

ごあいさつ

この度コスメトロジー研究振興財団として、23冊目の研究報告書を刊行いたしました。

設立以来25年に亘って、化粧品科学及び関連分野に貢献する研究テーマに対し助成活動を滞りなく継続できたことは、多くの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る次第でございます。

当財団の助成領域につきましては、医学、化学、薬学、生理学、心理学、文学、社会学など多岐に渡る分野の研究者のお力添えにより、コスメトロジーという分野が発展してきたといっても過言ではありません。助成させていただいた研究テーマは、新素材設計、ライフサイエンス、化粧品心理、文化論など多種多様であり、化粧品学の発展に有用な貢献ができたと考えております。また当財団の活動がその社会貢献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24～25年度に助成を受けられた方の中から31名の方の研究成果を掲載いたしました。

素材、物性に関する分野では、製剤化技術に関わる研究、天然物の新たな有用性に関するテーマが顕著であったと思われます。

生体作用、安全性に関する分野では、皮膚の構成成分に関する基礎的な研究が中心でしたが、昨今再生医療の要として注目されているiPS技術を用いた研究が目を引きました。

精神、文化に関する分野の研究につきましては、化粧品がもたらす心理的、脳科学的な影響に関する研究であり、大変興味深い内容であったと考えています。

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、化粧品学の発展のために、優れた研究に対して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27年7月

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

目 次

■ごあいさつ

■研究報告

I. 素材、物性に関する分野

- ・ 深海生物由来コラーゲンを活用した化粧品基材への応用研究 4
高知大学農学部 足立 亨 介
- ・ 金属イオン配位子修飾ヒアルロン酸の開発と組織浸透性に関する研究 8
東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター 伊藤 大 知
- ・ 皮膚組織再生を促進するリン酸カルシウム真球粒子の創製 14
国立研究開発法人産業技術総合研究所ナノ材料研究部門 大矢根 綾子、中村 真紀
- ・ 球状シリカマイクロ粒子とスメクタイト微結晶の複合技術開発 20
信州大学工学部物質工学科 岡田 友彦
- ・ 新規リン酸亜鉛白色顔料の粒子サイズ制御 26
京都府立大学大学院生命環境科学研究科 斧田 宏明
- ・ 紫外線カットマイクロカプセルの作製 30
横浜国立大学大学院工学研究院 金井 俊光
- ・ 加熱加水分解法を用いた紫外線吸収能を有するカルシウムヒドロキシアパタイト粒子の
新規調製法の開発とそのキャラクタリゼーション 34
大阪教育大学教育学部 神鳥 和彦
- ・ 両生類皮膚由来機能性生体分子の網羅的探索 41
国立研究開発法人産業技術総合研究所健康工学研究部門 茂里 康
- ・ 角度依存性のない構造発色性顔料の調製 48
名古屋大学大学院工学研究科 竹岡 敬和
- ・ 膜透過性ナノ集合体を封入した固体エマルションの開発 55
山口大学大学院理工学研究科 通阪 栄一
- ・ 神経細胞が分泌する酸化ストレスに対する保護因子の同定 61
同志社大学生命医科学研究科 野口 範子、斎藤 芳郎

II. 生体作用、安全性に関する分野

- ・ 白髪予防・治療剤の選別に有効な加齢性白髪を自然発症するモデル動物の開発 66
名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学 加藤 昌志
- ・ 皮膚細胞は独自に女性ホルモンを合成し、それが皮膚細胞の活動を制御している 71
東京大学大学院総合文化研究科 川戸 佳
- ・ 海洋性カロテノイドの酸化ストレス応答シグナル Nrf2-ARE シグナルを介した
HO-1 活性化による酸化ストレス軽減 78
国立沖縄工業高等専門学校生物資源工学科 平良 淳誠
- ・ 化粧品成分の安全性評価: CYP 誘導性と肝毒性の *in vitro* 評価系の構築 83
鳥取大学染色体工学研究センター染色体医療学研究部門 多田 政子
- ・ 炎症性皮膚疾患におけるアクアポリン9の機能解明 88
京都大学大学院医学研究科次世代免疫制御を目指す創薬医学融合拠点 竹馬 真理子

・ IL-33 デコイ受容体による皮膚炎症の制御	93
自治医科大学医学部生化学講座病態生化学部門 早川 盛 禎	
・ 小胞体における蛋白質の酸化的折畳み異常によるコラーゲン形成障害機構の解明	98
山形大学大学院医学系研究科生化学・分子生物学 藤井 順 逸	
・ iPS 細胞の造血幹細胞への分化能を応用した先天性皮膚疾患の治療	105
北海道大学病院皮膚科 藤田 靖 幸	
・ 新規な生体親和性化粧品素材ホスファチジルーパンテノールの抗炎症作用と分子機構の解明	111
北海道大学大学院水産科学研究院 細川 雅 史	
・ 新規経皮導入法による美白ペプチドを用いた高浸透化粧品の開発	117
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科細胞生理学 道上 宏 之	
・ 化粧品用無機ナノ材料の遺伝毒性作用の解明	123
大阪府立大学理学系研究科生物科学専攻分子細胞遺伝学分野 八木 孝 司	
・ サイトカインによる接触性皮膚炎誘導の制御に関する基盤研究	130
東京医科大学医学総合研究所免疫制御研究部門 善本 隆 之	
・ クラスリン集合因子 <i>CALM</i> 欠損マウスに見られる、毛や組織の色の薄さの解析 —細胞内物質輸送と体色との関連を探索—	134
奈良女子大学大学院人間文化研究科個体機能学講座 渡邊 利 雄	

Ⅲ. 精神、文化に関する分野

・ グローバル時代のハラールと化粧に対するモロッコの人々の意識と行動 —日常生活における宗教規範と美の実践—	140
松蔭大学観光メディア文化学部 川添 裕 子	
・ 嗅覚(芳香)刺激量を与える自律神経機能の経時的変化	148
慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科学教室 神崎 晶	
・ 心理・社会的発達と化粧行為の関連の検討 ——ライフ・ステージによる化粧意識の相違と老年期の化粧	155
立命館大学立命館グローバル・イノベーション研究機構 木戸 彩 恵	
・ 抗がん剤による皮膚障害とスキンケアに関する研究	162
京都薬科大学 臨床薬学教育研究センター 中村 暢 彦	
・ 統計的学習による「似合う」への計算論的アプローチの確立 —個人に似合う髪型の自動提示技術の開発を通して—	167
山梨大学大学院医学工学総合研究部 茅 暁 陽	
・ 19～20 世紀にわが国で使用された含鉛おしろいに関する研究	173
東京大学大学院新領域創成科学研究科環境システム学専攻 吉 永 淳	

■国際交流報告

・ 自己顔に対する意識に関する研究 —日韓における違い—	179
カリフォルニア矯正歯科 三軒茶屋 (元：北海道大学病院咬合系歯科矯正歯科) 日下部 豊 寿	

■記念講演

・ 第 25 回表彰・贈呈式記念講演 「〈香り〉はなぜ脳に効くのか ～認知症の予防・改善について～」	189
昭和大学医学部教授 塩田 清 二	

■コスメトロジー研究雑感	199
--------------------	-----

■付 録

事業報告書	217
平成 26 年度 研究助成を受けられた方々	219
役員一覧	221

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

深海生物由来コラーゲンを活用した化粧品基材への応用研究

高知大学農学部

足立 亨 介

A partial length cDNA of the Type I procollagen $\alpha 1$ helical was determined using cDNA from muscle of deep sea fish *Coryphaenoides yaquinae*. The helical region was composed of Gly-X-Y repeats; the conserved triplets within the same molecule in higher vertebrates. The number Ser residues in the helix were quite high compared to other vertebrates including fish.

The amino acid composition of purified Type I collagen from *Coryphaenoides acrolepis* shows also high contents of Ser residues among other fishes. These facts indicate that Ser is a key amino acid in Type I collagen in deep sea adaptation such as high pressure, low temperature and etc.

緒 言

コラーゲンは40年以上前から化粧品の配合材料として用いられているコスメ業界には非常になじみ深い成分である¹⁾。本分子は、3つのサブユニット遺伝子群がトリプルヘリックスを構成している。哺乳類、鳥類、爬虫類および両生類では2本の $\alpha 1$ 鎖と1本の $\alpha 2$ 鎖が $(\alpha 1)_2\alpha 2$ の形で存在しているが¹⁾、魚類ではこの3つが全て異なった鎖($\alpha 1\alpha 2\alpha 3$)である種が報告されている(図1)²⁾。

このI型コラーゲンの各サブユニットの両端には、N末端側には外側からシグナルペプチド、プロペプチドおよびテロペプチドが、同様にC末端側にはプロペプチドおよびテロペプチドが存在するが、シグナルペプチドおよびプロペプチドはコラーゲンが成熟する過程で切断されることが分かっている。またテロペプチドの間は各サブユニットにおいて[Gly-X-Y]トリプレット構造をとっており、3残基ごとにグリシンが338回繰り返す一次構造をとることが分かっている(図1)^{1,2)}。このアミノ酸XおよびYには、各々プロリンおよびヒドロキシプロリンが存在することが多く、これらはイミノ酸とも呼ばれ、コラーゲンの主要構成アミノ酸であることが知られている(図1)。イミノ酸はイミノ基とカルボキシル基を持ち、このうちヒドロキシプロリンのもつOH基がトリプルヘリックスを安定化させていると一般には考えられている^{1,2)}。このコラーゲン分子は1/4ずつずれた形で規則正しく会合し(1/4ずれ会合モデル)、コラーゲン繊維を作り上げている。コラーゲン繊維はさらに重合することによりハイドロゲルを形成すること

が知られる¹⁾。コラーゲンが化粧品の材料として用いられる理由の一つとして、その「保水効果」が挙げられるが、これはこの水分子を繊維中に封じ込めたハイドロゲルの効果を利用したものである¹⁾。

一方で我々は深海に生息する魚類であるシンカイヨロイダラ *Coryphaenoides yaquinae* (生息水深約6000m) およびイバラヒゲ *Coryphaenoides acrolepis* (生息水深約1000m) のコラーゲンの特質を生化学的に研究している。本種は深海中で10–60MPaにも及ぶ圧力、および通年1–2℃程度の低水温に適応して生きているが、これらの環境を直接的に受けとめているのは表皮・真皮であり、その主要な構成成分はコラーゲンである。このため深海動物のコラーゲンはその環境に適応した構造・機能・物性を分子内で進化させていると考えられる。しかしながら、これまでにその構造と機能は解析された例がなく、詳細は未解明のままである。

上述のようにコラーゲンを化粧品基材に用いる場合はその「保水効果」が鍵になるが、これまでに用いられている素材としては哺乳類由来のもの、ティラピアなど浅海性の魚類由来のものが中心である¹⁾。しかしながらこれらの素材はコラーゲンの分子としての性質が似通っており劇的な効果の違いを見ていない。

そこで本研究ではその生息環境から従来のコラーゲンとは全く異なる物性を有する可能性のある深海魚のI型コラーゲンのまずは構造に着目し、そのcDNA配列からアミノ酸配列を類推することでその特性を検討する。

試料および方法

シンカイヨロイダラI型コラーゲン $\alpha 1$ サブユニットのcDNA断片配列の決定

試料となるシンカイヨロイダラ(学名:*Coryphaenoides yaquinae*、英名:*Rattail fish*)は、採取後、 -80°C にて凍結保存した筋肉を用いた。TRIzol (Life Technologies) およびNucleoSpin RNA (Takara) にて全RNAの調製を行い、Rever Tra Ace (TOYOBO) にて逆転写した産物をEx



The application of collagen from deep sea animals to cosmetic vehicle

Kohsuke Adachi
Kochi University

TaqにてPCRで増幅した。PCRに用いたプライマーは5種類の硬骨魚種（タイセイヨウダラ、キンギョ、ゼブラフィッシュ、ティラピア、ヒラメ）、のI型コラーゲンの各塩基配列をマルチプルアラインメントし、保存性が高い部分をもとに、得られる断片が50 - 100bpオーラップさせるように設計した。増幅したPCR断片をMighty TA-cloning Kit (TaKaRa) を用いてライゲーションし、サブクローニングし得られたプラスミドを、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing KitおよびABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) に供し、配列解析を行った。

イバラヒゲI型コラーゲンの精製

試料となるイバラヒゲ（学名：*Coryphaenoides acrolepis*、英名：*Pacific grenadier*）は採取後、 -50°C で保管したものをを用いた。解凍後細切した皮から、コラーゲン以外のタンパク質および脂質を除去するために10倍量の0.1M NaOHを添加し、並列スターラー SRS360YA（アドバンテック東洋株式会社）を用いて1日間攪拌後、日立冷却遠心機 himac CR 21E（株式会社日立製作所）を用いて $10,000\times g$ で10分間遠心分離するアルカリ処理を2回繰り返した。ここで沈殿に10倍量の純水を添加し、30分間攪拌することで沈殿を洗浄後、 $10,000\times g$ で10分間遠心分離した。この純粋による洗浄を上清のpHが中性付近になるまで繰り返した。洗浄後の沈殿に10倍量の0.5M酢酸を添加し、3日間攪拌後 $10,000\times g$ で10分間遠心分離し、上清を布で濾過した。この際得られた上清に終濃度0.9MとなるようNaClを添加し、完璧に溶けるまで攪拌後、 $10,000\times g$ で30分間遠心分離を行った。その後デカントにより上清を除き、沈殿を10mlの0.5M酢酸に完璧に溶解した。これを透析用セルロースチューブUC30-32-100（三光純薬株式会社）に密封し、0.1M酢酸中で2日間透析（2回交換）後、

pHが中性付近になるまで純水中で透析し、3回ほど交換した。透析後、凍結乾燥機FD-1（東京理科器械株式会社）を用いて凍結乾燥したものを酸可溶性コラーゲン（Acid Soluble Collagen：ASC）とした。全ての操作は 5°C で行った。

精製コラーゲンのアミノ酸分析

凍結乾燥したコラーゲン試料1mgに蒸留水を2ml、濃塩酸を2ml添加した後、ソノクリーナー 200D（株式会社カイジョー）中でソニケーションしながら、循環アスピレーター WJ-20（柴田科学株式会社）を用いて10分間吸引・脱気した。脱気後、ミニバキュームチューブをドライサーモユニットDTU-1C（タイテック株式会社）中で 110°C 、24時間インキュベートすることで試料を加水分解した。放冷した後、試料をナス型フラスコに移し、ロータリーエバポレーター（東京理化学株式会社）を用いて試料を完全に乾燥させた。そこに、0.02M HClを3ml添加し、完全に溶解するまで攪拌した後、この溶液をマイクロシリンジで1mlとり、孔径 $0.02\mu\text{m}$ のディスポーザブルフィルターユニットDISMIC-13cp（アドバンテック東洋濾紙株式会社）を用いてアミノ酸分析用ガラス瓶に濾過し、これをアミノ酸分析用試料としてアミノ酸分析に供した。

結 果

シンカイヨロイダラI型コラーゲン $\alpha 1$ サブユニットcDNA断片配列とそれより類推されるアミノ酸組成

得られた4つのPCRcDNA断片を連結することで塩基配列1935bpを決定し、582残基のアミノ酸配列を推定した。同断片配列は、N末端側のシグナルペプチド領域、テロペプチド領域および三重らせん構造の一部を具体的には[Gly-X-Y]のトリプレット構造を140組含むことが判明した（図1）。cDNA配列から予想される同遺伝子のアミ

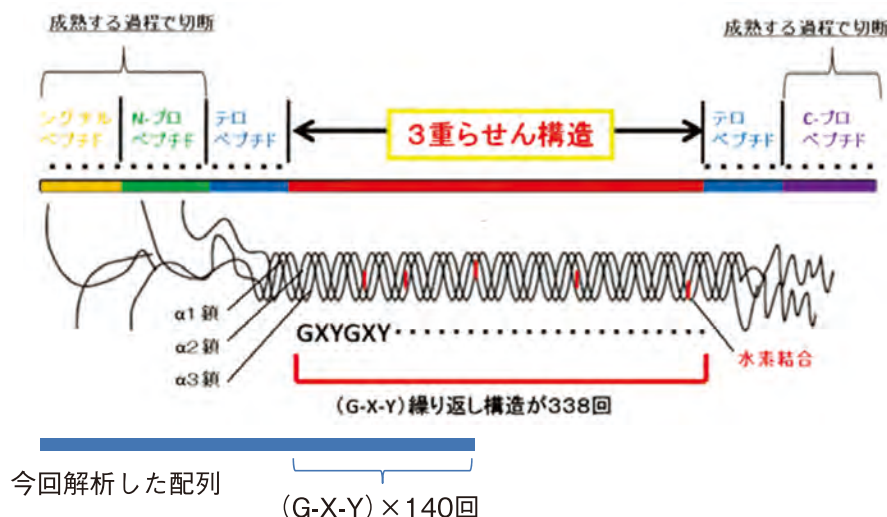


図1 魚類I型コラーゲン構造の模式図

3つの異なるサブユニットが3重らせんを構成している。シグナルペプチド、N-プロペプチドおよびC-プロペプチドは、コラーゲンが成熟する過程で切断される領域。Gly-X-YトリプレットのXおよびYの位置には各々ProおよびHypが多く見られる。

ノ酸組成を同じく配列の明らかになっている他種生物の同領域と比較し、表1に示した。結果、同断片配列においても他種生物と同じく、Glyがおおよそ1/3の割合を占める結果が得られた。またProの含有量が他生物よりも低く、Serの含有量が多い傾向があった。特にSerの多さは顕著であり、同じ魚類であるゼブラフィッシュ同遺伝子との比較では約4.6倍、ヒト同遺伝子の約2.8倍含まれていることが分かった。

イバラヒゲ皮由来のI型コラーゲンの精製とそのアミノ酸組成

イバラヒゲの皮4.8g（湿重量）から、上記の手法にて59.5mgの酸可溶性コラーゲン（ASC）を精製することが出来た。表2に各試料から精製したASCのアミノ酸組成を示した。イバラヒゲI型コラーゲンを構成するアミノ酸はGlyが全体の1/3を占め、Proは100アミノ酸残基あたり7.5、Hypは4.8残基、Serは7.3残基含まれていることが明らかになった。これまでに精製タンパク質アミノ酸組成の報告がある他魚種³⁻⁵⁾と比べても深海魚であるイバラヒゲでSerの含量が最も多く、Pro、Hyp量は最も少ない

ことが明らかになった。

考 察

本研究ではシンカイヨロイダラのI型コラーゲンの $\alpha 1$ サブユニットの断片配列を決定し、それから得られるアミノ酸配列から同遺伝子中にSer残基が多く含まれていることを明らかにした。その逆にProは表1で比較した生物中最も少ない値を示した（15.5残基）。緒言で述べたように本分子にはProの水酸化されたHypが含まれると予想されるが、これは翻訳後修飾であるため、cDNA配列のコドンからアミノ酸を推測する方法ではHypの含量は分からない。それ故ここでのProの量は実際タンパク質におけるProとHypの合計と考えるべきである。尚、著者らはI型コラーゲンを構成する $\alpha 2$ および3鎖においても同様の解析を行っているが、結果が $\alpha 1$ 鎖に追従するものであることを付記しておく。

一方で我々はシンカイヨロイダラよりやや浅い水深に生息するイバラヒゲよりI型コラーゲンを精製し、そのアミノ酸組成を検討した。その結果、実際のタンパク質を対象としても深海魚I型コラーゲンは高いSer含量を持つこと

表1 シンカイヨロイダラI型コラーゲン $\alpha 1$ サブユニットcDNA断片配列より類推されるアミノ酸組成

	シンカイ ヨロイダラ	ゼブラ フィッシュ	アフリカ ツメガエル	ニワトリ	ラット	ヒト
Ala(A)	9.5	14	10	12.4	11.4	11.2
Arg(R)	5.7	5.7	5	5.2	5.2	5.2
Asn(N)	2.9	1.9	2.1	1.4	1.7	1.4
Asp(D)	1.9	1.9	2.4	2.1	2.4	2.4
Cys (C)	0	0	0	0	0	0
Gln (Q)	1.9	1.9	3.1	3.1	2.6	2.6
Glu (E)	5.5	5.5	5	4.8	5	5
Gly (G)	35.5	34.3	34.1	33.3	33.6	33.8
His (H)	0.5	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Ile (I)	0.7	0.5	0.2	0.5	0.2	0.2
Leu (L)	1.9	0.7	1.4	1.9	1.9	1.9
Lys (K)	3.8	3.8	4.3	4	4	4
Met (M)	1.2	1.7	1.2	1.2	1.2	1.2
Phe (F)	1.7	1.7	1.4	1.4	1.4	1.4
Pro (P)	15.5	20.7	20.3	22.6	22.4	23.1
Ser (S)	8.8	1.9	6.7	3.3	3.6	3.1
Thr (T)	1.4	2.1	1.2	1.7	1.9	1.7
Trp (W)	0	0	0	0	0	0
Tyr (Y)	0	0	0	0	0	0
Val (V)	1.7	1.4	1.2	0.7	1.2	1.4
Pyl (O)	0	0	0	0	0	0
Sec (U)	0	0	0	0	0	0
Total	100	100	100	100	100	100

表2 イバラヒゲ精製I型コラーゲンのアミノ組成

イバラヒゲ	
Ala(A)	9.8
Arg(R)	5.2
Asn(N)	-
Asp(D)	5.9
Cys (C)	0.2
Gln (Q)	-
Glu (E)	8.7
Gly (G)	32
His (H)	1.1
Ile (I)	1.5
Leu (L)	3
Lys (K)	3
Met (M)	1.4
Phe (F)	1.6
Pro (P)	7.5
Ser (S)	7.7
Thr (T)	2.8
Trp (W)	-
Tyr (Y)	0.9
Val (V)	2.8
Hyp	4.8
Hylys	0.1
	100

が明らかになった。また同実験ではcDNAの解析と異なり、Hypの量も実際に測定することが出来る。その結果、ProおよびHyp含量はともに他魚種に比して低いという結果が得られた(表3)。これもシンカイヨロイダラの遺伝子配列から予想される結果に一致する。

Proはそれが水酸化されたHypとともにイミノ酸とも呼ばれる。これらイミノ酸は側鎖がアミノ基と結合して環状になっている故、立体配置座に大きな制限を与える。この制限によってコラーゲンの三重らせんは安定化するとはいえるし、柔軟性を失うとも考えることが出来る。またHyp中の水酸基は(議論は分かれるようだが)その作りだす水素結合によって三重らせんを安定化させると考えられている。今回の解析によって深海魚類であるシンカイヨロイダラ・イバラヒゲI型コラーゲンは陸上生物や他魚種に比してより少量のPro、Hypを持ち、より多くのSer残基を有することが、明らかになった。上記の事実と照らし合わせて考えると、イミノ酸の減少によって構成するアミノ酸の立体配置座の制限が減る一方で、Serを増やすことで水素結合による三重らせんの安定化を保持していると考えられる。

上記のことは深海魚I型コラーゲン分子の低水温・高水圧の深海環境への適応の結果と考えられる。低水温のみに対する魚類タンパク質の適応として酵素の活性中心付近での構造を少ないエネルギーで動かせるように柔軟化させているとの報告がある。また、高い水圧下への適応として分子が“柔軟化”するというのは一つの戦略であると考えられるが、深海魚ミオシンのロッド構造などではその構造をコンパクトにして固くしていると考えられる例もある。

これらコラーゲン分子の構造の適応がいかに本分子の構造に影響しているのかを検討し、化粧品基材への応用をはかることが今後の課題である。

総 括

本研究において深海魚のI型コラーゲンは陸上動物や浅

表3 イバラヒゲ精製I型コラーゲンのPro、Hyp、Ser含量の他魚種との比較

	Pro	Hyp	Ser
イバラヒゲ	8.4	4.9	7.3
マイワシ	11.1	8.6	4.1
マダイ	10.9	8.7	3.9
スズキ	10.8	8.5	4.2
ニジマス	11.2	7.2	2.3
ソウギョ	12.1	6.5	3.9
キンセンフエダイ	11.6	7.7	3.6
トラフグ	10.3	6.7	4.8

海性の魚類と比べて、ProおよびHypのイミノ酸含量を減らし、Serを増やす傾向にあることが明らかになった。今回、検討を行ったコラーゲンが、特有の物性や保湿効果を示すことが分かれば化粧品基材としての応用も大いに考えることが出来る。しかしながら、深海魚のコラーゲンの研究でネックになるのが、その入手できる量である。バイオマスとしての深海生物は莫大なものがあるが、6000mもの深海となるといまだ手軽なアクセス方法は確立されておらず、試料としてのコラーゲンをグラム単位で調製することは、ティラピアや畜産物のコラーゲンに比べて大きな壁になる。コラーゲンは構造が特殊なことや、翻訳後修飾が必要なこともあって組換えタンパク質の研究は他の分子に比べ立ち遅れている現状があるが、Pinkas 2011らによって大腸菌で作出に成功した例もある。また近年は人工遺伝子は以前よりも安価で作出できるようになってきた。今回得た内容を基盤にして深海から得たコラーゲンの構造をミミックした分子を組換えタンパク質にて作り出し、化粧品基材としての可能性を探ることも考えてみたい。

(引用文献)

- 1) コラーゲンの製造と応用展開II: 谷原正夫監修, シーエムシー出版
- 2) 海洋性コラーゲンを探る: 木村茂, 五曜書房
- 3) Nagai T, Izumi M and Ishii M.; Fish scale collagen. Preparation and partial characterization. International Journal of Food Science and Technology, 39, 239-244, 2004.
- 4) Shahiri Tabarestani H, Maghsoudlou Y, Motamedzadegan A, Sadeghi Mahoonak AR, Rostamzad H.; Study on some properties of acid-soluble collagens isolated from fish skin and bones of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). International Food Research Journal, 19, 251-257, 2012.
- 5) Zhang Y, Liu W, Li G, Shi B, Miao Y, Wu X.; Isolation and partial characterization of pepsin-soluble collagen from the skin of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Food Chemistry, 103, 906-912, 2007.
- 6) Fields PA.; Review: Protein function at thermal extremes: Balancing stability and flexibility. Comp. Biochem. Physiol. A 129, 417-431, 2001.
- 7) Morita T.; Comparative sequence analysis of myosin heavy chain proteins from congeneric shallow- and deep-living rattail fish (genus *Coryphaenoides*). The Journal of Experimental Biology, 211, 1362-1367, 2008.
- 8) Pinkas DM, Ding S, Raines RT, Barron AE.; Tunable, post-translational hydroxylation of collagen Domains in *Escherichia coli*. ACS Chem Biol. 6, 320-324, 2011.

金属イオン配位子修飾ヒアルロン酸の開発と組織浸透性に関する研究

東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター

伊藤 大知

Peritoneal metastasis is frequently found at a late stage of stomach and ovarian cancer. Recently intraperitoneal administration of anticancer drugs such as paclitaxel and cisplatin (CDDP) is expected because relatively high concentration of the drugs can be administered to disseminated cancer cells. i.p. of paclitaxel is now clinically used as an advanced medical treatment in Japan. However, the clearance of CDDP is much faster than that of paclitaxel, thus new approach to deliver CDDP to peritoneal nodules are expected. It is well known that high concentration of hyaluronan exists in peritoneum, thus hyaluronan (HA)-based drug carrier for CDDP is potentially biocompatible in peritoneum. In addition, the affinity between HA and CD44, which is highly expressed in cancer cells, can be utilized to delivery CDDP to cancer cells selectively. Therefore, we have developed nanogel composed of iminodiacetic acid-modified HA (HA-IDA) and CDDP. In the present research, we investigate the targeting effect of the nanogel in vitro using human disseminated stomach cancer cell line, MKN45P, and human mesothelium cell line, Met-5A. Moreover, we made stomach cancer cell spheroids of MKN74 using PDMS-bottom plate, then clarified the efficient penetration of the nanogel compared to HA-IDA without CDDP. HA has excellent water-retention ability, so is utilized widely in cosmetic industry nowadays. The knowledge from the present research will contribute not only to medical applications but also cosmetic applications.

1. 緒 言

ヒアルロン酸 (HA) は、N-アセチルグルコサミンとグルコン酸が交互に結合した多糖類であり、腹腔液に高濃度で含まれ消化器等の腹腔臓器同士の摩擦を低減する潤滑油的な働きをしていることが知られている。

腹腔内で起こる様々な疾患の中でも、がんの腹膜播種は生命に直結する予後の非常に悪い転移がんである (図1)。原発胃がんや卵巣がんが臓器漿膜を超えて浸潤し、腹腔内に飛散したがん細胞は腹腔中を拡散し、腹腔内の様々な場所に転移巣である播種巣を形成する。

期待される治療法の一つが抗がん剤を播種巣近傍に高濃度の抗がん剤を投与可能な腹腔投与であり、タキソールの腹腔投与は先進医療として認められている。一方で、セカンドラインとして期待されるシスプラチン (CDDP) は、腹腔からのクリアランスが速く、インフュージョンポンプを使った持続投与が試みられているが、効果は十分とは言えず、新たな投与方法が期待されている。

このため我々は、腹腔液に含まれるHAの生体適合性に着目し、HAをドラッグキャリアとしたCDDP送達システムの研究を行ってきた。とりわけCDDPを二座配位するイミノ二酢酸を修飾したヒアルロン酸HA-IDAの合成を行い、HA-IDAとCDDPから成る新たなナノゲル製剤の開

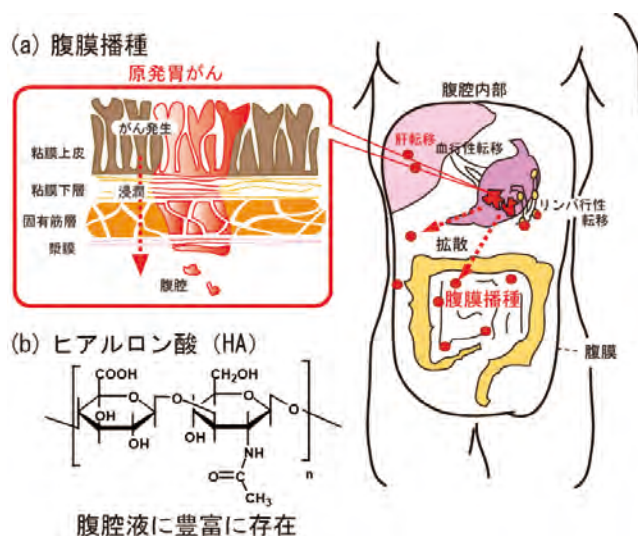


図1 腹膜播種(a)とヒアルロン酸(b)

発に成功した (図2)。難治固形がんでは、DDS製剤の組織浸透性も重要である。そこで本研究では、HA-IDA / CDDPナノゲルあるいはHA-IDAの抗がん特性や播種巣浸透性の検討を行った。

2. 実 験

2.1. HA-IDA及びHA-MAの合成

HA 0.5g (Mw=100kDa) を100mLの純水に溶解し、EDCI 0.78g (DMSO 3mL / 純水 3mL 混合液に溶解) を添加し、4時間攪拌を行った。さらにイミノ二酢酸 (IDA) 1.2gとNaOH (1N) 10mLをそれぞれ添加し、一晩攪拌した。さらに透析 (Spectra/Por MWCO=6000 ~ 8000Da) 膜を用いて純水で透析し、凍結乾燥を行った。重水中にてNMR測定を行い、修飾率を決定した。



Development of new hyaluronan derivatives modified with metal-ion ligands and their tissue penetration

Taichi Ito

Center for Disease Biology and Integrative Medicine
School of Medicine, The University of Tokyo

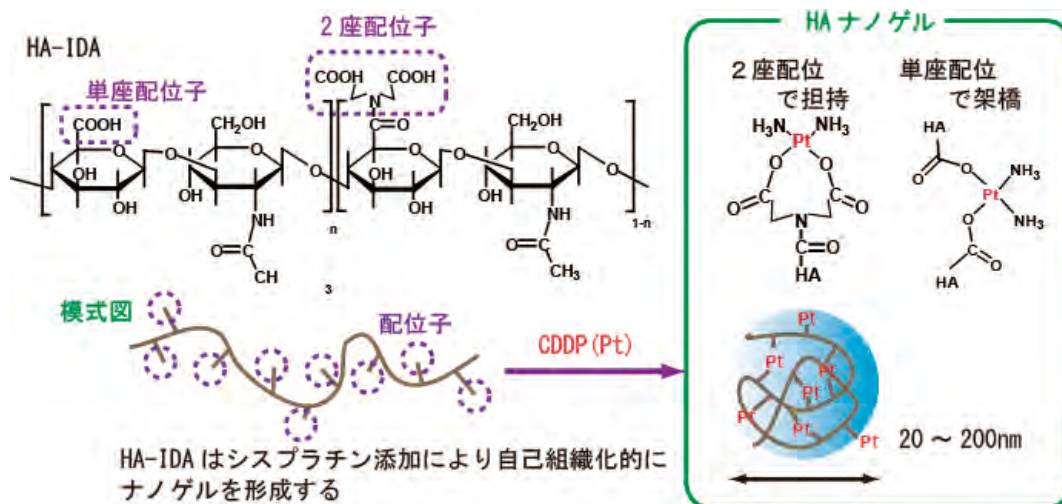


図2 HA-IDA/CDDP ナノゲルのコンセプト

IDAの代わりにマロン酸 (MA) を用いて、同様のスキームでマロン酸修飾ヒアルロン酸 HA-MA を合成した。IDA が CDDP と錯体配位すると 8 員環を形成する一方で、MA は 6 員環を形成する。このため MA の方が IDA よりもキレート形成定数が高いことが予想される。

また HA の代わりにカルボキシメチルセルロース (CMC) を使い、CMC-IDA を作製した。CMC は HA と非常に似た物性を示す一方で、ヒト細胞上の膜レセプターとは相互作用しない bio-inert な物質であることが知られている。このため物性は類似しつつ、生物学的が異なる HA の対照物質として用いられる。

引き続き、HA-IDA (または HA, CMC, CMC-IDA) 0.20 g を 15 mL 純水に溶解し、EtOH を HA が凝集しないように微量ずつ滴下した。さらに 2-chloro-1-methylpyridinium iodide 66 mg を添加した後、Triethylamine 70 μ L 滴下し、FTSC 4.0 mg を添加して、110 $^{\circ}$ C で 24 時間還流した。最後に、純水 / NaCl 水溶液で透析の後に、凍結乾燥を行って、蛍光測定により修飾率を決定した。

2.2. ナノゲル調製

HA-IDA 5 mg/mL 溶液 (母液 A) と CDDP 15 mg/mL (母液 B) 溶液をマイクロチューブ内で混合し、ヒートブロック 95 $^{\circ}$ C で加熱した。これを 20 分間氷上で冷却し、純水で透析した後凍結乾燥する事によりナノゲルを作製した。原子吸光によって CDDP 含有量を決定し、ナノゲル PBS 溶液の粒子径を DLS (動的光散乱) によって測定した。

2.3. ナノゲルのがん細胞標的性の検証

胃がん腹膜播種細胞株である MKN45P は、共同研究者の東京大学附属病院腫瘍外科・北山准教授によって作製されたものを用いた。MKN45 をヌードマウスに腹腔投与し、回収された腹水から培養、再投与を繰り返すことによって

樹立されたもので、高度な転移性を持つ細胞株である。また、腹腔の腹膜・臓器漿膜を覆っている中皮細胞の株化細胞である Met-5A (ATCC; CRL-9444) を用いた。

まず MKN45P に対して、HA-IDA 及び CMC-IDA を投与し、その取り込みを共焦点顕微鏡によって観察した。さらに HA-IDA/CDDP ナノゲルを調製し、同様に共焦点顕微鏡によって観察した。さらに HA-IDA/CDDP ナノゲル、HA-MA/CDDP ナノゲル、HA/CDDP ナノゲル、CMC-IDA/CDDP ナノゲルを作製し、0.1 mg/mL の濃度で MKN45P に添加 4 時間後、FACS 測定によって取り込み量を比較した。

さらに MKN45P または Met-5A を 24 穴プレートで培養し、ナノゲルを投与後、1 日後に MTT assay によって殺がん細胞効果を検証した。

2.4. スフィロイド培養とナノゲルの浸透実験

共同研究者である東京大学生産技術研究所・酒井教授の指導の下、ポリジメチルシロキサン (PDMS) ハニカムマイクロウエルシートを既報に従い、ソフトリソグラフィー法によって作製した¹⁾。良く洗浄したシリコンウエハ上にフォトレジスト (SU-8; MicroChem, Newton, MA) をスピニングにより塗布し、フォトマスクを用いて露光後、現像液で処理し、CF₃⁺ イオンを利用した反応性イオンエッチング (装置: SAMCO, Model RIE-10NR) を行った後に剥離して、モールドを作製した。PDMS と触媒 (Silpot 184, Dow Corning, Tokyo, Japan) を 9:1 で混合してモールドに流し込み、75 $^{\circ}$ C で 2 時間加熱後に剥離して、酸素プラズマで 10 秒間処理後、親水化コーティングのために MPC ポリマー (Lipidure-CR1701, Nichiyu) のエタノール溶液に浸漬して、PDMS ハニカムシートを得た。ハニカムシートを、24 穴プレートと同様のフレームの底にセットし、酸素透過性 24 穴プレートを作製した (図 3)。

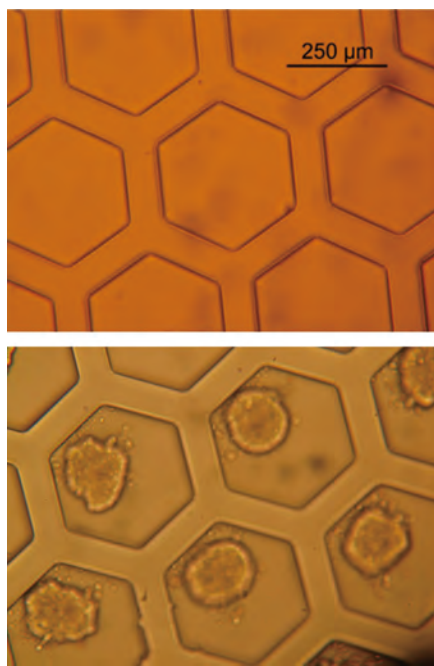


図3 作製したPDMS ハニカム培養プレート(上)と胃がん細胞株：MKN74 を用いて作製したスフィロイド

得られた培養プレートは底面素材にPDMSを用いているために、通常のポリスチレンディッシュの80倍の酸素を供給することが可能で、生理活性が高く、細胞密度が高いスフィロイドを作製することが可能である。

本研究ではPDMSハニカム培養プレートを用いて、胃がん細胞株であるMKN74を 5×10^{-6} cells/cm²で播種し、5日間培養することによって、直径200μm程度のスフィロイドを得た。さらに蛍光標識を行ったHA-IDA/CDDP ナノゲル、及びCMC-IDA/CDDP ナノゲルを0.1mg/mLの濃度で添加し、10時間後に共焦点顕微鏡観察によってナノゲルの浸透速度を評価した。

3. 結果

3.1. ナノゲルのキャラクタリゼーション

HA-IDAのIDA部位のメチレン基、HAのアセチル基のプロトン積分値の比から、修飾率を決定した(図4左)。IDA修飾率は40%程度まで向上可能であり、本研究ではHA-IDA (IDA修飾率35%)とHA-MA (MA修飾率36%)を用いた。

HA-IDA、HA-MA、及び対照物質としての未修飾のHAをCDDPと混合し、加熱してナノゲルを得た。未修飾HAもグルクロン酸のカルボキシル基とキレートすることによってナノゲル化する。DLS測定によって、PBS中ではHAが70μm程度に対して、ナノゲル化することによって10～20μmまで粒子径が変化した。またキレート配位子の種類によって粒子径が異なることが示され、ナノゲルサイズがHA-MA > HA-IDA > HAとなった。CDDPの水への溶解度はそれほど大きくないため、錯体形成定数が高いMAのCDDP配位数が一番多く、より疎水化して最も小さいサイズを取ったものと考えられる。

3.2. ナノゲルのがん細胞標的性

CD44はHAの6糖分を認識すると言われている。このためHAのCD44結合能は、化学修飾によって即座に失われるものではないが、HA主鎖への化学修飾率が増加するに従って、親和性は低下していくことが知られている。さらにHAを介したCD44のラフト化促進、あるいは低分子HAや可溶性CD44との競合によるラフト構造の消滅が、細胞の活性化や静止期への移行と、密接に関連していると言われている。また細胞種により活性化と静止化は刺激に対して逆転するケースも報告されている。このためHA-IDAやナノゲルが確かにがん細胞に取り込まれることを

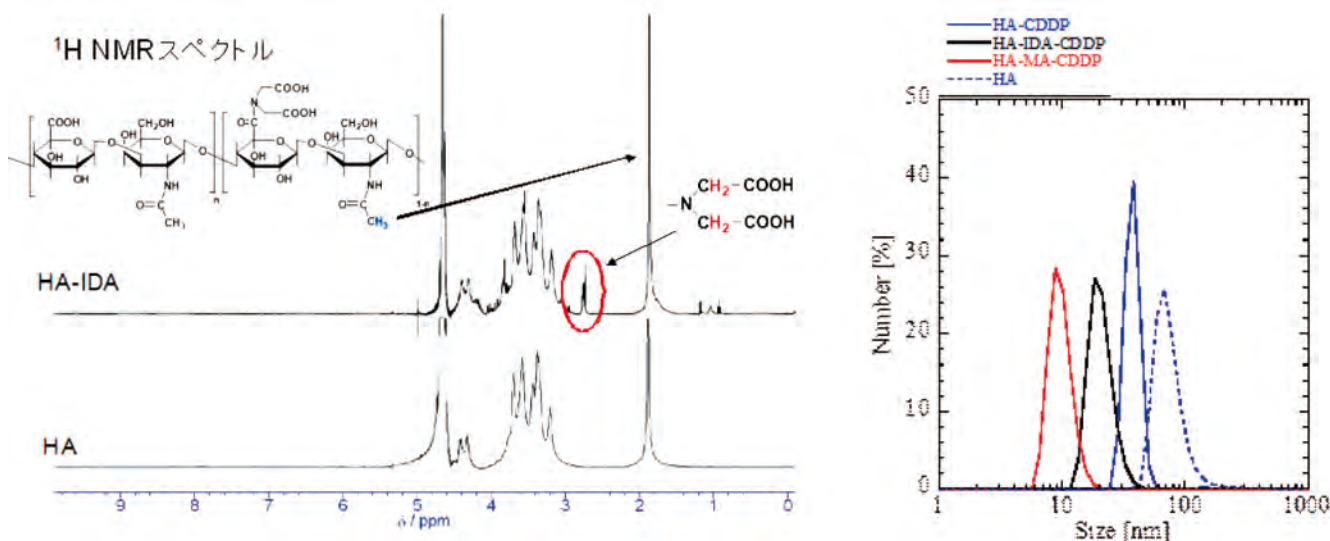


図4 HA-IDAの¹H NMR (左図)とCDDPと混合・加熱・透析を行って作製した各ナノゲルの動的光散乱により測定した粒子径(右図)

示すことが重要である。

HA-IDA と CMC-IDA の取り込み共焦点顕微鏡写真を図 5 に示す。CMC-IDA と比較して、HA-IDA が活発に播種細胞株に取り込まれていることが観察される。さらに HA-IDA/CDDP ナノゲルの取り込み過程を共焦点顕微鏡で観察した結果を図 6 に示す。CDDP と錯体配位しナノゲル化しても、高いエンドサイトーシス効率を示した。すなわち、本研究においては HA に IDA 修飾を施しても、さらに

CDDP と錯形成をさせて複合化させても、効率的にエンドサイトーシスされることを示した。

さらに FACS によって各種ナノゲルの取り込み量を図 7 に示す。PBS 中 4 時間後の時点で各ナノゲルは CDDP を十分に担持している (data not shown)。まず CD44 発現量が高かった播種細胞株 MKN45P で取り込み量が多い一方で、中皮細胞株 Met-5A では取り込み量が少ない。また CMC-IDA/CDDP ナノゲルの取り込み量が一番少ない。

一方で興味深いことに、リガンドポリマーとして HA を用いた時より、化学修飾を施した HA-MA、HA-IDA を用いたナノゲルの取り込み効率が高くなった。この点については、ナノゲルの構造とエンドサイトーシスの機構の関係をより詳細に調べていく必要がある。

以上の結果を踏まえ、MKN45P と Met-5A に対してナノゲルを添加し、MTT assay を行った結果を図 8 に示す。CMC-IDA/CDDP ナノゲルは若干毒性が低下するものの、CDDP とほぼ同様の用量作用曲線を描く。これに対して HA-IDA/CDDP ナノゲルと HA-MA/CDDP ナノゲルは、播種細胞に対しては遊離 CDDP と同程度かそれ以上の殺細胞効果を発現するのに対し、中皮細胞に対しては非常に低い毒性を示し、がん細胞選択性を発現して著しく副作用を低減できる可能性が示唆された。

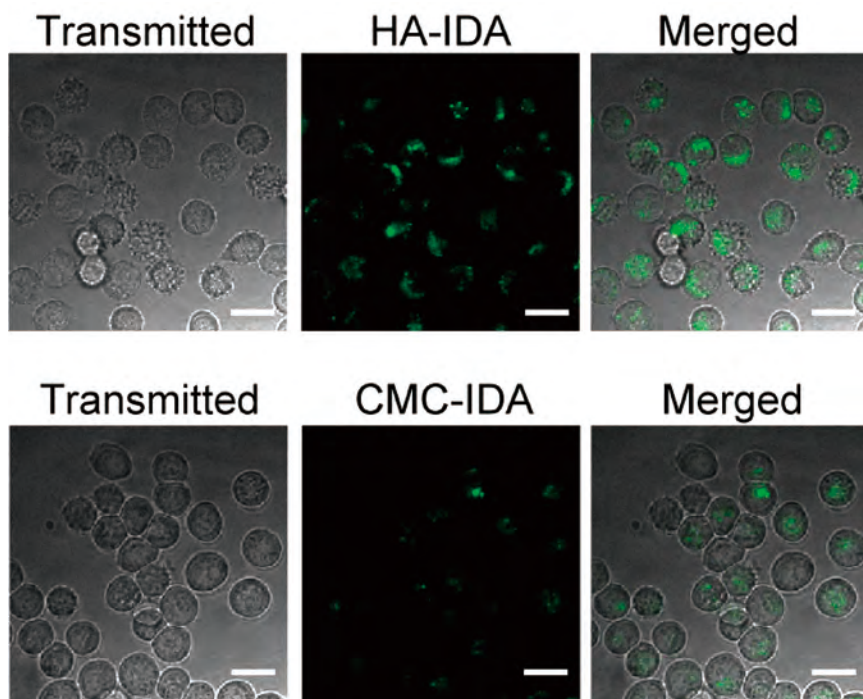


図 5 HA-IDA 及び CMC-IDA の MKN45P 取り込み効率

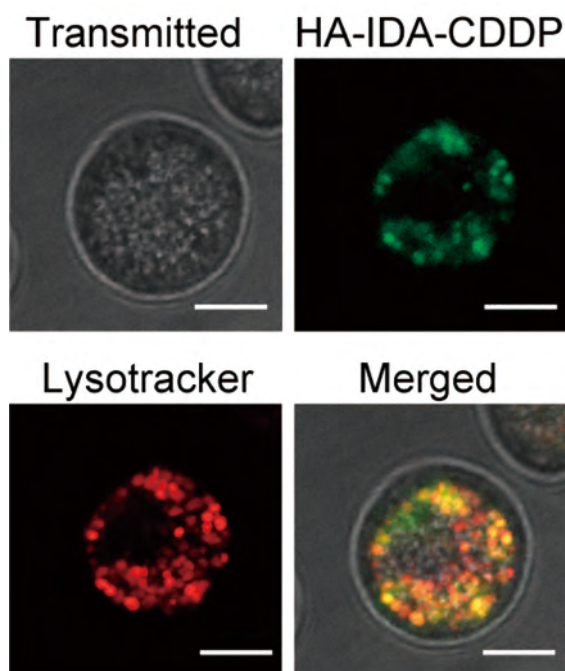


図 6 ナノゲルの MKN45P 取り込み過程の共焦点顕微鏡観察

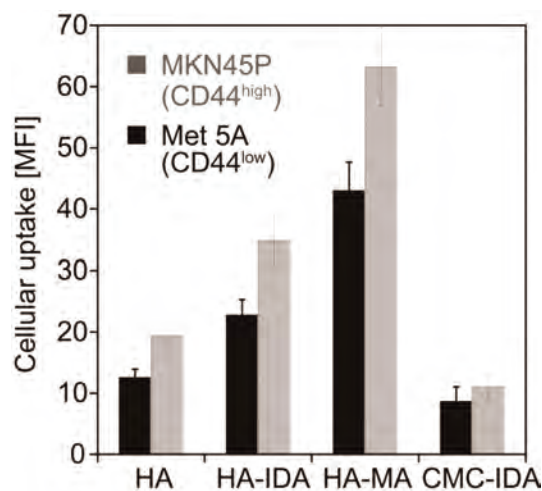


図 7 各ナノゲルの MKN45P 取り込み量の比較

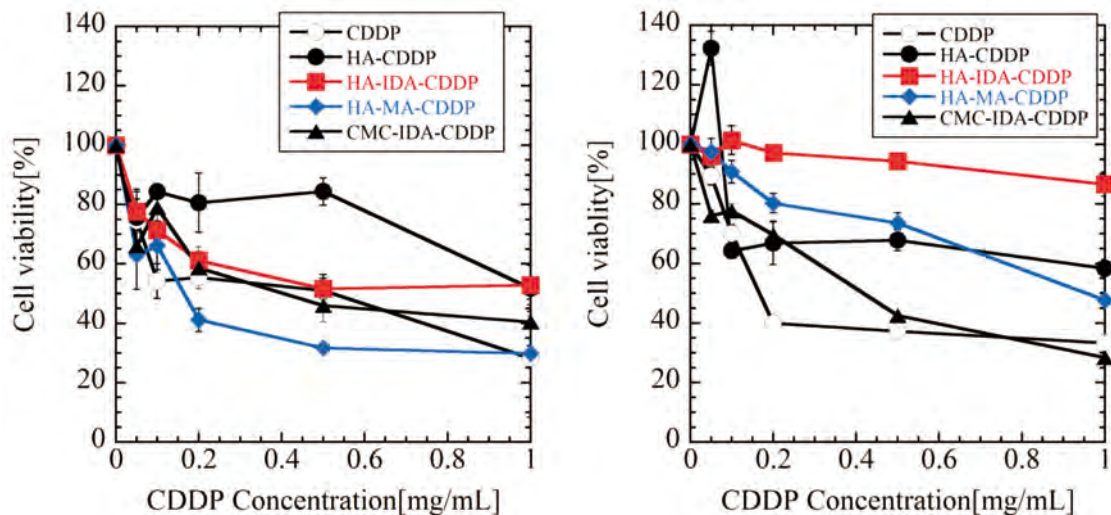
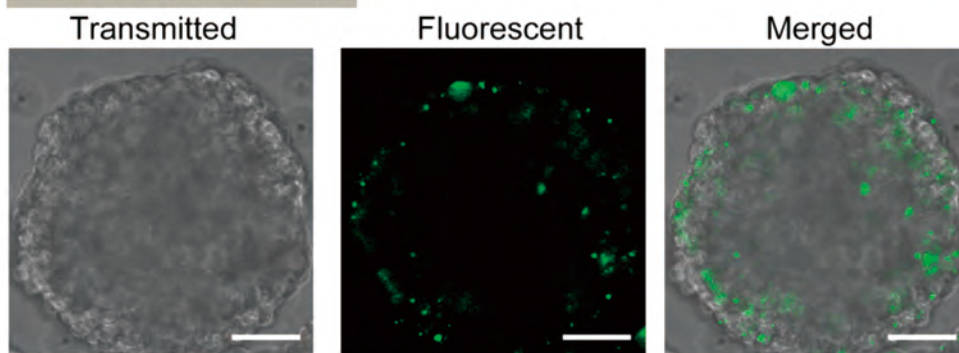


図8 各ナノゲルの腹膜播種細胞株 MKN45P (左)と中皮細胞株 Met-5A (右)への MTT assay の結果

HA-IDA(Polymer)



HA-IDA-CDDP(Nanogel)

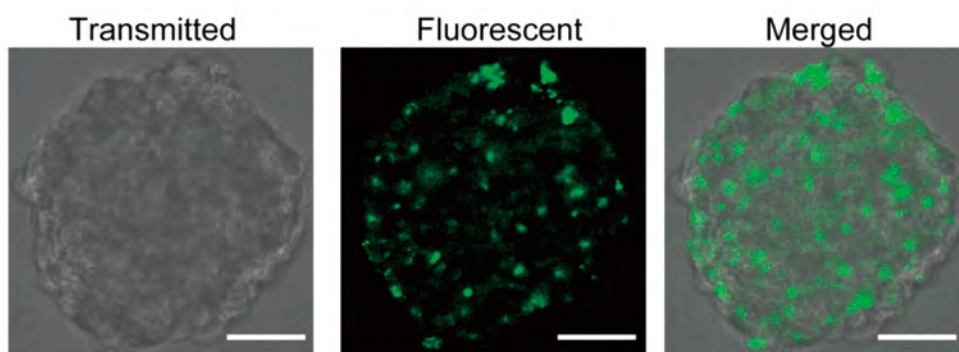


図9 MKN74 スフィロイド浸透性：HA-IDA (上)及び HA-IDA/CDDP ナノゲル(下)

3. 3. 胃がん細胞スフィロイドへのナノゲル浸透性

例え *in vitro* で高い効果を示しても、最終的に *in vivo* で高い効果を示さなければ意義ある研究とは言えない。腹膜播種に対する抗がん剤の腹腔投与で期待することは、腹腔から播種巣への抗がん剤の直接的な浸透による送達である。全身循環に移行してから血流を介して播種巣に抗がん剤が送達されるならば、静脈投与と同等の効果しか得られない。このために、外部境界から播種巣内部へのナノゲル浸透速

度を制御することは決定的に重要である。本研究では、プレート培養を用いた通常の *in vitro* 実験と動物モデルを用いた *in vivo* 実験をブリッジするものとして、スフィロイドを用いたナノゲルの浸透性評価を試みた。

実験結果を図9に示す。まずHA-IDAのみをスフィロイド外部から添加した所、10時間後でもスフィロイド内部までポリマーが拡散していない。一方で、CDDPとキレートさせHA-IDA/CDDPナノゲル化することによってスフ

イロイド中心部までナノゲルが拡散するとともに、プレート実験の結果とも良く一致してエンドサイトーシス効率も非常に高いことが観察された。これはHA-IDAのCDDPの配位の有無により、サイズや脂溶性が劇的に変化するためであると考えられる。

4. 考 察

ヒアルロン酸に二座配位子であるイミノ二酢酸 (IDA) やマロン酸 (MA) を修飾したヒアルロン酸誘導体を開発し、CDDPとのキレート形成により自発的に組みあがるナノゲルの開発を行って、IDAとMAという異なったリガンドを用いることにより、ナノゲルのサイズ等が異なることを明らかにした。さらにナノゲルはがん細胞に効率的に取り込まれ、遊離CDDPと同等かそれ以上の抗がん特性を発揮するのに対して、中皮細胞に対する毒性を劇的に低減できることを初めて明らかにした。

さらに一歩踏み込み、高酸素透過性培養プレートを用いて胃がん細胞スフィロイドを作製することに成功し、スフィロイド中でナノゲルの拡散性が劇的に向上することも見出した。現在 *in vitro* の結果に基づき、動物実験の検討を開始している。

ヒアルロン酸のCD44との結合、エンドサイトーシス、分解、細胞内情報伝達は、まだまだ不明な点が多く生理学的な研究が精力的に行われている。ナノゲルが効率的にエンドサイトーシスされる機構については、ヒアルロン酸分解酵素、エンドサイトーシス阻害剤やオリゴHA、抗CD44等を用いた更なる研究の深化が必要である。またナノゲルが間質中を拡散する機構についても、FCS等を用いたより詳細な研究が期待される。

5. 総 括

本研究では、ヒアルロン酸 (HA) にイミノ二酢酸 (IDA) 等を修飾した非常に単純な化学合成で作製したHA誘導体 (HA-IDA) を用いた研究である。EDTA等はかなりの高濃度を静脈投与しても安全なことがわかっている。イミノ

二酢酸はEDTAを丁度半分にしたと考えられる分子であり、潜在的に生体適合性が高い分子であると考えられる。実際合成したHA-IDAそのものは、繰り返し実験を行った結果 *in vitro* と *in vivo* での毒性は非常に低いことが明らかになった。合成スキームと化学構造の単純さから、将来臨床で十分に利用可能な材料となりうる。一方でこのポリマーとシスプラチン (CDDP) から作製したナノゲルの機能は、本研究で明らかにしたように、腹膜播種の腹腔投与DDSを実現する上で様々な利点を持っていることが明らかになった。今後は他のがん種への適用検討も有益であると考ええる。

さらに本研究とコスメトロジー分野への貢献を総括する。一般にHAの組織浸透性は非常に低く、分子量1kDa以下のHAの角質透過性などが報告されているが、本研究で用いている100kDaのHAが組織を浸透していくことはない。しかしイオンとキレートすることによって、組織の間質中を高速拡散することが示唆された。近年、ヒアルロン酸は保水性を高める化粧品材料として需要が増加している。HAをイオンや疎水性物質と複合化して、分子量が高いHAの回転半径を抑え、ナノサイズ化することにより組織浸透性を制御する、と考えれば、本研究はDDSの分野に止まらず、広く化粧品のR&Dにも応用可能な知見であると考えられる。

6. 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を賜りましたことを感謝申し上げます。ヒアルロン酸をご供与頂いたキッコーマンケミファに感謝致します。またスフィロイド作製プレートの作製をご指導頂いた東京大学生産技術研究所・酒井康行教授、腹膜播種細胞株をご供与頂いた東京大学医学部付属病院・北山丈二准教授に感謝致します。最後に、本研究の実験を行ったバイオエンジニアリング専攻修士課程2年平本翔大君、JSPS博士研究員・太田誠一博士に感謝致します。

皮膚組織再生を促進するリン酸カルシウム真球粒子の創製

国立研究開発法人産業技術総合研究所ナノ材料研究部門

大矢根 綾子、中村 真紀

Submicron spheres of calcium phosphate have potential as biocompatible and functional cosmetic materials. In the present study, we developed surfactant-free techniques for the synthesis of submicron-sized calcium phosphate-based spheres. In our techniques, pulsed laser irradiation was applied to dispersions of calcium phosphate integrated with various light-absorbing agents: ferric (Fe^{3+}) ions, ferrous (Fe^{2+}) ions, and carbon nanopowders.

For the integration of calcium phosphate and ferric/ferrous ions, FeCl_3 or FeCl_2 was supplemented to a calcium phosphate reaction mixture. Pulsed laser irradiation was performed to the reaction mixture during spontaneous precipitation of calcium iron phosphate. After irradiation, submicron- and micron-sized spheres of amorphous calcium iron phosphate were fabricated. In this process, ferric/ferrous ions integrated in the nano-sized precipitates induced melting and spheroidization of the precipitates *via* selective laser heating in the reaction mixture. Nucleation-growth process and Ostward ripening under supersaturated condition might be involved in the sphere growth.

For the integration of calcium phosphate and carbon nanopowders, hydroxyapatite nanopowders as the calcium phosphate source and carbon nanopowders were mixed using a ball mill. Pulsed laser irradiation was performed to a dispersion of the carbon-integrated hydroxyapatite nanopowders in ethanol. After irradiation, submicron spheres of amorphous calcium phosphate were fabricated. In this process, carbon nanopowders integrated with the hydroxyapatite nanopowders induced melting, spheroidization, and amorphization of the hydroxyapatite nanopowders *via* selective laser heating in the ethanol solvent. The carbon nanopowders were decomposed and/or evaporated during laser irradiation; hence, there was hardly any carbon remaining in the final spheres.

Our laser fabrication techniques would provide a new way to produce submicron-sized calcium phosphate-based spheres. The resulting spheres have a potential as biocompatible and functional cosmetic materials.

1. 緒 言

リン酸カルシウムはヒトの歯や骨の主要無機成分であり、身体に優しい安全・安心素材として、ファンデーション添加剤などのコスメトロジー素材や、人工骨などの生体材料に応用されている。また、リン酸カルシウムはタンパク質、抗体、DNAなどの生体分子を吸着する特性を有していることから、薬剤送達システム (Drug delivery system: DDS) 用担体としての応用も期待されている。本研究では、DDS機能を有するコスメトロジー素材への応用を目指し、細胞内への取り込みに適したサブミクロン球状構造を有するリン酸カルシウムを合成するための技術開発を行った。DDS機能を有するリン酸カルシウムサブミクロン球状粒子は、健常な皮膚の美容・保全だけでなく、創傷・皮膚炎・癬痕などの治療・予防にも有効な高機能コスメトロジー素材として有用と期待される。

従来のリン酸カルシウムサブミクロン球状粒子の合成法としては、界面活性剤を用いる手法 (ミセル法、エマルジ

ョン法など) が挙げられる。しかし、化学合成により得られる界面活性剤には、細胞毒性や製造コストなどの課題があった。これに対して最近Koshizakiらは、界面活性剤を必要としない簡便・迅速なサブミクロン球状粒子の合成法として、液中レーザー溶融法を報告している¹⁾。液中レーザー溶融法は、液相中に分散させた不定形ナノ粒子原料に低エネルギー密度のパルスレーザー光を非集光で照射することで、サブミクロン球状粒子を合成する手法である。この手法は、様々な金属や金属酸化物に適用されてきたものの、レーザー光吸収性に乏しいリン酸カルシウムへの適用は困難であった。

そこで我々は、リン酸カルシウムを種々の光吸収剤と複合化することによって、液中レーザー溶融によるサブミクロン球状粒子の合成を試みた。リン酸カルシウムと光吸収剤の複合化手法としては、鉄イオン共沈法およびカーボンミリング法の2種について検討した。鉄イオン共沈法 (2.1. 節) においては、光吸収剤として鉄 (Ⅲ) イオンおよび鉄 (Ⅱ) イオンを用いた。リン酸イオンとカルシウムイオンの混合反応液に鉄 (Ⅲ) イオンまたは鉄 (Ⅱ) イオンを添加し、同反応液に低エネルギーのパルスレーザー光を非集光で照射した。また、カーボンミリング法 (2.2. 節) においては、Liらの報告²⁾ に倣ってカーボンナノ粒子を光吸収剤として用いた。リン酸カルシウム原料として水酸アパタイトの不定形ナノ粒子原料を用い、光吸収性のカーボンナノ粒子をミリング混合によって複合化した。得られた複合粒子をエ



Fabrication of calcium phosphate spheres for skin tissue repair and regeneration

Ayako Oyane*, Maki Nakamura

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

タノール中に分散させ、低エネルギー密度のパルスレーザー光を非集光で照射した。

以上の2つの手法において、反応条件（レーザー光のエネルギー密度、照射時間など）を変化させ、得られた生成物の形態、化学組成、および構造を評価することによって、リン酸カルシウム系サブミクロン球状粒子を得るための基礎的条件を追求した。さらに、反応液中におけるレーザー光ならびに光吸収剤の役割・相互作用を基礎的に追及し、粒子の生成機構について考察した。

2. 実験

2.1. 試料作製〔鉄イオン共沈法〕^{3,4)}

鉄イオン共沈法における試料作製スキームを図1に示す。まず、カルシウムイオン水溶液、リン酸イオン水溶液、鉄(Ⅲ)イオン水溶液、および鉄(Ⅱ)イオン水溶液として、それぞれ200mM CaCl_2 （ナカライテスク製）水溶液、200mM $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ （ナカライテスク製）水溶液、200mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ （ナカライテスク製）水溶液、および $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ （和光純薬工業製）水溶液を、各々の試薬を超純水に溶解して調製した。

上記の原料溶液ならびに超純水をガラス製容器内に所定の容量比で添加、混合・攪拌することによって、種々の鉄イオン濃度(Fe(Ⅲ)):0、1、2、5、7、10mM、 Fe(Ⅱ)):0、1、2、5、10、20mM)を有する反応液(4mL)を調製した。反応液のカルシウムイオン濃度(16.7mM)およびリン酸イオン濃度(10mM)は一定とした。なお、原料溶液混合後の反応液は直ちに白濁した。

攪拌下、調製直後の上記反応液にナノ秒パルスレーザー光(Nd:YAG, Quanta-Ray LAB-150-30, Spectra-Physics製, ビーム径8mm)を集光せずに、30分までの種々の時間照射した。レーザー光の周波数は30Hz、波長は355nmとし、

エネルギー密度を67、133、200mJ/pulse/cm²（それぞれ2、4、6W/cm²）と変化させた。

照射後、遠心操作(6000rpm、10分)により生成物を回収、超純水で洗浄し、試料を得た。得られた試料は更なる遠心操作により、大粒径の分画L(500rpm、5分で沈降させた分画)、および小粒径の分画S(分画Lを沈降させた後の上澄液から、さらに1000rpm、10分で沈降させた分画)に分けた。

2.2. 試料作製〔カーボンミリング法〕⁵⁾

カーボンミリング法における試料作製スキームを図2に示す。水酸アパタイトの不定形ナノ粒子(1.5g、一次粒子径約100nm、太平化学産業株式会社提供)およびカーボンナノ粒子(0.3g、粒子径500nm以下、Sigma-Aldrich製)を遊星型ボールミルで10分間混合(600rpm)することにより複合化した。得られた複合粒子(0.005g)をエタノール(4mL)に分散させ、同分散液に攪拌下、2.1.項と同じナノ秒パルスレーザー光(30Hz、355nm)を非集光で20分間照射した。レーザー光のエネルギー密度は200mJ/pulse/cm²(6W/cm²)とした。照射後、遠心操作(6000rpm、10分)により生成物を回収、超純水で洗浄し、試料を得た。得られた試料は更なる遠心操作を行い、1000rpm、10分で粒子を沈降させた後の上澄液から、さらに2000rpm、10分で沈降させた粒子を回収した。

2.3. 試料評価

得られた試料(遠心操作後、超純水中に分散)の粒径分布を、動的光散乱法(DLS: Zetasizer Nano-ZS、Malvern製)により調べた。また、試料の形態、化学組成、ならびに結晶構造を、電界放射走査型電子顕微鏡(SEM: XL30、FEI製)観察、エネルギー分散型X線分光法(EDX、Genesis2000、

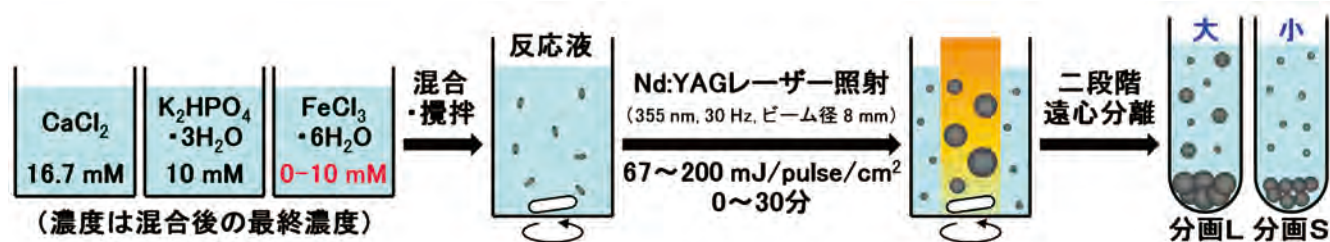


図1 鉄イオン共沈法による試料作製スキーム(鉄(Ⅲ)イオンの例)

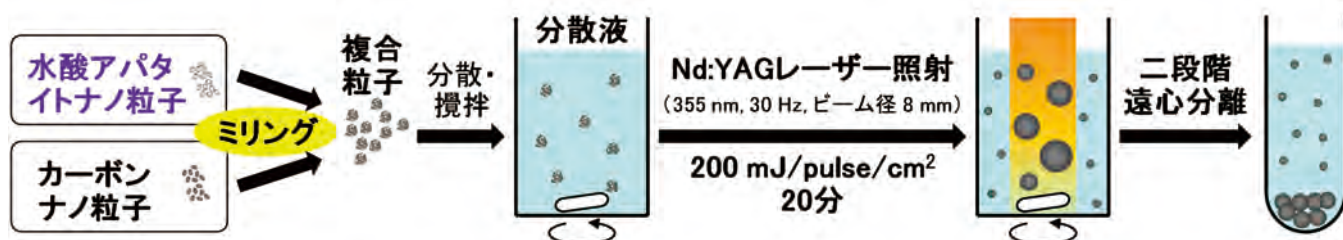


図2 カーボンミリング法による試料作製スキーム

EDAX 製)、透過型電子顕微鏡(TEM: JEM-2010、JEOL 製) 観察、および薄膜X線回折法(XRD: M18X、MAC Science 製) により調べた。SEM 観察およびEDX においては、試料をシリコン基板上にマウントし、表面にカーボンあるいは金を蒸着した。また、XRD においてはCuK α 線を用いた。

3. 結果と考察

3. 1. 鉄イオン共沈法

3. 1. 1. 光吸収剤として鉄(Ⅲ)イオンを用いた場合³⁾

鉄(Ⅲ)イオンを光吸収剤として用いて検討を行った。まず初めに、鉄(Ⅲ)イオン濃度 5mM、レーザー光のエネルギー密度 200mJ/pulse/cm²、照射時間 30 分の条件下で作製された試料について、構造と組成の評価を行った。SEM 観察の結果、分画 L に得られた試料は、主としてミクロンサイズ(DLS による平均粒子径 = 800nm)の球状粒子群であった(図 3 上)。一方、分画 S に得られた試料は、サブミクロンサイズ(DLS による平均粒子径 = 450nm)の球状粒子群であった(図 3 下)。以上の結果から、本法によって、サブミクロンからミクロンサイズの球状粒子を合成できることが確認された。

分画 S の球状粒子の EDX スペクトルを図 4 上に、XRD パターンを図 4 下に示す。EDX スペクトルでは、試料マウント用のシリコン基板およびカーボン蒸着膜に由来するピークの他に、カルシウム、リン、鉄、および酸素のピークが検出された(図 4 上)。XRD パターンでは、回折角 2θ

= 30° を中心にブロードなハローが検出された(図 4 下)。分画 L に得られた粒子についても、同様の EDX スペクトルおよび XRD パターンが得られた。以上の結果から、分画 S および分画 L の球状粒子はいずれも、アモルファスの鉄含有リン酸カルシウムであると考えられた。

球状粒子の生成過程においては、反応液中の鉄(Ⅲ)イオン濃度、およびレーザー光照射条件(エネルギー密度、照射時間)が重要な要素であると考えられた。そこで、レーザー光照射条件(200 mJ/pulse/cm²、30 分)を固定し、鉄(Ⅲ)イオン濃度を変化させて試料を作製した。分画 S および分画 L の球状粒子生成の有無を SEM 観察により調べた結果を表 1 に示す。鉄(Ⅲ)イオン濃度 1 mM 以下の反応液からは、リン酸カルシウムの不定形沈殿物のみが生成し、いずれの分画にも球状粒子は確認されなかった。一方、鉄(Ⅲ)イオン濃度 2 mM の反応液からは、分画 S にサブミクロン球状粒子が確認された。反応液の鉄(Ⅲ)イオン濃度を 5mM に高めると、分画 S のサブミクロン球状粒子(図 3 下)に加え、分画 L のミクロン球状粒子(図 3 上)の生成も認められた。さらに鉄(Ⅲ)イオン濃度を高めていくと、7 mM では分画 S のサブミクロン球状粒子のみが生成し、10 mM ではいずれの分画にも球状粒子は生成しなくなった。この理由については、3. 1. 2. 項で考察する。

次に、鉄(Ⅲ)イオン濃度(5mM) およびレーザー光照射時間(30 分)を固定し、レーザー光のエネルギー密度を変化させて試料を作製した。SEM 観察の結果(表 2)、レー

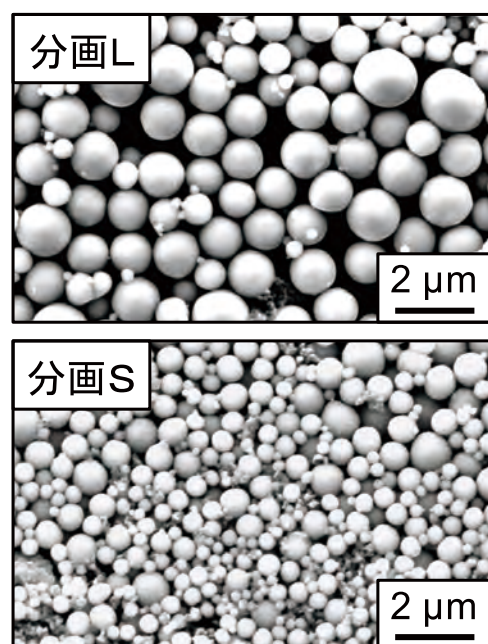


図3 鉄イオン共沈法で得られた分画 L (上)と分画 S (下)の試料の SEM 像 ([Fe (Ⅲ)] = 5 mM、30 分照射)

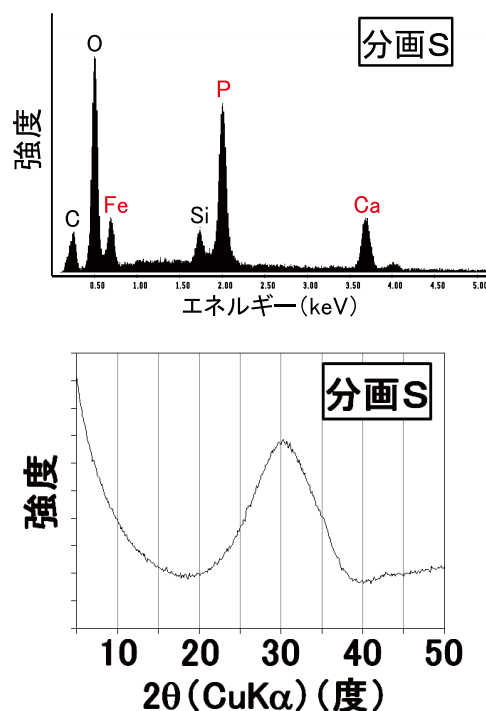


図4 鉄イオン共沈法で得られた分画 S の球状粒子の EDX スペクトル(上)と XRD パターン(下) ([Fe (Ⅲ)] = 5 mM、30 分照射)

レーザー光のエネルギー密度 67 mJ/pulse/cm^2 の条件では、いずれの分画にも球状粒子は確認されなかった。エネルギー密度を高めていくと、 $133 \text{ mJ/pulse/cm}^2$ の条件では分画 S にサブミクロン球状粒子が、 $200 \text{ mJ/pulse/cm}^2$ の条件では分画 S のサブミクロン球状粒子と分画 L のミクロン球状粒子の両方が生成するようになった。

続いて、鉄(Ⅲ)イオン濃度 (5 mM) とレーザー光のエネルギー密度 ($200 \text{ mJ/pulse/cm}^2$) を固定し、照射時間を変化させて試料を作製した。SEM 観察の結果(表 3)、照射時間 10～15 分の条件では分画 S にサブミクロン球状粒子が確認され、照射時間 20～30 分の条件ではさらに分画 L のミクロン球状粒子も確認された。この結果から、レーザー光の照射開始後 10 分以内にサブミクロン球状粒子が生成し、20 分以内に一部の粒子がミクロンサイズにまで成長すると考えられた。

球状粒子の生成過程は以下のように考察される。反応液

表 1 鉄イオン共沈法における鉄(Ⅲ)イオン濃度と粒子生成の関係 ($200 \text{ mJ/pulse/cm}^2$ 、30 分照射)

Fe (Ⅲ) (mM)	0	1	2	5	7	10
粒子生成	×	×	S	S+L	S	×

× : 球状粒子生成せず

S : 分画 S に球状粒子生成

L : 分画 L に球状粒子生成

表 2 鉄イオン共沈法におけるレーザー光のエネルギー密度と粒子生成の関係 ($[\text{Fe (Ⅲ)}] = 5 \text{ mM}$ 、30 分照射)

エネルギー密度 (mJ/pulse/cm^2)	67	133	200
粒子生成	×	S	S+L

表 3 鉄イオン共沈法におけるレーザー光照射時間と粒子生成の関係 ($[\text{Fe (Ⅲ)}] = 5 \text{ mM}$ 、 $200 \text{ mJ/pulse/cm}^2$)

レーザー時間照射 (分)	0	5	10	15	20	30
粒子生成	×	×	S	S	S+L	S+L

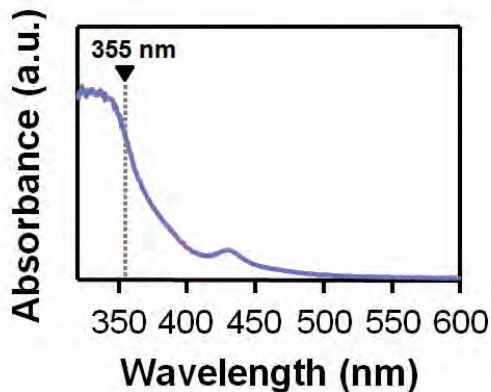


図 5 鉄イオン共沈法において調製された反応液 ($[\text{Fe (Ⅲ)}] = 5 \text{ mM}$) の初期析出ナノ粒子の吸収スペクトル

は調製直後に (レーザー光照射前)、波長 355 nm の紫外光吸収性(図 5)を示すナノ粒子を自発析出する。この反応液にパルスレーザー光を照射すると、初期析出ナノ粒子の凝集体がレーザー光エネルギーを吸収し、加熱溶融されて球状液滴となる。球状液滴は、レーザーパルスの間隔において周囲の水溶媒によって急冷され、アモルファス球状構造を保ったまま固化する。以上のような溶融・急冷反応がパルスレーザー光照射下で繰り返されるのに並行して、生成粒子が反応液中のカルシウムイオン、リン酸イオン、鉄イオン、クラスターを取り込み成長していくことで、サブミクロンおよびミクロンサイズの鉄含有リン酸カルシウム球状粒子が生成したと考えられる。

3. 1. 2. 光吸収剤として鉄(Ⅱ)イオンを用いた場合⁴⁾

続いて、鉄(Ⅲ)イオンに代えて鉄(Ⅱ)イオンを光吸収剤として用い、検討を行った。初めに、鉄(Ⅱ)イオン濃度 5 mM 、レーザー光のエネルギー密度 $200 \text{ mJ/pulse/cm}^2$ 、照射時間 20 分の条件下で試料を作製した。SEM 観察の結果、鉄(Ⅱ)イオンを用いた場合にも、3. 1. 1. と同様、サブミクロンからミクロンサイズの球状粒子を合成できることが確認された(図 6)。また、EDX および XRD の結果から、分画 S および分画 L の球状粒子はいずれも、アモルファスの鉄含有リン酸カルシウムであることも確認された。鉄(Ⅲ)イオンと同様、鉄(Ⅱ)イオンが反応液調製直後に析出するナノ粒子に含有されることで、レーザー光吸収と溶融・球状化を促したと考えられる。

続いて、レーザー光のエネルギー密度 (200 mJ/pulse/

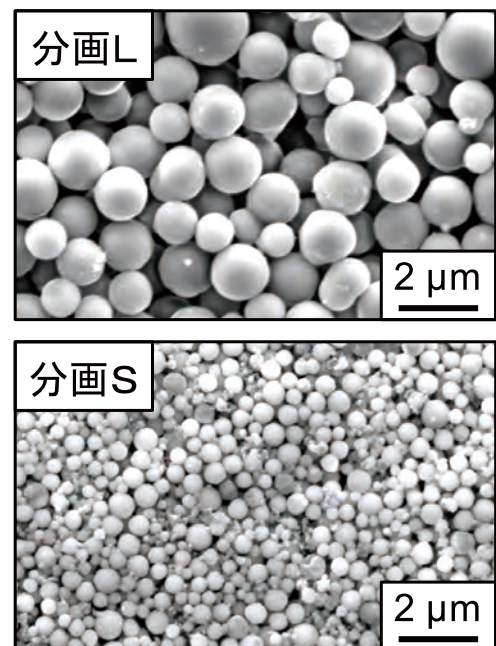


図 6 鉄イオン共沈法により得られた分画 L (上) と分画 S (下) の試料の SEM 像 ($[\text{Fe (Ⅱ)}] = 5 \text{ mM}$ 、20 分照射)

cm²)と照射時間(30分)を固定し、鉄(Ⅱ)イオン濃度を变化させて試料を作製した。分画Sおよび分画Lの球状粒子生成の有無をSEM観察により調べた結果を、鉄(Ⅲ)イオンの結果(表1)と合わせて表4に示す。鉄(Ⅱ)イオン濃度2mM以上の条件で、分画Sにサブミクロン球状粒子の生成が認められ、5mM以上の条件では、さらに分画Lにミクロン球状粒子の生成も確認された。また、鉄(Ⅲ)イオンを用いた場合(2~7mM)と比較して、鉄(Ⅱ)イオンを用いた場合(2~20mM)には、より広い濃度範囲において球状粒子が生成した。この理由の1つとして、調製直後の反応液の液性(pH)が考えられる。すなわち、鉄(Ⅲ)イオンの原料試薬FeCl₃・6H₂Oが酸性物質であることから、添加濃度の増加により反応液のpHが低下する(図7)。鉄(Ⅲ)イオン濃度の高い反応液中では、リン酸鉄およびリン酸カルシウムの溶解度が上昇する結果、球状粒子の生成が抑制される。一方、鉄(Ⅱ)イオンの原料試薬FeCl₂・4H₂Oの酸性度はFeCl₃・6H₂Oよりも弱いため、添加濃度の増加による反応液のpH低下が抑えられる。その結果、より高濃度(~20mM)の鉄(Ⅱ)イオンを添加した場合にも、球状粒子が生成したと考えられる。

以上の結果から、光吸収剤として鉄(Ⅲ)イオンまたは鉄(Ⅱ)イオンを用いる鉄イオン共沈法により、アモルファスの鉄含有リン酸カルシウムからなるサブミクロンおよびミクロンサイズの球状粒子を合成できることが確認された。

表4 鉄イオン共沈法における鉄(Ⅱ)/鉄(Ⅲ)イオン濃度と粒子生成の関係(200mJ/pulse/cm²、30分照射)

鉄イオン濃度(mM)	0	1	2	5	7	10	20
Fe(Ⅱ)	×	×	S	S+L	—*	S+L	S+L
Fe(Ⅲ)	×	×	S	S+L	S	×	—*

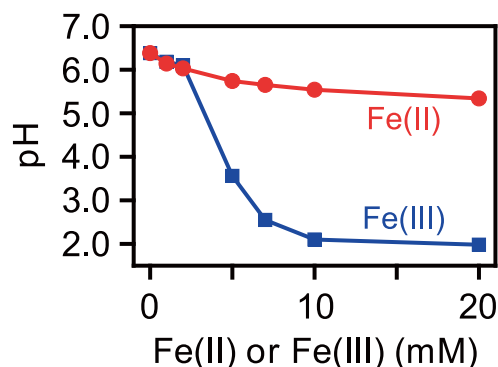


図7 鉄イオン共沈法において調製された反応液のpH(調製直後、レーザー光照射前)

3.2. カーボンミリング法⁵⁾

カーボンミリング法で作製された試料のSEM像を図8上に、EDXスペクトルを図8下に示す。SEM観察の結果(図8上)、サブミクロンサイズ(100~400nm)の球状粒子の生成が認められた。EDXスペクトル(図8下)では、試料マウント用のシリコン基板および金蒸着膜に由来するピークの他に、カルシウム、リン、酸素、およびカーボンのピークが検出された。カーボンのピーク強度は、レーザー光照射前の複合粒子と比較して大幅に減少した。これは、Liらも報告しているように²⁾、レーザー光照射により複合粒子中のカーボンが昇華あるいは分解したためと考えられる。生成したサブミクロン球状粒子の多くは、単一孔構造(Type A)または多孔構造(Type B)を有していたが、一部、緻密な構造(Type C)を有する粒子も確認された(図9)。透過電子線回折(TED)分析の結果、いずれの粒子もアモルファス構造を有していることが明らかになった(図9右上、Type Aの例)。

粒子の生成機構については、Liらの報告²⁾と同様と考えられる。すなわち、カーボンナノ粒子がレーザー光エネルギーを吸収し、それを水酸アパタイトナノ粒子との複合粒子に伝えることで、同複合粒子の熔融・球状化を促すと考えられる。この際、大部分のカーボンは昇華あるいは分解し、球状粒子中にはほとんど残らない。また、熔融液滴中に生じた気泡が、レーザーパルス間隔で急冷・固化される

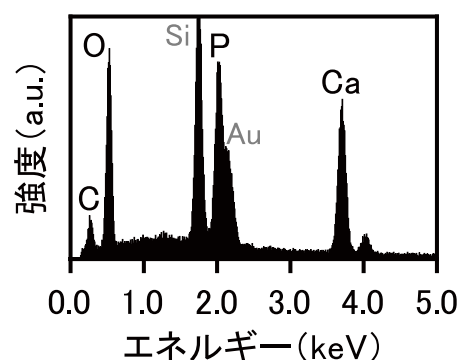
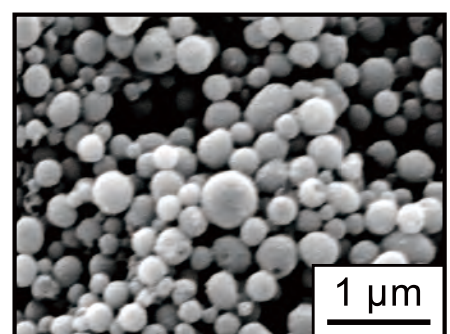


図8 カーボンミリング法により得られた試料のSEM像(上)とEDXスペクトル(下)

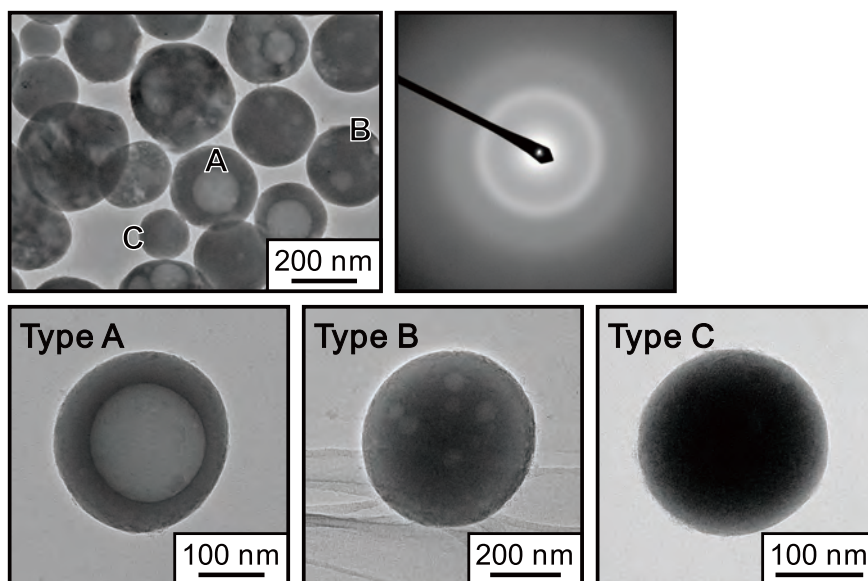


図9 カーボンミリング法で得られた試料のTEM像(左上、下)とTEDパターン(右上)

際に脱気できた場合には緻密構造が、脱気できずに残存した場合に孔構造 (Type A、Type B) が形成されると推察される。

以上、光吸収剤としてカーボンナノ粒子を用いるカーボンミリング法により、アモルファスリン酸カルシウムのサブミクロン球状粒子を合成できることが確認された。本手法で得られる球状粒子は孔構造を有することから、様々な薬剤分子のDDS担体として有用と考えられる。

4. 総括

液中レーザー溶融法¹⁾を発展させ、リン酸カルシウムに種々の光吸収剤を複合化することにより、リン酸カルシウム系サブミクロン球状粒子の合成に成功した。光吸収剤の複合化手法として、鉄イオン共沈法ならびにカーボンミリング法について検討し、それぞれの反応過程を明らかにするとともに、球状粒子を得るための基礎的条件を明らかにした。得られたリン酸カルシウム系サブミクロン球状粒子は、DDS担体として適した構造を有することから、治療効果を付加したコスメトロジー素材としての応用が期待される。今後の課題としては、粒子サイズの精密制御、大量合成技術の開発などが挙げられる。

謝辞

本研究は、平成24年度コスメトロジー研究振興財団の助成を受けて行われたものである。研究の実施にあたっては、産業技術総合研究所の清水禎樹博士、坂巻育子氏をはじめ、関係各位にご協力を頂いた。

(引用文献)

- 1) H. Wang, A. Pyatenko, K. Kawaguchi, X. Li, Z. Swiatkowska-Warkocka and N. Koshizaki, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, **49**, 6361.
- 2) X. Li, Y. Shimizu, A. Pyatenko, H. Wang and N. Koshizaki, *J. Mater. Chem.*, 2011, **21**, 14406.
- 3) M. Nakamura, A. Oyane, I. Sakamaki, Y. Ishikawa, Y. Shimizu, K. Koga, K. Kawaguchi and N. Koshizaki, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 38442.
- 4) M. Nakamura, A. Oyane, I. Sakamaki, Y. Ishikawa, T. Shimizu and K. Kawaguchi, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2015, **17**, 8836.
- 5) M. Nakamura, A. Oyane, I. Sakamaki, Y. Shimizu, K. Koga and N. Koshizaki, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 22620.

球状シリカマイクロ粒子とスメクタイト微結晶の複合技術開発

信州大学工学部物質工学科

岡田 友彦

Crystal growth of a layered smectite (a layered silicate) on monodispersed spherical silica particles has been investigated. Hydrothermal reactions between spherical silica and precursors of smectites (Mg, Li or Al salt) in the presence of urea resulted in formation of core-shell (silica-smectite) particles. Because of the heterogeneous nucleation, the fine crystallites were firmly glued on the silica substrate without flaking off the silicate layers from the silica in aqueous media. Cation-exchange reactions of the smectites on the hybrids with a long chain alkylammonium ion have been conducted to modify the surfaces for possible applications as supports of an active ingredient for controlled release.

1. 緒 言

スメクタイト族粘土鉱物はイオン交換性、膨潤性、熱的・化学的安定性などの特徴を有しており、陽イオンの吸着剤としてだけでなく、増粘剤、色素担体として利用されている(図1)¹⁾。また、スメクタイトの層間陽イオンを有機陽イオン(例：陽イオン性の界面活性剤など)で交換すると、有機修飾粘土(例：疎水性のスメクタイト)が得られる^{2,3)}。この有機修飾粘土へは非イオン性の有機分子が取り込まれることが古くから知られており、最近では薬剤徐放の担体のほかにも、ある特定の有機分子が選択的に吸着できる分子認識材⁴⁻⁹⁾や高機能な光／電子機能材料^{4,5,10,11)}への応用についても内外で広く検討されている。スメクタイトのイオン交換性を利用すると、ホスト-ゲストの多様な組み合わせから、多様な機能が発現する興味深い物質系となる。

スメクタイトは天然で豊富に存在する粘土鉱物であるが、鉄分を含んでいるため精製しても白色度がやや劣る。一方、化粧品の素材として有用な合成スメクタイトの粒子はナノメートルオーダーと極めて小さく、水に浸すと剥離しやすく皮膚に残存しやすい等ハンドリング性に乏しい。このようにスメクタイトは、天然、合成物ともに粒子形状が不規則であり、合成では形状制御が難しい。単結晶合成では最大で0.1mm程度が限界のサイズであり¹²⁾、しかも比較的高温、高圧でないと得られない。工業的に量産するには、低温で常圧の合成が望ましく、合成手法が様々提案¹³⁾されているが、一般に板状微結晶の集合体として得られる。本研究では、スメクタイト(層状ケイ酸塩の一種)の微結晶を球状シリカマイクロ粒子表面に固定する方法について検

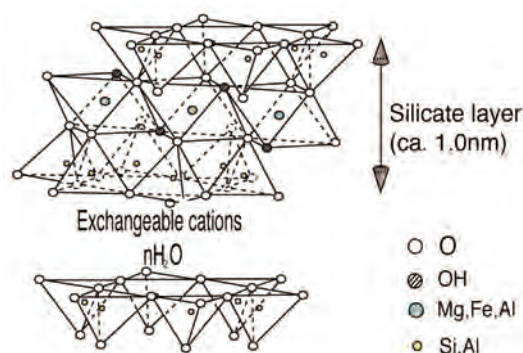


図1 スメクタイト族粘土鉱物の構造

討する。この方法の特徴は、シリカマイクロ粒子をスメクタイト生成の犠牲鋳型(sacrificial template)として利用する点にある。すなわち、球状シリカマイクロ粒子をスメクタイトの原料の一部に用い、不均一核生成により球状シリカ表面にスメクタイトの微結晶を直接成長させる方法(図2)¹⁴⁾であり、一旦剥離したナノシートをlayer-by-layerで貼り付ける手法とは本質的に異なり、スメクタイトはシリカ粒子表面と強固に接着するので、得られるスメクタイト-球状シリカ複合粒子を水に浸しても、スメクタイト成分が剥落することなくハンドリング性に優れたマイクロ粒子が得られると期待できる。複合粒子の応用性を高めるため、本研究では以下の2点を中心に検討した。

- I) スメクタイトの原料(球状シリカ、金属塩、尿素)を添加して温めるだけで、シリカ-スメクタイト複合粒子が得られるか。また種々のサイズの球状シリカを用いても実現可能か。
- II) 得られる複合粒子には種々のイオン(陽イオン性界面活性剤、色素等)との交換特性があり、粒子表面のスメクタイトが剥落しないか。また、陽イオン性界面活性剤で交換した試料には薬効成分の担持能力があるか。

2. 実験方法

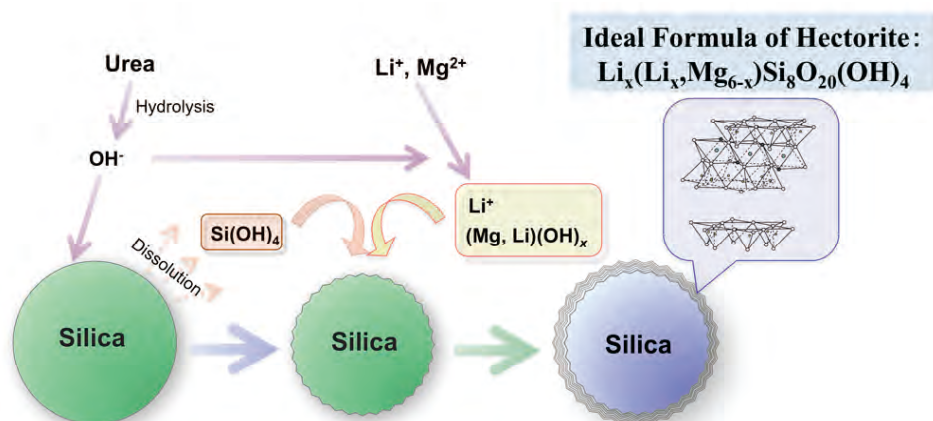
本研究で取り扱うスメクタイトは、ヘクトライト(理想



Hybridization of smectite crystallites with micro-spherical silica particles

Tomohiko Okada

Department of Chemistry and Material Engineering, Faculty of Engineering, Shinshu University

図2 シリカ粒子を犠牲鋳型としたスメクタイト(ヘクトライト)微結晶の育成¹⁴⁾

組成： $\text{Li}_x(\text{Li}_x, \text{Mg}_{6-x})\text{Si}_8\text{O}_{20}(\text{OH})_4$ およびサポナイト（理想組成： $\text{Na}_x\text{Mg}_6(\text{Si}_{8-x}\text{Al}_x)\text{O}_{20}(\text{OH})_4$ ）である。ヘクトライトの場合、 Mg^{2+} が低電子価の Li^+ に同形置換されることでシリケート層が負電荷を帯び、この電荷を補償するために層間に陽イオンを取り込む。サポナイトでは、 Si^{4+} の一部が Al^{3+} に同形置換され負電荷を生ずる。一般にサポナイトの結晶を育成するにはヘクトライトと比べ高温であることを必要とする。

2. 1. ヘクトライト微結晶の固定

基本的な方法は次の通りである。 LiF 、 MgCl_2 および尿素の混合水溶液（80mL）に、所定の粒子径の単分散球状シリカ水懸濁液（20mL）を加えて攪拌した後、混合物をテフロン内筒型密閉容器に移し、一定の速度で回転させながら 100°C 48時間保持した。容器を急冷した後、遠心分離により沈殿物を回収し、乾燥して試料とした。添加するLiおよびMg量を、既報¹⁵⁾のヘクトライト合成条件（Li：Mg：Si=1.4：5.3：8.0）と比較して15%に減じて仕込むことで、球状シリカを核、ヘクトライトを殻としたコアシェル粒子を得ようとした。また、尿素の加水分解反応を利用して、反応中に水酸化物イオンを生成させることで、ヘクトライトの生成を試みた。

a) 層表面電荷密度の制御¹⁶⁻¹⁸⁾

被覆されたヘクトライトの層表面電荷密度は、膨潤やイ

オン交換容量などの基礎物性に影響を及ぼすので、電荷密度の制御は有意義である。ここでは、出発物質のMg/Liを表1の通りに変化させ、電荷密度の制御を試みた。原料の単分散球状シリカ粒子には、平均径 $1.0\mu\text{m}$ のものを用了。

b) 単分散球状シリカの粒子径の影響¹⁹⁾

種々のサイズ（平均径： $0.2, 0.6, 1.0\mu\text{m}$ ）のシリカ粒子を原料として、仕込み比 $\text{LiF}:\text{MgCl}_2:\text{SiO}_2:\text{Urea}=0.21:0.80:8.0:8.0$ として2.1.と同様の条件で合成した。

これらの試料に対して、メチレンブルー（ MB^+Cl^- ）の水溶液からの吸着等温線（ 25°C ）を測定した。 MB^+Cl^- の吸着等温線から導かれた飽和吸着量に対し過剰量のジメチルジステアリルアンモニウムブロミド（ $2\text{C}_{18}\text{N}^+\text{Br}^-$ ）を加え、1日室温にて攪拌ののち水/エタノール混合溶液にて繰り返し洗浄することで、 $2\text{C}_{18}\text{N}^+$ で交換された単一型の層間化合物を得ようとした。

2. 2. サポナイト微結晶の固定^{20, 21)}

球状シリカ（日本触媒KE-S100、平均径 $1.0\mu\text{m}$ ）の水懸濁液に $\text{Al}[\text{OCH}(\text{CH}_3)_2]_3$ 、 $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$ および尿素を表2の仕込み比で混合した。得られた懸濁液をテフロン内筒型密閉容器に入れ、 175°C で72時間静置あるいは回転した。冷却の後、遠心分離、洗浄、乾燥して試料とした。また、 $2\text{C}_{18}\text{N}^+\text{Br}^-$ 溶液を試料と反応させ、イオン交換特性を

表1 出発物質の化学組成

Sample	LiF	MgCl ₂	Si ₂ O	Urea
S1	0.21	0.80	8.0	8.0
S2	0.42	0.69	8.0	8.0
S3	0.63	0.69	8.0	8.0
S4	0.84	0.69	8.0	8.0

表2 サポナイト結晶育成における水熱反応方法、原料のモル比および試料名

サポナイト	容器	Al	Mg	Si	Urea	H ₂ O	試料名
15%	静置	0.09	0.45	3.4	0.3	2.5	静置
	回転	0.09	0.45	3.4	0.3	2.5	回転
	回転	0.09	0.45	3.4	0.045	2.5	尿素減
	回転	0.09	0.45	3.4	0.3	0.6	水 0.6
	回転	0.09	0.45	3.4	0.3	0.3	水 0.3
5%	回転	0.03	0.15	3.4	0.3	2.5	5%

評価した。

$2C_{18}2C_1N^+$ とイオン交換した疎水性の試料に対して、ヒノキチオールを吸着させた。続いてその試料を n -ヘキサンに混合し、25℃で1日静置してヒノキチオールの脱着試験を実施した。この際、市販のスメクタイト（クニピア F、およびスメクトン SA：いずれも日本粘土学会参考試料）を $2C_{18}2C_1N^+$ で疎水化した試料へも同様にヒノキチオールを吸着させ、その脱着特性を比較した。

3. 結果および考察

3.1. ヘクトライト微結晶の固定

a) 層表面電荷密度の制御

S1 - S4 の XRD パターンには、いずれもヘクトライトに帰属できる回折ピークが見られた。SEM 像では、いずれも比較的径の揃った球状粒子が観察でき、すべての粒子表面に微細な凹凸が見られた（図 3）。これらの結果から、球状シリカ表面はヘクトライトで被覆されたことがわかった。表面の凹凸は、S1 および S2 と比較して、S3 および S4 では大きかった。図 4 に試料および原料シリカの TEM 断面像を示す。原料の球状シリカは極めて平滑な球面であるのに対し、試料 S1 - S4 ではいずれもシリカ粒子表面が削られている様子がみられた。また、いずれの場合でもヘクトライトのシリケート層（1 nm 程度の厚みをもつ層状構造）の集合体が見られた。LiF 添加量の少ない S1 および S2 では、

密なシリカ表面から 20 nm 程度の厚みで低密度な層を形成し、その表面からシリケート層が成長する様子がみられた。他方、LiF 添加量の多い場合（S3, S4）では、ヘクトライト結晶子のサイズが比較的大きく、シリカ粒子の外側の方向にシリケート層が交わるように成長する様子が見られた。

得られた試料に対する MB^+Cl^- の吸着等温線は、いずれも吸着剤-吸着質相互作用が極めて強い H 型であった。Langmuir 式に回帰して得られた吸着平衡定数 (K) および飽和吸着量 (q_m) を表 3 に示す。合成時に添加する LiF を増やすことで q_m が増大する結果となった。試料と $2C_{18}N^+Br^-$ との反応により、ヘクトライトの基本面間隔 (1.4 nm) が表 4 に示す値に増大した。これらの値から、 $2C_{18}N^+$ は S1 の層間では二分子層、S2 および S3 では擬三分子層、S4 ではパラフィンタイプで配向していると考えられる。また、 $2C_{18}N^+$ の吸着量を TG 曲線の 200 - 600℃ における重量減少から見積もった結果、表 4 の通りとなった。 $2C_{18}N^+$ 吸着量と層間での配向との関係¹⁵⁾を考慮すると、 $2C_{18}N^+$ 吸着量は、球状シリカの 15% がヘクトライトに変化したことと対応している。いずれの反応でも、表面で育成されたヘクトライトの微結晶が剥落する様子が見られなかった。

以上より、用いた有機陽イオンは試料のヘクトライト相へ選択的に吸着されることがわかった。また、出発物質として添加する LiF の量を増やすと、シリカ粒子表面上のヘクトライトの層表面電荷密度（イオン交換容量）が変化する

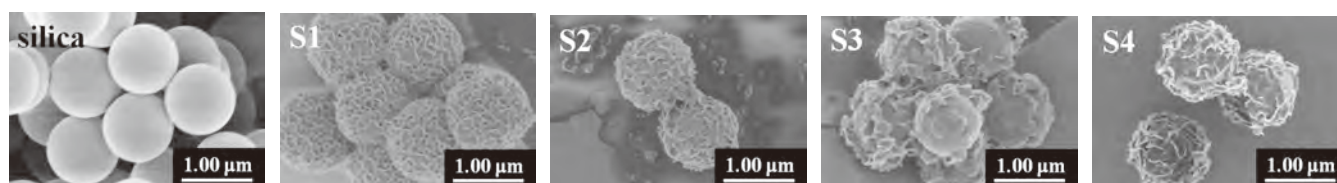


図 3 ヘクトライト被覆シリカ粒子(S1-S4)および原料シリカの SEM

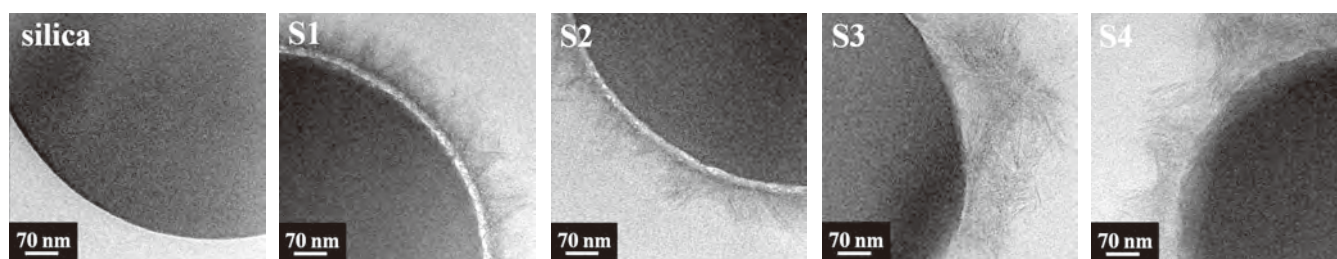


図 4 ヘクトライト被覆シリカ粒子(S1-S4)および原料シリカの断面 TEM 像

表 3 試料 S1 - S4 への MB 吸着に対する Langmuir 定数

Sample	K [$10^3 L/g$]	q_m [mmol/g]
S1	5.7	0.12
S2	4.3	0.17
S3	4.7	0.19
S4	2.0	0.23

表 4 試料 S1 - S4 に対する $2C_{18}N^+$ 吸着量および吸着後の基本面間隔

Sample	$d(001)$ [nm]	Amount of $2C_{18}N^+$ [mmol/g]
S1	1.8	0.11
S2	2.3	0.16
S3	2.2	0.19
S4	2.5	0.21

ことが明らかとなった。

b) 単分散球状シリカの粒子径の影響

平均径を $1.0\mu\text{m}$ から 0.2 および $0.6\mu\text{m}$ とした場合の試料の電子顕微鏡像を図 5a および 5b にそれぞれ示す。いずれもシリカ表面からヘクトライトの結晶が成長している様子が観察された。結晶子サイズは原料シリカの粒子サイズに依らずほぼ一定であることから、シリカ表面上におけるヘクトライトの結晶成長には、粒子径よりむしろ原料の濃度が重要であることが示唆された。いずれも $2\text{C}_{18}\text{N}^+\text{Br}^-$ とのイオン交換反応が進行し、ヘクトライトの基本面間隔 (1.4nm) はいずれも $2\text{C}_{18}\text{N}^+$ が層間で二分子層を形成する 1.8nm であったことから、シリカ球面で成長するヘクトライトの層表面電荷密度も、粒子径に関係なく出発原料の濃度が関係することがわかった。

3. 2. サポナイト微結晶の固定

サポナイトは構造中に Li^+ を含まず、シリケート骨格中の Si^{4+} の一部が Al^{3+} で同形置換することで負電荷を生ずる鉱物であることで知られる。試料“静置”および“回転”の XRD パターンにはいずれも (060) 回折線がみられ、その d 値は 0.152nm であることから、試料は三八面体型のスメクタイトを含むことが分かる。固体 ^{27}Al -MAS NMR スペクトルには、 60ppm 付近に四配位の Al に帰属できるシグナルが現れた。試料の ζ 電位は、分散媒の pH に依存せず $-40\sim-50\text{mV}$ であったことから、試料表面は永久電荷を帯びていると解釈できる。SEM 観察では、球状シリカ粒子の表面から板状の結晶が成長する様子がみられた。静置で反応させた場合、比較的大きな凹凸をもつ粒子は全体の 3 割程であった (図 6 左)。他方、回転させながら反応

させると、ほとんどの粒子表面に凹凸が見られた (図 6 中) ことから、シリカ粒子とアルカリがよく接触してシリカが溶解または溶融しながらサポナイトが生成したと考察した。試料への $2\text{C}_{18}\text{N}^+$ の吸着量を TG-DTA 曲線から求めた結果、“静置”では 0.16mmol/g ，“回転”では 0.15mmol/g であった。反応後の基本面間隔はいずれも 2.2nm であり、サポナイト層間の $2\text{C}_{18}\text{N}^+$ は擬三分子層で配向していると考えられる。この配向をするスメクタイトの陽イオン交換容量が $0.7-0.8\text{meq/g clay}^{[15]}$ であることを考慮すると、いずれの試料にもサポナイトが 2 割含まれていると推定できる。これらのことから、Al と Mg の添加量をサポナイトの生成する条件 (Al : Mg : Si = $0.6 : 3.0 : 3.4$)^[22] と比べ 15% に減らして水熱反応すると、サポナイトが球状シリカの表面で成長することが分かった。

XRD および固体 ^{27}Al NMR 分析より、“水 0.6”、“尿素減”および“5%”いずれの条件でもサポナイト様層状ケイ酸塩の結晶が生成した。SEM 観察から、“回転”条件と比べて添加する尿素あるいは Al, Mg 源の量を少なくすると、シリカ表面に凹凸をもつ粒子数が減る傾向にあった。一方、“回転”条件と比べ水の添加量を少なくすると、結晶子が小さく均一になった。水の量を更に減らすと (“水 0.3”), もとのシリカ粒子の形状を損ねることなく、シリカ粒子上でサポナイトの微結晶が成長した (図 6 右)。これらのことから、添加する水の量のみを減らすとサポナイトの過飽和度が大きくなり、その結果結晶子サイズの小さいサポナイトが成長すると考えられる。

図 7 に“水 0.3”の断面 TEM 像を示す。この像からサポナイトの微結晶は、シリカ球面から放射状に成長する様子がわかる。また、シリケート層の重なりは数枚程度と薄

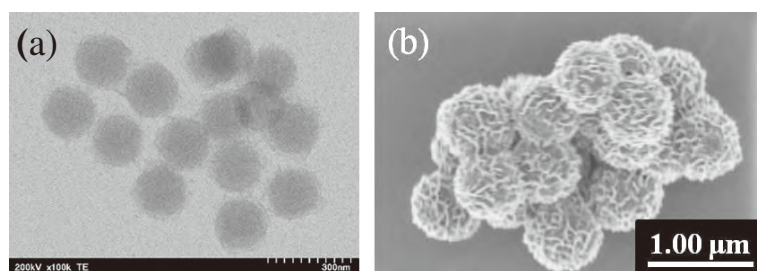


図5 ヘクトライト被覆シリカ粒子の (a) TEM 像 ($0.2\mu\text{m}$) および (b) SEM 像 ($0.6\mu\text{m}$)

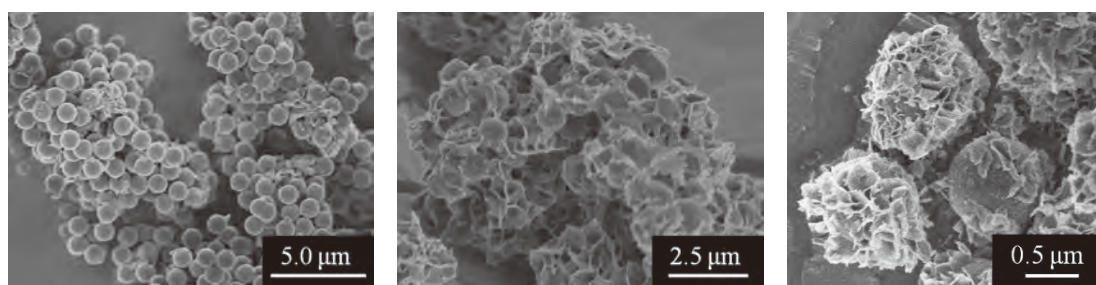


図6 サポナイト被覆シリカ粒子：(左) “静置” (中) “回転” (右) “水 0.3” の SEM 像

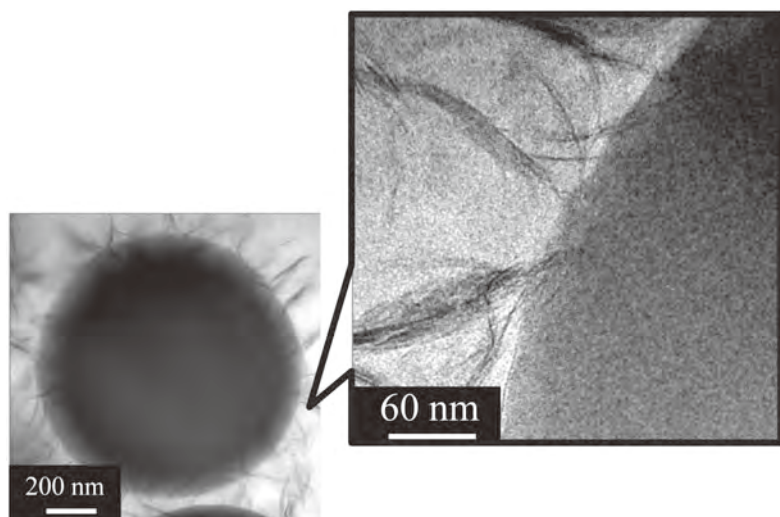


図7 サボナイトで被覆した球状シリカ粒子(試料“水 0.3”)の断面 TEM 像

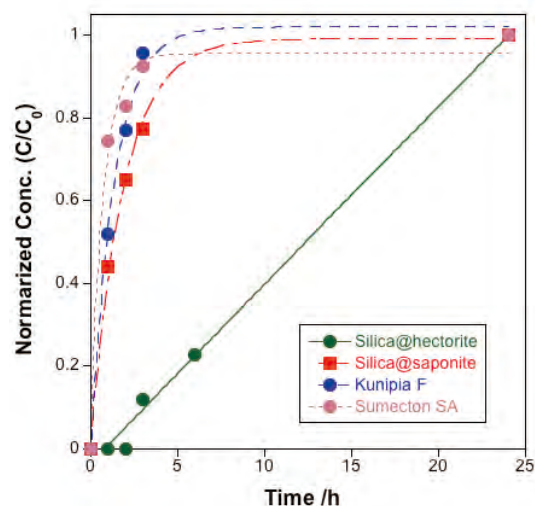


図8 疎水性スメクタイトに吸着されたヒノキチオールの *n*-ヘキサンへの脱着 (25°C) の経時変化

く、この積層に対してシートのサイズは $0.1 - 0.2 \mu\text{m}$ であり、ヘクトライト微結晶 (S1 乃至は S2) と比較すると、ち密でなく柔軟な構造であることがわかる。

試料“水 0.3”と $2\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{N}^+$ 塩との反応を実施した結果、 $2\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{N}^+$ の吸着量は 0.11 mmol/g であった。同様の反応を市販のス멕タイト (クニピア F、およびス멕トン SA) およびヘクトライト被覆シリカ粒子 (S1) に対しても行い、得られた疎水化物を *n*-ヘキサンに分散させた。長鎖アルキルアンモニウムで交換したス멕タイトは、*n*-ヘキサンなどの無極性溶媒で容易に膨潤することが知られている。市販のス멕タイトの場合では *n*-ヘキサンに膨潤し、体積の増加がみられた。一方、サボナイトおよびヘクトライトで被覆したシリカ粒子 (それぞれ試料“水 0.3”および S1) は膨潤しなかった。図 8 にヒノキチオールを吸着した試料に対する *n*-ヘキサンの脱着 (25°C) の経時変化を示す。脱着平衡濃度 (C_0) を規格化し、これを指数関数 $C/C_0 = a(1 - e^{-bt})$; (ただし、 t は経過時間 [h], a および b は定数) に回帰した。その結果、表 5 の通り脱着速度を表す b 値は、市販のス멕タイトで大きいのにに対し、サボナイトで被覆した粒子ではやや減少し、特にヘクトライトで被覆した場合には著しく小さく、ヒノキチオールの脱着がきわめて遅いことがわかった。市販のス멕タイトでは、*n*-ヘキサンに膨潤し層間が著しく拡大したことを反映して、ヒノキチオールの脱着が速く、一方の被覆粒子では、*n*-ヘキサンで層間膨潤していると考えられるが、とくにヘクトライトの場合、シリカ球面上でち密に結晶化しているため、市販ス멕タイトのような無限膨潤は起こらず、これを反映してヒノキチオールの脱着が遅いと解釈できる。

以上のように、シリカ球面上のス멕タイトの微結晶は、陽イオンおよび有機分子のインターカレーション能を示すが、従来のス멕タイトにみられるような無限膨潤はしな

表 5 ヒノキチオールの *n*-ヘキサンへの脱着結果

試料*	a	b	R^2
ヘクトライト被覆シリカ	38	0.0011	0.994
サボナイト被覆シリカ	0.98	0.53	0.998
ス멕トン SA	0.95	1.3	0.989
クニピア F	1.0	0.74	0.995

※いずれも $2\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{N}^+$ を吸着させ、疎水化した試料である。

いという特徴が現れた。長鎖アルキルアンモニウムで疎水化してもパラフィン系の有機溶媒で膨潤しないしは剥離しづらいため、化粧品素材としてシリケートの剥落残存がない等のハンドリング性に優れ、かつ長時間有効成分を保持・徐放されると期待される。

4. 総 括

- I) ス멕タイトの原料 (球状シリカ、金属塩、尿素) を添加して温めるだけで、シリカ-ス멕タイト複合粒子が得られる。また種々のサイズの球状シリカを用いても実現できる。さらに、原料に Li を使用しない系 (サボナイト) でも合成可能であることが見いだされた。
- II) 得られる複合粒子には種々のイオン (陽イオン性界面活性剤、色素等) との交換特性があり、溶液中でのこの反応において、粒子表面のス멕タイトは剥落しないことがわかった。球状シリカと複合化したス멕タイトの微結晶は、シリカ粒子表面と強固に接着しており、水溶液中での反応においてもハンドリング性に優れたマイクロ粒子であると期待できる。また、陽イオン性界面活性剤で疎水化したシリカ球面上のス멕タイトは、有機分子 (例：ヒノキチオール) を吸着した。シリカ球面上において、ス멕タイト微結晶をち密に成長させた疎水化粒子

では、有機分子の無極性溶媒への徐放が著しく遅延することがわかった。この方法により得られた疎水性スメクタイトは、有機溶媒中でもシリケートはほとんど膨潤・剥落しないため、ハンドリング性に優れた徐放剤として期待される素材である。

謝 辞

本研究は、コスメトロジー研究振興財団の援助を受け遂行されました。ここに記して謝意を表します。

(文献)

- 1) 日本粘土学会編：粘土ハンドブック（第3版）技報堂，2009.
- 2) Lagaly G. : Characterization of clays by organic compounds, *Clay Miner.*, **16**, 1-21, 1981.
- 3) 岡田友彦，：層状化合物への吸着量，日本油化学会編：油脂・脂質・界面活性剤データブック，丸善出版，2012, 376-378 頁.
- 4) Okada T, Ide Y, Ogawa M. : Organic-Inorganic Hybrids Based on Ultrathin Oxide Layers -Designed Nanostructures for Molecular Recognition, *Chem.-Asian J.*, **7**, 1980-1992, 2012.
- 5) Okada T, Seki Y, Ogawa M. : Designed Nanostructures of Clay for Controlled Adsorption of Organic Compounds, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **14**, 2135-2147, 2014.
- 6) 小川誠，岡田友彦，：吸着剤から検出へ，小川誠監修，機能性粘土素材の最新動向，シーエムシー出版，2010, 193-206 頁.
- 7) 小川誠，岡田友彦，：無機層状化合物を用いた分子認識，笹井亮，高木克彦監修，革新機能材料の開発と応用展開，シーエムシー出版，2012, 122-138 頁.
- 8) Okada T, Ogawa M. : 1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium-smectites as a novel adsorbent of phenols from water through charge-transfer interactions, *Chem. Commun.*, 2003, 1378-1379.
- 9) Okada T, Matsutomo T, Ogawa M. : Nanospace engineering in methylviologen modified hectorite-like layered silicates with varied layer charge density for the adsorbents design, *J. Phys. Chem. C*, **114**, 2010, 539-545.
- 10) Okada T, Watanabe Y, Ogawa M. : Photocontrol of the adsorption behavior of phenol for azobenzene-montmorillonite intercalation compound, *Chem. Commun.*, 2004, 320-321.
- 11) Okada T, Watanabe Y, Ogawa M. : Photoregulation of adsorption behavior of phenol for azobenzene-clay intercalation compounds, *J. Mater. Chem.*, **15**, 2005, 987-992.
- 12) Yamada H., Nakazawa H, Ito E, Cooling rate dependency of the formation of smectite crystals from a high-pressure and high-temperature hydrous melt, *Clays Clay Miner.*, **43**, 693-696, 1995.
- 13) Klopogge J T, Komarneni S, Amonette JE. : Synthesis of smectite clay minerals: a critical review, *Clays Clay Miner.*, **47**, 529-554, 1999.
- 14) Okada T, Yoshido S, Miura H, Yamakami T, Sakai T, Mishima S. : Swellable microsphere of a layered silicate produced by using monodispersed silica particles. *J. Phys. Chem. C*, **116**, 21864-21869, 2012.
- 15) Ogawa M, Matsutomo T., Okada T. : Preparation of hectorite-like swelling silicate with controlled layer charge density, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **116**, 1309-1313, 2008.
- 16) Suzuki A, Yoshido S, Okada T, Mishima S : Expandable microsphere of a layered silicate produced by using monodispersed silica particles, *Proc. 17th International Symposium on Intercalation Compounds (MCIC2013)*, 46-47, 2013;
- 17) 鈴木飛鳥，ほか3名，犠牲鋳型法で単分散球状シリカ微粒子に被覆したヘクトライトの陽イオン交換特性，第26回日本セラミックス協会秋季シンポジウム講演要旨集，2A18, 2013.
- 18) 鈴木飛鳥，ほか3名，犠牲鋳型法で合成した層状ケイ酸塩-シリカコアシェル粒子への陽イオン性色素の吸着，第32回固体表面光化学討論会講演要旨集，115, 2013.
- 19) 鈴木飛鳥，ほか3名，単分散球状シリカへの層状ケイ酸塩による被覆に及ぼすシリカ粒子径の影響，第94日本化学会春季年会講演要旨集，3E5-35, 2014.
- 20) 末吉 舞，ほか3名，球状シリカ微粒子と Al 含有層状ケイ酸塩との複合化，第94日本化学会春季年会講演要旨集，2PA-095, 2014.
- 21) 末吉 舞，ほか3名，サポナイト様層状ケイ酸塩と球状シリカ粒子との複合化，第58回粘土科学討論会講演要旨集，B5, 2014.
- 22) Klopogge J T, Breulelaar J, Jansen J B H, Geus J W: Development of ammonium-saponites from gels with variable ammonium concentration and water content at low temperature. *Clays Clay Miner.*, **41**, 103-110, 1993.

新規リン酸亜鉛白色顔料の粒子サイズ制御

京都府立大学大学院生命環境科学研究科

斧 田 宏 明

Zinc oxide that has the photocatalytic activity is used as white pigment for cosmetics. A certain degree of sebum on the skin is decomposed by the ultraviolet irradiation in sunlight. Recently, as a white pigment, zinc phosphates were prepared from zinc nitrate and phosphoric acid. These zinc phosphates indicated large particles in size for cosmetics. Generally, the kinds of raw materials in preparation process have influence on the chemical composition and powder properties of materials. Therefore in this work, zinc phosphates were prepared from sodium di-hydrogen phosphate and zinc nitrate, and from sodium triphosphate and zinc nitrate. Further, the obtained phosphates were treated with ball-mill to obtain small particles. These zinc phosphates had less photocatalytic activity, therefore, these materials are expected not to decompose the sebum on the skin. Samples treated with ball-mill had smaller particles than un-milled sample.

1. 緒 言

現在化粧品用白色顔料として用いられている酸化チタンや酸化亜鉛は光触媒活性を有しており、紫外線を含む日光に当たると皮脂を分解する¹⁾。そのため、酸化ケイ素によるコーティングなどが行われているが、光触媒活性は残っており、完全に抑制できていない。肌に塗布した時の危険性については様々な報告があるが、その中には酸化チタンや酸化亜鉛は皮膚内に取り込まれること、RNAやDNAの一部を分解すること、皮膚がんの要因になることなどの報告がある²⁻⁴⁾。これらのことを踏まえ、酸化チタンや酸化亜鉛の安全性に疑問符がつけられている⁵⁾。以上の事柄は、程度の問題はあるが、白色顔料を含んだ化粧品の塗布が危険性をもっていることを示しており、安全な代替物質が求められている。そこで、私の研究室では、酸化チタン、酸化亜鉛に替わる新規白色顔料として、光触媒活性を持たないリン酸チタン⁶⁾やリン酸亜鉛⁷⁾白色顔料について検討している。物性を少し改善するのであれば、試料作製後の改質などによって対応可能であるが、本質的に光触媒活性を有しない白色顔料を得るためには、これまで利用されてこなかった化合物を開拓していくことが必要である。リン酸塩は生体親和性を有しており、水を含有しやすい、保水性も期待できる素材である。これまでリン酸亜鉛の作製を行ってきたところ、光触媒活性をもたないが、粒子サイズが10 μm 以上となる粒子を多く含んでいた。一般に、試料作製時の原料を変化させることにより、生成物の組成や粒

子形状に影響が現れることがある。また、機械的な粉碎処理を行うことによる粒子の微細化は一般的によく行われている⁸⁾。そこで本研究では、リン源としてこれまで用いていたリン酸に替えてリン酸一ナトリウムあるいはトリリン酸ナトリウムを用いてリン酸亜鉛白色顔料の作製を試みた。トリリン酸ナトリウム $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ は3つのリン酸基が直鎖状に脱水縮合した縮合リン酸塩である。縮合リン酸塩は縮合していないオルソリン酸塩と異なる物性をもつことがあるため、本研究においても検討を行った。さらに、得られたリン酸亜鉛白色顔料についてボールミルを用いて微細化を試みた。

2. 実 験

2. 1. リン酸亜鉛白色顔料の作製

硝酸亜鉛水溶液とリン酸二水素一ナトリウム水溶液とを $\text{Zn/P} = 3/2$ となるように混合し、アンモニア水を用いてpH5および7に調整した。この Zn/P は $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ となるようにしたものである。得られた沈殿をろ過、乾燥することによりリン酸亜鉛試料を得た。また、比較のためにpH調整を行わない試料も作製したが、その時のpHは3.0であった。得られた試料について、X線回折法(XRD)により結晶組成を評価した。さらに試料の一部を硝酸に溶解させ、誘導結合プラズマ法(ICP)を用いて試料中のリンと亜鉛の比を算出した。試料の粒子形状は走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて評価した。また、粒子サイズは遠心沈降式粒度分布測定装置を用いて評価した。メチレンブルー分解反応を利用して、試料の光触媒活性を評価した。

2. 2. 縮合リン酸塩を用いたリン酸亜鉛白色顔料の作製

トリリン酸ナトリウムはリン酸二水素一ナトリウムとリン酸水素二ナトリウムを1:2の比で混合し、400℃で5時間加熱することにより合成した。得られたトリリン酸ナトリウムと硝酸亜鉛水溶液とを $\text{Zn/P} = 5/6$ となるように混



Particle size control of novel zinc phosphate white pigments

Hiroaki Onoda

Faculty of Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural University

合し、アンモニア水を用いてpH7に調整した。このZn/Pは $\text{Zn}_5(\text{P}_3\text{O}_{10})_2$ となるようにしたものである。得られた沈殿をろ過、乾燥することによりリン酸亜鉛試料を得た。試料は2.1.に記述した方法と同様に評価した。

2.3. リン酸亜鉛白色顔料の微細化

2.1.のpH5において作製した試料をボールミルにより12, 24, 36, 48時間処理した。ボールミル処理は、溶媒無し、水またはエタノール、乳酸ナトリウム水溶液を粉碎助剤とした場合について検討した。乳酸ナトリウム水溶液は、水と70%乳酸ナトリウムを体積比で9:1, 7:3, 5:5で混合した溶液を用いた。試料は2.1.に記述した方法と同様に評価した。

3. 結果および考察

3.1. リン酸亜鉛白色顔料の作製

リン酸二水素一ナトリウムを原料として用い、それぞれのpHにおいて作製した試料のXRDの結果をFig. 1に示す。全ての試料がリン酸亜鉛四水和物 $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ のピークパターンを示した。また、ICPの結果では全ての試料のZn/P比が1.5付近であった。このことから試料の主成分がリン酸亜鉛四水和物であることが確認できた。pH5で作製した試料は最もピーク強度が強く、結晶が成長していることが分かる。弱酸性であるpH5で作製した試料が最も結晶性が良いことは、化粧品用顔料として適している。以前に検討を行ったリン酸チタンはアモルファスとなり、XRDによる結晶組成確認ができなかったことに比べると、リン酸亜鉛は結晶組成確認ができるため工業的に利

用しやすい。

Fig. 2にはpH5で作製した試料と酸化亜鉛の紫外可視反射スペクトルを示す。酸化亜鉛は可視領域において高い反射率を示すものの、紫外光領域では低い反射率となっている。一方、本研究で作製したリン酸亜鉛白色顔料は、紫外領域でも高い反射率を示していた。このことは紫外線から皮膚をまもるための顔料として非常に有用である。

Fig. 3にメチレンブルーの分解反応を利用した試料の光触媒活性を示す。縦軸は吸光度から評価したメチレンブルー

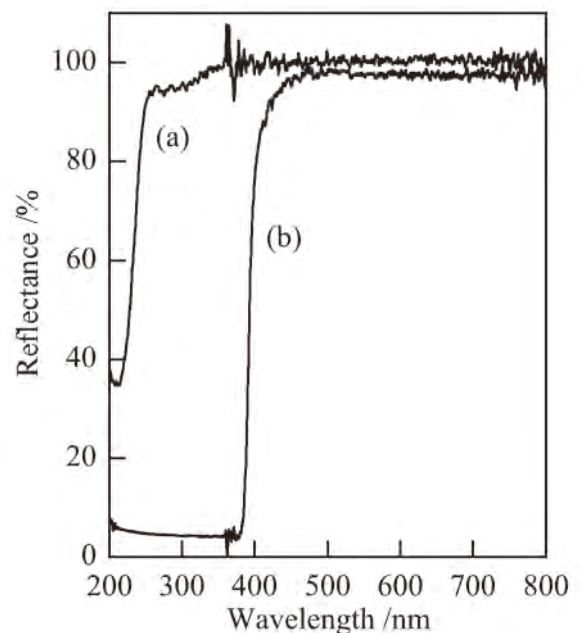


Fig. 2 UV-Vis reflectance spectra of sample prepared at pH5 (a) and ZnO (b).

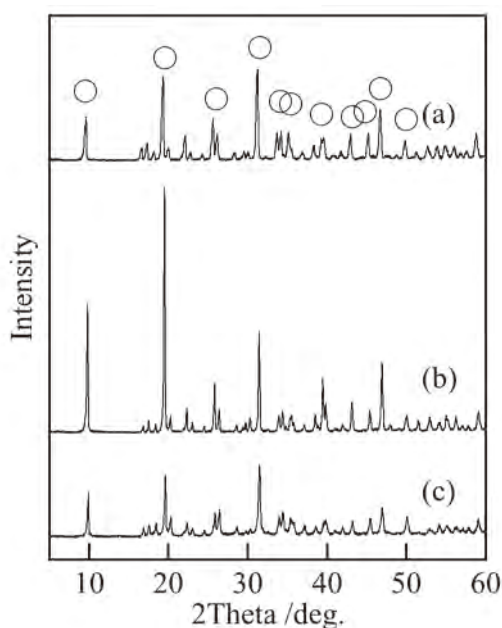


Fig. 1 XRD patterns of samples prepared at various pH, (a) 3, (b) 5, and (c) 7, ○; $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

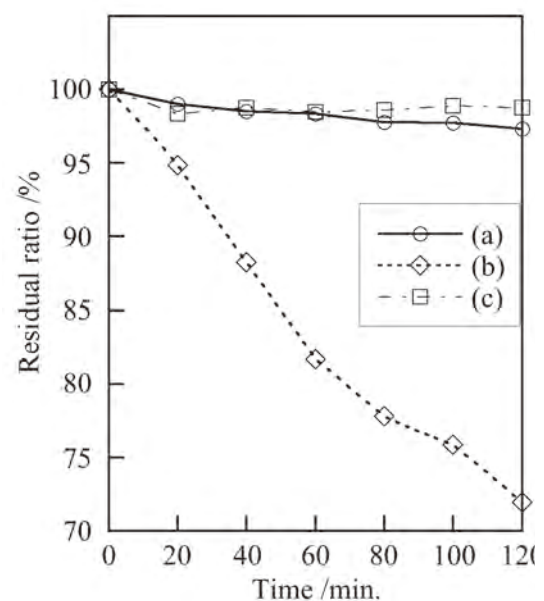


Fig. 3 Photocatalytic activity of sample prepared at pH 5, (a) blank, (b) ZnO, (c) sample.

一の残存率となっており、紫外線照射によって残存率が低下すると光触媒活性があるということになる。酸化亜鉛を用いた場合ではメチレンブルーの残存率が70%近くまで低下しており光触媒活性を有していることが分かるが、リン酸亜鉛試料では残存率が低下しておらず光触媒活性を有していないことが分かる。Fig. 3では代表的な試料についてのみ示しているが、本研究で作製した全ての試料が光触媒活性を有していなかった。このことは肌に塗布して紫外線に当たっても皮脂を分解しない白色顔料として用いることができることを示している。

3. 2. 縮合リン酸塩を用いたリン酸亜鉛白色顔料の作製

トリリン酸ナトリウムを原料とした試料はunknownのXRDピークパターンを示した。これは $Zn_5(P_3O_{10})_2$ のデータベースが存在しないことによると考えられる。試料を少量溶かし、ICPにより分析すると、Zn/P比は0.83であることが分かった。この値は理論比であるZn/P = 5/6と一致しており、調製比通りの試料が得られていると考えられ

た。SEM像では、トリリン酸を原料とした試料は凝集体を形成しており、粒度分布では10 μm 以上の大きな粒子が多く存在していた。紫外可視反射スペクトルを測定すると、紫外線領域も反射しており、オルソリン酸塩を原料とした試料と違いが見られなかった。また、メチレンブルーを用いた光触媒活性の評価において、トリリン酸ナトリウムを原料とした白色顔料は光触媒活性をもたないことが確認できた。本項目で扱ったトリリン酸ナトリウムを原料としたリン酸塩白色顔料はその組成評価などにおいて更なる検討が必要であり、また、凝集体を形成しやすい性質があることは新規白色顔料として適しておらず、改善方法が求められる。

3. 3. リン酸亜鉛白色顔料の微細化

3. 1. においてリン酸二水素ナトリウムと硝酸亜鉛を原料としたリン酸亜鉛について述べてきたが、粒子サイズが大きいという欠点があるため、ボールミルによる粉碎処理を行うことにした。Fig. 4にボールミルにより処理した

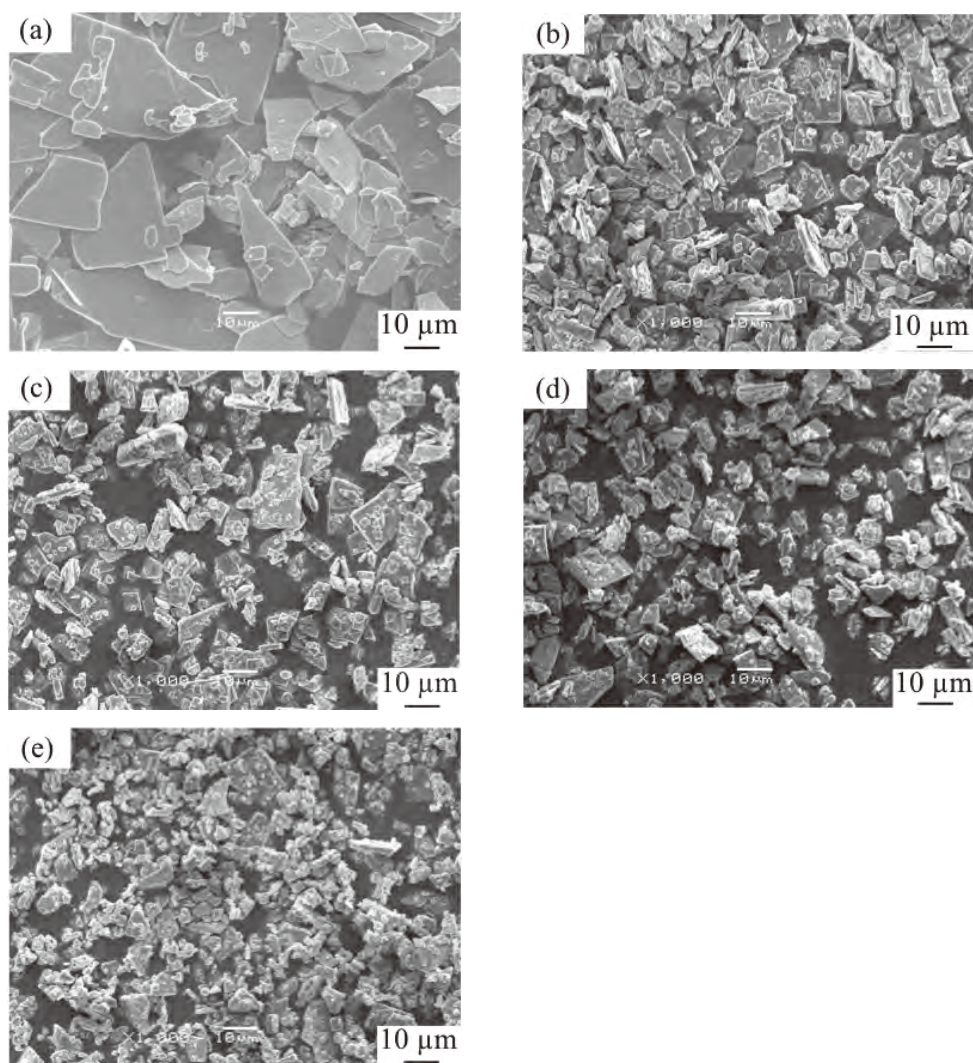


Fig. 4 SEM images of samples treated for several hours (without milling media) , (a) 0, (b) 12, (c) 24, (d) 36, and (e) 48 hours.

リン酸亜鉛のSEM像を示す。ミル処理を行う前の試料では大きな板状粒子が観察できる。一方、ミル処理を行った試料では粒子が小さくなっており、36時間処理した試料では板状粒子がほとんど見られなくなった。粒度分布の結果においても、ミル処理により粒子サイズが小さくなっていることが確認できた。本研究ではさらに粉碎助剤として水やエタノールを用いてミル処理を行った。その結果、水を溶媒に用いると、12時間処理の試料において10 μ m以下の粒子を多く含むのに対し、エタノールを溶媒とした場合では、10 μ m以下の粒子が少なかった。また、高濃度の乳酸ナトリウム水溶液を粉碎助剤として用いることにより、単分散に近い3 μ m以下の小さな粒子サイズをもつ顔料を得ることができた。

4. 総 括

本研究では、硝酸亜鉛とリン酸二水素一ナトリウムおよびトリリン酸ナトリウムを原料としてリン酸亜鉛白色顔料を得た。この白色顔料は、紫外線照射時の光触媒活性をもたず、近紫外領域の光を反射することが分かった。作製時点の顔料は板状の大きな粒子形状となっていたが、ミル処理することにより小さな粒子となることが分かった。さらに、粉碎助剤として、高濃度の乳酸ナトリウム水溶液を用いることにより、単分散に近い小さな粒子サイズをもつ顔料を得ることができた。

謝 辞

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

(引用文献)

- 1) Diebold U., The surface science of titanium dioxide, *Surface Science Report*, **48**, 53-229 (2003).
- 2) Bennat C., Muller-Goymann C. C., Skin penetration and stabilization of formulations containing microfine titanium dioxide as physical UV filter, *Intern. J. Cosmetic Sci.*, **22**, 271-283 (2000).
- 3) Hidaka H., Horikishi S., Serpone N., Knowland J., In vitro photochemical damage to DNA, RNA and their bases by an inorganic sunscreen agent on exposure to UVA and UVB radiation, *J. Photochem. Photobiology, A*, **111**, 205-213 (1997).
- 4) Dunford R., Salinaro A., Cai L., Serpone N., Horikoshi S., Hidaka H., Knowland J., Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients, *FEBS Letters*, **418**, 87-90, (1997).
- 5) Skocaj M., Filipic M., Petkovic J., Novak S., Titanium dioxide in our everyday life; is it safe?, *Radiol Oncol*, **45**, 227-247 (2011).
- 6) Onoda H., Yamaguchi T., Influence of ultrasonic treatment on preparation and powder properties of titanium phosphates, *J. Mater. Chem.*, **22 (37)**, 19826-19830 (2012).
- 7) Onoda H., Haruki M., Toyama T., Preparation and powder properties of zinc phosphates with additives, *Ceram. Intern.*, **40 (2)**, 3433-3438 (2014).
- 8) Taufiq-Yap Y. H., Goh C. K., Hutchings G. J., Dummer N., Bartley J. K., Influence of milling media on the physicochemicals and catalytic properties of mechanochemical treated vanadium phosphate, *Catal. Lett.*, **141 (3)**, 400-407 (2011).

紫外線カットマイクロカプセルの作製

横浜国立大学大学院工学研究院

金井 俊光

Protection reagents against ultraviolet lights based on the Bragg reflection at the optical stop band of colloidal photonic crystals were examined. We found that the colloidal crystals composed of monodisperse polystyrene particles with the particle diameter of 160 nm could reflect the lights below the wavelength of 400 nm. In addition, we examined a method for preparation of microcapsules with the colloidal crystal shells by microfluidic techniques.

1. 緒言

太陽光に含まれる有害な紫外線から身を守るために、サンスクリーン剤が開発され、使用されている。現在のサンスクリーン剤には、一般的にオクトクリレンに代表される有機系物質と、酸化チタン、酸化亜鉛などの無機系ナノ粒子が含まれており、これらの物質が太陽からの紫外線を主に吸収することにより防御している。しかしながら有機系紫外線吸収剤は紫外線を吸収すると同時に分解する性質があり、時間とともに紫外線吸収能力は低下する。さらに有機系吸収剤はアレルギーを引き起こすことがあり、乳幼児や敏感肌には適さないことがある。実際、乳幼児向けに有機系吸収剤を含まない無機系みのサンスクリーン剤も市販されているが、SPF (Sun Protection Factor) の値が小さく、また無機系ナノ粒子は皮膚の油分を吸収する性質があるため、肌が乾燥しやすく、やはり乳幼児や敏感肌には適さない場合がある。さらに最近、ナノ粒子 (粒径 50 nm 程度以下) については、人への有害影響を懸念させる研究報告が次々と発表されている。例えば、マウスを用いた実験では脳細胞や肝細胞を損傷するなどの報告もなされており、ナノ粒子の使用には不安が残る。

防御すべき紫外線には、波長域 280 ~ 320 nm の UV-B と波長域 320 ~ 400 nm の UV-A がある。かつてはエネルギーの大きい UV-B の防御が主であったが、近年、UV-A 防御の重要性が指摘されている。波長の長い UV-A はエネルギーは小さいものの肌の深部にまで到達でき、長時間浴び続けると硬く深いしわやたるみができる光老化を誘発する。さらに深刻になると皮膚がんに至ることがわかっている。これまでのサンスクリーン剤の開発は主に有機

系紫外線吸収剤が対象であり、高い紫外線吸収能力を有し、かつ分解されにくい新しい物質開発が進められている。しかしながら特に UV-A を防御する安定で安全性の高い有機系紫外線吸収剤の開発は難しく、さらに仮に新物質を開発したとしても、最終的に厚生労働省の認可が下りるには少なくとも十数年はかかるといわれており、そのハードルは高いのが現状である。

そこで本研究では、これまでほとんど検討されていない反射による紫外線防御方法について検討し、紫外線吸収剤の含有量をできる限り低減させた安心、安全なサンスクリーン剤の開発を行うことを目的とした。具体的には、従来行われているカプセル化技術を発展させ、カプセルのシェル部分に紫外線を反射する機能を持たせることを検討する。カプセル表面で自然と起こる光散乱による弱い紫外線カットの効果はよく知られているが、積極的に紫外線をカットする機能をカプセルに付与させた報告例はない。本研究ではシェル材料として我々がこれまで研究を行っているコロイドフォトリック結晶¹⁾の光学ストップバンドで起こるブラッグ反射による強い反射を利用することを検討した。コロイドフォトリック結晶は可視光領域にストップバンドを持つように設計するのが一般的であるが、本研究ではより小さな粒径のコロイド粒子を用いることにより、紫外光、特に UV-A 光をカットできる結晶を作製する。これにより紫外線により劣化しにくい安全性の高い紫外線防御材の開発を行うことを試みた。

2. 実験

2.1. UV-A 領域 (320 ~ 400nm) に光学ストップバンドを持つコロイド結晶の設計・作製

一般的にこれまでのコロイドフォトリック結晶は、ディスプレイや光通信デバイスへの応用を目指して、可視光や赤外光領域に光学ストップバンドを持つように設計・作製されている。本研究では、UV-A 領域 (320 ~ 400nm) の紫外光をカットするため、UV-A 領域に光学ストップバンドを持つコロイド結晶を設計し、実際にコロイド結晶を作製した。コロイド結晶の粒子配列は、最密結晶面が界面



Preparation of ultraviolet lights protective microcapsules

Toshimitsu Kanai

Faculty of Engineering, Yokohama National University

に対して平行に配列する場合が最もエネルギー的に安定であり、今回、最密結晶面に起因する光学ストップバンド波長の計算を行った。図1には、ポリスチレン微粒子からなるコロイド結晶について計算した最密結晶面に起因する光学ストップバンド波長の粒子直径依存性を示す。この図より320～400nmに光学ストップバンドを持つためには、直径140～170nm程度の粒子を用いる必要がある。そこで、本研究では直径160nmのポリスチレン微粒子(ThermoFisher Sci. 製)を用いてコロイド結晶を作製し、紫外線反射特性を評価した。

2. 2. 大きさ10 μm のマイクロカプセル形成用マイクロ流体デバイスの作製

我々はこれまでマイクロ流体デバイスを用いてコロイド結晶をシェルに持つ数百 μm 程度の単分散マイクロカプセルの作製に成功している²⁾。本研究では流路の内径を小さくすることにより、大きさ10 μm 程度の微小な単分散マイクロカプセルの作製を試みた。マイクロピペットプラーやマイクロフォージを用いて、ガラスキャピラリーの内径が1～5 μm 程度になるようにテーパ加工し、キャピラリーを組み合わせてデバイスを作製した³⁾。

2. 3. 大きさ10 μm のコロイド結晶シェルマイクロカプセルの作製

作製したダブルエマルション形成用マイクロ流体デバイスに、各相を流入させ、コロイド結晶をシェルに持つマイクロカプセルの作製を試みた。内側流路からコアとなるシリコンオイルを流入させ、中間流路からシェルとなる直径160nmのポリスチレン微粒子の水分散液を流入させた。連続相としてシリコンオイルを用い、外側流路からデバイスに流入させた。水相・油相界面を安定化させるため、シェル相と連続相には界面活性剤を添加した。3液体の流量をシリンジポンプを用いて制御して流入させることで、シリコンオイルコア・コロイド分散液シェルからなるマイクロカプセルを作製した。その後、コロイド分散液内の水分を蒸発させることでコロイド結晶化させ、コロイド結晶をシェルに持つマイクロカプセルの作製を試みた。

3. 結果と考察

3. 1. UV-A領域(320～400nm)に光学ストップバンドを持つコロイド結晶の設計・作製

図2には、直径160nmのポリスチレン微粒子を用いて作製したコロイド結晶の垂直反射スペクトルを示す。約370nmに半値幅約20nmの反射ピークが現れ、計算通りのコロイド結晶が得られることを確認した。

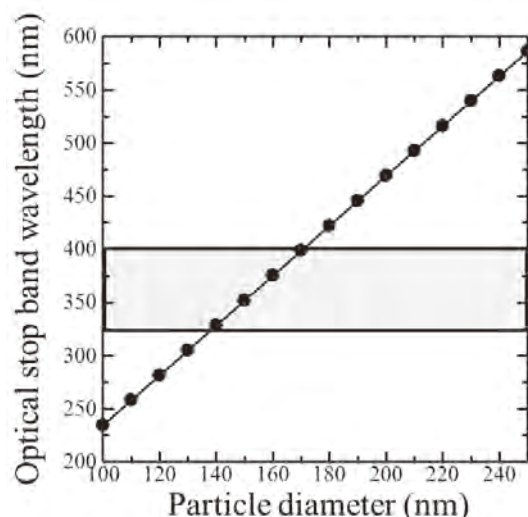


図1 ポリスチレン粒子からなるコロイド結晶における光学ストップバンド波長の粒子直径依存性

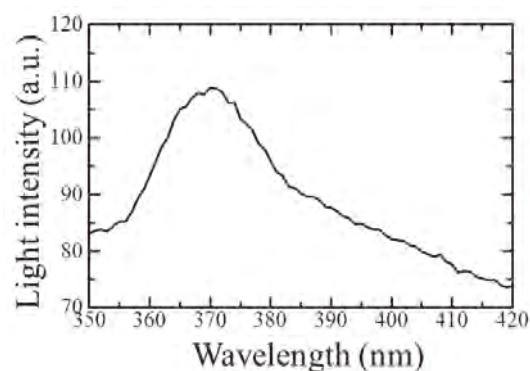


図2 直径160nmのポリスチレン微粒子からなるコロイド結晶の垂直反射スペクトル

3. 2. 大きさ10 μm のマイクロカプセル形成用マイクロ流体デバイスの作製

マイクロピペットプラーによりガラスキャピラリーを引き伸ばし、さらにマイクロフォージを用いて慎重に流路内径を調整した。試行錯誤の結果、3 μm の内径を持つ流路を作製できるようになった。図3にはこのキャピラリーを用いたマイクロ流体デバイスによるドロップ形成過程の写真を示す。分散相、連続相の流速条件を検討することにより最小で直径5 μm 程度の単分散ドロップが作製できた。

3. 3. 大きさ10 μm のコロイド結晶シェルマイクロカプセルの作製

まずカプセルに内包する油滴の作製を試みた。上述のデバイスを用いて内側流路からシリコンオイルを、外側流路から界面活性剤(2%、Tween20)を添加した超純水を流入させた。2液体の流量を調整することにより、油滴の大きさを制御することができた。特に外側流路の流量を上げることによって油滴サイズを小さくでき、最終的には図4に示す

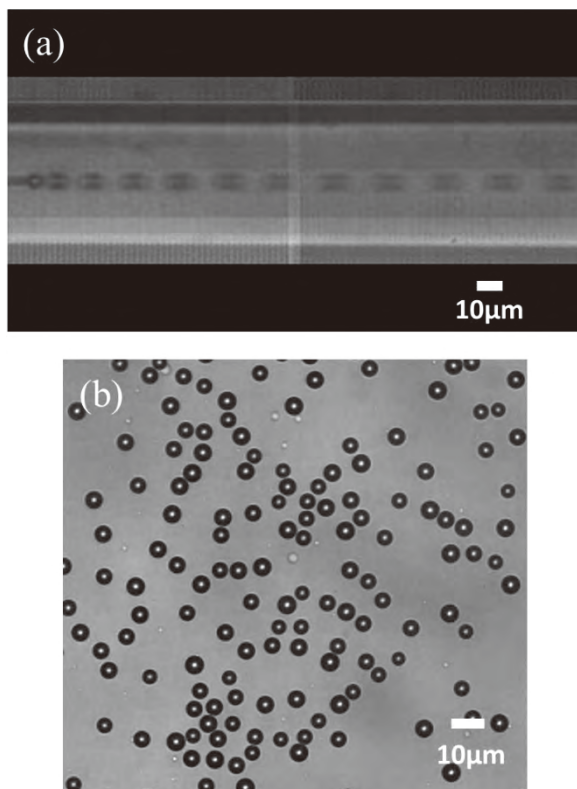


図3 (a) デバイス内での単分散ドロップ形成過程の写真、(b) 得られた単分散ドロップの写真

ように、直径 $6\mu\text{m}$ 、CV 値 6.5% の単分散油滴を得ることができた。

次にシェル部分となるコロイド結晶の作製について検討した。まず直径 160 nm のポリスチレン微粒子の水分散液を超純水で希釈し、0.08 vol% とした。これをマイクロ流体デバイスの内側流路から流入させ、外側流路から界面活性剤 (2%, DC-749) を添加したシリコンオイルを流入させた。2 液体の流量を調整することにより、図 5 (a) のように直径約 $100\mu\text{m}$ の水滴が形成できた。その後、水分を蒸発させ乾燥することでコロイド結晶化が可能であった。その結果、図 5 (b) に示すように直径 $5\mu\text{m}$ 程度のコロイド結晶が作製できた。

上述の油滴とコロイド結晶の作製を 1 つのダブルエマルジョン形成用デバイス内で行うことで、油滴コア・コロイド結晶シェルからなる直径 $10\mu\text{m}$ 以下の単分散マイクロカプセルの作製を試みた。内側流路からコアとなるシリコンオイルを、中間流路からシェルとなるコロイド水分散液を、外側流路からシリコンオイルを流入させた。3 液体の流量を調整することでコア油滴がコロイド液滴に内包されたカプセルを形成できた。しかしながら、流路途中でコア油滴がシェルから抜け出てしまい、油滴を内包した安定なマイクロカプセルの作製には至らなかった。コア油滴を安定してカプセル内に閉じ込めるためには、シェル相内

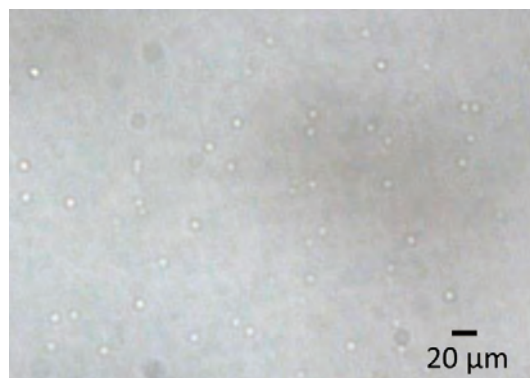


図4 マイクロ流体デバイスにより得られた単分散油滴の写真

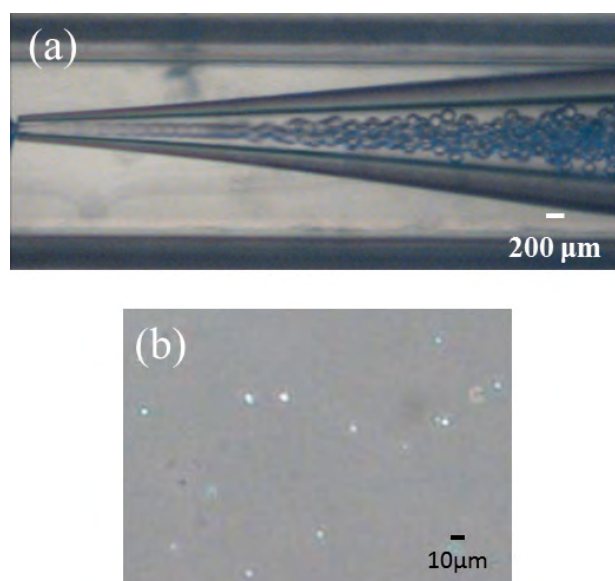


図5 (a) コロイド粒子水分散液の液滴形成過程の写真、(b) 乾燥後のコロイド結晶の写真

の界面活性剤濃度を増加させる必要がある。しかしそれによりシェル相の安定性が悪くなり、有効な界面活性剤の種類と濃度が決定できなかった。我々は以前、数百 μm 程度の単分散マイクロカプセルの作製に成功しているが、今回の実験とは適切な界面活性剤濃度が異なっていると考えられ、最適な作製条件を見い出す必要がある。

以上のように、本研究では直径 160 nm のポリスチレン微粒子からなるコロイド結晶により、UV-A 領域の紫外光をカットできることを示した。また内径 $3\mu\text{m}$ の流路を持つガラスキャピラリー型デバイスの作製に成功し、直径 $6\mu\text{m}$ 、CV 値 6.5% の単分散油滴を作製できることを示した。さらに希釈したコロイド分散液をデバイス内に流動させ、液滴形成後、乾燥によりコロイド結晶化できることを示した。しかしながらコロイド結晶シェル内に油滴を安定に内包することはできなかった。当初の目的であったコロイド結晶をシェルに持つマイクロカプセルの作製には至ら

なかったが、界面活性剤の選択や濃度調整、またグリセリン添加による粘度増加により、油滴を安定化できる可能性がある。またカプセル形状以外にも球形や板状でもUV-Aカット材料としては機能すると考えられ、今後はこれらの紫外線カット粒子の開発も行いたいと考えている。

4. 総 括

サンスクリーン剤は人体に有害な紫外線から身を守るものであるが、そのために人体に悪影響を与える可能性のある物質を用いるのは、本末転倒である。本研究課題は、これまで開発されていない反射による紫外線防御方法を検討した。カプセル化には課題が残ったが、コロイドフォトリック結晶を用いてUV-A光をカットできることは明らかになった。そのため、本結晶はUV-Aカット材料として機能すると考えられ、今後は内包物質の安定化やカプセル

以外の形状の紫外線カット粒子の開発を行いたいと考えている。

(引用文献)

- 1) Kanai, T., Sawada, T., Toyotama, A., Kitamura, K.: Air-Pulse-Drive Fabrication of Photonic Crystal Films of Colloids with High Spectral Quality, *Adv. Funct. Mater.*, 15, 25-29, 2005.
- 2) Kanai, T., Lee, D., Shum, H. C., Shah, R. K., Weitz, D. A.: Gel-Immobilized Colloidal Crystal Shell with Enhanced Thermal Sensitivity at Photonic Wavelengths, *Adv. Mater.*, 22, 4998-5002, 2010.
- 3) Kanai, T., Lee, D., Shum, H. C., Weitz, D. A.: Fabrication of Tunable Spherical Colloidal Crystals Immobilized in Soft Hydrogels, *Small*, 6, 807-810, 2010.

加熱加水分解法を用いた紫外線吸収能を有するカルシウムヒドロキシアパタイト粒子の新規調製法の開発とそのキャラクタリゼーション

大阪教育大学教育学部

神 鳥 和 彦

Ti and Ce ions doped calcium hydroxyapatite (TiHap and CeHap) particles were produced by aging $\text{Ca}(\text{OH})_2$, TiCl_4 (or CeCl_3) and sodium triphosphate (sodium tripolyphosphate, Natpp: $\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_{10}$) mixed solution at 100°C for 18 h. The ellipsoidal secondary particles with ca. 100~150 nm in length composing by aggregation of small ellipsoidal primary particles with ca. 20 nm in length were produced at atomic ratio of $\text{Ti}/(\text{Ca}+\text{Ti})$ [$X_{\text{Ti}} \leq 0.2$]. The *in-situ* IR spectra of these TiHap particles exhibited very small bulk OH^- band at 3570 cm^{-1} . This result indicated that the TiHap particles were produced by aggregation mechanism and OH^- ions along with *c*-axis in the poorly crystallized primary particles were disordered. The diffuse reflectance UV spectra of TiHap particles revealed that these particles have a UV absorption property, especially produced at $X_{\text{Ti}}=0.1$. The morphology of the particles produced with CeCl_3 was changed to rod-like with ca. 50~100 nm in width and 100~300 nm in length at $0.1 \leq X_{\text{Ce}} \leq 0.2$. Furthermore, particle shape varied to needle-like at $0.4 \leq X_{\text{Ce}} \leq 0.8$ and finally fine spherical particles with 5~10 nm in diameter were precipitated at $X_{\text{Ce}}=1.0$. The XRD patterns of the particles indicated that highly crystallized pure CeHap particles are produced at $X_{\text{Ce}} \leq 0.2$. On the contrary, the needle-like and very fine spherical particles precipitated at $X_{\text{Ce}}=0.4\sim 1.0$ were identified as CePO_4 . The time resolved TEM and XRD measurements suggested that the rod-like large CeHap particles are produced by the Ostwald ripening mechanism. The diffuse reflectance UV measurement indicated that CeHap particles have a UV absorption property, especially produced at $X_{\text{Ce}}=0.15$.

1. 緒 言

我々はこれまでに、単分散コロイド粒子は非常に微細なクラスター粒子が集合して生成する、いわゆる凝集機構によることを明らかにしてきた¹⁻²⁾。そこで、このように微細な一次粒子の凝集速度をコントロール出来れば、得られる粒子の形態と大きさを任意にコントロールすることが出来るものと期待される。今回取り上げる無機粒子は金属リン酸塩の1つであるリン酸カルシウムで、生体親和性の高い物質として古くから知られているカルシウムヒドロキシアパタイト (CaHap) である。これは人工骨、人工歯根等の他に触媒あるいは吸着剤などに使われているバイオセラミックスである。近年我々は、Tiや軽ならびに重希土類元素をドーブしたCaHap粒子の調製に成功し、これが強い紫外線吸収能を有することを見出している³⁻⁵⁾。しかし、それらの粒子の合成はオルトリン酸またはオルトリン酸塩をリン酸源として用いてきたため、反応速度が大変速く、凝集機構による粒子のモルフォロジーを制御する事は出来なかった。今回、縮合リン酸塩の加熱加水分解法を用いて、反応速度を制御し形態を制御したTiやCeをドーブした紫外線吸収能を有し生体に優しいCaHap白色顔料粒子の合

成を目指した。

2. 実 験

今回はドーブする元素としてTiならびにCeを検討した。粒子の調製は、 Ca^{2+} と Ti^{4+} を総量10mM、原子比 $X_{\text{Ti}}=\text{Ti}/(\text{Ca}+\text{Ti})=0\sim 1.0$ になるように $\text{Ca}(\text{OH})_2$ と TiCl_4 を脱炭酸水に溶解し、さらにトリポリリン酸ナトリウム (NaTPP; $\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$: 以下TPPと略記する) の濃度が1mMになるように調整した水溶液20mLを、テフロンキャップ付き試験管中で 100°C 、18時間熟成して行った。ここで、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 水溶液は使用前にミリポアフィルターでろ過したものを用いた。一方Ceの場合は、 CeCl_3 を用いて、 $X_{\text{Ce}}=\text{Ce}/(\text{Ca}+\text{Ce})=0\sim 1.0$ の範囲で、その他の条件はTiと同様にして行った。また、反応前後の溶液のpHを室温で測定した。得られた粒子はミリポア水で十分にろ過、洗浄を行い空气中 40°C で乾燥した。粒子のキャラクタリゼーションは、TEM、XRD、TG-DTA、FTIR、 N_2 および H_2O 分子吸着測定から行った。また粒子ならびに反応溶液中のCa, Ti, CeとPの濃度はICP-AESによって測定した。

3. 結果と考察

3. 1. Ti添加系について

Fig. 1に様々な X_{Ti} で得られた粒子のTEM写真を示した。 $X_{\text{Ti}}=0$ では前報⁶⁾と同様に約20nm程度の楕円体形一次粒子が凝集して約100nm程度の楕円体形二次粒子が得られた。 X_{Ti} の増加とともに、0.2まで一次、二次粒子の大きさは大きく変化しないものの、0.4以上では大変微細な粒子へと変化した。Fig. 1中の左下にある数字は、溶液の反応



Preparation and Characterization of Calcium Hydroxyapatite Particles with UV Absorption Property From Forced Hydrolysis Reaction

Kazuhiko Kandori

School of Chemistry, Osaka University of Education

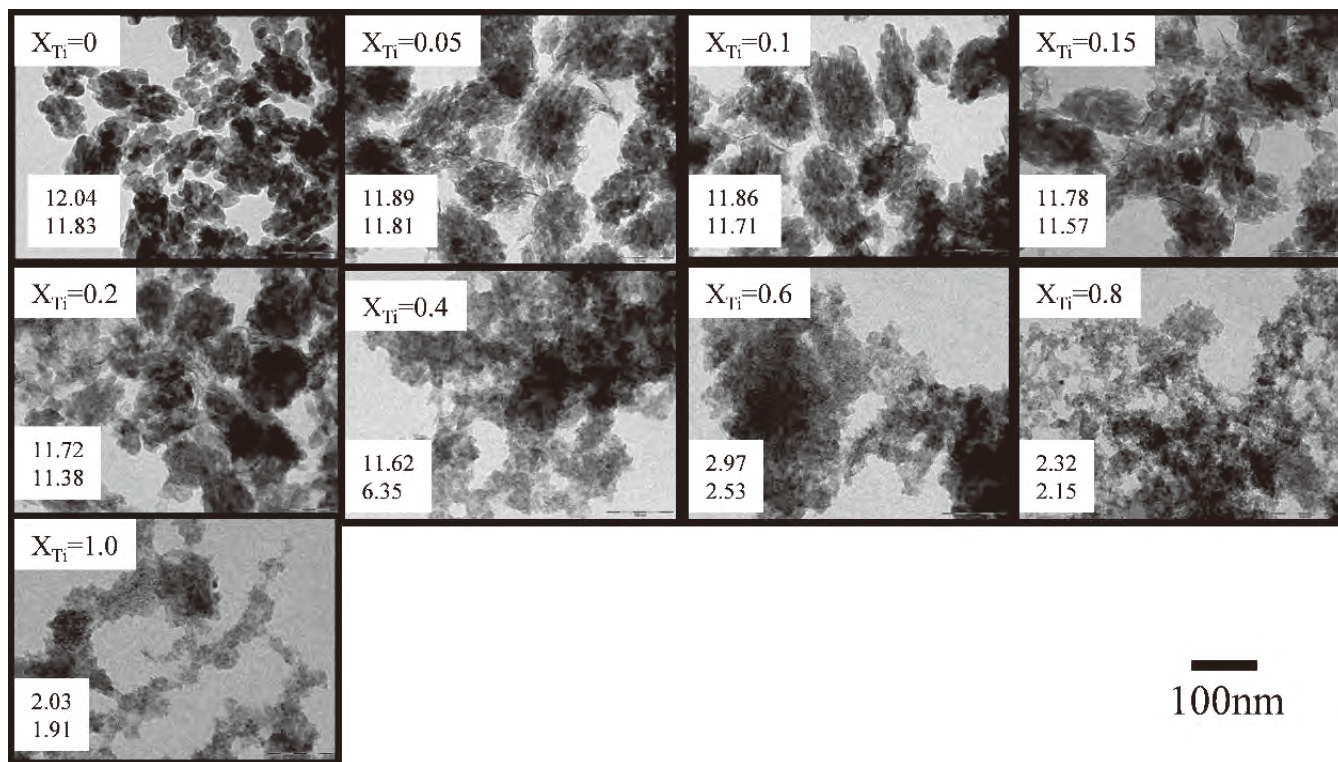


Fig. 1 TEM micrographs of the particles produced at various X_{Ti} values. The upper and lower values in the picture represent pH values before and after the reaction, respectively.

前(上段)と反応後(下段)の溶液のpHである。TPPの加水分解は以下の式(1)、(2)で表されるように、H⁺が生成する。



したがって、反応後のpHが低下していることから、TPPは加水分解したものと考えられた。Fig. 2は、X_{Ti}が0.2までの一次、二次粒子の平均短軸長と長軸長をX_{Ti}に対してプロットしたものである。TEMでも見られた様に、X_{Ti}=0.2まで大きな変化は見られず、一次粒子の凝集体であることが分かった。

Fig. 3 (a) には、様々なX_{Ti}で得られた粒子のXRDパターンを示した。X_{Ti}=0～0.4ではHapに特有な回折パターンのみが得られているが、X_{Ti}=0.4ではその強度は大変弱くなった。この結果から、X_{Ti}=0～0.4ではCaHapのCa原子の一部がTi原子に置換したチタンアパタイト(TiHap)が生成したことが分かった。また、X_{Ti}=1.0ではアナターゼ型のTiO₂の回折パターンが得られているが、その回折パターンはブロードで、粒子の結晶性は低いことが示唆された。この結果は、TEM写真で粒子が5 nm程度の非常に小さなものであることと良く対応している。X_{Ti}=0～0.2で得られたTiHap粒子について、(002)面と(300)面からScherrerの方法で結晶子径を求め、Fig. 2中に破線(△、▲)

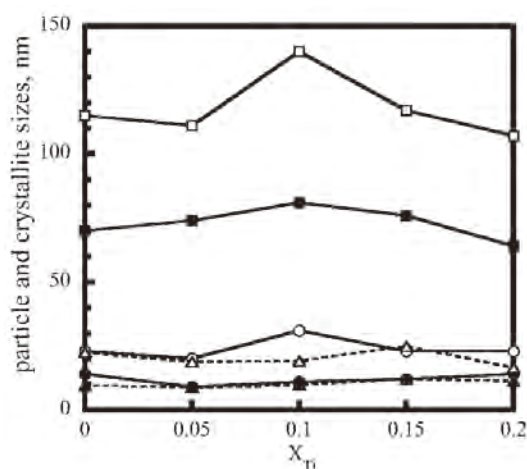


Fig. 2 Particle and crystallite sizes of the particles produced at various X_{Ti} values. The particle lengths (□, ○) and widths (■, ●), respectively. The symbols (□, ■) and (○, ●) are the results from secondary and primary particles, respectively. The crystallite sizes from (002) (△) and (300) (▲) faces are also plotted by dotted lines.

で示した。(002)、(300)面はそれぞれc軸方向、a、b軸方向を代表している。この図より、(002)、(300)面から得られた結晶子径は一次粒子の長軸長、短軸長と良く一致している。このことは、楕円体のTiHap一次粒子は単結晶であることを意味している。このことから、単結晶の一次粒子が凝集して楕円体の二次粒子となってTiHap粒子が生成していることが分かった。

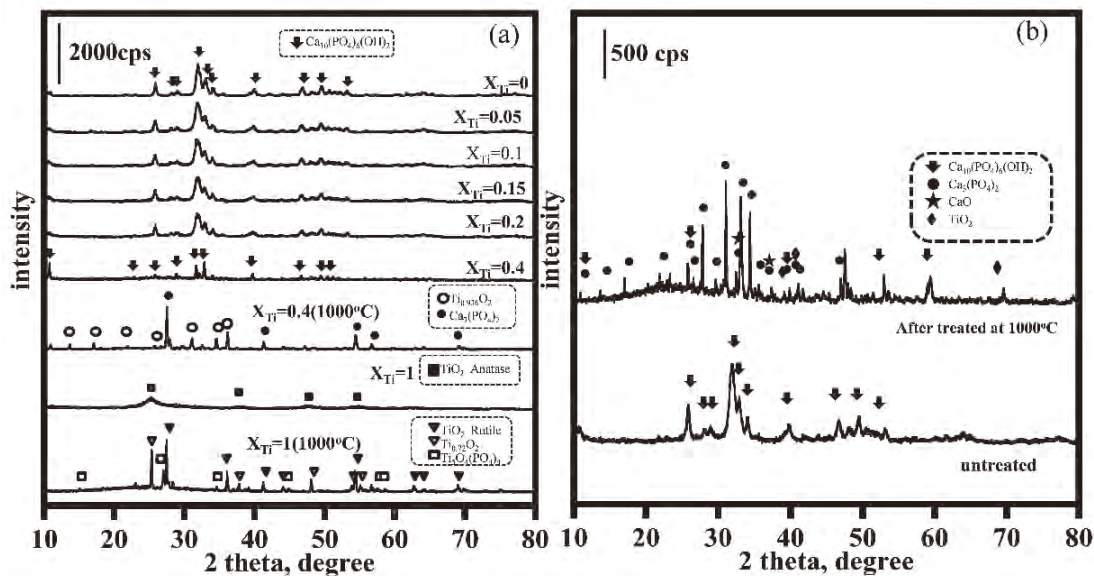


Fig. 3 (a) XRD patterns of the particles produced at various X_{Ti} values together with those after treated at 1000°C for 2h on the particles produced at $X_{Ti} = 0.4$ and 1.0. (b) XRD patterns of the particles produced at $X_{Ti} = 0.15$ before and after treated at 1000°C for 2h.

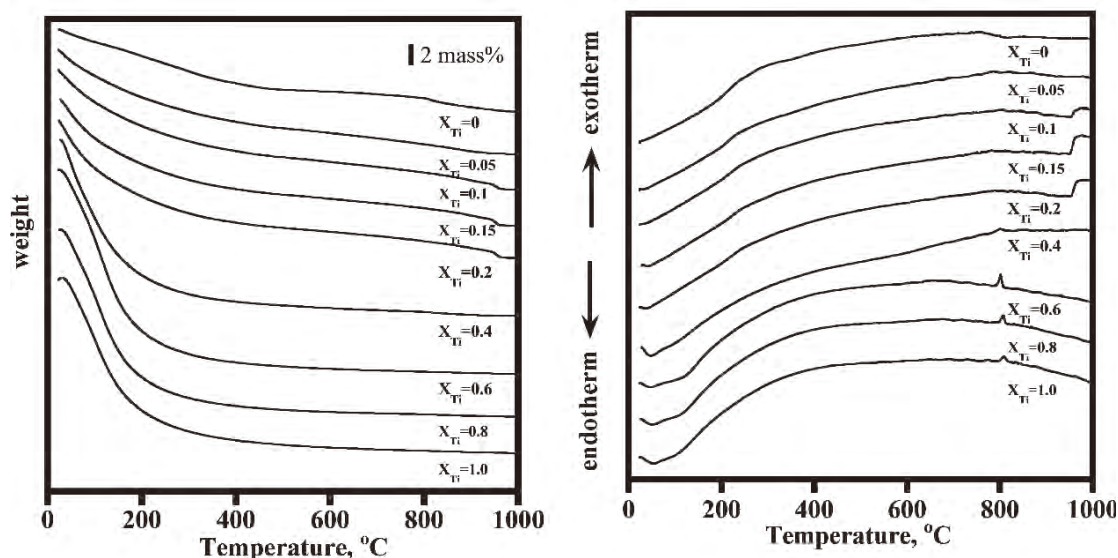


Fig. 4 TG-DTA curves of the particles produced at various X_{Ti} values.

Fig. 4 には、様々な X_{Ti} で得られた粒子の TG-DTA 曲線を示した。 $X_{Ti}=0 \sim 0.2$ の TiHap 粒子では室温から 400 °C までの結晶水・結合水の脱離による TG の減量は小さかった。また、 $X_{Ti}=0 \sim 0.05$ では 800 °C 付近から TG に減量と DTA に吸熱ピークが現れていた。一方、 $X_{Ti}=0.1 \sim 0.2$ では 950 °C に TG の減量と DTA に吸熱ピークが見られた。 Fig. 3 (b) には、 $X_{Ti}=0.15$ で得られた粒子と、さらにその粒子を 1000 °C で 2 時間処理した粒子の XRD パターンを示した。非加熱では Hap に由来するパターンのみが見られるが、加熱処理した粒子では、Hap の他に、 $Ca_3(PO_4)_2$ 、CaO、 TiO_2 のパターンが現れていた。この結果は、TiHap の主成分である CaHap において次式の反応が起こったこ

とを示唆している。



すなわち、Fig. 4 の DTA 曲線において 800 ~ 950 °C で現れた吸熱ピークは、 H_2O の脱離によるものであることが分った。 $X_{Ti}=0.4 \sim 1.0$ では、粒子の微細化にともなう 400 °C までの吸着水の脱離にともなう TG の大きな減量と 800 °C 付近に TiO_2 への結晶化にともなう発熱ピークが見られた。 Fig. 3 (a) には $X_{Ti}=0.4$ と 1.0 で得られた粒子を 1000 °C で 2 時間処理したもののパターンも示した。このように、いずれも $Ti_{0.936}O_2$ 、 $Ca_3(PO_4)_2$ 、 TiO_2 、 $Ti_{0.72}O_2$ 、 $Ti_5O_4(PO_4)_4$

等の結晶相⁸⁾が確認でき、DTAの結果と良く対応した。

Table 1 には、ICP – AESで分析した粒子中の金属元素の濃度をまとめた。CaとPの濃度はいずれも理論値よりも小さく、特にPにおいてその傾向は強く見られた。このことは、PがTPPの加水分解から生成するため、どうしても低くなっているものと考えられた。また、CaとPは X_{Ti} の増加とともにいずれも低下していた。これは、TiがTPPの加水分解を阻害したためと考えられる。粒子中の X_{Ti} の値は、出発溶液組成のそれよりも大きかった。 $X_{Ti}=0.15$ で得られた粒子を1000℃で処理した後 TiO_2 が生成したことから、非晶質な TiO_2 が含まれているため、 X_{Ti} の値が高くなったと考えられる。(Ca+Ti)/Pの値も化学量論比である1.67よりも高い。これは、いずれもTPPの加水分解が生じにくいため、粒子内へのPの取り込みが少ないからと考えられる。

Fig. 5 には、100℃で前処理した粒子の N_2 ならびに H_2O 分子吸着実験から求めた比表面積(それぞれ S_N , S_w と略記する)とその比(S_w/S_N)を示した。 S_N 値は $X_{Ti}=0$ で $80\text{ m}^2/\text{g}$ であり、 $S=6/Dp$ の式で球状粒子の直径 $D=20\text{ nm}$ 、密度 $\rho=3.16\text{ g/cm}^3$ と仮定して算出した S 値 $95\text{ m}^2/\text{g}$ と良く一致していた。このことは、一次粒子が二次粒子の中でルーズ

に凝集していることを示唆している。 S_N は $X_{Ti}\geq 0.4$ で突然大きく上昇し、 $X_{Ti}=1.0$ では $400\text{ m}^2/\text{g}$ となる。この S_N の増加も、粒子の微細化によるものである。同様な傾向は S_w においても見られた。したがって、 S_w/S_N 比もほぼ1前後と水分子選択吸着性は見られなかった。

Fig. 6 (a) には $X_{Ti}=0\sim 0.2$ で得られたTiHap粒子のセルフサポーティング法で測定した*in-situ* IRスペクトルを示した。 $X_{Ti}=0$ には内部 OH^- イオンの吸収が 3570 cm^{-1} に現れ、 3650 cm^{-1} にわずかに表面 $P-OH$ の吸収が見られた。これらは、石川らが報告している $3659, 3673, 3682\text{ cm}^{-1}$ に現れる表面 $P-OH$ の1つが現れているものと思われる⁷⁾。 X_{Ti} が増加すると 3570 cm^{-1} の吸収は弱くなり、表面 $P-OH$ の吸収は 3674 cm^{-1} に現れるようになった。これらの結果は、一次粒子が小さく c 軸方向への OH^- イオンの配向性が非常に低下するとともに、表面 $P-OH$ の状態も大きく変化していることを表している。 $X_{Ti}\geq 0.1$ のサンプルではわずかに 3737 cm^{-1} に表面 $Ti-OH$ の吸収が現れ、Ti原子のドーピングが確認できる。

我々は前報で、TiHapが600℃で熱処理することで、強い光触媒性を発現するのは、Tiドーピングによるトンネル構造の拡張や電場の変化によって摂動を受けた新たな内部

Table 1 Results of elemental analysis for the TiHap particles produced at $X_{Ti}=0\sim 0.2$.

X_{Ti} in solution	Ca (mmol/g)	P (mmol/g)	Ti (mmol/g)	X_{Ti} in particle	(Ca+Ti)/P in particle
0	9.646	5.384	0	0	1.79
0.05	8.850	4.675	0.716	0.08	2.05
0.10	8.356	4.305	1.376	0.14	2.26
0.15	7.656	3.961	1.898	0.20	2.41
0.20	7.449	3.964	2.354	0.24	2.65
	9.954 ¹⁾	5.972 ¹⁾			1.67 ¹⁾

1) The values represent the theoretical value.

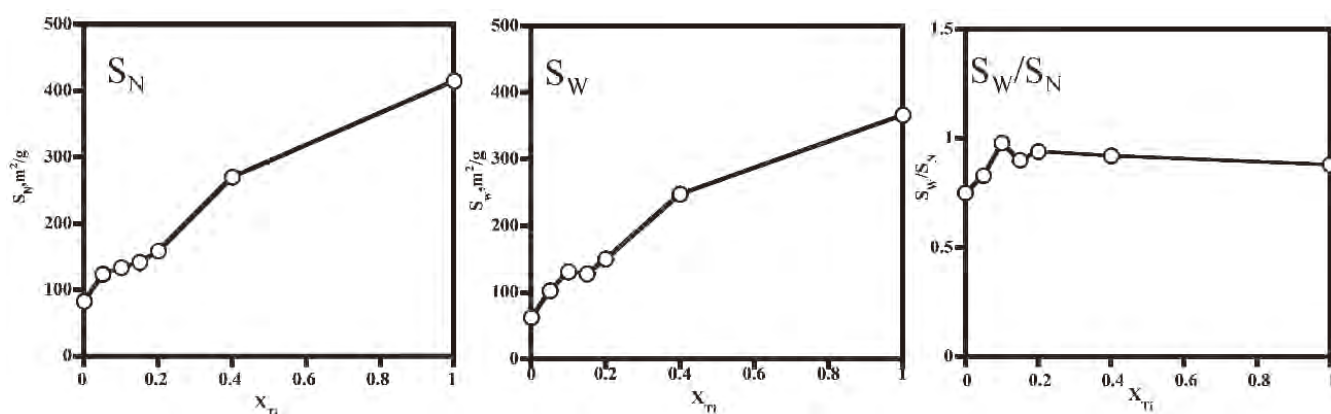


Fig. 5 Specific surface area of the particles produced at various X_{Ti} values measured by N_2 (S_N) and H_2O (S_w) adsorption experiments and their ratios.

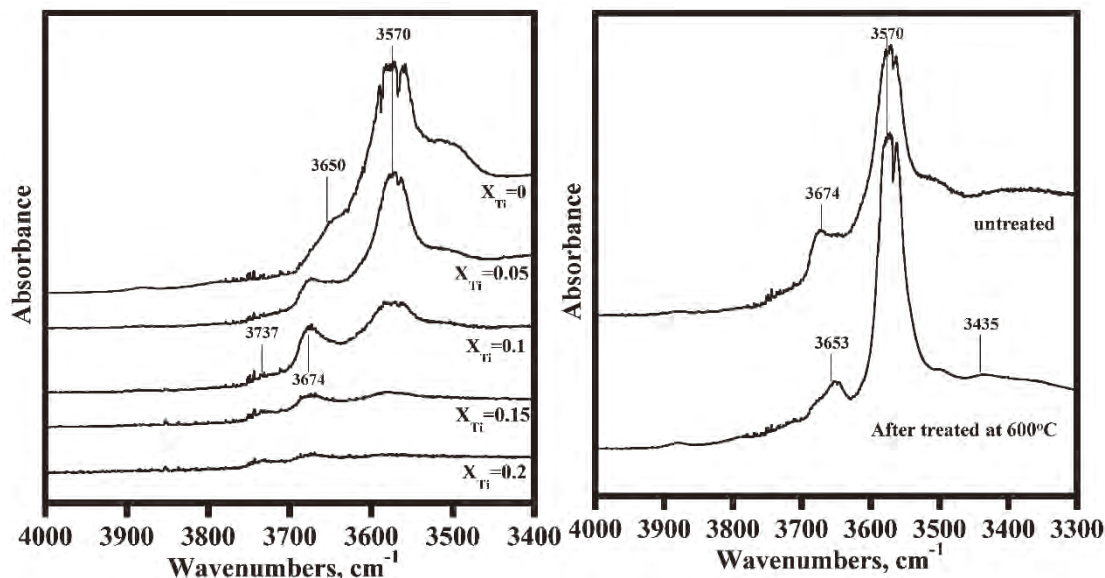


Fig. 6 (a) *In-situ* IR spectra of the TiHap particles produced at $X_{Ti}=0 \sim 0.2$ and (b) *in-situ* IR spectra of the TiHap particle precipitated at $X_{Ti} = 0.15$ before and after treated at 600°C for 2h.

OH⁻イオンが生成するためであると報告した¹⁰⁾。そこで、その点を明らかにする目的で、 $X_{Ti}=0.05$ で得られた粒子を600°Cで2時間熱処理した粒子の*in-situ* IRスペクトルを測定し、Fig. 6 (b) に示した。確かに、前報と同様に3435 cm⁻¹に吸収ピークが出現したが、その強度は大変小さい。これは、一次粒子が小さいため、非加熱粒子においてもすでに内部OH⁻イオンの吸収が小さく、熱処理による効果が現れにくいためと思われる。

さらに、 $X_{Ti}=0 \sim 0.2$ で得られたTiHap粒子の紫外線吸収能を調べるため、拡散反射UV測定を行った。その結果をFig. 7に示した。Ti原子を全く含まないCaHap ($X_{Ti}=0$)では全く吸収が見られないが、 $X_{Ti} \geq 0.05$ のサンプルでは、いずれも240–380 nmにO²⁻→Ti⁴⁺の電荷移動による吸収が現れ、特に $X_{Ti}=0.1$ のサンプルでは他の粒子の2倍の吸収が見られた。また、その吸収端波長からバンドギャップを見積もったところ、3.9–4.1 eVであった。これらのことから、今回得られたTiHap粒子の内、 $X_{Ti}=0.1$ のサンプルが最も高い紫外線吸収能を有することが分かった。

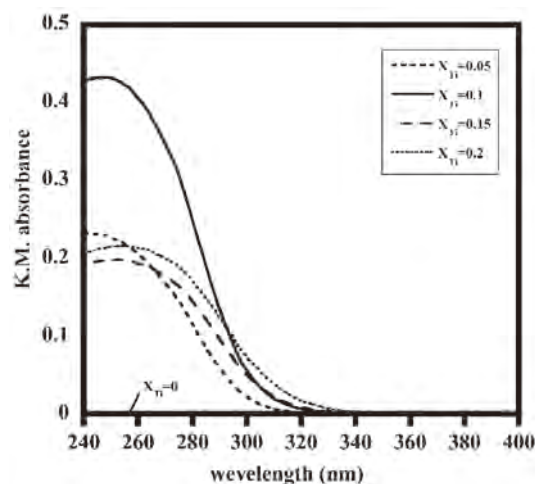


Fig. 7 Diffuse reflectance UV spectra of the TiHap particles produced at $X_{Ti}=0 \sim 0.2$.

分解したものと考えられた。

Fig. 9には、様々な X_{Ce} で得られた粒子のXRDパターンを示した。 $X_{Ce}=0 \sim 0.2$ ではHapに特有な回折パターンのみが得られているが、 $X_{Ce}=0.4$ 以上ではCePO₄の回折パターンが表れ、その強度は X_{Ce} の増加とともに強くシャープになった。この結果から、 $X_{Ce}=0 \sim 0.2$ ではCaHapのCa原子の一部がCe原子に置換したセリウムアパタイト (CeHap) が生成し、 $X_{Ce}=0.4 \sim 1.0$ ではCePO₄が生成することが分かった。この結果は、TEM写真で板状粒子がCeHap、棒状粒子ならびに微細粒子がCePO₄であることを示唆している。前回の中間報告で X_{Ti} が0.6以上でTiO₂(アナターゼ型) が生成したのに対して、今回CePO₄が生成したのは、Ceイオンが3価であり、PO₄³⁻イオンと反応し易いためと考えられる。すなわち、TiとCeイオンの価数の

3. 2. Ce添加系について

Fig. 8に様々な X_{Ti} で得られた粒子のTEM写真を示した。 $X_{Ce}=0$ では前報⁷⁾と同様に約20 nm程度の楕円体形一次粒子が凝集して約100 nm程度の楕円体形二次粒子が得られた。 X_{Ce} の増加とともに、0.2まで板状粒子となり大きさも大きくなった。さらに X_{Ce} が0.4以上では細長い棒状粒子へと変化し、 $X_{Ce} = 1.0$ では大変微細な粒子へと変化した。なお、 X_{Ce} が0.2までの大きな板状粒子にも一部 $X_{Ce} = 1.0$ で見られる小さな粒子が存在した (図中矢印)。Fig. 8中に示した反応後のpHが低下していることから、TPPは加水

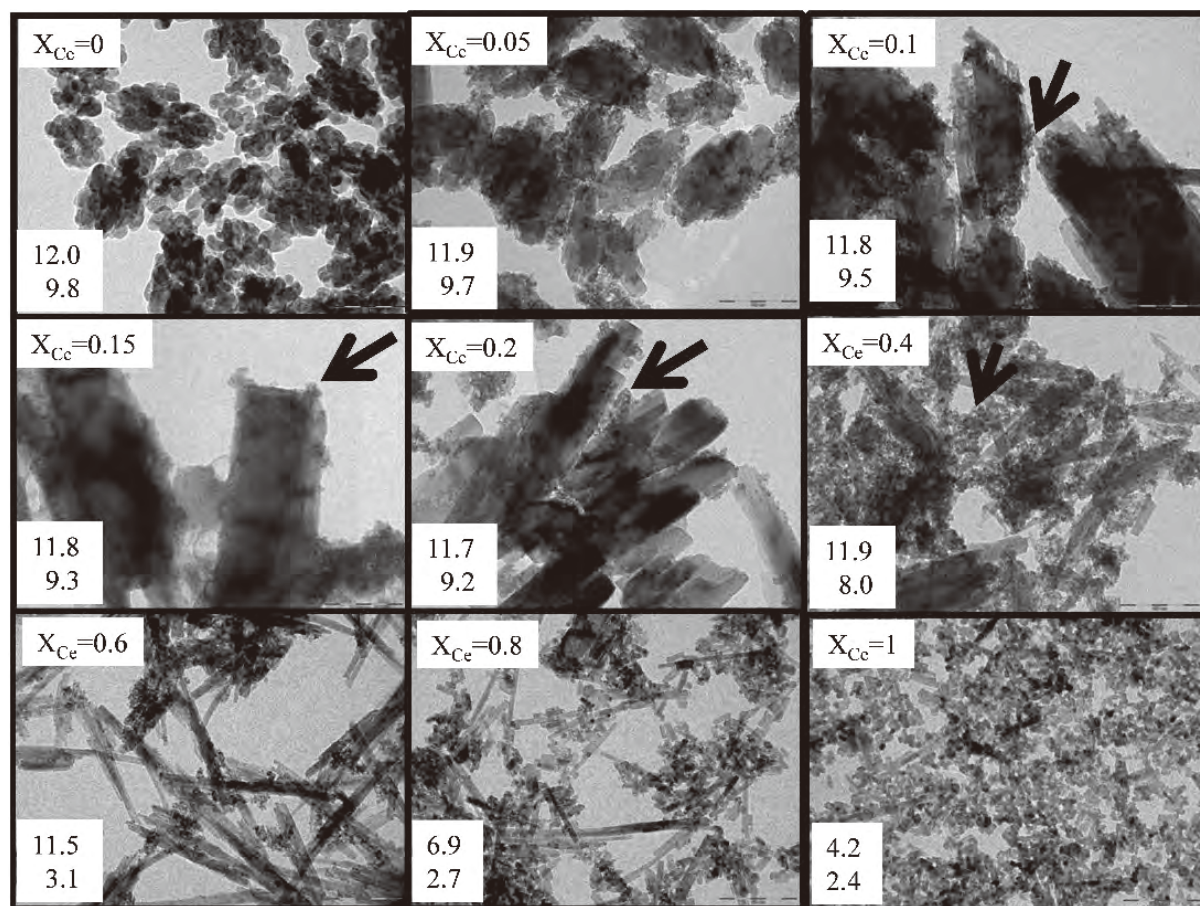


Fig. 8 TEM micrographs of the particles produced at various X_{Ce} values. The upper and lower values in the picture represent pH values before and after the reaction, respectively.

100 nm

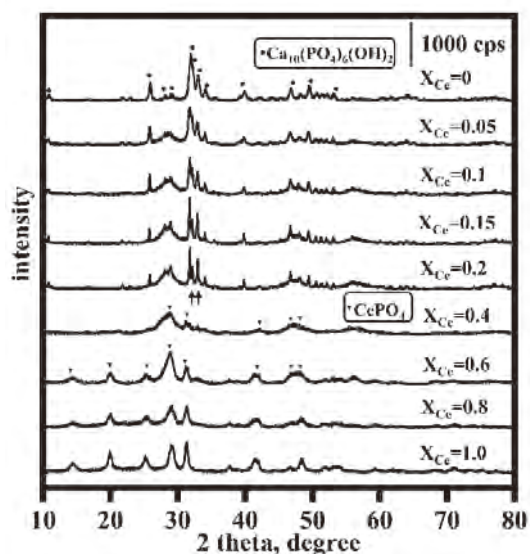


Fig. 9 XRD patterns of the particles produced at various X_{Ce} values.

Table 2 Results of elemental analysis and crystal form of the particles produced at various X_{Ce} values.

X_{Ce} in solution	Ca (mmol/g)	P (mmol/g)	Ce (mmol/g)	X_{Ce} in particle	(Ca+Ce)/P in particle	Crystal formula
0	9.646*	5.384†	0	0	1.79	CaCeHap
0.05	7.536*	4.239†	0.676	0.09	1.94	CaCeHap
0.10	6.439*	3.651†	1.194	0.16	2.09	CaCeHap
0.15	6.284*	3.095†	1.686	0.21	2.58	CaCeHap
0.20	5.955*	2.859†	1.928	0.24	2.76	CaCeHap
0.40	0	2.333	3.372	—	1.44	CePO ₄
0.60	0	2.153	3.540	—	1.64	CePO ₄ ·0.4H ₂ O
0.80	0	2.961	3.750	—	1.26	CePO ₄ ·0.4H ₂ O
1	0	3.714	3.832	—	1.03	CePO ₄ ·0.5H ₂ O
9.954*		5.972*			1.67*	

*Theoretical value of Hap

違いが大きく影響したものと考えられる。

Table 2 には、ICP - AES で分析した粒子中の金属元素の濃度をまとめた。Ca と P の濃度はいずれも理論値よりも小さく、特に P においてその傾向は強く見られた。これ

は、P が TPP の加水分解から生成するため、低くなったものと考えられる。この点は前報の TiHap と全く同様である⁶⁾。また、Ca と P は X_{Ce} の増加とともにいずれも低下していた。これは、Ce が TPP の加水分解を阻害したため

と考えられる。粒子中の X_{Ce} の値は、出発溶液組成のそれよりも大きかった。 $(Ca+Ti)/P$ の値も化学量論比である 1.67 よりも高い。これは、Ti 添加系と同様に、いずれも TPP の加水分解が生じにくいいため、粒子内への P の取り込みが少ないからと考えられる。

Fig. 10 には $X_{Ti}=0 \sim 1.0$ で得られた CeHap ならびに $CePO_4$ 粒子のセルフサポーティング法で測定した *in-situ* IR スペクトルを示した。 $X_{Ce}=0$ には内部 OH^- イオンの吸収が 3570 cm^{-1} に現れ、 3648 cm^{-1} にわずかに表面 $P-OH$ の吸収が見られた。これらは、石川らが報告している $3659, 3673, 3682\text{ cm}^{-1}$ に現れる表面 $P-OH$ の 1 つが現れているものと思われる⁷⁾。 X_{Ce} が増加すると 3570 cm^{-1} の吸収は弱くなり、 $X_{Ce} \geq 0.6$ で生成した $CePO_4$ 粒子では消失し、表面 $P-OH$ の吸収が $3637 \sim 3669\text{ cm}^{-1}$ に現れるようになった。これらの結果は、一次粒子が小さく c 軸方向への OH^- イオンの配向性が非常に低下するとともに、表面 $P-OH$ の状態も大きく変化していることを表している。

さらに、 $X_{Ce}=0 \sim 0.2$ で得られた CeHap 粒子の紫外線吸収能を調べるため、拡散反射 UV 測定を行った。その結果を Fig. 11 に示した。 Ce 原子を全く含まない CaHap ($X_{Ce}=0$) では全く吸収が見られないが、 $X_{Ce} \geq 0.05$ のサンプルでは、いずれも $240 \sim 400\text{ nm}$ に $O^{2-} \rightarrow Ce^{3+}$ の電荷移動による吸収が現れ、特に $X_{Ce}=0.15$ のサンプルで最も強い吸収が見られた。また、その吸収端波長からバンドギャップを見積もったところ、 $3.2 \sim 3.3\text{ eV}$ であった。これらのバンドギャップは TiHap の $3.9 \sim 4.1\text{ eV}$ と比較すると少し低いが、CeHap 粒子もかなり高い紫外線吸収能を有することが分かった。一方、 $X_{Ce} \geq 0.4$ の $CePO_4$ 粒子では吸光度は 0.1 以下となり、ほとんど紫外線吸収能が無いことがわかった。

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支援いただきましたことを深く感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Kandori K, in "Surface and Colloid Science, Second Edition" Auther Hubbert ed., Taylor & Francis: New York, 2006; 4, pp. 3126 - 3138.
- 2) 球状金属リン酸塩粒子のサイズ制御とそのキャラクターゼーション, 色材, **72**, 301(1999).
- 3) Wakamura M, Hashimoto K, Watanabe T, Photocatalysis by calcium hydroxyapatite modified with Ti(IV): albumin decomposition and bacterial effect, Langmuir **19**, 3428-3431, 2003.
- 4) Yasukawa A, Goto K, Tanaka H and Kandori K, Preparation and structure of calcium hydroxyapatite substituted with light rare earth ions, Colloids and

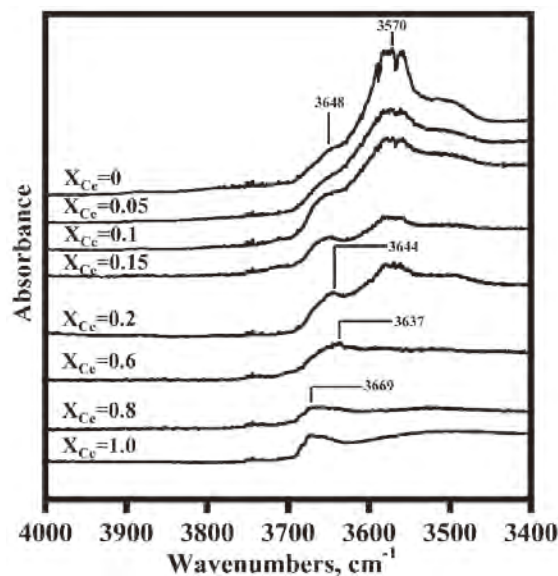


Fig. 10 *In-situ* IR spectra of the particles produced at various X_{Ce} values.

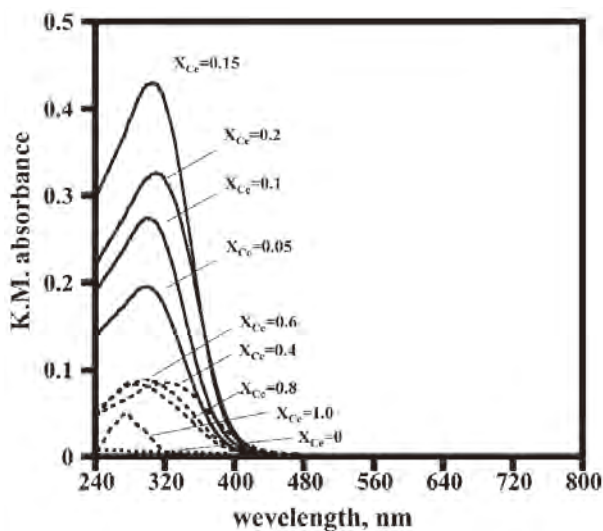


Fig. 11 Diffuse reflectance UV spectra of the particles produced at various X_{Ce} values.

Surfaces A., 393, 53-59, 2012.

- 5) Yasukawa A, Kandori K, Tanaka H and Goto K, Preparation and structure of calcium hydroxyapatite substituted with heavy rare earth ions, Materials Research Bulletin, **47**, 1257-1263, 2012.
- 6) Kandori K, and Matsui M, Preparation and characterization of calcium hydroxyapatite from forced hydrolysis of $Ca(OH)_2$ -Triphosphate-HCl Mixed Solution, Phosphorus Research Bulletin, **28**, 37-44 (2013).
- 7) Ishikawa T, Wakamura M, Kondo S, Surface characterization of calcium hydroxylapatite by Fourier Transform Infrared spectroscopy, Langmuir, **5**, 140-144, 1989.

両生類皮膚由来機能性生体分子の網羅的探索

国立研究開発法人産業技術総合研究所健康工学研究部門

茂 里 康

Twelve novel peptides (Pxt-1 - Pxt-12) were isolated from the skin of *Xenopus tropicalis* using topological mass spectrometry analysis. Among them, Pxt-8, Pxt-9, and Pxt-10 were N-terminus of Pxt-1, N-terminus of Pxt-3, and C-terminus of Pxt-11, respectively. The Pxt-3 and Pxt-11 peptides shared significant sequence homologies with magainins 1, 2 and levetide, respectively that were all isolated from *X. laevis*. Pxt-12 was identical to the *X. tropicalis* XT-6-like precursor previously isolated by ESI-MS/MS. None of the Pxt peptides contained any Cys, Asp, Tyr or Trp, while Ile, Leu and Lys were frequently found as typical frog-skin peptides. RT-PCR analysis confirmed the gene expressions of Pxt-2, Pxt-3, Pxt-4, Pxt-5, Pxt-7 and Pxt-11 in *X. tropicalis* skin. Several ion peaks corresponding to all identified Pxt peptides, were observed with MALDI-MS analysis of *X. tropicalis* secretory fluids, collected after *in vivo* stimulation which suggested that Pxt peptides were definitely secretory molecules. Circular dichroism studies and the Schiffer-Edmundson helical wheel projections suggested that Pxt-5, as well as mastoparan, at least, could form a typical amphiphilic α -helix without a phospholipid or a membrane-mimetic solvent. Moreover, Pxt-2 showed growth inhibitory effects on both *E. coli* (Gram-negative) and *S. aureus* (Gram-positive), at MIC values of 50 and 9.7 ($\mu\text{g/ml}$), respectively. Measurements of dynamic light scattering and the surface tensions of Pxt peptides solutions suggested that both Pxt-2 and Pxt-5 could form associations as micelles and behave like a general surfactant, affording critical association concentrations (CAC) of 38.1 and 57.3 μM , with γ_{CAC} of 46.9 and 38.3 mN/m.

1. 緒 言

両生類の代表格であるカエルは乾燥に弱いため、水辺等の湿った環境が生息の中心である。産卵場所は多様であるが、幼生はえら呼吸を行い、水中で生活している。成体になると肺呼吸を開始し、陸上の生活が可能となり、陸上・水中を行き来しながら生活している。このように陸上及び水中の両方の環境が生息に必要であるが、カエルツボカビ病をはじめとする感染症等により、近年生息数は激減している。

一方、生体適応・防御・内分泌系の観点から、カエルは絶好の研究材料として用いられてきた。陸上・水中の異なる生活環境を行き来することから、微生物等の攻撃に曝され易いと考えられる。その様な環境にも関わらず生き続けていることから、特殊な能力を保持していると考えられてきた。特にカエルは皮膚の分泌腺や毒腺が多いことから、これまで各種機能性分子(抗菌ペプチド等)が皮膚から単離されてきた。これらの機能性分子は、皮膚組織の破碎、抽出、バイオアッセイ、精製を繰り返し、単離、同定、遺伝子配列解読等が行われてきた¹⁾。一方 1990 年代になり新たな分析ツールとしてマトリックス支援レーザー脱離イオン化

質量分析計 (MALDI-MS) や Electrospray イオン化質量分析計 (ESI-MS) が登場した。そこで、これら分析機器の応用を試行錯誤しているうちに、組織切片を用い MALDI-MS を行うと、細胞内分泌顆粒の中に存在しているペプチド等の生体成分を分子量プロファイルとして選択的に検出できることを見出し、「Topological Mass Spectrometry Analysis (Direct tissue MALDI-TOF MS)」と命名した²⁾。本手法は質量分析法を駆使し、バイオアッセイや余計な精製プロセス無しに機能性分子の単離を可能とした。その結果、希少な動物からの生体分子の単離や不安定な生体成分の分析が可能である。

そこで本申請において、両生類を代表するカエルの皮膚を用いて、Topological Mass Spectrometry Analysis (Direct tissue MALDI-TOF MS) を駆使し、ペプチド等の新規生体分子を網羅的に探索することを実施した。

2. 実 験

2.1. カエル

実験に使用したカエル(トノサマガエル、ヌマガエル)については、大阪府池田市、箕面市周辺の田畑で捕獲した。またアマガエルについては、広島大学両生類研究施設 高瀬稔先生から供与して頂いた。ネッタイツメガエル(*Xenopus tropicalis*)は東京大学・産業技術総合研究所が維持している Nigerian 系統を使用した。

2.2. Topological Mass Spectrometry Analysis (Direct tissue MALDI-TOF MS)

トリス緩衝液、リン酸緩衝液、生理食塩水など生化学



Global exploration of functional biomolecules from amphibian skin

Yasushi Shigeri

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Health Research Institute

や組織学の実験でよく使われる緩衝液は、MALDI-MSにおいて試料のイオン化を阻害する。一方、質量分析法で推奨されるギ酸や酢酸溶液を組織切片に応用すると、浸透圧の関係で細胞形態が維持できない。そこで切片調製法として、生理食塩水による凍結包埋を試みた。摘出した皮膚組織（カエル及びオタマジャクシ）を0.4%食塩水で凍結包埋し、 -20°C でクリオスタット（CM1850 cryostat, Leica Microsystems, Germany）を用い、 $30 \sim 40 \mu\text{m}$ の厚さの切片を作成した。作成した切片はMALDI-MS用サンプルプレートに置き、マトリックス溶液（10 mg/ml CHCA in 50% acetonitrile + 0.1% trifluoroacetic acid）を添加した後、直ちに吸い取った。次にマトリックス溶液を再度添加し、真空下で素早く結晶化し、MicroflexAI mass spectrometer（Bruker Daltonics）を用い、リニア、ポジティブイオンモードでMALDI-MS測定を行った。

2. 3. ネットアイツメガエル (*Xenopus tropicalis*) 皮膚由来ペプチドのアミノ酸配列決定

前述のTopological Mass Spectrometry Analysis (Direct tissue MALDI-TOF MS) を用いて、得られた分子量を指標に、ネットアイツメガエルの皮膚から、抽出、ゲル濾過クロマトグラフィー、HPLCによる精製、ESI-MS/MS解析、データベース検索（<http://www.xenbase.org/genomes/blast.do>）、プロテインシークエンサーによるアミノ酸配列決定を行った。

ネットアイツメガエルの皮膚を、クリオスタット（CM1850 cryostat）を用い $10 \mu\text{m}$ にスライスした後、50% acetonitrile+0.1% trifluoroacetic acid溶液で、 4°C 、5時間抽出を行った。その後上清を、30% acetonitrile+0.1% trifluoroacetic acid溶液で平衡化したSuperdex-30カラムクロマトグラフィー（GE Healthcare, $500 \times 3 \text{ mm i.d.}$ ）で分離した。 $500 \sim 3000 \text{ Da}$ の分子量のmid fractionをさらに逆相HPLC（Gilson HPLC system, 東ソー, TSK gel ODS 120T, $5 \mu\text{m}$ particle size, $250 \times 4.6 \text{ mm i.d.}$ ）で0.1% trifluoroacetic acidを含むacetonitrileのグラジエントを用いて精製を行った。精製したフラクションは随時、MALDI-MS（MicroflexAI mass spectrometer）で分子量の確認を行った。またESI-MS/MS解析は、HPLCで精製したサンプル、あるいは精製したサンプルをトリプシン消化した物を使用し、LCQ Fleet（Thermo Scientific, MA）を用いて行った。LCQ Fleetには、LC-10 ADVPμポンプ（島津製作所）を使用して、 0.05 (ml/min) の流速で50% acetonitrile + 0.1% formic acid溶液でサンプルを負荷した。イオンスプレーの電圧は 5000 V 、MS/MSの分析の際の衝突エネルギーは 30 V で3価の前駆イオンの検出のために固定し、ポジティブイオンモードで測定を行った。プロテインシークエンサーはPPSQ-21（島津製作所）を用い、常法であるエドマン分

解法で分析した。プロテインシークエンサー及び質量分析から得られたアミノ酸予想配列データは、データベース検索（<http://www.xenbase.org/genomes/blast.do>）及び（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）を随時実施して、アミノ酸配列を確定した。

2. 4. 同定されたペプチドの固相合成

同定されたペプチドの性質解明のため、化学合成を試みた。ペプチドの化学合成はFmoc固相合成を利用し、PSSM8自動ペプチド合成装置（島津製作所）を用いて行った。合成ペプチドの精製は逆相HPLC（Waters 600）を使用し、カラムは5C18-AR-II（Cosmosil, nacalai tesque）を使用し、0.1% trifluoroacetic acidにacetonitrileのグラジエントを用いて精製を行った。精製品の確認はMALDI-MS（MicroflexAI mass spectrometer）を用い、マトリックスは（10mg/ml CHCA in 50% acetonitrile+0.1% trifluoroacetic acid）を使用した。

2. 5. 円二色性分散計 (Circular Dichroism, CD)を用いたペプチドの性質解明

同定されたペプチドの溶液中での二次構造を測定するために、日本分光円二色性分散計J-820を用いて測定を行った。合成ペプチドを 10 mM Tris-HCl（pH 7.2）の緩衝液に $50 \mu\text{M}$ の濃度に希釈し、光路長が 1 mm の角型石英セルを用いた。測定条件のバンド幅は 1 nm 、レスポンスは 4 sec 、測定範囲は $190 \sim 255 \text{ nm}$ 、データ取込間隔は 0.5 nm 、走査速度は 20 nm/min 、積算回数は4回に固定して測定した。測定温度は $10, 25, 37^{\circ}\text{C}$ の三つの異なる温度で測定を行った³⁾。

2. 6. 同定されたペプチドの抗菌及び溶血活性の測定

Escherchia coli DH5α（グラム陰性）と *Staphylococcus aureus* JCM2151（グラム陽性）を用いて同定されたペプチドの抗菌活性の測定を行った。まず 5 ml のLB（Luria-Bertani's broth）培地で 37°C 、15時間、160rpmで前培養を行った。その後 $100 \mu\text{l}$ の培地溶液を取り、本培養の培地（ 5 ml LB培地）に植菌した。 37°C 、2～3時間、160rpmで培養し、 $\text{OD}_{610 \text{ nm}}$ が0.5付近にまで培養した。その培養液を生理食塩水で100倍希釈し、その内 $50 \mu\text{l}$ をあらかじめペプチドを希釈して $50 \mu\text{l}$ ずつ入れてあった96well plateに添加して 37°C 、24時間培養した。ペプチドは最終濃度 $150 \mu\text{g/ml}$ の8段階の2倍希釈、最小濃度 $0.6 \mu\text{g/ml}$ に調製した。培養後の生菌数はマイクロプレートリーダーを使用し、 $\text{OD}_{595 \text{ nm}}$ の吸光度で測定した。

ラットの全血に対する同定されたペプチドの溶血活性は、稲垣らの方法に従って行った⁴⁾。

2. 7. 同定されたペプチドの界面物性測定

固相合成したそれぞれのペプチドを約 15mg 測り取り、超純水 15ml を添加した後、弱く攪拌することにより溶解させた。次に、この水溶液を適宜希釈することによって、各種濃度のペプチド水溶液を得た。各種ペプチド水溶液の表面張力は、協和界面科学株式会社製の DropMaster500 を用いて、ペンダントドロップ法を用い、25 度で測定した。なお、この方法では、キャピラリーに形成させた液滴の形状を解析して、表面張力値を得るが、解析には Young-Laplace 法を用いた。

3. 結 果・4. 考 察

3. 1. ペプチドの配列決定

大阪府池田市、箕面市周辺の田畑で捕獲したトノサマガエル、ヌマガエル及び、広島大学両生類研究施設から供与して頂いたアマガエルの皮膚組織を用いて Topological Mass Spectrometry Analysis (Direct tissue MALDI-TOF MS) を実施した。その結果、トノサマガエルでは (1611.2, 2811.4, 3105.9, 3769.4, 4601.1, 5149.8, 5652.5, 6952.5,

7717.5 m/z)、ヌマガエルでは (2174.0, 4998.3 m/z)、アマガエルでは (1101.9, 1845.8, 2327.2, 3265.9, 4977.7, 6537.4 m/z)等の分子イオンピークが検出された。しかしながらいずれの国産カエルもゲノム解析が行われておらず、それぞれのピークのアミノ酸配列を解析するのは困難が予想された。そこで、両生類で唯一ゲノム解析が完了しているネットイツメガエル (*Xenopus tropicalis*) (図 1)⁵⁾の皮膚を用いて Topological Mass Spectrometry Analysis (Direct tissue MALDI-TOF MS) を実施することにした。

図 2 に示すように、ネットイツメガエルのオタマジャクシ (tadpole, stage49-51) を用いて Topological Mass Spectrometry Analysis (Direct tissue MALDI-TOF MS) を行っても、有意な分子イオンピークはほとんど検出されなかった。

一般的にカエルから得られた抗菌ペプチド等の生理活性ペプチドは、成体に由来するものである⁶⁾。カエルの皮膚は幼生 (オタマジャクシ) と成体では大きく異なっており、皮膚腺 (顆粒腺) は変態が進まないと形成されない。そこで成体のネットイツメガエルの皮膚組織を使用して、

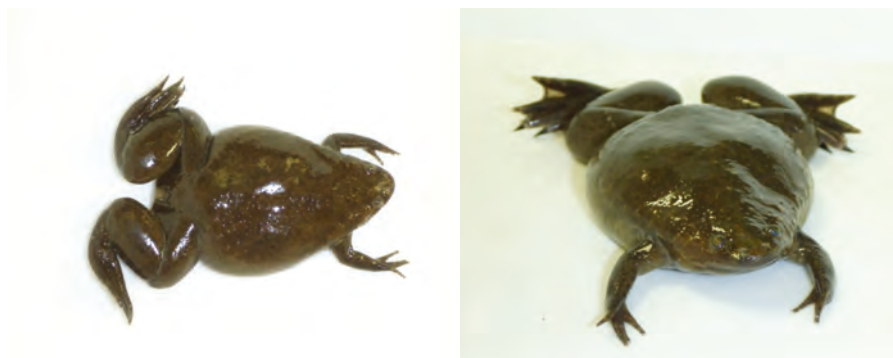


Fig. 1 *Xenopus tropicalis*

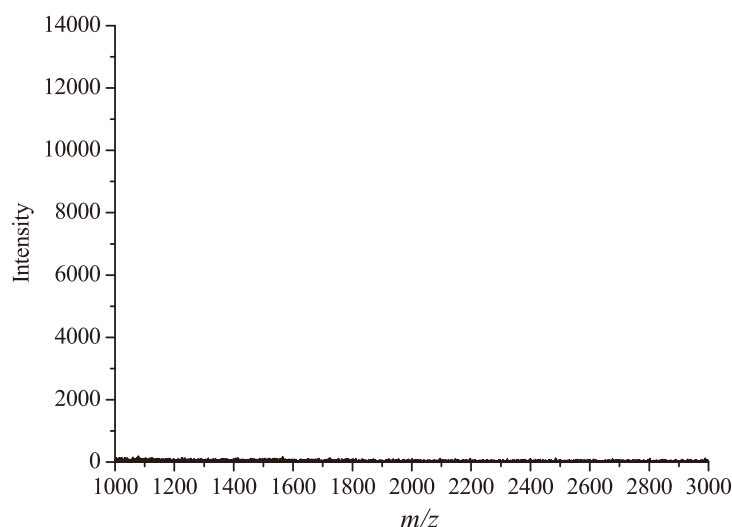


Fig. 2 Direct tissue MALDI-TOF MS spectrum of the hormones from the skin in *Xenopus tropicalis* tadpoles

Topological Mass Spectrometry Analysis (Direct tissue MALDI-TOF MS) (リニア、ポジティブイオンモード)を行った。その結果、ネッタイツメガエルでは 1000 ~ 3000 付近の m/z に各種分子イオンピークが検出された(図3)。

次に Topological Mass Spectrometry Analysis (Direct tissue MALDI-TOF MS) で得られた分子イオンピークを指標に、ネッタイツメガエルの皮膚から、有機溶媒による抽出、ゲル濾過クロマトグラフィー (Superdex-30)、逆相 HPLC による精製、ESI-MS/MS 解析、データベース検索を実施した。その結果、Pxt-1, Pxt-2, Pxt-3, Pxt-4, Pxt-5,

Pxt-7 の 6 つの新規ペプチドを同定した。また Topological Mass Spectrometry Analysis (Direct tissue MALDI-TOF MS) とエドマン分解法を併用し、Pxt-6 の新規ペプチドを決定した。Pxt-6 についてはデータベース検索でもヒットしないことから、ゲノム解析でも DNA 配列が解読されていない配列であることが示唆された (Table1)。また RT-PCR を用いて、各ペプチドの遺伝子発現を検討したところ、顕著に皮膚に遺伝子発現が認められた。またネッタイツメガエルは、接触刺激等により粘性かつ泡状の分泌液を出すことが知られている。その分泌液を直接

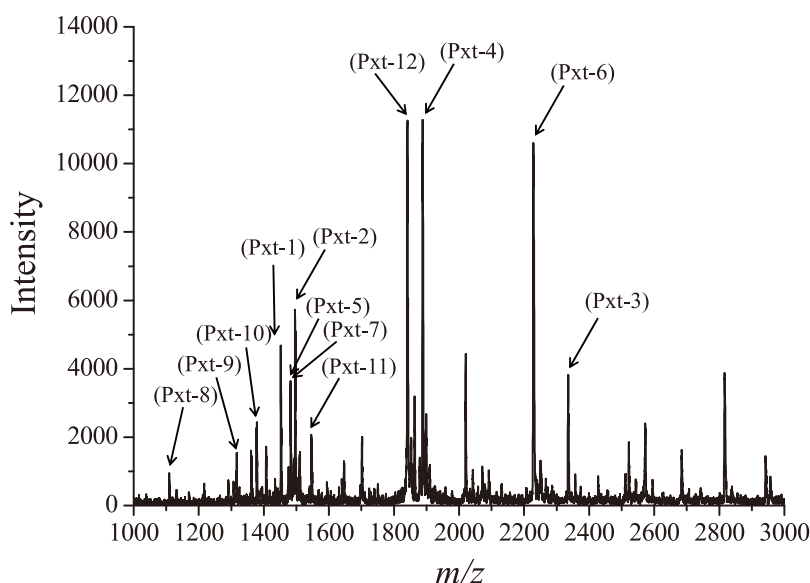


Fig. 3 Direct tissue MALDI-TOF MS spectrum of the hormones from the skin in *Xenopus tropicalis* adults

Table 1 Sequence, monoisotopic mass, and molecular charges of Pxtpeptides from *X. tropicalis* skin

Peptide	Sequence	Monoisotopic mass	Molecular charge at pH 7
Pxt-1:	<u>IRPIPFIP</u> RGGKT-NH ₂	1449.8	3.0
Pxt-2:	FIGALLRPALKLLA-NH ₂	1493.9	2.0
Pxt-3:	<u>GLKEVAHSAKKF</u> AKGFISGLTGS	2332.2	3.0
Pxt-4:	LKGASKLIPHLLPSRQQ	1885.1	3.0
Pxt-5:	FIGALLGPLLNLLK-NH ₂	1479.9	1.0
Pxt-6:	IRPVFFPPVHAKKVFLPH	2225.2	3.1
Pxt-7:	Pyr-GLIGTLTAKQIKK-NH ₂	1479.9	3.0
Pxt-8:	<u>IRPIPFIP</u> R	1107.6	2.0
Pxt-9:	<u>GLKEVAHSAKKF</u>	1313.7	2.0
Pxt-10:	<u>LMGTLISKQM</u> KK-NH ₂	1375.8	3.0
Pxt-11:	Pyr-GLMGTLISKQMKK-NH ₂	1543.8	3.0
Pxt-12:	NLLGSLLKTGLKVGSNLL-NH ₂	1839.1	2.0

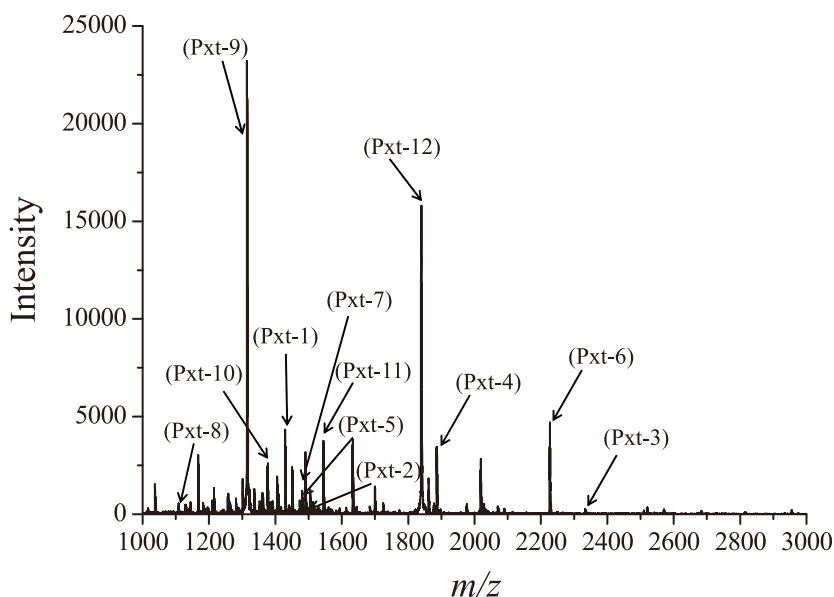


Fig. 4 MALDI-TOF MS spectrum of *Xenopus tropicalis* secretory fluids

MALDI-TOF MS で解析したところ、Pxt peptides が同様に検出出来た(図4)。つまり Pxt peptides は何れも分泌されていることが確認できた。

3.2. 同定されたペプチドの固相合成

同定されたペプチドの固相合成は、Fmoc 固相合成法を使用した(PSSM8 自動ペプチド合成装置、島津製作所)。逆相 HPLC で精製後、MALDI-MS (MicroflexAI mass spectrometer) を用いて精製品の確認を行ったところ、ほぼ純品であることを確認した。

3.3. 同定されたペプチドの2次構造解析

同定されたペプチド及び、比較のために、Pxt-5 の逆配列の ReversePxt-5、アフリカツメガエル皮膚より単離された抗菌ペプチドで有名な Magainin 1^{7,8)} 及びスズメバチ毒素の一種で典型的な両親媒性ペプチドである Mastoparan⁹⁾ を合成し、均一にまで精製した。これらのペプチドの二次構造解析を詳細に実施するために、円二色性分散計 J-820 (日本分光) を用いて測定を行った。その結果 Pxt-2 及び Pxt-5 は両親媒性のアルファヘリックスを形成することが判明した(data not shown)。

3.4. 同定されたペプチドの抗菌活性測定

Escherichia coli DH5 α (グラム陰性・大腸菌) と *Staphylococcus aureus* JCM2151 (グラム陽性・黄色ブドウ球菌) の微生物を用いて、Pxt-1, Pxt-2, Pxt-3, Pxt-4, Pxt-5, Pxt-6, Pxt-7, ReversePxt-5, Magainin 1, Mastoparan に対する抗菌活性を測定した^{10,11)}。その結果、Pxt-1, Pxt-3, Pxt-4, Pxt-6, Pxt-7, Magainin 1 については、150 μ g/ml

の濃度まで微生物の生育阻害は認められなかった。また Pxt-5 については、培地に添加したところ顕著な沈殿が認められたことから、抗菌活性の測定は出来なかった。ただし、Pxt-5 は純水や Tris 等の緩衝液には溶解した。一方 Pxt-2 の大腸菌及び黄色ブドウ球菌に対する MIC (最小発育阻止濃度, Minimum Inhibitory Concentration) は 50 μ g/ml, 9.7 μ g/ml であった。また ReversePxt-5 は、150 μ g/ml の濃度まで大腸菌に対する生育阻害は認められなかったが、黄色ブドウ球菌に対する MIC は 150 μ g/ml であった。最後に Mastoparan については、大腸菌及び黄色ブドウ球菌に対する MIC はそれぞれ、9.7 μ g/ml, 19.3 μ g/ml であった。またラット血球に関する溶血活性は 0.1% (Pxt-1), 0.4% (Pxt-2), 0.2% (Pxt-3), 0.1% (Pxt-4), 10.5% (Pxt-5), 0.3% (Pxt-6), 0.4% (Pxt-7), 0.3% (Pxt-11) であった。

3.5. 同定されたペプチドの界面物性測定

同定されたペプチドの界面物性を測定するために、ペンダントドロップ法を用い、表面張力の測定を行った。その結果、Pxt-2, Pxt-5 及び ReversePxt-5 については、顕著な表面張力の低下が認められ、有力なバイオサーファクタントとして機能することが示唆された(図5, 6)。

5. 総括

今回両生類では唯一ゲノム解析されているネッタイツメガエル (*Xenopus tropicalis*) の皮膚を使用して、Topological Mass Spectrometry Analysis (Direct tissue MALDI-TOF MS) で解析を行った。その結果7種類の新規ペプチド (Pxt1, 2, 3, 4, 5, 6, 11) を発見し、その物理的特性及び生物

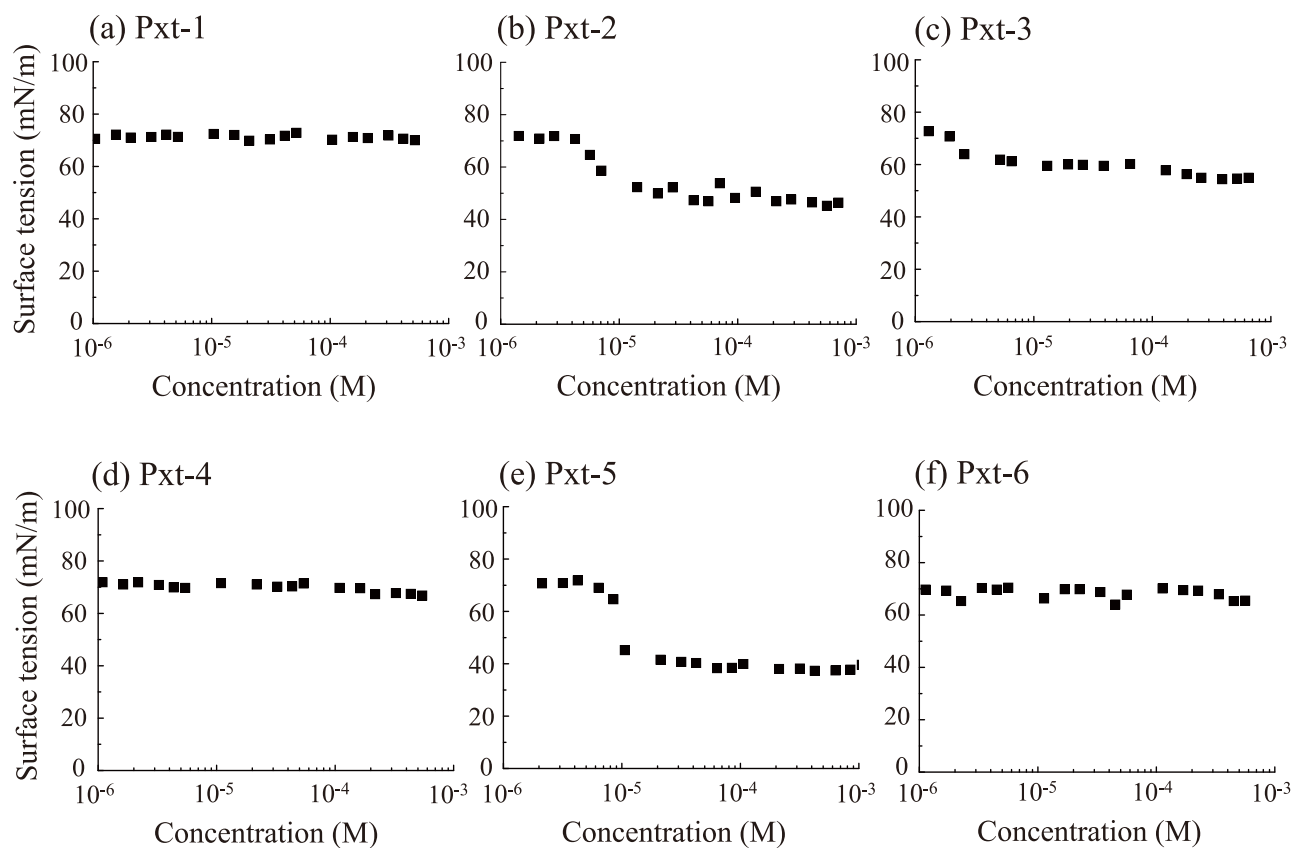


Fig. 5 Surface tension of Pxtpeptides (I)

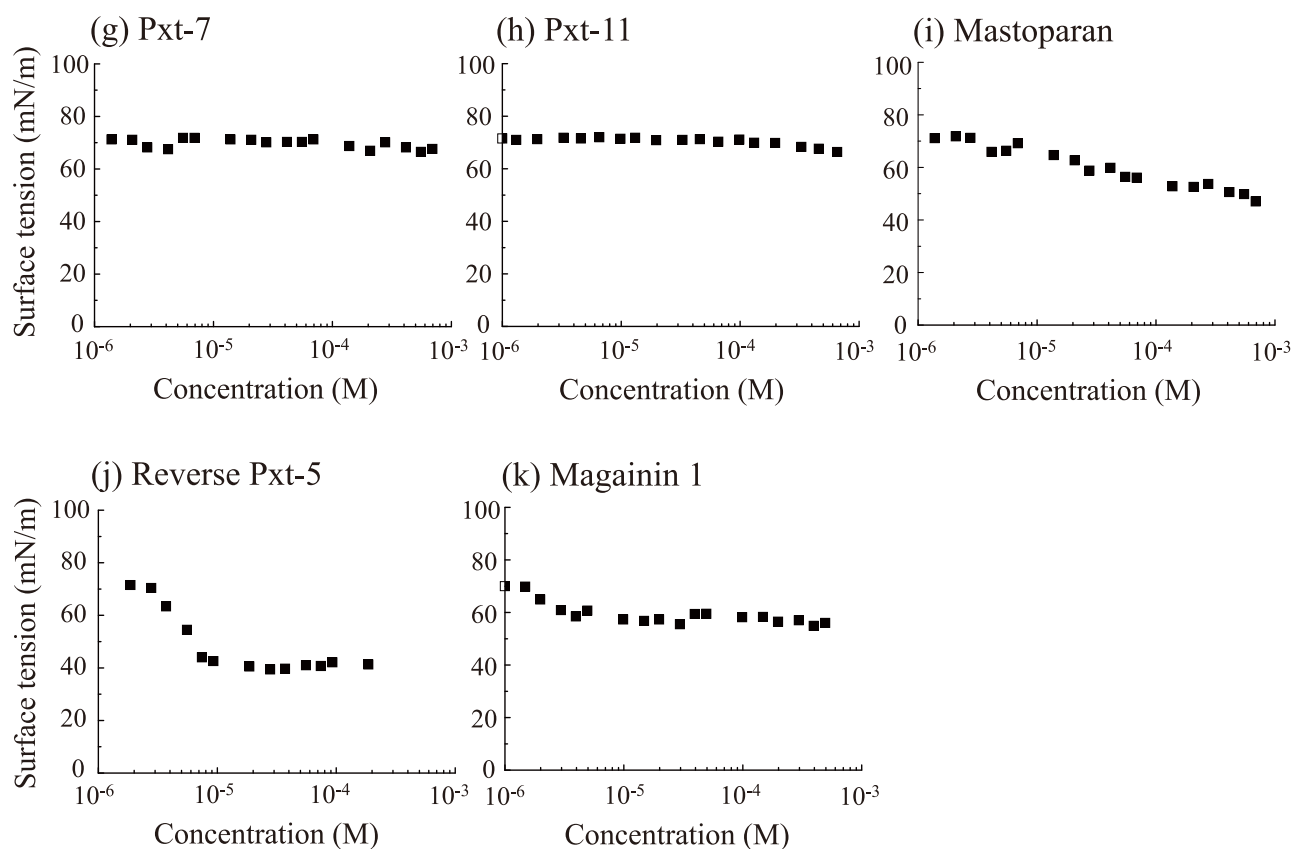


Fig. 6 Surface tension of Pxtpeptides (II)

学的な活性の測定を実施した。特にその界面活性剤としての特性や泡特性からスキンケア素材への可能性が示唆される。今後はどのような組織に発現されているか。またどのような生育時期から機能発現するのか、さらに物理特性を詳細に解析したいと考えている。本成果は文献 12 として印刷中である。

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に深く感謝します。

(引用文献)

- 1) Conlon M, Mechkarska M, King J.:Host-defense peptides in skin secretions of African clawed frogs (Xenopodinae, Pipidae), *Gen. Comp. Endocrinol.*, 176, 513-518, 2012.
- 2) 安田明和, 茂里康: Topological Mass Spectrometry Analysisによる翻訳後修飾された脳下垂体ホルモンの分子多型の新発見, *生化学*, 84, 582-587, 2012.
- 3) Scholtz JM, Qian H, York EJ, Stewart JM, Baldwin RL.:Parameters of helix-coil transition theory for alanine-based peptides of varying chain lengths in water, *Biopolymers*, 31, 1463-1470, 1991.
- 4) Inagaki H, Akagi M, Imai H, Taylor R, Kubo T.:Molecular cloning and biological characterization of novel antimicrobial peptides, pilosulin 3 and pilosulin 4, from a species of the Australian ant genus *Myrmecia*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 428, 170-178, 2004.
- 5) Hellsten U, ほか 47 名: The genome of the western clawed frog *Xenopus tropicalis*, *Science*, 328, 633-636, 2010.
- 6) 岩室祥一: 抗菌ペプチドによる先天的生体防御機構と内分泌系の接点を探る, *比較内分泌学*, 35, 71-92, 2009.
- 7) Zasloff M.: Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two forms and partial cDNA sequence of a precursor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84, 5449-5453, 1987.
- 8) Zasloff M, Martin B, Chen H.: Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85, 910-913, 1988.
- 9) Hirai Y, Yasuhara T, Yoshida H, Nakajima T, Fujino M, Kitada C, *Chem. Pharm. Bull.*, 27, 1942-1944, 1979.
- 10) 日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会報告: 微量液体希釈による MIC 測定 (微量液体希釈法), *Chemotherapy.*, 38, 102-105, 1990.
- 11) National committee for clinical laboratory standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically-second edition, tentative standard, NCCLS, Villanova, 1988
- 12) Shigeri Y, Yasuda A, Hagihara Y, Nishi K, Watanabe K, Imura T, Inagaki H, Haramoto Y, Ito Y, Asashima M.: Identification of novel peptides from amphibian (*Xenopus tropicalis*) skin by direct tissue MALDI-MS analysis, *FEBS J*, doi: 10.1111/febs.13107, 2014.

角度依存性のない構造発色性顔料の調製

名古屋大学大学院工学研究科

竹 岡 敬 和

We are able to observe a colour due to the interference of light from microstructures composed of different refractive index materials that is comparable to the visible wavelength of light; such a colour is called a structural colour. Because structural colour is fadeless and no energy is lost from the colour mechanism, structurally coloured materials are expected to be used for energy-saving reflective displays and sensors. Previously, however, the word “iridescence” rather than “structural colour” was used to describe the property of a surface that appears to change colour as the viewing angle or the angle of light illumination changes. Thus, people who are aware of the concept of the interference colour have a strong impression that all structurally coloured materials change hues when viewed from different angles, as indicated by the term “iridescence.” In fact, most artificial structurally coloured materials that we and other groups have studied so far change their hue depending on the viewing and light illumination angles because these structural colours are derived from Bragg reflection. Such angle dependence presents a barrier for developing displays and sensors using structurally coloured materials. Therefore, my group has been working to develop angle-independent structural coloured materials. The latest most notable ones are amorphous array systems. In this report, I describe the fabrication and the optical nature of the low-angle-dependent structurally coloured amorphous arrays.

1. 緒 言

長期間屋外に貼られたポスターが、色あせた状態になっているのを目にした人は多いだろう。このようなポスターは、紫外線によって分解しやすいイエローやマゼンダの染料(有機色素)が使われているため、長い時間を太陽光に晒されたことで、それらの染料は元の色合いを失ってしまったのである。他にも、水分や化学物質の影響を受けて酸化還元反応を起こして退色する場合もある。それに比べて、顔料の中には、耐光性、耐水性、耐薬品性、抗酸化還元性などを有するもの(特に無機顔料)が多く、様々な用途に利用されている。しかし、無機顔料は毒性の高い重金属を使用した化合物からできているものも多いため、化粧品など、人に直接触れるような用途には使用できる種類が限定されている。染料に関しても、化粧品などへの配合に関して、規制が厳しくなっている。とりわけ、ヨーロッパを中心に広がる環境に対する配慮から、その他の用途への染料や顔料に使用する材質についても、今後ますます規制が強化されることが考えられる。しかし、我々が豊かな生活を送る上で、様々な鮮やかな色を示す退色しない染料や顔料(色材)の存在は欠かせなくなっている。さらに、低毒性、低環境負荷性を備えた色材が安価に大量に得られるようになれば、今

後の我々の暮らしが永続的に発展可能で快適になることを後押しするだろう。そのためには、自然界に豊富に存在し、環境負荷性が低い自然調和性に優れた化合物を利用した色材作りが求められる。申請者は、人や環境に優しい材料から成る、光の波長ほどの微細構造の存在により色を示す構造発色性材料が、以上の要求を満たす色材になり得ると考えて研究に取り組んでいたところ、人や環境への負荷の低い材料から調製した白い微粒子と黒い微粒子を混ぜることで非常に鮮やかな角度依存性のない構造発色を示すことを発見した¹⁾。本研究では、マンドリルやある種のトンボ類の表皮で観測される角度依存性のない構造発色が参考になると考え、この構造発色性材料の発色メカニズムの解明に取り組んだ。申請者の発見した発色メカニズムが環境や人に優しい新顔料調製のヒントとなり、問題が指摘されている従来の色素や顔料に取って代わるものとなればと考えている。

2. 実 験

2.1. 材料の選定

粒径の揃ったサブミクロンサイズの微粒子としては、これまで有機高分子からなる系とシリカや酸化チタンなどの無機微粒子からなる系を用いている。本研究では、人や環境に優しい材質からなり、安価で大量に調製しやすく、光学的な評価を行いやすいということを条件に微粒子を構成する材料の選定を行った。シリカ微粒子の主成分であるSiO₂は、化学的に非常に安定な化合物で、化学実験のガラス器具などに利用されており、また、土壌の主成分としても存在している。さらに、シリカ微粒子の集合体が構造色を示すような粒径200nm以上のサブミクロンサイズな



Preparation of angle-independent structural colored pigments

Yukikazu Takeoka

Department of Molecular Design & Engineering, Nagoya University

らば生体への毒性も見られないことから、生体に対しても非常に安全な材料である。また、屈折率も 1.4 前後で、実験上の評価も行いやすい。よって、粒径の揃ったサブミクロンサイズの微粒子としては、シリカから成る微粒子を主に利用した。サブミクロンサイズのシリカ微粒子はパウダー状の形態では、可視光を全波長領域に渡って散乱するため、白い粉である。また、黒色の顔料としては、上の条件と同様にして選定すると、カーボンブラック (CB)、酸化鉄 (Fe_3O_4)、銀微粒子などが候補としてあげられる。酸化鉄 (Fe_3O_4) や銀微粒子を用いた場合には、磁性応答性、光応答性を示す構造発色性材料を開発できる可能性がある。紙面の関係上、本稿では CB を用いた結果のみを示す。

2. 2. コロイドアモルファス集合体の構築

サブミクロンサイズの微粒子 (コロイド微粒子) が短距離秩序を持って集合した状態をコロイドアモルファス集合体と呼ぶことにする。このサイズのコロイド微粒子は、比較的秩序だった配列になりやすく、短距離秩序だけでなく、長距離秩序も有するコロイド結晶となる場合が多い。集合体がアモルファス化することを促進するためには、スプレーによるコロイド微粒子懸濁液の噴霧やスピコート法によって、急激な溶媒の蒸発とコロイド微粒子の集合化が達成できるような調製条件が必要と考えている。コロイドアモルファス集合体の構造を再現良く調製できる方法を選択した。本稿では、スプレー法を利用した結果を示す。

2. 3. コロイドアモルファス集合体から観測される彩度の高い発色メカニズムの解明

コロイド微粒子が短距離秩序を持って配列すると、その秩序の距離や系の平均の屈折率に応じて、各微粒子から散乱された光が干渉することで特定の波長領域の光が強め合

うことが考えられる。つまり、干渉性散乱を生じることが、彩度の高い構造色を示す上での必要条件であると思われる。しかし、干渉による強め合いも相殺も起こらない散乱光も存在し、そのことが可視光全領域に渡って光を散乱してしまっている可能性がある。つまり、非干渉性の散乱が、コロイドアモルファス集合体が白く見えることの原因であると考えている。そこへ、黒色微粒子を添加すると、非干渉性の散乱を軽減し、干渉性の散乱が強調されるようになる結果、彩度の高い構造色を示すようになっていないかと仮定して、その発色性メカニズムを明らかにすることに取り組んだ。具体的には、1) アモルファス集合体からなる膜に対して照射する光の角度 (θ) と、サンプルから散乱された光を捕らえる検出器の角度 (ϕ) を変えて測定した反射スペクトルを測定すること、および、2) 直線偏光をかけた光をコロイドアモルファス集合体に照射し、散乱した光を様々な角度で配した直線偏光フィルターを付与した検出器で捕らえることを行った。前者では、照射された光がコロイドアモルファス集合体によって、どの方向に最も強く光が散乱されるのかがわかり、後者からは、コロイドアモルファス集合体からの光の散乱において単一散乱および多重散乱がどれだけ寄与しているのかを知ることができる。

3. 結果と考察

まずは、シリカ微粒子を分散させた懸濁液を調製した。分散媒には、シリカ微粒子を分散できて、揮発性の高いメタノールを選択した。メタノールに分散したシリカ微粒子溶液を、圧縮空気を利用してエアスプレーガンで噴霧する (図 1) と、スプレーのノズルから約 30 cm のところに置いたガラス板などの上にシリカ微粒子が均一な膜として堆積した (図 2a)。利用するシリカ微粒子の粒径に応じて、得られた膜の色は異なり、粒径 280 nm の微粒子、360 nm の

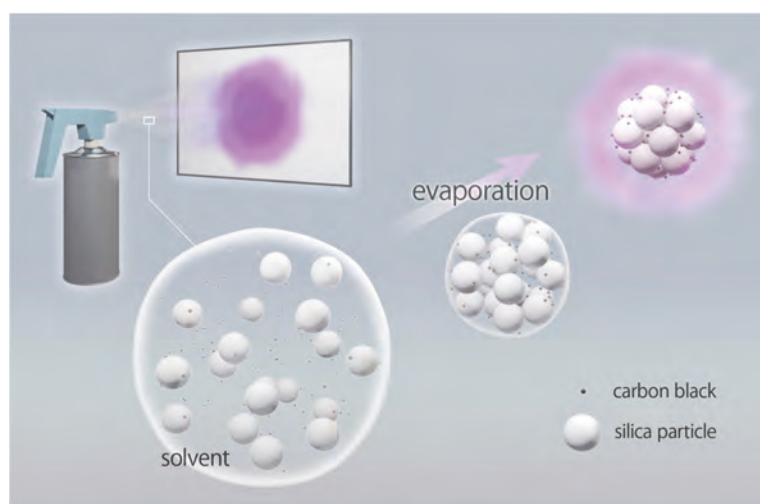


Figure 1 Schematic illustration of the spray method. Owing to the rapid evaporation, the silica particles are dried before they reach the canvas, and an amorphous aggregation state is achieved.

微粒子を用いた場合には、それぞれ、非常に淡い緑色、および、淡い赤色となった。それぞれのシリカ微粒子からなる膜を、積分球を用いて反射スペクトルを測定すると、それぞれ、460 nm、610 nm 辺りに p-PBG と見られるピークがはっきりと観測できた (図 2b)。また、図 2c には、粒径 360 nm の微粒子から得られた膜の透過スペクトルの角度依存性を示す。透過スペクトルでも反射スペクトル同様に p-PBG が 610 nm 辺りに見られ、かつ、この p-PBG の位置には角度依存性が生じないことがわかった。この角度依存性がない p-PBG は、シリカ微粒子集合体の短距離秩序の存在によるミ共鳴のエバネッセントカップリングが原因と考えられ、シリカ微粒子がアモルファス集合体を形成していることを示している。

このことを確かめるために、粒径 360 nm の微粒子集合

体を走査型電子顕微鏡により観察した。図 3a および 3b に、粒径 360 nm の粒子からなる膜の走査型電子顕微鏡写真を示す。シリカ微粒子が、ラズベリーのような形で様々な大きさに凝集した二次微粒子となっていることが分かった。表面の構造を捕らえた電子顕微鏡写真 (図 3b) のフーリエ変換像 (図 3c) からは、ハローパターンが観測され、粒子がアモルファス状に並んでいることが分かる。メタノールにシリカ微粒子を分散させた溶液をスプレー法によって噴霧することで生じた液滴は、メタノールの急激な蒸発に伴って微粒子が球状の集合体 (二次微粒子) を形成し、ガラス板上に堆積したためと考えられる。この二次微粒子の内部におけるシリカ微粒子の集合状態を調べるために、超高压電子顕微鏡による三次元画像を撮影し、シリカ微粒子が占有する体積分率を見積もった。

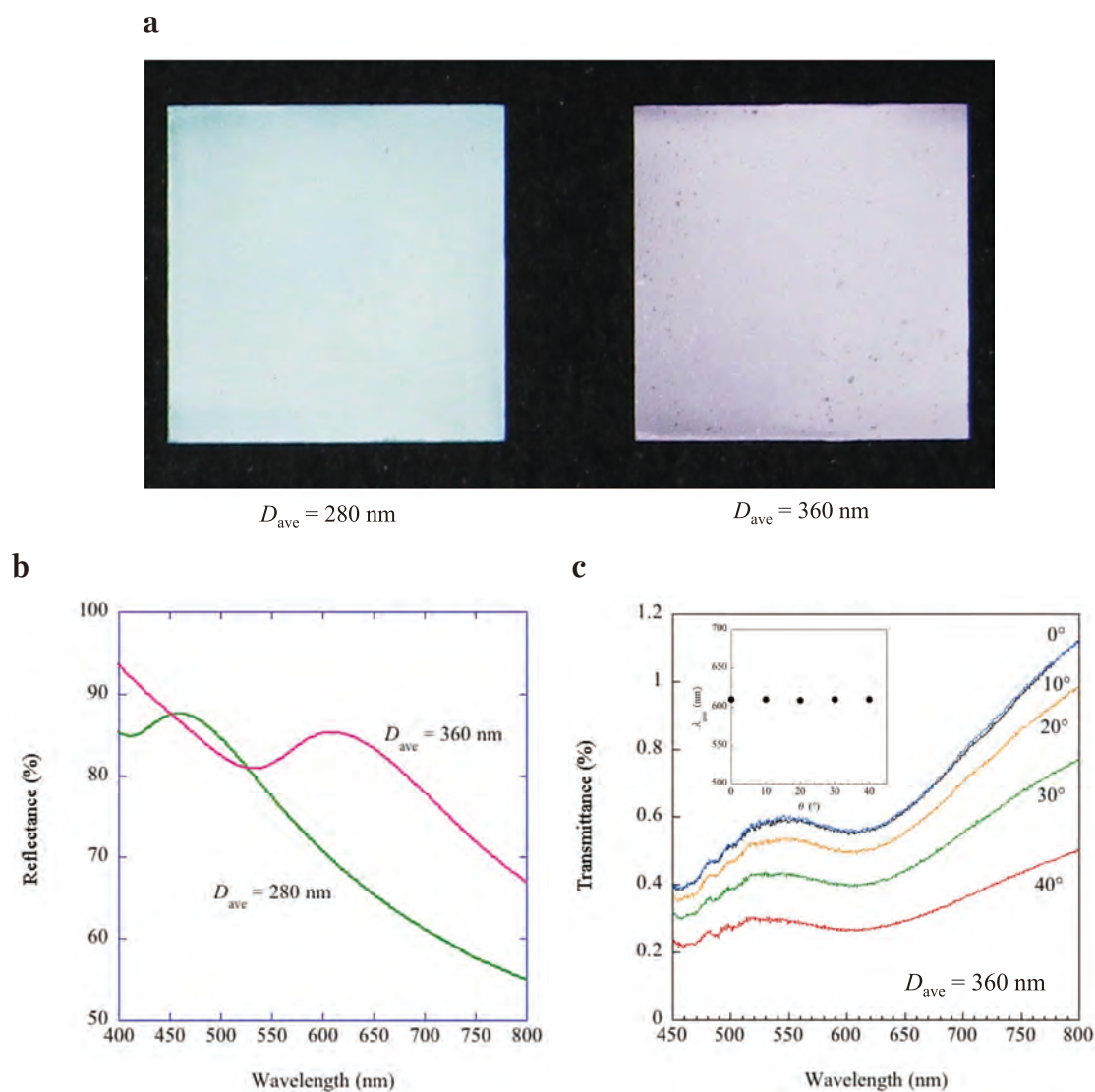


Figure 2 a, Optical photographs of whitish structural-coloured membranes composed of 280 nm silica particles and 360 nm silica particles. b, The reflection spectra of the membranes shown in Figure 2a obtained using the integrating sphere measurement. c, The transmission spectra of the membranes shown in Figure 2a, which were measured at various incident angles relative to the surface of the membranes. Inset: Plots of the position of the dip wavelength ($\lambda_{\min}$) versus the incident angle, θ .

以上より、シリカ微粒子がアモルファス集合体を形成した結果生じたp-PBGが可視光領域内にいることが原因で、作製した膜はうっすらとした状態だが色を示していると分かった。しかし、図2bより、p-PBGの領域以外の可視光も全体的に散乱されていることが分かる。人間の目の網膜中にある3種類の錐体細胞は、それぞれ、420nm、534nm、564nmをピークに可視光を検知することができ、それぞれが、青色(B)、緑色(G)、赤色(R)に対応する。我々人間は、これら3種類の錐体細胞が検知できる波長の光量に応じて、光やものが何色に見えるかを判断している。可視光全体に渡って光を反射するようなものに対しては、全ての錐体細胞が光を検知してしまう結果、色の彩度(saturation)が低下し、白っぽく見えるようになる。p-PBGによって反射された光を、色としてより鮮やかに捕らえられるようにするには、p-PBGの領域以外の光の散乱を抑えなければならない。

そこで、可視光全領域に渡って光を吸収することができるカーボンブラック(CB、平均粒径28nm)をシリカ微粒子の集合体中に混入するため、シリカ微粒子のメタノール分散溶液中にCBを分散し、それをスプレーによって噴霧した。図4aに、CBの含有量を変えて調製した膜の写真を示す。粒径280nmの微粒子(上)、360nm微粒子(下)からなるアモルファス集合体は、CBの量の増加に伴って、より明確な色が観測できるようになった。図4bに示した反射スペクトルからは、CBの量の増加に伴って、p-PBGのピーク強度はさほど変化しないのに対して、可視光領域全体に渡って見られた散乱が軽減されていることが分かる。つまり、p-PBGによる光の散乱がより際だった結果、色としても明確に捕らえられるようになったのである²⁾。

CBの添加効果を調べるために、図5aのような方法によって、アモルファス集合体から観測される偏光スペクトルを測定した。膜面に対して垂直な方向から偏光フィルター

を介して光を照射し、その方向より 10° の位置に置いた検出器の手前にも偏光フィルターをおいた。光源側においた偏光フィルターと検出器側においた偏光フィルターの偏光方向が平行な場合と、直交する場合に、粒径280nmの微粒子のアモルファス集合体から観測される反射スペクトルを図5bに示す。両偏光フィルターの方向が平行な場合に観測できた反射スペクトルには、CBの有無にかかわらず、約510nmの位置にピークが見られた。図2bおよび4bの反射スペクトルで観測されたピークの位置と少し異なるのは、積分球を用いた場合にはあらゆる方向に散乱された光を捕らえているのに対して、この偏光スペクトルでは一方方向に反射された光のみを捕らえているからである。一方、両偏光フィルターの方向が直交した場合には、ピークは見られないが、CBを含まない膜は、可視光全体に渡ってほぼ均一に光が散乱されることを示すスペクトルが観測された。しかし、CBを加えた膜では、CBを含まない膜で観測された光の散乱はほぼ抑制されていることが分かった。両偏光フィルターの方向が平行な場合に観測されるスペクトルは、偏光された光が膜によって偏光解消されずに反射された成分を観察している。つまり、この膜から観測されるp-PBGは、膜の表面の構造による単一散乱によって生じていると考えられる。一方、両偏光フィルターの方向が直交した場合に観測されるスペクトルは、偏光された光が膜内部の構造によって多重散乱を受けて、偏光解消した光を観測している。よって、可視光の全波長領域において生じている散乱には、膜内部で生じた光の多重散乱の寄与が大きいと言える。両偏光フィルターの方向が平行な場合、および、直交した場合に観測された反射強度の比を、波長に対してプロットした結果を図5cに示す。この結果は、各波長における多重散乱の寄与を表している。CBを含まない系においては、p-PBGの位置において、単一散乱が大きくなるものの、全体的に多重散乱の寄与が大きい。一

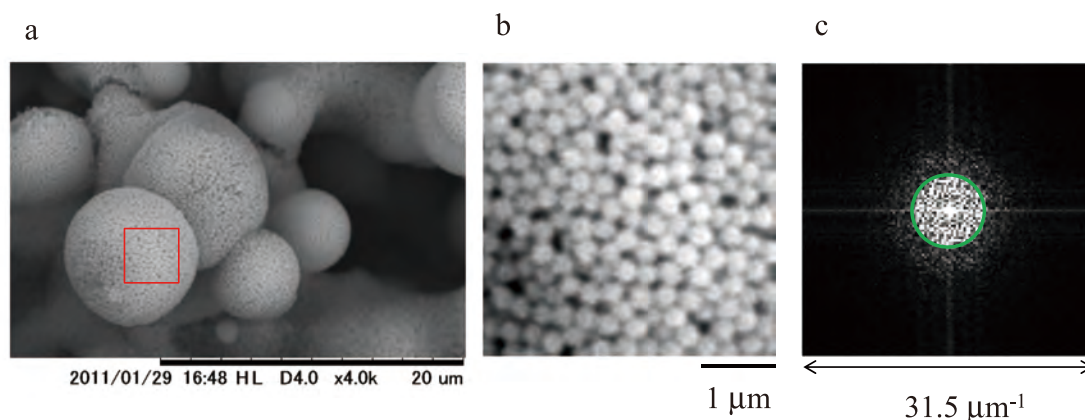
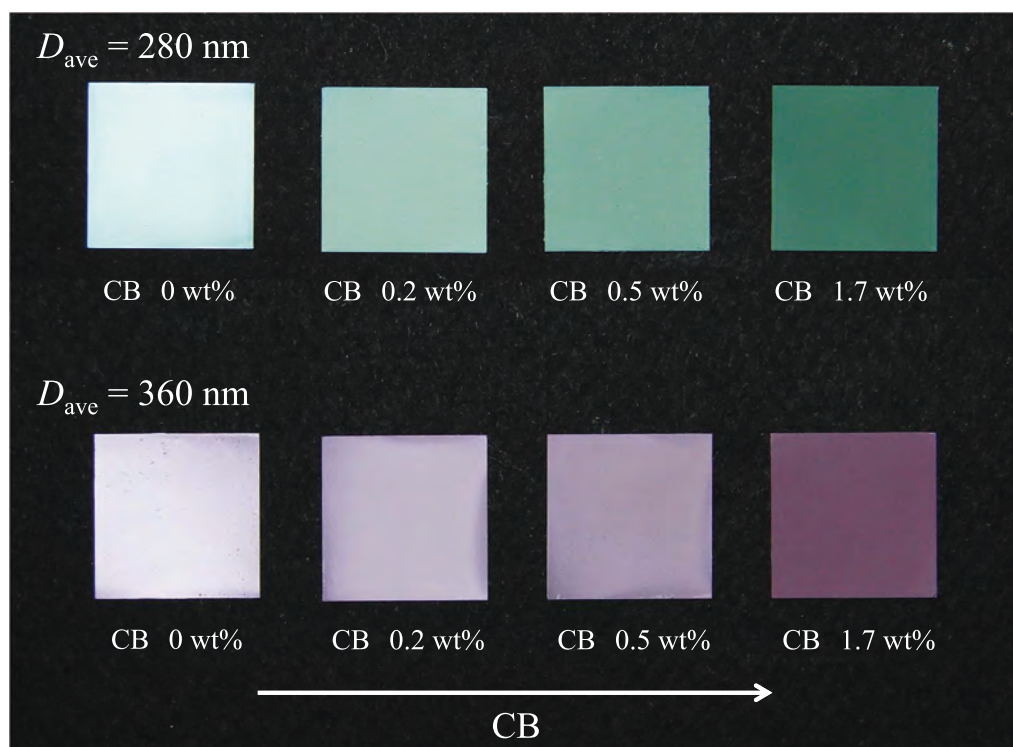


Figure 3 a, An SEM image of the membrane composed of 360 nm silica particles. b, A magnified view of the red-framed region of the SEM image shown in Figure 3a. c, The two-dimensional Fourier power spectra obtained from the SEM image in Figure 3b.

a



b

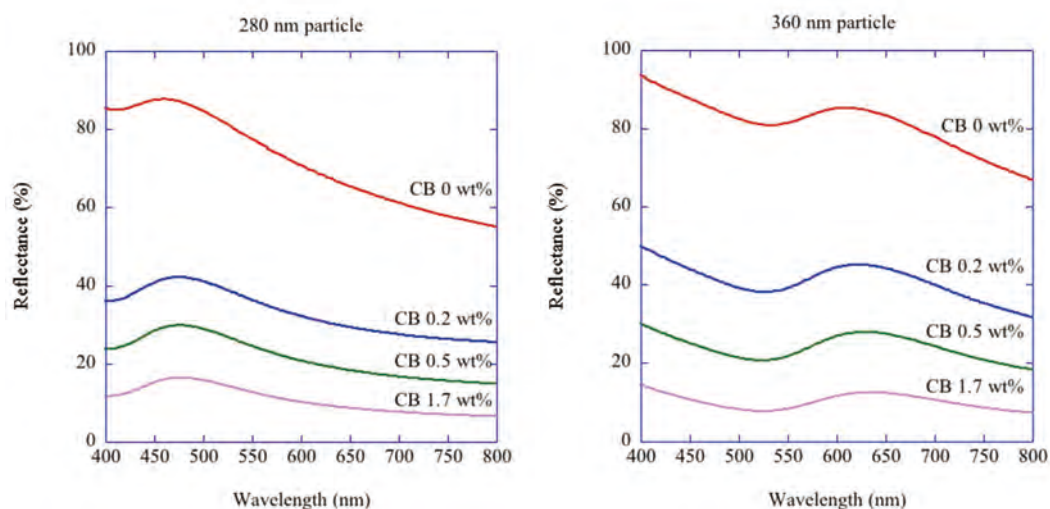


Figure 4 a, Optical photographs showing the colour change in the membranes composed of 280 nm particles with varying amounts of CB and 360 nm silica particles with varying amounts of CB. b, The reflection spectra of the membranes shown in Figure 4a obtained using the integrating sphere measurement.

方、CBを添加した系では、多重散乱が抑制され、その結果、彩度を上昇させている。短波長領域では、偏光解消された成分が強くなっているが、これは、微細構造に比べて波長が短くなると、散乱効率が上昇するという、一般的な振る舞いと一致している。

アモルファス集合体の発色特性をより詳しく調べるため

に、双方向反射率分布関数BRDF (Bidirectional Reflectance Distribution Function) の測定を行った (BRDFは入射方向と反射方向の二つの角度の関数として反射率を表したもので、colorantの標準的な評価方法である)。アモルファス集合体からなる膜に対して照射する光の角度 (θ) と、サンプルから散乱された光を捕らえる検出器の角度 (ϕ) を変えて測

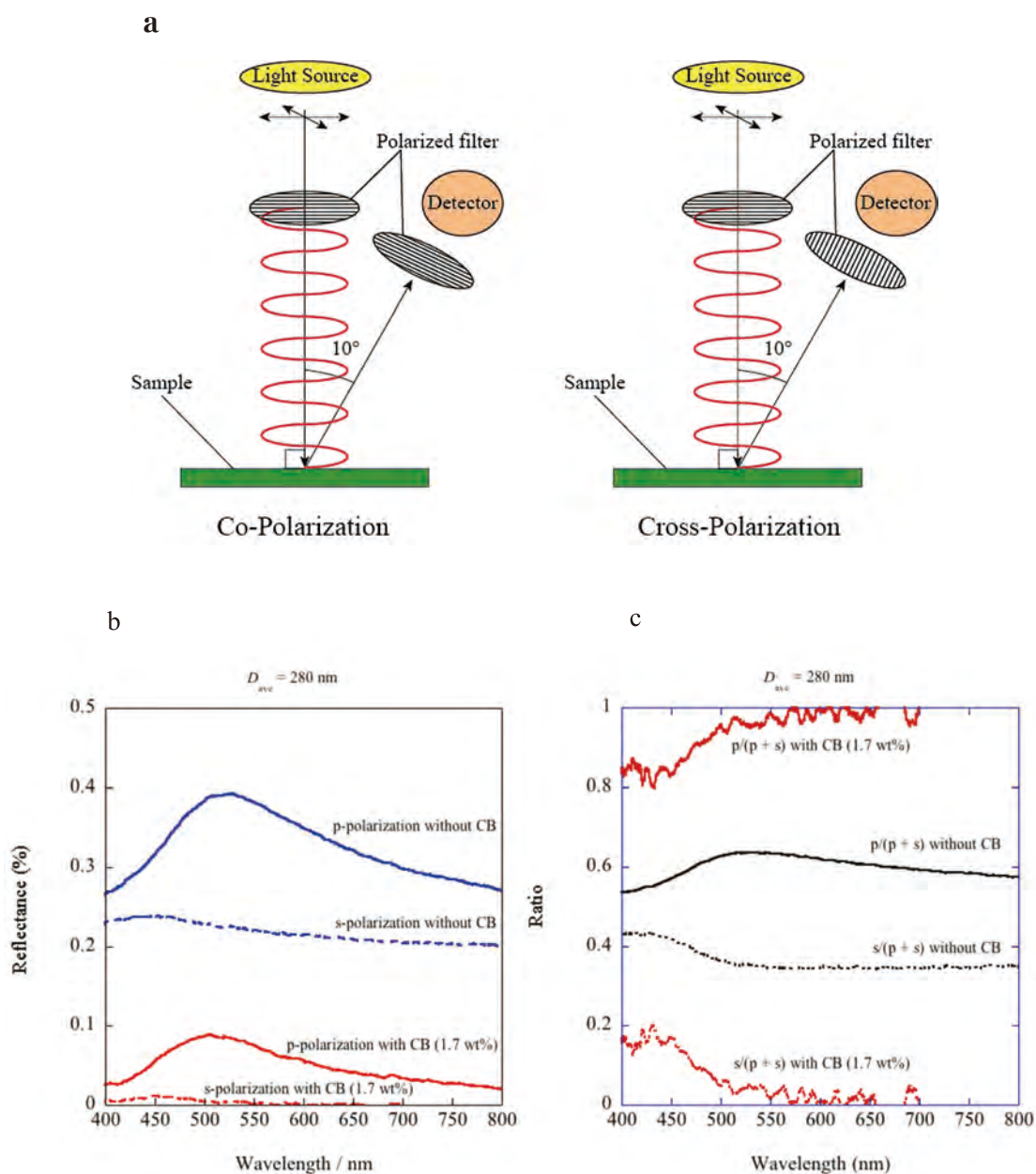


Figure 5 Polarisation spectra of the structural-coloured membranes. a, A schematic of the instrumental setup used for obtaining the co-polarisation (p-polarisation) and cross-polarisation (s-polarisation) spectra. b, The co-polarisation and cross-polarisation reflection spectra of the membranes composed of 280 nm silica particles with/without CB. c, Plots of the ratio of the co-polarisation and cross-polarisation components to the sum of the co-polarisation and cross-polarisation components.

定した反射スペクトルを測定した（図6a）。そして、様々な θ 、および、 ϕ の組み合わせで測定した反射スペクトルから、p-PBGのピーク的位置における反射強度を各 $\theta - \phi$ に対してプロットした等高線図を図6bに示す。 $\theta = \phi$ を満たす線上に、強い反射が存在することがわかった。このことは、アモルファス集合体に照射した光はp-PBG

においては、鏡面反射方向ではなく、後方に強く散乱されることを意味する。後方散乱による発色は、波長依存性がない、界面での鏡面反射の影響を受けにくい、発色材料として好ましい性質であるといえる。自然界の構造色の代表例であるモルフォチョウが、同様な強い後方散乱を持っていることは興味深い。

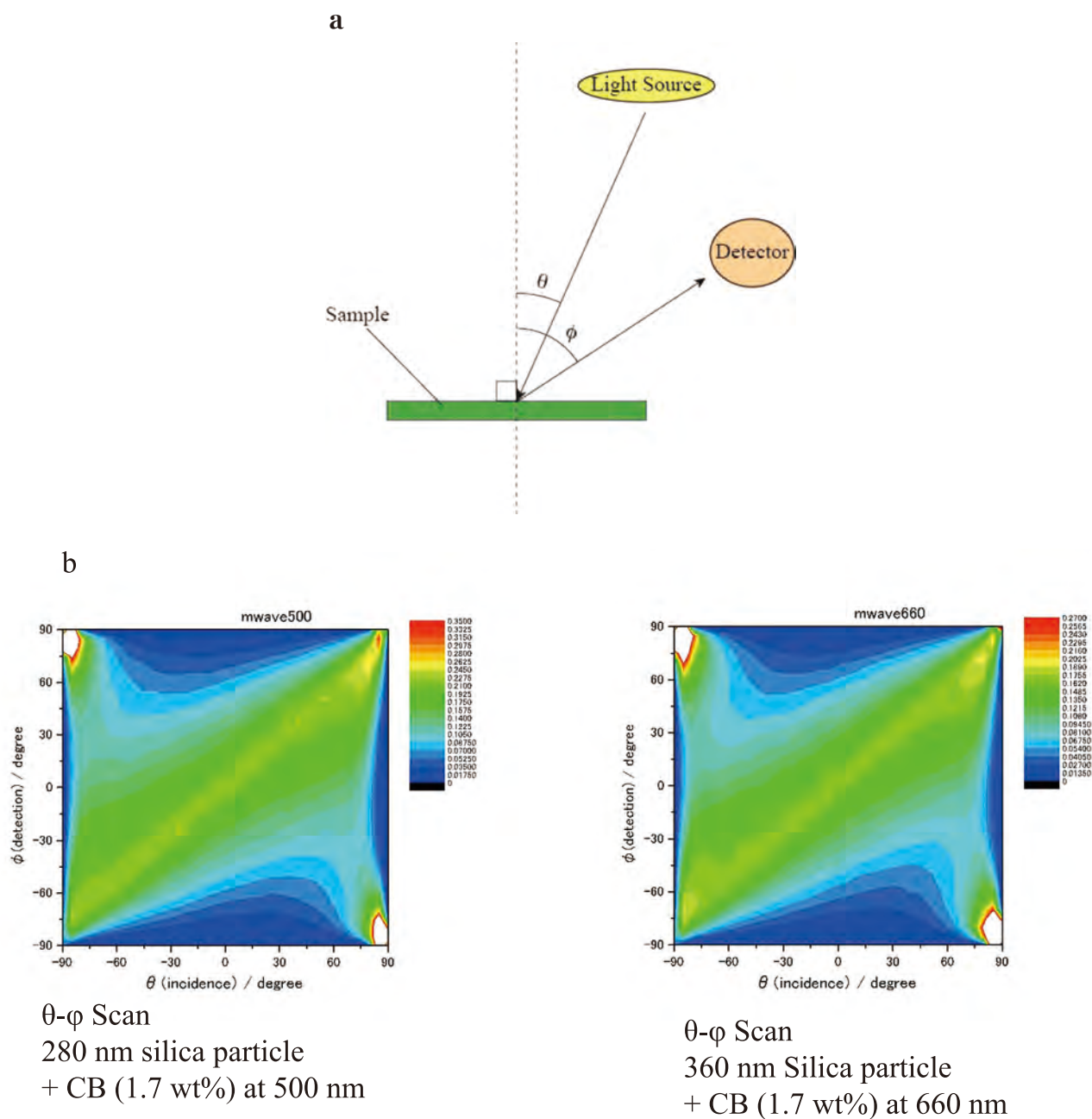


Figure 6 The BRDF of spectra of structural-coloured membranes. a, A schematic of the setup used to obtain the BRDF. b, Contour map of the reflected intensity versus the θ - ϕ coordinate at the peak wavelength of the p-PBG for membranes composed of 280 nm and 360 nm silica particles with 1.7 wt% CB.

謝 辞

本研究にご助成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深謝申し上げます。

(引用文献)

1) M. Harun-Ur-Rashid, A. Bin Imran, T. Seki, M. Ishii,

H. Nakamura, Y. Takeoka, *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 579-583.

2) Y. Takeoka, S. Yoshioka, M. Teshima, A. Takano, M. Harun-Ur-Rashid, T. Seki, *Scientific Reports* **2013**, *3*, 2371.

膜透過性ナノ集合体を封入した固体エマルションの開発

山口大学大学院理工学研究科

通 阪 栄 一

A transdermal administration on drugs has been limited due to very low permeability of drugs across skin. Especially, it is generally regarded that hydrophilic macromolecules such as proteins, peptides, and vaccines cannot penetrate across skin. In this study, a solid emulsion containing membrane permeability nanoassembly was developed for the transdermal delivery of the protein drugs. The nanoassembly was formed by the complex of surfactant and protein. The usage of a solid fat and gel-vegetable oil as oil phase of the emulsions was examined. Moreover, the surface of oil droplets was coated by the layer-by-layer method with polymer electrolyte. These methods made the stability of the emulsion enhance. In addition, the membrane permeability of protein was evaluated using the artificial epidermal membrane. In this study, the acceleration of protein transport was largely induced by the compatibility of the nanoassembly with the hydrophobic epidermal membrane. It is thus possible that the emulsion containing the nanoassembly resulted in the acceleration of protein transport across the epidermal membrane.

1. 緒 言

近年、動物細胞や微生物を利用して、ペプチドやタンパク質などのバイオ医薬品の製造が活発に行われている。これらバイオ医薬品は、低分子医薬品に比べ効果が大きく副作用も少ないため、期待は非常に大きい。これらの分子の大部分は確実に体内へ導入できる注射により投与されているが、患者の苦痛を回避し、患者自身が簡便に投与できる、塗る製剤の開発が望まれている。

塗るタンパク質製剤において最大の障壁は、表皮最外層の角質層のバリアーである。角質層は死細胞からなる疎水性の高い多層膜であり、外部物質の皮膚浸透において高いバリアー機能を示す。特に、親水性高分子であるタンパク質は、この疎水性膜の通過が困難である。これまでに、親水性高分子のタンパク質の吸収性改善を目指して物理的な方法や化学的手法が検討されている。

例えば、物理的な方法として、マイクロニードルにより角質層だけに小孔を開ける手法や、エレクトロポレーションで脂質に揺らぎを与える、あるいはソノフォレシスでキャビテーションを与えることで一過性の小孔を形成させる手法がある¹⁻³⁾。

また、化学的な方法としては、角質層に存在する脂質に作用し薬物の浸透性を向上させる低分子化合物が利用される⁴⁾。また、エマルションやリポソームは脂質から形成さ

れるため、角質層の脂質に浸透しやすい微粒子であり、キャリアとしての利用も検討されている^{5,6)}。

このように、タンパク質の経皮投与が試みられているが、体内取り込み量は、注射で投与した場合と比べて極端に低く、また安全性の面で使用が制限されるものもあり、十分な成果は得られていない。

我々は、これまでに膜透過性に優れた脂質集合体を開発した⁷⁻⁸⁾。この膜透過性ナノ集合体は、界面活性剤でタンパク質をコーティングすることで形成され、表面を脂溶性に改質することで、細胞膜との親和性が高くなり、タンパク質の細胞への導入を促進することが確認されている。この膜透過性ナノ集合体は、調製が簡便、薬物封入率が高い、安定性が高い、タンパク質の大きさ・化学的特性に関係なく封入でき、内封後の活性維持も可能といったタンパク質キャリアに適した特徴を持っており、化粧品への利用価値も高い技術である。そこで本研究では、このナノ集合体を油に分散させ乳化したSolid-in-Oil-in-Water (S/O/W) エマルションをタンパク質のキャリアとして応用し、皮膚透過性に優れた製剤の開発を目指している。

塗るタンパク質製剤の開発のために、まず不安定なコロイド粒子であるエマルションを安定化し長期保存可能な皮膚透過性の高いS/O/Wエマルションの調製が不可欠である。本報告では、S/O/Wエマルションの安定化のため固体エマルションの調製法について検討した結果を報告する。また、S/O/Wエマルションの皮膚透過性を確認する前段階として、人工膜をモデルとし、S/Oサスペンションを用いたときの膜透過性についても検討を行った。

2. 実 験

2. 1. S/O/Wエマルションの調製

ウシ血清アルブミン (BSA) 水溶液 (10 mL) とショ糖エル



Development of solid emulsions containing membrane permeability nanoassembly

Eiichi Toorisaka

Graduate school of science & engineering,
Yamaguchi University

カ酸エステル (ER-290) 含有ヘキサン溶液 (20 mL) をホモジナイザー (ULTRA-TURRAX T25: IKA Labortechnik) (24000 rpm, 2 min) で高速攪拌後、一晚凍結乾燥し (FREEZE DRYER FD-1000: EYELA), 界面活性剤-薬物集合体を得た。その後、複合体を大豆油 (10 mL) と混合し、超音波発振機を用いて分散させることで、S/O サスペンションを調製した。

調製したS/Oサスペンション (5 mL) と1 wt% 水溶性界面活性剤 (コール酸ナトリウムとTween20) 含有水溶液 (10 mL) をホモジナイザー (ULTRA-TURRAX T25: IKA Labortechnik) (13500 rpm, 1 min) で高速攪拌し、S/O/W エマルションを調製した。その後、親水性シラス多孔質ガラス膜 (SPG) を用いて膜乳化を行うことで、エマルションの油滴粒子径の制御を試みた。

2. 2. 油相の固体化

2. 1. の大豆油の代わりにカカオ脂を用いて同様に調製したS/O/W エマルションを調製した。また、2. 1. と同様にS/Oサスペンションを調製した後、1 wt% 植物 (唐ゴマ) 抽出の天然油脂系脂肪酸を油滴のゲル化剤としてS/Oサスペンションに添加し、同様の方法で乳化したS/O/W エマルションを調製した。

2. 3. 交互積層法による高分子コーティングエマルションの調製

スターラーで攪拌した高分子溶液 (10 mL) に、S/O/W エマルション溶液 (5 mL) を滴下 (1 mL/min) した。滴下後、そのまま10分間攪拌した。高分子溶液としては、カチオン性であるキトサン溶液とアニオン性であるアルギン酸ナトリウム溶液を交互に用いてコーティングを行った (図1)。

2. 4. エマルション特性評価

2. 4. 1. 安定性評価

調製したS/O/W エマルション及び粘膜附着性微粒子を4℃で静置し、エマルション内へのタンパク質の封入量の経時変化を評価した。封入量は、外水相に漏洩したタ

ンパク質の濃度を、吸光光度計 (280 nm), あるいはDC Protein Assayにより測定した。

2. 4. 2. 粒子特性評価

レーザー回折/散乱式粒度分布測定装置 (LA-920: HORIBA) を用いての粒度分布測定及び光学顕微鏡を用いての観察を行った。

また、エマルション表面電荷の測定のため、ゼータ電位測定を行った。

2. 5. 膜透過性評価

2. 5. 1. 評価用パッチの調製

5 wt% エチルセルロースのアセトン溶液を調製し、円形 (外枠: 厚さ1.0 mm, 直径6.0 mm, 内枠: 厚さ1.0 mm, 直径4.8 mm) の型に0.04 mL滴下し、室温下で乾燥させた。次に、3 wt% ヒドロキシプロピルセルロース (HPC) を、エチルセルロース層上に0.1 mL滴下し、一昼夜凍結乾燥させHPC多孔質層をもつパッチを調製した。その後、HPC層にS/Oサスペンション0.02 mLを含浸させ、パッチ製剤を調製した。S/OサスペンションにはFITC修飾インスリン (FITC-Ins) を封入した。脂溶性集合体中の界面活性剤としては、ショ糖エルカ酸エステル (ER-290), ショ糖オレイン酸エステル (O-170), ショ糖ラウリン酸エステル (L-195), ポリグリセリンエルカ酸エステル (ER-60D), ポリグリセリンオレイン酸エステル (O-50D) を使用した。

2. 5. 2. 人工角質層膜を用いた膜透過性評価

水平拡散セルを用いて膜透過実験を行った。膜透過性の評価には、人工膜 (疎水性メンブレンフィルターに10 wt% レシチンと0.5 wt% コレステロールを含むドデカン溶液を含浸させたもの) を用いた。パッチ製剤を人工膜に貼り付け、セル中にリン酸緩衝液を入れ、膜透過実験を行った。このとき、恒温槽 (EYELA BATH SB-9, EYELA) を用いてセルの温度を37℃に保った。時間毎に溶液を採取し、FITC-Insを蛍光分光光度計 (VersaFluor™ Fluometer, BIO-RAD) (励起波長490 nm, 蛍光波長520 nm) で測定した。

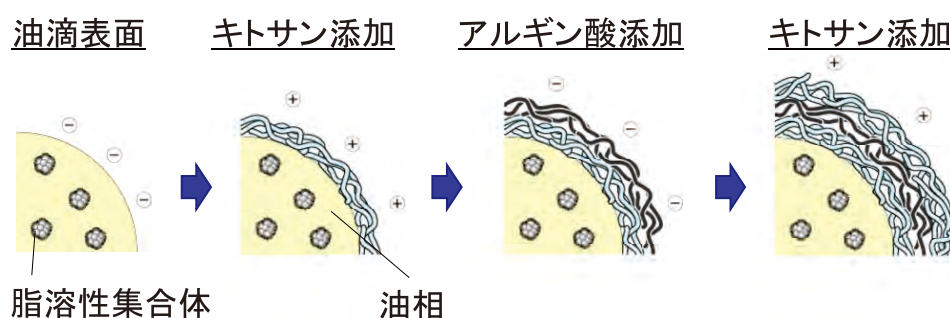


図1 交互積層法概念図

3. 結果と考察

3.1. エマルションの粒子径制御

一般に、エマルションの粒子径が細かく均一であるほど、エマルションは安定化する。また、粒子径を小さく揃えることで、皮膚との接触面積の向上により、より迅速で効率的なタンパク質の吸収が望め、また、使用感の向上にも繋がると考えられる。

そこで、膜乳化による粒子径の制御を試みた。図2に、調製したS/O/Wエマルションの粒度分布及び光学顕微鏡写真を示す。ホモジナイザー攪拌後、膜乳化を行うことで膜の細孔径に沿った粒子径にエマルションを制御できることが確認された。

3.2. 油相の固体化

安定な固体エマルションを得るため、油相の固化を試み

た。油相を固めることにより、内部に封入した膜透過性ナノ集合体の移動が阻害され、安定性が向上すると考えた。

固化する方法として、固体脂であるカカオ脂を利用する方法と、天然油脂系脂肪酸をゲル化剤として油滴をゲル化する方法を試みた。

安定性の結果を図3に示す。カカオ脂を用いたときも、ゲル化剤を用いたときも、封入率に減少が見られた。特にカカオ脂で、初期の漏洩が多い傾向がみられた。カカオ脂を用いた場合、粒子の調製中に固化と融解を繰り返すことにより膜透過性ナノ集合体が不安定化したため、より多くのタンパク質が漏洩したと考えられる。

3.3. 高分子コーティングエマルション

油滴の固化では十分な安定性が得られなかったことから、油滴表面を高分子コーティングすることで固体化することを試みた。

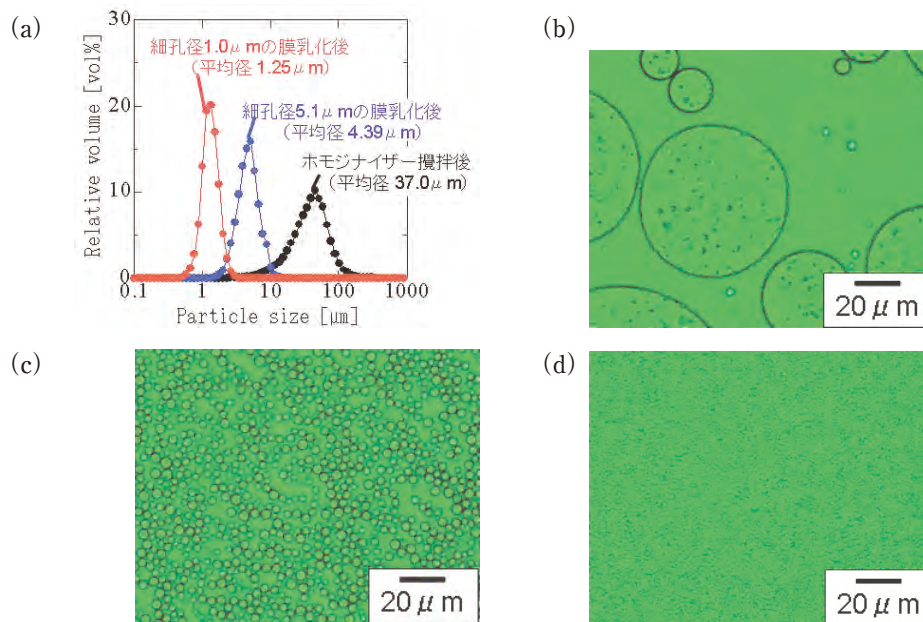


図2 S/O/W エマルションの粒度分布及び光学顕微鏡写真
(a) 粒子径分布 (b) ホモジナイザー攪拌後
(c) 膜乳化後(細孔径 5.1 μm) (d) 膜乳化後(細孔径 1.0 μm)

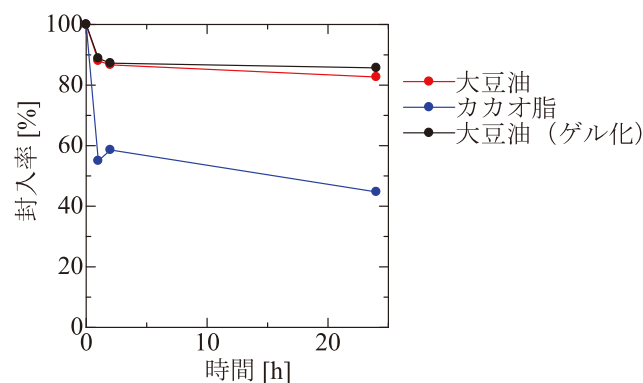


図3 油種によるBSA封入率の経時的変化

アニオン性界面活性剤でS/O/Wエマルジョンを調製し、そのエマルジョンをカチオン性高分子の溶液に加えることで、油滴表面を高分子コーティングすることを試みた。さらに、エマルジョン表面に対してカウンターイオンとなるイオン性高分子溶液を、交互に用いることで多層コーティングを試みた。

3.3.1. 水溶性界面活性剤の影響

交互積層法では、粒子表面と高分子間の静電的相互作用によって、粒子に高分子コーティングを行う。そのため、表面電荷の制御が良好な粒子調製に重要である。そこで、はじめにノニオン性界面活性剤であるTween20 とアニオン性界面活性剤であるコール酸ナトリウムを用い、その割合を変化させた場合の粒子特性への影響を検討した(図4,5)。

Tween20のみを用いたエマルジョンの場合、電解質高分子溶液中での粒子径に、ほとんど変化は見られなかった。また、コール酸ナトリウムの割合が0.1の時も、粒子径の変化は少なかった。しかし、コール酸ナトリウムの割合が

0.25より大きくなると電解質高分子溶液中が大きく増加した。

ノニオン性のTween20のみのエマルジョンは、電解質高分子との相互作用がないため、電解質高分子溶液中でも粒子径に変化がなかったと考えられる。一方でアニオン性のコール酸ナトリウムの割合が大きい場合、カチオン性のキトサンと相互作用も大きくなると考えられる。その結果、エマルジョン同士の凝集がおき、最終的にエマルジョンの融合が生じ粒子径が大きく増加したと考えられる。

結果として、エマルジョン表面の電荷が大きすぎると安定な粒子を調製できず、水溶性界面活性剤として0.1wt% コール酸ナトリウムと0.9wt% Tween20の条件でエマルジョン調製を行うと、エマルジョンの安定性が維持できることが確認された。

続いて、この条件で実際に、電解質高分子がコーティングされているか調べるため、エマルジョンのゼータ電位を測定した(図6)。カチオン性のキトサンとアニオン性のア

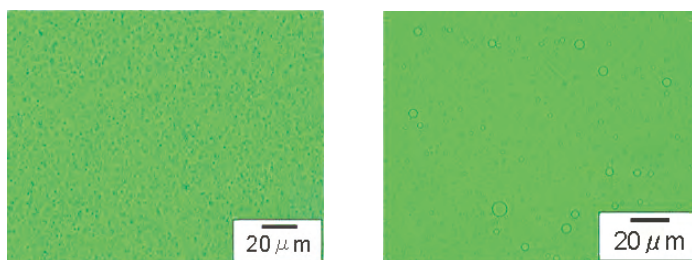


図4 キトサンコーティングエマルジョンの光学顕微鏡写真
(a) 条件②(コール酸割合 0.1) (b) 条件③(コール酸割合 0.25)

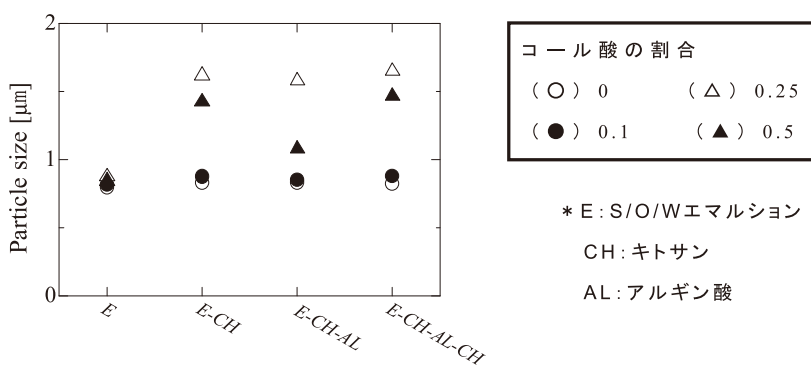


図5 高分子コーティング後の粒子径変化

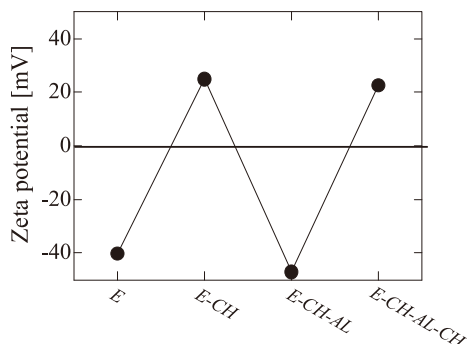


図6 高分子コーティングエマルジョンのゼータ電位変化

ルギン酸ナトリウムの水溶液にエマルションを交互に浸すことにより、ゼータ電位が大きく変化していることから、エマルション表面にそれぞれの高分子がコーティングされていることがわかる。これらの結果から、この条件で調製した粒子を以下の検討で用いた。

3.3.2. 安定性評価

高分子コーティングにより、タンパク質の漏洩を防ぐことができるかを検討した(図7)。コーティングしていないエマルションでは、24時間後にはBSAの封入率は80%以下にまで減少した。一方、高分子をコーティングしたエマルションでは、タンパク質の漏洩は減少した。また、多層コーティングしたエマルションでは、より漏洩を防ぐことが可能であり、キトサン-アルギン酸-キトサンと3重にコーティングした場合は、24時間後でも95%以上の安定性を示した。

3.4. 膜透過性評価

本研究ではタンパク質を界面活性剤でコーティングした膜透過性集合体により疎水性バリアとなっている皮膚表面

角質層の透過性を向上させることを目指している。ここでは、集合体の効果を確認するためにエマルション中の油相(S/Oサスペンション)を用いた疎水膜透過性評価を行った。

角質層のモデルとして、疎水性メンブレンフィルターに10 wt%レシチンと0.5 wt%コレステロールを含むドデカン溶液を含浸させた人工膜を用い、S/Oサスペンションの膜透過性を評価した。脂質集合体による膜透過性改善効果の確認と、その組成の最適化を行った。

はじめに脂質集合体の効果を確認した(図8)。インスリン水溶液、およびインスリンを油に分散させたものでは、ほぼ透過しなかった。一方でS/Oサスペンションでは、膜透過が確認された。脂質集合体が人工膜へ分配することで膜透過したものと考えられる。疎水性の細胞膜のモデルとして用いた人工膜においてタンパク質の透過が確認できたことから、外部物質の皮膚浸透において高いバリア機能を示す角質層も脂質集合体を用いることで効果的に透過できる可能性は高いと考えられる。

続いて、界面活性剤の種類の影響について検討を行った。結果を図9に示す。ER-290が最も透過性が低く、ER-60DやO-50Dのようなポリグリセステルを用いた脂質集合体

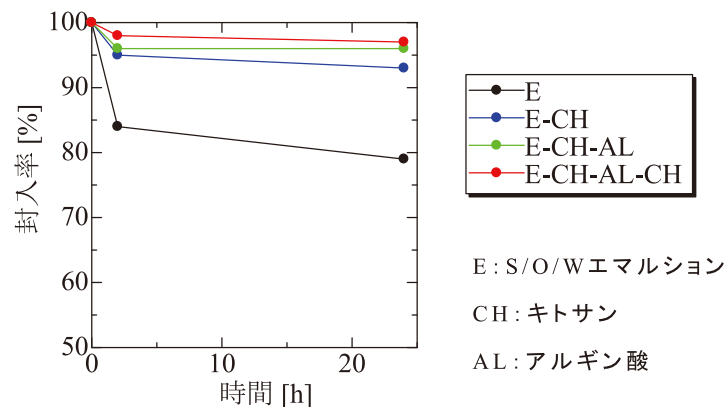


図7 高分子コーティングエマルションのBSA封入率の経時的変化

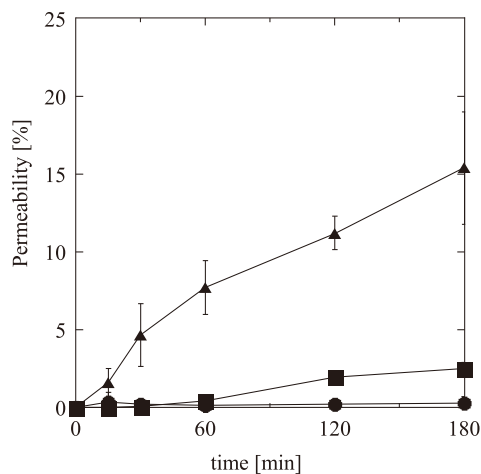


図8 インスリンの膜透過挙動

(●) インスリン水溶液, (■) インスリンを分散させた大豆油, (▲) S/O サスペンション

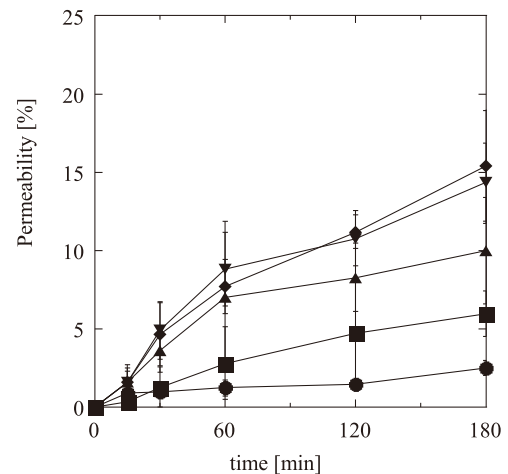


図9 界面活性剤の影響

(●) ER-290, (■) O-170, (▲) L-195, (◆) ER-60D, (▼) O-50D

において透過性が向上することが分かった。また、界面活性剤のアルキル鎖を比較すると、アルキル鎖の短い界面活性剤を用いたパッチの場合に透過性が向上することが確認された。したがって、膜透過性を改善する界面活性剤としては、ポリグリエステルでなおかつアルキル鎖長の短いものが適していると考えられる。

続いて、膜透過挙動への界面活性剤濃度の影響を検討した。図10に各界面活性剤濃度での180分後の透過率を示す。界面活性剤濃度1 wt%で調製したS/Oサスペンションの場合に著しく膜透過率が低いことが確認された。これは、タンパク質の周囲を界面活性剤が十分にコーティングすることが出来なかったためだと考えられる。また、界面活性剤濃度が5 wt%以上になると、膜透過率が低下した。これは、界面活性剤濃度が高くなるにつれて粘性も高くなり、複合体の拡散の妨げになるためだと考えられる。

以上から、S/Oサスペンションを用い効率的にタンパク質を皮膚透過させるためには、適した界面活性剤の選択と、安定な脂質集合体の調製が重要であると考えられた。また、透過速度には脂質集合体の拡散が大きく寄与していると考えられた。S/O/W エマルションは、パッチより微粒子化することにより表面積が拡大し、より速やかな拡散が起これると考えられることから、皮膚透過に有利な剤型であると予測される。

4. 総括

本研究では、固体化S/O/W エマルションの調製法について検討を行った。エマルションの固体化により、安定性の向上を予測したが、油滴の固化という方法では、十分な安定性が得られず、カカオ脂を用いた場合は、固体化した場合の方が、安定性が減少するという結果が得られた。調製時のカカオ脂の状態変化が、膜透過性ナノ集合体の不安定要因になったのではないかと推察される。

エマルション表面を高分子コーティングする方法では、エマルション表面の電荷の制御が、安定した粒子調製のために重要であることが確認された。また、多層コーティングしたエマルションにおいて、安定性の向上も確認された。

また、人工膜を用いたS/Oサスペンションの膜透過性について検討した。その結果、脂質集合体にすることでタンパク質を効果的に膜透過させることができることが確認された。またタンパク質にコーティングする界面活性剤の種類により透過に大きな違いがあること、油相中での集合体拡散速度が透過速度に大きく影響することが確認された。

今後は、さらにエマルションのコーティング基材の検討を行い、安定性に優れ、ハンドリングの良い粒子の開発を目指して検討を続ける予定である。タンパク質の低侵襲投与法としての経皮デリバリー技術の確立を実現したいと考える。

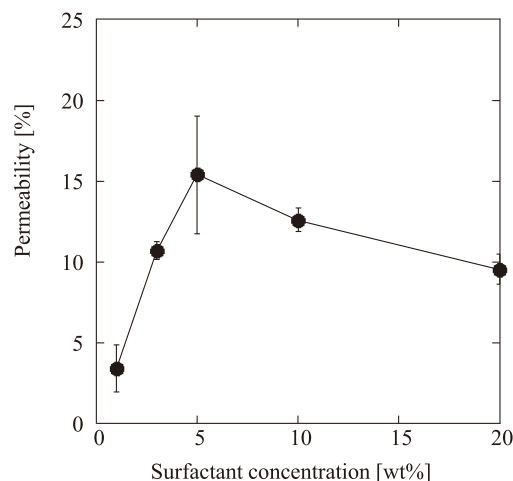


図10 界面活性剤濃度における透過率の変化(180min経過後)

(引用文献)

- 1) Tokumoto S, Higo N, Sugibayashi K, : Effect of electroporation and pH on the iontophoretic transdermal delivery of human insulin.
- 2) Wu X-M, Todo H, Sugibayashi K, : Enhancement of skin permeation of high molecular compounds by a combination of microneedle pretreatment and iontophoresis, J. Control. Release, 118, 189-195, 2007.
- 3) Paliwal S, Mitragotri S, : Ultrasound-induced cavitation: Applications in drug and gene delivery, Expert Opin. Drug Deliv., 3, 713-726, 2006
- 4) Williams A, Barry B, : Penetration enhancers, Adv. Drug Deliv. Rev., 64, 128-137, 2012.
- 5) Kajimoto K, Yamamoto M, et al. : Noninvasive and persistent trans follicular drug delivery system using a combination of liposomes and iontophoresis, Int. j. Pharm., 403, 57-65, 2011.
- 6) Korr F, Lademann J, et al. : Follicular transport route- Research progress and future perspectives, Eur. J. Pharm. Biopharm., 71, 173-180, 2009.
- 7) Toorisaka E, Ono H, et al. : Hypoglycemic effect of surfactant-coated insulin solubilized in a novel solid-in-oil-in-water (S/O/W) emulsion, Int. J. Pharma., 252, 271-274, 2003.
- 8) Toorisaka E, Watanabe K, et al., : Intestinal patches with an immobilized solid-in-oil formulation for oral protein delivery, Acta Biomater., 8, 653-658, 2012.

神経細胞が分泌する酸化ストレスに対する保護因子の同定

同志社大学生命医科学研究科

野口 範子、斎藤 芳郎

The protection of neurons from cell death is a vulnerable strategy to prevent neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease, since neuronal cell death is one of the major events in pathology of these diseases. PC12D cells are subspecies of PC12 cells which have been used for a variety of neuronal studies. We found that PC12D cells were resistant against 6-hydroxydopamine (6-OHDA) -induced cell death and that PC12D cell-cultured medium had abilities to decompose hydrogen peroxide (H_2O_2). The molecular weight of H_2O_2 decomposing active compounds was estimated at about 1,000 Da by gel chromatography analysis. The study using ion exchange resin column showed that the candidate compounds are not charged. The activity was not abolished by a metal ion chelater, EGTA but significantly suppressed by a polphyrin inhibitor, NaCN. These data suggest that PC12D cells secrete polphyrin-like compounds possessing H_2O_2 decomposing activities, by which cells are protected from cell death induced by 6-OHDA.

1. 緒言

アルツハイマー病やパーキンソン病は代表的な神経変性疾患として知られ、その名前が示すように神経細胞が変性し死滅することが病気の発症に深く関わっている^{1,2)}。これらの疾患では、認知機能や運動機能の低下が深刻であるが、加えて患者の表情は硬く乏しくなり、コスメトロジーの観点からも問題となる。従って、神経細胞死のメカニズムやそれを防止する方法の開発に関する研究は重要である。我々は、神経細胞が特異的に産生するオキシステロールの1種である24S-hydroxycholesterolが、高濃度では細胞死を^{3,4)}、低濃度では神経細胞に適応反応を誘導して酸化ストレスに対する抵抗性を獲得させること⁵⁾を示した。1976年にGreenらによって樹立されたPC12細胞は、ラット副腎髄質クロム親和性細胞腫から樹立された細胞株である。神経成長因子(NGF)非存在下の培養では副腎髄質クロム親和細胞の形質を示すが、NGFを作用させることにより、神経突起を伸長して交感神経細胞様に分化する。そのため、PC12細胞は、神経細胞における分化機構の解明やNGFの作用機構解明の研究などに広く用いられている⁶⁾。本研究で注目するPC12D細胞はPC12細胞の亜種であり、NGFやスタウスボリンなどの刺激に素早く反応し神経突起を伸長する。また、RNA合成阻害剤の存在下でも、神経突起伸長が誘導されることが知られている細胞である^{7,8)}。先行の研究により、PC12D細胞は細胞を播種してからの時

間や細胞濃度によって、6-OHDAなどによる酸化ストレス刺激に対する耐性が変化することが明らかにされていた(未発表)。つまり、PC12D細胞は酸化ストレス誘導性細胞死に対して抵抗性を示すことがわかっていた。この結果から、PC12D細胞から培養液中に酸化ストレスから神経細胞を保護する物質が分泌されている可能性が考えられた。本研究は、PC12D細胞から分泌される神経細胞保護因子の性質を明らかに、その因子を同定することを目的としておこなった。

2. 実験

2.1. PC12細胞 / PC12D細胞

実験に用いたラットの副腎髄質由来褐色細胞腫のPC12細胞、その亜種であるPC12D細胞は、37℃、5%二酸化炭素の環境下で培養した。Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM)、10%非働化Horse Serum (GIBCO)、5%非働化Fetal Bovine Serum (Hyclone)と抗生物質Streptomycin 0.05 µg/ml (GIBCO)を添加して、実験に用いた。

2.2. 培養上清の作成FM、CM作成

DMEMに5% N2サプリメント(GIBCO)と1%抗生物質0.05 µg/mlを加えた培養液をFresh Medium (FM)とした。PC12D細胞を10 cm dishに70%コンフレントの状態から16時間FMで培養後、培養液を回収して1,000 rpm 5分24℃で遠心して得た上清をCultured Medium (CM)とし、使用時まで-80℃で保存した。FMとCMは必要に応じて遠心濃縮機を用いて20倍まで濃縮し、使用時まで-80℃で保存した。

2.3. 細胞死誘導とその評価

細胞死の誘導は100~200 µMの6-OHDAあるいは H_2O_2 を用いた。細胞生存率の測定はMTTアッセイ法を用い



Identification of neuron-derived protecting factors against oxidative stress

Noriko Noguchi

Faculty of Life and Medical Sciences,
Doshisha University

た。6-OHDA から生成するパラキノン (pQ) の生成は 360 nm の吸光度測定により求めた。培養液中の H_2O_2 の濃度はスコボレチン蛍光法を用いて測定した。スコボレチンが H_2O_2 存在下で西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) により酸化され、蛍光物質が非蛍光物質に変化するため、この蛍光強度 (励起波長 366 nm、発光波長 460 nm) の減少から H_2O_2 を測定した。

2. 4. クロマトグラフィーを用いた分泌因子の特性解析

ゲル濾過カラムクロマトグラフィー：PD-10 カラム (GE Healthcare) を用いて、分子量 5,000 以上の物質と 1,000 以下の低分子物質とに分離した。また、分離能が高く高回収率担体である Superdex 30 prep grade (GE Healthcare) を用いて分子量 10,000 以下の分画を行った。

イオン交換樹脂：強酸性陽イオン交換樹脂 (交換基： $-SO_3^-$) Hi Trap SP FF (GE Healthcare) および強塩基性陰イオン交換樹脂 (交換基： $-NR_3^+$) Hi Trap Q FF (GE Healthcare) を用いて分泌因子の荷電性質を調べた。

2. 5. 阻害剤の添加効果

鉄をキレートするためにエチレンジアミン四酢酸 EDTA (2Na, 3Na) (WAKO) を用いた。ポルフィリン阻害剤として NaCN (WAKO) を用いた。

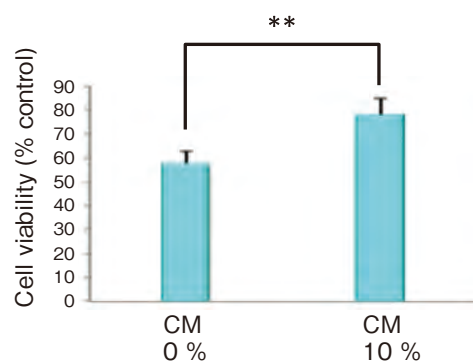


図1 PC12D 細胞の生存率に対する CM の添加効果
n=3, **P<0.01, Student t-test

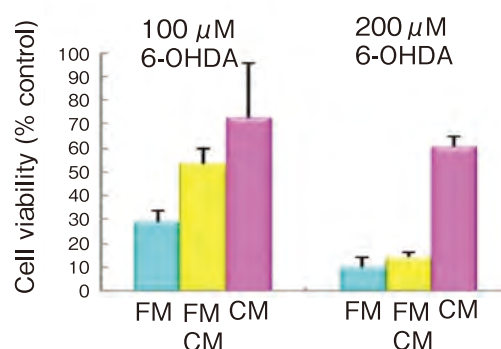


図2 PC12D 培養液の細胞死抑制効果
FM100% (FM), FM50%/CM50% (FMC), CM50% (CM) で培養したときの 6-OHDA による細胞死の抑制効果

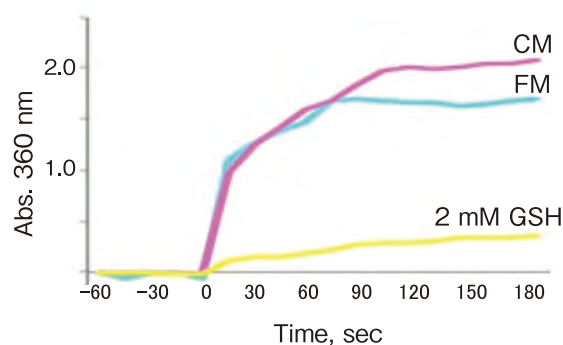


図3 6-OHDA からの pQ 生成に対する培養液の影響
6-OHDA の分解によって生成する pQ の吸収波長の吸光度を FM, CM, そして GSH を含む FM 中で測定した。

3. 結 果

3. 1. PC12D 細胞の培養液の細胞保護作用

PC12D を播種し、6-OHDA 100 μM で刺激をする 2 時間前に一旦培養液を FM に交換し、その 10 % 容量の CM を添加した。24 時間後に MTT アッセイ法により細胞生存率を測定したところ、CM を添加した細胞は添加しない細胞と比較して生存率が高かった (図 1)。次に、6-OHDA 誘導細胞死に対する CM の防御作用の容量依存性を調べた。6-OHDA 100 μM または 200 μM で刺激をする 2 時間前に培養液を FM 100 %, FM 50 %/CM 50 %, CM 100 % に交換し、24 時間後に MTT アッセイ法により細胞生存率を測定した。6-OHDA 誘導細胞死はいずれの濃度の場合も、CM の量に依存して抑制された (図 2)。

3. 2. 6-OHDA 由来の細胞死誘導物質

6-OHDA は水溶液中で速やかに分解し、パラキノン (pQ) とスーパーオキシド (O_2^-) を生成し、 O_2^- は不均化反応の結果 H_2O_2 が生成する。pQ や H_2O_2 はいずれも細胞死を誘導する可能性があるため、6-OHDA からこれらの生成に対する CM の影響を調べた。pQ は 360 nm に吸収波長をもつため、この波長の吸光度の経時変化を測定した。pQ の生成は FM 中と CM 中で差は見られなかった (図 3)。還

元型グルタチオン (GSH) は pQ と反応するため吸光度の増加は著しく抑制された。この結果から CM は 6-OHDA からの pQ の生成には影響を与えないことがわかった。

次に、FM 中と CM 中で 6-OHDA から生成する H_2O_2 濃度をスコボレン法で測定したところ、CM では有意に少なかった。また、既知の濃度の H_2O_2 を FM および CM に添加し、37℃ 15 分反応後、 H_2O_2 濃度を測定したところ、CM では FM より有意に減少していた (図 4)。この結果より、CM 中には H_2O_2 を分解する物質が含まれていることが示唆された。また、6-OHDA による PC12D 細胞の細胞死は、カタラーゼの添加によって抑制される結果も (data not shown)、CM 中の保護因子は H_2O_2 消去によって細胞死を抑制することを示唆している。

3. 3. 神経細胞保護因子の分子量と荷電状態

PD10 と Sephadex 30 prep grade の 2 種類のゲルクロマトグラフィーを用いて CM の分画をおこない、 H_2O_2 消去能を指標に保護因子の分子量は約 1,000 Da であることを明らかにした (data not shown)。次に、陽イオン交換樹脂および陰イオン交換樹脂を用いてクロマトグラフィーを行い、保護因子の荷電状況に依存して吸着することにより H_2O_2 消去能が失われるか検討したところ、いずれのイオン樹脂を通して H_2O_2 消去能には変化がなかった (data not shown)。この結果から、保護因子はプラスにもマイナスにも帯電していないことが示された。

3. 4. H_2O_2 消去能に対する阻害剤の効果

H_2O_2 の分解には Fe イオンが関与している可能性が考えられたため、Fe イオンをキレートする EGTA 2Na と EGTA 3Na を CM に添加して、 H_2O_2 分解能への影響を調べたが、いずれも分解能を抑制しなかった (data not shown)。次に、保護因子がポルフィリンである可能性を

考え、ポルフィリンの阻害剤である NaCN を CM に添加して H_2O_2 分解能を調べた。可変量の NaCN を用いて調べたところ、5 mM 以上の NaCN によって CM の H_2O_2 消去活性は抑制されることがわかった (図 5)。

4. 考 察

PC12D 細胞は、6-OHDA によって誘導される細胞死に抵抗性をもつことが先行の研究により示されていたが、本研究により、PC12D 細胞から培養液 (CM) 中に細胞保護因子が分泌されていることがわかった。培養液中では、6-OHDA から pQ と H_2O_2 が活性種として生成することが知られていたが、PC12D 細胞の培養液 (CM) は pQ 生成に影響を与えないことから、細胞死の抑制は H_2O_2 の分解によるものと考えられた。実際に CM に添加した H_2O_2 は速やかに分解された。また、6-OHDA による PC12D 細胞の細胞死は、カタラーゼの添加によって抑制されることから、CM 中の保護因子は H_2O_2 消去によって細胞死を抑制することが示唆された。クロマトグラフィーの結果から、CM 中の保護因子の分子量は約 1,000 Da であることが突き止められた。 H_2O_2 の分解には Fe や Cu などの遷移金属の関与が推測されたが、キレート剤が抑制効果を示さないことや、クロマトグラフィーの結果からもとめられた分子量などから、ポルフィリンが候補物質として考えられた。ポルフィリンの活性阻害剤である NaCN を添加すると、CM の H_2O_2 分解能が抑制されることから、CM 中の活性物質はポルフィリンもしくはポルフィリン様の化合物である可能性が高い。ポルフィリン錯体の分子量は約 500 Da であるが、配位している金属イオンを介して、ポルフィリン錯体ダイマーを形成する。また、ポルフィリン錯体ダイマーは水溶性でカタラーゼ活性をもち、 H_2O_2 と反応することが報告されている^{10, 11)}。以上より、PC12D 細胞の分泌する細胞保護因子は、ポルフィリン様物質であることが示唆された。

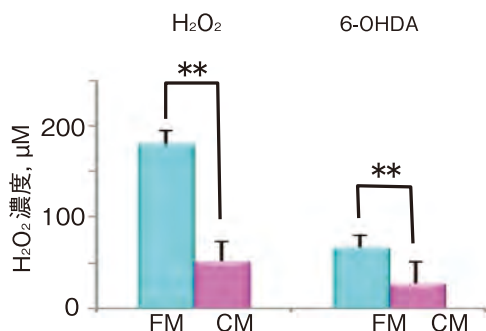


図 4 FM と CM の H_2O_2 消去能の比較
 H_2O_2 もしくは 6-OHDA を FM, CM に添加し、37℃ 15 分後の H_2O_2 濃度を測定した。 n=5, **P<0.01, Student t-test

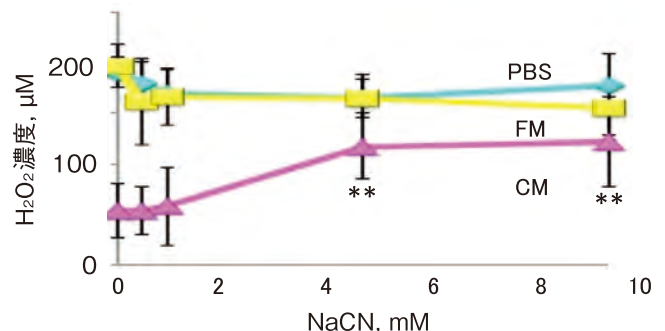


図 5 ポルフィリン阻害剤による CM の H_2O_2 消去活性抑制
n=10, **P<0.01, Dunnett, compared with 0 mM

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いただきましたことに深謝いたします。

(引用文献)

- 1) Gomez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S, Growdon JH, Petersen RC, Parisi JE, Hyman BT, : Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.*, 41, 17-24, 1997.
- 2) Forno LS, : Neuropathology of Parkinson's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 55, 256-272, 1996.
- 3) Yamanaka K, Saito Y, Yamamori T, Urano Y, Noguchi N, : 24S-Hydroxycholesterol induces neuronal cell death through necroptosis, a form of programmed necrosis. *J. Biol. Chem.*, 286, 24666-24673, 2011.
- 4) Yamanaka K, Urano Y, Takabe W, Saito Y, Noguchi N, : Induction of apoptosis and necroptosis by 24(S)-hydroxycholesterol is dependent on activity of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 1, *Cell Death Diseases*, 5, e990, 2014.
- 5) Okabe A, Urano Y, Itoh S, Suda N, Kotani R, Nishimura Y, Saito Y, Noguchi N, : Adaptive responses induced by 24S-hydroxycholesterol through liver X receptor pathway reduce 7-ketocholesterol-caused neuronal cell death, *Redox Biol.*, 2, 28-35, 2013.
- 6) Greene LA, Tischler AS, : Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73, 2424-2428, 1976.
- 7) Katoh-Semba R, Kitajima S, Yamazaki Y, Sano M, : Neuritic growth from a new subline of PC12 pheochromocytoma cells: cyclic AMP mimics the action of nerve growth factor. *J. Neurosci. Res.*, 17, 36-44, 1987.
- 8) Sano M, Kitajima S, : Activation of mitogen-activated protein kinases is not required for the extension of neurites from PC12D cells triggered by nerve growth factor. *Brain Res.*, 785, 299-308, 1998.
- 9) Miyama A, Saito Y, Yamanaka K, Hayashi K, Hamakubo T, Noguchi N, : Oxidation of DJ-1 induced by 6-hydroxydopamine decreasing intracellular glutathione. *PLoS One.*, 6, e27883, 2011.
- 10) Asayama S, Nakajima T, Kawakami H, : New water-soluble Mn-porphyrin with catalytic activity for superoxide dismutation and peroxynitrite decomposition. *Metallomics.*, 3, 744-748, 2011.
- 11) Ohse T, Nagaoka S, Arakawa Y, Kawakami H, Nakamura K, : Cell death by reactive oxygen species generated from water-soluble cationic metalloporphyrins as superoxide dismutase mimics *J. Inorganic Biochem.*, 85, 201-208, 2001.

Ⅱ． 生体作用、安全性に関する分野

白髪予防・治療剤の選別に有効な加齢性白髪を自然発症するモデル動物の開発

名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学

加藤 昌志

Hair graying is a symbol for senescence in humans and one of great cosmetic problems especially for women. Therefore, development of preventive therapy for hair graying is very important in the field of cosmetology. However, available preventive therapies for hair graying are very limited at present. Experiments using humans are difficult to develop drugs for hair graying. Therefore, model mice that mimic the mechanism of hair graying in humans could be strong tools for development of the preventive therapy. Up to now, more than 10 kinds of model mice for hair graying have been reported. However, most of the mice are models for premature hair graying with limited life span. In this study, we developed a novel model mouse for hair graying with long life span. Our macroscopic analysis showed that our model mice progressively develop hair graying with senescence. Previous microscopic studies showed that loss of follicular melanocyte stem cells is a fundamental cause for hair graying in humans. Therefore, we histologically evaluated follicular melanocyte stem cells in our model mice. Our melanocyte-targeted reporter transgene analysis showed depletions of follicular melanocyte stem cell as well as the descendant melanocytes in gray hairs of our model mice. Previous study showed that melanocyte stem cells divide and produce their descendant melanocytes in every hair cycles to regenerate pigmented hairs. Previous study also showed that promotion of hair cycles accelerates hair graying. We in this study examined effect of increased hair cycle on hair graying in our model mice. Hair graying was accelerated by depilation, which is a well-established method to artificially promote hair cycles, in our model mice. These results suggest that melanocyte stem cells and descendant melanocytes are associated with hair graying in our model mice. Our findings suggested that hair graying in our model mice are partially resembles hair graying in humans, whereas further analysis to characterize hair graying in our model mice will be needed. Thus, in this study, we developed a novel model mouse line for hair graying, partially clarified mechanism of hair graying in the mice with considering the similarity of hair graying in humans and suggest that the mice could be a potential tool to develop preventive therapy for hair graying.

1. 緒言

50歳の約半数が50%程度の白髪を発症すると報告されている¹⁾。このように白髪は加齢の象徴であり、特に女性にとって、美容上の大きな問題となる。美容上の解決策としては白髪染め(ヘアカラー)が、現時点では、最も現実的な選択肢である。実際に、日本における白髪関連製品は、年間1,000億円近い市場となっている。中国、インド、ブラジル等の新興国の経済発展により、美容への関心がさらに高まれば、市場規模は、今後増大すると推測できる。しかし、白髪染めは、使用にやや時間がかかるだけでなく、繰り返して使用することが求められる。白髪染めに関するアンケートでは、①自分で手間をかけずに染められること、②一度染めたら2～3週間は持続すること、③手の届きにくい部分を簡単に染められるブラシが付いていること、が求められているので、消費者が、より簡便な方法で、長期間効果の持続する製品を期待していることがわかる。もし、

白髪を発症を予防したり、さらに理想的には、既に発症してしまった白髪を改善することが、安全にできれば、コスメトロジー学上、極めて画期的であると言える。しかし、筆者が検索しえた限りでは、科学的根拠に基づいた白髪予防効果のある製品は存在しない可能性が高いと考えられる。

白髪予防・治療剤の開発においては、ヒトで効果を確認するのが最善である。しかし、ヒトの白髪については、①非常に長い期間かけて進行する、②発症時期や進行速度等、個人差が大きい、③薬物の安全性等の倫理的配慮の必要性、④効果を検討できる薬物の数が限られる、といった問題もある。ゆえに、ヒトにおいて、薬物や美容関連機器等の白髪予防・改善の効果を判定することは容易ではない。ヒトの白髪発症機構に類似した白髪モデル動物が存在すれば、外用または内服で有効な白髪予防・治療効果のある薬物や食品をスクリーニングすることができる。白髪を自然発症する動物が大型動物であると、飼育場所や飼育費用が高額になるとともに、管理に関係する人手もかかるので、マウス等の小動物であることが望ましい。しかし、出生時から白髪を発症しているマウス²⁾や一時的に白髪を発症するマウス³⁾は報告されているが、10ヶ月以上の寿命を持ち、ヒトと同じように加齢とともに徐々に白髪が進行するモデル動物は世界的にも稀である。

筆者らは、メラノサイトの分化・増殖・遊走の分子機構に焦点をあてた研究を推進している⁴⁻⁶⁾。近年では、遺伝子



Establishment of novel animal models for age-related hair graying that are useful to develop preventive therapies

Masashi Kato

Department of Occupational and Environmental Health, Nagoya University Graduate School of Medicine

改変技術を用い、新規の白髪を自然発症するマウスを開発している。本モデルマウスでは、2年以上の寿命を持つ個体も珍しくないため、ヒトと同じように加齢とともに徐々に白髪を発症するモデル動物であると言える。本研究では、中間報告での成果をさらに発展させ、白髪モデルマウスを用いたより詳細かつ専門的な組織学的解析を通して、ヒトとモデルマウスにおける白髪発症機構の類似性を検証する。さらに、白髪の予防・治療に有効な薬物のスクリーニング技術についても、より現実性の高いロードマップを提供する。

2. 実験

2.1. 対象

ヒト、野生型マウス、遺伝子改変マウスである白髪モデルマウスを対象とした。尚、メラノサイトを特異的かつ簡便に染色するために、メラノサイト特異抗原である dopachrometautomerase (Dct) のプロモーター下にレポーター遺伝子である lacZ 遺伝子をつないだ Dct/LacZ-トランスジェニックマウス⁷⁾と野生型マウスおよび白髪モデルマウスを交配してから解析を行った。

2.2. 形態解析

加齢性変化を考慮しながら、黒毛と白毛に関する肉眼的

所見を比較した。さらに、HE 染色および LacZ 染色により、病理組織学的に毛母メラノサイトを検出し、野生型マウスと白髪モデルマウスを比較した。

3. 結果

3.1. ヒトおよびモデルマウスに発症した白髪の肉眼所見

本研究では、ヒトとマウスについて、黒髪と白髪の肉眼的特徴を観察した(図1)。ヒトにおいても、モデルマウスにおいても、白髪では、メラニンが欠損しているという点で類似性が認められた。本結果より、本モデルマウスにおける白毛の毛母では、1)毛幹(シャフト)へのメラニン供給障害、2)メラノサイトにおけるメラニン産生障害、3)メラノサイトの消失、4)メラノサイトの細胞供給源であるメラノサイト幹細胞の消失あるいは機能障害のいずれか、あるいは、上記に関する複数の障害を持つ可能性を考えた。

3.2. モデルマウスにおける加齢性白髪の肉眼所見

本研究では、野生型マウスとモデルマウスについて、加齢と白髪の関係を肉眼で観察した。野生型マウスでは、1ヶ月齢、3ヶ月齢、9ヶ月齢のいずれにおいても、白髪は肉眼的に、ほとんど観察されなかった(図2A-C)。プレパラートをを用いた白髪率の解析により、野生型マウスの白

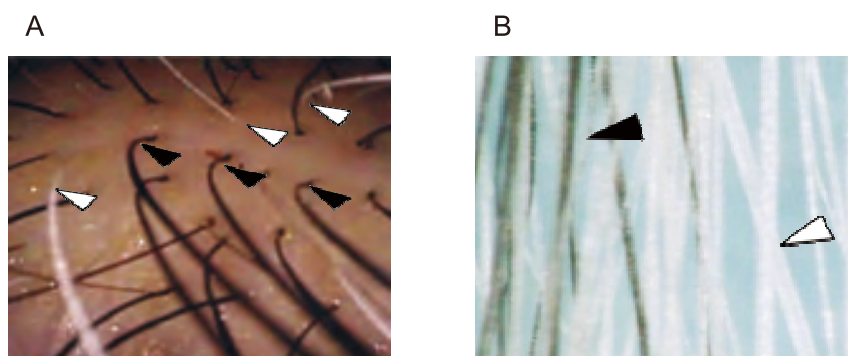


図1 毛髪の肉眼所見：ヒト(A)および白髪モデルマウス(B)における黒髪と白髪の肉眼所見を示している。黒の矢頭は黒髪を、白の矢頭は白髪を示している。

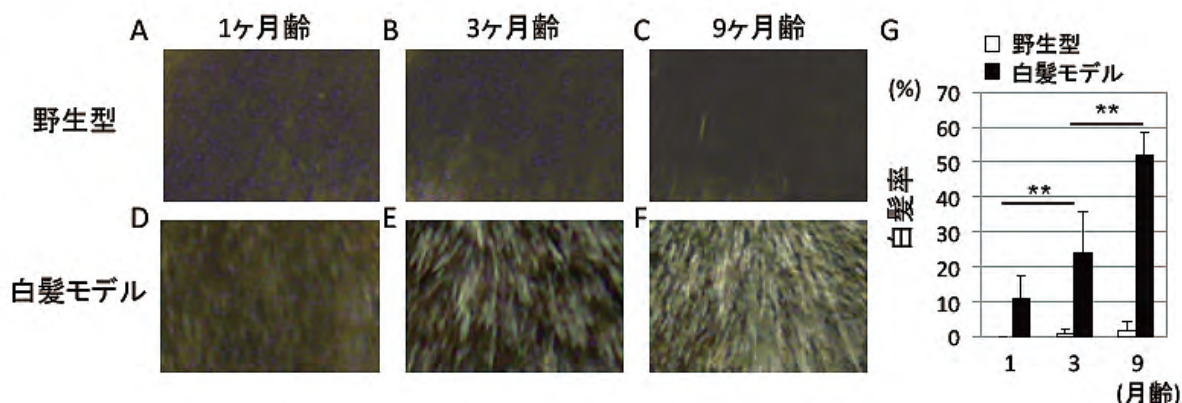


図2 マウスにおける加齢性白髪の肉眼所見と白髪率：野生型マウス(A-C)および白髪モデルマウス(D-F)における、月齢と白髪の肉眼所見(A-F)と白髪率(白髪の本数/カウントした毛髪の総本数)を示す(G)。

髪率は、1ヶ月齢で0.0%、3ヶ月齢で1.2%、9ヶ月齢でも1.7%程度であることが分かった。これは、野生型マウスにおいて、加齢性白髪の発症は極めて限られていることを、具体的な数値で示したものである。一方、モデルマウスでは、生後1ヶ月の段階で、白髪の割合は10.9%であった(図2G)。肉眼的に見ても野生型マウスに比較して多いように見える(図2A, D)。モデルマウスでは、加齢が進むにつれて、白髪率が24.1%(3ヶ月)、52.1%(9ヶ月)と増加することがわかった(図2D-G)。モデルマウスの寿命を30ヶ月、ヒトの寿命を80年(960ヶ月)と仮定し、単純計算すると、マウスの9ヶ月は288ヶ月(24年)に相当する。モデルマウスの9ヶ月齢の白髪率は52.1%(図2G)である。ヒトにおいて白髪がほとんどない25歳から24年経過し、約50歳を迎えた時、その約半数が50%程度の白髪を発症することが報告されている¹⁾ことを考えると、本モデルマウスにおける肉眼的白髪発症のダイナミクスは、ある程度ヒトの加齢性白髪に類似していると提案できる。

3. 3. モデルマウスにおける加齢性白髪の組織所見

野生型マウスとモデルマウスについて、黒毛と白毛におけるメラノサイトおよびメラノサイト幹細胞の分布を調べた(図3)。メラノサイトおよびメラノサイト幹細胞は

LacZ陽性細胞(青色に染色される細胞)として染色される。メラノサイト幹細胞はバルジと呼ばれる毛根上部に存在し、メラノサイトは毛球部に存在する。

野生型マウスのバルジ領域では(図3A)、過去の報告^{8,9)}と同様にLacZ陽性細胞が確認された。本白髪モデルマウスの黒毛のバルジ領域(図3B)でも、野生型マウスと同様にLacZ陽性細胞が観察されるのに対し、モデルマウスの白毛のバルジ(図3C)では、LacZ陽性細胞は観察されなかった。野生型マウス(図3D)およびモデルマウス(図3E)の黒毛の毛球部には、メラニンおよびメラノサイトが存在していた。一方、モデルマウスの白毛(図3F)の毛球部では組織学的にもメラニンが欠損しているだけでなく、メラノサイトも消失していた。さらに、少なくとも我々が観察した限りでは、バルジ領域にLacZ陽性細胞が存在しない毛根では、毛球部のLacZ陽性細胞も観察されなかった。これらの結果より、本モデルマウスの白毛では、メラノサイト供給源であるメラノサイト幹細胞が何らかの原因で消失し、その結果、毛球部へのメラノサイトの供給が停止し、結果としてメラニンが毛幹へ供給されなくなったと示唆される。過去の報告によると、ヒトの白髪でも、メラノサイト幹細胞および毛球部のメラノサイト消失が加齢と共に亢進することが報告されている⁸⁾。少なくともバルジ領域および毛球部のメラノサイトおよびメラニン産生に関する組織学的観点においては、モデルマウスにおける白髪発症機構とヒトの白髪発症機構は類似していると考えられる。

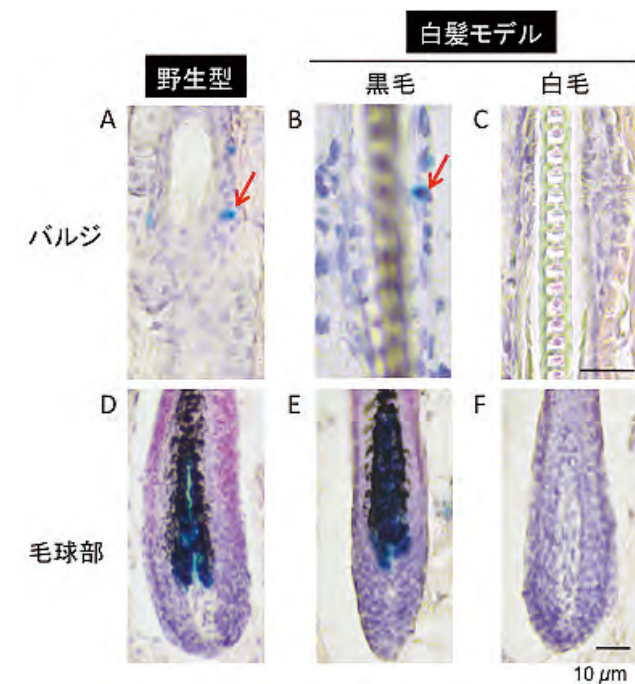


図3 マウスにおける加齢性白髪の病理組織所見：9ヶ月齢の野生型マウスのバルジ領域(A)および同腹の白髪モデルマウスの黒毛および白毛のバルジ領域(BとC)のLacZ染色像を示す。9ヶ月齢の野生型マウスの毛球部(D)および同腹の白髪モデルマウスの黒毛および白毛の毛球部(EとF)のLacZ染色像を示す。矢印は、バルジ領域のLacZ細胞を示す。

3. 4. 白髪マウスの幹細胞に焦点をあてた白髪化の機序解析

図3より、白髪化の根本原因がメラノサイト幹細胞にある可能性が示唆された。メラノサイト幹細胞は毛周期の回転とともに分裂し、子孫細胞であるメラノサイトを毛母に供給することが報告されている⁹⁾。メラノサイト幹細胞が本白髪モデルマウスにおける白髪化の原因であるならば、毛周期を加速させると白髪化も影響を受けるのではないかと仮説をたてた。本モデルマウスにおいて、脱毛処理により人為的に毛周期を加速させたところ、脱毛部特異的に白髪化が促進された(図4)。これは、メラノサイト幹細胞が脱毛により影響を受けている可能性を示している。



図4 モデルマウスにおける脱毛処理による白髪化の加速：3ヶ月齢のモデルマウスにおける、脱毛処理後の毛色の肉眼所見を示す。脱毛部分に一致して、白髪が発症している。

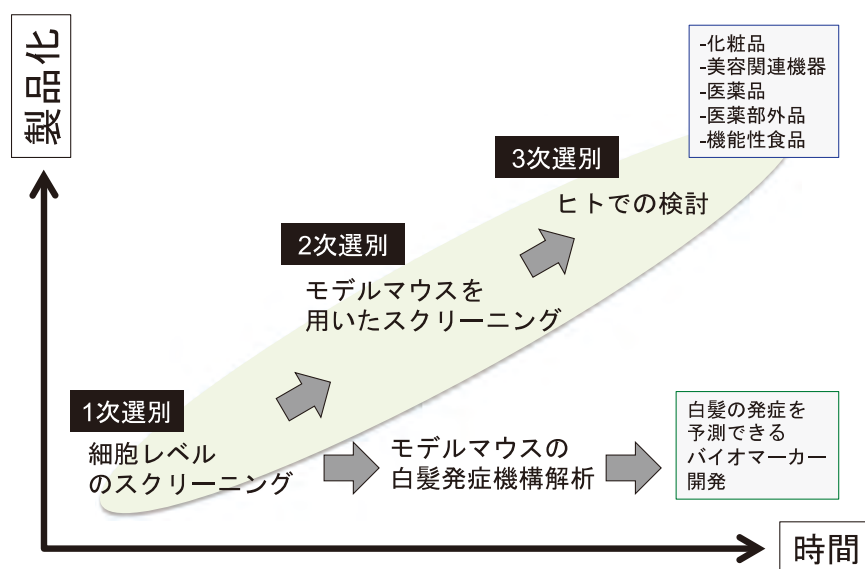


図5 白髪予防・治療剤開発の戦略：1次選別として、①細胞レベルのスクリーニング、2次選別として、②モデルマウスを用いた個体レベルでのスクリーニング、3次選別として、③ヒトにおける白髪予防・治療効果の確認、といったプロセスによる白髪予防・治療法開発のロードマップを示した。尚、モデルマウスを用いた個体レベルでのスクリーニング(2次選別)が難しい場合には、ヒトの皮膚を用いた *ex vivo* 解析等の代用の方法を検討する。

4. 考 察

肉眼的解析により、本モデルマウスに発症する白髪化は、ヒトの加齢性の白髪と形態的にも白髪発症期間についても非常に類似していることが示唆された。また、組織学的解析により、モデルマウスの白髪発症機構は、現時点で解明されているヒトの白髪発症機構と比較して、少なくとも「毛胞メラノサイト幹細胞およびメラノサイトの消滅によるシャフトへのメラニン供給の停止」と言う点については、類似していることがわかった。今後、本モデルマウスとヒトの白髪発症の分子機構をさらに詳細に比較することにより、①ヒトにおける白髪発症機構に関する新知見、②白髪発症に関与する分子群を特定することにより、将来白髪を発症する確率を予測できるバイオマーカーの開発、が達成できる可能性がある(図5)。さらに、白髪発症機構の解明を進め、分子機構を基にした細胞レベルで、白髪の予防・治療に有用な薬物をスクリーニングするシステムを提案後、実際に薬物スクリーニングを実施し、候補薬物をしぼった後に安全性試験や安定性試験を含めた実用性をヒトで調べることにより、白髪の発症を根本から予防・治療できる薬物を提案できる可能性がある(図5)。

5. 総 括

例えば、成人の毛髪のほとんどは成長期毛である一方、成獣(マウス)の毛は、ほとんどの毛が休止期毛である。このように、ヒトとマウスが全く同じ機構で白髪を発症する

ことは難しい。しかし、ヒトとマウスの相違点を理解した上で、本モデルマウスとヒトで、白髪発症機構の類似点を解析することにより、白髪予防・治療に有効な薬物や美容関連機器に関するスクリーニング技術を開発する可能性がある。そのため、コスメトロジー学の発展に貢献できる可能性があると考えている。

謝 辞

本研究の推進を御支援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。

(引用文献)

- 1) Keogh EV, Walsh RJ. Rate of greying of human hair. *Nature*. 207 (1999) : 877-8, 1965.
- 2) Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 22; 75 (2): 229-40, 1993.
- 3) Nishikawa S, Kusakabe M, Yoshinaga K, Ogawa M, Hayashi S, Kunisada T, Era T, Sakakura T, Nishikawa S. In utero manipulation of coat color formation by a monoclonal anti-c-kit antibody: two distinct waves of c-kit-dependency during melanocyte development. *EMBO J* 10 (8) : 2111-8, 1991.
- 4) Kato M, Takahashi M, Akhand AA, Liu W, Dai Y, Shimizu S, Iwamoto T, Suzuki H, Nakashima I.

- Transgenic mouse model for skin malignant melanoma. *Oncogene* 17 (14) : 1885-8, 1998.
- 5) Kato M, Takeda K, Kawamoto Y, Tsuzuki T, Kato Y, Ohno T, Hossain K, Iftakhar-E-Khuda I, Ohgami N, Isobe K, Takahashi M, Nakashima I. Protective effect of hyperpigmented skin on UV-mediated cutaneous cancer development. *J Invest Dermatol* 127 (5) : 1244-9, 2007.
- 6) Kumasaka MY, Yajima I, Hossain K, Iida M, Tsuzuki T, Ohno T, Takahashi M, Yanagisawa M, Kato M. A novel mouse model for de novo Melanoma. *Cancer Res* 70 (1) : 24-9, 2010.
- 7) Mackenzie MA, Jordan SA, Budd PS, Jackson IJ. Activation of the receptor tyrosine kinase Kit is required for the proliferation of melanoblasts in the mouse embryo. *Dev Biol* 192 (1) : 99-107, 1997.
- 8) Emi K, Nishimura, Scott R. Granter, David E. Fisher. Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. *Science* 307: 720-724, 2005.
- 9) Emi K, Nishimura, Siobha'n A. Jordan, Hideo Oshima, Hisahiro Yoshida, Masatake Osawa, Mariko Moriyama, Ian J. Jackson, Yann Barrandonk, Yoshiki Miyachi & Shin-Ichi Nishikawa. Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature* 416: 854-60, 2002.

皮膚細胞は独自に女性ホルモンを合成し、それが皮膚細胞の活動を制御している

東京大学大学院総合文化研究科

川戸 佳

We analyzed the local estrogen synthesis systems and estrogen receptors in female rat facial skin tissues. RT-PCR analysis revealed mRNA expressions of representative enzymes and receptors. We compared the skin steroidogenic enzymes/receptors with those of the brain hippocampus which also has the local estrogen synthesis systems and estrogen receptors. In the hippocampus, a center for learning and memory, locally synthesized estrogen plays a crucial role in modulating memory-related synaptic plasticity. Locally synthesized estrogen could also play a significant role in female facial skin condition in addition to plasma estrogen.

1. 緒 言

女性の顔の肌のつやつや感を保つには、女性ホルモンであるエストラジオールE2が重要であることは、よく知られている。生理サイクルと顔の肌の状態には密接な関係があり、エストラジオールは肌の最表層の角層の水分を保持し肌の潤いを保つ¹⁻³⁾。また、真皮層のコラーゲンやエラスチンの合成を促進して、肌のハリを保ち、シワやタルミを予防する働きがある。本研究では、顔の皮膚細胞が女性ホルモンを独自に合成し、それが皮膚細胞の活動度維持に役立っているという、新しい現象を見出した。

これまでの常識では、卵巣が合成して血中に分泌するエストラジオールとプロゲステロンが皮膚細胞の状態を制御していると思われていた。本研究では、皮膚組織の中に、性ホルモンの合成系の、「コレステロール→[P450scc]→プレグネノロンまたはプロゲステロン→[P450 (17 α)]→DHEAまたはアンドロステジオン→[17 β -HSD (1,3), P450arom]→テストステロン、エストロン、エストラジオール」が存在することを見出すことを目指す(図1)。皮膚細胞が合成する基底量に加えて、血中からくるエストラジオールが上乗せされると予測している。

もう1つの女性ホルモン、プロゲステロンは皮脂の分泌を促進する。皮脂の分泌が過剰になるとニキビの原因になる。このように、女性ホルモンは肌の状態に大きな影響を与え、例えば、エストラジオールがたくさん分泌される時期、つまり、生理が終わってから排卵までの間は、肌にとっては安定した良い時期で、この時期は肌の調子がよく、化

粧品ののりが良い。エストラジオール受容体も検出してほかの組織と比較する。最近の化粧品には、肌の状態をよくするために植物エストロゲンなども(イソフラボンなど)使用されているが、皮膚細胞がエストラジオールを合成するのであれば、その基質DHEAなどを含む、肌にやさしい化粧品なども考案できる。

2. 実 験

2.1. 実験の方針

メスラットを用いて、顔の皮膚組織を用いて、性ホルモンの合成系を解析する。図1に示した系があると考え、合

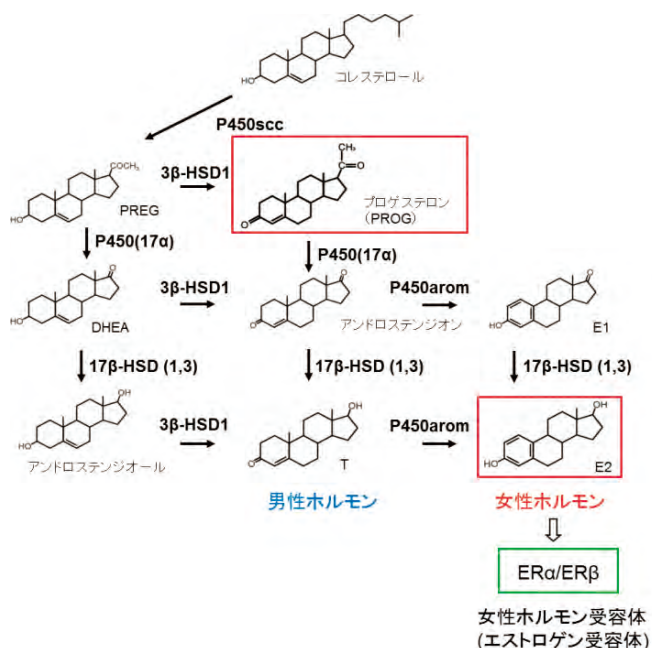


図1 本研究において解析した皮膚における女性ホルモン局所合成経路とその作用経路。川戸研究室の先行研究により、海馬においては、コレステロールから男性ホルモン・女性ホルモンに至る完全な局所合成系が存在し、作用サイトである女性ホルモン受容体や男性ホルモン受容体が神経細胞に局在することが証明されている⁴⁻⁶⁾。



ELocally synthesized steroids in facial skin modulate skin functions

Suguru Kawato

Graduate School of Arts and Sciences,
The University of Tokyo

1/1000 くらいの mRNA が発現していると予想するが、川戸研究室は、この微量の mRNA の検出が得意である。それは、2000 年頃から進めている、記憶中枢の脳海馬での局所的な男性・女性ホルモン合成の研究を行う過程で、技術力を磨いたからである。これは primer 設計を熱力学の自由エネルギー計算を用いて新たに行い、選択性や結合性を改良して、感度を過去の 1000 倍にした。これによって卵巣の 1/200 - 1/1000 くらいの mRNA が発現も検出できる。mRNA がこれくらい少なくても、局所の皮膚組織内で作用するのであれば、小さな皮膚組織の体積を総血管体積（ラットで 25mL）の 1/100 - 1/1000 くらいとすると、十分な濃度のエストラジオールが供給できるはずである。ちなみに脳海馬の体積は 0.1mL くらいで血管体積の 1/250 くらいである。エストラジオールが作用する受容体 ER α , ER β も解析する。

質量分析で局所エストラジオール濃度を分析し、血中と比較して、十分な濃度があるのかどうかを検査する。

2. 2. 実験動物

実験動物には、12 週齢のメス Wistar ラットを用いた。実験動物は室温 25℃、照明は午前 8 時に照らし、明暗周期を 12 時間（午前 8 時照明点灯、午後 8 時消灯）の状態で飼育した。餌として固形ペレットを与え、実験動物が餌・水ともに自由に得られる飼育環境にした。実験はすべて東京大学動物実験委員会の承認を得たうえで遂行した。

2. 3. total RNA の抽出

ラットを麻酔下で断頭後、顔の皮膚・卵巣・海馬を氷冷した人工脳脊髄液（pH 7.4, 290 mOsm）中で取り出し、直ちに液体窒素で凍結した。Total RNA の抽出には SV Total Isolation System（Promega, USA）を用いた。抽出した Total RNA は Recombinant DNase I（RNase-free DNase I; Takara, Japan）処理を行い、genome DNA の混入を防

いだ。タンパク質を除去したのちに 260 nm の吸光度を測定して RNA 濃度を求めた。

2. 4. RT-PCR 法

顔の皮膚や脳の海馬のような局所ステロイド合成系では、ステロイド合成酵素や受容体の発現は非常に少ない。内分泌組織（卵巣・精巣・副腎皮質）と比べて 1/300 - 1/5000 くらいと微量である。この場合過去の論文のプライマーを使用していたは検出できない。新しくプライマーを特別に設計しないと、正確な発現量は定量出来ない。熱力学的フリーエネルギー ΔG がハイブリダイゼーション部位の平均より更に負の値をとるように、コンピュータで計算して設計することで、この問題を解決した^{4,6)}。

Total RNA は oligo (dT) プライマーを用いて逆転写反応を行い、一本鎖の cDNA を合成した。反応液 (25 μ L) の組成：totalRNA 10 μ g, 1x RT buffer, 1 mM dNTP mixture, oligo (dT) 15 (Promega) 2 μ g, RNasin Plus (Promega) 40U, RTase (Toyobo, Japan) 200U。これらを 42℃ で 60 分反応させ、cDNA を合成し、75℃ で 15 分間処理して反応を停止させた。cDNA 溶液は 4U RNase H (Takara bio, Japan) 処理を行い、残った RNA を分解した。得られた cDNA 溶液は使用まで -20℃ に保存する。

PCR 反応液 (25 μ L) の組成：cDNA (total RNA 換算で 0.1 - 200 ng), 1x PCR buffer, 0.2 mM dNTP mixture, 0.2 μ M プライマー (forward and reverse), Blend Taq polymerase 0.63 U (Toyobo, Japan)。PCR は 3 ステップで行い、その増幅プロトコルは 95℃、5 分 (変性) $\rightarrow$ [95℃、30 秒 (変性) $\rightarrow$ Ta (58 ~ 68)℃、20 秒 (アニーリング) $\rightarrow$ 72℃、30 秒 (伸長)] $\times$ サイクル数 $\rightarrow$ 72℃、5 分 (伸長) であった。標的名、プライマー配列、サイクル数、アニーリング温度 (Ta) といった条件は表 1 に示した。

PCR 産物を 2% アガロースゲルで電気泳動して分離し、ゲルをエチジウムブロマイドで染色した。紫外線を照射し

表 1 本研究で用いた PCR の各条件

Gene	Direction	Primer Sequence (5' to 3')	Product Length (bp)	Ta (°C)	cDNA (ng)			PCR cycles
					卵巣	皮膚	海馬	
<i>Esr1</i>	Forward	GCCGGCTGCGCAAGTGTTACG	467	68	1	100	100	29
	Reverse	GGAGCGCCAGACCAGACCAATCA						
<i>Esr2</i>	Forward	GCAAACCAGGAGGCAGAAAGTAGC	591	60	0.1	100	50	36
	Reverse	AAGTGGGCAAGGAGACAGAAAGTAAGTA						
<i>Cyp19</i>	Forward	CTGATCATGGGCCTCCTCCTG	276	58	0.1	200	10	40
	Reverse	CCCACGCTTGCTGCCGAATCT						
<i>Hsd17b1</i>	Forward	ACTCCGGGCGTGTGCTGGTGA	517	65	1	100	100	30
	Reverse	GGCGTGTCTGGATCCCCTGAAACTT						
<i>Hsd17b3</i>	Forward	CTCCCCAACCTGCTCCCAAGTCATTT	408	65	1	100	50	38
	Reverse	AGCAAGGCAGCCACAGGTTTCAGC						
<i>Gapdh</i>	Forward	TATGACTCTACCCACGGCAAGTTCAA	830	60	10	10	10	23
	Reverse	ACCACCTGTGCTGTAGCCATATTCAT						

て各PCR産物のバンドから発する蛍光輝度をImage Jで解析し、発現量の定量に用いた。PCRサイクル数を横軸に、輝度を縦軸にプロットした増幅曲線を作成し、輝度の対数が線形に増加するサイクル数の範囲(指数増幅期)の中から定量の際に用いたPCRのサイクル数を決定した。例えば、ER α (Esr1) の場合、指数増幅期は26~30サイクルであるので、解析には29サイクルで増幅した試料を用いた。

異なる組織(卵巣・皮膚・海馬)間での標的遺伝子発現量の比較は、内部標準遺伝子である glycerol dehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の発現量(バンドの輝度)で標的遺伝子の発現量を割り算して規格化することで行った。GAPDHについても増幅曲線を作成し、23サイクルで増幅した試料を規格化に使用した。

2. 5. DNA シークエンス

観測したPCR産物が本当に標的遺伝子産物であるかどうかをDNAシークエンスから確認した。電気泳動後のPCR産物を Wizard SV Gel と PCR Clean-up System (Promega) を用いてアガロースゲルから抽出し、pGEM-T-Easy vectors (Promega) に組み込む。このベクターを BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて反応させ、蛍光を ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で測定してDNA配列を決定した。

2. 6. 質量分析LC-MS/MSによる女性ホルモン濃度の測定

異なる性周期ステージ(卵胞期: proestrus、排卵期: estrus、黄体期1: diestrus 1、黄体期2: diestrus 2)のメス、

卵巣摘出したメス(OVX)を用いた。

同じ個体由来の血漿と海馬を採取し、(1)血漿と(2)海馬から抽出・精製した各ステロイドを質量分析の試料とした。麻酔下で断頭したラットから採取した血液を遠心(1,900 xg, 4℃、10分間)して上清の血漿を試験管に分取し、液体窒素で急速凍結後-30℃で保存した。血液の採取と並行して95% O₂ / 5% CO₂ 混合ガスで十分にバブリングした緩衝液中で海馬の摘出を行った。

海馬1対あたり4mLの緩衝液を加えた。ホモジナイザーを用いて氷冷しながら穏やかにホモジナイズし、ホモジネートの2倍量のステロイド抽出液(ヘキサン: 酢酸エチル = 2:3の混合溶液)を加え10分間攪拌した後、遠心分離(2,500 xg, 室温、10分間)して有機層に溶出したステロイドを回収した。溶媒を完全に蒸発させ、C₁₈ カラム溶出用溶液(メタノール: DDW = 40:60) 1mLに再溶し、C₁₈ Amprep minicolumns (Amersham) を用いて、脂質等の夾雑物を除いた。C₁₈ カラム精製後、HPLCを用いて定量するステロイド毎に分画した。固定相にはシリカゲルの充填された順相シリカゲルカラム(0.46×15 cm, Cosmosil 5SL (Nacalai Tesque Inc.)) を、移動相にはヘキサン、イソプロパノール、酢酸の混合液を用いた。

E2, E1, Tについては質量分析器に導入時のイオン化効率を高め、検出感度を向上するために誘導体化を行った。E1とTについてはpicolinoyl誘導体化を、E2についてはpicolinoylに加えて、pentafluorobenzylでも誘導体化を行った。各ステロイド(誘導体)の構造と、LC-MS/MSの衝突部における開裂パターン・m/z値変化を図2に示した。

ステロイド(または誘導体化したステロイド)試料をトリプルステージ四重極型質量分析計に導入する。第1質量分

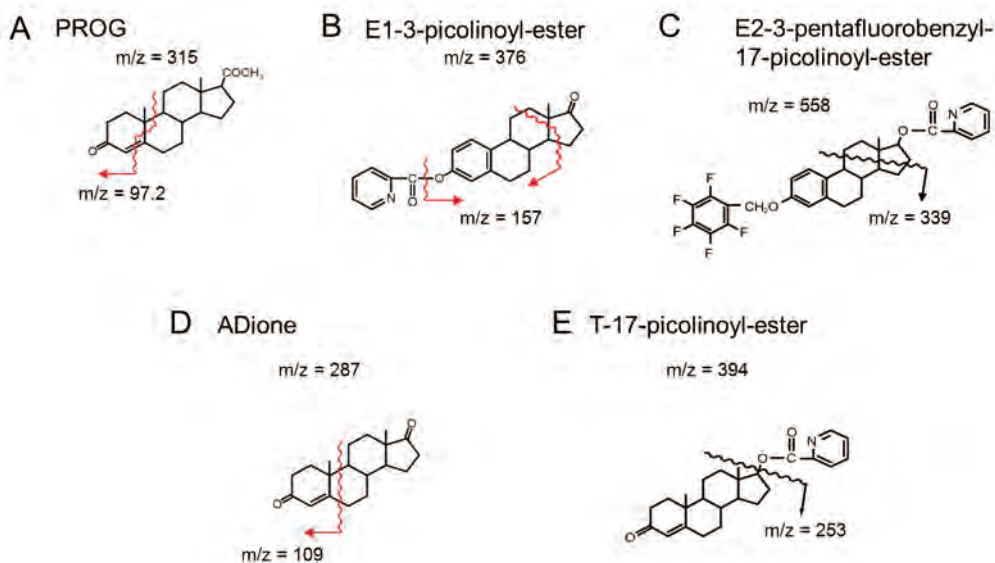


図2 本研究において定量したステロイドとその誘導体。各ステロイドは波線の部分で開裂し、娘イオンを生じる。この娘イオンの信号強度から各ステロイドの量を決定した。

析で親イオンが選択されて通過する(例えば、E2 誘導体なら $m/z = 558$)。次に窒素ガスとの衝突により誘導体が開裂し、断片化した娘イオン (E2 誘導体なら $m/z = 339$) が第2質量分析で検出される。標準溶液を用いて予め作成しておいた検量線と、観測された娘イオンの信号強度を比較して、各ステロイドを定量した。

3. 結 果

3.1. 17 β -HSD (type 1,3)(遺伝子は *Hsd17b1*, *Hsd17b3*) の発現解析

17 β -ハイドロキシ-ステロイド-脱水素酵素(17 β -HSD)は、エストロン (E1)→エストラジオール (E2)、DHEA→アンドロステジオール、アンドロステジオン→テストステロン (T) への変換、を担う酵素である。ステロイドの17 β 水酸化反応を行う。女性ステロイドホルモン合成系の中で重要な酵素である。14種存在する17 β -HSDのサブタイプのうち、17 β -HSD type1、type 3は順方向の代謝を行い、type 2、type 4は逆方向の代謝を行う。本研究では、テストステロン・エストラジオールの合成に重要な17 β -HSD (1、3)の発現解析を行った。

17 β -HSD1のPCR産物量の増幅解析を行った結果、PCR産物は28～34サイクル間で指数増幅し36サイクルから飽和状態に達した。PCRは指数増幅期の30サイクルで行い、顔の皮膚・海馬・卵巣の発現量を比較した(図3)。顔の皮膚における17 β -HSD1の発現量は海馬とは同程度であり、卵巣の約1/100であった。

17 β -HSD3のPCR産物量の増幅解析を行った結果、PCR

産物は32～40サイクル間で指数増幅し42サイクルから飽和状態に達した。PCRは指数増幅期の38サイクルで行い、卵巣・顔の皮膚・海馬の発現量を比較した(図3)。皮膚における17 β -HSD3の発現量は海馬の2/3で、卵巣の約1/60であった。

3.2. シトクロムP450aromatase (遺伝子は *Cyp19*) の発現解析

P450aromは、アンドロステジオン→エストロン、テストステロン(T)→エストラジオール(E2)の変換を行う酵素であり、エストラジオール合成において最も重要な酵素である。

P450aromのPCR産物量の増幅解析を行った結果、36～42サイクル間で指数増幅し、44サイクルから飽和状態に達した。PCRは指数増幅期の40サイクルで行い、顔の皮膚・海馬・卵巣の発現量を比較した(図3)。皮膚での発現量は低く、海馬の1/50～1/100であった。卵巣の約1/20000であった。

3.3. ER α , ER β (遺伝子は *Esr1*, *Esr2*) の発現解析

エストロゲン受容体(ER)は、エストラジオールをリガンドとする受容体で α 型(ER α)、 β 型(ER β)の2種類が存在している。両者のDNA結合領域、リガンド結合領域は類似しているが、N末端の転写調節領域が異なるため、作用様式が異なっている。

ER α (*Esr1*)のPCR産物量の増幅解析を行った結果、26～30サイクル間で指数増幅し、32サイクルから飽和状

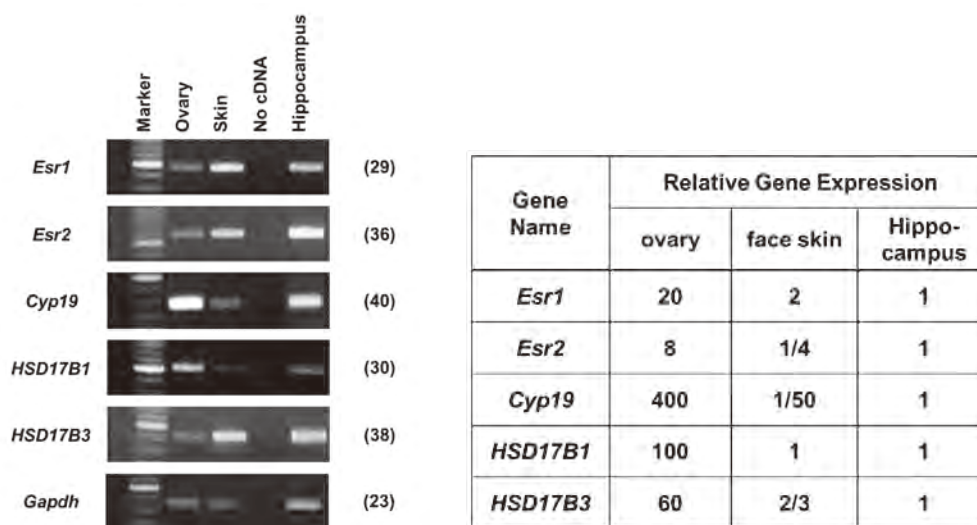


図3 メスラットの卵巣・顔の皮膚・海馬におけるステロイド合成酵素と受容体の発現解析。(左)各遺伝子のcDNAのPCR産物を電気泳動したゲルイメージ。()内は解析に用いたPCRのサイクル数。卵巣・皮膚・海馬で流したcDNA濃度は異なるので、規格化した比較は右の表が正しい。(右)卵巣・皮膚・海馬におけるステロイド合成酵素と受容体の発現量の比。Gapdhで規格化したのち、海馬を1として比較した。皮膚は、女性ホルモン前駆体の合成系は海馬と同程度存在するが、女性ホルモンへの変換能は弱そうである。受容体は十分な量発現している。

態に達した。PCRは指数増幅期の29サイクルで行い、卵巣・顔の皮膚・海馬の発現量を比較した。皮膚におけるER α の発現量は海馬の2倍であり、卵巣の1/10、であった。比較的多いといえる。

ER β のPCR産物量の増幅解析を行った結果、33～37サイクル間で指数増幅し、39サイクルから飽和状態に達した。PCRは指数増幅期の36サイクルで行い、顔の皮膚・海馬・卵巣の発現量を比較した。皮膚における*Esr2*の発現量は海馬の1/4であり、卵巣の約1/320であった。このことから、皮膚で発現するエストロゲン受容体のタイプは、主に*Esr1*であることがわかった。

3. 4. 海馬と血中におけるエストラジオールとプレグネノロンの濃度

女性ホルモンの一種であるプレグネノロンPROGは、女性ステロイドの合成における前駆体である。親イオンのm/z値は315、フラグメント化した娘イオンのm/z値は97.2であった。PROG濃度は、海馬内ではProestrus : 55.7 nM (n = 4)、Estrus : 40.7 nM (n = 4)、Diestrus 1 : 87.0 nM (n = 3)、Diestrus 2 : 48.0 nM (n = 4)、OVX : 24.5 nM (n = 5)であった。一方、血漿ではProestrus : 20.5 nM (n = 4)、Estrus : 16.7 nM (n = 4)、Diestrus 1 : 51.6 nM (n = 3)、Diestrus 2 : 24.1 nM (n = 4)、OVX : 10.1 nM (n = 5)であった。これらを川戸研の研究⁷⁾のオスのデータも入れてまとめたものが図4である。どの群においても、メスの海馬内濃度は血漿の2倍程度である。ここで、体積から考えて、血漿濃度は全血中濃度の約2倍と考えてよい。

E2の親イオンのm/z値は558、フラグメント化した娘イオンのm/z値は339であった(図2)。E2濃度は、海馬

内ではProestrus : 4.3 nM (n = 6)、Estrus : 1.0 nM (n = 4)、Diestrus 1 : 0.51 nM (n = 3)、Diestrus 2 : 0.7 nM (n = 4)、OVX : 0.7 nM (n = 4)、であった。一方、血漿ではProestrus : 0.111 nM (n = 6)、Estrus : 0.017 nM (n = 6)、Diestrus 1 : 0.009 nM (n = 5)、Diestrus 2 : 0.029 nM (n = 6)、OVX : 0.005 nM (n = 5)であった。これらを⁷⁾から得られたオスのデータも入れてまとめたものが図4である。海馬内濃度は血漿濃度の10～100倍程度という非常に高い濃度であった。E2の血漿濃度は低すぎてグラフのスケールでは見えない。

4. 考 察

本研究では、メスラットの顔の皮膚におけるステロイドホルモンの局所合成系・作用系に関わる分子の発現解析を行った。川戸研の研究で良くわかってきている、海馬の局所合成系との発現量比較を行い、顔の皮膚における局所合成系と作用系の意義を考察する。

4. 1. 顔の皮膚におけるエストラジオールE2の局所合成とその意義

海馬で得られたE2合成酵素の発現量とE2局所濃度のデータを用いると、顔の皮膚におけるE2合成酵素の発現量のデータから、皮膚のE2濃度を推定することができる。その生理的意義も考察する。

4.1.1. 顔の皮膚におけるエストラジオールの前駆体の合成系

メスにおける性ホルモンの局所合成において、主な前駆体はPROGである。血中のPROG濃度は性周期に伴って変動し、20～50 nMと十分な量が供給される。海馬では

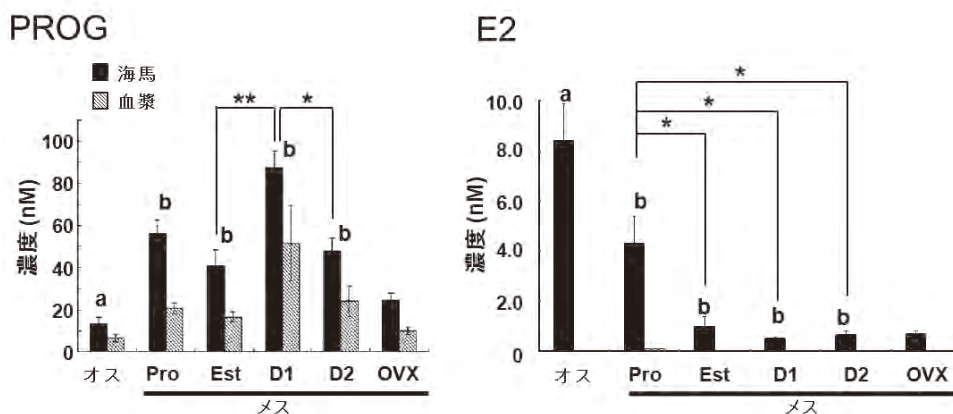


図4 メスラット脳海馬における、性周期ステージにおけるPROG, E2の濃度変動を質量分析により測定したもの。PROGは局所合成系において、E2をはじめとする性ホルモンの前駆体となる。濃度が海馬E2 >> 血中E2であることから、海馬では血中のE2は低濃度過ぎて寄与出来なくて、海馬におけるE2はほぼすべてPROGを前駆体として海馬内で局所合成されることがわかる。Pro: 卵胞期、Est: 排卵期、D1: 黄体期1、D2: 黄体期2。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。a, bは、オスとメスを比較して有意差($p < 0.05$)がある⁵⁾。mRNAの発現を比較すると、皮膚においても同様の局所合成が起こっていることが示唆される。

これに海馬自身が合成したPROGが加算されて、そこから、エストロンE1→E2（アンドロステンジオン→テストステロンも）を合成している。PROGよりも下流の局所合成された海馬ステロイドの濃度は血中濃度よりもずっと高い。本研究のmRNA発現の結果から、皮膚でも同様の現象が起きていることが予想される。

女性ホルモン合成酵素の途中に位置する17β-HSD (type 1, 3) の皮膚における発現量は、卵巣の1/100であるが、海馬とは同程度であり、局所合成系としては比較的高かった。従って17β-HSD (type 1, 3) は十分な量のE2前駆体の合成を行っていると考えられる。海馬においては、メスで2 nM 程度のアンドロステンジオンの産生を見出している^{5, 7-9)} ので、皮膚においてもE2前駆体が、やはり、1～2 nM程度の局所濃度を持つことが予想できる。血中のアンドロステンジオンの最大値は、高々0.4 nMであり、局所合成系で合成されたアンドロステンジオンが皮膚におけるE2合成の前駆体となっていると考えられる。

また、17β-HSD (type 1, 3) は、E1をE2に変換する経路も触媒するので、アンドロステンジオンがE1に変換された場合には、速やかにそれをE2にしているものと考えられる。

4. 1. 2. 顔の皮膚におけるエストラジオールの合成系とその意義

脳海馬のE2局所濃度は、卵胞期で最大値4.3 nM（血漿は0.1 nM）を取り、他は0.5～1.0 nM程度である（この時の血漿濃度は0.01 nM）。しかし、いずれのステージでも血漿のE2の最大濃度0.1 nMよりも高い値であり、海馬では局所合成されたE2が生理作用を担っている。

顔の皮膚において、女性ホルモンE2またはE1を合成する酵素P450 aromataseの発現量は海馬と比較して低かった。その発現量は、海馬の1/50程度である。しかし、これだけの発現量があれば、例えば、卵胞期における局所濃度の推定値は $4.3 \times 1/50 = 0.08$ nM となり、血中とほぼ同程度の合成が行われていると推測される。よって、血中から供給されるE2に顔の皮膚自身の合成したE2が上乗せされて、十分な発現量を持つ皮膚ERαに結合し、顔の皮膚の状態を改善する効果を発揮しているであろう。

4. 2. 皮膚におけるエストラジオールE2の作用系

女性ホルモンE2は皮膚水分・コラーゲン合成・ヒアルロン酸増加といった生理作用を及ぼし、皮膚の状態を改善する¹⁻³⁾。このE2の作用サイトの候補として、ERα、ERβの二つがある。本研究で、顔の皮膚において女性ホルモン受容体であるERαは、卵巣の1/10という十分に高い発現量であることが分かった。これに対して、ERβの発現量は卵巣の約1/300であった。このことから、顔の皮膚に

おいて女性ホルモンは、主にERαを介して生理作用を十分に発揮していると考えられる。

海馬においては、E2がERα、ERβを介してシナプス可塑性の変化や樹状突起スパイン（シナプス後部）密度の増加などを引き起こす^{10, 11)}。本研究において、顔の皮膚におけるERα、ERβの発現量は海馬と同程度であることから、ERは、生理作用を引き起こすのに十分な量だけ発現している。

5. 総 括

- (1) メスラット顔の皮膚において、女性ホルモンの局所合成系が存在することを明らかにした。エストラジオールE2合成系の酵素、及び、その受容体ERα、ERβは、脳の海馬と同程度のレベルで発現していた。
- (2) 顔の皮膚におけるE2局所濃度は、血中とほぼ同程度と推測される。これは海馬と血中におけるE2濃度の質量分析結果を用いて、局所合成系mRNAの発現レベルを比較して推測した。顔の皮膚で合成されるE2と血中から来るE2が合流して、ERα、ERβに結合して、皮膚の状態を改善していることが示唆される。
- (3) 海馬での局所合成能(mRNA発現)は性周期によらなかった⁵⁾、顔の皮膚でも局所合成能が一定だと仮定すると、卵巣からくるPROGとE2の性周期変動によって、顔の皮膚でのE2の性周期変動が作り出されるのではないかと。

(References)

- 1) Ashcroft, G.S., et al., *Topical estrogen accelerates cutaneous wound healing in aged humans associated with an altered inflammatory response*, in *Am J Pathol.* 1999: United States. p. 1137-46.
- 2) Dunn, L.B., et al., *Does estrogen prevent skin aging? Results from the First National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES I)*. *Arch Dermatol.* 1997. 133 (3): p. 339-42.
- 3) Hall, G.K. and T.J. Phillips, *Skin and hormone therapy*, in *Clin Obstet Gynecol.* 2004: United States. p. 437-49.
- 4) Hojo, Y., et al., *Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101 (3): p. 865-70.
- 5) Kato, A., et al., *Female hippocampal estrogens have a significant correlation with cyclic fluctuation of hippocampal spines*. *Front Neural Circuits*, 2013. 7: p. 149.
- 6) Kimoto, T., et al., *Semicomprehensive analysis of the postnatal age-related changes in the mRNA expression of sex steroidogenic enzymes and sex steroid receptors in*

- the male rat hippocampus*. Endocrinology, 2010. **151** (12): p. 5795-806.
- 7) Hojo, Y., et al., *Comparison between hippocampus-synthesized and circulation-derived sex steroids in the hippocampus*. Endocrinology, 2009. **150** (11): p. 5106-12.
- 8) Hojo, Y., et al., *Hippocampal synthesis of sex steroids and corticosteroids: essential for modulation of synaptic plasticity*. Front Endocrinol (Lausanne), 2011. **2**: p. 43.
- 9) Mukai, H., et al., *Automated analysis of spines from confocal laser microscopy images: application to the discrimination of androgen and estrogen effects on spinogenesis*. Cereb Cortex, 2011. **21** (12): p. 2704-11.
- 10) Mukai, H., et al., *Rapid modulation of long-term depression and spinogenesis via synaptic estrogen receptors in hippocampal principal neurons*. J Neurochem, 2007. **100** (4): p. 950-67.
- 11) Ooishi, Y., et al., *Estradiol rapidly rescues synaptic transmission from corticosterone-induced suppression via synaptic/extranuclear steroid receptors in the hippocampus*. Cereb Cortex, 2012. **22** (4): p. 926-36.

海洋性カロテノイドの酸化ストレス応答シグナルNrf2-AREシグナルを介したHO-1活性化による酸化ストレス軽減

国立沖縄工業高等専門学校生物資源工学科

平 良 淳 誠

Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) binds to antioxidant response element (ARE) induce antioxidant and phase II detoxification enzymes, such as heme oxygenase-1 (HO-1) and glutathione s-transferase under oxidative stress due to chemicals and exposed to UV-irradiation. Fucoxanthin (FX) and its gastrointestinal metabolite fucoxanthinol (FXOH) are marine carotenoid from edible brown algae, such as *Undaria pinnatifida*, *Hijikia fusiformis* and *Sargassum fulvellum*. In this study, the activation of compounds on Nrf2-ARE signaling in RAW 264.7 macrophage cells was examined using reporter assay. The compounds induced in low concentrations (2.5–10 μ M) and the western blot analysis showed to Nrf2 transfer into nuclear, resulted in expression of HO-1 protein due to binding to ARE. Interestingly, apoptotic cells with caspase 3/7 activity in the presence of the compounds also activated the Nrf2-ARE signaling with HO-1 protein expression, which indicated anti-apoptotic activity for cell survival. In addition, the activity of FXOH was higher than that of FX as well as antioxidant action and anti-inflammatory effects will be bioavailable compound in a biological system.

1. 緒 言

皮膚は紫外線や乾燥など、環境ストレスを受けやすい組織である。その環境ストレスの一つに、皮膚内で過剰に生じた活性酸素や窒素ラジカルによる酸化ストレスがある。皮膚の酸化ストレスは、細胞に障害を与えて生理機能の損失、皮膚組織の構造変化を引き起こし、皮膚のしみ、シワの要因をつくる。従来の研究では、抗酸化剤による酸化ストレス軽減を目的に行われ、植物抽出エキスやその活性成分による活性酸素消去作用を有する抗酸化剤の化粧品への開発が行われてきた¹⁻⁴⁾。生体には酸化ストレスに対する防御機構として、SOD、グルタチオンペルオキシダーゼ、チオレドキン等の抗酸化酵素がある。最近の研究で、Nrf2-Keap1 制御系による環境応答の制御機構転写因子Nrf2が、酸化ストレスに応答し、抗酸化応答配列(ARE)を介して一群の抗酸化及び薬剤耐性の遺伝子発現を活性化する酸化ストレス監視機構として働くことが明らかになった⁵⁾。皮膚においては、UVAによる皮膚障害の予防に、Nrf2-Keap1 制御系の応答によるNrf2が重要な役割を担っていることが、明らかとなった⁶⁾。

本研究では、著者がこれまでの研究で食歴のある安全性の高い植物から見出した抗酸化物質について、Nrf2-Keap1 制御系を指標に酸化ストレス軽減作用の評価を行い、有用な酸化ストレス軽減物質の検索を試みた。その

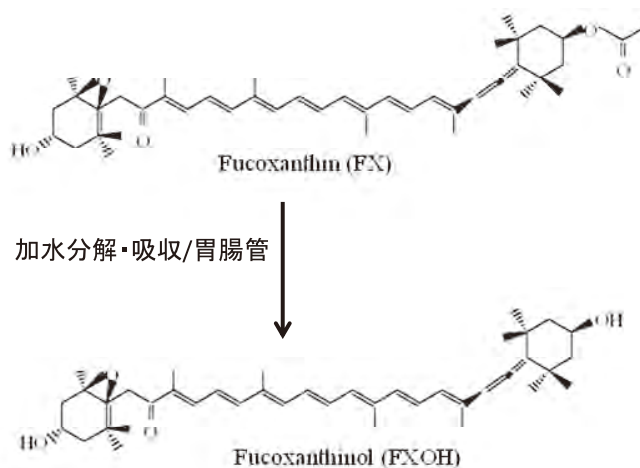


図1 Fucoxanthin (FX)とその代謝体 fucoxanthinol (FXOH) の化学構造

結果、モズクやワカメなどの褐藻類に含まれる海洋性カロテノイドのFucoxanthin (FX)とその胃腸管代謝物のFucoxanthinol (FXOH) (図1)⁷⁾にNrf2-AREシグナルを介したヘムオキシゲナーゼ1 (heme oxygenase-1: HO-1)の活性化作用による酸化ストレス軽減作用を明らかにした。評価物質のFXは化粧品素材として活用されている。本研究の結果は、今回評価した代謝体FXOHはFXよりも活性が高く作用機序が明確なことから、FXOHまたはFXとの併用による機能性化粧品の開発も期待できることを示唆した。

2. 実 験

2.1. 細胞培養

RAW264.7 細胞の培養

RAW264.7細胞はDMEM培地(10%牛胎児血清、500 U/ml ペニシリン、500 μ g/ml ストレプトマイシン)で、37



Marine carotenoid reduces oxidative stress due to HO-1 expression through Nrf2-ARE signaling

Junsei Taira

Okinawa National College of Technology,
Department of Bioresource Technology

℃のCO₂ インキュベータ (5% CO₂) で培養した。

2. 2. Nrf2-ARE シグナルのレポーターアッセイ

RAW264.7 細胞のみ及び試験化合物添加の細胞を、12-well のマクロプレート (5×10⁵ cells/ml) で 24 時間培養した。試験化合物は最終濃度が 2.5、5、10 μM になるように添加した。培養細胞に FuGENE 6 を用いてプラスミド pGL4.37 [luc2P/ARE/Hygro] をトランスフェクションした。培養 24 時間後に PBS で 2 回洗浄した細胞を 100 μl の lysis バッファーで可溶化した。この可溶性細胞 (50 μl) に ルシフェリン (50 μl) を添加して、発光強度をマクロプレートリーダーで測定した。また同試料のタンパク定量は BCA 法 (Thermo Fisher Scientific, Inc., IL) で行い、タンパク量当たりの比活性として示した。

2. 3. 細胞毒性試験

試験化合物の細胞毒性は MTT 法で測定した。レポーターアッセイで調製した培養細胞に、0.05% MTT 試薬を 500 μl 添加して、CO₂ インキュベータで 3 時間培養した。培養後に上清を完全に取り除き、50 μl の DMSO でミトコンドリアによる MTT 還元物のホルマザンを抽出して、その UV 吸収波長 540 nm と対照波長 655 nm の吸光度をマイクロプレートリーダー (model 680XR, BIO-RAD) で測定した。細胞生存率は、試験化合物未処理の細胞生存 100% に対する各試験化合物処理の細胞生存率を算出した。

2. 4. ウェスタンブロット分析

レポーターアッセイと同様に処理した培養細胞は、PBS で洗浄後に lysis バッファーで溶解して遠心 (13800 g, 5 min) を行い、SDS (4–12% SDS-polyacrylamide, Invitrogen) ゲルを用いて電気泳を行った。泳動後のゲルはニトロセルロース膜 (iBlot Gel Transfer Mini, Invitrogen) に転写した (iBlot Gel Transfer Device, Invitrogen)。転写膜は immunodetection system (Invitrogen) を用いてマニュアル手順により処理した後に、ウサギポリクローナルの HO-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc) 及び Nrf2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc) のマウスモノクローナル抗体と、各々反応させて二次抗体処理で検出した各タンパクの質蛍光強度を、Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences) 装置を用いて検出、定量した。

2. 5. カスパーゼ活性試験

カスパーゼ活性は、ルシフェリンをもつ基質 Z-DEVD を添加して ATP 存在下で、室温で反応させる。反応後にルシフェラーゼを添加して活性化カスパーゼ 3/7 で切断された基質から発光する発光強度を測定した。本試験では、レポーターアッセイで調製した培養細胞懸濁液 50 μl に、同

量の Caspase-Glo 3/7 Assay kit 試薬 (Promega) を添加して、そのマイクロプレートリーダー (GLOMAX MULTI Detection system, Promega) で発光強度を測定した。

2. 6. 統計処理

実験データは標準偏差 ±SD で示し、有意差は t-検定で行った。

3. 結果

3. 1. Nrf2-ARE シグナルのレポーターアッセイ

図 2 に、試験化合物存在下での Nrf2-ARE シグナル活性試験の結果を示した。FX と FXOH によるシグナル活性が、有意に濃度依存で示された。また、FXOH の活性は FX に比べて高かった。この結果から、両化合物の Nrf2-ARE シグナルによる転写因子 Nrf2 による抗酸化酵素群の発現が示唆された。

3. 2. Nrf2-ARE シグナル活性化に伴う HO-1 タンパク発現

図 3 に、化合物による Nrf2-ARE シグナル伝達における HO-1 タンパク発現の結果を示した。HO-1 タンパクは、FX と FXOH 存在下で顕著な発現を示した (図 3A)。このタンパク発現量を図 3B に示した。HO-1 タンパクは化合物の濃度に依存して有意に発現した。これらの結果から、FX と FXOH は Nrf2-ARE シグナルを活性化させて HO-1 タンパク発現をすることで、酸化ストレスを軽減させていることが示された。FX と FXOH の HO-1 タンパク発現は、Nrf2-ARE シグナル活性試験の結果と同様に、FXOH の存在下で高かった。

3. 3. 核内の Nrf2

化合物存在下で、Nrf2-ARE シグナルにおける Nrf2 の核

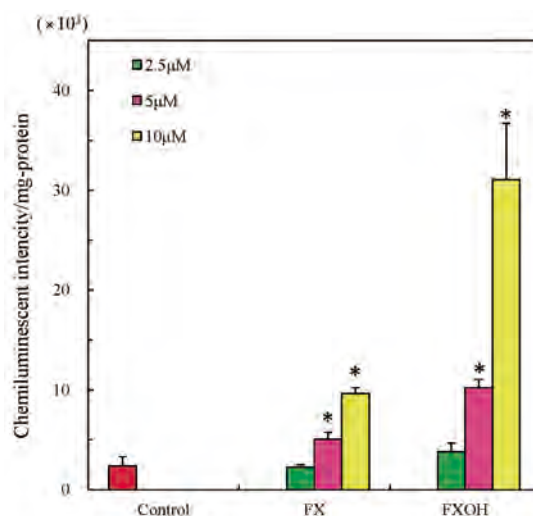


図 2 FX と FXOH の Nrf2-ARE シグナル活性
*control に対する有意差、 $p < 0.01$

内への移行を調べた。図3に、細胞質及び核内のNrf2タンパク発現とその発現量を示した。細胞質に多く存在するNrf2は、シグナル活性に伴い核内に移動していることが示された(図4A)。また、FXOHがFXに比べて核内に移動したNrf2タンパク量も多く(図4B)、この結果は、Nrf2-AREシグナルにおける活性及びHO-1タンパク発現の結果とも相関していた。

3. 4. 化合物の細胞毒性

試験濃度における化合物の細胞毒性の結果を図5に示した。10 μ Mの化合物処理で細胞毒性が認められた。また、両化合物とも、細胞毒性を示した濃度においてもNrf2-AREシグナルの活性を示した(図3)。

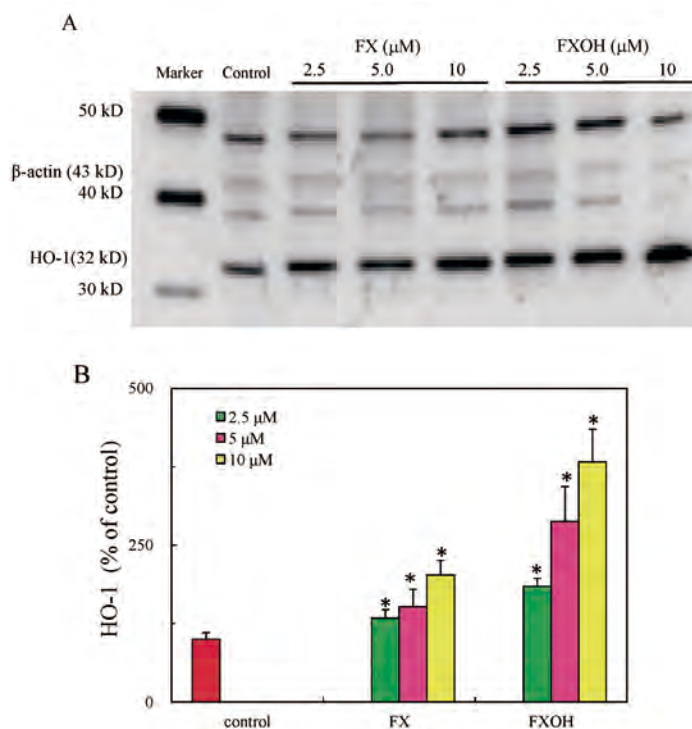


図3 Nrf2-AREシグナル活性化に伴うHO-1タンパク発現
A: FXとFXOH存在下でのHO-1タンパク発現
B: AにおけるHO-1タンパク発現量
*controlに対する有意差、 $p < 0.05$

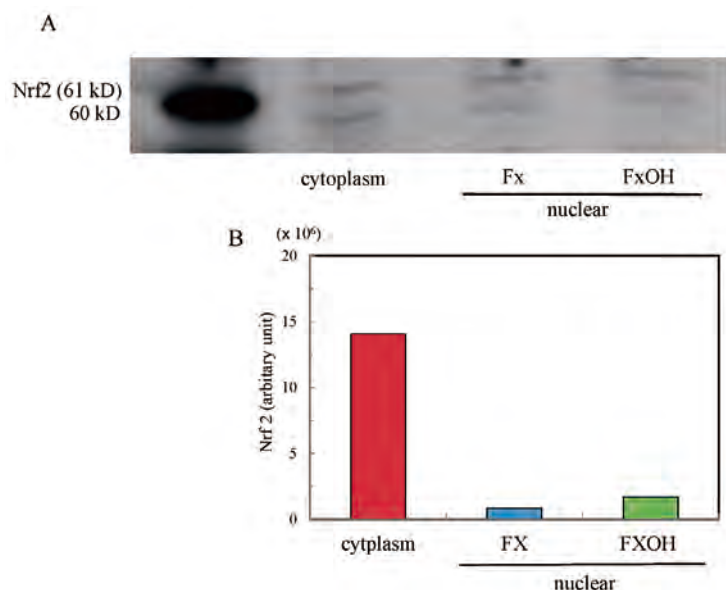


図4 FXとFXOH存在下の転写因子Nrf2核内移動
A: FX(10 μ M)とFXOH(10 μ M)存在下の転写因子Nrf2の核内移動
B: AにおけるNrf2の核内タンパク量

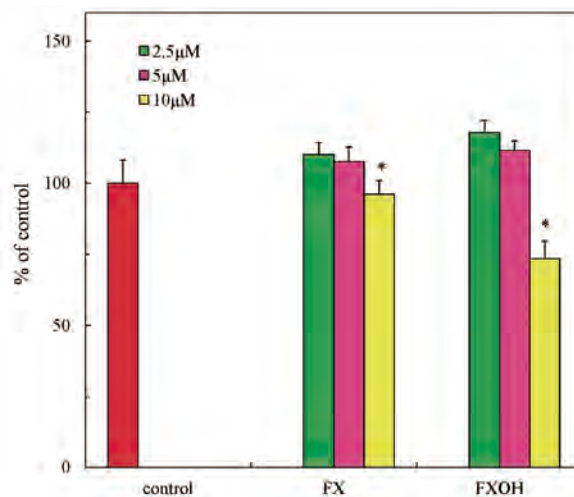


図5 Nrf2-AREシグナルにおける化合物の細胞毒性
*controlに対する有意差、 $p < 0.01$

3. 5. カスパーゼ活性

試験濃度における化合物のカスパーゼの3と7の同時活性 (caspase 3/7 活性) の結果を、図6に示した。化合物による細胞死を認めた濃度で、アポトーシスに伴う caspase 3/7 活性の上昇を認めた。従って、化合物による細胞死はアポトーシスによることが判明した。

4. 考 察

ワカメやモズクなどの食用の褐藻類に含まれている海洋性カロテノイドのFXとFXOHは、最近の研究で抗腫瘍活性⁸⁻⁹⁾、抗炎症作用¹⁰⁾、ラジカル消去¹¹⁾による抗酸化活性などの生理作用が明らかにされている。本研究では海洋性カロテノイドのFXとFXOHによるNrf2-AREシグナルの活性が示された。この時に転写因子のNrf2が核内に移行し、AREを活性化させて抗酸化酵素群の一つHO-1タンパクを発現することを示した。HO-1はHOのアイソフォームの一つで、ヘムをビリベルジン、一酸化炭素、遊離鉄に分解する酵素である。ビリベルジンは、ビリベルジン・リダクターゼにより、ビリルビンに分解される。ビリベルジンとビリルビンには強力な抗酸化作用があり、酸化ストレスなどによる細胞傷害を抑制する。FXとFXOHはNrf2-AREシグナルを介してHO-1を発現させてビリベルジンとビリルビンの抗酸化作用により、酸化ストレスを軽減させていることが示された。また、ビリベルジンはペルオキシラジカルと反応しビリルビンになることで、脂質過酸化反応を抑制している。先行実験ではFXとFXOHにはペルオキシラジカル消去活性も明らかにしたが、Nrf2-AREシグナル伝達の中でも、脂質過酸化反応を制御していることが推察される。これらの結果から、FXとFXOHには化合物のもつ抗酸化作用に加えて、Nrf2-Keap1 制御系の調節による酸化ストレス軽減作用が明らかになった。

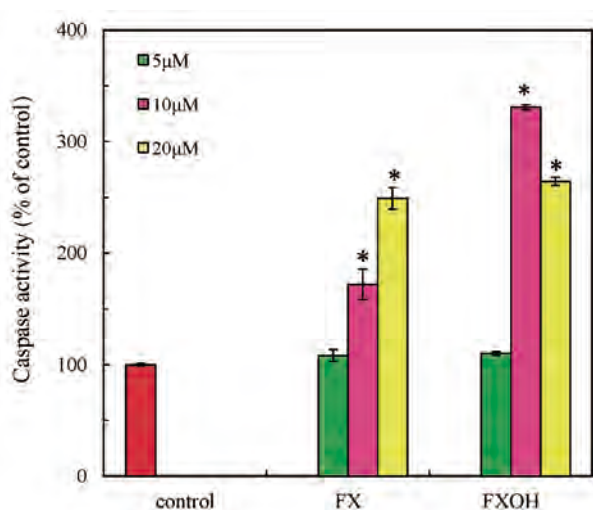


図6 Nrf2-ARE シグナルにおける化合物の caspase 3/7 活性
*control に対する有意差、 $p<0.01$

高濃度化合物存在下のNrf2-AREシグナル活性試験で、細胞毒性(細胞死)が示された。FXはアポトーシスを誘導することが報告されている⁸⁻⁹⁾。アポトーシスはデスレセプターとミトコンドリアを介するカスパーゼ(プロテアーゼ)の活性化(カスパーゼカスケード)に伴い実行される。本研究ではカスパーゼカスケードの下流にあるカスパーゼ3と7の活性を同時に測定した。結果に示されるように、FXとその代謝体FXOHで細胞死に相関してカスパーゼ活性が認められ、化合物によるアポトーシス誘導が明確に示された。一方で、アポトーシスを誘導した濃度においても、Nrf2-AREシグナル活性は上昇し、またHO-1タンパクも発現した。HO-1タンパクには抗アポトーシス活性が報告されている¹²⁾。また、Nrf2はAREのBcl-2遺伝子発現に伴うBcl-2タンパクによるアポトーシスの抑制が報告されている¹³⁾。即ち、高濃度の化合物処理はアポトーシスを誘導したが、同時にNrf2を活性化させることで、抗アポトーシス作用による細胞生存のリクルートが行われていることが推察される。今後の研究では、化合物によるアポトーシス誘導とNrf2による抗アポトーシス関連分子の発現を明らかにしていきたい。これまでの先行研究における抗酸化活性と抗炎症作用(未発表)の結果と同様に、代謝物FXOHの活性がFXに比べて高いことから、FXの生体における活性本体はFXOHであることも示唆された。以上の結果と考察から、海洋性カロテノイドFXとFXOHの酸化ストレス応答シグナルNrf2-AREにおける作用機序を図7にまとめた。

5. 総 括

本研究では、モズクやワカメなどの海藻に含まれる海洋性カロテノイドのFXとその代謝物のFXOHが、Nrf2-AREシグナル伝達を介し、転写因子Nrf2による抗酸化応

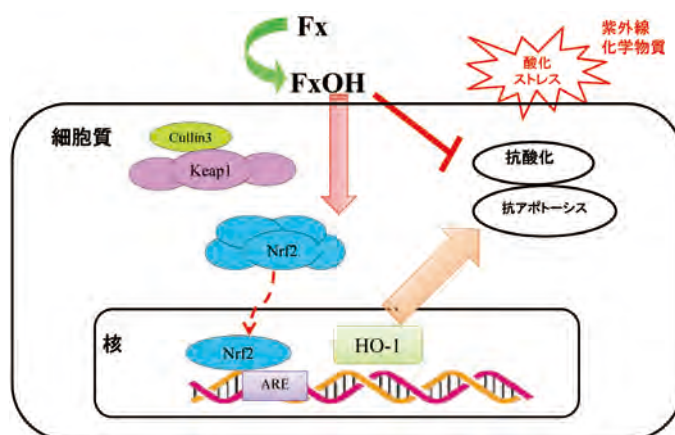


図7 海洋性カロテノイドFXと代謝体FXOHのNrf2-AREシグナルを介した抗酸化と抗アポトーシス機構

答配列 ARE との結合により抗酸化タンパク HO-1 を発現させ、酸化ストレスを軽減させていることを明らかにした。高濃度の化合物処理は、カスパーゼ 3/7 活性を伴うアポトーシス誘導をしたが、Nrf2-ARE シグナル活性も上昇した。従って、Nrf2-ARE シグナル活性に伴う HO-1 の発現による抗アポトーシス活性も示された。また、先行研究における抗酸化活性と抗炎症作用の結果と同様に、代謝物 FXOH の活性が FX に比べて高いことから、FX の生体における活性本体は FXOH であることも支持された。

引用文献

- 1) Taira J, Ikemoto T, Yoneya A, Hagi A, Murakami A, Makino, K.: Essential oil phenyl propanoids. Useful as ·OH scavenger? Free Rad Res Commun, 197-204, 1992.
- 2) Taira J, Ikemoto T, Yoneya A, Hagi A, Murakami A, Makino, K.: Hydroxyl radical formation by UV-irradiated epidermal cells, J Biochemistry, 17, 693-695, 1992.
- 3) Taira J, Ikemoto T, Mimura K, Hagi A, Murakami A, Makino K.: Effective inhibition of hydroxyl radicals by hydroxylated biphenyl compounds. Free Rad Res Commun, 71-77, 1993
- 4) Fujita S, Taira J.: Biphenyl compounds are hydroxyl radical scavengers: Their effective inhibition for UV-induced mutation in *Salmonella Typhimurium* TA102, Free Rad Biol Med, 17, 273-277, 1994.
- 5) Kimura S, Warabi E, Yanagawa T, Ma D, Itoh K, Ishii Y, Kawachi Y, Ishii T.: Essential role of Nrf2 in keratinocyte protection from UVA by quercetin, Biochemical and Biophy Res Commun, 387, 109-114, 2009.
- 6) Hirota A, Kawachi Y, Itoh K, Nakamura Y, Xu X, Banno T, Takahashi T, Yamamoto M, Otsuka F.: Ultraviolet A irradiation induces NF-E2-related factor 2 activation in dermal fibroblasts: protective role in UVA-induced apoptosis, J Invest Dermatol, 124, 825-832, 2005.
- 7) Sugawara T, Baskaran V, Tsuzuki W, Nagao A.: Brown algae fucoxanthin is hydrolyzed to fucoxanthinol during absorption by Caco-2 human intestinal cells and mice, J Nutr, 132, 946-951, 2002.
- 8) Hosokawa M, Wanezaki S, Miyaguchi K, Kurihara, H, Kohono H, Kawabata J, Kawabata J, Odashima S, Takahashi K.: Apoptosis-inducing effect of fucoxanthin on human leukemia cell line HL-60, Food Scie Tech Res, 5, 243-246, 1999.
- 9) Hosokawa M, Kudo M, Maeda H, Kohno H, Tanaka T, Miyashita K.: Fucoxanthin induces apoptosis and enhances the antiproliferative effect of the PPAR γ ligand, troglitazone, on colon cancer cells, Biochim Biophys Acta, 1675, 113-119, 2004.
- 10) Kim KN, Heo SJ, Yoon WJ, Kang SM, Ahn T-H Y, Jeon Y-J.: Europ J Pharmacol, Fucoxanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of NF- κ B and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages, 649, 369-375, 2010.
- 11) Sachindra NM, Sato E, Maeda H, Hosokawa M, Niwano Y, Kohno M, Miyashita K.: Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites, J Agric Food Chem, 55, 8516-8522, 2007.
- 12) Busserolles J, Megias J, Terencio MC, AlcarazInt MJ.: Heme oxygenase-1 inhibits apoptosis in Caco-2 cells via activation of Akt pathway, Int J Biochem Cell Biol, 38, 1510-1517, 2006.
- 13) Niture SK, Jaiswall AK.: Nrf2 Protein up-regulates antiapoptotic protein Bcl-2 and prevents cellular apoptosis, J Biol Chem, 287, 9873-9886, 2012.

化粧品成分の安全性評価：CYP 誘導性と肝毒性の *in vitro* 評価系の構築

鳥取大学染色体工学研究センター染色体医療学研究部門

多田 政子

Human adult hepatocytes are required for cell-based assays to evaluate the potential risk of drug-drug interactions caused by the transcriptional induction of P450 (CYP) enzymes in early-phase drug discovery and development. We created transgenic HepaRG cells by replacing the protein-coding regions of human CYP3A4 and CYP3A7 with enhanced green fluorescent protein (EGFP) and DsRed reporters, respectively, in a bacterial artificial chromosome (BAC) vector that included whole regulatory elements. In the created BAC-transgenic HepaRG cells, EGFP can be used as a quality assurance marker for identifying functional hepatocytes derived from DsRed-positive bipotential stem cells in real time without the need for many time-consuming steps.

1. 緒 言

健康や美容に優れた効果が期待される成分が見つかったとしても、細胞毒性や薬物間相互作用を引き起こす危険性について慎重に精査しなければならない。開発期間の短縮や低コスト化には、それら成分の不都合な特性を可能な限り早い時期に把握することが重要である。薬物相互作用、いわゆる「飲み合わせ」の問題は、服用した化合物が薬物代謝酵素群 P450 (CYP) の阻害や発現誘導を引き起こすことに起因する。この反応には種差があるため、ヒト細胞を用いた評価系の確立が望まれる。この実現には、2つの大きな課題が残されている。1つは、評価に用いる充分な質と量のヒト肝細胞ソースが確保されていないこと、もう1つは短時間に多検体を評価できるハイコンテツスクリーニング (HCS) 型の評価系が構築されていないことである。

我々は、市販薬の 50 - 60% の代謝を担う成人特異的な CYP3A4 と胎児肝臓で発現する CYP3A7 を 2 色蛍光で簡便かつ感度よく検出する一体型ベクターを開発した¹⁾。このベクターを用いると以下のことが可能になると予想した：①CYP3A7 を発現する肝芽細胞を赤色蛍光 (DsRed) で、CYP3A4 を発現する成人肝細胞を緑色蛍光 (EGFP) で同定することが可能になる。②成人肝細胞を緑色蛍光に基づいて分取することが可能になる。③ある種の化学物質は核内受容体の PXR や RXR と結合することで CYP3A4 発現誘導を引き起こすことが知られているが、この CYP3A4 誘導性を EGFP 蛍光量の増加に基づいて評価することが可能になる。

CYP3A4 と CYP3A7 はタンパク質レベルでは 90% 以上の

相同性を示し、抗体を用いて識別することが困難である²⁾。しかし、これらは、酵素反応性や基質特異性、更に発現誘導機序が異なっている。よって、CYP3A4 を発現している成人肝細胞の選択的利用が求められているものの、主なヒト肝細胞株は胎児性の遺伝子発現プロファイルを示すという問題がある。

本研究では、開発済みの一体型 2 色蛍光ベクター (CYP3A4G/7R BAC) をヒト肝細胞由来細胞株 HepaRG 細胞に導入しベクターの作動性を評価した。HepaRG 細胞は、ヒト肝細胞様への分化能を持ち、高い CYP3A4 発現を示すようになることが知られている^{3, 4)}。そこで、分化したトランスジェニック細胞 (CYP3A4G/7R HepaRG) がヒト肝細胞の代替モデル細胞として有用かどうか評価した。結果、CYP3A4G/7R HepaRG を用いると、EGFP 蛍光が内在性 CYP3A4 発現のインディケーターとなるため、HepaRG 細胞の分化状態のモニターや代謝活性の高い細胞を集めることが容易になった。更に、CYP3A4G/7R HepaRG に既知の CYP3A4 発現誘導剤を添加すると、EGFP 蛍光量が増加した。よって、CYP3A4G/7R HepaRG を用いることで、一度に多数の化合物に関して CYP3A4 発現誘導性をマルチウエルで評価できる HCS 系を構築できる可能性が示された。

2. 実 験

2. 1. 増殖培養と肝細胞分化

HepaRG 細胞 (Biopredic International) は、710 growth medium を用いて 5% CO₂、37℃ で増殖させた。HepaRG 細胞を分化させる場合は、710 growth medium で 2 週間培養し、連続的に 720 differentiation medium で 2 週間培養した。

2. 2. トランスジェニック細胞作製

2. 2. 1. loxP-HepaRG 細胞

CYP3A4G/7R BAC ベクター全長を Cre 酵素を介して受容細胞に 1 コピー導入する目的で、loxP サイトを BAC ベ



Dual-color fluorescent imaging of developmental shift from foetal hepatic cells to adult hepatocytes and CYP3A4 induction test in human hepatic carcinoma HepaRG

Masako Tada

Division of Chromosome Engineering & Therapeutics, Chromosome Engineering Research Center, Tottori University

クターに挿入した。次にBACベクターをHepaRG細胞に導入するため、loxPアクセプターサイトをもつHepaRG細胞 (loxP-HepaRG) を作製した。NotIで切断したloxPサイト導入用のプラスミドベクターをLipofectamine LTX (Life Technologies) でトランスフェクションした。loxP-HepaRGは、プラスミドベクター上のハイグロマイシン薬剤耐性遺伝子を用いて選択した。ゲノムDNAのPCR解析やDNA FISH法により、loxPの挿入やその染色体領域を同定した。

2. 2. 2. CYP3A4G/7R HepaRG細胞

CYP3A4G/7R BACはpCAG-Creベクターと共にloxP-HepaRGにLipofectamine LTXでトランスフェクションした。CYP3A4G/7R HepaRGクローンは、プラスミドベクター上のネオマイシン薬剤耐性遺伝子を用いて選択した。ゲノムDNAのPCR解析やDNA FISH法により、BACベクターの挿入やその染色体領域を同定した。

2. 3. CYP3A4 発現誘導

分化したCYP3A4G/7R HepaRGに10 μ Mリファンピシン (RIF)、25 μ Mデキサメタゾン (DEX)、25 μ Mクロトリマゾール (CLO)、100 μ Mニフェディピン (NIF) または25 μ M PCNを24–48時間添加した。全ての誘導剤に関して、細胞添加状態で0.1% DMSOになるようにDMSOに溶解したストック溶液を調整した。エリア総蛍光量を測定した後にRNAを抽出した。これにより、EGFP、DsRedおよび内在性CYP3A4のmRNA発現量変化と蛍光量変化を比較可能にした。cDNAはSuperscript III First-Strand Synthesis Kit (Life Technologies)を用いて合成し、LightCycler 480 (Roche Applied Science)を用いて通常の定量性RT-PCR法で解析した。

2. 4. CYP3A4 タンパク質発現解析

ウエスタンブロットは、10–20 μ gのHepaRG細胞タンパク質を25% LDS sample buffer (NuPAGE) に溶解し、5–20% SDS-polyacrylamide gradient gel (ATTO)を用いて分離した。Polyvinylidene fluoride membraneにトランスファーし、PBSに3%スキムミルクを溶解したブロッキング液を用いて、通常のウエスタンブロット法に従って抗体処理した。シグナルは、ECL Plus Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare)を用いて検出した。使用した一次抗体は以下の通り：anti-CYP3A4/7 antibody (rabbit polyclonal, 1:500; Enzo)、anti-EGFP (mouse monoclonal, 1:200; Santa Cruz Biotechnology, Inc.)、anti- β -actin (mouse monoclonal, 1:5,000; Abcam)。

2. 5. 蛍光陽性細胞のライブイメージング、数的評価および蛍光量解析

細胞の蛍光は通常の倒立型蛍光顕微鏡で観察できる。本

研究では、BZ-9000 蛍光顕微鏡(Keyence) で画像を取得し、専用の画像解析ソフトで相対的にエリア総蛍光量を比較した。また、自動蛍光画像取得および解析装置であるLEAP cell-processing workstation (Cyntellect)およびIncuCyte ZOOM (Essen BioScience) を適宜用いた。ライブセルイメージングには、VivaView FL (LCV-100) incubator fluorescence microscope (OLYMPUS)を用いた。EGFP陽性細胞は、FACS Aria flow cytometer (BD Biosciences) で解析および分取した。

3. 結 果

3. 1. CYP3A4G/7R HepaRG細胞作製

本研究支援期間の結果は、既に論文発表済みである。よって、図の重複使用を避けるため、詳細データは論文を参照して頂きたい¹⁾。CYP3A4とCYP3A7は、ヒト7番染色体上に並んでいる。この123 kbを含むBACクローンRP11-757A13を、BAC recombineeringの手法を使って改変した。CYP3A4のタンパク質コード配列 (ORF) をEGFP遺伝子に、CYP3A7のORFをDsRed遺伝子に置換した。このCYP3A4G/7R BACは、CYP3A4上流35 kbとCYP3A7上流の全て23 kbの制御領域を含んでいる。また、Cre-loxPシステムにより容易に哺乳類細胞へ遺伝子導入できるように一カ所のloxP配列をBACに挿入した (Fig. 1A)。

CYP3A4G/7R BACを導入する細胞として、予め、loxPサイトを一カ所もつloxP-HepaRGトランスジェニック細胞株を取得した (Fig. 1B)。このloxP-HepaRG細胞には、loxPサイトをもつあらゆる発現ベクターをCre酵素を介して容易に導入することができる。次いで、環状のCYP3A4G/7R BACをCre発現ベクターと共にloxP-HepaRGに導入することで、複数のCYP3A4G/7R HepaRGトランスジェニック細胞クローンを得た。

3. 2. CYP3A4G/7R HepaRG細胞の特性

得られた全てのCYP3A4G/7R HepaRG細胞クローンは、増殖期にはDsRed蛍光が極めて高い状態であった。これを分化誘導すると、EGFP陽性細胞が出現した (Fig. 2)。

得られた複数のクローンの中から、分化能が高くEGFP陽性率が高く染色体が安定なクローンを選別した。この基準を満たしたC3クローンを中心に詳細な解析を進めた。C3クローンは分化培地で培養すると、DsRed蛍光が著しく減少した。一方、EGFPのmRNA発現は、分化開始時から2週間で7倍に増加した。また、EGFP蛍光量は7-8倍に増加し、mRNAレベルの増加率を反映していた。

分化C3クローンにおける内在性のCYP3A4タンパク質発現を親株 (WT) のHepaRGとウエスタンブロット法で比較した。WT HepaRGに対してC3 HepaRGは、半分のタンパク質レベルのCYP3A4発現に減少していた。これは

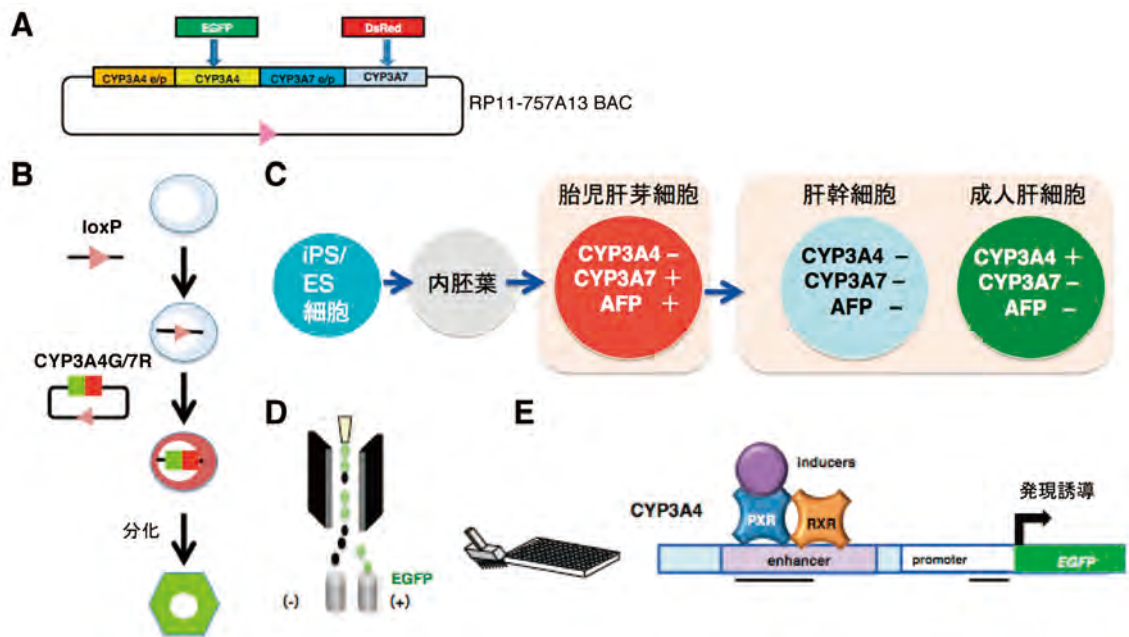


Figure 1 CYP3A4G/7R HepaRG 細胞の開発とその用途概要

- A. CYP3A4G/7R BAC 発現ベクターの概要。
 B. loxP-HepaRG 細胞と CYP3A4G/7R HepaRG 細胞の作製手順。
 C. CYP3A4G/7R BAC による肝細胞分化モニターの概要。
 D. EGFP 蛍光による CYP3A4 発現細胞の濃縮。
 E. EGFP 蛍光による CYP3A4 発現誘導性の評価系概要。

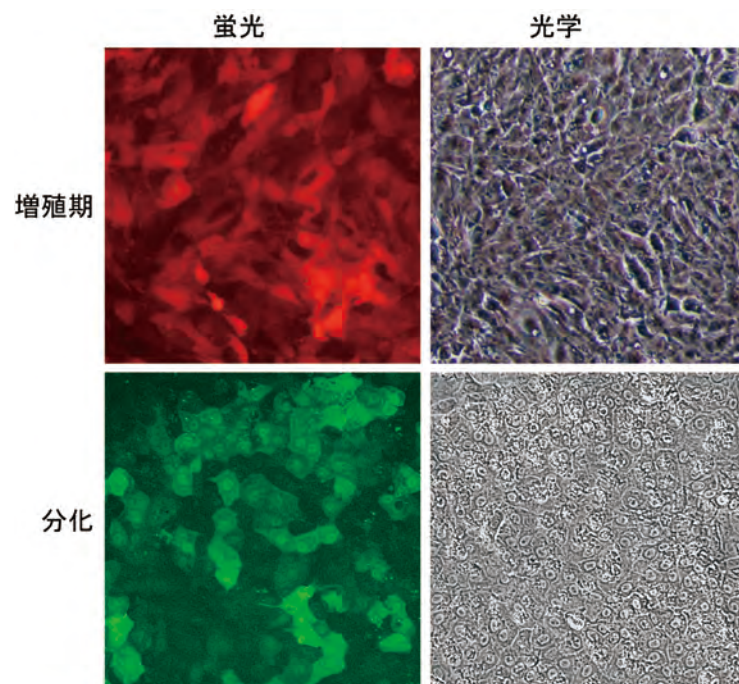


Figure 2 CYP3A4G/7R HepaRG 細胞の特性

(増殖期) 全ての細胞がDsRed陽性でCYP3A7発現状態であることを示す。
 (分化時) 分化細胞の一部がEGFP陽性のCYP3A4発現細胞になることを示す。

遺伝子クローニングによる分可能の低下によると考えられる。しかしながら、ウエスタンブロットで全くCYP3A4発現が確認できないHepG2細胞に比べ、十分に高い発現を示した。また、EGFPの発現量はウエスタンブロット法で十分に検出できるレベルであった。CYP3A4の発現レベルの向上は、EGFP発現の高いトランスジェニック細胞クローンの選別やEGFP陽性細胞の濃縮により更に改善可能と考えられる。

3. 3. DsRedとEGFPを用いた肝細胞分化過程の可視化

分化開始5日目のDsRed陽性細胞とEGFP陽性細胞が混在する分化途中のC3クローンの細胞集団をFACS解析した。結果、DsRed陽性細胞とEGFP陽性細胞に分離できたが、共に陽性の細胞集団は検出されなかった。このことは、CYP3A7陽性の胎児肝実質細胞である肝芽細胞は、CYP3A7非発現細胞状態を介してCYP3A4陽性の肝細胞、CYP3A4非陽性の肝細胞および胆管上皮細胞に分化することを示している。

次に、タイムラプス蛍光顕微鏡を用いてリアルタイムにCYP3A4G/7R HepaRG C3クローンの分化のプロセスを観察した。結果、多くのDsRed陽性細胞が当初非蛍光細胞となり、その中からEGFP陽性の細胞が出現した。また、非蛍光細胞の中には、細胞分裂直後にEGFP陽性となる細胞が存在することが観察されている。よって、CYP3A7を発現していないが増殖能を持つ幹細胞状態を経てCYP3A4を発現する成人型肝細胞になる可能性が示された。

以上の結果は、CYP3A4G/7R BACベクターをヒトES細胞やiPS細胞に導入したトランスジェニック細胞を作製した場合も、内胚葉状態を経て分化状態をモニターできる可能性を示唆している (Fig. 1C)。

3. 4. FACSによるEGFP陽性CYP3A4発現細胞の濃縮

EGFPを指標にCYP3A4を発現している代謝能の高い肝細胞をFACSを用いて濃縮できるか検討した。EGFP陽性細胞と非陽性細胞において内在性のCYP3A4 mRNA発現を定量性RT-PCR法で調べた結果、分化細胞集団からCYP3A4発現細胞を濃縮できることが示された (Fig. 1D)。

3. 5. CYP3A4誘導剤によるEGFP蛍光量の増加

4種類 (10 μ M RIF、25 μ M DEX、25 μ M CLO、100 μ M NIF)の既知のCYP3A4誘導剤でHepaRG C3クローンを処理し、48時間後に一定エリアの平均蛍光量を誘導前と比較した。コントロールとして0.1% DMSOで処理した。また、CYP3A4を誘導しないが、マウスCyp3a11発現を誘導することが知られている25 μ M PCNでHepaRG C3クローンを処理した。結果、EGFP蛍光は、0.1% DMSO処理群よ

りRIFで約2倍、DEXで約2.5倍に増加し、NIFとCLOで約3倍に増加した。一方、PCNでは、EGFP蛍光の増加は見られなかった。よって、CYP3A4G/7R HepaRG細胞は、細胞を破壊して行う解析を用いずにCYP3A4誘導性を評価するシステムの構築に寄与できる可能性が高い (Fig. 1E)。

4. 考 察

機能的な肝臓細胞は、その機能の研究、化学物質の安全性試験、薬物代謝酵素P450誘導性試験および再生医療研究など広範な領域で需要が高い。CYP誘導性や代謝産物の解析結果は、評価に用いる「細胞の質」に大きく左右される。しかし、(1)ヒトの初代培養は機能的に低いヘテロな集団であり再現性に乏しい、(2)ヒト肝臓癌由来の細胞株の多くは胎児性の性質をもつ、(3)薬物代謝やCYP誘導性には種差があるため動物を用いた評価にはfalse negativeにより生じた薬害が少なからずある、(4)ヒトiPS細胞からは未だ機能的で均質な肝臓細胞を得ることが困難であるなどの諸問題を抱えている。本研究で用いたヒト肝細胞様細胞HepaRGは、増殖状態では肝細胞としての特性を示さないが、専用の分化培地で1-2週間培養すると成熟肝細胞の特性を示す。定量性RT-PCR解析では、HepG2細胞がヒト成人肝臓の1%程度のCYP3A4発現量に留まっているのに対し、HepaRG細胞は120%に達していた。このように高いCYP3A4発現を示す細胞株はかつてなかった。しかし、肝細胞として成熟化していることを見極めるためには、使い頃を判断できる手軽なマーカーが必要であった。CYP3A4G/7R BACベクターを導入したトランスジェニックHepaRG細胞は、赤から緑へ蛍光がシフトするため、細胞の分化度が簡単に把握できるようになっている。このように、HepaRG細胞の利便性を高めたことで、ヒト肝細胞の初代培養細胞を代替するモデル細胞としての利用が進むと期待される。

CYP3A4G/7R HepaRG C3クローンでは、EGFPの蛍光量、EGFPのmRNAおよび内在性のCYP3A4のmRNA発現量の変化に対応が見られた。また、生細胞で連続的に観察可能なことから、EGFPは遺伝子発現変動をモニターできるHCS対応型の良好なレポーター遺伝子になり得る。一方、ルシフェラーゼや β ガラクトシダーゼ等の酵素反応を用いた遺伝子発現レポーターシステムの場合は、基質を添加して染色量や発光量を測定する操作が必要である⁵⁻⁷⁾。また、作製したCYP3A4G/7R HepaRG細胞は、内在性の遺伝子に改変を加えていないため、EGFP陽性細胞をCYP3A4発現細胞として肝細胞の代わりに使用できる。このようなモデル細胞の開発により、再現性と信頼性向上、開発期間の短縮と低コスト化、安全性試験に要する実験動物の削減につながると期待できる。

5. 総 括

本研究では、肝細胞が成熟すると CYP3A7 から CYP3A4 へ発現がシフトすることを利用して、2 色蛍光に基づき (1) 肝細胞の分化度のモニター、(2) 分化因子の同定、(3) 肝細胞の分取、(4) CYP3A4 誘導性評価などが可能なヒト肝モデル細胞 HepaRG 細胞を作製した。今後、HepaRG 細胞の遺伝子発現プロファイルをヒト肝細胞に更に近づける工夫を加えることで、汎用化が期待される。また、この細胞は肝細胞の分化過程を促進する培養条件の探索に有効である。これにより、ヒト iPS 細胞から機能的な肝細胞を作り出す条件が明らかにできると期待される。結果、ヒト iPS 細胞を用いた肝臓の「再生医療」の加速化への波及効果も期待できる。

謝 辞

本研究遂行にあたりコスメトロジー研究振興財団よりご支援賜り深く感謝申し上げます。

(参考文献)

- 1) Tsuji S, Kawamura F, Kubiura M, Hayashi A, Ohbayashi T, Kazuki Y, Chesné C, Oshimura M, Tada M, : Dual-colour fluorescence imaging to monitor CYP3A4 and CYP3A7 expression in human hepatic carcinoma HepG2 and HepaRG cells. PLOS ONE, 9(8): e104123, 2014.
- 2) Bertilsson G, Berkenstam A, Blomquist P,: Functionally conserved xenobiotic responsive enhancer in cytochrome P450 3A7. Biochem Biophys Res Commun 280: 139-144, 2001.
- 3) Gripon P, Rumin S, Urban S, Le Seyec J, Glaise D, et al.: Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 15655-15660, 2002.
- 4) Antherieu S, Chesne C, Li R, Camus S, Lahoz A, et al.: Stable expression, activity, and inducibility of cytochromes P450 in differentiated HepaRG cells. Drug Metab Dispos 38: 516-525, 2010.
- 5) Robertson GR, Field J, Goodwin B, Bierach S, Tran M, et al.: Transgenic mouse models of human CYP3A4 gene regulation. Mol Pharmacol 64: 42-50, 2003.
- 6) Tirona RG, Lee W, Leake BF, Lan LB, Cline CB, et al.: The orphan nuclear receptor HNF4alpha determines PXR- and CAR-mediated xenobiotic induction of CYP3A4. Nat Med 9: 220-224, 2003.
- 7) Zhang W, Purchio AF, Chen K, Wu J, Lu L, et al.: A transgenic mouse model with a luciferase reporter for studying in vivo transcriptional regulation of the human CYP3A4 gene. Drug Metab Dispos 31: 1054-1064, 2003.

炎症性皮膚疾患におけるアクアポリン9の機能解明

京都大学大学院医学研究科次世代免疫制御を目指す創薬医学融合拠点

竹馬 真理子

Aquaporins (AQPs, AQP0-12) are membrane water/glycerol channel proteins that participate in various cellular functions in many cell types. AQP9 is expressed in several immune cells including neutrophils; however, its role in cutaneous immune response remains unknown. Here we show the involvement of AQP9 in skin allergic inflammation using AQP9 knockout (AQP9^{-/-}) mice and the contact hypersensitivity (CHS) model.

First, AQP9^{-/-} mice showed impairment of CHS responses to hapten (DNFB) compared with wild-type (WT) mice. Adoptive transfer of AQP9^{-/-} LN cells into the ears of WT recipients resulted in impaired CHS response, indicating the defect of sensitization in AQP9^{-/-}. IL-17 production was decreased in AQP9^{-/-} compared with WT LN cells.

WT mice showed high neutrophil accumulation in LNs at 18 h after DNFB application, but it was abrogated in AQP9^{-/-} mice. In accordance, we found the attenuation of AQP9^{-/-} neutrophil migration to LNs after DNFB application. Furthermore, the neutrophil migration in response to CCR7 ligands was suppressed in AQP9^{-/-} using chemotaxis chambers.

Finally, we found that the administration of neutralizing antibody during the sensitization phase suppressed IL-17 production from LN cells as well as CHS response in WT mice, suggesting the implication of neutrophils for IL-17 production during the development of CHS.

These data suggest that AQP9-expressing neutrophils play an important role in the sensitization phase of CHS through their migration function.

1. 緒言

水は生命現象にとって必須の物質であり、体内ではみかけ以上にダイナミックな水輸送が行なわれている。この水輸送を支える膜蛋白として発見されたアクアポリン (AQP) は、現在までに、AQP0 から AQP12 までの 13 の遺伝子が報告されている。1992 年に AQP1 が発見されて以降、AQP の研究は、腎臓、腸管など水の吸収が盛んな臓器を中心に進められてきた。この進展により、近年では、AQP が、水やその他の物質輸送を介して、さらに高次の生命現象を制御することがわかってきている。

我々は皮膚における AQP に着目し、皮膚の構成細胞に発現する AQP 分子の機能を明らかにしてきた。これまでに、AQP3 欠損マウスおよび AQP3 ノックダウン細胞を主な研究材料に用い、表皮細胞に発現する AQP3 が、細胞遊走および細胞増殖を調節し、創傷治癒、腫瘍形成あるいはアトピー性皮膚炎発症に関与していることを明らかにしてきた^{1, 2, 3)}。また、T 細胞に発現する AQP3 が、ケモタキスを調節することで、接触皮膚炎発症に関与することを報告している⁴⁾。

一方 AQP9 は、今までの報告や予備検討から、分化し

た表皮細胞や、皮膚に浸潤する多くの免疫細胞 (好中球、肥満細胞、T 細胞など) に発現していることが示唆されているが、その機能はほとんど明らかにされていない。また AQP9 欠損マウスが既に樹立されているが、皮膚の詳細な機能解析は未だ実施されておらず、皮膚外観や組織には顕著な異常がないと言及されている⁵⁾。

我々は、免疫細胞に発現する AQP9 が、接触皮膚炎、アトピー性皮膚炎あるいは乾癬のような免疫異常を伴う炎症性皮膚疾患の発症に関与している可能性を検討した。AQP9 欠損マウスを用い、接触皮膚炎モデル⁶⁾における野生型マウスとの表現型を比較することで、AQP9 の機能解明を本研究の目的とした。

2. 実験

2.1. 接触皮膚炎モデル

AQP9 遺伝子欠損マウス (AQP9^{-/-}, C57BL/6 genetic background) は、Rojek 博士 (Aarhus University, デンマーク) から入手し、京都大学動物施設内にて、Hetero 同士交配により繁殖し実験に供した。AQP9^{-/-} および野生型 (WT) マウスは、2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) を腹部に塗布し感作した。塗布 5 日後に DNFB を耳介に塗布し (チャレンジ)、24 時間後の耳介浮腫を micrometer (Mitsutoyo) により測定した。

感作の成立を調べるため、DNFB 塗布 5 日後に、皮膚所属リンパ節を摘出し、2,4-dinitrobenzene sulfonic acid (DNBS) とともに 3 日間培養し、細胞増殖能 (³H サイミジン取り込み) と、培養上清のサイトカイン量 (INF-gamma, IL-17A) を測定した (ELISA kit, e-bioscience)。さらに、



Role of Aquaporin-9 in inflammatory skin disease

Mariko Chikuma

Center for Innovation in Immunoregulative Technology and Therapeutics, Kyoto University Graduate School of Medicine

DNFB感作5日後のリンパ節の細胞、およびチャレンジ24時間後のリンパ節ならびに皮膚中の細胞を調製し、flow cytometry FACS Fortessa system (Becton Dickinson) により解析した。

2. 2. Adoptive Transfer Experiments

DNFB感作5日後に、AQP9^{-/-}およびWTマウスの所属リンパ節から細胞を調製し、耳介へ皮下投与した。その後、耳介にDNFBを塗布した。翌日の耳介浮腫を測定した。

2. 3. Chemotaxis Assay

AQP9^{-/-}およびWTマウスのBone Marrow細胞から、Percoll分画により好中球を調製した。Transwell Chamber (5 μm pore size, Corning Costar) の上部に好中球をアプライし、下部のケモアトラクタント (CCL19, CCL21, fMLP) へ遊走した細胞数を、FACSにより解析した。

3. 結果

C57BL/6のWTマウスから好中球 (Neutrophil)、肥満細胞 (BMMC)、T細胞 (CD4⁺, CD8⁺細胞)、樹状細胞 (BMDC)、およびマクロファージ (BMM) を採取し、AQP9遺伝子発現量をリアルタイムPCRにより測定した。AQP9は、好中球および肥満細胞で高い発現が確認された (図1, left)。

好中球でのAQP9免疫染色では、AQP9が細胞膜と細胞質に局在していることが示された (図1, right)。

ハプテン (DNFB) 誘発による接触皮膚炎反応を、WTおよびAQP9^{-/-}マウスを用い検討した。AQP9^{-/-}マウス皮膚では、発症程度を表す耳介浮腫 (厚さ) が、WTマウスと比較して有意に抑制されていた (図2, left)。HE組織染色像から、AQP9^{-/-}マウス皮膚では、WTで認められる免疫細胞の浸潤と表皮肥厚が抑制されていることが示された (図2, right)。

接触皮膚炎反応惹起時 (チャレンジから24時間後) に採取した皮膚を用い、FACS解析あるいは組織解析により、皮膚内に浸潤しているT細胞 (CD4⁺, CD8⁺)、樹状細胞 (MHCII⁺ CD11c⁺)、肥満細胞 (Toluidine blue 染色)、および好中球 (Giemsa 染色) の細胞数を測定した。AQP9^{-/-}皮膚では、CD4⁺およびCD8⁺T細胞、ならびに好中球の浸潤がWT皮膚と比較して有意に低下していることが示された (図3)。

AQP9^{-/-}マウスで接触皮膚炎の感作が成立しているかを検討した。DNFB塗布5日後のリンパ節由来細胞を採取し、ナイーブマウス (WT, AQP9^{-/-}マウス) の耳介皮内に移入した (adoptive transfer)。直後にDNFBを塗布し、1日後に耳介浮腫を測定したところ、AQP9^{-/-}細胞はWT細胞と比較して、有意に耳介浮腫を減少させた (図4)。この結果は、AQP9^{-/-}マウスでは接触皮膚炎反応の感作過程の成立が抑

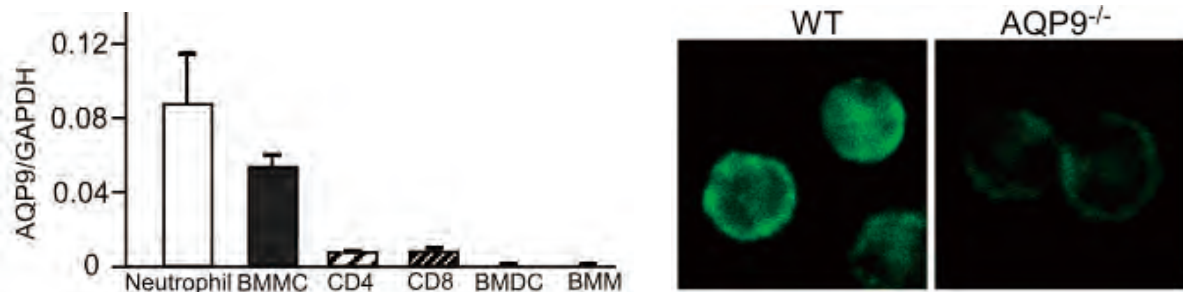


図1 C57BL/6 マウス由来細胞における AQP9 発現 (left; リアルタイム PCR による定量、right; 好中球での AQP9 免疫染色)

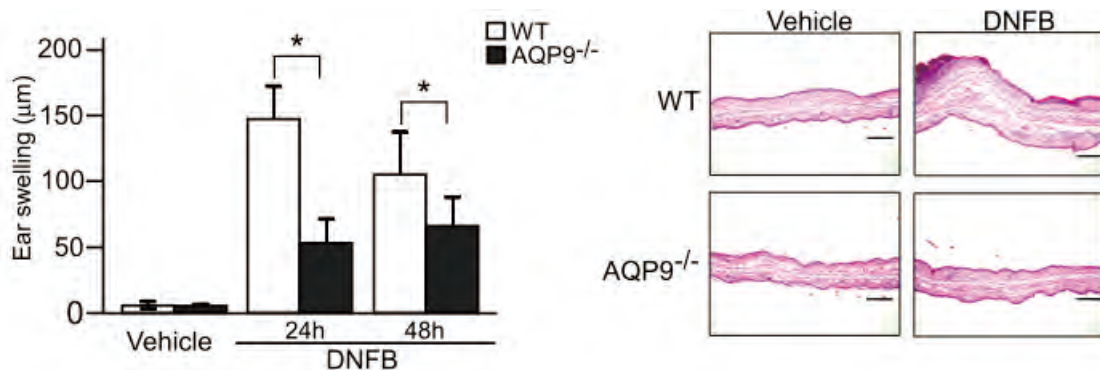


図2 WT および AQP9^{-/-} マウスにおける接触皮膚炎反応 (left; 接触皮膚炎反応による耳介浮腫、right; HE 組織染色)

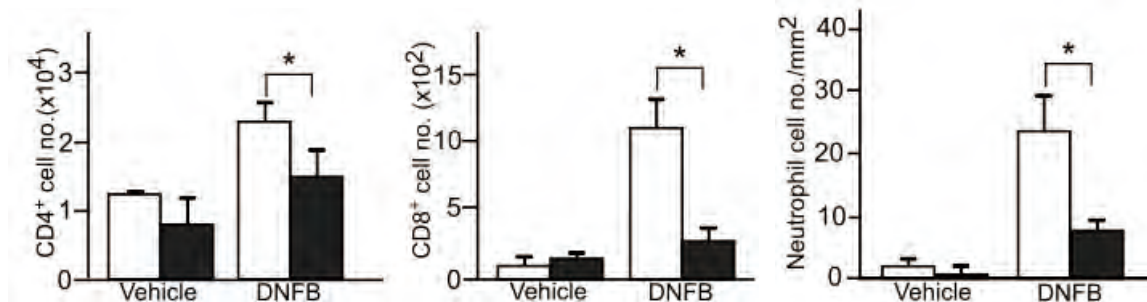


図3 接触皮膚炎反応惹起時の皮膚内の細胞数 (CD4⁺、CD8⁺ T 細胞、好中球)

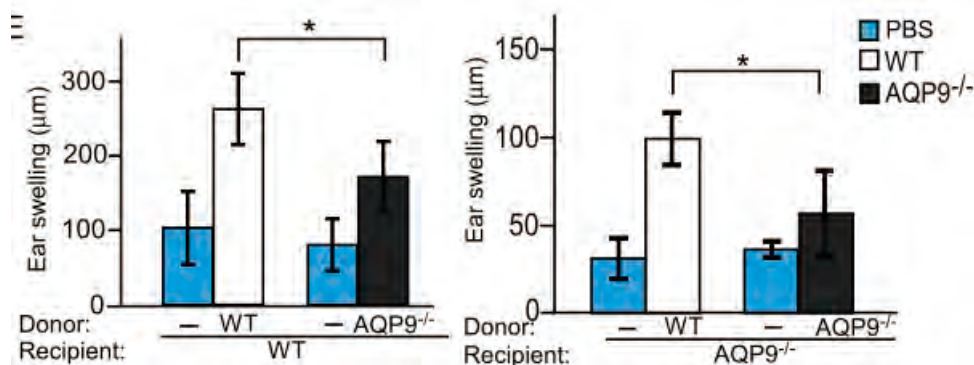


図4 所属リンパ節由来細胞の Adoptive transfer による接触皮膚炎反応

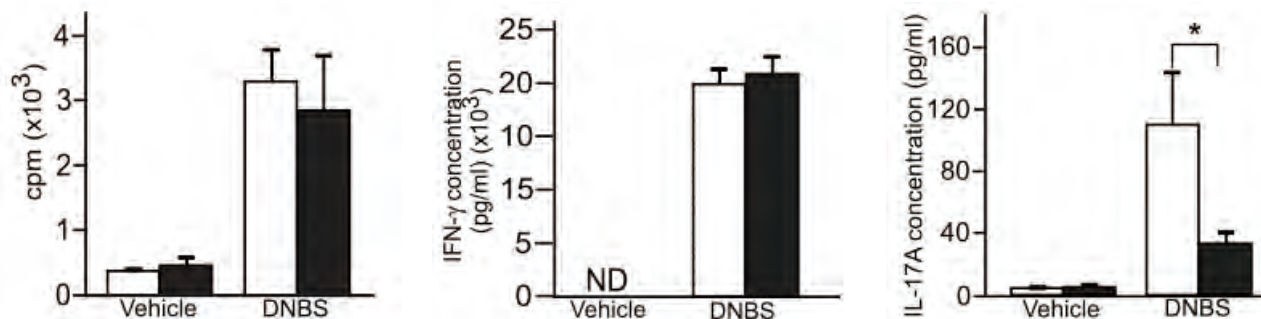


図5 DNFB 塗布 5 日後のリンパ節由来細胞の細胞増殖能(left)、IFN-gamma 産生量 (middle)、IL-17 産生量 (right)

制されていることを示している。

AQP9^{-/-}マウスで確認された接触皮膚炎反応の感作不成立の原因を探るため、DNFB塗布 5 日後のリンパ節由来細胞を採取し、DNBSと共に培養し、詳細を解析した。細胞内へのサイミジン取り込み、および細胞からの IFN-gamma 産生量は WT と AQP9^{-/-}マウス細胞で差はなかった。一方、IL-17 産生は、AQP9^{-/-}細胞で顕著な減少が認められた (図 5)。なお、リンパ節内の細胞分布は、WT と AQP9^{-/-}マウス細胞で有意な差はなかった (data not shown)。リンパ節内の細胞、特に CD8⁺ T 細胞からの IL-17 産生が、接触皮膚炎反応に必須であることが報告されている^{7,8)}。従って、AQP9^{-/-}細胞で IL-17 産生低下していることが、感

作不成立の主な原因と考えた。

種々の検討から、AQP9^{-/-}マウスにおいて観察される接触皮膚炎抑制には、好中球が関与していることを見出した。

WT マウスでは、DNFB塗布によりリンパ節内の好中球数が顕著に増加し、塗布 18 時間後に細胞数がピークになることを見出した (data not shown)。この時、AQP9^{-/-}マウスでは、好中球の増加が顕著に抑制されていた (図 6, left)。好中球の中和抗体 (anti-mouse Ly6G mAb) を投与し、好中球を除去した WT マウスでは、DNFB塗布による接触皮膚炎反応が抑制された (図 6, middle)。またこれらのマウス由来のリンパ節細胞では、IL-17 産生が顕著に低下していた (図 6, right)。さらに、AQP9^{-/-}マウスに、WT

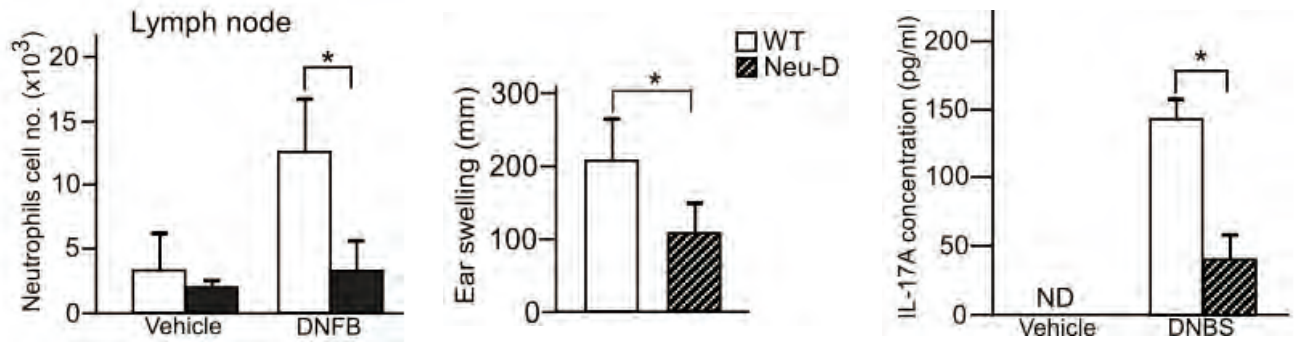


図6 好中球の接触皮膚炎への関与
リンパ節の好中球数(left)、好中球除去による接触皮膚炎の抑制(middle)およびIL17産生量低下(right)

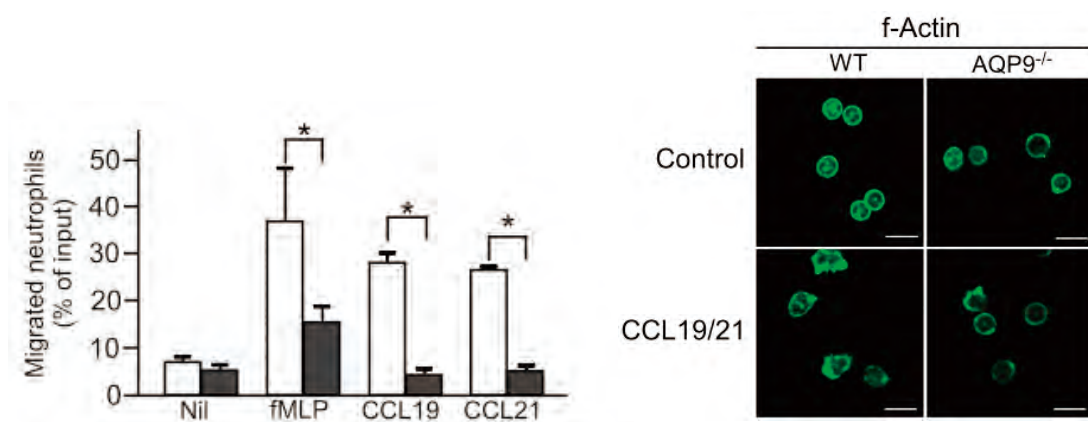


図7 好中球のケモタクシス(left)、F-actin染色(right)

マウス由来の好中球を移入することで、接触皮膚炎抑制とIL-17産生低下が回復した(data not shown)。以上の結果は、AQP9^{-/-}マウスでの接触皮膚炎低下は、好中球に原因があることを示唆している。

DNFB塗布後に、AQP9^{-/-}マウスにおいて、リンパ節に局在する好中球数の増加が抑制された要因として、好中球のリンパ節への浸潤/ホーミングがAQP9欠損により低下したことが予想された。好中球のリンパ節への浸潤には、CCR7-CCL19/21の関与が報告されている⁹⁾。そこで、好中球のCCL19/21に対する細胞遊走能を、Transwellを用いて検討した。AQP9^{-/-}好中球では、CCL19およびCCL21への細胞遊走が顕著に低下していた(図7, left)。また、AQP9^{-/-}好中球では、CCL19/CCL21刺激で誘発される細胞の方向性(F-actin染色)が低下していた(図7, right)。好中球に発現するAQP9が、ケモカイン誘発性の細胞遊走を調節していることが示された。

4. 考 察

AQP9は、皮膚の免疫反応を担う好中球で高い発現が確認され、また接触皮膚炎反応に必須であることが示された。好中球に発現するAQP9が、ケモカイン誘発性の細胞遊

走を調節していることが認められた。AQP9^{-/-}マウスでは、DNFB塗布により誘発される好中球のリンパ節への浸潤が低下することで、その後に起こるT細胞の活性化、特にIL-17産生の抑制が原因となり感作が成立せず、耳介浮腫を指標とする接触皮膚炎反応が惹起されなかったと考えられた。

今後も、接触皮膚炎における好中球の役割を詳細に探索するとともに、好中球に発現するAQP9の機能を明らかにしていく予定である。

(引用文献)

- 1) Hara-Chikuma M & Verkman AS (2008) Aquaporin-3 facilitates epidermal cell migration and proliferation during wound healing. *J Mol Med (Berl)* 86(2): 221-231.
- 2) Hara-Chikuma M & Verkman AS (2008) Prevention of skin tumorigenesis and impairment of epidermal cell proliferation by targeted aquaporin-3 gene disruption. *Molecular and cellular biology* 28 (1): 326-332.
- 3) Nakahigashi K, et al. (2011) Upregulation of aquaporin-3 is involved in keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia. *The Journal of investigative dermatology*

- 131 (4): 865-873.
- 4) Hara-Chikuma M, *et al.* (2012) Chemokine-dependent T cell migration requires aquaporin-3-mediated hydrogen peroxide uptake. *The Journal of experimental medicine* 209 (10): 1743-1752.
- 5) Rojek AM, *et al.* (2007) Defective glycerol metabolism in aquaporin 9 (AQP9) knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (9): 3609-3614.
- 6) Honda T, Egawa G, Grabbe S, & Kabashima K (2013) Update of immune events in the murine contact hypersensitivity model: toward the understanding of allergic contact dermatitis. *The Journal of investigative dermatology* 133 (2): 303-315.
- 7) Nakae S, *et al.* (2002) Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* 17 (3): 375-387.
- 8) He D, *et al.* (2006) CD8⁺ IL-17-producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses. *J Immunol* 177 (10): 6852-6858.
- 9) Beauvillain C, *et al.* (2011) CCR7 is involved in the migration of neutrophils to lymph nodes. *Blood* 117 (4): 1196-1204.

IL-33 デコイ受容体による皮膚炎症の制御

自治医科大学医学部生化学講座病態生化学部門

早川 盛 禎

Interleukin (IL)-33 is a member of the IL-1 cytokine family. Epithelial cells and vascular endothelial cells produce IL-33 in the nucleus and release it by stress, injury, or necrosis. IL-33 induces the production of Th2-associated cytokines via its receptor, ST2L on type 2 innate lymphoid cells, Th2 cells, and mast cells. Therefore, IL-33/ST2L signaling may contribute to development of allergic diseases such as asthma and atopic dermatitis. The ST2 gene produces a soluble secreted form, soluble ST2, in addition to a transmembrane form, ST2L, by alternative splicing. Soluble ST2 consists of only extracellular domain of ST2L. In previous study, we found that soluble ST2 acted as an IL-33 decoy receptor. Soluble ST2 specifically binds to free IL-33 and inhibits a binding activity of IL-33 for its receptor on target cells. To explore the function of soluble ST2 in vivo, we established that a transgenic mouse that constitutively express murine soluble ST2 cDNA under CAG promoter (ST2-Tg mouse). Here, we show that soluble ST2 is a critical repressor for skin inflammation in a murine model of house dust mite (HDM)-induced atopic dermatitis. Skin inflammation of ST2-Tg mice exhibited a lower development compared to that of wild-type mice. Levels of IL-13, total IgE, and HDM-specific IgE in sera were reduced in ST2-Tg mice. Furthermore, we examined HDM-specific response of lymph node cells in vitro. Analysis of cytokines in culture supernatants revealed the reduction of IL-4, IL-5, and IL-13 productions in ST2-Tg mice. We also applied ST2-Tg mice to hapten-induced contact hypersensitivity (CHS) model with fluorescein isothiocyanate (FITC). Migration of skin dendritic cells and ear swelling developed normally in ST2-Tg mice. These results suggest that soluble ST2 contributes to suppressions of skin inflammation and Th2-type immune response in atopic dermatitis. Therefore, soluble ST2 is a potential therapeutic agent for allergic diseases such as atopic dermatitis.

1. 緒 言

インターロイキン-33 (IL-33) は、上皮細胞や血管内皮細胞に発現するサイトカインである¹⁾。IL-33 は、自然リンパ球、Th2 細胞、肥満細胞などを活性化し、Th2 サイトカインの産生誘導を介して、アレルギー疾患の病態形成に関与する。アトピー性皮膚炎では、皮膚病変部において IL-33 の発現亢進が報告されている²⁾。

IL-33 受容体 (別名: ST2L) をコードする ST2 遺伝子の遺伝子産物には、膜貫通受容体型 ST2L の他に、分泌型 ST2 がある^{3,4)}。分泌型 ST2 は、IL-33 の結合部位である細胞外領域のみを持つ分子で、細胞外に分泌される。我々は、主に *in vitro* による検討から、分泌型 ST2 が IL-33 の機能を抑制するデコイ受容体として働くことを発見した⁵⁾。分泌型 ST2 は、遊離の IL-33 と特異的に結合し、複合体を形成する。この複合体は IL-33 受容体に結合できないため、標的細胞は活性化されない。生体内においても、分泌型 ST2 は IL-33 デコイ受容体として働くものと予想される。そこで、我々は生体内における分泌型 ST2 の作用を検討

するために、分泌型 ST2 を過剰発現するトランスジェニックマウス (ST2-Tg マウス) を作製した⁶⁾。

本研究では、ST2-Tg マウスを用いて、ハプテン塗布による接触皮膚炎モデル、およびダニ抗原塗布によるアトピー性皮膚炎モデルを作製し、皮膚炎症に対する分泌型 ST2 の作用を中心に検討した。

2. 実 験

2. 1. マウス

ST2 トランスジェニック (ST2-Tg) マウスは、CAG プロモーターにマウス分泌型 ST2 cDNA を挿入したベクターを用いて作製した⁶⁾。本研究では、BALB/c 系統にバッククロスしたマウスを使用した。図中では、外因性の分泌型 ST2 cDNA が、ゲノム DNA にヘテロの状態で存在するマウスをトランスジェニック (Tg)、外因性の分泌型 ST2 cDNA がゲノム DNA に挿入されていないマウスを野生型 (Wt) として表記した。ST2-Tg マウスの繁殖、成長、免疫細胞数などは、野生型マウスと比べて、差は見られなかった。

2. 2. 皮膚樹状細胞の遊走能の評価

マウスの右耳介の表裏に 0.5% fluorescein isothiocyanate (FITC) 液を 40 μ l 塗布し、左耳介の表裏に溶媒液を 40 μ l 塗布した。塗布 24 時間後、右側と左側の顎下リンパ節をそれぞれ採取し、細胞を単離した。細胞に抗 CD16/CD32 抗体を加えて Fc 受容体をブロックした後、7-amino-actinomycin D (7-AAD)、蛍光標識抗 CD11c 抗体、およ



Regulation of skin inflammation with IL-33 decoy receptor

Morisada Hayakawa

Department of Biochemistry, School of Medicine, Jichi Medical University

び蛍光標識抗I-A/I-E抗体を添加した。その後、フローサイトメーターにより、FITC陽性のCD11c⁺I-A/I-E⁺細胞を検出した。

2. 3. 接触皮膚炎モデル

マウスの腹部の毛をバリカンで刈り、腹部皮膚に0.5% FITC液を200μl塗布して感作した。感作6日後、両耳の耳介の厚さを測定した後、右耳介の表裏に0.5% FITC液を30μl塗布し、左耳介の表裏に溶媒液を30μl塗布した。その後、経時的に両耳の耳介の厚さを測定した。

2. 4. アトピー性皮膚炎モデル

マウスの背部の毛をバリカンで刈った後、除毛クリームで処理した。背部皮膚と耳介をテープストリッピングした後、50%グリセロール含有生理食塩水に溶解したコナヒョウヒダニ抽出物(HDM)を100μl (2.5 mg/ml)塗布した。コントロールには、50%グリセロール含有生理食塩水100μlを反復塗布した。塗布は週に2回、8週間行った。その間、経時的に耳介の厚さを測定した。最終塗布から24時間後に背部皮膚、耳介、血清、腋窩リンパ節を採取した。

耳介および背部皮膚のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色した。腋窩リンパ節から単離した細胞にHDMを添加し、4日間培養した後、培養上清を採取した。血清中、およびリンパ節細胞の培養上清中のサイトカインと免疫グロブリンの濃度をELISA法により測定した。

3. 結 果

3. 1. 皮膚樹状細胞の遊走能の解析

皮膚樹状細胞の遊走に対する分泌型ST2の関与を、FITCを用いて検討した。右耳介にFITC液、左耳介には対照として溶媒液を塗布した。24時間経過後、左右の顎下

リンパ節をそれぞれ採取し、FITC陽性の樹状細胞(FITC⁺CD11c⁺I-A/I-E⁺)をフローサイトメーターにより検出した(図1)。野生型およびST2-Tgマウスともに、左右リンパ節中の樹状細胞(CD11c⁺I-A/I-E⁺)の割合に差はなかった(図1A)。FITC⁺CD11c⁺I-A/I-E⁺細胞は、FITC塗布した右耳介側のリンパ節にのみ検出された(図1B)。また、FITC⁺CD11c⁺I-A/I-E⁺細胞数は、野生型マウスに比べて、ST2-Tgマウスの方が少なかったが、有意差はなかった(図1C)。これらの結果から、分泌型ST2は、ハプテン感作期による皮膚樹状細胞の遊走能には影響しないことが明らかになった。

3. 2. ハプテン塗布による接触皮膚炎における皮膚炎症の解析

ハプテンにFITCを用いて接触皮膚炎モデルを作製し、皮膚炎症に対する分泌型ST2の作用を検討した。まず、除毛した腹部皮膚にFITCを塗布して感作した。感作6日後、両耳の耳介の厚さを測定した後、右耳介にFITC液、左耳介に溶媒液を塗布して炎症を惹起した。その後、経時的に両耳の耳介の厚さを測定し、耳介の腫脹を算出した(図2)。FITC刺激による耳介の腫脹のパターンは、野生型およびST2-Tgマウスともに、塗布24時間後がピークとなり、その後減弱した。また、野生型とST2-Tgマウスの耳介の腫脹は同程度であった。これらの結果から、分泌型ST2は、FITCによる接触皮膚炎には影響しないことが示唆された。

3. 3. アトピー性皮膚炎モデルにおける皮膚病変部の解析

ダニ抗原によるアトピー性皮膚炎モデルを作製し、皮膚炎症に対する分泌型ST2の作用を検討した。アレルゲンとしてコナヒョウヒダニ抽出物(HDM)を用いて、除毛した背部皮膚と左右耳介に8週間反復塗布することにより炎症を誘導した。対照群には、HDM溶媒液である50%グリ

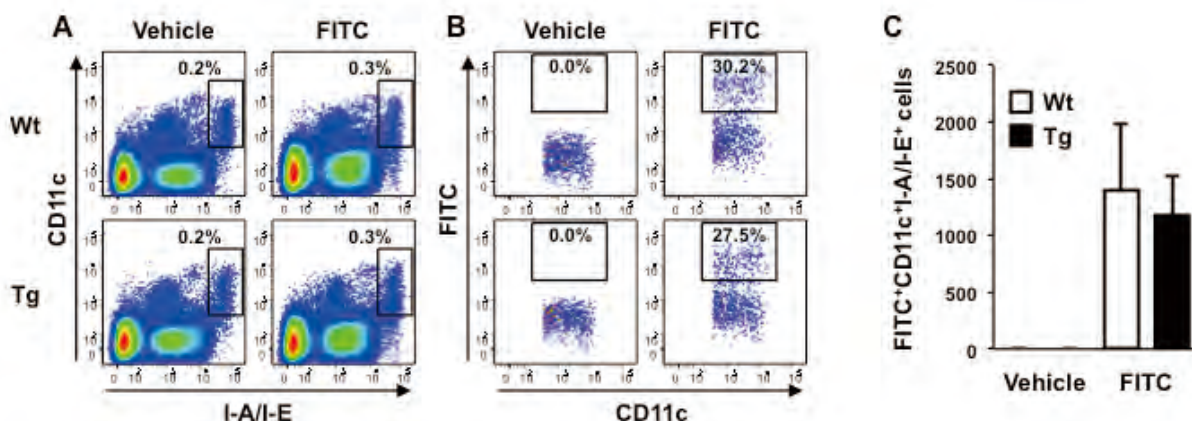


図1 表皮樹状細胞の遊走能の解析

(A) 顎下リンパ節中の樹状細胞(CD11c⁺I-A/I-E⁺)をフローサイトメーターにより検出した。(B) FITC陽性の樹状細胞(FITC⁺CD11c⁺I-A/I-E⁺)をフローサイトメーターにより検出した。(C) 顎下リンパ節中のFITC⁺CD11c⁺I-A/I-E⁺細胞数を計測した。

セロール含有生理食塩水を塗布した。経時的に耳介の厚さの測定を行い、最終塗布から24時間後に背部皮膚、耳介、血清、腋窩リンパ節を採取した。経時的に耳介の厚さを測定した結果、野生型およびST2-Tgマウスともに、HDM塗布1週後から耳介の腫脹が認められたが、ST2-Tgマウスでは、野生型マウスに比べて減弱していた。HDM塗布5週以降は、野生型とST2-Tgマウスとの差が顕著になった(図3A)。耳介の組織像を解析したところ、ST2-Tgマウスでは、野生型マウスに比べて、表皮および皮下組織の肥厚が減弱していた(図3B)。また、HDM塗布した野

生型マウスの背部皮膚は、表皮、真皮、および皮下組織に肥厚が認められた。ST2-Tgマウスでは、HDM塗布により肥厚は生じたが、野生型マウスに比べて減弱していた(図3B)。これらの結果から、ST2-Tgマウスの皮膚炎症は、野生型マウスよりも軽度であることが明らかになった。

3. 4. ダニ抗原塗布による血清サイトカインおよび血清IgEの増加

サイトカインと免疫グロブリンの産生について調べるため、各種サイトカイン、総IgE、およびHDM特異的IgE

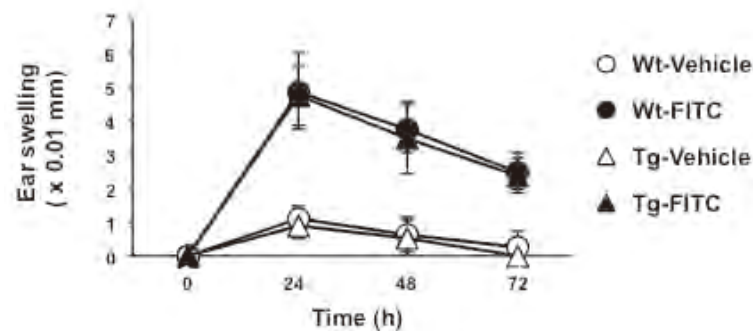


図2 接触皮膚炎による耳介の腫脹
FITC液(FITC)または溶媒液(Vehicle)塗布後の耳介の厚さから、塗布前の耳介の厚さを差し引き、その差を腫脹とした。

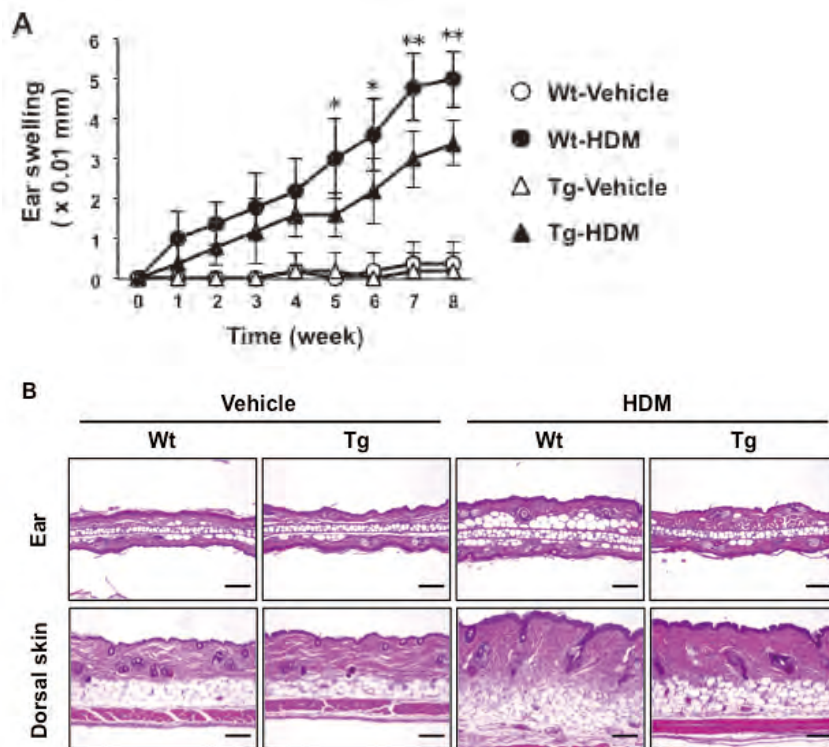


図3 ダニ抗原反復塗布による皮膚病変部の解析
(A) ダニ抗原(HDM)または溶媒液(Vehicle)塗布後の耳介の厚さから、塗布前の耳介の厚さを差し引き、その差を腫脹とした。*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ 。(B) 耳介および背部皮膚のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色した。(上段) 耳介、(下段) 背部皮膚。Scale bar=100 μm 。

の値をELISA法により測定した。HDM塗布群のST2-TgマウスにおけるIL-13値は、野生型マウスに比べて顕著に低かった。IL-5は非常に低濃度であったが、IL-13と同様の傾向を示した。また、ST2-Tgマウスにおける総IgE値およびHDM特異的IgE値も、野生型マウスに比べて低かった(図4)。IL-4、IFN- γ 、およびIL-33は、HDM塗布群および溶媒液塗布群のいずれにおいても、検出限界以下であった。これらの結果から、ST2-Tgマウスでは、Th2サイトカインやIgEの産生が抑制されていることが明らかになった。

3.5. 所属リンパ節におけるサイトカイン産生

腋窩リンパ節から単離した細胞を用いて、ダニ抗原刺激に応じて産生されるサイトカインを調べた。リンパ節細胞にHDMまたは生理食塩水を添加して4日間培養した後、培養上清中のIL-4、IL-5、IL-13、およびIFN- γ の

値をELISA法により測定した。HDM塗布群の野生型およびST2-Tgマウス由来リンパ節細胞は、HDM刺激に応じて、IL-4、IL-5、およびIL-13を産生した。しかしながら、ST2-Tgマウスでは、野生型マウスに比べて、いずれのサイトカインも低値であった。一方、IFN- γ の産生は、HDM塗布群のST2-Tgマウス由来のリンパ節細胞の方が、野生型マウスに比べて僅かに亢進していた(図5)。これらの結果から、ST2-Tgマウスの末梢リンパ組織におけるTh2型免疫応答は、野生型マウスよりも低下していることが明らかになった。

4. 考 察

本研究では、2種類の皮膚炎症モデルにより、皮膚炎症に対する分泌型ST2の作用を検討した。FITC塗布による接触皮膚炎モデルでは、野生型とST2-Tgマウスにおける皮膚樹状細胞の遊走能と皮膚炎症に大きな違いは見られな

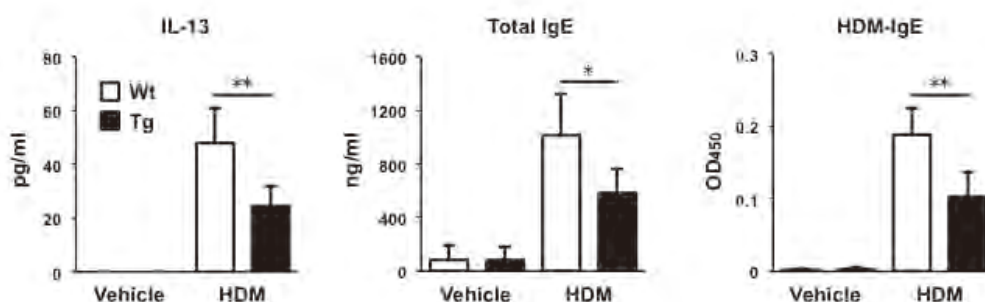


図4 血清サイトカインおよび血清IgEの産生

血清中のIL-13値、総IgE値(Total IgE)、およびHDM特異的IgE値(HDM-IgE)をELISA法により測定した。
*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ 。

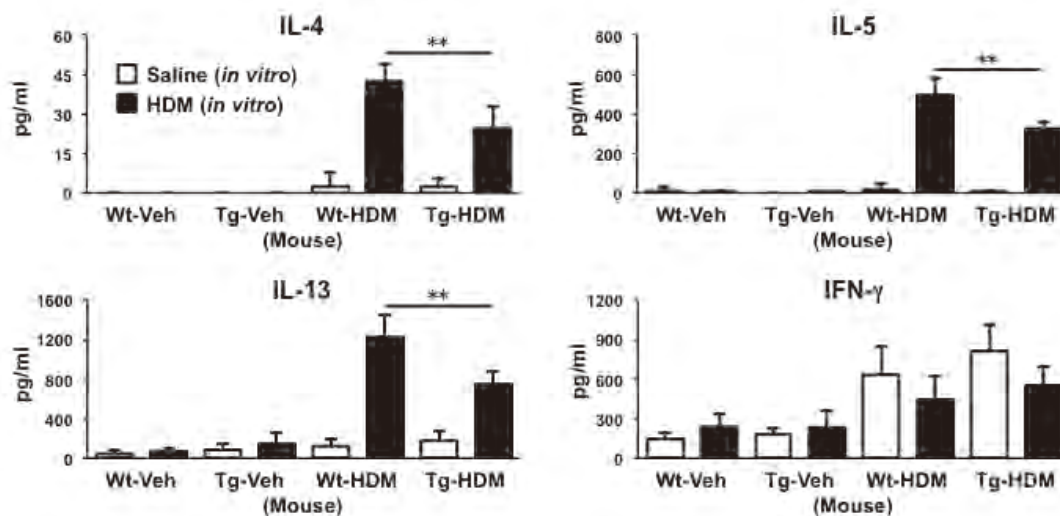


図5 所属リンパ節由来細胞のサイトカイン産生

溶媒液塗布またはHDM塗布した野生型およびST2-Tgマウス(Wt-Veh、Tg-Veh、Wt-HDM、Tg-HDM)の腋窩リンパ節由来の細胞に生理食塩水(Saline)またはダニ抗原(HDM)を添加し、4日間培養した後、培養上清を採取した。培養上清中のIL-4、IL-5、IL-13、およびIFN- γ の値をELISA法により測定した。**, $p < 0.01$ 。

かった。IL-33 欠損マウスにおける接触皮膚炎の各種症状も、野生型マウスと差がないことが報告されている⁷⁾。このことから、IL-33 / ST2L 系は、接触皮膚炎の発症に関与しないものと考えられ、分泌型 ST2 の有無も皮膚炎症に影響しないことが示唆された。

HDM 反復塗布によるアトピー性皮膚炎モデルでは、ST2-Tg マウスの皮膚炎症および Th2 型免疫応答は、野生型マウスに比べて減弱していた。このことから、分泌型 ST2 は、アトピー性皮膚炎の皮膚炎症を軽減させる作用を持つ可能性が示唆された。ST2-Tg マウスにおける分泌型 ST2 は、恒常的に様々な組織で発現しているだけでなく、血流を通して全身に循環している。このため、IL-33 の機能が分泌型 ST2 により抑制されるものと考えられた。しかしながら、ELISA 法では、HDM 刺激した野生型マウスにおいても血清 IL-33 を検出できなかった。今後、このモデルマウスの皮膚病変部における IL-33 の発現を調べる予定である。

アトピー性皮膚炎患者では、皮膚病変部に IL-33 の発現亢進が認められる²⁾。また、IL-33 トランスジェニック (IL-33-Tg) マウスを用いた解析において、IL-33 の発現亢進により皮膚炎症が誘導されることが示された⁸⁾。この IL-33-Tg マウスは、表皮特異的に IL-33 を過剰発現しており、アトピー性皮膚炎と似た皮膚炎症を自然発症する。また、Th2 サイトカイン産生能力を持つ 2 型自然リンパ球が皮膚炎症の発症に関与することも示唆された。しかしながら、IL-33 がどのような機序で細胞外に産生されるのかは分かっていない。IL-33 は、上皮細胞などで発現するが、その細胞内局在は核である。そのため、アトピー性皮膚炎の患者やモデルマウスでは、搔破行動により表皮細胞が傷つき、細胞外に IL-33 が放出されるものと考えられている。このように、アトピー性皮膚炎の発症機序にはまだ不明な点は多いが、その発症に IL-33 が関与する可能性は強く示唆されている。

5. 総 括

本研究は、ST2-Tg マウスを用いて、分泌型 ST2 がアトピー性皮膚炎に見られる皮膚炎症および Th2 型免疫応答を抑制することを明らかにした。今後、アトピー性皮膚炎の発症機序の解明や治療薬の開発に、分泌型 ST2、すなわち IL-33 デコイ受容体が寄与することが期待される。

(引用文献)

- 1) Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, and Kastelein RA; IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines, *Immunity*, 23, 479-490, 2005.
- 2) Pushparaj PN, Tay HK, H'ng SC, Pitman N, Xu D, McKenzie A, Liew FY, Melendez AJ; The cytokine interleukin-33 mediates anaphylactic shock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 106, 9773-9778, 2009.
- 3) Yanagisawa K, Takagi T, Tsukamoto T, Tetsuka T, and Tominaga S; Presence of a novel primary response gene ST2L, encoding a product highly similar to the interleukin 1 receptor type 1, *FEBS Lett.*, 318, 83-87, 1993.
- 4) Tominaga S; A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/c-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor, *FEBS Lett.*, 258, 301-304, 1989.
- 5) Hayakawa H, Hayakawa M, Kume A, and Tominaga S; Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation, *J. Biol. Chem.*, 282, 26369-26380, 2007.
- 6) Ohto-Ozaki H, Kuroiwa K, Mato N, Matsuyama Y, Hayakawa M, Tamemoto H, Tominaga S; Characterization of ST2 transgenic mice with resistance to IL-33, *Eur. J. Immunol.*, 40, 2632-2642, 2010.
- 7) Oboki K, Ohno T, Kajiura N, Arae K, Morita H, Ishii A, Nambu A, Abe T, Kiyonari H, Matsumoto K, Sudo K, Okumura K, Saito H, Nakae S; IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 107, 18581-18586, 2010.
- 8) Imai Y, Yasuda K, Sakaguchi Y, Haneda T, Mizutani H, Yoshimoto T, Nakanishi K, Yamanishi K; Skin-specific expression of IL-33 activates group 2 innate lymphoid cells and elicits atopic dermatitis-like inflammation in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 110, 13921-13926, 2013.

小胞体における蛋白質の酸化折畳み異常による コラーゲン形成障害機構の解明

山形大学大学院医学系研究科生化学・分子生物学

藤井 順逸

Vitamin C (ascorbic acid; AsA) is an essential nutritional factor and required for collagen production as well as antioxidation in human. We have analyzed genetically modified mice regarding Akr1a, which catalyzes a step in the AsA biosynthesis, and the embryonic fibroblasts derived from the mice (MEFs). The body weight of the knockout (KO) mice was the same as the wild-type (WT) mice up to ~20 weeks. The KO mice started dying around 10 weeks of age and all had died within one year under the AsA-deficient diet. However, supplementation of AsA contributed to maintaining body weight and extended the life-span of the KO mice. We then used MEFs from WT and human Akr1a-transgenic (Tg) mice to investigate the potential roles of Akr1a under culture conditions. Tg MEFs showed higher acrolein-reducing activities than WT MEFs and were more resistant to cytotoxicity. While the administration of ascorbic acid to the cells increased the intracellular levels of ascorbic acid, it had no effect on the resistance to acrolein. Thus, one of the principle roles of Akr1a in primates is the reductive detoxification of aldehydes, notably acrolein, and protection from its detrimental effects. We also examined the impact of a deficiency of Akr1a on fibrotic damage caused by unilateral ureteric obstruction in the mice. Even though Akr1a-deficient mice could produce only about 10% of the AsA produced by WT mice, no difference was observed in collagen I synthesis under pathological conditions. The data implied either a low demand for AsA or the presence of another electron donor for collagen I production in the mouse kidney. Application of the genetically modified mice would give us an advantage in elucidation of in vivo-roles of AsA such as collagen synthesis and anti-oxidation.

1. 緒言

皮膚は、外気や光その他の有害な外的環境に常にさらされているため、様々な影響を受けている。皮膚の創傷により、護られていた内部組織に障害が及び感染などの危険が増すため、すみやかな治癒が進行する(図1)。創傷治癒は複雑な過程を経るが、その際にコラーゲンなどをはじめとする細胞外基質タンパク質が大量に合成され、創傷部位の保護とその後のリモデリングなどに働く。

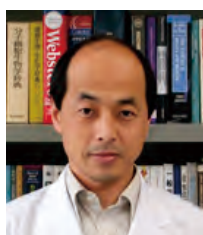
コラーゲンは身体で最も多いタンパク質であり、その保水性や弾力性によって皮膚を若く健康に保つ作用に加え、多様な生理機能を担っている。例えば心臓や肝臓などの臓器は虚血などによって細胞死が起り失われると、筋線維芽細胞が増殖してコラーゲンをはじめとする基質タンパク質を大量に分泌し、その間隙を埋める(図2)。このような臓器の線維化が緊急対応として機能し、その間に本来の細胞数が回復すれば臓器機能が維持されるが、線維化が進行すると臓器不全に陥る。こうした細胞外基質の形成は、細胞によるタンパク質の合成と分泌反応とも密接に関係する。

ビタミンC(アスコルビン酸; AsA)はその抗酸化能に加えて、いくつかの酵素系で電子供与体として作用する。中で

も Prolyl 4-hydroxylase によるプロリンのヒドロキシル化反応では、AsAが電子供与体となってコラーゲン形成に関わると考えられている。そのためAsAが不足するとコラーゲンなどの形成が障害され、壊血病や骨形成異常を来す。

霊長類は進化の過程でAsA合成の最終段階を触媒するGulo遺伝子に変異を生じたため、ヒトはその合成能を欠くが、げっ歯類をはじめとする多くの実験動物はグルコースやグリコーゲンを出発材料としてAsAを合成できる。Aldehyde Reductase(遺伝子名; Akr1a)はアスコルビン酸合成反応のうちGuloとは異なる段階を触媒し、その遺伝子欠損(Akr1a-KO)によりアスコルビン酸合成能が10%程度にまで低下する¹⁾(図3)。マウスは遺伝子改変技術が確立しているため病態モデル動物として頻用されるが、AsA欠乏の病態を示さないことから、AsAに関する生理機能の解明を目的とする研究材料には適さない。

一般に分泌タンパク質は、粗面小胞体で合成された後に小胞体内でシステイン-SH基が酸化されてジスルフィド結合を形成することで、機能を発揮できる立体構造をとる(図4)。PRDX4はERO1とともに新生タンパク質のシステイン-SH基を酸化してジスルフィド結合を導入し、タンパク質の酸化折畳みを行う²⁾。ERO1欠損マウスと我々が樹立したPRDX4欠損マウス³⁾を交配して得たERO1^{-/-};PRDX4二重欠損マウスは、タンパク質の酸化折畳みが正常に進行しないことが原因となってAsAが消費され、その結果コラーゲン形成障害が起って壊血病になる⁴⁾。一方、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の際に起こる線維化は、PRDX4欠損により増悪し過剰発現により改善される⁵⁾。このように、コラーゲンについては、小胞体における酸化



Elucidation of malfunction of collagen synthesis caused by defected oxidative protein folding in endoplasmic reticulum

Junichi Fujii

Yamagata University, Graduate School of Medical Sciences, Department of Biochemistry and Molecular Biology

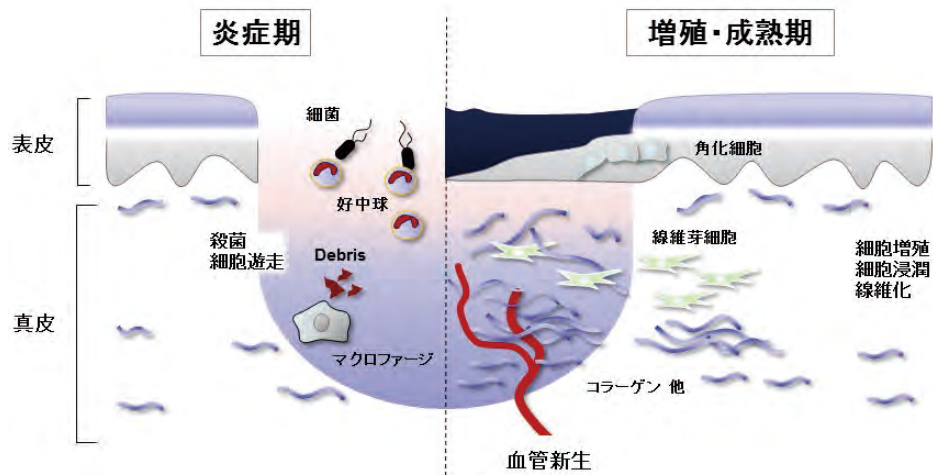


図 1 皮膚の創傷治癒過程とコラーゲンをはじめとする基質タンパク質の役割¹¹⁾

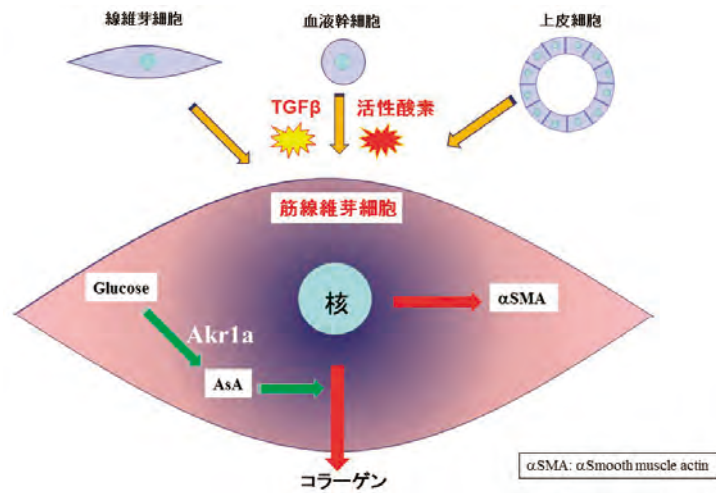


図 2 臓器線維化の過程で筋線維芽細胞が分化・増殖し、コラーゲンなどの基質タンパク質を生成する

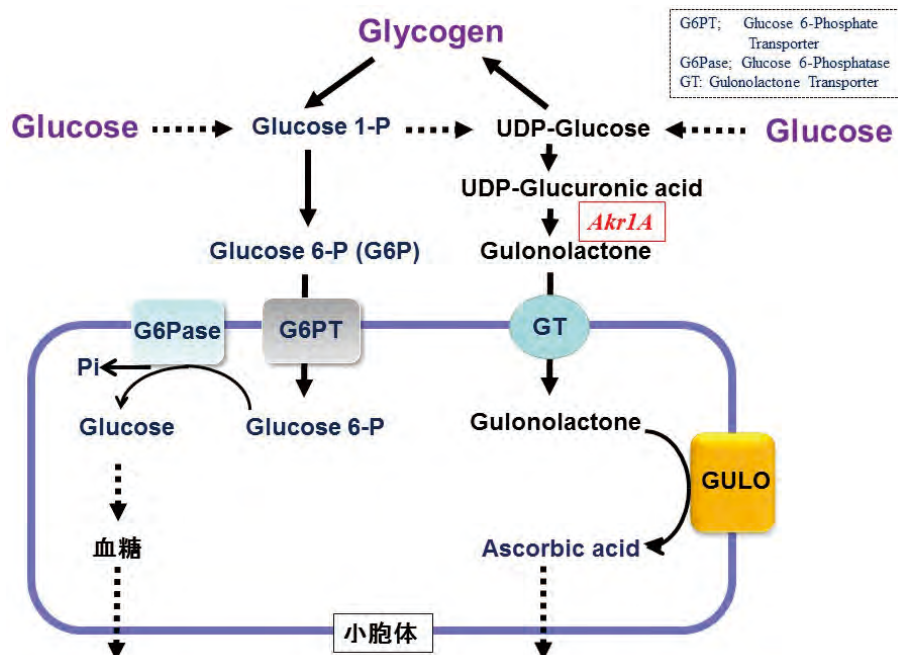


図 3 グルコース・グリコーゲンからの血糖供給と AsA の合成経路

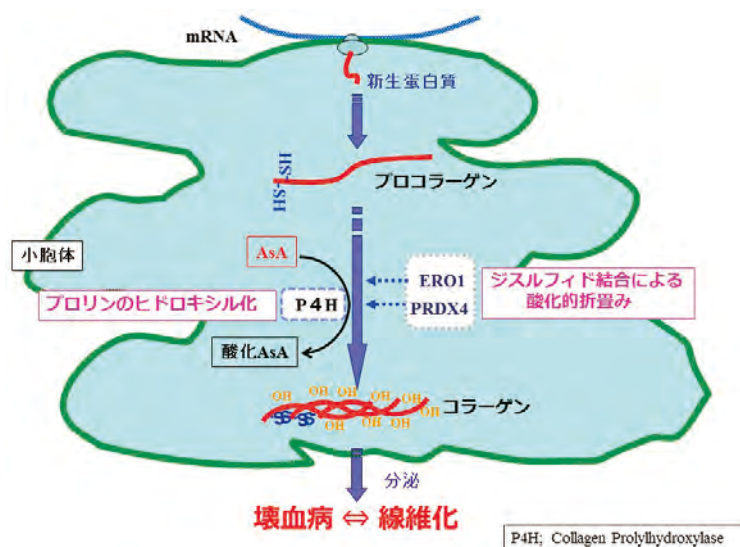


図4 コラーゲンの生成には小胞体におけるタンパク質の酸化的折畳みとプロリンのヒドロキシル化が必要

的折畳みに加えて、プロリンがヒドロキシル化された後に分泌され、細胞外基質としての機能を発揮するようになる。

本研究では、主に Akr1a 欠損マウスを用いて、コラーゲンの合成と機能発現における AsA の役割について解明するとともに、AsA 合成以外の Akr1a の役割について検討した。

2. 実験

2. 1. Akr1a KO マウスの表現型と個体における AsA の作用

野生型 (WT)・Akr1a 欠損 (Akr1a-KO)・ヒト Akr1a トランスジェニック (hAkr1a-Tg) マウスを AsA 欠乏餌で飼育し、AsA 欠乏がマウスの生存に与える影響を調べた。また Akr1a-KO マウスに AsA 含有水 (1.5 g/L) を与えることで AsA 欠乏症状への効果を調べ、肝臓・腎臓ならびに血漿中の AsA を測定した。

2. 2. マウス胚性線維芽細胞 (MEF) を用いた解析

WT・Akr1a-KO・hAkr1a-Tg の妊娠雌マウスの胎仔から MEF を単離し、SV40 large T 抗原を用いて不死化させて、それぞれの遺伝子型の MEF を樹立した。その MEF を用いて、AsA 含有量の測定と AsA の合成中間体である D-glucuronate の還元活性を測定し、さらに各種アルデヒド化合物に対する感受性を調べて、MEF における Akr1a の役割について検討した。特に脂質過酸化の最終産物や環境毒素として知られるアクロレインの解毒作用に焦点を当てて検討した。

2. 3. AsA のコラーゲン形成に果たす役割の検討

WT マウス、Akr1a-KO マウス、ならびに AsA を投与

した Akr1a-KO マウス (9-10 週齢) 群を用いて一側尿管結紮モデルを作製し、5 日目に腎臓を摘出して腎線維化に伴うコラーゲン形成と腎障害に及ぼす効果について検討した。腎臓組織切片を Elastica-Masson 染色して、線維化の程度を評価した。また、核酸の酸化体である 8-hydroxylguanine (8OH-dG) の抗体を用いた免疫染色を行い、酸化ストレスの病態への関与について検討した。さらに、線維化に関わる筋線維芽細胞のマーカータンパク質である α -smooth muscle actin (α SMA)、主要な基質タンパク質であるコラーゲン I、抗酸化酵素、小胞体関連タンパク質、オートファジー関連タンパク質、ミトコンドリア電子伝達複合体 (I~V) ならびにシトクローム-c の発現について、免疫ブロット解析を行った。

3. 結果

3. 1. Akr1a-KO マウスの表現型と個体における AsA の作用

Akr1a-KO 雌マウスについては、出生率の著しい低下が認められ、産まれた仔についてもその多くが出生後すぐに死亡した。また、生き残ったマウスも、通常餌での飼育では、1 年以内にすべて死亡した。そこで AsA (1.5g/L) を飲水に加えて投与したところ出生率が著しく改善し、死亡することもほとんどなくなった (図5)。

Akr1a-KO 雌マウスにペントバルビタール麻酔を施すと覚醒が遅れたが、AsA を投与することで改善された。この時ペントバルビタールの代謝を行う肝臓の P450 系は AsA 欠乏の影響を受けておらず、神経系への作用が関係する可能性がある⁶⁾。

マウスの肝臓・腎臓ならびに血漿中の AsA 含有量を測定したところ、Akr1a-KO マウスでは AsA 含有量は血漿中

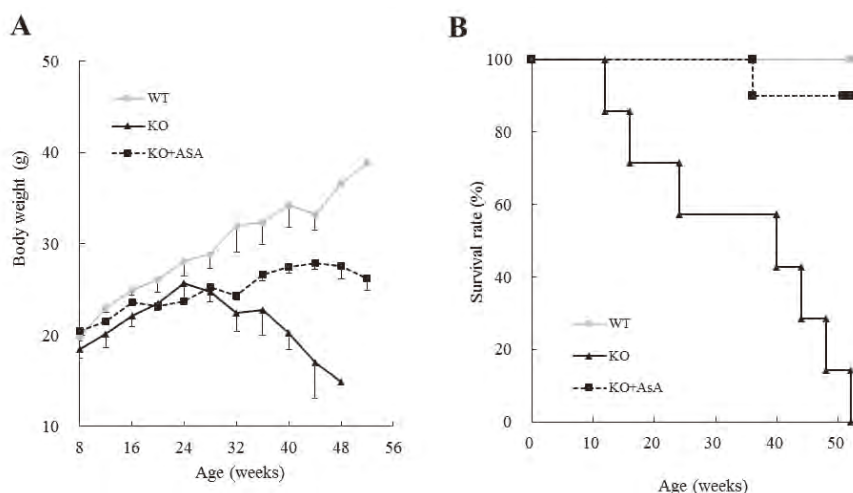


図5 Akrla欠損マウスはAsA欠乏により早期に死亡しAsA摂取により改善する

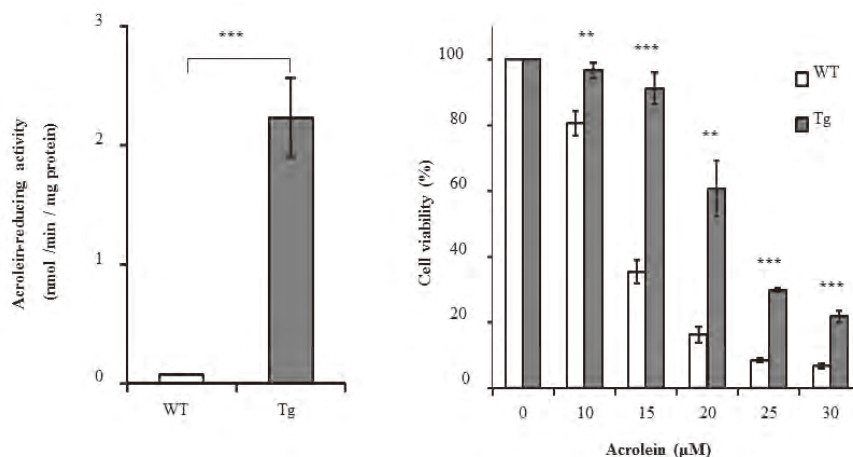


図6 Akrla-Tgマウスの線維芽細胞はアクロレインに対して耐性を示す⁷⁾

で数%にまで低下し、肝臓および腎臓でも約1割程度まで低下していた。Akrla-KOマウスにAsAを投与することでAsA含有量が回復し、Akrla欠損による影響は救済された。しかし、AsA水を給水し成獣にまで達したAkrla-KOマウスについてAsAの投与を中止してもその後に死亡率が高くなることはなかった。

3.2. マウス線維芽細胞 (MEF) を用いた解析

WT・Akrla-KO・hAkrla-Tgの各マウスからMEFを単離して形態を観察したが、大きな違いを認めなかった。AsAを含まない通常培地で不死化させたMEFを培養したところ、遺伝子型に関係なく正常に増殖した。それぞれの細胞抽出液を用いてNADPH依存性のD-glucuronate還元活性を測定したところ、WTとAkrla-KO MEFの活性に比べてhAkrla-Tg MEFは高い活性を示した。

この結果は、AkrlaがD-glucuronate還元に関わっていることを示している。しかしAsA含有量はどの細胞でも

極めて低く遺伝子型による違いが認められないことから、MEFはAsAをほとんど合成していないことが分かった。AsA合成過程でAkrlaの基質となるD-glucuronateの添加によりAsA合成量はわずかに増加したが、その量は肝臓などに比べて極めて僅かであった。一方、培地にAsAを添加した場合には、いずれの細胞でもAsAの顕著な増加が認められ、取り込み量には違いは見られなかった。

Akrlaの基質特異性は低く、様々なアルデヒド化合物を還元することで広く解毒反応に関わると考えられている。そこで各種アルデヒド化合物をMEFに添加してその細胞毒性について調べたところ、hAkrla-Tg MEFでは脂質過酸化によって生じるアクロレインの細胞毒性に対する耐性が増していた(図6)。AsAを添加し細胞内のAsA含有量を増加させた細胞でもこの傾向は変わらなかったことから、アクロレインに対する耐性の獲得にはAsAではなく、Akrlaによるアルデヒド還元活性が関わっていることが分かった⁷⁾。

3. 3. AsAのコラーゲン形成に果たす役割の検討

9-10週齢では、Akr1a-KOとWTマウスの腎臓の機能に違いは認められなかった。そこで一側尿管結紮モデル(UUO)を作製して5日後に摘出した腎臓の組織学的検討を行なったところ、炎症細胞の浸潤と線維化が認められたが、遺伝子型による顕著な違いはなかった。発現タンパク質の解析では、筋線維芽細胞への分化を誘導する線維化促進因子であるTGF β の発現が亢進していた(図7)。また α SMA、コラーゲンI、PRDX4の発現についても亢進が認められた。その一方で、抗酸化酵素の発現については、SOD1とCATがわずかに低下したのに対して、ミトコンドリアに局在するSOD2とGPX1については顕著な低下が認められた。尿管結紮による腎障害に小胞体ストレスが関与する可能性が示唆されているが、BipやPDIの発現量は僅かに変動しただけであった。また、LC3抗体を用いた検討でも顕著な増加は認められず、オートファジーの関与を示す結果は得られなかった。以上、いずれの検討でも遺伝子型による違いはなく、AsA欠乏の影響を認めなかった。

尿管結紮5日後の腎臓について、ミトコンドリア電子伝達複合体I~Vおよびシトクローム-cの発現量について調べたところ、尿管結紮により著しく低下していた。そこで腎線維化にミトコンドリア障害がどのように関わるかを明らかにするために、尿管結紮後の異なる時点でこうしたタンパク質の発現について評価した。その結果、ミトコンドリア電子伝達複合体I~Vやシトクローム-cの発現低下が α SMAやコラーゲンIの発現に先行して起っていることが分った⁸⁾。

4. 考 察

当教室は平成16年度に本財団より「SOD1ノックアウトマウスに発症する皮膚炎への活性酸素の関与の解明」の課題で第14回研究助成を受けた。その成果として、SOD1-

KOマウスでは顔面皮膚に炎症が自然発症し、それは抗酸化剤のN-アセチルシステインにより著しく遅延されるなど、抗酸化物質投与の有効性を明らかにした⁹⁾。創傷治癒モデルではSOD1欠損により治癒速度が遅延し、加齢の進んだマウスでは顕著になる。その機構を解明するために、初代培養MEFによる検討を行ったところ、通常培養(20%酸素)下ではSOD1-KO MEFは死ぬが、体内の酸素(1-2%)では増殖が停止した。こうした細胞分裂異常に細胞周期関連タンパク質の酸化傷害が関わると思われる¹⁰⁾。このように、in vivoとin vitroでは細胞の性質に大きな違いが認められた。こうした結果を踏まえ、コラーゲンの形成に密接に関わり、抗酸化力を有するAsAの役割を明らかにするために本研究を行った。

4. 1. Akr1a KOマウスの表現型と個体におけるAsAの作用

Akr1a-KOマウスにAsAを投与することで出生率が著しく回復し、生存率も著しく改善したことから、Akr1a-KOマウスに見られた表現型の多くはAkr1a欠損によるAsA合成能の低下を反映しているものと考えられた⁸⁾。AsAなどの水溶性ビタミンについては、腎臓から尿中に排泄されるため、過剰症とはならないことが知られており、今回の検討でも血漿中のAsAは数日で消失した。AsA-KO雌マウスでは出生率が著しく低下することから、胚発生過程での重要性が確認された。それが胎児に対する効果なのか、それとも母胎に作用して妊娠の維持に必要なのかといった点については引き続き検討を行っている。

4. 2. マウス線維芽細胞(MEF)を用いた解析

hAkr1a-TgマウスのMEFではAkr1aを過剰発現してもAsAの含有量に変化がなかったことは、AsA合成に関わる他の遺伝子の発現が十分でないことを示してお

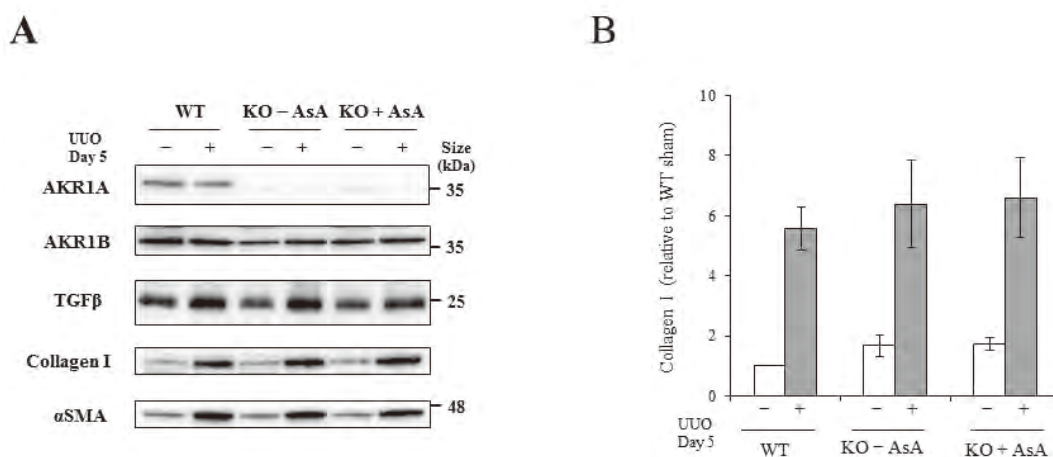


図7 Akr1a-KOによるAsA欠乏は線維化に伴うコラーゲン形成に大きな影響を与えない⁸⁾

り、体内でのAsA合成は肝臓などの限られた臓器で行われるとするこれまでの知見に一致する。肝臓は様々な有害化合物の解毒に働く臓器であり、Akr1aが肝臓で特に高い発現を示すことから、AsA合成の他にアルデヒド化合物の解毒に働くと考えられている。実際にMEFを用いた検討では、hAkr1a-Tg MEFがアルデヒドの中でも毒性が高いアクロレインに対する耐性を示し、高い解毒作用を有することが示唆された⁷⁾。hAkr1a-Tg MEFでは、アクロレインを基質としてNADPHによる還元活性が高いこともこの結果と一致する。MEFにAsAを添加して取り込ませておいてもアクロレインに対する感受性が変わらないことから、AsAはこの解毒作用には寄与しないことが分かった。このことは、hAkr1a-Tg MEFのアクロレイン耐性にはAkr1aによるNADPH依存性還元活性が直接関係することを示す。

4. 3. AsAのコラーゲン形成に果たす役割の検討

コラーゲンは身体を構成するタンパク質として最も多く、皮膚の保湿性や弾力性の保持など、抗老化にとっても重要である。AsAはコラーゲンの生成に必要であり、不足すると壊血病や骨形成異常を来す¹¹⁾。一方で、Gulo欠損によりAsA合成能を欠くマウスを用いた検討では、骨の発育不全を来し20週齢頃から死にはじめるが、皮膚のコラーゲンは正常に形成されるといった、これまでの認識を覆す結果が報告されている。このようにAsAの作用に関する分子機構については、従来の理解とは異なる現象も報告されている。

Akr1a-KOマウスにおいては、野生型マウスの10%程度しかAsAを合成することができないにもかかわらず、WTマウスと比較して、尿管結紮によって生じるコラーゲンIの合成量に差を認めなかった⁸⁾。この結果より、マウスの腎障害時におけるコラーゲンI合成には微量のAsAしか必要としない、もしくは、プロリルヒドロキシラーゼへの別の電子供給体が存在する、可能性が示唆された。ヒト由来の細胞を培養する際の培地にはAsAは含まれていない場合がほとんどであるが、こうした細胞でもコラーゲンの形成が起こることから、後者の可能性が高いと考えられる。プロリルヒドロキシラーゼへの電子の供給に働くレドックス分子としては、細胞内含有量の多いグルタチオンが有力な候補であるため、MEFなどを用いた検討により明らかにしたい。

5. 総 括

AsA合成障害のあるAkr1a-KOマウスを用いて、コラーゲン合成におけるAsAの関与について、培養細胞系とマウスを用いて検討を行った。AsAはコラーゲン形成の過程でプロリンヒドロキシル化に必要とされているが、欠損

してもコラーゲン量に影響を与えないことから、他の分子からの電子供与の可能性が示唆された。コラーゲンの形成には、小胞体の中での酸化的折畳みも関係することから、今後はPRDX4-KOとの二重欠損マウスについても併せて解析することで、コラーゲン形成に関わる因子の相互作用についての解明を目指したい。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、Akr1a-KOならびにhAkr1a-Tgマウスを提供くださいました宮田哲博士と、研究を助成してくださいましたコスメトロジー研究振興財団に心から感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Takahashi M, Miyata S, Fujii J, Inai Y, Ueyama S, Araki M, Soga T, Fujinawa R, Nishitani C, Ariki S, Shimizu T, Abe T, Ihara Y, Nishikimi M, Kozutsumi Y, Taniguchi N, and Kuroki Y. In vivo role of aldehyde reductase. *Biochim Biophys Acta*, 1820:1787-1796 (2012)
- 2) Fujii J, Ikeda Y, Kurahashi T, Homma T. Physiological and Pathological Views of Prdx4. *Free Radic Biol Med*, in press (2015)
- 3) Iuchi Y, Okada F, Tsunoda S, Kibe N, Shirasawa N, Ikawa M, Okabe M, Ikeda Y, and Fujii J. Peroxiredoxin 4 knockout results in elevated spermatogenic cell death via oxidative stress. *Biochem J*, 419:149-58 (2009)
- 4) Zito E, Hansen HG, Yeo GSH, Fujii J, and Ron D. Endoplasmic reticulum thiol oxidase deficiency leads to ascorbic acid depletion and noncanonical scurvy in mice. *Mol Cell*, 48:39-51 (2012)
- 5) Nabeshima A, Yamada S, Guo X, Tanimoto A, Wang KY, Shimajiri S, Kimura S, Tasaki T, Noguchi H, Kitada S, Watanabe T, Fujii J, Kohno K, and Sasaguri Y. Peroxiredoxin 4 Protects Against Nonalcoholic Steatohepatitis and Type 2 Diabetes in a Nongenetic Mouse Model. *Antioxid Redox Signal*, 19:1983-1998 (2013)
- 6) Ito J, Otsuki N, Zhang X, Konno K, Kurahashi T, Takahashi M, Yamato M, Matsuoka Y, Yamada K, Miyata S, and Fujii J. Ascorbic acid reverses the prolonged anesthetic action of pentobarbital in Akr1a-knockout mice. *Life Sciences*, 98:1-8 (2014)
- 7) Kurahashi T, Kwon M, Homma T, Saito Y, Lee J, Takahashi T, Yamada K, Miyata S, and Fujii J. Reductive detoxification of acrolein as a potential role for aldehyde reductase (AKR1A) in mammals. *Biochem Biophys Res Commun*, 452:136-141 (2014)

- 8) Nishida H, Kurahashi T, Saito Y, Otsuki N, Kwon M, Ohtake H, Yamakawa M, Yamada K, Miyata S, Tomita Y, and Fujii J. Kidney fibrosis is independent of the amount of ascorbic acid in mice with unilateral ureteral obstruction. *Free Radic Res*, 48:1115-1124 (2014)
- 9) Iuchi Y, Roy D, Okada F, Kibe N, Tsunoda S, Suzuki S, Takahashi M, Yokoyama H, Yoshitake J, Kondo S, and Fujii J. Spontaneous skin damage and delayed wound healing in SOD1-deficient mice. *Mol Cell Biochem*, 341:181-194 (2010)
- 10) Tsunoda S, Kibe N, Kurahashi T, and Fujii J. Differential responses of SOD1-deficient mouse embryonic fibroblasts to oxygen concentrations. *Arch Biochem Biophys* 537:5-11 (2013)
- 11) Kurahashi T, and Fujii J. Roles of antioxidative enzymes in wound healing. *J Dev Biol*, 3: 57-70 (2015)

iPS細胞の造血幹細胞への分化能を応用した先天性皮膚疾患の治療

北海道大学病院皮膚科

藤田 靖幸

Epidermolysis bullosa (EB) is a group of genodermatoses that cause blister formations from the congenital abnormality of anchor proteins between the epidermis and the dermis. There have been several strategies for the treatment of EB, and so far, cell therapies are the most promising approach because of the potential of systemic effects. We have proved that stem cell therapies, including bone marrow transplantation, hematopoietic stem cell transplantation, can ameliorate the phenotype and survival prognosis in the junctional EB model mice that lack type XVII collagen (Col17). In this study we explore more efficient approaches of stem cell therapies for EB, including intramedullary transplantation, mesenchymal stromal/stem cell infusion, application of induced pluripotent stem cells (iPSCs), and investigate factors in association with transdifferentiation from bone marrow-derived stem cells into keratinocytes.

1. 緒言

表皮水疱症は、皮膚の表皮-真皮境界部を構成する蛋白に先天性な欠損ないし構造異常が生じることで同部位の脆弱性を生じ、機械的刺激によって容易に水疱や潰瘍を形成する疾患である。現時点对症療法以外に確立した治療法は存在せず、特に重症型では感染症や脱水、二次的な悪性腫瘍などを生じ、生後数年以内に死亡するものも存在する。

表皮水疱症などの重症遺伝性皮膚疾患において近年研究されている治療法としては、遺伝子治療、蛋白補充療法および細胞療法がある。このうち細胞療法は、正常遺伝子を有する細胞を患者に投与して欠損蛋白の産生を促す治療法である。全身性の効果が期待できること、生着により長期間の治療効果が望めること、造血幹細胞移植など現代の医療レベルで施行可能な治療法があり倫理的障壁が低いこと、などの利点が考えられる。

重症遺伝性皮膚疾患の治療開発に於いては、疾患モデルマウスの利用が必須である。我々の研究室では近年、新規表皮水疱症モデルマウスとして、皮膚構成蛋白の17型コラーゲン (COL17) 欠損マウスの作成に成功した¹⁾。COL17欠損マウスは従来の表皮水疱症モデルマウスと異なり、成体まで生存する特徴を有しており、各種治療実験のモデルとして有用である。そして我々は、COL17欠損マウスにおいて実際に骨髄移植療法が予後改善および臨床症状の改善に寄与することを示した²⁾。

本研究は、上記表皮水疱症モデルマウスを用いて、効率

的な治療効果を得るために、幹細胞移植の時期および方法の最適化検討、皮膚分化因子を併用した造血幹細胞移植、骨髄内投与などのより効率の高い投与方法、および安全に施行しうる間葉系間質細胞療法や、iPS細胞を応用した幹細胞療法の有用性を検討する。本研究を遂行することにより、難治性疾患である表皮水疱症への新たな治療戦略を立てる上で重要な知見が得られるものと考えている。

2. 実験

2.1. 分化誘導

ES/iPS細胞の分化誘導はKitajimaらのプロトコールに準じて行った³⁾。Lhx2遺伝子を組み込んだレトロウィルスベクターをPLAT-E細胞にtransfectionし、培養後に上清を濃縮してLhx2レトロウィルス液を調製した。ES/iPS細胞をOP9細胞と10cmディッシュ内で5日間共培養し、mesodermal clustersを作製した時点でLhx2遺伝子を形質導入させた。さらに10日間OP9細胞と共培養を続け、血球系前駆細胞であるc-kit⁺, sca-1⁺, lineage-population (KSL細胞)の出現をフローサイトメトリーにて確認した。

2.2. 細胞移植

骨髄移植及び造血幹細胞移植として、ドナーとなる成体Col17欠損マウスに6Gy放射線照射を行い骨髄機能を非破壊的処置した後に、 5×10^6 個のGFP⁺トランスジェニックマウス由来の骨髄由来細胞ないし 5×10^3 個の造血幹細胞を経尾静脈投与した。新生仔マウスに対しては2.5Gy放射線照射ののちに、 5×10^6 個の骨髄由来細胞ないし 5×10^3 個の造血幹細胞を眼窩静脈叢を経由して静脈投与した。

MSC療法として、成体Col17欠損マウス、COL17レスキューマウス (マウス由来Col17 (以下mCol17) を欠損するが、ヒト由来COL17 (以下hCOL17) を発現することで表皮水疱症発症を回避したマウス¹⁾) およびCol17欠損新生仔マウスの背部に、手動的な水疱形成ないし4mmパン



Treatment of congenital severe skin disorders with hematopoietic stem cells obtained from induced pluripotent stem cells (iPSCs)

Yasuyuki Fujita

Department of Dermatology, Hokkaido University Hospital

チ皮膚メスを用いて全層皮膚欠損を作製した上で、GFP+トランスジェニックマウス由来のMSC 1×10^6 個を経静脈投与、腹腔内投与ないし水疱/創傷周囲への局所投与を行った。

ES/iPS細胞移植として、ドナーとなる成体COL17レスキューマウスおよびCol17欠損マウスに放射線照射を行った後に、 1×10^4 個のLy5.1 由来の造血系誘導済みES/iPS細胞を、サポーター細胞として成体Col17欠損マウス由来の全骨髓細胞 5×10^5 個とともに経静脈投与した。

2. 3. COL17 発現解析

骨髓移植・造血幹細胞移植においては、移植4週間後に末梢血フローサイトメトリー解析にてドナー血球細胞の生着を確認、背部皮膚に4mmパンチ皮膚メスを用いて全層皮膚欠損を作成し、3週間後に上皮化した部位の皮膚を採取して検討に用いた。MSC療法においては細胞療法後3週間で皮膚を採取し、検討した。

上記で得られた皮膚組織は①凍結切片作成後にマウスCol17モノクローナル抗体(1:2,500, KT4.2)による蛍光抗体法 ②total RNA抽出および定性RT-PCR ③電子顕微鏡によるヘミデスモソーム構造観察 ④表皮抽出物およびマウスCol17モノクローナル抗体(KT4.2)を用いたWestern blotting を施行し、Col17の発現を検討した。

2. 4. マイクロアレイ解析

造血幹細胞移植を行いドナー細胞の生着を確認したCol17欠損マウスに対して4mmパンチ皮膚メスを用いて全層皮膚欠損を作成し、3週間経過して上皮化した皮膚組織を採取した。ディスパーゼI(エーディア)を用いて真皮/表皮を分離し、さらに0.25%トリプシンで表皮細胞を分離させた後、FACS Ariaを用いて表皮角化細胞を含

む非血球細胞としてGFP+CD45-細胞(ドナー由来)およびGFP-CD45-細胞(レシピエント由来)を各々ソーティングした。これら細胞からRNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いてtotal RNAを抽出し、Ambion WT Expression Kit (Applied Biosystems)を用いてcRNAを増幅・精製した。逆転写反応によりcDNAを合成し、GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST Array (Affymetrix)を用いてマイクロアレイプローブとハイブリダイズさせた。GeneChip Scanner 3000 7GおよびGeneChip Command Console® Software (AGCC)を使用してシグナル測定、データを取得し、GeneSpring GXにて解析を行った。

3. 結 果

3. 1. 幹細胞移植の時期および方法の最適化検討

我々は、成体Col17欠損表皮水疱症マウスに対して骨髓由来細胞ないし造血幹細胞を経尾静脈移植し、臨床的な改善を見いだしている²⁾。現実的には表皮水疱症患者は特に重症例では成長前に死亡、ないし有棘細胞癌などの発症により移植処置が困難になることが予想される。また、Col17欠損マウスは成体まで成長するものが自然経過では全体の約20%にとどまり、成長前に死亡する個体が多い。そのためまず我々は、可能な限り生後早い段階での介入による治療可能性を検討した。生後3日以内の新生仔Col17欠損マウスに対して経眼窩静脈による骨髓移植を施行したところ、成体まで成長したマウスは4/34匹(11.8%)にとどまり、皮膚におけるCol17発現も免疫染色・RT-PCR・Western blottingで確認できなかった(図1A)。生存したCol17欠損マウスの末梢血フローサイトメトリー解析では、生着したドナー由来のGFP+血球細胞の割合は $12.8 \pm 2.2\%$ に過ぎなかった。また、臨床症状においても生後28

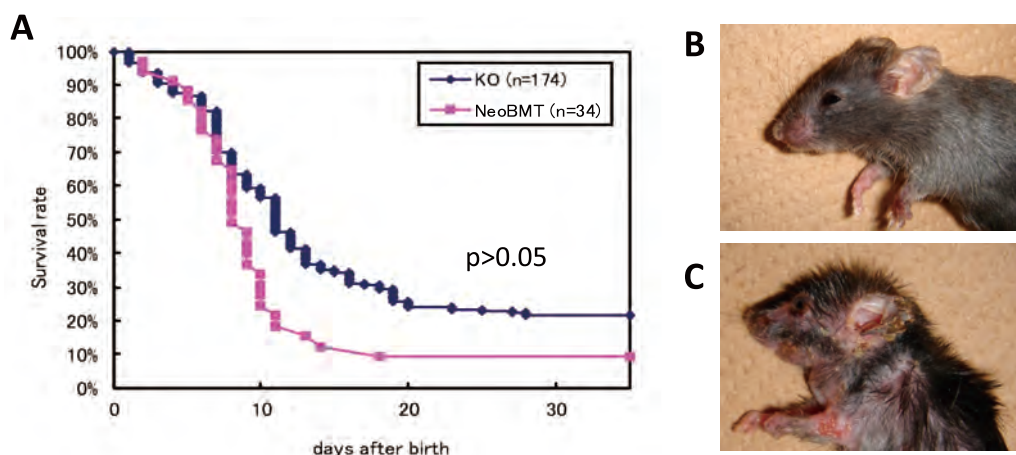


図1 Col17欠損表皮水疱症マウス新生仔に対する造血幹細胞移植
(A) Col17欠損表皮水疱症マウス新生仔に対する造血幹細胞移植療法の治療成績
(B, C) 新生仔移植療法成功例。

生後1ヶ月の時点(B)では正常マウスとほぼ同様の臨床像であり、極めて良好な治療効果が得られたが、生後2ヶ月より急激にびらん(びらん)の形成が強くなった(C)。

日の時点ではほぼ正常と同様であったものの、その後1ヶ月で急激に水疱びらんが多発するようになった(図1B,C)。この急激な臨床症状の変化の原因として、現病の表皮水疱症の悪化や、GVHDの発症などが可能性として考えられた。

新生仔マウスに対する骨髄移植療法が困難であることが確認されたため、次に、GVHDの発症可能性が低く、容易に細胞数を得ることが可能であるMSCの治療可能性を検討した。新生仔Col17欠損マウスに対してGFPトランスジェニックマウス由来MSCの腹腔内投与(n=11)および水疱内への皮内投与(n=24)を行ったが、全例で生後18日以内に死亡し、未治療群との生存率に有意差を認めなかった(図2)。

先天性皮膚疾患においては、白血病など血液悪性疾患における造血幹細胞移植とは異なり、造血細胞を完全置換する必要性が高くない。その一方で、Col17欠損表皮水疱症マウスへの骨髄移植実験において、造血系細胞の置換率(キメラ率)とドナー由来皮膚構成細胞の出現率との間には正の相関が観察される(data not shown)。そのため、皮膚障害をきたさない前処置でかつ、より生着率の高い移植手技が望ましい。また、MSC移植系においては、尾静脈投与では投与細胞の80%が肺にトラップされるとされ、MSCから皮膚構成細胞へ分化させるにあたり効率が相当低いことが推測される。これらの背景を勘案して、次に我々は、造血幹細胞・MSCをCol17欠損表皮水疱症マウスへ骨髄内投与する試みを行った。まず、成体Col17欠損表皮水疱症マウスへ6 Gyの放射線前処置の後、GFP+骨髄細胞を骨髄内移植した。4週間目におけるCD45+陽性細胞の生着キメラ率は $87.9 \pm 3.9\%$ (n=5)であり、尾静脈投与群の $72.1 \pm 5.5\%$ (n=12)と比較して生着率に有意差を認めた($p < 0.05$)。しかし、免疫染色による基底膜部Col17の発現割合に明らかな差を認めなかった。また、GFP陽性MSCを成体Col17欠損表皮水疱症マウスおよび野生型C57BL/6へ骨髄内移植した群においては、移植4週間後の時点でドナーGFP由来のMSCは骨髄内に観察されず、

皮膚においてもGFP陽性細胞が観察されなかった(それぞれn=5)。以上より本実験系においては、骨髄内投与は移植方法としてメリットが少なく、妥当性に乏しいことが判明した。

3.2. 皮膚分化関連因子の検索

我々は過去に、骨髄由来細胞やMSCに発現するケモカインレセプターおよびケモカインによる相互作用が皮膚創傷部への細胞動員を促進し、表皮角化細胞を含むドナー由来皮膚構成細胞の出現を亢進させることを報告している。そこでより直接的に、表皮水疱症マウスへの骨髄移植後に皮膚に出現するドナー由来およびレシピエント由来の表皮細胞における遺伝子発現の差を解析し、骨髄由来細胞の表皮角化細胞への分化関連因子の検索を試みた。Col17欠損マウスに骨髄移植を行い、生着後皮膚からGFP+CD45-細胞(ドナー由来表皮角化細胞)およびGFP-CD45-細胞(レシピエント由来)を各々ソーティングし、マイクロアレイ解析でmRNA発現の差を網羅的に検討した。合計23446プローブが解析可能であり、そのうち遺伝子発現に2.0倍差以上を認めたプローブが57同定された。既知の遺伝子でドナー由来角化細胞で発現が亢進しているものとして、*Mmp13*, *Cxcl10*, *Cxcl9*などが検出された(図3)。

3.3. ヒトMSCsの表皮水疱症治療への応用可能性の検討

我々は過去にマウスにおいて、MSCsが皮膚構成細胞へ分化しうることを示し、MSCsの静脈投与によって表皮水疱症マウスにおいて欠損蛋白が発現しうることを示した。ヒトMSCsにおいてはチリのグループで、健康人の兄弟骨髄から採取・培養したMSCsを栄養障害型表皮水疱症患者の病変皮膚に局所注射することで、治療効果を有したという報告があり、本邦でもMSC局所投与の臨床試験が開始されている。そこで、全身的作用に期待するという観点から我々は、ヒト細胞が生着しうる免疫不全NOGマウスにおいて、ヒトMSCの静脈投与がヒト基底膜蛋白の産生を

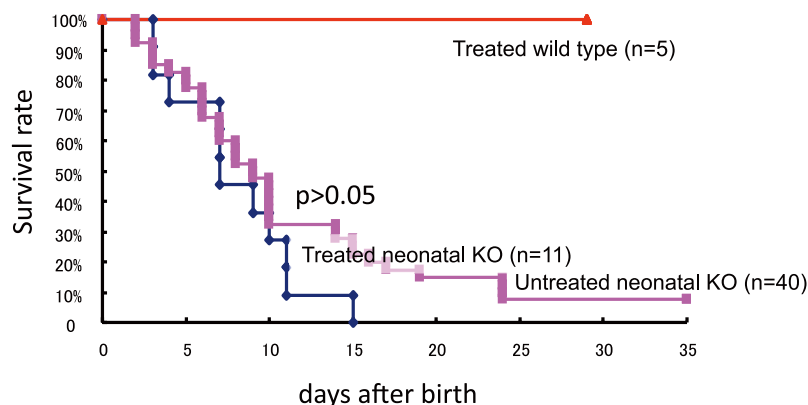


図2 Col17欠損新生仔マウスに対する間葉系間質細胞(MSC)腹腔投与療法の治療成績

もたすかを検討した。NOGマウス (n=4) に全層皮膚欠損を作製し、直後に尾静脈よりヒト MSC 1×10^6 cells を投与し、上皮化した皮膚を採取して検討したところ、免疫染色で MHC class I 陽性細胞が真皮に散見され(図 4A)、RT-PCR にても *human GAPDH* mRNA が検出された。4 匹中 2 匹において *human COL17*、1 匹で *human BPAG1* の mRNA の発現がわずかに確認された(図 4B) が、免疫染色

ではこれらの蛋白発現は確認されなかった。COL7 をはじめとした他の皮膚基底膜蛋白の発現は、免疫染色・RT-PCR とともに確認できなかった。

3. 4. ES/iPS 細胞による治療の検討

次に我々は、ES および iPS 細胞の造血系細胞への分化誘導による造血幹細胞移植の治療可能性を検討した。

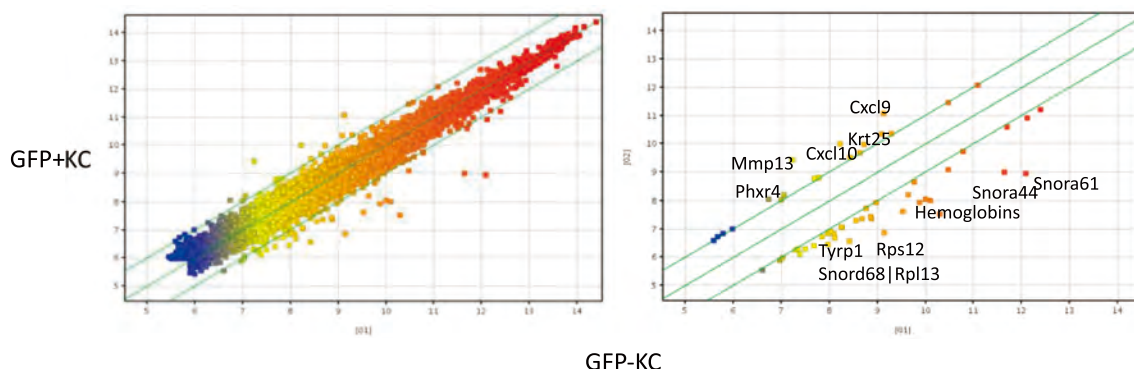


図 3 移植後角化細胞のマイクロアレイ解析

移植療法後の表皮水疱症マウス皮膚よりドナー由来 (GFP+) / レシピエント由来 (GFP-) の角化細胞を抽出し、遺伝子発現解析を行った。合計 23446 プローブが解析可能であり、そのうち遺伝子発現に 2.0 倍差以上を認めたプローブが 57 同定された。

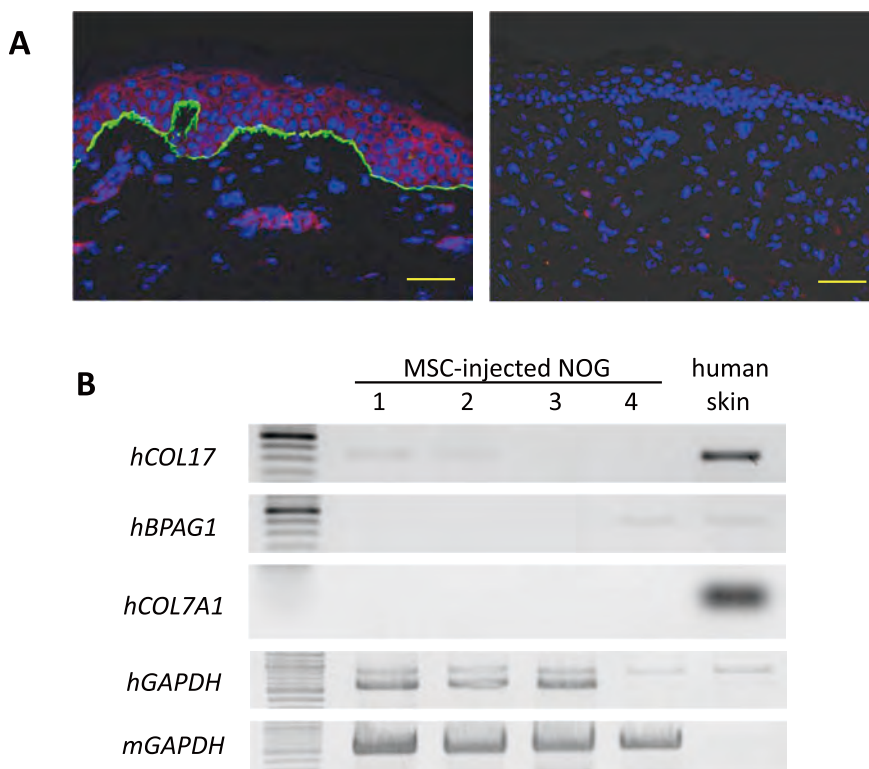


図 4 NOG マウスに対する MSC 療法の検討

- (A) ヒト MSC 投与後の NOG マウス皮膚の免疫組織学的検討。正常皮膚 (右) では COL17 が基底膜部に線状に観察され、表皮角化細胞および線維芽細胞等の細胞膜に HLA class I が発現している。ヒト MSC 静脈投与後の NOG マウス皮膚では、真皮に散在性に HLA class I 陽性細胞が観察された。
- (B) ヒト MSC 投与後の NOG マウス皮膚の RT-PCR 解析。4 匹中 2 匹に *human COL17*、1 匹で *human BPAG1* mRNA の発現が確認された。

Ly5.1 由来の ES 細胞ないし iPS 細胞に *Lhx2* 遺伝子を導入し、OP9 細胞と共培養することで血球系前駆細胞 (KSL 細胞) への分化を確認、さらに血球系細胞への分化を *in vitro* で確認した (図 5A, B)。このようにして得られた細胞を成体 COL17 レスキューマウスに移植したところ、移植後 4 週間後の時点での末梢血キメラ形成率は ES 細胞移植群で $6.32 \pm 2.53 \%$ ($n=5$)、iPS 細胞移植群で $12.2 \pm 5.26 \%$ ($n=10$) であった。定性 RT-PCR において計 15 匹中、iPS 細胞由来造血幹細胞移植を行った 2 匹、ES 細胞由来造血幹細胞移植を行った 1 匹において *mCol17* の発現が確認された (図 5C)。しかしながらこれらのマウス皮膚において、免疫染色で *mCol17* の基底膜への線状沈着は確認できなかった (図 5D)。また、電子顕微鏡においてヘミデスモソームの成熟化も確認できなかった。

4. 考 察

表皮水疱症は生下時より全身皮膚に異常をきたし、感染症や慢性貧血、悪性腫瘍など種々の合併症を併発して予後不良となることも多い重症先天性皮膚疾患である。今回

我々は、骨髓移植をはじめとした造血幹細胞移植療法が疾患モデルマウスにおいて治療法になり得るという知見を背景として、より有用な細胞療法の可能性を検討した。

表皮水疱症に対する骨髓移植療法 (造血幹細胞移植療法) は、移植された造血幹細胞、あるいは間葉系間質細胞やそれらの細胞から分化した前駆細胞等が、何らかの機序により皮膚構成細胞へと変換し、機能性を有する角化細胞として欠損蛋白を補充するという発想を基礎に置く。この角化細胞への変換においては、幹細胞ないし前駆細胞が自身の持つ可塑性を介して角化細胞へ分化する transdifferentiation という考え方と、幹細胞ないし前駆細胞、あるいはマクロファージなどの成熟細胞が角化細胞と融合 (fusion) することで、既存の角化細胞が欠損蛋白の産生能を獲得するという二つの機序が考えられる。我々が検討した範囲では、疾患モデルマウスに性別の異なるドナー骨髓細胞を移植した実験系において FISH で角化細胞の X/Y 染色体を検討したところ、fusion した細胞は観察されなかった²⁾。また、マウス PAM212 細胞をフィーダーとしてヒト造血幹細胞を共培養したところ、皮膚基底細胞に特

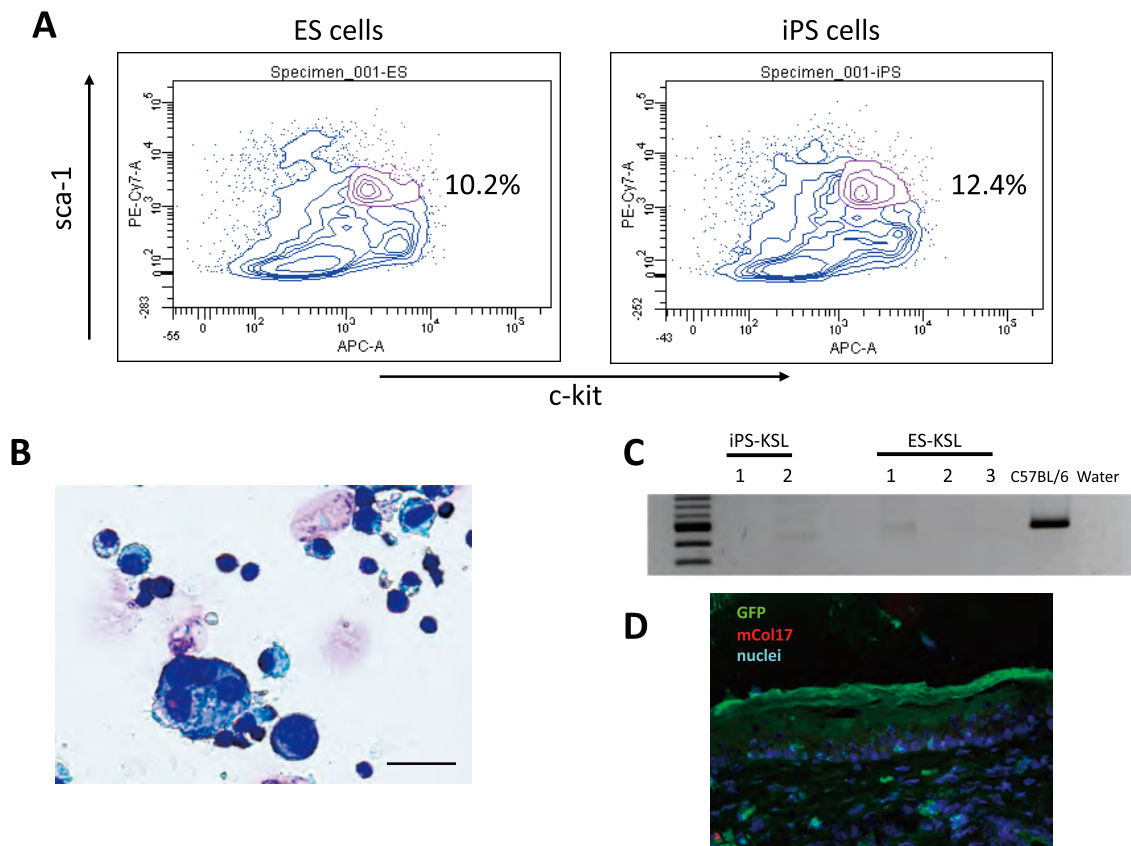


図 5 iPS/ES 細胞の血球系誘導

- (A) 血球分化誘導後の FACS 解析。ES 細胞 (左)、iPS 細胞 (右) ともに造血系前駆細胞 (KSL) が同定された。
 (B) さらに OP9 細胞と共培養することで、Giemsa 染色で分葉核を有する好中球を含む成熟血球細胞が多数出現した。
 (C) ES および iPS 細胞由来 KSL 細胞を COL17 レスキューマウスに移植したところ、一部のマウスにおいて *mCol17* mRNA の発現が定性 RT-PCR にて確認された。
 (D) 同移植マウス皮膚を免疫染色したが、*mCol17* の基底膜への沈着は確認されなかった。

異的に発現するK14陽性細胞, すなわちヒト角化細胞へ, fusionを介さずに分化した⁴⁾。同様の検討は, ヒト表皮水疱症患者へ造血幹細胞移植を行った例においても示されている。これらの知見からは少なくとも, 造血幹細胞から角化細胞へ直接分化した経路が存在すると考えられるが, 現実的にはfusionの経路を介して機能性角化細胞へ変化した細胞も少なからず含まれると考えられる。

今回我々は, より効率的な移植時期・方法を目指して新生仔疾患マウスへの骨髓移植・MSC移植および骨髓内投与による造血幹細胞移植を検討したが, いずれも通常の成体マウスへのconventionalな骨髓移植療法と比較して優位性を見いださなかった。しかしながら, 骨髓内投与においては移植後4週の早期の時点で生着キメラ率が高く, 臨床効果に有意差は無かったものの注目すべき知見であると考ええる。キメラ率の高い個体ほど骨髓細胞由来の皮膚構成細胞の出現割合は高くなる傾向が示唆されており, 患者への臨床応用という観点からは, 小児例で施行されている骨髓内移植は通常の静脈投与による造血幹細胞移植と比較して表皮水疱症の治療においても成績が向上する可能性が示唆される。

MSCを含む骨髓由来細胞の皮膚への遊走を促進し, 皮膚構成細胞への分化を促進させる因子として, 我々はケモカインの一種であるCTACK/CCL27やSLC/CCL21の可能性を示している^{5,6)}。また, TamaiらはMSCの皮膚構成細胞への促進因子としてHMGB-1が重要な役割を果たしていると報告している。我々はさらにcriticalな因子の存在を検討するべく, *in vivo*において, マイクロアレイ法を用いて骨髓由来とドナー由来の角化細胞における遺伝子発現パターンを比較したところ, *Mmp13*, *Cxcl10*, *Cxcl9*などが検出された。MMP13は創傷皮膚において血管新生や角化細胞増殖に関わることが知られており, またCXCL9/10は炎症性ケモカインとして生理的意義が検討されつつある。表皮水疱症マウスや患者に置ける, これらの因子の関与を今後検討することで, 表皮水疱症に対する細胞療法に新たな知見が加えられることが期待される。

また, 造血幹細胞移植においては時に移植細胞数の低下による生着不全や, MHC mismatchによる治療困難例が存在するが, iPS細胞を応用した造血幹細胞移植はこれらの問題点を克服できる可能性がある。本研究ではその端緒として, *Lhx2*遺伝子導入を併用したES/iPS細胞の血球系分化誘導を行い, *in vitro*で造血系前駆細胞(KSL細胞)および分化血球細胞を確認した。これらの細胞をCOL17レスキューマウスに移植したところ, 一部のマウスにおいてmRNAレベルでの欠損皮膚基底膜蛋白の発現が確認されたものの, 免疫染色や電子顕微鏡レベルでの回復は確認されなかった。これはいくつかの理由が考えられるが, その1つとして, conventionalな骨髓/造血幹細胞移植モデル

と比較して, 移植において十分な末梢血キメラ形成を得られていないことが挙げられる。血球誘導の効率的な方法の検討や, 移植細胞数の検討などをさらに重ねていく予定である。

iPS細胞の重症先天性皮膚疾患への応用は, 正常遺伝子を有するiPS細胞を角化細胞へ分化, 表皮シートを作製しそれを植皮と同様に貼布する方法や, 毛組織およびそれに含まれる毛幹細胞・表皮幹細胞へ誘導して病変部皮膚へ移入する方法などが考慮されるが, 我々は重症先天性皮膚疾患が全身皮膚を侵すという観点から, 全身性の効果が少ない治療回数で期待できる造血幹細胞移植の可能性を検討している。これら再生医療の分野においては, 臨床応用に繋がる安全性・効率を備えた新規治療戦略を考慮し検討を継続する必要がある。

(参考文献)

- 1) Nishie W, Sawamura D, Goto M, Ito K, Shibaki A, McMillan JR, Sakai K, Nakamura H, Olsasz E, Yancey KB, Akiyama M, Shimizu H. Humanization of autoantigen. *Nat Med* 13:378-383, 2007.
- 2) Fujita Y, Abe R, Inokuma D, Sasaki M, Hoshina D, Natsuga K, Nishie W, McMillan JR, Nakamura H, Shimizu T, Akiyama M, Sawamura D, Shimizu H. Bone marrow transplantation restores epidermal basement membrane protein expression and rescues epidermolysis bullosa model mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 14345-14350, 2010.
- 3) Kitajima K, Minehata K, Sakimura K, Nakano T, Hara T. In vitro generation of HSC-like cells from murine ESCs/iPSCs by enforced expression of LIM-homeobox transcription factor *Lhx2*. *Blood* 117:3748-3758, 2011.
- 4) Fujita Y, Inokuma D, Abe R, Sasaki M, Nakamura H, Shimizu T, Shimizu H. Conversion from human haematopoietic stem cells to keratinocytes requires keratinocyte secretory factors. *Clin Exp Dermatol* 37:658-664, 2012.
- 5) Inokuma D, Abe R, Fujita Y, Sasaki M, Shibaki A, Nakamura H, McMillan JR, Shimizu T, Shimizu H. CTACK/CCL27 accelerates skin regeneration via accumulation of bone marrow derived-keratinocytes. *Stem Cells* 24: 2810-2816, 2006.
- 6) Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol*. 180: 2581-2587, 2008.

新規な生体親和性化粧品素材ホスファチジル-パンテノールの 抗炎症作用と分子機構の解明

北海道大学大学院水産科学研究院

細川 雅史

Phosphatidyl-panthenol (P-panthenol) is a novel phospholipid prepared by phospholipase D-mediated transphosphatidylation. In this study, we found that P-panthenol suppressed mRNA expression of pro-inflammatory factors such as IL-6, IL-1 β , TNF- α , COX-2 and iNOS in LPS-stimulated macrophages like RAW264.7 cells. In addition, P-panthenol also down-regulated mRNA expression of pro-inflammatory cytokines in TNF- α stimulated human keratinocytes, HaCaT cells. The suppressive effects by P-panthenol were stronger than those of free panthenol and phosphatidylcholine used as substrate for P-panthenol synthesis. Inhibition of phosphorylation of p38, ERK and JNK in MAPK cascade is suggested to be the mechanism of anti-inflammatory effects by P-panthenol.

1. 緒 言

近年、化粧品には美しく見せることを目的とした従来までの基礎化粧品機能に加え、美しい素肌を維持する美白効果やアンチエイジング機能が期待されている¹⁾。それに伴って、安全性の高い新たなスキンケア化粧品素材の探索や開発が進められている。本研究では、そのような機能性素材として panthenol (ビタミンB₅アルコール) の新規リン脂質誘導体に注目した。Panthenolは、皮膚組織に対する抗炎症作用など優れた機能性²⁻⁴⁾が知られているが、水溶性であることから化粧品素材として利用するには、界面活性剤を用いて脂質中に乳化させ生体親和性を高める必要がある。そのような問題を解決し、スキンケアやヘアケアへの幅広い利用が期待できる新素材として phosphatidyl-panthenol (P-panthenol 図1) の合成を検討してきた。P-panthenolは、生体膜の主要な構成脂質であるリン脂質を基本骨格とすることから、生体適合性に優れているばかりでなく両親媒性が付与されるため、水中においてリポソーム形成能をもつ。筆者らは、これまでにホスホリパーゼDを用いたホスファチジル基転移反応により、テルペンアルコールやフェノール化合物のリン脂質誘導化法^{5,6)}を開発しており、その反応系を応用し、反応条件を検討することで高収率でのP-panthenolの合成が可能となった。

そこで本研究では、P-panthenolの新規化粧品素材としての優れたスキンケア機能を明らかにするため、美白効果やアンチエイジング効果と密接に関わる抗炎症作用⁷⁾に着目した。具体的には、皮膚組織を構成する角化細胞や浸潤

したマクロファージによる炎症性因子の過剰産生に対する抑制機能である。従来の遊離型 panthenol との効果の比較を行うとともに、分子機構の解明をはかり、新規化粧品素材としての有効性を明らかにすることを目的とした。

2. 実 験

2. 1. 細胞培養

マウス由来マクロファージ様細胞RAW264.7は大日本住友製薬より購入し、10% FBS含有RPMI1640 培地を用いて、37℃、5% CO₂存在下で培養を行った。ヒト角化細胞 HaCaT はCLS (Cell Lines Service, ドイツ)から購入し、10% FBS含有DMEM 培地を用いて、37℃、5% CO₂存在下で培養を行った。

2. 2. 炎症因子のmRNA 発現量の測定

RAW264.7 細胞 5×10^4 cells を RPMI1640 培地 1 ml を用いて 24-well プレートに播種し、24 h 前培養した。その後、P-panthenol または遊離型 panthenol、大豆 phosphatidylcholine (SoyPC) をそれぞれ所定の濃度となるように添加し、24 h 培養した。なお、試料はエタノール溶液として培地に添加した。エタノールの終濃度は、培地に対して 0.1 % とし、細胞毒性が見られないことを確認した。次いで、0.1 μ g/ml となるようにリポポリサッカライド (LPS) を添加して炎症刺激し、6 h の培養後に RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。

HaCaT 細胞 5×10^4 cells を DMEM 培地 1 ml を用いて 24-well プレートに播種し、24 h 前培養した。その後、上記と同様に試料添加し 48 h 培養した。更に 0.1 μ g/ml の TNF- α を添加して 24 h の培養後に total RNA を抽出した。

抽出した total RNA から cDNA を合成した。炎症因子の mRNA 発現量の測定は、定量 PCR 法により行った。なお、反応試薬は FastStart Universal Probe Master (ROX) (Roche) を使用し、TaqMan[®] Gene Expression Assay (Applied Biosystems Japan Ltd.) を用いて、所望の遺伝子



Anti-inflammatory effect of a novel phospholipid, phosphatidyl-panthenol

Masashi Hosokawa

Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University

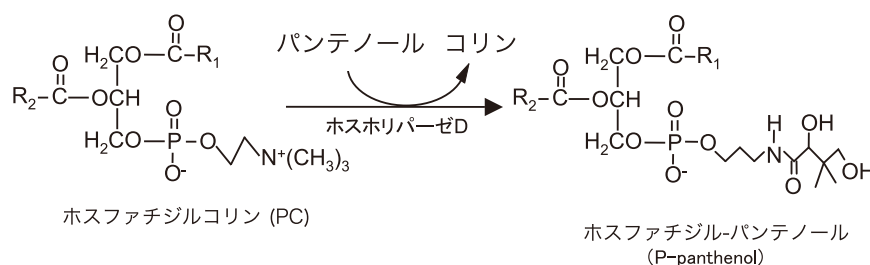


図1 ホスファチジル-パンテノール (P-panthenol) の合成反応

発現を測定した。

2. 3. 炎症性サイトカイン分泌量の測定

RAW264.7 細胞を 2. 2. と同様に培養した後、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の LPS を添加して炎症刺激し、更に 24 h の培養後に培地を回収した。IL-6 および IL-1 β の分泌量の測定は、mouse IL-6 ELISA Kit および IL-1 β ELISA Kit (いずれも Thermo Scientific) を使用し、添付されたプロトコールに従って行った。HaCaT 細胞も 2. 2. と同様に培養した後、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の TNF- α を添加して 24 h の培養後に培地を回収した。IL-6 分泌量の測定は、human IL-6 ELISA Kit (Thermo Scientific) を使用して行った。

2. 4. Western Blotting 法

RAW264.7 細胞および HaCaT 細胞 5×10^5 cells を培地 5 ml を用いて 6-well プレートに播種し、24h 前培養した。次いで、2. 2. と同様に P-panthenol を添加して RAW264.7 細胞は 24h 培養した後、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の LPS を添加して炎症刺激を行い、45 min の培養後に細胞を回収した。HaCaT は 48h 培養した後、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の TNF- α を添加して 15 min 培養後に細胞を回収した。その後、細胞タンパク質溶液を調製し、SDS-PAGE によるタンパク質分離を行った。電気泳動したポリアクリルアミドゲルから PVDF メンブランにトランスファーした後、一次抗体および二次抗体を用いて抗原抗体反応を行い、各タンパク質の発現量は、発光検出試薬は ECL (GE Healthcare) または ImmunoStar (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) を用いて検出を行った。タンパク質の発光シグナルの検出は ATTO Cold CCD Camera System (アトー株式会社) を用いて行った。

2. 5. 統計学的処理

得られた数値は各群で平均値及び標準偏差として示した。統計処理は、Dunnett または Tukey の検定を用いて行い、有意水準は $P < 0.05$ 、および $P < 0.01$ とした。

3. 結 果

3. 1. P-panthenol の活性化マクロファージに対する炎症因子産生抑制効果

新規リン脂質として合成した P-panthenol の抗炎症作用を評価するため、マクロファージ様 RAW264.7 細胞に対する炎症因子の産生抑制能を調べた。最初に、P-panthenol の細胞毒性を WST-1 法で調べた結果、終濃度 100 μM において細胞生残率への影響は見られず、毒性の低い脂質であることを確認した。

RAW264.7 細胞培養液に P-panthenol を添加して 24h 培養後、LPS を用いて炎症を誘発した結果、炎症性サイトカインである IL-1 β 、TNF- α および炎症関連酵素である iNOS および COX-2 の mRNA 発現量がコントロール群 (LPS (+)) と比較して有意に低下した (図 2)。P-panthenol は、IL-6 の mRNA 発現も抑制したが、同濃度では panthenol による抑制効果は認められず、また SoyPC による抑制効果と比較しても強い抑制傾向であった (図 3)。更に、P-panthenol は、終濃度 25 - 50 μM 以上で IL-6 および IL-1 β のタンパク質産生量を抑制することが示された (図 4)。

P-panthenol はビタミン B₅ のリン脂質誘導体であるが、ビタミン B₁ のチアミンやビタミン B₆ のピリドキシンについても PLD を用いてリン脂質誘導体を調製し、活性化マクロファージにおける炎症因子の産生抑制能を比較した。その結果、終濃度 50 μM 処理においてホスファチジル-チアミンには、弱いながらも IL-6 の mRNA 発現を抑制したが、ホスファチジル-ピリドキシンには認められず、P-panthenol の高い抗炎症効果が確認された。

3. 2. P-panthenol の皮膚細胞における炎症因子の産生抑制効果

皮膚組織では、刺激や損傷等によりマクロファージが浸潤し、皮膚表皮細胞と相互作用することによって炎症が進行する。その際、マクロファージから放出される TNF- α などの炎症性サイトカインがメディエーターとして重要な

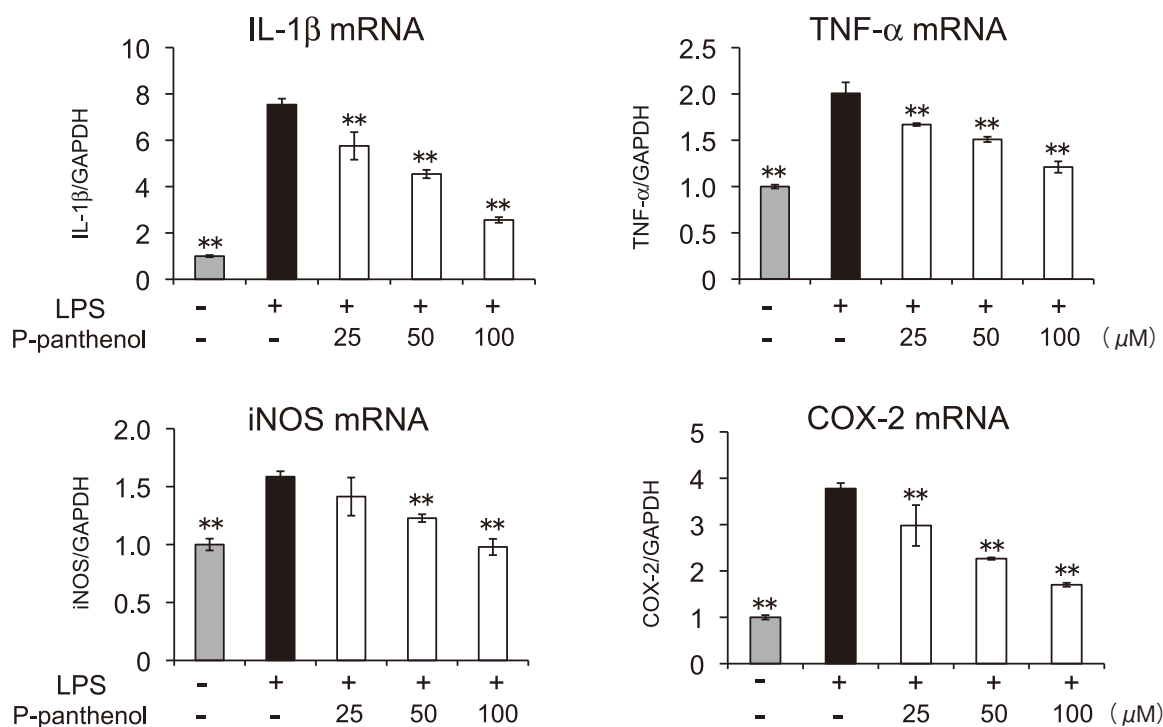


図2 P-panthenol の活性化マクロファージに対する炎症因子遺伝子の発現抑制
** $P < 0.01$ vs. LPS (+)

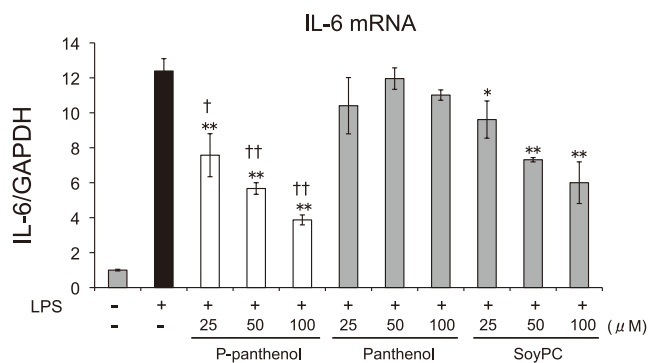


図3 P-panthenol の活性化マクロファージに対する IL-6 mRNA 発現抑制
** $P < 0.01$, * $P < 0.01$ vs TNF- α (+)
†† $P < 0.01$, † $P < 0.05$ vs Panthenol

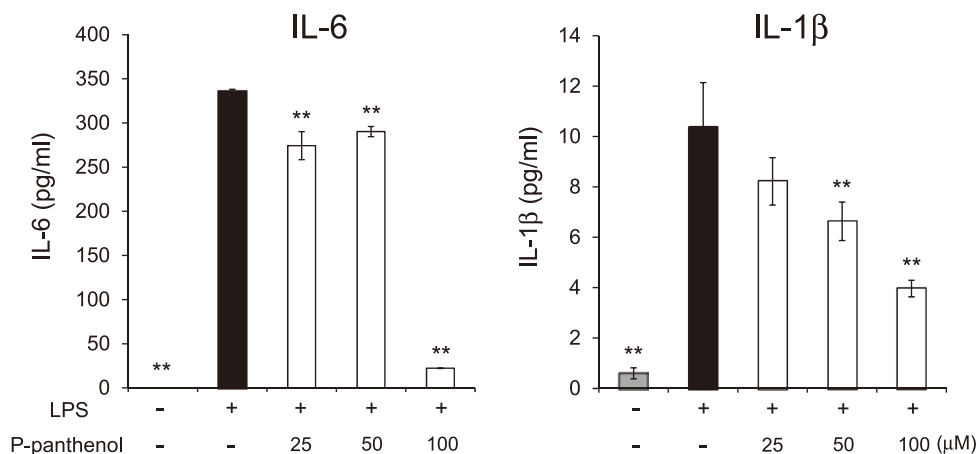


図4 P-panthenol の活性化マクロファージにおける IL-6 および IL-1β の産生抑制
** $P < 0.01$ vs.LPS (+)

役割を担っている。そこで、炎症性サイトカインによる皮膚表皮細胞の活性化に対するP-panthenolの抑制効果を明らかにするため、ヒト角化細胞HaCaTをTNF- α で刺激し、その炎症因子産生に及ぼす影響を評価した。

TNF- α 処理によりHaCaTではIL-6の産生が上昇したが、P-panthenolはそのmRNA発現誘導(図5)およびタンパク質産生を有意に抑制した。一方、合成反応の基質として用いた遊離型のpanthenolやSoyPCには終濃度50 μ M処理においては抑制効果が全く認められなかった。よって、TNF- α によるHaCaTの炎症誘導に対する抑制には、P-panthenolの構造が重要であることが推察される。

このような角化細胞に対するP-panthenolの炎症因子産生抑制効果は、TNF- α による刺激のみならず認められた。すなわち、RAW264.7細胞をLPS処理によって炎症刺激することにより得られた培地を用いてHaCaT細胞を培養したところ、IL-6やTNF- α のmRNA発現量が増加した。これに対し、HaCaT細胞をP-panthenolを用いてあらかじめ

め前処理することによって、それら炎症性サイトカインのmRNA発現量の有意な低下が認められた(図6)。以上の結果は、P-panthenolが皮膚表皮細胞とマクロファージ間の相互作用を効果的に制御して、炎症の誘導や進展を抑制することを示唆している。

3. 3. P-panthenolによる炎症因子遺伝子の発現抑制機構

P-panthenolがマクロファージ様RAW264.7細胞およびHaCaT角化細胞のいずれに対しても炎症因子の産生抑制効果を示したことから、それらの制御機構に関わる情報伝達経路としてMAPK経路への影響を調べた。図7に示すように、P-panthenolはLPSで刺激したRAW264.7細胞で見られるp38およびERKのリン酸化を抑制していることが示された。また、HaCaT細胞に対しては、p38に加えJNKのリン酸化を抑制し、それらの因子の活性化を制御していることがわかった(図8)。

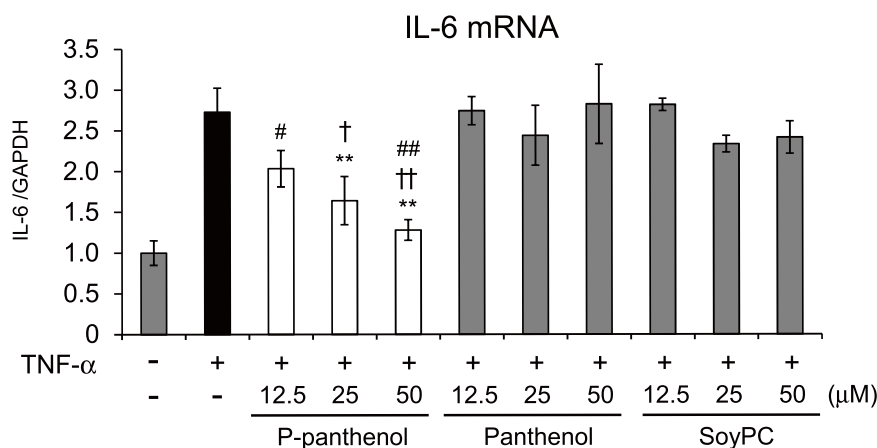


図5 P-panthenolのヒト皮膚細胞に対するIL-6 mRNA発現抑制

** $P < 0.01$ vs TNF- α (+)

†† $P < 0.01$, † $P < 0.05$ vs Panthenol

$P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs PC (同濃度間の比較)

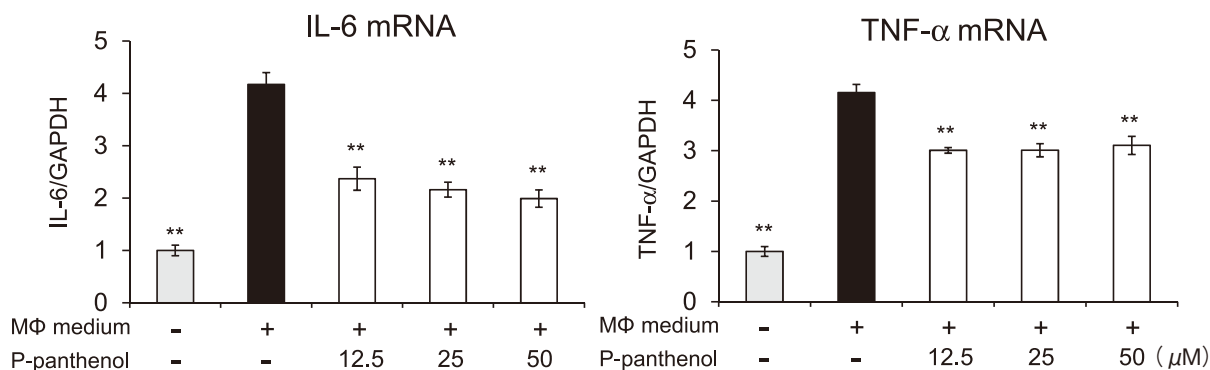


図6 ヒト皮膚細胞のマクロファージ培養液による活性化とP-panthenolによる抑制効果

** $P < 0.01$ vs MΦ medium

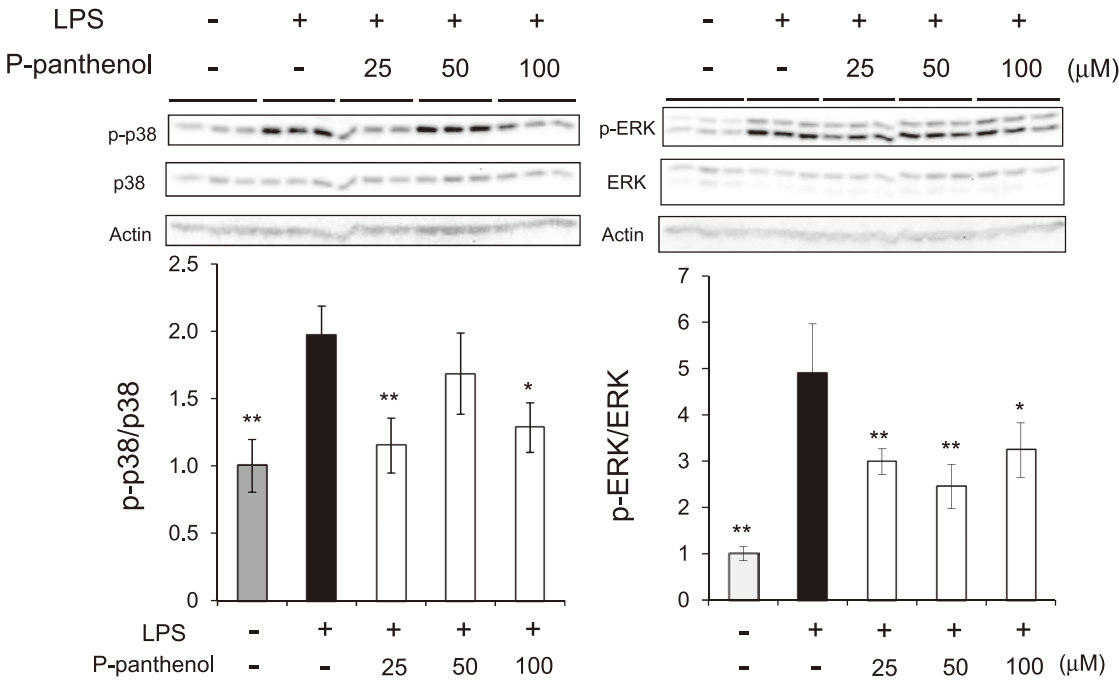


図7 P-panthenol のマクロファージ様 RAW264.7 細胞における MAPK 制御

**P < 0.01, *P < 0.05 vs LPS (+)

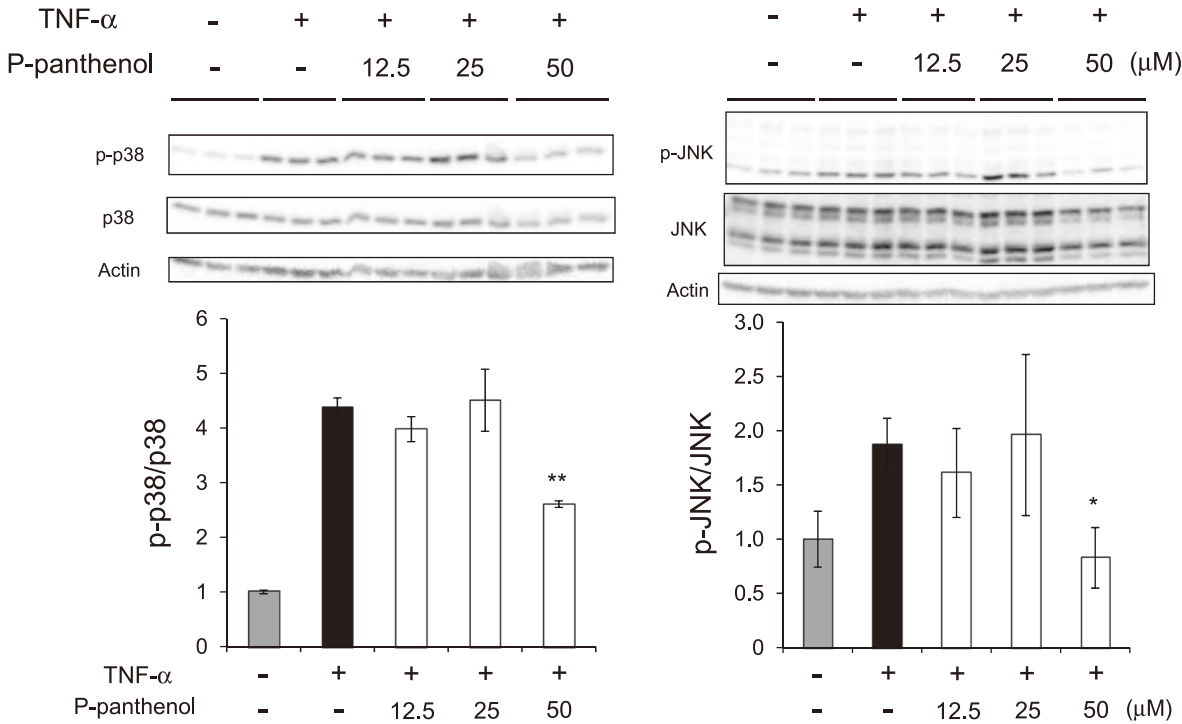


図8 P-panthenol のヒト皮膚細胞 HaCat における MAPK 制御

**P < 0.01, *P < 0.05 vs LPS (+)

4. 考 察

近年、男女を問わず化粧品素材の機能性として「スキンケア」が注目されている。スキンケア機能の一つとして皮膚老化や皮膚炎に対する抗炎症効果があり、炎症を予防したり、鎮静化することで健康で美しい肌の維持が期待される。本研究では、新規化粧品素材を開発する目的で、これまでに利用がなされている panthenol に着目した。Panthenolは生体内においてビタミンB₅である panthenic acidに変換されるプロビタミンである。クリームやシャンプー、育毛剤等に広く利用されており、安全性も高い物質といえる。しかし、panthenolは水溶性であるため、組織での滞留性が乏しいことや皮脂バリアを透過しにくいことがあり、応用面での制限が課題である。本研究では、そのような panthenolをリン脂質誘導化することで生体適合性や両親媒性を付与し、利用用途を広げるばかりでなく、その抗炎症作用が増強することを期待した。

生体内の炎症反応では、組織構成細胞に加え、マクロファージが重要な役割をこなす。合成したP-panthenolは、マクロファージ様RAW264.7細胞に対し、LPSによって誘導される炎症因子のmRNA過剰発現を効果的に抑制した。その効果は、従来の遊離型 panthenolよりも強く、リン脂質誘導体の優れた機能性を確認した。これらの発現制御機能は、炎症因子の産生に関わるp38やERKのリン酸化抑制を機序として、複数の経路を制御することによる効果的な作用であることが示唆された。P38やERKなどのMAPKカスケードの下流には、NF- κ B^{8,9)}やAP-1¹⁰⁾といった転写因子が存在し、炎症因子のmRNA発現を制御することから、それらへの影響についても検討することが期待される。また、P-panthenolはマクロファージが産生するTNF- α によって刺激した角化細胞HaCaTに対しても、p38やJNKのリン酸化抑制を介して炎症性サイトカインの産生を抑制したことから、皮膚の炎症時にみられる細胞間相互作用に対しても制御効果を示すものと推察する。

今後、より詳細な作用機構の解明や効果的な利用形態に関して更なる研究を重ねたいと考える。

謝 辞

本研究にご助成いただきました公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に深謝いたします。

(引用文献)

- 1) 正木 仁編.: 機能性化粧品素材の開発IV, シーエムシー出版, 2006.
- 2) Ebner F, Heller A, Rippke F, Tausch I, : Topical use of dexpanthenol in skin disorders, *Am. J. Clin. Dermatol.* 3, 427-433, 2002.
- 3) Wiederholt T, Heise R, Skazik C, Marquardt Y, Joussen S, Erdmann K, Schröder H, Merk HF, Baron JM.: Calcium pantothenate modulates gene expression in proliferating human dermal fibroblasts, *Exp. Dermatol.*, 18, 969-978, 2009.
- 4) Bissett DL.: Common cosmeceuticals, *Clin Dermatol.*, 27, 435-445, 2009.
- 5) Yamamoto Y, Hosokawa M, Kurihara H, Miyashita K.: Preparation of phosphatidylated terpenes via phospholipase D-mediated transphosphatidylation, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 85, 313-320, 2008.
- 6) Yamamoto Y, Kurihara H, Miyashita K, Hosokawa M.: Synthesis of novel phospholipids that bind phenylalkanols and hydroquinone via phospholipase D-catalyzed transphosphatidylation, *New Biotechnol.*, 28, 1-6, 2011.
- 7) 平尾哲二.: 角層サイトカインに着目した皮膚刺激緩和アプローチ, 正木 仁編.: 機能性化粧品素材の開発IV, シーエムシー出版, 2006, 72-79 頁.
- 8) Pasparakis M, : Role of NF- κ B in epithelial biology, *Immunol. Rev.*, 246, 346-358, 2012.
- 9) Tsuruta D.: NF-kappaB links keratinocytes and lymphocytes in the pathogenesis of psoriasis, *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.*, 3, 40-48, 2009.
- 10) Zenz R, Eferl R, Scheinecker C, Redlich K, Smolen J, Schonhaller HB, Kenner L, Tschachler E, Wagner EF, : Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease, *Arthritis Res. Ther.*, 10, 201, 2008.

新規経皮導入法による美白ペプチドを用いた高浸透化粧品の開発

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科細胞生理学

道上 宏之

Topical therapy is the most favored form of treatment for whitening against hyper-pigmentation and sunburn. However, high-molecular-weight, hydrophilic chemicals are difficult to use as transdermal delivery drugs and the use of topical drugs has been highly limited. We applied 11-arginine peptide (11R), a cell-membrane-permeable peptide, as a transdermal delivery system with a skin delivery enhancer, pyrenebutyrate. We performed intracellular peptide screening for melanogenesis inhibitors with several kinds of tyrosinase inhibitory peptides from natural sources. Next, we performed daily repetitive topical application of this LILVLLAI peptide found in gliadin protein, a wheat component, for two weeks against a UV-induced sun-tanning guinea pig model and confirmed significant melanogenesis inhibition in model skin. We showed that 11R using a transdermal drug delivery system with melanogenesis inhibitory peptide is a very safe and promising method for applications from cosmetics to the pharmaceutical industry.

1. 緒 言

タンパク質導入法とは、Protein transduction domain (PTD) と呼ばれる 10–20 個のアミノ酸からなるペプチドを融合することによりタンパク質、ペプチド、低分子化合物などの様々な生理活性物質を細胞内に導入し機能させる技術である。タンパク質が直接細胞内に導入されることは、ヒト免疫不全ウイルス I 型 (HIV-1) が発現する Trans-activator of transcription protein (TAT タンパク質) の研究により明らかになった¹⁾。TAT タンパク質の 11 個のアミノ酸からなる PTD は細胞膜透過性の性質を有していることが報告されている。TAT domain (MYGRKKRRERRR) の特徴は、11 個のアミノ酸の内、8 個のアミノ酸がアルギニンやリジンなどの塩基性アミノ酸で構成されていることである。このことから、正電荷を帯びていることが膜透過性に重要であることが示唆され、7–11 個の塩基性アミノ酸からなる数種類の PTD が発見された。そのうち、11 個のアルギニン(11R)による PTD が導入効率の面から優れていることを我々の研究室の松下らが報告している²⁾ (Fig. 1)。

PTD による細胞内導入では、エンドサイトーシスの一種であるマクロピノサイトーシスにより、エンドソームという小胞に包まれた形で細胞内に導入される³⁾。よって、PTD を付加したタンパク質や薬物が細胞内で活性を発揮するには、エンドソームから脱出して細胞膜に移行する、さらなるステップが必要となる⁴⁾。また、前処置として Pyrenebutyrate という物質を使用した。これは、ベンゼ

ン環を有する脂溶性の部分とカルボニル基を有する水溶性の部分を含わせ持つ両親媒性の物質である。これを前処置で使用すると、エンドソーム内のタンパク質が効率良く細胞内で拡散することが報告されている⁵⁾。Pyrenebutyrate 存在下ではエンドソーム内に蓄積することなく、膜透過後、速やかに細胞内全体へ導入できる。そのため、エンドソーム内で機能することなく蓄積していたタンパク質や薬物が、早期に細胞質に拡散し、より迅速で大きな効果が期待出来る⁶⁾。

今回、我々の研究では、このタンパク質導入法および Pyrenebutyrate を、経皮的導入法に応用することとした。まず、皮膚は表皮、真皮及び皮下組織の 3 層構造をとっている。表皮は表層より角質層、顆粒層、有棘層、基底層からなる。メラニンを産生するメラノサイトは、表皮の最下層である基底層に存在する。角質層は疎水性であり、外因性物質に対するバリアの役割を果たしており、経皮的導入においても大きな障害となる⁷⁾。

外用剤を皮膚に適用した時、含有される薬物の主な皮膚透過・吸収の経路は、毛包や汗腺等の付属器官を介する経付属器官ルートと角質層実質を透過する経角質層ルートの 2 通りが考えられている。付属器官を介した皮膚透過は皮膚実質を通るより速やかであるが、皮膚表面積に対する付属器官の割合は 0.1% 以下である⁸⁾。しかしながら、分子量 500Da 以上の物質や極性物質等では、皮膚実質をほとんど通過出来ないために毛包等の付属器官に集まると言われている⁹⁾。物質が皮膚実質を通る場合は、皮膚透過の最大のバリアである角質層中を拡散する必要がある。角質層を通る経路には角質細胞内を通る経細胞ルート (transcellular route) と細胞間隙を通る細胞間ルート (intracellular route) がある。角質層バリアの克服こそが経皮導入の最大の課題となっている。

現在、薬物の経皮的導入法は物理的促進法と化学的促進法に大別される。物理的促進法としては、例えばイオント



The development of whitening peptide with peptide percutaneous drug delivery system

Hiroyuki Michiue

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

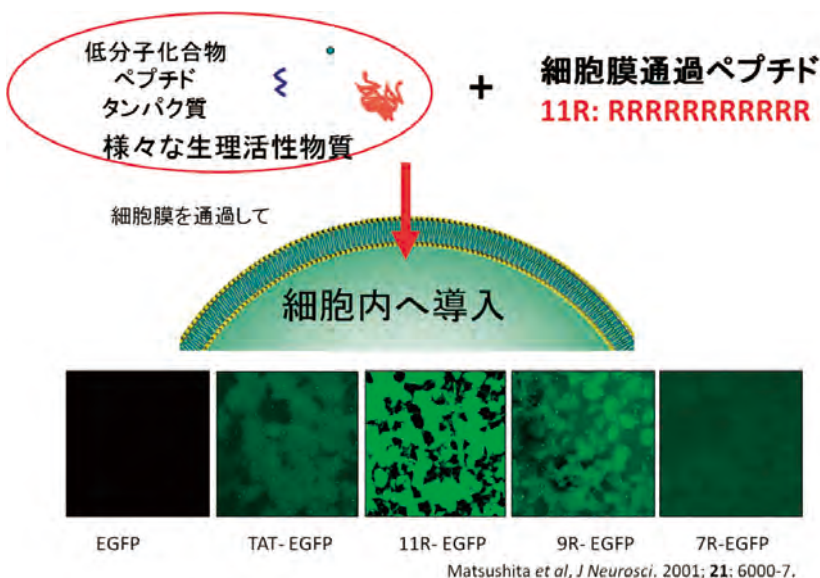


Fig. 1

フォレシス¹⁰⁾やマイクロニードル¹¹⁾が挙げられる。イオントフォレシスは、皮膚の離れた2点に陽極、陰極をセットし、酸性薬物(負に帯電)では陰極側に、塩基性薬物(正に帯電)では陽極側の基剤に封入する。その後低電圧を負荷させることで、比較的電気抵抗の低い部分である毛嚢や汗腺等の付属器官を介し、角質下の水分に富み電気電導率の高い(電気を通し易い)表皮・真皮部に電流が流れ、同時に荷電した薬物が電気泳動の要領で表層から皮膚深部へと移動し、経皮吸収される。マイクロニードル法は、角質層(10~20μm)のみを通過する針を有する剣山のようなものを皮膚に適用することで、神経に到達させずに角質層に穴を開け、バリア機能を低下させる方法である。

化学的促進法としては、例えば、リポソーム¹²⁾や界面活性剤¹³⁾が挙げられる。リポソームは、リン脂質からなる数十から数百nmの粒径をもつ微小なカプセルであり、その内部に様々な分子を封入することができると共に、生体適合性や生分解性にも優れていることから、その発見以来、薬物や生理活性物質の理想的な運搬体と考えられている。しかし、薬物の極性、分子量に依存しない経皮的導入法は確立されていない。

次に、日焼け後の色素沈着やシミ、ソバカスについて説明する。これらの原因となる紫外線は、UVA (320~400nm)、UVB (290~320nm)、UVC (200~290nm)に大別される。これらは、一般に皮膚の紫外線暴露による刺激やホルモンの異常又は遺伝的要素等によって皮膚基底層に存在するメラノサイトが活性化されメラニン産生が亢進した結果、生じるものと考えられている。また、このメラニンはメラノサイトの中で生合成される銅含有酵素チロシナーゼの働きによって、チロシンからDOPA、DOPAからDOPA quinoneに変化し、さらに中間体を経て形成さ

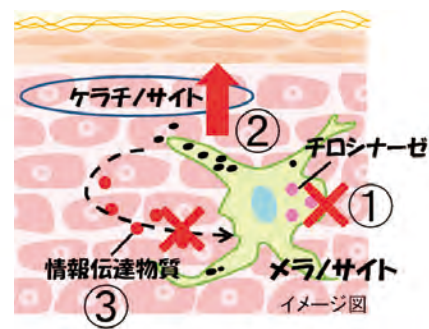


Fig. 2

Table 1¹⁸⁾

細胞膜通過ペプチド		
SPOT	Sequence	Protein source
101	APLRVYVE	β-Lactoglobulin
54	VSLLLVGI	α-Lactalbumin
325	ASVSVSFG	b-Conglycinin
195	MKTFLILV	Gliadin
151	SVNVHSSL	Ovalbumin
175	MVLVNAIV	Ovalbumin
53	MMSFVSLI	α-Lactalbumin
140	IAIMSALA	Ovalbumin
99	ISLLDAQS	b-Lactoglobulin
196	LILVLLAI	Gliadin
323	LLGLVFL	b-Conglycinin
55	LVGLFHA	b-Lactoglobulin
121	LACQCLVR	b-Lactoglobulin
186	LFRVASMA	Ovalbumin
176	NAIVFKGL	Ovalbumin
145	QINKVVRP	Ovalbumin
276	TLNRNALR	Gliadin
171	IIRNVLPQ	Ovalbumin
181	MPFRVTEQ	Ovalbumin
170	QTNGHIRN	Ovalbumin
232	VVLQQHNI	Gliadin
146	VVRFDKLP	Ovalbumin
252	GSFRPSQQ	Gliadin
51	VRGPFPII	b-Casein
200	VRFPVPQL	Gliadin
347	PFRPQPR	b-Conglycinin
251	PLGQGSFR	Gliadin
339	IFRPRPRP	b-Conglycinin

れるものとされている¹⁴⁾。Whitening効果を得るためのターゲットとしては、主に三つの機序(Fig. 2)があり、一つ目は、メラニン合成抑制¹⁵⁾、二つ目は、メラニン排出促進¹⁶⁾、三つ目は、メラノサイト刺激物質抑制である¹⁷⁾。今回、一つ目のメラニン合成を抑制する機序に焦点を当て、メラニン合成の律速酵素であるチロシナーゼに着目した。チロシナーゼ活性を抑制するペプチドに関しては、単体アミノ酸及び8つ連結したアミノ酸(Table 1)によるチロシナーゼの活性阻害と結合能が論文において報告されている。

さらにその論文において、単体アミノ酸では、バリン、ロイシン、イソロイシンといった疎水性アミノ酸がチロシナーゼの活性を阻害すると報告している。しかし、これは試験管レベルでの報告しかされていない¹⁸⁾。そこで、我が研究室の手法である、11Rを連結させて細胞内へ導入することで検討を行い、細胞レベルでのスクリーニングを行った。

2. 実験

2.1. ペプチドの作製

今回使用したペプチド¹⁸⁾は、ペプチド合成機を用いてペプチド固相法により作製したもので、近畿大学の研究室に依頼して合成したものである。本実験には、11Rを連結した候補ペプチドと候補ペプチドのみの両方を使用している。

2.2. 細胞内スクリーニング

まず、チロシナーゼ抑制効果を有する候補ペプチドに11Rを連結させて、B16メラノーマ細胞へ導入し、スクリーニングを行った。実験に用いたB16メラノーマ細胞は、マウス悪性黒色腫瘍細胞で、特異的なメラニン産生能を有している。1wellあたり 1×10^5 cellを撒き37℃、5% CO₂下で培養した。一日培養したメラノーマ細胞に希釈した候補ペプチドを添加した。72時間後にトリプシンで剥がし、5000rpmにて10分間遠心して細胞を回収した。その後、1N水酸化ナトリウム水溶液、80℃、2時間で細胞を溶解させ、マルチプレート対応スペクトロフォトメーター（DSファーマバイオメディカル㈱）で吸光度（405nm）を測定し、メラニン定量を行った。

2.3. WST-1 assayによる細胞毒性の有無の検討

決定したペプチドを用いて、WST-1試薬を用いて、細胞毒性の有無を検討した。1wellあたり、2000cellになるようにメラノーマ細胞をまき、一日培養した。実験には、96穴プレートを使用した。翌日、希釈した候補ペプチドを添加し、72時間培養した。その後、WST-1試薬を添加し、30min、60min後に、マルチプレート対応スペクトロフォトメーター（DSファーマバイオメディカル㈱）で吸光度（450nm、690nm）を測定した。コントロールはDMSOを使用した。

2.4. 196ペプチドのAlanine walkの検討

決定した196ペプチドを用いて、ペプチドの各アミノ酸を順番にアラニンに置換するAlanine walkを行った。実験操作は2.2.細胞内スクリーニングと同じである。

2.5. モルモットの背部にて11Rの導入の確認

11Rに蛍光標識のテトラメチルローダミンを連結したペプチド（TMR-11R）をモルモットの背部（4cm²区画、各

50uL）に塗布し、経時的に観察した。青色は、ヘキストによる核染色、赤色は、テトラメチルローダミンで蛍光標識した11Rペプチドである。観察は、共焦点レーザー顕微鏡（FV300、OLYMPUS）で行った。

2.6. 日焼けモデル動物の作成

日焼けモデルとして褐色モルモット（Guinea pig, Weiser-Maples, female, 8w）を採用した。これは、動物の中でも体表面積が大きいこと、またヒトと同様のメラニン形成を行うといった点から褐色モルモットに決定した。脱毛したモルモットの背部に、紫外線UVB強度測定装置にてUV強度を測定しつつ、UV照射機により、1日1回紫外線量0.25J/cm²を10日間照射した。照射面積は一区間2cm×2cmを4区間とした。

2.7. 日焼けモデル動物の治療

モルモット日焼けモデルに、Propylene glycolにて調整した500uM Pyrenebutyrateを前処置で50uL塗布した。5分後、Propylene glycolにて調整した候補ペプチドを各50uL、1日1回、14日間塗布した。その後、デルマパンチ（5mm、マルホ）を用いて皮膚サンプルを採取した。

2.8. ヘマトキシリン・エオシン（H.E.）染色

モルモット皮膚サンプルのパラフィン切片を作製し、カラッチヘマトキシリン液を滴下し、5分間静置した。洗浄し、エオシン液を滴下し、30秒間静置した。洗浄し、DIGITAL SIGHT DS-U1（Nicon）で観察した。

2.9. フォンタナ・マッソン染色

モルモット皮膚サンプルのパラフィン切片を作製し、キシレンに15分間（58℃）、10分間（RT）浸漬し、100%エタノール、95%エタノール、90%エタノールおよび70%エタノールを順に各5分間滴下した。蒸留水で洗浄し、2.5%フォンタナアンモニア銀染色液を滴下し、遮光して16時間静置した。蒸留水で洗浄し、0.25%チオ硫酸ナトリウム水溶液を1分間滴下した。蒸留水で洗浄し、ケルンエヒトリート液を5分間滴下した。蒸留水で洗浄し、70%エタノール 90%エタノール 95%エタノール 100%エタノールを順に各1分間滴下した。キシレンを5分間滴下し、VECTA MOUNTTMにて封入し、DIGITAL SIGHT DS-U1（Nicon）観察した。

3. 結果

3.1. 細胞内スクリーニング

黒いメラノーマ細胞が白くなっている候補ペプチドも数種類確認することが出来た。さらにメラノーマ細胞を水酸化ナトリウムにて溶解させた後、吸光度測定（405nm）を

行ったところ、コントロールより低い値を示したペプチドは、以下の8種類であった。また、50%以上のメラニン合成阻害を示したのは、196というスポット番号のペプチドであった。この配列は、小麦に存在するGliadinというタンパク質由来のペプチドである (Fig. 3)。

3. 2. WST-1 assayによる細胞毒性の有無の検討

WST-1 assayの結果より、決定したペプチドは、コントロールと比較して細胞への毒性はないことを確認した

(Fig. 4)。

3. 3. モルモットの背部にて11Rの導入の確認

6時間から48時間まで経時的に観察したところ、塗布12時間頃から、表皮基底層にて11Rペプチドの導入が確認出来た。また、24、48時間と時間が経過するごとに、真皮にまでペプチドが導入出来ていることが確認出来た (Fig. 5)。

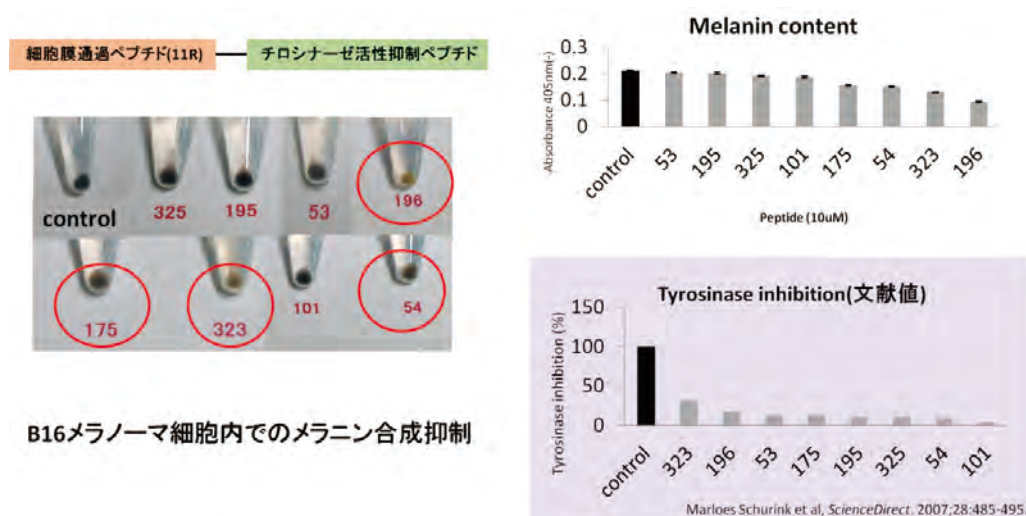


Fig. 3

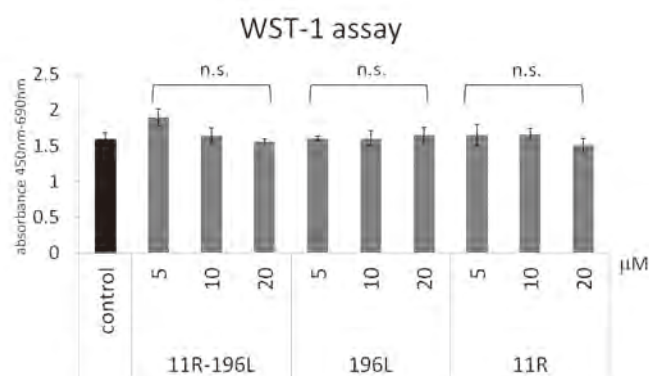


Fig. 4

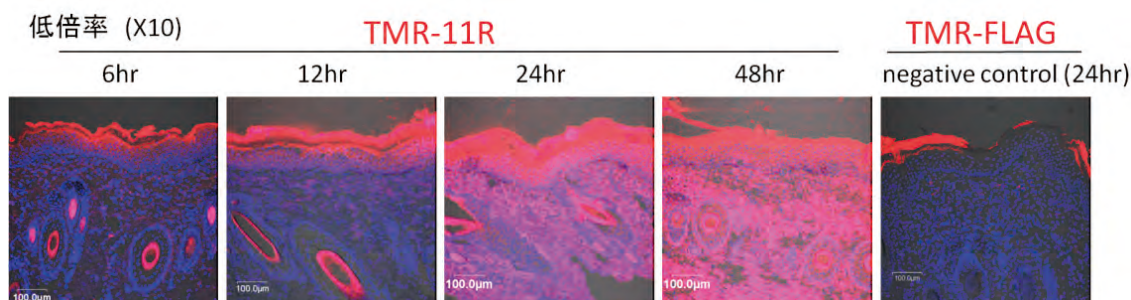


Fig. 5

3. 4. 動物モデルの検討結果

また、PBおよび各薬剤によるモルモット日焼けモデル皮膚サンプルについて、フォンタナ・マッソン染色を行った。control、11R + No.10L、No.10L-11Rを塗布したサンプルでは、表層から皮膚基底層までメラニン陽性細胞が多数観察されたのに対し、11R-No.10Lを塗布したサンプルは、他のサンプルと比較して、メラニン陽性細胞が減少していることを確認した(Fig. 6)。

次に、フォンタナ・マッソン染色によるメラニン陽性細胞数を10ヶ所の視野で、統計学的に検定したところ、PBおよび11R-No.10Lを塗布した皮膚において、メラニン陽性細胞数の有意な減少が見られた(Fig. 7)。

4. 考 察

新たなペプチドをスクリーニングする際に着目したのが、チロシナーゼ抑制に関する論文である。下図¹⁹⁾はチロシナーゼの活性部位(Fig. 8)を示したもので、この活性部位を阻害する天然素材が報告されている。例えば、牛乳、小麦、はちみつ、絹、ハエといったものが報告されている¹⁸⁾。

これらに共通する結論が、“チロシナーゼの活性部位に存在する銅イオンをキレートすることで、チロシナーゼの活性を阻害している”であった。こちらは、試験管内レベルの報告はあるが、細胞レベルや動物レベルの応用例はない。その理由は、これらのWhiteningペプチドを皮膚基底膜にある皮膚色素細胞に送達する手段がないためである。よって、我が研究室の手法である11Rを用いて、細胞レベルそして動物レベルにて検討を行い、さらにスクリーニングを行った。

文献の試験管レベルでのスクリーニングの結果と細胞内スクリーニングの結果より、メラニン合成抑制効果において異なる結果が得られた。これは、細胞内へ導入する際に細胞膜通過ペプチド、11Rを連結したことで、候補ペプチドに何らかの立体構造の障害が起きたと考えられる。例えば、候補ペプチドにマイナスチャージのアミノ酸を含有していた場合、11Rの強い塩基性を持つアルギニンとの静電的相互作用により、アミノ酸同士が接着する可能性が示唆される。決定した196ペプチドにおいて、11RをN末端とC末端のそれぞれに連結した場合、N末端がメラニン合成

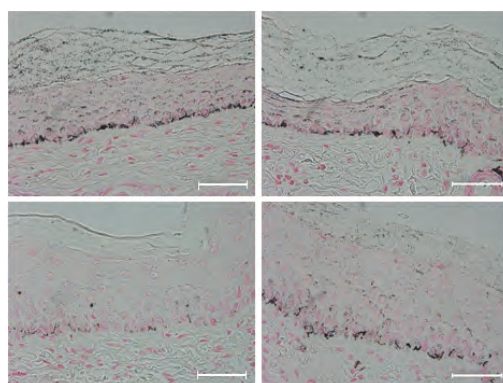


Fig. 6 フォンタナ・マッソン染色結果 scale bar : 50μm

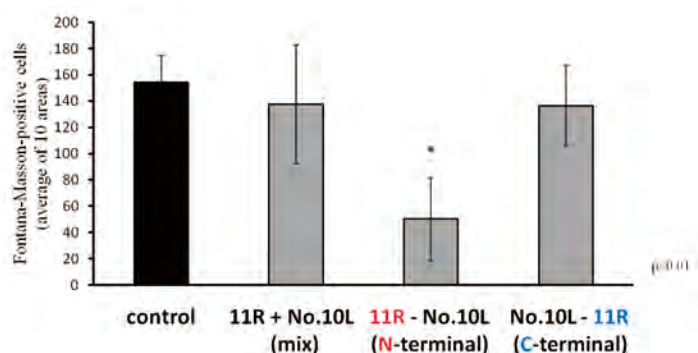


Fig. 7 フォンタナ・マッソン染色によるメラニン陽性細胞数の測定結果

チロシナーゼの活性部位

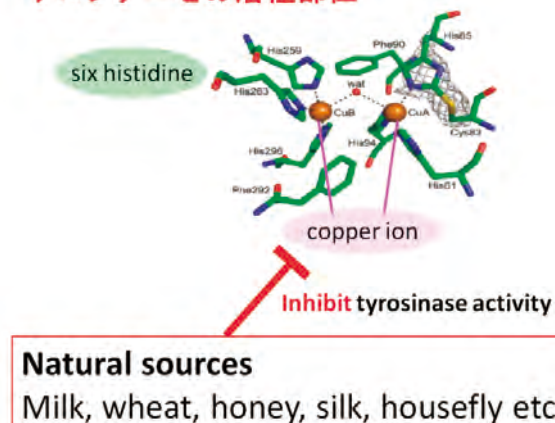


Fig. 8



Fig. 9

抑制効果を示すことも確認している。さらに、褐色モルモットを用いて、日焼けモデル動物を作製し (Fig. 9)、薬剤塗布の検討を行った。その後、H.E.染色、フォンタナ・マッソン染色、メラニン陽性細胞数の統計評価を行い、メラニン陽性細胞の有意な減少効果を認めた。

本研究成果は、The transdermal inhibition of melanogenesis by a cell-membrane-permeable peptide delivery system based on poly-arginine. Ookubo N, Michiue H, Kitamatsu M, Kamamura M, Nishiki T, Ohmori I, Matsui H, *Biomaterials*. 2014 May; 35 (15) :4508-16.

(引用文献)

- 1) Shiroh Futaki : Oligoarginine Vectors for Intracellular Delivery:Design and Cellular-Uptake Mechanisms: *Biopolymers*, 84, 241-249, 2006
- 2) Masayuki Matsushita: A High-Efficiency Protein Transduction System Demonstrating the Role of PKA in Long-Lasting Long-Term Potentiation, *The Journal of Neuroscience*, 16, 6000-6007, 2001
- 3) Jehangir S Wadia : Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis, *nature medicine*, 10, 310-315, 2004
- 4) Joliot A : Transduction peptides : from technology to physiology, *Nature Cell Biology*, 6, 189-196, 2004
- 5) Takeuchi T : Direct and rapid cytosolic delivery using cell-penetrating peptides mediated by pyrenebutyrate, *ACS Chem Biol*, 1, 299-303, 2006
- 6) Gerile Candan:Combining poly-arginine with the hydrophobic counter-anion 4-(1-pyrenyl)-butyric acid for protein transduction in transdermal delivery, *Biomaterials*, 33, 6468-6475, 2012
- 7) Marek Haftek: Compartmentalization of the human stratum corneum by persistent tight junction-like structures, *Experimental Dermatology*, 20, 617-621, 2011
- 8) Saman A. Nasrollahi : Cell-penetrating Peptides as a Novel Transdermal Drug Delivery System, *Chem Biol Drug Des*, 80, 639-646, 2012
- 9) Jan D. Bos: The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs, *Experimental Dermatology*, 9, 165-169, 2000
- 10) Tomasz Ciach : Buccal iontophoresis : an opportunity for drug delivery and metabolite monitoring, *Drug Discovery Today*, 16, 361-366, 2011
- 11) Shital H : Microneedles : an emerging transdermal drug delivery system, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64, 11-29, 2011
- 12) Fang J.Y.: Liposomes as vehicles for enhancing drug delivery via skin routes, *Curr Nanosci*, 2, 55-70, 2006
- 13) Simons E.J.: Effect of chemical permeation enhancers on nerve blockade, *Mol Pharm*, 6, 265-273, 2009
- 14) Juan Carlos Espin : Improvement of a Continuous Spectrophotometric Method for Determining the Monophenolase and Diphenolase Activities of Mushroom Polyphenol Oxidase, *J. Agric. Food Chem*, 45, 1084-1090, 1997
- 15) Jie Zhang : Wnt5a Inhibits the Proliferation and Melanogenesis of Melanocytes, *International Journal of Medical Sciences*, 6, 699-706, 2013
- 16) Matsuda H : Studies of cuticle drugs from natural sources.II.Inhibitory effects of Prunus plants on melanin biosynthesis, *Biol Pharm Bull*, 10, 1417-20, 1994
- 17) P.Thanigaimalai, Evaluation of 3,4-dihydroquinazoline-2 (1H)-thiones as inhibitors of α -MSH-induced melanin production in melanoma B16 cells, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 1555-1562, 2010
- 18) Marloes Schurink: Novel peptides with tyrosinase inhibitory activity, *ScienceDirect*, 28, 485-495, 2007
- 19) Wangsa T. Ismaya: Crystal Structure of Agaricus bisporus Mushroom Tyrosinase:Identity of the Tetramer Subunits and Interaction with Tropolone, *Biochemistry*, 50, 5477-5486, 2011

化粧品用無機ナノ材料の遺伝毒性作用の解明

大阪府立大学理学系研究科生物科学専攻分子細胞遺伝学分野

八木 孝司

Titanium dioxide (TiO_2) is widely used as an ultraviolet-scattering substance in cosmetics. Here, we investigated effects of particle sizes and surface modifications of TiO_2 NPs on their genotoxicity to human skin fibroblast and keratinocyte cells with the micronucleus (MN) assay. Induction of DNA strand breaks and reactive oxygen species (ROS) were also measured to elucidate the mechanism of the toxicity. Three types of TiO_2 NPs (35 nm and 1000 nm) with different surface coating ($\text{Al}(\text{OH})_3$ -coated-, $\text{Al}(\text{OH})_3/\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{COOH}$ -coated-, and plain- TiO_2 NPs) were examined. All TiO_2 NPs induced MN in both cells in a dose-dependent manner. Plain- TiO_2 NPs (35 nm) induced more MN, DNA-strand breaks and ROS than other two coated- TiO_2 NPs. Small TiO_2 NPs (35 nm, plain) were more genotoxic than large TiO_2 NPs (1000 nm, plain). The ROS production was closely correlated with the cellular uptake of the TiO_2 NPs. These results indicate that difference in a balance of the particle size and surface properties of TiO_2 NPs affects their cellular uptake, and causes different levels of genotoxicity.

1. 緒言

ナノサイズの微小粒子の毒性が懸念されている。これまで物質の毒性発現のメカニズムは、物質が生体高分子と相互作用する化学反応であったが、近年、生体分子との反応性のない無機物質であっても細胞毒性を持つことが報告され始めた。この毒性は物質の化学組成の他に、大きさと形状に依存する。一般の細胞の大きさは $30\text{ }\mu\text{m}$ 程度であり、 $1,000\text{ nm}$ 以下の大きさの固体は細胞の貪食作用によって細胞に取り込まれる。たとえば直径約 $10\sim 100\text{ nm}$ の銀粒子を細胞に曝露すると、銀粒子は容易に細胞に取り込まれてアポトーシスを起こす。この機構は短波長の可視光（またはUVA）との相互作用であることが明らかにされ、活性酸素分子種がDNA鎖を切断すると考えられている。また幅数 nm ・長さ約 100 nm の針状の多層カーボンナノチューブは暗所でも活性酸素分子種を介して細胞のDNA鎖を切断することが知られる。このメカニズムはアスベストの発癌メカニズムとの共通性で注目されている。

化粧品には多種類のナノサイズの物質が使用されている。たとえばカオリンは化粧品の基礎的成分、二酸化チタンや酸化亜鉛は紫外線防御剤として、マイカは光沢剤として使用される。さらにそれぞれが副成分によって種々の色彩を呈していたり、人工的に着色されたり、表面が親水加工や撥水加工されたりしている。これらのナノ粒子は化粧によ

って直接皮膚の細胞に接触し、可視光線および近紫外光の曝露を受ける。

このような背景のもと、表面処理の異なる酸化チタンナノ粒子 (TiO_2 NPs) を皮膚由来の2倍体培養角化細胞 (keratinocyte) および線維芽細胞 (fibroblast) に曝露し、遺伝毒性の有無を小核誘導試験によって調べた。またその毒性メカニズムを明らかにするためにDNA鎖切断と活性酸素誘導をそれぞれアルカリコメットアッセイと蛍光発光によって検出した。同様の方法で直径 35 nm と 1000 nm の TiO_2 NPs (表面無処理) の遺伝毒性を比較した。これらの結果、 TiO_2 NPs の遺伝毒性の強さは、その細胞へ取り込み量に比例することが明らかとなった。

2. 実験

2.1. 材料

TiO_2 NPs は、直径 35 nm 、結晶構造はルチル型。粒子表面処理は $\text{Al}(\text{OH})_3$ (親水処理)、 $\text{Al}(\text{OH})_3$ /ステアリン酸 (撥水処理)、無処理の3種類である。比較対象として表面無処理の直径 $1,000\text{ nm}$ TiO_2 NPs も用いた。細胞はヒト健常人皮膚由来2倍体の角化細胞 HEKn および線維芽細胞 FJ で、それぞれ Humedia-KG2 および RPMI1640 培地で、 37°C 、5%炭酸ガス条件で培養した。

2.2. 方法

細胞処理時の TiO_2 NPs の性質：培地に懸濁した TiO_2 NPs のゼータ電位を電気泳動光散乱法 (レーザードップラー法)、粒子径を動的光散乱法 (光子相関法) によって測定した。 TiO_2 を HEKn 細胞と FJ 細胞に処理し、6時間後の細胞の状態をレリーフコントラスト顕微鏡で観察した。小核の誘発： 10^5 個の細胞を 6 cm 培養皿に播種し、上記3種類の TiO_2 NPs を 0.1 、 1 、 10 、 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ の濃度で 6



Genotoxicity of inorganic nanomaterials used for cosmetics

Takashi Yagi

Laboratory of Molecular and Cellular Genetics, Department of Biology, Graduate School of Science, Osaka Prefecture University

時間処理した。細胞を42時間培養後、カルノア固定し、低張処理後スライドガラスに滴下、アクリジンオレンジ染色し、蛍光顕微鏡で小核を有する細胞の割合を求めた。

DNA鎖の切断：10⁵個の細胞を6cm培養皿に播種し、上記3種類のTiO₂ NPsを10および100μg/mLの濃度で1時間処理した。細胞を剥離し、アルカリアガロースに包埋後スライドガラスに接着してアルカリ電気泳動した。細胞をサイバークリーン染色後、蛍光顕微鏡でコメットテールの大きさ(tail DNA)を測った。

活性酸素(ROS)の誘導：10⁵個の細胞を6cm培養皿に播種し、3種類のTiO₂ NPsを10および100μg/mLの濃度で1時間処理した。剥離した細胞をH2DCFDAで処理し、発生する蛍光をイメージングサイトメーターで測った。

TiO₂ NPsの細胞内取込：10⁵個の細胞を6cm培養皿に播種し、3種類のTiO₂ NPsを10および100μg/mLの濃度で1時間処理した。剥離した細胞をフローサイトメーターにかけてforward scatterとside scatterを測定し、後者をTiO₂ NPsの細胞内取り込み量の指標とした。

3. 結 果

3.1. 細胞処理時のTiO₂ NPsの性質

無血清Medium中のTiO₂ NPs懸濁液のゼータ電位と粒

子径DLSを動的光散乱法(光子相関法)を用いて測定した。これらの結果を表1にまとめた。

TiO₂ NPs処理後のHEKn細胞とFJ細胞をレリーフコントラスト顕微鏡で観察し、その写真を図1に示す。TiO₂ NPsが発する青い蛍光によって、TiO₂ NPsは35nm-表面無処理>35 nm-Al(OH)₃表面処理>35 nm-Al(OH)₃/ステアリン酸表面処理>1000nm-表面無処理の順に、細胞に多く付着している(または取り込まれている)ことがわかった。

3.2. 小核の誘発

角化細胞と線維芽細胞において、無処理でも小核は低頻度で発生したが、TiO₂ NPsを処理すると濃度に依存してより高頻度に小核を誘発した。図2に誘発された小核の例を示す。表面無処理の35 nm TiO₂ NPsは35nm-表面無処理>35 nm-Al(OH)₃表面処理>35 nm-Al(OH)₃/ステアリン酸表面処理>1,000 nm-表面無処理の順に、より高頻度で小核を誘発した(図3)。

3.3. DNA鎖の切断(アルカリ性コメットアッセイ)

アルカリ性コメットアッセイの結果の一例を図4に示す。角化細胞においても線維芽細胞においても、表面処理の異

表1 TiO₂ NPsの物理的性質

表面修飾	表面特性	粒径 (nm)	DLS (nm)	ゼータ電位 (mV)
Al(OH) ₃	親水性	35	973.4±176.0	-15.88
Al(OH) ₃ /C ₁₇ H ₃₅ COOH	撥水性	35	572.6±124.2	-5.58
Plain	親水性	35	1291.3±218.9	-7.77
Plain	親水性	1000	2149.8±382.1	-11.06

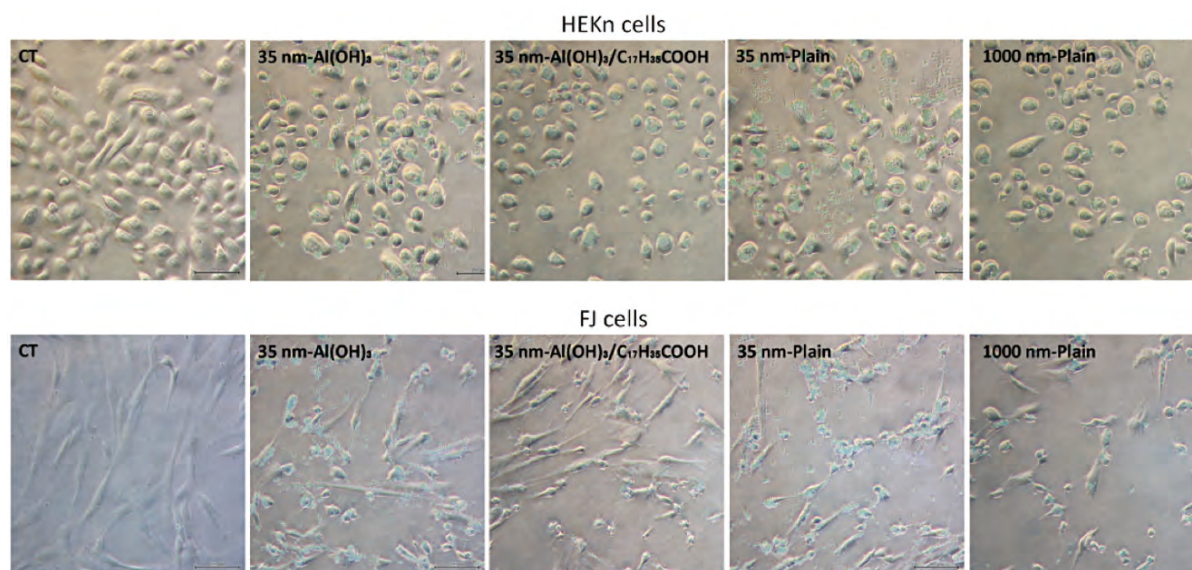


図1 TiO₂ NPs (100 μg/mL) 処理した HEKn、FJ 細胞のレリーフコントラスト顕微鏡画像。TiO₂ NPs が青い蛍光を発している。

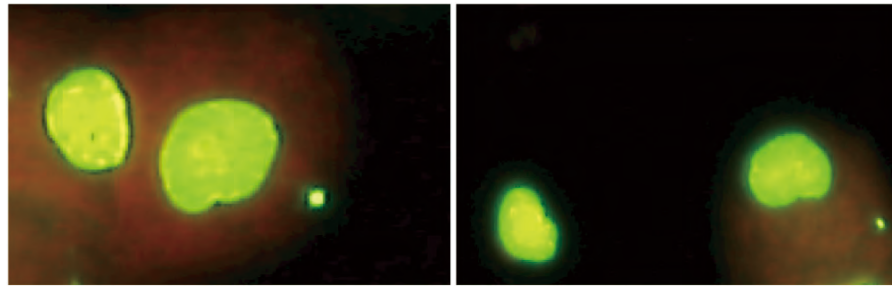


図2 TiO₂ NPsによって誘発された小核の例。細胞に TiO₂ NPs (35 nm-plain, 100 µg/mL) 処理した HEKn (左) と FJ (右) 細胞

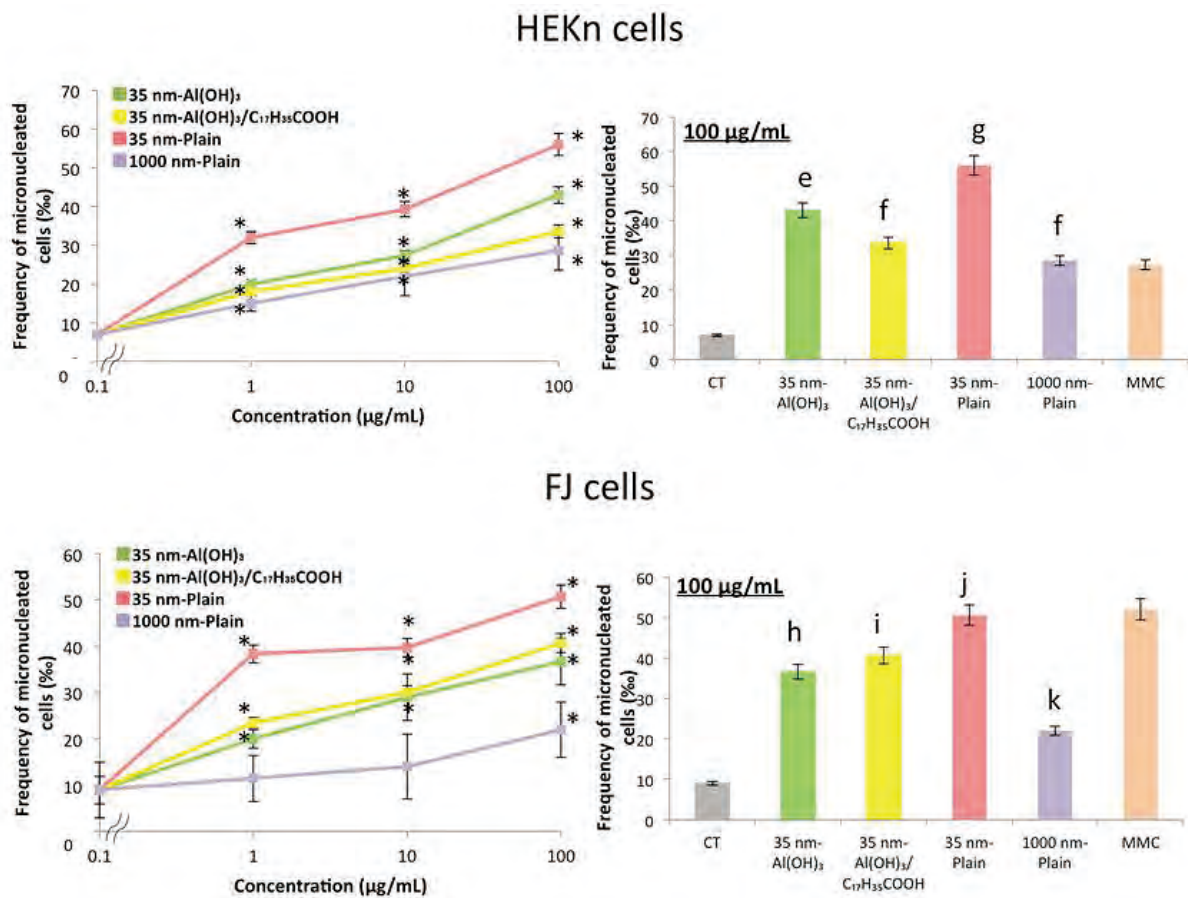


図3 角化細胞および線維芽細胞における、表面処理の異なる3種類のTiO₂ NPsによる小核誘発。3回の独立した観察の平均値 ±SD を表す。* 溶媒対照群と比較して有意差あり (p<0.01)、a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k 異文字間で有意差あり (p<0.01) (Tukey-Kramer 法)。縦軸は観察した細胞 1,000 個あたりの小核保有細胞出現頻度を示す。CT は溶媒コントロール。MMC はマイトマイシン C (陽性コントロール)。

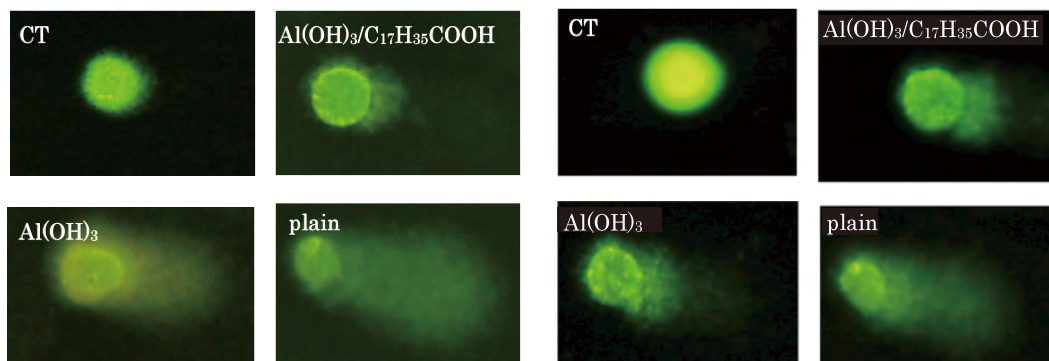


図4 アルカリ性コメットアッセイの例。左：角化細胞(HEKn)、右：線維芽細胞(FJ)

なる3種類のTiO₂ NPsは処理濃度に依存してより多くのDNA切断(tail DNA)を引き起こした。TiO₂ NPsは35 nm-表面無処理>35 nm-Al(OH)₃ 表面処理>35 nm-Al(OH)₃/ステアリン酸表面処理>1,000 nm-表面無処理の順に、より多くのDNA切断を起こした(図5)。

3. 4. 活性酸素 (ROS) の誘導

Tali イメージングサイトメーターを用いた細胞内ROS誘導量測定の一例を図6に示す。H2DCFDAがROSによって酸化されDCFDAとなり蛍光を発する。角化細胞および線維芽細胞において、3種類のTiO₂ NPsは10および

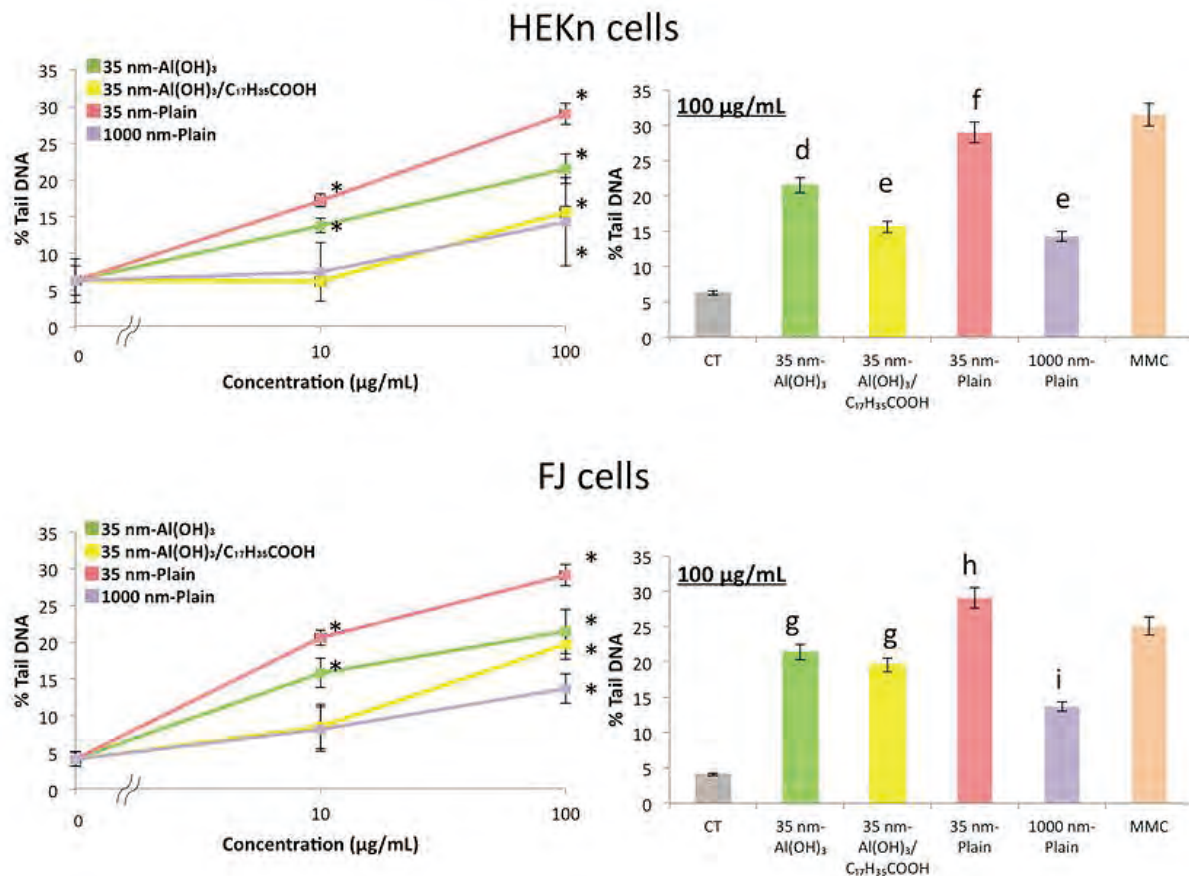


図5 角化細胞 (HEK293) および線維芽細胞 (FJ) における、アルカリ性コメットアッセイによって測定したTiO₂NPsによるDNA切断。独立した3回の% Tail DNAの平均値±SE。* 溶媒対照群と比較して有意差あり(p<0.01)、a, b, c, d, e, f, g, h, i 異文字間で有意差あり(p<0.01)。

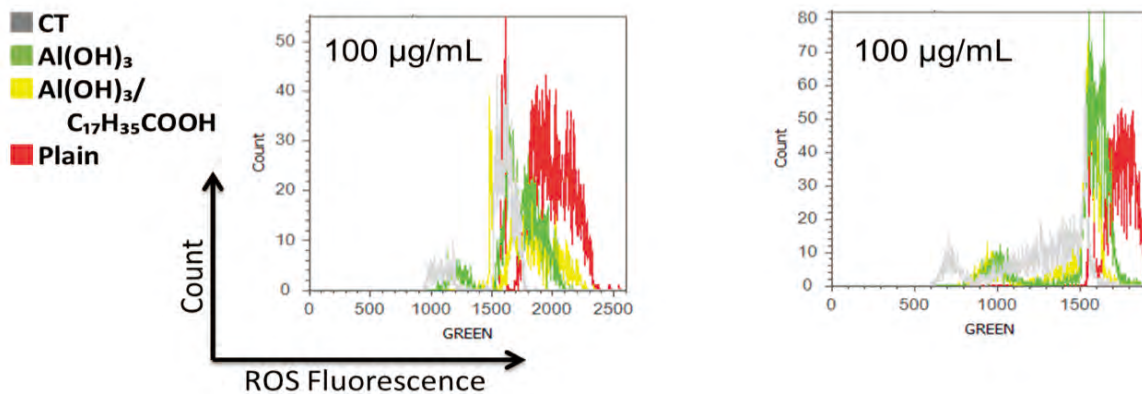


図6 角化細胞(HEK293) (左) および線維芽細胞(FJ) (右)におけるTiO₂ NPs100 μg/mL 処理後のROS 蛍光量

100 $\mu\text{g/mL}$ 処理によって ROS を誘導することがわかった。 TiO_2 NPs は 35 nm-表面無処理 > 35 nm- $\text{Al}(\text{OH})_3$ 表面処理 > 35 nm- $\text{Al}(\text{OH})_3$ /ステアリン酸表面処理 > 1,000 nm-表面無処理の順に多くの ROS を誘導した(図 7)。

3. 5. TiO_2 NPs の細胞内取込

TiO_2 NPs を 10 および 100 $\mu\text{g/mL}$ 、1 時間処理後、フローサイトメーターを用いて forward scatter と side scatter を測定した(図 8)。前者は細胞の大きさを反映する。後者は細胞内に取り込まれた TiO_2 NPs の量を反映する。全細胞数のうち赤の横線より上に分布している細胞の割合は、100 $\mu\text{g/mL}$ TiO_2 、35 nm- $\text{Al}(\text{OH})_3$ 表面処理、35 nm- $\text{Al}(\text{OH})_3$ /ステアリン酸表面処理、35 nm-表面無処理、1,000 nm-表面無処理、溶媒対照の順に、HEKn 細胞では 63.0 %、60.5 %、90.0 %、42.6 %、9.2 % であり、FJ 細胞では 86.1 %、33.6 %、91.0 %、31.2 %、0.3 % であった。

すなわち、角化細胞および線維芽細胞において、表面無処理の TiO_2 NPs が最も取り込まれ、次いで $\text{Al}(\text{OH})_3$ 処理が取り込まれやすく、 $\text{Al}(\text{OH})_3$ /ステアリン酸処理は取り込まれにくいことがわかった。表面無処理の 1,000 nm TiO_2 NPs が最も取り込まれにくいことがわかった。

4. 考 察

酸化チタンナノ粒子(TiO_2 NPs)は白色顔料や紫外線散乱剤として日焼け止め等の化粧品に使用されている。また、無機系・有機系の表面処理を施された TiO_2 NPs を含む化粧品もある。本研究では、表面処理の違いと遺伝毒性との関係を明らかにした。また同時に、表面無処理で直径が異なる 2 種類の TiO_2 NPs の遺伝毒性も比較した。化粧品が直接皮膚に接触することを考慮し、ヒト皮膚二倍体細胞(線維芽細胞および角化細胞)を用いて小核試験を行った。その結果、 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 表面処理、 $\text{Al}(\text{OH})_3$ /ステアリン酸表面処理、表面無処理の、どの TiO_2 NPs (粒子径が 35 nm) も濃度依存的に小核を誘導した。特に表面無処理の粒子による小核誘発頻度が最も高かった。またアルカリコメットアッセイにより、表面無処理の TiO_2 NPs が最も DNA 鎖切断を誘発することがわかった。さらに、ROS 産生能を、蛍光試薬を用いて調べたところ、表面無処理の TiO_2 NPs が最も ROS を誘導した。NPs の小核誘発能、DNA 切断量、ROS 産生量と細胞への取り込み量の関係を調べた結果、それらに正の相関が見られた(図 9)。

以上のことから、 TiO_2 NPs のヒト皮膚二倍体細胞に対

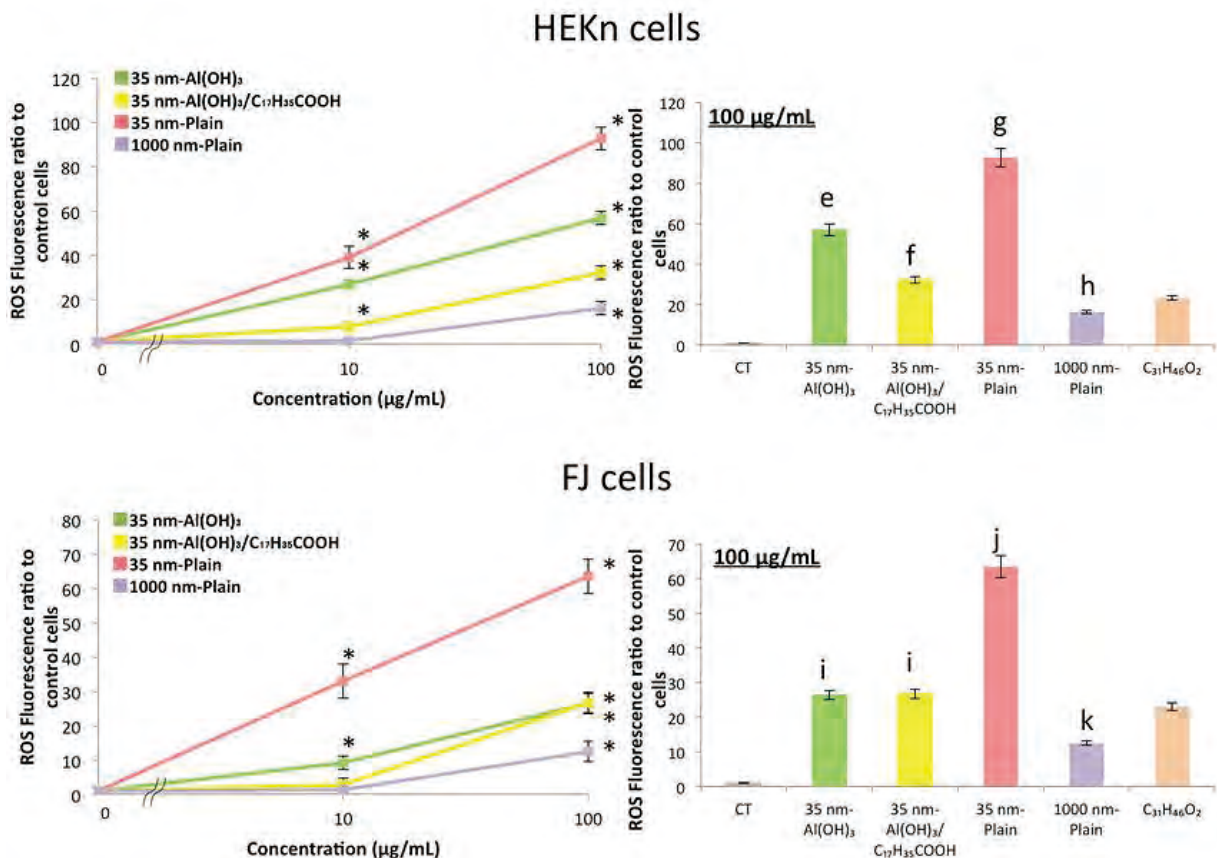


図 7 角化細胞(HEKn)および線維芽細胞(FJ)における、 TiO_2 NPs による細胞内 ROS 産生量。独立した 3 回の % Tail DNA の平均値 $\pm$ SE。* 溶媒対照群と比較して有意差あり ($p < 0.01$)、a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k 異文字間で有意差あり ($p < 0.01$)。縦軸はコントロールでの ROS 産生量を 1 としたときの相対値を示す。

する遺伝毒性の違いは、表面特性による細胞内への取り込まれやすさに起因することが示唆された。細胞は培養液中で負荷電していることから、TiO₂ NPsの細胞への取り込まれ易さは、粒子の親水性の他に、粒子表面電荷にも依存

すると考えられる。培養液 (pH 7) 中のTiO₂ NPs粒子のゼータ電位は親水性NPsで大きいことがわかり、TiO₂ NPsが凝集していることを示し、顕微鏡観察でもそのことがわかった。親水性で凝集性が高い35 nm NPsは多くのROS

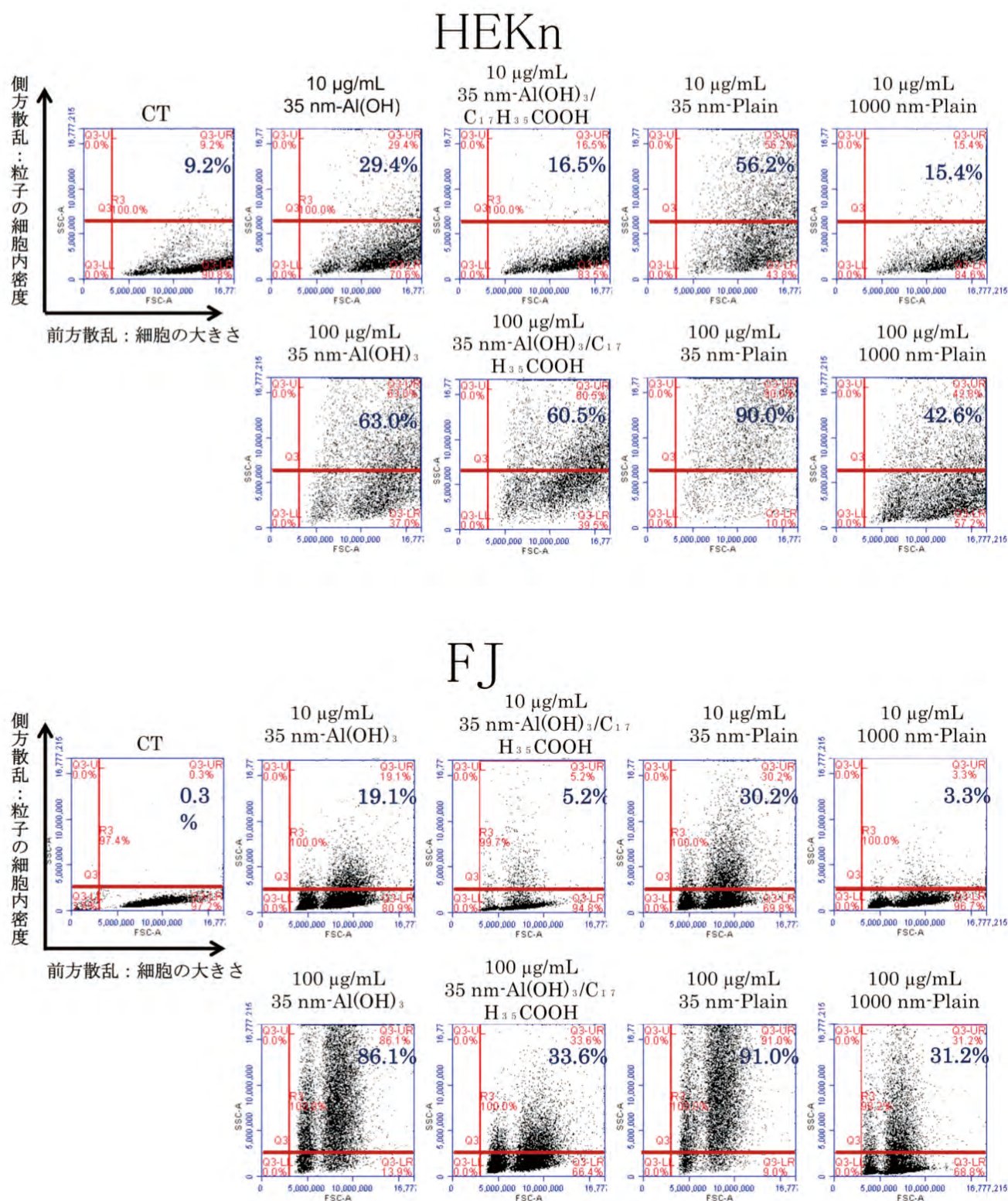


図8 フローサイトメーターによる TiO₂ NPs の細胞内取込量 (side scatter) の測定。上：角化細胞 (HEKn)、下：線維芽細胞 (FJ)

を産生し、DNA 損傷および小核を誘導していた。これは TiO₂ NPs が凝集することによって、細胞あたりの取り込み量が増え、細胞内 ROS 産生量とそれによる DNA 損傷量が増え、高頻度で小核を誘導すると説明できる。撥水性の NPs は凝集性が低く、細胞膜透過性も低いと考えられる。

1,000 nm NPs は 35 nm NPs と比べて、大きさの点で細胞膜透過性が低く、遺伝毒性が低いと考えられる。本研究結果から導かれる TiO₂ NPs の ROS を介した小核誘導のメカニズムを図 10 に示す。

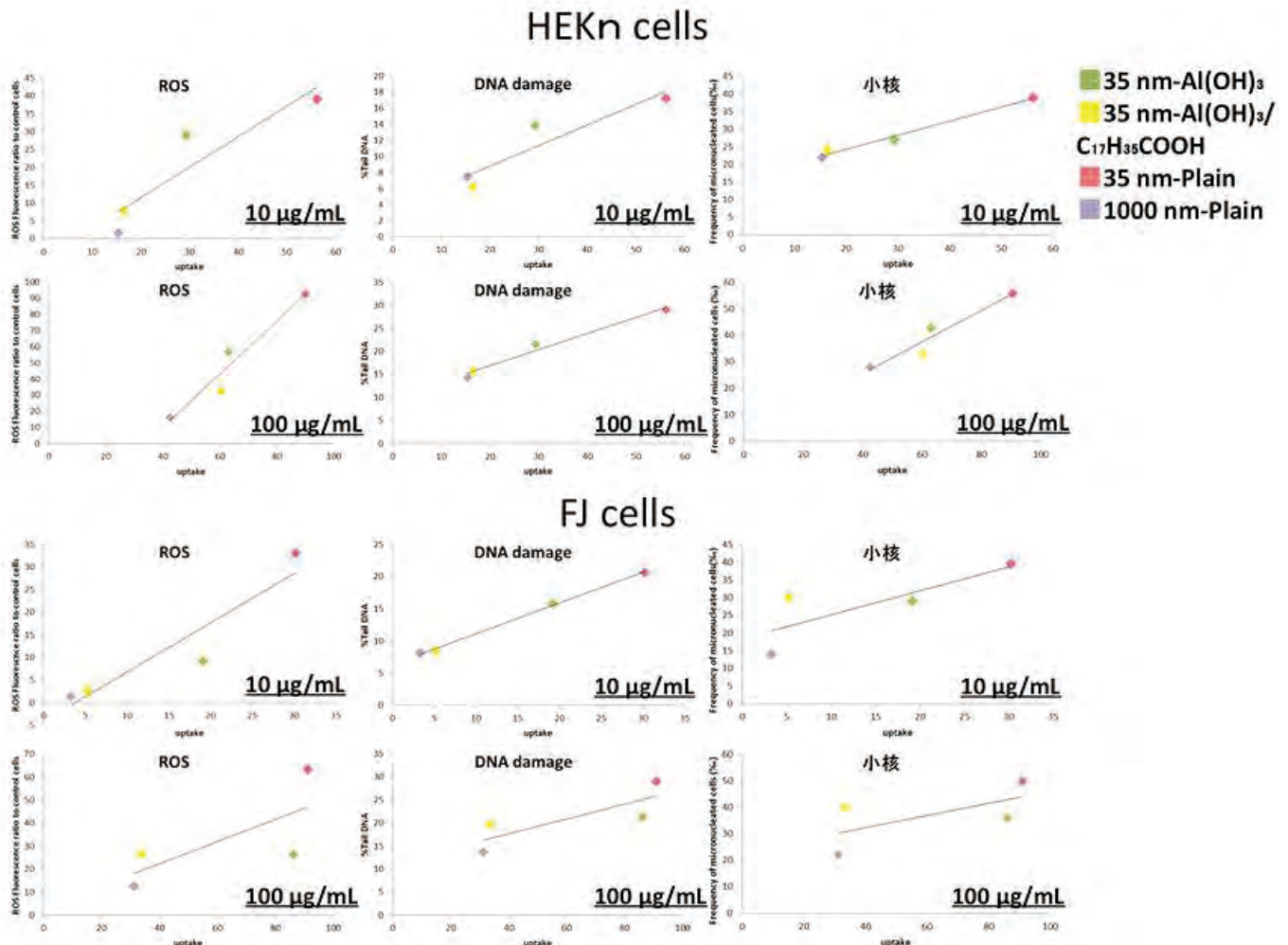


図9 TiO₂ NPs の ROS 産生量、DNA 損傷性、小核頻度と細胞への取り込み量との相関。上：角化細胞(HEK293)、下：線維芽細胞(FJ)

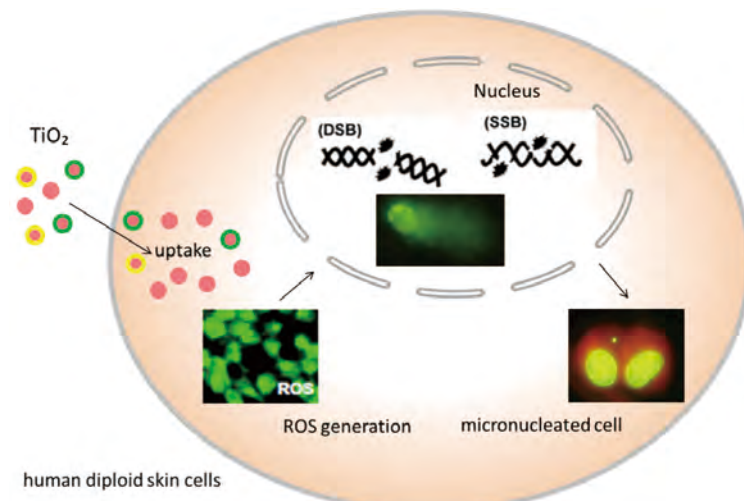


図10 TiO₂ NPs による小核誘導のメカニズム

サイトカインによる接触性皮膚炎誘導の制御に関する基盤研究

東京医科大学医学総合研究所免疫制御研究部門

善 本 隆 之

In contact hypersensitivity (CHS) induced by haptens such as 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB), CD8⁺ T cells producing IL-17 (Tc17) are important effector cells. Tc17 cells also produce IL-22, which promotes dermal inflammation, and IL-27 is an inhibitory cytokine for the differentiation to helper T-17 cells. The present study suggests that IL-22 produced by Tc17 cells is essential for the CHS reaction at the elicitation phase and that IL-27 inhibits it by suppressing the Tc17 differentiation.

1. 緒 言

接触過敏症 (CHS) は、化粧品や漆によるかぶれなどで炎症が起こるⅣ型アレルギー疾患で、原因となるアレルゲンは、化粧品や漆などに含まれる特定の化学物質である^{1,2)}。この比較的分子量の小さい化学物質 (ハプテン) は、体内に侵入し皮膚組織の蛋白質と結合し、この修飾蛋白質に対する免疫応答が誘導される。CHS のエフェクター T 細胞として以前からヘルパー CD4⁺ T (Th) 1 や細胞傷害性 CD8⁺ T (Tc) 1 細胞が考えられていたが、最近、ハプテンが Fluorescein isothiocyanate (FITC) の場合は IL-4 を産生する Th2 細胞が、2,4-Dinitrofluorobenzene (DNFB) の場合は IL-17 を産生する Tc17 細胞が重要なことが明らかにってきている³⁾。IL-22 は、炎症反応により CD4⁺/CD8⁺ T 細胞やナチュラルキラー (NK) /NKT 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞などの免疫細胞より産生され、表皮角化細胞などの非免疫細胞に作用し、抗菌ペプチドの発現誘導や角化細胞の増殖、表皮肥厚を引き起こすサイトカインで、Tc17 細胞からも産生されるが、CHS 反応における役割に関する報告は未だない⁴⁾。一方、IL-27 は、マクロファージや樹状細胞 (DC) から産生され、初期の Th1 分化誘導を促進するが、後期の Th1 分化や Th2 および Th17 分化は抑制するのみならず、IL-10 を産生する制御性 T 細胞である Tr1 細胞分化を増強し、炎症性サイトカイン産生も抑制する作用を有する多機能性サイトカインである⁵⁻⁷⁾。そこで、本研究では、IL-22 遺伝子欠損マウスと IL-27 を高発現しているトランスジェニック (Tg) マウスを用いて、CHS 反応における IL-22 の役割とさらに IL-27 の効果について検討を行った。

2. 実 験

2. 1. IL-22 欠損マウスにおける CHS 反応の解析

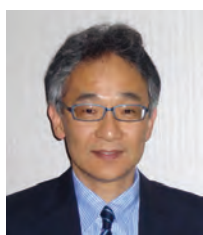
2 日前に背部の皮膚の毛剃りをした野生型および IL-22 欠損マウスの背部皮膚にハプテンとして DNFB を塗布し感作した。5 日後同じハプテンを片方の耳介に、溶媒のみを反対の耳介に塗布しその厚さを 24、48、72 時間と経時的に測定した。24 時間後には、それぞれの耳介を切除しホルマリン固定し、病理組織標本を作製しヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色し、炎症の程度を比較検討した。

2. 2. IL-22 欠損マウスにおける DC の所属リンパ節への遊走能の検討

IL-22 の作用機序を調べるため、まず、ハプテンとして蛍光を発するハプテンである Fluorescein isothiocyanate (FITC) で感作後、表皮の DC であるランゲルハンス細胞が抗原を捕らえ所属リンパ節へ遊走する能力を比較検討した。感作を直接耳で行うため、野生型および IL-22 欠損マウスの片方の耳介にハプテンを塗布し、反対の耳介に溶媒のみを塗布し、24 時間後、それぞれの耳介の所属リンパ節である顎下リンパ節を取り出した。次に、リンパ節細胞の懸濁液を調製し、MHC クラス II と DC に対する抗体で染色し、それぞれのダブルポジティブ細胞中の FITC 陽性細胞の割合を FACS を用いて解析した。

2. 3. 感作した IL-22 欠損マウスの所属リンパ節細胞の再刺激後のサイトカイン産生の検討

次に、IL-22 の Th 分化への影響を調べるため、野生型および IL-22 欠損マウスの耳介を DNFB で感作 5 日後、所属リンパ節である顎下リンパ節を取り出し、in vitro で同じ抗原性を有する水溶性化合物 2,4-dinitrobenzene sulfonate, sodium salt (DNBS) で再刺激し、24、48、72 時間後の培養上清を回収した。その上清中の IL-22、IL-17、IFN- γ のサイトカイン量を、それぞれの ELISA により定量した。



Studies on the regulation of contact hypersensitivity reaction by cytokines

Takayuki Yoshimoto

Department of Immunoregulation, Institute of Medical Science, Tokyo Medical University

2. 4. 惹起時に抗IL-22抗体投与の検討

IL-22の惹起相での役割を調べるために、ハプテンDNFBで感作した野生型マウスの耳介にDNFBを再塗布する際、抗IL-22抗体を投与し耳介厚を測定した。さらに、惹起24時間後それぞれの耳介をホルマリン固定し、病理組織標本を作製しHE染色を行い、炎症の程度を比較検討した。

2. 5. 惹起24時間後の耳介でのエフェクター分子の発現解析

ハプテンで惹起24時間後のエフェクター分子のmRNA発現を比較するため、野生型およびIL-22欠損マウスをハプテンDNFBで感作5日後、片方の耳介をDNFBで、反対の耳介を溶媒だけで塗布し惹起した24時間後に、耳介よりRNAを抽出しcDNAを調製し、リアルタイムPCRによりIL-22およびそのシグナル伝達の下流分子CXC3やCCL3、S100A7などの発現を比較検討した。

2. 6. IL-27TgマウスでのCHS反応の解析

次に、IL-27のCHS反応への影響を調べるため、我々が以前に作製した血清アミロイドP成分のプロモーターの下流にIL-27の2つのサブユニットEBI3とp28をリンカーを挟んで繋いで1本鎖IL-27を血中に多量に有しているトランスジェニック (Tg) マウスを用いた⁸⁾。野生型マウスおよびこのIL-27Tgマウスに、上述同様にDNFBをハプテンとして用い感作と惹起を行い、耳介厚を経時的に測定した。また、その際惹起24時間後の耳介をホルマリン固定し、病理組織学的解析も同様に行った。

2. 7. 感作したIL-27Tgマウスの所属リンパ節の再刺激後のサイトカイン産生の検討

IL-27の作用機序を調べるため、上述と同様に感作したマウスの所属リンパ節細胞からCD8⁺T細胞をAutoMACS Proを用いて精製し、in vitroで抗CD3抗体と抗CD28抗

体で刺激48時間後の培養上清中のIL-17やIL-22、IFN- γ 、IL-4などのサイトカイン産生量をELISAで測定した。

3. 結 果

3. 1. IL-22欠損マウスにおけるCHS反応が低下する

ハプテンとしてDNFBを用い、野生型マウスおよびIL-22欠損マウスのCHS反応への感受性の違いを検討したところ、IL-22欠損マウスでは耳介肥厚が約半分に減弱した(図1)。さらに、感作24時間後の病理組織解析より、野生型マウスに比べてIL-22欠損マウスではリンパ球に浸潤や表皮の肥厚、浮腫などの炎症症状が軽減していた。これより、IL-22欠損マウスではDNFBに対するCHS反応が低下することがわかった。

3. 2. IL-22欠損マウスにおけるDCの所属リンパ節への遊走能には影響ない

IL-22の作用機序を調べるために、まず耳皮膚にハプテンとしてFITCを感作後24時間後、抗原であるFITCを捕らえたDCの所属リンパ節への遊走能を比較すると、IL-22欠損マウスでも野生型マウスと同様にFITC⁺MHCクラスII⁺CD11c⁺細胞の所属リンパ節への遊走が見られた。これより、IL-22欠損マウスでは、DCの所属リンパ節への遊走能には影響がないことが示された。

3. 3. 感作したIL-22欠損マウスの所属リンパ節細胞の再刺激後のサイトカイン産生の検討

次に、DNFBで感作後所属リンパ節細胞をin vitroでDNBSで再刺激し、その培養上清中のサイトカイン産生量をELISAで測定した。IL-22欠損マウスでは、IL-22産生は全く検出されなかったが、IL-17産生やIFN- γ 産生には有意な差は見られなかった(図2)。これより、IL-22欠損マウスは、DNFBに対するT細胞分化には影響しないことが示された。

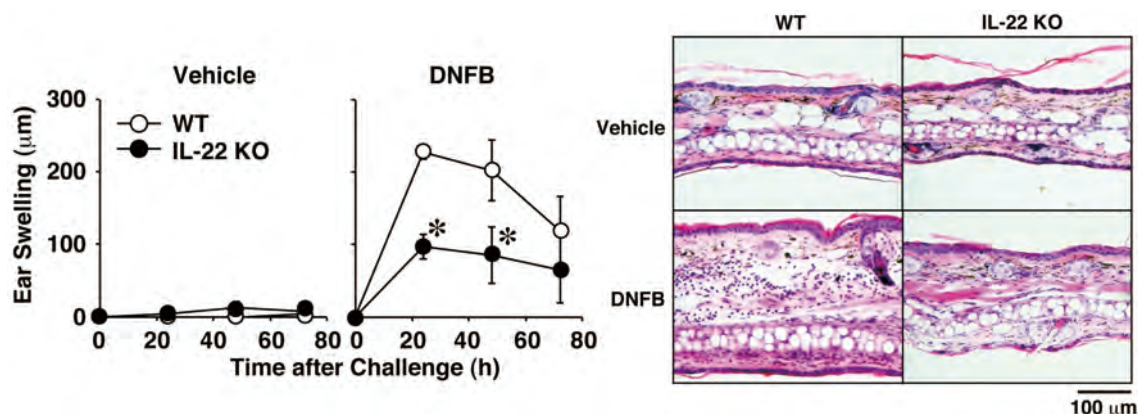


図1 IL-22欠損マウスでは、CHS反応で耳介厚と炎症反応が低下する

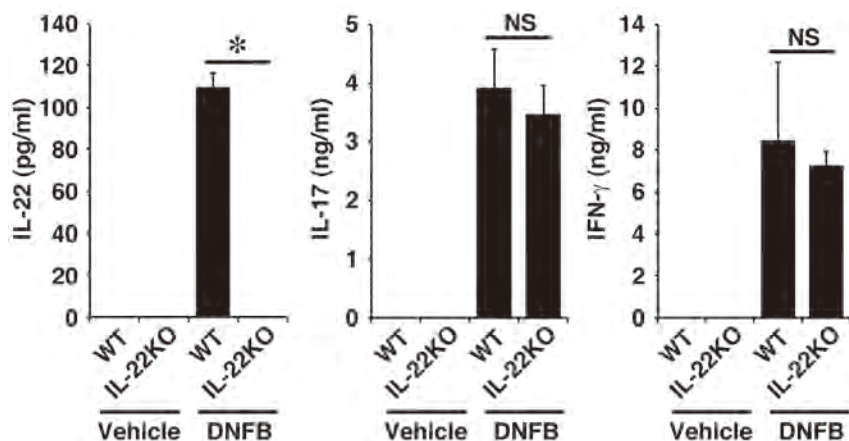


図2 IL-22欠損マウスでは、Th17やTh1分化には影響しない

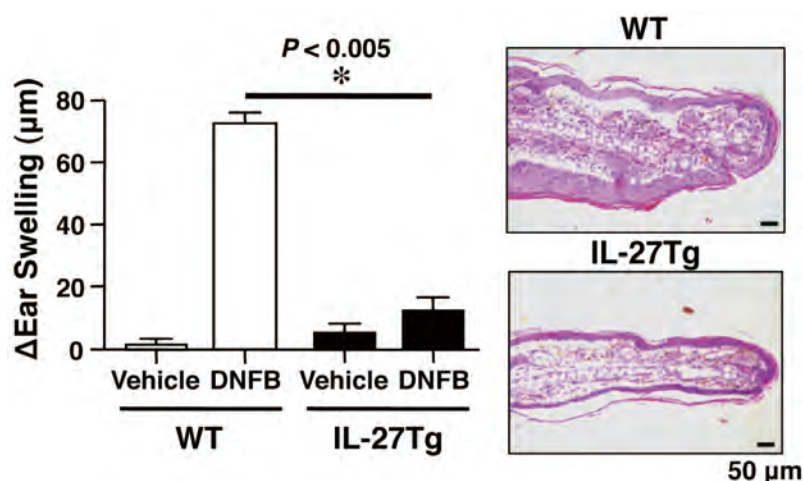


図3 IL-27Tgマウスでは、CHS反応で耳介厚と炎症反応が低下する

3. 4. 惹起時に抗IL-22抗体投与によるCHS反応が低下する

DNFBで感作した野生型マウスに惹起直前に抗IL-22抗体を投与し、DNFBで惹起すると、コントロール抗体を投与したマウスに比べ耳介厚が有意に半減し、さらに病理組織学的にもリンパ球の浸潤や表皮の肥厚、浮腫などが減弱していた。これより、IL-22は、CHS反応の惹起時に作用していることが明らかになった。

3. 5. 惹起24時間後の耳介でのエフェクター分子の発現解析

さらに、DNFBで感作・惹起24時間後の耳介皮膚でのエフェクター分子の発現を調べると、IL-22欠損マウスではIL-22発現は、ほぼ検出されず、IL-22シグナルの下流に位置するエフェクター分子であるCXCL3やCCL3などのケモカインや、抗菌ペプチドで好中球などの遊走にも関与するS100A7発現が低下傾向にあった。これより、IL-22欠損マウスでは、惹起時にIL-22の下流のシグナルが低下していることが示された。

3. 6. IL-27TgマウスでのCHS反応の低下

次に、IL-27Tgマウスを用いてIL-27によるCHS反応への効果を調べると、IL-27Tgマウスでは野生型マウスに比べ耳介の肥厚が顕著に減少し、病理組織学的解析よりリンパ球の浸潤や表皮の肥厚、浮腫などが減弱していた(図3)。これより、IL-27はCHS反応を抑制することが抑制することがわかった。

3. 7. 感作したIL-27Tgマウスの所属リンパ節の再刺激後のサイトカイン産生の検討

IL-27によるCHS反応の抑制の作用機序を調べるため、感作したIL-27Tgマウスの所属リンパ節細胞のCD8⁺T細胞を、in vitroで抗CD3抗体で刺激した上清中のサイトカイン産生をELISAで調べると、IFN-γ産生は野生型マウスと変わらなかったが、IL-17やIL-22産生は顕著に減少していた。IL-27は、Tc17分化を抑制しCHS反応を阻害することが示された。

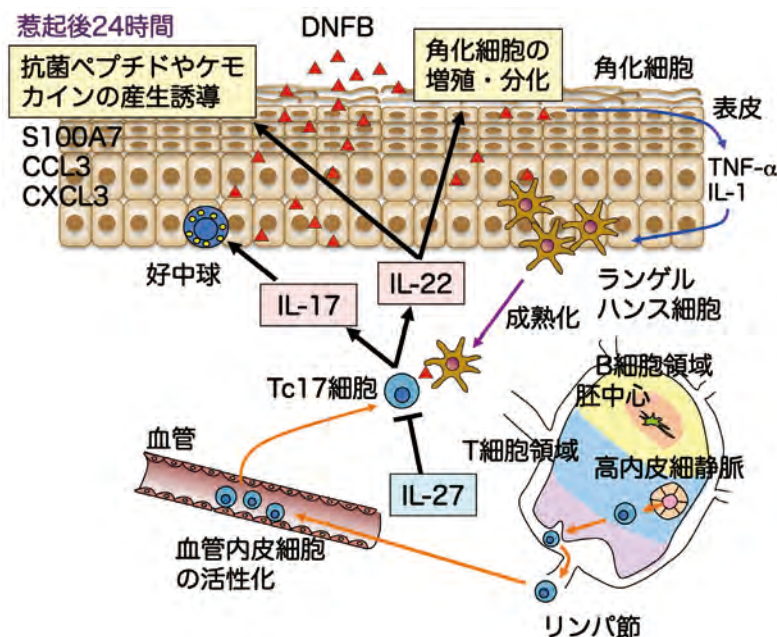


図4 IL-22は惹起相でのエフェクター機構に重要で、IL-27はTc17分化を阻害しCHS反応抑制する

4. 考 察

以上より、DNFBをハプテンとして用いたCHS反応において、IL-22は感作相であるTc/Th分化には強くは影響しないが、惹起相においてケモカインなどのエフェクター分子の発現を増強し、CHS反応の誘導に重要な役割を担っていることが明らかになった(図4)。さらに、IL-27は、このDNFBで誘導されるCHS反応において、Tc/Th17分化を阻害しIL-17やIL-22産生を低下することで抑制効果を発揮することが示された。IL-27による阻害効果の作用機序としては、IL-27がCD8⁺T細胞中のTc17分化に重要なROR γ tやROR α などの転写因子発現を低下させている可能性が考えられる。本研究より、接触過敏症において、IL-22発現や機能の阻害剤やその中和抗体、さらに、IL-27投与が治療効果を示す可能性が示唆された。

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支援頂きましたことに心より感謝感謝申し上げます。また、共同研究者として多大なるご協力を頂いた兵庫医科大学免疫学・医動物学講座教授・善本知広先生に深謝致します。

(引用文献)

- 1) Kaplan DH, Igyarto BZ, Gaspari AA. Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat Rev Immunol*, 12, 114-24, 2012.
- 2) Vocanson M, Hennino A, Rozieres A, Poyet G, Nicolas

JF. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy*, 64, 1699-714, 2009.

- 3) Kish DD, Li X, Fairchild RL. CD8 T cells producing IL-17 and IFN-gamma initiate the innate immune response required for responses to antigen skin challenge. *Journal of immunology*, 182, 5949-59, 2009.
- 4) Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J, Ouyang W. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature*, 445, 648-51, 2007.
- 5) Hall AO, Silver JS, Hunter CA. The Immunobiology of IL-27. *Adv Immunol*, 115, 1-44, 2012.
- 6) Hunter CA, Kastelein R. Interleukin-27: balancing protective and pathological immunity. *Immunity*, 37, 960-9, 2012.
- 7) Mizoguchi I, Higuchi K, Mitobe K, Tsunoda R, Mizoguchi J, Yoshimoto T. Interleukin-27: Regulation of immune responses and disease development by a pleiotropic cytokine with pro- and anti-inflammatory properties. In: Yoshimoto T, Yoshimoto T, eds. *Cytokine frontiers: Regulation of immune responses in health and disease*. Springer, 2013; 353-75.
- 8) Seita J, Asakawa M, Ooehara J, Takayanagi S, Morita Y, Watanabe N, Fujita K, Kudo M, Mizuguchi J, Ema H, Nakauchi H, Yoshimoto T. Interleukin-27 directly induces differentiation in hematopoietic stem cells. *Blood*, 111, 1903-12, 2008.

クラスリン集合因子 *CALM* 欠損マウスに見られる、毛や組織の色の薄さの解析 —細胞内物資輸送と体色との関連を探る—

奈良女子大学大学院人間文化研究科個体機能学講座

渡 邊 利 雄

CALM is not believed to be an essential component of clathrin-associated endocytosis of transferrin. However, we made *CALM*-deficient mouse and found that *CALM* does indeed appear to be involved in clathrin-mediated membrane traffic. We also noticed that *CALM*-deficient mouse showed pale coat color and started a trial to analyze the relationship between membrane traffic and coat color. As an initial step, we successfully established *CALM* knock-down melanoma cells for the analysis.

1. 緒 言

体の各組織は皮膚を含めて様々な色を持っている。メラニンに代表されるように色素は細胞内物流システムで輸送されることにより産生・分配される。この機構に不備が生じると、例えば皮膚におけるシミなどの色素沈着等の現象が起これと考えられる。ということはこの輸送を担う分子の動態を制御する方向での研究を行うことができれば、皮膚を健康に保つための新しい研究標的として役立つ可能性が高く、近年この物流システムに関与する因子と色素の輸送との関係が解析され始めている。代表的な成功例はメラノソーム輸送での低分子量Gタンパク質のRabの働きである¹⁾。しかし、細胞内の物流システムはRabのみで成り立つのではない。色素を輸送する小胞は小胞形成開始因子Arf群やArfの制御因子のGEF（GTP交換因子群で小胞形成の活性化因子）やGAP（Arf1が持つGTP加水分解活性の活性化因子群で小胞形成の不活性化因子）、被覆のクラスリンやその集合因子の*CALM*等々の様々な因子の関与があることは判明しているのであるが、これらと色素との関連の解析は遅々として進んでいない²⁻⁷⁾。

我々は、従来から培養細胞でのみ解析されてきたクラスリン集合因子の*CALM*を個体レベルで解析するために世界に先駆けてノックアウトマウスを作製し、これを用いた研究から、クラスリン集合因子*CALM*はEGF、トランスフェリン等のクラスリン依存性の小胞輸送に関して従来の報告とは真逆の働きをしていることが明らかになった。即ち、従来のドミナントネガティブ体（優性抑制型変異体）やノックダウンを用いた研究報告では*CALM*は関与しないと



図 1

言われていたが、ノックアウトでは*CALM*依存性が見られ、ノックアウトマウスはトランスフェリンによる鉄の取り込みの低下により重度の貧血となることを明らかにした^{8,9)}。さらに、大規模遺伝子変異解析から推定されていたが従来は因果関係が知られていなかった、*CALM*とアルツハイマー症との関係など、我々の作製したノックアウトマウスにより*CALM*の新しい知見が蓄積しつつある^{10,11)}。

このような研究を行う中で、我々はクラスリン集合因子*CALM*欠損マウスの体色が薄いことに気が付いた。図1の白い星印がホモ欠損マウスで、同腹の兄弟姉妹に比べて体色が薄い。その後、成長後の個体の解析から体色のみならず、肝臓や心臓等の臓器の色も薄いことを見出している。

本研究は、細胞内物流システムがどのように組織の色と関係しているのかを、クラスリン集合因子*CALM*欠損マウスで発見した毛や組織の色の薄さを解析することで明らかにしようと試みる、従来にない研究である。我々が作製した*CALM*の欠損マウスに見られた新しい知見を基に、従来知られていない*CALM*の欠損マウスでの毛や組織の色の薄さを手掛かりとして、現在までに一切の知見がないクラスリンを被覆として使う細胞内物流機構と毛や組織の色との関係を明らかにすることを目的とする。

2. 実 験

2. 1. *CALM*欠損マウスの色の薄さは何に由来するのか

明瞭な色素の薄さが観察されるのは、脾臓、骨髄、肝臓、心臓、皮膚、毛であり、そのほかの組織では色の薄さは明瞭ではない。そこで、これらの組織で組織の色を決定する分子の動態にどのような変化が生じているのかを*CALM*



An analysis on pale coat color found in *CALM*-deficient mice – A trial study on the relationship between membrane traffic and coat color –

Toshio Watanabe

Department of Biological Science, Graduate School of Humanities and Sciences, Nara Women's University

欠損マウスで検討し、標的として扱う分子を決定する。グロビンやミオグロビンなどの色素タンパク質が最初の解析対象になると予想している。このような計画を基に実験を開始した。

2. 2. *CALM* 欠損培養細胞株の樹立と解析

既に作成している *CALM* 遺伝子破壊マウスの胎児 (14 日胚) から初代培養を行い、胎児の繊維芽細胞 (MEF 細胞) を得、SV40 ウイルスの不死化遺伝子の T 抗原遺伝子を導入し、*CALM* 欠損および野生型の株細胞を樹立した。樹立した細胞株を用いて、初めに関与が推定される輸送機構の解析を、蛍光標識したトランスフェリンや EGF 等、クラスリン依存性のエンドサイトーシスで取り込まれる分子を取り込ませた後に、共焦点蛍光顕微鏡を用いて細胞内への取り込みに違いが無いかを解析する。マウスの解析から予想される色素に関して、その輸送に *CALM* の有無が効果を与えるか検討する。同様な解析を、メラニン合成細胞として知られる *CALM* 遺伝子破壊メラノサイトに関して行う。

2. 3. *CALM* ノックダウンメラニン合成細胞株の樹立

さて、申請研究の提案を行った際にも *CALM* 欠損マウスは離乳期以降にごくわずかに存在するだけで、十分な解析を行うことができないことが問題と考えられた。また、生体のメラノサイトの単離培養とメラニン合成の測定はかなりの熟練を要することから、最初はマウスと平行して培養細胞を用いたモデル系で実験も行うこととした。そこで、扱いやすさの点からメラニンを合成しているメラノーマ細胞の B16C2M 細胞をモデル系として、*CALM* のノックダウンによるメラニン合成への効果を調べるためにノックダウン細胞株の樹立を試み、得た細胞株を用いてメラニン合成と *CALM* との関連を解析した。

2. 4. 新しい個体レベルでの解析系を目指して

CALM 欠損マウスは交配を重ねることにより、生存率の低下が著しいことが判明した。特に C57B/6 の遺伝背景では全く生まれてこないことを新たに見出した。今後の個体レベルでの詳しい解析を目指して、新しくコンディショナルノックアウトマウスの作製を検討するために標的部位の解析を研究に加えることとした。加えて、発生後期の胚の検討を行い、*CALM* と体色との関連を探る手がかりを得ることを試みた。

3. 結 果

3. 1. *CALM* 欠損マウスの色の薄さは何に由来するのか

マウス系統の樹立時には、離乳期以降に生存するホモ欠損マウスの数が少ないものの誕生後 1 週間ほどの体色が判

断できる時点までは相当数のホモ欠損体を得ることができた。詳しい解析を安定して行うためにこの申請研究に向けて標準系統の C57BL/6 に戻し交配を行ったところ、誕生後にホモ欠損体が全く出現しなくなってしまった。また姉妹交配で維持していたマウスでも同様の現象が観察された。このことは、*CALM* 欠損の効果に影響を及ぼすマウスの遺伝子 (いわゆるモディファイヤー) の存在を示唆している。

マウス作製に使用した ES 細胞は C57BL/6 と CBA マウスの雑種一代目に由来することから、現在 CBA マウスへの戻し交配を行っており、誕生するマウスの取得を目指している。なお、我々とは独立に *CALM* 欠損マウスを作製したハーバード大のグループも *CALM* ホモ欠損マウスは生まれないとしていることから、我々が遭遇した事態は「ある種のマウスの遺伝背景」によるものだと考えるのは妥当だと判断できる。

3. 2. *CALM* 欠損培養細胞株の樹立と解析

既に作成している *CALM* 遺伝子破壊マウスの胎児 (14 日胚) から初代培養を行い、胎児の繊維芽細胞 (MEF 細胞) を得、SV40 ウイルスの不死化遺伝子の T 抗原遺伝子を導入し、*CALM* 欠損および野生型の株細胞を樹立した。樹立した細胞株を用いて、初めに関与が推定される輸送機構の解析を、蛍光標識したトランスフェリンや EGF 等、クラスリン依存性のエンドサイトーシスで取り込まれる分子を取り込ませた後に、共焦点蛍光顕微鏡を用いて細胞内への取り込みに違いが無いかを解析した。その結果、参考文献 1 に一部報告したように、従来の定説とは異なり、*CALM* がトランスフェリンの取り込みに重要であることを明らかにした。一方、同じクラスリン依存性で取り込まれる増殖因子の EGF の取り込みには影響が見られないことを発見した。現在、EGF に関しては細胞内への取り込み後の挙動に異常がないかを解析している。

3. 3. *CALM* ノックダウン細胞の樹立

CALM ノックアウト MEF 細胞では、増殖に問題がないことを確認していたので、ノックダウンは sh-RNA 発現ベクター HuSH (ORIGENE) を用いて、「*CALM* がノックダウンされた B16C2M メラノーマ細胞株」を樹立することとした。

CALM のノックダウンを目指して、sh-*CALM*-1 ~ 4 の以下の配列を用いた。

sh-*CALM*-1: GCCAGAGCCTGACGGACCGAATCACCGCG
sh-*CALM*-2: GAGCAAGTTGGAATTGACAGAGGAGATAT
sh-*CALM*-3: GAATGATGTAAGTTGGAGTCAACCAGGTG
sh-*CALM*-4: ATAATGACTGCACCAGCCATCGACATATT

コントロールとして、空のベクターとランダムな配列の SC を導入した。

図2に示すように、合計61個のクローンを得た。

最初にRT-PCRにて*CALM*のノックダウンの程度を検討した。図2に示すようにsh-CALM-2, 3で良好なノックダウンが見られたが、sh-CALM-1, 4ではあまり効果が見られなかった。これは別の細胞系のBAF3細胞を用いた場合も同様の結果を得ていることから（未発表）、*CALM*のノックダウンにはsh-CALM-2, 3の配列が有効であると考えられる。

良好なノックダウン効果が見られた7つのクローンに関して、再度確認実験をRT-PCRにて行った。結果を図3Aに示す。

うち6クローンに関してウエスタン法で*CALM*タンパク質の発現を検討した。図3Bに示すように、*CALM*タン

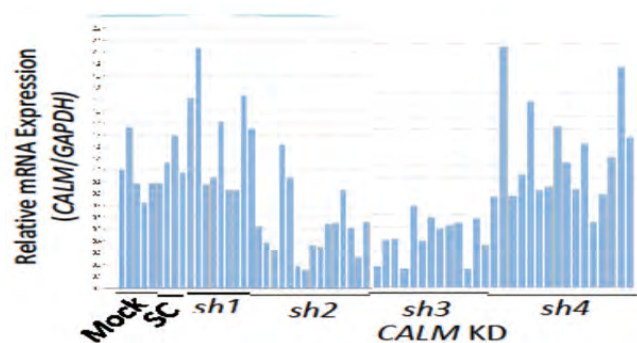


図2

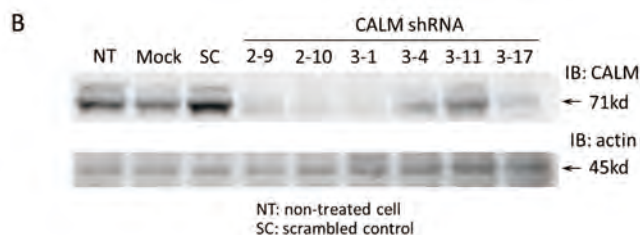
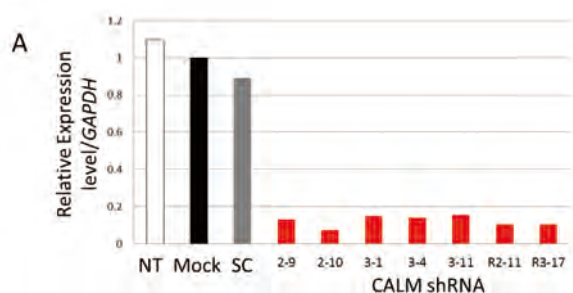


図3

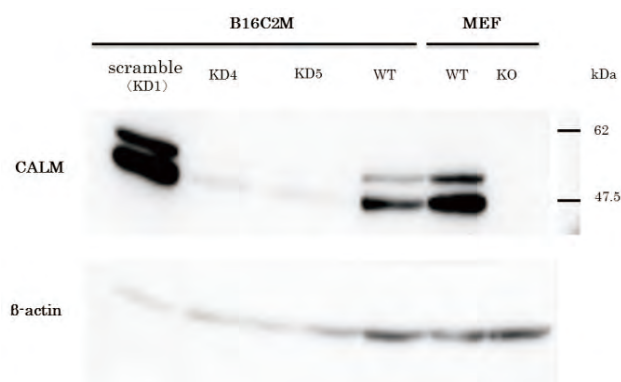


図4

パク質発現の低下が著しいクローン 2-9, 2-10, 3-1 と低下が見られる 3-17, 3-4, あまり低下が見られない 3-11 のクローンが得られた。

これらのクローンを実験に用いることとし、液体窒素中に保存した。

3. 4. *CALM*タンパク質の低下とメラニン合成との関連性の検討

スクランブル コントロールを導入した株、sh-CALM-2、sh-CALM-3を導入した株、親株、*CALM*の発現検討の対照として我々が作製した*CALM* KO MEF細胞と*CALM* WT MEF細胞を用いた解析を行った。

まず、選んだ細胞株の*CALM*発現をウエスタン法で確認した。

図4に示すように、向かって左側のB16C2M細胞のKD1はスクランブル コントロールを導入した株、KD4はsh-CALM-2を導入した株、KD5はsh-CALM-3を導入した株、WTは親株B16C2Mである。ウエスタン法のコントロールとして用いたMEF細胞では、WTは*CALM* WT MEF細胞、KOは*CALM* KO MEF細胞である。KOでバンドが検出されないことから抗体の特異性が確認できる。

sh-CALM-2を導入した株 (KD4) とsh-CALM-3を導入した株 (KD5) では*CALM*タンパク質の発現が低下していた。一方で、スクランブル コントロールを導入した株と親株では*CALM*タンパク質の発現が見られた。検出している

バンドが*CALM* (2本のバンド) であることは、*CALM* WT MEFでバンドが検出され、*CALM* KO MEFで検出されないことから判断できる。また β -アクチンのバンドから、KD4, KD5の*CALM*のバンドがKD1やWTに対しての薄いことが確認できる。

次に、細胞を沈殿させ沈殿の色を比較した。

図5に示したものが結果である。1はスクランブルコントロールを導入した株、2はsh-*CALM*-2を導入した株、3はsh-*CALM*-3を導入した株である。

この結果と先の*CALM*タンパク質の発現解析とからは、*CALM*の発現が低下しているB16細胞では細胞の色が親株の黒から白っぽくなっていることが分かる。

メラニン合成細胞は黒色を呈することから、*CALM*の発現量とメラニン合成とに何らかの関連があることが推察できる。

さらに、この色の変化がメラニン合成の低下によるものかを、吸光度によるメラニン量の測定を行い検討した(図6)。1はスクランブルコントロールを導入した株、2はsh-*CALM*-2を導入した株、3はsh-*CALM*-3を導入した株である。傾向として、*CALM*の発現が低下している細胞ではメラニンの含量が低下しているように見える。

3.5. 新しい個体レベルでの解析系を目指して

申請者が作製したKOマウスでは、発生初期から全身で*CALM*が欠損している状態での解析しかできなかったため、前述のように注目しているメラノソームでの解析が困難になっている。参考文献2の白血病との関連や、参考文献4のアルツハイマー症との関連の解析を行う際にも、同様の「解析前に個体が死亡してしまう」という問題を抱えている。より詳しい解析には発生が終了したのちに注目する組織や細胞特異的に*CALM*を欠損させて解析する必要がある。そこで、*CALM*欠損の効果を解析するために新しくcKOマウスを作製するために設計を行っている。参考

文献2で明らかにした*CALM*のNES(核排出)配列の欠損による効果の検討を、樹立した*CALM*欠損細胞を用いて変異体でのレスキュー実験を開始している。

現在までに、2種類知られている*CALM*のアイソフォームのいずれでもトランスフェリンの取り込みが回復することを確認している。現在NES変異体の作製を試みようとしている。

尚、現在保有している*CALM*欠損マウスは誕生直後に死亡すると推察される。そこで、誕生前の発生最終期の胚での解析ができないかを検討している。

E18.5日胚を解析したところ、図7に示すように*CALM*欠損胚では目の黒味が低下している(1, 2, 3の番号を付したホモ欠損体の目は、黒い色が薄くなっている)ことを見出している。今後は、E19.5日胚と誕生直後の胚(P0)を解析して、見出した目の色の薄さを手掛かりに、マウス個体を用いた*CALM*と色との関係を解析できないかを検討したい。

4. 考 察

これまでの研究期間に、予想したもの、予想しなかったものを含めて以下に述べる成果を得ている。

- (1) *CALM*遺伝子の機能を修飾する遺伝子(モディファイアー)の存在を示唆する結果を得た。
- (2) 戻し交配により(1)の仮説の検証を行う準備ができた。
- (3) *CALM*欠損培養細胞株としてMEF細胞株を樹立し、いくつかの新しい知見を得た。
- (4) メラニン合成への*CALM*の効果の有無を調べるツールとして、*CALM*がノックダウンされたB16C2Mメラノーマ細胞株の樹立に成功した。さらに*CALM*タンパク質量の低下とメラニン合成量の低下とに相関があることを見出した。
- (5) メラノサイトレベル、個体レベルでの解析を可能にすると期待される*CALM*のコンディショナルノックアウト

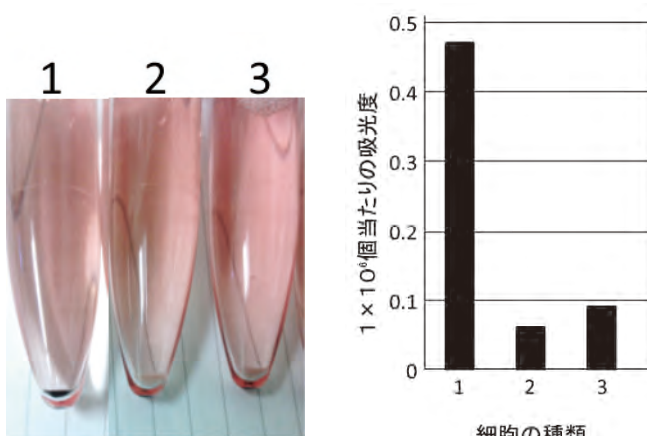


図5

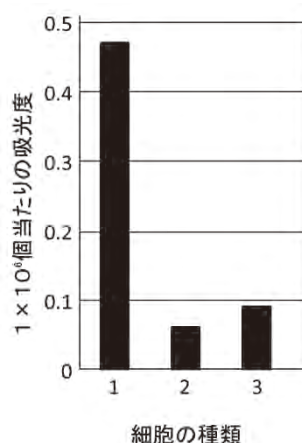


図6

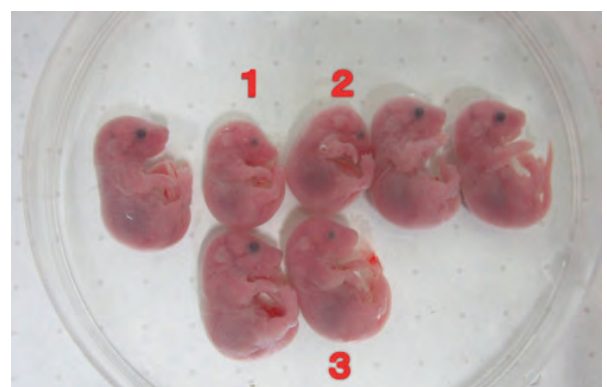


図7

トマウス作製に向けた一步を踏み出した。

(6) *CALM*欠損E18.5日胚の解析から、*CALM*欠損胚では目の色が薄いことを見出し、マウスを用いた解析の可能性を見出した。

*CALM*欠損マウスが生まれなくなったのは予想外であったが、新しい修飾遺伝子の存在が明らかになり、今後の解析への期待が持てた点は良かった。このために、当初の計画を若干変更してメラノーマ細胞を用いて*CALM*がノックダウンされたB16C2Mメラノーマ細胞株の樹立に成功し、*CALM*タンパク質量の低下とメラニン合成量の低下とに相関があることを見出したことは、今後の解析にとり大きな進捗であった。また予想外の障害を乗り越えるべく、将来的に重要になるとされるコンディショナルノックアウトマウス作製へに向けた一步を踏み出せたことは、研究の進展にとって良かったと思いたい。加えて、*CALM*欠損E18.5日胚の解析から、*CALM*欠損胚では目の色が薄いことを見出し、マウスを用いた解析の可能性を見出した。

今後の課題としては、見出した「*CALM*の発現量が低下するとメラニン合成が低下する」という相関関係は因果関係となり得るのかと言う点がまず解決すべき点である。このために、KD細胞への*CALM*遺伝子導入による*CALM*発現復帰体でのメラニン合成の回復の有無を検討する予定である。さらに、*CALM*低下によるメラニン合成低下の分子メカニズムを探るために、まずはメラニン合成系酵素の動態を探ることを計画している。加えて、*CALM*欠損E18.5日胚の解析から、*CALM*欠損胚では目の色が薄いことを手掛かりに解析が行えるかの検討を計画している。

謝 辞

本財団より受けた助成金が研究の一部を担った参考文献10, 11では、Cosmetology Research Foundationよりのサポートがあったことを明記した。

(参考文献)

- 1) M. Ishida, N. Ohbayashi, Y. Maruta, Y. Ebata Y, Fukuda M. (2012) Functional involvement of Rab1A in microtubule-dependent anterograde melanosome transport in melanocytes. *J Cell Sci.* 125, 5177-87. doi: 10.1242/jcs.109314.
- 2) J.G. Donaldson, C.L. Jackson. (2011) ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 362-375.
- 3) E. Mizuno-Yamasaki, F. Rivera-Molina, P. Novick. (2012) GTPase networks in membrane traffic, *Annu. Rev. Biochem.* 81, 637-659.
- 4) Militello R, Colombo MI. (2013) Small GTPases as regulators of cell division. *Commun Integr Biol.* 6, e25460. doi: 10.4161/cib.25460.
- 5) Seixas E, Barros M, Seabra MC, Barral DC. (2013) Rab and Arf proteins in genetic diseases. *Traffic.* 14, 871-85. doi: 10.1111/tra.12072.
- 6) Mizuno-Yamasaki E, Rivera-Molina F, Novick P. (2012) GTPase networks in membrane traffic. *Annu Rev Biochem.* 81, 637-59. doi: 10.1146/annurev-biochem-052810-093700.
- 7) Donaldson JG, Jackson CL. (2011) ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12, 362-75. doi: 10.1038/nrm3117.
- 8) M. Suzuki, H. Tanaka, A. Tanimura, K. Tanabe, N. Oe, S. Rai, S. Kon, M. Fukumoto, K. Takei, T. Abe, I. Matsumura, Y. Kanakura, T. Watanabe. (2012) The mouse clathrin assembly protein PICALM is required for erythroid maturation and transferrin internalization. *PLoS ONE*, 7(2): e31854. doi:10.1371/journal.pone.0031854
- 9) 鈴木麻衣、渡邊利雄 (2012) クラスリン集合因子 *CALM* はトランスフェリンの取り込みに必要で、欠損は貧血を引き起こす。－培養細胞研究での定説を覆す－細胞工学 31 巻 7 月号 808-809. HOT PRESS
- 10) M. Suzuki, K. Yamagata, M. Shino, Y. Aikawa, K. Akashi, T. Watanabe, I. Kitabayashi. (2014) The nuclear export signal (NES) within *CALM* is necessary for *CALM*-AF10-induced leukemia. *Cancer Science.* 105, 315-323.
- 11) K. Kanatsu, Y. Morohashi, M. Suzuki, T. Watanabe, T. Tomita, T. Iwatsubo. (2014) Decreased *CALM* expression modulates A β 42 production through clathrin-mediated endocytosis of γ -secretase. *Nature Communication* DOI: 10.1038/ncomms4386.

Ⅲ. 精神、文化に関する分野

グローバル時代のハラールと化粧品に対するモロッコの人々の意識と行動 —日常生活における宗教規範と美の実践—

松蔭大学観光メディア文化学部

川添 裕子

The purpose of this study is to contribute to the socio-cultural knowledge of cosmetology by exploring the *halal*-certified system and Muslim consumers' perceptions regarding notions of *halal* and beauty practices in Morocco. The term *halal* means "lawful" or "allowed" according to Islamic Law. The global *halal* market has gained a lot of attention because of the universal rise in the number of Muslims. If a product is marked "*halal*," this means that the materials, products, and process facilities of the products have been subjected to approved certification systems and that they provide consumers with a guarantee that no forbidden components are present. All Muslims and non-Muslims who value traceability and high-quality products are expected to be the new consumers of these products. The data for this study was derived mainly from ethnographic fieldwork research in 5 Moroccan cities in March 2014, including discussion with about 130 students, a preliminary questionnaire administered to 116 students, and face-to-face interviews with several persons involved in the certification system, as well as scholars.

The Moroccan government established a *halal*-certified system for foods in July of 2012. *Halal*-certified cosmetics and personal care products had no approval system in place at first, but three months after my fieldwork, it was instituted. Producers and makers who desire a *halal* logo have to contact IMANOR (Institut Marocain de Normalisation) for an inspection. It can help the procedures in Morocco if the cosmetics in question already have ISO 22716 (Cosmetics Good Manufacturing Practices) certification or have been approved by such certification institutions as JAKIM (Department of Islamic Development Malaysia). The government has approved the *halal* industry as being economically profitable, but most Moroccan consumers do not know that Morocco has entered this new industry. They believe that "every Moroccan product is *halal*," so they are not worried about *halal* as long as they are in Morocco. Besides, people care about whether or not food is *halal* rather than cosmetics and personal care products, so they use homemade, co-op, and big name brand cosmetics. There are also some people who consider cosmetics "*haram* (forbidden acts according to Islamic Law)".

Thus, the reaction toward *halal*-certified cosmetics is split. Some people regard selling them as an opportunity for economic growth or as a chance to start a business. Other people regard *halal*-certified cosmetics as excessive consumerism, believing them to be a capitalistic exploitation of religious norms. Companies that emphasize social responsibility can work on this point. An association of women in argan oil producing areas, for example, has attempted to raise awareness about sustainable development by promoting such concepts as environmental protection, literacy education, and so on. Now, more than 200 associations display an awareness of natural resources in their manufacturing processes. Likewise, promoting *halal*-certified cosmetics and personal care products can be promoted as a form of social responsibility as well.

Halal business can provide an opportunity to deepen mutual understanding between Muslims and non-Muslims, on one hand, while running the risk of emphasizing the differences between the two, on the other. At the same time, the gap between the rich and poor is inherent in it. Nonetheless, *halal*-certified cosmetics and personal care products are in demand as a mechanism that ties religious ethics to business ethics even more strongly than organic products and *halal*-certified food.

1. 緒言

イスラーム圏の経済成長とムスリム人口増加を背景に、「ハラール (*halal*)」認証商品が注目されている¹⁾。ハラールとは、イスラーム法で合法的な、許されたものという意味である。グローバル経済を背景に成立したハラール市場で流通する商品は、材料、加工法、包装、保存、輸送などの全行程がイスラーム法に即していると、ハラール認証機関から保証されたものである。このハラール認証機関は世界に130以上ある(2014年3月)。国内に複数の認証機関

が存在することも珍しくなく、「ISO (国際標準化機構)」のような国際規格はない。このように複雑な面もあるが、ムスリム消費者だけでなくトレーサビリティや高品質を求める非ムスリム消費者も取り込めるとあって、食品を中心に様々な分野で新たな市場の形成が期待されている。化粧品・パーソナルケア商品についても東南アジアを中心にハラール認証を受けたものが販売されており、コスメトロジーとして関連知識と現状を把握しておく必要がある。

そこで本研究は、イスラーム圏のモロッコ王国を事例に、日常のハラール意識、認証制度としてのハラール、化粧品実践と化粧品原料、ハラール認証の化粧品・パーソナル商品に対する反応について検討した。

2. 調査・実験

2.1. 調査対象者

主な調査対象者は、学生(大学、外国語学校)、ハラール認証制度関係者(モロッコ標準化機構²⁾、厚生省医薬局³⁾、



Consumers' Perceptions Regarding *Halal* and Cosmetics: The *Halal*-Certified System in Morocco

Hiroko Kawazoe

Faculty of Tourism, Media, and Cultural Studies, Shoin University

食品安全局⁴⁾、産業省)、業者(小売店、ハラール認証食品加工業)、専門家(大学、外国語学校、アラブサイエンスリサーチセンター)である。

2. 2. 調査方法と環境

2014年3月8日－3月30日、モロッコのラバト、カサブランカ、フェズ、アガディールの五都市で、ディスカッション(3国立大学と2外国語学校の計7クラスの受講者約130名、中心は20代)、インタビュー(認証制度関係者、業者、専門家)、参与観察を行った。なお事前に現地日本語教師に予備的アンケート実施を依頼した(フランス語版とアラビア語版を作成、日本語学習者116名から回答、本稿ではフランス語版の86名分を集計、中心は20代)。調査倫理は「日本文化人類学会」倫理綱領を遵守する。

3. 結 果

3. 1. ハラールと認証制度

3. 1. 1. 日常生活のハラール意識

モロッコは国民のほとんどがムスリムということもあり、人々の間には「国内産の食品は全てハラール」という認識が共有されていて、国内にいる限りは気にする必要はないと考えられている。グローバルなハラール市場の展開については、知らなかった人がほとんどで、自分たちの生活には無関係とみなす人もいた。さらに認証制度という形式が、従来からの人々の消費スタイルには馴染まない面も垣間見えた。あるムスリム女性は以下のように語っている。

モロッコでは、ラベルやマークなんかよりも、昔からの知り合いや親戚から買ったり、信用できる口コミを頼りにする。

人々は、迷路で有名な市場(スーク^{いちば})でも、それぞれ馴染みの店を持っている。同様の意見は他の人からも聞いた。一方で伝統的な顔がみえる商いは、スーパーの普及やインターネットの到来で変化もしてきている。特にネットを駆使できる若者は、親の世代より成分といった商品知識にも詳しい。上記の女性は次のようなことも述べている。

私はスーパーでもさっさと買い物をするけれど、子供は賞味期限とか裏のラベルを良く見てから買っている。

若者たちは、それまでの世代とは異なる生活スタイルを持っている。その中にはモロッコ産だからといって全てがハラールとは限らないと述べる人もいた。ハラール認証商品は、彼らに高品質商品とムスリムというアイデンティティを保証するものでもある。



図1 ハラールマーク(モロッコ標準化機構のHPより)

3. 1. 2. ハラール認証制度

ハラール認証制度は、モロッコ標準化機構が中心となり、諮問委員会、専門家、消費者団体、ウラマー最高評議会⁵⁾、企業、試験所、そして食品なら食品安全局、化粧品なら厚生省医薬局などが横断的に関わる。2012年7月から食品のハラール認証が始まり、調査時点で16社が認証を受けた商品を輸出していた。化粧品については筆者の調査終了から3ヶ月後に認証制度が整った。

ハラール認証を望む化粧品メーカーは、モロッコ標準化機構に申請書を提出し、該当商品の材料や添加物、生産過程から流通までがハラールかどうかの審査を受ける。当該化粧品が「ISO22716(化粧品優良製造規範)」や、マレーシアやインドネシアのハラール認証を取っていれば、モロッコ内でのハラール認証はスムーズにゆくと説明を受けた。手続き費用は実費に近い印象を受けたが、審査に合格するための設備投資や人件費などにも必要になる。さらに3年ごとに更新の審査を受けなければならない。

モロッコは化粧品原料に恵まれながらも原産地にとどまってきた。ハラール認証の化粧品・パーソナルケア商品は、イスラーム圏でかつ高品質の天然資源があるモロッコの強みを発揮することができる。関係機関の担当者は、モロッコブランドへの期待とあわせて、外国企業工場誘致にも積極的な姿勢を見せていた。

3. 1. 3. 宗教倫理とビジネス倫理の接合

ハラール認証制度においては商品製造から販売までの全過程が書面化され厳密化される。ムスリムが守るべき倫理という側面は、厳格な手続きのみに回収されてしまうのだろうか。

こうした疑問に対して、ベビーフードなどを製造するアグロフード社は一つの方向性を示している⁶⁾。同社商品は、モロッコ標準化機構とフランスの「AVS: A Votre Service」からハラール食品と認定され、国内および海外23ヶ国に輸出されている。興味深いのは、市民活動の一環として収益の一部を国内の孤児支援に回していることである。共同経営者の一人でフランスからモロッコに移民したフィリップ・シャロ氏は次のように述べている。

私たちの顧客は裕福な階層だが、その利益の一部を貧しい人たちに還元したい。孤児の支援はその一つ。ここ

では婚姻外で子供を出産した場合に母親が一人で育てることは難しい。～(中略)～私たちを受け入れてくれたこの国への恩返しだし、市民として、ムスリムとしての実践だ。

シャロ氏のいうムスリムとしての実践は「喜捨」と呼ばれ、困っている者を助ける、「アッラー（唯一神）」に感謝し、自分自身や自分の財産を浄める、という意義がある。

ハラールという概念は、ムスリムとして守り行うべき宗教倫理である。現地調査時点ではハラール認証の化粧品・パーソナルケア商品はまだ出回っていなかったが、アグロフード社のようにビジネス倫理が発揮されれば単なる付加価値やマーケティングを越える動きになっていくだろう。

3. 2. 化粧実践と化粧品資源の活用

3. 2. 1. スキンケア、ヘアケア、メイクアップ

化粧や身嗜みに関してしばしば引用されるイスラームの規範は、イスラームの聖典「クルアーン(コーラン)」とイスラーム伝承集成「ハディース」である。

それから女の信仰者にも言っておやり、慎しみぶかく目を下げて、陰部は大事に守っておき、^{おもて}外部に出ている部分はしかたがないが、そのほかの美しいところは人に見せぬよう。胸には蔽いをかぶせるよう。～後略～

(井筒俊彦訳『コーラン』(中)、光り 31、岩波文庫)

あごひげを伸ばすこと

(一) イブン・ウマルによると、神の使徒は「口ひげを短く刈り、あごひげは長く伸ばせ」と命じた。

(牧野信也訳『ハディース』(V)、衣服 65(一)、中公文庫)

これらは信者一人一人が理解力を尽くして読解することを期待するものでもある。したがって人々の認識や実践は均一ではない。特にイスラーム、アラブ、先住民ベルベル、ヨーロッパの文化の影響を色濃く受けてきたモロッコは多様である。都市部では、ヴェール(ヒジャーブ)を被っていない女性たちも少なくないし、ヒゲを全部剃っている男性もいる(図 18)。人々は、宗教的立場、社会体制、世界情勢、職業、男らしさ・女らしさ、流行、セックスアピール、世代、体質など、様々な要因を配慮しながら外見を整えている。

薄毛や縮毛などヘアケアはヴェールの着用や性別に関わりなく、関心が高いことが窺える。またムダ毛も悩みの種になっていることが垣間見える。たとえば訪問先の日本語クラスがたまたま女性だけになった時、20代の女性が次のような本音を吐いた。



図2 コホル(アンチモン表面の粉と他の成分を混ぜたものとされる)

私たちアラブの女性は、他の人たちから毛深いと思われる。嫌だあ～。

一同が笑いに包まれる中で様々な処理法が紹介された。眉毛は抜いたりしてはいけないという声もあったが、眉と眉が繋がるのは嫌がられていた。体毛の処理については、近代化以降の美の観念の変化やジェンダーの多様性からの分析もあるので今後検討を要する⁷⁾。

メイクアップについては、「ハラム(haram: イスラーム法で禁止された行為)」とみなす人、礼拝前の清めの時に取るという人、メイクしている場合は礼拝自体を遠慮するという人もいて一様ではない。街中でも、化粧をしていない女性からしっかりしている女性まで差がある。アンケートでは薄化粧派が三分の二以上だった(図 16)。この結果を自然志向とみることも可能だが、女性の社会進出に伴う現象という見方もある。女性の外出が稀だった時代は派手に化粧して出かけたが、外で働くことが普通になってくるに従って薄くなってきたというのである。黒いアバーヤなどで目と手足の先以外を覆っている女性に話を聞く機会はなかったが、不特定の人に顔を見せないからこそ派手な化粧も可能だという指摘があった。化粧の中でも、伝統的なコホル(図 2)は、アイラインやマスカラなどの化粧用だけでなく、眼病予防としての医薬品、邪視から守る魔除けに用いられてきた。現在は、アイライナー、マスカラ、アイシャドウ、付けまつげ、まつげ美容液などが広く流通している。アンケートでも、女性たちのアイメイク用品の利用がわかる(図 12)。

化粧品・パーソナルケア商品の製造は大まかに、個人の手作り、メーカー、協同組合の三つに分けられる。手作りは、自ら栽培したか市場で購入した材料から作るもので、家族や親しい人たちの間での楽しみになっている。メーカーは国内化粧品会社よりヨーロッパ系ブランドが目につくが、その中にはモロッコ産原料から作られたものもある。欧米での生活経験もある 50 代女性は以下のように述べている。

母の世代は伝統的な化粧品を使っていた。私の世代は若い頃からフランス製やスペイン製を使ってきた。でも自分の国の原料でできていることがわかった。つまり実際はモロッコ製。だから最近ではモロッコ製のものに戻ってきている。

自分たちで資源の採取から商品化まで行う協同組合は、上記のような声に応えるものである。同時に、次項で述べるように資源保護や女性の地位向上まで視野にいたれた社会活動となっている。

伝統的な市場には量り売りの黒石鹼やヘンナ（図3、17）、中国産の安価な化粧品類、協同組合製の商品などが所狭しと並んでいる。化粧品店やスーパーマーケットには協同組合製商品の他、世界的化粧品メーカー商品、大手スーパーマーケットチェーンの自社ブランド製品などが置いてある。調査に協力してくれた大学生たちはもっぱらスーパーマーケットで販売されている商品を購入していて、市場で販売される化粧品・パーソナルケア商品に対しては質に疑念を抱いていた。

3. 2. 2. 化粧品原料活用の光と陰

ここでは、モロッコ特産のアルガンオイルを例に化粧品原料の活用について考えたい⁸⁾。アルガンオイルは、古くから先住民ベルベル人が利用してきた。現在は、食用および美容資源として世界的にも有名で、海外の大手化粧品メーカーが化粧品原料として買い付けている。生産者にとっては現金収入になるが、安価で買い取られるので利益率は低い。アルガンの木の絶滅も危惧されていた。このような状況の改善を目的に、1996年ムハンマド五世大学のシャルーフ教授がアルガンオイルの産地で女性の協同組合による製造をはじめた⁹⁾。協同組合形式の生産は、製品の質向上や環境保護だけでなく、産地の女性たちの職業研修や識字教育などを実現し、各地に広がっている（図4、5）。

さて化粧品資源の新しい利用には、陰の面も見えてくる。天然やオーガニックを全面に出して洒落た容器に詰めれば同じ化粧品材料も値段が跳ね上がる。このような高額化粧品に対しては以下のように冷ややかな目もある。

10倍の値段をつけて販売している。店主は儲けに目が眩んでしまったかのようだ。

ハラール認証の化粧品・パーソナルケア商品は宗教倫理に基づくため、こうした反発はオーガニック化粧品より強くなる可能性がある。

3. 3. ハラール認証の化粧品・パーソナルケア商品に対



図3 ヘンナ（指甲花からできた染料。彩色の他、熱冷ましや魔除けや結婚式などに利用されてきた。日本でもオーガニックの白髪染や消せるタトゥーとして販売されている）



図4 アガディールにある協同組合製商品を販売する店の実演コーナー



図5 カサブランカの「Maroc Taswiq」では様々な協同組合で作られた商品が購入できる

する人々の反応

前に述べたように人々の間には「国内産は全てハラール」という認識が共有されている上に、意識するのは食品である。

何、それ？

ハラール認証の化粧品・パーソナル商品に対しては、まだ流通していなかったこともあるが、大方の人はこう言って首をひねったり、中には吹き出す人もいた。ただしこれまで意識してこなかったことへの驚きを表現する女性たち

もいた¹⁰⁾。

これまで考えたこともなかったけれど、言われてみれば肌に吸収している。特に口紅は口から摂取しているのも同じこと。どうして今まで気づかなかったのか。

ネイルは若い女性たちに人気が出始めていたが、メイクアップ同様、マニキュア自体を良くない(ハラム)とみなす人、清めがきちんとできるように礼拝前に取るという人、マニキュアをしている時は礼拝を遠慮するなど相違があり、イスラーム法学者などの判断を待っている状態だった。こうした状況を反映してか、調査終了後には水の透過性や通気性が良いとうたった商品が中東、ヨーロッパで販売されはじめた。

さて、グローバル市場におけるハラール認証商品の展開、モロッコにおける認証制度の進展を知った後の反応は次の二つに分かれる。まず肯定的な意見から紹介しよう。

ハラール認証商品は、モロッコ国内の経済活性化の起爆剤になりうる。

若者人口が多い割に雇用の受け皿となる自国産業が少ないために、男女とも上記のように考える人がいた。また現地の日本人日本語教師からは、ハラール産業を契機に日本企業が誘致されて教え子の雇用先が広がることを望む声も聞かれた。正則アラビア語、モロッコ方言アラビア語、フランス語、英語、スペイン語、日本語など多言語を操るマルチリンガルは、日本企業にとっても強みとなりうるだろう。さらに認証制度は、製品だけでなく働き方の質もあげるとの期待も聞かれた。確かにハラール認証などの標準化

は、高品質商品やサービスのために均質化された正確さを追求する。一方モロッコには職人のモノ作りも根強く残っていて、それがモロッコの文化を特徴づけてもいる。世界的な標準化の流れと、従来のモノ作りがどう共存していくのかという問題もみていく必要がある。

ハラール認証の化粧品・パーソナル商品に対しては、ハラール認証食品には向けられない否定的な意見もあった。

肌から吸収されるとはいっても、肉のように口から摂取するのとはレベルが違う。ハラール化粧品は必要ない。

ハラール化粧品は、宗教的というより単なる市場主義が生み出した結果。踊らされるのは馬鹿げている。

同様の批判的見解は学生や研究者など複数から聞いている。それまでの価格が数倍から数十倍になれば儲けは多くなるが庶民には手が出なくなる。ハラール認証の化粧品・パーソナルケア商品はハラール産業の申し子のような存在であるため、倫理的概念が単に金儲けに利用されるという印象がことさら強くなる。前に紹介したアルガンオイル協同組合やアグロフード社のようにビジネス倫理の構築が求められる。

3. 4. 予備的アンケート結果

現地調査に先立ち、ハラールと化粧に関する予備的アンケートをフランス語とアラビア語で作成し、モロッコ在住日本語教師を通して日本語学習者に実施してもらった。参考までに以下に紹介するが、フランス語版とアラビア語版で質問肢に若干の相違が生じたため、ここではフランス語版(86名分)の回答結果を抜粋する(図6～18)。

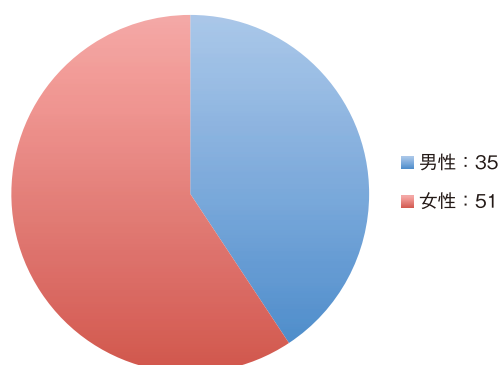


図6 アンケート対象者の性別(単位：人、以下同)

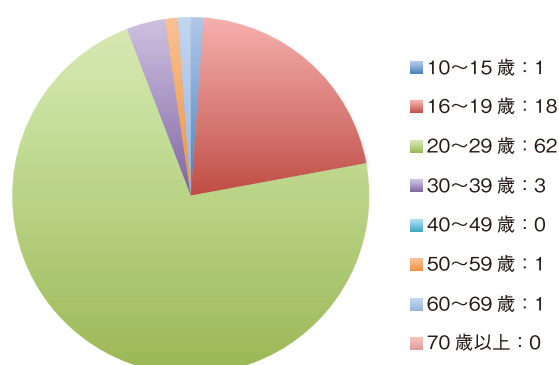


図7 アンケート対象者の年代

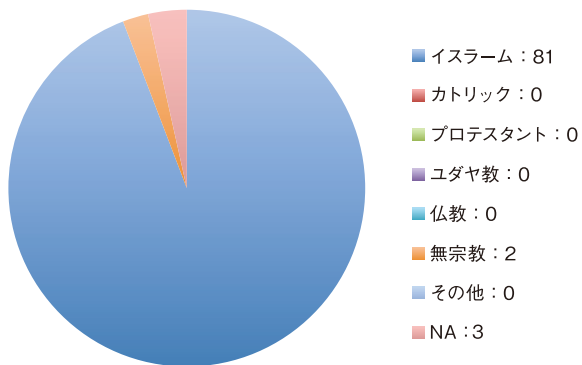


図8 アンケート対象者の宗教

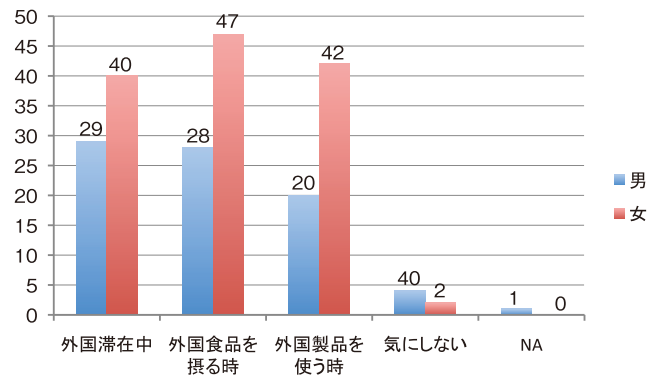


図9 Q.1: 次のような状況の時、あなたはハラルを意識しますか(複数回答可)。それとも全く気になりませんか。

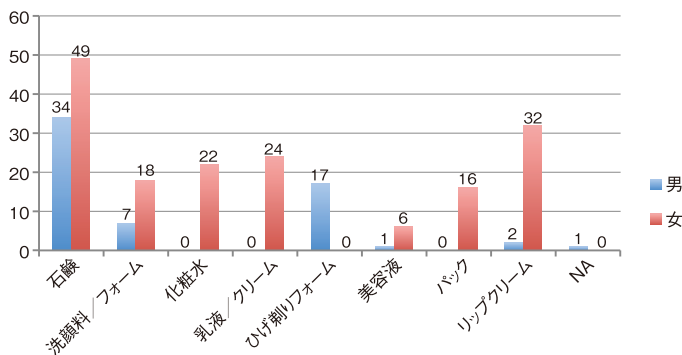


図10 Q.2: 次のようなスキンケア用品を使ったことはありますか(複数回答可)。

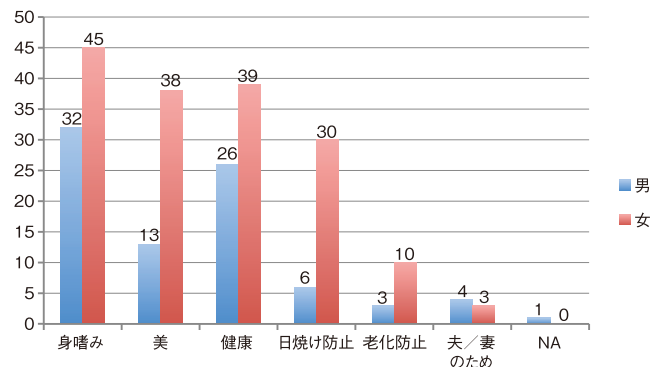


図11 Q.3: Q.2のスキンケア用品を使う理由と目的を次の中から選んでください(複数回答可)。

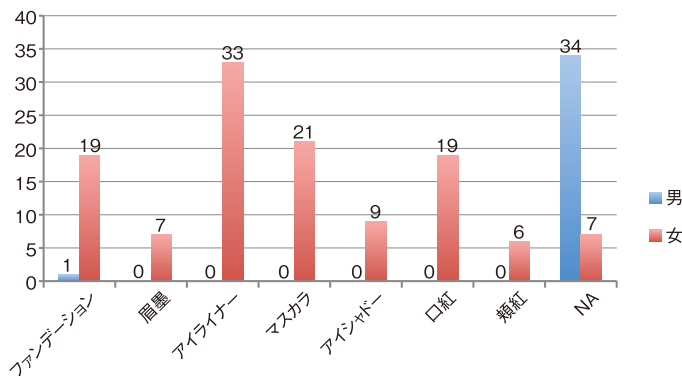


図12 Q.4: 次のようなメイクアップ用品を使ったことがありますか(複数回答可)。

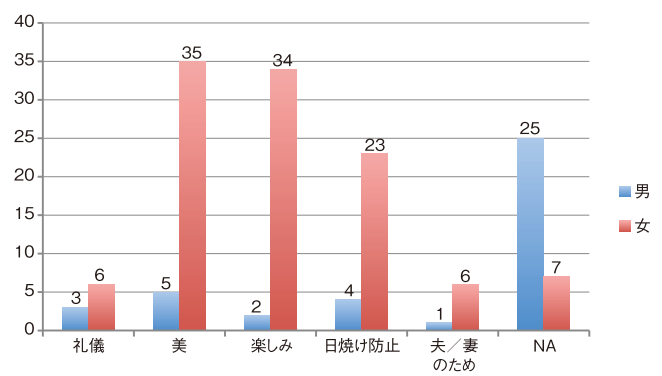


図13 Q.5: Q.4のメイクアップ用品を使う理由と目的は何ですか(複数回答可)。

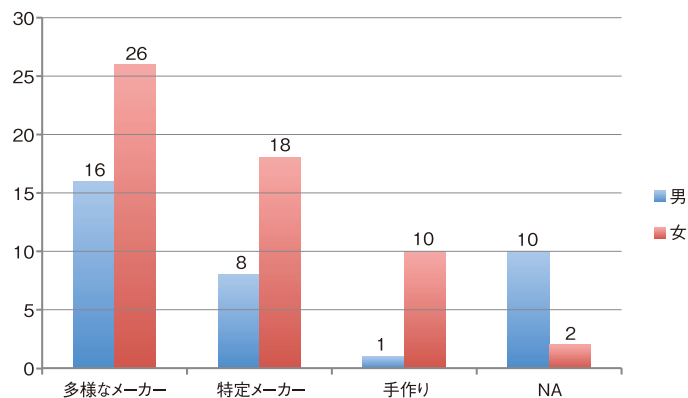


図 14 Q6：あなたが使っているスキンケア用品とメイクアップ用品はどのようなところで製造されたものですか。メーカー名も教えてください(本稿ではメーカー名省略)。

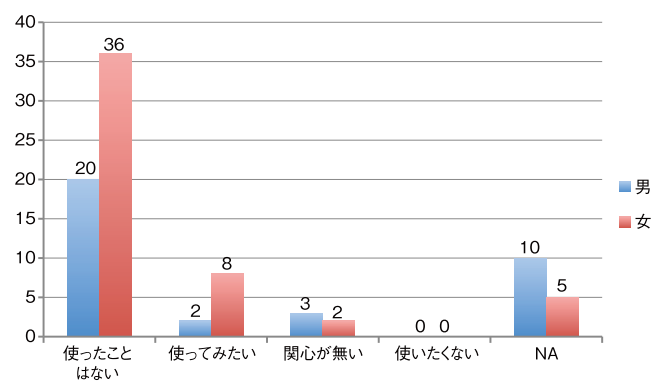


図 15 Q7：外国製スキンケア用品とメイクアップ用品についてどう思いますか。次の中から選んでください。

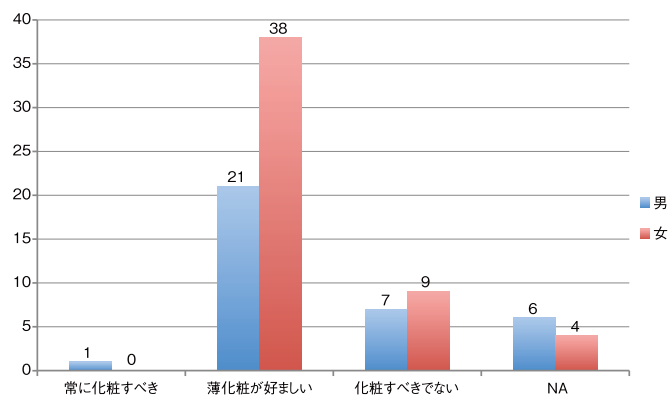


図 16 Q.8：女性の化粧についてどう思いますか。次の中から選んでください。

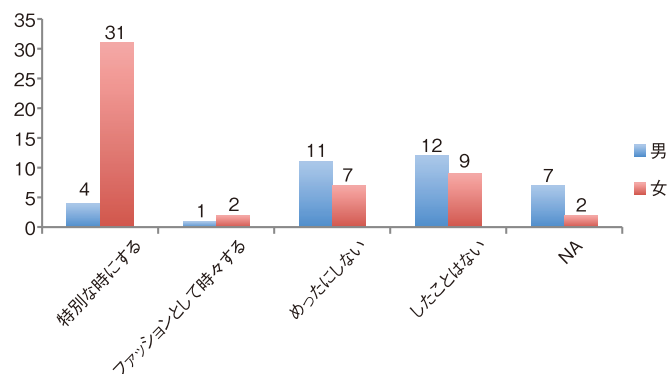


図 17 Q.9：ヘナをすることはありますか。次の中から選んでください。

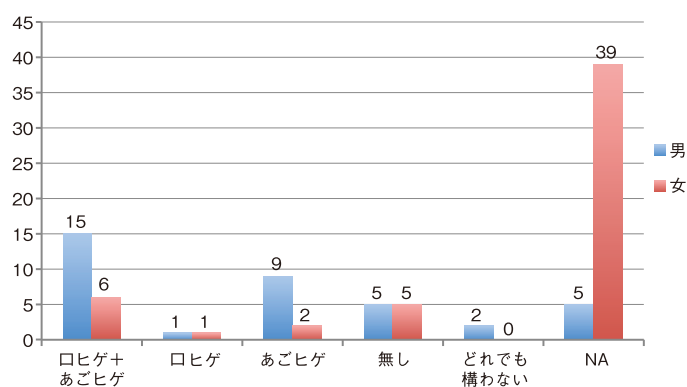


図 18 Q10：あなたはどのようなヒゲのスタイルが好みですか。次の中から選んでください。

4. 考 察

みてきたように、モロッコは食品に続いて化粧品・パーソナル商品のハラール認証制度を整えた。ハラール認証を望む化粧品メーカーは、モロッコ標準化機構に申請書を提出し、原材料、添加物、生産から流通までの全過程がハラールに適合しているかどうかの審査を受ける。当該化粧品が既にISO22716や、マレーシアやインドネシアのハラール認証をとっていれば、モロッコでのハラール認証はスムーズに進む。

こうした制度的な進展は、国内のムスリム消費者にはほとんど知られていなかった。ディスカッションやインタビューでは、「国内産は全てハラール」という認識が共有されている上に、ハラールかどうかを意識するのは食肉などの食品であって、化粧品・パーソナルケア商品はほとんど意識されていなかった。人々は手作り、協同組合製、メーカー製の化粧品類を利用している（図14）。中でもスキンケア用品はモロッコ産の原料から作られたものも人気があった。ヘアケアについては男女ともにかなり関心が高いことが窺えた。メイクアップとネイルに関しては、禁止された行為とみなして一切するべきではないという人、きちんと清めができるように礼拝前に取るという人、あるいはメイクやマニキュアをしている時は礼拝を遠慮するという人がいて判断は一樣ではない。メイク用品はもっぱらメーカー製のものが用いられている。都市部ではしっかり化粧している女性も見かけるが、調査では薄化粧を支持する人が一番多かった（図16）。また伝統的な化粧品コホルの影響もあってか、女性の中にはアイメイクへの関心の高さが窺える（図12）。目と手足以外を覆う真っ黒いアバーヤの女性はお洒落と無縁のようにみえるが、隠れているからこそ派手な化粧をすることもできるという指摘もあった。なお調査終了後に中東、ヨーロッパで水の透過性や酸素通気性をうたったマニキュアが売り出された。

ハラール市場に対する消費者の反応は大きく二つに分かれる。肯定的な意見は、化粧品を含めたハラール商品全般

をモロッコ経済の活性化やビジネスチャンスと捉えるものである。一方、ハラール化粧品を行き過ぎた資本主義の結果と批判的に見る人もいる。ハラール産業の申し子ともいえるハラール認証の化粧品・パーソナル商品には、宗教をビジネスに利用する利益至上主義的印象がことさら強くなる。この点で、喜捨として社会貢献活動を行うハラール食品業者や女性の識字教育活動や職業研修なども目指すアルガンオイル協同組合の活動は参考になる。ハラール認証の化粧品・パーソナル商品には輸出促進や新たな消費者発掘などの可能性があるが、宗教倫理をビジネス倫理につなげる仕組みがハラール認証食品やオーガニック化粧品より以上に求められる。

-
- 1) 川添裕子：「ハラール認証の化粧品・パーソナルケア商品」と消費行動（1）、松蔭大学紀要、18号、123-137、2015他。
 - 2) Institut Marocain de Normalisation.
 - 3) Médicaments et Pharmacies, Ministère de la Santé.
 - 4) L'Office National de Sécurité Sanitaire des Produits Alimentaires.
 - 5) Le Conseil Supérieur des Oulémas.
 - 6) Agro-Food Industrie.
 - 7) Najmabadi, A., *Women with Mustaches and Men without Beards*, University of California Press 2005.
 - 8) モロッコ南西部大西洋岸の乾燥・半乾燥地域に自生する樹木の果実から得られる。
 - 9) Zoubida Charrouf氏。
 - 10) 事前に実施した予備的アンケートでは、ハラールを意識する時として「外国滞在中」「外国食品を摂る時」に加えて「外国製品を使う時」にチェックした回答者がいたが（図9）、回収が遅くなったため、具体的にどのような製品なのかは確認できなかった。“外国”という言葉への反応、アンケート目的（ハラール認証化粧品）に影響された可能性も含めて、次回の現地調査の課題としたい。

嗅覚(芳香)刺激量が与える自律神経機能の経時的变化

慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科学教室

神 崎 晶

The olfactory epithelium includes the odorant receptors which connects adrenergic nerve fibers. Change occurs in the autonomic function by olfactory stimuli, symptoms appear in the circulatory system, such as a pulse.

However, a strong sense of smell has individual subjective elements and, it is difficult to be evaluated. Therefore, it is considered that if it is possible to observe a functional change in the autonomic nervous system involuntary, such as parasympathetic and sympathetic, highly accurate diagnosis can be done. It is considered that, it is compared to the response of Parkinson's disease by knowing the response of the autonomic nervous against odors variety of healthy subjects.

In this study, when it was in healthy subjects sniff the fragrance of the rose-like odor which is generally good smell, the activity of the autonomic nerves was increased. Further, when it was smell the odor of feces (skatole) like that are generally malodorous, it was found that the activity of the autonomic nerves is greatly enhanced, and the parasympathetic dominance yet.

1. 緒 言

嗅覚には解剖学的に自律神経との関連性も報告されている¹⁾。嗅覚刺激は嗅上皮に存在する嗅細胞の嗅覚受容体を通じ中枢に情報伝達される。ところが、最近の研究により、嗅上皮には嗅覚受容体のみならず、交感神経終末のアドレナリン受容体や副交感神経終末のムスカリン受容体が存在することが分かってきた。そのため健常者において、嗅覚刺激によって自律神経の活動を亢進および抑制されることが考えられる。

一方、パーキンソン病 (Parkinson disease) では、一番早期の非運動性の症状として嗅覚障害が見られる。この症状はパーキンソン病の初期段階 (early stage of PD) の患者の約 90% が発現し、また、運動性の障害に先行して生じる。

そのため、今回様々な香りの試薬を用いて嗅覚刺激を健常者に対し行い、その自律神経機能の反応を見る。有意な反応が見られれば、嗅覚障害がないパーキンソン病の患者の補助診断にこの検査方法が貢献できると考えられる。

また、男女ともに同性用香水では自律神経活動が亢進、異性では副交感神経活動が亢進した。また天然のラベンダーでは人工のそれより自律神経活動を抑制しえた。

嗅粘膜には自律神経線維と連絡があることが知られる。前述した通り、パーキンソン病の自律神経機能とも関連がある。そこで、嗅覚機能正常の成人に嗅気を曝露させて自律神経機能を測定した。嗅気の提示前後で自律神経機能に

変化が生じていることが判明している。一般に良い嗅気とされるバラ様の嗅気は自律神経の活動を亢進させ、また、一般に悪臭とされる糞様の臭気は自律神経の活動を亢進させ、副交感神経を優位に亢進させることが分かった。グレープフルーツの嗅気では交感神経を優位に活発化させる⁹⁾等、自律神経に様々な効果を与えることがすでに判明している。これらの知見をふまえて、神経疾患を有する患者に対して嗅覚刺激を曝露させることで自律神経機能を測定することが臨床的にも有用であることが解明されつつある。

2. 実 験

《方法》

2. 1. 被験者の自律神経機能の確認

まず初めに、被験者に自律神経機能に異常があるかどうかを予め把握するため、被験者に脈圧計を付け、起立性低血圧に陥るかどうかの試験を行った。

被験者の左上腕にカフを装着し、座位 2 分間→立位 2 分間→座位 1 分間の動作を取ってもらい、座位安静時、立位瞬間時、立位安静時、座位瞬間時、座位安静時 2 回目の脈圧を測定し、交感神経系、副交感神経系の機能の測定を行い、被験者の自律神経機能に関して評価を行った。

※ 健常者であれば、起立時に瞬間的に血圧が低下し、それに対し、頰動脈洞に存在する圧受容器が反応し延髄に存在する循環中枢に刺激が伝達される。この反応により、交感神経が働き心拍数上昇、および末梢血管の収縮により、血圧が正常に保たれる。そのため、自律神経系統に異常が見られる方は、交感神経の反応低下により血圧を保つことができず低血圧となる。

2. 2. 健常者の嗅覚刺激に対する自律神経機能の変化

本題の嗅覚刺激に対する自律神経機能の応答を測定する実験を行った。具体的には、特定の香りがついた試験紙を



Time course of autonomic nerve function affected by olfactory (aroma) stimulation

Sho Kanzaki

Department of Otolaryngology, School of Medicine, Keio University

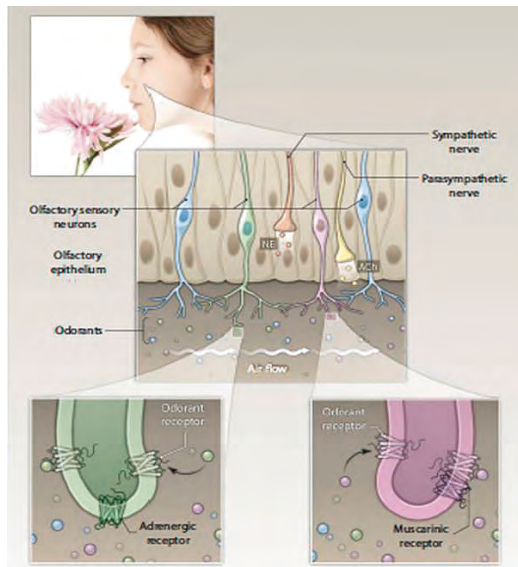


Fig.1 嗅上皮における自律神経の走行

被験者鼻孔約1 cm手前に置き嗅覚刺激を与え、予め四肢に装着していた電極により匂いを嗅がせる前(安静時)と匂いを嗅がせた後(嗅覚刺激後)での脈拍の変化を観測した。脈拍は、交感神経の働きと副交感神経の働きの拮抗によって決定されている。そのため、嗅覚刺激を与えた際に自律神経機能が正常であれば、何らかのレスポンスが生じると考えられる。また、今回の実験で用いる器具では、自律神経の総合機能の変化の大きさも評価することが出来、どういったように反応したかが分かる。以下が今回の実験に用いた、試料の種類と、具体的な実験行程である。

1. 電極を右手首および左足首に座位の状態で装着し、最初に、安静状態の心拍変動を4分間測定した（先ほどの起立性低血圧の実験での動作の影響を取り除くため）。
2. 4分後、香1（バラ様の香り）を浸した試験紙を被験者の鼻の前に持っていき10秒間匂いを嗅がせ、10秒後安静にし、その匂いを嗅がせた10秒間を含む30秒間を、イベント「香A」として心拍数を測定した。
3. 香りイベント測定後、5分間安静状態を測定した。（前の香りのafter-effectを取り除くため）
4. 安静後、「香2」を「香1」同様に、10秒間嗅がせ、30秒間測定した。
5. 以後、「香2」→「安静」→「香3」というように、3種類の香をすべて嗅がせた。

＊香りの種類

	主成分	含有量	溶剤	類似した香り
香1	β-フェニルエチルアルコール	315.5mg/5ml	日局プロピレングリコール	バラ
香2	スクアール	39.75mg/5ml	日局プロピレングリコール	糞
香3	男性用香水	不明	不明	形容しがたい一つんとくる香り



Fig.2 実験で使用した脈圧計測器

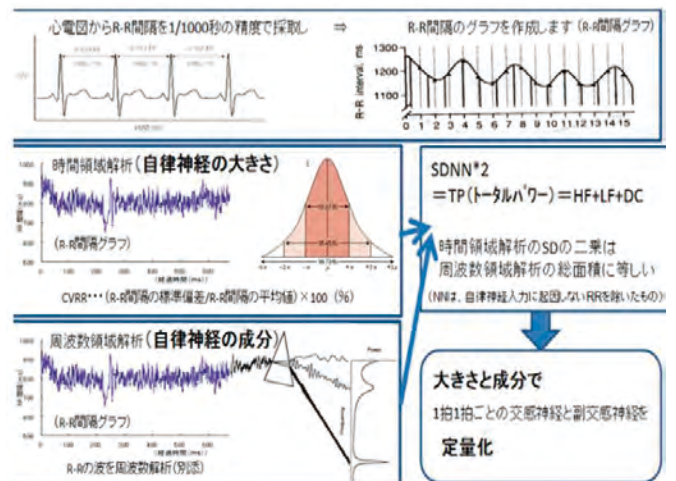


Fig.3 自律神経の活動の大きさと成分分析方法

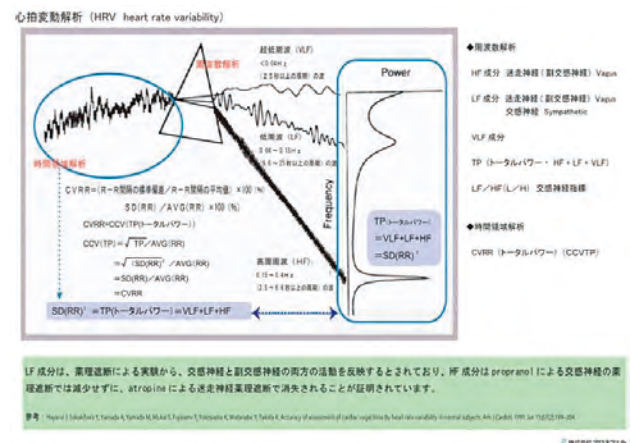


Fig.4 自律神経の成分分析方法

＊実験条件

- ・実験室は、気温25℃に保った

＊被験者条件

- ・正常状態における自律神経機能を測定するため、被験者は実験前日の夜は十分な睡眠を摂取した。

《原理》

Fig. 3 のように、心電図より時間領域解析を用いて自律神経全体の活動の大きさの定量化、および、Fig. 4 のように周波数領域解析により自律神経の成分すなわち交感神経、副交感神経各々の活動の大きさを分析できるようになって

また、各香りについて、匂いを嗅ぐ前と匂いを嗅いだ後での各々の値の変化に対するt-検定を行った結果が以下のものである。

2.3. 男性女性用香水と人工・天然香料の差について

嗅覚刺激に対する自律神経機能の応答を測定する実験を行った。具体的には、特定の香りがついた試験紙を鼻孔から1cmの距離で嗅がせる。

安静時と嗅覚刺激後で脈拍の変化を計測した。自律神経の総合機能も含めて評価する。

①極を右手首および左足首に座位の状態に装着し、最初に、

安静状態の心拍変動を測定した(先ほどの起立性低血圧の実験での動作の影響を取り除くため)。

②4分後、1つめの香りを浸した試験紙を被験者の鼻孔前にもって行き、10秒間嗅いでもらう。その10秒間を含む30秒間の心拍数を測定した。

③嗅覚刺激後の疲労をとるため5分間安静状態を測定した。

④安静後、「2つ目の香り」を「1つ目の香り」同様に、10秒間嗅がせ、30秒間測定した。

⑤後、「2つ目の香り」→「安静」から、「3つ目の香り」→「安静」→「4つ目の香り」の順で刺激を与えた。

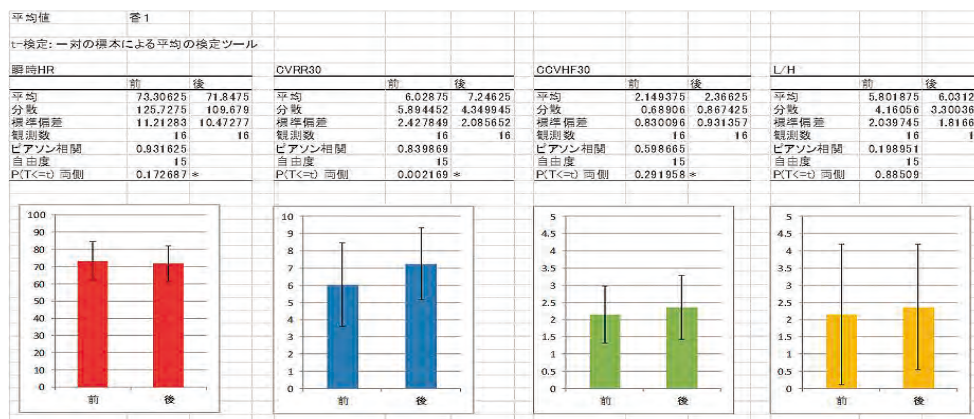


Fig. 6 香1 (バラ様の嗅気)を嗅がせた前後で各値の変化(t-検定)

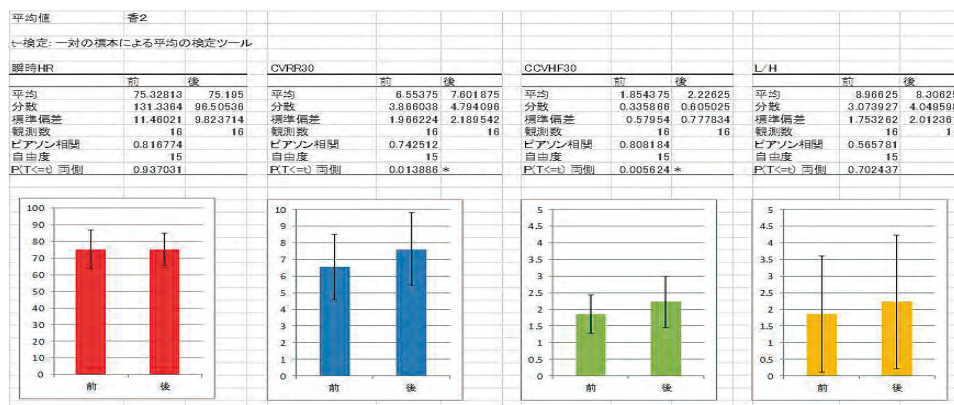


Fig. 7 香2 (糞様の臭気)を嗅がせた前後で各値の変化(t-検定)

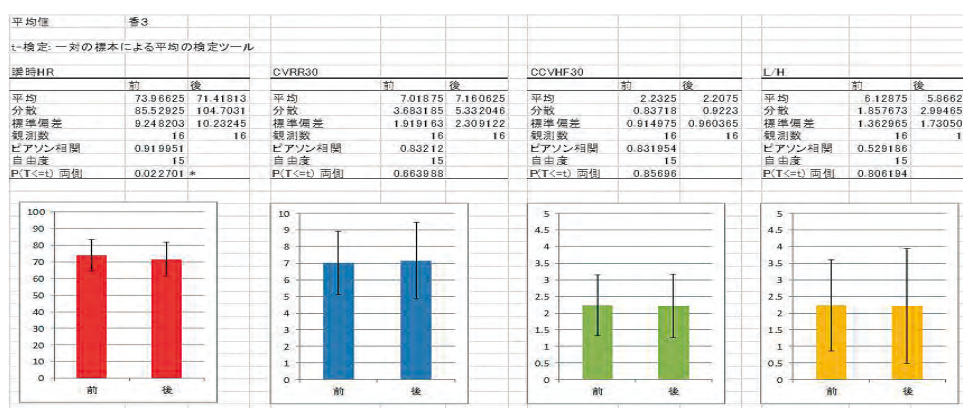


Fig. 8 香3 (男性用香水)を嗅がせた前後で各値の変化(t-検定)

＊香りの種類

- ・男性用香水 Dolce & Gabbana The One for Men (成分不明)
 - ・女性用香水 Jo Malone
 - ・ネクタリンプロッサム&ハニーコロソ(成分不明)
 - ・天然のラベンダー エッセンシャルオイル(花・葉から水蒸気蒸留したもの)
 - ・人工のラベンダー アロマエッセンス(界面活性剤、香料、ハーブ精油)
- これを被験者には分からないよう、ランダムに振り当てた。

＊実験条件

実験室は、気温 25℃に保った。

＊被験者条件

正常状態における自律神経機能を測定するため以下の条件を設定した。

- ・被験者は寝不足でない、また眠気はない
- ・食後 3 時間以上経過

＊自律神経の活動の大きさと成分分析方法

自律神経の総合的な活動の指標としては CVRR が挙げられる。なお、心拍の成分を分解すると超低周波、低周波、高周波の 3 つに分かれ、そのうち高周波 HF は副交感神経を、低周波 (LH) は副交感神経と交感神経両者の活動を反映している。

交感神経の活動の指標を LH/HF、副交感神経の活動指標を CCVHF とする。

この周波数解析の coefficient of component variance (CCV) とは、各周波数のゆらぎの係数であり、CVRR と同じように再現性が良い。

2. 3. 1. 男性用香水と女性用香水の比較

L/H 交感神経活動性 CCV HF - 副交感神経活動の指標、CVRR 総自律神経活動の指標は男性における男性香水と女性香水では有意差はなかった。女性においても同様であった。しかし、香水を嗅ぐ前後での変化量の平均をみると下図になる。

Table 2

		220 M								210 M							
		安静	人工	安静	天然	安静	女性	安静	男性	安静	天然	安静	女性	安静	人工	安静	女性
	心拍(平均)	72.55	71.6	71.1	72.16	72.17	69.68	71.6	67.16	69.86							
	CVRR (%)	5.17	6.6	4.69	3.5	6.03	4	4.91	5.6	4.03							
	L/H	10.28	18.4	6.17	3.5	14.38	2.37	9.26	10.45	3.51							
	CCV(HF)	1.26	1.38	1.48	1.5	1.37	1.32	1.33	1.46	1.45							
	CCV(LF)	3.68	5.83	3.33	2.59	4.7	2.37	3.51	4	2.38							
213 M	安静	人工	安静	男性	安静	女性	安静	天然	安静								
	心拍(平均)	61.1	59.3	61.7	63.36	60.37	57.36	59.9	65.8	60.06							
	CVRR (%)	3.75	7.12	8.07	5.78	8.09	7.81	7.21	8.8	7.57							
	L/H	5.47	2.91	7.74	1.29	5.63	3.31	3.67	4.47	5							
	CCV(HF)	3.08	3.02	2.63	2.7	2.86	3.2	2.83	3.11	2.67							
218 M	安静	人工	安静	男性	安静	天然	安静	女性	安静								
	心拍(平均)	66.85	61.4	66	65.42	67.58	65.11	68.2	63.33	67.63							
	CVRR (%)	5.31	5.36	6.23	5.87	5.13	6.72	6.53	6.22	7.01							
	L/H	4.11	1.85	4.09	2.68	2.89	2.06	3.07	4.01	4.36							
	CCV(HF)	2.21	1.71	2.29	1.31	2.12	2.84	2.54	2.41	2.48							
217 F	安静	人工	安静	男性	安静	天然	安静	女性	安静								
	心拍(平均)	76.59	70.6	74.8	70.64	72.18	68.01	76	70.77	69.8							
	CVRR (%)	6.53	7.04	5.72	5.74	5.87	6.69	5.69	8.41	6.79							
	L/H	6.32	3.95	4.57	3.55	3.81	2.33	4.42	3.15	4.59							
	CCV(HF)	1.86	2.11	1.81	2.07	1.94	2.23	1.94	2.55	2.14							
216 M	安静	人工	安静	男性	安静	天然	安静	女性	安静								
	心拍(平均)	45.92	47.6	44.1	49.39	47.76	43.92	45.9	51.85	45.75							
	CVRR (%)	8.14	8.85	6.45	11.32	8.54	8.18	6.24	9.15	7.26							
	L/H	1.92	6.69	2.22	3.25	3.93	2.16	1.81	0.53	1.4							
	CCV(HF)	2.68	3	2.55	2.36	2.85	2.61	2.26	3.08	2.88							
215 F	安静	人工	安静	男性	安静	天然	安静	女性	安静								
	心拍(平均)	68.07	65.2	68.5	64.22	69.73	65.83	71.5	67.34	71.21							
	CVRR (%)	6.81	8.54	7.43	7.89	7.64	7.04	6.46	6.71	5.76							
	L/H	4.81	1.44	3.45	11.9	3.63	4.73	3.35	5.37	4.22							
	CCV(HF)	2.64	1.77	3.17	1.63	2.93	2.35	2.72	2.03	1.87							
214 F	安静	人工	安静	男性	安静	天然	安静	女性	安静								
	心拍(平均)	78.2	79.3	80.1	75.5	76.29	72.01	75.2	76.06	73.98							
	CVRR (%)	5.1	4.63	5.22	5.75	5.11	4.49	5.61	4.6	4.09							
	L/H	5.44	2.37	3.04	4.46	3.04	2.2	5.55	1.33	0.83							
213 F	安静	人工	安静	男性	安静	天然	安静	女性	安静								
	心拍(平均)	84.8	79.2	85.6	84.3	86.27	84.08	84.3	82.81	83.17							
	CVRR (%)	7.04	7.7	7.2	6.99	6.31	5.68	6.23	6.52	7.32							
	L/H	6.04	2.16	11.8	7.17	8.07	5.22	6.65	2.27	8.46							
	CCV(HF)	2.62	4.02	1.95	2.26	1.97	2.04	2.19	3.37	2.5							
212 M	安静	人工	安静	男性	安静	天然	安静	女性	安静								
	心拍(平均)	84.65	75.2	82.4	71.85	83.54	80.3	86.9	75.24	78.55							
	CVRR (%)	5.32	5.73	7.31	7.59	6.14	6.51	6.19	8.27	7.18							
	L/H	14.27	5.17	1.01	2.35	11.79	8.74	8.78	6.05	11.95							
	CCV(HF)	1.57	1.89	2.13	3.31	1.67	1.28	1.7	2.63	1.78							
211 M	安静	人工	安静	男性	安静	天然	安静	女性	安静								
	心拍(平均)	79.03	71.3	79.4	78.82	79.4	74.67	84	75.92	81.13							
	CVRR (%)	6.72	6.34	7.58	7.22	6.19	6.64	7.33	8	7.94							
	L/H	4.74	4.52	6.73	6.17	5.98	1.94	3.95	20.11	7.07							
	CCV(HF)	2.65	1.7	2.48	2.59	2.27	3.25	2.6	1.97	2.39							
200 M	安静	人工	安静	男性	安静	天然	安静	女性	安静								
	心拍(平均)	59.85	59.7	69.9	58.35	64.83	62.24	68.1	64.36	66.65							
	CVRR (%)	7.91	7.91	8.52	7.28	7.74	10.6	7.83	5.83	7.35							
	L/H	4.92	8.13	17.3	1.91	8.94	4.4	14.5	1.13	3.85							
	CCV(HF)	2.92	2.17	1.94	3.22	2.35	3.3	2.16	3.29	2.36							
202 M	安静	人工	安静	男性	安静	天然	安静	女性	安静								
	心拍(平均)	67.72	61.9	68.7	69.44	67.68	68.94	67.8	63.78	69.66							
	CVRR (%)	10.67	9.16	8.84	8.2	9.14	8.71	9.36	10.41	8.35							
	L/H	5.8	5.31	4.25	2.43	6.11	5.48	4.84	2.13	7.01							
	CCV(HF)	3.27	3.65	3.28	3.12	2.84	3.06	3.23	3.7	2.65							
201 F	安静	人工	安静	男性	安静	天然	安静	女性	安静								
	心拍(平均)	75.06	67.6	75.2	68.12	74.28	79.3	79.5	72.92	78.13							
	CVRR (%)	5.67	5.97	5.7	7.58	6.91	8.68	6.83	4.22	9.8							
	L/H	8.82	2.08	6.38	4.26	7.92	7.3	3.56	3.66	6.62							
	CCV(HF)	1.73	2.03	1.65	1.75	1.92	1.93	1.91	1.57	1.75							

変化量の平均値であり、統計学的有意差が認められるものではないが、著しい差が認められる。男性被験者においてはCVRRが男性用香水で大きく変化し、CCVHFはほとんど変化が無かった。女性用香水ではCCVHが高まった。男性被験者は男性用香水を嗅いでも副交感神経活動は変化が無く、総自律神経活動が高まった。女性香水では副交感神経活動が亢進したことを意味する。女性被験者においては、L/Hが男性用香水では嗅覚刺激前より低下しCCVHFが同性(女性)香水より男性香水の方が高まった。女性被験者が男性用香水を嗅ぐと副交感神経活動が亢進し、交感神経活動は亢進しないことを意味する(Fig. 9)。

2.3.2. 天然ラベンダーと人工ラベンダーの比較 (Fig.10)

CVRR、L/H、CCVHの値自体は、有意差がみられなかった(L/Hに関しては $p = 0.0734$ であった)。

天然と人工の嗅覚刺激前後の変化量をまとめたが、L/Hの変化量の差が認められる。これは天然が人工ラベンダーよりも交感神経活動を抑制していることを意味する。

4. 考 察

香1すなわちバラ様の嗅気を発する物質では、P (< 0.05) となりうる値は、CCRRであり、これは自律神経の総合的な活動の指標である。そのため、一般に良い香りと称されるバラの嗅気では、自律神経機能活動の全体的な亢進が見られた。また、CCVHFとL/Hの値から、交感神経、

副交感神経どちらか優位に傾くことはあまりないものと考えられる。

香2(糞様臭気)に関しては、優位にCCRRとCCVHFの値に、匂いを嗅いだ後、嗅ぐ前でプラスの変化が見られることが分かる。おのおの、CCRRは自律神経の総合的な活動、CCVHFは副交感神経の活動を表しており、よって香2(糞様臭気)は自律神経の総合的な活動の亢進および、交感神経に対する副交感神経の活動が有意に亢進している。一般に悪臭とされる糞様臭気においても健常者は、良い嗅気(バラ様嗅気)よりも激しく自律神経機能を変化させ、また副交感神経機能を有意、すなわち脈拍を遅くする方へ働くことが言える。最後の香3の男性用香水では、特に自律神経の活動に変化を与えないことが言える。すなわち、一般に良い香りとされるバラ様の嗅気では、交感神経・副交感神経どちらかを特に優位に亢進させるのではなく、総合的な自律神経の活動を亢進させることが分かった。また、一般に悪臭とされる糞様の臭気では副交感神経優位に良い嗅気よりも激しく自律神経の活動を亢進させることが分かった。

これらのように、香りによって得られる反応が異なった理由として、各物質の物理構造の違いによるものと考えられる。

今回の研究で、自律神経機能亢進の反応が見えた、香1の β -フェニルエチルアルコールや香2のスカトールは、交感神経および副交感神経のリガンドであるアセチルコリン

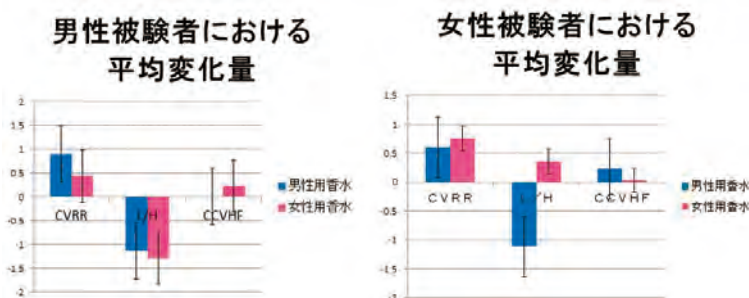


Fig. 9 男女被験者における平均変化量

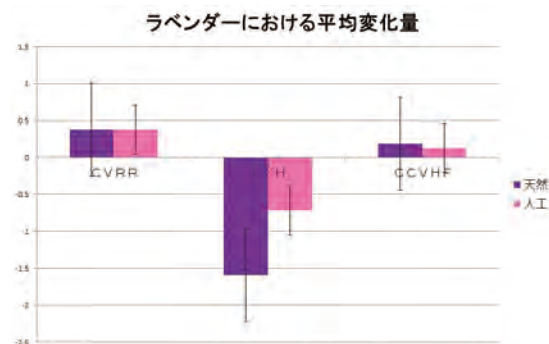


Fig. 10 ラベンダーにおける平均変化量

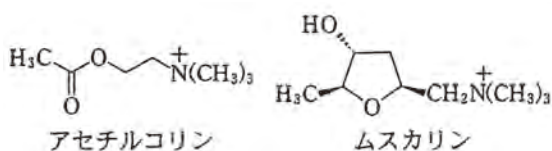


Fig. 11 副交感神経受容体のリガンド
(アセチルコリン、ムスカリン)

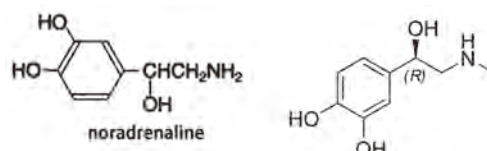


Fig. 12 交感神経受容体のリガンド
(ノルアドレナリン、アドレナリン)

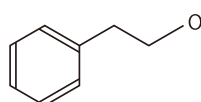


Fig. 13 香1 (β -フェニルエチルアルコール)

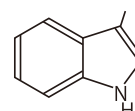


Fig. 14 香2 (スカトール)

やムスカリン、アドレナリン等の物質に構造が類似していたため、各受容体に対し親和性があったのではないかと考えられる (Fig.11 ~ 14)。その場合、香2 (スカトール) はよりアセチルコリンやムスカリン等の副交感神経系のリガンドの構造に物理構造特性が類似していると考えられる。なお、香3の男性用香水の詳細な物質は分からないが、実験結果から推定するに自律神経系のリガンドとは構造が類似しないことが推察される。これらの化学構造に関する証明は、より分子学的な実験を要する。

また、もう1つの可能性として、嗅上皮の自律神経を介さない応答がある。香1はバラ様の嗅気であり、これは普段私たちが嗅いだことのある匂いであり、習慣的にバラ→良い匂い→落ち着く気がする→自律神経が応答するという、記憶や慣習を介した自律神経の応答の可能性も考えられる。また、香2 (糞様臭気) では普段嗅いだ際に不潔な匂い→記憶的に気持ち悪くなる or 迷走神経反射→副交感神経応答 (嘔吐中枢) といった機序で自律神経の活動が活発になったとも考えられる。これらを検証するには既述した通り、物理化学的な実験を必要とする。

引き続き香料を嗅いだ際の男女差について考察する。男性は同性香水を嗅いでも交感神経亢進はなく、女性香水でリラックスする。女性では同性香水で交感神経が亢進し、男性用香水を嗅いで鎮静する。男女ともに同性香水でより自律神経活動が亢進し、異性用では鎮静する。この反応が男女間において何に寄与しているのかは不明であり、今後の課題である。

また天然と人工香料の比較検討では、L/H変化量の差から、天然ラベンダーの方が交感神経活動を抑制していることがわかる。これより、添加物が入っていない、高濃度の香料が効果をより期待できると思われる。

5. 総 括

今回の実験では、一般に良い嗅気とされるバラ様の嗅気は自律神経の活動を亢進させ、また、一般に悪臭とされる糞様の臭気は自律神経の活動を亢進させ、副交感神経を優位に亢進させることが分かった。また、いくつかの文献(※

3, 4) によると、グレープフルーツの嗅気では交感神経を優位に活発化させる等、他の嗅気も自律神経に様々な効果を与えることが分かってきている。今現在あまり嗅気による自律神経機能の変化・応答に関しての実験・研究・論文は少ないが、今後自律神経の様々な物質への応答の傾向・メカニズムが解明されれば、意図的に自律神経を活発化・抑制化することができ、また、交感神経/副交感神経どちらかを優位にすることも可能となるであろう。また、このような嗅覚刺激を行い、自律神経の応答を見ることで、パーキンソン病等の、症状の1つに嗅覚障害を伴う疾患のよりシンプルで客観的な診断検査ができると考えられる。本来、単なる嗅覚刺激の応答、すなわち匂いの感度の測定では、匂いに対しての応答・感じ方に個人差が大きかったが、自律神経は本人が制御できない automatic な反応であるため、主観的なバイアスがより少なく、なおかつ脈拍等の視覚化しやすい数値変換が行われるので、飛躍的に検査制度が上昇すると思われる。

(引用文献)

- 1) Randy A. Hall: Autonomic Modulation of Olfactory Signaling. *Science Signaling* 4 (155), p1. (2011).
- 2) Doty, R. L.: Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurol.* 8, 329-339 (2012); published online 15 May 2012.
- 3) Nijima A, Nagai K: Olfactory stimulation with scent of essential oil of grapefruit affects autonomic neurotransmission and blood pressure. *Exp Biol Med* (Maywood). 2003;228(10):1190-2.
- 4) Haze S, Sakai K, Gozu Y. Effects of fragrance inhalation on sympathetic activity in normal adults. *Jpn J Pharmacol.* 2002 Nov;90(3):247-53.
- 5) Delplanque S, Grandjean D, Chrea C, Aymard L, Cayeux I, Le Calvé B, Velazco MI, Scherer KR, Sander D. Emotional processing of odors: evidence for a nonlinear relation between pleasantness and familiarity evaluations. *Chem Senses.* 2008 Jun;33(5):469-79.

心理・社会的発達と化粧行為の関連の検討 ——ライフ・ステージによる化粧意識の相違と老年期の化粧

立命館大学立命館グローバル・イノベーション研究機構

木戸 彩恵

Psychological research on cosmetic behaviour/consciousness has been conducted primarily within the framework of social psychology. However, psychology does not focus sufficiently on the possible transfer of cosmetic behaviour/consciousness to an individual's specific cohort and age. The purpose of this study was to understand the transforming role of cosmetic behaviour/consciousness using questionnaire and qualitative research methods. In the first experiment, 90 participants (age range, 20–80 years) were asked to rate daily cosmetic use on a scale and report their cosmetic assumptions, their identity and gender identity. In the second experiment, 20 participants (age range, 20–70 years) participated in a semi-structured interview using the Schedule for the Evaluation of Individual Quality of Life. The data showed that cosmetic behaviour/consciousness in elderly women does not lead to general beauty consciousness and/or anti-aging consciousness from the perspective of life-span developmental psychology. Rather, social and common-sense dignity was emphasised. This attitude is expected to lead to deeper self-understanding and attractiveness due to cosmetic behaviour.

1. 緒言

化粧行為の対象は幼少期から老年期まで幅広い年齢に拡大する傾向にある。特に老年期の化粧についてはQOL（生活の質）の向上などといった目的から一定の成果をあげており、多くのボランティア等が活動を支えている状況がある。そうした活動の中では、「美しさ」や「抗齢（アンチエイジング）」など、実年齢よりも見た目を若く操作することが追及される。

活動の学術的根拠の一つとなる、化粧に関する心理学的研究は主に社会心理学分野において進められてきた。たとえば、宇山・鈴木・互(1990)¹⁾の研究では、実際に化粧を施した上で、その時の心理的变化が検討されている。宇山ら(1990)の研究からは、「積極性の上昇」「リラクゼーション」「対外的な気分の高揚」「対自的な気分の高揚」「安心」の5つの効用があることが明らかになっている。また、山本(2000)²⁾は、「顔の印象と対人的印象」において、外見の操作に焦点をあて、外見情報が他者との関係性の初期段階に与える影響や、外見の特徴が自他に与える影響をまとめている。そして、外見を通じた印象管理プロセスと管理に対する敏感さ、個人差について議論を展開した。その一方で、化粧をする個人の年齢やコホートに特徴的な化粧の意識や行為が変容していくという発達心理学的な検討はまだ充分ではない。現時点では、年齢段階が上がるに伴い化粧

の意識が段階的に変化していくことが研究されている（たとえば、阿部, 2001)³⁾にすぎず、化粧の役割が「質」的に変容することについて十分に議論がなされていない。

一方で、エイジング概念や老年期の化粧は確実に普及している。特に実践的な心理支援やマーケティングの観点からの介入は枚挙に遑がない。そうした文脈のなかでは、魅力の低下や美容・装いに関する関心の低下が単純に問題とされ、「ステキ」に元気になることを目指した介入がおこなわれる。こうした動向のなかで、発達と化粧の連関を巡る問題は基礎的な課題といえる。

生涯発達心理学の第一人者であるエリクソンは、老年期の発達における課題を自我の統合としている。老年期には人生のあらゆる心理社会的要素を体制化していくことが課題になり、自己の内的な特性と向き合うことが求められるようになる。つまり、より個別性の観点が強くなる老年期に単に多くの人から若々しく見えることを目指す現在の老年期の化粧の理解そのものを当てはめることが適切でない可能性がある。

そのため、本研究では生涯発達の視点に基づき、心理・社会的発達と化粧行為の関連の検討をおこなった。その際、時間の経過と共に宛先（となる他者や環境システム）との関係が変容すること、発達に伴い自身の身体性とそれを表現する仕方が変容することを考慮に入れ、20代から80代までの女性を対象とした質問紙調査と項目自己生成型QOL尺度を取り入れたインタビュー調査を実施した。

2. 調査

2.1. 質問紙調査

2.1.1. 調査協力者

調査協力者は、20歳から86歳までの女性90名（平均年齢54.00歳、標準偏差25.28歳であった）。うち、本調査で



An examination of socio-cultural development and cosmetic behaviour/consciousness: Cosmetic assumptions among different life-stages and cosmetic behavior/consciousness in elderly women

Ayae Kido

Ritsumeikan Global Innovation Research Organization, Ritsumeikan University

は、便宜的に20代から40代までの調査協力者を若年群(34名、平均年齢23.61歳、標準偏差7.54歳)、50代以上の調査協力者を中高年群(56名、平均年齢71.73歳、標準偏差10.77歳)と定義した。

2. 1. 2. 調査方法

全調査協力者に対し、本研究の趣旨・内容・調査協力者の権利に関する説明をおこなったうえで、質問紙への回答を求めた。中高年群の質問紙調査では、郵送にて質問紙を回収する手続きをとった。全体として120部を配布したうち、中高年群の質問紙回収率は46.7%であった。

2. 1. 3. 質問項目

質問項目は、①日常的に行っているメイクアップに関する項目として、化粧に関する一般的な質問4項目(化粧の頻度(選択形式／6段階)、濃さ(選択形式／4段階)、嗜好性(選択形式／5段階)、生活環境(選択形式／4段階))と②化粧に対する意識12項目(選択形式／5段階)(山田, 2012⁴⁾)を参考とした)を用いた。また、③アイデンティティに関わる質問項目として、自己の斉一性、一貫した自己感、自己に対する信頼の感覚、自己肯定的な自己受容の感覚を表す項目から構成されている藤村(2008)⁵⁾のアイデンティティ尺度7項目(選択形式／5段階)と、性別に対してどの程度のアイデンティティ感覚を持っているのか、その強さについて測定する尺度である佐々木・尾崎(2007)⁶⁾のジェンダー・アイデンティティ尺度7項目(選択形式／5段階)を用いた。

2. 1. 4. 分析方法

調査協力者を便宜的に若年群、中高年群に分け、質問項目①③については、*t*検定を用いて両群の平均の差の比較の検討をおこなった。質問項目②については、各項目の平均を算出した上でグラフ化した。

2. 2. インタビュー調査

2. 2. 1. 調査協力者

インタビュー調査協力者は若年群13名(20代9名、30代2名、40代2名)、中高年群7名(50代2名、60代3名、70代2名)の計20名であった。質問紙調査時に追跡調査への協力が可能と回答した調査協力者に個別にアポイントをとり、個別に1度ずつインタビューをおこなった。インタビュー時間は、最短約1時間から最長約4時間程度であった。インタビューの実施は、調査協力者が指定した場所を調査場所として選定し、個別に実施した。いずれのインタビューにおいても個人情報の保護管理に了承を得た上で録音の許可をとり、許可を得た上で会話内容をICレコーダーに録音した。

2. 2. 2. 調査方法

項目自己生成型QOL尺度であるSEIQOL-DW (Schedule for the Evaluation of Individual Quality of Life—a Direct Weighting procedure for Quality of Life Domains) 日本語版実施マニュアル(大生・中島, 2007⁷⁾)に準じる形式で半構造化インタビューを実施した。

SEIQOL-DWを用いたインタビュー調査の手続きは、以下のとおりである。まず、調査協力者が現時点で日常的なメイクアップをする際に、最も大切だと考えることについて領域・項目(Cue)を5つ挙げてもらう。このとき調査者はCueの定義や具体的な内容を聞き取る。もしCueを5つ列举出来ない場合は、マニュアルに付随する項目リストを例示する。次に、各CueにおけるLevel(充足度)をアナログの視覚尺度(Visual Analog Scale: VAS)を用いて評価してもらう。この際、初めにメイクアップ後の状態について評価してもらい、次いでメイクアップ前の状態について評価してもらう。そして、先ほど挙げた各CueのWeight(相対的重要度)を、円グラフを使って示す。最後に、各CueのLevelとWeightを掛け合わせ、SEIQOLの指標(index)を算出する。QOL indexは0から100の間で算出され、数値が高くなるほどQOLが高いと判断される。

2. 2. 3. 分析方法

SEIQOL-DWのQOL indexの算出

調査協力者が評価したQOLをSEIQOL-DWのマニュアルに基づき、QOL indexとして数値化した。次にQOLに関連する領域として構成されたCueに焦点をあて、年代別にQOLを構成するCueがどのような領域により構成されているかを検討した。メイクアップ前と後のCueのLevelの違いを比較することで、メイクアップによるQOLの変容を記述するよう試みた。

KJ法によるモデル化

調査協力者がメイクアップをする際に重要視するCueの領域を質的に把握するために、異質のデータや情報を統合することによって新しい発想とアイデアを生む方法論(川喜田, 1970)⁸⁾であるKJ法を使用し、データの整理をおこなった。

KJ法実施にあたっては、調査協力者のCueから100(1人につきCueは5つ)のラベルを作成した。年代別のデータの分散が分かるようにカードを色分けし、KJ法の手順(川喜田, 1970)に従い分析を実施した。

3. 結 果

3. 1. 質問紙調査結果

質問項目① 日常的に行っている化粧(メイクアップ)についての項目

頻度、濃さ、嗜好性、環境の各項目について、調査協力

者が日常的に行っているメイクアップの統計的差異について t 検定を用いて検討した。

メイクアップの頻度 若年群と中高年群のメイクアップの頻度の平均の差が統計的に有意かを確かめるために、有意水準 5% で両側検定の t 検定 (等分散を仮定しない) をおこなったところ、 $t(88)=1.05, p=0.30$ であり、若年群と中高年群のメイクアップの頻度に差異は認められなかった。

メイクアップの濃さ 若年群と中高年群のメイクアップの濃さの平均の差が統計的に有意かを確かめるために、有意水準 5% で両側検定の t 検定 (等分散を仮定する) をおこなったところ、 $t(88)=2.22, p=0.03$ であり、若年群と中高年群のメイクアップの濃さの差異が認められた。

メイクアップ嗜好性 若年群と中高年群のメイクアップ嗜好性の平均の差が統計的に有意かを確かめるために、有意水準 5% で両側検定の t 検定 (等分散を仮定する) をおこなったところ、 $t(88)=2.02, p=0.05$ であり、若年群と中高年群のメイクアップの指向性の差異が認められた。

メイクアップ環境 若年群と中高年群のメイクアップ環境の平均の差が統計的に有意かを確かめるために、有意水準 5% で両側検定の t 検定 (等分散を仮定する) をおこなったところ、 $t(88)=0.93, p=0.35$ であり、若年群と中高年群のメイクアップの環境の差異が認められなかった。

t 検定の結果、若年群と中高年群のメイクアップの頻度と環境には、差異が認められなかった。一方で、濃さと嗜好性については、若年群と中高年群に差異が認められた。具体的には、中高年群のメイクアップはより薄く、

メイクアップがあまり好きではないと評価されていた。この結果から、若年女性と中高年女性のメイクアップ頻度と環境は同様でありつつも、中高年女性の方がメイクアップは薄く、嗜好性は低くなる傾向があることが明らかになった。

質問項目② 化粧に対する意識についての項目

化粧に対する意識については、各質問項目の平均を算出した上でグラフ化した (図 1)。

全体的な回答傾向として、大きな差は認められなかったため、両群の差が 0.5 ポイント以上ある項目のみについて言及する。中高年群の平均値が若年群の平均値よりも 0.5 ポイント以上上回っていた項目は、「②化粧をすると心が落ち着く (中高年群 3.30, 若年群 2.80)」であった。反対に、中高年群の平均値が若年群の平均値よりも 0.5 ポイント以下下回っていた項目は「③化粧をすると気持ちが引き締まる (中高年群 3.52, 若年群 4.17)」, 「⑤化粧をして男性から魅力的だと思われたい (中高年群 2.55, 若年群 3.34)」であった。

質問項目③ アイデンティティおよびジェンダー・アイデンティティ尺度項目

若年群と中高年群のアイデンティティ尺度の平均の差が統計的に有意かを確かめるために、有意水準 5% で両側検定の t 検定 (等分散を仮定する) をおこなったところ、 $t(78)=5.51, p=0.00$ であり、若年群と中高年群のアイデンティティ項目回答傾向に強い差異が認められた。同様にジェンダー・アイデンティティ尺度の平均の差が統計的に有意かを確かめるために、有意水準 5% で両側検定の t 検定 (等分

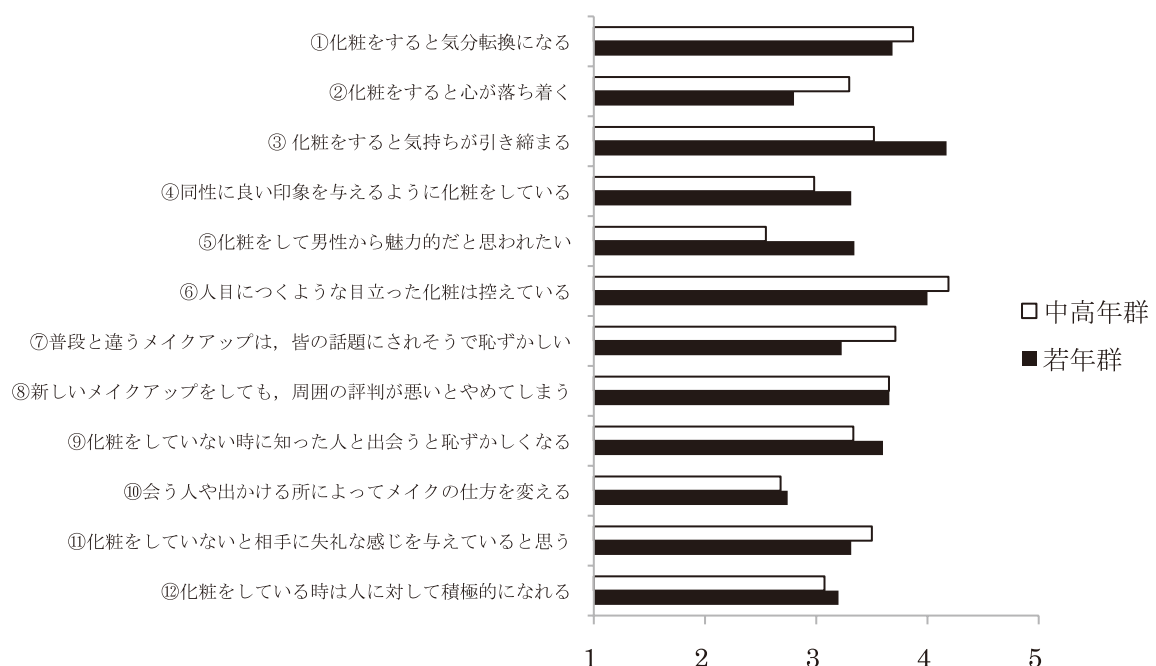


図 1 化粧に対する意識

散を仮定しない)をおこなったところ、 $t(78) = 3.55$, $p=0.00$ であり、若年群と中高年群のジェンダー・アイデンティティ項目回答傾向に強い差異が認められた。

いずれの尺度においても、共通して中高年女性が若年女性よりもよりアイデンティティ受容の感覚が強いことを示す結果となった。

3. 2. インタビュー調査結果

3. 2. 1. メイクアップによるQOL indexの変化

若年群のメイクアップ前のQOL index値の平均は27.27 ($SD=13.18$), メイクアップ後のQOL index値の平均は69.33 ($SD=8.23$)であった。メイクアップ前に比較し、メイクアップ後には平均で42.06ポイントQOL値が上昇していた。これに対して、中高年群のメイクアップ前のQOL index値の平均は33.55 ($SD=22.78$), メイクアップ後のQOL index値の平均は60.80 ($SD=20.16$)であった。メイクアップ前に比較し、メイクアップ後には平均で27.25ポイントQOL値が上昇していた。

若年群と中高年群のメイクアップに関するQOL index値を比較すると、中高年群は若年群に比べてメイクアップ前のQOL値は6.28高く、メイクアップ後のQOL値は8.53低かった。中高年群のメイクアップ前後の変化は、若年群と比較して、14.81ポイント小さかった。

なお、QOL indexで算出した数値について、母数が少ないことから統計的検定は実施しなかった。

3. 2. 2. KJ法分析結果

調査協力者がメイクアップをする際に重要視するCueの領域から、計100枚のカードが作成された。これらをカテゴリとして編成した結果、第1段階で41カテゴリとなり、第2段階で19カテゴリ、第3段階で11カテゴリ、第4段階で6カテゴリとなった。第4段階でこれ以上まとめようのない最大カテゴリになったと判断し、編成は第4段階で終了した。なお、第4段階で生成したデータのまとまりを「グループ」、第3段階で生成したデータのまとまりを「大カテゴリ」、第2段階で生成したデータのまとまりを「中カテゴリ」、第1段階で生成されたデータのまとまりを「小カテゴリ」と表現した。以下では、グループを【 】、大カテゴリを《 》で示し、説明を加える。

第4段階で抽出されたグループは【美しく可愛く見えるよう顔立ちを補正し、楽しくモチベーションを上げる】、【周囲との調和をとり関係性になじむ】、【他人に見せる若々しく新たな顔をつくり、自信と高揚感を高める】、【不快感や負担のない健康的で自然な表情やスタイルをつくる】、【質の良い化粧品を使い、肌状態を整えてきちんとした清潔感のある身だしなみに仕上げる】、【社会的・常識的な品格ある女性らしい魅力】の6つであった。

これらの結果を図解化したものが図2である。図解の縦軸が、個人と関係性を、横軸が幼さと成熟を、右上がりの斜め軸が社会的ベースと生理的ベースを、左上がりの斜め軸が可愛らしい魅力と品格ある魅力を示している。

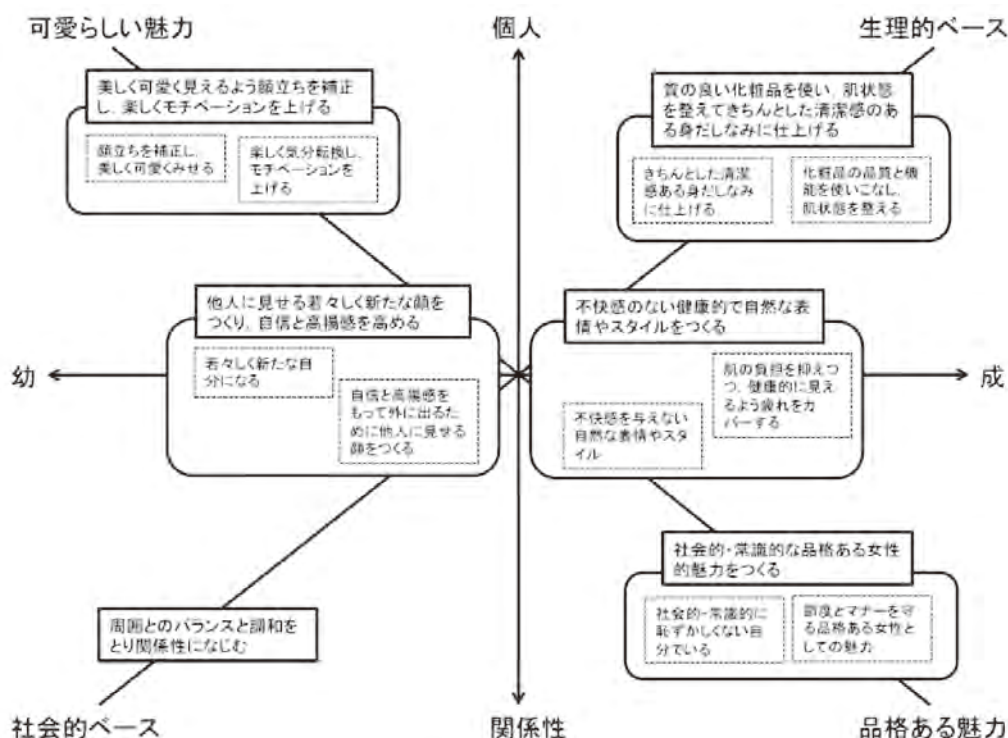


図2 KJ法図解

また、メイクアップをする際に重要視する Cue の領域として挙げられた語りを KJ 法を用いて整理するにあたり、どのようなラベルを付けてまとめたか、どの年齢層の調査協力者が回答していたかを表 1 にまとめた。なお、カテゴリーによっては下位カテゴリーがそのまま、より大きなカテゴリーとなっているものもある。以下、それぞれのグループ毎の内容について説明する。

【美しく可愛く見えるよう顔立ちを補正し、楽しくモチベーションを上げる】 このグループでは、《顔立ちを補正し、美しく可愛くみせる》ことが重視され、《楽しく気分転換し、モチベーションを上げる》ものとしてメイクアップが認識されていた。年代別にみると、20代から30代の調査協力者の Cue から編成されていた。見た目をよりきれいに可愛らしく見せることで気分転換、モチベーションの向上ができると認識されていた。

【周囲との調和をとり関係性になじむ】 このグループは、20代の調査協力者の Cue のみから編成されていた。周囲との調和をはかること、場所や装いと調和や風潮が重視されていた。このグループでは、社会的関係性をつくるためのベースとしてメイクアップが捉えられていた。

【他人に見せる若々しく新たな顔をつくり、自信と高揚感を高める】 このグループでは、《若々しく新たな自分になる》という自己の更新と、《自信と高揚感をもって外に出るために他人に見せる顔をつくる》という他者に対峙するための顔づくりが重視されていた。メイクアップにより、他人に見せる顔をつくりあげ、外出先への心理的スイッチングが行われることが分かる。なお、このグループは全ての年代の調査協力者の Cue により編成されていた。

【不快感や負担のない健康的で自然な表情やスタイルをつくる】 このグループは、メイクアップにより自然で健康的なイメージをつくり上げることが重視されていた。《不快感を与えない自然な表情やスタイル》に仕上げるという意識と、《肌の負担を抑えつつ、健康的に見えるよう疲れをカバーする》という疲れを見せないようにしようとする意識と、メイクアップを通した自分自身のモニタリングが行われているようである。このグループもまた全ての年代の調査協力者の Cue により編成されていた。

【質の良い化粧品を使い、肌状態を整えてきちんとした清潔感のある身だしなみに仕上げる】 このグループは、《きちんとした清潔感ある身だしなみに仕上げる》ために、化粧品の品質と機能を使いこなし、肌状態を整える》ことが重視されていた。全ての年代の調査協力者が Cue を挙げており、化粧品の品質と機能については、香り・値段・保湿・日焼け対策が内容として含まれていた。スキンケアを含む化粧により生理的なベースを整え、そして清潔感ある身だしなみに仕上げるという意識があるよう

である。このグループには、全ての年代の調査協力者が Cue を挙げていたが、小カテゴリーの「身だしなみ」に20代の調査協力者が5名 Cue を挙げていたことが特徴的であった。

【社会的・常識的な品格ある女性らしい魅力】 このグループは、40代以上の調査協力者の Cue により編成されていた。《節度とマナーを守る品格ある女性としての魅力》として TPO を意識すること、《社会的・常識的に恥ずかしくない自分である》ために、社会生活のなかでの仮面、感情を出さないよう、節度を保つためにメイクアップが使用されていることがわかる。

4. 考察

本研究では、心理・社会的発達と化粧行為の関連を検討することを目的とし、20代から80代の女性を対象とした調査研究を実施した。生涯発達を通じた化粧行為の変容を軸に、以下のようにまとめることができる。

4.1. 日常生活におけるメイクアップ

質問紙調査の結果から、日常生活におけるメイクアップの頻度や環境についての認識は、若年群も中高年群も大きく変わらないことが明らかになった。しかし、メイクアップの濃さはやや薄く、メイクアップに対する嗜好性もやや低いことが明らかになった。また、インタビュー調査におけるメイクアップに関する QOL index 値を若年群と中高年群で比較したところ、中高年群は若年群に比べてメイクアップ前の QOL 値が高く、メイクアップ後の QOL 値は低く見積もられていた。中高年群のメイクアップ前後の変化は、若年群と比較して、より小さいことが明らかになった。

これらを総合して捉えると、年齢を重ねることで、メイクアップに対してより控えめな認識をもつようになること、メイクアップもより薄くなる傾向があることが分かる。

4.2. メイクアップをする際に重要視する Cue の領域

インタビュー調査の結果から、女性が自己のプレゼンテーション方略を熟達化させ、「女の子」から「女性」へと発達していく過程を捉えることができた。また、従来のアンチエイジングの観点から捉えた場合に、老年期になるにつれ若々しさが重視されるようになると予想されたが、必ずしもそのような結果にはつながらなかった。本研究の結果からは、どの年齢にも普遍的にアンチエイジングに対する意識があり、若々しくありたい私という考え方を20代女性もが持っていることが明らかになった。

KJ 法による分析の結果は老年期に近づくにつれて、メイクアップが品格ある大人の女性としての魅力を示すために行われる行為となるという結論を導いた。

若年女性にとっては、美しさや可愛らしさを求めるため

表1 KJ法グループ編成の手順と内訳

グループ	大カテゴリー	中カテゴリー	小カテゴリー	年代別回答数
美しく可愛くみせるよう顔立ちを補正し、楽しくモチベーションを上げる	顔立ちを補正し美しく可愛くみせる	美しく可愛くみせる	可愛くなる	20代・・・2
			美しくみせる	20代・・・1 30代・・・1
			ポイントメイクによる顔立ちの補正	20代・・・3 20代・・・2
	楽しく気分転換し、モチベーションを上げる	楽しく気分転換し、モチベーションを上げる	楽しく気分転換	20代・・・2
			モチベーションを上げる時間	20代・・・3 20代・・・1
周囲との調和をとり関係性になじむ	周囲との調和をとり関係性になじむ	周囲との調和をとり関係性になじむ	調和とバランス	20代・・・2
			関係性になじませる	20代・・・3
	風潮	風潮	風潮	20代・・・1
他人に見せる若々しく新たな顔をつくり、自信と高揚感を高める	若々しく新たな自分になる	若々しく新たな自分になる	新しい自分になる	20代・・・2 60代以上・・・1
			若々しさ	20代・・・1 30代・・・1 60代以上・・・1
	自信と高揚感をもって外に出るために他人に見せる顔をつくる	褒められて自信と高揚感をもつ	褒められて自信をもつ	20代・・・1 60代以上・・・1
			自己高揚感	50代・・・1
		他人に見せるための顔を作り、外に出るためのスイッチングをする	化粧をした顔が他人にみせる顔	20代・・・1 60代以上・・・1
			外に出るためのスイッチング	20代・・・1 40代・・・1 60代以上・・・1
不快感や負担のない健康的で自然な表情やスタイル	不快感を与えない自然な表情やスタイル	不快感を与えない自然な仕上がり	不快感を与えない	40代・・・1 60代以上・・・2
			自然な仕上がり	30代・・・2 40代・・・1
		スタイル・表情の表出	スタイル	40代・・・1 60代以上・・・1
			表情	60代以上・・・1
	肌の負担を抑えつつ、健康的に見えるよう疲れをカバーする	肌負担の軽減	肌への負担	20代・・・1 30代・・・2
			気持悪さ	20代・・・1
		健康的に見えるために疲れをカバーする	健康的	50代・・・2
			疲れのカバー	20代・・・2 30代・・・1
			モニタリング	50代・・・1
質の良い化粧品を使い、肌状態を整えてきちんとした清潔感のある身だしなみに仕上げる	化粧品の品質と機能を使いこなし、肌状態を整える	化粧品の品質と機能	化粧品の性質	30代・・・1 40代・・・1
			値段	20代・・・1 60代以上・・・1
			保湿	40代・・・1
			日焼け対策	30代・・・1
		肌の状態を整える	肌の質感	20代・・・2 40代・・・1 60代以上・・・3
			肌の状態	20代・・・3 60代以上・・・1
	きちんとした清潔感ある身だしなみに仕上げる	清潔感ある身だしなみ	清潔感	20代・・・1 50代・・・1 60代以上・・・1
			身だしなみ	20代・・・5 30代・・・1 40代・・・1 60代以上・・・2
		きちんとした印象の仕上がり	きちんとした印象	20代・・・1 40代・・・1
			仕上がり	20代・・・2
社会的・常識的な品格ある女性らしい魅力	節度とマナーを守る品格ある女性としての魅力	TPOを守り、社会生活における節度とマナーを保つ	TPO	40代・・・1 60代以上・・・1
			社会生活における節度と	50代・・・1 60代以上・・・1
		品格ある女性らしさでより魅力的になる	品格のある女性らしさ	60代以上・・・2
			より魅力的に印象アップ	50代・・・2 60代以上・・・2
	社会的・常識的に恥ずかしくない自分である	社会的・常識的に恥ずかしくない自分である	社会的な常識	50代・・・1 60代以上・・・1
			恥ずかしくない自分である	50代・・・1 60代以上・・・1

に自己を補正するメイクアップが重視されるのに対し、老年期には成熟した関係性をつくるためのメイクアップが重視される。こうした化粧意識の発達の変容は、質問紙調査におけるアイデンティティ尺度およびジェンダー・アイデンティティ尺度項目への回答傾向が若年群よりも中高年群がより受容的であったという結果とも一致する。年齢を重ねるにつれ、社会的・常識的な品格ある女性らしい魅力が求められるようになるのは、自我同一性を確立したうえで心理社会的な自我の統合を目指した自分らしさを求める化粧行為がおこなわれているためだと考えられた。

5. 総 括

本研究の結果から、生涯発達の視点から捉えた場合に、老年期女性にとって化粧行為は必ずしも一般的な美しさやアンチエイジングに関連する意識に結びついていると言えないことが明らかになった。老年期には、むしろ社会的・常識的な品格ある女性らしい魅力を発揮することが重視される。このような意識を重視した上で、化粧をケアに応用することは、化粧を介した自己理解の深化と魅力の深化の実現につながり、化粧の意義の深い理解にもつながるだろう。

今後は、本研究から導き出した生涯発達を通じた化粧行為の変容過程に関する仮説モデルを精緻化していきたい。そのために、30代から50代の調査協力者を増やし、更なる調査研究をおこないたい。

謝 辞

本研究遂行にあたり、ご助成頂いた公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に心から感謝申し上げます。また、調査にご協力下さった立命館大学衣笠総合研究機構客員研究員の石川真理子氏と立命館大学文学部サトウタツヤ教授にお礼申し上げます。

(引用文献)

- 1) 宇山侑男, 鈴木ゆかり, 互惠子, : 日本化粧品学会誌, 14, 163-168, 1990.
- 2) 山本真理子, : 日本化粧品技術者会誌, 34, 351 - 358.
- 3) 阿部恒之, : ストレスと化粧の社会生理心理学, フレグランスジャーナル社, 2001.
- 4) 山田雅子, : 埼玉女子短期大学紀要, 25, 111 - 126, 2012.
- 5) 藤村和久, : 大阪樟蔭女子大学人間科学研究紀要, 8, 211 - 220, 2009.
- 6) 佐々木掌子, 尾崎幸謙, : パーソナリティ研究, 15, 251-265, 2007.
- 7) 大生定義・中島孝(監訳). 個人の生活の質評価法(SEIQOL)生活の質ドメインを直接的に重みづけする方法(SEIQOL—DW)実施マニュアル日本語版(暫定版), 2007.
- 8) 川喜田二郎, : 問題解決学—KJ法ワークブック, 講談社, 1970.

抗がん剤による皮膚障害とスキンケアに関する研究

京都薬科大学 臨床薬学教育研究センター

中 村 暢 彦

In the past decade, cetuximab and panitumumab, molecular target drugs, have been widely used in the treatment of advanced colorectal cancer. The skin toxicities are seen in from 70% to 90% of patients, and these agents are also strongly associated with improve of overall survival of patients. For assessment of skin toxicities, Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) is usually used as a method of grading severity scales for adverse events in cancer therapy. However, this assessment method is subjective and toxicities are evaluated only by medical staffs. Thus, more objective evaluation for skin toxicities is required for more precise evaluation of efficacy and safety of cancer chemotherapy by molecular target agents.

The aim of this study was to evaluate a new method for assessing the conditions and degree of skin toxicity using photographic images of skin toxic site in patients receiving cetuximab or panitumumab with advanced colorectal cancer. The assessment procedures using RGB color values obtained from photographic images are developed in combination with a color reference marker, and the method was applied to an objective evaluation for skin toxicities in patients. The time course data for the RGB color values as well as the CTCAE grading scores were obtained in a patient. Currently no clear relationship was detected between these parameters, and further researches are needed to clarify the validity of the present assessment method.

1. 緒 言

分子標的抗がん剤による薬物療法においては、開発当初には想定されていなかった薬剤特異的な皮膚障害が70～90%の高い頻度で発現する¹⁾。その発現部位は顔から足の指先まで広範囲に渡り、痤瘡様皮疹と呼ばれるニキビのような湿疹や皮膚乾燥、爪の周りが炎症を起こす爪囲炎など種々の特徴的な症状が発現する^{2,3)}。分子標的抗がん剤による皮膚障害は、従来のフルオロウラシルなどの殺細胞性抗がん剤で発現する骨髄抑制などのような致死的な有害事象ではないが、患者自身の不快感や日常生活に大きな影響を及ぼすことからその症状のマネージメントが重要である。一方で、手術不能な進行・再発大腸がんを使用されるセツキシマブやパニツムマブなどの薬剤では皮膚症状の強さが治療効果の指標となる場合があり⁴⁻⁷⁾、皮膚症状を軽減しながら治療を継続することが大変重要である。がん薬物療法における有害事象の評価には世界各国でCTCAE (Common Terminology Criteria for Adverse Events) が一般的に使用されているが、皮膚障害の評価は医療スタッフの目視による主観的な評価である。そのため異なる医療スタッフ間の評価の違いが治療方針に影響を及ぼすなど、基準が不明瞭のため医療現場では個々に工夫した予防、治

療が行われているのが現状である。皮膚症状にあわせた適切なスキンケアの方針を立てるためにも、従来の目視による主観的な評価から客観的な評価へとシフトする必要があるが、皮膚症状の色彩を数値化して定量的な評価のための手段が開発されていない。

そこで本研究では、皮膚障害が高頻度で発現するセツキシマブあるいはパニツムマブ療法施行中の進行大腸がん患者を対象に、抗がん剤の薬物療法による皮膚症状の色彩を数値化し、炎症の状態や程度を点数化することを検討した。

2. 方 法

2.1. 対象患者

適格基準は、20歳以上のセツキシマブあるいはパニツムマブの薬物治療を受ける進行・再発の大腸がん患者でEastern Cooperative Oncology Group (ECOG)のPerformance Status (PS)が0-2とした。担当医が3ヶ月以上の生存が期待できない、または重篤な循環器障害や呼吸器障害などの基礎疾患やアレルギー疾患の既往など有するため他の治療の影響を排除できない等の理由で被験者として不適切と判断された患者は除外した。

2.2. 症例登録

研究分担医師は、選択基準を満たした被験者本人あるいは代諾者から文書による同意を取得後、対象の部位を撮影し電子媒体に保存した。撮影した画像データは個人識別情報管理者へ手渡し、個人識別情報管理者は患者情報の匿名化を行い新たな症例番号を付して情報の保存・管理を行った。



Analysis of the skin toxicity and care in patients with cancer chemotherapy

Nobuhiko Nakamura

Education and Research Center for Clinical Pharmacy, Kyoto Pharmaceutical University

2.3 皮膚障害の予防的治療

研究分担医師は、皮膚障害に対し「尋常性痤瘡治療ガイドライン」に沿って初回投与時から下記の薬剤を投与した。

ミノマイシン 100mg / 日、ヒルドイドソフト軟膏 50g (手足)、ロコイドクリーム 5g (顔)、マイザー軟膏 10g (体幹部)。

2.4 皮膚障害評価の項目

皮膚障害評価の項目は痤瘡様皮疹、皮膚乾燥、爪囲炎の3つとした。皮膚障害評価は研究分担医師がCommon Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) version 4.0 を用いて評価し (表1)、グレード評価をカルテに記録した。

2.5 撮影方法

画像補正用カラーチャート (CASMATCH[®]) を撮影部位の周りに置き、デジタルカメラを使用し撮影した。撮影条件は先の報告から 2,048×1,536 以上のピクセル JPEG 形式で保存とした。自動ホワイトバランス設定、フラッシュは使用せず、被写体とカメラの距離は 30 cm に固定した^{8,9)}。撮影部位は露出度が高くスキンケアが特に必要な顔面、前胸部、背部の3点とした。

2.6 画像解析

撮影した画像は、CASMATCH[®] の説明書に従い Adobe Photoshop CS6 を用いて撮影した画像の色調補正を行った。補正画像から CASMATCH[®] を含まない患部部位を選択範囲とし 50 万ピクセルを抽出した。選択した画像は画像解析ソフトウェア Image J freeware を用いた解析から RGB 値を算出した。RGB 値の計測結果は、色彩の明るさ感が

観察距離によって変化しないと評価される輝度値 $V = (R+G+B)/3$ に変換し、皮膚障害が発現していない薬物治療開始日の「皮膚障害グレード0」群と皮膚障害が発生した観察日の「皮膚障害グレード1-2」群の2群間において Wilcoxon 符号付順位和検定を行った。なお統計的な有意水準は5%とした。

2.7 倫理的配慮

本研究のすべての担当者は、「ヘルシンキ宣言」および「臨床研究に関する倫理指針」を遵守して実施した。研究実施に係わる画像試料等を扱う際は、被験者の個人情報とは無関係の番号を付して管理し、被験者の秘密保護に十分配慮した。また、研究結果を公表する際は、被験者を特定できる情報を含めないようにした。

研究担当者は、研究協力医療施設の医療倫理審査委員会で承認の得られた同意説明文書を被験者 (代諾者が必要な場合は代諾者を含む) に渡し、文書および口頭による十分な説明を行い、被験者の自由意思による同意を文書で取得した。

3. 結果

3.1 患者背景

本研究の選択基準を満たす患者に対し、研究目的と協力について文書と口頭による十分な説明を行い、同意を得た登録患者は12名 (男性7名・女性5名) であった。患者の性別、年齢、身長、体重、体表面積、BMI、観察期間、皮膚障害について背景を表2に示す。

患者の年齢、身長、体重、体表面積、BMIは大腸がん患者の平均的な数値であった。観察期間中央値は90.5 (30

表1 皮膚障害のグレード定義

有害事象名	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4	Grade 5
痤瘡様皮疹	体表面積の<10%を占める紅色丘疹および/または膿疱で、そう痒や圧痛の有無は問わない	体表面積の10-30%を占める紅色丘疹および/または膿疱で、そう痒や圧痛の有無は問わない; 社会心理学的な影響を伴う; 身の回り以外の日常生活動作の制限	体表面積の>30%を占める紅色丘疹および/または膿疱で、そう痒や圧痛の有無は問わない; 身の回りの日常生活動作の制限; 経口抗菌薬を要する局所の重複感染	紅色丘疹および/または膿疱が体表面積のどの程度の面積を占めるかによらず、そう痒や圧痛の有無も問わないが、静注抗菌薬を要する広範囲の局所の二次感染を伴う; 生命を脅かす	死亡
皮膚乾燥	体表面積の<10%を占めるが紅斑やそう痒は伴わない	体表面積の10-30%を占め、紅斑またはそう痒を伴う; 身の回り以外の日常生活動作の制限	体表面積の>30%を占め、そう痒を伴う; 身の回りの日常生活動作の制限	—	—
爪囲炎	爪襞の浮腫や紅斑; 角質の剥脱	局所的処置を要する; 内服治療を要する (例: 抗菌薬/抗真菌薬/抗ウイルス薬); 疼痛を伴う爪襞の浮腫や紅斑; 滲出液や爪の分離を伴う; 身の回り以外の日常生活動作の制限	外科的処置や抗菌薬の静脈内投与を要する; 身の回りの日常生活動作の制限	—	—

－254) 日であった。薬物療法は4名がセツキシマブ療法、8名がパニツムマブ療法施行であり、これらパニツムマブ症例の2症例は観察期間中に薬物療法に伴うインフュージョンリアクションあるいは皮疹増悪のため中断となった。皮膚障害種別は痤瘡様皮疹が8件、皮膚乾燥は2件発現し、爪囲炎は認められなかった。皮膚障害の発現部位は患者や観察時期により異なり、手指や顔面、前胸部、背部などの局所的な症例から全体的な症例まで認められた。

3. 2. 皮膚障害評価グレードおよびRGB値の関連性

痤瘡様皮疹が8件認められた症例の中で、観察期間中に背部に皮膚障害評価グレード0から2まで推移した1症例が含まれており、この症例において薬物治療開始初日を含

め観察期間内に7時点(1, 33, 54, 68, 82, 96, 110日目)での皮膚障害患部の画像を得た。図1に画像の例を示す。さらに研究分担医師のカルテ記録と照合し、経過観察日と皮膚障害評価グレードの経時的変化をまとめた結果を、およびこれらの時点におけるRGB値の推移を示す(図2, 3)。

薬物治療開始初日の皮膚障害評価はグレード0であり、薬物治療開始33～54日目には背部にグレード1の皮膚障害が認められた。その後、68～96日目には皮膚障害評価はグレード1-2となり、110日目にはグレード2の皮膚障害が認められた。図2の色彩の明るさの評価である輝度値は初日から96日目までは122～150までの値を示しており、110日目のグレード2では100の値を下回った。図3の色の表現法であるR値、G値、B値も同様の推移を示した。

表2 患者背景

症例(N=12)	件数(範囲)	中央値(範囲)
性別		
男性	7	
女性	5	
年齢(歳)		75.5 (49 – 82)
身長(cm)		160.6 (140.0 – 170.4)
体重(kg)		52.4 (42.2 – 73.9)
体表面積(m ²)		1.50 (1.24 – 1.75)
BMI		21.7 (15.0 – 28.7)
観察期間(日)		90.5 (30 – 254)
薬物治療		
セツキシマブ	4	
パニツムマブ	8	
皮膚障害(グレード)		
痤瘡様皮疹	8 (1–3)	
皮膚乾燥	2 (1)	
爪囲炎	0	

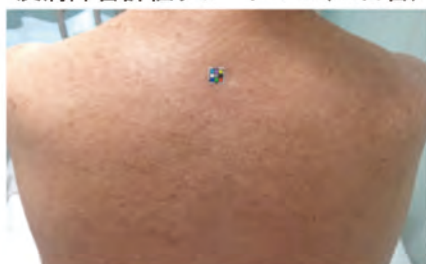
皮膚障害評価グレード0(1日目)



皮膚障害評価グレード1(33日目)



皮膚障害評価グレード1-2(68日目)



皮膚障害評価グレード2(110日目)



図1 経過観察日と皮膚障害評価グレードの経時的変化

「皮膚障害グレード0」群と「皮膚障害グレード1-2」群における輝度値の変化を示す(図4)。これら皮膚障害の有無と輝度値との関連性について統計学的に有意差($p=0.81$)は認められなかった。

4. 考 察

今回、観察期間中に背部に皮膚障害評価グレード0から2まで推移した1症例を得た。分子標的抗がん剤による皮膚障害の色彩評価について経時的に調査したデータはなく、1例ではあるが貴重なデータであると考えられる。

患者の皮膚障害部位は正常である薬物治療開始日と比べて視覚的に色彩が赤みを帯びており、経過観察日の推移と共に赤みの程度が濃くなっていた(図1)。しかし、今回の赤みの程度を客観的に数値化したRGB値では、皮膚障害の有無とRGB値との関連性が認められなかった。RGB値は3つの値が0から255までの範囲の数値を示すことにより色彩の表現が可能である。例えば3つの値すべてが0を示せば色彩は黒となり、すべてが255を示せば白となる。今回のデータにおいてグレード2の皮膚障害では皮膚障害が発現していないグレード0に比べRGB値は低い値を示

し、主観的な評価とも同じ傾向であることを示唆するものである。重篤な皮膚障害の色彩をRGB値に数値化することは可能であるが、得られたデータのRGB値は最小値から最大値までの幅が広く、軽度の皮膚障害の状態や程度をRGB値の256の値から点数化するのは困難であると考えられる。このように画像データの解析においては、RGB値を単純に用いるのではなくさらなる検討が必要である。

分子標的抗がん剤における皮膚障害の発生機序は明確には明らかではない。一部、上皮細胞増殖因子(epidermal growth factor receptor: EGFR)を目標物とする分子標的抗がん剤では、共通の目標物であるEGFRが皮膚組織にも分布し、増殖や分化に関与するため、角化異常が起こり、瘡瘍様皮疹が発現するとされている¹⁰⁾。そのため、EGFR阻害薬であるセツキシマブやパニツムマブでは高頻度に皮膚障害が発現し、皮膚症状の強さが治療効果の指標となることが報告されている⁴⁻⁷⁾。しかし、その皮膚障害の有害事象評価は目視による主観的な方法を用いており、画像データを客観的に評価した報告はされていない。このような客観的な評価が確立していない状況の中で、パニツムマブにより発現する皮膚症状に対する予防療法の有用性を評価す

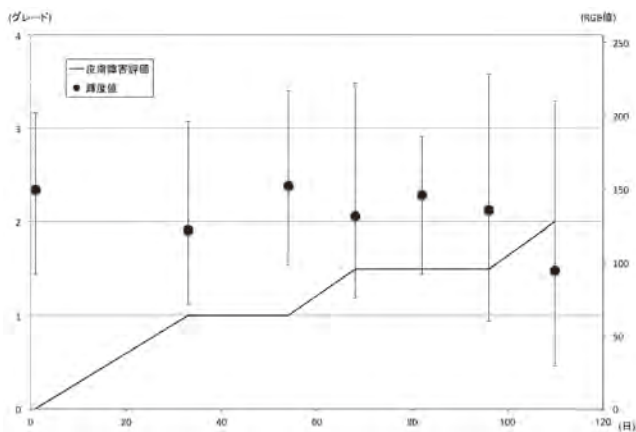


図2 皮膚障害評価グレードおよび輝度値(平均値±範囲)の推移

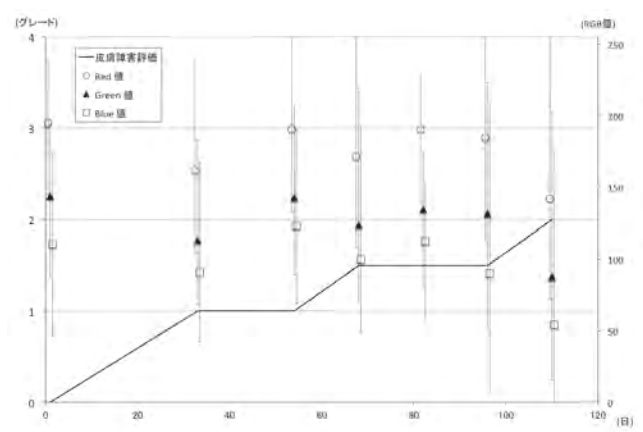


図3 皮膚障害評価グレードおよびRed値 Green値、Blue値(平均値±範囲)の推移

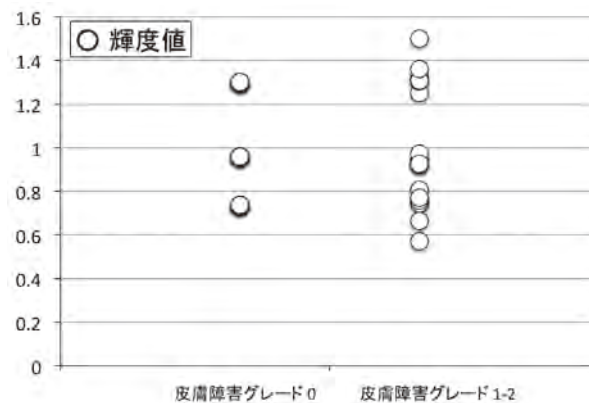


図4 皮膚障害評価グレード0およびグレード1-2における輝度値の変化
Wilcoxon符号付順位和検定, $p=0.81$

る目的で、初回投与の前日から6週間スキンケアを継続した群(予防療法群)と、皮膚障害発現時に担当医の判断によりスキンケアを開始した群(対症療法群)との臨床試験が実施されている¹¹⁾。予防療法群には医療用医薬品の他にサンスクリーンおよび保湿剤が用いられている。グレード2以上の皮膚障害は、予防療法群で29%、対症療法群で62%と皮膚障害の発現は予防療法によって対症療法に比べ半減されており予防的なスキンケアの有用性が明らかとなっている。この結果は、皮膚障害軽減のために抗生物質内服剤やステロイド外用剤の医療用医薬品の使用だけではなく、起床時に保湿剤の塗布、外出時にはサンスクリーンの塗布の重要性を示唆している。一方で、抗がん剤の薬物療法における皮膚障害は、乳がん患者では他者からその症状が認識できるために患者の苦痛度は口内炎や発熱よりも高いと報告されており¹²⁾、外見の変化を苦痛と感じていることが浮き彫りとなった。患者の日常生活において、がん薬物療法の治療効果を伴い、かつ他者に認識される皮膚の露出部分をスキンケアにより皮膚障害の発症予防が可能であれば予防的スキンケアが推奨されるのは望ましい。現在、主観的な皮膚障害の評価を用いて臨床試験が先行しているが、根本的に患者の症状と苦痛を取り除く為にも皮膚障害の客観的な評価法を確立した上で患者に合わせた適切なスキンケアを構築する必要がある。

今後は皮膚症状にあわせた適切なスキンケアの方針を立てるためにも、新しい評価方法へのアプローチを行い色彩評価の確立が望まれる。

5. 総 括

本研究では、分子標的抗がん剤による皮膚障害の色彩評価について調査したデータはなく、大腸がん患者の皮膚症状の色彩について経時的なデータが得られた。皮膚症状の色彩を数値化したが、皮膚障害の有無と色彩の数値には関連性が認められなかった。炎症の状態や程度を点数化するには、新しい評価方法へのアプローチを行う必要性が示唆された。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究費をご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深く御礼申し上げます。また、本研究の実施にあたりご協力頂きました大阪赤十字病院の薬剤師、消化器外科医師、外来通院治療センターの看護師の皆さんに対し厚く御礼申し上げます。最後に、本研究にご助言とご指導頂きました京都薬科大学臨床薬学教育研究センター矢野義孝教授に深謝いたします。

(引用文献)

1) Agero AL, Dusza SW, Benvenuto-Andrade C et

al., Dermatologic side effects associated with the epidermal growth factor receptor inhibitors, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **55**, 657-670, 2006.

2) Van Cutsem E, Challenges in the use of epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal cancer, *Oncologist*, **11**, 1010-1017, 2006.

3) Heidary N, Naik H, Burgin S, Chemotherapeutic agents and the skin: An update, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **58**, 545-570, 2008.

4) Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ et al., Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor, *J. Clin. Oncol.*, **22**, 1201-1208, 2004.

5) Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS et al., Cetuximab for the treatment of colorectal cancer, *N. Engl. J. Med.*, **357**, 2040-2048, 2007.

6) Stintzing S, Kapaun C, Laubender RP et al., Prognostic value of cetuximab-related skin toxicity in metastatic colorectal cancer patients and its correlation with parameters of the epidermal growth factor receptor signal transduction pathway: results from a randomized trial of the GERMAN AIO CRC Study Group, *Int. J. Cancer*, **132**, 236-245, 2013.

7) Van Cutsem E, Peeters M, Siena S et al., Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer, *J. Clin. Oncol.*, **25**, 1658-1664, 2007.

8) Iyatomi H, Oka H, Hagiwara M et al., Computerized quantification of psoriasis lesions with colour calibration: preliminary results, *Clin. Exp. Dermatol.*, **34**, 830-833, 2009.

9) Iizaka S, Sugama J, Nakagami G et al., Concurrent validation and reliability of digital image analysis of granulation tissue color for clinical pressure ulcers, *Wound Repair Regen.*, **19**, 455-463, 2011.

10) Lacouture ME, Mechanisms of cutaneous toxicities to EGFR inhibitors, *Nat. Rev. Cancer*, **6**, 803-812, 2006.

11) Lacouture ME, Mitchell EP, Piperdi B et al., Skin toxicity evaluation protocol with panitumumab (STEPP), a phase II, open-label, randomized trial evaluating the impact of a pre-emptive Skin treatment regimen on skin toxicities and quality of life in patients with metastatic colorectal cancer, *J. Clin. Oncol.*, **28**, 1351-1357, 2010.

12) Nozawa K, Shimizu C, Kakimoto M et al., Quantitative assessment of appearance changes and related distress in cancer patients, *Psychooncology*, **22**, 2140-2147, 2013.

統計的学習による「似合う」への計算論的アプローチの確立 — 一個人に似合う髪型の自動提示技術の開発を通して —

山梨大学大学院医学工学総合研究部

茅 暁 陽

Hairstyle is one of the most important features people use to characterize one's appearance. Since whether a hairstyle is suitable or not is relied on the aesthetic sense of human, it is difficult to model the suitability mathematically. We focused on the fact that the suitable hairstyle is related to one's face shape. This research proposes a new technique for automatically retrieving a suitable hairstyle from a collection of hairstyle examples through learning the relationship between face shapes and suitable hairstyles. We first designed the facial feature vector that are relevant to hairstyle. Aesthetic knowledge on face and hair stylists' ideas are used to design the facial features. And for producing realistic hairstyle images, we use matting and thin-plate-spline interpolation to improve the synthesis result. The four major contributions of this project can be summarized as follows: 1. A new framework for retrieving suitable hairstyles through learning the relationship between facial shapes and hairstyles from successful hairstyle examples. 2. The design of a compact feature vector space enabling fast non-parametric sampling in statistical learning. 3. A method of hair-face image composition utilizing modern matting techniques for synthesizing realistic hairstyle images automatically. 4. An evaluation experiment demonstrating the validity of the feature vector and the effectiveness of the example-based approach. Experiments have been conducted to investigate how different features of face shape can influence the results. The effectiveness of the proposed technique was validated through subject studies.

1. 緒 言

ヘアスタイルは人の外見を決める上で最も重要な要素の一つであり、ヘアスタイルを変えるだけで人に与える印象は大きく変わる。本研究では、ノンパラメトリックサンプリングに基づく似合うヘアスタイルの自動探索法を提案する¹⁻⁴⁾。「似合う」とは感性的な概念であり、その数値モデルを作成することは困難である。提案手法では、ヘアスタイルが似合うかどうかを決める最も重要な要因が顔の形状特徴であることに着目し、ヘアスタイルの成功例から顔の形状特徴とヘアスタイルとの関係を学習することにより、利用者の顔に似合うヘアスタイルを得る。図1に提案システムのフレームワークを示す。システムは大きく分けて学習と実行の2つの部分から構成される。学習では、ヘアスタイルカタログに掲載されているヘアスタイルを成功例とみなし、顔特徴とその顔に合ったヘアスタイルのペアを学習データとしてデータベースに格納する。実行時は、入力される利用者の顔画像に対し、データベース構築のときと同様の方法で顔特徴抽出を行う。そして、平均顔と比較し、個人の顔の特徴の強調を行い、顔特徴空間で距離の近い画像をデータベースから探索し、それと対になるヘアスタイルを似合うヘアスタイルとして出力する。出

力は入力顔画像にヘアスタイルを合成する形で提示する。Matting⁵⁾やThin-Plate-Spline⁶⁾補間技術を利用し、写実的なヘアスタイル画像の呈示が可能である。顔の形状特徴として、①顔の形や額の高さなど顔の基本形状を表す6次元のベクトル $V1 = (v1, v2, v3, v4, v5, v6)$ 、②基本形状に加えて顔の魅力度の知覚にもっとも寄与されている目間の距離と顔の幅の比及び鼻の長さとの顔の長さの比を加えた黄金比⁷⁾を考慮する10次元のベクトル $V2 = (v1, v2, \dots, v10)$ 、そして、③これらの特徴の平均顔からの差分、つまり利用者の顕著な特徴を表す12次元のベクトル $V3 = (v1, v2, \dots, v12)$ の3種類を用いて、それぞれの有効性について、評価実験を通して検証を行った。

2. 実験・結果

提案手法が似合うヘアスタイルの探索を実現できているかを確かめる被験者実験を行った。利用者本人が判断する似合うヘアスタイルと、利用者以外が判断する似合うヘアスタイルには違いがあることが予想されたため、自己評価と他者評価の2種類の評価実験を行った。自己評価の実験では利用者自身を被験者として、提示されたヘアスタイルについて評価を行った。他者評価の実験では利用者以外の被験者によって、提示される利用者のヘアスタイルの評価を行った。

なお今回の実験では、髪の色による影響を無視するために、カラー画像をグレースケール画像に変換して実験を行った。髪の色も似合うかどうかの判断に重要な影響を与えられられるが、個人の好みによるものが大きいこと、提案手法ではもっとも似合う髪の色に関する考慮がないことから、髪の色については無視して実験を行った。



A Computational Approach to Hairstyle Fitting Based on Statistic Learning

Xiaoyang Mao

Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, University of Yamanashi

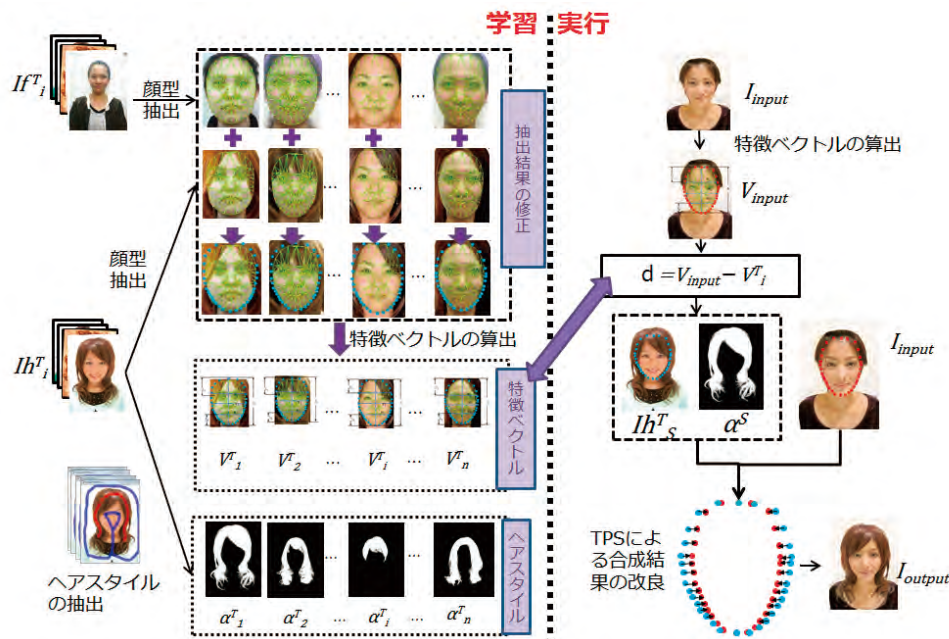


図1 提案システムのフレームワーク

2. 1. データベースの構築

本研究では、ヘアスタイリストが作ったヘアスタイル画像をデータベースに登録することでシステムを構築する。登録するヘアスタイルは利用者や利用場面に応じて変更することができる。

我々はまず、髪の毛の量と髪質、髪の毛の長さを属性値として与え、それぞれに対するデータベースを構築した。これは似合うと判断されたヘアスタイルでも、利用者の持つ髪の毛の量、髪質および髪の毛の長さによって実現できないヘアスタイルが提示されないようにするものである。髪の毛の量、髪質および髪の毛の長さをそれぞれ以下の3段階に分けてデータベースを構築した。

- ・髪の毛の量：多い、普通、少ない
- ・髪質：かたい、普通、やわらかい
- ・髪の毛の長さ：ロング、ミディアム、ショート

これらの属性値は一般的なヘアカタログで利用者への情報として記載されるものであり、ヘアカタログにこれらの情報の記載があれば、これをそのまま属性値として与えることができる。画像から自動で判別することができるが、撮影環境の違いや解像度の違いなどによって困難であった。本研究では、ヘアカタログに情報があるものについてはそのまま属性値として利用し、情報が無いものについてはデータベース作成時に手動で属性値を与えた。

一般向けデータベースはプロのヘアスタイリストが作った84枚のヘアスタイル画像によって構築した。男性向けデータベースでは、まずインターネット上のヘアスタイル画像283枚を集めた。属性値は手動で与えた。男性に好まれやすいヘアスタイルを選ぶために、15名の男性被験者



図2 評価用画像セット

にそれぞれのヘアスタイルについて好みであるかどうかを答えてもらった。このとき、顔によってヘアスタイルの好みは左右されないように、顔にぼかしを加えた画像を提示した。顔型はヘアスタイルが似合うかどうかの判断に必要であると考え、顔の輪郭にはぼかしを加えなかった。

2. 2. 一般向けデータベースでの自己評価実験(特徴ベクトルV1)

この実験では「利用者自身に似合うと思うヘアスタイル」と「提案システムから提示されるヘアスタイル」が一致しているかどうかを調べることを目的とする。被験者は女子大学生10名とした。10枚を1セットとする画像集を3セット用意する。それぞれの画像集には本研究で似合うと判断したヘアスタイルの画像2枚と無作為に選んだヘアスタイル画像8枚が含まれている。被験者は各画像集から自分に似合うと思う画像を上位3枚選択する。図2に示すように、

被験者は自分に1番目、2番目、3番目に似合うと思うヘアスタイルの画像の番号を順に選択する。10名の被験者が3セットの画像集に対して回答を行った、総試行回数は30回となる。

以下の3つのケースについて、回答に有意な偏りがあるかを調べた。

ケース1：被験者が1番に選んだヘアスタイルは、提案手法が似合うと判断するヘアスタイルである。

ケース2：被験者が1番と2番に選んだヘアスタイルのうち、少なくとも1枚は提案手法が似合うと判断するヘアスタイルである。

ケース3：被験者が1番、2番と3番に選んだヘアスタイルのうち、少なくとも1枚は提案手法が似合うと判断したヘアスタイルである。

画像集に含まれる10枚のすべての画像が選ばれる確率は同じであることを帰無仮説として、2項検定を行った。結果を表1に示す。

30回の試行に対して、ケース1は4回、ケース2は16回、ケース3は26回満たされた。ケース2は5%有意で、ケース3は1%有意で帰無仮説を棄却することができた。つまり、被験者は2枚か3枚を選ぶときに、少なくとも1枚は提案するシステムが似合うと判断するヘアスタイルを選ぶことがわかった。この結果から、提案するシステムがもっとも似合うとまではいえないまでも、よく似合うヘアスタイルを探索することができているといえる。

2.3. 一般向けデータベースでの他者評価実験 (特徴ベクトルV1)

この実験では「被験者以外の利用者が似合うと思うヘアスタイル」と「提案システムから提示されるヘアスタイル」が一致しているかどうかを調べた。被験者を13名の大学生(男性6名、女性7名)とし、10枚の画像を1セットとする画像集12セットを用意した。総試行回数は156回である。男女を区別しない実験結果を表2に示す。

156回の試行で、ケース1は34回、ケース2は80回、ケース3は102回満たされた。ケース2とケース3は1%有意で帰無仮説を棄却することができた。

しかし、13名の被験者の中で男性と女性の評価結果(表3, および表4)を分けてみると、男性の評価結果は全てで有意差がなく、女性の評価結果では全て有意であることがわかった。このことから、女性のヘアスタイルを判断するとき、男性と女性で似合うかどうかの判断基準が異なることがうかがえる。

2.4. 男性向けデータベースでの他者評価実験 (特徴ベクトルV1)

男性に好まれるヘアスタイルのみでデータベースを構築

した場合に、一般向けデータベースと比べてよい結果が得られるかを調べた。被験者は男子大学生19名と20代男性会社員6名、計25名とした。2.3.の実験と同様に、10枚の画像を含む画像集12セットを用意した。各画像集には提案システムが似合うと判断したヘアスタイル画像が2枚含まれている。被験者は各画像集から似合うと思う画像を上位3枚まで選択する。総試行回数は300回である。実験結果を表5に示す。

男性向けデータベースの評価では、ケース1から3まですべてで1%有意で帰無仮説を棄却することができた。こ

表1 一般向けデータベースの自己評価実験の結果 (**: 1%有意, *: 5%有意)

	選択された回数 (10名×3セット)	割合
ケース1	4	0.134
ケース2	16	0.533*
ケース3	26	0.867**

表2 一般向けデータベースでの他者評価実験の結果 (**: 1%有意)

	選択された回数 (13名×12セット)	割合
ケース1	34	0.218
ケース2	80	0.513**
ケース3	102	0.654**

表3 一般向けデータベースでの他者評価実験の結果 (男性被験者のみ)

	選択された回数 (6名×12セット)	割合
ケース1	12	0.167
ケース2	30	0.417
ケース3	40	0.556

表4 一般向けデータベースでの他者評価実験の結果 (女性被験者のみ, **: 1%有意)

	選択された回数 (7名×12セット)	割合
ケース1	32	0.381**
ケース2	50	0.595**
ケース3	62	0.738**

表5 男性向けデータベースでの他者評価実験の結果 (**: 1%有意)

	選択された回数 (12名×3セット)	割合
ケース1	50	0.347**
ケース2	74	0.514**
ケース3	101	0.701**

のことに、利用者に応じたデータベースを構築することにより、より似合うヘアスタイルを探索できることが確かめられた。

2. 5. 順位づけの妥当性の検証 (特徴ベクトル①)

提案手法では顔特徴ベクトル間の距離によって、似合うヘアスタイルを選択している。この距離が似合うヘアスタイルをよく表現できているかを検証するために、順位相関を調べた。

実験では、利用者以外の被験者6名(いずれも大学生、男性3名、女性3名)に、一般向けデータベースから得られる上位20枚のヘアスタイル画像を提示した。被験者には20枚の画像を似合うと思う順に選択してもらった。図3に評価に用いた画像を示す。

実験により求められたスピアマンの順位相関係数 ρ を求め、自由度18のt検定によって評価を行った。結果を表6に示す。

被験者6人の結果からは、1名で1%、3名で5%、2名で10%の有意水準で有意に相関が高いことが確かめられた。男女で比べると、女性でやや順位相関が高かった。この結果から、もっとも似合うヘアスタイルだけでなく、提案手法が与える距離が似合うヘアスタイルをよく表現できているといえる。

2. 6. ヘアスタイリストによる他者評価実験 (特徴ベクトルV1)

さらに、ヘアスタイリストによる評価実験を行った。被験者は美容師4名(男性2名、女性2名)とした。2.3.の実



図3 順位づけの妥当性検証のための提示画像

験と同じ画像集12セットを提示し、各画像集から似合うと思う画像を上位3枚まで選択してもらった。総試行回数は48回である。実験結果を表7に示す。

実験結果では、ケース3についてのみ5%有意で帰無仮説を棄却することができた。この結果は一般人による結果よりも悪くなったものの、本提案手法で選んだヘアスタイルが被験者に選ばれやすい結果は得られた。

被験者のうち1名からは「髪型を細分化してパーツごとに似合うものを選びたい」というコメントを得た。このコメントから、ヘアスタイリストは、顔と髪型の全体のバランスのほかに、顔と髪型の各部位ごとのバランスを見ていることがわかる。本提案手法では、全体のバランスのみによって似合うかどうかを判断しており、このことが、ヘアスタイリストの結果を一般人の結果よりも悪くしているのではないかと考察する。

2. 7. 個人特徴の強調及び黄金比の導入に関する評価実験 (V2, V3)

この実験は個人特徴の強調および黄金比の導入した合成結果について提案システムの有効性を検証するための実験である。本実験で利用した画像データセットは4種類(1: V2, 誇張なし; 2: V2, 誇張あり; 3: V3, 誇張なし; 4: V3, 誇張あり)である。

2. 7. 1. システムの有効性

被験者を20名の大学生(男性10名、女性10名)とし、10枚の画像を1セットとするそれぞれの実験用データベースからの画像集48セット(12セット×4種類)を用意した。総試行回数はそれぞれの画像データセットで240回である。また同様にヘアスタイリスト10名(男性7名、女性3名)を被験者とした実験も行った。総試行回数はそれぞれの画像データセットで120回である。

表6 順位づけに対する順位相関係数
(**: 1%有意, *: 5%有意, +: 10%有意)

被験者	男性			女性		
	1	2	3	4	5	6
ρ	0.40 ⁺	0.46*	0.26	0.61**	0.46*	0.37*

表7 ヘアスタイリストによる評価の結果
(*: 5%有意)

	選択された回数 (4名×3セット)	選択された割合
ケース1	13	0.271
ケース2	22	0.458
ケース3	31	0.646*

表8に示すように、一般人の結果では、240回の試行で、ケース1が満たされたのは53, 56, 57, 60回であった。個人特徴を誇張し、黄金比の特徴量も含めて合成した結果の方が5%有意である結果になった。ケース2とケース3では5%有意である結果となり、誇張した黄金比の特徴量を含めた合成結果の方が選ばれる確率は比較的高いことが分かった。一方、ヘアスタイリストの評価結果では、総試行回数は120回で、ケース1が満たされたのは15, 21, 16, 25回であった。すべて有意ではない結果となった。一般人の結果より悪いが、個人特徴を誇張し、黄金比の特徴量を含めた合成結果の方が良いと分かった。ヘアスタイリストは、2.6.の実験と同様に顔のパーツごとに似合うものを選ぶという観点を持っている。一般の人と違い、専門家はそれに関する知識と経験を踏まえて判断しているため、顔のパーツについての注目度が高いことが分かった。

2.7.2. 順位づけの妥当性

2.5.の実験と同じように個人特徴を強調し、黄金比の特徴ベクトルを導入し、最適なヘアスタイルをよく表現できるかを検証するために、順位相関を調べた。

この実験の被験者は20名(大学生, 男性10名, 女性10名)である。図4 (a) (b) (c) (d)はそれぞれの評価用画像データセットを示す。一般向けデータベースから得られる上位20枚の似合うヘアスタイル画像を提示した。被験者には20枚の画像を似合うと思う順に選択してもらった。

実験により求められたスピアマンの順位相関係数 ρ を求め、自由度18のt検定によって評価を行った。結果を表9に示す。相関が高いことが確かめられた。個人特徴を強調し黄金比を含めた特徴ベクトルで最も良い結果が得られた。

表8 個人特徴の誇張及び黄金比の導入システムの有効性に関する評価実験の結果 (*: 5%有意)

被験者	case	割合							
		強調なし		強調あり		強調なし		強調あり	
		実験結果	確立	実験結果	確立	実験結果	確立	実験結果	確立
一般人 (20人)	1	53	0.221	56	0.233	57	0.238	60	0.250*
	2	110	0.458*	113	0.471*	112	0.467*	120	0.500*
	3	154	0.642*	160	0.667*	153	0.638*	165	0.688*
美容師 (10人)	1	15	0.125	21	0.175	16	0.133	25	0.208
	2	44	0.367	50	0.417	49	0.408	56	0.467*
	3	65	0.542	79	0.658*	67	0.558	75	0.625*



図4 順位づけの妥当性検証のための提示画像セット

表9 順位づけに対する順位相関係数

(**: 1%有意, *: 5%有意, +: 10%有意)

被験者	順位相関係数 平均値	輪郭特徴(V10)		輪郭特徴+黄金比特徴(V12)	
		実験結果	確立	実験結果	確立
一般人 (20人)	ρ	0.51** (3人)	0.58** (2人)	0.51** (5人)	0.61** (6人)
		0.41* (12人)	0.47* (15人)	0.43* (13人)	0.49* (13人)
		0.32+ (5人)	0.35+ (3人)	0.34+ (2人)	0.40+ (1人)

3. 考 察

2.3. 節で紹介した実験では、男女被験者の評価結果が大きく異なることが分かった。また一部の男性被験者になぜこのヘアスタイルが似合うと思われたか聞いてみると、ロングがすきだからという回答があり、個人の好みが評価結果に大きく影響していることが分かった。男性がよいと評価したヘアスタイルで構築した事例データベースを使用することで、よい結果が得られた。似合うとは非常に主観的な概念であり、すべての人に適用できるような数理モデルを作成することが困難であるが、対象を考慮して適切な事例データを準備することにより、事例ベースアプローチが有効であることを確認することができた。

4. 総 括

本研究では、事例に基づく最適なヘアスタイルの生成技術を提案した。ヘアカタログから得られる成功例に基づいて似合うヘアスタイルのデータベースを構築し、顔型を基に似合うヘアスタイルを探索した。探索した結果は入力顔画像に対して最新の画像合成手法を用いて合成することで、ユーザに自然なヘアスタイル画像を呈示することができた。さらに個人特徴を誇張し、黄金比を表す特徴ベクトルを導入することにより、結果をさらに改善させることができた。

今後の課題として、顔型以外の特徴による似合うヘアスタイルの探索を挙げる。本研究では顔型の一部の特徴のみ

に焦点を当てて似合うヘアスタイルの探索を行ったが、顔の各部品の形状や髪の色も似合うかどうかの判断に影響を与えているものと考えられる。さらに、外見を決める上で服装も重要な要因の一つである。本研究で提案した技術は個人の特徴を考慮したファッション推奨にも応用できると考えられる。

(引用文献)

- 1) Wei Yang, Masahiro Toyoura, Xiaoyang Mao, Example-Based Hairstyle Advisor, International Symposium on Computational Aesthetics (CAe), Poster, 2011-8.
- 2) Wei Yang, Masahiro Toyoura, Xiaoyang Mao, Hairstyle Suggestion Using Statistical Learning, International Conference on MultiMedia Modeling (MMM2012), 2012-1.
- 3) 楊 薇, 豊浦 正広, 茅 曉陽, : 例に基づくヘアスタイルアドバイザー, 芸術科学会論文誌, Vol.11, No.4, pp.195-204
- 4) 楊 薇, 豊浦 正広, 茅 曉陽, : 顔特徴分析によるヘアスタイルアドバイザー, VCWS2013
- 5) Wang, M. Cohen, Optimized Color Sampling for Robust Matting, CVPR, 2007
- 6) Bookstein F.L. (1979). Shape Models II: The Thin Plate Spline. The Palaeontological Association.
- 7) P.M. Pallett Link, K. Lee S. (2010). New "Golden" Ratios for Facial Beauty. Vision Research 50, 149-154

19～20世紀にわが国で使用された含鉛おしろいに関する研究

東京大学大学院新領域創成科学研究科環境システム学専攻

吉 永 淳

Prevalence of non-infectious encephalopathy was high among children in *Meiji* and *Taisho* era in Japan. It had turned out that lead poisoning due to the use of face powder by their caretakers was the cause. In this study seven face powder samples, manufactured during *Meiji* era, were analyzed for lead by inductively coupled plasma mass spectrometry to characterize lead in those historic samples. Four of the 7 samples contained lead at elevated levels (17-55%) and the other one sample contained at moderate level (0.35%). Lead was not detected in the rest of the samples. Lead isotope ratios ($^{207}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$ and $^{208}\text{Pb}/^{206}\text{Pb}$) of the leaded face powders indicated that the face powder of those days contained lead either from Japanese or Australian ores. The lead isotope ratios were consistent with those in human hair of those days suggesting that leaded face powder was one of major contamination sources of lead of Japanese people of those days.

1. 緒 言

明治～大正時代のわが国で、小児の「脳膜炎」が多数見られたことが記録に残っている。ウイルスや細菌が原因の髄膜炎は現在でもよく見られる疾患であるが、当時の「脳膜炎」には非感染性で、原因がはっきりとしないものが多かったという。

この「脳膜炎」が、患児の親が使用していた含鉛おしろいによる鉛中毒であることを、大正12年(1923年)、京都大学小児科の平井毓太郎教授が突き止めた。1895年にその原因不明の「脳膜炎」(当時は「所謂脳膜炎」と称されていた)が最初に医学的に報告されてから原因解明まで四半世紀と長くかかったのであるが、その間の医学的な経緯については、堀口ら¹⁾及びそれに続く一連の文献に詳しい。

鉛を扱う作業現場などにおいて、高いレベルの鉛に長期間曝露すると、作業には主に神経系、消化管、腎臓、造血系に毒性があらわれ、貧血や鉛痙攣などの典型的な鉛中毒症状を呈する。神経系への毒性のうち、もっとも重篤なものが脳症であり、せん妄、昏睡、痙攣などの症状があらわれる。おしろいを多用する歌舞伎役者にもこうした鉛脳症と考えられる症状が見られたことは、「中村福助の鉛中毒事件」等の顛末とともに、「化粧ものがたり」²⁾に詳しく記述されている。成人に比べ小児の鉛の毒性への感受性は高いので、より少ない曝露量で神経系への影響がみられる可能性があり、明治～大正期の「脳膜炎」には、現在知られているところのこの脳症がかなり含まれていたと考えられ

る。その後、平井教授の指摘に基づき、1934年に内務省令によって含鉛おしろいの製造・販売が禁止されると、「脳膜炎」患児数は減少の一途をたどったといわれている。

筆者は、先史時代～近現代までのわが国における人体鉛汚染に関する研究を続けている。上記のような鉛脳炎の多発が知られている明治～大正時代というのは、わが国の鉛人体汚染史からみてもきわめて特徴的な時代であったと考えて、「かもじ」や針山の詰め物として残されていた、この時代の日本人成人女性の頭髪の鉛分析を行った経験がある³⁾。その結果、この時代の女性の頭髪には、現代の数百倍という、きわめて高いレベルの鉛が検出され、当時の人々に高いレベルの鉛汚染があったことが裏付けられた。さらに1930年代以降の頭髪サンプル中鉛濃度は大きく減少しており、上記の含鉛おしろいの製造・販売禁止の時期とよく一致していた。また、一般に鉛の原産国の違いを反映する鉛安定同位体比を測定すると、明治～大正時代の女性には、日本産とは明らかに異なるきわめて特徴的な同位体比の鉛を頭髪中に含有する人が多かったことを見出した。

以上のことを背景として、当時使用されていたおしろいの鉛濃度や安定同位体組成と、当時の女性の頭髪中鉛のそれとの比較をすることで何らかの新しい情報が得られるかを調べるために、おしろいの鉛分析を行うこととした。

2. 実 験

2.1. 分析試料

ポーラ文化研究所よりご提供いただいたおしろい、「都の花」「歌舞伎香」の2種類(入手時には含鉛/無鉛不明)及び、ビューティーサイエンス学会高橋雅夫先生よりご提供いただいた、「姿見香」「無類御化粧」(以上含鉛おしろい)、「ちごさくら」「白雪」「御園のつぼみ」(以上『無鉛おしろい』として販売されていた)の5種類、合計7種類の明治時代おしろいを分析試料として用いた。



Leaded face powder used in 19-20th century in Japan

Jun Yoshinaga

Department of Environment Systems,
Graduate School of Frontier Sciences,
University of Tokyo

2. 2. 鉛分析

おしろい試料は、7mL容のテフロンPFA製のネジ蓋付分解容器 (Tuf-tainer vial) に5～30 mgを精秤し、超高純度硝酸 (多摩化学, 川崎) を1 mL加えた。分解容器の蓋を締め、しばらく室温放置した後、ステンレス製分解容器に挿入し、140℃, 3時間加熱・加圧分解を行った。分解終了後、冷却してから、精製水を用いて分解容器の内容をポリプロピレン製ボトルに洗いこみ、50～100 gとして、試料分解原液を作製した。この原液を適宜0.14 mol/L硝酸で希釈して、鉛分析用試料とした。

おしろい分解液中の鉛濃度の測定は、10 mg/L混合標準液 (XSTC-622, SPEX, USA) を希釈して作製した鉛1 ng/gの検量線用標準液を使用して作成した検量線に基づいて行った。鉛濃度測定には、誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS) (Agilent 7500ce, アジレントテクノロジージャパン, 東京) を使用した。測定には²⁰⁸Pbをモニター同位体とし、3ポイント取り込み、各ポイント100 msec積分 (0.3 sec積分/マス)、100 スキャンを3回繰り返し測定した。

測定して得られた各おしろい試料の分解液中鉛濃度を基にして、鉛濃度を約5 ng/gになるように再希釈を行い、同じICP-MSを使用して²⁰⁷Pb/²⁰⁶Pb, ²⁰⁸Pb/²⁰⁶Pbを測定した。米国National Institute of Standards and Technology (NIST) の鉛安定同位体比測定用認証標準物質NIST SRM 981を、おしろい試料と同様に5 ng/gに調製して同位体比測定用の装置校正を行った。²⁰⁶Pb, ²⁰⁷Pb, ²⁰⁸Pbそれぞれ3ポイント取り込み、各ポイント0.33秒積分とし (1 sec積分/マス)、1000 スキャンに設定し、各試料5回測定を行った。なお鉛同位体比測定の精度は、どちらの比も、変動係数としておよそ0.3%程度であった。

3. 結 果

7試料の明治時代おしろいの鉛分析結果 (濃度および同位体比) を表1にまとめて示した。無鉛おしろいとして販売されていたという「ちごさくら」「白雪」「御園のつぼみ」の3種のうち、「ちごさくら」のみ低いレベルの鉛 (0.35%) が検出されたが、他2種からはたしかに鉛が検出されな

表1 分析したおしろい (明治時代) の鉛濃度および安定同位体比

	鉛濃度 (%)	²⁰⁷ Pb/ ²⁰⁶ Pb	²⁰⁸ Pb/ ²⁰⁶ Pb
都の花	55	0.942	2.203
歌舞伎香	32	0.847	2.091
姿見香	28	0.847	2.088
無類御化粧	17	0.847	2.078
ちごさくら	0.35	0.884	2.131
白雪	<0.01	—	—
御園のつぼみ	<0.01	—	—

った。一方、「都の花」「歌舞伎香」「姿見香」「無類御化粧」の4種のおしろいからは17～55%という高濃度の鉛が検出され、いわゆる含鉛おしろいであったことが裏付けられた。

鉛が検出された5試料の鉛安定同位体比のうち、「歌舞伎香」「姿見香」「無類御化粧」の3試料はきわめて近い値であった。この3試料と大きく離れた同位体比を持つのが「都の花」で、低濃度鉛が検出された「ちごさくら」は「都の花」と他3種とのちょうど中間くらいの値であった。

4. 考 察

含鉛おしろい4試料のうち、3試料の²⁰⁷Pb/²⁰⁶Pbは0.847で同じであり、²⁰⁸Pb/²⁰⁶Pbが2.078～2.091と非常に近い値であった (表1)。これは国内の鉛鉱山から算出する鉛 (²⁰⁷Pb/²⁰⁶Pb=0.844±0.007, ²⁰⁸Pb/²⁰⁶Pb=2.093±0.014) とほぼ同じ同位体比である。このことから、「歌舞伎香」「姿見香」「無類御化粧」は国内産鉛を原料とする鉛化合物を含むものと考えられる。一方、「都の花」の²⁰⁷Pb/²⁰⁶Pb、²⁰⁸Pb/²⁰⁶Pbは0.942, 2.203と、他の含鉛おしろい3試料とは全く異なる同位体比をもっており、このおしろいに使用されている鉛は国外から輸入されたものであることが明らかである。貿易統計によると、1900～20年にわが国に輸入されていた鉛の産地は、オーストラリア (43%)、日本 (24%)、アメリカ (19%) の順であったという⁴⁾。オーストラリアの代表的な鉛鉱山であるBroken Hillの鉛の²⁰⁷Pb/²⁰⁶Pbは0.96であることが知られている⁴⁾。「都の花」の同位体比はこれと近い。もともと無鉛おしろいとして販売されていて、他4試料と比較すると1/100程度の含有量であった「ちごさくら」中の鉛は、意図的に添加されたものか、原材料や生産ラインの汚染によって、非意図的に混入してしまったのかは明確には判断できないが、その同位体比は国産とオーストラリア産のちょうど中間の値であった。意図的な添加であればどちらかの値を取るのではと想像されるので、「ちごさくら」中の鉛は、非意図的な混入の結果であったと想像することができる。

明治～大正時代の女性の頭髮中鉛同位体比³⁾と今回測定したおしろい及び国産とオーストラリア産の鉛鉱石のそれとを図1にプロットした。図示したように、おしろい、頭髮、鉛鉱石 (日本、オーストラリア) の²⁰⁷Pb/²⁰⁶Pb、²⁰⁸Pb/²⁰⁶Pbプロットは直線上にのる。これは鉛の各同位体の親元素 (ウラン及びトリウム) の放射壊変の半減期に依存した、鉛の「成長曲線」に沿ったものであるためである。当時の女性の頭髮鉛の同位体比は、日本産の鉛とは大きく異なる同位体比をもっていることはすでに指摘し、当時の環境を汚染していた鉛の同位体比⁴⁾とも異なることから、頭髮中の高いレベルの鉛濃度は環境汚染が原因でないことを議論している³⁾。環境汚染でなく、人体のみを汚染するということは、

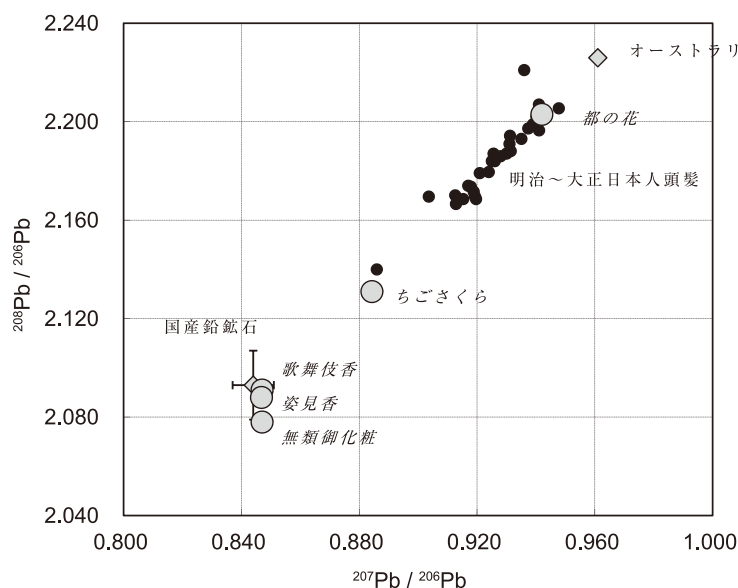


図1 含鉛おしろい、頭髪、鉱石の鉛安定同位体比

生活環境の中で、人々の身近で使用される「もの」からの直接の汚染であろうと推測される。これだけ鉛濃度の高いおしろいが当時家庭内で使用されていたのだとすれば、頭髪に見いだされた人体鉛汚染の原因として、含鉛おしろいがその有力な候補であると考えるのが自然であろう。

当時の女性の頭髪鉛の同位体比は、多くが図1の右上方向に分布しており、また、分布に多少の幅がある、すなわち頭髪中の鉛は産地の異なる複数の鉛の混合物であることがわかる。このことは、国産鉛を使用したおしろいよりも、オーストラリア産鉛を使用したおしろいへの依存度が高かったこと、しかしおそらく女性たちは一種類のおしろいではなく、複数のブランドのおしろい（日本産鉛のおしろいとオーストラリア産のもの）を使用していたこと、を示唆している。

今回分析した含鉛おしろいでは、国産鉛を原料とするものが3点、オーストラリア産鉛を原料とするものが1点と、たまたま国産ものの方が多かったが、図1を見る限り、オーストラリア産鉛を原料とするおしろいの方を使用する女性の方が多かったものと考えられる。おしろいの原料成分の鉛が国産であろうとオーストラリア産であろうと、そのことはおしろいの品質等とは関係がなかったはずであり、おそらく単純に市場に出回るおしろいの多くがオーストラリア産鉛を使用していたものであったのであろう。このことは、当時の貿易統計でオーストラリア産鉛がもっとも多く用いられていたこと⁴⁾によっても支持される。

5. 総 括

明治時代のおしろい7点に含まれる鉛の分析を行った。

7点中4点には鉛が17～55%という高濃度で含まれており、含鉛おしろいであることが明らかとなった。2点に鉛は検出されず、1点にはおそらく製造過程での非意図的な混入と考えられる低濃度鉛が検出された。含鉛おしろいの鉛安定同位体比は、純国産鉛を含むおしろいと、オーストラリア産鉛を含むおしろいがあることを示していた。明治～大正期の日本人女性の頭髪鉛同位体比についての筆者の既発表データと比較すると、当時の女性はオーストラリア産鉛を含むおしろいの使用が多かったこと、同じ女性でも複数のおしろいを使用していたことなどが示唆された。

(文献)

- 1) 堀口俊一, 寺本恵子, 西尾久英, 林千代(2008)「児科雑誌」に発表された仮称所謂脳膜炎(鉛毒性脳症)に関する研究の足跡(1) 平井毓太郎による究明まで. 労働科学 84: 62-71.
- 2) 高橋雅夫(1997)化粧ものがたり. 雄山閣, 東京.
- 3) M. Matsumoto, J. Yoshinaga (2010) Isotope ratios of lead in Japanese women's hair of the twentieth century. Environmental Sciences and Pollution Research 17: 643-649.
- 4) Y. Hirao, H. Mabuchi, E. Fukuda, H. Tanaka, T. Imamura, H. Todoroki, K. Kimura, E. Matsumoto (1986) Lead isotope ratios in Tokyo Bay sediments and their implications in the lead consumption of Japanese industries. Geochemical Journal 20: 1-15.

國際交流報告

自己顔に対する意識に関する研究 ―日韓における違い―

カリフォルニア矯正歯科 三軒茶屋 (元：北海道大学病院咬合系歯科矯正歯科)

日下部 豊 寿

The purpose of this study was to investigate how laypersons are aware of their own faces via a questionnaire between Japanese and Korean. The selected subjects were Sixty Japanese and 60 Korean females from 18 to 27 years old, who are students in Dental Hygienist Academy. All subjects are asked to fill out a questionnaire about awareness of their own facial appearance describing focusing on the visual impression. The Japanese and Koreans are similar anatomically. However, they chose the one that will completely different likes of own face. In addition, Japanese compared to Koreans, had to feel about the front than profile, and especially for nasolabial. Compare Koreans, Japanese felt a very dissatisfaction for their own profile.

1. 緒 言

近年、歯科の中でも矯正治療に対する意識が向上し、虫歯の治療だけではなく歯並びや顎の位置がずれているかみ合わせを治す歯科矯正治療を希望する患者が増加している。特に、成人になってから矯正治療を希望する患者数は大きく増加している¹⁾。歯科矯正治療のゴールは「きれいな歯並びを獲得する」という目的のみならず、正しい口腔機能を達成するための「個性正常咬合(正しいかみ合わせ)」を確立するという目的がある。また、近年ではかみ合わせの善し悪しが健康長寿や体の不具合に深く関連するとも考えられていることから、医科からも注目を集める部分である。一方、歯科矯正治療は歯並びやかみ合わせの改善と同時に歯と口唇との相互位置も変化することから、口元を中心とした顔貌の改善を主訴として治療を期待する患者も少なくない。口元は側貌の美しさを決める上で重要な意味を持つと考えられており、歯科矯正治療ではTweedが「顔面線(横顔)の調和」を治療目標の1つに掲げるなど、実際の治療ゴールを考える上では側貌(横顔)形態が歯科矯正学においては重要な位置づけにある。この側貌形態の計測には、Tweed分析²⁾や一般的にも有名なRickettsのEsthetic line(E-line)³⁾などの軟組織分析がある。顔面は頭蓋骨や顔面骨さらには顎骨などの骨組織の上に多種多様の筋肉や脂肪がのっており、この上に皮膚組織がのって軟組織を形成している。さらに、上下顎骨にある歯槽骨には歯が植立しており、この位置が口唇の状態を決める大きな要因となる。このため、側貌を考える時にはこれら歯や骨組織や筋肉、

さらには皮膚や脂肪組織なども大きく影響することを踏まえる必要があることは言うまでもない。これを背景に、歯科矯正治療では側面のレントゲン写真(セファログラム)から硬軟組織に関わる各種解析を行い、いわゆる「美しい横顔」を一つのゴールとして提案している。しかし、(1)日本人はそもそも横顔に対する認識が強いという報告⁴⁾、(2)各種メディアの普及により美しさに対する認識がボーダーレスになってきている可能性があること、(3)顔面軟組織形態は骨格に大きく左右されること、(4)ほうれい線の問題などagingに対する認識が強くなっていること、など、従来からある古典的な手法のみで美しさを判断、提案するには不十分と言わざるを得ない環境に直面している。これまでの研究手法では「術者が」あるいは「一般人が」他人の側貌に関してどのような印象を持つかというものが主体であったが、そもそも自分自身が自分の顔をどのように感じているのか、という視点に欠けるものであった。このようなことを背景に今回、術者サイドからのretrospectiveな研究ではなく、「一般人や矯正患者が自分自身の自己顔に対してどのような意識をもっているのか、また、これが本人の顔面軟組織形態とどのような関連にあるのか、さらにこれらの個々人がどのような顔貌を好むのか、を明らかにすること」とした。このような目的で、以前当財団の協力により、日本人の自己顔に関する意識調査をさせていただく機会をもらった。結果、一般人のE-line(横顔から鼻と顎に接する線)からの平均的な口元の位置は、Rickettsの言う好ましいシルエットに近似しているにも関わらず、自己顔の“横顔の全体印象”や“横顔の輪郭”はやや不満の傾向にあった。また、“口や口元周囲”、“鼻”そして“顎”など横顔の印象は、やや不満に感じていた。これらから、鼻、唇そして顎から成り立つE-lineが、好みの横顔を理解する上でとても重要であることを示すと考えた。一方、これらの結果はまた、口唇とE-lineの距離と同時に、構成要因や形の間で包括的な関係が、横顔の好みを決定することも示唆する。すなわち自己顔は、口元が後方にあり、好みの横



Investigation of Consciousness for Own Facial Appearance between Japanese and Korean

Toyohisa Kusakabe
California Orthodontics Sangenjaya

顔も口元が後方にあったが、一般人は自己顔についてやや不満を感じていた。それを受けて、大韓民国は日本に一番近い国であると同時に、日本人に最も近い民族といわれている。そんな隣国でありながら、審美に対する意識は、美容外科の普及をみても、日本人より高いことがうかがえる。そこで今回、日本人と韓国人の間で、自己顔の意識にどのような違いがあるか明らかにすることを目的に、研究を行った。

2. 実験

2.1. 対象

本研究は北海道大学病院倫理委員会とウルサン大学ASAN病院倫理委員会の審査を経て行うものである。研究対象は本研究への同意がえられた18歳以上の女性で、北海道大学病院咬合系歯科にて実習を行った衛生士学校学生の女性60人と、韓国ASAN病院矯正歯科(ソウル)にて実習を行った衛生士学校学生の女性60人を対象とした(18歳から27歳)。

2.2. 顔面写真撮影方法

被験者顔貌写真を規格化して撮影した。すなわち、頭部固定を左右のイヤードットにておこない、被写体、カメラ間距離を1.5mとして撮影を行った。カメラはNikon社製D40にて焦点距離55ミリのレンズを用いた。さらにパソコン上での計測のため、ルーラーを同じ画面に写すこととした。顔面規格写真の撮影は正面、45度斜位、側面の方

2.3. 資料

撮影した画像データから等倍に印刷した側面の顔貌写真(以下側貌写真)を作成し資料とした。次に、側貌写真上で各対象のE-lineを設定し上下口唇との距離を計測した。な

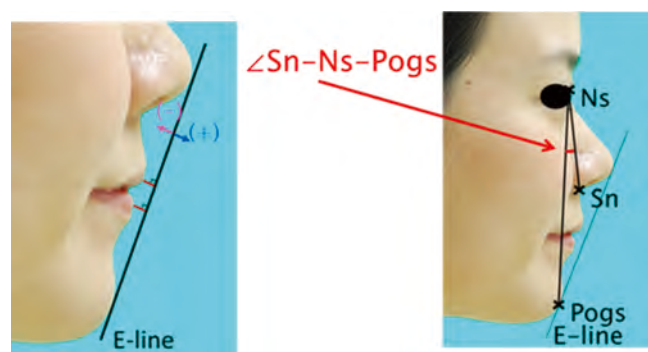


Fig. 1 側貌写真上にE-lineを設定し、上下口唇との距離およびSn-Ns-Pogsの角度を計測した。

お、E-lineの設定は鼻尖とオトガイを結ぶ接線とした(Fig. 1)。また、計測に際しては、E-lineより前方に口唇がある場合を「+」、後方にある場合を「-」とした。

側貌写真からは、上下顎の骨の前後的位置関係を調べた。レントゲンを使わず、佐藤の方法で軟組織から計算⁵⁾した(Fig. 1)。

2.4. アンケート調査

被験者に対して、以下の自己顔に対する意識に関するアンケート⁶⁾調査を行った(Table 1)。アンケートは30項目からなるが、内訳は(1)正面顔、横顔、斜め顔の印象、アウトラインの印象、など顔全体に関する印象からなる9項目、ならびに(2)目、鼻、口、口元、かみ合わせ、歯、唇、あご、えら、などの個々のパーツからなる15項目と、横顔やほうれい線に関する意識調査の6項目とした。これらのアンケートは満足から不満までの5段階評価の尺度順位の形式をとるものである。さらに本アンケートに加えて、(3)我々が所蔵する日本人側貌の平均シルエットを基準にE-lineをもとに上下口唇部を一塊にして前後に2mmずつ移動させて作製した8枚のシルエットと、同様にオトガイ部を前後に2mmずつ移動させて作製した8枚からなる2種類のシルエットシリーズを作製し、それぞれで「最も好ましいもの」を抽出させた(Fig. 2)。また、(4)今までに自分の横顔を写真やビデオ等で意識してみたことがあるか、化粧の時(髪ではなく)、横顔を意識して見たことがあるか、一日に何度くらい鏡をのぞくか、化粧の時に特に注意する

Table 1 アンケートの一部

	1満足	2どちらかというと満足	3どちらともいえない	4どちらかというと不満	5不満
正面顔全体の印象	(1	2	3	4	5)
斜め顔全体の印象	(1	2	3	4	5)
横顔全体の印象	(1	2	3	4	5)
顔の輪郭(正面)	(1	2	3	4	5)
顔の輪郭(側面)	(1	2	3	4	5)
顔の各部分のバランス	(1	2	3	4	5)
顔の左右のバランス	(1	2	3	4	5)
口元全体の印象	(1	2	3	4	5)
唇全体の印象	(1	2	3	4	5)
まゆ	(1	2	3	4	5)
まぶた	(1	2	3	4	5)
目	(1	2	3	4	5)
ひたい(おでこ)	(1	2	3	4	5)
鼻	(1	2	3	4	5)
耳	(1	2	3	4	5)
ほほ	(1	2	3	4	5)
上唇	(1	2	3	4	5)
下唇	(1	2	3	4	5)
あご	(1	2	3	4	5)
えら	(1	2	3	4	5)
歯	(1	2	3	4	5)
歯並び	(1	2	3	4	5)
自分の横顔は好きですか?	(1	2	3	4	5)
自分の笑顔は好きですか?	(1	2	3	4	5)

点はどこか、などの日常生活に関するアンケートを行った。一方、これらのアンケートの後に先に撮影した本人の顔貌の画像データをタブレットPC (iPad 2, Apple社) 上に描出し、(5) アンケート (1), (2) 上で自己顔に対して「満足」もしくは「不満」という点数を与えた項目についての具体的内容に関しての聞きとり調査を行った。

3. 結 果

上下口唇の突出度の平均値 (Table 2) と好みのシルエット (Fig. 3) は、日本人の衛生士学校の学生群も、韓国の衛生士学校の学生群も共に平均的なものを選んでいった。これは、解剖学的には極めて近似している両群であったが、自



Table 2 日本人と韓国人の、上下口唇と E-line との距離の平均値、最大値、最小値、中央値。

Japanese	ave.	max.	min.	median
upper lip	-0.8	4.5	-6.0	-0.5
lower lip	0.9	5.4	-4.6	1.0

Korean	ave.	max.	min.	median
upper lip	-0.4	3.6	-5.1	-0.2
lower lip	1.0	4.7	-4.1	1.4

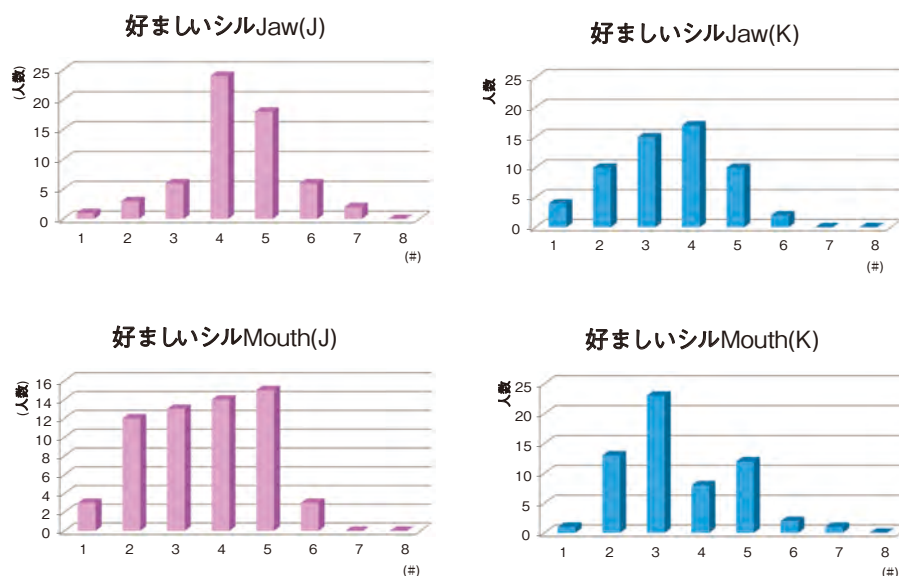


Fig. 3 日本人(J)と韓国人(K)の、好ましいシルエット

己顔に対する好み (Table 3-1) は全く異なる傾向を示した。また、どちらかという日本人は韓国人より、横顔を意識しないが、正面から見られるほうれい線やその深さを気に

していた (Table 3-2)。特に、側貌形態は、平均値は比較的近似していたが (Fig. 4, 5)、極めて不満の程度が高いことが解った。

Table 3-1 日本人 (Japanese) と韓国人 (Korean) のアンケート結果

Japanese					Korean				
	1:満足、5:不満 ave.	max.	min.	median.		1:満足、5:不満 ave.	max.	min.	median.
正面顔全体の印象	3.7	5	1	4	正面顔全体の印象	3.2	5	1	3
斜め顔全体の印象	3.7	5	2	4	斜め顔全体の印象	3.4	5	1	3
横顔全体の印象	3.9	5	3	4	横顔全体の印象	3.5	5	1	4
顔の輪郭(正面)	3.9	5	2	4	顔の輪郭(正面)	3.3	5	1	3
顔の輪郭(側面)	3.8	5	2	4	顔の輪郭(側面)	3.7	5	2	4
顔の各部分のバランス	3.6	5	2	4	顔の各部分のバランス	3.3	5	1	3
顔の左右のバランス	3.7	5	1	4	顔の左右のバランス	3.5	5	1	4
口元全体の印象	3.7	5	2	4	口元全体の印象	3.2	5	1	3
唇全体の印象	3.5	5	1	4	唇全体の印象	3.0	5	1	3
まゆ	3.3	5	1	3	まゆ	2.5	4	1	3
まぶた	3.5	5	1	4	まぶた	2.7	5	1	3
目	3.5	5	1	4	目	2.6	5	1	2.5
ひたい(おでこ)	3.1	5	1	3	ひたい(おでこ)	2.9	5	1	3
鼻	3.6	5	1	4	鼻	3.2	5	1	3
耳	2.7	5	1	3	耳	2.3	5	1	2
ほほ	3.5	5	1	3	ほほ	2.9	5	1	3
上唇	3.3	5	1	3	上唇	2.6	5	1	3
下唇	3.3	5	1	3	下唇	2.6	4	1	3
あご	3.6	5	1	4	あご	3.5	5	1	3.5
えら	3.4	5	1	3	えら	3.5	5	1	3
歯	3.1	5	1	3	歯	3.1	5	1	3
歯並び	3.2	5	1	3	歯並び	3.1	5	1	3
かみ合わせ(前歯)	3.1	5	1	3	かみ合わせ(前歯)	3.0	5	1	3
かみ合わせ(奥歯)	2.8	5	1	3	かみ合わせ(奥歯)	2.5	5	1	2

Table 3-2 日本人 (Japanese) と韓国人 (Korean) のアンケート結果

Japanese	1 よくある	2 どちらかというところ	3 どちらともいえない				
	4 どちらかというところ	5 全くない	ave.	max.	min.	median	
今までに自分の横顔を写真やビデオ等で意識してみたことがありますか?			2.8	5	1	2	
化粧の時(髪ではなく)、横顔を意識して見たことがありますか?			3.4	5	1	3	
	1:気になる	2:どちらかという気になる	3:普通				
	4:どちらかという気にならない	5:気にならない					
ほうれい線は気になりますか?			3.1	5	1	3	
ほうれい線の深さは気になりますか?			3.3	5	1	3	

Korean	1 よくある	2 どちらかというところ	3 どちらともいえない				
	4 どちらかというところ	5 全くない	ave.	max.	min.	median	
今までに自分の横顔を写真やビデオ等で意識してみたことがありますか?			2.0	5	1	2	
化粧の時(髪ではなく)、横顔を意識して見たことがありますか?			2.0	5	1	2	
	1:気になる	2:どちらかという気になる	3:普通				
	4:どちらかという気にならない	5:気にならない					
ほうれい線は気になりますか?			3.4	5	1	3	
ほうれい線の深さは気になりますか?			3.7	5	1	4	

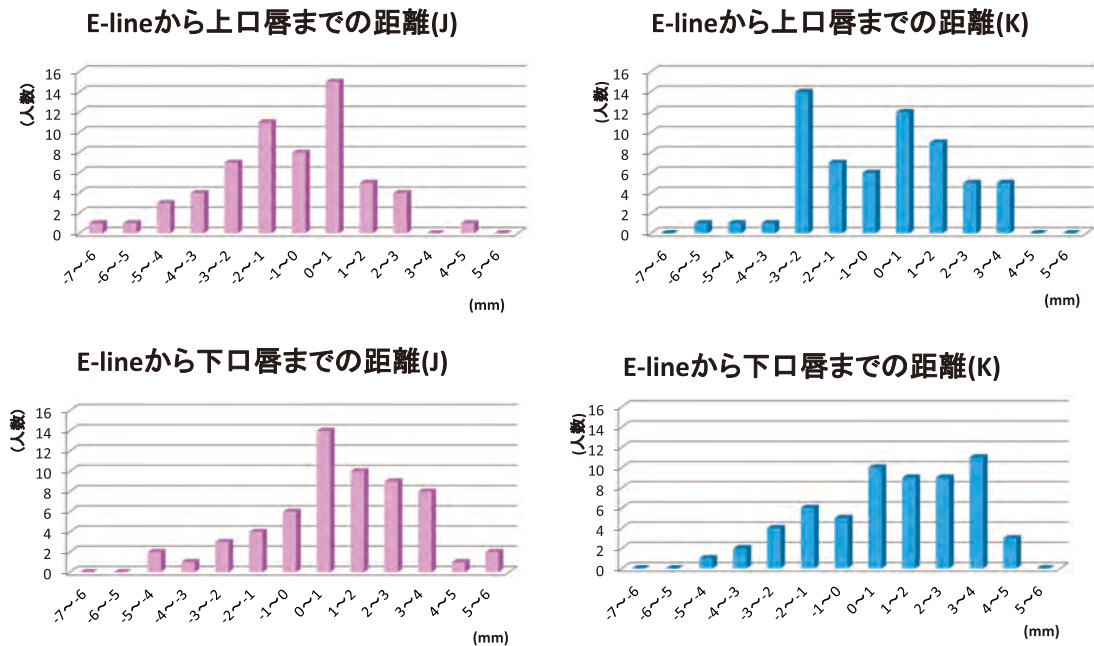


Fig. 4 日本人(J)と韓国人(K)の、上下口唇とE-lineとの距離

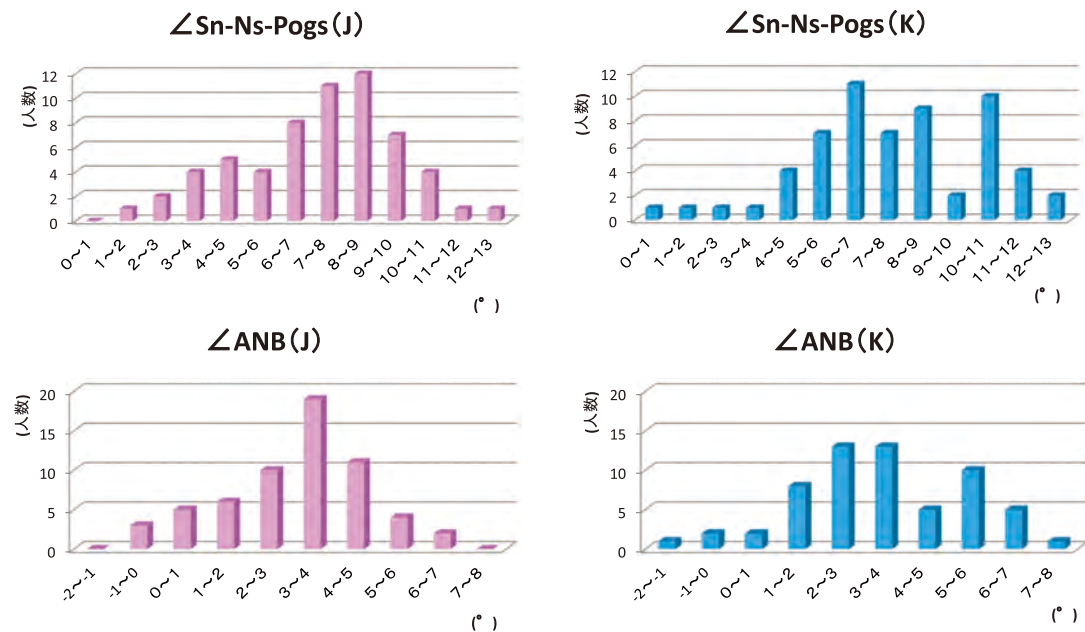


Fig. 5 日本人(J)と韓国人(K)の、Sn-Ns-PogsとANBの角度

4. 考 察

両外来ともに、1年を通して複数の歯科衛生士学校の実習生が来るため、日本と韓国で同時に平行して実験を行うことで、研究成果の抽出に時間的な効率化を図ることができた。そのため、1. 実験の周辺整備、2. 途中経過そして、3. データがそろったところの2回現地に赴き、短期間で話し合いをもつことができた。一方、両外来に実習に来ている歯科衛生士学校の学生を選択した理由は、1. 両被験者

集団は、歯科衛生士学校の学生であること、2. 学生のためある程度の年齢に集約出来ること、3. 男性に比較して美に対する意識が高いことなど、国の違いだけである程度相似した集団のため、データのばらつきが制約されるため被験者として適当であると考えた。

これまでの研究は一般集団の個々人や歯科矯正治療を受ける患者がどのように自己顔を認識しているのか、という基本的な観点については全く検討しておらず、一般的に「美しい横顔」あるいは「矯正歯科医師が美しいと判断した横

顔」といった概念に偏在しているという大きな欠点がある。このような展開は、各個人がもつ顔面形態とこれに対する意識、さらにはagingに対する顔貌の変化とこれに対する意識の変化といった人間がもつ根源的なものを網羅できない危険性を有すると考えられる。

本研究ではこれらの点を十分に考慮することで、「各個人が自分の顔を（おそらくは社会に存在するひとりの人間として）どのようにとらえているのか」を導き出すことを目的とするものであり、個々人の認識の上にいわゆる「歯科矯正治療におけるオーダーメイド治療」の展開の可能性があるという認識である。

軟組織に関わる評価はいわゆる「attractiveness」や「preference」といったキーワードに深く関連づけられるため、評価そのものが困難であり、人種や文化のバックグラウンドを考慮する必要もあることから、一般的に研究対象の抽出には難しい面を有する。これに対してわれわれはこれまでも、「自己顔」に対する「attractiveness」という観点から軟組織側貌を検討した実績を有し、この部分の研究の有用性と重要性を示唆している⁶⁻⁸⁾。さらにわれわれは軟組織の形態は「美しさ」という点のみならず、口唇閉鎖が可能かどうかというきわめて機能的な側面と密接に関連することを示唆しており^{9,10)}、「機能的な形は優れた形態美をも有する」ことは人間においても両立するというのが着想の発端である。

結果より、今回用いた被験者のE-lineからの平均的な口元の位置は、Rickettsの言う好ましいシルエットに近似していた。この値は過去の日本人の報告に比べややE-lineに対して後方に位置するものである。一方、自己顔の“横顔の全体印象”や“横顔の輪郭”、“口や口元周囲”、“鼻”そして“オトガイ”など横顔の印象は、やや不満に感じていた。これらの項目は概ね「横顔」に関するものであることは注視すべき点である。一般集団を用いて行ったわれわれの研究⁵⁾ではE-lineに対する上下口唇の位置は今回の被験者よりもやや前方にあり一般的な「attractiveness」とはやや乖離していたために不満の程度が強いとも考えられた。しかし、今回の被験者は少なくともE-lineに対する上下口唇の位置はRickettsの言う好ましいシルエットに近似していたにも関わらず不満の程度が強かった。このことは、推察の域をでないものではあるが、日本人は横顔そのものへの抵抗（嫌悪）があるという見方をすることもできると考えられる。また、韓国人に比べると、日本人の方がより不満度が強かった。しかし、日本と韓国の女子大生に対する研究において、1994年の大坊の報告¹¹⁾では日韓ともにあまり変わらないという報告であった。また、これらの被験者においては、そもそも「横顔を意識してみることがあるか」「化粧の時（髪ではなく）、横顔を意識して見たことがあるか」の問いに対しては「あまり意識していない」という回答を示す傾

向がみられた。これらより、日本人にとっては、横顔の概念が非日常の概念につながり、若干の抵抗感を示すものとも考えられる。

現在、われわれは、歯科矯正治療を希望する患者と一般集団という異なる2つの集団で自己顔への意識の調査を、形態学的な観点を踏まえて行っている。これら2群は美に対する意識が異なり、矯正患者の方で意識が高いという仮説を立てている。今回用いたアンケートは、これら矯正患者が自己顔についてどのように認識し、良い点や悪い点をどのように認識しているか、あるいはそれに対してどのような「執着」をもって対応しているかがわかるものになっている。これらの集計から、自己顔に対する満足の程度の高い部分や不満の程度の高い部分が抽出されると予想している。いわゆるほうれい線については、メディアなどでも露出頻度は高い。しかしながら、形態学的な裏付けや個人の好みまで含めた検討は皆無である。これまで我々はMidfacial Line（横顔における頬の張り出し）の検討を行ってきた⁷⁾。矯正治療を希望する患者においてはセファログラムを撮影することから、今後はさらにほうれい線に関する調査が可能になると考えられる。

以上より、日韓の間の相違は、形態の問題ではなく、文化的な違いが大きく寄与していると考えられる。

5. 統 括

今回の研究では、日本人と韓国人との間では、解剖学的には極めて近似していたが、自己顔に関する好みは全く異なる傾向を示した。特に側貌に関しては、日本人の方が不満の程度が高かった。

謝 辞

本研究を実施するにあたりご支援いただきました公益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^{12,13)}。また、本研究の遂行にあたり多大なご教授を賜りました北海道大学大学院歯学研究科口腔機能学講座歯科矯正学教室准教授 佐藤嘉晃先生に心より御礼申し上げます。

(引用文献)

- 1) 金澤成美、山本隆昭、高田賢二、藤井元太郎、石橋抄織、佐藤嘉晃、原口直子、今井徹、中村進治：北海道大学歯学部附属病院を受診した矯正患者の過去15年間の変遷。日矯歯誌 57 (2) : 92-102 (1998)
- 2) Tweed, CH : Evolutionary trends in orthodontics, past, present, and future. Am J Orthod 39 : 81-108 (1953)
- 3) Ricketts, RM : Planning treatment on the basis of the facial pattern and an estimate of its growth. Angle Orthod 27 : 14-37 (1957)

- 4) 村澤博人 顔と美 織消誌 37:558-564 (1996)
 - 5) 佐藤嘉晃, 角野晃大, 小原三郎, 他「軟組織プロファイルから硬組織の上下顎前後的位置関係を予測する」道矯誌 38(1):10-16 (2010)
 - 6) 佐藤嘉晃, 井上則子, 大滝尚子 他: 顔貌に関する意識調査 北矯歯誌 26 (1) : 21-30 (1998)
 - 7) 日下部豊寿, 佐藤嘉晃, 岡本亨, 他「骨格性下顎前突症患者の側貌の変化―下顎枝矢状分割術と矯正治療との比較―」日顎変形誌 16(1):1-7 (2006)
 - 8) 大滝尚子, 佐藤嘉晃, 梶井貴史 他: CR画像側面頭部X線規格写真によるMidfacial lineの研究 道矯誌, 30(1):40-45 (2002)
 - 9) Handa K, Sato Y, Kaneko T, Yamamoto T, and Iida J : A new method to evaluate lip sealing and its clinical application, Part 2 : Lip sealing during the daytime and sleep. Hokkaido J Dent Sci 26 : 83-93 (2005)
 - 10) Leonardo SE, Sato Y, Kaneko T, et al : Differences in dento-facial morphology in lip competence and lip incompetence. Orthodontic Waves 68 : 12-19 (2009)
 - 11) Daibou Ikuo, Hiroto Murasawa and Yong-Jin Chou : Attractive faces and affection of beauty-A comparison in preferences of feminine facial beauty in Japan and Korea. The Japanese Jopurnal of Research on Emotion, 1(2):101-123 (1994)
- (本助成金による業績)
- 12) Yoshiaki SATO, Toyohisa KUSAKABE, Junichiro IIDA : Do Japanese laypersons have Attractive Profile? 45th Annual Scientific Congress Korean Association of Orthodontics, 4th Joint Symposium of KAO and JOS, November 1-3rd, 2012, Seoul (Korea)
 - 13) 日下部豊寿, 佐藤嘉晃, 福島久夢, 飯田順一郎: 顔貌の意識に関する研究―歯科衛生士について―, 第55回北海道矯正歯科学会総会・学術大会, 2014年6月26日, 札幌

記念講演

●
第 25 回表彰・贈呈式記念講演 塩田 清二
●

〈香り〉はなぜ脳に効くのか ～認知症の予防・改善について～

昭和大学医学部 教授
塩田 清二

しおだ・せいじ

1974年、早稲田大学教育学部生物学研究科を卒業、76年新潟大学大学院医学修士課程修了後、昭和大学医学部第一解剖学教室助手に、83年、昭和大学医学部博士号取得、同年10月、昭和大学医学部第一解剖学講師、97年4月助教授、99年4月から同大学医学部第一解剖学教室主任教授に就任。2001年8月から米国チューレン大学医学部兼任教授に就任、現在に至る。

・専門分野：解剖学、組織学（特に神経細胞死を中心とした基礎及び臨床研究）

：メディカルアロマセラピー（特に認知症等の予防医学研究）

・その他：日本解剖学会評議員、日本アロマセラピー学会理事長、他多数歴任



ただいま紹介いただきました昭和大学の塩田と申します。
きょうはこのようなすばらしい表彰・贈呈式で記念講演をさせていただくという栄誉をいただきまして、まことにありがとうございます。あわせてきょうは、研究助成32件、学術集会支援1件の助成の表彰がありましたが、受賞された先生方ほんとうにおめでとうございます。

私のきょうの話は、〈香り〉の研究についてですが、ぜひ楽しみながら聞いていただきたいと思います。

きょうも、この第3分野で受賞された方で、例えば「ムスリム女性の美と消費」とか「ハラル化粧品の可能性」という研究がありますけど、こういったコスメの香りも、一種のアンチエイジングにつながりますので、そういったことも含めまして、お話しさせていただきたいと思います。

私どもの研究室をご紹介しますと現在大体40名ぐらいおり、4つに分かれて研究しております。先ほど司会者からご紹介いただきましたが、神経再生、あるいはGPCRリガンドでPACAPという神経ペプチドの研究をやっております。これが最近ドライアイやドライマウスの原因になる遺伝子になるのではないかと思います、今こういった予防治療法も考えております。それから、摂食調節は、脳の中でどのようにして我々の食欲がコントロールされているかを研究中ですが、これもいろんな神経ペプチドを調べながら、神経ネットワークを調べているところです。

最後にアンチエイジングですが、これはアロマセラピーにもつながります。最近日本でも大分浸透してまいりました統合医療という研究分野です。今年の12月20日、21日、横浜パシフィコで統合医療学会とアロマセラピー学会が同時に開催されます。

いろんなところの方々と共同研究させていただきながら、この4つのテーマで研究を、昭和大学ではもう35年ぐらいさせていただいています。

さて、きょうのお話ですが、まず芳香療法の背景ですが、皆さん方、芳香療法というとアロマセラピーというふうになるわけですけど、どういう印象をお持ちでしょうか。何かエステティックとか、サロンとか、そういうイメージが

多いかと思います。ただ、よく考えてみますと、芳香植物の利用というのは、非常に昔から我々の人類祖先が、お祭りとか、儀礼とか、あるいは最近は美容とか治療、こういったところに芳香植物を使って、応用した利用がされております。

例えば、儀礼でいいますと、仏教で仏さんにお参りするときに必ずお線香を立てて香りを出しますけど、これも一種のアロマセラピーなんですね。それから、キリスト教でもやはり香りを漂わせますし、イスラムでも同じということで、やはり宗教にはこういった香りがもう離れられないというか、非常に密接な関係があるということは言われています。

そこで、香りに魅了された歴史的な人を挙げてみました。古くはローマ皇帝ネロですね。この方は非常にバラが好きで、自分の奥さんにもバラの香りをつけたりして、部屋の中も一面にバラの香りを漂わせていたと言われております。クレオパトラも、ご存じのように、バラの香りを使っている男性を魅了したというふうに言われております。それから、ハンガリー王妃のエリザベート、この方は、歴史上非常に有名な王妃というか女性で、ハンガリー帝国を非常に大きくした女性ですけれど、この方も、実はバラが非常に好きであったと言われていまして、バラのエッセンシャルオイル、精油を使ってご自身のリウマチの治療をしていたとも言われています。

最後はマリー・アントワネットさん。皆さんご存じのように、マリー・アントワネットという方はこのエリザベートのところからフランスのルイ16世のところに嫁入りしたわけですけど、この方も非常にバラが好きであったということで、自分の肖像画を描くときにもバラを手を持って描いていた、バラの香りを使ってアロマバスをその当てもやっていたというふうに言われています。

このように歴史的人物で有名な人というのは、こういった香りに魅了されていたということが言われています。

芳香植物が歴史的に見ていつごろ使われ始めたかという、古くはエジプト時代と言われております。エジプトでは、

紀元前 3000 年とか 4000 年前になると思いますが、ミイラづくりをやっていました。ミイラをつくったときに、内臓を取り出して体は残していますが、防腐措置をすることで腐らないようにするにはどうしたらいいかと、乳香や、没薬、ボスウェリアやモツヤクジュという木の樹液、これが抗菌作用があったので、その作用を使って、遺体の周りに塗り込んで、そして遺体が腐らないようにしました。それで現在でもミイラは、大英博物館へ行けばいっぱい並んでいますけど、これが腐らなかったのはこのような、いわゆる芳香植物の抗菌作用を使っていたということになります。

時代が下りましてルネッサンスになりますと、非常に香水がはやりました。エッセンシャルオイルの生産量が増加してきたことで、19 世紀に入りますと、天然の素材のエッセンシャルオイルだけでは足りなくなり、合成香料が出現しました。また、植物から有効成分を取り出して薬剤として使用されるということが 19 世紀以降起きるようになりました。

このエッセンシャルオイルの製法ですけれど、これはどうやってつくるかという、皆様方ご存じだと思いますが、水蒸気蒸留法というのがあります。これは直接蒸留と間接的なものがありますけれど、いずれにしても植物を釜の中に入れて、水蒸気を当てる。水蒸気に当てて壊れたものが揮発して、水で冷やしますと、エッセンシャルオイルと蒸留水、残った水、フラワーウォーター、これが残るわけです。こういう方法はアラビア医学で発達したということで、10 世紀にイブン・シーナーという人がこの水蒸気蒸留を初めて植物で適用して、植物からエッセンシャルオイルをつくりました。これがアロマセラピーの原型であろうと言われています。

なぜこの水蒸気蒸留がここで使われたかという、これはいわゆる錬金術ですね。イスラムでは、金とかプラチナとか、いわゆる金属を取り出すために水蒸気蒸留法を使った。そのときに植物を使い、エッセンシャルオイルができたと言われています。

したがって、ここでのアラビア医学ですが、これは十字軍の遠征でヨーロッパに伝達されることになります。ヨーロッパはその当時、こういう技術がなく、むしろアラビア医学のほうが進んでいたということになります。そして 1920 年代の初めに、モーリス・ガットフォセというフランス人が、実験をやっていたときにやけどを負って、そのときとっさに近くにあったラベンダー精油に手を浸したところ傷の治りが非常によかったということです。抗炎症作用や細胞の再生作用があるというのは最近わかっていますが、彼はこれを医療に使えるのではないかと考え、研究を開始して 1928 年に『Aromatherapy』という本を出版いたしました。そして、それをさらにジャン・バルネとい

う人が、精油を使って、医療をさらに応用して功績を上げました。この『芳香療法』という、アロマセラピー実践のバイブル的な本でありますけど、これをジャン・バルネさんが出版をしています。

このように、アロマセラピーの認知度というのはフランスをベースにしてどんどん世界中に広がっていったということになります。

その中でこのアロマセラピーは、ガットフォセのお弟子さんで、マルグリット・モーリーというオーストリー人の女性化学者が、フランスのガットフォセのところでアロマセラピーを学び、そしてこれをフランスからイギリスに伝えます。ご主人がイギリス人だったので、フランスからイギリスに移住して、そこでアロマセラピーを美容方面に活用する、そういう技術を発達させて、それが今で言うアロママッサージということになります。

イギリスではアロマセラピーというのは医療というよりもむしろマッサージ、エステティックなものにかなり力点がいったことで、日本では、イギリスで発達したこのアロマセラピー、マッサージ技法が 1980 年代に入ってきて、それが今までずっと続いてきております。

アロマセラピーはどういうものかという、ちょっと定義を見ますと、アロマセラピーあるいはアロマセラピーといいますが、花とか木、こういった植物に由来する芳香成分、これをエッセンシャルオイルといいますが、これを使って心身の健康、美容を増進する、そういう技術あるいは行為のことと言われています。また、お香やフレグランスのキャンドル、こういったものも、ストレスを解消するために、リラクゼーション効果を含めて、アロマセラピーと言われております。ちなみににお香、香道というのは日本で室町時代に発達して、御家流とか志野流とか、そういった流派ができて、現在も香道、香りの「道」と書いていますが、香道は行われています。

5 年ぐらい前に、志野流の香道の全国大会がありまして、400 人ぐらい集まるんですけど、そこで香りのいわゆる医学的な応用という話をしたら、「お香にそんな効果あるんですか」とびっくりされました。実際にお香の中で真南蛮という香りをかいでみますと、非常にリラクゼーション効果が起きるというのを唾液を調べて成分の解析結果を発表しました。アロマセラピーの中にお香も入ってきます。

したがって、アロマセラピーというのは、全体からいいますと、まず補完・代替医療の中に入りまして、その中に植物療法、フィトセラピーというのがあります。これは植物を使って、それを医療に使うということで、その中にアロマセラピーが入ってきます。例えば、東洋で言うと漢方がありますけど、この漢方医学や漢方医療もやはりフィトセラピーなんですね。植物を煎じて、それを人に使うわけですので、それがフィトセラピーということで、西洋で言

うとアロマセラピー、東洋で言う漢方、そういうふうなものになるかと思います。

このエッセンシャルオイルは、現在では二百数十種類出ておりますけれど、いろんな症状に対して使われています。気分が落ち込んだうつ状態のときには、クラリセージやカモミール・ローマンを使う、あるいはいらいらして気分が過敏に反応するようなときは、ラベンダーやサイプレスなど鎮静作用のあるようなエッセンシャルオイルをかぐといったということで、いろいろ症状に応じて使用するエッセンシャルオイルというのが盛んに研究されてきております。

エッセンシャルオイルは、自然の、天然の植物由来のもので、非常に多種多様な炭化水素、アルコール、エステル、いろんなものが入っております。こういうものをガスマス分析するわけですが、そこでこのように値が出てきますが、こういう構成成分を含めてケモタイプというふうにいいです。ですから、この真正ラベンダーがどういう成分からできているかということ进行分析して、それをこういうふうにケモタイプという形で書いております。

ちなみに、この真正ラベンダーの場合でいいますと、主成分はここにあるモノテルペンアルコールのリナロールと、エステル系の酢酸リナリル、これでおおよそ 90 % がこの成分からできるといことになりますが、それ以外に非常に微量成分がここに入っております。ですから、トータルでこの真正ラベンダーという香りができているわけで、その辺がいわゆる西洋医学的なものと違って、主成分はこれですから、リナロールをやればラベンダーの作用が出ますというわけでもないんですね。やはり混合したもので初めて我々はラベンダーというものを感じているということになります。

それで、エッセンシャルオイルをかぐと、気体として揮発しますので、後で詳しくお話しますが、鼻から入って、嗅神経を伝わって脳の中に情報が入ってきます。最終的にいろんな標的臓器に働き、内分泌、自律神経、免疫、あるいは高次脳機能、いろんなところに影響が出てきます。また一方、吸入したエッセンシャルオイルが肺に入りますと、肺胞から血液に入って体循環をする。経皮投与で皮膚にマッサージをしますと、ここから血液に入って体循環をする。経口投与しましても腸管から吸収されて最終的に末梢臓器に運ばれていく、ですから、エッセンシャルオイルは実際に吸ったり、あるいはつけたりすると、いろんな形で体の中に入っていくということになります。

これから、〈香り〉が脳に一体どういう影響をするかという、そういったところの話をさせていただきます。

香りはどこで感じるかといいますと、この嗅覚器とありますが、この鼻の中の上の奥のところに、においの部分といまして嗅部という場所があります。ここに実は嗅神経という神経が来ております。この部分を拡大したのが右図

で、これを嗅上皮といひます。この上皮は、多列上皮ですが、嗅細胞といひまして、神経細胞の一種です。それからいわゆる支持細胞といひまして、これは神経ではない一種のグリア細胞です。ところが、この 2 つの細胞はどこから来るかという、この基底にある基底細胞という細胞が分裂をして、この細胞が神経細胞と支持細胞に分化していくわけだす。これは一種のステムセル(幹細胞)です。ステムセルということは自己増殖ができるということになります。ですから、年をとっても、この細胞がある限り、嗅細胞とか、あるいは支持細胞、こういった上皮がどんどんつくられるということになります。

そこで、この嗅細胞の樹状突起に相当するものが外のほう(表面)に出てきます。これを嗅小毛といひまして、1 つの神経細胞から十数本の枝が分かれて外に出てきます。この嗅小毛の表面に、においの受容体が存在するということがわかってきました。したがって、におい分子がこの嗅細胞の表面にある受容体にくっつきますと、この細胞が興奮をして、この情報はこの軸索を伝わって篩骨、篩板という骨を通して、嗅球という中枢神経のところに伝えられていきます。ここから先に嗅索を伝わって脳の中に入っていくということになります。

これはヒトの嗅粘膜の光学顕微鏡ですが、嗅上皮の基底にあるこの細胞、これがいわゆるステムセルに相当します。この細胞が分裂していきますと、上に上がっていきまして、嗅細胞とか支持細胞になっていきます。この表面に薄く毛が見えると思いますけれども、これが実は嗅小毛という、嗅細胞がつくる突起の毛に相当します。

この場所を電子顕微鏡でもっと詳しく見ますと、この一本一本が嗅細胞の突起になります。この嗅細胞の突起は、表面でちょっと膨らみを持ていまして、これを嗅小胞といひます。ここから、実は十数本の毛がここに出てきます。この表面にいろいろありますが、この毛の表面ににおいの受容体というのが存在いたします。

この受容体を発見したのはだれかといひますと、ここにありますように、リチャード・アクセルとリンダ・バックルという 2 人です。この 2 人が、におい分子に結合するレセプターを発見いたしました。ここからにおいの科学的な研究が始まったと言われています。

この 2 人は何をやったかといひますと、実はマウスを使ひまして、受容体の遺伝子が約 1,000 種類あるということをして 1991 年に発表いたしました。ちなみに受容体の遺伝子の数は全遺伝子の約 3 % です。ということで、非常に大きなグループをつくっております。しかもこれはいわゆる GPCR と呼ばれる、G タンパク質結合体の受容体です。まあ、我々人間やネズミもそうですけど、おおよそ遺伝子は 3 万というふうに言われていますが、そういったうちの 1,000 個もあるということは、においにかかわる遺伝子が我々の体

にとって非常に重要であるということになります。ちなみに我々の嗅覚の受容体遺伝子は幾つかというと、約 350 です。つまり我々人間は、においについてはマウスなどの動物に比べると3分の1ぐらいの遺伝子ということで、においについて見ると、私たちの機能はネズミより退化しているということになります。

ただ、それでもいろいろ遺伝子の組み合わせになりますから、私たちは数万種類の香りをかぎ分けると言われています。遺伝子がたった 350 でどうやってそんな何万種類の香りをかぎ分けられるのか、というのは次のところの話に入っていきますと大体ご理解いただけると思います。

彼らは結局この嗅細胞のところにあるにおいの受容体、遺伝子をクローニングして、そして、そのにおいによってこの細胞が興奮して、それが糸球体と呼ばれる嗅球のところにその情報が伝えられるというところまで見つけたんです。ここから先のことはまだ良くわかっておりません。

嗅覚系の受容体ですが、OR、odorant receptor といいますので、におい受容体というふうに言っています。これは先ほどの毛の表面にある膜のところに、膜を7回貫通するGPCRです。これがにおい受容体の基本です。ただ、ここにVNRとかVRとありますが、これはフェロモンの受容体です。これを見るとわかりますように、フェロモンの受容体にもにおい受容体もほぼ同じような、非常によく似た構図をしています。ただ我々人間の場合には、残念ながらフェロモンは存在しないということが言われていますので、ネズミにあるかどうかということですけど、我々はこのにおい受容体でにおい分子が来て、それが結合することによってにおいを感じるということになります。

このリチャード・アクセルとリンダ・バックルさんは、91年にこういう構図を発表いたしました。これはにおい受容体部位のアミノ酸配列で、膜を7回貫通しまして、N末端が細胞外、C末端が細胞内にあり、これがG蛋白と結合するということが明らかになっています。

実際ににおいはどのように受容されるかというと、におい分子がやってきますと、先ほどの嗅神経細胞の膜のところににおい分子特異的なレセプターがあります。そうすると、におい分子がくっつきますと、これは特異性があるわけですけど、1つのレセプターは1つのにおい分子としかくっつかないと言われておりますが、そうしますと、細胞側にあるG蛋白が活性化して、それがアデニル酸シクラーゼという酵素によってATPからcAMPができる。このcAMPがこういったナトリウムチャンネルにくっつきますと、外からナトリウムが入ってきて、この細胞の膜の脱分極というのが起きる。それによって嗅細胞は興奮をするということになります。

実際にイソアミルアセテートやカンファーといった香り分子を受容体に反応させて、嗅細胞の膜電位をはかると、

濃度をどんどん上げていきますと、非常に発火頻度が上がってくるということがわかっています。細胞内記録法によって嗅細胞のにおい応答というのが濃度依存性であるということも証明されております。

ということで、嗅覚系の神経回路の概略としては、においを感じる嗅細胞というのがにおいをキャッチしますと、軸索が脳の中に入っていくって、嗅球の糸球体と呼ばれるところに神経が終末します。そうすると、次の、2次ニューロンにこれがシナプスという形で情報が伝達され、それが嗅皮質に入り、さらに3次ニューロンにシナプスで転換されていくことで、香りの化学的な情報が電気的な情報に変わって、それが脳の中に入っていくということになります。

これは東大の森先生の図を借用したんですけど、科学雑誌『サイエンス』にレビューで書かれていますが、実はこの香りを感じる細胞というのは、先ほど言った嗅球の糸球体に軸索が投射されますが、ランダムにいくわけではなく、ある特定のにおいにはある特定の糸球体にいくということがわかってきました。つまり、これは糸球体のところにおいの番地があるということです。ですから、あるにおいが来ますと、ある特定の糸球体のところに行く。においに1丁目1番目という、こういう番地が振ってあるということがわかってきたということです。

ここから先はどうなるかというのは、まだ残念ながらよくわかっておりません。まだ研究中ということなんです。これはなかなか難しいところがあります。

ところで、嗅球から入ってきた情報は、外側嗅索を経て脳のいろんなところに投射されていきます。それがさらに扁桃体や海馬や視床も経ますが、こういったところを通して最終的に前頭葉の眼窩回のところに入っていきます。我々はこのにおいの情報を最終的に集めて、連合して、そしてそのにおいに対するリアクションというのを起こすわけですね。ですから、これが気持ちいいとか、悪いとか、あるいはこの香りをかぐとおなかのすいたとか、そうすると、おなかのすいたので、今度はちょっと食べ物を食べようとか、そういう意思のほうにいくわけですね。いろんな形で情報が脳の中に入って、それが集まっていくということになります。

私たちは、functional MRIを用いた香りの研究というのをもう10年以上前から行っております。ご存じのように、このfMRIというのは、核磁気共鳴を利用して、脳や脊髄の活動に関連した血流の動態反応を視覚化します。神経細胞の活動を直接見るわけではなくて、ある領域の脳の中の血流が非常に高まっているということを測定することができます。ですから、当然ある場所の神経細胞が活性化していれば脳血流は上がるわけですので、逆に脳血流が上がっているところは神経細胞が興奮しているということがわかります。それを画像化することで、生きた状態で脳の活動

を見ることができるわけです。

例えばこれはヒトの脳ですけど、前頭葉は活性化しておりますけれど、こういうふうな形で、あるにおいをかがせてもいいですし、あるいは何か物を食べてもいいですし、あるいはそれを考えてもいいわけですけど、脳が動いているときに必ず血流は上がるわけですから、こういったところを見ると、逆に、ある香りをかがしたときに脳のどういう場所が興奮するかというのがわかるわけです。

それで私たちは、味の素の中央研究所の動物専用のMRIを使って香りをやろうということで、8種類ぐらい異なる香りを使いまして——これはエッセンシャルオイルです。そしてコントロールとして基準臭を使って、そしてそれをネズミ、ラットにかがせて、それで撮像するというところを行ないました。

例えばこれ、olfactory bulbですけど、ちょっとぼやっとしていますけど、これはラットのMRIの画像です。こういうふうな5つぐらいに脳を分けていって、どういう場所が香りで興奮するかということを調べていきました。

例えば、真正ラベンダーをかがせると、この嗅球のところで、外側のところは血流が低下します。ところが腹側のところは脳血流が上がってきます。背側部は変化しない。ですから、ある特定の香りをかがせると、脳のある特定の場所が興奮すること、あるいは抑制されるということがわかってきました。

プチグレンという精油をかがせると、今度は外側のほうと腹側の領域が両方このように脳血流が低下して、神経細胞の活動が低下するということがわかってきました。

さらに脳の後ろのほう、前脳、forebrainのところを見ていって、いろんなところを分けて、それぞれの場所での脳血流を見ていきますと、これはレモンという柑橘系の香りをかがせます。それで前脳のレベルで調べていきます。例えば、運動皮質とか体性感覚皮質はこういった変化がありません。しかし、前脳の内側部や腹側部、この領域、こちらがコントロールの香りでこちらがレモンをかがせると、この領域、こちらでは赤くなっていますけどこちらはグリーンになっています。つまり、内側とか腹側領域の血流が低下するということがわかりました。

この場所はどのような場所かと調べていきますと、これは解剖生理学的な、昔からいろんな研究の蓄積がありまして、この場所の神経細胞がずっと後ろの脳幹部のところに投射して、それが交感神経を抑制する場所であるということがわかっています。

そういうことで、この内側領域、腹側領域の神経細胞が、血流が落ちるということはここが神経活動が低下するので、したがって、逆に脳幹部のほうで神経活動が高まる。こういうふうな神経のリレー、こういったエビデンスがとれてきたということが分かりました。

我々は、各種におい刺激に対する脳の応答性を調べ、脳のどういう場所がどういう香りで活性化するのか、あるいは不活性化するのかを調べてきました。全部はお話しできませんが、例えば、このLHAと呼ばれるここは摂食センター、あるいは覚醒センターと呼ばれています。視床下部では外側領域というのがありますが、その場所は、いわゆる我々がおなかがすいたときに非常に活動が高まる場所なんです。食欲の、摂食センターと呼ばれています。ですから、そこにジンジャー、あるいはティートリーとかの香りをかがせると、私たちはおなかがすいた状態で非常に物を食べたくくなります。それから、ペパーミントといまして、この香りをかぐと、LHA、外側視床下部は興奮します。ここがいわゆる覚醒センターです。

最近の研究でわかってきましたのは、外側視床下部のLHAにはオレキシンというニューロンがありまして、このニューロンが、こういった香り刺激をすると、非常に覚醒作用があるニューロンですので、興奮すると考えられる。ですから、興奮することとは神経活動が高まるわけで、しかもオレキシンというのは、覚醒作用もあるとともに食欲を亢進する作用があります。ですから、我々は、まあ、動物でも同じですけど、物を食べるというときは覚醒状態なんです。覚醒状態にあつて物を食べるという行動にいくわけです。ですから、例えば皆さん方、もう経験あると思いますけど、非常に眠いときというのは食欲がなくなるんです。我々よりももっと動物のほうのはっきりしているわけなんですけど、動物は、食欲を亢進させるというときは必ず外側視床下部が活性化して、そして食欲を増進させて、物を取りにいくという、そういう行動にいくわけです。

ところで、このVMHと呼ばれる満腹センターですが、残念ながら、満腹センターを興奮させるにおいというのは、いろいろ調べましたが、なかなかないんですね。ですから、私どもは、VMHと呼ばれる満腹センターを興奮させる香りを今探しております。それができれば、いわゆる抗肥満のダイエットに効く香りというのはできると思います。これを化粧品に練り込めば、化粧品を塗りながらおなかがいっぱいになって、ダイエットになります。ダイエット化粧品というのもできるんじゃないかというようなことも考えています。

ちょっとそれは話が飛びますが、そういうことで、嗅細胞で感受された情報は、嗅球を伝わって脳の中に入っていく。ですから、最終的には眼窩皮質のところに行くということになります。

先ほど言いましたように、こういう食物の情報、嗅覚とか視覚の情報は、目から入って、それが情動認知系とか運動系を動かし、さらに視床下部を介して末梢の自律神経系も動かします。ですから、こういう香りとか視覚というのは、私たちの脳のいろんな場所を使いながら摂食行動とか

代謝調節など、自律神経活動をやっているということになります。

さて、これから本題になります。認知症ですが、現在世界の認知症患者さんは非常に増えております。3,560万人とここに書いてありますけど、今はもっと多いのかもしれませんが。特に高所得国よりも低・中所得——これ、発展途上国と言っていると思うんですが——ここで非常に認知症の人口が増えているということが今後非常に大きな問題になると思います。

日本における認知症の患者さんは、2015年、およそ250万人で、その数は大体65歳以上に占める割合7.6%。これがどんどん先にいきますと、その認知症の数は増え、しかもパーセンテージは上がってまいります。ですから、少なくとも10%以上が認知症になるということになります。

この認知症ですけど、加齢か物忘れかということと言えますと、ちょっと違いがあります。単なる物忘れというのは、体験の一部を思い出せないわけですけど、認知症の場合は全体を忘れてしまう。新しいことを覚えられない。自覚に乏しい。だから自分は心配していないんですね。「私は大丈夫です」と言う人ほど危ないという、そういうことなんですね。

それから、注意したい変化ですが、いろんな変化が出ております。日時、曜日がわからなくなるとか、好きなこと、趣味をやらなくなってしまう、それから怒りっぽくなるというケースもあります。大体認知症の人の共通しているところというのは、面倒くさいと言うんですね。何かやってくれと言ったと、「いや、私、面倒くさいからやりません。面倒くさいから私やりたくない」と、こうなると、認知症はもうかなり進んでいるといつてよいでしょう。ですから、自分でもし何か心当たりがあったら、ちょっと考えないといけないんですけど、面倒くさいということが非常にキーワードになると思います。

女性の主婦の場合ですと、同じ料理が出てくるんですね。きのう食べたものがまたきょうも出てくる。それからあとは、同じ食材を常にかい込み、冷蔵庫がいっぱいになっております。皆さん方、あまり冷蔵庫をあけたことないかもしれませんが、たまには冷蔵庫をあけてみたほうがいいと思います。そうすると、同じ食材がいっぱい入っているんですね。私も時々チェックしているんですけど、「何で同じもの買うの?」と言って。「よくわかりません」と。「認知症、始まりじゃないですか?」なんて言うのと怒られるんですけど、あとは、食材でないものを冷蔵庫にしまい込んでいるんですね。冷蔵庫をあけると花が出てきたりするわけですね。こういうことも注意したい変化ということになります。

中核症状ということと言えますと、いわゆる認知機能が中核症状なんですけど、それ以外に、周りにいろんな周辺症

状というのが出てきます。夜行性徘徊とか、暴力を振るうとか、あるいは過食をするとか、幻想を抱く、せん妄を抱く、睡眠障害、意欲低下、抑うつ状態、こういうものがどんどん周辺症状として出てくるので、そういう認知症の患者さんをテイクケアするのは非常に大変だということになると思います。

認知症の原因疾患ですけど、アルツハイマー病は大体45%から50%にもなっております。昔は、脳血管痴呆といいまして、脳血管が詰まって、脳梗塞が起きて、それで認知症が起きるというケースが多かったんですけど、最近では欧米型のタイプ、アルツハイマー型の痴呆というのが増えております。

このアルツハイマー型の痴呆の特徴は、年をとるに連れてそのパーセンテージが上がってくるということです。大体65歳から70歳とか、これぐらいだと10%レベルですけど、80歳から90歳ぐらいになると、20%を超えます。ですから、65歳ぐらいだと大体10人に1人なんですけど、80歳、90歳になってきますと、4人とか3人に1人が認知症ということになります。しかもそれがアルツハイマー病ということになります。

アルツハイマー病の特徴は、側頭葉の萎縮が特徴で、これを見るとわかりますが、この側頭葉の神経細胞が死んでしまいますのでだんだん萎縮します。それとともに、これはポジトロンエミッショントモグラフィー（PET）で、持ってきた絵ですけど、正常の人は、前頭葉とか側頭葉が働いていますが、アルツハイマーになってしまいますと、こういうふうになるようになって、神経細胞は働かないんですね。こういうのはアルツハイマー型認知症の特徴ということになります。

現在この認知症の治療薬というのはアリセプト、ガランタミン、メマンチン、3種類出ております。しかし、いずれも対症療法でして、根本治療にはなっておりません。ですからこれ、飲んだとしても、認知症が治るわけじゃなくて、認知症の発症をおくらせることができるという、根本的な治療じゃないんですね。ここが非常に大きい問題だということになっています。

それで我々は、認知症に対してアロマセラピーがどういうふうな効果があるかと、特に中核症状、物忘れ、この認知機能をアロマセラピーで改善できるということがわかってきましたので、それを使えば有効な治療ができるのではないかと考えました。特に高度な認知症の患者さんでも効果があるということがわかってきました。

これはADAS（エイダス）といいまして、スコアなんですけど、認知機能の障害の重症度と嗅覚障害を見たものです。縦軸は嗅覚の認知度です。ですから、においに対して非常に反応性が悪い人はスコアが下になりまして、においをかぎ分けられる人はこういうふうには10点というふう

なります。

これで見えていきますと、ADASスコアで見ると、認知機能が非常に悪くなるとこの値が上がってきます。ですから、それに連れて嗅覚障害が起きるということがわかります。ですから、嗅覚障害と認知機能の重症度というのは非常に相関性があるということがわかってきました。これは今年論文に出しておりますが、さらに、嗅覚障害の相関で見て、血液中のタウ蛋白、あるいは β アミロイドですが、こういったものは認知症、特にアルツハイマーになると増えてきますけど、この値が上がってきますと嗅覚の障害が起きてくるということがよくわかります。

そういうことで、実際に正常の人とアルツハイマー病の患者さんを比べると、においに対する障害、重症度が非常に違うということがわかります。ですから、においの、いわゆるきき分けができなくなるということが認知症とかなりリンクしているということになるわけです。

これは私どもの教室の神保博士が研究して発表したんですけど、アルツハイマー病の患者さんに、アロマセラピーを実際に行ってみたデータです。これがコントロール、まあ、これはにおいをかがせない状態ですけど、ここからアロマセラピーを約1カ月間、毎日、昼間に交感神経を刺激する香り、夜に、寝る前に、ラベンダーとかリラクゼーションする香りをかがせて、28日、約1カ月やります。GBSスケールで測定すると非常に認知度が上がってまいります。ところが、これをやめてしまいますと、また悪くなってしまうということになります。

これはアルツハイマー病の患者さんの初期から後期にかけて、70人から80人の患者さんで実施しました。次に高度のアルツハイマー病の患者さんだけ選んでみましても、やはり同じように、このアロマセラピーをやっていきますと非常にADASのスコアが低くなって、認知機能が上がってくるということがわかりました。さらに、アルツハイマー病以外に、例えば血管性の脳痴呆とかありますけれど、こういう患者さんにもアロマセラピーをやると、非常に認知度がよくなるということがわかりました。そしてまたこれをやめてしまいますと、悪い方向にいくということになりました。

そういうことで、芳香療法をやりますと、認知症患者の認知機能障害、物忘れなどを非常によくするという、効果的であるというデータが出まして、これを我々は論文にしております。

最近私たちは、レモングラスというものに着目して、これと認知症の改善ということで研究しております。一般的な方法でつくった精油とか芳香水というのは、水蒸気蒸留でやりますと物が壊れてしまいます。我々は低温真空抽出技術法というものをつくりまして、これは非常に低温で、かつ真空状態で抽出していきますので、物の壊れ方が非常

に少ないので、この中に芳香植物を入れまして、低温で、大体40度ぐらいで、真空状態で、7～8時間やりますと、50キロぐらいのものを入れると、ここに水と精油が一緒に出てきます。この装置ですね。この中に入れてやりますと、ここに回収するものが出てきます。最後は、この残査は、真空でやりますので、パウダーとして出てきます。ということで非常に熱に弱い成分を自然に近い状態で抽出ができる。それから、ほかに溶媒とか使いませんので、芳香水(セルエキストラクト)の抽出ができます。

それで我々は、いろんな日本独自の植物を使って、低温真空法で抽出しています。最近では、例えばサクラですね、ヤエザクラからこの低温真空で初めて細胞水というのを抽出することができました。今までサクラをいろいろやった人がいましたけど、だれも成功していなかったんです。この技術を使うと、低温真空で、サクラの、いわゆる細胞水、セルエキストラクトがとれたことで、これをかがせてみると、結構リラクゼーション効果があるということもわかりました。

さて、それで、こういったレモングラスですけど、これをかがせてヒトで実験しました。およそ30名ぐらいの、老健施設に入っていられる人たちに、毎日2時間ですけど、レモングラスをディフューザーでかいでいただいて、それを8週間、16週間と、こういうふうにならざるやっております。そうしますと、においによって精神症状はよくなります。それより最もおもしろいのは、不眠状態の改善で、非常に夜眠れるようになったという、そういうことがわかりました。

また、知的機能の改善については、先ほど言いましたように、いわゆる物忘れ。これをやっていきますと、8週間で既に有意によくなってきたことで、さらに16週間やりますと、知的機能の改善が起きてきたことから、現在老健施設でレモングラスウォーターをかいでいただいて、認知症の治療も行っております。

その過程で、なぜレモングラスをかがると認知機能がよくなるのか。そのエビデンスを明らかにしようと考え、NIRS(ニールズ)といたしまして、近赤外光を使ったスペクトロスコピーを実施しました。脳の外側にヘルメットをかぶせまして、ここに近赤外光が出る電極をつけます。ここから近赤外光を出して、そして脳の中でヘモグロビンがどういうふうになっているかをスペクトロスコピーではかることによって、それで脳の血流をはかることができます。fMRIとはちょっと違いますけれど、例えばエッセンシャルオイルをかがせてNIRSで見ると、これはレモングラスをかがせると、大脳の、前脳ですけど、大脳皮質の前頭葉の内側が非常に活性化します。ところが、ミルラ(myrrh)やペッパー(pepper)をかがせると、こういった前頭葉の内側はあまり血流量が変化しません。血流が増えないん

ですね。逆に側頭葉とかが増えてきます。

ということで、エッセンシャルオイルをかがせた場合に、なぜレモングラスをかがせると認知機能がよくなるかということをごういったNIRSイメージで証明することができるようになりました。現在いろんなエッセンシャルオイルを使って、このNIRSイメージで、特に大脳皮質、前頭葉のところを調べています。

認知症をはじめとして脳の関連する疾患に芳香療法は非常に治療効果を持つこと、特に高度な認知症患者さんにも一定の効果があるということがわかりました。それで我々は、認知症の治療においても、従来の薬物療法とあわせて使うと非常に有望な認知症治療の選択肢になるのではないかと考えています。

65歳以上の人口3,186万人ということで、4人に1人。現在日本は世界一の長寿立国と言われております。しかしながら、この人生最後の10年間、平均寿命と健康寿命に10年ギャップがあります。ですから、長生きしたといっても、最後10年間は寝たきりで過ごさなきゃいけないということになっていますから、いかに健康で長生きできるかということを我々は考えないといけないのではないかと考えています。そういう意味で、ごういった芳香療法を使うということは、認知症の予防と改善にもつながりますので、この人生最後の10年間、元気で過ごしたいと考えています。

最後の話ですが、ギネスブックで、泉重千代さんという方、皆さんご存じだと思いますけど、120歳と237日生きた、男性で世界トップですね。この人が111歳のときに、女性レポーターの取材を受けました。レポーターが「長寿の秘訣は何か」と言うと、「酒と女だ」と言うんですね。「お酒は何か」と言うと、「黒糖の焼酎を薄めて飲む」。「では、女性

はどういうタイプがお好きですか」と言うと、「年上の女だ」と言うんですね。111歳のときですから、年上の女って120歳とかになっちゃって、こんな人いないわけですね。まあ、これを承知で言っているわけで、つまり、それだけこの人は頭がやわらかいということですよ。だから、111歳のときでごういうふうな受け答えができたということは、やっぱり認知症ではないということを逆に証明していると思います。

そういう意味で、我々も、酒と女というのはなかなか難しいので、香りで何とかできないかというふうにごう考えているわけです。

最後になりました。この研究は我々のところの教室の教室員とさっきここに出しました、ヒューマンライフケア横浜というしまして、ここは戸田中央病院グループの中のケアのシステム、老人介護のところなんですけど、そこで我々、実際に今、このアロマセラピーで、レモングラスをかいだいて、認知症の人たちに、予防・改善ということでごうやっております。たまたまこの前、レモングラスが一たん切れてしまって、供給が途絶えたんですね。そうしたら、ケアマネジャーの人が、芳香療法をやっている人たちが急に元気がなくなって、食欲がなくなっちゃいましたと。それで、どうしようと言うから、またやってくださいと言って、芳香療法をまたやり始めたら、今度は元気になって、食欲が出て、みんな残さないで食べるようになりましたというふうにごう言っていました。

ですから、ごういう香りというの、QOLを上げるのに非常に重要な働きをしているのではないかと、ということごうです。

ご清聴ごうもありがとうございます。

—— 了 ——

コスメトロジー研究雑感

平成 24 年度 研究助成

深海生物とコスメトロジー

足立 亨介

(のっけから私事で恐縮ですが)学生時代より理系人間、体育会出身でアカデミアに進んだ私はコスメ業界とはこれまで全く無縁に生きてきました。また今回の研究対象分子はコラーゲンでしたが、これも特に専門でもなく、現職に赴任時にちょっとした縁があって研究をはじめることになったまでです。コラーゲンは細胞と細胞の間隙でそれをつなぎとめるはたらきをしますが、これまた偶然にも私とコスメ業界という全く無関係な両者もつないでくれたように思います。

コラーゲンは元々牛を中心とした畜産物を主原料としてきましたが、周知のとおり 2001 年に BSE の問題が起きてから種々の海洋生物から抽出されたコラーゲンが「マリンコラーゲン」として市場に出回るようになりました。名前からしてイメージもよく、主原料が畜産物から水産物に置き換わるのに大きな混乱もなかったように感じています。しかしながら畜産物は種類が非常に限られているのに対し、

水産物は多種多様で、かつ水温や水圧といったパラメータに分子の特性が左右されます。代替品として水産物に着目したことはあっても、この点に着目して、コラーゲンを扱っている人はまだまだ少ないのが現状です。

今回、私はその多様な水産物の中でもとりわけ特殊な深海生物のコラーゲンを化粧品基材としての活用を見出す可能性を探る研究をさせていただきました。研究例が少ないこともあってまだまだ先は長いと言わざるを得ないのですが、「低温」「高圧」の深海環境に適応し、少なくとも陸上生物と異なる構造を有していることは分かりました。何らかの形でこの構造から分子としての特性を探っていきたいと考えています。今後、私自身が「お寒い」状況にさらされようと、周りから妙な「プレッシャー」をかけられようと、うまく適応しコスメ業界に少しでも貢献出来れば幸いです。この度はコスメトロジー研究振興財団の研究助成に採択していただき本当にありがとうございました。(高知大学農学部)

平成 24 年度 研究助成

Department of Cosmetology ?

伊藤 大知

化学工学が専門である筆者と、化粧品は専門性の相性は良いかと思う。粉体工学、混合、攪拌、分散、膜分離、液液抽出、イオン交換と、講義や研究にて使う単位操作は、化粧品のファウンデーションや乳液などの開発や生産に、直接的に役立っているのであろう。また研究にて扱う生体適合性材料は化粧品素材としてオーバーラップする範囲が広い。

ところで、今回の研究助成を頂いて最も感銘を受けたのは、素材や安全性に関する研究にとどまらず、精神・文化に関する分野の研究課題が多数選ばれていることだった。化粧品は、コミュニケーションの手段であり、科学的合理性では推し測れない文化的合理性に根差す趣向の違いが色濃く反映されるであろう。そういう意味で、文理境界領域の研究として、コスメトロジーの面白さを感じたし、今後の海外マーケットの展開は、グローバルな文化差を考慮しながら研究も産業も発達していくのだろうから、本助成のユニークさと先見性に感銘を受けた。

数字に関して厳密に精査しているわけではないが、国内

の化粧品マーケットは 2013 年度で 2 兆 3000 億円程度(株式会社富士経済の調査結果)。日本の医療用医薬品の生産高は 2010 年度で、6 兆 8000 億円程度(厚生労働省「薬事工業生産動態統計調査」平成 22 年度)であるそうだから、市場としても十分なボリュームのある産業である。そして経済成長が著しいアジア各国や、これから成長するアフリカ諸国など、経済成長に伴い確実にマーケットが大きくなる地域がある。

そんなことを考えると、市場の大きさや発展性、研究の学際性などから、化粧品学科、Department of Cosmetology というのが、大学にほとんど存在しないのは不思議である。特に女子学生にとって化粧品メーカーは就職で人気であるし。しかし専門の縦割りにとらわれない柔軟さが、コスメトロジーの発展の源なのか、と。門外漢だった筆者にとって、視野が広がり、これからコスメトロジーに関わる手がかりを与えてくれた、これが小生にとって本助成の最も大きな収穫だった。(東京大学大学院医学系研究科)

私とコスメトロジー素材

大矢根 綾子

この度の研究助成により、「皮膚組織再生を促進するリン酸カルシウム真球粒子の創製」に関する研究を発展させることができました。手厚いご支援を頂きましたことに、心より感謝申し上げます。

私が治療効果を併せ示すコスメトロジー素材に興味を持ったのは、今から十数年前のことです。顔中にできるニキビに悩まされ、様々な化粧品・スキンケア製品を試したものの一向に改善せず、皮膚科を受診しました。抗菌薬を含む塗り薬が処方されたのですが、その時の注意点が、「ファンデーション等は併用しないように」とのこと。思わず「えっ!？」と聞き返してしまったことを覚えています。年頃の女性として(当時は)、治療をとるか、化粧をとるかの二者択一に迷いました。結局、使用上の注意を守らずにファンデーションを併用してしまったのですが、その為か、症状は改善しませんでした。この経験をきっかけに、高い治

療効果を示し、かつ肌に優しいコスメトロジー素材を作りたいとの考えを持つに至りました。今回の助成研究で私たちは、薬剤担体として有用なサブミクロンサイズの球状粒子を、生体親和性・安全性に優れたリン酸カルシウム(骨や歯の無機質と同じ成分)から簡便に合成する技術を開発しました。この技術は、治療効果を付加した高機能コスメトロジー素材の新しい製造技術としての可能性を秘めていると考えています。未だ解決すべき課題は残っていますが、今後も、安全・安心・高機能なコスメトロジー素材に関わる技術開発を通じて、国民健康福祉の向上に貢献できるよう努力していきたいと考えています。

最後に、本研究課題の実施において中心的役割を果たして下さった産業技術総合研究所の中村真紀博士および坂巻育子氏に、誌面をお借りして感謝の意を表します。

(産業技術総合研究所ナノ材料研究部門)

粘土鉱物とコスメトロジー素材

岡田 友彦

粘土鉱物は、「千の用途のある素材」ともいわれるように、比較的安価であることから、化粧品素材としては勿論のこと、様々な分野で利用されています。ある化粧品会社さんの基礎研究部門の方から、本助成期間中にとある雑誌の総説執筆を依頼されました。未だに粘土科学は、化粧品の基礎研究でも貢献できることがあるのだと改めて実感させられた次第です。

粘土とは、水を含むと粘性をもつ土の総称です。スメクタイトと呼ばれる一群の層状粘土鉱物は、水中で膨潤する性質があり、水に分散するとシリケート層(約1 nm)が剥離し安定な懸濁液になる、と数多くの教科書や総説、解説などに書かれています。ところが、研究者ゆえに「へそ曲がり」な性格のせいでしょうか、長くそのように理解され、受け入れられていることとは違ったことをしてみよう、と思ったのです。すなわち、粘土鉱物のようにインターカレーション能はあっても、シリケート層が膨潤・剥離しないような「モノ」をつくれなにか?という発想から、本助成金の申請につながっています。サイエンスの視点から明らかにしようとした(している)主旨はこれだけですが、昨今卒

業研究のテーマを設定しこれを説明する際に、ある程度実用性を絡めないと、なかなか学生の推進力とはなりにくいようです。化粧品応用で、乳液でこれを〇〇に使う、あるいはファンデーションで△△で使うには、などとすると、動機付けが明確になるためか、研究の意義の理解を促すには有効なようです。また、化粧品応用を意識したテーマは、使用実績があることを考え、その素性を理解しているであろう女子学生が担当するのですが、当の私自身は商品の特徴や使い心地云々まで細かいところを知る由もありません。よって、その学生にいろいろ訊くのですが、事情を知らない他の学生にとってはその様子が奇異に映るようです。

このように少々恥ずかしい思いもしましたが、今回助成金をいただいた機会に、化粧品素材設計の理屈や合理性などを垣間みることができました。また、化粧品開発には芸術性や流行も必要なようで、理屈だけではないその奥深さも少しですが知ることができました。何かの機会にさらなるご教示を賜りますと幸いです。末筆ながら、本研究を進めるにあたりコスメトロジー研究振興財団からの助成に心から御礼申し上げます。(信州大学工学部物質工学科)

平成 25 年度 研究助成

新規白色顔料の可能性を探って

斧田 宏明

この度はコスメトロジー研究振興財団の研究助成に採択して頂き、心より感謝致します。私の研究室では、化粧品や日焼け止めに用いられる白色顔料として、新規材料を提案する研究を行っております。現在白色顔料として用いられている酸化チタンや酸化亜鉛は光触媒活性をもっており、紫外線に当たることにより有機物を分解する性質をもっております。私が学位を取得して最初に勤めた研究室では、一部の学生が酸化チタン薄膜の光触媒活性を高める研究を行っておりました。このような光触媒活性のあるものを肌に塗布していることに疑問をもちつつ、研究室を主宰する立場になったときに新たなテーマとして検討することになりました。大学院時代にリン酸塩の触媒活性を検討しておりましたが、非常に弱いということが分かっており、リン酸塩は生体材料としても用いられておりますので、リン酸チ

タンやリン酸亜鉛が新規白色顔料として可能性があるのではないかと研究を進めております。予想通り、リン酸チタンやリン酸亜鉛には光触媒活性がなく、凝集しにくいという性質もあり、なめらかな塗布が可能であるということが分かりました。しかしながら、欠点として生成する粒子が酸化物に比べて大きいということがあります。そこで今回の研究ではミル処理を行うことにより微細化を検討することを行いました。また、化粧品に関するテーマは身近な材料開発ということで学生や大学職員からも高評価を頂いております。近年は大学も外に向けてアピールしなければならなくなっており、分かりやすく身近であることは重要とのことでした。今後は、このリン酸塩白色顔料の実用化を目指して一歩ずつ進めていきたいと考えております。

(京都府立大学大学院生命環境科学研究科)

平成 25 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

金井 俊光

この度は、コスメトロジー研究振興財団研究助成に採択して頂きまして、誠にありがとうございました。今回申請致しました研究課題は、安全・安心なサンスクリーン剤を開発するものであり、これまで一般的な吸収による紫外線防御方法ではなく、反射による新しい防御方法を検討したチャレンジングな提案をさせて頂きました。サンスクリーン剤は肌に直接塗布するものですので、より安全性の高い安心な材料でなければなりません。紫外線を反射することで、サンスクリーン剤自体も劣化しない方法を検討しました。研究過程で想定外の課題も発生し試行錯誤の連続でした。残念ながら提案当初の目標であったカプセル化までは完了しませんでしたでしたが、課題が明確になり、今後の研究の

方向性がはっきりしてきました。また本研究により少なくともコロイドフォトリック結晶の光学ストップバンドを利用することによりUV-A領域を充分防御できることが明らかとなりました。私の中ではこれだけでも価値ある成果と思っており、今後の可能性が広がったと思っております。具体的にはカプセル形状のみならず、より簡単に形成できる球形や板状のコロイド結晶でも紫外線防御が期待できると考えられ、これらの形状制御も今後行っていきたいと考えております。より安全性の高い安心なサンスクリーン剤を開発すべく、研究を続けていきたいと思っております。本研究にご支援頂きました貴財団に改めてお礼申し上げます。(横浜国立大学大学院工学研究院機能の創生部門)

研究雑感

神鳥 和彦

筆者らはこれまでに、単分散コロイド粒子は非常に微細なクラスター粒子が集合して生成する、いわゆる凝集機構によることを明らかにしてきました。そこで、このように微細な一次粒子の凝集速度をコントロール出来れば、得られる粒子の形態と大きさを任意にコントロールすることが出来るものと期待し、今回の貴財団の研究助成金を申請いたしました。

今回私が取り上げた無機粒子は金属リン酸塩の 1 つであるリン酸カルシウムで、生体親和性の高い物質として古くから知られているカルシウムヒドロキシアパタイト (CaHap) です。これは人工骨、人工歯根等の他に触媒あるいは吸着剤などに使われているバイオセラミックスです。筆者ら、これまでに共沈法を用いて作成した Ti や軽ならびに重希土類元素をドーブした CaHap 粒子が強い紫外線吸収能を有することを見出し、光触媒効果があることも見

出しています。しかし、それらの粒子の合成はオルトリン酸またはオルトリン酸塩をリン酸源として用いてきたため、反応速度が大変速く、凝集機構による粒子のモルフォロジーを制御することは出来ませんでした。

今回貴財団の研究助成金を頂くことで、縮合リン酸塩 (トリポリリン酸ナトリウム) の加熱加水分解法を用いて反応速度を制御し Ti ならびに Ce イオンをドーブした紫外線吸収能を有した CaHap 白色顔料粒子の合成することに始めて成功しました。今後はこれまでの研究をさらに発展させて、さらに異なる縮合リン酸塩を用いて、新規な物性を有する CaHap 系白色顔料粒子の合成を検討してゆく所存です。

最後に、今回の研究にあたり研究助成を頂いたコスメトロジー研究振興財団に深謝申し上げます。

(大阪教育大学)

コスメトロジー研究雑感

茂里 康

この度は研究助成に採択して頂き、誠にありがとうございました。本研究を思いついたのは、最近はやりの韓国コスメからです。カタツムリクリーム等の韓国コスメが流行するなら、何とか日本オリジナルな生物でコスメが出来ないか、と思いついた次第です。まずどこにでも居そうなトノサマガエルやヌマガエル、少し貴重なツチガエル等を調べましたが、うまくいきませんでした。そこで、私の知人のバージニア大学の中山卓哉先生、カエルの発生研究で著名な浅島誠先生のアドバイスを頂き、両生類で唯一ドラフトゲノム解析が終了しているネッタイツメガエル (*Xenopus tropicalis*) を用いて、Topological Mass Spectrometry Analysis (Direct tissue MALDI-TOF MS) という、我々が開発した方法を駆使しました。その結果、あれよ、あれよと順調に研究が進展した次第です。

私の研究スタンスとしては、いろいろ異なる分野の一線の研究者と交流・議論を実施し、自分の興味に合致したいろいろな知識を系統的にまず蓄積する様に心がけています。その様な情報や知識はすぐに活かさない事が多いですが、今回の様に思わぬところで成果に結びつく場合もあります。

最近特に思うのは、若手の研究者が精力的に人間交流や情報収集をしないということです。もちろんインターネット等の検索を利用して情報収集をされていますが、face-to-face の議論や少しアルコールを嗜んでの交流の場は、非常に貴重です。また積極的に海外に渡航されずに国内でじっとされている方も見受けられます。これもゆとり教育の弊害でしょうか。応用嗜好も一段落ついて、根本的な基礎回帰も重要ではないでしょうか。

(産業技術総合研究所健康工学研究部門)

平成 25 年度 研究助成

白い微粒子と黒い微粒子から得られる角度依存性のない構造発色性顔料の調製

竹岡 敬和

この度は本研究を進めるにあたり、研究費を援助して頂いたコスメトロジー研究振興財団に心より感謝致します。

現在、進めている研究は、白い微粒子と黒い微粒子を混ぜて様々な色を示す材料を作るという内容です。白い微粒子や黒い微粒子は、環境に安全で安価な材料から得られる物が沢山ありますので、これらを用いれば様々な色の顔料を作り出すことが可能になります。現在利用されている高価、もしくは、毒性の高い顔料などに置き換わる顔料を、我々の方法で作れるようにすることが一つの目標です。そ

のためには、これらの微粒子が周期性や長距離秩序を有する集合状態ではなく、短距離秩序のみを有する集合体にする事で、従来の顔料同様に角度依存性のない発色性を示すようになります。すぐに役立つ物は、まだ得られていませんが、角度依存性のない様々な色を示す色材が得られることを確認しております。コスメトロジー研究振興財団からの援助によって、素晴らしい発展に結びつけられるようになったと言えるように努力します。

(名古屋大学大学院工学研究科)

平成 24 年度 研究助成

コスメトロジー研究雑感

通阪 栄一

この度はコスメトロジー研究振興財団より研究助成の援助をいただきましたこと、深く感謝申し上げます。本研究助成によりバイオ医薬品の低侵襲性経皮投与技術の開発について検討致しました。近年、バイオテクノロジーの発展に伴い活発に開発されているタンパク質性薬物などのバイオ医薬品は、低分子薬物に比べ特異的にターゲット部位へ結合できるために効果が高い反面、体内での安定性が低いものが多いといった欠点があります。また、それらは親水性の高分子であるために、腸や皮膚からの吸収性が低く、注射で投与されているのが現状です。しかし、注射投与はどうしても患者の苦痛を伴う上、アレルギー反応を引き起こすこともあり、患者自身で負担なく簡単に投与できる、

塗る、飲む、吸う製剤の開発が期待されています。私はこれまで、バイオ医薬品の経口投与技術の開発を目指し検討を行ってききましたが、本助成ではその技術を経皮投与へ応用しました。経口投与では腸上皮細胞層、経皮投与では角質層がバイオ医薬品の吸収におけるバリアとなりますが、どちらも疎水膜により親水性高分子の透過が阻止されることが原因です。つまり、吸収を促進させるためには疎水膜への親和性を向上させることがポイントとなります。私は界面活性剤との複合化技術でこの課題に取り組んでいます。今後は、この疎水膜の透過メカニズムを明らかにし、効率的輸送を実現できる製剤開発を行いたいと考えています。

(山口大学大学院理工学研究科)

平成 24 年度 研究助成

雑 感 野口 範子

本研究は、神経細胞に関する研究によく使われるPC12細胞の亜種であるPC12D細胞が、成長因子に速やかに反応して神経突起を伸長したり、酸化ストレスに対する耐性を示すなど、要するに元気のいい細胞であることに気づい

ていた研究者から、その原因を突き止めてほしいという相談から始まった。しかも、PC12Dが培養液中にその原因物質を分泌していると考えられるデータを見せられた。細胞自身が酸化ストレスに抵抗する物質を産生そして分泌

し、生育しやすい環境を自ら作り出しているというのだから非常におもしろいと思った。そして、すぐにこの酸化ストレス抵抗物質の同定に着手した。この物質が H_2O_2 を分解・消去する活性をもつことは早くにわかった。数種類のクロマトグラフィーを駆使しておおよその分子量を決定し、荷電状態も明らかにした。様々な阻害剤を用いた活性抑制実験の結果もあわせて、細胞保護因子はポルフィリン様の物質で、ペルオキシダーゼではなくカタラーゼ様の活性により H_2O_2 を消去することを突き止めた。しかし、本研究期間にこの保護因子の同定には至らなかった。また、おそ

らく遷移金属が含まれているはずであるが、それを決定することもできなかった。もう少しというところまで来れると思われるので大変悔しい思いでいる。神経細胞が元気であることはコスメトロジーにおいても重要なことである。また、コスメトロジーに直接関係する細胞にも細胞自身の抵抗性を上げるだけではなく、酸化ストレスに対抗できる物質を分泌し、周囲の細胞も保護する性質を獲得した細胞が存在する可能性が高い。今後は保護因子の同定に加え、細胞の保護因子分泌を亢進させる方法の開発が進むことが期待される。
(同志社大学生命医科学研究科)

平成 24 年度 研究助成

安心・安全な化粧品を開発するための健康リスク評価技術

加藤 昌志

大変残念なことであるが、近年化粧品による健康被害が社会的に大きな注目を集めている。これらの化粧品は現行の試験で安全性を確認された後に商品化されている。それにもかかわらず、健康被害が発生している現状は、「現行の安全性試験では化粧品の健康リスク評価技術に問題がある可能性」を示している。

美白剤を例にとっても考えると、健康被害が公表された後も売り上げは増加している。さらに、今回問題となった美白剤以外にも 10 種類以上の化粧品が白斑を誘導する可能性があり、現在調査を進めているとの報告もある。こうした現状は、美容関連製品による健康被害が、今後も拡大する可能性があることを示している。安全性の高い化粧品を供給するために、新しい化粧品の健康リスク評価システムの構築が必要であると考えられる。

従来の安全性試験では、細胞を用いた *in vitro* 実験系に加え、齧歯類等を用いた動物実験によっても安全性を評価している。それでもなお、健康被害が発生している原因の

一つとして、安全性試験の「感度」が十分ではないと考えられる。特に、今回の白斑被害は美白剤使用者全体の 2% 程度であることを考えると、技術革新により、より高感度で化粧品の健康リスクを評価できる技術を開発する必要がある。

一方、化粧品の開発に実験動物を用いることが、難しくなりつつある。ヒトを用いた安全性試験には、倫理的に多くの制約があるので、*in vitro* 実験系をはじめとする種々の代替技術の開発が進められている。しかし、動物実験という個体における化粧品の健康リスク評価の過程を経ずに、ヒトにおける化粧品の安全性を担保することは容易ではないとも考えられる。美白剤により白斑を発症した患者さんが 2 万人近くにのぼっている現状を考えると、少なくとも環境労働衛生学を専攻する研究者の立場としては、化粧品の安全性評価には、動物を用いた健康リスク評価を継続する方法もあるのではないかと感じられる。

(名古屋大学医学系研究科環境労働衛生学)

平成 24 年度 研究助成

皮膚細胞は独自に女性ホルモンを合成し、それが皮膚細胞の活動を制御している

川戸 佳

今年で東大を定年退官になるので、今は引っ越しの準備でてんやわんやである。私の頭の中もてんやわんやである。最後の院生達の学位論文審査もあるし、最終講義の準備もある…。いつしか、この雑感を書くことを忘れてしまい、

先日お叱りの電話を頂いた。

というわけで、今慌てて書いているわけであるが、東大の教授生活最後の年にコスメトロジーに関わる研究ができたのは楽しかった。これまでずっと、脳の記憶中枢の海馬

での性ホルモン合成と神経シナプスの活性化という研究をしてきたが、皮膚にも性ホルモンの合成系が存在することを今回の研究で証明できて、性ホルモンの局所合成系は脳に限らず、色々な組織に(筋肉や骨にも)存在する普遍的な系なのだという実感が湧いてきた。最近、卵巣や精巣以外の器官でも、女性・男性ホルモンの局所分泌が重要な役割

を果たしているのではないかとこの研究が活発になってきているので、その助けになるはず。4月からの新しい大学でも、面白い研究ができることを期待しつつ、筆を置く。

(東京大学大学院総合文化研究科)
(現・順天堂大学医学部泌尿器科学)

平成 25 年度 研究助成

コスメトロジーに基づく化粧品開発

平良 淳誠

私は以前に化粧品研究開発に従事し、医薬部外品などの開発を行った経験があります。本校では、コスメトロジーのほんの一部ではありますが皮膚の生理と美白剤や保湿剤などの役割などの内容を授業に取り入れています。皮膚はからだの中で最大組織であり、他の臓器とは異なる様々な生理作用をもっていることなど、一人でも多くの学生が皮膚に興味をもてるように、心がけて授業を行っています。私は、化粧品は単に美的追求のみの産物ではなく、機能性をもっていること、そして国内の化粧品会社における研究成果の積み重ねが、皮膚科学の推進に大きく貢献してきたと思っています。

研究課題では、化粧品に活用できる素材や物質を提供できるように、酸化ストレス応答シグナルNrf2-AREに対する作用機序を明確にした活性評価を進めました。報告書にも示しましたようにモズクやワカメなどの褐藻類に含まれる海洋性カロテノイドの有用性の高いことを明らかにでき

ましたが、まだ他にもいくつかの機能性の高い物質も探索できることが、今回の研究を通してわかってきました。研究時間が限られていることもあり、まだ化粧品への実用化の部分では基礎と応用の両方の面で至らないのが現状でありますので、今後の研究で少しでも進展させたいと考えています。最近、問題になった薬用美白剤の件もありますので、単に機能性の追求のみではなく、物質の持つ副作用も考慮しなければいけないと強く感じています。今回の研究助成は、皮膚に活用できる安全で機能性の高い物質の探索を進める良い機会になりました。これを機会に、よりコスメトロジーに基づく化粧品へ応用できる研究課題にも積極的に取り組んでいきたいと思っています。この度の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並びに関係者各位には、この誌面を借りて深謝いたします。

(国立沖縄工業高等専門学校生物資源工学科)

平成 25 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

多田 政子

「美しさは内面から」と言われます。その人の生き方や表情、健康状態などが姿に映し出されます。そのため、健康だけでなく美しさを手に入れるために「体にいい」といわれる機能食品が求められ、市場にあふれています。一種類の容量は記されているものの、他の食品も合わせて総合的にどれだけの量を摂取するかは、子供を含む一般の人の見識に託されています。「過ぎたるは及ばざるが如し」といいますが、単一成分のとり過ぎには気をつけなければなりません。

ん。その意味で、沢山の成分の濃度依存的な細胞毒性を調べることが今後大事になると考えられ、ヒトモデル細胞の需要は増えてくると考えられます。本研究で開発したヒト肝細胞モデル細胞を開発段階に留めることなく、製品化により広く利用して頂くことで、生活の安全性を高めることに貢献したいと思っています。末尾になりましたが、コスメトロジー研究の益々の発展をお祈り申し上げます。

(鳥取大学染色体工学研究センター)

平成 24 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

竹馬 真理子

皮膚の研究をしている過程で浮かんだ「歳をとると、なぜ皮膚にしわができるのか?」「肌のみずみずしさを決めている遺伝子があるのではないか…?」そんな単純な疑問が、当時全く研究されていなかった「皮膚のアクアポリン」研究をはじめたきっかけでした。その後の研究から、アクアポリンが、皮膚細胞の水分状態/代謝を調節しているだけではなく、細胞増殖や細胞遊走を司る重要な遺伝子であることを明らかにしてきました。これからも、皮膚・

アレルギー疾患やガンなどの治療を見据えて、未だ解明できていないアクアポリンの機能を研究し続けていきたいと思っております。

最後になりましたが、本研究を進めるにあたり、コスメトロジー研究振興財団よりご支援いただきましたことに、心より感謝申し上げます。

(京都大学大学院医学研究科

次世代免疫制御を目指す創薬医学融合拠点)

平成 25 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

早川 盛禎

研究助成の応募時、3つの分野「素材、物性」、「生体作用、安全性」、「精神、文化」を見て、多角的な研究助成だと思いました。皮膚科学専門の研究者だけでなく、他分野の研究者にも門戸が開かれているのは大変有り難いことです。私の専門は生化学ですが、二つのきっかけから、皮膚科学の研究に携わるようになりました。

一つ目は、今回の研究テーマにもあるインターロイキン-33 (IL-33)とその受容体です。私の所属する研究室は、後にIL-33受容体として知られる遺伝子をクローニングしました。長年、オーファン受容体でしたが、2005年にIL-33が同定され、細胞内シグナル伝達など機能面が明らかになりました。2010年には、IL-33刺激に応じて大量にTh2サイトカインを産生する2型自然リンパ球が発見されました。これらの研究成果により、気管支喘息やアトピー性皮膚炎の病態形成にIL-33が関与することが分かってきました。同時に、私の研究分野も生化学に留まらず、免疫学や皮膚科学へと広がっていきました。

もう一つのきっかけは、海外留学です。免疫細胞の細胞内シグナル伝達を研究できるところを探していましたが、偶然にも、皮膚科学専門の研究所に属する研究室に採用されました。皮膚組織の写真もほとんど見たことがない素人が、その道のプロ集団に入ったことで苦労はありました。しかし、新鮮さもあり、帰国後は自分の研究テーマにも皮膚科学を取り入れようと考えていました。それを実現させてくれたのが、今回の研究助成でした。

貴財団の分野の枠にとらわれない取り組みは、皮膚科学の発展になくてはならないと思います。その研究成果が、将来、皮膚のケアや治療を必要とする方々に役立つものになればと期待します。私もその一助となるように研究を続けていきたいと思っています。最後になりますが、本研究をご支援頂きましたコスメトロジー研究振興財団に心より御礼申し上げます。

(自治医科大学医学部生化学講座病態生化学部門)

平成 24 年度 研究助成

コスメトロジーと酸化ストレス

藤井 順逸

それまで対象としていた研究領域から、活性酸素・酸化ストレスの研究領域に移って 25 年になりますが、関連領域ではその間に一酸化窒素の発見や一酸化炭素・硫化水素の生理作用の解明と、多くの出来事がありました。急速に進む生命科学の進展に合わせて、活性酸素の理解も着実に進んでいます。研究をはじめた頃は、酸化ストレスは未だ専門の研究者だけが使う専門用語に過ぎなかったように思いますが、今では研究者だけではなく、一般の方が普通に使う用語となりつつあります。ことに健康食品やサプリメントの宣伝文句でお目にかかる機会が多く、医学の領域でもよく耳にするようになりました。しかし、残念ながら、前者では効果のしくみがよく分かっていない場合に、後者でも病因が分からない時に、とりあえず酸化ストレスを抑える、酸化ストレスが原因といったように便利に使用されていることが多いように思います。

この度の研究ではビタミンCを主にした課題でご助成い

たしましたが、平成 16 年の時はSuperoxide Dismutase 1 (SOD1) に関する研究にご助成いただきました。ビタミンCは古くから知られる食品成分のため研究し尽くされている感があり、新規性が問われる競争的資金はなかなか獲得できない状況です。そうした中でコスメトロジー研究振興財団からご支援いただいたことで、ビタミンCとコラーゲンに関する研究を進めることができました。SOD1 欠損とビタミンC欠乏については、少しは関係するかと思いながらも別のテーマとして取り組んで来ましたが、最近になってビタミンCがスーパーオキシドの消去に重要であるといった結果を得つつあります。未だ確証がないため、今回の報告書には記載できませんが、現在検証を進めていますので近いうちに公表できればと思っています。スーパーオキシドとビタミンCの両課題にご支援いただいたコスメトロジー研究振興財団には、心から感謝申し上げます。

(山形大学大学院医学系研究科生化学・分子生物学)

平成 24 年度 研究助成

表皮水疱症の臨床から研究、そして臨床へ

藤田 靖幸

私がコスメトロジー研究振興財団に採択された研究テーマは、表皮水疱症という患者数が少ないながらも大変な経過をたどる疾患について、何とかして良い方向に向かわせることは出来ないかというものです。表皮水疱症は、皮膚の強度形成に関わる複数の構造蛋白のうち、どれか1つにでも異常や欠損があると、全身の皮膚がもろくなり、少しの刺激で全身に水疱や潰瘍を作ってしまう先天性の疾患です。皮膚科という診療科全体をみても最も重篤な経過をたどるものであり、患者さんやご家族のみならず医療関係者ですら、出口の見えない処置や合併症に絶望しかねない状況です。

私が表皮水疱症、それも治療をターゲットに研究するきっかけになったのは、大学を卒業して医師として働き始めた初日に、病棟で担当になったのが表皮水疱症の患者さんであったことであると、今になって振り返ると実感いたし

ます。私よりはるかに若い方が、全身の潰瘍に苦悶し、皮膚痛を発症していく姿をみて、この疾患に取り組むことがphysician-scientistとしての皮膚科医の責務の一つであると考えました。幸いなことに疾患マウスにおいて造血幹細胞移植が有効であることを報告することができ、その知見も踏まえて海外では実際に患者さんに対して治療が始まりつつありますが、今回はそれをさらに進めてiPS細胞などで治療をすることが出来ないかを検討いたしました。残念ながら思い通りの結果を得られるまでの状況には至らず、今後のさらなる精進や条件検討が必要であります。いつか研究成果が再び臨床に還元される日を夢見て、引き続き邁進したい所存です。貴財団から援助を受けて研究を進めることができ大変光栄でした。この場を借りまして、心より御礼申し上げます。

(北海道大学病院皮膚科)

平成 25 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

細川 雅史

この度、コスメトロジー研究振興財団の研究助成に採択頂き、誠に有難うございました。私のこれまでの研究は、水産化学、食品栄養学、脂質化学を専門としており、皮膚や化粧品に関連した業績が全くないにもかかわらず、ご支援頂きましたことを大変うれしく光栄に思っております。贈呈式には、分野の異なる先生方に混じって出席させて頂き、記念講演では慶応義塾大学医学部の天谷先生の非常にインパクトのある研究内容を拝聴する機会をもつことができましたことに重ねてお礼申し上げます。

研究を進めるにあたって購入した実験書では、これまでの研究内容と比較して、その手法や原理に大きな違いは見られないのですが、タイトルに「育毛」、「ニキビ」、「日焼け」、「美白」といった私生活で気にしてきた単語が散見され、研究者としての興味というよりは、一般人として気になる用

語が多く見られることに気づきました。コスメトロジー研究が、男女や世代を問わず多くの人々に関心のある分野であることを改めて実感した次第です。

今回助成いただいた研究内容は、従来から化粧品素材等で利用されてきたパンテノールの高機能化をはかることを目的とした内容で、これまで私が行ってきた研究とは全く異なるものです。皮膚組織を構成する細胞が次々に新しいものに新陳代謝されることにあやかって、私自身の研究分野にも新しい視点を取り入れる機会にできればと思う次第です。新しい分野の先生方と出会うことができたことに感謝するとともに、社会に少しでも役立つ研究成果を得ることができるよう頑張りたいと思っております。

(北海道大学大学院水産科学研究院)

平成 24 年度 研究助成

雑感 道上 宏之

公益財団法人コスメトロジー研究振興財団第 23 回(平成 24 年度)研究助成を頂き、とても光栄に思います。私の主たる研究分野は、悪性脳腫瘍の治療研究です。医学部を卒業し、脳神経外科医として臨床に携わると同時に、悪性脳腫瘍の恐ろしさに、治すことができない無力さを痛感し、研究を始めました。それと同時に、Drug Delivery System の素晴らしさに目覚め、痛い思いをする注射より、脳腫瘍が塗って治るなら多くの方が笑顔になると思い、研究しています。これまでに、ペプチドを使った経皮的導入システムの開発や毛母細胞の細胞周期を促進させて育毛剤を開発など、の研究を行ってきましたが、今回、皮膚メラノサイトのチロシナーゼ活性を阻害するペプチドをスクリーニングし、ペプチドを使って経皮導入し効果を得ること

に成功しました。これは、美白剤ができたという、単なる結果というよりは、ペプチドを使って、水溶性分子や高分子など様々な生理活性物質を導入できる一つのシステムを証明する一助になると考えられます。この研究は、私と修士課程に在籍した一人の女性研究者が中心となり研究を続け、Biomaterials という雑誌にアクセプトされる結果を出してくれました。一步、一步ですが、経皮導入という分野において、公益財団法人コスメトロジー研究振興財団より頂きました研究助成のおかげで進むことができていると、胸を張って、他の研究者、応援して下さる方にご報告できると思います。この度は、大変お世話になりました。

(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科細胞生理学)

平成 24 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

八木 孝司

いま大阪のミナミ、道頓堀界隈を歩いていると、韓国語や中国語が飛び交い、まるでソウルの繁華街、明洞にいるのかと錯覚しそうになる。私がソウルの東国大学の外国人特別教授となって丸3年が経ち、ソウル通いはこれまで20回にも及んでいる。3年前の明洞は日本からの女性観光客で満ちあふれ、あちこちの店から日本語で呼び込みがかかった。しかし日本でも韓国でも政権が代わり、政治的・経済的関係が悪化するや否や、明洞の日本人観光客が激減した。

当時、明洞での日本人女性観光客のおみやげ第一位は韓国製化粧品であった。私が東国大学の環境科学の科目で、紫外線の人体影響について授業をしたとき、日焼けや皮膚がんが生じるメカニズムから、紫外線防御化粧品まで話を進めた。私も家内から韓国M社のBBクリームをおみやげに買って帰ることを頼まれていると話した。

授業終了後のアンケートを読んで、1人の女子学生のコ

メントが意外で驚いた。韓国女性は自国の化粧品を信用しておらず、日本製の化粧品を使う。日本人女性が韓国の化粧品を買って帰る理由がわからないという内容だった。

昨年12月の中央日報によれば、韓国人が訪れた外国のトップは日本だった。また、日本で行きたい町のトップは大阪であった。いつの間にか旅行者の流れが逆転していた。韓国の女性観光客に人気の日本のおみやげは何かをネットで検索してみると、S社の化粧品がトップ3にランクされていた。なるほど、日本と韓国の女性は互いに他国の化粧品が優れていると思っているらしい。

このたび貴財団から、紫外線防御剤として使われるナノ材料の安全性に関する研究に助成していただき、深く感謝申し上げます。私どもの研究がこれらの女性に、安全で信頼できる化粧品を提供する一助となれば幸いです。

(大阪府立大学理学系研究科)

平成 24 年度 研究助成

感作性物質の評価

善本 隆之

皮膚表皮の表層にある角層は、外界に対するバリア機能を担い、その中の主要な蛋白質であるフィラグリンは、角層の水分保持やバリア機能に重要な蛋白質である。近年、このフィラグリンの遺伝子変異が、アトピー性皮膚炎の発症の原因の一つであることが明らかになった。さらに、従来、即時型食物アレルギーの発症機序として食事で感作される、すなわち、消化管での感作が主であると考えられていたが、最近、経皮感作による食物アレルギーの発症の可能性が注目を集めている。特に、茶のしずく石鹼の問題は、食物アレルギー発症における経皮感作の重要性を証明する大規模な疫学的結果となった。つまり、石鹼や化粧品の中に含まれる食物由来蛋白質が皮膚を通過し感作される場合もあり、さらに、低分子化学物質がハプテンとして感作し、再度の接触によりI型呼吸器およびIV型皮膚アレルギー反応を誘導する場合もある。それ故、これらの危険性を除くため、これまでマウスなどの動物を用いた感

作性試験が行われてきた。ところが、近年、動物実験に対して、動物を使用しない実験方法への代替(Replacement)、実験動物数の削減(Reduction)、実験方法の改良により実験動物の苦痛の軽減(Refinement)の3Rの原則が作られ、これらの安全性試験において動物を使わないin vitro代替評価法の開発が急務となっている。この代替評価法の一つとして、3次元の皮膚角化細胞培養系を用いた実験系などが開発されているが、さらに呼吸器と皮膚感作性も見分ける評価法の必要性も迫られている。

我々は、今回サイトカインによる接触性皮膚炎誘導の制御に関して研究を行ったが、今後このようなin vitroの新しい感作性評価法の開発も検討していきたいと考えている。最後になりましたが、今回研究助成金の支援を頂き、改めてコスメトロジー研究振興財団に心より御礼申し上げます。

(東京医科大学医学総合研究所免疫制御研究部門)

コスメトロジー雑感

渡邊 利雄

右も左もわからず研究費も設備もなく、隠居しろとまで言われながらの独立でした。研究費を申請しても、「女子大でそのような研究が行えるとは思えない」との理由で不採択になることもあり、建前とは異なり現実はかなり厳しいものでした。

そうは言いうものの、女子大学で自分のラボを立ち上げるにあたって3つの目標を立てました。(1) 女子大でも世界と伍す研究成果を発表する。(2) 女性研究者の育成を行う。(3) 女子大らしい研究を行う。

それから9年、最初の5年は論文公表できるだけの成果が出ずに、海外のラボとの競争があり苦しかったです。現在も互いに抜きつ抜かれつと苦労は続いているものの(1)に関しては論文発表等の業績(本学学生が著者の公表論文数は9編)も増え、小胞輸送研究や癌研究で対外的に一応の認知を得るところまでは来られた。また、ラボに来てくれる学生に恵まれたおかげで、(2)に関しては産業界と研究の世界の両方で卒業生が活躍しており、一応の成果を出

すことができ現在も育成を継続している。その一方で、(3)に関しては、本学で単離された遺伝子のノックアウトマウスが、培養細胞での解析から期待された表現型を一切示さずにまったく解析が進まず苦戦中で、かつ理学部に受け入れられるような女子大らしいテーマも裏付けとなる研究費の欠如等の理由によりなかなか進まなかったが、幸いにも本申請研究が採択されたことにより、本申請研究内容が学生のテーマたり得ることが判明し、今後の目標達成に向けた成果を得ることができた。

昨今、大学からの研究経費の大幅削減と競争的研究資金の獲得競争の激化により、小規模女子大での研究への支援が細るなか、よくぞ支援していただいたものと感謝しております。本申請研究で得た成果をさらに発展させ、公表できる成果へと発展させることを次のラボの目標とさせていただきます。今回のご支援、本当にありがとうございます。

(奈良女子大学大学院人間文化研究科個体機能学講座)

ハラールと化粧品—モロッコから

川添 裕子

「サウジアラビアやドバイではなく、モロッコですか？」第26回表彰・贈呈式(平成25年11月28日)会場で複数の参加者から質問された。モロッコを調査地に選んだ理由は、日本で人気が出始めたアルガンオイルの産地だったことに加えて、ハラール市場への参入がそれほど早くない分、新たな商品流通による人々の認識や社会の変化をみることができると思ったからである。

モロッコには、アルガンオイルをはじめ豊かな化粧品原料がある。中には家伝の手作り化粧品を楽しむ人もいる。女性たちとはメイクアップやネイルや脱毛の話でも随分盛り上がった。一方男性たちは年齢が上がる程「外見は気にしない」と言う人の割合が高くなる。とはいえヘアスタイルやヒゲは念入りに整えられているし、「毎晩こっそり手作り育毛剤をつけているお父さん」も少なくないらしい。男女ともにヘアケア製品の需要は相当ありそうだ。

ガイドブックには、モロッコの魅力として美容、ハンマーム(浴場)、アラビア書道、ミントティー、お香、寄木細工などが掲載されている。どれも日本人には目新しくかつ親しみを感じるものである。これらはもっぱら政治経済外の領域とみなされがちだが、化粧品類は古くから各地の交易品として取引されてきたし、銭湯やサウナは社交の場としても利用されてきた。身体装飾はホモサピエンスの特徴の一つである。ハラール認証の化粧品・パーソナルケア商品市場が今後大きく展開するかどうかは未知数だが、コミュニケーション、経済活性、ビジネス倫理の発動などの可能性もみえてきた。化粧に着目することで、モロッコと日本の関係にも原産地と消費地だけではない新しい繋がり方も見出せるかもしれない。そんなことを考えながら研究を続けている。

(松蔭大学観光メディア文化学部)

平成 24 年度 研究助成

嗅覚と精神・生活

神崎 晶

今回貴財団から研究費を賜りましてありがとうございます。お陰様で、この研究費を通じて、嗅覚と社会生活、精神・神経について以前よりも考える機会をいただくことができました。嗅覚障害で来院される患者さんの多くの方は生活がつまらなくなった、と嘆かれます。視覚聴覚と比較すると注目されにくい領域ですが、嗅覚を使う職業をされていなくても困っている方、失望されている方は多いのです。そこで、嗅覚障害がどれだけ辛いものかを測定するため、QOLを調査しました。臨床的に最も予後の悪い「頭部外傷後」に伴う嗅覚障害はQOLも非常に悪い結果でした。次に、嗅粘膜の受容体には自律神経受容体が関与することで、自律神経との関連を解析しました。良い香り、悪臭それぞれをかがせたところ、交感あるいは副交感いずれかが興奮するのですが、一定の傾向はありません。さらに男女

に同性異性用の香料をかがせてみたところ、興味深いことに男女とも異性香水でリラックスしていることがわかりました。感覚的にはわかりやすい結果ですが、この反応が男女間において何に寄与しているのかは不明であり、今後の課題です。また、人工と天然香料で自律神経の反応が異なることもわかりました。こちらの解明も今後の課題です。なお、この研究は慶応義塾大学医学部学生である西田梨紗さんの尽力で行われたものであり、非常に興味深いものである。若い世代には嗅覚はますます重要になっており、嗅覚障害に興味をもつ学生も多い。

嗅覚障害に関する病態、それに伴う精神への影響などについて今後もっと研究がさかんになると期待しています。

(慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科)

平成 24 年度 研究助成

「かわいい」から「品格」へ

木戸 彩恵

本研究課題の予備調査のために「大学で研究員をしています。メイクアップに関する研究をしているので、差し支えなければ、お話を伺わせて頂けませんか。」と、街頭で年配の女性にお声がけし、何度かお話を伺わせて頂きました。この時には、怪訝な目で見られ、多くの方に警戒されてしまいました。おそらく、化粧品のセールスやエステの勧誘のたぐいと勘違いされてしまったのでしょう。また、本調査をお願いした年配女性にも何人かネガティブな反応をされることや、「年をとると、化粧は関係なくなるの。」という感想を頂くこともありました。

一方で、別の調査協力者の方々から、調査に参加することで、「自分自身を振り返るよい機会になりました。」という感想や、「普段「女性」としてということを考えなくなっているなど改めて感じました。」という省察的な感想を頂くこともありました。

これまでに私自身が行ってきた女子大学生を対象とした研究とは違い、壮年期以降の化粧に対する価値観は解釈が

難しいかもしれないと素データや調査協力者の反応を見ながら考えていました。しかし、データと向き合い、研究の全体像を捉え直したときに、自己と他者の媒介として化粧が表面的な「かわいい」から「品格」へと生涯を通して変容することに気づきました。これは、私にとっては大きな発見であり、女性の生涯発達と化粧に関連づけながら考えるための土台となる視点を頂くことができた、とても嬉しく感じました。

女性にとって化粧は身体化された行為であるからこそLife（生命・生活・人生）に関わる重要なテーマとなります。私自身、ライフワークとして化粧を通して女性の生き方の研究に携わって参りたいと考えておりますが、化粧心理学の研究ではこれまで予算を頂くことができずに苦心して参りました。末筆となりましたが、貴財団から初めて助成いただくことで、関心をもつ研究を実現させることができました。ご支援に心からの感謝を申し上げます。

(立命館大学立命館グローバル・イノベーション研究機構)

コスメトロジーとがん薬物治療

中村 暢彦

コスメトロジーの世界は美しく華やかなイメージです。化粧品などの商品の広告にはイメージキャラクターとして今を時めく話題の若い女優さんが起用されています。一方、がんは内閣府の20歳以上に実施された「がん対策に関する世論調査」で「こわい病気と思う」人の割合が76.7%に上がっています。その理由は「死に至る場合があるから」を挙げた人が最も多く75.1%でした。子どもたちを対象にした別のアンケートでも同様の数字であり「抗がん剤で毛が抜ける病気」といったイメージでした。これはテレビの影響が大きいのかも知れませんが、よいイメージではありません。

がん薬物療法の研究者はしのぎを削って生命予後が改善できる薬物の開発に取り組んでいます。その結果、最近では「分子標的薬」と呼ばれるがん細胞を標的とする薬剤が臨床では広く使用されています。しかし、肺や大腸がんの使用される代表的な分子標的薬には皮膚に副作用が70～90%と出やすく、ニキビのような「皮疹」が頭の先から足

まで全身に出てきます。薬物投与を中止することもできますが、副作用の皮疹が治療効果とも関連しており、原則として治療を継続します。患者さんは薬物療法によって変化した外見に悩んでおり、顔や手足に出る皮膚の障害は生活の質にも影響を与えます。この副作用の皮疹を抑えるにはスキンケアが大切ですが、各施設で独自のスキンケアが実施されているのが現状です。このような中、私はがん薬物療法のスキンケアに関してコスメトロジーの研究に寄与できればと願っています。

2025年には65歳以上の高齢者の占める割合が30%を超え、女性でも2人に1人ががんになる時代です。誰でも最後まで美しく華やかでいたいものです。コスメトロジーは化粧品を中心として時代とともに発展し続け、がんスキンケアの広告のイメージキャラクターには今を時めく年を重ねた女優さんが起用されているのではないのでしょうか。

(京都薬科大学臨床薬学教育研究センター)

情報技術とコスメトロジー

茅 暁陽

まず、研究助成をくださった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。この助成により、私自身のこれまでの研究分野を大きく広げることができたと思います。

私は画像処理と統計学習技術を利用して、個人の顔に似合うヘアスタイルを推薦する研究を行いました。メイクやヘアをはじめ、美容は個人に似合ってこそ、その人をより美しくみせることができます。皮膚や髪への影響を考えれば、メイクやヘアカラーリングは何度も試すことはできません。また、髪は一度切ってしまうと、すぐには元に戻りません。したがって、事前に自分に最も似合うものを特定できるような情報技術があれば、その用途はたいへん大きいと考えます。肌の性質など、本人のデータや好みを入力すれば、化粧品に関するアドバイスを呈示してくれるようなエキスパートシステムは従来から利用されていますが、近年は画像処理やCG技術を利用して化粧やヘアスタイルをビジュアルにシミュレーションできる情報技術も開発され、

話題を呼んでいます。今回の研究ではユーザ自身がデータ入力またはシミュレーションを行うことなく、システム側がユーザの顔画像から特徴を自動抽出し、「似合う」ヘアスタイルを推薦するものです。しかし、評価実験においても再確認されました通り、「似合う」は主観的かつ感性的な概念ですので、経験やジェンダーによっても大きく異なります。本研究では「似合う」を直接定量的に扱うことをせずに、ヘアスタイルと個人の特徴との関係を過去の成功事例から学習するアプローチを試みました。このような統計学習アプローチはまさに今ビッグデータブームの主役でもあります。また、今回のアプローチにおいて特に重要なのは特徴ベクトルの設計であるため、視線装置を用いてユーザの感性を特徴設計に反映させる検討も行いました。その効果的な利用は今後の課題として残されています。

データの蓄積と流通が益々進むにつれて、今後のコスメトロジーにおける情報技術の活用になお一層大きな期待を寄せたいと思います。(山梨大学大学院医学工学総合研究部)

平成 25 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

吉永 淳

「コスメトロジー研究報告」を拝見すると、コスメトロジー研究振興財団の助成金には、動物実験やin vitro系を活用した、いわゆる医学生物学系の分子レベルの研究が多く採択されているようです。そのなかで筆者の申請研究「19～20世紀にわが国で使用された含鉛おしろいに関する研究」はやや趣が異なるものでしたが、幸いにも採択されて研究を進めることができました。この研究は、明治時代に

わが国で使用されていたおしろいに含まれる鉛に関する理化学的な分析を主とするもので、わが国の化粧品使用の歴史にかかわる「文科系」的な研究を「理科系」的な手法で行おうというものでした。コスメトロジー研究振興財団の懐の深さに敬服するとともに深く感謝申し上げます。

(東京大学大学院新領域創成科学研究科環境システム学専攻)

平成 26 年度 学術集会支援助成

第1回 アジアオレオサイエンス会議を終えて

宮下 和夫

第1回アジアオレオサイエンス会議(1st Asian Conference on Oleo Science:ACOS2014)は、平成26年9月8日から同9月10日までの3日間、札幌市のロイトン札幌において、宮下和夫実行委員長のもと開催されました。本会議への参加者は300名を超え、そのうち海外からの参加者は、アジアを中心に14カ国100名以上となりました。ACOS2014での口頭発表は基調講演2題などを含め112題、ポスター発表は92題にのぼりました。また、ビジネスミーティング(9月8日)、懇親会(9月10日)やエキスカージョン(9月10日)などにも多数の参加者がありました。ビジネスミーティングでは、パーム油などの主な油糧作物はアジア諸国が主産地であり、これらの原料は、食用の他、石鹸・洗剤や化粧品といった製品の重要な素材となっていること、我が国はパーム油など多くの油脂資源をアジア諸国から輸入していることなどの共通認識のもと、有意義な議論を行うことができました。特に、外国の方からは、ACOSの今後の発展を望む声が多く聞かれました。その内容は、研究交流に留まるだけでなく、日本企業とのコラボレーションなど多岐にわたるものであり、アジアにおけるオレオサイ

エンスの重要性と、本会の役割を強く期待するものでした。

外国人参加者の多くは、9月11日に帰国する予定でしたが、当日は北海道ではこれまで例のない大雨となり、参加者の帰りの足が大変心配されました。しかし、外国の方からは、帰りの便には間に合わなかったけれども、千歳の航空カウンターの方の“信じられないような”親切な対応で何とか無事帰国できたとのメールも届いております。また、ホテルスタッフやエキスカージョンを企画してくれた札幌市のボランティアの方々への感謝のメール、札幌から函館経由でバンコクに戻った方からは、切符の購入から列車への案内までしてくれた見知らぬ日本人への感謝の言葉がありました。国際会議が単に、関連の研究交流に留まらず、国際親善にも貢献できることを知りました。

最後になりましたが、本会議の開催にあたり、コスメトロジー研究振興財団より助成金の支援をいただきましたことに心より感謝申し上げます次第です。

(第1回アジアオレオサイエンス会議実行委員長

北海道大学大学院水産科学研究院)

付 録

●
事業報告（平成 26 年度）
役 員
●

事業報告書

(自平成 26 年 4 月 1 日 至平成 27 年 3 月 31 日)

《研究助成関連》

2014	5	7	公募開始	全国 550 の大学、病院、研究機関等へ公募要領及び推薦書を送付、関連学術雑誌 7 誌、当財団 HP 他 3 機関 HP に掲載
	7	8	公募締切り	応募総数125件
	7/15	8/22		各選考委員による個別審査
	9	1	選考委員会(第 2 分科会)	生体作用、安全性に関する分野の選考
	9	4	選考委員会(第 3 分科会)	精神、文化に関する分野の選考
	9	5	選考委員会(第 1 分科会)	素材、物性に関する分野の選考
	9	25	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32課題を選考
	11	27	理事会	本選考委員会より答申、助成課題決定
			第25回 表彰・贈呈式 記念講演	研究助成対象32課題の代表者へ、表彰状、助成金目録等を授与 演題：『〈香り〉はなぜ脳に効くのか』～認知症の予防・改善について～ 講演者：塩田清二 先生 昭和大学医学部 教授
	12	12	助成金交付	採択課題に対し研究助成金を交付 総額2,800万円

《国際交流助成関連》

2015	1	5	審査	応募課題の審査
			助成金交付	国際交流助成金の交付 無し

《学術集会支援助成関連》

2014	5	26	審査	応募課題の審査
	6	10	助成金交付	学術集会支援助成金の交付 50万円

《理事会関連》

2014	5	29	第一回通常理事会	平成25年度事業報告及び収支決算報告の承認、補欠評議員候補者の選出、任期満了に伴う選考委員及び理事、監事候補者の選出、株主としての議決権行使、報告事項
	6	20	臨時（書面）理事会	代表理事（理事長及び副理事長）及び業務執行理事（専務理事）の互選、事務局長の選任、常勤役員報酬の承認
	11	27	第二回通常理事会	平成26年度（第25回）研究助成者等の承認、平成27年度事業計画及び予算案の承認、報告事項

《評議員会関連》

2014	6	13	第一回定時評議員会	平成25年度事業報告及び収支決算報告の承認、補欠評議員の選任、任期満了に伴う理事、監事の選出、評議員 1 名の辞任願いの承認、評議員会長の互選
	8	18	評議員報告（書面）	上野芳夫評議員逝去、後任の選任無し（定員数を満たしているため）
	12	5	評議員報告（書面）	第二回通常理事会議決事項、第25回表彰・贈呈式

《その他》

1) 報告書発行

2014	5	1	中間報告集	研究業績 中間報告集 第23号
	9	1	完了報告集	コスメトロジー研究報告 2014 vol.22

2) 情報公開 (当財団HP)

2014	3	13	事業計画及び収支予算	平成26年度事業計画及び収支予算書
	4	4	公募要領	2014年度「コスメトロジー研究」公募要領
	6	16	事業報告及び収支決算	平成25年度事業報告書及び収支決算報告書
	6	30	役員の変更	理事、監事任期満了改選に伴う新役員
	9	1	研究報告の要旨	コスメトロジー研究報告 2014 vol.22 掲載課題の要旨
	12	1	研究助成者及び課題名	平成26年度研究助成者名及び研究課題名

平成 26 年度 助成を受けられた方々

1) 研究助成 (32 課題)

第 1 分野：素材、物性に関する分野 (9 課題)

氏 名	所 属	職位	研究課題
飯島 志行	横浜国立大学大学院 環境情報研究院	講師	カチオン性高分子の部分的疎水化と化粧品原料微粒子の油中分散安定化剤への応用
江島 広貴	東京大学生産技術研究所	助教	天然を超える抗酸化&抗菌活性の発現をめざしたポリフェノール模倣高分子の精密重合
杉本 幸子	広島大学大学院 医歯薬保健学研究院	講師	アーユルヴェータ生薬および熱帯植物からのアンチエイジングを志向した抗糖化および美肌薬の創薬研究
出口 茂	独) 海洋研究開発機構 海洋生命理工学研究開発センター	センター長	ナノ乳化におけるトップダウンプロセスとボトムアッププロセスの比較
松岡 秀樹	京都大学大学院 工学研究科高分子化学専攻	准教授	外部刺激による高分子ミセルの特異的形成／崩壊制御とその物質輸送系への応用
三浦 佳子	九州大学大学院 工学研究院化学工学部門	教授	高分子ナノゲル粒子の短距離秩序に基づく色彩の研究
道信 剛志	東京工業大学大学院理工学研究科 有機・高分子物質専攻	准教授	水溶性フラーレンの設計とそれらを用いた抗酸化作用に関する研究
安永 秀計	京都工芸繊維大学大学院 工芸科学研究科 バイオベースマテリアル学部	准教授	バイオベースマテリアルを用いた人体により安全な染毛法の開発
山路 稔	群馬大学学術研究院 分子科学部門	准教授	抗炎症効果のあるUVサンスクリーン分子の開発と基礎物性の研究

第 2 分野：生体作用、安全性に関する分野 (15 課題)

氏 名	所 属	職位	研究課題
池ノ内 順一	九州大学大学院理学研究院 生物科学部門	准教授	タイトジャンクションの形成を促進するシグナル伝達経路の解明
岩脇 隆夫	群馬大学 先端科学研究指導者育成ユニット	講師	酸化ストレスの生体分子イメージングから迫る対紫外線スキンケア分子の新規探索と機能評価
大沢 匡毅	岐阜大学大学院医学系研究科 生命機能分子設計分野	教授	皮膚角化層形成にともなう上皮細胞のダイナミズムを制御する分子メカニズム
大津 浩	東北大学大学院工学研究科 応用量子医工学分野	教授	慢性皮膚炎モデルにおける HDC 遺伝子レポーターマウスを用いたヒスタミン産生細胞の同定
岡野 純子	滋賀医科大学医学部医学科 解剖学講座生体機能形態学部門	准教授	レチノイン酸の皮膚内濃度モニタリングと新規アンチエイジング分子の同定への応用
尾上 誠良	静岡県立大学薬学部 薬物動態学分野	教授	光線過敏症リスク予測方法の確立と国際協調活動の戦略的推進
菊地 和也	大阪大学大学院工学研究科	教授	炎症時における細胞動態と酵素活性を in vivo で可視化する機能性 MRI プローブ
佐々木 均	長崎大学病院薬剤部	教授・ 薬剤部長	新規ナノ粒子を用いた皮内 siRNA デリバリーによる皮膚の恒常性維持
住吉 秀明	東海大学医学部再生医療科学	講師	創傷をより綺麗に修復させる皮膚再生促進薬の開発
平 修	福井県立大学生物資源学部	准教授	経皮吸収物質の体内動態のイメージング質量分析による解析

氏 名	所 属	職位	研究課題
谷崎 英昭	京都大学大学院 医学研究科皮膚科	助教	皮膚バリア機能障害を伴う皮膚疾患を対象としたラマン分光装置を用いた角層天然保湿因子の解析
中台 枝里子	大阪市立大学複合先端研究機構 /大学院生活科学研究科	特任 准教授	極長鎖脂肪酸含有セラミドの表皮バリア形成における機能と分子機構の解明
原 俊太郎	昭和大学薬学部	教授	皮膚疾患におけるプロスタグランジン最終合成酵素群の機能解析
松崎 伸介	大阪大学大学院 連合小児発達学 研究科 こころの発達神経科学講 座 分子生物遺伝学領域	准教授	創傷治癒機構における小胞体ストレス応答の関与
水品 善之	神戸学院大学大学院 食品薬品総合科学研究科	准教授	紫外線ダメージ抑制作用を有する熱帯植物の探索と作用メカニズムの解析

第3分野：精神、文化に関する分野（8課題）

氏 名	所 属	職位	研究課題
東 照二	立命館大学言語教育情報研究科	教授	「香り」の社会言語学：人はどのように「香り」の言語化を行うのか？
大川 真由子	早稲田大学人間科学学術院	助教	ムスリム女性の「美」と消費 ―中東におけるハラル化粧品の可能性
荻 あや子	岡山県立大学 保健福祉学部看護学科	准教授	患者や家族と看護者の化粧に対する認識の比較に関する研究
熊崎 博一	福井大学 子どものこころの発達 研究センター	特命助教	自閉症スペクトラム症の香料過敏についての調査
高坂 康雅	和光大学 現代人間学部心理教育学科	准教授	自我発達からみた女子青年における容姿・容貌に対する劣等感への化粧効果の認識に関する発達心理学的研究
佐々木 一郎	同志社大学商学部	准教授	消費者ニーズの変化と化粧品チャンネルに関する研究
広瀬 英史	静岡文化芸術大学 文化政策学部国際文化学科	准教授	女性の美における訴求表現に関する研究
藤原 寿理	福島県立医科大学医学部 システム神経科学講座	助教	化粧がもたらす自己の価値および社会行動における価値の変化 － 行動学的検討

3) 学術集会支援助成（1件）

実施責任者	所 属	職位	集会名 及び 内容
宮下 和夫	北海道大学大学院 水産科学研究院	教授	第1回アジアオレオサイエンス会議 平成26年9月8日～9月10日（ロイトン札幌にて） 目的：油脂（脂質）に関わる学際領域を網羅しているオレオサイエンスの啓蒙と発展及び関連企業の発展

役 員

平成 27 年 7 月 1 日現在

理事長	小林 保清	株式会社コーセー 名誉会長
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	元株式会社コーセー 常勤監査役
理 事	宇佐美昭次	早稲田大学 名誉教授
理 事	関根 茂	日光ケミカルズ株式会社 代表取締役社長
理 事	二木 鋭雄	東京大学 名誉教授
理 事	西川 武二	慶應義塾大学 名誉教授
理 事	廣部 雅昭	東京大学 名誉教授
理 事	野呂 影勇	早稲田大学 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	村上 實	弁護士
評議員会長	内藤 昇	株式会社コーセー 常務取締役
評議員	伊藤 正俊	東邦大学 名誉教授
評議員	齊藤 勲	元厚生省大臣官房審議官
評議員	仙名 保	慶應義塾大学 名誉教授
評議員	中村 陽子	元厚生省医薬安全局安全対策課安全対策企画官
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	元昭和館 館長
評議員	原田 敬之	東京女子医科大学 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.23／2015

非売品

2015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 〒171-0014 東京都豊島区池袋四丁目24番7号 電話 03(3590)5375
印刷	太陽印刷工業

表紙デザイン監修：株式会社コーセー 商品デザイン部デザイン1課

©2015

不許複製 禁無断転載