ごあいさつ

この度コスメトロジー研究振興財団として、24冊目の研究報告書を刊行いたしました。

設立以来25年以上にわたって、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、社会学など多岐にわた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25～26年度に助成を受けられた方の中から30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、独創的な視点での機能性素材開発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、皮膚の老化に関する研究、皮膚の機能・構造における新たなメカニズムに関わる研究が中心であったと思われます。

精神、文化に関する分野の研究につきましては、香粧品による認知心理学的な研究が多く、大変興味深い内容であったと考えています。

この研究報告書COSMETOLOGY誌がより幅広く活用されることを祈念します。

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28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

・紫外線吸収剤を内包した O/I_1 型ゲルエマルションの調製 …… 4
横浜国立大学大学院環境情報研究院　荒牧　賢治

・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 …… 11
横浜国立大学大学院環境情報研究院　飯島　志行

・天然由来の美白性ペプチド素材の探索とその作用機序の解明 …… 16
新潟大学工学部機能材料工学科　落合　秋人

・モルフォ蝶のミステリーに基づく、けばけばしくならない光輝粉体の開発 …… 22
大阪大学大学院工学研究科　齋藤　彰

・保湿性・抗菌性を有するバイオベースの新しいスキンケア素材の開発 …… 27
国立研究開発法人 産業技術総合研究所 機能化学研究部門　佐藤　俊

・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 …… 32
国立研究開発法人 海洋研究開発機構 海洋生命理工学研究開発センター　出口　茂

・コスメトロジー素材に向けてのアロエ *C*-グリコシルクロモン類の高機能化 …… 38
神戸大学大学院理学研究科　林　昌彦

・明るい環境でより鮮やかに着色する有機材料の開発 …… 43
東京工業大学大学院理工学研究科　平田　修造

・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 …… 53
京都大学工学研究科高分子化学専攻　松岡　秀樹

・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 …… 59
群馬大学大学院理工学府分子科学部門　山路　稔

Ⅱ．生体作用、安全性に関する分野

・必須脂肪酸欠乏時における皮膚障害発症のメカニズムの解明 …… 70
お茶の水女子大学基幹研究院自然科学系　市　育代

・天然物特異的モノクローナル抗体を用いた甘草エキス成分の作用機構に関する研究 …… 77
長崎国際大学薬学部薬品資源学研究室　宇都　拓洋

・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 …… 84
岐阜大学大学院医学系研究科生命機能分子設計分野　大沢　匡毅

・香り誘発性鎮痛の視床下部オレキシン神経による調節 …… 90
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科　柏谷　英樹

・新規細胞膜上、女性ステロイドホルモン受容体を介した生理・病態機能の解明 …… 95
東京農工大学大学院農学研究院応用生命化学専攻　木村　郁夫

・スピルリナの紫外線皮膚老化抑制効果に対する検討およびそのメカニズムの解明 …… 99
神戸大学大学院医学研究科内科系講座皮膚科学分野　国定　充

・ケラチノサイト分化におけるジアシルグリセロールキナーゼの機能解明 …… 105
神戸大学大学院農学研究科　白井　康仁

・新しい生体内ホメオスターシス維持機構に基づくアンチエイジング法の開発 …… 112
信州大学大学院医学系研究科循環病態学講座　新藤　隆行

・皮膚機能のサーカディアンリズムと時計遺伝子によるその調節機構の解明 …… 117
日本大学薬学部健康衛生学研究室　榛葉　繁紀

・フィラグリンをターゲットにしたアトピー性皮膚炎の新規治療法の開発 …… 124
北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野　乃村　俊史

・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 …… 129
昭和大学薬学部社会健康薬学講座衛生薬学部門　原　俊太郎

・皮膚感覚神経－毛包幹細胞相互依存における基底膜領域特殊化の役割 …… 134
理化学研究所 多細胞システム形成研究センター細胞外環境研究チーム　藤原　裕展

・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 …… 141
信州大学大学院農学研究科　水品　善之

・ミトコンドリア活性化による皮膚老化の抑制に関する研究 …… 149
東京薬科大学生命科学部　柳　茂

Ⅲ．精神、文化に関する分野

・自閉スペクトラム症児の香料過敏についての調査 …… 154
金沢大学子どものこころの発達研究センター　熊﨑　博一

・中・高年の見た目年齢の解析 …… 159
愛媛医療センター神経内科　小原　克彦

・顔の魅力度認知における部分情報の統合 …… 167
東京大学大学院工学系研究科先端学際工学専攻　三枝　千尋

・笑顔のリズムが創る印象空間の可視化と化粧効果の測定 …… 172
秋田県立大学システム科学技術学部機械知能システム学科　佐藤　和人

・睡眠誘導効果をもつ(－)－酢酸ボルニルの睡眠促進効果ならびに肌質改善効果 …… 181
九州大学農学研究院　清水　邦義

・リラックスおよび安眠効果に有用な植物芳香成分の探索 …… 190
産業医科大学保健センター　八谷　百合子

■記念講演

・第 26 回表彰・贈呈式記念講演
「ヒト常在菌叢と超生命体　～微生物が作る体内ミクロコスモス～」 …… 201
早稲田大学理工学術院 教授　服部　正平

■コスメトロジー研究雑感 …… 213

■付　録

事業報告書 …… 233
平成 27 年度　研究助成を受けられた方々 …… 235
役員一覧 …… 237

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

紫外線吸収剤を内包した O/I_1 型ゲルエマルションの調製

横浜国立大学大学院環境情報研究院
荒牧　賢治

Oil-in-cubic phase (O/I_1) emulsions encapsulating cosmetic UV abosorbing agents, 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate (EHMC), 2-etylhexyl 2-cyano-3,3-diphenylacrylate (OCR) and 1-(4-tert-butylphenyl)-3-(4-methoxyphenyl) -1,3-propanedione (TBMP), were prepared by vortex mixing accompanied with a heating-cooling process. A ternary phase diagram in a water/$C_{12}EO_{25}$/EHMC system at 25°C was constructed and a two-phase equilibrium of an oil phase and an I_1 phase, which is necessary to prepare the O/I_1-type emulsions, was comfirmed. Also melting of the I_1 phase into fluid micellar solution phase was confirmed, allowing emulsification with a heating-cooling process. The O/I_1-type emulsions were formulated in the ternary system as well as a four-component system containing, in addition, a cosolvent (isopropyl mylistate), which can reduce the composition of EHMC having a poisonous nature with keeping low surfactant concentration. Formulation of the O/I_1-type emulsions with other UV absorbing agents (OCR and TBMP) was also possible by the same emulsification method. UV absorbability of the O/I_1-type emulsions encapsulating UV absorbing agents was confirmed by UV aborption spectra. We have also studied the formulation and UV absorbability of the S/I_1-type dispersions obtained by subtituting isopropyl mylistate with tripalmitin.

1. 緒　言

混じり合わない２種類の液体の一方をもう片方へ液滴として分散させたエマルションの粘度は分散相の体積分率、または連続相の粘度により主に支配される。相互作用を持たない剛体球の空間充填率 0.74 をエマルションの分散相体積分率が超えるとゲル状のエマルション（ゲルエマルション）が得られる。このようなゲルエマルションは高内相比エマルション（HCE）と呼ばれる[1,2]。また、分散相体積分率が 0.74 以下でも荷電エマルション滴のナノエマルション化によりゲルエマルションが得られることも報告されている[3]。連続相の増粘によりゲルエマルションは食品エマルションとしてよく使用される。多くの食品ゲルエマルションの場合はタンパク質や天然高分子により連続相をゲル化させることで得られる。また、界面活性剤の分子集合構造を利用したゲルエマルションも可能であり、ラメラ液晶中に油滴を分散させたゲルエマルションが化粧品用の安定なナノエマルション調製法として知られる液晶乳化法のプロセスにおいて重要であることが古くから知られている[4,5]。近年では Rodriguez らがミセルキュービック相（I_1）を連続相としたエマルション調製を初めて報告[6]して以来、液晶中油滴分散型（O/LC 型）ゲルエマルションに関する多くの研究がなされた。O/LC 型ゲルエマルションに使用できるリオトロピック液晶はミセルキュービック相のものが多く[6–12]、それ以外に、ヘキサゴナル液晶（H_1）も報告されている[13,14]。O/LC 型と逆構造である W/LC 型も逆ミセルキュービック相（I_2）や逆ヘキサゴナル液晶（H_2）を用いて調製できる[15,16]。HCE と異なり、O/LC 型や W/LC 型ゲルエマルションは水、界面活性剤、油を含む系の油相あるいは水相と液晶相との２相平衡領域で得られる[17,18]。また、分散相体積分率が 0.74 より低い場合でもゲルエマルションが得られる[19,20]。リオトロピック液晶の中でも I_1 相は最も粘度が高い[21]ため、O/I_1 型ゲルエマルションも高粘性となる。ただし、分散相分率が高くなると粘度低下が生じる。O/LC 型、W/LC 型ゲルエマルション調製については、ポリ（オキシエチレン）型界面活性剤系が多いが、その他にも糖系[22]、ポリグリセリン型界面活性剤[7]、アミノ酸型界面活性剤[12]などが報告されている。以上のように O/LC 型、W/LC 型ゲルエマルションについてはその調製、構造、レオロジー特性などの基礎的な研究はなされてきたが、応用研究は少ない[23,24]。本研究においてはサンスクリーン剤への応用を指向し、紫外線吸収剤を内包させた O/I_1 型ゲルエマルションの調製を行った。また、紫外線吸収剤の保持安定性を向上させることを期待して油相に融点が室温以上であるトリグリセリドを用いた S/I_1 型ゲルエマルションの調製を試みた。

有害な紫外線から肌を守るために使用されるサンスクリーン剤にはメトキシ桂皮酸オクチルやオクトクリレンに代表される有機系紫外線吸収剤と酸化チタン、酸化亜鉛などの無機系ナノ粒子による紫外線散乱剤が主に配合されている。そのうち、有機系紫外線吸収剤については、吸収された紫外線のエネルギーと無機系紫外線吸収剤の光触媒作用

Preparation of O/I_1-Type Gel Emulsions Encapsulating UV Absorbing Agents
Kenji Aramaki
Graduate School of Environment and Information Sciences, Yokohama National University

による分解が進み、時間経過とともに紫外線防御効果の低減が生じること、アレルギーの誘引や毒性が指摘されていること、などの問題点が指摘されている。そこでFig.1に示すように有機系紫外線吸収剤をO/I_1型ゲルエマルションの油滴に内包させることにより問題点の解決ができると考えた。分散された油滴はゲル状のキュービック液晶に覆われているため、合一やクリーミングが生じない。また、分散相の油には多くの油剤（炭化水素、エステル油、トリグリセリドなど）を用いることができる。有機系吸収剤は油溶性のため、エマルション中の油滴に安定保持されることが期待できる。また、化学的プロセスを必要とするシリカや高分子膜で紫外線吸収剤をカプセル化する手法[25,26]に比べると調製が容易である点も特徴である。

2. 実　験

2. 1. 試薬

親水基の重合度が25であるポリ（オキシエチレン）ドデシルエーテル（東京化成工業製）を界面活性剤として用いた。以下、これを$C_{12}EO_{25}$と呼ぶ。紫外線吸収剤はいずれも東京化成工業製の2-エチルヘキシル4-メトキシケイヒ酸（メトキシケイヒ酸オクチル）、2-エチルヘキシル 2-シアノ-3, 3-ジフェニルアクリル酸（オクトクリレン）、1-（4-tert-ブチルフェニル）-3-（4-メトキシフェニル）-1, 3-プロパンジオン（アボベンゾン）の3種類を用い、それぞれEHMC、OCR、TBMPと呼ぶ。油剤は東京化成工業製のミリスチン酸イソプロピル（IPM）を用い、水は逆浸透膜で濾過したものを用いた。

2. 2. 実験方法

2. 2. 1. 相平衡図の作成

所定の組成の試薬をねじ口試験管に入れ、ボルテックスミキサーを用いて撹拌した。その後、恒温槽に静置し状態観察を目視により行った。複屈折性のサンプルについては2枚の偏光板を直交させたものの間に置き、観察した。

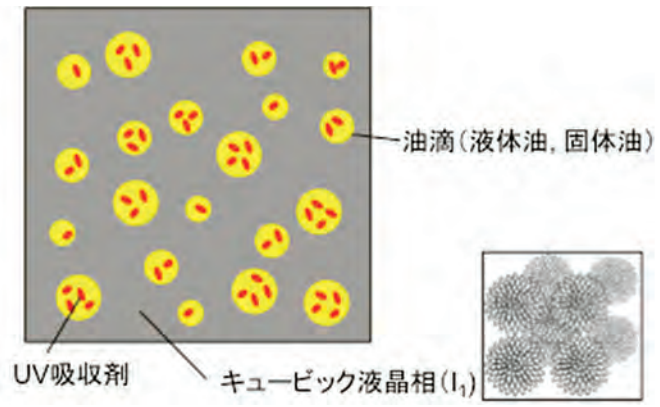


Fig.1　Structure of O/I_1-type emulsions encapsulating UV absorbing agent

2. 2. 2. O/I_1型, S/I_1型ゲルエマルションの調製

ねじ口試験管に最終組成になるように入れた試薬混合物を加熱し、ボルテックスミキサーで撹拌しながら冷却した。O/I_1型エマルションの相分離の有無は目視で判別し、S/I_1型エマルションの相分離の有無は光学顕微鏡観察により判別した。

2. 2. 3. 吸光度測定

2 mg/cm^{2}の薄膜に成形したサンプルについて紫外可視分光光度計 UV-2550PC（島津製作所社製）を用いて測定し、紫外光吸収スペクトルを得た。

3. 結果と考察

3. 1. 水/$C_{12}EO_{25}$/EHMC系の相挙動

3. 1. 1. 25℃における3成分状態図

Fig. 2に水/$C_{12}EO_{25}$/EHMC系の25℃における相図を示す。水-界面活性剤軸上では界面活性剤濃度が増すと、流動性の高い光学的等方性溶液相（ミセル相、W_m）から高粘性・光学的等方性相（ミセルキュービック相、I_1）、さらに再びW_mへ転移した。60℃以上ではI_1相が消失し、二つのW_m相領域は連続する[6]ため、これら二つのW_m相は本質的に同一のものである。水/界面活性剤系にEHMCが加わると相挙動はやや複雑になる。界面活性剤高濃度領域ではラメラ液晶（L_α）、ヘキサゴナル液晶（H_1）、両連続キュービック相（V_1）がW_m相、I_1相に加えて形成される。EHMCの水への溶解度は低く、必然的に界面活性剤の分子集合体中に可溶化される。ゆえに、EHMCの添加による分子集合体の構造転移は他の油剤の可溶化による構造転移[27-29]と同一の機構により引き起こされていると考えられる。各相への可溶化限界を超えると過剰の油相（EHMC相）とそ

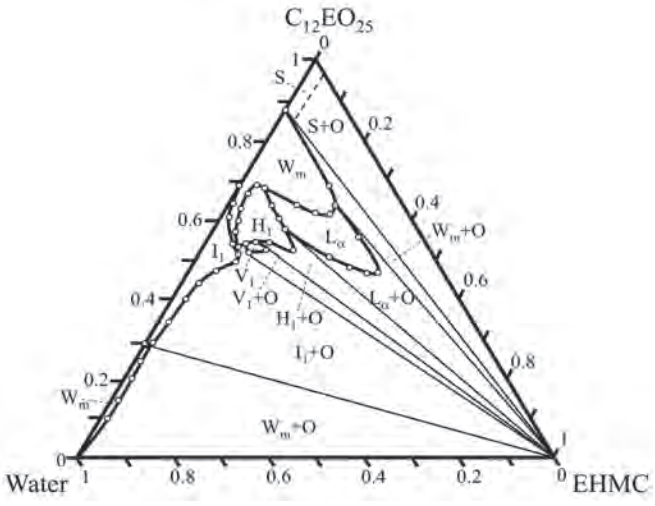


Fig. 2　Phase diagram in the water/$C_{12}EO_{25}$/EHMC system at 25℃ are shown. W_m, I_1, V_1, H_1, L_α, S and O indicate micellar, discontinuous cubic, bicontinuous cubic, hexagonal, lamellar, solid and oil phases, respectively.

れぞれの相の2相平衡状態（W_m+OやI_1+O）となる。

3. 1. 2. EHMC組成-温度状態図

水/$C_{12}EO_{25}$重量比を6/4に固定し、EHMC組成と温度を変数とした状態図をFig. 3に示す。EHMCを含まないI_1相の融解温度は55℃付近であるが、10%のEHMCの可溶化により65℃付近へ上昇した。55℃以上の高温領域ではH_1, V_1, W_m相が形成された。これらの相へのEHMCの可溶化限界は温度上昇とともに増加した。同様の現象は他のポリ（オキシエチレン）型界面活性剤系においても報告されて[30-33]おり、温度上昇による界面活性剤膜の曲率が減少する[34]ことによる。EHMC濃度が高くなると2相平衡領域になり、室温付近で形成されるI_1+Oのサンプルを90℃まで加熱すると、相状態はH_1+O、V_1+Oを経てW_m+Oになる。このような温度上昇による秩序−無秩序転移は油相（EHMC相）を高粘性のI_1相へ乳化分散させるために適しており、他の相への相転移（例えばL_α相への転移）などが生じる場合はエマルション化できない[13]。

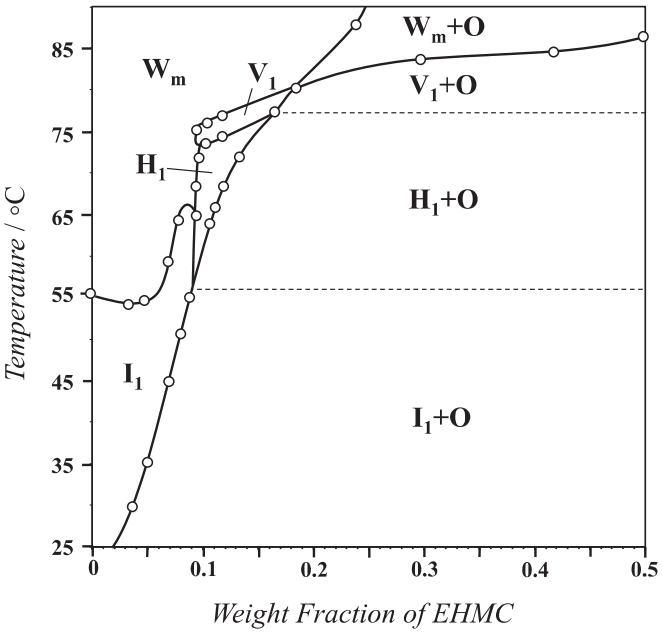


Fig. 3 Temperature-EHMC composition phase diagram in the water/$C_{12}EO_{25}$/EHMC system at constant water-to-surfactant weight ratio, 6/4, is shown. Phase notations are same as in Fig. 2.

3. 2. 紫外線吸収剤を内包したO/I_1型ゲルエマルションの調製

Fig. 3に示したようにEHMC濃度が20%以上組成で90℃での相状態はW_m+Oである。よってこの温度ではボルテックスミキサーで容易にO/W型エマルションが得られた。その後、サンプルを室温まで冷却することによりO/I_1型ゲルエマルションが得られた。エマルション化はEHMC濃度が最大80%まで可能であった。しかし、有機系紫外線吸収剤は毒性があるため、各国で化粧品への配合上限が規定されている。日本では化粧品基準（平成12年9月29日厚生省告示第331号）により、例えばEHMCでは上限値が20%となっている。水/$C_{12}EO_{25}$/EHMC系においてもEHMC濃度が20%以下でO/I_1型ゲルエマルションは得られるが、この場合は界面活性剤濃度が32%と非常に高くなる。界面活性剤濃度を低く保ったままでEHMC濃度を20%以下に抑えるために、ミリスチン酸イソプロピル（IPM）をcosolventとして配合し、EHMCとIPMの混合物を油相とすることにした。Table 1(a)は油相の濃度と油相中の混合割合を変化させたときのエマルション化試験結果である。エマルション調製操作の後、25℃で24時間静置したサンプルについて目視により相分離が生じているものをU、相分離がないものをSと表記してある。また、＊を付したものは化粧品基準を満たす組成であることを示す。エマルション化限界は油相の組成が変化しても大きく変化せず、80%までは安定なエマルションを得ることができた。混合油の組成範囲の自由度が高いために、界面活性剤を低く保ったまま、EHMCを20%以下に抑えたO/I_1型ゲルエマルションを得ることができる。すなわち、ここではIPM/EHMC=9/1のときに8%の界面活性剤で20%以下のEHMCを配合したO/I_1型ゲルエマルションを得ることができた。EHMCの代わりにOCRを用いたときのエマルション化試験結果をTable 1（b）に示す。エマルション化限界は60～70%となり、EHMC系よりも低くなった。OCRについては化粧品基準で配合上限は10%とされており、その条件下ではOCR/IPM=9/1において12%の界面活性剤濃度でO/I_1型ゲルエマルションを得ることが可能であった。Table 1（c）はTBMP系におけるエマルション化試験結果である。他の二つの紫外線吸収剤が常温で液体であったのに対してTBMPは粉末状であり、IPMへの溶解度も低い。そのため、TBMP/IPM=9/1の結果のみ示した。この系においても60%までエマルション化が可能であり、TBMPの配合上限は10%を満たすO/I_1型ゲルエマルションが、界面活性剤濃度16%で調製できた。

3. 3. 紫外線吸収剤を内包したS/I_1型ゲルエマルションの調製

油剤をIPMからトリパルミチン（TP）に変更してエマルション化を行った。TPの融点は64℃であり、室温で固体状態となる。また、TPに室温で液体であるEHMCを混合させると融点は50℃程度まで低下するが、室温では固体状態となる。したがって、得られたエマルションの油滴は固体状態であり、本研究ではこのようなエマルションをS/I_1型エマルションと呼ぶ。Fig. 4は水/$C_{12}EO_{25}$/TP/EHMC系において、水/$C_{12}EO_{25}$=65/35、TP/EHMC=6/4のときに得られたサンプルの油相重量%を変えたときの顕

Table 1 (a) Emulsification test results for O/I_1-type emulsions with EHMC

Oil (IPM+EHMC) (wt%)		20	30	40	50	60	70	80	90
Surfactant (wt%)		32	28	24	20	16	12	8	4
IPM/EHMC (w/w)	0/10	S*	S	S	S	S	S	S	U
	1/9	S*	S	S	S	S	S	S	U
	2/8	S*	S	S	S	S	S	S	U
	3/7	S*	S	S	S	S	S	S	U
	4/6	S*	S*	S	S	S	S	S	U
	5/5	S*	S*	S*	S	S	S	S	U
	6/4	S*	S*	S*	S*	S	S	S	U
	7/3	S*	S*	S*	S*	S*	S	S	U
	8/2	S*	S*	S*	S*	S*	S*	S*	U*
	9/1	S*	S*	S*	S*	S*	S*	S*	U*
	10/0	S	S	S	S	S	S	S	U

S: Successful emulsification, U: Unsuccessful emulsification

* : EHMC composition below Japan's cosmetic regulation (20wt%)

Table 1 (b) Emulsification test results for O/I_1-type emulsions with OCR

Oil (IPM+OCR) (wt%)		20	30	40	50	60	70	80	90
Surfactant (wt%)		32	28	24	20	16	12	8	4
IPM/OCR (w/w)	0/10	S	S	S	S	S	U	U	U
	1/9	S	S	S	S	S	U	U	U
	2/8	S	S	S	S	S	U	U	U
	3/7	S	S	S	S	S	U	U	U
	4/6	S	S	S	S	S	U	U	U
	5/5	S**	S	S	S	S	U	U	U
	6/4	S**	S	S	S	S	U	U	U
	7/3	S**	S**	S	S	S	U	U	U
	8/2	S**	S**	S**	S**	S	S	U	U
	9/1	S**	S**	S**	S**	S**	S**	U**	U**

** : OCR composition below Japan's cosmetic regulation (10wt%)

Table 1 (c) Emulsification test results for O/I_1-type emulsions with TBMP

Oil (IPM+TBMP) (wt%)		20	30	40	50	60	70	80	90
Surfactant (wt%)		32	28	24	20	16	12	8	4
IPM/TBMP (w/w)	9/1	S***	S***	S***	S***	S***	U***	U***	U***

*** : TBMP composition below Japan's cosmetic regulation (10wt%)

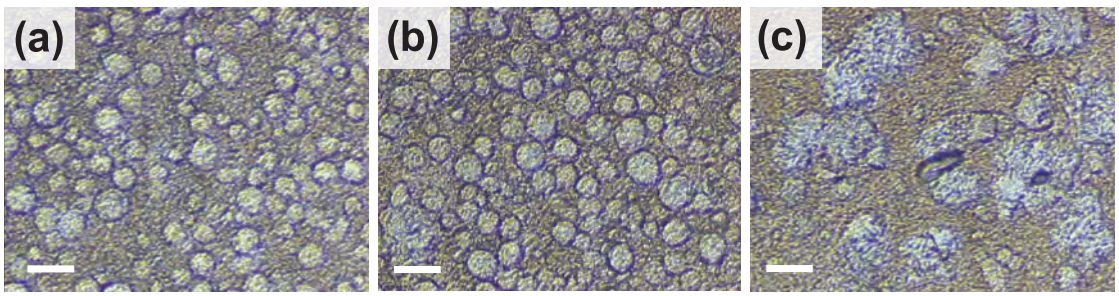


Fig. 4 Photomicrographs of S/I_1-type dispersions in the water/$C_{12}EO_{25}$/TP/EHMC system at water/$C_{12}EO_{25}$=65/35 and at TP/EHMC=6/4 are presented. Oil (TP+EHMC) composition in the system is (a) 30wt%, (b) 50wt% and (c) 60wt%. The bar indicates 20μm.

微鏡観察結果である。油相重量％が30％のとき、10ミクロン程度の粒子径の球状油滴が観察され、エマルションの外観も均一である。油相重量％が60％になるとサンプルの外観は均一状態を保ったままであるが、顕微鏡観察で見られる油滴の形状が球状でなくなり、粗大化した。S/I_1型はO/I_1型よりも明らかに高粘性であり、油滴の合一が生じてもマクロな相分離までは至らないと考えられる。本研究ではFig. 4 (a) (b) の状態をエマルション化できたもの(S)、Fig. 4 (c)の状態を相分離が生じた(U)と判定し、その結果をTable 2にまとめた。TP/EHMC比を変えたところ、概ね40～50%の油相重量％まではエマルション化が可能であることが分かった。

3. 4. 紫外線吸収剤を内包したO/I_1型およびS/I_1型ゲルエマルションのUV吸収特性

Fig. 5 (a)は3種の紫外線吸収剤を内包したO/I_1型ゲルエマルションについての紫外吸収スペクトルである。Blankと記したものは紫外線吸収剤を含まないO/I_1型ゲルエマルションのスペクトルであり、紫外線吸収はほとんど生じなかった。それに対し、紫外線吸収剤を内包したサンプルについてはEHMC, OCR, TBMPともそれぞれの物質が有する紫外線吸収領域に対応する紫外線吸収特性を有することが分かった。すなわち、EHMCではUV-B領域(280－320nm)、OCRではUV-A (320－400 nm)とUV-Bの二つの領域にわたって、TBMPではUV-A領域において強い吸収が生じた。Fig. 5 (b) はS/I_1型ゲルエマルションについての同様の紫外吸収スペクトルであり、EHMCによる紫外線吸収特性を示した。よって、本研究で得られたO/I_1型およびS/I_1型ゲルエマルションは適切なUV吸収能力を有することが確かめられた。

4. 総　括

O/I_1型ゲルエマルションはおよそ過去10年間にエマルション化試験、レオロジー特性、光学特性などの基礎研究がなされてきたが、応用研究についてはほとんどなされてこなかった。本研究においてはO/I_1型ゲルエマルションについてUVケア化粧品への利用可能性を調べるために実施した。非イオン性界面活性剤であるポリ（オキシエチレン）ドデシルエーテル(親水鎖重合度25)を用いて温度変化による相変化を利用することにより有機系紫外線吸収剤で

Table 2　Formulation test results for S/I_1-type dispersions with EHMC

Oil (TP+EHMC) (wt%)		10	20	30	40	50	60	70
Surfactant (wt%)		31.5	28	24.5	21	17.5	14	10.5
TP/EHMC (w/w)	3/7	S*	S*	S	S	U	U	U
	4/6	S*	S*	S*	S	U	U	U
	5/5	S*	S*	S*	S*	S	U	U
	6/4	S*	S*	S*	S*	S*	U	U
	7/3	S*	S*	S*	S*	U*	U	U
	8/2	S*	S*	S*	S*	U*	U	U
	9/1	S*	S*	S*	S*	S*	U*	U*
	10/0	S	S	S	S	S	U	U

* EHMC composition below Japan's cosmetic regulation (20wt%)

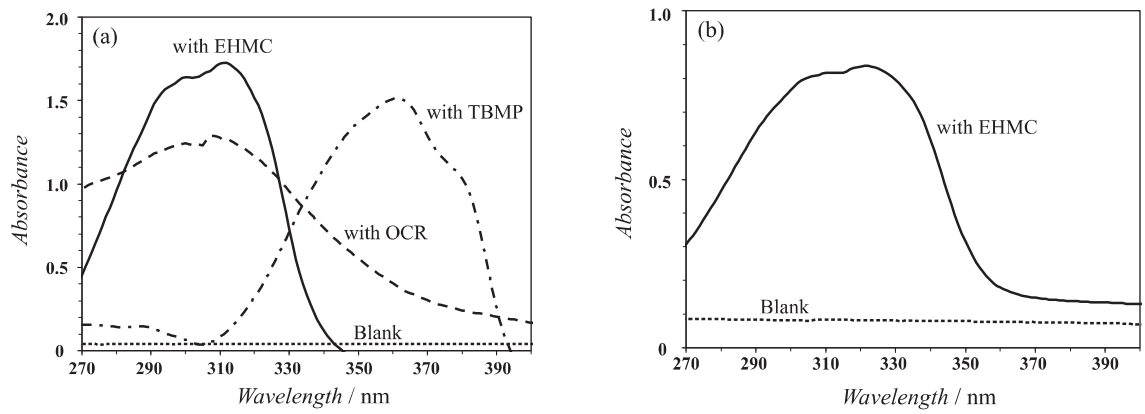


Fig. 5 UV absorption spectra for the O/I_1-type emulsions (a) and the S/I_1-type dispersions (b) encapsulating UV absorbing agents are shown.

あるEHMC, OCR, TBMPを安定にエマルション化することができた。また、cosolventとしてIPMを用いて紫外線吸収剤を希釈することで界面活性剤濃度を低く保ったまま、安定なO/I_1型ゲルエマルションを得ることができた。また得られた各エマルションはそれぞれの紫外線吸収剤が有する紫外線吸収能を発揮することを確かめた。さらに、紫外線吸収剤の保持能力がより高いことが期待できる固体油をcosolventとして用いたS/I_1型ゲルエマルションの調製も行い、紫外線吸収能を発揮するものが得られた。

謝　辞

本研究を遂行するにあたり、実験を行った横浜国立大学大学院環境情報学府環境システム学専攻の木村美波氏、増田収希氏に感謝します。

(引用文献)

1) Kunieda H, Evans DF, Solans C, Yoshida M, : The structure of gel-emulsions in a water/ nonionic surfactant/oil system, Colloids Surf. 47, 35-43, 1990.
2) Pal R, : Rheology of high internal phase ratio emulsions, Food Hydrocolloids, 20, 997-1005, 2006.
3) Kawada H, Kume T, Matsunaga T, Iwai H, Sano T, Shibayama M, : Structure and Rheology of a Self-Standing Nanoemulsion, Langmuir, 26, 2430-2437, 2010.
4) Suzuki T, Takei H, Yamazaki S, : Formation of fine three-phase emulsions by the liquid crystal emulsification method with arginine β-branched monoalkyl phosphate, J. Colloid Interface Sci. 129, 491-500, 1989.
5) Nakama Y, Siojima Y, Harusawa F, : O/W Type Emulsions using Liquid Crystal formed at Oil / Water Interface, J. Jpn Oil Chem. Soc. 47, 585-590, 1998.
6) Rodriguez C, Shigeta K, Kunieda H, : Structure and Rheology of a Self-Standing Nanoemulsion, J. Colloid Interface Sci. 223, 197-204, 2000.
7) Matsumoto Y, Alam MM, Aramaki K, : Phase Behavior, Formation, and Rheology of Cubic and Hexagonal Phase Based Gel Emulsions in water/ tetraglyceryl lauryl ether/oil systems, Colloids Surf. A. 341, 27-32, 2009.
8) Alam MM, Ushiyama K, Aramaki K, : Phase Behavior, Formation, and Rheology of Cubic Phase and Related Gel Emulsion in Tween80/Water/Oil Systems, J. Oleo Sci. 58, 361 -367, 2009.
9) Alam, MM, Aramaki K, : Effect of molecular weight of triglycerides on the formation and rheological behavior of cubic and hexagonal phase based gel emulsions, J. Colloid Interface Sci. 336, 329-334, 2009.
10) Alam, MM, Shrestha LK, Aramaki K, : Glycerol effects on the formation and rheology of cubic phase and related gel emulsion, J. Colloid Interface Sci. 329, 366-371, 2009.
11) Alam, Md. M.; Sugiyama, Y.; Watanabe, K.; Aramaki, K. Phase behavior and rheology of oil-swollen micellar cubic phase and gel emulsions in nonionic surfactant systems, J. Colloid Interface Sci. 341, 267-272 (2010).
12) Alam MM, Aramaki K, : Self assembly and rheology of emulsions-mimicking food emulsion rheology, Food Structure, 1, 137-144, 2014.
13) Alam MM, Aramaki K, : Hexagonal Phase Based Gel-Emulsion (O/H1 Gel-Emulsion): Formation and Rheology, Langmuir, 24, 12253-12259, 2008.
14) Alam, MM, Matsumoto Y, Aramaki K, : Effects of surfactant hydrophilicity on the oil solubilization and rheological behavior of a nonionic hexagonal phase J. Surf. Deterg., 17, 19-25, 2014.
15) Uddin MH, Rodriguez C, Watanabe K, Lopez-Quintela A, Kato T, Furukawa H, Harashima A, Kunieda H, : Previous Article Next Article Table of Contents, Phase Behavior and Formation of Reverse Cubic Phase Based Emulsion in Water/ Poly(oxyethylene) Poly(dimethylsiloxane) Surfactants/ Silicone Oil Systems, Langmuir, 17, 5169-5175, 2001.
16) May A, Aramaki K, Gutierrez JM, Phase Behavior and Rheological Analysis of Reverse Liquid Crystals and W/I_2 and W/H_2 Gel Emulsions Using an Amphiphilic Block Copolymer, Langmuir. 27, 2286-2298, 2011.
17) Rodriguez C, Shrestha LK, Varade D, Aramaki K, Maestro A, Quintela AL, Solans C, : Formation and properties of reverse micellar cubic liquid crystals and derived emulsions, Langmuir. 23, 11007-11014, 2007.
18) Alam MM, Shrestha LK, Aramaki K, : Glycerol effects on the formation and rheology of cubic phase and related gel emulsion, Journal of Colloid and Interface Science. 329, 366-371, 2009.
19) Kunieda H, Tanimoto M, Shigeta K, Rodriguez C, : Highly concentrated cubic-phase emulsions: basic study on d-Phase Emulsification using Isotropic Gels, Journal of Oleo Science. 50, 633-639, 2001.
20) Rodriguez C, Roman MG, Kunieda H, Rheology and dynamics of micellar cubic phases and related emulsions, Langmuir, 20, 5235-5240, 2004.

21) Rodriguez C, Acharya DP, Aramaki A, Kunieda H, : Structure and rheology of direct and reverse liquid-crystal phases in a block copolymer/water/oil system, Colloids Surf. A, 269, 59-66, 2005.
22) Alam MM, Hoshida S, Arima S, Aramaki K, : Lyotropic behavior of nonionic sugar surfactant and rheology of the liquid crystal, J. Dispers. Sci. Technol. 34, 1629-1634, 2013.
23) Esquena J, Nestor J, Vilchez A, Aramaki K, Solans C, : Preparation of meso/macroporous materials in highly concentrated emulsions based on cubic phases by a single-step method, Langmuir, 28, 12334-12340, 2012.
24) Alam MM, Aramaki K, : Liquid Crystal-Based Emulsions: Progress and Prospects, J. Oleo. Sci., 63, 97-108, 2014.
25) 特表 2008-546848A
26) 特開 2005-2248162
27) Aramaki K, Kunieda H, : Solubilization of Oil in Mixed Cationic Surfactant Liquid Crystal, Colloid Polym. Sci., 277, 34-40, 1999.
28) Kunieda H. Horii M, Koyama M, Sakamoto K, : Solubilization of Polar Oils in Surfactant Self-organized Structures, J. Colloid Interface Sci. 236, 78-84, 2001.
29) Aramaki K, Tawa K, Shrestha LK, Iwanaga T, Kamada M, Formation and cleansing performance of bicontinuous microemulsion in water/ poly(oxyethylene) alkyl ether/ ester-type oil systems, J. Oleo Sci. 62, 803-808, 2013.
30) Kunieda H, Umizu G, Aramaki K, : Effect of Mixing Oils on the Hexagonal Liquid Crystalline Structures, J. Phys. Chem. B. 104, 2005-2011, 2000.
31) Aramaki K, Kabir MH, Nakamura N, Kunieda H, Ishitobi M, : Formation of Cubic-Phase Microemulsions in Sucrose Alkanoate Systems, Colloids Surf. A, 183-185, 371-379, 2001.
32) Aramaki K, Khalid MH, : Effect of Addition and Molecular Size of Triglyceride Oils on Phase Behavior and Surfactant Self-Assemblies, J. Oleo Sci. 53, 557-563, 2004.
33) Alam Md, Varade D, Aramaki K, : Solubilization of Triglycerides in Liquid Crystals of Nonionic Surfactant, J. Colloid Interface Sci. 325, 243-249, 2008.
34) Strey R, : Microemulsion microstructure and interfacial curvature, Colloid Polym. Sci. 272, 1005-1019, 1994.

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

横浜国立大学大学院環境情報研究院

飯島　志行

Series of polyethyleneimine (PEI)–fatty acid complex has attempted to be prepared in isopropyl myristate (IPM) using stearic acid, oleic acid and isostearic acid for their application as a dispersant for TiO_2/IPM suspensions. While it was not possible to fabricate PEI-stearic acid complex those were soluble in IPM, PEI complex with oleic acid and isostearic acid has successfully dissolved in IPM when the content of fatty acids were larger than 40 mol% and 80 mol%, respectively, based on the number of ethyleneimine monomer units. FT-IR analysis of PEI-OA and PEI-ISA dissolved in IPM showed that the hydrogen bonded COOH groups originally found in the spectra of free fatty acid has disappeared and new peaks those attributes to carboxylates has generated, which confirms the complex formation between carboxyl group of fatty acid and amine group of PEI. PEI-OA and PEI-ISA, which fatty acid complex ratio was 80 mol% based on EI unit content, was used for further investigation as a dispersant for TiO_2/IPM suspensions. It was interestingly found that while PEI-ISA effectively adsorbed on TiO_2 fine particles in IPM and reached to a saturated adsorption condition when the additive content was 2.4 mg/m^2, the adsorbed content of PEI-OA has kept increasing as increasing their additive content under the tested condition (~3.0 mg/m^2) which suggests multi-layer adsorption. In spite of different adsorption structures, the sedimentation test of TiO_2/IPM diluted suspension showed that the addition of PEI-OA and PEI-ISA can improve their dispersion stability when additive content was larger than 2.4 mg/m^2 while the suspension without and less complex addition formed sedimentation rapidly due to aggregate formation. It was also found that the dispersion improvement by PEI-OA and PEI-ISA can achieved under dense suspension; the suspension kept flowing for 15 vol% and 20 vol% suspension with 2.4 mg/m^2 addition of PEI-ISA and PEI-OA, respectively, while non-treated TiO_2/IPM suspension rapidly solidified at 15 vol%. It was revealed that the dispersant design through the complex formation between PEI and fatty acid is applicable to IPM solvent system and the destined complex efficiently improved the stability of TiO_2/IPM suspensions.

1. はじめに

サンスクリーンや口紅などをはじめとした化粧品剤の開発において、紫外線散乱や色彩調整などの機能付与を目的として酸化チタン、酸化亜鉛や酸化鉄などを例とした各種無機微粒子の濃厚系油中分散体が多用されている。最終製品使用時の透明感、密着感、すべり感などの質感の制御を実現するにあたっては、各原料微粒子の油中での分散制御が大きな鍵であり、原料微粒子種や溶媒に応じた様々な分散安定化剤が配合されている。無機微粒子の油中分散安定化を実現するための分散安定化剤の設計は、化粧品剤の開発分野に限らず国内外において古くから検討されており、これまでにアクリル酸－メタクリル酸アルキル共重合体、グリセリン・ポリグリセリンやポリエチレングリコールの脂肪酸エステルおよびそれらの誘導体など、多岐にわたる化合物が開発･利用されてきた[1-4]。それぞれについて、分散安定化剤の分子量や親水基／疎水基比などが粒子に対する吸着特性や分散安定化状態に多大に影響を及ぼすことが報告されており、所望の微粒子材質／分散媒の組合せにおいて所望の分散特性を実現するためには、取り扱っている系に適合する分散剤構造を専門性の高い高分子合成化学のアプローチでいくつか設計したうえで、その中から経験的に選択されてきたのが現状である[5]。そのため、無機微粒子の各種分散媒中における分散安定性を効率的にチューニングにするにあたって、さまざまな分散系に適用できてかつ、簡便に分散剤構造を設計できる新しい設計手法が求められている。

これらの課題を解決するべく、筆者らはこれまでに非水系溶媒中（トルエン）で各種分子量のカチオン性分散剤（ポリエチレンイミン（PEI）とオレイン酸（OA）を混合し、超音波処理と撹拌処理を施すことによって得られる会合体が、窒化ケイ素、酸化イットリウム、酸化アルミニウムなど性状の異なる微粒子に効果的に吸着可能であり、トルエン中における分散安定性を劇的に改善できることを報告している[6]。また、本プロセスが各種分子量のPEIに適用可能であることも見出しており、PEIとオレイン酸の会合体の分子量によって微粒子間に作用する立体障害斥力および濃厚系トルエンスラリーの流動特性が制御できることも報告した。本会合体の形成プロセスは簡便でありながら様々な分子量のPEIと様々な有機鎖を有する脂肪酸の組み合わせに拡張できることが想定され、無機微粒子の油中分散安定性の制御に有効であることが期待されるが、会合する脂肪酸種や対象とする溶媒種が、会合体の形成状態と微粒子の

Partial hydrophobication of cationic polymers and applications toward stabilizer of cosmetic raw powders in oil

Motoyuki Iijima

Graduate School of Environment and Information Sciences, Yokohama National University

分散安定性に与える影響は明らかになっていないのが現状である。本研究では、酸化チタン微粒子／ミリスチン酸イソプロピル（IPM）濃厚系スラリーを対象とし、脂肪酸種がIPM中におけるPEIとの会合体形成状態に与える影響、得られた会合体の酸化チタン微粒子表面に対する吸着性、およびIPM中における分散安定性に与える影響を明らかにする。

2. 実　験

2. 1. IPM中におけるPEI-脂肪酸会合体の調製と評価

ポリエチレンイミン（PEI、和光純薬工業、分子量1800）0.125gと異なる有機鎖を持つ脂肪酸としてオレイン酸（OA、和光純薬工業）、ステアリン酸（SA、東京化成工業）、またはイソステアリン酸（ISA、東京化成工業）をミリスチン酸イソプロピル（IPM、東京化成工業）中に加えたうえ、25℃で10分間の超音波処理を施すことによりPEI-脂肪酸会合体を調製した。脂肪酸の添加量は、PEIを構成するエチレンイミン（EI）モノマーユニット数に対して30～100 mol %となるよう、Table 1に示す通りに添加した。各PEI-脂肪酸会合体のIPM中における溶解性を目視観察、会合状態をFTIR-ATRにより評価した。

2. 2. PEI-脂肪酸会合体を分散安定化剤として用いたTiO_2/IPMサスペンション調製と評価

脂肪酸の添加比率がEIモノマーユニットに対して80 mol %のPEI-脂肪酸会合体を、Table 1に従ってIPM中で調製し、分散安定化剤として利用した。TiO_2微粒子（テイカ、MT-500B、比表面積（BET法）38.9 m^2/g）1.0 gに対して粒子濃度が5 wt%、PEI-脂肪酸会合体の添加量がサスペンション内の粒子総表面積に対して0～3.0 mg/m^2となるようにIPMとPEI-脂肪酸会合体を混合し、超音波処理（1min.）および24h.の撹拌を施すことでTiO_2/IPMサスペンションを調製した。得られたサスペンションをIPMで4倍希釈した溶液10mLをメスシリンダーに移し、静置した際の粒子沈降挙動からTiO_2微粒子の分散安定性を評価した。

また、サスペンションを遠心分離（10 min, 3300 rpm）して得られる上澄み溶液についてエタノールで3倍希釈した後の導電率を測定し、予め求めておいた各会合体濃度とPEI-脂肪酸会合体／トルエン／エタノール混合溶液の導電率の関係を示す検量線から溶媒に残存する未吸着のPEI-脂肪酸会合体量および粒子表面に吸着したPEI-脂肪酸会合体量を見積もった。

さらに、TiO_2/IPM濃厚系サスペンションの分散安定化に与えるPEI-脂肪酸会合体の添加効果を明らかにするため、2.4 mg/m^2となるようにPEI-脂肪酸会合体を溶解したIPM溶液に5～20 vol %となるようにTiO_2微粒子を加え、1min.間の遊星混合（2000 rpm）および24h.の振盪処理を施すことで得られるTiO_2/IPMサスペンションの流動特性をレオメーターで評価した。流動特性の評価直前には、再度サスペンションに1min.間の遊星混合を施し、ずり速度を300 s^{-1}に上下する過程でのせん断応力を測定した。

Table 1　Reagent contact for producing PEI-fatty acid complex in IPM

Fatty acid ratio [mol %]	30	40	70	80	100
Fatty acid [g]	0.24	0.32	0.57	0.66	0.82
IPM [g]	4.63	4.54	4.30	4.21	4.05

3. 結果および考察

3. 1. 各種脂肪酸を用いたIPM中におけるPEI-脂肪酸会合体の調製

Fig. 1には、脂肪酸としてステアリン酸、オレイン酸およびイソステアリン酸を用い、IPM中でPEIと様々な添加比条件で混合することにより会合体の調製を検討した様子を示す。はじめに、PEI自体は親水性のカチオン性高分子であるため、単体ではIPMには溶解せず、IPM層とPEI層が分離した状態で存在した。PEIを構成するEIユニットに対して様々な添加比のステアリン酸を混合した条件では、Fig. 1 (a)に観察されるように、すべての条件で系が白濁し、IPMに溶解した状態で会合体が得られないことが明らかとなった。IPM中におけるステアリル鎖間の分子

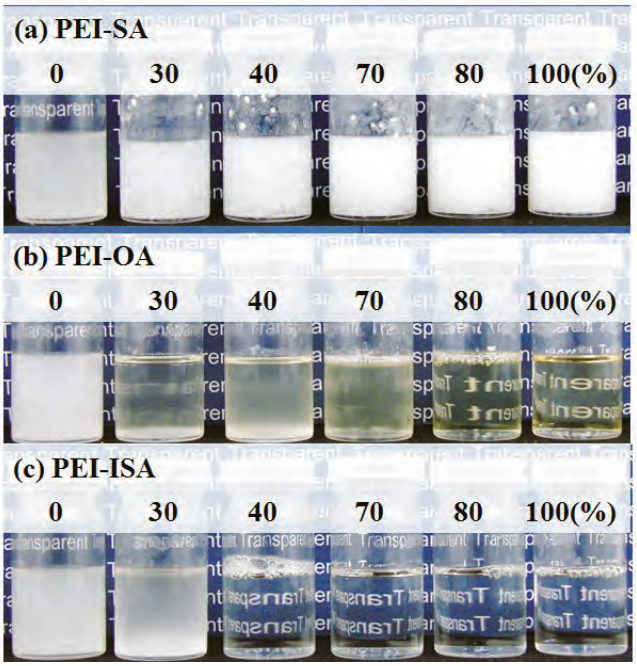


Fig. 1　各種脂肪酸を用いて調製したPEI-脂肪酸会合体のIPMに対する溶解性（図中の数値はEIモノマーユニットに対する脂肪酸のモル比）

間力が強く、会合体が十分に溶解できなかったものと推察している。一方、脂肪酸としてオレイン酸を用いた系(Fig. 1 (b))では、EIユニットに対するオレイン酸の添加比が増大するにつれて溶液が透明化し、80 mol %以上のオレイン酸を加えた条件ではPEIが溶解していることが確認された。オレイン酸がPEIと会合することでPEIが疎水化され、会合体としてIPM中に溶解しているものと考えられる。また、脂肪酸をイソステアリン酸とした系では、イソステアリン酸の添加量が40 mol %以上で混合溶液が透明化し、オレイン酸添加系を同様に会合体としてIPM中に溶解していることが観察された(Fig. 1 (c))。分岐構造に伴うイソステアリン酸鎖の1分子あたりの占有面積が大きいことからPEIが効果的に疎水化され、オレイン酸と比べてより少ない添加比で会合体として溶解できたものと推察される。

Fig. 1でPEIと脂肪酸の混合溶液が透明化した条件において、PEI-脂肪酸の会合状態をFTIR-ATRによって評価した結果をFig. 2に示す。Fig. 2 (a)は、オレイン酸、PEI、IPMおよびPEI-OA会合体のFTIRスペクトルを示しており、オレイン酸からは水素結合した-COOHの伸縮振動($1710\ cm^{-1}$)、C-O-Hの変角振動($1418 cm^{-1}$)ならびにCH_2のはさみ変角振動($1462\ cm^{-1}$)に帰属する吸収[7-9]、PEIからはN-H変角運動($1600\ cm^{-1}$)およびCH_2はさみ変角運動($1462\ cm^{-1}$)に帰属する吸収[10]が認められた。一方、IPM中におけるPEI-OA会合体のスペクトルでは、水素結合した-COOH型の伸縮振動($1710\ cm^{-1}$)の吸収は消失し、IPMに由来する吸収に加えて、カルボン酸塩($-COO^-$)型の逆対称($1407\ cm^{-1}$)および対称伸縮振動($1543\ cm^{-1}$)に帰属される吸収が認められた[8]。これは、オレイン酸のCOOH基が会合体中では$-COO^-$塩として存在していることを示しており、カチオン性高分子であるPEIのアミノ基との塩として会合していることが示唆された。Fig. 2 (b)には、イソステアリン酸を用いたPEI会合体のFTIRスペクトルを示す。脂肪酸としてオレイン酸を用いた場合と全く同様の傾向が観察され、イソステアリン酸単体からは水素結合した-COOHの伸縮振動($1710\ cm^{-1}$)とC-O-Hの変角振動($1418\ cm^{-1}$)が認められた一方で、PEI-ISA会合体からはIPMに由来する吸収に加えて、カルボン酸塩($-COO^-$)型の逆対称($1407\ cm^{-1}$)および対称伸縮振動($1543\ cm^{-1}$)に帰属される吸収認められた。また、ISAの添加比を増大させていくと再び水素結合型の(塩を形成していない)-COOH基に由来する吸収が再度認められる様子も観察され、ISAの添加比がEIモノマーユニットに対して100 mol %の条件では会合体生成に寄与しない過剰量のISAが存在していることも明らかとなった。

3. 2. IPM中におけるPEI-OAおよびPEI-ISAのTiO_2微粒子に対する吸着

Fig. 1およびFig. 2によりIPM中に可溶であることが明らかになったPEI-OAおよびPEI-ISAについて、TiO_2微粒子に対する吸着特性を評価した結果をFig. 3に示す。PEIに対する脂肪酸の添加比率は、IPMに可溶でありかつ未会合の脂肪酸が生成しない条件として、EIユニットに対して80 mol %とした。PEI-ISAについては、その添加量が少ない条件ではほぼすべての添加したPEI-ISAがTiO_2微粒子の表面に吸着しており、$2.4\ mg/m^2$の添加条件で飽和吸着状態に至った。これは、既報[6]で報告したトルエン中における窒化ケイ素微粒子に対するPEI-OAの吸着挙動と類似した傾向である。一方、IPM中でPEI-OAをTiO_2微粒子上に吸着する系ではこれらと挙動が大きく異なっており、PEI-OAの添加量増大に伴って吸着量も増大し続け、多層吸着する挙動が観察された。本現象の具体的なメカニズムは現時点で十分に解明できていないが、Fig. 1に示した脂肪酸会合度を変えたPEI-OAとPEI-ISAのIPMに対する溶解試験結果より、PEI-OAのIPMに対す

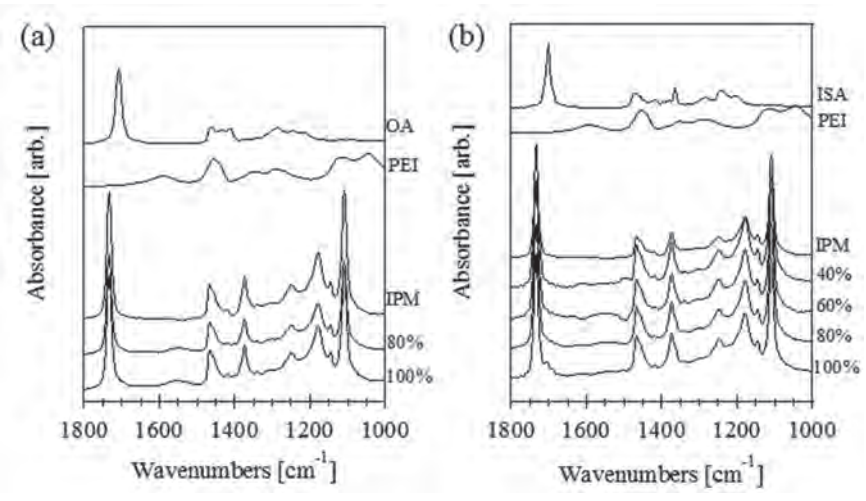


Fig. 2 IPMに溶解した (a) PEI-OA および (b) PEI-ISA の FTIR スペクトル

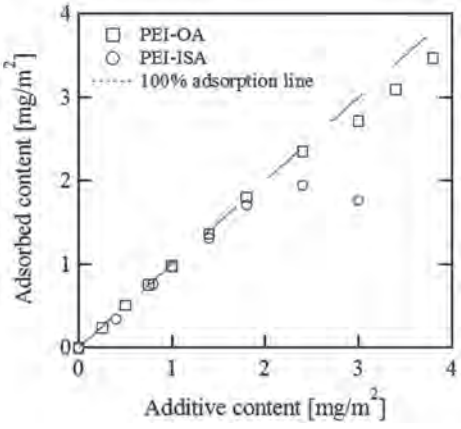


Fig. 3 PEI-OA および PEI-ISA の IPM 中における TiO_2 微粒子に対する吸着挙動 (EIモノマーユニット数に対する脂肪酸添加比は 80 mol%)

る溶解性が相対的に劣ることが示されており、PEI-OAはIPM中で溶解状態にあるより粒子表面上に吸着した方が安定であることが推察される。

3. 3. PEI-OAおよびPEI-ISAを用いたTiO_2/IPMサスペンションの分散安定化

Fig. 4にはPEI-OAおよびPEI-ISAのIPM中における微粒子分散安定化剤としての応用性を確認するため、様々な添加量で会合体を加えたTiO_2/IPMサスペンションの沈降挙動を示す。PEI-OAおよびPEI-ISAのいずれの場合においても、会合体未添加の条件および会合体の添加量が少ない条件でTiO_2微粒子の沈降が促進し、凝集状態にあることが観察された。会合体の添加量をより増大させるにつれてTiO_2微粒子の沈降速度はしだいに低下し、PEI-ISAでは特に飽和吸着状態（2.4 mg/m^2）に至る添加量以上で効果的にTiO_2微粒子が分散化した様子が観察された。PEI-OAについては、2.4 mg/m^{2}以上の添加条件では添加量の増大に伴って分散安定性が改善する傾向が観察された。PEI-OA、PEI-ISAいずれを添加した場合においても、TiO_2微粒子表面に会合体が吸着することによって粒子は疎水化され、IPMとの親和性向上と立体障害斥力の付与によって分散安定性が改善したものと考えられる。また、PEI-OAについては添加量の増大に伴って多層に吸着していることが示唆されており（Fig. 3）、添加量の大きい条件下ではより大きな立体障害斥力が発現し、分散安定性が向上したものと考えられる。

Fig. 5およびFig. 6には会合体の添加が濃厚系TiO_2/IPMサスペンションの流動特性に与える影響を評価した結果を示す。Fig. 5は会合体を添加していないTiO_2/IPMサスペンションの概観事例であるが、粒子濃度が15 vol %以上になると凝集体の生成に伴ってサスペンションが固化する様子が観察された。一方、Fig. 6にはPEI-OAまたはPEI-ISAを2.4 mg/m^{2}の条件で添加したTiO_2/IPMサスペンションの流動曲線を示す。PEI-ISAを添加した系では粒子濃度が15 vol %まで向上させてもサスペンションは流動性を有しており、会合体未添加系と比べて分散安定性の改善が認められた。ただ、低いせん断速度領域においてせん断速度の上昇過程と下降過程間において測定されたせん断

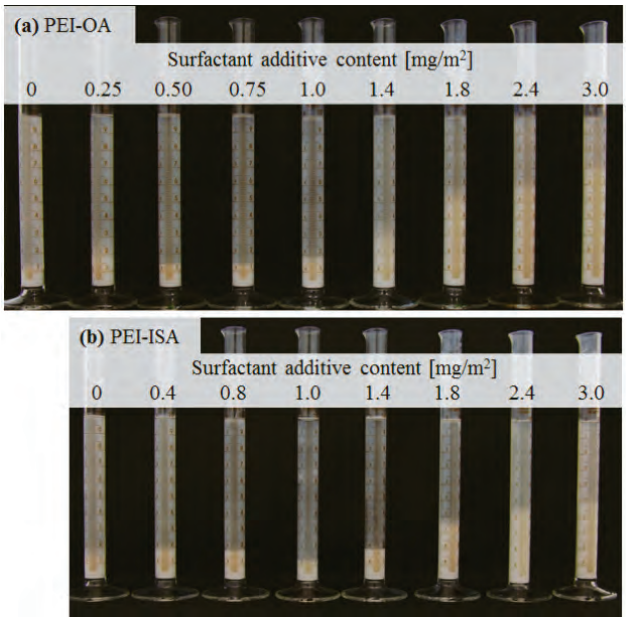


Fig. 4 (a) PEI-OA および(b) PEI-ISA を添加した TiO_2/IPM サスペンションの沈降挙動

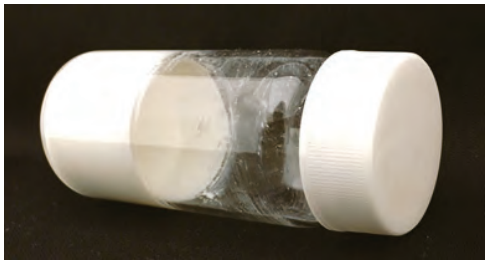


Fig. 5 TiO_2/IPM サスペンションの概観（会合体未添加、15 vol %）

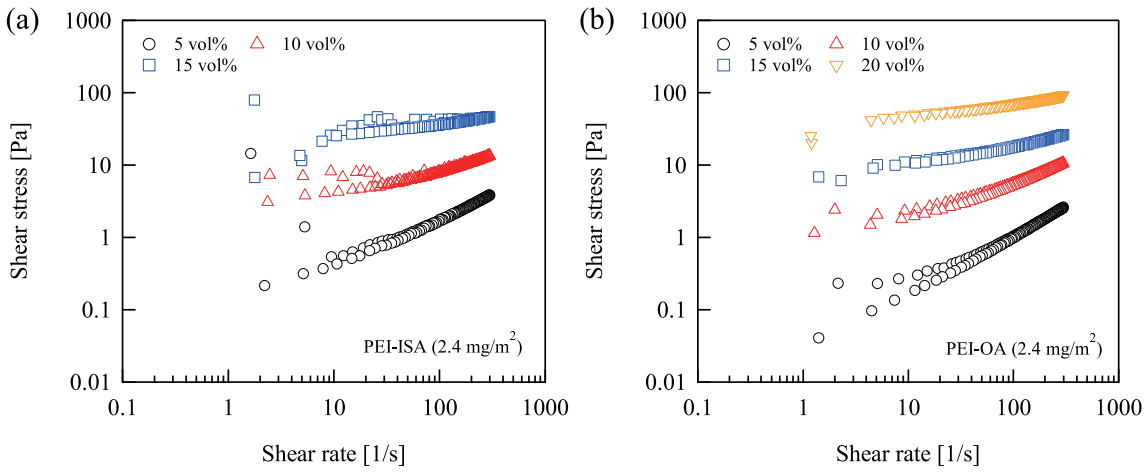


Fig. 6 (a) PEI-ISA および(b) PEI-OA を 2.4 mg/m^2 添加した濃厚系 TiO_2/IPM サスペンションの流動曲線

応力の値が異なる様子も読み取れ、依然弱い凝集体がサスペンション中に存在していることも示唆された。PEI-OAを添加した系では、TiO_2微粒子の濃度を20 vol％まで上昇させてもサスペンションの流動性が認められ、PEI-ISAの系で発現した顕著な流動曲線のヒステリシスな挙動は認められなかった。各粒子濃度におけるTiO_2/IPMサスペンションの粘度もPEI-OAを添加した系の方が低いことも観察されており、PEI-OAがIPM中でより効果的にTiO_2微粒子を分散安定化できることが明らかとなった。

4. 総　括

IPM中においてステアリン酸、オレイン酸、イソステアリン酸を用いたPEIとの会合体形成を試みたところ、オレイン酸とイソステアリン酸を用いた系においてIPMに可溶なPEI-脂肪酸会合体が調製できることが明らかとなった。PEI-脂肪酸会合体を可溶化するために必要なエチレンイミンモノマーユニット数に対する脂肪酸添加比は、オレイン酸では80 mol%以上、イソステアリン酸では40 mol%以上であった。得られたPEI-脂肪酸会合体の分散安定化剤としての適応可能性を確認するため、80 mol％の条件でオレイン酸とイソステアリン酸を加えて調製したPEI-脂肪酸会合体のIPM中におけるTiO_2微粒子上への吸着特性を評価したところ、両者ともに効果的に吸着することが明らかになったが、PEI-ISAの系では添加量の増大に伴って2.4 mg/m^2の添加条件で飽和吸着状態に至った一方で、PEI-OAについては多層吸着する傾向が観察された。PEI-ISA、PEI-OAともに2.4 mg/m^2以上の添加条件でTiO_2微粒子のIPM中における分散安定性が改善し、特に濃厚系サスペンションにおいては会合体未添加系でサスペンションが凝集固化した一方で、PEI-ISAでは15 vol％、PEI-OAでは20 vol％でも高い流動性を保ったサスペンションが得られることが明らかとなった。IPMを溶媒とした系においても、PEI-脂肪酸会合体の調製が可能であり、微粒子の分散安定性の制御に有効であることが確認された。

(引用文献)

1) Chaari K, Bouaziz J, Bouzouita K, J. Colloid and Interface Sci. 285, 469-475, 2005

2) Thwala JM, Goodwin JW, Mills PD,: Dispersion properties of silica particles in nonaqueous media with a non-ionic surfactant, dodecyl hexaethylene glycol monoether, C12E6, Colloids and Surfaces A, 31, 162-174, 2008

3) Asaro F, Benedetti A, Savko N, Pellizer G,: Inverse nonionic microemulsion studied by means of 1H, 13C and PGSTE NMR during silica nanoparticle synthesis, Langmuir, 25, 3224-3231, 2009

4) Palla BJ, Shah DO,:Stabilization of high ionic strength slurries using surfactant mixtures: Molecular factors that determine optimal stability, J. Colloid Interface Sci., 256, 143-152, 2002

5) Zhang W, Du Z, Chang CH, Wang G,: Preparation and properties of comb-like surfactants containing poly(ethylene oxide) methyl ester grafts, J. Colloid and Interface Sci. 337, 563-568, 2015

6) Iijima M, Okamura N, Tatami J,: Polyethyleneimine-oleic acid complex as a polymeric dispersant for Si_3N_4 and Si_3N_4-based multicomponent nonaqueous slurries, Ind. Eng. Chem. Res., 54, 12847-12854, 2015

7) Tandon P, Raudenkolb S, Neubert RHH. Rettig W, Wartewig S,: X-ray diffraction and spectroscopic studies of oleic acid-sodium oleate, Chem. Phys. Lipids, 109, 37-45, 2001

8) De Palma R, Peeters S, Van Bael MJ, Van den Rul H, Bonroy K, Laureyn W, Mullens J, Borghs G, Maes G,: Silane ligand exchange to make hydrophobic superparamagnetic nanoparticles water-dispersible. Chem. Mater., 19, 1821-1831, 2007

9) Kadamne JV, Jain VP, Saleh M, Proctor A,; Measurement of conjugated linoleic acid (CLA) in CLA-rich soy oil by attenuated total reflectance-fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR), J. Agric. Food Chem.,57, 10483-10488, 2009

10) Iijima, M.; Yamazaki, M.; Nomura, Y.; Kamiya, H. Effect of structure of cationic dispersants on stability of carbon black nanoparticles and further processability through layer-by-layer surface modification. Chem. Eng. Sci., 85, 30-37, 2013

天然由来の美白性ペプチド素材の探索とその作用機序の解明

新潟大学工学部機能材料工学科
落合　秋人

Tyrosinase is a rate-limiting enzyme in melanin biosynthesis. Thus, many inhibitors against tyrosinase have been proposed to be skin-lightening agents. However, many of the existing inhibitors cannot be widely used in the cosmetic industry owing to their high cytotoxicity and low activity. In this study, we isolated new naturally derived peptides from the enzymatic hydrolysate of rice bran protein that exhibited inhibitory activity against tyrosinase. Furthermore, mutational and structural analyses were tried for elucidating the structure-function relationship of these peptides.

1. 緒　言

紫外線から皮膚を保護する生体防御反応として、我々の身体はメラニンと呼ばれる褐色色素を生産する。通常、皮膚のターンオーバー（皮膚細胞の新陳代謝）によってメラニンは自然に肌から排出されるが、色素の過剰生産もしくはターンオーバーの低下などの理由で“しみ”や“そばかす”などの色素沈着を起こす[1)]。ターンオーバーが乱れる要因として、過度な紫外線の暴露、栄養バランスの崩れ、疲労、ストレス、ホルモンバランスの崩れなどが挙げられるが、一般的には加齢に伴う新陳代謝の衰えが原因である。また、最近の研究では、お年寄りが継続的にスキンケアと化粧を行うことで日常生活動作（ADL）が向上することが明らかになっている。これらのことから、若い世代においてのみならず、10年後には65歳以上の高齢者が30％近くに達するとされる超高齢化社会を迎える中で、生活の質を高めるためのスキンケア、特に美白については多くの人々が望む皮膚ケアであり、生き生きとした生活を支えるためにますます重要な課題であると言える。

メラニン色素の沈着は、主にメラニン形成の出発段階に関わるチロシナーゼ酵素の働きによる[2)]。チロシナーゼは、図1に示すように、メラニン形成の出発段階に関わる中核酵素である[2, 3)]。そのため、これまでに多くのチロシナーゼ阻害成分が色素沈着防止剤や美白剤として提案されている[4)]。現在、色素沈着防止剤や美白剤として、様々な化学合成品や天然物成分が用いられているが、近年の白斑問題に象徴されるように、コウジ酸やハイドロキノンなどの既存物質はアレルギー性や毒性が強く、その安全性が問題視されている[4)]。また、チロシナーゼ阻害活性を持つアルブチン、グルタチオン、アスコルビン酸は、比較的安全ではあるものの、その活性が相対的に低く、化粧品向けの有用な美白素材にはなっていない。申請者は、過去に合成ペプチドTH10がチロシナーゼ阻害活性を有することを見出し、C末端のチロシン（Y）残基がこの阻害活性に必須であることを明らかにした[5)]。そこで、芳香族アミノ酸のカルボキシル基側のペプチド結合を切断するキモトリプシンで米糠タンパク質を消化した結果、消化産物中には多数のチロシナーゼ阻害成分が派生することを見出した。また、この酵素消化産物からチロシナーゼ阻害ペプチドCT-1, CT-2を単離同定した。これらは、それぞれ9残基もしくは6残基のペプチドであり、共通してC末端にチロシン残基を含む。一方で、これらのペプチドの阻害の強さ（IC_{50}）には大きな相違が確認され、阻害活性の発現には様々な要因を考慮する必要があることがわかった[6)]。

これらの背景を踏まえ、本研究では、チロシナーゼを阻害するペプチドのさらなる網羅的な単離・同定を行い、構造生物学的手法や阻害ペプチドの派生ペプチドを用いてチロシナーゼ阻害活性を与える構造要因を明らかにする。これらの結果と合わせて、ペプチドの一次構造とチロシナーゼ阻害活性との相関解析を行い、チロシナーゼ阻害ペプチドの高い活性の発現に必要な構造要因を明らかにする。

2. 実　験

2. 1. チロシナーゼ活性の測定

チロシナーゼの酵素活性は、L-チロシンまたはL-DOPAを基質として、チロシナーゼのモノフェノラーゼ反応またはジフェノラーゼ反応を波長475 nmにおける光吸収を測定することにより測定した。酵素阻害は、モノフェノラーゼ反応に対する各ペプチドの50％阻害濃度（IC_{50}）を求めることにより評価した。また、本研究においては、マッシュルーム由来のチロシナーゼ（Tyrosinase from *Agaricus bisporus*, AbTyr, Sigma）を使用した。AbTyrは真核生物のモデル系として、チロシナーゼ阻害試験に一般的に使用

Searching for the naturally derived peptides having a skin whitening effect and elucidation of its action mechanism
Akihito Ochiai
Department of Materials Science and Technology, Faculty of Engineering, Niigata University

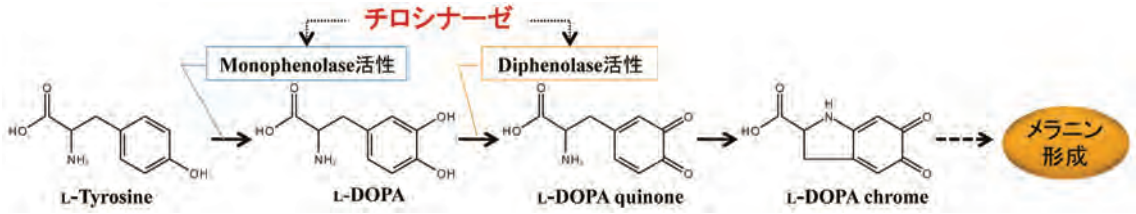


図１　ヒト細胞におけるメラニン形成機構

されている。

2. 2. 新規チロシナーゼ阻害ペプチドの単離と同定

新規のチロシナーゼ阻害ペプチドは、米糠タンパク質の酵素加水分解物から単離・同定した。

まず、3.0 gの米糠タンパク質（RBP55, 築野食品工業株式会社）を秤量して超純水中に懸濁した。ホモジナイザーを用いて米糠タンパク質を均一に撹拌した後、透析により低分子物質を除去し、Trypsin と Chymotrypsin をそれぞれ 60 mg加えて 50℃, 6時間インキュベートすることにより加水分解反応を行った。得られた加水分解物から、チロシナーゼ阻害活性を有する画分を２種類のゲルろ過クロマトグラフィーおよび逆相クロマトグラフィーを使用して分離し、均一なペプチド成分を単離した。単離したペプチドのMS/MSスペクトルをMALDI-TOF MS（Auto Flex-III, BRUKER DALTONICS）を用いた質量分析により収集し、Mascotプログラム（マトリクスサイエンス株式会社）を利用してイネゲノムデータベースと照合することによりその配列を同定した。

また、これらペプチドの派生ペプチドは、ペプチド合成装置（PSSM-8、島津株式会社）を用いてFmoc固相法により化学合成し、逆相クロマトグラフィーによって高純度化して使用した。

2. 3. B16 マウスメラノーマ細胞を用いたメラニン合成抑制試験

チロシナーゼ阻害ペプチドによるメラニン合成抑制試験はマウスB16 メラノーマ細胞を使用して以下のように行った。5％ FBSを含むE-MEM培地を用いて 1×10^4 cells/mLの培養細胞溶液を調製し、6wellマイクロプレートに 1.5 mL/wellずつ分注して 37℃, 5％ CO_2 雰囲気下で 24 時間培養した。その後、上清培地を各種濃度のペプチドを含む5％ FBS含有E-MEM培地と交換し、さらに３日間培養した。培養後の細胞を 0.25％トリプシンおよび１N NaOHにより剥離・溶解させ、420 nmにおける吸光度を測定することにより細胞内に蓄積したメラニン量を定量した。

また、96 wellマイクロプレートにおいて、同様の条件にてペプチド処理および培養を行った。その後、生細胞測定キット（Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System, タカラバイオ株式会社）を用いて生存細胞数を測定し、ペプチド添加後の３日目までに細胞増殖に与える影響を観察した。

2. 4. AbTyrの結晶化とX線回折実験

結晶化には高純度のタンパク質が必要であるため、AbTyrの市販品（Sigma社）をゲルろ過クロマトグラフィーおよび陰イオン交換クロマトグラフィーを用いてさらに高純度化した。AbTyrとCT-2との複合体の結晶は、過去に報告されているAbTyrの結晶化条件[7]を参考にして、9 % PEG 4000, 0.1 M NaAc（pH 4.5）, 5 mM HoCl, 1.56 mM CT-2 を含む条件において、蒸気拡散法を用いて調製した。X線回折実験は、高エネルギー研究機構（つくば市）の放射光を利用した。

2. 5. AbTyrとチロシナーゼ阻害ペプチドとのドッキングシミュレーション解析

AutoDock Vina（version 1. 5. 4）ソフトウェアを使用して、AbTyrと各チロシナーゼ阻害ペプチドとの結合をシミュレーション解析した。解析には短鎖ペプチドSWY, SWW, もしくはYWSを使用した。AbTyrの立体構造は既に報告されているものを使用した（PDB ID : 2y9w）[7]。それぞれのシミュレーション解析において、AbTyrの活性中心を構成する３つのアミノ酸残基（Asn-260, His-244, Glu-322）を柔軟性を持つ残基として指定し、グリッドマップサイズは 16×18×18、グリッドセンターを x=7, y=27, z=99 に設定した。

3. 結　果

3. 1. 新規チロシナーゼ阻害ペプチドの探索

米糠タンパク質加水分解物を２種類のゲルろ過クロマトグラフィーによって分離し、各画分のチロシナーゼ阻害活性を測定した。高い阻害活性を有するピーク画分を回収し、逆相クロマトグラフィーによってさらに精製を行った。得られた複数の主要ピークをそれぞれ分取し、同一のカラムを用いた再クロマトグラフィーによって、それぞれのピークに含まれるチロシナーゼ阻害ペプチドを単離した。質量分析とイネゲノムデータベースにおける照合検索を行い、２種類のチロシナーゼ阻害ペプチドCT-3, CT-4 を同定し

た。CT-3およびCT-4は、それぞれ7残基と9残基のアミノ酸から構成されており、CT-3はC末端にチロシン残基を有している一方で、CT-4はチロシン残基を有していなかった。これらのペプチドを化学合成してチロシナーゼ阻害活性を測定した結果、CT-3は400μMの濃度でモノフェノラーゼの活性を35%程度抑制することがわかった（図2）。この阻害活性は、過去に同定した阻害ペプチドCT-1と同等であった。一方で、CT-4はCT-1~CT-3のペプチドと比較してやや低い阻害活性（400μMの濃度でモノフェノラーゼの活性を10%程度抑制）を示した（図2）。

阻害活性の強い3種類のペプチド（CT-1~CT-3）を使用して、マウスB16メラノーマ細胞におけるメラニン合成抑制試験を行った（図3）。CT-1とCT-3では、むしろメラニン合成量を増大させる結果となった。一方で、最も強いチロシナーゼ活性阻害を示したCT-3は、0.5 mMで60%程度のメラニン合成抑制効果を示した。既存のメラニン合成抑制剤であるアルブチンを濃度0.5 mMで処理した場合は約70%程度の抑制効果を示すことから、CT-3はアルブチンと同等の効果が期待できると考えられた。また、これらのペプチドは全て、1 mMの濃度範囲において全く細胞毒性を示さなかった。

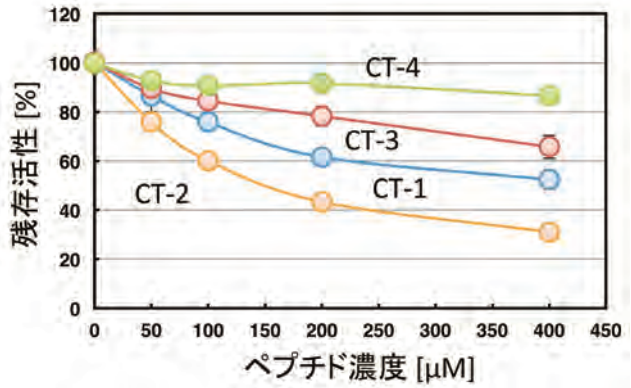


図2　米糠加水分解物から見出したチロシナーゼ阻害ペプチド

3. 2.　チロシナーゼ阻害活性に関わるペプチド中の各アミノ酸残基の役割の解明

強いチロシナーゼ阻害活性を示したCT-1~CT-3およびTH10は、その配列のC末端に共通してチロシン残基を有することがわかった。過去の研究においても、TH10のC末端チロシン残基がそのチロシナーゼ阻害活性に必須であることを明らかにしている。これらのペプチドは、L-チロシンのアナログ基質としてチロシナーゼの酵素反応を阻害していると推測された。そこで我々は、過去に報告されているチロシナーゼ阻害ペプチドのなかから、TH10の10残基の配列のうち7残基が一致し、かつ同等のチロシナーゼ阻害活性を示すペプチドP4[8]に着目した（表1）。P4

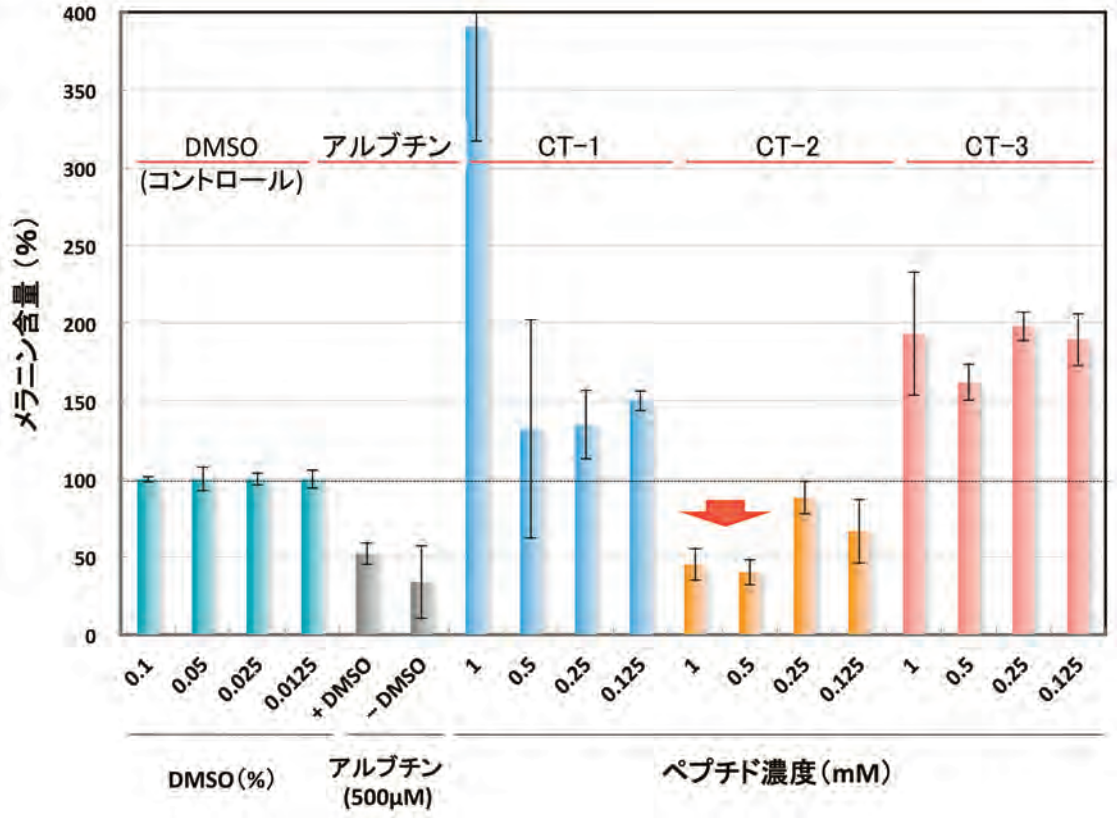


図3　マウスB16メラノーマ細胞におけるメラニン形成抑制試験

とTH10は、配列中にそれぞれ3残基と1残基のチロシンを有している。これらのチロシン残基を中心に変異を導入し、合計12種類の派生ペプチドを設計して（表1）、配列と阻害活性との相関を解析した。

その結果、チロシン残基を欠失させた派生ペプチド（TH10-1, TH10-2, TH10-3）において完全にチロシナーゼ阻害活性が喪失したことから、チロシナーゼ阻害活性の発現にはチロシン残基が必須であることが立証された。興味深いことに、P4のC末端以外に配置されたチロシン残基の欠失（P4-1, P4-2, P4-3）は、その阻害活性に影響を及ぼさなかった。また、C末端のチロシン残基のみを欠失させた派生ペプチド（P4-4）においては完全に阻害活性が喪失したことから、C末端に配置されたチロシン残基のみがチロシナーゼの阻害に関与することが明らかになった。一方で、C末端から2番目に配置されたトリプトファン残基に変異を導入すると、その阻害活性は顕著に低下した。従って、チロシン残基周辺のアミノ酸配列も阻害活性の強弱に影響することが示唆された。

表1　TH10およびP4と設計したそれらの派生ペプチドのチロシナーゼ阻害活性

ペプチド	アミノ酸配列	IC_{50}[a]
TH10	MRSRERSSWY	102 μM
P4	YRSRKYSSWY	123 μM
TH10-1	MRSRERSSW–	–[b]
TH10-2	MRSRERSSWF	–[b]
TH10-3	MRSRERSSWW	–[b]
TH10-4	YWSSRERSRM	–[b]
P4-1	–RSRKYSSWY	123 μM
P4-2	–RSRKRSSWY	133 μM
P4-3	YRSRKRSSWY	122 μM
P4-4	YRSRKYSSW–	–[b]
P4-5	YRSRKRSSW–	–[b]
P4-6	–RSRKYSSW–	–[b]
P4-7	–RSRKRSSRY	400 μM
P4-8	YWSRKRSSW–	–[b]

[a] チロシナーゼのモノフェノラーゼ活性に対する50%阻害濃度
[b] 決定不能（IC_{50} > 400μM）

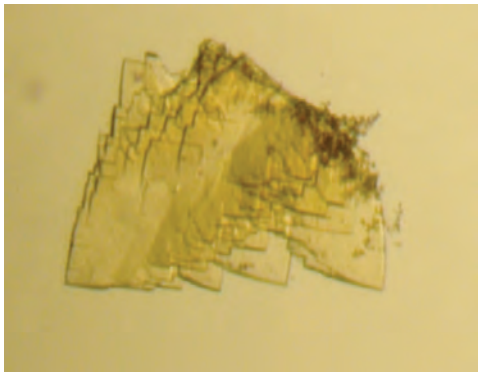
3. 3. AbTyrの結晶化とX線回折実験

チロシナーゼ活性阻害に関わるペプチドの詳細な阻害機構を明らかにするため、X線結晶構造解析によりAbTyrとその阻害ペプチドとの複合体立体構造の解明を試みた。阻害ペプチドとして、CT-1, CT-2, CT-3, TH10, およびP4を使用した。1.56 mM のCT-2を含む9% PEG4000, 0.1 M NaAc（pH 4.5）, 5 mM HoClの組成から成る結晶化条件において、AbTyr/CT-2複合体の結晶を得た（図4左）。得られた結晶を用いて、高エネルギー加速器研究機構のPhoton Factoryの放射光を使用して回折実験を行った。その結果、最大分解能2.4 Å程度の回折像を得ることができた（図4右）。しかしながら、結晶の重なりが原因とみられる回折像の光暈が特定の振り角において生じ、立体構造の決定には至らなかった。TH10およびP4との複合体結晶も得られたが、同様に構造決定には至らなかった。

3. 4. ドッキングシミュレーション解析を用いたAbTyrと阻害ペプチドとの結合様式の解明

前述の「3. 2.」の結果から、C末端に配置されたチロシン残基のみがチロシナーゼの阻害に関与することを明らかにした。AbTyrとその阻害ペプチドとの複合体立体構造の解析が不調に終わったため、シミュレーションソフトウェアAutoDock Vinaを用いてAbTyrと阻害ペプチドとの結合様式の解明を試みた。計算を容易にするため、TH10のC末端側3残基と一致するSWY、そのC末端のチロシン残基をトリプトファン残基に置換したSWW, およびSWYの配列を逆順に配列したYWSの3種類のペプチドを使用した。

シミュレーション解析を行った結果、3つの短鎖ペプチドはいずれもAbTyrの活性クレフトに結合していた。触媒残基および銅イオンが近接するBinding Pocket 1（BP1）



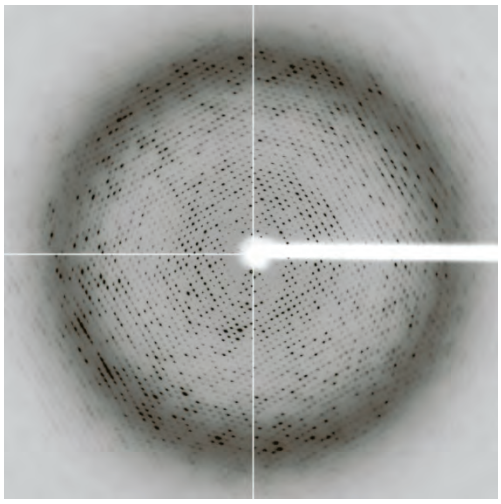


図4　調製したAbTyr/CT-2複合体の結晶（左）とX線回折像（右）

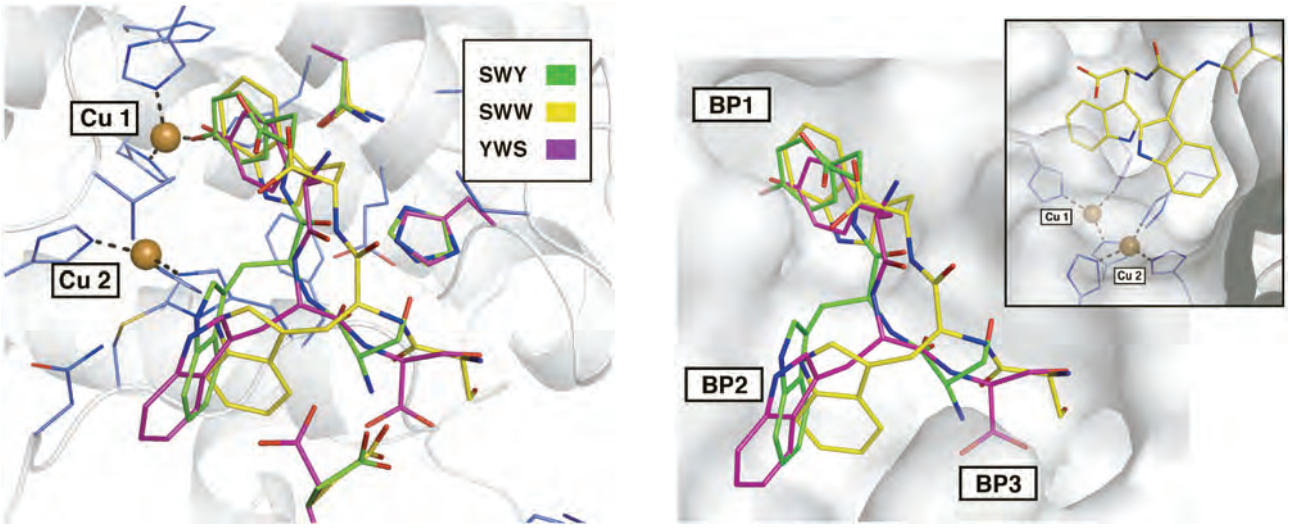


図５　AbTyr と３種類の短鎖ペプチドとの相互作用（左：リボンモデル，右：分子表面モデル）

にはSWYのC末端チロシン残基、SWWのC末端トリプトファン残基、YWSのN末端チロシン残基がそれぞれ結合していた（図５左）。SWYペプチドのC末端チロシン残基はBP1に結合しており、TH10およびP4のC末端チロシン残基がAbTyrのアナログ基質として機能している可能性を強く支持した。また、SWW配列をもつTH10-2ペプチドはチロシナーゼ阻害活性を持たない（表1）。この理由は、SWWのC末端トリプトファン残基と触媒銅イオンとの間には6Å程度の距離があることから（図５右）、基質（チロシン）の接近を妨げることができず、活性を抑えられないからと考えられる。また、YWS配列をもつTH10-4ペプチドもチロシナーゼ阻害活性を持たない（表1）。シミュレーション解析の結果は、YWSのN末端チロシン残基がBP1を塞ぐことが可能であることを示している。一方で、このチロシン残基にはN末端アミノ基が残っていることから図１に示す反応が進み、結果としてYWSペプチドからメラニン様物質が生成してしまう可能性を示した。

4. 考　察

本研究により、チロシナーゼ阻害活性を示す２種類の新規なペプチド（CT-3, CT-4）を見出した。それらの阻害活性は、過去に見出したCT-2ペプチドに比べてやや低く、それぞれ400 μMの濃度で35％, 10％程度の活性を阻害した。阻害活性の強いCT-1, CT-2, CT-3のペプチド配列を比較すると、共通してC末端にチロシン残基を有することがわかった。TH10と相同性の高いP4の配列をシャッフリングした派生ペプチドの阻害活性を解析することにより、C末端に配置されたチロシン残基の存在が阻害活性に重要であるという共通則を提示することができた。一方で、今回我々が見出したCT-4はその配列中にチロシン残基を有していないものの、弱い阻害活性を示した。チロシン残基を介さないチロシナーゼ阻害機構が存在することを示した。

今回調製したAbTyrとCT-2の複合体結晶から2.4Å分解能までのX線回折像を得ることができた。しかしながら、調製した結晶においては結晶性が極端に悪い格子面が存在し、各ペプチドとの複合体立体構造の決定には至らなかった。そこで、AutoDock Vinaソフトウェアを用いたシミュレーション解析によりAbTyrと阻害ペプチドとの結合様式の解明を試みた。解析の結果、ペプチド中のチロシン残基がAbTyrのアナログ基質として機能することにより、チロシナーゼ活性を阻害する可能性を示した。また、そのチロシン残基はペプチド中のC末端に配置される必要があり、同じ芳香族アミノ酸であるトリプトファン残基残基によって代替できないことを示した。

これらの結果は、C末端にチロシン残基をもつペプチドを網羅的にスクリーニングすることにより、高い阻害活性を有するチロシナーゼ阻害ペプチドを設計することが可能になることを示している。一方で、我々はC末端チロシン残基に隣接するアミノ酸残基もチロシナーゼ阻害活性の強弱に影響を与えることを明らかにした。より高い阻害活性を有するチロシナーゼ阻害ペプチドを設計するには、阻害機構のさらなる解明が必要であると考えられる。

謝　辞

本研究を遂行するに当たり、公益財団法人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に深く感謝申し上げます。

（発表論文）

1）Ochiai A, Tanaka S, Imai Y, Yoshida H, Kanaoka T, Tanaka T, Taniguchi M,: New tyrosinase inhibitory decapeptide: Molecular insights into the role of

tyrosine residues, J. Biosci. Bioeng., 121, 607–613, 2016.

（引用文献）

1） Lynde CB, Kraft JN, Lynde CW,: Topical treatments for melasma and postinflammatory hyperpigmentation, Skin Therapy Lett., 11, 1–6, 2006.
2） Sánchez-Ferrer Á, Neptuno Rodríguez-López J, García-Cánovas F, *et al.*,: Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism, Biochim. Biophys. Acta, 1247, 1–11, 1995.
3） Burton SG,: Oxidizing enzymes as biocatalysts, Trends Biotechnol. 21, 543–549, 2003.
4） Solano F, Briganti S, Picardo M, *et al.*,: Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects, Pigment Cell Res., 19, 550–571, 2006.
5） 吉田久志，富谷倫之，落合秋人，ほか2名：米由来ペプチドによるチロシナーゼ活性の阻害とメラニン形成の抑制：2011年度日本生物工学会大会要旨集，148頁，2011.
6） 落合 秋人，田中 聖也，吉田 久志，ほか2名：チロシナーゼ阻害作用を示す米糠タンパク質由来新規ペプチドの同定と機能解析：2013年度日本農芸化学会大会プログラム集，71頁，2013.
7） Ismaya WT, Rozeboom HJ, Schurink M, *et al.*,: Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of tyrosinase from the mushroom Agaricus bisporus, Acta crystallogr., F67, 575–578, 2011.
8） Abu Ubeid A, Zhao L, Wang Y, *et al.*,: Short-sequence oligopeptides with inhibitory activity against mushroom and human tyrosinase, J. Invest. Dermatol., 129, 2242–2249, 2009.

モルフォ蝶のミステリーに基づく、けばけばしくならない光輝粉体の開発

大阪大学大学院工学研究科
齋藤　彰

Morpho butterfly's blue is known as a typical structural color, which attracts interest due to metallic luster from a biological body. However, the blue by interference having high reflectance (>~60%) contradicts single color in too wide angle. The key of this mystery is nanostructure having nano-disorder preventing the rainbow color. According to this principle, we have developed a new type of color powder having luster without loud glitter by emulating the 3D nanostructures. Also we have developed a quite simple process to fabricate the *Morpho*-powder and film based on a new principle.

1. 緒　言

構造色は光波長レベルのナノ構造による発色で、大抵は干渉や反射による「光輝色」を帯びる。このためすでに多くの化粧品（マニキュア・アイシャドー等）で使われている。しかし干渉や鏡面反射のため、反射率や色の角度依存性が大きい原理的な特性がある（正反射に鋭い強度ピークをもち、虹色になる）。したがって塗布量によっては容易に「派手な（けばけばしい）」発色となってしまう。

近年、生物の構造色は広く知られてきた（玉虫や真珠、孔雀など）。中でもモルフォ蝶の発色は他と違い、特異である。それは「干渉色ながら干渉に矛盾し、どこから見ても青い（虹色でない）」物理学的ミステリーである（図1）。その理由が実は特異なナノ構造に起因し、「秩序」と「乱雑さ」の矛盾する要素を巧みに利用した自然の妙であることを筆者は2003年、ナノ構造の再現で実証した。

その後、筆者は工学へ視点を変え、モルフォ発色の多様な応用価値を見出した。それは、色素不要なケミカルフリー発色（低環境負荷と高い安全性）や、広視野で単色の光輝性、長期にわたる無退色、省材料、などである。しかし、応用には多くの壁があり、筆者は約10年、壁を順々に除いてきた（量産技術、光特性制御、乱雑効果の予測と設計、等）。

本計画当初、発色体は作製プロセスの制約で厚い基板上（＞1mm厚）に平板状でのみ作製可能だった。この点は応用の大きな足かせとなる。化粧品を始め多くの応用にとって（インク、塗料等も同様）、最大の近道は、基板を除く「発色部のみ（～1μm厚）」の「粉体化」の実現である。そこで本研究の目的は、特異なモルフォ発色体の1）（発色膜のみの）効率的な分離、2）粉体化と制御（サイズと、光特性に関わる概形）、3）解析（光学的証明）と設計である。これにより、未だ実現されないモルフォ発色体の、化粧品への応用が初めて可能になる。

2. 実　験

モルフォ発色の本質は、ナノの乱雑さを含む切れ切れ多層膜である（図2（b））。人工発色体はその物理エッセンスを抽出し、乱雑さを設計したナノパターン上への多層膜蒸着で発色を再現した（図2（d））。当初基板表面のナノパターン作製には半導体プロセスを用いたが、高価で時間がかかるため量産ではナノインプリントリソグラフィ（NIL）を導入し、樹脂によるパターン複製で劇的に（約千倍）効率が向上した（図3）。ただし工程に分厚い基板を要する上、発色多層膜の蒸着の都合で平板上にのみ作製し得る。ここが前項の通り、応用の大きな足かせであった。

そこで粉体化だが、それにはまず発色部（1μm厚）の膜を剥離し（図4）、その後、膜を粉体化するのが最善である。ここで、多層膜下に犠牲層を挟み剥離を易化する、等は技術的に可能だが、追加工程は量産化にそぐわない。量産のNIL工程に合う簡便なプロセスが肝要である。そこでNIL用の特殊アクリル樹脂に注目し、溶液で樹脂部を剥離し、

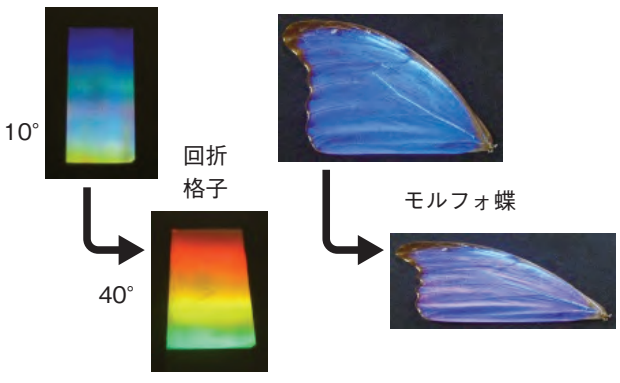


図1　角度依存性の比較

Development of color powder having luster without loud glitter that is based on the mystery of *Morpho* butterfly

Akira Saito
Graduate School of Engineering, OSAKA Univ.

A. Saito, S. Yoshioka, S. Kinoshita:
Proc. SPIE, 5526（2004）188. ほか

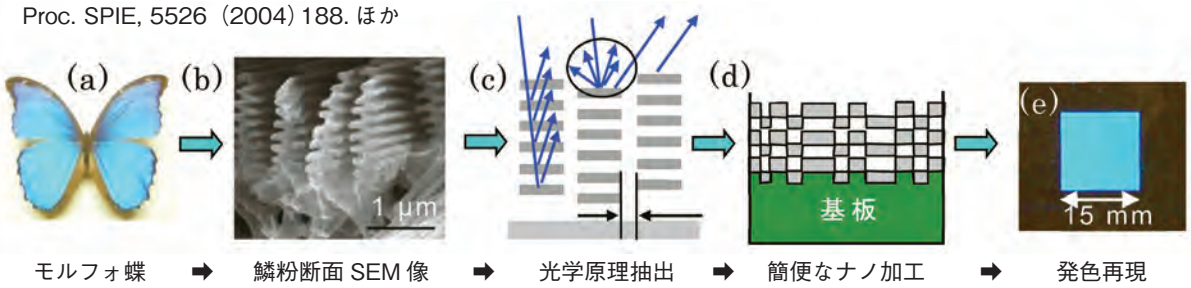


図２　モルフォ発色体の再現プロセス

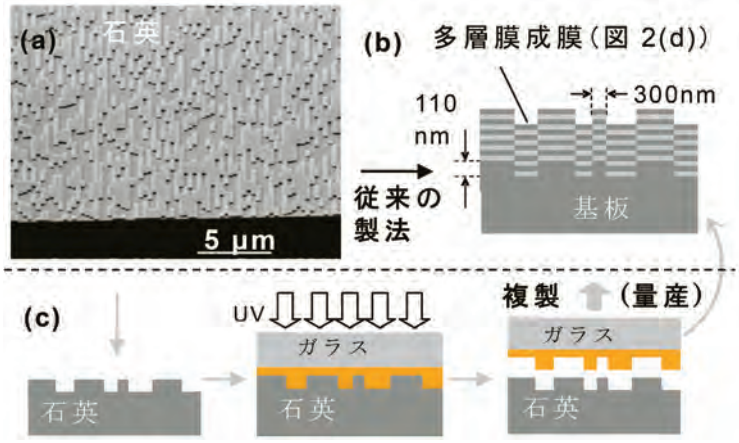


図３　ナノパターン作製プロセスと、(c)量産化プロセス .

図４　発色体フィルム化

1)　発色部のみを分離した。この際、使用樹脂の特性から、極めて簡便な剥片剥離法を見出した。さらに中間報告時点では未発見だった新たな効果を見出し、発色部の（剥片でない）連続フィルム剥離も簡便に可能になった。この結果、粉体を照準にした当初計画に対し予想外の手段でフレキシブルフィルム作製も可能になった。

2)　また量産化を目指し、（主に超音波衝撃による）発色膜の粉体化を行った。ただし化粧品用途と、光特性との対応を考え、「粉体サイズと形状の制御（異方的な概形に反射方向が依存するため）」が必要で、その制御パラメータを半経験的に求めた。

3)　最終的に剥離した粉体・フィルムの光特性を確認し、「設計・制御まで含めた光輝粉体技術」への道筋ができ、化粧品を主とする応用に近づいた。特に、粉体のみならず連続フィルムも含めた「基板フリー化」を極めて簡便に実現する技術が開発できた点は重要である。

主な目標サイズは 50 ～ 100 μm だが（目的により異なる）、微小粒でモルフォ固有の光特性が再現されるか否かは、頻繁に議論されてきた。筆者は最近開発した理論計算によりサイズと光特性の相関を得ており、理論上は、上記サイズまでは光特性は保たれる予想であった。結果はこの予測を支持しており（後述）、したがって作製と計測の間で相互対応を詰めつつ、理論予測を援用し、設計を含むモルフォ発色固有の粉体を実現する方法論が確立できたと言える。

3. 結　果

中間報告書に記載した内容の詳細は紙幅の都合である程度省略しつつ、全体のまとまりに留意して以下、記す。

3. 1. 粉体化プロセス開発（連続平坦多層膜）

まず、量産型（NIL 仕様）で安価な平坦基板上の連続多層膜（ナノパターン無し）を用いて剥離・粉砕の条件出しを行った。パラメータとして①基板を浸漬する溶媒の種類、②その溶媒の温度、③超音波粉砕の時間を振り、粉体化に最適な条件を求めた。

3. 1. 1.　剥離用溶媒の選定

溶媒は超純水・エタノール・アセトン 3 種で薄膜剥離の様態を比較した。使用樹脂 PAK-01 の特性から超純水を、アクリル樹脂の溶解性から代表的な有機溶剤エタノール・アセトンを、候補として選択した。

各溶媒（20℃）に樹脂膜厚～ 10 μm の連続多層膜を基板ごと浸漬し、時間経過を撮影･観察した結果、以下であった。

・超純水……浸漬開始から約 2 時間で基板・樹脂の端部から亀裂が生じ、亀裂が進行したが、24 時間後まで剥離せず。なお亀裂の進行速度は場所によるムラがある（原因は恐らく樹脂膜厚の不均一性にある）。

・エタノール…24 時間浸漬しても、特に変化なし。

・アセトン……24時間浸漬しても、特に変化なし。

超純水での亀裂発生を剥離につながる現象と考え、次の温度最適化では、超純水のみを使用した。

3. 1. 2. 剥離温度

超純水の温度上昇に連れ亀裂の進行速度も増し、～80℃で比較的短時間（50分）でガラスから樹脂と多層膜が剥離した。超純水80℃での時間経過の詳細な観察から、剥離の原理についてヒントが得られた。

上述の通り当初、剥離方法は樹脂－ガラス界面の樹脂溶解を考えた。ところが、諸般の観察（おもに亀裂）と使用樹脂の特性から、結論として剥離原因は樹脂溶解でなく、膨潤とわかった。つまり基板側面から超純水が樹脂に浸透し、樹脂が膨潤する。それでガラス－樹脂界面に界面応力が生じ、樹脂がガラスから剥離する（この過程で樹脂の膨張により亀裂を観測）。剥離後は軽い振動など弱い力で多層膜と樹脂の分離が確認された（膨潤による界面応力で、密着性が低下したため）。

本実験で使用した超純水と樹脂では、温度上昇に伴い膨潤速度も上昇する結果が得られた。また溶解と同様、極性（または溶解度パラメータ）が近い物質の組み合わせは膨潤しやすいことがわかっている。

3. 1. 3. 超音波粉砕と粒径の測定（連続平坦多層膜）

超純水80℃への浸漬で剥片状の発色体が剥離した状態でガラス基板のみ除き、超音波洗浄器で粉砕を行った。この際、数cmサイズの大きな発色体は、予め数mm程度に砕いて超音波にかけた。超音波洗浄器は一定の出力・周波数で㈱エスエヌディ、型名US-2、高周波出力120 W、発振周波数：38 kHz）、粒径の粉砕時間依存性を調べた。

処理時間で8種の試料を用意し、各試料ごとに粉体100個の粒径を光学顕微鏡で測定した（平均粒径と標準偏差を算出）。なお、粉体形状が非等方なため、粒径は「粉体面積の平方根」と定義した。

粉砕時間に伴う平均粒径と標準偏差の変化を図5に示す（エラーバーが標準偏差に対応）。平均粒径は粉砕開始から5分後、標準偏差は7分後まで減少を続ける。また両値とも、一定時間後ほぼ一定値（平均粒径~70μm、標準偏差~30μm）で推移する。粉砕時間が長くなると、粒径>120μmの粉体は減少、40~100μmは増加傾向を示す。粉砕時間に伴い、粒径のばらつき（標準偏差）が減少する様子がよくわかる。

この通り、量産型モルフォ発色粉体作製の条件出し用に、より安価・高効率な連続多層膜で粉体化を試みた結果、超音波洗浄器により系統立った粒径制御が可能とわかった。

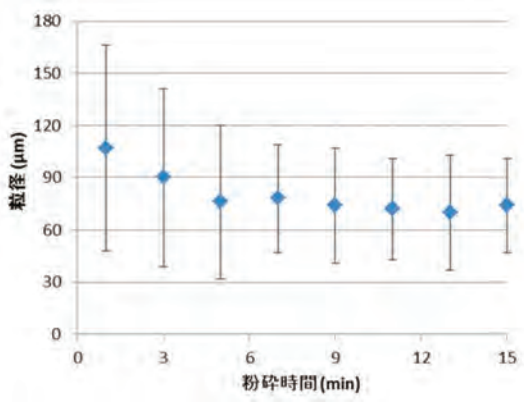


図5　超音波粉砕時間による粒径変化（平均径とばらつき）

3. 2. 粉体化プロセス開発（モルフォ蝶型切れ切れ多層膜）

次に、前節で求めた剥離条件（80℃超純水へ浸漬）でモルフォ発色薄膜の剥片を作り、超音波処理によりモルフォ発色粉体作製を試みた。

3. 2. 1. 剥離

量産型（NIL仕様）の連続平坦多層膜とモルフォ発色膜の間に剥離条件で大きな差異は無いと考え、前節の剥離条件（超純水80℃に浸漬）で試みた。その結果、3時間程度の浸漬で樹脂および多層膜の剥離に成功した。さらに条件に応じて（樹脂の厚み、加熱時の振動環境、等）、発色体が剥片化することなく、一体の連続フィルムとして剥離する現象が見出された（図6：この場合90分）。

これは予想外で、前節の剥離原理（樹脂膨潤による応力と亀裂）と多層膜（総厚~1 μmの極めて脆いTiO_2とSiO_2）構成を考えると一見、説明ができない。その後、調査と検討の結果、やはりこの現象も樹脂膨潤が鍵と判った。つまり膨潤応力は膜部（樹脂＋多層膜）を曲げて剥離するだけでなく、ナノパターンがあるため、膜部全体を安定に固定化する作用があるのである。ナノパターン形状を考えるとわ

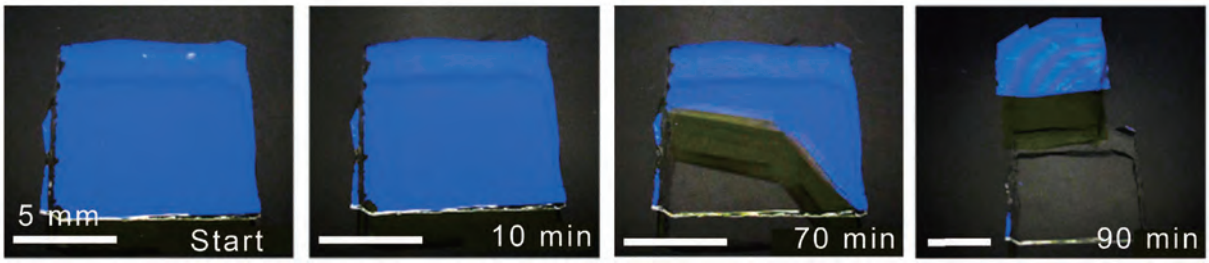


図6　剥片化せず連続フィルムとして剥離したモルフォ発色体

かるが、NILで複製された樹脂凹凸（幅300 nm、高さ100 nm）上に多層膜が蒸着される。材質上、膨潤は樹脂のみで生じ、多層膜部は膨潤する樹脂に対して反作用を及ぼす。基板面内方向を考えると、固い多層膜部の反作用は一種のアンカー効果として働き、樹脂と多層膜を強固に保持することになる。勿論、樹脂の応力はこの一体化した発色膜（樹脂＋多層膜）を基板から剥離するのにも働き、連続膜が剥離する。この「連続一体剥離」は上記「膨潤アンカー効果」という新たな原理に基づき、発色部をフレキシブルフィルムとして自立剥離する、新手法として応用可能である。本研究ではコスメトロジーの観点で粉体が主眼だが、ディスプレイ等デバイスの観点では、本技術は新たな価値を生み出す可能性がある。

本務である粉体作製（次項）に当たり、樹脂膜厚等の条件次第では連続平坦膜と同様、数mm～数cm径の剥片となるため、以下では剥片化したモルフォ発色体の超音波粉砕を試みた。なお、全てモルフォ発色用のナノパターンを転写した領域（□10 mm）を、剥離後に選択して量産型モルフォ発色体として用いた。

3. 2. 2.　超音波粉砕と粒径の測定

得られた知見を元に、切れ切れ多層膜に基づくモルフォ発色粉体を作製した。連続平坦多層膜の場合と比べ、諸々の差異は見られたが、同様の行程で剥離→超音波粉砕の結果、同条件で前項に比べ若干、大きな粒径の粉体が得られた（図7）。ただし上述のとおり、最終的な粒径は超音波のパワーと処理時間で制御可能である。一般に使用される、薄膜干渉に基づく光輝化粧品の粒径は50~100 μmである。したがって将来の実用化に鑑みても、すでに近い値の粉体化が実現できた。用途に応じて更に精緻な粒径制御が必要な場合、出力や周波数可変な超音波発生器を用い、さらに厳密な粒径制御、光学特性の測定などを行い、様々な用途に応じたモルフォ発色粉体の作製が可能となる。

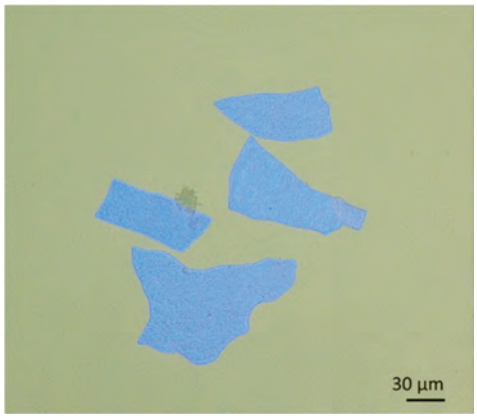


図7　モルフォ蝶型人工発色粉体

3. 3.　粉体の光学特性

3. 1.で述べた連続多層膜粉体と、3. 2.のモルフォ発色粉体の反射特性を図8に示す。青色波長（460 nm）における半値全幅（FWHM）は、連続多層膜粉体~5°に対し、モルフォ発色粉体は~40°で、「広角で青く見える」モルフォ固有の反射角広がりが確認できる。

粉体でない発色体に比べてエッジ散乱により緑色反射も強くなっており、スペクトルは若干ブロードになっていると予想される。しかし、50~100 μmのサイズでも、モルフォ蝶固有の「広角で単色」かつ「高反射率」という光学特性が保たれることは判明した、といえる。

4. 考　察

コスメトロジー分野で構造色や反射による光輝効果を用いる多くの発色は現在、冒頭の通り「鋭い正反射と、反射の強い角度依存性、虹色干渉」を原理的に避けられない。一方、ナノの乱雑さに基づくモルフォ発色を再現した粉体が実現されると、「高反射率ながら、滑らかな反射角度分布をもち、広角で単色（かつモルフォ蝶は青が支配的だが、人工物では色調整が可能）」という反射特性が得られる。こうした光特性の実効的な意義は、本課題名の通り、量を塗布しても派手にならず、光輝材特有な正反射のギラつき・けばけばしさが無い「上品な発色」である。しかも合成色素不用なため（発色材はSiO_2とTiO_2のみ）、環境負荷が低い上に毒性が無く、人体への安全性も高い。

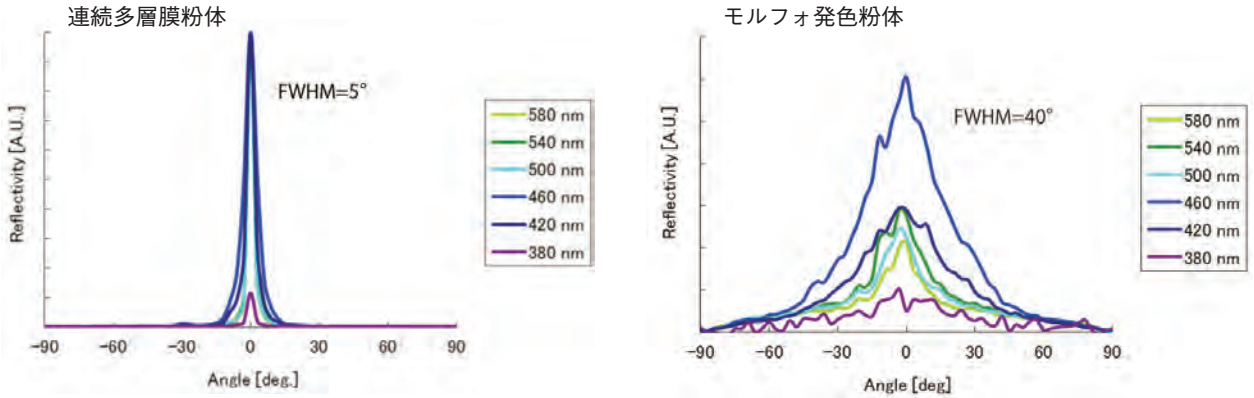


図8　連続多層膜とモルフォ型切れ切れ多層膜、各粉体の光学特性（反射率の角度・波長依存性）

こうした光輝材は従来、量の多寡を問わず「存在すらせず」、コスメトロジー分野でのインパクトには大きな期待が持てる。本粉体の、多数を塗布した集団的色彩効果は世界でまだ誰も見ていない。微小サイズによるモルフォ発色失効の懸念は、筆者のシミュレーション結果から~50 μm径ならば問題なく、その効果は図９のように予想されたが、図８からその予想は正しいと判った。安全で新規な色彩効果をもつ本光輝材は、およそ粉体をベースにした多くのコスメトロジー関連品への波及効果が期待できる。

また従来のコスメティック粉体と比べた上記の考察に加え、さらに幅広いモルフォ発色体利用から見た本結果の意義を考えることも価値があろう。発色体の実態は、NILによる複製の如何によらず「多層膜」である（図３（b）：発色を担う多層膜の総膜厚は、色にもよるが1~2 μm）。多層膜形成法は当座、光学薄膜の厚み精度の要求が高いため真空蒸着を要する。従って、現状では厚い平坦基板にしか発色できない。これでは装飾を始め、用途を厳しく制限してしまう。

しかし上述したモルフォ発色粉体の完成で、発色の付与範囲は「平板だけ」という形状（と蒸着槽サイズ）の制約から解放され、飛躍的に広がった。しかもモルフォ発色体の単なる破砕（それでは体積比で圧倒的な基板が邪魔）でなく、多層膜の「簡便な薄膜化（剥離）プロセス」「均一な粉体作製」「粉体の光特性」が保証できた。

加えて、剥離プロセスの過程で新たに発見した膨潤アンカー効果は、フレキシブル発色フィルムの簡便な（湯浸だけ）作製を可能にする。恐らくこの意義は大きく、反射型デバイスや量産発色体の運搬（ロール状）に威力を発揮するであろう。

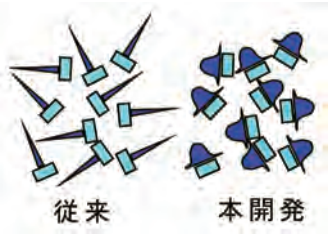


図９　粉の光特性

真の実用に残る唯一の壁は、コストである。NILやレーザ、電鋳で５－６桁の能率・コスト改善に成功したが、実用ベースではまだ２桁程改善を要するだろう。しかし粉体工程のさらなる効率化、制御の高精度化（光特性と粉体サイズ）等、残りは研究よりも開発に委ねられる部分である。基本技術の点では目途が立ち、本課題の予想と計画に沿った進捗は実現できた、と言える。

謝　辞

本研究を行うに当たり、大阪大学大学院工学研究科・精密科学・応用物理学専攻・桑原研究室の各位、特に石橋幸成氏の協力があったこと、また、コスメトロジー研究振興財団よりご支援いただいたことを深く感謝申し上げます。

保湿性・抗菌性を有するバイオベースの新しいスキンケア素材の開発

国立研究開発法人 産業技術総合研究所 機能化学研究部門
佐藤　俊

Skin care products are now widely used not only by women but also by men of all ages. They require skin-care products with versatile effects like moisturizing, anti-aging, and antimicrobial functions. Also, due to growing consumers' demands for safer chemical materials, skin care products made from natural and/or bio-based materials are preferred. Thus, novel bio-based materials with moisturizing function and antimicrobial activity are necessary for the application to cosmetic products. In this study, characteristics of glyceric acid, which is a phytochemical and can be mass produced from glycerol by acetic acid bacterial fermentation, were investigated. It was observed that water-retention ability of glyceric acid sodium salt in agar gels were comparable to that of glycerol, which is a practical skin hydration reagent. In addition, glyceric acid sodium salt showed no effect on the recovery of sodium dodecyl sulfate-treated human skin cells by using three-dimensional cultured human skin model. It was also found that glyceric acid as well as other short chain fatty acids like acetic, propionic, and lactic acids inhibited growth of *Propionibacterium acnes*, which is one of normal skin bacteria and causes inflammatory acne by their overgrowth, on agar medium. These results suggest that glyceric acid possesses a potential in use as a cosmetic ingredient with moisturizing function and antimicrobial effect.

1. 緒　言

みずみずしく健康的な美しい素肌へ導くためのスキンケア化粧品は、現在では男性向け市場の拡大もあり、ニーズの多様化に応える特徴ある製品が求められている。また、ニキビや肌荒れ等に効果のある成分を配合させることで、より高いスキンケア効果を持つ製品の開発も重要である。そのためには、スキンケア化粧品の基本機能である保湿効果に加えて、抗菌性や美白効果等、複数の機能を有する高機能素材の開発が鍵となる。

グリセリンは、高い保湿効果を有する天然素材としてスキンケア製品に広く利用されているが、ニキビの原因菌である*Propionibacterium acnes*のグリセリン資化能から、増殖を促進する効果が指摘されている[1)]。また、酢酸やプロピオン酸等の有機酸は、一般に抗菌作用が知られているが、乳酸菌の生産する培養液中の有機酸が*P. acnes*の増殖を阻害することも報告されている[2)]。そこで、両者の効果を兼ね備えた新しい素材として、筆者はグリセリンの酸化誘導体：グリセリン酸に注目した（図1）。グリセリン酸は、植物に微量含まれる有機酸の一種で、天然由来の安全性の高い化合物と考えられる[3)]。しかし、化学触媒によるグリセリンの酸化反応では、多段階の酸化反応制御が難しく、グリセリン酸の量産技術は確立されていなかった。そのため、グリセリン酸の詳細な物性評価や化粧品素材としての機能性評価は、現在でも十分に行われていない。

図1　グリセリン(A)およびグリセリン酸(B)の化学構造

近年、Habeらは、食酢の醸造で用いられる酢酸菌と同種の菌株を用いたグリセリン酸の量産化技術の開発に成功した[4)]。この技術では、有害な金属触媒や有機溶剤を用いることなく、グリセリンを特異的にグリセリン酸へと変換することが可能である。例えば、*Gluconobacter frateurii* NBRC103465株を用いた場合、5L容ジャーファーメンターでのpH制御法による流加培養で、培養6日目に発酵液中のグリセリン酸濃度は136 g/Lに達した。また、グリセリン酸には、2位の炭素に不斉が存在するが、酢酸菌株の種類を選択することで、D体をエナンチオマー過剰率99％以上で生産できるプロセスも開発されている。そのため、天然由来の化合物であり、かつ、食酢製造で利用されている酢酸菌類を用いた光学活性なバイオ生産物であるという点で、化粧品等に応用可能な新しいバイオ素材として魅力的である。

そこで本研究では、グリセリン酸に期待される保湿効果や抗菌性等の機能性を評価・検証し、新しいバイオベースのスキンケア素材の開発を行うことを目的とした。まず、グリセリン酸が保湿性および抗菌性を有するかどうかを評価するための手法を検討し、グリセリンや乳酸等、現在化粧品等に配合されている化合物と比較した。さらに、ヒト皮膚再構築モデルを用いて、脱脂処理を施した皮膚細胞に対するグリセリン酸の影響を評価した。

A novel bio-based material with moisturizing function and antimicrobial activity
Shun Sato
Research Institute for Sustainable Chemistry, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

2. 実　験

2. 1. 試薬

2 mol/L DL-グリセリン酸は、東京化成工業㈱製のものを用いた。ナトリウム塩への変換は、1当量の1 N水酸化ナトリウム（和光純薬工業製）を添加して中和し、pH試験紙を用いて溶液のpHが約8付近であることを確認した。加えた水酸化ナトリウム水溶液の量から、グリセリン酸ナトリウム水溶液の濃度を算出した。プロピオン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、50％乳酸ナトリウム、グリセリン、寒天、およびドデシル硫酸ナトリウム（SDS）は、和光純薬工業製のものを用いた。大腸菌の培養には、LB培地（Difco）を、*Propionibacterium acnes*の培養には、GAMブイヨン「ニッスイ」（日水製薬株式会社製）を用いた。固体培地の作製には、寒天（和光純薬工業製）を1.5 wt%となるように加えた。試薬の溶解および培地の調製には、1次イオン交換水を用いた。液体および固体培地の滅菌は、オートクレーブ（121℃、20分）を用い、培地に添加する試薬類の滅菌は、0.2 μmポアサイズのフィルターを用いて滅菌したものを使用した。生細胞数測定にはCell Count Reagents SF（ナカライテスク社製）を用いた。

2. 2. 寒天ゲルを用いた水分保持能の評価

グリセリン酸の保湿性評価として、試験薬を含有する寒天ゲルの重量変化から、重量減少率を指標に評価した。直径3 cmのガラスシャーレに、加熱溶解させた1 wt%の寒天水溶液を2 mLと、等量の試験薬水溶液を80℃に加熱したホットプレート上で混合し、室温で冷却した。ゲル化した寒天の重量を測定し、濃硫酸100 mLを入れて調湿した3 L容のガラスデシケーターに寒天シャーレを静置した。デシケーターを25℃の恒温槽に入れて24時間経過後、寒天の重量差から、下記の式（1）に従い、添加した試験薬の水分保持能を評価した。

$$\text{Weight loss}\ (\%) = [(W_{t=24} - W_{t=0})/W_{t=0}] \times 100 \qquad (1)$$

ここで、$W_{t=0}$は、寒天ゲルの初期重量、$W_{t=24}$は、デシケーター内で24時間静置後の寒天ゲルの重量である。

2. 3. ヒト皮膚再構築モデルを用いたグリセリン酸の皮膚細胞への影響評価

グリセリン酸の水分保持能評価の一つとして、脱脂された肌における皮膚細胞に対する影響を、ヒト皮膚再構築モデルを用いて評価した。三次元培養皮膚モデルLSE-high（東洋紡）の組織頂上部表面を、森田らの方法に従い、1 wt% SDS水溶液で脱脂した[5]。SDSを表面から除去洗浄したのち、1 wt% グリセリン酸ナトリウム水溶液を塗布し、キット添付のLSEアッセイ培地で37℃、5％ CO_2下で24時間培養した。その後、Cell Count Reagents SFを培地の1/10量添加して、37℃で4時間インキュベートした。培地中に生成したホルマザン色素生成量は、450 nmの吸光度測定により評価した。生細胞数の評価は、SDS処理していない条件を対照とし、コントロールを100％とする相対値で示した。また、SDS処理後に水のみを塗布した条件も並行して行った。

2. 4. 細菌株および培養条件

大腸菌DH5α株（タカラバイオ株式会社）は、グリセロールストック溶液から1白菌耳LB寒天培地に植菌し、37℃で一晩培養し、コロニーを形成させた。1コロニーをLB液体培地5 mLを含む試験管に植菌し、37℃、200 strokes/minで振とう培養した。*P. acnes* NBRC107605株は、30%スキムミルクで懸濁した培養液の－80℃ストック溶液から、GAMブイヨン「ニッスイ」固体培地上に植菌し、嫌気培養用アクロネパックおよびアクロネパックジャー（三菱ガス化学）を用いて37℃で培養した。固体培地上に形成されたコロニーは、継代培養および液体培養で用いた。液体培養は、10 mLのニッスイ培地を含む試験管に1コロニーを植菌し、嫌気ジャー中で静置して37℃で培養した。培養経過後2－3日で、試験管の底部に増殖した菌が沈降していることが観察された後、ピペッティングにより沈殿している菌を分散させた培養液100 μLをGAMブイヨン「ニッスイ」固体培地上に播種し、37℃、嫌気ジャー内で培養した。

2. 5. 細菌に対する増殖阻害効果の評価

グリセリン酸の抗菌性の評価方法として、大腸菌および*P. acnes*の増殖阻害効果を、固体培地上に播種した細菌の増殖阻害によりグリセリン酸を染み込ませたろ紙ディスク周縁にできるハローで評価した。固体培地上に培養液100 μLを塗り広げ、表面を乾燥させた後、滅菌した桐山ロート用ろ紙ディスク（ϕ＝8 mm）に10 μLの試験薬を滴下し、所定の温度で1－7日培養した。培養後、ディスク周縁にできたハローの大きさを観察し、コントロールとして用いた滅菌水の場合と比較した。

3. 結　果

3. 1. グリセリン酸の水分保持能評価

グリセリン酸がグリセリン様の保湿性能を有するかどうかを検証するため、0.5 wt%の寒天ゲルから蒸散する水分量を抑制する能力での評価を試みた。図2には、寒天のみ、グリセリン、グリセリン酸ナトリウム、および乳酸を10 wt%添加して作製したゲルの24時間に損失した重量減少量を、初期重量に対して％で表示したものである。寒天

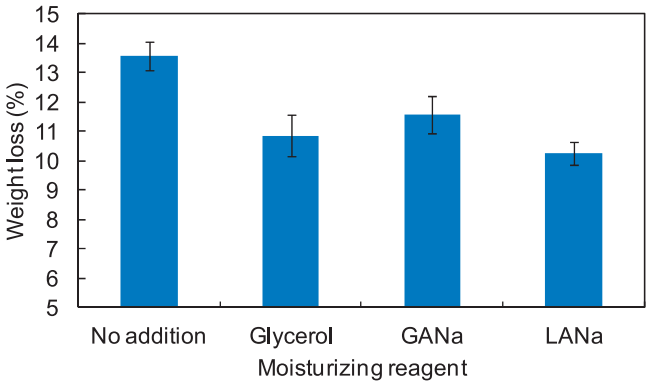


図２　保湿剤を含有する 0.5 wt% 寒天ゲルの重量減少量の評価。調湿したデシケーター内、24 時間、25℃で静置した寒天ゲルの重量減少を、初期重量に対して相対的に示した。デシケーター内の相対湿度は、57±3%。データは、３回の平均および標準偏差を示した。No addition、無添加（コントロール）；GANa、グリセリン酸ナトリウム；LANa, 乳酸ナトリウム。

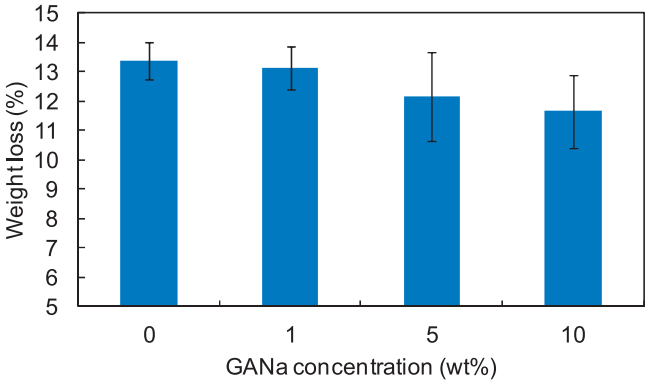


図３　グリセリン酸ナトリウムを含有する 0.5 wt% 寒天ゲルの重量減少量の評価。調湿したデシケーター内、24 時間、25℃で静置した寒天ゲルの重量減少を、初期重量に対して相対的に示した。デシケーター内の相対湿度は、51 ± 3%。データは、３回の平均および標準偏差を示した。GANa、グリセリン酸ナトリウム。

のみの場合、ゲル重量に対して 13.6 wt% の水分が 24 時間で損失されているのに対し、10 wt% のグリセリンを添加した場合は、損失量が約 2.7 wt% 減少することが分かった。添加しているグリセリンが 10 wt% であることから、減少した水分量の約１割は、添加したグリセリンによって初期の寒天ゲル中の水が減少した分として考慮することができる。そのため、約 1.3 % 程度の水分が、グリセリン添加によってゲル中に保持されたことが示唆された。この条件において、同様にグリセリン酸ナトリウムでの試験を行った。グリセリン酸を 10 wt% 添加したゲルでは、グリセリンと同様に損失した水分量が 2 wt%、無添加の場合に比べて減少していた。また、乳酸を同濃度で添加した場合、最も重量減少が抑制され、無添加に比べて水分の減少量が 3.3 wt% 低下した。

一方で、水分保持効果におけるグリセリン酸ナトリウムの濃度の効果を検討した（図 3）。グリセリン酸ナトリウムの濃度の増加に伴い、水分の減少量が低下している傾向が見られ、5 wt% のグリセリン酸ナトリウムを添加した場合は、無添加と比べて 2.2 wt%、10 wt% 添加では 2.7 wt%、水分の減少が抑制された。一方で、同じ炭素数 3 の脂肪酸であるプロピオン酸ナトリウムを同濃度で添加した場合、添加することで 1 wt% 程度の水分減少量の抑制が見られたものの、その効果に濃度依存性は見られなかった（data not shown）。

3. 2.　肌荒れ状態の皮膚細胞に対するグリセリン酸の影響評価

上記 3. 1. より、グリセリン酸ナトリウムが水分保持能を有していることが示唆された。そこで、グリセリン酸の保湿能をさらに評価するため、ヒトの皮膚構成を再構築した三次元皮膚培養モデルを用いて、脱脂された状態の皮膚に

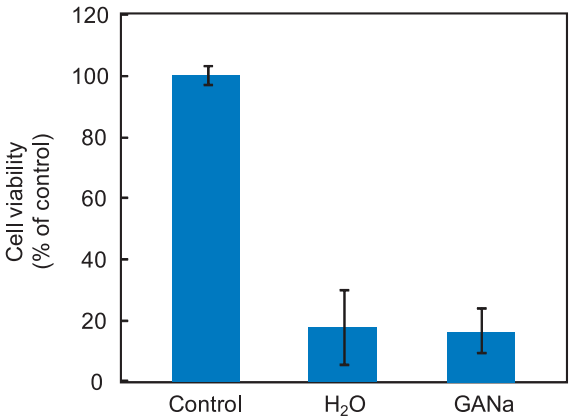


図４　三次元皮膚培養モデルを用いたグリセリン酸の保水性能の評価。ドデシル硫酸ナトリウム処理したヒト皮膚モデルに 1 wt% グリセリン酸ナトリウム水溶液を塗布し、24 時間後の生細胞数を Cell Count Reagent SF を用いて評価した。ドデシル硫酸ナトリウム処理していない条件（Control）を 100 % として相対的に示した。データは、３検体の平均および標準偏差を示した。H_2O、水のみ；GANa、1 wt% グリセリン酸ナトリウム水溶液。

おけるグリセリン酸が皮膚細胞に与える影響を 24 時間後の生細胞数により評価した。森田らの方法を参考に、SDS 処理した三次元培養細胞モデルの頂上部表面に 1 wt% グリセリン酸ナトリウム水溶液を塗布して培養した。その結果、SDS 処理をしていない条件に比べて、生細胞数は 80 % 以上減少していることが示唆された（図 4）。しかし、SDS 処理後に水のみを塗布したものと比較しても生細胞数の違いは見られなかったことから、グリセリン酸には脱脂処理された細胞に対する賦活性は見られないと考えられた。

3. 3.　グリセリン酸の抗菌活性評価

グリセリン酸による微生物の増殖阻害効果を評価するた

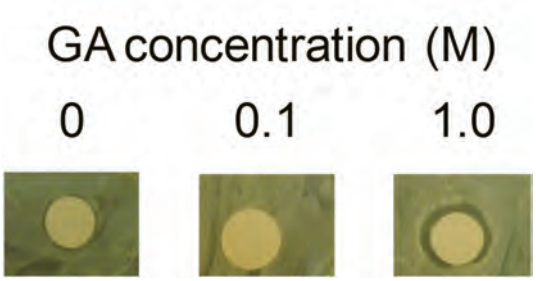


図５　*P. acnes* の増殖に対するグリセリン酸の効果。グリセリン酸を含むディスク周囲にできるハローの存在で、増殖抑制の効果を評価した。*P. acnes* は GAM 寒天培地上で嫌気ジャー内、37℃、３日間培養した。GA、グリセリン酸。

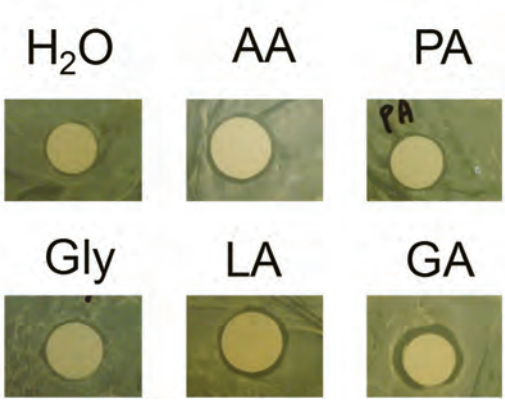


図６　*P. acnes* の増殖に対する有機酸類の効果。１M の各試験薬を含むディスク周囲にできるハローの存在で、増殖抑制の効果を評価した。*P. acnes* は GAM 寒天培地上で嫌気ジャー内、30℃、３日間培養した。AA、酢酸；PA、プロピオン酸；Gly、グリセリン；LA、乳酸；GA、グリセリン酸。

め、初めに、大腸菌Ｋ株由来であるDH5α株および短鎖の有機酸を用いて、薬剤ディスク周囲にできるハローでの評価を検討した。LB寒天培地上に一晩振とう培養して増殖した菌液を播き、その上に各試験薬を染み込ませたディスクを置き、培養経過に伴う菌の増殖を観察した。その結果、水および何も染み込ませかったディスクには、ディスクの周囲まで菌が増殖していたが、酢酸やプロピオン酸など、増殖阻害効果が知られている有機酸類では、ディスク周囲に菌が増殖していないハローが見られた（data not shown）。そこで、この手法を用いて*P. acnes*に対するグリセリン酸の増殖阻害効果の評価を試みた。*P. acnes*が増殖した培養液100μLを播種したGAM寒天培地上に、グリセリン酸を所定濃度染み込ませたディスクを静置し、37℃で培養した。培養３日後では、プレート全面に*P. acnes*の増殖が認められ、コントロールとした滅菌水を染み込ませたディスクの縁まで菌の増殖が認められた（図５）。一方で、グリセリン酸濃度0.1Ｍのディスクでは、コントロールの場合と同様に菌が増殖していたが、1.0Ｍのディスク周辺には、菌が増殖していない領域が１－２mm認められた。また、この領域は、７日間培養した後でもはっきり残っており、周囲に増殖した*P. acnes*の炭素源として消費される等により、グリセリン酸濃度が低下せず、増殖阻害効果を維持していることが示唆された。

また、グリセリン酸と同じ濃度において、短鎖有機酸類およびグリセリンを用いて比較実験を行った。図６に示すように、グリセリン酸を含む有機酸類（酢酸、プロピオン酸、および乳酸）では、ディスクの周辺に*P. acnes*が増殖していない領域が数mm観測された。一方、グリセリンを染み込ませたディスクの周囲には同様のクリアな領域が観察されず、コントロールとした滅菌水のディスクと同様に*P. acnes*が周囲まで増殖していた。また、類似の構造の有機酸類の場合でもハローが認められ、*P. acnes*の増殖を阻害することが分かった。一方、グリセリン酸のナトリウム塩では、同濃度での試験において、*P. acnes*の増殖阻害は見られなかった。

４．考　察

グリセリン酸は、グリセリンの片末端のヒドロキシ基が酸化された化合物である（図１）。そのため、グリセリンに見られるポリオールとしての性質、および、カルボン酸に由来する有機酸としての性質の両方が期待される化合物である。グリセリンは、古くから保湿剤として化粧品等で利用されており、一方で、有機酸は、微生物の増殖を阻害する効果から食品等でその効果を発揮している。そのため、本研究では、グリセリン酸に関する双方の機能について検証した。

保湿剤としての性能は、寒天ゲルに保持されている水分量を比較することで、水分保持能として評価した。その結果、グリセリン酸は、グリセリンや乳酸など化粧品等で保湿剤として用いられている低分子の糖アルコールやヒドロキシ酸と同様に、水分保持能を有していることが明らかになった。また、プロピオン酸の比較実験から、水分保持効果においては、ヒドロキシ基の存在が重要であることが分かった。さらに、ヒト皮膚の再構築モデルを用いて、界面活性剤処理により脱脂した皮膚の細胞に対する影響を評価した結果からは、試験した条件下での細胞賦活性は見られず、グリセリン酸に期待される保湿能は検証できなかった。

一方、微生物の増殖阻害効果は、ニキビの原因菌である*P. acnes*を用いて、その効果を検証した。グリセリン酸は、対照として用いた短鎖の有機酸類と同様に、*P. acnes*の増殖を阻害できることが分かった。また、この効果は同濃度のグリセリンには見られず、グリセリンとは異なる性質を有していることが確認された。また、ナトリウム塩では同

様の増殖阻害が見られなかったことから、グリセリン酸は培地中のpHを低下させることで、抗菌性を発揮しているものと推測された。

以上から、グリセリン酸は、保湿性と有機酸に認められる抗菌性を兼ね備えたバイオベース素材であることが明らかになった。今後は、グリセリン酸の保湿性および抗菌性の定量的な評価によって、スキンケアに有効なバイオベース素材であることを実証するとともに、種々の皮膚細胞に対する賦活性等、新たな機能が見いだされることによって、多機能なスキンケア素材としてのグリセリン酸の応用展開が期待される。

謝　辞

本研究の遂行にあたり、公益財団法人コスメトロジー研究振興財団によりご援助いただきましたことに深謝いたします。

（参考文献）

1）Gribbon EM, Cunliffe WJ, Holland KT,: Interaction of *Propionibacterium acnes* with skin lipids in vitro, J. Gen. Microbiol., 139, 1745–1751, 1993.

2）Kang MS, Oh JS, Lee SW, Lim HS, Choi NK, Kim SM,: Effect of *Lactobacillus reuteri* on the proliferation of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis*, J. Microbiol., 50, 137–142, 2012.

3）Habe H, Fukuoka T, Kitamoto D, Sakaki K,: Biotechnological production of D-glyceric acid and its application, Appl. Microbiol. Biotechnol., 84, 445–452, 2009.

4）Habe H, Shimada Y, Yakushi T, Hattori H, Ano Y, Fukuoka T, Kitamoto D, Itagaki M, Watanabe K, Yanagishita H, Matsushita K, Sakaki K,: Microbial production of glyceric acid, an organic acid that can be mass produced from glycerol, Appl. Environ. Microbiol., 75, 7760–7766, 2009.

5）Morita T, Kitagawa M, Suzuki M, Yamamoto S, Sogabe A, Yanagidani S, Imura T, Fukuoka T, Kitamoto D,: A yeast glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, shows potential moisturizing activity toward cultured human skin cells: the recovery effect of MEL-A on the SDS-damaged human skin cells, J. Oleo Sci., 58, 639–642, 2009.

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

国立研究開発法人 海洋研究開発機構 海洋生命理工学研究開発センター
出口　茂、木下　圭剛

Dodecane-in-water nanoemulsions were prepared by a conventional top-down process and a bottom-up MAGIQ in the presence of four different types of nonionic surfactants. A good correlation was found between the final droplet size and dynamic surface tension, suggesting that adsorption dynamics of surfactants to oil/water interfaces is critical in determining droplet size in MAGIQ.

1．緒　言

本来、互いに混ざり合わない水と油を乳化物として混合し取り扱う技術は、化粧品開発・製造のみならず、食品、インク、医薬品、化学工学など広範な産業分野で利用されている大変重要な基盤技術である。最近では油滴サイズを20 ～ 200 nm程度にまで超微細したナノエマルションが注目を集めている。油滴サイズのナノ化に伴って、通常のエマルションには見られない様々な新特性が現れるためである。例えば通常のエマルションは牛乳のように白濁しているのに対し、ナノエマルションは透明あるいは半透明である。また油滴サイズの小ささを活かして、肌への浸透性を高めた機能性化粧品、ドラッグデリバリーシステムでの薬物キャリア、ナノ材料合成のためのリアクターなど、エマルションの新たな用途も生まれようとしている。

通常の乳化は「トップダウン」プロセスであり、水／油／乳化剤の混合物に、撹拌や超音波照射などによって外部からエネルギーを加え、粗大油滴を繰り返し引きちぎって微小油滴を生成する（図１）。この際、外部から加えたエネルギーが油滴内部と外部の圧力差（ラプラス圧と呼ばれる）に勝ったときに油滴の微細化が進行する。ところが、ラプラス圧は油滴サイズに反比例するため、サイズの低下とともに油滴の更なる微細化は困難となっていく。一方、ナノサイズの固体粒子（ナノ粒子）の製造では、粒子を構成する原子あるいは分子の自己組織化を利用してボトムアップで合成するのが一般的である。ナノサイズの液滴の調製でも、当然ボトムアップの方が好ましいと考えられる。しかしながら、そのためには本来混ざり合わない水と油が分子レベルで混合した均一溶液が必要となるというジレンマがある（図１）。

例えば水と2,6－ルチジンの混合物は34.1℃に下限臨界溶解温度（LCST）を有し、LCST以下の温度では均一混合、LCST以上の温度では二相分離する。水／ルチジンの均一溶液をLCST以上に加熱すると、相分離によってルチジン（組成によっては水）の液滴が生成するが、その際に乳化剤を添加しておくと、エマルションが生成されることが報告されている[1)]。しかしながら同様の温度に依存した相挙動を示す系は極めて限られており、例えば水と炭化水素の混合物など、一般的に乳化の対象とされる実験系には適用できない。

筆者の所属する国立研究開発法人海洋研究開発機構は、有人調査潜水船「しんかい6500」（図２）に代表される深海調査ファシリティーを運用して、主として海底資源、気候、地震、ならびに生物に関する研究を行っている。地球上の水の97%は、地球表面の約70％を占める海洋に存在

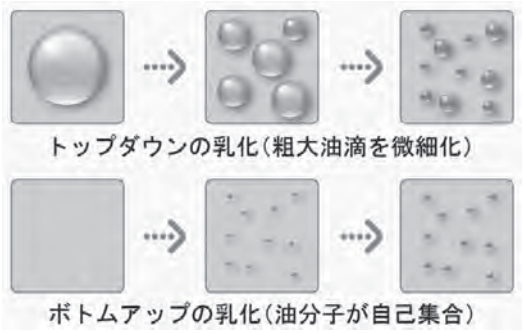


図１　トップダウン（上）とボトムアップ（下）による微細油滴の生成

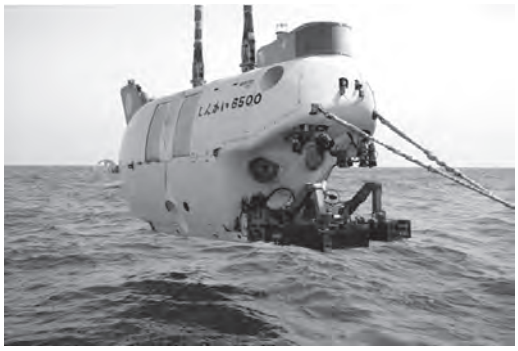


図２　有人調査潜水船「しんかい6500」

*

Comparison of Top-down and Bottom-up Process for Preparing Nanoemulsions

Shigeru Deguchi*, Keigo Kinoshita

R&D Center for Marine Biosciences, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology

する。海洋の全球平均深度は3,800メートルであり、その内水深200メートル以深が深海と呼ばれる。水深10メートルごとに水圧は0.1 MPa（1気圧が0.1 MPaに相当）ずつ上昇するため、世界最深部（マリアナ海溝、チャレンジャー海淵、水深約11,000メートル）での水圧は約110 MPaに達する。また太陽光は水深200メートルまでしか届かないため、深海は常に暗黒の世界で、水温も2－4℃に保たれている。ところが深海には例外的に超高温環境も存在する。熱水噴出孔と呼ばれる、深海底から湧き出す温泉である（図3）。地上と比べて深海底は熱源である地下のマグマ溜りに近いため、熱水噴出孔から吹き出す水の温度は極めて高い。2008年に大西洋中央海嶺で発見された熱水噴出孔では、臨界点（臨界温度：374℃、臨界圧力：22.1 MPa）を超えた超臨界状態の水が噴出している[2)]。

我々は高温・高圧の極限である超臨界水の性質に着目し、従来法とは根本的に異なる原理に基づく「ボトムアップ」のナノ乳化手法を確立した[3)]。超臨界水は我々が良く知る常温・常圧の水とは著しく異なる特性を示す。例えば

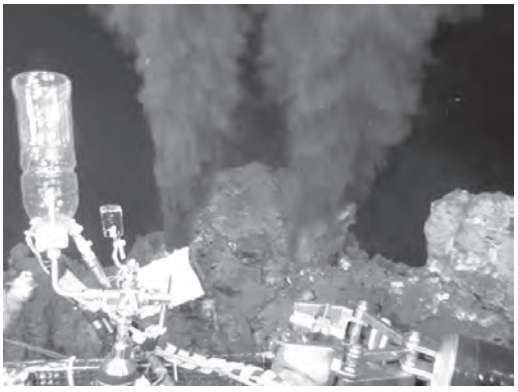


図3　南部マリアナトラフ・うらしま熱水域（水深2935メートル）で発見された熱水噴出孔。勢いよく噴き出す黒色の熱水の最高温度は270℃

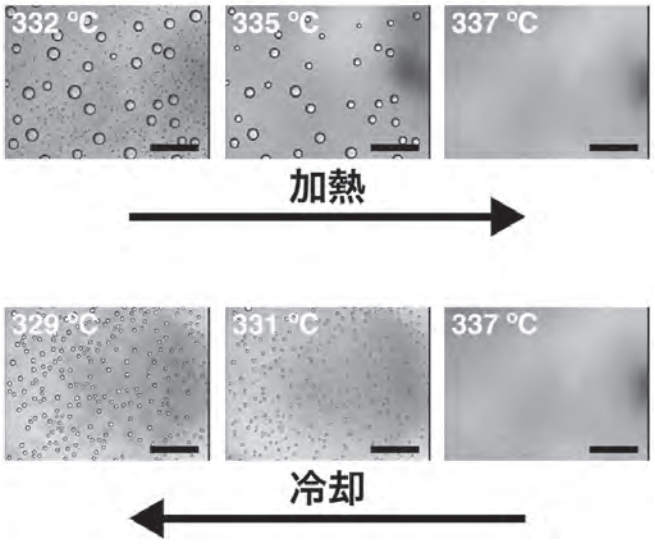


図4　MAGIQのコンセプトを示す高温・高圧顕微鏡像。250気圧でドデカン／水混合物を観察

物質の極性の指標となる比誘電率を例にとると、常温・常圧での水の比誘電率は80前後と液体としては極めて高い値を示すが、超臨界状態では2と炭化水素と同じ値にまで減少する[4)]。そのため超臨界状態の水は様々な油を分子レベルで溶解することができる[5)]。MAGIQ（Monodisperse nAnodroplet Generation In Quenched hydrothermal solution）と呼ばれる我々が確立した乳化手法は、油と超臨界水の均一溶液を調製した後、室温まで200℃／秒を超える速度で冷却して急激に相分離を誘起することによって、油分子を自己集合させて微細油滴を生成する（図4）。独自に開発した流通型の装置を用いて1体積パーセントのドデカンを水に乳化した実験では、10秒以内という極めて短い時間で平均直径61 nmのサイズの揃った油滴を分散したナノエマルションを生成できた[3)]。また超高温での加熱時間を数秒に抑えたことで、ドデカンの熱分解も1％以下に抑えられていた[3)]。

本申請課題では、同一組成の試料を用いて高圧乳化とMAGIQの2つの異なる手法で乳化を行い、得られたエマルションの油滴サイズや分布を比較検討することで、ナノエマルション調製におけるトップダウン手法とボトムアップ手法との違いの明確化、さらにはボトムアップでのナノ油滴生成メカニズムを解明することを目的として研究を行った。

2．実　験

ドデカン／水系をモデルとして、従来のトップダウン手法とボトムアップのMAGIQの2つの異なる方法でエマルションを調製し、得られた油滴のサイズと分布を比較・検討した。乳化剤にはBrij 97（polyoxyethylene（10）oleyl ether）、Brij 98（polyoxyethylene（20）oleyl ether）、Tween 20（polyoxyethylene（20）sorbitan monolaurate）、Tween 80（polyoxyethylene（20）sorbitan monooleate）の4種の非イオン性界面活性剤を用いた。

トップダウンの乳化には、予め撹拌機（Heidolph社製RZR 2051、半月型撹拌翼を装着）を用い、500 rpmで3分間処理したプレエマルションを高圧ホモジナイザー（GEA Niro Soavi社製Panda PLUS 2000）を用い、25 MPaの圧力条件で20パスの処理を行った。MAGIQによる乳化は、図5に示す流通型の装置を用いて、25 MPaの一定圧力下で行った。予熱コイルによって加熱した水にドデカンを注入した後、404～440℃に保たれた混合管の内部で約4.5秒間加熱することによって均一溶液を得た。その後、乳化剤の冷水溶液と混合するとともに冷却コイルも併用して溶液を急冷し、相分離を誘起してナノ油滴を生成した。

油滴サイズの測定は動的光散乱法（大塚電子㈱製FPAR-1000）を用いて25℃で行った。また動的表面張力測定は、九州大学 瀧上研究室にて懸滴法を用いて行った。

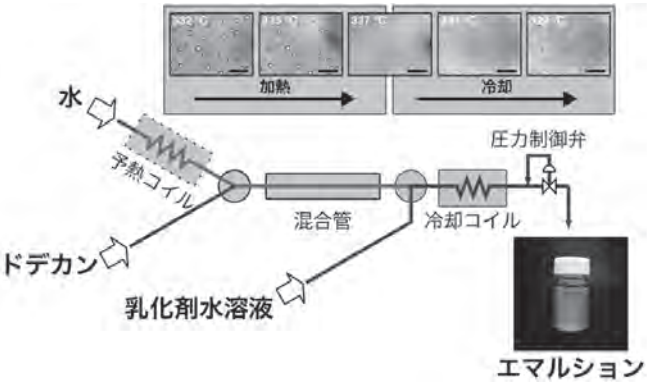


図５　MAGIQ によるナノエマルション調製のための流通型装置

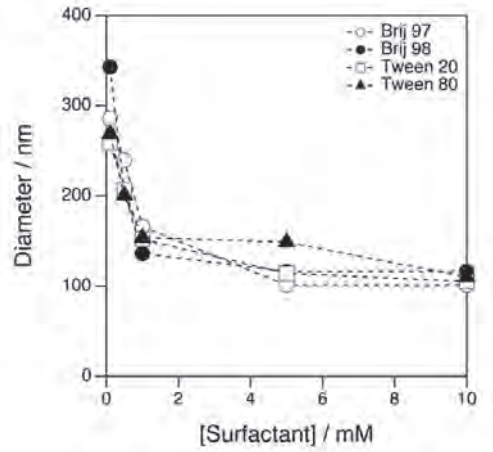


図６　高圧ホモジナイザーを用いて調製したナノエマルション中の油滴サイズ

得られた結果をFilippovらの理論[5]を用いて解析し、吸着の緩和時間を求めた。

３．結　果

３．１．高圧ホモジナイザーによるトップダウンのナノエマルション調製

高圧ホモジナイザーを用いて、界面活性剤の濃度を様々に変えながら１体積％のドデカンを乳化した結果を図６に示す。

１mM以下の低濃度の界面活性剤濃度の添加時には、油滴サイズは活性剤濃度の増加とともに急激に低下した。界面活性剤濃度とともに水／ドデカン界面の界面張力が低下しラプラス圧が減少した結果、油滴の微細化が促進されたものと考えられる。ところが界面活性剤濃度が１mM以上になると、得られた油滴のサイズは120 nm前後と一定の値となり、界面活性剤濃度にはあまり依存しなかった。また界面活性剤の種類は、いずれの界面活性剤濃度範囲においても生成する油滴のサイズに大きくは影響しなかった。

緒言にも述べたように、トップダウンの乳化で油滴の微細化を進めるためには、油滴内外の圧力差（ラプラス圧）に打ち勝つだけのエネルギーを外部から投入する必要がある。ラプラス圧は油滴サイズに反比例するため、油滴サイズが小さくなるにつれて困難となる。図６の結果は、油滴サイズが120 nm前後にまで低下すると、高圧ホモジナイザーで投入されるエネルギーに対してラプラス圧が大きくなりすぎ、それ以上の油滴の微細化が進行しないことを示している。換言すると、トップダウンでのナノエマルションの生成では、投入するエネルギーの大きさが最終的な油滴サイズを決定する一義的な要因となっていると解釈できる。

３．２．MAGIQによるボトムアップのナノエマルション調製

高圧ホモジナイザーを用いた場合とは全く異なり、MAGIQによって調製した油滴のサイズは用いた界面活性剤の種類に強く依存した（図７）。乳化剤としてBrij 97とTween 80を用いた場合には、得られた油滴の最小サイズは、高圧ホモジナイザーを用いた場合よりも小さかった。例えば５mMのBrij97を用いた場合、高圧ホモジナイザーで得られた最小の油滴直径は100 nmであったのに対し、MAGIQでは直径61 nmの油滴が得られた。乳化剤としてBrij 98を用いた場合には、得られた油滴の最小サイズは調製方法によらず同じであった。一方、乳化剤にTween 20を用いた場合には、MAGIQで得られた油滴のサイズは高圧ホモジナイザーを使った時よりも大きかった。

３．３．動的表面張力と油滴のサイズ

ボトムアップのMAGIQで得られた結果（図７）を詳細に検討したところ、油滴サイズと界面活性剤のHydrophilic-Lipophilic Balance（HLB）との間に良好な相関を見出した（図８）。より具体的には乳化剤に用いた界面活性剤のHLBが小さいほど油滴サイズも小さくなることがわかった。HLBは、乳化の際に適切な界面活性剤を選定する指標として広く用いられている。疎水性の高い界面活性剤ほど小さなHLBを有することから、乳化剤として用いた界面活性剤の疎水性が高いほど、小さな油滴が得られることを定性的に示す結果である。

しかしながらHLBの科学的な意味は明確ではない。そこでMAGIQにおける油滴生成メカニズムに関する知見を得るために、動的表面張力に着目した。動的表面張力は、界面活性剤溶液中で新しく形成された油／水界面に、界面活性剤が吸着することによって起こる界面張力の低下を経時的に測定して得られるものであり、界面活性剤分子の濃度、拡散係数、疎水性／親水性のバランス、ミセル中での滞在時間など、様々な複合的要因を総合的に含めて界面への界面活性剤分子の吸着ダイナミクスを評価する指標として利用できる。

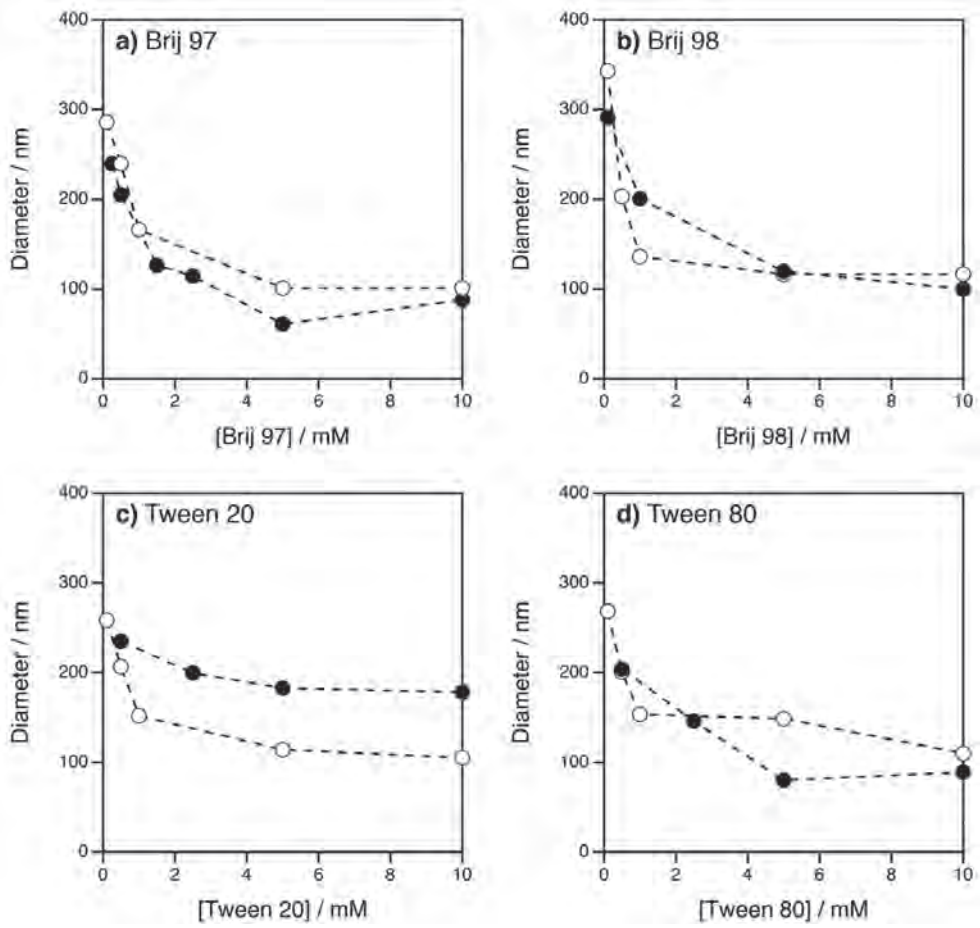


図７　異なる界面活性剤を使用してトップダウン（○）とボトムアップ（●）で調製したナノエマルション中のドデカン油滴のサイズ

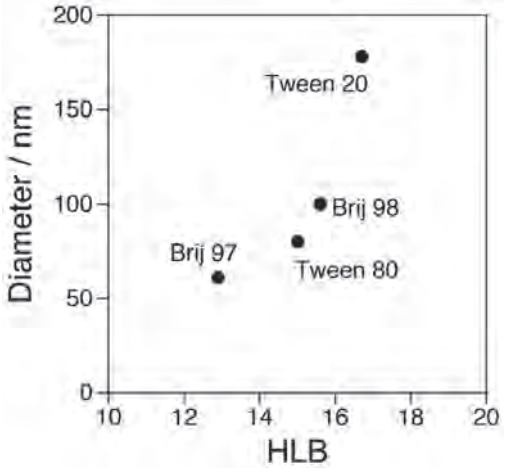


図８　界面活性剤の HLB と MAGIQ で調製した油滴サイズとの相関

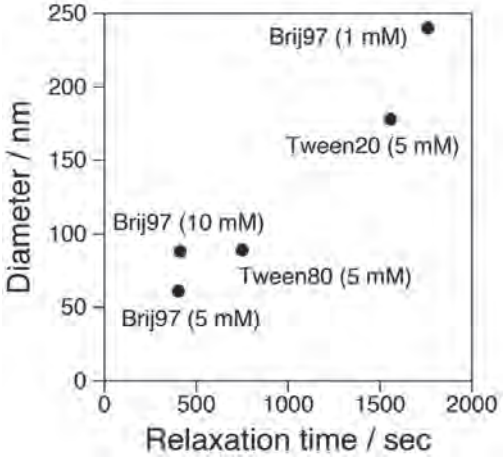


図９　動的界面張力と MAGIQ で調製した油滴サイズとの相関

実験に用いた界面活性剤の水／ドデカン界面での動的表面張力測定を行い、吸着の緩和時間を求めた後、MAGIQ で得られた油滴のサイズと比較したところ、吸着の緩和時間が短いほど、すなわち水／ドデカン界面への吸着が速い界面活性剤を用いたときほど、生成される油滴のサイズが小さくなることがわかった（図 9）[7]。

4．考　察

トップダウンの乳化では、最終的に得られる油滴のサイズは、外部から加えるエネルギーと水／油の界面張力で決定される。一方、油分子の自己組織化によってボトムアップで油滴を生成する MAGIQ では、得られる油滴のサイズ

を決定する因子は大きく異なると予想される。またトップダウンの乳化では、乳化剤には1）水／油界面に吸着して界面張力を低下させる、2）生成した油滴を安定化する、の2つの役割があるのに対し、MAGIQでの油滴生成は相分離によって進行するため、乳化剤の機能は油滴の安定化のみとなる。図6と図7の結果は、2つの異なる乳化手法での油滴生成メカニズムや乳化剤の役割の違いを反映したものと考えられる。

MAGIQによるボトムアップの油滴生成を説明する最も単純なメカニズムは、油／水均一溶液を急冷した際に「相分離によって微細油滴が生成され、その表面に界面活性剤が吸着することで安定化される」というものである。これに従えば、MAGIQで生成される油滴のサイズは添加する界面活性剤の濃度や種類には依存しないはずである。ところが図7に示した1体積％のドデカンをMAGIQによって水に乳化した実験では、油滴サイズは活性剤の濃度や種類に大きく依存した。そこで我々は、現在、ドデカンと水の均一溶液を急冷して相分離を誘起した際に、スピノーダル分解によって1次油滴が生成した後、

1）1次油滴の合一による油滴の成長

2）表面へ吸着した界面活性剤分子による油滴の安定化

の2つのプロセスが同時進行し、最終的に安定なナノ油滴が生成されるという新たなメカニズムを考えている。このメカニズムに従えば、最終的な油滴のサイズは2つのプロセスのダイナミクスのバランスで決定される。

本研究によって、図9に示したように、油／水界面への界面活性剤の吸着速度がMAGIQによって生成される油滴のサイズを支配していることが明らかとなった。さらに合一による油滴の成長速度は乳化する油の量に依存すると考えられるが、エマルション中の油の量が一定であっても界面活性剤の濃度や種類によって生成されるナノ油滴のサイズが大きく変化した図7の結果をも考慮すると、水／油界面への界面活性剤分子の吸着ダイナミクスこそが、MAGIQによって生成される油滴のサイズを決定する支配的要因だと推察される[7)]。

5．総　括

油／界面活性剤／水の相挙動を利用した転相乳化などの乳化など、ナノエマルションの調製に向けた様々な手法が確立されてきた。しかしながら従来の手法は系の組成に強く依存するなど、汎用性には乏しい。一方、超臨界水はメタンからイコサンまでの直鎖炭化水素、スクアランに代表される分岐炭化水素など多様な油を溶解するため、MAGIQは高い汎用性を有すると期待される。さらには酸素、水素、窒素などの無極性ガスも超臨界水には自由に相溶することから、ナノバブル製造などへの応用も可能である。MAGIQは、この他にも1）乳化に要する時間が短い、2）流通型の装置を使用するためスケールアップが容易、3）乳化剤選択の幅が広いなどの特長も有する。その一方で、MAGIQによる乳化機構、中でも最も重要な油滴生成メカニズムに関する基礎的知見はほとんど得られていなかった。

今回の研究によって、油と水の均一溶液の相分離時によって1次油滴が生成した後、合一による油滴の成長と界面活性剤分子による油滴の安定化という2つのプロセスが同時進行して、最終的に安定なナノ油滴が生成されるというメカニズムを強く支持する結果を得ることができた。さらに2つのプロセスの内、後者が油滴サイズを決定する支配的要因であることもわかった。そのためMAGIQでは、従来のトップダウンの乳化では考慮されてこなかった動的表面張力、すなわち界面活性剤の水／油界面への吸着速度が、生成される油滴のサイズを決定する上で大きな役割を果たしていることが明らかとなった。今後、MAGIQを用いた様々な研究開発を行う際に、乳化剤選定の指針となりうる重要な知見である。

MAGIQでの乳化に用いる乳化剤の選定では、調製したエマルションの保存安定性への取り組みも必要である。例えば、5 mMのBrij 97を、直径61 nmのドデカン滴を含むナノエマルションを調製できるが、得られたエマルションの保存安定性は十分に高いというわけではなく、室温で1週間程度放置すると、オストワルド熟成によって油滴サイズが200 nm前後にまで増加する。今後は、油滴の微細化と保存安定性の向上を両立できる乳化剤の検討も進めていく予定である。

エマルションは熱力学的に不安定な系であるため、生成経路によって生成物が大きく異なる。極端な場合には、油に水を加えた場合と、水に油を加えた場合でも、生成するエマルションが異なる。これが「乳化はサイエンスではなくアートである」と言われる所以である。従来プロセスとは根本的に異なる原理で乳化を行うMAGIQは、化粧品の製造はもちろんのこと、ナノ乳化を必要とする様々な産業分野で利用されることが期待されるが、高温・高圧の超臨界水を取り扱うための特殊な機器を必要とすることが技術の普及に向けた大きなボトルネックであった。そこで我々は、高温・高圧機器の専業メーカーである株式会社AKICOと共同で、高温・高圧機器の取り扱いに関する特別な専門知識がなくてもMAGIQを安全に利用できるナノエマルション製造装置の開発を進めている。2016年3月に販売開始を予定している装置は、サイズも1300W × 750D × 1600H（mm）と、家庭用冷蔵庫1台半ほどの大きさに収まっている。これを契機としてMAGIQの普及が進むと期待している。

（引用文献）

1） Herzig E M, White K A, Schofield A B, Poon W C K, Clegg P S, : Bicontinuous emulsions stabilized solely by colloidal particles, Nature Mater., 6, 966–971, 2007.

2） Koschinsky A, Garbe-Schönberg D, Sander S, Schmidt K, Gennerich H-H, Strauss H, : Hydrothermal venting at pressure-temperature conditions above the critical point of seawater, 5° S on the Mid-Atlantic Ridge, Geology, 36, 615–618, 2008.

3） Deguchi S, Ifuku N, : Bottom-up formation of dodecane-in-water nanoemulsions from hydrothermal homogeneous solutions, Angew. Chem. Int. Ed., 52, 6409–6412, 2013.

4） Deguchi S, Tsujii K, : Supercritical water: A fascinating medium for soft matter, Soft Matter, 3, 797–803, 2007.

5） Brunner E, : Fluid mixtures at high pressures IX. Phase separation and critical phenomena in 23 (n-alkane + water) mixtures, J. Chem. Thermodyn., 22, 335–353, 1990.

6） Filippov L K, Filippova N L, : Dynamic surface tension and adsorption kinetics from micellar solutions on planar surfaces, J. Colloid Interface Sci., 187, 304–312, 1997.

7） Kinoshita K, Ishiwata D, Kondo Y, Takiue T, Deguchi S, : Importance of Adsorption Dynamics of Surfactants in Bottom-up Formation of Dodecane-in-Water Nanoemulsions by MAGIQ, in preparation.

コスメトロジー素材に向けてのアロエ*C*-グリコシルクロモン類の高機能化

神戸大学大学院理学研究科
林　昌彦

Isolation and determination of structure of acacetin-7-*O*-β-D-galactopyranoside, a natural flavonoid isolated from flower heads of *Chrysanthemum morifolium*, has been reported in 1994. We achieved the total synthesis of compound acacetin-7-*O*-β-D-galactopyranoside by employing a one-pot synthesis of the aglycon. The key reactions in this approach include the modified Baker-Venkataraman reaction and regio- and stereoselective *O*-glycosylation. Furthermore, we synthesized 3-feruloyl-γ-quinide and examined the glycosidation using 1-fluoro sugar.

1．緒　言

フラボノイド類は自然界、特に植物界に多く存在し、現在7000種を超える報告がある。フラボノイドの基本骨格は図1のように示される[1)]。

フラボノイドの中には糖と結合した配糖体の形で存在するものも多く、*O*-グリコシドあるいは*C*-グリコシドの形で存在する。*O*-グリコシドの代表として、グアイヤベリン、チュリパニン、アピゲニン4' -グリコシドおよびアカセチン-7-β-D-ガラクトピラノシドの構造を図2に示す。

一方、*C*-グリコシドには、ビテキシン、イソビテキシン、オリエンチン、マンギフェリンなどが知られている(図3)。

一般にフラボノイドのようなポリフェノール類は抗酸化作用がある。さらに配糖化することによって非糖化合物単体に比べ生体への吸収効率が高く、生理活性が高くなる。さらに、単体の糖、あるいは非糖化合物にはない生理活性を獲得できる可能性もある。そこで、本研究では、コスメトロジー素材に向けてフラボノイドの配糖化研究を行った。

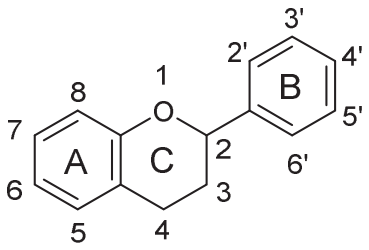


図1　フラボノイドの基本骨格

High performance of alone *C*-glycosyl chromone towards cosmetology
Masahiko Hayashi
Graduate School of Science, Kobe University

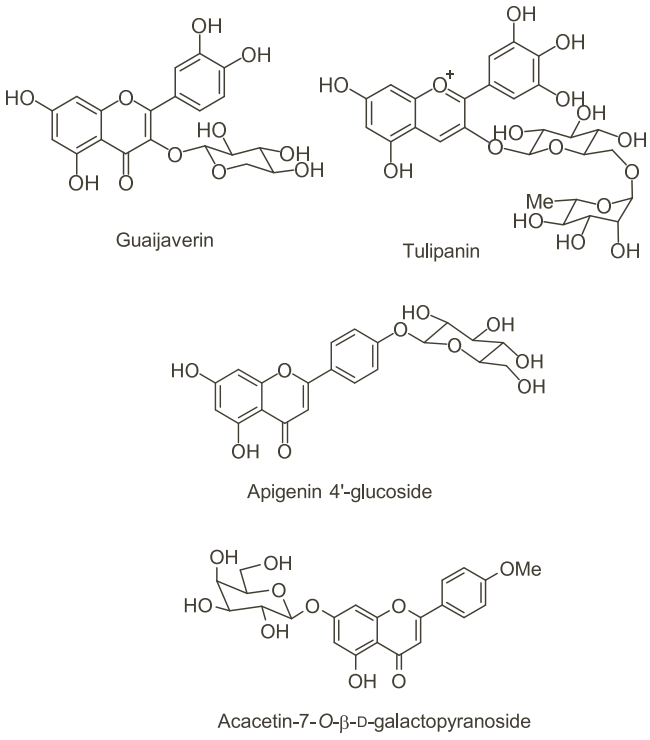


図2　代表的なフラボノイド*O*-グリコシドの構造

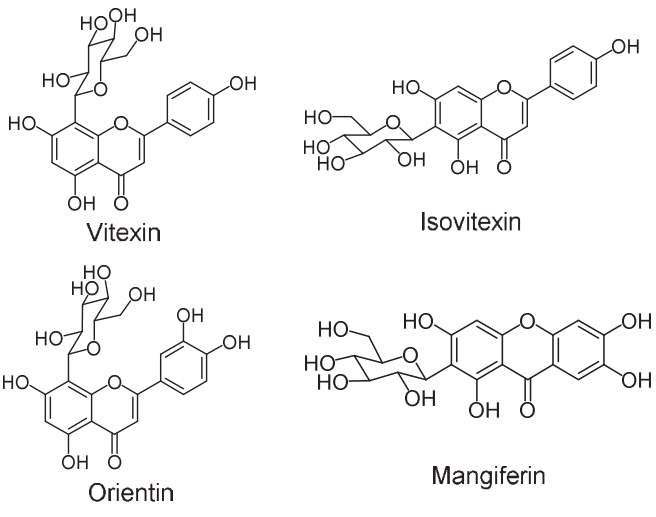


図3　代表的なフラボノイド*C*-グリコシドの構造

2. 実　験

まず、代表的なフラボノイドO-グリコシドとしてアカセチン-7-β-D-ガラクトピラノシドの合成を行い、次に、これまでに配糖化の報告例のない3-フェルロイル-γ-キニドの合成および、そのモデル化合物の配糖化実験を行った。

3. 結果および考察

3. 1. アカセチン-7-β-D-ガラクトピラノシドの合成

アグリコン部分は改良型Baker-Venkataraman転位反応[2,3]を用いて式1の方法で合成した。

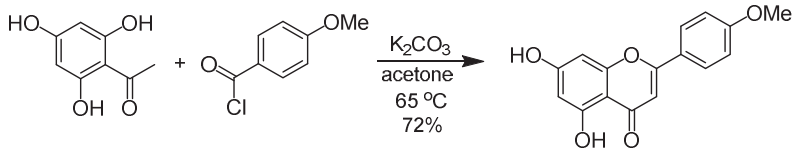
次に、配糖化の際に、グリコシル供与体として用いる1-フルオロ糖はHF-ピリジンあるいはDASTを用いて調製した(式2および表1)[4]。

種々のルイス酸触媒を用いて配糖化を検討した結果、表2、エントリー4に示したように、グリコシル供与体としてβ-ガラクトピラノシドを用い、塩化メチレン中、ルイス酸として三フッ化ホウ素を用いた場合に、収率78%、α/β=3:97で目的とする配糖化生成物が得られた。最後に、アセチル基を脱保護し、アカセチン-7-β-D-ガラクトピラノシド(図4)の合成を完了した(式3および表2)。

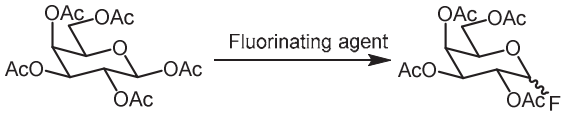
天然から得られたもの(文献5)と今回合成した化合物の物性値を表3にまとめる。天然からでは未報告の物性も今回の合成品で明らかにできた。

3. 2. 3-フェルロイル-γ-キニドの合成

Hofmannらの方法[6]を参考に、適宜改良を加えながら、スキーム1の方法で、3-フェルロイル-γ-キニドを合成した。



式1

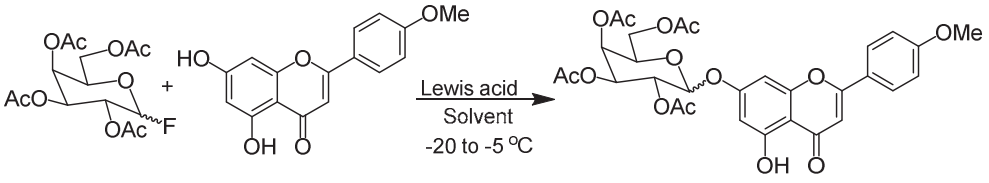


式2

Table 1　Fluorination of *O*-pentaacetylated-α-D-galactopyranoside

Entry	Fluorinating agent	Solvent	Yield (%)[a]	α/β[b]
1	70% HF-pyridine	No solvent	82	96/4
2	DAST	CH_2Cl_2	87	67/33

[a] Isolated yield. [b] Determined by ^{1}H NMR analysis.



式3

Table 2　Glycosidation using lewis acid catalyst

Entry	Anomeric config. of 1-F sugar	Solvent	Lewis acid	Yield (%)[a]	α/β[b]
1	α	CH_2Cl_2	$BF_3.Et_2O$	68	12:88
2	α	CH_2Cl_2	$SnCl_4$	64	16:84
3	β	CH_2Cl_2	$ZnCl_2$	76	4:96
4	β	CH_2Cl_2	$BF_3.Et_2O$	78	3:97
5	α and β (1:1)	CH_3CN	$ZnCl_2$	69	8:92

[a] Isolated yield after column chromatography. [b] Ratio was determined by ^{1}H NMR analysis.

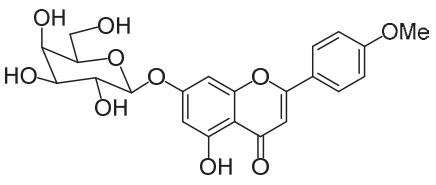
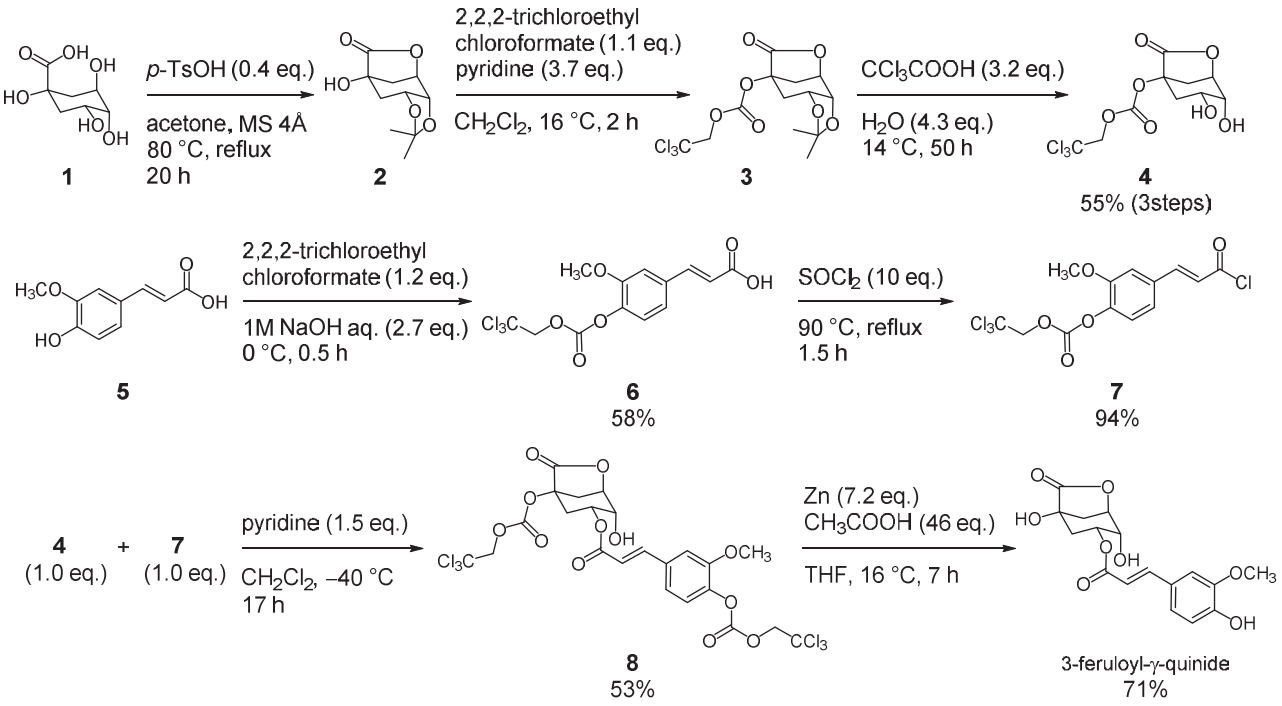


図4

Table 3　Comparison between the spectral data of acacetin-7-*O*-β-D-galactopyranoside obtained from natural sources and synthetic acacetin-7-*O*-β-D-galactopyranoside.

Parameter	Natural product[2]	Synthetic product
Mp (°C)	254 – 256	251 – 254
$[\alpha]_D^T$	Nd	+32.37 (*c*1.0 $CHCl_3$)
MS (*m/z*)	446 (M^+)	446.87 $(M+H)^+$
IR (cm^{-1})	Nd	1595, 1645, 2930
Elemental analysis	Nd	Anal. Calcd for $C_{22}H_{22}O_{10}$: C, 59.19; H, 4.97. Found: C, 58.98; H, 4.78.
^1H NMR (DMSO)	δ 8.04 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-2`, 6`), 7.14 (2H, d, *J* = 8.0 Hz, H-3`, 5`), 6.97 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 6.86 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6), 6.44 (1H, s, H-3), 5.1 – 3.2 (m, galactosy), 3.86 (3H, s, OCH_3, 4`).	δ 8.04 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-2`, 6`), 7.14 (2H, d, *J* = 9.2 Hz, H-3`, 5`), 6.97 (1H, s, H-8), 6.86 (1H, s, H-6), 6.49 (1H, s, H-3), 5.7 – 3.7 (m, galactosy), 3.41 (3H, s, OCH_3, 4`).
^{13}C NMR (DMSO)	Nd	δ 22.51, 38.87, 40.13, 55.31, 113.38, 129.34, 161.58, 167.45, 171.53.

Nd = No data.



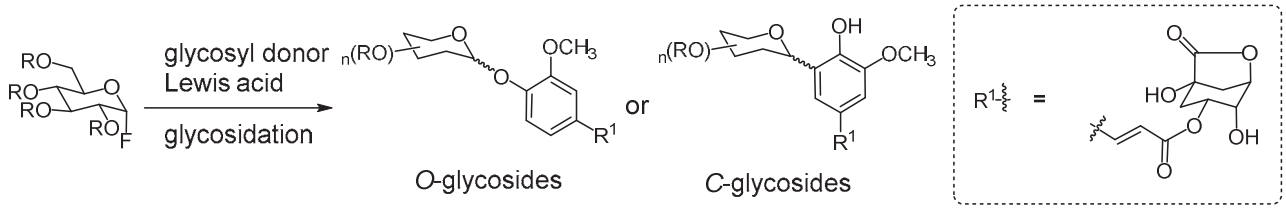
Scheme 1

3. 3. 3-フェルロイル-γ-キニドのモデル化合物の配糖化実験

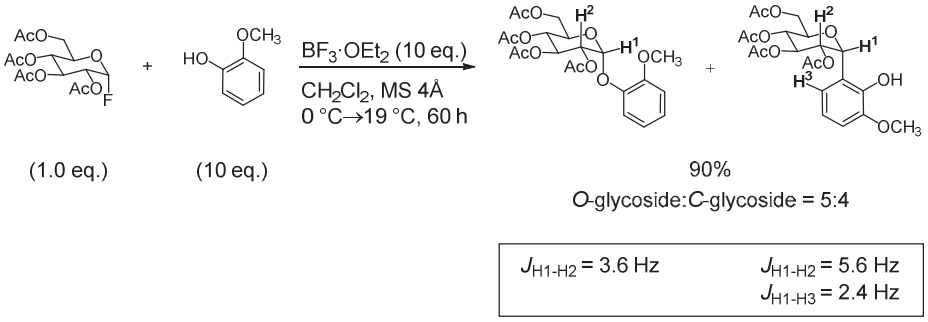
3-フェルロイル-γ-キニドの配糖化(グリコシル化反応)を行うにあたり、下に示すスキーム2からアグリコンとして*o*-メトキシフェノールをモデル化合物としてグリコシル化反応の検討を行った。

その結果、*O*-グリコシドと*C*-グリコシドが5：4の比率で合計収率90%で得られた。*O*-グリコシド、*C*-グリコシドいずれもα体のみが得られた。

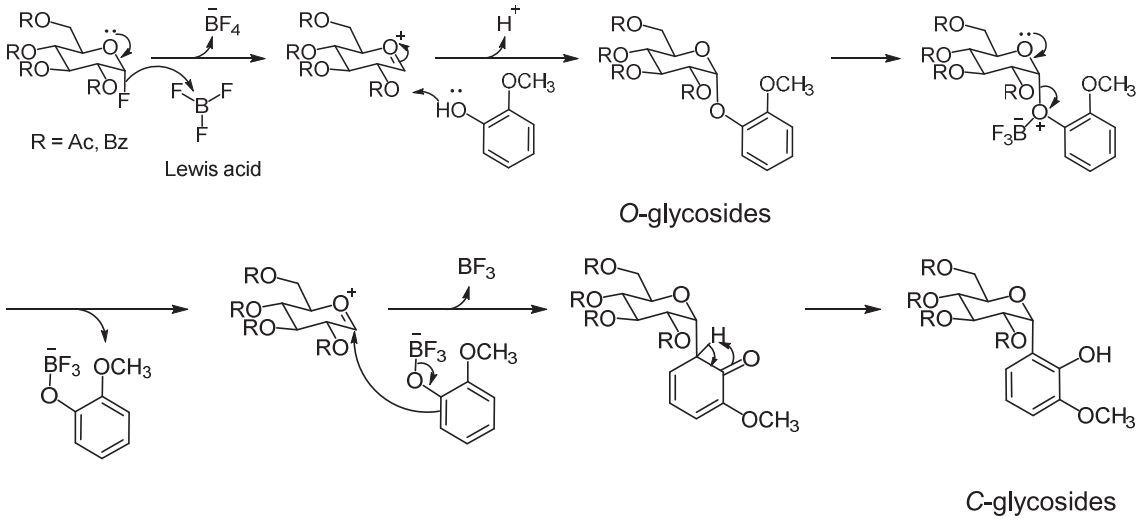
ここで、*O*-グリコシドと*C*-グリコシドが得られた理由は次のように説明できる。ルイス酸である三フッ化ホウ素が1-フルオロ糖を活性化し、生じたオキソカルベニウムイオンに対してフェノールのヒドロキシ基が求核攻撃をし、まず、*O*-グリコシドが生成する。三フッ化ホウ素はこのフェノキシドも活性化し、アノメリック炭素(C)とフェノキシドの酸素(O)結合を切断し、オルト位のベンゼン環上の炭素が求核攻撃をすることによって、*C*-グリコシドが生成する(スキーム3)。



Scheme 2



式4



Scheme 3

4. 総　括

本研究によりフラボノイド配糖体のうち*O*-グリコシドの一つアカセチン-7-β-D-ガラクトピラノシドの立体選択的全合成を達成した。さらに、3-フェルロイル-γ-キニドの合成およびそのモデル化合物の配糖化実験を行った。今後、身体および環境にやさしいこれらのフラボノイド配糖体がコスメトロジー素材として利用されることを期待している。

謝　辞

本研究は公益財団法人コスメトロジー研究振興財団のご援助により遂行することができました。深く感謝申し上げます。

(引用文献)

1）武田幸作、齋藤規夫、岩科司,:植物色素フラボノイド, 文一総合出版, 2013.
2）Baker, W. *J. Chem. Soc.*, 1381-1389 (1933).
3）Mahal, H. S.; Venkataraman, K. *J. Chem. Soc.*, 1767-1771 (1934).
4）Hashimoto, S.; Hayashi, M.; Noyori, R. *Tetrahedron Lett.*, ***25***, 1379-1383 (1984).
5）Hu, C.-Q.; Chen, K.; Shi, Q.; Kilkuskie, R. E.; Cheng, Y.-C; Lee, K.-H. *J. Nat. Prod.*, ***57***, 42-51 (1994).
6）Frank, O.; Zehentbauer, G.; Hofmann, T.; *Eur. Food Res. Technol.* ***222***, 492-508 (2006).

明るい環境でより鮮やかに着色する有機材料の開発

東京工業大学大学院理工学研究科
平田　修造

We show that hydroxyl steroidal matrices embedding properly designed aromatic molecules as acceptors and transition-metal complexes as donors exhibit high RSA on exposure to weak incoherent light at room temperature and in air. Accumulation by photosensitization of long-lived room-temperature triplet excitons in acceptors with a large triplet–triplet absorption coefficient allows a nonlinear increase in absorbance also under low-power irradiation conditions. As a consequence, continuous exposure to weak light significantly decreases the transmittance of thin films fabricated with these compounds. These optical limiting properties may be used to protect eyes and light sensors from exposure to intense radiation generated by incoherent sources and for other light-absorption applications that have not been realized with conventional RSA materials.

1．緒　言

非線形吸収現象とは、材料に入射する光の強度が変化すると材料の吸収効率が変化する現象のことを指す[1)]。これまでにカーボンブラック[2, 3)]、フラーレン[4, 5)]、金属フタロシアニン[6-8)]、カーボンナノチューブ[9-13)]、金属ポルフィリン[14-16)]、共役系高分子[17, 18)]、半導体ナノ粒子[19-22)]、金属ナノワイヤー[23)]、白金ビスアセチリド[24-27)]、グラフェン[28-33)]などで大きな非線形吸収特性を示す分子や材料が報告されてきた。しかし、従来このような非線形吸収現象は大型で高額なレーザーからの強いパルス光によってのみ瞬間的に生じる現象であった[27)]。それゆえ、このような材料の用途は一部の研究室の光学的用途に限定され、一般消費者に広く使われてこなかった。もし太陽光や発光ダイオードのような弱い非コヒーレントな連続光からの光照射で大きな非線形吸収現象が生じる材料が開発されれば、そのような材料は一般消費者が広くその機能を扱うことができるようになる。例えば、太陽光などの白色光の照射強度が増加すると、吸収効率が上昇するような材料が構築できれば、室内では発色が目立たないが、外の日差しが強い環境では色が濃くなるような材料の構築となる。このような材料は新しい色剤としての可能性を秘めている。

我々はこれまでの研究でヒドロキシステロイドに軽原素のみからなる平面性芳香族化合物をゲストとしてドープすると、ゲストの励起三重項状態（T_1）の寿命が通常の1000倍以上の1秒以上にまで増加することを見出している[34, 35)]。

Large nonlinear absorption under weak continuous incoherent light

Shuzo Hirata
Department of Organic and Polymeric Materials, Tokyo Institute of Technology

このホストゲスト材料では、ゲストに対しての励起光の照射強度を強めていくと、ゲストのT_1の寿命が長いために、ゲストのT_1が材料中に蓄積されていくと考えられる。もしこのゲストのT_1状態が基底状態よりも大きな吸光係数を示せば、照射強度の増加とともに吸収効率が増加すると考えられる。

本課題では室内のような弱い白色光下で薄い着色状態を示し、日差しの強い太陽光下（10 mW/cm^2）では瞬時にその色が濃くなり、再び弱い白色光に戻った際に数秒で薄い色の状態に戻る素材の開発を目的とした。

2．実　験

2．1．非コヒーレント光照射下での励起子の蓄積を確認するための実験

まずヒドロキシステロイドに芳香族ゲストをドープした材料に関して、ゲストが吸収する波長の弱い光を照射した場合に、ゲストの三重項励起子が蓄積されるのかを確認するために以下の実験を行った。

図1に用いた芳香族ゲストおよびヒドロキシステロイドの構造を示す。本実験では0.3 wt%の芳香族ゲストをヒドロキシステロイドの1つであるβ-estradiolにドープしたホストゲスト材料を作成した。具体的には図1に示す構造の芳香族ゲストを200℃で融解したβ-estradiolに入れ、溶

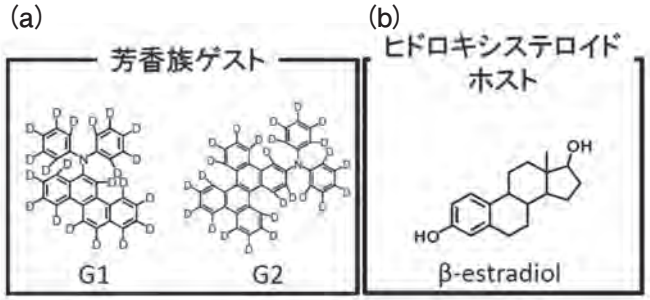


図1　三重項励起子の蓄積の確認のために用いた材料の構造式
(a) ゲスト分子　(b) ホスト分子

解させた後、その融液をガラス基板上に滴下し、もう一枚のガラス基板と挟みこみ、その後室温まで急冷することで、２枚のガラス基板の間に非晶状態のホストゲスト材料の薄膜が挟まれた状態の試料を得た。図１のG1をゲストとして用いたサンプルをサンプルA、G2をゲストとして用いたサンプルをサンプルBとする。

次に、図２に示す測定系を用いてサンプルAもしくはサンプルBに励起光を照射する時（図２(a)）と照射しない時（図２(b)）の可視光境域の透過率を測定した。この際励起光の照射パワーを変化させ、それぞれに対して試料の可視域の透過率を測定した。

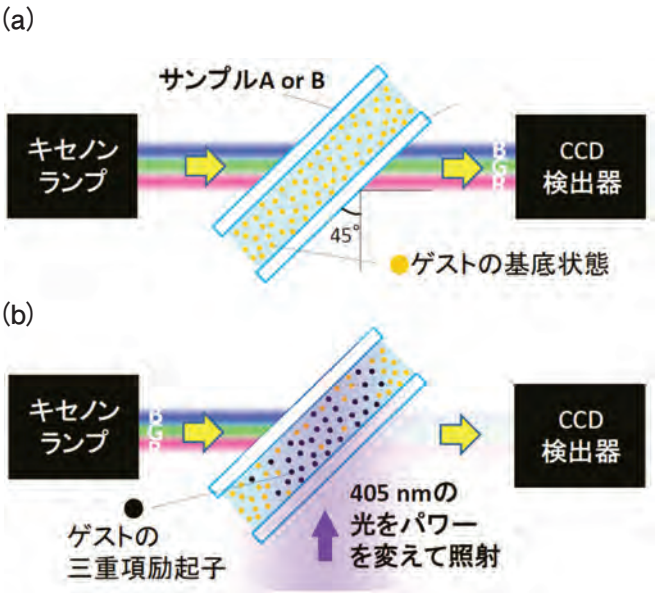


図２　三重項励起子の蓄積の確認のために用いた評価光学系の模式図　(a)励起光を照射しない時　(b)励起光を照射した時

２. ２. 非線形吸収特性を確認するための実験

非線形吸収機能を構築するために、図３(a)に示すようにドナー（D）とアクセプター（A）をゲストとしてβ-estradiolにドープした材料を提案した。その材料中に用いた化合物の構造を示す。本実験では１wt%のDと５wt%のAをヒドロキシステロイドの１つであるβ-estradiolに

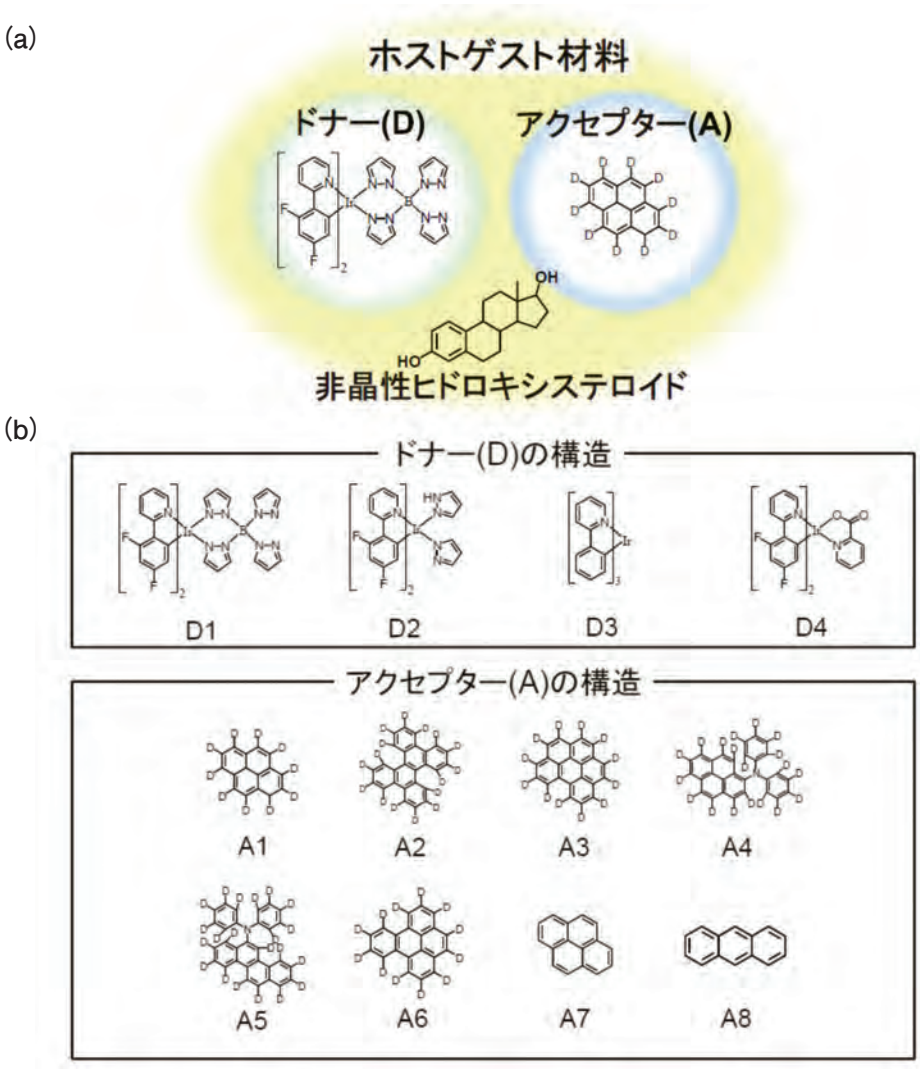


図３　用いた材料の概要(a)およびDとAの化学構造(b)

ドープしたホストゲスト材料を作成した。具体的には図3（b）に示す構造のDとAをそれぞれ200℃で融解したβ-estradiolに入れ、溶解させた後、室温まで急冷することで、非晶状態のホストゲスト材料の粉末を得た。

次に図4（a）に示す測定システムを構築し、上記ホストゲスト材料の粉末を積分球に入れて、拡散反射法により吸光度を測定した。まずキセノンランプからの光に含まれる紫外線をロングパスフィルターでカットし、白色光のみを積分球中の材料粉末に絞って照射し、材料粉末から反射された光を積分球で拡散させて検出器であるCCDに入れて検出した。次に、材料を入れずに同様の測定を行いベースとなる反射光を測定した。この2つの差を考えることで、材料の吸光度を算出した。

次に上記材料の薄膜を2枚のガラス基板中で挟み込んだ素子を作製した。その薄膜を図4（b）の光学系にセットし、半導体レーザーからの405 nmの光をその薄膜に照射し、その強度をNDフィルターで増加させながら薄膜の透過率を測定した。またその際の吸収スペクトルの変化を重水素キセノンランプとCCDにより測定した。

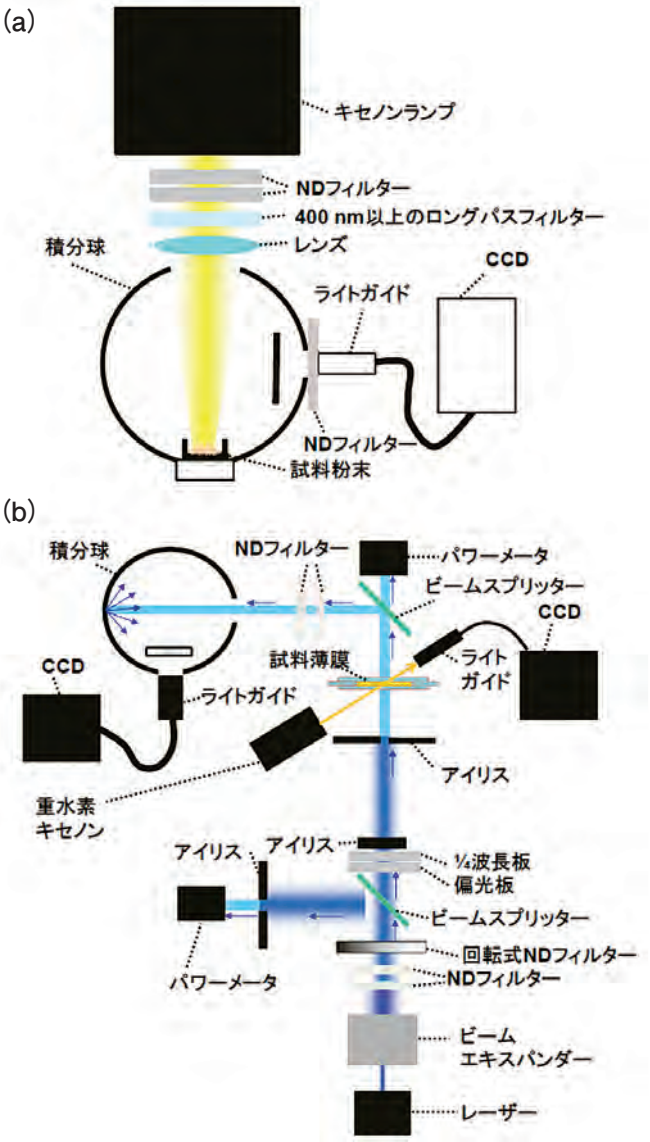


図4　拡散反射法による材料の吸収評価法の測定系（a）と材料薄膜の透過率の照射光強度依存性の評価系（b）

3．結　果

3．1．弱い光照射下のβ-estradiol中の単一の芳香族ゲストの三重項励起子の蓄積の確認

図5には図1中のG1およびG2のβ-estradiol中での吸収スペクトルおよび三重項励起子の吸収スペクトルを示す。G1およびG2は405 nmの光を吸収する。吸収した後最低励起一重項状態（S_1）から最低励起三重項状態（T_1）への項間交差を経て三重項励起子が形成されると、可視域全体に吸収が生まれる。

図6の上段は405 nmの光を1 W/cm^{2}の光強度でサン

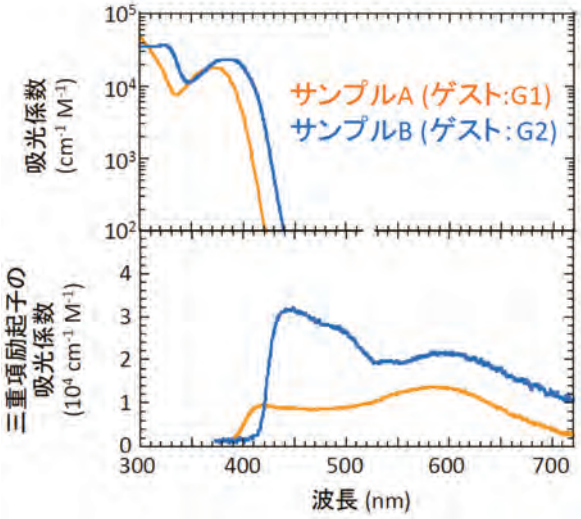


図5　サンプルAおよびB中のG1およびG2の吸収スペクトル（上段）および三重項励起子の吸収スペクトル（下段）

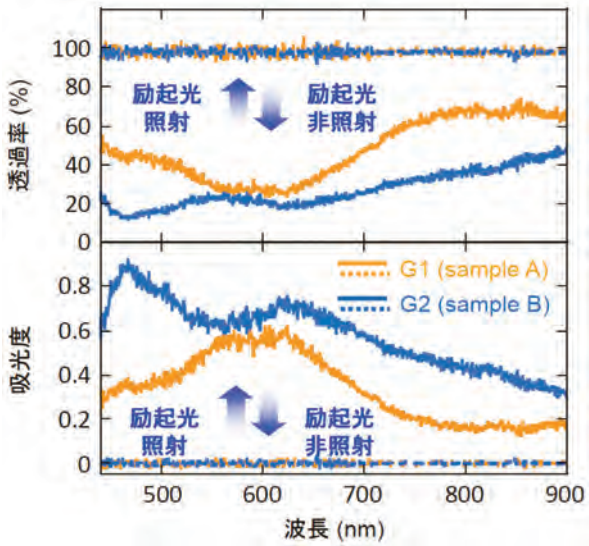


図6　サンプルAおよびBに対して405 nmの光を照射する前後における透過率（上段）および吸光度（下段）の波長依存性

プルＡもしくはＢへ照射した時のサンプルＡおよびＢの透過率の変化である。405 nmの励起光の照射により可視域の透過率が大きく減少した。図６の下段は上段の透過率変化からランバートベールの法則に基づいて吸光度を算出した場合の結果である。図６の下段の吸収スペクトルの形状は、図５の三重項励起子の吸収スペクトルの形状と類似するため、405 nmの光照射とともにサンプルＡもしくはサンプルＢに三重項励起子が蓄積され、その三重項励起子が可視域に新しい吸収を示していると考えられる。

図７は405 nmの光を照射した時のサンプルＢの透過率変化（緑色）およびG2のりん光強度変化（赤色）を測定した結果である。405 nmの光照射が停止した直後の透過率が基の値に戻る挙動は、G2のりん光の減衰と同期していることから、サンプルＢに関しては405 nmの光照射とともにG2の三重項励起子が材料中にと蓄積され、それにより透過率が減少していることが裏付けられた。

以上の結果から、β-estradiolのような水素結合のある非共役系の剛直なホスト中に平面性芳香族をドープすると1W/cm^{2}以下の弱い光でも十分三重項励起子を蓄積させることが可能であることが確認された。

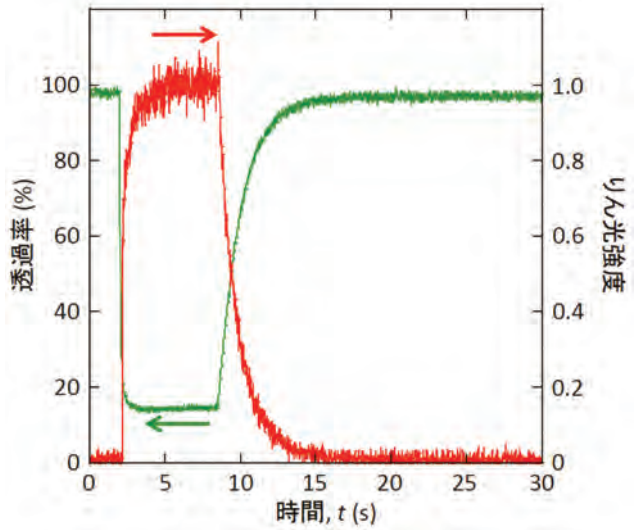


図７　サンプルＢに対して405 nmの光を照射する前後におけるサンプルＢの透過率（緑）およびりん光強度（赤）の時間変化

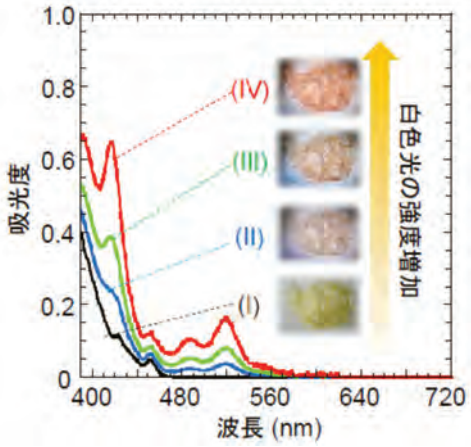


図８　非コヒーレント光に応答する非線形吸収材料の非線形吸収特性

３．２．　ドナー分子とアクセプター分子からなる材料における非線形吸収機能の確認

図８は、1 wt%のD1をDとして、5 wt%のA1をAとして、β-estradiolホストに分散させた材料（材料１）の粉末の吸光度と照射された白色光強度の関係である。材料１の粉末は白色光の強度が弱い時（0.1 mW/cm^2）は400から450 nmにかけて弱い吸収を示し、青い光がわずかに吸収されるために薄い黄色に見える（図８の（Ⅰ）の写真）。一方で白色光の強度の増加とともに400から450 nmにかけての吸光度が大きく増加した（図８の（Ⅱ）→（Ⅳ））。この状態では白色光に含まれる青色領域の光のみ強く材料に吸収されるようになるため、吸収されずに反射された光の色調である橙色の色調が強くなっていく（図８の（Ⅱ）→（Ⅳ）の写真）。

４．考　察

図９の上段はD1とA1の基底状態およびT_1状態の吸収スペクトルである。また図９の下段はD1とA1のりん光スペクトルである。

図10は図９の光学スペクトルから考察される材料１の非線形吸収のメカニズムを説明するための図である。A1は紫外域のみの吸収しか示さない（図９上段）ので、可視光が材料中に照射されると可視光はD1にのみ吸収される（図10（a）の①）。次に、D1は重原子を有しているため重原子効果が強く働き、S_1からT_1への100%の項間交差が生じる（図10（a）の②）。そして、A1はD1よりも低いT_1エネ

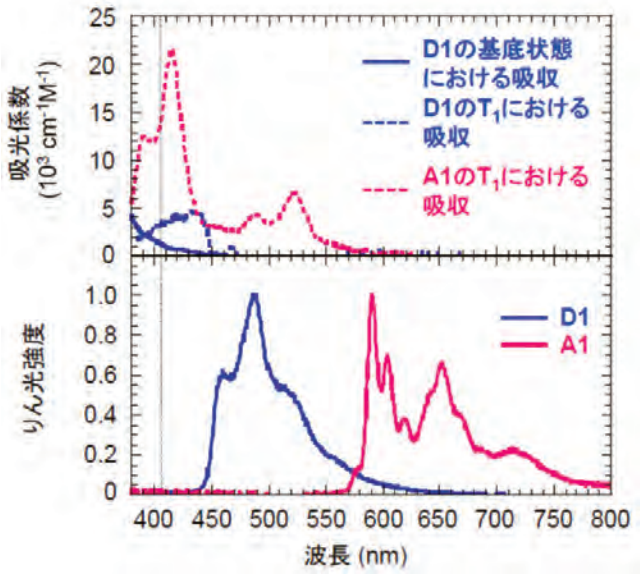


図９　D1とA1の吸収スペクトル（上段）とりん光スペクトル（下段）

ルギーを有する（図９の下段）ため、DのT_1からAのT_1へエネルギー移動が生じ（図10(a)の③）AのT_1が形成される。Aは平面性が高く軽元素のみからなる芳香族化合物であるため、ヒドロキシステロイド中では１秒以上の長いτを有する。それゆえ、Aの三重項励起子が材料中に蓄積されていく（図10（b））。このAの三重項励起子は、T_1からT_n状態への新たな吸収を示すようになるが、その吸光係数は非常に大きい（図10（a）の④、図４の上段）。結果的に可視光の照射光強度の増加とともに青色領域の材料の吸光度が増加し、青色の光が材料から反射しにくくなることで橙色が濃くなっていく。

このような非晶の光学材料のシステムは、日差しの強い時のみ色が濃くなるような色材などへ応用できる可能性がある（図11の(i)）。通常白色光が強い場合は、照り返しの光が強くなるため白身がかった色調に見える場合が多い。本材料を用いると日差しの強い時は、色が自動的に濃くなるため、暗い環境や明るい環境の両者に対してはっきりと色合いを出すことが要求される応用に有効であると考えら

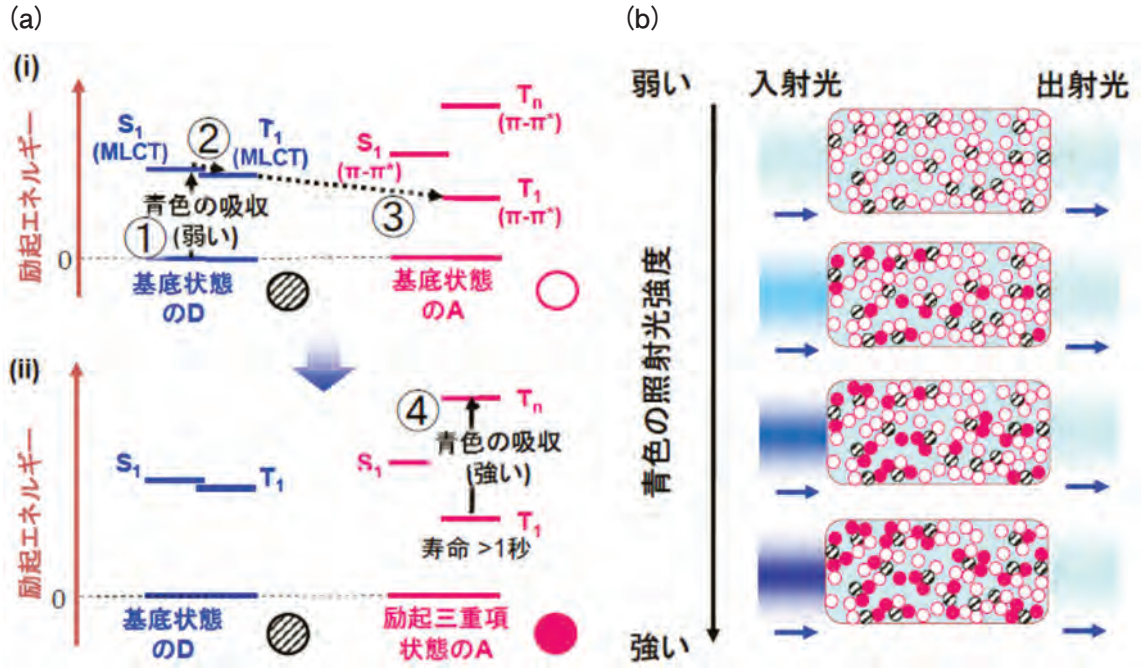


図10　非線形吸収メカニズムの説明　（a）エネルギーダイアグラムによる説明　（b）Aの励起子蓄積の様子のイラストレーションによる説明

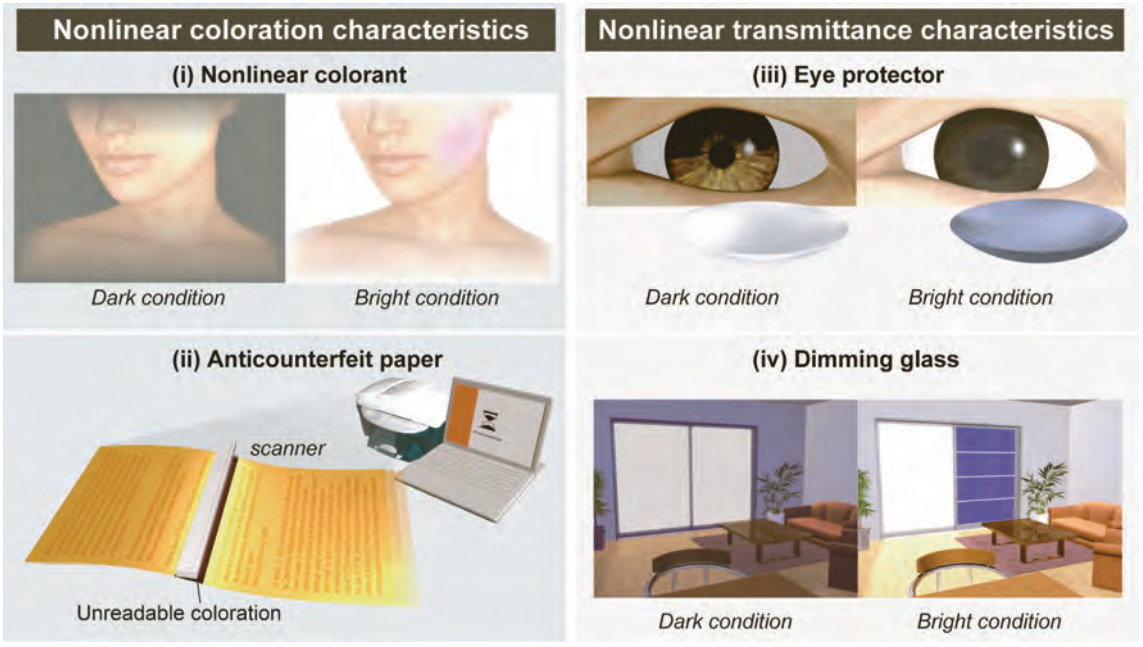


図11　非線形吸収材料の応用の展望

れる。

またこのような色材が塗られた紙は、室内の弱い光では文字などを自然に目視することが可能である一方で、スキャナで取り込む際のスキャナの強い白色光により瞬時に色づくと考えられる（図11（ii））。このような現象により取り込まれた画像のコントラストが低下するため、高解像度のデータ取り込みを防ぐことが必要とされる応用に好適と考えられる。それゆえ、本材料は紙幣、パスポートそして機密文書の偽造防止などに有効である可能性がある。

また本材料からなる薄膜は非晶性のため光散乱が生じず、ガラスに用いると日差しが強い時のみ吸光度が増加することでサングラスのようになり、エネルギーを用いないで動作するスマートウィンドウ（図11（iv））などへの応用が期待される。またこのような特徴はレーザーポインターから目を守るような用途(図11（iii))への展開も可能である。

例えば図12はさまざまな材料（材料1から4）をガラス板で挟み込んだ薄膜を作製し、その薄膜に青色や緑色の光を強度を変化させて照射した時の、調光特性の結果である。材料1から4では1wt%のDと5wt%のAをヒドロキシステロイドの1つであるβ-estradiol中にドープしたものである。これらの薄膜は1mW/cm^{2}以下の弱い光強度では60%の透過率を示すが、光照射強度(I_0)の増加とともに透過率は減少し、I_0=100 mW/cm^{2}では明確に減少し、さらにI_0=1 W/cm^{2}では大きな低下を示した。このようにmW/cm^{2}領域の非コヒーレント光下での調光特性が確認された。また、適切なDとAの組み合わせを用いることにより、青色領域から緑色領域の光に対する大きな調光特

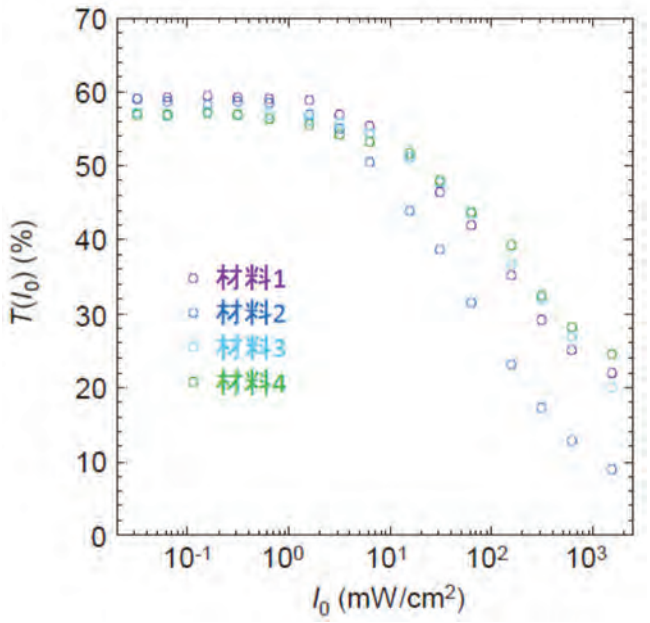


図12　非線形吸収材料の薄膜からなるガラスの調光特性．材料1から4は1wt%のDと5 wt%のAがβ-estradiol中にドープされた薄膜である。材料1：D=D1, A=A1, 材料2：D=D1, A=A2, 材料3：D=D2, A=A3, 材料4：D=D3, A=A4

性を得た。

図13は405 nmの光の照射強度を増加させた時に材料1からなる薄膜において観測される吸収スペクトルや吸光度の変化である。図13（a）に示す通り、照射光強度を10 mW/cm^{2}から100 mW/cm^{2}まで照射強度を増加させると、400 nmから550 nmまで吸収が増加する。この増加したスペクトルの形状は照射光強度に依存せず、その形状は図8の上段のA1のT_1の吸収スペクトルに類似している。それゆえ、白色光に含まれる青色光の強度の増加とともにA1のT_1が材料中で蓄積されていくことで非線形吸収特性が発現していることがわかる。また、図13（b）は時間0－2秒までは弱い405 nmの青色光を照射し、時間2秒の時に瞬間的に強い405 nmの光に切り替え、時間6.8秒の時に再び弱い405 nmの光に切り替えた場合の405 nmの吸光度の変化である。時間2秒で強い光を照射すると、照射強度を強くするほど吸光度が増加していることがわかる。図13（c）は時間6.8秒を最初の時間とした場合の吸光度の減衰とりん光強度の減衰の結果である。吸収の減衰の時定数がA1のりん光の減衰の時定数と同様であることから、A1の蓄積により吸光度の増加が生じていることが裏付けられる。A1は青色光を吸収しないことからも、D1からの三重項三重項（TT）エネルギー移動により、A1のT_1が形成されていることがわかる。

非線形吸収が図10のメカニズムに基づいて生じる場合、材料薄膜の透過率変化は理論的に以下の式1で表される。

$$\log(T(I_0)/T(0))=\log T(0)\sigma_{34}(\lambda)\Phi_T\tau\Phi_S(I_0)I_0 \qquad (式1)$$

ここで、I_0は光の入射光強度、$T(0)$はI_0が弱い時の薄膜の透過率、$T(0)$は照射光強度がI_0の時の透過率、$\sigma_{34}(\lambda)$は波長λにおけるAのTT吸収の吸光係数、Φ_TはDからAへのTTエネルギー移動の効率、τはAのT_1の寿命、$\Phi_S(I_0)$は照射光強度がI_0の時の薄膜の膜厚方向での光の減衰や照射光強度による励起子蓄積のアニヒレーションの補正因子である。

材料5－9からなる薄膜を新たに作製し上記理論式の検証を行った。材料5－9は1 wt%のDと3 wt%のAがβ-estradiol中にドープされた薄膜であり、どのDとAを用いたかを表1に示した。また表1には、各々の材料の式1中に含まれるさまざまな物理因子の値も示す。

図14は材料5－9からなる薄膜に対しての透過率と照射光強度の関係の実験値(プロット)および表1のデータを式1に代入することで得られた計算値(破線)を比較したものである。実験値は理論値といい一致を示した。このことから、光強度に基づく薄膜の透過率の減少は、図10のメカニズムに基づき、AのT_1の蓄積により生じていることが裏付けられた。

式1より、照射光強度が弱い時の透過率が同じ場合、大きな透過率の減少(大きな非線形吸収)を得るためには、A

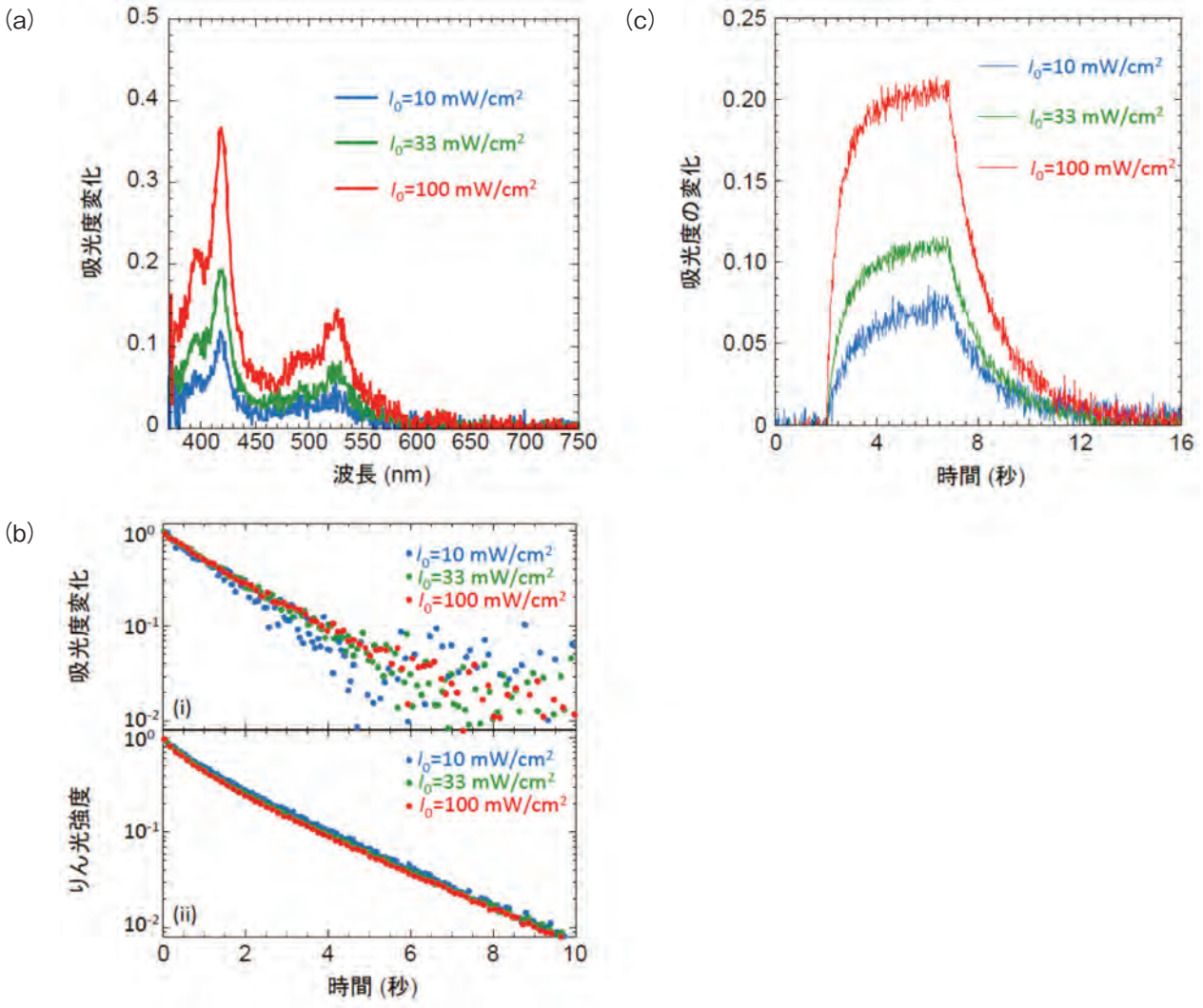


図 13　材料 1 からなる薄膜の非線形吸収特性の詳細
(a) 異なる強度の 405 nm の光が薄膜に照射された時の定常状態における吸光度変化
(b) 異なる強度の 405 nm の光が薄膜に照射された時の吸光度の時間変化
(c) 405 nm の照射光が停止された直後の薄膜の吸光度変化 (i) とりん光強度変化 (ii)

表 1　各材料の光物理パラメーターのまとめ

材料	λ (nm)	D	A	C_d *1 (wt%)	C_a *2	Φ_T	τ (秒)	$\sigma_{34}(\lambda)$ ($10^3 cm^{-1}M^{-1}$)	T (0) (wt%)
5	405	D1	A1	1.0	3.0	0.25	1.65	15	28
6	405	D1	A6	1.0	3.0	0.27	2.77	3.4	30
7	405	D1	A7	1.0	3.0	0.25	0.49	16	30
8	405	D1	A8	1.0	3.0	0.25	0.04	17	30
9	405	D4	A1	1.0	3.0	0.22	1.38	15	30

*1：β-estradiol 中の D の濃度
*2：β-estradiol 中の A の濃度

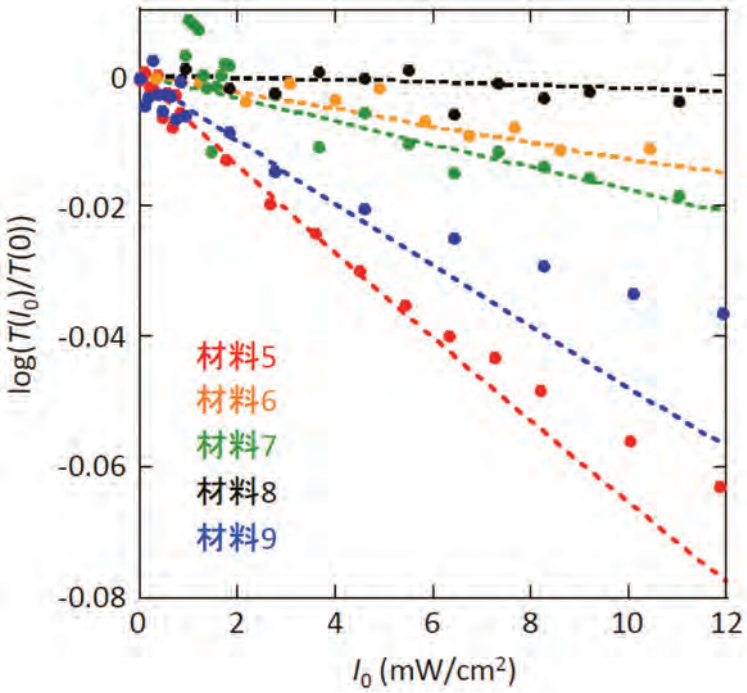


図 14　材料 5 － 9 の薄膜の透過率と 405 nm の照射光強度との関係
シンボル：実験値　　破線：式 1 による計算値

の T_1 の吸収の吸光係数が大きいこと、DからAの三重項三重項エネルギー移動の効率が大きいこと、そしてAの T_1 の寿命が長いことが重要になることが確認された。

5．結　論

本実験では弱い白色光下で薄い着色状態を示し、日差しの強い太陽光下（10 mW/cm^2）では瞬時にその色が濃くなり、再び弱い白色光に戻った際に数秒で薄い色の状態に戻る素材の開発を目的とした。

芳香族化合物を非晶ヒドロキシステロイドにドープした材料においては、1 W/cm^2 の励起光の光照射により、効率よく芳香族化合物の三重項励起子が材料中に蓄積され、それにより大きな透過率の変調が生じることが確認された。このような成果は、サポート光により可視光の透過率を任意に変調することが可能な光学素子へ応用可能と考えられる。このような1 W/cm^2 の光照射による十分な濃度の励起子の蓄積はこれまでに類がないため、その成果はAdvanced Optical Materialsに採択されている[36]（論文の謝辞の項に貴財団からの助成を受けた旨を記載した）。

さらに金属錯体からなるDと軽元素のみの平面性芳香族からなるAを非晶ヒドロキシステロイドにドープした材料は、mW/cm^2 クラスの白色光の照射下で、照射光強度の増加とともに吸光度が増加する非線形吸収機能を示した。その現象は、DからAへの三重項光増感によりAの室温長寿命三重項励起子が材料中に蓄積されていくことに由来している。さまざまなDとAの組み合わせを検討した結果、青色領域から緑色領域の吸光度が増加する材料の構築に成功した。このような非コヒーレント光によって生じる非線形吸収機能はこれまでに類がない。本成果はNature Materialsに2014年9月7日にpublishされた[37]（論文の謝辞の項に貴財団からの助成を受けた旨を記載した）。また本成果はNature Materialsのnews & views[38]や米国化学協会のNoteworthy Chemistry[39]で取り上げられた。現在はまだ大きな吸光度の増加を得るためには100 mW/cm^2 以上の照射光強度を必要とするため、太陽光で大きな非線形吸収機能を得るためには今後照射光強度の閾値を1/10以下に下げていくことが重要になる。現在さまざまなアプローチから閾値を下げる試みに挑戦中である。

（引用文献）

1）Perry JW,: Organic and metal-containing reversible saturable absorbers for optical limiters, *Nonlinear Optics of Organic Molecules and Polymers*, 13, 813-840, 1997.

2）Mansour K, Soileau MJ, Van Stryland EW,: Nonlinear optical properties of carbon-black suspension (ink), *J. Opt. Soc. Am. B*, 9, 1100-1109, 1992.

3）Nashold KM, Walter DP,: Investigation of optical limiting mechanism in carbon particle suspensions and fullerene solutions, *J. Opt. Soc. Am. B*, 12, 1228-1237, 1995.

4）Tutt LW, Kost A,: Optical limiting performance of

C_{60} and C_{70} solutions, *Nature*, 356, 225-226, 1992.

5) Chi SH, Hales JM, Cozzuol M, Ochoa C, Fitzpatrick M, Perry JW,: Conjugated polymer-fullerene blend with strong optical limiting in the near-infrared, *Opt. Express*, 17, 22062-22072, 2009.

6) Perry JW, Mansour K, Lee YISS, Wu -LXL, Bedworth PV, Chen TC, Ng D, Marder SR, Miles P, Wada T, Tian M, Sasabe H,: Organic optical limiter with a strong nonlinear absorptive response, *Science*, 273, 1533-1536, 1996.

7) Perry JW, Mansour K, Marder SR, Perry KJ, Alvarez D, Choong I,: Enhanced reversible saturable absorption and optical limiting in heavy-atom-substituted phthalocyanines, *Opt. Lett.*, 19, 625-627, 1994.

8) de la Torre G, Vazquez P, Agullo-Lopez F, Torres T,: Role of structural factors in the nonlinear optical properties of phthalocyanines and related compounds, *Chem. Rev.*, 104, 3723-3750, 2004.

9) Tang BZ, Xu H,: Preparation, alignment, and optical properties of soluble poly(phenylacetylene)-wrapped carbon nanotubes, *Macromolecules*, 32, 2569-2576, 1999.

10) Chen P, Wu X, Sun X, Lin J, Ji W, Tan KL,: Electronic structure and optical limiting behavior of carbon nanotubes, *Phys. Rev. Lett.*, 82, 2548-2551, 1999.

11) Vivien L, Anglaret E, Riehl D, Bacou F, Journet C, Goze C, Andrieux M, Brunet M, Lafonta F, Bernier P, Hache F,: Single-wall carbon nanotubes for optical limiting, *Chem. Phys. Lett.*, 307, 317-319, 1999.

12) Riggs JE, Walker DB, Carroll DL., Sun YP,: Optical limiting properties of suspended and solubilized carbon nanotubes, *J. Phys. Chem. B*, 104, 7071-7076, 2000.

13) Sun X, Yu RQ, Xu GQ, Hor TSA, Jia W,: Broadband optical limiting with multiwalled carbon nanotubes, *Appl. Phys. Lett.*, 73, 3632, 1998.

14) McEwan K, Lewis K, Yang GY, Chng LL, Lee YW, Lau WP, Lai KS, Synthesis, characterization, and nonlinear optical study of metalloporphyrins, *Adv. Funct. Mater.*, 13, 863-867, 2003.

15) Senge MO, Fazekas M, Notaras EGA, Blau WJ, Zawadzka M, Locos OB, Mhuircheartaigh EMN,: Nonlinear optical properties of porphyrins, *Adv. Mater.*, 19, 2737-2774, 2007.

16) Hales JM, Cozzuol M, Screen TEO, Anderson HL, Perry JW,: Metalloporphyrin polymer with temporally agile, broadband nonlinear absorption for optical limiting in the near infrared, *Opt. Express*, 17, 18478-18488, 2009.

17) Vijaya R, Murti YVGS, Vijayaraj TA, Sundararajan G,: Opticl nonlinearities in substituted conjugated polymers, *Opt. Quant. Electron.*, 25, 723-731, 1993.

18) Zhou GJ, Wong WY, Dongmei C, Cheng Y,: Large optical-limiting response in some solution-processable polyplatinaynes, *Chem. Mate*r., 17, 5209-5217, 2005.

19) Francois L, Mostafavi M, Belloni J, Delouis JF, Delaire J, Feneyrolu P,: Optical limitation induced by gold clusters, Size effect, *J. Phys. Chem. B*, 104, 6133-6137, 2000.

20) Sun YP, Riggs JE, Rollins HW, Guduru R,: Strong optical limiting of silver-containing nanocrystalline particles in stable suspensions, *J. Phys. Chem. B*, 103, 77-82, 1999.

21) Jia WF, Douglas EP, Guo FG, Sun WF,: Optical limiting of semiconductor nanoparticles for nanosecond laser pulses, *Appl. Phys. Lett.*, 85, 6326-6328, 2004.

22) Venkatram N, Rao DN, Akundi MA,: Nonlinear absorption, scattering and optical limiting studies of CdS nanoparticles, *Opt. Express.*, 13, 867-872, 2005.

23) Pan H, Chen WZ, Feng YP, Ji W, Lin JY,: Optical limiting properties of metal nanowires, *Appl. Phys. Lett.*, 88, 223106, 2006.

24) Zhou GJ, Wong WY, Lin Z, Ye C,: White metallopolyynes for optical limiting/transparency trade-off optimization, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45, 6189-6193, 2006.

25) Zhou GJ, Wong WY, Poon YC, Lin Z,: Optical Power Limiters Based on Colorless Di-, Oligo-, and Polymetallaynes: Highly Transparent Materials for Eye Protection Devices, *Adv. Funct. Mater.*, 17, 963-975, 2007.

26) Zhou GJ, Wong WY, Poon SY, Ye C, Lin Z,: Symmetric versus unsymmetric platinum (II) bis(aryleneethynylene)s with distinct electronic structures for optical power limiting/optical transparency trade-off optimization, *Adv. Funct. Mater.*, 19, 531-544, 2009.

27) Zhou, GJ, Wong WY,: Organometallic acetylides of Pt^{II}, Au^{I} and Hg^{II} as new generation optical power limiting materials, *Chem. Soc. Rev.*, 40, 2541-2566, 2011.

28) Xu Y, Zhang X, Wang Y, Tian J, Huang Y, Ma Y, Zhang X, Chen YA,: Graphene hydrid material covalently functionalized with porphyrin: synthesis and optical limiting property, *Adv. Mater.*, 21, 1275-1279, 2009.

29) Wang J, Hernandez Y, Lotya M, Coleman JN, Blau

WJ,: Broad nonlinear optical response of graphene dispersions, *Adv. Mater*., 21, 2430-2435, 2009.
30) Zhao B, Cao B, Zhou D, Li D, Zhao W,: Nonlinear optical transmission of nanographene and its composites, *J. Phys. Chem*. C, 114, 12517-12523, 2010.
31) Feng M, Zhan H, Chen Y,: Nonlinear optical and optical limiting properties of grapheme families, *Appl. Phys. Lett*., 96, 033107, 2010.
32) Lim GK, Chen ZL, Clark J, Goh RGS, Ng WH, Tan HW, Friend RH, Ho PKH, Chua LL,: Giant broadband nonlinear optical absorption response in dispersed graphene single sheets, *Nat. Photon*., 5, 554-560, 2011.
33) Xu X, Ou D, Luo X, Chen J, Lu J, Zhan H, Dong Y, Qin J, Li Z,: Water-soluble graphene sheets with large optical limiting response via non-covalent functionalization with polyacetylenes, *J. Mater. Chem*., 22, 22624-22630, 2012.
34) Hirata S, Totani K, Zhang J, Yamashita T, Kaji H, Marder SR, Watanabe T, Adachi C,: Efficient persistent room temperature phosphorescence in organic amorphous materials under ambient conditions, *Adv. Funct. Mater*., 23, 3386-3397, 2013.
35) Hirata S, Totani K, Kaji H, Vacha M, Watanabe T, Adachi C,: Reversible thermal recording media using time-dependent persistent room temperature phosphorescence, *Adv. Opt. Mater*., 1, 483-488, 2013.
36) Hirata, S; Vacha, M. Large Transmittance Change Induced by Exciton Accumulation under Weak Continuous Photoexcitation. *Adv. Opt. Mater*. doi: 10.1002/adom.201500378.
37) Hirata S, Totani K, Yamashita T, Adachi C, Vacha M,: Large reverse saturable absorption under weak continuous incoherent light, *Nat. Mater*., 13, 938-946, 2014.
38) Qin A, Tang BZ,: Nonlinear optics: Modulating optical power, News & Views, *Nat. Mater*., 13, 917-918, 2014.
39) http://www.acs.org/content/acs/en/noteworthy-chemistry/2014-archive/october-27.html#nc3, *Noteworthy Chemistry*, 2014, Oct. 27.

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

京都大学工学研究科高分子化学専攻
松岡　秀樹

By utilizing the special characteristics of "non-surface active" polymers, a novel drag delivery system of polymer micelle has been established. The critical micelle concentration (cmc) of "non-surface active" polymers increases with increasing added salt concentration. Hence, this polymer micelle can be disintegrated by salt addition, which was applied to drug release system with salt addition as a trigger. The system with UV irradiation as a trigger was also investigated.

1．緒　言

一般の低分子界面活性剤水溶液の表面張力は，活性剤濃度の増加と共に減少し，屈曲点を経て，一定値となる（図1）．この屈曲点が，水中でミセルが形成され始める濃度，すなわち，臨界ミセル濃度cmcである．この挙動は，どの教科書にも記述されており普遍現象と信じられてきた．しかしながら，分子が大きな「高分子」となると，必ずしも，このような性質を示さないことが，我々のイオン性両親媒性高分子に関する研究により示された[1, 2]．図2は，その一例である．試料は，水素化ポリイソプレンを疎水鎖，ポリスチレンスルホン酸を親水鎖とするジブロックコポリマーである．この水溶液の表面張力は，高分子濃度が増大しても変化せず，純水の値（73 mN/m）のまま一定である．しかし，図に示すように，疎水性色素の可溶化実験によりcmcの存在が示され，ある一定以上の濃度で，ミセルが形成されていることが分かる．我々は，この特性を「界面不活性性」と名付けた．そして，10年以上に渡る系統的基礎研究により，その根源は，気水界面における鏡像電荷効果と水中のミセルの非常に高い安定性によりもたらされるものであることを明らかとした[1, 2]．親水鎖が高分子イオンであるため，鏡像電荷による斥力が非常に強くなる．そのため，気水界面への吸着が起こりにくくなる．一方，水中のミセルは，疎水鎖が高分子のため，非常に安定な疎水性コアを形成する．さらには，親水鎖コロナも高分子であり，これに覆われることもあり，非常に安定なミセルとなる．従って，気水界面に吸着すること無く，ミセルを形成する，という「界面不活性性」が発現することになる（図3）．すなわち，界面不活性性は，ある種の高分子効果なのである．

Control of unimer/micelle transition of amphiphilic diblock copolymer by external stimuli and its application to drag delivery systems

Hideki Matsuoka
Department of Polymer Chemistry, Kyoto University

この界面不活性高分子の特徴（特異性）の一つは，cmcの異常な添加塩濃度依存性である．通常のイオン性低分子界面活性剤のcmcは，塩濃度の増加と共に減少する．これは古くから知られるCorin-Harkins則であり，ミセル中のイオン性頭部間の斥力が添加塩により緩和されることにより説明される．しかるに，界面不活性高分子のcmcは，図4の例のように，塩濃度の増大と共に，増加することが我々の研究により発見された．真逆の傾向である[3]．これ

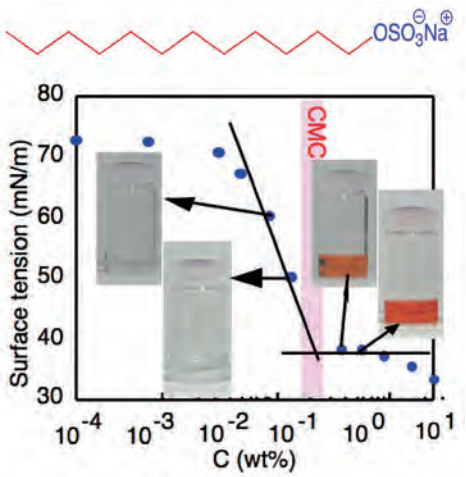


図1　ドデシル硫酸ナトリウム（分子構造：上）水溶液の表面張力の濃度依存性．疎水性色素の可溶化実験の結果（写真）より，cmc 以上でのミセルの形成が確認できる．

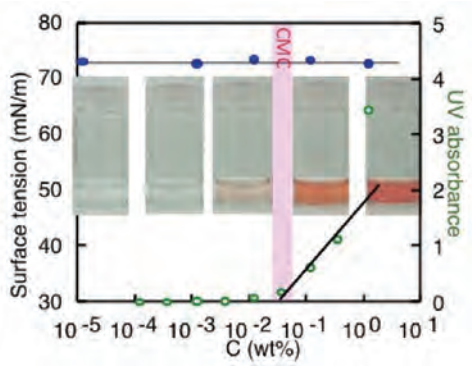


図2　水素化ポリイソプレンとポリスチレンスルホン酸ナトリウムのジブロックコポリマー水溶液の表面張力（青）と可溶化実験の結果（緑および写真）．

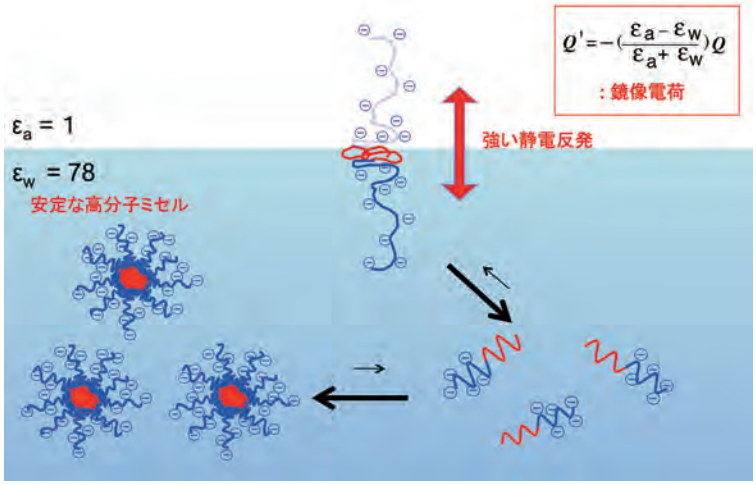


図３　「界面不活性性」発現機構の模式図

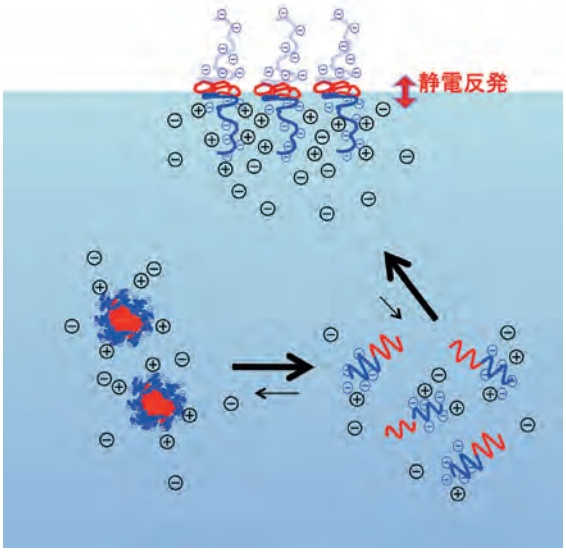


図５　界面不活性高分子水溶液に対する添加塩の効果の模式図

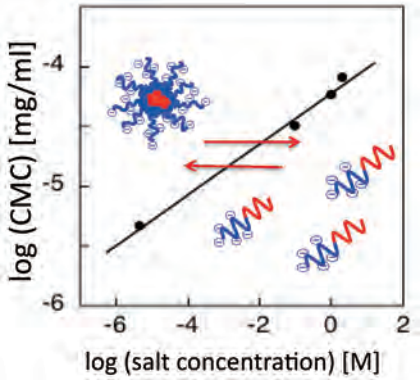


図４　界面不活性高分子の cmc の添加塩濃度依存性
低分子イオン性界面活性剤と真逆に，上昇傾向を示す．

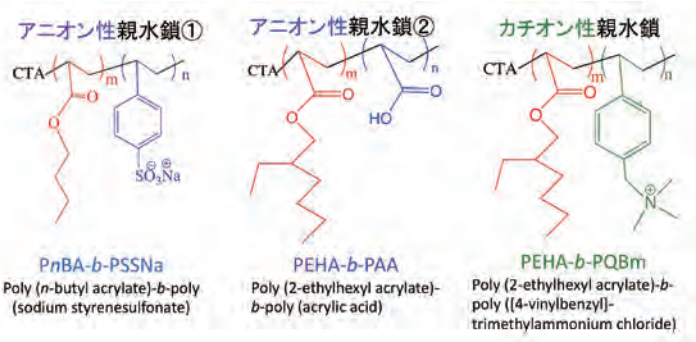


図６　本研究で用いた，３種のイオン性両親媒性ブロックコポリマー

は図５に模式的に示すように，鏡像電荷斥力が添加塩により遮蔽され，吸着しやすくなる，平衡が，ミセル側から吸着側へシフトしたためと考えられる．

このcmc増大の特性を利用すると，図４から分かるように，塩を加えることによりcmcを跨ぐことができ，ミセルを「崩壊」させることが可能になると期待される．低分子の場合は，逆向きに跨ぐので，ミセルを「形成」させることはできるが，崩壊は不可能である．よって，このような添加塩によるミセルの崩壊制御は，界面不活性高分子によってのみ達成される，特異機能ということができる．

本研究では，図６に示す３種の高分子（親水鎖が，強酸性，弱酸性，およびカチオン性）について，このcmc増加現象の普遍性を確認すると共に，添加塩のイオン種依存性（NaCl, KCl, NaBrなどなど）を調査し，さらには，ミセル内に取り込ませた色素を，塩の添加により放出させることを試みた．さらには，より発展的応用として，光照射により疎水性からイオン性の親水鎖に変化するブロックを有する高分子ミセルを構築し，UVを照射することにより，ミセル内部の色素を放出する系の構築を試みた．

２．実　験

図６に示す３種の高分子は，可逆的付加開裂連鎖移動（RAFT）重合により合成した．近年開発された水溶性の連鎖移動剤を用いることにより，水溶性モノマーを直接重合することが可能となり，100%イオン基を導入した親水鎖の合成が可能となると共に，疎水鎖とのブロック重合も容易に行えるようになっている．

表面張力の測定は，協和界面科学製 FACE CBVP-Zにより行った．試料水溶液は，調製後一晩静置してから測定を行った．cmcの決定は，静的光散乱法により行った．大塚電子製SLS-7000により散乱角度90°方向への静的散乱強度を測定し，ダイレクトとの強度比I_s/I_0を濃度に対してプロットし，その屈曲点をcmcとした．ミセルの大きさ（流体力学的半径）は，大塚電子製SLS-7000に光子相関計GC-1000を組み合わせたシステムにより決定した．蛍光強度測定は，日立製F-2500により測定した．照射するUV光には，三永電機社製コンパクトUV光源UV-203Fを用いた．Hg-Xeランプからの波長360 nm，強度30 mW/cm^{2}のUV光を試料に照射した．

3．結果と考察

図7は，用いた3試料水溶液の表面張力とI_s/I_0の濃度依存性である．表面張力は，いずれの試料も高分子濃度に依存しておらず，純水の値，すなわち，73 mN/m附近でほぼ一定である．その一方，静的光散乱強度には，明らかな屈曲点があり，cmcが存在すること，すなわち，ある濃度以上でミセルが形成されていることがわかる．よって，「表面張力が低下せずミセルを形成する」という界面不活性高分子の特性を，今回のいずれの高分子も有することが確認された．弱酸およびカチオン性高分子の場合，高濃度でやや表面張力が低下する傾向が認められる．これは，界面不活性性があまり高くない高分子に見られる特徴である．

図8には，DLS測定により得られたミセルの流体力学的半径R_hの添加塩濃度依存性を示す．R_hはある一定の塩濃度（図では，10^{-4}M程度）までR_hは変化していない．これは，ミセル表面を覆うイオン性高分子のコロナ（一種の高分子ブラシ）の中のイオン濃度が極めて高いために，添加された塩イオンがコロナ内に浸入できず，ミセル構造が添加塩の影響を受けない領域である．同様の傾向は，水面のイオン性高分子ブラシに対しても観察されている[4]．その後，R_hは減少しているが，これは塩イオンがコロナに浸入し，コロナを形成するイオン性高分子鎖が静電反発により伸張した状態から，それが遮蔽され，収縮していっていることを示している．その後R_hは一定となっているが，これは完全にイオン鎖が収縮しきった状態と考えられる．

図9と図10は，用いた3種の高分子のcmcに対する添加塩効果のイオン種依存性である．図9は，塩のカチオンをLi^+, Na^+, K^+と変えた場合，図10は，アニオンを，F^-, Cl^-, Br^-と変えた場合を示している．図9では，親水鎖がカチオンの高分子は，塩のカチオン種を変えて，影響を受けていないが，アニオン性の高分子は，強酸，弱酸，いずれもイオン種によりcmc増大の程度が異なっていることがわかる．塩のカチオンは，アニオン性親水鎖のカウン

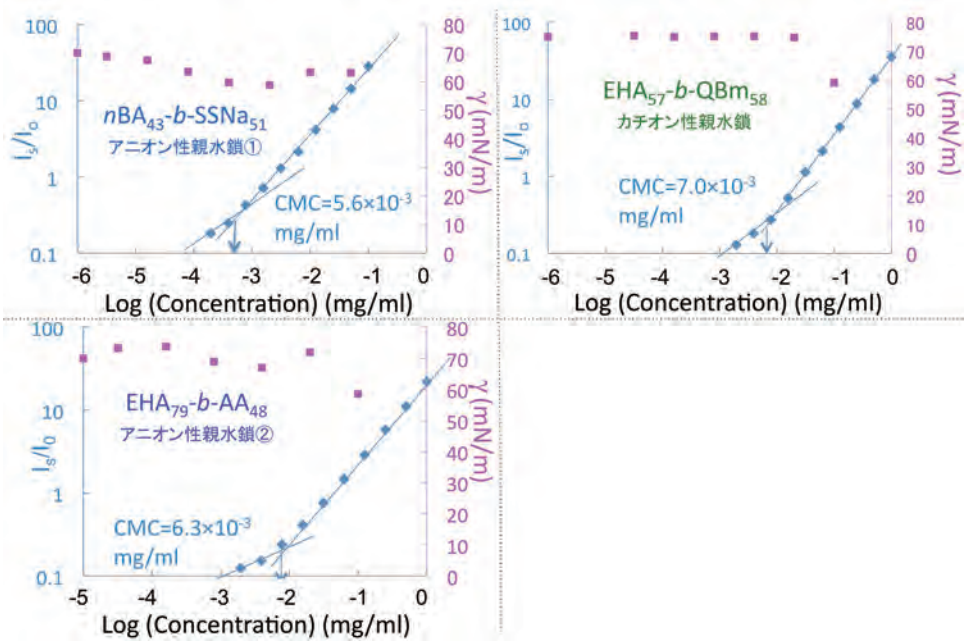


図7　用いた3種のポリマー水溶液の表面張力（赤）と静的光散乱強度（青）の濃度依存性

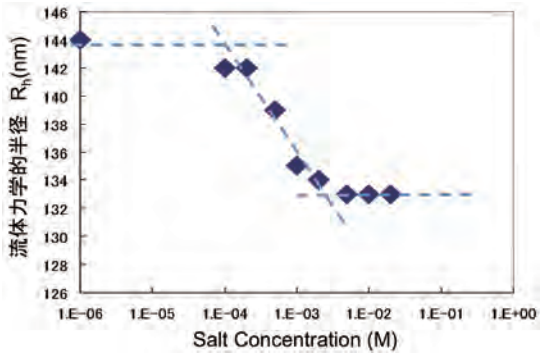


図8　界面不活性高分子ミセルの流体力学的半径（R_h）の塩濃度依存性．サンプルは，P*n*BA-*b*-PSSNa

ターイオンとなり，ペアを組むため，イオン種依存性が表れるものと考えられる．さらに，効果の程度は，Li^+がもっともcmcを増大させる効果が強く，次にNa^+, K^+の順となっている．この順番は，古典的なHofmeiser順列[5]と一致していることが興味深い．Li^+は非常に強い水の構造形成イオン，Na^+は，やや弱い構造形成イオン，K^+は，構造破壊イオンである．この事実は，cmcの変化が，溶媒である水の構造性と何らかの相関を有することを示している可能性がある．今後の課題として興味深い．アニオン種を変えた図10では，逆にカチオン性親水鎖のポリマーにイオン種依存性が見られ，そのイオン種の順番は，やはりHofmeister順列に従っている．しかしながら，近年になって，Hofmeiser順列の起源に異説が唱えられるようになり，必ずしも水の構造性を反映するものではないとの考えが提示されている[6]．このような可能性も念頭に，今後の検討課題としたい．

次に，蛍光色素であるピレンをミセル内部に取り込ませ，塩の添加によりミセルが崩壊し，ピレンが放出される

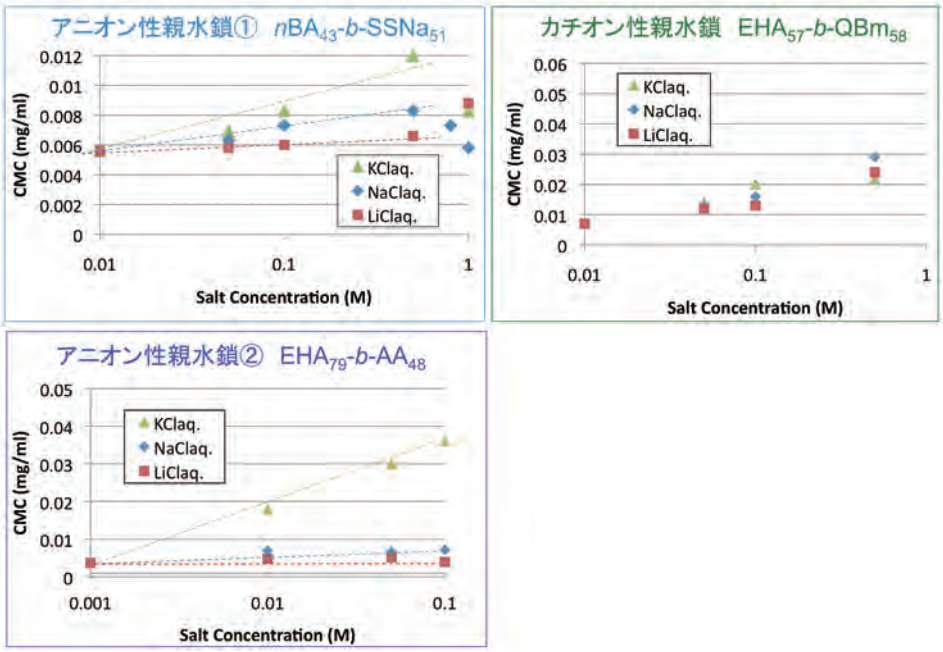


図９　３種のポリマーのcmcに対する添加塩の効果とそのカチオン種依存性

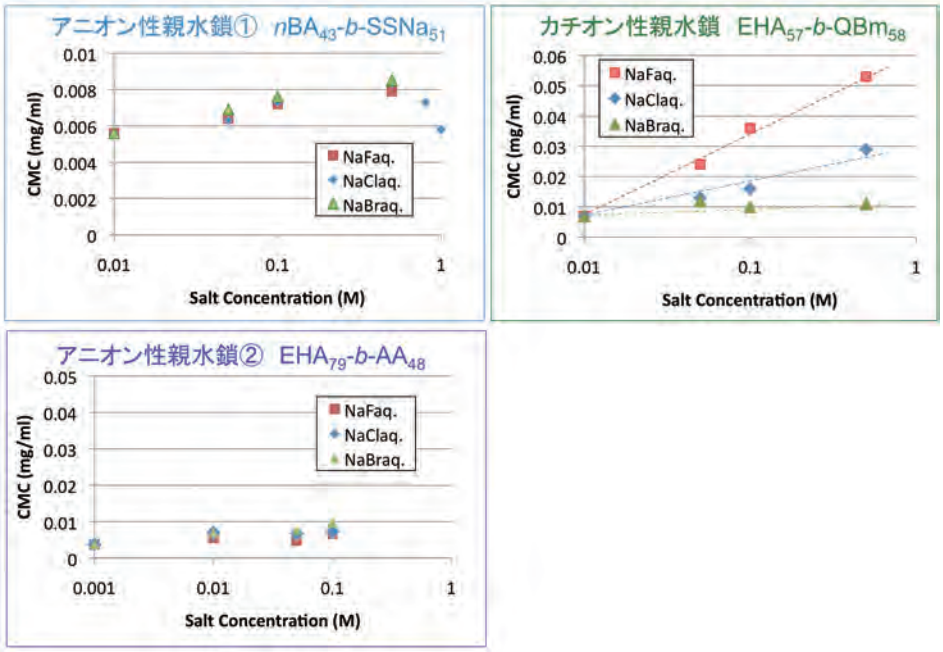


図10　３種のポリマーのcmcに対する添加塩の効果とそのアニオン種依存性

様子を蛍光分光測定により追跡した．強酸性の高分子を試料として用いた．ピレンの蛍光発光の第一ピークI_1と第3ピークI_3の比，I_1/I_3は，ピレンが存在する環境の極性を反映することが知られている[7,8]．図11は，I_1/I_3の添加塩濃度依存性である．図中の右上がりの点線は，cmcの塩濃度依存の線である．このように，cmcを跨ぐ前後で，I_1/I_3が1.50程度から，1.55程度にジャンプする傾向が確認された．I_1/I_3は，環境の疎水性が高いほど，小さな値となる．よって，I_1/I_3＝1.50は，ピレン分子がミセルのコア内に存在することを示し，1.55とジャンプしたところは，ミセルの崩壊によりピレン分子がミセルコアから放出されたことを示していると考えられる．変化があまり劇的ではないが，これには二つの理由が考えられる．一つは，cmc直前，直後の状況となっているため，形成されるミセルもまだ「しっかりした」ミセルではなく，そのコアも緩い状態で，その疎水性もまだ十分高くない状態である可能性がある．二つ目は，このミセルが高分子であるため，ミセルの形成／崩壊の転移がシャープではないことの影響である．活性剤濃度を変化させての形成／崩壊現象も，低分子界面活性剤に比べ，高分子の場合は，そのシャープさがかなり劣っていることが知られている．

次に，光照射による制御を試みた[9]．用いた高分子は，図12に示すカルボキシベタインを親水鎖，ポリメタクリル酸のニトロベンゼンエステルを疎水鎖とするものである．このエステル結合は，UV照射により容易に切断され，高分子鎖は，親水性のポリメタクリル酸へと転移し，アルデヒドが放出される．

pH 7におけるこのミセルのR_hは，25 nm，色素（ナイルレッド）を取り込ませたミセルのR_hは，32 nmとなり，十分な量が取り込まれていることが確認できた．これにUVを照射し，吸光度を測定した結果が，図13である．照射前は，

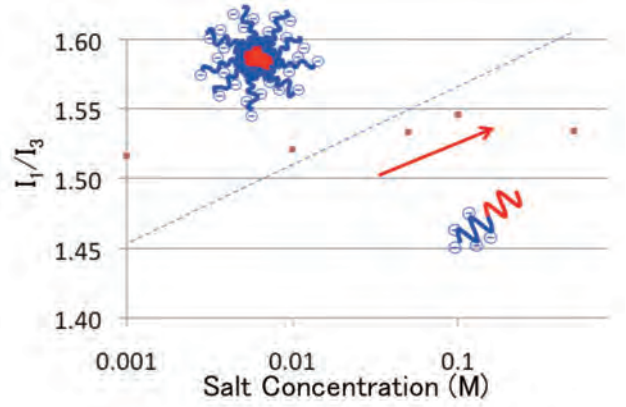


図11　ピレンからの蛍光発光強度の塩濃度依存性とcmcとの関係

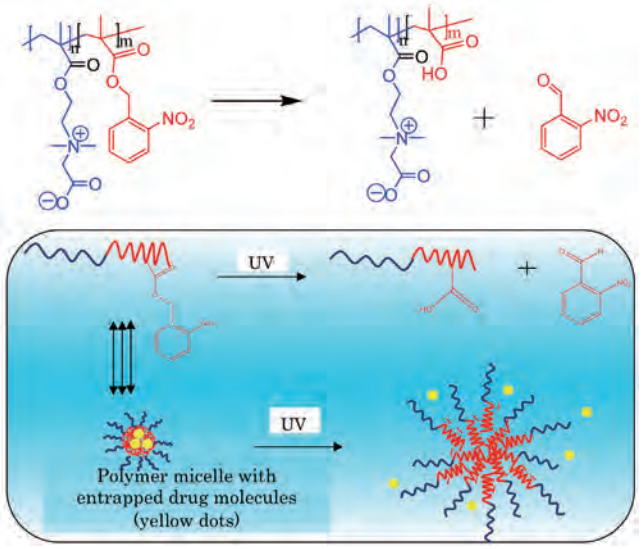


図12　光照射によるミセル崩壊転移に用いたポリマーの分子構造とその反応様式，およびミセル崩壊制御

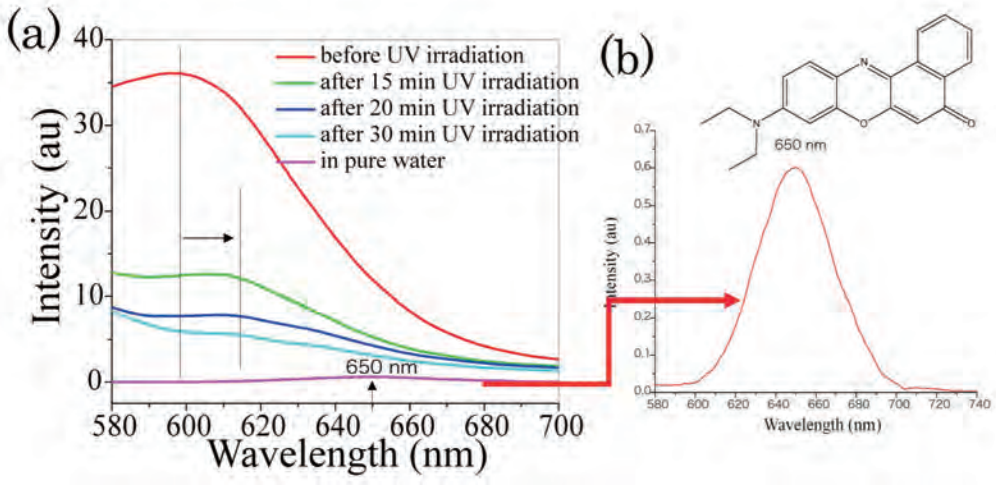


図13　ナイルレッドの発光スペクトル
ポリマー濃度：0.2 mg/ml，（a）pH7の緩衝液中　（b）水中（励起波長：550 nm）

十分強い吸収があり，疎水性で水に不溶なナイルレッドが，ミセルコア内に取り込まれることにより，水中に存在していることが分かる．これにUVを照射すると，照射時間を長くするほど，吸光度は減少し，またピーク位置もレッドシフトし，純水中でのプロファイルに近づいているが，完全に消失はしなかった．これは，UV照射による反応の効率が，70%程度とやや低く，ミセルが完全には崩壊していない可能性が考えられる．実際，DLSによりUV照射後のR_hを測定すると，40 nmと大きな値となった．しかしながら，その時の散乱強度は非常に弱くなっており，この大きなR_hは，大きなミセルが形成されたことを意味するのでは無く，UV照射により疎水鎖の70%が親水鎖に転移したため，疎水性のコアが溶媒である水で膨潤したためと考えられる．今後，反応効率の改善により，完全な崩壊・放出系が構築できると期待される．

4．総　括

添加塩濃度の増加に伴いcmcが増加するという，「界面不活性高分子」が持つ特長を活かして，「塩を添加することにより，薬物が放出される」というdrag deliveryに応用可能な高分子ミセル系の構築に成功した．また，triggerとして光を用いる系についても，検討を行った．添加塩による系は，発汗による香料の放出など，コスメ系材料への応用も期待でき，新しい機能材料開発の可能性が示された．

（引用文献）

1） Matsuoka, H.; Chen, H.; Matsumoto, K. "Molecular weight dependence of non-surface activity for ionic amphiphilic diblock copolymers". Soft Matter, 8, 9140 − 9146, 2012.

2） 松岡秀樹，「イオン性両親媒性ジブロックコポリマーの「界面不活性」性は何故発現するか？」，*Colloid & Interface Communication*（*日本化学会・コロイドおよび界面化学部会ニュースレター*），38 (3), 30 - 33, 2013.

3） Kaewsaiha, P.; Matsumoto, K.; Matsuoka, H. "Non-surface activity and micellization of ionic amphiphilic diblock copolymers in water. Hydrophobic chain length dependence and salt effect on surface activity and the critical micelle concentration". Langmuir, 21, 9938 − 9945, 2005.

4） Kaewsaiha, P.; Matsumoto, K.; Matsuoka, H. "Salt Effect on the Nanostructure of Strong Polyelectrolyte Brushes in Amphiphilic Diblock Copolymer Monolayers on the Water Surface". Langmuir, 23 (13), 7065 − 7071, 2007.

5） Kunz, W.; Henle, J.; Ninham, B. W. 'Zur Lehre von der Wirkung der Salze' (about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister' s historical papers. Curr. Opin. Colloid Interface Sci., 9, 19 − 37, 2004.

6） Zhang,Y. Cremer, P.S., "Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series", Curr. Opinion in Chem. Biol., 10, 658-668（2006）

7） Kalyanasundaram, K., Thomas, J. K., "Environmental Effects on Vibronic Band Intensities in Pyrene Monomer Fluorescence and Their Application in Studies of Micellar Systems", J.Amer.Chem.Soc., 99(7), 2039-2044, 1977.

8） Ananthapadmanabhan, K.P., Goddard, E. D., Turro, N. J., Kuot, P. L., "Fluorescence Probes for Critical Micelle Concentration" Langmuir, 1, 352-355, 1985.

9） Shrivastava, S., Matsuoka, H., "Photocleavable amphiphilic diblock copolymer micelles bearing a nitrobenzene block", Coll.Polym.Sci., 294, 879-887, 2016.

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

群馬大学大学院理工学府分子科学部門

山路　稔

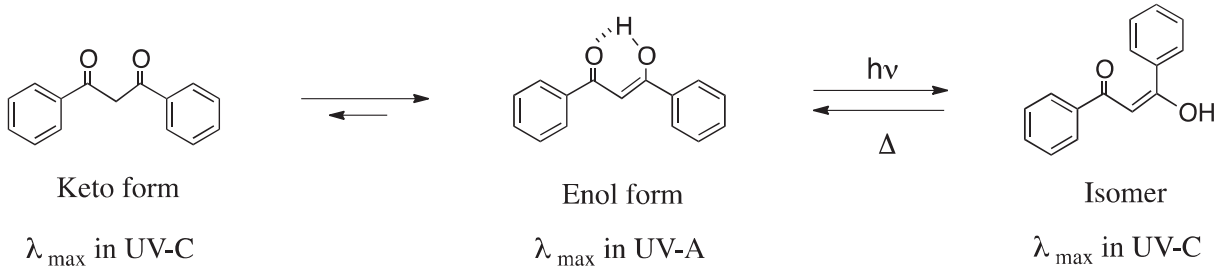
The alkyl keto-diketones having five-membered rings undergo photoinduced tautomerization to the enol in acetonitrile. The alkyl enol-diketones, thus formed, undergo thermal tautomerization to the original keto forms in a few days. The alkyl enols show fast internal conversion from the excited singlet state to the ground state without yielding the corresponding isomeric forms (rotamer).

1. 緒　言

芳香族アルケンのケトーエノール互変異性化反応は、溶液中で頻繁に観測される反応である[1-3]。β-ジケトンの一つとしてよく知られている1,3-ジベンゾイルメタン（DBM）の分子構造は室温溶液中でエノール体であり[4-8]、UV-A 波長領域に π,π^* 遷移に由来する強い吸収帯を示す。DBMの殆どの誘導体は光励起しても発光を示さず効率良く励起エネルギーを放出する。これは励起状態で回転異性体（rotamer）を形成し、熱失活で励起エネルギーを緩和するからである。一般的な反応過程をScheme 1に示す。

DBMのその反応機構がUV-A サンスクリーンとして機能する。特に4-*tert*-ブチル-4'-メトキシジベンゾイルメタン（アボベンゾン、以下ABと略す）は世界中でUV-サンスクリーンとして使用されている[2,4,8-25]。我々はエノール体のABがアセトニトリルで光照射によりケト体へ異性化し、熱的にエノール体へ異性化することを報告している[24]。

ABのC_2位をメチル化した1,1-（4-*tert*-ブチルベンゾイル）（4'-メトキシベンゾイル）メタン（MeAB）はUV-C波長領域に吸収帯を示す[23]。レーザー閃光分解法を使ったMeABの研究では、ケト体のMeABは光励起後に励起一重項（S_1）からの項間交差を経由してn,π^*三重項（T_1）状態を形成することが示されている[23]。MeABは光励起によりエノール体への互変異性化は起こさない。一方、メチル基をプロピル基にした1,1-(4-*tert*-ブチルベンゾイル)(4'-メトキシベンゾイル）プロパン（PrAB）は溶液中n,π^*三重項を経由してNorrish II 型反応を起こすことが報告されている[26]。本研究ではABの芳香環をフラン（F）とチオフェン（T）に置換したメチルおよびプロピルジケトン（Chart 1）を新規に合成した。これらの化合物が光熱異性化反応を起こすことを新たに見出し、その光化学的反応機構を定常光およびレーザー閃光分解法を用いて解明した。

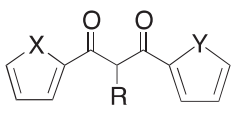


Scheme 1　Keto-enol tautomerization of DBM and isomerization processes of enol DBM.

Steady state and laser photolysis studies of keto-enol tautomerizations in 2-alkyl-1,3-diketones having five-membered rings in acetonitrile: Temporal UV-A sunscreen

Minoru Yamaji

Division of Molecular Science, Graduate School of Science and Engineering, Gunma University



X = O, Y = O, R = H (FF)
R = Me (MeFF)
R = *n*-C_3H_7 (PrFF)
X = O, Y = S, R = H (FT)
R = Me (MeFT)
R = *n*-C_3H_7 (PrFT)
X = S, Y = S, R = H (TT)
R = Me (MeTT)
R = *n*-C_3H_7 (PrTT)

Chart 1　Molecular structures and abbreviations of the compounds used in this study.

2. 実　験

ビス（2-フロイル）メタン（FF）、（2-フロイル）（2-テノイル）メタン（FT）およびビス（2-テノイル）メタン（TT）は アセチル体とエチルエステル体をTHF中、NaHの存在下でクライゼン縮合することにより合成した。1, 1-ビス（2-フロイル）メタン（MeFF）、1, 1-（2-フロイル）（2-テノイル）メタン（MeFT）、1, 1-ビス（2-テノイル）メタン（MeTT）、1, 1-ビス（2-フロイル）メタン（PrFF）、1, 1-（2-フロイル）（2-テノイル）ブタン（PrFT）、1, 1-ビス（2-テノイル）ブタン（PrTT）はアセトン中K_2CO_3存在下ヨウ化メチルおよびヨウ化プロピルとジケトンの反応で合成した。吸光度分析用のアセトニトリル（ACN）とエタノールを測定に用いた。

吸収スペクトルとケイ光スペクトルはそれぞれJASCO U-best 50と日立F-4010ケイ光計を用いて測定した。試料は1 cmの光路長セルにいれて、純アルゴンで脱酸素を行った。レーザー閃光分解に用いた試料濃度は励起波長で約 0.7になるように調整した。光分解光源は低圧水銀灯（254 nm）および高圧水銀灯（λ>330 nm）とNd:YAGレーザー（LT-2137 from Lotis-TII, 10 mJ/pulse, パルス幅 18 ns）の第3（355 nm）および第4（266 nm）高調波を用いた。過渡吸収測定の光路図は既報に記してある[27]。過渡吸収シグナルはユニソク社製USP-T1000-MLTを用いて解析した。汎密度関数理論（DFT）に基づく量子化学計算はGaussian 09 Rev D.01を用いてB3LYP/6-31G（d）レベルで行った[28]。

3. 結果と考察

3. 1. 吸収発光測定

Fig. 1にFF、FT、TT、MeFF、PrFF、MeFT、PrFT、MeTTおよびPrTTの吸収発光スペクトルを示す。

360 nmに吸収を示すアルキル無置換のジケトンは、エノール体であることを示す。一方、260－270 nmに吸収を示すアルキル置換体は、ケト体であることが判る。いずれの化合物からの295 Kでのケイ光は観測されない。アルキル無置換体からは77 Kで弱いケイ光が観測された。ケイ光が観測されなかったことはアルキル置換体のS_1の電子状態構造はn, π^*であり、アルキル無置換体はπ, π^*である。観測されたリン光から三重項エネルギー（E_T）を決定し結果をTable 1に示した。吸収極大波長（λ_{max}）とS_1エネルギー（E_S）も Table 1に示した。

3. 2. 定常光光分解

我々はアセトニトリル中、330 nmより長波長のUV-B光を30 分間、アルキル置換されていない化合物に照射したが、吸収スペクトルの変化は溶存酸素の有無にかかわらず起こらなかった。一方、254 nmのUV-C光をアルキル体に照射した時に観測された吸収スペクトル変化をFig. 2に示す。

照射時間の増加につれて270 nmのケト体の吸光度は減少し、新たな吸収帯が380 nmに現れた。この吸収帯はアルキル基を有さない化合物の吸収スペクトルとは異なっている。光分解中、等吸収点は現れなかったことは光分解で様々な中間体が生成しているためと考えられる。そのため反応出発物質のアルキルプロピルのケト体の光分解の量子収率は、吸収スペクトル変化からは決定できなかった。光照射後、試料を室温暗所に放置後2、3日経過すると、380 nmの吸収帯は消滅し、元のケト体の吸収が現れた。これは380 nmの吸収帯がアルキル基を有するエノール体

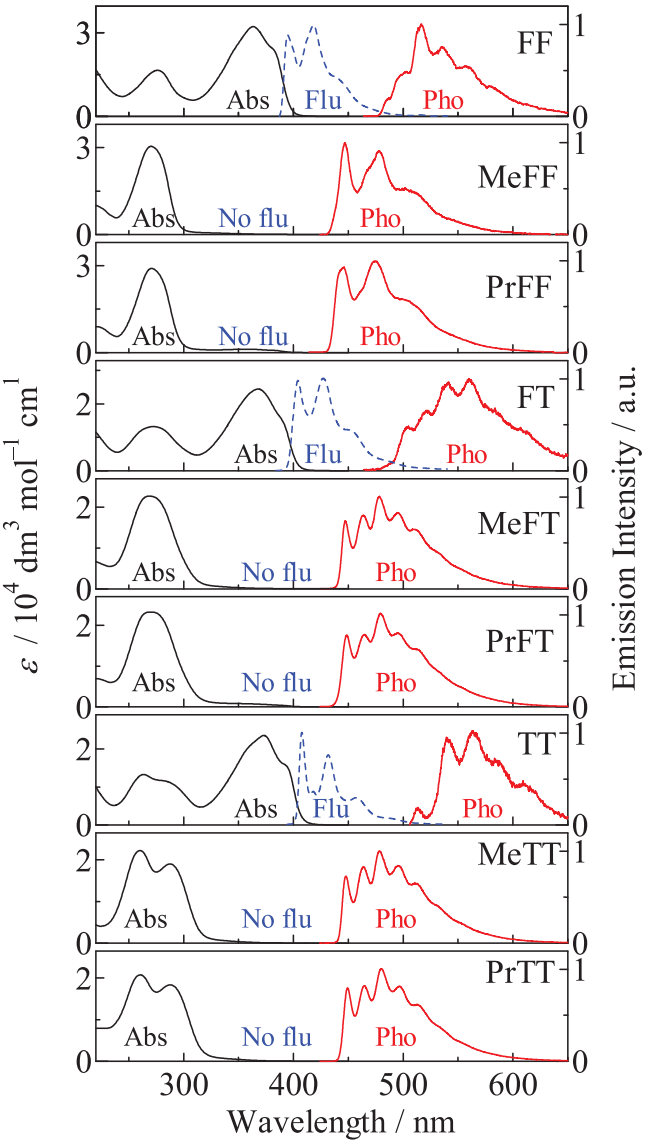


Fig.1 Absorption spectra (solid) in ACN at 295K and fluorescence (blue broken) and phosphorescence (red) spectra in EtOH at 77K. The alkyl-free diketones were excited at 370nm while the alkyl diketones were at 300 nm.

Table 1 Absorption properties, excited state energies, triplet properties and lifetimes of the rotamers for the 1,3-diketones used in the present work.

Compound	λ_{max} [a] / nm (ε / dm^3 mol^{-1} cm^{-1})	E_S [b] / kcal mol^{-1}	E_T [c] / kcal mol^{-1}	τ_T [d] / μs	λ_{max}^{T-T} [e] / nm	τ_{rot} [f] / μs
FF	360 (31800)	72.4	57.2	-	-	280
FT	360 (24700)	70.5	56.6	-	-	230
TT	370 (23100)	70.0	68.5	-	-	320
MeFF	270 (30700)	~75	63.9	2.3	430	-
MeFT	270 (22800)	~75	63.8	1.5	350	-
MeTT	260 (22200)	~75	63.8	0.36	350	-
PrFF	270 (29100)	~75	64.0	3.0	430	-
PrFT	270 (23200)	~75	63.6	1.7	350	-
PrTT	260 (20800)	~75	63.6	0.40	350	-

a) The maximum wavelength of the absorption in ACN.
b) Values for FF, FT and TT were averaged energies determined from the 0-0 origins of the absorption spectra in ACN at 295 K and of the corresponding fluorescence spectra in EtOH at 77 K while that for the others were determined from the onsets of the absorption spectra.
c) Determined from the 0-0 origin of the phosphorescence spectrum in EtOH at 77 K.
d) The triplet lifetime in ACN at 295 K.
e) The maximum wavelength of the triplet-triplet absorption in ACN at 295 K.
f) The recovery lifetime of the rotamer in ACN at 295 K.

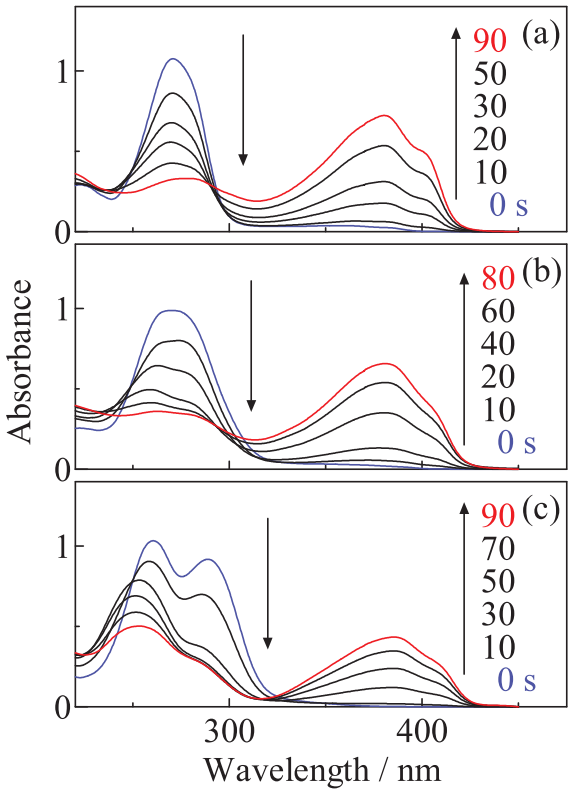


Fig. 2 Absorption spectral changes obtained upon 254nm photolysis of PrFF (a), PrFT (b) and PrTT (c) in Ar-purged ACN at 295K. The irradiation times are noted in the figure.

であることを強く証明する事実である。酸素溶存したアセトニトリル中ではケト体の光分解は起こらなかった。このことからプロピル体の様々な中間体の三重項がケト体からエノール体への異性化反応に関連していると考えられる。一方、エノール体からケト体への熱異性化反応は一次反応解析でも二次反応解析でも解析できなかったので、回復過程の反応速度論的議論はできなかった。以上の実験事実から様々な分子構造を有したプロピルジケトンのケト体がこの反応過程で並列的に、または連鎖的に発生していると思われる。330 nm より長波長の光をエノール体に照射したが、溶存酸素の有無にかかわらず回復過程は早くならなかった。以上の結果をまとめると、プロピル基をもつケト体はアセトニトリル中の光照射により三重項でエノール体への異性化反応を起こし、2、3 日で元のケト体へ回復することが判った。メチル置換されたケト体でも同様の光-熱反応が吸収スペクトルから観測された。

Fig. 3 に MeFF、MeFT および MeTT のアセトニトリル溶液溶液に 254 nm に光を照射したときに観測された吸収スペクトルを示す。

照射時間の増加につれて 270 nm のアルキルメチルのケト体の吸光度は減少し、新たな吸収帯が 380 nm に現れた。この吸収帯はアルキル基を有さない化合物の吸収スペクトルとは異なっている。プロピル基を有するケト体の光分解生成物と同様にメチル基を有するエノール体が生成しているものと考えられる。光分解中、等吸収点は現れなかったことは光分解で様々な中間体が生成していると考えられる。そのため反応出発物質のアルキルメチルのケト体の光分解の量子収率は吸収スペクトル変化からは決定できなかった。

MeFF と MeFT はアルゴン飽和したアセトニトリル溶液中の光照射で吸収スペクトルが減少したが、酸素溶存中では減少が遅くなった。これは MeFF と MeFT が三重項で分解反応が進行するためである。一方、MeTT のアセトニトリル中の光分解過程では、溶存酸素の有無にかかわらず光分解が進行することが判った。これは MeTT の光分解は励起一重項で進行していることを示唆する。光分解で反応したメチルケト体の反応生成物であるメチルエノール体は、暗所放置により 2, 3 日後、元のケト体の吸収体が回復することが判った。結局、アルキルケト体は光照射

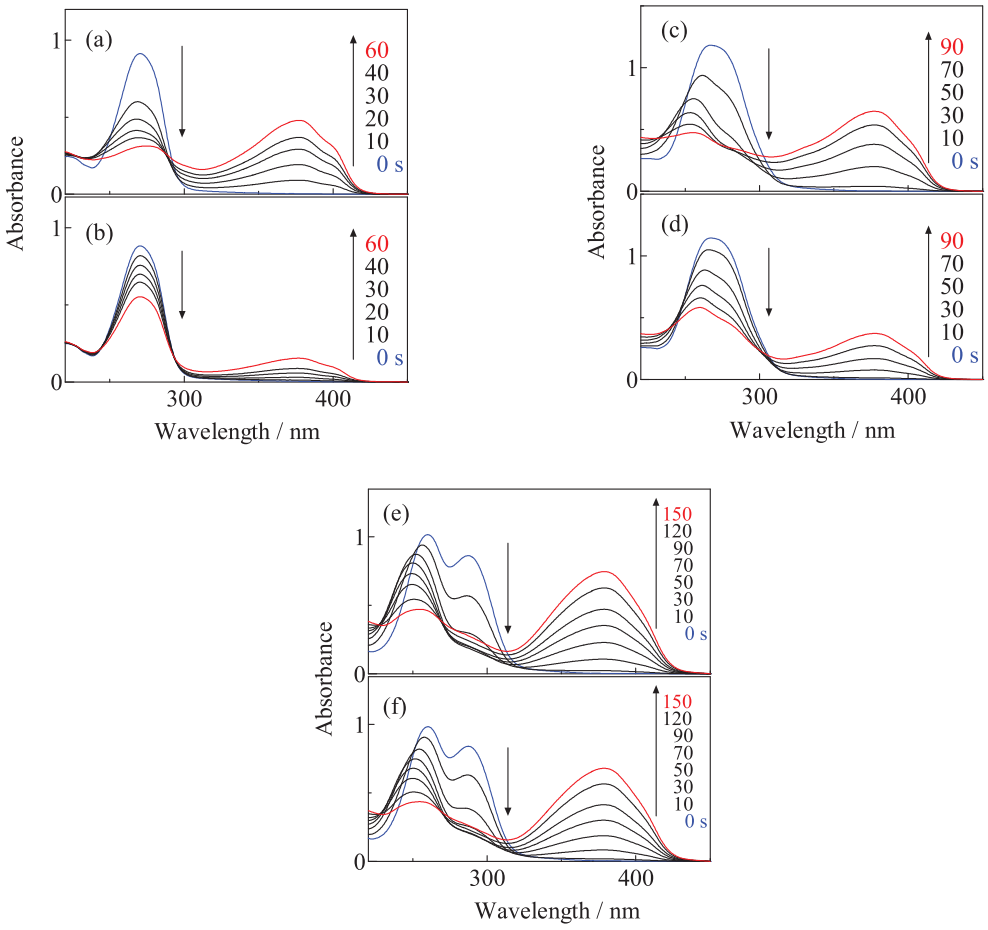


Fig. 3 Absorption spectral changes upon 254 nm photolysis of MeFF in Ar-purged ACN (a) and aerated ACN (b), of MeFT in Ar-purged ACN (c) and aerated ACN (d), and of MeTT in Ar-purged ACN (e) and aerated ACN (f).

によりエノール体へ光異性化し、2，3日の寿命で元のケト体へ回復することが判った(Scheme 2)。

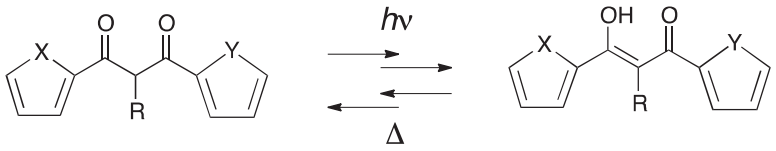
本研究で見出された見出された光熱異性化過程は、報告されているアルキルAB類の光反応（MeABは光照射により三重項生成し、異性化は起こらず[23] PrABはNorrish Type Ⅱ反応を起こす[26]）とは全く異なる挙動を示した。この違いは芳香環の違いに由来すると考えられる。DBMの三重項電子構造がn,π*であるのに対し、ベンゼン環をフラン環およびチオフェン環に置換したアルキルケト体の三重項電子構造がπ，π*に入れ替わったため、異性化が進行したと考えられる。

3. 3. レーザー閃光分解法による過渡吸収測定

Fig. 4はアルキルジケトンのアセトニトリル溶液に266 nmのレーザー光を照射したときに観測された過渡吸収スペクトルを示す。

MeFFとPrFF の過渡吸収スペクトルの形はよく似ているが、他のアルキルケト体の過渡吸収スペクトルの形とは異なっている。過渡吸収は一次の速度式に従ってマイクロ秒領域の寿命（τ_T）で減少した。得られた寿命の値をTable 1に示す。酸素溶存条件下では減衰の寿命は短くなったことから、観測された過渡吸収スペクトルはアルキルケト体の三重項－三重項吸収と同定できる。三重項－三重項吸収の極大波長（λ_{max}^{T-T}）をTable 1に示す。MeTT以外のアルキルケト体で得られた三重項減衰の寿命の逆数がエノール体へ異性化するときの速度定数である。三重項－三重項吸収が消滅後、350 nmより長波長域には何も吸収は観測されなかった。

次にレーザー閃光分解法を用いて、光照射により生成したアルキルエノール体とアルキル基を持たないエノール体の過渡吸収を測定した。DBMのエノール体の光反応における特徴はScheme 1に示した様に光異性化反応である。DBMのエノール体にレーザー光照射後観測される過渡吸収スペクトルは、回転異性体が生じることによるブリーチングであることが多く報告されている[6, 8, 12, 15]。Fig. 5にアルキル基を持たない FF、FT、およびTTに355 nmレーザー光を照射したときに観測された過渡吸収スペクトルを示す。



X, Y = O, S

R = Me, *n*-C_3H_7

Scheme 2　Keto-enol tautomerizations of the alkyl diketones studied in the present work.

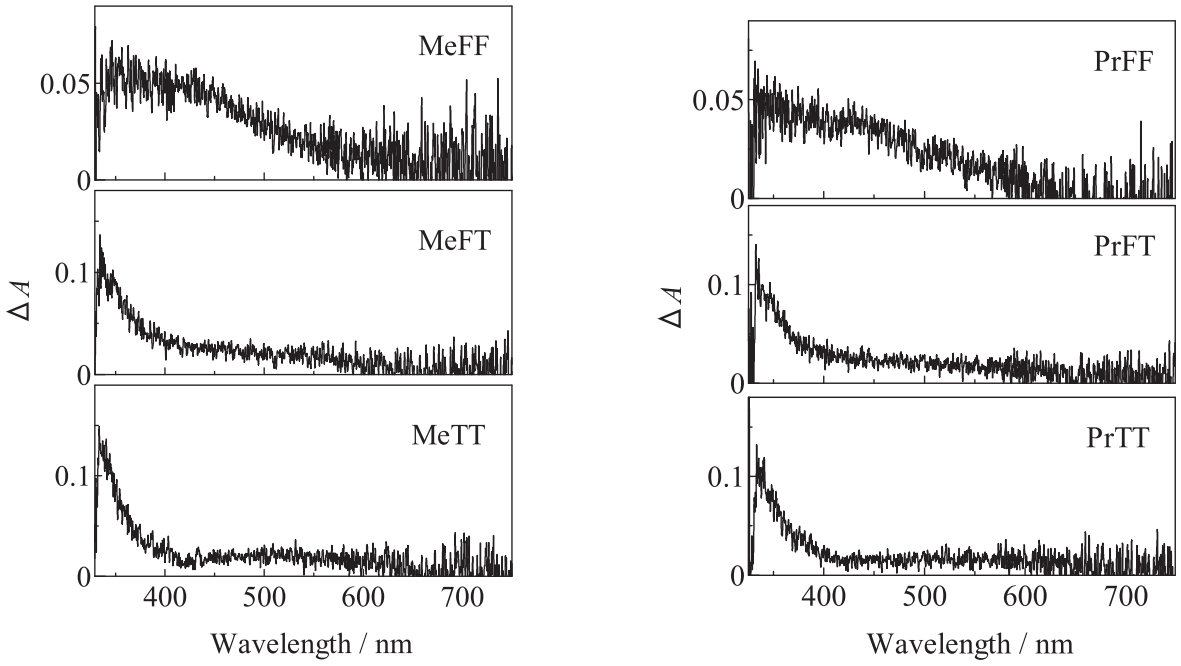


Fig. 4　Transient absorption spectra at 100 ns obtained upon 266 nm laser photolysis of the alkyl diketones in Ar-purged ACN at 295 K.

380 nmに観測されるブリーチングはアルキル無置換体のS_1状態で生成した回転異性体により現れたと解釈できる。ブリーチングは回転異性体の緩和に伴う現象で、数百マイクロ秒の寿命（τ_{rot}）で回復した。得られたτ_{rot}の値をTable 1に示した。τ_{rot}の値は溶存酸素の有無に依存しなかった。以上の実験事実からアルキル基を持たないFF、FT およびTTはDBMの光化学過程と同じ失活過程を辿ることが判った。一方、事前に254 nmの光照射を行い生成させたアルキル基を有するエノール体に355 nmのレーザー光照射を行い、過渡吸収の観測を行った。しかし、320 − 600 nmの波長領域で、100 ナノ秒から2 ミリ秒の時間領域では、過渡吸収は何も観測されなかった。アルキル基を有するエノール体からはケイ光は観測されていないことから、アルキル基を有するエノール体の励起一重項からの失活過程は内部転換であることが判った。

3. 4. DFT量子化学計算による生成熱の計算

本研究で扱ったアルキルジケトンのエネルギー状態を議論するために、それらのケト体およびエノール体の生成熱（Δ_fH）を、アセトニトリルを連続媒体としたモデルに適用し、B3LYP/6-31G（d）レベルのDFT計算で算出した。アルキル基を有さないエノール体とその回転異性体の生成熱も同様の方式で算出した。FT、MeFTおよびPrFTのエノール体の構造にはChart 2に示す様にEnol Type F とEnol Type Tの二つの構造が考えられるので、計算の際はそれらも考慮した。

Table 2に ケト体とエノール体の生成熱の差（Δ_fH（enol）− Δ_fH（keto））、および回転異性体とエノール体の生成熱の差（Δ_fH（rot）− Δ_fH（enol））を示した。

アルキルエノール体の生成熱の値はケト体の値より8 − 19 kcal mol^{-1}程大きいことが判る（Table 2）。このことは、アルキルエノール体からケト体へは発熱的に異性化反応が起こる可能性を示唆している。逆にアルキル基を有する場合の回転異性体とエノール体の生成熱の差は（Δ_fH（rot）-Δ_fH（enol）、Table 2）、−1.3 kcal mol^{-1}から14.2 kcal mol^{-1}まで変化している一方、アルキル基の無いエノール体は発熱的な結果が得られている。我々はアルキル基の無いエノール体で（FF, FTおよびTT）回転異性体が生成していることを確かめている。計算で得られた生成熱の差（Δ_fH（rot）− Δ_fH（enol））が発熱的であることから、回転異性体が観測されなかった理由は状態エネルギーにあるのではなく、励起一重項状態で進行するC-C二重結合を軸とした回転の際のアルキル基の立体障害に由来すると考えた。以上の考察を踏まえて、本研究で用いたアルキルジケトンのケト体、エノール体および回転異性体のエネルギーダイアグラムをScheme 3に示す。

アルキルケト体の光反応はMeTT はS$_1$状態で、その他のアルキル体はT$_1$状態で進行しエノール体を形成する。元のケト体の分子構造とは異なる励起状態を経由してエノール化は進行すると考えられる。形成されたエノール体は熱的障壁（ΔE）を有する様々な分子構造を有する中間体を経て元のケト体を回復する。対して、アルキルエノール体を光励起するとそのS$_1$状態が形成されるが、S$_1$状態は回転異性体を形成することなく内部変換により基底状態へ失活する。回転異性体が形成されない理由はジケトン骨格のC-C二重結合を軸とした回転に対して、C2位に位置するアルキル基の立体障害のためであると考えられる。

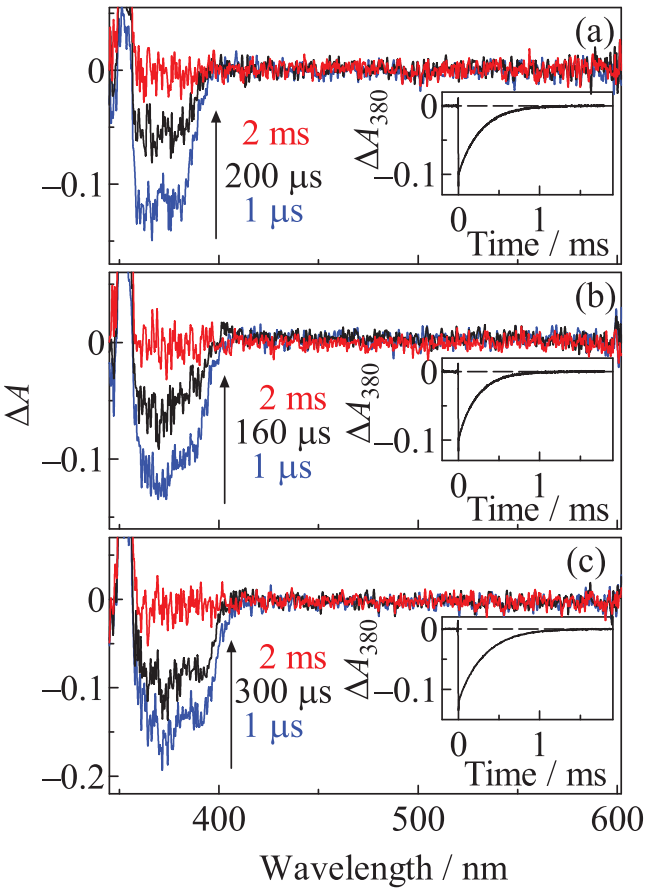


Fig. 5 Transient absorption spectra obtained upon 355 nm laser pulsing in FF (a), FT (b) and TT (c) in Ar-purged ACN at 295 K. Insets; time profiles at 380 nm.

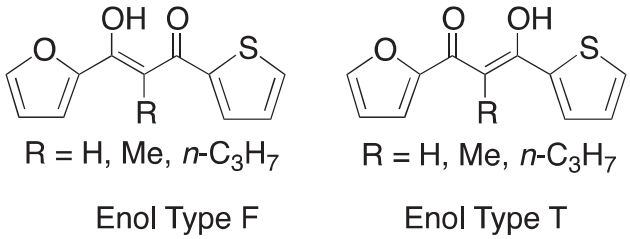
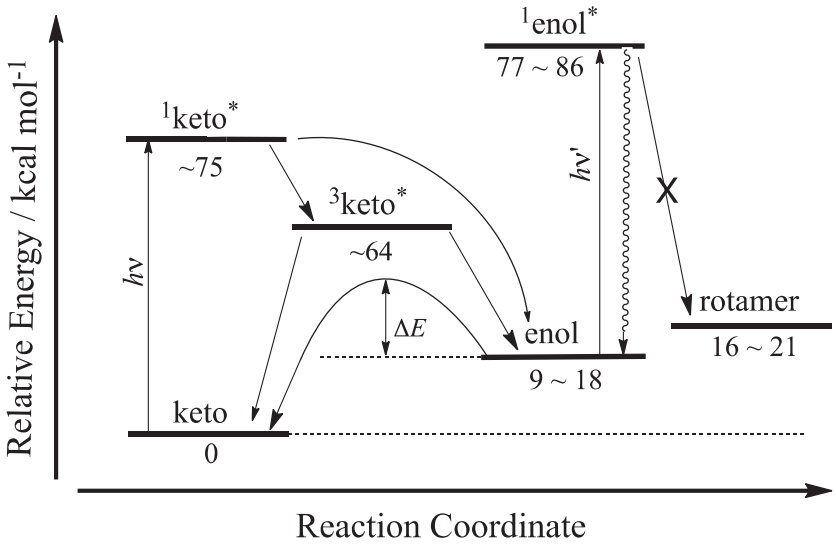


Chart 2 Molecular configurations for the enol forms of FT, MeFT and PrFT.

Table 2 Differences in $\Delta_f H$ between the keto and enol forms and between the enol and rotamer forms.

Compound	$\Delta_f H$ (enol) - $\Delta_f H$ (keto) / kcal mol^{-1}	$\Delta_f H$ (rot) - $\Delta_f H$ (enol) / kcal mol^{-1}
FF	-	4.0
FT	-	3.7 [a] (0.5) [b]
TT	-	0.4
MeFF	14.6	4.2
MeFT	18.8 [a] (16.9) [b]	-0.5 [a] (0.7) [b]
MeTT	16.2	1.1
PrFF	17.7	-1.3
PrFT	7.7 [a] (9.6) [b]	14.2 [a] (9.5) [b]
PrTT	16.3	0.7

a) For enol Type F. b) For enol Type T.



Scheme 3 A schematic energy diagram for the tautomerization of the alkyl diketones and the photophysical pathway of the enol forms. The S_1 energy of the enol form was evaluated from the onsets of the absorption spectra to be ca. 68 kcal mol^{-1}.

4. 総 括

我々は5員環を有する2-アルキル-1,3-ジケトンを新規に合成し、アセトニトリル中で定常光およびレーザー閃光分解法によりそれらの光化学的挙動について研究を行った。アルキルケト体を光励起するとエノール体が生成することが新たに判った。この光反応過程では様々な構造のMeTTのS_1状態、その他のアルキルケト体ではT_1状態が関与している。光生成したエノール体は数日内で元のケト体へ回復する。この回復反応過程には熱的障害が存在すると考えられる。一方、光生成したアルキルエノール体を光励起すると回転異性体を形成することなくS_1状態から内部転換過程によって基底状態へ失活する。これらの実験事実よりアルキルエノール体は一時的なUV-Aサンスクリーンとして振る舞うことが判った。サンスクリーンとしての光熱変換機構は従来のDBM体で見られた回転異性体形成ではなく、内部転換過程であることが新たに判明した。この光熱変換機構が生じる理由は、アルキルエノール体のS_1状態でのジケトン骨格のC-C二重結合を軸とした回転に対してC2位に位置するアルキル基の立体障害であると考えられる。アルキルエノール体からアルキルケト体への熱回復過程もこのアルキル基による立体障害が影響していると考えられる。量子化学計算により決定したケト体、エノール体および回転異性体の生成熱に基づき、ケト-エノール光熱異性化反応過程とエノール体の光励起失活過程のエネルギー相関図をScheme 3にまとめた。

（引用文献）

1）Veierov D., Bercovici T., Fischer E., Mazur Y. and Yogev A.: Photoisomerization of the enol form of 1,3-dicarbonyl compounds, J. Am. Chem. Soc., 99, 2723-2729, 1977.

2）Vila A. J., Lagier C. M. and Olivieri A. C.: Proton transfer in solid 1-phenylbutane-1,3-dione and related 1,3-diones as studied by carbon-13 CPMAS NMR spectroscopy and AM1 calculations, J. Phys. Chem., 95, 5069-5073, 1991.

3）Raczynska E. D., Kosinska W., Osmialowski B. and Gawinecki R.: Tautomeric Equilibria in Relation to π Electron Delocalization, Chem. Rev., 105, 3561-3612, 2005.

4）Gacoin P.: Studies of the Triplet State of Carbonyl Compounds. I. Phosphorescence of β-Diketones, J. Chem. Phys., 57, 1418-1425, 1972.

5）Yankov P., Saltiel S. and Petkov I.: Photoketonization and excited state relaxation of dibenzoylmethane in non-polar solvents, J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 41, 205-214, 1988.

6）Tobita S., Ohba J., Nakagawa K. and Shizuka H.: Recovery mechanism of the reaction intermediate produced by photoinduced cleavage of the intramolecular hydrogen bond of dibenzoylmethane, J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 92, 61-67, 1995.

7）Hansen B. K. V., Winther M. and Spanget-Larsen J.: Intramolecular hydrogen bonding. Spectroscopic and theoretical studies of vibrational transitions in dibenzoylmethane enol, J. Mol. Struct., 790, 74-79, 2006.

8）Aspée A., Aliaga C. and Scaiano J. C.: Transient enol isomers of dibenzoylmethane and avobenzone as efficient hydrogen donors toward a nitroxide pre-fluorescent probe, Photochem. Photobiol., 83, 481-485, 2007.

9）Gonzenbach H., Hill T. J. and Truscott T. G.: The triplet energy levels of UVA and UVB sunscreens, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 16, 377-379, 1992.

10）Roscher N. M., Lindemann M. K. O., Bin Kong S., Cho C. G. and Jiang P.: Photodecomposition of several compounds commonly used as sunscreen agents, J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 80, 417-421, 1994.

11）Schwack W. and Rudolph T.: Photochemistry of dibenzoyl methane UVA filters Part 1, J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 28, 229-234, 1995.

12）Andrae I., Bringhen A., Böhm F., Gonzenbach H., Hill T., Mulroy L. and Truscott T. G.: A UVA filter (4-*tert*-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane): photoprotection reflects photophysical properties, J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 37, 147-150, 1997.

13）Dubois M., Gilard P., Tiercet P., Deflandre A. and Lefebvre M. A.: Photoisomerisation of the sunscreen filter PARSOL© 1789, J. Chim. Phys., 95, 388-394, 1998.

14）Gasparro F. P., Mitchnick M. and Nash J. F.: A review of sunscreen safety and efficacy, Photochem. Photobiol., 68, 243-256, 1998.

15）Cantrell A. and McGarvey D. J.: Photochemical studies of 4-*tert*-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane (BM-DBM), J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 64, 117-122, 2001.

16）Eric C. and Bernard G.: Photostabilization of butyl methoxydibenzoylmethane (avobenzone) and ethylhexyl methoxycinnamate by bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine (Tinosorb S): A new UV broadband filter, Photochem. Photobiol., 74, 401-406, 2001.

17）Wetz F., Routaboul C., Lavabre D., Garrigues J.-C., Rico-Lattes I., Pernet I. and Denis A.: Photochemical behavior of a new long-chain UV absorber drived from 4-*tert*-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane, Photochem. Photobiol., 80, 316-321, 2004.

18）Damiani E., Rosati L., Castagna R., Carloni P. and Greci L.: Changes in ultraviolet absorbance and hence in protective efficacy against lipid peroxidation of organic sunscreens after UVA irradiation, J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 82, 204-213, 2006.

19）Dondi D., Albini A. and Serpone N.: Interactions between different solar UVB/UVA filters contained in commercial suncreams and consequent loss of UV protection, Photochem. Photobiol. Sci., 5, 835-843, 2006.

20）Damiani E., Baschong W. and Greci L.: UV-Filter combinations under UV-A exposure: Concomitant quantification of over-all spectral stability and molecular integrity, J. Photochem. Photobiol. B: Biol., 87, 95-104, 2007.

21）Huong S. P., Rocher E., Fourneron J.-D., Charles L., Monnier V., Bun H. and Andrieu V.: Photoreactivity of the sunscreen butylmethoxydibenzoylmethane (DBM) under various experimental conditions, J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 196, 106-112, 2008.

22）Mturi G. J. and Martincigh B. S.: Photostability of the sunscreening agent 4-*tert*-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane (avobenzone) in solvents of

different polarity and proticity, J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 200, 410–420, 2008.
23) Paris C., Lhiaubet-Vallet V., Jiménez O., Trullas C. and Miranda M. Á.: A blocked diketo form of avobenzone: Photostability, photosensitizing properties and triplet quenching by a triazine-derived UVB-filter, Photochem. Photobiol., 85, 178–184, 2009.
24) Yamaji M. and Kida M.: Photothermal Tautomerization of a UV sunscreen (4-*tert*-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane) in acetonitrile studied by steady-state and laser flash photolysis, J. Phys. Chem. A, 117, 1946–1951, 2013.
25) Oguchi-Fujiyama N., Miyazawa K., Kikuchi A. and Yagi M.: Photophysical properties of dioctyl 4-methoxybenzylidenemalonate: UV-B absorber, Photochem. Photobiol. Sci., 11, 1528–1535, 2012.
26) Yamaji M., Paris C. and Miranda M. Á.: Steady-state and laser flash photolysis studies on photochemical formation of 4-*tert*-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane from its derivative via the Norrish Type II reaction in solution, J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 209, 153–157, 2010.
27) Yamaji M., Aihara Y., Itoh T., Tobita S. and Shizuka H.: Thermochemical profiles on hydrogen atom transfer from triplet naphthol and proton-induced electron transfer from triplet methoxynaphthalene to benzophenone via triplet exciplexes studied by laser flash photolysis, J. Phys. Chem., 98, 7014–7021, 1994.
28) Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., G. E. Scuseria, Robb M. A., Cheeseman J. R., Scalmani G., Barone V., Mennucci B., Petersson G. A., Nakatsuji H., Caricato M., Li X., Hratchian H. P., Izmaylov A. F., Bloino J., Zheng G., Sonnenberg J. L., Hada M., Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., T. Nakajima, Honda Y., Kitao O., Nakai H., Vreven T., J. A. Montgomery J., Peralta J. E., Ogliaro F., Bearpark M., Heyd J. J., Brothers E., Kudin K. N., Staroverov V. N., Keith T., Kobayashi R., J. Normand, Raghavachari K., Rendell A., Burant J. C., Iyengar S. S., Tomasi J., Cossi M., Rega N., Millam J. M., Klene M., Knox J. E., Cross J. B., Bakken V., Adamo C., Jaramillo J., Gomperts R., Stratmann R. E., Yazyev O., Austin A. J., Cammi R., Pomelli C., Ochterski J. W., Martin R. L., Morokuma K., Zakrzewski V. G., Voth G. A., Salvador P., Dannenberg J. J., Dapprich S., Daniels A. D., Farkas O., Foresman J. B., Ortiz J. V., Cioslowski J. and Fox D. J.: Gaussian 09, Revision D.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2010.

（参考資料）

謝辞にコスメトロジー研究振興財団の支援が記されている原著論文（投稿中も含む）

1．Yamaji M., Suwa Y., Shimokawa R., Paris C. and Miranda M. A.: Photochemical reactions of halogenated aromatic 1,3-diketones in solution studied by steady state, one- and two-color laser flash photolyses, Photochem. Photobiol. Sci., 2015, **14**, 1673–1684.
2．Suwa Y. and Yamaji M.: Steady state and laser photolysis studies of keto-enol tautomerizations in 2-alkyl-1,3-diketones having five-membered rings in acetonitrile: Temporal UV-A sunscreen, J. Photochem. Photobiol. *A: Chem*., 2016, **316**, 69–74.
3．Mamiya M., Suwa Y., Okamoto H. and Yamaji M., Preparation and photophysical properties of fluorescent difluoroboronated β-diketones having the phenanthrene moieties studied by emission and transient absorption measurements: Photochem. Photobiol. Sci., 2016, **15**. 278–286.
4．Suwa Y., Yamaji M. and Okamoto H.: Synthesis and photophysical properties of difluoroboronated β-diketones with the fluorene moiety that have high fluorescence quantum yields, Tetrahedron Lett., 2016, **57**, 1695–1698.

Ⅱ． 生体作用、安全性に関する分野

必須脂肪酸欠乏時における皮膚障害発症のメカニズムの解明

お茶の水女子大学基幹研究院自然科学系

市　育代

Essential fatty acids (EFA) and their downstream long-chain polyunsaturated fatty acid (PUFA) are localized to cell membranes as phospholipid esters and play critical roles in regulating membrane structure, dynamics, and permeability. It is reported that EFA deficiency state causes the disruption of the skin barrier. Therefore, changes of fatty acids during EFA deficiency might participate in pathologic changes in the skin. In EFA deficiency animals, 5,8,11-eicosatrienoic acid (Mead acid, C20:3n-9) is endogenously synthesized from oleic acid, and is detected in the plasma and tissues. Mead acid is thought to be used in biological membranes as a substitute for other PUFAs. In this study, we investigated the change of Mead acid in inflammation and the influence of the decrease of Mead acid on the skin barrier function during EFAD state.

To study change of fatty acid metabolism in the skin by inflammation, we investigated the change of Mead acid in human keratinocyte HaCaT cells of EFAD state. The mRNA of inflammatory cytokine, such as IL-1β and IL-6 were significantly increased by the stimulation of TNF-α. The mRNA of filaggrin and involucrin, which proteins correlate with barrier function, were decreased by TNF-α, suggesting that the barrier function was disrupted in HaCaT cells by inflammatory. The Mead acid composition in the cells with treatment of TNF-α was reduced 33% of the level in control cells, but other fatty acid compositions did not changed significantly. These results suggesteed that Mead acid synthesis was suppressed in EFAD keratinocytes by inflammation.

Next, we examined the influence of the inhibition of Mead acid synthesis on barrier function in human keratinocyte HaCaT cells. The level of Mead acid was significantly decreased by the addition of 50 μM Δ6 desaturase inhibitor sc26196. The mRNA level of filaggrin and involucrin was significantly decreased by the addition of sc26196. Moreover, we investigated the influence of Mead acid reduction on inflammatory response and ER stress. Although the IL-1β and IL-6 mRNA were unchanged by treatment of sc26196, the mRNA levels of ER stress marker genes, such as CHOP and GRP78 were significantly increased. These results suggested the possibility that inhibition of Mead acid synthesis induced the skin barrier dysfunction via up-regulation of ER stress.

1．緒　言

必須脂肪酸は生体膜の構成成分であるだけでなく、生体機能の恒常性維持にも重要な物質である。哺乳動物において必須脂肪酸が欠乏すると、成長異常や生殖機能の障害、皮膚の水分・バリア機能損失などの障害がみられることが知られている[1, 2]。皮膚のバリア機能において、セラミドやコレステロール、遊離脂肪酸から成る細胞間脂質は重要な役割を果たしており、皮膚における脂質の変化とバリア機能の異常との関連が指摘されている[3]。必須脂肪酸欠乏時の脂質の変化と皮膚バリア機能異常については、必須脂肪酸欠乏モデル動物の皮膚のセラミドにおいて、リノール酸含有アシルセラミドが減少し、代わりにオレイン酸含有アシルセラミドが増加すること、そしてその脂質の変化が経皮水分蒸散量の増加に関与している可能性が示唆されている[4]。しかしながら、必須脂肪酸欠乏時の脂肪酸の変化と皮膚障害に関する知見は乏しい。

The clarification of the mechanism of skin lesions in essential fatty acid deficiency states

Ikuyo Ichi

Natural Science Division, Faculty of Core Research, Ochanomizu University

必須脂肪酸欠乏時には、生体内でミード酸（C20：3n-9）という多価不飽和脂肪酸がオレイン酸から産生されることが知られており[5]、我々は必須脂肪酸欠乏時に産生されるミード酸に関して産生遺伝子と産生経路を明らかにしている[6]。ミード酸はアラキドン酸（C20:4n-6）と同じΔ5位に二重結合を有するなど構造が類似している。アラキドン酸はプロスタグランジンやロイコトリエンなど炎症性代謝物の前駆体であり、代謝物は関節リウマチ[7]や気管支喘息[8]などの様々な炎症性疾患に関与していることが知られている。ミード酸に関してもロイコトリエン様の化合物が同定されているが[9]、ミード酸やその代謝物の生理機能はよくわかっていない。そこで本研究では、皮膚細胞におけるミード酸の生理作用を明らかにするにあたり、必須脂肪酸欠乏時のミード酸の産生抑制が皮膚のバリア機能に及ぼす影響を検討した。

また、皮膚において必須脂肪酸は重要な構成成分であり、必須脂肪酸などの多価不飽和脂肪酸は生体膜のリン脂質に多く存在している。生体膜リン脂質には、飽和脂肪酸から多価不飽和脂肪酸まで様々な脂肪酸が結合しており、多くの分子種が存在するが、ホスファチジルイノシトール（PI）はホスファチジルコリン（PC）やホスファチジルエタノールアミン（PE）などの他のリン脂質と異なり、sn-1位にステアリン酸（C18：0）、sn-2位にアラキドン酸を有する分子種がその殆どを占めている。我々は以前、必須脂肪酸欠

乏マウスのPIにおいてミード酸が圧倒的に多く分布することを見出している。このように必須脂肪酸欠乏時のPIでは、減少したアラキドン酸の代わりに同じΔ5位に二重結合を持つミード酸が選択的に取り込まれた可能性がある。PIは細胞内シグナル伝達において極めて重要な役割を持つ物質であり、様々な生命現象に関与するが、PIが他のリン脂質に比べて特徴的な脂肪酸鎖が必要である生物学的意義は分かっていない。最近、PIの脂肪酸鎖を規定する遺伝子で、sn-2位にアラキドン酸を導入するアシル基転移酵素lysoPI acyltransferase 1（LPIAT1）が同定された[10]。LPIAT1欠損マウスは脳の形態形成に異常があり、生後間もなく死に至る。しかし、必須脂肪酸欠乏時の皮膚においてリン脂質の脂肪酸鎖の変化が皮膚のバリア異常とどのように関わっているかは不明である。そこで本研究では、必須脂肪酸欠乏の皮膚細胞においてPIの特異的な脂肪酸組成がどのような意義を有しているか検討を行った。

2. 実　験

2. 1. 細胞培養

ヒト表皮角化細胞株HaCaT細胞およびマウス線維芽細胞株NIH3T3細胞は、10％FBSと1％PS（Penicillin-Streptomycin）と1%ピルビン酸ナトリウムを含むDMEM培地で、37℃、5 %CO_2条件下で培養した。

2. 2. Δ6位不飽和化酵素の阻害剤によるミード酸の産生抑制

必須脂肪酸欠乏状態にあるHaCaT細胞において、細胞播種の48時間後にミード酸産生酵素であるΔ6位不飽和化酵素の阻害剤sc26196を2, 10, 50 μM添加し、24時間後に細胞を回収した。

2. 3. TNF-α による炎症誘導の条件

HaCaT細胞において、細胞播種48時間後にTNF-αを5ng/mLおよび20ng/mL添加し、24時間後に細胞を回収した。

2. 4. siRNAによる発現抑制

LPIAT1のsiRNAにはstealth RNAi（MSS246502 invitrogen）を用い、コントロールにはstealth RNAi Negative Control Duplexeを用いた。NIH3T3細胞において、細胞播種24時間後に20nMのLPIAT1のsiRNA（stealth RNAi；MSS246502 invitrogen）をLipofectamine RNAiMAXを用いて導入し、72時間後に細胞を回収した。LPIAT1の発現抑制効率は定量PCRを用いて確認した。

2. 5. ガスクロマトグラフィー質量分析装置（GC-MS）による脂肪酸の分析

細胞はBligh & Dyer法にて脂質を抽出後、硫酸－メタノールによるメチルエステル化を行い、GC-MS（GCMS-QP2010 Ultra, 島津製作所）にて脂肪酸を解析した。

3. 結　果

3. 1. HaCaT細胞におけるミード酸の産生抑制がストレス因子に及ぼす影響

我々は、必須脂肪酸欠乏時のミード酸がΔ6位不飽和化酵素を介して、オレイン酸（C18:1n-9）から産生されることを明らかにしている[5]。そこで、Δ6位不飽和化酵素の阻害剤sc26196を用いて、ミード酸の産生を抑制した際の細胞機能や炎症性因子に及ぼす影響を調べた。

必須脂肪酸欠乏状態にあり、ミード酸が存在するヒト表皮角化細胞HaCaTへの50μMのsc26196添加よって、ミード酸は15%程度まで減少した（図1）。しかしながら、他の多価不飽和脂肪酸の変化はみられなかった。また、MTT assayにより、sc26196添加による細胞死について調べたところ、50μMのsc26196添加では細胞死はみられなかった（図2）。

次に、必須脂肪酸欠乏におけるミード酸の産生抑制が皮

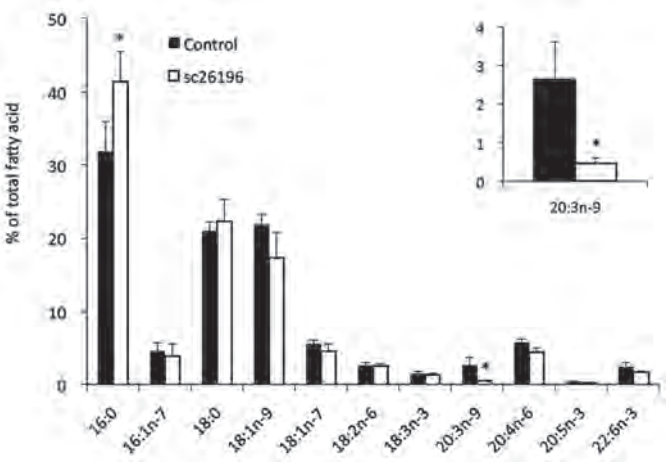


図1　Δ6不飽和化阻害剤によるHaCaT細胞の脂肪酸組成の変化
細胞播種の48時間後に、50μMのsc26196を添加し、24時間後に細胞を回収した。Mean±SE (n=3), *; p<0.05 vs Control

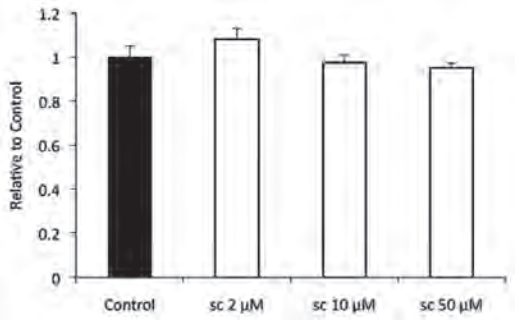


図2　Δ6不飽和化阻害剤添加が細胞死に及ぼす影響
細胞播種の48時間後に、50μMのsc26196を添加し、24時間後に細胞を回収した。Mean±SE (n=3), *; p<0.05 vs Control

膚のバリア機能関連タンパク質であるフィラグリンやインボルクリンの遺伝子発現に及ぼす影響を調べた。表皮は約95%が角化細胞で構成され、分化度の異なる角化細胞が重層化した構造をしているが、バリア機能は主に最外層である角層が担っていることが知られている。角層におけるバリア機能に関与する代表的なタンパク質として、フィラグリンとインボルクリンが挙げられる。フィラグリンは、角化細胞骨格を形成するケラチン線維を束ね、角層構造を強固に保つとともに、分解産物である天然保湿因子は、角層の水分保持に関与している[11]。また、インボルクリンは角層の細胞膜の内側に存在する不溶性タンパク質膜の主成分となり強靭な細胞構造を形成している[12]。必須脂肪酸欠乏のHaCaT細胞へのsc26196添加によってフィラグリンやインボルクリン遺伝子発現は有意に減少した（図3）。したがって、表皮角化細胞におけるミード酸の産生抑制は皮膚バリア機能の低下を誘導する可能性が示唆された。

皮膚におけるバリア機能の異常に、皮膚細胞の炎症性因子[13]や小胞体ストレス[14]の増加が関与しているという報告がある。ミード酸産生を抑制したHaCaT細胞では、炎症性サイトカインのIL-6やIL-1βが増加し（図4a）、小胞体ストレスマーカーであるCHOPやGRP78の遺伝子発現も有意に増加した（図4b）。これらの結果より、ミード酸の産生抑制によるHaCaT細胞の皮膚バリア機能の低下には、炎症性サイトカインや小胞体ストレスの増加が関与している可能性が示唆された。

3. 2. HaCaT細胞における必須脂肪酸欠乏時の炎症誘導がミード酸産生に及ぼす影響

我々は以前、必須脂肪酸欠乏状態のマウスマクロファージ細胞株Raw264.7細胞への炎症刺激によってミード酸

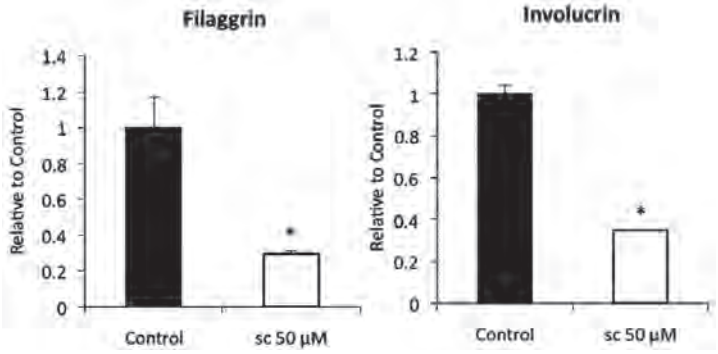


図3　ミード酸産生抑制が皮膚バリア機能関連因子発現へ及ぼす影響
細胞播種の48時間後に、50μMのsc26196を添加し、24時間後に細胞を回収した。Mean±SE (n=3), *; p<0.05 vs Control

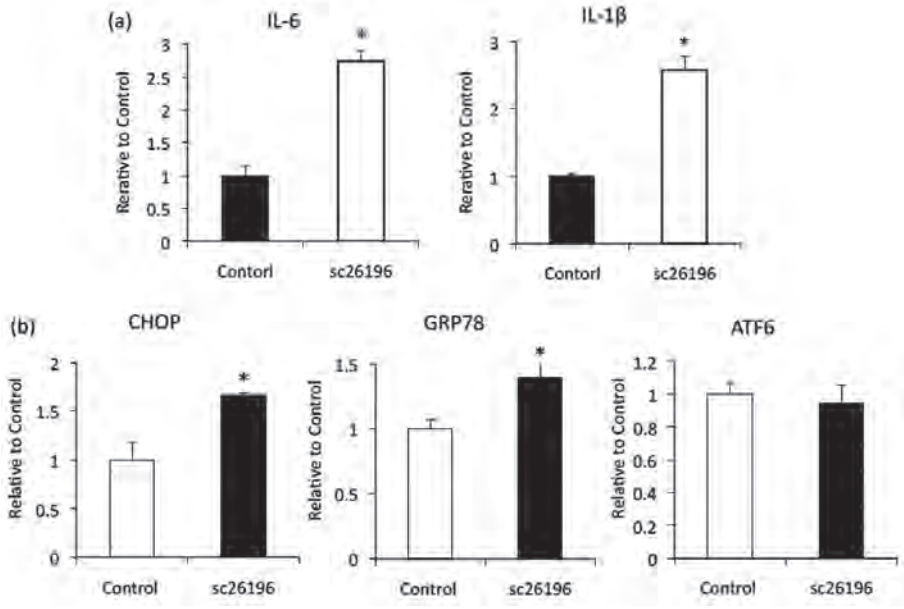


図4　ミード酸の産生抑制が炎症因子や小胞体ストレスに及ぼす影響
細胞播種の48時間後に、50μMのsc26196を添加し、24時間後に細胞を回収し、(a)炎症サイトカインと(b)小胞体ストレスのmRNAを測定した。
Mean±SE (n=3), *; p<0.05 vs Control

の産生が抑制されることを明らかにしている（未発表）。必須脂肪酸欠乏時の皮膚細胞において炎症誘導が脂肪酸代謝に及ぼす影響は不明であることから、ヒト表皮角化細胞株HaCaT細胞を用いて、必須脂肪酸欠乏時のTNF-αによる炎症誘導が脂肪酸代謝に及ぼす影響を検討した。

必須脂肪酸欠乏状態のHaCaT細胞において、5 ng/mL及び20 ng/mLのTNF-α添加では細胞生存率に変化はみられなかったことから、以降の実験は20ng/mLのTNF-αを用いて行った。まず、炎症性サイトカインのIL-6やIL-1βの遺伝子発現はTNF-αによる炎症誘導時に増加していた（図5a）。次に、皮膚バリア機能関連タンパク質のフィラグリンやインボルクリンの遺伝子発現を調べたところ、TNF-α添加によってこれらの遺伝子発現は有意に減少しており（図5b）、HaCaT細胞への炎症刺激によってバリア機能低下が誘導されている可能性が示唆された。そこで、TNF-αによる炎症誘導時の脂肪酸組成の変化を比較したところ、ミード酸はControlの33%まで減少した。しかし、その他の脂肪酸組成に大きな変化はみられなかった（図6）。したがって、炎症誘導によるミード酸の減少が皮膚のバリア機能の破綻に関与している可能性が示唆された。

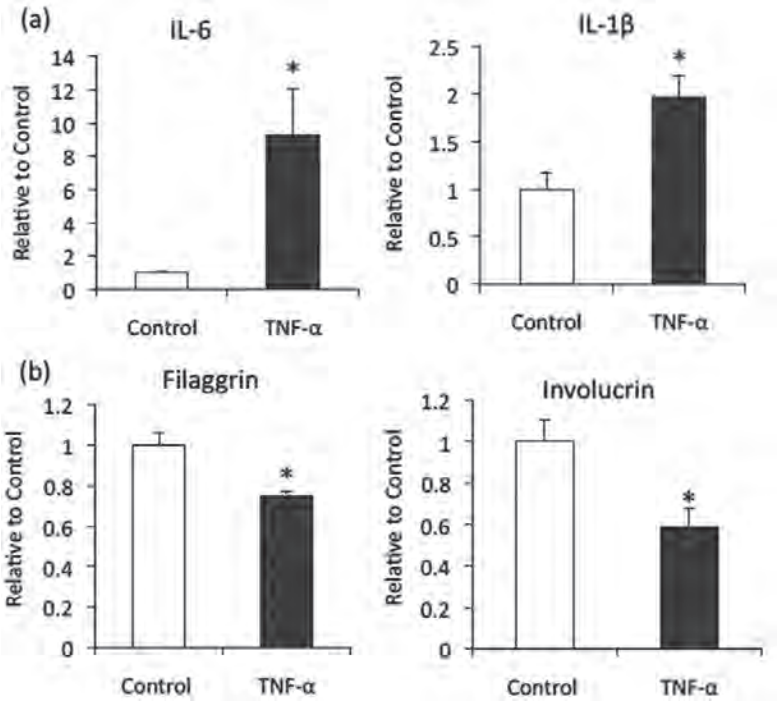


図5　TNF-α による炎症誘導と皮膚バリア機能関連因子への影響
細胞播種の 48 時間後に 20ng/mL の TNF-α と 50μM を添加し、24 時間後に細胞を回収した。Mean±SE (n=3), *; p<0.05; 異なる文字間で有意差あり

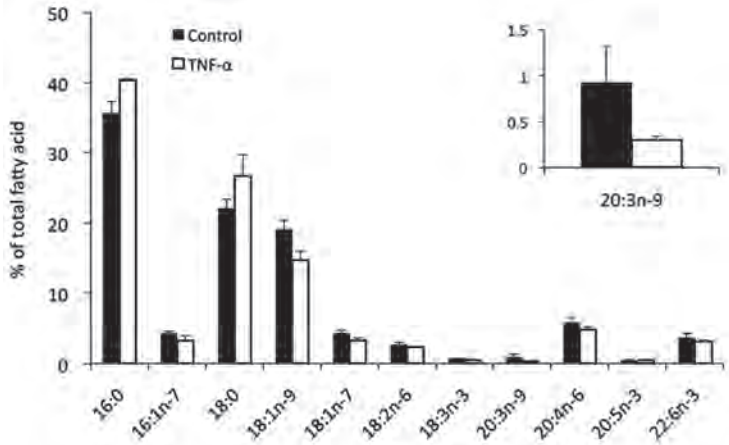


図6　HaCaT 細胞における TNF-α の炎症誘導による脂肪酸組成の変化
細胞播種 48 時間後に 20ng/mL の TNF-α を添加し、24 時間後に細胞を回収した。Mean±SE (n=3), *; p<0.05 vs Control

しかしながら、皮膚細胞におけるミード酸の抗炎症作用については、ミード酸の添加実験を行うなどして明らかにする必要がある。

3. 3. 線維芽細胞におけるリン脂質のミード酸減少が細胞機能に及ぼす影響

先の研究より、必須脂肪酸欠乏マウスにおいてミード酸はリン脂質の中でもPIでの増加が著しいことを報告している。必須脂肪酸欠乏時のミード酸は、PIのsn-2位にアラキドン酸を導入するアシル基転移酵素LPIAT1によって導入される可能性があることから、LPIAT1の発現抑制によってPIのミード酸が減少する可能性がある。そこで本研究では、培養細胞の中でもミード酸が多く分布するマウス線維芽細胞NIH3T3を用いて、LPIAT1の発現抑制によるリン脂質の脂肪酸組成の変化を調べた。LPIAT1の発現抑制細胞ではmRNAが20%程度まで減少しており、この添加濃度でLPIAT1の発現抑制が十分に行われていることを確認した。これらの細胞の各リン脂質のミード酸を比較したところ、LPIAT1の発現抑制細胞ではPIでのみミード酸の減少がみられ、ホスファチジルコリン（PC）やホスファチジルエタノールアミン（PE）での減少はみられなかった（図7）。

そこでこれらの細胞を用いて、PIにおけるミード酸の減少が細胞増殖やストレス応答に及ぼす影響を調べた。まず、siLPIAT1細胞において細胞増殖が亢進している可能性が示された（図8）。

次に、LPIAT1遺伝子発現抑制による小胞体ストレスや炎症性因子の遺伝子発現の変化を調べた。その結果、LPIAT1の発現抑制細胞でこれらのストレスマーカーに変化はみられなかった（図9）。したがって、PIにおけるミード酸の減少によって細胞増殖は促進するが、ストレス因子には影響を及ぼさないことがわかった。

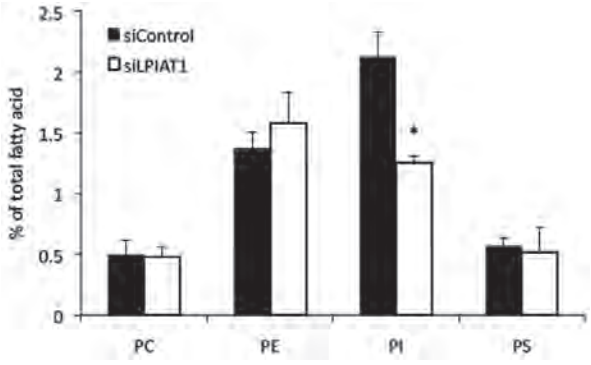


図7　LPIAT1発現抑制細胞のリン脂質におけるミード酸の変化
細胞播種24時間後の細胞に50nMのLPIAT1のsiRNAをトランスフェクションし、72時間後に細胞を回収した。リン脂質を分画後、各リン脂質のミード酸を比較した。Mean±SE（n=3），*；p<0.05 vs siControl

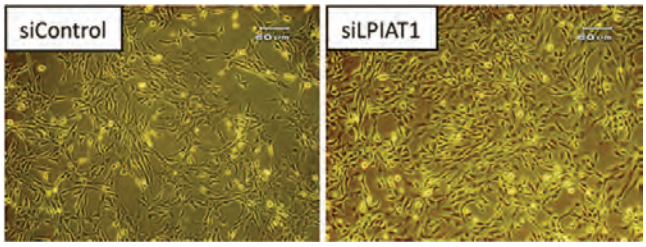


図8　LPIAT1の発現抑制が細胞増殖に及ぼす影響
細胞播種24時間後の細胞にLPIAT1のsiRNAをトランスフェクションし、72時間後に細胞を回収した。Mean±SE（n=3），*；p<0.05 vs siControl

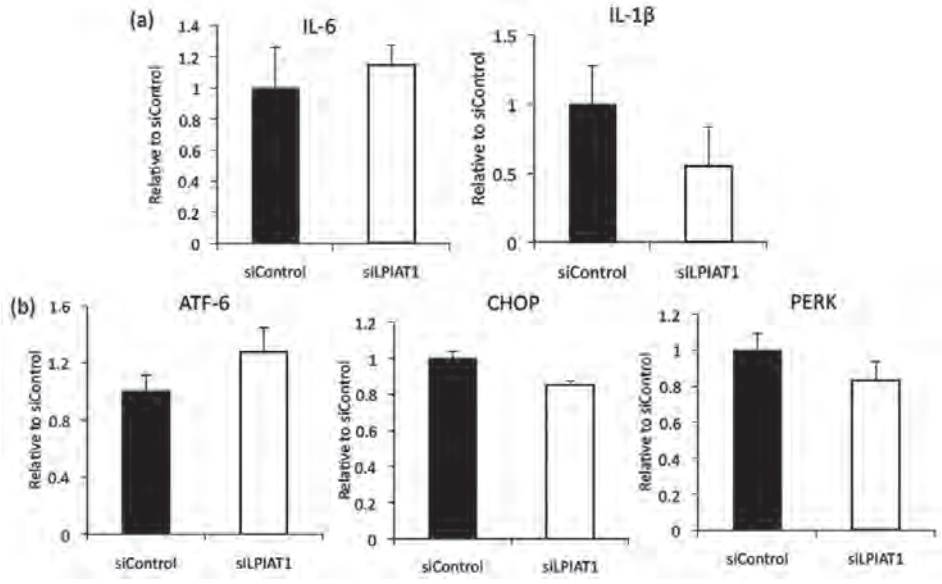


図9　LPIAT1の発現抑制が小胞体ストレス及び炎症因子に及ぼす影響
細胞播種24時間後の細胞にLPIAT1のsiRNAをトランスフェクションし、72時間後に細胞を回収した。小胞体ストレスのマーカーとしてATF-6、CHOP、PERKを、炎症性のマーカーとしてIL-6とIL-1βのmRNAを測定した。Mean±SE（n=3），*；p<0.05 vs siControl

4. 考　察

わが国において、通常の食生活で必須脂肪酸が欠乏することは殆どないが、クローン病など脂質の吸収阻害がみられる場合や長期にわたって中心静脈栄養を行っている患者では、必須脂肪酸欠乏症が生じることがある。近年、高齢者における栄養不良が増加しており、また高齢者では脂質吸収能の低下もみられることから、今後栄養不良に伴う必須脂肪酸欠乏の高齢者などが増加する可能性がある。皮膚における脂質やタンパク質はバリア機能に重要な役割を果たしていることが知られているが、皮膚における脂肪酸の生理作用に関する報告は少なく、また必須脂肪酸欠乏時の皮膚における脂肪酸代謝に関する知見はない。そこで本研究では必須脂肪酸欠乏状態の培養細胞を用いて、必須脂肪酸欠乏時に産生されるミード酸の減少による「炎症性因子」変化や、ミード酸の産生抑制による皮膚バリア機能の異常を調べることで、ミード酸の皮膚における生理的意義について検討した。

まず、必須脂肪酸欠乏時のミード酸の産生抑制によって、皮膚のバリア機能因子であるフィラグリンとインボルクリンの遺伝子発現が減少し、バリア機能の異常が引き起こされている可能性が示唆された。in vitroの実験において、炎症刺激や小胞体ストレスによってフィラグリンやインボルクリンの発現が減少することが報告されていることから[13,14]、炎症因子や小胞体ストレス因子への影響を調べたところ、必須脂肪酸欠乏時のミード酸の産生抑制によってCHOPやGRP78などの小胞体ストレス因子の遺伝子発現の増加がみられた。必須脂肪酸欠乏時には魚鱗癬様の皮膚障害がみられるが、魚鱗癬の症状がみられる先天性の皮膚疾患患者ではCHOPのタンパク質発現が増加しており、小胞体ストレスの上昇が皮膚機能の異常を誘導している可能性が示唆されている[14]。本研究において、HaCaT細胞におけるミード酸の産生抑制によりCHOPやGRP78の遺伝子発現が増加したことから、小胞体ストレスが誘導されバリア機能異常が誘導された可能性があるが、今後この要因については詳細に検討する必要がある。

また、我々は以前にマクロファージ様のRaw細胞を用いて、抗炎症作用のあるEPA（エイコサペンタエン酸）に比べて弱いながらも、ミード酸が抗炎症作用を有する脂肪酸であることを示している（未発表）。今回、必須脂肪酸欠乏時のミード酸の産生抑制によって、炎症性サイトカインであるIL-6やIL-1βも有意に増加していたことから、必須脂肪酸欠乏時のミード酸は炎症反応に対して抑制的に作用し、皮膚のバリア機能維持を担っている可能性が考えられる。

必須脂肪酸欠乏時のミード酸はリン脂質の中でホスファチジルイノシトール（PI）に多く分布することが報告されている。生体膜リン脂質には、飽和脂肪酸から多価不飽和脂肪酸まで様々な脂肪酸が結合しており、多くの分子種が存在するが、PIはsn-1位にステアリン酸、sn-2位にアラキドン酸の分子種がその殆どを占めている。PIにおける脂肪酸鎖の特性の意義は不明であるが、必須脂肪酸欠乏時にPIでミード酸が増加したのは、減少したアラキドン酸の代わりに同じΔ5位に二重結合を持つミード酸が選択的にPIに取り込まれたことが考えられる。LPIAT1の遺伝子発現抑制では、PIでのみミード酸が減少し、細胞増殖が増加する傾向がみられた。siLPIAT1ノックアウトマウスではPIのアシル基が1本少ないLysoPIが増加することが報告されているが[15]、LysoPIは癌化したラット甲状腺上皮細胞において、細胞増殖を活性化させることが報告されている[16]。したがって、本研究でみられたLPIAT1発現抑制細胞における細胞増殖の亢進は、LysoPIの増加が関与している可能性が考えられる。

一方、PI由来のセカンドメッセンジャーであるイノシトール1, 4, 5-三リン酸（IP3）や、ジアシルグリセロール（DAG）の産生には、ホスホリパーゼC（PLC）という酵素が関与しており、PLCには6種類のアイソザイムが存在する。PLCのアイソザイムのうち、PLCδ1欠損マウスでは、表皮の肥厚や分化異常がみられたり[17]、PLCγ1の発現抑制によりインボルクリンの発現が抑制されたりするなど[18]、PIの代謝異常によって皮膚機能に異常がみられることが報告されている。必須脂肪酸欠乏症でも表皮細胞の異常による皮膚障害がみられるが、その発症メカニズムは不明である。必須脂肪酸欠乏では本来生理的に重要なアラキドン酸を持つPIの代わりに、ミード酸を持つPIが増加することが、必須脂肪酸欠乏症の皮膚障害の要因であることも考えられる。今回、LPIAT1の発現を抑制することでPIにおけるミード酸の減少はみられたが、炎症性サイトカインなどのストレス因子に対する影響はみられなかった。本研究においてPIにおけるミード酸の特異的な増加がもつ意義を明らかにすることはできなかったが、今後も必須脂肪酸欠乏時のミード酸の変化と皮膚の異常との関連について研究を進めることで、皮膚における脂肪酸の新たな機能を解明したいと考えている。

（引用文献）

1）George OB, Mildred MB, : A new deficiency disease produced by the right exclusion of fat from the diet, J. Biol. Chem., 82, 345-67, 1929.

2）Innis SM, : Essential fatty acids in growth and development, Prog. Lipid Res., 30, 39-103, 1991.

3）Lavrijsen AP, Bouwstra JA, Gooris GS, Weerheim A, Boddé HE, Ponec M, : Reduced skin barrier function parallels abnormal stratum corneum lipid organization

in patients with lamellar ichthyosis, Invest. Dermatol., 105, 619–24. 1995.
4) Melton JL, Wertz PW, Swartzendruber DC, Downing DT, : Effects of essential fatty acid deficiency on epidermal O–acylsphingolipids and transepidermal water loss in young pigs, Biochim. Biophys. Acta, 921, 191–7, 1987.
5) Mead JF, : The metabolism of the essential fatty acids, Am. J. Clin. Nutr., 6, 656–61,1958.
6) Ichi I, Kono N, Arita Y, Haga S, Arisawa K, Yamano M, Nagase M, Fujiwara Y, Arai H, : Identification of genes and pathways involved in the synthesis of Mead acid (20:3n–9), an indicator of essential fatty acid deficiency, Biochim. Biophys. Acta, 1841, 204–13, 2014.
7) Robinson DR, McGuire MB, Levine L, : Prostaglandins in the rheumatic diseases, Ann. N. Y. Acad. Sci., 256, 318–29, 1975.
8) Sally E, Wenzel MD, : Arachidonic Acid Metabolites: Mediators of Inflammation in Asthma, Pharmacotherapy, 3S–12S, 17, 1997.
9) Jakschik BA, Morrison AR, Sprecher H, : Products derived from 5,8,11– eicosatrienoic acid by the 5–lipoxygenase–leukotriene pathway, J Biol Chem., 258, 12797–800, 1983.
10) Lee HC, Inoue T, Sasaki J, Kubo T, Matsuda S, Nakasaki Y, Hattori M, Tanaka F, Udagawa O, Kono N, Itoh T, Ogiso H, Taguchi R, Arita M, Sasaki T, Arai H, : LPIAT1 regulates arachidonic acid content in phosphatidylinositol and is required for cortical lamination in mice, Mol. Biol. Cell, 23, 4689–700, 2012.
11) Rawlings AV, Scott IR, Harding CR, Bowser PA, : Stratum corneum moisturization at the molecular level, J. Invest. Dermatol., 103, 731–41, 1994.
12) Eckert RL, Green H, : Structure and evolution of the human involucrin gene, Cell, 46, 583–9, 1986.
13) Kim BE, Howell MD, Guttman–Yassky E, Gilleaudeau PM, Cardinale IR, Boguniewicz M, Krueger JG, Leung DY, : TNF–α downregulates filaggrin and loricrin through c–Jun N–terminal kinase: role for TNF–α antagonists to improve skin barrier, J. Invest. Dermatol., 131, 1272–9, 2011.
14) Dahlqvist J, Törmä H, Badhai J, Dahl N, : siRNA silencing of proteasome maturation protein (POMP) activates the unfolded protein response and constitutes a model for KLICK genodermatosis, PLoS One, e29471, 2012.
15) Anderson KE, Kielkowska A, Durrant TN, Juvin V, Clark J, Stephens LR, Hawkins PT, : Lysophosphatidylinositol–acyltransferase–1 (LPIAT1) is required to maintain physiological levels of PtdIns and PtdInsP(2) in the mouse, PLoS One, 8, e58425, 2013.
16) Falasca M, Silletta MG, Carvelli A, Di Francesco AL, Fusco A, Ramakrishna V, Corda , : Signalling pathways involved in the mitogenic action of lysophosphatidylinositol. Oncogene, 10, 2113–24, 1995.
17) Kanemaru K, Nakamura Y, Sato K, Kojima R, Takahashi S, Yamaguchi M, Ichinohe M, Kiyonari H, Shioi G, Kabashima K, Nakahigashi K, Asagiri M, Jamora C, Yamaguchi H, Fukami K, : Epidermal phospholipase Cδ1 regulates granulocyte counts and systemic interleukin–17 levels in mice, Nat Commun., 3, 963, 2012.
18) Xie W, Samoriski GM, McLaughlin JP, Romoser VA, Smrcka A, Hinkle PM, Bidlack JM, Gross RA, Jiang H, Wu D, : Genetic alteration of phospholipase C beta3 expression modulates behavioral and cellular responses to mu opioids, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 10385–90, 1999.

天然物特異的モノクローナル抗体を用いた甘草エキス成分の作用機構に関する研究

長崎国際大学薬学部薬品資源学研究室

宇都　拓洋

Licorice (*Glycyrrhiza* spp.) is the most important ingredient for the Japanese Kampo medicine and the traditional Chinese medicine, and has been reported to show various pharmaceutical functions. Liquiritin (LQ) and its aglycon liquiritigenin (LQG) are major licorice flavonoids classified as a phloroglucinol. Our screening of components of licorice extract revealed that LQ and LQG activate melanin synthesis in melanoma cells. In this study, we elucidated the molecular mechanism of melanin synthesis activated by LQ and LQG. In addition, we investigated the intracellular accumulation and target protein of LQ and LQG using anti-LQ/LQG monoclonal antibody (anti-LQ/LQG mAb). LQ and LQG activated melanin synthesis in mouse (B16-F1 and B16-4A5) and human (HMV-II) melanoma cell lines. LQ and LQG enhanced the expression of tyrosinase (Tyr), TRP-1, and TRP-2. Molecular analysis suggests that LQ and LQG activate the p38 and PKA signaling pathways leading to the MITF expression. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using anti-LQ/LQG mAb indicated that LQ and LQG cannot be detected in cellular lysate, and Western blotting using anti-LQ/LQG mAb as the primary antibody demonstrated that LQ binds to an approximately 35-38 kDa protein. These results suggest that LQ and LQG enhance melanin synthesis via the activation of p38 and PKA signaling pathways by binding to an approximately 35-38 kDa protein.

1．緒　言

メラニンはメラノサイトより合成され、紫外線や活性酸素種の刺激から皮膚を保護する役割を持つとともに、メラニン合成の減少が白髪や白斑の原因になることが知られている[1, 2]。メラニンは、メラノサイト内のメラノソームにおいてL-チロシンを出発物質として生合成されており、一連の合成反応は、チロシナーゼ（Tyr）、Tyrosinase-related Protein-1（TRP-1）およびTRP-2により調節されている[3]。またこれらメラニン合成因子の発現は、Microphthalmia-associated Transcription Factor（MITF）がプロモーター領域のM-boxに結合することで誘導され、MITFの活性化は複雑なシグナル伝達系により制御されている[4, 5]。これまでメラニン合成を抑制する天然化合物の探索およびその作用機序解明に関する報告は数多いが、メラニン合成を誘導する天然化合物に関する報告は少なく、メラニン合成を促進することで皮膚がんや白髪予防、白斑治療などが期待されることから、これらの研究が望まれている。

甘草は全漢方処方の約7割に配合される重要な生薬で、抗炎症、抗アレルギー、抗潰瘍など多くの薬効が知られている[6]。また甘草は、味噌や醤油などに甘味料と用いられる他、健康食品にも利用されている。さらに最近は、甘草エキスや甘草フラボノイドが配合されている化粧品、育毛剤、染毛剤などが多く市販され、甘草の持つ美容効果への関心が高まっており、甘草エキス成分の機能解析や作用機序に関する科学的エビデンスが求められている。

我々は、これまでに約30種類の活性天然物に対する特異的モノクローナル抗体（mAb）の作製に成功しており、それらを用いたアッセイ系の開発を中心に研究を行ってきた[7-10]。さらに、これら抗天然化合物特異的mAbをツールとして、高感度ELISAやドットブロットによる生薬成分定量法の開発、免疫染色による植物組織中の活性成分局在分布解明、主有効成分のみをアフィニティーカラムで除去し、主要成分除去エキスを用いた生薬成分の相乗効果解明などの応用研究を展開してきた[11-12]。そこで本研究は、甘草エキス成分に対する特異的mAbを作製し、細胞内での挙動や分子標的を解明し、甘草エキスのメラニン合成制御機構に関する新たな知見を見出すことを目的とした。

甘草成分の解析は国内外で盛んに行われてきており、約500種の成分がこれまでに同定されている。主要生理活性成分はグリチルリチン（GC）であることが知られているが、フラボノイド類（甘草フラボノイド）をはじめとするGC以外の成分も、抗炎症、抗がん、抗菌作用など多彩な機能を持つことが報告されている[6, 13]。しかしながら、甘草エキス成分のメラニン合成への影響に関する報告はほとんどない。本研究の初期実験として、甘草エキス成分のメラニン合成に与える影響をスクリーニングしたところ、代表的な甘草フラボノイドであるリクイリチン（LQ）とそのアグリコンであるリクイリチゲニン（LQG）（図1）が、B16メラノーマ細胞においてメラニン合成誘導活性を持つことを見出し

Analysis of the mechanism of action of constituents from licorice root using monoclonal antibody against natural compounds

Takuhiro Uto

Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki International University

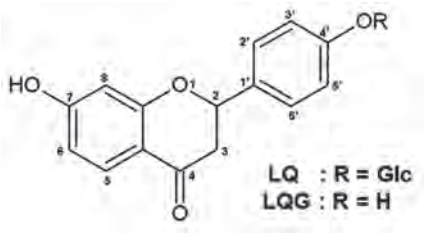


図1　LQ および LQG の化学構造

た。そこで本研究は、はじめにLQおよびLQGのメラニン合成に関与する酵素群、さらにそれらを制御する転写因子やシグナル伝達分子への影響を解析し、さらにLQおよびLQGに対するmAb（抗LQ/LQG-mAb）を作製することで、LQおよびLQGの細胞内挙動と分子標的の解析を行った。

2．実　験

2. 1. 細胞培養

B16-F1およびHMV-IIはECACC、B16-4A5はRIKEN Cell Bankより入手した。B16-F1およびB16-4A5は10% FBS含有DMEM培地、HMV-IIは10％ FBS含有RPMI1640培地で培養した。

2. 2. メラニン産生量測定

細胞を24-well plateに1×10^4cells/wellで播種し、1日培養後、LQもしくはLQGを添加した。3日培養後、細胞を120 μLの1N NaOHで溶解し、415 nmの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、メラニン産生量を測定した。

2. 3. 細胞増殖抑制能測定

細胞生存率は3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium Bromide（MTT）法を用いた。B16-F1細胞を96well plateに0.2×10^4cells/wellで一晩培養し、LQもしくはLQGを添加した。3日間培養後、MTT（5 mg/mL）を10 μLずつ各ウェルに添加し、さらに4時間培養した。沈殿したMTT-formazanを100 μLの0.04N HCl-Isopropanolにて溶解し、マイクロプレートリーダーで吸光度（595 nm）を測定した。

2. 4. Western Blotting

B16-F1細胞（3×10^5cells）を6cmディッシュに播種し一晩培養し、LQもしくはLQGで処理した。培養後、RIPA bufferで細胞溶解後、Protein Assay Dye Reagent Concentrate（Bio-Rad）にてタンパク量を定量した。SDS-PAGEはLaemmli法を用い、等量のセルライセートタンパクをPolyacrylamide Gelにて分離し、PVDFメンブランに転写した。ブロッキング後、各種一次抗体中で4℃下一晩処理し、HRP結合二次抗体で1時間反応させた。検出はECL Prime（GE Healthcare）を用いてLAS-1000（GE Healthcare）にて行った。

2. 5. 抗LQ/LQG-mAbの作製

LQ-MeOH溶液に、$NaIO_4$-H_2O溶液を滴下し、室温で30分間撹拌した。この反応液に50 mM Carbonate Buffer（pH 9.6）で溶解したKeyhole Limpet Hemocyanin（KLH）を滴下し、室温で6時間撹拌した。反応生成物を精製水に対して透析し、凍結乾燥後、LQ-KLHコンジュゲートを得た。また同様の手法でLQ-Human Serum Albumin（HSA）コンジュゲートも作製した。これらの免疫複合体中のLQの結合数をMALDI-TOF MSで確認後、マウスへ免疫感作し、抗体価が上昇した時点でマウスの脾臓細胞を単離した。得られた脾臓細胞とミエローマ細胞の細胞融合を行い、HATセレクションによりハイブリドーマを選抜しmAbの作製を行った。

2. 6. 競合的ELISAの確立

50 mM Carbonate Bufferで溶解したLQ-HSAを96-well plateに100 μLずつ分注し、抗原を固相化した。0.05% Tween-PBS（T-PBS）で洗浄後、300 μLの5％ Skim Milk-PBS）を加え、1時間ブロッキングした。T-PBSで洗浄後、LQもしくはセルライセートを50 μLを加え、さらに抗LQ/LQG-mAb溶液を50 μLを分注した。1時間の競合反応後、T-PBSで洗浄し、100 μLのHorseradish Peroxidase（HRP）-labeled Anti-mouse IgG（Fc specific）Solutionを加えさらに1時間インキュベートした。洗浄後、100 μLの2, 2-Azino-di(3-ethylbenzthiazoline)Sulfonic Acid（ABTS）を加え十分に発色したのち、405 nmにおける吸光度を測定した。

2. 7. 交差反応性の算出

LQおよびその類縁化合物に対する交差反応性を調べるために、各種化合物を用いて競合的ELISAを行った。各種化合物の交差反応性は、サンプル非存在下での吸光度を100%とし、吸光度が50%阻害される濃度（IC_{50}）で算出した。

2. 8. LQおよびLQGの細胞内蓄積量測定

B16-F1細胞（1×10^6cells）を10 cmプレートに播種し、一晩培養後、経時的にLQもしくはLQGで処理した。細胞回収はPBSで細胞を十分洗浄し、Proteinase Inhibitors Cocktailを含むPBSで回収した。超音波破断機で細胞を粉砕後、タンパク量を定量し、抗LQ/LQG-mAbを用いた競合的ELISAにてLQおよびLQGの細胞内蓄積量を測定した。

3．結　果

3. 1. LQおよびLQGのメラニン合成誘導能

マウスメラノーマ細胞B16-F1細胞におけるLQま

たはLQGのメラニン合成能の結果を図2Aに示す。α-Melanocyte-Stimulating Hormone（α-MSH）はポジティブコントロールとして用いた。コントロール（未処理）と比較してLQまたはLQGで処理した細胞ではメラニン合成が誘導されており、その効果はLQよりLQGが強かった。また同様の結果がB16-4A5細胞やヒトメラノーマ細胞HMV-IIにおいても確認された（data not shown）。さらに、LQおよびLQGの細胞毒性は認められなかったことから（図2B）、LQおよびLQGはメラニン合成促進能を有することが示唆された。

3. 2. LQまたはLQGのTyr、TRP-1およびTRP-2のタンパク質発現への影響

*in vitro*チロシナーゼ活性解析の結果、LQおよびLQGは、直接的にチロシナーゼ活性を誘導しなかった（図3A）。そこで、メラニン合成に関与する酵素群の発現を解析したところ、LQおよびLQGは共にTyr、TRP-1、TRP-2の発現を誘導した（図3B）。この結果より、LQおよびLQGのメラニン合成促進能は、Tyr、TRP-1、TRP-2のタンパク質発現上昇に起因することが示唆された。

3. 3. LQまたはLQGの転写因子およびシグナル伝達因子への影響

MITFは活性化されると核内へ移行し、Tyr、TRP-1、TRP-2遺伝子のプロモーター領域のM-Boxに結合することにより転写活性を高める[14]。CREBはMITF遺伝子の転写調節を担い、Akt、ERK、p38により制御されている[14]。また、p38とERKは直接的にMITFを誘導することも報告されている[15]。そこで、LQおよびLQGのこれら転写因子およびシグナル伝達因子への影響を調べた。LQまたはLQGはMITFタンパク質発現を誘導した（図4A）。さらに図4Bに示すように、LQまたはLQG処理後5分よりCREB、ERK、p38のリン酸化が誘導され、時間経過とともにリン酸化が消失した。一方、PI3K-Akt経路は、α-MSHの刺激により逆に不活性化されメラニン産生を誘導することが知られているが[15]、LQおよびLQGによるAktリン酸化の抑制能は強くなかった。

さらにLQおよびLQGのメラニン合成への各シグナル

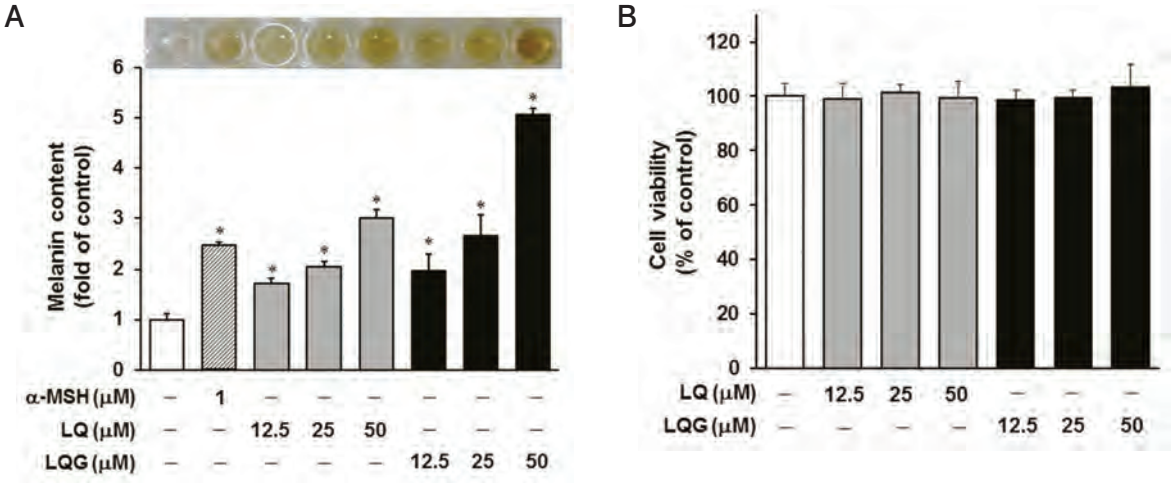


図2　B16-F1細胞におけるLQおよびLQGのメラニン合成誘導能（A）、細胞生存率への影響（B）
$^{*}p < 0.01$ vs control

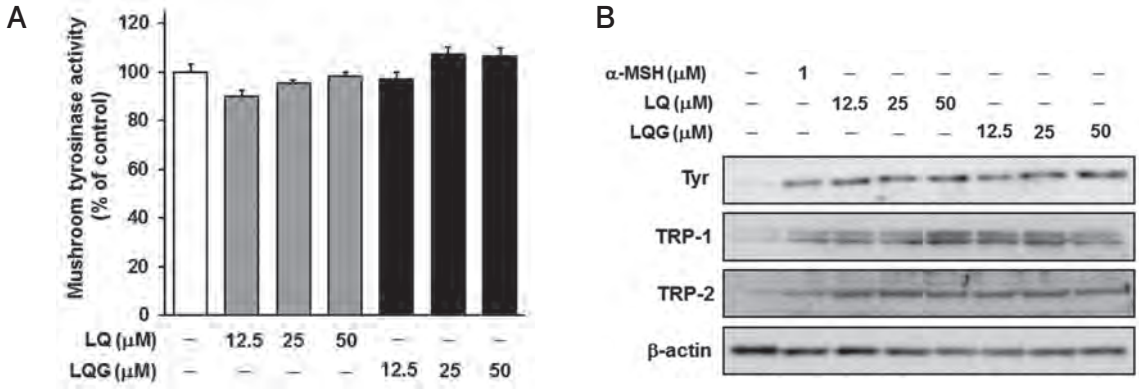


図3　LQおよびLQGの*in vitro*チロシナーゼ活性（A）、Tyr、TRP-1、TRP-2発現への影響（B）

伝達系の関与を調べるために、PI3K阻害剤（LY294002）、p38阻害剤（SB203580）、MEK阻害剤（U0126）、PKA阻害剤（H-89）によるLQまたはLQG誘導性メラニン合成へ与える影響を解析した。図5に示すように、LQまたはLQG誘導性メラニン合成は、SB203580とH-89で抑制されたことから、LQおよびLQGのメラニン合成にはp38およびPKAが関与していることが示唆された。

3. 4. 抗LQ/LQG-mAbの作製

さらなるLQおよびLQGの作用機序解析を目的として抗LQ/LQG-mAbの作製を行った。今回我々は、LQをハプテンとしKLHをキャリアタンパク質とした免疫原（LQ-KLHコンジュゲート）の調製を行った。LQ-KLHコンジュゲートの調製は、LQの糖部を$NaIO_4$で開環し、開環した糖部のアルデヒドをKLHのリジン残基とアルカリ条件下での縮合によりシッフベース形成することで作製した。LQ-KLHコンジュゲートを免疫原としてマウスに免疫し、ハイブリドーマを樹立しmAbを調製した。精製したmAbのアイソタイプのタイピングを行った結果、サブクラスはIgG2aで軽鎖がκのmAbであることを確認した。次に抗LQ/LQG-mAbを用いて競合的ELISAの確立を行った。プレートに固相化したLQ-HSAと遊離のLQとの競合によるアッセイ系を検討した結果、0.39～25μg/mL（0.93～59.75μM）の濃度範囲内で吸光度との間に良好な直線関係が得られた（data not shown）[16]。

3. 5. 抗LQ/LQG-mAbの交差反応性試験および構造活性相関

抗LQ/LQG-mAbの特異性を調べるために、構造類似化合物および各種天然化合物に対する交差反応性を競合的ELISAにより測定し、IC_{50}を算出した。その結果、本mAbは、LQG（IC_{50} = 33.09μM）、Hesperetin（IC_{50} = 17.83μM）、Naringenin（IC_{50} = 79.41μM）に対して交差反応は示したものの、その他のFlavone類および構造類似

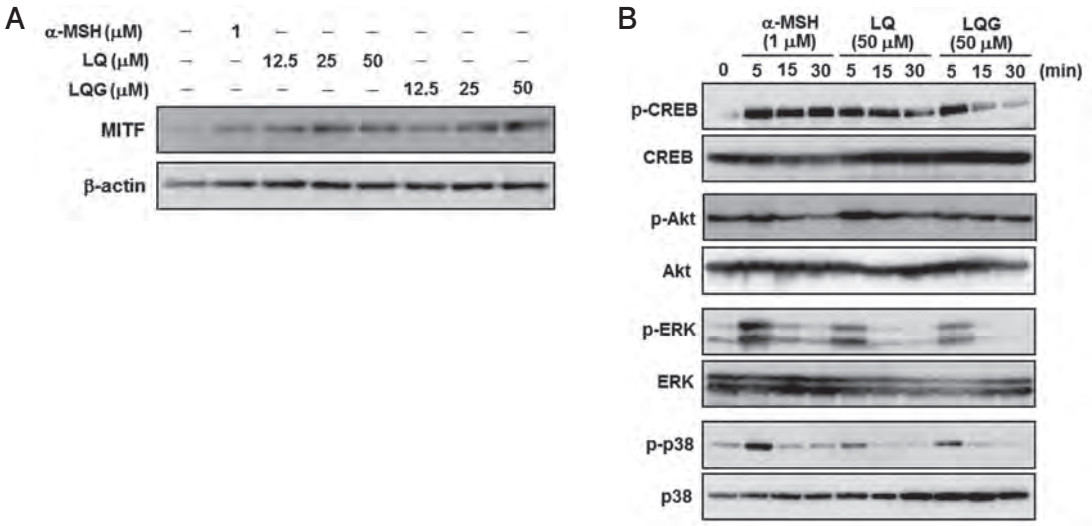


図4　LQおよびLQGのMITF発現（A）、CREB、Akt、ERK、p38リン酸化（B）への影響

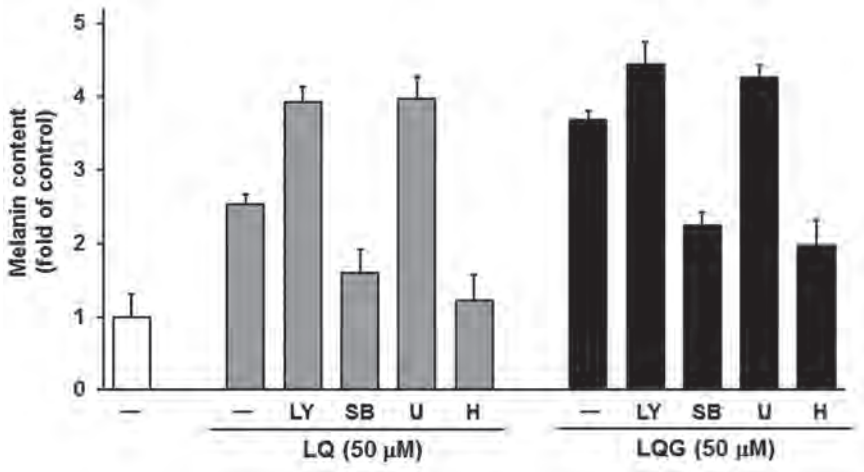


図5　LQおよびLQG誘導性メラニン合成への各種阻害剤の影響
LY294002（LY）:10μM、SB203580（SB）:10μM、U0126（U）: 5μM、H-89（H）: 2.5μM

化合物に対しては交差反応を示さなかった（表1）。これらの結果より、C-7のhydroxyl基とC-2 − C-3間の単結合が本mAbの認識に重要な役割を果たしていることが示唆された。本mAbはLQGも良好に認識することから、LQGを用いて競合的ELISAを行ったところ、1.56 ～ 50 μg/mL（6.09 ～ 195.12 μM）の濃度範囲内で吸光度との間に良好な直線関係が得られた。よって本mAbはLQとLQGに非常に特異性が高いmAbであり、LQおよびLQGの作用機序解析に有用なツールになりうる可能性が示唆された[16]。

3. 6. LQおよびLQGの細胞内蓄積

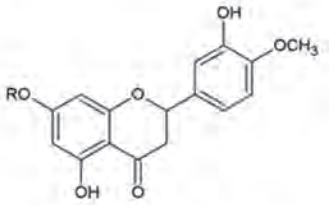
LQまたはLQG処理したB16-F1細胞から調整したセルライセート中のLQおよびLQGの蓄積量を、抗LQ/LQG-mAbを用いた競合的ELISAで測定した。60分以内で経時的にLQまたはLQG処理した細胞から得られたセルライセート中にはLQまたはLQGはほとんど検出されなかった（data not shown）。

3. 7. LQの結合タンパク質の検出

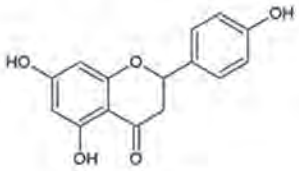
LQおよびLQGの標的分子同定を目的として、抗LQ/LQG-mAbを一次抗体としたWestern Blottingを行った。抗LQ/LQG-mAbはLQGよりもLQに対する反応性が強いことから、LQ処理細胞由来のセルライセートの解析を行った。図6に示すように、コントロールおよびLQ処理由来のセルライセートにおいて非特異的なバンドがいくつか検出されるが、LQ処理5分において35-38kDa付近にLQ結合タンパク質のバンド（◀）が検出された。

表1　抗LQ/LQG-mAbの交差反応性

Compound	Classification	IC_{50} (μM)
LQ	Flavanone glycoside	**8.60**
LQG	Flavanone	**33.09**
Hesperetin	Flavanone	**17.83**
Hesperidin	Flavonoid glycoside	>100
(±)-Naringenin	Flavanone	**79.41**
(±)-Eriodictyol	Flavanone	>100
Apigenin	Flavone	>100
Luteolin	Flavone	>100
Myricetin	Flavonol	>100
Quercetin	Flavonol	>100
Fisetin	Flavonol	>100
Kaempferol	Flavonol	>100
Isorhamnetin	Flavonol	>100
(-)-Epigallocatechin	Flavanol	>100
(-)-Epicatechin	Flavanol	>100
Daidzein	Isoflavonoid	>100
Rutin	Flavonoid glycoside	>100
Glycyrrhizin	Triterpenoid	>100
3-Monoglucuronyl-glycyrrhetic acid	Triterpenoid	>100
Glycyrrhetic acid	Triterpenoid	>100
Saikosaponin a	Triterpenoid	>100
Ginsenoside Rb1	Triterpenoid	>100
Peaoniflorin	Monoterpenoid	>100



Hesperidin : R = Glc-Rha
Hesperetin : R = H



Naringenin

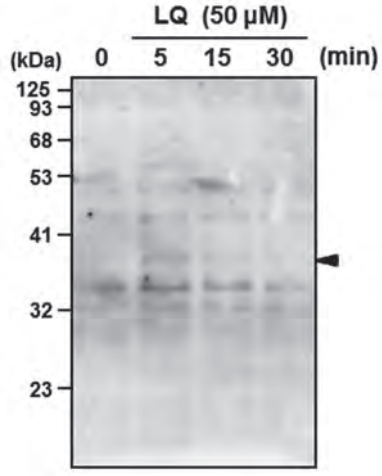


図6　抗LQ/LQG-mAbを用いたWestern Blottingによる LQ結合タンパク質の検出

4．考　察

本研究は、代表的な甘草フラボノイドであるLQとそのアグリコンのLQGの持つメラニン合成誘導能に注目し研究を行った。近年LQおよびLQGの生物活性に関する報告は多くなっているが、メラニン合成に関する報告は皆無である。LQおよびLQGは、マウスメラノーマ細胞（B16-F1、B16-4A5）およびヒトメラノーマ細胞（HMV-II）においてメラニン合成を促進し、その効果はLQよりLQGが強かった。また、LQおよびLQGはチロシナーゼ酵素活性に直接的に影響せず、Tyr、TRP-1、TRP-2の発現を高めることでメラニン合成を促進していることが明らかになった。さらに転写因子・シグナル伝達系の解析や各種阻害剤による解析結果をまとめると、LQとLQGはp38及びPKA活性化を引き起こし、CREBのリン酸化誘導を介する経路もしくは直接的にMITFの発現を誘導することで、Tyr、TRP-1、TRP-2の発現を高めてメラニン合成を促進していることが示唆された（図7）。

さらに我々は、LQおよびLQGの細胞内での挙動・分布、標的分子の同定を目標として、特異的mAbの作製を行った。本研究では、LQ-KLHコンジュゲートを免疫原としてマウスに免疫することでハイブリドーマを樹立し、抗LQ/LQG-mAbの作製に成功した。本mAbは、LQとLQGに加えてHesperetinとNaringeninに対して交差反応は示すが、その他のFlavone類及び構造類似化合物に対しては交差反応を示さないことから、LQおよびLQGの作用機序解析に有用なツールになりうる可能性が示唆された。抗LQ/LQG-mAbを用いた競合的ELISAを用いて、LQおよびLQG処理したB16-F1細胞由来セルライセート中のLQおよびLQG量を測定したが、LQおよびLQGはほとんど検出されなかった。この結果は、セルライセート中のLQおよびLQG量がELISAの感度の0.39～25μg/mL（0.93～59.75μM）以下であるため検出できなかったと考えられ、LQおよびLQGは細胞内には多く取り込まれずに細胞膜表面のレセプター等に関与していると考えている。さらに抗LQ/LQG-mAbを一次抗体としたWestern Blottingの結果、LQで5分処理した細胞由来のセルライセートにおいて、35-38kDa付近にLQ結合タンパク質のバンドが検出された。これはp38、ERK、CREBがリン酸化された時間とも一致していることから、LQ結合タンパク質のメラニン誘導機構への関与が示唆される。

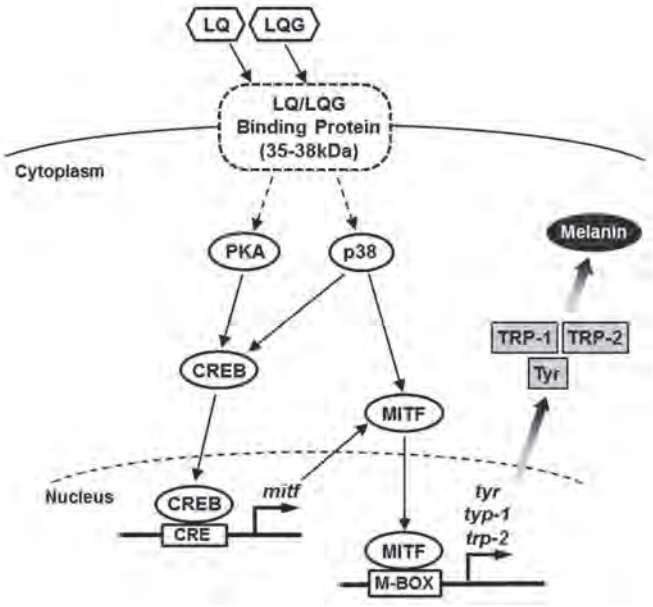


図7　LQおよびLQGによるメラニン合成促進の分子機構

ケミカルバイオロジー研究の発展により、天然化合物の標的分子の同定を試みる研究が活発になってきているが、天然由来の生理活性物質の多くは単一ではなく複数の標的をもつことや、標的分子との結合様式やアフィニティーの違いが多様であり解析が困難な点が多い。現在の標的分子解析法として、アフィニティークロマトグラフィー法や分子プローブ法が広く知られているが、これらの手法では限界があるため新しい手法が求められている。我々は抗天然物特異的mAbをツールとして、生薬成分の細胞や組織内の局在解明や標的分子同定に取り組んでいる。本手法は生薬成分の構造を修飾する必要はなく、生細胞や組織での解析が可能という利点がある。しかしながら、目的成分と標的分子の結合部位と、抗体のエピトープが近い位置であれば抗体が結合できずに検出できない可能性がある。また、目的成分と標的分子間の結合様式が弱い場合は、Immunocytochemistry（ICC）やWestern Blottingでは検出できない恐れもある。本研究で用いた抗LQ/LQG-mAbは、Western BlottingではLQ結合タンパク質を検出できたが、ICCでは良好な検出ができなかった（data not shown）。今後、LQ結合タンパク質を抗LQ/LQG-mAbを用いた免疫沈降法により単離し、質量分析法により標的タンパク質を同定する予定である。またエピトープの異なるmAbによるICCやWestern Blottingに加えて、アフィニティークロマトグラフィー法や分子プローブ法も行うことで、LQおよびLQGの細胞内の挙動・局在や標的分子同定を確実なものとしたい。抗天然化合物特異的mAbを用いた解析が、メラニン合成を制御する天然化合物の作用機構に関する新たな知見に繋がることを期待している。

（謝　辞）

本研究の遂行にあたりコスメトロジー研究振興財団よりご支援いただきましたことに深く感謝申し上げます。また、本研究の共同研究者である長崎国際大学薬学部の正山征洋教授、健康管理学部の藤井俊輔助手のご助言およびご協力に心より御礼申し上げます。

（引用文献）

1）Sturm RA: Skin colour and skin cancer - MC1R, the genetic link, Melanoma Res., 12, 405-416, 2002.

2）Goding CR: Melanocytes: the new Black, Int. J. Biochem. Cell. Biol., 39, 275-279, 2007.

3）Yasumoto K, Yokoyama K, Takahashi K, Tomita Y, Shibahara S: Functional analysis of microphthalmia-associated transcription factor in pigment cell-specific transcription of the human tyrosinase family genes, J. Biol. Chem., 272, 503-509, 1997.

4）Yamaguchi Y, Hearing VJ: Physiological factors that regulate skin pigmentation, Biofactors, 35, 193-199, 2009.

5）Suzuki I, Cone RD, Im S, Nordlund J, Abdel-Malek ZA: Binding of melanotropic hormones to the melanocortin receptor MC1R on human melanocytes stimulates proliferation and melanogenesis, Endocrinology, 137, 1627-1633, 1996.

6）Asl MN, Hosseinzadeh H: Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds, Phytother. Res., 22, 709-724, 2008.

7）Xuan L, Tanaka H, Xu Y, Shoyama Y: Preparation of monoclonal antibody against crocin and its characterization, Cytotechnology, 29, 65-70, 1999.

8）Fukuda N, Tanaka H, Shoyama Y: Formation of monoclonal antibody against a major ginseng component, ginsenoside Rg1 and its characterization. Monoclonal antibody for a ginseng saponin, Cytotechnology, 34, 197-204, 2000.

9）Kim JS, Tanaka H, Shoyama Y: Immunoquantitative analysis for berberine and its related compounds using monoclonal antibodies in herbal medicines, Analyst, 129, 87-91, 2004.

10）Shan SJ, Tanaka H, Shoyama Y: Enzyme-linked immunosorbent assay for glycyrrhizin using anti-glycyrrhizin monoclonal antibody and an eastern blotting technique for glucuronides of glycyrrhetic acid, Anal. Chem., 73, 5784-5790, 2001.

11）Uto T: Functional analysis of bioactive natural compounds using monoclonal antibodies against natural compounds, Yakugaku Zasshi, 134, 1061-1067, 2014.

12）Uto T, Morinaga O, Tanaka H, Shoyama Y: Analysis of the synergistic effect of glycyrrhizin and other constituents in licorice extract on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production using knock-out extract, Biochem. Biophys. Res. Commun., 417, 473-478, 2012.

13）Chin YW, Jung HA, Liu Y, Su BN, Castoro JA, Keller WJ, Pereira MA, Kinghorn AD: Anti-oxidant constituents of the roots and stolons of licorice (*Glycyrrhiza glabra*), J. Agric. Food. Chem., 55, 4691-4697, 2007.

14）Wan P, Hu Y, He L: Regulation of melanocyte pivotal transcription factor MITF by some other transcription factors, Mol. Cell. Biochem., 354, 241-246, 2011.

15）Chan CF, Huang CC, Lee MY, Lin YS: Fermented broth in tyrosinase- and melanogenesis inhibition, Molecules, 19, 13122-13135. 2014.

16）Fujii S, Morinaga O, Uto T, Nomura S, Shoyama Y: Development of a monoclonal antibody-based immunochemical assay for liquiritin and its application to the quality control of licorice products, J. Agric. Food Chem., 62, 3377-3383, 2014.

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

岐阜大学大学院医学系研究科生命機能分子設計分野
大沢　匡毅

The skin epidermis serves as a protective barrier that shelters the body from environmental insults and dehydration. Defects in skin barrier result in various forms of skin inflammatory diseases including psoriasis and atopic dermatitis, the most common diseases in the human population. Therefore, understanding molecular basis of skin barrier formation has important implications for establishing effective therapeutic strategies for such skin disorders.
One of the key aspects of terminal differentiation of epidermal keratinocytes is dynamic cellular remodeling, in which various filamentous proteins and lipids are cross-linked to form rigid bundles and cell organelles including nucleus and mitochondria are eliminated to induce cell death. Although each of these processes has been extensively studied, the molecular mechanism that coordinates these events to achieve the dramatic cellular remodeling is poorly understood. One candidate mechanism that enables such quick remodeling might be autophagy, a process that promotes cellular self-cannibalization. Autophagy is an intracellular bulk degradation system that delivers cytoplasmic organelles and proteins to the lysosome, where they are degraded to be quickly eliminated from the cell. Accumulating evidence indicates that autophagy has been implicated in wide range of the cellular remodeling that occurs during organogenesis, thereby enabling cells to rapidly differentiate or change their fate in order to acquire new functions. Therefore, we hypothesize that the induction of autophagy may play an important role in promoting epidermal terminal differentiation. In this study, we aim at obtaining an experimental proof for the involvement of autophagy in the regulation of epidermal terminal differentiation and barrier formation. Our study will uncover a novel role of autophagy in regulating epidermal barrier formation and provide new insights into development of novel therapeutic strategies for skin disorders.

1. 緒　言

皮膚は生体内の環境と外界とを隔てるバリアとして働く。このような皮膚上皮のバリア機能は、皮膚上皮の最上層に存在する角質層によって維持されている。従来の研究によって、角質層の機能異常による皮膚のバリア機能の低下がさまざまな皮膚病の原因となっていることが示されている[1]。角質層は、細胞骨格の再編成、脱核、ミトコンドリアや細胞内小器官の除去、細胞死など、上皮細胞がダイナミックなリモデリングを果たすことによって形成される[2]。しかし、このような細胞のダイナミズムがどのような分子的機構によって制御されているのかについては明らかにされていない。近年の研究から、細胞内小器官のクリアランスにオートファジーが中心的な役割を果たしていることが示されている[3]。そこで、我々は、皮膚上皮の角質化の過程においても細胞のリモデリングにオートファジーが何らかの役割を果たしているという仮説を考えた。

我々は、従来の研究で、皮膚上皮細胞の増殖分化の制御にNotchシグナルが中心的な役割を果たしていることを示した[4]。Notchシグナルを皮膚上皮細胞特異的にノックアウトしたマウスを作成したところ、角化層形成が著しく低下していることを認めた。この結果からNotchシグナルの活性化が角化層の形成に対し必須な作用を持つことが判明した[4]。我々は、Notchシグナル経路の下流で角化層の形成を制御する分子を検索し、オートファジー制御分子Bnip3に注目するに至った。遺伝子発現解析実験により*Bnip3*の発現がNotchシグナルの支配下で制御されていることが確認され、また、組織学的解析により皮膚の顆粒層細胞にBnip3の発現が局在していることが示された。さらに、培養ケラチノサイトを用いてBnip3の分子機能解析を行い、Bnip3がケラチノサイトのオートファジーを誘導するとともに細胞分化を促進する作用を持つことを明らかにした[5]。しかし、*Bnip3*ノックアウトマウスでは皮膚上皮の角質化が正常に起こることから、生体内のケラチノサイトではBnip3の作用を補完する何らかの分子が存在していることが考えられた。

以上の成果を踏まえ、本研究では、Bnip3の類縁分子であるNix（Bnip3l）に注目し[3]、NixがBnip3と協調的に働くことによってケラチノサイトのオートファジー誘導や細胞分化が制御されているという仮説を立て、ケラチノサイトに対するNixの分子機能を明らかにすることを目標に研究を進めた。

Molecular mechanisms of epidermal cornification during skin development

Masatake Osawa
Department of Regeneration and Applied Biomedical Sciences, Graduate School of Medicine, Gifu University

2. 実　験

2. 1. マウス皮膚切片および培養ケラチノサイトの免疫組織染色

子宮から取り出したマウス胎児をPBSで洗浄後、氷上

で冷やした4％ PFA溶液に浸し、800wの電子レンジで1分間マイクロウエーブ処理をした後に氷上で30分間放置し固定を行った。マウスの胎児または新生児から採取した皮膚片についても同様な方法によって固定を行った。固定した胎児または皮膚片はOTCコンパウンドに包埋し液体窒素中で凍結させ凍結ブロックを作成した。

クリオスタットにより厚さ10μmの切片を作成した。凍結切片を4％ PFA溶液に浸し0℃で10分間固定を行った。固定後、切片をPBS+1％ SDS溶液に浸し室温で10分放置し抗原賦活化処理を行った。その後、切片をPBS+0.05% Tween-20によって5回洗浄することにより浸透化処理を行った。浸透化した切片をPBS+5% Skim milk+0.05% Tween-20（ブロッキング液）に浸し4℃で一晩ブロッキングを行った。ブロッキングを行った切片に対し、1次抗体を含むブロッキング液を添加し室温で1時間反応をさせた後に、Alexa 488またはAlexa 555をコンジュゲーとした2次抗体と反応させた。抗体染色を終えた切片は、PBS+0.05% Tween-20によって3回洗浄した後、DAPIを含むAnti-fade gold（In Vitrogen社）封入剤を添加しカバーグラスで封入した。

封入後のサンプルはコンフォーカル顕微鏡によって観察を行った。

2. 2. マウスケラチノサイトの初代培養および３次元重層化皮膚上皮構築培養

胎生15日目のマウス胎児から皮膚を採取し、PBS+1mM EDTA溶液の表面上に浮かせ37℃で1時間インキュベートした。実体顕微鏡下でピンセットを用いて表皮と真皮を分離した後、表皮をTrypLE Express（Gibco社）上にのせ、37℃で20分間インキュベートした。その後、ペトリディッシュの底面に表皮を擦りつけ細胞を解離させた。解離した細胞をCnT-57培地（CELLnTECH社）に懸濁し、遠心分離によって細胞を回収した。細胞を4×10^4個/cm^2になるように播種し培養を行った。ケラチノサイトの3次元重層化培養は、3D Keratinocyte Starter Kit（CELLnTECH社）のプロトコールを改変して行った。Milliporeカルチャーインサートの培養膜上に1型コラーゲンを加えゲルを形成させた。1×10^6個/mLの培養ケラチノサイトの懸濁液を予めコラーゲンゲルを形成させたカルチャーインサート上に添加し、CnT-PR培地を加え細胞がコンフルエントになるまで培養を行った。その後、インサート内の培地を除去し，細胞を空気曝露させた。インサート外にCnT-PR-3Dを添加し、CO_2インキュベーター内で14日間培養を行い、皮膚上皮の積層化を誘導させた。

2. 3. 培養ケラチノサイトの分化誘導

初代培養ケラチノサイトにTryLE Express（Gibco社）を加え、細胞をディッシュから剥離させた後に、0.5 mM $CaCl_2$を添加したCnT-02培地（CELLnTECH社）に細胞を懸濁し、非付着性ペトリディッシュ上に播種し浮遊細胞培養を行った。分化誘導後、継時的に細胞を回収し、qRT-PCRアッセイおよびウエスタンブロッティングによりケラチノサイトの各種マーカー分子の発現変化を解析した。

2. 4. siRNAを用いた遺伝子ノックダウン

初代培養ケラチノサイトに対し、Lipofectamine RNAi MAX（In Vitrogen社）を用いてsiRNAのトランスフェクションを行った。トランスフェクションに用いたsiRNAは以下の通りである。

Nix-si#1: GCCATGCAGTTACATCTCTTT
Nix-si#2: GCCTAGACATACATGAAACTT
Nix-si#3: GTCCATCAGTGAGCTTGTACA
Scrambled: GTTCGTAACCATGCCTCTATT

3. 結　果

3. 1. マウス皮膚上皮発生期におけるNixの発現パターン

皮膚上皮は胎児期14.5～15.5日目に基底層の細胞が積層化を開始することによって始まり、胎児期18.5日目頃に角化層形成が起こり皮膚上皮の発生が完了する。皮膚上皮発生過程におけるNixの発現パターンを調べるために、胎児期15.5日目以降の皮膚切片を作成し、抗Nix抗体を用いて免疫組織染色を行った。その結果、皮膚上皮におけるNixの発現は胎児期16.5日目以降から認められるようになり、その発現は顆粒細胞層に限局していることが判明した（図1）。顆粒層は角化層へと最終分化を起こす過程にあ

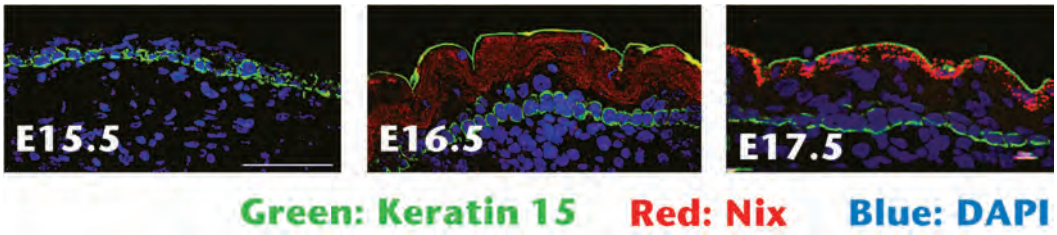


図1　マウス胎児皮膚上皮におけるNixの発現パターン
胎生15.5日目、16.5日目、および17.5日目から採取した皮膚切片を抗Nix抗体および抗ケラチン15抗体を用いて免疫組織蛍光色染色を行い、コンフォーカル顕微鏡によって観察した。Nixの発現は胎生16.5日目より認められるようになり、その発現は皮膚上皮の顆粒層に局在していることがわかった。

る細胞であることから、Nixが最終分化に何らかの作用を果たしていることが考えられた。

3. 2. 培養ケラチノサイトを用いたNixの分子機能解析

ケラチノサイトをカルシウムイオン存在下で浮遊培養を行うと、ケラチノサイトは速やかに最終分化を起こし、脱核まで至る[6]。このようなケラチノサイトの分化誘導培養系を用いて、Nixの分子機能解析を行った。

はじめに、ケラチノサイトの分化と*Nix*との発現の関連性を調べるために、浮遊培養開始前のケラチノサイトと24時間の浮遊培養を行ったケラチノサイトをそれぞれ回収し、ケラチノサイトの分化マーカーである*Krt1*と*Krt10*の遺伝子発現量および*Nix*の遺伝子発現量をqRT-PCR法によって比較定量を行った。その結果、*Krt1*と*Krt10*同様に、*Nix*の遺伝子発現量が細胞分化誘導刺激により著明に上昇することを認めた（図2）。一方、Nixの類縁分子である*Bnip3*については分化誘導刺激の前後においてその発現量に有意な差が認められなかった。我々は、従来の報告でBnip3がケラチノサイトの分化に重要な働きをしていることを示したが、この結果より、浮遊培養による分化刺激に対してはNixの方がより鋭敏に反応することを示している。

従来の報告から、Nixはオートファジー（ミトファジー）を誘導することで細胞からミトコンドリアを除去する働きを持つことが示されている[7]。このことから、浮遊培養によって誘導されるNixの発現上昇がケラチノサイトにおけるミトコンドリア除去に関与している可能性が考えられた。このような可能性を調べるために、浮遊培養による分化誘導刺激によりケラチノサイトにおいてオートファジーが起こるかどうか検討を行った。浮遊培養12時間後のケラチノサイトをサイトスピンによって回収し、抗LC3抗体と抗Nix抗体を用いて細胞免疫染色を行った。その結果、浮遊培養後のケラチノサイトにおいてNixの発現が認められるとともに、細胞質にLC3陽性の顆粒が観察され、オートファゴソーム形成が起こっていることが示唆された。また、浮遊培養後のケラチノサイトを経時的に回収し、抗LC3抗体を用いてウエスタンブロッティングを行ったところ、オートファゴソーム形成を示すLC3B-IIのバンドが時間経過とともに増強することが明らかになり、ケラチノサイトにおいてオートファジーが誘導されていることが判明した（図3）。また、浮遊培養後のケラチノサイトを、抗LC3抗体および抗ミトコンドリア抗体（Tomm 20）を用いて免疫染色を行ったところ、LC3陽性のオートファゴソームとミトコンドリアが共局在していることが観察され、浮遊培養後のケラチノサイト中でミトファジーが起こっていることが示唆された。また、より長期間の浮遊培養を行ったケラチノサイトの中には、脱核を完了しミトコンドリアを失っ

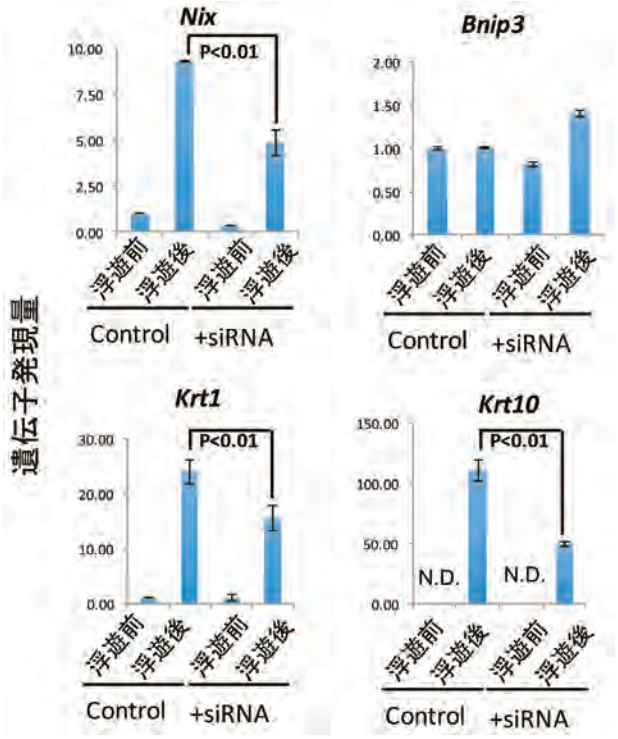


図2　ケラチノサイトの分化誘導開始前後における各種遺伝子の発現変化およびNix遺伝子ノックダウンが分化に及ぼす影響
浮遊培養による分化誘導前のケラチノサイトと、24時間分化誘導を行ったケラチノサイトからRNAを回収した後、qRT-PCR法によってそれぞれの遺伝子発現量を比較定量した。Nixに対するsiRNAをトランスフェクションしたケラチノサイトについても同様な定量を行った。

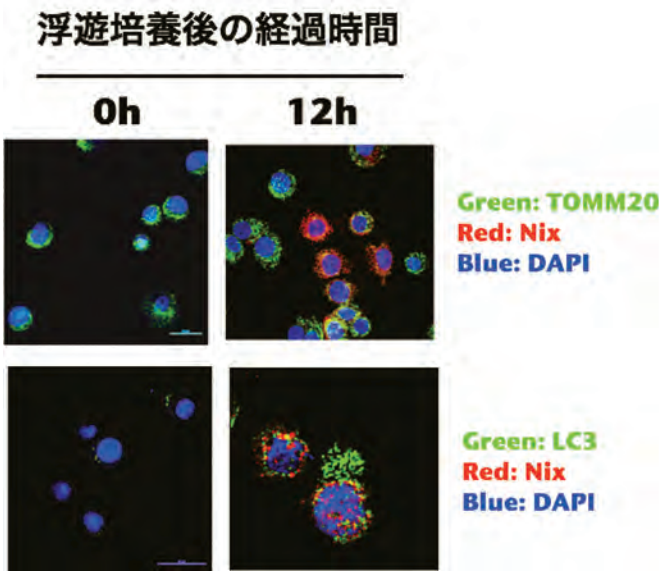


図3　ケラチノサイトの分化刺激によって起こるNixの発現誘導とオートファゴソーム形成
ケラチノサイトの浮遊培養を行い分化誘導刺激を行った。その後ケラチノサイトを回収し、抗ミトコンドリア抗体（Tomm20）、抗Nix抗体、および抗LC3抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。

た細胞が認められ、これらはNixを強く発現していることがわかった（図4）。これらの結果から、ケラチノサイトの分化誘導に伴い、Nixの発現、ミトファジーの誘導、およびミトコンドリアの排除がシークエンシャルに起こることが明らかになった。

ケラチノサイトにおけるNixの機能を調べるために、siRNAを用いて*Nix*遺伝子のノックダウンを行い、ケラチノサイトの分化やオーファジー誘導に対する影響を調べた。*Nix*に対する3つの異なるsiRNAを設計し、ノックダウン効率が90%以上であることを確認した。*Nix*に対するsiRNAをトランスフェクションした培養ケラチノサイトに対して浮遊培養によって分化刺激を与えた後、分化マーカー遺伝子の発現量をqRT-PCR法によって比較定量するとともに、抗LC3抗体を用いてウエスタンブロッティング法によりオートファゴソーム形成に対する影響を解析した。その結果、*Nix*のノックダウンにより、浮遊培養刺激誘導性のケラチノサイトの分化に遅延が起こるとともに、オートファゴソーム形成が低下することが認められた。これらの結果から、Nixがケラチノサイトの分化やオートファジーの誘導に重要な役割を果たしていることが示唆された（図5）。

3. 3. 皮膚3次元培養系を用いたNixの分子機能解析

以上の研究では、ケラチノサイトの浮遊培養系を研究ツールとして用いてNixの分子機能解析を行った。しかし、このような培養系は人為的であり、それによって得られた知見についても生理的現象を反映していない可能性が考えられた。そこで、皮膚上皮形成の過程をより忠実に再現できる皮膚3次元培養系を用いて、ケラチノサイトに対するNixの分子機能について再検討を行った。

培養ケラチノサイトをコラーゲンゲルの上に播種し空気に暴露し積層化を誘導した。培養9日目には積層化が完了し、顆粒層および角化層が認められ、組織学的所見上は生体の皮膚上皮と同等な構造が観察された。このようにして作成した3次元構成皮膚の切片を、抗LC3抗体、抗ミトコンドリア抗体、および抗Nix抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、3次元構成皮膚においても、顆粒層および角化層からミトコンドリアが消失していることが観察されるとともにNixの発現とオートファゴソームの形成が認められ、生体の皮膚上皮と同様な現象が起こっていることがわかった（図6）。そこで、Nixの分子機能を調べるために、予め*Nix*に対するsiRNAをトランスフェクションした培養ケラチノサイトを用いて皮膚3次元培養を行った。その結果、*Nix*に対するsiRNAによって処理を行ったケラチノサイトを用いた場合には、積層化が著しく阻害され、明瞭な皮膚上皮が形成されなかった（図6）。この結果より、Nixはケラチノサイトの分化や積層化構造の構築に必要な役割を果たしていることが示唆された。

4. 考　察

本研究では、ケラチノサイトの分化や角化細胞形成に対するNixの役割について検討を行った。これまでに、皮膚上皮におけるNixの発現について解析された例はない。そ

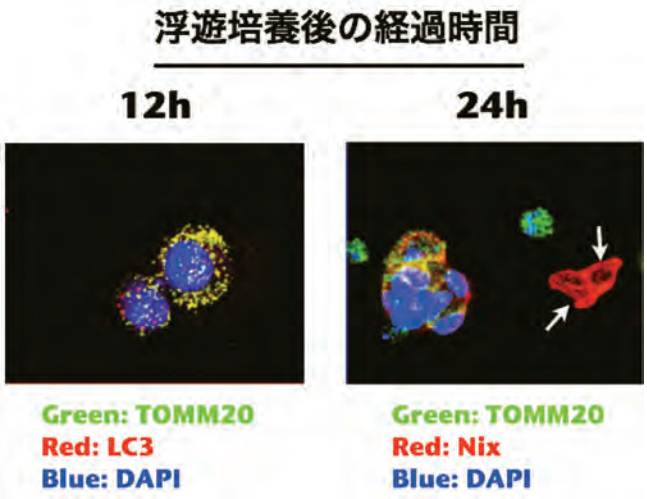


図4　ケラチノサイトの分化刺激によって起こるミトファジーとミトコンドリアの消失
ケラチノサイトの浮遊培養を行い分化誘導刺激を行った後、ケラチノサイトを回収し、抗ミトコンドリア抗体（Tomm20）、抗Nix抗体、および抗LC3抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。左写真：ミトコンドリアとオートファゴソームの共局在が認められることよりミトファジーが起こっていることがわかる。右写真：分化誘導刺激24時間後には脱核しミトコンドリアを失った細胞が認められた。

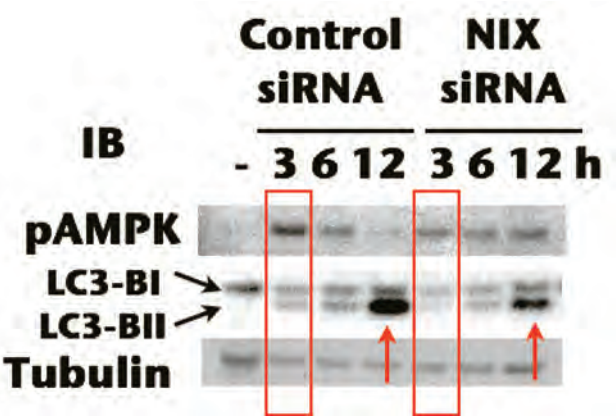


図5　ケラチノサイトの分化刺激によって起こるオートファジー誘導
ケラチノサイトの浮遊培養を行い分化誘導刺激を行った後、経時的にケラチノサイトを回収し、抗LC3抗体を用いてウエスタンブロッティング法によりオートファゴソーム形成に対する影響を解析した。オートファゴソーム形成が起こるとLC3のC末がリン脂質と共有結合を起こし、LC3-BIIの割合が増加する。

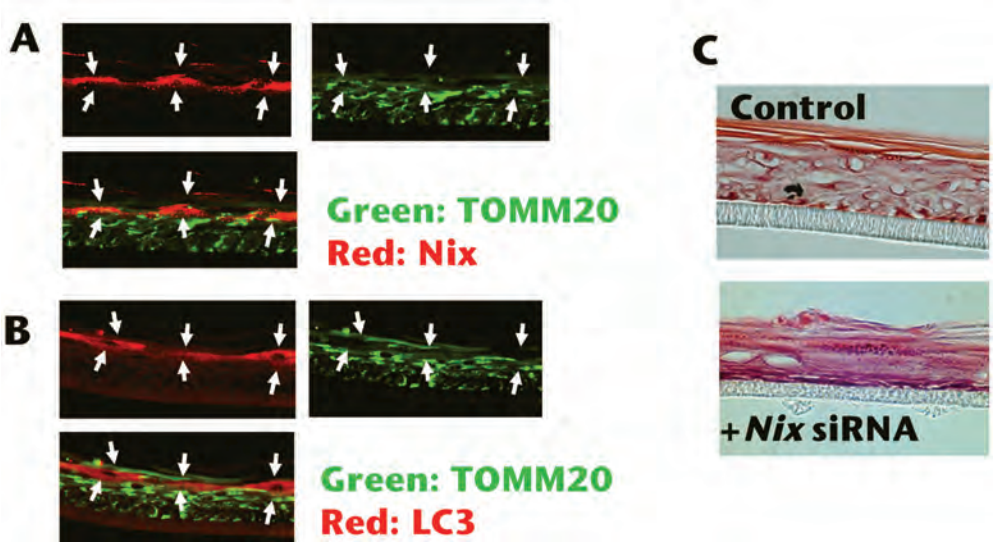


図６　A、B：皮膚３次元培養において認められるオートファジー誘導とミトコンドリアの除去、C：Nix のノックダウンが皮膚３次元培養に及ぼす影響
A、B：ケラチノサイトの３次元培養によって作成された皮膚片を抗ミトコンドリア抗体（Tomm20）、抗 Nix 抗体、および抗 LC3 抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。白矢印で挟んだ領域では Nix の発現およびオートファジーが認められミトコンドリアが存在しない。C：Nix のノックダウンしたケラチノサイトを用いた場合は積層化が起こらない。

こで、本研究では、まず、免疫組織染色法を用いて皮膚上皮発生過程における Nix の発現パターンを詳細に解析した。その結果、Nix が皮膚上皮の顆粒層に限局して発現していることが明らかになった。我々は従来の研究において、Nix の類縁分子である Bnip3 も顆粒層に発現していることを報告している。これらの結果から、皮膚上皮顆粒層の細胞には Nix と Bnip3 が共に発現していることが示された。今後、これらの分子についてより詳細な機能解析を行うためには、遺伝子ノックアウトマウスを作成し、皮膚上皮における表現型について詳細に解析を行う必要がある。Nix と Bnip3 は互いに重複する機能を持ち、それぞれを補完しあうことができる。皮膚上皮に Nix と Bnip3 が共発現しているという結果から、遺伝子ノックアウトマウスを作成し分子機能解析を行う際には、これらの分子の補完作用を避けるために、双方の遺伝子を同時にノックアウトしたマウスを作成する必要性が考えられる。我々は、すでに双方の遺伝子を皮膚上皮特異的にノックアウトしたマウスの作成に着手している。

本研究では、培養ケラチノサイトを用いて *Nix* の発現解析および分子機能解析を行った。その結果、ケラチノサイトの分化に伴い *Nix* の発現が著明に上昇するとともにオートファゴソームの形成が誘導されることを見出した。また、*Nix* 遺伝子の発現を siRNA によってノックダウンしたところ、ケラチノサイトの分化とオートファゴソーム形成が遅延することが認められた。これらの結果より、Nix がケラチノサイトの分化や分化に伴うオートファジーの誘導に関与していることが示唆された。また、我々は、従来の研究において、Bnip3 の分子機能解析を行い、Nix と同様に Bnip3 についてもケラチノサイトの分化やオートファジー制御に関与していることを報告している[5]。これらの研究結果より、Nix と Bnip3 が相加的もしくは相乗的に作用することにより、ケラチノサイトが制御されている可能性が考えられる。実際に、Nix と Bnip3 については、ともにオートファゴソームの膜上に存在する LC3/GABARAP タンパク質と結合することによりミトコンドリアを選択的にオートファゴソームへとリクルートする機能を持つことが示されており[3]、ミトファジーを誘導するという点においてこれらの分子は同様な機能を有している。本研究において、我々は、皮膚上皮の顆粒層ではオートファジーが誘導されているとともにミトコンドリアが消失していることを見出した。これらのことから、ケラチノサイトにおいても、Nix と Bnip3 が協調的に働くことによりミトコンドリアのクリアランスを行い、最終分化に伴うダイナミックな細胞のリモデリングを可能にしていることが考えられる。

一方で、本研究では、Nix と Bnip3 の発現制御機構や分子機能に相違点があることも認められた。*Nix* mRNA の発現はケラチノサイトの浮遊培養刺激により速やかに上昇することが認められたが、*Bnip3* の発現量は分化誘導刺激の前後で変化することがなく一定に保たれていた。また、*Nix* をノックダウンしたケラチノサイトを用いて皮膚の３次元培養を行った場合は積層化が著しく阻害されたが、*Bnip3* をノックダウンしたケラチノサイトを用いた場合は

このような著明な異常は観察されなかった。これらの結果から、両者の遺伝子の発現が異なる仕組みにより制御されている可能性が考えられ、また、両者の分子機能やその作用の仕方にも違いがあることが示唆される。実際に、Nixはミトコンドリア膜の脱分極を誘導することにより活性化酸素の産生を上昇させオートファジーを誘導する作用を持つことが示されているが[8]、Bnip3は活性化酸素非依存性にオートファジーを誘導することが報告されており[9]、両者はオートファジー誘導能を持つという点においては同様な機能を持つが、その作用メカニズムは異なることが推測される。近年、ケラチノサイトの分化を誘導するためにはミトコンドリアから産生される活性化酸素が必須な役割をもつことが報告された。本研究では、Nixがケラチノサイトの分化誘導に重要な役割を果たしていることが示されたが、このような分化誘導はNixによるミトコンドリアからの活性化酸素の産生制御を介して行われている可能性が考えられる。

本研究によって、皮膚上皮の角質化の過程にオートファジーが関与していることが示唆された。一般的に、ストレスにより肌の調子が悪くなるということが広く信じられている。オートファジーはさまざまなストレスの影響を受けることから[10]、ストレスによってオートファジー活性が変化することを介して角化層の機能が変化する可能性が考えられる。本研究のさらなる発展によって、皮膚のオートファジー制御機構の分子的詳細が明らかにされれば、皮膚の健康を維持するための方策として、オートファジー制御を標的にした新たなアプローチ法を開拓できる可能性がある。

(引用文献)

1) Ramos-e-Silva M & Jacques C (2012) Epidermal barrier function and systemic diseases. *Clin Dermatol* 30 (3) :277-279.

2) Candi E, Schmidt R, & Melino G (2005) The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (4) : 328-340.

3) Ney PA (2015) Mitochondrial autophagy: Origins, significance, and role of BNIP3 and NIX. *Biochim Biophys Acta* 1853 (10 Pt B) : 2775-2783.

4) Moriyama M, *et al.* (2008) Multiple roles of Notch signaling in the regulation of epidermal development. *Dev Cell* 14(4):594-604.

5) Moriyama M, *et al.* (2014) BNIP3 plays crucial roles in the differentiation and maintenance of epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 134 (6) : 1627-1635.

6) Li L, Tennenbaum T, & Yuspa SH (1996) Suspension-induced murine keratinocyte differentiation is mediated by calcium. *J Invest Dermatol* 106 (2) : 254-260.

7) Sandoval H, *et al.* (2008) Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature* 454(7201):232-235.

8) Ding WX, *et al.* (2010) Nix is critical to two distinct phases of mitophagy, reactive oxygen species-mediated autophagy induction and Parkin-ubiquitin-p62-mediated mitochondrial priming. *J Biol Chem* 285 (36) : 27879-27890.

9) Quinsay MN, Thomas RL, Lee Y, & Gustafsson AB (2010) Bnip3-mediated mitochondrial autophagy is independent of the mitochondrial permeability transition pore. *Autophagy* 6 (7) : 855-862.

10) Huang Z, Zhou L, Chen Z, Nice EC, & Huang C (2016) Stress Management by Autophagy: Implications for Chemoresistance. *Int J Cancer*.

香り誘発性鎮痛の視床下部オレキシン神経による調節

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
柏谷　英樹

To reveal the central neuronal circuit underlying the odorant-X induced analgesia, I examined the contribution of hypothalamic orexin neurons, one of the higher centers for the intrinsic analgesia-system. Formalin test revealed that the odorant-X induced analgesia was not observed in orexin mutant mice, indicating that the orexin neurons are essential for the odorant-X induced analgesia.

1. 緒　言

世界には多様な香気が存在するが、その中の一部は鎮痛効果を持つことが予想されており、一部の民間療法では香気療法が取り入れられている。実際、いくつかの香気分子は末梢組織において鎮痛効果を持つことが証明されている。例えばウィンターグリーン（ツツジ科）由来の香気分子であるサリチル酸メチルは独特の香気を持つが、体内に摂取されるとサリチル酸へ代謝され、末梢でCOX-2を阻害しプロスタグランジン生成を阻害することで鎮痛効果を発揮する。しかしながら、香気成分が「香り」として、言い換えれば嗅覚系を介した嗅覚入力として鎮痛効果を持つのか、もし持つならばそれはどのような神経回路メカニズムが介在するのか、については明らかになっていない。

本申請者は、この嗅覚系を介した鎮痛効果を検証しようと考え、種々の匂い暴露下で 疼痛行動（ホットプレートテスト及びホルマリンテスト）を観察し、鎮痛効果を持つ匂い分子odorant-X（テルペノイドの一種。未発表データであるため仮称）を見出した。図1は、ホルマリンテストにおけるodorant-Xの鎮痛効果を調べたデータである。ホルマリンテストでは特徴的な2相性の疼痛行動を示すが、odorant-X香気暴露により両相で有意に疼痛行動が減少している（$p<0.05$；マンホイットニーU検定）。この鎮痛効果は嗅覚遮断マウス（嗅上皮破壊マウス及び嗅球破壊マウス）では消失することから、嗅覚入力を介して鎮痛効果が現れることが明らかになった。

本研究では、この香気誘発性鎮痛がどのような中枢神経回路により発現するかを明らかにすることを目的としている。申請者は鎮痛を含む多様な自律神経反応に関与するこ

Orexin neurons in hypothalamus contribute to odor-induced analgesia

Hideki Kashiwadani
Graduate School of Medical and Dental sciences, Kagoshima University

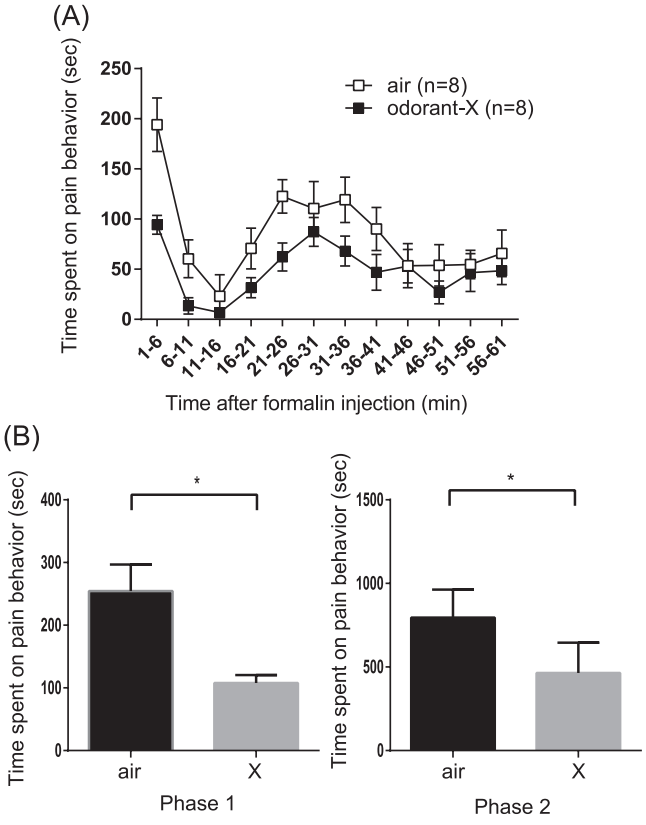


図1　odorant-X香気誘発性鎮痛（ホルマリンテスト）

とが知られているオレキシンペプチドに着目し、オレキシン含有神経が香気誘発性鎮痛に関与するかどうかを検討した。

2. 実　験

2. 1. 香気暴露及びホルマリンテスト

自作のオルファクトメーターにより定流量・濃度の気化odorant-Xを作成し、0.5Lの観察チャンバー内を換気した。換気は1L/minで行った。室温は25±1℃とした。マウスを予め5分間観察チャンバー内でodorant-Xに暴露した後、左後肢足底に20μLの2%ホルマリン液を皮内注入し、観察チャンバー内に戻した後、ホルマリン誘発性疼痛行動を観察した（ホルマリンテスト）。疼痛行動は注入側後肢のlicking, lifting, flinching, bitingに費やした時間の計測で行

い、5分間毎の疼痛行動量としてあらわした[1]。匂い暴露群のコントロールとして、無臭空気暴露群の疼痛行動量を測定し、疼痛行動量差を検証した。ホルマリンテストでは、ホルマリンによる侵害受容器刺激性疼痛と中枢シナプス感作及び末梢炎症性疼痛の表出時間の異なる2相性の疼痛行動を示すことが知られている。Odorant-X香気誘発鎮痛がどちらの疼痛行動に影響与えるかを検証するため、疼痛行動量差は1相、2相に分けて検証した。

2. 2. 動物（マウス）

香気誘発性鎮痛に対するオレキシン神経の関与を検証するため、オレキシン神経除去マウス[2]、及びオレキシンペプチド欠損マウス[3]における匂い誘発性鎮痛を検証した。これらのミュータントマウスは、共同研究者である桜井武教授（金沢大学大学院医薬保健学総合研究科）より提供を受けた。実験は雄マウス（25－32g）を用いて行った。複数回実験による学習効果を除外するため、全ての動物は1度のみ疼痛実験に用い、ホルマリンテスト終了後直ちに麻酔薬の過剰投与により安楽死させた。オレキシン神経活性化をc-Fos発現により検証する際は、ミュータントマウスのbackground strainであるC57BL6マウスを用いた。

2. 3. 匂い分子

Odorant-Xは東京化成工業より入手した。匂い分子の劣化を防ぐため、odorant-Xは4℃で保存し、実験毎に分注して用いた。

2. 4. 免疫抗体染色

オレキシン神経のc-Fos活性化を検証するため、抗オレキシンA抗体と抗c-Fos抗体による免疫抗体蛍光二重染色を行った。1時間の匂い暴露後、ウレタン水溶液（1.5g/kg, i.p.）により深麻酔し、4%PFAにより灌流固定を行った。抜脳後40μm切片を作成し、floating staining methodを用いて染色を行った[4]。c-Fosの可視化にはウサギ抗c-FosA抗血清（1/1000, oncogene）、ビオチン化抗ウサギIgG抗体（1/250, Jackson ImmunoResearch）及びストレプトアビジン結合AlexaFluor488抗体（1/200, Invitrogen）を、オレキシン神経の可視化にはヤギ抗オレキシン抗血清（1/100, Santa Cruz）及びCF568結合抗ヤギIgG抗体（1/200, Biotium）を用いた。c-Fos陽性細胞のカウントは、1匹あたり視床下部を含む3枚の脳切片から行った。

2. 5. innate odor preference test

マウスのodorant-Xに対する生得的な好悪を判定するため、innate odor preference test（IOP test）を行った[5]。動物を実験環境及び手順に慣らすため、プラスチックケージ（20×15×13 cm）に静置し、30分毎に新しいケージへ移す作業を4回行った。馴化後、マウスを同型のケージに移し、匂い分子20μLを染み込ませた2×2 cmのろ紙を静置した同型のケージにマウスを移し、ろ紙の嗅探索行動時間を計測した。

2. 6. innate odor avoidance test

マウスのodorant-Xに対する生得的な嫌悪を判定するため、innate odor avoidance test（IOA test）を行った[4]。実験は3室の連なった手製のテストチャンバーを用い、両側のチャンバーは無臭空気または香気で換気（1L/min）できるよう設定した。実験2日前、無臭空気で換気したテストチャンバー内にマウスを静置し、60分間自由にチャンバー内を探索させ装置に馴化させた。翌日、両側のチャンバーを無臭空気で換気した状態でマウスを中央チャンバーに静置し、両側のチャンバーへの侵入回数及び滞在時間を10分間測定し、両側チャンバーの好悪に関してバイアスがかかっていないことを確認した。実験当日、片方の匂いチャンバーを無臭空気で、他方のチャンバーにオルファクトメーターから導入した香気で還流し、それぞれのチャンバーへマウスが探索した回数及び滞在時間を10分間計測した。

2. 7. 血中コルチコステロンのELISAによる定量

Odorant-X暴露によるマウスのホルモン性ストレス応答を計測するため、匂い刺激60分後のコルチコステロン（ストレスホルモンの一種）の血中濃度をELISA法により計測した。オルファクトメーターを用いて60分間匂い暴露した後、素早く（15秒以内）断頭を行い、EDTA管に全血採血した。ELISAにはcorticosterone ELISA kit（ADI-900-097, ENZO, NY, USA）を用い、添付のプロトコルに従い計測を行った。

3. 結　果

3. 1. オレキシン神経除去マウスでは匂い誘発性鎮痛が消失する

Odorant-X香気誘発性鎮痛に対するオレキシン神経の寄与を検証するため、オレキシン神経を選択的に除去したマウス（ORX-AB）を用い、odorant-X暴露下及び無臭空気暴露下でのホルマリン誘発性疼痛行動量を測定した。

図2AはORX-ABにおいてホルマリン性疼痛の1相及び2相の総疼痛行動量をodornat-X暴露群と無臭空気暴露群で比較している。1相、2相両相で疼痛行動量は両群で大差がなく、野生型マウスで観察されたodorant-X暴露による疼痛行動量減少は観察されなかった（$p>0.05$; マンホイットニーU検定）。この結果から、odorant-X誘発性鎮痛の発現には視床下部オレキシン神経が必要不可欠であることが示唆された。

3. 2. オレキシンペプチド欠損マウスでは匂い誘発性鎮痛が消失する

オレキシン神経は、神経伝達物質としてオレキシンの他にグルタミン酸等を含有することが知られている。そこで、香気誘発性鎮痛にはオレキシンペプチドによる神経伝達が必須であるのか、あるいはオレキシン神経に含まれる他の神経伝達物質による神経伝達が必須であるのかを検証することを目的とし、オレキシンペプチドを選択的に欠損させたマウス（ORX-KO）を用いて、odorant-X香気誘発性鎮痛を検証した。

図2BはORX-KOにおいてホルマリン性疼痛の1相及び2相の総疼痛行動量をodornat-X暴露群と無臭空気暴露群で比較している。1相、2相両相で疼痛行動量は両群で大差がなく、野生型マウスで観察されたodorant-X暴露による疼痛行動量減少は観察されなかった（$p>0.05$; マンホイットニーU検定）。この結果から、odorant-X誘発性鎮痛の発現にはオレキシンペプチドによる神経伝達が必要であることが示唆される。

3. 3. Odorant-X刺激によりオレキシン神経は活性化する

Odorant-X刺激で実際オレキシン神経が活性化されるかを検証するため、野生型マウスでホルマリンテスト時同様1時間のodorant-X香気暴露を行い、神経活性マーカーである最初期遺伝子産物c-Fosを発現するオレキシン神経の割合を定量化した。その結果、コントロール群及びodorant-X暴露群の両群で視床下部オレキシン神経でc-Fos発現細胞が観察されるが、odorant-X暴露群で有意にc-Fos陽性オレキシン神経の数が増加していた（図3）。これらの結果は、odorant-X香気暴露により活性化される視床下部オレキシン神経が増加し、その結果odorant-X香気誘発性鎮痛が発現することを示唆している。

3. 4. Odorant-X刺激はマウスに強いストレス応答を引き起こさない

Odorant-X香気暴露はマウスに有意な鎮痛効果をもたらすが、これはodorant-X暴露がマウスに強いストレスを引き起こし、その結果ストレス誘発性鎮痛が惹起された可能性が考えられる。odorant-Xがマウスに強いストレスを引き起こすのであれば、マウスはodorant-Xに対して忌避行動をとることが予想されるため、innate odor preference test（IOP test）及びinnate odor avoidance test（IOA test）によりodorant-Xに対する忌避性を検証した。

IOP testで、odorant-X香気を付着させたろ紙の探索時間と無臭ろ紙の探索時間を比較した所、有意な差は検出されず、odorant-X香気付着ろ紙の探索時間が延長する傾向を示した（$p>0.99$；ダン多重比較検定）。一方、マウスに先天的忌避行動を誘発するtrimethylthiazolin（TMT）を付着させたろ紙に対する探索行動は無臭ろ紙と比較し有意に減少した（$p<0.05$; ダン多重比較検定）。

次にIOA testでodorant-X香気灌流チャンバーと無臭空気灌流チャンバーの滞在時間を比較した所、有意な差は検出されなかった（$p>0.99$;ウィルコックソン検定）。一方、TMT灌流チャンバーでは有意に滞在時間が減少した（$p<0.05$;ウィルコックソン検定）。

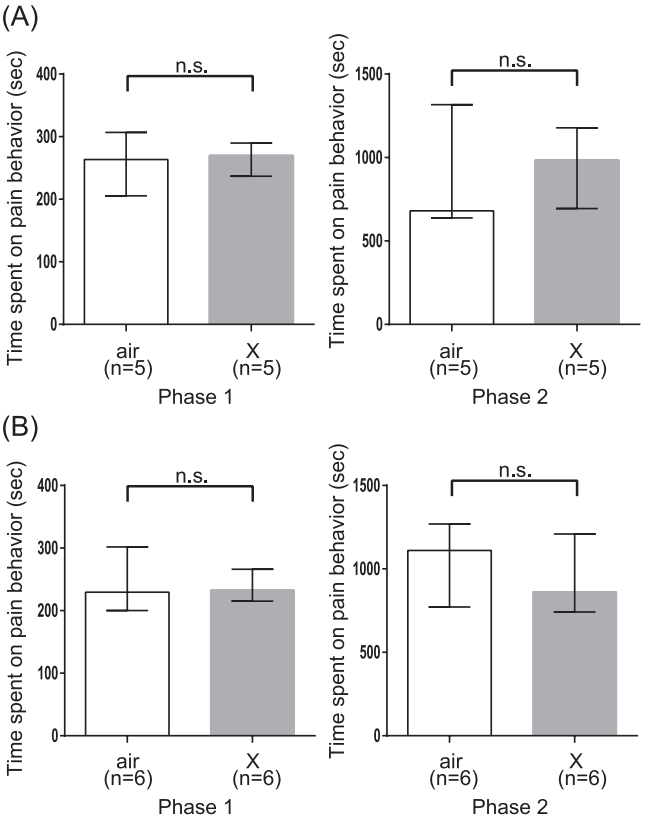


図2　オレキシン神経除去マウス（A）及びオレキシンペプチド欠損マウス（B）ではodorant-X香気誘発性鎮痛は消失する

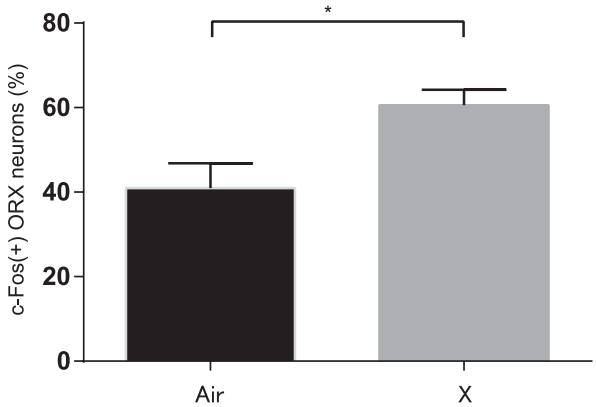


図3　Odorant-X香気暴露により、視床下部オレキシン神経においてc-Fos蛋白質陽性細胞数は増加する

これらのodorant-Xに対する好悪行動テストから、マウスはodorant-Xに対して、TMT臭気に示す忌避行動を惹起することはなく、TMTがもたらすような強い忌避性ストレスを引き起こさないことが示唆された。

更に、odorant-Xがマウスへ与えるストレスをより直接的に検証するため、ストレスホルモンの一種であるコルチコステロンの血中濃度変化をELISA法により検証した。げっ歯類に有意なストレス反応を引き起こすTMT暴露ではコルチコステロン量は有意に増加したが($p<0.0001$; テューキー多重比較検定)、odorant-X香気暴露時にはコルチコステロン量の有意な増加は見られなかった（$p>0.20$; テューキー多重比較検定)。これらの結果より、odorant-X暴露はマウスに対して忌避行動を惹起するような強いストレスをもたらすことなく、odorant-X誘発性鎮痛はストレス誘発性鎮痛とは異なる機序で発現していると考えられる。

4. 考　察

本研究により、odorant-X香気誘発性鎮痛の発現には、オレキシン含有神経が必要であることが明らかになった。オレキシン含有神経は視床下部に局在することが知られており、睡眠覚醒、摂食、体温調節、循環調節、鎮痛といった多様な自律神経調節に深いかかわりを持つ[6]。これまでに、ストレス誘発性鎮痛発現にオレキシン神経が関与することが示唆されてきた[7]。ストレス誘発性鎮痛と香気誘発性鎮痛はオレキシンを活性化する入力経路に差があるが、共通した出力系により鎮痛効果を発現する可能性が考えられる。

また、オレキシン神経は直接脊髄後角に軸索投射し、上向する疼痛情報を抑制する可能性が指摘されている[7]。実際、脊髄内にオレキシン受容体アゴニストを局所注入することで鎮痛効果が現れることが示されている[8]。また、オレキシン神経は中脳水道鎮痛回路を賦活化し、下行性抑制系を介して鎮痛効果を現すことも、薬理学的方法で示されている[9]。香気誘発性鎮痛は、多機能性ペプチドであるオレキシンの受容体を直接的に刺激することなく鎮痛を誘発できるため、臨床応用への障害がより少ないと考えている。

本研究で用いた鎮痛香odorant-Xは、これまでアロマセラピーの世界で鎮痛効果を持つと信じられている複数の植物由来香気成分から、ガスクロマトグラフィ等により分離同定された匂い分子リストを作成し、マウスの行動学的スクリーニングで見出した。本研究によりオレキシン神経が鎮痛効果発現のハブとなっていることが明らかになったため、オレキシン神経をターゲットとした麻酔下マウスを用いた電気生理学的手法により、鎮痛作用を持つ候補香気をより効率的にスクリーニングすることが可能となった。ホルマリンテストを用いると1匹あたり1時間程度の時間を要し、また動物の学習効果等を勘案すると1匹あたり1つの匂い分子しか検証できない。一方、電気生理学的手法を用いると、1細胞あたり30程度の候補分子の応答を検証することが可能であり、また1匹あたり20程度の細胞の応答を記録することができる。この新しいスクリーニング法を用いることで、より鎮痛効果の高い香気成分の分離同定が容易になることが予想される。

これまでに明らかになったodorant-X香気誘発性鎮痛に関するデータをまとめた論文を執筆・投稿したところ、複数の査読者から機械的痛覚刺激に対する香気誘発性鎮痛の効果を付け加えるべき、というコメントがついた。そこで古典的なvon Frey法により機械的痛覚刺激に対する応答閾値の測定を試みたが、香気刺激後動物が安静状態に至るまでの経過時間にばらつきが大きく実験手法として不適当であることが判明した。そこで本申請で新たにpincher test装置を購入しコントロール実験を行った。その結果、非常に高安定度及び高時間分解能でマウスの機械的痛覚閾値の測定が可能であることが明らかになった。現在、pincher test装置により機械的痛覚刺激に対する香気誘発性鎮痛の効果を検証中である。

5. 統　括

本助成による研究で、odorant-X誘発性鎮痛が視床下部オレキシン含有神経を介して発現することが明らかになった。しかしながら、嗅覚情報がどのような神経経路を介してオレキシン神経を活性化するのか、あるいはオレキシン神経からの出力がどのような経路を介して実際鎮痛効果をもたらすのか、いまだに不明である。上述のc-Fos発現を指標に本申請者はオレキシン神経の上流、下流の神経回路の解明に取り掛かっており、いくつかの候補経路が見出されている。今後これらの経路の薬理学的、電気生理学的ブロックにより実際香気誘発性鎮痛が遮断されるか検証する予定である。これら香気誘発性鎮痛の神経回路を解明することにより、香気誘発性鎮痛を臨床応用するための基礎データを得ることができる。また本研究によりodorant-Xはマウスに対して明らかな忌避性ストレス反応を引き起こすことがなく、odorant-X誘発性鎮痛はストレス誘発性鎮痛とは異なる機序で発現することが強く示唆された。これらの結果は香気誘発性鎮痛の臨床応用へ大きな前進となり、機能性香気研究の重要な手掛かりとなると予想される。

(文献)

1) Miyata M, Kashiwadani H, Fukaya M, et al: Role of thalamic phospholipase Cb4 mediated by metabotropic glutamate receptor type 1 in inflammatory pain, J. Neurosci., 23, 8098-108, 2003

2) Chemelli RM, Willie JT, Sinton CM, et al: Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep

regulation, Cell 98, 437–51, 1999
3) Hara J, Carsten TB, Nambu T, et al: Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity, Neuron 30:345–54, 2001
4) Yonemitsu T, Kuroki C, Takahashi N, et al: TRPA1 detects environmental chemicals and induces avoidance behavior and arousal from sleep, Sci. Rep. 3, 3100, 2013
5) Kobayakawa K, Kobayakawa R, Matsumoto H, et al: Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb, Nature 450, 503–8, 2007
6) Sakurai T: The role of orexin in motivated behaviors, Nat. Rev. Neurosci.15, 719–31, 2014
7) Kuwaki T: Orexin links emotional stress to autonomic functions, Auton. Neurosci. 161, 20–7, 2011
8) Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N, Chiba T: Analgesic effect of intrathecally administered orexin-A in the rat formalin test and in the rat hot plate test, Br. J. Pharmacol. 137, 170–6, 2002
9) Azhdari Zarmehri H, Semnanian S, Fathollahi Y, et al: Intra-periaqueductal gray matter microinjection of orexin-A decreases formalin-induced nociceptive behaviors in adult male rats, J. Pain 12, 280–7, 2011

新規細胞膜上、女性ステロイドホルモン受容体を介した生理・病態機能の解明

東京農工大学大学院農学研究院応用生命化学専攻

木村　郁夫

Sex steroid hormones are involved in not only reproductive functions but also aggression, maternal behavior, learning, memory, moods, feeding, and so on. Some of these actions are related to unknown rapid non-genomic action, as which cannot be currently explained by the genomic action of nuclear receptors. Recently, several sex steroid receptors were found on the plasma membrane. Hence, it implies that these membrane receptors may be related to the non-genomic actions. In these receptors, a progesterone membrane receptor (mPR), a putative G-protein coupled receptor, is activated by progesterone and abundantly expressed in the brain. Here, we examined neurotrophic effects of mPR and the intracellular signaling in central nervous system. In the future, further functional analysis of mPR will provide new insights into not only understanding of neurotrophic activity but also physiological function by progesterone in brain and may represent an important avenue of research for drug development for the treatment of infertility, metabolic disorders, and dysrhythmia targeting this receptor.

1. 緒　言

性ステロイドホルモンは核内受容体を介して働き、遺伝子発現調節を介した性成熟等の長期的な機能に関与することが知られてきた。しかし近年、攻撃性や摂食、睡眠、そして記憶や学習といった高次脳機能に至るまで、性機能以外の様々な作用にも性ステロイドホルモンが関与することが明らかになった。これらは核内受容体による転写調節を介したgenomicな反応では説明づけられない作用が多数であり、その分子実体は近年まで明らかにされていなかった。

近年、性ステロイドホルモンの細胞膜上受容体として、エストロゲンに対しGPR30[1]、プロゲステロンに対しmPR（membrane progesterone receptor）ファミリー[2]、MAPR（membrane- associated progesterone receptor）ファミリー[3]が同定され、これらが性ステロイドホルモンによる即時性作用に関与する可能性が示唆された。これらの細胞膜上ステロイドホルモン受容体は一般的に知られている核内受容体を介したgenomicな作用に対し、即時性のnon-genomicな作用（MAPK経路の活性化、細胞内Ca濃度の上昇等）を有する。そのために、ステロイドホルモンが関与する乳癌細胞等の増殖の直接的な原因であると予想され、創薬開発の観点からも非常に有用な標的として注目されている。加えて、これらの受容体は卵成熟期だけではなく、成体においても種々の組織において高い発現が確認されていることから成体においても重要な生理機能を担っていると予想される。しかしながら、詳細な機能に関しては未だ明らかにされていない。我々はMAPRファミリーに属するneudesin、neuferricinを世界で初めて単離・同定し[4, 5]機能解析を進める一方で、もう一つのプロゲステロン細胞膜上受容体ファミリーであるmPRファミリーの解析にも着手した。mPRファミリーは7回膜貫通型と予測されており、GPCRである可能性が高いと考えられていた[6]。また、mPRファミリーのうちいくつかの受容体は中枢神経系に高発現することが報告されており[2]、これらの受容体を介したプロゲステロンによる即時的作用が生体にとって重要な役割を果たしている可能性が示唆された。そこで我々は、これらプロゲステロン細胞膜上受容体のうち、特に中枢神経系に高発現すると報告されている受容体に着目した。そしてその詳細な発現解析、プロゲステロンによる細胞内シグナル伝達機構解析を行った。

Physiological function via novel progesterone membrane receptor

Ikuo Kimura

Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Agriculture and Technology Graduate School of Agriculture

2. 実　験

2. 1. 定量RT-PCR

マウスの各組織からtotal RNAを抽出し、逆転写後、SYBR greenを用いたインターカレーター法によりPCR産物を定量した。

In situ hybridization　マウス胎児全身、成体脳の凍結切片を作製し、35S-標識アンチセンスRNAプローブを用いて切片中のmRNAを標識した。その後X線フィルムに感光させシグナルを検出した。

2. 2. 細胞培養

Flp-in mPR T-REx HEK293細胞は10％FBS、ハイグロマイシン、ブラストサイジンを添加したDMEM培地を用い培養した。ラット副腎褐色細胞腫由来PC12細胞は10％ HS、5% FBS、ペニシリン、ストレプトマイシンを添加したDMEM培地で培養した。全ての細胞は37℃、

5% CO_2 条件下で培養した。

cAMP assay　細胞を24wellプレートに播種し、HEK293細胞にはドキシサイクリン、PC12細胞には神経成長因子NGFを添加し24時間インキュベートした。細胞は各濃度のプロゲステロンで10分間刺激し、0.1N HClで回収した。得られたサンプルについて、cAMP kit（cayman）のプロトコルに従ってcAMP濃度の測定を行った。

2. 3. Ca^{2+} assay

細胞をコラーゲンコート96wellプレートに播種し、HEK293細胞にはドキシサイクリン、PC12細胞にはNGFを添加し24時間インキュベートした。FLIPR Calcium 4 assay kitを用いて細胞内Ca^{2+}の変動を測定した。

ERK1/2 assay　細胞を24wellプレートに播種し、HEK293細胞にはドキシサイクリン、PC12細胞にはNGFを添加し24時間インキュベートした。細胞は各濃度のプロゲステロンで10分間刺激し、Lysis bufferで回収した。各サンプルについて、Western blot法によりERK1/2、Phospho-ERK1/2量を測定した。

突起伸長活性評価　リジンコート6 wellプレートにPC12細胞を播種し、Lipofectamine 2000を用いてsiRNAを導入した。その後NGF・プロゲステロンを添加し、3日後に写真撮影した。神経突起が細胞体以上に伸長している細胞の最大突起長のみをimageJ（NIH）で測定した。

2. 4. ERK1/2 assay

細胞を24wellプレートに播種し、HEK293細胞にはドキシサイクリン、PC12細胞にはNGFを添加し24時間インキュベートした。細胞は各濃度のプロゲステロンで10分間刺激し、Lysis bufferで回収した。各サンプルについて、Western blot法によりERK1/2、Phospho-ERK1/2量を測定した。

2. 5. 突起伸長活性評価

リジンコート6 wellプレートにPC12細胞を播種し、Lipofectamine 2000を用いてsiRNAを導入した。その後NGF・プロゲステロンを添加し、3日後に写真撮影した。神経突起が細胞体以上に伸長している細胞の最大突起長のみをimageJ（NIH）で測定した。

2. 6. mPRノックアウト（KO）マウスの作製

mPRのコーディング領域を含む配列の一部をLacZ配列に置換したターゲティングベクターを設計し、ジーンターゲティング法によりmPRKOマウスを作製した。

3. 結　果

3. 1. mPRは中枢神経系に高発現する

各組織におけるmPRの発現量をRT-PCRにより解析すると、mPRは脳、精巣において高発現していた（図1A）。更に、胎児、成体マウス脳切片を用いてin situ hybridizationを行ったところ、mPRは胎児期から中枢神経系に発現しており、成体脳においては部位特異的に発現が見られることが確認できた（図1B）。

mPRがどの細胞に発現しているか調べるため、神経細胞、アストロサイト、神経幹細胞それぞれについてのRT-PCRによるmPR発現量を調べた結果、mPRはアストロサイトではなく神経細胞、神経幹細胞に発現しており、成熟ニューロンまたは分化過程のニューロンにおいて何らかの役割を果たしていることが示唆された。

3. 2. 強制発現系を用いたmPR下流シグナルの検討

Flp-in mPR T-REx HEK293細胞にドキシサイクリンを添加してmPRを強制発現させ、プロゲステロン刺激による細胞内シグナリングを調べた。mPRファミリーはGPCRであると予測されていたため、GPCRの下流シグナルであるCa^{2+}、cAMP濃度の測定を行ったところ、どちらもプロゲステロン刺激によっては反応が見られなかった。次にプロゲステロン刺激によるERK1/2のリン酸化を調べたところ、mPR発現下でプロゲステロン濃度依存的にERK1/2の活性化が見られた。したがって、mPRはプロ

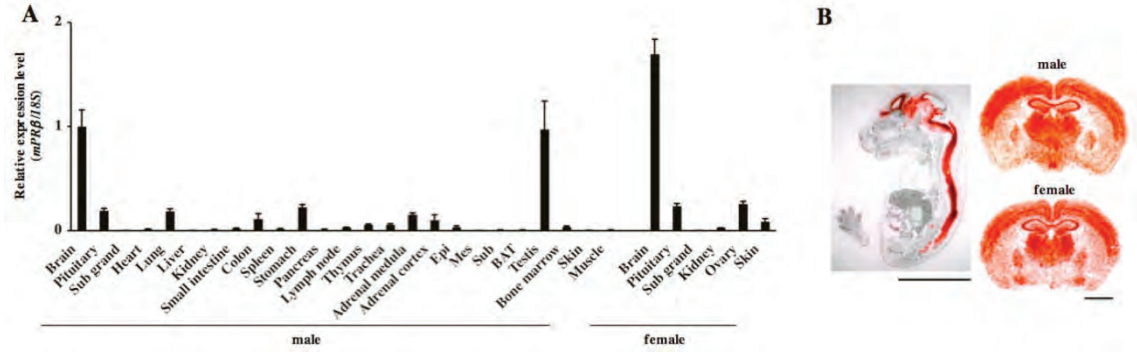


図1　mPRの発現：（A）7週齢マウスのmPR mRNA発現量解析（n=3）.（B）35S標識アンチセンスmPRプローブを用いたin situ hybridization法による胎生15.5日齢マウス切片（左, Scale bar：5 mm）、7週齢マウス脳切片（右, Scale bar：2 mm）のmPR発現部位確認.

ゲステロン刺激を受けERK1/2を活性化させることが示唆された。

3. 3. 内因性mPR発現細胞株を用いたプロゲステロン下流シグナルの検討

次に、mPRを内因性に発現する細胞を用いてプロゲステロン刺激による下流シグナルを調べた。ラット副腎褐色細胞腫由来PC12細胞は神経成長因子NGFを添加することで神経細胞様に分化するため、神経分化のモデルとして用いられる。NGFによる分化誘導開始後、各時間におけるプロゲステロン受容体の発現を調べたところ、mPRの発現のみが細胞の分化に伴い急激に上昇していたため、PC12細胞の分化の過程もしくは分化後にmPRが何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

mPRの発現が神経分化の初期段階から急激に上昇することから、プロゲステロンがmPRを介して神経分化に何らかの影響を与えるのではないかと考え、以下の実験を行った。PC12細胞をNGFで分化誘導する際、プロゲステロンを同時添加すると、神経突起の伸長が有意に促進された。更に、mPRに対するsiRNAを導入した後に同様の実験を行うと、プロゲステロンによる神経突起伸長促進作用が抑制される傾向が見られた。したがって、mPRがプロゲステロンによる神経分化促進作用に関与していることが示唆された。

また、NGFで分化誘導し、mPRの発現が上昇した状態でプロゲステロン刺激による各シグナルについて検討したところ、強制発現系における結果と同様にPC12細胞においてもプロゲステロン刺激によるGPCR下流シグナルは見られなかったが、ERK1/2のリン酸化はプロゲステロン濃度依存的に亢進していた。このプロゲステロンによるERK1/2リン酸化の亢進について、どの受容体を介したものか確かめるため、核内受容体PRの阻害剤RU486またはMAPRファミリーに属する細胞膜上プロゲステロン受容体PGRMC-1の阻害剤AG205で前処置したものについて、ERK1/2のリン酸化を測定した。しかし各受容体の阻害によってERK1/2リン酸化亢進の抑制は見られなかった。

3. 4. mPRKOマウスの表現型

我々は独自にmPRKOマウスを作製し、その表現型について検討を行うことでin vivoにおける機能解析も行った。mPRKOマウスはほぼメンデル則に従って得られた。また、WTマウスとKOマウスで体重に差は見られなかったが、脳、精巣といったmPRが発現する組織の重量がWTマウスに比べてKOマウスで軽かった。

4. 考　察

本研究では、近年その存在が明らかになり注目を浴びている性ステロイドホルモンの細胞膜上受容体のうち、プロゲステロンをリガンドとするmPRに着目した。mPRファミリーは7回膜貫通型と予測されており、GPCRであると考えられていたが[6]、GPCRとは異なる構造を持つという報告もあった[7]。当研究室では脂肪酸受容体を中心としたGPCRの機能解析を行っており[8-10]、その経験を活かしてGPCR下流シグナルの解析を行うことでmPRがGPCRであるかどうかについて検討を行った。その結果、mPRを強制的または内因性に発現する細胞において、プロゲステロン刺激によってCa^{2+}動員、cAMP濃度の変化といったGPCR下流シグナルは確認されなかった。したがって、我々では、mPRはGPCRとは異なるシグナル伝達に関与している可能性が高いと考えている。今後更にmPRを介したシグナル伝達機構の解明を進めていく予定である。

また今回、プロゲステロンがERK1/2のリン酸化を亢進させることを示した。しかしPC12細胞におけるプロゲステロン10 μMによるERK1/2のリン酸化は各受容体の阻害によっては抑制が見られず、今回PC12細胞におけるプロゲステロンのERK1/2リン酸化亢進作用がどの受容体を介するものか確かめることはできなかった。強制発現系においてはmPR発現時にプロゲステロン1 μM、10 μMでリン酸化亢進が見られるため、本来プロゲステロンの作用が1 μMで現れる可能性を考え、今後PC12細胞においてもこの濃度において解析を行う必要があると考えている。

本研究は、中枢神経系に高発現するプロゲステロン受容体mPRが生体において果たす役割の解明において、基礎的データを提供するものである。mPRノックアウトマウスの作製が完了した現在、今後更にmPRファミリーの機能解析を進めることにより、性ステロイドホルモンが関与する高次脳機能の解明、更にはこれらの受容体をターゲットとする性ステロイドホルモン関連疾患、中枢神経系疾患領域における新規治療薬開発への新たな知見を提供するものと期待される。

（参考文献）

1）Revankar CM, Climino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER : A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. Science., 307, 1625-1630, 2005.

2）Zhu Y, Bond J, Thomas P : Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor. Proc Natl Acad Sci U S A., 100, 2237-2242, 2003.

3）Mifsud W, Bateman A : Membrane-bound progesterone receptors contain a cytochrome b5-like ligand-binding domain. Genome Biol., 3,

RESEARCH0068, 2002.
4) Kimura I, Yoshioka M, Konishi M, Miyake A, Itoh N : Neudesin, a novel secreted protein with a unique primary structure and neurotrophic activity. J Neurosci Res., 79, 287-294, 2005.
5) Kimura I, Nakayama Y, Kinishi M, Kobayashi T, Mori M, Ito M, Hirasawa A, Tsujimoto G, Ohta M, Itoh N, Fujimoto M : Neuferricin, a novel extracellular heme-binding protein, promotes neurogenesis. J Neurochem., 112, 1156-1167, 2010.
6) Thomas P, Pang Y, Dong J, Groenen P, Kelder J, de Vlieg J, Zhu Y, Tubbs C : Steroid and G protein binding characteristics of the seatrout and human progestin membrane receptor subtypes and their evolutionary origins. Endocrinology., 148, 705-718, 2007.
7) Smith JL, Kupchak BR, Garitaonandia I, Hoang LK, Maina AS, Regalla LM, Lyons TJ : Heterologous expression of human mPRalpha, mPRbeta and mPRgamma in yeast confirms their ability to function as membrane progesterone receptors. Steroids., 73, 1160-1173, 2008.
8) Ichimura A, Hirasawa A, Poulain-Godefroy O, Bonnefond A, Hara T, Yengo L, Kimura I, Leloire A, Liu N, Iida K, Choguet H, Besnard P, Lecoeur C, Viveguin S, Ayukawa K, Takeuchi M, Ozawa K, Tauber M, Maffeis C, Morandi A, Buzzetti R, Elliott P, Pouta A, Jarvelin MR, Korner A, Kiess W, Pigeyre M, Caiazzo R, Van Hul W, Van Gaal L, Horber F, Balkau B, Levy-Marchal C, Rouskas K, Kouvastsi A, Hebebrand J, Hinney A, Scherag A, Pattou F, Meyre D, Koshimizu TA, Wolowczuki U, Tsujimoto G, Froguel P : Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. Nature., 483, 350-354, 2012.
9) Kimura I, Inoue D, Maeda T, Hara T, Ichimura A, Miyauchi S, Kobayashi M, Hirasawa A, Tsujimoto : Short-chain fatty acids and ketones directoly regulate sympathetic nervous system via G protein-cooupled receptor 41 (GPR41). Proc Natl Acad Sci U S A., 108, 8030-8035, 2011.
10) Kimura I, Ozawa K, Inoue D, Imamura T, Kimura K, Maeda T, Terasawa K, Kashihara D, Hirano K, Tani T, Takahashi T, Miyauchi S, Shioi G, Inoue H, Tsujimoto G : The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. Nat Commun., 4, 1829, 2013.

スピルリナの紫外線皮膚老化抑制効果に対する検討およびそのメカニズムの解明

神戸大学大学院医学研究科内科系講座皮膚科学分野

国定　充

Reactive oxygen species produced in response to UV radiation are important in skin tumor development. We have previously reported that deficiency of the *Ogg1* gene, encoding the repair enzyme for 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoG), increases skin tumor incidence in mice upon repetitive UVB exposure and modulation of UVB-induced inflammatory response. *Spirulina platensis* (*S. platensis*) is used as a human food supplement because it contains abundant nutritional and antioxidant components. Therefore, we investigated the inhibitory effects of *S. platensis* on UVB-induced skin tumor development in *Ogg1* knockout-(KO) mice and the wild-type (WT) counterpart. Dietary *S. platensis* suppressed tumor induction and development in both genotypes compared to our previous data without *S. platensis*. Induction of erythema and ear swelling, one of the hallmarks of UVB-induced inflammatory responses, were suppressed in the skin of *Ogg1*-KO mice and albino hairless mice fed with dietary *S. platensis*. Compared with untreated mice, *S. platensis*-administered mice showed significantly reduced 8-oxoG formation in the skin after UVB exposure. Moreover, we found that *S. platensis* effectively down-regulated the signal proteins p38 MAPK, SAPK/JNK, and ERK after UVB exposure especially in *Ogg1*-KO mice. Our results suggest that *S. platensis* exerts anti-tumor effects against UVB irradiation in the skin through its anti-inflammatory and antioxidant effects. Now we are currently working on other factors, that is, aging related genes by *S. platensis*.

1. 緒　言

紫外線による人体における影響は様々なものがあるが近年特に注目されているのはそれによる発癌およびしみ・しわなどの老化現象である。発癌について我々は今まで紫外線による直接的なDNA損傷が主な原因とされていたが、その他に紫外線によって皮膚に生じる活性酸素により間接的にDNA損傷が生じそれによって皮膚発癌が引き起こされることを報告してきた[1]。一方、中南米やアフリカなどで自生する*Spirulina platensis*（*S. platensis*）という珪藻類があるがそれはβカロチンなどを多く含み、元来抗酸化作用があるとされ、その肝庇護作用[2]や抗ウイルス作用[3]、抗アレルギー作用[4]などが報告されてきたが*S. platensis*が紫外線を受けた皮膚に対しての作用などは今まで研究がなされて来なかった。今回我々は*S. platensis*による紫外線の皮膚における影響、特に発癌に着目していかに短期、または中長期で影響を及ぼすか検討した。また我々は紫外線－活性酸素－DNA損傷による皮膚発癌において炎症因子が重要な役割があることも報告している[5]のでその作用点として炎症因子がいかに関与しているかも合わせて検証した。

The study of effects on ultraviolet-induced skin aging by *Spirulina platensis*

Makoto Kunisada

Division of Dermatology, Department of Internal Related, Kobe University Graduate School of Medicine

2. 実　験

2. 1. 経口*S. platensis*摂取による皮膚腫瘍形成の時期の検討

過去の我々のC57Blマウス（野生型および活性酸素によるDNA障害の8-oxoGを修復できない*Ogg1*ノックアウトマウス）の実験結果[6]を参照にして週3回、マウスの背中を剃毛後、2.5kJ/m^{2}のブロードバンドUVB光源（TL 20W/12RS fluorescent lamps（Philips, Eindhoven, Holland））を用いて照射を続けた。群においては10％*S. platensis*が入った飼料と通常飼料、それぞれ野生型と*Ogg1*ノックアウトの群に分けて45週まで照射を継続し、どの群において皮膚腫瘍形成が早いかを比較・検討した。

2. 2. 経口*S. platensis*摂取によるUVB照射によるマウス皮膚における炎症反応の評価

マウス皮膚においてUVB照射後のDNA損傷から紫外線発癌に至る経緯で重要な要素として炎症反応が挙げられる[5]。*S. platensis*摂取（4週間投与）によってその炎症反応が抑制されているかを経時的に野生型および*Ogg1*ノックアウトマウス、さらにはアルビノヘアレスマウスにて、評価方法としてはマウス耳介の腫脹（mm）を計測し、紅斑反応はスコア化して比較した。尚紫外線照射は単回で照射量は*Ogg1*マウスには2.5 kJ/m^2, アルビノヘアレスマウスには1.5 kJ/m^{2}とした。

2. 3. 経口*S. platensis*摂取によるUVB照射によるマウス皮膚における炎症反応関連遺伝子の検討

2. 2. と同様に4週間*S. platensis*を投与しその後単回UVBを照射後、皮膚よりmRNAを抽出しそれを用いてリ

アルタイムRT-PCR法で皮膚の炎症で重要とされるIl1βおよびCxcl1の発現を野生型および*Ogg1*ノックアウトマウスにて3, 6, 24時間後にてそれぞれ比較検討を行った。さらにIl1βでは抗体を用いた免疫染色にて24時間後での検討を行い、同様にTLR4では免疫組織染色およびリアルタイムRT-PCR法で同様比較した。

2. 4. *S. platensis*の実効成分であるフィコシアノビリンにおけるシグナル蛋白の影響の検討

*S. platensis*の実効成分はフィコシアニンとされその活性型としてフィコシアノビリン(Phycocyanobilin: PCB)とされている。それが細胞内のシグナル蛋白にいかなる影響を及ぼしているかを検討するためにウエスタンブロット法にてp38, JNK, ERKにおいてそれぞれリン酸化された蛋白も含めて、30分後、2, 6, 24時間後において検討した。検討したものは胎児マウス皮膚より単離した線維芽細胞(Mouse embryonic fibroblasts: MEFs)についてPCBを精製した粉末(5μg/mL)をMEFsに添加し、UVB照射後に検討した。

3. 結　果

3. 1. 経口*S. platensis*摂取による皮膚腫瘍形成の時期の検討

図1のごとく、*S. platensis*摂取群では*Ogg1*遺伝子型に関わらず1週から6週遅らせることができた。また*S. platensis*摂取群では通常飼料を与えた群では照射後約45週で100％皮膚腫瘍を生じるのに対し、45週時点でも全マウスの約40％にしか腫瘍形成を認めなかった。

3. 2. 経口*S. platensis*摂取によるUVB照射によるマウス皮膚における炎症反応の評価

UVB照射後の耳介腫脹の比較では*S. platensis*摂取群が通常飼料摂取群と比較して野生型あるいは*Ogg1*ノックアウトマウスいずれにおいても抑制することが経時的に確認できた(図2a)。またマウスのバックグラウンドを変えて同様現象が見られるかアルビノヘアレスマウスを用いた実験でも耳介腫脹は抑制されていた(図2b)。ヘアレスマウスではさらにUVB照射後の紅斑反応をも比較検討したが図2cのごとく72時間後では紅斑反応の抑制が*S. platensis*摂取群においても観察され鱗屑の減少も見られた(図2c, d)。

3. 3. 経口*S. platensis*摂取によるUVB照射によるマウス皮膚における炎症反応関連遺伝子の検討

図3のごとく、UVB照射後の*S. platensis*摂取群においては通常飼料摂取群と比較して皮膚炎症関連遺伝子として知られるIl1β、Cxcl1いずれにおいても発現の抑制が見られた(図3a, b, c)。特に*Ogg1*ノックアウトマウスでのIl1βはすべてのUVB照射後のタイムポイントにおいてその傾向が統計学的有意差をもって示された(図3a)。またTLR4においても免疫組織染色法やリアルタイムRT-PCR法いずれにおいてもUVB照射後の発現抑制が*S. platensis*摂取群において見られた(図3d, e)。

3. 4. *S. platensis*の実効成分であるフィコシアノビリンにおけるシグナル蛋白の影響の検討

ウエスタンブロット法にて、またマウス胎児よりの線維芽細胞(MEFs)を用いてPCB添加でいかにシグナル蛋白、

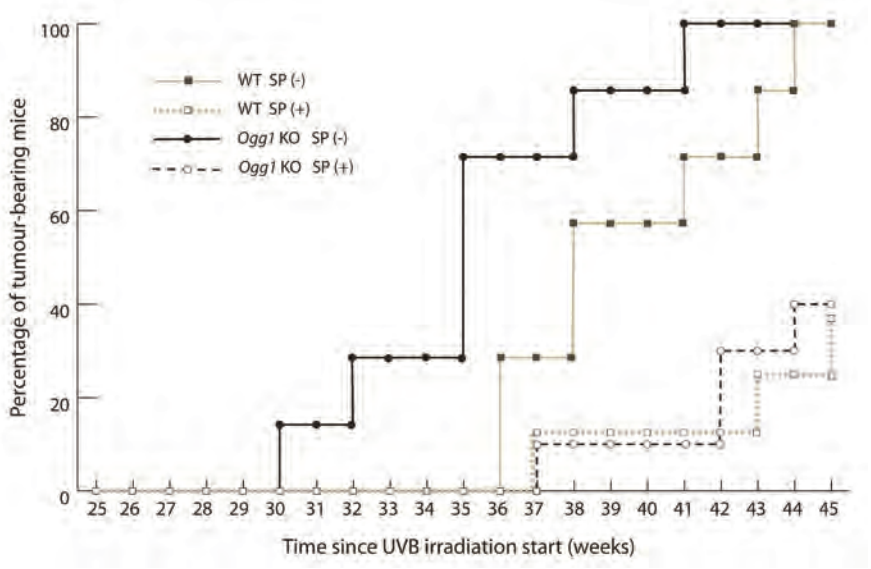


図1　*S. platensis*添加において野生型および*Ogg1*ノックアウトマウス両方において腫瘍発生時期を遅らせることができた。

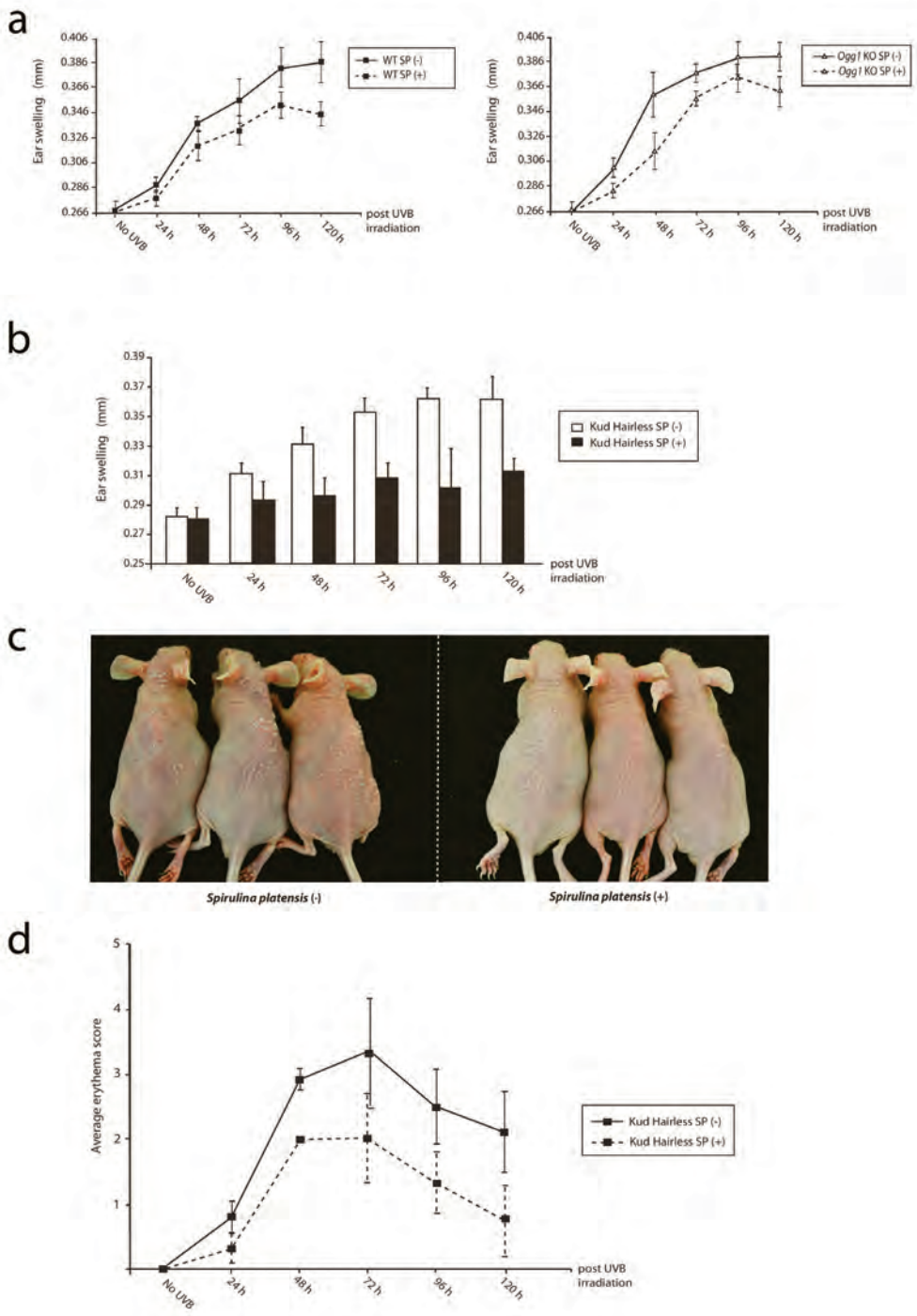


図2　*S. platensis* 群と通常飼料群での炎症反応の比較　a マウスの耳介腫脹の野生型および *Ogg1* ノックアウトマウスでの比較　b ヘアレスマウスでの耳介腫脹比較実験　c 紫外線照射後 72 時間後のヘアレスマウス背部の紅斑反応の比較　d c の紅斑反応比較をスコア化して比較したもの

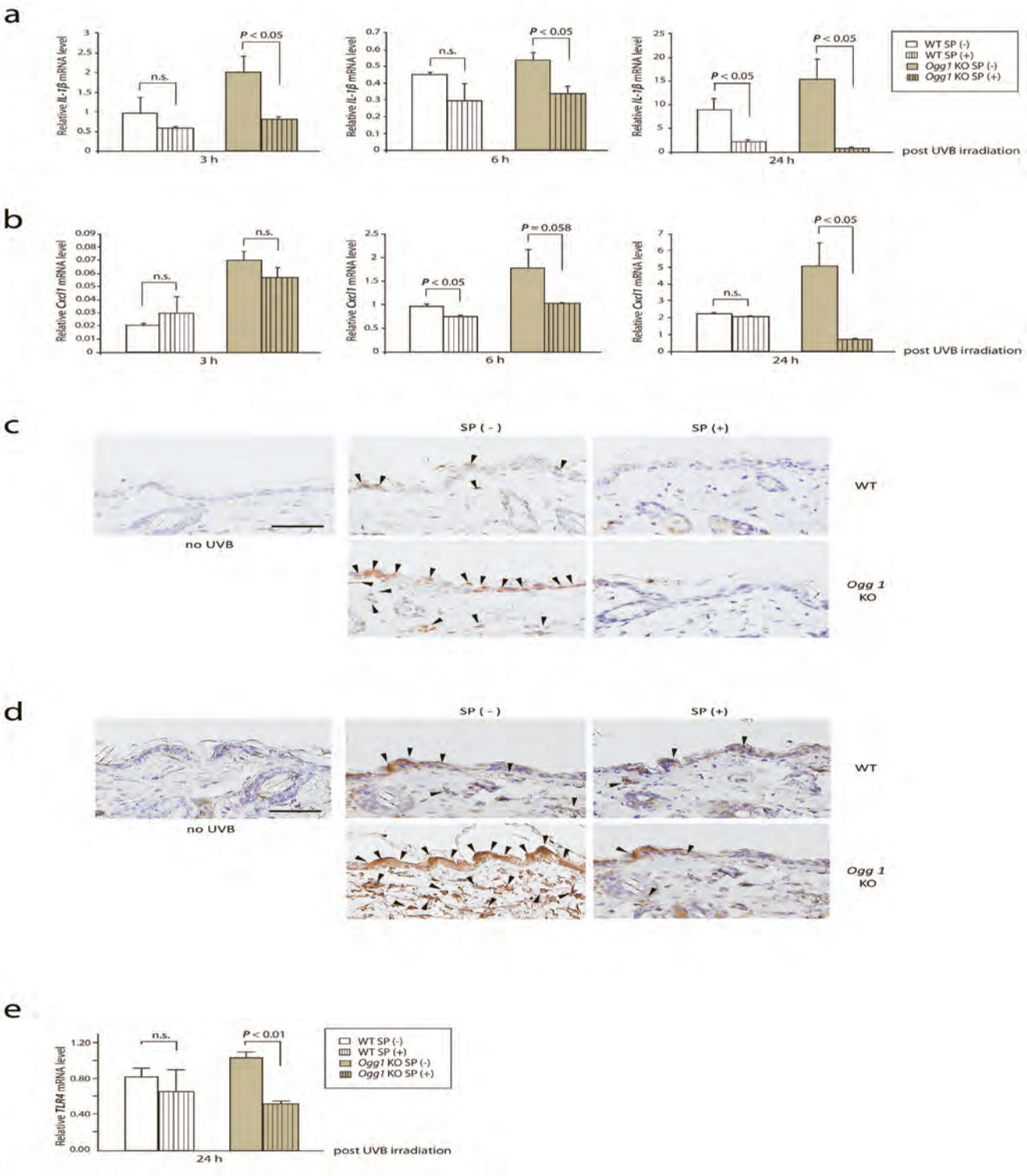


図3　*S. platensis* 摂取群と通常飼料群での炎症因子・遺伝子の比較
a　Il1β　と b Cxcl1 の expression の比較、リアルタイム RT-PCR 法
c　Il1β の免疫組織染色
d　TLR4 における免疫組織染色およびリアルタイム RT-PCR 法での検討 (e)

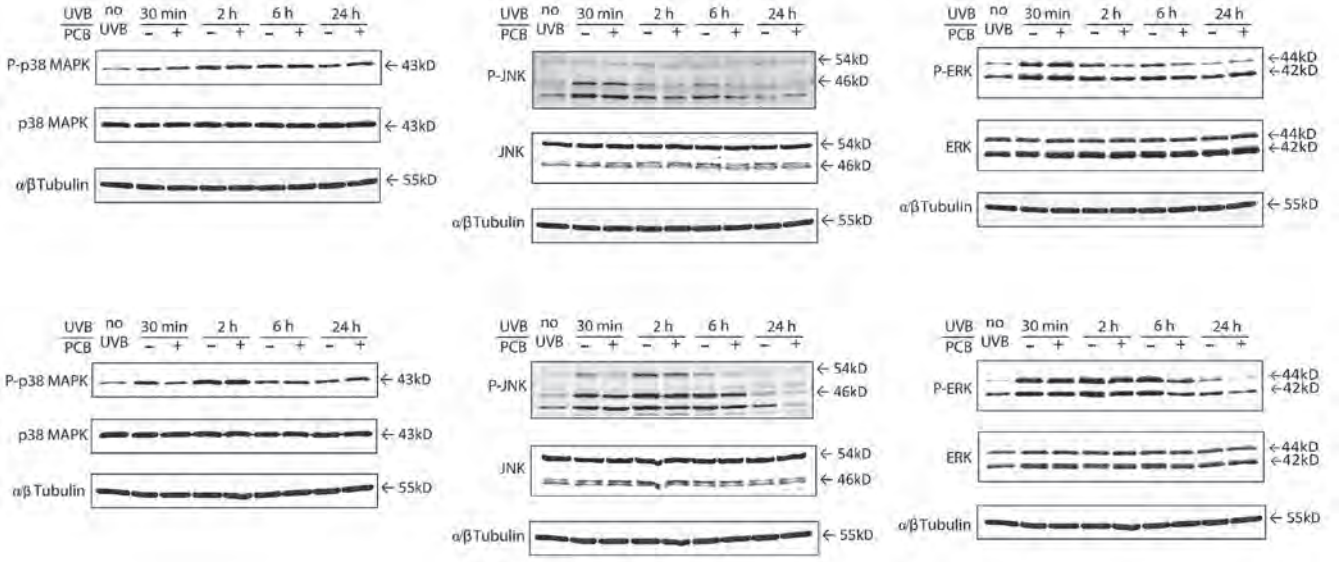


図4　ウエスタンブロット法によるシグナル蛋白のリン酸化　上段：野生型 -MEFs、下段：*Ogg1* ノックアウトマウス -MEFs、それぞれ左より p38, JNK, ERK とそのリン酸化された蛋白を検討

ここでは紫外線応答に重要とされるもののリン酸化に注目し評価した。p38 のリン酸化では特に *Ogg1*-MEFs について照射後早い時間（30 分後）において強い抑制が見られ、JNK のリン酸化でも同様に野生型 -MEFs では明らかではなかったものの、*Ogg1*-MEFs にて 30 分後において抑制が認められた。それとは対照的に ERK のリン酸化では野生型 -MEFs, *Ogg1*-MEFs とともに照射後遅い時間帯にてリン酸化抑制が認められた（図 4）。

4．考　察

S. platensis においては我が国ではまだ馴染みが薄いが欧米各国ではサプリメントとして普及している。今回の我々の実験の結果からその作用点は紫外線により産生される活性酸素量を抑制していることが考えられるが、実際 *S. platensis* は還元型のグルタチオンのレベルを上昇させることが報告されているので[7]、今回の実験においては還元型グルタチオンの上昇は結果的に活性酸素で誘導される DNA 損傷である 8-oxoG の産生を抑制していると考えられその効果により発癌作用を抑制していると考えられる。また *S. platensis* は今回の実験で皮膚における炎症反応も抑制することを示すことができた。我々は以前マウス皮膚に繰り返し UVB 照射すると炎症部位より有意にペルオキシ亜硫酸（peroxynitrites）が上昇することを示した[8]。ペルオキシ亜硫酸は好中球やマクロファージなど炎症部位より放出される一酸化窒素やスーパーオキサイドによって産生されるので、以上を考え合わせると *S. platensis* の働きは抗炎症反応には特に PCB によりペルオキシ亜硫酸のスカベンジャーとして機能していると考えられる。

我々はまた *S. platensis* および紫外線が皮膚におよぼす関係の中で MAPK が多分に関与することを示した。Kim らは p38 MAPK が UVB で誘導される炎症反応を制御し、それらはおそらく Cxcl1 や Il6 やシクロオキシゲナーゼ 2 などの誘導を介して行われている可能性を報告している[9]。*S. platensis* が紫外線誘導の皮膚の炎症を抑える仕組みではこの p38MAPK の他に JNK も今回の実験では働いていることが示されているので今までの抗酸化作用のある N アセチルシステインで JNK が抑制されている報告[10] などと照らし合わせると *S. platensis* のシグナル蛋白に対する作用は多点に渡ると考えられる。

謝　辞

本研究はコスメトロジー研究振興財団の助成を得て遂行されています。また *S. platensis* の原末や PCB 原末飼料を提供して頂いた DIC ライフテック社にも合わせて深く感謝いたします。

（参考文献）

1）Kunisada M, Sakumi K, Tominaga Y et al. (8-Oxoguanine formation induced by chronic UVB exposure makes *Ogg1* knockout mice susceptible to skin carcinogenesis. *Cancer Res* 65:6006–10 2005

2）Ismail MF, Ali DA, Fernando A et al. Chemoprevention of rat liver toxicity and carcinogenesis by *Spirulina. Int J Biol Sci* 5:377–87 2009

3）Hayashi K, Hayashi T, Kojima I A natural sulfated polysaccharide calcium spirulan, isolated from *Spirulina*

platensis: in vitro and ex vivo evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12:1463-71 1996

4) Kim HM, Lee EH, Cho HH et al. Inhibitory effect of mast cell-mediated immediate-type allergic reactions in rats by *Spirulina*. *Biochem Pharmacol* 55:1071-6 1998

5) Kunisada M, Yogianti F, Sakumi K et al. Increased expression of versican in the inflammatory response to UVB- and reactive oxygen species-induced skin tumorigenesis. *Am J Pathol* 179:3056–65 2011

6) Kunisada M, Kumimoto H, Ishizaki K et al. Narrow-band UVB induces more carcinogenic skin tumors than broad-band UVB through the formation of cyclobutane pyrimidine dimer. *J Invest Dermatol* 127: 2865-71 2007

7) Dasgupta T, Banejee S, Yadav PK et al. Chemomodulation of carcinogen metabolising enzymes, antioxidant profiles and skin and forestomach papillomagenesis by *Spirulina platensis*. *Mol Cell Biochem* 226: 27-38 2001

8) Hattori Y, Nishigori C, Tanaka T et al. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine is increased in epidermal cells of hairless mice after chronic ultraviolet B exposure. *J Invest Dermatol* 107:733-7 1996

9) Kim AL, Labasi JM, Zhu Y et al. Role of p38 MAPK in UVB-induced inflammatory responses in the skin of SKH-1 hairless mice. *J Invest Dermatol* 124:1318-25 2005

10) Assefa Z, Garmyn M, Bouillon R et al. Differential stimulation of ERK and JNK activities by ultraviolet B irradiation and epidermal growth factor in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 108:886-91 1997

ケラチノサイト分化におけるジアシルグリセロールキナーゼの機能解明

神戸大学大学院農学研究科
白井　康仁

It is well-known that keratinocytes differentiation is partly regulated by PKC. However, function of diacylglycerol (DG) kinase (DGK), which can attenuate PKC activity by reducing the amount of DG, in keratinocyte differentiation is fully unknown. Therefore, we tried to identify DGK subtype(s) expressed in the keratinocytes and investigate function(s) of DGK in the skin.

We found that human keratinocytes, HaCaT cells, express almost all DGK subtypes except for DGKκ. At least DGKβ, γ, and ι, were up-regulated during the differentiation, while DGKη was down-regulated. mRNA level of the other DGK subtypes did not changed. We focused on DGKγ and found that the DGK subtype was expressed in the basal, spinous and granular layers but not in the cornified layer by immunofluorescent staining. To further explore a function of DGKγ in the differentiation, we overexpressed GFP-DGKγ in HaCaT cells and compare the cell shape. However, we could not detect remarkable difference. Therefore, we then tried to produce DGKγ knock out (KO) mouse and succeeded. We checked "allergy level", "bailer function" and "recovery speed from wounding" using the KO mice. However, there was no significant difference between KO and WT mouse in all tested.

1．緒　言

表皮は外部環境からの乾燥、外傷、感染などから個体を防御するバリアとなっている。この表皮は、基底細胞層でつくられたケラチノサイトが、有棘細胞層での細胞周期の停止、顆粒細胞層での扁平化および分化マーカー蛋白質の合成を経て、角化細胞へと分化することにより形成されていく。また、魚鱗癬や乾癬等の角化異常症はケラチノサイト分化の異常であるといえる。

ケラチノサイトには、少なくとも５つのプロテインキナーゼC（PKC）サブタイプ（α, ε δ, η ζ）が存在し、ケラチノサイトの分化において重要な働きをしていることが知られている。例えば、これまでに、少なくともPKCαやηが重要な働きをしていることが知られている[1-3]。我々も、独自に活性化したPKCηが、低分子量Gタンパク質のひとつであるRalAに直接結合することでケラチノサイトの扁平化を誘導していることを明らかにした[4]。

一方、本研究の対象であるジアシルグリセロールキナーゼ（DGK）は、PKCの活性化剤であるジアシルグリセロール（DG）をリン酸化し、ホスファチジン酸（PA）に変換する脂質キナーゼである。即ち、DGKは、DGを減少させることで間接的にPKC活性を抑制できる。また、このDGKには10種類のサブタイプが存在することが報告されている（図１）。各サブタイプは組織発現様式が異なり、異なった機能を有していると考えられている。一方、産生されるPAも、mTORやRaf1キナーゼなどを活性化する脂質シグナルである。さらに、皮膚における脂質組成はバリア機能などに深くかかわっている。従ってDGKは、PKCの抑制や、他の酵素の活性化、あるいは皮膚における脂質組成を調節することによって、ケラチノサイトの分化や、皮膚バリア機能に重要な働きをしていると推察される。しかし、未だにケラチノサイトに発現しているDGKサブタイプや、その機能に関しては全く不明である。

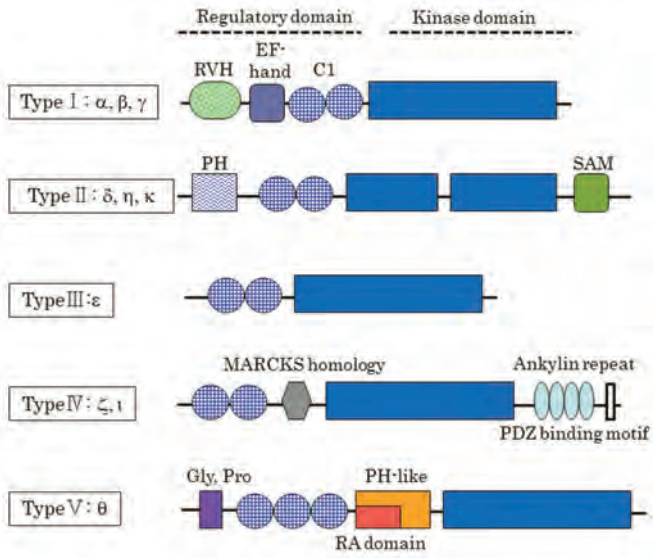


図1　哺乳類のDGKサブタイプとドメイン構造
C1：Conserved region1, RVH：recoverin homology,
PH：pleckstrin homology, SAM：steril a motif,
MARCKS：myristrated alanine-rich C-kinase substrate,
RA：Ras associating,
Gly, Pro：glycine & proline rich domain.

Function of diacylglycerol kinase in keratinocyte differentiation
Yasuhito Shirai
Graduate School of Agricultural Science, Kobe University

そこで本研究では、ケラチノサイト分化におけるDGKの機能を明らかにし、将来的なDGKをターゲットとするスキンケア商品の開発を目指すことを研究の目的とした。

2. 実　験

2. 1. 材料

すべてのプライマーはInvitorgenに合成をお願いした。DGKγ抗体は当研究室で作製したものを用いた[5]。その他の試薬は、研究に十分たるグレードのものを使用した。

2. 2. HaCaT細胞の培養

実験には、不死化ヒトケラチノサイトであるHaCaTを用いた。培養には10% FBS、ペニシリン（100 units/mL）、ストレプトマイシン（100 μg/mL）を含むDulbecco's Modified Eagle Medium（Wako）を用いた。尚、培養はすべて37℃、5% CO_2の条件下で行った。尚、ケラチノサイトの分化は1.5 mMカルシウムを用いて72時間培養することにより行い、分化したことは分化マーカーであるインボルクイリンとケラチン1の発現誘導をQuantative-PCRにて確認した[4]。

2. 3. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

上述の条件で分化させたHaCaT及び分化させてない細胞から定法に従い、SV Total RNA Isolation System（Promega）を用いてmRNAを抽出した。200 ngに相当するmRNAを鋳型にランダムプライマーを用いて逆転写し、最終的に20 μLのcDNA溶液を得た。得られたcDNA 溶液1 μLを鋳型に、表1に示すプライマーセットを用いて、PCRに供した。尚、ポリメラーゼはKOD plus（TOYOBO）を用い、アニーリング温度及びサイクル数は表1に示すように設定した。その他の条件は定法に従った。

2. 4. SDS-PAGE及びウエスタンブロット

上述の条件で分化させたHaCaT及び分化させてない細胞を10 cmシャーレに用意した。全細胞を回収後、それぞれ300 μLのhomogenate buffer〔250 mM sucrose、10 mM EGTA、2 mM EDTA、1% triton-X 100、20μg/mL leupeptin、1 mM PMSF/50 mM Tris-HCl（pH 7.4）〕に懸濁し、handy sonic（UR-20P TOMY SEIKO CO., LTD）を用いて氷上で破砕した（output 5、30秒2回）。遠心後（15000 rpm、4℃、10分間）、上清のタンパク質量をBCA法（Promega）により測定し、10%ゲルを用いたSDS-PAGEに供した。泳動後、ニトロセルロース膜に転写した。5%スキムミルクでブロッキングしたのち、1次抗体にDGKγ抗体を、2次抗体にはHRPO標識抗ウサギIgG抗体を用いた。尚、検出にはECL™ Western blotting Detection Reagent（Amersham Bioscience）を用い、化学発光強度をimagerで記録した。

2. 5. マウス皮膚蛍光免疫染色

WTおよびDGKγKOマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、心臓より0.9%NaClで灌流した後、皮膚を採取した。O.C.T. Compound（Sakura Finetek）で皮膚を包埋し、クリオスタット（Leica CM1850）で10 μmにスライスした。スライスした切片をスライドガラスに貼り付け、皮膚凍結切片試料とした。作製した切片を、段階的に濃度を高くしたエタノール溶液に順に浸し脱水した。ついで、エタノール脱水後の切片をアセトンに浸漬し、固定した。水和した後、数分間流水で洗浄を行い、その後蒸留水で洗浄した。洗浄後蒸留水を除き、0.3% Triton X in PBS（-）で30分間切片を室温でインキュベートした。洗浄後、2 % NGS in PBS（-）で30分間切片を室温でインキュベートすることによりブロッキングした。1次抗体には、DGKγ抗体またはTGase1抗体を0.03% Tween 20 in PBS（-）（PBS-Tw）で適当な濃度に希釈し、72時間、4℃で反応させた。ついで、anti-rabbit Alexa 546をPBS-Twで1000倍希釈し、2次抗体として1時間、室温で反応させた。PBS-Twで洗浄したのち、50%グリセロールで封入し、共焦点レーザー顕微鏡および一体型顕微鏡で観察した。

2. 6. DGKγノックアウトマウスの作製

DGKγ KOマウスの作製は、大阪大学微生物研究所に依頼した。飼料は、飼育繁殖固形飼料を自由に摂食させ、自

表1　PCRに用いたプリマー及びアニーリング温度（A）とサイクル数（B）

Sub-type	Forward primer	Reverse primer	A	B
α	AGGAGACCCCATGGGG	GCATGGGCATCTGGTTC	59	35
β	TGATCATGATGGAACCGTGT	CACCAAACACAATGCAGTCC	59	35
γ	CCACATCTTACTGCCC	ATCCAAAATCCAGCCA	59	35
δ	GGAAGATTGGATTGCA	CAGGTCTTGTCGCACA	59	35
ε	TTGGGTTGGGGTACAG	CCCATCCCTTCCCATA	59	35
ζ	TCAATCCCCGACAAGT	CAAAGCCCAGGCTGAA	59	35
η	CTGCCAAGACGCTATG	TCAATGACTTGCCTCA	59	35
ι	CAGGAGGGGAAATGTAAGCA	GCAAGGGTTTCATGAGAGGA	57	35
κ	GCGCTCTTACAGGAAA	CACCTGCACTGGGATA	59	35
θ	CCACCAGGCACGGGAAGAGGAGCCTGG	CTGGCCCATGTGCACGAC	59	40

動給水により自由に飲水させた。

温度は18－26℃で保ち、12時間明、12時間暗の光条件で飼育した。また、飼育及び以下の動物実験は本学倫理委員会の規定に基づいて行った。

DGKγKOマウスは、図2に示すようなinsertionをもっていることから、図2下に示す位置にプライマーを設計し、907bpのバンドが検出されたものを野生型（WT）、523bpのバンドが検出されたものをDGKγKO、両方のバンドが認められたものをDGKγ ヘテロとした。尚、genotypingには尾部から定法により調製したgenomeとEnocoTaq polymerase（Lucigen）を使用し、アニーリング温度62℃、サイクル数40に設定した。

2. 7. 接触性皮膚炎発症モデルマウスの作製

WT及びDGKγKOマウスの腹部の毛を除去し、5％TNCB（アセトン：エタノール=1：4）50μLを2日連続腹部に塗布し、感作した。最後の感作から3日後、右耳の各面に1% TNCBを20μLずつ塗布し、接触性皮膚炎を誘発した。また、ネガティブコントロールとして左耳の各面に溶媒(アセトン:エタノール=1:4)を20μLずつ塗布した。

2. 8. マウス皮膚凍結切片の作製

WTおよびDGKγKOマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、接触性皮膚炎誘導24時間後の両耳の皮膚を採取した。O.C.T. Compound（Sakura Finetek）で皮膚を包埋し、クリオスタット（Leica CM1850）で10μmにスライスした。スライスした切片をスライドガラスに貼り付け、皮膚凍結切片試料とした。作製した切片を、段階的に濃度を高くしたエタノール溶液に順に1分間ずつ浸し脱水した。エタノール脱水後の切片をアセトンに浸漬し、固定した。100％から濃度を段階的に低くしたエタノール溶液に順に1分間ずつ浸し水和した後、数分間流水で洗浄を行い、その後蒸留水で洗浄した。

2. 9. HE染色

2. 8. のように処理した切片を、マイヤー・ヘマトキシリン溶液（武藤化学株式会社）に1分間浸漬した後、数分間流水洗浄を行った後、蒸留水に浸漬した。続いて、1％エオジンY溶液（武藤化学株式会社）に1分間浸漬し、段階的に濃度を高くしたエタノール溶液に順に1分間ずつ浸し脱水した。その後キシレンに3分間×3回透徹した後、Mount-Quick（大道産業株式会社）にて封入し、一体型顕微鏡の2倍レンズを用いて観察した。

2. 10. トルイジンブルー染色

2. 8.のように処理した切片を、0.3％ Triton X in PBS（-）で30分間切片を室温でインキュベートした。0.03％Tween-20 in PBS（-）（PBS-Tw）で5分×3回洗浄した。トルイジンブルー溶液（pH 2.0）に40分間浸漬した後、PBS-Twで3回洗浄した。さらに95％エタノールに1回、100％エタノールに2回素早く通し、その後キシレンで3分×3回透徹した後、Mount-Quickにて封入し、一体型顕微鏡の20倍レンズを用いて観察した。

2. 11. 経皮吸収試験

DGKγ ヘテロマウス同士のmatingによって生後0日目の新生児を得た。新生児を37℃の0.4w/v% trypan blue solution（Wako）中で5 min振とうした後、1×PBS（-）で2回洗浄し、写真撮影を行った。染色した新生児の背部の皮膚を採取し、2. 3. のように凍結切片を作製した。一体型顕微鏡の20倍レンズを用いて観察した。

2. 12. Wound healing assay

10週齢のWTおよびDGKγKOマウスの背部の毛をバリカンで除去した。局所麻酔薬としてマーカイン® 0.125 %（AstraZeneca）を塗布した後、イヤーパンチを用いて背部

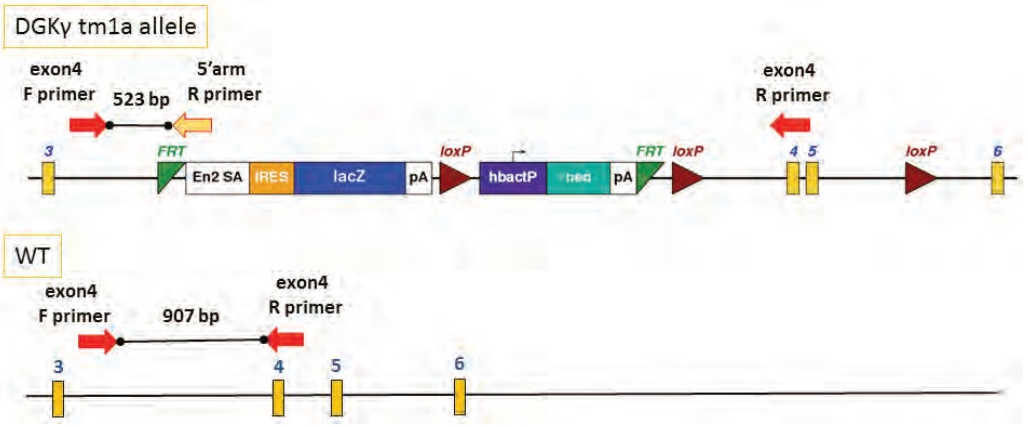


図2　DGKγKOの作製に用いたインサーションカセット（上）と野生型DGKγ 遺伝子の一部（下）

の皮膚に直径約2mmの傷を付けた。写真撮影を行って傷の治癒を観察した。

3．結　果

3. 1. HaCaTに発現しているDGKサブタイプの同定

まず、ケラチノサイトに発現しているDGKサブタイプを同定するために、RT-PCRを行った。その結果、ケラチノサイトにはDGKα, β, γ, δ, ε, ζ, η, θ, ιが発現していることが明らかになった(図3)。

3. 2. HaCaTの分化に伴い変動するDGKサブタイプの同定

ついで、どのブタイプがケラチノサイトの分化に伴って変動するか、PCRで調べた。その結果、少なくともβ, γ, ιが分化に伴い増加していることが明らかとなった(図4)。一方、ηは分化ともに減少する傾向を示し、他のサブタイプには顕著な変動は認められなかった。この中で、ιは変化量が小さかったこと、またβは神経系における役割が報告されているのに対し[6-8]、γサブタイプは比較的変化量も多く、その機能がほとんど明らかでなかったため、γサブタイプに着目することにした。そこで、本当にDGKγが分化に伴い増加しているのかをタンパク質レベルで確認することとした。その結果、図5に示すように、DGKγタンパク質量は分化に伴い、顕著に増加した。

3. 3. マウス表皮におけるDGKγの局在

そこで、実際にDGKγが分化に伴って増加しているのか、どの細胞層に発現しているのかを蛍光免疫染色で調べた。尚、コントロールとして、顆粒層から有棘層にかけて発現が増加するトランスグルタミナーゼ1（TGase1）の抗体を用いた。

その結果、図6に示すように、DGKγはTGase1よりも深い層、即ち基底層から、その発現が認められた。また、基底層から有棘層にかけて、蛍光強度が強くなったことから、分化とともに増加することが確認された。一方、角質層には、その発現は認められなかった。

3. 4. HaCaTにおけるDGKγの機能解析

分化に伴い、DGKγの発現量が増加してくることから、DGKγはケラチノサイトの形態に関係しているのではないかと考え、HaCaTにGFP-DGKγを強発現させ、細胞の面積及び厚さを測定した。しかし、顕著な差は認められなかった(data not shown)。

3. 5. DGKγノックアウト(KO)マウスの作製とその表現型

そこで、DGKγKOマウスを作製することにした。まず、genotypingによってKOと判断されたマウスについて、本当にDGKγがノックアウトされているか否か確認するため

図3　HaCaT細胞に発現しているDGKサブタイプ
Mr.：サイズマーカー

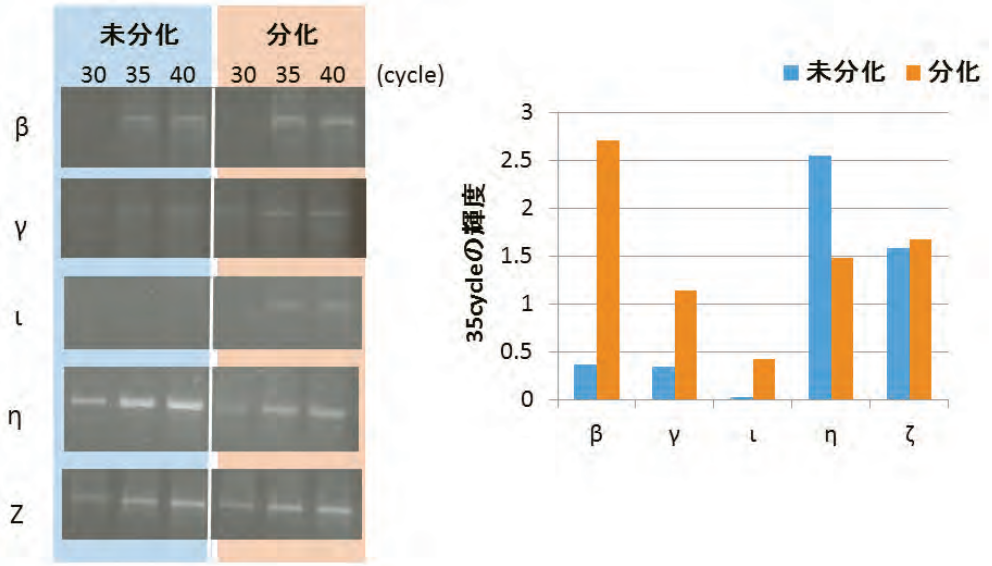


図4　分化・未分化HaCaTにおけるDGK発現の確認

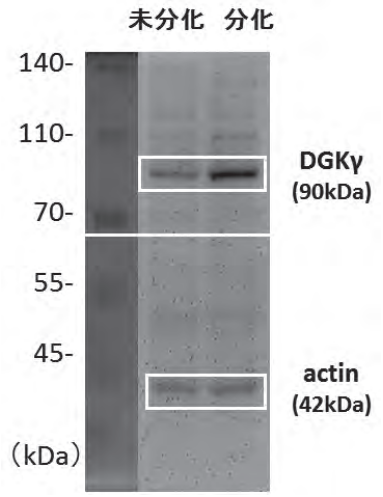


図５　分化に伴うDGKγ タンパク質量の変化

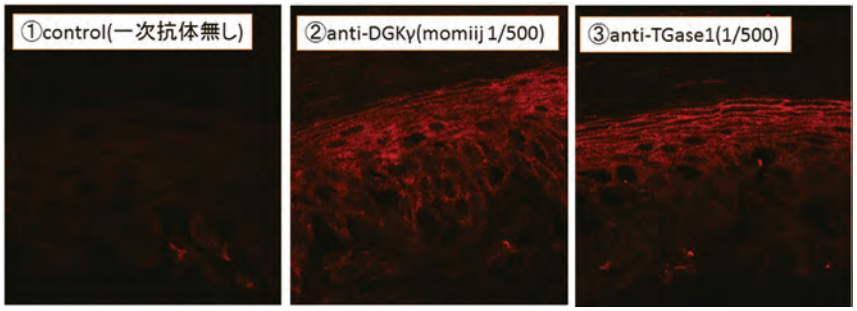


図６　マウス皮膚における DGKγ の局在

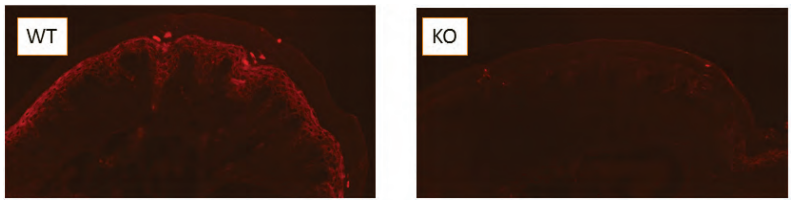


図７　DGKγKO マウス皮膚における DGKγ の消失

に、ウエスタンブロット及び蛍光免疫組織染色を行った（図7）。その結果、脳におけるDGKγの発現は完全に消失しており（data not shown）、皮膚における免疫反応も消失した（図7）。このことから、作製したマウスはDGKγがノックアウトされていることが確認された。そこで、得られたWT、DGKγKO、ヘテロマウスの体重を2週齢目から12週齢まで1週間ごとに測定したが、雌雄ともに顕著な体重の変化も見られず、メンデルの法則にしたがって生まれてきた（data not shown）。さらに、皮膚においても、脱毛やバリア機能障害を示す表現型は今のところ観察されていない。

3. 6. 接触性皮膚炎試験

一方、我々はDGKγがマスト細胞からのヒスタミン分泌に関与していることを明らかにしている[9]。そこで、DGKγの接触性皮膚炎への関与を調べるために、KOマウスを用いて接触性皮膚炎試験を行った。

10週齢の雄のWTおよびDGKγKOマウスに、TNCBを用いて接触性皮膚炎を発症させ、遺伝子型間でその症状を比較した。皮膚炎誘導24時間後の耳切片をHE染色して観察し（図8A）、耳の平均の厚みを算出した。 耳の平均の厚みは、耳切片染色図を12分割し、各地点の耳の幅を測定、平均することで算出した。その結果、溶媒のみを塗布した左耳と比較してTNCBを塗布した右耳の方が、WT、KO共に厚みが増していた（図8B）。更に、KOマウスは、WTと比較して耳の厚みの増加率が高い傾向にあった。続いて、トルイジンブルー染色によって各耳切片中の肥満細胞を赤紫色に異染色し、細胞数や脱顆粒率を遺伝子型間で比較した。その結果、KOマウスの方が皮膚炎誘導による1 mm^2 あたりの肥満細胞数の増加が、小さい傾向にあった（図8C）。即ち、浸潤してきているマスト細胞が少ない傾向が認められた。一方、WT、KO共に皮膚炎誘導によって肥満細胞の脱顆粒が促進される傾向が見られたものの、遺伝子型間で有意な差は見られなかった（図8D）。脱顆粒率は、皮膚切片全体の肥満細胞数中の脱顆粒している肥満細胞数から算出した。

3. 7. 経皮吸収試験

経皮吸収試験は皮膚のバリア機能におけるDGKγの必要性を検討するために行った。DGKγヘテロマウス同士のmatingによって得た新生児を、生後間もなく0.4w/v％trypan blue solution（Wako）中で振とうした。その結果、染色前後で比較するとマウスの皮膚表面に青い染色が見られたが、WTとDGKγKOマウス間で見た目や染色の濃さに有意な差は見られなかった（data not shown）。さらに組織学的に染色の浸潤度を比較するために、染色後の新生児の背部の皮膚を用いて、凍結切片を作製した。その結果、両遺伝子型で表皮の角質層に青い染色が見られたが、WTとDGKγKOマウス間で差は見られなかった（data not shown）。

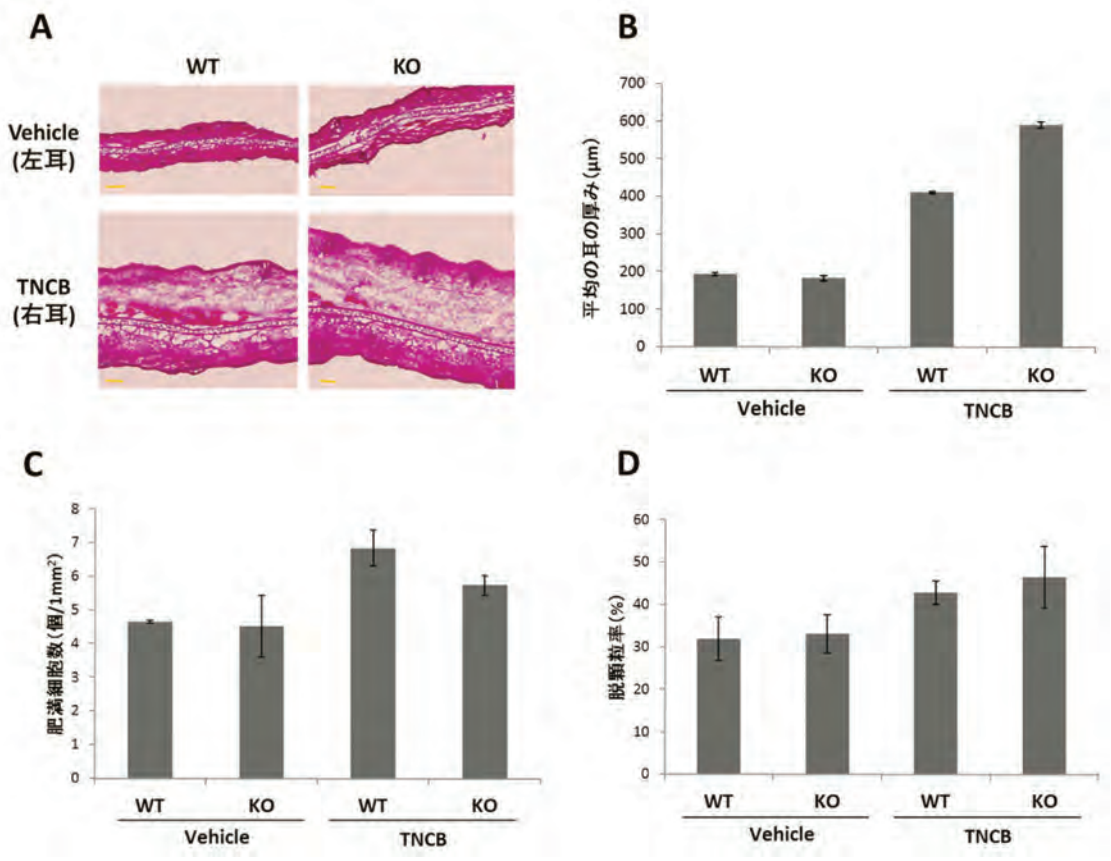


図 8　接触性皮膚炎誘導 24 時間後の皮膚炎症状の比較

(A) 接触性皮膚炎誘導 24 時間後の耳切片を用いて HE 染色を行った。 (黄色線 = 300 μm)
(B) 遺伝子間で、耳の平均の厚みを比較した。図 . 1A のように HE 染色した耳切片図を 12 分割し、各地点の耳の厚みから平均の耳の厚みを算出した。
(C) 遺伝子型間で、皮膚切片 1 mm^2 あたりの肥満細胞数を比較した。
(D) 遺伝子型間で肥満細胞の脱顆粒率を比較した。脱顆粒率は、皮膚切片全体の肥満細胞数中の脱顆粒している肥満細胞数から算出した。また、トルイジンブルー染色によって染色された肥満細胞が、8 つ以上の顆粒を放出している時、脱顆粒していると判断した。

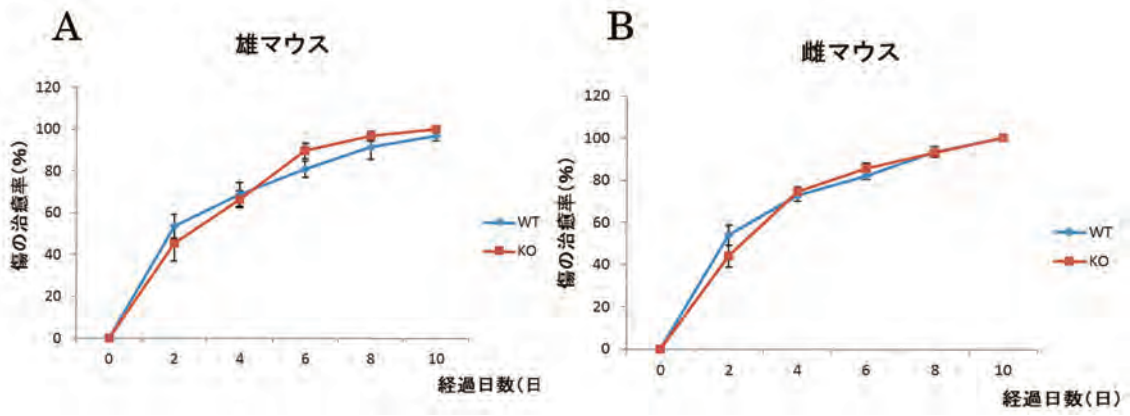


図 9　傷の治癒速度の比較

経過日数ごとに 0 日目からの傷の治癒率を雄 (A)、雌 (B) ごとに示した。(雄 : n=2、雌 : n=3)

3. 8. Wound healing assay

Wound healing assay は傷の治癒に DGKγが関与しているかどうかを検討するために行った。10 週齢の WT および DGKγKO マウスの背部の毛を剃り、皮膚に直径約 2 mm の傷を付け、経過日数ごとに測定した傷の面積を元に、創傷 0 日目からの傷の治癒率を算出した。その結果、WT 及び DGKγKO マウス共に、創傷 10 日目で傷が完治した。しかし、雌雄共に遺伝子型間で、傷の治癒速度に大きな差は見られなかった (図 9A, B)。

4. 総括及び考察

本研究により、ケラチノサイトには多くのDGKサブタイプが発現していることが明らかになった。例えば、DGKβ, γ, ιサブタイプは分化に伴い増加し、ηは減少することが示唆された。しかし、本実験は、それぞれのサブタイプが分化前と分化後を比較してその増減をみたものであるので、各サブタイプ間の発現量を比較することは困難である。また、mRNAの量を調べただけであり、タンパク質レベルの解析を今後行っていく必要がある。このうち、DGKγは皮膚の蛍光免疫染色において、染色することには成功しているが、皮膚のウエスタンにおいて、そのバンドを確認するにはいたっていない。増減が確認されたサブタイプについても、ウエスタンや蛍光免疫染色を行い、もっともケラチノサイトの分化に寄与していそうなサブタイプを特定し、同様の実験を行っていく予定である。

皮膚に発現していることが明らかになったDGKサブタイプのうち、少なくともDGKγは基底層から顆粒層まで発現し、分化とともにタンパク質レベルで増加することが明らかとなった。しかし、今のところ、培養細胞においても、KOマウスにおいてもケラチノサイトの分化においてDGKγの重要性を示唆するような知見は得られていない。一方、我々はDGKγがマスト細胞からのヒスタミン分泌に必須であることを発見した[9]。そこで、DGKγ KOマウスを用いて接触性皮膚炎試験も行った。その結果、炎症部位へのマスト細胞の浸潤の減少傾向は認められたものの、皮膚の肥厚や脱顆粒を起こしているマスト細胞の数には有意な差は認められなかった。実際DGKγ KOマウスにおいて、ヒスタミン量が減少しているのか、他の炎症性メディエーターの量がどのようになっているのか調べていく必要がある。

さらに、皮膚のバリア機能及び傷に対する治癒速度などを検討したが、有意な差は認められなかった。今後、皮膚におけるDGKγの新たな機能を検討すべくより詳細な検討が必要と考えられる。一方、皮膚にはDGKγ以外にもDGKβ, ι, ηサブタイプは分化に伴い変動していることから、これらのサブタイプの機能についても検討してく必要があろう。そして何よりも、さらに、ヒト皮膚組織を用いて、ケラチノサイトに発現しているDGKサブタイプについて、調べていく必要がある。

（参考文献）

1） Koster, M.I. and Roop, D.R. Mechanism regulating epithelial stratification. *Annu. Rev. Cell Biol.* 23, 93–113, 2007.

2） Denning, M.F. Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms. *Int. J. Biochem. Cell Boil.* 36, 1141–1146, 2004.

3） Nishizuka, Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258, 607–614, 1992.

4） Sakuma, M., Shirai, Y., Yoshino K., Kuramasu, M., Nakamura, T., Yanagita, T., Mizuno, K., Hide, I., Nakata, Y. and Saito, N. Novel PKCα–mediated phosphorylation site(s) on cofilin and their potential role in terminating histamine release. *Mol. Biol. Cell* 23: 3707–3721, 2012.

5） Adachi N, Oyasu M, Taniguchi T, Yamaguchi Y, Takenaka R, Shirai Y, and Saito N. Immunocytochemical localization of a neuron–specific diacylglycerol kinase β and γ in the developing rat brain. *Mol. Brain Res.* 139, 288–299, 2005.

6） Ishisaka M., Tsuruma K., Shimazawa M., Shirai Y., Saito N. and Hara H. Increased seizure susceptibility in a mouse with diacylglycerol kinase β deficiency. *Neuroscience & Medicine*, 4, 117–122, 2013.

7） Kakefuda K., Oyagi A., Ishisaka, M., Tsumura, K., Shimazawa M., Yokota, K., Shirai Y., Horie K., Saito N., Takeda J. and Hara H. Diacylglycerol kinase β knockout mice exhibit lithium–sensitive behavioral abnormalities. *PLoS ONE* 5. e13447, 2010.

8） Shirai Y., Kouzuki T., Kakefuda K., Moriguchi S., Oyagi A., Horie K., Morita S., Shimazawa M., Fukunaga K., Takeda J., Saito N. and Hara H. Essential role of neuron–enriched diacylglycerol kinase (DGK), DGKβ in neurite spine formation, contributing to cognitive function. *PLoS ONE* 5. e11602–, 2010.

9） Sakuma M, Shirai Y, Ueyama T, Saito N. Diacylglycerol kinase γ regulates antigen–induced mast cell degranulation by mediating Ca^{2+} influxes. Biochem *Biophys Res Commun*., 445:340–350, 2014.

新しい生体内ホメオスターシス維持機構に基づくアンチエイジング法の開発

信州大学大学院医学系研究科循環病態学講座

新藤　隆行、桜井　敬之、神吉　昭子

Adrenomedullin (AM), originally identified as a vasodilating peptide, is now recognized to be a pleiotropic molecule possessing various bioactivities. We have reported that knockout mice deficient in AM or RAMP2, an AM-receptor accessory protein, show embryonically lethal, and proved that RAMP2 is the critical determinant of the vascular functions of AM. However, not only in the vascular system, AM and RAMP2 are highly expressed in adipose tissue. To clarify the pathophysiological roles of AM-RAMP2 system in adult, we performed conditional gene targeting of RAMP2. Using gene-targeted mice, we found that AM-RAMP2 system plays critical roles of maintaining homeostasis in adult. AM-RAMP2 system can thus be a novel therapeutic target of anti-aging.

1．緒　言

生体は、健康な状態を維持していく上で、様々な恒常性維持（ホメオスターシス）の制御システムを有している。生体内生理活性物質とその受容体システムは、元来生体が備えたホメオスターシス制御システムの一つであるが、一方でその調節異常は、老化現象の進行や様々な生活習慣病の原因となる。こうしたホメオスターシス制御システムを統合的に理解し、人為的に介入・操作することができれば、様々な病気の予防やアンチエイジング法の開発につながることが期待される。

アドレノメデュリン（adrenomedullin:AM）は、ヒト褐色細胞腫から分離された生理活性ペプチドである[1)]。AMは血管、心臓、腎臓など様々な臓器で産生・分泌され、血管拡張作用、抗酸化作用、抗炎症作用、臓器保護作用など多彩な生理活性を有する因子である。AMは脂肪組織にも由来し、血中の1/4は脂肪組織由来とされている。また、ヒトの血中AM濃度は肥満に伴い上昇し、Body mass indexに相関することも報告されており[2)]、AMはメタボリックシンドロームの病態にも重要な役割を持つと考えられている。

一方、AM受容体はGタンパク共役型受容体であるCLR（calcitonin receptor-like receptor）という7回膜貫通型受容体であるが、CLRには、RAMP（receptor activity-modifying protein）という1回膜貫通型タンパクが結合し、受容体機能を制御している[3)]。RAMPには1、2、3の3種類のサブアイソフォームがあり、CLRがRAMP2またはRAMP3と結合することによりAM受容体として機能する。

*

Anti-aging based on a novel system maintaining homeostasis in the body

Takayuki Shindo*, Takayuki Sakurai, Akiko Kamiyoshi

Department of Cardiovascular Research, Shinshu University Graduate School of Medicine

我々はこれまでに、AMとAMの受容体活性調節タンパクであるRAMP2のノックアウトマウスを樹立し、AMホモノックアウトマウス（AM-/-）とRAMP2ホモノックアウトマウス（RAMP2-/-）では、共に血管形成異常や浮腫が認められ、胎生致死となることを明らかにした。このことから、AMの血管における機能がRAMP2によって規定されていることがはじめて明らかとなった[4,5)]。

本研究では、通常のジーンターゲティングの方法に加えて、Cre-loxPシステムを用いたコンディショナルターゲティングの方法により、血管あるいは脂肪組織特異的なRAMP2ノックアウトマウスを作成し、成体におけるAM-RAMP2システムによる、ホメオスターシス制御機構の詳細なメカニズムについて検討を行った。

2．実　験

RAMP2のエクソン2～4の両側にloxPサイトを配置したRAMP2floxマウスを樹立し、CAG-Cre トランスジェニックマウスと交配することで、全身でRAMP2を欠損するマウス（RAMP2-/-）を作成した。ホモノックアウトマウス（RAMP2-/-）は胎生致死となるため、成体が得られるヘテロノックアウトマウス（RAMP2+/-）を用いて検討を行った。次に血管におけるRAMP2の病態生理学的意義を明らかとするために、RAMP2 floxマウスと、血管内皮細胞特異的にCreリコンビナーゼを発現するvascular endothelial（VE）-cadherin Creトランスジェニックマウスを交配し、Cre-lox Pシステムにより、血管内皮細胞特異的RAMP2ノックアウトマウス（E-RAMP2-/-）を作成した。さらに脂肪細胞特異的にCreリコンビナーゼを発現するaP2Creトランスジェニックマウスと RAMP2floxマウスを交配し、脂肪細胞特異的RAMP2ノックアウトマウス（A-RAMP2-/-）を作成した。

これらの遺伝子改変マウスを用いて、野生型（WT）マウスと表現型を比較検討することで、RAMP2欠損に伴う生体内ホメオスターシス破綻と老化との関係について検討を行った。

3．結　果

全身型のRAMP2ヘテロノックアウトマウス（Conventional RAMP2+/−）は成体まで成長し、外見上の変化は認めないが、1年齢を超える加齢マウスでは、肺、腎臓、肝臓といった主要な臓器に血管炎様の細胞浸潤が自然発症し、胸部大動脈では、早期老化マーカーであるSA-β-gal染色陽性の所見が認められた。さらに、炎症性接着因子であるICAM-1,VCAM-1が、8週齢の若年期から発現が亢進していた。一方、E-RAMP2−/−では、RAMP2+/−より、病変がさらに早期に出現した（図1）。血管炎様の所見は若年期でも認められ、6ヶ月齢程になると、より著明となった。浸潤細胞は、CD3やF4/80陽性細胞が多いことからTリンパ球やマクロファージの浸潤による慢性炎症が生じていることが示唆された。

これらの炎症細胞浸潤のメカニズムを検討するために、WTとRAMP2+/−マウスから、肝臓類洞内皮細胞を初代培養し、マクロファージの接着実験を行った。RAMP2+/−由来の内皮細胞では、WTと比較して、マクロファージの接着性が亢進していた。また、Real-time PCR法により内皮細胞の遺伝子発現を検討したところ、RAMP2+/−の肝臓類洞内皮細胞では、VCAM-1の発現亢進、eNOSの発現低下が認められた。これらのことから、RAMP2発現が低下したマウスでは、加齢と共に血管の恒常性が失われ、炎症性接着因子の発現が亢進することで、炎症細胞が接着しやすくなり、各臓器内の血管炎症の原因になると考えられた。

一方で、E-RAMP2−/−のほとんどは、周産期に致死であったが、一部のE-RAMP2−/−では成体が得られ、これらを用いて病理学的解析を中心に解析を進めた。E-RAMP2−/−の肝臓においては、6ヶ月齢以上の加齢マウスで、肝硬変様の形態変化が認められた（図2）。肝臓組織のSirius red染色による検討では、通常の肝硬変とは異なり、線維化は肝細胞側ではなく、血管の走行に沿って進行していた。

E-RAMP2−/−の腎臓では、水腎症と多発性嚢胞腎が自然発症し、嚢胞の周囲には線維化が著明であった（図3）。糸球体も拡大しており、糸球体硬化症を伴っていると考えられた。電顕像からは、糸球体において、足突起の融合、基底膜の肥厚、内皮細胞と基底膜の部分的離開などが確認された。

以上の結果から、血管内皮細胞のRAMP2が失われると、血管の恒常性が障害を受け、加齢と共に、各臓器の機能不全の原因になると考えられた。

一方。A-RAMP2−/−マウスは、普通食投与下において5週齢の若年期よりWTマウスと比較して体重が有意に増加した（図4）。A-RAMP2−/−は、白色脂肪組織においてRAMP2遺伝子がWTマウスの約30％に低下していることが確認された。エネルギー消費を調べるため、呼吸代謝測定を行った結果、普通食投与下において、A-RAMP2−/−はWTマウスと比較して、明期、暗期ともに酸素消費量の低下と呼吸商の上昇が見られた（図5）。呼吸商が上昇していることから、脂肪を消費しにくく、肥満になりやすいと考えられた。

次に、病理解析を行った。A-RAMP2−/−はWTマウスと比較して、個々の脂肪細胞が肥大化し（図6A）、間質におけるF4/80免疫染色陽性のマクロファージ浸潤も増加していた（図6B）。さらに加齢マウスでは、脂肪組織間質の著明な線維化の亢進が認められた（図6C）。また、皮下脂肪組織において、若年期より皮下脂肪層の肥厚と（図7A）、

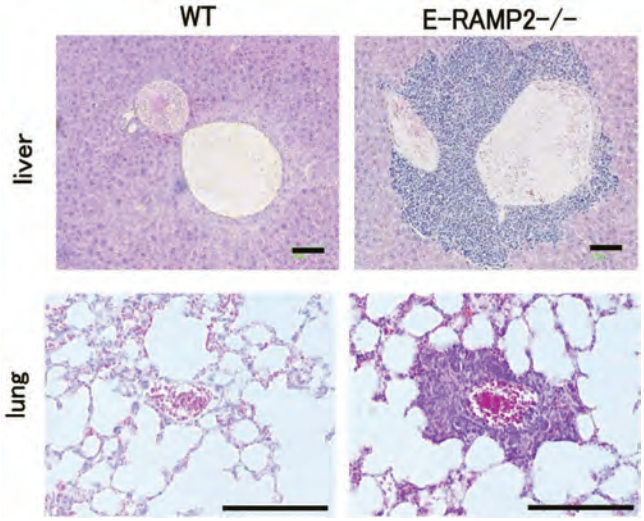


図1　6ヶ月齢E-RAMP2−/−マウスの肝臓と腎臓の病理像
（Scale bars＝100μm）

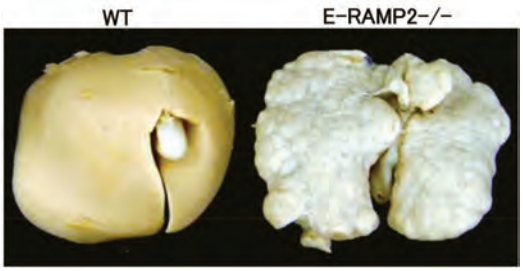


図2　6ヶ月齢E-RAMP2−/−マウスの肝臓の外観

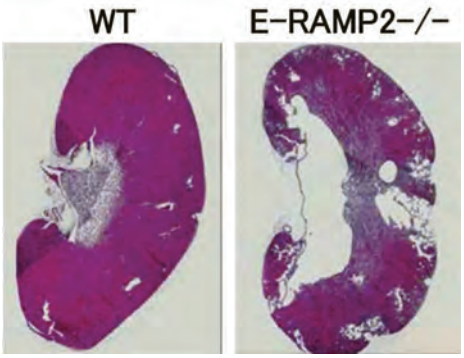


図3　6ヶ月齢E-RAMP2−/−マウスの腎臓の断面像

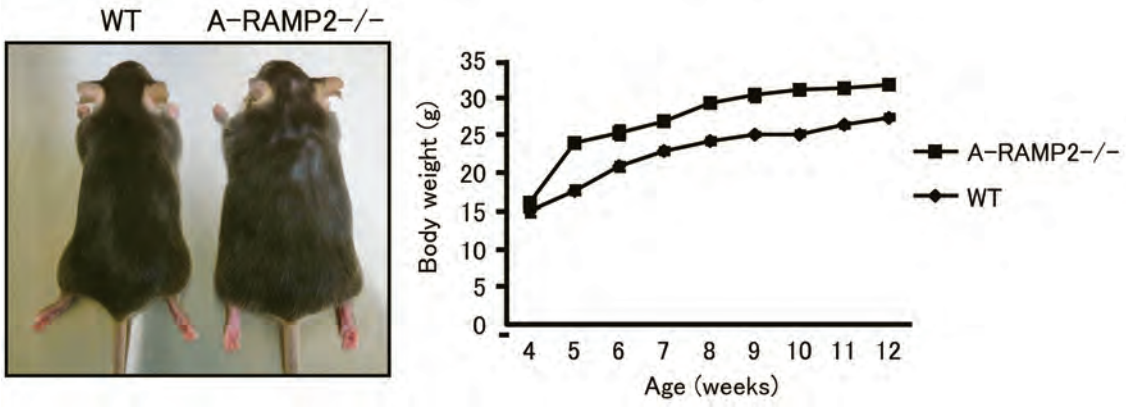


図４　A-RAMP２-/- マウスの外観と体重増殖曲線

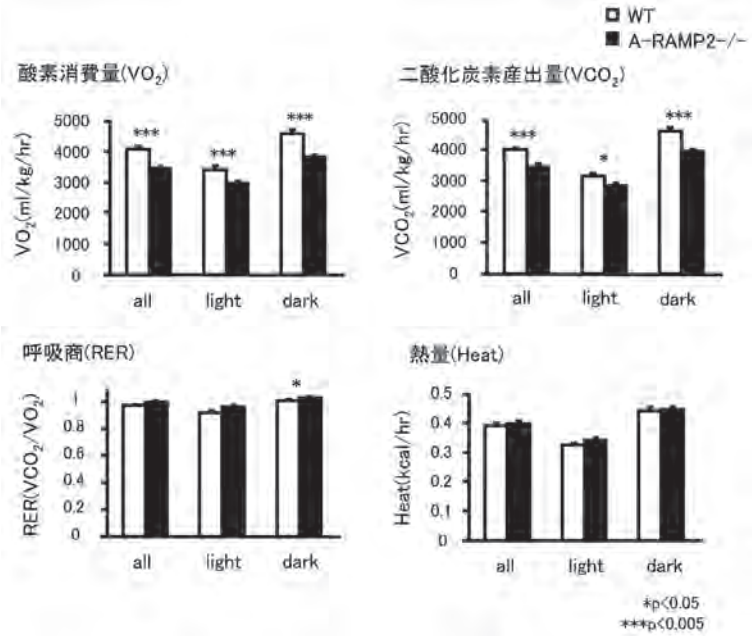


図５　A-RAMP２-/- マウスの呼吸代謝測定

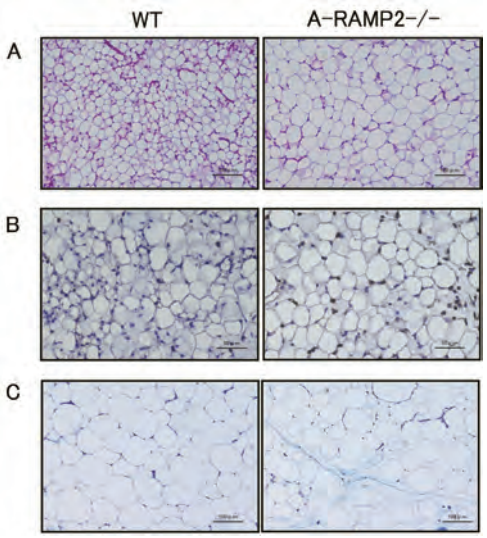


図６　A-RAMP2 -/- マウスの白色脂肪組織の病理像
A: HE 染色
B: F4/80 免疫染色
C: Masson Trichrome 染色

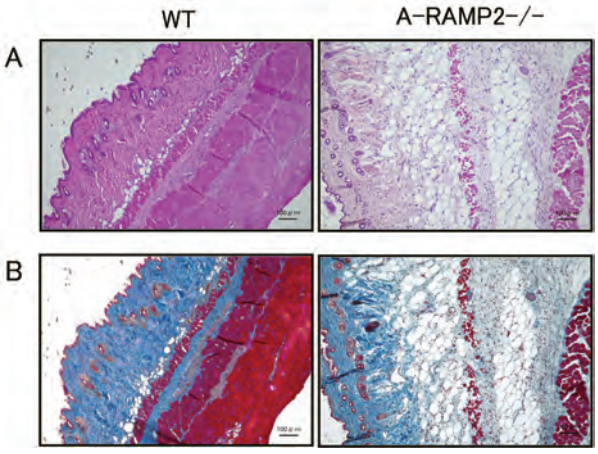


図７　A-RAMP2 -/- マウスの皮下脂肪組織の病理像
A: HE 染色
B: Masson Trichrome 染色

線維化の亢進が認められた（図7B）。A-RAMP2-/-では、皮下組織において、ビメンチン免疫染色陽性の線維芽細胞の数も増加しており、トルイジンブルー陽性の肥満細胞の数も増加していた。Real-time PCR法により皮膚における遺伝発現を検討したところ、A-RAMP2-/-ではRAMP2の発現がWTの4割程度まで低下し、一方でAMは代償性に約3倍に増加していた。A-RAMP2-/-の皮膚ではTNF-α, IL-1β, MCP-1といった炎症性サイトカイン、ケモカインの発現がWTの2倍程度まで発現亢進しており、一方で、IL-10といった抗炎症性サイトカインは2割程度まで発現が抑制されていた。

脂肪細胞には、エネルギーを蓄積する白色脂肪細胞の他にも、熱産生を行う褐色脂肪細胞、白色脂肪組織中に存在し、熱産生を行うベージュ脂肪細胞が存在し、それぞれが異なる機能を有する。

そこで次に、褐色脂肪組織の解析を行った。褐色脂肪組織においては、白色脂肪組織と同様にA-RAMP2-/-ではRAMP2遺伝子が野生型マウスの約20％に低下していることが確認された。褐色脂肪組織のリアルタイムPCRによる遺伝子発現解析により、普通食投与下において、A-RAMP2 -/-は野生型マウスと比較して、脂肪酸酸化系遺伝子であるACSL1とミトコンドリア関連遺伝子であるATP synthase、COX IV、UCP1などの発現低下が見られた。従って、褐色脂肪組織のミトコンドリア機能の維持とエネルギー消費にも、AM-RAMP2システムが関与していると考えられた。

一方、鼠径部皮下脂肪組織は、若年期には褐色脂肪様の脂肪細胞（ベージュ脂肪細胞）が多く見られるが、加齢と共に、白色脂肪細胞の割合が増加する。A-RAMP2-/-マウスの鼠径部皮下脂肪組織においては、野生型マウスと比較して若年期に白色脂肪細胞の割合が多いことから、白色脂肪細胞の分化制御にもAM-RAMP2システムが関与していることが示唆された。

以上の結果から、RAMP2は、脂質の代謝と共に、炎症や線維化抑制など、脂肪組織の恒常性に関与しており、その破綻は、肥満や皮膚の老化の原因となると考えられた。

4．考　察

E-RAMP2-/-の主要臓器では、血管炎様の細胞浸潤が認められた。これらの血管炎様の所見は、若年期でも認められるが、生後6ヶ月ほど経過した個体において、より広範囲に現れた。肝臓では、血管炎様の細胞浸潤のみならず、肝硬変様の形態変化が確認できた。活性化されたマクロファージが多数確認できることから、慢性炎症が起きていることが示唆された。また、線維化は中心静脈周辺から広がるのではなく、類洞内皮細胞に沿って進行していることから、類洞内皮細胞の障害が、肝線維化の原因となっていることが予想された。E-RAMP2-/-の肝臓、腎臓における、superoxide、酸化脂質、NADPH oxidaseの亢進が確認された。AMには、強力な酸化ストレス抑制効果があることから、酸化ストレスの亢進が、E-RAMP2-/-において臓器障害を促進した、もう一つの原因と考えられた。

一方、脂肪組織は様々なアディポカインを産生する臓器であり、生体の恒常性維持に重要な役割を担うが、AMも脂肪組織から多く分泌されている。A-RAMP2-/-では、普通食下でも肥満を発症し、酸素消費量の低下を認めることからAMはアディポカインの一つとして、生体内の代謝恒常性を直接制御していると考えられた。興味深いのは、A-RAMP2-/-では、皮下脂肪組織においても、若年期より皮下脂肪層の肥厚と、線維化の亢進を認め、老化現象に似た組織像を示したことである。RAMP2は皮膚の恒常性維持にも係わっていることから、美容上のアンチエイジングについても、重要なターゲットとなりうる可能性がある。

5．総　括

生体のホメオスターシス維持において、生体内生理活性分子群は重要な機能を有しており、老化現象とは、これらの生体内生理活性分子によるホメオスターシス機構が、環境に応じて適応や変容を繰り返し、徐々に調節異常が蓄積した状態とも考えられる。従って、生理活性分子によるホメオスターシスのメカニズムの包括的な解析を進めることで、アンチエイジングや、健康長寿のための新しい予防・治療法につながることが期待される。

今回、コンディショナルターゲティングの手法を用いることで、生理活性ペプチドAMと、その受容体活性調節タンパクであるRAMP2の生体内ホメオオスターシス維持における意義を示すことができた。AM-RAMP2系は、アンチエイジングや、新しい予防・治療法開発のための良いターゲット分子として期待される。

（引用文献）

1） Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, Eto T: Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. Biochem Biophys Res Commun 1993, 192:553-60.

2） Nomura I, Kato J, Tokashiki M, Kitamura K: Increased plasma levels of the mature and intermediate forms of adrenomedullin in obesity. Regulatory peptides 2009, 158:127-31.

3） McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM: RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. Nature 1998, 393:333-9.

4) Shindo T, Kurihara Y, Nishimatsu H, Moriyama N, Kakoki M, Wang Y, Imai Y, Ebihara A, Kuwaki T, Ju KH, Minamino N, Kangawa K, Ishikawa T, Fukuda M, Akimoto Y, Kawakami H, Imai T, Morita H, Yazaki Y, Nagai R, Hirata Y, Kurihara H: Vascular abnormalities and elevated blood pressure in mice lacking adrenomedullin gene. Circulation 2001, 104:1964–71.

5) Ichikawa-Shindo Y, Sakurai T, Kamiyoshi A, Kawate H, Iinuma N, Yoshizawa T, Koyama T, Fukuchi J, Iimuro S, Moriyama N, Kawakami H, Murata T, Kangawa K, Nagai R, Shindo T: The GPCR modulator protein RAMP2 is essential for angiogenesis and vascular integrity. J Clin Invest 2008, 118:29–39.

皮膚機能のサーカディアンリズムと時計遺伝子によるその調節機構の解明

日本大学薬学部健康衛生学研究室
榛葉　繁紀

In this study, we examined if reactive oxygen species (ROS) level shows circadian rhythm in the skin and role of the molecular clock system in the process. ROS level and gene expression involved in ROS production showed clear circadian rhythm in the skin of mice. The rhythmicity was diminished in the skin of molecular clock deficient mice. Consequently, we are led to conclude that molecular clock system may regulate the skin homeostasis by controlling the cellular ROS level.

1. 緒　言

皮膚は、水分の喪失や透過を防ぐ水分保持機能、体温を調節する体温保持機能、さらには微生物や物理化学的刺激から生体を守るバリア機能など、内的ならびに外的環境変化に適応してホメオスタシスの維持を行うための様々な機能を担っている[1)]。これらの皮膚機能が睡眠不足等の生活時間の変化により低下することが数多く報告されている[2,3)]。このような生活時間の変化による皮膚機能の変化は、皮膚においてサーカディアンリズムが存在することを示唆しており、事実、体温調節、皮脂の産生さらには水分蒸散量などに日内変動が存在することが知られている[2,3)]。

各組織・細胞における生理機能の日内変動は、多くの時計遺伝子により転写レベルにおいて調節されており、その中心は転写因子Brain and muscle Arnt-like protein-1（BMAL1）である。BMAL1欠損（KO）マウスは、行動のサーカディアンリズムの消失をはじめとして多くの生理機能の異常を示すが[4)]、中でも最も著しい表現型は寿命の短縮ならびに各組織における老化マーカーの増加である[5)]。BMAL1KOマウスの寿命は、平均37週であり、通常のC57BL/6Jマウスのそれに比較して著しく短い[5)]。また生後30週以内にほぼ全てのBMAL1KOマウスは白内障を生じる[5)]。これらに加えて、剃毛後の体毛の再伸長阻害さらには皮下脂肪の減少等、皮膚機能に関連した老化現象が観察される[5)]。BMAL1欠損に伴うこれら老化現象の発現メカニズムは明らかではないが、BMAL1KOマウスでは各臓器において活性酸素種（reactive oxygen species；ROS）量が増加しており、このことが加齢促進に関係していると推察される[5)]。

Regulation of skin functions by the molecular clock system

Shigeki Shimba
Department of Health Science, School of Pharmacy, Nihon University

上述したように皮膚機能においてサーカディアンリズムの存在が示唆されること、さらにはサーカディアンリズムのマスターレギュレーターである*Bmal1*の遺伝子欠損により皮膚機能の低下に基づく老化現象が観察されることなどから皮膚機能維持におけるBMAL1の重要性が予想される。そこで、本研究では、皮膚機能におけるサーカディアンリズムを明らかにするとともにその調節におけるBMAL1の役割を検討する

2. 実　験

2. 1. 実験動物

実験動物の取り扱いは日本大学薬学部実験動物倫理規定に準じて行った。1ケージ当たり3−6匹に分配し自由給餌、温度23±1℃、相対湿度50±10％、明暗12時間周期の条件で飼育した。BMAL1ヘテロ欠損マウス同士の交配によりBMAL1ホモ欠損マウスを繁殖した。また同腹より得られた野生型マウスをコントロールマウスとした。恒暗条件下における実験では、サンプル採取の前にマウスを恒暗条件下で5日間馴化させた後に実験に用いた。

明暗条件下における実験では時刻をZT（Zeitgeber time）で表示した。ZT0は明期の開始を、またZT12は暗期の開始を示す。

恒暗条件下における実験では時刻をCT（Circadian time）で表示した。CT0は明暗条件下における明期の開始に相当する時刻を示す。

2. 2. Total RNAの抽出

組織をPhosphate buffered saline（PBS）で洗浄し、凍結プレス破砕装置 クライオプレス（マイクロテック・ニチオン化㈱）で破砕した後、TRI REAGENT（シグマアルドリッチ㈱）を用いて、total RNAを抽出した。残存するDNAを除去するためにtotal RNA10μgをDNase（RT-grade,和光純薬工業㈱）2unitsにより37℃、15分間の処理を行った。反応後フェノール/クロロホルム抽出によりRNAを抽出し、アルコール沈殿により精製した。

2. 3. 逆転写反応

2. 2. で得られたRNAを0.8 μM oligo dTプライマー（インビトロジェン㈱）および1mM dNTP（インビトロジェン㈱）を含むReaction buffer（和光純薬工業㈱）中において60℃、5分間、次いで37℃、10分間反応させた。その後、Reverse Transcriptase（和光純薬工業㈱）200 unitsを加えて37℃、60分間、次いで95℃、15分間反応させ、cDNAを得た。

2. 4. Real-time PCR法によるmRNAの定量

2. 3. で得られたcDNA（0.1 μg total RNA相当）ならびに各種プライマー（最終濃度0.2 μM）をPlatimun SYBR Green qPCR SuperMix-UDG（インビトロジェン㈱）と混合し、MX3000P Q-PCR system（ストラタジーン㈱）を用いて変性：94℃，30秒間、アニーリング：58℃，30秒間、伸長反応：72℃，30秒間を35～40サイクル条件下で反応を行い、各mRNAの発現量を測定した。

2. 5. ROS量の測定

組織をPBSで洗浄した後、凍結プレス破砕装置 クライオプレス（マイクロテック・ニチオン㈱）で破砕した。その後、PBS中にてホモジナイズし、次いで900×g, 15分間（4℃）遠心分離して得られた上清を組織抽出液とした。

試料中のタンパク質量を定量するために、組織抽出液にプロテインアッセイCBB溶液（ナカライテスク㈱）を添加し、混合・発色させた後、595 nmの吸光度を測定した。同様にウシ血清アルブミン（BSA）（インビトロジェン㈱）を用いて作成した検量線から、タンパク質量を算出した。

タンパク質量で補正した組織抽出液にH2DCFDA（インビトロジェン㈱）を加え、37℃で30分間インキュベートした後、485 nmならびに520 nmにおける蛍光強度を測定した。

2. 6. 8-OHdG測定

組織を採取した後、DNAエキストラクター TISキット（和光純薬工業㈱）を用いてDNAを抽出した。得られたDNAを、8-OHdG測定前処理試薬セット（和光純薬工業㈱）を用いて前処理した後、含まれる8-OHdG量を高感度8-OHdG Check（日本老化研究所）を用いて測定した。

3. 結　果

3. 1. マウス皮膚における時計遺伝子発現の日内変動（明暗条件飼育下）

マウス皮膚における時計遺伝子の発現ならびにその日内変動を確認するため、明暗条件下（明期：暗期＝12h：12h）で飼育したマウス背部より皮膚を採取し、その時計遺伝子の発現を検討した（Fig. 1）。体内時計のマスターレギュレーターである*Bmal1*遺伝子の発現量は、暗期から明期（ZT22-ZT2）にかけて最大となり、明期から暗期（ZT10-ZT14）にかけて最小となる日内変動が認められた（Fig. 1）。BMAL1のパートナーである*Clock*の発現量は、他の組織と同様にリズム性は認められなかった（Fig. 1）。BMAL1/CLOCKの転写を負に制御するCry1の発現量は暗期にピークを迎えた。BMAL1/CLOCKの標的遺伝子である*Rev-erb*αならびに*D site albumin promoter binding protein*（Dbp）の発現パターンはBMAL1におけるそれと逆位相を示し、明期にピークを迎えた（Fig. 1）。また時計遺伝子関連転写因子であるRAR-related orphan receptor（Ror）の発現量には日内変動は認められなかった（Fig. 1）。

3. 2. マウス皮膚における皮膚機能関連遺伝子発現の日内変動（明暗条件下飼育下）

明暗条件下にてその発現量が日内変動する皮膚機能関連遺伝子を探索するために、各遺伝子発現量を検討し、片側ANOVA解析により日内変動の有無を判定した。活性酸素消去酵素*Catalase*（Cat）の発現はZT10にトラフが存在する日内変動を示した。また、Cu, Zn-スーパーオキシドジスムターゼならびにグルタチオンペルオキシダーゼの発現も弱いながら日内変動を示した。活性酸素産生酵素であるNADPHオキシダーゼのサブユニットに関して、測定したいずれの遺伝子発現量も、ZT6に最小値を示し、ZT14に最大値を示す日内変動が観察された。

3. 3. マウス皮膚における時計遺伝子発現のサーカディアンリズム（恒暗条件下）

マウス皮膚における自律的な遺伝子発現の日内変動（サーカディアンリズム）の存在を確認するために、マウスを恒暗条件下で飼育し、その際の皮膚における時計遺伝子発現を検討した。その結果、明暗条件下と同様、時計遺伝子発現に振幅が認められ、特に*Bmal1*および*Clock*は明暗条件下よりも大きな振幅を示した（Fig. 2）。また、明暗条件下にて振幅を示さなかった*Ror*の発現量は、ZT18において増加が認められ、*Cry1*と同様の発現パターンを示した。以上のことから、マウス皮膚における遺伝子発現にサーカディアンリズムの存在が確認された。

3. 4. マウス皮膚における遺伝子発現のサーカディアンリズム（恒暗条件下）

マウス皮膚において、その発現にサーカディアンリズムを持つ皮膚機能に関連した遺伝子を探索するため、恒暗条件下で飼育したマウス皮膚における各遺伝子の発現量を検討した。検討した遺伝子のうち、*Col1a1*、*Mmp3*、*Foxo1*、*Cu-Zn-Sod*、*Mn-Sod*、*Gpx*, $p40^{phox}$ならびに$p67^{phox}$の発現量が、CT2~CT14にかけて低く、CT18~CT22に高い

発現の変動を示した。

3. 5. マウス皮膚における活性酸素種(reactive oxygen species ; ROS)量

活性酸素は細胞内代謝や遺伝子発現をはじめとする多くの分子反応を制御しており、様々な生理反応に影響を与える。そこで、マウス皮膚におけるROS量の日内変動を検討した。明暗条件下ではZT2およびZT10が高い傾向にあり、最大時と最小時で約2倍の量的違いが認められた(Fig. 3A)。恒暗条件下ではCT10が最も高く、最大時と最小時においては約5倍の量的違いが認められた（Fig. 3B)。これらの結果から、ROS量にサーカディアンリズムが存在

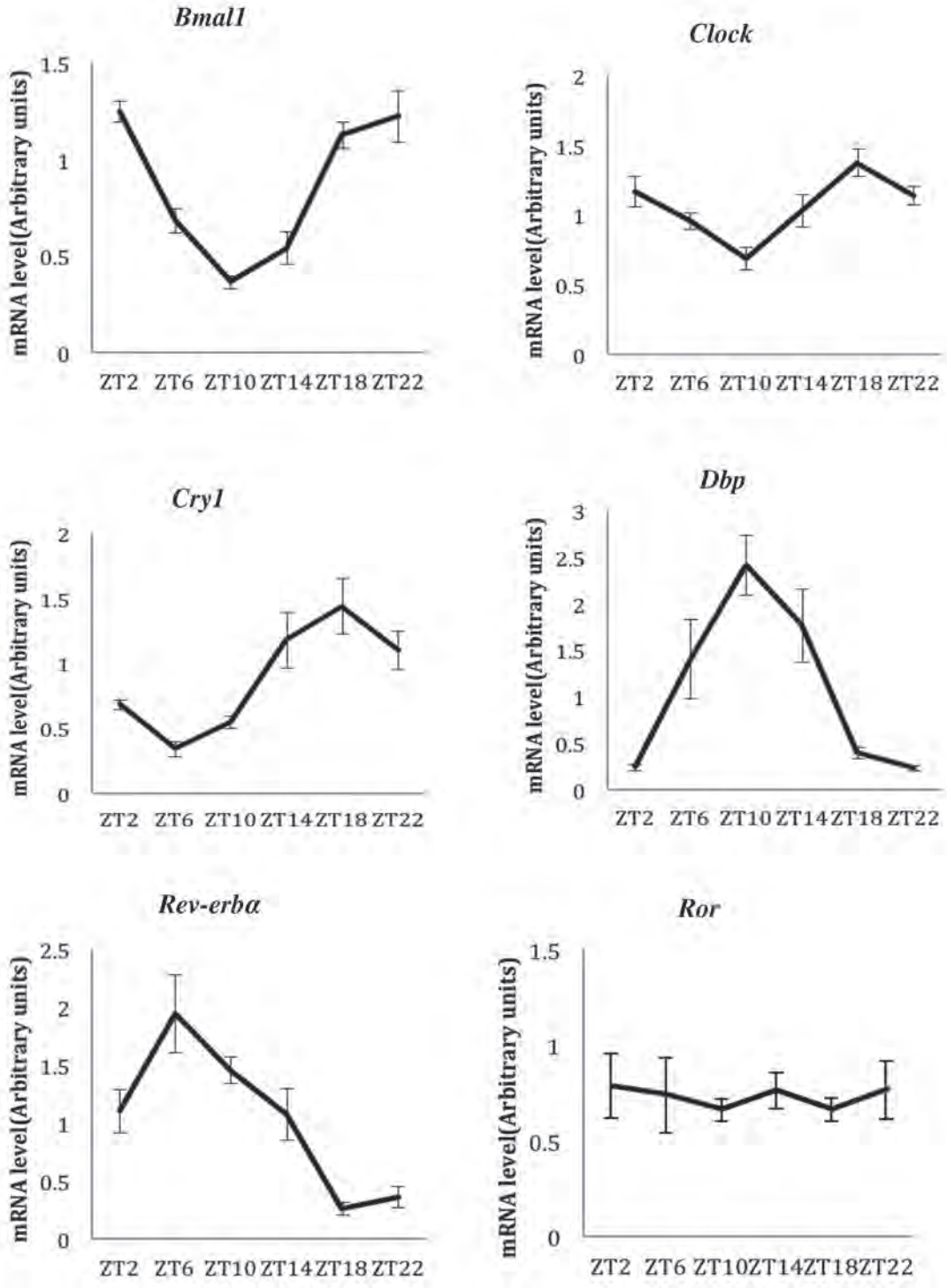


Fig. 1　マウス背部皮膚における時計遺伝子発現の日内変動
明暗条件下(12 時間明期 -12 時間暗期条件下)にて飼育したマウス背部の皮膚を 4 時間ごとに採取し、mRNA の発現を、real-time PCR 法を用いて検討した。Mean±SEM (n=5)

することが示された。

3. 6. BMAL1 欠損に伴うマウス皮膚におけるROS量

前節において、皮膚におけるROS量にサーカディアンリズムがあることが示された（Fig. 3B）。そこでコントロールマウスならびにBMAL1KOマウスの皮膚におけるROS量を測定し、ROS産生におけるBMAL1の関与を検討した。若齢（10週齢）においてコントロールマウスとBMAL1KOマウスの間に皮膚ROS量の違いは認められなかった（Fig. 4）。しかしながら、20週齢において、コントロールマウス皮膚におけるROS量は10週齢時に比べて約3倍に増加したが、BMAL1KOマウスのそれは10週齢時

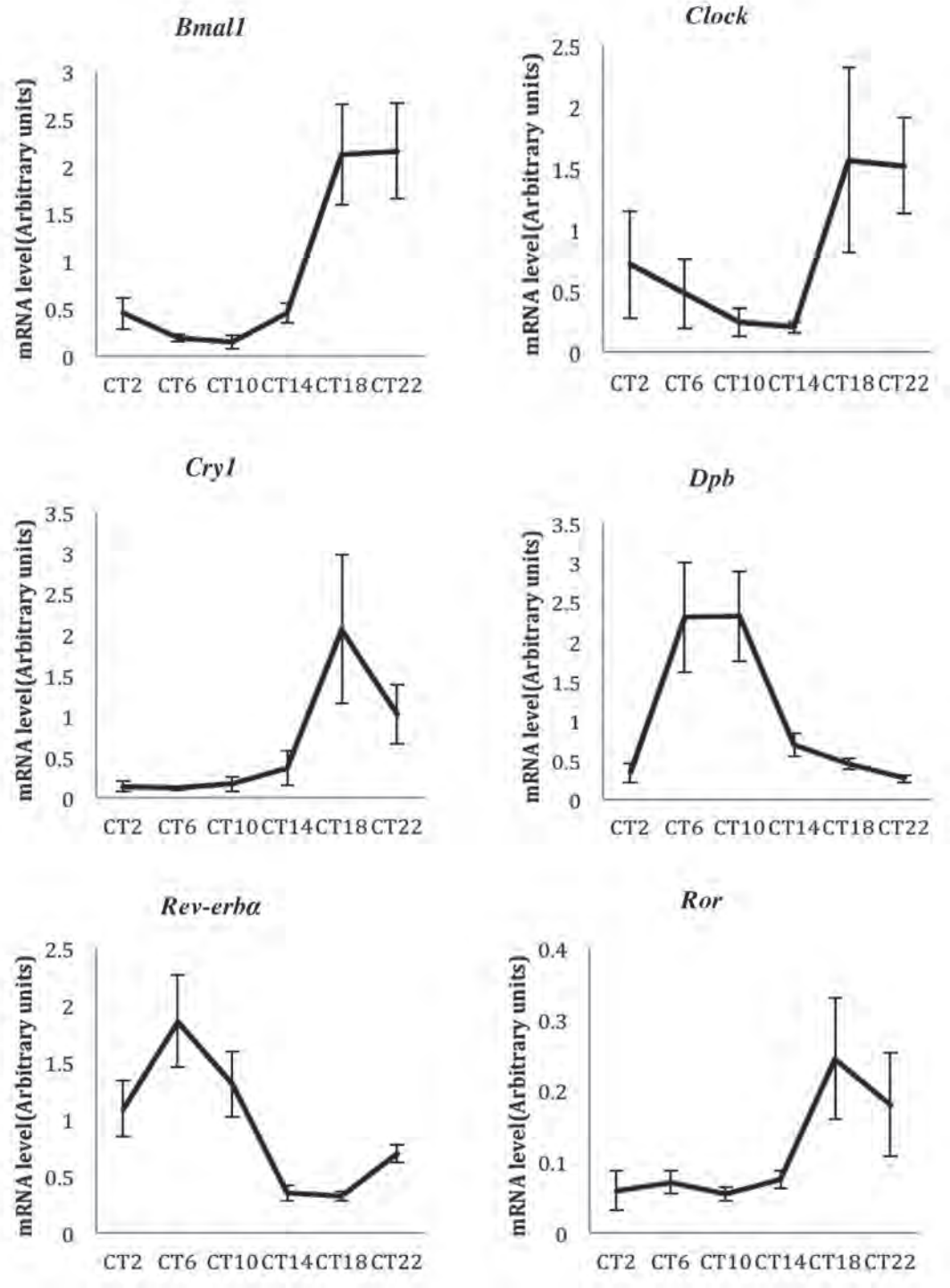


Fig. 2　マウス皮膚における時計遺伝子発現のサーカディアンリズム
恒暗条件下にて馴化させたマウス背部の皮膚を4時間ごとに採取し、mRNAの発現を、real-time PCR法を用いて検討した。Mean±SEM（n=5）

と同程度であった(Fig. 4)。

3. 7. DNA酸化損傷マーカー8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)量

細胞内ROSによるDNAの酸化損傷に伴い8-OHdGが生成する。そこで3. 6. においてROS量に差の生じた20週齢のコントロールマウスとBMAL1KOマウス皮膚を用いて、8-OHdG量を検討した。その結果、BMAL1KOマウス皮膚において減少傾向が見られた(Fig. 5)。

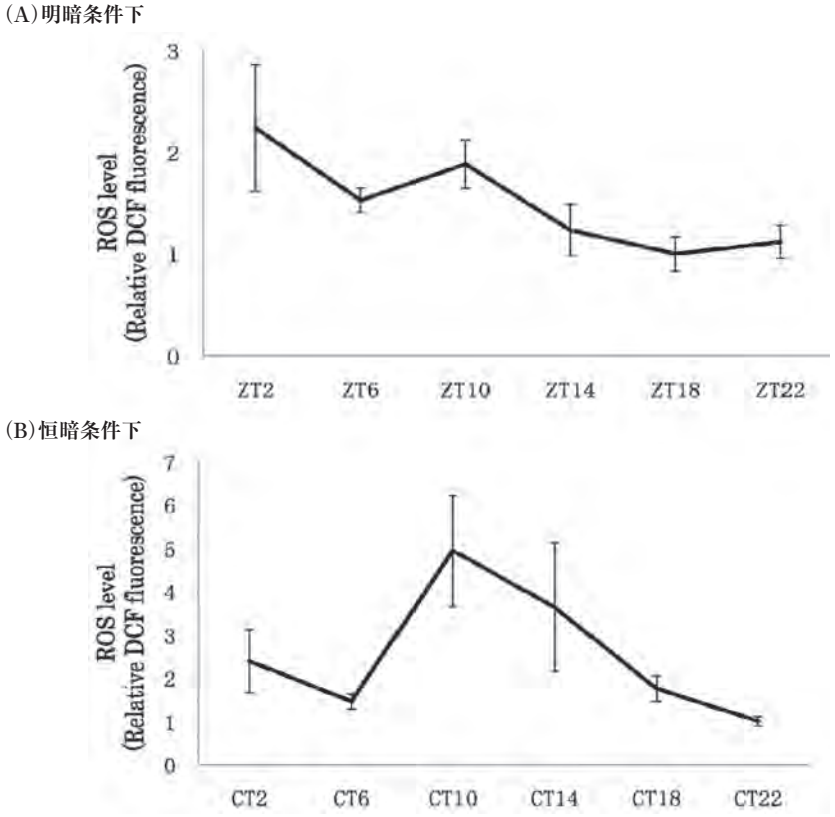


Fig. 3　マウス背部皮膚におけるROS量の日内変動およびサーカディアンリズム
明暗条件下(12時間明期 -12時間暗期条件下) にて飼育したマウス(A) ならびに恒暗条件下にて馴化させたマウス(B) の背部皮膚を4時間ごとに採取し、そのROS量を、H_2DCFDAを用いて測定した。Mean±SEM (n=5)

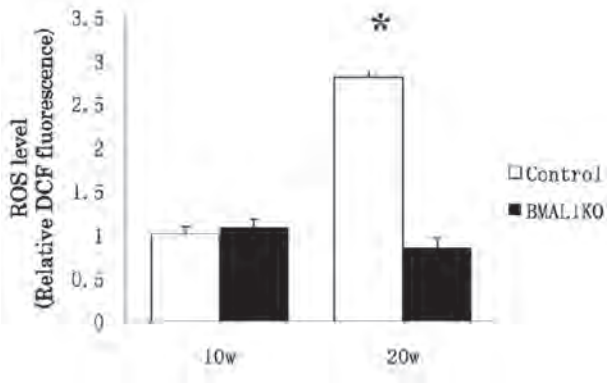


Fig. 4　マウス背部皮膚におけるROS量
明暗条件下にて飼育した10週齢 (10w) ならびに20週齢 (20w) のコントロールマウスおよびBMAL1KOマウスから背部皮膚をZT10に採取し、その際のROS量を、H_2DCFDAを用いて測定した。Mean±SEM (n=3) (*p<0.05)

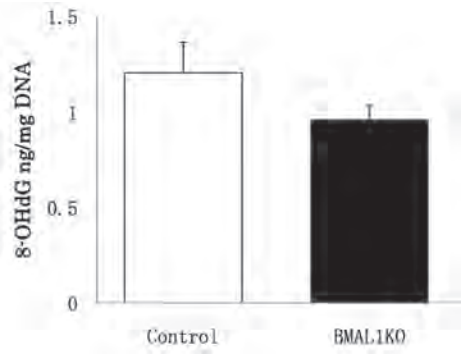


Fig. 5　マウス皮膚における8-OHdG量
明暗条件下にて飼育した20週齢のコントロールマウスおよびBMAL1KOマウス皮膚をZT10に採取し、8-OHdG量を、ELISAキットを用いて測定した。Mean±SEM (n=3)

3．8．BMAL1KOマウス皮膚における活性酸素関連遺伝子の発現変化

BMAL1による皮膚機能調節を検討するため、ZT10およびZT22においてコントロールマウスとBMAL1KOマウスの背部皮膚を採取し、その遺伝子発現を検討した。活性酸素消去系酵素の発現はいずれの時間においてもコントロールマウスとBMAL1KOマウスとの間に差異は認められなかった（Fig. 6A）。一方、活性酸素生成酵素であるNADPHオキシダーゼサブユニット類の発現は、検討したいずれの時間においてもBMAL1KOマウスにおいて減少傾向が認められた（Fig. 6B）。

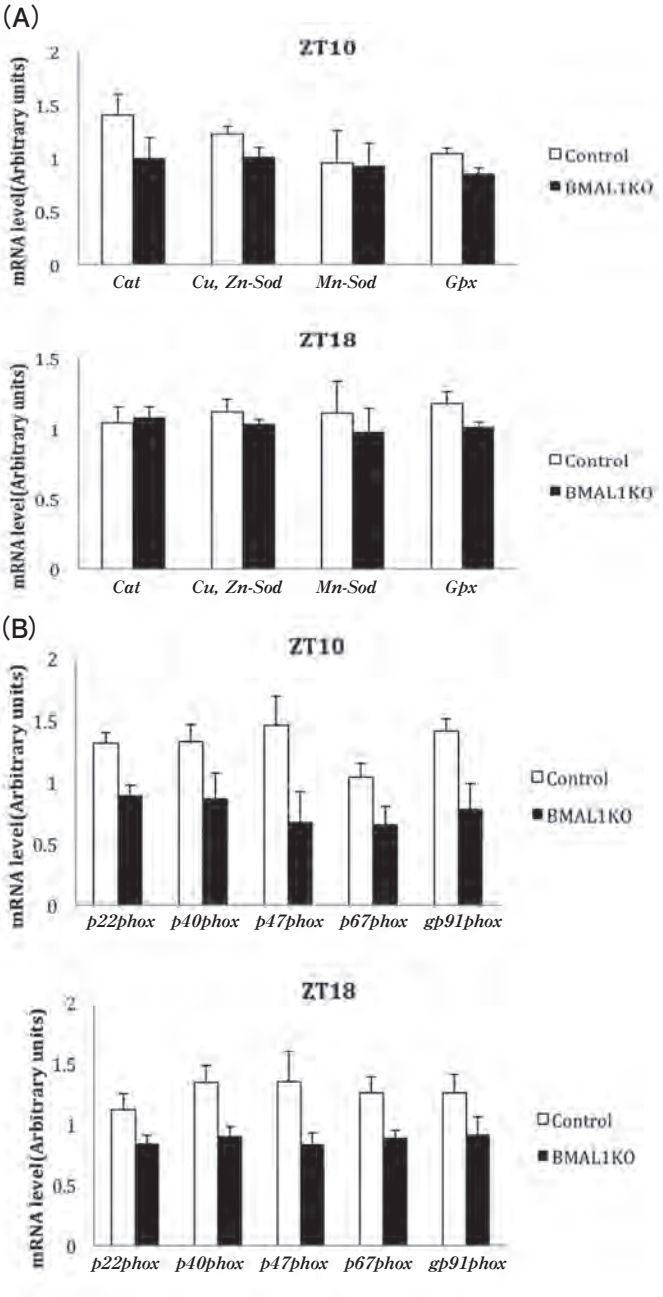


Fig. 6　BMAL1KO マウス皮膚における活性酸素関連因子の遺伝子発現
明暗周期条件下にて飼育した10週齢のコントロールマウスおよびBMAL1KOマウスから背部皮膚をZT10およびZT18に採取し、そのmRNAの発現を、real-time PCR法を用いて検討した。(A) 活性酸素消去系　(B) 活性酸素産生系　Mean±SEM (n=7)（*p<0.05）

4．考　察

皮膚機能におけるサーカディアンリズムを解明するためには、まず皮膚における時計遺伝子の発現パターンを明らかにする必要がある。明暗条件下で飼育したマウス皮膚を4時間ごとにサンプル採取し、時計遺伝子発現パターンを解析したところ、*Ror*を除くすべての時計遺伝子は日内変動を示した（Fig. 1）。そこで、これら明暗条件下における遺伝子発現変化が、光刺激により誘導される“日内変動”であるのか、あるいは自律的な“概日リズム（サーカディアンリズム）”の存在を反映しているものなのかを明らかにする目的で、恒暗条件下においてマウスを飼育し、その皮膚における遺伝子発現を解析した。その結果、時計遺伝子の発現は明暗条件下と同様の発現パターンを示し、さらには明暗条件下では変動しなかった*Ror*の発現量にもリズム性が生じていた（Fig. 2）。また、*Bmal1*や*Clock*の発現パターンを両飼育条件間で比較するとわかるように、恒暗条件下のほうが明暗条件下よりも、変動の幅が大きくなっていることがわかる（Fig. 1および2）。これらの結果から、皮膚における遺伝子発現にはサーカディアンリズムが存在すること、そしてその活性は光刺激の影響を少なからず受けることが示され、*Ror*の発現は、この光刺激によるサーカディアンリズムの抑制の一例であると考えられる。

恒暗条件下で飼育したマウス背部皮膚を用いた検討から皮膚におけるROS量にサーカディアンリズムの存在が示されたことから、皮膚におけるROS量制御へのBMAL1の関与が示唆された（Fig. 3B）。BMAL1KOマウスにおけるROS量はコントロールマウスのそれに比較して、脾臓、心臓、腎臓は増加、その一方で肝臓では低下が報告されている[5]。そこで皮膚におけるROS量を測定したところ、10週齢時におけるROS量は、コントロールマウスとBMAL1KOマウスとの間で差異は認められなかったが、BMAL1KOマウスでは、コントロールマウスにおいて観察された加齢に伴うROS量の増加は認められなかった（Fig. 4）。さらにこの際、DNA酸化損傷のマーカーである8-OHdGの値も、BMAL1KOマウスにおいて減少傾向が見られた（Fig. 5）。これらの結果より、BMAL1は皮膚におけるROS量、特に加齢に伴う皮膚におけるROS量の産生を制御していることが明らかとなった。

次いでROS量の制御に関与する因子の遺伝子発現量を検討した。これら因子の発現は、時計遺伝子により産み出されるサーカディアンリズム、そして明暗周期による、すなわち光刺激により誘導される日内変動のいずれの影響も受けることが示された。例えば、恒暗条件下飼育マウスを

用いた検討により、*Cu, Zn-Sod*、*Mn-Sod*、ならびに*Gpx*の発現にサーカディアンリズムの存在が確認されたが、その一方で、明暗条件下で飼育したBMAL1KOマウスにおいて、これら遺伝子の発現に差が認められなかった。このことは、これら遺伝子の発現の制御は、BMAL1による制御を受けるものの、光刺激の影響が強いことを示している。他にも*Cat*あるいはNADPHオキシダーゼのサブユニットの一部の発現解析からも、光刺激による制御が支持される。

これらの結果から、皮膚において様々な機能が1日を通じて変動していることが示唆され、またその制御には時計遺伝子による制御のみならず、光刺激の関与も大きいことが明らかとなった。したがって本研究で得られたこれら知見は、生活時間の重要性を説くものであり、今後、化粧品開発をはじめとして、皮膚機能調節における概念に科学的エビデンスを与えるものである。

(引用文献)

1) 清水　広：あたらしい皮膚科学 中山書店 2011.
2) Yosipovitch G, Xiong GL, Haus E, Sackett-Lundeen L, Ashkenazi I, Maibach HI: Time-dependent variations of the skin barrier function in humans: transepidermal water loss, stratum corneum hydration, skin surface pH, and skin temperature. J. Invest. Dermatol., 110, 20-23, 1998.
3) Le Fur I, Reinberg A, Lopez S, Morizot F, Mechkouri M, Tschachler E: Analysis of circadian and ultradian rhythms of skin surface properties of face and forearm of healthy women. J. Invest. Dermatol., 117, 718-724, 2001.
4) Bunger MK, Wilsbacher LD, Moran SM, Clendenin C, Radcliffe LA, Hogenesch JB, Simon MC, Takahashi JS, Bradfield CA: Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. Cell, 103, 1009-1017, 2000.
5) Kondratov RV, Kondratova AA, Gorbacheva VY, Vykhovanets OV, Antoch MP: Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. Genes Dev., 20, 1868-1873, 2006.

フィラグリンをターゲットにしたアトピー性皮膚炎の新規治療法の開発

北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野
乃村　俊史

Filaggrin plays a crucial role in epidermal barrier formation. Recently, loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin (*FLG*) have been shown to predispose to atopic dermatitis. Since most of the *FLG* mutations identified are a nonsense mutation, we, in this study, aimed to develop novel therapeutic strategies for atopic dermatitis targeting at nonsense mutations in *FLG*. First, we performed mutation analysis of *FLG* to clarify the mutation frequency in the Japanese population and showed that 10% of the population carry one or more *FLG* mutations. Subsequently, we established reporter gene assays that can detect readthrough efficacy and performed compound screening by using these assays. Notably, we identified about 50 potential hits from the compound libraries. These results would open a new avenue for developing more effective and specific therapies for this intractable disease.

緒　言

アトピー性皮膚炎は、小児の約 10 − 20%が罹患する極めて頻度の高い疾患である。しかし、アトピー性皮膚炎の病因は長らく不明であり、その治療はステロイド剤外用を中心とした対症療法に頼らざるを得ず、難治例では皮膚萎縮などのステロイドの副作用を高率に生じ、大きな社会問題となってきた。ステロイドに代わる新規治療薬の開発が強く求められる中、申請者は最近、日本人アトピー性皮膚炎患者の比較的小さな集団を解析し、その約 30%がフィラグリン遺伝子変異を持つことを明らかにした[1-3]（図 1）。フィラグリンは、皮膚バリア機能に必須のタンパク質であり、遺伝子変異により皮膚バリア機能が低下すると種々の抗原に易感作性となり、アトピー性皮膚炎を発症しやすくなると推測されている。

そこで本研究では、まず、サンプルサイズの大きな集団を用いてフィラグリン遺伝子変異の保有率を解析し、さらに皮膚バリアの破綻に伴う慢性抗原刺激がアトピー性皮膚炎の主要な病因であるという新しい仮説のもとに、アトピー性皮膚炎の病因に直接的に基づいた初めての治療の試みとして、フィラグリン遺伝子に生じたナンセンス変異を読み飛ばすリードスルー療法の開発を目指すことにした（図 2）。通常、ナンセンス変異により早期終止コドンができるとそこでリボソームはタンパク質の翻訳を中止するため、機能性タンパク質が産生されず、疾患を発症する。本研究では、リボソームによる mRNA 翻訳時にナンセンス変異を読み飛ばしタンパク質合成をし続ける「リードスルー」という現象を使い、フィラグリン遺伝子のナンセンス変異を読み飛ばすことを目指す。日本人アトピー性皮膚炎患者で同定されたフィラグリン遺伝子変異の 80%以上がナンセンス変異であるため[3]、リードスルー活性を持つ薬剤を用いれば多くの患者で正常の機能を持つフィラグリンの産生増加が見込める。本研究では、リードスルー治療を用い、患者皮膚でのフィラグリンの発現そのものを増やすことで正常な角層形成を促しバリア機能を是正するという、従来の治療法とは全く異なる独創的な治療法の開発を目指す（図 2）。

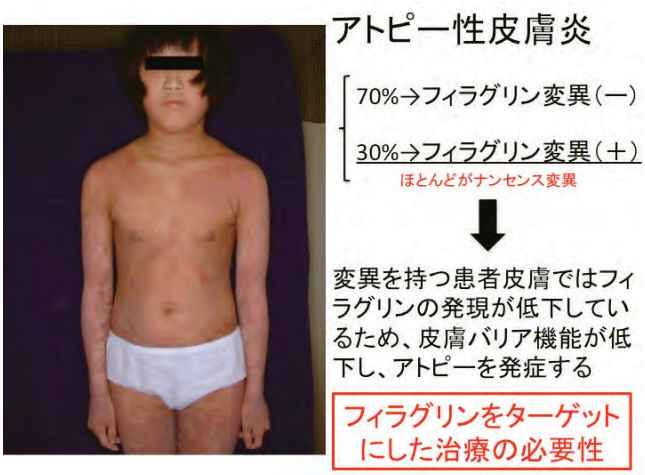
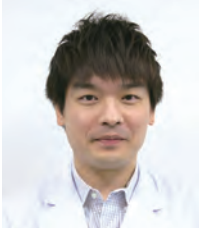


図 1　アトピー性皮膚炎患者の一部はフィラグリン遺伝子に生じたナンセンス変異により発症する。

実　験

1. フィラグリン遺伝子変異保有率解析

環境と子供の健康に関する北海道研究（通称：北海道スタディ）は、平成 13 年からリクルートを開始し、現在、北海道内の約 2 万人の児が登録している出生コホート研究であり、一般集団を対象にしている。今回の研究では、そのうち、7 歳に到達した児 1,065 名を対象にフィラグリン



Development of novel therapeutic strategies for atopic dermatitis targeting at filaggrin
Toshifumi Nomura
Department of Dermatology, Hokkaido University Graduate School of Medicine

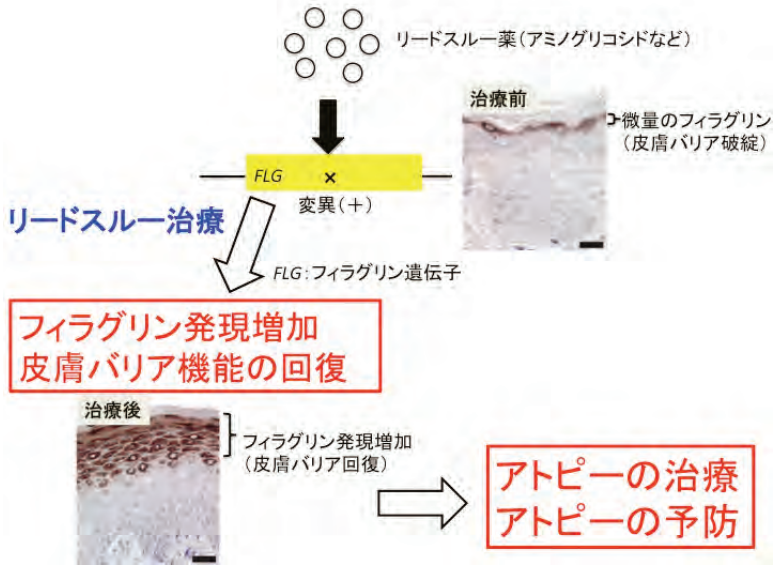


図２　フィラグリン遺伝子に生じた変異を読み飛ばす（「リードスルー」）ことで皮膚バリア機能が回復し、アトピー性皮膚炎の治療と予防につながることが期待される。

遺伝子変異（臍帯血）とアトピー疾患の発症率などについて解析した。フィラグリン遺伝子変異については、これまで我々が同定した11種類の変異のうち、頻度の高い８種類のフィラグリン遺伝子変異（3321delA, S1695X, Q1701X, S2554X, S2889X, S3296X, K4022X, 新規変異１つ）についてSanger法を用いたダイレクトシークエンスでスクリーニングした。アレルギー疾患（アトピー性皮膚炎、気管支喘息）の有無と重症度については、International Study of Asthma and Allergies in Childhood（ISAAC）の問診票を用いて、２歳時、４歳時、７歳時に判定した。

2. リードスルー活性を測定可能なレポータージーンアッセイの確立

pGL4.20ベクターのルシフェラーゼ遺伝子（*luc2*）内に、site directed mutagenesisにより、人工的に早期終止コドン（TAA）を作成した（Y179X）。制限酵素を用い、同変異を有する*luc2*遺伝子をpcDNA5/FRTベクター内のCMVプロモーターの下流にクローニングした。変異*luc2*遺伝子を挿入した同ベクターとpOG44を293FlpIn細胞にco-transfectionし、ハイグロマイシンで選択後に得られたコロニーから、stable cell lineを作成した（図3）。それぞれのコロニーから得られたクローンについて、ルシフェラーゼアッセイによるcharacterizationを行った。同様に、GFP遺伝子内に、site direct mutagenesisを用い、人工的に早期終止コドン（TAA）を作成した（Y40X）。pcDNA5/FRTベクターにクローニングし、ルシフェラーゼと同様の方法でstable cell lineを作成した。この細胞株についても、得られた複数のクローンについて、Western blot法を用いてcharacterizationを行った。

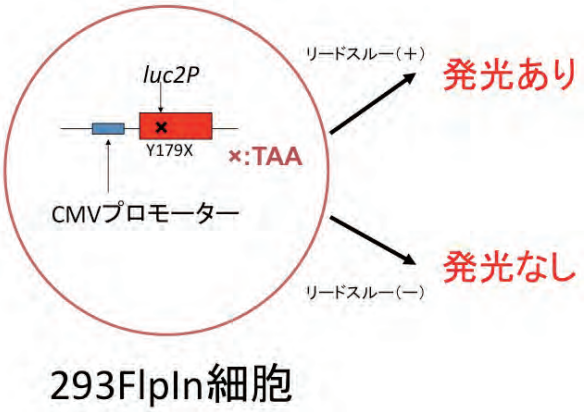


図３　この細胞株はリードスルーが起こったときにのみ発光強度が増すため、薬剤のリードスルー活性測定に有用である。

3. フィラグリンをターゲットにしたアトピー性皮膚炎の新規治療法の開発（リードスルー治療）

2. で作成した変異*luc2*遺伝子を持つstable cell lineを、19,992種類の化合物で24時間治療し、発光量を計測した。なお、アミノグリコシド系抗生物質の一つであるG418（注：重大な副作用を持ち、人体には投与不可能）を用いた治療によりこの細胞株は強い発光を示したため、G418を陽性コントロールとして用い、陰性コントロールには、DMSO（1％）を用いた。また、すべての実験で細胞数自動カウント装置や分注機を用いることでなるべくマニュアルでの作業を減らし、再現性の高い実験になるよう工夫を凝らした。

結　果

1. フィラグリン遺伝子変異保有率解析

1065 人中 96 人にフィラグリン遺伝子変異を認め（heterozygote が 93 人、compound heterozygote が 3 人）、解析集団の 9.3%がフィラグリン遺伝子変異を有していた（図 4）。変異の内訳は、3321delA：15 人、S1695X：0 人、Q1701X：2 人、S2554X：11 人、S2889X：38 人、S3296X：7 人、K4022X：27 人、新規変異：2 人であった（図 4）。フィラグリン遺伝子変異とアトピー性皮膚炎の関連について解析したところ、2 歳時、4 歳時では、オッズ比がそれぞれ 1.55（95% 信頼区間：1.08-2.22）、1.47（95% 信頼区間：1.03-2.09）であり有意差を認めたが、7 歳時ではオッズ比が 1.34（95% 信頼区間：0.95 − 1.90）であり、有意差を認めなかった。また、アトピー性皮膚炎の重症度については、フィラグリン遺伝子変異保有群のほうが非保有群と比べて有意に高かった（4 歳時）。しかしながら、変異の種類と重症度の間には明らかな相関は認めなかった。フィラグリン遺伝子変異やアトピー性皮膚炎の有無と気管支喘息の発症率には有意差を認めなかった。

2. リードスルー活性を測定可能なレポータージーンアッセイの確立

ダイレクトシークエンスにより、*luc2* 遺伝子内に Y179X が、*GFP* 遺伝子内に Y40X が、それぞれ作成されていることを確認した。変異 *luc2* 遺伝子を持つ stable cell line は、無治療ではルシフェラーゼアッセイにおいて極めて低い発光しか示さないのに対し、強力なリードスルー薬である G418（ヒトには使用不可能なアミノグリコシド系抗生剤）で 24 時間治療後には強い発光を示した。一方、変異 *GFP* 遺伝子をトランスフェクションした stable cell line は、抗 GFP 抗体を用いた Western blot で目的のバンドが確認できなかった。そこで、同ベクターをアトピー性皮膚炎 293 細胞に transient transfection し、同様の方法で Western blot を施行したところ、G418 の濃度依存性に GFP の発現量も増加していた。その後、変異 *luc2* 遺伝子を持つ stable cell line を用いて、細胞数など種々の条件を変えてルシフェラーゼアッセイを行い、96 ウェルプレートに 5,000 個の細胞を播き、500mg/mL の G418 で 24 時間治療した場合に、最も精度の高いデータ（%CV、Z' factor）が得られることを確認した。

3. フィラグリンをターゲットにしたアトピー性皮膚炎の新規治療法の開発（リードスルー治療）

2. で作成した変異 *luc2* を持つ stable cell line を用いて、primary screening を行ったところ、陰性コントロールと比べ約 4 倍以上の発光を示した化合物が、130 個同定された（全化合物の約 0.65%）（図 5）。最も強い発光を示した化合物は、陰性コントロールと比べ、約 60 倍の発光増加を認めた。なお、陽性コントロールの %CV は 7.9%、陰性コントロールの %CV は 14.8% であり、Z' factor は 0.77 と良好な値を示した。130 個の化合物について、ルシフェラーゼアッセイを用い、retest screening を施行したところ、約 40% の化合物が再度、強い発光増加を示した。

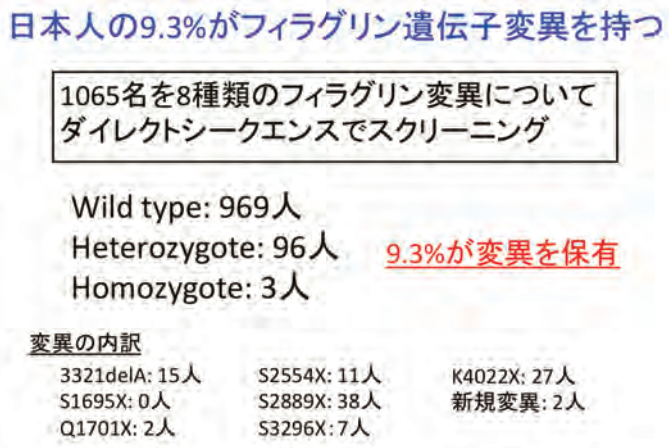


図 4　日本人の一般人口の約 10% がフィラグリン遺伝子変異を有している。

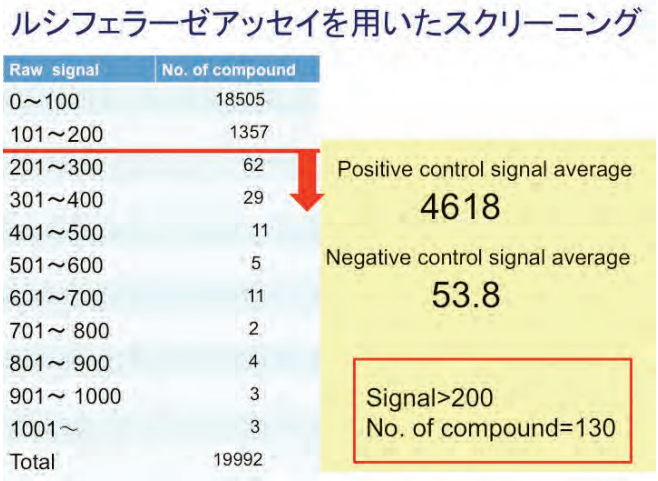


図 5　ルシフェラーゼアッセイを用いた 1 次スクリーニングにより、130 個の hit compound を同定した。

考　察

1. フィラグリン遺伝子変異保有率解析

1. 1. フィラグリン遺伝子変異の保有率について

英国の学童調査では変異の保有率は 13.8% であり [4]、北海道八雲町の成人を対象にした八雲スタディでの変異の保有率は 11.1% であった [5]。今回の我々の結果でも対象集団の約 10% 弱が変異を保有しており、フィラグリン遺伝子変異の保有率は日本でも英国でも約 10% 程度と推測される。人口の少なくとも 1 割は遺伝的に皮膚バリア機能が低

下しており、経皮的に易感作性でアトピー性皮膚炎を発症しやすいことが予想される。

1. 2. フィラグリン遺伝子変異とアトピー性皮膚炎について

欧米のスタディでは、フィラグリン遺伝子変異はアトピー性皮膚炎の重要な発症因子であることが示されており（オッズ比：2.13 ～ 4.78）[6, 7]、日本人でも両者に有意な相関は認められたが、欧米のデータと比するとオッズ比はやや低めであった。

2. リードスルー活性を測定可能なレポータージーンアッセイの確立

アトピー性皮膚炎に対するリードスルー治療の開発に向けては、我々の保有する約2万種類の化合物を用いた大規模スクリーニングを企画し、ルシフェラーゼアッセイを用いて、drug screeningに不可欠な、薬剤のリードスルー活性を測定可能なレポータージーンアッセイシステムを構築することに成功した。また、GFPを用いたアッセイシステムも構築した。ルシフェラーゼアッセイは感度が高い一方、疑陽性が多いことが知られているが、我々が今回作成したGFPアッセイと併用することで、これらの欠点を克服することが可能である。また、今回のスクリーニングで、%CV、Z' factorともに良好な値を示し、今回我々が確立したアッセイがリードスルー活性測定において精度と質の高いものであることを確認した。

3. フィラグリンをターゲットにしたアトピー性皮膚炎の新規治療法の開発（リードスルー治療）

上述の実験2. で作成した、良質なアッセイシステムを用い、我々は約50個のヒット化合物を同定した。これらの化合物は、強いリードスルー活性を持つことが予想され、今後アトピー性皮膚炎や種々の遺伝性疾患への臨床応用につながることが期待される。また、今後、これらのヒット化合物について、GFPなど他のレポータージーンアッセイを用いた評価を進めるとともに、フィラグリン遺伝子にナンセンス変異を持つアトピー性皮膚炎患者由来の培養細胞を治療し、フィラグリンの発現が回復するか検討を行う予定である。また、ナンセンス変異を持つモデル動物への投与により、*in vivo*での効果と副作用についても詳細な検討を行う予定である。

総　括

本研究により、日本人の約10%がフィラグリン遺伝子変異を持ち、アトピー疾患を発症しやすい状態であることが明らかになった。これは、アトピー性皮膚炎の治療にフィラグリンの発現を増やすことが重要であることを示唆するとともに、アトピー性皮膚炎を発症するから保湿剤の使用などにより皮膚バリア機能を回復させることでアトピー疾患を予防できる可能性を示唆する重要な知見である。

リードスルー治療については、現時点ではリードスルー活性を持ちヒトへの投与が可能な薬剤はアミノグリコシド系抗生剤（ゲンタマイシンなど）とPTC124しか知られていないが、両者ともにリードスルー活性が低く、前者は副作用の点から患者への長期投与が困難である。薬剤のリードスルー活性を測定可能なレポータージーンアッセイシステムとして、ルシフェラーゼとGFPを用いたアッセイを確立し、約2万種類の化合物をスクリーニングし、約50個のリードスルー活性の高い化合物を同定することに成功した。これらの化合物は、アトピー性皮膚炎の治療や予防のみならず、種々の遺伝性疾患の治療にも有効である可能性があり、今後、モデル動物を用い、効果と安全性を検討していく予定である。また、今回我々が確立したスクリーニングシステムはリードスルー化合物の検索に有用であったため、追加で化合物ライブラリーを購入し、さらなるdrug screeningを行うことも可能である。これにより、アトピー性皮膚炎患者皮膚でのフィラグリンの発現そのものを増やすことで正常な角層形成を促し、バリア機能を是正するという、従来の治療法とは全く異なる独創的な治療法の開発が可能となるものと確信している。

（引用文献）

1）Nomura T, Sandilands A, Akiyama M, et al. Unique mutations in the filaggrin gene in Japanese patients with ichthyosis vulgaris and atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol 119: 434-440, 2007.

2）Nomura T, Akiyama M, Sandilands A, et al. Specific filaggrin mutations cause ichthyosis vulgaris and significantly associated with atopic dermatitis in Japan. J Invest Dermatol 128: 1436-1441, 2008.

3）Nomura T, Akiyama M, Sandilands A, et al. Prevalent and rare mutations in the gene encoding filaggrin in Japanese patients with ichthyosis vulgaris and atopic dermatitis. J Invest Dermatol 129: 1302-1305, 2009.

4）Brown SJ, Relton CL, Liao H, et al. Filaggrin haploinsufficiency is highly penetrant and is associated with increased severity of eczema: further delineation of the skin phenotype in a prospective epidemiological study of 792 school children. Br J Dermatol 161: 884-889, 2009.

5）Kono M, Nomura T, Ohguchi Y, et al. Comprehensive screening for a complete set of Japanese-population-specific filaggrin gene mutations. Allergy 69: 537-540, 2014.

6）Irvine AD, McLean WH, Leung DY. Filaggrin

mutations associated with skin and allergic diseases. N Engl J Med 365: 1315-1327, 2011.
7) Cramer C, Link E, Horster M, et al. Elder siblings enhance the effect of filaggrin mutations on childhood eczema: results from the 2 birth cohort studies LISAplus and GINIplus. J Allergy Clin Immunol 125: 1254-1260, 2010.

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

昭和大学薬学部社会健康薬学講座衛生薬学部門
原　俊太郎

Microsomal prostaglandin (PG) E synthase-1 (mPGES-1) and prostacyclin synthase (PGIS) are PG terminal synthases that function downstream of inducible cyclooxygenase (COX)-2 in the PGE_2 and PGI_2 biosynthetic pathways, respectively. In the present study, to reveal the role of these PG terminal synthases in skin diseases, we investigated the effects of genetic deletion of mPGES-1 and PGIS on skin disease models in mice. As the results, we found that both mPGES-1- and PGIS-deficient mice exhibited a significantly decreased contact hypersensitivity response, indicating that mPGES-1 and PGIS cooperatively exacerbate skin inflammatory reactions. Chemical-induced skin carcinogenesis was also suppressed by mPGES-1 deficiency, but PGIS deficiency did not affect skin carcinogenesis. mPGES-1 plays an important role in skin carcinogenesis, but contribution of PGIS might be little.

1．緒　言

プロスタグランジン（PG）類は様々な生理現象に関わるばかりでなく、炎症やがんといった幅広い病態の発症や進行にも関わることが知られている。各々のPG類はシクロオキシゲナーゼ（COX）によりアラキドン酸から産生されたPGH_2に、それぞれのPG類に特異的なPG最終合成酵素が作用することにより産生される（図1）。アスピリンなどの非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）はCOXを抑制しこのPG類の産生を抑えることで、抗炎症作用、抗がん作用といった薬理作用を発揮するが、従来用いてこられたNSAIDsは胃粘膜保護作用など重要な生理作用を示すPG類を含め、すべてのPG類産生を抑えてしまうために、多くの副作用を併せもつことが問題となっている。また、皮膚疾患においては、NSAIDsがアレルギー性皮膚炎を逆に増悪化すること、一部のNSAIDsが光過敏症を誘発することも知られており、NSAIDsの皮膚疾患への適用を妨げる大きな要因となっている。そこで、本研究では、皮膚疾患にも適用可能な新たなNSAIDsの創製を指向し、従来のNSAIDsが標的とするCOXに代わる新たな創薬標的として、COXの下流ではたらくPG最終合成酵素、中でもPGE合成酵素の1つ、膜結合型PGE合成酵素-1（mPGES-1）と、PGI合成酵素（PGIS）に注目した。NSAIDsの標的であるCOXには、生体の恒常性維持に主に関わる構成型のCOX-1と、炎症やがんの発症や進展に伴い発現誘導される誘導型のCOX-2の2つのアイソザイムが存在するが、

Role of prostaglandin terminal synthases in skin disease
Shuntaro Hara
Division of Health Chemistry, Department of Healthcare and Regulatory Sciences, School of Pharmacy, Showa University

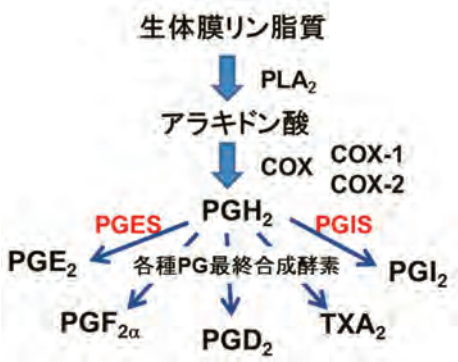


図1　プロスタグランジン類の合成経路

mPGES-1とPGISはいずれもこのうちCOX-2と選択的に機能連関し、それぞれPGE_2、PGI_2を産生する酵素である[1]。本研究では、mPGES-1およびPGISの遺伝子欠損マウスを用い、皮膚炎や皮膚がんを惹起した際に、野生型マウスと、病態の発症や進行にどのような違いがみられるか検討した。また、病態の発症や進行に伴い産生される各PG類を、LC-MS/MSを用い経時的に定量解析した。

本研究で解析を行うmPGES-1の特異的阻害剤については、現在、副作用の少ないNSAIDsとして国内外でその開発が進んでいるが、この新たな阻害剤は、これまでのNSAIDsとは作用点だけでなく構造もかなり異なり、それゆえに光過敏症等を起こさない可能性も期待できる。これらの研究は、PG最終合成酵素群を標的とする新たな皮膚疾患の治療薬の可能性を示すだけでなく、今まで明らかとなっていなかった皮膚疾患の新たな発症、進展の機構の解明にもつながることが期待される。

2．実　験

2．1．動物

mPGES-1の遺伝子欠損マウス[2]は大阪大学の審良静男教授より寄贈されたmPGES-1遺伝子ヘテロ欠損（+/-）マウス（C57BL/6×129Sv系）を、PGISの遺伝子欠損マウス[3]

は神奈川工科大学の横山知永子先生より寄贈されたPGIS遺伝子ヘテロ欠損（+/−）マウス（C57BL/6系）を交配したものおよび、それぞれBalb/c系に10代以上戻し交配したものを用いた。これらのマウスの尻尾先端部からDNAを抽出後、常法によりジェノタイピングし、KO、ヘテロ、WTに識別し、各実験に使用した。

2. 2. DNFB誘導アレルギー性接触皮膚炎モデル

アレルギー性接触皮膚炎におけるmPGES-1、PGISの役割を検討するために、dinitrobenzene sulfonic acid（DNFB）によるアレルギー性接触皮膚炎を惹起した。DNFBはアセトン：オリーブオイル＝4：1溶液として用いた。まず、Balb/c系マウスの腹部の毛をバリカンで剃り、翌日に0.5％ DNFBを塗布した後5日間おいて感作を成立させた。5日後、マウスの右耳介皮膚に0.3％ DNFBを塗布し、耳介の厚さを1、2、3、5、7、14日と継時的に測定し、アレルギー性皮膚炎の指標とした。また、コントロールとして左耳介にはアセトンのみを塗布した。DNFBを耳介に塗布して2日後の耳介組織を摘出し、組織標本の作製、組織中のPG類の定量に用いた。

2. 3. TPA誘導一次刺激性接触皮膚炎モデル

一次刺激性接触皮膚炎におけるmPGES-1、PGISの役割を検討するために、12-*O*-tetradecanoylphrobol-13-acette（TPA）による皮膚炎を惹起した。TPAはエタノールに溶解して16 mMに調製してストックし、使用時に16μMになるようにアセトン溶液とした。マウスの右耳介にTPA 3.2nmol（200μL/mouse）を塗布後、耳介の厚さを1、3、5、6、24時間と継時的に測定し、皮膚炎の指標とした。また、コントロールとして左耳介にはアセトンのみを塗布した。

2. 4. DMBA/TPA誘導皮膚発がんモデルを用いた解析

皮膚での化学発がんにおけるmPGES-1、PGISの役割を検討するために、7, 12-dimethylbenz[*a*]anthracene（DMBA）/TPAを用いた2段階発がんモデルによる解析を行った。DMBAは2 mMアセトン溶液とし、TPAは16μMアセトン溶液とした。マウスの背部皮膚に、DMBA 0.4 μmol（200 μL/mouse）を塗布し、1週間後から1週間に2度ずつTPA 3.2 nmol（200 μL/mouse）を塗布した。20週間後に皮膚に生じたポリープ数をカウントするとともに、皮膚組織の病理学的解析、PG類の定量、PG産生酵素の発現レベル解析を行った。

2. 5. 組織中PG類の定量

摘出した組織をBead Crusher（Taitec）を用いてメタノール中でホモジネートした。3000 rpm、4℃、5分間遠心した後に、上清を回収し脂質を抽出した。調製したライゼートに内部標準としてLTB4-d4を加え、3 mLのPBSにて希釈後、塩酸を1滴加えた試料を事前にメタノール5 mL、蒸留水5 mLで洗浄したSEP-PAK C18（Waters）カラムに吸着させ、蒸留水、15％エタノール、ベンゼンの順に各5 mLで洗浄後、酢酸エチル・メタノール（9：1）溶液3 mLで溶出してPG類を抽出した。溶媒を除去し、水：アセトニトリル：ギ酸（63：37：0.02）に再度溶解し、測定用サンプルとした。

PG類の測定はLC-MS/MSの系[4]で行った。液体クロマトグラフィー（LC）の分離はProminence HPLCシステム（島津）を用いて以下の条件で行った（カラム：TSKgel ODS-100 V column（2.0×150mm内径、5μm particle、Tohso）、サンプル流入量：5 μL）。移動相は水：アセトニトリル：ギ酸（63：37：0.02）とアセトニトリル：イソプロパノール（1：1）のグラジェントでカラムに保持された試料を流速300 μL/minで溶出させた。MS/MS解析はトリプル四重極質量分析装置QTRAP5500システム（AB Sciex）を用いてイオンを検出した。

2. 6. RNAの調製、逆転写、定量的PCR

摘出した組織にTRIZOL（Invitrogen）500 μLを加えて細胞を破砕し、常法によりRNAを抽出した。抽出したRNAをHigh Capacity cDNA Reverse Transcription Kit（Applied Biosystems）を用いて逆転写反応を行い、cDNAを得た。合成したcDNAを用いて定量的PCRを行い、mRNA発現を解析した。反応はApplied Biosystems Step One™ Real-Time PCR SystemによってPower SYBR® Green PCR Master Mix（Applied Biosystems）を用いて行った。

2. 7. 組織標本の作製

摘出した組織を中性緩衝ホルマリン溶液によって固定後、パラフィン包埋して薄切した。ヘマトキシリン・エオジン染色には、マイヤーヘマトキシリン溶液（WAKO）および1％エオシンY液（武藤化学）を用いた。

3．結　果

3. 1. mPGES-1の欠損はアレルギー性接触皮膚炎を抑制する

はじめに、mPGES-1の接触性皮膚炎における役割を明らかとするために、DNFBを用いたアレルギー性接触皮膚炎モデルによる解析を行った。DNFBを腹部に塗布し、感作させたのち、DNFBを耳介に塗布すると、野生型マウスでは2日後をピークに耳介が肥厚し、その後緩やかに寛解した。

一方、mPGES-1 欠損マウスでは、野生型マウスと同じく2日目をピークに耳介の肥厚が認められたが、野生型マウスと比較すると肥厚の程度は抑制されていた。

3. 2. PGISの欠損はアレルギー性接触皮膚炎を抑制する

次に、PGISの接触性皮膚炎における役割を検討するために、同様に、DNFBを用いてアレルギー性接触皮膚炎を惹起した。PGIS欠損マウスにおいてもDNFBを耳介に塗布してから2日目に最も肥厚が認められたが、野生型マウスと比較して、耳介の肥厚は抑制された(図2)。

野生型マウスの耳介組織中のPG類の量を測定したところ、DNFBを塗布してから2日後にはPGI_2代謝物である6-ketoPGF$_{1\alpha}$量が増加していたが、PGIS欠損マウスでは6-ketoPGF$_{1\alpha}$は検出されなかった。これらの結果より、PGISの欠損はPGI_2産生を抑制し、アレルギー性接触皮膚炎を抑制することが示唆された。

さらに、一次刺激性皮膚炎へのPGISの関与を調べるために、TPAを耳介に塗布して皮膚炎を惹起し、耳介の肥厚を測定した。TPAによる耳介の肥厚はPGIS欠損マウスにおいても野生型マウスと同程度であった。

3. 3. mPGES-1の欠損は皮膚化学発がんを抑制する

さらに、mPGES-1の皮膚化学発がんにおける役割を明らかとするために、DMBA/TPAによる皮膚化学発がんモデルによる解析を行った。野生型マウスではDMBA/TPAの塗布により12匹中11匹のマウスに皮膚腫瘍が形成されたのに対し、mPGES-1欠損マウスでは8匹中2匹にしか腫瘍は観察されず、発がん率の顕著な低下が認められた(図3)。さらに、腫瘍数を測定したところ、野生型マウス

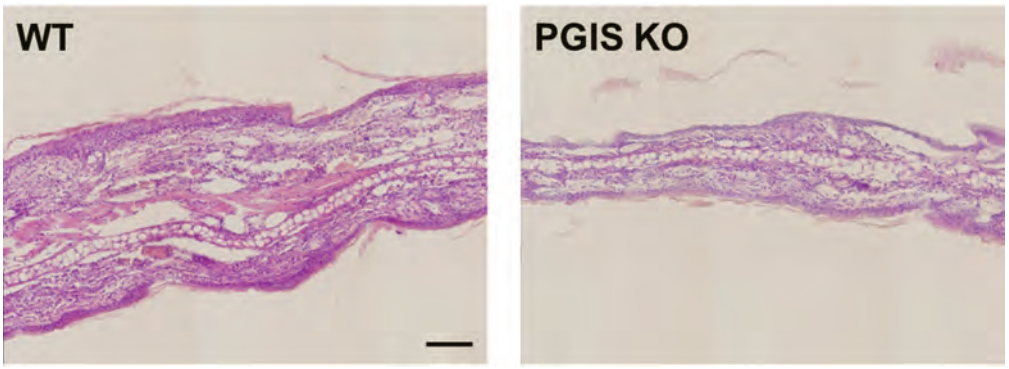


図2　野生型およびPGIS欠損マウスにおけるアレルギー性接触皮膚炎反応
HE組織染色(bar：100 μm)

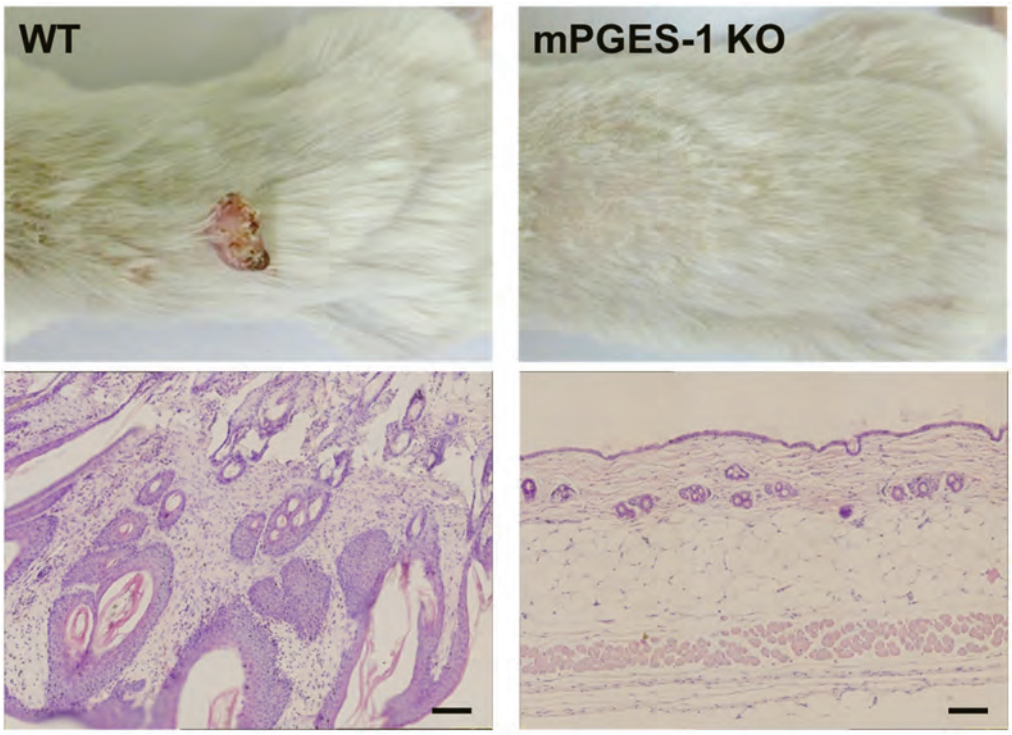


図3　野生型およびmPGES-1欠損マウスにおける皮膚化学発がん
上：肉眼所見、下：HE組織染色(bar：100 μm)

では12匹中4匹において10個以上の腫瘍が認められたが、mPGES-1欠損マウスでは腫瘍が形成された2匹においても5個または6個しか認められなかった。これらの結果より、mPGES-1の欠損は発がん率、腫瘍数ともに顕著に抑制することが示唆された。

野生型マウスの皮膚組織中のCOX-2、mPGES-1のmRNA発現を定量的PCRにて解析したところ、未処理の皮膚組織と比較してDMBA/TPA塗布により顕著にCOX-2、mPGES-1発現が促進され、腫瘍組織ではさらに増加した。このときのPGE2産生をLC/MSを用いて測定したところ、COX-2、mPGES-1発現の増加に伴い、腫瘍組織において顕著に増加していた。一方、mPGES-1欠損マウスではDMBA/TPAによるPGE_2産生が抑制されていた。

これらの結果より、mPGES-1の欠損はPGE_2産生を抑制し、DMBA/TPAによる皮膚における化学発がんを抑制することが明らかとなった。

3. 4. PGISの欠損は皮膚化学発がんに関与しない

さらに、PGISの皮膚化学発がんにおける役割についても解析を行った。Balb/c系PGIS欠損マウスではDMBA/TPAによって8匹中7匹に皮膚に腫瘍が形成され、野生型マウスと同程度の発がんが認められた。Balb/c系マウスは発がん率が高く、ほぼすべてのマウスに発がんが認められている。我々はこれまでに大腸においてはPGISの欠損は化学発がんを促進することを見出しており[5]、より発がんしにくい条件下では皮膚においてもPGISの欠損が発がんを促進する可能性も考え、次にC57BL/6系マウスを用いて同様に皮膚発がんを誘導した。その結果、C57BL/6系マウスにおいても、PGIS欠損マウスでは野生型マウスと同程度の発がんが認められた。また、皮膚においてはPGI_2代謝物である6-keto$PGF_{1\alpha}$はほとんど検出されなかった。

これらの結果より、皮膚組織中のPGI_2産生量は少なく、PGISの欠損はDMBA/TPAによる皮膚発がんには関与しないと考えられた。

4. 考　察

以上の結果より、mPGES-1とPGISはそれぞれ、PGE_2およびPGI_2産生を介して接触性皮膚炎を促進することが示唆された。PGE_2受容体にはEP1～EP4の4種類が知られているが、このうちのEP1の欠損マウスではTh1への分化が抑制されることでDNFBによるアレルギー性接触皮膚炎が抑制される[6]。しかし、EP3欠損マウスでは反対に増悪することが報告されている[7]。これは、ケラチノサイトに発現するEP3がCXCL1の発現を抑制することで好中球の浸潤を抑制し、抗炎症作用を示すため、EP3の欠損によって抗炎症作用が抑制されてしまったことによると報告されている。今回、mPGES-1欠損マウスにおいてDNFBによる接触性皮膚炎が抑制されたのは、mPGES-1/PGE_2/EP1のシグナルが抑制されたためであると考えられる。また、PGI_2受容体であるIPの欠損マウスにおいてもIFNγ産生の減少に伴い、DNFBによるアレルギー性接触皮膚炎の抑制が認められている[8]。また、PGI_2誘導体はTh1分化を促進することも報告されていることから、mPGES-1とPGISはPGE_2およびPGI_2産生を介してともにTh1分化を促進し、アレルギー性接触皮膚炎に関与することが考えられた。

一方、皮膚化学発がんにおいては、mPGES-1は促進的に作用することに対し、PGISは関与しないことが明らかとなった。PGE_2は多くの組織において発がんを促進することが報告されており[2]、皮膚においてもEP2の欠損によってDMBA/TPAによる発がんが抑制されること[9]や、反対にEP1、2、4を過剰発現させたマウスでは発がんが促進されること[10~12]が報告されている。今回mPGES-1の欠損が皮膚においても化学発がんを抑制することが明らかとなったことで、皮膚においてもmPGES-1によって産生されたPGE_2がEP受容体を介して発がんを促進していることが裏付けられた。PGI_2とがんの関連についてはPGISの遺伝子多型が発がんリスクに関わるといった報告[13]があるものの、その機構についてはほとんどわかっていない。我々はこれまでにPGISの欠損が大腸における化学発がんを促進することを見出してきた[5]が、皮膚発がんへのPGISの関与については全く不明であった。本研究により組織によってPGISの発がんへの寄与は異なる可能性が示唆された。今後どのような要因がPGISと発がんを結びつけるのか解明していく必要がある。

5. 総　括

本研究により、アレルギー性接触皮膚炎においてはmPGES-1とPGISがともに促進的に作用し、協調的な働きをしていることが明らかとなった。また、皮膚化学発がんにおいてはmPGES-1が促進的に働く一方で、PGISの関与はないことが示唆された。

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研究助成を賜りましたこと、心より感謝いたします。

（引用文献）

1）Smith WL, Urade Y, Jakobsson PJ, : Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis, Chem. Rev., 111, 5821-5865, 2011.

2）Sasaki Y, Kamei D, Ishikawa Y, Ishii T, Uematsu S, Akira S, Murakami M, Hara S, : Microsomal prostaglandin E synthase-1 is involved in multiple

steps of colon carcinogenesis, Oncogene, 31, 2943–2952, 2012.

3) Yokoyama C, Yabuki T, Shimonishi M, Wada M, Hatae T, Ohkawara S, Takeda J, Kinoshita T, Okabe M, Tanabe T, : Prostacyclin-deficient mice develop ischemic renal disorders, including nephrosclerosis and renal infarction, Circulation, 106, 2397–2403, 2002.

4) Kuwata H, Yoshimura M, Sasaki Y, Yoda E, Nakatani Y, Kudo I, Hara S, : Role of long-chain acyl-coenzyme A synthetases in the regulation of arachidonic acid metabolism in interleukin 1β-stimulated rat fibroblasts, Biochim. Biophys. Acta, 1841, 44–53, 2014.

5) Sasaki Y, Kamiyama S, Kamiyama A, Matsumoto K, Akatsu M, Nakatani Y, Kuwata H, Ishikawa Y, Ishii T, Yokoyama C, Hara S, : Genetic-deletion of cyclooxygenase-2-downstream prostacyclin synthase suppresses inflammatory reactions but facilitates carcinogenesis, unlike deletion of microsomal prostaglandin E synthase-1, Sci. Rep., 5, 17376, 2015.

6) Nagamachi M, Sakata D, Kabashima K, Furuyashiki T, Murata T, Segi-Nishida E, Soontrapa K, Matsuoka T, Miyachi Y, Narumiya S, : Facilitation of Th1-mediated immune response by prostaglandin E receptor EP1, J. Exp. Med., 204, 2865–2874, 2007.

7) Honda T, Matsuoka T, Ueta M, Kabashima K, Miyachi Y, Narumiya S, : Prostaglandin E_2-EP_3 signaling suppresses skin inflammation in murine contact hypersensitivity, J. Allergy Clin. Immunol., 124, 809–818, 2009.

8) Nakajima S, Honda T, Sakata D, Egawa G, Tanizaki H, Otsuka A, Moniaga CS, Watanabe T, Miyachi Y, Narumiya S, Kabashima K, : Prostaglandin I_2-IP signaling promotes Th1 differentiation in a mouse model of contact hypersensitivity, J Immunol., 184, 5595–5603, 2010.

9) Sung YM, He G, Fischer SM, : Lack of expression of the EP2 but not EP3 receptor for prostaglandin E2 results in suppression of skin tumor development, Cancer Res., 65, 9304–9311, 2005.

10) Surh I, Rundhaug JE, Pavone A, Mikulec C, Abel E, Simper M, Fischer SM. : The EP1 receptor for prostaglandin E2 promotes the development and progression of malignant murine skin tumors, Mol. Carcinog., 51, 553–564, 2012.

11) Sung YM, He G, Hwang DH, Fischer SM. : Overexpression of the prostaglandin E2 receptor EP2 results in enhanced skin tumor development, Oncogene, 25, 5507–5516, 2006.

12) Simper MS, Rundhaug JE, Mikulec C, Bowen R, Shen J, Lu Y, Lin K, Surh I, Fischer SM, : The tumor promoting activity of the EP4 receptor for prostaglandin E2 in murine skin, Mol. Oncol., 8, 1626–1639, 2014.

13) Poole EM, Bigler J, Whitton J, Sibert JG, Potter JD, Ulrich CM. : Prostacyclin synthase and arachidonate 5-lipoxygenase polymorphisms and risk of colorectal polyps, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 15, 502–508, 2006.

皮膚感覚神経–毛包幹細胞相互依存における基底膜領域特殊化の役割

理化学研究所 多細胞システム形成研究センター細胞外環境研究チーム
藤原　裕展

Accurate sensory perception requires the precise targeting and structure of sensory nerve endings and specialized non-neural end cells. However, the mechanisms that regulate the sensory terminal architecture remain poorly understood. We demonstrated that an extracellular matrix protein, EGFL6, which is localized in the upper bulge region of mouse hair follicles, sustains the architecture and location of the piloneural mechanoreceptor complex. During development of the piloneural complex, EGFL6 is deposited in a highly organized palisade pattern in the upper bulge region and interdigitates tightly with protrusions of the terminal Schwann cells and sensory axon endings of the piloneural complex. In *Egfl6* null mice, the structure of the terminal Schwann cells and sensory nerves is abnormal and they are often located in positions slightly lower than normal on the hair follicle. Electrophysiological analysis of skin-nerve preparation showed the decreased mechano-sensitivity in the KO mouse. Our results indicate that the specialized extracellular matrix acts as a framework to regulate the architecture and function of sensory terminals in the hair follicle.

1. 緒　言

毛を作る器官である毛包は、発生過程で神経・血管・筋肉などと正確に連結されることにより、感覚受容、体温調節、威嚇などの高次機能を創発的に獲得する。しかし、これら異なる組織間の相互作用や連結を制御する分子機構は殆ど明らかにされていない。本研究では、毛包バルジ領域のわずか上部に特異的に結合する感覚神経複合体の毛包へのターゲティングとその複雑な末端構造の形成に、バルジ上部の毛包幹細胞及び、毛包と神経複合体とのインターフェースに位置する基底膜がどのように関わっているのかを明らかにする（図1）。また、感覚神経切除により毛包幹細胞の多能性が変化することが報告されていることから[1]、感覚神経複合体による毛包幹細胞制御機構も解析し、基底膜を介した神経–毛包幹細胞相互依存の可能性を探求する。本研究により、触覚と毛形成とをつなぐ分子基盤の解明を目指す。

我々は、毛包と間充織組織との連結には、これら組織間の相互作用とそれを仲介する基底膜の領域特殊化が重要な役割を担っているとの仮説を立て、研究を展開している。最近、我々は、鳥肌形成を担う立毛筋の毛包バルジ領域への結合が、立毛筋と毛包幹細胞とを隔てるバルジ基底膜の領域特殊化によって制御されていることを見出した[2]。分子機構としては、毛包発生過程において毛包幹細胞が基底膜分子nephronectinを分泌することにより、真皮側に存在する立毛筋前駆細胞のバルジへの接続と立毛筋への分化を誘導するというものである。これに加え、感覚神経複合体が結合するバルジ上部の基底膜が、nephronectinファミリーメンバーであるEGFL6で高度に特殊化されていることを見出している（図1）。これらの知見を基盤とし、本研究ではEGFL6の役割を切り口として、皮膚感覚神経複合体と毛包幹細胞との相互作用を制御する機構の理解を目指した。

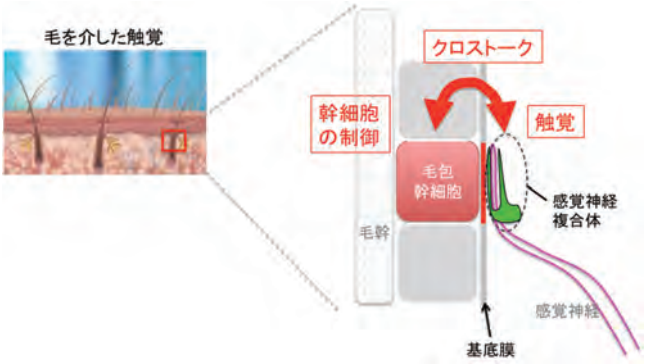


図1　特殊化された基底膜を介した皮膚感覚神経

2. 実　験

2. 1. EGFL6抗体の作製

マウスEGFL6蛋白質を特異的に認識する抗体を作製した。抗体作製に用いる抗原を得るため、EGFL6たん白質のN末端部を欠くm*Egfl6*-Mucin-MAM-Myc-Hisコンストラクトを作製し、293細胞へ導入した後、培地への組換え蛋白質の分泌を確認した。培地に分泌されたEGFL6蛋白質を、ニッケルアフィニティカラムにより精製した。精製EGFL6をウサギに免疫し、免疫組織染色及び、ウェスタンブロッティングでEGFL6を特異的に認識する抗血清を得た。抗原アフィニティカラムを用い、抗血清からEGFL6蛋白質に特異的に結合するIgGを精製した。染色パターンの

Role of the regionally specialized basement membrane in the interdependence between skin sensory nerves and hair follicle stem cells
Hironobu Fujiwara
Tissue Microenvironment, RIKEN Center for Developmental Biology

特異性は、*Egfl6* ノックアウトマウスにおける染色性の消失によって確認した。

2. 2. EGFL6 の局在解析

上記方法で作製したラビット抗マウスEGFL6抗体により、発生期から成体にかけてのEGFL6の局在の変化を解析した。胎生14.5日(E14.5)，E16.5，E18.5，生後1日(P1)，P5，P49のマウス背部皮膚凍結切片を、毛包幹細胞マーカーであるケラチン15の抗体とともに染色した。

2. 3. 皮膚３次元イメージング法を用いたEGFL6の局在解析

毛包とその付属器官(立毛筋、感覚神経など)の相互作用部位は空間的に非常に限局されており、かつ複雑な立体構造を取る。このような解剖学的構造を正確に把握するには、2次元的な組織切片解析から脱却し、3次元的組織学を可能とする方法論の確立が必須である。ここでは、毛包、EGFL6、そして感覚神経複合体の3者の局在を、3次元的に高精度で同時に捉えることができる「皮膚3次元イメージング法」を確立した。表皮と真皮を含む皮膚を切り出し、4%パラホルムアルデヒド(PFA)で1－3時間固定し、皮膚ホールマウント標本とした。毛包、EGFL6、感覚神経複合体を長時間の抗体染色により標識し、組織の透明化を施した後、共焦点顕微鏡により100枚程度のZ-stack画像を取得した。3次元画像解析ソフトImarisによりZ-stack画像を3次元的に再構成し、毛包 - 知覚神経接続部の3次元高精度画像を得た。

2. 4. *Egfl6* ノックアウトマウスにおける感覚神経複合体の構造解析

感覚神経複合体の構造と配置におけるEGFL6の役割を検討するため、*Egfl6* ノックアウトマウスにおける感覚神経複合体を上記3次元イメージング法で可視化し、その構造と配置の変化を、定量的解析を交えて検討した。

2. 5. 皮膚感覚神経の電気生理

8－12週齢のマウス後ろ足から、感覚神経束を損じないようにして皮膚を切り出した。テストチャンバーに皮膚を固定し、32℃のクレブス溶液に浸した。Aδ-LTMR（low-threshold mechano-receptor）神経を同定し、電極を接続した。神経活動電位はDAPSYSデータ取得システムで解析した。皮膚への触覚刺激は、Kleindiek nanotechnik社のpiezo-controlled micromanipulatorを用い、4~1280μmの範囲でプローブを移動させることで、皮膚に組織の歪みを生じさせた。

3. 結　果

3. 1. 毛包発生におけるEGFL6沈着パターンの変化

我々は先行研究において、EGFL6が成体マウス背部皮膚毛包のバルジ上部に特異的に沈着することを見出している[2)]。ここでは、独自に開発したEGFL6抗体を用いて、発生期におけるEGFL6蛋白質の局在変化を詳細に解析した。毛包形成が始まる前のマウス胎仔皮膚では（E14.5)、EGFL6は表皮と真皮を区切る基底膜に一様に存在した(図2)。毛包形成が始まると（E16.5 － 18.5)、毛芽と毛乳頭

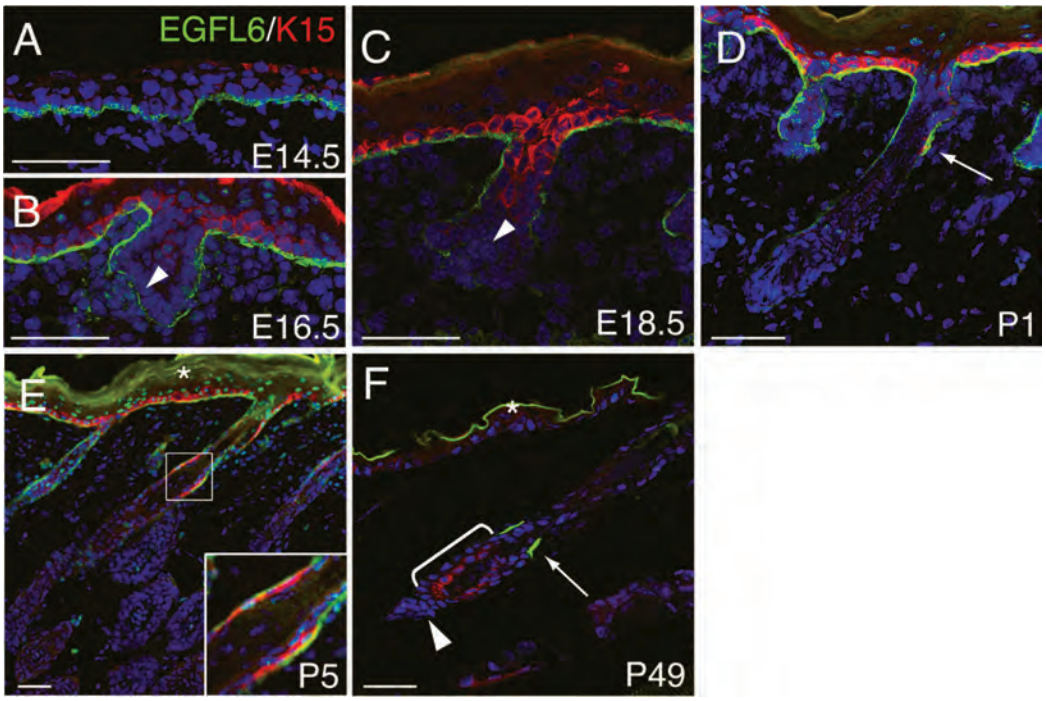


図２　マウス背部毛包におけるEGFL6蛋白質の局在。凍結組織切片をEGFL6抗体（緑）と毛包幹細胞マーカーであるKeratin15の抗体（赤)で染色した。矢尻は毛包と毛乳頭の接続部を示す。バーは50μm。

を区切る基底膜からは消失し、表皮と真皮を区切る基底膜と毛包の幹部を覆う基底膜に局在した。毛包発生の後期には（P1, 5）毛包幹細胞が存在する毛包バルジ部に局在した（矢印）。バルジ部のEGFL6は、成体（P49）では消失し、バルジ上部にその沈着部は移動した（矢印）。このように、EGFL6の存在部位は基底膜領域に限局されながらも、その局在は発生段階に応じてダイナミックに変化することが明らかとなった。成体になりEGFL6 の局在がバルジ上部に限局されると、毛包の成長サイクルに関わらず、EGFL6の沈着部は固定された。

3. 2. EGFL6と感覚神経複合体との共局在

バルジ上部には機械刺激を感知する感覚神経複合体が接続される[3]。そこで、成体毛包において、EGFL6が感覚神経複合体と共局在するかどうかを検討した。毛包の感覚神経複合体は、神経マーカーβ III-tubulinで染色される複数種類の低閾値機械感受性神経（Low threshold mechano-receptors; LTMRs）の軸索終末が、nestin陽性の終末シュワン細胞の突起にサンドイッチされることにより形成される。感覚神経複合体とEGFL6の解剖学的構造は高度な3次元構造を形成することが予想されたため、ここでは、新たに開発した皮膚3次元高解像度イメージングにより、EGFL6の局在パターンを詳細に解析した。先行研究では、イメージングの解像度の低さから、EGFL6がバルジ上部に連続的な帯状の染色パターンを示したが[2]、改良された解析法では、EGFL6は毛包長軸方向の柵状ストライプパターンとして沈着していることが示された（図3）。また、マウス背部皮膚には形態的に異なるGuard, Awl/Auchene, Zigzagと呼ばれる3種類の毛包が存在するが、全ての毛包のバルジ上部でEGFL6の柵状ストライプパターンが観察された。

EGFL6、β III-tubulin、nestinの共染色から、EGFL6は、感覚神経とnestin陽性の終末シュワン細胞がバルジ上部に到達した後に、終末シュワン細胞の突起部の外周に沈着することが示された（図4）。特徴的なEGFL6のストライプパターンは、終末シュワン細胞がフォーク状構造を完成させてから形成されることも明らかとなった。また、蛍光染色像と電子顕微鏡写真の解析より、EGFL6は感覚神経とシュワン細胞の両者に接触する可能性が示唆された。

3. 3. *Egfl6* ノックアウトマウスにおける感覚神経複合体の構造と配置の変化

これまでの解析により、EGFL6が感覚神経複合体と高度に共局在していることが明らかとなった。ここでは、EGFL6が終末シュワン細胞と感覚神経の形態及び配置の制御に関わるかどうかを、*Egfl6* ノックアウトマウスを用いて解析した。まず、毛包あたりの終末シュワン細胞の数を数えたところ、*Egfl6* ノックアウトマウスにおいてその数が有意に減少していることが明らかとなった（図5）。次に、終末シュワン細胞の突起部の幅及び各突起の長さを定量解析したところ、突起部の幅には有意な差は認められなかったが、突起の長さが減少していることが示された。終末シュワン細胞の形態変化をいくつかの項目に分けて解析し、その結果をスコア化したところ、*Egfl6* を欠失しているシュワン細胞では、より多くの細胞で形態的な変化が観察されることが明らかとなった。

次に、感覚神経の形態変化を検討した。Zigzag型毛包は、TrkB陽性のAδ-fiberと、Ret陽性のC-fiberから構成される。それぞれの本数と長さに変化は認められなかったが、軸索終末のパラレル構造が乱れ、交差を形成している軸索終末の数が有意に増加した（図6）。これらの結果から、EGFL6が感覚神経複合体の構造形成に重要な役割を果たしていることが示された。

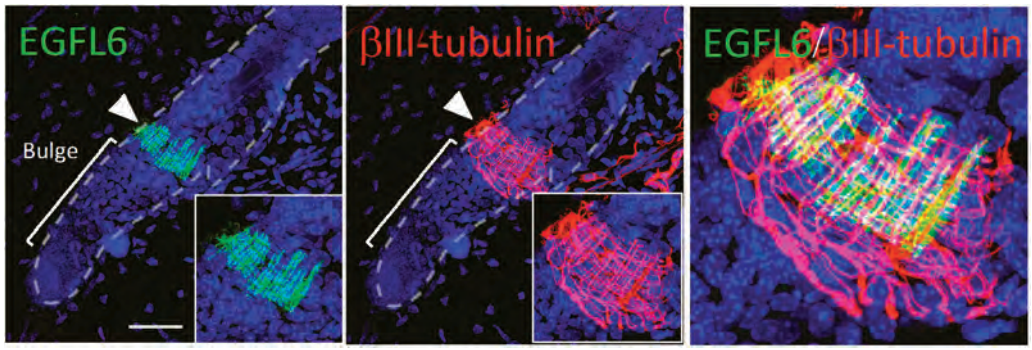


図3　皮膚3次元高解像度イメージングにより可視化されたEGFL6と感覚神経終末。マウス背部皮膚のホールマウント標本をEGFL6抗体（緑）と神経マーカーである βIII-tubulinの抗体（赤）で染色した。矢尻はバルジ上部を示す。バーは50μm。

3. 4. *Egfl6* ノックアウトマウスにおける触覚機能の低下

成体マウスの後肢から皮膚組織を切り出し、皮膚に機械刺激を与えた際のAδ-fiber感覚神経の活動電位を測定した。Kleindiek piezo-controlled micromanipulatorに取り付けたプローブを、皮膚組織表面に接触させ、プローブをrostral-caudalの方向に4~1280 μmの範囲で動かすことで、皮膚に機械的刺激を与えた。その結果、EGFL6ノックアウトマウスからの皮膚では、低度の機械刺激に対する活動電位のスパイクの数が顕著に減少していた（図7）。一方、機械刺激の強度を増すと、その差は消失した。この結果から、感覚神経複合体周囲に局在するEGFL6は、比較的軽い触覚刺激の受容に必須であることが示された。

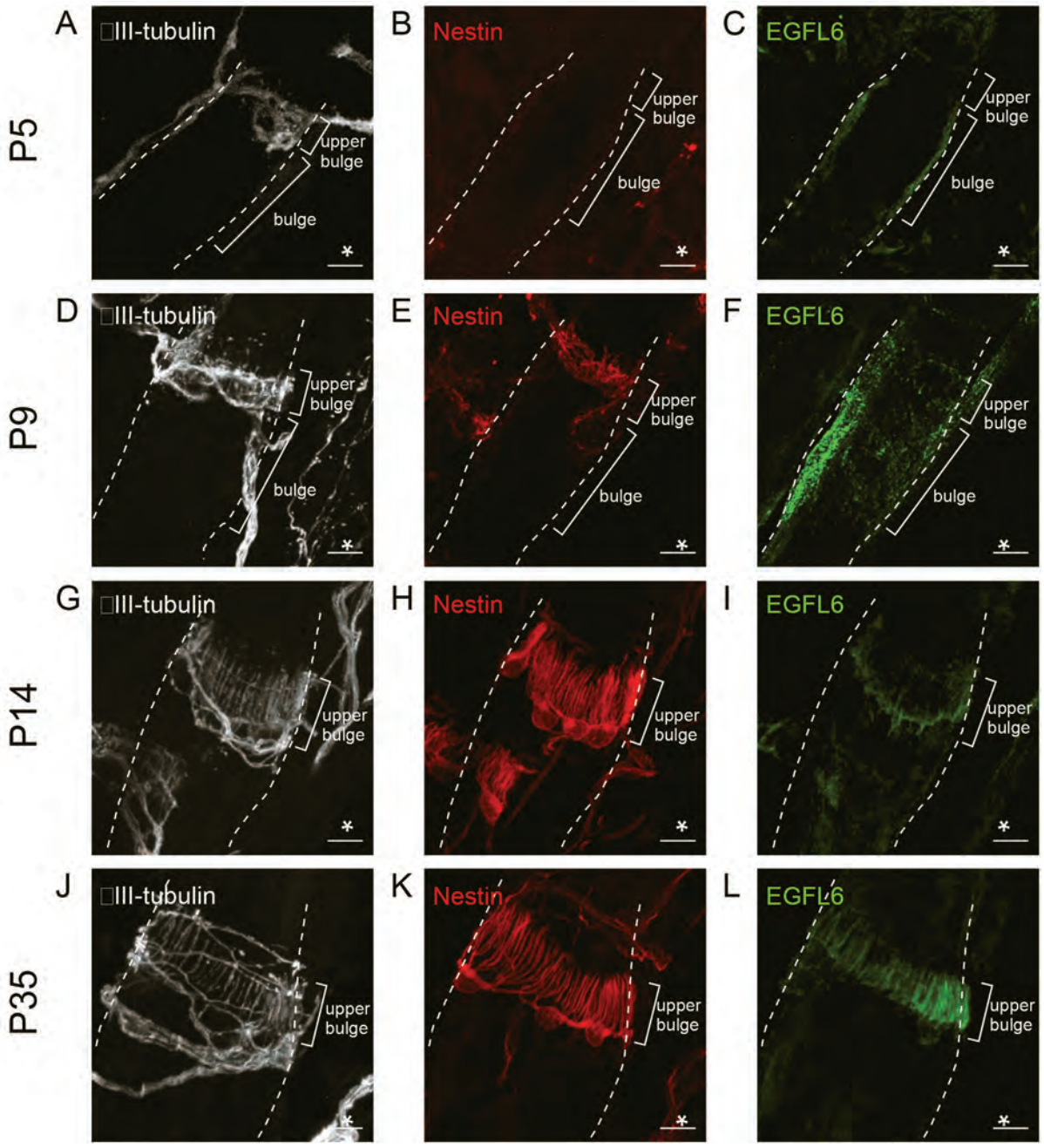


図4　マウス感覚神経終末の構成因子の発生順序。マウス背部皮膚のホールマウント標本をβIII-tubulinの抗体（白）、nestin抗体（赤）、EGFL6抗体（緑）とで共染色し、3次元画像を再構成した。

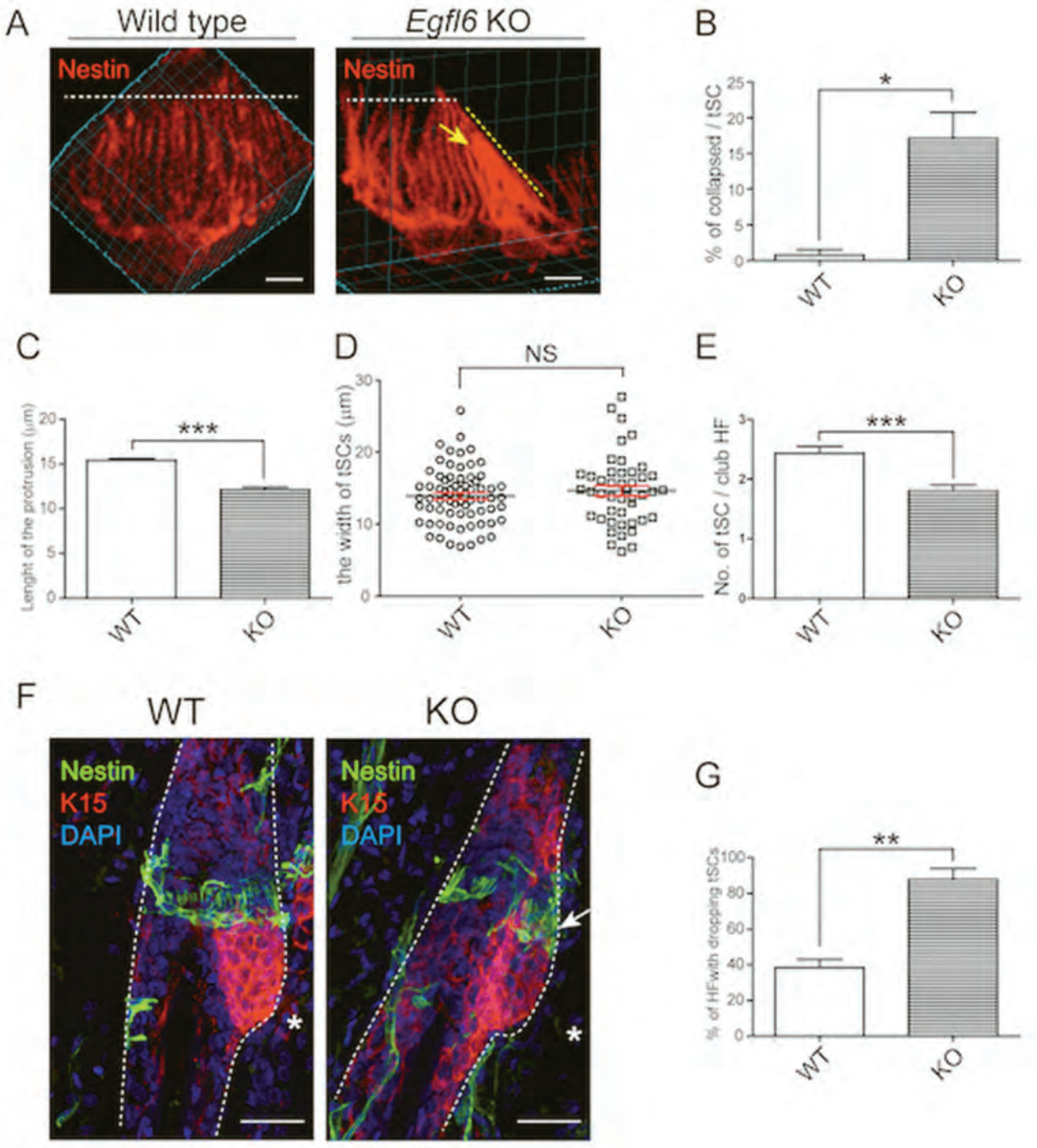


図5　*Egfl6* ノックアウトマウスにおける終末シュワン細胞の形態変化。A）nestin 染色により終末シュワン細胞の形態を可視化した。B) 終末シュワン細胞の形態異常をスコア化した。C－E) 終末シュワン細胞の突起長、細胞体の幅、毛包当たりの細胞数を計測した。F）K15 との共染色により、終末シュワン細胞の配置を検討した。G）K15 陽性部に異所性に位置する終末シュワン細胞を持つ毛包の割合。

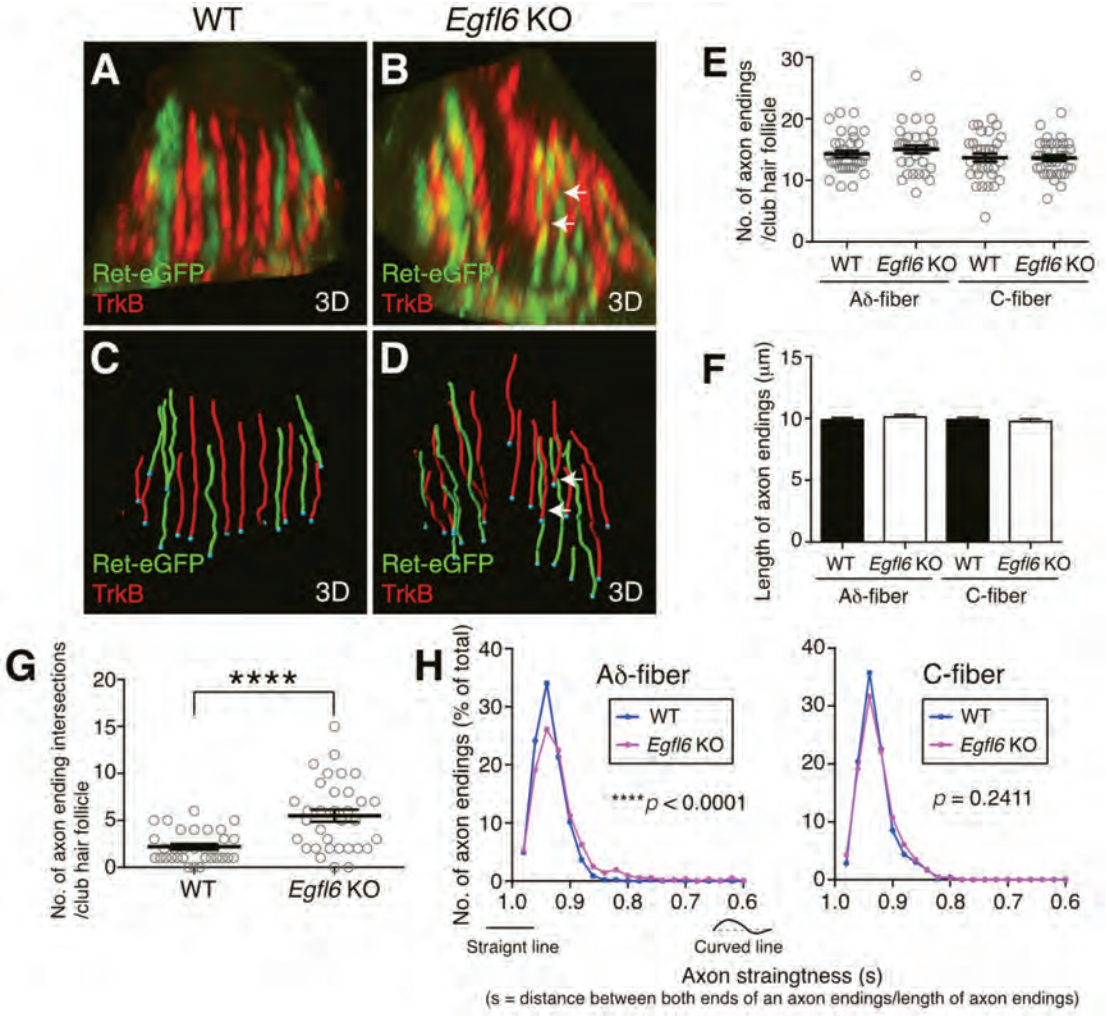


図6　*Egfl6* ノックアウトマウスにおける感覚神経終末の形態変化。A － D）Ret-eGFP と TrkB 染色により Aδ-fiber と C-fiber 神経終末の形態を可視化した。E）毛包当たりの軸索終末の数を定量した。F）軸索終末の長さを定量した。G）軸索終末の交差点の数を定量した。H）軸索終末の直線性を定量した。

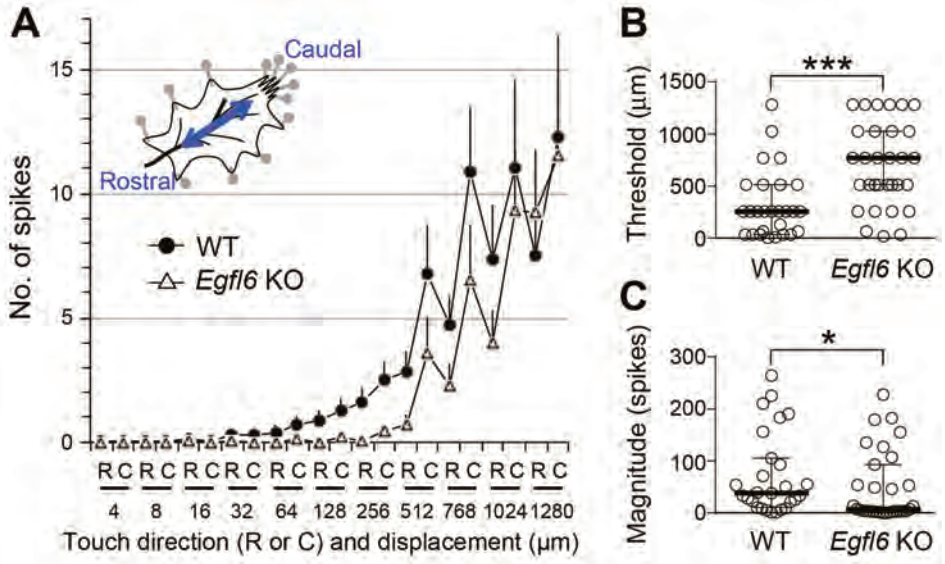


図７　皮膚を機械刺激した際の Aδ-fiber 活動電位の測定。A）皮膚組織に機械刺激を与えた際の活動電位の数を定量した。Kleindiek マニピュレータに取り付けたプローブを皮膚組織に接触させ、Rostral-Caudal 方向に 4~1280μm の距離移動させた。B）活動電位を発生させるために必要な機会刺激の閾値を測定した。C）1回の機械刺激プロトコル（4~1280μm）で誘発される活動電位の総数。

4. 考　察

毛包上皮と間充織組織との相互作用には、主に1. 毛包−毛乳頭相互作用、2. 毛包−立毛筋相互作用、3. 毛包−感覚神経複合体相互作用がある[4]。これら毛包と周囲の間充織組織との接続及び相互作用は、毛成長、立毛、体温調節、感覚受容などの毛包の高次機能の発現に不可欠である。しかし、これら異種組織間の相互作用の分子基盤は殆ど理解されていなかった。本研究では、この中でも特に報告がなかった 3. 毛包−感覚神経複合体相互作用の理解につながる成果が得られた。すなわち、毛包幹細胞から分泌されると考えられるEGFL6が（data not shown)、バルジ上部に投射される感覚神経複合体と互いに組み合わさるようにストライプ構造を形成することにより、感覚神経複合体の形態、さらには触覚受容能を制御することが示された。これは、毛包の長軸に沿ってコンパートメント化される上皮系毛包幹細胞が、神経細胞に最適化された細胞外微小環境、つまりニッチを提供していることを示すものである。

EGFL6のバルジ上部への沈着は、感覚神経とシュワン細胞がパラレルパターンを形成した後に出現する（図4)。よって、EGFL6マトリックスは、感覚神経やシュワン細胞のストライプパターンの形成を誘導するというよりは、むしろ一度形成された構造の機能化のために作られるフレームワーク様の役割を持つと考えられる。EGFL6のノックアウトマウスにおいて、シュワン細胞と軸索終末の形態に異常が現れるが、これは上記の仮説をサポートするものである。毛包は、皮膚の伸展などに伴う強い変形にさらされるが、そのような条件においても正確な機械刺激の受容機能と構造の維持が求められる。そのために、感覚神経終末部は自身の機能に特化した細胞外マトリックス構造を周囲に形成している可能性が考えられる。

発生期を通したEGFL6の局在パターンの解析より、EGFL6は表皮と間充織を区切る基底膜様の染色パターンを示した。これは、EGFL6が基底膜蛋白質として機能することを示唆している。但し、EGFL6の基底膜内での局在は、毛包器官形成の過程でダイナミックに変化し、発生初期においては感覚神経複合体が存在しない部位において広範に沈着が認められる。よって、EGFL6は複数の異なる生物学的現象を、異なる細胞種に働きかけることにより仲介していることが予想される。EGFL6の機能を更に深く理解するには、EGFL6のノックアウトマウスの解析に加え、EGFL6を認識する細胞表面レセプターやEGFL6と結合する細胞外マトリックスや可溶性因子の同定が必要である。EGFL6のレセプターとしてはインテグリンα8β1が報告されているが[5]、皮膚においては両者の局在はほとんど一致しない（data not shown)。今後は、生化学的・細胞生物学的な解析を通して、EGFL6の真のレセプターの同定を進める必要がある。

（文献）

1） Brownell, I., Guevara, E., Bai, C. B., Loomis, C. A., and Joyner, A. L. (2011) Nerve-derived sonic hedgehog defines a niche for hair follicle stem cells capable of becoming epidermal stem cells. *Cell stem cell* **8**, 552-565

2） Fujiwara, H., Ferreira, M., Donati, G., Marciano, D. K., Linton, J. M., Sato, Y., Hartner, A., Sekiguchi, K., Reichardt, L. F., and Watt, F. M. (2011) The basement membrane of hair follicle stem cells is a muscle cell niche. *Cell* **144**, 577-589

3） Li, L., Rutlin, M., Abraira, V. E., Cassidy, C., Kus, L., Gong, S., Jankowski, M. P., Luo, W., Heintz, N., Koerber, H. R., Woodbury, C. J., and Ginty, D. D. (2011) The functional organization of cutaneous low-threshold mechanosensory neurons. *Cell* **147**, 1615-1627

4） Watt, F. M., and Fujiwara, H. (2011) Cell-extracellular matrix interactions in normal and diseased skin. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**

5） Osada, A., Kiyozumi, D., Tsutsui, K., Ono, Y., Weber, C. N., Sugimoto, N., Imai, T., Okada, A., and Sekiguchi, K. (2005) Expression of MAEG, a novel basement membrane protein, in mouse hair follicle morphogenesis. *Experimental cell research* **303**, 148-159

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

信州大学大学院農学研究科
水品　善之

Many naturally occurring agents are believed to protect against ultraviolet (UV)-induced skin damage. I established an *in vitro* assay to measure cellular DNA polymerase (Pol) activity in cultured normal human epidermal keratinocytes (NHEK) by modifying Pol inhibitor activity, and screened 10 tropical plant extracts for Pol activity enhancement. I found that the fruit of Rose Myrtle (*Rhodomyrtus tomentosa*) was the strongest enhancer of Pol activity in UVB-irradiated NHEK. I next sought to examine the effect of the Rose Myrtle extract active component, piceatannol, on UVB-induced damage and inflammation in cultured NHEK. The protective effect of rose myrtle extract and the two key components, piceatannol and piceatannol-4'-*O*-β-D-glucopyranoside, on UVB-induced damage and inflammation in cultured NHEK was investigated. The 80% ethanol extract from rose myrtle fruit with piceatannol exhibited protection of UVB-induced cytotoxicity in NHEK; however, piceatannol-4'-*O*-β-D-glucopyranoside exhibited no protection, as determined by a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. This extract and piceatannol reduced the production of UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimers and enhanced the cellular enzyme activity of the DNA polymerases in UVB-irradiated NHEK, suggesting that UVB-stimulated DNA damage was repaired by the polymerases. In addition, the secretion of prostaglandin E2, which is an inflammatory mediator, was decreased. These results indicated that rose myrtle fruit extract and its key constituent, piceatannol, are potential photoprotective candidates for UV-induced skin damage.

1. 緒　言

UVB（290－320 nm）は紫外線の中でも皮膚に対する影響が大きいとされており、直接DNAに作用して損傷を引き起こすとともに、他の光吸収物質を介して活性酸素種を発生させることで、紅斑や色素沈着などさまざまな影響を及ぼすことが知られている。また、紫外線の長期暴露は光老化を引き起こし、シミ、シワ、たるみ、乾燥の原因となる[1]。

このような紫外線の皮膚に対する有害作用は一般的に広く認識されており、サンスクリーン剤（すなわち物理的遮蔽剤）の使用が普及している。しかし、この方法だけでは紫外線による損傷を完全に防ぐことはできないと考えられており、紫外線によるDNA損傷などは最少紅斑量の10分の1でも起こること[2]やサンスクリーン剤を使用して紅斑が現れていなくても、免疫抑制やマトリックスメタロプロテアーゼの活性化が起こることが示されている[3]。そこで、紫外線を物理的に遮蔽する方法だけでなく、皮膚本来がもつ防御能力を上げる防御法を開発できないかと考えた。生体（細胞）に内在する損傷DNAを修復する酵素群のひとつであるDNA修復型DNA合成酵素（DNAポリメラーゼ、Polと略す）に注目した。

Screening for suppression of inflammatory responses against UVB-induced DNA damage in skin cells from natural plant extract, and analysis of its suppressive mechanism

Yoshiyuki Mizushina
Graduate School of Agriculture, Shinshu University

Polは、ヒトをはじめとする高等真核生物ではゲノム解析などによって、数多くの分子種が近年に次々と発見されて、2015年現在では、15種類のPol分子種が報告されている（Table 1）[4-7]。Polの機能は、主にDNAの複製（コピー）、損傷DNAの修復、DNAの組換えの3つであり、各Pol分子種がこれらの機能を分業していると考えられている[4, 5]。ミトコンドリアのDNA合成（複製と修復）はPolγが担当し、残りの14種類のPolは細胞核のDNA合成を行う。15種類のPol分子種は、このような機能の類似性やアミノ酸配列の相同性からA、B、X、Yの4つのファミリーに分類されている[4, 5, 8]。さらに、*in vitro*における酵素反応は塩（KCl）によって阻害されるPol分子種（＝DNA複製型のPolα、δ、ε）と、塩の存在で活性に影響を受けないか、むしろ活性化するPol分子種（上記の3つ以外）に分かれる。

これまでに私は、各Pol分子種の活性がある精製酵素を準備し、*in vitro*系のPol阻害活性測定法を開発して[9-11]特許を取得した[12]。この測定法を応用して、Pol精製酵素の代わりに皮膚上皮系の角化細胞（ケラチノサイト）を用いて、紫外線を照射した細胞の抽出液を調製し、細胞内のPol活性を測定する技術を立ち上げた。そして、UVB照射によってヒト皮膚角化細胞内のPol活性が上昇することを確認した。さらに、この細胞内Pol活性を上昇させる天然物があるか探索（スクリーニング）した。その際の探索源は熱帯植物抽出物とした。なぜならば、熱帯地方は日々強い紫外線に暴露されており、そこに生息する植物は常にDNA損傷が起こっている。熱帯植物には、内在性の損傷DNA修復系、すなわち修復型Polを活性化させる物質が存在すると考えられるからである。

本研究では、熱帯植物抽出物から正常ヒト新生児表皮角

化細胞（Normal Human Epidermal Keratinocytes, NHEK）内のDNA修復型Polを活性化する成分の単離・精製、化学構造の決定、紫外線ダメージ抑制メカニズムの解析を実施した。

2．実　験

2．1．NHEKの細胞培養

NHEKと増殖添加剤を含むEpilife-KG2培地（KGM）はクラボウから購入した。NHEKを75cm^{2}シャーレに3×10^{5}個/5mL KGMを播種して、37℃、5％ CO_2条件下で75%コンフルエントになるまで培養した。MDSOに溶かした被験試料を最終0.05％になるように添加後、24時間培養した（Fig. 1）。培地をHank's緩衝液に交換してからUVB（0～150mJ/cm^2）を照射して、KGMに戻して2～24時間培養した。

2．2．NHEK内のPol活性測定

培養したNHEKをスクレイパーで回収して、プロテアーゼ阻害剤を含む細胞溶解緩衝液（50mM Tris-HCl（pH7.5），1mM EDTA, 5mM 2-mercaptoethanol, 15% glycerol）に溶解させた。遠心上清を回収してタンパク定量したものを細胞抽出液としてPol活性測定に使用した。

Pol反応には、基質として鋳型DNAとデオキシリボヌクレオチド（dNTP）の2つを必要とするが、*in vitro*系の本測定におけるPolの基質は、鋳型DNAとして合成DNAのpoly(dA)/oligo(dT)$_{18}$、デオキシリボヌクレオチドと

Table 1　Human Pol species

Name	Catalytic subunit		Family [a]	Function	KCl (120 mM) inhibition
	Gene	Size of protein (kDa)			
Pol α	*POLA1*	166	B	DNA replication priming	+
Pol β	*POLB*	38	X	BER and meiotic recombination	–
Pol γ	*POLG*	140	A	Mitochondrial DNA replication and repair	–
Pol δ	*POLD1*	124	B	DNA replication, NER, and MMR	+
Pol ε	*POLE*	262	B	DNA replication, NER, and MMR	+
Pol ζ	*REV3L*	353	B	TLS and mutagenesis	–
Pol η	*POLH*	78	Y	Bypass of UV radiation-induced DNA adducts, especially CPDs	–
Pol θ	*POLQ*	290	A	Defence against ionizing radiation-induced DNA damage	–
Pol ι	*POLI*	80	Y	Backup enzyme for UV radiation-induced DNA adducts and BER	–
Pol κ	*POLK*	99	Y	Bypass of bulky adducts, backup enzyme for NER	–
Pol λ	*POLL*	63	X	V(D)J recombination; possibly and joining	–
Pol μ	*POLM*	55	X	V(D)J recombination; possibly and joining	–
Pol ν	*POLN*	100	A	? (ICL repair or testis-specific function)	–
REV1	*REV1*	138	Y	TLS and mutagenesis, anchor for several Pols	–
TdT	*DNTT*	58	X	Immunoglobulin diversity at junctions of coding regions	–

BER, base excision repair; CPD, cyclobutane pyrimidine dimer; ICL, interstrand crosslink; MMR, mismatch repair; NER, nucleotide excision repair; Pol, DNA polymerase; TdT, terminal deoxynucleotidyl transferase; TLS, translesion DNA synthesis; UV, ultraviolet.
[a] In human cells, these enzymes fall into four distinct families, designated A, B, X, and Y, based on amino acid sequence.

して放射性同位元素のトリチウムで標識した［^{3}H］-dTTPを用いた（Fig. 1）。そして、Polによって重合された［^{3}H］-dTTPの放射活性を液体シンチレーションカウンターで定量することでPol活性とした[10, 11]。

2. 3. 細胞死抑制作用の評価

NHEKを48穴プレートに播種し、サブコンフルエントになるまで培養後、培地をHank's液に交換し、50mJ/cm^{2}のUVBを照射した。KGMで溶解した被験試料（溶解のため終濃度0.5% DMSOを含む、以降の実験についても同様に含む）に交換し、24時間培養後の生存率をMTTアッセイにより測定し、UVB非照射を100%、UVB照射被験試料無添加を0%となるように細胞死抑制率を計算した。

2. 4. DNA中のシクロブタン型ピリミジンダイマー（CPD）の評価

NHEKを60 mmシャーレに播種し、サブコンフルエントになるまで培養後、KGMで溶解した被験試料を各シャーレに添加し24時間培養した。培地をHank's液へ交換し、50mJ/cm^{2}のUVBを照射した。KGMで溶解した被験試料に交換し、4時間培養後、細胞をセルスクレーパーにより回収した。

回収した細胞よりQIAamp Blood Kit（QIAGEN）を用いてDNAの抽出、精製後、同濃度になるよう希釈したDNA中のCPD量を抗CPDモノクローナル抗体（コスモバイオ）を用いたELISA法により定量した。

2. 5. プロスタグランジンE_2（PGE_2）の評価

NHEKを48穴プレートに播種し、サブコンフルエントになるまで培養したのち、KGM-hydに交換し、さらに1日培養した。培地をHank's液へ交換し、50 mJ/cm^{2}のUVBを照射した後、KGM-hydで溶解した被験試料に交換し、24時間培養した。培養上清中のPGE_2量をPGE_2EIAKit（Cavman Chemical）を用いて定量した。

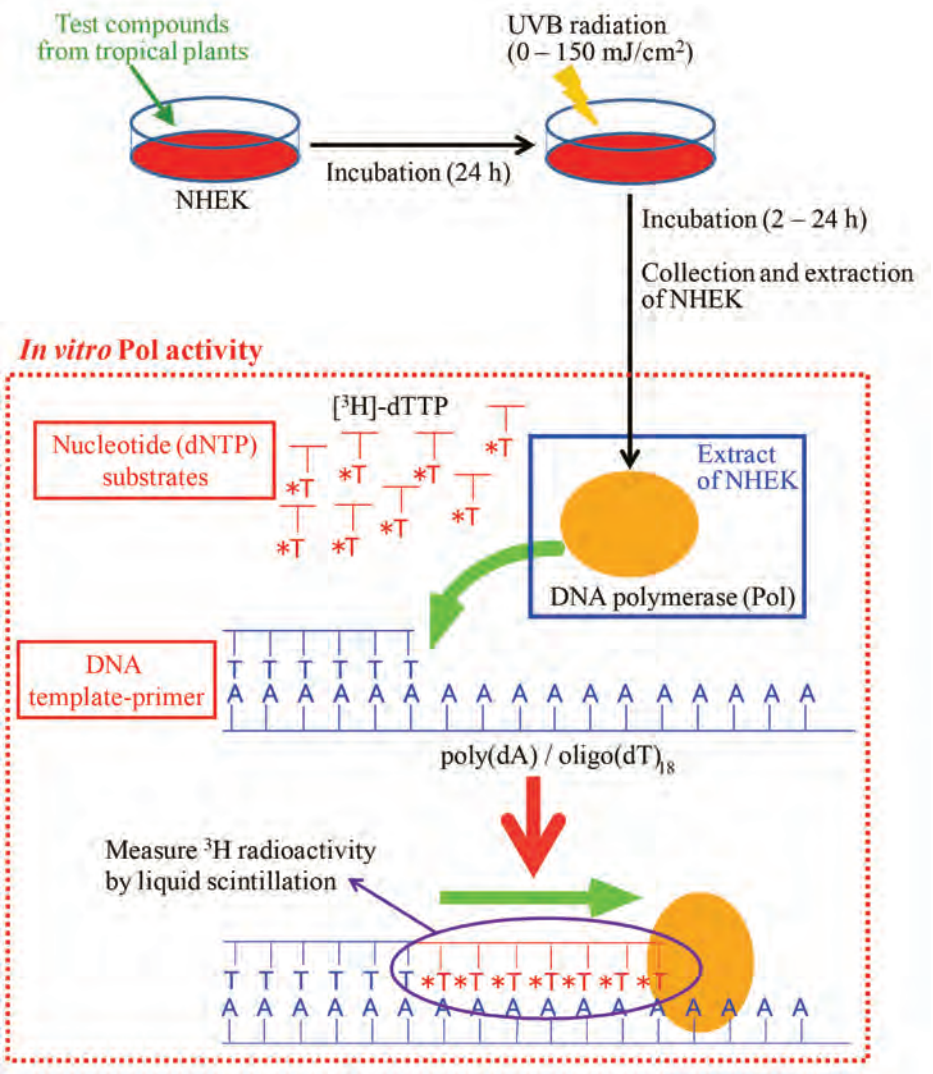


Fig. 1　*In vitro* cellular Pol activity assay using cell extract from UVB-exposed NHEK

2. 6. 統計学的検定

実験結果は平均値 ± 標準誤差により示した。また、統計学的有意差検定には、Student's t-testを用い、$p< 0.05$の場合を有意差ありと判断した。

3. 結　果

3. 1. NHEK内のPol活性測定の条件検討

NHEK内のPol活性測定系を立ち上げるにあたり、UVB照射量と照射後の培養時間の検討を行った。NHEKの細胞抽出液には塩が含まれていない。塩が無い細胞抽出液と120 mM KClを添加した場合のPol活性を比較した。前者はDNA複製型のPolα、δ、εを含む全てのPol分子種(DNA複製＋DNA修復）の活性値であり、後者はPolα、δ、εを除いたDNA修復型Pol分子種のみの活性値であると考えられる(Table 1)。

まずUVB照射後の培養時間を1時間に固定して、UVB照射量を0～150 mJ/cm^{2}の範囲で振った。UVB照射量が12.5 mJ/cm^{2}と50 mJ/cm^{2}ではPol活性の増加は見られなかったが、50 mJ/cm^{2}以上ではPol活性化が見られた（Fig. 2A)。このUVB照射によるPol活性化は、120 mM KCl有りの方が1.2倍以上高くなった。

次にUVB照射量を100 mJ/cm^{2}に固定して、UVB照射後の培養時間を2～24時間の範囲で振った。その結果、4時間培養で最も高いPol活性の増加を見出した(Fig. 2B)。

Fig. 2AではUVB照射量とPol活性化は相関しているように見えるが、150 mJ/cm^{2}照射では細胞死（アポトーシス）を誘発するため不適であると考えた。そこで、2番目にPol活性化させた50 mJ/cm^{2}が至適であると考察した。Fig. 2BからUVB照射後は4時間培養が至適であることが分かった。これらの条件でPol活性化する熱帯植物の探索を行った。

3. 2. NHEK内のPolを活性する熱帯植物の探索と活性成分の精製と同定

10種類の熱帯植物果実の抽出物（凍結乾燥後の80％エタノール抽出物）は、丸善製薬㈱から提供していただいた。UVB照射したNHEKのPolを最も活性化したのはテンニンカ（*Rhodomyrtus tomentosa*）であった。そこで、テンニンカ果実の乾燥物100 gを1 Lの80％エタノールで大量に抽出した。得られた抽出物(6.6 g)を疎水カラムクロマトグラフィー（Diaion HP-20)、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、およびHPLCにかけることにより、Pol活性化成分(1.14 mg)の完全精製に成功した。そして、NMRおよびMSで構造解析した結果、既知物質のピセアタンノール(Fig. 3)であった。

以降の実験は、市販試薬のピセアタンノールとピセアタンノールを含有しているテンニンカの80％エタノール抽出物を用いた。

3. 3. テンニンカ抽出物とピセアタンノールのNHEK内Pol活性化

Fig. 1に示したUVB照射NHEK内Pol活性測定系を用いて、テンニンカ抽出物とピセアタンノールのPol活性化を調査した。測定系の条件は、UVB（50 mJ/cm^2）照射し4時

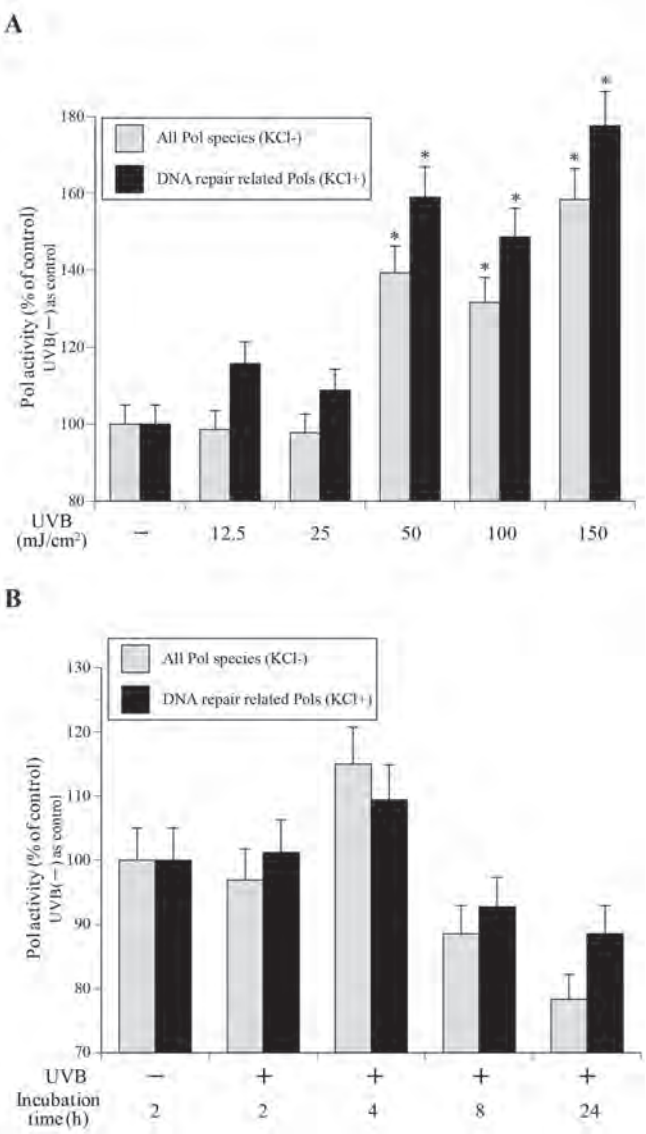


Fig. 2　Examination of cellular Pol activity in UVB-exposed NHEK. (A) Cellular Pol activity was dependent upon the level of UVB irradiation (0–150 mJ/cm^2). NHEK were cultured for 1 h after UVB irradiation. (B) Pol activity is dependent upon incubation time (2–24 h) above 100 mJ/cm^2 UVB-exposed NHEK. Gray bars and black bars are all human Pol species and DNA repair-related Pol species, respectively (the standard reaction conditions without or with 120 mM KCl, respectively). The Pol activity of vehicle control without UVB irradiation was taken as 100%. All data are expressed as mean ± SEM (n=3). *P < 0.05 compared with the UVB (−) vehicle control.

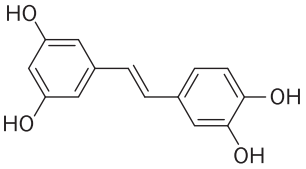


Fig. 3　Structure of purified compound 1 (piceatannol) from Rose Myrtle fruit (*Rhodomyrtus tomentosa*)

間培養した(Fig. 2)。塩(120 mM KCl)無しの全Pol分子種の活性をFig. 4A、塩有りのDNA修復型Pol分子種の活性をFig. 4Bに示す。Fig. 4A, Bは同じ傾向であり、テンニンカ抽出物(10 μg/mL)、ピセアタンノール(2 μg/mL)ともにPol活性を1.1 ～ 1.2倍上昇させた。UVB照射と併用すると1.6 ～ 2倍近くまでPol活性が増加した。この増加はUVB照射と被験試料の添加の相加効果ではなく相乗効果であった。ピセアタンノールはテンニンカ抽出物の5分の1の添加濃度であったがPol活性化が大きかった。ピセアタンノールの配糖体であるpiceatannol-4'-*O*-β-D-glucopyranosideにはPol活性化作用は見られなかった(データ示さず)。

3. 4.　テンニンカ抽出物とピセアタンノールのUVB照射NHEKの細胞毒性

50 mJ/cm^{2}のUVB照射によるNHEKへの影響を調査した。NHEKは、UVB照射によって細胞生存率が若干低下した。しかし、アポトーシスは誘導していなかった(データ示さず)。そこへテンニンカ抽出物とピセアタンノールを添加すると濃度依存的に細胞生存率が高くなった(Fig. 5)。

3. 5.　テンニンカ抽出物とピセアタンノールのUVB照射NHEKのDNA修復能

UVBによる直接的なDNA損傷に対する作用を検討するために、主要なDNA損傷であるCPDに着目し、NHEKを用いてUVBによって生成するCPDの低下作用を検討した。その結果、Fig. 6のようにピセアタンノールとテンニンカ抽出物にはUVB照射4時間後におけるCPD量の低下作用が観察された。その強さはピセアタンノールの方が顕著であった。

3. 6.　テンニンカ抽出物とピセアタンノールのUVB照射NHEKのプロスタグランジンE$_2$ (PGE$_2$) 産生への影響

紫外線による皮膚の炎症に対する作用検討のため、炎症性メディエーターとしてPGE$_2$に着目し、NHEKを用いてUVB照射によるPGE$_2$産生に対するテンニンカ抽出物およびピセアタンノールの効果を検討した。その結果、Fig. 7のように抑制作用を示した。その効果は、1.0 μg/mLのピセアタンノールで顕著であった。

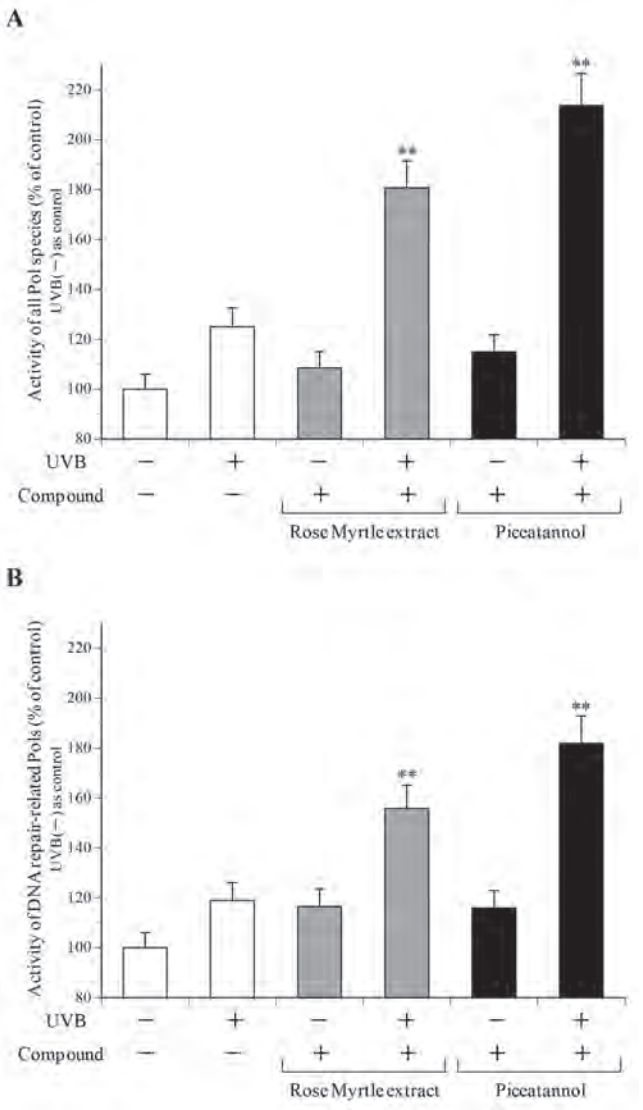


Fig. 4　Effect of Rose Myrtle extract and piceatannol on NHEK Pol activity with or without UVB irradiation. (A) Pol activity of all human Pol species using standard reaction conditions without KCl. (B) Pol activity of DNA repair-related Pol species using standard reaction conditions with 120 mM KCl. NHEK were incubated for 24 h with or without each compound (10 μg/mL Rose Myrtle extract and 2 μg/mL piceatannol) before UVB (50 mJ/cm^2) irradiation. Pol activity of vehicle control without UVB irradiation was taken as 100%. All data are expressed as mean ± SEM (n=3). $^{**}P < 0.01$ compared with the UVB (−) vehicle control.

4. 考　察

テンニンカ果実エキスのNHEKに対するUVB誘導細胞死抑制作用について、エキスより単離した成分について同様の作用が認められるか試験したところ、ピセアタンノールに抑制作用が確認されたことから活性成分のうちの一つであると考えられる。テンニンカ抽出物50 μg/mL中に含まれるピセアタンノールの濃度は、その含量から約0.1

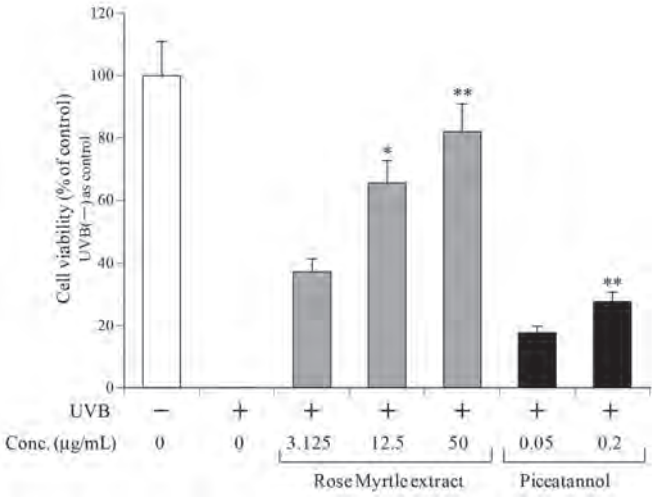


Fig. 5 Effect of Rose Myrtle extract and piceatannol on cell viability of UVB-exposed NHEK. NHEK were irradiated with UVB (50 mJ/cm^2), and treated with each compound at the indicated concentrations. MTT assays were used to evaluate living cells 24 h after treatment. The cell viability of vehicle control with or without UVB irradiation was taken as 0% or 100%, respectively. All data are expressed as mean ± SEM (n=6). *P < 0.05 and **P < 0.01 compared with the UVB (−) vehicle control.

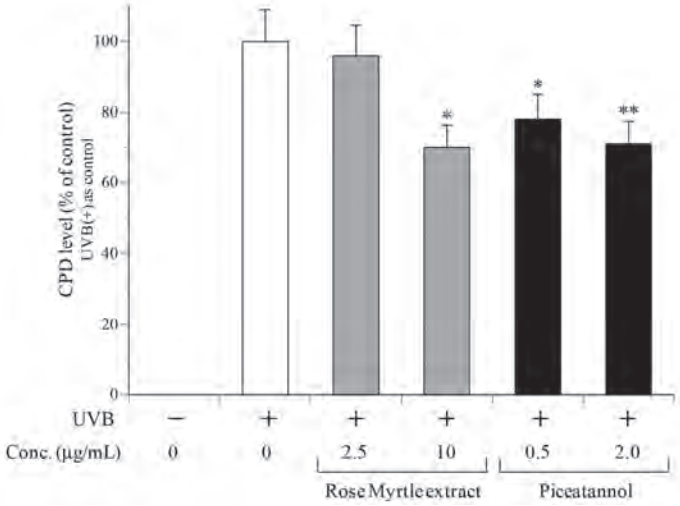


Fig. 6 Effect of Rose Myrtle extract and piceatannol on UVB-induced CPD production in NHEK. NHEK were incubated with each compound at the indicated concentrations before and after UVB (50 mJ/cm^2) irradiation. CPD was quantitatively evaluated by DNA-ELISA. CPD production by vehicle control with or without UVB irradiation was taken as 100% or 0%, respectively. All data are expressed as mean ± SEM (n = 6). *P < 0.05 and **P < 0.01 compared with the UVB (+) vehicle control.

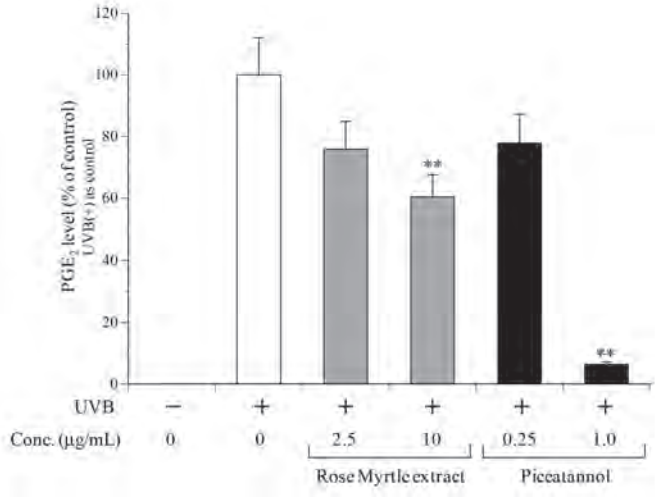


Fig. 7. Effect of Rose Myrtle extract and piceatannol on UVB-induced PGE_2 production in NHEK. NHEK were incubated with each compound at the indicated concentrations after UVB (50 mJ/cm^2) irradiation. Supernatant PGE_2 was quantitatively evaluated by ELISA. PGE_2 production by vehicle control with or without UVB irradiation was taken as 100% or 0%, respectively. All data are expressed as mean ± SEM (n = 5). **P < 0.01 compared with the UVB (+) vehicle control.

μg/mLと考えられる。実際にピセアタンノールについて0.1μg/mLでは試験していないが、その上下の濃度における試験結果より、ピセアタンノールのみがテンニンカ抽出物の活性を担っているとは考えられないが、主要な成分ではあると考えられる。テンニンカ抽出物中には、その他の単離できていない成分が含まれると考えられ、ピセアタンノールをはじめ、多種の活性成分が相乗•相加効果を発揮し、成分単独では得られない高い作用を示すであろう。

我々の皮膚は常に外界からの物理的刺激、化学的刺激、温度変化、そして紫外線曝露など様々な刺激に晒されている。その一つである紫外線曝露はシミ・シワ・たるみといった皮膚の形態的変化(光老化)、炎症及び皮膚ダメージの長期蓄積による皮膚がん前駆症を誘因し放置すると皮膚がんなどの病気を引き起こす原因となる[13]。細胞は環境要因による刺激で生じたDNA損傷の増大に対してDNA修復を行うが、DNA修復が追いつかなくなった細胞はがん化するかアポトーシス(プログラム細胞死)により除去される。光老化や発がんの直接的原因は、紫外線によって引き起こされるCPDの生成によるDNA損傷と活性酸素種によるDNA塩基の酸化損傷(8-oxo-dG)であり、ともにPol(特にDNA修復型Pol分子種)の塩基の取り込みエラーにより突然変異を誘発する原因となり得る。従って、光老化や発がんを未然に防ぐためには、これらのDNA損傷の発生を抑えること、すなわちDNA損傷修復作用を促進させることが非常に有効であると考える。皮膚細胞内のDNA修復型Pol活性を増大(活性化)させることができれば紫外線暴露によるDNA損傷は直ちに修復されて正常な状態を維持できる。

色素性乾皮症(XP)は重篤な光過敏症とPolη欠損に伴うDNA修復異常に関連した発がんを特徴とする常染色体劣勢遺伝疾患である。XPはさまざまなDNA修復に関連した遺伝子の変異により8つのグループに分けられる(A〜Gとバリアント体)。このXP原因遺伝子であるPolηは、ヌクレオチド除去修復(NER)遺伝子に属しているため(Table 1)、XP患者の傷害を受けた細胞はCPDを取り除くことができず、高頻度な発がんに繋がる[14]。また、XP患者では紫外線照射により、光過敏反応として重篤な炎症を起こすことは有名である。これらのことから、XP患者ではCPDのようなDNA損傷の修復ができないことによって、炎症が悪化することを示している。つまりCPDが炎症の引き金である可能性が考えられる。また、XPA患者においてUV照射後の重篤な炎症部位で高濃度のPGE_2が観察されるという報告から[15]、CPDはPGE_2産生を誘導する可能性が示唆された。よってCPDの減少は抗炎症につながると考えられ、今回の試験におけるテンニンカ抽出物とピセアタンノールのPGE_2産生抑制作用のメカニズムの一序として、CPD量の減少が考えられる。

5. 総　括

本研究では、紫外線防御を単なるサンスクリーン剤で行うという従来の考えだけでなく、DNA修復型Pol活性化という生物化学的なアプローチによって防御する「non-sunscreen photoprotection」という新しい観点を取り入れ、植物エキスの紫外線による肌への影響を抑える作用と肌本来が持つ防御作用を高める作用について、その有効成分の探索とともに検討した。

熱帯植物のうち、テンニンカ果実の80％エタノール抽出物に含まれるピセアタンノールは、ヒト表皮角化細胞においてPol活性化とUVBダメージ抑制作用を有し、その作用メカニズムとしてCPDの減少作用といったDNAダメージ抑制作用が示唆された。また、PGE_2のような炎症要因を抑制する作用も認められた。これより、テンニンカ抽出物やピセアタンノールのCPDのようなDNA損傷の抑制に基づいた抗炎症作用のメカニズムの可能性について考察できた(Fig. 8)。

以上の結果から、テンニンカ抽出物は、その成分であるピセアタンノールの働きにより、DNA修復型Pol活性化に伴うDNA損傷作用というアプローチにより、紫外線による細胞へのダメージを抑制することで紅斑のような短期的な症状や光老化のような長期的な症状を抑制する植物素材であると考えられ、日常的に使用する基礎化粧品への応用が期待される。さらに本研究の成果として、紫外線防御を単なるサンスクリーン(紫外線遮蔽)剤で対処するという従来の概念とは異なった皮膚細胞本来が持つ紫外線防御能力を高める『ノン・サンスクリーン剤』の開発が期待できる。

謝　辞

本研究を実施するにあたり、研究助成を賜りまし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を申し上げます。特に、本助成期間中に大学を異動しましたが、スムーズな手続きに携わってくださいました財団事務局の川端徹様に深謝いたします。

本研究の一部は、すでに次の学術論文として公表している。

Shiratake S, Nakahara T, Iwahashi H, Onodera T, *Mizushina Y, : Rose myrtle (*Rhodomyrtus tomentosa*) extract and its component, piceatannol, enhance the activity of DNA polymerase and suppress the inflammatory response elicited by UVB-induced DNA damage in skin cells, Mol. Med. Rep., 12, 5857-5864, 2015. (*Corresponding author)

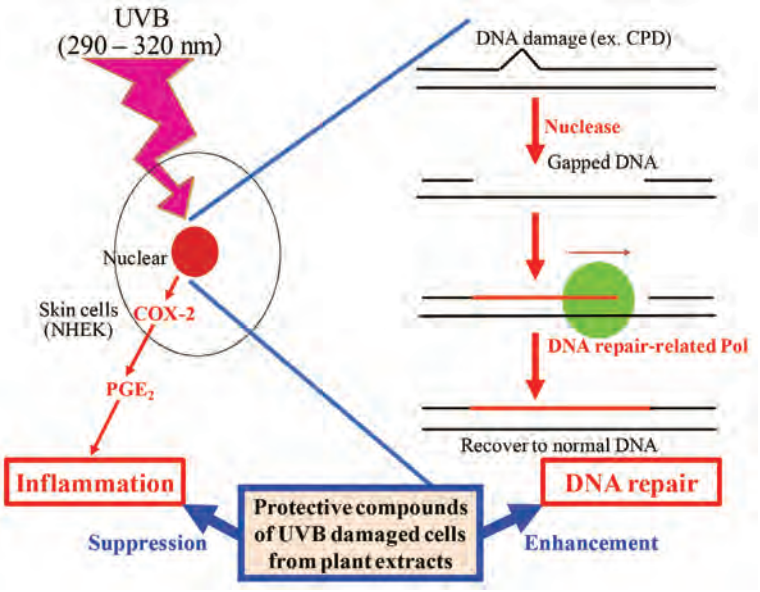


Fig. 8　The relationship between enhanced DNA repair-related Pol activity and suppression of inflammation in UVB-irradiated skin cells treated with plant extract.

（引用文献）

1）武田克之，原田昭太郎，安藤正典，監修，：化粧品の有用性評価技術の進歩と将来展望，薬事日報社，125-143, 2001.

2）栗原浩司，：フレグランスジャーナル，9, 83-88 2002.

3）Matsui MS, ：第9回光老化研究会講演要旨集，34, 2008.

4）Hubscher U, Maga G, Spadari S, : Eukaryotic DNA polymerases, Annu. Rev. Biochem., 71, 133-163, 2002.

5）Bebenek K, Kunkel TA, In: DNA Repair and Replication Advances in Protein Chem., (Yang W, eds), Elsevier, San Diego, 69, 137-165, 2004.

6）Takata K, Shimizu T, Iwai S, Wood RD, : Human DNA polymerase N (POLN) is a low fidelity enzyme capable of error-free bypass of 5S-thymine glycol, J. Biol. Chem., 281, 23445-23455, 2006.

7）Yamtich J, Sweasy JB, : DNA polymerase family X: function, structure, and cellular roles, Biochim. Biophys. Acta, 1804, 1136-1150, 2010.

8）Friedberg EC, Feaver WJ, Gerlach VL, : The many faces of DNA polymerases: strategies for mutagenesis and for mutational avoidance, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 5681-3, 2000.

9）Mizushina Y, Yagi H, Tanaka N, Kurosawa T, Seto H, Katsumi K, Onoue M, Ishida H, Iseki A, Nara T, Morohashi K, Horie T, Onomura Y, Narusawa M, Aoyagi N, Takami K, Yamaoka M, Inoue Y, Matsukage A, Yoshida S, Sakaguchi K, : Screening of inhibitor of eukaryotic DNA polymerases produced by microorganisms, J. Antibiot. (Tokyo), 49, 491-492, 1996.

10）Mizushina Y, Tanaka N, Yagi H, Kurosawa T, Onoue M, Seto H, Horie T, Aoyagi N, Yamaoka M, Matsukage A, Yoshida S, Sakaguchi K, : Fatty acids selectively inhibit eukaryotic DNA polymerase activities in vitro, Biochim. Biophys. Acta, 1308, 256-262, 1996.

11）Mizushina Y, Yoshida S, Matsukage A, Sakaguchi K, : The inhibitory action of fatty acids on DNA polymerase beta, Biochim. Biophys. Acta, 1336, 509-521, 1997.

12）特許 第3821867号，発明の名称：DNAポリメラーゼ活性阻害剤，出願日：1995年7月4日，登録日：2006年6月30日，特許権者：坂口謙吾，東洋水産㈱，発明者：田中伸和，北村晃利，坂口謙吾，水品善之，松原行雄

13）Scharffetter-Kochanek K, Wlaschek M, Brenneisen P, Schauen M, Blaudschun R, Wenk J, : UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging, Biol. Chem., 378, 1247-1257, 1997.

14）Robbins JH, Kraemer KH, Lutzner MA, Festoff BW, Coon HG, : Xeroderma pigmentosum. An inherited diseases with sun sensitivity, multiple cutaneous neoplasms, and abnormal DNA repair, Ann. Intern. Med., 80, 221-248, 1974.

15）Kuwamoto K, Miyauchi-Hashimoto H, Tanaka K, Eguchi N, Inui T, Urade Y, Horio T, : Possible involvement of enhanced prostaglandin E2 production in the photosensitivity in xeroderma pigmentosum group A model mice, J. Invest. Dermatol., 114, 241-246, 2000.

ミトコンドリア活性化による皮膚老化の抑制に関する研究

東京薬科大学生命科学部
柳　茂

We previously identified a mitochondrial ubiquitin ligase MITOL, whose dysfunction causes production of reactive oxygen species from mitochondria. Here, we generated keratinocyte–specific MITOL-deficient mice and examined the relationship between MITOL and ageing. Interestingly, MITOL-deficient mice revealed typical senescence-associated skin phenotypes. Our results provide novel insight into how mitochondrial function controls ageing.

1. 緒　言

ミトコンドリアの主な生理的役割は脂肪酸のβ酸化や、電子伝達系による酸化的リン酸化によるエネルギー（ATP）産生である。このATPの産生の過程では、生体内酸素の90％以上を消費するが、その一方で消費酸素のうちの数％を活性酸素種（ROS : reactive oxygen species）として漏出する。これらの活性酸素は種々の要因によりミトコンドリア自身にも影響を与え、細胞内に遊離して様々な生物現象（老化、がん、アポトーシスなど）を誘起している[1]。またミトコンドリアは絶えず融合分裂を繰り返しながらその機能を維持している。ミトコンドリアの分裂には通常細胞質に存在している分裂因子であるDrp1がミトコンドリアにリクルートされることにより行われ[2]、この過程においては、ミトコンドリアの外膜に局在するhFisやMffなどのDrp1結合分子が関与する[3,4]。また、ミトコンドリアの融合にはミトコンドリア外膜に局在するMitofusin[5]や、ミトコンドリア内膜に局在するOpa1[6]などの融合因子が関わっている。

MITOLはミトコンドリア外膜に局在するE3ユビキチンリガーゼであり、ミトコンドリア分裂因子であるhFis1, Drp1をユビキチン化し、分解を促進する[7]。また、ミトコンドリアに蓄積する変性タンパク質を分解することで細胞内毒性を軽減し、ミトコンドリアの品質管理に関与する[8,9]。さらに、我々はMITOLの基質として微小管関連タンパク質であるMAP1B-light chain 1（LC1）を同定し、MITOLが一酸化窒素（NO）によって修飾されたLC1を選択的にユビキチン化しその分解を促進することで細胞内における毒性を回避することを報告した[10]。今後MITOLのin vivoにおける生理的機能を明らかにすることが課題である。

皮膚は紫外線（UV）などの環境要因の影響により、皮膚細胞、色素細胞、真皮結合細胞、血管などにダメージが蓄積することで老化が進行する。紫外線（UV）は表皮細胞内において細胞老化の原因とされるROSのレベルを上昇させるため、皮膚老化現象とROSの関係性が注目されており、実際に表皮細胞増殖に関与する表皮ケラチノサイト成長因子がUVによって引き起こされる表皮ケラチノサイト内のROSのレベルの上昇を抑えていることが報告されている[11]。ミトコンドリアは生体内の主要なROSの産生源であり、近年ではミトコンドリアダメージによるROSのレベルの上昇が皮膚老化を進行させるという報告がされている[12]。今回、皮膚老化とミトコンドリア機能維持の関係性に着目し、MITOLがミトコンドリアダメージによる細胞内のROSのレベルの上昇を防ぐことで、皮膚老化を制御するという仮説を立て、表皮ケラチノサイトにおけるMITOLのコンディショナルノックアウトマウスを作製し、この仮説を検証した。

Role of mitochondria in skin senescence
Shigeru Yanagi
Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

2. 実験（材料と実験方法）

マウスを用いた実験

▼動物
- C57BL/6N mouse（日本SLC）
- MITOL Flox mouse（理研）
- STOCK Tg（KRT14-cre）1Amc/J（The Jackson Laboratory）

▼ゲノムPCR/アガロースゲル電気泳動
- ゲノムサンプルはmouse tailを50mM NaOHで可溶化したものを使用
- DNAマーカー：ΦX174-Hinc Ⅱ digest（TaKaRa）
- アガロースゲル: 2% Agarose（ニッポン・ジーン）in TAE

▼ウエスタンブロット
- SDS-PAGEにより分離し、PDVEメンブレン（Millipore）に転写後、各抗体を用いてブロットした。

・〈抗体〉抗MITOL抗体（当研究室で作製）、α-tubulin（SIGMA）
▼パラフィン切片
・HE染色：Mayer's Hematoxylin Soln（和光純薬工業）
・1％ Eosin Y Solutions（和光純薬工業）
・TUNEL assay：in situ cell death detection kit, TMR red（Roche）
・DAB染色：（Dako）
▼サザンブロット（TRFs：Southern blots of terminal restriction fragments）
・フェノール/クロロホルム処理によりゲノムを精製
・制限酵素処理：Hinf I（TaKaRa）、Rsa I（TaKaRa）
・プローブtelomere 5 repeat：（CCC TAA）[5]
・プローブ合成キット：DIG Oligonucleotide 3' end Labeling Kit, 2nd generation（Roche）、ハイブリダイゼーション：Perfect Hyb（TOYOBO）
・抗DIG抗体：Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments（Roche）
・発色液：Amersham CDP-Star（GE Healthcare）

細胞を用いた実験

▼細胞HaCaT（ヒト表皮角化細胞由来）
▼細胞培養・遺伝子導入
・5% CO_2, 37℃条件下において10% Fetal Bovine Serum（GIBCO）、100U/mL penicillin, 100mg/mL streptomycinを含んだDMEM（Nissui）で培養した。遺伝子導入はlipofectoamine 2000を用いて行った。
▼qRT-PCR
・RNAの抽出にはRNeasy Mini Kit（QIAGEN）を使用した。
・cDNA合成にはReverTra Ace® qPCR RT Kit（TOYOBO）を使用した。
▼ROS generatin detection assay
・CM-H_2DCFDA（invitrogen）蛍光プローブで処理し、flow cytometryを用いて検出した。

3. 結　果

表皮特異的MITOL欠損マウス（MITOL cKOマウス）の作製

MITOL FloxマウスにKRT14-cre遺伝子をもつマウスを掛け合わせ、表皮特異的なMITOLノックアウトマウスを作製した。今回用いたMITOL FloxマウスはExon2がlox Pに挟まれるように設計をした。MITOL遺伝子がノックアウトされていることは、ゲノムPCR法、ウエスタンブロッティング法で確認を行った。マウスの表皮サンプルからゲノムを抽出し、ゲノムPCRを行った。作製したマウスのサンプルからは欠損バンドである約600bpにバンドが確認できたため、このマウスではターゲットとするExon2が欠損していることがわかった。また、表皮タンパク質をサンプルとし、ウエスタンブロットを行った結果、作製したマウスのサンプルからはMITOLのバンドは確認できなかった。以上の結果より、表皮特異的MITOLノックアウトマウスの作出に成功した。

MITOL cKOマウスの表現系

出生後1～6ヶ月ではMITOL cKOマウスでは顕著な表現型を示さなかったが、7ヶ月の時点において、オスのMITOL cKOマウスでは白髪の増加が観察された。この白髪の増加は背中や両足を中心に起こっており、白髪は体全体の毛の1/3程を占めていた。また、白髪だけではなく、脱毛および皮膚異常が観察された。その後、このMITOL cKOマウスを1ヶ月毎に観察した。その結果、時間経過とともに白髪が進行した。この白髪の進行は尾部から頭部に向かって行われており、白髪は体全体の毛の2/3程を占めた。また、それと同時に脱毛、皮膚の異常も進行しており、皮膚の一部ははがれ落ちた。メスのMITOL cKOマウスでは出生後7ヶ月の時点において、雄のMITOL cKOマウスのような特徴は観察されなかったが、出生後12ヶ月の時点において、白髪や脱毛が観察された。

MITOL cKOマウスの表皮構造に異常が観察される

オスのMITOL cKOマウスでは7ヶ月齢から脱毛および皮膚の脱落などの表現型が観察された。そこで、皮膚組織切片を作成し、MITOL cKOマウスの皮膚構造を観察することにした。コントロールマウスおよびMITOL cKOマウスから皮膚を採取し、皮膚切片を作成し、組織標本の一般的手法であるHE染色法を行い双方のマウスの皮膚構造を観察した。その結果、表皮層において、MITOL cKOマウスではコントロールマウスに比べ、有棘層の肥厚（表皮過形成）が観察された。さらに、毛胞に着目すると、コントロールマウスに比べ、MITOL cKOマウスでは毛胞ひとつに対して肥大化した皮脂腺が増加していることがわかった。MITOL cKOマウスでは表皮過形成および肥大化した皮脂腺の数の増加など、表皮構造形成の異常が起こっていることがわかった。

MITOL cKOマウスでは細胞死が進行する

皮膚組織切片を作成し、TUNEL assay を行うことで細胞死の検定を行った。その結果、MITOL cKOマウスではコントロールマウスに比べ、顕著にTUNEL positiveな細胞が多く観察されており、これらTUNELポジティブな細胞は表皮層の中でも特に有棘層に集中していた。また、このようなTUNELポジティブな細胞はMITOL cKOマウスの毛包内にも多く観察された。

4. 考　察

本研究の結果から、MITOL cKOマウスでは、白髪の増加や脱毛、皮膚異常など老化モデルマウスに近似した表現型を示すことがわかった。また、MITOL cKOマウスで観察された、表皮の肥厚や皮脂腺の肥大化などの炎症症状の進行、表皮および毛胞における細胞死の増加、テロメア鎖の短縮は、MITOL cKOマウスの表皮において老化が進行していることをサポートする結果である[13, 14]。さらに、HaCaT細胞にMITOL siRNAを遺伝子導入した実験結果から、MITOL cKOマウスの示した表現型の原因が、表皮ケラチノサイト内のROSのレベルの上昇、および分化マーカーであるインボルクリンの減少であることを示唆する結果も得ることができた。老化分野におけるミトコンドリア研究としては、加齢によるミトコンドリア遺伝子の変異の蓄積が細胞機能に悪影響を与える『ミトコンドリア遺伝子変異説』が提唱されており、表皮細胞においては、ROSによってミトコンドリア遺伝子の変異が起こることが証明されている[15]。また、実際にミトコンドリアDNA修復機能不全マウス（$Polg^{D257A/D257A}$）では脱毛や白髪化、また、細胞死の増加などの老化現象が進行することが明らかにされており、このマウスは早老症のモデルマウスとして確立されている[16]。今回、MITOL cKOマウスで観察された白髪の増加や脱毛、皮膚異常、細胞死の増加などの老化を示す表現型は、表皮ケラチノサイト内のミトコンドリアダメージによって引き起こされたものであり、細胞内においてMITOLが老化に関与することが示唆された。

今回、メスのMITOL cKOマウスでは、脱毛、白髪の増加、表皮異常、および表皮の肥厚や皮脂腺の肥大化の増加などの炎症反応の進行がオスで観察された時期よりも遅れて観察され、かつその程度が軽度であることがわかった。生体内での活性酸素の除去にエストロゲンが関わることが報告されている[17]。メスのMITOL cKOマウスの表現型の遅れは、エストロゲンの活性酸素の除去機能に起因していることが推測される。

MITOL cKOマウスでは表皮肥厚が観察され、さらに、HaCaT細胞を用いたMITOLノックダウンの実験結果より、表皮分化マーカーであるインボルクリンのmRNAの発現量の低下が観察されている。インボルクリンは表皮分化の過程において、有棘層から角層にかけて発現が強くなる分化マーカーであり、細胞内のCa^{2+}濃度依存的なCキナーゼの活性化により、その発現が促進されることが知られている。MITOL cKOマウスで観察された表皮の肥厚は、ケラチノサイト内のROSのレベルの上昇による細胞ダメージだけではなく、Ca^{2+}の濃度調節異常による分化異常の可能性も考えられる。結論としてミトコンドリア機能低下は老化に直結しており、今回作成されたMITOL cKOマウスは老化の分子機構を解析する良い解析モデルになるだろう。

（参考文献）

1）Marchi S, Giorgi C, ：Mitochondria-ros crosstalk in the control of cell death and aging, J. Signal Transduct., **2012**, 329635, 2012.

2）Otsuga D, Keegan BR, ：The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast, J. Cell Biol. **143**, 333-349, 1998.

3）James D, Parone PA, ：hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery, J. Biol. Chem. **278**, 36373-36379, 2003.

4）Otera H, Wang C, ：Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells, J. Cell Biol. **191**, 1141-1158, 2010.

5）Huang P, Galloway CA, ：Control of mitochondrial morphology through differential interactions of mitochondrial fusion and fission proteins, PLoS One, **6**, e20655, 2011.

6）AlexanderC, Votruba M, ：OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28, Nat. Genet., **26**, 211-215, 2000.

7）YonashiroR, Ishido S, ：A novel mitochondrial ubiquitin ligase plays a critical role in mitochondrial dynamics, EMBO J., **25**, 3618-3626, 2006.

8）Yonashiro R, Sugiura A, ：Mitochondrial ubiquitin ligase MITOL ubiquitinates mutant SOD1 and attenuates mutant SOD1-induced reactive oxygen species generation, Mol. Biol. Cell., **20**, 4524-4530, 2009.

9）Sugiura A, Yonashiro R, ：A mitochondrial ubiquitin ligase MITOL controls cell toxicity of polyglutamine-expanded protein, Mitochondrion, **11**, 139-146, 2011.

10）Yonashiro R, Kimijima Y, ：Mitochondrial ubiquitin ligase MITOL blocks S-nitrosylated MAP1B-light chain 1-mediated mitochondrial dysfunction and neuronal cell death, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **100**, 2382-2387, 2012.

11）Kovacs D, Raffa S, ：Keratinocyte growth factor down-regulates intracellular ROS production induced by UVB, J. Dermatol. Sci., **54**, 106-113, 2009.

12）Velarde MC, Flynn JM, ：Mitochondrial oxidative stress caused by Sod2 deficiency promotes cellular senescence and aging phenotypes in the skin, Aging（Albany NY）, **4**, 3-12, 2012.

13) Pillai S, Oresajo C, : Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review, Int. J. Cosmet. Sci., **27**, 17-34, 2005.
14) Kuhn A, Herrmann M, : Accumulation of apoptotic cells in the epidermis of patients with cutaneous lupus erythematosus after ultraviolet irradiation, Arthritis Rheum, **54**, 939-950, 2006.
15) Birch-Machin MA, Swalwell H, : How mitochondria record the effects of UV exposure and oxidative stress using human skin as a model tissue, Mutagenesis, **25**, 101-107, 2010.
16) Kujoth GC, Hiona A, : Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging, Science, **309**, 481-484, 2005.
17) Yang XP, Reckelhoff JF, : Estrogen, hormonal replacement therapy and cardiovascular disease, Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. **20**, 133-138, 2011.

Ⅲ． 精神、文化に関する分野

自閉スペクトラム症児の香料過敏についての調査

金沢大学子どものこころの発達研究センター
熊﨑　博一

In this experiment, we used an olfactory measurement that uses pulse ejection. Pulse ejection system can present scent for a short duration the picoliter level. This experiment was conducted to elucidate the sensory abnormality in children with autism spectrum disorder (ASD). This experiment examined odor detection threshold and adaptation to change. We could have shown that olfactory trait of children with ASD are different from children with TD.

1．緒　言

自閉スペクトラム症（Autism Spectrum Disorder：以下ASDと略す）とは、対人相互作用やコミュニケーションの発達に障害を持ち、常同行動や限局的・反復的な興味および行動のパターンを示す発達障害である。世界的診断基準であるDSM-5[1]にて感覚過敏や感覚刺激に対する低反応といった感覚の問題が初めて診断基準の一つに取り上げられた。感覚の問題はASDの患者にとって実生活の中で抱く困難性の本質に近く、情動・行動や運動・行為の問題に影響する。感覚の問題の中で嗅覚は、視覚や聴覚と異なりその伝達経路が視床を通らないこともあり、注目されてこなかった歴史がある。“Gillbergの診断基準”で有名なGothenburg大学のGillberg先生はその著の中で“ASD児はにおいに対し思いがけない反応を示すことも非常に多いこと、ASD児がある種の部屋や特定の環境を避けるのも異常な嗅覚認知で説明できるかもしれないこと、においがASD児に対し強い影響を及ぼすことに気づいていない専門家も多い。”との警鐘を鳴らしている[2]。作業療法士のLaneらは、嗅覚過敏の強いことがコミュニケーション能力や不適応行為の予後を示唆すること[3]、Hubberdらは、偏食の半分以上は嗅覚特性によって説明できることを報告しており[4]、ASD児がその嗅覚認知のために我々の想像以上に社会生活に支障が出ている可能性を指摘している。ASD児が特定の人を避ける、特定の人の前で情緒が不安定になるのも異常な嗅覚認知にて説明できる可能性も考えられている。香料濃度が高いことがASD児の不快感・拒絶の誘因になり対人関係を築けず、情動行動に影響を与える可能性もある。Bagasra等は“ある種の香りが神経を刺激し、異常な脳発達に影響を与えているかもしれない”と述べている[5]。一方で適度な香料濃度はASD児の情意安定をもたらすと考えられる。

ASD者の嗅覚特性に関して、両親からのレポート、質問紙を用いた先行研究は現在までに多数認めている[6, 7]。一方で実験器具を用いた既存の嗅覚研究では、感度が低く、ASD児の嗅覚特性についての解明は進んでいなかった。従来の実験における香り提示は高濃度の長時間連続提示となり、空間に香りが残留する残り香の問題、徐々に香りの濃度差を感じなくなる順応の問題があった。また複数の香りを提示し、一時的に記憶にとどめておかないといけないため、ワーキングメモリーを要することも大きな課題であった。さらに言語能力を要する課題が多かったことも課題であった。「香り発生デバイス」（図1）は精密な射出制御が可能であり、児童の嗅覚特性の同定に道を拓くことができる。「香り発生デバイス」を用いてASD児の嗅覚検知閾値を導き出し、定型発達児の嗅覚検知閾値と比較することを目的とした。

またASD児の特徴の一つに変化への適応が悪いことが挙げられる。においにおいても、あるにおいになじんでいる中でにおいの種類が変化したときにその変化に気がつかずに反応の遅れの原因となっている可能性がある。日常生活においてにおいの種類の変化に気がつく能力はASD者の社会性と関連している可能性もあり、ASD重症度とにおいの種類の切り替えについての能力の関係を調べることをもう一つの目的とした。

図1　香り発生デバイス

Investigation of spice sensitivity for children with autism spectrum disorders
Hirokazu Kumazaki
Research Center for Child Mental Development, Kanazawa University

2. 実　験

2. 1. 実験1

2. 1. 1. 被験者

被験者は5～15歳のASDと診断されている患者、及び定型発達児を対象とした。参入条件として1）IQ≧70、2）研究に自発的に参加していること、除外条件として1）感冒症状を認めないこと、2）嗅覚疾患にて耳鼻科通院をしていないこととした。ASDについては助成者が、被験者の生育歴について十分に調査するとともに、広汎性発達障害日本自閉症協会評定尺度（Pervasive Developmental Disorders Autism Society Japan Rating Scale：PARS）を用いて診断した。また全被験者に対して神経疾患の既往がないことを確認した。ヘルシンキ宣言に基づいた本研究の主旨・内容・実験の安全性および被験者の権利に関する説明を行い、書面による参加の同意を得た。実験開始30分前より飲食の摂取をしないように教示した。

2. 1. 2. 香り発生デバイス

「香り発生デバイス」は単位時間射出量［ejection quantity per unit time：EQUT］256段階、最小射出時間［ejection time：ET］667マイクロ秒と非常に精密に香りを射出制御できる射出量を微細に制御することができるpulse ejection system（図2）を用いて人の嗅覚特性を測定する装置である。微小時間で香りを提示する「パルス射出」が可能となっている。このパルス射出により微小香料の香りを提示することができ、残り香が室内に充満する問題、徐々に順応し濃度差を感じなくなるといった問題がない。また意図通りに香りを感じさせることができ、感度も高い。

2. 1. 3. 試薬

予備実験では香料にバナナ様エッセンスである酢酸イソアミル（isoamyl acetate）、オレンジ様エッセンスであるリモネン（limonene）、パイナップル様エッセンスであるカプロン酸アリル（allyl caproate）、バラ様エッセンスであるβ-フェニルエチルアルコール（phenethyl alcohol）、ペパーミント（peppermint）を用いた。本番実験では多くの児が不快に感じない酢酸イソアミル（isoamyl acetate）、カプロン酸アリル（allyl caproate）を用いた。

2. 1. 4. 実験環境

実験室は被験者にとっては馴染みのある部屋で行った。気温を約23℃に設定した。被験者の前にタッチパネルディスプレイ（図3）を置き、実験者は対面にてコントロール用のディスプレイを操作した。実験者と被験者の間には仕切り板を置いた。

2. 1. 5. 香り発生デバイスの設定

初期値をEQUT：80，ET：200msに設定した。ETについては固定、EQUTについては後述のように徐々に低下させた。

2. 1. 6. タッチパネルディスプレイの開発

ASD者はワーキングメモリーに障害を有するケースが多く、ワーキングメモリーの弱さに配慮したセッティングは重要であった。一方でASD者は視覚的な理解は強くディスプレイを用いることで、ASD者のワーキングメモリーの弱さを補えるのではないかと考えた。タッチパネルディスプレイは図3のようになっており、箱をクリックすると香りが射出される仕組みとなっている。

2. 1. 7. 香料の好み

本実験では香料の好みについて5段階のリッカート尺度を用いて調査した。それぞれの香料について、香りが心地よいという質問を作り、1. 全く同意できない、2. 同意できない、3. どちらともいえない、4. 同意できる、5. 非常に同意できる、で回答させた。

2. 1. 8. 小児自閉症評定尺度(Childhood Autism Rating Scale：CARS)

ASD児の重症度測定のためにアメリカ・ノース・カロライナ州の自閉症治療教育プログラム（TEACCH：Treatment and Education of Autistic and related Communication handicapped Children）で用いられているCARSを用いた。CARSは“人との関係”、“模倣”、“感情”、“身体の使い方”“物との関係”、“環境変化に対する適応”、“視覚による反応性”、“聴覚による反応性”“味覚・嗅覚・触覚による反応性”、“不安反応”、“言語性のコミュニケーション”、“非言語性のコミュニケーション”、“活動水準”、“知的機能”、“全体的な印象”の15項目からなり、この15項目のそれぞれについて、

図2　Pulse ejection system

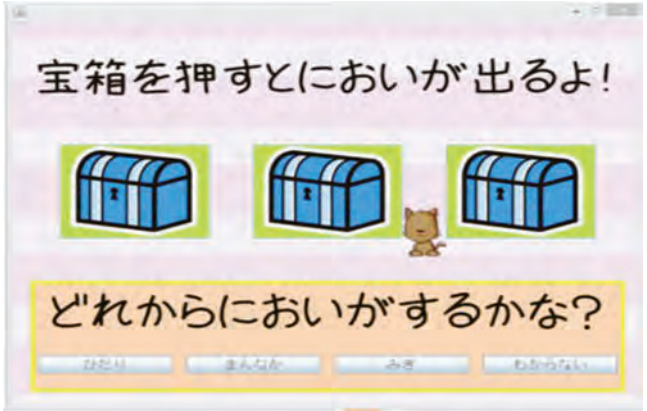


図3　タッチパネルディスプレイ（嗅覚検知閾値）

正常範囲内(1点)、軽度の異常(2点)、中等度の異常(3点)、重度の異常(4点)という評点をつける。

例えば“味覚・嗅覚・触覚による反応性”は味覚・嗅覚・触覚刺激に対する反応性を評定する。また子どもがこれらの感覚様式を適切に使えるかの評定もする。子どもが時々食べられない物のにおいを嗅いだりなめたりする程度で2点、においを嗅ぐことについて中等度の強さで嗅ぐ程度で3点、子どもが対象物に対して通常の扱い方や興味の示し方をしないで感覚的ににおいを嗅ぐことに没頭する程度で4点となる。

2. 1. 9. 手順

EQUT80で開始した。3つの箱のうち、1つは香料を有しており、残りの2つは香料を有していない設定とした。タッチパネル上の箱をクリックすると3箱のうち2箱は無香料の気体が射出、1箱は有香料の気体が射出された。それぞれの箱を2回ずつクリックできる設定とし、香料を有している箱がどこにあるかを当てる設定とした。被験者が香料を有している箱を当てることができなかったら、実験は終了とした。被験者が香料を有している箱を2回連続で当てることができたら、EQUTを半分の濃度として同様の試みを繰り返した。EQUTを80, 40, 20, 10と低下させEQUT10で2回当てることができた際に、実験を終了とした。

2. 2. 実験2

2. 2. 1. 被験者

5～15歳のASD児を対象とした。参入条件として1) IQ≧70、2) 研究に自発的に参加していること、除外条件として1) 感冒症状を認めないこと、2) 嗅覚疾患にて耳鼻科通院をしていないこととした。ASDの診断については助成者が、被験者の生育歴について十分に調査するとともに、広汎性発達障害日本自閉症協会評定尺度(Pervasive Developmental Disorders Autism Society Japan Rating Scale：PARS)を用いて診断した。また全被験者に対して神経疾患の既往がないことを確認した。対照群として健常者が参加した。ヘルシンキ宣言に基づいた本研究の主旨・内容・実験の安全性および被験者の権利に関する説明を行い、書面による参加の同意を得た。実験開始30分前より飲食の摂取をしないように教示した。

2. 2. 2. 香料

香料にはバナナ様エッセンスである酢酸イソアミル(isoamyl acetate)、オレンジ様エッセンスであるリモネン(limonene)を用いた。

2. 2. 3. 実験環境

実験室は被験者にとっては馴染みのある部屋で行った。気温を約23℃に設定した。被験者の前にタッチパネルディスプレイ(内容については後述)を置き、実験者は対面にてコントロール用のディスプレイを操作した。実験者と被験者の間には仕切り板を置いた。

2. 2. 4. 香り発生デバイスの設定

EQUT：80, ET:200msに設定した。

2. 2. 5. タッチパネルディスプレイ

図4のようなタッチパネルを開発した。時間制限(1分半)を設け，一定時間ごとに種類を切り換えた。バナナの香りがする際にはバナナのボタン、パイナップルの香りがする際にはパイナップルのボタンを押す設定とした。

2. 2. 6. 手順

時間制限(1分半)を設け，一定時間ごとに種類を切り替えた。初めの30秒はバナナの香り、次の20秒はオレンジの香り、次の20秒はバナナの香り、最後の20秒はオレンジの香りとした。香りは0.8秒間隔で射出された。バナナの香りがする際にはディスプレイ上でバナナのボタン、オレンジの香りがする際にはディスプレイ上でオレンジのボタンを押すように説明した。1回以下しかボタンタッチのミスをしなかった方を課題達成者、2回以上ミスした方を課題非達成者とした。

3. 結　果

3. 1. 実験1の結果

ASD児20名、健常児20名が参加した。ASD児では定型発達児と比べてCARSのTotalスコア及び味覚・嗅覚・触覚スコアとも有意に高かった。イソアミルアセテート、カプロン酸アリルにおいてはASD児で健常児より嗅覚検知閾値が高いとの結果が出た(表1)。

全被験者が5種類の香料を不快とは感じないことを確認した。

3. 2. 実験2の結果

ASD児8名、定型発達児6名が参加した。ASD児では定型発達児と比べてオレンジのミス率、及び全体のミス率

図4　タッチパネルディスプレイ(においの種類切り換え実験)

表１　ASD 児、TD 児の嗅覚検知閾値

	ASD	TD	*P*
IA	61.5±41.6	17.0±10.8	＊
AC	51.5±45.5	12.0±25.5	＊

＊$p<0.01$
IA：isoamyl acetate
AC：allyl caproate

表２　においの種類切り換え実験の結果

	ASD	非ASD	有意差
オレンジミス率(%)	26.6±25.7	5.56±3.14	$P<0.01$
バナナミス率(%)	23.0±22.8	10.8±5.96	なし
全体ミス率(%)	26.6±21.1	8.84±4.77	$P<0.01$
気づく時間(秒)	4.47±1.78	3.04±1.21	なし

が有意に高いとの結果となった(表2)。

4. 考　察

実験１では２種類の香料に対しASD児と健常児の嗅覚検知閾値を比較した。ASD児では２種類の香料に対し鈍麻との結果となった。実験２の結果ASD児が定型発達児と比べてにおいの種類切り換えに対する反応が悪い可能性が示唆された。

現在まで実験室環境にてASD群と健常児の嗅覚検知閾値を比較した研究は４つあった。Suzuki et alは12名のASD群（平均30代）と12名の健常群（平均30代）に対し1-butanol を用いて嗅覚検知閾値を比較した[8]。ASD群と健常群で嗅覚検知閾値に大きな差異はないとの結果を得た。Dudova et alは31名のASD群（平均年齢10歳）と35名の健常群（平均年齢10歳）に対しSniffin Sticks with n-butanolを用いて嗅覚検知閾値を比較した[9]。ASD群では健常群と比べて嗅覚検知閾値は高いとの結果を得た。Tavassoi et alは38名のASD群（平均年齢28歳）と42名の健常群（平均年齢28歳）に対しSniffin Sticks with n-butanolを用いて嗅覚検知閾値を比較した[10]。ASD群と健常群で嗅覚検知閾値に大きな差異はないとの結果を得た。Ashwin et alは17名のASD群（平均年齢27歳）と17名の健常群（平均年齢28歳）に対しAlcohol Sniffin Test（香料はisopropyl alcohol）を用いて嗅覚検知閾値を比較した[11]。健常群ではASD群と比べて嗅覚検知閾値は高いとの結果を得た。

上記のように現在までの嗅覚検知閾値に関する結果は一貫していなかったが、その理由としてそれぞれの実験における用いた香料が異なること、被験者の年齢が異なっていることが考えられた。香料に対する検知閾値は年齢の変化に伴い大きく変化すること、また香料によって大きく異なることが知られている。また緒言で述べたように、実験室のセッティングの影響も大きく受ける。

Ashwin et alの研究においては被験者が香料に順応しないように最大限配慮された。一方で結果は本実験結果とは異なりASD群は香料に敏感というものであった。検知閾値は香りについての好み、不安の影響を受けることが知られている。多くのASD児でisopropyl alcoholを不快に感じていたことが示唆される。

嗅覚機能は生命を営むに当たり多くの役割を果たしており危険認識(食物の腐敗・煙・ガスから守る)、生殖活動の誘発（フェロモン)、興奮や鎮静（アロマ)、食事の好き嫌い・食欲、気分、自律神経・内分泌・免疫と多岐にわたる。本研究の結果からASD児では多くの香料において嗅覚検知閾値が大きく異なることが示唆されるが、まずは今後ASD児一人一人の嗅覚特性を支援者が容易に把握できるシステムが必要と考える。

Parkinson病では嗅覚特性が運動症状、認知症状の予測因子で嗅球は病理学的に最初に障害となっていること[12, 13]、Alzheimer型認知症では初期より識別力が低下しており、嗅覚障害の程度と海馬の容積に相関があること[14]、統合失調症ではその前駆期である Ultra High Riskにおいて同定力が障害されていること[15]、また同定力は発症予測因子、陰性症状とも相関関係にあること、パーソナリティー障害においても嗅覚の同定力の低下がみられる[16]、など多くの神経性心疾患において嗅覚特性が予後のマーカーとして注目されている。嗅覚特性はASDの診断及び予後を判断する上で重要なマーカーとなり得るとの報告があり[17]、本研究結果もそれを示唆するものとなった。

臨床場面においては、ペンキのにおいが嫌で図工室に入れない、体臭が気になり人に向き合うことができない、お盆のにおいが嫌いでおやつが食べられない、色々なもののにおいを嗅ぐ、においがするからと繰り返し手を洗う、調子が悪くなるとマスクをつけたりタオルを首に巻くなど多くの嗅覚に起因する問題が見られる。本実験では香料に対する嗅覚検知閾値、香料の変化への適応について調べたが、こういった臨床所見について検討するには他にも嗅覚順応（香料物質に連続的にさらされてからそのニオイを感じなくなるまでの現象）についても検討する必要がある。今後も多くの側面からASD児の香料に対する特性を明らかにし、ASD児の社会支援を行っていきたいと考えている。

5. 総　括

本研究では、ASD児の香料過敏についておよび香料の変化への適応について実験し検討を行った。ASD児と定型発達児の間で香料に対する嗅覚検知閾値が大きく異なる可能性があること、ASDの重症度によって香料の変化に対する適応が大きく異なることが明らかになった。嗅覚特性はASDの診断及び予後を判断する上で重要なマーカーとなり得ること、ASD児がその嗅覚特性のために多くの

困難を有していることを考慮すればASDの嗅覚特性について追及する意義は大きい。今後はASD児の香料に対する閾値や変化への適応だけでなく、順応など他の多くの嗅覚特性について検討し、ASD児の社会困難と嗅覚特性の関係について明らかにしていきたい。

(引用文献)

1) American Psychiatric Association (APA). Diagnostic and statistical manual of mental disorders (5th ed., pp. 5–25). Arlington, VA: American Psychiatric Publishing.2013.

2) A GUIDE TO ASPERGER SYNDROME by Christopher Gillberg. Cambridge University Press 2002.

3) Lane AE, Young RL, Baker AE, Angley MT. Sensory processing subtypes in autism: association with adaptive behavior. J Autism Dev Disord. 2010; 40:112–22.

4) Hubbard KL, Anderson SE, Curtin C, Must A, Bandini LG. A Comparison of Food Refusal Related to Characteristics of Food in Children with Autism Spectrum Disorder and Typically Developing Children. J Acad Nutr Diet. 2014; 114: 1981–7.

5) Bagasra O, Golkar Z, Garcia M, Rice LN, Pace DG. Role of perfumes in pathogenesis of autism. Med Hypotheses.2013;80:795–803.

6) Leekam SR, Nieto C, Libby SJ, Wing L, Gould J. Describing the sensory abnormalities of children and adults with autism. J Autism Dev Disord. 2007; 37:894–910.

7) Tomchek SD, Dunn W. Sensory processing in children with and without autism: a comparative study using the short sensory profile. Am J Occup Ther. 2007; 61:190–200.

8) Suzuki Y, Critchley HD, Rowe A, Howlin P, Murphy DG: Impaired olfactory identification in Asperger's syndrome. J Neuropsychiatry Clin Neurosci. 2003; 15:105–7.

9) Dudova I, Vodicka J, Havlovicova M, Sedlacek Z, Urbanek T, Hrdlicka M: Odor detection threshold, but not odor identification, is impaired in children with autism. Eur Child Adolesc Psychiatry. 2011;20: 333–40.

10) Tavassoli T, Baron-Cohen S: Olfactory detection thresholds and adaptation in adults with autism spectrum condition. J Autism Dev Disord. 2012;42:905–9.

11) Ashwin C, Chapman E, Howells J, Rhydderch D, Walker I, Baron-Cohen S. Enhanced olfactory sensitivity in autism spectrum conditions. Mol Autism. 2014;5: 53.

12) Doty RL (2007) Olfaction in Parkinson's disease. Parkinsonism Relat Disord 13(Suppl 3):S225–S228

13) Kranick SM, Duda JE (2008) Olfactory dysfunction in Parkinson's disease. Neurosignals 16(1):35–40

14) Stamps JJ, Bartoshuk LM, Heilman KM. A brief olfactory test for Alzheimer's disease. J Neurol Sci. 2013 Oct 15; 333(1–2):19–24.

15) Atanasova B, Graux J, El Hage W, et al (2008) Olfaction: a potential cognitive marker of psychiatric disorders. Neurosci Biobehav Rev 32(7):1315–1325

16) Croy I, Springborn M, Lötsch J et al. Agreeable smellers and sensitive neurotics--correlations among personality traits and sensory thresholds. PLoS One. 2011 Apr 27;6(4):e18701. doi: 10.1371/journal.pone.0018701.

17) Brewer WJ, Castle D, Ch Pantelis. Olfaction and the brain. Cambridge University Press, New York; 2006.

本研究は下記の学会に発表しました。

・H. Kumazaki, A. Tomoda, K. Okada, T. Muramatsu, M. Mimura. Olfactory Detection Thresholds in Children with Autism Spectrum Disorders Using Pulse Ejection Systems.
International Meeting for Autism Research (IMFAR) 2015 (Salt Lake City, Utah, USA)

・自閉スペクトラム症向けの嗅覚アプリケーションを用いた嗅覚特性の評価
熊崎博一、友田明美、小坂浩隆、松浦絵理、岡田謙一、村松太郎、三村將.
第111回日本精神神経学会総会 2015年6月 大阪

中・高年の見た目年齢の解析

愛媛医療センター神経内科
小原　克彦

Background and Objective: Several studies have shown that perceived facial age is a biomarker for systemic aging. In addition, it has been reported that subjects who looked younger compared with their twin counterpart had a better survival rate. Moreover, we reported that subjects who looked younger than their chronological age had a significantly lower age-related increase in carotid atherosclerosis compared with those who looked older than their chronological age. However, the effects of perceived facial age with makeup on end organ damages and frailty indices have not been fully investigated.

Methods: Perceived age of photos of face and standing posture was evaluated in 427 middle-aged to elderly subjects (188 men and 239 women), by 20 nurses and 5 attendants who were familiar with elderly subjects. All women were wearing makeup. The following parameters were evaluated for each participant; carotid intima-media thickness, brachial-ankle pulse wave velocity, augmentation index on radial arterial waveform as atherosclerotic indices; brain damages by MRI, plasma b-type natriuretic peptide concentration, estimated glomerular filtration rate, urinary excretion of protein and albumin as indices for end-organ damages; cognitive function, sarcopenic indices including hand grip strength, skeletal muscle mass, and thigh muscle cross-sectional area on CT, pulmonary function, and speed of sound in the calcaneus bone, as indices for frailty.

Results: The mean chronological age, mean perceived age, and mean difference between perceived age and chronological age were 67.2±10.5, 65.0±8.3, and –2.2±4.9 years, respectively. Perceived age was significantly related to chronological age (r=0.89). Perceived age was also significantly related to body height, body weight, blood pressure, all atherosclerotic indices, all end-organ related indices, and all frailty-related indices. On the other hand, after correction for chronological age and sex, only blood pressure and anti-dyslipidemic drug use were significantly related to the difference between perceived age and chronological age. Further, the interaction between chronological age and the presence of hypertension was significantly related to the difference between perceived age and chronological age [F=10.3, p=0.002], after correction for chronological age and sex.

Conclusions: Perceived age itself is a biomarker for not only atherosclerosis, but also for end-organ damages and the frailty. Makeup may underlie the lost of their association after correction for the chronological age. The findings indicate the socio-medical significance of makeup in the aged society.

1. 緒　言

社会の高齢化に伴い高齢者医療や福祉が重大な関心事になっている。平均寿命の伸長に伴い要介護状態での生存期間が長くなり、医療費や介護費は国費を圧迫することになる。要介護の原因（要支援は除く）として、平成25年度の国民生活基礎調査の報告では、脳卒中22％、認知症21%、衰弱 13%、転倒・骨折11%、関節疾患7%の順であり、神経疾患やロコモーティブ症候群をはじめとした整形外科的な疾患が健康寿命を損なう主な要因である。

高齢者の要介護に至る状態としてフレイルが提唱されている。フレイルは、虚弱や脆弱を示す状態であり、ホメオスターシスに破綻をきたし、ADLの障害を介して、要介護や施設入所に至るリスクと考えられている[1-3]。有効な予防介入を加えるために、フレイルを適切に評価し、要介護リスクの高い集団を抽出することが重要である。

ヒトが対象者を評価する場合に、瞬時に性別や年齢を推定する。これは、相手が自己に対して目上か否かの判断に必要であり、ヒトが社会生活を円滑に営む上において非常に重要な知覚であり、発達や成熟の過程で自然に備わる能力である。

一方、暦年齢が同じであっても、見た目年齢には大きな幅があり、年齢以上に老けて見られる場合も、年齢よりも若くみられる場合も存在する。欧米の成績では、皮膚の状態(シワ、シミ、クスミなど)と共に、目や鼻といった顔面器官の相対的な位置、輪郭の明瞭さ、唇の厚さなどが影響を与えているようであるが、完全には明らかにされていない[4-6]。

この見た目年齢が身体機能や生命予後を反映するバイオマーカーとなる可能性が示されている。暦年齢以上に若く見られるヒトは、老けて見られるヒトに比し、動脈硬化が少なく、生命予後も良好であることが示されている[4-6]。我々も、暦年齢よりも若く見られるヒトでは、頸動脈の加齢性肥厚が小さいことを認めている[7]。また皮膚の老化指標であるシミの存在は、女性において動脈硬化を反映していることを認めた[8]。一方、見た目年齢が臓器障害やフレイル指標をどの程度反映するのかに関しては、これまで十

Clinical evaluation of perceived age in middle aged to elderly subjects

Katsuhiko Kohara
Department of Neurology, Ehime Medical Center

分な検討がなされていない。

化粧をした状態での見た目年齢は、化粧をしない場合に比し、老化のバイオマーカーとしての効果が低くなることが予想される。本研究の中間報告において、化粧により、約5歳見た目年齢が若くなることを報告した。最終報告では、化粧をした普段の見た目年齢のバイオマーカーとしての有用性を13項目の動脈硬化関連指標、8項目の臓器障害指標、そして14項目のフレイル関連指標において検討した。さらに、見た目年齢に影響を及ぼす要因についても検討を行った。

2. 実　験

愛媛大学抗加齢ドックを受診し研究参加に同意を得た427名を対象とした。

2. 1. 見た目年齢の評価

ドック受診時の化粧をしている状態での顔と全身の写真をそれぞれ撮影した。女性は、全員化粧をしていた。見た目年齢評価は、高齢者診療の経験が豊富な老年内科病棟勤務の看護師20名と事務員5名の併せて25名が行った。バックグランドの情報は分からない状態で、パソコンに表示される顔と全身の写真から年齢を推定した。個々人の見た目年齢は、評価者25名の平均値とした。見た目年齢と受診時の実年齢との差を『見た目年齢差』として求めた。

2. 2. 動脈硬化因子の評価

動脈硬化指標として頸動脈内膜中膜厚（IMT）、上腕-足首間脈波伝搬速度（baPWV）、橈骨動脈圧波形から求めた血圧の増幅係数（AI：augmentation index）を評価した。また、動脈硬化リスク因子として、血圧、空腹時血糖、総コレステロール、HDLコレステロール、中性脂肪を調べた。

2. 2. 1. 頸動脈内膜中膜厚の計測

7.5MHzのプローブを用いて頸動脈エコー（SSD-3500SV、Aloka社製）により左右両側の総頸動脈を前、側面、後の3方向からスキャンし、1cm間隔の3ポイントにおいて遠位側の内膜中膜厚を計測し、その平均値を求めた[9-11]。

2. 2. 2. 上腕-足首間脈波伝搬速度の計測

血圧脈波検査装置（Form ABI、オムロンヘルスケア社製）により上腕-足首間脈波伝搬速度を計測した[9-11]。

2. 2. 3. 血圧増幅係数の計測

血圧脈波検査装置（HEM-9000AI、オムロンヘルスケア社製）により、左橈骨圧波形より収縮期血圧の増幅係数を計測した[10-11]。

2. 2. 4. 脈硬化危険因子

血圧は座位で5分間の安静後にオシロメトリック法により2回計測し（HEM-9000AI、オムロンヘルスケア社製）、その平均値を求めた。最低12時間の絶食後に採血を行い、空腹時血糖、総コレステロール、HDLコレステロール、中性脂肪を計測した。身体計測を行い、身長、体重から体格指数（BMI）を求めた。降圧薬、高脂血症薬、糖尿病治療薬の使用はアンケートにて聴取した。

2. 3. 臓器障害の評価

臓器障害関連因子として脳障害をMRIにより評価した。心に対する負荷指標として、血漿BNP濃度を測定した。腎障害の指標として推定糸球体濾過値（eGFR）と尿蛋白、尿中アルブミン排泄量を評価した。

2. 3. 1. 脳障害の評価

3T MRI装置により無症候性脳梗塞および微小出血の有無と脳室周囲白質障害、深部白質障害の程度をそれぞれ4および5段階で評価した[12-13]。

2. 3. 2. 心機能障害の評価

血漿BNP濃度は、PATHFAST BNP キット（三菱化学メディエンス）を用いて測定した[14]。

2. 3. 3. 腎機能障害の評価

推定糸球体濾過値（eGFR）は、血清クレアチニン（Cr）値より以下の式により求めた。eGFR =194× 年齢 − 0.287× Cr − 1.094×0.739（女性の場合の係数）（mL/min/1.73 m^2）。スポット尿から、尿中蛋白および尿中アルブミンを測定し、それぞれ尿中クレアチニンにて補正した。

2. 4. フレイルの評価

フレイル関連指標として認知機能、サルコペニア関連指標、骨密度、肺機能、重心動揺を求めた。

2. 4. 1. 認知機能

認知機能は、タッチパネル式認知機能テスト（MSP-1100、日本光電社、15点満点）により求めた[15]。

2. 4. 2. サルコペニア関連指標

骨格筋の量的、質的異常を評価した。電子握力計（TKK5410、竹井機器工業）により利き腕の握力を測定した[11]。バイオインピーダンス法（カラダスキャンHBF-701、オムロンヘルスケア社製）により骨格筋率を求め、体重から骨格筋量を算出した[11]。361名においては、大腿中央部のCT断層像から大腿筋横断面積計測した[9-11]。

2. 4. 3. 骨密度指標

骨密度の指標としては、踵骨内超音波伝導速度をCM-200（Furuno社製）により測定した。

2. 4. 4. 肺機能

肺機能として、スパイロ（Microspiro HI-801；チェスト社製）により肺活量、機能的肺活量、一秒量を求めた。

2. 4. 5. 重心動揺の使用

ふらつきの指標として開眼立位の重心動揺をGravicorder G-5500（アニマ社製）により計測し、総軌跡長と外周面積として求めた[13]。

2. 5. 統計処理

統計解析は、市販のソフトウェア（JMP Ver10, SAS institute）を用いて行った。P<0.05 を統計学的有意とした。

3. 結　果

3. 1. 実年齢と見た目年齢

表 1 に対象者の臨床的背景を示す。平均実年齢は、男性 67.4 ± 11.2 歳、女性 67.0 ± 9.9 歳であった。一方、見た目年齢の平均は、男性 65.5 ± 8.6 歳、女性 64.6 ± 8.1 歳であり、見た目年齢差は、男性 −1.9 ± 5.4 歳、女性 −2.4 ± 4.4 歳であった。

3. 2. バイオマーカーとしての見た目年齢

表 2 に見た目年齢と諸指標との単相関を示す。見た目年齢は、実年齢と r = 0.89 と強い相関を示し、検討した多くの指標と有意な相関を示した。特に血圧をはじめとした動脈硬化指標、脳、心、腎の臓器障害指標、そして認知機能や肺活量、重心動揺、骨塩指標などの全てのフレイル指標と有意な相関を示した。

3. 3. 実年齢との独立した効果

見た目年齢差が、実年齢とは独立して諸指標と関連するかを検討するために、性・年齢を補正して検討した（表 3）。見た目年齢差は、実年齢と強い負の相関を示し（男性 r = − 0.68, 女性 r = − 0.59）、男女いずれも年を取るほど若く見えることが示された。一方、検討した諸指標のうち、性・実年齢で補正後も、見た目年齢差と有意な相関を示したのは、血圧値と高脂血症治療薬の服用のみであった。

3. 4. 高血圧が見た目年齢に及ぼす影響

以上の結果に基づき、高血圧と脂質異常症が見た目年齢差に影響を及ぼしている可能性を検討した。高血圧の有無、脂質異常症の有無でそれぞれ 2 群に分けて、実年齢と見た目年齢との関係を示したのが図 1 である。高血圧の有無により実年齢と見た目年齢差との関係が有意に異なった。すなわち、高血圧患者と正常血圧者では、加齢に伴う見た目年齢差の変化に差があり、高血圧患者は高齢期に見た目年齢差が小さく、すなわち、正常血圧者より老けて見られることを示している。一方、このような関係は、脂質異常症では認められなかった。

4. 考　察

今回の検討において、化粧をした状態での見た目年齢は、実年齢と同等の動脈硬化、臓器障害、フレイルに対するバイオマーカーとなることを認めた。一方、化粧をした状態での見た目年齢差が、実年齢とは独立してこれらの障害の予測因子となることは見出すことができなかった。さらに、高血圧患者では正常血圧者に比し、加齢に伴う見た目年齢差の変化が小さいことを認めた。これらの成績は、化粧により減弱するものの、見た目年齢には、臓器障害やフレイルに対するバイオマーカーとしての効果があり、高血圧など生活習慣病が影響を与えている可能性が考えられる。

今回の検討においても、見た目年齢差は、実年齢と有意な負の相関を示した。すなわち、実年齢が進むほど（年をとるほど）、若く見られることを示している。この所見は、これまでの報告と一致した所見であり、一般的に認められる現象と考えられる [4-6]。

これまでの我々自身の報告とは異なり [7]、今回の検討では、見た目年齢差は、実年齢とは独立した動脈硬化のリスク因子とはならなかった。中間報告で示した通り、化粧が見た目年齢に影響し、その結果、見た目年齢の持つバイオマーカーとしての強さが弱まった可能性が考えられる。

一方、見た目年齢自体は、実年齢で補正をしない（実年齢が分からない）状況では、動脈硬化関連因子のみではなく、すべての臓器障害やフレイル関連因子と強く相関していた。このことは、実年齢が分からない日常の生活状況において、我々が相手の見た目から推定する年齢は、動脈硬化や脳・心・腎の臓器障害、さらには全身の種々の身体機能の老化をも適切に評価していることを示している。

フレイルの定義は、主に 2 種類存在する。累積負荷指数 [16] は、疾病や機能障害などを加算することで求める指数であり、種々のパラメータを組み合わせて評価する。生物学的症候群モデル [17] は、握力の低下、歩行速度の低下、活動性の低下、強い疲労感、予期せぬ体重減少の 5 項目のうち 3 項目以上を満たした場合がフレイルと定義される。

本研究では、フレイルのみならず臓器障害として、認知機能、肺機能、サルコペニア指標、重心動揺（ふらつき）、骨密度指標、心機能、腎機能、脳障害の程度など全身機能・障害指数を詳細に検討した。その結果、これらの指標は、全て見た目年齢と有意な相関を示していた。しかし、実年齢で補正を行った見た目年齢差は、これらの指標とは有意な相関を示さなかったことから、ここでも、化粧の効果が関係している可能性があると思われる。

興味深いことに、高血圧の存在が、見た目年齢差に影響を与えていた。この関係の詳細な機序は明らかではないが、高血圧は動脈硬化の重要な危険因子であると共に、加齢と共に罹患率が急増し、60 歳代の 6 割、70 歳代では 7 割に高血圧が存在する。動脈硬化指標そのものは、様々な要因が影響するため、化粧により見た目年齢の効果が減弱したが、加齢性の変化が強い高血圧は、化粧の効果を凌駕した影響を示したのかも知れない。

今回の研究から、化粧の持つ社会的・生物学的な意味合いを考えるとき、化粧は『見た目年齢』を若くすることのみではなく、その背景に存在する『健康であること』にも影響

表 1　対象者の臨床的背景

	n	
男性/女性	427	188/239
年齢, 歳	427	67.2±10.5
見た目年齢	427	65.0 ± 8.3
見た目年齢差	427	-2.2 ± 4.9
身長, cm	427	158.8±8.8
体重, kg	427	58.4±10.98
BMI, kg/m^2	427	23.06±3.14
動脈硬化関連指標		
baPWV, cm/sec	427	1600±341
頸動脈 IMT, mm	427	0.76±0.13
収縮期血圧, mmHg	427	128.4±17.8
拡張期血圧, mmHg	427	71.8±10.8
血圧増幅指数, %	427	88.4±11.4
中性脂肪, mg/dl	427	103.0±51.8
総コレステロール, mg/dl	427	209.1±35.7
HDLコレステロール, mg/dl	427	62.7±15.2
空腹時血糖値, mg/dl	427	102.9±18.3
インスリン濃度, μg/ml	427	6.23±4.33
降圧薬服用, n (%)	427	139 (32.6)
高脂血症治療薬服用, n (%)	427	132 (30.9)
糖尿病治療, n (%)	427	20 (4.7)
臓器障害関連指標		
BNP, pg/ml	427	31.06 ± 47.03
eGFR, ml/min/1.73m2	427	68.58 ± 13.62
尿蛋白 g/Cr	427	0.05 ± 0.3
尿中アルブミン mg/Cr	427	0.43 ± 1.8
無症候性脳梗塞 (+), n (%)	352	47 (13.4)
脳内微小出血(+), n (%)	352	36 (10.2)
脳室周囲白質障害, grade	352	1.3 ± 0.8
深部白質障害, grade	352	1.6 ± 0.9
フレイル関連指標		
認知機能テスト, point	427	14.2±1.3
骨格筋率, %	425	25.4±3.6
骨格筋量, kg	425	15.1±4.3
大腿筋面積, cm2	361	112.6±26.7
握力, kg	427	28.8±9.2
重心動揺総軌跡長, cm	426	95.3±26.7
重心動揺外周面積, cm2	426	3.68±1.76
肺活量, L	424	2.72 ± 0.86
%肺活量, %	424	98.0 ± 19.0
機能的肺活量, L	424	2.04 ± 0.76
%機能的肺活量, %	424	73.2 ± 17.5
一秒量, L	424	2.00 ± 0.70
%一秒量, %	424	97.0 ± 22.5
踵骨内超音波伝搬速度, cm/sec	426	1508.6 ± 28.4

平均値±SD.

表２　見た目年齢との相関

	n	β	p
年齢	**427**	**0.89**	**<.0001**
身長	**427**	**-0.29**	**<.0001**
体重	**427**	**-0.21**	**<.0001**
BMI	427	-0.04	0.39
動脈硬化関連指標			
baPWV, cm/sec	**427**	**0.47**	**<.0001**
頸動脈 IMT, mm	**427**	**0.44**	**<.0001**
収縮期血圧, mmHg	**427**	**0.22**	**<.0001**
拡張期血圧, mmHg	**427**	**-0.23**	**<.0001**
血圧増幅指数, %	**427**	**0.19**	**<.0001**
中性脂肪, mg/dl	427	-0.03	0.59
総コレステロール, mg/dl	427	-0.06	0.17
HDLコレステロール, mg/dl	427	-0.03	0.54
空腹時血糖値, mg/dl	427	0.09	0.07
インスリン濃度, μg/ml	427	-0.06	0.23
降圧薬服用, yes =1	**427**	**0.22**	**<.0001**
高脂血症治療薬服用, yes=1	**427**	**0.13**	**0.007**
糖尿病治療, yes=1	427	0.09	0.06
臓器障害関連指標			
BNP, pg/ml	**427**	**0.24**	**<.0001**
eGFR , ml/min/1.73m2	**427**	**-0.43**	**<.0001**
尿蛋白, g/Cr	**427**	**0.12**	**0.01**
尿中アルブミン, mg/Cr	**427**	**0.15**	**0.002**
無症候性脳梗塞, yes=1	**352**	**0.22**	**<.0001**
脳内微小出血, yes=1	**352**	**0.21**	**<.0001**
脳室周囲白質障害, grade	**352**	**0.46**	**<.0001**
深部白質障害, grade	**352**	**0.49**	**<.0001**
フレイル関連指標			
認知機能テスト, point	**427**	**-0.30**	**<.0001**
骨格筋率, %	**425**	**-0.37**	**<.0001**
骨格筋量, kg	**425**	**-0.32**	**<.0001**
大腿筋面積, cm2	**361**	**-0.29**	**<.0001**
握力, kg	**427**	**-0.26**	**<.0001**
重心動揺総軌跡長, cm	**426**	**0.37**	**<.0001**
重心動揺外周面積, cm2	**426**	**0.24**	**<.0001**
肺活量, L	**424**	**-0.35**	**<.0001**
%肺活量, %	**424**	**-0.20**	**<.0001**
機能的肺活量, L	**424**	**-0.38**	**<.0001**
%機能的肺活量, %	**424**	**-0.26**	**<.0001**
一秒量, L	**424**	**-0.38**	**<.0001**
%一秒量, %	**424**	**0.15**	**0.002**
踵骨内超音波伝搬速度, cm/sec	**426**	**-0.34**	**<.0001**

性別にて補正.

表３　見た目年齢差との相関

	n	β	p
年齢	**427**	**-0.64**	**<.0001**
身長	427	-0.05	0.16
体重	427	0.01	0.91
BMI	427	0.04	0.48
動脈硬化関連指標			
baPWV, cm/sec	427	-0.01	0.92
頸動脈 IMT, mm	427	-0.06	0.26
収縮期血圧, mmHg	**427**	**0.13**	**0.035**
拡張期血圧, mmHg	**427**	**0.196**	**0.001**
血圧増幅指数, %	427	0.088	0.14
中性脂肪, mg/dl	427	0.11	0.081
総コレステロール, mg/dl	427	0.03	0.63
HDLコレステロール, mg/dl	427	-0.02	0.71
空腹時血糖値, mg/dl	427	0.01	0.87
インスリン濃度, μg/ml	427	-0.05	0.42
降圧薬服用, yes =1	427	-0.09	0.12
高脂血症治療薬服用, yes=1	**427**	**-0.12**	**0.044**
糖尿病治療, yes=1	427	0.04	0.53
臓器障害関連指標			
BNP, pg/ml	427	0.07	0.24
eGFR , ml/min/1.73m2	427	-0.04	0.46
尿蛋白, g/Cr	427	-0.03	0.66
尿中アルブミン, mg/Cr	427	-0.03	0.59
無症候性脳梗塞, yes=1	352	0.04	0.55
脳内微小出血, yes=1	352	0.02	0.75
脳室周囲白質障害, grade	352	-0.02	0.74
深部白質障害, grade	352	0.01	0.84
フレイル関連指標			
認知機能テスト, point	427	0.02	0.75
骨格筋率, %	425	-0.04	0.22
骨格筋量, kg	425	-0.01	0.75
大腿筋面積, cm2	361	-0.02	0.61
握力, kg	427	0.00	0.99
重心動揺総軌跡長, cm	426	-0.03	0.61
重心動揺外周面積, cm2	426	-0.04	0.52
肺活量, L	424	0.05	0.19
%肺活量, %	424	0.06	0.31
機能的肺活量, L	424	0.03	0.44
%機能的肺活量, %	424	0.02	0.73
一秒量, L	424	0.03	0.46
%一秒量, %	424	0.01	0.88
踵骨内超音波伝搬速度, cm/sec	426	-0.07	0.22

性別、実年齢にて補正.

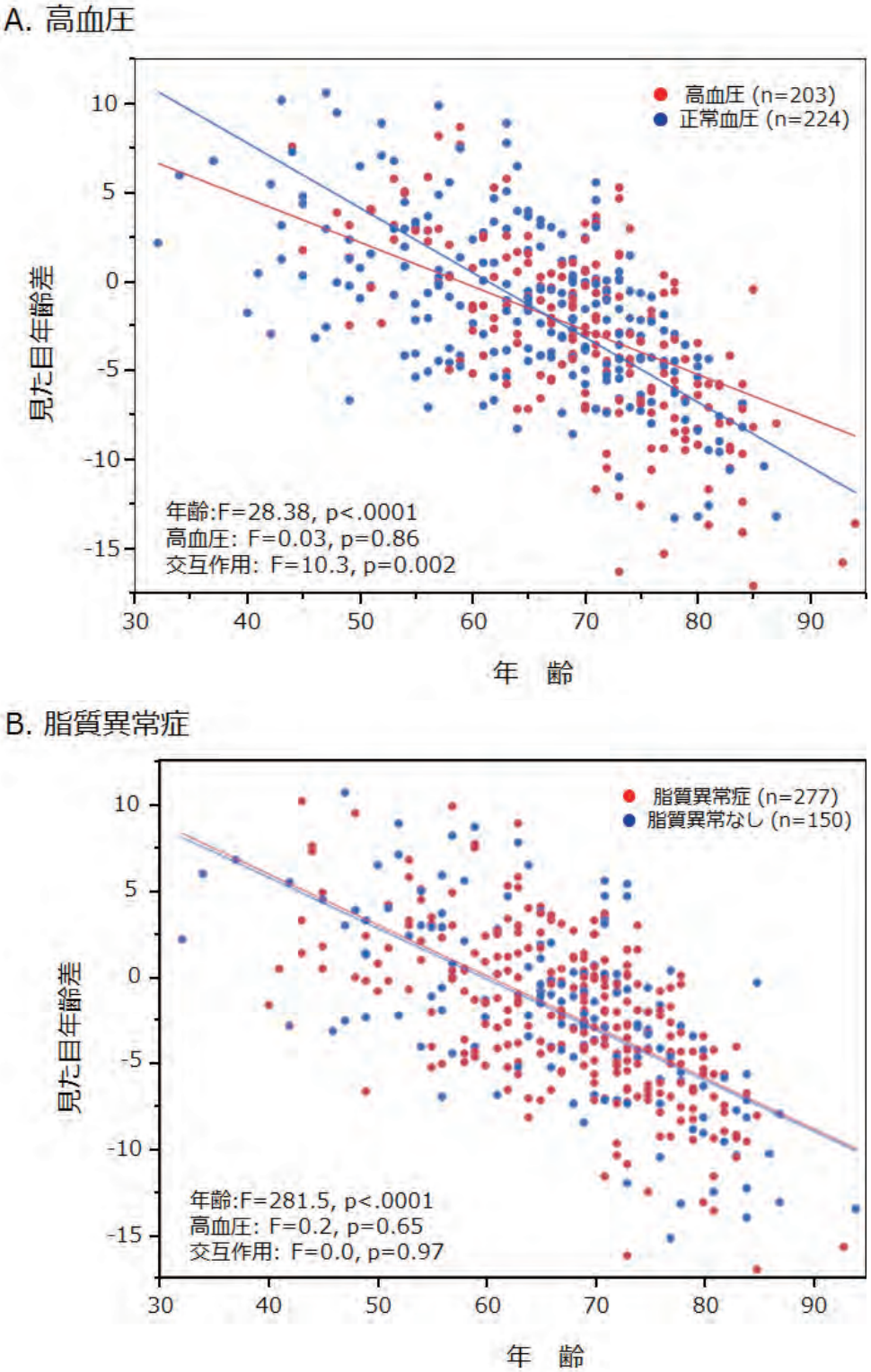


図１　高血圧および脂質異常症と見た目年齢差

高血圧患者では正常血圧者に比し、加齢に伴う見た目年齢差の低下が小さい。

を与えており、健康に見せるための化粧が見た目を若くしているとも考えられる。

5．総　括

化粧をした状態での見た目年齢は、動脈硬化、臓器障害、フレイルのバイオマーカーとなることを認めた。見た目年齢の効果は、化粧により減弱するものの老化のバイオマーカーとして有用であると考えられる。

（文献）

1）Afilalo J, Alexander KP, Mack MJ, et al. Frailty assessment in the cardiovascular care of older adults. J Am Coll Cardiol., 63, 747-762, 2014.

2）Robertson DA, Savva GM, Kenny RA. Frailty and cognitive impairment – A review of the evidence and causal mechanisms. Ageing Research Rev., 12, 840-851, 2013.

3）Chen LK, Liu LK, Woo J, et al. Sarcopenia in Asia: consensus report of the Asian Working Group for Sarcopenia. J Am Med Dir Assoc., 15, 95-101, 2014.

4）Christensen K, Thinggaard M, McGue M, et al. Perceived age as clinically useful biomarker of ageing: cohort study. BMJ., 339, 2009, b5262.

5）Gunn DA, Rexbye H, Griffiths CE, et al. Why some women look young for their age. PLoS One., 4, e8021,2009.

6）Mayes AE, Murray PG, Gunn DA, et al. Ageing appearance in China: biophysical profile of facial skin and its relationship to perceived age. J Eur Acad Dermatol Venereol., 24, 341-348,2010.

7）Kido M, Kohara K, Miyawaki S, et al. Perceived age of facial features is a significant diagnosis criterion for age-related carotid atherosclerosis in Japanese subjects: J-SHIPP study. Geriatr Gerontol Int., 12, 733-740, 2012.

8）Miyawaki S, Kohara K, Kido T, et al. Facial pigmentation as a biomarker of carotid atherosclerosis in middle-aged to elderly healthy Japanese subjects. Skin Res Technol., 22, 20-24, 2016.

9）Ochi M, Kohara K, Tabara Y, et al. Arterial stiffness is associated with low thigh muscle mass in middle-aged to elderly men. Atherosclerosis. 212, 327-332, 2010.

10）Kohara K, Ochi M, Tabara Y, et al. Arterial stiffness in sarcopenic visceral obesity in the elderly: J-SHIPP study. Int J Cardiol., 58, 146-148, 2012.

11）Ohara M, Kohara K, Tabara Y, et al. Portable indices for sarcopenia are associated with pressure wave reflection and central pulse pressure: the J-SHIPP study. J Hypertens., 33, 314-322, 2015.

12）A new guideline making committee of a brain dock. Brain MRI examination. In: Japanese Society for Detection of Asymptomatic Brain Disease, ed. Braindock Guideline 2014. 4th edition, Tokyo, Japan: Kyobunsha, 38-47, 2014. (In Japanese).

13）Tabara Y, Okada Y, Ohara M, et al. Association of postural instability with asymptomatic cerebrovascular damage and cognitive decline: the Japan Shimanami health promoting program study. Stroke., 46, 16-22, 2015.

14）Yamashita T, Kohara K, Tabara Y, et al. Muscle mass, visceral fat, and plasma levels of B-type natriuretic peptide in healthy individuals (from the J-SHIPP Study). Am J Cardiol.,114, 635-640, 2014.

15）Inoue M, Jinbo D, Nakamura Y, et al. Development and evaluation of a computerized test battery for Alzheimer' s disease screening in community-based settings. Am J Alzheimers Dis Other Demen., 24, 132-135, 2009.

16）Rockwood K, Fox RA, Stolee P, et al. Frailty in elderly people: an evolving concept. CMAJ., 150, 489-495, 1994.

17）Fried LP, Tangen CM, Walston J, et al; Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. Frailty in older adults: evidence for a phenotype. J Gerontol A Biol Sci Med Sci.56, M146-156, 2001.

顔の魅力度認知における部分情報の統合

東京大学大学院工学系研究科先端学際工学専攻
三枝　千尋

Human facial attractiveness plays an important role in interpersonal impression formation. Studies have suggested that each facial part differently contributes to holistic facial attractiveness; however, it remains unknown whether the differential contribution of facial parts is stable over time. In the current study, we examined how contributions of facial parts to whole facial attractiveness changes over time and gaze direction of the face.

1. 緒　言

顔はその持ち主に関する様々な情報を映し、対人コミュニケーションにおいて重要な役割を持つ。なかでも顔の魅力は、善良さなどのポジティブな性格特徴と関連付けて知覚される傾向があり[1]、外見の魅力が社会生活において重要な意味を持つことが示されてきた。その重要性から、顔の魅力はごくわずかな時間のうちに判断することが可能と考えられている。顔の魅力、信頼性や有能さ、好ましさといった社会的な性質の判断はともに100ミリ秒間のみ提示された顔画像に対しても行うことが可能であること、顔の魅力が他の社会的な性質の評価と高い相関を持つことが報告されている[2]。また別の研究では、13ミリ秒という非常に短い提示時間であっても顔の魅力判断は可能であること、メイクアップを施した顔の魅力判断も250ミリ秒という短い時間の間にできることが示されている[3, 4]。これらの研究結果は、顔の魅力がごく短時間の間に取得した視覚情報のみに基づいて判断できることを示唆している。

それでは魅力的な顔とはどのような要素から構成されるのだろうか。魅力的な顔の形態特徴として、対称性の高い顔、平均化された顔、平均化された顔からさらに性差を強調した顔が美しいと評価されること[5-7]、顔の色やテクスチャも魅力評価に影響を及ぼすことが報告されている[8]。また、顔全体の魅力評価に対する顔のパーツの影響としては、目と眉の魅力度は顔全体の魅力と有意に相関するものの鼻と口は相関を持たないことが示唆されている[9]。顔の魅力評価は評価者の性別によっても異なることが知られており、筆者らの研究では女性評価者が男性顔の魅力を評価する際に、魅力的とされる顔ほど評価者間で評価がばらつく傾向があることが示唆された[10]。

知覚される顔の魅力は対人的なコンテクストによっても変化する。例えば､評価者の方に視線を向けている顔画像の魅力度は、評価者から視線をそらしている顔画像の魅力度よりも魅力度が高いと知覚されることが報告されている[11]。視線方向は相手が注意を向けている対象を知る手がかりであり、評価者に向けられた視線は、その顔の持ち主が評価者に対して注意を向けていることを示すと考えられる。Jonesらの研究[12]では、魅力的な顔に対する選好が、その顔の視線方向と表情に応じて変化することも報告されており、対人的なコンテクストに依存した魅力知覚の様相の変化が示唆されている。

これまでの研究においては、短時間のみ提示された顔の魅力判断を構成する要素については検討されてこなかった。しかし実生活においては相手の顔を長時間見つめるようなシチュエーションは少ないと考えられ、ごくわずかな時間のみ見た顔の魅力がどのような構成要素に基づいて判断されるのかを明らかにすることは、日常生活において知覚される顔の魅力を理解する上で重要と考えられる。そこで本研究においては、顔全体の魅力評価に対する部分情報の寄与の提示時間による変化、及び、対人的なコンテクストの違いによる部分情報統合の変化を明らかにすることを目的とし、実験心理学的手法を用いた検討を行った。

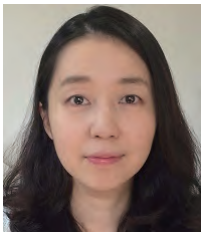
2. 実　験

2. 1. 顔全体の魅力に対するパーツ情報寄与の時間依存性（実験 1）

2. 1. 1. 顔画像の準備

HKU Face Databaseに含まれるアジア人女性58名の顔写真（正面から撮影されたカラー写真）を用い、顔全体提示条件では58枚の写真それぞれのフェイスラインより内側を正方形に切り抜いた画像を、パーツ提示条件の刺激画像として目の部分のみ、鼻の部分のみ、口の部分のみをそれぞれ長方形に切り抜いた画像を実験に用いた。

予備実験において得られた時間制約のない条件における魅力評定値（男性評定者16名、女性評定者20名、平均年



Judgment of facial attractiveness as an integration of facial parts
Chihiro Saegusa
Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo

齢21.8歳）をもとに、58枚の画像を各群が同程度の平均魅力評定値を持つ3群にわけた後、Willis & Todorovの報告[2]を参考に、各群に対して3つの提示時間条件（20ミリ秒、100ミリ秒、1000ミリ秒）を3通りの組み合わせによって割り当てた。この際、同じモデルの顔から作成された各刺激画像（顔全体、目のみ、鼻のみ、口のみ）に対しては必ず同じ提示時間条件が割り当てられるように組み合わせた。実験参加者は刺激群と提示時間の3通りの組み合わせに対して均等に割り付けられた。

2. 1. 2. 実験参加者

実験参加者は通常の視力（矯正視力含む）を有する19歳から30歳の男女43名（男性24名、女性19名；平均年齢22.3歳）であった。

2. 1. 3. 実験手続き

実験は、目のみ、鼻のみ、口のみ、顔全体の4つの提示条件に該当する4ブロックにより構成された。パーツのみを提示する3つのブロックの順序は実験参加者間で均等になるように割り付けを行い、顔全体提示条件のブロックは必ず最後になるようにした。画像提示に用いたモニターは、22インチのMitsubishi Diamond CRTモニター（画面解像度：1024×768、リフレッシュレート：100ヘルツ）であり、画面上に提示された刺激画像の視角は、顔全体条件の場合には9.2°×9.2°、目のみの場合には7.7°×1.5°、鼻のみの場合には3.1°×4.6°、口のみの場合には4.2°×2.3°であった。各ブロックのはじめには、ブロック内で提示する全画像を1枚あたり0.5秒ずつモニター画面にプレビュー表示した。その後、各画像をあらかじめ割り当てられた提示時間（20ミリ秒、100ミリ秒、1000ミリ秒のいずれか）だけモニター画面上に提示し、その魅力度を「1：魅力的ではない」～「7：魅力的である」の7段階尺度で評価させた。各画像はブロック内においてランダムな順序で2回ずつ提示された。魅力度の評定には、尺度の全範囲を用いるよう教示した。

2. 1. 4. 解　析

実験プログラムの不備により実験を完了しなかった4名を除く39名分（男性23名、女性16名）のデータを解析に用いた。7段階尺度による評定値は、下記の換算式を用いて標準化得点に換算した上で解析に用いた：

標準化得点 $z = (x - \mu) / \sigma$

ここで、xは各試行における評定値、μは各実験参加者が実験中に用いた評定値の平均値、σは各実験参加者が実験中に用いた評定値の標準偏差である。

2. 2. 短時間提示でのパーツ情報統合に対する視線方向の影響（実験2）

2. 2. 1. 顔画像の準備

実験1で用いたのと同じHKU Face Databaseのアジア人女性58名の正面顔画像を用いて刺激作成を行った。視線方向を統制するため、FaceGen ModellerのPhotoFit機能を用いて各顔画像から顔モデルを作成し、視線が正面を向いている直視条件の刺激画像を合成した。またモーフィング機能によって視線を左右に同じだけ操作することで、視線が左右に逸れている逸視条件の刺激画像を合成した。合成した各刺激画像から、顔全体、目のみ、鼻のみ、口のみの各提示条件に用いる刺激をそれぞれ切り出して実験に用いた（図1）。刺激画像を実験1と同様に3群にわけ、3通りの組み合わせによって3つの提示時間（20ミリ秒、

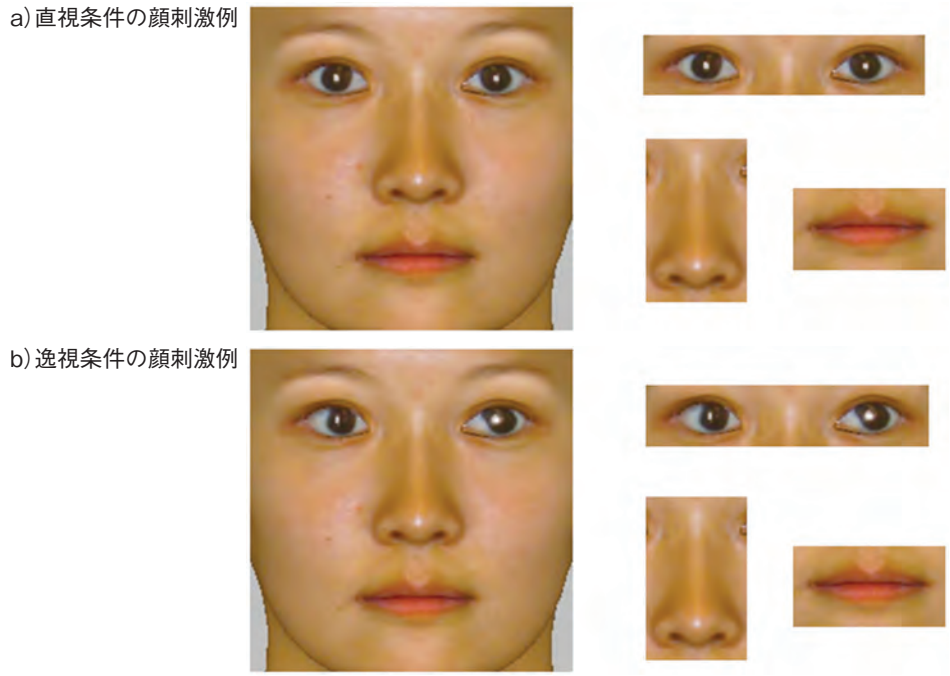


図1　実験に使用した顔刺激の例（文献[13]を改変）

100 ミリ秒、1000 ミリ秒)に割り当てた。

2. 2. 2. 実験参加者

実験参加者は通常の視力（矯正視力を含む）を有する 19 ～ 30歳の男女38名(男性21名､女性17名;平均年齢22.3歳)であった。

2. 2. 3. 実験手続き

顔の各パーツの魅力評価を行う 4 ブロック（視線一致条件の目、視線が逸れた条件の目、鼻、口）と顔全体の魅力評価を行う 2 ブロック（視線一致条件の顔全体、視線が逸れた条件の顔全体）の合計 6 ブロックから構成された。ブロックの順序は常にパーツ条件の 4 ブロックを実施した後に顔全体条件の 2 ブロックを実施した。また、パーツ条件／顔全体条件内でのブロック順序は実験参加者間で均等になるように割り付けを行った。各ブロックの初めに、ブロック内で提示される 58 枚の刺激画像を各 0.5 秒ずつプレビュー表示した。その後、58 枚の画像をランダムな順序で 1 回ずつ、画像に割り当てられた提示時間の間モニター画面上に提示し、実験参加者に提示画像の魅力度を「1：魅力的ではない」～「7：魅力的である」の 7 段階尺度で評価させた。他の実験条件は全て実験 1 と同じになるように設定した。

2. 2. 4. 解析

実験プログラムの不備により実験を完了しなかった 2 名を除く 36 名分（男性 20 名、女性 16 名）のデータを解析に用いた。実験 1 と同様に、7 段階尺度による評定値を標準化得点に換算して解析を行った。

3. 結　果

3. 1. 顔全体の魅力に対するパーツ情報寄与の時間依存性

顔全体の魅力評価は 13 ミリ秒間という短い時間のみ提示された顔刺激に対しても可能であることが先行研究[3)]によって示されている。しかし短時間のみ提示された顔のパーツに対する魅力評価が可能であるかは不明である。そこで、短時間提示された顔全体の魅力評価に対する各パーツの魅力の寄与を検討するにあたり、まず短時間提示された顔のパーツに対する魅力評価の一貫性を調べることとした。各提示時間条件における顔のパーツに対する魅力度評定の平均値と、予備実験から得られた時間制約なし条件における顔のパーツの魅力度評定の平均値とのピアソン積率相関分析を行った。この結果、目の魅力評定において 20 ミリ秒という短い提示時間後の魅力評価が、時間制約なし条件における魅力評価と高い正の相関を示した（目：$r = 0.86$, $p < .001$）ほか、口と鼻の魅力評価においても 20 ミリ秒提示後の魅力評価と時間制約なし条件における魅力評価には有意な正の相関（鼻：$r = 0.69$, $p < .001$; 口：$r = 0.64$, $p < .001$）が認められ、顔全体の場合と同様に顔の各パーツについても 20 ミリ秒という短い時間の間に得られる視覚情報に基づいた魅力評価が可能であることが示唆された。

各提示時間条件（20 ミリ秒、100 ミリ秒、1000 ミリ秒)、及び、各画像提示条件(顔全体、各パーツのみ)におけるそれぞれの刺激画像の魅力を、全実験参加者の魅力評定の平均値を算出することにより求めた。各提示時間条件における顔全体の魅力を目的変数、それと同じ提示時間条件における目のみ、鼻のみ、口のみの魅力を説明変数とした重回帰分析を行い、各提示時間条件における顔全体の魅力に対するパーツ情報の寄与を求めた。この結果、目の標準化偏回帰係数は 20 ミリ秒提示条件においてβ = 0.54、100 ミリ秒提示条件においてβ = 0.50、1000 ミリ秒提示条件においてβ = 0.49（いずれも $p < .001$）と一貫して高く、提示時間の長さによらず顔全体の魅力度評価に影響を及ぼすことが示唆された。一方、口の標準化偏回帰係数は 20 ミリ秒提示においてβ = 0.30、100 ミリ秒提示においてβ = 0.32、1000 ミリ秒提示においてβ = 0.35、また鼻の標準化偏回帰係数は 20 ミリ秒提示においてβ = 0.27、100 ミリ秒提示においてβ = 0.31、1000 ミリ秒提示においてβ = 0.36 であり、いずれの場合にも提示時間が長くなるとともに係数が大きくなる傾向が見られた（20 ミリ秒の鼻の係数のみ $p = .051$; 他の全ての係数について $p < .001 \sim .05$)。これらの重回帰分析の結果から、目は 20 ミリ秒間という短い時間のみ提示された顔の魅力評価にも大きく影響するものの、他のパーツ(鼻と口)の影響は提示時間が長くなるにつれて大きくなり、パーツ種類によって顔全体の魅力評価に対する寄与の提示時間依存性が異なることが示唆された。

3. 2. 短時間提示でのパーツ情報統合に対する視線方向の影響

顔全体の魅力に対するパーツの魅力の寄与の対人的なコンテクストによる違いとして、評価する顔刺激の視線方向の効果を検討した。顔全体の魅力を目的変数、各パーツの魅力を説明変数とした 3. 1. と同様の重回帰分析を行った結果、直視条件においては、20 ミリ秒という短い提示時間の条件においても、全てのパーツの標準化偏回帰係数が有意または有意傾向であった（目：β = .44, $p < .001$；鼻：β = .27, $p < .05$；口：β = .20, $p = .077$)。

一方で逸視条件においては、20 ミリ秒提示条件の顔魅力評価に対してはいずれのパーツの偏回帰係数も有意ではなかった（目：β = .25, $p = .082$; 鼻：β = .10, $p = .45$; 口：β = − .169, $p = .24$)。また直視条件では 20 ミリ秒間提示条件における重回帰モデルの説明力が $R^2 = .386$（$p < .001$）であるのに対し、逸視条件では重回帰モデルの説明力は低いという結果が得られた（$R^2 = .074$, $p = .24$)。従って逸視条件においては、顔全体の魅力がパーツの魅力のみからは説明できず、パーツ情報の寄与が低下しているものと考えら

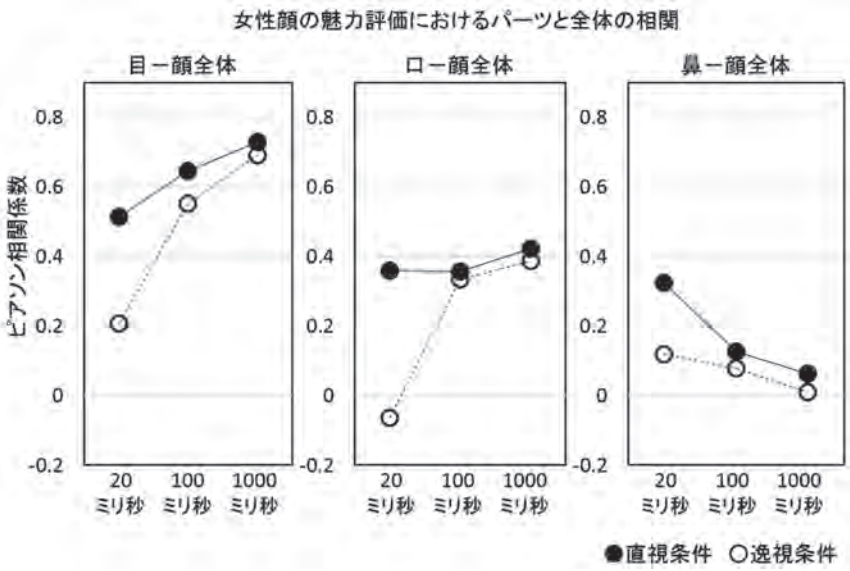


図2　顔全体の魅力と各パーツの魅力との相関（文献[13]を改変）

れた。

実験1の結果では、直視条件における重回帰モデルの各パーツの偏回帰係数は、提示時間によらずゼロよりも有意に高い（20ミリ秒提示における鼻の係数のみ有意傾向）という結果が得られた。しかし実験2の重回帰分析においては、鼻と口の偏回帰係数はいずれも有意傾向にしかなかった。本実験の結果解析においては目と口の魅力評定の間に弱い正の相関が確認され、これが重回帰モデルに影響を及ぼしている可能性が考えられる。そこで直視条件と逸視条件における顔全体と顔のパーツの魅力の関係を、ピアソン相関分析によっても確認した（図2）。この結果、提示時間が1秒と長い場合には逸視条件における顔全体－パーツ間の相関係数は同程度であるものの（例えば直視条件における目－顔全体：r=.730、逸視条件における目－顔全体：r=.691；Z=0.425、p=.337）、提示時間が20ミリ秒と短い場合には逸視条件における相関係数は直視条件における相関係数よりも低いという結果（例えば直視条件における目－顔全体：r=.514、逸視条件における目－顔全体：r=.206；Z=1.84、p<.05）が得られ、重回帰分析によって得られた傾向と同様の結果が得られた。

4. 考　察

実験1から、顔全体の場合と同様に顔のパーツも20ミリ秒の間に取得した情報に基づいて魅力判断が可能であること、20ミリ秒という短い時間提示された顔についても顔の魅力判断は可能であるが、魅力知覚を構成するパーツとその寄与は提示時間によって変化している可能性があることが示唆された。また、パーツの寄与の提示時間に依存した変化はパーツの種類によっても異なり、目の魅力は提示時間の長さによらず顔全体の魅力に対する高い寄与を示したのに対し、鼻と口の魅力は提示時間が20ミリ秒と短い場合には顔全体の魅力に対する寄与は低く、提示時間が長くなるにつれて寄与が高まる傾向が見られた。

顔全体の魅力評価に対して目の魅力が大きく寄与する理由として、目は白目部分と黒目部分が接していることから大きな輝度コントラストを持ち、そのため顕著性が高く、注意をひきやすい刺激であることが考えられる。また同時に、目は対人コミュニケーションにおいて非常に重要な役割を担うパーツであることから、対人的な顕著性が高く、他のパーツよりも速く知覚される可能性もある。

そこで、対人的なコンテクストが異なる場合に、顔全体の魅力に対する各パーツの寄与がどのように変化するかを明らかとするため、顔刺激の視線方向を変化させた実験2を実施した。この結果、顔刺激の視線が評価者を向いている直視条件においては、20ミリ秒間提示後の顔全体の魅力に顔の各パーツの魅力が有意に寄与した。一方で、顔刺激の視線が評価者から逸れている逸視条件においては、20ミリ秒間提示後の顔全体の魅力に対してパーツの魅力情報が統合されていない可能性が示唆された。これらの結果は、目は社会的手がかりとしての重要性が高いために短時間提示においても顔全体の魅力に大きく寄与すると考えられること、また視線が評価者の方に向けられることによって、顔全体の魅力に対するパーツ情報の統合が促進されることを示唆している。

謝　辞

本研究にご支援をいただいたコスメトロジー研究振興財団に深く感謝いたします。また、本研究の共同研究者である早稲田大学の渡邊克巳教授に深謝申し上げます。本報告書において述べた研究成果は引用文献13に掲載され、

本報告書は論文誌発行元であるAmerican Psychological Associationの許諾範囲内において作成しました。上述の文献、及び、助成金が研究の一部を担った引用文献10では、Cosmetology Foundationより助成を受けている旨明記しました。

（引用文献）

1） Dion, K., Berscheid, E. & Walster, E. What is beautiful is good. *J. Pers. Soc. Psychol.* **24**, 285–290 (1972).
2） Willis, J. & Todorov, A. First Impressions Making Up Your Mind After a 100-Ms Exposure to a Face. *Psychol. Sci.* **17**, 592–599 (2006).
3） Olson, I. R. & Marshuetz, C. Facial attractiveness is appraised in a glance. *Emotion* **5**, 498–502 (2005).
4） Etcoff, N. L., Stock, S., Haley, L. E., Vickery, S. A. & House, D. M. Cosmetics as a feature of the extended human phenotype: modulation of the perception of biologically important facial signals. *PLoS One* **6**, e25656 (2011).
5） Grammer, K. & Thornhill, R. Human (Homo sapiens) facial attractiveness and sexual selection: the role of symmetry and averageness. *J. Comp. Psychol.* **108**, 233–242 (1994).
6） Langlois, J. H. & Roggman, L. A. Attractive faces are only average. *Psychol. Sci.* **1**, 115–121 (1990).
7） Perrett, D. I. et al. Effects of sexual dimorphism on facial attractiveness. *Nature* **394**, 884–7 (1998).
8） Fink, B., Grammer, K. & Thornhill, R. Human (Homo sapiens) facial attractiveness in relation to skin texture and color. *J. Comp. Psychol.* **115**, 92–99 (2001).
9） 加藤隆，阿磨大介，森岡久美子，赤松茂．顔の魅力度判断におけるパーツの魅力の影響．信学技報，HIP97-53, 1998.
10） Saegusa, C. & Watanabe, K. Is an attractive face attractive for all? An exploratory research on attractiveness evaluation by female observers. in *2014 6th Int. Conf. Knowl. Smart Technol.* 105–107 (IEEE, 2014). doi:10.1109/KST.2014.6775403
11） Ewing, L., Rhodes, G. & Pellicano, E. Have you got the look? Gaze direction affects judgements of facial attractiveness. *Vis. cogn.* **18**, 321–330 (2010).
12） Jones, B. C., Debruine, L. M., Little, A. C., Conway, C. A. & Feinberg, D. R. Integrating Gaze Direction and Expression in Preferences for Attractive Faces. **17**, 588–591 (2006).
13） Saegusa, C. & Watanabe, K. Judgments of Facial Attractiveness as a Combination of Facial Parts Information Over Time : Social and Aesthetic Factors. *J. Exp. Psychol. Hum. Percept. Perform.* **42**, 173–179 (2016).

笑顔のリズムが創る印象空間の可視化と化粧効果の測定

秋田県立大学システム科学技術学部機械知能システム学科
佐藤　和人

This paper presents a framework of tempos and rhythms to clarify the relevance between psychological states and facial expressions, particularly addressing repetitive operations of intentional facial expressions after giving a stress stimulus. By acquiring image datasets of facial expressions under the states of pleasant–unpleasant stimulus for 20 subjects, we extracted expressive tempos for respective subjects. Consequently, averages of extraction rates show that the pleasant state was 81.1%. The unpleasant state was 77.8%. Regarding effects of pleasant–unpleasant stimulus on the expressive tempos, particularly addressing the variation of the number of frames constituting one tempo, the variation in unpleasant stimulus became greater than that in the pleasant stimulus. The results show that the analysis using expressive tempos and rhythms is valid as an indicator for estimating the psychological state.

1. 緒　言

魅力的な笑顔は人を惹きつけ，相手の心を和ませる幸福のシンボルであり，コミュニケーションの潤滑剤として有効である．魅力的な笑顔が有する幾何学的特徴を分析した研究[1]によると，男女共に最も魅力的に感じる笑顔の部位は目，次いで魅力ある部位は口の順で，目尻や口元など目と口に付随する部位も笑顔の魅力要因として大きいことが報告されており，魅力的な笑顔には目と口を構成要素とする表情矩形のアスペクト比に黄金比が認められている．また，顔パーツから形成される印象と顔の全体印象との関連性について調べた山田らは[2]，目は他者の印象を形成する際に大変重要な役割を果たしており，各パーツから形成される印象を加算結合することにより全体印象をある程度説明可能であるとしているものの，どのパーツからの情報を相対的に重視しているかについては個人差が存在する可能性を示唆している．笑顔の表出に着目して男女別の視点で捉えると，女性は男性よりも良く笑顔を表出する規則があると言われており[3]，男性に比べて笑顔であることが自然で笑顔を創ることに長けている．特に，女性はポジティブ情動表出の調整に優れており，自然な表出と変わらず，受け手にポジティブな影響をもたらすことができる．しかしながら，意図的に表情表出を創り出す場合，自然な表情表出とは異なる表情筋が動くと言われており[4]，表出過程に焦点を当てると，笑顔を創り出す顔パーツの変形程度や動作するタイミングが微妙に異なることが予想される．

Measurement of Cosmetic Effect and Visualization of Impression Space by Rhythm of Smile Expression

Kazuhito Sato

Department of Machine Intelligence and Systems Engineering Faculty of Systems Science and Technology Akita Prefectural University

一方，人間は動いているもの，音を発しているものなど身の回りのもの全てにリズムを感じることができる．また，人間は会話や生活のリズムというように日常生活を営む上で何らかのリズムを感じており[5,6]，これらのリズムはパーソナルテンポに基づいている．パーソナルテンポとは，個人固有の生体リズムのことであり，特に制約のない自由な行動場面で自然に表出される個人固有の速さを表す．会話における表情の表出は日常的な生活行動の一つであることから，パーソナルテンポに基づく固有なリズムが存在すると考えられる．

我々は，これまでに表情と心理状態との関連性を明らかにするために，表情空間チャートという枠組みを用いて，ストレスと表情表出の関係性を検証した結果，ストレスの蓄積程度の違いが表情の種別や表出プロセスに影響することを明らかにした[7,8]．また，ストレス刺激後の意図的表情を繰り返し表出するプロセスに着目した表出テンポとリズムという枠組みを提案した[9]．表出テンポとリズムは，表情の表出程度をラベル化した時系列変化[6]において，無表情から表情表出を経て無表情に戻る区間を１テンポ，テンポを複数回繰り返したものを１リズムと位置付け，快刺激時に比べて不快刺激時の方が，「喜び」表情の１テンポを構成するフレーム数のばらつきが大きいことを示した．更に，ベイジアンネットワーク（Bayesian Networks:BNs）を用いて，心理的ストレスの蓄積程度と表情表出の相互関係をグラフィカルに表現したストレスモデルを構築し，心理的ストレスの影響が現れ易い表情が「喜び」と「悲しみ」表情であることを明らかにすると共に，表情の種別によって現れ易い顔部位（目元や口元など）が異なる可能性を示した[10–12]．

本研究では，情動喚起ビデオによる快･不快刺激後の「喜び」表情の表出過程に着目し，顔部位が刻む表出リズムを相互情報量の観点から定量的に解析することにより，人間の心理状態に起因する表情表出時の複雑性や曖昧性を客観的に表現することを試みる．さらに，接客支援ツール（Smile

Learning）の試作開発を通して，化粧効果と他者に与える印象変化の相関関係について，受け手の視線誘導効果の定量的解析を基に検証する．

2．実験方法

顔という対象の形状が人物それぞれで異なるように，表情表出の仕方，例えばある感情をどの程度の大きさの顔面変形として表情に表出するかについては個人差がある．このため，赤松は，個々人の表情表出の特性に応じて修正していく適応的な学習メカニズムが必要と述べている[13]．したがって，本研究では，被験者が意図的に表出した表情を対象として，時間軸方向への圧縮による正規化と表情表出における位相変化を抽出するためにSOMs（Self Organizing Maps）を用いて表情パターンの分類を行う．さらに，SOMsにより分類した表情画像を，安定性と可塑性を併せ持った適応的学習アルゴリズムであるFuzzy ARTを用いて再分類する．SOMsは，予め決められた写像空間の中で相対的にカテゴリ分類を行うが，Fuzzy ARTは，ビジランスパラメータで制御された一定の粒度のもとでカテゴリ分類を行うため，長期間に及ぶ時系列データに対しても，同じ基準で分類することができる．提案手法の処理手順を図1に示す．以下では，表出強度の時系列変化の抽出，相互情報量による表情表出リズムの定量化について個別に説明する．

2．1．表出強度の時系列変化の取得

前処理として，時系列表情画像に対して輝度値の正規化を行い，照明条件などによる濃淡値の影響を軽減する．また，ヒストグラムの平滑化によって，画像の明瞭化とコントラストの調整を行う．さらに，特徴表現法としてGabor Wavelets特徴の方位選択性により，目，眉，口，鼻といった表情のダイナミクスを特徴づける顔パーツを強調する．Gabor Wavelets変換した時系列表情画像に粗視化処理を行うことで，情報量の圧縮と顔画像を撮影する際に発生する微少な位置ずれの影響を緩和する．

次に，表出強度の時系列変化を取得する手順の詳細を図2に示す．はじめに，粗視化処理を施した時系列表情画像の輝度値情報をSOMsにより学習し，表情の位相変化が類似する顔画像ごとに15個の写像ユニットに分類する．次に，これら15個の写像ユニットの中でも類似したユニットをFuzzy ARTで同一のカテゴリに統合する．さらに，Fuzzy ARTによって統合されたカテゴリを無表情（真顔）から最大表出まで並べ替えることで，表情の表出程度を定量的にラベル化した表出強度を取得する．最後に，時系列表情画像の各フレームと表出強度の対応付けを行い，表出強度の時系列変化を生成する．図2は，「顔全体」を対象領域とした場合を示しており，眉や目を含む「顔上部」と口元などの「顔下部」についても同様の手続きで表出強度の時系列変化を求める．

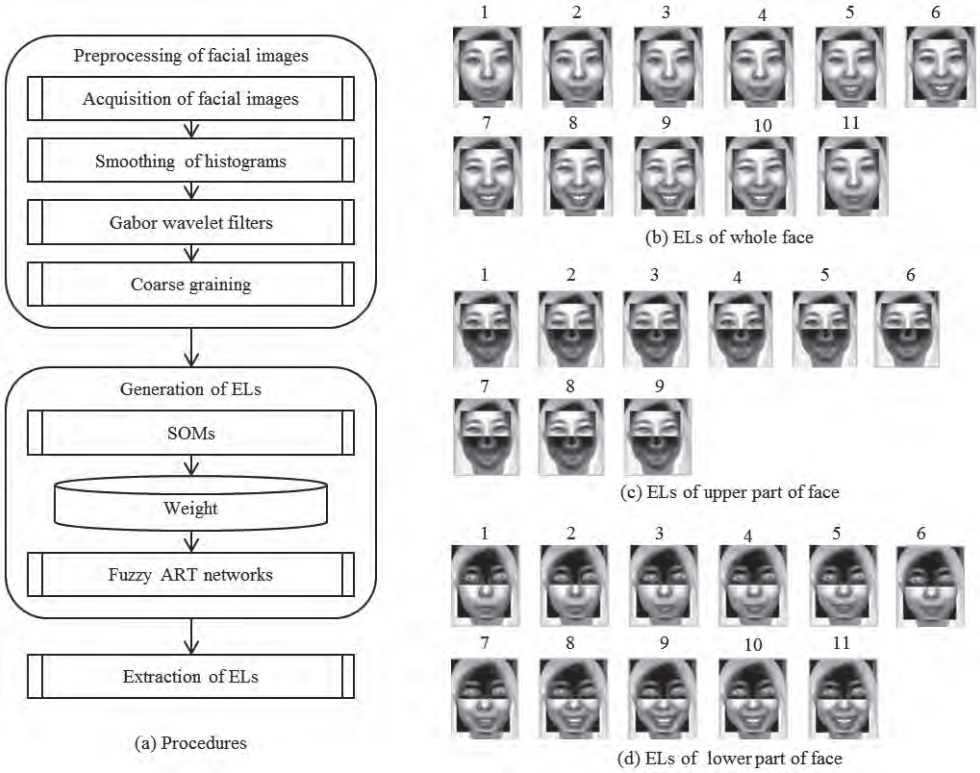


Fig. 1　Overview of the procedures used for our proposed method.

2. 2. 相互情報量による表情表出リズムの定量化

相互情報量[14, 15]は，信号間の変化の同期性や絡み合いを表現可能であり，2つの時系列データ間の線形・非線形依存度を表す量として捉えることができる．2つの信号間の情報の流れや動力学的なカップルリングを表しており，観測対象の2つのシステムが完全に異なる独立なものであれば，この2つの信号間の相互情報量はゼロになる．これを表情表出過程に適用すると，各顔部位間の同期性や機能的な連結度を数値化することができる．2. 1. で求めた「顔全体」「顔上部」「顔下部」における表出強度の時系列変化の1例を図3に示す．本研究では，表情表出過程における顔部位間の相互情報量として，次に示す3つの関心領域を対象に算出する．

表情表出過程における顔全体，顔上部，及び顔下部の表出強度の時系列変化をそれぞれ，

$R_w=R_w(t)$，$R_u=R_u(t)$，$R_d=R_d(t)$

とすると，各関心領域の相互情報量は以下のように求められる．

・顔全体と顔上部の相互情報量

$I(R_w;R_u)$：

$$I(R_w;R_u)=H(R_w)+H(R_u)-H(R_w,R_u) \quad (1)$$

・顔全体と顔下部の相互情報量

$I(R_w;R_d)$：

$$I(R_w;R_d)=H(R_w)+H(R_d)-H(R_w,R_d) \quad (2)$$

・顔上部と顔下部の相互情報量

$I(R_u;R_d)$：

$$I(R_u;R_d)=H(R_u)+H(R_d)-H(R_u,R_d) \quad (3)$$

ここで$H(R_w)$, $H(R_u)$, $H(R_d)$はそれぞれ$R_w(t)$, $R_u(t)$, $R_d(t)$のエントロピー，$H(R_w, R_u)$，$H(R_w, R_d)$，$H(R_u, R_d)$はは両者の結合エントロピーである．なお，導出手順の詳細は割愛する．

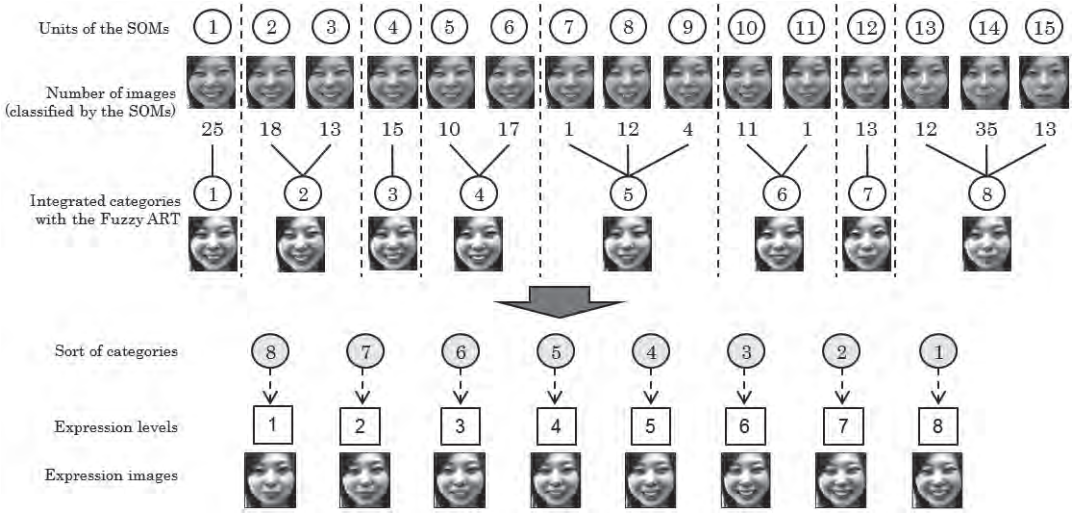


Fig. 2　Procedure details for acquiring a time-series variation of ELs.

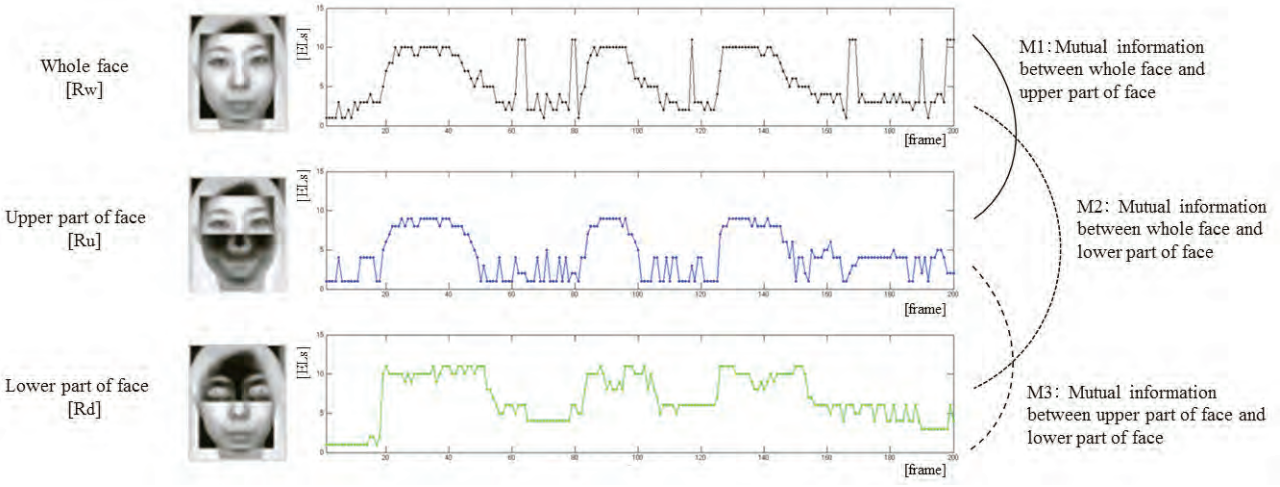


Fig. 3　Each mutual information among time-series changes of facial parts.

3. 実験データセット

本研究では，長期間に渡る表情変化を扱うために，独自のデータセットを構築した．1回の実験は，平常時のstep1，快ビデオ視聴時のstep2および不快ビデオ視聴時のstep3で構成される．快・不快状態を引起す情動喚起ビデオを視聴するタスクを被験者に与え，一過性のストレス状態を測定するために唾液アミラーゼ試験によるストレス測定を行った．また，情動喚起ビデオは，視聴時間が約3分の快ビデオ(3種類の漫才映像)と不快ビデオ(2種類の残酷映像とインプラント手術映像）を用意し，視聴した際の主観評価(5段階評価）も実施した．なお，全ての被験者に対して，研究倫理規定に基づき事前に実験内容を十分説明し，被験者の自由意志により書面により実験参加の同意を得た．さらに，特定の被験者からは，実験参加の同意と併せて顔画像掲載の許諾に関する同意も得ている．

基本6表情の中で，自発的に最も表出しやすいと考えられる「喜び」の表情に注目し，快状態時の「喜び」，不快刺激状態時の「喜び」を対象として，20名の被験者に対して表情画像を取得した．各被験者は事前に選定した情動喚起ビデオを視聴した直後に表情表出を行った．被験者の内訳は，男子大学生10名（J = 20歳，B, G, H, I = 21歳，A, E, F= 22歳，C, D= 23歳），女子大学生10名（K, M, O, P = 20歳，L, Q, R, S, T = 21歳，N=23歳）である．撮影期間は全ての被験者において3週間(1週間間隔)とした．撮影環境は，室内の一角にカーテンで仕切られた表情撮影用スペースにおいて，被験者の頭部がフレーム中に含まれる状態で正面顔画像を撮影した．あらかじめ被験者には，頭部をあまり動かさないで表情を表出するように指示して撮影したため，一定の範囲内に顔領域が収まっているが，微少な変動に対しては，テンプレートを画像上で移動させながら表情画像と比較し，次いで画像間の差分情報を利用することによる，テンプレートマッチングによって補正した．被験者には20秒間を目安に自分のタイミングで表情表出を3回繰り返し，3回表出し終えたら無表情を継続するよう指示した．カメラのサンプリングレートは毎秒10フレームに設定し，1セット200フレームの画像列から構成されるよう設定した．

4. 結果および考察

はじめに，各顔領域が刻む表出強度の時系列変化における相互情報量の算出結果を基に男女別の傾向を分析する．次に，快・不快刺激が表情の表出リズムに与える影響を相互情報量の観点から考察する．

4. 1. 女性被験者の分析

各顔領域が刻む時系列変化の相互情報量を算出した結果を図4に示す．女性被験者5名を対象に図4の(a)に快刺激時，図4の（b）に不快刺激時の算出結果を示している．女性被験者の全体的な傾向として，「領域1:顔全体と顔上部」「領域2：顔全体と顔下部」「領域3：顔上部と顔下部」の順に相互情報量の値が減少する被験者（K, O, L, P）と「領域2：顔全体と顔下部」の値が他の値に比べて突出して大きい被験者Mが存在する．被験者K, M, Oは，快刺激及び不快刺激によって各相互情報量の傾向に大きな変化は見られない．一方，被験者LとPは，快刺激と不快刺激で各相互情報量の傾向に特異的な変化が見られる．特に，被験者Lはその傾向が顕著で，快刺激時では「領域1:顔全体と顔上部」「領域2：顔全体と顔下部」「領域3：顔上部と顔下部」の順に相互情報量の値が減少するが，不快刺激時では「領域2：顔全体と顔下部」が大きな値を示す．被験者Pは，不快刺激時で「領域1:顔全体と顔上部」「領域2:顔全体と顔下部」「領域3：顔上部と顔下部」の順に相互情報量の値が減少するが，快刺激時では「領域1：顔全体と顔上部」の値が減少し相互情報量の順序関係が被験者Lと逆転する傾向を示す．

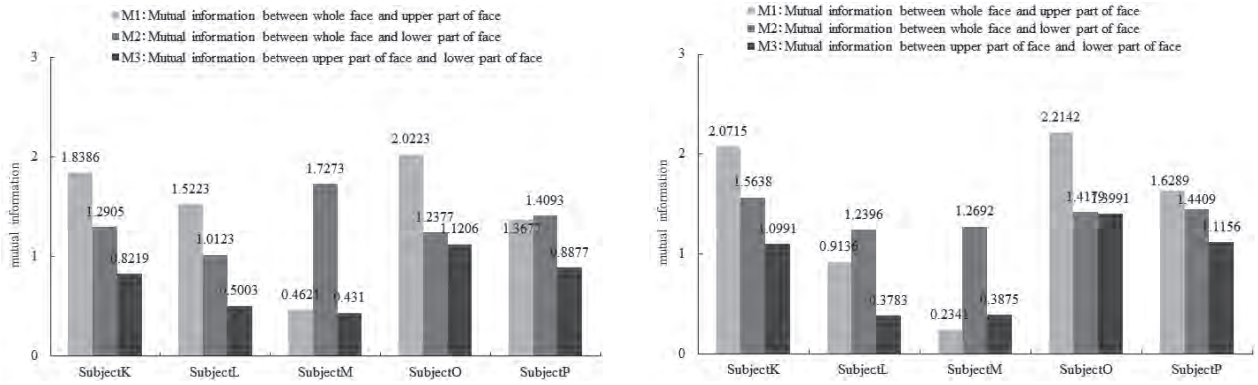
次に，快刺激及び不快刺激共に同じ傾向ではあるが，各顔領域における相互情報量の順序性が大きく異なる被験者KとMを比較する．被験者Kは，快刺激及び不快刺激共に「領域1：顔全体と顔上部」の値が「領域2：顔全体と顔下部」に比べて大きく，「領域3：顔上部と顔下部」の値も被験者Mに比べて大きい．一方，被験者Mは，快刺激及び不快刺激共に「領域2:顔全体と顔下部」の値が突出して大きく，「領域1：顔全体と顔上部」と「領域3：顔上部と顔下部」の値が被験者Kに比べて極めて小さい．被験者KとMの快刺激時における「喜び」表情の時系列変化を表したサムネイル画像を図5に示す．図5の(a)が被験者K，図5の(b)が被験者Mである．図5の各上部には，「喜び」表情を表出した際の特徴的な区間を拡大表示している．図4の各相互情報量の算出結果と図5の拡大表示したサムネイル画像を比べると，被験者Kは顔上部の眉や目元，及び顔下部の口元に「喜び」表情の変化が確認できるが，被験者Mは顔上部の眉や目元には表情変化が全く認められず，顔下部での口元の口角のみ大きく変化している．被験者Kは，表情表出時の顔上部と顔下部が共に同期して変化しており，実験者の主観的印象ではあるが，より自然な表情表出に見える．一方，被験者Mは，顔下部の口角のみ変化しており，不自然な「喜び」表情に見えると共に違和感が残る．

4. 2. 男性被験者の分析

男性被験者5名の各顔領域が刻む時系列変化の相互情報量を算出した結果を図6に示す．図6の（a）に快刺激時，図6の（b）に不快刺激時の算出結果を示している．男性被験者の全体的な傾向として，「領域1:顔全体と顔上部」「領域2：顔全体と顔下部」「領域3：顔上部と顔下部」の順に

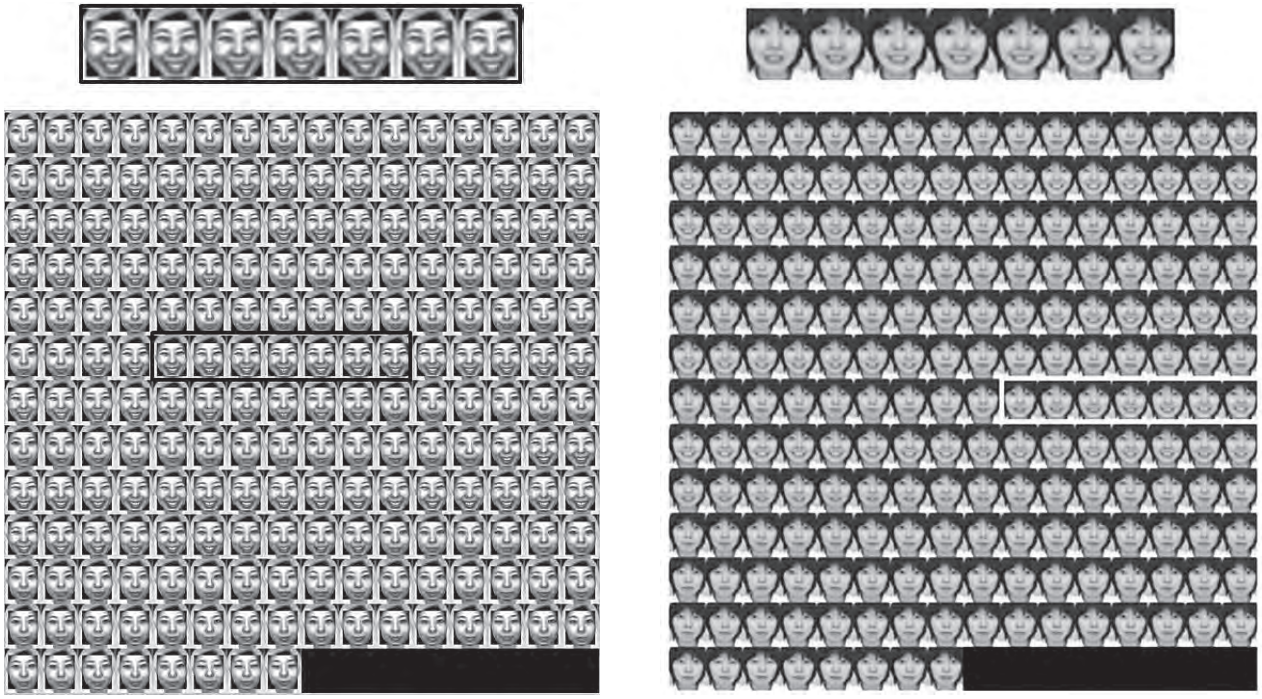
相互情報量の値が減少する被験者D及びFと，「領域2：顔全体と顔下部」の値が他の値に比べて突出して大きい被験者C，G及びJが存在する．被験者C，D，F，G及びJ共に，快刺激及び不快刺激によって各顔領域が刻む時系列変化の相互情報量の順序関係に変化は見られない．

次に，女性被験者と同様に，各顔領域における相互情報量の順序性が大きく異なる被験者DとJを比較する．被験者Dは，快刺激及び不快刺激共に「領域1:顔全体と顔上部」の値が「領域2：顔全体と顔下部」に比べて大きく，「領域3：顔上部と顔下部」の値も被験者Jに比べて大きい．一方，被験者Jは，快刺激及び不快刺激共に「領域2：顔全体と顔下部」の値が突出して大きく，「領域1：顔全体と顔上部」と「領域3：顔上部と顔下部」の値が被験者Dに比べて極めて小さい．被験者DとJの快刺激時における「喜び」表情の時系列変化を表したサムネイル画像を図7に示す．図7の(a)が被験者J，図7の(b)が被験者Dである．図7の各上部には，女性被験者と同様に「喜び」表情を表出した際の特徴的な区間を拡大表示している．図6の各相互情報量の算出結果と図7の拡大表示したサムネイル画像を比べると，被験者Dは顔上部の眉や目元，及び顔下部の口元に「喜び」表情の変化が確認できるが，被験者Jは顔上部の眉や目元には表情変化が全く認められず，顔下部での口元の口角のみ大きく変化している．被験者Dは，表情表出時の顔上部と顔下部が共に同期して変化しており，より自然な表情表出に見える．一方，被験者Jは，顔下部の口角のみ変化しており，不自然な「喜び」表情に見えると共に違和感が残る．これら



(a) Pleasant stimulus with emotion-evoking videos　　(b) Unpleasant stimulus with emotion-evoking videos

Fig. 4　Mutual information results among each facial part for female.



(a) Subject K　　(b) Subject M

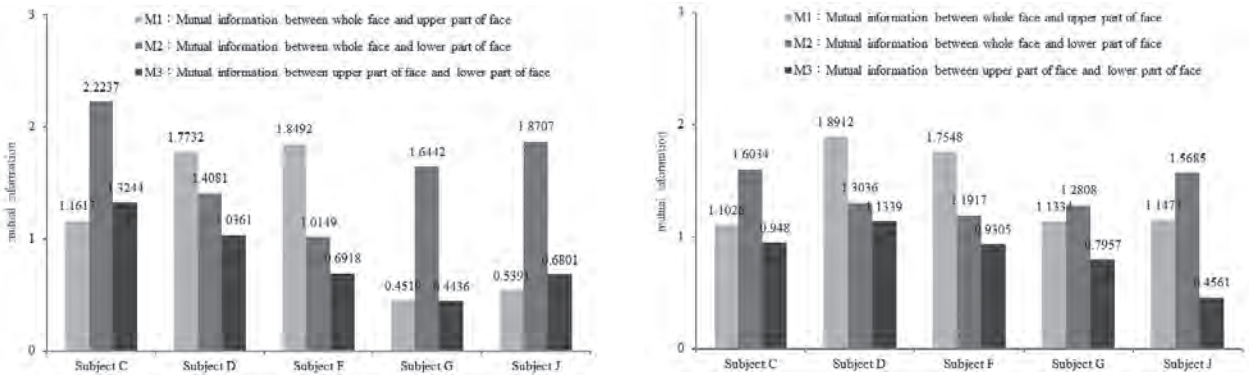
Fig. 5　Time-series changes of smile facial expression with pleasant stimulus for specified subjects of female.

の結果は，女性被験者と共通の傾向を示しており，各顔領域が刻む時系列変化の相互情報量から表情表出時の印象を定量化する新たな指標として期待できる．

4. 3. 快・不快刺激が相互情報量に及ぼす影響

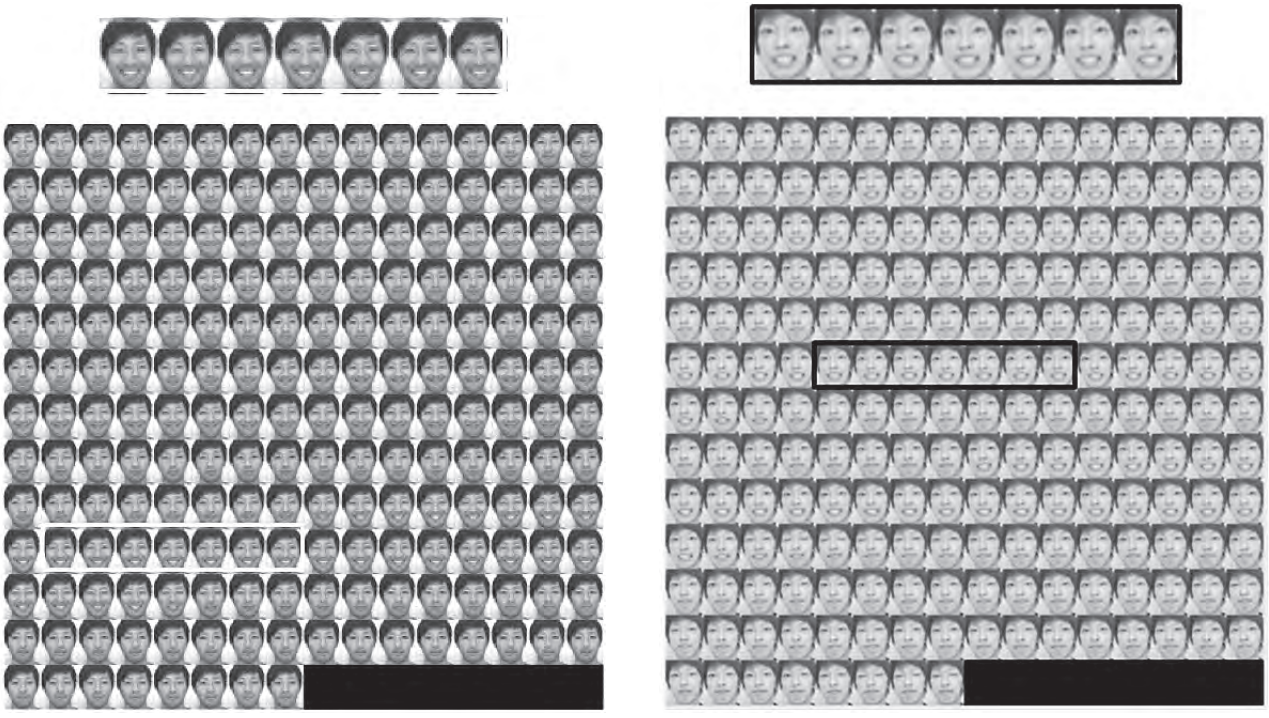
表情表出における不一致表出とは，悲しい時にも笑顔を見せるなど，ある情動を経験した時，それとは一致しない情動を表出することを意味する．これまでの先行研究では，ネガティブ情動経験中にポジティブ情動を表出することは，表出者の交感神経活動の増幅[35]や，主観的情動経験の増大，情動経験時の記憶低下[16]を招くことが明らかにされており，表出者に認知的負荷がかかり易く精神的健康に悪い影響を与えかねない．また，表情表出における表出抑制とは，悲しい時に泣くのをこらえるなど，ある情動を経験した時に表情による情動表出を抑制することである．表出抑制が社会的サポートや他者との親密さ，社会的満足感の低下と関係していることが示唆されている[17]．更に，女性は男性に比べて笑顔を創ることに長け，かつポジティブな情動表出の調整に優れ，受け手に対して自然な表出と変わらない影響を与えるとされている[3]．

快ビデオ視聴後に「喜び」表情を表出する場合は一致表出であり，不快ビデオ視聴後に「喜び」表情を表出する場合は不一致表出に相当する．相互情報量の順序性が大きく異なる女性被験者ＫとＭの表情表出リズムを図８に示す．4. 1. の印象分析では，被験者Ｋの笑顔は自然な印象を与えるのに対して，被験者Ｍの笑顔には不自然さが感じられた．



(a) Pleasant stimulus with emotion-evoking videos　　(b) Unpleasant stimulus with emotion-evoking videos

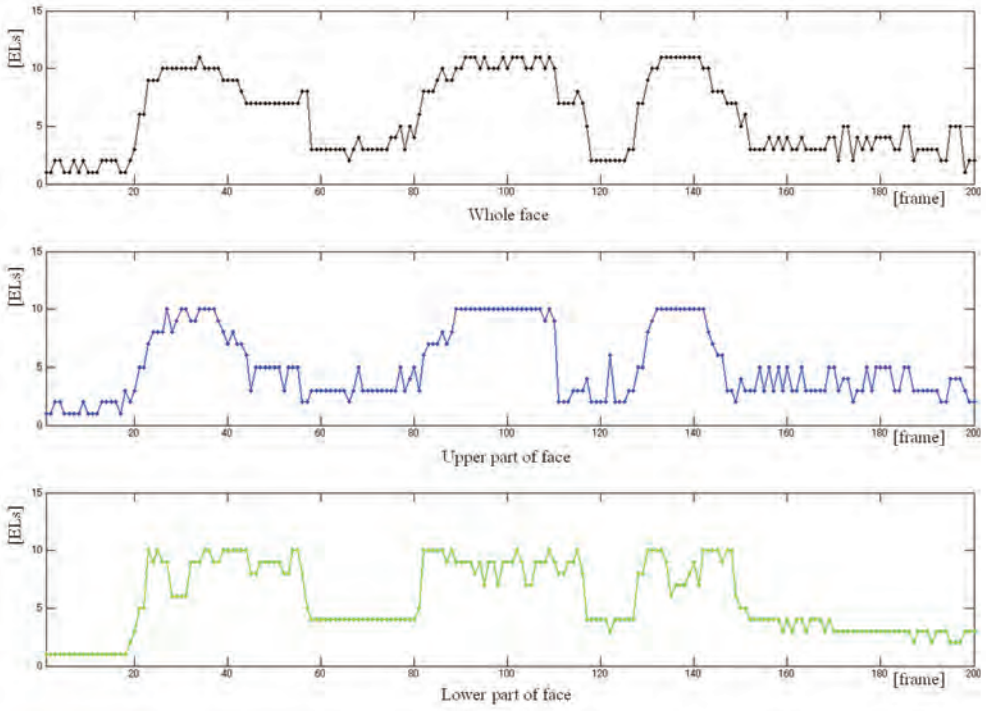
Fig. 6　Mutual information results among each facial part for male.



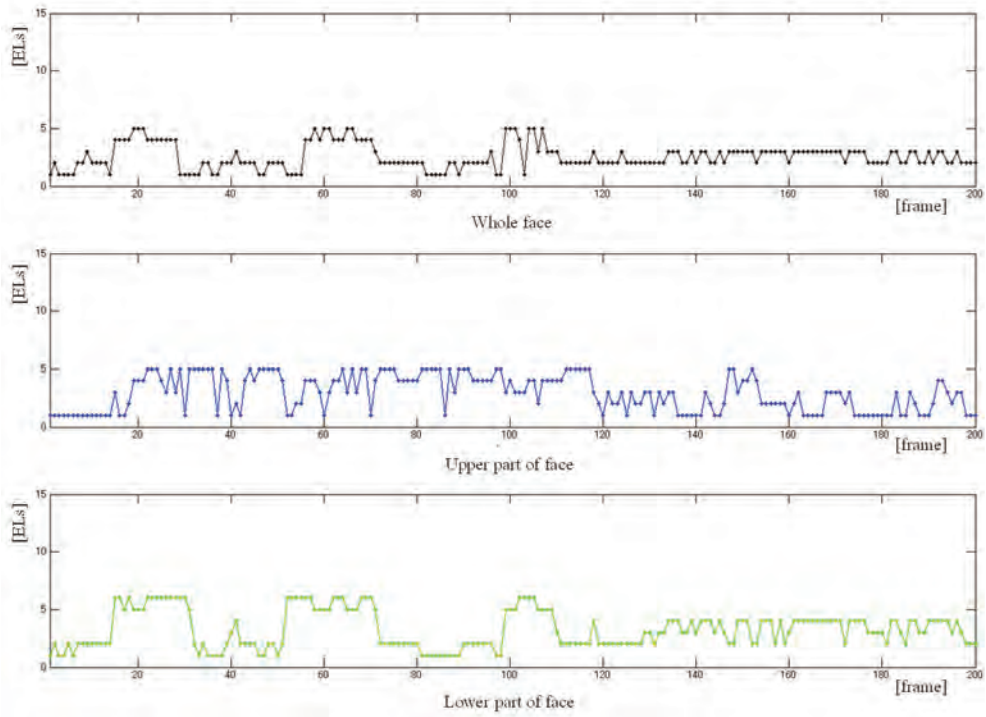
(a) Subject D　　(b) Subject J

Fig. 7　Time-series changes of smile facial expression with pleasant stimulus for specified subjects of male.

各顔部位が刻む表出リズムに着目すると，被験者Kの表出リズムは，顔部位間で協調が取れた時系列変化を示している．一方，被験者Mの表出リズムは，顔上部と顔下部の時系列変化がバラバラで協調的な動きが認められない．各顔領域の相互情報量（領域1，領域2，領域3）は，顔部位が刻む表情表出リズムにおける信号波形の類似性や同期の程度を表現しており，顔全体から受ける印象形成に寄与する顔上部（眉や目元）と顔下部（口元）の程度や同期を示すタイミング構造を定量化した値と解釈できる．4. 1. 及び4. 2. の分析結果を総合的に捉えると，領域1と領域2の相互情報量の大小関係に着目することで「目は口ほどに物を言う」という言葉の定量的解釈の可能性が覗える．また，顔上部と顔下部のタイミング構造を定量化した領域3の値を中心に，領域1と領域2の値の大小関係や順序関係に着目する



(a) Subject K



(b) Subject M

Fig. 8　Comparison of time-series changes of ELs with unpleasant stimulus.

ことは，表情表出時の自然さや不自然さの程度を定量化する指標として有効と考える．更に，男性被験者に比べて，女性被験者は，意図的に「喜び」表情を創ることが容易で，かつ不一致表出の影響を受け難いものと推察する．

4. 4. 化粧による視線誘導効果

試作した接客支援ツール（Smile Learning）の印象空間を通して，化粧前後（ベースメイク，アイメイク，アイブロー，リップメイク，チーク）における受け手の視線変化を定量的に解析する．検証実験では，8大接客用語の中から「①いらっしゃいませ」「②ありがとうございます」「③かしこまりました」を選択し，①から③の順番に繰り返した接客の様子（上半身）を動画撮影する．具体的には，「真顔」で「接客用語」を発話し，「1礼」した後，「笑顔」を表出するというプロセスを3種類の接客用語で繰り返すよう指示した．撮影した動画は，化粧前，ベースメイク後，アイメイク後，アイブロー後，リップメイク後，及びチーク後（化粧後）の6種類である．その後，前方正面の大型液晶ディスプレイに6種類の接客映像を再生しながら，頭部視線追跡装置（FaceLab）を用いて，化粧前後における受け手の視線変化を計測した．

図9に視線誘導効果の1例を示す．図9の(a)～(f)は，化粧前から各化粧工程後の接客動画に対する受け手の視線誘導効果をヒートマップの形式で表現した結果である．図中，赤い部分は視線が集中した領域，青い部分は視線集中が疎の領域を表している．なお，各接客動画の先頭フレームの静止画上にヒートマップを重畳して結果表示している．図9の全体的な傾向として定性的ではあるが，化粧前（9の(a)）に比べて，各化粧工程後の視線の分布が広がる傾向が見られる．また，視線の集中度を表す赤い領域も，リップメイク後（9の(e)）やチーク後（9の(f)）のように，少し拡大する傾向が確認できる．これらの結果は，接客時における化粧の有効性を支持するものと推察できる．

(a) 化粧前　(b) ベースメイク後

(c) アイメイク後　(d) アイブロー後

(e) リップメイク後　(f) チーク後（化粧後）

Fig. 9　Heat maps of eye-gaze movements each cosmetic process.

5. 総　括

本研究では，被験者 20 名（男女各 10 名）に対して，平常状態，快・不快刺激を与えた状態の表情画像データセットを取得した．また，情動喚起ビデオによる快・不快刺激後の「喜び」表情の表出過程に着目し，顔部位が刻む表出リズムを相互情報量の観点から定量的に解析することにより，人間の心理状態に起因する表情表出時の複雑性や曖昧性を客観的に表現することを試みた．評価実験では，被験者 10 名（男女各 5 名）を対象に，各顔領域（顔全体，顔上部，顔下部）が刻む時系列変化の相互情報量を求め分析した結果，以下の点が明らかとなった．

・各顔領域が刻む表出リズムにおける相互情報量の大小関係や順序関係から表情の印象を推定可能
・表出リズムの相互情報量は表情表出時の自然さや不自然さの程度を測る指標として有効
・女性被験者は，男性被験者に比べて意図的に「喜び」表情を創ることが容易で，かつ不一致表出の影響を受け難い

更に，Smile Learningの印象空間を通して，化粧前後における受け手の視線変化を解析した結果，接客時における化粧の有効性を支持する視線誘導効果を確認した．

今後は，印象形成に及ぼす顔部位における表出テンポのゆらぎを定量化し，そのタイミング構造を解析することにより，自然な表情と意図的な表情の発現パスの違いを明らかにすると共に，意思疎通の可視化へ挑戦する予定である．

謝　辞

本研究は，平成 25 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．実験データの取得に際し，被験者として長期に渡り表情画像の撮影に協力して頂きました本学の 20 名の学生諸氏に深く感謝申し上げます．

（引用文献）

1） 井口竹喜，“魅力的な笑顔に表れる幾何学的特徴：感性×技術＝カンセイウエアの魅力づくり“, 電子情報通信学会技術研究報告. SIS, スマートインフォメディアシステム , pp. 51-56, 2007.
2） 山田 貴恵, 笹山 郁生, “ 顔のパーツから形成される印象と顔全体から形成される印象との関連 “,性の検討. 福岡教育大学紀要, vol. 48, no. 4, 229-239, 1999.
3） L. Ellis, “Gender differences in smiling: An evolutionary neuroandrogenic theory,” Physiology and Behavior, Vol. 88, pp.303-308, 2006.
4） K. M. Prkachin, “Effects of deliberate control on verbal and facial expressions of pain,” Pain, Vol. 114, pp.328-338, 2005.
5） 延谷直哉，仲谷善雄，“パーソナルテンポを基とした音響リズム支援による会話支援システム，” 情報処理学会第 71 回全国大会,pp.4-227 ～ 4-228, Mar. 2009.
6） 大石周平，尾田政臣，“話者間の精神テンポの差がコミュニケーションの円滑化に及ぼす影響，” 電子情報通信学会技術研究報告，pp.31-36, 2005.
7） 間所洋和，佐藤和人，門脇さくら，“表情の時系列変化を可視化する表情空間チャート，” 知能と情報(日本知能情報ファジィ学会誌)，vol.23, No.2,pp.157-169, 2011.
8） H. Madokoro and K. Sato, “Facial Expression Spatial Charts for Representing of Dynamic Diversity of Facial Expressions,” ' Journal of Multimedia, Vol. 6, No. 1, pp. 1-12, Jan. 2007.
9） 佐藤和人，間所洋和,門脇さくら，” 一過性のストレス刺激が意図的な表情に及ぼす影響”，第 11 回情報科学技術フォーラム，RJ-005, pp.29-36, 2012.
10） 佐藤和人，間所洋和,門脇さくら，” 意図的な表情表出に及ぼす心理的ストレス要因の分析”，第 12 回情報科学技術フォーラム，RJ-002, pp.21-28, 2013.
11） K. Sato, H. Otsu, H. Madokoro and S. Kadowaki, "Analysis of Psychological Stress Factors and Facial Parts Effect on Intentional Facial Expressions," Proceedings of The Third International Conference on Ambient Computing, Applications, Services and Technologies, pp.7-16, Oct. 2013.
12） K. Sato, H. Otsu, H. Madokoro and S. Kadowaki, "Analysis of Psychological Stress Factors by Using Bayesian Network," Proceedings of 2013 IEEE International Conference on Mechatronics and Automation, pp.811-818, Aug. 2013.
13） 赤松茂，“人間とコンピュータによる顔表情の認識[I] - コミュニケーションにおける表情とコンピュータによるその自動解析 -,” 信学誌，Vol.85, No.9, pp.680-685, Sep 2002.
14） 池田徹志，石黒浩，浅田稔，“相互情報量最大化に基づく信号情報源の移動軌跡の推定 “，電子情報通信学会論文誌 D，Vol. J90-D, No. 2, pp. 535-543，2007.
15） 菊池登志子，岸浩一郎，宮道壽一，” 相互情報量により学習パラメータを調整した効率的データ自動分割アルゴリズム”，電子情報通信学会誌 D，Vol. J82-D- Ⅱ , No. 4, pp. 660-668, 1999.
16） W. Sato, M. Noguchi, and S. Yoshikawa, “Emotion elicitation effect of films in a Japanese sample,” Social Behavior and Personality, Vol. 35, pp.863-874, 2007.
17） S. Srivastava, M. Tamir, K. M. McGonigal, O. P. John, and J. J. Gross, “The social costs of emotional suppression: A prospective study of the transition to college,” Journal of Personality and Social Psychology, Vol. 96, pp.883-897, 2009.

睡眠誘導効果をもつ(−)−酢酸ボルニルの睡眠促進効果ならびに肌質改善効果

九州大学農学研究院[1]、近畿大学産業理工学部[2]

清水　邦義[1]、松本　清[1]、大貫　宏一朗[2]

This study aimed to investigate whether (-)-bornyl acetate promoted sleep and had any concomitant effects on skin condition. Healthy women over 50 years of age participated in our experiment for 2 weeks. Each of them inhaled water mist with/without (-)-bornyl acetate every night for 1 h after they went to bed. They maintained logs of sleep time and wake time, measured their skin's moisture level, and constantly wore a triaxial accelerometer to record daily physical activity. They filled out questionnaires regarding sleep quality and skin condition on the first and last day of the experiment. The results showed that subjects in the group inhaling water mist with (-)-bornyl acetate went to bed about 20 min earlier and showed an increase in sleep duration for 2 weeks. In addition, the subjective measures of oil and moisture content of the facial skin improved. These findings suggest that (-)-bornyl acetate affected the temporal characteristics of sleep and improved the subjective assessments of oil and moisture content of the skin. Moreover, we observed that skin moisture of eye area was related to sleep length.

1. 緒　言

社会生活の夜型化・24時間化が進行した現代社会において、睡眠障害による経済的な損失は年間3兆円を超えると試算されている。不眠症の治療では、睡眠時の緊張や不安を取り除き寝つきをよくするために、睡眠導入剤が用いられているが、一定の効果は期待できるものの副作用の問題があるため、そのような薬剤に頼らない方法の検討が進められている。アロマテラピーのように天然由来の香りを用いた睡眠サポートもそのひとつである。例えば、ラベンダーの香りには睡眠の質を改善する効果がある[1,2]。

睡眠不足による肌機能の低下に注目したKahanら[3,4]は、人や動物を対象とした睡眠不足や睡眠遮断と肌機能との関連を調査した研究例をレビューし、睡眠不足による睡眠覚醒リズムの不調は肌質の低下をもたらすと結論づけている。これに対し国内では、山崎ら[5]が魚介類に多く含まれる“グリシン”に着目し、若年女性を対象にグリシン食品の就寝直前の摂取による睡眠の質と肌質への効果を検討している。その結果、睡眠の質の向上、成長ホルモン分泌量の増加、皮膚バリア機能改善および敏感肌改善が認められたことを報告している。

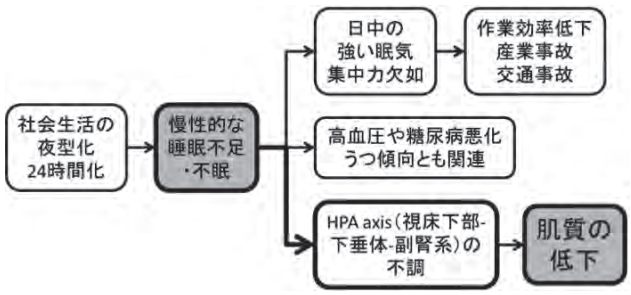


図 1-1　睡眠不足と肌質低下の関係

以上のことから、肌質の改善・向上までも視野に入れ、香りによって睡眠覚醒リズムに働きかけ、睡眠の質の向上を図る方法を探索することは、十分に検討の余地があり、それが特定されれば香りの新しい機能性を見いだすこととなり、実用的にも学術的にも価値のある知見となる。

一方、(−)−酢酸ボルニルは、マツやモミなどのマツ科樹木の針葉から採る精油に多く含まれる成分のひとつであり、松葉の爽やかな香りを有し、“森の香り”とも呼ばれる成分である。爽やかな印象を持つ香料であることから、ウッディな香りの商品（例えば、石鹸、入浴剤、ルームフレグランスなど）を作る際などによく使用され、特に男性化粧品に使われることが多い。吸引することによって作業効率低下の抑制効果や作業後の覚醒状態の低下効果（θ 波増強）および自律神経の緊張緩和効果が認められており[6-9]、効果的な睡眠を促進する可能性がある。

肌質を健やかな状態に導くためには、肌質改善効果のあるとされる食品成分や天然素材からの抽出成分を、経口または経皮によって摂取することが有効な方法として、数多くの研究がなされている。しかし、肌質は睡眠とも関わりが深く[4]、肌質の改善や維持に対して睡眠という行動的側面からサポートすることも重要であると考えられる。

そこで本研究では、人を対象に日常生活における睡眠時に (−)−酢酸ボルニルを提示した時の睡眠の質の評価を行うことによって、(−)−酢酸ボルニルが人の睡眠覚醒リズムにどのような影響をあたえるのかを明らかにする。また、一定期間 (−)−酢酸ボルニルの吸引を実施し、その前後の肌質を評価することによって、(−)−酢酸ボルニルの肌質

*

Sleep promotion and skin condition improvement using (-)-Bornyl acetate

Kuniyoshi Shimizu*[1], Sayaka Matsumoto[1], Koichiro Ohnuki[2]

Faculty of Agriculture, Kyushu University[1], Facultyof Humanity-Oriented Science Engineering, Kinki University[2]

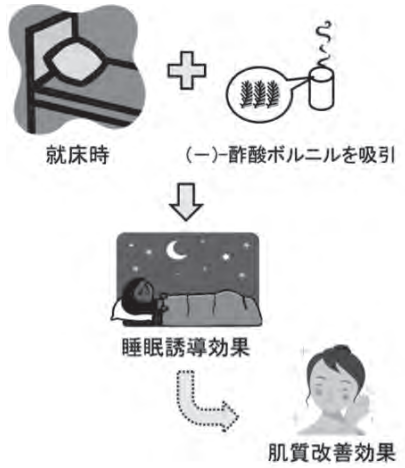


図 1-2　期待される就床時の香り吸引による効果

の改善効果についても検討する。さらに、睡眠覚醒リズムや肌質向上に対して、より効果的な (−)- 酢酸ボルニルの提示方法を特定する。

2. 実　験

本研究は、九州大学農学研究院の倫理委員会の承認を得て実施された。実験は、被験者が日常生活の中で就床時に (−)- 酢酸ボルニルを吸引することを 2 週間続ける必要があるためモニター調査方式とし、被験者募集時に実験内容を伝え、被験者の書面による同意を得た後に開始された。実験に用いる道具や質問紙の一式が被験者の自宅に送付され、被験者は日常生活の中で実験を 2 週間行い、実験終了後に使用した道具と質問紙の一式は回収された。

2. 1. 被験者

本研究では、(−)- 酢酸ボルニル吸引による睡眠への効果に加えて肌質への波及効果を検討するため、被験者には肌質に対する関心度の観点から女性を対象とした。また、女性の肌質には月経周期が深く関与することからその影響を取り除くために、閉経を迎えていることが予想される 50 歳以上を対象として募集を行い、26 名が実験に参加した。就床時に香りを吸引する群(香りあり群)と香りを吸引しないプラセボ群（香りなし群）の 2 群を設定し、13 名ずつランダムに割り当てた。26 名中 3 名が 50 歳未満であったため以降の分析から除外し、香りあり群は 11 名 (50 ～ 71 歳, M= 57.8 歳, SD= 6.3 歳)、香りなし群は 12 名 (50 ～ 72 歳, M= 57.4 歳, SD= 6.3 歳)であった。

2. 2. 就床時の香りの吸引

(−)- 酢酸ボルニルの香り試料には、シグマアルドリッチ B55203 95%（Aldrich）を用いた。就床時の香りの吸引には、アロマディフューザー（良品計画 超音波アロマディフューザー 11SS)を使用した。

アロマディフューザーに入れる溶液は、香りあり群には超純水 100mL に対し (−)- 酢酸ボルニル 10μL を添加したものとし、香りなし群には超純水 100mL のみとした。溶液は、1 回分の分量をスクリュー管に封入したものを実験日数分用意し、1 回ごとに溶液の交換を行うこととした。

アロマディフューザーは、枕元の頭から半径 50cm 程度離れたところに配置した。香りの吸引は、タイマー機能を利用して就床開始 1 時間として、実験 2 日目から 14 日目まで実施した。

どちらの群にも、「香りはごく薄い濃度に調節しているため、香りを感じない場合もありますが、気にせずに実験を行ってください」と教示した。

2. 3. 測定項目

睡眠の質および肌質の評価には、それぞれ客観的な評価と主観による評価を用いた。

睡眠の質の客観的な評価には、実験期間中の就床および起床の時刻と身体活動量を用いた。就床および起床の時刻は、睡眠および睡眠以外の時間（活動時間）の時間的な側面の評価が可能である。身体活動量(METS)は、被験者が実験期間中に活動量計（オムロン 活動量計 HJA-3501T Active style Pro）を腹側のウエストの位置に装着して計測した。就床中や日中の身体活動の程度から睡眠の質を評価することができる。睡眠および活動時間の時間的側面、身体活動量は、実験期間中の変動を検討した。

睡眠の質の主観による評価には、質問紙の PSQI（ピッツバーグ睡眠質問票）[10-12] と OSA-MA（OSA 睡眠感調査票 MA 版）[13, 14] を用いた。PSQI は直前の 2 週間の睡眠を振り返って回答してもらうものであった。また、睡眠の質に関する内省と日中の身体活動に関する内省との関連を検討するために、日中に身体をどの程度動かしたと思うか（運動感)の質問を追加した。OSA-MA は起床時にその夜の睡眠についての内省を回答してもらうものであった。いずれも実験の開始日と終了日に回答してもらい、睡眠に関しての主観評価の実験前後の変化を検討した。

肌質の客観的な評価には、肌水分計（スカラ モイスチャーチェッカー MY-808S）を用いた。測定方法は簡易で、センサーを肌に水平に押し当てて数秒待つと表示部に測定部位の水分率(%)が表示される。肌の乾燥の程度を意識しやすい目尻(右目)と衣服に覆われていることが多い前腕内側（左腕の肘から 3 cm の位置）の 2 ヶ所についてそれぞれ 3 回ずつ、毎晩就床前と毎朝起床後に測定することとした。肌水分は、睡眠の時間的側面や身体活動量と同様に、実験期間中の変動を検討した。

肌質に関する質問紙は、実験開始日の夜とその翌朝、実験終了日の夜と翌朝の計 4 回、肌水分の計測と合わせて実施することとした。顔(全体)、目尻、前腕内側の 3 ヶ所に

ついて、水分、油分、弾力の程度を自身の感覚に基づいてそれぞれ回答してもらうものであった。選択肢は「ない(−2点)」、「やや少ない(−1点)」、「適度(0点)」、「やや多い(1点)」、「非常に多い(2点)」の5つとして採点し、睡眠の質の主観評価と同様に、肌質の主観評価の実験前後の変化を検討した。

3. 結　果

まず、睡眠の質について客観的指標の2週間の変動を検討し、主観評価の実験前後の変化を検討した。次に肌質について客観的指標の2週間の変動を検討し、主観評価の実験前後の変化を検討した。

次に、2週間連続して記録した項目は1週目と2週目の差を、睡眠の質や肌質に関する内省については実験前後に記入した質問紙の合計点の差をとり、各項目の相関関係を検討した。

3. 1. 睡眠の質への影響

3. 1. 1. 時間項目

就床時刻の実験期間2週間の変動については、香りなし群は実験期間中通して大きな変動はなかったのに対し、香りあり群は第1週に比べて第2週は就床時刻が早くなる傾向が観察された。1週間ごとの平均就床時刻を算出し、週(2水準)×群(2水準)の分散分析を行ったところ、週×群の交互作用に有意差が得られた(F (1, 21) = 4.92, p = 0.037)。下位検定の結果、香りなし群には第1週(23：45±0：18, $M \pm SE$)と第2週(23：49±0：20)の間に就床時刻の差はなかったのに対し、香りあり群は第1週(24：12±0：29)に比べ第2週(23：53±0：30)は就床時刻が早くなっていたことが示された(p = 0.019)。

起床時刻に関しては、両群ともに実験期間通して大きな変動はなく、1週間ごとの平均起床時刻も、香りなし群では第1週6：13±0：16、第2週6：12±0：15、香りあり群では第1週6：35±0：17、第2週6：38±0：20であった。就床時刻と同様の分散分析を行ったが、有意差は得られなかった。

次に、就床時刻から翌朝の起床時刻までの時間を就床持続時間とし、起床時刻からその日の就床時刻までを起床持続時間として、それぞれの時間の長さ(分)を検討した。1週間ごとの平均就床持続時間は、香りなし群では第1週388.23±15.75分、第2週383.82±20.37分、香りあり群の第1週383.27±27.84分、第2週405.03±29.89分であった。分散分析を行ったところ、週×群の交互作用の差に有意傾向が得られた(F (1, 21) = 4.09, p = 0.055)。起床持続時間については、同様の分析の結果、週×群の交互作用に有意差が得られ(F (1, 21) = 6.46, p = 0.018)、香りなし群には第1週(1049.94±16.04分)と第2週(1058.84±21.95分)の間に起床持続時間の差はなかったのに対し、香りあり群は第1週(1057.16±27.45分)に比べ第2週(1032.70±30.30分)は起床持続時間が短くなっていたことが示された(p = 0.017)。

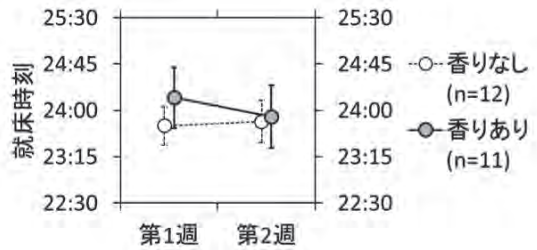


図 3-1-1　就寝時刻の変動

以上の分析の結果、時間に関する項目では、香りなし群は実験期間中にはいずれの測定項目においても変化は見られなかったが、香りあり群は就床時刻が早くなり就床持続時間の延長傾向と起床持続時間の短縮が観察された。

3. 1. 2. 身体活動量

身体活動量は実験期間中の連続記録であったため、日々の就床時刻と起床時刻に基づいて、就床中(就床持続時間)と日中(起床持続時間)に分けて検討した。どちらも個人によってまた日によって時刻や時間の長さが異なっていため、まず、全体を6等分した区間に分けて時間経過による変動の全体的な傾向を検討した後に、それぞれ特定の時間帯に注目して検討した。

就床中の6区分は、就床直後の区分を就床1とし、順に就床2、3、4、5、起床直前の区分を就床6として各区分の平均活動量を算出し検討したところ、一晩の活動量は就床直後が高く、就床途中は低下し、起床直前にまた増加することが示された。そこで、就床直後と起床直前のそれぞれ120分間を15分ごとに区切り、各区間の合計活動量の変動を検討した。これらの分析では、就床持続時間が240分未満の日のデータは除外したため、香りあり群の1名はデータ欠損となった。

就床直後120分間では、香りなし群/あり群とも第1週/2週とも、就床後0～15分の活動量が顕著に高く(10 METS前後)、15～30分で急速に低下し(4 METS前後)、30分以降はそのままの水準を保っていた。週(2水準)×時間経過(8水準)×群(2水準)の分散分析を行ったところ、時間経過の主効果に有意な差が認められた(F (7, 140) = 47.03, p < 0.001)。下位検定の結果、就床後0～15分の活動量は15分以降120分までの15分ごとの活動量よりも高く(ps < 0.001)、就床後15～30分の活動量は30分以降105分までの15分ごとの活動量よりも高かったことが示された(ps < 0.05またはps < 0.01)。群の主効果にも有意な差が認められ(F (1, 20) = 5.92, p = 0.024)、香りあり群の就床後120分間の活動量は香りなし群よりも高かったことが示された。

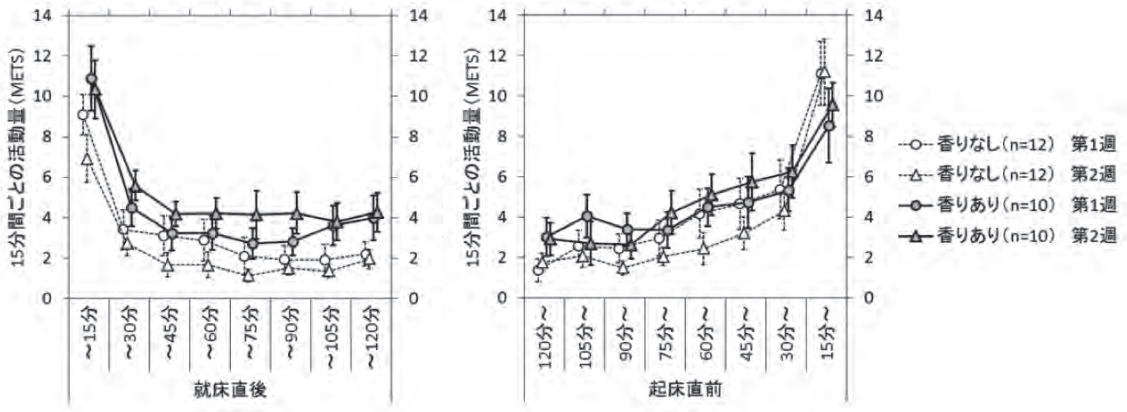


図 3-1-2-1　就床直後および起床直前の 15 分ごと身体活動量

起床直前の 120 分間では、香りなし群 / あり群とも第 1 週 /2 週とも、起床直前 120 ～ 75 分までの 15 分ごとの活動量は2.5 METS前後で、その後～起床直前15分までに徐々に増加し（5.3 METS前後）、直前の 15 分間で 10 METS前後まで急増した。同様に分散分析を行ったところ、時間経過の主効果のみに有意な差が認められ（F (7,140) = 34.64, $p < 0.001$）、群間の差は得られなかった。

日中の6区分は、起床直後の区分を日中1とし、順に区分2、3、4、5、就床直前の区分を日中 6 として、各区分の平均活動量を算出した。全体的に、日中 1 と 2 の活動量が高く（1.6 METS前後）、日中 3 から 5 にかけて徐々に減少し（1.4 METS前後）、日中 6 ではさらに減少していた（0.9 METS前後）。また、一般的な社会活動の時間として 10 時から 18 時までに注目し、8 時間を 2 時間ごとに区切り、各区間の合計活動量の変動を検討した。香りなし群 / あり群とも第 1 週 /2 週とも、10－12 時の活動量が 200 METS前後で最も高く、その後徐々に低下して 16－18 時には、ばらつきは大きいが、190 METS前後まで低下していた。日中の 6 区分および 10 時から 18 時までの時間のいずれにおいても、週 × 時間経過 × 群の分散分析まで実施したが、群間に顕著な差は観察されなかった。

次に、就床中の身体活動すなわち体動は睡眠段階が深くなるほど体動が少なくなる [15] ことに着目し、身体活動量に基づく睡眠周期の検討を試みた。就床時刻から 3 時間について、睡眠中のある時間（1 分）の前後 15 分を合わせた合計 31 分間の合計活動量（METS）を体動密度 [16] として算出し、その変動の周波数解析を行った。この分析では、就床持続時間が 180 分未満の日のデータは除外したため、香りあり群の 1 名はデータ欠損となった。

下図に示す通り、睡眠周期のパワーは、低い周波数（0.00013 Hz, 128 分周期）から高い周波数（0.00052 Hz, 32 分周期）にかけてなだらかに減少し、群および週の間に顕著な差は観察されなかった。

以上の身体活動量の分析の結果、就床中の身体活動量に関しては、一晩の変動の仕方や就床直後の活動量について

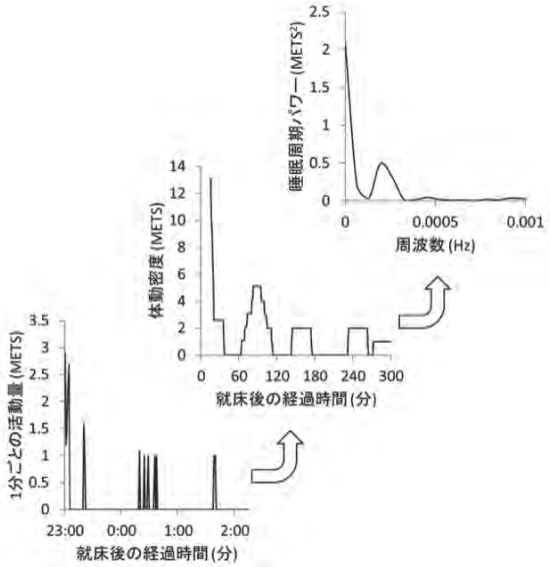


図 3-1-2-2　身体活動量による睡眠周期分析

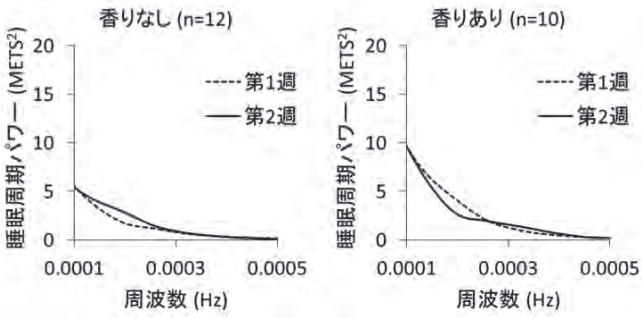


図 3-1-2-3　体動からみた睡眠周期の変動

香りなし群と香りあり群の差は認められたが、日中の身体活動量には群間の差はほとんど見られなかった。また、身体活動量に基づく睡眠周期についても検討を行ったが群間の差は観察されなかった。

3. 1. 3. PSQI（ピッツバーグ睡眠質問票）

実験開始日の回答を Pre、終了日の回答を Post として、それぞれの総合得点と項目別得点の変化を検討した。PSQI の得点は、得点が低いほど睡眠の質が良好であった

ことを示すものである。香りあり群の 1 名は記入漏れがあったため、データ欠損となった。

香りなし群の総合得点は 5.91 ± 0.67 点から 5.08 ± 0.71 点に減少し、香りあり群も 7.20 ± 1.16 点から 6.20 ± 0.85 点に減少していた。時間 (2 水準) × 群 (2 水準) の分散分析を行った結果、時間の主効果に有意差が認められたことから (F (1, 20) = 7.69, p = 0.011)、どちらの群も総合得点が Pre から Post にかけて減少し、睡眠の質は総合的に改善されていたことが示された。

3. 1. 4. OSA-MA (OSA 睡眠感調査票 MA 版)

初日の回答を Pre、最終日の回答を Post として、5 つの因子ごとに得点の変化を検討した。OSA-MA は、得点が高い方が睡眠感は良好であったことを示すものである。

因子 I (起床時眠気)、Ⅲ (夢み)、Ⅳ (疲労回復) については、Pre から Post への変化が小さく、香りなし群とあり群の差もほとんど見られなかった。因子Ⅱ (入眠と睡眠維持) とⅤ (睡眠時間) については、香りなし群とあり群の差はほとんど見られないものの、Pre から Post にかけて増加する傾向がみられた。分散分析の結果、いずれも時間の主効果の差は有意傾向 (因子Ⅱ : p = 0.054, Ⅴ : p = 0.091) であることが示された。

以上の分析の結果、起床時の睡眠感に関しては、どちらの群も入眠と睡眠維持および睡眠時間について改善傾向はあるものの、香りなし群とあり群の間の差は観察されなかった。

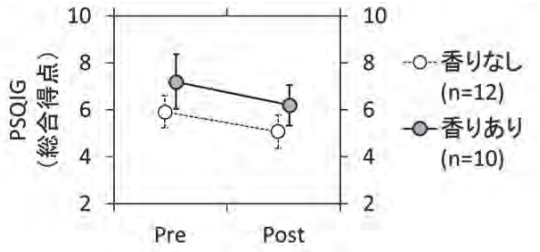


図 3-1-3　PSQI 総合得点の変動

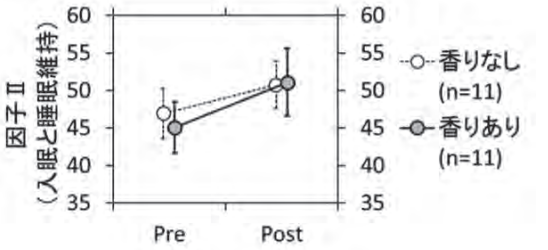


図 3-1-4　OSA-MA 因子Ⅱの変動

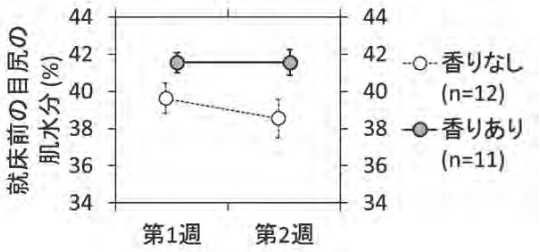


図 3-2-1　就床前の目尻の肌水分の変動

3. 2. 肌質への影響

3. 2. 1. 肌水分

毎晩就寝前 (夜) に測定された目尻の肌水分は、香りあり群も香りなし群も実験期間を通して大きな変動はなく、全般的に香りあり群の方がより高い値を示した。1 週間ごとの平均値を算出し、週 (2 水準) × 群 (2 水準) の分散分析を行った。群の主効果に有意差が得られ (F (1, 21) = 5.38, p = 0.030)。香りあり群の夜の目尻の肌水分 (第 1 週 : 41.5 ± 0.5 %, 第 2 週 : 41.5 ± 0.6 %) は、香りなし群 (第 1 週 : 39.6 ± 0.8 %, 第 2 週 : 38.5 ± 1.0 %) よりも高かったことが示された。

毎朝起床後 (朝) に測定された目尻の肌水分についても、香りあり群も香りなし群も実験期間を通して大きな変動はなく、全般的に香りあり群の方がより高い値を示した、就床前 (夜) と同様の分析の結果、群の主効果に有意差が得られ (F (1, 21) = 6.09, p = 0.022)、香りあり群の朝の目尻の肌水分 (第 1 週 : 41.5 ± 0.8 %, 第 2 週 : 40.7 ± 0.7 %) は、香りなし群 (第 1 週 : 38.8 ± 0.6 %, 第 2 週 : 38.7 ± 0.5 %) よりも高かったことが示された。

毎晩と毎朝に測定した前腕内側の肌水分については、実験期間中の変動は少なく、香りなし群とあり群の差もほとんど見られなかった。それぞれ分散分析を行ったが、いずれの主効果にも交互作用にも有意差は得られなかった。したがって、どちらの群も前腕内側の肌水分には変化はなかったことが示された。

以上の分析の結果、目尻の肌水分については、就床前も起床後も、香りなし群より香りあり群の方が高かったものの、どちらの群も実験期間中の変動は見られなかった。こ

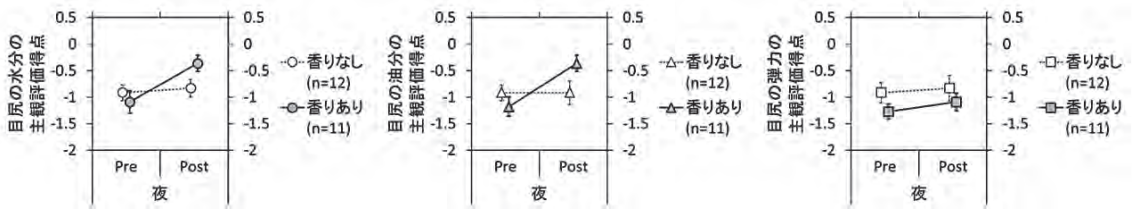


図 3-2-2　就床前の目尻の肌質主観評価の得点変化
(左 : 水分、中 : 油分、右 : 弾力／ 0 点 : 適度、−1 点 : やや少ない、−2 点 : 非常に少ない)

れに対し、前腕内側の肌水分には、就床前にも起床後にも群間の差と実験期間中の変動は観察されなかった。

3. 2. 2. 肌質の主観評価

顔（全体）、目尻、前腕内側の 3 ヶ所について、水分、油分、弾力の程度を「ない（−2 点）」から「非常に多い（2 点）」の 5 件法で回答してもらったが、ほぼ 0 点以下が選択されており、全体として、水分、油分、弾力は適度または少ないと感じていたと考えられる。

就床前の目尻の肌質の評価は、香りなし群では水分、油分、弾力全てにおいて実験前後の変化は見られなかったが、香りあり群の水分と油分にはPre（−1 点前後）からPost（−0.3 点前後）に得点が増加していた。水分、油分、弾力のそれぞれに時間（2 水準）× 群（2 水準）の分散分析を行った結果、水分と油分には時間の主効果に有意差が認められ（水分：F (1, 21) = 8.70, p = 0.0076, 油分：F (1, 21) =14.31, p=0.0010）、時間 × 群の交互作用にも有意差が得られた（水分：F (1, 21) = 5.49, p = 0.0029, 油分：F (1, 21) =14.31, p = 0.0010）。交互作用の下位検定の結果、香りなし群ではPre と Post の間に有意差はなく、香りあり群ではPre からPost にかけて有意に得点が増加していた（水分：p = 0.0014, 油分：p <0.001）。

起床後の目尻、就床前と起床後の顔（全体）、就床前と起床後の前腕内側については、水分、油分、弾力とも実験前後の変化は小さく、群間の差もほとんど見られなかった。それぞれ分散分析を行ったが、いずれの主効果にも交互作用にも有意差は得られなかった。したがって、どちらの群も起床後の目尻、就床前と起床後の顔（全体）、就床前と起床後の前腕内側についての肌質の主観評価には、実験前後の変化も群間の差もなかったことが示された。

以上の分析の結果、香りなし群と香りあり群との違いが見られたのは、就床前の目尻の水分と油分の主観評価で、いずれも香りなし群は実験前後の変化がなく、香りあり群では実験前から実験後にかけての改善が観察された。

表 3-3　睡眠に関する項目と肌質に関する項目の相関分析

			睡眠に関する項目							肌質に関する項目	
		年齢	A	B	C	D	E	F	G	H	I
年齢		*r*	-0.072	0.043	0.271	0.198	-0.366	-0.068	-0.019	-0.089	-0.095
		n	23	23	22	22	22	22	22	23	23
		p	0.744	0.845	0.222	0.377	0.093	0.763	0.933	0.686	0.666
睡眠に関する項目	A	*r*	**-0.821**	-0.045	-0.126	0.004	-0.151	0.158	-0.303	0.009	
		n	**23**	22	22	22	22	22	23	23	
		p	**<0.001**	0.842	0.576	0.985	0.502	0.482	0.159	0.967	
	B	*r*	0.047	0.165	-0.080	0.000	-0.293	**0.457**	-0.161		
		n	22	22	22	22	22	**23**	23		
		p	0.835	0.463	0.723	1.000	0.185	**0.028**	0.463		
	C	*r*	**0.874**	0.331	0.061	-0.105	-0.332	0.337			
		n	**22**	22	21	21	22	22			
		p	**<0.001**	0.132	0.792	0.650	0.131	0.125			
	D	*r*	0.382	-0.005	-0.050	-0.085	0.263				
		n	22	21	21	22	22				
		p	0.079	0.982	0.829	0.706	0.236				
	E	*r*	**0.484**	0.208	-0.326	-0.026					
		n	**21**	21	22	22					
		p	**0.026**	0.365	0.138	0.908					
	F	*r*	0.048	-0.337	-0.232						
		n	21	22	22						
		p	0.836	0.125	0.298						
	G	*r*	-0.080	0.243							
		n	22	22							
		p	0.723	0.275							
肌質に関する項目	H	*r*	0.027								
		n	23								
		p	0.902								
	I										

睡眠に関する項目 A：就床時刻の変化量（分）
睡眠に関する項目 B：就床持続時間の変化量（分）
睡眠に関する項目 C：就床後 45-60 分の身体活動量の変化量（METS）
睡眠に関する項目 D：就床後 60-75 分の身体活動量の変化量（METS）
睡眠に関する項目 E：睡眠周期のパワーの変化量（METS2）
睡眠に関する項目 F：PSQI（ピッツバーグ睡眠質問票）総合得点の変化量（点）
睡眠に関する項目 G：OSA-MA（OSA 睡眠感調査票 MA 版）合計点の変化量（点）
肌質に関する項目 H：就寝前（夜）の目尻の肌水分の変化量（%）
肌質に関する項目 I：就寝前（夜）の目尻の肌質の主観評価合計点の変化量（点）
r：相関係数，n：サンプル対の数，p：有意確率

3. 3. 睡眠および肌質に関する項目の関連性の検討

睡眠と肌質の関連について検討するために、睡眠および肌質に関する項目の変化量の相関関係を検討した。睡眠に関しては7項目（就床時刻、就床持続時間、就床後45-60分および60-75分の身体活動量、睡眠周期のパワー、PSQI総合得点、OSA-MA合計点）、肌質に関しては2項目（就寝前の目尻の肌水分および肌質の主観評価水分・油分・弾力の合計点）を選出した。全被験者を対象に、第1週と第2週の各平均値の差または実験前Preと実験後Postの差をそれぞれ算出し、これらの変化量に年齢を加えた10項目の相関係数を求めた。

その結果、①就床持続時間と就床時刻、②就床持続時間と肌水分、③就床後45−60分および60−75分の身体活動量、④睡眠周期のパワーとPSQI総合得点の4つの項目対に有意な相関関係が認められた。

①就床持続時間と就床時刻では、高い負の相関関係が認められた（$r = -0.821$, $p < 0.001$）。このことは、就床時刻が早まれば就床持続時間が延長し、就床時刻が遅延すると就床持続時間が短くなることを示し、当然の結果であるといえる。

②就床持続時間と肌水分では、中程度の正の相関関係が認められ（$r = 0.457$, $p = 0.028$）、就床持続時間が延長すると肌水分も増加し、就床持続時間が短縮されると肌水分も減少するという対応関係であった。このことは、睡眠と肌質の関連性を示唆するものと考えられる。

③就床後45−60分および60−75分の身体活動量では、高い正の相関関係が認められた（$r = 0.874$, $p < 0.001$）。就床後45−60分および60−75分の時間帯は、睡眠周期の最初のサイクルの中で、睡眠段階が深く体動が最も少なくなることが予想される時間帯である。したがって、これらの時間帯の身体活動量すなわち体動は睡眠の質を左右する項目の一つと考えられ、肌質に関する項目との関連も期待されたが、相関関係としては検出されなかった。

④睡眠周期のパワーとPSQI総合得点の間には、中程度正の相関関係が認められた（$r = 0.484$, $p = 0.026$）。睡眠周期のパワーは、睡眠周期に近い周波数帯域（0.00013 Hz, 128分周期および0.000195 Hz, 約85分周期）のパワーを合計したもので、パワーの増加はその周期の体動がより明白に出現していたことを示すものである。PSQI総合得点は、高いほど睡眠の質が低下することを示すものであることから、体動の出現頻度と睡眠の質との間にも対応関係があることを示していると考えられる。

以上の分析の結果、複数の睡眠に関する項目の中でも就床持続時間について、就床前の目尻の肌水分との間に対応関係が観察され、睡眠の時間的側面と肌質との関連が示唆された。

4. 考　察

本研究は、睡眠誘導効果をもつ天然由来の香り(−)− 酢酸ボルニルを用いた睡眠サポート法を提案し、睡眠促進によ

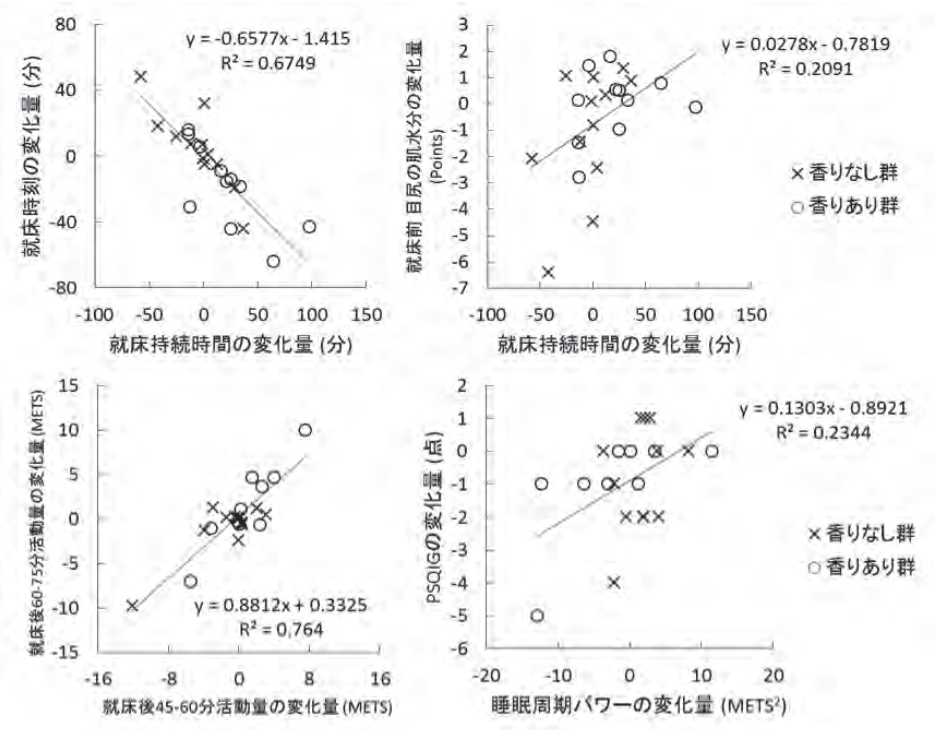


図 3−3　睡眠および肌質に関する項目（変化量）の相関関係

る肌質への波及効果を検討することを目的として、50歳以上の成人女性を対象に就床時の香りの吸引を2週間実施し(香りあり群)、プラセボ群(香りなし群)との比較を行った。

睡眠の質の評価には、就床・起床の時刻とその持続時間、就床中と日中の身体活動量、直近の2週間の睡眠に関する内省、起床時の睡眠感を用いた。

時間に関する項目では、就床時に(−)-酢酸ボルニルの香りを吸入した香りあり群において、就床時刻が早くなり就床持続時間の延長傾向と起床持続時間の短縮が観察された。起床時刻(6:30頃)は変化せずに就床時刻が早まった(第1週では0:10頃だったのが第2週では23:50頃になった)ことから、社会生活への影響は少なく、睡眠時間確保の観点からも睡眠の質の改善につながる変化であったともいえる。なお、全被験者の各測定項目の変化量の相関分析では、就床時刻が早いことと就床持続時間の延長との対応関係も示されており、この結果とも一致している。(−)-酢酸ボルニルの香りには、作業後の覚醒状態の低下効果(θ波増強)および自律神経の緊張緩和効果が報告されており[6-9]、これらの効果によって睡眠の質が向上し、より早い就床行動を促進した可能性が考えられる。

身体活動量に関しては、就床中でも日中においても、顕著な群間の差の検出には至らなかった。また、就床後3時間の身体活動量すなわち体動に基づいて睡眠周期の検討を行ったが、こちらでも群間の差は観察されなかった。これらは、身体活動量による睡眠の質の評価は未だ開発途中であり[15,16]、評価方法が定まっていないことも理由のひとつと考えられる。睡眠の質の客観的な評価には、脳波、眼球運動、筋電図などの生体信号を収録して評価する終夜睡眠ポリグラフィ検査が一般的であるが[17]、身体に多数の電極を装着する必要があるなどの様々な制約があり、個人レベルでの計測は困難である。睡眠研究の推進のためには日常生活の中で簡易的に計測できる方法の開発が必要であり、今後も身体活動量・体動による睡眠評価を試み続け知見を蓄積していく必要がある。

睡眠に関する内省と起床時の睡眠感については、どちらの群にも実験前から後にかけて改善が見られた。ただし、群間の差は得られなかったことから、この改善効果はプラセボ効果と考えられる。

一方、肌質の評価は、肌水分の測定と肌質(水分、油分、弾力)の主観評価を用いた。

肌水分の測定は、目尻と前腕内側の2ヶ所について就床前と起床後に行い、目尻では就床前も起床後も、香りなし群より香りあり群の方が高く、どちらの群も実験期間中の変動は見られなかった。実験初期から香りあり群の方が高い値を示していたため、この結果は就床時の香りの吸引の効果とは考えにくい。前腕内側の肌水分は、実験期間中の変動も群間の差も見られなかった。実験は3月下旬から4月上旬にかけて実施されたことから、前腕内側は季節的に衣服(長袖)に覆われていることが多い部位であり、衣類で保護されている部位とみなすことができる。そのため、外気に晒されている顔の部位に比べると変動が起きにくい状況にあったと考えられる。

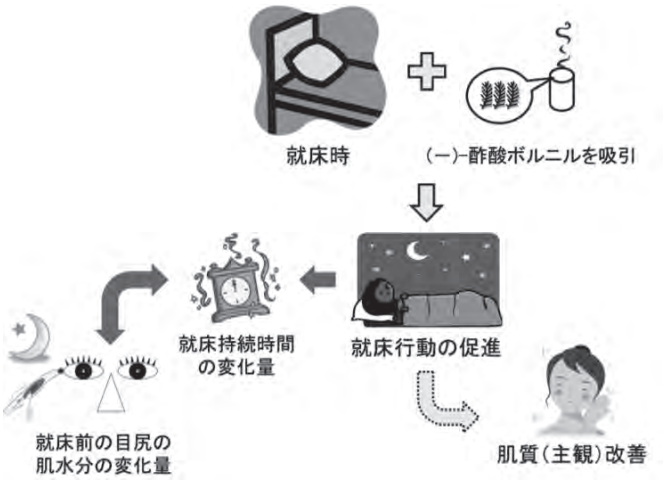


図4　本研究の成果

肌質(水分、油分、弾力)の主観評価は、顔(全体)、目尻、前腕内側の3ヶ所について実験開始日と終了日のそれぞれ就床前と起床後の計4回実施したところ、就床前の目尻の水分と油分の主観評価に関して、就床時に香りの吸引を行った香りあり群では実験前から実験後にかけての改善が観察された。水分は実験期間中の毎晩毎朝に計測を行っており、就寝前の目尻の肌水分の測定値は増加しておらず、油分については測定をしていないため、被験者が何に基づいて肌質の評価をしたのか推測は難しい。グリシン食品摂取が睡眠の質と肌質に及ぼす効果を調査した山崎ら[5]は、睡眠の質の向上とともにPSQIの総合得点と皮膚バリア機能との対応関係を確認している。本研究においても、全被験者を対象とした分析ではあるが、就床持続時間の変化量と就床前の目尻の肌水分の変化量との間には正の相関関係が認められている。したがって、就床時刻が早まり就床持続時間が延長した香りあり群の被験者は、睡眠の質の改善とともに肌質も改善されたと仮定すると、肌水分測定以外のところで何らかの変化を感じ取り、それが肌質の主観評価得点に反映されたことが可能性のひとつとして考えられる。

以上の結果から本研究では、(−)-酢酸ボルニルを就床時に吸引することによって、睡眠の時間的側面に改善効果が確認され、肌質には夜間の目尻の水分と油分に対する主観に対して好ましい波及効果が認められた。また、本研究の測定項目からも、睡眠と肌質の関連性が示唆された。これらの香りの効果をより正確に把握しより有効に発揮させるためには、測定項目の精度の向上とともに、吸引時の(−)-酢酸ボルニルの濃度や吸引する期間も合わせて引き続き検討していく必要がある。

（引用文献）

1）Goel N, Kim H, Lao RP, : An olfactory stimulus modifies nighttime sleep in young men and women, Chronobiol Int., 22（5）, 889-904, 2005.

2）Lewith GT, Godfrey AD, Prescott P, : A single-blinded, randomized pilot study evaluating the aroma of Lavandula augustifolia as a treatment for mild insomnia, J Altern Complement Med., 11（4）, 631-637, 2005.

3）Kahan V, Andersen ML, Tomimori J, Tufik S, : Stress, immunity and skin collagen integrity: evidence from animal models and clinical conditions, Brain Behav Immun., 23（8）, 1089-1095, 2009.

4）Kahan V, Andersen ML, Tomimori J, Tufik S, : Can poor sleep affect skin integrity?, Med Hypotheses., 75（6）, 535-537, 2010.

5）山崎俊介, 谷口亜樹子, 渡辺謹三, : 各種アミノ酸摂取による生体への機能性研究：疲労回復をもたらす食品の探索的研究, 鎌倉女子大学学術研究所報, 10, 59-69, 2010.

6）Matsubara E, Fukagawa M, Okamoto T, Ohnuki K, Shimizu K, Kondo R, : (−)-Bornyl acetate induces autonomic relaxation and reduces arousal level after visual display terminal work without any influences of task performance in low-dose condition, Biomed Res., 151-157, 2011.

7）Matsubara E, Fukagawa M, Okamoto T, Ohnuki K, Shimizu K, Kondo R, : The essential oil of Abies sibirica（Pinaceae）reduces arousal levels after visual display terminal work, Flavour Frag J., 26（3）, 204-210, 2011.

8）松原恵理, 深川未央, 岡本剛, 大貫宏一郎, 清水邦義, 近藤隆一郎, : 天然素材の多機能性　(5) (−)- 酢酸ボルニルの多機能性　～“森の香り”(−)- 酢酸ボルニルが視覚作業後の覚醒状態や緊張緩和に及ぼす効果～, Aroma research, 12（1）, 76-83, 2011.

9）松原恵理, 深川未央, 岡本剛, 大貫宏一郎, 清水邦義, 近藤隆一郎, : 天然素材の多機能性 (6) モミ精油の多機能性 -- モミ精油は視覚作業後の覚醒状態を低下させる, Aroma research, 12（2）, 180-186, 2011.

10）Buysse DJ, Reynolds CF 3rd, Monk TH, Berman SR, Kupfer DJ, : The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice and research, Psychiatry Res., 28（2）, 193-213, 1989.

11）土井由利子, 箕輪眞澄, 内山真, 大川匡子, : ピッツバーグ睡眠質問票日本語版の作成, 精神科治療学, 13, 755-763, 1998.

12）Doi Y, Minowa M, Uchiyama M, Okawa M, Kim K, Shibui K, Kamei Y, : Psychometric assessment of subjective sleep quality using the Japanese version of the Pittsburgh Sleep Quality Index（PSQI-J）in psychiatric disordered and control subjects, Psychiatry Res, 97（2-3）, 165-172, 2000.

13）小栗貢, 白川修一郎, 阿住一雄, : OSA 睡眠調査票の開発－睡眠感評定のための統計的尺度構成と標準化－, 精神医学, 27, 791-799, 1985.

14）山本由華吏, 田中秀樹, 高瀬美紀, 山崎勝男, 阿住一雄, 白川修一郎, : 中高年・高齢者を対象としたOSA睡眠調査票（MA版）の開発と標準化, 脳と精神の医学, 10, 401–409, 1999.

15）日本睡眠学会, : 体動, 日本睡眠学ハンドブック, 朝倉書店, 2002, 460-467 頁.

16）神林優太, 萩原啓, : 体動の出現頻度を用いた睡眠周期推定の試み, 生体医工学, 50（1）, 99-104, 2012.

17）川名ふさ江, : 終夜睡眠ポリグラフ検査, 松浦雅人編, : 臨床神経生理検査の実際, 新興医学出版社, 2007, 142-150 頁.

リラックスおよび安眠効果に有用な植物芳香成分の探索

産業医科大学保健センター[1]、早稲田大学大学院情報生産システム研究科[2]
八谷 百合子[1]、柴田　美雅[1]、犬島　浩[2]

The purpose of this study is to examine the effect of an olfactory stimulus on changes in a physiological index and sleep. Using aromas during the loading of stress, we measured beat-to-beat interval (R-R interval) times from electrocardiogram (ECG) recordings. Measurement of heart rate (HR) variability from short and long-term ECG recordings is a non-invasive method for evaluating cardiac autonomic regulation. In an analysis of the power spectrum in the R-R interval times, the high and low frequencies in the physiological index of stress loading suggest that the aromas have an effect on the autonomic nervous system. As the strain on the sympathetic nerve was relaxed, we conclude that the aroma affected the sympathetic nerves. We also measured the average amount of sleep and quality of waking by the activity meter and a questionnaire during the aroma-load. We conclude that there are individual differences in amount of sleep and quality of waking.

1. 緒　言

職場では，うつ病，不安障害，心身症などのストレス関連疾患が急増している[1)]．ストレス関連疾患は，長期にわたる休職や過労死などとの関連性が報告されている[2)]．健康管理や労務管理の上で，ストレス関連疾患を予防することは重要な課題である．また，ストレスを誘引とする不眠の影響のため，日中の集中力の低下や頭痛などから労働の意欲が減退し，生産活動の低下をもたらすと言われている．よって，このような状態に陥る前に，ストレスや不眠を緩和することが必要であり，ストレス緩和法が望まれている．植物芳香成分は，抗不安作用，鎮静作用，抗うつ作用など，ストレスを緩和しリラックスや安眠の効果があると言われている．しかし，植物芳香成分の効果の有用性については未だ不明である．その原因としては，香りの効果は身体的条件，環境的条件に左右されるものと考えられる．心理学的な測定のための質問紙や，採血，唾液，生理学的検査として指尖容積脈波，皮膚電気抵抗，皮膚温度，脳波などを測定した結果があるが，いずれも有意差は認められていない．よって，植物芳香成分の効果について，心理的な測定や生理学的検査から確認できる状況に至っていない．

本報告では，成人を対象として作業負荷方法の選定と生体信号の計測を行い，心電図の心拍変動の解析を時系列で検討することで植物芳香成分のリラックス効果を検討した結果と活動量計および問診票を用いて睡眠状況を把握し，植物芳香成分の安眠効果について評価したことを報告する．

*
Exploration of useful scented liquid from plants for relax and good sleep
Yuriko Hachiya*[1], Minori Shibata[1], Hiroshi Inujima[2]
Health Center, University of Occupational and Environmental Health[1], Graduate School of Information, Production and Systems, Waseda University[2]

2. 実　験

2. 1. 植物芳香成分のリラックス効果

2. 1. 1. 対象

平均年齢 23 ± 1.0 歳（22 ～ 24 歳），コンピュータ使用経験が平均年数 6.0 ± 1.7 年（5 ～ 8 年）の男子大学生 3 名（被験者記号 A ～ C）を被験者とした．

2. 1. 2. 植物芳香成分の呈示方法

本研究では，植物芳香成分として，フランスのPranarom社のラベンダー・アングスティフォリィア（真性）を使用した．ラベンダーの主な成分は酢酸リナリルであり，副交感神経に働き，精神安定や鎮静作用を持ち[3)]，ストレスによる疲労感に対して，中枢神経を刺激し，リフレッシュ効果がある[4)]．今回使用したラベンダー・アングスティフォリィア（真性）は，酢酸リナリル 40.00 %とリナロール 42.19 %を含んでいた．それぞれ 200 µg のラベンダーを含ませた濾紙 3 枚を専用の設置台に刺し，実験室の中央に置いた（Fig. 1）．

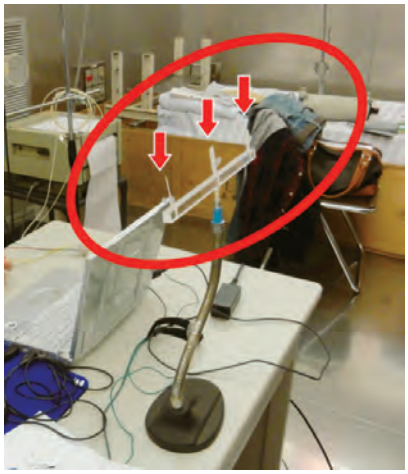


Fig. 1　The lavender diffusing equipment
ラベンダーの拡散装置（八谷百合子，柴田美雅，犬島浩：植物芳香成分吸引時における心拍変動の検討，電気学会研究会資料知覚情報研究会 PI-14-075，p. 63，2014，の p. 63 の図 1 より転載）

2. 1. 3. 植物芳香成分によるリラックス効果実験の流れ

植物芳香成分によるリラックス効果実験のスケジュールをFig. 2に示す．被験者1人につき2回実験を行った．1回目の実験では，安静後水を嗅がせ，「暗算作業ソフト」を使用し作業負荷を与え，アニメーション視聴によるリラックスの後安静とした．別な日に行った2回目の実験では，安静後ラベンダーを実験室に設置し，実験終了まで植物芳香成分を連続して嗅がせた．安静後「暗算作業ソフト」を使用し作業負荷を与え，アニメーション視聴によるリラックスの後安静とした．実験に際して被験者の状態を統一するため，被験者に「前日はアルコールを飲まない，十分に睡眠をとる」等を指導した．被験者は，非喫煙者のみとした．実験当日に体調に問題がないことを確認した後，各種測定装置を装着後，約1時間程度実験室の中で環境に慣れてもらい，データ収集を行った．被験者が10分おきに0－9までの数字を使って「疲労感の変化」をキー・ボードから入力し自動的に記録した．これは0を疲労感無し，9を作業が続けられないほどの疲労感としたものである．一瞬で判断できるように0～9の段階に区分し，言葉は付帯しなかった．実験で使用した心電図の測定機器は，ECG monitor（model: Bioview 1000，PB1402, NEC, Tokyo, Japan）であった．なお，被験者にはinformed consentを行い，同意書を得た上で実験を実施した．本研究の実施について，産業医科大学倫理委員会の承認を得た．

2. 1. 4. 実験環境

生体情報は環境（室温，湿度，照度，騒音，気圧，電磁波など）と被験者の体調に左右されやすい．また，VDT作業を行う室内の温度は17～28℃，湿度は40～70％，エアコンの風などが作業者に直接当たらないようにすることが重要といわれている[5]．よって，測定は周囲の環境を一定にできる産業医科大学人工気候室で行い，条件は室温25℃，湿度60％，騒音60 dB，照度680 Lux，上着衣量140g，風速0.2m/s，シールド使用（減衰率40dB以上（at 0.5～200MHz））とした．

2. 1. 5. 暗算作業ソフト

オリジナルの「暗算作業ソフト」の画面をFig. 3に示す．被験者は，3つの数字を足し合わせ，下一桁の数字を「暗算作業ソフト」に入力した．「暗算作業ソフト」は，作業量

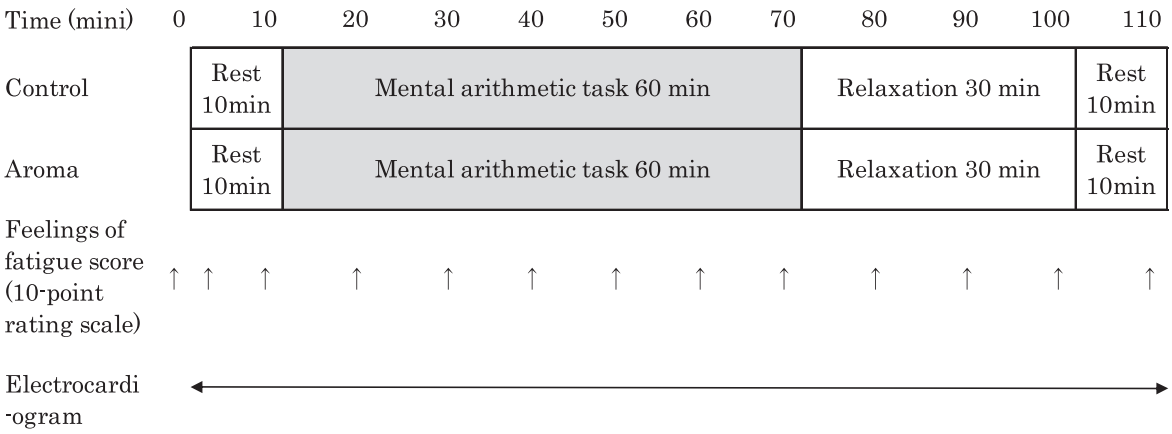


Fig. 2　Experiment procedure during mental arithmetic operation
植物芳香成分によるリラックス効果実験のスケジュール（八谷百合子，柴田美雅，犬島浩：植物芳香成分吸引時における心拍変動の検討，電気学会研究会資料知覚情報研究会 PI-14-056～080・082～093，63－67，2014，のp. 64の図2より一部修正の上転載）

Fig. 3　Outline of measurement for workload of mental arithmetic operation
暗算作業ソフトの画面（八谷百合子，柴田美雅，犬島浩：植物芳香成分吸引時における心拍変動の検討，電気学会研究会資料知覚情報研究会 PI-14-056～080・082～093，63－67，2014，のp. 64の図3より一部修正の上転載）

とミス入力数を自動計算した．また，「暗算作業ソフト」は被験者が入力した「疲労感の変化」も自動的に記録した．

2. 1. 6. 解析ソフト

ECG monitor で測定した心電図波形を VITALRHYTHM 2100（有限会社メディカルトライシステム）で解析した．

2. 1. 7. 心拍変動[6)]

2. 1. 7. 1. 心拍変動

循環器機能は，交感神経と副交感神経の相互作用を通して調節されている．吸気相と呼気相に同期した周期性変化は，心拍変動と呼ばれる．心拍変動は，心拍の R-R 間隔の 1 拍ごとの変動を測定する．本研究では，心拍変動の評価の一つである心拍の周期変動の周波数分析を用い，低周波数（low frequency :LF，0.04 ～ 0.15 Hz），高周波数（high frequency :HF，0.15 ～ 0.40 Hz）のパワースペクトル解析用いた．

2. 1. 7. 2. ストレスと心拍変動[7)]

心拍変動は精神的ストレスの指標となることが知られており，負荷が強くなるに従って心拍変動は減少する．精神的ストレスを受けると交感神経緊張が亢進し，LF 成分が増大および HF 成分が減少する．よって，LF 成分と HF 成分は鏡像を形成する．本研究において，心拍における 0.04 ～ 0.15 Hz の低周波数帯域を P1 とし，心拍における 0.15 ～ 0.40 Hz の高周波数帯域を P2 とした．また，LF/HF を求め，P1/ P2が高ければ精神的負荷が高いものとした．

2. 1. 7. 3. R-R 間隔の測定

心電図の波形例を Fig. 4 に示す．心電図は，心臓の拍動に伴う心臓の電気的な活動をグラフの形にしたものである．本実験では胸部誘導（3 点誘導）で測定した心電図を 1ms でサンプリングした．1ms の精度で R 波を検出し R-R 間隔を順次計測した．R-R 間隔の時系列例を Fig. 5 に示す．

2. 1. 7. 4. パワースペクトルの計算

本研究では，心拍変動の振動成分の抽出のため，R-R 間隔の時系列のスペクトル解析を行った．R-R 間隔時系列に対しパワースペクトルを求めた．パワースペクトルの例を

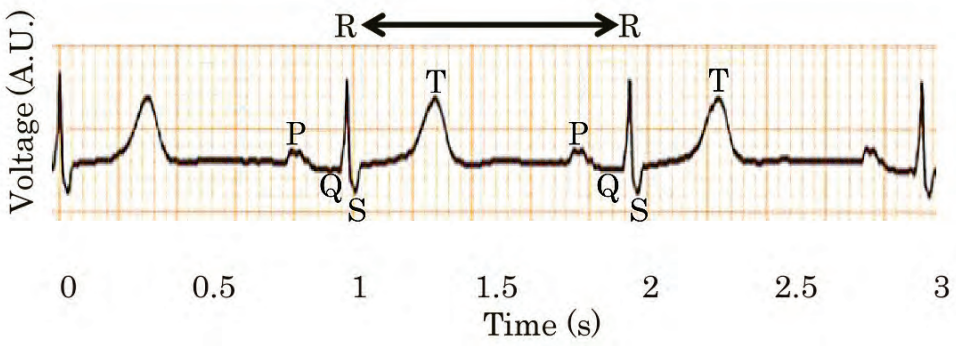


Fig. 4　Typical example of the electrocardiograph
心電図の波形例（八谷百合子，柴田美雅，犬島浩：植物芳香成分吸引時における心拍変動の検討，電気学会研究会資料知覚情報研究会 PI-14-075，p. 65，2014，の p. 65 の図 4 より転載）

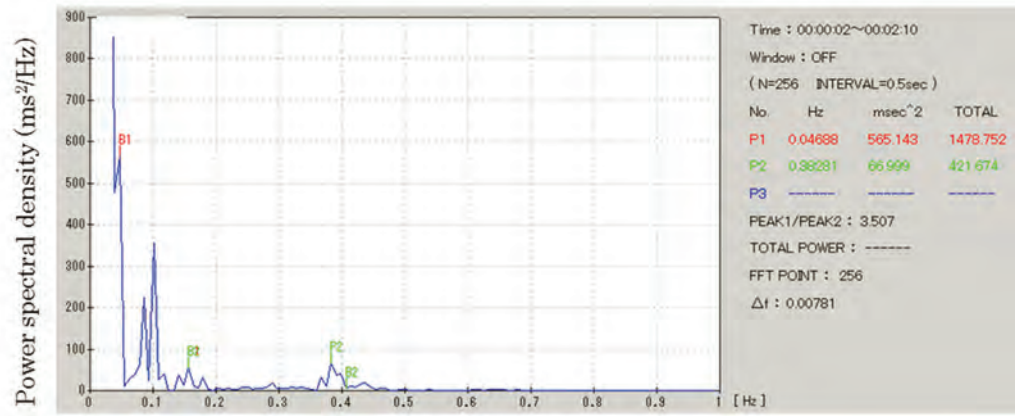


Fig. 5　An example of the R-R interval times
R-R 間隔の時系列例（八谷百合子，柴田美雅，犬島浩：植物芳香成分吸引時における心拍変動の検討，電気学会研究会資料知覚情報研究会 PI-14-056 ～ 080・082 ～ 093，63 － 67，2014，の p. 65 の図 5 より転載）

Fig. 6 に示す．低周波数帯域(P1)高周波数帯域(P2)のピーク位置にマークを表示した．

2. 2. 植物芳香成分の安眠効果

2. 2. 1. 対象

平均年齢 23±1.0 歳(22 ～ 24 歳)の男子大学生 3 名(被験者記号 D ～ F)を被験者とした．

2. 2. 2. 評価項目

・3 軸加速度センサ搭載の丸型活動量計 MTN-210（キッセイコムテック)による 6 方向の姿勢情報(立位，倒立位，仰臥位(左右)，側臥位(左右)，仰臥位）による睡眠と覚醒の評価，歩数および運動量による活動量の評価
・事前問診票（Epworth Sleepiness Scale，ピッツバーグ睡眠質問票，睡眠健康調査票(SHRI)
・睡眠感調査票（OSA 起床時睡眠感調査票（MA 版)，起床時間記入票）

2. 2. 3. 植物芳香成分による安眠効果実験の流れ

被験者に事前問診票を渡し記入させ回収する．次に，被験者に活動量計，睡眠感調査票，直径 20cm 円形の濾紙を 8 等分に切ったものとラベンダーを渡し，以下のように行う．活動量計を 24 時間連続して木曜日から 14 日間被験者のシャツの襟に装着させ（Fig. 7)，姿勢情報，歩数および運動量を測定する．なお，入浴前は活動量計をシャツの襟から取り外し，入浴後再び同位置に装着させる．毎朝起床時に，睡眠感調査票に記入させる．ただし，8 日目から 14 日目までの就寝時は，就寝直前にラベンダー 200μg を濾紙に吸収させ，その濾紙を寝室に置いたまま就寝させる．翌朝，使用した濾紙は廃棄させる．実験開始から 15 日後に，活動量計と睡眠感調査票を回収しデータを保管する．なお，被験者には informed consent を行い，同意書を得た上で実験を実施した．本研究の実施について，産業医科大学倫理委員会の承認を得た．

3. 結果・考察[8)]

3. 1. 植物芳香成分のリラックス効果の結果

3. 1. 1. P1 と P2 の結果と考察

本研究では，解析データは R-R 間隔，1 回のパワースペクトル解析処理ポイントは 256 点，加算平均回数は 1 回(256 点毎にパワースペクトル解析が 1 回行われる)，ウィンドウはなし，タイプは R-Rms2 を選択した．実験開始から直後のパワースペクトル解析処理ポイントの 256 点が 128 秒であったため，心電図を 1ms でサンプリングしたものを

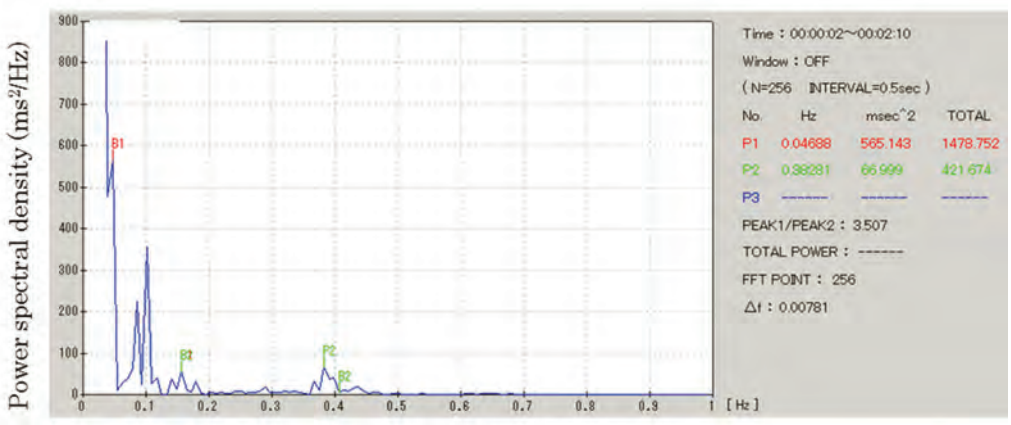


Fig. 6　An example of the power spectrum
パワースペクトルの例（八谷百合子，柴田美雅，犬島浩：植物芳香成分吸引時における心拍変動の検討，電気学会研究会資料知覚情報研究会 PI-14-056 ～ 080・082 ～ 093，63 － 67，2014，の p. 65 の図 6 より転載）

Fig. 7　The activity meter　活動量計

128秒毎にパワースペクトル解析を行った．代表例として，被験者Aの香りの有無別におけるコントロール中およびストレス中の心拍変動の低周波および高周波のパワーの結果をFig. 8に示す．

a点より安静を開始，b点より暗算作業を開始，c点よりリラックスを開始，d点より再び安静を開始した．Fig. 8の上段のグラフは，ラベンダーを使わない実験であった．P1は徐々に増加し，P2は変化しなかった．これは，暗算作業による精神的ストレスの影響があったものと判断した．

Fig. 8の下段のグラフは，ラベンダーを使った実験であった．P1はいくつかのピークを除いて増加せず，P2は変化しなかった．ラベンダーを使用したことにより，暗算作業中にリラックスできたものと思われた．

以上より，被験者Aについては，ラベンダーが暗算作業による交感神経緊張を緩和させ，精神的ストレスを減少させたと推測した．

3. 1. 2. 被験者A，B，CのP1/ P2の結果と考察

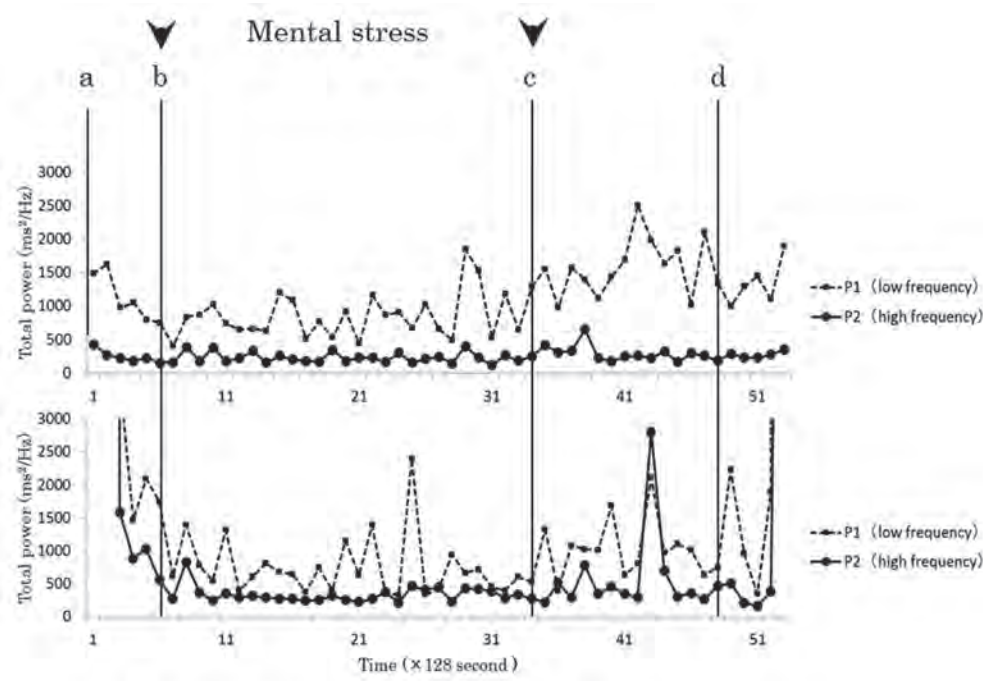
次に，被験者A，B，Cの植物芳香成分使用別のP1/ P2をFig. 9に示す．P1/ P2が高ければ交感神経が緊張状態であり，精神的負荷が高いと言われている．上段は被験者A，中段は被験者B，最下段は被験者Cである．ラベンダーを使わなかった結果を点線，ラベンダーを使った結果を実線で示す．

上段の被験者AのP1/P2の実線は，変化は見られなかった．ラベンダーの効果により，暗算作業中の交感神経緊張状態が緩和されたのではないかと推測した．中段の被験者BのP1/ P2の点線は，徐々に増加した．これに比べラベンダーを使った実線は，変化が見られなかった．被験者Bは，被験者Aと同様にラベンダーの効果により暗算作業中の交感神経緊張状態が緩和されたと推測した．最下段の被験者CのP1/ P2は，点線が徐々に増加した．ラベンダーを使わない場合でも暗算作業中の交感神経緊張状態は回避された．また，実線は漸次増加した．ラベンダーの香りが，暗算作業中の被験者にストレスを与えたためと思われる．植物芳香成分が個人とって心地よい香りと感じる否かは個人差があり，被験者Cにとっては心地よい香りではなかったと思われた．

本研究では，被験者の好みにかかわらず，ストレスによる疲労感に対してリフレッシュ効果があると言われるラベンダーを使用した．被験者の嗜好性は考慮しなかったが，今後の研究においていろいろな植物芳香成分を選択し実験を行うことが課題と思われる．

3. 2. 植物芳香成分の安眠効果の結果

丸型活動量計MTN-210解析ソフトを使用し，6方向の姿勢情報による睡眠と覚醒の評価，歩数および運動量によ



a : Start of rest, b: Start of mental arithmetic operation,
c : Start of relaxation, d : Start of rest.

Fig. 8　The power spectrum of high and low frequency in case of subject A
コントロール中およびストレス中の心拍変動の低周波および高周波のパワー（被験者Aの香り有無別）
（八谷百合子，柴田美雅，犬島浩：植物芳香成分吸引時における心拍変動の検討，電気学会研究会資料知覚情報研究会 PI-14-056 ～ 080・082 ～ 093，63 － 67，2014，のp. 66の図7より一部修正の上転載）

る活動量の評価，各問診票の集計を行った．

3. 2. 1. 睡眠日誌の結果

植物芳香成分の安眠効果として，問診票による平均睡眠時間と起床時の目覚めについての検討結果を示す．平均睡眠時間と起床時の目覚めの良さにおいて，ラベンダーを使用しなかった場合と使用した場合を比較した．結果をFig. 10 ～ Fig. 12 に示す．目覚めの良さは，1 が大変目覚めが悪く，10が大変目覚めが良いと定義し，被験者に記録させた．

被験者Dと被験者Fは，ラベンダーを使用しなかった場合に比べてラベンダーを使用した場合の方が，睡眠時間が短く，目覚めも悪かった．被験者Eは，ラベンダーを使用しなかった場合に比べてラベンダーを使用した場合の方が，睡眠時間が長く，目覚めも良かった．植物芳香成分の安眠効果については，個人差があるものと推測された．

3. 2. 2. 活動量計の解析

次に活動量計の解析結果の代表例として，被験者Eのラベンダーを使わなかった場合の結果をFig. 13 に，ベンダーを使った場合の結果をFig. 14 に示す．黒色の部分は日

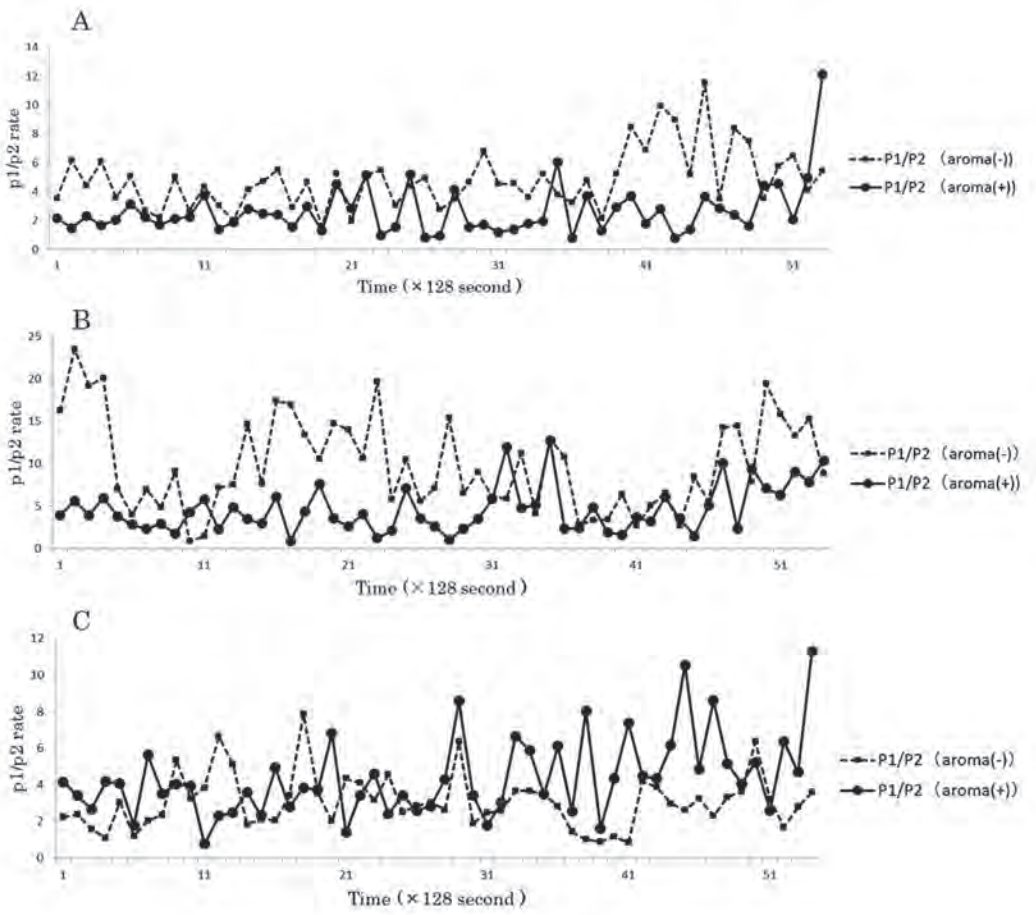


Fig. 9　The high and low frequency rate of power spectrum in case of A, B and C
A, B, C: subjects' code
心拍変動の低周波および高周波成分の比率（被験者 A, B, C の香り有無別）（八谷百合子，柴田美雅，犬島浩：植物芳香成分吸引時における心拍変動の検討，電気学会研究会資料知覚情報研究会 PI-14-056 ～ 080・082 ～ 093，63 － 67，2014，の p. 66 の図 8 より転載）

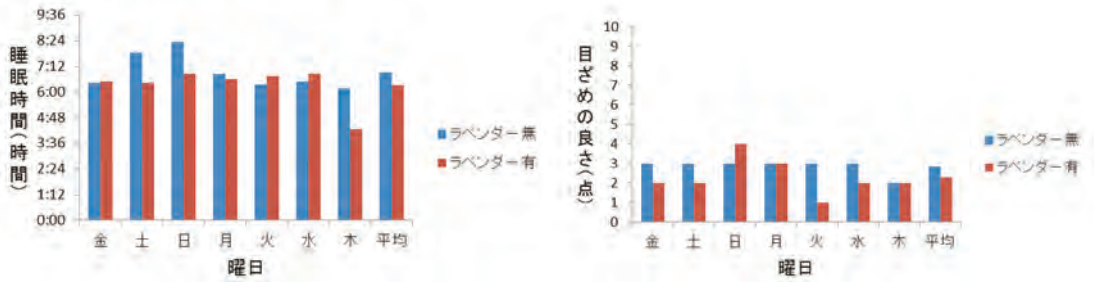


Fig. 10　A average amount of sleep and quality of waking from sleep（subject D）
平均睡眠時間と目覚めの良さ（被験者 D）

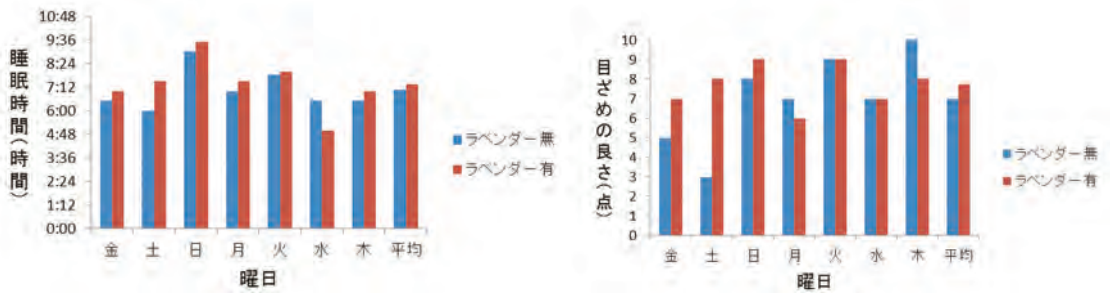


Fig. 11　A average amount of sleep and quality of waking from sleep（subject E）
平均睡眠時間と目覚めの良さ（被験者 E）

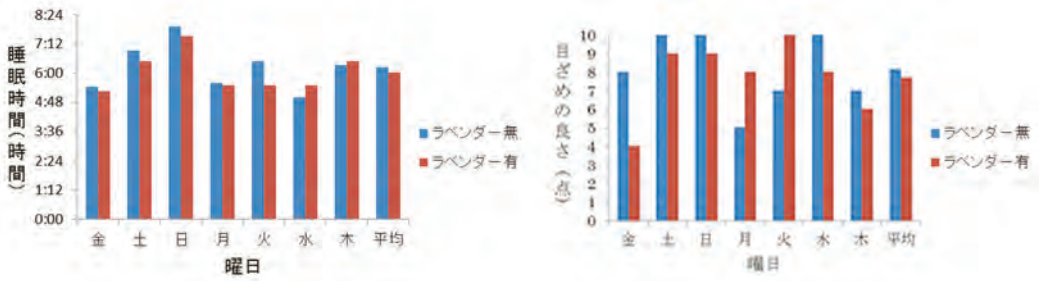


Fig. 12　A average amount of sleep and quality of waking from sleep（subject F）
平均睡眠時間と目覚めの良さ（被験者 F）

Fig. 13　The result of analysis on the activity meter in case of subject E without lavender
活動量計の解析結果（被験者 E，ラベンダー無）

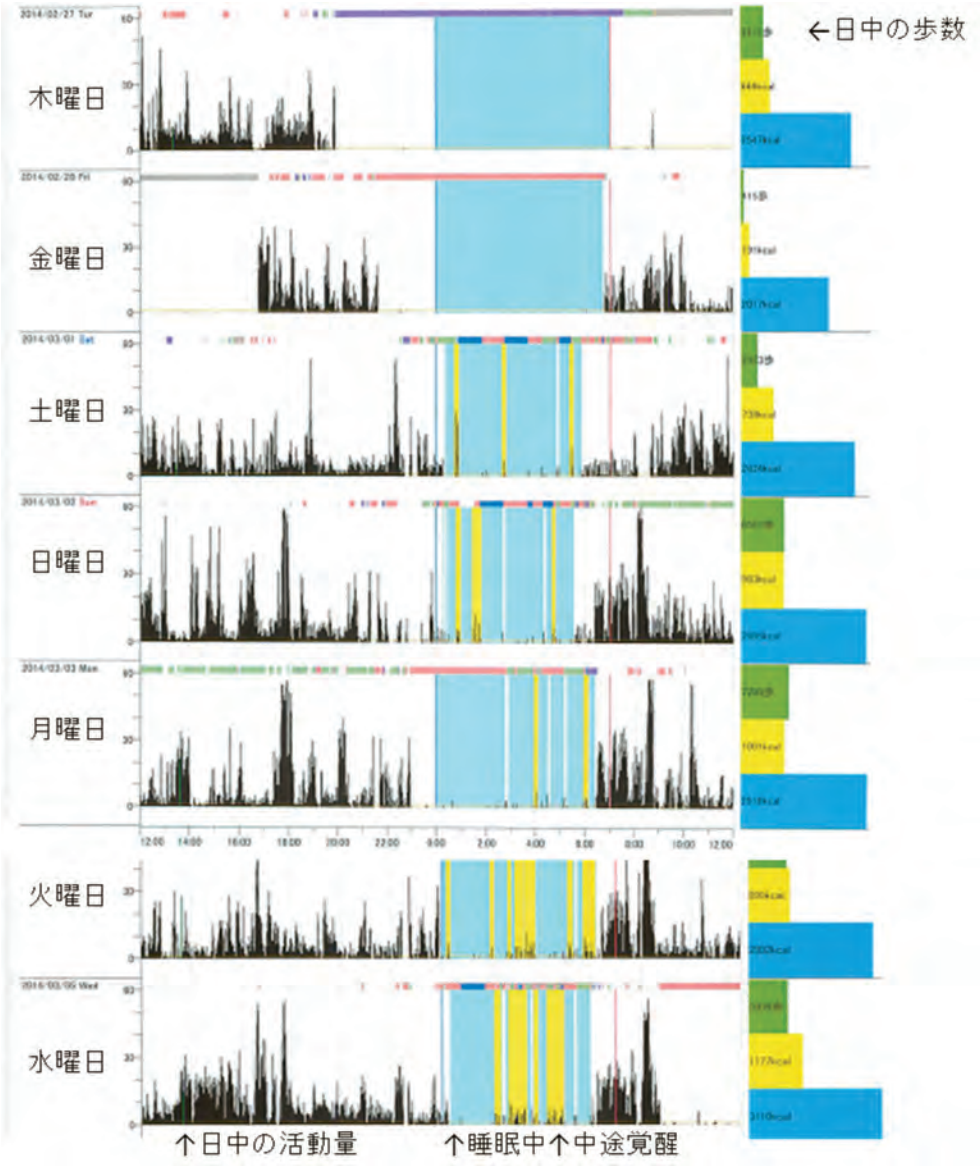


Fig. 14　The result of analysis on the activity meter（subject E, lavender（+））
活動量計の解析結果（被験者 E，ラベンダー有）

中活動していることを示す．青色の部分は就寝中を示し，その内黄色の部分は，中途覚醒を示す．被験者Eは，問診票においてラベンダーを使用した場合の方が，目覚めが良かったと答えている．活動量計の黄色の部分の中途覚醒状況をFig. 13とFig. 14で比べると，ラベンダーを使用した場合のうち，木曜日と金曜日は全く中途覚醒が見られなかった．被験者Eについては，ラベンダーによる安眠効果があったと推測される．

4. 総　括

本研究は，生体情報の変化を検討することで，嗅覚刺激がストレス作業および睡眠に対してどのように影響を与えるか検討することを目的とした．被験者男子学生3名を対象に各2回ずつ暗算作業を行わせた．ラベンダーを使わなかった1回目の実験では，10分間の安静後60分間暗算計算を行わせ，30分間のアニメーション視聴によるリラックス時間の後，10分間の安静を経て，実験を終了した．同じプロトコールを用い，ラベンダーを使う2回目の実験を行った．2回目の実験では，10分間の安静後から実験終了までストレスによる疲労感に対してリフレッシュ効果があるラベンダーを継続して嗅がせた．実験を通して，心電図を測定しR-R間隔の時系列のスペクトル解析を行った．低周波数帯域と高周波帯域比率を比較した結果，被験者3名のうち2名については，ラベンダーにより交感神経緊張状態の緩和作用が見られたと推測された．

次に，植物芳香成分による安眠効果について検討した．睡眠日誌の評価において，ラベンダーを使用した場合の方が，睡眠時間が長く，目覚めが良い被験者1名を確認した．しかし，他の2名は睡眠時間が短く目覚めも悪かった．植物芳香成分の安眠効果については，個人差があるものと推

測される．活動量計の中途覚醒状況において，ラベンダーを使用しなかった場合に比べ，ラベンダーを使用した場合の方が，中途覚醒が少ない被験者を確認した．今後は，被験者を増やし，データの再現性および属性による特徴を示す事が必要と思われる．

謝　辞

本研究を進める上でご協力を頂いた，産業医科大学共同利用研究センター門司幸一様，合同会社メディスアール竹田貞則様，早稲田大学大学院情報生産システム研究科立野繁之准教授，産業医科大学産業生態科学研究所人間工学研究室藤木通弘教授に深く感謝します．尚，この研究の一部は，公益財団法人コスメトロジー研究振興財団からの第24回（平成25年度）研究助成金（課題番号J-13-30）および公益財団法人北九州産業学術推進機構からの平成25年度産学連携研究開発事業シーズ探索助成金によって実施した．

（引用文献）

1）久保千春，吉原一文：ストレス関連疾患と慢性疲労症候群，医学の歩み，228，6，687，2009.
2）田中喜秀，脇田慎一：ストレスと疲労のバイオマーカー，日本薬理学雑誌，137，185，2011.
3）川端一永・吉井友季子・田永智子：臨床で使うメディカルアロマセラピー，メディカ出版，2000，6頁.
4）今西二郎：メディカル・アロマセラピー，金芳堂，2000，137頁
5）厚生労働省安全衛生部労働衛課編：VDT作業における労働衛生管理―ガイドラインと解説，中央労働災害防止協会，2002.
6）林博史編集：心拍変動の臨床応用－生理的意義－病態評価,予後予測－，医学書院，1999，1－16頁.
7）Pagani M. Furlan R, Pizzinelli P et al：Spectral analysis of R-R and arterial variabilities to assess sympatho-vagal interaction during mental stress in humans，J Hypertens，7(Suppl 6)，S14-S15，1989.
8）八谷百合子，柴田美雅，犬島浩：植物芳香成分吸引時における心拍変動の検討，電気学会研究会資料知覚情報研究会PI-14-056～080・082～093，63－67，2014.

記念講演

第 26 回表彰・贈呈式記念講演　服部 正平

（日本薬学会長井記念ホール・平成27年11月19日）

ヒト常在菌叢と超生命体
～微生物が作る体内ミクロコスモス～

早稲田大学理工学術院 教授
服部　正平

はっとり・まさひら
1972年岐阜大学工学部工業化学科を卒業、79年大阪市立大学大学院工学研究科博士課程（工学博士）を修了後、東亜合成化学工業㈱研究員に、84年には九州大学遺伝子情報実験施設助手、87年に米国・スクリプス研究所及びカリフォルニア大学・サンディエゴ研究員、91年に東京大学医科学研究所・ヒトゲノム解析センター助教授、99年から理化学研究所ゲノム科学総合研究センターチームリーダー、2002年、北里大学北里生命科学研究所教授、2006年7月から東京大学大学院新領域創成科学研究科教授を9年ほど務められ、2015年4月から現職の早稲田大学の教授に就任、現在に至る。
・専門分野：情報生命科学分野（特にメタゲノムデータの情報学的解析）
・その他：日本学術振興会、ゲノムテクノロジー委員会、他多数参画

ただいま紹介いただきました服部です。

ノーベル賞を取られた大村先生とはもう十数年前からつき合いがあるんですけど、土壌からああいうすごい薬をつくるというのはあり得ない話なんですが、初めて会ったときは、もうこの人は普通じゃないというのはしゃべっているだけでわかりました。もうそのころから、この人がノーベル賞を取ってもおかしくないなあというのはすごく感じていまして、それまで僕はほんとうに大村先生の存在を何も知らなかったんですけれども、おそらく多くの方も知らなかったと思うんですね。というのは、アフリカの風土病によくきく薬なので、日本には関係ないなというのがあったと思うんです。しかし、毎年数千万人の人が救われている薬を見つけた人と思うと、これは何かすごい人だなというふうにずっと昔から思っていまして、大村先生と会った次の年から、私は講義で、学生に大村先生を紹介することにしたんですよ。日本にこんなすごい先生がいるんだよと。それでもほとんどが知らなくて、今年ノーベル賞を取られて、やっぱり取ったかという感じがありました。

そういうことで、ノーベル賞を取ったとき、実は僕もすごく忙しくなりました。どんな先生でしたかというインタビューをすごく受けまして、ちょっとだけテレビに出たことがあります。そういうことで、私はきょう、常在菌の話をさせていただきます。

これは微生物の話なので、微生物はどんなものかという認識を改めていただきたいということで、見えないものですから、どのぐらいいるんだというのはわからないんですが、ここに書いてありますように、これはそれぞれのいろんなものの重さが書いてあります。例えば、ヒトの1つの細胞は大体10^{-9}グラムなんですね。我々1人の体重が5×10^{4}で、今人口が大体70億人ぐらいということで、そうすると世界中の人間の総重量は3×10^{14}なんですが、細菌は1個大体10^{-12}グラムあります。ところが、これは2009年の『Nature』の報告なんですが、地球上に細菌の総数は10^{30}いると。この掛け算をしますと10^{17}オーダーになると。そういうことは、重さにして人間よりも微生物は1,000倍重い。かつ、まあ、10^{10}ぐらいの人間の固体数に比べて10^{30}ですから、もし微生物が人間と同じ大きさでしたら、私1人の周りに10^{20}人の人間がいる、そのくらい密にいると。この認識をまず持っていただくと、私が今後話をすることに関してはすごく理解が早いと思われます。

このように地球上にはいっぱい微生物が棲んでいるんですが、我々の体も例外ではないというわけです。ここに書いてありますように、いろんな部位にいろんなタイプの菌が、1,000菌種以上、または単位面積と単位グラム当たりに、10^{14}ぐらいの菌が棲んでおりまして、消化器系、特に大腸ですが、最も多い菌種と菌種数が生息しているというわけです。ヒトの細胞というのは、最近37兆個に変わりましたが、それでもヒト常在菌の数は数百兆個になりまして、一けた多い細胞がヒト1人に棲みついているということになっているわけです。

このような常在菌を調べる方法としまして、当然これはパスツール以来、北里柴三郎以来その存在は知られておりまして、それを何とかしようという研究が始まっております。実際のところ、1960年ごろになりまして、日本では光岡先生というパイオニアの先生がいらっしゃいまして、当然のことながら、培養して微生物を確認するということがされ始めました。しかしながら、我々の体に棲んでいる菌というのはなかなか培養ができないということがわかっておりまして、ほんの一部しか見えません。そこで、その後、なかなか見えないものをどうするかということが問題になっていたんですが、1980年に移りますと、遺伝子、DNAを調べる技術が出てきました。これはいわゆる分子生物学になるわけです。そうしますと、ここにいる菌の塊を全部DNAにしちゃう。我々はこれをゲノムと言うんですが、そうしちゃう。英語では細菌叢のことをfloraと言ったり、僕らはmicrobiotaと言います。そこから出てくるゲノムの塊をマイクロバイオーム（microbiome）という言い方をします。このようにDNAができるわけです。そうするとこのDNAを対象にしまして、例えば、PCR等を使ってバクテリアの16SリボソームRNA遺伝子というのが

ありまして、すべてのバクテリアが持っております。その遺伝子を調べることで、どんな菌がいるのかということが可能になりました。そうすると、培養する必要がなくて、そのDNAを調べるだけでどんな菌がいるのかわかるわけで、培養できなかった菌の正体もここでわかるようになったわけです。

ところが、この方法では菌種はわかったんだけどそいつらが何をしているかわからない、機能がわからないという問題が残っておりました。それを解決したのが、今度は2004年、10年ほど前になりますが、メタジェノミクスという方法でそれが解決されました。すなわち、こちらの場合は16SリボソームRNA遺伝子だけをターゲットにしていたんですが、ランダムに遺伝子を見つけるという、我々はショットガンシークエンス法と言っているんですが、それをすることでそれぞれの微生物が持っている遺伝子を網羅できるというわけです。これによって菌種と機能の情報を獲得することができるようになりました。しかしながら、こちらはすごく膨大でして、この方法を使ってもすべてをつかまえることができるのかという大問題が残っておりました。

それを解決したのが、ここに書いてありますが、NGSというんですが、これはnext-generation sequencerといいまして、我々は次世代シークエンシング技術という言い方をします。これはすごい量のデータを出す機械、シークエンサーが2008年以降実用化されまして、これを使うことで非常に複雑な細菌叢のほぼ全部を網羅できるようになって今日に至ってきたという流れがあります。

先ほどのNGS、次世代シークエンサーですが、これは私が従事しましたヒトゲノム解析ですが、それにこういうシークエンサーを使ったんですが、そのころ、ヒト1人のゲノムを決めるのに何千億円とかかっておりました。しかしながら、その後、このシークエンサーという解読機械がどんどん開発され続けまして、今では10万円か20万円でヒト1人のゲノムが決まる、このぐらいのスピード、さらに10万倍早く、コストも10万分の1になりまして、そのおかげで、今までとても対象にできなかった細菌叢の解読ができるようになったということが背景にあります。

こういうような流れの中で、2008年に、これはやはり世界的なコンソーシアムをつくってやりましょうということになりました。これをInternational Human Microbiome Consortiumといいまして、IHMCと我々は略しております。このような、日本を含め、欧米の各国が集まって、データを共有し、技術を共有し、世界で競争しながら協働的にやりましょうというわけです。実際我々は、2005年に、日本においてはHMGJという日本のコンソーシアムをつくってこれをスタートさせました。IHMCができると同時に、その背景にあったんですが、米国のNIHがHuman Microbiome Project、HMPというのを立ち上げ、かつ欧州連合ではMetaHITというプロジェクトが、中国のBGIというセンターと一緒になって、やはりこれも2008年に始まった。というわけで、2008年から世界的に本格的な解析が始まって今に至っているわけです。

実際今どのようにしてこの常在菌を研究しているかという図がこの図になります。大きく2つの戦略をとっております。右と左です。左は、実際に我々自身のサンプルからどんな菌がいるのか、メタゲノムとか16Sとか、あとこれは代謝物等を見て、健常者及び病態の方々からいただいて、そのデータベースをつくる。これは何が質問かというと、Who is there? そこにどんなやつがいるんだということになるわけです。一方、そこにいる菌種たちは一体何をしているのかを研究するのが右になります。これはWhat are they doing?ということになるわけです。この場合、ヒトは使えませんので、我々は特殊なマウス、いわゆる無菌マウスというのを使います。全く菌を持たないマウスをつくりまして、それに研究したいバクテリア及びそのフローラを接種して、それを持つマウスをつくります。これをノトバイオートマウスといいます。これはもう1950年か60年か、ものすごく古くからある技術でして、ここに来てこの技術が大事になっています。

このようにしてできたノトバイオートマウスに対して、ここに書いてあるいろんな遺伝子の解析、代謝物の解析及び細胞の解析、そういうデータを得て、宿主と微生物の間の相互作用を調べる。それによって接種した微生物が宿主に対して何をしているのかということを解明しようと。この2つが両輪になって現在進んでいるというわけです。私はヒトゲノムとこちらのほうを得意としますので、主にこちらの話をしばらくさせていただきます。

これはややこしい図なんですが、基本的にどういうデータが得られるかを示した図です。ここに細菌叢のDNAがあります。16S解析はこのような形でやるということです。これで菌種の解析ができます。一方、メタゲノム解析は、こっちからこっちへ来まして、いっぱい配列データを得る。それを、これはコンピュータ上なんですが、微生物の非重複配列を得て、そこから遺伝子を同定する。これにbioinformaticsをやりまして、得られた遺伝子に対して、COGとかKEGGとかというデータベースがあります、これは機能データベースでして、こういう遺伝子はこういう機能を持っているというのがわかるので、ここで得られた遺伝子と、ここに相同検索というのをやることで、機能とか代謝系の解析ができるというわけです。

もう一方、ここはヒトの糞便と書いてありますが、やはり培養も大事だということで、ヒトから取れてくるバクテリアの培養も始めておりまして、取れた培養株に関しても、やはりNGSで、そのゲノム情報を得るというわけです。

これはリファレンスゲノムというわけです。これは 1 個のバクテリアの全ゲノム情報がそれぞれ入っておりまして、それが今 7,000 株以上たまった、これもデータベースになります。このデータベースを利用して、メタゲノムで得られた配列がどのゲノムに由来しているか、どの菌種から来ているかというのをマッピングという方法によって調べることができます。このようなやり方で菌叢解析をしております。

これは、126 名の日本人の方で、青いのが 19 歳～ 59 歳の成人で、緑が 1.5 歳～ 8 歳の、離乳後の赤ちゃんから小学生、それと離乳前の赤ちゃん、これは 5 ～ 6 名しか書いてありませんが、その腸内細菌がどのぐらいの菌種を持っているか、どのぐらいの菌種数でできているかを調べた図です。このように、生まれたての赤ちゃんは 30 ～ 40 菌種でできていますが、一たん離乳しますと、2 歳でも 3 歳でもほぼ大人と一緒ぐらいの菌種数を持つようになります。以降、成人になりますと、このようなでこぼこはありますが、大体 150 とか、そのぐらいの菌種がここで検出できるということになっています。このように、おぎゃあと生まれてからだんだんと菌叢ができ上がってくるというのがわかっていただけると思います。

このようにして菌種数を調べることができるということと、あとは菌種の組成を見ることができる。ここにも乳幼児から成人の各 126 人の菌種組成を見ています。腸内細菌というのは、ヒトの常在菌というのはすべてそうなんですが、4 つの種類の門レベルという、分類の仕方で一番大雑把にバクテリアを分けるレベルを門と言います。門レベルですと、ファーミキューテス、アクチノバクテリア、バクテロイデーテス、プロテオバクテリア、その他ということであるんですが、基本的にヒトの腸内細菌というのはこの 4 種類の門からできているというわけです。しかしながら、年齢によってその優勢性が変わる、メジャーになる菌が変わったりします。しかしながら、一般的に成人になるとこのようになるというわけです。

これはアメリカのデータから取ってきたんですが、鼻腔とか皮膚とか口腔内の、これは実はもう何百人とヒトが並んでいまして、それぞれの組成の割合が書いてあります。一応ファーミキューテスの順番に並べているんですが、このように見ていただくと、腸内細菌はこんな感じですが、この黄色なんかを見ますと、ほほとか皮膚とか口腔の中ではこのプロテオバクテリアが結構たくさんいるとか、その 4 門の間において組成が部位によってちょっとずつ変わるということがわかるということ。あと、個人間で非常に多様性が高いというのがわかります。これを主成分分析しますと、このように消化器系、泌尿器系、皮膚、口腔・鼻腔がきれいに分かれまして、ここに書いてありますが、生息部位によって菌叢構造が大きく異なるということがこれでわかっていただけると思います。

もう一つおもしろいのは、家族間で似ているとか、お母さんの菌が子供にうつるとか、そのような話があるんですが、結論から言いますと、皆さん個人個人は、親子に関係なく、自分自身の独自の菌叢を持つということに帰結します。

これはアメリカのデータで、154 名の親子と双子を、双子も一卵性と二卵性双生児の子供の糞便、腸内細菌を見る。さらにこれは経時変化をとっていまして、自分自身同士を比べる。縦の軸は、ここに書いてありますように、高くなるほどそれぞれの菌叢の間の類似性が低くなる。UniFrac distance と言うんですが、これが短いほど類似性が高いという、ちょっとややこしいんですが、そういうような、細菌叢間の似ぐあいを調べる方法があります。それで調べたのがこのデータでして、大事なことはここを見ていただきたいと思います。この 2 人は、一卵性にしろ二卵性にしろ、兄弟です。このぐらいの類似性、違い性があるのですが、自分自身の distance が短くなっており、自分自身と極めて似ている。それに比べて兄弟というのはあまり似ていないということを実は示しています。左は全くの他人同士の似ぐあいでして、全く違うという場合はこのぐらい。一部、親子とか兄弟間で似ますが、自分自身と比べると区別ができるぐらい兄弟間でも違うということを言っています。

これはなぜかというのは簡単でして、先ほど言いましたが、我々は 10^{10} 個の人間がいるけど、その 10^{20} 倍このバクテリアが周りにいるということを考えてもらいますと、同じ菌が来るということはまずあり得ないということから理解してもらえると思います。

各個人が独特の菌叢を持つことから、このような論文も出ております。これは皮膚の細菌叢を使って個人識別をするというものです。コンピュータのキーボードがありまして、皆さんこういうふうにさわります。そのときに、指の皮膚細菌叢がここにくっつくわけです。そのときに、A さん、B さん、C さん、それぞれがあって、それぞれがコンピュータを持っている。ここにいるキーボード上の細菌叢と、その方の皮膚の細菌叢を取ってきて、どのぐらい似ているかというのを調べて展開した結果がここにありまして、近いほどそれぞれが似ているということを示しています。ちゃんと A さん、B さん、C さんが分かれて、かつその人の皮膚細菌叢とその人のキーボードが極めて似ているということになるわけです。このような形で、法医学で使えるぐらい違うと。ゲノム自身は、一卵性双生児とか親子とか、その辺は個人識別はすごく難しいんだけど、これは一卵性双生児の識別ができるぐらい厳密なものであるということになるわけです。

きょうは皮膚の話にご興味あるということなので、ここで、我々が実際やっている日本人の皮膚細菌叢の幾つかの

菌種解析データを示します。

これは、人数も違いますが、個人が並んでいまして、耳の裏とほほと腕と額――腕というのは、前の、この辺なんですが――あと頭皮の16S解析をやったときの菌種の組成の多い順番で並べているという、こんなデータを得ることができました。基本的に、このブルーはプロピオニバクテリウムというものでして、その次の赤は、何となく赤が多く感じるんですが、これはスタフィロコッカス。このようなものが優勢している。しかしながら、このように見てもらうと、同じ皮膚でも部位によって全然違うし、多様性もすごく高いということがわかっていただけると思います。

これは、どのぐらいの菌種数でできているかというのを調べたものです。左に、我々の腸内細菌と、実はこれ、唾液と胃液と糞便のそれぞれを構成する菌種、これ何十人とやっていますので中央値が出ておりますが、このぐらいの、左が菌種数、実測した菌種数と思っていただければいいと思います。それに対してほほ、前の腕、額、頭皮、このように見てみますと、このように、皮膚の場合は部位によって構成する菌種の数がかなり違うというわけです。こういう場合は多様性が低い、かなり限られた菌種でできている。一方、腕は、便とか唾液に比べてもっと多くの菌種で構成されているということがわかりました。

下のChao1というのは、ここにある3,000のデータを用いたときに実際に得られた菌種数なんですが、この3,000というものを無限大に増やしたとき、どれくらいまでこの菌種数が大きく増えるかという、そういうestimationなんです。そうすると、ちょっとここに桁が変わりますが、傾向は全く一緒なんです。実際このぐらいの菌種数で、皮膚の場合でしたら300とか400できるということがわかった。

あと、これは年齢による違いを見てみました。先ほどの菌種数なんですが、nは18と19で少ないんですが、23歳～37歳と60歳～67歳の間で、それぞれ先ほどの部位に対して菌種数を見ますと、このような感じで得られまして、どうも皮膚の細菌叢というのは年をとるほど多様性が増える。すなわちyoungの人に比べて60～67歳の場合は構成する菌種が多くなることがわかってきました。これは我々、唾液とか糞便、腸内細菌でやっているんですが、これらはあまり年齢による違いはないんですが、皮膚に関しては結構明確に、部位にかかわらず、高齢になるほど菌種数が増えるというデータを得ております。

これはもっと複雑なんですが、実は我々は細菌叢を調べるだけではなくて、皮膚についているといいますか、そこにいる代謝物、いろんな低分子の代謝物も定量しておりまして、そこで得られるいろんな代謝があるんですが、代謝物と、皮膚細菌叢を構成する菌種を並べまして、それの相関解析。この代謝物が多いとこの菌種が多くなるとか、これが少なくなるとこれが少なくなる、そういう相関解析を実はやっておりまして、緑になるほどポジティブ、正の相関がある、赤がネガティブ相関。こういうこともやっております。これはまだ今のところデータだけでして、これからどうするかという大問題があるんですが、とにかく皮膚細菌叢とは一体何だということを知りたいということで、多角的にデータを見るということを進めております。

ここで一応皮膚の話は終わりますが、あと、先ほど唾液とか胃液が出てきましたので、唾液と胃液と糞便がどのぐらい似ているかというデータを示します。同一の人から同時に3カ所取ったというやり方をして、30人ぐらい調べました。これ各被験者なんですが、近くにいるほど菌叢が似ているということになります。見事に唾液と胃液は区別つかないぐらいにごちゃ混ぜになっちゃう。一方、糞便はこっちに来るというわけです。個人差はこれだけ長くなるので、これは多様性のためです。すなわち、胃にいる細菌叢というのは基本的に唾液と一緒。これも、今まで胃は胃の細菌叢がいるという話があったんだけど、実はそうじゃない。もう唾液がそのまま来ているんだということを言っていまして、一々胃液を調べることはなくて、唾液を調べればその人の胃液がわかるということを実は証明しております。

次に唾液にいきますが、これは非常におもしろくて、ここに書いてありますが、概日リズムを持つ。菌叢の揺らぎがありまして、それが24時間で揺らいでいる。24時間ごとに同じ菌叢に戻っているということを実は証明しております。

これはある人なんですが、4時間ごとに唾液を取りまして菌叢を解析します。実際、菌種の組成解析はこういうふうに揺らぐんですが、これをもう少し門ごとに調べますと、このようなでこぼこ、これ3日ほど調べているんですが、1日ごとに増えたり減ったりする、こういうふうになります。これの自己相関係数をとります。すると、このように、24時間で最大の自己相関係数になる。すなわち、24時間で最大ということは24時間をピークにするような概日リズムということがわかるわけです。かつ、これとこれで見ますと、ピークがお互い逆さまになるということがわかります。

さらにもっと細かく、属レベルでやりますと、これは何人も被験者を使っているんですが、どうも朝型菌がいるというわけです。午前4時から正午ぐらいまでに増える菌がいると。その後減るんですが、こういうタイプの菌。それと昼型菌。これはおそらく正午ぐらいから夜の8時ぐらいまでずっと増える菌、その後減っちゃう菌とか、一方、夜型菌がいまして、夕方16時ごろからミッドナイトに増えている菌。これも同じですが、こんな名前の菌がいますよと。あとは、このようにサーカディアン、24時間するんだけど、個人ごとでばらばらという菌。時間はいつかわか

らないけど、ばらばらの菌もいると。こういうふうに唾液の細菌叢というのは、要するに人の生活リズムと同じように彼らも菌叢が変わるということ。よくある質問で、食事をした場合どうなるんだというのがありまして、口腔内の場合、食事をしたときどうなるかを調べました。

これややこしいんですが、食べる直前の、正午なんでお昼御飯なんですが、その菌叢を取っておいて、それから食べる。食べた後、30 分置きに唾液を取っていったわけです。その結果どういうことがわかったかというと、これ見えにくいスライドで申し訳ないんですが、3 人書いてありますが、この辺が 24 時間の変動の幅としてください。ところが、食事をすると、30 分後ぐらいに一たん動くんです。すごく菌叢が変わる。変わるんだけれど、24 時間のサーカディアンリズムほど変動しない。この幅よりも皆短いというわけで、ちょっと変動するというのがわかって、多くの場合は 90 分以内にもとに戻り、食事の影響がなくなる。こういうことがわかってきました。すなわち、唾液というのはどうも食事等の外的な要因よりも内的な要因でレギュレーションがかかっている。すなわち、ほんとうに肝臓とか腎臓とか、ああいう臓器と全く一体になっているような、1 つの臓器のような振る舞いをしているということをこのデータは示しております。おそらく皮膚も、時間ごとに取れるので、そういうことをやれば、皮膚の部位によってひょっとしたら違うかもしれないけど、あるかもしれません。

ここまで来まして、腸内細菌の話を少しさせていただきます。

2008 年から、このように腸内細菌の研究は世界的に進んで、すごい発見の 1 つは、病気とすごく関係しているという、前から病気と関係しているとは言われていたんだけれど、消化器系の病気でしょうという感覚だったわけです。ところが、そうじゃなくて、もう全身のあらゆる病気、ここに書いてありますように、大腸がんは当然イメージあるんだけど、肝臓がんとか、神経系の難病ですが多発性硬化症、自閉症等々、あと早産、未熟児も腸内細菌が絡んでいるというわけです。代謝系、免疫系、神経系。そういうふうに絡んでいるということがわかってきました。

この絡んでいるという 1 つの指標は、その患者さんの菌叢を調べると、正常な方に比べて非常に構造が変わっている。これを僕らは dysbiosis と、異常構造をとっていると言っております。これは IBD、炎症性腸疾患を持ってきているんですが、このように、healthy に比べて大きく変わるということと、もう一つの指標は、構成している菌種数が、病気になっちゃうと基本的に減る。いわゆる多様性が減っちゃうというのが一般的にあります。こういう病気ではすべてこういうことが検出されまして、どうも病気と腸内細菌の dysbiosis は関係しているということが明確になってきたし、あらゆる病気と関係しちゃうということが出てきたわけです。

より具体的にイメージしてもらうために、実はある 1 人のデータを持ってきております。この方は健常者なんですが、その中で異常が見つかったという人です。見た目は健常で、自覚もない人なんですが、調べてみると、まず日本人の平均の菌種数の半分以下ぐらいに減っちゃっていたというのがわかったということと、あと、この人の菌種組成なんですが、これ属レベルなんですが、まず Bifidobacterium とか Faecalibacterium というのが、通常の日本人には結構たくさんいる優勢菌なんだけど、この人はゼロ、全然検出できなかったということです。あと、ほとんど健常者にはいない Fusobacterium が 20 ～ 30 % ぐらい占めるという、優勢する菌になっていたという、この大きな違いです。

この方と最も類似した菌叢を持っていたのはこの B さんで、この方も健常者のボランティアでやっていたんですが、これがおかしいということで、ちゃんと調べると胃がんが見つかったということでして、この人もやはり Bifidobacterium と Faecalibacterium がすごく少ないということと、Fusobacterium が異常なぐらい多くなっていた。腸内細菌というのはこのぐらいわかるんですね。それも別に腸内でなくても、この場合、真ん中の方は胃がんだったんですけど、ただ、もうひとりの方は、今のところ何も発症していないんです。でもおそらく発症すると思って、期待すると言うと変だけど、そのぐらい腸内細菌というのは、この因果関係はまだはっきり言えませんが、いいマーカーになるということを認識していただければいいかなと思っています。

そこで、これから少し、私たちのやっている研究で、おそらく皆さん興味津々で聞いていただけることを少し話させていただきたいと思います。

これはメタゲノムを使った解析の話です。メタゲノムという方法自体は、平成 24 年の高校生の生物の副読本になっているぐらいですから、今の高校生は皆メタゲノムということは知っているぐらいになっております。我々は日本人の腸内細菌をずっと調べております。一方で、このようにスウェーデンとかデンマークとかロシア、アメリカ、中国、スペイン、さらにはアフリカの原住民である、マラウィに住んでいる方とか、ベネズエラのアマゾンの近くに住んでいる原住民の人とか、実はそういうデータがたまっておりまして、全部合わせると 1,000 人以上になっています。

ここで、各国の人の腸内細菌というのはどのぐらい似ていてどのぐらい違うのだろうということを調べました。実際日本人の場合は 106 人なんですが、これ成人ですが、経時変化もあって、1 人から何サンプルも取ったりして、合計 178 サンプルの便をいただいて、シークエンシングで配列データをいっぱい出して、いろいろバイオインフォマティックスをやって、106 人の中に 23 million、2,300 万の遺

伝子を見つけました。その中で、似たような遺伝子というのはありますので、それを排除するということで、ユニークな配列、non-redundantな遺伝子として106名から約4.9 million、490万のユニークな遺伝子を見つけました。

このような遺伝子を見つけるわけですが、これに対して先ほど言ったようなKEGGとかCOGというデータベースにblastというやり方で、この遺伝子は何だ、どういう機能を持っているんだというようなことを調べますと、機能に関するcomposition analysisができる。もう一方、メタジェノミックにいっぱい得られた配列データ、リードを、前に言いましたが、レファランスのジェノムにマッピングという方法で、個々のデータがどの菌株から由来しているかを調べると、バクテリアのcomposition analysisができる。このやり方で、菌種組成と機能の両方で各国のデータを比べることでその違いを見ようということをやりました。

これは日本人の場合ですが、106名の大人で、属レベルで菌種組成を見ております。Bacteroidesというのがあって、赤がBifidobacteriumとか、いろいろ優勢菌種はいるんですが、このように個人間ですごくばらばらになっているというわけで、これは先ほど言ったような個人間の多様性が多いということになります。

これをもう少しまとめて、平均をとってみますと、日本人で一番多い菌種は何ですかと言われたときに、ボックスプロットなんですが、こういう幅でBifidobacteriumというのが一番多い。その後、Ruminococcus等々、こういう順番で各菌種が組成比を持っているというわけです。

この図自体は非常におもしろくて、これはベキ分布という分布をしています。英語で言うとPower Lawというわけです。これは何を言っているかというと、いっぱい菌種はいるんですが、その大部分をつくっているものはほんのわずかな菌種であるということを実は言っています。すなわち、例えば、アマゾンの本の売り上げがあります。アマゾンは何十万冊という本があるんだけど、その売り上げの多くを上げているのは前の100冊であるとか、それと同じようなことが見えまして、なぜ自然界においてもこういうことが見えるのかという数理的な問題が残っておりますが、数理的にこれを解決するということがあるわけです。こういう基本構造がある。

さて、各国の比較ですが、これは門レベル、これは属レベル。門が一番分類が大まか。ぱっと見た感じで、各国で、特に日本はほかと違うなというのは見てもらったらわかるんですが、属レベルでも何げに国々で違うなというのがわかっていただけると思います。

それを、千何十人か忘れましたが、とにかく各被験者の似ぐあいで、これは主成分解析なんですが、このようにドットをしますと各個人がドットされるんですが、近くにいるほど似ているというふうに考えてください。そうしますと、日本人は赤ですが、やはり何げに日本人は日本人で塊をつくる、青のアメリカの人は塊をつくるというわけで、それぞれ国々でお互い似ぐあいが違うんだなというのがわかるわけです。

そのトータルをとったのが右の図でして、これは上にいくほどお互いが似ているというわけです。これは、1つの国の中の個人同士を比べたときの似ぐあいのボックスプロットです。右は、違う国の個人間の似ぐあいを調べたときに、こんな感じになりまして、どうも違う国同士よりも国内同士で比べるほうがお互いが似合うというわけで、これはすなわち国ごとに特異的な菌叢を持つということを実は示すことになるわけです。

それをもう少し平均的にかきますと、こんなふうになります。それぞれの国の関係がここに見えます。近くなるほどお互い似るということで、これを階層式クラスタリングといいます。これでいきますと、大きく2つ、実は3つなんですが、大きくぱっと見た感じでは左と右に分かれて4カ国ずつ。左はアメリカ、中国、デンマーク、スペインですが、特徴は、ブルーのBacteroidesという菌が多いというわけです。右は、Bacteroidesはこのように少ないんですが、Ruminococcusというのは実は左に比べると多いという特徴があります。これがベネズエラ、マラウィで、原住民ですが、原住民は似ていますので一緒くたにしますと、ここはここで独特に、Prevotellaというものが多い。こういう特徴に分かれるというわけです。

そこで、目ざとい人はすぐわかっていただけると思いますが、なぜ日本とスウェーデンとロシアが一緒なんだとか、なぜアメリカと中国が似ているんだとか、何げに中国と日本人は似ているんじゃないかと思うんですが、そういう答えになっていない。このなぞ解きが非常におもしろくていろいろやりました。

もう一つ言い忘れましたが、Bifidobacteriumというのは日本人だけに独特に多いんですね。これもなぜ多いか、今のところまだ解を得ていませんが、こういう結果になっています。

腸内細菌に影響するものが何かというのを調べますと、やはり当然日々の食事があるわけです。実はもう一つ我々が最終的に見つけたのは、抗生物質の使用量というのがあります。この2つのデータベースをとってきます。これは食事情報、FAOSTATというデータベースがありまして、これはかなりお墨付きがある、119のfood itemの毎年の、1人何グラム食べるかというdietary dataがあります。このデータと、もう一つは、各国が出している抗生物質の使用量のデータがあります。これを調べる。

まず初めに食事情報を調べますが、これがFAOSTATでして、1961年からやっていて、245カ国のデータが毎年出ている。1人1日何グラム、ここに細かいですが、ビ

ールとか、ポテトとか、豚肉とか、こういう量が各国のデータとして得られています。このデータを利用するわけです。先ほどの相関解析をするわけです。

菌種組成の増減と各国の食事データの相関解析をずらっとやりますと、結果的にこういうデータが得られます。これは横が菌種で、縦が、食事情報を 9 種類に分けました。穀物とか、海産物とか、動物製品（animal products）とか、オイルとかシュガー、こういうふうに大きく 9 つのカテゴリーに分けて相関解析をしましたが、こういう結果が得られます。赤が正の相関になります。Prevotella とか Succinamonas という菌が、ある意味、炭水化物ですね、穀物類と極めて強い正の相関をする。一方で、逆相関するのが動物性の食べ物であるというデータが得られるわけです。

もう一つ、全く逆の相関する菌種としまして、Ruminiclostridium と Akkermansia というのが全く逆で、穀物類にはネガティブな相関を示す一方、animal products に対しては正の相関をする。すなわち、例えばこれ、animal products をいっぱい食べる国では、この Prevotella とこれが少なくて、Ruminiclostridium と Akkermansia が多い。そういう傾向を示すということになって、かつこれは統計的に有意であるというふうになるわけです。

一方、先ほどクラスター解析の図で Bacteroides が左の国に非常に多く占めると言っていたんですが、このメジャーな菌に対しては、食事というのは全く有意な相関を示すものはありませんでした。すなわち、Bacteroides に対応する食事というのはどうもなさそうであるということになったわけです。そこで僕らはもう少し詳しく、なぜそうなっているかということを調べました。

これは 2011 年の FAOSTAT の食事情報を、プロテインとリピッドと炭水化物の割合で分けて、このデータで各国の関係、食事の似ぐあいをクラスタリングするとこういうふうになりまして、予想どおり、日本と中国というのはほかの西洋国に比べるとやはり似ているわけです。だから、日本は西洋化されたと言っていますが、食事に関しては全然されていない。相変わらず欧米とは違う。この認識をまず持っている必要があるというわけです。

先ほどのデータですが、食事データから得られた各国の関係が右にかいてありまして、菌種組成から得られた各国の関係が左にかいてありまして、先ほどの質問にありましたように、なぜスウェーデンと日本が近いのかということと、全然食事は合わない。日本と中国では食事が似ているんだけど菌叢が合わない。というわけで、先ほど言ったように、食事だけでは菌種組成、腸内細菌はレギュレーションされていないということをこれが示していることになるわけです。

次に、一気に調べたわけではないんですが、このなぞを解くのに 2 年ほどかかりました。それでたどり着いたのが実は抗生物質です。いろんな抗生物質がありまして、実は 11 カ国のデータがあるんですが、ベータラクタム系とか、total antibiotics とか、テトラサイクリンとか、いろいろなデータが出ておりまして、それと各菌種の増減を見たところ、先ほど食事とは全く関係なかった Bacteroides が有意にベータラクタム、いわゆるペニシリンとか、total antibiotics の量と極めて正の相関をすることがわかりました。これがその相関図でして、この相関係数も極めて高く、これ以上言うことないというような相関が出ております。

抗生物質の使用からの各国の関係を先ほどと同じようにクラスタリングしますと、こんなような相関図が出ます。すなわち、ここできれいに分かれるわけです。たくさん antibiotics を使う国は左に来まして、幸い日本は少ないです、low antibiotics でここになりまして、菌種組成との関係と antibiotics の関係というのが極めて高い相関を示しております。ただし、ベネズエラとマラウィは、さすがに抗生物質のデータがないので外しておりますが、このようにして、食事以上に抗生物質の使用量のほうが我々の菌種組成と相関するというデータになったわけです。

今の量はヒトに対する抗生剤でした。ところが、アメリカなんかを見てもらうとわかるんですが、実はヒトよりも 5 倍ぐらい使っているのが家畜です。実は家畜にえさのごとく使っているわけです。実際その家畜の抗生物質の影響を見ようということで、7 カ国のデータを得ることができました。これはトータルの抗生物質になるんですが、それと先ほどの Bacteroides の相関を見ますと、これも見事に、単に消費量だけでも高い係数だし、各国の人口で割っても高い相関係数が出まして、ヒトの抗生物質だけじゃなくて家畜の抗生物質に対しても極めて高い相関を示したことになります。

もう一つ、よく我々は院内感染ということで耐性遺伝子が蔓延して大変なことになっているというのが病院などで言われていますが、実はその耐性遺伝子がどこから来ているかを調べたのが、これは 2011 年のデータです。ちょっと見にくいんですが、単純に言いますと、farm から来ている、あと食事からの耐性、要するに農場にいる耐性遺伝子及び食事中に含まれる耐性遺伝子と、腸内細菌が持っている耐性遺伝子が極めて似ている。赤いということはものすごく似ているということで、要は、実は farm から抗生物質耐性遺伝子が来ている。すなわち、腸内細菌の環境と家畜等の環境というのはお互いが association している。すごいコネクションを持っているというわけで、そのことから言うと、我々のデータもそのことをサポートするということになるわけです。

だから実際こういうことが起こっているんじゃないかというわけです。抗生物質というのは、第一次か第二次世界大戦か忘れましたが、100 年ぐらい前に初めて出てきたわ

けです。だから当時は抗生剤はなかったわけで、基本的に我々は感染症に苦しんでいたわけです。そこで抗生物質が使えるようになってくるわけです。そうすると、抗生物質を使い出すと、基本的に我々の周りの菌の組成も当然抗生物質の影響を受けるわけです。

例えば、緑とオレンジの菌がいるとします。これが抗生物質に耐性度が高いとしますと、初めはぷつぷつと普通にいたんだけど、だんだん抗生剤の使用量が多くなってくると、緑とオレンジの菌が増えてくる。それがどんどん月日がたつにつれてもっと大きくなる。我々はそれを次の世代に、赤ちゃんが実は曝露されるわけです。すなわち、昔に比べて年代とともにそれぞれの各世代は違う細菌叢でできている。先ほど、腸内細菌の違いは病気と関係すると言ったわけですが、今の現代病が結局こういう関係にあるというのがわかっていただけると思います。抗生剤が多くあるほど感染症は少なくなるんだけど、日本、アメリカもそうですが、現代病が増えてくる。現代病というのは、花粉症もあれば、自己免疫疾患、いろいろ、昔にはなかった病気が増えてきているというわけです。

これを平たく言うと抗生剤の使用が今の現代病をつくっている、その原因であるということを実は物語っているような気がするというわけです。これをやると結構ブーイングを受けます。でもこれがサイエンスであり、事実ではないかなというのが腸内細菌の今の研究から出てきたということになるわけです。

次に遺伝子の話、機能の話を少しさせていただきます。実際我々は490万ほどの遺伝子を見つけたんですが、ほかをスウェーデンとアメリカとデンマーク、スペイン、中国、たくさんデータのあるところと比べるわけです。結局似ている遺伝子はどのぐらい、全く一緒の遺伝子はどのぐらいあったかというと、このぐらいありまして、和集合はどのぐらいかというと、約1,000万以上になりました。すなわち我々は人類として1,000万以上の遺伝子を持っているというわけです。ヒトの遺伝子というのは2.5万ぐらいで、そこから出てくるたんぱく質の種類みたいなものは20万種ぐらいなんですね。それに比べたら全然けた違いに我々は多様な遺伝子を抱えているということになるわけです。

もう一つの特徴は、日本人が持っている遺伝子の半分は日本人に特異的である。それは、先ほど言ったように、極めて特徴的な遺伝子が各国で出てきているといったことと一致するわけです。

このような遺伝子を持つんですが、お互いが、例えば、これは我々106人を調べているんですが、そのうちの半分、53名の人が共通して持っている遺伝子はいくつかというのを調べたのがこのようになります。その次、30％の人が共通して持っている遺伝子はどのぐらいか。そういうふうにして20％、10％、5％、2％、で1％。1％というのは2人ですね。最後は、自分しか持っていない遺伝子はどのぐらいあるかを調べて、このとき、被験者数を増やしていったときにそのような遺伝子がどのぐらい見つかるかを調べています。そしてこういうグラフを得る。

これはすなわち何を言っているかというと、この辺はもうすべて平らになっていますよね。2人以上が同時に持っている遺伝子というのは、100人を超えるとほぼプラトーに達する。これ以上、100人から1,000人に増やしても、見つかる遺伝子は個人に特異的な遺伝子がほとんどであるということを実は言っていて、だから、我々が106名調べている理由は、もうこれで大体その集団における遺伝子を確保しているということになる。ほんの一部じゃないかという疑問に対して答えています。あと見つかるのは個人に特異的な遺伝子ばかりになるということになるわけです。そういうことを実は言っております。

こういう機能の話で非常におもしろかった論文はこの2010年のものです。これは、海洋細菌が持っているある種の酵素、porphyranaseというのがあります。これは、ノリやワカメの多糖類を分解する酵素です。これはポリフィランという多糖類ですが、これを分解する酵素は海洋細菌が持っているという論文だったんですが、このporphyranaseの遺伝子を調べると、日本人の腸内細菌もこの遺伝子を持っていたという論文です。それも13人中5人が持っていて、その当時のデータでアメリカ人は0であった。これはどうも日本人の腸内細菌が特異的に持っている遺伝子だというデータです。すなわち、どのように起こっているかというと、遺伝子の水平伝播というのがありまして、海洋細菌が持っているこの遺伝子が何らかのことである種の腸内細菌にうつって、その腸内細菌がその遺伝子を持つようになるというわけです。

我々はノリやワカメ、生で魚を食べます。そうすると、この多糖類はどんどんおなかの中に入ってきます。そうすると、この遺伝子を持っている腸内細菌はそれをえさにできます。すなわちエネルギーとして彼らは生きることができる。一方、欧米の方は、例えばこういう菌がいても、ノリやワカメを食べる機会は少ない。だから、この菌はそのエネルギーとなるえさが来ないから、基本的に生きられない。日本人の中ではよく生きられるけど、欧米の方の中では生きられない。まあ、そういうわけで、もっと後で調べたんですが、日本人は大体7割の方がこの遺伝子を持っている。一方、欧米の人は、少し持っていましたが、3％ぐらいしか持っていない。このように、食文化、習慣が腸内細菌機能の獲得と維持に関係しているという論文が出たわけです。しかしこれは全くの氷山の一角でして、先ほどの490万の遺伝子を、多くのほかの国と調べた結果、日本人の機能的特徴はこういうふうになりました。

炭水化物の代謝とアミノ酸の代謝が欧米の方よも圧倒的

に多いということと、膜合成、複製・組換・修復の遺伝子が欧米に比べて圧倒的に少ない。このデータはある意味、日本人にとっては朗報なんです。なぜかというと、この修復というのは、傷がついたものを修復する遺伝子なんです。だから、修復の遺伝子が多いことは傷が多いということです。我々のように欧米に比べて少ないということはあまり傷がついていないということになるわけです。だから、日本人は長寿だとか、そういうのがあるんですが、そういうことと関係してくるかもしれません。

もう一つの特徴は、ちょっとこれは難しいんですが、メタンを生産する代謝系というのが、日本人はほとんど持っていない。一方、酢酸を生産する代謝系というのはほかの国より日本人が非常に多いというわけです。このメタンを生成する代謝系というのは、いわゆる古細菌という、またちょっと違う菌種がいまして、極めて珍しいんですが、Methanobrevibacterという菌がつくる。しかし、このように系が少ないということは、この菌を持っているか持っていないかを調べているだけなんですが、日本人はその菌を持っている人が非常に少ないという、これとこれが一致しているわけです。

このデータからすごくおもしろいことが推察されます。すなわち、我々、炭水化物を食べると、酢酸とかそういう短鎖脂肪酸、これはヒトの細胞のエネルギーになるんですが、それと二酸化炭素と水素ガスを出します。だから、先ほど日本人は炭水化物の代謝能が高いと言いましたが、いっぱいこれが出てきます。ところが、これが右の反応にいくためには、この水素ガスを何とか処理する必要があるわけです。水素ガスを消費する必然性があるわけです。そのときに、どうも欧米の方は、この水素ガスをこういうルートで、メタン生成のルートで、最終的にメタンができて、水素を消費してメタンを生成する。一方、日本人は、酢酸生成が多くて、この右のライン、こういう形でいっぱい水素を使ってくれて、最後に酢酸ができる、こういうルートをどうも使っているみたいだと。

昔の文献があるんですが、欧米の方よりも日本人のほうが呼気の中に含まれるメタンの量が少ない。日本人はメタンの量が少ない。これは遺伝子とかいっぱいいろんなことが今まで調べられたんだけれども、結論は出ていなかったんです。おそらくこれでしょう、というふうに今考えているし、酢酸をつくること自体がほんとうにむだがないというか、これまたエネルギーになっちゃうので、そういう、すごく日本人にとってはいい話のようなメカニズムが入っているみたいです。

それと、腸内細菌は病気と関係すると言いましたが、病気になったために腸内細菌が変わっちゃったと思うんですが、実はそうではない。変わった腸内細菌が実は病気を起こすという話です。これは肥満マウスの腸内細菌を普通のマウスに移すと肥満になっちゃうとか、これはメタボリック症のあるマウスなんですが、そいつの糞便を健全なマウスに入れるとメタボリック症になる。すなわち、病気の細菌叢があって、それが病気を起こす。その逆が、これは有名な話でして、正常な、健康な細菌叢は病気を治すというわけです。これは2013年に出たんです。これはClostridium difficileが関係した慢性の炎症がありまして、通常は抗生剤と腸洗浄で治すんですが、これはほとんど治らない。治癒率は20～30％。ところが、これにプラス、健常な人の便を移植する、便微生物移植なんですが、それをすると、一気に治癒率が上がった。これが2013年に出まして、今2015年ですが、もう世界中でいろんな便微生物移植をやられて、ほんとうかいなというぐらいの治癒率がいろんな病気で上がってきております。

そうすると、正常な腸内細菌叢には病気を治す力があると。僕らは、本田先生と一緒に、その中でどの菌がそういうことをやっているのかを探そうということをしたわけです。その中で僕らがねらったのは、Tregという、T細胞ですね。免疫細胞なんですが、これ2種類ありまして、Th17というのは炎症を誘発するような細胞です。一方、逆に炎症を抑えるのがTregという細胞で、要するにこのTregがたくさんあると炎症を抑える。だから逆に、炎症を起こしている、病気の人は、実はTregが下がっているんですね。このような、このT細胞が上がったり下がったりするんですが、この上がったり下がったりするのは結局何が起因しているかというと、実は腸内細菌であったという話です。それは2011年ぐらいからわかってきたんです。さらにその中でどの菌が、というのを探そうとやったのが次のスライドです。

実はこれ、先ほどから言っているマウスを使っています。ヒトの糞便を無菌マウスに入れて、ノトバイオートをつくって、Tregをたくさん持っているマウスを探すという実験をします。Tregがぽっと上がるマウスを探すと、そのマウスから菌を取ってきまして、これを2万分の1に希釈して、要するに菌種数を減らす。さらにそれをマウスに移植して、またそのマウスからTregをいっぱい出している菌種を探す。こういうことを数回繰り返して、最後30菌種ぐらいになったときにやめて、そこから培養して17菌種まで取ったんですが、その17菌種を今度はカクテルをつくって無菌マウスに入れると、ボンとTregが上がって、ここでTregを上げる17菌種をつかまえたわけです。これは実際にヒトの糞便を入れたときに大体こういう菌種ができていて、だんだん赤くなっていくんですが、このようにしていくと、最終的に30菌種ぐらいになったのが4番目でして、そのうち取ったのが17菌種、この黄色で示している菌が最終的に取れていたんです。

これおもしろいのは、この17菌種を1菌種ごとに無菌

マウスに入れてTregのinductionを見ると、1菌種ごとは何の効果もないんです。17混ぜるとドンと上がっちゃう。実際これはランダムに3菌種とか5菌種とか混ぜてやっても、17菌種ミックスに比べたら有意に上がらなかったというわけで、どうも常在菌というのは単独ではフルに機能しない。一方、病原菌は1種類で機能するんですが、そこは概念的に違うなというのがあります。常在菌はチームで機能する。それが常在菌の特徴である。すなわち、常在菌というのは極めてrobust。1個の菌が暴れまくったら我々にとっては困るわけです。いつもいるから。だからそういうふうにさせていない。1個1個は大きく影響しないようにさせるというような性格があるのではないかというわけです。

実際、この17菌種のカクテルを入れますと、腸炎を抑制したり下痢を抑制したりする。これがほんとうのプロバイオティクスかなというのが、まあ、薬になると思うんですが、なっています。

このように、ばあっと今流しましたが、基本的に我々は、生命医学をやっているんですが、ベースとなる技術は、ここに書いたように、情報学、統計学、いっぱいあるビッグデータからほんとうにいいものを出す、これが統計学で情報学、こういうものが今後必要になってくるというふうに考えているわけです。

先ほどの、便が病気を治すというわけで、ヒトの、宿主の生理状態というのは具体的にはどうなっているかという概念がここに書いてあります。昔はヒトゲノム、ヒトの遺伝子が大きく絡んでいるでしょうとか、食事がこのように絡んでいるでしょうとか言っていたんですが、ここに書いてありますように、常在菌がここに来まして、こいつのほうがすごく大きな影響を持っている。食事、ほかの環境、抗生物質の環境も実はこっちに影響して、よりこっちのほうに影響していると。こういうのがほんとうであって、今多くの薬があるじゃないですか。でもあのターゲットは皆こっちのほうのたんぱく質になっていますが、今後はおそらくこっちをターゲットにするほうがより効果的ではないかなと今考えている次第であるわけです。

こういうことで、ヒトマイクロバイオームの市場というのは、今はサイエンスの話でしたが、今後いっぱいあります。メタゲノム技術というのは、常在菌だけではなくて、大気を見る、家畜・畜産、魚介養殖場、海洋、土壌。今は宇宙飛行士・ISSの中でも今やろうとしております。それとあと病院施設がどんなふうな環境下にあるかというのをより正確にメタゲノム技術で解析できるんじゃないかというわけです。

ちょっとオーバーしましたが、ここで私の話を終わらせていただきます。ご清聴どうもありがとうございました。

コスメトロジー研究雑感

平成 25 年度　研究助成

社会貢献を意識する研究テーマ立案について

荒牧　賢治

今回採択していただいた課題においては新しい構造をもつエマルションであるO/LC型エマルションの化粧品への応用を検討しました。界面活性剤は水中でミセルを作りますが、濃度が高くなるとリオトロピック液晶を形成します。この液晶相中に油滴を分散させたエマルションをO/LC型エマルションと呼びます。液晶相は粘性が高いゲル状であり、O/LC型エマルションもゲル状のエマルションが得られます。この特性を活かして油滴中に化粧品用の有機系紫外線吸収剤を安定保持したエマルション製剤を得ることが本研究の目的です。有機系紫外線吸収剤はある程度毒性があるため、メイクアップ製品に配合した場合に肌に直接接触しないようにする必要があり、本研究は一つのソリューションを提案しました。

私の研究室では従来から界面活性剤の分子集合体（ミセルやリオトロピック液晶）についてその構造と構造変換についての基礎的な学術研究を中心に行ってきました。界面活性剤は多様な工業製品と製造プロセスに用いられており、特に化粧品においては性状や使用感の設計において主要な役割を果たしています。そのため、化粧品関連の企業の方と共同研究などを実施させて頂きましたが、基本的には応用を強く意識して行う研究は行ってきませんでした。今回は研究室独自の研究シーズ（素材）を応用展開させることを試みたということで私としてもこれまであまり行ったことがないことでした。実際に研究成果を学会発表してみると産業界からの注目も純粋な基礎研究よりも高いことがわかり、研究テーマの社会還元を意識して行うことが重要であることが認識できました。今回本研究助成に採択して頂いたおかげで研究費の支援以上に、今後の研究テーマ立案に際して新しい指針が得られたことが一番の収穫です。

（横浜国立大学大学院環境情報研究院）

平成 26 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

飯島　志行

はじめに、コスメトロジー研究振興財団第 25 回研究助成を賜りましたこと、ご関係各位の皆様方に深く御礼を申し上げます。当研究は無機微粒子の油中分散制御を目的とした高分子分散剤の構造設計に関わる課題であり、サンスクリーンや口紅などに代表される各種化粧品製剤はもちろん、先進セラミックス材料やポリマーナノコンポジット材料などのプロセッシングの場面でも極めて需要な役割を果たす課題であると考えております。化粧品製剤開発を目的とした観点からは、生体毒性の低い材料を使用したプロセスの構築が必須である点で使用可能な手法や物質が大きく制限され、その他の機能性材料開発にはない困難性も改めて実感した次第です。こうした困難性の高い分散系において、分散剤をはじめとした添加剤の選定やその配合量は長年にわたって培われてきた経験に頼られている部分も少なくはないことから、体系的な添加剤の設計手法や操作因子の解明などの基盤技術の蓄積は、新しい材料や着想を迅速に具現化する際に強力なツールになると信じています。本助成研究の遂行により、カチオン性高分子と脂肪酸の無数の組合せから比較的簡便、自在かつ体系的に高分子分散剤の構造設計と微粒子分散制御の実現を予感する貴重な成果が得られました。一方で、微粒子表面における高分子の吸着構造や非水系溶媒中における粒子間相互作用などのより直接的な評価手法の開拓と理論的体系化による微粒子分散化のメカニズム解明には、体系的に構造設計された添加剤を用いた基礎的な検討を継続する必要がある点も現実かと思われます。特に、原料として用いられている粉体ではその粒子径、形状、表面粗さを一例とした基礎的物性の分布が様々であり、より現象の解釈を複雑にしている点においても、解決するべき課題は山積しています。本助成で得られた成果を基盤に、引き続き微粒子の表面設計と分散安定化技術の構築と現象の評価・理解に向けて努力して参りたい所存です。

（横浜国立大学大学院環境情報研究院）

平成 25 年度　研究助成

研究を終えて

落合　秋人

今回、公益財団法人コスメトロジー研究振興財団より支援を受けて、美白剤としてのペプチドの研究をさせて頂いた。この研究は、私が 5, 6 年前に新潟大学に着任して最初に始めた研究の一つである。美白剤に関して、これまでに多くの研究が国内外でなされており、多数の美白剤候補化合物が既に報告されていた。しかしながら、世間を賑わした多くの報道に見受けられる通り、それら化合物に関して安全性が担保されているとは言い難かった。そこで着目したのがペプチドである。ペプチドはアミノ酸からなる生体を構成する成分であり、保水や皮膚の再生を目的として既に様々な化粧品に利用されているように、肌への適合性も優れている。また、新潟大学は日本有数の米所に立地する大学であり、米に関する研究が非常に多い大学でもある。その結果辿り着いたのが、米由来ペプチドを利活用する研究である。具体的には米（米糠）タンパク質を酵素加水分解し、そこから美白成分を分離しようというものである。残念ながら、研究を始めてほどなくして海外の研究者から美白に有効なペプチドが報告され、商品化までされてしまった。仕方がないので、我々の方向性は正しかったのだと自分に言い聞かせるようにしている。

ただ、我々の研究が終わってしまったわけではない。米、特に未利用資源の一つである米糠を有効利用する、または高い美白効果を有するペプチドを設計するという本来の目的は未だ失われていない。今後何年かをかけて目的の達成のために研究を続けることになるであろう。近い将来、その成果を報告することができると考えている。最後に、この研究を遂行するにあたり多くの方々のご協力やご支援を賜った。特に、私にペプチド研究の場を提供して頂いた新潟大学谷口正之教授、および本研究にご支援を賜った公益財団法人コスメトロジー研究振興財団にはこの場を借りて感謝の意を述べたい。　（新潟大学工学部機能材料工学科）

平成 25 年度　研究助成

慈雨と執念、蝶とコスメトロジー

齋藤　彰

コスメトロジー研究振興財団研究助成に採択を賜り、本当にありがとうございました。筆者は自身で競争的資金を得るようになって 20 年ほど経ちますが、たまたま幸運だったらしく、財源で大きな苦労をした記憶があまりありません（普通の苦労はもちろん、しばしばです）。ところが本助成の開始年は未曽有の干ばつに陥り、暗黒の春から始まったのを今もよく覚えています。そんな中、乏しい残額を指折りながら必死で関連分野の助成を応募し、通ったのが本助成です。干天の慈雨でした。「これで学生も無理をせず実験できる」「（約束もあった）少し遠い出張に行ける」と本当に嬉しかった思いは今後とも忘れません。

筆者のテーマは、輝くモルフォ蝶の（物理学的に一見、矛盾する）不思議な色に学び、それを工学で役立てる試みです。自然・生物は老獪で、多くの神秘を隠しています。それだけに謎は尽きず、対象自体は光輝材として当初よりコスメトロジー分野への深い関連を謳われながら、自身では研究開始 10 年以上経てもまだ市場に貢献していません。むしろ過去数十年、今に至るまで「発色再現」を謳った例は世界中に多いですが、結果は光特性の一部のみを利用した場合が多く（それはそれで独創性の高い物もありますが）、光特性を十分に汲み出した真の応用はまだです。それだけに採択の眼力と恩義には何としても報いたいと思っています。今回お陰さまで、生産技術で複数の進展が得られました。これをテコに、執念で世の役に立ちたい思いです。これからも初心を忘れず、貴財団に受けた恩を返せるように励みます。

（大阪大学大学院工学研究科精密科学・応用物理学専攻）

平成 25 年度　研究助成

グリセリンとグリセリン酸

佐藤　俊

化粧品・トイレタリー分野の市場調査を見ると、内訳として46%がスキンケア製品であると推定されている（2012年、出荷額ベース、矢野経済研究所ホームページより）。その多くの製品に、保湿機能や粘性等の物性制御のためにグリセリンが配合されている。一方で、スキンケア製品には、保湿機能だけが求められているわけではなく、美白も、アンチエイジングも、ニキビケアも、といった複数の機能が要求される。これら複数の機能性を持たせるためには、一つの素材が複数の機能を発現することが最も簡単な方法である。しかし、それぞれの機能性は、異なる作用機構により発現しているものが多く、一つの素材でカバーすることの難しさは容易に想像できる。グリセリンに、現状以上の機能性が見出せるかと考えると、それは構造を見る限り、難しい。そんな中、筆者の所属する研究グループでは、グリセリンの酸化誘導体であるグリセリン酸の量産化技術開発を進めてきた。グリセリン酸は、その構造からグリセリンの性質を保持しつつ、同時に有機酸類の機能を発現できる化合物であると期待される。その生産方法は、従来の化学触媒反応ではなく、酢酸菌を用いた発酵法によるものであり、グリセリンを原料とするバイオベース素材であることも化粧品素材として有利な点ではないかと考えられた。そこで本研究では、グリセリンの特徴に加えて+αの機能を有する素材の開発を目指して、グリセリン酸のスキンケア素材としての可能性を探索した。実験を進めると、グリセリン様の性質に加えて有機酸としての性質を持ち合わせることが確認でき、スキンケア素材としてのポテンシャルは有していると考えている。さらなる+αの機能が見出されれば、グリセリン酸はグリセリン+αの機能を有する新素材に成長すると期待している。

（国立研究開発法人産業技術総合研究所機能化学研究部門）

平成 26 年度　研究助成

自然という偉大な本を読み解く力

出口　茂

2013年1月に放映されたNHKスペシャル「世界初撮影！深海の超巨大イカ」が16.8％の高視聴率を記録して以来、ちょっとした深海ブームが訪れている。最近では深海を題材にした映画やドラマが製作されるなど、メディアでの露出も高い。筆者の所属する海洋研究開発機構も深海ブームの恩恵を受けて認知度が高まったように感じられる。ただ残念なことに、自己紹介をするときには、たとえ相手が研究者であっても「海洋研究開発機構」と言うよりは、「「しんかい6500」を運用している機関です」と言った方が通りが良い。つまり「しんかい6500」というハードは広く知られているが、ソフト面、すなわち「しんかい6500」を使って得られた科学的成果は、一部の専門家を除いてはあまり知られていないのが現実である。これは大変もったいない話だ。

「人間が作り出したものは、すべて自然という名の偉大な本の中に書かれている」というのは、サグラダ・ファミリアの設計で名高いアントニ・ガウディの言葉である。彼の言葉通り、自然は様々な技術革新に向けたインスピレーションの宝庫である。中でも人の手がまだまだ及んでいない深海には、いまだ開かれてもいないページが多数残されている。ところが自然という本をただ漠然と眺めるだけでは、イノベーションにつながる発想は到底生まれてこない。

筆者らが開発したMAGIQは油分子の自己組織化によってナノ乳化を実現した技術である。従来のトップダウンとは180度異なるボトムアップで乳化を行う着想は、実は熱水噴出孔と呼ばれる深海底から湧き出す温泉から生まれた。海洋学や海洋生物学など、海洋に関連した科学を専門とする研究者であれば、誰もが深海熱水噴出孔の存在を知っている。MAGIQは、海洋科学の常識を界面化学という異分野の視点で読み解いたからこそ生まれた技術なのだ。自然という偉大な本からヒントを得るには、それを読み解く力こそが最も重要であると言えよう。

（国立研究開発法人海洋研究開発機構・
海洋生命理工学研究開発センター長）

平成 25 年度　研究助成

有機合成とコスメトロジーの合体

林　昌彦

有機合成化学者として、天然からはごく微量しか得られないものを必要量安定かつ安全に合成・製造・提供すること、さらには、天然物の性質・機能を凌駕する新規な物質を創生することは最も重要なことだと考えております。その分野としてコスメトロジー分野は非常に身近な物質科学です。今回は「配糖化」をキーワードに申請し、採択していただき、研究を実施することができました。自然界にフラボノイド類は極めて多種多様に存在し、配糖化された化合物も数多く存在します。今回の助成期間では、まず、自然界にある*O*-グリコシドの一つアカセチン-7-β-D-ガラクトピラノシドの簡便な合成法を達成しました。さらには、これまで配糖体の報告例のない、3-フェルロイル-γ-キニドをアグリコンとした配糖化研究を実施しました。すると、予想していた*O*-グリコシド体だけでなく、*C*-グリコシド体も得られました。自然界にはフラボノイドの*O*-グリコシド体と*C*-グリコシド体の両方が存在しますが、同じアグリコンではどちらか一方です。フラスコ内では、一つのアグリコンから両方作ることができます。今回得られた知見を基に、配糖化研究をより「深化」させ、真の意味でのコスメトロジー分野に化学者として貢献できるよう今後とも引き続き研鑽を積んでいきたいと考えております。

（神戸大学大学院理学研究科）

平成 25 年度　研究助成

本研究を通して感じたこと

平田　修造

本研究助成の研究内容では、励起状態の寿命を数多く評価することが性能の向上を得ていく上で極めて重要であった。本助成の資金を活用して導入した小型発光寿命測定装置を用いることで、ドナー分子からアクセプター分子のエネルギー移動過程や、蓄積した励起子の寿命を正確に且つ高速にスクリーニングすることができ、結果的に研究が加速した。この点に関して研究助成をいただ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たい。

本材料を産業的な展開のフェーズに引き上げるためには、報告書で記載した基礎的な性能が必要であることは間違いないと感じている。本助成による研究者は、これまでに有機EL材料の研究も行ってきたが、分子ベースとする光機能性材料の用途は、最近光触媒、光ディスク、そして有機ELの材料に限定され、その他の学術的な多くの研究が産業的な展開を見せていないと感じる。それゆえその他の数多くの光機能性材料の研究が“おもちゃ”に留まっているのも事実である。本助成を受けて開発を行っている材料も、現時点では後者に相当するため、具体的な商品ターゲットを定めて、具体的な仕様を目標値に掲げて研究を行うことが必要となると感じている。このような取り組みに対して、是非産業界からもアカデミックの分野に積極的なアプローチをお願いしたい。

また本研究者は、他の研究助成者および本内容の開発を通して出会った若手研究者とコミュニケーションをとる中で、いいアイディアやスキルを持つ若手研究者が急増していることを実感している。このような研究者の研究は、第３者的な観点で見た時、著名な研究者をも凌駕するクラスの内容も数多く含んでいるように感じる。それゆえ、公益財団の観点からこのような若手研究者に最大のチャンスを与える場の継続的な提供を切にお願いしたい。

（東京工業大学大学院理工学研究科）

平成 26 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

松岡　秀樹

この度は，私の申請研究を採択くださり，誠に有り難うございました．個人的には，久しぶりに民間助成を頂いたことになりました．私の研究は，高分子界面化学に関する非常に基礎的なものです．そのため，実際，やってみないとどうなるか分からない研究であり，先が見通せないため，予算申請時に大変苦労することになります．新しい高分子，新しい系になるので，「予想される成果」を具体的に示すことが非常に困難です．その一方，科研費でさえ，「予想される成果」を示す必要があり，ひいては，「社会にどのように役立つか」まで，記すよう，要求されます．応用研究・技術開発では，それが可能で，求められることは当然と思いますが，基礎研究は，「どうなるか分からない」から行うものであり，逆に言えば，結果が分かっているのなら，やる必要が無い研究，と言うことになります．さらに，近年は，私が「若手」であったころと大きく異なり，「若手研究者」を重視し支援する傾向が強くなっており，年齢的に私には応募すらできないfundが非常に多くなっており，ますます研究環境が厳しくなってきた，と感じております．今回の研究は，私が10年以上研究を進めているイオン性両親媒性高分子について，「偶然発見した特性」が，コスメ関係へ応用できるのではないか，と思いつき，提案させていただいたもので，申請時にある程度出口を示すことができ，結果的にもそれが可能なことを示すことができました．しかしながら，これは，10年以上にわたる「基礎研究」があったからこそ，実現したことであり，いきなりの単なる思いつき等では決してありません．やはりそのような「土台」が必要なのです．今年は，TVドラマの影響で，「技術」という言葉が流行ったと思います．もちろん技術は大事ですが，「科学」も大事なのです．数年前，政府内で，「科学技術」という表記にするか，「科学・技術」という表記にするかで，議論になったことがあると聞いています．もちろん前者は，科学に基づいた「技術」であり，後者は，「科学」と「技術」の二つを意味します．この二つが共に等しく重視され，相乗効果を生み出していくのが正しい姿なのでは，と考えます．

（京都大学工学研究科高分子化学専攻）

平成 26 年度　研究助成

陽向（ひなた）で生かせ、コスメトロジー

山路　稔

このたびは、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、謝意を表したく存じます。その研究補助金にてUVサンスクリーン分子の研究の遂行完了を無事報告できることを慶びに思います。有機分子の光化学・光物理基礎過程を研究していた小生としては、何か応用に繋がる研究を始めてみたいと常々考えておりました。人間は太陽の下で一生暮らしていかなければなりません。近年紫外線が良いも悪いも人体に与える影響は科学・医学に関するニュースや美容・化粧品業界で少なからず話題になっていました。小生近年、UV-C紫外線によりDNAが損傷する光反応機構を基礎研究の立場から解明するに至りました。とても小さな確率で光を二度吸収することにより起こる化学反応を経てようやくDNAの損傷が起きることがわかりました。今度はこのDNA損傷を引き起こすUV-C光線をコスメトロジーの力で人体への影響を軽減する分子の研究に至りました。UV-C光線を効率的に吸収し、一時的ではありますがUV-Aのサンスクリーンに化学的に変化し、その役割を終えると元のUV-Cサンスクリーンに戻る分子を発見しました。自然科学の研究対象は無限です。次はサンスクリーン分子にプラスαの機能を持たせた分子の開発に挑みたいとワクワクしています。コスメトロジー研究振興財団の今後の発展をお祈りします。

（群馬大学大学院理工学府分子科学部門）

平成 25 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

市　育代

皮膚異常は栄養不良の代表的な所見でありますが、栄養不良は様々な疾病において病状の進行を左右することが知られています。栄養不良は食事摂取不足だけでなく、疾病や術後など様々なストレスに起因する代謝変化によっても生じます。栄養不良は病状の悪化に関与するだけでなく、重症化すると死に結びつくことがあり、栄養不良には早期の診断が求められています。皮膚の異常も栄養障害でみられる症状であり、見逃してはならない栄養不良の所見です。栄養不良に伴う皮膚障害では、皮膚の乾燥や皮脂量の減少がみられますが、皮膚は分化度の異なる角化細胞が重層化した構造をし、バリア機能を担っていることから、他の臓器に比べて特殊な脂質組成であると言われております。

必須脂肪酸欠乏には魚鱗癬と言われる皮膚症状がみられ、どのような脂質が皮膚症状の異常に関わっているかは未だ不明でありますが、今後も必須脂肪酸欠乏時の皮膚障害のメカニズム解明に繋がる研究を行い、皮膚障害に関わる脂質成分の探索を行っていきたいと考えております。

最後に、本研究を遂行するために研究助成のご支援を頂きましたこと、更に研究の幅を広げるきっかけを頂いたことに関しまして、コスメトロジー研究振興財団ならびに関係者各位に、心より感謝申し上げます。

（お茶の水女子大学基幹研究院自然科学系）

平成 25 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

宇都　拓洋

この度、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、深く感謝申し上げます。私はこれまで、漢方薬の原料である生薬成分を中心に機能解析研究を行ってきましたが、皮膚や化粧品に関する研究経験はなく、本研究助成によりコスメトロジー分野に研究の幅を広げることが出来ました。研究を進める中、ドラッグストアの化粧品コーナーの商品を手に取り成分を確かめたり、化粧品CMを注意深く見たりするようになりましたが、各メーカーの工夫を凝らした商品開発やアピール法は大変興味深いです。

漢方薬とコスメトロジーの分野はオーバーラップする部分が多くあります。化粧水などに使われているハトムギは、よく知られていることですが、ハトムギの種皮を除いた種子はヨクイニン（薏苡仁）と呼ばれ、いぼとりや肌荒れに、漢方では利尿、消炎、鎮痛、排膿の目的に用いられています。また、婦人病の漢方薬に使われるトウキ（当帰）やボタンピ（牡丹皮）も薬用化粧品に含まれているのをよく見かけます。このように生薬などの天然物が化粧品素材として有用であることは確かですが、それらに含まれる活性成分の作用機序については不明な部分が多く残されています。白樺樹皮などから単離されたロドデノールによる健康被害が問題になったことは記憶に新しいですが、天然由来成分の安全性試験の難しさや詳細な作用機序解明の必要性を痛感しました。今回の助成による研究は、漢方薬の７割に含まれる重要な生薬であるカンゾウ（甘草）のフラボノイドに注目し、そのメラニン合成に関する分子機構と標的分子の解析を行うことで、新しい知見を得ることが出来ました。この研究成果はコスメトロジー分野では小さなことかもしれませんが、今後も研究成果を積み重ねていくことで、コスメトロジー研究の発展に少しでも貢献できればと考えております。

（長崎国際大学薬学部）

平成 26 年度　研究助成

コスメトロジー研究雑感

大沢　匡毅

私が研究を続けていくうえでの一番のモチベーションの拠り所は単に生物学が好きだということであり、“自分の手で生命の神秘を解き明かしたい”という欲望に突き動かされて研究を行っています。また、自然科学の中でなぜ生物学に魅了されたのかといえば、生物学が観察という行為に立脚した“見える科学”だからです。

私は子供の頃から生き物が大好きでした。これまでに様々な種類の生き物を飼育しました。彼らの生命の営みを日々観察し、そこから感動を得ることが単に好きだったのです。そして、このような気持ちは自分のラボを構えるようになった今でも何ら変わりません。

私が皮膚の分野に転向したのはつい 15 年ほど前のことです。転向した理由は単純で、皮膚は観察するには打って付けの研究対象だからです。皮膚に異常が起こると、ハゲたり、カサカサになったり、白髪になったりと、摩訶不思議なことがたくさん起こります。そして、“なんでこんなことが起こるんだ！”と一大奮起できるのです。それが純粋に楽しいのです。

なぜこんなことを書いているのかと申しますと、それは、私が日本の基礎科学を取り巻く現状に懸念を感じているからです。近年の応用科学偏重の社会的風潮にも抵抗感を感じます。応用研究は社会に直接貢献するので是非推進するべきだと思います。また、研究費は税金で賄われているのだから、納税者のためになる研究を行うべきだといった考え方も理解できます。しかし、科学研究を行う根源的なものは研究者の好奇心であり、純粋に好奇心を満たしたいという気持ちで行う基礎研究についても、もっと尊重されるべきだと思うのです。たとえその成果が社会貢献を果たさないとしても、少なくとも学問の進歩には何らかの貢献をするはずです。応用研究も学問の進歩がなければ成立しない訳ですから。残念ですが、最近は、基礎科学に情熱を持った学生に出会う機会がほとんどなくなってきました。

貴財団の助成金システムはとてもユニークだと感じます。これほど広範囲かつ異分野のテーマを採択する助成システムはないと思います。今後も、特定の方向に偏ることなく、基礎から応用研究まで大きな視野でテーマを採択するポリシーを貫いていただきたく思います。この度は、我々の研究に対し研究費を支援してくださいまし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。

（岐阜大学大学院医学系研究科生命機能分子設計分野）

平成 25 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

柏谷　英樹

「香気」は不可視な存在でありながら、「こころ」や「からだ」に多大な影響を与えるものとして、紀元前より人々の強い関心を引いてきました。現在でも「アロマセラピー」という形で多くの方に親しまれています。しかしながら香気は必然的に嗅感覚を伴うためプラセボ効果が大きく、その効果を科学的に実証することは困難であると考えられてきました。実際「香気で鎮痛効果を…」という話を学会で持ち出すと、それだけで「胡散臭い奴だ」という眼差しで見られることも多々あり、研究費の獲得にも四苦八苦していたところをコスメトロジー研究振興財団の研究助成によりサポートして頂き、心より感謝を申し上げます。

香気誘発性鎮痛という現象論だけではどうしても「怪しげだなぁ」という印象をぬぐえないところでしたが、ここに脳科学的なエビデンスを加えることができたのは、香気誘発性鎮痛を科学的に検証する上で大きな前進であったのではないかと自負しているところです。オレキシン含有神経は鎮痛だけではなく、循環、呼吸、睡眠・覚醒、摂食など多様な自律神経出力のスイッチボードとなる神経細胞です。アロマセラピーで用いられる精油の効能の「いくらか」は、精油の香気がオレキシン神経を介して自律神経調節を行う結果なのではないか、と妄想する今日この頃です。

（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科）

平成 25 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

木村　郁夫

この度は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頂きましたことを深く感謝申し上げます。我々は現在､腸内細菌叢や性差に関係する脂質リガンド(短鎖脂肪酸およびプロゲステロン）の細胞膜上受容体を介した即時性の生理機能(特にエネルギー制御関連生命現象)を明らかにすることにより、肥満・糖尿病に代表される生活習慣病などのエネルギー代謝疾患の治療・予防に対する機能性食品、プロバイオティクス、そして創薬応用へ繋げることを目標に日々研究に励んでおります。特に本研究助成での研究テーマである「細胞膜上の性ステロイドホルモン受容体」については、従来、ステロイドはその脂質特性から核内受容体に結合し、多様な生理活性を発揮すると考えられておりましたが、この細胞膜上の受容体の発見により、今までの通説を覆す、今まで全く説明できなかったステロイドの即時性機能について、この受容体を介した新たなシグナル伝達メカニムズにより証明が可能ではないかと考えております。そして、さらには、この細胞膜受容体を創薬標的とした新たな性差依存的疾患治療や、化粧品応用が可能なのではと大いに期待し、我々一同、現在研究に精進しております。本助成金のおかげで順調に研究も進行しており、さらには、これら細胞膜上の各種遺伝子改変動物を作成し、生体での機能について検討を始めたところで、ここからまた、新たな発見があると固く信じ、大変期待しております。今後は、色々な分野に目を向けながらも、創薬研究や化粧品開発に役立つ成果を挙げることを目標に、一緒に研究を進めてくれるスタッフおよび学生と共に日々、頑張っていきたいと考えております。

（東京農工大学大学院農学研究院応用生命化学専攻）

平成 25 年度　研究助成

スピルリナの紫外線皮膚老化抑制効果に対する検討､実験を終えて

国定　充

この度けい藻類で抗酸化作用を有するといわれていた *Spirulina platensis*（*S. platensis*：スピルリナ）が紫外線皮膚癌において抑制するか、またその作用機序について本研究はコスメトロジー研究振興財団の助成を得て遂行された。しかし、論文採択に至る良い実験データを蓄積するには想像以上の時間と労力を費やし、むしろそれらの苦労の方が強く雑感として残っている。まず、紫外線のマウスに対する慢性紫外線照射実験であるが当初は以前自分で確立したプロトコル通りいかなかった。慣れない留学生に教えながらの実験であったが、マウスが紫外線照射による皮膚腫瘍発生を待っている間に別の病因により死亡させてしまったり、少しの実験中の手間取りでマウス皮膚に余計な反応を起こしたりと安定した時間内で終わることに努めることに終始した。当たり前のことであるが動物実験を対象にするわけであるので *in vitro* 系のように安定した結果は出にくいのは分かっていたが、努めて細胞の実験のような再現性があり信頼性がある結果を求めた。また、スピルリナの原末を用いた皮膚線維芽細胞を対象とした実験もすんなりとは進まなかった。スピルリナに含まれるフィコシアニンおよびフィコシアノビリンの至適濃度について研究グループ内でも違った意見があり、紫外線およびスピルリナ添加により目的とするシグナル蛋白の変化がより明瞭に見られる濃度を実験によりまたは文献の情報を参考に模索していった。最終的には至適濃度を見つけることができ、結果シグナル蛋白のりん酸化が捉えられ、シグナル蛋白によっても時間や種類により差異がかなり存在することも明らかに出来た。最後にこれらの研究成果は大学院生のヨギアンティ他、統括して頂いた錦織教授、他の研究メンバーの協力がなければ到底なり得なかった。またスピルリナを対象として扱うにあたりスピルリナの原末や成分原末を提供して頂いたDICライフテック社にも合わせて深く感謝いたします。

（神戸大学大学院医学研究科内科系講座皮膚科学分野）

平成 25 年度　研究助成

コスメトロジー研究に寄せて

白井　康仁

今回、プロテインキナーゼC（PKC）の活性化剤であるジアシルグリセロール（DG）をリン酸化し、ホスファチジン酸（PA）に変換する脂質キナーゼであるジアシルグリセロールキナーゼγ（DGKγ）のノックアウトマウスを作製し、その皮膚における機能解明を試みた。しかし、バリア機能を調べてみても、創傷治癒を調べてみても、今のところ顕著な表現型は認められていない。DGKは皮膚の分化において重要なPKCの機能を調節でき、且つ基底層から有棘層にかけて発現が増加していたことから、皮膚の分化において何らかの働きをしていると考えられるが、残念ながら未だその機能は不明である。DGKには複数のサブタイプが存在し、よく似た機能を持つことから、DGKγKOマウスにおいても、他のサブタイプが代償しているのかもしれない。このあたりが、KOマウスを用いた研究の悩ましいところである。さらに、もし仮にKOマウスで表現型が現れていたとしても、それがヒトで再現できるかはまた別の問題である。かくして、研究は終わりの見えない旅だとつくづく思う。

旅のゴールはもちろん、人に役立つようなスキンケア商品の開発である、多くのアトピー性皮膚炎や、魚鱗癬などの皮膚疾患に悩む方々のお役に立てれば、私の旅はどれだけ有意義で楽しいことだろう。たとえ大きな皮膚疾患でなくとも、日々の水仕事に手を傷めている方の力になれればと心から思う。なかなか、ゴールの見えない旅路ではあるが、様々な人との出会いで、その道中や行き先は大きく変わるのかもしれない。小生の陳腐な研究成果を目にし、何か「こうすればよいのでは？」という奇特な御仁がおられれば、ぜひしばらく旅を伴にしていただきたいものである。きっと、すばらしい未来が開けるのではないかと思う。

（神戸大学大学院農学研究科）

平成 25 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

新藤　隆行

今回の研究は、我々が遺伝子改変マウスを用いた研究を進める中で、若年期より皮下脂肪層の肥厚と、線維化の亢進を認め、老化現象に似た組織像を示すマウスラインがたまたま得られたことがその端緒となりました。我々はホメオスターシス維持に関わる生体内システムの研究を行っていますが、老化現象とは、ホメオスターシスを制御する生体内システムが､環境に応じて適応や変容を繰り返し､徐々に調節異常が蓄積した状態とも考えられます。従って、今後、生体内ホメオスターシス維持に関わる生理活性因子の分子メカニズムの解明が進むことで、アンチエイジング法開発への展開が期待されると考えています。

超高齢者社会を迎えつつある我が国において、健康長寿という問題は避けて通ることのできない重大な課題となると同時に、老化とアンチエイジング研究の、今後ますますの発展が望まれます。

今回の研究課題採択にあたり、コスメトロジー研究振興財団および選考に当たられた先生方に、心より御礼申し上げます。　（信州大学大学院医学系研究科循環病態学講座）

平成 25 年度　研究助成

コスメトロジーとは何か？

榛葉　繁紀

何となくはわかるが、言葉あるいは文字にして説明できる自信はない。

私が専門とする薬学には香粧品学がある。どうやらそれと似ているものか？これが本研究助成事業に応募するにあたっての私の正直な気持ちであった。助成期間が終了する現在に至って、香粧品学と違うことは理解できた。しかしまだコスメトロジーとは何かを説明できない。「何を寝ぼけたことを」とお叱りを受けそうだが、本研究助成事業に採択されたテーマのタイトルをみていただければ、それをご理解いただけると思う。すなわちコスメトロジーがカバーする範囲は科学から文化まで多彩であり、裾野の広さと懐の深さを感じさせる。だからこそ私のような異端な研究者まで受け入れていただけたと感謝する次第である。

「異端」と書いたが、私の主要な研究テーマのひとつは、体内時計、正確には時計遺伝子による生体機能調節機構の解明である。簡単に言えば、1 日を通じて皮膚機能はどのように変化し、それはどのように制御されているのかを知りたいと思っている。今回の研究では、皮膚の機能が内的因子（時計遺伝子）と外的因子（光）の両方により制御されていることを示すことができた。これら知見は、皮膚の機能を適切な状態に保つためには生活環境と体内時計の協調、すなわち規則正しい生活時間を過ごすことの重要性に科学的エビデンスを与えるものである。このような研究もコスメトロジーの裾野の広さの拡大の一助となれば幸いである。

最後ではありますが、今回、研究助成金のご支援をいただき、あらためてコスメトロジー研究振興財団に心からお礼申し上げます。　（日本大学薬学部健康衛生学研究室）

平成 25 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

乃村　俊史

アトピー性皮膚炎は非常に common な疾患ですが、長らくその病態はクリアに説明されておりませんでした。2006 年にスコットランドの McLean 教授によりアトピー性皮膚炎の多くが遺伝的に皮膚バリア機能異常を有していることが解明されましたが、これは我々皮膚科医のみならず、世界中の医師に大きな衝撃を与えました。皮膚バリア機能異常と免疫異常の両方が疾患の形成に関わっていることは古くから指摘されていましたが、どちらかと言えば後者が病態の中心にあると思われていたからです。2006 年当時、卒後 5 年目であった私はすぐさまスコットランドに行く機会を与えられ、1 ヶ月間みっちりと手技を学ぶだけではなく、最新の疾患概念を McLean 教授から直接学ぶという貴重な体験をすることができました。これによりアトピー性皮膚炎と皮膚バリア機能に興味を抱くようになり、現在もこの両分野は私の研究の基軸となっています。またその後、2008 年から約 2 年半、再度 McLean 教授のもとに留学し、今回の研究の基盤となった遺伝性疾患に対する治療開発に関わる研究に従事いたしました。アトピー性皮膚炎のメインの病態が皮膚バリア機能異常―特にフィラグリン遺伝子変異―であることが解明された今、患者皮膚でフィラグリンを増やすことでアトピー性皮膚炎の治療や予防ができることが期待されています。今回の研究で用いたリードスルー治療をはじめとした新しい治療法が開発され、多くの患者さんが苦しむアトピー性皮膚炎治療の新時代が来ることを願ってやみません。最後になりますが、本研究にご支援を頂きましたコスメトロジー研究振興財団に深謝いたします。（北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野）

平成 26 年度　研究助成

新たなNSAIDsの創製を指向して

原　俊太郎

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、心より感謝致します。

今回私は「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」という研究課題に助成いただきました。私事ですが、若い頃からかなり太ってしまった私は、最近になり、腰や膝の痛みに悩まされています。痛みをやわらげるためには、やせることと、患部の周りの筋肉を鍛えることが大切なのはわかっておりますが、痛みを感じるとき、何よりも助かるのは様々な非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）です。NSAIDsはシクロオキシゲナーゼという酵素を阻害し、私の専門領域であるプロスタグランジンの生合成を抑えることで、痛みをとめてくれます。腰や膝が痛い時は、特に、ケトプロフェンテープなどのNSAIDsを含む外用鎮痛付剤がとても有効ですが、これらは長期に貼り続けると皮膚がかぶれてしまうし、薬によっては光過敏症のような副作用も気にしなくてなりません。すぐに痛みをとめてくれる一方で副作用の少ないNSAIDsをつくることができないか？これが私たちの研究の目的です。今回得ることができた研究成果を、少しでも臨床応用へ結びつけていきたいと考えております。

（昭和大学薬学部社会健康薬学講座衛生薬学部門）

平成 25 年度　研究助成

細胞社会のダイナミズム

藤原　裕展

皮膚は単純な器官だと思われる方が多いのですが、実は非常に複雑な器官です。まず、皮膚には由来の異なる様々な細胞が存在します。外胚葉由来の表皮細胞、中胚葉由来の立毛筋、血管細胞、線維芽細胞、毛乳頭細胞、脂肪細胞、種々の免疫系細胞、そして、神経堤細胞由来の色素細胞、末梢神経などです。さらに、これら多様な細胞が、発生期に適切な時に適切な場所で増殖分化し、適切な細胞と出会い、相互作用することで、はじめて精巧な皮膚構造ができあがり、皮膚特有の生理機能が発揮されます。これほどまでに複雑で精巧な器官が、自律的にできあがるとは、まったく驚くしかありません。今回の研究では、発生という長い旅の途中で表皮細胞と感覚神経という全く異なる旅路を経た細胞が、毛包バルジで再会するドラマに立ち会うことができました（感覚神経の核は脊髄のすぐ近くにあり、皮膚まで長い軸索を伸ばしています）。この出会いのストーリーを、早く多くの皆様に知って頂いて、皮膚科学や発生生物学の面白さや魅力に触れていただきたいと思います。皮膚に存在する細胞たちが、どのように折り合いをつけながら、そして協力しながら皮膚という細胞社会を形成しているのか、興味は尽きません。

私が行っている研究は非常に基礎的な研究ですので、臨床応用を簡単に展望することはできません。しかし、長い目で見ると、正常発生を知ることで、発生異常としての病気の仕組みを理解することに貢献できるでしょう。また、発生メカニズムの理解は、失われた組織の再生にも貢献すると考えます。これからも、皮膚の細胞社会の成り立ちを研究することで、基礎科学の発展に関わっていきたいと思います。

最後になりましたが、本研究をご支援いただきましたコスメトロジー研究振興財団及び関係者の皆様に、心からお礼申し上げます。

（理化学研究所 多細胞システム形成研究センター
細胞外環境研究チーム）

平成 26 年度　研究助成

研究室運営は自転車操業

水品　善之

この度は、公益財団法人コスメトロジー研究振興財団の第 25 回（平成 26 年度）研究助成を賜りまして、誠にありがとうございました。昨今の大学は、大学本部からの研究費（校費）が削減され続けており、外部資金を獲得しないと研究レベルが維持できなくなっています。公官庁や民間財団の競争的研究費に積極的に応募し続けて、かなりの高倍率の競争の中でどうにか食いつないでいる、まさに綱渡りの自転車操業状態です。本財団の研究助成は、一年前の第 24 回（平成 25 年度）にも「植物精油から哺乳類 DNA 合成酵素の分子種選択的活性調節成分の探索と化粧品開発へ向けた抗炎症・抗アレルギー作用の解明」というテーマで応募しましたが、残念ながら不採択でした。当時の私は、DNA 合成酵素の阻害剤を探索・研究することがメインであり、阻害剤を中心とするコスメトロジーらしいテーマを強引に設定して応募しました。不採択になってから、真剣にじっくりと考えて、逆転の発想、すなわち「阻害剤」ではなく「活性化剤」が想い浮かびました。そして、翌年の応募では無事に採択となりました。従って、私の本財団の戦績は 1 勝 1 敗の勝率 5 割になります。しかしながら、他の民間財団の研究助成金については、私のテーマ設定が悪いのか、文章表現が悪いのか、なかなか採択に至りません。近年は自身の採択率が 10％くらいと厳しい結果になっています。それでもめげることなく、日々の研究活動（近年は教育活動や大学運営活動も非常に多い）の合間に申請書を書き続けている状態です。

（信州大学大学院農学研究科）

平成 25 年度　研究助成

表舞台に登場したミトコンドリア

柳　茂

私は以前内科の医師として病院勤務をしておりましたが、原因もわからず有効な治療法もない病気が多いことに驚きました。病気の原因を解明し、根本的な治療法を開発したいと考えて研究の道を志したのですが、なかなか思い通りにはいかず日々悪戦苦闘しています。現在興味をもって研究を進めているのはミトコンドリアです。いまでも神経細胞のミトコンドリアの動画を見て興奮したのを覚えています。ミトコンドリアは融合と分裂を繰り返しながら活発に動き回っていました。先祖はバクテリアだったことが納得できました。なかには細胞の外に飛び出そうとする挙動不審なミトコンドリアもあり、他のオルガネラとはまったく異なる不思議な動きをしていました。このようなミトコンドリアの動態は、ミトコンドリアダイナミクスと呼ばれ、世界的にも注目される研究テーマの一つになっています。ミトコンドリアダイナミクスが破綻すると、ミトコンドリアの機能は悪くなり有害な活性酸素を大量に作り出し、遺伝子やタンパク質を壊してしまいます。それが原因でがん、アルツハイマー病、心不全、老化など様々な病気を引き起こすことがわかってきました。今ではこれら一連の研究が大きな流れとなり、「ミトコンドリア疾患学」なる新たな分野が生まれています。ミトコンドリアは疾患の裏舞台から表舞台に登場してきたのです。最近私たちは、ミトコンドリアの機能を良くする新しい酵素を発見し、MITOL と命名しました。MITOL を増やしてやるとミトコンドリアからの活性酸素は減少し、ミトコンドリアはとても元気になります。MITOL の役割を解明することにより、ミトコンドリア機能の破綻を予防する新しい創薬の開発が可能になるのではないかと期待しているのですがそんなに簡単にはいきません。

（東京薬科大学生命科学部）

平成 26 年度　研究助成

なぜ自閉スペクトラム症児の嗅覚特性に着目するのか

熊﨑　博一

私は児童精神科医師として臨床の立場から自閉スペクトラム症（Autism Spectrum Disorder）児に関わっている。ASDは有病率が高く、また根本的な治療を認めないため社会問題となっている。ASDの介入・支援には新しい発想が不可欠と考えている。ASD児の多くには、社会コミュニケーション障害、限局的な興味関心や反復的行動などだけではなく、感覚や運動の問題が見られる。2013年に発刊されたアメリカ精神医学会の診断基準であるDSM-5においてもASDの診断項目において感覚の問題が取り上げられているように、感覚過敏や感覚刺激への低反応はASD児によく観察される問題である。例えば、赤ちゃんの泣き声を聞くとパニックになる、他の人から触られるとかんしゃくを起こすなどの感覚過敏がある子どもがいる。一方、呼ばれても気付かないように見える、痛みに鈍感に見えるなどの低反応の問題や、背中があることがわからないなどの身体図式の問題も報告されている。感覚の問題はASD児の70－90％に見られることが指摘されている。とりわけ感覚過敏は高頻度に起こっていることが報告されている。

自閉スペクトラム症児にとっての感覚の問題は本質的との見方もあり注目を集めているが、嗅覚についてはその伝達経路が視床を通過しないこともあり注目されてこなかった歴史があった。一方で臨床場面において当事者から垣間見ることができる嗅覚特性は社会的な困難及び予後と直結しており深刻な問題が多いと考えられた。Bromleyらの調査によるとASD児の41％に臭いに対する過敏が起こっていることがわかっている。

コスメトロジー研究振興財団には、本研究のようなまだまだ注目されていない研究に対し、支援を与えてくださったことに感謝の気持ちである。本助成が研究資金面でどれほど力になってくれたか計り知れない。今後もASD児の嗅覚特性について多方面から検討を重ね、ASD児の嗅覚特性に迫っていくことこそが貴財団への恩返しと考えている。

（金沢大学子どものこころの発達研究センター）

平成 25 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

小原克彦

高齢者の診療を行い、老化の臨床研究を行っているが、老化をどのように定義するかは、非常に難しい。老化を自覚し、老いを受け入れることはさらに難しい。自分自身の心で感じている年齢と実年齢とには大きな差があるからである。定義では、65歳以上が高齢者になるが、65歳の誰もが自分を高齢者とは思っていない。自己は物心ついてから途切れることなく連続しており、30歳代のことを昨日のことのように思い返すことができるからである。しかし、客観的に見た65歳は、明らかに30歳ではない。老化は、文字通り、一目見れば明らかである。自分で認めなくても、他人は、客観的に自分を評価しているのである。しかし、実際自分が何歳に見られているのかは分からない。誰しも、うぬぼれがあり、親しい友人でもなかなか本当のことは(角が立つので)、教えてくれない。今回の研究では、看護師に見た目年齢の評価をお願いしたが、写真に写った顔の見た目年齢を教えてくれるアプリが存在する。パテントの関係で、今回の研究では利用することができなかったが、以前の研究では、コンピュータにより評価した見た目年齢もヒトによる評価と同じく、動脈硬化に対してバイオマーカーとなっていた。

見た目が若いことは、特に女性にとっては、重要である。中年期以降では、美しさよりも、若さが求められているのかもしれない。化粧はその意味では、心強い味方である。中間報告で示した通り、見た目年齢を約5歳若くする効果がある。しかし、化粧を施した見た目年齢は、当然のことながら、老化のバイオマーカーとしての効果が少ないようである。

化粧以外に見た目を若くする方法はあるのだろうか。健康であり続けることが重要である。今回の成績でも、高血圧があると、高齢期の見た目年齢差が小さく（見た目年齢が高く）なることが示された。若いころから健康的な生活習慣を続けることが、地味だが確実な方法のように感じる。超高齢社会のわが国で、心身のみならず見た目も若い高齢者が増えることを願いたい。

（愛媛医療センター）

平成 25 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

三枝　千尋

スキンケアやメイクアップ、ヘアカラー、ヘアスタイリングなど、人は日常生活の中で化粧行動に手間と時間を費やしている。化粧をすることでより魅力的になる、というのが化粧動機の一部であることは確かだ。しかし魅力的であるかどうかは、どのように判断されるのだろうか。

こうした疑問を抱いたことから、「魅力」を研究テーマとした社会人大学院生生活が始まりました。魅力に関する先行研究は数多くあり、特に対人認知の文脈から魅力を探る社会心理学、配偶者選択の観点から魅力を探る進化心理学に関する研究が数多く見つかる一方で、魅力を構成する視覚的要素がどのように統合されるかという観点の研究はあまりないこと、魅力知覚の特徴でもある「ぱっと見た瞬間に魅力的だとわかる」ことに寄与する視覚要素は明らかにされていないことがわかり、魅力を構成する視覚的要素の統合過程に関する研究を学位研究のテーマとして選びました。学位研究の主となる研究に対して研究助成を頂きましたコスメトロジー研究振興財団に改めて深くお礼申し上げます。

人の魅力知覚に関する研究は研究者にとっても魅力的に映るようで、日々魅力知覚に関する新たな知見が公開されています。公開される研究をウォッチしていて感じるのは、「魅力」を切り出す研究者の視点の多様さ、そして魅力という研究テーマの奥深さです。こうした点が、魅力研究が研究者にとっても魅力的である理由の一因なのかもしれません。筆者自身も、魅力を切り出す新たな視点を見つけ、魅力の新たな一面を明らかにし、さらには新しい魅力を創造することを目指し、魅力に関する研究を継続していきたいと思います。

（東京大学大学院工学系研究科先端学際工学専攻）

平成 25 年度　研究助成

笑顔に魅せられて

佐藤　和人

私は、これまで人の顔を対象とした研究を精力的に行ってきた。人それぞれの顔には、自己主張されたその人の個性がにじみ出る。そんな中でも、笑顔は魅力的だ。なぜなら笑顔には国境が無い。文化や言葉の壁さえ、いとも簡単に乗り越えてしまうような不思議な力が込められている。ふと目にした紛争地域で暮らす子供達の笑顔に心が奪われる。生活の大変さを微塵も感じさせない明るい笑顔がそこにあった。相手を差別することなく全てを受け入れてくれるようなメッセージを子供達の笑顔に感じた。やはり何と言っても、笑顔は万国共通の優れたコミュニケーションツールであることを痛感した。

世界が注目する日本人の「おもてなしの心」は、礼節を重んじる自然で爽やかな笑顔が基本だと考える。私は次のような仮説を立てた。「笑顔の表出テンポとリズムが相手の印象形成に大きく寄与するだろう」と。しかし、笑顔の表出テンポとリズムという概念が受け入れられるかどうか不安があった。幸いにも今回の研究助成では、おもてなしの心を育む「Smile Learning」の試作開発にご助成頂いた。お陰様で、笑顔のリズムが創る印象空間の可視化に一歩近づくことができました。心より感謝申し上げます。今後は、コミュニケーションにおける印象空間の可視化を意思疎通の可視化へ発展させたいと夢を膨らませています。

（秋田県立大学）

平成 25 年度　研究助成

香りの複雑さへチャレンジ！

清水　邦義

覚醒を促す香り、眠りを誘う香り…。物質にもよるが、モノテルペン類やセスキテルペン類などの構造的多様性は、非常に低分子かつ類似した構造であっても、ヒトに相反する効果を引き起こす。香り成分の構造と機能の関係については、近年の嗅覚受容体に関する生命科学研究の著しい発展により、その分子機構についての解明が進みつつある。しかしながら、香りがヒトに及ぼす影響を、実際に検証することは難しい。なぜなら、構造だけでなく、濃度も関連してくるためである。人体に作用する薬の影響を考える際には、その薬の血中濃度が高いほど作用も強くなるとされる濃度依存性が考慮されることが多い。一方、香りに限っては、必ずしも、濃度依存性が得られるとは限らない。ごくごく低濃度の香りの方が、高濃度の香りと比較して、ヒトへの影響が大きい場合も報告されている。そのメカニズムは複雑多岐にわたり、いまだ不明な点も多い。香りとヒトの関係は、生理応答のみならず、好き嫌いといった嗜好性の要因が複雑に絡み合いながら成り立っている。そのことも、メカニズムの解明を困難にさせている要因の一つであろう。香りの生理応答の解析だけでも複雑すぎるのに、さらに、好き嫌いという被験者の歴史的背景まで含む要因が重なり合うと、もはやお手上げしたくなることもある。受容体レベル、細胞レベルであれば、きれいな結果を出すことも可能かもしれないが、ヒトとなると、なかなか思ったような結果がでない。その中で、今回は、森の香りとも形容される(−)−酢酸ボルニルに着目し、ヒト試験を実施した。アロマディフューザーを被験者に配布し、タイマー機能を利用して就床開始から１時間、香りを提示した。果たして、このような提示方法で、プラセボ群と比較して、なんらか差が得られるだろうか。詳細については、報告書を参照いただきたいが、ヒト実験は、いつもデータを解析する最後まで、はらはらどきどきである。しかし、すべての香りの物質、受容体、細胞レベルで得られる基礎研究が、最終的には、ヒトでの検証によって完結することは言うまでもない。チャレンジし続けるしかない！

（九州大学農学研究院）

平成 25 年度　研究助成

香りとコスメトロジー

八谷 百合子

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。

大学院生の頃より、生体疲労信号解析および疲労度推定手法に関する研究を行ってきました。職場では、さまざまなストレス因子によりうつ病などのストレス関連疾患が急増していますが、ストレス関連疾患では精神疲労を伴っていることが多いと報告されています。精神疲労の評価は、主に質問調査票などによる主観的疲労が把握されていますが、私は生体信号より定量的に評価を行う方法を開発しました。この結果を発表したところ、産業医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学の嗅覚・味覚の制御機構がご専門の柴田美雅先生と早稲田大学大学院情報生産システム研究科の信号処理技術がご専門の犬島浩教授がご興味をお持ち下さり、香りによるリラクゼーションや安眠の効果について研究を行うことになりました。柴田先生より嗅細胞の嗅小毛の表面にある受容体に香りがつくとその情報がすぐに脳の中に入ることなど、犬島教授より香りセンサの開発に関することなど、加えて睡眠については、スタンフォード大学睡眠研究所で研究をされていた、睡眠研究がご専門の産業医科大学人間工学研究室の藤木通弘教授より、活動量計による睡眠解析方法やEpworth Sleepiness Scaleなどに関するアドバイスを頂きました。そして、何よりコスメトロジー研究振興財団様のご支援頂きました研究助成により「リラックスおよび安眠効果に有用な植物芳香成分の探索」に関する研究を実施することができました。

数々のよい出会いに恵まれましたことに感謝し、今後もリラックスや安眠の効果がみられる植物芳香成分の探索を続け、コスメトロジー（美容学、化粧品学）と健康に関する研究の発展に寄与したいと思います。本研究にご支援頂きました貴財団に改めてお礼申しあげます。

（産業医科大学保健センター）

平成 26 年度　国際交流助成

痒みを計る

室田　浩之

痒みは掻きたいという「情動」であり、「皮膚感覚」でもある。1660 年、Hafenreffer博士はこれらをうまく融合する形で「痒み」を「掻きたい衝動を引き起こす不快な皮膚の感覚」と定義した。20 世紀になり、痒みの理解は爆発的に進む。1922 年、Maximillian Von Frey博士は「痒みは弱い痛み」であるという説を提唱した。von Frey博士は自身の考案した（von Frey）フィラメントを用いることでヒトの全身の皮膚感を調べた。触感を伴わず痛覚のみを感じる部位（pain point:痛点）があることから、皮膚に痛覚受容器が存在すると提唱した。さらに痛点からフィラメントを離した瞬間に痒みの残感覚が生じることを見出した。痒みだけを感じるitch pointがないため、痒みは弱い痛みであるという仮説を立てた。この説では痒みは独立した“感覚様式”ではなく本質的には痛みということになる。この考えは本邦でも広く長期間受け入れられていた。この仮説に反する知見もある。強い痒みは痛みを誘発しないこと、モルヒネやある種のオピオイドは疼痛を抑えるが痒みを増強すること、生体は痛みに対して回避行動を示すが、痒みに対して掻破行動を示すこと、などである。これらの知見は痒みが本質的に痛みと異なることを示唆している。最近になって痒みは興奮した痛覚神経と興奮していない痛覚神経の間の極端なコントラストによって生じるという“Spatial contrast theory”が提唱された。このように本質のつかみづらい痒みを評価するのは難しい。痒みの評価方法の確立は化粧品の性能評価への応用が期待される。コスメトロジー研究振興財団の助成を受け、第８回国際痒み学会においてハイデルベルグ大学のWeisshaar教授と痒み評価の国際基準に関する討論会が実現した。その成果をもとにInternational Forum on the Study of Itchは痒みの評価基準のアンケート用紙を作成し検証研究を行うことになった。痒いところに手が届く評価方法になることを願っている。

（大阪大学大学院医学系研究科皮膚科学教室）

平成 26 年度　学術集会支援助成

第 47 回日本結合組織学会学術大会を終えて

稲垣　豊

この度、コスメトロジー研究振興財団の学術集会支援助成を受け、平成 27 年 5 月 15 日・16 日の 2 日間にわたって、東京港区のコクヨホールにおいて第 47 回日本結合組織学会学術大会をお世話させて頂きました。

本学会は、昭和 44 年に第 1 回の学術集会が東京の地で開催された、半世紀近くの歴史と伝統を有する学会であります。その特徴は、マトリックス関連分子や病態解析の専門家が一堂に会し、また基礎から臨床までの幅広い領域の研究者が自由闊達な意見交換を行う場として、大きな発展を遂げてきたところにあります。

細胞外マトリックスは、単に組織や臓器の形態を保持するのみならず、皮膚を初めとする全身の細胞の発生･分化･増殖・老化等に深く関わり、生命活動に必須であることが明らかになってきました。しかしながら、慢性炎症に起因するマトリックスの動的変容は臓器線維症や動脈粥状硬化症などを引き起こし、今やその総死亡数は癌患者を凌ぐと言われます。また、今日の超高齢化社会において、骨・関節組織の変性疾患は日常活動に支障をもたらし、身体機能の低下とともに多くの内臓合併症を引き起こします。さらには、発癌やその進展機序を理解する上で、また今日の再生医学の発展と再生医療の実現化にとっても、マトリックス生物学や結合組織研究が果たす役割が一層注目されているところです。

今年度は、上述の学術的重要性を鑑みて、日本結合組織学会とマトリックス研究会が発展的に統合して初めての学術大会であり、メインテーマとして「伝統と創造 ―世代を越えた学問の継承―」を掲げました。新たな試みとして企画した、学部生と大学院生を対象とした「若手フォーラム」が好評を博しました。また、一般演題の司会にも次代を担う中堅研究者を積極的に起用することで、世代を越えて結合組織研究・マトリックス医学生物学が継承される工夫を凝らし、これからの新たな学問の潮流を築く上で有意義な 2 日間を学会員が共有して、成功裏に幕を閉じました。

今回の学術大会で得られた成果を皮膚の健康や疾病予防に活かすとともに、ご支援を賜ったコスメトロジー研究振興財団にあらためて感謝を申し上げる次第です。

（東海大学医学部再生医療科学／
第 47 回日本結合組織学会学術大会 会長）

付　　録

事業報告（平成 27 年度）
役　　員

事 業 報 告 書

（自平成 27 年 4 月 1 日　　至平成 28 年 3 月 31 日）

《研究助成関連》

2015	5	7	公募開始	全国 577 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112件
	7/15 ～ 8/21			各選考委員による個別審査
	9	2	選考委員会(第１分科会)	素材、物性に関する分野の選考
	9	3	選考委員会(第３分科会)	精神、文化に関する分野の選考
	9	4	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	24	本選考委員会	各分科会の結果を総合的に判断して研究助成30課題を選考
	11	19	理事会	本選考委員会より答申、助成課題決定
			第26回 表彰・贈呈式	研究助成対象30課題の代表者へ、助成金贈呈書、目録等を授与
			記念講演	演題：ヒト常在菌叢と超生命体 ～微生物が作る体内ミクロコスモス～ 講演者：服部 正平 先生　早稲田大学理工学術院 教授
	12	11	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
2016	2	20	選考委員への承認(書面)	平成28年度研究助成公募内容他

《国際交流助成関連》

2015	6	22	審査	応募課題の審査
	7	31	助成金交付	国際交流助成金の交付　50万円

《学術集会支援助成関連》

2014	11	7	審査	応募課題の審査
2015	4	1	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》

2015	5	28	第一回通常理事会	平成26年度事業報告及び収支決算報告の承認、任期満了に伴う評議員候補者の選出、株主としての議決権行使、報告事項
	10	2	理事への承認（書面）	平成27年９月24日開催の選考委員会決定内容の承認
	11	19	第二回通常理事会	平成27年度収支予算書の一部変更の承認、平成27年度（第26回）研究助成者等の承認、平成28年度の事業計画及び予算案の承認、報告事項

《評議員会関連》

2015	6	12	定時評議員会	平成26年度事業報告及び収支決算報告の承認、任期満了に伴う評議員の選任、評議員会長の互選、報告事項
	12	25	評議員への報告（書面）	第二回通常理事会議決事項、第26回表彰･贈呈式

《その他》

1）報告書発行

2015	5	1	中間報告集	研究業績　中間報告集　第24号
	9	1	完了報告書集	コスメトロジー研究報告　2015 vol.23

2）情報公開（当財団HP）

2015	4	10	公募要領	2015年度「コスメトロジー研究」公募要領
	6	30	事業報告及び収支決算	平成26年度事業報告書及び収支決算報告書
			役員の変更	評議員任期満了に伴う改選
	9	1	研究報告の要旨	「コスメトロジー研究」2015 vol. 23 掲載課題の要旨
	11	20	予算書一部修正	平成27年度予算書の一部修正
			研究助成者及び課題名	平成27年度研究助成者及び研究課題名

平成 27 年度 助成を受けられた方々

1）研究助成（30 名）

第 1 分野：素材、物性に関する分野（8 名）

氏　名	所　属	職位	研究課題
井嶋　博之	九州大学大学院工学研究院	教授	ヘパリン導入コラーゲンからなるG/Oエマルションの開発
川崎　信治	東京農業大学応用生物科学部 バイオサイエンス学科	教授	微細藻類が生産するアスタキサンチンを水溶化するタンパク質の化粧品素材としての開発
小山　義之	公益財団法人結核予防会 新山手病院臨床医用工学研究室	室長	低刺激性生体接着材料の開発とその化粧品への応用
酒井　健一	東京理科大学理工学部工業化学科	講師	アミノ酸系機能性界面制御剤による革新的な乳化技術の開発
谷口　正之	新潟大学自然科学系工学部 機能材料工学科	教授	化粧品・スキンケア製品に適した米糠タンパク質由来生理活性単鎖ペプチド素材の開発
鳴瀧　彩絵	名古屋大学大学院工学研究科 結晶材料工学専攻	准教授	エラスチン類似ポリペプチドの合理的設計による温度応答性ゲルの創製
東　顕二郎	千葉大学大学院薬学研究院	講師	Suspended-state NMR 測定による水分散中の化粧品ナノ粒子の分子状態評価
宮崎　敏樹	九州工業大学大学院生命体工学 研究科生命機能応用工学専攻	准教授	安全性に優れた化学合成コラーゲンによるドラッグデリバリー用球状微粒子の創成

第 2 分野：生体作用、安全性に関する分野（16 名）

氏　名	所　属	職位	研究課題
飯田真智子	名古屋大学大学院医学系研究科 環境労働衛生学	研究員	革新的なシミ予防・治療法の開発
井川　健	東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科皮膚科	准教授	ヒトiPS細胞を利用して、表皮角化細胞の様々な刺激に対する反応性にフィラグリン遺伝子の変異が与える影響について検討する。
石田　竜弘	徳島大学大学院医歯薬学研究部	教授	ポリエチレングリコール（PEG）含有化粧品使用による抗PEG抗体誘導とPEG化製剤の薬理効果への影響
大塚　篤司	京都大学大学院医学研究科皮膚科	助教	フィラグリン遺伝子欠損ラットを用いたアレルギーマーチの解明
大林　典彦	筑波大学医学医療系	准教授	メラニン合成酵素を輸送するRab32およびRab38の不活性化因子GAPの色素細胞における機能解析
片岡　健	岡山理科大学理学部 臨床生命科学科	准教授	創薬のための毛嚢を有する*in vitro*人工皮膚モデルの開発
木戸　博	徳島大学疾患酵素学研究センター 生体防御・感染症病態代謝研究部門	特任教授	皮膚顆粒細胞の活性化とタイトジャンクション修復による皮膚バリア機能増強とアトピー・アレルギーの発症予防
久原　篤	甲南大学理工学部 統合ニューロバイオロジー研究所	准教授	皮下組織のコラーゲンが体の温度適応に与える影響
倉岡　功	大阪大学大学院基礎工学研究科 物質創成専攻機能物質化学領域	准教授	化学物質の新規リスク評価のためのライブシングルセル解析手法の開発
河野　望	東京大学大学院薬学系研究科 衛生化学教室	講師	皮膚アレルギーを制御するオメガ3由来脂肪酸メディエーターの産生・作用機構の解明

氏　名	所　属	職位	研究課題
鈴木　亮	名古屋市立大学大学院薬学研究科 生体超分子システム解析学分野	講師	皮膚ホメオスタシス制御に向けたアレルゲンセラピーの基盤研究とその応用
夏賀　健	北海道大学病院皮膚科	助教	皮膚加齢における基底膜蛋白の生理学的意義の解明
西村　智	自治医科大学分子病態研究部	教授	生体皮膚「質感」「機能」二光子イメージングによる化粧品作用の評価システムの確立
林　謙一郎	大阪大学大学院医学系研究科	准教授	皮膚の恒常性維持における転写補助因子MRTF-A/Bの役割
宮戸　健二	国立成育医療研究センター・ 研究所・再生医療センター	室長	クエン酸による細胞機能の調節機構：美容および美白、老化における役割
山下　富義	京都大学大学院薬学研究科	准教授	アレルギー性皮膚炎に対するナノ粒子化ヘパリンの抑制効果

第３分野：精神、文化に関する分野（６名）

氏　名	所　属	職位	研究課題
奥田　逸子	国際医療福祉大学三田病院 放射線診断センター	准教授	顔面加齢の評価のための画像解析手法の開発：主観的感覚的評価から客観的定量的評価へ
恒次　祐子	国立研究開発法人森林総合研究所 構造利用研究領域	主任 研究員	植物由来の香りが睡眠におよぼす影響の解明
徳田　克己	筑波大学医学医療系	教授	現代の子ども文化の中に見られる化粧の話題の分析と保護者と保育者の化粧に関する認識
野々村美宗	山形大学大学院理工学研究科	准教授	バイオミメティック触覚センシングシステムによる化粧料の使用感評価
村田　航志	福井大学医学部 組織細胞形態学･神経科学領域	助教	香りのなつかしさの神経メカニズム
森　悦秀	九州大学大学院歯学研究院	教授	新しい顔面3次元形状評価法の開発　―相同モデル化による顔面形状の特徴を定量化する試み―

２）国際交流助成（１件）

実施責任者	招聘者	目　的
大阪大学大学院 医学系研究科 教授 片山　一朗	Department of Dermatology, Heidelberg University Dr. Elke Weisshaar	痒み研究の第一人者である博士を招聘し、学会へ参加していただくことで、痒み研究の更なる深化を図る （第８回国際かゆみ学会：平成27年9月26日～ 30日　奈良春日野国際フォーラムにて）

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
稲垣　豊	東海大学医学部 基盤診療学再生医療科学	教授	第47回日本結合組織学会学術大会　平成27年5月14日～ 16日（コクヨホールにて） 目的：結合組織研究とマトリックス医学生物学の更なる発展

役　　員

平成 28 年 3 月 31 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　取締役会長
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	野呂　影勇	早稲田大学　名誉教授
理　事	廣部　雅昭	東京大学　名誉教授
理　事	山﨑　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	宮﨑　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.24／2016　　**非売品**

2016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室

©2016　　不許複製　禁無断転載