ごあいさつ

コーセーコスメトロジー研究財団の28冊目の研究報告書をお届けします。

本財団は、1990年、株式会社コーセーの創業者小林孝三郎により設立され、今年30周年を迎えます。この間、本財団がコスメトロジー（化粧品科学）の発展をめざして研究助成活動を滞りなく継続できましたことは、多くの関係者の皆様のご理解と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。

昨年には、コスメトロジー研究振興財団からコーセーコスメトロジー研究財団に名称を変更させていただいております。

化粧品科学は、医学、生理学、化学、薬学、心理学、社会学など幅広い学問領域を基盤に成り立っており、これら様々な専門分野の研究者が集って化粧品分野の研究に参画していただくことで、今日のコスメトロジーが形作られてきたといえます。

これまでに本財団が助成した研究テーマも、新素材や物性評価などの工学的なテーマから、皮膚科学・安全性をはじめとする医学・生命科学、さらには化粧心理や化粧文化に至るまで多種多様であり、それぞれ大変有意義な研究成果を発表していただきました。この活動を通して、本財団がコスメトロジーの発展に微力ながら貢献できましたことは、私どもの大きな喜びとするところでございます。

今回の報告書は、2017年度から2018年度に助成を受けられた先生方38名の研究報告を掲載しております。また、昨年秋の第30回表彰・贈呈式でご講演いただいた帝京大学の奥　直人先生の講演録、および、今回報告された先生方による所感「コスメトロジー研究助成を受けて」を掲載しています。

皆様には、この研究報告書 COSMETOLOGY 誌をご高覧いただきまして、コスメトロジーの更なる発展に向けてご活用いただきますことを願っております。

引き続き、本財団は、化粧品科学の発展のために、独創的で波及性ある研究テーマを積極的に助成してまいる所存でございます。

今後とも、皆様のますますのご協力とご支援をお願い申し上げます。

2020年9月

公益財団法人 コーセーコススメトロジー研究財団

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

・紫外光照射下での酸化チタン粒子からの活性酸素を制御するナノ構造コーティングの開発…… 4
広島大学大学院先進理工系科学研究科　犬丸　　啓

・シクロデキストリンを用いたサーファクタントフリーエマルションの安定化メカニズムの解明…… 9
明治薬科大学　井上　元基

・ナノ粒子の物性の違いが角層作用過程におけるナノ粒子と角層の相互作用に与える影響の検討
―放射光 X 線を用いたアプローチ― …… 14
静岡県立大学薬学部臨床薬剤学分野　内野　智信

・化粧くずれの低減を目的とした新規な非水素結合性有機ゲル化剤の開発…… 24
山口大学大学院創成科学研究科　岡本　浩明

・テラヘルツ波を用いた皮膚への化粧水浸透評価手法の開発…… 29
岡山大学大学院ヘルスシステム統合科学研究科　紀和　利彦

・テラヘルツ分光で切り拓く角質中に必要な水の“質”の解明…… 33
理化学研究所生命医科学研究センター　白神　慧一郎

・皮膚疾患に有効な新規骨格を有するビタミン D 誘導体の創製 …… 38
お茶の水女子大学基幹研究院自然科学系　棚谷　　綾

・撥水性、抗菌・抗ウイルス性、紫外線遮蔽性を併せ持つ新規酸化物固体材料の開発…… 43
東京工業大学物質理工学院　中島　　章

・化粧品原料の次世代スクリーニング用細胞の創製：ES/iPS 細胞の多重遺伝子加工…… 53
関西学院大学理工学部生命医化学科　平井　洋平

Ⅱ．生体作用、安全性に関する分野

・微弱紫外線による皮膚タイトジャンクションバリアの破壊機構の解明と保護化合物の探索…… 62
岐阜薬科大学　五十里　彰

・太陽光紫外線に暴露された毛髪の酸化度の X 線イメージングによる画像化 …… 68
東海大学工学部原子力工学科　伊藤　　敦

・イオン導入時の微弱電流による皮膚組織炎症への影響と安全性の検証…… 73
徳島大学大学院医歯薬学研究部　小暮　健太朗

・細胞の損傷や老化により生成する脂質過酸化物のバイオイメージング…… 77
東京大学大学院農学生命科学研究科　佐々木　栄太

・メラニン生成関連タンパク質における新規糖修飾の解析と応用への展開…… 83
慶應義塾大学理工学部応用化学科　清水　史郎

・革新的ハイブリッド型三次元ヒト皮膚モデルの開発…… 87
弘前大学大学院医学研究科生体構造医科学講座　下田　　浩

・ナノマテリアルによる細菌遺伝子発現の制御と感染調節…… 94
北海道公立大学法人札幌医科大学　白土　明子

・動物実験の 3Rs に寄与する化学物質の光安全性評価法の戦略的開発 …… 97
静岡県立大学薬学部薬剤学分野　世戸　孝樹

・プロシアニジン B2 による皮膚炎の治療効果の検証と抗炎症作用のメカニズムの解明 …… 105
信州大学農学部　田中　沙智

・皮膚細胞を保護するタンパク質の分泌機構の解明と分泌促進因子の探索…… 113
同志社大学生命医科学部　野口　範子

・加齢に伴う皮膚のステロイド合成系の変容が皮膚機能に及ぼす影響…… 119
昭和大学医学部生化学講座　原口　省吾

・ヒト未分化胎盤幹細胞を用いた合成香料の安全性評価システムの開発…… 124
東北大学大学院医学系研究科　樋浦　　仁

・皮膚保湿マーカー遺伝子 FABP5 の発現と機能制御機構の解析 …… 130
信州大学先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所　藤井　　博

・制御性 T 細胞による皮膚恒常性維持メカニズムの解明 …… 136
東京大学大学院薬学系研究科免疫・微生物学教室　堀　　昌平

・植物由来グルコシルセラミド中のスフィンゴイドジエンの構造特性と皮膚改善機能…… 140
神戸大学大学院農学研究科　水野　雅史、久世　雅樹

・カルシウムイオンの生体内観察・操作による KID 症候群の病態解析 …… 148
京都大学医学研究科皮膚科学講座　村田　光麻

・皮膚の酸化ストレス障害に対する間葉系幹細胞の治療効果と制御機構の解明…… 151
群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学　茂木　精一郎

・皮膚老化予防に寄与する新規オートファジー制御機構の解明…… 154
近畿大学薬学総合研究所　森山　博由

・表皮細胞間接着分子の発現増強条件と皮膚機能の総合的検討…… 158
慶應義塾大学医学部皮膚科学教室　山上　　淳

・プラズマローゲン型リゾリン脂質代謝系を基軸とした皮膚の恒常性と疾患調節の作用機序の解明…… 162
徳島大学大学院社会産業理工学研究部（生物資源産業学域）　山本　　圭

・化学物質のアレルギー感作性 in vitro 評価法の開発…… 167
東京医科大学医学総合研究所免疫制御研究部門　善本　隆之

・栄養補助食品として使用されるレスベラトロールならびにエクオールのチロシナーゼ酸化物
による pro-oxidant 活性…… 175
藤田医科大学医療科学部　若松　一雅

Ⅲ．精神、文化に関する分野

・香りの文化と法的保護…… 186
九州大学芸術工学研究院　麻生　　典

・化粧品原料オイルとしてのパーム油の可能性と課題…… 191
関西大学商学部　小井川　広志

・懐かしい香りを用いた回想法の効果検証および脳メカニズム解明…… 199
東北大学加齢医学研究所　大場　健太郎

・生物・化学と経営の異分野融合による若年層男性に求められる化粧品に関する研究…… 204
宇部工業高等専門学校物質工学科　廣原　志保、根岸　可奈子

・顔面神経麻痺患者に対するメーキャップ治療の有効性の検討…… 208
北海道大学大学院医学研究院耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室　藤原　圭志

・化粧がもたらす社会的効用 ―その神経基盤を探る…… 211
福島県立医科大学医学部システム神経科学講座　藤原　寿理

・ハイブリッド相同モデルによる result-oriented な顎顔面手術シミュレーション法の開発…… 217
九州大学大学院歯学研究院口腔顎顔面病態学講座口腔顎顔面外科学分野　山田　朋弘

■記念講演

・第 30 回表彰・贈呈式記念講演
「リポソーム研究の魅力」…… 225
帝京大学薬学部長・教授　奥　　直人

■コスメトロジー研究助成を受けて・…… 235

■付　録

事業報告書　…… 261
2019 年度　研究助成を受けられた方々　…… 263
役員一覧　…… 266

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

紫外光照射下での酸化チタン粒子からの活性酸素を制御するナノ構造コーティングの開発

広島大学大学院先進理工系科学研究科

犬丸　啓

Coatings with a unique nanostructure was applied to the surfaces of titanium oxide (TiO_2) particles, and the reaction of active oxygen inside the nano channels was traced using methyleneblue (MB) dye molecules as a probe under UV irradiation. Titanium oxide particles were covered with mesoporous silica (MPS) and 6-O-palmitoyl-L-ascorbic acid (PAA, an active oxygen scavenger) molecules were retained inside the nano channels of MPS. Under UV irradiation active oxygen were generated by TiO_2 and the consumption of MB reflects the competitive reaction with PAA and MB. In this study we could intentionally retain the hydrophobic organic molecules in the nanostructured coatings and succeeded in detecting the reaction of active oxygen by using a small organic molecules as a reaction probe.

1．緒　言

酸化チタンはエネルギーギャップが約3.0eVの半導体であり紫外光を吸収するため、化粧品等において紫外光吸収剤としてすでに多用されている。酸化チタンは、無毒であり化学的にも安定である優れた紫外光吸収剤であるが、高い光触媒活性をもつことが紫外光吸収剤としては欠点となる。酸化チタンが紫外光を吸収すると、価電子帯から電子が伝導帯へ励起されその電子が還元反応を、価電子帯に生成した正孔（ホール）が酸化反応を表面で引き起こす。水溶媒中では、溶存酸素が還元された超酸化物イオン（O_2^-）、水酸化物イオン（OH^-）が還元されたヒドロキシラジカル（·OH）などのいわゆる「活性酸素」が生成するといわれている。さらに過酸化水素（H_2O_2）のような酸化剤となる分子の生成も報告されている[1)]。このような化学種は、有機物分子を酸化分解する作用をもつので、これを利用して例えば水中有機物分子の分解除去・水の浄化への応用が研究されている。一方、化粧品に関しては、基剤中の有機分子を分解変質させてしまうため光触媒作用は逆に問題となる。これを防止する対策の一つが、酸化チタン粒子表面をシリカ（SiO_2）などの皮膜で被覆し表面を不活性化することである。しかし、表面をSiO_2で単純に被覆して「活性酸素」の生成を完全に抑制することは必ずしも容易ではない。SiO_2被覆により、生成する化学種（O_2^-, ·OHとH_2O_2）の割合が変化し、シリカ被覆によりむしろ反応性の高い·OHやO_2^-の生成量・生成速度が増加するという報告もある[1)]。

我々は、表面の化学修飾による光触媒の機能制御という観点から長らく研究を行ってきた。酸化チタンの光触媒作用に有機分子を選んで分解する分子選択性を付与することに、粒子状の酸化チタンでは初めて成功した[2-5)]。我々のこれらの研究をきっかけとして、この新しい研究分野が形成されその後大きく発展した[6,7)]。シリカによる表面被覆においては、直径3nmの円筒状細孔（ここではナノ細孔と呼ぶことにする）が規則的に（ハチの巣のように）並んだ多孔質材料（メソポーラスシリカとして知られる）で酸化チタン粒子を包含した複合体（図1）を開発し、アルキルフェノール類の光触媒的分解に分子選択性を発現することを報告した[3-5)]。

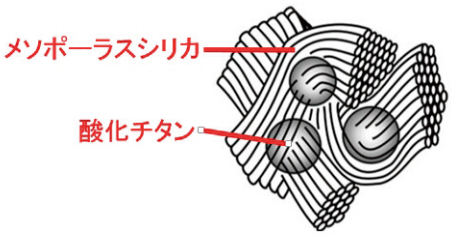


図1　MPS-TiO_2の構造の模式図

本研究では、コスメティック材料として貢献できる、メソポーラスシリカの特異な細孔構造を利用した新しい材料開発の可能性を検討することを目的とする。一つのメルクマールとして、「活性酸素」の生成を制御するためのナノレベルで構造が設計されたコーティングの可能性を探るため、抗酸化剤となる有機物を組み込んだナノ構造コーティングの合成を行いその構造を調べた。さらに、プローブ分子としてメチレンブルー（MB）を用い、「活性酸素」との反応を観測することにより、ナノコーティングの作用機序に関する考察を行った。これにより，コスメティック新材料開発に貢献できる学理構築に資することを目的とした。

2．方　法

市販の酸化チタン（TiO_2）粒子（P25）にゾルゲル法によりシリカを被覆した試料SiO_2/TiO_2と、さらにそれをメソ

Designing nanostructured coating of TiO_2 particles for control of active oxygen release under ultraviolet irradiation

Kei Inumaru

Graduate School of Advanced Science and Engineering, Hiroshima University

ポーラスシリカ（MPS）により包含被覆した複合試料MPS-SiO_2/TiO_2（図2）を調製した。さらに，この複合体に、抗酸化剤として知られる6-O-パルミトイル-L-アスコルビン酸（PAA）分子をナノ細孔内に保持させた試料の合成を試みた。反応性を調べる対象有機分子として、シリカに対する吸着性の高いメチレンブルー（MB）を用いた。空気を十分バブリングした所定の濃度の300 mLのMBもしくはフェノール水溶液に試料を酸化チタン成分が10 mgになる量を分散し、暗所で1 h撹拌し吸着平衡に到達させたのち、ブラックライトにより波長365 nmの光を照射し、有機物の濃度の経時変化を上澄みのUV-Vis測定により追跡した。

3．結果と考察

3．1．ナノ構造コーティング試料の合成

種々の粒子をMPSで包含する我々の技術を活用して、従来、TiO_2粒子を直接MPSで包含したMPS-TiO_2（図1）を合成してきた。これに加えて、本研究ではさらに構造の異なる3種類のナノ構造コーティングを施した試料を合成した。

図2にそれらの構造模式図を示す。まず、ゾルゲル法によりシリカコーティングしたTiO_2（SiO_2/TiO_2）を合成した。次に、このSiO_2/TiO_2粒子の外側をMPSで被覆包含した構造を構築した。この構造を以下、MPS-SiO_2/TiO_2と称する。この場合、最下層のSiO_2には多数のミクロ細孔が開いており、TiO_2の光触媒作用により生成する「活性酸素」が通り抜けて、MPSのナノ空間細孔中に拡散してくる。そこで、本研究では、さらにこのナノ細孔壁に、疎水性の抗酸化剤であるPAAを吸着保持させた「複合ナノ構造コーティング」を試みた。合成の目的は、MPS-SiO_2/TiO_2の粒子外にはほとんどPAAの固体が析出することなくナノ細孔内にPAA分子を均質に吸着保持させることにある。これにより、細孔内に保持したPAA分子の「活性酸素補足」の効果を測定することができる。PAAの保持の方法として、種々の溶媒にPAAを溶解させ、MPS-SiO_2/TiO_2と混合し、その混合物を蒸発乾固またはろ過洗浄する方法を試行錯誤した。蒸発乾固法では、種々の混合比を検討したものの、どの試料でも粉末X線回折測定でPAAの結晶の回折ピークが観測され、MPS-SiO_2/TiO_2粒子の外部にPAAの固体が析出していた。種々の溶媒、条件検討の結果、アルコールと水の混合溶媒にPAAを溶解しMPS-SiO_2/TiO_2と混合、洗浄した試料で、PAAの細孔内保持に成功した。

3．2．ナノ構造コーティング試料の解析

図3に、MPS-SiO_2/TiO_2および、PAAを吸着保持した試料（以下、PAA-MPS-SiO_2/TiO_2と称する）の77 Kでの

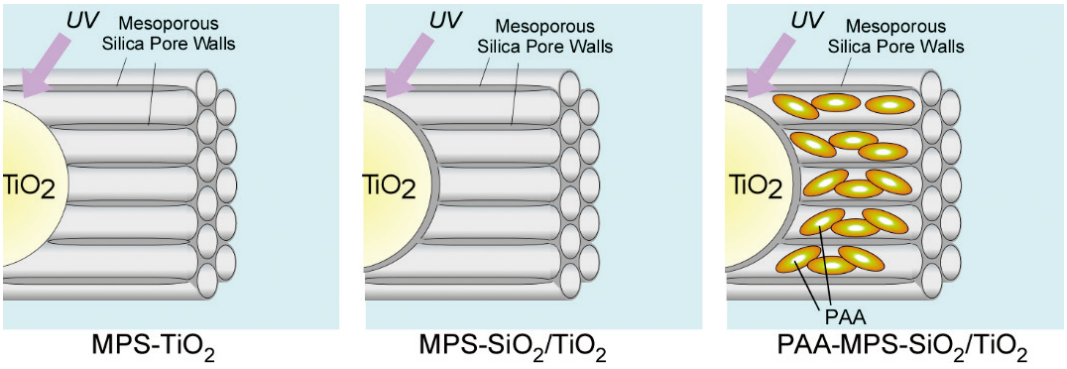


図2　本研究で構築したナノ構造コーティングの構造の模式図

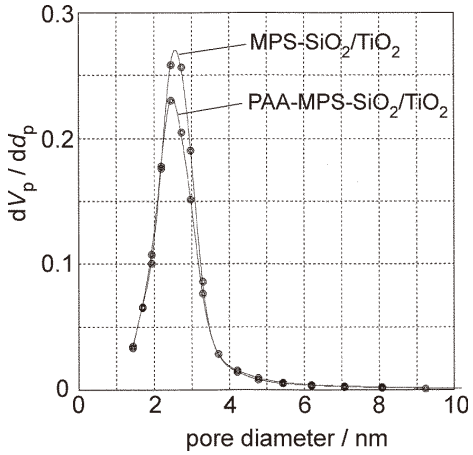


図3　各試料の窒素吸着等温線から BJH 法により求めた細孔径分布

窒素吸着等温線をBJH法で解析して得た細孔径分布を示す。細孔直径10nm 以下を拡大して示してあるが、これより大きな細孔径の位置には両試料ともに全く細孔がない。MPS-SiO_2/TiO_2が細孔直径2.7nm の位置にシャープなピークを与えていること、それに比べて、PAA-MPS-SiO_2/TiO_2は細孔容量が減少し、明らかに細孔径分布のピークが小さい方へシフトしている。細孔径の減少は、細孔内へのPAA分子が吸着保持されたことを示している。αsプロットから求めた細孔容積は、MPS-SiO_2/TiO_2およびPAA-MPS-SiO_2/TiO_2の細孔容積はそれぞれ0.352および0.312cm^3g^{-1}となり、PAAの導入により細孔容積が大きく減少している。ここで問題になるのは、試料に導入されたPAAのうち、どれくらいの割合が細孔内に保持されているか、である。PAAの添加により全重量が増えれば、見かけ上、試料重量あたりの細孔容積が減少する方向に変化する。細孔内に入っているPAAのみを正確に定量することには困難が伴うが、分析と考察の結果、試料に導入されたPAAの大部分が細孔内に保持されているとの結論に達した。すなわち、PAAの密度をパルミチン酸の値0.85gcm^{-3}と置けば、細孔内へのPAA吸着量と細孔外のPAA存在量の比と細孔容積の減少量の関係が導ける。これと細孔径の変化の大きさ、および外表面積が両試料でほとんど同じである事実をすべて説明できることとして、MPS-SiO_2/TiO_2に対して重量で約3%のPAAが試料に導入され細孔内に吸着保持されていると考えられた。PAA-MPS-SiO_2/TiO_2の粉末X線回折測定ではPAAの結晶が観測されないこともこの結論と矛盾しない。以上のことから、図2に示したMPS-SiO_2/TiO_2およびPAA-MPS-SiO_2/TiO_2のナノ構造コーティングを実現することができたことが分かった。

3. 3. MBをプローブ分子とした「活性酸素」との反応の追跡

まず、MBの水溶液を用いて試料への吸着を調べた。MBについて、TiO_2, SiO_2/TiO_2およびMPS-TiO_2への吸着等温線を測定した。TiO_2にはMBはほとんど吸着しなかった。SiO_2/TiO_2には多量のMBが吸着し、吸着等温線はLangmuir型吸着式でフィッティングできた。SiO_2の等電点は約2であるので、中性に近い今回の反応条件ではSiO_2は負に帯電していると考えられMBはカチオン性の色素分子なので、静電的な相互作用によりSiO_2表面にMBが多量に吸着しLangmuir型の吸着等温線を示すことは理解できる。一方、MPS-TiO_2 は表面積がはるかに大きいにもかかわらずこの試料へのMBの吸着はSiO_2/TiO_2への吸着より大幅に少なく、Langmuir型には従わないことが分かった。このことから、MPSのナノ細孔内では、MB分子は、細孔壁に強く捉えられることなくルーズに保持されていると考えられる。そのため、MPS細孔内のMB分子の反応速度を測定することは、ナノ細孔内での「活性酸素」のプローブとして好適であると考えられる。

次に、実際に光照射下におけるMB分解反応速度の測定を行った。図4がその結果である。コーティングしていないTiO_2を含め、MPS-TiO_2、MPS-SiO_2/TiO_2、そしてPAA-MPS-SiO_2/TiO_2についての結果を示してある。図4(a)が濃度の経時変化、(b)がその一次プロットである。まず、時間0minにおけるMB濃度の差について考察する。これは、試料をMB水溶液に投入後、吸着平衡に到達させるよう時間をおいてから測定した値であり、従って、初期濃度1×10^{-5}mol dm^{-3}との差が吸着量の目安になる。TiO_2にはMBはほとんど吸着しない。実際、時間0minにおいて、初期濃度の低下はTiO_2では見られない。MPS-TiO_2、MPS-SiO_2/TiO_2では、ある程度の吸着が見られ、MB分子がMPSの細孔空間へ濃縮されていることが分かる。前述の通り、この場合の濃縮は、MPS細孔内壁への吸着というよりは、ナノ細孔空間にルーズに捉えられていると考えられる。ただし、細孔容積で吸着量を割り付けると、この2つの試料においてもバルク溶液に比べて大幅に濃縮されていることになる。

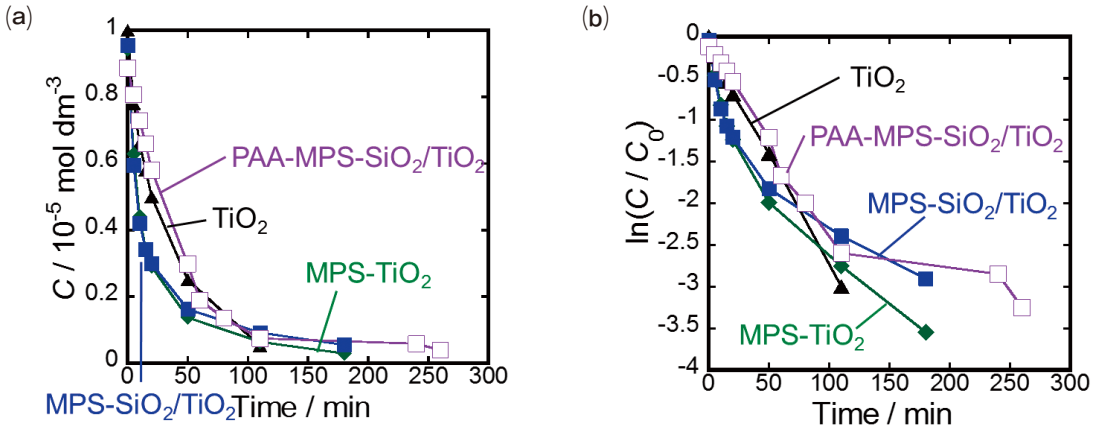


図4　メチレンブルー水溶液中の(a)濃度経時変化とその(b)1次プロット

一方、PAA-MPS-SiO_2/TiO_2の0minのMB濃度を見ると、ここで調べた試料の中で、一番濃度変化が大きい。つまり、MBの吸着性としては、

TiO_2 << MPS-TiO_2, MPS-SiO_2/TiO_2, < PAA-MPS-SiO_2/TiO_2

の序列となる。PAAのナノ細孔への吸着保持により、MBの吸着が促進される効果があることが分かる。すなわち、MB分子はPAA-MPS-SiO_2/TiO_2のナノ細孔空間において、PAA分子と共存しながら高い濃度まで濃縮されていることになる。吸着量の比較から、細孔内でのMB分子濃度は、MPS-SiO_2/TiO_2と比べてPAA-MPS-SiO_2/TiO_2の場合かなり高くなっていることになる点に注目しておく必要がある。

さて、このような状態において、光の照射を開始した場合、TiO_2から放出される「活性酸素」がナノ細孔空間に拡散してきたとき、TiO_2粒子近傍にあるPAA分子とMB分子とで「活性酸素」との反応における競争反応になると考えられる。すなわち、MBが細孔内で「活性酸素」と反応すれば、そこで消費されたMBに相当する量のMBが細孔外から吸着平衡により供給され、外部の溶液のMB濃度減少として観測される。PAAが「活性酸素」と反応すればその分「活性酸素」が消費されMBの反応速度が低下するので、このMBの反応速度は、細孔内PAAと「活性酸素」の反応速度を反映するプローブとなる（もちろんMB分子の存在の影響を受けたうえでの速度、という意味である）。

MBの反応速度について、初速度とその後の経時変化を区別して考えることが重要である。MBが光触媒から放出された「活性酸素」と反応すると完全に無機化（CO_2と水まで完全に分解されること）するまでに中間生成物を経ることになり、その中間生成物の酸化分解にも「活性酸素」が使われる。反応初速度は中間生成物が存在しないため「PPA vs MB」の「活性酸素」との競争反応の速度を正確に反映する。一方、その後の反応速度の経時変化は、ナノ細孔空間の中での反応場としての状況に関する別の情報を与えると考えるのが良い。

図4(a)の経時変化のうち、初速度を比較すると、MPS-TiO_2とMPS-SiO_2/TiO_2の初期速度は同等であった。これは、下層のSiO_2層の有無でMBの分解初速度が変化していない、ということになり、今回合成した下層のSiO_2下層の有無は「活性酸素」の生成速度にはほとんど影響していないことを示唆する。SiO_2下層がミクロ細孔を有しそこを通って「活性酸素」が拡散してくるものと考えられる。さて、PAAをナノ細孔内に吸着保持した試料すなわちPAA-MPS-SiO_2/TiO_2のMB反応初速度は、MPS-TiO_2とMPS-SiO_2/TiO_2の5分の1程度まで低下した。

MPS-SiO_2/TiO_2とSiO_2下層がミクロ細孔を有しそこを通って「活性酸素」が拡散してくるものと考えられる。この場合、MB分子がその細孔に入っているかは不明であるが、PAA分子はそのミクロ細孔に入れない大きさであることは明らかである。従って、この点は、両者の競争反応においてMB分子にどちらかというと有利に働くであろう。このことを考慮すると、この競争反応において細孔内に吸着保持したPAAが「活性酸素」のスカベンジャーとしての大きな効果を発揮していると解釈することができる。

一方で、解釈が複雑な実験事実が2点ある。それは、(1)前述のPAAの効果があるにもかかわらずPAA-MPS-SiO_2/TiO_2のMB反応初速度は、TiO_2単味のそれとほとんど差がないこと、さらに、(2) PAA-MPS-SiO_2/TiO_2の経時変化の特徴もTiO_2と似ていること、である。(1)については、理由を定量的な証拠と共に明示することは現段階のデータだけでは困難であるが、今回用いたMB分子がPAA-MPS-SiO_2/TiO_2のナノ細孔空間の深くまで侵入可能な程度の大きさの分子であることから、粒子外に放出される「活性酸素」量という観点ではTiO_2との直接の比較をすべきではなく、その検討をするためには細孔に侵入できないくらい大きな分子径をもつプローブ分子で比較するのが良いことに注意すべきである。つまり、細孔内部を反応場とした場合においてもPAAの効果が大きく表れているという図4(a)の解釈は成り立つと考えられる。一方、(2)については、さらに複雑である。図4(b)は、図4(a)のデータを対数軸とした、いわゆる1次プロットである。MPSで包含被覆したナノ構造をもつ2つの試料 MPS-TiO_2、MPS-SiO_2/TiO_2は1次プロットが、反応初期には直線に乗るが、反応が進むにつれ下に凸に湾曲してくる。これは、従来の我々の解釈は、MBが酸化された中間生成物のナノ細孔内での濃度が上昇してくると、「活性酸素」がその中間生成物の更なる酸化分解にも使われるので、MBの反応速度が1次反応から外れて減速する、TiO_2の場合は中間生成物がバルク溶液中へ拡散希釈されるのでその影響が少ない、というものであった。実際、MBの分解反応が進むにつれ、反応液のUV吸収スペクトルの吸収の形が変化し短波長側にシフトする変化が観測されている。今回、PAA-MPS-SiO_2/TiO_2とTiO_2の1次プロットが、反応率が高い領域でも直線性を保つという両者の類似性は、我々の従来の解釈の改訂を迫る結果かもしれない。すなわち、MBの分解の中間生成物の蓄積が、MPS-SiO_2/TiO_2などでは起こるが、PAA-MPS-SiO_2/TiO_2では起こらない、といったことがない限り従来の考えの延長で説明することは難しい。この点に関しては、今後の検討を要する。

4．総　括

酸化チタン（TiO_2）粒子の表面に、特異なナノ構造を有するコーティングを施し、色素分子（MB）をプローブ分子とした活性酸素との反応の追跡を行った。特異なナノ構造

とは、酸化チタン粒子をメソポーラスシリカ（MPS）で包含被覆し､そのナノ細孔空間に活性酸素スカベンジャー（あるいは抗酸化剤）の役割が期待される 6-O-パルミトイル-L-アスコルビン酸（PAA）分子を吸着保持させた構造である。種々の方法を系統的に検討した結果、PAA 分子をナノ空間に導入保持させることに成功した。この試料を用い、光照射下で生成する「活性酸素」と MB の反応を、MB 濃度の経時変化を追跡することによりモニターした。MB は、PAA を保持した試料においてもナノ細孔に侵入可能であり、MB 濃度変化は、ナノ細孔空間の内部における PAA と MB の「活性酸素」との競争反応の結果、すなわち、ナノ細孔空間の奥深くで起こっている反応の状況を反映している。本研究により、ナノ細孔空間に意図的に疎水性の有機分子を保持し、酸化チタンから生成する活性酸素と反応させることができ、その効果を他の有機小分子をプローブとして用いて検出することができることを実証した。小分子が侵入しない構造の合成・構築まで至らなかったことから、当初の目標として掲げた粒子外部において「活性酸素の放出を完全に抑制する」ことができているか、を検証するまでには、それを可能とする大分子径のプローブ分子の設定ができなかったため至らなかった。しかし、本研究で得られた知見は、ナノ構造を設計したコーティングによる活性酸素種の反応制御とそのモニターの実証例として、コスメティック材料の設計開発に資するものであると信じている。

本研究は広島大学大学院生であった定森早紀氏、同じ研究室の同僚の片桐清文教授との共同研究である。

（引用文献）

1）J. Oguma, Y. Kakuma, S. Murayama, Y. Nosaka, *Appl. Catal. B*, **129,** 282-286（2013）.
2）K. Inumaru *et al., Appl. Catal. B*, **52**, 275-280（2004）.
3）笠原，犬丸，山中，第 42 回セラミックス基礎科学討論会 1F-04（2004）; 特許第 5194249 号.
4）K. Inumaru *et al., Chem. Commun*., 2131-2133（2005）.
5）K. Inumaru *et al., J. Mater. Chem.,* **21**, 12117-12125（2011）.
6）M. A. Lazar and W. A. Daoud, *RSC Adv.,* **3**, 4130-4140（2013）.
7）J. Kou *et al*., *Chem. Rev.,* **117**, 1445-1514（2017）.

シクロデキストリンを用いたサーファクタントフリーエマルションの安定化メカニズムの解明

明治薬科大学
井上　元基

Surfactants are essential to prepare emulsions. However, some kinds of surfactants show adverse effects on the human body or environments. Consequently, many researchers are attempted to prepare emulsion without use surfactants called surfactant-free emulsions. Emulsion stabilized by cyclodextrins has been reported by many researchers in 90 s. Although these reports focus on preparation and application for practical use, improving the physical property of the emulsion has many problems due to a lack of the formation mechanism. In this study, the formation mechanism of emulsion using cyclodextrin as emulsifier was investigated by physicochemical and spectroscopic methods. Water in oil type emulsion was prepared in the case of the use of hydrophobic group modified cyclodextrin. From the stability tests and droplet size measurements, the emulsion was destabilized by creaming. The surfaces of droplets were covered with precipitates by cryo-SEM observation. Therefore, this emulsion was classified as Pickering emulsion, which defined as stabilized by adsorption of solids on the surface of the droplets. In the second section, α-cyclodextrin was used as an emulsifier that forms the inclusion complex with oil molecules. We focused centrifuge precipitates in the oil in water type emulsion. From Raman spectra, centrifuged precipitates and absorbed at the surface of droplets showed similar spectra. From the PXRD, precipitates and original cyclodextrins showed different patterns. Therefore, the precipitate at the surface on the droplets derived from cyclodextrins and related to form the emulsions.

1．緒　言

一般にエマルションの調製には界面活性剤の使用が不可欠である。しかし、界面活性剤の種類によっては、人体に対して悪影響をおよぼすものや高い環境負荷のものもある。そのため、界面活性剤を使用しないサーファクタントフリーエマルションの開発が望まれている。シクロデキストリン（CD）はグルコースがα-1,4結合した環状オリゴ糖で内側に疎水部を有する。外側は親水性であるため高い水溶性をもち、疎水部の内洞が疎水性化合物を包接することにより包接複合体を形成する。CDと油分子が包接複合体を形成し、親水部を水相、疎水部を油相に吸着することで液滴を安定化するためエマルションを形成すると考えられてきた[1]。しかしながら、液滴の安定化にはCD由来の析出物の析出が不可欠であるため、固体が油／水界面に析出することで形成されるPickeringエマルションであることがわかっている[2]。これまでの検討では、エマルションの形成には固体の存在が不可欠であることはわかっているものの、油／水界面における固体の化学的な性質の直接的な解明はなされていない。本研究は、CDを乳化剤としたエマルションの実用化に向け、分光光学的手法を用いて基礎物性を明らかにすることを目的とした。

Formation mechanism of surfactant-free emulsion stabilized by cyclodextrins

Motoki Inoue
Meiji Pharmaceutical University

2．方　法

2．1．試　薬

αおよびβ-CDは、日本食品化工㈱製のものを減圧乾燥（100℃, 12h）した。*n*-octane、*n*-dodecaneおよび*n*-hexadecaneは、関東化学㈱製の特級品をそのまま使用した。疎水化CDとしてheptakis（2, 3, 6-tri-O-propanoyl）-β-CD（以下、TP-β-CD）を選択し、Hirayamaらの方法に従い、β-CDをピリジン中で無水プロピオン酸と反応させることにより調製した[3]。

2．2．エマルションの調製

所定量のCD、水および*n*-alkane類をホモジナイザー（10000 rpm, 5分間）で撹拌しエマルションを調製した。25℃恒温下、1時間静置後の相状態を目視および光学顕微鏡観察し、三成分系状態図を作成した。なお、エマルションの型の判別は電気伝導度法および希釈法により行った。

2．3．安定性試験および液滴粒子径の測定

バイアルに入れたエマルションを25℃恒温下にて静置し、経時的にエマルション相の高さを測定することで評価した。エマルションの粒子径は、エマルションの光学顕微鏡写真を元に、ImageJを用いて計測した。

2．4．クライオ走査型電子顕微鏡および偏光顕微鏡観察

エマルションの液滴表面の状態はクライオ走査型電子顕微鏡（SEM）により観察した。エマルションを試料ステージに挟み込み、液体窒素中（−196℃）に突入させ急速凍結

させ物理的な固定を行った。ステージに挟み込まれた試料を、クライオユニット内で割断処理し、クライオSEM（JSM-6301F、日本電子㈱製）の加速電圧を12kVに設定し、断面を観察した。エマルションの液滴表面は偏光顕微鏡により観察した。

2.5. エマルション中に生じた析出物の粉末X線回折（PXRD）測定

10000rpm、30minでエマルションを遠心分離した後、生じた析出物を減圧乾燥させ測定試料とした。試料をSi単結晶製の無反応試料プレートに充填し、粉末X線回折装置（Miniflex、理学電機㈱製）Cu-kα線（30kV, 15mA）を用いて走査速度4°/minで測定した。

2.6. ラマンスペクトル測定

ラマン分光装置は光源波長785nmレーザー、スペクトル分解能4cm^{-1}のWork Station™（Kaiser Optical Systems）を用いた。なお、レーザー出力は400mW、露光時間は1sとした。

3. 結　果

3.1. エマルション液滴の安定性

疎水性CD誘導体であるTP-β-CDを乳化剤としてエマルションを調整すると油中水（W/O）型となった。Figure 1はエマルションの経時変化を示す。この検討では、調製直後のW/O型エマルションの高さを100%とし、残存するエマルションの割合を百分率で表した。エマルション割合は7日後まで徐々に低下し、それ以降ほぼ一定値を示した。なお、この検討では連続相である*n*-alkaneのみの分離がみられた。その分離の傾向は鎖長により異なり、短いものほどエマルションの安定性が低いことが明らかとなった。

Figure 2はエマルション中液滴の粒子径の経時変化を示す。いずれの*n*-alkaneを用いた場合も直径50-60μmの液滴が確認された。その大きさは*n*-alkaneのアルキル鎖長によってわずかに異なり、*n*-octane>*n*-dodecane>*n*-hexadecaneの順に粒子径が大きかった。エマルションの不安定化に合一が認められず連続相の分離のみであること、液滴の平均粒子径は調製28日後までほとんど変化がないことから、TP-β-CDを用いたエマルションの不安定化は、主にクリーミングにより引き起こされることが明らかとなった。

3.2. エマルション液滴表面の観察ならびに表面化学的特性

液滴断面を視覚的に明らかにするためにエマルションを凍結後に割断し、走査型電子顕微鏡（SEM）で直接的に液滴表面を観察した。Figure 3は液滴表面のクライオSEM像を示す。液滴径は100μm程度で液滴表面の一部に卵殻状の析出物が吸着していることを確認した。このことより、TP-β-CDを乳化剤として用いたエマルションは、油／水界面に吸着した析出物により安定化するものと考えられた。

エマルション中の析出物により油および水へのぬれ性が異なる理由について詳細に調べるため、表面自由エネルギーγ_sを算出した。ここで、γ_sは分散力成分（γ_s^d）と極性力成分（γ_s^p）の2成分に大別され[4, 5]、2種の物質同士の各成分の値が近いほど物質間に相互作用が働きやすいといわれている。なお、析出物のγ_s^dおよびγ_s^pは、分散力成分および極性力成分が既知のプローブ液体を用いて接触角を測定し、以下のFowkesの式（式(1)）により算出した。

$$\gamma_{SL} = \gamma_S + \gamma_L - 2\sqrt{\gamma_S^d \gamma_L^d} - 2\sqrt{\gamma_S^p \gamma_L^p} \quad (1)$$

ここで、γ_{SL}は液体と固体の界面張力、γ_Lは液体の表面

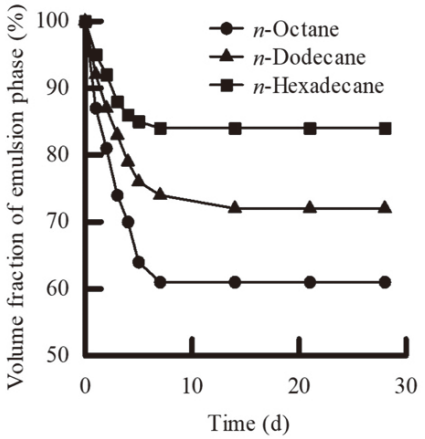


Figure 1　Volume fraction of the W/O emulsion phase for 4 weeks. Weight ratio of the emulsion is *n*-alkane/TP-*β*-CD/water= 0.4/0.2/0.4.

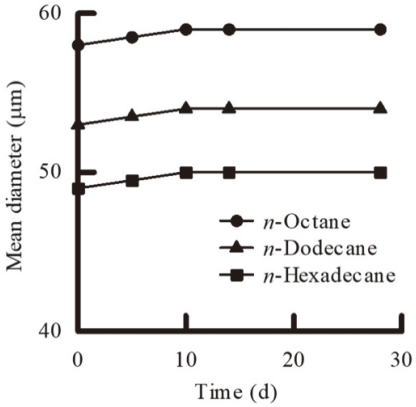


Figure 2　Time course of the water droplet size in the W/O emulsions. Weight ratio of the emulsion is *n*-alkane/TP-*β*-CD/water= 0.4/0.2/0.4.

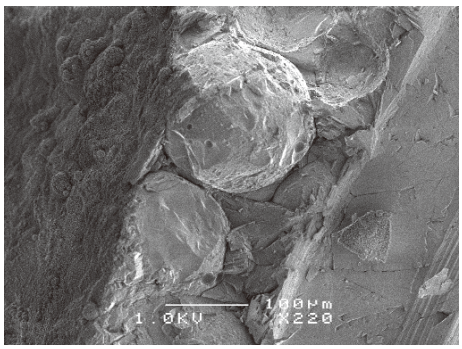


Figure 3　Cryo-SEM images of W/O emulsion. Weight ratio of the emulsion is *n*-alkane/TP-*β*-CD/water= 0.4/0.2/0.4.

張力、γ_s^dおよびγ_s^pはプローブとして用いた液体の表面張力の分散力成分および極性力成分である。Figure 4 はTP-β-CDを用いたエマルション中析出物のγ_s^dおよびγ_s^pの値を示す。*n*-alkaneの鎖長の増加に伴って析出物のγ_s^p値は減少し、γ_s^dは増加した。これはTP-β-CD由来の析出物が*n*-alkaneの影響を受け、分散力が高まり極性力が小さくなったと考えられる。

3．3．エマルション中析出物の分光光学的な分析

油と包接化合物を形成しやすいα-CDを用い、*n*-alkaneエマルションについて検討を行った。α-CD水溶液の上に*n*-alkaneを積層すると油/水界面に目視で確認できる程度の白濁を確認した。Figure 5 は*n*-octane/水界面の偏光顕微鏡像であり、α-CD由来不溶性析出物は複屈折を示した。したがって、この析出物は結晶性の化合物であることがわかった。

ここで生じた析出物を採取し、ラマンスペクトルを測定した。Figure 6 はエマルションを遠心分離により収集した析出物、*n*-octane/水界面に生じた析出物および原料であるα-CDのラマンスペクトルを示す。α-CDのスペクトルは複数のピークを有しており、特徴的な形状であった。一方、いずれの析出物のスペクトルにもα-CD由来のピークは確認されず、1350 cm^{-1} 付近の幅広いピークのみが確認された。油／水界面に生じた析出物はα-CD結晶ではなくCDとオクタンによる包接複合体であることが推察された。

さらに結晶について詳細な検討を行うためエマルションを遠心分離して得られた析出物を乾燥し、PXRD測定した。いずれの析出物もCD単独のX線回折パターンとは異なる

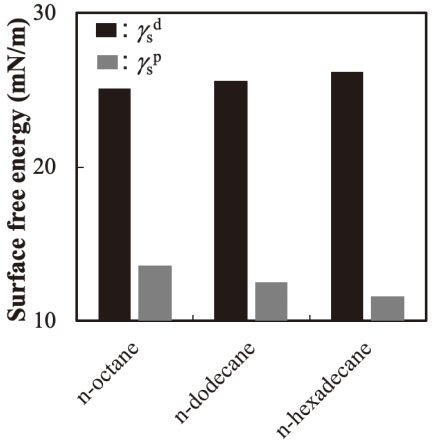


Figure 4　Dispersion force component (γ_s^d) , and polar force component (γ_s^p) of precipitates in *n*-alkane/tripropanoyl β-CD/water systems at 25℃. The precipitates were centrifuged from the emulsion consisting *n*-alkane/TP-β-CD/water= 0.4/0.2/0.4.

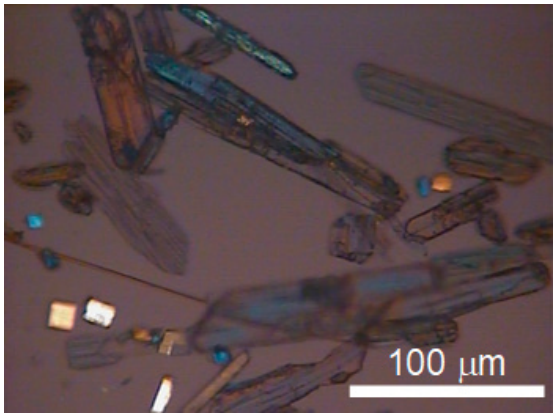


Figure 5　Polarized microscopic photographs of precipitates generated at the interface between *n*-octane and saturated α-CD solution.

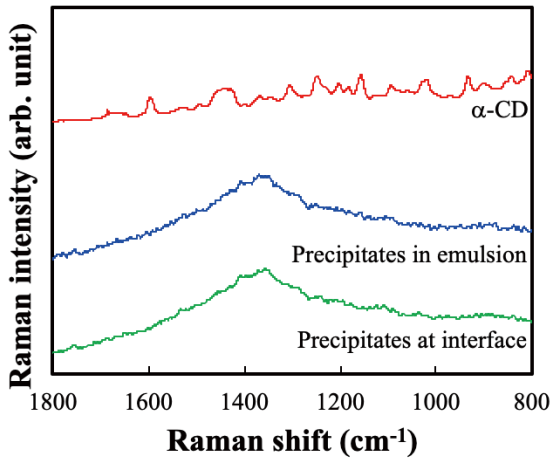


Figure 6　Raman spectra of precipitates and α-CD. The precipitate generated at the interface between *n*-octane and saturated α-CD solution and centrifuged from *n*-octane emulsion.

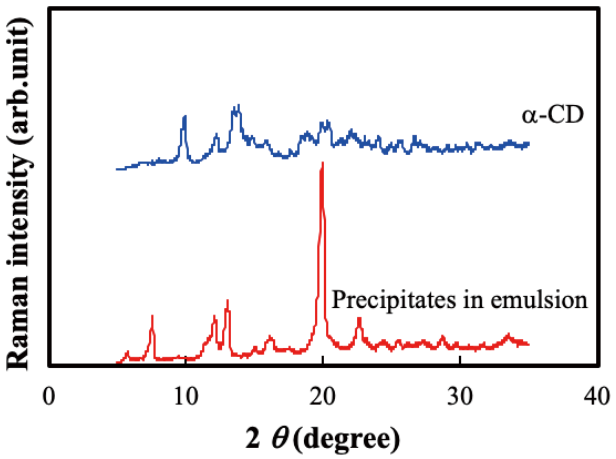


Figure 7　PXRD patterns of precipitates in emulsion and α-CD. The composition of the emulsion is 0.4/0.08/0.52 (*n*-octane / α-CD/water).

パターンを示したため、CD単独とは異なる結晶格子であることが示唆された。したがって、CDを用いたエマルション中の析出物はCD由来の包接錯体であることが確認された。したがって、シクロデキストリンを乳化剤としたエマルション形成にはα-CD単独ではなく包接複合体の結晶による寄与が大きいことが示唆された（Figure 7）。

4．考　察

CDを乳化剤として用いたエマルションは界面活性剤を使用しないサーファクタントフリーエマルションであるため、近年、基礎研究のみならず実用化に関する研究も行われている。Pavnovらはこのエマルションを「Cyclodextrinosome」と名付け、水／油界面に吸着した不溶性の包接複合体についてSEMならびに色素を使った染色による詳細な検討を行っている[6]。Leclecqらは抗真菌薬の基剤として応用するための検討を行い、従来の外用性基材と比較して遜色ないほど安定で、界面活性剤を乳化剤としたエマルションと比較して刺激も低いと報告している[7]。CDを乳化剤としたエマルションは香粧品のみならず外用剤としても有用であることが期待されるにも関わらず、実用化には至っていない。それはエマルションを形成した際の析出物の物性が明らかになっていないためである。本研究では疎水化CDおよび天然のCDを用いて、CDを乳化剤としたエマルションの形成メカニズムを詳細に検討した。W/O型エマルションの不安定化を検討したところ、油相の分離が徐々に起こるものの水相の分離は起こらなかった。したがって、このエマルションの不安定化は合一ではなく、クリーミングにより引き起こされていると推察された。液滴表面を観察したところ、油／水界面に析出物が見られPickeringエマルションであることが推察された。ZhangらはCDによるエマルションの形成は水／油界面張力の低下と不溶性複合体が形成するミクロクリスタルによる水／油界面への吸着によるPickeringエマルションの形成の2つのメカニズムにより安定化すると報告した[8]。しかしながら、Pickeringエマルションの場合、水と油の界面張力が大きいほど固体は油／水界面に吸着しやすくなる。ここで、仮にミクロクリスタルがエマルション形成に関与していれば、析出物を取り除き、残った水相と油相を再び撹拌することで、液滴が形成されると考えた。フィルター（孔径0.45μm）ろ過後、水相と油相を撹拌したが液滴の形成は見られなかった。したがって、本エマルションは主に固体が油／水界面に吸着することでエマルションを形成することが考えられた。析出物の油水界面でのぬれ性を評価するため、固体の表面自由エネルギーを算出した。エマルション調製に用いた*n*-alkaneの鎖長の増加に伴い分散力が増加するものの、極性力は低下した。これは*n*-alkaneの物性の傾向と一致しており、析出物は用いた油相の種類に影響されることが推察された。次に、油分子と包接複合体を形成するα-CDを用いて油／水界面で形成される析出物の直接的な観察を行った。偏光顕微鏡による観察では、油／水界面に複屈折を示す析出物の吸着が見られた。この結晶をエマルション状態で化学的に検討するため、ラマンスペクトルを取得した。エマルション中から沈殿として得た析出物および油／水界面に生じた析出物のスペクトルを比較すると、油／水界面に生じた析出物はα-CD結晶ではなくCDとオクタンによる包接複合体であることが推察された。したがって、シクロデキストリンを乳化剤としたエマルション形成にはα-CD単独ではなく包接複合体の結晶による寄与が大きいことが示唆された。CDを乳化剤として用いたエマルションはFigure 8に示すように固体微粒子が油／水界面に吸着して液滴を安定化すると考えられる。すなわち、油／水界面に吸着するあるいは析出し、液滴を覆い尽くすと、連続相に分散して3次元構造を形成する。塗布時に液滴の破壊が起こるため、油相を効果的に塗布ができるといった特徴があるため、クリーム性基剤として応用できる可能性がある。今後は析出物が生成する条件を検討することで、実用化に近づけると考えられる。

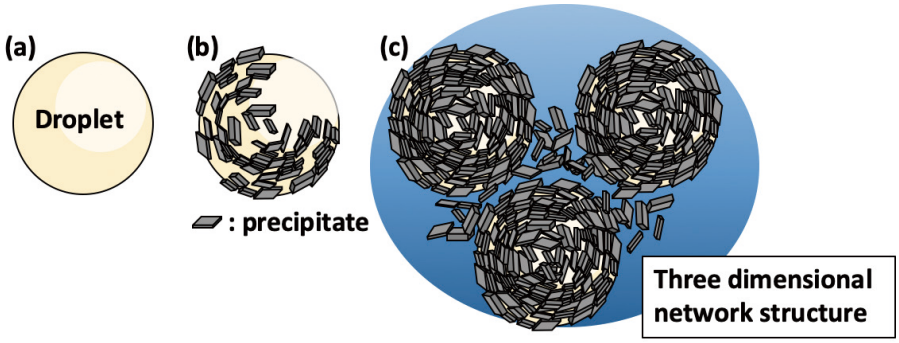


Figure 8　The formation mechanism of emulsion stabilized by cyclodextrins. (a) water or oil droplets, (b) precipitates generate and adsorb on the surface of droplets, (c) surface of the droplets were covered with generated precipitates and contributed to the formation of the three-dimensional network structure in the dispersed phase.

謝　辞

本研究の遂行にあたり、多大なるご支援をいただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に心より感謝申し上げます。

（引用文献）

1）Kazuko, S.; Kimiko, K.; Junko, I.; Takashi, N. *Food Science* **1992**, *57*, 655–656.
2）Inoue, M.; Hashizaki, K.; Taguchi, H.; Saito, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, *56*, 668–671.
3）Hirayama, F.; Yamanaka, M.; Horikawa, T.; Uekama, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 130–136.
4）Fowkes, F. M. *The Journal of Physical Chemistry* **1962**, *66*, 382–382.
5）Fowkes, F. M. *Industrial & Engineering Chemistry* **1964**, *56*, 40–52.
6）Mathapa, B. G.; Paunov, V. N. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2013**, *15*, 17903–17914.
7）Leclercq, L.; Nardello-Rataj, V. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2016,** *82*, 126–137.
8）Li, X.; Li, H.; Xiao, Q.; Wang, L.; Wang, M.; Lu, X.; York, P.; Shi, S.; Zhang, J. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2014**, *16*, 14059–14069.

ナノ粒子の物性の違いが角層作用過程におけるナノ粒子と角層の相互作用に与える影響の検討　―放射光 X 線を用いたアプローチ―

静岡県立大学薬学部臨床薬剤学分野

内野　智信

We have developed drug loaded nanoparticle formulations for the improvement of drug permeation across the skin. Recently, we have investigated drug permeation mechanism across the skin by synchrotron X-ray diffraction. In this study, phospholipid nanoparticles (PNs) containing vitamin C, 3-O-cetyl ascorbic acid (VCCE) were examined. Tocopherol acetate (TA) and sodium cholate (SC) were also loaded in PN formulations as model drug and charge inducer at a molar ratio of 20/80/5/6 (VCCE/Soya PC/SC/TA). Glycerol (GL) or diglycerol (DG) were also added to improve the skin accumulation of TA. Three TA loaded PNs (TA-PNs) were evaluated using a dynamic light scattering, Nuclear Magnetic Resonance (NMR), Transmission Electron Microscope (TEM), skin accumulation test for TA, and small-angle X-ray diffraction (SAXD) analysis. TA-PN formulations (150 nm) were stable for two weeks and they encapsulated 1.8 mg/mL of TA. TEM and SAXD analysis revealed that the nanoparticles formed a spherical multilayer structure. ^{1}H-NMR spectra indicated that GL and DG enhanced the proton mobility of choline groups of soya PC molecules located on the membrane surface of TA-PNs. TA accumulation in the dermis was increased by adding GL and DG. SAXD analysis revealed that GL and DG promoted the formation of new lamellar structures on the stratum corneum, which contributed to improving the skin accumulation of TA.

1．緒　言

薬物が角層を浸透する場合、薬物は細胞間脂質間の分配を繰り返しながら浸透していく（細胞ルート）のではなく、細胞間隙を浸透している（細胞間隙ルート）と考えられている。

これまでにこの角層のバリア能を効率的に突破する手法の一つとして、100 nm 程度の粒子径をもったナノ粒子に薬物を封入することにより、封入された薬物の皮膚浸透性を向上させる検討が多数行われているが[1-3]、薬物皮膚浸透性メカニズムの詳細は未だ議論の最中である[4]。

本研究の最終的な目的は、薬物輸送担体として有効性があるといわれており、一方において角層に浸透するかどうかに関する議論のあるナノ粒子が角層に作用する際に角層構造にどのような影響を与えているかについて、放射光を用いた小角広角 X 線散乱の時間変化測定により明らかにし、皮膚浸透性機構、さらに有効性を解明し、この分野の発展に資することである。

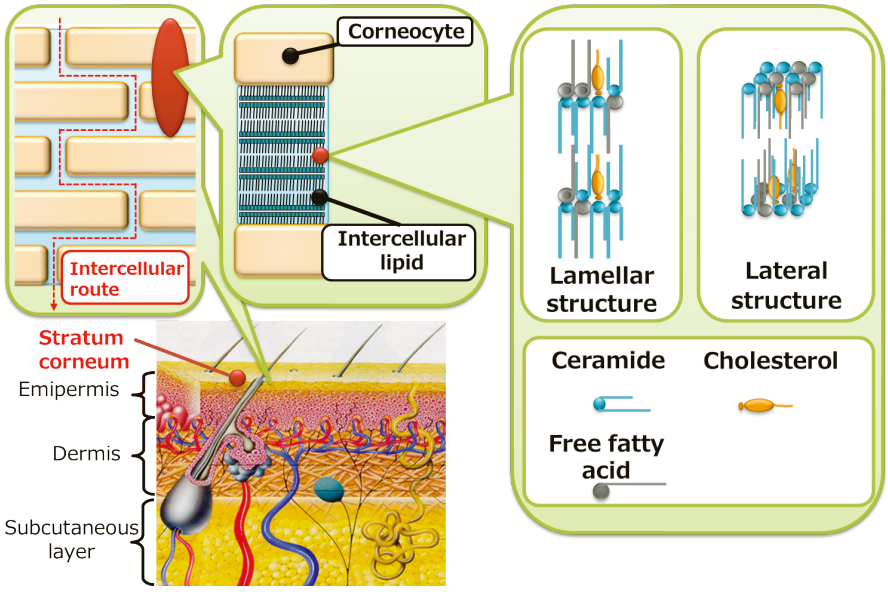


Fig. 1　Structure of stratum corneum and drug permeation route

角層の細胞間脂質は、主としてセラミド、脂肪酸、コレステロールからなり、自己組織化により規則性をもつラメラ構造を形成する。そのラメラ構造には周期が 13 nm の長周期ラメラ構造と 6 nm の短周期ラメラ構造が存在する。また、炭化水素の充填構造（ラテラル構造）として、六方晶（格子定数 0.42 nm）と直方晶（格子定数 0.42 nm、0.37 nm）が報告されている[5]。

これまでに我々は、二重層構造をもったベシクルをヒト角層に作用させた後の X 線散乱の時間変化測定を行ったところ、ナノ粒子は角層の細胞間脂質の短周期ラメラ構造と相互作用しており、角層浸透過程においてそれらの構造を乱すこと、ナノ粒子の弾力性が高いほうが短周期ラメラ構造の周期を伸長させる効果が大きいことを報告した[6]。封

Investigation of the effect of differences in physical properties of nanoparticles on the interaction between nanoparticles and the stratum corneum using X-ray diffraction

Tomonobu Uchino

Department of Clinical Pharmaceutics, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka

入薬物の皮膚浸透性を改善するナノ粒子は、弾力性は同程度でも、用いる界面活性剤の物性により薬物の浸透性が異なることが明らかにされている[3)]。これは、ナノ粒子の構成成分によってナノ粒子が角層を浸透する過程におけるナノ粒子と角層の相互作用が異なることに由来すると推察されるが、その詳細は明らかとなっていない。

そこで本申請では、引き続き放射光X線の時間変化測定を用い、ナノ粒子の物性の違いが角層作用過程におけるナノ粒子と角層の相互作用に与える影響の検討を行うことを目的の中心として研究を行った。本報告書においては、ビタミンC誘導体膜であるビタミンCセチルエーテル（VCCE）と大豆由来のホスファチジルコリン（Soya PC）からなるリン脂質ナノ粒子（phospholipid nanoparticles: PNs）の構成成分として配合し、ビタミンE誘導体であるトコフェロールアセテート（TA）を封入薬物に用いたナノ粒子、その粒子にグリセロール（GL）およびジグリセロール（DG）粒子を添加したPNsを角層に作用させた事例について報告する。なお、報告するPNsの物性の違いを明確にするために、一部放射光X線回折測定以外のデータを紹介させていただくことをご容赦頂きたい。

2．方　法

2．1．試　料

ビタミンC誘導体であるVCCEは日光ケミカルズ株式会社より供与された。ビタミンE誘導体であるTAはSigma-Aldrichより購入した。膜の構成成分として用いたSoya PCは，Lipoid GmbH（Ludwigshafen，Germany）より供与された。電荷誘起剤として用いたSodium cholate（MW 431）は、和光純薬工業株式会社（Tokyo, Japan）より購入した。ポリオールであるGLおよびDGは、阪本薬品工業株式会社（Osaka, Japan）より供与された。その他の試薬は、特級品を用いた。

2．2．TA-PNsの調製方法

TA-PNsは、これまでの我々が用いてきた手法を改変し[2, 3, 7)]、薄膜法により調製した。あらかじめ調製したVCCE、Soya PC、SC、TAのエタノール溶液をVCCE/Soya PC/Sodium cholate/TAのモル比が20/80/5/6になるよう混合した後、ロータリーエバポレーターを用いて減圧下、40℃で有機溶媒を除去した。得られた薄膜に0.1% EDTA-2Na含有50mMクエン酸緩衝液（pH5.0）を加えてバス型ソニケーターを用いて超音波処理を5分間行い、薄膜を懸濁させた後、Extruderを用いて懸濁液を孔径100nmのポリカーボネートフィルターから押し出す操作を10回行い、TA-PNsを調製した。GLおよびDGを添加する場合は、再分散溶媒として0.1% EDTA-2Na含有50mMクエン酸緩衝液（pH5.0）にそれぞれを30%添加したものを用いた。

2．3．TA-PNsの形状観察

各TA-PNsの形状の観察を目的に、ネガティブ染色法にて透過電子顕微鏡（TEM）（HT-7700, 日立製作所）観察を行った。各TA-PNsをフォルムバール膜貼付メッシュ（日新EM株式会社）に5μL滴下し、5分間静置後水分を拭き取り、次に1%モリブデン酸アンモニウム溶液を5μL滴下し、1分間静置したのち1時間乾燥した後、TEMを用いて観察を行った。観察時の加速電圧は80kVとした。

2．4．TA-PNsの平均粒子径、PDI、ゼータ電位の測定

各TA-PNsの平均粒子径、PDI、ゼータ電位は、Zetasizer Nano ZX（Malvern Instruments Ltd.）を用いて動的光散乱法（dynamic light scattering：DLS）により調製から2週間後に測定した。全ての製剤は、0.1% EDTA-2Na含有50mMクエン酸緩衝液（pH 5.0）を用いて50倍希釈した後、測定を行った。ゼータ電位は同一の機器を用いてレーザードップラー電気泳動法により測定した。

2．5．TA封入率の決定

各TA-PNsに封入されているVCCEおよびTAの封入率の測定には、0.1mL用のSlide-A-Lyzer™ MINI Dialysis Device（カットオフサイズ：2000, Thermo Fisher Scientific Inc.）を用いた。透析膜上部に各TA-PNsを充填した。各TA-PNsの透析液はそれぞれの製剤の再分散溶液4.2mLを5mLのポリプロピレンチューブに充填し、先の製剤を充填したSlide-A-Lyzer™ MINI Dialysis Deviceをセットし、室温で2時間透析処理を行った。透析後のそれぞれの溶液に含有しているVCCEおよびTAを下記のHPLC法により定量した。VCCEおよびTAの封入率は透析後薬物量（the amount of drugs after dialysis）および透析前薬物量（the amount of drugs before dialysis）を用いて、次式により算出した：

$$\text{薬物封入率 EE\%} = \left(\frac{\text{the amount of drugs after dialysis}}{\text{the amount of drugs before dialysis}} \right) \times 100$$

2．6．^{1}H-NMR測定

各TA-PNsの^{1}H-NMRは、JEOL ECA-500（日本電子株式会社）を用いて、共鳴周波数500 MHzで測定した。全ての測定は、ヒトの平均的な皮膚表面温度と同様の32℃で行った。Relaxation delayは5秒、積算は100回で測定した。Data pointは16384とした。試料調製は2．2．の方法に準じて行い、再分散溶液には軽水の代わりに重水を使用した。

2. 7. TAの*in vitro*皮膚浸透性試験および皮膚貯留性試験

*In vitro*皮膚浸透試験にはユカタンマイクロピッグ（YMP）を用いた、YMP皮膚膜は角層側をドナー側、真皮側をレシーバー側となるようにしてフランツ拡散セル（有効拡散面積：0.38cm^2）に装着した。ドナーコンパートメントに各製剤500μLを適用し、レシーバー溶液として30%エタノール含有PBS（pH7.4）5.0mLを使用した。試験中、レシーバー溶液はスターラーで連続的に撹拌し、恒温送水ポンプを用いて温度を37℃に保った。皮膚に製剤を適用した後、ドナーコンパートメントをパラフィルムで覆い、閉塞（occlusive）条件にした。皮膚透過性試験では、0、1、2、4、6、24時間ごとにレシーバー相より200μL溶液を採取し、採取後に同量のリザーバー溶液を補充した。貯留性試験では、24時間後の適用部位の皮膚（0.38cm^2）を使用した。実験後に皮膚上の適用製剤を十分にふき取った後、皮膚をスライドグラスに挟み、60℃で12分間加温し、表皮と真皮に分離した[8]。表皮と真皮をそれぞれチューブに入れ、内部標準物質を含むエタノール溶液（Ergocalciferol 5μg/mL）を1.0mL加えた。その後、ホモジナイザー（IKA ULTRA-TURRAX®T10，IKAジャパン株式会社）を用いてホモジナイズし、10000rpmで10min遠心分離を行い、上清を採取後フィルター（TORAST Disc SyringeFilter，疎水性PTEEメンブレン，直径13mm，孔径0.45μm）でろ過し、HPLCを用いてTA量を測定した。

2. 8. HPLCによるVCCEおよびTAの定量

HPLCシステムは、ポンプ（LC-20AD，島津製作所）、オートインジェクター（SIL-20AC，島津製作所）、UV検出器（SPD-20A，島津製作所）、解析システム（CBM-20A，島津製作所）から構成されているものを使用した。カラムはTSK-gel ODS-100Z 3μm（100 × 2.0mm，東ソー株式会社）、ガードカラムはTSK-gel guardgel ODS-100Z 3μm（10 × 2.0mm，東ソー株式会社）を使用した。移動相は、メタノール（0.1% トリフルオロ酢酸）：水（0.1% トリフルオロ酢酸）を97：3（v/v）の比率で用いた。流速は0.2mL/min、UV波長は285nmと設定し、カラム温度は40℃とした。この条件におけるTAの保持時間は10minであった。内部標準物質としてErgocalciferol（測定波長245nm）を用い、内部標準法によりTAの濃度を算出した。

2. 9. 放射光X線回折測定

測定は、兵庫県の大型放射光施設「SPring-8」のビームラインBL40B2（構造生物学）を使用した。X線回折プロファイルは、30cm×30cmのイメージングプレートを使用した。

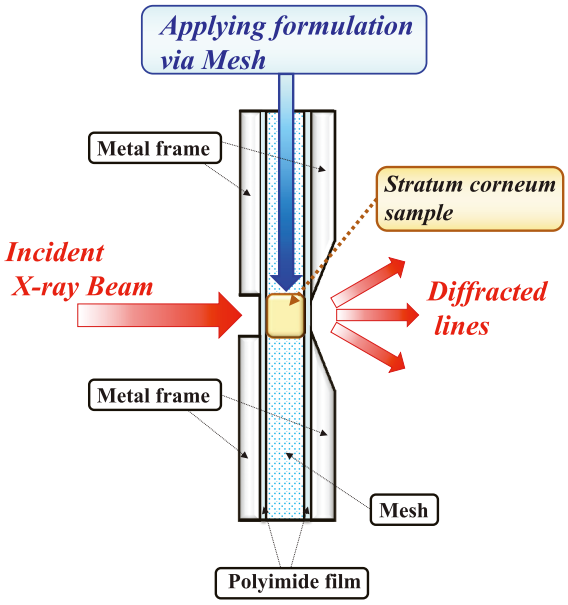


Fig. 2　Schematic image of sample measurement using solution cell

測定は、八田らの開発した「溶液セル」を使用した[9]（Fig. 2）。

TA-PNsの処方のX線回折測定の場合には、製剤を溶液セル内に注入し、TA-PNsのX線スペクトルの測定を行った。サンプルのX線の露光時間は5秒とした。

TA-PNsと角層の相互作用解析の場合、溶液セルの中央部に約1 × 2cmの高水和（78.8% w/w）または低水和（22.3% w/w）のヘアレスマウス角層（数mg）を充てん後、X線回折装置にセットした後、シリンジ部分に処方溶液を作用させ、適用から30分後までは1.5分ごと、30分後から123分後までは3分ごとX線を測定し、製剤適用後の経過時間に伴った角層および、ベシクルの構造変化を測定した。サンプルのX線の露光時間は5秒とした。なお、Fig. 8（c）および（d）では、得られたプロファイルのS=0.1nm^{-1}のピークから、積分強度および半値幅を算出し、サンプル適用後の経過時間に対してプロットした。

3. 結果および考察

3. 1. TA-PNsのキャラクタリゼーション

Table 1に調製した3種類のTA-PNsの粒子特性を示した。

調製したTA-PNsの平均粒子径は105.1 ～ 131.6nmで、PDIは0.13以下の値であったことから、調製したナノ粒子は均一な分散系として存在することが示された。また、調製した各製剤のゼータ電位は－0.04 ～ 0.22mVと、絶対値は小さいが調製直後と調製から2週間後の間に変化はなく、安定な粒子として存在することが示された。各TA-PNsのTA封入率は94.0～95.9%と高値を示した。このことから、PNs中に薬物を十分に封入できたことが確認された。また、ポリオール未添加の系とくらべると、GLやDG

添加に伴い平均粒子径が小さくなっていた。このことから、ポリオールはTA-PNsの粒子径に影響を与えているものと推察された。

Fig. 3 に調製したTA-PNsのTEM写真、Fig. 4 にそれらのSAX測定の結果を示した。

Fig. 3 の結果から、粒子は球状の多重層構造をしていることが確認でき、Fig. 4 で示したSAX測定の結果もTEMの結果と一致していた。また、観察した粒子の粒子径は、動的光散乱法で測定した結果とほぼ一致していた。次に、Table 1 で示したポリオールが各TA-PNsに与える影響について検討するため、各TA-PNsの ^{1}H-NMRスペクトル測定を行った。その結果をFig. 5 に示した。

Table 1　Particle characterization of TA-PNs formulation (n=3)

Formulation name	Composition (Soya PC/CA/SC/TA)	TA Concentration (mg/mL)	Z-average (nm) d.nm ± SD	PDI ± SD	Zeta potential (mV) ± SD	Entrapment efficiency (%) of TA
TA-PNs	80/20/5/5	1.8	131.6 ± 1.3	0.086 ± 0.005	-0.04 ± 0.15	95.9 ± 7.1
GL-containing TA-PNs	80/20/5/5	1.8	121.7 ± 3.6*	0.130 ± 0.027	0.22 ± 0.24	95.9 ± 5.1
DG-containing TA-PNs	80/20/5/5	1.8	105.1 ± 0.7**, ***	0.096 ± 0.017	0.14 ± 0.13	94.0 ± 9.5

Values represent the mean ± SD (n = 3),
*p < 0.05 versus TA-PNs, **p < 0.05 versus DG-containing TA-PNs, ***p < 0.05 versus GL-containing TA-PNs

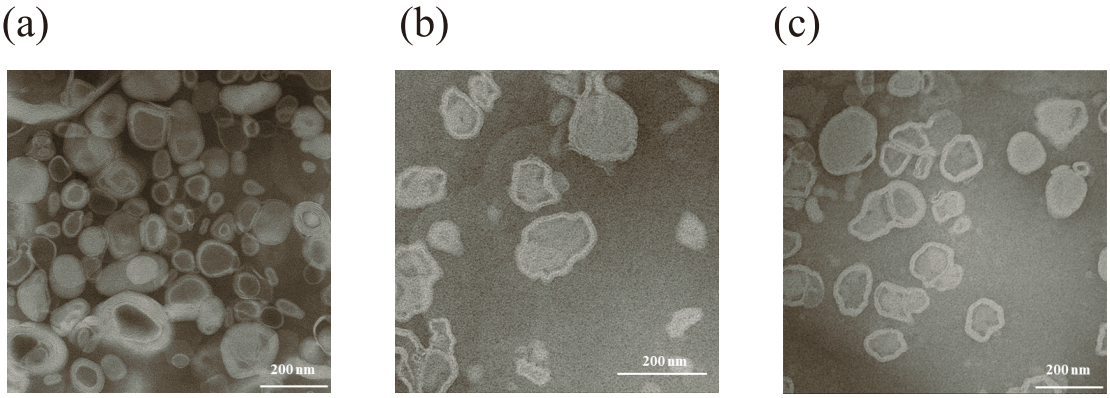


Fig. 3　TEM images for (a) TA-PNs, (b) GL containing TA-PNs, (c) DG containing TA-PNs.

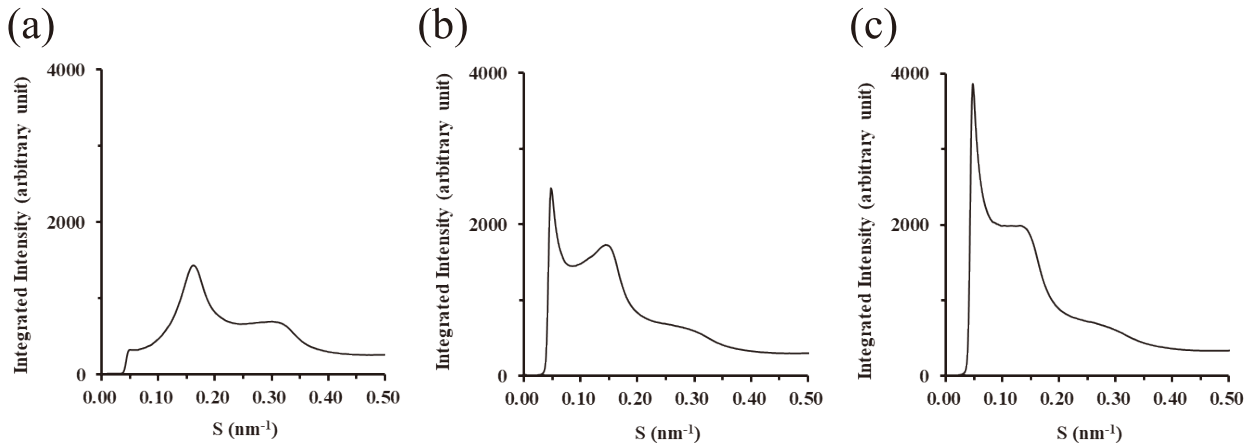


Fig. 4　Small angle X-ray diffraction (SAXD) profiles of (a) TA-PNs, (b) GL-containing TA-PNs, and (c) DG-containing TA-PNs

Soya PCのCD_3OD各溶液のNMRスペクトルの結果から、3.2ppmのシグナルはSoya PCのコリン基の末端のメチル基のプロトン由来であるものと帰属された。各製剤でコリン基の末端のメチル基のプロトンのケミカルシフトは異なっており、GL添加TA-PNsおよびDG添加TA-PNsではシグナルがシャープになっていることが観察され、TA-PNsとはメチル基のプロトンの運動性に違いがあることが認められた。また、DG添加TA-PNsはGL添加TA-PNsにくらべピーク強度が強く、DGの方がGLにくらべ、メチル基のプロトンに与える影響が強いことが推察された。

以上の結果から、TA-PNsの脂質膜表面で起こっている現象の模式図をFig. 6に示した。

Fig. 6に示したように、GLおよびDG分子はTA-PNsの膜表面においてSoya PCのO-P基と相互作用することにより、コリン基の端末のメチル基の運動性を高め、脂質膜表面の流動性を向上させることが推察され、またその効果はDGで特に強いことが推察された。

以上Table 1およびFig. 3～6の結果から、調製した3種のTA-PNsの物性はそれぞれ異なるものと推察された。

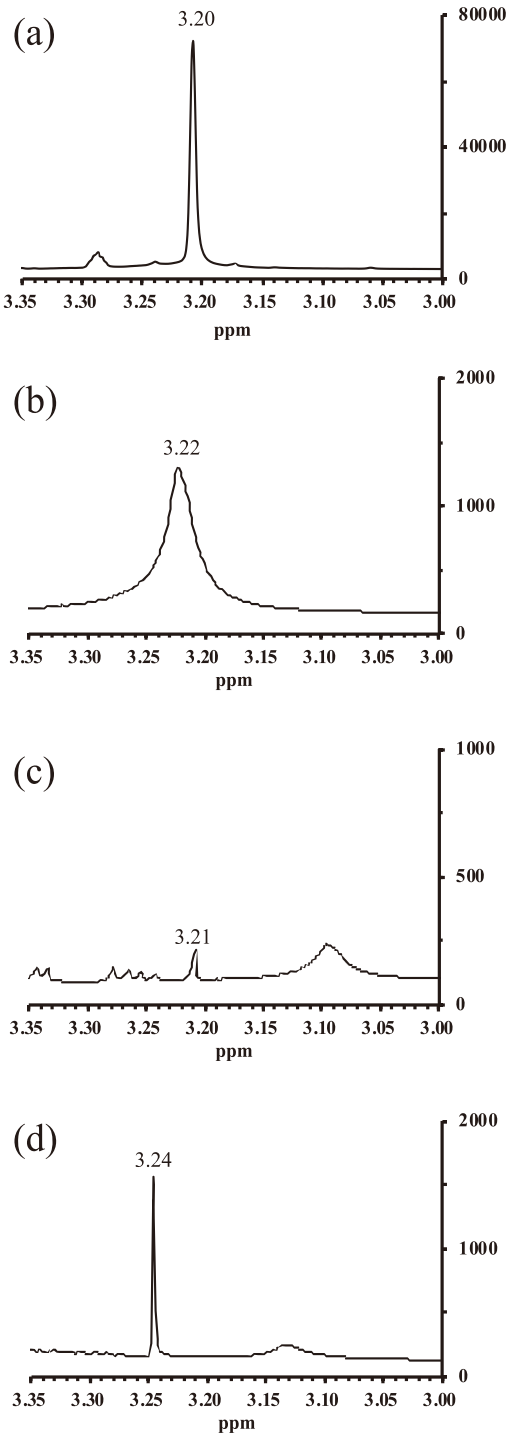


Fig. 5 ^{1}H NMR spectra of methyl region in (a) Soya PC CD_3OD solution, (b) TA-PNs, (c) GL containing TA-PNs and (d) DG containing TA-PNs.

3. 2. 各TA-PNsからのTAのYMP皮膚貯留性評価

各製剤適用から0、1、2、4、6、24時間後の各レシーバー相のTAの濃度をHPLCによって測定したところ、全てのサンプルにおいてTAは検出されなかった。このことから、TAは脂溶性が高いため、24時間では皮膚透過が起こりにくいことが推察された。次に、皮膚重量で補正した適用24時間後のTAの真皮および表皮における皮膚貯留量を測定した。その結果をFig. 7に示した。

Fig. 7の結果から、TAの表皮への貯留量については各製剤間で有意差は見られなかった。しかし真皮への貯留量については、対照群に対し、GL添加TA-PNsおよびDG添加TA-PNsで有意差が見られたのに加え、TA-PNsとDG添加TA-PNsの間にも有意差が見られた。このことから、TA-PNsへのDGの添加により、封入薬物であるTA

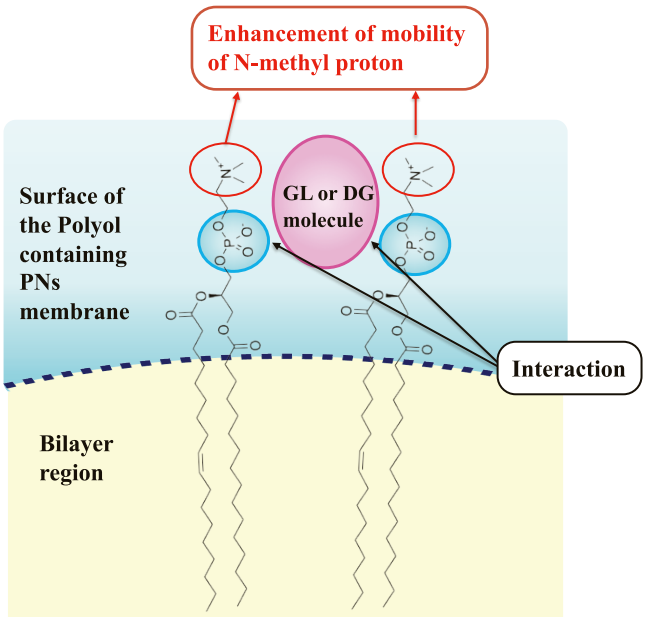


Fig. 6 Speculated interaction between GL or DG and PC molecules in TA-PNs formulations

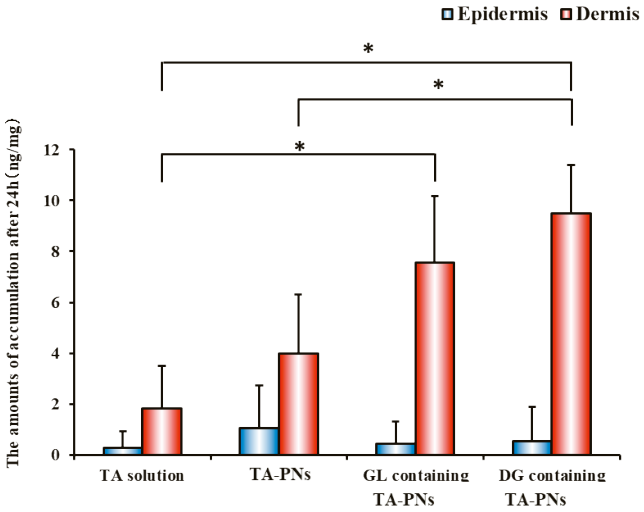


Fig. 7　TA amount in the epidermis and dermis of YMP skin after 24h of permeation study. (mean+S.D. (n=6), *p<0.05)

の皮膚貯留性を向上させることが可能となった。Phamらは、GLを角層に作用させた場合、角層の細胞間脂質と角層細胞の両方に作用し、それぞれの構成成分の運動性を上昇させることで、薬物の皮膚浸透性を向上させることを報告している[10]。DGに関しては、そのような報告はされていないが、DGはGLのダイマーであることから、類似の効果があるものと推察され、その効果はGLよりも強いものと示唆された。

3.3. 放射光X線を用いた角層浸透過程におけるTA-PNsと角層の相互作用評価

Fig. 8にヘアレスマウス角層およびヘアレスマウス角層に各TA-PNsを適用した後のSAXの時間変化測定の結果を示した。

Fig. 8(a)に示したように、◆で示した位置に、13.6nmの格子間隔をもつ長周期ラメラ構造の1～5次反射のピークが観察された。各TA-PNsを強水和角層に適用した際のSAX測定の結果を、Fig. 8(b)～(d)に示した。いずれの製剤を適用した際にも、青の矢印で示した$S=0.16\,nm^{-1}$付近のピーク強度が時間経過とともに減少していることが認められたが、この領域は長周期および短周期ラメラ構造に由来するピーク、そして赤で示した処方由来のピークがオーバーラップしているため、変化の解析は不可能であった。次に、緑の矢印で示した$S=0.31\,nm^{-1}$付近に長周期ラメラ構造の4次反射に由来するピークが認められた。また、製剤適用後に赤矢印で示した$S=0.10\,nm^{-1}$付近では、時間経過に伴いピーク強度の上昇が見られた。特にGL添加TA-PNsおよびDG添加TA-PNsではその作用が強く、新たなピークが出現していた。我々は、これまでにsucrose-laurate esterを基盤としたベシクルを非閉塞系でYMP皮膚に適用した際、処方中の水分の蒸発に伴ってベシクル構造がラメラ構造に変化することを報告している[3]。今回の事例は溶液セル中での実験であり、製剤適用後の水分の蒸発は伴わないものの各TA-PNsをヘアレスマウス角層に作用させることによって角層上で多重層のベシクル構造がラメラ構造へ変化しているものと推察された。Fig. 8(c)および(d)における赤矢印で示した$S=0.10\,nm^{-1}$付近の積分強度および半値幅の時間経過に伴う変化を、Fig. 9に示した。

Fig. 9(a)に示したように、積分強度については、123分後のピーク強度はDG添加TA-PNsではGL添加TA-PNsに比べ、約2倍となっていた。このことから、角層と製剤の接触面がDG添加TA-PNsではGL添加TA-PNsにくらべ約2倍の広さになっていることが推察された。半値幅についてはどちらの製剤においても時間経過に伴う変化が見られなかった。このことから、角層上での製剤の積層の高さには差がないことが推察された。

Fig. 10にヘアレスマウス角層に各処方適用後の広角X線の時間変化測定の結果を示した。

Fig. 10(a)においては、炭化水素の充填構造(ラテラル構造)として、$S=2.4\,nm^{-1}$および$2.7\,nm^{-1}$に六方晶(格子定数0.42nm)と直方晶(格子定数0.42nm、0.37nm)に由来するピークが観察された。各TA-PNsを角層に適用した場合、報告されている溶液セル中に処方が満たされることによってベースラインの上昇が認められたものの、ピーク位置や半値幅に変化は認められなかった。よって、これらのTA-PNsは、ラテラル構造に影響を与えないことが推察された。次に、TAの真皮への貯留に及ぼす角層の水和状態の影響について検討するために、低水和量ヘアレスマウスの角層を溶液セルに装着し、Fig. 8と同様の実験を行った。その結果をFig. 11に示した。

しかし、高水和された角層にGLおよびDG添加TA-PNsで見られたベシクルからラメラ構造への転移は観察されなかった。このことから、Fig. 8で見られた積層には角層表面の水分子が関与しているものと推察された。さらに、Fig.12にTAを封入していない各PNsをヘアレスマウス角層に作用させた結果を示した。

いずれの系においても、ベシクルからラメラ層への相転移は観察されなかった。以上Fig. 8~12の結果から、TA-PNsのベシクル構造からラメラ構造への構造変化は角層上の水分とTAの浸透が関与しているものと推察され、Fig. 13に示したようなTAの角層への浸透メカニズムが推察された。

角層サンプルは水分含量が25%（w/w）で水和されることが報告されていることから、Fig. 8の高水和量の角層表面では多量の自由水が存在しているものと考えられる。よって、ベシクルが角層上に接触すると、角層上の自由水と

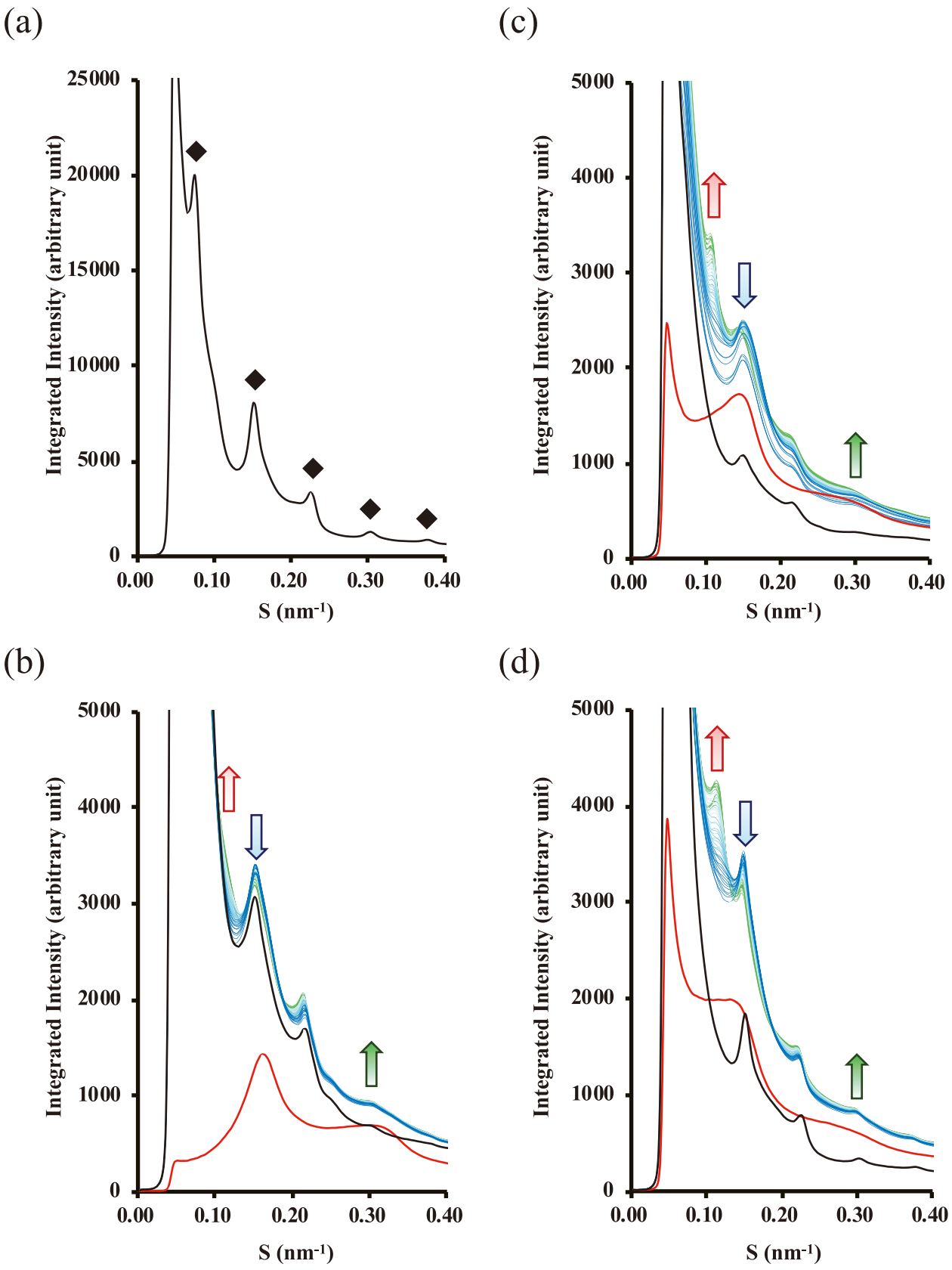


Fig. 8　SAXD profile by hairless mouse stratum corneum (a) and change in the SAX profiles after application of (b) TA-PNs, (c) GL containing TA-PNs and (d) DG containing TA-PNs for the strongly hydrated hairless mouse stratum corneum. Black and red line showed stratum corneum and each formulation, respectively. The change from dark blue to green indicate that of the SAX profile from 0 to 123 min.

Red allow in Fig. 8 (b), (c) and (d) shows the structure due to the new lamellar phase.

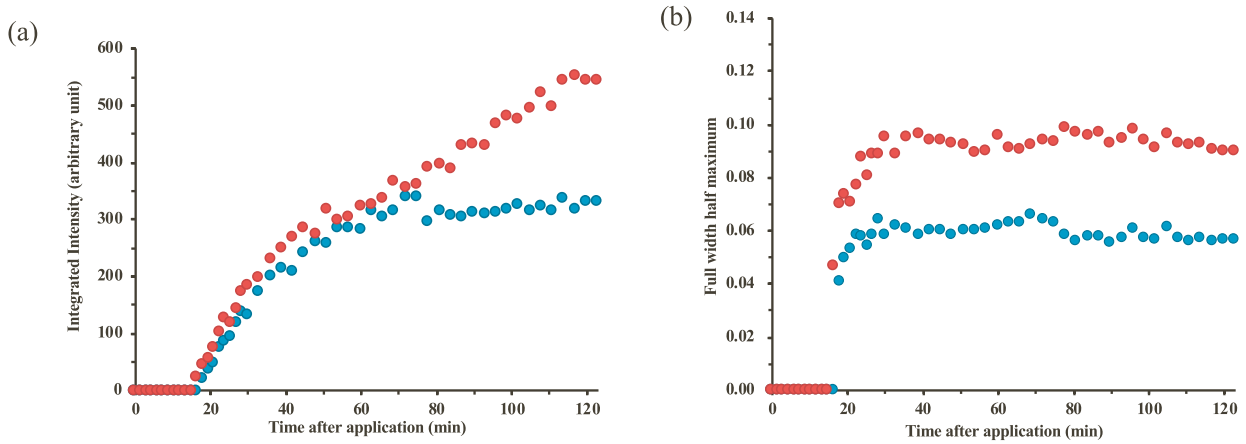


Fig. 9　Change in the (a) integrated intensity, and (b) full width half maximum for the peak at S=0.10 nm^{-1} in the SAX profiles after GL containing TA-PNs (●) and DG containing TA-PNs (●) application.

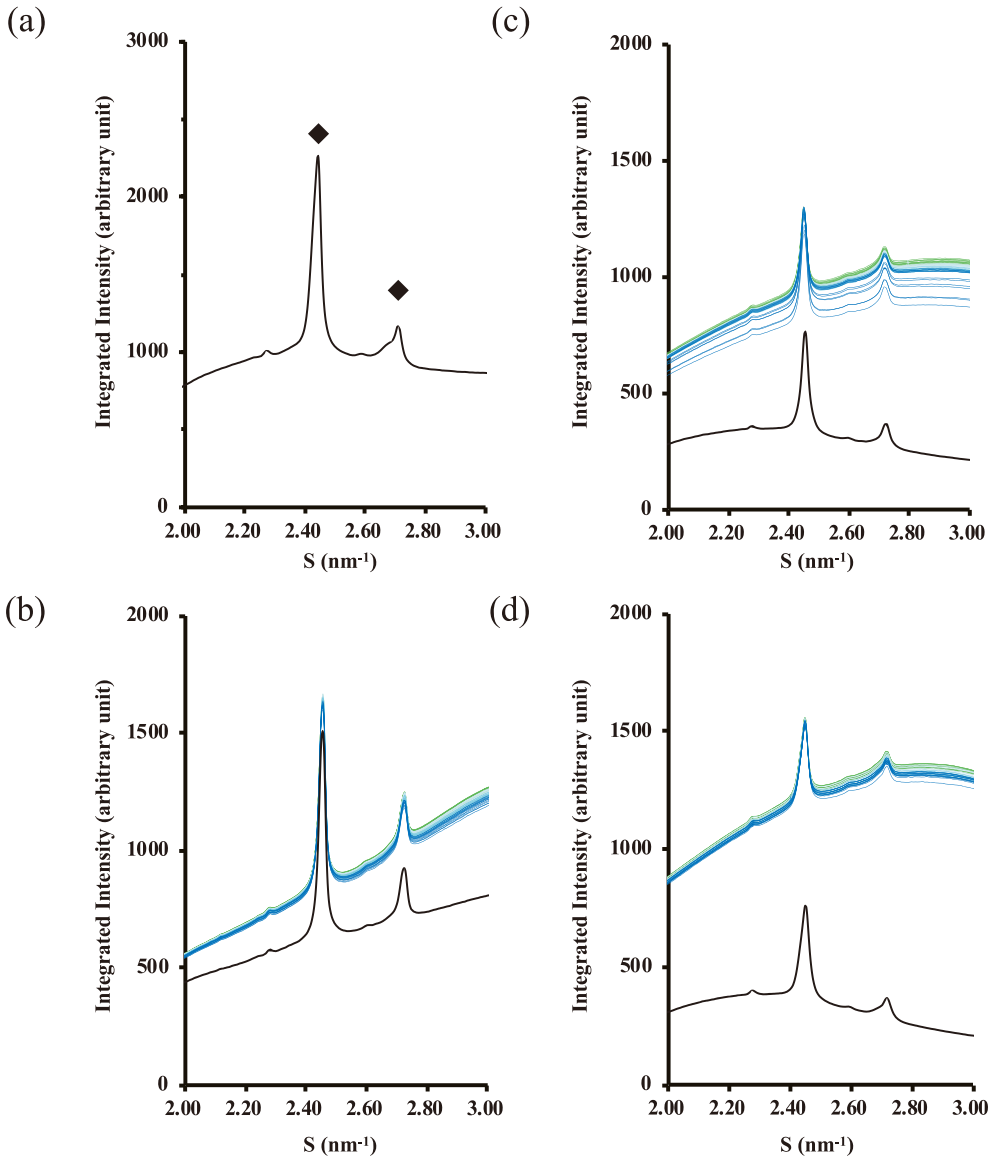


Fig. 10　Wide angle X-ray Diffration(WAXD) profile by hairless mouse stratum corneum (a) and change in the WAX profiles after application of (b) TA-PNs, (c) GL containing TA-PNs and (d) DG containing TA-PNs for the strongly hydrated hairless mouse stratum corneum. The change from dark blue to green indicate that of the SAX profile from 0 to 123 min.

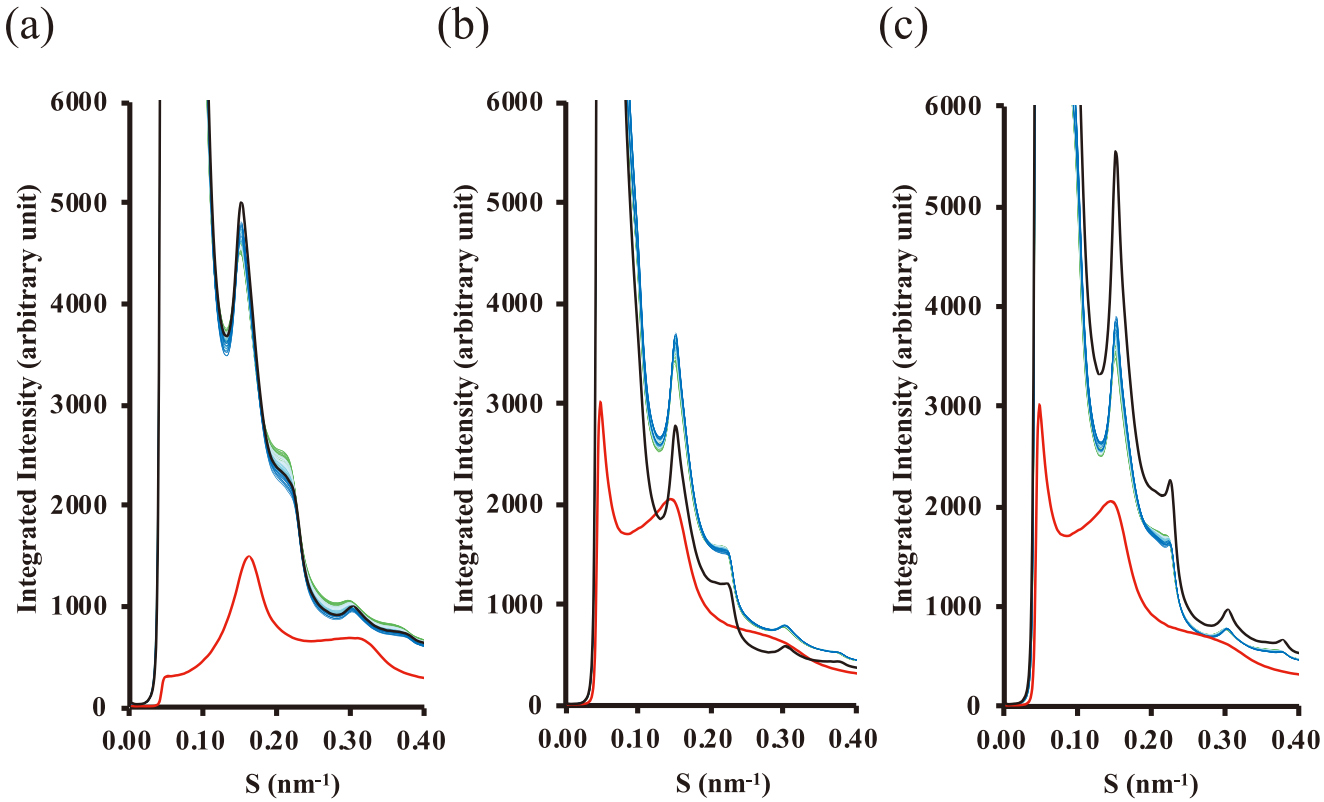


Fig. 11　Change in the SAXD profiles after application of (a) TA-PNs, (b) GL containing TA-PNs and (c) DG containing TA-PNs for the weakly hydrated hairless mouse stratum corneum . Black and red line showed stratum corneum and each formulation, respectively. The change from dark blue to green indicate that of the SAX profile from 0 to 123 min.

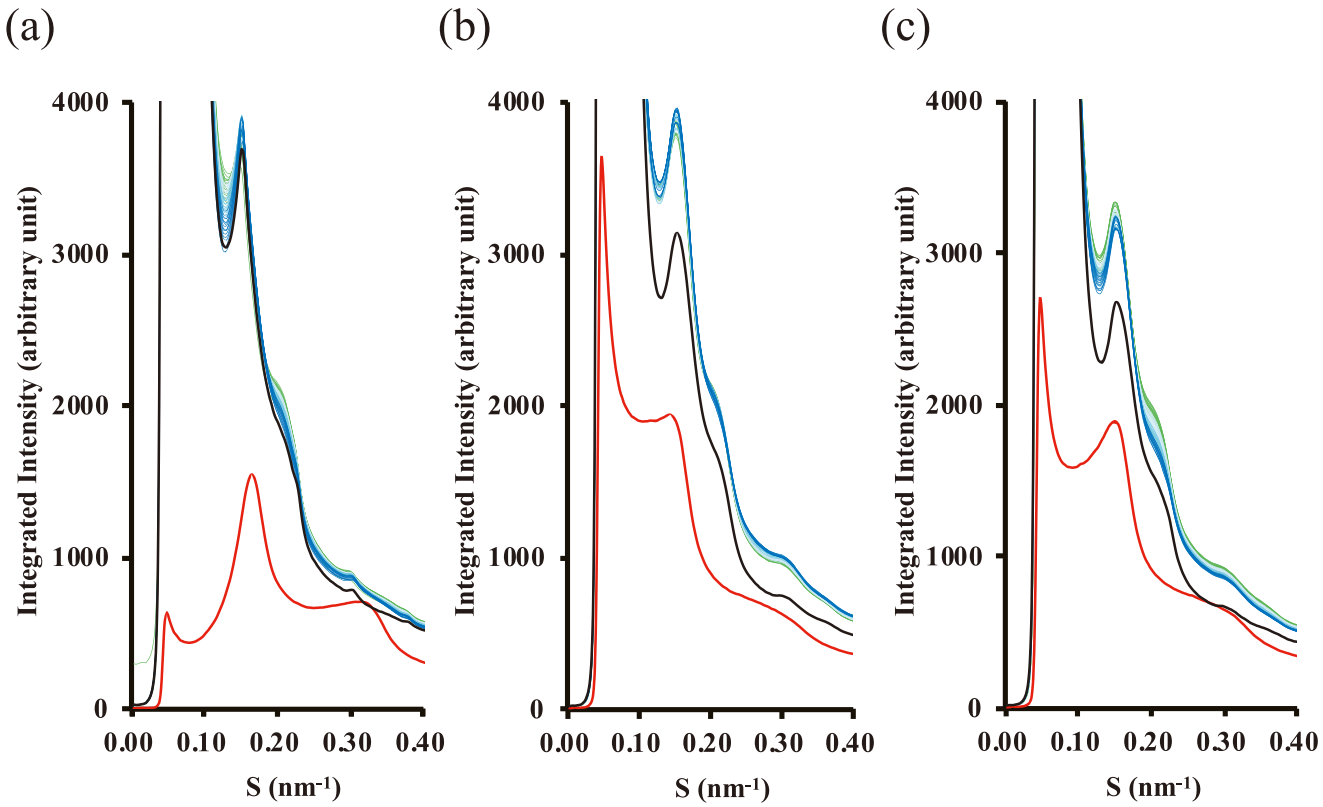


Fig. 12　Change in the SAXD profiles by (a) TA-PNs, (b) GL containing TA-PNs and (c) DG containing TA-PNs for the strongly hydrated hairless mouse stratum corneum. Black and red line showed stratum corneum and each formulation, respectively. The change from dark blue to green indicate that of the SAX profile from 0 to 123 min.

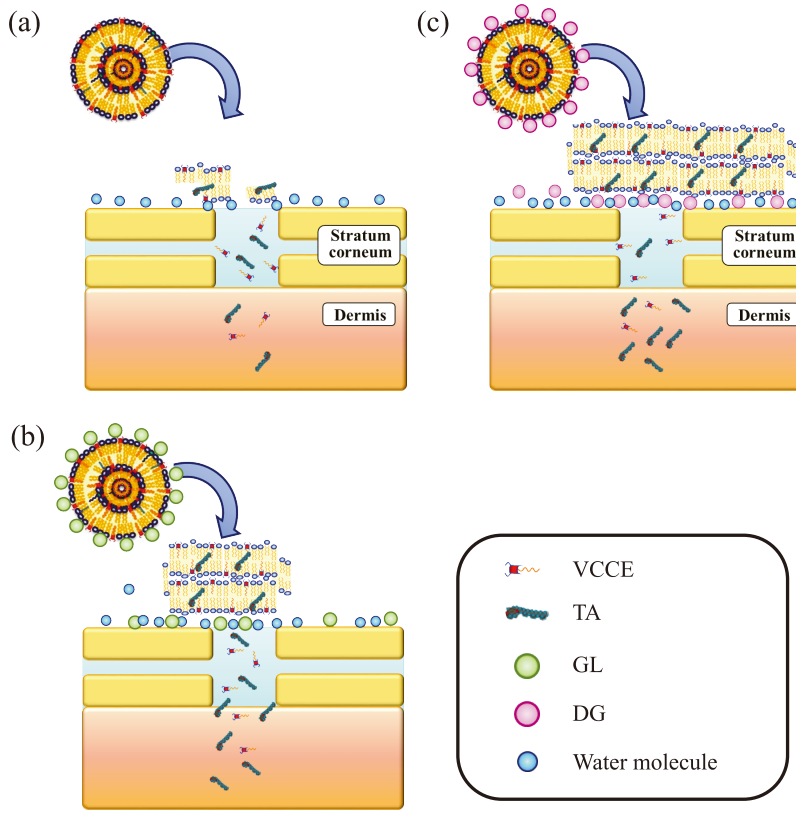


Fig. 13　Speculated mechanism for the effect of polyol in the TA-PNs formulation on the lamination forming (a) TA-PNs, (b) GL containing TA-PNs, (c) DG containing TA-PNs.

の相互作用により、ベシクル構造からラメラ構造への構造変化が起こり、角層上に積層することでTAの浸透が起こるものと推察された。^{1}H-NMRの結果から、GLやDGはTA-PNsの表面に存在し、脂質膜の流動性に変化を与えていることが明らかとなっている。そのため、ポリオールはベシクル構造からラメラ構造への転移を促進する効果があるものと推察された。またFig. 7の解析結果から、S=0.10 nm^{-1}に出現したピーク強度がGLとDGで2倍となっていたこと、TAの真皮への浸透量はDG添加系の方が多かったことを考えるとDGの方がベシクル構造からラメラ構造への促進効果が高いものと考えられ、このベシクルからラメラ構造への構造変化のしやすさがDG添加系におけるTAの皮膚浸透性向上の一助となっているものと推察された。

4．総　括

以上一連の結果から、放射光X線を用いることにより物性の異なるTA-PNsがTAの皮膚浸透を促進するメカニズムを明らかにすることが可能となった。この一連の研究成果は、コスメトロジー研究の発展の一助となると考えられる。

（引用文献）

1）Uchino T., Murata A., Miyazaki Y., Oka T., Kagawa Y., *Chem Pharm Bull.* **63**, 334-340 (2015).
2）Uchino T., Lefeber F., Gooris G., Bouwstra J., *Eur J Pharm Biopharm.* **86**, 156-166 (2014).
3）Uchino T., Matsumoto Y., Murata A., Oka T., Miyazaki Y., Kagawa Y., *Int J Pharm.* **464**, 75-84 (2014).
4）El Maghraby G. M. M., Williams A. C., Barry B. W., *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* **58**, 415-429 (2006).
5）Ohta N., Ban S., Tanaka H., Nakata S., Hatta I., *Chem Phys Lipids.* **123**, 1-8 (2003).
6）Uchino T., Hatta I., Miyazaki Y., Onai T., Yamazaki T., Sugiura F., Kagawa Y., *Int J Pharm.* **521**, 222-231 (2017).
7）Uchino T., Lefeber F., Gooris G., Bouwstra J., *Int J Pharm.* **412**, 142-147 (2011).
8）Wester R. C., Christoffel J., Hartway T., Poblete N., Maibach H. I., Forsell J., *Pharm Res.* **15**, 82-84 (1998).
9）Hatta I., Nakazawa H., Obata Y., Ohta N., Inoue K., Yagi N., *Chem Phys Lipids.* **163**, 381-389 (2010).
10）Pham Q. D., Björklund S., Engblom J., Topgaard D., Sparr E., *Journal of Controlled Release.* **232**, 175-187 (2016).

化粧くずれの低減を目的とした新規な非水素結合性有機ゲル化剤の開発

山口大学大学院創成科学研究科

岡本　浩明

Novel organic gelators without hydrogen-bonding functional groups were developed and investigated for application to cosmetic materials. It was found that these organic gelators form fluorous solvent gels with an addition amount of less than 5%. The fluorous gels are physical gels that undergo a sol-gel transition, thermo-reversibly, and the transition temperature changes from 120°C to room temperature depending on the amount of the organic gelator. From the dynamic viscoelasticity measurements of the fluorous solvent gels, it was found that the gels exhibited a relatively liquid property while exhibiting a high viscosity.

1．緒　言

化粧くずれは、汗や皮脂といった生体からの分泌物による化粧膜の濡れや、雨や埃などの付着や衣服に接触し、すれるなどの物理的摩擦により生じるとされている。外観上の化粧くずれは、あぶらが浮いてくる、肌がてかる、色がくすむといった現象とされており、特に、「てかり」に化粧くずれを感じる人が多いとされている。このような化粧くずれは、てかりと関係が深い皮脂がもっとも問題視されており、皮脂の分泌により化粧膜がくずれないため考えられている。この化粧膜が皮膚から分泌される皮脂（脂成分）となじまなければ、化粧くずれは起こらないため、最近では、フッ素化合物による処理が期待されている。ところが、はつ油性の高いフッ素化合物は、耐皮脂性に優れるものの、肌への親和性が低く、密着性に乏しいといった欠点も指摘されている。すなわち、これらのフッ素化合物の肌への親和性と密着性を高めるためには、フッ素化合物をゲル化することによる粘度上昇が効果的であると考えられる。ところが、はつ油性の高いフッ素化合物をゲル化する化合物（有機ゲル化剤）はほとんど知られていない上に、形成したゲルの物性に関する研究例はほとんどない。さらに、有機ゲル化剤が細胞に取り込まれるリスクを考慮して、水素結合性の官能基を分子内に含まない構造とすることで、親水性を低減した分子構造が必要と考えた。

そこで本研究では、フッ素化合物、特に、高度にフッ素化されたフルオラス溶媒を微量の添加量でゲル化可能な有機ゲル化剤の開発する。すでに、先行研究において、アルコール性溶媒や炭化水素系溶媒のみならず、低分子量の有機化合物では、ゲル化が困難とされてきた高誘電率有機溶媒やイオン液体や高誘電率有機溶媒などの多様な有機溶媒を達成している。この有機ゲル化剤から構築したゲルは、加熱・冷却により、ゾル（液体）・ゲル（擬固体）に変化する物理ゲル（図1）である[1-9]。本研究課題ではこれらの先行研究において開発した有機ゲル化剤を礎に、フルオラス溶媒のゲル化を達成するべく、水素結合性の官能基を含まない「非水素結合性」の有機ゲル化剤を開発し、形成したゲルの熱物性を解析した。その上で、化粧品として使い心地を考慮し、構築したフルオラス溶媒ゲルのレオロジー特性の解明を試みた。

本研究を達成するために、図2に示すようなエステル基の配向方向とペルフルオロアルキル鎖長の異なり、水素結合性の官能基を含まない化合物 **1**-n および化合物 **2**-n を分子設計した上で、本研究課題を遂行することとした。

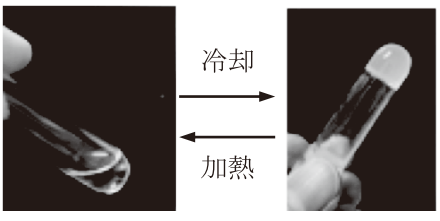
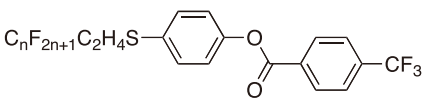
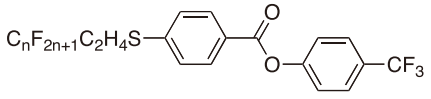


図1　物理ゲル（熱可逆的ゲル）



化合物　**1**-n



化合物　**2**-n

図2　有機ゲル化剤（化合物 **1**-n および化合物 **2**-n）の分子構造

Development of new non-hydrogen-bonding organic gelators for reducing makeup deterioration

Hiroaki Okamoto

Graduate School of Sciences and Technology for Innovation, Yamaguchi University

2．方　法

2．1．有機ゲル化剤の合成方法

下記に示す合成経路（スキーム 1）に従い、化合物 **1**-n および化合物 **2**-n（n=**4** または **6**）を合成した。化合物の分子構造の同定は ^{1}H NMR および IR スペクトルなどを用いて行い、物性測定には純度が 99.9％以上の物質を用いた。

2．2．フルオラス溶媒ゲルの熱物性の測定方法

ゲル化の確認は目視により、室温でゲル化するために必要な最小添加量を最低ゲル化濃度とし、形成したゲルを加熱してゾルになる温度をゾル－ゲル転移温度とした。フルオラス溶媒としては、揮発性が小さく、加熱による重量変化が小さい DEMNUM™（ダイキン）および Krytox®（デュポン）を用いた（図 3）。

2．3．フルオラス溶媒ゲルのレオロジー特性の測定方法

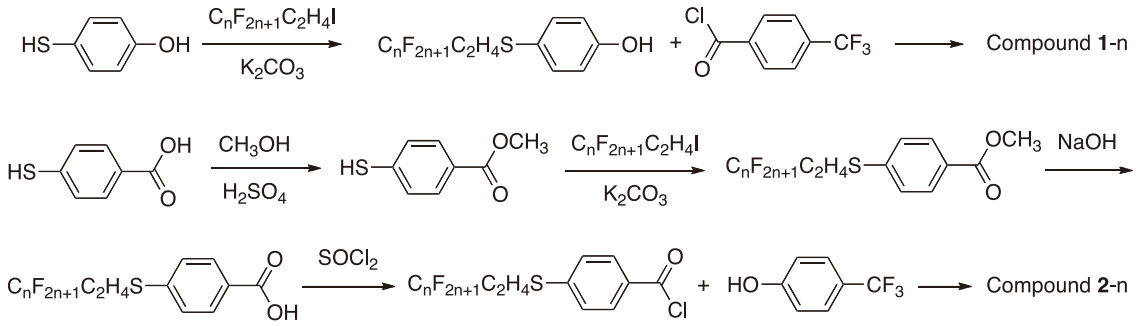
フルオラス溶媒ゲルのレオロジー特性は、Rheosol G1000（株式会社 UBM）（図 4）を用い、定常流粘性測定では、コーンプレートを用い、プレートギャップは 0.05mm、剪断速度依存モード、剪断速度は、0.01 ～ 143s^{-1} の範囲で測定した。一方、動的粘弾性測定では、パラレルプレートを用い、プレートギャップは 1mm、周波数依存モード、周波数は 0.01 ～ 10Hz の範囲で測定した。

3．結果と考察

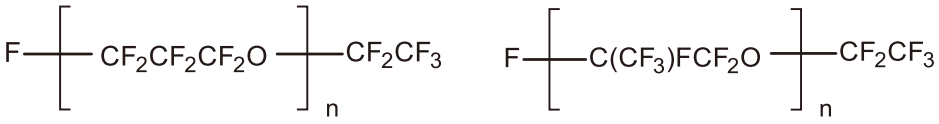
3．1．化合物 **1**-n および化合物 **2**-n の最低ゲル化濃度とゾルーゲル転移温度

化合物 **1**-n および化合物 **2**-n の最低ゲル化濃度を表 1 にまとめた。最低ゲル化濃度とは室温でゲルの状態を維持できる最低のゲル化濃度のことを示し、カッコ内の値が小さいほど、少ない添加量でゲル化できることを示す。したがって、値が小さいほど、高性能な有機ゲル化剤と言える。

化合物 **1**-n はペルフルオロアルキル鎖長の伸長に伴い、最低ゲル化濃度が低下したことから、ペルフルオロアルキル鎖長がゲル化に及ぼす効果が大きいことがわかった。一



スキーム 1　有機ゲル化剤（化合物 **1**-n および **2**-n）の合成スキーム



DEMNUM™　　Krytox®

図 3　DEMNUM™ および Krytox® の構造

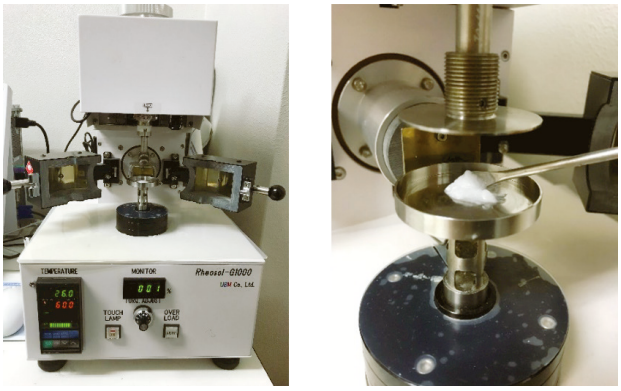


図 4　レオメーター（左、G1000）と測定用プレート（右）

表 1　化合物 **1**-n および化合物 **2**-n の最低ゲル化濃度（wt%）

Fluorous solvents	Compounds			
	1-4	**1**-6	**2**-4	**2**-6
Krytox®	G (0.4)	G (0.1)	P (5.0)	G (0.7)
DEMNUM™	G (0.3)	G (0.1)	P (5.0)	G (0.6)

G and P indicate gel and precipitate states, respectively.
Parentheses indicate critical gel concentration (wt%).

方、化合物 **2**-n では、ペルフルオロブチル基を持つ化合物 **2**-4 では沈殿が生じるものの、ペルフルオロヘキシル基を持つ化合物 **2**-6 ではゲルを形成することがわかった。

3. 2. フルオラス溶媒ゲルのゾルーゲル転移温度

フルオラス溶媒として Krytox® を用いた場合のゾル－ゲル転移温度を化合物 **1**-n および **2**-6 の濃度に対してプロットした結果を図 5 に示す。化合物 **1**-4、**2**-6 はゾル－ゲル転移温度は低く、3wt％程度の濃度では 30℃～50℃程度であった。一方、化合物 **1**-6 はゾル－ゲル転移温度が比較的高く、3wt％以上の濃度では 100℃以上のゾル－ゲル転移温度となった。

同様に、フルオラス溶媒として、DEMNUM™ を用いた場合のゾル－ゲル転移温度を図 6 にまとめた。その結果、フルオラス溶媒として、Krytox® を用いた場合と同様に、化合物 **1**-4、**2**-6 はゾル－ゲル転移温度は低く、3wt％程度の濃度では 30℃～50℃程度であり、化合物 **1**-6 はゾル－ゲル転移温度が比較的高く、3wt％以上の濃度では 100℃以上のゾル－ゲル転移温度となることがわかった。これらの結果から、化合物の添加量の増加に伴い、ゾル－ゲル転移温度は上昇し、化合物の分子構造に依存したゾル－ゲル転移温度を示すことがわかった。さらに、ペルフルオロアルキル基の炭素鎖長の伸長によりゾル－ゲル転移温度は上昇する傾向にあり、有機ゲル化剤の分子内のエステル基の配向方向の違いがゾル－ゲル転移温度に大きな影響を与えることがわかった。

一方、フルオラス溶媒の分子構造、すなわちペルフルオロアルキル鎖の分岐の有無はゾル－ゲル転移温度には、大きな影響を及ぼさないことがわかった。このことは、はつ油性の高いフッ素化合物においても同様の傾向を示すと考えられ、化粧品への応用に向けた基礎物性を示した結果と言える。

3. 3. フルオラス溶媒ゲルのレオロジー特性

上記の結果を踏まえ、構築したフルオラス溶媒ゲルのレオロジー特性を測定した。図 7 に DEMNUM™ の定常流粘度測定の結果を示す。低速領域での粘度は数 Pa·s 程度の粘度であり、高速領域では粘度が低下していることがわかる。再び剪断速度を低速領域へ戻すことで、概ね粘度が回復していることがわかる。

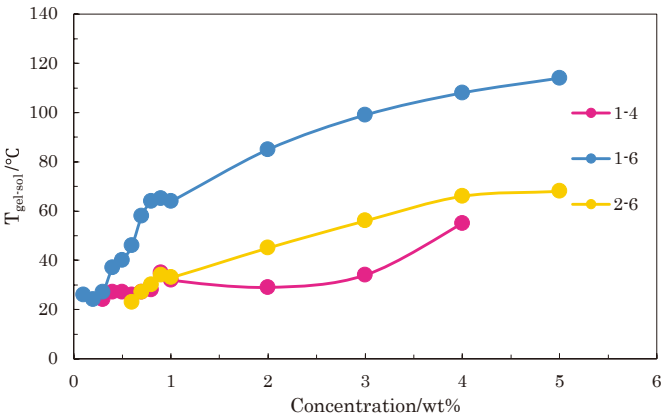


図 5　化合物 **1**-n と化合物 **2**-6 のゾルーゲル転移温度
（フルオラス溶媒：Krytox®）

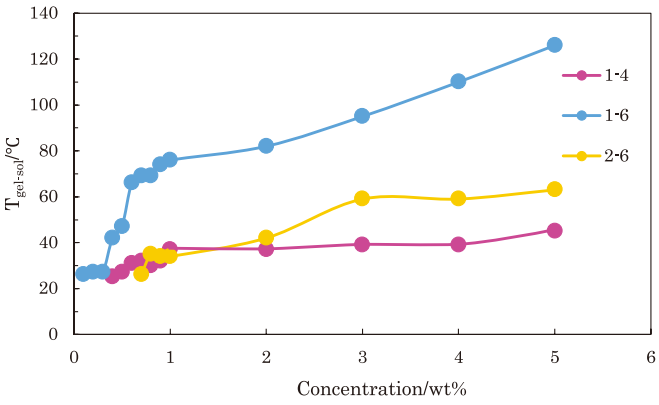


図 6　化合物 **1**-n と 化合物 **2**-6 のゾルーゲル転移温度
（フルオラス溶媒：DEMNUM™）

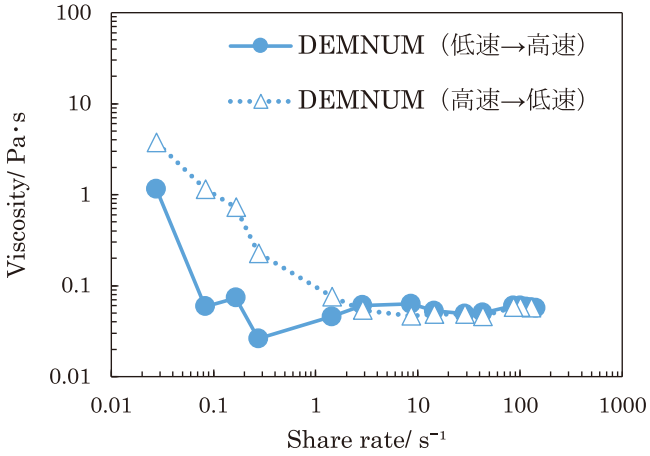


図 7　DEMNUM™ の定常流粘度測定の結果

このような粘度特性を示すDEMNUM™に化合物 **1**-n および化合物 **2**-6 を 5wt％程度を添加したDEMNUM™ゲルの定常流粘度測定の結果を図 8 ～図 10 に示す。

ゾル－ゲル転移温度が比較的低い化合物 **1**-4 や **2**-6 においては、低い剪断速度領域では粘度上昇が見られたものの、高い剪断速度の領域においては、フルオラス溶媒と同程度の粘度を示すことがわかった。高い剪断速度領域から低速の剪断速度領域と変化させた場合、粘度低下が観測された。このような定常流粘度測定におけるヒステリシス特性は、化合物 **1**-6 から形成したDEMNUM™ゲルにおいても観測されるが、剪断速度の低速領域から高速領域の全領域において、化合物 **1**-4 や化合物 **2**-6 よりも二桁程度高い粘度を示すことがわかった。

さらに化合物 **1**-6 が低濃度（3wt%）のDEMNUM™ゲルおいても、全体の粘度は低下するものの、図 11 に示すようにヒステリシス損が小さいように思われる。これらの結果は、剪断応力によりフルオラス溶媒ゲルの構造が崩れるものの、応力を取り除くことにより、粘度が回復することからゲル構造が再構築していることが示唆されている。

さらに、動的粘弾性測定からフルオラス溶媒ゲルの粘性要素と弾性要素を測定した。動的粘弾性測定は、上記の定常流粘性測定と異なり、物質に与える応力およびそれに伴うひずみが正弦波である。本実験ではフルオラス溶媒ゲルに振動を与え、応力とひずみの位相のピーク値と時間軸上における位相差との関係から物体の粘性要素と弾性要素を測定した。

図 12 および図 13 に、化合物 **1**-4 および化合物 **1**-6 の濃度が 3wt%におけるDEMNUM™ゲルの動的粘弾性の測定結果を示した。貯蔵弾性率（G'）が弾性要素を表し、損失弾性率（G"）が粘性要素を示す。G' ＞G" のとき、試料は固体的であり、G'＜G"のとき、試料は液体的であることを示す。

図 12 に示すように、化合物 **1**-4 のDEMNUM™ゲルは低周波数側から 1.2Hz 程度まではG' ＞G" となることから、低周波数のとき固体的な性質が優勢なゲルと言える。一方、

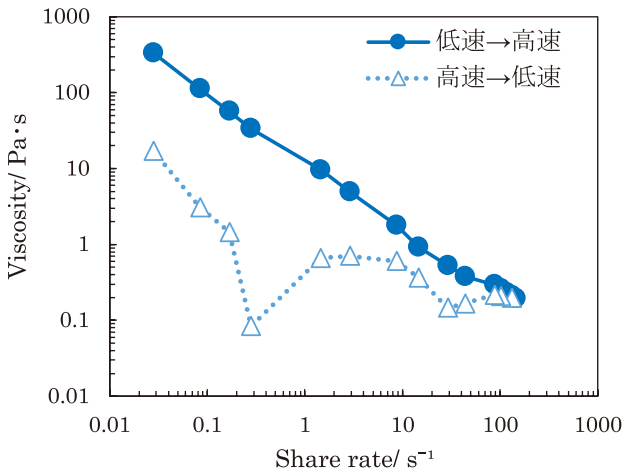


図 8　DEMNUM™ ゲルの定常流粘度測定
化合物 1-4 の濃度：5wt%

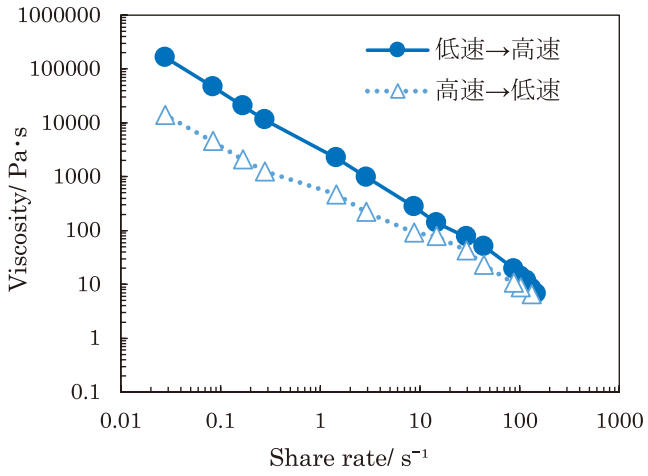


図 9　DEMNUM™ ゲルの定常流粘度測定
化合物 1-6 の濃度：5wt%

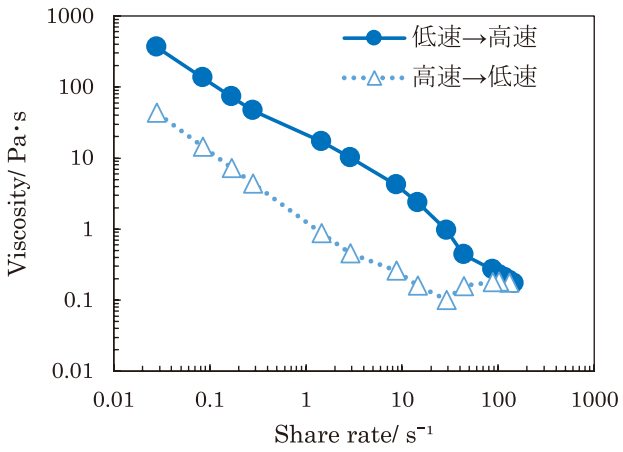


図 10　DEMNUM™ ゲルの定常流粘度測定
化合物 2-6 の濃度：5wt%

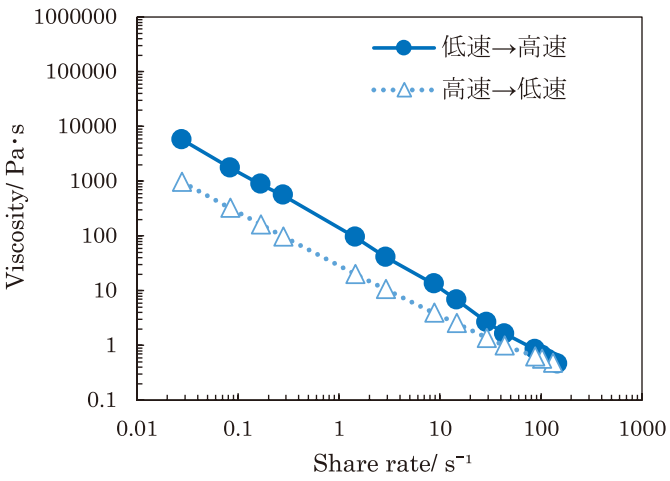


図 11　DEMNUM™ ゲルの定常流粘度測定
化合物 1-6 の濃度：3wt%

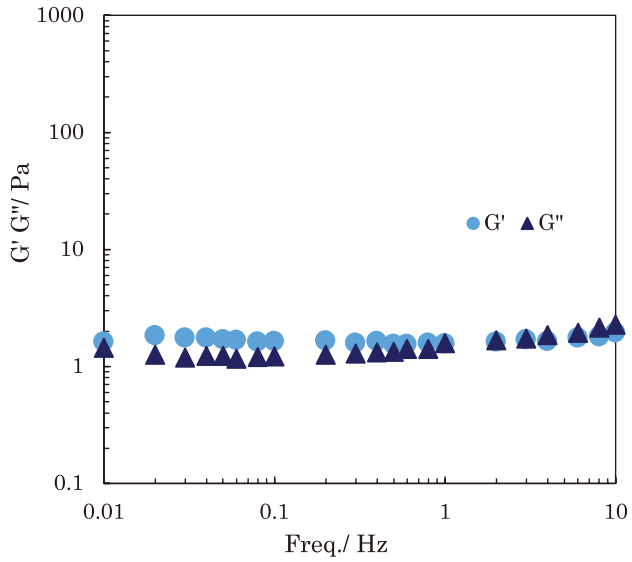


図 12　化合物 1-4 の動的粘弾性

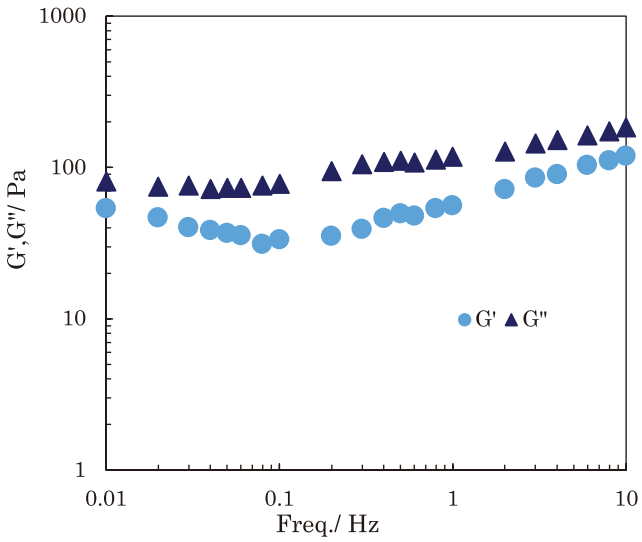


図 13　化合物 1-6 の動的粘弾性

1.2Hz以上の高周波数のときG’＜G” であることから、液体的な性質が優勢なゲルとなることがわかった。一方、化合物 **1**-6 のDEMNUM™ゲルの場合には、図 13 に示すように全測定周波数（0.01Hz ～ 10Hz）においてG’＜G” であることから液体的な性質が優勢なゲルであることがわかった。さらに、化合物 **1**-6 のDEMNUM™ゲルがG’，G” の値が、化合物 **1**-4 のDEMNUM™ゲルよりも全体的に大きいことから、複素弾性率（G*）が大きいといえる。すなわち化合物 **1**-6 の方が化合物 **1**-4 より、同量を変形させる場合に大きな力が必要なゲルを形成することがわかった。

4．総　括

①本研究により、フルオラス溶媒をゲル化する低分子量の有機化合物（有機ゲル化剤）を開発することができた。これらの化合物は、従来の有機ゲル化剤の分子構造とは異なり、分子内に水素結合性の官能基を含むことなく、両親媒性の化合物でもない、全く新しい分子設計に基づいた化合物である。これらの有機ゲル化剤は、極めて微量の添加量でフルオラス溶媒をゲル化することがわかった。

②本研究により開発した有機ゲル化剤から形成したフルオラス溶媒ゲルは、有機ゲル化剤の分子構造や添加量によりゾル－ゲル転移温度を制御できることがわかった。その一方で、フルオラス溶媒の分子構造に対するゾル－ゲル転移温度の変化量は小さいことがわかった。

③有機ゲル化剤を数％程度添加することで、フルオラス溶媒の粘度を 10^2 ～ 10^4 倍程度も上昇することが可能であることがわかった。さらに、動的粘弾性測定からは、比較的液体的な性質が優勢なフルオラス溶媒ゲルであることがわかった。

謝　辞

ここで紹介した研究は当研究室の学生諸氏の協力による成果であり、学生各位に心よりお礼を申し上げます。また、本研究課題を遂行するにあたり、公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団のご支援を頂きましたことに深くお礼を申し上げます。

（引用文献）

1）H. Okamoto, EKISHO, **24**, 112-120（2020）.
2）岡本浩明、森田由紀、特願 2020-37205.
3）B. Cao, C. Shen, Y. Xu, Q. Zhou, Y. Morita, H. Okamoto, and Q. Xiao, J. Fluorine Chem., **226**, 109348-109354（2019）.
4）B. Cao, C. Shen, R. Wang, H. Ding, R. Yang, H. Okamoto, and Q. Xiao, Chem. Lett., **48**, 312-314（2019）.
5）A. Ohashi, N. Uematsu, N. Tsukiyama, Y. Morita and H. Okamoto, Chem. Lett., **47**, 810-813（2018）.
6）T. Yoshida, A. Ohashi, Y. Morita and H. Okamoto, Mol. Cryst. Liq. Cryst., **647**, 299-306（2017）.
7）B. Cao, Y. Kaneshige, Y. Matsue, Y. Morita and H. Okamoto, New J. Chem., **40**, 4884-4887（2016）.
8）B. Cao, S. Hayashida, Y. Morita, and H. Okamoto, Mol. Cryst. Liq. Cryst., **632**, 49（2016）.
9）森田由紀、岡本浩明、イオン液体のゲル化とイオン液体ゲルの特性、低分子ゲルの開発と応用、シーエムシー出版、2016 年、pp. 132-139.

テラヘルツ波を用いた皮膚への化粧水浸透評価手法の開発

岡山大学大学院ヘルスシステム統合科学研究科
紀和　利彦

The penetration speed of a cosmetic liquid into human skin is recognized as an important parameter for developing cosmetics. A terahertz time-of-flight (THz-TOF) method was applied to nondestructively evaluate the penetration speed. In contrast to the conventional THz-TOF method that utilizes THz pulses traveling through free space, skins were directly mounted on the Si-based THz emitter in the THz-TOF method. The difference between penetration speeds for tap water and coconut oil was clearly observed using the proposed method. Additionally, mixing ratio dependence was observed with respect to the penetration speed for an ethanol and distilled water mixture. These results indicated that the THz-TOF method with the silicone-based THz emitter could be a potentially useful option for evaluating cosmetic liquids.

1．緒　言

本研究では，化粧水有効成分の皮膚への浸透速度を高速定量評価する新しい手法を開発する。これまでにない新しい手法として，多層構造材料の深さ方向の定量評価が可能であるテラヘルツ波飛行時間測定法（THz-TOF法：Terahertz Time-of-Flight法）を採用し，加えて，テラヘルツ波放射素子と皮膚試料マウントを一体型にした評価チップを新しく開発する。

皮膚への薬剤浸透を評価することは，化粧水の薬効を知る上で重要である。皮膚は，基底層，有棘層，顆粒層，角質層といった構造の異なる組織がわずか0.2mmの厚さに構成されており，かつ，細胞の粗密，隙間を埋める皮脂の状態によって，薬剤浸透が大きく異なるなど複雑である。しかしながら，倫理の観点から，人や動物へ直接薬剤を塗布し，評価する実験を探索的網羅的に行うことは出来ない。これに対して，テラヘルツ波を用いて，非破壊で薬剤浸透を評価する。これにより，薬剤浸透の経時変化が評価出来るようになる。さらに，本研究で開発するテラヘルツ波放射素子と皮膚試料マウントを一体型にした評価チップは，チップのどの場所からでも任意にテラヘルツ波を放射させることが出来る。この為，同一皮膚モデルの異なる位置に異なる薬剤を塗布することで，それぞれの薬剤の浸透を同時に評価することが出来る[1)]。

得られる成果は，病理学的に有用な知見を与えるのみではなく，将来，化粧水の効果を高速・正確に評価する装置を提供することが出来るなど社会的な波及効果が大きい。

Evaluation method of penetration speed of cosmetic liquid into skins using terahertz technology

Toshihiko Kiwa

Graduate School of Interdisciplinary Science and Engineering in Health Systems, Okayama University

2．方　法

図1は化粧水浸透評価の概念図である。計測ではセンシングプレート上に皮膚モデルあるいは，培養皮膚が設置されている。基板側からレーザーを励起することで，センシングプレートで発生したテラヘルツ波の一部は，直接，空間へ放射するT1。また，一部は，皮膚モデル中で化粧水が浸透した境界で反射し，空間へ放射するT2。このとき，テラヘルツ波T1とT2の到着時間差を計測することで，どれくらい化粧水が浸透しているかを評価することが可能である。

図2は，本グループで開発したテラヘルツ波計測装置の光学システム図および写真である。レーザー光源としてはSpectra-Physic社製フェムト秒一体型モードロックチタンサファイアレーザーを使用し，そのスペックは出力800mW，中心波長780nm，パルス幅100fs，パルスの繰り返し周波数は82MHzである。出力されたレーザーパルスはビームスプリッターによってポンプ光とプローブ光に

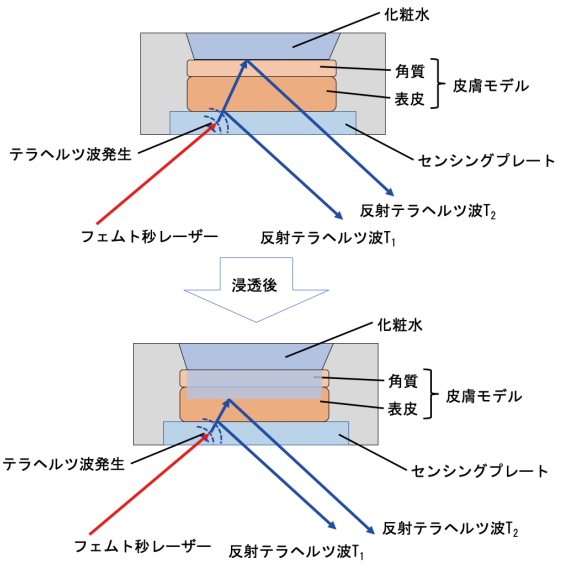


図1　化粧水浸透評価の概念図

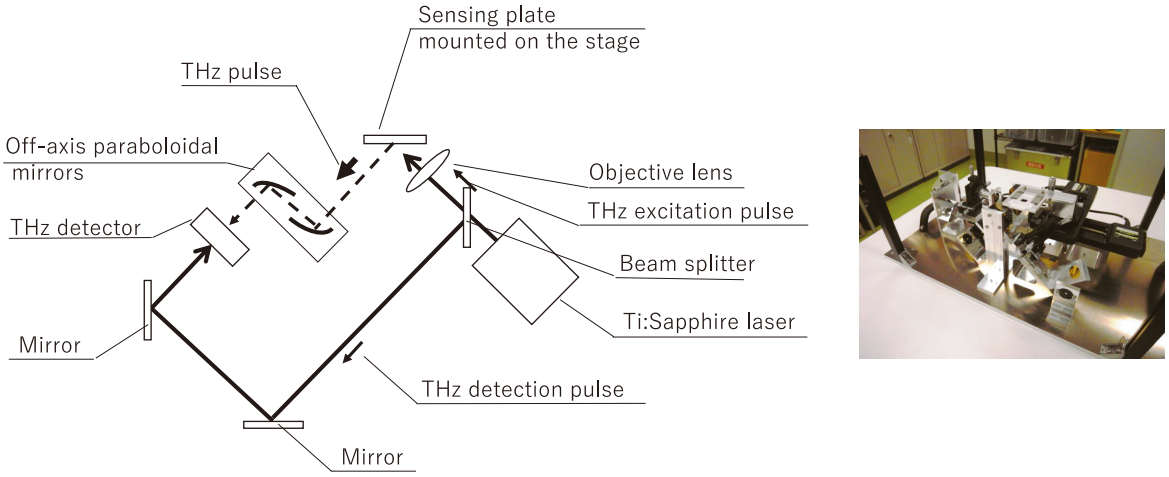


図２　開発したテラヘルツ波計測装置の光学システム図および写真

分けられる。図２に示す通りに，ポンプ光はチョッパーによって2kHzに変調されて集光レンズによって集光された後，センシングプレートに入射する。一方で，プローブ光は時間遅延ステージを経由したのち集光レンズで集光され光伝導アンテナに入射する。これによって光伝導アンテナから電流を得ることでテラヘルツ波を検出することが出来る。ただし，電流はnAオーダーと非常に小さいため電流増幅器を経由して増幅したものを検出する。増幅された電流はロックインアンプに入力され，チョッパーの2kHzの参照信号と同期検波を行うことでPCで時間波形の取得を行う。ロックインアンプはエフエヌ回路設計ブロック社製（LI5640），電流アンプはFemto社製LCAシリーズUltra-Low-Noise Current Amplifier（LCA-40K-100M）を使用している。本研究においてはテラヘルツ波の水蒸気による吸収を軽減することや，レーザーの使用，信号が微弱であることを考慮して，実験は実験環境21℃，湿度25％程度に保たれている電磁波遮蔽室（シールドルーム）内で行った。

３．結果・考察

図３は皮膚モデルとして，鳥皮膚を用い，パームオイルおよび水道水を浸透させたときの浸透の時間変化を示している。飛行時間差は，T1とT2の時間差を意味しており，負に大きくなるほど，浸透していることを意味する。この結果は，水道水に比べてパームオイルの方が早くに到着時間差が変化し，浸透していることが分かった。また，図中に示した直線はデータを線形フィットした結果である。この傾きが大きいほど浸透速度が速いことを表しており，この結果より，水道水よりパームオイルの方が，浸透速度が速いことが示された。

次に開発した手法を用いて，化粧水のエタノール濃度を変化させたときの，浸透速度への影響を評価した。

精製水，エタノール，グリセリンについて精製水とグリセリンについては1.00gで固定し，エタノールについては

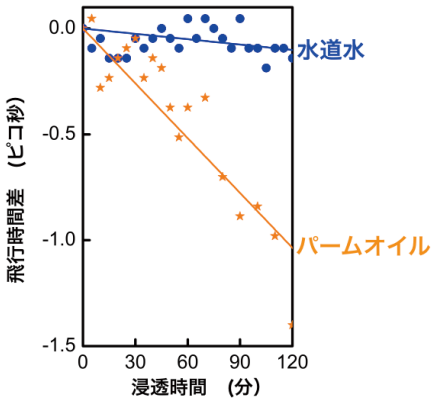


図３　鳥皮膚への浸透評価結果

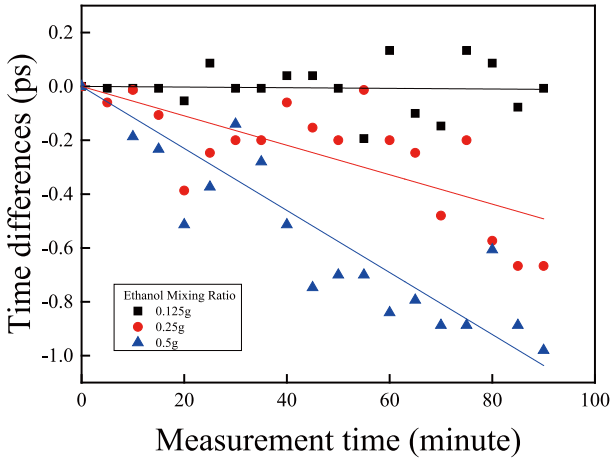


図４　各エタノール含有量における浸透評価結果

0.125g，0.250g，0.500gの３つのパターンを用意し，十分に均一化するために混合したものを５分間撹拌して作製した。

図４は各エタノール含有量の浸透の時間変化を示している。エタノール含有量が0.125gでは，ほとんど浸透していないのに対して，エタノール含有量を増加せると，浸透速度が大きくなることが示された。エタノールにより表面

の皮脂膜が除去され，水分が容易に浸透するようになったためと考えられる。

次のステップとして，人皮膚に近い組織構造を持つ豚皮膚を用いた計測を実施した。豚皮膚組織として，日本チャールズリバー株式会社のYucatan Micropig Skinを用いた。生後5カ月，メスの半身部分を10cm × 10cmで採取したものを使用した。皮膚組織の構成は表皮，真皮，皮下脂肪から成っており，表皮の厚さは75 ～ 125μm，角質層は10 ～ 40μm，皮下脂肪は0.5 ～ 1.5cmであった。計測対象は角質層である表皮部分を用いるため皮下脂肪を切除しておよそ1 mm以下の厚さに調整した。豚は人と同じ哺乳類であり，皮膚構造が類似しているためin-vitro透過試験で使用が推奨されている。

皮膚組織でエタノール濃度依存性が見られたように，豚皮膚組織でも同様の傾向が見られるか確認するため，滴下試料に水道水，およびグリセリン1gにエタノール0.125g，0.25g，0.5gをそれぞれ配合したものを用いた。計測時間は1分間隔の30分間で行っている。この測定を5回分繰り返し行い，1stパルスと2ndパルス間の時間差の平均値，標準誤差を算出してプロットした。なお，計測ごとに皮膚組織は新しく切除したものを使用した。図5にその結果を示す。

水道水は，傾きがマイナスにはならず，30分経過まで基準とした横軸0分(計測開始時)に近い値となった。それに対して0.125g，0.25g，0.5gでは近似直線の傾きはマイナスになっていた。ただし，全体のプロットに対する線形フィッティングを施したため，図5(b)の0.125gについては計測開始時から10分経過まで時間差は増加していることは無視出来ない。計測値のばらつきについては位相進みが見られなかった0.125gで最大0.7ps，0.25g，0.5gではおよそ1psであった。ばらつきが少ない部分を見れば，0.25gでは計測開始から10分経過までの位相進みは信頼できる値とみなせる。0.5gでは計測開始からすぐの位相進みは大きいがそれ以降のばらつきはほとんど同じ値であるため5分経過までは信頼できると思われる。それぞれの場合の浸透速度を算出してみると，水道水と自作化粧水の間では鳥皮膚を使用した実験と同様に浸透速度，浸透深さに大きな違いがあった。しかしながら，エタノール0.25gでは-12.6×10^{-3}，エタノール0.5gでは-12.4×10^{-3}と，エタノール含有量の増加に対して浸透速度に差がなかった。

鳥皮膚，豚皮膚両方のエタノール含有量依存性評価で算出した浸透速度比較のための棒グラフを図6に示す。比較結果を見ると，鳥皮膚ではエタノール0.125gで浸透がほとんど見られず0.25gで浸透速度が大きく増加しているのに対して，豚皮膚ではエタノール.125gで鳥皮膚にエタノール0.25gの自作化粧水を滴下したときと同程度の浸透速度となった。即ち，豚皮膚は鳥皮膚よりも少量の浸透促進剤で浸透していることが分かる。鳥皮膚と豚皮膚では皮膚

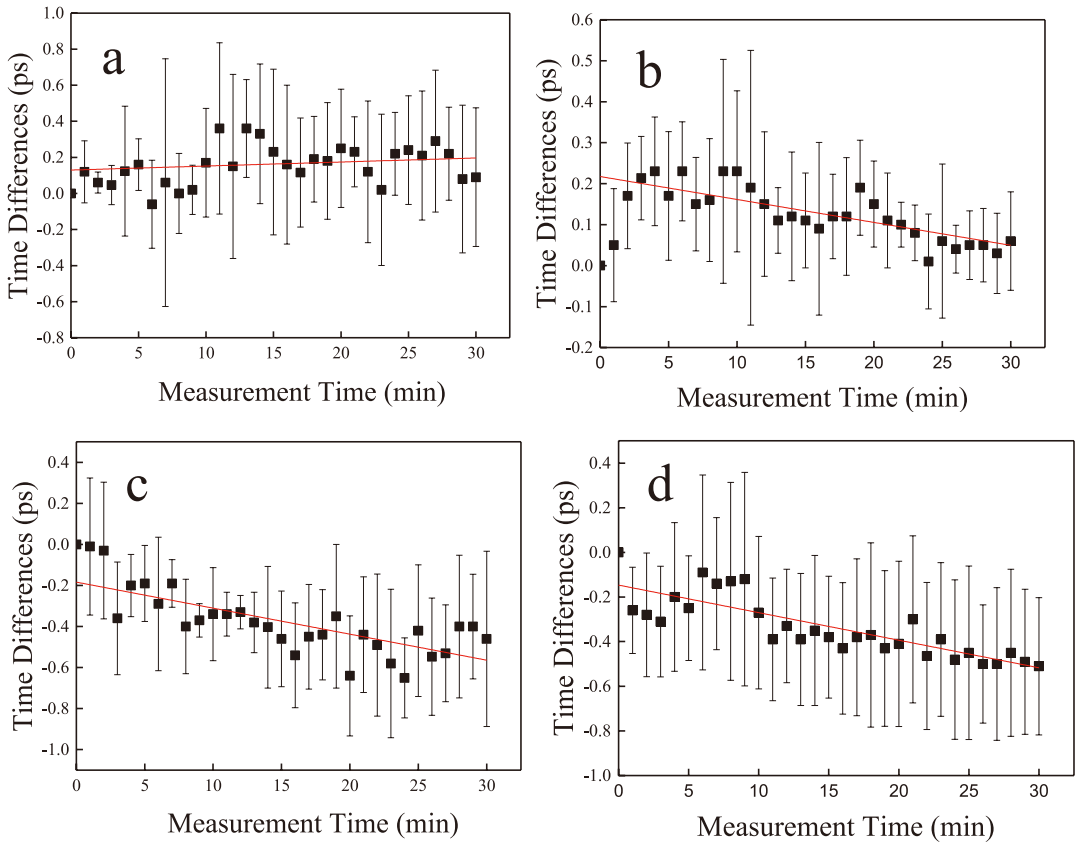


図5　各エタノール含有量の浸透比較　(a)水道水，(b)エタノール0.125g，(c)エタノール0.25g，(d)エタノール0.5g

表面の構造が異なり，鳥皮膚の場合，哺乳類に存在する通常の皮脂腺に加えて別の皮脂腺を有しており，羽が水を弾くことが出来るようにその皮脂腺から油分を補充している。従って，表面の油分量が異なるためにエタノールが少量でも豚皮膚で浸透促進効果が作用したと思われる。それに加えて，エタノール含有量によって自作化粧水全体としての粘性も変化している。この粘性も浸透に何らかの影響を与えていることも考えられる。以上から，鳥皮膚組織の結果と比較して，エタノール含有量に比例した浸透速度，浸透深さの変化は見られなかったが，エタノール含有量が一定量を超えると浸透速度，深さに違いが現れる，また，鳥皮膚のときよりも少量のエタノールでも浸透していることが確認出来た。豚皮膚の場合でもテラヘルツ波飛行時間測定法が有効となる可能性を示すことが出来た。

以上の結果は，開発した装置により，浸透の評価が可能であることを示している。

ここまでの計測では，皮膚モデルを用いた計測を想定し，皮膚裏面より計測を実施した。これに対して，皮膚表面からの計測を想定した構成を検討した。図７は計測の構成図である。テラヘルツ波を放射するセンシングプレートに，化粧水を浸潤させた市販ファイスマスクを設置，その上に皮膚表皮がファイスマスクに接触するように設置する。図８は，実際の浸透評価の結果である。裏面から計測した場合に対して，傾きが逆になっていることが分かる。以上の様に，本方法では，フェイスマスクを設置することで，化粧水の浸透を表面から計測出来ることが示された。

４．総　括

本研究では，多層構造材料の深さ方向の定量評価が可能であるテラヘルツ波飛行時間測定法（THz-TOF 法：Terahertz Time-of-Flight 法）を採用し，加えて，テラヘルツ波放射素子と皮膚試料マウントを一体型にした評価チップを新しく開発することで，皮膚モデルへの化粧水浸透の定量評価を実現した。特に鳥皮膚を用いた浸透評価実験を行い水道水とパームオイルでの浸透の深さ，速度の差を計測することに成功した。

今後，人皮膚モデルとして一般に用いられる豚皮膚を用いた計測手順の標準化を行っていく。

（引用文献）

1） 紀和 利彦，神谷 樹，飯田 将弘，井上 博文，堺 健司，豊岡 伸一，塚田 啓二，テラヘルツ波ケミカル顕微鏡を用いた生体関連物質評価法 日本レーザー医学会誌，39 巻，4 号，p.341-346，2019.1.15

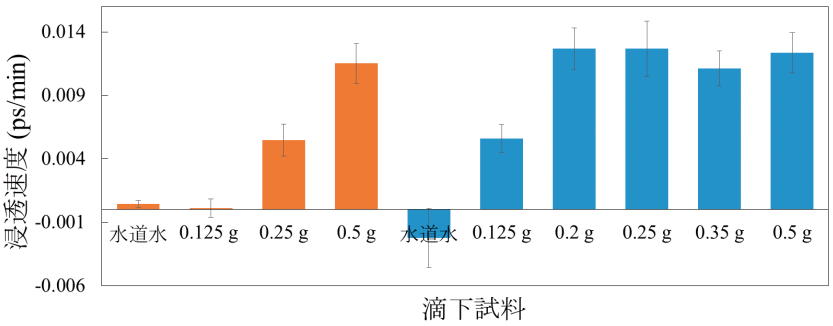


図6　水道水，各エタノール含有量の自作化粧水滴下時の鳥皮膚（橙），豚皮膚（青）それぞれの浸透速度の評価

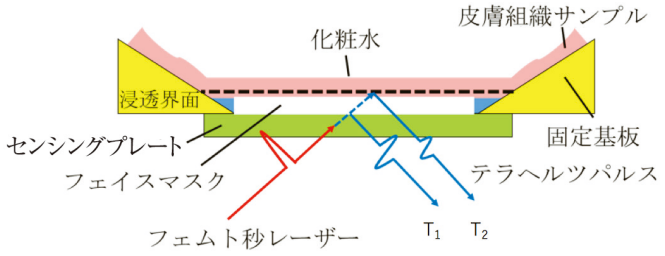


図７　フェイスマスクを用いた浸透評価の構成図

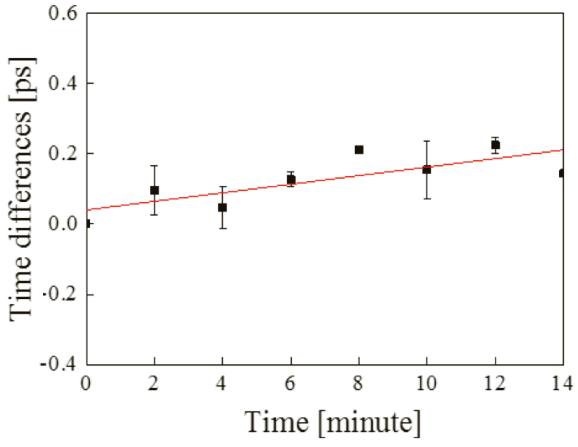


図８　浸透評価の結果

テラヘルツ分光で切り拓く角質中に必要な水の“質”の解明

理化学研究所生命医科学研究センター
白神　慧一郎

Although the moisture content in the skin is of major interest in cosmetology and dermatology, the roles and functions of water are yet to be understood at a molecular level. Over more than half a century, physicochemical and biophysical studies have emphasized the importance of hydration water that surrounds biological macromolecules to prompt their native functions, but such a “quality” of water has been overlooked in biological samples due to experimental difficulty in characterizing the free/hydration water content in vivo. To settle this issue, in this study we constructed a homebuilt terahertz time-domain attenuated total reflection spectroscopy system and developed a theoretical algorithm to derive the depth profile of free water in living skin. Our results showed that the free water content in the stratum corneum of a hairless mouse is kept at particularly low level, but applying pure water and a cosmetic lotion substantially increases the population of free water albeit temporarily. Interestingly, the cosmetic lotion (sekkisei) was found to have a greater ability in retaining free water for a longer period, compared to pure water.

1．緒　言

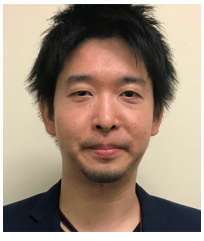
“Water is life's matter and matrix, mother and medium. There is no life without water.” ―1937年にノーベル生理学賞を受賞したSzent-Györgyi博士が語ったように，水は生命を維持する媒質として古くから重要性が認識されていた[1]．水の中で誕生した生命が約3億6千万年前に陸上に進出して以降，気相環境に適応できる体表面の上皮構造の変化が進んだことで[2]，我々ヒト表皮の最外殻に位置する角質層は体内の乾燥を防ぐ最後の砦として身体内の恒常性を維持する役割を担っている[3]．またそれと同時に，角質層の保湿は健全な皮膚機能を維持するために不可欠であるため，適当量の水を供給・保持することで柔軟性に富んだ美しい肌を保つことが化粧品製剤のもつ大きな意義となっている[3]．そのため，これまでに角層内に存在する水や角質層から受動的に拡散喪失する水の“量”を評価する技術によって保湿状態が定義されてきたものの，角層水分量と経皮水分蒸散量の間に整合性が認められない例も報告されており[4]，これは水の“量”的観点だけでは不十分であることを示唆している．

液体の水分子はピコ（10^{-12}）秒という極めて短い時間スケールで絶えず揺らぎ続けている一方で，タンパク質のような生体分子の表面に位置する水分子は界面に特有の作用を受けることでその動態が著しく遅くなることが明らかになっている[5]．このように生体分子の束縛を受けることで，通常の水（自由水またはバルク水）とは異なる挙動を示すようになった水分子を水和水（または結合水や生体水）と呼び，水和水は様々な高分子の機能発現や自己組織化に積極的に関与していることが見出されている．このことは，自由水／水和水という“質”的に異なる水の状態が生命機能を織りなす場として機能していることを示唆しており，皮膚表皮内においても“量”にとどまらず水の“質”の観点から議論することで保湿の本質的理解に至れる可能性がある．

しかし細胞や組織中では数多の物質が不均一に分布する複雑環境であることから，生体中における自由水／水和水の質的評価を行った例は報告されていなかった．周波数0.1～10 THz（10^{11}～10^{13} Hz）で定義されるテラヘルツ波は近年の技術発展が著しい電磁波帯であり，可視光に比べて1000倍以上も光子エネルギーが小さい安全な光として生物を対象とした応用開拓が進められている．テラヘルツ波のもつエネルギーは自由水のピコ秒揺らぎと一致するため，テラヘルツ帯の分光スペクトルは自由水の動的状態を直接的に反映する一方で，水和水や生体高分子の吸収は自由水に比べて圧倒的に小さいため，テラヘルツ帯は自由水のみを選択的に観測できる電磁波帯であることが近年明らかになってきた．そこで本研究では，皮膚表皮中の水の自由水／水和水評価に向けたテラヘルツ測定系を構築し，化粧水が皮膚表皮中の水の“質”に及ぼす影響の定量評価を行った．

2．方　法

吸収の大きい試料のスペクトルを測定する手法として，サブ波長程度の深さに局在するエバネッセント光と試料の相互作用を観測する全反射減衰（Attenuated total reflection, ATR）測定は赤外分光で広く用いられている．エバネッセント光の電場強度はプリズムからの距離に応じて指数関数的に減少し，光強度が$1/e^2$に減衰する深さd_pは周波数νの関数として



“Quality” of water in stratum corneum investigated with terahertz spectroscopy
Keiichiro Shiraga
RIKEN Center for Integrative Medical Sciences

$$d_p(\nu)=\frac{c}{\sqrt{2}\pi\nu}\left[\sqrt{\left(\varepsilon_p\sin^2\theta-\varepsilon'(\nu)\right)^2+\varepsilon''(\nu)^2}+\left(\varepsilon_p\sin^2\theta-\varepsilon'(\nu)\right)\right]^{-1} \quad (1)$$

で与えられる[6,7]．ここで，c：真空中の光の速度，θ：入射角，ε_p：ATRプリズムの誘電率実部であり，測定試料の複素誘電率を$\tilde{\varepsilon}(\nu)=\varepsilon'(\nu)-i\varepsilon''(\nu)$としている．ATR分光はテラヘルツ帯で大きな吸収をもつ水の分光測定においても高い実用性が報告されており，高抵抗シリコン単結晶（ε_p=11.7）をプリズムに用いると周波数ν=1 THzでは$d_p\approx$25 μmとなる．この深さは角層厚みと同程度であるため，テラヘルツ帯のATR分光では角層中の自由水を選択的に観測できると期待される．そこで本研究では，中心波長780 nmのフェムト秒ファイバーレーザー（FemtoFErb780，トプティカフォトニクス株式会社）を励起光に用いてダイポール型光伝導アンテナ（G10620-11，浜松ホトニクス株式会社）でテラヘルツパルスの発生・検出を行う全反射減衰テラヘルツ時間領域（Terahertz time-domain attenuated total reflection, THz TD-ATR）分光測定系を構築した[8]．

本手法ではATRプリズム近傍に局在する近接場の分光情報を得るため，本研究では高い密着性を期待してヘアレスマウスの腹部（20 × 30 mm）を対象としてTHz TD-ATR測定を行った．実験に使用したマウスは顆粒層SG1で特異的に発現するSkin aspartic protease遺伝子をヘテロで有するヘアレスマウスであり，電気伝導率測定計ASA-M3（日本アッシュ株式会社）を用いた予備測定では野生型と同程度の角層水分量をもつことがわかっている．そこで，全身麻酔を投与したマウスの左腹部と右腹部をそれぞれ交互に3回ずつ測定を行い，その平均値を定常状態のマウスの測定値，そして標準誤差を測定の不確かさとみなした．また，その後にマウスの左腹部と右腹部に純水と化粧水（薬用雪肌精，株式会社コーセー）をそれぞれ1 mLずつ塗布し，その1分後に表面の残留成分を軽く拭き取ってから左腹部（純水）→右腹部（化粧水）→ 左 →…と左右交互に3回ずつ測定を行い，塗布後1分目と11分目にTHz TD-ATR測定を実施した．なお，塗布物の中に含まれる自由水の影響を把握するために，THz TD-ATR分光で純水と化粧水（雪肌精）のテラヘルツ帯スペクトルも測定した．

3．結果および考察

3．1．化粧水中の水和状態評価

本研究で構築したTHz TD-ATR系を用いて純水と化粧水を測定した結果を図1左に示す．どちらの試料にも共通して，バックグラウンド測定（試料がない場合）に比べてテラヘルツパルスの振幅が減少し，またピーク位置が後方に遅延していることが認められる．これは，全反射時にエバネッセント光として試料内部にもぐり込んだテラヘルツ波が試料と相互作用し，吸収や位相遅延が起きていることを表している．また純水（図中青色実線）と化粧水（赤色実線）を比較すると，特に吸収に由来する振幅減少は化粧水に比べて純水の方でより顕著であった．緒言で述べたようにテラヘルツ波は試料中の自由水とのみ相互作用することを鑑みれば，化粧水中には水以外にも様々な基剤が含まれているうえ，一部の水分子は水和水としてそれらの基剤を取り巻いているため，自由水のみからなる純水に比べてテラヘルツ波の吸収が小さくなっていると考えられる．次に，THz TD-ATR測定で得たテラヘルツパルスの電場波形をFourier変換し，吸収の大きさを表す複素誘電率の虚部（誘電損失スペクトル，$\varepsilon''(\nu)$）を求めた結果を図1右に示す．純水の誘電損失スペクトル$\varepsilon''(\nu)$は0.2~3.0 THzの周波数領域において単調減少する傾向が認められたが，これは本測定帯域が～20 GHzに位置する自由水の巨大な吸収ピークの高周波裾野に対応していることに起因する．赤外分光や核磁気共鳴とは異なり明瞭なピーク構造が見られず特徴に欠けるスペクトルであるように思えるが，この吸収の大きさそのものがピコ秒の時間スケールで揺らぐ自由水の量を反映している．また図1右では，化粧水も純水と類似したスペクトル形状を示しているが，これはテラヘル

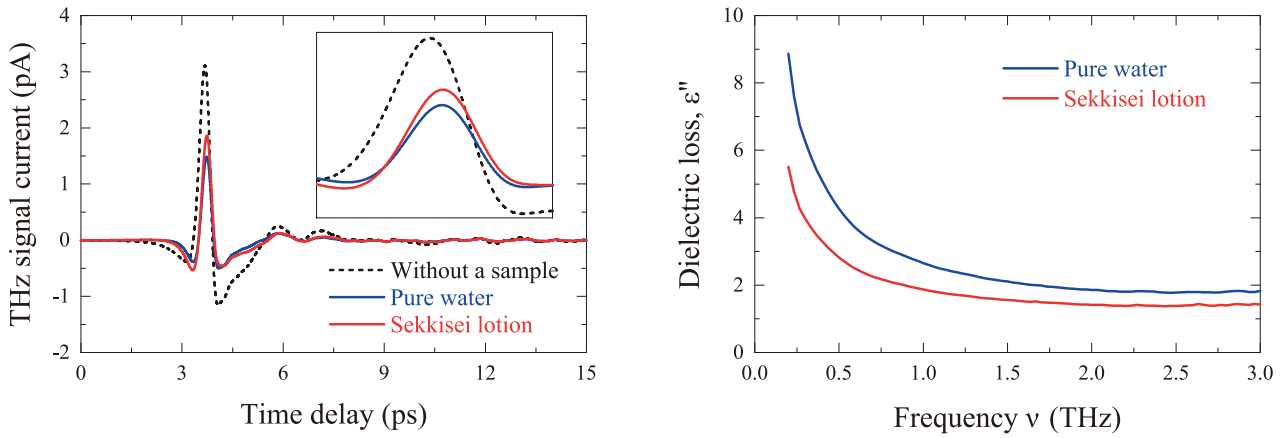


図1　（左）THz TD-ATR測定で得られたテラヘルツパルスの電場波形．挿入図はパルスピーク付近の拡大図．
（右）32℃における純水と化粧水（雪肌精）の誘電損失スペクトル．

ツ帯では化粧品基剤に特有の吸収ピークが現れず，化粧水中の自由水だけが誘電損失スペクトル$\varepsilon''(\nu)$に寄与していることを表している．したがって，純水に対する化粧水の吸収の比率は化粧水中に含まれる自由水量比に他ならず，本THz TD-ATR測定ではその値が66.1±0.05%であると見積もられた．しかしこの値は，赤外領域に見られるH-O-H変角振動ピーク強度から推定した水分量比(89.9%)よりも有意に小さい．ここで，H-O-H変角振動は化粧水中に含まれる全ての水分子(自由水＋水和水)を観測しているのに対し，テラヘルツ帯の誘電損失スペクトル$\varepsilon''(\nu)$には自由水しか寄与を及ぼしていないため，そもそも同一の水を見ているわけではない．ここで両水分量比を比較すると，化粧水中ではその差分に相当する23.8%（=89.9－66.1）の水分子が水和水となりテラヘルツ波と相互作用しなくなっていることがわかる．

3．2．定常状態におけるマウス皮膚中の自由水量評価

上記の解析手法は自由水のみがテラヘルツ帯の吸収に寄与していることを前提としているが，これまでの研究では水以外の角質構成成分がテラヘルツ帯でほとんど吸収を示さないことが報告されている．そのため純水や化粧水に限らず，ヘアレスマウスの誘電損失スペクトル$\varepsilon''(\nu)$から角質層内の自由水量を定量解析することも可能であると考えられる．そこで，塗布物を適用する前に測定した定常状態のマウス皮膚のTHz TD-ATR測定結果を図2左に示す．ヘアレスマウスの誘電損失スペクトル$\varepsilon''(\nu)$は純水のそれと類似した形状を示しているものの，その値は非常に小さいことがわかった．また，挿入図に示すように純水に対するマウスの吸収比率は周波数依存性があり，周波数の増加に応じて自由水量が減少している傾向が見出された．周波数ごとに自由水量が異なるという結果には違和感を感じるが，これは式(1)で記述したようにエバネッセント光の局在深さd_pが周波数νに依存していることが原因に挙げられる．式(1)を用いて実際にエバネッセント光の局在深さ$d_p(\nu)$を計算すると，ν=0.5THzではd_p=50.0μm，ν=1.0THzではd_p=25.6μm，ν=2.0THzではd_p=12.5μmとなり，高周波側では局在深さが小さい，すなわちマウス表皮の浅い領域のみを観測していることが理解できる．したがって，周波数ごとに(マウス)／(純水)の吸収比率が異なるという結果は，マウス表皮内の深さ方向における自由水量の勾配を反映していると考えられる．

吸収の大きい媒質のATR分光を行ったとき，プリズム表面から深さzまでの領域が全体の吸収に占める寄与率C_{0z}は

$$C_{0z}(\nu) = 1-\exp\left(-\frac{2z}{d_p(\nu)}\right) \qquad (2)$$

で与えられる[6,7]．そのため，詳細は省くが式(1)および(2)を用いた理論解析計算を行うことで，誘電損失スペクトル(図2左)からマウス皮膚中における自由水量の深さプロファイルを求めることができる．その結果，図2右に示すようにヘアレスマウス皮膚表層10μmから15μmにかけて自由水量が急激に増加し，その後50μmまでなだらかな増加を経てさらに深い領域では約30%で一定に達していることがわかった．

これまで角層水分量は静電容量や導電率を測定する電気的手法や共焦点ラマン分光を用いた評価が行われてきたが，これらの測定方法では原理的に自由水と水和水を識別することができないため，それらの総和(全水量)を出力値として得ている．ここで，3300cm^{-1}付近に位置するOH伸縮共焦点ラマンスペクトルを用いてヒト前腕の全水量プロファイルを求めた先行研究結果[9]も図2右に示す．今回のTHz TD-ATR測定ではヘアレスマウス腹部を測定しているため両者の定量的な比較は困難であるが，共焦点ラマン分光で得た全水量がどの深さにおいても自由水量を大き

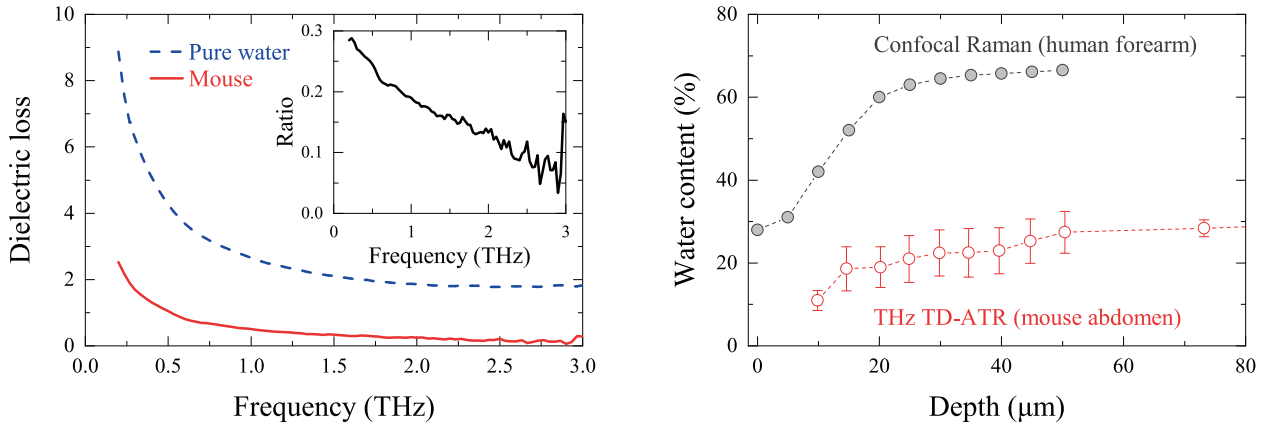


図2　(左) 純水とヘアレスマウス腹部の誘電損失スペクトル．挿入図は純水に対するヘアレスマウスの誘電損失の比．(右) マウス腹部におけるバルク水量の深さプロファイル．参照用データとしてヒト前腕の共焦点ラマン測定結果[9]も示している．

く上回っていることが定性的に理解できる．全水量と自由水量の差は水和水量に相当するため，図2右に示した両プロットの差は皮膚表皮内に存在する水和水の量を反映する．概して言えば，20μm以下ではバルク水に対して水和水の割合が特に多いのに対し，20μmを超えるとバルク水の割合が徐々に増えて，深さ50μmでは水和水：バルク水の比率がおよそ3：2程度に収束している．上述のように，ここでは異なる皮膚試料を比較しているため厳密な議論を行うことはできないものの，本結果は顆粒層より深部に存在する生細胞中では細胞内水の約6割程度が水和水として存在しているのに対し，角質層中では自由水割合がさらに減少して相対的に水和水の比率が高くなっていることを示唆している．生体分子に束縛されている水和水に対して自由水の方が高い蒸気圧を示すことを鑑みれば，タイトジャンクションの外側に位置する角質層内では気化を妨げるバリアが存在しないため自由水量が低下するという傾向は直感的にも納得できるものである．

3．3．純水・化粧水塗布後におけるマウス皮膚中の自由水量評価

次に，定常状態のヘアレスマウスに純水と化粧水（雪肌精）をそれぞれ1mLずつ塗布したときの自由水量変化を図3右に示す．塗布後1分目の時点では，純水（上段）と化粧水（下段）ともに著しい自由水量の増加が認められ，その影響は特に表面付近で顕著であった．しかし塗布後11分経過では，純水を塗布したマウス皮膚中の自由水量が塗布直前と同程度まで減少しているのに対し，化粧水塗布では自由水量が有意に高いレベルに保たれていることが見出された．ここで自由水量の増加割合を評価するために，定常状態（塗布前）に対する塗布後の自由水量の比に相当する“相対自由水量”の深さプロファイルを求めた結果を図3右に示す．1分後の時点では純水塗布と化粧水塗布で酷似した相対自由水量のプロファイルを示し，角質層（深さ20μm以下）では一時的に自由水量がおよそ3倍にまで増加するものの，観測領域が深くなるにつれて自由水量の相対値が1.5倍程度に収束していることがわかる（化粧水における深さ10μmの異常値は皮膚表面でふき取れずに残留していた化粧水の影響であると考えられる）．また純水・化粧水塗布に共通して，塗布直後1分目の時点において50μmより深い領域で相対自由水量が50％も増えているということは，皮膚表面に晒された自由水は角質層のバリアをくぐり抜けて急速に深部へ到達していることを示唆している．

塗布直後には純水と化粧水が同様の自由水量プロファイルを示すものの，その10分後には両者の間に有意な差が認められる．純水塗布時には相対自由水量が1，すなわち塗布前の定常状態にまで戻っているが，この原因としては(i)塗布した水が蒸発によって失われたこと，また(ii)塗布した水が水和水に変化したこと，の2点が考えられる．ただしTHz TD-ATR測定と並行して実施した電気伝導率測定では，塗布前（5.8 ± 2.3μS）と塗布後11分目（5.8 ± 0.8μS）で全水量に有意差が見られないという結果が得られていることを踏まえれば，可能性(ii)は排除でき，塗布した水が全て蒸発したという(i)のシナリオが妥当であると考えられる．その一方で，化粧水を塗布した場合は深さ

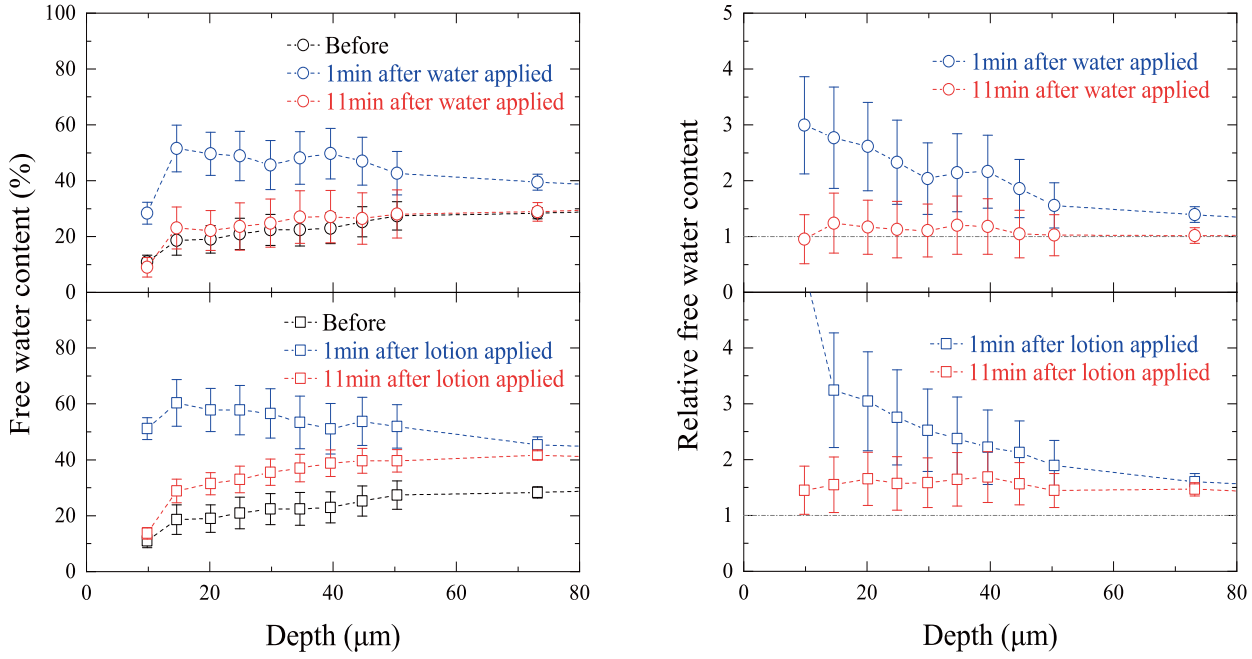


図3　（左）マウス腹部におけるバルク水量の深さプロファイルと塗布後の経時変化．上段：水を適用した場合，下段：化粧水を適用した場合．（右）塗布前に対するバルク水量の相対比．

にかかわらず一様に相対自由水量が50％程度増加していることが見出された．化粧水中の約1/3は自由水ではない成分（溶質基剤ならびに水和水）で占められているにもかかわらず，純水に比べて化粧水の方がより高い“自由水の保湿能力”を有していることは非常に興味深い．

4．総　括

本研究ではTHz TD-ATR測定を用いて皮膚表皮内の“自由水”深さプロファイルを定量的に評価することに成功した．ヘアレスマウスを用いた実証実験では，角質層内の水の大半は水和水として存在し，自由水の比率は低い値に保たれていることが明らかになった．また，皮膚に純水と化粧水（雪肌精）を塗布すると，適用直後は両者ともに特に皮膚表面で自由水量が著しく増加したのに対し，化粧水塗布の場合のみ10分以上経過した時点でも効果的に“自由水の保湿”が行われていることが見出された．これまで水溶液レベルでは示差走査熱量測定（Differential scanning calorimetry, DSC）などを用いて実験的に自由水／水和水の割合を評価する研究は行われていたが，in vivoで水の“質”を評価する研究はほとんど行われていなかった．そのため，生体侵襲性の低いテラヘルツ波を用いてin vivoで皮膚中の自由水量を求めるという本技術は従来の水分量評価技術とは一線を画していると考えられる．今後は共焦点ラマン分光などを用いた全水量測定との融合を図りつつ，THz TD-ATR測定系の最適化を進めることで本質的な意味で保湿の重要性を明らかにすることができる可能性があると期待している．

謝　辞

本研究の実施にあたって技術的な御指導，御協力をいただいた松井毅博士と横尾里佳氏に感謝申し上げます．また，本研究を助成対象課題として採択していただいた公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深謝申し上げます．

（引用文献）

1） 上平恒，多田羅恒雄，「水の分子生理」メディカル・サイエンス・インターナショナル（1998）．
2） 松井毅，陸上脊椎動物の皮膚の適応進化と内在性レトロウイルス．*ウイルス*，**66**，31-38，（2016）．
3） 安部隆，皮膚と水．*油化学*，**34**，413-419，（1985）．
4） T. Matsui *et al.*, SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing. *EMBO Mol. Med.* **3**, 320-333, (2011).
5） B. Baguchi, Water dynamics in the hydration layer around proteins and micelles. *Chem. Rev.* **105**, 3197-3219, (2005).
6） N. J. Harrick, Electric field strengths at totally reflecting interfaces. *J. Opt. Soc. Am.* **55**, 851-857, (1965).
7） K. Ohta and R. Iwamoto, Experimental proof of the relation between thickness of the probed surface layer and absorbance in FT-IR/ATR spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* **39**, 418-425, (1985).
8） M. Nagai *et al.*, Terahertz time-domain attenuated total reflection spectroscopy in water and biological solution. *Int. J. Infrared Milli. Waves* **27**, 505-515, (2006).
9） S. Bielfeldt *et al.*, Assessment of human stratum corneum thickness and its barrier properties by in-vivo confocal Raman spectroscopy. *IFSCC Magazine* **12**, 9-15, (2009).

皮膚疾患に有効な新規骨格を有するビタミンD誘導体の創製

お茶の水女子大学基幹研究院自然科学系
棚谷　綾

Active vitamin D_3 (**1**) plays important roles in many physiological processes, including calcium and phosphate homeostasis, bone metabolism, and immune regulation, via binding to vitamin D nuclear receptor (VDR). Since VDR is involved in the pathogenesis of various diseases, many VDR ligands have been developed as candidate therapeutic agents. Structurally, almost all of the developed VDR ligands with high potency have the same secosteroidal skeleton, while non-secosteroidal VDR ligands are promising candidates for many clinical applications. In this study, we synthesized several derivatives of lithocholic acid (**2**) that was identified as the second endogenous VDR agonist. Novel compounds were designed by using a lithocholic acid derivative **4** with potent vitamin D activity as the lead compound. Among compounds **3**–**7** with a different 3-substituent, the compound **5** was more potent inducer of the HL-60 cell differentiation than the lead compound **4**. The SAR study indicated the size and shape of 2-ethyl-2-hydrozy-1-butyl group as the 3-substituent are proper for potent activity. Then, the replacement of the carboxyl group of compound **4** with other functional group was examined. The compounds **8**–**10** bearing the amide group in the side chain were as potent as active vitamin D_3 (**1**). Further, compounds **11** and **12** with acyclic 1, 3-diol structure, instead of the carboxyl group of compound 4 also showed potent activity in HL-60 cell assay. Since these novel lithocholic acid derivatives are one of the most potent non-secosteroidal VDR agonists reported to date, and would have unique vitamin D functions and different pharmacological properties, compared with the conventional vitamin D derivatives, they would be promising lead for development of novel drug candidates.

1．緒　言

脂溶性ビタミンに属するビタミンD_3は、生体内で代謝を受けて活性型ビタミンD_3(1α, 25-ビタミンD_3、**1**、図1a)となり、特異的核内受容体VDR（Vitamin D receptor）に結合することで、カルシウムやリンの代謝調節や恒常性、骨の形成などを担う生体内分子である[1]。皮膚疾患の領域では、ビタミンD_3誘導体が乾癬の特効薬として用いられている。乾癬はケラチノサイトの異常な増殖、分化を特徴とする皮膚疾患であり、近年、その理解が深まるにつれ、ビタミンD_3の細胞分化誘導作用や表皮細胞増殖抑制作用ばかりでなく、炎症や免疫機能に対する役割が注目されるようになり、ビタミンD_3の持つ抗炎症作用や免疫機能制御に基づく皮膚の健康増進、皮膚疾患治療への応用が期待されている。

これまで、皮膚疾患や骨疾患治療薬開発を目的に多くのビタミンD_3誘導体が創製されてきたが、臨床応用された化合物も含めて高活性誘導体はほとんどすべて、天然の活性型ビタミンD_3（**1**）と同じセコステロイド構造を有している。セコステロイド構造は、化学合成が煩雑で、化学的安定性も低く、取り扱いが難しい。そのため、セコステロイド構造を持たない、新しい骨格を有するビタミンD誘導体の創製が望まれているが、高活性な非セコステロイド型誘導体としては、米国リガンド社が開発したジフェニルメタン誘導体[2]と筆者ら（東京医科歯科大学との共同研究）が開発したホウ素クラスター含有ビタミンD_3誘導体[3,4]など数種に限られている（図1b）。本研究では、以上の背景をもとに、皮膚疾患に対する新たなビタミンD療法の開発基盤の構築を目指し、新規非セコステロイド型ビタミンD誘導体の創製を行った。

Development of Novel Vitamin D Derivatives with Clinical Utilities in the Field of Skin Diseases

Aya Tanatani
Ochanomizu University

2．方法　—分子設計—

2002年にMakishimaらによって二次胆汁酸であるリトコール酸（**2**、図2）がVDRの第二の内因性リガンドであることが同定された[5]。しかし、リトコール酸（**2**）のビタミンD活性は、活性型ビタミンD_3（**1**）と比べると数千分の一程度と、非常に弱く、また、高活性なリトコール酸誘導体の報告はなかった[6-8]。筆者らは、リトコール酸（**2**）とVDRリガンド結合領域との複合体の結晶構造の解析[9]をもとに、リトコール酸の3位水酸基を化学修飾した化合物**3**および**4**（図2）を分子設計、合成したところ、ヒト白血病細胞HL-60の分化誘導活性において、化合物**4**がリトコール酸（**2**）の数千倍で、1α, 25$(OH)_2D_3$よりも高い活性を有することを見いだした[10]。一方で、化合物**4**の血中からの消失が著しく速く、体内動態の改善が必要であることが示唆された。そこで、化合物**4**をリード化合物として、更なる構造展開を図ることとし、まず、化合物**5**～**7**を合成して3位置換基の構造活性相関を明らかとし、次いで、側鎖カルボキシ基を化学変換した化合物**8**～**12**を設計、合成した。

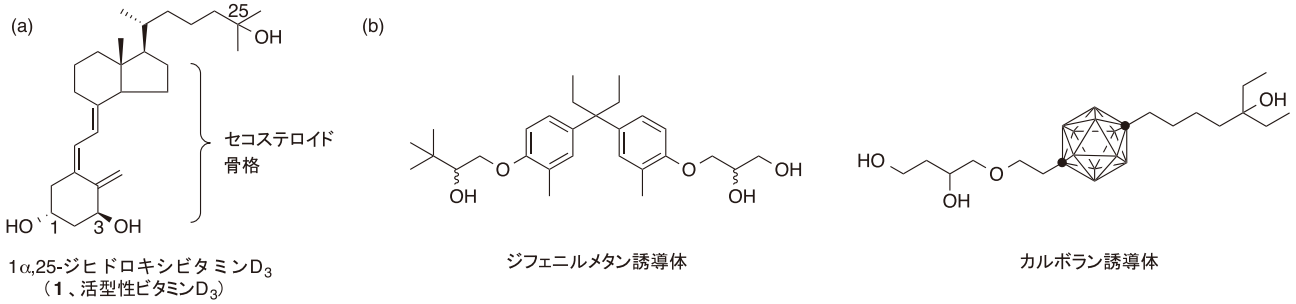


図 1 (a)活性型ビタミン D_3、(b)高活性非セコステロイド型ビタミン D_3 誘導体の構造

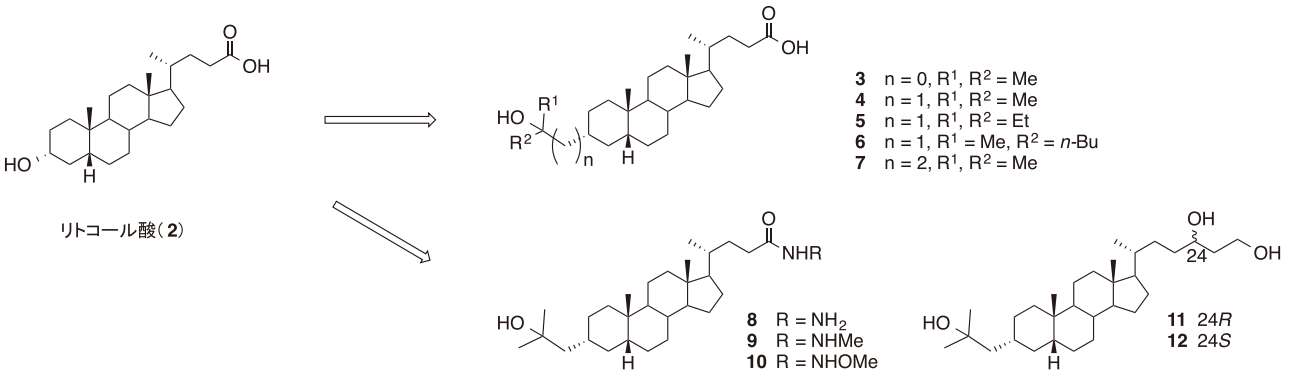


図２　リトコール酸および本研究で創製した誘導体の構造

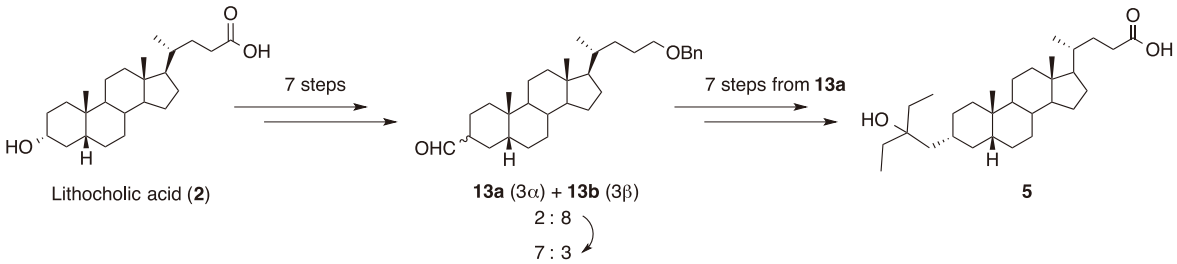


図３　化合物 5 の合成（概略図）

3. 結　果

3. 1. 合　成

化合物 **5** は、リトコール酸（**2**）を出発原料として、まず側鎖カルボキシ基の還元、保護を行った後、3 位の化学変換により合成した（図 3）。鍵化合物である 3 位にアルデヒド基を有する化合物 **13** は 3 位の立体がα体とβ体の混合物として得られ、望みの 3α体の比率は約 20％であった。本混合物をメタノール–THF 中で炭酸カリウム処理することで混合比を変えることができ、3α体の比率を約 70％とすることができた。これらの異性体はシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離することができ、生成したアルデヒド **13a** を用いて化合物 **5** へと導いた。化合物 **6** および **7** も同様の方法で合成を達成した。なお、化合物 **6** は 3 位置換基中に不斉炭素を 1 つ持っており、異性体の混合物として活性評価に用いた。

化合物 **3** の側鎖カルボキシ基は化合物の ADME に大きく関わると考えられるので、その誘導体として、まずアミド誘導体 **8** ～ **10** を合成した。化合物 **4** をリトコール酸（**2**）より 15 工程で合成した後、メチルエステルとしてからアンモニアもしくはメチルアミンと反応させて、それぞれ化合物 **8**、**9** を合成した。また化合物 **3** をクロロギ酸エチルにより酸無水物とした後、*O*–メチルヒドロキシルアミンと反応させて化合物 **10** を得た（図 4）。

リガンド社のジフェニルメタン誘導体や筆者らのカルボラン誘導体（図 1）では、非環式ジオール構造が活性型ビタミン D_3（**1**）の環状ジオール構造に対応すると考えられている。一方、リトコール酸（**2**）と VDR リガンド結合領域との複合体の結晶構造では、リトコール酸（**2**）のカルボキシ基は活性型ビタミン D_3（**1**）の環状ジオール構造の代替となって、VDR のアミノ酸残基と水素結合を形成している。そこで、リトコール酸誘導体 **4** のカルボキシ基を非環式 1,

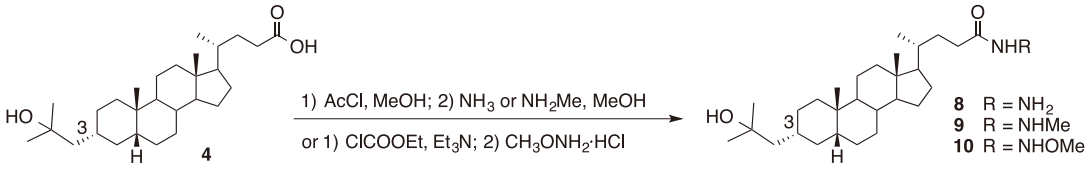


図４　化合物８～10の合成

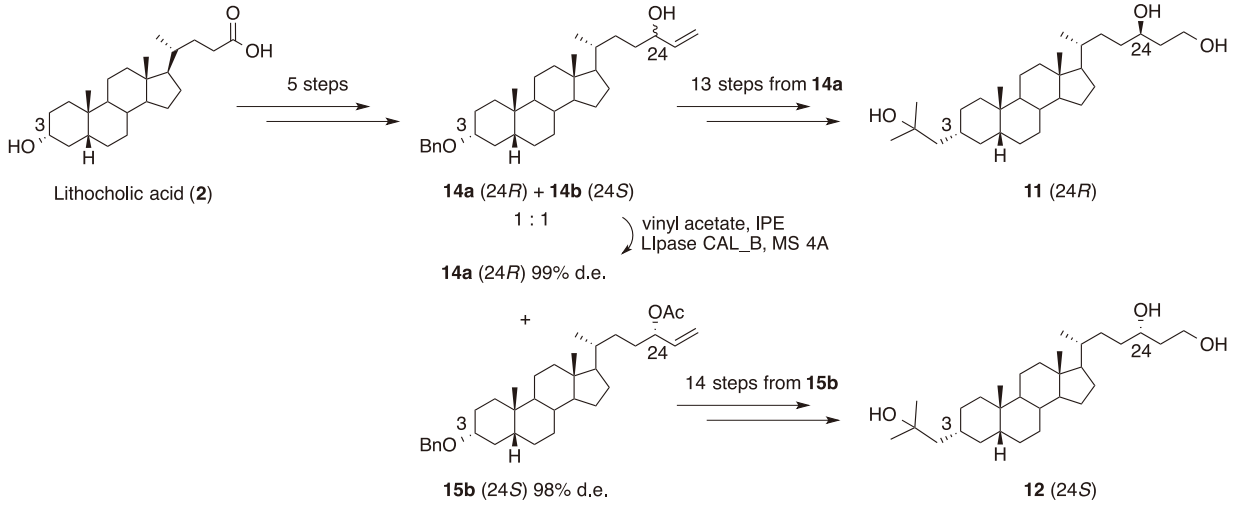


図５　化合物11、12の合成

3-ジオール構造に変換した化合物**11**、**12**を合成した。リトコール酸（**2**）を出発原料として、5工程で鍵中間体であるアルコール体**14**へと導いた（図5）。化合物**14**は24位の立体化学の異なる異性体の1：1の混合物として得られたため、**14**および化合物**11**/**12**合成までの中間体の各ステップで異性体の分離を試みたが、いずれの段階でも分離することはできなかった。そこで、化合物**14**の酵素を利用したアセチル化を種々検討したところ、リパーゼとしてCAL_Bを用いることで、選択的に24*S*体のみがアセチル化されることがわかった。精製した化合物**14a**から13工程で化合物**11**を、アセチル化体**15b**から14工程で化合物**12**を合成することができた。化合物の24位の立体化学については、X線結晶構造解析により決定し、リパーゼの反応性から予想される立体構造と一致していることがわかった。

合成した化合物の構造および純度は、^{1}H NMR、^{13}C NMR、質量分析により確認した。

3. 2. 活性評価

合成した化合物のビタミンD活性は、ヒト急性前骨髄球性白血病細胞HL-60に対する分化誘導能により評価した。リトコール酸（**2**）は、この試験濃度範囲ではビタミンD活性を示さなかった。今回合成した誘導体はいずれも細胞分化誘導活性を有していた。リード化合物である化合物**4**は活性型ビタミンD_3（**1**）よりも強い細胞分化誘導活性を

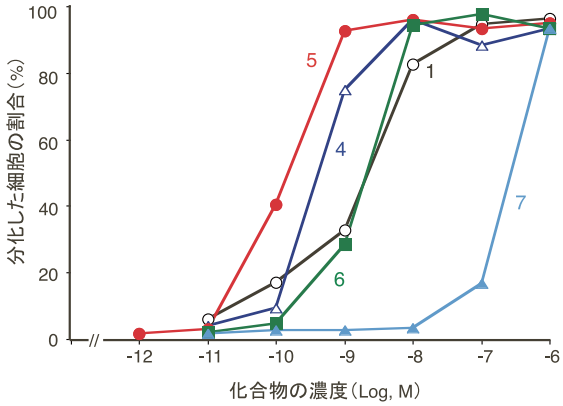


図６　３位修飾体４～７のHL-60細胞分化誘導活性

持っていた。3位置換基の炭素鎖の長さの違う化合物の比較では、化合物**4**よりも炭素鎖が1つ長い化合物**7**では大きく活性が低下した。合成した化合物の中では、化合物**5**が、活性型ビタミンD_3（**1**）やリード化合物**4**よりも高い活性を示した。水酸基の付け根の炭素についているアルキル基としてはエチル基が最適と思われ、化合物**4**の持つ2つのメチル基のうち1つを*n*-ブチル基に変えた化合物**6**は活性が若干低下した（図6）。

化合物**4**のカルボキシ基をアミドに変えた化合物**8**～**10**は、いずれもリード化合物**4**の活性よりは低いものの、活性型ビタミンD_3（**1**）と同等の活性を有していた（図7a）。一方、カルボキシ基をジオール構造に変えた化合物**11**～

12では若干活性は低下したものの、高い細胞分化誘導活性を保持していた。ジオール構造の立体化学に関しては、24*R*体**11**の方が24*S*体**12**よりも活性が高く、水酸基の立体化学が細胞分化活性に影響することがわかった。

4．考　察

本研究では、新規皮膚疾患治療薬開発を念頭に、新規非セコステロイド型ビタミンD_3誘導体としてリトコール酸誘導体を設計、合成した。筆者らが既に見いだした高ビタミンD活性を有する化合物**4**をリード化合物として構造展開を図った。まず、リトコール酸（**2**）の3位水酸基をヒドロキシアルキル基としたことで活性が向上したことから、その構造活性相関を検討した。これまでの研究から3位の置換基はα位に位置する方が、活性が高いことがわかっていたので、3α位にアルキル部分の長さの異なる置換体を持つ誘導体を合成した。その結果、化合物**4**よりも水酸基の位置を骨格から離した化合物**7**で活性が著しく低下した。水酸基が直接ステロイド骨格に結合したリトコール酸（**2**）や炭素1つを挟んで連結した化合物**3**の活性も化合物**4**より低いことから、水酸基の位置はステロイド骨格からメチレン鎖2つ分は離れた位置が最適であることがわかった。また、化合物**4**の3位の水酸基の付け根の炭素に結合したアルキル基を比較すると、ジエチル体**5**の活性がジメチル体**4**よりも高く、さらに長い*n*-ブチル基を持つ化合物**6**では活性が低下した。以上のことから、3位の置換基としては、2-ethyl-2-hydroky-1-butyl基が適していると考えられる。その要因としては、3位置換基の末端アルキル基をメチル基からエチル基に変換したことによりVDRのリガンド結合ポケットにおける疎水的な相互作用が増加したためと推測している。現在、VDRのリガンド結合領域との共結晶のX線構造解析により、詳細な結合様式の解明を進めている。

次に、化合物**4**の血中からの早い消失を考慮し、そのカルボキシ基を他の官能基に代替した化合物を設計、合成した。カルボキシ基をアミドに変えた化合物はいずれも、カルボン酸体**4**よりも活性は低下するものの、活性型ビタミンD_3（**1**）と同等の高い活性を示した。このことから、リトコール酸誘導体のカルボキシ基は他の生物学的等価性基で代替可能であることが示唆された。そこで、カルボキシ基を1,3-ジオール構造に置き換えた誘導体を合成したところ、化合物**11**が活性型ビタミンD_3（**1**）と同等の活性を有することがわかった。化合物**11**と**24**位水酸基の立体化学が異なる異性体**12**では活性が若干低下した。このことから、ジオール構造の置換位置、立体化学が活性に影響すると考えられ、周辺部位の置換基導入も含め、構造最適化の余地があると考えられる。

今回、合成した化合物については、ヒト急性前骨髄球性白血病細胞HL-60の分化誘導活性を指標に活性を評価した。現在、VDRへの結合親和性、活性化能、結合様式の解析等を進めている。また、皮膚疾患治療薬開発のために、体内動態の解析に加え、抗炎症作用や免疫機能制御といった機能の解明を行うことを計画している。

5．総　括

筆者らが見いだした高活性な非セコステロイド型ビタミンD誘導体である化合物**4**をもとに、更に高い細胞分化誘導活性を有する化合物**5**を見いだすとともに、3位における構造活性相関を明らかにすることができた。更に、カルボキシル基を持たない高活性誘導体の創製へと展開することができた。これらの化合物の機能を詳細に解析するとともに、更なる構造展開により、ビタミンDとしての活性プロファイルや体内動態で特徴的な性質を持つ新規化合物の創製が期待でき、皮膚疾患等に対するビタミンD療法への応用を目指す。

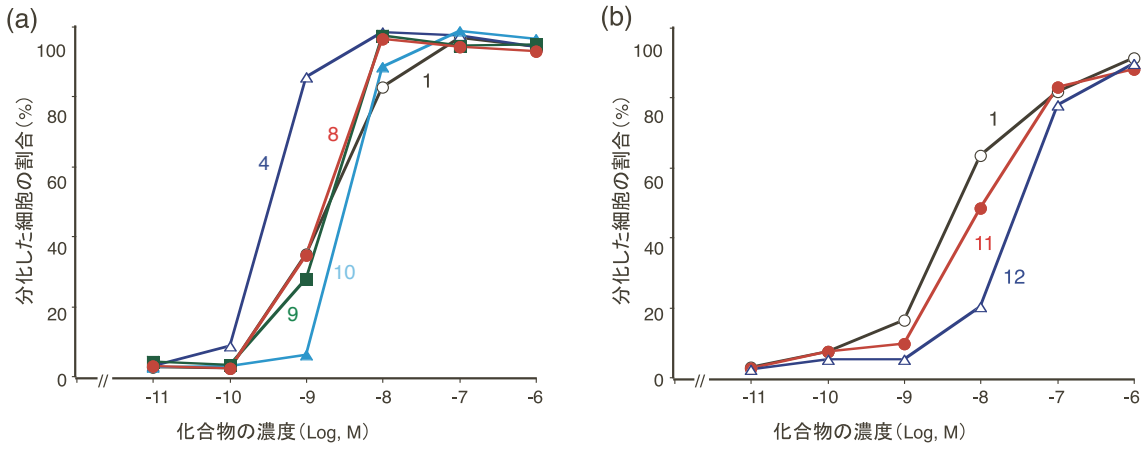


図7　カルボキシ基を変換した化合物8～12のHL-60細胞分化誘導活性

（引用文献）

1） Haussler, M. R.; Whitfeld, G. K.; Haussler, C. A.; Hsieh, J. C.; Thompson, P. D.; Selznick, S. H.; Dominguez, C. E.; Jurutka, P. W. *J. Bone Miner. Res.* **1998**, *13*, 325–349.

2） Boehm, M. F.; Fitzgerald, P.; Zou, A.; Elgort, M. G.; Bischoff, E. D.; Mere, L.; Mais, D. E.; Bissonnette, R. P.; Heyman, R. A.; Nadzan, A. M.; Reichman, M.; Allegretto, E. A. *Chem. Biol.* **1999,** *6*, 265–275.

3） Fujii, S.; Masuno, H.; Taoda, H.; Kano, A.; Wongmayura, A.; Nakabayashi, M.; Ito, N.; Shimizu, M.; Kawachi, E.; Hirano, T.; Endo, Y.; Tanatani, A.; Kagechika, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 20933–20941.

4） Fujii, S.; Sekine, R.; Kano, A.; Masuno, H.; Songkram, C.; Kawachi, E.; Hirano, T.; Tanatani, A.; Kagechika, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 5891–5901.

5） Makishima, M.; Lu, T. T.; Xie, W.; Whitfi eld, G. K.; Domoto, H.; Evans, R. M.; Haussler, M. R.; Mangelsdorf, D. J. *Science* **2002**, *296*, 1313–1316.

6） Adachi, R.; Honma, Y.; Masuno, H.; Kawana, K.; Shimomura, I.; Yamada, S.; Makishima, M. *J Lipid Res.* **2005**, *46*, 46–57.

7） Ishizawa, M.; Matsunawa, M.; Adachi, R.; Uno, S.; Ikeda, K.; Masuno, H.; Shimizu, M.; Iwasaki, K.; Yamada, S.; Makishima, M. *J Lipid Res.* **2008**, *49*, 763–772.

8） Masuno, H.; Kazui, Y.; Tanatani, A.; Fujii, S.; Kawachi, E.; Ikura, T.; Ito, N.; Yamamoto, K.; Kagechika, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2019**, *27*, 3674–3681.

9） Masuno, H.; Ikura, T.; Morizono, D.; Orita, I.; Yamada, S.; Shimizu, M.; Ito, N. *J.Lipid Res.* **2013**, *54*, 2206–2213.

10） 棚谷綾、佐々木晴江、川崎波留、影近弘之、増野弘幸、ビタミンD活性を有するリトコール酸誘導体、PCT/JP2017/002902.

撥水性、抗菌・抗ウイルス性、紫外線遮蔽性を併せ持つ新規酸化物固体材料の開発

東京工業大学物質理工学院

中島　章

Effect of atom substitution on the hydrophobicity, antibacterial and antiviral properties of $La_2Mo_2O_9$ (LMO) was investigated by using Ce (LCMO) with citric acid polymerization method. The sintered bodies showed hydrophobicity by exposure to ambient air. Although antibacterial activity of LCMO was inferior to that of LMO against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, it was sufficient for practical use. On the other hand, LCMO exhibited higher or similar antiviral activity than LMO against *bacteriophage Qβ*, and *bacteriophage ϕ6*. LCMO absorbed ultraviolet with little photocatalytic activity. This material possesses hydrophobicity, antibacterial, antiviral, and ultraviolet shielding properties, simultaneously. It should be a promising material for the fusion of makeup and medicine.

1．緒　言

近年、新型Φコロナウイルス（COVID-19）の世界的な流行により、様々なウイルスの世界的な大流行（ウイルスパンデミック）の脅威が高まっている。一度ウイルスパンデミックが発生すると、医療機関でワクチンの接種が可能になるのには少なくとも数ヶ月を要するため、「予防」や「拡大抑制」に関する研究は喫緊の課題となっている。

無機系の抗ウイルス材料は有機系に比べて歴史が浅い。しかしながら、様々なウイルスに対して効果があり、比較的広い温度範囲で適用可能であり、ウイルスが耐性を獲得しにくい等の特徴を有することから、近年活発に研究が行われている。これまでAg, Cu等の金属系[1-3]やTiO_2等の光触媒系[4,5]、ZnO, CaO等[6,7]において抗ウイルス活性が報告され、実際に使用されている。しかしながら酸化等による着色や活性の低下、使用環境の制限（光の必要性、アルカリ化）などの問題点があり、これらを解決できる、活性の高い新たな無機抗ウイルス材料の開発が望まれている。

ごく最近、我々は希土類酸化物の撥水性[8-12]とモリブデンの抗菌性[13-16]に着目し、LaとMoの複合酸化物である$La_2Mo_2O_9$（以下LMO）の粉末および焼結体をクエン酸重合法[17]と常圧焼結法で作製したところ、この物質が抗ウイルス活性と抗菌性、撥水性を併せ持つ新規の無機抗ウイルス材料であることを見出した[18]。この材料の粉末は、グラム陰性菌である大腸菌とグラム陽性菌である黄色ブドウ球菌、エンヴェロープを持たないウイルスであるバクテリオファージQβ（以下Qβ）、エンヴェロープを持つウイルスであるバクテリオファージΦ6（以下Φ6）のいずれに対しても6時間で2桁以上（99％以上）の抗菌・抗ウイルス活性を示す。しかしながらCOVID-19や新型インフルエンザと同じタイプであるΦ6に対する活性は、他の菌やQβに比べて低いという問題点があった。

本研究では、Φ6に対する抗ウイルス活性の向上に加え、化粧品への応用を意識して紫外線遮蔽性能を併せ持つ、これまでにない酸化物材料の開発を目指して、LMOの元素の一部を他の元素で置換することを検討した。本研究では置換する元素としてCeを選択した。CeはLaと同様に比較的安価な希土類元素であり、その酸化物は抗菌活性を発現する[19-22]とともに紫外線遮蔽能があることが知られている[23-25]。事前に予備実験を行ったところ、CeはCe(Ⅲ)とCe(Ⅳ)の2つの価数を持つことから、Ceの添加量が多くなると、単相の複合酸化物が得られにくいことが分かった。本報告ではLaサイトの10％をCeで置き換えた$La_{1.8}Ce_{0.2}Mo_2O_9$（以下LCMO）の粉末を作製しLMOとの活性比較を行った結果について述べる。

Preparation of hydrophobic complex oxides with antibacterial, antiviral, and ultraviolet shielding properties

Akira Nakajima

Department of Materials Science and Engineering, School of Materials and Chemical Technology, Tokyo Institute of Technology

2．方　法

2.1．試料の作製

出発原料として、La源に$La(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$、Mo源に$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$、Ce源に$Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$をそれぞれ精製せずにそのまま用いた。LMOでは、硝酸ランタン（2.5g）とモリブデン酸アンモニウム（1.0g）の粉末をそれぞれ10mLの蒸留水に溶解させ、LaとMoのモル比がLa：Mo=1：1になるようにこれらの水溶液を混合した。LCMOでは、硝酸ランタン（2.25g）と硝酸セリウム（0.25g）の粉末をそれぞれ8mL, 2mLの蒸留水に溶解させ、LaとCeのモル比がLa：Ce=9：1になるようにこれらの水溶液を混合した。その後モリブデン酸アンモニウム（1.021g）の粉末を10mLの蒸留水に溶解させ、（La+Ce）とMoのモル比が（La+Ce）：Mo=1：1になるように混合した。

続いて蒸留水で溶解させた濃度2.31mol/Lのクエン酸

水溶液を金属イオン（La+Ce+Mo）とクエン酸のmol比が、（La+Ce+Mo）：クエン酸＝1：2になるようにこれらの混合溶液に加えて10分間撹拌した。その後エチレングリコールとクエン酸とのmol比が2：3になるように、上記の溶液にエチレングリコールを添加した。この溶液を80℃で6時間撹拌し、エステル化させることにより前駆体を得た。得られた前駆体は200℃で24時間、大気雰囲気下で乾燥し、得られた乾燥粉末を乳鉢で10分間粉砕した。この前駆体粉末を500℃（LMO）または550℃（LCMO）で12h大気下で仮焼し、LMO, LCMOの各粉末を作製した。以後これらを仮焼粉末と記述する。

得られた仮焼粉末約0.15gに成形助剤として体積分率2%のエチレングリコールを混合し、100MPa, 3min保持の条件で、一軸加圧成形して成形体を得た。得られた成形体は大気雰囲気下で900℃, 12hの焼成を行うことにより、焼結体を作製した。

得られた粉末の微構造は走査型電子顕微鏡（FE-SEM, 日本電子, JSM7500F, Japan）を用いて観察した。粉末の比表面積は窒素吸着法（MicrotracBEL, BEL SORP mini, Japan）を用いて測定した。粉末の結晶相はCu Kα線源（40kV, 30mA）を用いて、X線回折（XRD, SHIMAZU, XRD-6100, Japan）より評価した。粉の組成はICP発光分析装置（ICP-OES, 5100 VDV, Agilent Technologies, USA）で確認した。光吸収性能の評価には、可視紫外分光法（V-660, 日本分光）を用いた。焼結体の密度はアルキメデス法により算出した。焼結体の表面粗さは、レーザー顕微鏡（3D Measuring Laser Microscope, LEXT OLS4000, OLYMPUS, Japan）で測定した。作製した焼結体の濡れ性の評価を行うために，3μLの水滴に対する接触角（Dropmaster 500 協和界面科学株式会社）を測定した。焼結体表面の化学組成は、XPS（X-ray Photoelectron Spectrometer 5500MT; PerkinElmer Inc., USA）を用いて評価した。励起X線はAl Kα（14 kV, 300W）を用いた。

2．2．抗菌・抗ウイルス活性試験(フィルム密着法)

作製したLMO, LCMOの各粉末はそれぞれエタノールで分散させ、サスペンションを作製した（試料粉末: エタノール＝1mg：1mL）。このサスペンション0.15mLをガラス基板（25mm × 25mm）上に均一に塗布し、100℃で30分乾燥・滅菌を行った。この塗布～滅菌までの工程を3度繰り返すことにより試料粉末が均一に載っている試料基板を作製した。

2．2．1．抗菌試験

抗菌活性試験では黄色ブドウ球菌（NBRC 12732）と大腸菌（NBRC 3972）を用いた。抗菌活性試験ではISO 17094, JIS R 1752に記載されている「フィルム密着法」を用いて抗菌活性の評価を行った。まず初めに大腸菌と黄色ブドウ球菌の栄養を含む寒天であるNA（Nutrient Agar）培地上で37℃，18時間の条件下で培養を行った。その後、栄養源のNB（Nutrient Broth）を滅菌水で500倍に希釈して1/500NB溶液を作製し、NA培地上で培養を行った大腸菌、黄色ブドウ球菌を1/500NB中に溶解させ、およそ2.0×10^6cfu/mLの濃度になるように菌液の濃度を調整した。粉末を塗布した試料基板上に作製した菌液50μL（コロニー数＝10^5cfu相当）を乗せ、透明フィルムで密着させた。その後、湿度が調節された室温での環境下で暗所で保持し、所定の時間（0, 2, 4, 6時間）が経った試料基板を5mLのSCDLP（soybean casein digest broth with lecithin and polysorbate）培地に入れ、2分間振盪させることにより試料粉末と細菌間の反応を停止した。続いて細菌を含むSCDLP溶液をPBS（phosphate buffered saline）溶液を用いて希釈を行い、菌希釈溶液を作製した。その後コロニー数を数えるためにNA培地に1mLの細菌を含んだ菌希釈溶液を添加・混合し、37℃で48時間培養することにより細菌のコロニーを形成した。NA培地上に存在するコロニー数をカウントし、得られたコロニー数を希釈倍率でかけた値を生存菌数として抗菌活性試験前後の細菌の生存数を求めた。粉末試料なし（control）の細菌の生存数はガラス基板上に試料粉末を載せずにフィルム密着法による抗菌活性を行った。また抗菌試験前に存在していた細菌の存在量（N_0）は各々の試料の0時間における細菌の生存数とした。コロニーカウントは2度行い、それらの平均の値を採用した。

2．2．2．抗ウイルス試験

抗ウィルス活性試験にはQβ（NBRC 20012）とΦ6（NBRC 105899）を用いた。まず初めに、QβとΦ6のファージ株はISO 18061を参照して用意した。各々培養されたファージは1/500NB を用いておよそ2.0×10^7pfu/mLの濃度になるようにウイルス液の濃度を調整した。粉末を塗布した試料基板上に作製したウイルス液50μL（プラーク数＝106pfu相当）を乗せ、透明フィルムで密着させた。その後，湿度が調節された室温での環境下で暗所で保持し、所定の時間（0, 2, 4, 6時間）が経った試料基板を5mLのSCDLP培地に入れ、2分間振盪させることにより試料粉末とウイルス間の反応を停止した。続いてウイルスを含むSCDLP溶液をPBS溶液を用いて希釈を行い、ウイルス希釈溶液を作製した。その後、Qβは緑膿菌（NBRC 14084）に、Φ6は大腸菌（NBRC 106373）にそれぞれを10分間混和、感染させた。その後プラーク数を数えるために1mLのウィルスを含んだ希釈溶液を0.5% LB（Luria-Bertani medium）培地ナンカンと混合し、1.5% LBナンカン培地上に添加、37℃で48 時間培養させることによりウイルスのプラークを形成した。その後のLB培地上に存在するプラーク数をカウントし、得られたプラーク数を希釈倍率で

かけた値を生存ウイルス数として抗ウイルス活性試験前後のウイルスの生存数を求めた。粉末試料なし（control）のウイルスの生存数はガラス基板上に試料粉末を載せずにフィルム密着法による抗ウイルス活性を行った。また抗ウイルス試験前に存在していたウイルスの存在量（N_0）は各々の試料の0時間におけるウイルスの生存数とした。プラークカウントは2度行い、それらの平均の値を採用した。

フィルム密着法では溶液存在下における細菌・ウイルスとの接触試験のために、粉末がイオンとして溶液中に漏出する可能性が考えられる。既往の研究報告において、粉末と細菌・ウイルスの“直接的接触”と粉末から溶け出したイオンと細菌・ウイルスの“間接的接触”では細菌・ウイルスの死滅のしやすさが異なるために粉末から溶け出すイオンの量は非常に重要になる[18, 26]。そのため作製した各試料粉末の1/500NB 溶液に対する金属イオン溶出量と溶液中のpH値を測定した。 溶液中での試料粉末の振盪時間は2時間とし、100回/分の速さで振盪した。振盪させた粉末を含むイオン漏出液をシリンジで採取しフィルターを用いて粉末を除去し、漏出したイオンのみを含むイオン溶液を作製した。得られた溶液はpH測定（HM-21P 東亜DKK株式会社）、ICP発光分析装置（ICP-OES, 5100 VDV, Agilent Technologies, USA）による溶解金属イオン量の測定を行った。

本研究では合成したLMO, LCMOだけでなく、関連する市販の酸化物試薬（La_2O_3（99.99%），CeO_2（99.5%），MoO_3（99.0%））についても同一条件で評価を実施した。

3．結果および考察

3．1．粉体、焼結体特性および撥水性

得られた試料粉末のX線回折図形をFig. 1に示す。得られた粉末はいずれも概ね単相の$La_2Mo_2O_9$（card No. 28-0509）であった。SEM観察の結果、1次粒子径は50-100nm程度であった（Fig. 2）。ICP分析から、得られた粉末は仕込み通りの組成比であることが確認された。

Table 1に各粉末のICP-MSによるイオン漏出量，pH，比表面積測定の結果を示す。比表面積はLMOとLCMOは

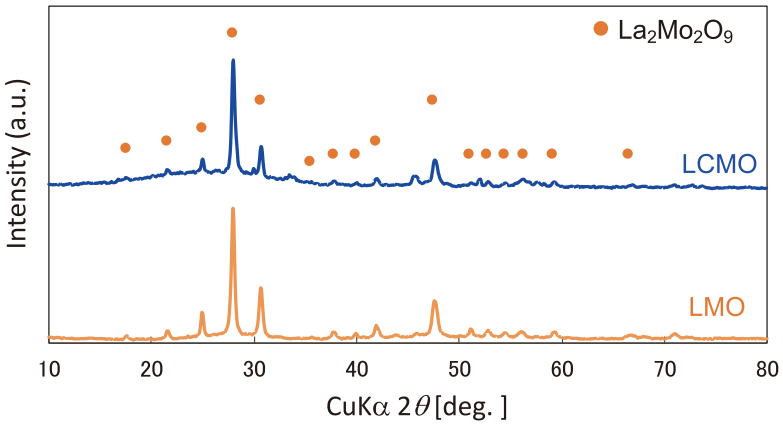


Fig. 1　XRD patterns of prepared powders.

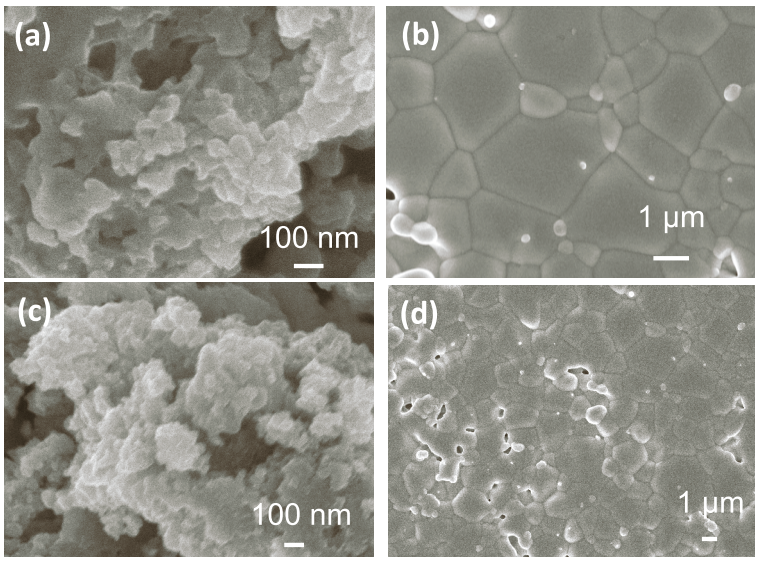


Fig. 2　SEM micrographs of prepared powders and sintered bodies: (a) & (b) LMO, and (c) & (d) LCMO.

7～10 m^2/gであった。イオン漏出前の1/500NB溶液のpHは7.8であった。MoO_3, CeO_2はいずれも、Laとの複合酸化物よりも溶解しやすい傾向を示した。MoO_3の水に対する溶解度は3.4 mmol/L（28℃）[27]であるが、La_2O_3, CeO_2の溶解度はいずれもほぼ不溶[28, 29]であり、漏出量の結果は溶解度の違いと概ね一致する。La_2O_3は試薬酸化物の中で最も漏出量が低く、Mo, Ceと複合酸化物を形成すると漏出量が高くなる傾向がみられる。La_2O_3の溶解度が低いため、Mo, Ceの溶出が抑制され、これらのイオンに徐放性が付与されることが分かる。また、合成した複合酸化物ではLaとMoの漏出量のオーダーが概ね同程度であることから、Moの溶解がLaの溶解を誘発していることが考えられる。MoO_3は漏出量が多い上にpHを大きく低下させる効果があることが分かる。これは前報[18]で考察したように、MoO_3の溶解によりヒドロニウムイオンの濃度が増大するためである。単純酸化物のpHの変化の序列はLa_2O_3 > CeO_2 > MoO_3となり、MoO_3, CeO_2はいずれもLaとの複合酸化物となることでpHが高くなった。

Table 1　Results of pH and dissolved ion concentration in the water with 1/500NB solution, with the specific surface areas of samples.

	pH	SSA [m²/g]	La[μmol/L]	Ce[μmol/L]	Mo[μmol/L]
LMO	5.26	6.8	168	N.D.	299
LCMO	5.77	10.4	75	0.43	112
La_2O_3	6.60	0.6	2	N.D.	N.D.
MoO_3	3.35	1.7	N.D.	N.D.	3992
CeO_2	5.46	3.3	N.D.	4	N.D.

得られた焼結体の結晶相も同様に$La_2Mo_2O_9$であった。アルキメデス法により求めた焼結体の相対密度はLMOは96%, LCMOは94%であった。各焼結体の表面のSEM写真をFig. 2に示す。焼結体の平均表面粗さ（Ra値）は、それぞれ0.535 μm（LCMO）、0.395 μm（LMO）であり、違いは無視できるレベルであった。焼成後大気下暗所で保持した際の、保持時間に対する焼結体表面の接触角変化と、保持時間に対する焼結体表面の炭素量の金属元素に対する割合をFig. 3 (a), (b)にそれぞれ示す。LMOと同様に焼成直後はLCMOは親水的であるが、その後は急速に接触角が増大することが分かる。この現象は、焼成直後の焼結体表面は清浄表面であるため、初期は大気中での濃度が高い水分子の吸着が進行して低い接触角を示すが、時間経過に従い、表面の水分子は徐々に大気中の有機物に置き換わるために生じると考えられる。LCMOはLMOよりも撥水化が速く、有機物濃度の上昇も速い。これは希土類であるCeの高い撥水性[9]が影響しているものと思われる。撥水化した各試料に対し、オゾン照射前後の焼結体の撥水性の変化を確認するために真空紫外光を大気中に照射することでオゾンを発生させ、焼結体表面の清浄を行った。結果をFig. 4に示す。LMOで2週間かかっていた撥水性の再現がLCMOでは8日に短縮され、撥水化速度の向上が確認

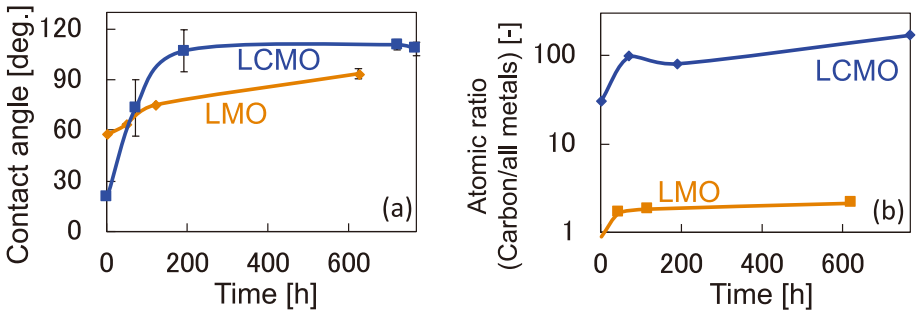


Fig. 3　(a) Contact angle change and (b) the surface carbon ratio for LMO and LCMO ceramics during storage in ambient air after firing.

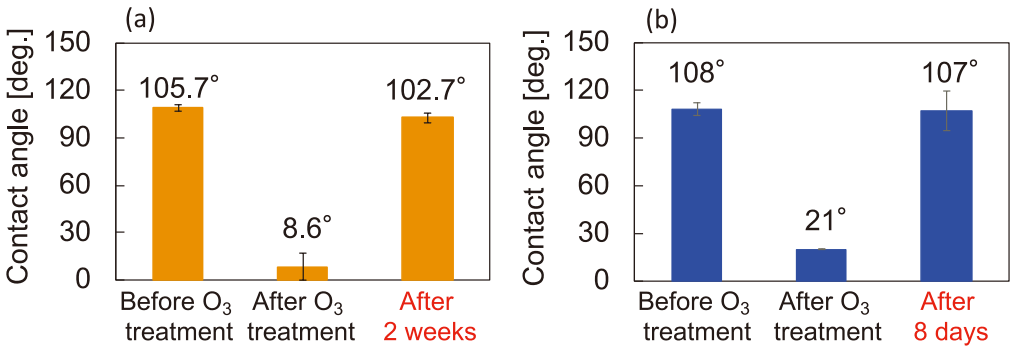


Fig. 4　Contact angle change of the LMO and LCMO sintered bodies before and after ozone treatment.

された。LCMOはこのように優れた自己撥水性を示すため、有機物との親和性が高いことが予想される。

3. 2. 抗菌・抗ウイルス活性

Fig. 5(a), (b)に本研究で合成した試料および試薬酸化物の、大腸菌に対する抗菌活性を示す。Laとの複合酸化物では活性序列は、LMO > LCMO であり、試薬酸化物では、MoO_3 > La_2O_3 >> CeO_2 となった。CeO_2 には抗菌活性は殆ど認められなかった。

La_2O_3 の抗菌効果については先行研究[30-32]があり、リン酸吸着による栄養阻害の効果が報告されている[31, 32]。LMOにはLaとMoの相乗的な効果が見られ、La_2O_3 や MoO_3 よりも高い抗菌活性を示した。抗菌活性の機構を検討するため、我々はフィルム密着試験によるアルカリフォスファターゼ酵素(ALP)の減少率の算出を行った。Fig. 6に実験結果を示す。減少率を比較すると MoO_3, La_2O_3、LCMO, LMOがALP酵素を多く不活化させていることが明らかになった。ALP減少率と抗菌活性値を比較すると大きな傾向は一致しており、抗菌作用の機構には、ALP酵素などの酵素タンパク質の不活化が影響していることが考えられた。

Fig. 5 (c), (d)に本研究で合成した試料および試薬酸化物の、黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性を示す。傾向は大腸菌と同様であり、これらのことからCeの元素置換による効果は、菌に対しては少ないことが明らかになった。しかしながらLCMOであっても6時間で3ケタを超える十分に高い抗菌活性を示すことが分かった。

Fig. 7に、本研究で合成した試料および試薬酸化物の抗ウイルス活性を示す。Qβに対しての抗ウイルス活性は、LMOはLCMOとほぼ同程度であり、Φ6に対してはLCMO > LMOとなった。またCeO_2はほとんど活性を示さないのに対し、La_2O_3は一定の活性を示した。試薬酸化物の活性序列は、MoO_3 > La_2O_3 > CeO_2 となった。

Moの漏出イオンはpH6以下ではポリ酸を形成する可能性が高く、また反応液中にはリンをはじめとする各種のイオンも存在することから、Moはこれらのイオンとヘテロポリ酸を形成している可能性がある。ポリ酸は水溶液中で負の電荷を持ち、抗ウイルス活性を示すことが報告されている[33-36]。Juddらは HIV ウイルス（エンベロープを持つウイルス）に存在する逆転写酵素の活性部位であるLysine残基（Lys41, Lys43, Lys55）のカチオン部位にポリ酸が静電相互作用的に吸着するとHIVウイルスを不活化することを報告した[37]。また、宿主と脱着に寄与する部位であるノイラミニダーゼ(NA)の蛋白質分解酵素との結合にはLysine残基が必要であることが知られている[38]。そのために、ポリ酸の存在によりLysine残基の不活化が生じ、宿主から脱着ができずに増殖を抑える可能性が考えられる。一方、ノンエンベロープウイルスの表面にも宿主との

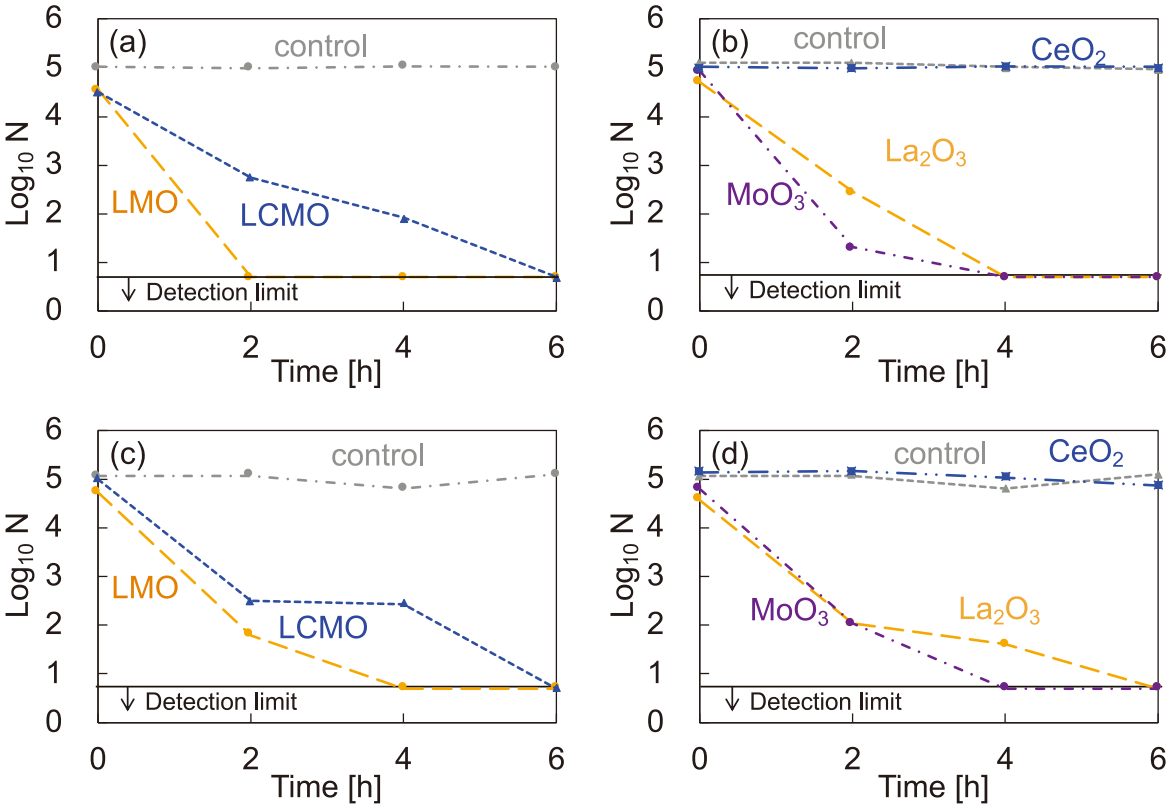


Fig. 5 Results of antibacterial activity experiments against (a) & (b) *Escherichia coli*, and (c) & (d) *Staphylococcus aureus*.

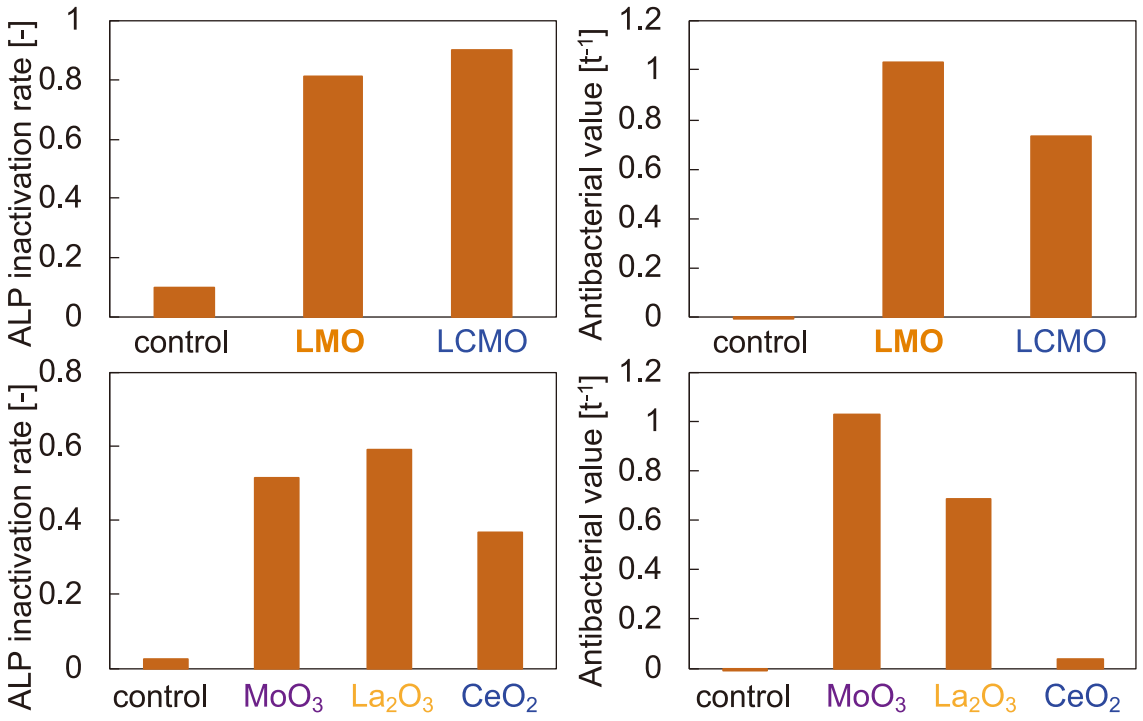


Fig. 6 Relation between antibacterial activity and ALP inactivation rate

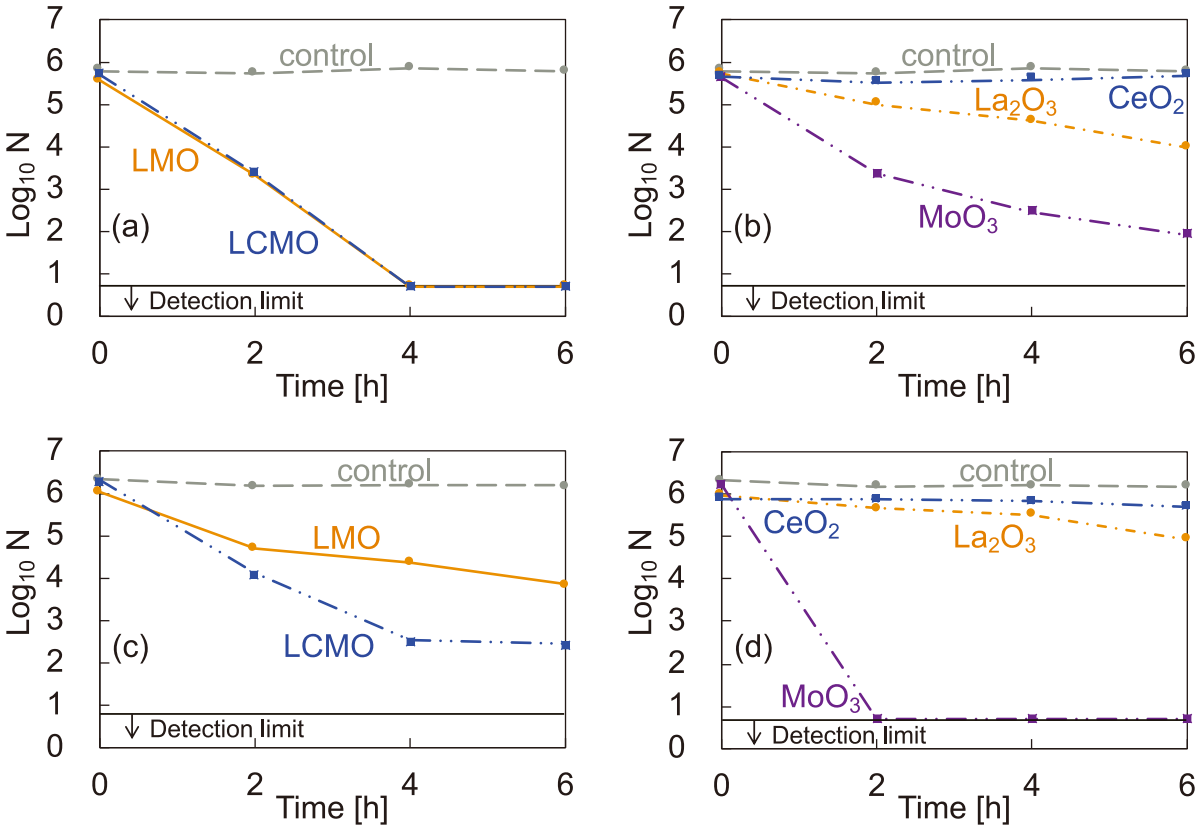


Fig. 7 Results of antiviral activity experiments against (a) & (b) bacteriophage Qβ, and (c) & (d) bacteriophage Φ6.

結合に用いられるスパイク（VP4）の活性部位に正電荷を持つLysine残基が存在する[39]ことからHIVのエンベロープウイルスと同様に、結合部位をポリ酸との静電相互作用による強い吸着作用により不活化させる可能性がある。

また、La(Ⅲ)やCe(Ⅲ)のイオンには、ホスト細胞がウイルスのRNA再生を抑制する効果があることが報告されている[40]。CeO_2の活性が低いのは、イオンの多くがCe(Ⅳ)であるためかも知れない。Φ6に対しては、La(Ⅲ)の活性はあまり見られなかった。ウイルスの特性の違いによるものと思われるが、現状では理由は明らかでない。一方、LCMOがLMOよりも高い活性を示すことからCeの効果が見られる。CeO_2単独では殆ど活性を示さないことから、CeイオンとMoイオンとの相乗的な効果が関与していることが考えられる。

希土類元素とポリ酸の組み合わせによる抗ウイルス活性についてはいくつか報告されており[41-43]、Liuらはタングステン系のヘテロポリ酸において、ポリ酸のWイオンの一部が還元されたヘテロポリブルーの状態ではCeイオンの方がLaイオンよりも高い抗インフルエンザウイルス活性を与えることが報告している[42]。また、KatoやShioharaらは、Ceイオンの高い酸化力に起因するMars - van Krevelen機構[44,45]が、NiやMnなどの多価金属の酸化物と組み合わせることで増大することを報告している[46,47]。実際、常温でLCMOとアルコールを反応させることでCe(Ⅳ)の割合が減少し、Moの一部が還元されてMo(Ⅴ)が生じることがXPS分析により確認できていることから、Ce自体の強い酸化力が関与してポリ酸の抗ウイルス効果を高めている可能性が示唆される。現状では未だ支配的な機構は明確ではないが、Ceの効果はエンヴェロープを有するΦ6の方が、エンベロープを持たないQβより顕著であることが考えられる。ポリ酸とCeイオンの組み合わせは、Φ6と同じ型のインフルエンザウイルスやCOVID-19等に有効である可能性がある。Fig. 8に今回合成した試料のΦ6の実際のプラークの変化を示す。6時間でプラークの数が大幅に減少していることが分かる。なお、今回作製したLMO, LCMOは、いずれの試料においてもMDCK細胞（CCL-34, イヌ腎臓尿細管上皮細胞由来の細胞株）に対する顕著な毒性はみとめられなかった。

今回作製したLaの複合酸化物の水に対する漏出量はAg_2Oのそれ（0.86μmol/L[48]）よりは多いが、MoO_3よりは少ない。いずれも粉末も白色または薄い黄色であるため、意匠性を損なう可能性が低く、様々なところに応用が可能である。MoO_3は水への溶解度が高いため、初期は抗菌・抗ウイルスを発現すると思われるが、すぐに失活する。成分を徐放するLa複合酸化物は、失活しづらく、撥水性も与えるため、広い用途に適用できる。今回作製したLCMOは薄い黄色を呈し、紫外・可視領域に吸収が見られる（Fig. 9）が、光触媒活性は確認できなかった。このことから紫外線吸収効果のある抗ウイルス材料としての用途が期待される。

また、今回の抗菌・抗ウイルス活性の評価は、これらの撥水性の寄与は加味されていない。撥水性表面は水と接触しにくいことから抗菌活性が向上することが報告されている[49]。今後、撥水性が抗菌・抗ウイルス活性へ及ぼす寄

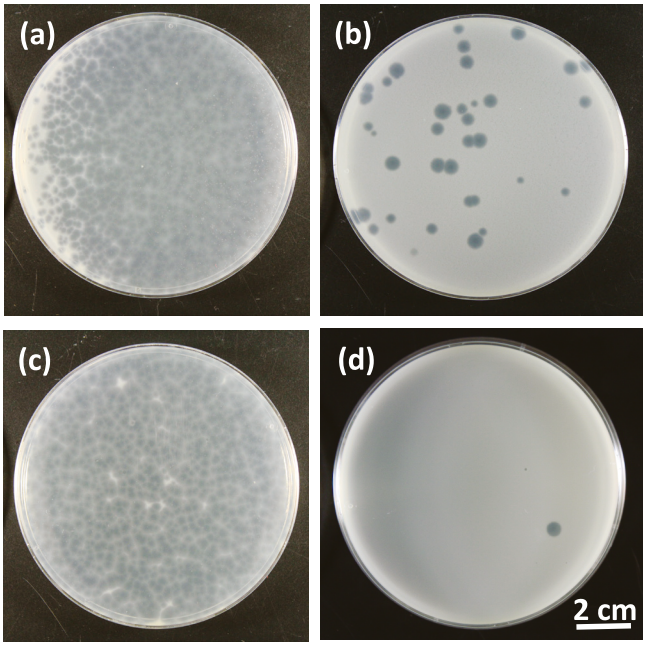


Fig. 8　Practical photographs of plaques for LMO (a & b) and LCMO (c & d) against Φ 6 between 0 h (a & c) and 6 h (b & d).

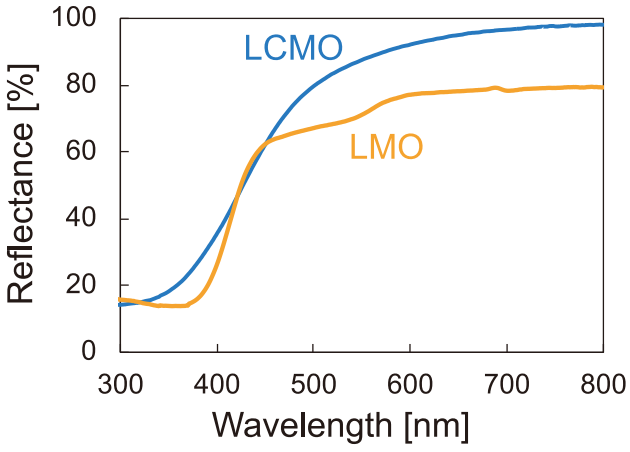


Fig. 9　UV-is spectra of LMO and LCMO

与について、定量的な検討を行っていく必要がある。

4．総　括

本研究で開発したLCMOは、自己撥水性、紫外線吸収能、抗菌・抗ウイルス性を兼ね備えた新規の酸化物粉末材料である。これまで撥水性や紫外線吸収能を有する化粧品は存在したが、新たな機能として抗菌・抗ウイルス活性が添加されると、人を彩る「化粧」という活動をする人が、「健康」という価値を新たに得ることができるようになる可能性がある。これまでも化粧をすることで日焼け等の肌のトラブルを防止する機能は得られているが、この材料の化粧への応用は、これまでの概念から一歩進んで、寿命そのものを延ばす試み、いわば化粧と医療の融合に繋がる可能性を秘めている。単に高齢者へ生きがいを与え、健康寿命を延ばすだけでなく、ウイルス感染からの防止を通じて、本当の意味での健康獲得に繋がることが考えられる。

(References)

1) S. Galdiero, A. Falanga, M. Vitiello, M. Cantisani, V. Marra, M. Galdiero, Silver nanoparticles as potential antiviral agents, *Molecules*, 16, 8894-8918 (2011).

2) K. Zodrow, L. Brunet, S. Mahendra, D. Li, A. Zhang, Q. Li, P. J. J. Alvarez, Polysulfone ultrafiltration membranes impregnated with silver nanoparticles show improved biofouling resistance and virus removal, *Water Research*, 43, 715-723 (2009).

3) S. Gaikwad, A. Ingle, A. Gade, M. Rai, A. Falanga, N. Incoronato, L. Russo, S. Galdiero, M. Galdiero,, Antiviral activity of mycosynthesized silver nanoparticles against herpes simplex virus and human parainfluenza virus type 3, *Int. J. Nanomedicine*, 8, 4303-4314 (2013).

4) R. Nakano, H. Ishiguro, Y. Yao, J. Kajiok, A. Fujishima, K. Sunada, M. Minoshim, K. Hashimoto, Y. Kubota, Photocatalytic inactivation of influenza virus by titanium dioxide thin film, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 11, 1293-1298 (2012).

5) C. Zhanga, Y. Li, D. Shuai, Y. Shen, D. Wang, Progress and challenges in photocatalytic disinfection of waterborne Viruses: A review to fill current knowledge gaps, *Chem. Eng. J.*, 355, 399-415 (2019).

6) H. Ghaffari, A. Tavakoli, A. Moradi, A. Tabarraei, F. Bokharaei-Salim, M. Zahmatkeshan, M. Farahmand, D. Javanmard, S. J. Kiani, M. Esghaei, V. Pirhajati-Mahabadi, A. Ataei-Pirkooh, S. H. Monavari, Inhibition of H1N1 influenza virus infection by zinc oxide nanoparticles: another emerging application of nanomedicine, *J. Biomedical Sci.*, 26:70, 1-10 (2019).

7) K. Motoike, S. Hirano, H. Yamana, T. Onda, T. Maeda, T. Ito, M. Hayakawa, Antiviral activities of heated dolomite powder, *Biocontrol Sci.*, 13, 131-138 (2008).

8) G. Azimi, R. Dhiman, H. M. Kwon, A. T. Paxson, K. K. Varanasi, Hydrophobicity of rare-earth oxide ceramics, *Nat. Mater.*, 12, 4, 315-320 (2013).

9) D. J. Preston, N. Miljkovic, J. Sack, R. Enright, J. Queeney, E. N. Wang, Effect of hydrocarbon adsorption on the wettability of rare earth oxide ceramics, *Appl. Phys. Lett.*, 105, 1, 11601 (2014).

10) S. Sankar, B. N. Nair, T. Suzuki, G. M. Anilkumar, M. Padmanabhan, U. N. S. Hareesh, K. G. Warrier, Hydrophobic and Metallophobic Surfaces: Highly Stable Non-wetting Inorganic Surfaces Based on Lanthanum Phosphate Nanorods, *Sci. Rep.*, 6, 1, 22732 (2016).

11) G. Carchini, M. G. Melchor, Z. Łodziana, N. López, Understanding and Tuning the Intrinsic Hydrophobicity of Rare-Earth Oxides: A DFT+U Study, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 8, 1, 152-160 (2016).

12) K. K. Oh, L. Kangsik, K. Zonghoon, Y. L. Kyung, W. L. Chang, J. M. Su, M. L. M. Jae, N. Clement, D. Wontae, K. Christian, L. Hyungjun, B. R. Han, Hydrophobicity of Rare Earth Oxides Grown by Atomic Layer Deposition, *Chem. Mater.*, 27, 1, 148-156 (2015).

13) N. Desai, S. Mali, V. Kondalkar, R. Mane, C. Hong, P. Bhosale, Chemically Grown MoO_3 Nanorods for Antibacterial Activity Study, *J. Nanomed. Nanotechnol.*, 6, 6, 1000338 (2015).

14) C. Zollfrank, K. Gutbrod, P. Wechsler, J. P. Guggenbichler, Antimicrobial activity of transition metal acid MoO_3 prevents microbial growth on material surfaces, *Mater. Sci. Eng.* C, 32, 1, 47-54 (2012).

15) K. Krishnamoorthy, M. Premanathan, M. Veerapandian, S. J. Kim, Nanostructured molybdenum oxide-based antibacterial paint: effective growth inhibition of various pathogenic bacteria, *Nanotechnology*, 25, 315101 1-10 (2014).

16) C. C. Mardare, A. W. Hassel, Investigations on Bactericidal Properties of Molybdenum-Tungsten Oxides Combinatorial Thin Film Material Libraries, *ACS Comb. Sci.*, 16, 11, 631-639 (2014).

17) R. A. Rocha, E. N. S. Muccillo, Synthesis and thermal decomposition of a polymeric precursor of the

$La_2Mo_2O_9$ compound," *Chem. Mater.*, 15, 22, 4268-4272 (2003).

18) T. Matsumoto, K. Sunada, T. Nagai, T. Isobe, S. Matsushita, H. Ishiguro, A. Nakajima, Preparation of hydrophobic $La_2Mo_2O_9$ ceramics with antibacterial and antiviral properties, *J. Hazard. Mater.*, 378, 120610 (2019).

19) A. Arumugama, C. Karthikeyan, A. S. H. Hameed, K. Gopinath, S. Gowri, V. Karthika, Synthesis of cerium oxide nanoparticles using Gloriosa superba L. leaf extract and their structural, optical and antibacterial properties, *Mater. Sci. Eng. C* 49, 408-415 (2015).

20) A. Gupta, S. Das, C. J. Neala, S. Seal, Controlling the surface chemistry of cerium oxide nanoparticles for biological applications, *J. Mater. Chem. B*, 4, 3195-3202 (2016).

21) Y.-F. Goh, A. Z. Alshemary, M. Akram, M. R. A. Kadir, R. Hussain, In-vitro characterization of antibacterial bioactive glass containing ceria, *Ceram. Int.*, 40, 729-737 (2014).

22) P. Bellio, C. Luzi, A. Mancini, S. Cracchiolo, M. Passacantando, L. D. Pietro, M. Perilli, G. Amicosante, S. Santucci, G. Celenza, Cerium oxide nanoparticles as potential antibiotic adjuvant. Effects of CeO_2 nanoparticles on bacterial outer membrane permeability, *BBA-Biomembranes* 1860, 2428-2435 (2018).

23) R. Li, S. Yabe, M. Yamashita, S. Momose, S. Yoshida, S. Yin, T. Sato, Synthesis and UV-shielding properties of ZnO- and CaO-doped CeO_2 via soft solution chemical process, *Solid State Ionics,* 151, 235-241 (2002).

24) F. Caputo, M. De Nicola, A. Sienkiewicz, A. Giovanetti, I. Bejarano, S. Licoccia, E. Traversa, L. Ghibelli, Cerium oxide nanoparticles, combining antioxidant and UV shielding properties, prevent UV-induced cell damage and mutagenesis, *Nanoscale*, 7, 15643-15656 (2015).

25) M. Aguirre, M. Paulis, J. R. Leiza, UV screening clear coats based on encapsulated CeO_2 hybrid latexes, *J. Mater. Chem. A.*, 1, 3155-3162 (2013).

26) K. Sunada, M. Minoshima, K. Hashimoto, Highly efficient antiviral and antibacterial activities of solid-state cuprous compounds, *J. Hazard. Mater.*, 235-236, 265-270 (2012).

27) Y. Inaba, K. Ishikawa, K. Tatenuma, E. Ishitsuka, Development of ^{99}Mo Production Technique by Solution Irradiation Method Characterization of Aqueous Molybdate Solutions, *At. Energy Soc. Japan*, 8, 2, 142-153 (2009). [in Japanese]

28) M. Takaya, Y. Shinohara, F. Serita, M. Ono-Ogasawara, N. Otaki, T. Toya, A. Takata, K. Yoshida, N. Kohyama, Dissolution of Functional Materials and Rare Earth Oxides into Pseudo Alveolar Fluid, *Ind. Health*, 44, 4, 639-644 (2006).

29) Lange's Handbook of Chemistry 12th edition, Ed. J. A. Dean, McGraw-Hill Book Company, New York, pp 4-38, 4-125, (1978).

30) F. J. Jing, N. Huang, Y. W. Liu, W. Zhang, X. B. Zhao, R. K. Y. Fu, J. B. Wang, Z. Y. Shao, J. Y. Chen, Y. X. Leng, X. Y. Liu, P. K. Chu, Hemocompatibility and antibacterial properties of lanthanum oxide films synthesized by dual plasma deposition., *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 87A, 1027-1033 (2008).

31) J. He, W. Wang, W. Shi, F. Cui, La2O3 nanoparticle/polyacrylonitrile nanofibers for bacterial inactivation based on phosphate control, *RSC Adv.*, 6, 99353-99360 (2016)

32) J. Liu, G. Wang, L. Lu, Y. Guo, L. Yang, Facile shape-controlled synthesis of lanthanum oxide with different hierarchical micro/nanostructures for antibacterial activity based on phosphate removal, *RSC Adv.*, 7, 40965-40972 (2017).

33) S. G. Sarafianos, U. Kortz, M. T. Pope, M. J. Modak, Mechanism of polyoxometalate-mediated inactivation of DNA polymerases: An analysis with HIV-1 reverse transcriptase indicates specificity for the DNA-binding cleft, *Biochem. J.*, 319, 2, 619-626 (1996).

34) Y. Inouye, Y. Tokutake, T. Yoshida, Y. Seto, H. Hujita, K. Dan, A. Yamamoto, S. Nishiya, T. Yamase, S. Nakamura, In vitro antiviral activity of polyoxomolybdates. Mechanism of inhibitory effect of PM-104 $(NH_4)_{12}H_2(Eu_4(MoO_4(H_2O)_{16}(Mo_7O_{24})_4)\cdot 13H_2O$ on human immunodeficiency virus type 1, *Antiviral Res.*, 20, 4, 317-331 (1993).

35) M. S. Weeks, C. L. Hill, R. F. Schinazi, Synthesis, Characterization, and Anti-Human Immunodeficiency Virus Activity of Water-Soluble Salts of Polyoxotungstate Anions with Covalently Attached Organic Groups, *J. Med. Chem.*, 3, 35, 1216-1221 (1992).

36) K. Dan, K. Miyashita, Y. Seto, H. Fujita, T. Yamase, The memory effect of heteropolyoxotungstate(PM-19) pretreatment on infection by herpes simplex virus at the penetration stage, *Pharmacol. Res.*, 46, 4, 357-362 (2002).

37) D. A. Judd, J. H. Nettles, N. Nevins, J. P. Snyder, D. C. Liotta, J. Tang, J. Ermolieff, R. F. Schinazi, C. L. Hill, Polyoxometalate HIV-1 Protease Inhibitors. A New Mode of Protease Inhibition, *J. Am. Chem. Soc*., 123, 5, 886-897 (2001).

38) H. Goto, A novel function of plasminogen—binding activity of the NA determines the pathogenicity of influenza A virus, *Virus*, 54, 4, 83-91 (2004) [in Japanese].

39) G. Sutton, J. M. Grimes, D. I. Stuart, P. Roy, Bluetongue virus VP4 is an RNA-capping assembly line, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 14, 5, 449-451 (2007).

40) G. Wengler, G. Wengler, A. Koschinski, A short treatment of cells with the lanthanide ions La^{3+}, Ce^{3+}, Pr^{3+} or Nd^{3+} changes the cellular chemistry into a state in which RNA replication of flaviviruses is specifically blocked without interference with host-cell multiplication, *J. General Virology,* 88, 3018-3026 (2007).

41) Y.-N. Liu, S. Shi, W.-J. Mei, C.-P. Tan, L.-M. Chen, J. Liu, W.-J. Zheng, L.-N. Ji, In vitro and in vivo investigations on the antiviral activity of a series of mixed-valence rare earth borotungstate heteropoly blues, *Eur. J. Med. Chem*., 43, 1963-1970 (2008).

42) J. Liu, W.-J. Mei, A.-W. Xu, C.-P. Tan, S. Shi, L.-N. Ji, Synthesis, characterization and antiviral activity against influenza virus of a series of novel manganese-substituted rare earth borotungstates heteropolyoxometalates *Antiviral Research*, 62, 65-71 (2004).

43) D. L. Barnarda, C. L. Hill, T. Gage, J. E. Matheson, J. H. Huffman, R. W. Sidwell, M. I. Otto, R. F. Schinazi, Potent inhibition of respiratory syncytial virus by polyoxometalates of several structural classes, *Antiviral Research*, 34, 27-37 (1997).

44) M. Lykaki, E. Pachatouridou, S. A.C. Carabineiro, E. Iliopoulou, C. Andriopoulou, N. Kallithrakas-Kontose, S. Boghosian, M. Konsolakisa, Ceria nanoparticles shape effects on the structural defects and surface chemistry: Implications in CO oxidation by Cu/CeO_2 catalysts, *Appl. Catal. B: Environ.* 230, 18-28 (2018).

45) S. Scirè, S. Minicò, C. Crisafulli, C. Satriano, A. Pistone, Catalytic combustion of volatile organic compounds on gold/cerium oxide catalysts, *Appl. Catal. B: Environ*., 40, 43-49 (2003).

46) M. Shiohara, T. Isobe, S. Matsushita, A. Nakajima, Decomposition of 2-naphthol in water by TiO_2 modified with MnOx and CeOy, *Mater. Chem. Phys*., 183, 37-43 (2016).

47) C. Kato, M. Shiohara, K. Sunada, T. Isobe, A. Yamaguchi, S. Matsushita, H. Ishiguro, M. Miyauchi, A. Nakajima, Decomposition of 2-naphthol in water and antibacterial property by NiO and CeO_x modified TiO_2 in the dark or under visible light, *J. Ceram. Soc. Jpn*., 127, 688-695 (2019).

48) D. R. Lide, "Handbook of Chemistry and Physics" (81 ed.). Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 4-83, 1998.

49) X. Zhang, L. Wang, E. Levänen, Superhydrophobic surfaces for the reduction of bacterial adhesion, *RSC Adv*., 3, 30, 12003-12020 (2013).

化粧品原料の次世代スクリーニング用細胞の創製：ES/iPS 細胞の多重遺伝子加工

関西学院大学理工学部生命医化学科
平井　洋平

Primary cultured normal human epidermal keratinocytes (NHEK) have been widely used for evaluation of activities of cosmetic components, however, these cells have considerable lot-to-lot variations and readily to lose differentiation potential upon serial passages. This study aimed to prepare a novel iPS-derived cell system for effective screening of cosmetic compounds. We generated iPS cells that were stably transfected with tet/dox-inducible expression cassette for BMP4 (Tet-BMP4-iPS), so that these cells can be maintained as iPS cells in conventional medium, but undergo differentiation into ectodermal lineages after treatment with retinoic acid (RA) and subsequently into *krt14*-positive keratinocyte progenitors upon treatment with dox. We found that thus generated keratinocyte progenitors were unstable and spontaneously differentiate into several epidermal lineages. To detect the appearance of the specific epidermal lineage, e.g., hair cortex, Tet-BMP4-iPS cells were further introduced with differentiated cell-specific promoter, e.g., KRT31 promoter for hair cortex, which had been connected with luciferase reporter. When treated simultaneously with RA, dox and soluble factors from dermal papilla cells, Tet-BMP4-iPS cells quantitatively increase the expression of luciferase up to three days, suggesting that activity of any soluble components for hair cortex differentiation could be evaluated by this cell system. To find the optimal condition of RA and dox treatment for sensitive detection of hair differentiation, we then developed a model of differentiation process of pluripotent iPS cells into terminally differentiated hair cortex cells.

1．緒　言

本研究は、初代培養細胞や細胞株に比べ遥かに優れた次世代の化粧品評価モデルを創出し、最終的には種々の化粧品研究に新たなブレークスルーを与えることを目指したものである。現在、業界として実験動物が使えないため化粧品材料の評価には培養細胞に多くを頼らざるを得ない状況がある。一方で、汎用される初代培養ケラチノサイトはヘテロな分化状態の細胞が混在しているだけでなく、継代可能回数に限りがあるため遺伝子操作による均一細胞の樹立も難しい。本研究では、未分化な表皮前駆細胞が十分量確保でき、さらに表皮構成成分への分化を容易にモニター可能な系の確立を試みた。具体的には、低分子化合物の添加のみでES/iPS細胞から表皮前駆細胞を作製し、かつ、表皮前駆細胞から目的細胞への分化を容易に定量追跡できる系を確立することにした。分化万能性を有するES/iPS細胞が表皮前駆細胞に分化するためには、まず中・内胚葉ではなく外胚葉へ変化し、次に神経系ではなく表皮系へと分化する必要がある。前者についてはレチノイン酸の添加が、また、後者については細胞近傍の一時的なBMP4の濃度上昇が効果的であるとされる[1]。

そこで、本研究では必要に応じてiPS細胞表面でBMP4を発現誘導できるような仕掛けを予め施し、導入したBMP4の遺伝子発現をオフの状態で十分量にまで増殖させ、そこに外胚葉への分化を促すためのレチノイン酸と、外胚葉から表皮系列に向かわせるBMP4を発現誘導することにした。また、得られる細胞には表皮前駆細胞以外の細胞も含まれると考えられるため、表皮前駆細胞からの分化プロセスを高感度にモニターできるように、表皮分化マーカーのプロモーターにレポーター遺伝子を連結させた遺伝子の導入も併せて行った。本研究では、表皮前駆細胞から変化する分化細胞として、特に培養系での分化誘導が困難とされる毛／毛包に着目し、毛のケラチンであるKRT31のプロモーターを適応させることにした。さらに、万能細胞の分化数理モデルを作成してその分化誘導効率の向上についても検討した。本研究のコンセプトによって作成されたiPS細胞は、培養液に2種類の安価な低分子化合物を添加し、レポーター遺伝子の発現追跡を行うだけで分化状態を定量的に把握できるため、薬剤候補物質をこの系に添加することでその分化誘導活性を評価できると期待される。

The next-generation screening cells for cosmetic components: ES/iPS cells with multiple gene-manipulations

Yohei Hirai

Department of Biomedical Chemistry, Kwansei Gakuin University

2．方　法

2．1．iPS細胞の遺伝子加工Ⅰ

未分化な万能細胞は生理活性分子に敏感に応答することや遺伝子の導入・発現が難しいことを考慮して、テトラサイクリン／ドキシサイクリンを添加した時だけ導入遺伝子の発現が可能になるシステム（Tet-on system）を採用し、強制的にゲノムに遺伝子挿入できるPiggybacトランスポゾンの活性[2]を利用することにした。そのため、まずPB-tetベクターをベースにしたコンストラクトを構築し

た（図1）。次に調製したコンストラクトをrtTA、トランスポゼース、薬剤耐性ベクターと共にマウスiPS細胞に導入し、テトラサイクリン／ドキシサイクリンの添加によりBMP-4の発現量がON/OFFできる安定細胞を作製した（tet-BMP4-iPS細胞）。また、この細胞がテトラサイクリン／ドキシサイクリン非添加状態では未分化状態を保ちながら通常のiPS細胞として扱えることを確認し、十分に増殖させたものをストックした。

2．2．iPS細胞の遺伝子加工Ⅱと分化の検出

本研究では、特に培養下で未分化表皮細胞／表皮前駆細胞からの分化が困難とされ特殊な表皮付属物である毛／毛包への分化をモデルに選び、その分化プロセスを簡便に追跡できる系への展開を試みた。細胞から毛／毛包への分化が高感度に検出できるように、表皮前駆細胞が毛へ分化する際に発現するケラチン31のプロモーター活性を定量追跡できるように、まずゲノムからケラチン31のプロモーター領域を抽出しルシフェラーゼレポーターを連結したプラスミドを作成しこれを細胞に導入した。

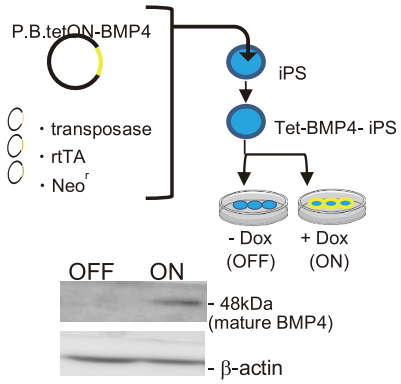
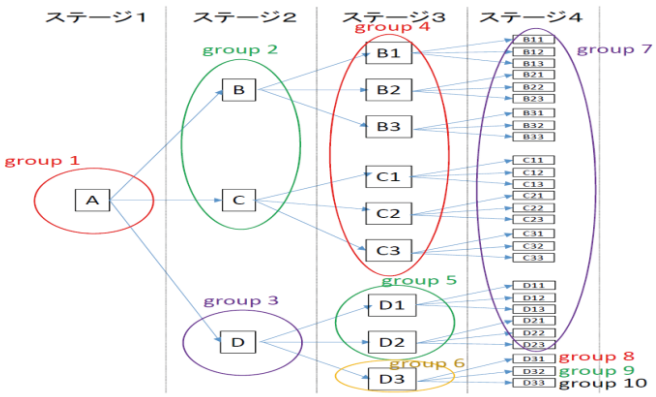


図1　コンストラクトおよび遺伝子導入細胞（tet-BMP4-iPS）

2．3．ES/iPS細胞の分化プロセスのモデル化

まず、多能性幹細胞であるiPS細胞から外胚葉、内胚葉、中胚葉への3胚葉分化と、外胚葉から神経前駆細胞や表皮前駆細胞への分化、さらには表皮前駆細胞から表皮細胞、毛包・毛髪細胞への分化のプロセスを考慮した細胞系譜図を作成した（図2）。次に、この図のD32/D33を目的の毛包・毛髪細胞と設定しグループ分けを行った。グループ分けの第1段階として（ステージ2）group1の一つの細胞集団が3種類の細胞に分化すると仮定し、その仮定に基づいてD32/D33の分化に関与しないグループ（group2）と関与するグループ（group3）に分けた。さらに、第2段階として（ステージ3）、group3の中でもD32/D33の分化に関与しないグループ(group5）と関与するグループ(group6）に分け、group6が直接的にD32/D33に分化するとプログラムした。また、初期の細胞数を便宜上100個とし、条件として各ステージの細



状態　グループ　　分裂割合　分化割合　分化割合　分化割合　維持割合　消滅割合

state	group	row1	row2	row3	div	dif1	dif2	dif3	stay	dis
A	1	2	3	4	0.01	0.25	0.25	0.25	0.24	0
B	2	5	6	7	0.15	0.25	0.25	0.25	0.1	0
C	2	8	9	10	0.15	0.25	0.25	0.25	0.1	0
D	3	11	12	13	0.15	0.25	0.25	0.25	0.1	0
B1	4	14	15	16	0.15	0.25	0.25	0.25	0.1	0
B2	4	17	18	19	0.15	0.25	0.25	0.25	0.1	0
B3	4	20	21	22	0.15	0.25	0.25	0.25	0.1	0
C1	4	23	24	25	0.15	0.25	0.25	0.25	0.1	0
C2	4	26	27	28	0.15	0.25	0.25	0.25	0.1	0
C3	4	29	30	31	0.15	0.25	0.25	0.25	0.1	0
D1	5	32	33	34	0.15	0.25	0.25	0.25	0.1	0
D2	5	35	36	37	0.15	0.25	0.25	0.25	0.1	0
D3	6	38	39	40	0.15	0.25	0.25	0.25	0.1	0
B11	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
B12	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
B13	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
B21	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
B22	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
B23	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
B31	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
B32	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
B33	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
C11	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
C12	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
C13	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
C21	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
C22	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
C23	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
C31	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
C32	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
C33	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
D11	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
D12	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
D13	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
D21	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
D22	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
D23	7	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
D31	8	NA	NA	NA	0.6	0	0	0	0.4	0
D32	9	NA	NA	NA	0	0	0	0	0.9	0.1
D33	10	NA	NA	NA	0	0	0	0	0.9	0.1

図2　iPS細胞から各細胞への分化モデル

左：分化プロセスの区分け
A; 多能性幹細胞（iPS細胞）（group1）　B.C; 内胚葉もしくは中胚葉（group2）　D; 外胚葉（group3）　B1~B3, C1~C3: B11~B33もしくはC11~C33の前駆細胞（group7）　D1,2; D11~D23の前駆細胞（group5）　D3; 表皮前駆細胞（group6）　D31; 表皮細胞（group8）　D32, D33; 毛包（group9）もしくは毛髪細胞（group10）
右：シミュレーションのパラメータ
分裂割合; 事象が起こる際に細胞が分裂する割合。1, 2, 3への分化割合; 事象が起こる際に分化する割合（例えばDがD1へ分化する割合を1への分化割合。D2へ分化する割合を2への分化割合。D3へ分化する割合を3への分化割合としている）。現状維持割合; 事象が起こる際にそのステージにとどまり変化をしない割合。

胞は１日ごとにそれぞれある割合で（1）“分裂”（2）“次のステージに移行”（3）“現状維持”のいずれかの事象を起こすと仮定した。また、D32/D33 は分裂しないため(1)“分裂”の条件は適用されず、さらに毛包や毛髪細胞は脱核し、mRNAの発現がなくなることから（4）“消滅”を条件として付け加えた（図 2）。

3．結　果

従来から、分化万能性を有する細胞はレチノイン酸（RA）の添加で外胚葉へ、外胚葉は細胞近傍のBMP4 の刺激で各種の表皮由来細胞のソースである表皮前駆細胞に分化しやすいことが知られている。そこで、本研究ではフィーダーフリーで安定して増殖させることができるマウスiPS細胞を出発材料に選び、これにRA とBMP4 を作用させることで表皮前駆細胞の安定供給を試みることにした。RA は低分子化合物で容易に取り扱えるのに対し、BMP4 は不安定で高価なタンパク質である。そこで、今回はiPS細胞自身にBMP4 を生産・分泌させる系を構築した。具体的には、低分子化合物によってBMP4 遺伝子の発現を人工的に制御できるようにtet on システムを用いて細胞に安定的な遺伝子導入を行った。樹立した遺伝子導入細胞（Tet-BMP4-iPS細胞）はテトラサイクリン（tet）／ドキシサイクリン(Dox）の添加に応じてBMP4 を発現し、BMP4 の下流のsmad1/5/8 も速やかにリン酸化されることが確認できた。また、未分化マーカー nanogと神経前駆マーカー nestinのmRNA発現を指標に、この細胞を外胚葉に分化誘導するための至適RA濃度を決定した。次に、導入遺伝子の発現誘導により表皮前駆細胞への分化が促進されるかを調べることにした。RAと同時にDoxを添加し神経前駆細胞のマーカー *nestin* と表皮前駆細胞のマーカー *krt14* の発現変動をqRT-PCR法にて解析したところ、DoxがRAによる神経前駆細胞への分化を抑制し表皮前駆細胞への分化を促進することが確認できた。次に、RAとDoxを添加し24時間、48時間、72時間で各種マーカーのmRNA発現変動ならびにkrt14免疫蛍光染色やFACSによる解析を行った。その結果、分化誘導24時間で未分化マーカー *nanog* の発現が低下し未分化性が失われていること、神経細胞マーカー *tuj1* の発現は変わらないこと、*krt14* の発現が増加していくことがわかった。免疫蛍光染色やFACS解析では、KRT14 の発現細胞の割合も日を追うごとに増加していくことも判明した（図3）。次に、Tet-BMP4-iPS細胞由来の表皮前駆細胞は通常の表皮前

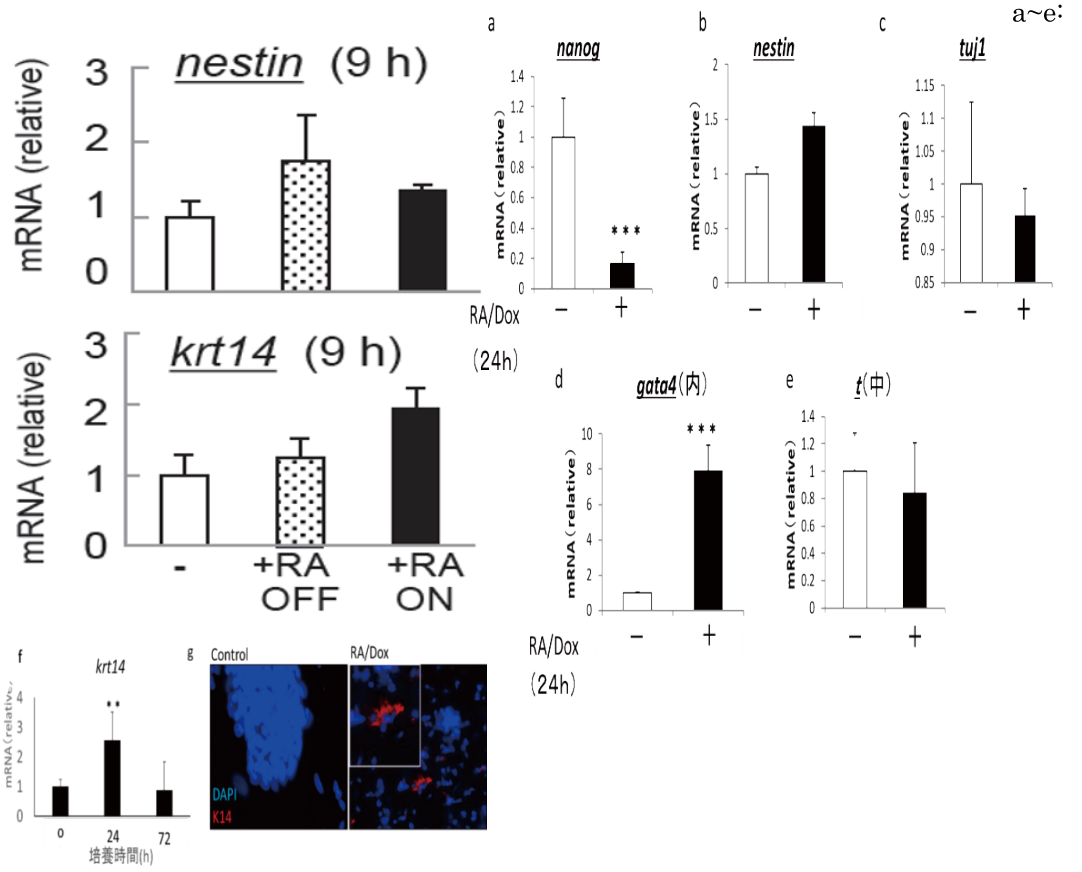


図３　tet-BMP4-iPS の分化誘導

上;各種マーカーの発現　*nanog*（未分化マーカー）、*nestin*（神経前駆マーカー）、*tuj1*（神経系マーカー）、*gata4*（内胚葉マーカー）、*t*（中胚葉マーカー）N=3　＊＊＊ p<0.001
krt14（表皮前駆マーカー）N=4 ＊＊ p<0.01

下：KRT14 の免疫蛍光染色。control では KRT14 ポジティブな細胞が確認できなかったが、RA/Dox による分化誘導によって KRT14 ポジティブな細胞が確認された。

駆細胞と同様に成長因子による増殖や、次のステージへの分化が可能であるかを調べた。Tet-BMP4-iPS細胞をRAとDoxで刺激する際に同時にkeratinocyte growth factor（KGF）（100ng/ml）を添加すると、*krt14*の発現がさらに上昇したことから、分化誘導された表皮前駆細胞はKGFにより増殖が促されると考えられる。ただし、*krt14*の発現量は72時間を超えると減少に転じ、角化した表皮のマーカーであるトランスグルタミナーゼ1（TGase1）の発現が開始されていたことから、得られた表皮前駆細胞はこの段階で自発的に次のステージへ分化したと考えられた。以上の結果より、RA/Dox非添加系で安定して増殖・維持できるTet-BMP4-iPS細胞は、RA/Doxの添加に応答して生体内の表皮前駆細胞と同様な性質を有する細胞へと簡単に分化することがわかった。次に、Tet-BMP4-iPS由来の表皮前駆細胞が、初代培養表皮細胞では分化しにくい毛包・毛髪細胞に分化誘導が可能なのかを調べた。生体内において表皮前駆細胞は毛乳頭細胞との相互作用することにより毛包・毛髪細胞へと分化することが知られている[3,4]。その現象を模倣するため、多孔膜メンブレンを使って毛乳頭細胞との共培養を行い、Tet-BMP4-iPS由来細胞内の毛包マーカーkrt75ならびに毛髪のマーカーkrt31, krt33aのmRNA発現をqRT-PCR法で解析した。その結果、共培養1日で*krt75*の発現が増加し、3日目でピークに達した後ゆるやかに発現が減少した。一方、*krt31*、*krt33a*の発現は4日でピーク達しその後減少した（図4）。この結果は、Tet-BMP4-iPS由来の表皮前駆細胞は毛乳頭細胞と共培養をすることで、まず毛包へ、そして少し遅れて毛髪細胞へと分化することを示唆している。ちなみに、生体内でも未分化な表皮から毛包／毛が発生する過程で同様の挙動を示すことが知られている。本研究で用いた共培養系においてはTet-BMP4-iPS由来細胞は毛乳頭細胞とは多孔質膜を隔てて存在していること、毛乳頭細胞以外の細胞を使って共培養しても毛包／毛へと分化誘導されないことから、毛乳頭細胞から分泌される液性因子（拡散性因子）の中に毛包や毛髪細胞へ分化させる物質が存在していると考えられる。現在、毛乳頭細胞から放出される毛／毛包形成因子の1つとしてWnt5aが着目されている[5]。そこで、RA/Dox存在下で単独培養したTet-BMP4-iPS細胞にWNT5a（100ng/mL）を添加したところ、*krt75*の発現は有意に増加したが*krt31*の発現には変化が見られなかった。また、前述のKGFについては、krt14に対するkrt75/krt31両方の相対的な発現量変動に影響を与えないことがわかった。これらの結果は、WNT5aは発毛誘導活性を有すると考えられるが実際には毛包細胞への分化を

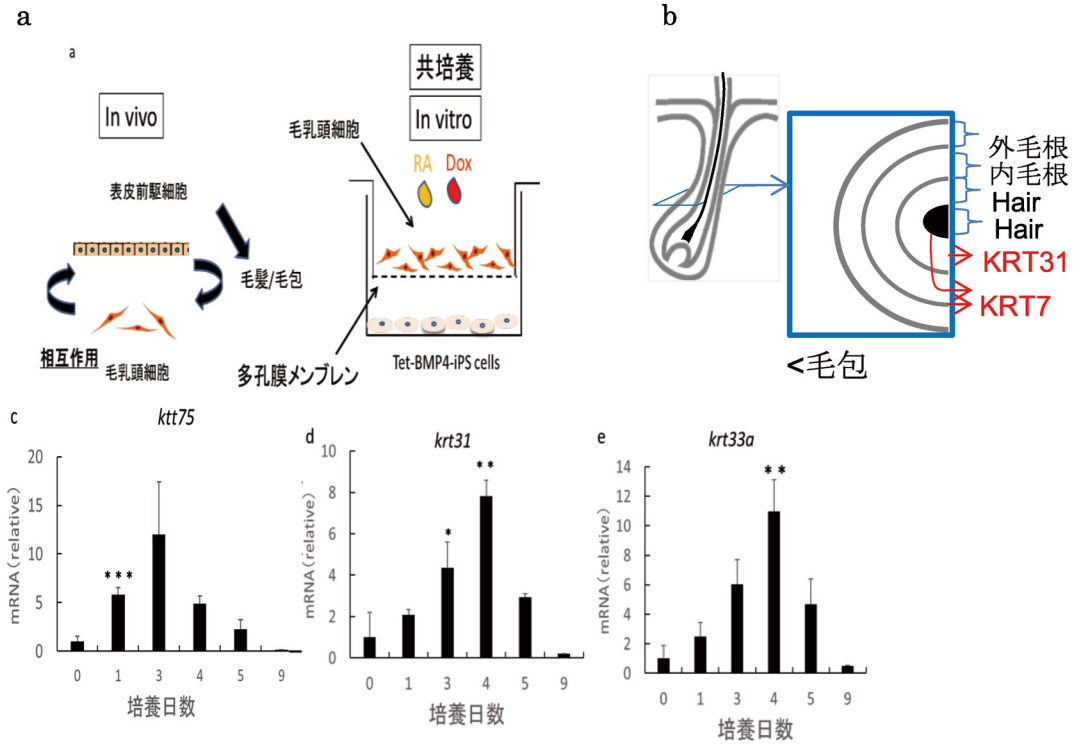


図4　毛乳頭細胞が分泌する因子による毛包・毛への分化誘導

a; 共培養の模式図。Tet-BMP4-iPS細胞は毛乳頭細胞の分泌する発毛誘導因子の影響を受ける。

b; 毛包・毛髪の構造における各遺伝子の発現場所の簡易図。*krt75*は毛包細胞への分化マーカー*krt31*または、*krt33a*は毛髪細胞分化マーカーとして使用した。

c~e: 毛包（*krt75*）／毛髪（*krt31*, *krt33a*）細胞分化マーカーの発現変化。これらのマーカーの発現が有意に増加することから、毛包・毛髪細胞への分化が進行していることが確認できる。

N=3 ＊p<0.05　＊＊p<0.01　＊＊＊p<0.001

促進させる一方で毛髪細胞への分化には影響しないこと、KGFは表皮前駆細胞の増殖のみに関わり毛/毛包への分化に関わらないことを示唆する。ただし、この実験系では産生される表皮前駆細胞の割合が十分とはいえず（表皮前駆細胞の割合は10％程度）、高感度の分化追跡法の確立（以下の3. 2.）、ならびに分化誘導条件の再検討（以下の3. 3.）が必要と考えられた。

3. 2. 毛への分化の高感度追跡系

前述の通り、表皮前駆細胞の産生効率が低いことを考慮し、次に、最終的な表皮由来の目的細胞（モデルケースでは毛髪細胞）への分化プロセスを高感度にモニターできる系の構築に取り組んだ。具体的には、毛髪細胞への分化に応答して特異的に発現開始されるKRT31のプロモーターにレポーターのルシフェラーゼ遺伝子を連結したコンストラクトをTet-BMP4-iPS細胞に導入する方法を採用した。まず、KRT31のプロモーターと予想される領域1700bpをPCRでマウスゲノムより取得し、それにルシフェラーゼ遺伝子を連結したコンストラクトプラスミド（KRT31pr-Luc）を作製しこれをTet-BMP4-iPS細胞へ遺伝子導入した（Tet-BMP4-KRT31-Luc-iPS細胞）。このTet-BMP4-KRT31-Luc-iPS細胞をRA/Doxで刺激し毛乳頭細胞との共培養処理を行うことで、毛髪細胞分化が高感度で継時的にモニターできるようになった（図5）。また、KGFによって表皮前駆細胞の数を増やすことにより、さらに顕著に毛髪細胞分化が追跡できることも確かめられた。これらの結果は、Tet-BMP4-KRT31-Luc-iPS細胞を用い、毛乳頭細胞との共培養処理の代わりに試験物質の薬剤候補因子を添加することで試験物質の発毛誘導活性を高感度にモニターできる可能性を示唆している（図5）。

3. 3. ES/iPS細胞の分化モデルと分化誘導条件の検討

Tet-BMP4-iPS細胞から表皮前駆細胞への分化効率を向上させるためには、RAならびにDoxの最適添加条件を決めることが必要と考えられた。そこで、iPS細胞から毛/毛包への分化プロセスの数理モデル化を行い、そこから添加条件を抽出することにした。「2.方法」の項で述べたパラメータから毛包・毛髪細胞（D32, 33）のmRNAの発現パターンはある一定期間増加しピークを迎えた後、ゆるやかに減少していくと予想できた（図2）。そこで、この縦軸（発現量）を上げる、即ち、効率的に毛包・毛髪の細胞への分化を促進させるためにgroup1（A）からgroup2（B, C）、group3（D）への分化パラメータを変化させた。その結果、group1から3（D）への分化割合を変動させることで、D32の縦軸が大きく変動するが（赤枠で囲った図）、group1, 2（B, C）への分化割合を変化させてもD32の変動が小さい結果となり（緑枠で囲った図）、group1か

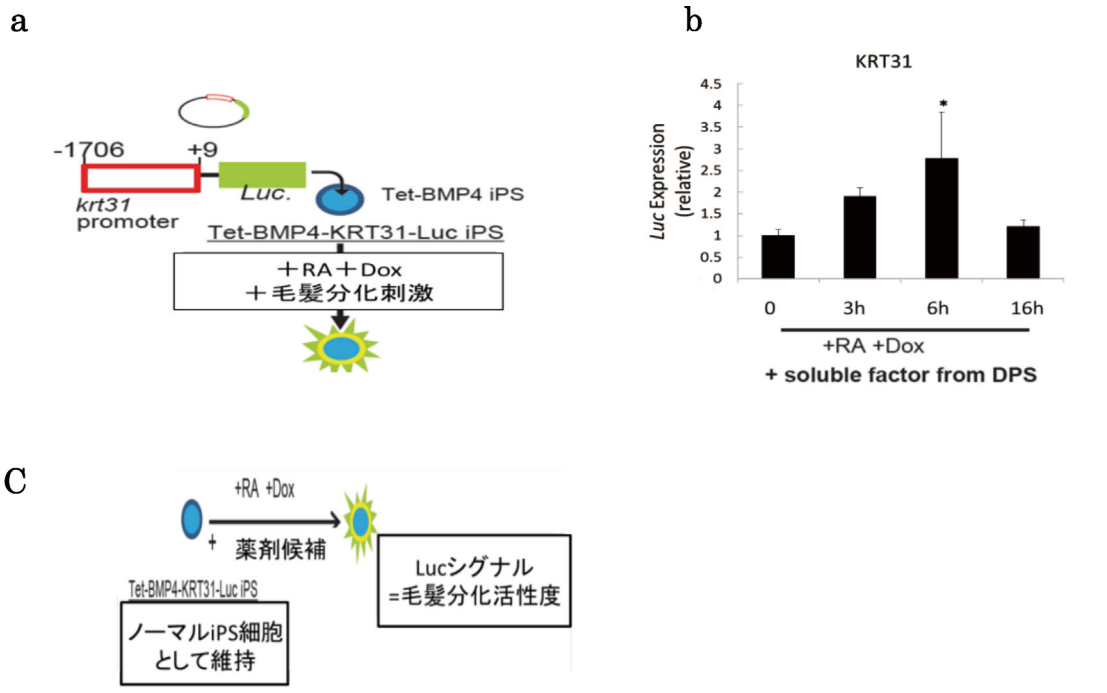


図5　系の概略図

a; tet-BMP4-KRT31-LUC iPS細胞の調製と毛髪細胞への分化追跡　KRT31 プロモーター配列をLucの遺伝子上流に挿入し、tet-BMP4-iPS細胞に導入した。この細胞にRA, Doxと発毛誘導剤を作用させるとルシフェラーゼが発現する。インターナルコントロール, β-gal

b; 毛乳頭細胞からの分泌因子による発毛誘導の追跡　N=3 ＊$p<0.05$

c; 毛髪細胞への分化能をもつ薬剤スクリーニング系の簡略図。

らgroup3（D）への分化を促すことでより毛包・毛髪の細胞への分化誘導効率を上げることができると予想された（図2）。同様の解析を行うと、①group1からgroup3への分化を促す、②group3からgroup6への分化を促す、③group6からgroup9や10への分化を促す、の3つのことが最も有効であり、各プロセスを加速させてもD32/D33の発現はまず増加してピークを迎え、その後ゆるやかに減少するパターンをとると考えられた。これらの結果を鑑み、まずRAのみを120時間作用させて外胚葉分化誘導を十分にした後に、Doxのみを72時間作用させたところ、RAとDoxを同時に192時間作用させたものと比べてKRT14陽性細胞の割合が14％から34％にまで増加した（図6）。

4．考　察

本研究でiPS細胞に多重の遺伝子加工を施すことで、安定して増殖・維持でき、しかも低分子化合物の添加のみで機能的な表皮前駆細胞を産生できる細胞が準備できるようになった。また、元来表皮前駆細胞は非常に不安定で、特別な分化誘導なしに自発的に各種表皮由来細胞に分化してしまうが、本研究で得られた細胞は毛髪細胞に変化したときにのみレポーター遺伝子が発現するため、毛髪分化を加速もしくは抑制する因子のスクリーニング細胞として有用なものと考えられる。もちろん、ここで考案したシステムは極めて単純なアイデアをベースにしたものであり、用いたプロモーターを他の目的細胞特異的タンパク質のものに換えることで毛髪以外の表皮由来細胞への分化プロセスも容易に定量追跡できるはずである。ただし、これまで発毛活性が認められてきたWNT5aには毛髪分化誘導能は検出されず、また、同様の活性が指摘されているShh[5-7]にも明らかな活性は認められなかった（データ示さず）。一方で、WNT5aには表皮前駆細胞から毛包細胞への分化を促すことが確認され、これらの因子群のもつ発毛誘導活性は毛髪を生み出すことによるのではなく、毛髪細胞の支持細胞を生み出すことによる間接的なものである可能性もある。

本研究では、表皮前駆細胞の状態で安定的に維持することができないことが確認された。この、表皮前駆細胞の自然分化を引き起こす原因としては培養液中のカルシウム濃度が適切でなかった可能性がある。一般的に、未分化な表皮細胞は低カルシウムの培養液（0.15mM以下）で維持され、高濃度のカルシウムイオン存在下（1mM以上）では自然に分化してしまうことが知られている[8]。本研究で使用しているiPS細胞はカルシウム濃度の低い初代表皮細胞用培地中では生存できず、約1mMのカルシウムイオンを含んだ培地を用いて培養を行った。将来的には、分化誘導のあるタイミングで低カルシウムの培養液に交換することが有効である可能性がある。

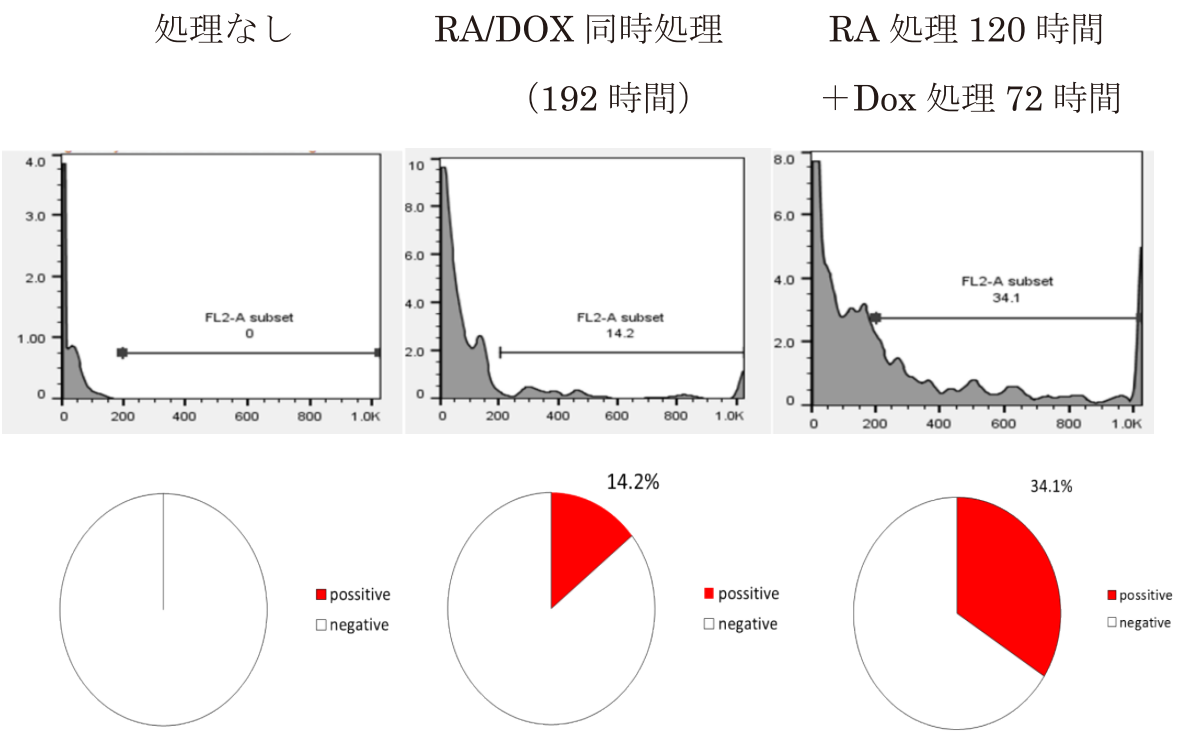


図6　RA, Doxの処理条件の最適化
KRT14陽性細胞のFACS解析（上）とそれをグラフ化したもの（下）
RAによる外胚葉分化処理を120時間行った後、Doxを72h処理したものは、RA/Dox72h処理に比べてKRT14陽性細胞の割合が増加した。

5．総　括

本研究で示したTet-BMP4-KRT31-Luc-iPS細胞は、通常のiPS細胞として安定して増殖、維持できるだけでなく、RA（120時間）とDox（72時間）で前処理することで、毛髪への分化誘導に応答してルシフェラーゼを発現するため、簡便で優れた発毛剤のスクリーニング系に利用できると思われる。

謝　辞

本研究は大学院生の城戸拓巳君が中心となって行ったものであり、数理モデルの構築は関西学院大学の吉野公三准教授の助言を受けました。ここに感謝いたします。

（引用文献）

1）Veraitch O, Kobayashi T Fau-Imaizumi Y, Imaizumi Y Fau-Akamatsu W, Akamatsu W Fau-Sasaki T, Sasaki T Fau-Yamanaka S, Yamanaka S Fau-Amagai M, et al.: Human induced pluripotent stem cell-derived ectodermal precursor cells contribute to hair follicle morphogenesis in vivo.

2）Randolph LN, Bao X, Zhou C, Lian X: An all-in-one, Tet-On 3G inducible PiggyBac system for human pluripotent stem cells and derivatives. Scientific reports 7: 1549, 2017.

3）Enshell-Seijffers D, Lindon C, Kashiwagi M, Morgan BA: beta-catenin activity in the dermal papilla regulates morphogenesis and regeneration of hair. Developmental cell 18: 633-642, 2010.

4）Rendl M, Polak L, Fuchs E: BMP signaling in dermal papilla cells is required for their hair follicle-inductive properties. Genes & development 22: 543-557, 2008.

5）Reddy S, Andl T, Bagasra A, Lu MM, Epstein DJ, Morrisey EE, et al.: Characterization of Wnt gene expression in developing and postnatal hair follicles and identification of Wnt5a as a target of Sonic hedgehog in hair follicle morphogenesis. Mechanisms of development 107: 69-82, 2001.

6）Huelsken J, Vogel R, Erdmann B, Cotsarelis G, Birchmeier W: beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. Cell 105: 533-545, 2001.

7）Telerman SB, Rognoni E, Sequeira I, Pisco AO, Lichtenberger BM, Culley OJ, et al.: Dermal Blimp1 Acts Downstream of Epidermal TGFbeta and Wnt/beta-Catenin to Regulate Hair Follicle Formation and Growth. J Invest Dermatol 137: 2270-2281, 2017.

8）Elsholz F, Harteneck C, Muller W, Friedland K: Calcium--a central regulator of keratinocyte differentiation in health and disease. European journal of dermatology : EJD 24: 650-661, 2014.

Ⅱ． 生体作用、安全性に関する分野

微弱紫外線による皮膚タイトジャンクションバリアの破壊機構の解明と保護化合物の探索

岐阜薬科大学
五十里　彰

Human skin keratinocytes form a tight junction (TJ) in the lateral membrane between neighboring cells. The TJ restricts the paracellular flux of water, nutrients, and solutes. The architecture of TJ is composed of claudins, transmembrane proteins, and zonula occludens, adaptor proteins. Claudins have four transmembrane domains and comprise a multi-gene family with 27 members. Claudin-1 acts as a physiological barrier in the skin. Ultraviolet (UV) light may disrupt the TJ barrier, but the pathophysiological mechanism has not been clarified well. We found that UVB causes a mislocalization of claudin-1, decrease in transepithelial electrical resistance, and increase in paracellular permeability of lucifer yellow, a hydrophilic fluorescent marker, in human keratinocyte-derived HaCaT cells. Similarly, NOC, a NO donor, and SIN-1, a peroxynitrite donor, caused the mislocalization of claudin-1. PCR showed that opsin (OPN) 2 and 3 mRNAs are expressed in HaCaT cells. UVB increased intracellular Ca^{2+}, nitric oxide, and peroxynitrite concentration, which were inhibited by OPN2 siRNA. In addition, the elevation of Ca^{2+} concentration was inhibited by the siRNA of transient receptor potential vanilloid subtype 1 (TRPV1), suggesting that UVB enhances Ca^{2+} influx mediated through TRPV1. NOC increased the amount of tyrosine nitration and ubiquitination of claudin-1.

Our results indicate for the first time that UVB increases intracellular Ca^{2+}, NO, and peroxynitrite concentration, resulting in the mislocalization of claudin-1. Peroxynitrite may elevate the amount of nitration and ubiquitination of claudin-1. The compounds, which inhibit nitration and ubiquitination of claudin-1, may have a role in preventing the destruction of the TJ barrier caused by UV.

1．緒　言

皮膚は体外と体内の境界をなすバリアとして働き、体外からの病原菌や異物の侵入を防ぐとともに、体内からの水分子やイオンの漏出を防ぐ。皮膚にはコラーゲンなどによって形成される角質層と細胞間接着分子によって形成される顆粒層の二重のバリアが存在する。角質層にはヒアルロン酸、コラーゲン、セラミドが存在し、皮膚の保湿機能が維持される。一方、顆粒層バリアの形成には、タイトジャンクションに発現するクローディンが重要な役割を担う。クローディンは27種類のサブタイプが同定されており、組織選択的に各サブタイプが発現する[1, 2]。クローディン-1ノックアウトマウスは、脱水症状によって生後まもなく死亡するため、顆粒層バリアの形成にクローディン-1が重要な役割を果たすことが明らかになった[3]。最近、クローディン-1の発現量がアトピー性皮膚炎の症状と逆相関することが報告され、皮膚疾患との関連も明らかになってきた[4]。敏感肌・乾燥肌の保湿ケアにおけるコスメトロジーの観点およびアレルギー性皮膚疾患の治療補助としてのファーマコロジーの観点から、クローディン-1を起点とした顆粒層バリアの構築および病態メカニズムの解明が必要である。

クローディン-1は足場タンパク質のZO-1とともにタイトジャンクションに分布するが、傷害性ストレスなどの負荷によりタイトジャンクションから細胞内へ移行する。最近申請者はクローディン-1の細胞局在制御機構を検討し、タイトジャンクションへの分布に191Thrのリン酸化が必要なこと、脱リン酸化クローディン-1がクラスリン依存性エンドサイトーシス機構を介して細胞内へ取り込まれることを解明した[5]。しかし、リン酸化以外の翻訳後修飾の関与やその制御機構は不明である。本研究では、微弱紫外線照射によりクローディン-1がタイトジャンクションから解離することを見出したため、そのメカニズムを検討し、クローディン-1の局在異常を改善する化合物を探索した。

Search for protective compounds against weak ultraviolet light-induced dysfunction of tight junction barrier in skin

Akira Ikari
Gifu Pharmaceutical University

2．方　法

2．1．細胞培養

ヒト皮膚由来の不死化角化細胞株のHaCaT細胞を、37℃、5% CO_2条件下の炭酸ガスインキュベーター内で培養した。増殖培地として5% 熱非働化牛胎児血清、100U/ml penicillin-G potassium、100μg/ml streptomycin sulfateを含むダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）を用いた。トリプシン溶液を用いて培養皿から細胞を剥離させ、3～4日ごとに継代した。

2．2．RNA抽出とPCR

細胞を回収後、TRI reagentを用いてRNAを抽出した。ReverTraAceを用いて逆転写反応後、ロドプシン（OPN1、2、3、5）およびβ-アクチンに対するプライマーを用い

てPCRを行った。PCR産物をアガロースゲルに泳動し、OPNの発現を確認した。

2．3．細胞内Ca^{2+}、一酸化窒素、パーオキシナイトライト濃度の測定

細胞を96ウェルプレートに播種し、72時間培養した。細胞内Ca^{2+}、NO、パーオキシナイトライト濃度を測定するため、細胞にFluo-8、DAF-2またはNiSPYを負荷した。各指示薬の蛍光強度を、Infinite F200 PRO（テカン社）を用いて測定した。

2．4．免疫沈降とウエスタンブロット

細胞を回収後、lysis bufferを用いて細胞膜を溶解した。遠心操作によって核画分を除去し、細胞抽出画分を調製した。免疫沈降の際には、細胞抽出画分、プロテイン-G セファロースビーズ、抗クローディン-1抗体を混合し、4℃で16時間インキュベートした。サンプルをSDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、トランスブロットセル（バイオラッド社）を用いてPVDF膜に転写した。PVDF膜を抗クローディン-1抗体、抗ニトロ化チロシン抗体、抗ユビキチン抗体でブロットした。EzWestLumi Plus（アトー社）で発光後、C-DiGit（スクラム社）を用いてバンドを検出した。

2．5．蛍光免疫染色と蛍光観察

カバーガラスを入れた35mm培養皿上に細胞を播種し、96時間培養した。UVBの照射直前または照射してから3時間後、細胞を冷メタノールで固定した。0.2% Triton X-100による細胞膜の透過処理と4% Block Aceによるブロッキング後、抗クローディン-1抗体を4℃で16時間処理した。その後、DyLight 555標識二次抗体を室温で1時間処理した。LSM700 共焦点レーザー顕微鏡（Zeiss社）を用いて、クローディン-1タンパク質の細胞局在を解析した。

2．6．細胞間透過性の評価

細胞をトランスウェルに播種し、96時間培養した。Volt ohm meter（Millipore社）を用いて、上皮膜間電気抵抗値（TER）を測定した。また、トランスウェルの上層から下層へのlucifer yellow（LY、水溶性蛍光マーカー）の移行量を指標として、細胞間低分子透過性を評価した。

3．結果と考察

3．1．クローディン-1の細胞局在に対するUVBの効果

共焦点レーザー顕微鏡を用いてクローディン-1の細胞局在を調べたところ、コントロール状態でクローディン-1は細胞隣接部位（タイトジャンクション）に分布していた。5mJ/cm^2の微弱紫外線（UVB）照射により、細胞傷害率はほとんど変化しなかったが、クローディン-1は主に細胞質に分布した。クローディン-1がタイトジャンクションから消失することにより、細胞間バリア機能が低下することが示唆されるため[6]、UVB照射によるクローディン-1の局在異常メカニズムを検討することにした。

3．2．クローディン-1の細胞局在に対するROSの効果

HaCaT細胞に紫外線を照射すると、一酸化窒素の産生量が増加する[7]。そこで、クローディン-1の細胞局在に対する一酸化窒素の影響を検討した。HaCaT細胞を一酸化窒素産生剤のNOCで処理したところ、タイトジャンクションに分布するクローディン-1量が低下した（Fig. 1）。同様に、パーオキシナイトライト産生剤のSIN-1処理により、タイトジャンクションからクローディン-1が消失した。細胞内の一酸化窒素量をDAF-2で測定したところ、NOC処理により増加が観察された（Fig. 2）。一酸化窒素はスーパーオキシドと反応し、パーオキシナイトライトを産生する。パーオキシナイトライト量をNiSPYで測定した

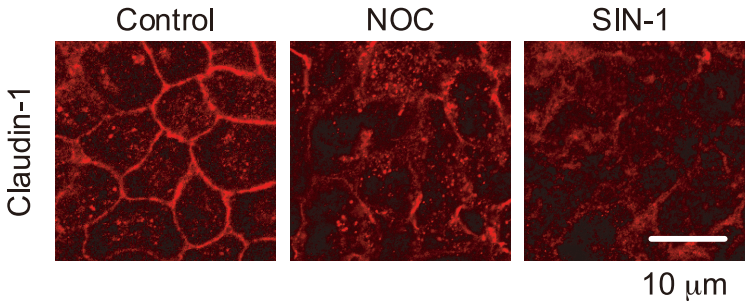


Fig. 1　Effects of NO and peroxynitrite donors on the localization of claudin-1

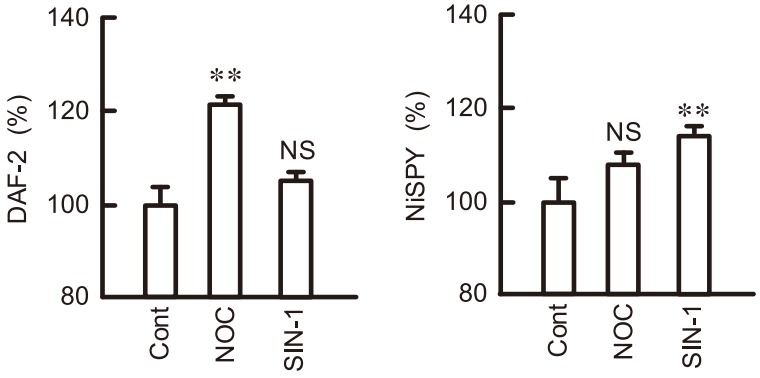


Fig. 2　Measurement of intracellular concentration of NO and peroxynitrite

ところ、NOCで増加傾向が、SIN-1で有意な増加が観察された。以上の結果から、クローディン-1の局在異常に、一酸化窒素とパーオキシナイトライト濃度の増加が関与することが示唆された。

3. 3. 細胞間バリアに対する一酸化窒素の影響

細胞をトランスウェルに培養し、TERとLY透過性を指標として細胞間バリア機能を評価した。NOCまたはSIN-1で処理したところ、コントロールに比べて有意にTERが低下し、LY透過性が増加した(Fig. 3)。そのため、一酸化窒素とパーオキシナイトライトは、クローディン-1の局在異常を介して細胞間バリアを減弱させることが示唆された。一酸化窒素とパーオキシナイトライトの産生を抑制することにより、細胞間バリアの維持に繋がると考えられるため、そのメカニズムを検討することにした。

3. 4. UVBによる一酸化窒素の産生におけるOPNの関与

紫外線などの光は、オプシン受容体によって感知されることが報告されている[8]。PCR法でOPN1、2、3、5の発現を調べたところ、HaCaT細胞にOPN2、3の発現が確認された（Fig. 4)。細胞に5mJ/cm^2 UVBを照射したところ、細胞内Ca^{2+}、一酸化窒素、パーオキシナイトライト濃度が増加した。これらの効果は、OPN2 siRNAの導入によって阻害されたが、OPN3 siRNAは阻害効果を示さなかった。以上の結果から、OPN2がUVBのセンサーとして働くことが示唆された。

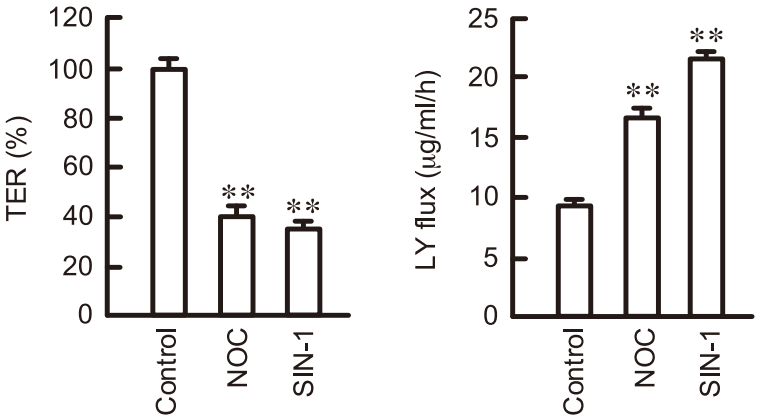


Fig. 3　Effects of NO and peroxynitrite donors on tight junction barrier

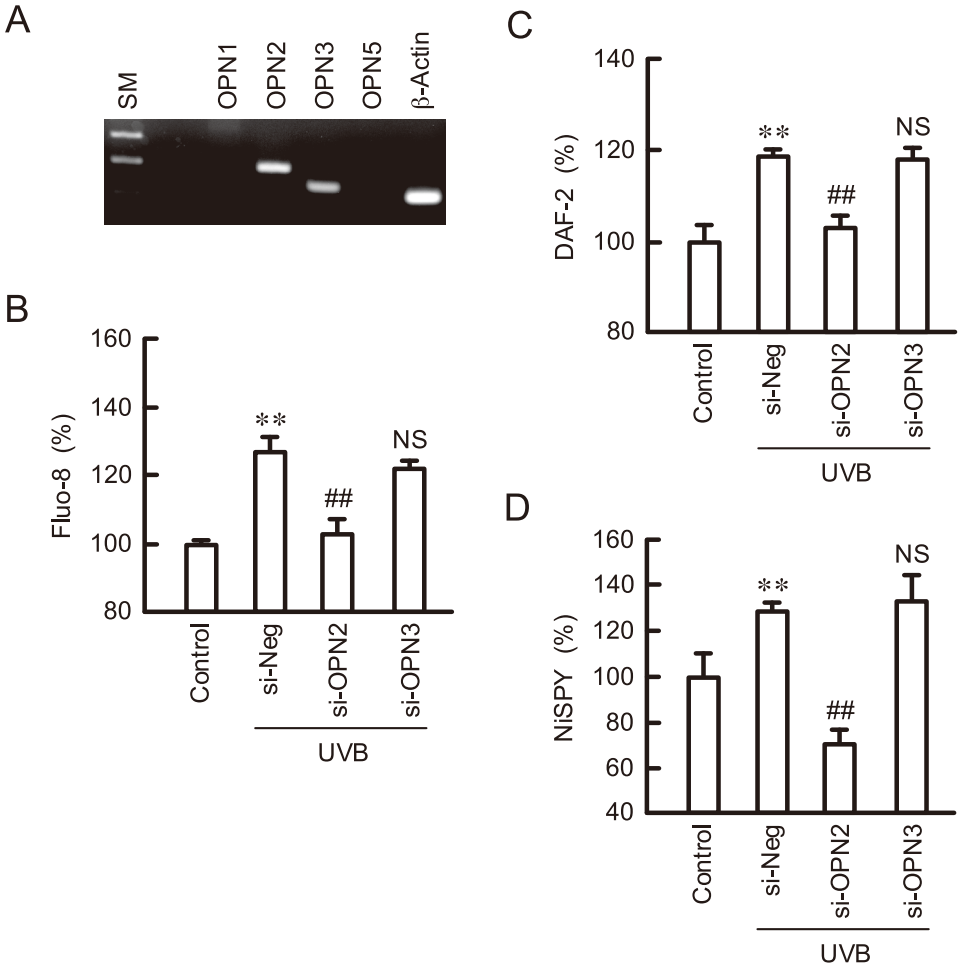


Fig. 4　Expression of OPN in HaCaT cells

3. 5. UVBによる一酸化窒素の産生におけるTRPVチャネルの関与

OPN受容体の活性化によるCa^{2+}濃度の上昇機序を解明するため、一過性受容器電位チャネルであるTRPVチャネルの関与を検討した。皮膚にはTRPV1とTRPV4の発現が報告されているため[9]、それぞれの選択的阻害剤であるAMG9810とRN1734の効果を調べた。UVB照射による細胞内Ca^{2+}、一酸化窒素、パーオキシナイトライト濃度の増加は、AMG9810処理によって阻害されたが、RN1734は阻害効果を示さなかった（Fig. 5）。また、Ca^{2+}キレート剤のEGTAも、UVBによる細胞内Ca^{2+}、一酸化窒素、パーオキシナイトライト濃度の増加を阻害した。TRPV1アゴニストのolvanilは、UVBと同様に細胞内Ca^{2+}、一酸化窒素、パーオキシナイトライト濃度を増加させた。以上の結果から、UVB照射によってTRPV1を介したCa^{2+}流入が増加し、それによって一酸化窒素とパーオキシナイトライトの濃度が増加することが示唆された。

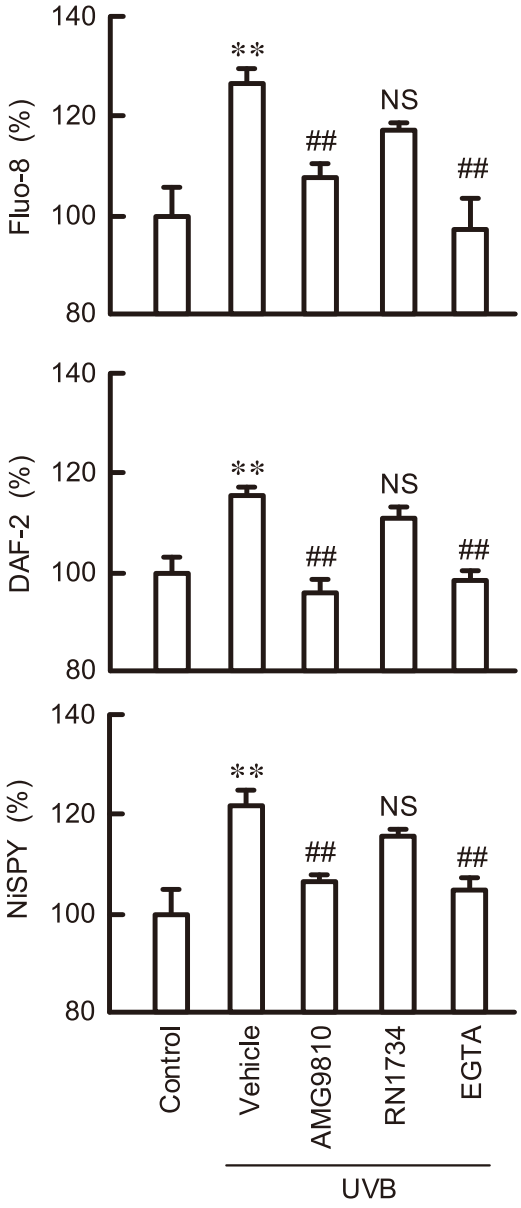


Fig. 5 Inhibition of UVB-induced elevation of intracellular Ca^{2+}, NO, and peroxynitrite concentration by AMG9810

3. 6. UVBによる一酸化窒素の産生におけるNOSの関与

一酸化窒素は恒常的に発現するNOS1、NOS3または誘導型のNOS2によってアルギニンから産生される[10]。ウエスタンブロット法でNOSタンパク質の発現量を調べたところ、NOS1は検出限界以下であった（Fig. 6）。NOS2発現量はUVBやAMG9810処理によって変化しなかった。一方、UVB照射によってNOS3発現量が増加し、この効果はAMG9810共処理によって阻害された。また、olvanil処理によってNOS3発現量が増加した。次に、クローディン-1の細胞局在に対する効果を検討した。UVB照射により、タイトジャンクションにおけるクローディン-1の分布量が低下した、この効果はAMG9810共処理によって阻害された。また、olvanil処理によって、UVBと同様にタイトジャンクションからクローディン-1が消失した。以上の結果から、UVB照射によるクローディン-1の局在異常に、NOS3の発現増加が関与すると示唆された。これまでに最小紅斑量のUVB照射により、NOS1 mRNA量が増加することが報告されているが[11]、我々の結果ではNOS1の増加が観察されなかった。UVBの照射量によって、NOSは異なる応答性を示す可能性がある。

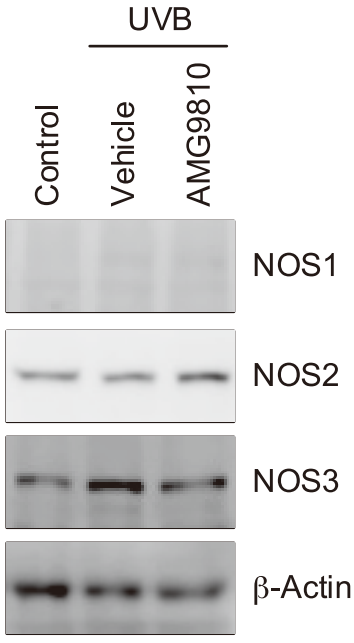


Fig. 6 Effects of UVB on NOS expression

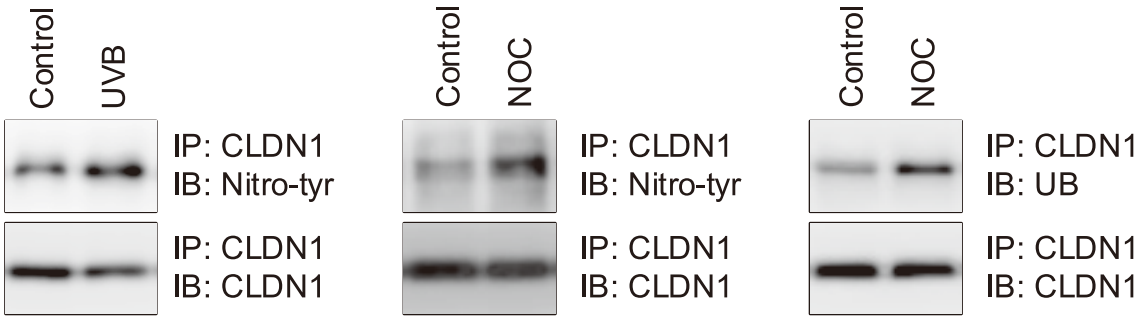


Fig. 7 Effects of UVB on nitration and ubiquitination of claudin-1

3. 7. クローディン-1の局在異常における翻訳後修飾の影響

UVB照射により、クローディン-1のニトロ化チロシン量が増加した（Fig. 7）。同様に、NOC処理により、クローディン-1のニトロ化チロシン量が増加した。クローディン-1の細胞局在はユビキチン化酵素によって制御されるため[12]、ユビキチン化の関与を検討した。その結果、NOC処理により、クローディン-1のユビキチン化量が増加した。以上より、一酸化窒素濃度の増加により、クローディン-1のニトロ化とユビキチン化修飾量が増加し、エンドサイトーシスが促進されると示唆された。今後、クローディン-1のニトロ化およびユビキチン化部位を同定し、両者の関係を解明する必要がある。

3. 8. クローディン-1のニトロ化修飾に対する抑制因子の探索

UVB照射によるクローディン-1のエンドサイトーシスに、ニトロ化修飾の関与が示唆されたため、その阻害効果を有する食品成分を探索した。フラボノイドの効果を検討したところ、数種類のフラボノイドにニトロ化修飾の阻害効果が観察された（特許申請に関わるため化合物名は非公開）。

4. 総　括

本研究において、強い細胞傷害を誘発しないUVB処理により、クローディン-1のタイトジャンクション局在量が低下することを見出した。これまでに我々は、クローディン-1の細胞局在の調節にリン酸化が関与することを報告したが[5]、他の翻訳後修飾の関与は不明であった。UVB照射により、OPN2を介したTRPV1の活性化、Ca^{2+}流入、一酸化窒素産生、パーオキシナイトライト産生といったシグナル伝達経路が活性化されることが示唆された。さらに、クローディン-1のニトロ化修飾やタイトジャンクションからの解離が観察されたため、これらが細胞間バリア機能の低下を誘発すると示唆された。紫外線による皮膚の保湿機能の低下に、細胞傷害だけでなく、クローディン-1の局在異常が関与する可能性がある。UVB照射によるクローディン-1のニトロ化は、数種類のフラボノイドの処理によって阻害されたため、これらを皮膚に塗布することにより、紫外線による保湿機能の低下が抑制されることが期待される。

（引用文献）

1） Mineta, K., Yamamoto, Y., Yamazaki, Y., Tanaka, H., Tada, Y., Saito, K., Tamura, A., Igarashi, M., Endo, T., Takeuchi, K., Tsukita, S., Predicted expansion of the claudin multigene family, *FEBS Letters*, 585, 606-612（2011）.

2） Turksen, K., Troy, T.C., Barriers built on claudins, *J Cell Sci*, 117, 2435-2447（2004）.

3） Sugawara, T., Iwamoto, N., Akashi, M., Kojima, T., Hisatsune, J., Sugai, M., Furuse, M., Tight junction dysfunction in the stratum granulosum leads to aberrant stratum corneum barrier function in claudin-1-deficient mice, *J Dermatol Sci*, 70, 12-18（2013）.

4） Gruber, R., Bornchen, C., Rose, K., Daubmann, A., Volksdorf, T., Wladykowski, E., Vidal, Y.S.S., Peters, E.M., Danso, M., Bouwstra, J.A., Hennies, H.C., Moll, I., Schmuth, M., Brandner, J.M., Diverse regulation of claudin-1 and claudin-4 in atopic dermatitis, *Am J Pathol*, 185, 2777-2789（2015）.

5） Marunaka, K., Kobayashi, M., Shu, S., Matsunaga, T., Ikari, A., Brazilian Green Propolis Rescues Oxidative Stress-Induced Mislocalization of Claudin-1 in Human Keratinocyte-Derived HaCaT Cells, *Int J Mol Sci*, 20,（2019）.

6） Morita, K., Miyachi, Y., Furuse, M., Tight junctions in epidermis: from barrier to keratinization, *Eur J Dermatol*, 21, 12-17（2011）.

7） Liu, W., Wu, S., Differential roles of nitric oxide synthases in regulation of ultraviolet B light-induced apoptosis, *Nitric Oxide*, 23, 199-205（2010）.

8) Haltaufderhyde, K., Ozdeslik, R.N., Wicks, N.L., Najera, J.A., Oancea, E., Opsin expression in human epidermal skin, *Photochem Photobiol*, 91, 117-123 (2015).
9) Ho, J.C., Lee, C.H., TRP channels in skin: from physiological implications to clinical significances, *Biophysics*, 11, 17-24 (2015).
10) Mattila, J.T., Thomas, A.C., Nitric oxide synthase: non-canonical expression patterns, *Front Immunol,* 5, 478 (2014).
11) Kuhn, A., Fehsel, K., Lehmann, P., Krutmann, J., Ruzicka, T., Kolb-Bachofen, V., Aberrant timing in epidermal expression of inducible nitric oxide synthase after UV irradiation in cutaneous lupus erythematosus, *J Invest Dermatol*, 111, 149-153 (1998).
12) Takahashi, S., Iwamoto, N., Sasaki, H., Ohashi, M., Oda, Y., Tsukita, S., Furuse, M., The E3 ubiquitin ligase LNX1p80 promotes the removal of claudins from tight junctions in MDCK cells, *J Cell Sci,* 122, 985-994 (2009).

太陽光紫外線に暴露された毛髪の酸化度のX線イメージングによる画像化

東海大学工学部原子力工学科
伊藤　敦

Oxidative damage in human hair induced by the exposure of external oxidants and its protection is one of the important issues in the health care against ageing of hair. Although many studies on the UV damage to hair have been reported including structural changes of the outermost part of hair, cuticle area, there are few studies to detect the area of oxidation from cuticle to the inside areas called cortex and medulla, depending on the kinds of solar UV radiation.

We have developed an imaging method of oxidative damage in human hair by X-ray spectromicroscopy with submicron resolution at the K absorption edge of sulfur. The method enabled us to obtain the distribution of cysteic acid, one of the oxidation products of cystine, a major amino acid in human hair. In addition, such X-ray imaging method has an advantage in the detection of oxidative damage deep inside the hair with a thickness of about 0.1 mm. The X-ray spectromicroscopy system was installed at the synchrotron radiation facilities, Photon Factory at Tsukuba.

The oxidative damage by the black light UVA lamp with an emission peak around 365nm was observed at only the surface of the hair at a short exposure, but with prolonged exposure, the damage was extended over the whole area of the hair. Since the UVA exposure of the short exposure case by the UVA lamp corresponds to about 2 hr exposure of solar UV at noon on the clear day of May at the location of Tokai university Shonan campus, our data strongly suggest that even one day exposure to solar-UV induces significant oxidative damage to hair. In contrast to UVA, UVB damage by the UVB lamp with an emission peak around 315nm seems to be limited in the cuticle region, probably because of its low permeability.

1．緒　言

我々が日常的に浴びている太陽光UV（290−400nm）は、長波長領域のUVA（320−400nm）と短波長領域のUVB（290−320nm）に分類される。これらのUVが毛髪にダメージを引き起こすことはよく知られており、総説にもまとめられている[1, 2]。特に酸化ダメージについては、UV暴露による損傷ばかりでなく、oxidative dyeによる染色のメカニズム、脱染色の防止などの観点からの研究も多い[3−5]。毛髪損傷を検出する手段としては、化学的な分析や構造変化によるものがほとんどであり[6]、最近の研究では表面のキューティクル構造の変化を原子間力顕微鏡、走査型電子顕微鏡などで損傷を画像化（可視化）したものが報告されているが、いずれも高分解能ではあるが表面構造を検出するのみで、毛髪内部を観察するには至っていない[7]。

しかしながら、特にUVAは毛髪表面だけでなく、深部にも到達するにもかかわらず、毛髪表面のキューティクルから内部のコルテックス、さらに中心部のメデュラに至る毛髪全体の酸化ダメージの分布を非侵襲的に観察する手段がこれまでになかった。本研究では、我々がこれまでに開発してきたブリーチ処理毛髪の酸化ダメージの分布を検出するX線顕微鏡による手法を、UVA及びUVB照射毛髪に適用することによって、表面から内部に至る酸化ダメージの全容を紫外線の種類に応じて明らかにする。これによって将来的な酸化ダメージ防護剤の開発のための基礎的情報を提供することを目的とする。

X-ray imaging of oxidative damage of human hair exposed to solar ultraviolet radiation

Atsushi Ito

Department of Nuclear Engineering, School of Engineering, Tokai University

2．方　法

2．1．X線分光顕微法

X線顕微鏡はX線によって物質の内部を可視光顕微鏡より高分解能で観察する手段である。波長が可視光より短いため、原理的に高分解能が達成されること、電子顕微鏡に比べて物質への透過率が高いため、厚い試料でも観察可能なこと、などが利点としてあげられる。特に本研究で用いたX線分光顕微法は、分子を識別して画像化するX線顕微鏡特有の手法である。我々はこれまでにX線分光顕微法を毛髪を構成するイオウ含有アミノ酸（シスチンとその酸化物システイン酸；図1に化学構造式を示す）に適用できる

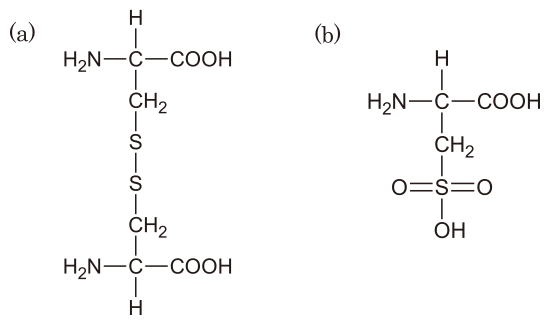


図1　シスチンとシステイン酸の化学構造式
シスチン(a)とシステイン酸(b)の化学結合の違いが吸収端微細構造に反映する。

ことを報告してきた[8, 9]。概要を以下に示す。

物質のX線吸収スペクトルを測定すると、含有元素特有の鋭い吸収が観察される(吸収端と呼ばれる)。さらにその吸収端近傍のX線エネルギー（波長）を細かく測定すると、当該元素を含む分子種に特有の吸収微細構造が観察される(Near Edge X-ray Absorption Fine Structure; NEXAFSと呼ばれる)。毛髪を構成する主なアミノ酸であるシスチンのイオウ吸収端におけるNEXAFSとその酸化物システイン酸のNEXAFSを図2に示す。シスチン画像は図の(a)と(b)のX線エネルギーで撮影した画像の差分により、システイン酸画像は図の(c)と(d)で撮影した画像の差分により求められる。一例として、図3に女性毛髪における両分子の分布を示す。シスチンは毛髪の主成分であることから全体に分布する（メデュラは密度が低いためシスチンが少ない)。一方､システイン酸はキューティクルに多く分布し、毛髪表面の酸化が大きいことがわかる。

この手法を我々はX線光源として放射光と組み合わせたX線密着顕微鏡(検出器はX線ズーミング管)を用いて実現した。放射光は強度の高い単色X線を得るのに必須であり、X線密着顕微鏡は0.5ミクロンの分解能をもち、視野のズーミングが可能な生体試料に適した顕微鏡装置である[10]。放射光施設は茨城県つくば市のPhoton Factoryを利用した。

2.2. UV照射

UVA照射にはブラックライト(FL15BLB、ニッポ電機)、UVB照射にはUVBランプ（FGL-15E、ニッポ電機）を用いた。それぞれ、UVA領域に365nmをピークとしたブロードな発光スペクトル、UVB領域に315nmをピークとしたブロードな発光スペクトルをもつ。UV強度はそれぞれ1.40mW/cm^{2}及び2.34mW/cm^{2}であった（UVX Digital Radiometer, UVP Inc., CA, USAによる測定)。さらに、実際の屋外の太陽光UVの作用を調べるために、東海大学湘南校舎にて2019年5月（晴天）の日中での照射も行った。UV強度は時刻と天候状況によって変化したが、平均してUVAが1mW/cm^2、UVBが0.5mW/cm^{2}であった。照射時間は、人が日中現実的に屋外に滞在する場合を考慮して、2時間、4時間、6時間とした。一方、ランプ照射時間については、屋外でのUV光量とほぼ同程度となるように調節した。表1に太陽光UVの光量をまとめた。

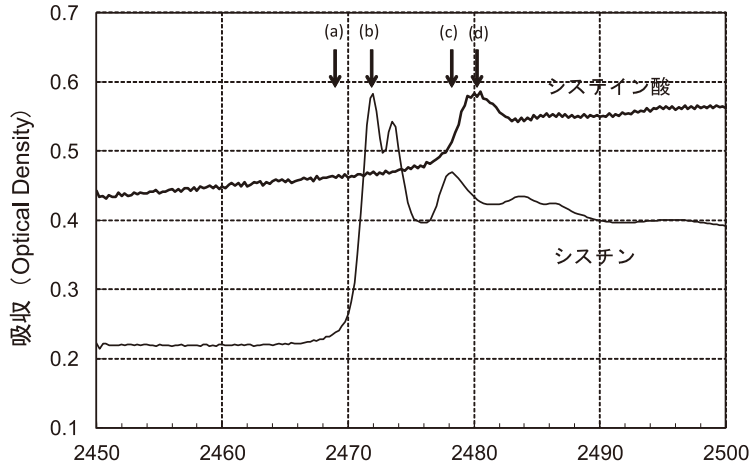


図2　シスチンとシステイン酸のイオウK吸収端近傍微細構造（NEXAFS）
(a)と(b)のエネルギーで取得された画像の差分がシスチン画像、(c)と(d)のエネルギーで取得された画像の差分がシステイン酸画像を与える。

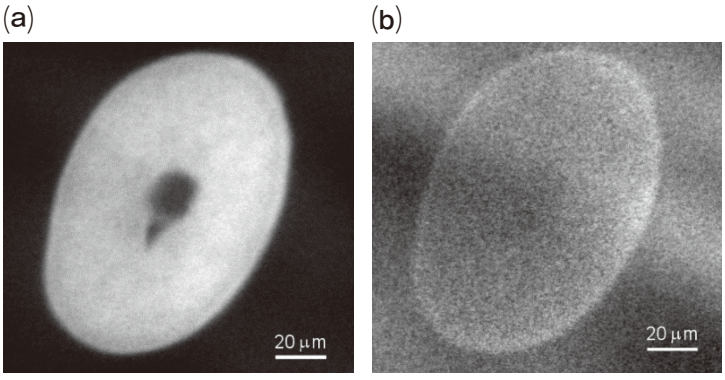


図3　人毛髪断面のシスチン及びシステイン酸の分布
(a)シスチン画像、(b)システイン画像。白い部分が分子が多い領域を示す。

表1　太陽光UVの照射時間とUVA、UVB光量

照射時間(分)	UVA 照射光量(kJ/m^2)	UVB 照射光量(kJ/m^2)
120	72	36
240	144	72
360	216	108

※東海大学湘南校舎での測定（2019年5月の晴天時）

2. 3. 毛髪試料

毛髪は市販の日本人女性由来のものを用いた。X線顕微鏡観察のために、照射後の毛髪に対して垂直スライサー（HS-1、ジャスコエンジニアリング）を用いて約20ミクロン厚の切片試料を作製し、エタノールに懸濁後、シリコンフレームに支持された窒化シリコン膜（100nm厚、Silson, UK）上に滴下し風乾させた（図4）。

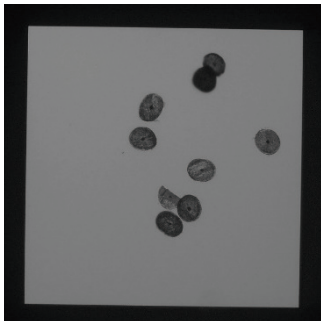


図4　窒化シリコン膜上の毛髪切片
1mm角の窒化シリコン膜（100nm厚）に載せられたX線顕微鏡観察用の毛髪切片の光学顕微鏡画像。周囲の黒い領域はシリコンフレーム（0.38mm厚）。

3. 結　果

図5にUV照射を行った毛髪におけるシステイン酸の分布画像を疑似カラーを用いて示した。3種類のどのUVに

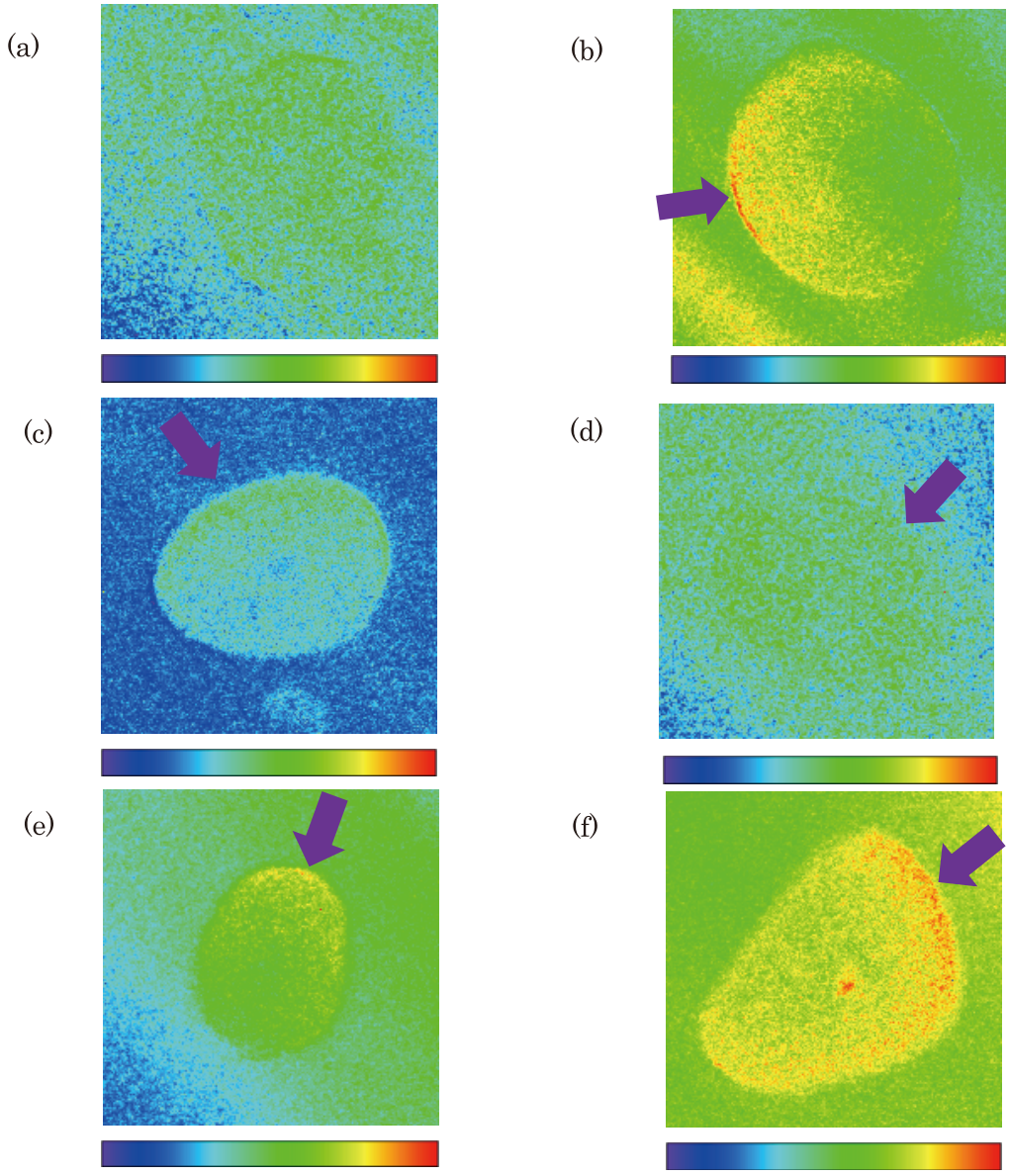


図5　X線顕微鏡によるシステイン酸の分布画像（疑似カラー表示）
(a)：未照射、(b)：太陽光UV照射（光量108kJ/m^2）、(c), (d)：UVA照射（光量はそれぞれ201.6kJ/m^{2}と302.4kJ/m^2）、(e), (f)：UVB照射（光量はそれぞれ168.5kJ/m^{2}と252.7kJ/m^2）。矢印はUVの照射方向。

おいても照射方向部位が最も酸化度が高く、内部に行くにつれて低くなった。(c), (d)のUVA照射試料ではかなり内部まで酸化が進んでいる。特に光量の大きい(d)ではほぼ均一に酸化しているように見える。一方、(e), (f)のUVB照射試料では表面と内部の酸化の差が大きい。これらの結果は、UVAに比べてUVBは透過率が低いことによるものと考えられる。

これらの画像をもとにキューティクル、コルテックス、メデュラの3領域の酸化度の定量化を試みた。縦軸はシステイン酸の吸収の程度(OD; Optical Density)をシスチンとシステイン酸を合計した全量で規格化したものとした。測定面積は、キューティクルで1.3ミクロン角、コルテックスは5.4ミクロン角、メデュラは1.9ミクロン角の平均値を求めた。なお、試料周囲のバックグラウンドの数値の補正も行った。キューティクルの酸化度はいずれのUVも光量とともに増加した。興味深いのはUVAではコルテックス、メデュラの内部領域での酸化が光量とともに進行したのに対して(パネルaの赤丸印)、UVBでは増加がほとんど見られないことである(パネルb)。また、太陽光UVの場合、最も光量の大きい試料(324kJ/m^2)の酸化度が他より小さいのは説明し難く再現性を確認する必要があるが、他の3点を見ると毛髪内部の酸化度が有意に上昇する結果とはならなかった。これらの結果は、実際の太陽光ではUVAよりUVBの作用が重要と解釈できる。

4. 考　察

X線顕微鏡による酸化度分布測定法によって、UVA、UVB、太陽光の3種による酸化度分布の違いを求めることができた。また、X線顕微鏡の高分解能の特徴生かして、キューティクル、コルテックス、メデュラの3領域における酸化度の違いを明らかにすることができた。結果は以下のようにまとめられる。

1) いずれのUVでもキューティクルの酸化が顕著であった。またそれは光量に依存して増加した。
2) UVAは毛髪内部のコルテックス、メデュラでも有意に酸化を誘発した。一方、UVBでは酸化はキューティクルに限られているように見える。これはUVBの透過度が低いためと考えられる。
3) 太陽光UVはUVBの光量依存性に近く、内部の酸化は顕著ではなかった。しかし、放射光施設を利用する本実験では、1年間の限られたビームタイムの関係から多くの試料測定に制限があり、今後、より明確な結論を出すために、再現性向上に向けてさらに測定数を増やすことが必要である。

太陽光UVの最も低い照射光量試料は、2時間照射であった。この試料でもキューティクルからコルテックス表層部にかけて有意な酸化が観察されたことは確かな結果である(図5b、図6c)。2時間の屋外活動は一般的であり、帽子の着用、さらに加えて、皮膚を防護するためのサンスクリーン剤のような毛髪酸化防止の防護剤の開発が望まれる。

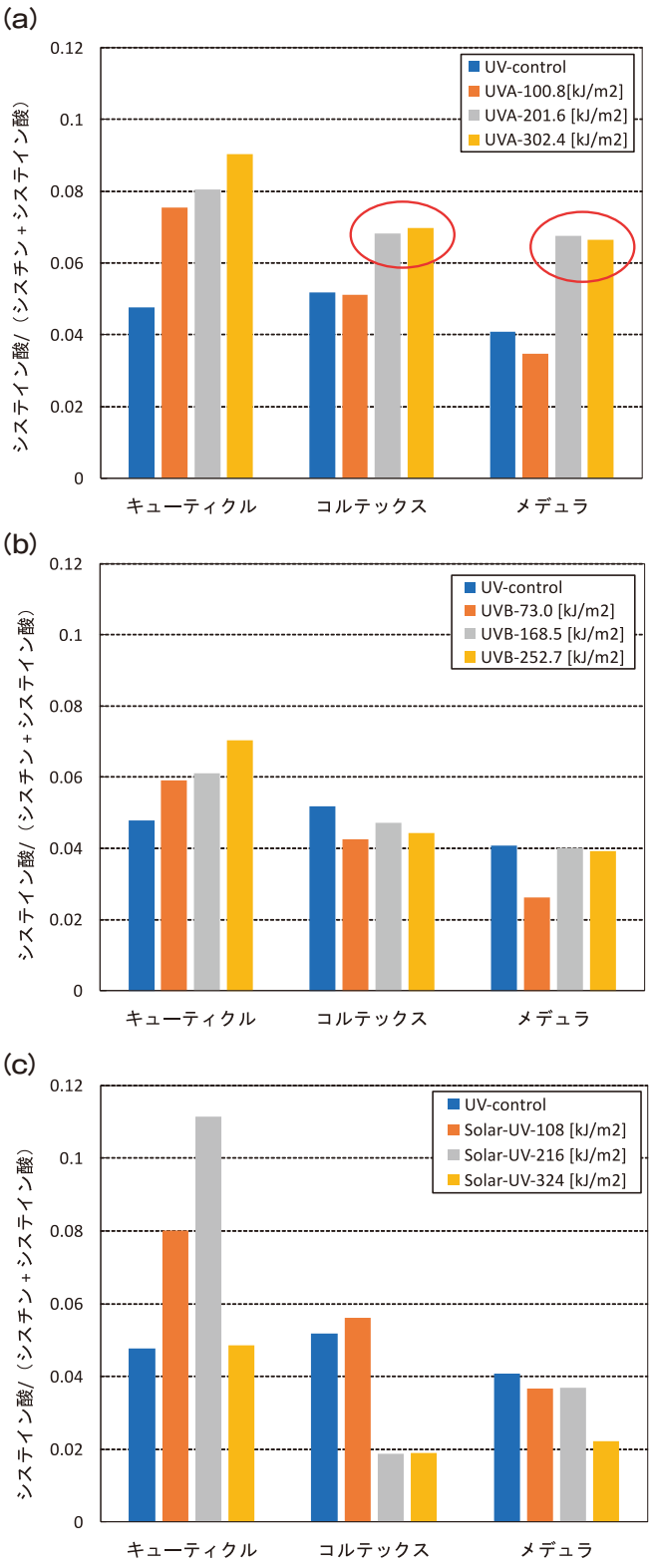


図6　キューティクル、コルテックス、メデュラにおけるUVによる酸化度
(a) UVA、(b) UVB、(c) 太陽光UV

なお、本成果については以下の学会で英語発表を行った。
M. Torigata and A. Ito, Imaging of oxidative damage in human hair exposed to solar-UV radiation by X-ray spectromicroscopy at the S-K absorption edge, The 15th Symposium of Japanese Research Community on X-ray Imaging Optics（第15回X線結像光学シンポジウム）, Sendai, 2019年10月25日

（引用文献）

1） V. Signori, Review of the current understanding of the effect of ultraviolet and visible radiation on hair structure and options for photoprotection, *J. Cosmet. Sci.*, **55**, 95–113（2004）.
2） A.C. Nogueira *et al.*, About photo-damage of human hair, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **5**, 165–169（2006）.
3） Y. Zhou *et al.*, Protection of oxidative hair color fading from shampoo washing by hydrophobically modified cationic polymers, *J. Cosmet Sci.*, **60**, 217–238（2009）.
4） T. Kojima *et al.*, Investigation of dyeing behavior of oxidative dye in fine structures of the human hair cuticle by nanoscale secondary ion mass spectrometry, *Skin Res. Technol.*, **21**, 295–301（2015）.
5） T. Kojima *et al.*, Dyeing regions of oxidative hair dyes in human hair investigated by nanoscale secondary ion mass spectrometry, *Colloids Surf B: Biointerfaces*, **106**, 140–144（2013）.
6） M.N. Chandrashekara and C. Raganathaiah, Chemical and photochemical degradation of human hair: a free-volume microprobe study, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **101**, 286–294（2010）.
7） M. Richena and C.A. Rezende, Effect of photodamage on the outermost cuticle layer of human hair, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **153**, 296–304（2015）.
8） A. Ito *et al.*, Application of XANES profiles to X-ray spectromicroscopy for biomedical specimens: Part I. Discrimination of macromolecules with sulfur atoms, *J. X-Ray Sci. Technol.*, **19**, 249–260（2011）.
9） T. Inoue *et al.*, Application of XANES profiles to X-ray spectromicroscopy for biomedical specimens: Part II. Mapping oxidation state of cysteine in human hair, *J. X-Ray Sci. Technol.*, **19**, 313–320（2011）.
10） A. Ito *et al.*, X-ray contact microscopy system for spectromicroscopy of biological specimens, *J. Synchrotron Radiat.*, **5**, 1099–1101（1998）.

イオン導入時の微弱電流による皮膚組織炎症への影響と安全性の検証

徳島大学大学院医歯薬学研究部
小 暮　健太朗

Iontophoresis is a non-invasive transdermal drug delivery technology using weak electric current. Although iontophoresis is widely used in beauty field, its safety has not been investigated. From the previous our research, it was predicted that iontophoresis will induce inflammation via activation cell signaling. In this study, we tried to study the effect of weak electric current at iontophoresis on the skin tissue inflammation and safety. The skin cross section after iontophoresis was compared with non-treated skin. There was no difference in skin tissue between before and after iontophoresis. Furthermore, to check the inflammation induction by iontophoresis, the amounts of various mRNAs relating inflammation, such as tumor necrosis factor-α and interleukin (IL) -1β. Although statistical significant difference was not recognized, mRNAs of inflammatory cytokines was not activated by iontophoresis. Interestingly, anti-inflammatory cytokine IL-10 mRNA showed the tendency to increase after iontophoresis. From these results, it was suggested that iontophoresis does not induce any inflammation in the skin tissue. In conclusion, iontophoresis is safety technology for transdermal drug delivery and skin beauty.

1．緒　言

微弱な電流（0.3～0.5mA/cm^2）を用いて皮膚内にイオン性の物質を送達する技術としてイオントフォレシスが知られており、美容領域においては「イオン導入」として一般には認知されている。様々なデバイスが開発されており、美容整形外科等で用いられている。イオントフォレシス（イオン導入）に関しては、これまで低分子薬物を対象とした研究が盛んに行われており、通常切り取った動物皮膚および市販のヒト皮膚をフランツ型セルにセットし、上層から皮膚を透過して下層に移行した薬物量を定量する研究が主である。また、現在の国内化粧品企業では、動物個体を用いた研究が行えない状況にある。そのため、「死んだ皮膚」を用いることが多く、皮膚の物理的損傷に関しては検討されているが、生理的影響、特に炎症性サイトカイン産生やシグナル伝達系タンパク質の活性化等は観察することができない。ヒトでモニターする場合も、皮膚表面の発赤くらいしか検討できない。しかしながら、イオン導入における微弱電流の皮膚への影響を検討するには、「生きた皮膚」を用いることが必須であり、特に皮膚組織生理への影響に関しては個体レベルでモニターすることが重要である。インターネット等でイオン導入に関する記事をよく目にするが、すべて「ビタミンC等の美容成分を皮膚内に非侵襲的に導入することができる」という点のみを述べており、イオン導入（微弱電流処理）が皮膚にどのような影響を及ぼすのか、に関するものは皆無と言ってよい。すなわち、薬学的観点および香粧品開発の観点において、イオン導入の皮膚に及ぼす影響については、ほとんど手付かずと言ってよいのが現状である。

我々は、2005年からイオントフォレシス（イオン導入）の高分子薬物送達への展開に取り組んできた[1-3]。当初は、他の研究者同様に切り取った（死んだ）皮膚を用いて、低分子薬物（抗炎症剤）の皮膚透過について検討を行っていたが、主たる研究者の専門であったナノ粒子（リポソーム）とイオントフォレシスとの組み合わせを検討する過程において、生きた皮膚（動物個体）を用いた時、それまで不可能であると考えられていた高分子・ナノ粒子が皮膚内に送達可能であることを発見した[1-3]。従来、イオントフォレシスによる皮膚内への薬物送達機構は、電気的反発とイオンの動きに伴う水の流れ（電気浸透流）であると考えられていたが、主たる研究者の検討の結果、皮膚組織細胞のシグナル伝達系が活性化され、細胞間隙が開裂することによると発見するに至った[4]。すなわち、微弱電流によって皮膚組織の生理機能が変化することが、イオントフォレシス（イオン導入）による薬物の皮内浸透メカニズムであることが明らかになったわけである。さらに、検討を重ねた結果、微弱電流刺激は、皮膚組織細胞間隙を開裂させるだけでなく、細胞の取り込み機構（エンドサイトーシス）を誘起し、細胞外の物質を細胞内に取り込ませることも発見している[5-8]。これらのことから、イオントフォレシスにおける微弱電流処理は、皮膚組織・細胞におけるシグナル伝達経路を活性化し、組織レベルおよび細胞レベルでの生理機能を変化させることが明らかとなり、薬物送達に繋がっていることが示唆されている。そのため我々は、上記検討から薬物送達に繋がる細胞シグナル伝達以外にも、微弱電流は様々なシグナル伝達、特に安全性に関与する炎症関連シグナルを活性化するのではないかと考えた。そこで本研究では、美容領

Study of the effect of weak electric current at iontophoresis on the skin tissue inflammation and safety

Kentaro Kogure

Graduate School of Biomedical Sciences, Tokushima University

域等で汎用されているイオン導入（微弱電流による皮膚処理）が、皮膚組織の生理機能、特に炎症性サイトカインの発現等に与える影響を検討することで、イオン導入（イオントフォレシス）の安全性を検証することを目的とした。

2．方　法

2．1．微弱電流処理した皮膚の組織学的変化の検討

Wisterラット（当初計画では、マウスを予定していたが、mRNA定量に必要な量のRNAを抽出するために、より大きいラットに変更して行った）背部皮膚の毛を刈り、露出した皮膚上にPBSを浸透させた脱脂綿を置き、その上から心電図用のAg/AgCl電極を用いて、これまでの検討で用いてきた条件（0.34mA/cm^2、1時間）により微弱電流処理を行った。微弱電流処理を施した部分の皮膚を回収し、OCTコンパウンド中で凍結固化させたものをクライオスタットを用いて凍結切片とした。得られた切片をヘマトキシリン・エオシン（HE）によって染色し、染色後の皮膚切片を顕微鏡で観察することで、皮膚の組織学的変化について検討した。皮膚の採取は、微弱電流処理後3時間および24時間後とし、それぞれ回収した皮膚について組織切片観察を行った。

2．2．微弱電流処理した皮膚における炎症性サイトカインmRNA量の検討

毛を刈ったWisterラットの背部皮膚上に心電図用Ag/AgCl電極を置き、微弱電流処理（0.34mA/cm^2、1時間）を行った。微弱電流処理を施した部分の皮膚を回収し、キットを用いてRNAを抽出した後、Real-time PCR法によって炎症性サイトカイン等（インターフェロン（INF）-γ、腫瘍壊死因子（TNF）-α、インターロイキン（IL）-6、IL-1β、IL-33、シクロオキシゲナーゼ（COX）-2）および抗炎症性サイトカイン（IL-10、腫瘍成長因子（TGF）-β）のmRNA量を定量解析した。皮膚の採取は、微弱電流処理後3時間および24時間後とし、各5匹以上のラットから回収したRNAについて解析を行った。さらに、より強力な電流強度（1.0mA/cm^2、1時間）において処理したラット皮膚について、処理後3時間におけるこれら炎症性サイトカイン等（IL-6、IL-10、TNF-α、TGF-β）のmRNA発現を定量解析した。

3．結　果

3．1．微弱電流処理した皮膚の組織学的変化の検討

微弱電流処理後、HE染色を行った皮膚切片について顕微鏡観察したところ、写真で示すように、3時間後の皮膚切片は、未処理皮膚と同じであり、微弱電流処理による皮膚組織への目立った影響は確認されなかった（図1A）。さらに、微弱電流処理24時間後の皮膚についても同様にHE染色した組織切片観察を行ったが、24時間後においても未処理皮膚と同じであり、微弱電流処理による組織への影響は認められなかった（図1B）。アトピー性皮膚炎や乾癬、紫外線障害等の炎症病態では、皮膚表皮領域の肥厚化が確認されるが、微弱電流処理後の皮膚においては、そのよう

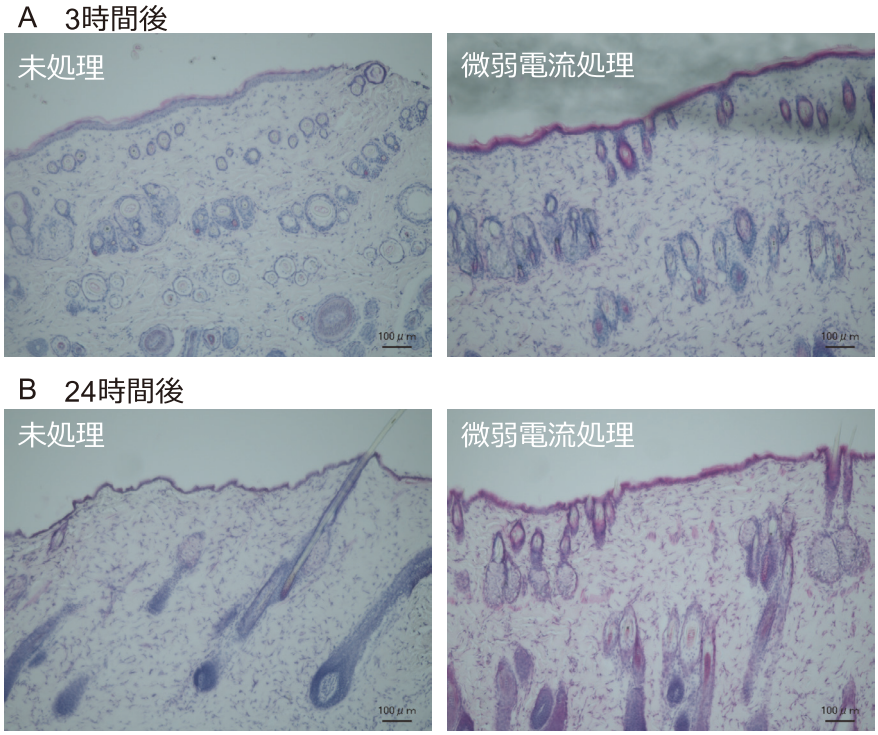


図1

な変化は認められなかった。

3．2．微弱電流処理した皮膚における炎症性サイトカインmRNA量の検討

微弱電流処理した皮膚中のRNAを回収し、Real-time PCR法によって炎症性サイトカイン等の炎症関連因子（INF-γ、TNF-α、IL-6、IL-1β、IL-33、COX-2および抗炎症性サイトカイン（IL-10、TGF-β）のmRNA量を定量解析した。微弱電流処理3時間後における皮膚組織中の各因子mRNAを比較すると、それぞればらつきが大きいが、以下のようになった。COX-2およびIL-6は、変動は見られなかった。IL-1β、IL-33、TGF-β、TNF-αは、若干減少しているようであった。一方IL-10は、増加する傾向が認められた。さらに、微弱電流処理24時間後における皮膚中の各因子mRNAについて定量したところ、3時間で変化のなかったCOX-2とIL-6がやや増加傾向に、3時間では若干減少していたIL-1β、IL-33、TGF-β、TNF-αは、3時間時点よりも多くなり、IL-1βとTGF-βは、コントロールレベル、TNF-αは、コントロールよりも若干高めになっていた。3時間において増加傾向が認められたIL-10は、やや減少していた。しかし、これらの変動は、ばらつきが大きいため、いずれも統計的に有意な変化ではなかった。これらのことから、通常のイオン導入処理条件（0.3-0.5mA/cm^2）では、大きな負の影響は示さないことが示唆されたため、当初計画にも示したように、通常条件よりもより強力な電流強度（1.0mA/cm^2、1時間）による処理の皮膚炎症に及ぼす影響を追加検討した。ここでは、IL-6、IL-10、TNF-α、TGF-βに絞って電流処理3時間後の皮膚におけるmRNA発現量の定量解析を行った。その結果、検討したすべてのサイトカインmRNA発現量が大きく増加することが明らかとなった。

4．考　察

我々のこれまでの検討によって、イオン導入（イオントフォレシス）処理時の微弱電流が、組織細胞におけるシグナル伝達系を活性化し、様々なタンパク質のリン酸化を誘起することで、細胞間隙の開裂やエンドサイトーシスが誘導されることを見出してきた[4-9]。そのため、イオン導入時の微弱電流は、皮膚組織における炎症性サイトカイン遺伝子等の発現にも影響を及ぼすのではないかと考えるに至り、本研究を実施することとした。過去の検討において、ラット皮膚に炎症を誘起してアトピー性皮膚炎モデルおよび乾癬モデルを作成した場合、皮膚の表皮層の顕著な肥厚化が認められていたため、微弱電流処理によって皮膚に炎症が誘起される場合には、同様に皮膚組織の肥厚化が見られるのではないかと考え、微弱電流処理の有無による皮膚組織像の比較を行った。その結果、微弱電流処理24時間後においても、皮膚組織に目立った変化は認められなかったことから、微弱電流処理による顕著な炎症反応等は誘起されないことが示唆された。

このことを、より厳密に評価するために、炎症に関与する種々の因子の遺伝子発現について定量解析を試みた。今回は、炎症性サイトカインとしてINF-γ、TNF-α、IL-6、IL-1β、IL-33、炎症関連因子としてCOX-2、抗炎症サイトカインとしてIL-10、TGF-βに着目した。本研究で着目した因子であるが、以下のような特徴を有する。IL-1βは、アトピー性皮膚炎において、アレルギー感作性の亢進と角質層内IL-1βの増加との間に関連性があると報告されている。IL-33は、IL-33が著しく増大したマウスはアトピー性皮膚炎様症状を発症することが報告されている。掻破された皮膚が、IL-33を分泌しTh2炎症を引き起こすことも報告されている。TNF-αは、関節リウマチや乾癬に関与することが知られている。また、Ⅰ型およびⅢ型コラーゲンの産生を抑制する特性を有することも報告されている。IL-6は、炎症性サイトカインおよび抗炎症性サイトカイン両方の作用を有する。TNF-αやIL-1によって産生が誘導されるが、それらの活性化を抑制するとともに、それらの内因性阻害物質（sTNFRやIL-1ra）の産生を高める。COX-2は、炎症時にサイトカインや増殖因子等の刺激により発現が誘導されるため、COX-2を介して炎症反応を進行させるPGE2やPGI2等の産生が亢進することが知られている。一方、抗炎症性サイトカインのIL-10は、創傷部の炎症環境ではCOX-2が活性化し、プロスタグランジンE2（PGE2）の産生が上昇することによって、IL-10産生が上昇することが知られている。IL-10は、炎症性サイトカインの産生（マクロファージからのIL-1βやTNF-α等）を抑制することができる。また、TGF-βは、線維芽細胞によるコラーゲン合成に必要なサイトカインである。そのため、TGF-βの変化は、皮膚中コラーゲンの減少や弾性の低下に繋がることが予想される。これらの因子について、微弱電流処理後の皮膚から抽出したRNAを用いて各mRNA量を定量解析した。その結果、得られた結果は、ばらつきが大きく、有意な変化は認められなかったものの、炎症性サイトカイン類に関しては、若干減少する傾向がみられ、また抗炎症性サイトカインのIL-10は、増加する傾向が認められた。このことは、組織観察の結果と一致しており、微弱電流処理によって、少なくとも炎症が誘起されないことを示唆している。むしろ、抗炎症性サイトカインのIL-10が増える傾向が得られたことから、微弱電流処理は炎症を鎮める効果を有する可能性も考えられる。

微弱電流処理による炎症惹起に閾値があるのか確かめるため、より強力な電流強度（1.0mA/cm^2、1時間）で処理した皮膚における炎症性サイトカイン等の発現を追加検討した結果、調査したすべてのサイトカイン（IL-6、IL-10、

TNF-α、TGF-β）のmRNA量が大きく増大することが明らかとなった。このことから、通常条件よりも強力な電流強度では、やはり皮膚に大きなストレスをかけるため、炎症性サイトカイン等の発現が上昇し、炎症が惹起される可能性が確認された。すなわち、通常条件（0.3-0.5mA/cm^2）を超えるような電流強度を用いなければ、炎症惹起は防げることが示唆された。

当初、炎症性サイトカインが上昇すると予想していたため、それに関連する炎症性シグナル関連タンパク質の活性化や皮膚のアポトーシス等を検討することも考えていたが、1時間という長時間の微弱電流処理にもかかわらず、通常条件（0.3-0.5mA/cm^2）でのイオン導入（イオントフォレシス）であれば炎症性サイトカイン等の炎症関連因子の大きな変動もなかったことから、これらの検討は行うに至らなかった。しかし、抗炎症性サイトカインIL-10の若干の増加等の傾向もみられたことから、今後より詳細な検討を行う必要があると考えている。また、微弱電流が皮膚組織細胞のシグナル伝達系を活性化することから、皮膚の機能性に関連する因子、すなわちセラミドやコラーゲン・エラスチン等が変化している可能性も考えられる。今後、これらの皮膚機能性に関する因子についても検討を行いたいと考えている。

謝　辞

本研究の遂行にご支援をいただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に篤く御礼申し上げます。

（引用文献）

1） Kigasawa K, Kajimoto K, Hama S, Saito A, Kanamura K, Kogure K. Noninvasive delivery of siRNA into the epidermis by iontophoresis using an atopic dermatitis-like model rat. *Int. J. Pharm*. 383, 157-160（2010）.

2） Kajimoto K, Yamamoto M, Watanabe M, Kigasawa K, Kanamura K, Harashima H, Kogure K. Noninvasive and persistent transfollicular drug delivery system using a combination of liposomes and iontophoresis. *Int. J. Pharm*. 403, 57-65（2011）.

3） Kigasawa K, Kajimoto K, Nakamura T, Hama S, Kanamura K, Harashima H, Kogure K. Noninvasive and efficient transdermal delivery of CpG-oligodeoxynucleotide for cancer immunotherapy. *J. Control. Release*. 150, 256-265（2011）.

4） Hama S, Kimura Y, Mikami A, Shiota K, Toyoda M, Tamura A, Nagasaki Y, Kanamura K, Kajimoto K, Kogure K. Electric stimulus opens intercellular spaces in skin. *J. Biol. Chem*. 289, 2450-2456（2014）.

5） Hasan M, Nishimoto A, Ohgita T, Hama S, Kashida H, Asanuma H, Kogure K. Faint electric treatment-induced rapid and efficient delivery of extraneous hydrophilic molecules into the cytoplasm. *J. Control. Release* 228, 20-25（2016）.

6） Hasan M, Tarashima N, Fujikawa K, Ohgita T, Hama S, Tanaka T, Saito H, Minakawa N, Kogure K. The novel functional nucleic acid iRed effectively regulates target genes following cytoplasmic delivery by faint electric treatment. *Sci Technol Adv Mater* 17, 554-562（2016）.

7） Hasan M, Hama S, Kogure K. Low electric treatment activates Rho GTPase via heat shock protein 90 and protein kinase c for intracellular delivery of siRNA. *Sci. Rep*. 9, 4114（2019）.

8） Torao T, Mimura M, Oshima Y, Fujikawa K, Hasan M, Shimokawa T, Yamazaki N, Ando H, Ishida T, Fukuta T, Tanaka T, Kogure K. Characteristics of unique endocytosis induced by weak current for cytoplasmic drug delivery. *Int. J. Pharm*. 576, 119010（2020）.

細胞の損傷や老化により生成する脂質過酸化物のバイオイメージング

東京大学大学院農学生命科学研究科
佐々木　栄太

Oxidative stress due to cell damage or aging results in lipid peroxidation, which produces various lipid radicals and α, β-unsaturated aldehydes. The highly reactive aldehyde species readily modify specific or unspecific protein sites and maybe involved in many diseases such as atherosclerosis and cancer. Although many analytical methods have been developed for lipid peroxidation, imaging of the aldehydes in living cells is still challenging due to lack of appropriate chemical probes. Here, I designed, synthesized an investigated two aryl azide-based fluorescence probes to detect acrolein, the shortest α, β-unsaturated aldehydes with a three carbon unit, and an alkoxyamine-based probe targeting the reactive aldehydes. One of the aryl azide-based probes with a 7-nitrobenzoxadiazole scaffold yielded the corresponding formyl triazole product upon reaction with acrolein. The reaction product showed substantially red-shifted absorbance compared to the unreacted probe, however, instability of the azide group in the probes may limit their use for the imaging of acrolein in living cells. The other probe containing a rhodamine scaffold with an alkoxyamine substituent showed pH-dependent absorbance and fluorescence spectra, which are characteristic for many rhodamine derivatives due to the open and closed spirocyclic forms in equilibrium. When it was mixed with α, β-unsaturated aldehydes at pH 7, significant increase of absorbance and fluorescence was observed likely because the open form was stabilized for the reaction product. Thus, the probe was applied to HeLa cells. Confocal microscopy images showed fluorescence increase in some cellular compartments. Co-labeling the cells with a lysosome-targeted dye revealed that the probe turned to fluorescence in lysosome, where the local pH is known to be 4.5-5.0. Accumulation of the probe in lysosome may hamper the desired imaging of the reactive aldehyde species. Further investigation is in progress to determine where the probe distributes in the cells and if it can detect endogenous aldehydes under oxidative stress.

1．緒　言

生体組織の酸化還元状態は、酸化物質と還元物質の巧みなバランスによって適切な状態に保たれている。しかし、癌や生活習慣病をはじめとする疾患や、加齢などによって酸化ストレスが亢進すると、生体内で日常的に発生している反応性の高い活性酸素種が、DNA、タンパク質、脂質といった主要な生体構成分子を酸化し、細胞障害を引き起こす。したがって、これらの活性酸素種、またはそれによって酸化的な修飾を受けた生体分子を感度良く検出することができれば、細胞の健康状態や老化の度合いを判定する上で有効である。

リン脂質やコレステロールエステルなどの生体膜を構成する多価不飽和脂肪酸は、特に活性酸素による酸化修飾を受けやすい性質をもつ。したがって、これらの脂質が酸化的に分解して生じる不飽和アルデヒド化合物（加齢臭の原因として知られる2-ノネナールや毒性の高いアクロレインなど）は酸化ストレスの良いマーカーとなりうる。近年、これらの高反応性脂質過酸化物が、タンパク質の特定アミノ酸残基を化学修飾しうることがわかってきて注目を集めている。それによって生成するさまざまなタンパク質修飾体の詳細な働きは未だ明らかとなっていないが、疾病や老化に関わる新たな危険因子の可能性がある[1)]。

本研究では、細胞内に生成する脂質過酸化物を高感度・高時空間分解能で検出する方法の開発を目指し、生理的条件下これらの分子種と反応して蛍光性を獲得する機能性小分子プローブを創成することを目的とした。具体的には、1）近年アクロレインとの反応性が報告されたアリルアジド基を反応部位として含む蛍光プローブ、2）さまざまな炭素鎖長を有するアルデヒド基をターゲットとしたアルコキシアミノ基を反応部位とする蛍光プローブの開発を行った。目的とする脂質過酸化物感受性蛍光プローブによって、さまざまな酸化ストレス条件下での生細胞イメージングデータを蓄積することができれば、疾病や老化による細胞障害の診断や、新たな病態または加齢メカニズムの解明につながると期待できる。

Bioimaging of lipid peroxidation induced by cell damage or aging
Eita Sasaki
Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

2．方　法

2．1．プローブの合成

アリルアジド基を反応部位として含む蛍光プローブ**1**および**2**（図1A）は、4-クロロ-7-ニトロベンゾフラザンおよびIR-780ヨウ化物をアセトンまたはメタノールに溶解し、アジ化ナトリウムを加えることで合成した。アルコキシアミノ基を反応部位とする蛍光プローブ**3**（図1B）は、ローダミンBをベンジルアルコール誘導体（**4**）、ベン

ジルブロマイド誘導体へと変換した後に[2]、*N,N*-ジメチルホルムアミド（DMF）中に溶解し、ジアザビシクロウンデセン存在下N-Boc-ヒドロキシルアミンと反応させ、酸によるBoc基の脱保護を行うことによって合成した。それぞれのプローブまたはその中間体は、シリカゲルクロマトグラフィーまたは逆相カラム（C18）を用いた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）（JASCO）によって精製した。また、得られた化合物の構造は、NMR（JNM-ECA500II, JEOL）および質量分析（JMS-T100LC, JEOL）によって同定した。

2．2．プローブとアクロレインやその他のα,β-不飽和アルデヒドとの反応

プローブ**1**をテトラヒドロフラン（THF）中でアクロレインと混合した後、HPLCを用いてその反応物を分析、分取した。プローブ**1**およびそのアクロレインとの反応物の光学特性は、分光光度計（U-3900, Hitachi）、蛍光光度計（F-7100, Hitachi）を用いて分析した。プローブ**2**は、メタノール、DMF、クロロホルム、ジクロロメタン、アセトン、酢酸エチル、アセトニトリル中でアクロレインと混合し、またはプローブのみで、その吸収スペクトル、蛍光スペクトルを継時的に測定した。プローブ**3**は、リン酸緩衝液（pH7または8）中でアクロレインを加えた時の吸収スペクトル、蛍光スペクトルを継時的に測定した。さらに、プローブ**3**をさまざまな炭素鎖長をもつα,β-不飽和アルデヒド分子（C3-C10: acroleine, crotonaldehyde, trans-2-pentanal, trans-2-hexenal, trans-2-heptenal, trans-2-octenal, trans-2-nonenal, trans-2-decenal）とリン酸緩衝液（pH7）中またはメタノール中で反応させ、波長560nmの吸光度をプレートリーダー（ARVO X3, PerkinElmer）によって測定し、それぞれの溶液をHPLCおよび質量分析装置によって解析した。

2．3．プローブ3のリン酸緩衝液中での光学特性

プローブ**3**のジメチルスルホキシド（DMSO）溶液をさまざまなpHに調製した0.1Mのリン酸緩衝液（pH3-11）に終濃度が10μM（1% DMSO）となるように溶解し、分光光度計、蛍光光度計を用いてその吸収・蛍光スペクトルを分析した。また、対象実験として、ローダミンBとそのベンジルアルコール誘導体（**4**）の光学特性についても同様に分析した。

2．4．プローブ3による培養細胞（HeLa細胞）のイメージング

直径35mmのガラスボトムシャーレ（CELLview, Greiner Bio-One）上に培養したHeLa細胞をカルシウムとマグネシウムを含むリン酸緩衝食塩水（PBS（+））で洗浄後、1mLのPBS（+）を加えた。プローブ**3**のDMSO溶液を1mLのPBS（+）と混合し、これを共焦点レーザー顕微鏡（FV1200, Olympus）下、シャーレに加え、経時的な蛍光観察を行った（プローブ**3**の終濃度100nM, DMSOの終濃度0.1%）。また、市販のリソソーム染色蛍光試薬（LysoTracker Green DND-26, ThermoFisher Scientific）による細胞染色は、販売元の取扱い説明書の指示に従っ

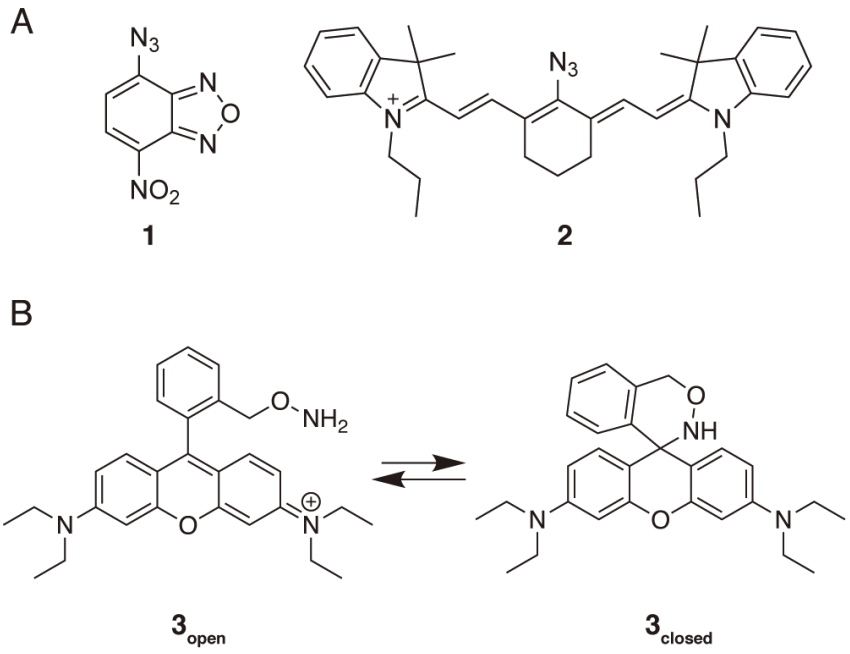


図1（A）アジド基を反応部位とする蛍光プローブ**1**, **2**の構造式（B）アルコキシアミノ基を反応部位とする蛍光プローブ**3**の構造式

て行った。具体的には、HeLa細胞の培養液に試薬を終濃度75nMで加え、37℃で30分インキュベートした後に、PBS（+）で洗浄した。

3．結　果

3．1．プローブ1

フェニルアジドをニトロベンゾオキサゾール骨格へ導入したプローブ**1**をTHF中アクロレインと混合すると、プローブ**1**のホルミルトリアゾール誘導体であると推定される生成物がHPLCおよび質量分析によって検出された。これを分取精製し、プローブ**1**およびアクロレインとの反応物の吸収スペクトルを測定したところ、アクロレインとの反応によって吸収極大波長が385nmから465nmへと大きく長波長側へシフトしていた（図2A）。そこで、459nmの励起波長を用いて蛍光スペクトルを測定したところ、アクロレインと反応することによって、蛍光極大波長536nmの蛍光を発することを観測した（図2B）。以上の結果より、波長459nm付近の光で励起することによって、ホルミルトリアゾール体のみが蛍光を発するようなアクロレイン検出条件を設定可能であることがわかった（図2B）。

次に、プローブ**1**の光安定性を検討するため、**1**を水、メタノール、またはTHFに溶解し、室内灯下で吸収スペクトルを測定したところ、時間依存的なスペクトルの変化（吸収極大波長～385nmの減少と吸収極大波長～455nmの増大）が観測された。質量分析の結果、その原因はプローブ**1**のアジド基がアミノ基へと変換されたことに由来すると推察された。

3．2．プローブ2

フェニルアジドをトリカルボシアニン骨格へ導入したプローブ**2**をメタノールに溶解し、アクロレインを加えたが、その光学特性に大きな変化は観察されなかった。そこで、プローブ**2**とアクロレインとの反応をさまざまな溶媒を用いて検討したところ、DMF、クロロホルム、ジクロロメタン、アセトン、酢酸エチル、アセトニトリルなど、多くの溶媒下で化合物**2**のスペクトルに継時的な変化（吸収極大波長774nmの減少と吸収極大波長642nmの増大）を観測した。しかしながら、当スペクトル変化はアクロレイン無添加でも引き起こされ、光の照射によって加速された。質量分析などの測定の結果、プローブ**2**とアクロレインとの期待された反応物は検出されず、プローブ**1**と同様にそのアジド基がアミノ基へと変換されていることが確認された。

3．3．プローブ3

アルコキシアミノ基を有するローダミンB誘導体であるプローブ**3**をさまざまなpHに調製したリン酸緩衝液（pH3－11）に加え、光学特性を分析したところ、pH依存的な吸収スペクトル、蛍光スペクトルの変化が観察された（図3A, B）。すなわち、溶液を酸性から塩基性にすることで、吸光度（吸収極大波長560nm）は減少し、それに合わせて580nm付近の蛍光強度も減少した。吸収極大波長の吸光度をpHに対してプロットしたところ、吸光度の最大値の50％を与えるpH（pKcycl）[3]は6.2付近であると見積もられた。対象実験として、ローダミンBとプローブ**3**の合成中間体であるローダミンBのベンジルアルコール誘導体（**4**）についても同様の測定を行った。ローダミンBの吸収スペクトルはpH3−11の範囲でほとんど変化しなかった。**4**の吸光度はプローブ**3**と同様に酸性から塩基性にすることで減少し、そのpKcyclは8.3付近と見積もられた（図3C）。以上の結果により、プローブ**3**は中性のpH7付近（あるいはそれ以上のpH）では、吸光度、蛍光強度ともに低く抑えられており、酸性条件下ではそれらが上昇するということがわかった。

次にプローブ**3**をpH7または8に調製したリン酸緩衝液に溶解し、アクロレインを加えると、いずれの場合でも吸光度と蛍光強度の経時的な上昇が観察された（図3D）。さらに、プローブ**3**をさまざまな炭素鎖長をもつα,β−不

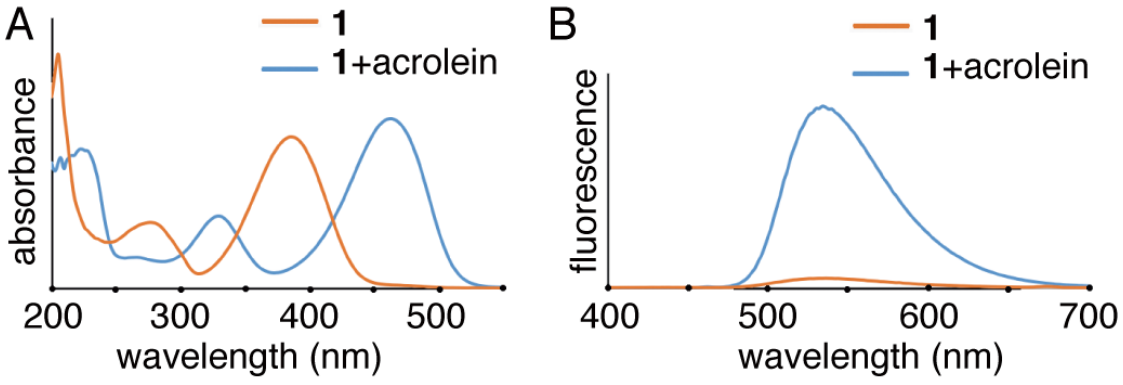


図2　（A）プローブ**1**およびアクロレイン反応生成物の吸収スペクトル（B）プローブ**1**およびアクロレイン反応生成物の蛍光スペクトル（励起波長: 459 nm）

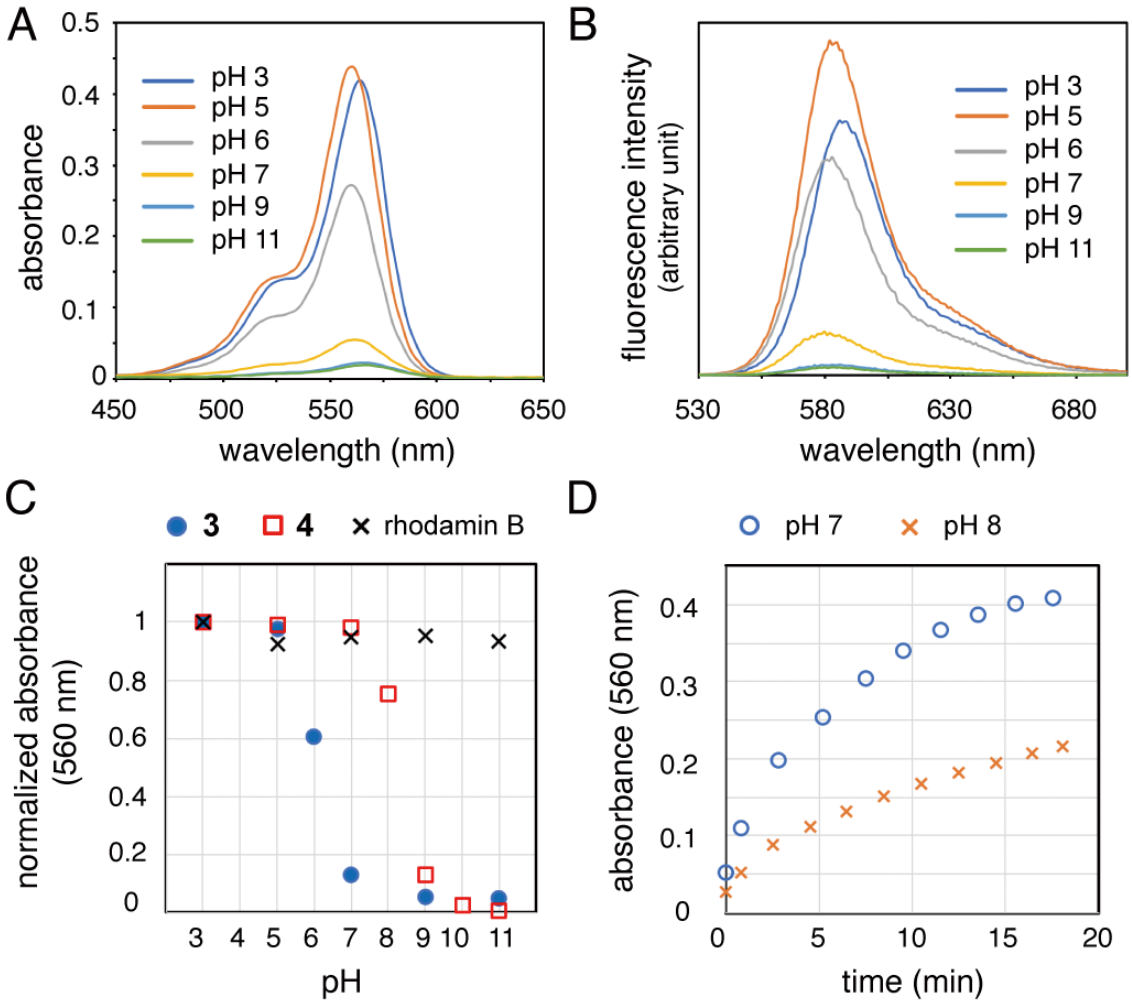


図３（A）プローブ３（10μM）の 0.1 M リン酸緩衝液（pH３－11）中の吸収スペクトル（B）プローブ３（10μM）の 0.1M リン酸緩衝液（pH３－11）中の蛍光スペクトル（励起波長：520nm）（C）プローブ３、ローダミン B のベンジルアルコール誘導体（4）、ローダミン B の 0.1M リン酸緩衝液中の pH 依存的な吸光度（560nm）変化（D）0.1M リン酸緩衝液（pH7 または８）に溶解したプローブ３（10μM）にアクロレイン（1mM）を加えた時の吸光度（560nm）の時間変化

飽和アルデヒド分子（C3−C10）とリン酸緩衝液（pH7）またはメタノール中で反応させたところ、いずれの条件下でも吸光度の上昇が観察された。さらに、それぞれの反応溶液を質量分析に供することで、対応するオキシム体へと変換されていることを確認した。

最後にプローブ**3**を共焦点レーザー顕微鏡下、HeLa細胞に加えると、経時的な細胞内蛍光強度の上昇を観察した（図４A）。細胞内の蛍光分布の様子から、プローブ**3**がリソソームに局在している可能性が推測されたため、市販のリソソーム染色試薬（LysoTracker Green DND−26）で予め染色したHeLa細胞にプローブ**3**を加えたところ、リソソーム染色試薬で染色していない場合と比較して、細胞内でのプローブ**3**の蛍光強度の上昇の仕方が大幅に遅延したが、その蛍光分布には良い重なりが観察された（図４B）。リソソーム内はpH4.5−５程度の酸性条件であるために、プローブ**3**はリソソームに局在することで、その蛍光強度が上昇したと推察される。

４．考察とまとめ

生理的条件下での脂質過酸化物のバイオイメージングを可能とする蛍光プローブの基本設計としては、(i) α,β−不飽和アルデヒド構造をもつ脂質過酸化物と特異的かつ効率的に反応する「反応部位」、(ii) 細胞毒性の少ない可視光から近赤外光を吸収して蛍光を発する「蛍光部位」、(iii) 標的物質と反応することで蛍光強度が増強するようなメカニズム、の３点を満たすことが理想である。標的とするα,β−不飽和アルデヒド構造を有する分子種の中で、もっとも短い炭素鎖（C3）をもつ分子は、アクロレインである。アクロレインの従来の検出・定量法としては、フェニルヒドラジンとの反応で誘導体化した後に、高速液体クロマトグラフィーで検出する方法がよく知られている他、アニリンまたはフェニレンジアミンを反応基とする蛍光プローブが報告されている[4, 5]。しかし、これらの蛍光プローブを用いた検出には、強酸あるいは有機溶媒存在下 80−100℃の

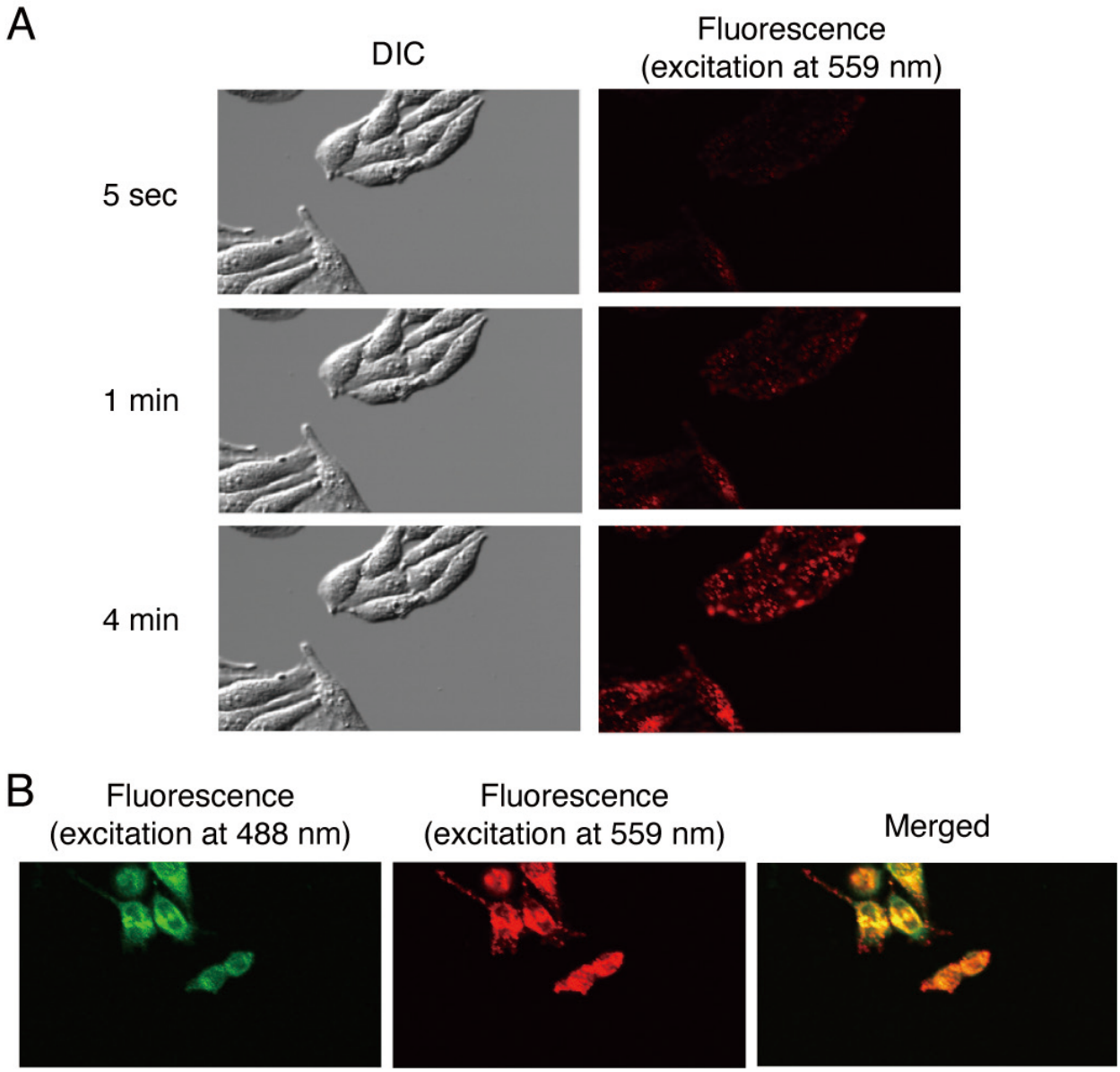


図４　(A) プローブ３(終濃度 100nM) を HeLa 細胞に添加した直後(5 秒)、1 分後、4 分後の微分緩衝像(DIC) および蛍光像 (559nm レーザー励起) (B) HeLa 細胞を LysoTracker Green とプローブ３で共染色した後の蛍光像(左から 488nm レーザー励起、559nm レーザー励起、それらの重ね合わせ)

加熱が必要なため、生細胞へ直接応用することは非現実的であった。ところが近年、アクロレインが生理的条件下アリルアジドと反応することが新たに見出され、これを利用した生細胞内でのアクロレインの蛍光観察が報告された[6]。そこで本研究では、上記反応によって、アジド基がホルミルトリアゾールへと変換されることに着目し、その反応前後での電子状態の変化が、吸収・蛍光スペクトルの変化に連動するようなプローブを創出することが可能であると考え、アクロレインとの「反応部位」であるフェニルアジドと、生細胞に応用可能な「蛍光部位」であるニトロベンゾオキサゾールまたはシアニン色素を結合した分子 (**1**, **2**) を設計し、アクロレインとの反応前後での吸収・蛍光スペクトルの変化を測定した。

プローブ **1** はアクロレインと反応することで、吸収スペクトルが約 80nm 長波長シフトした蛍光性のホルミルトリアゾール体を生成することが確認できた一方、プローブ **2** については、アクロレインとの反応生成物を検出することができなかった。現在のところ、アリルアジド基を反応部位とするプローブの設計とその細胞応用には 2 点の問題点が挙げられる。1 点目は、そのアクロレインとの反応性が不十分である点である。詳細は省略するが、さまざまなフェニルアジド置換体を用いて、アジド基とアクロレインの反応性を検討したところ、電子供与基、電子吸引基のいずれの置換基においても反応性の向上が見られなかった。したがって、アクロレインを高感度で検出できるプローブを設計するためには、さらなる検討が必要である。2 点目は、

プローブ**1**、**2**のアジド基が、溶媒、光、熱などの影響を受け、特定の条件下において容易にアミノ基へと変換されうるという点である。同様の反応はこれまでにも報告されており、光によってアジド基から窒素が放出され、反応性の高いニトレン中間体が生じると考えられており、これを利用した生体分子の光親和性標識法への応用も示唆されている[7,8]。プローブ**1**においては、アクロレイン反応体（ホルミルトリアゾール体）とアミン誘導体の吸収スペクトルが類似しているため、アクロレイン選択的なイメージングプローブとしての利用を妨げる要因になりうる。したがって、アジド基を用いたアクロレイン検出蛍光プローブをより実用化に近づけるためには、アジド基の安定性についてさらなる検討と改良が必要である。

そこで次に、アリルアジドとは異なる「反応部位」によって、脂質過酸化反応で生じるさまざまな炭素鎖長を有するアルデヒド基を標的とした蛍光プローブの設計を試みた。アルデヒド基に対する「反応部位」としては、アルコキシアミンとヒドラジンがよく知られており、それぞれ対応するオキシムとヒドラゾンを生成する[9]。これらの「反応部位」を利用したアルデヒド検出試薬は数多く報告されているが、生細胞の脂質過酸化反応に由来するアルデヒドをイメージングした例はほとんどない[10]。そこで、アルコキシアミノ基を「反応部位」とし、細胞イメージングに汎用される蛍光色素であるローダミンを「蛍光部位」とする分子（**3**）を新たに設計した。一般的に、ローダミン分子内のキサンテン骨格9位への求核攻撃は、分子内共役系の切断に伴う吸光スペクトルの変化及び蛍光の消失をもたらすことが知られている。アルコキシアミノ基の求核性は溶液中のpHによって大きく影響を受けるが、これまでに報告されているさまざまなローダミン系の蛍光プローブの蛍光特性から[3]、**3**は中性条件下においては、スピロ環化合物（$\mathbf{3}_{closed}$）としてほぼ無蛍光となることを推測した。平衡状態として一部存在するフリーのアルコキシアミン（$\mathbf{3}_{open}$）が標的とするアルデヒド分子と反応してオキシムを形成すると、上記の分子内環化反応が抑制されるために、蛍光が増強することを期待した。

実際に、プローブ**3**をさまざまなpHに調製したリン酸緩衝液中に溶解し、吸収・蛍光スペクトルを測定したところ、予想通り中性・塩基性条件下では吸光度、蛍光強度ともに低く抑えられていることが確認できた。また、pH5以下の酸性条件下では吸光度、蛍光強度がほぼ一様に高くなることが観察された。したがって、プローブ**3**はpH7、8の条件下では、その大部分がスピロ環化合物（$\mathbf{3}_{closed}$）として存在していることが推測された。ここにアクロレインなどのα,β−不飽和アルデヒド分子を加えると、期待通りアルデヒド分子と反応したオキシム体（開環構造）の形成に伴う吸光度・蛍光強度の増強が確認できた。また、その反応速度は、pH7においてpH8よりも速いことが観察された。一般的に、アルコシキアミンとアルデヒドからオキシムが生成する反応速度は、pH4.5付近で最も速くなることが知られている[9]。最後にプローブ**3**をHeLa細胞に応用し、共焦点レーザー顕微鏡による蛍光観察を行った。ローダミンBは細胞内のミトコンドリアに局在することがよく知られている色素だが、共染色の結果、プローブ**3**は極めて効率良くリソソームを染めることが観察された。しかし、pHが4.5−5程度であることが知られているリソソーム内では、プローブ**3**はほぼ全てが開環構造（$\mathbf{3}_{open}$）を形成していると考えられるため、当初計画していたようなアルデヒド分子との反応による蛍光強度の増強を期待することは難しい。一方で、プローブ**3**の細胞内分布は明確にはわかっておらず、細胞質やその他の細胞小器官などの中性環境下にも分布する場合は、酸化ストレス由来のアルデヒド分子と反応することで蛍光強度が増強することが期待できる。逆に、プローブ**3**がリソソームに局在している場合は、上述したようにオキシム形成に適したpHであるため、酸化ストレスを加えた後の細胞溶解液を質量分析することで、リソソーム選択的な脂質過酸化物の同定が可能になるかもしれない。これらの実験については、今後の課題である。

以上、本研究課題では、生細胞に応用可能な脂質過酸化物感受性蛍光プローブの開発を目的とした研究を行った。本研究で得られた知見をさらに発展させ、生細胞内に生成する脂質過酸化物をイメージングすることができれば、さまざまな酸化ストレスに伴う肌機能の低下を直接または間接的に推測することが可能になると期待されるとともに、疾患や老化の新たなメカニズムの解明にも役立つはずである。

（引用文献）

1） Parvez, S., Long, M. J. C., Poganik, J. R. & Aye, Y. *Chem. Rev.* **118**, 8798-8888（2018）.
2） Luo A. L., Gong, Y. J., Zhang, J., Zhang, C. C., Zhang, X. B. & Tan, W. *Talanta*, **117**, 326-332（2013）.
3） Uno, S. *et al. Nat. Chem.*, **6**, 681-689（2014）.
4） Togashi, M. *et al. Org. Lett.*, **12**, 1704-1707（2010）.
5） Imazato, T. *et al. Biomed. Chrom.*, **29**, 1304-1308（2015）.
6） Pradipta, A. R. *et al. ACS Sensors* **1**, 623-632（2016）.
7） Lord, S. J. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **130**, 9204-9205（2008）.
8） Lord, S. J. *et al. J. Phys. Chem. B* **114**, 14157-14167（2010）.
9） Kölmel, D. K. & Kook, E. T. *Chem. Rev.* **117**, 10358-10376（2017）.
10） Suchy, M., Lazurko, C., Kirby, A., Dang, T., Liu, G. & Shuhendler, A. J. *Org. Biomol. Chem.*, **17**, 1843-1853（2019）.

メラニン生成関連タンパク質における新規糖修飾の解析と応用への展開

慶應義塾大学理工学部応用化学科
清水　史郎

Premelanosome protein (PMEL) is a functional protein as a scaffold for melanin synthesis and pigmentation in melanosome. PMEL forms non-toxic amyloid fibrils through aggregation of its fragments. In the previous studies, PMEL has several *N*-glycosylation and *O*-glycosylation sites and those are significant for membrane trafficking or fibril formation. *C*-mannosylation is a unique type of protein glycosylation, which the alpha-D-mannopyranose is attached to the first tryptophan residue in the consensus sequence, Trp-Xaa-Xaa-Trp/Cys (Xaa represents any amino acid). PMEL has one predicted *C*-mannosylation consensus sequence, Trp 153 -Lys-Thr-Trp, in the N-terminal region (NTR) and Trp 153 is probably *C*-mannosylated; however, the presence of *C*-mannosylation in PMEL has not been reported. In this study, we first demonstrated by mass spectrometry that PMEL is *C*-mannosylated at predicted Trp 153 , and also *C*-mannosylated at Trp 104 and Trp 156 , which belong to Trp 104 -Val-Asn-Asn and Trp 156 -Gly-Gln-Tyr, respectively. In addition, we identified that *C*-mannosylation at Trp 104 can occur near *N*-glycosylation at Asn 106 . Furthermore, we evaluated the role of *C*-mannosylation in PMEL on its function of fibril formation, using *C*-mannosylation-defective mutant (W 104 F, W 153 F/W 156 F) PMEL transiently overexpressed HeLa cells. Compared with control and W 104 F, W 153 F/W 156 F especially diminished fibrils. Taken together, PMEL is *C*-mannosylated at Trp 104 , Trp 153 and Trp 156 , and we suggest that the *C*-mannosylation of PMEL regulates amyloid fibril formation and/or pigmentation in melanosome.

1．緒　言

ヒトゲノムプロジェクトの成果をもとに、ゲノムだけでなく転写産物やタンパク質の情報も網羅的に理解することができるようになってきた。これらの情報は時に様々な疾病との関連を明らかにし、治療法ならびに診断法の新規開発と改良が進められてきた。そして、今後も生命分野の情報はAIなどとの結びつきでさらに発展することが期待されている。

また、生命現象の解明に貢献したのはゲノム情報だけではなく、質量分析機器の技術革新によるところが少なくない。例えば、これまでは解析に膨大な時間を要した生体内の代謝産物をスピーディーに解析し病態を理解することができるようになったり、報告例がない生体内の有機物（核酸やタンパク質の翻訳後修飾など）の発見につながったりと、その恩恵は計り知れない。

タンパク質翻訳後修飾の1つである*C*-mannosylationは1994年にヒト尿中のRNase 2より見出された[1]。これまでに基質タンパク質は約30知られており、分泌、細胞内局在、フォールディングに関与していることが分かっている。基質の多くはトロンボスポンジンタイプIリピート（TSR）領域を持ち、その領域内で複数箇所修飾を受ける[2]。実際に約30の例のうち、半分以上がTSR領域で*C*-mannosylationされている。そして、TSR領域内での*C*-mannosylation責任酵素として線虫ではdpy-19が[3]、哺乳類ではDPY19L1やDPY19L3などが報告されている[4,5]。一方、TSR領域以外での*C*-mannosylationの報告も我々の研究成果を含めて数例知られている。現在までにTSR領域以外で起こる*C*-mannosylationの責任酵素がDPY19ファミリーによるものであるか否かは不明であるが、より多くの基質例を提示することで*C*-mannosylationに対する新たな知見が提示できるものと思われる。

メラノソーム内においてメラニン色素沈着の足場として重要な役割を担うPMELタンパク質は、糖鎖修飾を受ける糖タンパク質である。PMELはメラノサイトやメラノーマ特異的に発現しており、その組織特異性からメラノーマ検出のための腫瘍抗原でもある。また、PMELはプロテアーゼによる切断を経てアミロイド繊維を形成し、それが色素沈着の足場として機能する。そのため、PMELの繊維形成機構を解明することは、メラニン産生とアミロイド形成の両方の点で重要である。PMELはN末端に疎水性アミノ酸を多く含むシグナルペプチドを持つ分泌型タンパク質である。PMELはメラノソームに輸送されたのち、数回の切断を経てメラニン色素沈着のための繊維が形成される。PMELにおける糖鎖修飾は、*N*型糖鎖修飾（*N*-glycosylation）、*O*型糖鎖修飾（*O*-glycosylation）ともに存在し、それぞれの役割も解析されているが、*C*-mannosylationの有無や役割は未解明のままである。

Novel glycosylation of melanin-related protein and its application

Siro Simizu

Department of Applied Chemistry, Faculty of Science and Technology, Keio University

2．方　法

2．1．PMEL過剰発現細胞の樹立とリコンビナントタンパク質の精製および質量分析法による*C*-mannosylationの確認

全長のヒトPMELタンパク質は膜貫通領域があり、過剰発現させた際に精製するのが困難であると考えられたので、*C*-mannosylationされる可能性が高いPMELのN-terminal region（PMEL-NTR）をクローニングし、そのN末端に検出用のMyc配列と精製用のHis6配列を導入した発現ベクターを作製した。発現ベクターをCHO-K1細胞に遺伝子導入し、選択培地で培養することで、PMEL-NTRを安定的に過剰発現する細胞株を取得した。樹立した細胞からアフィニティー精製によりリコンビナントのPMEL-NTRを大量に得ることに成功したため、得られたPMEL-NTRが*C*-mannosylationされているか否かを質量分析法で確認した。

2．2．PMELにおける*C*-mannosylationがその機能に及ぼす影響

ヒト子宮頸がん細胞のHeLa細胞はPMELを発現していないが、PMELを発現させると本来の機能発現に必要な切断を受けることが知られている。そこで野生型および*C*-mannosylationされるトリプトファンをフェニルアラニンに置換した変異型PMELをHeLa細胞に遺伝子導入し、野生型が切断を受ける条件で変異型が切断されるか否かを評価した。また、ヒトメラノーマ細胞のSK-MEL-28細胞はPMELを発現しているが、メラノソーム成熟過程のステージⅡからステージⅢへの移行ができないことが知られている。よって、SK-MEL-28細胞の内在性PMELをノックアウトし、その後、野生型または変異型のPMELを再発現させることでメラノソームの成熟にPMELの*C*-mannosylationが関与しているか否かを評価した。

2．3．PMELにおける*C*-mannosylation責任酵素の探索

C-mannosylation責任酵素が存在しないことが報告されていたハエ由来のS2細胞にPMEL-NTRを発現させ、同時に*C*-mannosylation責任酵素の可能性がある遺伝子も導入することで酵素の同定を試みた。*C*-mannosylationの有無は上述と同様に質量分析法で評価した。

3．結　果

3．1．PMELタンパク質における*C*-mannosylation

図1にヒトPMELタンパク質の概略を示す。PMELはN末端側からシグナルペプチド（SP）、N-terminal region（NTR）、Polycystic kidney disease domain（PKD）、リピート領域（RPT）、kringle-like domain（KLD）、そして膜貫通領域（TM）があり、細胞が分化する過程でRPTとKLDの間でプロテアーゼによる切断を受ける。切断された断片はそれぞれN末端側がMα、C末端側がMβと呼ばれる。Mαは細胞外領域に存在し、その中に153番目のトリプトファンを含んだ*C*-mannosylationを受ける可能性があるコンセンサス配列がある。

図1の210番目のアミノ酸までをクローニングし、さらに検出用のMycタグと精製用のHis6タグ配列を導入したベクターを作製した。配列が正しいことを確認後、ハムスター由来であるCHO-K1細胞に遺伝子導入し、G418によるセレクションを経て安定的に過剰発現している細胞株（CHO-K1-HM-PMEL-NTR）を樹立した。また並行して、全長のPMELをクローニングし、発現用ベクターを作製した。

PMELの153番目のトリプトファンが*C*-mannosylationされているかを確認するため、CHO-K1-HM-PMEL-NTR細胞よりリコンビナントPMEL-NTRを粗精製した。そして得られたタンパク質の質量分析を行うことで*C*-mannosylationを検出した。その結果、予想されていた153番目のトリプトファンだけでなく、104番目および156番目のトリプトファンも*C*-mannosylationされていることが示唆された。

3．2．PMELタンパク質における*C*-mannosylationの役割

3．1．の結果を受けて、PMELタンパク質における*C*-mannosylationの役割を解析するために、2つの実験を行った。1つはHeLa細胞に野生型または変異型のPMEL

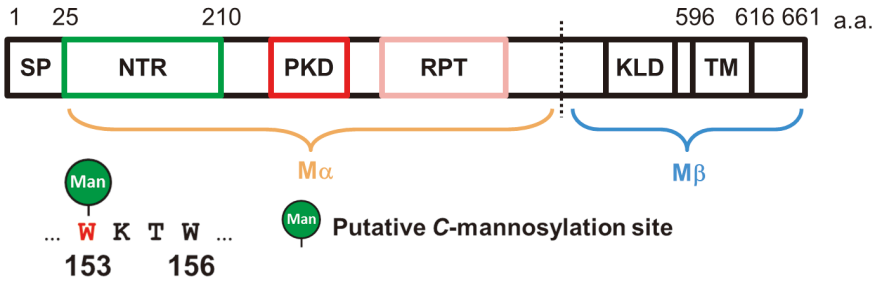


図1　ヒトPMELタンパク質の概略

を発現させてその差を比較する実験であり、もう1つはメラノーマ細胞のPMELをノックアウトし、野生型または変異型を再発現させる実験である。3.2.の実験は全て全長のPMELを使用した。

HeLa細胞を用いた実験結果を図2に示す。前述したようにHeLa細胞にはPMELは発現していないため、空ベクターを導入したneoのレーンにはPMELは検出できない。また野生型(wt)を発現させた場合は、全長を検出できるE-7抗体で100kDa付近にバンドが確認でき、さらにHMB45抗体でMαおよび細かく切断されたPMELを認識することができた。同条件で104番目のトリプトファンをフェニルアラニンに置換したWFを遺伝子導入した際はwtを導入した時との差があまりなかった。一方、153番目と156番目のトリプトファンを2か所ともフェニルアラニンに置換した2WFを遺伝子導入すると、断片化されたPMELの量が減少していた。このことからPMELタンパク質における特に153番目および156番目の*C*-mannosylationが、PMELが切断されるのに重要である可能性が示唆された。

2つ目の実験である、メラノーマ由来SK-MEL-28細胞におけるPMELのノックアウト実験は、現在までにノックアウト細胞を樹立し、その後にwt、WF、または2WFを再導入した細胞を樹立中である。なお、ノックアウト細胞における電子顕微鏡像から、これまでの報告通り、II型のメラノソームが検出できなくなっていることは確認した(図3)。

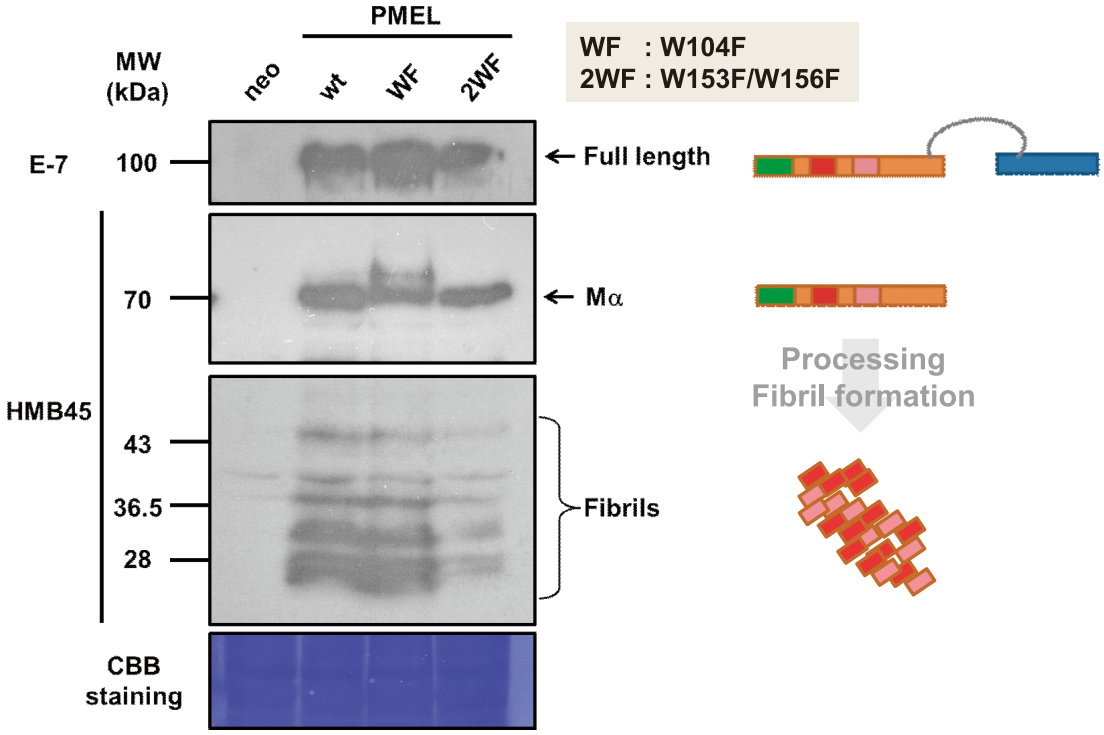


図2　HeLa細胞を用いたPMELタンパク質における*C*-mannosylationの役割の解析

図3　SK-MEL-28細胞におけるステージIIのメラノソーム電子顕微鏡像の例

3．3．PMELにおける*C*-mannosylation責任酵素の探索

これまでに我々は新たな*C*-mannosylation責任酵素としてDPY19L3を報告しているが、その際にハエ由来のS2細胞を使用したノックイン実験を行っている。つまり、S2細胞には*C*-mannosylation責任酵素が欠損しており、基質とともに酵素を導入すると、基質タンパク質が*C*-mannosylationされていた。そのことを利用し、PMELの*C*-mannosylation責任酵素も同様に探索することとした。具体的には、S2細胞にPMELだけ、または同時に責任酵素の候補であるDPY19L1～L4のそれぞれを導入し、PMELにおける*C*-mannosylationの有無を質量分析により確認した。その結果、予想に反しPMELだけを導入したS2細胞由来のリコンビナントPMELが*C*-mannosylationされていた。また、DPY19ファミリーを共発現してもその*C*-mannosylationの程度が変化しなかった。このことから、PMELにおける*C*-mannosylation責任酵素は、これまでに知られているDPY19ファミリータンパク質ではない、新規なものである可能性が示唆された。

4．考　察

本研究では、メラニン生成関連タンパク質であるPMELにおける*C*-mannosylationの役割を解析した。その結果、大変興味深い研究成果を得ることに成功した。

Ⅰ）PMELは*C*-mannosylationされることを世界で初めて明らかにすることができた。また、予想された153番目だけではなく、104番目と156番目のトリプトファンも*C*-mannosylationされていた。さらに、104番目と156番目の*C*-mannosylationは、我々のこれまでの研究からも提唱されているコンセンサス配列以外で起こったことから、*C*-mannosylationのコンセンサス配列に関する有益な情報を提供することができた。

Ⅱ）PMELの*C*-mannosylationは繊維形成の前段階であるプロテアーゼによる切断に関与している可能性が示唆された。以前の報告で、アラニン・スキャンによりPMEL中の重要なトリプトファンをスクリーニングしている報告があり、153番目と156番目のトリプトファンを他のアミノ酸に置換するとPMELとしての機能が著しく低下することは分かっていた。しかし、本研究成果により、その原因が*C*-mannosylationである可能性を示唆することができた。詳細はPMELノックアウト細胞に様々な変異型PMELを再発現させることで明らかになると考えられる。

Ⅲ）PMELの*C*-mannosylation責任酵素はこれまでに同定されていないものである可能性が高いことが分かった。すなわち、*C*-mannosylation責任酵素が欠損していることが知られているS2細胞にPMELを遺伝子導入するだけで、（DPY19ファミリータンパク質を導入しなくても）*C*-mannosylationされた。本研究で、責任酵素の同定までには至らなかったが、新規*C*-mannosylation責任酵素の存在が示唆された。

謝　辞

質量分析は理化学研究所・環境資源科学研究センター・生命分子解析ユニットの堂前直先生、鈴木健裕先生との共同研究によるものです。また、電子顕微鏡像は東京医科歯科大学・難治疾患研究所の清水重臣先生、荒川聡子先生との共同研究の成果です。

本研究成果により、日本糖質学会より第20回日本糖質学会ポスター賞（第36回日本糖質学会）を研究室に所属していた大学院生である小松 良亮が「メラノソーム関連タンパク質PMELにおける*C*-mannosylationの解析」と題し受賞している。

また、本研究を遂行するにあたり公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団よりご助成いただきましたことに感謝申し上げます。

（引用文献）

1）Hofsteenge J, Müller DR, de Beer T, Löffler A, Richter WJ, Vliegenthart JF. New type of linkage between a carbohydrate and a protein: *C*-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase Us. *Biochemistry* **33**, 13524-30（1994）.

2）Niwa Y, Simizu S. *C*-mannosylation; previous studies and future research perspectives. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **30**, E231-8（2018）.

3）Buettner FF, Ashikov A, Tiemann B, Lehle L, Bakker H. *C. elegans* DPY-19 is a *C*-mannosyltransferase glycosylating thrombospondin repeats. *Mol. Cell* **50**, 295-302（2013）.

4）Niwa Y, Suzuki T, Dohmae N, Simizu S. Identification of DPY19L3 as the *C*-mannosyltransferase of R-spondin1 in human cells. *Mol. Biol. Cell* **27**, 744-56（2016）.

5）Shcherbakova A, Tiemann B, Buettner FF, Bakker H. Distinct *C*-mannosylation of netrin receptor thrombospondin type 1 repeats by mammalian DPY19L1 and DPY19L3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **114**, 2574-9（2017）.

革新的ハイブリッド型三次元ヒト皮膚モデルの開発

弘前大学大学院医学研究科生体構造医科学講座

下田　浩

Establishment of full-thickness human cutaneous three-dimensional (3D) equivalent containing blood and/ or lymphatic vasculature is required for drug discovery and development of chemicals and cosmetics, because microcirculatory system in nature human skin plays an important role in regulating cutaneous morphogenesis and physiological function. The present study employed our developed layer-by-layer (LbL) nanofilm coating and unique collagen gel cell-accumulation techniques to fabricate human epidermis on dermis-like cellular and fibrous tissue with or without blood or lymphatic capillary network. Our constructs without vascular network exhibited a well-organized epidermal tissue involving cellular differentiation of keratinocytes and distinctive layer formation with cornification on basement membrane of dermal connective tissue and a high barrier function after exposure to a cytotoxic corrosive. Additional equipment of horizontal capillary network within the dermal tissue by LbL coating method facilitates formation of every layer in epidermis, as well as dermal tissue, to increase thickness of each tissue. Three-dimensional configuration of the vascular network introduced by collagen gel cell-accumulation procedure further accelerates maturation and thickening of both tissues. However, the lymphatic network prepared by the current LbL coating method was somewhat different in its form from that in normal nature human skin and leave little impression on both epidermal and dermal structure in the engineered cutaneous tissue, so that improved procedure for building lymphatic vasculature, being closely like that in nature dermis, has been currently developed. The present results consequently demonstrate that our peculiar tissue-engineering methods afford *in vitro* full-thickness human cutaneous 3D model like nature skin simply and substantial vascular network, being effective in tissue maturation, in a shorter period than that described previously. Our vascularized cutaneous tissue constructs are expected as next-generation *in vitro* skin models for drug and cosmetic development and as biomaterials for regenerative medicine.

1．緒　言

化粧品の開発において、EUでは既に動物実験が禁止され、本邦でも自主規制が強化されている。また、評価成績のヒトへの応用を考慮した場合、皮膚構造が異なる実験動物ではなくヒトにおける研究が好ましいのは明白であるが、このことは倫理的に困難な問題を含んでいる。これに対して近年、ヒト表皮細胞を分化・重層化した表皮組織[1]が汎用されているが、最近ではよりヒト皮膚に近い構築を模倣する真皮様結合組織に表皮組織を積層した擬似皮膚相同体の開発が報告されている[2-9]。しかし、その多くは体液の通路と生体反応の環境を提供する微小循環系（血管・リンパ管）を真皮組織内に装備しておらず[1-6]、組織内における脈管の組織化に乏しい例[7]と脈管の構築に特殊なデバイスや多種多様な生理活性添加剤、加えて長い期間と多数の煩雑な工程を要する例[8]を見るに止まっている。これらの課題を同時に解決するには、血管やリンパ管が解剖学的正確性をもって配置された真皮組織と優れた機能形態を有する表皮組織から成る三次元（3D）構造体が短期間で自己組織化される、再現性の高い簡便な技術の確立が不可欠である。このことは化粧品などの化成品の開発のみならず、医薬品や再生医療材料の開発においてもきわめて大きな意義を有する。我々の研究グループは独自に開発した細胞集積法[9]によりこれまで心筋[10]、腹膜[11-12]、動脈[13]など様々なヒト三次元組織を創製するとともに、その内部に数日で血管やリンパ管のネットワークを自己組織化させることに成功している。この3D組織構築技術を応用し、化粧品・医薬品の開発と再生医療への応用性に優れた、高度な機能解剖学的特性をもつ血管・リンパ管網含有3Dヒト皮膚モデルを確立することが本研究の目的である。

Development of progressive human cutaneous 3D model

Hiroshi Shimoda

Department of Anatomical Science, Neuroanatomy, Cell Biology and Histology, Hirosaki University Graduate School of Medicine

2．方　法

2．1．細胞培養

ヒト皮膚線維芽細胞（NHDF；Lonza, NJ, USA）、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC；Lonza）、ヒト皮膚リンパ管内皮細胞（HDLEC；PromoCell, Heidelberg, Germany）、正常ヒト表皮角化細胞（NHEK；Kurabo, Japan）を37℃、5% CO_2 濃度下で、それぞれの専用培地（10% fetal bovine serum（FBS）含有DMEM（Lonza），EGM™-2MV, NHEK増殖添加剤含有EpiLife™（Thermo Fisher Scientific, MA, USA））を皮膚モデルの作製に供した。

2．2．LbL・細胞集積法による三次元皮膚モデルの構築

細胞表面にフィブロネクチン（Sigma-Aldrich, MO, USA）とゼラチン（Wako Pure Chemical Industries, Japan）による

多層性（layer-by-layer；LbL）ナノフィルムコーティングを施したNHDFを24-well用Transwell® insert（Corning, NY, USA）に8層となるように播種・積層化し、翌日～数日後にNHDF積層組織表層をType IV collagen溶液（0.04mg/ml；Sigma-Aldrich）でコーティングした後、その上層にNHEKを3層性に播種した（図1）。NHEK積層翌日より10% FBS含有DMEMとEpiLife™の等量混合培地に25μg/mlアスコルビン酸（Wako Pure Chemical Industries）を添加した培地を用いてair-liftによる培養を7日間行い、真皮と表皮より成る皮膚モデルを構築した（図1）。

2．3．LbL・細胞集積法による血管（リンパ管）網含有三次元皮膚モデルの構築

NHDFおよびHUVECの細胞表面に2．2．と同様のコーティングを行い、1層のHUVECを各4層のNHDFでサンドイッチ状に挟み込むように播種・積層化した（図1）。翌日～数日後に2．2．と同様にNHEKの培養を7日間行い、血管網含有皮膚モデルを構築した（図1）。

リンパ管網含有皮膚モデルについては、HUVECの代わりにコーティングを施していない0.5層分のHDLECを用いて上記と同様の操作を行うことによりリンパ管網含有皮膚モデルを構築した（図1）。

2．4．コラーゲンゲル・細胞集積法による血管網含有三次元皮膚モデルの構築

コラーゲンゲル溶液（3mg/ml；collagen from human placenta；Sigma-Aldrich）にNHDF（1×10^5）とHUVEC（0.5×10^5）を浮遊させ、遠心平衡化（1100G, 15分）した後、24-well用Transwell® insertに播種し，翌日より2．2．と同様にNHEKの培養を7日間行い、血管網含有皮膚モデルを構築した（図2）。

2．5．光学顕微鏡的解析

2．2．～2．4．において構築した各種三次元組織（各3体）を4%パラホルムアルデヒド溶液で固定し、5μm厚のパラフィン包埋組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン（H. E.）染色ならびに下記の免疫染色に供した。また、2．3．

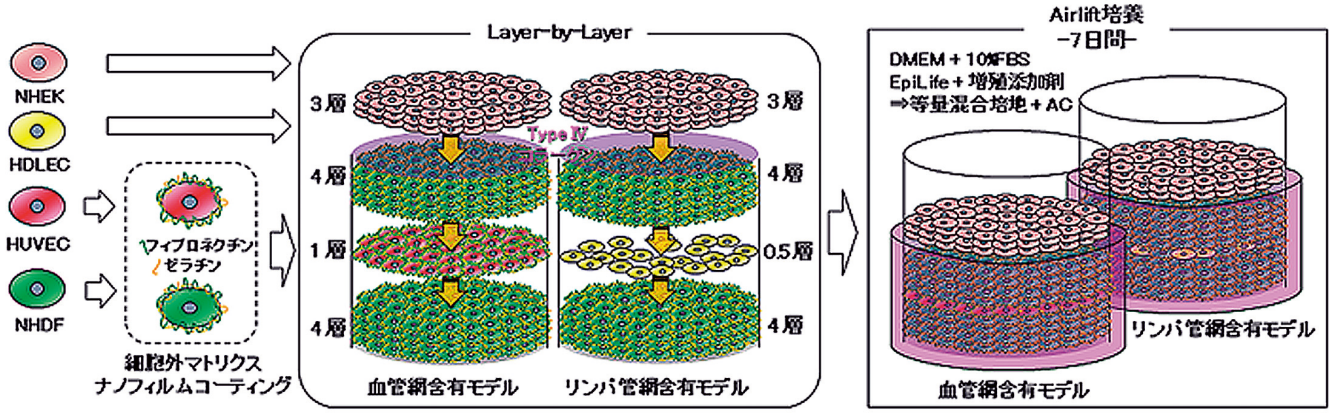


図1　LbL・細胞集積法による血管（リンパ管）網含有3D皮膚モデルの構築。主にフィブロネクチンとゼラチンによる多層化（Layer-byLayer；LbL）ナノフィルムコーティングを行ったヒト皮膚線維芽細胞（NHDF）とヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）またはヒト皮膚リンパ管内皮細胞（HDLEC）を積層化した後、上層に正常ヒト表皮角化細胞（NHEK）を播種し、air-liftの状態で分化・誘導する。

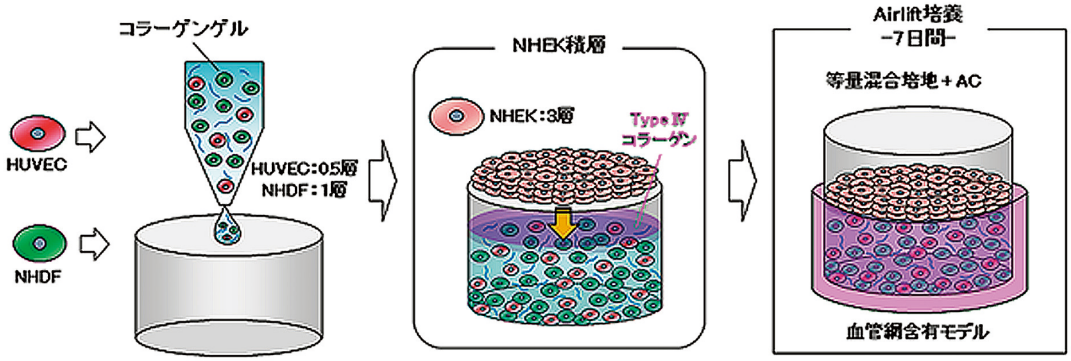


図2　コラーゲンゲル・細胞集積法による血管網含有3D皮膚モデルの構築。コラーゲンゲル溶液にヒト皮膚線維芽細胞（NHDF）とヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）と浮遊・遠心し、積層化した後、上層に正常ヒト表皮角化細胞（NHEK）を播種し、air-liftの状態で分化・誘導する。

～2．4．において構築した血管網含有皮膚モデル各2体を4%パラホルムアルデヒド溶液で固定後、whole-mount標本として下記の免疫染色に供した。

2．6．免疫染色

2．2．で構築した皮膚モデルの組織切片をクエン酸緩衝液（0.01M, pH6.0）で煮沸した（121℃, 15分）後、anti-occludin IgG（abcam, Cambridge, UK）、anti-desmoglein IgG（Heiderberg, Germany）、anti-laminin IgG（Sigma-Aldrich）を一次抗体として、各一次抗体の動物種に特異的なIgGに蛍光物質（fluorescein isothiocyanate, Cy3, Cy5）を結合させた二次抗体を用いてレーザー共焦点顕微鏡で各タンパクの局在を可視化した。

2．3．～2．4．のwhole-mount標本については、anti-CD31 IgG（DAKO, Glostrup, Denmark）を一次抗体として、Cy3を結合させた特異的二次抗体を用いてレーザー共焦点顕微鏡で血管網を可視化した。

2．4．で構築したリンパ管網含有皮膚モデルの組織切片をクエン酸緩衝液で煮沸した後、anti-LYVE-1 IgG（R&D Systems, MN, USA）を1次抗体として、peroxidaseを結合させた特異的二次抗体を用いて3.3'-diaminobenzidineを免疫反応産物としてLYVE-1の局在を光学顕微鏡で可視化した。

2．7．電子顕微鏡的解析

2．2．で構築した皮膚モデル各2体を透過型電子顕微鏡（TEM）および走査型電子顕微鏡（SEM）による解析に供した。TEM解析については、検体を2.5%グルタルアルデヒド溶液で固定した後、常法に従い超薄切片を作製し、JEM1250（JEOL, Tokyo）で観察した。また、SEM解析については、上述のパラフィン包埋組織より組織切片を作製した残りの組織を1%オスミウム酸溶液で導電染色した後、凍結乾燥と白金コーティングを行い、JSM-6510LV（JEOL, Tokyo）で観察した。

2．8．皮膚刺激性評価試験

三次元皮膚モデルのバリア機能を評価するために、2．2．で構築した三次元皮膚モデルならびにNHDFのみで構成された三次元真皮モデルに対して生理食塩水ならびにドデシル硫酸ナトリウム（SDS）溶液(1, 2, 4, 10, 50mg/ml）を組織表面に暴露し，18時間後 に洗浄した後，常法通りにMTT（3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide）アッセイを行い、得られた測定値から細胞生存度（各濃度のSDS溶液暴露後の検体の吸光度/生理食塩水暴露後の検体の吸光度×100（%））を算出した。

3．結　果

3．1．三次元皮膚モデルの構造

本研究で用いた細胞集積法は10日以内に真皮様結合組織と表皮様組織から成る3Dヒト皮膚モデルを構築することができた。24-well insert内に構築された3D組織は1cmの径をもち、多数の線維芽細胞と細胞外マトリクスから成る80～100μm厚の真皮様組織とその上に形成された基底層から角質層の各層が識別される50～70μm厚の表皮組織で構成されていた（図3A, B）。表皮組織において基底層と有棘層は明瞭であったが、顆粒層はやや乏しく、

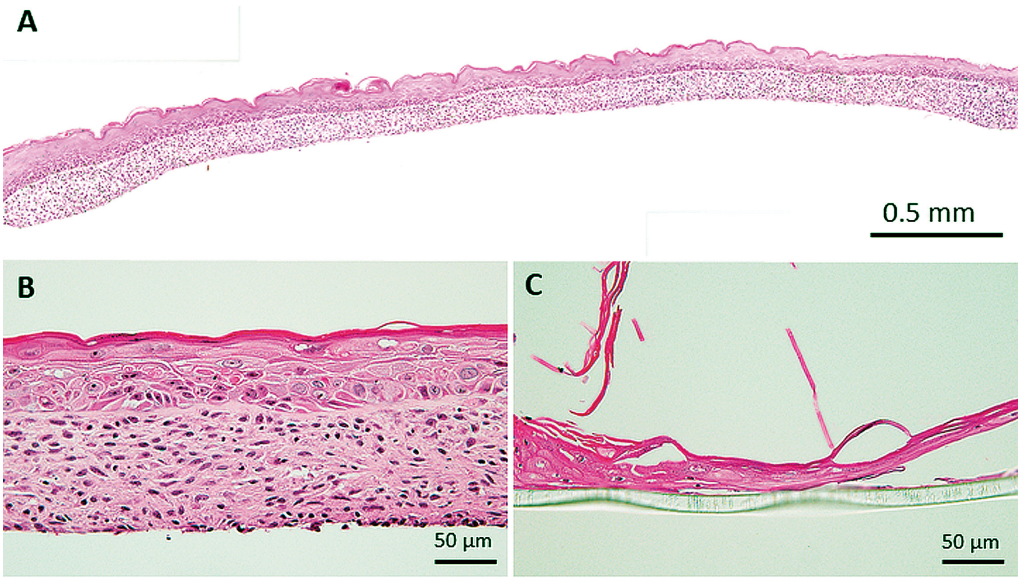


図3　3D皮膚モデルの構造。A. LbL-細胞集積法で構築された三次元皮膚モデルの組織切片の全体像。B. A. の一部の拡大像。線維芽細胞と細胞外マトリクスから成る真皮様組織上に細胞分化と角質化を伴う表皮組織が見られる。C. ヒト表皮角化細胞のみで分化誘導した表皮様組織。細胞分化による層形成が乏しく、重層化されない。A. －C. H.E. 染色

角化層には扁平な細胞核をもつ錯角化を示す細胞も散見された（図3B）。真皮様組織を構築せずにNHEKのみで作製した構造体は表皮としての分化傾向を呈したが、組織化されなかった（図3C）。

LbL・細胞集積法により構築された皮膚モデルの表皮組織では、トノフィラメントをはじめとするケラチノサイトの特性を有する細胞がデスモゾームを備えた細胞間橋を無数に発達させて基底層と有棘層を構築し、基底膜の形成に伴いヘミデスモゾームをもつ基底細胞が散見された（図4A）。顆粒細胞内ではトノフィラメントの間に大小のケラトヒアリン顆粒が散在し、その上層には扁平な細胞が屋根瓦様に堆積する角質層が形成されていた（図4A, B）。ま

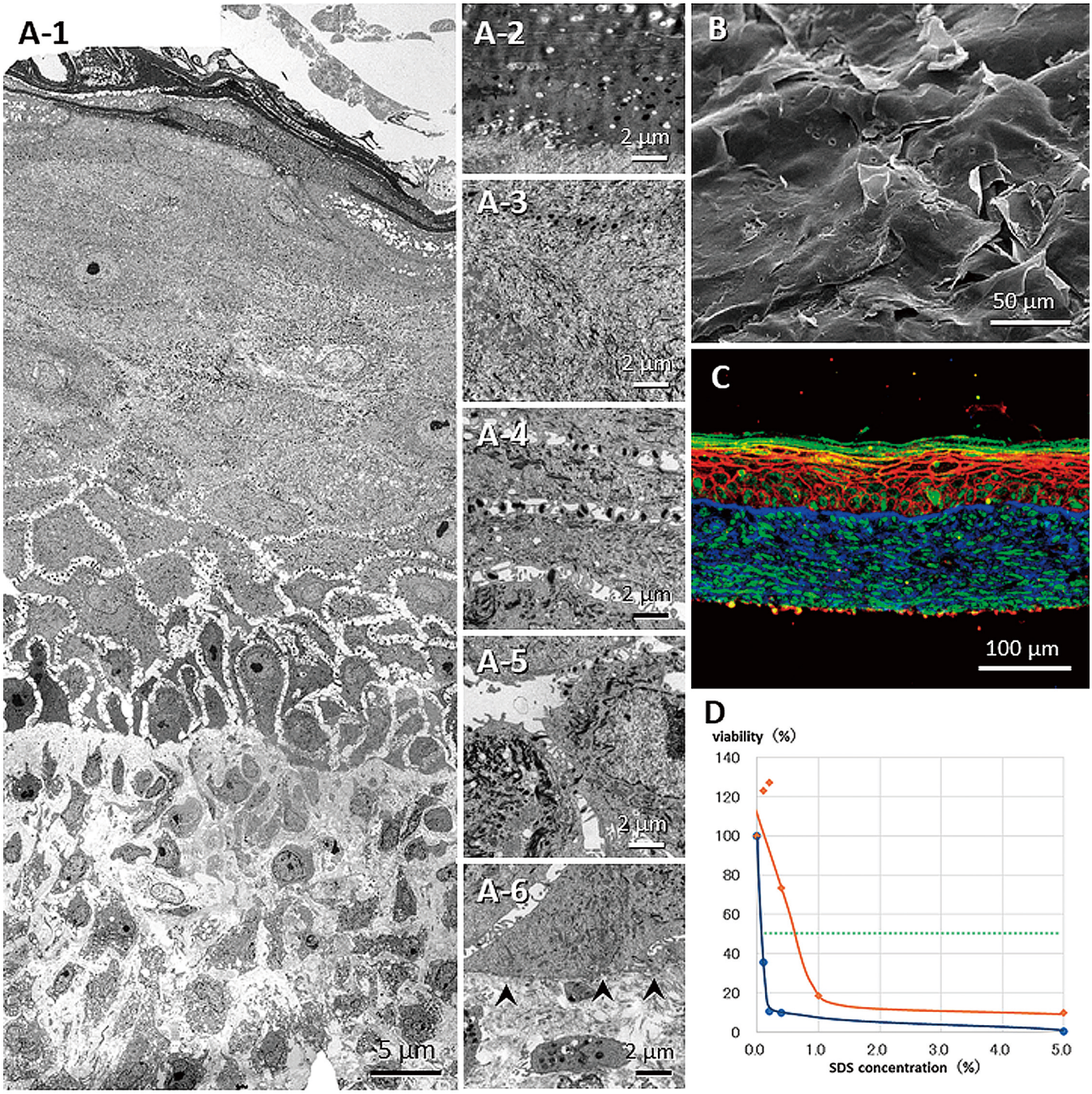


図4　3D皮膚モデルのTEM像（A）、SEM像（B）、desmoglein（赤）・occludin（緑）・laminin（青）に対する免疫染色像（C）、皮膚刺激性試験（D）. A-1. 表皮から真皮にかけての全体像。 A-2. A-1. の表皮角質層から顆粒層の拡大像。A-3. A-1. の表皮顆粒層の拡大像。A-4. A-1. の表皮有棘層の拡大像。A-5. A-1. の表皮有棘層から基底層の拡大像。A-6. A-1. の表皮基底層から真皮にかけての拡大像。矢頭は基底膜とヘミデスモゾーム様構造を指す。B. 角質層の表層は扁平な細胞の屋根瓦状の堆積から成る。C. desmoglein、occludin、lamininはそれぞれ表皮全体、表皮表層、表皮と真皮の境界層および真皮全体に局在が見られる。D. 青曲線と赤曲線はそれぞれ真皮様結合組織と3D皮膚モデルに対するSDS各濃度溶液（横軸）暴露後のMTTアッセイ後の吸光度（縦軸）を示す。

た、基底層から有棘層の細胞間でデスモゾームが発達するのに対し、顆粒層から角質層ではdesmogleinなどのデスモゾーム構成タンパクに加えてoccludinを含む閉鎖結合構成タンパクが密に分布していた（図4C）。一方、真皮様結合組織では表皮組織との境界面にlamininを含む基底膜が形成されたが、lamininは結合組織深層にも散在性に分布していた（図4A, C）。

3．2．三次元皮膚モデルのバリア機能の評価

SDS溶液とMTTアッセイを用いた3D皮膚モデルのバリア機能評価において、NHDFのみで構築した3D結合組織では暴露されるSDS溶液の濃度上昇に伴い急激に細胞生存率が減少し、1mg/ml溶液で50％未満になるのに対し、真皮様組織上に表皮構造が形成された3D皮膚モデルはSDS溶液濃度の上昇に対してより緩やかな細胞生存率の減少を示し、細胞生存率が50％に低下する溶液濃度は4～7mg/mlであった（図4D）。

3．3．血管網含有三次元皮膚モデルの構造

LbLまたはコラーゲンゲルを用いたいずれの細胞集積手法においても毛細血管網を有する全層性の3D皮膚モデルを10日以内に構築することができた（図5）。LbL法による皮膚モデルの真皮様組織では、二次元的に広がる毛細血管網が中層部に形成され、その厚さは血管網を有しないモデルの真皮様組織より約1.5倍に増加していた（100～150μm；図5A, B）。同モデルの表皮組織は、明瞭な顆粒層を形成する細胞分化を呈し、血管網をもたない皮膚モデルに比べて約1.5倍に肥厚していた（約100μm；図5A）。また、角質層は細胞核をもたない扁平な細胞の堆積のみで構成され、その上層はしばしば脱落していた（図5A）。

一方、コラーゲンゲル法で構築した3D皮膚モデルは、真皮様組織内に三次元的に広がる毛細血管網が形成され、LbL・細胞集積法による毛管網含有皮膚モデルよりさらに真皮様組織の厚み（約150μm）が増していた（図5C, D）。また、本モデルの表皮組織はLbL法による皮膚モデルと同様に明確な細胞分化と角化を呈し、その厚さは120～150μmに達していた（図5C）。

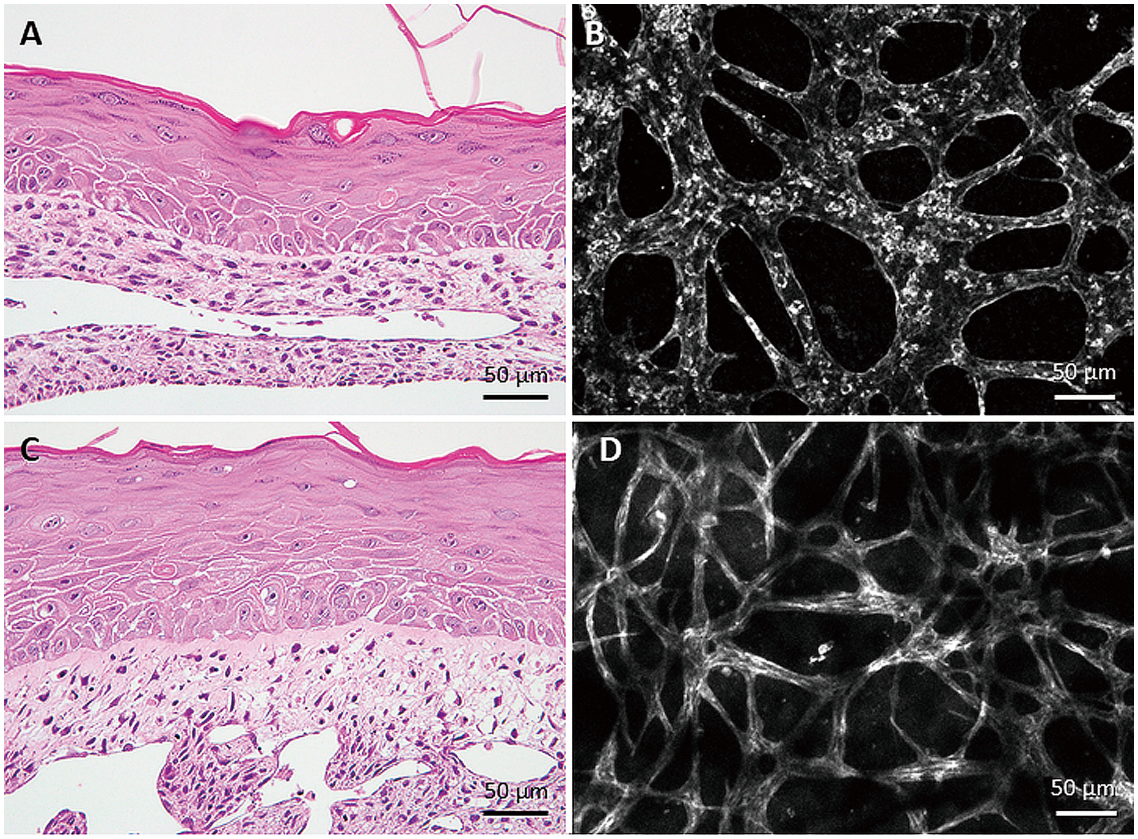


図5　血管網含有3D皮膚モデルの構造．A. LbL・細胞集積法により構築された3D皮膚モデルの組織切片像。真皮様組織中層に管腔を形成する血管が見られる。H.E.染色 B. LbL・細胞集積法により構築された3D皮膚モデルの真皮様組織内で2次元的に広がる血管網。Whole-mount標本におけるCD31に対する免疫染色 C. コラーゲンゲル・細胞集積法により構築された3D皮膚モデルの組織切片像。真皮様組織の浅層から深層にわたり管腔を形成する血管が見られる。H.E.染色 D. コラーゲンゲル・細胞集積法により構築された3D皮膚モデルの真皮様組織内で三次元的に広がる血管網。Whole-mount標本におけるCD31に対する免疫染色

3．4．リンパ管網含有三次元皮膚モデルの構造

LbL法によりリンパ管網を含有する全層性の3D皮膚モデルを10日以内に形成することができた（図6）。真皮様組織の中層部を中心に、リンパ管内皮マーカーの一つであるLYVE-1陽性の拡張した毛細リンパ管網が二次元的に発達していたが、真皮様組織の厚さは80～100μmと血管・リンパ管網をもたない皮膚モデルとほぼ同等であった（図6A, B）。その表皮組織では紡錘状の細胞への分化傾向と角質層（20μm）の形成が明瞭であったが、その厚さは約70μmで血管網を有する皮膚モデルより薄い傾向を示した（図6A）。

4．考　察

我々の研究グループが独自に開発した細胞外マトリクスのLbL・コーティング技術を用いた細胞集積法[9-13]は、真皮様結合組織上でケラチノサイトが生体と同様の分化・成熟と角質形成を呈する全層性の皮膚組織を構築した。本構造体は、特殊なデバイスや多種多様の添加剤を用いることなく、細胞自身が自己組織化することにより形成され、ヒト生体皮膚に類似する組織学的特性を有していた。加えて、従来の皮膚相同体[2-8]に比べて、簡便に10日以内で構築できることも大きな特徴である。本法では線維芽細胞が分布する真皮様組織上においてのみ表皮が形成されることから、本構造体はケラチノサイトの表皮形成に真皮との接触・相互作用を必要とする生体皮膚[14]と同様の微小環境を提供することでヒト表皮と相同の細胞・組織構造と分子発現を再現していると思われる。このことが、細胞毒性基準物質に対して本構造体がヒト表皮モデル[15]より高いバリア機能を発揮することに寄与していると考えられる。しかし、表皮の分化と角質形成は未だ十分とは言えず、真皮様組織においても微小循環系をはじめとする組織構築が不足しており、生体皮膚に代わる評価系の確立にはこれを解決する必要があると思われる。

上記の課題に応えるために、本研究ではさらに全層性皮膚モデルの結合組織内に血管網の付与を行った。我々のLbL・細胞集積法は立体組織内に血管・リンパ管網を組織化することに優れ、これまで微小循環系を内蔵する様々な3D組織を創製している[10-13]。先行研究の脈管網含有皮膚相同体がその作製に煩雑な操作と28日以上の長い期間を要する[9]のに対して、LbL・細胞集積法は10日以内に真皮様組織内に2次元的に広がる毛細血管網を有する皮膚モデルを作製し、さらに新たに開発したコラーゲンゲル・細胞集積法は同期間内に真皮全層に広がる3次元的毛細血管網を構築した。コラーゲンゲル法による3D皮膚モデルはLbL法に比べて線維芽細胞の密度を抑えて細胞外マトリクスの増加と分散配置を図ることにより、より生体真皮に近い組織を構築することが可能であり、このことが血管網の3次元化に働いていると推測される。結合組織内に血管網が構築されたことにより皮膚モデルの真皮様組織が厚くなるとともに、表皮組織が明確な細胞分化による肥厚を示したことは、血管網の形成と配置が真皮組織だけでなく表皮組織の機能形態形成にも深く関与することを示唆している。コラーゲンゲル法による3D皮膚モデルではさらに真皮、表皮ともにその厚みを増していたことから、血管網の三次元化は栄養素やガスの各組織への供給を迅速に有効化することで皮膚組織の分化・成熟を促進すると思われる。

生体の皮膚には血管系だけでなく、細胞の代謝物、異物などを含む組織液の排導や高分子物質と細胞の輸送に関わるリンパ管が配備され、近年では皮膚の恒常性の維持や免疫の機能調節に密接に関与することが知られている[16]。これより、3D皮膚モデルの結合組織内にリンパ管網を構築し、皮膚組織の形態形成について解析を行ったが、血管網の場合と異なり、脈管を有さない皮膚モデルとの間に明らかな差は見られなかった。このことは脈管本来の機能的差異によるものかもしれないが、今回構築されたリンパ管網は拡張した管腔による平面的な洞様構造を呈し、生体皮膚のリンパ管網の機能形態と乖離していることがその結果

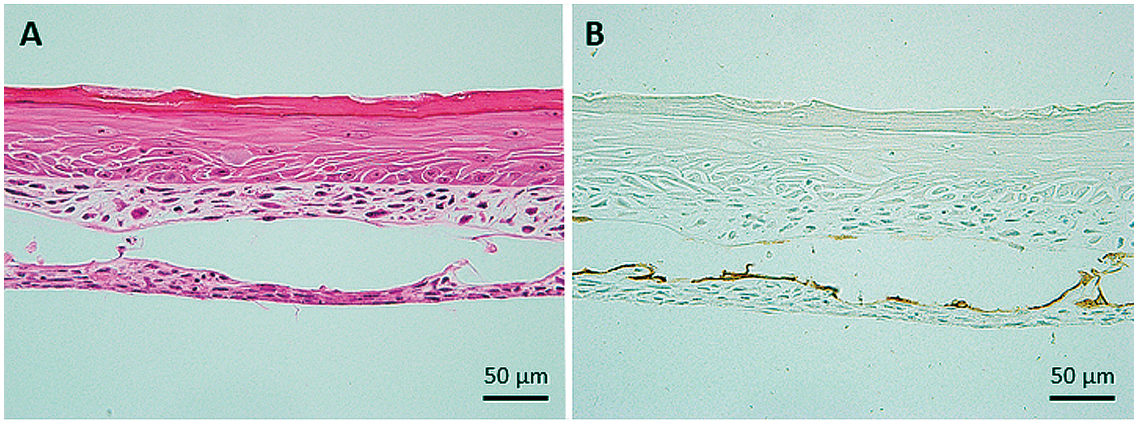


図6　リンパ管網含有3D皮膚モデルの構造。A. LbL・細胞集積法により構築された3D皮膚モデルの組織切片像。真皮様組織中層を中心に洞様に拡張したリンパ管が見られる。H.E.染色 B. Aの隣接切片におけるLYVE-1に対する免疫染色像。LYVE-1陽性の内皮細胞が管腔を形成する。

に影響している可能性が否定できないことから、より解剖学的に正確なリンパ管網含有3D皮膚モデルを構築すべく現在その技術改善を行っている。

5．総　括

本研究成果は独自に開発した立体組織構築技術がヒト生体皮膚に類似した*in vitro* 3D皮膚モデルを簡便に短期間で構築できることを示している。加えて、解剖学的に高い相同性をもつ毛細血管網を本構造体の真皮内に装備することにより真皮組織だけでなく、表皮組織の分化・成熟と機能性を亢進させることが明らかになり、微小循環系を内蔵する本皮膚相同体は*in vitro*における薬剤や化粧品・化成品の開発に高い有用性をもつ実験動物代替ヒト皮膚モデルとして、さらには再生医療材料としての応用が期待される。

謝　辞

本研究の遂行にあたり、多大なるご支援を賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に心より感謝申し上げます。

また、本研究は当教室の高橋一人氏と成田大一氏の尽力によるものであり、研究の遂行にあたり明石満教授（大阪大学生命機能研究科）と松崎典弥教授（大阪大学工学研究科）に温かいご指導を頂きました。この場をお借りいたしまして厚く御礼申し上げます。

（引用文献）

1）Alépée N, Grandidier MH, Cotovio J: sub-categorization of skin corrosive chemicals by the EpiSkin™ reconstructed human epidermis corrosion test method according to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431. Toxicology in Vitro 28: 131–145, 2014

2）Black AT, Hayden PJ, Casillas RP, Heck DE, Gerecke ER, Sinko PJ, Laskin DL, Laskin JD: Expression of proliferative ans inflammatory markers in a full-thickness human skin equivalent following exposure to the model sulfur mustard vesicant, 2-chloroethyl ethyl sulfide. Toxicol Appl Pharmacol 249: 178–187, 2010

3）Thakoersing VS, vanSmeden J, Mulder AA, Vreeken RJ, El Ghalbzouri A, Bouwstra JA: Increased presence of monounsaturated fatty acid in the stratum corneum of human skin equivalents. J Invest Dermatol 133: 59－67, 2013

4）Falanga V, Isaacs C, Paquette D, Downing G, Kouttab N, Butmarc J, Badiavas E, Hardin-Young J: Wounding of bioengineered skin: cellular and molecular aspects after injury. J Invest Dermatol 119: 653–660, 2002

5）Pupovac A, Senturk B, Griffoni C, Maniura-Weber K, Rottmar M, McArthur AL: Toward immunocompetent 3D skin models. Adv Healthcare Mater 7, 1701405, 2018

6）Groeber F, Holeiter M, Hampel M, Hinderer S, Schenke-Layland K: Skin tissue engineering－*in vivo* and *in vitro* applications. Adv Drug Deliv Rev 128: 352-366, 2011

7）Black AF, Berthod F, Heureux NL, Germain L, Auger FA: *In vitro* reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent. FASEB J 12: 1331–1340, 1998

8）Bourland J, Fradette J, Auger FA: Tissue-engineered 3D melanoma model with blood and lymphatic capillaries for drug development. *Sci Rep* 8: 13191, 2018

9）Matsusaki M, Fujimoto K, Shirakata y, Hirakawa S, Hashimoto K, Akashi M: Development of full-thickness human skin equivalents with blood and lymph-like capillary networks by cell coating technology. J Biomed Mater Res A 103A, 3386–3396, 2015

10）Narita H, Shima F, Yokoyama J, Miyagawa S, Tsukamoto Y, Takamura Y, Hiura A, Fukumoto K, Chiba T, Watanabe S, Sawa Y, Akashi M, Shimoda H: Engraftment of vascularized human iPS cell-derived 3D-cardiomyocyte tissue after xenotransplantation. *Sci Rep* 7: 13708, 2017

11）Asano Y, Odagiri T, Oikiri H, Matsusaki M, Akashi M, Shimoda H: Construction of artificial human peritoneal tissue by cell-accumulation technique and its application for visualizing morphological dynamics of cancer peritoneal metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 494: 213–219, 2017

12）Oikiri H, Asano Y, Matsusaki M, Akashi M, Shimoda H, Yokoyama Y: Inhibitory effect of carbonyl reductase 1 against peritoneal progression of ovarian cancer: evaluation by ex vivo 3D-human peritoneal model. *Mol Biol Rep* 46: 4685–4697, 2019

13）Shima F, Narita H, Hiura A, Shimoda H, Akashi M: Construction and histological analysis of a 3D human arterial wall model containing vasa vasorum using a layer-by-layer technique. *J Biomed Mater Res A*. 105:814–823, 2017

14）Liu N, Matsumura H, Kato T, Ichinose S, Takada A, Namiki T, Asakawa K, Morinaga H, Mohri y, De Arcangelis A, Georges-Labouesse E, Nanba D, Nishimura EK: Stem cell competition orchestrates skin homeostasis and aging. Nature 68, 344–350

15）化学物質の試験に関するOECDガイドライン 439 *in vitro*皮膚刺激性：再構築ヒト表皮試験法

16）下田　浩：リンパ管の解剖学と老化．アンチエイジング医学14：191–196，2018

ナノマテリアルによる細菌遺伝子発現の制御と感染調節

北海道公立大学法人札幌医科大学
白土　明子

Some nanomaterials in cosmetic products act as UV-filters for skin. It is known, however, that some types of nanomaterials can induce skin inflammation. The inflammation is thought to be due to the harmfulness of the nanomaterials themselves. On the contrary, we considered another hypothesis on the action of nanomaterials in the skin damages. That is, nanomaterials would alter gene expression of indigenous bacteria in skin and they would induce inflammation indirectly. We investigated influence of some nanomaterials on the action of membrane receptors of *Escherichia coli*, and found level of two receptors activities were reduced by treatment of two nanomaterials ZnO and TiO_2. Lack of the receptors in *E. coli* altered bacterial virulence to model host *Drosophila*. These results suggested that some nanomaterials have roles for regulation of bacterial virulence through change the activity of the membrane receptors.

1．緒　言

近年，ナノマテリアルが利用されている化粧品が増えており，中でも，日焼け止めやファウンデーションなどの，皮膚に直接に触れる面積の広い種類へ配合される例もある。そのため，ナノマテリアルの毒性評価は化粧品の安全性に重要な要素とされてきている。

近年，毒性が低いとされる細菌が，皮膚や傷に付着した際に皮膚炎や傷害，強い毒性を与える場合のあることが報告されるようになった。細菌には環境を感知する仕組みがあり，環境中の化学物質や宿主内の物質の認識により，遺伝子発現を変化させて環境変化に適応して生存生育する。皮膚表面には常在細菌を含め多くの細菌が存在しており，ナノマテリアルが細菌の生理状態を変化させることで，皮膚への炎症や傷害の状態に影響を与えている可能性が提唱されているが[1-3]，直接の作用はまだ十分に調べられてはこなかった。

本研究では，ナノマテリアルによる細菌の遺伝子発現変動と生理的性質の変化，および宿主組織への影響を解析することとした。細菌の細胞膜には環境物質を認識する膜受容体があり，これが活性化すると特定の転写調節因子の活性状態を変化させ，支配下遺伝子群の発現を正または負に調節する。また，特定の情報経路はストレス応答，輸送体群，呼吸関連，代謝などの，ひとまとまりの働きを発揮する遺伝子群を一括して制御する[4]。特に，遺伝子発現制御系の解析が進んでいる遺伝学モデル細菌では，制御下遺伝子群の実体や制御機構の知見の蓄積が多い。そのため，活性変化する情報経路がわかると，細菌の性質変化をある程度予測することも可能となる。また，細菌の情報経路は細菌種を超えて共通する種類も多く，各種のモデル細菌系で得られた成果は，他の細菌にも当てはまる可能性が高い。これらのことから，ナノマテリアルが細菌の情報経路に与える作用を評価した。

Role for nanomaterials of bacterial gene expression and infectious state of host organisms

Akiko Shiratsuchi
Sapporo Medical University

2．方　法

2．1．材　料

グラム陰性細菌のうち，遺伝子発現制御機構がもっともよく知られている大腸菌の実験株のBW 25113株を材料とし，また，これを親株とする遺伝子欠損菌株を，国立遺伝学研究所ナショナルリソースセンターより入手して用いた。大腸菌の環境感知を行う情報経路は二成分制御系と呼ばれ，細胞膜受容体と転写調節因子の２種類のタンパク質の組み合わせで構成され，約50の因子を持つ（Fig. 1 前が受容体、後が転写調節因子の名前を示す）。それぞれの経路により正に制御される遺伝子を選び，これらの転写プロモーター配列の制御下に緑色蛍光タンパク質（GFP）またはルシフェラーゼを発現するプラスミドpBR322を準備し，それぞれを保持させた大腸菌株を用意した（Fig. 2）[4]。ナノマテリアルとして，サンスクリーン剤に利用されるMZ-500（ZnO）およ

代謝	ストレス応答	物質輸送
AtoC-AtoD	BarA-UvrY	BaeS-BaeR
CitA-CitB	CpxA-CpxR	BasS-BasR
DcuS-DcuR	EnvZ-OmpR	CusS-CusR
UhpB-UhpA	QseC-QseB	EvgS-EvgA
NtrB-NtrC	YedV-YedW	HydH-HydG
PhoR-PhoB	呼吸	KdpD-KdpE
CreB-CreC	ArcB-ArcA	PhoQ-PhoP
走化	NarQ-NarP	
CheA-CheB	NarX-NarL	機能不明
	TorS-TorR	RstA-RstB

Fig. 1

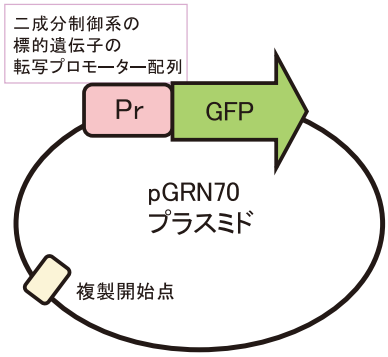


Fig. 2

びTiO$_2$を用いた。宿主との接触を模倣するために，宿主血液および血清を用いた。また，個体レベルの実験では，ヒトと同じ自然免疫機構を持つキイロショウジョウバエの野生型として*Oregon R*系統(Kyorin Flyより供与)を用いた[5, 6]。

2. 2. 遺伝子転写プロモーター活性の測定

大腸菌株はLB液体培地で培養し，ここに様々な濃度のナノマテリアルを加えた試料も作成する。培養時間経過に伴う600nmの吸光度を測定して，細菌増殖に影響のない濃度を設定した。定常期まで培養した大腸菌は，バッファーで一度すすいでから，測定用の新たなバッファーに懸濁した一定濃度になるよう希釈してからマルチウエブプレートに分注し，ここに試料群を加えて共培養した。つづいて，GFPの蛍光強度，もしくは，ルシフェラーゼの酵素活性を，プレートリーダーを用いて測定した。それぞれをレポーターとして，測定値を転写プロモーター活性の指標とした[4]。一方，細菌のそれぞれの受容体経路の下流には，当該経路でのみ，かつ正の制御を受ける遺伝子群が存在する。そのような遺伝子と内部コントロールとしてDNAポリメラーゼアルファサブユニットのmRNAレベルを解析して，受容体活性化のmRNAレベルでの指標とした[6]。

2. 3. モデル宿主を用いた*in vivo*感染系での毒性解析

キイロショウジョウバエ成虫オスを炭酸ガスで麻酔し，ハエの腹に窒素ガス制御性マイクロインジェクターに接続したキャピラリーを用いて，バッファーに懸濁した一定数の大腸菌，もしくはバッファーのみを注入した。覚醒後のハエは，餌を入れたバイアルに移し，29℃で飼育した。飼育時間に伴う生存率を調べて毒性の指標とした[7, 8]。また，ハエをPBS中でホモジナイズして粗抽出液を調製し，LB寒天培地に塗布して得られたコロニーを計測して，コロニー形成菌数を生菌の指標とした[6]。

3. 結　果

3. 1. 宿主遭遇時の大腸菌膜受容体経路活性の変化

ナノマテリアルの作用を知る前提として，宿主体液の存在で活性化程度の高い二成分制御系を調べた。そのために，それぞれの受容体経路で活性化することの知られる遺伝子の転写プロモーター制御下に蛍光タンパク質を発現するプラスミドを構築し，これを大腸菌に保持させたライブラリーを準備した。それぞれのプラスミド保持菌株をモデル宿主ショウジョウバエの体腹に注入し，蛍光強度を画像解析した。その結果，ストレス応答性遺伝子を制御するEnvZ-OmpRとCpxA-CpxR，代謝に関連するPhoB-YuhU/YpdA，呼吸に関連するEnvS-EvgAとPhoQ-PhoPを含む数種類の経路がが高い活性を示した。このうち，細菌の毒性や免疫耐性を念頭におき，ストレス応答に関連する2種類の経路に着目した。EnvZ-OmpR，CpxA-CpxRのそれぞれで正に制御される遺伝子を選びその転写プロモーター活性を調べると，宿主の血液成分により活性化することがわかった(未発表データ)。つづいて，受容体が体液により活性化していることを，リン酸化を指標として調べた。そのために，当該受容体をFLAGとの融合タンパク質として発現させる大腸菌株を準備し，ここに体液を作用させたのち，抽出液を調製してPhos-tag-SDS-PAGEにより分離し，抗FLAG抗体を用いたウエスタンブロットを行った。Phos-tagはリン酸基を捕獲してSDS-PAGEによる易動度を小さくする。大腸菌抽出液からは二本のバンドが得られ，易動度の大きいシグナルを非リン酸化体，小さいシグナルをリン酸化体として評価した。体液が存在すると，易動度の小さいシグナルの割合が大きくなったことから，EnvZのリン酸化体の割合が増え，活性化程度が亢進したと判断した（Fig. 3)。この結果は，体液から血球成分を除いた液性成分だけでも，さらにこれを100℃で5分間処理した成分でもこの性質が保持された（Fig. 4)。これら

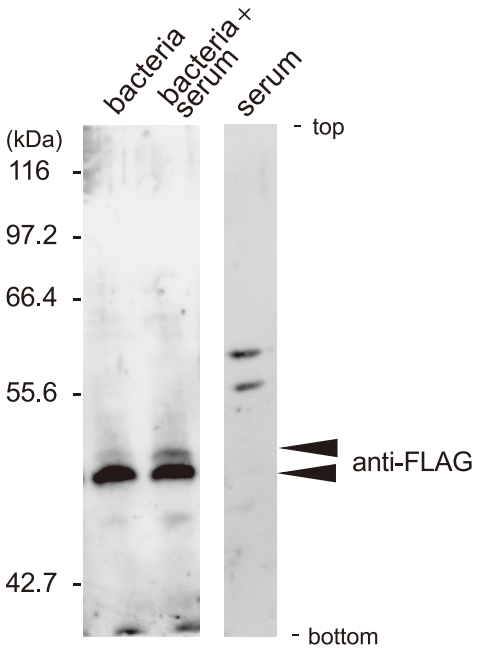


Fig. 3

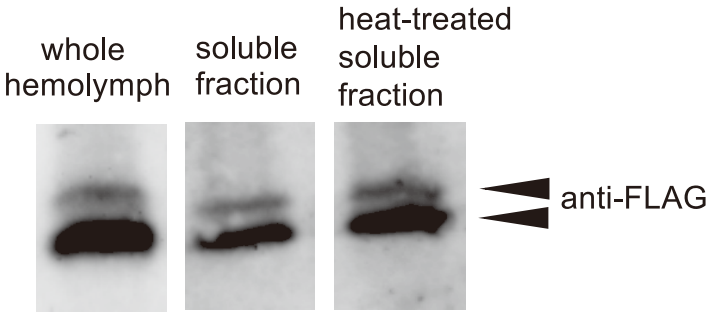


Fig. 4

のことから，体液中の加熱に耐性の液性成分の中に，二成分制御系の膜受容体EnvZを活性化する因子が存在すると考えられた。CpxA-CpxRに関しても同様の解析が進行している。

3．2．大腸菌の生存増殖に影響しないナノマテリアル処置条件の設定

LB液体培地に様々な濃度のナノマテリアルZnOまたはTiO_2を添加し，大腸菌BW25113株を37℃で空気中でしんとう培養し，時間経過に伴う600nmにおける吸光度を定常期に達するまで測定した。その結果，試料の吸光度は培養時間の経過に伴って増加し，5％(w/v)以内の濃度では，両者ともにコントロールとしたPBSとの違いはなかった。また，大腸菌にZnOまたはTiO_2を添加して暴露させ，LB寒天培地でのコロニー形成菌数を調べると薬剤なしとの顕著な違いはなかった。これより，ZnOおよびTiO_2は，5％(w/v)で大腸菌の生存増殖を阻害しないと判断し，今後の実験ではこの濃度を用いて解析を行った。

3．3．ナノマテリアルによる大腸菌情報経路活性への作用

ここまでに得られた知見を元に，大腸菌液にZnOおよびTiO_2を添加してEnvZ-OmpR経路への働きを調べた。宿主導入時の当該経路下流遺伝子の転写プロモーターの活性は，ナノマテリアルの存在により抑制傾向を示し，コントロール群と比較してTiO_2添加群では91％，ZnOでは72％であり（n=3，有意差あり）その働きはZnOの方が大きかった。このことから，ナノマテリアルはEnvZ-OmpR経路を抑制し，この経路による細菌遺伝子発現の変化を通じ宿主への作用を変化させる可能性がある。

3．4．大腸菌膜受容体経路の宿主毒性への作用

次に，宿主体液で活性化するEnvZ-OmpRおよびCpxA-CpxRの宿主感染時の働きを調べるために，キイロショウジョウバエ*Oregon R*系統の成虫オスの腹に*envZ-ompR*遺伝子，*cpxA-cpxR*遺伝子のそれぞれを欠損した大腸菌株を注入した。その結果，*envZ-ompR*遺伝子欠損菌株は

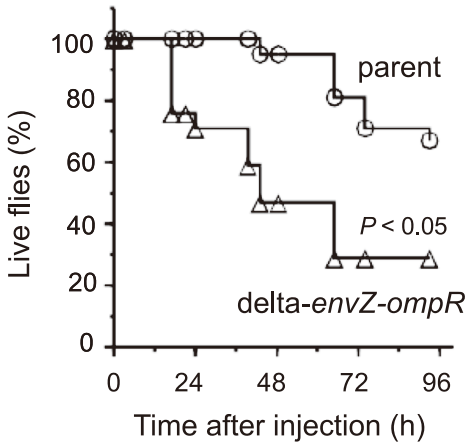


Fig. 5

親菌株BW25113株と比較して，多くのハエを殺すとわかった（Fig. 5）。一方，*cpxA-cpxR*遺伝子欠損菌株は親菌株BW25113株と比較して，ハエの生存率が低い傾向があり，また，マクロファージにより早く貪食殺菌されることがわかった(未発表)。これらのことより，EnvZ-OmpRは宿主への毒性に抑制的に働き，CpxA-CpxRは宿主の免疫へ抵抗に働くと考えられた。今回解析に用いたナノマテリアルにより活性変動する受容体経路の中に，宿主への毒性を調節するものが見出された。

4．考察および総括

大腸菌は体液成分を感知して情報経路の活性を変化させて遺伝子発現パターンを変えることが示され，宿主への毒性や免疫感受性を変化させる。そして，ZnOおよびTiO_2は，これらの経路の働きを変化させる作用を有することが判明した。皮膚表面には多くの常在細菌を含む細菌が付着しており，サンスクリーン剤に含まれるナノマテリアルは，細菌の情報経路の活性変化を通じて，遺伝子発現を変化させる作用を持ち，これが細菌の性質を変化させる可能性がある。今後は，例えば，宿主への傷害に関連する細菌遺伝子の働きを抑える作用など，これまでに見出されたこなかった，ナノマテリアルの働きが見出される可能性がある。

(引用文献)

1） Kinoshita, R., et al. Yakugaku Zassi, 132, 319-324(2012)
2） Lee, N-Y., et al. Front. Pharmacol., 10, 1153（2019）
3） Yallet-Regi, M., et al. Int. J. Mol. Sci., 20, 3806（2019）
4） Pukklay, P., et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 438, 306-311 (2013)
5） Nainu, F., et al. Journal of Center of Medical Education, Sappro Medical University 10, 21-32（2019）
6） Hashimoto, Y., et al. J. Immunol., 183, 7451-7450（2009）
7） Shiratsuchi, A., et al. J. Immunol., 192, 666-675(2014)
8） Shiratsuchi, A., et al. J. Immunol., 197, 1298-1307(2016)

動物実験の 3Rs に寄与する化学物質の光安全性評価法の戦略的開発

静岡県立大学薬学部薬剤学分野
世戸　孝樹

Drug-induced phototoxicity is caused by exposure to sunlight after topical and/or systemic administration of photosensitive chemicals. Both photoreactivity of chemicals and its distribution to sunlight-exposed tissues are key determinants of drug-induced phototoxicity. Recently, 3Rs principle (replacement, reduction, refinement) tends to be compliance in pharmaceutical and cosmetic industries. In this study, a new photosafety screening strategy based on the combined use of a reactive oxygen species (ROS) assay and an *in vitro* skin permeation test was developed as an alternative to animal experiments. The phototoxic risk of 6 phototoxic compounds, acridine (ACD), furosemide (FSM), hexachlorophene (HCP), 8-methoxypsoralen (MOP), norfloxacin (NFX), and promethazine (PMZ), were evaluated based on photochemical and in vitro skin deposition properties. An *in vivo* phototoxicity test in rats was undertaken to verify the prediction capacity of the proposed system. All tested compounds exhibited strong absorption in UVA/B regions, and generation of significant ROS from all tested chemicals were observed under simulated sunlight exposure. The steady-state concentration (C_{ss}) values of tested compounds in removed rat skin were estimated on the basis of the skin permeability. The C_{ss} values of ACD, FSM, HCP, MOP, NFX, and PMZ were calculated to be 69, 2.8, 57, 50, 3.2, and 59, respectively. On the basis of the ROS data and C_{ss} values of tested compounds, the phototoxic risk of tested compounds was predicted. The predicted phototoxic risk by proposed screening system (ACD > HCP > MOP > PMZ > FSM ≒ NFX) was mostly in agreement with the observed *in vivo* phototoxicity (ACD > HCP > MOP > FSM ≒ PMZ > NFX). From these findings, the phototoxic risk of tested compounds could be predicted by combined use of ROS assay and *in vitro* skin permeation test, and the new photosafety screening system would contribute to product development and animal welfare.

1．緒　言

薬剤性光線過敏症は特定の化合物を全身または局所投与後，太陽光曝露により惹起される皮膚および眼における異常反応である[1]．本症は患者が視覚的に認知でき，本症に対する様々な処置が必要となるため，患者のquality of lifeの低下を招きうる．光毒性は医薬品のみならず，様々な化学物質が原因となることが報告されており[2]，創製・開発される製品について適切な光毒性リスク予測およびその回避が求められている．光毒性反応はUVA/B（UVB, 290–320nm; UVA, 320–400nm）および可視光（visible light: VIS, 400–700nm）領域の光エネルギーを化合物が吸収することが引き金となる．光励起された化合物はエネルギー的に不安定な状態であり，吸収した光エネルギーの放出を蛍光，燐光，熱および光化学的反応を介して行う[3]．皮膚もしくは眼に存在する化合物が太陽光曝露にて励起することで生体内分子と光化学的反応を引き起こす可能性がある．この光化学的反応は反応様式によりエネルギー転移を介するtype I光化学反応およびフリーラジカル産生を介するtype II光化学反応がある[4]．光励起化合物は生体内に存在するタンパク，脂質およびDNAと反応し，細胞・組織障害を引き起こす．反応する生体内分子に基づき光毒性は光刺激性，光遺伝毒性および光アレルギーに大別される．生体内にはO_2も豊富に存在しており，O_2自身が光エネルギーのacceptorとして光化学的反応に関与することもある．光励起化合物とO_2が反応することで産生する活性酸素種（reactive oxygen species; ROS）は反応性が非常に高く，化合物の光毒性反応に関与すると考えられている．

化合物の光安全性評価法はこれまで数多く開発されており，光毒性の発現機序に基づく評価系が存在する[5]．特に，UV/VIS吸収特性評価[6]，*in vitro* 3T3 neutral red uptake phototoxicity test（3T3 NRU PT）[7]，ROS assay[8]は化学物質の光安全性評価にて広く用いられる評価系である．2014年にはInternational Council for Harmonisation of Technical Requirement for Pharmaceutical Human Use（ICH）より医薬品の光安全性評価に関するガイドライン（ICH S10）が施行され，医薬品候補化合物の光安全性評価の流れを示し，上記の評価方法などが推奨されている．また，当研究室で開発したROS assayは，2019年に*in chemico*光反応性評価法としてOrganisation for Economic Co-operation and Development（OECD）におけるテストガイドライン化（TG 495）に成功した．

光毒性化合物は生体内にて太陽光へ曝露されなければ光毒性反応を引き起こす可能性は低く[9]，露光部位である皮膚や眼などへの曝露も光毒性発現に強く関わる．以前の研究にて，化合物の光化学的および薬物動態学的特性の統合的解析により化合物の光毒性リスクを効果的に予測できる

Strategic development of a photosafety evaluation system for chemicals contributing to 3Rs principle in animal experiments

Yoshiki Seto

Laboratory of biopharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka

ことを報告した[10]．さらに，薬物動態試験におけるコスト，動物実験の3Rs（reduction, replacement, refinement）および評価スループットの観点からの改善を指向し，1匹の実験動物に複数化合物を同時に投与することで生体サンプル中の複数化合物濃度の測定を可能にする*in vivo* cassette-dosing薬物動態試験を導入することで新たな統合的光安全性評価法を提案し，複数化合物の光毒性リスクを高効率的かつ高精度に予測できることを報告し，光反応性および皮膚曝露の両特性に着目した光安全性評価は医薬品候補化合物の光毒性リスク予測ツールとして高い有用性を示した[11-14]．一方で，cassette-dosing法においても皮膚内濃度推移を得るには一定数の実験動物の使用は必要であり，動物福祉とスループットの観点から更なる改良が必要であった．経皮適用化合物の開発では候補化合物の皮膚透過性評価としてFranz型拡散セルを用いた*in vitro*皮膚透過性試験（OECD TG 428）[15]などが用いられる．さらに皮膚透過性評価を応用し，化合物の皮膚透過速度が定常状態に達した際の皮膚中濃度（steady-state concentration; C_{ss}）を算出する方法が報告されている[16]．しかしながら，経皮適用化合物の光毒性リスク予測にて皮膚曝露の指標としてのC_{ss}の適用可能性は不明である．

そこで本研究ではROS assayと*in vitro*皮膚透過性試験を組み合わせた統合的光安全性評価法を新規に提案し，本評価法の経皮適用化合物の光安全性評価への適用性について精査した．被験物質としてacridine（ACD），furosemide（FSM），hexachlorophene（HCP），8-methoxypsoralen（MOP），norfloxacin（NFX）およびpromethazine（PMZ）を用いた（Fig. 1）．6種の被験物質はそれぞれ異なる母骨格を持ち，分子量およびClog P値は幅広い物性値を示す．被験物質の光化学的特性はUV-VIS吸収測定およびROS assayにより評価した．ラット摘出皮膚を用いた*in vitro*皮膚透過性試験を実施し，各被験物質のC_{ss}を算出した．各被験物質のROS dataならびにC_{ss}を用いた統合的解析により被験物質の光毒性リスクを予測し，*in vivo*光毒性試験の結果と比較し，本評価系の予測能を検証した．

2．方　法

2．1．実験材料

ACDはAlfa Aesar（Haverhill, MA, USA）より購入した．FSM，NFXおよびPMZは富士フィルム和光純薬より購入した．HCPおよびMOPは東京化成工業より購入した．その他の試薬は市販品を購入して用いた．

2．2．実験動物

Sprague-Dawley系雄性ラット（9-14週齢，体重約300-450 g）は日本SLCより購入した．ラットは室温24±1℃，湿度55±5%ならびに明暗サイクル12 hで維持された動物飼育施設にて自由摂餌と飲水が可能な環境で飼育された．全ての動物実験は静岡県立大学実験動物倫理委員会のガイドラインに準じて実施した．

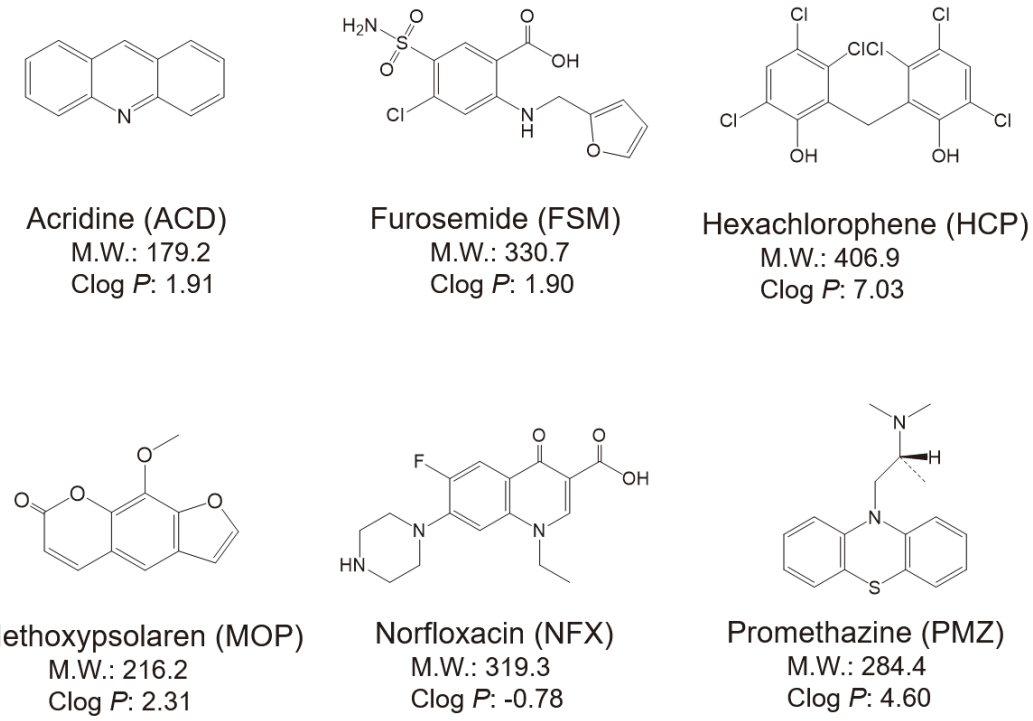


Fig. 1　Chemical structures and physicochemical properties of test compounds.

2．3．UV-VIS吸収スペクトル測定

各被験物質濃度(20μM)を20mM sodium phosphate buffer (NaPB, pH7.4)に溶解し，石英セル(光路長：10mm)に移した．各被験物質のUV-VIS吸収スペクトルをHITACHI U-2010 spectrophotometer（株式会社日立ハイテクノロジーズ)により記録した．

2．4．ROS assay

2．4．1．擬似太陽光照射装置

擬似太陽光照射装置としてAtlas Suntest CPS+（Atlas Material Technology LCC）を用いた．装置は1,500Wの Xenon arc lampおよび短波長の UVをカットするフィルターを備えたものを使用した．照射強度はUVA detectorであるDr. Hönle #0037（Dr. Hönle)を用い，UVA強度として約2.0mW/cm^{2}であることを確認し，Atlas Suntest CPS+内の温度は28℃に保った．

2．4．2．評価方法

光照射によって被験物質からsinglet oxygeおよびsuperoxid産生を測定した[17]．Singlet oxygenについて，被験物質(200μM), p-nitrosodimethylaniline (50μM) およびimidazole (50μM)を含む20mM NaPB (pH7.4) 200μLを96-well microplateに分注し，440nmの吸光値をSAFIRE microplate spectrophotometer (TECAN) を用いて測定した．その後，プレートをreaction containerにセットし，擬似太陽光を1h照射した．照射後，440nmの吸光値を測定し，440nmの吸光値の減少をsinglet oxygen産生の指標とした．Superoxideについて，被験物質 (200μM) およびnitroblue tetrazolium(50μM)を含む20mM NaPB(pH7.4) 200μLを96-well microplateに分注し，560nmの吸光値をSAFIREを用いて測定した．その後，プレートをreaction containerにセットし，擬似太陽光を1h照射した．照射後，560nmの吸光値を測定し，560nmの吸光値の増加をsuperoxide産生の指標とした．

2．5．*In vitro*皮膚透過性評価

Isoflurane麻酔下でラット腹部皮膚を採取し，未処置の摘出皮膚ならびにテープストリッピングを20回行うことで角質を除去した皮膚を実験に用いた．レセプター液としてpolyethylene glycol 400 (PEG 400)を40%含むリン酸緩衝液(phosphate-buffered saline；PBS，pH7.4) を用い，試験中は32℃に保った．全被験物質(各1mg/mL)を含むpropylene glycol溶液を摘出皮膚の上部に添加し，透過性試験を開始した．試験開始から0，0.5，8，10，12，18および24h後にレセプター溶液100μLを採取した．得られたサンプル中の各被験物質濃度をultra-performance liquid chromatography equipped with electrospray ionization mass spectrometry (UPLC/ESI-MS)を用いて測定した．

2．6．皮膚滞留性予測

皮膚透過パラメーターを用いて化合物の皮膚透過速度が定常状態の際の皮膚中濃度を算出できる[16, 18]．まず，被験物質のレセプター溶液中蓄積量 (accumulated amount; Q)は以下のように示すことができる．

$$Q = KLC_{\mathrm{v}}\left(\frac{D}{L^2}t - \frac{1}{6}\right)$$

K, L, CvおよびDはそれぞれpartition coefficient, thickness, chemical concentration in applied solutionおよびdiffusion coefficientを示す．分配(K・L) および拡散(D/L^2) は最小二乗法を用いて算出した．

透過係数 (permeation coefficient; P) は以下の式にしたがって算出した．

$$P = \frac{KD}{L}$$

各摘出皮膚に対するPの関係を以下に示す．P_{tot}，P_{sc}およびP_{ved}はそれぞれpermeability coefficient through whole skin，permeability coefficient through stratum corneumおよびpermeability coefficient through viable epidermisを意味する．

$$\frac{1}{P_{\mathrm{tot}}} = \frac{1}{P_{\mathrm{sc}}} + \frac{1}{P_{\mathrm{ved}}}$$

上記式を用いて算出した被験物質の皮膚透過性のパラメーターを用いて，透過速度が定常状態となった際の皮膚中濃度C_{ss}を以下の式を用いて算出した．

$$C_{\mathrm{ss}} = \frac{C_{\mathrm{v}}}{2L_{\mathrm{tot}}}\left\{K_{\mathrm{sc}}L_{\mathrm{sc}}\left(1 + \frac{P_{\mathrm{tot}}}{P_{\mathrm{ved}}}\right) + K_{\mathrm{ved}}L_{\mathrm{ved}}\frac{P_{\mathrm{tot}}}{P_{\mathrm{ved}}}\right\}$$

L_{tot}，L_{sc}とL_{ved}はそれぞれmean thickness of whole skin, mean thickness of stratum corneum と mean thickness of viable epidermisを表す．K_{sc}およびK_{ved}はそれぞれpartition coefficients to stratum corneumおよびpartition coefficients to viable epidermisを示す．

2．7．*In vivo*光毒性評価

試験開始24h前にラット腹部を剃毛し，被験物質(100mg/mL) を含むdimethyl sulfoxide (DMSO) 溶液を調製し，各被験物質のDMSO溶液100μLを塗布した．DMSO溶液塗布3h後に除去し，麻酔下でラット腹部にブラックライトを用いてUVを照射した．UV照射強度の測定はUVA detectorであるDr. Hönle #0037 (Dr. Hönle) を用いて行い，約2.7mW/cm^{2}の照射強度で照射量が30J/cm^{2}となるまでUV照射した．照射前および照射終了24h後の皮膚表面の色調を測定し，UV照射前後のΔE値を光毒性評価の指標とした．色差はCommission International del's Eclariage (CIE) により推奨されている$L^*a^*b^*$ systemにより記録する色差計 (NF333，日本電色工業) を用いて測定した．色差計は白色およびゼロ補正

をした後にラット腹部皮膚表面の色差を測定した．測定した輝度(L^*)，色相(a^*)および彩度(b^*)の値を基に色差(ΔE)を以下のように算出した．

$$\Delta E = \sqrt{[(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]}$$

2．8．データ解析

In vivo 光毒性試験において，各被験物質のUV照射および非照射群間の統計処理はstudent's t検定を実施し，危険率5%以下($P < 0.05$)を持って有意とした．脂溶性の指標であるClog P は ChemBioDraw 16.0 software (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) に各被験物質の構造式を入力することで算出した．

3．結　果

3．1．光化学的特性評価

全被験物質はUV領域に強い吸収を持ち（Fig. 2A），極大吸収波長でのMEC値は19,500（ACD），14,900（FSM），11,200(HCP)，24,900(MOP)，24,900(NFX)と6,600(PMZ) $M^{-1}\cdot cm^{-1}$ であった．290–700 nmの波長においてMECが1,000 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$ 上回らない化合物は直接的な光毒性を引き起こす懸念はないと定義されており[19]，6種の被験物質は高い光励起性を持つと判断した．ROS assayにおいて，HCPを除く全被験物質が擬似太陽光照射により強いsinglet oxygenおよびsuperoxideの産生を認め，HCPはsinglet oxygenのみ産生する結果を得，その程度は全被験物質中最も高い値を示した（Fig. 2B）．いずれの被験物質も以前の検討にて設定したcriteria（$\Delta A_{440\,nm} \times 10^3$: 25 for singlet oxygen and/or $\Delta A_{560\,nm} \times 10^3$: 20 for superoxide）[20, 21] を超えており，強い光反応性を有していた．特に，ACDはsinglet oxygenおよびsuperoxideのどちらの産生も非常に高く，被験物質中で最も高い光反応性を有していた．

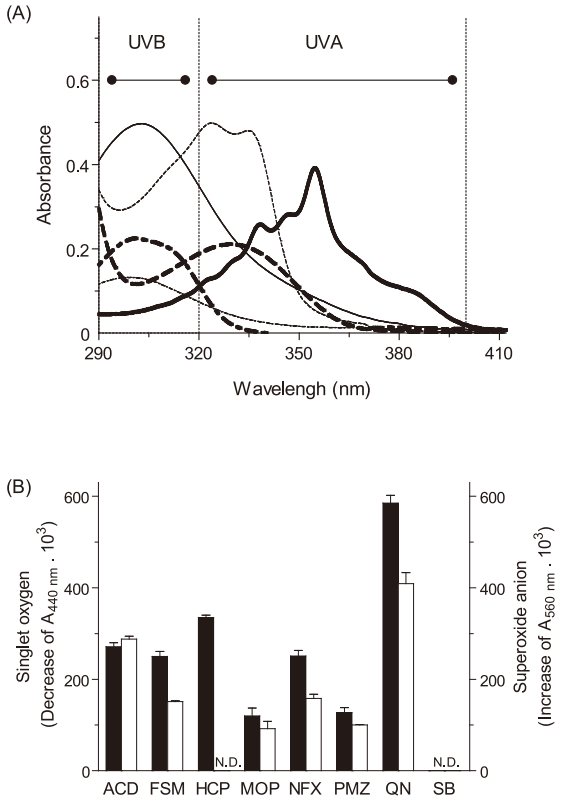


Fig. 2　Photochemical properties of test compounds. (A) UV absorption spectra of test compounds (20μM) in 20 mM sodium phosphate buffer (pH7.4). Thick solid line, ACD; thick dashed line, FSM; thick dotted line, HCP; thin solid line, MOP; thin dashed line, NFX; and thick dotted line, PMZ. (B) Generation of ROS including singlet oxygen (filled bars) and superoxide (open bars) from test compounds (200μM) exposed to simulated sunlight (250 W/m^2) for 1 h. QN, quinine (positive control); and SB, sulisobenzone (negative control). Data represent the mean±S.D. of 3 experiments. N.D., not detected.

3．2．*In vitro* 皮膚透過性評価およびC_{ss}の算出

経時的にレセプター溶液中の各被験物質濃度を測定した結果，MOPは両方の摘出皮膚で最も高い累積量を示した（Fig. 3）．一方で，NFXの透過量は両摘出皮膚において全

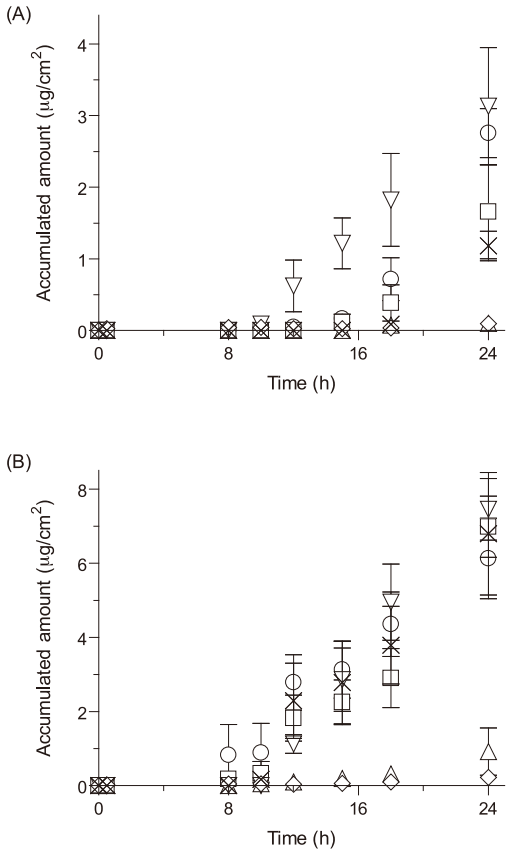


Fig. 3　*In vitro* skin permeability of test compounds. Accumulated amount of test compounds that permeated through (A) whole skin and (B) stripped skin. ○, ACD; △, FSM; □, HCP; ▽, MOP; ◇, NFX; and ×, PMZ. Data represent mean±S.E. for 4–6 experiments.

被験物質中最も低値であった．被験物質の累積量プロファイルに基づき，P_{tot} は 1.6×10^{-4}（ACD），2.3×10^{-5}（FSM），9.3×10^{-5}（HCP），1.0×10^{-4}（MOP），4.6×10^{-6}（NFX）および 1.0×10^{-4}（PMZ）cm/s であり，P_{ved} は 3.1×10^{-4}（ACD），7.8×10^{-4}（FSM），4.3×10^{-4}（HCP），2.3×10^{-4}（MOP），1.4×10^{-5}（NFX）および 4.5×10^{-4}（PMZ）cm/s であった（Table 1）．

得られた皮膚透過性パラメーターを基に被験物質のラット摘出皮膚における C_{ss} を算出したところ，ACD，FSM，HCP，MOP，NFX および PMZ の C_{ss} はそれぞれ 69.1，2.8，57.3，50.7，3.2 および 59.1 μg/mL であった（Fig. 4）．したがって，ラット皮膚における *in vitro* 皮膚曝露は ACD ＞ PMZ ＞ HCP ＞ MOP ＞ NFX ＞ FSM であった．

3. 3. *In vivo* 光毒性評価

各被験物質の *in vivo* 光毒性を評価すべく，ラットを用いた *in vivo* 光毒性試験を行った．本試験では，UVA 照射前後のラット腹部の皮膚表面における色調変化を評価することで *in vivo* 光毒性を評価した（Fig. 5）．全被験物質は UVA 照射により有意に皮膚表面の色調が変化した．特に UVA 照射群では，全ての被験物質で Δa 値が正の変化を示したことから塗布部の赤みが増したことを示しており，単回投与により UVA 照射にて紅斑反応を誘発することを認めた．すなわち，全被験物質は経皮投与により生体内で光毒性を引き起こすことを示唆した．特に，ACD および HCP 投与群の色調変化が他の 4 種の被験物質と比較して大きかった．各被験物質における UVA 照射時および非照射時の ΔE 値の差を基に，*in vivo* 光毒性の強さは ACD ≒ HCP ＞ PMZ ＞ MOP ＞ FSM ＞ NFX であると判断した．

4. 考　察

本研究では *in vivo* 皮膚内動態評価を *in vitro* 皮膚透過性試験に代替した光安全性評価系を提案し，光反応性および *in vitro* 皮膚曝露データを用いて 6 種の被験物質の光毒性リスクを予測することで，本光安全性評価系の適用可能性を精査した．

全被験物質は UV 領域において強い光吸収を示し，MEC 値は ICH S10 で定める基準値を大きく超えており，光励起により化合物は光化学的反応を引き起こすことを示唆した．光化学的反応による ROS 産生は化合物の光毒性発現に関与することが報告されている[2]．ROS assay より，全被験物質が高い光反応性を示し，光毒性リスクを有することを示唆した．6 種の被験物質のうち，ACD および HCP の光反応性が高く，FSM および NFX の光反応性は中程度であった．MOP および PMZ は強い ROS 産生を示したが，他の被験物質と比し低値であった．光安全性評価のための criteria に基づく ROS assay の陽性検出率は 100% であることが報告されている[20, 21]．本検討で用いた被験物質はすべて光毒性を惹起することが報告されており，得られた結果は以前の報告を裏付ける結果であった．

Table 1　Parameters for skin permeation of test compounds

	ACD	FSM	HCP	MOP	NFX	PMZ
P_{tot} ($\times 10^{-5}$ cm/s)	16	2.3	9.3	10	0.46	10
P_{ved} ($\times 10^{-5}$ cm/s)	31	7.8	43	23	1.4	45

P_{tot}, permeability coefficient through whole skin; and P_{ved}, permeability coefficient through viable epidermis

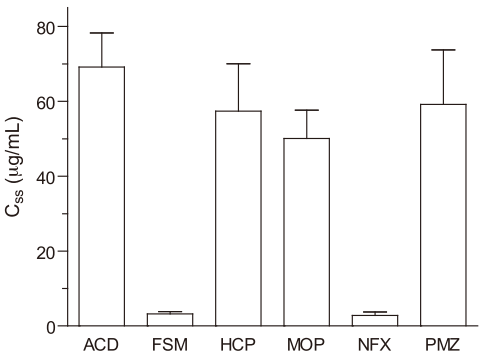


Fig. 4　C_{ss} values of test compounds in the intact rat skin. Data represent the mean±S.E. of 4–6 experiments.

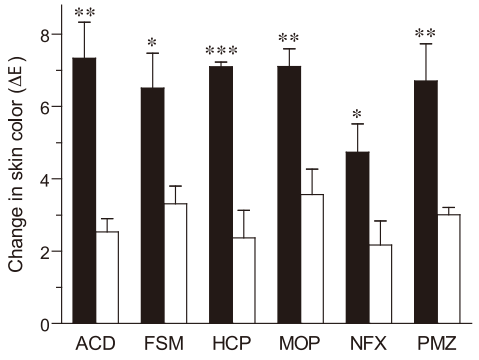


Fig. 5　Colorimetrical changes in the rat skin caused by irradiated and non-irradiated test compounds. Filled bars, irradiated group; open bars, non-irradiated group. Data represent the mean±S.E. of 4 experiments. *, $p<0.05$; **, $p<0.01$; and $p<0.001$ vs. corresponding non-irradiated group.

*In vitro*皮膚透過性試験では全被験物質が摘出皮膚を透過した．一般的に全身曝露を指向した経皮投与には分子量500以下および適度な脂溶性を持つ化合物が適切である[22]．経皮投与された化合物は主に角質層および表皮・真皮層の細胞間隙および細胞内ルートをFickの拡散則に従い透過することで全身循環へ移行する[23]．Clog *P*値が正である5種の被験物質は主にラット摘出皮膚の細胞間隙および細胞内ルートを透過しレセプター溶液中へ移行したと考える．一方，NFXのClog *P*値は−0.78であり，脂溶性が低い．水溶性化合物や高分子化合物の皮膚透過には主に毛嚢および汗腺を介したルートの寄与が報告されており[24]，脂溶性の低いNFXはこれら付属器官を介して皮膚を透過したと考える．

化合物が持つ光反応性および皮膚曝露は光毒性のリスクファクターである．したがって，ROS assayおよび*in vitro*皮膚透過性試験より得られた結果を統合的に解析することで被験物質の光毒性リスクを予測した（Table 2）．強力な光反応性を有するACDおよびHCPは高い*in vitro*皮膚曝露を示したことから光毒性リスクは高いと判断した．特にACDの光毒性リスクが最も高いと予測した．MOPおよびPMZは比較的低い光反応性を示したが，*in vitro*皮膚曝露についてはACDおよびHCPと同程度のC_{ss}を示した．したがって，MOPおよびPMZの光毒性リスクは今回用いた被験物質中では中程度であると判断した．FSMおよびNFXのROS産生は被験物質中では中程度であったが，他の4種の被験物質と比較し，*in vitro*皮膚曝露は非常に低い値を示したことから，FSMおよびNFXの光毒性リスクは今回用いた被験物質中では比較的弱いと考えた．すなわち光毒性予測はTable 3に示すとおりである．ラットを用いた*in vivo*光毒性試験にて，すべての被験物質で光毒性反応に起因すると考える皮膚の色調変化を観察した．提案した評価系の予測精度を検証すべく，予測した光毒性リスクおよび*in vivo*光毒性の結果を比較したところ，比較的良好に対応することが明らかとなった（Table 3）．本知見より，提案した評価系の経皮適用化合物の光安全性予測に対する有用性を示唆した．本検討では良好な結果が得られたが，皮膚曝露評価ではUV曝露部位における化合物の最大濃度および滞留時間の両方が光毒性発現のリスクとなり得る．今回算出したC_{ss}は化合物の皮膚透過速度が定常状態となった際の皮膚中濃度に相当するため過小評価となる懸念がある．経皮投与化合物の皮膚中濃度および滞留時間はその脂溶性に依存することが報告されている[25]．したがって，今回構築した評価系についてはさらなる適用可能性の検証が必要であろう．ROS assayおよび*in vivo*体内動態評価を用いた光安全性評価系と比較し，動物実験を用いない本評価系は光安全性評価に必要な実験動物数の削減および評価スループットの向上に寄与すると考える．光反応性および*in vitro*皮膚曝露に基づく光安全性予測法は候補化合物選択において開発初期のスクリーニング法として有用であろう．

本研究助成により得られた成果

1） Y. Iyama, H. Sato, Y. Seto, S. Onoue: A new photosafety screening strategy based on *in chemico* photoreactivity and *in vitro* skin exposure for dermally-applied chemicals, *Toxicology Letters*, **317**: 45－52, 2019

2） Y. Iyama, H. Sato, Y. Seto, S. Onoue: Photochemical and pharmacokinetic characterization of orally administered chemicals to evaluate phototoxic risk, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **108**（**3**）:1303-8, 2019

Table 2 Decision matrix

	ACD	FSM	HCP	MOP	NFX	PMZ
ROS assay [a]						
$^1O_2$ ($\Delta A_{440\,nm} \cdot 10^3$)	271	250	335	120	251	127
O_2^- ($\Delta A_{560\,nm} \cdot 10^3$)	288	151	N.D.	92	158	100
In vitro skin permeation test						
C_{ss} (μg/mL)	69.1	2.8	57.3	50.1	3.2	59.2

The risk level was divided into two grades. Black cells indicate high risk for phototoxicity. [a] $\Delta A_{440\,nm}$ and $\Delta A_{560\,nm}$ represent decrease in $A_{440\,nm}$ and increase in $A_{560\,nm}$, respectively.

Table 3 Prediction capacity of the proposed photosafety screening system

Predicted phototoxic risk										
ACD	＞	HCP	＞	PMZ	＞	MOP	＞	NFX	≒	FSM
Observed *in vivo* phototoxicity										
ACD	≒	HCP	＞	PMZ	＞	MOP	＞	FSM	＞	NFX

3） Y. Seto, H. Ohtake, H. Sato, S. Onoue: Phototoxic risk assessment of dermally-applied chemicals with structural variety based on photoreactivity and skin deposition, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **113**: 104619, 2020

謝　辞

本研究を遂行するにあたり，公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団（旧 公益財団法人コスメトロジー研究振興財団）よりご援助いただきましたことに深く感謝申し上げます.

（引用文献）

1） R.S. Dawe, S.H. Ibbotson. Drug-induced photosensitivity, *Dermatol. Clin*., **32**（**3**）: 363–368（2014）

2） S. Onoue, Y. Seto, G. Gandy, S. Yamada. Drug-induced phototoxicity; an early *in vitro* identification of phototoxic potential of new drug entities in drug discovery and development, *Curr. Drug Saf*., **4**（**2**）:123–136（2009）

3） A. Jablonski. Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes, *Nature*, **131**: 839–840（1933）

4） C.S. Foote. Definition of type I and type II photosensitized oxidation, *Photochem. Photobiol*., **54**（**5**）: 659（1991）

5） Y. Seto, K. Hosoi, H. Takagi, K. Nakamura, H. Kojima, S. Yamada, S. Onoue. Exploratory and Regulatory Assessments on Photosafety of New Drug Entities, *Curr. Drug Saf*., **7**（**2**）: 140–148（2012）

6） D.E. Moore. Mechanisms of photosensitization by phototoxic drugs, *Mutat. Res*., **422**（**1**）: 165–173（1998）

7） H. Spielmann, M. Liebsch, B. Doring, F. Moldenhauer. First results of an EC/COLIPA validation project of in vitro phototoxicity testing methods, *ALTEX*, **11**（**1**）: 22–31（1994）

8） S. Onoue, Y. Tsuda. Analytical studies on the prediction of photosensitive/phototoxic potential of pharmaceutical substances, *Pharm. Res*., **23**（**1**）: 156–164（2006）

9） J.H. Epstein. Phototoxicity and photoallergy in man, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **8**（**2**）: 141–147（1983）

10） Y. Seto, S. Onoue, S. Yamada. *In vitro/in vivo* phototoxic risk assessments of griseofulvin based on photobiochemical and pharmacokinetic behaviors, *Eur. J. Pharm. Sci*., **38**（**2**）: 104–111（2009）

11） Y. Seto, R. Inoue, M. Ochi, G. Gandy, S. Yamada, S. Onoue. Combined use of in vitro phototoxic assessments and cassette dosing pharmacokinetic study for phototoxicity characterization of fluoroquinolones, *AAPS J*., **13**（**3**）: 482–492（2011）

12） S. Onoue, M. Kato, R. Inoue, Y. Seto, S. Yamada. Photosafety screening of phenothiazine derivatives with combined use of photochemical and cassette-dosing pharmacokinetic data, *Toxicol. Sci*., **137**（**2**）: 469–477（2014）

13） Y. Seto, H. Ohtake, M. Kato, S. Onoue. Phototoxic Risk Assessments on Benzophenone Derivatives: Photobiochemical Assessments and Dermal Cassette-Dosing Pharmacokinetic Study, *J. Pharmacol. Exp. Ther*., **354**（**2**）: 195–202（2015）

14） Y. Iyama, H. Sato, Y. Seto, S. Onoue. Photochemical and Pharmacokinetic Characterization of Orally Administered Chemicals to Evaluate Phototoxic Risk, *J. Pharm. Sci*., **108**（**3**）: 1303–1308（2019）

15） OECD. Test No. 428: Skin Absorption: *In Vitro* Method.（2004）

16） T. Hatanaka, S. Yoshida, W.R. Kadhum, H. Todo, K. Sugibayashi. *In Silico* Estimation of Skin Concentration Following the Dermal Exposure to Chemicals, *Pharm. Res*., **32**（**12**）: 3965–3974（2015）

17） ROS assay Validation Management Team. REACTIVE OXYGEN SPECIES（ROS）ASSAY TO EXAMINE PHOTOREACTIVITY OF CHEMICALS.（2013）

18） K. Sugibayashi, H. Todo, T. Oshizaka, Y. Owada. Mathematical model to predict skin concentration of drugs: toward utilization of silicone membrane to predict skin concentration of drugs as an animal testing alternative, *Pharm. Res*., **27**（**1**）: 134–142（2010）

19） B. Henry, C. Foti, K. Alsante. Can light absorption and photostability data be used to assess the photosafety risks in patients for a new drug molecule? *J. Photochem. Photobiol. B,* **96**（**1**）: 57–62（2009）

20） S. Onoue, K. Hosoi, S. Wakuri, Y. Iwase, T. Yamamoto, N. Matsuoka, K. Nakamura, T. Toda, H. Takagi, N. Osaki, Y. Matsumoto, S. Kawakami, Y. Seto, M. Kato, S. Yamada, Y. Ohno, H. Kojima. Establishment and intra-/inter-laboratory validation of a standard protocol of reactive oxygen species assay for chemical photosafety evaluation. *J. Appl. Toxicol.*, **33**（**11**）: 1241–1250（2013）

21） S. Onoue, K. Hosoi, T. Toda, H. Takagi, N. Osaki, Y. Matsumoto, S. Kawakami, S. Wakuri, Y. Iwase, T. Yamamoto, K. Nakamura, Y. Ohno, H. Kojima. Intra-/inter-laboratory validation study on reactive oxygen species assay for chemical photosafety evaluation using two different solar simulators, *Toxicol. In Vitro*, **28**（**4**）

: 515–523 (2014)
22) J.D. Bos, M.M. Meinardi. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs, *Exp. Dermatol.*, **9** (**3**) : 165–169 (2000)
23) T. Higuchi. PHYSICAL CHEMICAL ANALYSIS OF PERCUTANEOUS ABSORPTION PROCESS FROM CREAMS AND OINTMENTS. *J. Cosmet. Sci.*, **11** (**2**) : 85–97 (1960)
24) F. Mohd, H. Todo, M. Yoshimoto, E. Yusuf, K. Sugibayashi. Contribution of the Hair Follicular Pathway to Total Skin Permeation of Topically Applied and Exposed Chemicals, *Pharmaceutics*, **8** (**4**) (2016)
25) A. Yamamoto, K. Setoh, M. Murakami, M. Shironoshita, T. Kobayashi, K. Fujimoto, N. Okada, T. Fujita, S. Muranishi. Enhanced transdermal delivery of phenylalanyl-glycine by chemical modification with various fatty acids, *Int. J. Pharm.*, **250**(**1**): 119–128(2003)

プロシアニジン B2 による皮膚炎の治療効果の検証と抗炎症作用のメカニズムの解明

信州大学農学部

田中　沙智

Psoriasis is a chronic, immune-mediated inflammatory skin disease characterized by cutaneous parakeratosis and hyperproliferation of epidermal cells. Psoriasis is a disease caused by infiltration of immune cells into the epidermis and dermis and increased production of inflammatory cytokines. Imiquimod is a low-molecular-weight compound with immunostimulatory activity, and is known to be able to induce psoriasis by applying a cream containing imiquimod to the skin of mice. In this study, we established an imiquimod-induced psoriasis model mouse and verified the preventive effect of EGCG and Procyanidin B2 gallate (PCB2DG) on psoriasis.

When the mouse back skin was treated with imiquimod cream, psoriasis symptom including erythema, thickening and scales were observed on the mouse back skin. These psoriasis symptoms were reduced by administration of EGCG. In addition, histological analysis of the skin showed that hypertrophy of the spinous layer of the epidermis due to the development of psoriasis was reduced by the administration of EGCG. Mouse spleen cells were increased by imiquimod treatment, but decreased by administration of EGCG. Furthermore, the administration of PCB2DG also reduced the symptoms of psoriasis.

These results suggested that we could establish an imiquimod-induced psoriasis model mouse and showed that administration of EGCG or PCB2DG reduced the symptoms of psoriasis. In the future, we would like to evaluate the psoriasis prevention effect of other food-derived polyphenols using imiquimod-induced psoriasis model mice.

1．緒　言

乾癬は、角化細胞の分化不全と過剰増殖を特徴とする慢性皮膚疾患であり、患者の割合は世界人口の約２～３％であると推定される。乾癬の典型的な症状として、皮膚表面がわずかに隆起する肥厚、そこに境界の明瞭な赤い発疹である紅斑ができ、その表面に乾燥した銀白色の角質が付着する鱗屑がある[1, 2]。乾癬の症状が最も顕著に現れる皮膚は、表皮、真皮、皮下組織から構成されており、表皮はさらに基底層、有棘層、顆粒層、角質層に分けることができる。角化細胞は基底層で分裂後、上層に向かって移動しながら有棘細胞、顆粒細胞、角質細胞へと分化し、皮膚から剥離する角化システムによって表皮の機能を維持している[3]。乾癬患者の皮膚において、通常の約 10 倍の速さで角化細胞が分化することにより、角質が剥がれ落ち、角化細胞の核が分解されず角質層に残存する不全角化が起こると同時に、細胞の過剰増殖による有棘層の肥大化が慢性症状として現れる。また、乾癬の特徴として表皮の肥大化に伴い表皮突起が規則的に伸長することが知られている。乾癬の発症原因は特定されていないが、原因のひとつとして遺伝的要因と環境要因が関与しており、免疫応答の中心的役割を担うＴ細胞の機能異常や自己免疫反応により病態が形成されると考えられている[4]。Ｔ細胞のうち、他の免疫細胞に対して活性化の誘導や抗体産生を促すヘルパー Ｔ（Th）細胞として機能するCD4陽性Ｔ細胞は、エフェクター機能の違いによりさらにTh1、Th2、Th17、制御性Ｔ細胞の４つのサブセットに分類される。その中でも乾癬では特にTh17が発症や慢性症状に関与することがわかってきている[5]。

乾癬の治療には紫外線療法やCD4陽性Ｔ細胞やマクロファージの活性化を抑制するシクロスポリン製剤のような免疫抑制剤や、乾癬に関与するサイトカインに作用する抗TNF-α、IL-12、IL-23、IL-17抗体などの生物学的製剤などが使用されており、症状の軽減や早期治療による効果は認められているが乾癬の根治には至っておらず、強い免疫抑制作用による副作用や治療の長期化が問題となっている[6-8]。

乾癬はイミキモドの塗布により誘発されることが知られている[9]。イミキモドは、イミダゾキノリン系の低分子化合物で、樹状細胞やマクロファージが発現するトル様受容体（TLR）７のアゴニストである。イミキモドをマウスの皮膚に塗布することでTLR7に認識され、樹状細胞やマクロファージを活性化させる。それにより、ナイーブヘルパーＴ細胞のTh1への分化を誘導するIL-12やTh17への分化を誘導するIL-6、IL-23などのサイトカインの産生、炎症性サイトカインであるTNF-αの産生誘導、インターフェロン制御因子によるⅠ型インターフェロンの産生が起こる[10-13]。これらのサイトカインによりＴ細胞のTh1、Th17への分化が誘導され、Th1からIFN-γや、Th17からIL-17、IL-22が産生される。IFN-γが角化細胞を活性

Anti-inflammatory effects of Procyanidin B2 on dermatitis in mouse model

Sachi Tanaka

Graduate School of Agriculture, Shinshu University

化し、IL-17やIL-22が角化細胞の増殖を誘導することで皮膚炎症や分化不全が誘導されることが知られている[14]。また、活性化した免疫細胞から産生されたサイトカインによりケモカインが産生され、皮膚への免疫細胞の浸潤が起こる。イミキモドによって誘発された皮膚炎症では、紅斑、角化細胞の過剰増殖による表皮肥厚や分化不全による鱗屑が観察される。これらの症状がヒトにおける乾癬の症状と非常によく似ていることから、イミキモドを用いたマウス乾癬モデルが広く利用されている[15-17]。

乾癬の治療において、副作用の少ない新たな治療法の開発が課題となっており、免疫抑制作用を有する食品由来成分であるポリフェノールが着目されている。乾癬抑制効果をもつ食品由来成分として、マンゴスチン由来ポリフェノールであるイソガルシノールやブロッコリーやケールなどに含まれるフラボノイドであるケンペロールが報告されている[18, 19]。また、緑茶中に最も多く含まれるカテキン類であるエピガロカテキンガレート（EGCG）は抗酸化活性、抗腫瘍効果、抗炎症効果などの生理活性を示すことが知られている[20-22]。そこで本研究では、イミキモド誘発乾癬モデルマウスにEGCGを投与した際の乾癬予防効果について検証を行った。

ポリフェノールの一種でありブドウやカカオ、お茶に含まれるプロシアニジンB2（PCB2）およびPCB2ガレート（PCB2DG）による炎症抑制効果について研究を進めてきた。PCB2の中で、特にガレート基をもつPCB2DGは炎症性T細胞で過剰に産生されるIL-17などのサイトカイン産生を抑えて、抗炎症効果をもつことを報告している[23]。しかしながら、PCB2DGが生体内で炎症を抑制することを確認できていない。そこで、イミキモドで誘導する乾癬のマウスモデルを用いてPCB2DGによる乾癬予防効果を明らかにすることを目的とした。

2. 方　法

2. 1. 実験動物

C57BL/6マウス（雌）はCLEA Japan（Tokyo, Japan）より購入した。マウスは、室温23±2℃、明期12時間、暗期12時間の環境で飼育を行った。飼育は、信州大学動物実験委員会の定める指針に従った（承認番号019023）。

2. 2. イミキモドの塗布による乾癬の誘発およびEGCGおよびPCB2DGの投与

イミキモド誘発乾癬モデルマウスは、マウス背側の皮膚に62.5mgのイミキモド5%を含有するクリーム（BESELNA CREAM 5%, 持田製薬株式会社, Tokyo, Japan）を5日間連続して塗布することで構築した。乾癬モデルマウスにおけるEGCGの効果を評価するために、マウスを無作為に3群に分け、コントロール群（CON, n=3）、PBS投与イミキモド塗布群（IMQ, n=5）、EGCG投与イミキモド塗布群（EGCG, n=4）とした（図1）。PCB2DGの乾癬抑制効果を検証するために、同様にマウスを3群に分けて実験を行った。マウスをイソフルランにより麻酔後、背部の体毛を電気シェーバーで剃毛した。剃毛の翌日からIMQ群は200μLのPBS、EGCG群はEGCG（2.5mg/200μL）、PCB2DG群はPCB2DG（2mg/200μL）毎日経口投与し、剃毛3日後から毎日CON群はワセリン、IMQ群、EGCG群およびPCB2DG群は5%イミキモドクリームを62.5mg塗布した。EGCGは、ナガラサイエンス（Gifu, Japan）より購入し、PCB2DGは信州大学農学部の真壁秀文教授より供与頂いたものを使用した。

2. 3. 乾癬様皮膚炎症の重症度スコア

重症度指数（PASI：Psoriasis Area Severity Index）を用いて背部皮膚の炎症状態を評価した。スコアは炎症面積を考慮せず評価を行った。紅斑、鱗屑および皮膚の厚さは0から4の範囲（0：なし、1：軽度、2：中程度、3：重症、4：極めて重症）で採点した。総合スコアは上記3つの項目の合計（0～12）で表した。

2. 4. 皮膚の組織学的解析

7日間投与した後、マウスを頸椎脱臼により屠殺し、背部の皮膚を採取した。サンプルを4%パラホルムアルデヒドで18時間固定し、1mLのPBS中で保存後、HE染色標本を作成し、光学顕微鏡による組織学的観察に供した。

2. 5. 脾臓細胞の調製

屠殺したマウスから脾臓を摘出してほぐし、脾臓細胞を単離した。その懸濁液を40μmナイロン製セルストレ

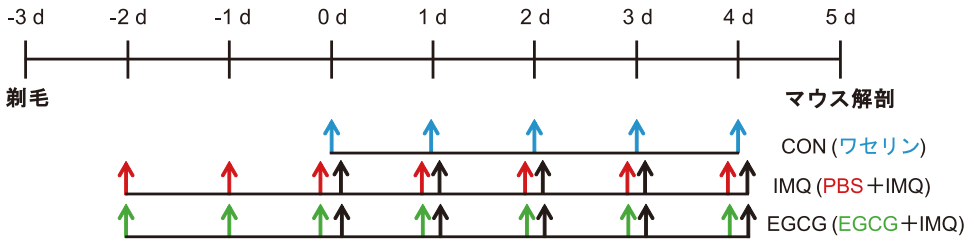


図1　実験スケジュール

ーナー（BD Falcon, Franklin Lakes, NJ）に通した。次に、赤血球を除去するために、0.83% NH_4Cl を含む 0.17 M Tris-HCl 緩衝液（pH7.65）で細胞を処理した。遠心分離後、細胞は 10%FBS とペニシリン G（100 U/mL）、ストレプトマイシン（100 μg/mL）（Sigma, St. Louis, MO）、2-Mercaptoethanol（Sigma）を含む RPMI-1640 培地（Sigma）を加えて再懸濁した。単離した脾臓細胞のうち、8×10^6 cells をフローサイトメトリー解析に用い、残りの細胞を CD4 陽性 T 細胞の単離に使用した。

2. 6. 統計解析

有意差検定は、Student の *t* 検定を用いて行い、有意水準は $P<0.05$ とした。

3. 結　果

3. 1. EGCG 投与乾癬モデルマウスにおける皮膚症状

イミキモド誘導乾癬モデルマウスにおける EGCG の効果を調べるため、マウス背部を剃毛し、翌日から 7 日間毎日 PBS または EGCG を経口投与し、剃毛 3 日後から 5 日間毎日ワセリンまたはイミキモドクリームを背部皮膚に塗布した。マウス皮膚の外観から、IMQ 群で肥厚、鱗屑の症状がみられ、EGCG 群で症状の抑制が確認された（図 2A）。また、皮膚の血管分布を観察したところ、IMQ 群で太い血管が発達しているのに対し、EGCG 群では血管がやや細く、血管拡張が抑制されていることが示された（図 2B）。

乾癬を評価する際に利用される PASI を用いてマウス背部皮膚の炎症状態を評価した。CON 群と比較して IMQ 群、EGCG 群で紅斑・肥厚・鱗屑および総合のスコアの増加がみられ、IMQ 群に比べ EGCG 群でややスコアが低く、特に鱗屑のスコアの増加が大きく抑制されることが確認された（図 3A）。体重増加率は CON 群で変化がなく、IMQ 群、EGCG 群で Day 0 から Day 2 にかけて減少がみられ、その後 IMQ 群で回復がみられたが EGCG 群では回復しなかった（図 3B）。

実験終了時に、マウスの背部皮膚を採取して HE 染色を施し、組織学的解析を行ったところ、IMQ 群で表皮の肥大化と表皮突起の下方への伸長がみられ、EGCG 群で表皮の肥大化および表皮突起の伸長が軽減した（図 4）。以上の結果から、EGCG の経口投与はイミキモド塗布による乾癬様皮膚症状を軽減することが確認された。

3. 2. EGCG 投与乾癬モデルマウスにおける脾臓の重量および細胞数

マウスから脾臓を採取し、重量および細胞数の測定を行ったところ、CON 群と比較して IMQ 群では脾臓が肥大化し、EGCG 群で脾臓の肥大化がやや抑制された（図 5A）。また、IMQ 群で脾臓重量および細胞数が有意に増加し、EGCG 群でそれらが有意に抑制された。（図 5B）。

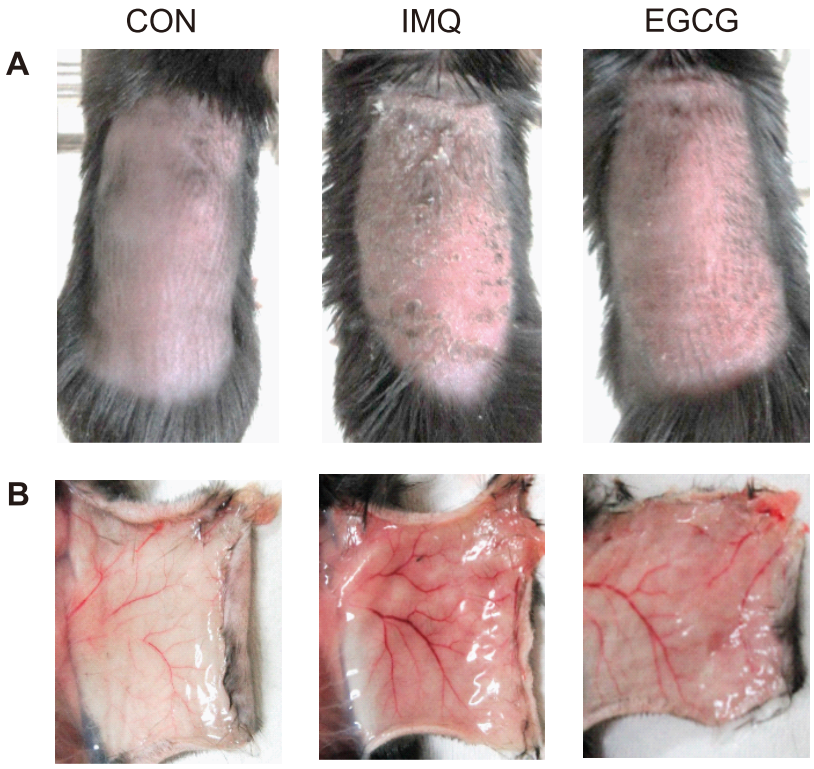


図2　イミキモド誘発乾癬モデルマウス皮膚の外観

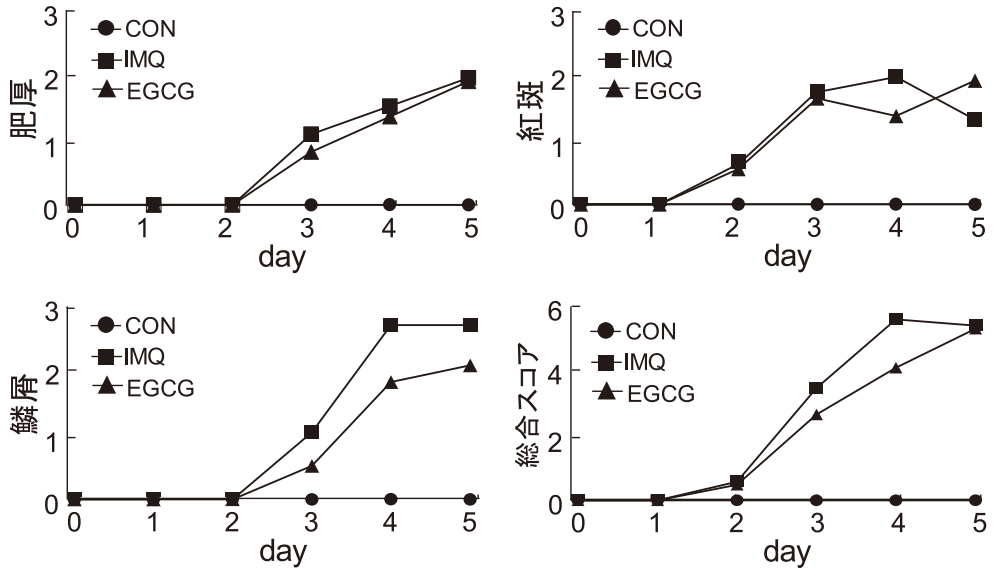


図3　イミキモド誘発乾癬モデルマウス皮膚の重症度スコア

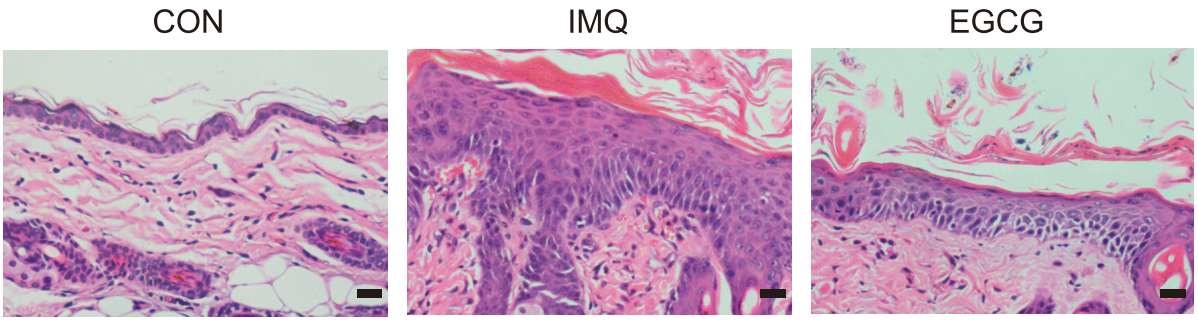


図4　イミキモド誘発乾癬モデルマウス皮膚のHE染色

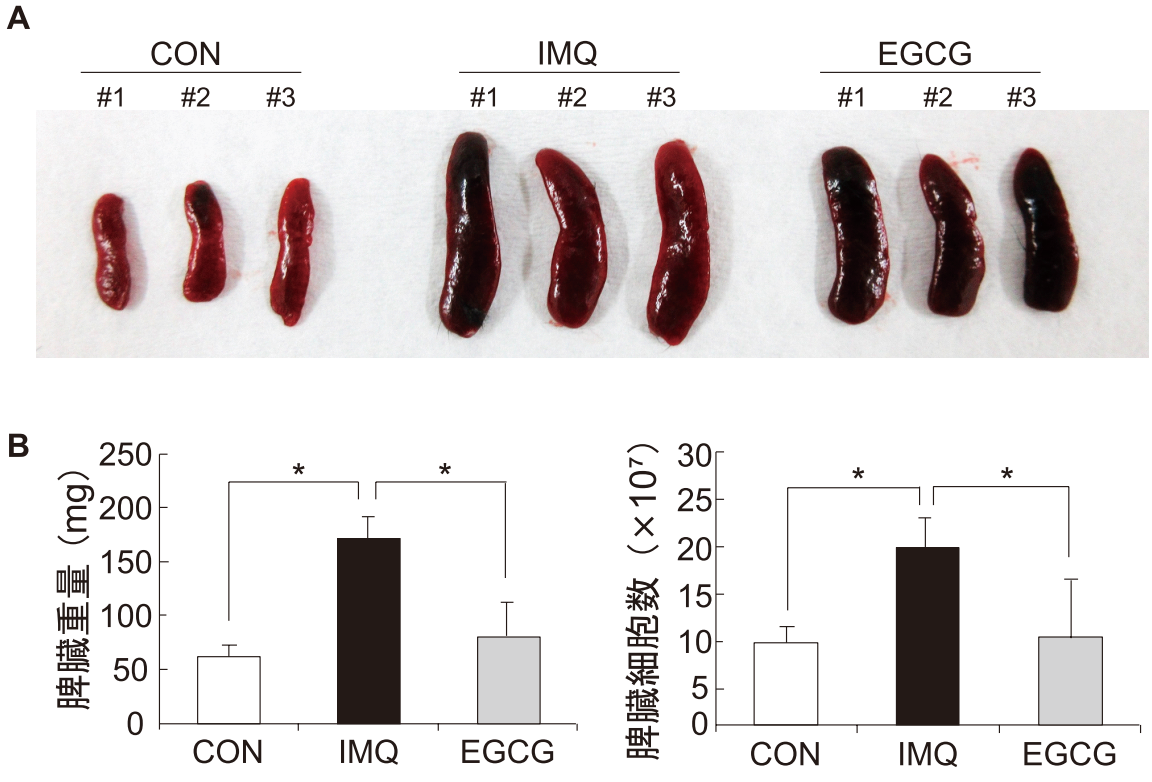


図5　イミキモド誘発乾癬モデルマウス皮膚の脾臓の外観および脾臓重量・細胞数

3. 3. 乾癬モデルマウスにおけるPCB２DGの効果

イミキモド誘導乾癬モデルマウスにおけるPCB2DG（図6A）の効果を調べるため、マウス背部を剃毛し、翌日から７日間毎日PBSまたはPCB2DGを経口投与し、剃毛３日後から５日間毎日ワセリンまたはイミキモドクリームを背部皮膚に塗布した。マウス皮膚の外観から、IMQ群で肥厚、鱗屑の症状がみられ、PCB2DG群で症状の抑制が確認された（図6B）。乾癬を評価する際に利用されるPASIを用いてマウス背部皮膚の炎症状態を評価したところ、IMQ群と比較してPCB2DG投与により紅斑、肥厚、鱗屑および総合のスコアが低下傾向にあった（図6C）。

4. 考　察

本実験において、マウスの背部を剃毛し５％イミキモドクリームを５日間塗布することにより、乾癬の特徴である肥厚、紅斑、鱗屑、表皮の肥大化が確認され、イミキモド誘発乾癬モデルマウスの確立、それを利用した実験系の確立に成功した。また、EGCGおよびPCB2DGの投与により皮膚の乾癬様症状、表皮の肥大化が抑制されることを確認した。

イミキモドを皮膚に塗布することで皮膚に炎症反応が起こり、角化細胞の増殖を促進し、分化異常を引き起こすことが報告されている[15, 16]。また炎症に伴い血管の拡張や毛細血管が増加することも知られており、Th17からのサイトカインが血管増殖因子を活性化することによるものであると考えられている[24]。本実験において、イミキモドの塗布により、紅斑・鱗屑・肥厚の症状および皮膚の血管拡張がみられたことから、イミキモドの塗布により活性化した免疫細胞により乾癬が誘発され、分化したTh17から産生されたサイトカインによる血管増殖因子の活性化によって血管が拡張したと考えられる。また本実験において、EGCGを経口投与することで、皮膚の乾癬様症状が軽減し、皮膚の血管拡張も抑制されることが示された。EGCGは、ナイーブヘルパーT細胞のTh17への分化を抑制することが報告されていることから[25]、EGCGによるナイーブヘルパーT細胞の分化調節作用により皮膚症状および血管拡

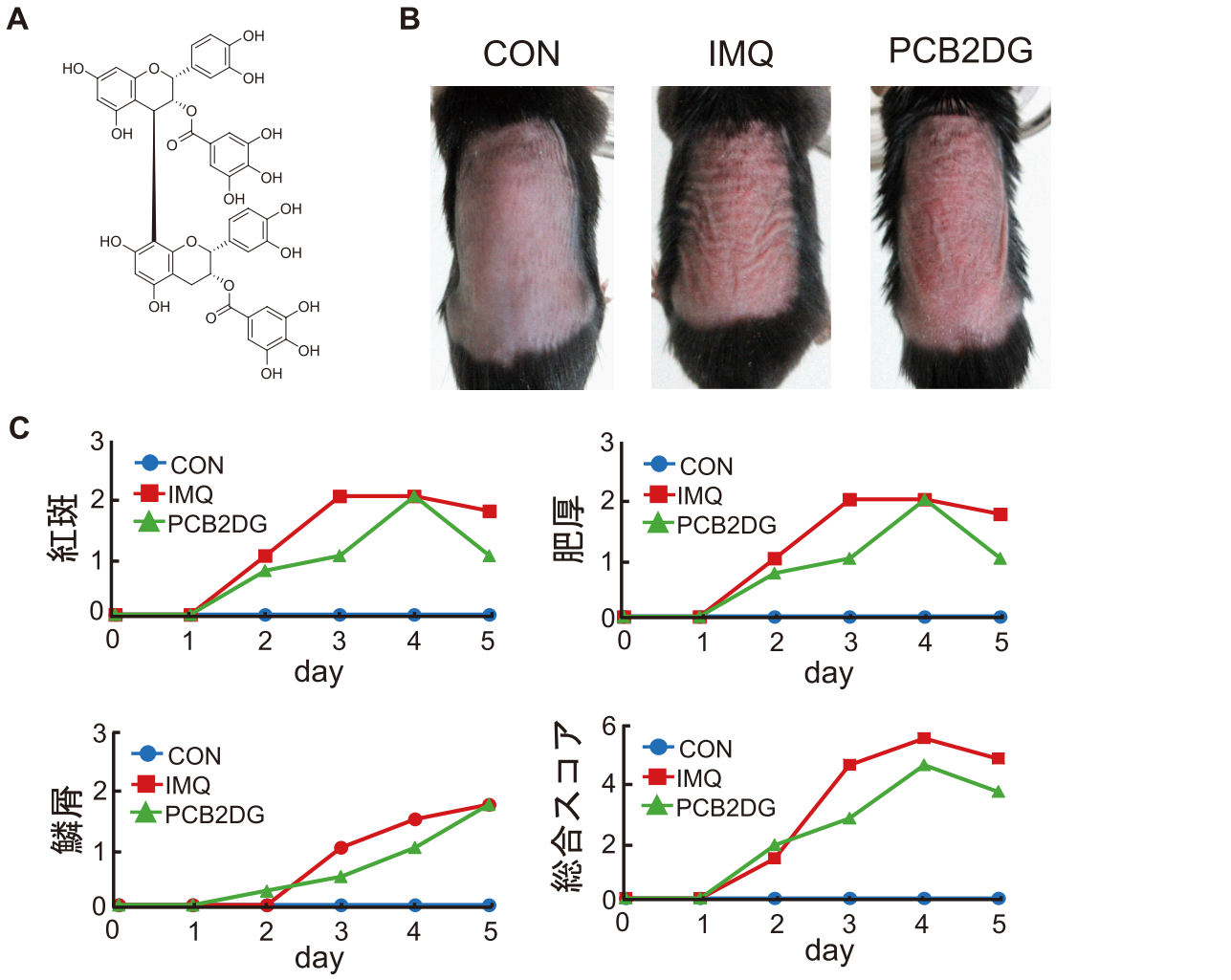


図6　PCB2DGを投与したイミキモド誘発乾癬モデルマウスの皮膚の外観

張が抑制されたと考えられる。

表皮は基底層、有棘層、顆粒層、角質層で構成されており、角化細胞が基底層から角質層へと移動しながら分化することで、表皮の機能が維持される。一方、乾癬を発症した皮膚においては、角化細胞の正常な分化に関与するカスパーゼ14の発現が低下し、角化細胞の分化不全や過剰増殖が起こり、症状として鱗屑、肥厚、紅斑などが現れる[26]。本実験においてPASIスコアを算出した結果、肥厚と鱗屑はイミキモドを塗布してから3日目以降観察され、その後も経時的に悪化したが、紅斑はイミキモドを塗布して2～3日目で一時的に悪化し、その後は徐々に改善されることが示された。一方、EGCGの投与により、肥厚と紅斑のスコアは個体差があったもののIMQ群と比較してやや低い値を示し、鱗屑と総合スコアはEGCG群で顕著に低い値を示し、症状の軽減が確認された。EGCGはカスパーゼ14合成促進作用および活性化作用を有し、角化細胞の正常な分化を誘導することが報告されている[27]。そのため、EGCGを投与することによってカスパーゼ14の合成が促進され、角化細胞の分化不全や過剰増殖を抑制することで、皮膚症状を軽減したと考えられる。

Th17の分化に関して、炎症に伴い樹状細胞やマクロファージから産生されるIL-6によりナイーブT細胞のSTAT3が活性化し、転写因子であるRORγtの発現によってTh17は分化する。また、Th17はIL-17やIL-22を産生し、IL-22もSTAT3を活性化し、乾癬症状の悪化を引き起こすことが報告されている[17]。また、STAT3は角化細胞の増殖シグナルとしても知られている[28]。皮膚のHE染色の結果、イミキモド誘発乾癬モデルマウスにおいて表皮の肥大化および表皮突起の伸長が観察され、EGCGの投与によりそれらが抑制されることが示された。イミキモドの塗布によりIL-6が産生され、STAT3が活性化したことでTh17が増加し、IL-22産生量の増加に伴うSTAT3のさらなる活性化により、角化細胞の肥大化が誘導されたと考えられる。また、EGCGはSTAT3シグナルを阻害する効果をもつことが報告されていることから[29, 30]、EGCGの投与によりSTAT3シグナルの阻害およびTh17の分化抑制により表皮の肥大化が抑制されたと考えられる。

一般的に全身性の炎症反応によって脾臓が肥大化することが知られており、イミキモド誘発乾癬モデルマウスにおいても脾臓の肥大化が報告されている[5]。本実験において、イミキモドの塗布により脾臓が肥大化し、脾臓重量、脾臓細胞数が有意に増加したことから、全身性の炎症反応が起こったと考えられる。また、EGCGは抗炎症作用を有することが報告[21]されていることからEGCGの抗炎症作用により全身性の炎症反応が抑制され、脾臓の肥大化が抑制されたと予想される。

これまでに、T細胞を刺激した条件下でPCB2DGを添加したところ、IL-17やTNF-α、IL-6などのサイトカイン産生を抑えることを報告している[23]。また、PCB2DGはLPS刺激で誘発する炎症性サイトカインの産生を抑えることも確認している。そのため、PCB2DGの投与によるイミキモド誘発乾癬の抑制効果のメカニズムとしては、IL-17や炎症性サイトカインの低下によるものであると考えられる。今後は、PCB2DGの乾癬抑制効果に関わるサイトカイン産生の抑制について、マウスの脾臓や皮膚組織で、サイトカインmRNA発現ならびに免疫組織学的解析を実施することにより、詳細を明らかにする必要がある。

5．総　括

本実験で確立したイミキモド誘発乾癬モデルマウスの解析およびEGCGおよびPCB2DGによる乾癬抑制作用の検証により、過去の知見と同様の結果が得られたことから、イミキモド誘発乾癬モデルマウスを用いた実験系の確立に成功した。この実験系を用いて、ポリフェノールをはじめとする様々な食品由来成分による乾癬への影響を評価することにより、過剰な免疫反応や慢性炎症などを特徴とする皮膚疾患を改善する成分の発見やメカニズムの解明、それを利用した機能性食品の開発が期待される。

謝　辞

PCB2DGをご供与頂きました信州大学農学部の真壁秀文教授に深く感謝申し上げます。また、本研究の遂行にあたり、ご援助を賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深く感謝申し上げます。

（引用文献）

1）Rosa P, Deborah P.M. S, Christopher E.M. G, Darren M. A. Global Epidemiology of Psoriasis: A Systematic Review of Incidence and Prevalence. Journal of Investigative Dermatology, 2013, 133, 2, 377-85.

2）Boehncke WH, Schon MP. Etiology and Pathogenesis of Psoriasis. PlumX Metrics, 2015, 386, 983-94.

3）Vanessa LP, Karen Y, Brian JZ, Katherine LJ, Paul AK. Genetic pathways in disorders of epidermal differentiation. Trends in Genetics, 2013, 29, 1, 31-40.

4）Michelle A. L, Anne M. B, James G. K. Pathogenesis and therapy of psoriasis. Nature, 2007, 445, 866-73.

5）Leslie F, Sabine M, Jane SAV, Marius K, Louis B, Jon DL, Ferry C, Anne-MM, Edwin F, Errol PP, Erik L. Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis. J Immunol ,2009, 182, 9, 5836-45.

6）Papp KA, Tyring S, Lahfa M, Prinz J, Griffiths CEM, Nakanishi AM, Zitnik R, Van De Kerkhof PCM.

A global phase III randomized controlled trial of etanercept in psoriasis: safety, efficacy, and effect of dose reduction. British journal of Dermatology, 2005, 152, 6, 1304-12

7) Mark L, Bruce S, Alan M, Kenneth G, Jolanta W, Dr.Med., Lluis P, Kim P, Lynda S, Darryl T, Francisco K, April W. A, Georg S. Phase 3 Studies Comparing Brodalumab with Ustekinumab in Psoriasis. N Engl J Med, 2015, 373, 1318-28.

8) Kenneth BG, Andrew B, Kim AP, Richard GL, Thomas L, Mamitaro O, Kristian R, David A, Susan GB, Daniel KB, Gregory SC, Janelle E. Phase 3 Trials of Ixekizumab in Moderate-to-Severe Plaque Psoriasis. N Engl J Med, 2016, 375, 345-56.

9) Wu, JK, Siller G, Strutton G. Psoriasis induced by topical imiimod. Australas. J. Dermatol. 2004, 45, 47-50.

10) Gilliet M, Conrad C, Geiges M, Cozzio A, Thurlimann W, Burg G, Nestle FO, Dummer R. Psoriasis triggered by Toll-like receptor 7 agonist imiquimod in the presence of dermal plasmacytoid dendritic cell precursors. Arch. Dermatol, 2004, 140, 1490-95.

11) Palamara F, Meindl S, Holcmann M, Luhrs P, Stingl G, Sibilia M. Identification and characterization of pDC-like cells in normal mouse skin and melanomas treated with imiquimod. J. Immunol, 2004, 173, 3051-61.

12) Schon MP, Schon M. Imiquimod: mode of action. Br. J. Dermatol. 2004, 157, 8-13.

13) Gibson SJ, Lindh JM, Riter TR, Gleason RM, Rogers LM, Fuller AE, Oesterich JL, Gorden KB, Qiu X, McKane SW. Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod. Cell Immunol, 2002, 218, 74-86.

14) Katia B, François-X. B, Martine G, Austin L. G, Jean-C. L, Franck M. IL-22 Inhibits Epidermal Differentiation and Induces Proinflammatory Gene Expression and Migration of Human Keratinocytes. J Immunol, 2005, 174, 6, 3695-702.

15) Fujisawa H, Shivji G. M, Kondo S, Wang B, Tomai M. A, Miller R. L, Sauder D. N. Effect of a novel topical immunomodulator, S-28463, on keratinocyte cytokine gene expression and production. J. Interferon Cytokine Res, 1996, 16, 555-59.

16) Kono T, Kondo S, Pastore S, Shivji GM, Tomai MA, McKenzie RC, Sauder DN. Effects of a novel topical immunomodulator, imiquimod, on keratinocyte cytokine gene expression. Lymphokine Cytokine Res, 1994, 13, 71-76.

17) Lowes, Bowcock MA, Krueger AM. Pathogenesis and therapy of psoriasis. Nature, 2007, 445, 866-873.

18) Shanzao C, Kesheng H, Hu L, Juren C, Yanfang Y, Hezhen W, andQun W. Isogarcinol Extracted from Garcinia mangostana L. Ameliorates Imiquimod-Induced Psoriasis-like Skin Lesions in Mice. J. Agric. Food Chem. 2017, 65, 4, 846-857.

19) Liu C, Liu H, Lu C, Deng J, Yan J, Chen H, Wang Y, Liang C.L, Wei J, Han L, Dai Z. Kaempferol attenuates imiquimod-induced psoriatic skin inflammation in a mouse model. British Society for Immunology, 2019, 198, 3, 403-15.

20) Katiyar SK, Afaq F, Perez A, et al. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress. Carcinogenesis, 2001, 22, 2, 287-94.

21) Dayong W, Junpeng W, Munkyong P, Simin N.M. Green tea EGCG, T cells, and T cell-mediated autoimmune diseases. Molecular Aspects of Medicine, 2012, 33, 1, 107-18.

22) Meeran SM, Akhtar S, Katiyar SK. Inhibition of UVB-induced skin tumor development by drinking green tea polyphenols is mediated through DNA repair and subsequent inhibition of inflammation. J Invest Dermatol, 2009, 129, 5, 1258-70.

23) Tanaka S, Furuya K, Yamamoto K, Yamada K, Ichikawa M, Suda M, Makabe H. Procyanidin B2 gallates inhibit IFN-γ and IL-17 production in T cells by suppressing T-bet and RORγt expression. Int Immunopharmacol. 2017 44, 87-96.

24) Azael TC, Isaí MT, Sandra RM, Fernando GC, Juan C, Cancino-D, Ernesto AVS, Mario E. Cross Talk between Proliferative, Angiogenic, and Cellular Mechanisms Orchestred by HIF-1α in Psoriasis. Mediators of Inflammation, 2015, 607363, 11.

25) Dayong W, Junpeng W, Munkyong P, Simin NM. Green tea EGCG, T cells, and T cell-mediated autoimmune diseases. Molecular Aspects of Medicine, 2012, 33, 107-18.

26) Lippens S, Kockx M, Knaapen M, Mortier L, Polakowska R, Verheyen A, Garmyn M, Zwijsen A, Formstecher P, Huylebroeck D, Vandenabeele P, Declercq W. Epidermal differentiation does not involve the pro-apoptotic executioner caspases, but is associated with caspase-14 induction and processing. Cell Death & Differentiation, 2000, 7, 1218-24.

27) Stephen H, Douglas D, James B, Douglas S. Walsh, Joseph W, Haiyan Q, Julia W, Henna P, George S, Wendy B. Bollag. Green tea polyphenol induces caspase 14 in epidermal keratinocytes via MAPK pathways and reduces psoriasiform lesions in the flaky skin mouse model. Experimental Dermatology, 2007, 678-84.

28) Shigetoshi S, Keith SC, Steve C, John C, Mary P, Kaoru K, Satoshi I, Brian J N, John D G. Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. Nature Medicine, 2005, 43-49.

29) Gyuman P, Byung S Y, Jai H M, Bona K, Eun K J, Sejong O, Hyunggee K, Hea J S, Joo Y N, ChilHwan O, Seungkwon Y. Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-Gallate Suppresses Collagen Production and Proliferation in Keloid Fibroblasts via Inhibition of the STAT3-Signaling Pathway. Elsevier, 2008, 128, 10, 2429-41.

30) Yang W, Xuequn R, Chaoyang D, Lu Y, Erfu Y, Tao G, Yanmin L, Marvin X X. Mechanism of the inhibition of the STAT3 signaling pathway by EGCG. Oncology Reports, 2013, 30, 6, 1021-335

皮膚細胞を保護するタンパク質の分泌機構の解明と分泌促進因子の探索

同志社大学生命医科学部
野口　範子

PARK 7/DJ-1 is a multifunctional protein which is involved in gene transcription regulation and anti-oxidative defense. DJ-1 plays an important role in protection against UV irradiation and oxidative stress in the skin. Although DJ-1 lacks the secretory signal sequence, it is secreted and plays important physiological and pathophysiological roles. Whereas secretory proteins lacking the endoplasmic reticulum-targeting signal sequence are secreted from cells by the unconventional secretion mechanism, the specific processes responsible for DJ-1 secretion across the plasma membrane have remained unclear. In the present study, we found that DJ-1 secretion was increased by treatment with 6-hydroxydopamine (6-OHDA) via the unconventional secretory pathway in human neuroblastoma SH-SY5Y cells and mouse embryonic fibroblast (MEF) cells. We also found that 6-OHDA-induced DJ-1 secretion was suppressed in *Atg5*-, *Atg9*-, or *Atg16l1*- deficient MEF cells or ATG16L1 knockdown SH-SY5Y cells, indicating that the autophagy-based unconventional secretory pathway is involved in DJ-1 secretion. We moreover observed that 6-OHDA induced decrease in glutathione levels, which was suppressed by pretreatment with antioxidant N-acetyl-L-cysteine (NAC), and that NAC treatment suppressed autophagy and DJ-1 secretion. We also observed that 6-OHDA-induced autophagy was associated with activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) and ULK1 (unc-51 like autophagy activating kinase 1) via a pathway which was independent of mechanistic target of rapamycin kinase (mTOR). Collectively these results suggest that 6-OHDA enhances oxidative stress followed by AMPK-ULK1 pathway activation and induction of secretory autophagy for the unconventional secretion of DJ-1.

1．緒　言

DJ-1 は生体の酸化ストレス防御に重要な因子であり、DJ-1 の発現量が低下すると細胞は酸化ストレスに脆弱になる。逆に発現量が増加すると、高レベルの酸化ストレス下でも細胞は生存できる。また、DJ-1 は酸化ストレス下で自身が酸化され、酸化DJ-1 を生じる。DJ-1 は全身のどの細胞にも広く発現分布するタンパク質であり、その機能にはほかにも、転写調節能、シャペロン活性、プロテアーゼ活性等、多機能タンパク質として知られる。さらにDJ-1 をコードする遺伝子PARK7 は家族性パーキンソン病の原因遺伝子として注目されており[1]、国内外で盛んに研究されている。パーキンソン病の発症・進展には酸化ストレスが関与すると考えられているが、DJ-1 はドーパミン産生神経細胞の酸化ストレスの緩和に働き、その機能喪失はパーキンソン病の発症に関与すると考えられている。

皮膚は、紫外線（UV）等の外因性因子により障害を受けやすく、酸化ストレス障害の多い臓器の一つに挙げられる。くり返しUV を浴びることで皮膚老化が促進するが、UV により発生した活性酸素種（Reactive Oxygen Species：ROS）は、脂質の過酸化やタンパク質の変性等の酸化障害を引き起こす。これまで我々は、角層中でDJ-1 が高濃度存在する細胞はUV や活性酸素による障害に強い抵抗性を示すことを明らかにしてきた[2]。さらにヒトの皮膚レベルで観察したところ、角層中DJ-1 レベルの高い被験者のほうが、UV により変化した皮膚の色素沈着が早期に回復し、赤みや紅斑が早期に低下することを見出しており、皮膚におけるDJ-1 レベルが酸化ストレス耐性を示す優れたバイオマーカーとなることが明らかとなっている[2]。

DJ-1 は主に細胞質に存在するが、細胞外に分泌されることも知られている。細胞外では抗酸化因子やシグナル伝達等のはたらきを示すと考えられている。通常、細胞外に分泌されるタンパク質はアミノ末端側にシグナル配列をもち、小胞体やゴルジ体を経由して、小胞輸送により細胞外へと分泌される典型的経路をたどる。一方で、サイトカインであるインターロイキン-1β（IL-1β）やIL-12 等のシグナル配列をもたない細胞質局在タンパク質も、細胞外へ分泌されることが知られており、これらの分泌経路は非典型的経路と呼ばれている[3, 4]。非典型的経路により分泌されるタンパク質には生理的に重要な役割を果たすタンパク質が多く含まれているにもかかわらず、水溶性である細胞質局在タンパク質がどのように脂質二重層である細胞膜を通過して細胞外に分泌されるか、その分泌機構は未知な点が多い。DJ-1 はシグナル配列をもたないことから、小胞を介さない非典型的な経路によって分泌されると考えられるが、その分泌機構は不明であった。そこで本研究において我々は、皮膚の酸化ストレス防御において重要な役割を果たすと考えられるDJ-1 の細胞外分泌メカニズムについて解析することを目的とした。また、その分泌を促進する化合物を見出すことで、細胞防御タンパク質の分泌促進による皮膚の健康増進法を開発することを目指した。

The secretion mechanism of skin cell-protecting protein
Noriko Noguchi
Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University

2．方　法

2．1．細胞とその培養法

ヒト神経芽細胞種（SH-SY5Y）細胞はECACCから購入した。マウス野生型MEF細胞およびatg5$^{-/-}$MEF細胞[5]は、水島昇教授（東京大学）からご供与いただいた。atg9$^{-/-}$とatg16l1$^{-/-}$MEF細胞[6,7]は、審良静男教授（大阪大学）からご供与いただいた。基礎培地としてDMEM/F12培地を用い、10% FBSと抗生物質を添加した。培養は37℃、5% CO_2環境下で行った。

2．2．細胞処理と分泌評価法

分泌誘導刺激として、6-hydroxydopamine（6-OHDA）を用いた。6ウェルプレートで培養した細胞に対して、50-100μM 6-OHDAで3時間処理し、さらにserum-free培地で2時間培養した。N-acetylcysteine（NAC）処理は、2mM NACで2時間前処理を行った。処理後、細胞と培養上清をそれぞれ回収し、細胞から可溶化バッファー（10mM Tris-HCl, pH7.4, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 5mM EDTA-2Na, protease inhibitor cocktail）を用いて、whole cell lysateを回収した。培養上清は、遠心後、回収した上清1mLに1mgのBSAと終濃度10% Trichloroacetic acid（TCA）を加え、TCA沈殿により濃縮を行い、サンプルバッファーに溶解し、SDS-PAGE用サンプルとした。タンパク質はBCA法により定量し、SDS-PAGE、二次元PAGE、ウエスタンブロット法により解析した。また、Lactate dehydrogenase（LDH）法を用いて、培養上清中のLDH活性を測定することにより、細胞膜破綻の判定を行った。

2．3．細胞内還元型Glutathione（GSH）量の測定

6ウェルプレートで培養した細胞に対して、刺激を行い、回収した細胞を0.2M過塩素酸溶液で溶かし、氷上で30分インキュベートした。遠心後、上清を1M CH_3COONaを用いてpH3付近になるよう調整し、フィルターろ過後、SC-5ODSカラムを用いてHPLCにより定量した。エレントとして99% 0.1M sodium phosphate buffer, pH2.5, 1% methanol, 100mg/L sodium octanesulfonate, and 50mg/L EDTA-2Na溶液を用い、標品として還元型GSHを用いた。

2．4．免疫細胞染色、電子顕微鏡観察

カバーガラス上で培養した細胞を、冷メタノールで固定、BSAでブロッキング後、一次抗体として抗DJ-1抗体、抗LC3抗体、二次抗体としてAlexa標識抗体を用いて染色後、Zeiss LSM710共焦点顕微鏡を用いて、細胞を観察した。また、電子顕微鏡観察の場合、細胞は2%グルタルアルデヒドで固定し、JEM-1200 EXによるTEM観察を行った。

3．結　果

3．1．6-OHDA処理は、酸化ストレス依存的にDJ-1の分泌を促す

細胞からの分泌メカニズムを明らかにするため、評価系が確立しているSH-SY5Yを用いた。分泌誘導刺激として、内在性のカテコールアミン作動性神経毒であり、パーキンソン病発症モデル化合物として広く用いられている6-OHDAを用いた。その結果、6-OHDAの濃度依存的（0-100μM）にDJ-1の細胞外分泌が亢進した（図1A）。また、6-OHDA刺激下においても、通常小胞体に存在するribophorin 1（RPN1）（図1A）や細胞質に存在するLDH

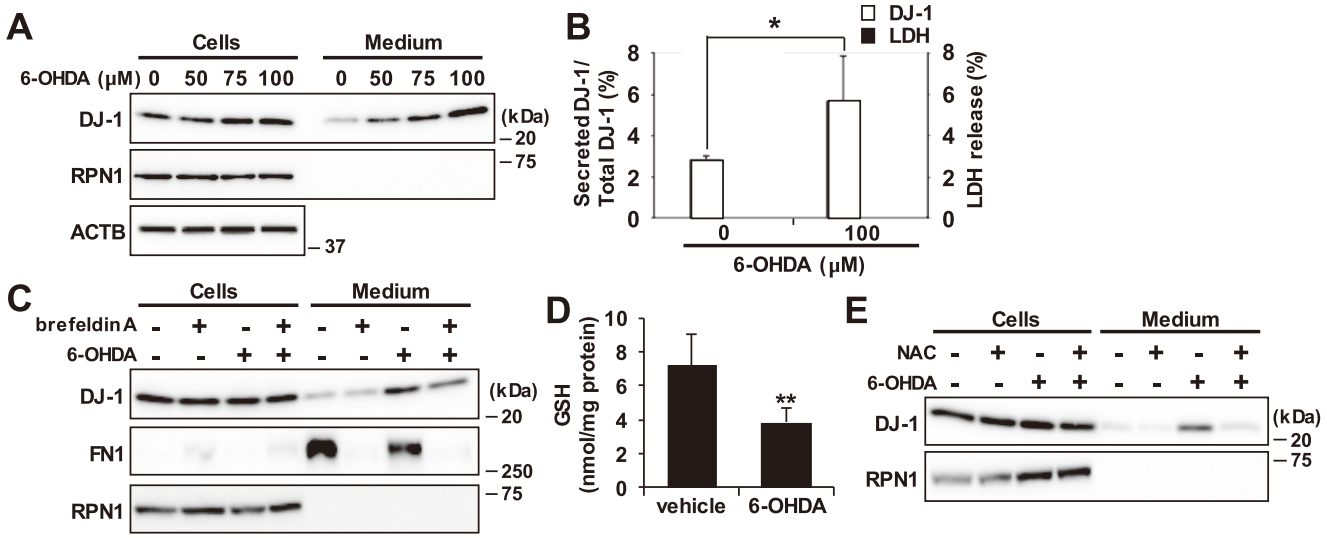


図1（A）SH-SY5Y細胞における6-OHDA刺激によるDJ-1分泌への影響。（B）6-OHDA刺激によるDJ-1分泌とLDH releaseに対する影響。n=3; mean±S.D.; *, p<0.05.（C）6-OHDA誘導性DJ-1分泌亢進に対するbrefeldin Aの影響。（D）細胞内GSH含量。n=5; mean±S.D.; **, p<0.01.（E）6-OHDA誘導性DJ-1分泌亢進に対するNACの影響。

活性の培養上清中での上昇が認められなかったことから（図1B）、DJ-1分泌が膜破綻によるものではないことが確認された。分泌経路について、典型的分泌経路の阻害剤であるBrefeldin Aを用いて解析したところ、Brefeldin Aの共処理は、6-OHDA誘導性のDJ-1分泌に影響を与えなかった一方で、典型的経路により分泌されることが知られているfibronectin 1（FN1）の分泌は顕著に減少していたことから、DJ-1は非典型的経路により分泌されていることが明らかとなった（図1C）。

6-OHDAは速やかにH_2O_2と6-OHDA quinoneに分解され、細胞内酸化ストレスを上昇させることが知られていることから、細胞内のGSH濃度を測定した。その結果、100μM 6-OHDA刺激により、GSH濃度が有意に減少していることを確認した（図1D）。そこで細胞内GSH濃度を増加させることが可能なN-acetyl cysteine（NAC）で前処理を行うと、6-OHDAにより亢進したDJ-1の分泌が抑制された（図1E）。以上の結果から、6-OHDAによる酸化ストレスの上昇がDJ-1の分泌を亢進させることが示唆された。

3．2．DJ-1の分泌を促す6-OHDA刺激は、オートファジーを誘導する

さらに詳細な6-OHDA誘導性のDJ-1分泌機構を明らかにするため、非典型的な分泌機構への関与が指摘されているオートファジーに着目した。オートファジー進行のマーカーとしてLC-3のI型からII型への変化を解析したところ、6-OHDAの濃度依存的にLC3-IIが増加していることが確認された（図2A）。そこでDJ-1分泌に対するオートファジーの関与を明らかにするため、オートファジー研究でよく用いられている野生型MEF細胞に6-OHDA刺激を行い、DJ-1の分泌に対する影響を調べた。その結果、6-OHDA濃度依存的にDJ-1の分泌が亢進した（図2B）。また、培養上清中のLDH活性の上昇は起きていなかった（data not shown）。さらに75μM 6-OHDA刺激で、LC3-II型の増加が確認された（図2C）。そこで、電子顕微鏡観察を行ったところ、6-OHDA刺激を加えた細胞では、隔離膜やオートファゴソーム、オートリソソームと考えられる構造が観察された（図2D）。また、蛍光顕微鏡を用いて免疫細胞染色を行ったところ、6-OHDA刺激によりDJ-1とLC3が共局在することが観察された（図2E）。以上の結果から、DJ-1の分泌を促す6-OHDA刺激下では、オートファジーも誘導されていることが明らかとなった。

3．3．DJ-1の分泌は、オートファジー欠損MEF細胞で抑制される

次にDJ-1分泌に対するオートファジーの関与を明らかにするため、オートファジー進行に必要な因子であるAtg5、Atg9、Atg16L1をそれぞれ欠損したMEF細胞を用いて、6-OHDAの効果を検証した。その結果、野生型（WT）細胞と比べ、Atg5欠損細胞（図3A）やAtg9、Atg16L1欠損細胞（data not shown）において、LC3-II型が減少するとともに、6-OHDA刺激によるDJ-1の

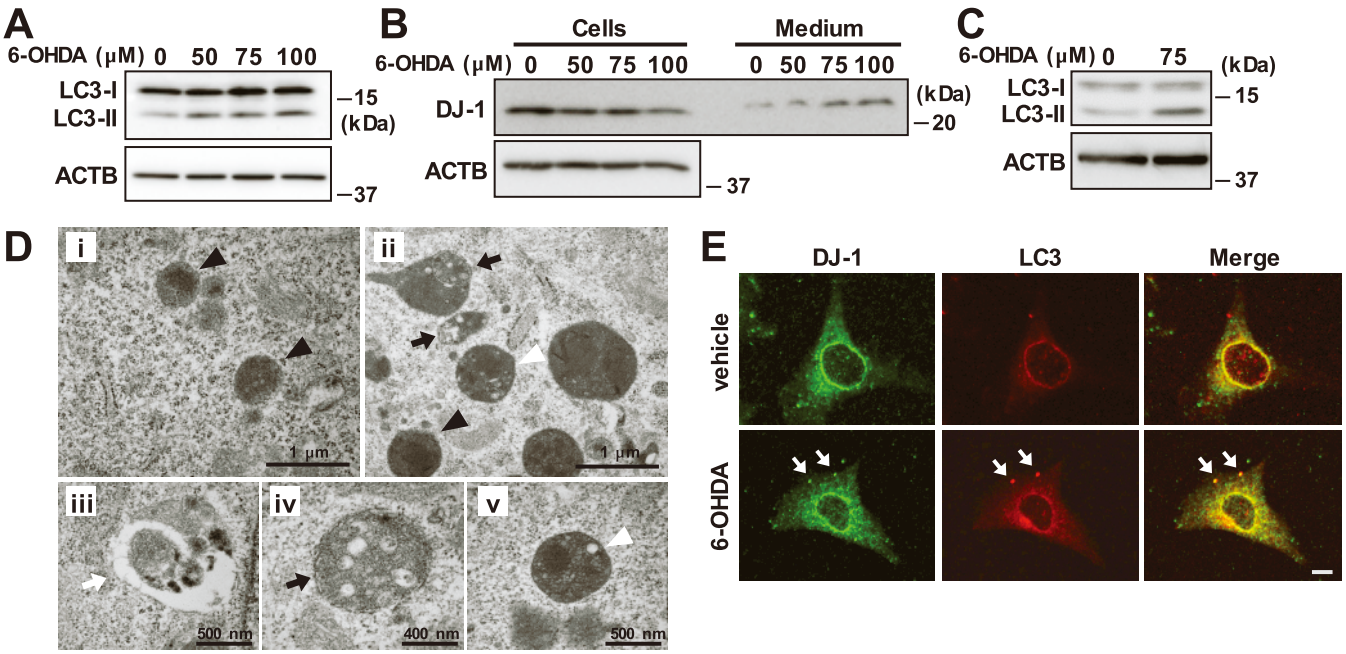


図2（A）SH-SY5Y細胞における6-OHDA 刺激によるLC3への影響。（B、C）MEF細胞における6-OHDA刺激によるDJ-1分泌（B）、LC3（C）への影響。（D）MEF細胞における6-OHDA刺激時の電子顕微鏡観察。i：コントロール刺激、ii-v:6-OHDA刺激、iii隔離膜、iv:オートファゴソーム、v:オートリソソーム。（E）MEF細胞における6-OHDA刺激時の免疫細胞染色。

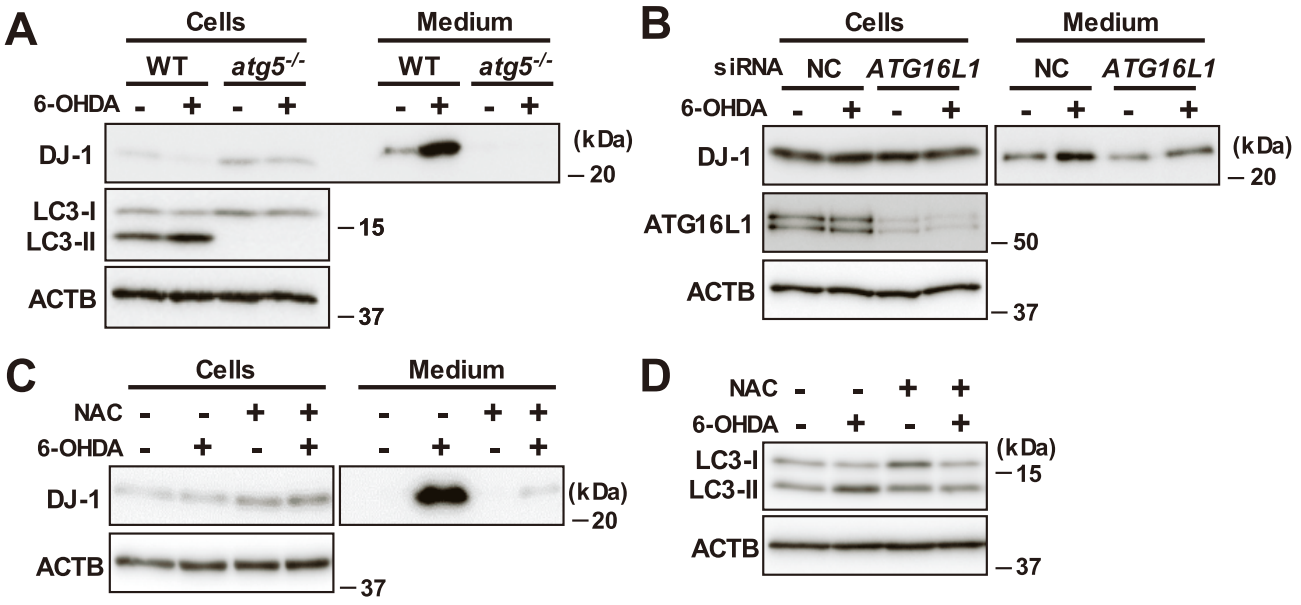


図3（A）WTおよびatg5$^{-/-}$MEF細胞における6-OHDA 刺激によるDJ-1分泌への影響。（B）SH-SY5Y細胞におけるATG16L1ノックダウンによるDJ-1分泌への影響。（C、D）WT MEF細胞における6-OHDA誘導性DJ-1分泌亢進（C）、LC3（D）に対するNACの影響。

分泌亢進が観察されなかった。さらに、siRNAによりATG16L1をノックダウンしたSH-SY5Y細胞においても、同様に6-OHDA誘導性DJ-1分泌が抑制された（図3B）。これらの結果から、オートファジーの進行が、6-OHDA誘導性のDJ-1非典型的分泌に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

また、MEF細胞においても、NACの前処理は6-OHDA誘導性DJ-1分泌亢進を抑制し（図3C）、LC3-II型の増加も抑制していた（図3D）ことから、酸化ストレスの上昇が、オートファジーの誘導やDJ-1の分泌に関与していることが明らかとなった。

3．4．AMPKとULK1の活性化が、6-OHDA誘導性のオートファジーやDJ-1分泌亢進に重要である

そこで6-OHDAによる酸化ストレスの上昇が、なぜオートファジーを誘導するのか明らかにするために、オートファジーのシグナル伝達経路と酸化ストレスの双方に含まれる制御因子であるAMP活性化プロテインキナーゼ（AMPK）とその下流のunc-51 like autophagy activating kinase 1（ULK1）の活性化（リン酸化）、およびオートファジーの負の制御因子であるmechanistic target of rapamycin kinase（mTOR）の活性に着目した。その結果、比較対象として用いたmTORの阻害剤であるrapamycin処理は、AMPKやULK1のリン酸化に影響を与えずに、mTORの標的であるp70S6Kのリン酸化を抑制した（図4A）。一方で6-OHDA刺激は、AMPKのThr172のリン酸化とULK1のSer555のリン酸化を誘導したが、p70S6Kのリン酸化には影響していなかった。さらにNAC前処理はAMPKのリン酸化を抑制したことから、6-OHDA誘導性酸化ストレスがmTOR非依存的にAMPK、ULK1のリン酸化を引き起こしていることが示された（図4B）。またAMPKの活性化は、AMP：ATP比により調節されていることから、AMPとATPレベルを解析したところ、6-OHDA刺激はAMP:ATP比を上昇させていた（図4C）。

次に6-OHDA誘導性オートファジーやDJ-1の分泌に対するULK1阻害剤MRT68921の効果を検討した。その結果、MRT68921の共処理は、6-OHDAによるLC3-II型の増加を抑制するとともに（図4D）、DJ-1の分泌亢進も抑制した（図4E）。これらの結果から、AMPK-ULK1経路の活性化が6-OHDA誘導性のオートファジーやDJ-1の分泌亢進に関与していることが示された。

3．5．トレハロースはオートファジーやDJ-1分泌を促す

最後に6-OHDA以外の刺激でもDJ-1の分泌が亢進するか検証した。天然の糖質であり皮膚の保湿効果があることが知られるトレハロースは、AMPK-ULK1経路を活性化し、mTOR非依存的にオートファジーを誘導することが知られていること[8, 9]から、DJ-1の分泌に対する効果を検討した。その結果、トレハロース処理は濃度依存的にLC3-II型の増加を誘導し（図5A）、200mMトレハロースは6-OHDAと同程度にDJ-1の分泌を亢進した（図5B）。

4．考　察

本研究ではDJ-1の分泌メカニズムを明らかにするため

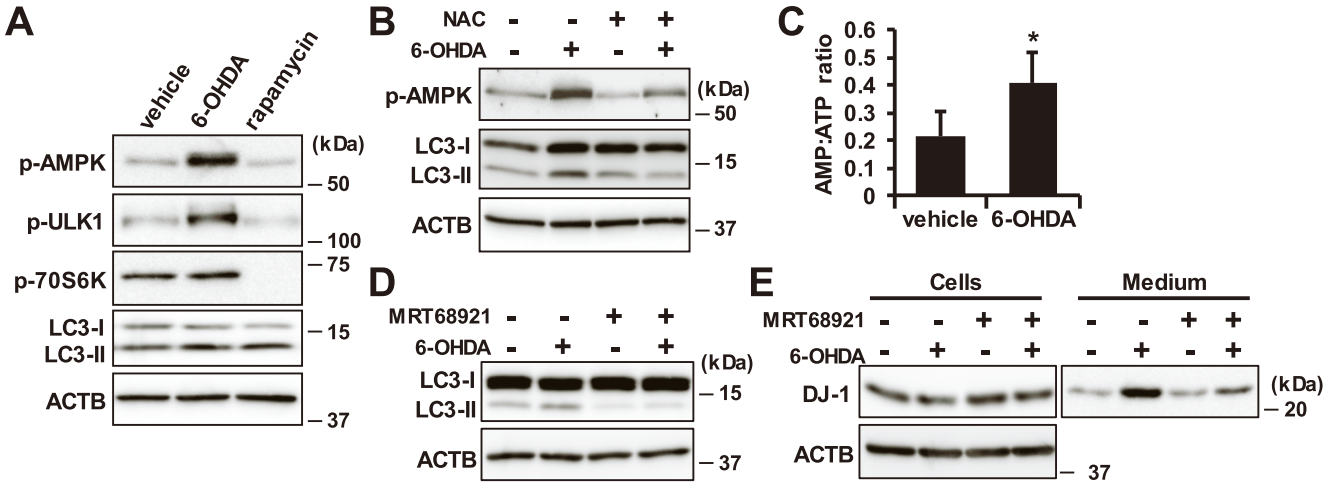


図4（A）WT MEF細胞における6-OHDA 刺激によるAPMK、ULK1、p70S6Kのリン酸化への影響。（B）WT MEF細胞における6-OHDA とNAC共処理によるAMPKのリン酸化とLC3に対する影響。（C）WT MEF細胞における細胞内AMP:ATP比。n = 3; mean ± S.D.; *, p < 0.05.（D、E）SH-SY5Y細胞における6-OHDAとMRT68921共処理によるLC3（D）とDJ-1分泌（E）に対する影響。

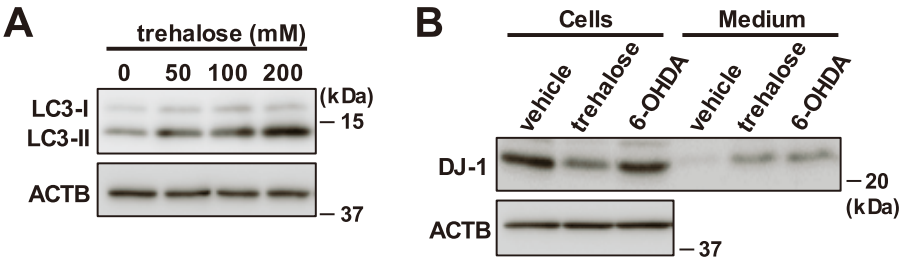


図５（A）WT MEF細胞におけるトレハロース刺激によるLC３（A）と、DJ-１分泌（B）に対する影響。

に神経細胞と線維芽細胞を用いた。その結果、6-OHDAによる細胞内酸化ストレス上昇がAMP：ATP比率を変化させ、AMPKを活性化させたことで、オートファジーの進行に関わるULK1のリン酸化が起き、分泌性オートファジーによるDJ-1の分泌が起きることを見出した。これらの結果から通常細胞質に存在するDJ-1の分泌機構として、オートファジー性の小胞に囲まれ、その後小胞が細胞膜と融合することでDJ-1の細胞外への非典型的分泌が起こるという可能性が示唆された（図6）。また、DJ-1分泌促進剤として、化粧品原料としても用いられるトレハロースを同定した。なお本報告書は文献10の内容をもとに作成した。

今回我々が新規に明らかにした分泌性オートファジーによるDJ-1の分泌機構が、UV刺激による酸化ストレスの上昇に伴う皮膚細胞からのDJ-1の分泌に関わるか今後明らかにする必要がある。また、本研究で見出したトレハロースをはじめ、DJ-1の分泌を促進する化合物の探索や、DJ-1とともに分泌されるタンパク質の同定やその機能が明らかになれば、皮膚細胞の保護タンパク質の分泌促進につながることが期待される。

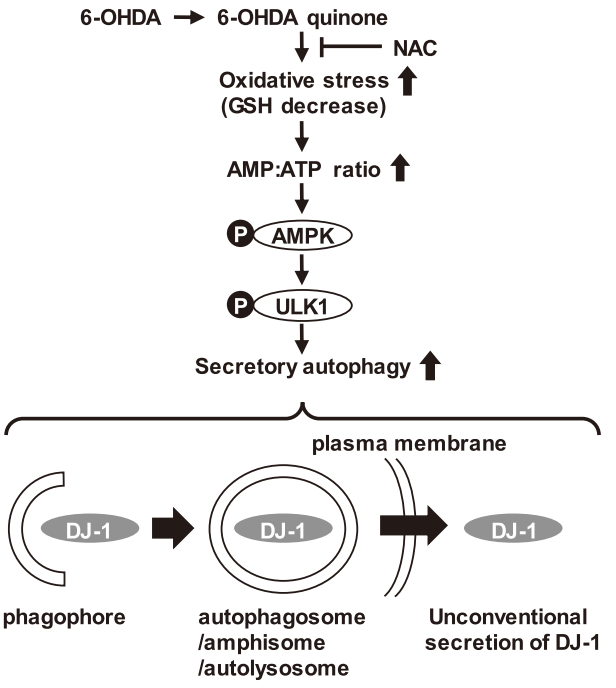


図6　6-OHDA刺激によるDJ-1の非典型的分泌機構の模式図

（引用文献）

1）Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M, et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. Science 299, 256-259, 2003.

2）Ishiwatari S, Takahashi M, Yasuda C, Nakagawa M, Saito Y, Noguchi N, Matsukuma S. The protective role of DJ-1 in ultraviolet-induced damage of human skin: DJ-1 levels in the stratum corneum as an indicator of antioxidative defense. Arch. Dermatol. Res. 307, 925-935, 2015.

3）Zhang M, Schekman R. Unconventional secretion, unconventional solutions. Science 340, 559-61, 2013.

4）Malhotra V. Unconventional protein secretion: an evolving mechanism. EMBO J. 32, 1660-1664, 2013.

5）Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhisa T, Mizushima N. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. Nature 432, 1032-1036, 2004.

6）Saitoh T, Fujita N, Hayashi T, Takahara K, Satoh T, Lee H, Matsunaga K, Kageyama S, Omori H, Noda T, et al. Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 106, 20842-20846, 2009.

7）Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang BG, Satoh T, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Komatsu M, et al. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. Nature 456, 264-268, 2008.

8）DeBosch BJ, Heitmeier MR, Mayer AL, Higgins CB, Crowley JR, Kraft TE, Chi M, Newberry EP, Chen Z, Finck BN, et al. Trehalose inhibits solute carrier 2A（SLC2A）proteins to induce autophagy and prevent hepatic steatosis. Sci. Signal 9, 21, 2016.

9）Sarkar S, Davies JE, Huang Z, Tunnacliffe A, Rubinsztein DC. Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. J. Biol. Chem. 282, 5641-5652, 2007.

10）Urano Y, Mori C, Fuji A, Konno K, Yamamoto T, Yashirogi S, Ando M, Saito Y, Noguchi N. 6-Hydroxydopamine induces secretion of PARK7/DJ-1 via autophagy-based unconventional secretory pathway. Autophagy 14, 1943-1958, 2018.

加齢に伴う皮膚のステロイド合成系の変容が皮膚機能に及ぼす影響

昭和大学医学部生化学講座
原口　省吾

The sex steroids, androgens and estrogens, play essential roles in many health conditions of men and women. However, the level of circulating sex steroids decreases with advancing age, mainly due to the aging of gonads in both sexes. Moreover, in men, a decline in testosterone is associated with many physiological signs of aging, such as a decrease in muscle mass and strength, bone mass, skin thickness, and hair; poor wound healing; and an increase in fat mass, especially visceral adipose tissue. However, the changes in the production and secretion of sex steroids with age in several steroidogenic organs, muscle, bone, skin in men are not well documented.

Therefore, to uncover the changes in steroidogenesis in skin with age, we analyzed the changes in the levels of sex steroids in young and aged male mice. First, we demonstrated that cutaneous testosterone levels were higher in aged mice than in young mice. Then, we demonstrated that Hsd17b3 localized in sebaceous glands is responsible for the upregulation of cutaneous testosterone levels in aged mice. Inhibition of hyperproduction of cutaneous testosterone by treatment with an inhibitor of Hsd17b3 increased the hair length of aged mice. Finally, we demonstrated that the suppression of hair length by elevated testosterone levels was mediated by ZIP9, but not by the androgen receptor, in hair follicle cells of aged mice.

1．緒　言

加齢に伴う生殖腺の機能低下により、男性では血中の性ステロイドであるアンドロゲンが40代後半から漸減し、男性更年期障害と言われる加齢性腺機能低下症(late-onset hypogonadism：LOH症候群）が発症する。LOH症候群は、うつをはじめとした様々な精神症状や、性機能低下をはじめとした様々な身体症状が出る。そこで、アンドロゲン補充療法が行われるが、その治療効果には疑問の声も多い。それは、LOH症候群の病態が複雑であり、アンドロゲンの低下だけでは説明できない症例が多いことに起因すると考えられている。そのため、より効果的な治療法開発に向けて、世界的に加齢時の体内ホルモン環境に対するエビデンスの蓄積が求められている[1-3]。

生殖腺や副腎以外にステロイドを産生する器官として皮膚が知られている。皮膚で産生されたステロイドは、生殖腺や副腎から血流を介して皮膚に到達するステロイドと協働し、皮膚の生理機能を精緻に制御している。皮膚におけるステロイドの代表的な作用として、発毛や皮脂分泌、コラーゲン産生の制御がある[4-6]。LOH症候群の徴候の一つに「体毛と皮膚の変化」があり、体毛量の変化、皮膚の乾燥や異常な発汗等が症状として現れる。

そこで研究代表者は、加齢時の精巣由来アンドロゲンの減少が、皮膚局所のステロイド産生系へどのような変化を引き起こすのか高齢マウスを用いて解析した。その結果、高齢の雄マウスでは、若齢の雄マウスに比べて、血中テストステロン濃度は低下していた。一方で、高齢マウスは皮膚のテストステロン濃度が上昇していた（図1）。これまで、加齢に伴う性腺機能の低下によって、体内のテストステロン濃度は低下する一方であると考えられてきたが、皮膚局所では加齢に伴いテストステロン濃度が上昇することがわかった。さらに、研究代表者はイメージング質量分析法により、加齢時の皮膚テストステロンの増加は真皮層で生じていることを明らかにした。この加齢時の皮膚テストステロンの増加は、テストステロン合成酵素の一つである17β-ヒドロキシステロイド脱水素酵素タイプ3（*hsd17b3*）が責任遺伝子であり、HSD17B3タンパク質は皮脂腺細胞に高発現していることを明らかにしている。

このように研究代表者は、加齢時の皮膚にはテストステロンが高濃度に存在し、その責任遺伝子が*hsd17b3*であることを明らかにしていた。しかし、加齢に伴い皮膚で増加するテストステロンにどのような生理的・病態生理学的意義があるのかは不明である。そこで、本研究では、次の2つの研究項目を設定し、それらを明らかにすることを目的とした。

研究項目① 高齢時に皮膚でテストステロンの過剰産生・蓄積が生じる分子機構の解明

研究代表者は「加齢に伴う精巣機能の低下・老化はテストステロン産生の低下を引き起こし、血中テストステロンの減少を引き起こす。しかし、皮膚には性腺とは独立したステロイド産生系がある。従って、血中テストステロンが減少すると、皮膚ステロイド産生系が皮膚機能を維持するために(恒常性維持のために)亢進し、皮膚局所でステロイド供給を増やそうとするのではないか？」との仮説を立て

The effects of changes in cutaneous steroidogenesis with advancing age on the function of skin
Shogo Haraguchi
Department of Biochemistry, Showa University School of Medicine

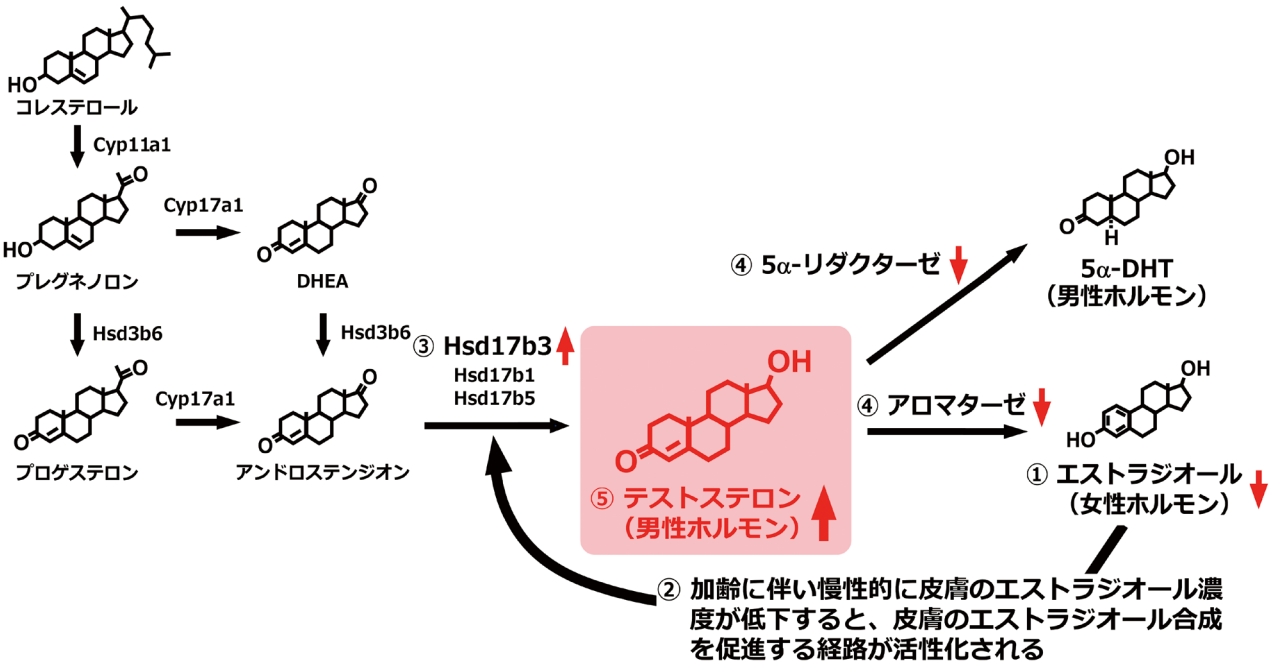


図1　高齢マウス皮膚におけるホルモン恒常性の破綻によるテストステロン過剰産生機構
加齢に伴い血液由来のテストステロンやエストラジオールは慢性的に少ない状態になる（①）。しかし、皮膚ではホルモン環境を維持するために、エストラジオール産生を促すようにフィードバック機構が働き（②）、テストステロン合成酵素Hsd17b3の発現が誘導される（③）。しかし、テストステロン代謝に関わるアロマターゼや5α-リダクターゼ等のステロイド代謝酵素の発現が老化に伴い低下しているため（④）、皮膚でテストステロンの過剰産生・蓄積が生じる（⑤）。

た。本研究項目では研究代表者の仮説の妥当性を検討した。

研究項目② 高齢時の皮膚に存在する高濃度テストステロンが関与する皮膚疾患の解明

上述のように皮膚においてステロイドホルモンは、発毛や皮脂分泌の制御、コラーゲン産生等に関わる。高齢者皮膚でも発毛周期の変容や脱毛、皮脂成分の変化、コラーゲン産生の低下等が知られている。そこで皮膚局所に高濃度で存在するテストステロンが、これらへ影響を与え皮膚疾患に関与するのか解析した。

2. 方　法

2. 1. 動　物

実験にはマウスC57BL/6J（若齢3ヵ月齢）とC57BL/6J-Aged（高齢22ヵ月齢）の雄を日本チャールス・リバー社から購入して用いた。3ヵ月齢は個体として成熟しており、ヒトにおける20歳程度、22ヵ月齢はヒトにおける65歳程度に相当する。若齢・高齢マウスは各種疾患の発症が見られない健康な加齢個体を用いた。

2. 2. 血清中・皮膚組織中のステロイド濃度の測定

血清と皮膚組織は、それぞれメタノール中でホモジナイズ後、ISOLUTE SLE+（Biotage社）によるステロイドの抽出・精製を行い、AB Sciex社のLC/MS/MS（TripleTOF 4600）で解析を行った。

2. 3. 皮膚組織中のステロイド合成酵素mRNAの測定

マウスの皮膚全層を採取後、total RNAを抽出し逆転写を行った。皮膚組織中のmRNAはリアルタイムPCR（StepOnePlus, Applied Biosystems社）で測定した。

2. 4. 毛包幹細胞の単離とアポトーシスの解析

マウス背部皮膚全層を採取したのち、PBSで軽く洗浄後、60分間酵素処理を行った。酵素処理後、皮膚表面をメスでかきとり、皮膚の細胞群を回収した。この皮膚の細胞群の中から毛包幹細胞の特徴を示す細胞（Sca-1$^-$/CD34$^+$細胞）を磁気細胞分離法（ミルテニー社; Sca-1抗体, #14-5981-82, eBioscience社; CD34抗体, #14-0341-82, eBioscience社）により回収した。この細胞に対して、6時間のテストステロン処理を行い、6時間後のアポトーシス量をELISA法（ApoStrand ELISA アポトーシス検出キット, Enzo社）により測定した。

2. 5. 皮膚組織を用いた免疫組織化学染色による解析

マウス皮膚は4%PFAで固定後、定法に従いパラフィンブロックとし、10μm厚の組織切片を作製した。脱パラフィン後、自家蛍光低減処理（TrueBlack リポフスチン自家蛍光クエンチャー, Biotium社）を行い、免疫組織化学染色に用いた。ZIP9抗体は、#17607-1-AP, Proteintech社を用いた。Hsd17b3抗体は川崎医科大学解剖学講座 嶋雄

一教授より分与頂いた抗体を用いた。

3．結　果

3．1．高齢時に皮膚でテストステロンの過剰産生・蓄積が生じる分子機構の解明

加齢に伴い血中のテストステロンやエストラジオールが減少する。一方、皮膚ではテストステロンの増加が見られた。従って、皮膚ではエストラジオールやその他の性ステロイドの減少が、テストステロン増加の引き金となっていると考えられた。

そこで高齢マウス皮膚へエストラジオール、プロゲステロン、5α-DHT等の主要な性ステロイドを塗布し、皮膚のテストステロン産生に変化が見られるかを解析した。この際、皮膚局所のステロイド産生系の作用であることを確認するために、血中の性ステロイド濃度には影響を与えないことを確認した。その結果、エストラジオールを塗布した場合に高齢マウス皮膚のテストステロン濃度が低下した。従って、高齢マウス皮膚のテストステロン産生の増加は、皮膚におけるエストラジオール低下が引き金となっていることが考えられた。

そこで次に、ヒト皮脂腺細胞（SZ95細胞）を用いて長期的なエストラジオール欠乏がHsd17b3発現を変化させるのかを解析した。その結果、通常のFBSを用いた細胞に比べて、チャコール処理（活性炭にステロイド等を吸着させ、FBS中のステロイド等を除いた）FBSでは、SZ95細胞でHsd17b3 mRNAとHSD17B3タンパク質の発現量が増加した。さらに、チャコール処理FBSで培養したSZ95細胞へエストラジオールを添加すると、Hsd17b3発現が抑えられた。加えて、これらの変化は皮脂腺細胞に発現するエストロゲン受容体を介した作用であることも明らかにした。

次に、長期的なエストラジオールの欠乏がHsd17b3発現を増加させるのか、エストラジオール合成酵素アロマターゼをノックアウトしたマウス（Aromatase Knockout；ArKO）を用いて解析した。その結果、ArKOマウスでは皮膚のHsd17b3発現が増加するとともに、皮膚テストステロン濃度がワイルドタイプマウス（WT）に比べて著しく高かった。

これらの結果から、加齢に伴う皮膚でのエストラジオールの減少が、皮膚のステロイド産生系を皮膚ステロイド量を維持しようとする方向に働かせ、その結果、皮膚におけるテストステロンの過剰産生・蓄積を引き起こしたと考えられる。

3．2．高齢時の皮膚に存在する高濃度テストステロンが関与する皮膚疾患の解明

次に、高齢マウス皮膚に蓄積したテストステロンが皮膚機能へどのような変化を引き起こすのか、それが老人性の皮膚疾患の発症に関与し得るのかを解析した。高齢マウス皮膚へHSD17B3阻害剤を塗布し、高齢マウス皮膚の皮膚厚変化（組織学的解析）、コラーゲン産生量（Collagen I mRNA変化）、細胞増殖量の変化（Ki67発現変化）、体毛の長さの変化等を解析した。その結果、高齢マウス皮膚においてHSD17B3の働きを阻害することで、テストステロン合成を抑制すると体毛の伸長が見られた。従って、高濃度のテストステロンは体毛の成長を抑制的に制御すると考えられた。男性型脱毛症AGAでは毛乳頭細胞に発現するアンドロゲン受容体を介したアンドロゲンの作用が頭髪の成長を抑制することが知られている[7]。そこで、高齢時のテストステロンの作用機序を明らかにするためにアンドロゲン受容体の局在解析を行った。しかし、高齢マウスの毛包細胞・毛乳頭細胞にはアンドロゲン受容体の発現が見られなかった。これに関しては先行研究でも同様の結果が報告されている[8]。従って、テストステロンはアンドロゲン受容体以外の何らかの情報伝達経路を介して体毛の成長を抑制していることが考えられた。最近、前立腺がん細胞を用いた研究から、テストステロンが亜鉛トランスポーターZIP9に作用し、アポトーシスを誘導する作用を発揮することが報告されていた[9]。そこで、高齢マウスの皮膚におけるZIP9の局在解析を行ったところ、体毛の成長の制御に関わる毛包幹細胞にZIP9の発現が見られた。従って、高濃度テストステロンは毛包幹細胞に発現しているZIP9を介して、体毛の成長に抑制的なシグナルを伝えていることが示唆された。そこでマウス毛包幹細胞を単離し、高濃度テストステロン処理を行ったところ、アポトーシス誘導因子の発現量が増加するとともに、アポトーシスの誘導作用が見られた。

4．考　察

男性型脱毛症AGAでは、思春期以降に精巣で合成・分泌されたテストステロンが、頭皮に発現する5α-リダクターゼにより5α-DHTへと代謝され、前頭部や頭頂部の毛乳頭に高発現するアンドロゲン受容体へ作用する。毛乳頭では5α-DHTの働きにより、TGF-βなどの発現が誘導され、それらが毛母細胞の増殖を抑制することで、毛の成長が阻害され男性型脱毛症が発症する（図2）。

一方で、加齢に伴うびまん性の脱毛、老人性脱毛症ではエストラジオールの低下に応答した皮膚ステロイド産生系の亢進により、テストステロン濃度が増加する。このテストステロンが毛包幹細胞に発現するZIP9を介して体毛の成長を妨げるために、前頭部や頭頂部に限局されないびまん性の脱毛が生じると考えられる（図2）。

本研究によって、男性型脱毛症と老人性脱毛症の発症にはどちらの場合も性ステロイドであるアンドロゲンが関わることが分かったが、その発症機序は全く異なるものであ

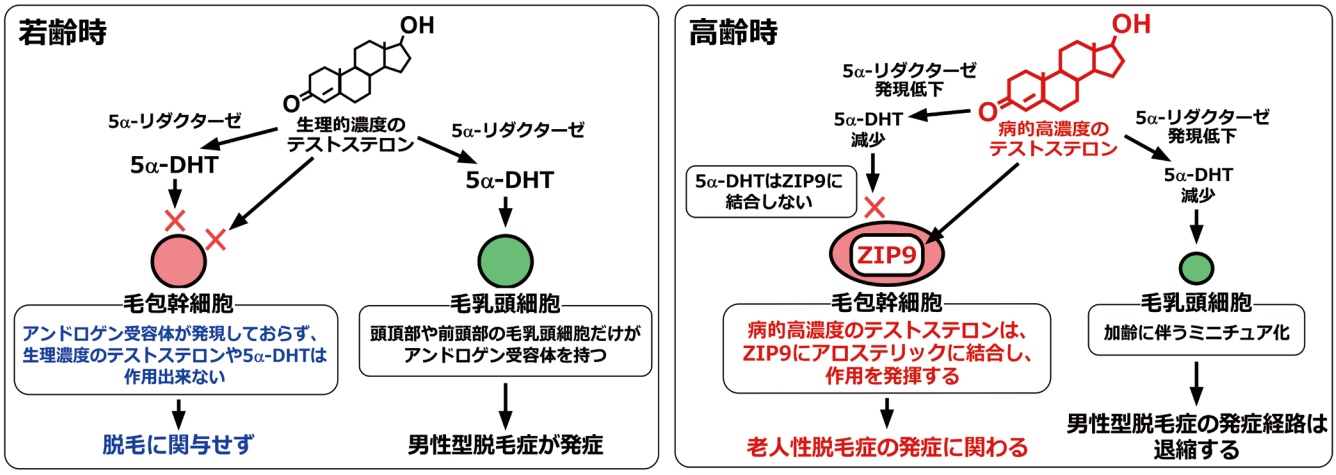


図2　若齢時と高齢時の脱毛症発症機序の違い
加齢に伴い皮膚局所でテストステロンが過剰産生・蓄積され出す（図1）。病的高濃度に達したテストステロンは、本来の受容体ではない亜鉛トランスポーター（ZIP9）に作用し、毛包幹細胞の細胞死を誘導することで老人性（びまん性）の脱毛を引き起こす。

った。男性型脱毛症では5α-リダクターゼの阻害剤であるフィナステリド、あるいはデュタステリドが治療に用いられるが、これらが老人性脱毛症に対しても有効であるという報告は殆どない。これは本研究成果を考えれば当然であり、5α-リダクターゼを介さない発症機序である老人性脱毛症では5α-リダクターゼ阻害剤の効果は少ないと考えられる。

5．総　括

加齢に伴う生殖腺の機能低下・老化により、血中の性ステロイドが減少することはヒトでもマウスでもよく知られている。しかし、体内には様々な内分泌器官があり、生殖腺由来のホルモンと協働しつつ、各器官が独自の機能を発揮することで生体機能を精緻に制御している。また、生殖腺機能は、加齢に伴う細胞老化などの影響を受けて低下すると考えられているが、本研究で対象とした皮脂腺細胞は全分泌という特殊な分泌様式により皮脂を供給しているため、高齢になっても活発に増殖を続けている。従って、加齢に伴う生殖腺の機能低下により、血中の性ステロイドレベルが大きく低下するが、各内分泌器官は必ずしも器官老化・細胞老化を起こしているわけではなく、それぞれの持つ特性に基づいてそれぞれの臓器の機能的な恒常性を保つように働いていると考えられる。

本研究の成果から、高齢になっても元気に働いている器官・細胞が体内に多く残っていることが示唆された。従って、今後の老化研究では臓器や細胞が衰える面にばかり着目するのではなく、体内の器官・細胞が正常に働けるように補助するような新たな観点からのアンチエイジング医学の発展が期待できる。

謝　辞

今回の助成により得られた結果は、原著論文として投稿中であり、本報告書では個々のデータにつきましては掲載を見送らせて頂きました。ここまで研究をまとめることが出来たのは公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団よりご助成頂いたおかげであり心より感謝申し上げます。

（引用文献）

1）「加齢男性性腺機能低下症候群診療の手引き」日本泌尿器科学会／日本Men's Health医学会編
2）Snyder PJ, Bhasin S, Cunningham GR, Matsumoto AM, Stephens-Shields AJ, Cauley JA, Gill TM, Barrett-Connor E, Swerdloff RS, Wang C, Ensrud KE, Lewis CE, Farrar JT, Cella D, Rosen RC, Pahor M, Crandall JP, Molitch ME, Cifelli D, Dougar D, Fluharty L, Resnick SM, Storer TW, Anton S, Basaria S, Diem SJ, Hou X, Mohler ER 3rd, Parsons JK, Wenger NK, Zeldow B, Landis JR, Ellenberg SS. Testosterone Trials Investigators: Effects of Testosterone Treatment in Older Men. *N. Engl. J. Med.*, **374**, 611-624（2016）.
3）Yeap BB, Page ST, Grossmann M. Testosterone treatment in older men: clinical implications and unresolved questions from the Testosterone Trials. *Lancet Diabetes Endocrinol.*, **6**, 659-672（2018）.
4）Smith QT, Allison DJ. Changes of collagen content in skin, femur and uterus of 17β-estradiol benzoate-treated rats. *Endocrinology*, **79**, 486-492（1966）.
5）Nikkari T, Valavaara M. The production of sebum in young rats: effects of age, sex, hypophysectomy and treatment with somatotrophic hormone and sex

hormones. *J. Endcrinol.*, **43,** 113–118（1969）.
6） Thornton MJ. The biological actions of estrogens on skin. *Exp. Dermatol.*, **11**, 487–502（2002）.
7） Inui S, Fukuzato Y, Nakajima T, Yoshikawa K, Itami S. Identification of androgen-inducible TGF-β1 derived from dermal papilla cells as a key mediator in androgenetic alopecia. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, **8**, 69–71（2003）.
8） Cottle DL, Kretzschmar K, Schweiger PJ, Quist SR, Gollnick HP, Natsuga K, Aoyagi S, Watt FM. c-MYC-induced sebaceous gland differentiation is controlled by an androgen receptor/p53 axis. *Cell Rep.*, **3**, 427–441（2013）.
9） Thomas P, Pang Y, Dong J, Berg AH. Identification and characterization of membrane androgen receptors in the ZIP9 zinc transporter subfamily: II. Role of human ZIP9 in testosterone-induced prostate and breast cancer cell apoptosis. *Endocrinology*, **155**, 4250–4265（2014）.

ヒト未分化胎盤幹細胞を用いた合成香料の安全性評価システムの開発

東北大学大学院医学系研究科

樋浦　仁

Recently mouse embryonic stem cells have been applied as system for toxicity testing in Europe. However, a mouse ES cell test (EST) may not be sufficiently rigorous for human toxicity testing, while the use of human ES cell presents an ethical problem. Tests using human trophoblastic stem (TS) cells, which are derived from the placenta, sidestep a potential to these issues. A test based on human TS cell would have relevance to the human embryo during pregnancy and could therefore be useful in testing low-dose toxic substances, which may alter the epigenome. The purpose of this study is to establish whether human TS cell have relevance to epigenetic teratogenicity testing. We have developed a new toxic screening methods using human TS cells to evaluate the effect of the synthetic perfume Hydroquinone (HQ) , 1,3,4,6,7,8-Hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethylcyclopenta[g]-2-benzopyran solution (HHCB) and Methyl P-Hydroxybenzoate (MP) 1) the rate of cell growth: human TS cells were more sensitive in growth rate than human ES cells (IC50). 2) the rate of trophoblast differentiation: the differentiation marker, hCGB was increased with dose-dependent manner. 3) mRNA expression: micro RNAs (miR-1323, miR-518b) are sensitive, with the substance. 4) DNA methylation: DNA methylation of imprinted genes (*H19*, *PEG3*) are increased with dose-dependent manner. We concluded that we have first establishment human TST method and establishment of bioassay system of TST. We next will apply the TST method to human disease-specific TS cells.

1．緒　言

合成香料は、難分解性で環境中に残出し、食物連鎖を介し、ヒト体内に蓄積される傾向にある。また、エストロゲン作用により、胎児の涙腺、肝臓、骨などの奇形の増加も報告されている[1,2]。これらの物質は、妊娠中胎盤を通して、長期間蓄積し、胎児に移行することで、胎児の発育や出生後の成長および精神・神経学的な発達に影響を及ぼす可能性もある。従来、動物実験で人体への有毒性を予測していたが、新法の制定に伴い、ヒト正常培養細胞等を用いて毒性試験を行う必要性が高まっている。しかしながら、ヒト胎児への細胞毒性機序や代謝動態をin vitroにおいて評価するための、国際基準に基づく毒性試験は未だ確立していない。

最近我々は、世界で初めてヒト胎盤由来未分化幹（TS）細胞の樹立に成功した[3]。ヒトTS細胞は、通常分娩後破棄される胎盤組織を細胞源とするため、入手に伴う倫理的な問題、量的問題は比較的少ない。そのため、分化誘導系の確立したヒトTS細胞の特性を生かし、短期間に低コストで正確な細胞毒性を評価すること（TST法（図1））が可能であると期待される。本研究では、化学物質の低濃度かつ長期間ばく露による子宮内の有害性評価法として、TST法を確立することを目的とした。

Development of cosmetics safety test using human trophoblast stem cells

Hitoshi Hiura

Graduate School of Medicine, Tohoku University

2．方　法

2．1．合成香料

・標準品：多環リスク（HHCB：Sigma-Aldrich社製）、メチルパラベン（MP：Sigma-Aldrich社製）、ハイドロキノン（HQ：㈱和光純薬製）。

・標準溶液：標準品を精秤し、エタノール溶液に溶解、標準原液を調整した。

2．2．ヒト未分化幹細胞株

正常ヒトTS細胞（男児由来）を供した。

2．3．細胞へのばく露濃度

HHCBの場合は、血中濃度0倍（溶媒のみ、対照区）、（5 nM）の100倍（500 nM）、500倍（2.5μM）、1,000倍（5μM）、5,000倍（25μM）、10,000倍（50μM）について検討した。

MP、HQの場合は、0（溶媒のみ、対照区）、0.01、0.05、0.1、0.5、1μMを、それぞれTS細胞培養液に添加した。

2．4．培養条件

ガラス4-wellプレートは、2種類（BD Falcon社製、Nunclon Surface社製）で検討した。培養液には蒸散防止のためSydney IVF culture oil（Cook社）を無血清積層し、37℃、5%CO_2条件下で細胞培養を実施した。1ウェルあたり5×10^4個のTS細胞を、TS細胞培養液にて播種後、翌日に化学物質を含んだTS細胞培養液に培地交換し、培

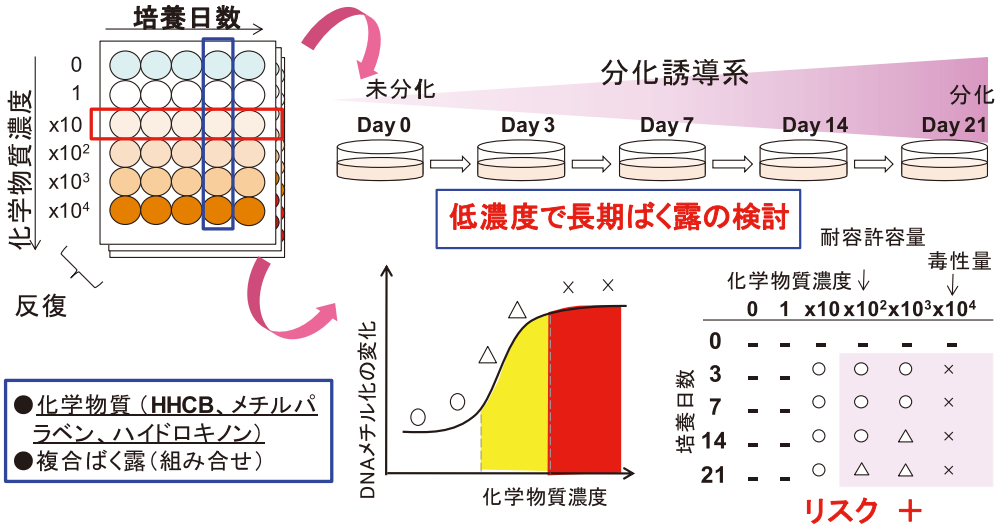


図１　TST 法の概要
細胞増加抑制と化学物質濃度などの相関について検討し、安全域と危険域を設定する。

養を行った。

２．５．培養条件

培養液は血清無添加で、増殖因子は必要最小限とした。

２．６．バイオアッセイ系の検討

２．６．１．　細胞増殖能

血球計算盤を用いて細胞数を計測し、50％阻害濃度（IC50）を算出した。

２．６．２．　細胞分化能

10 視野における巨細胞（合胞体性栄養膜細胞）の出現数を測定した。また、分化マーカー遺伝子（*TP63*、*HLA-G*、*hCGB*）の発現量を定量化した。

２．６．３．　遺伝子発現の解析

インプリント遺伝子および低分子RNA（miRNA）の遺伝子発現量を定量化した。*H19*, *IGF2*, *MEST*, *PEG3* およびヒト 19 番染色体上の miRNA クラスター C19MC を構成し、インプリンティングを受ける miRNA（miR-520h, miR-1323 および miR-518b）の発現量を検討した。インプリント遺伝子には *GAPDH* を、miRNA には snoRNA である *RNU44* を用いて内部補正した。インプリント遺伝子の発現アレルについては、gDNA および cDNA を用いて PCR-RFLP（制限酵素多型解析）を用いて定量解析した。

２．６．４．　DNA メチル化解析

5 種類のインプリントを遺伝子の制御領域であるアレル特異的メチル化領域（DMR）（*H19*, *PEG3*, *MEST*, C19MC, IG-DMR）について、COBRA 法にて DNA メチル化レベルを定量した。また、ゲノムレベルの DNA メチル化解析には、LINE-1 のメチル化について解析した。

（倫理面への配慮）

ヒトゲノム・遺伝子解析研究にあたっては、関係法令と「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」および各研究機関の規程に従い、東北大学大学院医学系研究科ヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査委員会の審査を経たのち、実施した。ヒト胎盤幹（TS）細胞は、試料提供者の利益・不利益を十分に説明した上で同意書を取得して実施した。法令、指針、規定を遵守し、試料管理・個人情報保護には細心の注意を払い、本研究を実施した。

３．結　果

３．１．バイオアッセイ系の検討（急性毒性試験）

ヒト TS 細胞（46XY）に血中濃度を参考に化学物質（HHCB、MP および HQ）を 5 段階の濃度で培養液に添加し、ガラス製培養ディッシュにて、3 日間培養した。培養終了時に細胞形態を観察および細胞数を計測し、micro RNA を含む total RNA およびゲノム DNA を抽出した。以下の 4 つのバイオアッセイ系で評価し、プロトタイプを開発した。

３．１．１．　細胞増殖能

TS 細胞における 50％阻害濃度（IC50）は、HHCB：0.06 μM、HQ：3.80 μM であった。また、ヒト ES 細胞の HHCB の IC50 は 0.5 μM であり、HQ 50 μM で、TS 細胞の方が高感受性であることが判明した。細胞の細胞数は対照区と比較して 25.6％しか減少しなかった（図 2）。

３．１．２．　細胞分化能

分化マーカーの遺伝子発現は、HHCB 添加 TS 細胞では、*hCGB*（合胞体性栄養膜細胞マーカー）は濃度依存的に発現が亢進し、対照区と比較して *hCGB* は最大 4.62 倍まで亢進していた（図 3）。

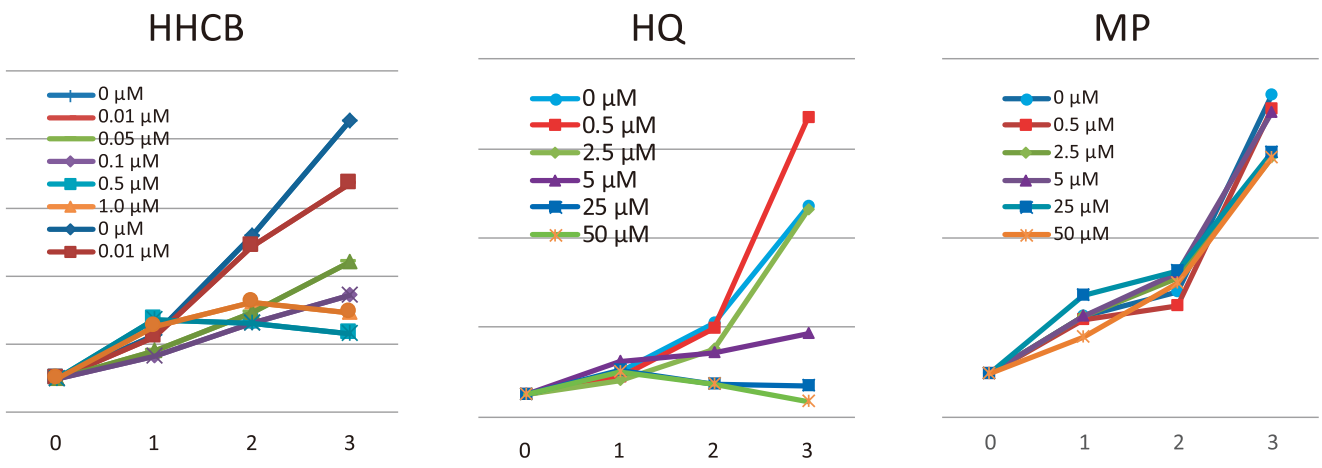


図２　細胞増殖能
50%阻害濃度（IC50）：0.06μM（HHCB），3.80μM（HQ）

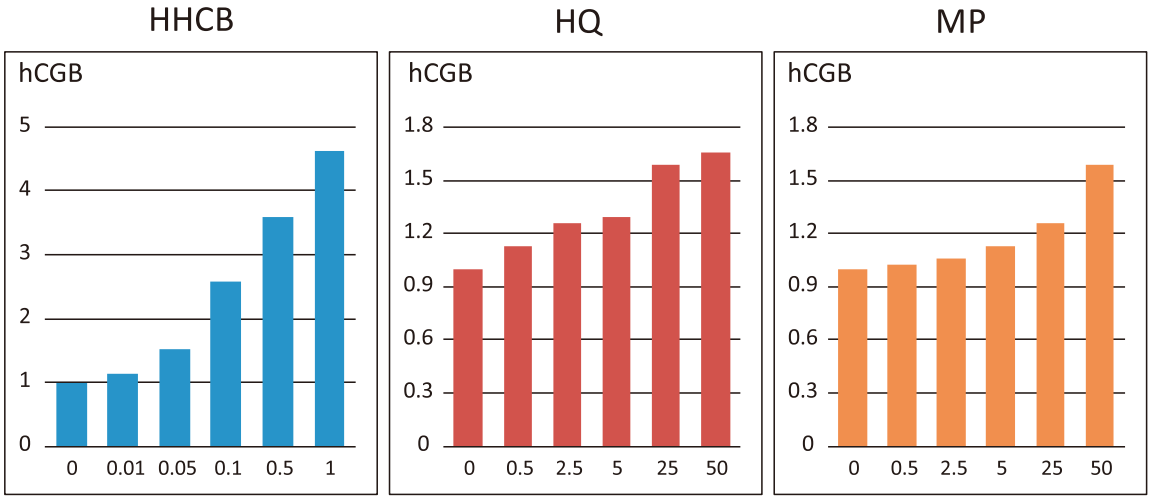


図３　細胞分化能
濃度依存的に分化能は亢進している。

3．1．3．　遺伝子発現

インプリント遺伝子の発現では、HHCB添加TS細胞では、miR-1323およびmiR-518bは濃度依存的に発現減少し、miR-1323は対照区と比較して最大0.35倍まで減少し、miR-518bは対照区と比較して最大0.52倍まで減少した。一方、HQ添加TS細胞では、miR-1323は濃度依存的に発現亢進し、対照区と比較して最大2.33倍まで亢進していた（図4）。また、ヒトTS細胞の遺伝子多型がいずれもホモ接合型であったため、発現アレルについては明らかにすることができなかった。

3．1．4．　DNAメチル化解析

HHCB添加TS細胞ではLINE-1，*H19*，IG-DMR，*PEG3*，C19MCが濃度依存的にメチル化はわずかに亢進していた。一方、HQ添加TS細胞ではLINE-1，*H19*および*PEG3*が濃度依存的にメチル化はわずかに亢進していた。

3．2．遅発性効果試験の検討

ヒト未分化幹細胞（TS細胞）に化学物質（HHCB，MP，HQ）を血液濃度を参考に100倍濃度までの単独で5段階希釈法により培養した。TS細胞は、3日目、7日目、14日目、21日目に回収し、ゲノムDNAを抽出した。細胞形態学的特性と5種類のインプリンティングを受ける遺伝子のアレル特異的メチル化領域（*H19*，*PEG3*，*MEST*，C19MC，IG-DMR）を対象としたエピゲノム（DNAメチル化）の定量解析を行い、TST法による細胞毒性評価の有用性について検討した。基準値の100倍濃度の化学物質の添加では、顕微鏡学的に細胞形態の変化や増殖能に著しい変化はみられなかった。DNAメチル化の定量解析では、血中濃度および10倍濃度で培養の期間に関わらず、インプリント遺伝子に顕著な変化はみられなかった。しかし、血中濃度の100倍濃度のHHCBを添加した場合には、培養期間が長期に及ぶとIG-DMRのメチル化が低下することが確認された（図5）。

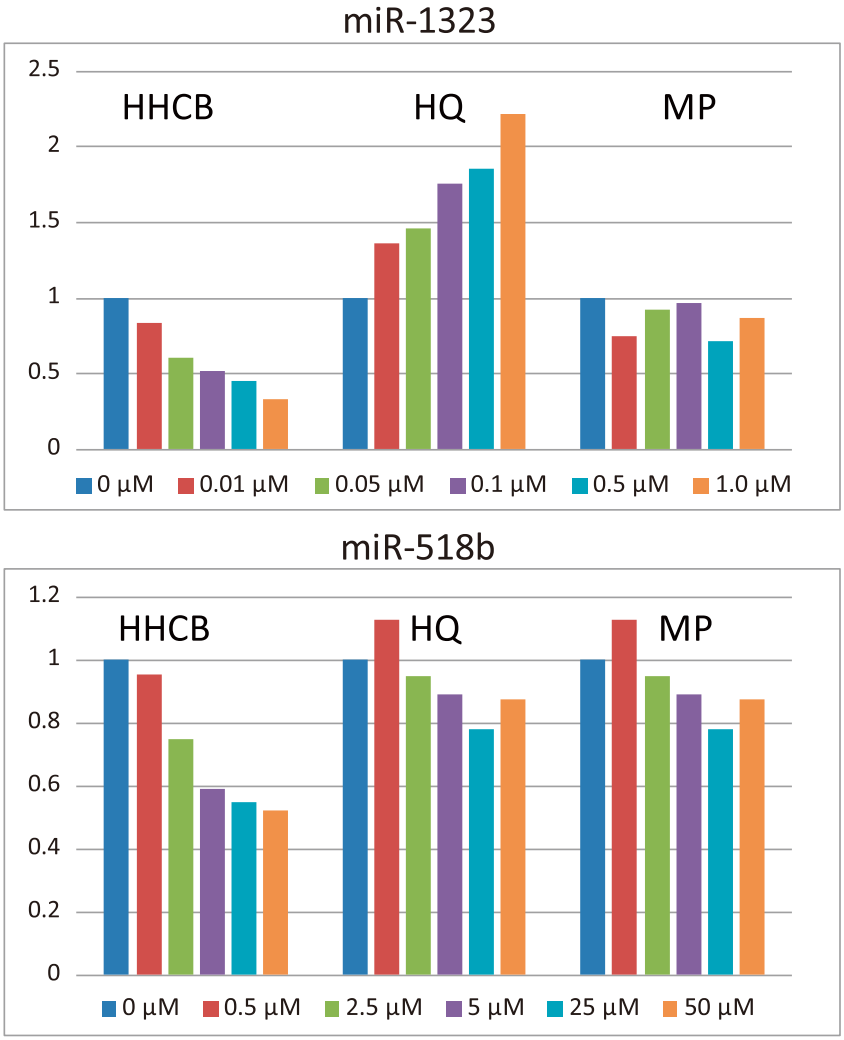


図 4　遺伝子発現解析
一部のインプリント遺伝子の発現は濃度依存的な変化を示す。

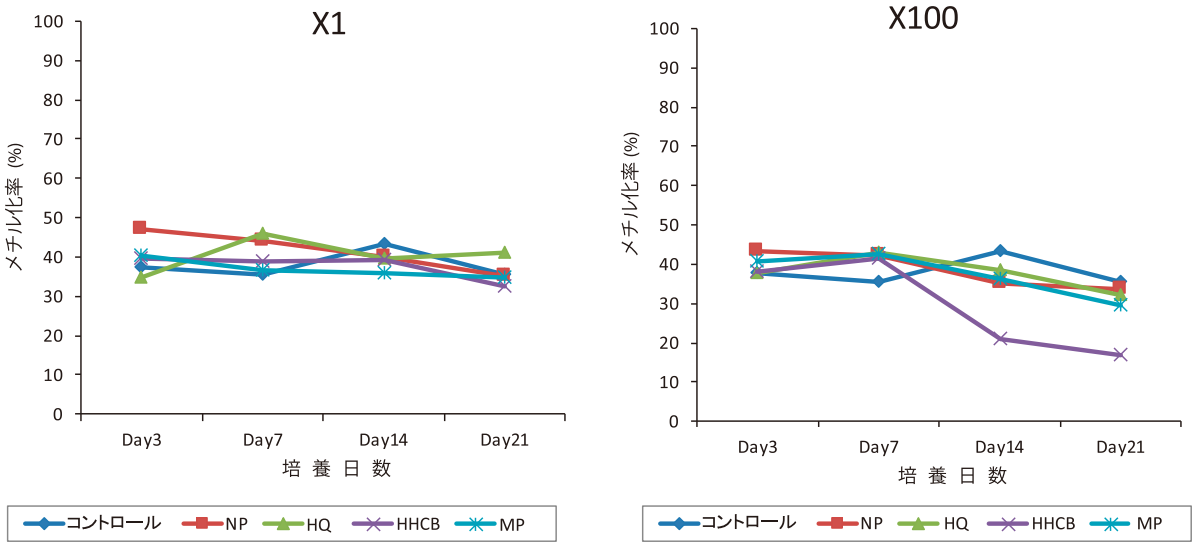


図 5　遅発性効果試験
血中濃度の 100 倍濃度のハイドロキノン(HQ)を添加した場合には、培養期間が長期に及ぶと IG-DMR のメチル化が低下することが確認された。

4．考　察

最近の毒性評価試験では、動物実験の代替法として、in vitro発生毒性試験法が求められている。本研究では、分化誘導型ヒト胎盤幹（TS）細胞を用い、単一な化学物質ばく露ではなく、低濃度でも長期間および複合ばく露による細胞毒性について、様々な異常に対する毒性評価法を確立することを目的とし、TST法のプロトタイプを開発した。特に、エピゲノム変異検出系は、低用量でも残留性、遅発性の有害事象の指標として、有用な子宮内環境評価法となる可能性がある。

急性、遅発性効果試験のメチル化の変化の結果のまとめを表1に示す。化学物質ばく露における急性、遅発性効果について、インプリント遺伝子のメチル化に変化がみられたことから、本法の有用性について確認することができた。しかし、複数の細胞での確認や、複合ばく露の影響については、さらなる検討を行う必要がある。TST法は、細胞を分化誘導することで異常が生じる過程を培養下に詳細に観察し、評価することが可能であるため、動物実験代換システムとして、医薬品、食品、化粧品開発においての毒性評価に大変有用であると期待される。

国内の新有効成分含有医薬品の承認数は、2005年で17件であり、1994年のピーク時から半分以下に減少している。一方、研究開発費は1990年以降、年々上昇しており、2005年は、1990年時の2.5倍の約9,000億円に達している（日本製薬工業協会　DATE BOOK 2007）。これは、臨床段階における安全性や優位性の評価が問題となることが原因といわれており、世界的にも同様の傾向を示している。この問題を解決するためには、化学物質の安全性、有効性を早期に確認することが重要であり、臨床試験の前段階となる非臨床試験の結果により、薬剤の安全性が十分に確保される必要がある。非臨床において、ヒトTS細胞を用いた評価を行うことで、動物実験や従来のマウスES細胞の試験[4, 5]とは異なり、種による薬物反応の違いを解消し、より生体内の反応を反映した検査を行うことが可能となる。また、ヒトES細胞など、ヒト由来細胞を使用する場合は、入手の難しさや倫理的問題が想定されるが、通常分娩後に廃棄される胎盤より作り出されるTS細胞の場合は、これらの問題が解消され、短時間で測定が可能となることからコスト面でも有用である。

医新有効成分医薬品の場合、毒性試験は(1)単回投与毒性試験、(2)反復投与毒性試験、(3)遺伝毒性、(4)生殖発生毒性試験を実施することが求められる。1つの開発品におけるこれらの毒性試験に要する費用は、最低でも10億円といわれている（平成16年度～平成17年度調査報告「ヒト等の細胞を使った化学物質の影響評価試験手法の現状と課題に関する調査（バイオ分野）」）。国内で臨床開発が進められている開発品品目数は2004年度末で576品目（医薬産業政策研究所ニュースNo.19 2006年）であることから、年間5000億円以上の市場が見込まれる。加えて、動物福祉の観点からも現行の動物実験に代わるシステムの実用化が求められている。2007年時点で、動物実験代替システムの市場は6億円（日経バイオ年鑑 2007年）と見積もられているが、今後急速な伸長が見込まれている。したがって、本研究開発により、TST法を用いた有用な毒性試験システムを構築することで、新有効成分含有医薬品の承認にかかる費用や期間が削減できることに加え、動物代替システムとして広く利用可能であり、今後、様々な研究の発展への貢献が期待できる。

表1　化学物質によるDNAメチル化への影響

	血中濃度	急性試験効果	遅発性試験効果	
		7	14	21
HHCB	1.9 ppb	→	▲	▲
HQ	2.9 ng/ml	→	→	→
MP	0.29 ng/ml	→	→	→

三角（▲）は、メチル化の変化（15% 以下）を示す。

5．総　括

ヒト未分化胎盤幹細胞は、低用量でばく露された有害物質の影響を検出するための、新たな薬物毒性評価法の細胞源を提供する。同時に、ヒト疾患との関連性を解明していく上でも有用であると考えられる。さらに、エピゲノム変異は、先天性疾患に限らず、乳幼児の行動や発達障害（自閉症、ADHD等）にも影響を与えるため、TST法は、疾患の発症予防のための国際基準に適合する重要な解析法となりうる。今後はさらなる性能評価を行うとともに、EST法との比較を行う。また、可能であれば機能未知の化学物質についてもTST法による評価を加えていく。

ヒト胎盤幹細胞を用いたエピゲノム変異検出系による化学物質毒性評価法は、多様な非特定化学物質の影響を単一細胞の分化・形態変化および遺伝子修飾機構として鋭敏に反映するため、短時間かつ容易に解析が可能な信頼性の高い試験法と期待できる。また、単に個別物質の安全性評価を行うものではなく、低用量でかつ長期間ばく露された有害物質や複合ばく露汚染などの影響も検出可能な、体系的、統合的な胎児・胎盤の評価手法となる可能性が高い。今後、妊娠中の様々な基礎化粧品や植物オイルなどが胎児に及ぼす影響についても、応用することが可能となると考える。

（引用文献）

1）Eisenhardt S et al. Nitromusk compounds in women with gynecological and endocrine dysfunction. *Environ*

Res. 87 : 123–130.2001.

2） Kalfa N et al. Is Hypospadias Associated with Prenatal Exposure to Endocrine Disruptors? A French Collaborative Controlled Study of a Cohort of 300 Consecutive Children Without Genetic Defect. *Eur Urol*. 68 (6) : 1023–30. 2015

3） Okae H et al. Derivation of Human Trophoblast Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 22 (1) : 50–63. 2018.

4） Buesen R et al. Trends in improving the embryonic stem cell test (EST) : an overview. *ALTEX*. 21 (1) : 15–22. 2004.

5） Genschow E, et al. Validation of the embryonic stem cell test in the international ECVAM validation study on three in vitro embryotoxicity tests. *Altern Lab Anim*. 32 (3) : 209–44. 2004.

皮膚保湿マーカー遺伝子 FABP5 の発現と機能制御機構の解析

信州大学先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所

藤 井　博

The fatty acid-binding proteins (FABPs) are a family of low-molecular weight, intracellular lipid-binding proteins consisting of ten isoforms. FABPs are involved in uptake and transport of fatty acids. Recent studies have shown that FABPs play important roles in the regulation of gene expression, cell growth and differentiation.

In the present study, we have shown that epidermal fatty acid-binding protein (FABP5), of these isoforms, is specifically expressed in undifferentiated and differentiated human epidermal keratinocytes. Its expression level in differentiated keratinocytes is higher than that in undifferentiated cells. To clarify mechanisms of FABP5 gene expression and its function during epidermal keratinocytes differentiation. As a result, the methylation status of CpG island in FABP5 gene promoter was almost the same between before and after keratinocytes differentiation. Furthermore, c-Myc and Sp1, potent transcription factors involved in FABP5 gene expression were unchanged during keratinocytes differentiation. Therefore, other unknown factors could be responsible for the regulation of FABP5 gene expression during keratinocytes differentiation.

To clarify function of FABP5 during the course of differentiation of epidermal keratinocytes and in the differentiated epidermal keratinocytes, we have next tried to do the knockdown of FABP5 gene with siRNA. As a result, we have shown that FABP5 knockdown reduced expression levels of the differentiation marker such as Keratin 10, suggesting that FABP5 might play an important role in regulating human keratinocytes differentiation. In addition, we showed that nuclear receptor ERRα which have been shown to crosstalk with FABP5 are involved in regulation of keratinocytes differentiation. Further studies should be needed to clarify its mechanisms in the future.

Thus, the present study suggests that FABP5 could be a promising molecular target to study homeostasis, aging and inflammation in human epidermal keratinocytes.

1．緒　言

皮膚の表皮基底層幹細胞は、皮膚の恒常性維持において重要な機能を担っている。また、表皮基底層幹細胞が分化したTA細胞（Transit amplifying cell）は、幹細胞に比べて高い細胞増殖・分化能をもち、皮膚の創傷治癒力や老化において重要な機能を果たしていると考えられているが、その分子基盤は明らかにされていない。したがって、皮膚の幹細胞・TA細胞・表皮角化細胞の恒常性維持機構の解明は、コスメトロジーの発展（アンチエイジング化粧品の開発など）に貢献するだけでなく、皮膚の健康維持・増進、皮膚疾患の予防・治療法の開発などにも貢献する可能性が期待される。

皮膚の水分保護バリアー形成や脂質代謝は、皮膚の保湿において重要である。詳細な分子機構は不明であるが、著者らは皮膚の表皮有棘層、顆粒層および皮脂腺などの細胞で発現している上皮細胞型脂肪酸結合タンパク質（FABP5: Fatty acid-binding protein 5）が、皮膚の保湿において重要な機能を果たしていることを明らかにした[1-3]（図1）。一方、脂肪酸の細胞内輸送に関与しているFABP5は転写因子c-Mycとともに、TA細胞のマーカー遺伝子として同定されていることから、表皮角化細胞のFABP5遺伝子の恒常的な発現と機能制御が、健康的な皮膚（しわのない弾力性に富んだ肌）の形成と抗老化において重要であると考えられる。著者らは、がん細胞において、FABP5が転写因子c-Mycの標的遺伝子であることを明らかにしていることから[4]、本研究課題では、皮膚表皮角化細胞の保湿や抗老化におけるc-Myc依存的なFABP5遺伝子の転写制御機構とその生理的意義の解明を目指している。

また、著者らは、正常細胞では発現していないFABP5が転移能を獲得した悪性がん細胞（前立腺がん、乳がん、大腸がんなど）においてエピジェネティックな機構（DNA脱メチル化）で高発現し、FABP5の発現レベルとがんの増殖能・転移能獲得が密接に関係していることを見出した[4-9]。さらに、FABP5が核内受容体ERRαシグナルとクロストークし、エネルギー代謝系やミトコンドリアの機能を制御することによって、がん細胞の増殖促進に関与することを明らかにした[10]。したがって、このシグナル伝達経路が、表皮基底層幹細胞・TA細胞や表皮角化細胞でも機能しているかどうかを検証することは、これらの細胞のエネルギー代謝や恒常性維持機構を解明する上で重要である。

前述したように、FABP5は表皮基底層幹細胞やTA細胞のマーカー遺伝子としても同定されているが、表皮基

Expression and functional analyses of moisturizing gene FABP5 in the skin

Hiroshi Fujii

Department of Interdisciplinary Genome Sciences and Cell Metabolism, Institute for Biomedical Sciences, Interdisciplinary Cluster for Cutting-Edge Research, Shinshu University

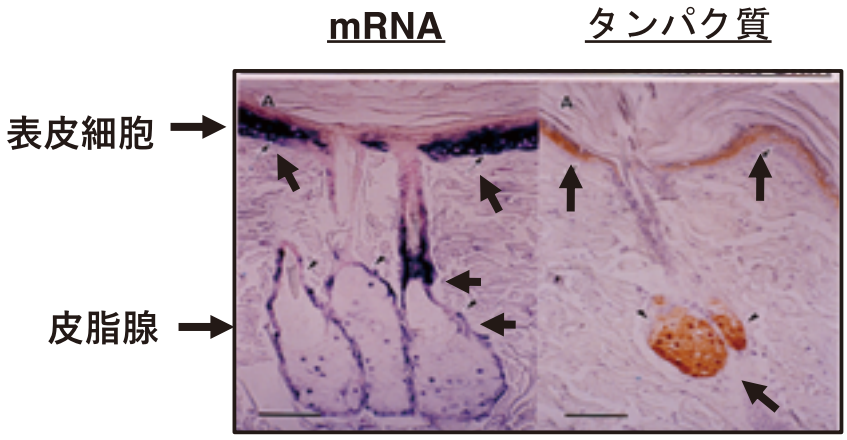


図 1　皮膚細胞における FABP5 の発現
文献 1 を一部改変。ラット皮膚組織における FABP5 の発現を解析した。mRNA（左）とタンパク質（右）の発現を、それぞれ In situ hybridization、Immunohistochemistry で解析した。表皮細胞では、主に有棘層や顆粒層の細胞で発現していた。また、皮脂腺でも強い発現がみられた。

底層幹細胞・TA 細胞や表皮角化細胞の分化過程における FABP5 遺伝子の発現制御機構や機能は解明されていない。一方、著者らは、FABP5 遺伝子が正常ヒト前立腺細胞のがん化過程で、転写因子 c-Myc および Sp1 の誘導と FABP5 遺伝子プロモーター領域の DNA 脱メチル化によって高発現し、前立腺がん細胞の増殖・転移能獲得において重要な機能を果たしていることを見出している[4, 10-11, 13]。したがって、本研究課題では、正常ヒト新生児表皮角化細胞の分化過程および分化した表皮角化細胞における FABP5 遺伝子の発現制御機構と機能の解明を目的とした。

2．方　法

2．1．ヒト表皮角化細胞の培養

本研究では、増殖能と分化能を有する正常ヒト新生児表皮角化細胞（NHEK（NB）、クラボウ）を表皮角化細胞として用いた。また、表皮角化細胞の分化は、培地に Ca^{2+}（最終濃度 1 mM）を添加し、一定時間培養後、分化マーカー遺伝子の発現を解析することによって評価した。表皮角化細胞は、2500 個 /cm^2 の密度で播き、5 ～ 6 日間培養後、30-80％コンフルエントになる前に 2 次培養した。

2．2．FABP アイソフォーム遺伝子の発現解析

未分化および分化した表皮角化細胞からそれぞれ mRNA を調製後、ヒト FABP アイソフォーム遺伝子の発現レベルを半定量 RT-PCR で解析した。

2．3．FABP5 および他の関連遺伝子の発現解析

表皮角化細胞を一定時間培養後、細胞から mRNA を調製後、目的遺伝子の発現（mRNA）レベルを qPCR で解析した。また、FABP5 遺伝子の転写制御に関与する c-Myc と Sp1 の発現レベルを qPCR で解析した。表皮角化細胞の分化マーカーとして、Keratin 10 などを用いた。

2．4．ヒト表皮角化細胞の分化過程における FABP5 の細胞内局在

未分化および分化した表皮角化細胞をそれぞれヒト FABP5 抗体と反応させ、分化前後の細胞における FABP5 の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡で評価した。細胞核は、Hoechst 33342 で染色した[10]。

2．5．FABP5 遺伝子プロモーター領域（CpG アイランド）のメチル化状態の解析

未分化および分化した表皮角化細胞を一定時間培養後、各細胞からゲノム DNA を調製後、バイサルファイトシークエンス法で、ヒト FABP5 遺伝子プロモーター領域（CpG アイランド）のメチル化状態を解析した[5]。

2．6．ヒト表皮角化細胞における FABP5 遺伝子の機能解析

表皮角化細胞の FABP5 遺伝子を siRNA でノックダウンし、48 時間後に Ca^{2+} 添加によって分化誘導した。48 時間培養後、分化マーカー遺伝子（Keratin 10 など）の発現レベルを qPCR で評価した。FABP5 遺伝子のノックダウンは、mRNA（qPCR）とタンパク質（ウエスタンブロット）の発現レベルで確認した。

2．7．ヒト表皮角化細胞における核内受容体シグナルの機能解析

表皮角化細胞において、核内受容体とその関連遺伝子（ERRα, β, γ、PPARα, β/δ, γ、PGC-1α, β など）の発現を解

析した。また、比較的発現レベルの高いERRαとPPARβ/δについて、表皮角化細胞の分化過程における機能を評価した。まず、各遺伝子をsiRNAによってノックダウンし、48時間後にCa^{2+}添加によって分化誘導した。48時間経過後、分化マーカー遺伝子の発現レベルをqPCRで解析し、ERRαとPPARβ/δの表皮角化細胞の分化過程に与える影響を評価した。

2．8．ヒト表皮角化細胞におけるFABP5と核内受容体シグナルのクロストーク機構の解析

表皮角化細胞において、FABP5が核内受容体ERRαシグナル伝達系とクロストークしているかどうか解析した。FABP5遺伝子をsiRNAでノックダウンし、ERRαの標的遺伝子（mRNA）の発現レベルをqPCRで解析した。

3．結　果

3．1．ヒト表皮角化細胞の分化過程におけるFABPアイソフォームの発現解析

未分化および分化した表皮角化細胞において、10種類のヒトFABPアイソフォーム遺伝子の発現レベルを半定量RT-PCRで解析した。その結果、図2に示すように、FABP5が未分化および分化した表皮角化細胞において、特異的に発現していることがわかった（図2）。また、未分化細胞に比べて分化した細胞の方が、FABP5遺伝子の発現レベルが3～4倍高いことがわかった。すなわち、FABP5は増殖能と分化能をもつ表皮角化細胞（NHEK）でも少量発現しているが、分化した細胞においてより高発現していることがわかった。したがって、FABP5は未分化・分化表皮角化細胞において重要な機能を果たしている可能性が示唆された。

3．2．ヒト表皮角化細胞の分化過程におけるFABP5遺伝子プロモーター領域のメチル化状態の解析

未分化および分化した表皮角化細胞を一定時間培養後、各細胞からゲノムDNAを調製後、バイサルファイトシークエンス法で、FABP5遺伝子プロモーター領域（CpGアイランド）のメチル化状態を解析した。その結果、両細胞由来のFABP5遺伝子プロモーター領域は、ほぼ同程度に脱メチル化されていた。したがって、FABP5遺伝子の発現に重要な転写因子c-Mycの結合サイト（E-box: CAGCGTG, 転写開始点下流にクラスター形成）は、未分化・分化表皮角化細胞で脱メチル化されていることがわかった（図3, 上流（プロモーター＋エキソン1）領域; 分化前：98.7 ± 0.4%, 分化後：99.3 ± 0.3%, 下流（イントロン1）領域; 分化前：99.7 ± 0.3%, 分化後：98.5 ± 1.3%）。

3．3．FABP5遺伝子の発現に関与している転写因子c-MycとSp1の発現解析

次に、未分化および分化した表皮角化細胞におけるc-MycとSp1の発現レベルを解析した。表皮角化細胞を一定時間培養後、分化過程におけるc-MycとSp1の発現をqPCRで解析したところ、未分化と分化細胞で各遺伝子の発現レベルに有意な差はみられなかった。したがって、分化に伴いFABP5遺伝子の発現が亢進するのは、表皮角化細胞の分化過程でFABP5遺伝子プロモーター領域の脱メチル化やc-MycとSp1の発現レベルが亢進するためではないことが示唆された。今後、表皮角化細胞の分化に伴いFABP5遺伝子の発現が亢進するメカニズムの解明が必要である（図3）。

3．4．ヒト表皮角化細胞におけるFABP5遺伝子の機能解析

これまで、表皮角化細胞の分化過程および分化した表皮角化細胞におけるFABP5の詳細な機能は解明されていない。したがって、FABP5遺伝子のsiRNAによるノックダウンで、表皮角化細胞の分化マーカー遺伝子の発現レベルをqPCRで評価し、表皮角化細胞の増殖および分化過程に

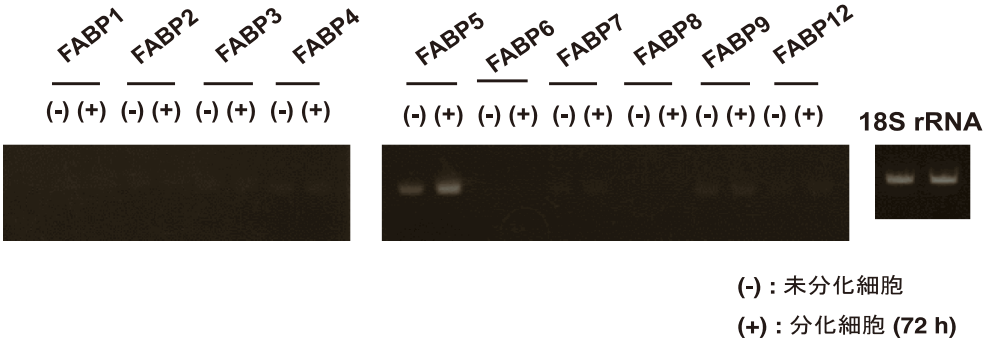


図2　ヒト表皮角化細胞ではFABPが特異的に発現する
未分化および分化誘導した正常ヒト新生児表皮角化細胞（NHEK）からmRNAを調製後、ヒトFABPアイソフォーム遺伝子（mRNA）の発現を半定量RT-PCRで解析した。ヒト表皮角化細胞では、FABP5が特異的に発現していた。FABP5の発現は、未分化表皮角化細胞（(-), Ca^{2+}無添加）では低レベルであったが、分化した細胞（(+), Ca^{2+}添加）では、発現が3～4倍亢進した。

おけるFABP5の機能を解析した。その結果、未分化表皮角化細胞においてFABP5遺伝子のノックダウンによって、表皮角化細胞の分化マーカー遺伝子（Keratin 10）の発現レベルが有意に低下した（図4）。したがって、FABP5は表皮角化細胞の分化や分化マーカー遺伝子（Keratin 10）の発現制御において、重要な機能を果たしている可能性が示唆された。

3．5．ヒト表皮角化細胞の分化過程におけるFABP5の細胞内局在の解析

未分化および分化した表皮角化細胞におけるFABP5の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡で解析した。その結

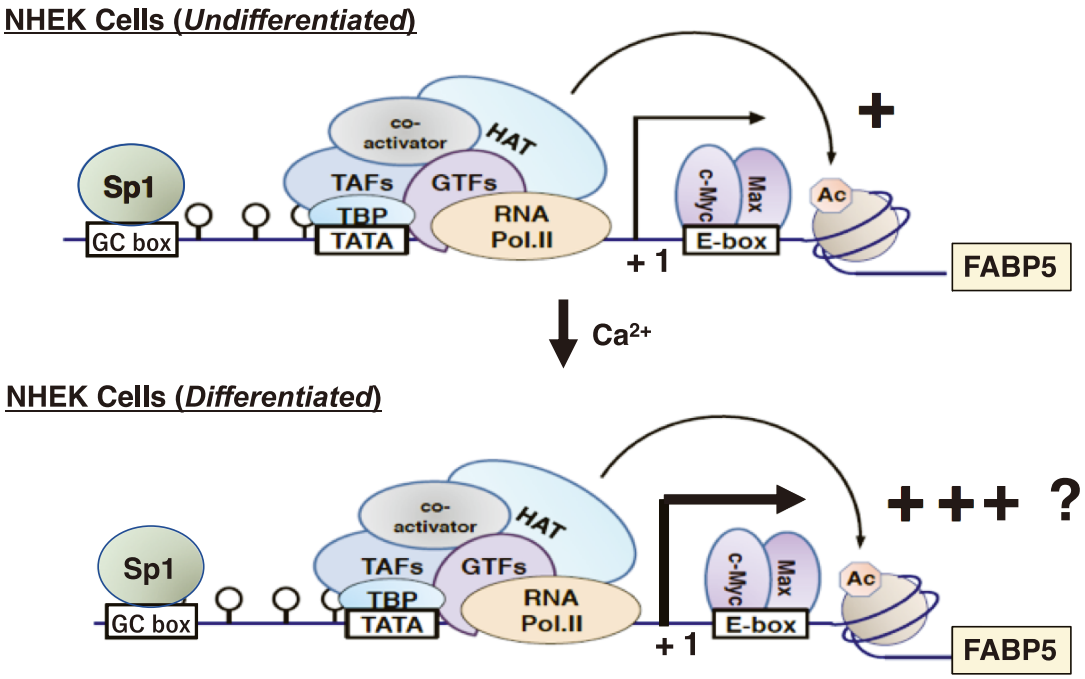


図３　ヒト表皮角化細胞における FABP5 遺伝子発現制御機構の解析

未分化および分化誘導した正常ヒト新生児表皮角化細胞 (NHEK) からゲノム DNA を調製し、FABP5 遺伝子プロモーター領域（CpG アイランド）のメチル化状態を解析した。その結果、ほとんどの領域の CpG アイランドが、いずれの細胞でも脱メチル化されていた（図中○）。また、FABP5 遺伝子の発現に関与する主要な転写因子 c-Myc と Sp1 の発現レベルも、分化・未分化細胞でほとんど変化はみられなかった。表皮角化細胞の分化に伴い FABP5 遺伝子の発現が亢進するメカニズムは不明。

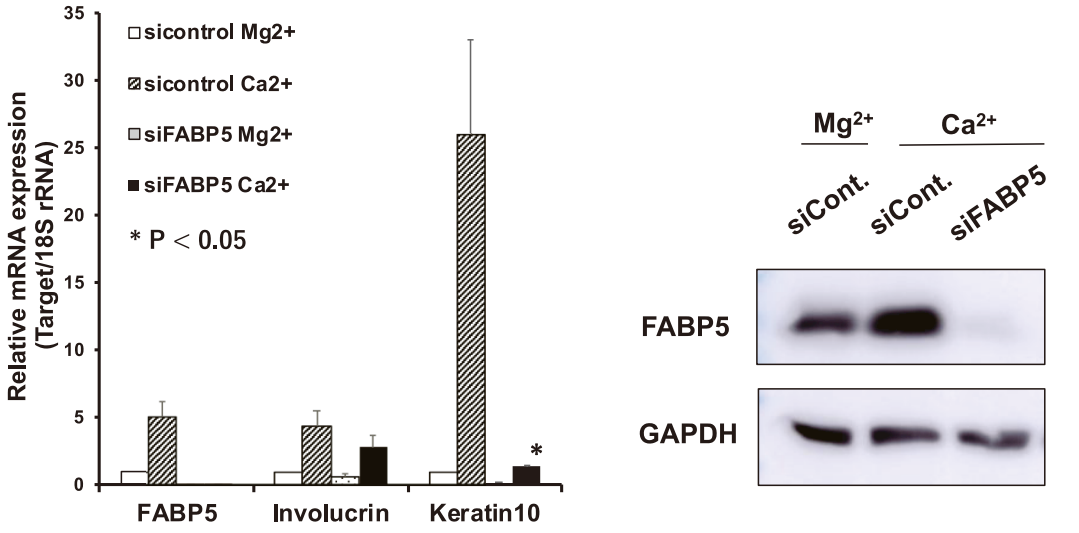


図４　ヒト表皮角化細胞における FABP5 の機能解析

未分化の正常ヒト新生児表皮角化細胞（NHEK）で発現している FABP5 遺伝子を siRNA でノックダウンし、48 時間後に Ca^{2+} 添加によって細胞を分化誘導した。さらに 48 時間培養後、分化マーカー遺伝子（Keratin 10 など）の発現レベルを qPCR で評価した（左）。FABP5 遺伝子のノックダウンの確認は、mRNA（左）とタンパク質（右）の発現レベルで評価した。

果、未分化表皮角化細胞では、細胞質に比べて核内に多く局在している傾向があった。一方、分化した細胞では、FABP5の発現上昇に伴い、核内だけでなく細胞質にも局在がみられた。未分化および分化後の表皮角化細胞におけるFABP5の細胞内局在と機能の関係について、今後詳細な解析が必要である。

3．6．ヒト表皮角化細胞における核内受容体シグナルの機能解析

次に、核内受容体遺伝子（ERRα、PPARβ/δなど）が表皮角化細胞の分化過程に関与しているかどうか検討した。各遺伝子特異的siRNAによるノックダウンによって分化マーカー遺伝子の発現レベルをqPCRで解析し、これらの核内受容体遺伝子の表皮角化細胞分化過程に与える影響を評価した。その結果、未分化表皮角化細胞のERRαあるいはPPARβ/δ遺伝子のノックダウンによって、表皮角化細胞の分化マーカー遺伝子（Keratin 10など）の発現レベルが有意に低下した。したがって、ERRαやPPARβ/δは、表皮角化細胞の分化あるいは分化マーカー遺伝子の発現制御において、重要な機能を果たしている可能性が示唆された。

3．7．ヒト表皮角化細胞におけるFABP５と核内受容体シグナルのクロストーク機構の解析

未分化表皮角化細胞のFABP5、ERRαおよびPPARβ/δ遺伝子のsiRNAによるノックダウンによって、表皮角化細胞の分化マーカー遺伝子（Keratin 10など）の発現レベルが有意に低下した。したがって、これらの遺伝子は表皮角化細胞の分化や分化マーカー遺伝子の発現制御において、重要な機能を果たしている可能性が示唆された。

次に、表皮角化細胞において、FABP5がERRαシグナル伝達系とクロストークしているかどうか解析した。その結果、FABP5遺伝子のノックダウンによってERRαのいくつかの標的遺伝子の発現が有意に低下したことから、表皮角化細胞においても、FABP5とERRαシグナルがクロストークしている可能性が示唆された。上記3．5.でFABP5は表皮角化細胞において核内に局在していることから、FABP5とERRδシグナルのクロストークは、表皮角化細胞におけるFABP5の機能発現に重要である可能性が示唆された。

4．考　察

表皮基底層幹細胞が分化したTA細胞は、幹細胞に比べて高い細胞増殖能と分化能をもち、皮膚の創傷治癒力や老化において極めて重要な機能を果たしていると考えられている。FABP5はTA細胞のマーカー遺伝子として報告されているが、TA細胞におけるFABP5遺伝子の発現制御機構および機能は解明されていない[14]。著者らは、これまでに脂肪酸の細胞内輸送に関与しているFABP5が表皮有棘層、顆粒層、および皮脂腺などの細胞で発現し、皮膚の水分保護バリアー形成や脂質代謝制御において重要な機能を果たしていることを見出したが[1-3]、その分子基盤や表皮角化細胞におけるFABP5遺伝子の機能や発現制御機構は解明されていない。

一方、これまでにFABP5が転移能を獲得した悪性がん細胞（前立腺がん、大腸がん、乳がんなど）において高発現していることを見出しており、FABP5遺伝子プロモーター領域のメチル化状態とFABP5遺伝子の発現レベルが密接に関係していることを明らかにしている[4]。FABP5遺伝子プロモーター領域のCpGアイランドががん化過程で脱メチル化され、E-box（CAGCGTG）の脱メチル化に伴って、c-Myc依存的なFABP5遺伝子の転写活性化が起こることを明らかにした[4]。しかしながら、表皮角化細胞では、分化に伴いFABP5遺伝子の発現は有意に上昇していたが、FABP5遺伝子プロモーター領域（CpGアイランド）は、分化および未分化の両細胞間でほとんど差はみられず、脱メチル化されていた。さらに、FABP5遺伝子の発現に重要な転写因子c-MycとSp1の発現レベルについても、分化・未分化細胞間でほとんど差がみられなかった。今後、表皮角化細胞の分化に伴いFABP5遺伝子の発現が亢進するメカニズムの解明が必要である。

次に、表皮角化細胞の分化過程、および分化した表皮角化細胞におけるFABP5の機能を解明するために、FABP5遺伝子のノックダウンによって分化マーカー遺伝子の発現レベルをqPCRで評価した。その結果、未分化表皮角化細胞のFABP5遺伝子ノックダウンによって、表皮角化細胞の分化マーカー遺伝子（Keratin10）の発現レベルが有意に低下した。したがって、FABP5は表皮角化細胞の分化あるいは分化マーカー遺伝子の発現制御において、重要な機能を果たしている可能性が示唆された。

また、未分化表皮角化細胞のERRαおよびPPARβ/δ遺伝子のノックダウンによって、表皮角化細胞の分化マーカー遺伝子（Keratin 10など）の発現レベルが有意に低下したことから、ERRαやPPARβ/δは、表皮角化細胞の分化あるいは分化マーカー遺伝子の発現制御において、重要な機能を果たしている可能性が示唆された。今後、表皮角化細胞におけるERRαやPPARβ/δの機能を解明するために、ERRαやPPARβ/δの標的遺伝子の同定とその機能解析が必要である。興味深いことに、FABP5遺伝子のノックダウンによってERRαの標的遺伝子の発現が有意に低下したことから、表皮角化細胞において、FABP5がERRαシグナルとクロストークしている可能性が示唆された。FABP5は未分化表皮角化細胞では核内にも局在していることから、FABP5とERRαシグナルのクロストークは、がん細胞の場合と同様に、表皮角化細胞におけるFABP5の機能発現

に重要であることが示唆された。今後、詳細な解析が必要である。

本研究課題は、皮膚の恒常性維持において重要な遺伝子として同定されたFABP5の表皮角化細胞における発現と機能制御機構の解明を目指したものである。得られた研究成果は、保湿効果やアンチエイジング作用を有する化粧品の開発など、コスメトロジーの発展に貢献する可能性が期待される。さらに、本研究課題の所期成果は、FABP5および核内受容体(PPARβ/δ、ERRαなど)シグナルの破綻に起因する皮膚疾患(がん、乾鮮、炎症など)の予防・治療法の開発、老化メカニズムの解明などにも貢献する可能性が期待される。このように、本研究課題の成果は、コスメトロジーおよび医療分野におけるイノベーション創出に貢献する可能性が期待される。

最後に、本研究を遂行するにあたり、公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成をいただき、深謝いたします。

(引用文献)

1) R. Watanabe, H. Fujii, A. Yamamoto, H. Yamaguchi, T. Takenouchi, K. Kameda, M. Ito, T. Ono, Expression of cutaneous fatty acid-binding protein and its mRNA in rat skin. *Arch. Dermatol. Res.* 288: 481-483, 1996

2) R. Watanabe, H. Fujii, A. Yamamoto, T. Hashimoto, K. Kameda, M. Ito, T. Ono, Immunohistochemical distribution of cutaneous fatty acid-binding protein in human skin. *J. Dermatol. Sci.* 16: 17-22, 1997

3) H. Yamaguchi, A. Yamamoto, R. Watanabe, N. Uchiyama, T. Ono, H. Fujii, M. Ito, High transepidermal water loss induces fatty acid synthesis and cutaneous fatty acid-binding protein expression in rat skin. *J. Dermatol. Sci.* 17: 205-213, 1998

4) K. Kawaguchi, A.Kinameri, S. Suzuki, S. Senga, Y. Ke, H. Fujii, The Cancer-Promoting Gene Fatty Acid-Binding Protein 5 (FABP5) is Epigenetically Regulated During Human Prostate Carcinogenesis. *Biochem. J.* 473, 449-461, 2016

5) K. Kawaguchi, S. Senga, C. Kubota, Y. Kawamura, Y. Ke, H. Fujii, High expression of fatty acid-binding protein 5 promotes cell growth and metastatic potential in colorectal cancer cells. *FEBS Openbio* 6 (3), 190-199, 2016

6) E. A. Morgan, S. S. Forootan, J. Adamson, C. S. Foster, H. Fujii, M. Igarashi, C. Beesley, P. H. Smith, Y. Ke, Expression of Cutaneous fatty acid-binding protein (C-FABP) in prostate cancer: Potential prognostic marker and target for tumougigenicity-suppression *Int. J. Oncol.* 32: 767-775, 2008

7) J. Adamson, E. A. Morgan, C. Beesley, Y. Mei, C. S. Foster, H. Fujii, Y. Ke, High level expression of cutaneous fatty acid-binding protein in prostatic carcinomas and its effect on tumorigenecity. *Oncogene* 22 (18) : 2739-2749, 2003

8) C. Jing, C. Beesley, C. S. Foster, H. Chen, P. S. Rudland, D. C. West, H. Fujii, Y. Ke, Human cutaneous fatty acid-binding protein induces metastasis by up-regulating the expression of vascular endothelial growth factor gene in rat Rama 37 model cells. *Cancer Res.* 61: 4357-4364, 2001

9) C. Jing, C. Beesley, C. S. Foster, P. S. Rudland, H. Fujii, T. Ono, H. Chen, P. H. Smith, Y. Ke, Identification of the messenger RNA for human cutaneous fatty acid-binding protein as a metastasis inducer. *Cancer Res.* 60 : 2390-2398, 2000

10) S. Senga, K. Kawaguchi, N. Kobayashi, H. Fujii, A novel Fatty acid-binding protein 5-Estrogen-relatedreceptor α signaling pathway promotes cell growth and energy metabolism in prostate cancer cells. *Oncotarget* 9 (60), 31753-31770, 2018

11) S. Senga, N. Kobayashi, K. Kawaguchi, A. Ando, H. Fujii, Fatty acid-binding protein 5 (FABP5) promotes lipolysis of lipid droplets, *de novo* fatty acid (FA) synthesis and activation of nuclear factor-kappa B (NF-kB) signaling in cancer cells. *BBA-Molecular and Cellular Biology of Lipids* 1863, 1057-1067, 2018

12) K. Watanabe, H. Fujii, T. Takahashi, M. Kodama, Y. Aizawa, T. Ono, G. Hasegawa, M. Naito, T. Nakajima, Y. Kamijyo, F. J. Gonzalez, T. Aoyama, Constitutive regulation of cardiac fatty acid metabolism through peroxisome proliferator-activated receptor α (PPARα) associated with age-dependent cardiac toxicity. *J. Biol. Chem.* 275 (29) : 22293-22299, 2000

13) C. Jing, C. Beesley, C. S. Foster, P. S. Rudland, H. Fujii, T. Ono, H. Chen, P. H. Smith, Y. Ke, Identification of the messenger RNA for human cutaneous fatty acid-binding protein as a metastasis inducer. *Cancer Res.* 60 : 2390-2398, 2000

14) R. F.L. O'Shaughnessy, J. P. Seery, J. E. Celis, A. M. Frischauf, F. M. Watt, PA-FABP, a novel marker of human epidermal transit amplifying cells revealed by 2D protein gel electrophoresis and cDNA array hybridization. *FEBS Lett.* 486, 149, 2000

制御性 T 細胞による皮膚恒常性維持メカニズムの解明

東京大学大学院薬学系研究科免疫・微生物学教室

堀　昌平

Foxp3-expressing regulatory T cells (Treg) are indispensable for the maintenance of immunological self-tolerance and immune homeostasis. Recent studies have revealed that Treg cells reside not only in lymphoid, but also in non-lymphoid, tissues including the skin and that skin Treg cells play an important role in maintaining skin homeostasis. However, the molecular mechanisms that regulate Treg accumulation and function in the skin remain elusive. We have previously shown that the Foxp3^{A384T} mutation, which was identified in human IPEX patients, impairs accumulation of Treg cells in selective tissues including the skin and causes inflammation in those sites at least in part by repressing expression of the transcription factor BATF, which act down-stream of TCR signaling. In this study, by generating and analyzing Treg-specific BATF conditional knockout mice, we show that BATF is indispensable for the accumulation and suppressive function of Treg cells in the skin. BATF appears to cooperate with Foxp3 to control Treg accumulation in the skin by promoting expression of molecules implicated in leukocyte migration to and retention in the skin. Furthermore, we also show that skewed TCR repertoire selectively exacerbates skin inflammation in Foxp3^{A384T} mutant mice, which otherwise develop mild dermatitis. In summary, our results suggest that interactions between Foxp3 and the TCR-BATF axis represents an important determinant of Treg accumulation and anti-inflammatory function in the skin.

1．緒　言

皮膚は様々な病原体の侵襲から身体を守る免疫応答の場であるとともに、組織を傷害する過剰な免疫応答から「自己」を守る免疫寛容の場でもある。「自己」に対する免疫寛容は制御性T細胞（regulatory T cells、以下Treg）によって能動的に維持されている。我々は、ヒト自己免疫疾患IPEX（immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked）症候群の原因遺伝子として同定されたFoxp3がTreg分化と機能を司るマスター転写因子として機能することを世界に先駆けて報告し、Tregの分子基盤と生理的意義を明らかにした[1, 2]。近年、Tregは皮膚にも多数存在し、Tregの数的・機能的な異常がIPEXを含む様々な皮膚疾患（アレルギー疾患、自己免疫疾患など）の発症にかかわっていることが明らかにされてきた。さらに最近、皮膚におけるTregの機能は免疫抑制に留まらず、創傷治癒や毛包幹細胞の増殖・分化の促進など皮膚組織自体の恒常性維持にも及ぶことが明らかにされており、皮膚恒常性維持におけるTregの役割が注目されている[3]。しかしながら、Tregが皮膚に移行・集積し機能する分子メカニズムは未だ十分に解明されていない。

Tregは通常型Foxp3-T細胞（conventional T cells; Tconv）と同様に、2次リンパ組織を巡回するCD44^{low} CCR7^{high}ナイーブ型サブセットと、抗原刺激を受けて活性化したCD44^{high} CCR7^{low}エフェクター型サブセットに大別され、非リンパ組織のTregは専らエフェクター型Tregによって構成されている。我々はFoxp3によるTreg分化と機能の制御メカニズムを明らかにするために、ヒトIPEX患者で同定されているFoxp3変異を導入したマウスモデルを作製してその影響を分子、細胞、個体レベルにわたって解析してきた。その過程で、機能欠失型変異がTregの分化や抑制機能など広範な性質を障害して皮膚、肺、肝臓など様々な組織にTh1およびTh2型の炎症を惹起するのに対し、Foxp3^{A384T}変異（Ala384のThrへの置換）がDNA結合特異性を拡大させる機能獲得型変異であり、皮膚・肺・大腸など特定の組織におけるTregの集積を障害し、これらの組織選択的にTh2およびTh17型の炎症を惹起することをみいだした。さらに、Foxp3^{A384T}マウスにおけるこれら組織へのTregの集積障害はAP-1ファミリーに属する転写因子BATFの発現抑制に起因することを明らかにした[4]。しかしながら、BATFがどのように皮膚へのTregの集積を制御するのか、また、Foxp3^{A384T}変異がなぜ皮膚や肺などの組織選択的にTregの集積を障害して組織選択的な自己免疫疾患を惹起するのかは明らかでない。

本研究で我々は、これら2つの問題の解明に取り組んだ。まず、BATFによるTregの皮膚への集積制御メカニズムとその意義の解明を目指した。そして、TregのTCRレパトアは組織間で異なっており、組織集積にはTCR特異性が重要であるという報告に基づき、Foxp3^{A384T}変異により皮膚抗原特異的なTregのTCRクローンが欠失し、そのために皮膚抗原に対する自己免疫応答の制御が破綻するの

Elucidating the mechanisms of regulatory T cell-dependent maintenance of skin homeostasis

Shohei Hori

Laboratory for Immunology and Microbiology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

ではないかと仮説を立て、その検証を試みた。

2．方法と結果

2．1．BATFによるTregの皮膚への集積メカニズムとその意義

Tregの皮膚への集積と炎症制御における転写因子BATFの役割を明らかにするために、*Foxp3*^{YFPCre}マウスと*Batf*^{flox}マウスを交配させてTreg特異的BATF欠損マウス（以下cKOマウス）を作製した。cKOマウスは生後8週齢までに約半数が死亡し、皮膚、肺、肝臓、大腸などの組織において炎症細胞の浸潤を伴う激しい炎症を呈した（図1）。このとき各組織のCD4^{+}T細胞中のCCR7^{low} Foxp3^{+}エフェクター型Treg、CCR7^{low} Foxp3^{-} エフェクター型Tconvの割合を検討したところ、前者が著しく減少していたのに対し、後者は逆に顕著に増加していた。以上の結果から、BATFがTregの皮膚への集積に必須の役割を担っていることが明らかになった。

BATFによるTregの皮膚への集積メカニズムを明らかにするために、cKO Tregおよび野生型TregのRNA-seq解析を行い、BATFの標的遺伝子の同定を行った。その結果、BATF cKO Tregではエフェクター型Tregに高発現するケモカイン受容体、サイトカイン受容体、接着分子、副刺激分子などの発現が低下しており、なかでもリンパ球の皮膚への移行と保持に関与することが報告されている複数の分子の発現が低下していた。このことから、BATFがこれら分子の発現を制御することによりTregの皮膚への集積を制御していると考えられた。

次に、TregおよびTconvにおいてBATFのChIP-seq解析を行い、ゲノム上のBATF結合領域を比較した。その結果、全BATF結合領域のうち18.6%がTreg選択的に結合する領域であった。そしてこれらTreg選択的BATF結合領域近傍に存在する遺伝子のGene Ontology解析を行ったところ、Foxp3の標的遺伝子が多く含まれることがわかった。実際、Treg選択的BATF結合領域の約半数にFoxp3も結合していた。これらTreg選択的BATF結合領域の近傍にはエフェクター型Treg選択的に高発現する遺伝子が多く含まれており、それらの遺伝子近傍のTreg選択的BATF結合領域には、特にエフェクター型Treg選択的にFoxp3が結合していた。以上の結果から、BATFはFoxp3と機能的に協調することによりエフェクター型Treg選択的遺伝子の発現を制御する可能性が考えられた。

以上の結果から、BATFのみならずFoxp3もエフェ

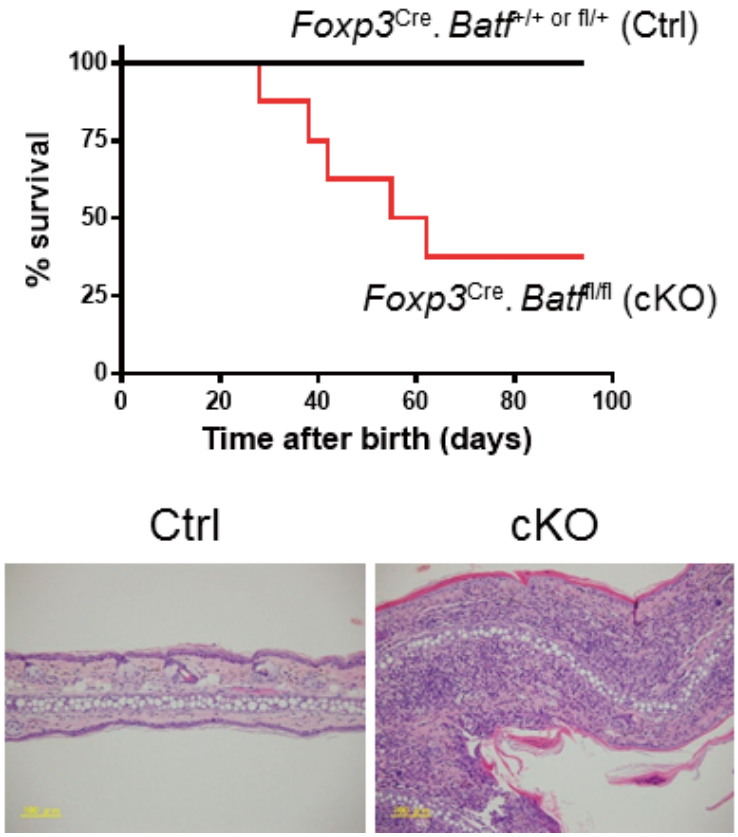


図1　Treg特異的BATF欠損マウスは皮膚炎を伴う致死的な自己免疫疾患を発症する. Treg特異的BATF欠損マウス（cKO）と対照マウス（Ctrl）マウスの生存曲線（上）と皮膚（耳介）のHE染色像（下）.

クター型Tregの分化と組織への集積に重要である可能性が考えられた。この可能性を検証するために、Foxp3のDNA結合活性を欠失させるamorphic変異であるFoxp3^{R397W}変異を導入したノックインマウスを解析したところ、このFoxp3変異マウスもエフェクター型Tregを欠いており、皮膚におけるTregも激減していた。

2．2．皮膚炎制御におけるTregのTCRレパトアの役割

Foxp3^{A384T}変異マウスにおいてなぜ皮膚を含む特定の臓器においてTregの集積に異常がみられ、これらの組織選択的に炎症が発症するのかを明らかにすることを目指して研究を進めた。1つの仮説として、これらの組織に特異的に発現する（自己）抗原を認識する抗原特異的Tregがこの変異により欠損することが考えられる。この仮説を検証するために、次世代DNAシーケンシングによりTregおよびTconvのT細胞受容体（TCR）レパトア解析を行うことにした。

これまでに、独自に樹立した単一のTCRβ鎖を発現するTCRβ^{fixed}マウスを活用し、TCRα鎖のレパトアを次世代シーケンシングにより網羅的に解析する手法を確立している（TCRβ鎖を固定することで、TCRα配列を決定すれば個々の細胞のTCRのクローン型を一義的に決定できる）。そして、このマウスとFoxp3^{A384T}変異マウスを交配させ、TCRβ^{fixed} Foxp3^{A384T}マウスでも固定しない（以下TCRβ^{WT}と表記）Foxp3^{A384T}マウスと同様の組織選択的なTregの減少、組織選択的な炎症がみられるかを検討した。炎症の指標としては、組織から単離される白血球数と炎症性サイトカインを発現するTconvの割合を計測した。その結果、TCRβ鎖の固定の有無にかかわらず、皮膚と肺ではFoxp3^{A384T}変異によりTregの割合が大きく減少し白血球数が増加したが、肝臓ではTregの減少と白血球数の増加は認められなかった。

一方で、TCRβ^{fixed} Foxp3^{A384T}マウスではTCRβ^{WT} Foxp3^{A384T}マウスよりも皮膚（耳介）の厚み、白血球数（特に好中球数）が選択的に増加することがわかった。また炎症の程度に大きな個体差がみられた（図2）。皮膚の炎症増悪と関連する遺伝子を定量的RT-PCRで探索した所、炎症が増悪したTCRβ^{fixed} Foxp3^{A384T}マウスの皮膚では、TCRβ^{WT} Foxp3^{A384T}マウスと比べTh1応答に関連するケモカインとサイトカイン遺伝子の発現が特異的に亢進していた。

研究の過程で、C57BL/6背景（MHCハプロタイプはH-2^{b}）と考えられていたTCRβ^{fixed}Foxp3^{WT}およびTCRβ^{fixed}Foxp3^{A384T}マウスに、B10.BR系統に由来するMHCハプロタイプ（H-2^{k}）が混入していることが発覚した。そこで、皮膚炎の個体差がMHCハプロタイプの違いによるのではないかと考え、TCRβ^{fixed} Foxp3^{A384T}マウスをH-2のハプロタイプごとに分類し、それぞれの皮膚の肥厚、皮膚のTh1応答関連遺伝子の発現を比較した。その結果、H-2$^{k/k}$およびH-2$^{k/b}$背景のTCRβ^{fixed} Foxp3^{A384T}マウスでのみ顕著な皮膚の肥厚やTh1応答関連遺伝子の発現上昇がみられた。

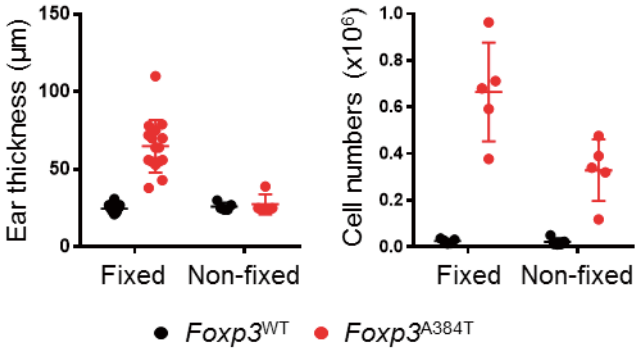


図2　TCRβ鎖固定によるFoxp3^{A384T}変異マウスの皮膚炎増悪．
耳介の厚み（左）と白血球数（右）．

3．考察・総括

Tregは炎症抑制のみならず、創傷治癒、発毛など、皮膚の様々な生理的、病理的現象に深くかかわっている。従って、皮膚におけるTregの集積と機能のメカニズムを明らかにすることは、自己免疫疾患やアレルギー疾患などの皮膚疾患の治療という観点はもちろん、皮膚の美容と健康を保つというコスメトロジーの観点からも重要な課題である。

本研究により、Tregの皮膚への集積と炎症抑制機能において転写因子BATFが必須の役割を担っていること、BATFはTregの皮膚への移行・保持にかかわることが知られている遺伝子群の発現を制御することで皮膚への集積を制御していることが明らかになった。さらに、Tregの皮膚への集積にはFoxp3も重要であり、Foxp3はBATFと協調することでエフェクター分化と皮膚への集積を制御する可能性が示唆された。このことは、BATFとFoxp3の機能的協調作用を人為的に強化または阻害することで、皮膚においてTregとTconvのバランスを操作することができる可能性を示唆している。両者の機能的協調のメカニズムの詳細を明らかにすることで、皮膚における自己免疫疾患やアレルギーなどの病的免疫応答を抑制し、がん免疫を強化するための新しい治療法の開発につながることが期待される。

一方、TCRβ鎖を固定したFoxp3^{A384T}変異マウスの解析から、このマウスにおいて皮膚炎が選択的に増悪する個体がいること、そして皮膚炎の重症化はH-2^{k}ハプロタイプの存在に依存していることが明らかになった。現時点では皮膚炎の増悪にFoxp3^{A384T}変異とH-2^{k}のみで十分であるのか、TCRβ鎖の固定も必要であるのか不明である。この問題を検討するために、現在H-2^{k}背景のTCRβ^{WT} Foxp3^{A384T}マウスを作出して病態解析を進めている。いずれにせよ、MHC

はTCRレパトア選択において中心的な役割を担うことから、この知見はFoxp3^{A384T}変異とTCRレパトアの相互作用により皮膚炎が重症化することを強く示唆している。これまでの自己免疫疾患のGWAS解析から、疾患感受性遺伝子としてMHC遺伝子の特定のハプロタイプと*CTLA4*や*IL2Ra*などのTreg関連遺伝子が同定されている。このことは、特定のMHCハプロタイプによるTCRのレパトアの偏りとTregの異常が相互作用することで自己免疫疾患の組織選択性が規定されている可能性が考えられる。H-2^{k}ハプロタイプとFoxp3^{A384T}変異の相互作用による皮膚炎増悪のメカニズムを解明することで、自己免疫疾患の組織選択性を規定するメカニズムの解明の貢献することが期待される。

（引用文献）

1） Hori S, Nomura T, and Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299 : 1057-61, 2003

2） Komatsu N, and Hori S. Full restoration of peripheral Foxp3+ regulatory T cell pool by radioresistant host cells in scurfy bone marrow chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 : 8959-64, 2007

3） Kalekar LA, and Rosenblum MD. Regulatory T cells in inflammatory skin disease: from mice to humans. *Int Immunol* 31 : 457-63, 2019

4） Hayatsu N, Miyao T, Tachibana M, Murakami R, Kimura A, Kato T, Kawakami E, Endo TA, Setoguchi R, Watarai H, Nishikawa T, Yasuda T, Yoshida H, and Hori S. Analyses of a Mutant Foxp3 Allele Reveal BATF as a Critical Transcription Factor in the Differentiation and Accumulation of Tissue Regulatory T Cells. *Immunity* 47 : 268-83 e9, 2017

植物由来グルコシルセラミド中のスフィンゴイドジエンの構造特性と皮膚改善機能

神戸大学大学院農学研究科

水野　雅史、久世　雅樹

We have reported that a glycosylceramide (GlcCer) showed improvement in skin barrier function in mice. Only the GlcCer from pineapple (P-GlcCer) showed the activity among other plant-derived GlcCers. We supposed the specific activity would be originated from the chemical structure of P-GlcCer, especially the moiety of sphingadienine (SD) would have the responsibility for the specificity. Here, we reported the investigation of the structure-activity relationships between the cis/trans geometries of sphingadienines (SD-1~4) and their biological activities. The challenge was initiated to establish the stereoselective synthesis of sphingadienines (SD-1~4). The stereoselective hydrogenolysis of ene–yne was employed to construct the diene moiety. The ene–yne units were prepared by stereoselective addition of acetylide ions of ene–yne units to Garner's aldehyde. Wittig reaction and Johnson–Claisen reaction afforded the required starting ene–ynes. Lindlar catalyst reduced alkyne to afford cis olefin, on the other hand, Red-Al reduction afforded trans olefin. By combination of Wittig/Johonson–Claisen reactions and Lindlar/Red-Al reductions, stereoselective syntheses of SD-1~4 were achieved. Cytotoxicity of SD-1~4 was checked by MTT assay. These compounds showed no cytotoxicity against RBL-2H3 cells at the concentration of 4.71 μg/ml. To confirm the anti-allergic activity of SD-1~4, RBL-2H3 cells were preincubated with each geometric SDs before sensitization of anti-DNP IgE and challenge of DNP-albumin. β-Hexosaminidase released into supernatant was measured as an index of its degradation. It was demonstrated that 4*cis*, 8*cis*-SD possessed the highest activity compared with the other three ones.

1．緒　言

スフィンゴ脂質の一種であるセラミドは、皮膚角質層の主要な細胞間脂質として約50％を占めており、高い保湿効果とバリア機能で肌トラブルを防ぎ、うるおいを保ち健康な肌を維持することから、美肌成分として多くの基礎化粧品に配合されている。また最近になり、これらを経口摂取した際にも抗腫瘍や抗炎症効果を示すなど、食品機能成分として注目を集めている。我々の研究グループでは、植物由来のセラミド成分に着目し、その皮膚炎症状の改善効果における作用機序を解明することで、皮膚バリア機能の改善・向上を可能にするコスメとして将来的に利用するための学術基盤の形成を目指している。

皮膚に乾燥症状を引きおこす特殊飼料HR-ADを食餌として与えられたマウスに、パイナップル由来グルコシルセラミド（P-GlcCer）を経口投与すると皮膚炎症状の改善がおこることを報告している[1]。さらにその作用機序は、HR-ADによって引きおこされる血中TGF（Transforming Growth Factor）-β量の減少をP-GleCerが元の状態まで回復されるためであることを明らかにした。またその作用は、我々の研究室で新たに構築した培養細胞を用いた共培養系腸管疑似モデル[2]を用いることで、グルコシルセラミドが直接作用しているのではなく、腸上皮細胞から吸収される際に生成された脱グルコース化したセラミドそのものが機能していること、および小腸でのインターロイキン（IL）-23mRNA発現が間接的に関与していることも明らかにしている。そこで各種植物由来グルコシルセラミドにも、同様の機能があるかをこのモデル系を用いて確かめたところ、P-GlcCerでのみ活性が認められた。一般に植物由来グルコシルセラミドは構造上スフィンゴイド塩基部分が多様であり、スフィンガジエニン中にシス体とトランス体が存在することが知られている。このことを加味すると、P-GlcCerのみに活性が認められた要因がスフィンゴイド塩基部の構造に起因していると考えられた。そこで我々はP-GlcCerの代謝物が皮膚炎の回復に寄与しているのではないかという仮説を立て、セラミド中のスフィンゴイド塩基部分、特に4,8-スフィンガジエニンの二重結合が*cis:cis, cis:trans, trans:cis, trans:trans*の四種異性体を合成し、共培養系腸管疑似モデルを用いてIL-23mRNA発現を指標に、食品成分であるグルコシルセラミドのうちどのような立体構造を有していれば皮膚改善能をもたらすのかを明らかにすることを目的とした。

*

Structural Property and Improvement Activity of Skin Barrier Function by Sphingoid Diene in Plant-Derived Glucosylceramide

Masashi Mizuno*, Masaki Kuse

Graduate School of Agricultural, Kobe University

2．方　法

2．1．スフィンガジエニン異性体の完全化学合成

スフィンガジエニンの異性体が四種合成できれば、P-GlcCerの異性体は既知の手法で合成できる。このスフィンゴイド塩基部分を効

率よく化学合成するために収束的な合成経路を立案した。一般にアルキンを還元する際、①水素化アルミニウムリチウムではトランス還元が、②Lindlar触媒ではシス還元が選択的に進行するので、目的とする異性体を選択的に合成できる。そこで、あらかじめ選択的オレフィン化反応により合成した末端アルキンと、セリンから誘導したGarner's aldehydeとを結合し、*cis*あるいは*trans*のオレフィンを持つ末端アルキンをそれぞれ用意し、それらを①および②の方法を用いて選択的に還元することでスフィンゴイド塩基の異性体四種を合成することにした。4-5位炭素と8-9位炭素がcis/trnasで作り分けられた4種の4,8-sphingadienineをそれぞれをSD-1~4と呼ぶ(Figure 1)。

SD-1~4は、中間体(**1**, **2**)における4-5位炭素であるアルキン部分を、*cis*もしくは*trans*選択的に半還元(アルキンをアルケンに還元)することで合成できると考えた。そして、中間体(**1**, **2**)はGarner's アルデヒド(**3**)への末端アルキン(**4**, **5**)のアセチリドイオンのジアステレオ選択的な付加反応により得られると考えた。末端アルキン(**4**, **5**)は、目的物において8-9位炭素に該当する二重結合が*cis*もしくは*trans*として選択的に合成されている(Scheme 1)。

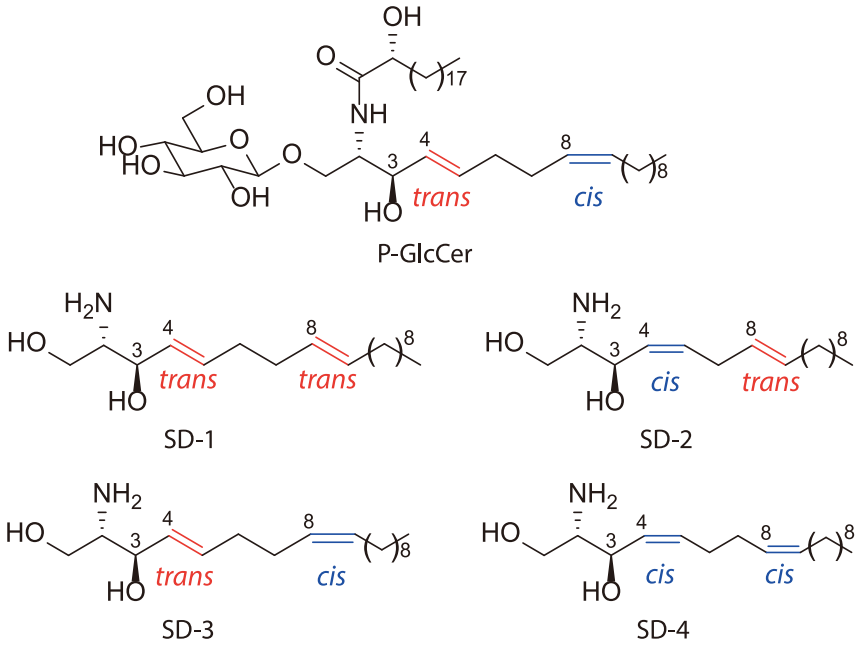
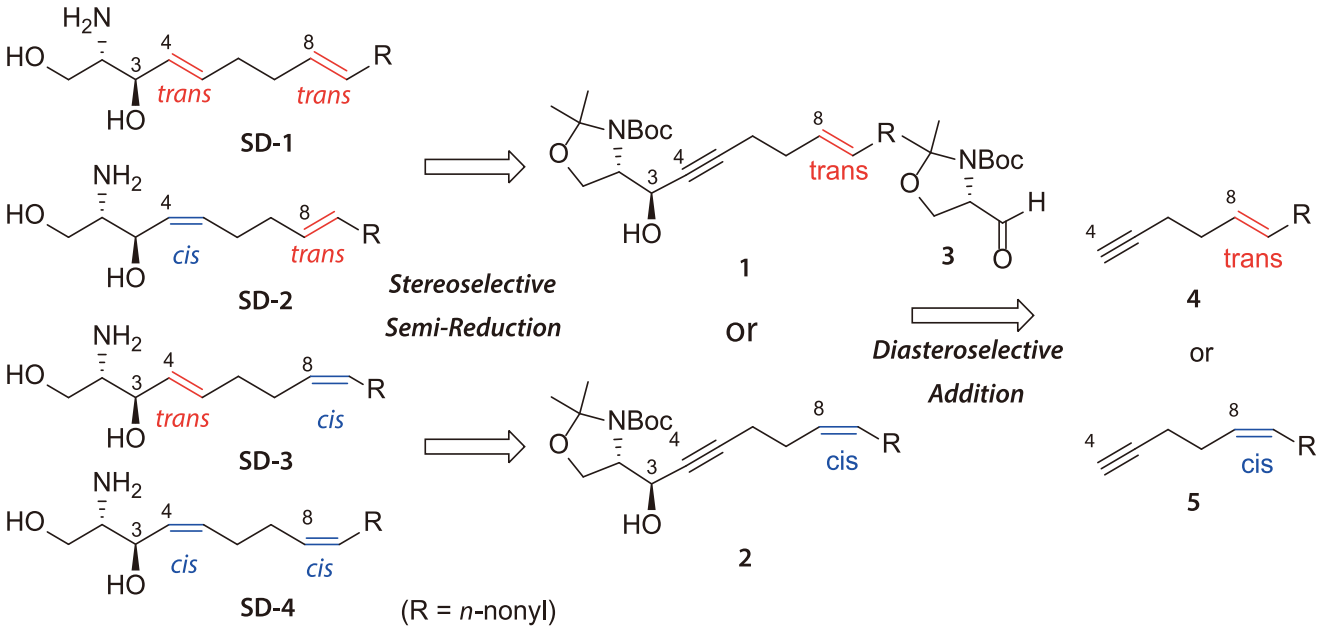


Figure 1　P-GlcCerと4種類の4,8-sphingadienineの異性体(SD-1~4)



Scheme 1　4種類の4,8-Sphingadienineの幾何異性体の逆合成解析

2．2．各異性体の細胞毒性

4種のSDの細胞毒性は、MTTアッセイにより評価した。RBL-2H3細胞を2.0 × 10^5cells/wellで24穴プレートに播種し、RPMI 1640培地中にてオーバーナイトでインキュベートした。培地を除去し、試験試料を含む培地を添加して37℃で6時間インキュベートした。培地を除去し、MTT溶液（1.21 mM in RPMI 1640, 110 μL）を細胞に添加し2時間後、MTT溶液を除去し、DMSO（200 μL）を添加した。マイクロプレートリーダーで570 nmの吸光度を測定した。細胞生存率はコントロール群と比較して算出した。

2．3．抗アレルギー活性測定[3)]

RBL-2H3細胞を2.0 × 10^5cells/wellで24穴プレートに播種し、RPMI 1640培地中にて一昼夜培養した。試験試料を含む培地を添加して37℃で2時間インキュベートした。終濃度200 ng/mLの抗TNP IgE抗体を添加し、4時間培養した。すべての培地をシラガニアン緩衝液（SB; 119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 40 mM NaOH, 25 mM PIPES, 5.6 mM glucose, 0.1% BSA, pH 7.2）に置き換えた後、終濃度20 ng/mLのTNP-BSAを添加し、37℃で1時間反応させた後、プレートを氷上に10分間静置し脱顆粒反応を停止させた。上清50 μLを96穴プレートに移し、等量の基質（0.2 Mクエン酸緩衝液中に*p*-nitrophenyl-*N*-acetyl-β-D-glucosaminideを終濃度1 mMで溶解, pH 4.5）と混合して37℃で1時間反応させた。停止液（0.2 M glycine-NaOH溶液, pH 13.0）を100 μL/wellで添加し、反応を終了させた。マイクロプレートリーダーで405 nmの吸光度を測定することで、酵素反応生成物である*p*-nitrophenolを定量し、これをβ-ヘキソサミニダーゼ遊離量の指標とした。上清中のβ-ヘキソサミニダーゼ遊離率は、脱顆粒誘導群の遊離量に対する百分率として算出した。

3．考　察

3．1．Garner's aldehydeの合成

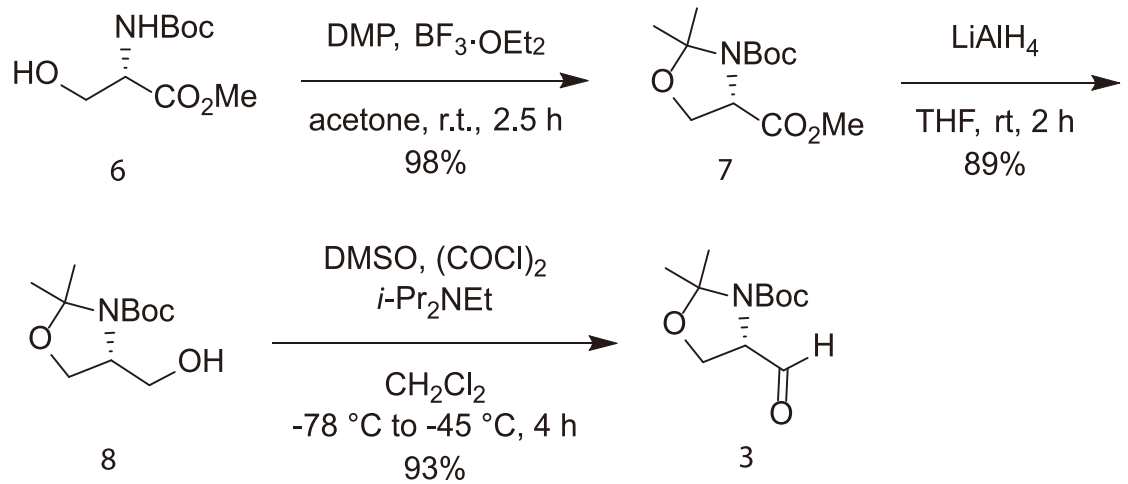
報告されている方法に基づいてGarner's aldehyde（**3**）の合成に取り組んだ[4, 5)]。*N*-Boc-L-セリンメチルエステル（**6**）（Boc: *t*-Butoxycarbonyl）を出発原料とし、ジメトキシプロパン、三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体（BF_3·OEt_2）と反応させ、環状アミナール(**7**)を収率98％で得た。得られた環状アミナール（**7**）を水素化アルミニウムリチウム（$LiAlH_4$）で還元することでアルコール（**8**）を収率89％で得た。このアルコール(**8**)を種々の条件下でPCC（ピリジニウムクロロクロメート）と反応させたが、副反応が起きてしまい、精製を行っても純粋な目的物を得ることは難しかった。そこで、Swern酸化での酸化を試みたところ、反応が良好に進行し、収率93％でGarner's aldehyde（**3**）を得た(Scheme 2)。

3．2．Garner's aldehydeへの立体選択的なアルキンの求核付加反応

得られたGarner's aldehyde（**3**）に対して、1-ペンタデシン（**9**）をモデルアルキンとして用いて、立体選択的な求核付加反応の条件検討を行った（Scheme 3）[6)]。その結果、LamとMendezらが報告している条件[7)]であるエントリー4で最も良い選択性が得られた(Table 1)。

3．3．アルキン(10)の4位炭素の*cis*/*trans*選択的な半還元反応

得られたアルキン(**10**)を用いて幾何選択的に還元を行い、4位炭素の幾何制御に取り組んだ。まず、*trans*体の合成から取り組んだ。アルキン(**10**)をRed-Alで還元したが[8, 9)]、反応は進行せず原料回収という結果であった。Boc基が大きいためにRed-Alが反応点に近づくことができないために、反応



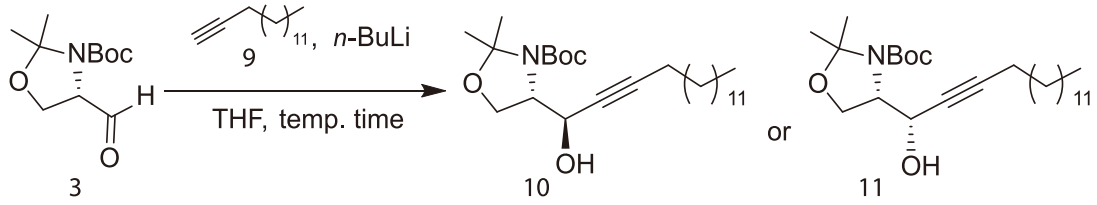
Scheme 2　Garner's aldehydeの合成

が進行しなかったと考えた。そこで脱保護の後に還元を試みた。まずアルキン（**10**）を*p*-トルエンスルホン酸（TsOH）で処理し、その後トリフルオロ酢酸で処理することでアルキン（**13**）を2段階収率34％で得た。得られたアルキン（**13**）をRed-Alと反応させると、収率45％で目的の*trans*アルケン（**14**）が得られた（Scheme 4）。

次は*cis*アルケンの合成に取り組んだ。アルキン（**10**）を水素雰囲気下、リンドラー触媒存在下[10]、メタノール溶媒中で撹拌すると、定量的に目的の*cis*アルケン（**15**）を得た。続いて*trans*アルケンを合成した時と同様に脱保護を行い、モデル体であるアルケン（**16**）を2段階収率25％で得た（Scheme 5）。以上により4位炭素の幾何制御の方法が確立できた。

3．4．（5*E*）-5-Pentadecen-1-yne（4）の合成

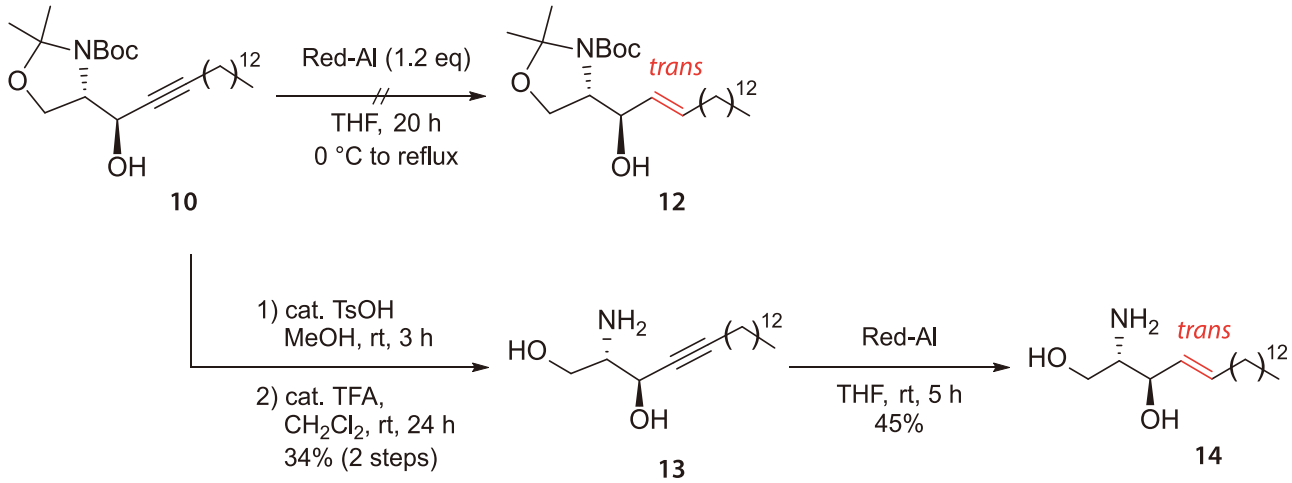
次に、8位炭素の*cis*/*trans*幾何制御の方法を確立する研究に取り組んだ。市販のdecanal（**17**）を出発原料とし、ビニルマグネシウムブロミドと反応させ、アルコール（**18**）を収率96％で得た。得られたアルコール（**18**）を過剰のオルト酢酸トリエチル中、プロピオン酸存在下で加熱する



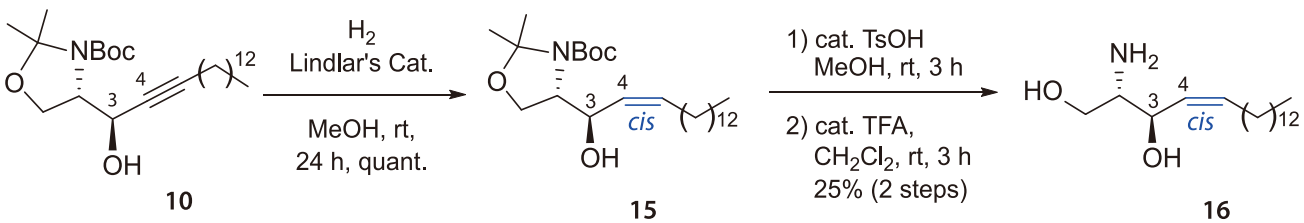
Scheme 3　Garner's aldehyde へのアセチリドイオンの付加

Table 1　立体選択的な求核付加反応の条件検討 .

Entry	Reagent（eq）	Temp.（℃）	Yield %	*anti*（6）: *syn*（13）
1	1.2	−78	61	71 : 29
2	1.5	−78	73	5 : 95
3	1.0	−78	46	87 : 13
4	1.0	−40	48	93 : 7
5	1.0	−78 to rt	59	56 : 44



Scheme 4　4-5 位アルキン部における *trans* 選択駅な半還元



Scheme 5　4-5 位アルキン部における *cis* 選択駅な半還元

ことで、Johnson-Claisen転位反応を引きおこし、アルケン（**19**）を*trans*選択的に収率84％で得た。得られた*E*-アルケン（**19**）を$LiAlH_4$と反応させて、収率96％でアルコール（**20**）を得た。続いて得られたアルコールとPCCを反応させ、収率80％でアルデヒド（**21**）を得た。このアルデヒド（**21**）とトリフェニルフォスフィン、亜鉛、四臭化炭素との反応により収率13％でジブロモアルケン（**22**）を得た。さらにこのジブロモアルケン（**22**）を*n*-BuLiで処理するCorey-Fuchsアルキン化反応により収率56％で（5*E*）-5-pentadecen-1-yne（**4**）を得た（Scheme 6）。

3．5．（5*Z*）-5-Pentadecen-1-yne（5）の合成

次に*cis*体の合成に取り組んだ。アルコール（**23**）からPCC酸化によりアルデヒド（**24**）を収率72％で得た。次にブロモデカン（**25**）をアセトン溶媒中でNaIと反応させることで収率95％でヨードデカン（**26**）を得た。得られたヨードデカン（**26**）をトリフェニルホスフィンとトルエン溶媒中、還流条件下で24時間反応させることで、ホスホニウムヨージド（**27**）を収率99％で得た。ホスホニウムヨージド（**27**）をNaHで処理し、アルデヒド（**24**）とWittig反応させたところ[11]、収率47％でオレフィン（**5**）を得た（Scheme 7）。以上により8位炭素の*cis*/*trans*幾何制御を達成した。

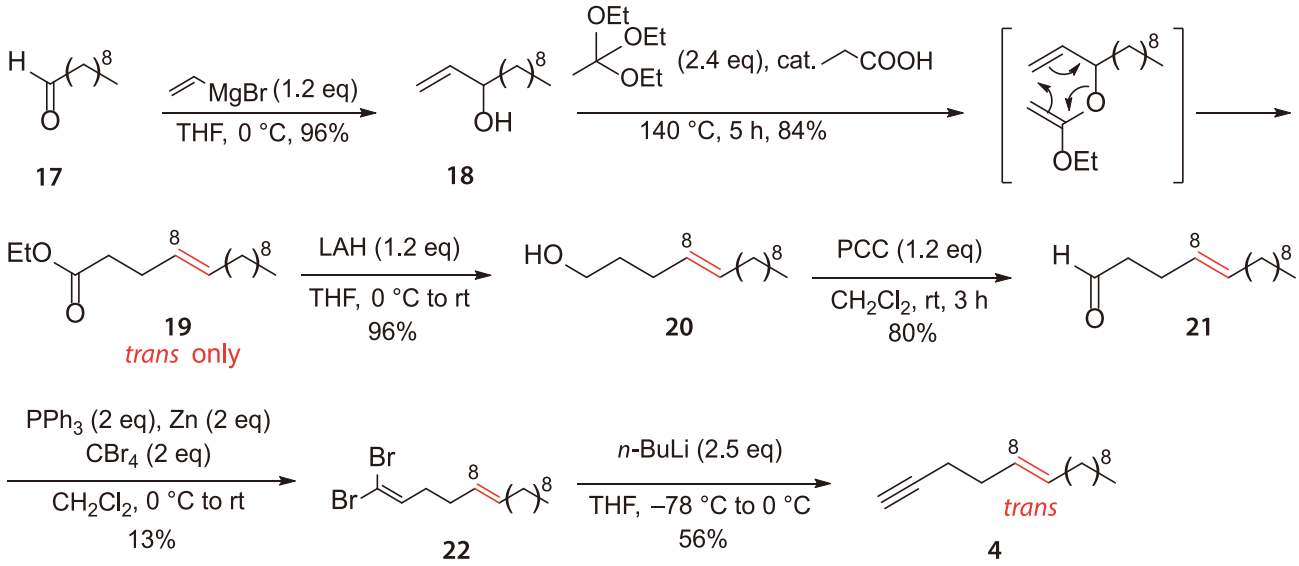
3．6．スフィンガジエニンの4種異性体（SD-1～4）の合成

すべての合成単位の選択的な合成経路が確立できたので、SD-1～4の合成に取り組んだ。

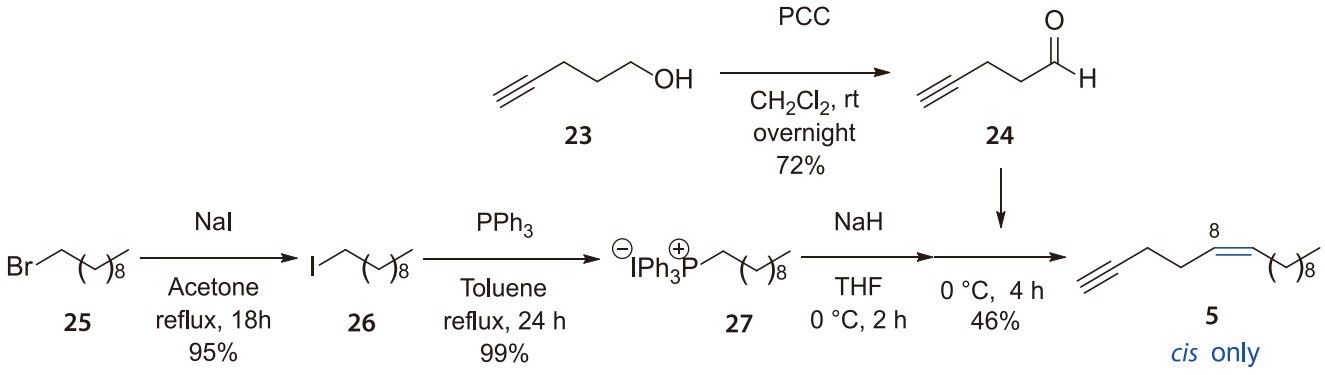
3．6．1．（*E*）-4,8-スフィンガジエニン（SD-1,2）の合成

Garnaer's アルデヒド（**3**）に対して、アルキン（**4**）のアセチリドイオンを付加させて、化合物**28**を得た。脱保護して化合物**29**へと誘導したのち、Red-Alで還元することで、*trans*/*trans*のスフィンガジエニン（**SD-1**）の合成を達成した（Scheme 8）。

次に、アルキン（**4**）のアセチリドイオンをGarner's アルデヒド（**3**）に付加させ、化合物**28**を合成した。これをLindlar触媒下、加水素分解により**30**を合成した。最後に脱保護することで、*cis*/*trans*スフィンガジエニン（SD-2）の合成を達成した（Scheme 9）。



Scheme 6　（5*E*）-5-Pentadecen-1-yne（**4**）の合成



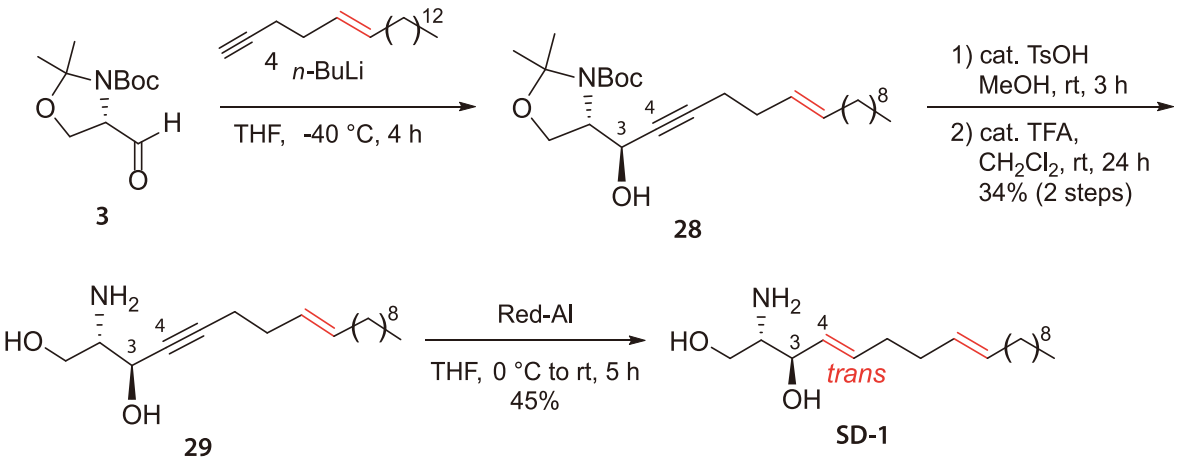
Scheme 7　1-Bromodecane からのビルディングブロック（**5**）の合成

3．6．2．(*Z*)-4,8-スフィンガジエニン(SD-3,4)の合成

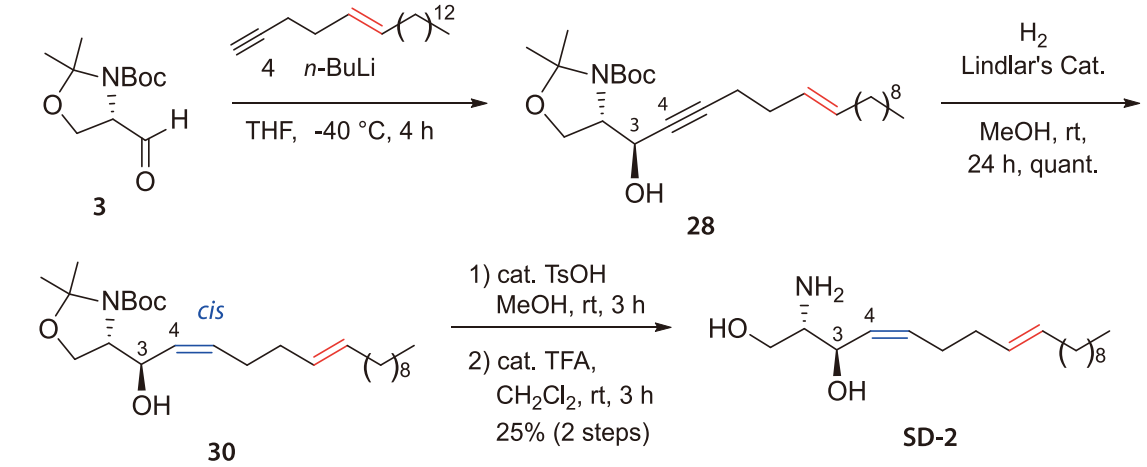
Garnaer's アルデヒド (**3**) に対して、アルキン (**5**) のアセチリドイオンを付加させて、化合物 **31** を得た。脱保護して化合物 **32** へと誘導したのち、Red-Al で還元することで、*trans/cis* のスフィンガジエニン (**SD-3**) の合成を達成した (Scheme 10)。

最後に、アルキン (**5**) のアセチリドイオンを Garner's アルデヒド (**3**) に付加させ、化合物 **31** を合成した。これを Lindlar 触媒下、加水素分解により **33** を合成した。最後に脱保護することで、*cis/cis* スフィンガジエニン (**SD-4**) の合成を達成した (Scheme 11)。

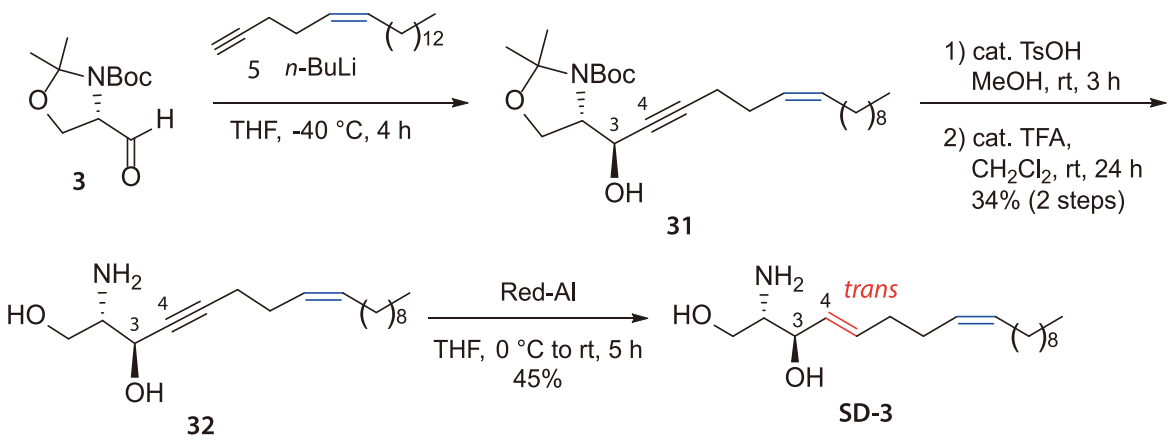
以上、4-5 位炭素と 8-9 位炭素が *cis/trans* で作り分けられた 4 種の 4,8-sphingadienine (**SD-1**～**4**) の完全化学合成を達成した。



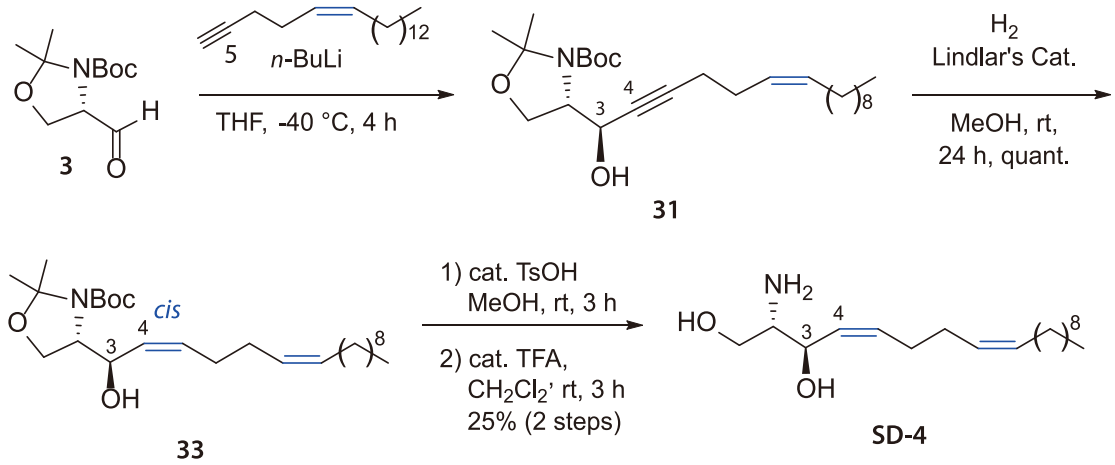
Scheme 8　SD-1 の合成



Scheme 9　SD-2 の合成



Scheme 10　SD-3 の合成



Scheme 11　SD-4 の合成

3．7．異性体四種の抗アレルギー効果

P-GlcCer の代謝物が皮膚炎の回復に寄与しているのではないかという仮説を立て、セラミド中のスフィンゴイド塩基部分、特に 4,8-スフィンガジエニンの二重結合が *cis*:*cis*, *cis*:*trans*, *trans*:*cis*, *trans*:*trans* の四種異性体を合成し、共培養系腸管疑似モデルを用いて IL-23 mRNA 発現を指標に、食品成分であるグルコシルセラミドのうちどのような立体構造を有していれば皮膚改善能をもたらすのかを明らかにすることを目的とした。しかしながら、実際共培養系を用いて管腔側から試料を添加した際、Caco-2 細胞によって代謝されるため、IL-23 mRNA 発現を指標にすることができないことが分かった。そこで合成した異性体四種の生理活性を明らかにするため、感作された肥満細胞 RBL-2H3 に対する合成した 4 種のスフィンゴイド塩基の抗アレルギー効果を検討した。

桑田ら[1]の報告では、P-GlcCer を Caco-2 細胞に添加した際、54.8%が代謝されると報告している。したがって、本実験では、グルコシルセラミド 80 μg/mL の濃度で Caco-2 細胞に添加した場合に、代謝産物がすべて 4,8-スフィンガジエニン（SD）に変換されたと仮定して、その濃度（4.71 μg/mL）における RBL-2H3 細胞の脱顆粒に与える影響を評価した。4,8-SD の RBL-2H3 細胞活性化抑制効果の評価を行うにあたり、まずは四種 SD が 4.71 μg/mL で細胞毒性を示すかどうかを確認した。その結果、Figure 2 に示すとおり所定濃度では細胞毒性は認められなかった。次に、四種 SD の立体異性体による RBL-2H3 細胞の β-ヘキソサミニダーゼ放出率を評価した。抗原抗体添加群（Positive control）で β-ヘキソサミニダーゼ放出率は有意に増加し、4*cis*, 8*trans*-SD、4*cis*, 8*cis*-SD を添加したところ β-ヘキソサミニダーゼ放出率は有意に抑制され、特に 4*cis*, 8*cis*-SD において最も抑制率が高く約 10%であった（Figure 3）。

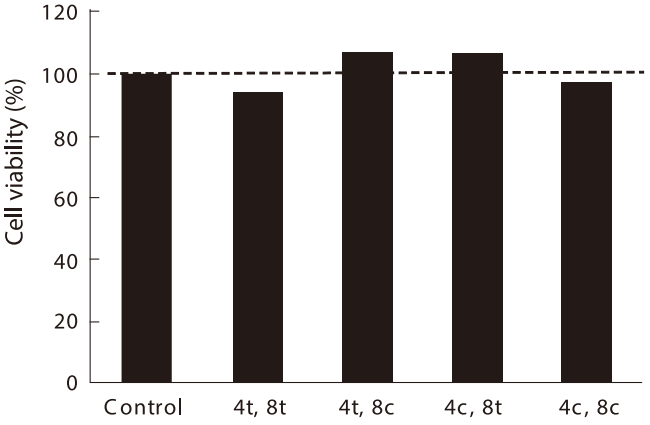


Figure 2　スフィンガジエニンによる細胞毒性

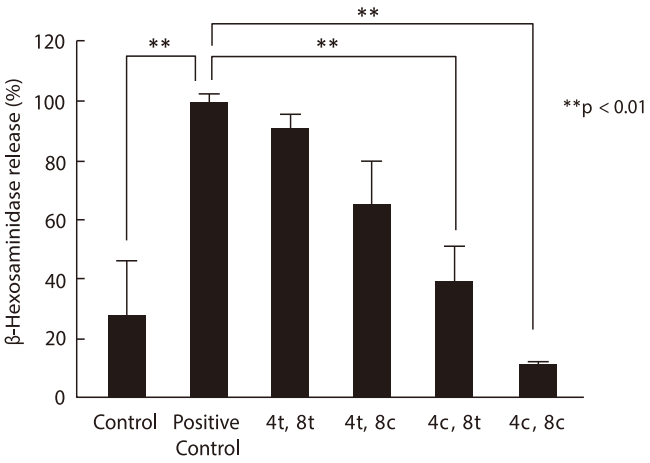


Figure 3　スフィンガジエニンによる肥満細胞活性化抑制効果

4．考　察

本研究では、収束的な合成経路によるスフィンゴイド塩基の異性体四種（SD-1～4）の化学合成経路の確立を目指した。4-5 位アルキン部分の還元では、モデル化合物を用いて条件検討を重ねた結果、トランス還元では Red-Al に

よる還元が最適条件であった。この際、出発物質の保護基はすべて脱保護しておくことが必須であった。それは、立体障害によるRed-Alの接近を妨げないことが重要であったと考えられた。シス還元では、Lindlar触媒による水素化反応が有効であった。アルカンまでの過剰な還元反応を防ぎつつ、シス選択的に還元することができた。SD-1～4の前駆体は、Garnerアルデヒドへのene-yneのアセチリドイオンの付加反応が効果的に進行した。反応条件について精査した結果、－40℃の低温で反応を行うと高選択的に付加反応が進行し、前駆体を得ることができた。アセチリドイオンの原料となるene-yneの合成では、Johnson Claisen反応を利用するとtransのene-yneが選択的に合成できた。Wittig反応を利用したcisのene-yne合成が最も難しい段階であった。種々の反応条件と出発物質を精査することで、cisのene-yne合成手法が確立できた。こうして、cis/transの4種類立体異性体であるSD-1～4の合成経路を確立することができた。また、肥満細胞由来の培養細胞RBL-2H3を用いた4種類立体異性体の抗アレルギー活性を測定した結果、4*cis*, 8*cis*-SDに最も高い活性が見られた。

（引用文献）

1） T. Kuwata, T. Hashimoto, N. Ohto, H. Kuwahara, J. W. Lee, T. Bamba, M, Mizuno, A metabolite of dietary glucosylceramide from pineapples improves the skin barrier function in hairless mice, *J. Funct. Foods*, 30, 228-236, 2017.

2） T. Tanoue, Y. Nishitani, K. Kanazawa, T. Hashimoto, M. Mizuno, In vitro model to estimate gut inflammation using co-cultured Caco-2 and RAW264.7 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 374, 565-569, 2008.

3） S. Yamashita, Y. Yokoyama, T. Hashimoto, M. Mizuno, A novel in vitro co-culture model comprised of Coco-2/RBL-2H3 cells to evaluate anti-allergic effects of food factors through the intestine. *J. Immunol. Meth.*, 435, 1-6, 2016.

4） P. Garner, J. M. Park, E. Malecki, A stereodivergent synthesis of D-erythro-sphingosine and D-threo-sphingosine from L-serine, *J. Org. Chem.*, 53, 4395-4398, 1988.

5） P. Herold, Synthesis of D-Erythro- and D-Threo-Sphingosine Derivatives From L-Serine, *Helvetica Chimica Acta*, 71, 354-362, 1988.

6） M. Passiniemi, A.M. P. Koskinen, Garner's aldehyde as a versatile intermediate in the synthesis of enantiopure natural products, Beilstein *J. Org. Chem.*, 9, 2641-2659, 2013.

7） L. Wong, Sheryl S. L. Tan, Y. Lam, A. J. Mendez, Synthesis and Evaluation of Sphingosine Analogues as Inhibitors of Sphingosine Kinases, *J. Med. Chem.*, 52, 3618-3626, 2009.

8） I. V. Overmeire, S. A. Boldin, F. Dumont. S. V. Calenberrgh, G. Slegers. D. D. Keukeleire, A. H. Futerman, P. Herdewijin, Effect of Aromatic Short-Chain Analogues of Ceramide on Axonal Growth in Hippocampal Neurons, *J. Med. Chem.*, 42, 2697-2705, 1999.

9） M. Moreno, C. Murruzzu, A. Riera, Enantioselective Synthesis of Sphingadienines and Aromatic Ceramide Analogs, *Org. Lett.*, 13, 5184-5187, 2011.

10） M. L. Fanani, J. V. Busta, J. Sot, J. L. Abad, G. Fabrias, L, SAiz, J. M. G. Vilar, F. M. Goni, B. Maggio, A. Alonso, *Langmuir*, 34, 11749-11758, 2018.

11） T. Kawate, N. Fukuta, A. Nishida, M. Nakagawa, Synthesis of Sphingosine Analogues: Stereoselective Synthesis of 3-Deoxysphingosine and cis-Isomers, *Chem. Pharm. Bull.*, 45, 2116-2118, 1997.

カルシウムイオンの生体内観察・操作によるKID症候群の病態解析

京都大学医学研究科皮膚科学講座
村田　光麻

Connexins (Cxs) make gap-junction/hemichannel that mediate cell-cell/cell-extracellular movement of water-soluble molecules such as calcium ions (Ca^{2+}). In some of hereditary diseases caused by mutations in Cxs, marked thickening of corneal layer of the skin occurs (Cx-related keratoderma), resulting in significant cosmetic and functional disadvantages. It is revealed that gain of function mutations that induce hyperactive hemichannels cause Cx-related keratoderma, and that keratinocytes-specific introduction of pathogenic mutant Cx reproduce the hyperkeratosis in mice, indicating that Cx-mutations in keratinocytes are responsible for the hyperkeratosis. However, it is still elusive how hyperactive hemichannels on keratinocytes result in hyperkeratosis. Here, using a mouse model of Cx-related keratoderma in combination with two-photon microscope, we show a close association between hyperkeratosis and distinct dynamics of cytoplasmic Ca^{2+} in Cx-mutant keratinocytes *in vivo*. We made an inducible mouse model of KID syndrome, one of the representative Cx-related keratoderma, by crossing Cx26S17F mice and K14creERT mice. In this model, hyperkeratosis at the footpads of the paws was observed within 2 weeks after the induction of mutation. We then crossed the mice with transgenic mice systemically expressing a Ca^{2+} indicator (GCaMP3) and evaluated the cytoplasmic Ca^{2+}-dynamics in keratinocytes throughout the course of disease development. In normal keratinocytes, a transient elevation of cytoplasmic Ca^{2+} preceded the cornification at granular layer uniformly at a single-cell level. In contrast, in keratinocytes with Cx mutations before the formation of hyperkeratosis, patterns of cytoplasmic Ca^{2+} elevation were heterogenous spatiotemporally. Subsequently, we identified intense elevation of cytoplasmic Ca^{2+} in the granular layer just before the formation of hyperkeratosis. Our results not only demonstrate the plausible role of aberrant Ca^{2+}-dynamics in the hyperkeratosis of Cx-related keratoderma, but also suggest the importance of strictly regulated Ca^{2+}-dynamics for epidermal homeostasis.

1．緒　言

皮膚の最表面は死細胞によって構成される角層であり、その異常を示す疾患には、ありふれた胼胝（タコ）から稀な先天性疾患まで多数が存在するが、いずれの疾患も難治である。その原因の1つに、表皮細胞の角化による角層形成のメカニズムが未解明であり、特異的な治療がないことがあげられる。報告者はこれまでに、生体マウスの皮膚内で角化細胞内の細胞内カルシウムイオン（Ca^{2+}）濃度を直接観察することで、角化直前に表皮細胞がCa^{2+}濃度を上昇させることを見出した[1]。この現象は皮膚の恒常性維持メカニズムに重要な視点を与えるとともに、角層の異常を来す疾患の病態解明・治療法の開発の糸口になることが期待される。

Keratitis-Icthyosis-Deafness（KID）症候群は、角層肥厚・角膜炎・難聴を特徴とする先天性の難病で、コネキシン26や30をコードする遺伝子の変異による[2]。顔面を含む全身が侵され醜形を来すため、角層肥厚の病態の解明と治療法の開発が強く望まれている（図1）。そこで、KID症候群の病態を明らかにし、治療薬の候補をあげるため、以下の2つを明らかにしたいと考えた。

図1

①KID症候群における表皮細胞内Ca^{2+}動態の異常の有無
②Ca^{2+}動態と角化の異常との因果関係

2．方　法

2．1．変異コネキシン26の導入による表皮細胞内Ca^{2+}濃度の変化の観察

現存するKID症候群のモデルマウスを改良し、後天的にKID症候群の変異コネキシン26が導入されるマウスモデルを作成した。具体的には、Cx26S17Fマウス[3]とK14Cre-ERTマウス[4]を交配し、得られた成体マウスにタモキシフェン（0.1mg/g BW, 5日連続, 腹腔内）を投与

Analysis of pathogenesis of KID syndrome by in vivo observation and manipulation of cytoplasmic Ca^{2+} ion concentration

Teruasa Murata

Department of dermatology, Kyoto University

した。このマウスに、カルシウムレポータータンパクであるGCaMP3[5]と、形態を観察するためのtadem-dimer Tomato（tdTomato）のそれぞれの全身発現マウスを交配し、2光子顕微鏡で、生体マウスの表皮細胞内Ca^{2+}濃度を観察するとともに形態学的解析を行った。

2.2．表皮細胞内のCa^{2+}濃度の制御異常と角層の肥厚との因果関係の検証

次に、生体マウスの表皮細胞内のCa^{2+}濃度を特異的に上昇させるため、Chemogeneticsの手法を用いた。化学物質（Clozapin-N-oxide: CNO）の投与により活性化し細胞内Ca^{2+}を上昇させるGタンパク共役型レセプター（hM3Dq）を発現するマウス[6]を用い、表皮細胞特異的にこれらの分子を発現するようにしたマウスを作成した。具体的には、これらのloxP-stop-loxPマウスと、IVL-CreERT2マウスとを交配し、タモキシフェン（0.1mg/g BW, 週2回、腹腔内）を投与し、2光子顕微鏡で観察中に、CNO（1mg/kg BW, 皮下）を投与した。

3．結　果

3.1．KID症候群モデルマウスにおける表現型

KID症候群モデルマウスでは、タモキシフェン投与3－4週で肉眼的な病変が前後肢のフットパッドを中心に出現した。病変の分布は、KID症候群患者における角層肥厚が著明な部位と一致しており、KID症候群をよく模倣する系と考えられた（図2）。

3.2．KID症候群の病変形成過程における表皮細胞内Ca^{2+}動態

タモキシフェン投与直後から、フットパッドの表皮細胞の細胞質Ca^{2+}濃度を測定した。すると、意外なことに細胞質Ca^{2+}濃度は角層の最下層から上昇し始め、その後、顆粒層、有棘層へとその上昇が拡大していた。重要なことに、顆粒層の細胞質Ca^{2+}濃度の上昇の直後に角層の肥厚が起こっていた。この時間的な関係は、顆粒細胞のCa^{2+}濃度が角化の亢進に関与していることを示唆する。

また、角層肥厚よりも1週間以上前から、角層最下層の細胞質Ca^{2+}濃度が上昇していたことから、角化の亢進の結果としてCa^{2+}濃度の上昇が起こったのではなく、ヘミチャネルによるCa^{2+}動態の異常が先に生じると考えられ、実験系が想定通り成立したと考えられた（図3）。

3.3．細胞質Ca^{2+}濃度を操作する実験系の確立

さらに、細胞質Ca^{2+}濃度と角化亢進との因果関係を*in vivo*で証明するためのモデルマウスを作成した。CNO投与により、速やかに表皮細胞の細胞質Ca^{2+}は上昇し、生

図2

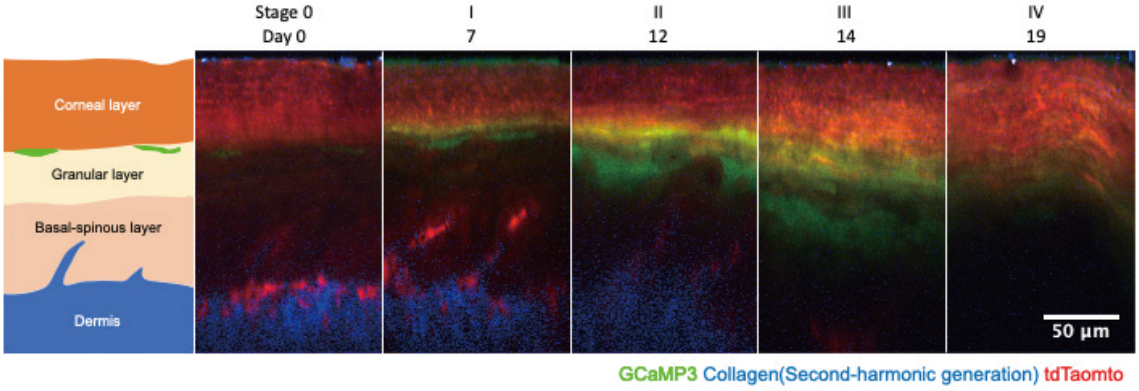


図3

理的な角化中（図4, 矢印）に匹敵する濃度となった。しかし、その位置は、顆粒層の中層から有棘層にとどまり、肝心の角化前の顆粒細胞ではその上昇は軽度に留まり、因果関係を検討する実験系は完成していない。現在、投与する薬剤や投与経路の変更による改善を試みている。

4．考　察

KID症候群モデルマウスを用いた生体内観察により、角層の肥厚と細胞質Ca^{2+}濃度の異常との、時間的に密接な関係が明らかになった。この結果は、KID症候群の病態の中心に顆粒層のCa^{2+}濃度の異常があることを強く示唆する重要なものである。今後、ヘミチャネルの阻害薬を含めた治療薬の開発が期待されるが、顆粒層に作用させるためのドラッグデリバリーの検討も重要と考えられた。

表皮の上皮細胞の最終分化（細胞死）の誘導メカニズムは未だ明らかではない。今回得られた結果は、細胞質Ca^{2+}濃度の上昇が最終分化の単なる結果ではなく、その誘導メカニズムの一端である可能性を示唆した。今後、上述の*in vivo*の系に続き、*in vitro*の系での因果関係の検討を計画している。

表皮において、個々の細胞は互いに時間的、空間的に前後しながら継続的に分化するため、分化に関わるシグナルや酵素反応は組織のごく一部に限局する。そのため、従来の方法では真の現象とノイズとの区別が難しかった。本研究は、このような時間的・空間的に稀な現象に着目する新しい形態学的アプローチであった。また、現象間の因果関係や薬理作用まで生体内で検証し、細胞間相互作用を見落とすことなく評価する点に本研究の特色がある。さらに、観察中に遺伝子変異を導入することで、変異タンパクが病態を形成するまでの過程全体を捉えようとする点は前例がない。この方法は原因遺伝子が知られているものの病態が明らかになっていない疾患の解析方法の一例となると考えられる。

謝　辞

本研究にご支援をいただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に篤く御礼申し上げます。

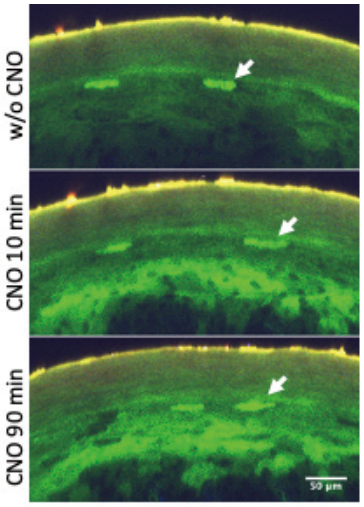


図4

（引用文献）

1）Murata, T. *et al.* Transient elevation of cytoplasmic calcium ion concentration at a single cell level precedes morphological changes of epidermal keratinocytes during cornification. *Sci. Rep.* **8**, 6610 (2018).
2）Lilly, E., Sellitto, C., Milstone, L. M. & White, T. W. Connexin channels in congenital skin disorders. *Semin. Cell Amp Dev. Biol.* **50**, 4-12 (2016).
3）Bosen, F. *et al.* Altered epidermal lipid processing and calcium distribution in the KID syndrome mouse model Cx26S17F. *FEBS Lett.* **589**, 1904-1910 (2015).
4）Vasioukhin, V., Degenstein, L., Wise, B. & Fuchs, E. The magical touch: genome targeting in epidermal stem cells induced by tamoxifen application to mouse skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 8551-8556 (1999).
5）Ebina, T. *et al.* 3D clustering of GABAergic neurons enhances inhibitory actions on excitatory neurons in the mouse visual cortex. *Cell Rep.* **9**, 1896-1907（2014）.
6）Zhu, H. *et al.* Cre-dependent DREADD（Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs）mice. *genesis* **54**, 439-446（2016）.

皮膚の酸化ストレス障害に対する間葉系幹細胞の治療効果と制御機構の解明

群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学
茂木　精一郎

Cutaneous ischemia-reperfusion (I/R) injury is associated with the early pathogenesis of cutaneous pressure ulcers (PUs). The objective of this study was to investigate the effect of mesenchymal stem cells (MSCs) injection on the formation of PUs after I/R injury and determine the underlying mechanisms. We found that the subcutaneous injection of MSCs into areas of I/R injured skin significantly suppressed the formation of PUs. I/R-induced vascular damage, hypoxia, oxidative DNA damage, and apoptosis were decreased by MSCs injection. Oxidative stress signals detected after I/R in OKD48 (Keap1-dependent oxidative stress detector, No-48-luciferase) mice were decreased by the injection of MSCs. In cultured fibroblasts, MSCs-conditioned medium significantly inhibited oxidant induced reactive oxygen species (ROS) generation and apoptosis. Furthermore, endoplasmic reticulum (ER) stress signals detected after I/R in ERAI (ER stress-activated indicator) mice were also decreased by the injection of MSCs. These results suggest that the injection of MSCs might protect against the development of PUs after cutaneous I/R injury by reducing vascular damage, oxidative cellular damage, oxidative stress, ER stress, and apoptosis.

1．緒　言

加齢による変化によって血管量低下や血管機能障害が生じ、皮膚への血流量が低下して皮膚が虚血になりやすくなることが知られている。さらに、外部からの圧迫や紫外線照射などの外的刺激によって皮膚の虚血が誘導され、低酸素に至りやすくなる。例えば、ベッドなどによる外的圧迫によって生じる皮膚の虚血性潰瘍である「褥瘡（じょくそう）」（いわゆる「床ずれ」）は高齢者に生じやすく治りにくい。持続的な圧迫による虚血に加えて、虚血に陥った組織に血液が再還流すると、活性酸素などが発生し、血管内皮細胞や周囲の組織を傷害し、より広範囲に血流障害・組織障害を来すことが知られており、これを「虚血再還流障害」と呼び、酸化ストレス障害がその病態に深く関わっている。

褥瘡は皮膚潰瘍が生じる前の「急性期褥瘡」と生じた後の「慢性期褥瘡」に分類される（図1）。褥瘡の発生直後は紅斑や紫斑を呈するが、組織壊死が進行し皮膚潰瘍が出現するまでに1～3週間かかり、この時期を「急性期褥瘡」と呼ぶ。

これまでに、皮膚潰瘍が生じた後の「慢性期褥瘡」に対する数多くの治療法が開発されてきたが、皮膚潰瘍が生じる前の「急性期褥瘡」に対する治療法はガイドラインでも、除圧と創部の保護だけでありエビデンスレベルの高い治療法がない。従って、せっかく皮膚潰瘍に至る前の褥瘡を早期に発見することができても、残念ながら、潰瘍になるまで観察していく以外に全く方法がない。この急性期褥瘡の機序を明らかにし、組織障害の進行を防ぐ治療法を開発できれば、その後の潰瘍の発生、拡大を防ぐことができる画期的な治療・予防が期待できる。

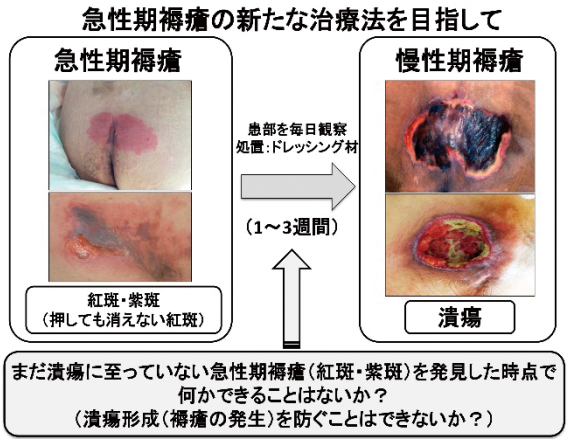


図1

今回、我々は間葉系幹細胞（MSC）に注目した。MSCは皮膚創傷治癒においては、血管や表皮細胞への分化、細胞外基質の産生リモデリング、炎症性サイトカインの抑制、血管新生の促進、M2マクロファージの誘導などを介して創傷治癒を促進させることが知られている（図2参照）[1]。近年、間葉系幹細胞（MSC）と虚血再還流障害に関する様々な研究がなされている。脳、肝臓、腎臓などの虚血再還流障害モデルにおいてMSCがアポトーシス細胞や酸化ストレス、一酸化窒素合成酵素などを抑制することが知られている。しかし、皮膚の虚血再還流障害に対するMSCの治療効果とその機序は不明である。そこで、今回の研究では、間葉系幹細胞による皮膚虚血再還流障害（酸化ストレス障害）の治療効果と制御機構を明らかにすることを目的とした。

Elucidation of therapeutic effect and regulatory mechanism of mesenchymal stem cells on oxidative stress disorder of skin

Sei-ichiro Motegi

Department of Dermatology, Gunma University Graduate School of Medicine

2．方　法

我々はこれまでにマウスを用いた皮膚虚血再還流障害の実験系を確立してきた。方法としては、2つの磁石を用いてマウス背部の皮膚を挟み、圧迫された部分を虚血させる。

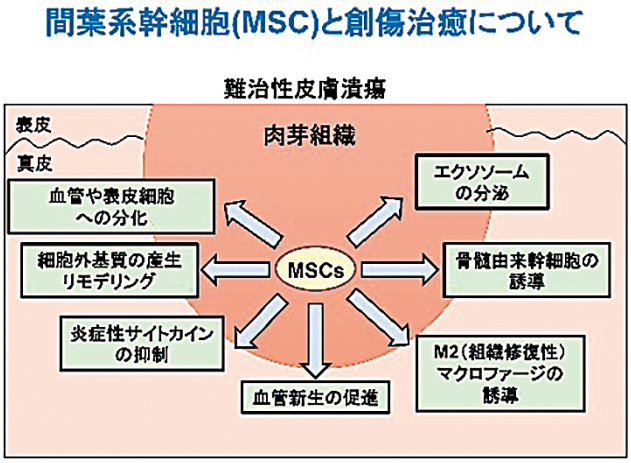


図２

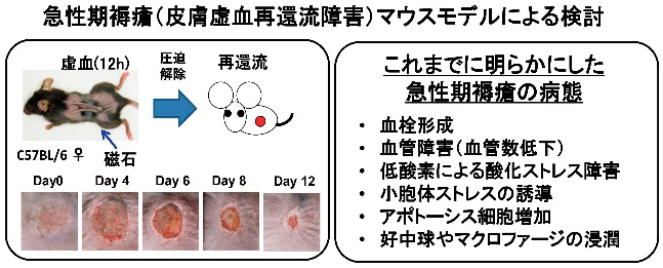


図３

その状態を12時間持続させ、その後、磁石を外すことで虚血部位に再還流を生じさせる。我々は、これまでに、この皮膚虚血再還流障害(急性期褥瘡)モデルマウスを用いて検討した結果、圧迫部位に多数の血栓が生じ、血管障害による血管量の低下が起こり、虚血、低酸素による酸化ストレスが生じることを明らかにしてきた[2-4]（図３参照)。また、圧迫虚血部位に副腎皮質ホルモンを外用したところ、血管数低下、酸化ストレス障害、アポトーシス細胞数が増加し、潰瘍が増悪することも明らかにしてきた[4]。

3．結　果

皮膚虚血再還流障害（急性期褥瘡）モデルを用いて、MSC投与群とコントロール（PBS）投与群における虚血再還流障害後に生じる皮膚潰瘍形成を比較した。再還流させた直後にMSCもしくはPBSを虚血再還流部に局注した。その結果、MSCの皮下投与によって皮膚虚血再還流障害(急性期褥瘡)の後に生じる皮膚潰瘍の形成が抑制されたことを見出した（図4)。また、MSCによる制御機構を解明するため、虚血再還流後の潰瘍部を含む皮膚組織を検討した結果、MSC局注によって血管障害が抑制され、さらに、皮膚の低酸素領域や酸化ストレス障害によるアポトーシスが抑制されることを見出した。

また、我々は、共同研究者の金沢医科大学　岩脇隆夫教授より酸化ストレス可視化マウス（OKD48マウス）を供与いただいている。これらのマウスを用いて、皮膚虚血再還流障害を起こしたところ、MSCの皮下注入によって、急性期褥瘡部位の酸化ストレス、小胞体ストレスが抑制されることも見出した(図4上)。酸化ストレスにより誘導され

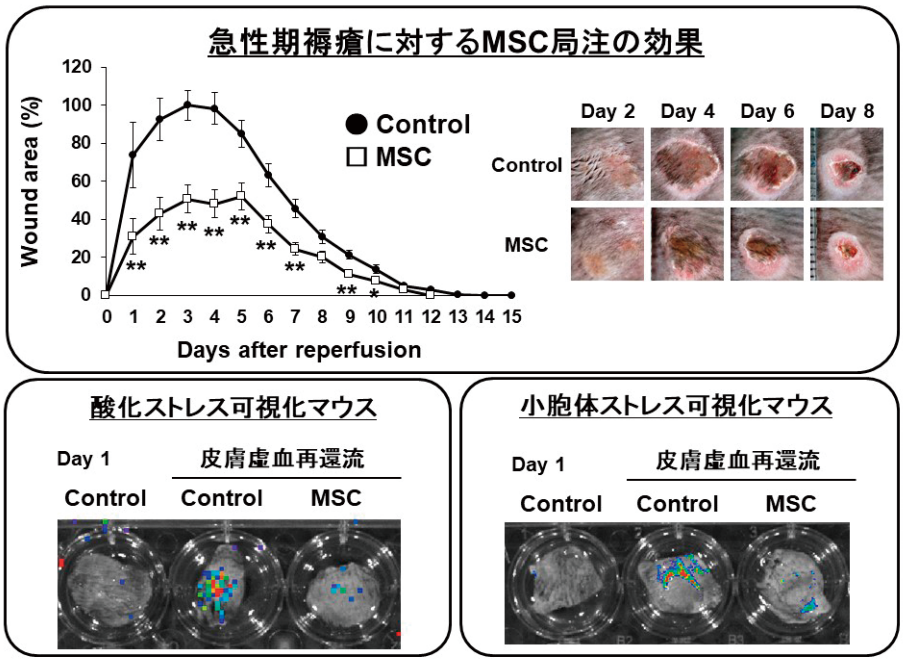


図４

る因子であるHO-1や活性酸素の産生を調節する因子であるNOX2の発現量もMSCの皮下注入によって抑制された。また、マウス線維芽細胞を用いて、酸化ストレス障害に対するMSCの影響についてin vitroの検討を行った結果、過酸化水素刺激によるROS産生亢進が、MSCの細胞培養上清によって抑制された。これらの結果より、MSCの皮下注入によって、急性期褥瘡部位に生じる血管障害や低酸素による酸化ストレスが抑制され、皮膚潰瘍の形成が抑制されることが示唆された[4)]。

また、小胞体ストレス可視化マウス（ERAIマウス）を用いて検討したところ、急性期褥瘡の発生部位では小胞体ストレスが増加し、MSC皮下注入によって抑制されることも見出した(図4)。さらに、小胞体ストレス因子(GRP78/BiP、CHOPなど）が急性期褥瘡部位で増加し、MSC皮下注入によって抑制されることも明らかにした。これらの結果より、MSCの皮下注入が、皮膚虚血再還流障害によって生じる血管障害を抑制し、酸化ストレスや小胞体ストレスを軽減させて、皮膚潰瘍の出現を有意に減少させることを見出した。MSCが急性期褥瘡の新たな治療法への応用が期待できると考えている。

4．考　察

加齢により皮膚の虚血が生じやすい理由として、血管量の低下、血管機能の低下、組織(皮膚・脂肪・筋肉)の量と機能が低下し、脆弱となること、骨突出が生じること、知覚低下などが挙げられる。さらに、老化に伴う創傷治癒力、免疫力低下は、高齢者の皮膚潰瘍が治りにくい原因と考えられる。既に人口の4分の1が65歳以上という超高齢者社会を迎えている我が国においては、人口の高齢化に伴って、皮膚の虚血障害によって生じる病変（褥瘡や末梢循環障害など）を有する患者数も増大し、予防・治療・管理の重要性はこれまで以上に高まると考えられる。老化による皮膚の虚血、酸化ストレス障害に注目し、その後の皮膚障害・皮膚潰瘍の発生を少しでも予防、抑制できるような薬剤を開発することができれば、医療費や人件費、労働量の削減につながるのではないかと考え今回の研究を着想した。今回の研究成果から、MSCの皮下注入が、皮膚虚血再還流障害によって生じる血管障害を抑制し、酸化ストレスや小胞体ストレスを軽減させて、皮膚潰瘍の出現を有意に減少させることを見出した。MSCが急性期褥瘡の新たな治療法に応用できる可能性が示唆された。さらに今回の研究成果は、紫外線などで誘導される皮膚酸化ストレス障害によって促進される皮膚老化を予防できるような革新的な薬品、化粧品の開発に貢献できることが予想される。

(引用文献)

1）Motegi S, et al. Journal of Dermatological Science 2017; 86: 83-89.
2）Uchiyama A, Yamada K, et al. Journal of Investigative Dermatology 2015; 135: 1157-65.
3）Uchiyama A, Yamada K, et al. Scientific Reports 2015; 5: 9072.
4）Uchiyama A, Yamada K, et al. Experimental Dermatology 2016; 25: 678-683.
5）Uchiyama A, Motegi S, Sekiguchi A, et al. J Dermatol Sci. 2017; 86: 187-197.
6）Motegi S, Sekiguchi A et al. Scientific Reports 2017; 7: 17186.

皮膚老化予防に寄与する新規オートファジー制御機構の解明

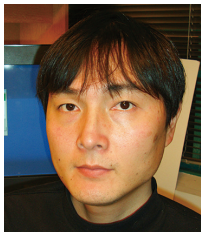
近畿大学薬学総合研究所
森山　博由

We have shown that skin tissue aging is caused by normalized chronic skin stress, such as exposure of the skin to ultraviolet light in sunlight and repair (wound healing) of the skin from abrasions and lacerations. Ultraviolet rays (UV) from sunlight exposure can cause cell apoptosis in the skin epidermis, resulting in the disruption of the barrier. Previously, we have demonstrated that BNIP3 stimulates autophagy in epidermal keratinocytes and has a protective effect in these cells upon UVB irradiation. In this study, we found that the accumulation of reactive oxygen species (ROS) by UVB irradiation was sufficient to trigger the activation of JNK and ERK mitogen- activated protein kinase (MAPK) in human primary epidermal keratinocytes. In turn, activated JNK and ERK MAPK mediated the upregulation of BNIP3 expression. Treatment with an antioxidant reagent or a specific inhibitor of MAPK, U0126, and a JNK inhibitor significantly attenuated the expression of BNIP3 triggered by UVB, followed by the induction of cell death by apoptosis. Furthermore, UVB-induced apoptosis was significantly stimulated by chloroquine or bafilomycin A1, an inhibitor of autophagy. Moreover, BNIP3 was required for the degradation of dysfunctional mitochondria upon UVB irradiation. These data clearly indicated that BNIP3-induced autophagy, which occurs via UVB-generated ROS-mediated JNK and ERK MAPK activation, has a crucial role in the protection of the skin epidermis against UVB irradiation.

1．緒　言

加齢とともに物理的ストレスは蓄積し、体を構成する組織にダメージを与え続ける。その影響を最も受け続けている組織の一つが体表面を被う皮膚である。皮膚は加齢とともに構造変化をきたし変容する、いわゆる老化する組織である。その皮膚構造の変化・変容そのものが外見に反映される唯一の臓器といえる。加齢とともに表層化し易くなる皮膚ダメージは、心身快活な長寿ライフを阻害する直接的な発現要因（悩みの種）として捉えることができる。それゆえ、皮膚の正常な新陳代謝メカニズム（皮膚恒常性）をポイントアウトすることが嘱望されている。

我々はこれまで、太陽光に含まれる紫外線の皮膚への照射、皮膚が擦過傷や裂傷から修復（創傷治癒）などの常態化した慢性皮膚ストレスにより皮膚組織の老化が引き起こされることを明らかにしてきた。このとき、皮膚を構成する細胞間のシグナル伝達に必要なNotchシグナルの標的分子（Hes1転写因子）の発現が上昇することも報告してきた。また、Hes1が細胞内の恒常性を司ると考えられるオートファジーを促進する因子（Bnip3）の発現を抑制することで、オートファジーが抑制されることも見出してきた。しかしながら、これらの役者が寄与する皮膚老化の仕組みの鍵となるメカニズムの提示には至っていない。そこで我々は、皮膚老化予防に寄与する新規オートファジー制御機構を解明すべく、UVストレスや創傷などの皮膚の恒常性を破綻させうる各種ストレス暴露における、Notch-Hes1の発現パターンの解析をおこない、ストレス暴露時におけるNotch-Hes1経路のオートファジー誘導能に与える影響およびHes1ノックアウトマウスにおける表皮ストレス耐性解析をおこなった。その結果、Notch-Hes1経路はUVBの照射量が強くなるほど活性化し、それにともなってアポトーシスによる細胞死が増えること、また、生体における全損欠損創ストレス下では、創傷部位の表皮においてHes1の発現が上昇していることを見出した。これらの結果は、皮膚恒常性を破綻させる日常ストレスに対する皮膚が有する恒常性維持メカニズムについての新知見である。これらの知見は、皮膚恒常性維持の分子機構に基づく新たな機能性香粧品研究開発にも活用が可能であり、老いに付帯する不安要因の緩和や老化にともなう皮膚脆弱性からの寛解・堅牢性の再獲得など、これからの長寿社会にも大きく寄与できるものと考えられる。



Elucidation of the novel regulation mechanism in autophagy that contributes to the prevention of skin aging

Hiroyuki Moriyama

Pharmaceutical Research and Technology Institute, KINDAI University

2．方　法

2．1．ヒト表皮ケラチノサイトにおけるNotch-Hes1および関連因子の解析

初代ヒト表皮ケラチノサイトはCELLnTec社より購入し、CnT-PR（CELLnTec社）で培養した。培養にて安定化させたヒト初代表皮ケラチノサイトにUVBの照射強度を変化させ照射した後、4時間後にタンパク質を回収してウェスタンブロッティング法をおこない、活性化型Notch1、Hes1、Bnip3、Cleaved Caspase 3の発現量を確

認した。また、Bnip3、Hes1発現用アデノウイルスベクターを感染させた後、UVB照射をおこない、LC3Bに対する免疫染色をおこない、オートファジー活性を測定した。

2．2．生体でのストレス応答時におけるHes1の発現解析

全損欠損創は以下のように作成した。マウスはイソフルランによる麻酔下のもと、背部皮膚に直径5mmの生検トレパンで全損欠損創を作成し、シリコンリングを創の周辺に縫い付けた。創はテガダーム™トランスペアレントフィルム（3M）と包帯で保護し、5日ごとに創を撮影した。創傷治癒率はImage Jで傷の大きさを測定し、算出した。

マウス皮膚は4%PFA/PBSで固定した後、20%ショ糖/PBS溶液に一晩つけてからOCT compoundで包埋した。10μm厚で凍結切片を作成した後、PBSMT（2%スキムミルク, 0.1% TritonX-100含有PBS）でブロッキングし、1次抗体としてラット免疫抗Hes1抗体、ニワトリ免疫抗ケラチン14抗体、ウサギ免疫抗ケラチン10抗体を使用した。2次抗体としてAlexa488標識抗ラットIgG抗体、Alexa555標識抗ウサギIgG抗体を用いた。封入にはProlong Gold Antifade Kit with DAPI（LifeTechnologies社）を用いた。撮影はLSM800共焦点顕微鏡（Zeiss）でおこなった。

3．結　果

ヒト表皮ケラチノサイト（HPEK）を用いて、UVB照射におけるNotch-Hes1経路の活性化についての発現解析をおこなった。まず、UVB照射後Notch-Hes1経路が活性化するUVB照射量を調べたところ、20mJ/cm^{2}で活性化のピークを迎えていることがわかった（図1）。対して、BNIP3の発現量を調べたところ、10mJ/cm^{2}で発現量のピークを迎えることがわかった（図1）。また、Cleaved Caspase 3の発現量は20mJ/cm^{2}から急激に増加することが判明した（図1）。つまり、Notch-Hes1経路はUVBの照射量が強くなるほど活性化し、それにともなってアポトーシスによる細胞死が増えることが示唆された。

一方、BNIP3とHES1のオートファジー活性について調べたところ、HPEKにBNIP3を強制発現させると、我々の以前の報告どおりオートファジーが誘導された[1]（図2）。しかし、HES1を強制発現させると、オートファジーの誘導が抑制されていることが明らかとなった（図2）。以前の結果より、UVB照射時によるBNIP3の発現増加は、オートファジー誘導による損傷ミトコンドリアの除去により、抗アポトーシスとして働くことが示唆されている[1]。また、Notch-Hes1経路の活性化は、BNIP3の発現を抑制する働きがあることも突き止めている[2]。このことから、10mJ/cm^{2}のUVB照射量では、BNIP3の発現が優位に働くため、紫外線照射によるアポトーシスがあまり誘導されないものの、20mJ/cm^{2}のUVB照射量ではNotch-Hes1経路の活性化によりBNIP3の発現量が抑制され、オートファジーも抑制されることからアポトーシスによる細胞死が増えていることが示唆された。また、損傷ミトコンドリアの除去により、活性酸素も除去されていることが予想される。このことから、Notch-Hes1経路の阻害が、抗老化につながることも期待される。このように皮膚恒常性を脅かすストレスは、Notch-Hes1経路に影響を及ぼしていることがわかる。このことは、皮膚恒常性ストレスにおいて、Notch-Hes1経路が重要な役割を担うことを大いに示唆するものである。そうであれば、それは他のストレス要因でも観察される現象に他ならない。そこで、生体におけ

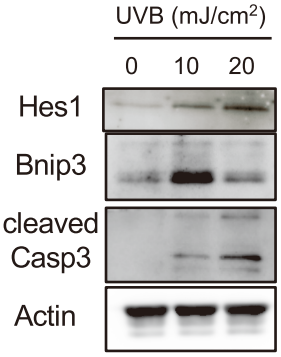


図1

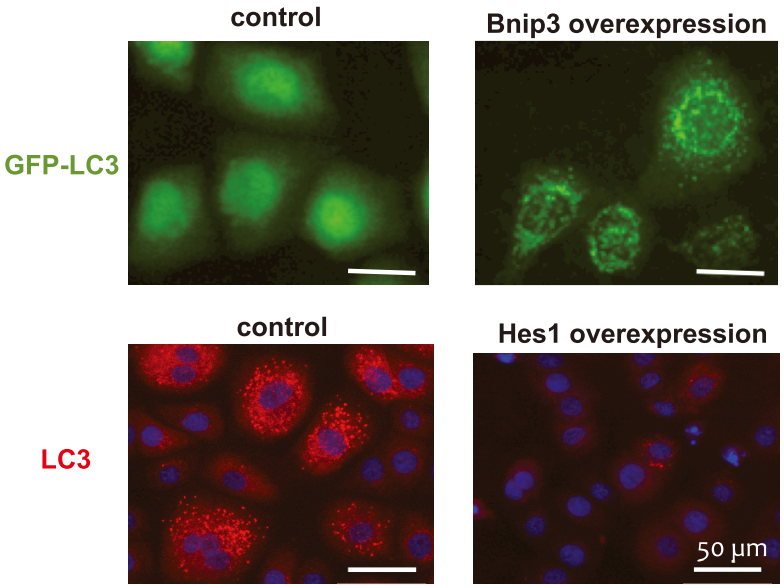


図2

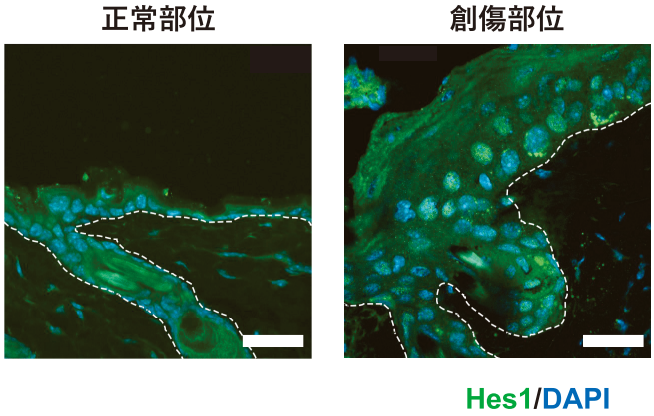


図３

るHes1のストレス応答を観察するために、マウスに全損欠損創を作成し、Hes1の発現解析をおこなった。全損欠損創を作成した２日目に皮膚を回収し、Hes1に対する免疫染色をおこなったところ、図３に示すように、創傷部位では非創傷領域と比べ、表皮でのHes1の発現が優位に上昇していることを見出すに至った（未発表データ）。

４．考　察

UVB照射が皮膚に与える分子制御機構について、ヒトの表皮ケラチノサイトではNotch-Hes1経路の活性化が起こり、それにともないアポトーシス細胞の増加が顕著となった。これらを誘起するUVB照射量は20mJ/cm^{2}でピークを迎えることもわかった。これは日常生活で受ける照射量の範疇であり、特に夏場にはUVB照射量はこれを大きく超える時間帯もあることから、皮膚構成細胞のうち特に表皮ケラチノサイトにおけるNotch-Hes1経路が、その後に引き起こされるアポトーシスによる細胞死の抑制に寄与することが考えられる。面白いことに、一般にアポトーシス誘導などに関連するBNIP3の発現は、UVB照射量が10mJ/cm^{2}でピークを迎えることもわかった。これらの分子間での発現制御機構とバランスが、皮膚のターンオーバーにおける皮膚恒常性を制御する鍵となるかもしれない。それゆえ、我々は皮膚恒常性にとって鍵となる生命現象を広く捉え、その因子のひとつとしてオートファジー制御機構に着目した。実際、BNIP3とHES1のオートファジー活性について調べたところ、HPEKにBNIP3を強制発現させるとオートファジーが誘導される（図２）[1,2]。しかし、HES1の強制過剰発現は、オートファジー誘導を抑制した（図２）。さらに、我々のこれまでの研究成果より、UVB照射時に引き起こされるBNIP3の発現増加は、オートファジー誘導による損傷ミトコンドリアの除去を誘導するなど抗アポトーシス作用因子として働くことも示している[1,2]。これらの結果は、紫外線照射によるNotch-Hes1経路の活性化によりBNIP3の発現量が抑制され、オートファジーも抑制されることからアポトーシスによる細胞死が増えていることを示唆する。またこの時、損傷ミトコンドリアの除去により、活性酸素などの細胞老化因子も除去されていることも予想されるため、Notch-Hes1経路は抗老化作用の主要な細胞内シグナル伝達経路と捉えられ、この経路の効果的な阻害が新たな抗老化の作用点となることが期待される。

このように、Notch-Hes1経路には皮膚の恒常性に広範に寄与する新たなキーメカニズムの可能性が見出された。皮膚の恒常性を即座に脅かす外的ストレス要因の筆頭は、皮膚が傷ついて破綻する作用、いわゆる創傷作用である。そこで、生体におけるHes1のストレス応答を観察するためにマウスに全損欠損創を作成し、Hes1の発現解析をおこなったところ、創傷部位の表皮においてHes1の発現が大きく上昇していることがわかった。創傷早期に誘起されるHes1の発現上昇とその生理的・分子生物学的メカニズムについては、解析を進めているところであるが、NotchシグナルやHes1およびその関連分子が皮膚恒常性に係る現象をいくつか発見するに至っている。これらを総じて、今回の研究成果は、基礎皮膚科学や臨床皮膚研究などの医療の観点はもとより、人々の心身の健康をひろく支える香粧品の評価機材の開発[3]や新規機能性香粧品の創製、さらには長寿社会を支える新たな社会基盤研究の一助に通じる萌芽的成果として捉えることができる。

５．統　括

昨今の一億総活躍社会実現の積極的推奨の観点からも拙速に進みつつある使役勤労長寿社会化において、心身のストレスを背景にした老化の問題はつぶさに喫緊に対処すべき深刻な社会的課題である。唐突ではあるが、この課題に踏み込む切り口のひとつが「皮膚の恒常性と老化」、その科学的探究と考える。体表を被う皮膚は、多様な外部環境やストレスに速やかに応答する直接的な防御壁である。皮膚は身体的健康を維持する生体恒常性を維持するバリア装置である。それとともに、外見として他者の視覚的意識にも反映される臓器ゆえ、精神的な健康にも影響を及ぼす心理的なバリア装置ともなり得る。老化に伴う皮膚機能の破綻は、理想とする容貌や容姿の破綻だけでなく、生体内部の機能破綻、強いては生命の破綻までつながるトリガーでもある。圧倒的な長寿人口社会の負の問題のリスクヘッジとして「皮膚の抗老化」は極めて重要な研究課題として捉えることができる。

我々の求める研究成果は、老いに付帯する不安要因の緩和や老化にともなう皮膚脆弱性からの寛解・堅牢性の再獲得など、これからの長寿社会に寄与できるものと考えられる。これらの観点は終局的に、(1) 我が国が初となるオートファジー皮膚恒常性機構の解明、(2) 長寿社会での社会

保障費・医療費の削減、(3) 予防医療受診への啓蒙、(4) 褥瘡や加齢皮膚疾患等に対する特効薬開発や治療法の開発に波及的な効果を及ぼすことが期待できるものと考えている。

(引用文献)

1) Moriyama M, Moriyama H, Uda J, Matsuyama A, Osawa M, Hayakawa T. BNIP3 plays crucial roles in the differentiation and maintenance of epidermal keratinocytes. J Invest Dermatol, 2014.134(6):p.1627-35.

2) Moriyama M, Moriyama H, Uda J, Kubo H, Nakajima Y, Goto A, Morita T, Hayakawa T. BNIP3 upregulation via stimulation of ERK and JNK activity is required for the protection of keratinocytes from UVB-induced apoptosis. Cell Death Dis, 2017. 8 (2) : p. e2576.

3) Moriyama M, Sahara S, Zaiki K, Ueno A, Nakaoji K, Hamada K, Ozawa T, Tsuruta D, Hayakawa T, Moriyama H. et al., BAdipose-derived Stromal/Stem Cells Improve Epidermal Homeostasis. Sci Rep, 2019. 9 (1) : p. e18371.

表皮細胞間接着分子の発現増強条件と皮膚機能の総合的検討

慶應義塾大学医学部皮膚科学教室

山上　淳

This study aimed to comprehensively evaluate skin function by examining the conditions for enhancing the expression of epidermal intercellular adhesion molecules. Our results suggested the effect of steroid administration on enhancing desmoglein expression and would help with understanding the adhesive function of epidermal cells. Steroid effects on other molecules making up desmosomes, cytoskeleton and other barrier structures, and compounds other than steroids are expected to be clarified on the basis of this study when the exhaustive search system of mRNA expression, which are still underway, is set up. The ultimate goal of this study is the accumulation of information needed to maintain skin health for a longer period of time, and the conditions for maintaining skin with a stronger adhesion function. Because epidermal cell-cell adhesion is an important basic function of the skin, we are going on our efforts to disseminate new information about the direction of skin care. From another point of view, it was very meaningful to obtain new knowledge directly related to the pathogenesis and treatment of pemphigus and pemphigoid, state-designated intractable diseases. We have been able to collect information on epidermal cells not only from healthy skin but also from diseased skin that has caused blisters and erosions form various angles, and would like to contribute to cosmetology, which is expected to become more diversified in the future.

1．緒　言

表皮細胞同士の接着にはデスモゾームが大きな役割を果たしている。デスモゾームでは、細胞外でデスモグレイン（Dsg）およびデスモコリンといったデスモゾーマルカドヘリンと呼ばれる細胞接着分子同士が結合し、細胞膜部で内側からプラコグロビン、デスモプラキン、プラコフィリンといった細胞裏打ちタンパクに支えられることで、表皮細胞間接着が保持されている。天疱瘡は、主にDsgに対する自己抗体によってデスモゾームの機能が障害されることにより、粘膜・皮膚に水疱・びらんを生じる自己免疫疾患である。我々は、これまで天疱瘡の診療・研究に従事してきたが、天疱瘡に罹患した皮膚が副腎皮質ステロイドの外用によって上皮化が促進され、治癒する症例を多数経験してきた。従来より、副腎皮質ステロイドの天疱瘡に対する作用機序として、原因となる自己抗体の産生を低下させる免疫抑制作用が主に考えられてきた。しかし、抗体産生細胞への作用のみであれば、効果発現までに時間がかかるのに対して、ステロイド外用剤の皮膚症状への効果は投与開始後数日で現れることは、多くの皮膚科医の知るところである。そのため、抗体産生細胞への作用以外に、水疱形成を抑制し上皮化を促進させる機序が関与している可能性が示唆されてきた。

Comprehensive study on the skin function and conditions for enhancing the expression of epidermal cell-cell adhesion molecules

Jun Yamagami

Department of Dermaotology, Keio University School of Medicine

これまでに行われてきた研究の結果からは、天疱瘡において自己抗体が抗原に結合してから水疱形成に至るまでの機序として、大きく2つの説が考えられている。1）自己抗体の結合によりDsgの機能を空間的に直接阻害するsteric hindrance説と、2）自己抗体がDsgに結合することで細胞内シグナルを誘導してDsgのリン酸化を介して細胞膜上から細胞内に引き込まれる、あるいはp38MAPKなどによって二次的に活性化されたプロテアーゼにより棘融解が惹起されるというシグナル伝達説である。近年、病原性のあるモノクローナル抗体がシグナル非依存性に水疱を形成する一方で、ポリクローナルな抗体からなる天疱瘡患者血清はp38MAPKを介してDsgを凝集させてエンドサイトーシスを起こすことがわかってきており、患者内では上記の2つの機序が混在しながら水疱形成を起こしていると考えられる[1, 2]。これを受けて、副腎皮質ステロイドの作用として、1）表皮角化細胞におけるDsgなどのタンパク発現に対する影響、2）シグナル伝達に対する影響があることが予想された。以上のような背景から、副腎皮質ステロイドの濃度などを中心に、表皮細胞間接着に関わる遺伝子およびタンパクの発現を増強させる条件を検討することにより、皮膚機能を総合的に評価することを目的として、本研究を計画した。

また、天疱瘡はDsgに対する自己抗体によって表皮細胞間接着が傷害されて水疱が形成される疾患だが、同様の機序で皮膚および粘膜に水疱および紅斑を生じる自己免疫疾患に水疱性類天疱瘡（bullous pemphigoid; BP）がある。表皮基底膜部（basement membrane zone; BMZ）の構成タンパクであるBP180（XVII型コラーゲン）およびBP230に対するIgG自己抗体が原因で、BP患者の皮膚ではBMZへのIgG・補体の線状沈着を認め、血清からはこれらの自己

抗原特異的なIgG抗体が検出される。加えて、一部のBP患者でBP180特異的な血清中のIgE抗体や、BMZへのIgEの沈着を認めたという報告が以前より散見され、BPにおける水疱および紅斑の形成、病態へのIgEの関与が示唆されてきている。本研究で、表皮内に水疱を形成する天疱瘡との対比として、表皮下に水疱を生じるBPでのIgGおよびIgEの病態における役割を比較検討することで、皮膚機能の総合的理解が深まることが考えられた。

2．方　法

2．1．培養表皮角化細胞における細胞接着分子発現条件の検討

ステロイドおよび他の化合物の表皮細胞への影響を評価するため、培養したヒト表皮角化細胞を用いたin vitroの系を用いた。基礎的な実験として、培養したヒト表皮角化細胞にさまざまな濃度および種類の副腎皮質ステロイド（プレドニゾロン、ヒドロコルチゾン）を加え、Dsg1およびDsg3、デスモコリン、デスモプラキン、プラコフィリン、プラコグロビンといったデスモゾームを構成する分子のmRNA発現の経時的変化、また培地中の副腎皮質ステロイド含有濃度との関連性についてリアルタイムPCR法で評価した。

2．2．抗Dsg3抗体の水疱形成抑制作用の検討

ステロイドの用量および時間経過の条件検討の後に、各化合物存在下における抗Dsg3抗体の水疱形成作用の変化を検討した。我々の研究室では、抗体の水疱形成能を定量的に評価する系として、培養ヒト角化細胞に表皮剥奪毒素（exfoliative toxin A; ETA）を入れてDsg1の接着機能を消失させた後に、抗Dsg3抗体を加えてピペッティングによる機械的ストレスを与えた際の細胞断片数を測定するin vitro dissociation assayが確立されている。さらに天疱瘡患者の血清、天疱瘡患者およびモデルマウス由来の多様な病原性を有するDsg3に結合するモノクローナル抗体を多数所有しており、in vitro dissociation assayで加えた抗体の種類およびステロイドの濃度に応じて、シグナル伝達物質およびデスモゾーム構成タンパクのmRNA発現を検討した。

2．3．水疱性類天疱瘡の水疱形成におけるIgEの役割の検討

皮膚BMZへのIgEの沈着とBPの病態との関連を調べるため、当科で皮膚生検を行い、BPと診断された53例の患者の凍結皮膚切片を直接蛍光抗体法（direct immunofluorescence; DIF）によりIgEで染色した。診断時に未治療だった症例に関しては、臨床症状スコアであるbullous pemphigoid disease area index（BPDAI）とIgEの皮膚への沈着との関連を検討した。BPDAIのスコアは、びらん／水疱（erosion/blister）、紅斑／膨疹（erythema/urticaria）に分けて記録されているので、IgEのBMZへの沈着が皮膚症状として水疱と紅斑のどちらに寄与したのかを、ある程度判別することが可能と考えられた。

3．結　果

培養したヒト表皮角化細胞に水疱形成を誘導するDsg3に対するモノクローナル抗体（AK23）を加えて細胞接着障害の程度を観察するin vitro dissociation assayを用いて、接着分子の発現および機能に対するステロイドの作用を観察した。0.00001mMから1mMまでの濃度のプレドニゾロン（PSL）およびヒドロコルチゾンの存在下で検討したところ、培地中のPSL濃度が0.001mMの時に、AK23によって生じる細胞断片の数が最も小さくなり、水疱形成抑制効果が最も高いと推測された。ヒドロキノンでも0.1mMの存在下で水疱形成抑制効果が見られたが、臨床現場で天疱瘡に対して第一選択で投与されるPSLを用いて実験を続けることとした。

水疱形成抑制の機序を解明するため、培養ヒト角化細胞に0.0001mMから0.1mMまでの濃度のPSLを加え、Dsg、デスモコリン、デスモプラキン、プラコグロビン、プラコフィリンといったデスモゾームを構成する分子のmRNA発現をリアルタイムPCR法で検討した。デスモコリン、デスモプラキン、プラコグロビン、プラコフィリン、Dsg1に関しては、PSL存在下での変化は観察されなかったが、Dsg3のmRNAは、PSL添加後8時間後から12時間後にかけて、生食を加えた時に比べて有意に上昇していることがわかった。ただし、ピークのPSL濃度は0.0001mMで、in vitro dissociation assayにおけるピークである0.001mMと異なっていた。

これらの結果を受けて、複数の天疱瘡患者血清およびAK23以外のモノクローナル抗体（AK23よりも病原性の弱いAK18、落葉状天疱瘡患者から単離されたDsg1のみに反応するPF1-8-15など）の水疱形成機能を抑制させる効果を示す、表皮角化細胞培養中のPSL濃度を調査しながら、その機序を解明するためのリアルタイムPCRの条件について、現在検討を重ねている。

また、BP患者53例の皮膚凍結標本を用いてDIFでBMZへのIgEの沈着を調べた。53例中10例（18.9％）でBMZへの強いIgE沈着（IgE+群）、13例（24.5％）でBMZへの顆粒状の弱いIgE沈着を認め（IgE±群）、両群を合わせると23例（43.4％）となっていた。次に53例のうち、診断時に未治療だった15例に関して臨床症状スコアであるBPDAIを比較した。IgE+の症例群では、沈着を認めなかった症例（IgE−群）に比べて有意にびらん／水疱のBPDAIスコアが高かった一方で（IgE+; 38.0 ± 20.8、IgE−; 18.0

± 11.2、p<0.05)、膨疹／紅斑のBPDAIスコアには有意差を認めなかった。さらに、IgE+またはIgE ±の症例群では、IgE−の症候群に比べてステロイド内服開始後にびらん／水疱のBPDAIスコアが治療前の25%以下に減少するまでにより長く時間がかかり、ステロイド治療に対する反応性の低さが示唆された（IgE+およびIgE ±; 20 ± 8.0［日］、IgE−; 9.4 ± 3.8［日］、p<0.05)。またIgE+の症例群では、IgE ±およびIgE−の症例群に比べて、ELISA法で測定した血清中のBP180特異的IgE抗体価が有意に高かった(p<0.05) [3]。

4．考　察

本研究の結果から、ステロイドの投与によりDsg3のmRNA発現が上昇し、細胞間接着が補強されることにより、自己抗体による水疱形成が抑制されることが示唆された。これまでの研究でも、培養細胞をステロイドで処理してから天疱瘡血清を加えた後の、デスモゾームの構成因子の発現を検討することが行われていたが、本研究ではsteric hinderance説に基づき、直接的に細胞間接着を障害するモノクローナル抗体における機序に関する理解が深まった点が非常に意義深い。

Dsg分子の細胞内取り込みを調節する因子として、protein kinase C（PKC)、RhoA、c-myc、プラコグロビンなどのシグナル伝達経路の関与がこれまでに言及されており、よく知られているp38MAPKの活性化機構とともに、さらなる検討を進めていく予定である。今後の実験の精度を高めるとともに、ステロイド投与からの時間経過、ステロイドの種類の違い、天疱瘡血清およびモノクローナル抗体の病原性の違いなどが、デスモゾーム構成分子のmRNA発現にどのように作用するか検討を進め、水疱形成機序に特化した治療標的を探索していきたいと考えている。

BPでの成果に目を向けると、BP180に特異的なIgEの抗体価とBPの病勢の関連を検討した報告は過去にも存在する。以前の研究や蕁麻疹でのIgEの役割から、IgE自己抗体はBPの紅斑の形成に関わっていることが予想された。しかし、今回の結果でBMZへのIgEの沈着は、BPDAIの膨疹／紅斑スコアよりもびらん／水疱のスコアとの関連が見られたため、紅斑よりもむしろ水疱の形成と増悪および治療抵抗性に関係していることが示された。今回の研究では、DIFで皮膚のBMZに結合しているIgEを検出して評価することが重要なポイントとなっている。ただし、BPにおける自己抗体の最も重要な標的タンパクであるBP180に特異的なIgEを検出できるELISAとは異なり、抗体の特異性についてはDIFのみでは判定できない。今回は、DIFとELISAの結果と組み合わせることにより、IgE自己抗体のBPの病態における役割について、より精度の高い検討が可能となったと考えられる。BPの診断基準には、IgGおよび補体（C3）のBMZへの沈着が含まれているが、実際のBPの病態においてIgGとIgEのどちらの関与がより大きいのか、というのは非常に興味深い疑問点である。今回の研究のみからは結論づけることはできないが、臨床症状を比較した15例においては、全例で典型的なBPと同様にBMZへのIgGおよびC3の沈着が見られており、それに加えてIgEのBMZへの沈着が生じることで、さらなる症状の増悪および治療抵抗性につながっている可能性が推測された。ただ、今回の研究ではIgEのBMZへの沈着は陽性、弱陽性、陰性の3段階で評価しているのに対し、IgGの沈着は陽性、陰性の2段階でしか評価していないのは問題点と考えられた。今後は、これまでの臨床・研究であまり注目されてこなかったBMZへのIgGの沈着量にも着目して、IgG沈着の定量法を確立するとともに臨床症状スコアとの関連があるかなど、多方面から検討すべきであろう。

一般的にIgEはFcε受容体を介して免疫応答を起こし、肥満細胞の脱顆粒などを通じて臨床症状を生じると考えられている。今回の研究の結果からは、その経路とは別に、生体内で自己抗原に直接結合したIgEが、水疱形成を通じてBPの発症および増悪に関与する可能性が示唆された。BMZに沈着しているIgEが水疱を起こす機序については、現時点で明確な解答があるわけではないが、過去の報告からはBMZに存在しているIgEによりBP180の細胞内移行が起こり、表皮真皮間の接着強度が低下すること、さらに皮膚への好酸球や好中球の浸潤が促進され、タンパク分解が誘導されて水疱が形成されることなどが考えられる。実際に、BP患者の血清や水疱液中で、IL-4やIL-5などのTh2関連のサイトカインの上昇はしばしば認められるため、いわゆるアレルギー疾患を起こす何らかの反応が、BPの発症に関連している可能性はあり、そのカスケードの中でIgEが大きな役割を果たしている可能性が示唆されている。実際に、IgEに対するモノクローナル抗体であるオマリズマブは、主に血清IgE高値、好酸球増多を認めるBPの症例に奏効した報告がある [4]。今後BMZに沈着するIgE抗体に関連した病態生理の解明により、抗IgE抗体をはじめとして、BP患者に対するより安全で有効な、ステロイドに依存しない新規治療法の確立が期待される。

5．統　括

本研究は、表皮細胞間接着分子の発現増強条件の検討から総合的に皮膚機能を評価する計画であり、ステロイドの投与によるDsg発現増強の効果を確認できたことは、大きな成果であったと考えられる。めざしていたマイクロアレイのセットアップは研究期間内には間に合わなかったため、デスモゾームを構成する他の分子、細胞骨格や他のバリア

構造を司る分子、ステロイド以外の化合物の影響などについては、現在も進めている理想的な条件検討が終わった段階で、今後解明されることが期待される。表皮細胞間接着は皮膚の重要な基礎機能であり、本研究の最終的な目的は、より強固な接着機能を持つ皮膚を保つための条件、長く皮膚の健康を維持するために必要な情報の蓄積である。スキンケアの方向性に関する新しい情報を発信できるように、努力を続けたいと考えている。

また別の視点から考えると、天疱瘡・類天疱瘡という国指定難病の病態・治療に直結する新知見が得られたことは、非常に有意義であった。健康な皮膚だけでなく水疱・びらんを生じた病的な皮膚からも、表皮細胞の情報を多角的に収集できたことは大きく、今後ますます多様化が求められるコスメトロジーに少しでも貢献できればと考えている。

（引用文献）

1）Saito M, Stahley SN, Caughman CY et al. Signaling dependent and independent mechanisms in pemphigus vulgaris blister formation. PLoS One 2012; 7（12）: e50696

2）Yoshida K, Ishii K, Shimizu A et al. Non-pathogenic pemphigus foliaceus（PF）IgG acts synergistically with a directly pathogenic PF IgG to increase blistering by p38MAPK-dependent desmoglein 1 clustering. J Dermatol Sci 2017; 85（3）: 197-207

3）Kamata A, Kurihara Y, Funakoshi T et al. Basement membrane zone IgE deposition is associated with bullous pemphigoid disease severity and treatment results. Br J Dermatol 2019; doi: 10.1111/bjd.18364.［Epub ahead of print］

4）Balakirski G, Alkhateeb A, Merk HF et al. Successful treatment of bullous pemphigoid with omalizumab as corticosteroid-sparing agent: report of two cases and review of literature. J Eur Acad Dermatol Veneol 2016; 30（10）: 1778-82

プラズマローゲン型リゾリン脂質代謝系を基軸とした皮膚の恒常性と疾患調節の作用機序の解明

徳島大学大学院社会産業理工学研究部（生物資源産業学域）

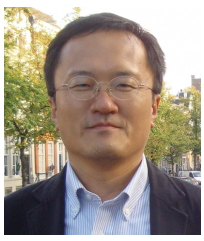
山本　圭

Epidermal lipids play important roles in skin homeostasis and diseases. We herein report that lysoplasmalogen (P-LPE), preferentially produced by group IIF secreted phospholipase A_2 (sPLA$_2$-IIF; an "epidermal sPLA$_2$") that is expressed in the suprabasal epidermis, promotes epidermal hyperplasia. In both mice and humans, the expression of sPLA$_2$-IIF is increased in inflamed skin in correlation with that of several inflammatory markers such as *S100A9* and TNF. *Pla2g2f*$^{-/-}$ mice had a fragile stratum corneum and were strikingly protected against psoriasis, atopic dermatitis. Conversely, global and keratinocyte-specific *Pla2g2f*-transgenic mice developed psoriasis-like epidermal hyperplasia spontaneously. Primary keratinocytes from *Pla2g2f*$^{-/-}$ mice showed defective differentiation and activation. sPLA$_2$-IIF was induced by calcium or Th17 cytokines (IL-17A and IL-22) in keratinocytes and preferentially hydrolyzed ethanolamine plasmalogen secreted from keratinocytes to give rise to P-LPE. Treatment with P-LPE restored defective activation of *Pla2g2f*$^{-/-}$ keratinocytes both *in vitro* and *in vivo*, while forcible degradation of P-LPE by topical application of recombinant lysophospholipase D from *Thermocrispum*, a lysoplasmalogen-specific hydrolase, prevented psoriasis and atopic dermatitis by in wild-type skin. Moreover, P-LPE markedly facilitated upward proliferation and differentiation of human primary keratinocytes in three-dimensional culture. Diagnostically, the increase of several P-LPE species, but not other lysophospholipids, was readily detectable in the tape-stripped stratum cormeum obtained from psoriatic and atopic skins. Overall, our results highlight P-LPE as a previously unrecognized bioactive lysophospholipid and point to the sPLA$_2$-IIF/P-LPE axis as a novel drug or biomarker target for psoriasis and atopic dermatitis and possibly other epidermal-hyperplasic diseases.

1．緒　言

皮膚、とりわけ表皮は体内の生命環境と非生命環境との間の境界バリアの役目をもち、体内からの水分の蒸発、体液の漏出あるいは病原体などの侵入から体を守っている。表皮角質層は表皮角化細胞（ケラチノサイト）の周囲をセラミドやコレステロールからなる角質細胞間脂質により満たされているために物理的・化学的刺激に対して非常に安定であり、また脂肪酸などにより表皮は酸性に保たれている。しかし、一旦ケラチノサイトの分化および増殖のサイクルが壊れると皮膚のバリアが乱れ、魚鱗癬などの重篤な角質不全疾患を呈する他に、乾癬やアトピー性皮膚炎などの慢性炎症性皮膚疾患につながり、その克服が望まれている。

栄養素として摂取された脂肪酸はグリセロール骨格に結合した形でリン脂質や中性脂肪に蓄えられ、必要時に脂質分解酵素群によって遊離される。我々は、リン脂質分解酵素の一群であるホスホリパーゼA_2（PLA$_2$）群の網羅的欠損マウスの表現型解析に脂質質量分析（リピドミクス）を用いることで、各PLA$_2$により動員される疾患固有の脂質代謝とその生物学的意義を解明してきた[1,2]。その中で、表皮角化細胞の間隙に分泌される表皮リン脂質代謝酵素（sPLA$_2$-IIF）がプラズマローゲン型リゾホスファチジルエタノールアミン（リゾプラズマローゲン：P-LPE）を産生し、このP-LPEが表皮角化細胞の分化に寄与すること、さらに表皮肥厚性疾患を惹起する新規リゾリン脂質であることを報告した[3]（図１）。しかし表皮におけるP-LPEの機能については未だ未解明な部分が多い。そこで本研究ではP-LPEの分子メカニズムを詳細に解析することを目的とした。



Elucidation of mechanism of skin homeostasis and disease regulation by plasmalogen-type lysophospholipid pathway

Kei Yamamoto

Division of Bioscience and Bioindustry, Graduate School of Technology, Industrial and Social Sciences, Tokushima University

2．方　法

2．1．ヒト表皮角化初代培養細胞

実験には不死化ヒト表皮角化細胞株 NHEK/SVTERT3-5（Evercyte）を用いた。細胞の継代は正常ヒト表皮角化細胞増殖用培地HuMedia-KG2（クラボウ）を用いて37℃、7% CO_2条件下でおこなった。三次元培養は、角化細胞分化専用培地CnT-PR-3D：CnT-Prime 3D Barrier（CELLnTEC）に懸濁した細胞を2.0×10^5cells/wellになるように24 wellセルカルチャーインサートに播種し、翌日、セルカルチャーインサート内の培地を除去した後、気相培養をおこなった。siRNAによる抑制実験では、三次元化する前日にLipofectamine RNAiMAX Reagent（Thermo）を用いてsiRNAを導入した細胞を用いた。三次元培養開始から３日後、終濃度10ng/mLのTNF-α、IL-1β、IL-22、IL-17A、IL-17F、IL-6（PEPROTECH）、あるいは10nM P-LPEを加え、48時間培養した。

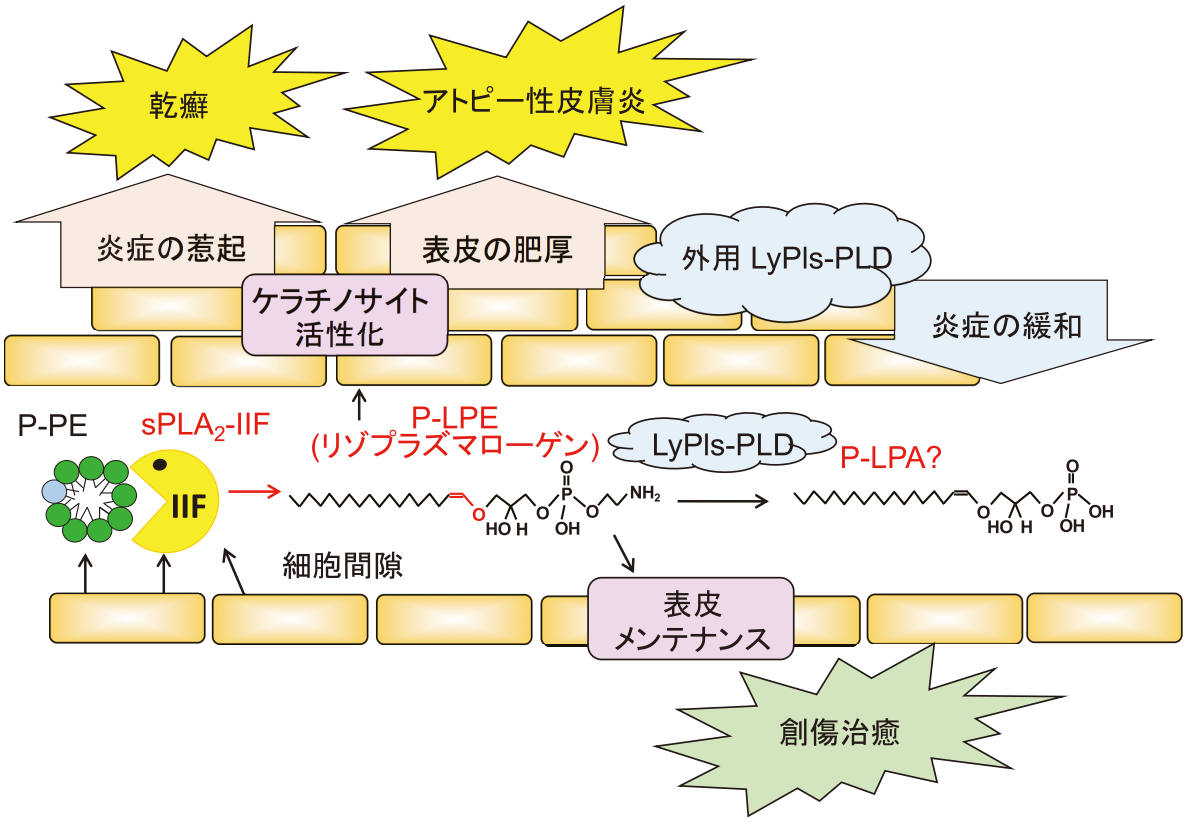


図1　sPLA$_2$-IIF/p-LPE 経路は皮膚バリアを構築するマスターレギュレーターである

2．2．創傷治癒モデル

実験にはC57BL/6背景の野生型マウスおよびsPLA$_2$-IIF遺伝子欠損マウス[3]を使用した。バリカンを用いてマウス背部の体毛を剃り、露出させた皮膚に5mm生検トレパンを用いて穿孔し、経時的に穿孔径を測定した。また、sPLA$_2$-IIF遺伝子欠損マウスの患部に10nM P-LPE（5%エタノール/生理食塩水）を添加し、遺伝子欠損による表現型の回復を評価した。

2．3．乾癬モデル

Balb/c背景の野生型マウスおよびsPLA$_2$-IIF遺伝子欠損マウス[3]の耳介に5%イミキモド（ベセルナクリーム、持田製薬）を5日間連続して塗布して乾癬モデルを作成した。阻害剤およびリゾプラズマローゲン特異的ホスホリパーゼD（LyPls-PLD）[4]は後述に従って塗布した。耳介厚の測定を行うとともに、回収した耳介からmRNAを抽出し定量的PCR法を用いてsPLA$_2$-IIFならびに乾癬に関わる遺伝子を測定して評価した。

2．4．アトピー性皮膚炎モデル

Balb/c背景の野生型マウスおよびsPLA$_2$-IIF遺伝子欠損マウス[3]の耳介に80nMカルシポトリオール（MC903、Cayman）を連続3日間かつ3週繰り返して塗布し、4週目に再びカルシポトリオールを塗布して翌日に解析した。阻害剤およびLyPls-PLD[4]は後述に従って塗布した。ビデオカメラを用いて30分間マウスを撮影し、前肢および後肢による耳介の掻痒回数を測定した。耳介厚の測定および回収した耳介からmRNAを抽出し定量的PCR法を用いてsPLA$_2$-IIFならびにアトピー性皮膚炎に関わる遺伝子を測定して評価した。

2．5．角質脂質を用いたリピドミクス解析

マウス耳介から1検体につきテープ約0.7cm × 0.7cm、5枚分の角質を採取した。ヒトの場合は健常者、アトピー性皮膚炎患者、乾癬皮膚炎患者から1検体につきテープ約2.5cm × 6cm、5枚分の角質を採取した。裁断したテープから総脂質を抽出し、質量分析装置（4000QTrap, Sciex）を用いて分析した[3]。内部標準としてd7-LPE（18:1）、d5-EPAを用い、各測定値はサンプルの総蛋白量を用いて補正した。

3．結　果

3．1．ヒト表皮角化初代培養細胞におけるsPLA$_2$-IIF/P-LPE経路の役割

表皮角化細胞株NHEK/SVTERT3-5を高密度の濃度でトランスウェルに播種し、三次元化専用培地のCnT-PR-

3Dを用いて、気相培養をおこなった。その結果、細胞の著しい三次元化の亢進および分化マーカー *KRT1* の誘導が認められるものの基底層の *KRT14* の発現には変化はなく、細胞の三次元化が適切におこなわれていることが示された。この条件下において $sPLA_2$-IIFの発現は細胞の三次元化に伴って増加した。表皮細胞の *PLA2G2F* をノックダウンすると細胞の三次元増殖および分化マーカー *KRT1* の発現増加が抑制されたが、*KRT14* の発現には影響がなかった。さらに、三次元化した表皮角化細胞にTh17応答性のサイトカインを含む6種類のサイトカイン（TNF-α, IL-1β, IL-22, IL-17A, IL-17F, IL-6；各10ng/mL）を添加して乾癬を誘導させると、細胞活性化マーカー *S100A9* とともに $sPLA_2$-IIFの発現が著しく増加した。この *S100A9* の発現増加は *PLA2G2F* のノックダウンにより抑制された。一方、乾癬はJAK/STAT3経路を介して惹起されることが知られている。本実験モデルにおいてサイトカイン添加によるSTAT3リン酸化の亢進は *PLA2G2F* のノックダウンにより消失した。さらに $sPLA_2$-IIFノックダウン細胞にP-LPEを添加すると細胞活性化マーカー *S100A9* の発現が増加し、ノックダウンによる影響をレスキューした。以上の結果から、$sPLA_2$-IIF/P-LPE経路は表皮角化細胞の活性化に寄与することが示された。

3.2. 創傷治癒における $sPLA_2$-IIF/P-LPE経路の役割

$sPLA_2$-IIF/P-LPE経路はケラチノサイトを活性化し、皮膚バリアの形成に寄与する重要な役割をもつことが示唆されていることから、皮膚創傷治癒に関与することが想定される。バリカンを用いてマウス背部の毛を剃り、背部皮膚に5mmの生検パンチで円形の創傷を作成し経時的に観察した。創傷面積の測定を行い創傷閉鎖の動態を元の創傷面積に対する割合として評価した。その結果、野生型マウスの創傷部は経時的に改善され創傷から3日目にそのほとんどが閉じたが、$sPLA_2$-IIF遺伝子欠損マウスの創傷閉鎖速度は野生型マウスと比較して有意に遅延した。さらに $sPLA_2$-IIF遺伝子欠損マウスの創傷部に10nM P-LPEを塗布すると創傷閉鎖の遅延が有意に回復した。以上の結果から、$sPLA_2$-IIF/P-LPE経路はケラチノサイトの分化に寄与し創傷治癒を促進することが明らかとなった。

3.3. 乾癬における $sPLA_2$-IIF/P-LPE経路の役割

乾癬はTh17応答を介する表皮肥厚性疾患であり、表皮角化細胞の異常増殖と異常角化や毛細管の拡張、T細胞や好中球などの浸潤を特徴とする。マウスの皮膚にイミキモドを連続塗布することによりヒト乾癬と類似した皮膚炎が誘導される。乾癬モデルを $sPLA_2$-IIF欠損マウスに施行すると、野生型と比較して表皮の肥厚およびケラチノサイトの活性化が抑制され、病態が有意に改善した[3]。$sPLA_2$-IIFは乾癬の表皮肥厚部に発現していることから、$sPLA_2$-IIFの酵素反応産物であるP-LPEは表皮角質に局在することが想定される。そこで、Balb/cマウスの耳介にイミキモドを塗布し、塗布5日目の表皮角質のリピドミクス解析をおこなった。その結果、P-LPE群がイミキモドを塗布した表皮角質で増加し、そのうちLPE（P-18:0）は7.0pmol/cm^2 であった。さらに $sPLA_2$-IIF欠損マウスの角質では野生型で増加したP-LPE群は有意に低下した。以上の結果から、P-LPEが表皮角質層に局在し病態に応じた変化が認められたことから、P-LPEは乾癬のバイオマーカーとして期待できることが示唆された。

リゾプラズマローゲン特異的ホスホリパーゼD（LyPls-PLD）はP-LPEを特異的に分解しプラズマローゲン型リゾホスファチジン酸（P-LPA）を産生する放線菌由来の酵素である[4]。精製した組換LyPls-PLDを乾癬を惹起させたマウス耳介に外用塗布するとP-LPEの低下を伴って、表皮の肥厚および炎症マーカーTNFの発現が低下した。この低下のレベルはデキサメサゾンによる表皮の肥厚抑制と同程度であった。すなわち $sPLA_2$-IIF/P-LPE経路は乾癬に寄与すること、この経路はデキサメサゾンに代わる新規創薬ターゲットになる可能性があることが示唆された。

3.4. アトピー性皮膚炎における $sPLA_2$-IIF/P-LPE経路の役割

アトピー性皮膚炎は、好酸球やTh2細胞の増多、高IgE血症などの症状が認められる表皮肥厚性疾患であり、皮膚の肥厚に加え痒みが特徴で、掻くことによりさらにバリア機能が低下するという悪循環に陥ってしまう。胸腺間質性リンパ球新生因子（TSLP）はケラチノサイト由来のアトピー性皮膚炎の病態を形成する最も重要なケモカインの一つとして位置付けられ、ビタミンD受容体アナログのカルシポトリオール（MC903）の反復塗布によりTSLPが誘導されアトピー性皮膚炎モデルが成立する。Balb/cマウスにアトピー性皮膚炎モデルを適用すると耳介の肥厚、*Tslp*、*Tnf*、*S100A9*、*Il31* の発現の亢進とともに、$sPLA_2$-IIFが増加した。野生型マウスの掻痒行動は30分あたり22.8回であったが、$sPLA_2$-IIF欠損マウスでは有意に低下し6.6回であった。$sPLA_2$-IIF欠損マウスにP-LPEを塗布すると掻痒行動が有意に増加した。免疫抑制剤のタクロリムス（FK506）を耳介に塗布すると、マウスの掻痒行動が濃度依存的に低下し、0.01％ FK506の塗布で $sPLA_2$-IIF欠損マウスと同じレベルになった。この結果は、アトピー性皮膚炎のモデルにおいて、$sPLA_2$-IIFの阻害がFK506の効果と匹敵するほどの抑制効果をもつことを示唆している。上述のLyPls-PLDをMC903反復塗布アトピー性皮膚炎モデルに塗布すると表皮角質のP-LPE低下を伴っ

て掻痒行動が有意に低下した。以上の結果から、sPLA$_2$-IIF/P-LPE経路がアトピー性皮膚炎の掻痒に寄与すること、タクロリムスに代わる新規創薬ターゲットになる可能性があることが示唆された。

3.5. ヒト慢性皮膚炎症疾患におけるsPLA$_2$-IIF/P-LPE経路の役割

ヒト角質検体を用いてP-LPE量を測定した結果、健常人の角質ではP-LPEが0.84 pmol/mg、アトピー性皮膚炎の検体ではP-LPEが3.54 pmol/mgの量で検出され、健常人と比較してアトピー性皮膚炎の患者で有意に高値であった。一方、乾癬検体のP-LPEは健常人と比較して若干増加していたが、無疹部と皮疹部には差がなかった。このことは乾癬の病態において無疹部と皮疹部の区別なくP-LPEが増加しており、乾癬の素地がある皮膚ではP-LPEが多いことを示している。この結果は、マウスを用いた実験によって提唱された乾癬およびアトピー性皮膚炎におけるsPLA$_2$-IIF/P-LPE経路がヒトにも存在することを示唆している。まだ例数が少ないため測定検体を増やす必要があるが、P-LPEが慢性皮膚炎症疾患のバイオマーカーとして、またテープストリッピングを用いたP-LPEの検出法がP-LPEを標的とした軽微侵襲測定法として活用できる可能性がある。

4. 考　察

体表全体を覆う皮膚は、外界からの病原菌、アレルゲン、環境物質の侵入ならびに体内からの水分の蒸散を防ぐ物質透過性バリアを形成するとともに、外界から侵入した異物に対する免疫応答が始まる場でもある[5]。皮膚は他の臓器には見られないユニークな脂質分子を多く含み、また皮膚だけに発現している脂質代謝酵素が多数存在する。このことは、皮膚は新しい機能性脂質を探索するための宝の山であり、脂質を標的とすることで皮膚疾患の新しい診断法の開発や創薬が可能であることを示唆している。

リン脂質代謝酵素のうち、表皮角化細胞に発現している細胞内酵素PNPLA1（カルシウム非依存性ホスホリパーゼA$_2$の一つ）はアシルセラミドの生合成を通じて角質バリアの形成に必須の役割を担う[6]。体毛に発現する細胞外型ホスファチジン酸ホスホリパーゼA$_1$α（PA-PLA$_1$α）は2-アシル型のリゾホスファチジン酸を産生し、リゾホスファチジン酸受容体（LPA6）を介して、体毛の形成に重要な機能をもつ[7]。また体毛に発現するsPLA$_2$-IIEは高度不飽和脂肪酸をもつリゾホスファチジルエタノールアミン（LPE）の産生を介して体毛形成に寄与している[8]。一方、リンパ組織の樹状細胞に高発現しているsPLA$_2$-IIDは、抗炎症性のω3脂肪酸代謝物を構成的に動員することで接触性皮膚炎におけるTh1免疫応答を抑制する[9]。sPLA$_2$-IIDの欠損および過剰発現マウスを用いて、本酵素の免疫抑制機能の普遍性について検証するとsPLA$_2$-IIDはリンパ組織の脂質バランスを構成的に免疫抑制の方向にシフトさせることにより、リンパ節炎症（急性炎症）、接触性皮膚炎（Th1応答）、乾癬（Th17応答）の各炎症病態を改善する。一方で、抗腫瘍免疫を抑制して皮膚癌を促進する。このことは、ω3脂肪酸代謝物動員酵素としてのsPLA$_2$-IIDの免疫抑制作用は病態に応じて体に良い方向にも悪い方向にも作用し得ることを示唆している[10]。ω6脂肪酸のアラキドン酸代謝産物である12（S）-ヒドロキシヘプタデカトリエン酸（12-HHT）は表皮角化細胞の遊走を制御することで皮膚バリア機能を制御することが報告されている[11]。

本研究では、sPLA$_2$-IIFが表皮顆粒層から角質層にかけて分泌され、角質細胞の細胞間隙にP-LPEを動員することにより、皮膚バリアの恒常性維持に重要な役割をもつことを示した。このP-LPEが過剰に産生すると表皮角化細胞が活性化され、Th17応答性の乾癬や環境因子の暴露による過剰なTh2型免疫応答性のアレルギー性皮膚疾患につながる。すなわち角質に局在するsPLA$_2$-IIF/P-LPE経路は外来からの攻撃を守る役割を担う皮膚バリアを構築するマスターレギュレーターであることが示唆された（図1）。またこのsPLA$_2$-IIF/P-LPE経路は角質に局在することから、本経路を標的とした軽微侵襲性診断法としての医療応用が期待できる。

このように表皮に局在する脂質代謝酵素は、特徴的な基質特異性ならびに産生されるリゾリン脂質分子種の違いにより、厳密に生命現象を制御している。最近のリピドミクス解析技術の急速な進歩が、これまで想定されなかった未知の脂質代謝経路を紐解き、それぞれの脂質代謝酵素が生体内の異なる局面で固有の脂質代謝を動かし、多彩な生命現象に関わることが明らかになりつつある。今後は、ヒト疾患との関連性を含めて解明することで、新たなバイオマーカーや創薬への展開が期待される。

（引用文献）

1）Murakami, M., Yamamoto, K., Miki, Y., Murase, R., Sato, H., and Taketomi, Y. The roles of secreted phospholipase A2 gene family in immunology. *Adv. Immunol.* 132, 91-134 (2016).

2）Murakami, M., Miki, Y., Sato, H., Murase, R., Taketomi, Y., and Yamamoto, K. Group IID, IIE, IIF and III secreted phospholipase A2s. *Biochim. Biophys. Acta*, 1864, 6, 803-818 (2019).

3）Yamamoto, K., Miki, Y., Sato, M., Taketomi, Y., Nishito, Y., Taya, C., Muramatsu, K., Ikeda, K., Nakanishi, H., Taguchi, R., Kambe, N., Kabashima, K., Lambeau, G., Gelb, M.H., and Murakami, M. The role

of group IIF secreted phospholipase A_2 in epidermal homeostasis and hyperplasia. *J. Exp. Med.* 212, 1901–1919 (2015).

4) Matsumoto Y, Kashiwabara N, Oyama T, Murayama K, Matsumoto H, Sakasegawa SI, Sugimori D. Molecular cloning, heterologous expression, and enzymatic characterization of lysoplasmalogen-specific phospholipase D from *Thermocrispum sp. FEBS Open Bio.* 6, 1113–1130 (2016).

5) Dainichi T, Kitoh A, Otsuka A, Nakajima S, Nomura T, Kaplan DH, Kabashima K. The epithelial immune microenvironment (EIME) in atopic dermatitis and psoriasis. *Nat Immunol.* 19, 1286–1298 (2018).

6) PNPLA1 has a crucial role in skin barrier function by directing acylceramide biosynthesis. Hirabayashi T, Anjo T, Kaneko A, Senoo Y, Shibata A, Takama H, Yokoyama K, Nishito Y, Ono T, Taya C, Muramatsu K, Fukami K, Muñoz-Garcia A, Brash AR, Ikeda K, Arita M, Akiyama M, Murakami M. *Nat Commun.* 8, 14609 (2017).

7) Inoue A, Arima N, Ishiguro J, et al. LPA-producing enzyme PA-PLA (1) alpha regulates hair follicle development by modulating EGFR signalling. *EMBO J.* 30, 4248–4260 (2011).

8) Yamamoto, K., Miki, Y., Sato, H., Nishito, Y., Gelb, M.H., Taketomi, Y., Murakami, M. Expression and function of group IIE phospholipase A_2 in mouse skin. *J. Biol. Chem.* 291, 15602–15613 (2016).

9) Miki, Y., Yamamoto, K., Taketomi, Y., Sato, H., Shimo, K., Kobayashi, T., Ishikawa, Y., Ishii, T., Nakanishi, H., Ikeda, K., Taguchi, R., Kabashima, K., Arita, M., Arai, H., Lambeau, G., Bollinger, J.M., Hara, S., Gelb, M.H., Murakami, M. Lymphoid tissue phospholipase A_2 group IID resolves contact hypersensitivity by driving anti-inflammatory lipid mediators. *J. Exp. Med.* 210, 1217–1234 (2013).

10) Miki, Y., Kidoguchi, Y., Sato, M., Taketomi, Y., Taya, C., Muramatsu, K., Gelb, M.H., Yamamoto, K., Murakami, M. Dual roles of group IID phospholipase A_2 in inflammation and cancer. *J. Biol. Chem.* 291, 15588–15601 (2016).

11) Liu M, Saeki K, Matsunobu T, Okuno T, Koga T, Sugimoto Y, Yokoyama C, Nakamizo S, Kabashima K, Narumiya S, Shimizu T, Yokomizo T. 12-Hydroxyheptadecatrienoic acid promotes epidermal wound healing by accelerating keratinocyte migration via the BLT2 receptor. *J Exp Med.* 211, 1063–1078 (2014).

化学物質のアレルギー感作性 in vitro 評価法の開発

東京医科大学医学総合研究所免疫制御研究部門
善本　隆之

Recently, several in vitro assays to predict the respiratory sensitizing potential of chemicals were developed, because the use of animal models in safety testing of chemicals is significantly limited. However, these alternative methods cannot distinguish chemical respiratory sensitizers and skin sensitizers, although the risk management systems for them are quite different. Therefore, in the present study, we aim at developing a novel in vitro assay, which can discriminate chemical respiratory sensitizers from skin sensitizers by taking advantage of the fundamental differences between their modes of function; development of helper T (Th) 2 immune responses, which is critically important for respiratory sensitization.

We have established a novel 3-dimensional (3D) coculture system using scaffold, which consists of human airway epithelial cell line, immature dendritic cells (DCs) derived from human peripheral blood $CD14^+$ monocytes, and human fibroblast cell line. The present results indicate that this DC coculture system can discriminate the respiratory sensitizing potential of chemicals from their skin sensitizing potential by means of more enhanced expression of key costimulatory molecule OX40 ligand, which is important for Th2 differentiation, as a marker in DCs. Moreover, we have also developed a novel DC/T coculture system, which consists of the sensitized DCs and allogenic naive $CD4^+$ T cells. In this system, we have great advantage that IL-4 up-regulation can be used as a marker for the prediction of respiratory sensitizing potential. Indeed, our data suggest that selective up-regulation of IL-4 was observed by the stimulation with respiratory sensitizer as compared to that with skin sensitizer.

Taken together, the present results suggest that our 3D coculture systems consisting of epithelial cells, DCs, fibroblast cells, and T cells would be useful for in vitro evaluation of allergenic sensitizing potential of chemicals. We are currently trying to further improve the versatility of these systems by using iPS technology.

1．緒　言

近年、動物実験を用いない3Rsの世界的な潮流により、医薬品や化学物質などの安全性評価に関するin vitro試験代替法の開発が産業界のみならず社会的にも急務とされている。皮膚感作性試験代替法としては、蛋白質との結合性を評価するDPRA法、ケラチノサイトのストレス応答を評価するKeratinoSens法、樹状細胞の活性化を評価するh-CLAT法などが、最近、OECDのテストガイドラインに採択された（図1）[1-3]。ところが、これら既存の代替法は、例えば、危機管理体制が大きく異なる呼吸器感作性［ヘルパーT（Th）2反応優位］と皮膚感作性（混合Th1/Th2/Th17反応）の違いを識別できず、現在、これらの感作性の違いを識別可能な方法の開発が望まれている。さらに、これらの代替法は、それぞれ単独では、従来の動物を用いるGPMT法やLLNA法などの試験法を代替することは不可能であるとされ[1-3]、そのため、有害性発現経路（AOP）[4]に基づいた複数の方法の組み合わせ（IATA）によるより厳密な評価が必要とされている[5]。これら既知の代替法は、皮膚および呼吸器感作性のAOPのKey event（KE）1～3に相当する初期の機序を反映した方法であるため、生体内でのアレルギー発症により近いKE4のT細胞の活性化や分化誘導を反映した方法の方がより確度が高いと考えられる。ところが、これまでにいくつか検討されているが、未だその方法の確立には至っていない[6]。

最近、我々は、ヒト気道上皮細胞株とヒト末梢血$CD14^+$単球由来未成熟樹状細胞（DC）、ヒト線維芽細胞株の3種類の細胞を、Scaffold（足場材）を用いてそれぞれ3次元培養した後順に重ね、気道上皮組織をより忠実に模倣した生体により近い3次元DC共培養系を開発した（図2）。そこで、本研究では、複数の代表的感作性化学物質を用いて、皮膚と呼吸器の感作性の違いを、これらの作用機序の違いを示すTh2分化および反応の誘導に係わる分子の発現増強の違いで識別できないか検討した。さらに、この3次元DC共培養系にT細胞も加えた3次元DC/T共培養系の構築の可能性についても検討を行った。

Development of in vitro evaluation system of allergenic sensitizing potential of chemicals

Takayuki Yoshimoto

Department of Immunoregulation, Institute of Medical Science, Tokyo Medical University

2．方　法

2．1．細胞株

ヒト気道上皮細胞株BEAS-2B（CRL-9609）とヒト肺線維芽細胞株MRC-5（CCL-171）は、ATCCより購入し、10%FCSを含むMEM培地で培養した。ヒト健常人末梢血$CD14^+$単球は、10%FCSを含むRPMI1640培地で培養した。

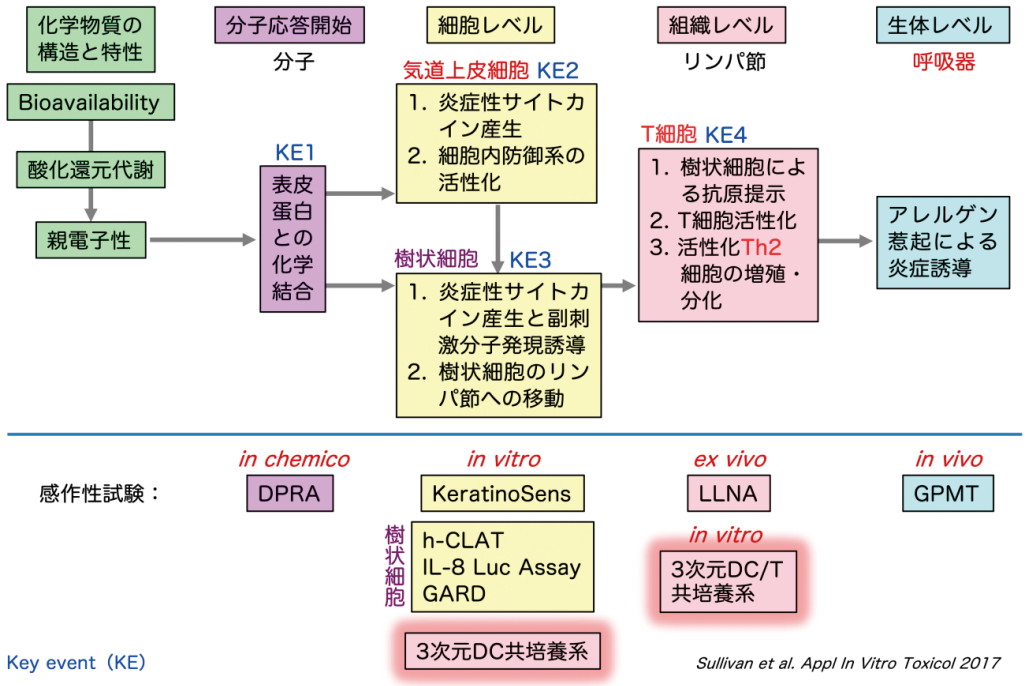


図１　感作性化学物質による呼吸器アレルギー発症までの有害性発現経路(AOP) と、既存の各試験法と本研究で開発中の３次元 DC 共培養系と３次元 DC/T 共培養系の位置づけ

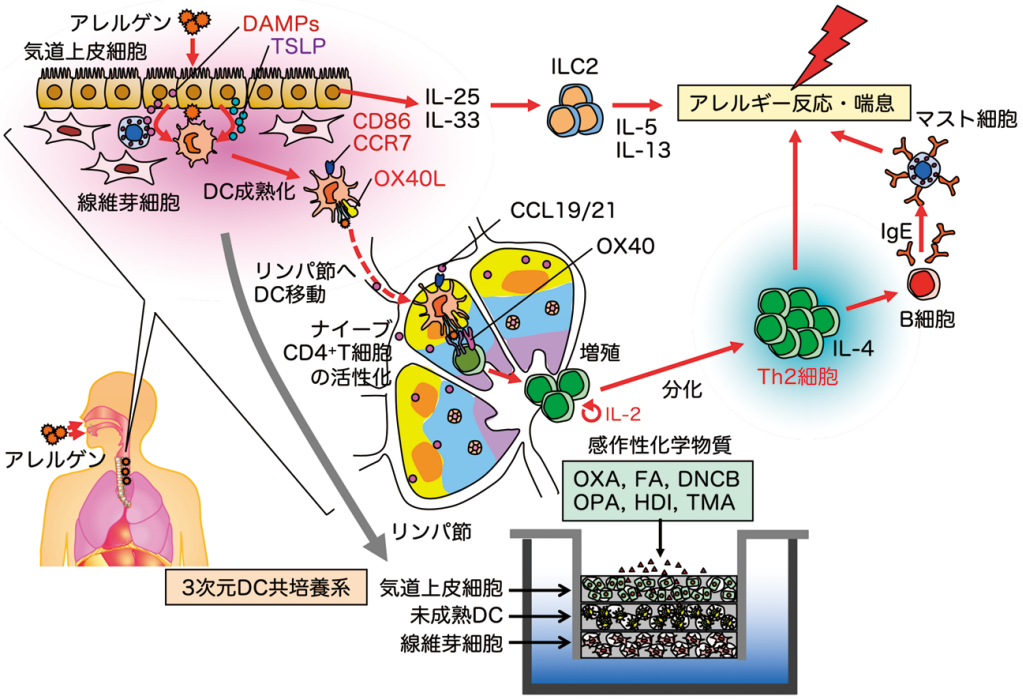


図２　気道上皮組織をより忠実に模倣するため、気道上皮細胞株、末梢血単球 $CD14^+$ 単球由来未成熟 DC、肺線維芽細胞株を用いてより生体に近い３次元 DC 共培養系を構築

２．２．感作性化学物質

３種類ずつの代表的な呼吸器感作性化学物質{ortho-phthaldialdehyde（OPA），hexamethylene diisocyanate（HDI），trimellitic anhydride(TMA)}と、皮膚感作性化学物質{oxazolone（OXA），formaldehyde（FA），2,4-dinitrochlorobenzene（DNCB)}は、全てSigma-Aldrich社より購入した。始めにDMSOに溶解後、共培養用培地（MEM培地とRPMI1640培地を１：１に混ぜた培地）で希釈し、至適濃度を検討後使用した。

2．3．Scaffold（図 3）

市販のポリスチレン性の多孔質Scaffold（Reinnervate社のAlvetex® Scaffold 24 well plate、Alvetex® Scaffold 12 well insert）を用いた。

2．4．ヒト健常人末梢血CD14$^+$単球由来未成熟DCの調製方法

東京医科大学医学研究倫理委員会の承認（受付番号3323、課題：アレルゲンのin vitro感作性評価法の開発）の下、健常人ボランティアの同意の後、末梢血50mlをヘパリン存在下で採血し、Lympholyte-H（Cedarlane社）に重層後、比重勾配遠心法により単核球を分離した。その後、抗CD14抗体のマイクロビーズ（Miltenyi社）を反応後、AutoMACS ProでCD14$^+$細胞を精製（純度＞99%）した。次に、このCD14$^+$単球をGM-CSF（50ng/ml）とIL-4（10ng/ml）で6日間培養後、抗CD11c抗体のマイクロビーズを反応後、AutoMACS Proで未成熟DCを精製（純度＞99%）した。

2．5．ヒト健常人末梢血ナイーブCD4$^+$T細胞の精製

上述（2. 4.）のようにヒト健常人末梢血より分離した単核球から、ヒトナイーブCD4$^+$T細胞アイソレーションキット（Miltenyi社）を用いて、ナイーブCD4$^+$T細胞を精製（純度＞95%）した。

2．6．3次元DC共培養系の作製（図 4）

まず、ヒト気道上皮細胞株BEAS-2Bとヒト肺線維芽細胞株MRC-5を、1.5 × 10^{6}個ずつ個別の12 well insertのScaffold内で3日間培養した。一方、精製した未成熟DCを、0.7～1 × 10^{6}個12 well insertのScaffold内で1日間培養後、無菌的にそれぞれのScaffoldを脱着し、次に、上から順に気道上皮細胞株、未成熟DC、肺線維芽細胞株とそれぞれのScaffoldを順番に重ねて1つの12 well insertに装着した。次に、始めにDMSOに溶解後、共培養用培地（MEM培地とRPMI1640培地を1：1に混ぜた培地）で希釈した感作性化学物質を5μlずつ一番上のScaffoldに均等に6箇所添加し、そのまま30分放置後、共培養培地2mlをプレートの方から一番上のScaffoldの所まで静かに加えた。9時間後には、リアルタイムRT-PCR解析用のサンプルを回収し、24時間後には、免疫組織学的解析用のサンプルを回収した。

2．7．3次元DC/T共培養系の作製（図 5）

上述の（2. 6.）の3次元DC共培養系で24時間反応後、DCのScaffoldだけを無菌的に取り出し、新しい24well plateの底に置き、アロジェニックなナイーブCD4$^+$T細胞（1.5 × 10^{6}個）を含む10%FCS含有RPMI1640培地50μlを加え、2日後にさらに100μl同じ培地を加え、4日後にはさらに200μl同じ培地を加えて培養した。5日後に、Scaffoldおよび培養液中の細胞から、リアルタイムRT-PCR解析用のサンプルを回収した。

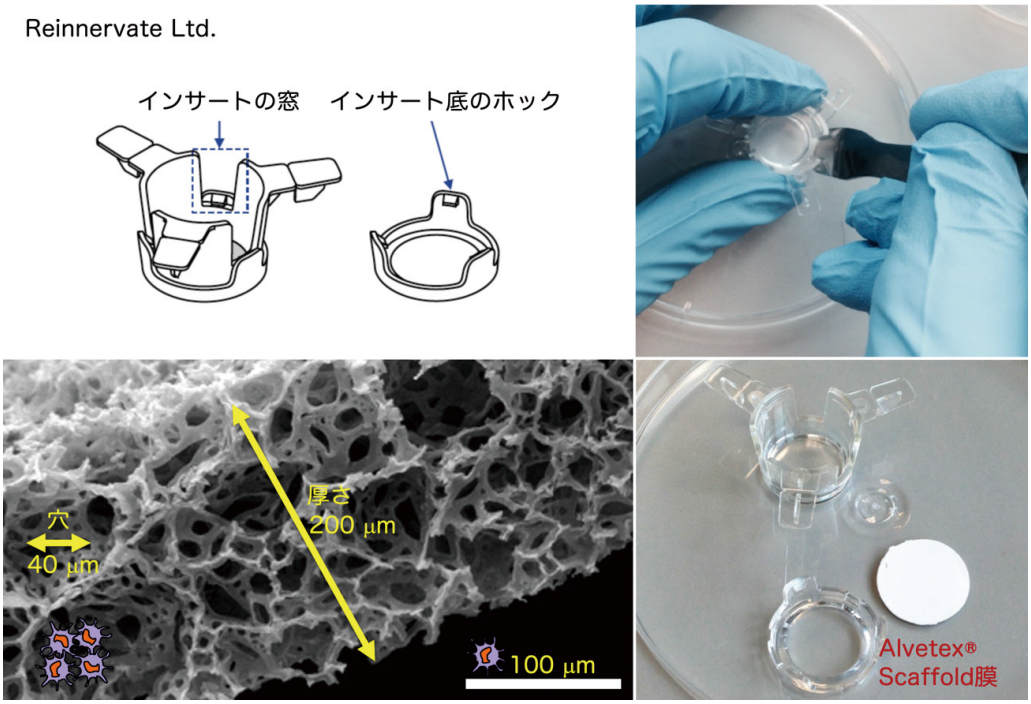


図3　ポリスチレン性の多孔質足場材であるAlvetex® Scaffoldは、生体内の3次元的な細胞間相互作用を反映し、Scaffold膜の無菌的脱着が可能

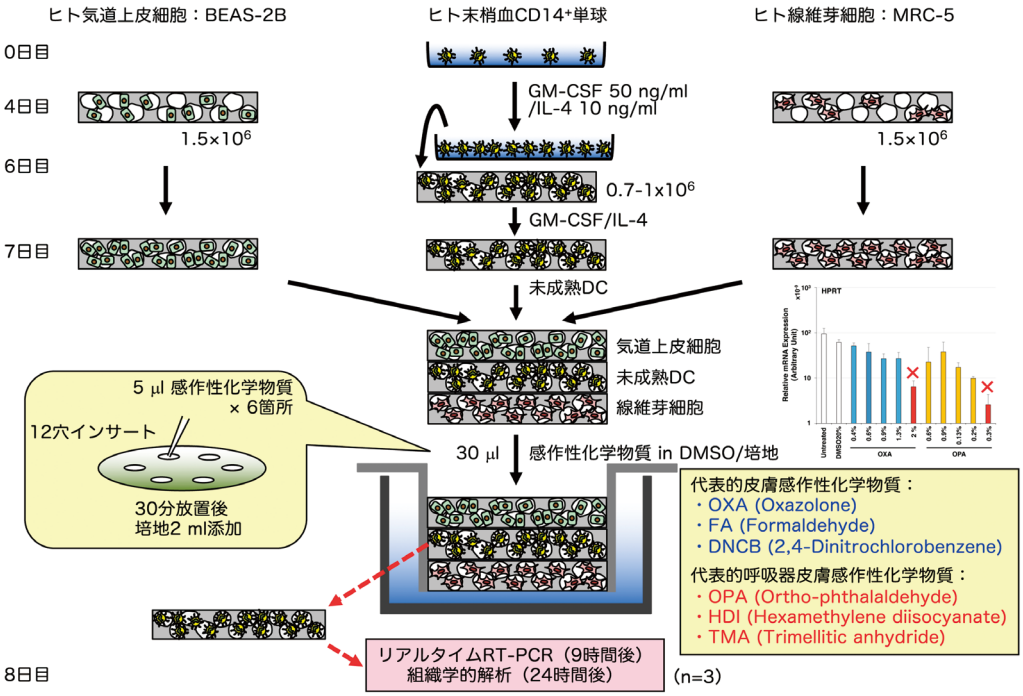


図４　３次元 DC 共培養系の構築方法：まず、個々の Scaffold で培養後、３つを重ね合わせ、その一番上から、感作性化学物質を添加し 30 分放置後、培地を加えて培養、解析を行う

２．８．リアルタイムRT-PCR解析

各Scaffoldおよび細胞よりtotal RNAをRNeasy Mini Kit（QIAGEN社）を用いて調製し、SuperScript® III Reverse Transcriptase（Thermo Fisher Scientific社）でcDNAを作製し、TB Green® Premix Ex Taq™ IIおよびPerfect Real Timeサポートシステムのプライマーセット（Takara社）を用いたリアルタイム-RT-PCRで標的分子のmRNA発現を解析した。

２．９．免疫組織学的解析

各ScaffoldをOCTコンパウンドで包埋し液体窒素で凍結した後、10μmの切片を作製し、ホルマリン固定後、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色、抗CD11c抗体によるDCの免疫組織学的染色、Hoechstを用いた核染色を行った。

３．結　果

３．１．３次元DC共培養系を用いた呼吸器および皮膚の感作性化学物質の識別

まず、代表的な呼吸器感作性化学物質としてOPA、代表的な皮膚感作性化学物質としてOXAを用いて、それぞれの濃度を振って、刺激9時間後にRNAを回収し、リアルタイムRT-PCRにより、内部標準であるハウスキーピング遺伝子Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase（HPRT）のmRNA発現が、非刺激時の10分の１以下にならない濃度を決めた（図4）。そして、その濃度を用いて、刺激24時間後、各Scaffoldの組織切片を作製し、HE染色や抗CD11c抗体、Hoechstなどを用いた免疫組織学的解析により、刺激24時間後も、上の上皮細胞のScaffoldや下の線維芽細胞のScaffoldへ、真ん中のDCのScaffold中のDCが移動することは、殆ど見られなかった（data not shown）。そこで、刺激９時間後に、各ScaffoldよりRNAを回収し、DCの成熟化やTh2分化、Th2反応の誘導に関わる分子｛副刺激分子でDCの成熟化マーカーでもあるCD80やCD86、MHCクラスIIのHLA-DR、ナイーブT細胞のリンパ節への遊走に重要なケモカインレセプターでDC成熟化のマーカーでもあるCCR7、接着分子ICAM-1、上皮細胞から産生されDC上にOX40L発現を誘導するサイトカインTSLP、ナイーブCD4⁺T細胞のTh2分化誘導に重要な副刺激分子OX40L、炎症性サイトカインIL-1βやIL-8、抑制性サイトカインIL-10、Th1分化に重要なヘテロダイマーサイトカインIL-12の２つのサブユニットIL-12p35とIL-12p40、上皮細胞から産生されTh2反応を増強する自然リンパ球（ILC2）の分化増殖に重要なサイトカインIL-25やIL-33など｝のmRNA発現をリアルタイムRT-PCRを用いて調べた。その結果、OPAとOXA刺激により、副刺激分子CD80やCD86の発現増強は両者で同レベルであったが、Th2分化の誘導に重要なOX40Lの発現増強が、OXAに比べOPA刺激で有意に高かった（data not shown）。次に、HDIとFA、TMAとDNCBの組み合わせで同様な検討を行ったところ、やはり、調べた上記の

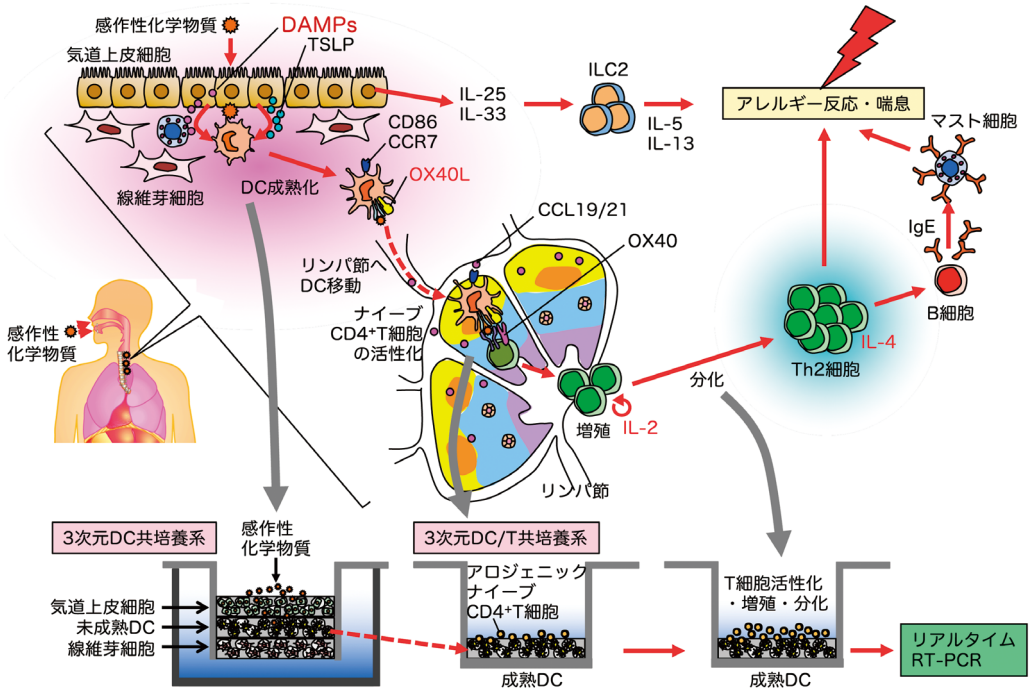


図５　３次元 DC 共培養系にさらに T 細胞も加えた新しい３次元 DC/T 共培養系を用い、T 細胞を指標にした呼吸器と皮膚の感作性化学物質を識別する評価系の構築

分子の中で、CD80 や CD86 の発現増強は両者で同レベルであったが、FA や DNCB 刺激に比べ、HDI や TMA 刺激で、OX40L の発現増強が有意に高かった（data not shown）。

そこで、これら６種類の代表的な呼吸器と皮膚の感作性化学物質の至適濃度を用いて、この３次元 DC 共培養系で CD86 と OX40L 発現を調べたところ、非刺激に比べいずれの感作性化学物質刺激でも CD86 発現増強は同レベルであったが、OX40L 発現増強のレベルが６種類の感作性化学物質が２グループに分かれ、OXA や FA、DNCB の皮膚感作性化学物質の刺激に比べ、OPA や HDI、TMA の呼吸器感作性化学物質の刺激で、有意に OX40L 発現増強が強かった（図 6）。

以上の結果は、本研究の３次元 DC 共培養系は、DC での OX40L 発現増強を指標に、呼吸器と皮膚の感作性化学物質の識別が可能である可能性を示している。

３．２．３次元 DC 共培養系における上皮細胞の重要性

次に、この３次元 DC 共培養系が有効である理由を調べるため、同じ Scaffold を用いた DC だけの３次元 DC 単独培養系と、OPA と OXA を用いて比較検討した。その結果、３次元 DC 共培養系では上述と同様に、CD86 発現増強は両者で同じレベル発現増強が見られ、OXA に比べ OPA 刺激で OX40L 発現増強がより強く見られたが、３次元 DC 単独培養系では、CD86 発現増強は両者で同じレベル見られたが、OX40L 発現増強は、両者で有意な差が見られなかった（図 7）。

以上の結果は、本研究の３次元 DC 共培養系において、呼吸器と皮膚の感作性化学物質の識別に上皮細胞のバリヤー機能や免疫調節機能の重要性を示唆している。

３．３．３次元 DC/T 共培養系を用いた呼吸器および皮膚の感作性化学物質の識別

生体内では、気道上皮で抗原に感作されると、その抗原を DC が取り込み、成熟化して、所属リンパ節へ遊走し、そこで初めて抗原特異的なナイーブ $CD4^+$T 細胞を刺激し、増殖とエフェクター細胞への分化が誘導され、獲得免疫系が始動する。即ち、生体内では、抗原を捕らえた DC が所属リンパ節へ移動することは極めて重要である。上述の検討より、本研究の３次元 DC 共培養系では、感作性化学物質で刺激 24 時間後には、DC が刺激により他の Scaffold への遊走が殆ど見られず留まっていたことより、生体内での DC の移動を再現するため、24 時間後、DC の Scaffold だけ取り出し、新しい 24 well plate の底に入れ、その上からナイーブ $CD4^+$T 細胞を加え、反応させることにした。まず、$CD4^+$T 細胞としてシンジュニックな細胞を用いたところ、反応が弱かった。そこで、アロジェニックな細胞を用いたところ、いわゆる、アロの混合リンパ球反応（MLR）により、両者を混ぜただけで、T 細胞の活性化が見られ、T 細胞の活性化マーカーである CD69 や Th1 分化のマーカーである IFN-γ の発現増強が見られた。しかし、そこへ、呼吸器感作性化学物質 OPA と皮膚感作性化学物質 OXA を加える

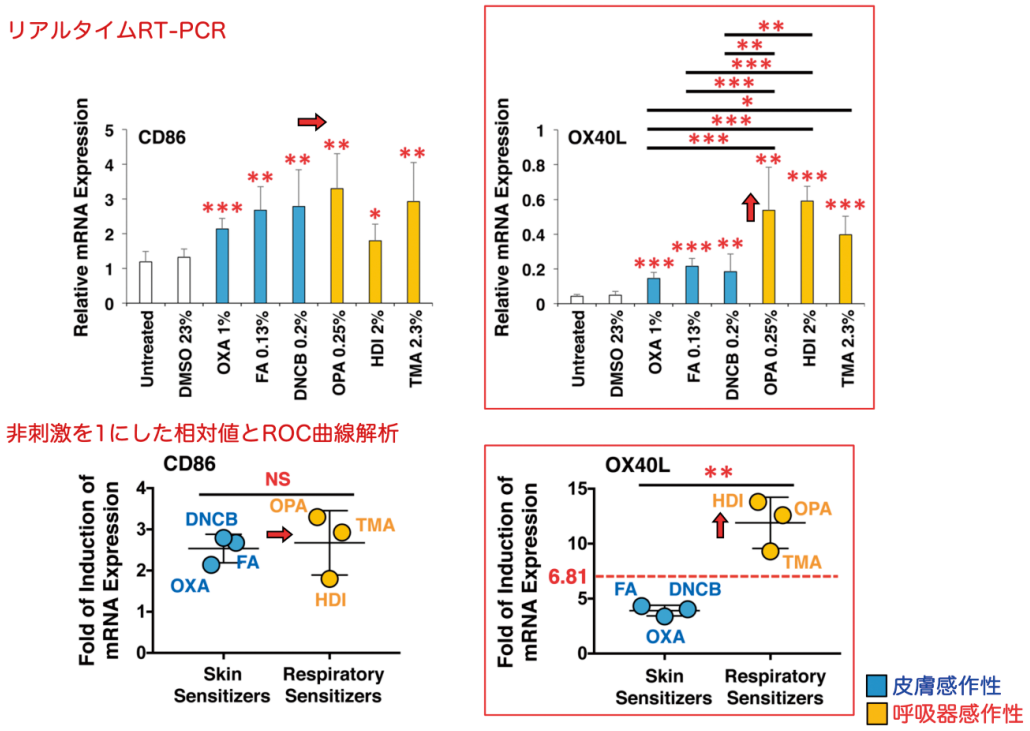


図６　６種類の代表的感作性化学物質刺激で、CD86 発現増強は同程度、呼吸器感作性物質で OX40L 発現が有意に増加し、OX40L 発現増強の違いで２グループに識別可能

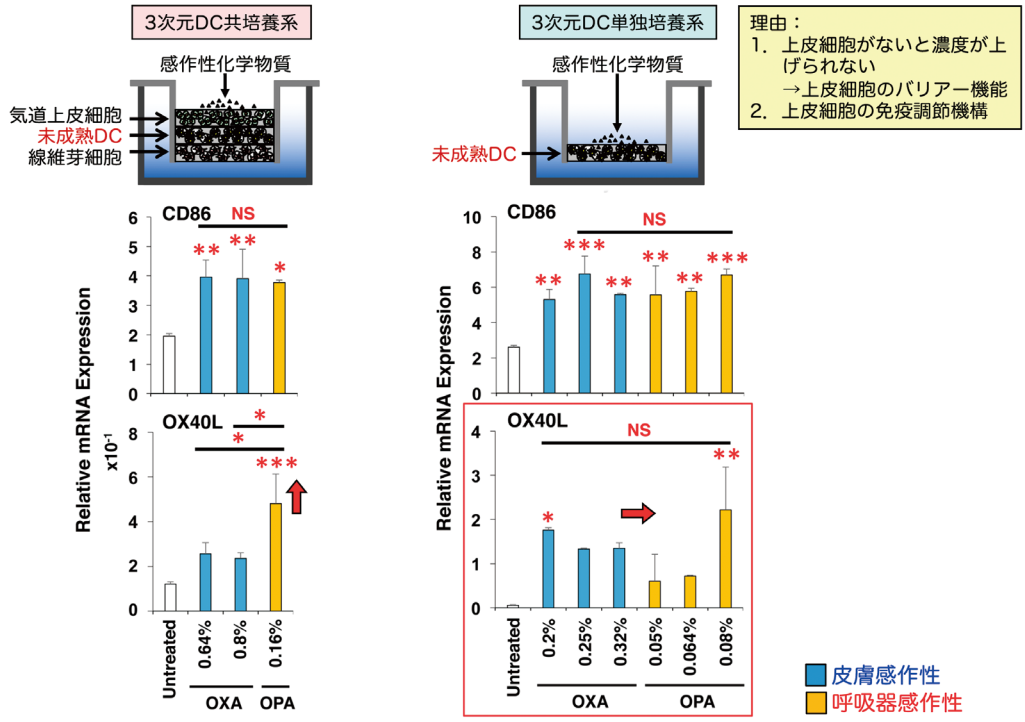


図７　３次元 DC 共培養系と３次元 DC 単独培養系を比較すると、選択的 OX40L 発現増強は DC 単独培養系では見られず、上皮細胞のバリヤー機能や免疫調節機能が重要

と、OXA 刺激に比べOPA 刺激により IFN-γ発現のさらなる増強と、OPA 刺激に比べOXA 刺激により Th2 分化マーカーである IL-4 発現のさらなる増強が見られた（図 8）。

以上の結果は、本研究の３次元DC/T 共培養系は、T 細胞での IL-4 発現増強を指標に、呼吸器と皮膚の感作性化学物質の識別が可能である可能性を示唆している。

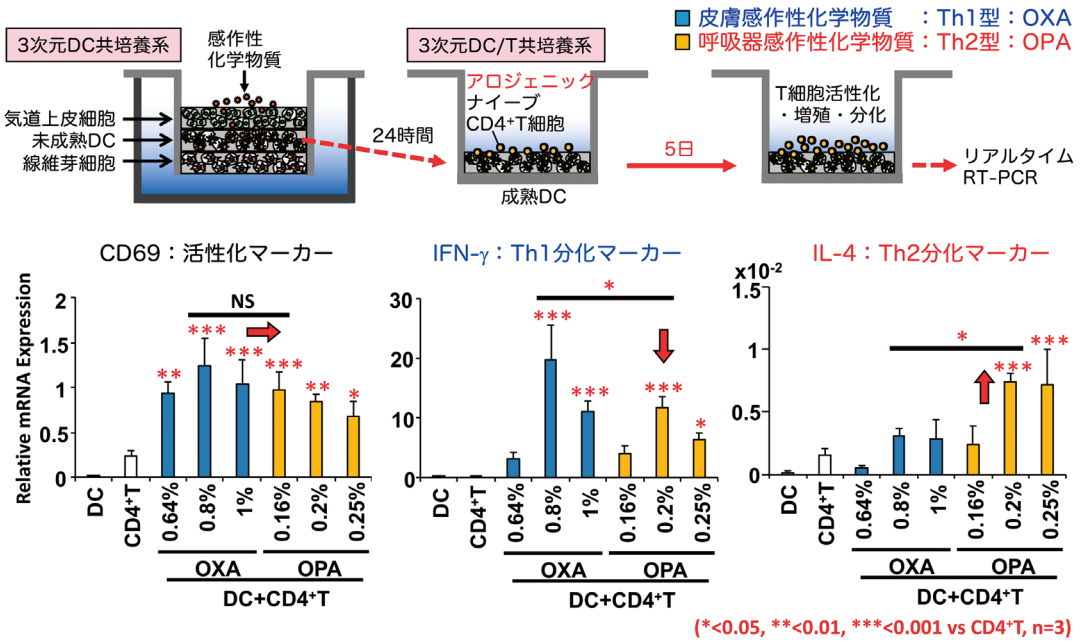


図８　ヒトプライマリー細胞を用いた新しい３次元 DC/T 共培養系を用い、T 細胞での IL-4 発現増強の違いにより呼吸器と皮膚の感作性化学物質の識別が可能

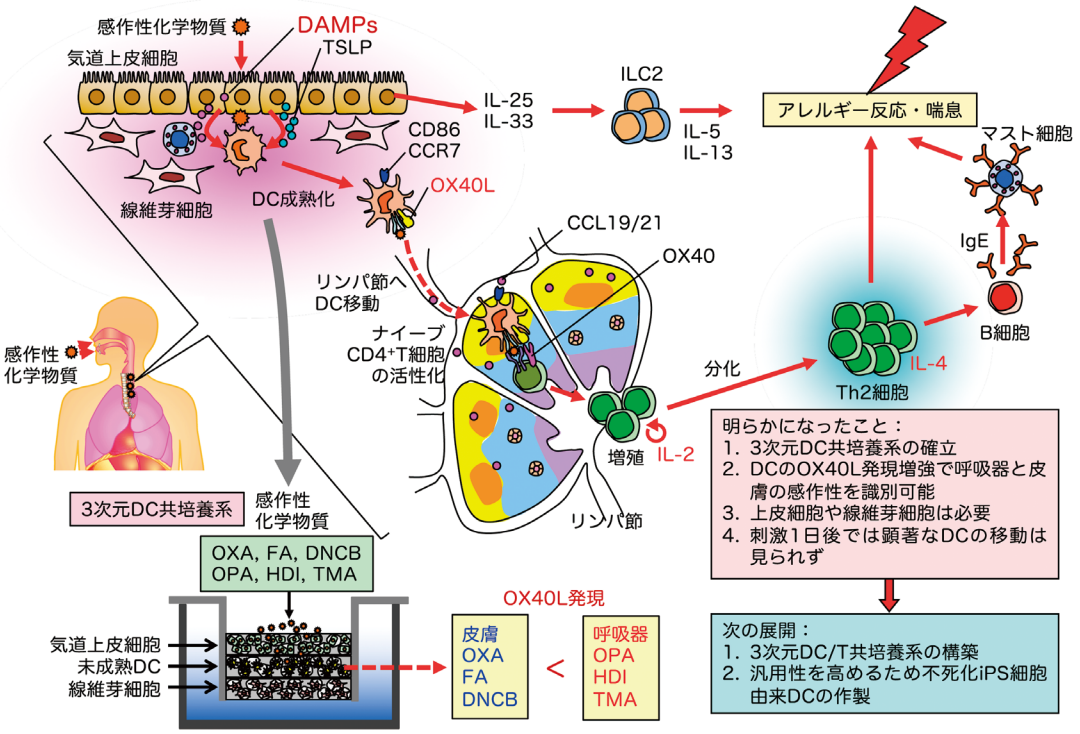


図９　ヒト末梢血単球由来 DC を用いた３次元 DC 共培養系により、DC での OX40L 発現増強の違いにより皮膚と呼吸器の感作性化学物質の識別が可能

４．考　察

現在、さらに、複数の感作性化学物質を用いる検討や、これらの系の汎用性を向上させるため、iPS由来のDCを複数作製し、LPSやOK-432による刺激後の成熟マーカーの発現解析や抗原提示能力などについて比較検討し、３次元DC共培養系への応用を試みている。さらに、そこへ、T細胞ハイブリドーマや不死化したTh細胞を加えて、同様な結果が得られれば、より有用な評価系になることが期待される。

これまでに、呼吸器と皮膚の感作性化学物質を識別可能な方法として、皮膚感作性評価法のゴールドスタンダードであるマウスを用いたLLNAで刺激開始６日後に所属リンパ

節でのリアルタイムRT-PCR解析する方法が唯一報告されている[7, 8]。この系では、皮膚感作性化学物質に比べ呼吸器感作性化学物質の刺激で、Th2分化やTh2反応の誘導に重要なIL-4やIL-4R、IL-10、OX40L、TSLPなどの分子の発現がより増強されることが示された[7, 8]。ところが、このような呼吸器と皮膚の感作性化学物質を識別可能なin vitro動物実験代替法は、今のところ開発されていない[9]。

5．総　括

本研究では、気道上皮組織を模倣した気道上皮細胞とDC、肺線維芽細胞から構成される新しい3次元共培養系を構築し、この系を用いて、DCでのTh2分化誘導に重要なOX40L発現増強を指標に、6種類の代表的な感作性化学物質を呼吸器と皮膚の感作性化学物質の2グループに識別可能であることが示された（図9）[10]。さらに、この系にアロジェニックなナイーブCD4$^+$T細胞を加えた3次元DC/T共培養系では、T細胞でのIL-4発現増強を指標に、呼吸器と皮膚の感作性化学物質の識別が可能である可能性が示唆された。免疫反応は複雑なため、アレルギー感作性の評価には、本研究のような生体内のキーになる反応をより忠実に模倣した3次元共培養系が有効と考えられ、その汎用性を上げるべく現在も検討を続けている。

（引用文献）

1) OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442C: In Chemico Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA). Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. (2015).

2) OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. (2015).

3) OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation: human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. (2016).

4) Sullivan, K. M., Enoch, S. J., Ezendam, J., Sewald, K., Roggen, E. L. & Cochrane, S. An Adverse Outcome Pathway for Sensitization of the Respiratory Tract by Low-Molecular-Weight Chemicals: Building Evidence to Support the Utility of In Vitro and In Silico Methods in a Regulatory Context. *Appl Vitro Toxicol*, 3 (2017).

5) OECD Guidance document on the reporting of defined approaches and individual information sources to be used within integrated approaches to testing and assessment (IATA) for skin sensitization. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development. (2016).

6) van Vliet, E., Kuhnl, J., Goebel, C., Martinozzi-Teissier, S., Alepee, N., Ashikaga, T., Blomeke, B., Del Bufalo, A., Cluzel, M., Corsini, E., Delrue, N., Desprez, B., Gellatly, N., Giese, C., Gribaldo, L., Hoffmann, S., Klaric, M., Maillere, B., Naisbitt, D., Pallardy, M., Vocanson, M. & Petersohn, D. State-of-the-art and new options to assess T cell activation by skin sensitizers: Cosmetics Europe Workshop. *ALTEX* **35**, 179-192 (2018).

7) Adenuga, D., Woolhiser, M. R., Gollapudi, B. B. & Boverhof, D. R. Differential gene expression responses distinguish contact and respiratory sensitizers and nonsensitizing irritants in the local lymph node assay. *Toxicol Sci* **126**, 413-425 (2012).

8) Cumberbatch, M., Clelland, K., Dearman, R. J. & Kimber, I. Impact of cutaneous IL-10 on resident epidermal Langerhans' cells and the development of polarized immune responses. *J Immunol* **175**, 43-50 (2005).

9) North, C. M., Ezendam, J., Hotchkiss, J. A., Maier, C., Aoyama, K., Enoch, S., Goetz, A., Graham, C., Kimber, I., Karjalainen, A., Pauluhn, J., Roggen, E. L., Selgrade, M., Tarlo, S. M. & Chen, C. L. Developing a framework for assessing chemical respiratory sensitization: A workshop report. *Regul Toxicol Pharmacol* **80**, 295-309 (2016).

10) Mizoguchi, I., Ohashi, M., Chiba, Y., Hasegawa, H., Xu, M., Owaki, T. & Yoshimoto, T. Prediction of Chemical Respiratory and Contact Sensitizers by OX40L Expression in Dendritic Cells Using a Novel 3D Coculture System. *Front Immunol* **8**, 929 (2017).

栄養補助食品として使用されるレスベラトロールならびにエクオールのチロシナーゼ酸化物による pro-oxidant 活性

藤田医科大学医療科学部
若松　一雅

trans-Resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-*trans*-stilbene, RES), a naturally occurring polyphenol, is well known for its antioxidant, anti-platelet, anti-inflammatory, anti-aging, cardioprotective and cancer chemopreventive properties and has recently attracted increased interest as a health-beneficial agent. However, the recent incidence of rhododendrol-induced leukoderma highlights the risk of using compounds having *p*-substituted phenols because of their rapid conversion to toxic *o*-quinones. Based on its *p*-substituted phenol structure, RES is also expected to be a substrate for tyrosinase and to produce a toxic *o*-quinone metabolite. In fact, RES was found to be a good substrate for tyrosinase. The results of this study demonstrate that the oxidation of RES by tyrosinase produces 4-(3',5'-dihydroxy-*trans*-styrenyl)-1,2-benzoquinone (RES-quinone), which decays rapidly to an oligomeric product (RES-oligomer). RES-quinone was identified after reduction to its corresponding catechol, known as piceatannol. RES-quinone reacts with *N*-acetylcysteine, a small thiol, to form a diadduct and a triadduct, which were identified by NMR and MS analyses. The production of a triadduct is not common for *o*-quinones, suggesting a high reactivity of RES-quinone. RES-quinone also binds to bovine serum albumin through its cysteine residue. RES-oligomer can oxidize GSH to GSSG, indicating its pro-oxidant activity. These results suggest that RES could be cytotoxic to melanocytes due to the binding of RES-quinone to thiol proteins and the cosmetic use of RES should be considered with caution. Equol (7,4-dihydroxy-isoflavan) is one of the end products of the intestinal bacterial biotransformation of the isoflavone daidzein which is phytoestrogen found in soy and soy-derived products, and a nonsteroidal estrogen of the isoflavone family. Equol is not a natural constituent of plants, but established as a bacterial metabolite of daidzein. Since equol has the *p*-substituted phenol structure as well as RD and RES, it is expected to be a substrate for tyrosinase and to produce a toxic *o*-quinone metabolite. In order to examine whether equol produces the *o*-quinone, we performed the tyrosinase-catalyzed oxidation of equol. UV/visible spectra showed the unstable quinone absorption at 420 nm within 15 min. Converting the *o*-quinones produced by tyrosinase oxidation of equol in the presence of ascorbic acid to more stable catechols, we could obtain three compounds by preparative HPLC at UV detection. Although these compounds have been known to be metabolized from equol using human liver microsomes, it is the first time that these compounds are formed by tyrosinase-catalyzed oxidation of equol.

1．緒　言

trans-Resveratrol（レスベラトロール，3,5,4'－トリヒドロキシ-trans-スチルベン，以下RESと略す、図1の(**1**)は，ブドウ，ベリー，ピーナッツなどの植物中から得られる天然のポリフェノールである（Baur and Sinclair et al., 2006)。RES（**1**）は，その抗酸化，抗血小板，抗炎症，抗老化，心臓保護および癌の予防特性により，健康に有益な薬剤として最近関心が高まっている（Baur et al., 2006; Jang et al., 1997)。RES（**1**）は，皮膚を光保護し，光発がんを抑制することも示されている（Afaq and Katiyar, 2011)。特に多機能性色素沈着低下剤として皮膚化粧品に使用する目的でRES（**1**）を使用することへの関心が，近年大幅に高まっている(Na et al., 2019)。

チロシナーゼは，L-チロシンのドーパキノンへの酸化を触媒する重要な酵素であり，メラノサイト中のメラノソームと呼ばれる特殊なオルガネラ内で，メラニン色素であるユーメラニンおよびフェオメラニンの産生をもたらす(Ramsden and Riley, 2014)。チロシナーゼは，天然の基質であるL-チロシンだけでなく，多数の*p*-置換フェノールおよびカテコールを酸化して，オルトキノンを生成することができる。*o*-キノンは非常に反応性の高い化合物で，チオール酵素と結合し，活性酸素種(ROS)を生成することにより細胞毒性を発揮する（Bolton et al ., 2000)。また，*o*-キノンは，メラノソーム内のタンパク質と共有結合してネオ抗原を生成するハプテンとしても作用し，免疫反応を引き起こすことが知られている（Westerhof et al., 2011)。実際，多くのフェノール化合物が，*o*-キノンへの活性化を通じて，ヒトの皮膚に白皮症を誘発することが知られている。これらのフェノールのうち，4-メトキシフェノール（Riley, 1969)，モノベンゾン（4-ベンジルオキシフェノール）（Manini et al., 2009)、4-*tert*-ブチルフェノール（James et al., 1977)，ロドデンドロール［4-（4-ヒドロキシフェニル）-2-ブタノール，以下RDと略す］(Ito et al., 2018; Sasaki et al., 2014)およびラズベリーケトン［4-ヒドロキシフェニル］-2-ブタノン］(Ito et al., 2017a）が知られている。

Tyrosinase-catalyzed oxidation of resveratrol produces a highly reactive *ortho*-quinone: implications for melanocyte toxicity

Kazumasa Wakamatsu

Department of Chemistry, Fujita Health University School of Medical Sciences

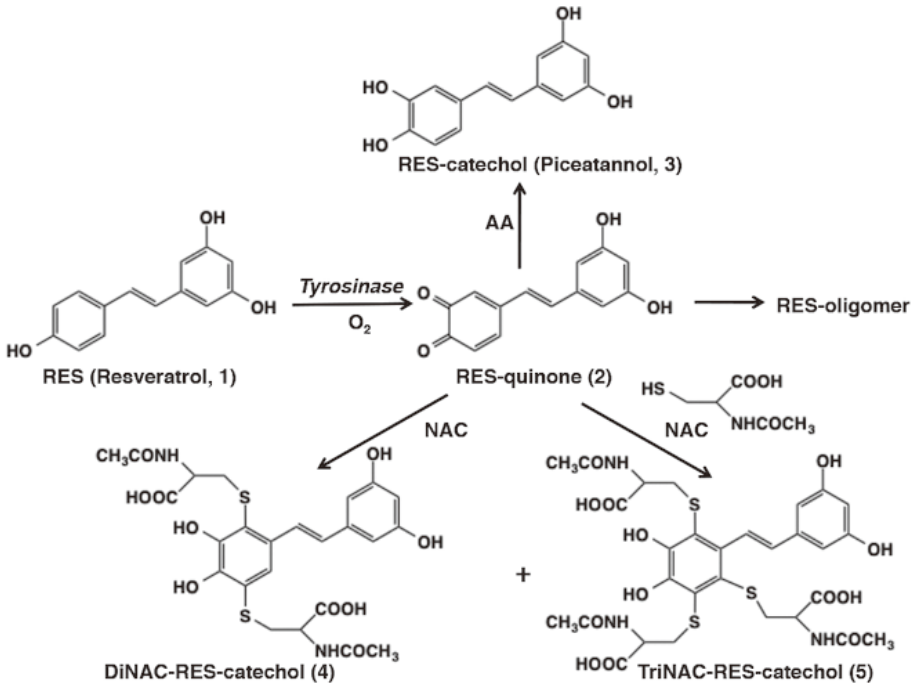


図１　チオールの存在下，または非存在下における RES (1)のチロシナーゼ酸化の反応経路

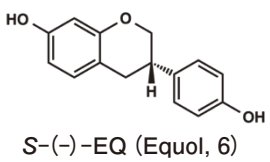


図２

本研究では，RESキノン(**2**)をまず同定し，チオールタンパク質であるウシ血清アルブミン（BSA）を含むチオール化合物との反応を調べることを目的とした。続いて，RESの酸化生成物（RESオリゴマー）のpro-oxidant活性（酸化促進活性）を調べた。

エクオール（EQ, 7,4-ジヒドロキシ-イソフラバン, 図2の**6**)）は，大豆および大豆由来製品に含まれる植物エストロゲンであるイソフラボンダイゼインの腸内細菌の生体内変換の最終産物の１つであり，イソフラボンファミリーの非ステロイド性エストロゲンである（Lephart, 2017)。エクオールは植物の天然成分ではなく，ダイゼインの細菌代謝産物であることが知られている（Setchell, and Clerici, 2010; Lephart, 2016)。EQ (6)は，RDとRESと同じように，*p*-置換フェノール構造を持っているため，チロシナーゼの基質となり，毒性のある*o*-キノン代謝物を生成し，酸化促進作用を示すことが推測される。天然のEQ(6)は，*S*-(-)-体と*R*-(+)-体の二種類のエナンチオマーが存在する。そこで，エクオールが*o*-キノン体を生成するかどうかを調べるために，今回は，S-(-)-EQ (6)のチロシナーゼ触媒酸化反応を行い，次に酸化促進活性も同様に調べた。

２．方　法

２．１．L-アスコルビン酸またはN-アセチルシステイン（NAC)の非存在下または存在下でのチロシナーゼによるRES（**1**）またはRES-カテコール（**3**)の酸化

100 μM RES(**1**)またはRES-カテコール(**3**)の溶液(2 mL)を50 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.8または5.3)中, 37℃でチロシナーゼ(50 U/mL)により酸化し，吸収スペクトルの変化を定期的に60分間追跡した。酸化は，1000 μMアスコルビン酸または200 μMまたは300 μM NACの存在下でも行った。反応を還元的に終結させるために，200 μLの一定量を20 μLの10 % $NaBH_4$と混合し，続いて180 μLの0.4 Mギ酸を混合した。アスコルビン酸，CySHまたはGSHの存在下での実験では，$NaBH_4$の添加は省略した。

２．２．DiNAC-RES-カテコール(**4**)およびTriNAC-RES-カテコール（**5**)の分離

RES（**1**, 20.5 mg, 0.09 mmol)，RES-カテコール(**3**, 2.5 mg, 0.01 mmol)，NAC（163 mg, 0.4 mmol）のエタノール2 mL溶液を98 mL 50 mMリン酸ナトリウム(pH 6.8)と混合した。混合物を37℃で激しく振盪し，それに1 mLの緩衝液中のチロシナーゼ（20,000 U）を加えた。酸化の30分後，2 mLの6 M HClを添加して酸化を停止し，混合物を100 mLの1-ブタノールで2回抽出した。減圧下で1-ブタノールを蒸発させた後，残渣をHPLC溶出緩衝液に溶解し，分取HPLCにかけた。分取した画分の凍結乾燥により，DiNAC-RES-カテコール（**4**, HPLC純度97 %）として13.6 mg（22 %収率)，およびTriNAC-RES-カテコール(**5**, HPLC純度99 %)として18.3 mg（24 %)が得られた。

２．３．２,５-ジ-S-[(N-アセチル)システイニル]-３,４,３’,５’-テトラヒドロキシトランススチルベン（DiNAC-RES-カテコール,**4**)

DiNAC-RES-カテコール(**4**)は，^{1}H NMRスペクトルと

^{13}C NMRスペクトルおよび高解像度LC-MSより構造を確認した。

2．4．2,5,6-Tri-S-［(N-アセチル)システイニル］-3,4,3′,5′-テトラヒドロキシトランススチレン（TriNAC-RES-カテコール，5）

TriNAC-RES-catechol（**5**）は，^{1}H NMRスペクトルと^{13}C NMRスペクトル，高解像度LC-MSより構造を確認した。

2．5．RESキノン(2)とシステイン(CySH)およびグルタチオン(GSH)との付加反応

RESカテコール（**3**，2.5mg，0.01mmol）およびCySH（4.9mg, 0.04mmol）の10mL 50mMリン酸ナトリウムバッファー（pH 6.8)溶液を37℃で激しく振盪した。その中に1mLのバッファーに溶かしたチロシナーゼ（2,000 U）を加えた。10分の酸化後，0.2mLの6Mギ酸を添加して酸化を停止し，混合物を減圧下で蒸発乾固させた。残渣をHPLCで使用する緩衝液に溶解し，分取用HPLCカラムで分取した。最も早く溶出した画分，次に溶出した画分，最後に溶出した画分を凍結乾燥して，それぞれ，DiCyS-RES-カテコール（0.8mg，17％収率），MonoCyS-RES-catechol-B（1.3mg，36％），およびMonoCyS-RES-カテコール-A（0.6mg，17％）を得た。CySH置換の数は，高解像度LC-MS分析によって確認した。

RES-カテコール（**3**，2.5mg，0.01mmol）とGSHの溶液（12.4mg，0.04mmol）を同様に処理し、分取用HPLCカラムで分取した。最も早く溶出した画分，次に溶出した画分，最後に溶出した画分を凍結乾燥して，それぞれ，DiGS-RES-カテコール（2.8mg，33％収率），MonoGS-RES-カテコールB（1.7mg，31％），およびMonoGS-RES-カテコールA（それぞれ1.0mg, 18％）を得た。GSH置換の数は，高解像度LC-MS分析によって確認した。

2．6．RES酸化生成物，RES-オリゴマーの酸化促進活性

過去に報告したように（Ito, Hinoshita et al., 2017; Ito, Okura et al., 2017），RESオリゴマーとRDオリゴマーは，前駆体RES（1.1mM）およびRD（1mM）から50mMナトリウムリン酸緩衝液（pH 7.4）中で調製した。チロシナーゼ（200U）を各前駆体溶液2mLに加え，反応混合物を37℃で120分間インキュベートした。対照としてチロシナーゼのみ（100U/mL）も使用した。メラニン溶液(2,000μL)を10mM GSH（200μL、1mol当量）と混合し、37℃でインキュベートした。0，30および60分の反応時間で，反応混合物を100μL取り出し，0.4M HClO4（800μL）と混合して酸化を停止した。酸化反応物中のGSHとGSSGは，我々のHPLC法を使用して分析した(Imai et al., 1987; Ito, Hinoshita et al., 2017; Ito, Okura et al., 2017)。酸化反応物(20μL)中の過酸化水素をpH 7.4緩衝液(180μL)で希釈した後，分光測光法で分析した。希釈した混合物をAmpliflu™Red試薬（200μL）と反応させ、568nmの吸収極大を持つ赤色色素を生成させた(Zhou et al., 1997)。

3．結　果

3．1．RES (1)のチロシナーゼ触媒による酸化はRES-キノン(2)を生成する

チロシナーゼ(50U/mL)によるRES（**1**,100μM）の酸化は、pH6.8の50mMリン酸ナトリウム緩衝液中、37℃で

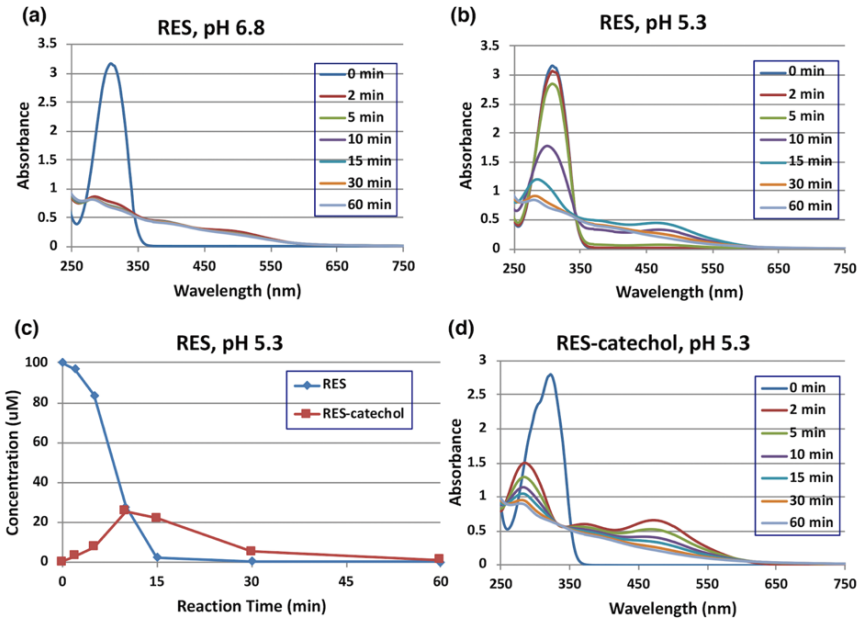


図3　RES (1) およびRES-カテコール (3) のチロシナーゼ酸化反応と生成物のHPLC分析

実施した。UV/可視スペクトルの変化を60分間追跡したところ，単調な吸収を持つオリゴマーの迅速な生成が示され（図3a），*o*-キノン酸化生成物の非常に速い二次反応が示されたので，pH5.3で酸化を行うことで反応を遅くした。図3bに示すように，実際に反応は遅くなった。UV/可視スペクトルの変化が複雑に現れたので，次に，pH5.3での酸化を310nmでのUV検出器を使用してHPLCで追跡した。図3cに示すように，RES（**1**）は，15分以内に消費され，HPLCでの保持時間5.5分（RESは6.9分に現れた）を持つ新しい化合物が現れた。その構造はRES-カテコール（ピセアタンノール，**3**）と推定された。RES-カテコール（**3**）の構造は，HPLCによる市販のピセアタンノールとの同時注入により確認された。このRES-カテコール（**3**）の同定により，4-(3',5'-ジヒドロキシ-トランス-スチレニル)-1,2-ベンゾキノン（RESキノン，**2**）として485nmで吸収極大を示す直後の生成物の構造が確認された。図3cに示すように，RESキノン(**2**)は非常に反応性の高い化合物であると思われ，RESキノンから可能なオリゴマー生成物を分離する試みはうまくいかなかった。図3dに示すように，その酸化により，2分以内に485 nmに吸収ピークを持つ化合物が急速に生成した。

チロシナーゼ酸化中，RESカテコール(**3**)の生成は，pH5.3での10mol当量のアスコルビン酸(1,000μM)存在下で，100μM RES（**1**）を酸化することによりさらに確認された。図4aに示すように，RES（**1**）のUVスペクトルは，2～5分でRES-catechol（**3**）のUVスペクトルに置き換えられた。反応混合物のHPLC分析により，RESカテコール（**3**）が5分間で高収率（80％）に急速に生成し，RESカテコールは，RESキノン(**2**)に酸化された。その後，アスコルビン酸はすべてRESキノンとの酸化還元交換により消費された(図4b)。

3.2．RESキノン(**2**)とNACとの反応は，二付加体と三付加体を生成する

次に、RESキノン（**2**）がチオール化合物と結合するかどうかを調べた。RES(**1**)（100μM）が，pH5.3で2mol当量のNAC(200μM)の存在下で，チロシナーゼ(50U/mL)により酸化された時，酸化は5分以内に急速に進み，450nm付近に最大吸収波長を持つ*o*-キノン色素が生成した(図5a)。これはかなり驚くべきことである。なぜなら，2mol当量のチオールの存在下でのフェノール（およびカテコール）のチロシナーゼ酸化は，通常、主な生成物として無色のモノチオール付加物を生成するからである（Ito, Hinoshita et al., 2017; Ito and Prota, 1975)。したがって、NAC濃度を3mol当量（300μM）に増やしたところ，450nmでの吸収は3分の1に減少し，2mol当量のNACを使用した場合よりも318および282nmでの2つの吸収極大はより明確になった（図5b)。2当量のNACを使用した場合，5分間の反応時間でのHPLC分析により，3付加体と2付加体の保持時間がそれぞれ4.8分と9.6分である2つの主要な化合物の生成が示された(RES（**1**）は11.7分に出現した(図5c)。しかし，ほとんどの生成物は，キノン型への酸化により15分以内に消失した。3当量のNACが使用された場合，これら2つの生成物は，安定した状態であった(図5d)。

これらの付加物の構造を同定するために，4mol当量のNAC（4mM）の存在下，RES（**1**，1mM）の酸化を行ったが，十分速く進行しなかったので，生成物を取り出すことはできなかったので，RES-カテコール（**3**，0.1mM）を触媒として添加した。その後，急速に反応は進行して2つの主生成物を生成し，それらを分取HPLCで分離した。これらの化合物の構造は，^{1}H-NMR，2D-NMR，^{13}C-NMR，高分解能MS分析により同定した。これらにより，このTriNAC付加物の構造(**7**)を同定した。

3.3．RES-キノン(**2**)とBSAを含む他のチオールとの反応

次に，CySHまたはGSHとの反応性を調べた。3mol当量のCySHまたはGSHの存在下，RES（**1**）(100μM）の反応は，フェノールの酸化におけるチオールの阻害作用により非常にゆっくりと進行することがわかった（Naish-Byfield et al., 1994)。RESカテコール（**3**）（100μM）は，pH5.3で3mol当量（300μM）のチオール存在下で，チロシナーゼ(50U/mL)により酸化した。図6a, bに示すように，CySH

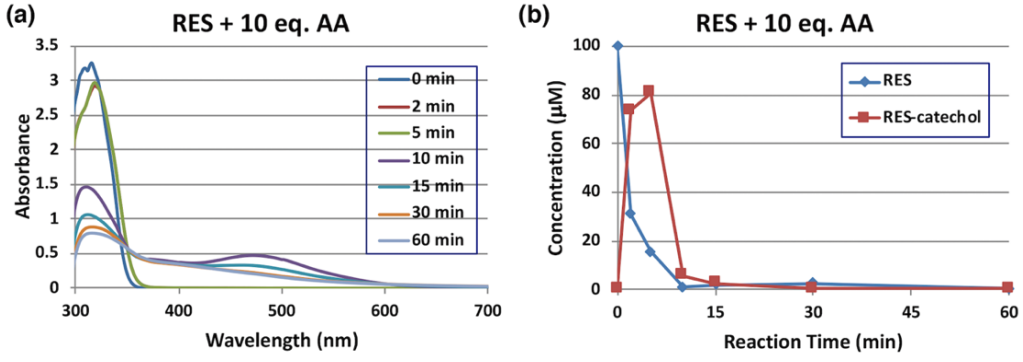


図4　アスコルビン酸存在下，RES (1)のチロシナーゼ酸化反応とHPLC分析

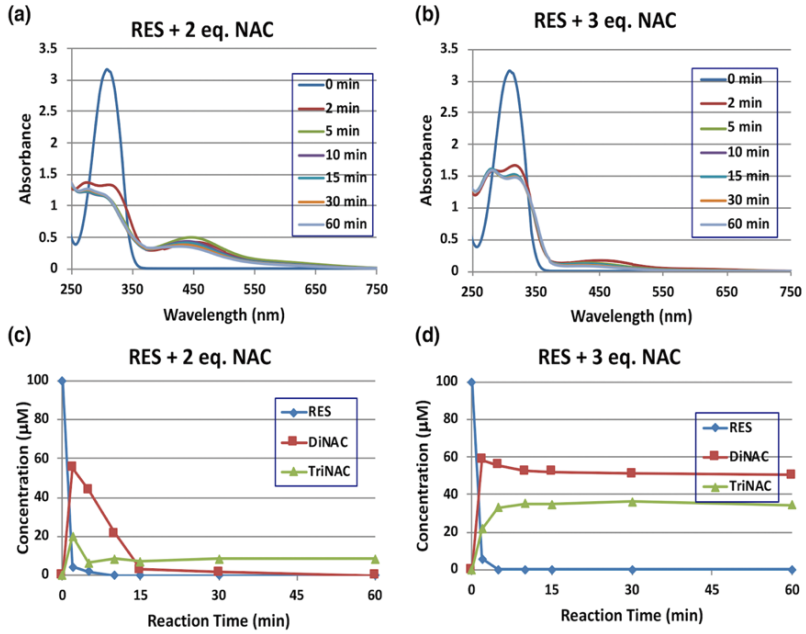


図 5　NAC 存在下，RES (1) のチロシナーゼ酸化反応と反応生成物の HPLC 分析

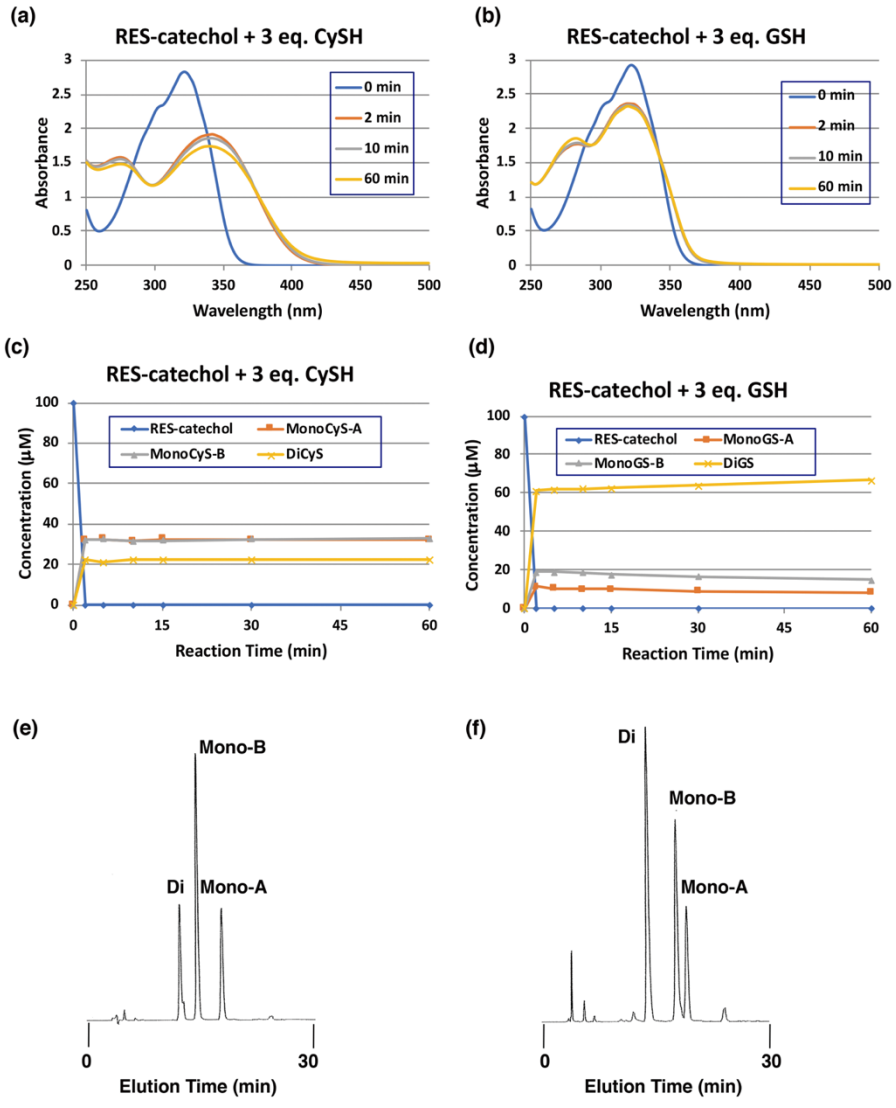


図 6　チオール存在下，RES- カテコール (3) のチロシナーゼ酸化反応と HPLC 分析

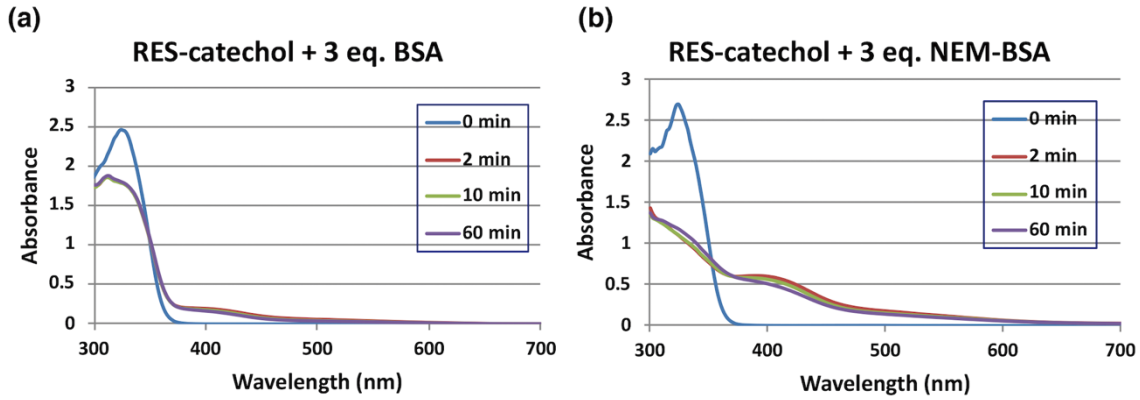


図 7　ウシ血清アルブミン（BSA）存在下，RES- カテコール（3）のチロシナーゼ酸化

とGSHは急速に反応して無色で比較的安定なチオール付加物を生成した。HPLC分析は，3つの主生成物の生成を示した。その収率は，60分の酸化中ほぼ一定であった（図6c, d）。Cys-付加物とGSH-付加物のHPLC分析は，3つのピークを示し，それらは質量分析により構造決定した（図6e, f）。

次に，BSAとRESキノン（**2**）の反応性を調べた。BSAには，17個のシスチン残基に加えて1個のシステイン残基が含まれている。BSAは，そのシステイン残基の反応性が広く研究されており，*o*-キノンの反応に敏感であることが判明したため，代表的なチオールタンパク質として使用した（Ito, Hinoshita et al., 2017; Manini et al., 2009）。BSA付加物は314nmで大きな吸収極大を持つが，300nm未満のBSAによる大きな吸収は，小さなチオールからの吸収よりも明確ではなかった（図7a）。314nmでの吸収は，BSAのシステイン残基を経由して生成した付加物と帰結できる。それは，モノチオール付加物のスペクトルとの類似性に基づいている（図6e、f）。400nm付近に生成した弱い吸収は，おそらくキノン型に起因するものと推測される。RESキノン（**2**）への結合にシステイン残基が関与している可能性を確認するために，システイン残基をN-エチルマレイミド（NEM）で修飾したBSAとRESキノン（**2**）を反応させたところ（図7b），RESキノン（**2**）の390nmでの0.60の吸光度は，天然のBSA（400nmで0.20）の吸光度と比べて約3倍大きかった。NEM修飾BSAからのこの大きな吸収は，NEM-BSAとRES-キノン（**2**）のアミノ基間のキノイド発色団の生成に起因する可能性がある。これらの結果から，RESキノン（**2**）の大部分がシステイン残基を介してBSAに結合することを示している。

3．4．RESオリゴマーはGSHをGSSGに酸化し，pro-oxidant活性（酸化促進活性）を有する

合成フェオメラニンと同様に天然のフェオメラニンは，強力な酸化促進活性を持つことが知られている（Panzella et al., 2014）。我々は，以前，RDのチロシナーゼ触媒で酸化されたRDオリゴマー（またはRDユーメラニン）が，合成フェオメラニンと同じくらい強力な酸化促進活性を持っていることを示した（Ito, Hinoshita et al., 2017）。したがって、RES（**1**）のオリゴマー酸化生成物であるRESオリゴマーが酸化促進活性を有するかどうかを調べた。 RESオリゴマーとRDオリゴマー（陽性対照として使用）は，それぞれ1mM RES（**1**）またはRDをpH 7.4で120分間，チロシナーゼ（100U/mL）で酸化することにより調製した。

各オリゴマーは，1mol 当量のGSHと60分間反応し，GSHと酸化型グルタチオン（GSSG）の残量は，GSH量を測定するためのDBBQを使用する我々の特別なHPLC法によって分析された（Imai et al., 1987; Ito, Okura et al., 2017）。図8aに示すように、GSH量は時間依存的に，そして，RESオリゴマーおよびRDオリゴマーとの60分間のインキュベーションで，それぞれ約50％および90％まで減少した。GSHの減少の大部分は，GSSGへの酸化に起因するが，減少の一部は，GSHの酸化生成物とキノンとの結合を経由して進行しているように見える。次に，これらのオリゴマーによりGSHの酸化中に過酸化水素が生成されるかどうかを調べた。図8bに示すように，26μM過酸化水素がGSHとの30分間の反応中にRDオリゴマーから生成したが，RESオリゴマーからはわずか6μM過酸化水素（コントロールと同じ量）が生成した。ただし、このRESオリゴマーからの過酸化水素の生成の減少が、過酸化水素を生成できないことによるのか，RESオリゴマー自体による過酸化水素の除去によるのかは，現在不明である。

3．5．EQ（**6**）のチロシナーゼ酸化

EQ（**6**）のチロシナーゼ酸化を追跡したところ，UV/可視スペクトルで15分以内に420nmでの不安定なキノン吸収が現れた。アスコルビン酸の存在下，還元して*o*-キノンをより安定したカテコールに変換後，HPLC分取によって6-hydroxy-EQ（12％），3’-hydroxy-EQ（25％），6,3’-dihydroxy-EQ（25％）のカテコール体が得られた（図

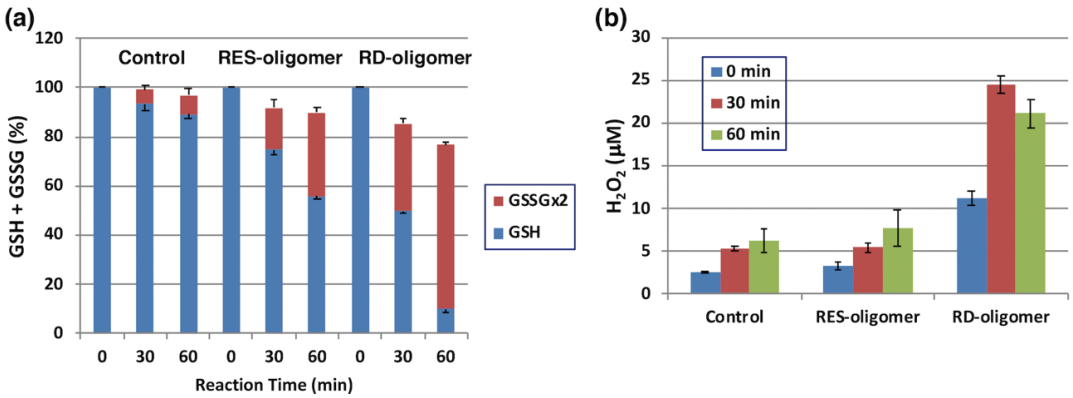


図 8　RES オリゴマーと RD オリゴマーによる GSH の酸化

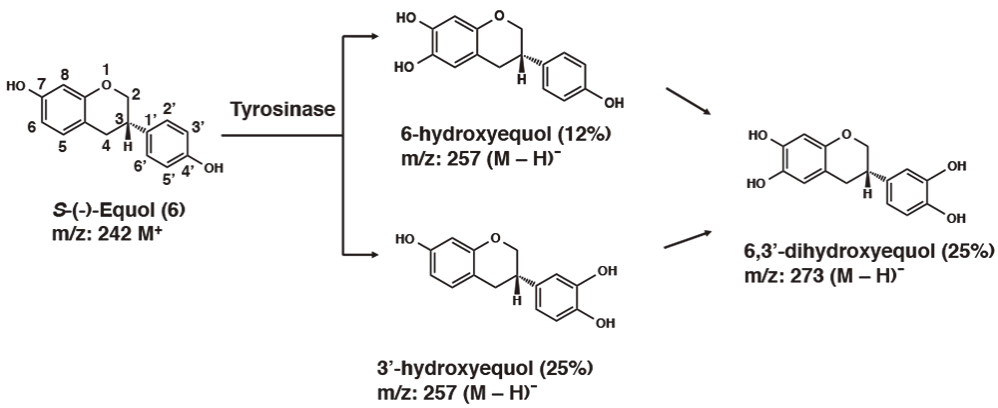


図 9　EQ (6) のチロシナーゼ酸化物

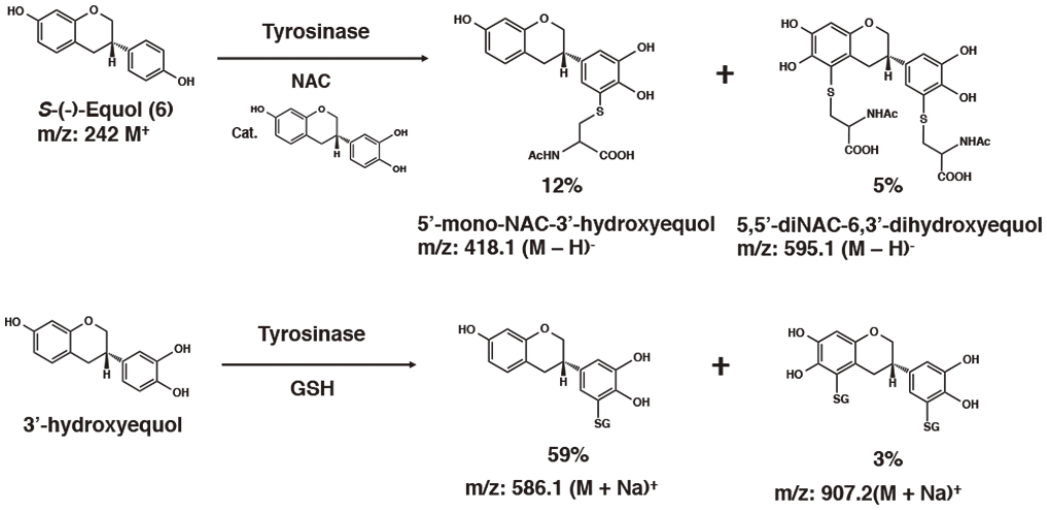


図 10　EQ (6) および 3'-hydroxy-EQ の NAC および GSH 共存下のチロシナーゼ酸化物

9)。生成物の構造は，^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR および高分解能 ESI-TOF 質量スペクトルにより同定した。これらの化合物は，すでにヒト肝ミクロソームを使用した EQ (**6**) からの代謝により生成することが知られているが，EQ (**6**) のチロシナーゼ触媒酸化によって生成することがわかったのは最初の実験結果である。以上の結果は，*p*-置換フェノール体である EQ (**6**) が酸化により，細胞毒性を示す *o*-キノンを生成することを示している。

3．6．EQ (6) のチロシナーゼ酸化による NAC および GSH との反応

触媒量の 3'-hydroxy-EQ (0.01 mmol) 存在下，EQ (**6**, 0.09 mol) とチロシナーゼを触媒として，NAC (0.4 mmol) と反応させ，生成物の構造を ^{1}H-NMR および高分解能 LC-MS 質量スペクトルにより同定した。5'-mono-NAC-3'-hydroxy-EQ (12%) と 5,5'-diNAC-6,3'-dihydroxy-EQ (5%) が得られた (図 10)。一方，エクオール (**6**) と GSH と

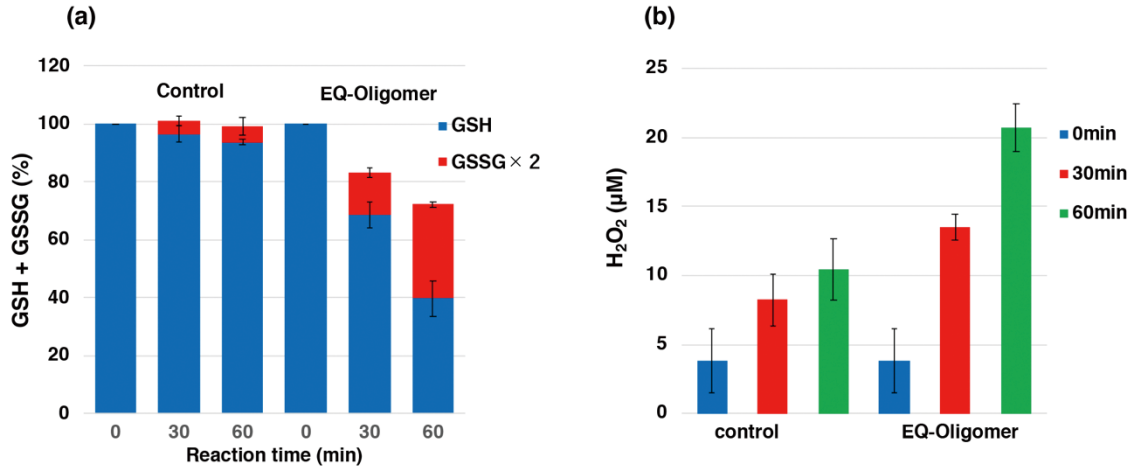


図 11　EQ オリゴマーによる GSH の酸化と過酸化水素量の変化

の反応は，3' -hydroxy-EQ（0.01 mmol）に 4 等量の GSH 存在下，チロシナーゼ酸化したところ，モノ GSH 付加体が 59%，ジ GSH 付加体が 3 %の収率で得られた。これらの構造は，NAC 体との比較で ^{1}H-NMR，^{13}C-NMR および高分解能 ESI-TOF 質量スペクトルから構造決定した。

3．7．EQ（6）の酸化促進活性

EQ（**6**）の酸化促進活性を測定した（図 11）。図 8 と比較して，酸化促進活性が，RES オリゴマーと RD オリゴマーの中間的な結果が得られた。一方，過酸化水素の産生については RD オリゴマーとほぼ同様な結果が得られた（図 11b）。この結果は，EQ（**6**）オリゴマーが，RA オリゴマー，RES オリゴマーと同様に酸化促進活性を有することがわかった。

4．考察と総括

RES（**1**）は，一般に基質よりもむしろチロシナーゼの優れた阻害剤と考えられている（Na et al., 2019）。例えば、Park ら（2014）は，RES（**1**）は，マッシュルームチロシナーゼを 1.8 μM の IC50 で強く阻害することを示した。しかし，本研究は，RES（**1**）がマッシュルームチロシナーゼの優れた基質であり，反応性 *o*-キノンである RES キノン（**2**）を生成することを示している。ヒトを含むさまざまなものに存在するチロシナーゼは，さまざまな *p*-置換フェノールを酸化して *o*-キノンを形成することができる（Ito et al., 2014; Ramsden and Riley, 2014）。

p-置換フェノールのメラノサイトへの細胞毒性の可能性にもかかわらず，多くの研究が RES（**1**）の色素沈着低下効果を報告している。たとえば，Lee ら（2014）は，RES（**1**）がメラノーマ細胞におけるメラニン形成関連タンパク質の発現を低下させ，RES（**1**）の局所適用は，in vivo における紫外線 B で刺激されたモルモットの皮膚の色素沈着過剰を有意に抑制したことを発見した。Lei ら（2017）は，RES（**1**）が HT-144 ヒトメラノーマ細胞の増殖を 5 ～ 10 μM の IC50 で強く阻害したことを発見した。同様に，Okura ら（2015）は，RES（**1**）が B16F1 マウスメラノーマ細胞および NHEMb ヒト表皮メラニン細胞の増殖をそれぞれ 27.1 および 38.2 μM で阻害した。その値は，ハイドロキノン（28.3 および 9.4 μM）に匹敵する値である。一方，RES（**1**）の細胞毒性はかなり弱いことがわかり，別の研究では IC50 は ≫ 100 μM であった（Lee et al., 2014）。

RES（**1**）の局所適用は，一般に，皮膚に有害というよりも有益であると考えられている（Na et al., 2019）。しかし，我々の研究では，チロシナーゼが効果的に RES（**1**）を酸化し，反応性の高い RES キノン（**2**）を生成できることを示している。高い反応性は，その急速な減衰（図 3）と，DiNAC-RES-catechol（**4**）および TriNAC-RES-catechol（**5**）の定量的収率での生成によって示される。ジ付加体の生成も CySH と GSH に対して確認された。これらの結果は，RES（**1**）が RES キノン（**2**）のチオールタンパク質への結合によりメラニン細胞に対して細胞毒性を示す可能性があることを示唆している。RD オリゴマーほど強力ではないが，RES オリゴマーの酸化促進活性は細胞毒性に寄与する可能性がある。

EQ（**6**）は，チロシナーゼの基質となり，*o*-キノンを産生しカテコール体を生成することが今回の実験からわかった。このことは，EQ（**6**）がメラニン細胞に対して，細胞毒性を示す可能性があることを示している。EQ オリゴマーの酸化促進活性は，RES オリゴマーと RD オリゴマーの中間的であり，一方，過酸化水素の産生については，RD オリゴマーとほぼ同様な結果が得られた。EQ（**6**）は，大豆食品を食べた時に大豆イソフラボン（ダイゼイン）が，おなかの中で腸内の EQ 産生菌によって代謝され生成することが知られている（Setchell and Clerici, 2010; Lephart,

2016)。EQ（**6**）は女性ホルモン（エストロゲン）と構造が似ているため，体内で女性ホルモンと似た働きをする。EQ（**6**）の効果は，①骨粗鬆症予防，②血管内皮作用，④更年期症状の改善，③目尻のシワが改善するなど，皮膚老化予防，美肌効果，④抗酸化作用などが知られているが，上記に述べたように，RES（**1**）とEQ（**6**）の構造は酸化されやすいフェノール骨格を持ち，チロシナーゼ酸化で細胞毒性を示す*o*-キノン体を生成し，RES（**1**）およびEQ（**6**）のチロシナーゼ酸化により生成したオリゴマーが強い酸化促進活性を示すことがわかった。以上の観点から，RES（**1**）およびEQ（**6**）を美白剤として皮膚に塗布した場合，これらの化合物がチロシナーゼの基質になり，毒性代謝物を産生する可能性を示唆できた。RES（**1**）およびEQ（**6**）を皮膚へ塗布する危険性について注意を喚起する必要がある。

謝　辞

本研究を推進する上で，藤田医科大学伊藤祥輔名誉教授，岐阜医療科学大学田中ひとみ助教，化学教室卒論生の藤木優衣氏に感謝申し上げます。また，^{1}H-NMR, ^{13}C-NMRおよび高分解能ESI-TOF質量スペクトルを測定して頂いた名古屋大学大学院生命農学研究科小鹿一教授に重ねて深謝申し上げます。

(引用文献)

1) Afaq, F., Katiyar, S. K. (2011). Polyphenols: Skin photoprotection and inhibition of photocarcinogenesis. Mini Review in Medical Chemistry, 11, 1200-1215.

2) Baur, J. A., Sinclair, D. A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature Review Drug Discovery*, *5*, 493-506.

3) Baur, J. A., Pearson, K. J., Price, N. L., Jamieson, H. A., Lerin, C., Kalra, A., … Sinclair, D. A. (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, *444*, 337-342.

4) Bolton, J. L., Trush, M. A., Penning, T. M., Dryhurst, G., & Monks, T. J. (2000). Role of quinones in biology. *Chemical Research in Toxicology*, *13*, 135-160.

5) Imai, Y., Ito, S., & Fujita, K. (1987). Determination of natural thiols by liquid chromatography after derivatization with 3,5-di-*tert*-butyl-1,2-benzoquinone. Journal of *Chromatography 420*, 404-410.

6) Ito, S., & Prota, G. (1975). A facile one-step synthesis of cysteinyldopas using mushroom tyrosinase. *Experientia*, *33*, 1118-1119.

7) Ito, S., & Wakamatsu, K. (2018). Biochemical mechanism of rhododendrol-induced leukoderma. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*, e552.

8) Ito, S., Yamashita, T., Ojika, M., & Wakamatsu, K. (2014a). Tyrosinase-catalyzed oxidation of rhododendrol produces 2-methylchromane-6,7-dione, the putative ultimate toxic metabolite: implications for melanocyte toxicity. *Pigment Cell and Melanoma Research*, *27*, 744-753.

9) Ito, S., Hinoshita, M., Suzuki, E., Ojika, M., & Wakamatsu,K.(2017a). Tyrosinase-catalyzed oxidation of the leukoderma-inducing agent raspberry ketone produces (*E*)-4-(3-oxo-1-butenyl)-1,2-benzoquinone: Implications for melanocyte toxicity. *Chemical Research in Toxicology*, *30,* 859-868.

10) Ito, S., Okura, M., Wakamatsu, K., & Yamashita, T.(2017b). The potent pro-oxidant activity of rhododendrol-eumelanin induces cysteine depletion in B16 melanoma cells. *Pigment Cell and Melanoma Research*, *30*, 63-67.

11) Ito, S., Agata, M., Okochi, K., & Wakamatsu, K.(2018). The potent pro-oxidant activity of rhododendrol-eumelanin is enhanced by ultraviolet A radiation. *Pigment Cell and Melanoma Research*, *31*, 523-528.

12) James, O., Mayes, R. W., & Stevenson, C. J. (1977). Occupational vitiligo induced by *p*-tert-butylphenol: a systemic disease? *The Lancet*, *310*, 1217-1219.

13) Jang, M., Cai, L, Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W. W., … Pezzuto, J. M. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, *275*, 218-220.

14) Lee, T. H., Seo, J. O., Baek, S. H., & Kim, S. Y. (2014). Inhibitory effects of resveratrol on melanin synthesis in ultraviolet B-induced pigmentation in guinea pig skin. *Biomolecules & Therapeutics*, *22*, 35-40.

15) Lei, M. J., Dong, Y., Sun, C. X., & Zhang, X. H. (2017). Resveratrol inhibits proliferation, promotes differentiation and melanogenesis in HT-144 melanoma cells through inhibition of MEK/ERK kinase pathway. *Microbial Pathogenesis*, *111*, 410-413.

16) Lephart, E.D. (2016). Skin aging and oxidative stress: Equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms. *Ageing Research Review*. *31*, 36-54.

17) Lephart, E.D. (2017).Resveratrol, 40 Acetoxy Resveratrol, R-equol, Racemic Equol or S-equol as Cosmeceuticals to Improve Dermal Health. *International Journal of Molecular Sciences, 18*, 1193.

18) Manini, P., Napolitano, A., Westerhof, W., Riley,

P. A., & d' Ischia, M. (2009). A reactive ortho-quinone generated by tyrosinase-catalyzed oxidation of the skin depigmenting agent monobenzone: self-coupling and thiol-conjugation reactions and possible implications for melanocyte toxicity. *Chemical Research in Toxicology*, *22*, 1398-1405.

19) Na, J. I., Shin, J-W., Choi, H. R., Kwon, S-H., & Park, K-C. (2019). Resveratrol as a multifunctional toical hypopigmenting agent. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*, E956.

20) Naish-Byfield, S., Cooksely, C. R., & Riley, R.A. (1994). Oxidation of monohydric phenol substrates by tyrosinase: effect of dithiothreitol on kinetics. *Biochemical Journal*, *384*, 155-162.

21) Okura, M., Yamashita, T., Ishi-Osai, Y., Yoshikawa, M., Sumikawa, Y., Wakamatsu, K., & Ito, S. (2015). Effects of rhododendrol and its metabolic products on melanocytic cell growth. *Journal of Dermatological Sciences*, *80*, 142-149.

22) Park, J., Park, J. H., Suh, H-J., Lee, I. C., Koh, J., & Boo, Y. C. (2014). Effects of resveratrol, oxyresveratrol, and their acetylated derivatives on cellular melanogenesis. *Archives of Dermatological Research 306*, 475-487.

23) Ramsden, C. A., & Riley, P. A. (2014). Tyrosinase: the four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation and inactivation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *22*, 2388-2395.

24) Riley, P. A. (1969). Hydroxyanisole depigmentation: in-vivo studies. *The Journal of Pathology*, *97*, 193-206.

25) Sasaki, M., Kondo, M., Sato, K., Umeda, M., Kawabata, K., Takahashi, Y., … Inoue, S. (2014). Rhododendrol, a depigmentation-inducing phenolic compound, exerts melanocyte cytotoxicity via a tyrosinase-dependent mechanism. *Pigment Cell and Melanoma Research*, *27*, 754-763.

26) Setchell, K. D. R. & Clerici, C. (2010). Equol: History, chemistry, and formation. *The Journal of Nutrition, 140*, 1355S-1362S.

27) d' Ischia, M. (2011). The haptenation theory of vitiligo and melanoma rejection: a close-up. *Experimental Dermatology*, *20*, 92-96.

28) Zhou, M., Diwu, Z., Panchuk-Voloshina, N., & Haugland, R. P. (1997). A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Analytical Biochemistry*, *253*, 162-168.

Ⅲ． 精神、文化に関する分野

香りの文化と法的保護

九州大学芸術工学研究院
麻生　典

This research is exploring the legal protection of fragrances while paying attention to the cultural background of fragrances. The legal protection of fragrances under the Patent Law, the Trademark Law, the Copyright Law, and the Unfair Competition Prevention Law would be conceivable. Among of them, the legal protection by the Patent Law or the Unfair Competition Prevention Law is restrictive and insufficient, whereas, regarding to the legal protection by the Trademark Law, it was expected trademark applications of fragrances would increase when the requirement of graphical representability of the Community Trademark Regulation and Directive was discarded. However, the EUIPO still keeps the status not allowing fragrances to be registered as a trademark. Nevertheless, analyzing the component of fragrances would be possible technically, so there is a possibility that expressing fragrances objectively and clearly is not so difficult technically. If such objectivity and clarity are ensured, the legal protection of fragrances under the Trademark Law seems to be worth considering.

On the other hand, the legal protection of fragrances under the Copyright Law is sometimes emphasized from the cultural aspect. In France, fragrances are valued traditionally focusing on perfume, and considered to be a perfumer's creation. In Japan, the traditional culture of *Kodo* (Japanese incense) can be evaluated to have a cultural aspect of fragrances. However, even in France, the legal protection of fragrances under the Copyright Law is claimed by masking the industrial aspect of fragrances with the cultural aspect. Then, we should consider an approach to protection from the industrial aspect, not from the cultural aspect. Therefore, it seems that the legal protection of fragrances under the Trademark Law should be aimed.

In any case, it is strange that the legal protection of fragrances hasn't been so appealed in Japan, despite that the cultural and industrial importance of fragrances are well recognized. These points are for further study.

1．緒　言

本研究は香りの文化的背景に留意しつつ、香りの法的保護を探求しようとするものである[1]。

産業界において、独自の香りを開発し、その香りを基に利益を得ることは通常行われている。例えば、芳香物質そのものには、しばしば特許権が取得されている。しかし、特許権の保護は、特許化された物質と同一の物質にしか及ばないことから、特許権に基づいては結果的に同じ香りを有する他の物質の製造を差し止めることはできない。そのため、特許権による香りの保護は間接的なものに過ぎない。

そこで、香りを直接的に保護するために訴求されるのが、商標法による保護と著作権法による保護である。しかし、商標法による保護は欧州法の下では認められている一方で、我が国では認められていない。また、我が国では香りの著作権法による保護に関する議論はほとんど存在していないが、フランスにおいては幾度となく（日本の最高裁にあたる）破毀院で争われるなど、その議論は非常に活発である。

他方、香りはその国の文化の反映でもあると考えられる。人間が絶対的に心地良いと感じる香りも存在すると考えられるが、好まれる香りは各国で差異があり、そこには各国で積み重ねられた文化的背景が影響している可能性が高い。

このように、香りの保護を考える際には、法的保護のあり方と、その前提となる文化的背景の分析が必要である。

そこで、本研究は、フランス法および欧州法を比較対象として、香りの文化的背景と、その法的保護を探求することを目的とした。

2．方　法

研究手法は、外国法研究を含むため、比較法研究の手法を採用した。

3．結　果

3.1．著作権法による保護

3.1.1．フランスにおける議論

フランスにおいて著作物として香気が問題となることを明らかにし、香気に対する著作権による保護を初めて明確に認めた裁判例がThierry Mugler Parfums c/GLB Molinard事件である[2]。そして、そこで示された論理がフランスの後の諸判決での基礎とされることとなる。その意味でThierry Mugler Parfums c/GLB Molinard事件は、

[1] 化粧品分野における香りの重要性は従来から指摘されるところである（例えば、Fragrance journal 2005年4月号の特集「最近香りの研究と化粧品への応用」を参照）。

[2] Thierry Mugler Parfums c/ GLB Molinard, T. com. Paris, 24 sept.1999, RIPIA, 2000, p.71. 2008年頃までのフランスにおける議論状況については、拙稿「香気の著作物性―フランスにおける議論を中心に―」。

The culture of fragrances and the legal protection
Tsukasa Aso
Faculty of Design, Kyushu University

2006年の破毀院判決までのリーディングケースとなった。とはいえ、創作性の判断基準についてはその後の諸判決においても相違があり、学説でもそれは同様であった。学説の態度はThierry Mugler Parfums c/GLB Molinard事件の理論を受け継ぎ香気の保護に好意的であったが、保護否定説も若干ながら存在していた。

破毀院が香気の保護についてなした最初の判決が、2006年6月13日の判決である。破毀院は、「ノウハウの単なる実行から生じる香水の香りは、上述の［知的財産法典112条－1、112条－2の］意味において、著作権法による精神的著作物の保護の利益を受けることができる表現形式の創造を構成しない」[3]として香りの保護を拒絶した。本判示は、香りはノウハウの実行に過ぎないとして香りの著作権による保護を否定したものであり、このような判示は破毀院でその後幾度となく繰り返され[4]、破毀院の香りの著作権法による保護を断固として否定するという態度を見て取れる。

ただし、香りを著作物としては保護しないという結論は変わらないものの、その理由づけには若干の変化も見られる。2013年の破毀院判決では「著作権は、知覚可能な形式がその伝達を可能とするために十分な明確さと共に確認しうる場合に限り、知覚可能な形式における創造を保護する。香水の香りは、それ自体は著作物とならない精製という手法の外縁で、この特徴を表明する形式を有さず、著作権による保護を受けることはできない」[5]。2006年の破毀院判決における香気はノウハウの実行にすぎないという理由づけから、香りはその不明確さから知覚可能で形式とは言えないという理由づけに変化しているのである。2006年の破毀院判決に対する学説や下級審の批判に対応したものと考えられるが、2013年の破毀院判決に対してもなお、嗅覚に訴えかける香りがなぜ知覚可能とは言えないのか、という批判は見られるところである。

このように、フランスにおいては、香りの著作権法による保護は学説・下級審では強く主張されているものの、破毀院はこれを一貫して否定してきた。理由づけに変化が見られるとしても、著作権法による保護についてはフランスでは困難な状況にあると言えよう。

他方で、フランスにおいては香水に代表されるように、香りがその文化の一部を形成している。調香師の社会的地位も認められており、Que sais-jeシリーズでも調香師を代えて香りの創造についての2度書籍が出版されている[6]。そして、産業的にも、実際に香りの保護について訴訟を提起しているのは香水を提供する会社である。しかし、こうした動きが例えばファンデーションなど化粧品全般にまで及び、多数の訴訟が提起されているわけではない。その理由は明らかではなく、今後は社会学的分析が必要となろう。いずれにしても、フランスでは文化的にも産業的にも香りの保護の社会的要請は強いという状況にあるが、どちらに主眼が置かれているかと言えば、それはやはり産業的側面と言わざるをえない。むしろ、産業的側面からの著作権保護の主張を隠すために香水の香りの文化的側面を強調しているとも言えるかもしれない。その意味で、フランスにおいては純粋な文化的保護を指向することで香りの著作権による保護を望むものではなく、あくまで著作権を道具とした産業的投資の保護の指向であるように思われる。

3.1.2. 欧州の状況

欧州においては欧州全体に及ぶ著作権の保護はなく、情報社会指令[7]と呼ばれる指令により各国法の調和が図られているに過ぎない。そのため、味覚・嗅覚によって知覚される無体物が著作物として保護されるかも各国に委ねられるが、その解釈については欧州司法裁判所が示すことができる。

最近、香りではないものの食品の味に関する欧州司法裁判所の判決がなされた。著作権法による著作物としての保護の議論の枠組みで言えば、著作物として例示されていない嗅覚・味覚で知覚される無体物が著作物として保護対象となりうるのか、という点に関連するものである。

本件は、オランダの会社が提起した訴訟についてオランダの裁判所が欧州司法裁判所に対して先決裁定を求めたものであるが、実はオランダは香りに対して著作物性を最高裁が認めた国でもある[8]。そのため、味覚で知覚できる食品の味という無体物についても著作物として著作権法の保護対象となる可能性を期待して、訴訟が提起されたという事情があろう。結論から言えば、欧州司法裁判所は食品の

法学政治学論究78号317頁以下を参照。

[3] Cass 1re civ., 13 juin 2006, Bull. civ. Ⅰ. n°307, p.267.

[4] Cass com., 1re juill. 2008、, Juris-Data 07-13952, Cass 1re civ., 22 janv. 2009, Juris-Data 08-11404. その背景には、2006年の破毀院判決後も下級審では香気の著作権法による保護が肯定されていたという事情がある（例えばBPI c/ Senteur Mazel, TGI Bobigny, 28 nov.2006, inédit, cité par J.DALEU, D.2007, AJ. p.736, BPI c/ Senteur Mazel, CA Paris, 4ᵉch., 14 févr.2007, Juris-Data 06-09813, Lancôme c/ Argeville, CA Aix en Provence, 2ᵉch, 13 sept.2007, Juris-Data 05-23579.）。

[5] Cass com., 10 déc. 2013, Juris-Data 11-19872.

[6] Edmond Roudnitska, Le parfum, PUF, 1980, Jean-Claude Ellena, Le parfum, 5.éd., PUF, 2017.

[7] Directive 2001/29/EC of the European Parliament and of the Council of 22 May 2001 on the harmonisation of certain aspects of copyright and related rights in the information society.

[8] オランダ最高裁2006年6月16日判決（H.R. 16 juin 2006, LJN AU89/40）参照。さらにそこでは創作性の証明責任が侵害者側に転換されている（Kamiel KOELMAN, Parfum ou forme d'expression artistique ? , Magazine de l'OMPI, oct. 2006, n°5, p.3）。

味の著作物性を否定したが（CJUE, 13 novembre 2018, aff. C-310/17, Levola hengelo BV C/smilde Foods BV.）、より重要なのはその理由づけである。欧州司法裁判所は、著作権法における保護対象である表現は必ずしも永続的である必要はないが、十分に明確で客観的でなければならない。食品の味の識別は本質的に、感情と主観的で変わりやすい味覚的経験、すなわち、年齢、好み、消費習慣、食した際の状況・環境に左右されることから、明確性と客観性が欠けている。それゆえ、食品の味について著作物性は認められないとした。

本判決が重視しているのは、知覚対象物の客観性と明確性である。言い換えれば、その知覚が主観的なものであってはならないということである。こうした論拠は、人によって受け取られ方が異なることから香りは著作物としての保護を受けられないとする批判としてフランスにおいて従来から見られるものであるが、本判決には香りの商標についての登録を拒絶した欧州司法裁判所の判決の影響もあろう（CJCE、12 déc. 2002、aff. C-273/00、Ralf Sieckmann c/ Deutsches Patent-und Markenamt：この点については後述）。

いずれにしても問題は、この判決が香りの著作権法による保護の議論にどのような示唆を与えるのか、ということである。もちろん、香りも味と同様に客観性と明確性という観点から著作物性を満たさないという評価も可能であろう。他方で、香りについては技術的な成分分析から明確性と客観性を保つことも可能との評価もありえようし、香りは味ほど個人の経験に左右されないと評価できる可能性もある。欧州司法裁判所の判決の射程は、事案からして食品の味にしか及ばないと解されるが、香りの著作権法による保護についても、知覚対象物の明確性と客観性が欠けているとして欧州司法裁判所で否定的な評価がなされる可能性は高まったように思われる。そして、この欧州司法裁判所の判決は、香りに関する著作物性についての各国の著作権法の解釈に影響を与える可能性が高まったと言えよう。

3.1.3. 我が国の状況

我が国では香りの著作権法による保護についての裁判例は存在せず、学説においても十分な議論は存在しない[9]。

3.2. 商標法による保護[10]

では、商標法による香りの保護はどうか。欧州各国の商標法は欧州共同体商標指令によって調和されているため、欧州共同体商標指令の解釈に従うこととなる。また、欧州全体で効力を有する商標権に関する欧州共同体商標規則が存在する。欧州共同体商標指令と欧州共同体商標規則において基本的に商標の登録要件は異ならないことから、両者を区別せず検討する。

まず、欧州では香りの商標の登録例が存在したことが注目に値する。すでに権利としては消滅しているが、指定商品をテニスボールとし、刈ったばかりの草の香りを商標とした商標権の存在である（登録番号:428870）。本商標登録については、旧欧州共同体商標指令2条の「写実的表現可能性」要件を満たすと判断されたが、出願書類では香りについて文章だけで表現されたものであった。

しかし、この文章だけで写実的表現可能性を満たすという点については、本商標登録とは別の出願にかかる事件において欧州司法裁判所で否定されることとなった。欧州司法裁判所は、香りの商標に関して、旧欧州共同体商標指令2条の「写実的表現可能性」要件を充足するためは、明白、明確、自己充足的、入手容易、理解容易、永続的、かつ、客観的でなければならないとした（CJEU, 12 déc. 2012, aff. C-273/00）。当該判決における明白性等の内容は非常に厳格なものであり、香りの商標についてこの写実的表現可能性を満たすことは現実的には不可能と言えるものであった。実際、本判決後においては、香りの商標が欧州において保護されることはなかった。

他方で、この写実的表現可能性要件が2015年の欧州共同体商標指令および欧州共同体商標規則によって削除されたことにより[11]、商標の登録要件が緩和されたと理解する向きがあった。言い換えれば、香りにかかる商標についての保護可能性が開かれたという期待があったのである。しかし、現実にはそうはならなかった。

2015年の欧州共同体商標規則4条では、商標は「明確、かつ、正確な主題を判断することができる態様」[12]で表示されることが必要とされている（欧州共同体商標指令3条も同旨）。さらに、欧州共同体商標委員会実施規則3条は、「商標は、管轄当局及び公衆に対して、明確性及び正

[9] 拙稿「香気の著作権法による保護」『著作権・著作隣接権論文集 第7回』、著作権情報センター、1頁以下、2009年。
[10] 商標による保護の概論を示したものとして、反町ボルド祐美「諸外国における香りの商標の現状とTPP11協定」パテント72巻8号152頁。
[11] Directive（EU）2015/2436 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2015 to approximate the laws of the Member States relating to trade marks, Regulation（EU）2015/2424 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2015 amending Council Regulation（EC）No 207/2009 on the Community trade mark and Commission Regulation（EC）No 2868/95 implementing Council Regulation（EC）No 40/94 on the Community trade mark, and repealing Commission Regulation（EC）No 2869/95 on the fees payable to the Office for Harmonization in the Internal Market. また、Regulation（EU）2017/1001 of the European Parliament and of the Council of 14 June 2017 on the European Union trade mark。
[12] 邦訳は特許庁の諸外国・地域・機関の制度概要および法令条約等から引用（2020年3月27日最終確認）（https://www.jpo.go.jp/system/laws/gaikoku/document/mokuji/ec-shouhyou_rijikai.pdf.a）。

確性を伴って所有者に付与される保護の主題を判断することが可能になるように、明確、正確、自己充足的、入手容易、理解容易、永続的で、かつ、客観的な方法で管理簿に再現するべく一般的に利用可能な技術を用いて何らかの適切な様式で表示される」と規定している[13]。そして、これらの条文の解釈として欧州知的財産庁（EUIPO）の商標ガイドラインにおいては、「現在のところ、嗅覚と味覚の商標は受け入れられない。というのは、その表現は、それ自体が明確、正確、完全であり、容易にアクセス可能、理解可能、継続可能、そして、客観的でなければならず（欧州共同体商標委員会実施規則３条第１段落）、技術の現状はこの種の商標をそうした方法で表現することはできないからである。その上、欧州共同体商標委員会実施規則は、サンプルまたは見本の寄託を適切な表現と認めていない。商標の記述は表現に代替できない。なぜなら香りの記述は明確でも、正確でも、客観的でもないからである［12/12/2002, C-273/00、Sieckmann, EU:C:2002:74, § 69-73; 04/08/200, R 120/2001-2, THE TASTE OF ARTIFICIAL STRAWBERRY FLAVOUR（gust.)］。それゆえ、あらゆる嗅覚または味覚の商標の出願は、欧州知的財産庁によって欧州共同体商標登録出願として扱われない（出願でないとみなされる）。なぜなら、その出願は出願日の取得のために要求される要件を満足しないからである」[14]とされている。

そのため、欧州では「写実的表現可能性」要件が削除されたにもかかわらず、旧欧州共同体商標指令２条の解釈として2012年の欧州司法裁判所で示された解釈が現在の欧州共同体商標指令および欧州共同体商標規則の条文の解釈としても維持されており、現状、欧州では香りを商標権で保護することは不可能な状況にある。

3.2.2. 我が国の状況

我が国では香りは商標法における保護を受けることはできない（商標法２条）。

3.3. 他の方策

香りについて芳香物質としての特許権による保護は当然に可能であり、この点についての疑義は存在しない。ただし、先にも述べたように、特許権が及ぶのはその芳香物質そのものであり、他の物質が同じ香りを発したとしても特許権の効力は及ばないことから、香りを保護するためには特許権の実効性は薄い。

他方で、フランスの裁判例ではノウハウに言及されているが、ノウハウが営業秘密に該当するような場合には香りは保護を受けることが可能である。フランスでは営業秘密に関する欧州共同体指令をうけて[15]、2018年に制定された「営業秘密の保護に関する法律第2018-670号」に基づいて営業秘密の定義等を設け[16]、商法典に具体的な規定が設けられた（商法典L.151-1 以下）。当該法律が成立する以前から、フランスでは判例によって民法1240条（旧1382条）に基づいた不正競争訴訟または寄生競争訴訟で営業秘密が保護されており、それは営業秘密に関する指令後でも変わらない[17]。我が国においては、営業秘密に該当する場合には不正競争防止法による保護を受けることが可能であるが、香りが商品等表示に該当するかは検討を要する事項であり、また、民法709条に基づく不法行為での保護を受ける可能性は高くない[18]。

4. 考　察

本研究の申請時点においては、欧州で欧州共同体商標指令および欧州共同体商標規則が改正され「写実的表現可能性」要件が削除されたことにより、香りについての商標出願が欧州で増加するのではないかという期待があった。しかし、実際には、そうした動きは広がっているとは言い難い。実際、欧州知的財産庁では、現状、香りの商標は登録しないとしており、裁判例も存在していないことから、香りについて商標出願してその解釈を裁判所で争うほどの意味まではないと欧州の企業も考えている可能性が高い。もちろん、上記で検討したように、特許権または営業秘密としての保護を各国で受ける可能性もあるが、その保護には限界があり十分な保護とは言い難い。

他方で、香りの成分分析などは十分に技術的に可能であり、香りを客観的かつ明確に表現することも技術的にはそれほど困難でない可能性もある。そうした客観性と明確性が確保されるのであれば、商標法での保護は十分に検討に値するように思われる[19]。

一方で、香りの文化的側面から著作権による保護が強調

---

[13] 邦訳は特許庁の諸外国・地域・機関の制度概要および法令条約等から引用（2020年3月27日最終確認）（https://www.jpo.go.jp/system/laws/gaikoku/document/mokuji/ec-shouhyou_iinkai.pdf.）。

[14] https://guidelines.euipo.europa.eu/1803430/1799014/directives-des-marques/9-11-2--------9-3-11-2-marques-olfactives-et-marques-gustatives.

[15] DIRECTIVE (EU) 2016/943 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 8 June 2016 on the protection of undisclosed know-how and business information (trade secrets) against their unlawful acquisition, use and disclosure.

[16] 解説として、安藤英梨香「【フランス】営業秘密の保護に関する法律」、外国の立法、No.279-2、12頁、2019。

[17] 拙稿「フランスにおける寄生概念」瀬川先生・吉田先生古稀記念『社会の変容と民法学の課題下』、成文堂、691頁、2018。

[18] 最判平23年12月8日民集65巻9号3275頁［北朝鮮映画事件］。

[19] 技術的に色で香りを表現することで、客観性と明確性を担保することもありえよう（Amandine Esquis, De la marque traditionnelle à la marque atypique : l'exemple de la marque olfactive, 2014, thèse, Université de Lorraine, p.284以下）。

されることがある。フランスでは香水を中心に香りを伝統的に重視し、それを調香師の創作であると考える立場も有力である。我が国でも香道という伝統文化からすれば、香りが文化的側面を有すると評価できる。ただし、結局のところフランスでも、香りの産業的側面を文化的側面で覆い隠して著作権による香りの保護が主張されていると言える。そうであるとすると、文化的側面から保護のアプローチを考えるのではなく、産業的側面から保護のアプローチを考えるべきである。そのため、基本的には、商標法での香りの保護が指向されるべきであるように思われる。

いずれにしても、香りの文化的重要性、産業的重要性がこれほど認識されているにもかかわらず、その保護がこれほど訴求されないというのも不思議な状況である。それらの点は今後の検討課題としたい。

化粧品原料オイルとしてのパーム油の可能性と課題

関西大学商学部
小井川　広志

This study focuses on the palm oil as one of the most important ingredients for cosmetic and personal care (CPC) products. My approach is mainly based on social science, particularly economic and management, examining the view of palm oil producers toward their perspectives of CPC markets.

Palm oil is currently the largest in production volume among all oils and fats. This is because it is versatile in terms of applicability to a number of oils and fats-based products such as frying oil, margarine, shortening, confectionery, cocoa butter equivalent, detergent, biofuel and other edible as well as non-edible items. However, surprisingly, palm oil is the newest comer in these, including CPC, markets as it was not commercially developed until the late 1960s. This means palm development was highly successful to penetrate the markets above. Based on this historical background, this study intends to examine the interaction of palm development and the promise of CPC market.

My fieldwork was conducted for two weeks in Malaysia in March 2018, where several interviews and data collection were successfully completed. Malaysia was chosen as it used to be the largest palm oil producer (until 2005, surpassed by Indonesia) and still a global leader in palm oil-related technologies. MPOB, formerly named as PORIM, a government agency, continuously conducted intensive research and development efforts on palm oil related-technologies. CPC markets have been one of the most important targets for MPOB to penetrate, as its products are highly valued. Regarding the cosmetic application, two important technological developments have been witnessed; namely, technologies related to DHSA (9,10-dihydroxystearic acid) and tocotrienol. These are exclusively palm-based and can be developed as functionality cosmetics. MPOB expects, due to its aesthetically appealing, multifunctional and safe nature, they should be welcomed by potential customers.

In conclusion, the markets for CPC products are highly promising for palm oil producers and suppliers; however, this study notices several issues remained.

1．緒　言

パーム油は、マレーシア、インドネシアの２国で世界総生産量の８割、世界市場シェアの９割を占める熱帯原産の植物油である。パーム油産業は広範なバリューチェーンを有し、我々の日常生活の細部に入り込んでいる。例えば、日本人が国内で利用する石けんの多くは、マレーシア産パーム油が精製、加工され日本に輸出されたものである。この他にも、インスタント食品の加工や外食産業の厨房で利用されるフライ油の多くにはパーム油が利用されている。マーガリン、菓子原料のショートニング、洗剤などでも同様にパーム油由来のものが多い。油ではないが、廃材から作られる木材チップも、バイオマス発電の燃料として日本に多く輸出されている。我々の日常生活は、パーム油とは切っても切れない関係にある。

このように様々な用途に利用されるパーム油だが、本研究はその中でも、化粧品用途としてのパーム油の役割を検討するものである。ユーザーである化粧品メーカーにとって、パーム油は数多い原料の一つであり、その化学的特性などについての研究は進んでいる[1)]。しかし、本研究はパーム油の香粧品科学的分析を行うものではない。著者の専門とする社会科学的見地から、パーム油と化粧品の関係を検討していく。加えて本研究のユニークな着眼点は、ユーザー目線ではなく、生産者・供給者側から見たパーム油の化粧品用途の位置付け・重要性を検証しようとする点にある。このような視点からの研究は、国内外でも多くない。言うまでもなく供給者側は、パーム油の素材特性を活かすことで他の油脂との差別化をはかり、高付加価値化を模索している。本研究は、その実態と研究開発の取り組みを紹介するものである。

本研究では、主にマレーシアにおけるパーム油関連の研究開発に焦点を当てる。パーム油生産は、マレーシア、インドネシアの２国が圧倒的シェアを握っているが、中でも、パーム油に関連する研究開発の殆どは、技術的に先行するマレーシアの政府系研究機関であるMPOB（Malaysia Palm Oil Board）がほぼ一手に担っている。従って、以下では、パーム油の化粧品用途拡大に向けたMPOBの研究活動と取り組みを中心に議論していく。なお、パーム油は、狭義にはパーム油とパーム核油の２つがあり、化粧品原料はオレオケミカルの元となるパーム核油由来が主となる。ただし以下では、特に区別して議論する必要のある場合を除いて、２つを併せて単にパーム油と呼称する。

以下、第２節では、本研究のアプローチを説明する。第

The Issues and Perspectives for Palm Oil as the Ingredient for Cosmetic Applications
Hiroshi Oikawa
Faculty of Business and Commercee, Kansai University

3節では、まず、パーム油産業の発展と産業的特徴を、産業バリューチェーンの枠組みに従って概観する。続けて、パーム油産業から見た化粧品用途の位置付けをふまえて、パーム油化粧品関連製品の研究開発をPORIMモデルとして定式化し、研究開発の具体例と成果を検討する。第4節では、マレーシア・パーム油産業にとっての化粧品の課題と展望を議論する。

2. 方　法

本研究は、文献調査、データ収集、ならびに関係者へのインタビュー調査による知見に基づいている。特に歴史的分析に関しては、文献研究に拠るところが大きい。マレーシアでの現地調査は、2018年3月の2週間が充てられた。政府関係者5名（MPOB技術者3名、マーケシング担当者1名、MPOCのCEO）、プランテーション企業2社（FELDA、Sime Darby）、日系商社1社とインタビューを行った。すき間時間は、MPOB図書室、およびNational Libraryにて関連文献、統計資料などの複写による収集に充てた。これらの資料を基に、以下で報告するパーム油産業における化粧品分野の位置付けが明らかにされた。

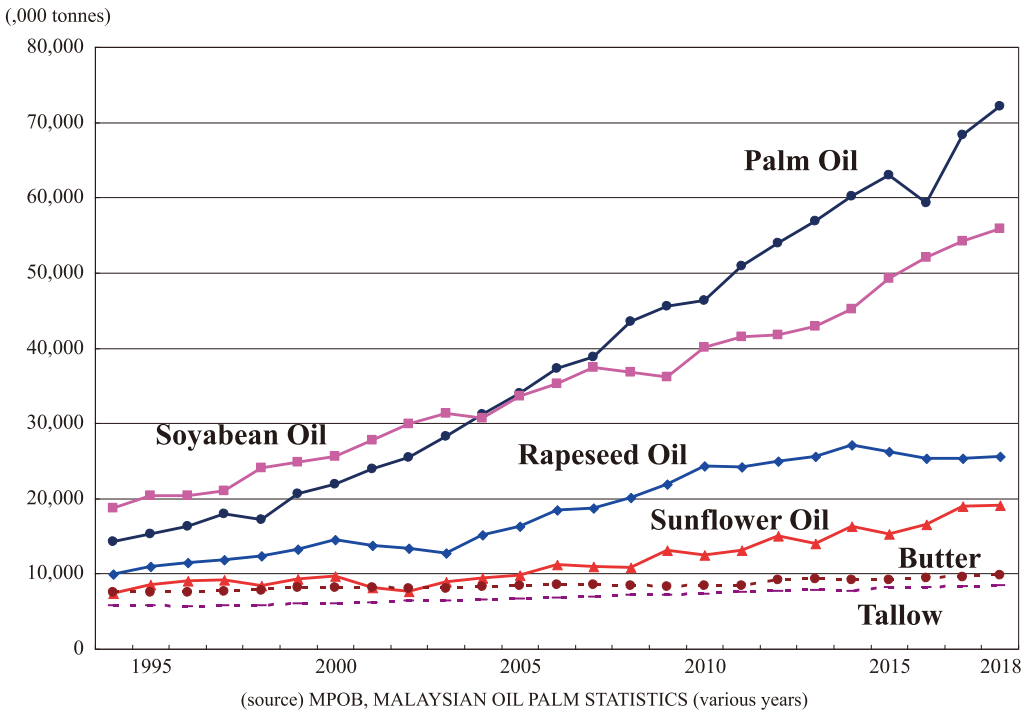
3. 結　果

3. 1. パーム油産業バリューチェーンの検証

オイルパーム樹はもともとマレーシア自生ではなく、19世紀後半に西アフリカから持ち込まれた外来の商品作物である。マレーシアでオイルパームの本格的な商業生産が開始されたのは1960年を過ぎた頃からである。その背景には、ゴム、錫など少数の一次産品依存構造からの脱却を進めようとするマレーシア政府主導の多角化政策があった。その政策の下でパーム油産業は支援を受け、順調に成長した。60年代、70年代を通じて作付面積および産出量は共に年平均20％前後の高い成長率で拡大し、その20年の間にそれぞれ19倍、28倍に急拡大している。80年代に入り増加ペースはやや鈍化するものの、引き続き年平均10％を超える高いペースで生産を拡大してきている。90年代以降は耕作地拡大の制約に直面するが、土地生産性を高めることで年平均5％前後の増産ペースを維持してきた。

植物油脂には、大豆油、なたね油、ひまわり油、綿実油、ココナッツ油、オリーブ油など多くの種類が存在する。その中でパーム油は、生産量、消費量共に最大である。各植物油脂の生産量の推移をFig.1から確認する。最新の統計が利用可能な2018年時点で、パーム油の生産量は7,200万トンを超え世界第1位の生産量を誇る。これに続くのが5,500万トン余の大豆油、約2,500万トンのなたね油、約1,900万トンのひまわり油などである。動物油脂の生産量は、ここ数十年ほとんど増えていない。Fig.1から読み取れる興味深い特徴は、この間の著しい油脂生産総量の拡大である。この10年間で、植物油脂は約4割の生産量が拡大した。しかもその大部分は、パーム油と大豆油の生産拡大によって担われている。潤沢に供給可能な油脂という視点から、パーム油はますます注目されていくであろう。

パーム油関連産業は、栽培から精製、加工まで幅広いバリューチェーンを包摂し、雇用創出や所得産出の面でマレーシア経済に大きく貢献している。2009年にパーム油関



(source) MPOB, MALAYSIAN OIL PALM STATISTICS (various years)

Fig. 1　World Production of Major Oils & Fats 1994-2018

連産業は527億リンギットの付加価値を産み出したが、これはマレーシアGNI（国民総所得）の約８％に相当し、エネルギー、金融サービス、卸売・小売サービスに次いで部門別で４番目に大きい[2)]。

パーム油産業バリューチェーンの広がりと奥行きを図示したものがFig.2である[3)]。川上部門のオイルパーム樹栽培に始まり、搾油、精製過程を経て、最川下の最終製品販売に到る流れが示されている。川上・川中部門については別の説明に譲ることにして[4, 5)]、以下では化粧品、パーソナルケアと関連する精製および最終財過程について概観していく。

精製は、パーム原油から様々な不純物を除去し、油分を取り出す工程である。脱ガム（パーム油中のリン脂質成分の除去）、脱酸、脱色、脱臭などのプロセスを経てパーム精製油が取り出される。精製には物理精製、化学精製の２通りがあり、それによって得られる最終精製油の化学的性質も異なる。コストなどの面から物理精製の利用度が高い。パーム原油(Crude Palm Oil)からは、フライ油やショートニング、マーガリン、ココアバター代替脂などに使われる成分を分別していく。果房の核の部分から抽出されるパーム核油（Palm Kernel Oil）は、パーム油とは全く異なる成分特性を持つ。これを加水分解、またはエステル変換することで、脂肪酸アルコール、脂肪酸が得られるが、これらはオレオケミカルとして非食用の用途に用いられる。ここで対象とする石鹸や洗剤、界面活性剤などは、主にこのパーム核油由来となる。

パーム油産業が、マレーシアの中心的な産業の一つとして一層の飛躍を遂げていくには、これまでの量的な拡大から、バリューチェーン全体で質的な高度化を図る必要がある。現状において、マレーシアは、耕作可能地拡大の制約に阻まれて産出量拡大が困難な状況にある。そのような事情からも、パーム油バリューチェーン全体の高付加価値化を進めていく誘因は大きい。そのためには、相対的に低付加価値の食用油からより高付加価値の製品に、パーム油利用の最終製品の割合をシフトさせる必要がある。

パーム油由来のどのセグメントがより高い付加価値を生み出すのか。Table 1は、パーム油最終財の輸出量と輸出金額、および千トン当たり単価((b)/(a))を比較したものである[6)]。この中で、化粧品・健康食品輸出のセグメント(表中(8))の単価が他部門に比較して突出して高いことが分かる。しかしながら、その輸出量は順調に増えているものの、その量、額は圧倒的に小さい。当該部門の一層の拡大が望まれる所以である。

３．２．研究開発の特徴と現状

化粧品原料油脂としてのパーム油・パーム核油の本格的な登場はごく最近である。1990年に発行された香粧品科学のテキストには、マイナーな植物油脂まで含めて21種

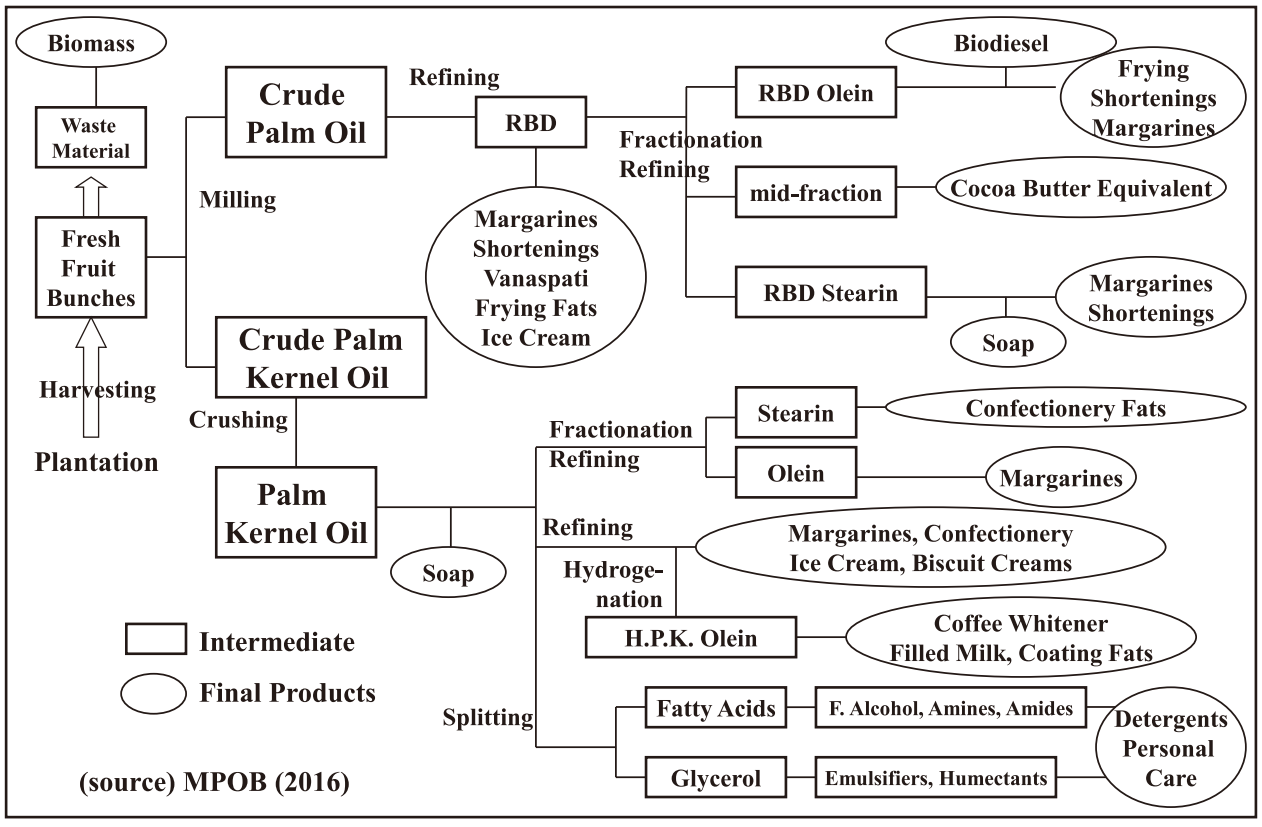


Fig. 2　Versatility of Palm Oil & Palm Kernel Oil in Food and Non Food Applications

Table 1　Export Volume & Value of Palm - Based Finished Products: 2010, 15 & 18

(,000 tonnes and RM million)

	2018			2015			2010		
	Volume (a)	Value (b)	(b)/(a)	Volume (a)	Value (b)	(b)/(a)	Volume (a)	Value (b)	(b)/(a)
(1) Shortening	191.88	618.0	3.2	180.43	570.75	3.2	214.39	665.5	3.1
(2) Soap	148.29	701.0	4.7	77.52	356.85	4.6	30.75	108.4	3.5
(3) Vegetable/Dough Fats	117.81	669.4	5.7	65.82	230.86	3.5	44.80	165.0	3.7
(4) Cocoa-Butter Subs/ Equiv.Replacer	44.65	306.7	6.9	28.20	199.36	7.1	41.86	247.9	5.9
(5) Vegetable Ghee/Venaspati	43.32	151.3	3.5	43.44	152.96	3.5	39.14	134.5	3.4
(6) Blended Vegetable Oil	34.87	106.6	3.1	11.64	56.87	4.9	15.64	56.1	3.6
(7) Margirine	23.62	103.5	4.4	24.65	97.51	4.0	18.18	67.4	3.7
(8) Tocotrienol/Carotenoid/ Other Vitamins	0.84	55.9	66.3	0.16	30.64	196.4	0.003	0.4	133.3

類の油脂の特性が解説されているが、驚くべきことに、パーム油、パーム核油はそこで取り上げられていない[7]。パーム油の本格的な商業生産が開始されたのは僅か半世紀前の1970年代に入ってからであり、当時はフライ油、ショートニングなどの食用油向けの需要が中心であった。パーム油の生産が拡大し、より多角的な販路拡大が模索され始めたのは1980年代になってからである。その頃から、オレオケミカル部門の高付加価値化が模索され始めたのだが、タイミング良く、オイルショックによって価格の高騰したペトロケミカルの代替として、さらには環境問題への関心の高まりを背景として、オレオケミカルへの関心が世界的に高まっていた時期と符合する。このような経緯の中で、オレオケミカル部門の中でも、高付加価値化が期待できる化粧品原料油脂としての利用拡大の可能性が模索され始めた。

3. 2. 1. パーム油の有用性認識を浸透させたPORIMモデル

パーム油は歴史の浅い植物油脂だが、前節で見たように、現在、世界で最も生産量・消費量が多い植物油脂となっている。高い土地生産性と豊富かつ安定した供給がパーム油の国際競争力の源泉である。これが植物油脂利用のユーザー企業に重宝がられ、大豆油など伝統的な他の植物油脂に徐々に代替する形で、着実に利用が拡大していった。

しかしながら、パーム油の利用拡大が順風満帆に進んでいった訳ではない。他の油脂には利用実績があり、新参者のパーム油がそれに食い込んでいくには、それを凌駕するほどに有用でコストパフォーマンスの優れた原材料であることをユーザー企業に認識してもらう必要があった。マレーシア・パーム油の場合、供給者側が、科学的根拠を提示しながらパーム油の魅力を積極的に喧伝し、ユーザー側の興味を引きつけていった。そのためにマレーシアの政府、研究者、業界関係者の払った努力は甚大であった。ここではこれを、「PORIMモデル」と名付けよう。PORIM（Palm Oil Research Institute of Malaysia）とは、1979年に設立されたパーム油関連の研究開発に特化したマレーシア政府系の研究機関である（2000年に、MPOBに改組）。以下で、そのモデルの構造を説明する。

PORIMモデルは、悪く言えばずる賢い。油脂間に化学的代替性があることを頼みに、安価で潤沢なパーム油を売り込み、他の油脂に代替する形で利用を広げていくというモデルである。それを示す典型的な例と言えるものが石鹸である。石鹸は、油脂とアルカリを混合して製造するのが一般的であるが、かつてこれには主に牛脂が使われてきた。だが、牛脂は安定供給の面で不安を抱えており、そこにパーム油の参入する余地があった。パーム油が石鹸の製造に有用な原材料油脂であることを示すため、PORIMは地道な研究開発を続け、積極的にその成果を公表していった。PORIMの技術者は、パーム油利用の可能性のある世界中のユーザー企業に足繁く通ってパーム油の有用性を訴え、何か不調があればそれを研究所に持ち帰って製品の改良につなげた。P&GやUnileverなど、先進的な世界的大企業との共同研究も積極的に推進した。パーム油の利用拡大は、このような地道な基礎研究と積極的なマーケティング活動の結合の賜物である[8]。食用油、菓子素材、マーガリン、チョコレート原料、バイオ燃料、洗剤など、油脂を利用するあらゆる製品において、石鹸のケースと同様の試みが続けられた。新興国がこのような主体的な努力により海外市場を開拓していった例はマレーシアのパーム産業固有の試みであり、PORIMモデルとして注目すべきものである。

3. 2. 2. PORIMモデルの中のCosmetic Application

化粧品原料の中でも、油脂およびその誘導体は、あらゆる化粧品の構成成分として広く用いられており、後発のパーム油にも参入の余地はあるはずである。この理論上の可能性を現実化させていくことが、PORIMモデルの成否をにぎる。化粧品用途の需要拡大の応用は、主に2つの方向性で進められた。第一は、精製過程で生まれる副産物の化粧品原料としての有効利用の模索、第二は、パーム油に特徴的な成分の化粧品原料としての応用可能性の模索、である[9]。

前者に関連して、C8-C14源のパーム核油はオレオケミカルの原料となるが、ここからC12～C14が抽出されて界面活性剤の原料が作られる。ところがFig. 3にあるように、オレオケミカルの7割は需要が旺盛な界面活性剤に使われており[10]、その生産に比例して、C16, C18およびC18 : 1などの副産物が排出されることになる。PORIMでは、その副産物からC8～C10を取り除き、純度の高いDHSA（9, 10-dihydroxystearic acid）に転換する技術を開発した。これは、安定的で極性のある油相成分であり、顔料のコーティングに使った場合塗りやすく、油性感を抑え、肌とも親和するという特性を持っている。PORIMでは口紅やマスカラへの応用で特許を取っている。パーム核油の精製過程で副産物として生み出されるオレイン酸の有効利用を目指す試みである。

後者に関しては、パーム油に含まれる微量成分のトコフェノールおよびトコトリエノールの有効活用が考えられている。Fig. 4で明らかなように[11]、トコトリエノールは他の油脂に殆ど含まれない成分であり、これの有効利用はパーム油の優位性を決定付ける。トコトリエノールは、強力な抗酸化作用を持つことからスーパー・ビタミンEとも呼ばれ、最近では健康食品としての利用が期待されている[12]。PORIMおよびMPOBでは、機能性化粧品としてのトコトリエノールの効能を検証している。その効果は多岐にわたり、日焼け止め、脱毛予防、発毛促進の効果が確かめられている[13]。

このように、PORIMからMPOBへと続く様々な研究開発から、化粧品原料としてのパーム油の技術的利用可能性が模索されてきた。それを一覧にしたものが、Table 2である[13]。

4．考察：パーム油の化粧品原料としての課題と展望

パーム油産業バリューチェーンが、今後、一層の拡充、高付加価値化を進めていくには、化粧品セグメントの発展が不可欠である。以上で概観したように、これに対するマレーシアの取り組みはPORIMモデルの延長としてシステマティックかつ積極的であり、一定程度の成果を上げてきている。しかしながら、化粧品セグメントへの期待という観点では、いくつかの課題が残されている。

第一に、化粧品原料として消費される絶対量が他の用途、例えば燃料や食用用途に比較して圧倒的に少ない。したがって、ある程度の高付加価値化が期待できるとしても、化粧品用途の重要性はパーム油バリューチェーン全体の中では相対的に低い。もちろんこれは、化粧品原料のような高級素材には構造的な問題である。その克服には、更なる高付加価値化で需要量の不足を補うような、より革新的な研究開発の成果が望まれる。

第二に、より根本的な問題として、マレーシア・パーム油産業が飽くまで原料サプライヤーの地位に甘んじている点が指摘できる。化粧品原料を供給することには熱心であ

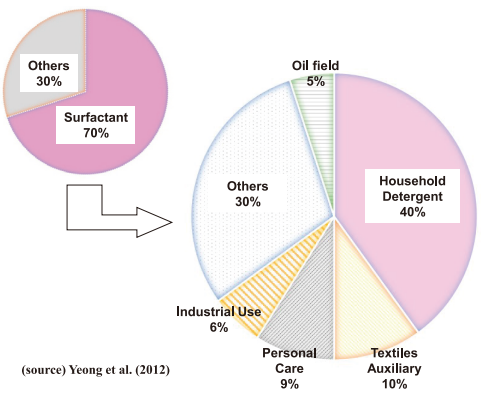


Fig. 3　The Final Distribution of Oleochemical Uses (2004)

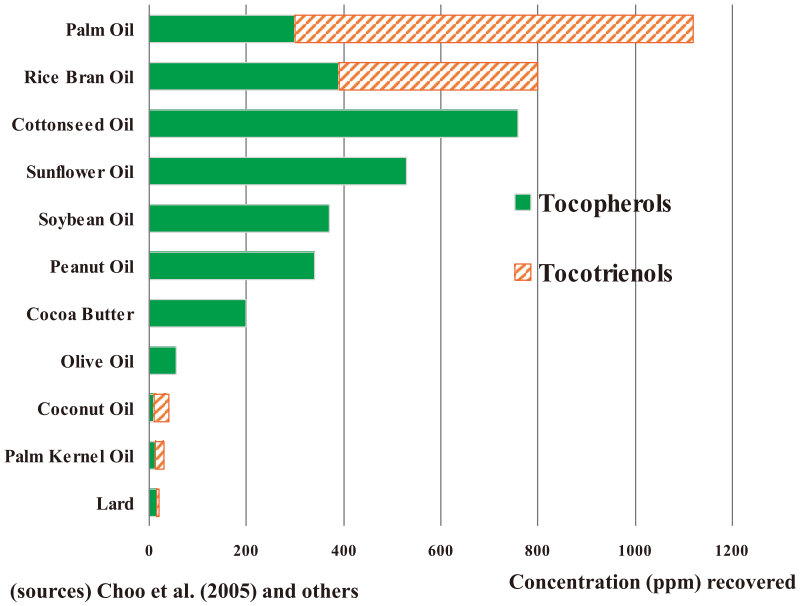


Fig. 4　Vitamin E Content in Vegetable Oils

Table 2　Cosmetic and Personal Care Ingredients and Their Functions

Definition	Category	Examples
Emulsifiers - substances, which stabilise emulsions by increasing their kinetic stability. They are also known as surface-active substances or surfactants. They possess both hydrophilic and hydrophobic moieties in their chemical structures, and have an affinity for both the oil and water phases.	Anionics	Soaps (sodium stearates, sodium myristates), fatty alcohol sulphate (FAS), fatty alcohol ether sulphate (FAES).
	Cationics	Quarternary ammonium compounds.
	Nonionics	Fatty alcohol, fatty alcohol ethoxylate (FAE), fatty acid exthoxylates, monoglycerides (glyceryl stearates), polyglycerol esters, sucrose esters.
Emollients – substances that soften and soothe the skin. These substances have occlusive action, i.e. they function as a barrierto prevent trans-epidermal water loss, thus increasing the water content and maintaining the flexibility of the skin.	Hydrocarbons	*Mineral oil, petrolatum,* squalene, squalane.
	Lanolin derivatives	*Lanolin oil, lanolin alcohol.*
	Silicones	*Cyclomethicones, dimethicones.*
	Fatty acids	Stearic acid, oleic acid, linoleic acid, isostearic acid.
	Fatty alcohols	Cetyl alcohol, stearyl alcohol, cetearyl alcohol.
	Esters	Isopropyl myristate, isopropyl palmitate, octyl stearate, *jojoba oil*.
	Triglycerides	*Sunflower oil, cocoa butter,* caprylic/capric triglyceride.
Humectants/Moisturisers - substances that arehygroscopic. They are often molecules withseveral hydrophilic groups, most often hydroxyl groups, which have the affinity to form hydrogen bonds with molecules of of water. They thus reduce trans-epidermal water loss from the skin, making it soft and supple.	Polyols	*Propylene glycol*, glycerine, polyglycerol, *sorbitol*.
	Amino acids	*Hydrolised proteins.*
	Miscellaneous	*Urea, lecithin, aloe vera, lactic acids.*
Rheology modifiers - substances added in small quantities (<1%) to modify the rheology (flow properties) of the products, which must, according to consumer preference, be of an acceptable consistency. As the rheology is modified, these substances are also known as rheological additives.	Natural organic polymers	*Carrageenan gum, cellulose, xanthan gum, guar gum.*
	Chemically modified polymers	Cellulose derivatives, e.g. hydroxethyl cellulose, methyl cellulose, carboxymethyl cellulose.
	Synthetic organic polymers	*Carbomers (polymers of acrylic acid).*
	Mineral (inorganic)	*Clays, e.g. hectorite, bentonite.*
	Miscellaneous	*Salts*, fatty esters of long chain, polyglycerols, *waxes*.

Table 2　Cosmetic and Personal Care Ingredients and Their Functions（Continued）

Definition	Category	Examples
Preservatives – substances added to products to prevent the growth of or to destroy microorganisms that may destabilise the products or create a health hazard.	Acids	*Benzoic acid, dehydroacetic acid, parabens, sorbic acid, salicylic acid.*
	Halogenated compounds	*Bromopol, chloroacetamide, cholorobutanol, dicholorobenzyl alcohol.*
	Alcohols	*Benzyl alcohol, ethyl alcohol, phenoxyethanol, dicholorobenzyl alcohol*, batyl and chimyl alcohols.
	Quats	*Benzalkonium chloride, polyquaternium.*
	Monoglycerides	Monocaprylic (18), monocapric (C10), monolaurin (C12).
Sunscreens – active ingredients used in sun-care formulations to control the amount of UV light penetrating the skin.	Chemical Sunscreen	*p-aminobenzoic acid (PABA) and its derivatives, cinnamates, salicylates, benzophenone.*
	Physical Sunscreen	*Inorganic pigments and minerals (talc, kaolin, mica), inorganics (zinc oxide and titanium dioxide)*
Plant extract	Active Ingredient	Vitamin E, carotenoids, *cammomile, calendula, tea tree oil.*

(note) Items indicated in Italic are not derived from palm and palm kernel oils.
(source) Ismail et al. (2011)

っても、それを最終製品にまで加工し、より高い付加価値を付けて高級化粧品として高価格で販売できるブランド力のあるマレーシア企業が全く育っていない。この状況が続けば、化粧品関連から得られる付加価値には限界がある。ブランド力ある企業の育成は、製造技術力に加えてマーケティング戦略などの総合的な力量が問われるのだが、新興国マレーシアにこれは荷が重い[14]。この問題は、菓子、洗剤など他のパーム油産業下流部門でも共通に観察されている。MPOBは技術面での研究開発に特化した組織であり、PORIMモデルのある種の限界がここに観察される。

しかしながら、この限界の克服は不可能ではない。現実的な戦略としては、外資との連携が考えられる。マレーシア単独で競争力ある化粧品メーカーを創出することは困難であっても、提携あるいは合弁形態で外資を呼び込んでそのノウハウを活用し、例えば新規のブランドを立ち上げて国際展開をはかることは可能である。この点に関連して、パーム油由来の原材料生産地という優位性以外に、マレーシアはある種のアドバンテージを有している点を忘れてはならない。それは、イスラム圏へのゲートウェイとしてのマレーシアの国際的地位である。世界に広く認められたハラル認証をはじめ、世界の主要金融機関がクアラルンプールにオフィスを置くイスラム金融機能など、マレーシアはイスラム圏と西欧圏を結ぶ結節点として重要な役割を果たしている。今後、イスラム圏では、人口と所得の増加により化粧品関連の需要急増が見込まれている。非イスラム圏の企業がこの需要を取り込むには、イスラム圏とのタイアップが不可欠であり、マレーシアがその筆頭候補になるであろう。マレーシア・パーム油産業にとっての化粧品産業は、イスラム経済圏にその販路を拡大できる重要な役割が期待されている。

以上のように、マレーシア・パーム油産業における化粧品セグメントの位置付けは、いくつかの課題を抱えつつも、技術的、社会文化的に大きな可能性に満ちており、有望な分野と言える。

（文　献）

1）フレグランスジャーナル臨時増刊 Vol.20『化粧品用油性原料－その開発と応用』
2）PEMANDU (2010) *ECONOMIC TRANSFORMATION PROGRAMME*. Prime Miniser's Department, Malaysian Government
3）MPOB (2016) *FACT SHEETS : MALAYSIAN PALM OIL*. Kelana Jaya and Kajang, Selangor
4）寺坂道夫、田原秀雄、安倍裕 (2007)「植物性化粧品

用油性原料の探索、生産、精製の現状」、上記臨時増刊号、pp.24-31.
5) 加藤秋男 (1990)『パーム油・パーム核油の利用』幸書房
6) MPOB, *MALAYSIAN OIL PALM STATISTICS*（各年度版), Bandar Baru Bangi, Kajang
7) 田村健夫・廣田博 (1990)『香粧品科学 －理論と実際－(第2版)』フレグランスジャーナル社
8) PORIM (1995) *PORIM'S STRATEGIC PLAN*. Bandar Baru Bangi, Kajang
9) Ahmad, Salmiah and Luigi Rigano (2004) "A Cosmetic Ingredient from Palm Kernel Oil" Oils & Fats International, March 2004, 30-31.
10) Yeong, Shoot Kian, Zainab Idris and Hazimah Abu Hassan (2012) "Palm Oleochemicals in Non-Food Applications." Ch.20 in Lai, Oi Ming, Chin-Ping Tan and Casimir C. Akoh (eds.) *PALM OIL: PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND USES*. *AOCS* Monograph Series on Oilseeds 5, AOCS Press, Urbana, IL. USA.
11) Choo, Yuen May, Mei Han Nga, Ah Ngan Maa et al.(2005) "Application of Supercritical Fluid Chromatography in the Quantitative Analysis of Minor Components (carotenes,vitamin E, sterols, and squalene) from Palm Oil" Lipids, 40 (4), 429-432.
12) 湊貞正(2001)「トコトリエノールの機能と健康食品への応用」Fragrance Journal, 29 (2), 43-48.
13) Ismai, Roshah, Ismail Ab. Raman and Hazimah Abu Hassan (eds.) (2011) *PALM SECRETS FOR BEAUTY*. MPOB, Ministry of Plantation Industry and Commodities, Malaysia
14) 小井川広志(2015)「マレーシア・パーム油産業の発展と資源利用型キャッチアップ工業化」アジア経済 56 (2), 41-71。特に、p.63 にその言及がある。

懐かしい香りを用いた回想法の効果検証および脳メカニズム解明

東北大学加齢医学研究所
大 場　健太郎

Recently, odor-evoked nostalgia gets a lot of attention from the field of both social psychology and psychological therapy, since it has positive psychological functions such as mood increment. Thus far, however, the precise neural mechanisms have not been demonstrated. We hypothesized that 1) retrieval of nostalgic memories have rewarding value and is associated with ventral striatum activity, 2) nostalgic odor has physiological effect and is associated with hypothalamus activity, and 3) the combination of nostalgic memory and odor has synergistic effect and is represented in the hippocampus as the interaction. In the current study, we addressed these hypotheses using functional magnetic resonance imaging (fMRI). Sixteen right-handed healthy older adults (M = 68.8, SD = 3.95) who have normal olfaction participated in this study. Before the fMRI experiment, participants selected two nostalgic and two familiar odors and were interviewed by the experimenter about the autobiographical memory relevant to each odor. There were two factors (memory and odor) with two levels (nostalgic and familiar) in the experimental task. During fMRI participants were asked to remember each memory cued by short "title" which was created based on the memory interview and rate the vividness and pleasantness of the memory remembered. In the behavioral level, there was significant memory*odor interaction in both vividness and pleasantness. In the neural level, as expected, we found significant 1) main effect of memory on the left ventral striatum, 2) main effect of odor on the hypothalamus, and 3) interaction on the left hippocampus. These results may suggest the neural mechanism relevant to the role of nostalgic odor on the reminiscence activities.

1．緒　言

近年、社会心理学の分野において懐かしい記憶の回想がもたらす心理的機能に関する研究が精力的に行われ、懐かしい記憶の回想は気分を改善させ、自尊心、社会的つながりの知覚、楽観性、人生への意味付けを高める等の適応的心理効果があることが明らかにされてきた[1)]。実際懐かしさは、認知症の周辺症状(抑うつや不安)の低減、または認知症予防のためアクティビティとして医療機関や地域で広く行われている、回想法という心理療法の重要な要素とされている[2)]。回想法の現場では、多くの場合昔使っていた道具や写真、音楽等の視聴覚刺激を手がかりとして過去を想起する方法が用いられている[3)]。

一方、香りによって引き起こされる懐かしさ体験は特に“プルースト効果”と呼ばれ、これまで文学や記憶心理学の分野では注目されてきたが、近年その関心は精神医学や健康科学にも広がりを見せている[4)]。香りは音楽やその他の方法よりも約2倍懐かしさ体験を引き起こすことも報告されている[5)]。これらの知見からも、回想法に懐かしい香りを取り入れることは相乗効果を生み出すと考えられるが、その効果および背景メカニズムを多角的に検証した研究はない。我々は先行研究において、視覚刺激（過去に関連する画像）を用いて懐かしい記憶回想の脳メカニズム研究を行い、記憶想起と報酬処理に関わる脳領域の協調的活動を明らかにした[6)]。そこで本研究では、嗅覚以外の感覚モダリティを用いた従来の回想に「懐かしい香り」を取り入れることが相乗効果を生み出すかどうか、心理学的・脳科学的に検証することを目的とした。

我々は回想と香りの組み合わせによる効果に関して、以下の仮説を立てた。1)懐かしい記憶の想起は報酬的価値を持つため[6)]、香りとの組み合わせによらず腹側線条体の活動が高まる、2)懐かしい香りは様々な保護的な生理作用を持つことが報告されていることから[7)]、記憶の想起意図に関わらず自律神経系や神経内分泌の中枢である視床下部の活動が高まる、3)想起時に懐かしい香りが伴うことにより記憶の検索[8)]が促進され(相乗効果)、これを反映した海馬の活動が認められる。本研究では、主観評価および機能的MRIを用いた脳活動計測の両側面からこれらの仮説の検証を行った。

2．方　法

2．1．被験者

被験者は健康な地域在住の高齢者16名(M=68.8, SD=3.95, 女性12名)であった。以下に該当する方はMRI撮像の安全面および実験課題への影響を考慮しリクルートから除外した（体内・体表の金属、開頭、開胸、開腹手術の経験、糖尿病、慢性鼻炎、呼吸器疾患、精神・神経疾患、閉所・暗所恐怖症、日常的にタバコを吸う、香りの専門家(アロマセラピスト、ソムリエ等))。嗅覚同定能力の測定(Open Essence ; 富士フイルム 和光純薬株式会社)の結果、全員がカットオフ値(7/12点)以上であった(M=9.44,

Investigation of the neural mechanism of reminiscence using nostalgic odor
Kentaro Oba
Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University

SD=0.81)。被験者には実験参加に先立ち書面および口頭で十分な説明を行い、書面で同意の確認を行った。本研究は、東北大学医学系研究科倫理委員会より承認を受けて実施した。

2.2. リクルート、香り試料の準備

香りによって自伝的記憶を思い出す人の割合は低い（16%ほど）という報告があることから[9]、香りと記憶に関するアンケート送付、電話インタビューの2段階で被験者のスクリーニングと懐かしい香りの事前聴取を行った。これらの手続きの結果に基づき、被験者ごとに懐かしい香り試料(精油や香水)を購入した。また、比較対象となる日常的な香りとして、身近な環境にある果実や植物の精油を中心に事前に香り試料を準備した。

2.3. 記憶に関するインタビュー

機能的MRI実験に先立ち、懐かしい香り／日常的に身の回りにある香りの選別と思い出される記憶の詳細を把握するために個別にインタビューを行った。リクルートの手続きで事前に個別に選別した香り試料および実験者があらかじめ用意しておいた試料を嗅いでもらい、懐かしい香りを2種類選んでもらった。そして、思い出される記憶に関連する場所、人物、状況等について詳細を語ってもらい、その内容をもとにその出来事を表す「タイトル」を作成した（例,「祖父の木工所でおがくず遊び」)。このタイトルは、機能的MRI実験において記憶を回想する手がかりとして用いた。また、コントロール刺激として、懐かしくはないが馴染み深く直近1年の出来事と関連する香りを2種選別し、その出来事についても同様に詳細を伺い「タイトル」を作成した。

2.4. 香り提示

MRI対応の香り提示装置 Olfactometer (Neuro Device)を使用してMRI内の被験者に香りを提示した。Olfactometerは、コンプレッサーから送り出した空気を香り試料の入った試験管内に送り込むことにより、最大4種類の香りと空気(ウォッシュアウト用)を送ることができる装置である。本研究では、試験管に各香り試料を染み込ませたニオイ紙(第一薬品産業株式会社)を入れた。香りの強さはニオイ紙に染み込ませる試料の量を変えることで、楽に感知できる匂い(1 無臭～4 楽に感知できる匂い～7 強烈な匂い, 7段階評価）になるように調整した。4種の香りと空気を送るチューブは独立しており、計5本のチューブの先端を酸素マスク(㈱メディカルセンス)につなぎ、被験者はそれを鼻と口が覆われるように装着した。苦しさや違和感がないことを事前に確認した。

2.5. 回想課題・機能的MRI

被験者は、MRIの中で事前インタビューの内容をもとに作成した出来事の「タイトル」を手がかりとして自伝的記憶を思い出す回想課題を行った。課題は、記憶（懐かしい, 日常）×香り（懐かしい, 日常）の二要因計画で、以下の4条件を設定した。

①懐かしい記憶×懐かしい香り
②懐かしい記憶×日常香り
③日常記憶×懐かしい香り
④日常記憶×日常香り

被験者は上記いずれかの条件でタイトルを手がかりとした回想を18秒間行い、その後思い出された記憶の鮮明度と思い出した現在の心地よさを4段階(1-4)で評価した(各4秒)。試行間には15秒間の休憩をはさみ、その間は空気を流してマスク内に残存する香りをウォッシュアウトした。回想課題はPsychoPy（University of Nottingham）で作成した。

脳活動の時系列データは3テスラMRI (Philips Achieva)を用いて取得した。側頭葉内側前部や眼窩前頭皮質等嗅覚関連領域周辺は磁化率アーチファクトの影響を受けやすいため、その影響を低減させるためにdual echoシークエンスを用いて脳機能画像の撮像を行った(TR=2,000ms, TE=13/35ms)。

取得した脳画像データは、被験者ごとに時系列での脳の位置補正、スライスタイミング補正、MNI (Montreal Neurological Institute) 標準脳座標空間への変換、スムージング処理等の前処理を行った後、脳画像のボクセルごとに各条件の回想時間と血行動態関数(刺激に対する脳血流の応答)を畳み込み積分した関数を回帰子、前処理で算出した頭部の動きを共変量とした重回帰分析を行い、各回想条件における脳活動の推定値を算出した。その後、全被験者のデータを用いて1)懐かしい記憶の主効果、2)懐かしい香りの主効果、3)懐かしい記憶と香りの交互作用の検討を行った。本研究では、各条件における効果の仮説に基づき、関心領域を対象とした解析を行った。1)では先行研究[6]で懐かしい記憶の回想で活動上昇が示されている腹側線条体[10]、2）では懐かしい香りが持つ自律神経系への作用を検討するために視床下部(Talairach Atlas)、3)では香りによる回想の促進を検討するために海馬（Automated Anatomical Labeling; AAL）を関心領域とした。以上の脳画像の分析にはSPM12（Statistical Parametric Mapping; Wellcome Center for Human Neuroimaging, UCL)を用いた。

3. 結　果

3.1. 自伝的記憶を回想させる香り

香りを嗅ぎながら過去を回想してもらう事前インタビューの結果、選別された懐かしい香り、日常の香りを表1に

示した。懐かしい香りとして上位に選ばれたのはリーフアルコール（青葉アルコール）やスギ（葉部，枝葉部）等の草や樹木の香りであり、関連する懐かしい記憶としては幼少期に草原で遊んだこと、刈った草を干して家畜の餌にしたこと、杉林から枝葉を集めてきて冬場に燃料にしたこと等が挙げられた。香水も懐かしい香りとして選ばれ、関連する記憶としてはその香水を使っていた人物との思い出が挙げられた。日常に結びついた香りとしては、ユズやグレープフルーツ等の柑橘系、ラベンダー等の植物等が選ばれ、関連する記憶としては日常の料理場面やガーデニング場面等が挙げられた。懐かしい香りと日常的な香りの印象評価（7段階）の結果、「好き」（懐かしい:M=5.25, SD =0.86, 日常：M=5.06, SD=1.15, t（15）=0.49, p=0.32）と「なじみ深さ」（懐かしい：M=5.47, SD=0.78, 日常：M=5.16, SD=0.99, t（15）=0.37, p=0.36）では有意差は認められなかったが、「懐かしさ」は懐かしい香りで有意に高い評定であった（懐かしい:M=6.19, SD=0.77, 日常:M=3.09, SD=0.71, t（15）=13.5; $p < 0.001$）。

3．2．回想による心理効果

回想課題における「記憶の鮮明度」と「心地よさ」を条件間で比較した結果、どちらの評価においても記憶と香りそれぞれの主効果は認められなかったが、交互作用が有意であった（$F(1, 15)=8.81$；$p < 0.01$, $F(1, 15)=12.1$；$p < 0.01$）。また、これらの心理指標においては、条件①と④に有意差は認められなかった（図1）。

3．3．回想課題中の脳活動

本研究で関心領域とした各脳領域（腹側線条体，視床下部，海馬）を図2に示した。まず、懐かしい記憶の想起は香りとの組み合わせによらず報酬的価値を持つという仮説のもと、腹側線条体を関心領域として懐かしい記憶の主効

表1　使用した香り一覧

懐かしい			日常		
香り試料	学名等	選択人数	香り試料	学名等	選択人数
リーフアルコール	cis-3-Hexenol	5	ユズ（果皮）	*Citrus junos*	8
スギ（葉部）	*Cryptomeria japonica*	5	グレープフルーツ（果皮）	*Citrus paradisii*	5
スギ（枝葉部）	*Cryptomeria japonica*	4	サンショウ（果皮）	*Zanthoxylum piperitum*	4
ダイダイ（果皮）	*Citrus aurantium*	3	コーヒー（豆）	*Coffea arabica*	3
ヘイ（干し草）	*Hierochloe alpina*	3	シソ	*Perilla frutescens*	3
バニラ（鞘）	*Vanilla planifolia*	2	ラベンダー	*Lavandula angustifolia*	3
モア	資生堂	2	ミズメザクラ（枝葉部）	*Betula grossa*	2
アオモリトドマツ（枝葉部）	*Abies mariesii*	1	ユリ	*Lilium*	2
ニュービーズ	花王	1	ショウガ（根茎）	*Zingiber officinale*	1
レールデュタン	ニナリッチ	1	ダマスクローズ	*Rosa damascena*	1
No.5	シャネル	1			
ミツコ	ゲラン	1			
シナモンバーク（樹皮）	*Cinnamomum zeylanicum*	1			
ヒメコマツ（木部）	*Pinus parviflora*	1			
ヒノキ（木部）	*Chamaecyparis obtusa*	1			

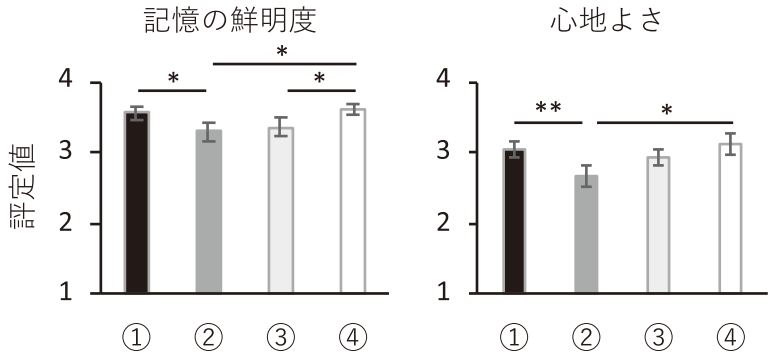


図1　回想課題の各条件における「記憶の鮮明度」と「心地よさ」の評定値
①懐かしい記憶×懐かしい香り，②懐かしい記憶×日常香り，③日常記憶×懐かしい香り，④日常記憶×日常香り（*p<0.05，**p<0.01 Bonferroni corrected, エラーバーは標準誤差を示す）

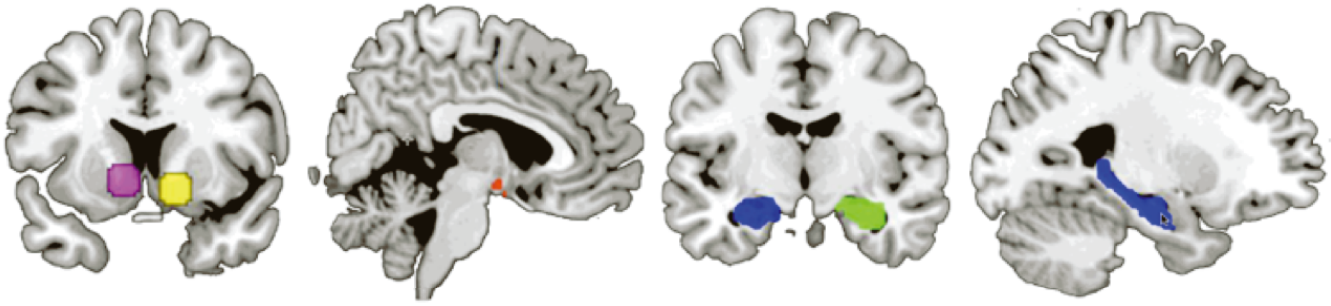


図2 脳の関心領域
左腹側線条体（紫）で懐かしい記憶回想の主効果、視床下部（赤）で懐かしい香りの主効果、左海馬（青）で記憶と香りの交互作用が認められた（pFWE < 0.05, small volume correction）。右腹側線条体（黄）, 右海馬（緑）

果（(①+②)−(③+④)）を検討した結果、左腹側線条体に有意な関連性が認められた（pFWE < 0.05, small volume correction, peak MNI座標 [−12, 12, 2]）。次に、懐かしい記憶の想起意図に関わらず懐かしい香りは生理作用を高めるという仮説のもと、視床下部で懐かしい香りの主効果（(①+③)−(②+④)）を検討した結果、視床下部に有意な関連性が認められた（pFWE < 0.05, small volume correction, peak MNI座標 [4, −4, −10]）。さらに、想起時に懐かしい香りが伴うことにより記憶の検索が促進されるとの仮説のもと、海馬を関心領域として記憶と香りの交互作用（(①−②)−(③−④)）を検討した結果、左海馬に有意な交互作用が認められた（pFWE < 0.05, small volume correction, peak MNI 座標[−14, −2, −14]）。

4．考　察

本研究では、思い出す記憶と提示する香りの組み合わせを操作することにより、香りによる回想の促進効果を主観および脳活動から検討した。

回想による心理効果（鮮明度,心地よさ）に関しては、④日常記憶×日常香り条件でも評定値が高いという結果が得られ、予想していた①懐かしい記憶×懐かしい香り条件特異的な相乗効果による交互作用のパターンとは異なるものであった。自伝的記憶の想起自体に気分調整効果があることから[11]、本研究でも日常記憶の回想が促進されることでこのような気分調整機能が強く発揮された可能性が考えられる。一方、記憶と香りが不一致となる条件②③では一致条件に比べ評定値が有意に低いという結果が得られたため、これらの条件では相乗効果は認められなかったと考えられる。これらの結果は、回想を行う際に記憶と一致する香りを用いることの有効性を示唆しているが、懐かしい記憶の回想による心理効果は多岐にわたるため[1]（自尊心、楽観性の向上など）、今回用いた二つの指標以外に関してはどのような効果の違いが見られるかについては、さらなる検討が必要である。

脳活動解析においては、予想通り腹側線条体で懐かしい記憶想起の主効果が認められた。これは、懐かしい記憶の想起は報酬的価値を持つという先行研究[6]の結果を再現する結果である。視床下部における懐かしい香りの主効果は、先行研究[7]で示されてきた懐かしい香りの生理作用を中枢神経レベルで裏付ける結果である。海馬における記憶と香りの交互作用は香りによって記憶の検索が促進している可能性を示唆している。しかしながら、海馬単独で記憶の想起プロセスが実現しているわけではないため、この知見を手がかりに今後海馬と他の領域との機能的な関連性等を検討していく必要がある。

事前インタビューにおいて被験者に選別された懐かしい香りは、集団を対象とした回想における香りの効果研究[12]と同様の香り（みかん等）がある一方、本研究の被験者特異的と思われる香り（アオモリトドマツ；学生時代の登山との関連、香水；かつて身近にいた特定の個人との関連）も認められた。このことは、回想に香りを取り入れる際、年代で共通して懐かしさを喚起させうる香りが確かに存在することを示唆する一方で、より特異的な思い出と結びついた香りを聴取することでより個別化した深い回想が可能になる可能性も示唆している。集団で回想を行う際は前者が、個別に回想（ライフレビュー）を行う際には後者が適していると考えられる。

本研究では回想における懐かしい香りの効果の神経メカニズム解明に取り組み、懐かしい記憶の報酬的価値、懐かしい香りの生理的作用、香りによる記憶検索の促進効果の神経基盤の一端が解明された。今回得られた知見をベースに、香りと記憶想起の神経メカニズムをより詳細に明らかにすることで、香りを用いた回想法に対する科学的根拠の提供につなげていきたい。

（引用文献）

1） Sedikides C, Wildschut T. Past Forward: Nostalgia as a Motivational Force. Trends Cogn Sci. 2016 May; 20(5): 319-321.

2） Yamagami T, Oosawa M, Ito S, Yamaguchi H. Effect of activity reminiscence therapy as brain-activating rehabilitation for elderly people with and without dementia. Psychogeriatrics. 2007, 7: 69-75.

3） Woods B, O'Philbin L, Farrell EM, Spector AE, Orrell M. Reminiscence therapy for dementia. Cochrane Database Syst Rev. 2018 Mar 1; 3: CD001120.

4） Herz RS. The Role of Odor-Evoked Memory in Psychological and Physiological Health. Brain Sci. 2016 Jul 19; 6(3): 22.

5） Reid CA, Green JD, Wildschut T, Sedikides C. Scent-evoked nostalgia. Memory. 2015; 23(2):157-66.

6） Oba K, Noriuchi M, Atomi T, Moriguchi Y, Kikuchi Y. Memory and reward systems coproduce 'nostalgic' experiences in the brain. Soc Cogn Affect Neurosci. 2016 Jul; 11(7): 1069-77.

7） Matsunaga M, Isowa T, Yamakawa K, et al. Psychological and physiological responses to odor-evoked autobiographic memory. Neuro Endocrinol Lett. 2011; 2(6): 774-780.

8） Svoboda E, McKinnon MC, Levine B. The functional neuroanatomy of autobiographical memory: a meta-analysis. Neuropsychologia. 2006; 44(12): 2189-208. doi: 10. 1016/j. neuropsychologia. 2006. 05. 023. Epub 2006 Jun 27. PMID: 16806314; PMCID: PMC1995661.

9） Willander J, Larsson M. Smell your way back to childhood: autobiographical odor memory. Psychon Bull Rev. 2006 ; 13(2): 240-244.

10) Diekhof EK, Kaps L, Falkai P, Gruber O. The role of the human ventral striatum and the medial orbitofrontal cortex in the representation of reward magnitude - an activation likelihood estimation meta-analysis of neuroimaging studies of passive reward expectancy and outcome processing. Neuropsychologia. 2012; 50(7): 1252-1266.

11） Josephson B. Mood Regulation and Memory: Repairing Sad Moods with Happy Memories, Cognition and Emotion, 1996, 10:4, 437-444

12） 有園博子, 佐藤親次, 森田展彰他(1998): 高齢者に対するニオイを用いた回想療法の試み.臨床精神医学, 27:63-75.

生物・化学と経営の異分野融合による若年層男性に求められる化粧品に関する研究

宇部工業高等専門学校物質工学科
廣原　志保、根岸　可奈子

The world cosmetics market is increasing year by year, and overseas there is also an increase in men's cosmetics. However, the men's cosmetics market has been sluggish in Japan. If this problem could be solved, the cosmetics industry in Japan would expand dramatically.

In this study, we take advantage of the characteristics of our students (the number of male students is large, there are students of a wide range of ages from 15 to 22 years old) and the faculty in different fields (Department of Chemical and Biological Engineerin and Department of Business Administration), He worked to identify problems with the spread of male cosmetics and to develop cosmetics required by young men. In this paper, a prototype hand cream was synthesized using oranges produced in Yamaguchi. We conducted a questionnaire evaluation using this prototype hand cream and two types of commercial products. The evaluation is conducted in the form of a questionnaire with five-point scale, mainly for those aged 15 to under 20 years.

1．緒　言

世界の化粧品市場は、年々増加傾向に見あり、海外では男性用化粧品も好調に伸びている[1)]。しかし我が国では、男性用化粧品市場は海外と異なり伸び悩んでいる[2)]。この男性化粧品普及の妨げになっている原因を見出し、その問題を解決することができれば、我が国の化粧品産業は飛躍的に拡大すると考えられる。

化粧品市場は、企業によって相違点はあるが、一般的にはスキンケア化粧品、メイクアップ化粧品、ヘアケア化粧品およびフレグランス化粧品が主要な製品カテゴリーとして挙げられ、男女とも変わらない状況である。

しかしながら男性用化粧品は、女性用化粧品とは異なり、あらゆる年齢層ですべての上述のカテゴリーを網羅しているとは言えず[3)]、また男女あるいは国により化粧に対する意識も異なっている[4)]。我が国の男性化粧品市場では、依然としてメイクアップ化粧品には一定のハードルがあり、この分野を普及させるのは困難である。

そこで本研究では、スキンケアのなかでも年齢層を問わず男性も気軽に使えるハンドクリームに焦点を当て、その開発を行った。

本校 宇部工業高等専門学校は工学系の高等教育機関であり、男子学生が多くまた15歳から22歳までと幅広い年齢層の学生が在籍している。また本校は、機械、静電気、制御、物質および経営分野の幅広い分野の学科が存在し、その専門教員が在籍している。

Study of the young group men's cosmetics by the different field fusion

Shiho Hirohara

Department of Chemical and Biological Engineering, National Institute of Technology, Ube College

そこで本研究は、上記の本校の特徴に加え物質工学科、経営情報学科の教員すなわち生物・化学、経営分野という異分野の専門教員および学生達で協力しながら、我が国の男性化粧品普及のための問題点の抽出および日本人男性が求める化粧品の開発を行った。

2．方　法

本実験では山口県美祢産のゆずおよび山口県周防産のみかんの果皮を使用しみかんオイルを抽出した。抽出したこれらの果皮オイルを用い試作品ハンドクリームを調製した。これら試作品ハンドクリームと、インターネットで人気の高い市販ハンドクリーク2種類を用い、その使用感についてアンケート調査を実施した。

2．1．果皮オイルの抽出法の最適化

果皮オイルは、細かくちぎったゆずまたはみかんの皮をまず冷凍後、蒸留水とこの冷凍果皮(約1:2、圧搾法は2:1)を家庭用ミキサーで粉砕し粉砕液を得た。これらの粉砕液を、①有機溶剤(ジエチルエーテル)による抽出法[5)]、②圧搾法および③水蒸気蒸留法[5)]の3通りの抽出法を検討し果皮オイルを得た。

2．2．果皮オイル入りハンドクリームの調製

2．1．で得られた果皮オイルを用い、ハンドクリームの調製を行い、最適な果皮オイル入りハンドクリームの成分比の条件検討を行った。

ハンドクリームは、Cafe de Savonより購入したみつろう(晒／ホワイト)と精製シアバター、無印良品より購入したピュアオイルJO（ホホバオイル)、および今回水蒸気蒸留で抽出した果皮オイルを用いて調製した。

ハンドクリームの試薬成分比は、https://felice-kaori.com/article/5555を参考にし、表1の成分比を変えたハンドクリーム作製を検討した。

まず、みつろう、シアバターおよびホホバオイルをビーカーに入れ、家庭用電子レンジで全て溶解させた。

この溶解液を約80度に冷却した後、みかんオイルを加え混合した。混合後素早く、滅菌済プラツボ5（11mL, ケーエム化学㈱）に分注した。

ゆずハンドクリームは、ゆずオイル0.5mLの量で表1 run (a)の条件で調製した。

2. 3. アンケート調査

試作品および市販品2種類の合計3種類に対し、アンケート調査(9項目)を実施した(表2)。まず、表1 run (a)で作製したゆずオイルを用いた試作品で評価を行った後、その結果を踏まえ成分比を改善し、みかんオイルを用いたハンドクリームを用いて評価を行った。

ゆずオイルを用いた試作品に対するサンプル数は87名で、そのうち15歳以上22歳未満が42.4％、また無回答および上記対象外が57.6％で、男性23名、女性59名であった。

一方、みかんオイルを使用した試作品に対するサンプル数は76名であった。このアンケートの対象年齢はすべて15歳以上22未満であった。内訳は、男性50名、女性25名および無回答1名であった。このみかんオイルを用いた試作品のアンケートについては、本研究テーマ 男性用化粧品の開発観点より、男性のデータのみを使用した。

全てのアンケートは、以下の指標について5段階評価で行った(表3)。

3. 結果および考察

3. 1. 果皮オイルの抽出法の最適化

本実験では、山口県美祢産のゆずおよび山口県周防産のみかんの冷凍果皮を蒸留水とともに家庭用ミキサーで粉砕した溶液を用いて、3種類の抽出法（①有機溶剤による抽出法[3]、②圧搾法および③水蒸気蒸留法[3]）を検討した。

抽出の結果、②の圧搾法は夾雑物が図1の写真に示すように多く、その後に水蒸気蒸留を行い果皮オイルの精製が必要であった。

一方、①、③の方法は、純粋な果皮オイル（図1）を抽出することができ、特に③の方が多く果皮オイルを抽出することができた。

3. 2. 果皮オイル入りハンドクリームの調製

表1の条件に従い、みつろう、シアバターの量を変えた4種類の条件でハンドクリームを作製した(図2)。

みつろうの量を検討したところ、みつろうの量が多くなるに従い硬いクリームになり、(a)のみつろう20gの場合、容器から取り出すことが困難なほど硬いクリームであった。

シアバターの量を検討したところ、シアバターの量が多いとべたべた感があり、男子学生には不評であった。

これらの検討より、ハンドクリームの調製条件として(b)のみつろう(g)、シアバター（g)、ホホバオイル(mL)およびみかんオイル（mL）の成分比割合は、表1 run（b）の6g、20g、40mL、0.8mLが良いことが分かった。また、ゆずオイルはみかんオイルよりも香りが強いため、0.6mL以内の量で十分な香りを示した。

表1　ハンドクリームの調製

run	みつろう(g)	シアバター(g)	ホホバオイル(mL)	みかんオイル(mL)
(a)	20	40	40	0.8
(b)	6	20	40	0.8
(c)	7	20	40	0.8
(d)	8	20	40	0.8

表2　アンケート項目

1. さらっとしている
2. 脂っぽさが気になる
3. 肌に馴染む
4. しっとりする
5. ヒビ・アカギレに効きそう
6. 自分の肌に合う
7. 使ってみたい
8. かたい
9. 好きなにおい

表3　5段階指標

① 非常にそう思う
② そう思う
③ どちらともいえない
④ そう思わない
⑤ 全くそう思わない

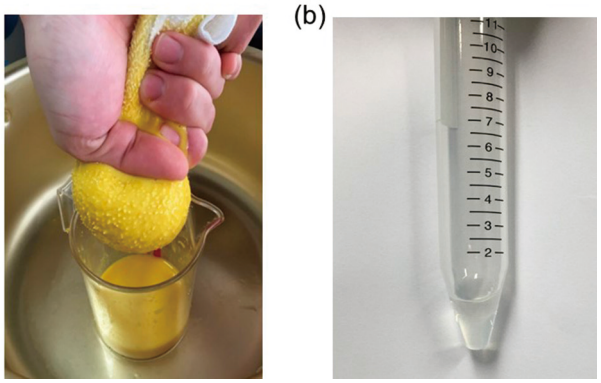


図1　圧搾法で得たみかんオイル (a) および水蒸気蒸留で得たみかんオイル (b)

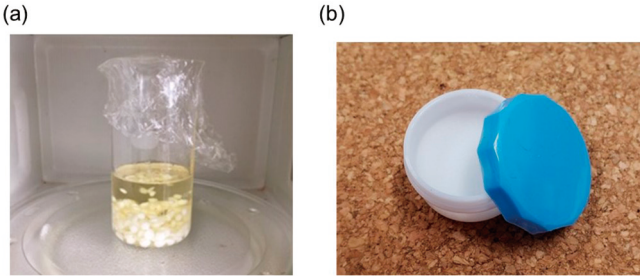


図2　ハンドクリームの作成風景 (a) および作成されたハンドクリーム (b)

3. 3. アンケート調査

まず、表1 run (a)で作製したゆずオイルを用いた試作品と、インターネットで人気の高い市販ハンドクリーク２種類を用い、その使用感についてアンケート調査を実施した。

結果を表4, 5, 6に示す。各項目について、最も回答が集中した指標を見ると、ほとんど男女差がないことが分かった。

試作品は否定的な回答は少なかったが、脂っぽさに欠けさらっとした感じという回答が多くみられた。また、アンケート項目２の「脂っぽさが気になる」については，市販品と比べ「非常にそう思う」「そう思う」が低い結果となった。

しかしながら、今後も使用したいという項目において今回作った試作品の方が市販品を上回ったことから、試作品はおおむね好評価であった。またゆずオイルのにおいは、男女とも高評価であった。一方、試作品は市販品に比べて硬いと感じる回答が多く見られた。

そこでこの試作品に対する評価を受け、表１に示すように成分比を変化させ、果皮オイルは本実験で多く得られたみかんオイルを用いた試作品ハンドクリームを用いてアンケート調査を行った。このアンケートについては、本研究テーマ 男性用化粧品の開発観点より、男性のデータのみを使用した。

結果を表7, 8, 9に示す。前述のゆずオイルを用いた試作品で問題となった市販品よりも硬いという点については、表1 run (b)の成分比組成　みつろう6g、シアバター20g、ホホバオイル40mL、みかんオイル0.8mLからなる試作品を用いることで問題点を改善することができた。

また表1 run (b)で作製した試作品は、項目２「脂っぽさ」

表4　試作品（ゆずオイル）に対するアンケート結果（男女）

		指標(%)				
		1	2	3	4	5
アンケート項目	1	18.4	46.0	12.6	18.4	0.0
	2	5.7	16.1	24.1	47.1	2.3
	3	14.9	51.7	25.3	2.3	0.0
	4	13.8	54.0	20.7	5.7	0.0
	5	13.8	29.9	47.1	3.4	0.0
	6	12.6	51.7	31.0	0.0	0.0
	7	18.4	52.9	24.1	0.0	0.0
	8	20.7	41.4	13.8	18.4	1.1
	9	42.5	42.5	10.3	0.0	0.0

表5　市販品Ａに対するアンケート結果（男女）

		指標(%)				
		1	2	3	4	5
アンケート項目	1	6.9	28.7	25.3	36.8	2.3
	2	3.4	37.9	32.2	21.8	4.6
	3	8.0	62.1	21.8	5.7	2.3
	4	11.5	69.0	11.5	6.9	0.0
	5	17.2	47.1	28.7	6.9	0.0
	6	2.3	33.3	52.9	10.3	0.0
	7	3.4	31.0	35.6	23.0	6.9
	8	5.7	9.2	29.9	52.9	2.3
	9	6.9	11.5	24.1	40.2	16.1

表6　市販品Ｂに対するアンケート結果（男女）

		指標(%)				
		1	2	3	4	5
アンケート項目	1	8.0	27.6	19.5	40.2	2.3
	2	6.9	33.3	26.4	27.6	2.3
	3	5.7	48.3	26.4	13.8	1.1
	4	12.6	55.2	21.8	8.0	0.0
	5	6.9	43.7	39.1	8.0	0.0
	6	5.7	27.6	47.1	17.2	0.0
	7	2.3	32.2	41.4	19.5	2.3
	8	10.3	21.8	21.8	41.4	2.3
	9	2.3	14.9	47.1	27.6	5.7

表7　試作品（みかんオイル）に対するアンケート結果（男女）

		指標(%)				
		1	2	3	4	5
アンケート項目	1	14.0	50.0	24.0	10.0	0.0
	2	12.0	26.0	32.0	26.0	4.0
	3	14.0	50.0	28.0	8.0	0.0
	4	16.0	58.0	20.0	6.0	0.0
	5	10.0	34.0	48.0	8.0	0.0
	6	14.0	40.0	36.0	10.0	0.0
	7	10.0	49.0	30.0	14.0	0.0
	8	0.0	26.0	26.0	40.0	8.0
	9	34.0	34.0	20.0	10.0	2.0

表8　市販品Ａに対するアンケート結果（男）

		指標(%)				
		1	2	3	4	5
アンケート項目	1	8.0	27.6	19.5	40.2	2.3
	2	6.9	33.3	26.4	27.6	2.3
	3	5.7	48.3	26.4	13.8	1.1
	4	12.6	55.2	21.8	8.0	0.0
	5	6.9	43.7	39.1	8.0	0.0
	6	5.7	27.6	47.1	17.2	0.0
	7	2.3	32.2	41.4	19.5	2.3
	8	10.3	21.8	21.8	41.4	2.3
	9	2.3	14.9	47.1	27.6	5.7

表9　市販品Ｂに対するアンケート結果（男）

		指標(%)				
		1	2	3	4	5
アンケート項目	1	18.0	36.0	26.0	20.0	0.0
	2	8.0	34.0	18.0	36.0	4.0
	3	14.0	54.0	28.0	4.0	0.0
	4	24.0	52.0	16.0	8.0	0.0
	5	22.0	28.0	44.0	6.0	0.0
	6	18.0	36.0	26.0	24.0	0.0
	7	14.0	36.0	26.0	24.0	0.0
	8	6.0	16.0	22.0	50.0	6.0
	9	2.0	22.0	58.0	14.0	4.0

については市販品よりも「非常にそう思う」という回答が増加した、においについては、ゆずオイルを用いた場合と同様、みかんオイルでも市販品よりも高評価であった。

4．総　括

本研究では、スキンケアのなかでも年齢層に問わず男性も気軽に使えるハンドクリームに焦点を当て、本校宇部工業高等専門学校の学生達の特色（男子学生が多い、幅広い年齢層、運動系クラブが多い）と異分野（経営情報学科、物質工学科）の専門教員という利点を生かし、男性化粧品の普及への障害すなわち問題点の抽出や若年男性が求める化粧品の性質や性状などを経営学の観点から分析し、試作品ハンドクリームを作製した。

アンケートの結果、男女差はほぼ見られなかった。また、表1 run (b)の組成（みつろう6g、シアバター20g、ホホバオイル40mL、みかんオイル0.8mL, ゆずオイル0.6mL）で作製した試作品が高評価を得た。

また、みかんのにおいが高評価であったことから、冬場に多く食べられるみかん皮を再利用できることが分かった。教育的な面からは学生達が積極的に、最適な果皮オイル抽出法やハンドクリームの最適な試薬組成の検討など、自らかんがえ改善活動に取り組む姿勢が見られた。

今後は、ハンドクリームの成分を変更させよりよい男性用ハンドクリームの開発を行うとともに、アンケートサンプル数を全学に拡大していく。

謝　辞

本研究は公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団よりご援助いただき、実施いたしました。この場をお借りして、厚く御礼申し上げます。

（引用文献）

1） 日本貿易振興機構,「ジェトロセンサー」(2014/02).
2） 矢野経済研究所,『化粧品・マーケティング総監2018年版』, 2018.
3） 西岡敦子,「男性の化粧は受け入れられるのか―男性の化粧行動から―」, 繊維製品消費科学, **54**(**4**), 332-338 (2013).
4） 村澤博人, 大坊郁夫, 趙鏞珍,「日本人と韓国人の化粧観の国際比較研究　男女学生のアンケート調査から」, コスメトロジー研究報告, **13**, 38-47 (2005).
5） 磯部稔, et al., フィーザー／ウィリアムソン有機化学実験書 原書8版, 丸善出版株式会社, 2000.

顔面神経麻痺患者に対するメーキャップ治療の有効性の検討

北海道大学大学院医学研究院耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室

藤原　圭志

Objectives: To investigate the effectiveness of make-up therapy for patients with facial nerve palsy.
Methods: Seven female patients with facial nerve palsy who received specialist make-up therapy were enrolled. The objective of the make-up therapy was to obtain a symmetrical facial appearance.
Results: Overall score for the Facial Clinimetric Evaluation (FaCE) scale was significantly improved after make-up therapy. There was a tendency for symptoms of depression to be improved among patients after make-up therapy.
Conclusion: Make-up therapy to improve the symmetry of facial appearance could afford a non-invasive and low-cost treatment for patients with facial nerve palsy, especially in terms of patient quality of life and psychological condition.

1．緒　言

顔面神経麻痺の後遺症は患者の生活の質（Quality of Life：QOL）に大きな影響を与え、特に女性において、QOLの低下が大きいことが報告されている[1]。一般に、後遺症に対しては、形成手術やボツリヌス毒素治療、ミラーフィードバックなどのリハビリテーションが用いられる[2, 3]。過去の顔面神経麻痺患者に対するメーキャップ治療の報告[4]では、精神面への有効性が示されており、また、顔面の色素沈着に対してメーキャップを指導したところ、うつ症状が改善したとする報告もある[5]。今回我々は、顔面神経麻痺患者のQOLや精神面に対するメーキャップ治療の有効性について検討したので報告する。

2．方　法

対象は、当科顔面神経外来を受診し、メーキャップ治療を施行された女性顔面神経麻痺患者7例である。年齢は26-64歳（中央値：46歳）、疾患の内訳はBell麻痺1例、Ramsay Hunt症候群3例（Zoster sine herpeteを含む）、耳下腺癌2例、顔面神経鞘腫1例である（表1）。顔面神経麻痺の評価は柳原法およびSunnybrook法を用いて行った。メーキャップ治療は、安静時非対称の軽減を目的に、眉毛の高さ、瞼裂の幅、鼻唇溝の深さ、口角偏位に特に留意した指導がなされた。メーキャップ治療自体は顔面神経麻痺の発症早期から施行可能ではあるが、麻痺の回復による精神面への影響を除外するために、症状が固定したと考えられた後にメーキャップ治療を施行した症例を対象とした。

Make-Up Therapy for Patients With Facial Nerve Palsy

Keishi Fujiwara

Department of Otolaryngology-Head & Neck Surgery, Faculty of Medicine and Graduate School of Medicine, Hokkaido University

QOLの評価としてはFaCEスケール[6]、精神面の評価としては、うつ状態の評価にうつ性自己評価尺度（Self-rating Depression Scale：SDS）[7]を用いた。SDSは20問の設問からなり、各1-4点、合計20-80点となり、点数が高いほど抑うつ傾向が強いと評価される。点数によりGroup1（40点未満：正常）、Group2（40点以上50点未満：軽度抑うつ）、Group3（50点以上：中等度抑うつ）の3群に分類された。メーキャップ治療前と治療後6ヶ月の時点でFaCEスケールとSDSの評価を行った。Wilcoxonの符号付順位検定を用いて統計学的検討を行った。

3．結　果

3．1．FaCEスケール

治療前のFaCEスケールは19～50点（中央値48点）、治療後は24～59点（中央値51点）で、統計学的に有意に改善していた（図1）。社会活動スコアは7例中5例において改善が認められた。

3．2．SDS

データ不十分の1例を除く6例において検討を行った。治療前はGroup1が1例、Group2が4例、Group3が1例であった。統計学的有意差は認めなかったものの、6例中4例でSDSスコアの改善がみられた（図2）。治療後にはGroup3の1例がGroup2へ、Group2の2例がGroup1へと改善した。

3．3．重症度とメーキャップ治療の効果

7例を安静時非対称の重度群（Sunnybrook法　安静時非対称スコア10点以上）の3例と軽度群（同スコア10点未満）の4例の2群に分けて検討したところ、FaCEスケール、SDSスコアとも2群間に大きな差はみられなかった。しかし、SDSが唯一悪化した症例では安静時非対称スコアが15点と非対称の強い症例であった。

表1　患者背景

症例	年齢	疾患	患側	SB: Movement	SB: Resting	SB: Synkinesis	SB: Composite	眉毛の非対称
1	53	Bell 麻痺	R	68	15	7	46	+
2	64	Ramsay Hunt 症候群	L	56	15	7	34	-
3	50	顔面神経鞘腫	L	48	5	1	42	-
4	46	耳下腺癌	R	80	0	3	77	+
5	42	Ramsay Hunt 症候群	R	56	5	4	47	+
6	36	Ramsay Hunt 症候群	L	85	5	7	73	-
7	26	耳下腺癌	R	72	10	0	62	+

SB: Sunnybrook スコア

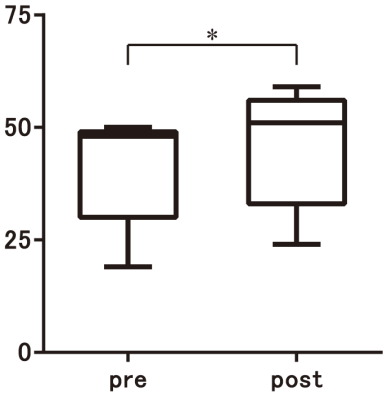


図1　治療前後のFaCEスケールの比較

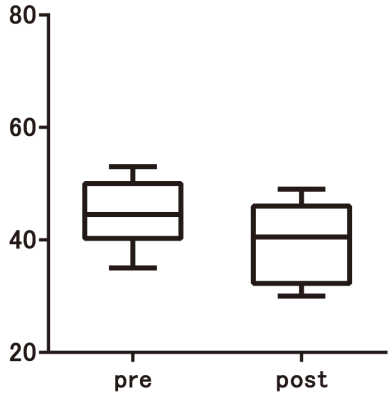


図2　治療前後のSDSスコアの比較

4．考　察

顔面神経麻痺患者における後遺症は、患者のQOLに大きな影響を与え、精神面への影響も大きいと考えられる。これまでに顔面神経麻痺患者の精神面の変化を治療前後で評価した研究はほとんどみられないが、本検討によってメーキャップ治療が顔面神経麻痺患者のQOLや精神面へ有効な可能性が示された。ただし、安静時非対称の強い症例ではSDSスコアの改善を認めず、重症例に対してメーキャップ治療単独での治療は困難である可能性がある。

顔面神経麻痺患者のQOLを評価するFaCEスケールの治療前後での有意な改善が認められ、メーキャップ治療が顔面神経麻痺患者のQOLを改善することが示された。特に、外出を避けている、など社会活動に与える影響を軽減させる効果が期待できると考えられる。医療者側による顔面神経麻痺の評価は、患者側の評価とは必ずしも一致しないと報告されており[8]、QOLの低下の程度は顔面神経麻痺の重症度からは予測できないとする報告もある[9]。医療者側は麻痺の重症度だけではなくQOLの評価も行い、適切な対応を取ることが求められる。

Kanzakiらは、2例の女性顔面神経麻痺患者に対してメーキャップ治療を施行し、うつ状態や劣等感、神経質な状態が軽減され、社会的活動性が増加したと報告している[4]。本検討でもうつ状態を評価するSDSスコアが改善する傾向を認め、同様の結果が得られている。Hospital Anxiety and Depression Scale（HADS）を用いて、顔面神経麻痺非治癒例の精神状態とFaCEスケールについて検討したところ、不安やうつのスコアとFaCEスケールに有意な相関を認めたとする報告[10]もあり、精神状態を改善させることがQOLの改善につながる可能性が示唆される。

なお、本報告書に記載した結果を含む内容で、2019年に論文発表した[11]。

謝　辞

本研究をサポートしていただいた公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深謝致します。

（引用文献）

1）Kleiss IJ, et al: Health-related quality of life in 794 patients with a peripheral facial palsy using the FaCE Scale: a retrospective cohort study. Clin Otolaryngol 40 : 651-656. 2015

2）May M, et al : Bell's palsy: management of sequelae using EMG rehabilitation, botulinum toxin, and

surgery. Am J Otol 10 : 220-229. 1989
3) Nakamura K, et al: Biofeedback rehabilitation for prevention of synkinesis after facial palsy. Otolaryngol Head Neck Surg 128 : 539-543. 2003
4) Kanzaki J, et al: Effect of corrective make-up training on patients with facial nerve paralysis. Ear Nose Throat J 77 : 270-274. 1998
5) Wright ET, et al: Some psychological effects of cosmetics. Percept Mot Skills 30 : 12-14. 1970
6) Kahn JB, et al: Validation of a patient-graded instrument for facial nerve paralysis: the FaCE scale. Laryngoscope 111 : 387-398. 2001
7) Zung WW: A SELF-RATING DEPRESSION SCALE. Arch Gen Psychiatry 12 : 63-70. 1965
8) Ng JH, et al: The use of the facial clinimetric evaluation scale as a patient-based grading system in Bell's palsy. Laryngoscope 123 : 1256 -1260. 2013
9) Lee J, et al : Assessing impairment and disability of facial paralysis in patients with vestibular schwannoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 133 : 56-60. 2007
10) Diaz-Aristizabal U, et al: Correlations between impairment, psychological distress, disability, and quality of life in peripheral facial palsy. Neurologia 34:423-428. 2019
11) Fujiwara K et al: Make-Up Therapy for Patients With Facial Nerve Palsy. Ann Otol Rhinol Laryngol 128:721-727. 2019

化粧がもたらす社会的効用 ― その神経基盤を探る

福島県立医科大学医学部システム神経科学講座
藤原　寿理

Cosmetic studies have drawn many attentions not only in beauty business but in social psychology field. Previous studies indicated that wearing makeup can increase an individual's quality of life and decision confidence. However, it remained unknown where in the brain represent these makeup effects, and how social information such as majority or minority impacts decision confidence. Here, we addressed this open question using fMRI. Students who wear makeup habitually participated in the study. The experiment was performed on two different days, once with and once without make up. In the fMRI scanner, participants engaged in commonly used binary decision tasks and provided a confidence rating regarding their decision. We compared the brain activation related to confidence both with/without make up and with/without social information. Behaviorally, decision accuracy in the discrimination tasks did not differ across conditions. However, decision confidence significantly increased both in the makeup condition and social majority condition compared to no-makeup condition and no-influence condition. In the brain, at the time of the confidence rating, we found that medial prefrontal cortex underpin the decision confidence and basal ganglia-prefrontal network enhance this confidence by being social majority and waring makeup.

1．緒　言

リハビリメイクのように、事故や手術などで外観に損傷を負った人が化粧をすることでQOL（心の健康度）が向上すること、また社会行動に自信を持つことが知られている。このように化粧が外見の審美性だけでなく内面的な自信や満足など社会行動にポジティブな影響をもたらすことから、化粧の社会的効用に期待が高まっている。行動学的先行研究により、化粧をする人ほど社交性が高く、また自己に対する自信が高いことが示されている[1)]。近年、藤原（2017）は同一被験者に対して化粧有無の両条件下におけるQOLや自信を直接比較し、化粧行為が顕在的にも潜在的にも社会行動にポジティブな効用を与えることを示した[2)]。さらに、自分が少数派か多数派かといった社会的要因を考慮した場合、自己の意思決定に対する自信は他者との一致度に影響を受け変化することも示した[3)]。一方、機能的磁気共鳴画像（fMRI）法を用いた先行研究によると、認知課題解答後の自信を客観的に判断するメタ認知能力は、課題の正答率に関わらず単独で計測可能であり脳内で独立して表現されていることが示されている[4)]。しかしながらこれまでに化粧がもたらす自信およびその自信が社会的影響（他者との一致度）によりどう変化するかについてのfMRI研究は未だ行われてこなかった。本研究では化粧の有無で意思決定に対する自信がどう変化するかについて社会的影響の有無も含めて行動学的および神経科学的に検討した。

Neural mechanisms of social utility by wearing makeup - fMRI study

Juri Fujiwara

Fukushima Medical University School of Medicine, Department of Systems Neuroscience

2．方　法

2．1．被験者

日常的に化粧習慣のある健常女子学生15名（平均年齢22.3 ± 4.9歳）を対象に実験を行った。すべての被験者について、神経・精神疾患の既往、体内金属がないことを確認し、実験の趣旨、内容、fMRI実験に伴いうる危険性について十分な説明を行い、本人の自由意志に基づき文書による参加同意を得た。

2．2．実験手順

実験は同一被験者に対し化粧の有無別に2日間行った。1日目と2日目の間には1週間空け、化粧有無の順番は被験者ごとランダムにした。実験当日、被験者は化粧の有無いずれかの条件で朝から過ごし、午前中に一度実験者が化粧有無の確認を行った。被験者は再度夕方に実験室にて化粧有無の確認を受け、TDMS二次気分尺度質問紙への記入およびfMRIスキャナ内にて二者択一弁別課題と自信度評価を行った。実験1日目と2日目の弁別課題は難易度を揃え、被験者間でランダムな順番にした。

コンピュータを用いた課題は、人物や家屋の写真を用いた濃淡の弁別およびランダムドットを用いた左右の動き弁別から構成され、いずれも難易度を高く設定した。被験者は、弁別課題の解答直後に一問ごと解答への自信度を評価した（社会的影響なし課題）。課題の半分では、弁別課題の解答後に他の被験者30名との一致度を円グラフで呈示し、社会的少数／多数の影響が自信に及ぼす影響についてあわせて検討した（社会的影響あり課題，図1）。社会的影響に用いた一致度は実験的に操作した値であり、それぞれ11、22、33、44％を少数派、55、66、77、88％を多数派

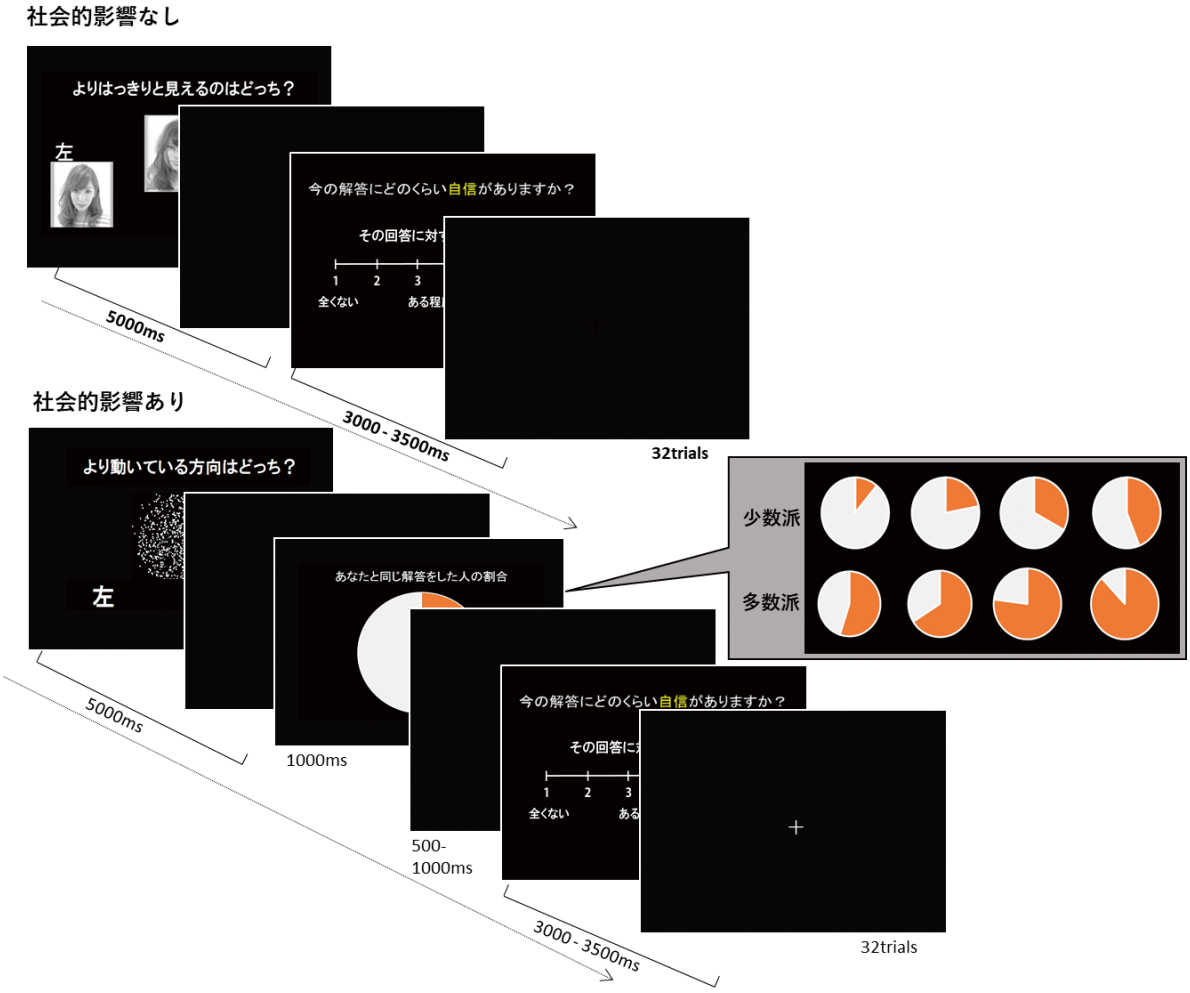


図1　fMRI実験課題

としランダムな順番で呈示した。弁別課題はコンピュータ上で作動するPresentationソフトウエア（Neurobehavioral Systems Inc.）を用いて作成した。弁別課題の解答時間は5秒以内、自信度は3秒以内と定め、被験者になるべく早く正確に答えるよう指示した。反応は被験者手元のボタン押しにより得た。解答および反応時間はコンピュータに記録し、解析に用いた。課題遂行中の脳活動は全て記録し、自信度評価のタイミングにおける脳活動を条件ごとに分けて比較検討した。fMRI撮像は福島県立医科大学内のPET-MRI（SIEMENS Biograph mMR 3T）にて行い、脳機能データの解析にはMATLAB（MathWorks）上で動作するspm12（https://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/）ソフトウエアを用いて行った。行動データの統計解析には市販のソフトウエア（GraphPad Prism5, GraphPad Software, Inc.）を使用し、被験者内で対応のある両側t検定あるいは分散分析を行った。グラフ中に示したエラーバーは被験者15名の標準誤差である。

3．結　果

3．1． 被験者が1日中化粧をした状態あるいは化粧をしていない状態で過ごした実験当日の夕方の気分をTDMS二次元気分尺度質問紙にて計測した。化粧有無の条件間で気分状態に違いがみられるかについて比較検討した。その結果を図2に示す。

化粧ありの状態で1日を過ごすことにより、化粧なしの状態で1日を過ごすことに比較して安定度（落ち着いた状態である）および快適度が有意に高くなることが示された（安定度：$t(14) = 2.5, p < .05$, 快適度：$t(14) = 2.3, p < .05$）。

また被験者の個別のデータを条件ごとにプロットしてみると、被験者が化粧なしの場合はほぼ平常心エリアに該当するのに対し、化粧ありの場合では活動に適した気分状態にあることが分かった（図3）。

3．2．二者択一弁別課題と自信度評価

fMRIスキャナ内にて、化粧の有無とは直接関係のない二者択一の弁別課題を行わせ、各問に対し自分の解答にどれくらい自信があるかを聞いた。その正答率と自信度について正答誤答別に図4に示す。

正答率に関して条件間の差はみられなかった。一方、自分の解答に対する自信の度合いは正答、誤答に関わらず化

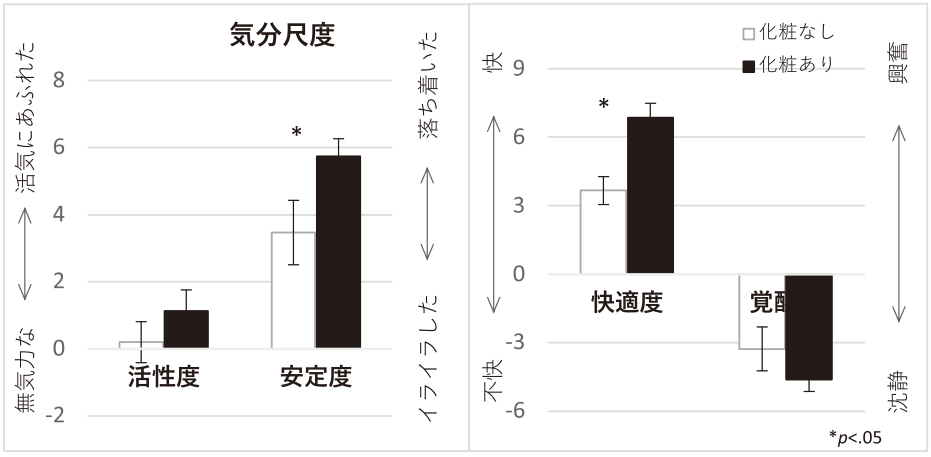


図2　二次元気分尺度

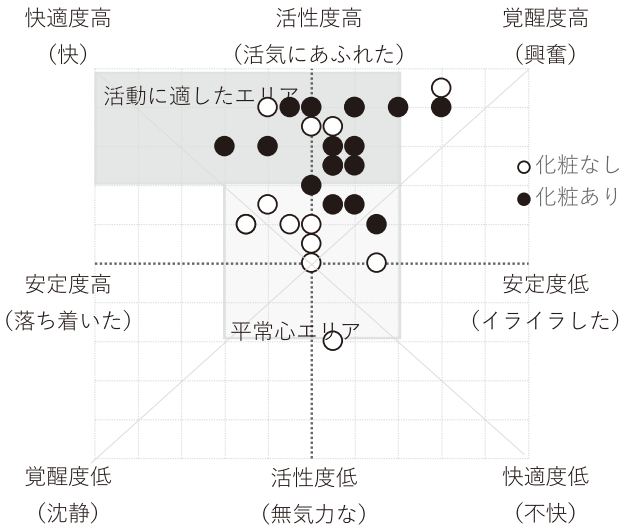


図3　二次元気分尺度（個別データ）

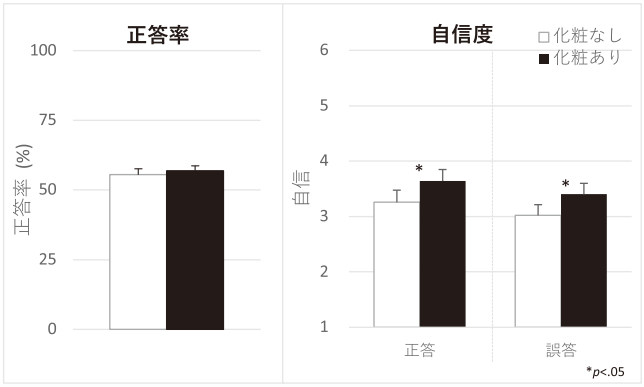


図4　行動データの結果

粧なし条件に比べて化粧あり条件で有意に高くなることが示された（正答：t（14）=2.1, p < .05, 誤答：t（14）=2.2, p < .05）。弁別課題および自信度評価の反応時間に条件間での有意差はみられなかった。

社会的少数／多数派の影響別にみると、正答率に差はないものの、自信度評価に関しては化粧の有無に加えてさらに多数派であることが自信を有意に高めることが示された（図5右上，化粧の有無：F（1,84）=14.1, p < .0005，社会的影響：F（2,84）=10.0, p < .0001，下位検定における条件間比較のp値はグラフ内に記載）。さらに、社会的環境下での自信度を正答／誤答別に比較すると、誤答に比べて正答に対する自信が化粧ありの場合に有意に増加した（影響なし：t（14）=2.1, p < .05，少数派：t（14）=4.0, p < .005，多数派：t（14）=3.0, p < .05）。化粧による自信の増加は特に少数派の場合において顕著であった。一方、誤答への自信度は社会的な影響による差はなく、影響なし条件でのみ化粧による自信の増加がみられた（影響なし：t（14）=3.3, p < .005）。

3．3．自信度に関わる脳活動

まず、fMRIスキャナ内にて行った弁別課題中の、自信度評価のタイミングにおける脳活動データについて、化粧の有無条件を比較した。化粧あり条件で化粧なし条件に比べて有意な賦活が認められた脳領域は、背内外側前頭前野（DMPFC, DLPFC）および前頭弁蓋部（Operculum）であった。一方、中脳（Midbrain）においては化粧ありの条件で有意に低い賦活が認められた（図6，いずれの賦活もp <0.001 uncorrected）。

次に社会的少数／多数派の影響別にみると、多数派の場合に自信度評価において線条体（Striatum）、内側前頭前野（mPFC）、外側前頭眼窩部（lOFC）が賦活し、その賦活は化粧なしに比べて化粧ありでやや強いことが示された（図7上段，p <0.001 uncorrected）。

一方、両側の島皮質（Insula）および海馬（Hippocampus）

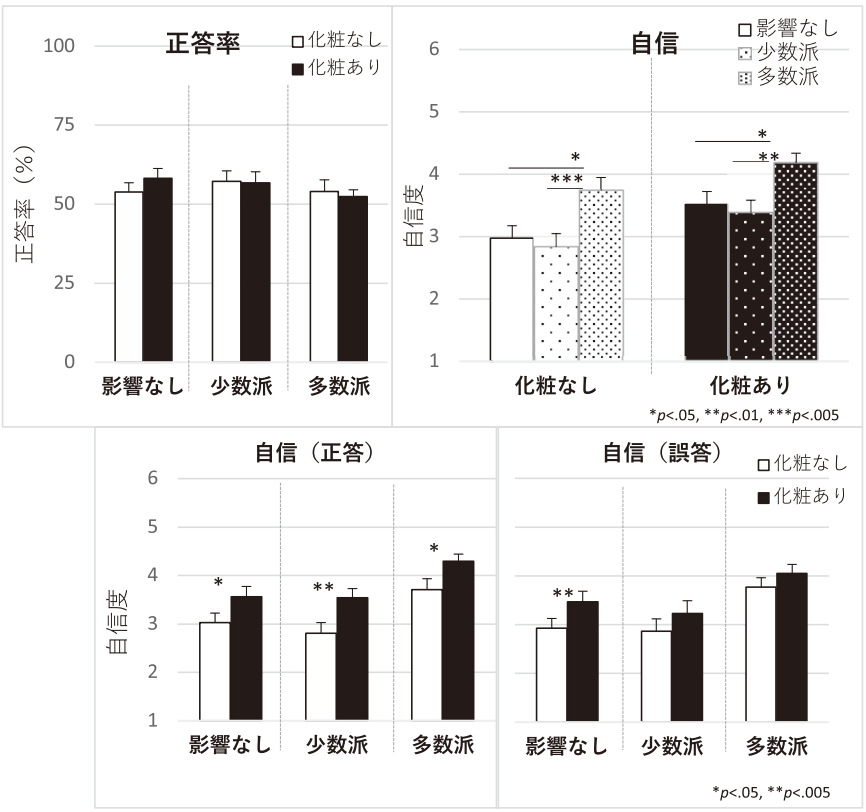


図5　行動データの結果（社会的影響条件下）

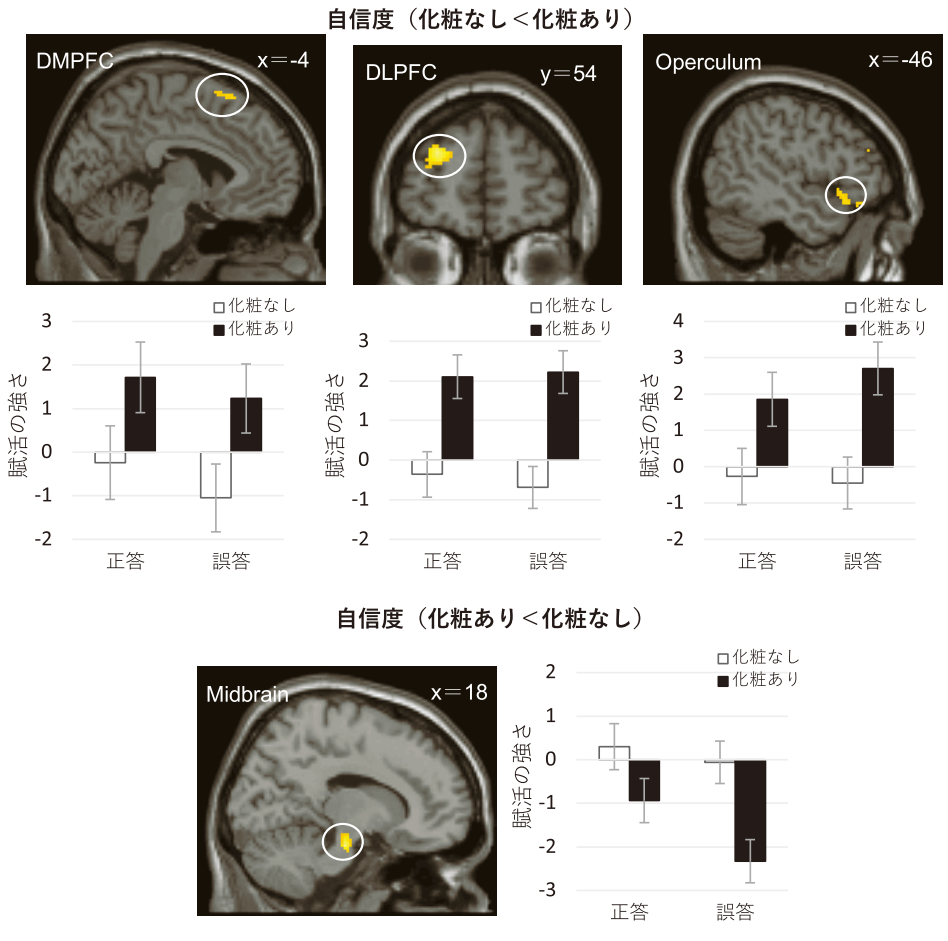
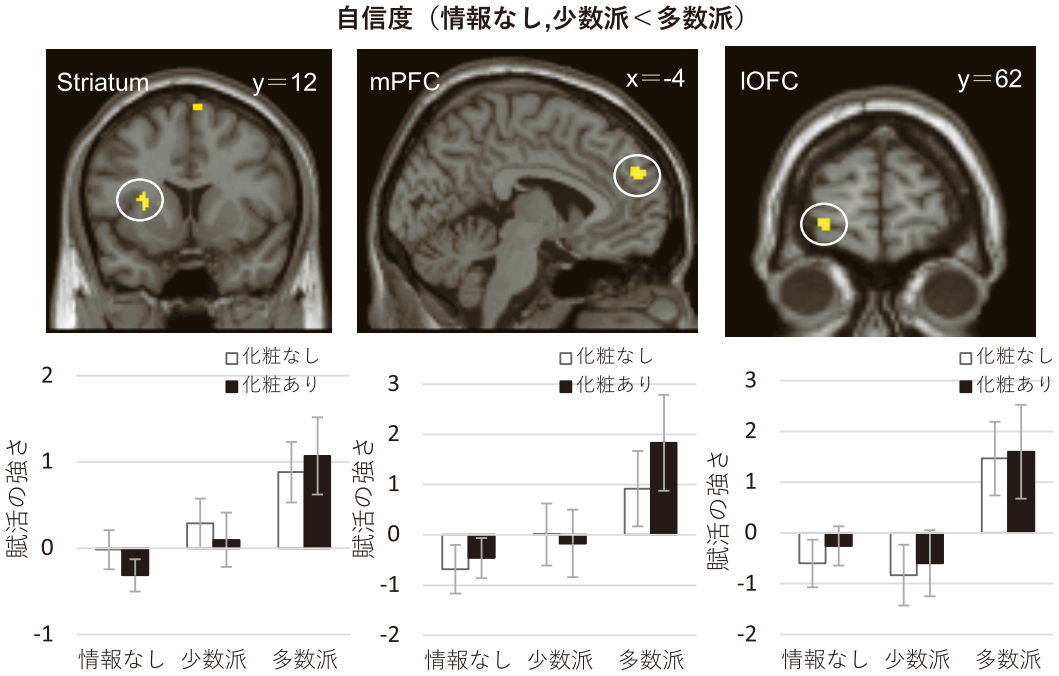


図6　化粧と自信に関わる脳活動



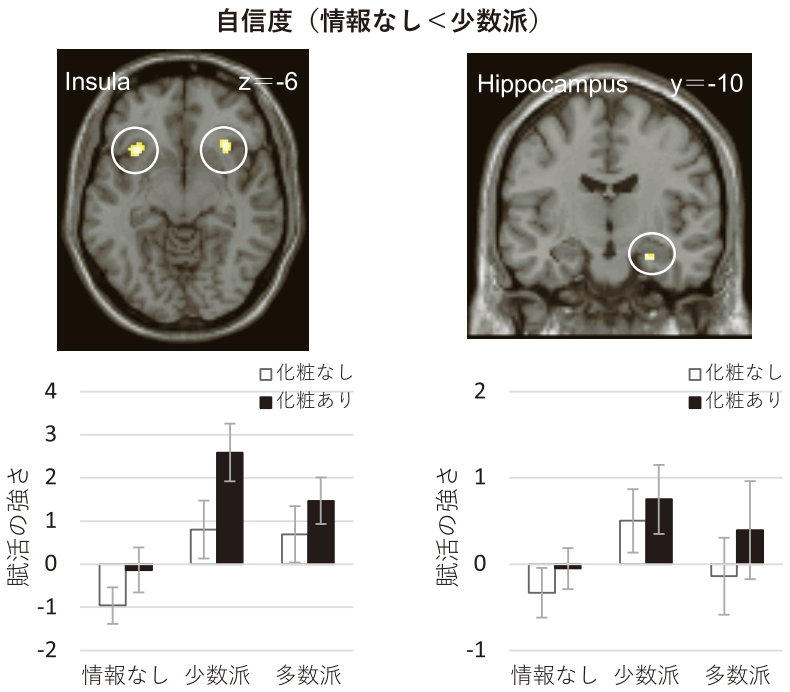


図7　化粧と自信に関わる脳活動（社会的影響条件下）

においては、情報なし（コントロール）条件に比べて少数派の時に賦活し、またその賦活は化粧なしに比べて化粧ありでやや強いことが示された（図7下段，$p < 0.001$ uncorrected）。

4．考　察

本研究により、日常的に化粧をする習慣のある健常の成人女性では、化粧をしている状態としていない状態で気分状態が異なることが示された。化粧をしていない状態では平常心であった気分状態が、化粧をすることにより活動に適した快適で安定した気分状態へと変化することが示された。これにより、化粧が内面の気分状態にポジティブな影響を与えることが明らかになった。

本研究ではfMRIスキャナ内で二者択一の弁別課題を行うことにより、被験者の意思決定に対する潜在的な自信およびそれに関わる脳活動の計測を試みた。弁別課題には、二枚の写真の濃淡や動きの左右方向を弁別させるという難易度の高い課題を用意した。したがって解答に対する自信

を認知することは課題同様に難しいことが予想された。結果、正答率はチャンスレベルである50％よりもやや高い値であったが、化粧有無の条件間では差がなく、いずれの条件でも難しい弁別課題であり、正答かどうかを予期することは困難であったことが示された。それに対して自信の度合いは、化粧あり条件の方がなし条件に比べて有意に高く、化粧をして過ごすことが判断の難しい問題の解答に対して高い自信を持つことにつながる可能性が示唆された。

行動データで有意差のあった自信度について脳活動を比較した結果、化粧あり条件で化粧なしに比べて有意な賦活が認められた脳領域は、背内外側前頭前野および前頭弁蓋部であった。背内外側前頭前野領域は、先行研究で示されているメタ認知能力（自己の意思決定の正誤を正確に判断できているかどうか）の高さと関係のある賦活領域と一致した[4)]。また、前頭弁蓋部はポジティブな情動情報に関与していることが知られており[5)]、これらの領域は、化粧をすることにより向上した自信の神経科学的背景になっていることを示唆する。一方、化粧ありの条件で特に誤答につながる解答に対する自信で低い賦活が認められた中脳は報酬関連領域として知られており、間違った解答への自信を評価することが報酬低下を示唆し、化粧をしている際はさらにその賦活が顕著になることが明らかになった。

社会的環境要因を加え、自己の意思決定が社会的に少数派なのか多数派なのかに分けて自信の変化を調べた結果、少数派に比べて多数派の場合において自信が高まり、化粧をすることがその自信を助長することが示唆された。脳内では、多数派の場合に自信度評価の際に線条体、内側前頭前野、外側前頭眼窩部が賦活したが、いずれも先行研究で報酬、メタ認知領域、価値判断として知られている領域であり[4-7)]、化粧をすることにより向上した自信が、多数派であることを受けさらに社会的な価値が上乗せされ、それに関わる脳領域がネットワークとして関与したことが示唆された。一方、少数派の場合にはネガティブな情動や痛みに関連した領域として知られる島皮質の賦活や記憶に関係した領域である海馬の賦活が有意に認められた。このことから、少数派であることが自信を答える際にネガティブな情動を喚起し、また自分の解答について振り返るために記憶を参照したことが示唆された。またそれら賦活は化粧なしに比べて化粧をしている際はさらに顕著になったことから、基本的な自信に関わる神経ネットワークは化粧や社会的環境に応じて強化される可能性が示唆された。これらの結果から化粧という行為が行動学的だけではなく神経科学的な側面からも気分状態や自信をポジティブな方向へ高めるといった社会的効用を与えることが示唆された。

5．総　括

本研究は、女性が日常的に経験する、化粧をすることで自分に自信が持てるという現象の神経科学的根拠を明らかにする点で社会的に意義があるものであった。化粧をすることで向上することが示された「自信」という内面の社会的効用は、より高次な価値判断に関わっていると考えられる前頭前野領域で表現されていることが明らかになった。化粧行動と共に意識的にこの領域の賦活を高めることができれば、自分に自信が持てるような生活の提供を可能にするかもしれない。また本研究の成果は、リハビリメイクのように化粧を用いることでQOLの向上を図る医療の現場だけでなく、美容・服飾業界をはじめ、化粧品の開発、宣伝や販売促進の現場において、さらには就職活動をはじめ高いコミュニケーション能力を必要とするような現場においても将来的な戦略を提供することにつながる発展性のある研究であったと考えられる。

謝　辞

本研究の遂行にあたり、助成をして下さいましたコーセーコスメトロジー研究財団に深く感謝いたします。助成金により遂行された研究成果は今後国内外の学会で発表させていただくとともに、速やかに論文として国際学術雑誌に投稿し、科学の発展に寄与することを目指します。

（参考文献）

1） Miller, L. C., & Cox, C. L.（1982）. For appearances' sake: Public self-consciousness and makeup use. *Pers Soc Psychol Bull*, 8, 748-751.
2） 藤原 寿理. 化粧がもたらす自己の価値および社会行動における価値の変化－行動学的検討.（2017）コスメトロジー研究報告. 25: 170-175.
3） Fujiwara J, Tobler PN, Eifuku S. Being in a social majority enhances decision confidence and activates frontostriatal neuroarchitecture.（2019）. *Society for Neuroscience* abstract.
4） Fleming SM, Huijgen J & Dolan RJ.（2012）. Prefrontal contributions to metacognition in perceptual decision making. J. Neurosci. 32, 6117-6125.
5） Fujiwara J, Tobler PN, Taira M, Iijima T, Tsutsui K.（2009b）. Segregated and integrated coding of reward and punishment in the cingulate cortex. *J Neurophysiol.* 101 (6) : 3284-93.
6） Vogt, B. A.（2005）. Pain and emotion interactions in subregions of the cingulate gyrus. *Nat Rev Neurosci* 6: 533-544.
7） Howard JD, Gottfried JA, Tobler PN, and Kahnt T.（2015）. Identity-specific coding of future rewards in the human orbitofrontal cortex. *PNAS* 21, 112 (16) 5195-5200.

ハイブリッド相同モデルによる result-oriented な顎顔面手術シミュレーション法の開発

九州大学大学院歯学研究院口腔顎顔面病態学講座口腔顎顔面外科学分野

山田　朋弘

A homologous model that converts the surface shape of a living body consisting of a huge point cloud into a small number of parameters (principal component vectors) reflecting anatomical features. In this study, homologous model was applied to the morphology of the facial surface and jawbone and was used in the simulation of oral and maxillofacial surgery, especially jaw deformity (orthognathic) surgery. From the aimed facial form assumed in advance, we tried to make a prediction model for hard tissue surgery for each patient.

Prior to model creation, the reproducibility of anatomical landmarks of facial soft tissue was verified. The subjects were 10 healthy adults. When reproducibility was examined using ICC (intra-class correlation coefficients), 11 reliable landmarks were confirmed.

Based on the CT data of a healthy person (TY), a homology model of hard and soft tissues with 3187 vertices was created as a hybrid homologous model. Using this as a template, a hybrid homologous model of jaw deformity patients with facial asymmetry was created.

The difference between the hard tissue morphology predicted from the amount of change in the jawbone calculated from the aimed facial form of the soft tissue, and the actual post-operative hard tissue morphology had a difference of approximately 5 mm in the mandibular ramus and the lateral part of the chin, which remains asymmetry after the operation.

The result-oriented hard tissue simulation for orthognathic surgery obtained from the aimed soft tissue morphology was useful for planning surgery and discussing postoperative problems.

1．緒　言

顎変形症をはじめとする顎顔面手術では、治療目的が咬合の改善による咀嚼力の向上や歯周組織の健全化であることが多い。しかしながら、副次的な目的の一つにバランスのとれた顔貌がある。ところが実臨床では、予定通りの咬合が得られても必ずしも顔貌の満足度が高くない症例が存在する。特に顔面非対称症例の場合、咬合の緊密化が輪郭の対称性に合致しない場合も散見される。

これまで顎変形症などの治療に用いられていたシミュレーション法では顎骨の移動量を決めてから骨片の干渉部位や骨形態を予測するのみであり、望ましい顔貌が得られるか否かは明確にすることができなかった[1)]。そこで、事前に理想(目標)顔貌を予測し、軟組織の移動量を逆算して骨の移動様式をシミュレーションする方法に着目した。理想的な軟組織形態の獲得を優先させた手術シミュレーションが可能になれば、治療計画立案のツールに新たな選択肢が加わり、より満足度の高い治療が可能になることが期待される。本研究では、ハイブリッド相同モデルを応用し、result-oriented な手術シミュレーション法を開発することを目的とする。

Result-oriented simulation for maxillofacial surgery using homologous modelling

Tomohiro Yamada

Section of Oral and Maxillofacial Surgery, Division of Maxillofacial Diagnostic and Surgical Sciences, Faculty of Dental Science, Kyushu University

2．方　法

2．1．相同モデル化技術に必要な解剖学的ランドマークの確立

ビデオカメラや立体カメラなどで取得できる立体データは、ポリゴンと呼ばれる三角形の集合体でできており、各立体データによってポリゴン数にばらつきがあるため、統計処理をすることが困難である。そこで各立体データに対して、ポリゴン数を決めた共通のテンプレートデータを、設定した解剖学的ランドマークに一致させながら各立体データに貼り付けることにより、すべての立体データのポリゴン数が一致したモデルを作製する技術を相同モデル化技術と呼ぶ[2-4)]（図1）。この結果できたモデル（＝相同モデル）を用いることで多変量解析などの統計処理ができ、解剖学的ランドマークの設定が困難な部位でも形態評価が可能となる。

顔面軟組織の立体（3D）データを相同モデル化するためには、解剖学的ランドマークの設定が重要となる[5)]。そこで、まず再現性の高い解剖学的ランドマークを明らかにすることを目的とした。

対象は2016年4月から2017年3月までに九州大学歯学部に所属した日本国籍の学生のうち男性5人、女性5人の計10人（平均年齢23.6±1.2歳）を対象とした。対象は先天性疾患、顎顔面外傷の既往および顎矯正手術の治療歴がある学生を除外した。

3D画像撮影解析装置（VECTRA® H1, Canfield Scientific, Parsippany, NJ）を用いて3つのアングルで被検者の顔を撮影し、得られた画像データを3Dデータ構築ソフト（VECTRA Capture Module, Canfield）で画像を三

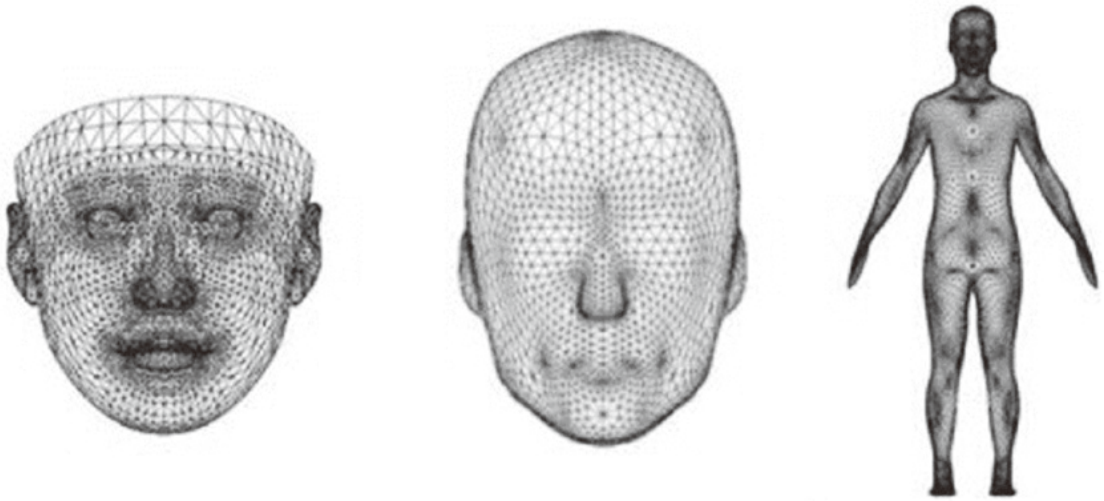


図1　相同モデルの定義

次元構築し、医療画像キャプチャソフトウェア（Mirror® PhotoFile®, Canfield）を用いてSTL（Stereo lithographic）形式に変換して顔面データとして保存した。得られた顔面データを相同モデル支援ソフトウェア（HBM-Rugle, メディックエンジニアリング, 京都）に転送し、顔面データ上に、過去の文献を参考にし、以下に示す解剖学的ランドマーク計26点（うち左右対称となるランドマークは9対18点）を計測点としてプロットした（図2）。

プロットする計測者は同一人物とし、それぞれ1週間以上の間隔を空けて計3回プロットした。1回目と2回目、2回目と3回目、1回目と3回目それぞれにおける点間距離を測定して同一解剖学的ランドマーク内で比較し、再現性を検討した。計測点の再現性の統計学的検定にはICC（級内相関係数、intraclass correlation coefficients）を採用した。左右対称となるランドマーク9対18点については、左右それぞれにおける同一試行回における点間距離の平均値を算出して1対ごとに計測点の再現性を検討した。統計解析はJMP®（SAS Intsitute Inc. Cary, NC）を用いた。

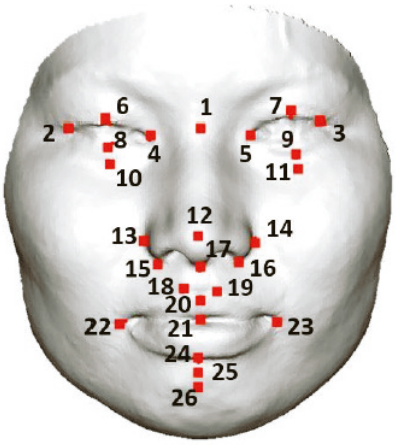


図2　検証した解剖学的ランドマーク

2．2．ハイブリッド相同モデルの作製

CT撮影は九州大学病院放射線撮影室内に設置しているAquilion（キャノンメディカルシステムズ、大田原）を使用した。撮影は患者を仰臥位で閉口させ、管電圧120kV、管電流100mAの条件で行った。撮影範囲は、眼窩上孔から舌骨までの範囲で、眼窩中央より下3cmの範囲では、スライス厚2mm、テーブル移動速度3mm/secで撮影した。顎関節部ではスライス厚1mm、テーブル移動速度1.5mm/sec、オトガイ付近ではスライス厚2mm、テーブル移動速度3mm/secで撮影した。基準平面は フランクフルト（FH）平面を用い、それに平行な断面で計測した。

健常人の被験者1名（著者）の撮影から得られたDICOMデータをMimics（Materialise, Leuven, Belgium）で3次元構築し、3Matics（Materialise）でSTLファイルに変換した。軟組織表面と顔面骨組織のそれぞれでSTLファイルを作成しHBM-Rugleで頂点数を3187まで間引いてテンプレートとした（図3）。

2．3．顔面非対称患者の術後硬組織形態のシミュレーション

相同モデルは頂点同士が対応を持っているため、差分ベクトルを作ることができる。硬組織と軟組織の対応がとれたハイブリッド相同モデルを用いることで、なんらかの方法で術後軟組織の相同モデルが作成できれば、術前後軟組織の差分ベクトルを術前硬組織の相同モデルに加算することにより術後硬組織の予測モデルが作成できる（図4）。

3．結　果

3．1．相同モデル化技術に必要な解剖学的ランドマークの確立

ICCにおける再現性は0.40＜ICC≦0.60 を “moderate”、

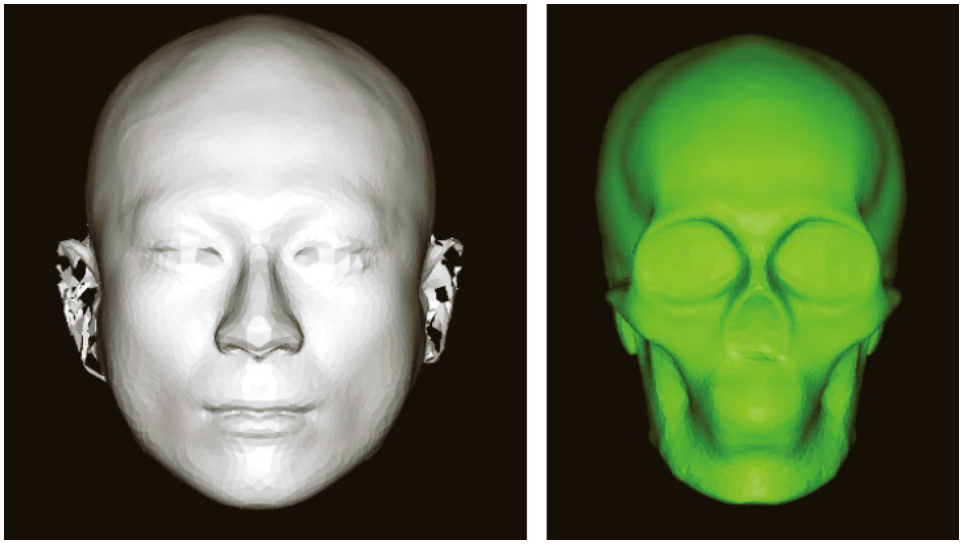


図3　ハイブリッド相同モデルのテンプレート

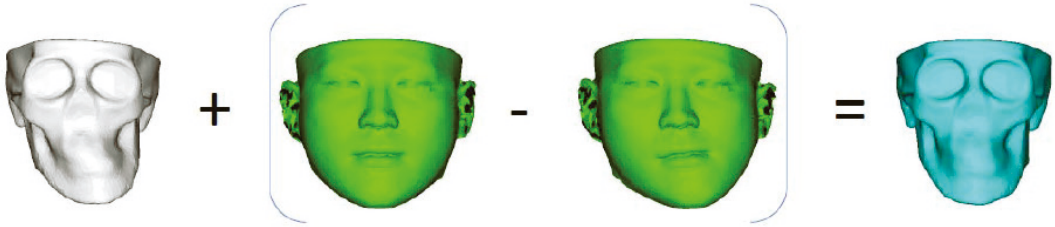


図4　ハイブリッド相同モデルによる硬組織形態の決定

0.60＜ICC≦0.80 を “substantial”、ICC≧0.80 を “almost perfect”とし、“almost perfect”を再現性が高いランドマークとした。本検証にて、N, Ps-R, Ps-L, Ac-R, Ac-L, Sn, Cph-R, Cph-L, St, Li, Srn は “almost perfect”、Pi-R, Pi-L, Prn, Ch-R, Ch-L, Po は“substantial”であった（表 1）。

以降の研究において、相同モデル化するための解剖学的ランドマークを “almost perfect” と判定された①’ N, ②’ Ps-R, ③’Ps-L, ④’Ac-R, ⑤’Ac-L, ⑥’Sn, ⑦’Cph-R, ⑧’ Cph-L, ⑨’St, ⑩’Li, ⑪’Srn の 11 点とすることにした（図 5）。

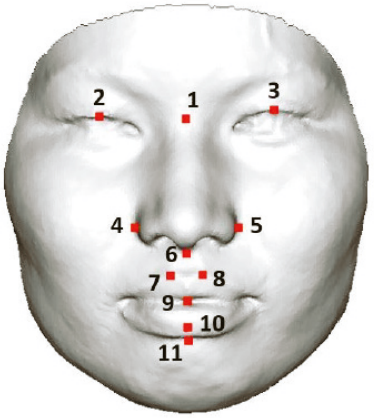


図5　相同モデル化に使用する解剖学的ランドマーク

3．2．目標軟組織形態からの硬組織シミュレーションモデルと術後形態の比較

顔面非対称患者に対する従来の方法（目標の咬合から上下顎骨の移動量を算出）で手術計画をたて、実際に手術を行った（図 6）術後患者において、目標顔貌から硬組織予測形態を作製した（図 7）。この、予測顎骨形態と実際の術後顎骨形態の差を面間距離としてカラーマッピング表示した（図 8）ところ、上顎骨、下顎角部、オトガイ部側方で差が大きいことが明らかとなった。このことは同部位において、軟組織形態の改善に重点をおくと、骨の移動量が不足していたことを示す。

4．考　察

顎顔面の形成手術、特に顎変形症の手術において、顎骨形成の指標はほとんど歯列が中心であり、咬合や咀嚼機能の改善に重点がおかれている。それは医療として当然あるべき姿であると思われるが、機能と形態は一対のものであるもののどちらかが不完全な状態をとらざるを得ない状況も存在する。その代表的な例が顔面非対称を伴う顎変形症の治療であり、術後の顔面軟組織の形態に関しては正確な予測は困難である。現在の実臨床では、顔貌の予測は側貌の一方向に限られることがほとんどであり、非対称症例に関しては十分な予測はできていないのが現状である。海外においては、いくつかのシミュレーション方法が開発され、市販されているものもあるが、いずれも骨の移動量をまず

表1　各解剖学的ランドマークの再現性の検証結果

番号	解剖学的ランドマーク	点間距離（mm）			ICC	再現性
		1st – 2nd	1st – 3rd	2nd – 3rd		
1	N	0.20±0.09	0.24±0.15	0.26±0.12	1.00	a.p.
2	Ex-R	1.06±0.09	1.36±0.67	0.72±0.46	0.54	m
3	Ex-L	1.16±1.19	1.48±1.17	0.52±0.26		
4	En-R	0.58±0.30	1.38±0.70	1.43±0.84	0.51	m
5	En-L	0.43±0.31	1.52±0.59	1.92±0.55		
6	Ps-R	0.97±0.60	1.11±0.72	0.96±0.48	0.99	a.p.
7	Ps-L	0.94±0.41	1.29±0.97	1.00±0.75		
8	Pi-R	0.94±0.53	1.09±0.84	1.07±0.83	0.76	s
9	Pi-L	0.84±0.47	1.65±0.67	1.29±0.78		
10	Or-R	2.21±1.21	1.73±1.25	1.28±0.94	0.53	m
11	Or-L	1.91±1.37	2.05±1.35	0.86±0.56		
12	Prn	0.36±0.21	0.61±0.40	0.60±0.23	0.77	s
13	Ac-R	0.75±0.31	0.76±0.47	0.76±0.47	1.00	a.p.
14	Ac-L	0.79±0.53	1.00±0.43	0.97±0.36		
15	Sbal-R	0.71±0.28	0.70±0.49	0.90±0.41	0.56	m
16	Sbal-L	0.78±0.46	0.69±0.43	1.11±0.56		
17	Sn	0.62±0.39	0.61±0.73	0.50±0.49	1.00	a.p.
18	Cph-R	0.57±0.31	0.82±0.27	0.69±0.32	1.00	a.p.
19	Cph-L	0.86±0.50	0.88±0.76	0.90±0.36		
20	Ls	0.60±0.24	0.54±0.22	0.39±0.27	0.56	m
21	St	0.42±0.15	0.46±0.26	0.43±0.21	1.00	a.p.
22	Ch-R	0.57±0.28	1.38±1.56	1.28±1.45	0.68	s
23	Ch-L	0.74±0.41	1.50±0.82	1.51±0.85		
24	Li	0.56±0.36	0.70±0.43	0.89±0.50	0.82	a.p.
25	Srn	1.58±1.81	1.25±0.78	1.80±1.75	1.00	a.p.
26	Pog	1.56±1.00	1.90±0.69	2.20±0.99	0.76	s

m : “moderate” (0.40 < ICC ≤ 0.60), s : “substantial” (0.60 < ICC ≤ 0.80), a.p. : “almost perfect” (ICC ≥ 0.80)

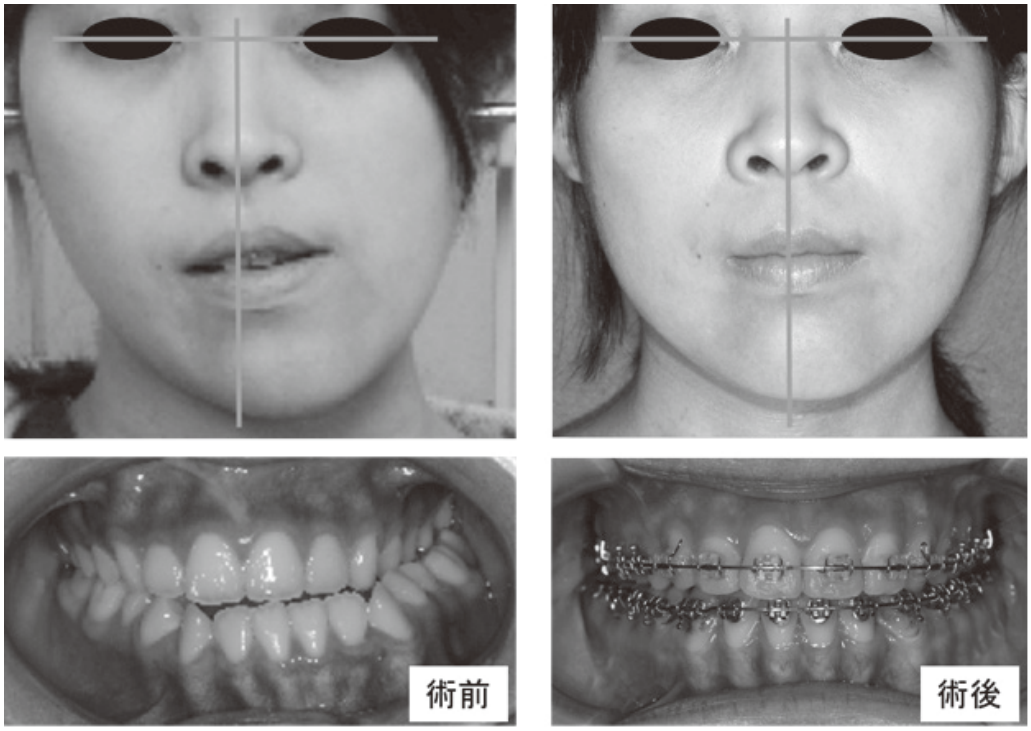


図6　目標の咬合から顎骨の移動計画をたて手術を行った顔面非対称症例の術前後

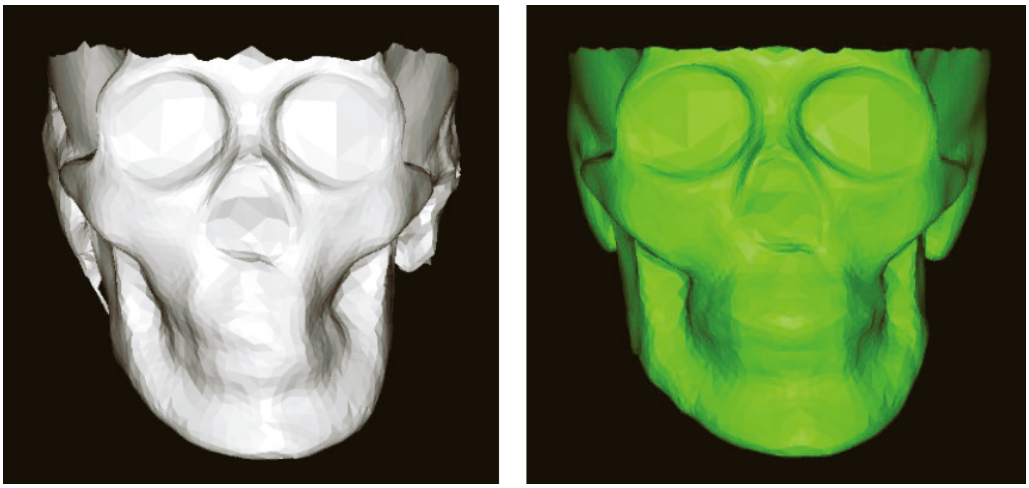


図7　シミュレーションモデルと実際の術後形態

決定し、それに追随する軟組織の移動を予測するものである[1]。従って、軟組織の最終的な result を出発点とした骨組織の移動様式を計画することは不可能であった。

近年、生体の表面形状を相同モデル化する手法が開発され、膨大な点群からなる解剖学的特徴を反映した少数のパラメータ(主成分ベクトル)に変換することにより、これまで不可能であった生体三次元形状の統計的解析ができるようになった[2-7]。われわれは、この相同モデル化技術を顎顔面の形態解析に応用し、下顎骨を相同モデル化することにより彎曲を含めた骨形態の定量化を可能にした[8]。さらに、顔面表面データの相同モデル化により、これまで特徴点の取りづらい曲面を中心とした顔面形態を統計的に扱えるようになった[9]。

本研究で用いる相同モデル化技術は日本で開発されたもの((独)産業技術総合研究所)であり、外国での医療目的の研究はほとんどない。近年、法医学分野において、この相同モデルが復顔に用いられつつあるが、軟組織の必要移動量から硬組織(顎骨)の移動様式をシミュレーションすることは、まさに復顔と逆の工程であり、復顔手法を応用した術後シミュレーション法を考案した。医療分野での類似の試みはほとんどなく、この日本発の相同モデリング技術を応用した手術シミュレーションは独創的な研究と思われる。これまで人体形状の相同モデルを医学研究、特に手術計画や評価に応用した研究はほとんどなく、医学分野への波及

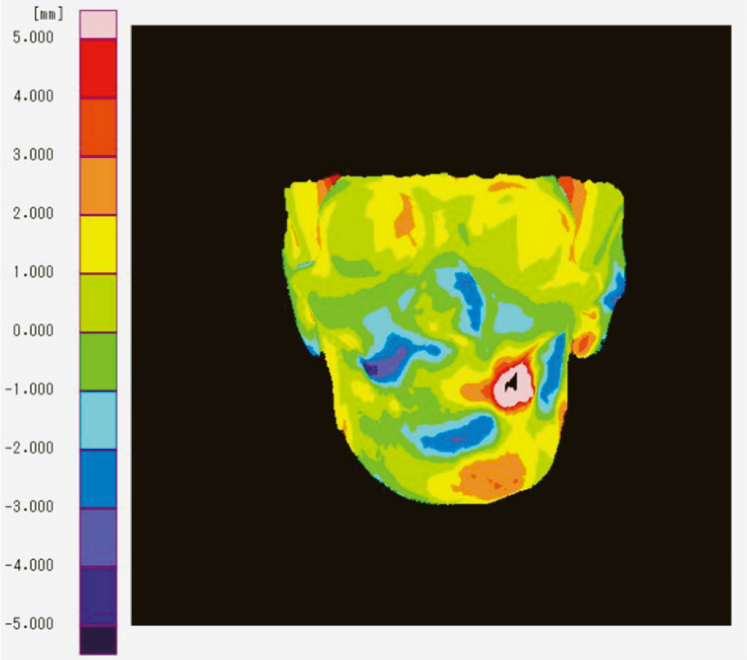


図8　シミュレーションと実際の術後形態の差

効果としては、本手法により顎変形症のみならず口腔・顎顔面の腫瘍切除や再建手術の治療シミュレーションへの応用が期待される。これにより、より予知性の高い手術的治療が可能になると思われる。

将来的な波及効果としては、相同モデルでは解剖学的特徴がデータ点に反映されるため、アニメーションなど、動画作成への応用が期待される。また、顔面形状の経年的変化によるデータを蓄積すれば加齢による顔貌予測も可能となる。このことから、アンチエイジングやコスメトロジー分野においても多大な成果が期待できるものと考えられる。今後は、顔面軟組織と骨組織の対応関係を蓄積し、より正確なシミュレーションができるように研究を進め、日常の臨床での使用につなげたいと考えている。

（引用文献）

1) Moehlhenrich SC, Heussen N, Kamal M, Peters F, Fritz U, Hoelzle F, Modabber A. Influence of setback and advancement osseous genioplasty on facial outcome: A computer-simulated study. J Craniomaxillofac Surg 43 (10), 2017-2025, 2017.

2) Mochimaru M, Kouchi M. Statistics for 3D human body forms. SAE Digital Human Modeling for Design and Engineering Conference 2000-01-2149, 2002.

3) Kouchi M, Mochimaru M. Inter-individual variations in intra-individual shape change patterns. SAE Digital Human Modeling for Design and Engineering Conference 2006-01-2353, 2006.

4) Kouchi M, Mochimaru M. Simulation of the body shape after weight change for health-care services. Proceedings of the 3rd International Conference on Applied Human Factors and Ergonomics 217-222, 2010.

5) Allen B, Curless, Popovic Z. Brian The space of human body shapes: reconstruction and parametrization from range scans. ACM T GRAPHIC 22 (3) : 587-594, 2003.

6) Kato A, Kouchi M, Mochimaru M, Isomura A, Ohno N. A geometric morphometric analysis of the crown form of maxillary central incisor in humans. Dental Anthropology 24 (1), 1-10, 2011.

7) Matsuoka A, Yoshioka F, Ozawa S, Takebe J. Development of three-dimensional facial expression models using morphing methods for fabricating facial prostheses. J Prosthodont Res 63: 66-72 2019.

8) Inoue K, Nakano H, Sumida T, Yamada T, Otawa N, Fukuda N, Nakajima Y, Kumamaru W, Mishima K, Kouchi M, Takahashi I, Mori Y. A novel measurement method for the morphology of the mandibular ramus using homologous modeling. Dentomaxillofac Radiol 44: 20150062.

9) Yasuda K, Nakano H, Yamada T, Albougha S, Inoue K, Nakashima A, Kamata Y, Sugiyama G, Tajiri S, Sumida T, Mishima K, Mori Y. Identifying differences between a straight face and a posed smile using the homologous modeling technique and the principal component analysis. J Craniofac Surg 30 (8) : 2378-2380, 2019.

記念講演

第 30 回表彰・贈呈式記念講演　奥 直人

（ステーションコンファレンス東京・2019 年 11 月 19 日）

リポソーム研究の魅力

帝京大学　薬学部長・教授
奥　直 人

おく・なおと
1980 年東京大学大学院薬学系研究科を修了後、アメリカ・ノースウエスタン大学に留学、摂南大学を経て、1991 年から静岡県立大学薬学部助教授、その後に教授に就任。この間、静岡県立大学薬学部長、副学長を歴任。2018 年からは帝京大学薬学部教授、現在帝京大学薬学部長に就任。先生はリポソームを利用したドラッグデリバリーシステムの研究で多くの業績を残されておられます。
・専門分野：薬物送達学、リポソーム
・その他：2016 年に日本薬学会賞、2019 年にバンガム賞（Bangham Award）を受賞

コーセーコスメトロジー研究財団の第 30 回表彰・贈呈式にお招きいただき、記念講演の機会をいただきまして、ありがとうございます。また本日、財団の助成金を贈呈されました皆さん、おめでとうございます。

今日は、「リポソーム研究の魅力」というタイトルでお話しさせていただきます。直接コスメトロジーには関係ないかもしれませんが、今までやってきた研究について少しお話しさせていただきたいと思います。

皆さんご存じの方も多いと思いますが、まずリポソームとは何かについて簡単にお話しして、リポソームが生体膜モデル、それからDDSキャリアへと移ってきたので、DDS（薬物送達システム）の話を中心にお話ししたいと思います。DDSの基礎研究から最近やっている応用研究、私の研究室でやってきたことをお話ししたいと思っています。よろしくお願い致します。

まずリポソームについて、これは皆さんもちろんご存じだと思いますが、生体膜はリン脂質を中心にできています。このリン脂質を取ってきて水で懸濁するとリポソームができます。先ほどご紹介がありました、イギリスのバンガム博士が 1964 年に脂質膜を取ってきて、有機溶媒などで脂質を分離し水に懸濁したところ、二重層膜が見えたとのことです。二重層膜が見えて小胞ができましたが、次の年に、この小胞にイオンと水溶性のものが内封されることを見つけたため、リポソームの発見の年は、1965 年とよくいわれています。リポソームの中には、SUV（Small Unilamelar Vesicle）と呼ばれる小さい一枚膜リポソームから、1 マイクロメーターぐらいまでの大きな一枚膜リポソームがありLUV（Large Unilamelar Vesicle）といっています。それからもう少し大きな多重層膜リポソームMLV（Multi Lamelar Vesicle）と呼ばれているものがあります。コーセーで以前に撮られたMLVの写真がきれいなので、そちらを参考にしていただいたほうが良いと思います（https://www.kose.co.jp/company/ja/research/secretstory/liposome/）。

もっと大きいものがあるかというと、私がアメリカへ留学していたときに、10 マイクロメーター以上のきれいなものができることがわかりました。私がジャイアンツファンなので、ジャイアンツリポソーム（GUV）と名前を付けさせていただいています。

バンガム博士はどのような方かというと、リポソームを作られた方で、図 1 は彼自身が描いた絵で、英国の王立科学研究所でお話しされたときに使ったものです。生命の誕生のときに、最初は多分、両親媒性分子ができて、それがだんだん脂質分子らしくなっていって、リン脂質になって、リポソームみたいなものを作ってきて、この中に様々なものを溜めるので、RNA とかが溜まり、これが生命の誕生であろうといっています。これより前に、1924 年にオパーリンがコアセルベートを出したのは有名な話なので、ご存じだと思います。そのようなところからも、最初はリポソームを生体膜のモデルとして用い研究がなされてきました。

自分のことをあまりいってもしょうがないですが、私自身は 1975 年に大学を卒業しましたけれども、74 年に教室配属で入ったときには、4 人の先生方がおられました

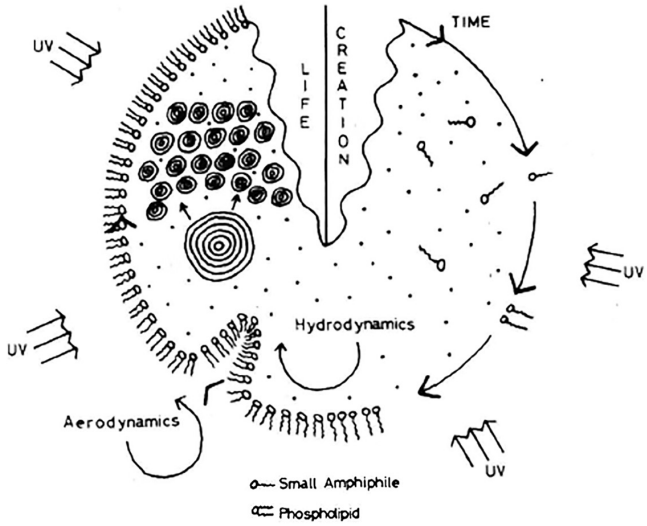


図 1　生命創造とリポソーム様小胞
バンガム博士の英国王立科学研究所講演（1979 年）で使用：
Bangham A.D. in “Liposome Letters” Academic Press (1983)

が、誰一人リポソームはやっていませんでした。この数年前、1972年に前教授が亡くなられて、5月に新しい野島庄七教授が決まって来られました。次の年になってから、だんだん先生方が他に移られるようになって、1975年の5月に井上圭三先生が来られて、そして西島正弘先生が来られ研究室ががらっと変わりました。このとき、井上先生は、アメリカのワシントン大学セントルイスで、先ほどのバンガム博士の直弟子のキンスキー博士からリポソームを習って帰ってきたところでした。リポソームの草分け的な存在である若い井上先生について、私はリポソーム研究を始めることになりました。

最初、リポソームは生体膜モデルだということでいろいろなことをやりました。ドクターのテーマでやったことを一つだけお話しします。センダイウイルスとか、その他いろいろなウイルスがありますが、よく膜融合を起こすウイルスがあります。膜融合を起こすウイルスは、その膜のところにFタンパク質とか、膜融合に関係するようなタンパク質があります。これが働いて膜融合を起こすのだろうといわれていますが、その頃はまだちゃんとわかっていませんでした。タンパク質全盛期の頃ですから、この相手は多分細胞膜の上にあるタンパク質だろうと、タンパク質が関与していて、タンパク質が実際に融合を起こすと考えられていたわけです。そう考えていない研究者も結構いましたが、私もその一人で、井上先生もそう考えていませんで、Fタンパク質の融合の相手は生体膜だと考えていたということです。これはリポソームですけれども、リポソームにウイルスをかけて、受容体だけは入れていますが、そうすると、このウイルスのタンパク質が図2（右）のように見えます。これはフリーズフラクチャーという方法で、このようにタンパク質があると二分子膜の間で割れるので、ポツポツポツと見えますが、普通のウイルスは図2（左）の矢印で示したような形です。これをリポソームにかけると、リポソーム上にブツブツがこのように増えることで、相手が直接二分子膜に融合していることがわかったわけです（図2）。

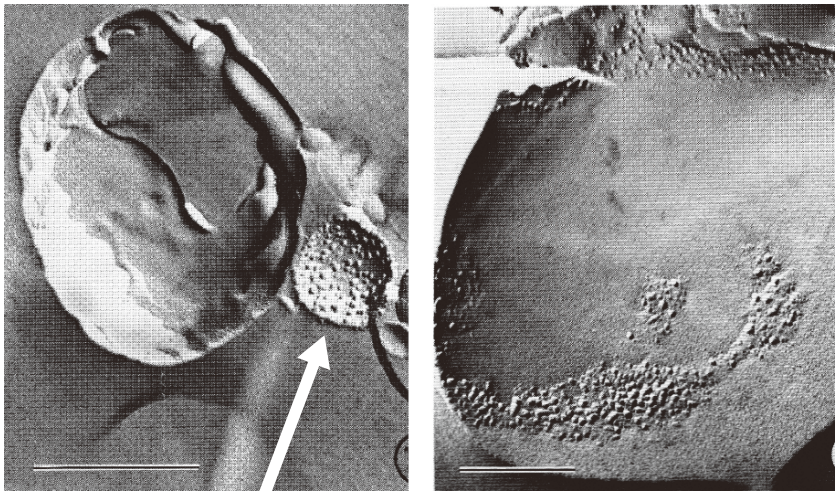
このようにリポソームを生体膜モデルとして使うことが、ずっとやられていましたが、それ以外にDDSキャリアとして使えるのではないかとして、様々なことが始まりました。ご存じだと思いますが、DDSとはDrug Delivery Systemの略で、薬を必要な量、必要な時間、必要な部位に送達する技術で、このような技術があれば、少量の薬で副作用がなくて効くだろうと、様々なところに使われてきました。

実際には、必要な量、必要な時間、必要な部位に送達する技術としてはどのようなものがあるのかですが、障壁透過性を変えるものがあります。例えば今まで注射剤でしかできなかったものを経口投与ができるようになる、経皮投与とか経肺から入れられる、また、脳血液関門がある脳の中にうまく運ぶことができるなどです。それからコントロールドリリースとか放出を制御するとか、実際に打って患部だけにリポソームを行かせるなど様々な方法があります。こちらは、どちらかというと患者QOLの改善をするために非常に役立つので、わが国のように超高齢社会になった国では、よりDDSが重要であろうと考え、リポソームのDDS研究を始めたわけです。

DDSのリポソーム研究については、プラットホームができていないとなかなか発展できなかったわけですが、バンガム博士がリポソームを発見して以来、どんどんいろいろな人がプラットホームを作っていきました。一つは1970年にWeissman博士が初めてリポソームに酵素を入れました。ライソゾームの中に酵素が欠損しているとTay-Sachs病とか様々な病気になるわけですけれども、そこに酵素を入れたリポソームを入れてあげれば、ライソゾームの中に酵素が届いて働いてくれるようになるだろうと始めたのがWeissman博士です。

流動モザイクモデルは、Singer博士とNicolson博士が1972年に出していますけれども、1973年にGregoriadis博士が初めて抗がん剤をリポソームに入れて、抗がん剤とか様々なものに使う研究を始めていました。

リポソーム研究の中でいくつか画期的な



膜に粒子のあるセンダイウイルスの膜断面　　リポソームにウイルスが融合し膜上に粒子拡散

図2　センダイウイルスとリポソーム融合

Oku N, Inoue K, Nojima S, Sekiya T, Nozawa Y: Electron microscopic study on the interaction of Sendai virus with liposomes containing glycophorin. *Biochim BiophysActa.*(1982).

ものがありましたが、その一つ、Extruderによるサイジングについて説明します。これはフィルターに一定のサイズの孔が空いていて、そこにリポソームをかけることによって、そのリポソームのサイズを一定に作る方法です。これの利点はそれだけではなくて、例えば100ナノメーターとか80ナノメーターのサイズの孔に通すことで、それでろ過滅菌ができ、そのままリポソームが使えることです。その後、多くのリポソームの製剤は、Extruderで、ろ過滅菌して使っています。

次に、リモートローディングについて説明します。リポソーム内に薬などを入れるときに、普通に試験管などでリポソームを作って様々な薬を入れると数パーセント、よくても数十パーセント程度しか入らないのですが、それを変えた方法です。例えばプラスにチャージする薬、これはドキソルビシンという抗がん剤などですけれども、このような薬だったら、リポソームの中のpHを下げておくと、この薬は疎水性があるのでリポソーム膜を透過して、中に入ったときに、pHが下がっている段階で正電荷になってそのままとどまることができます。これでやるとほぼ100％薬を中に入れられます。マイナスになる薬は、逆にpHを上げるとか、様々な方法がとれます。これはリモートローディングと呼ばれる方法です。これを作ったのは、Cullis博士とMayer博士らです。

さらにもう一歩進めたものが、中に硫酸アンモニウムを入れておき、硫酸アンモニウムの硫酸と薬のコンプレックスを作らせて結晶化させた、リポソームの抗がん剤のドキシルがあります。後でもお話ししますが、これは日本でも海外でも使われており、このような方法で、効率的に中に結晶化した形で抗がん剤を入れていることになります。

そのような方法ができましたが、さらに日本で発見されたEPR効果について説明します。現在国立がんセンター東病院におられる松村保広先生が、前田浩先生のところでドクターを取られたときの仕事で、EPR効果で物をがんに集めることができる方法です。それを先に説明しますと、正常細胞は血管が非常にタイトなので、あまりリポソームは集まりません。がん細胞では新生血管ができて、血管が非常にグスグスであります。そういうグスグスのところにリポソームが行くと、がん組織中に溜まってきます。それからたまにリポソームが正常組織の血管外に漏れ出すことがありますけれども、正常組織では漏れたときにはリンパ管に吸収されるので、あまり作用はありません。一方、がん細胞ではリンパ管が発達していないので、溜まったところから、がんに薬が行くだろうことが考えられます。先ほどの松村保広先生がドクターのときの仕事で、がん部位の新生血管のもとで高分子が溜まることを見つけられました。そしてこれをEnhanced Permeability and Retention（EPR）効果といっています。

さらに、リポソームが長く血中を流れていれば、がんがあればそのところに溜まるだろうとのことで、長期血中滞留性リポソームをAllen博士がみつけました。リポソームを長くもたせるために、最初は糖脂質を使い作りました。その後で、Huang博士と、丸山 一雄先生が、ポリエチレングリコール（PEG）でリポソームを修飾するとやはり長く血中を滞留するということを見出しました。

そのようなことを背景として、リポソームががんに効くことがわかってきました。普通にマウスにがんを作っておいて、長期血中滞留型リポソームを打ってやると、がんのところに溜まっていきます。一方、長期血中滞留型でなければ、肝臓に溜まるということです。がんのサイズを見ると、未処理だとがんが大きくなりますが、このように溜まってくるものに抗がん剤を入れておくと効くようなことを、われわれもやっていました。

そのようなことをやりながら、日本でリポソームがだんだん出てくるようになりました。リポソーム製剤として世界で一番最初にできたのがアムビゾームという製剤で、ポリエン系の抗生物質アムホテリシンBをリポソームの中に入れた製剤です。膜にコレステロールを入れておくと、アムホテリシンBがそこに入っていってリポソームができます。それまではFungizoneといって、界面活性剤を用いて溶かしていたので、それで打ってやると溶血などの可能性もあります。そのようなことを防ぐために、アムビゾームを用いると、真菌に行くとアムホテリシンBがこのようなところで抜けて、カビが持っているエルゴステロールと穴を作って、それでカビを壊すということです。がんの末期症状でよく出る真菌の感染症などに効くことで、最初に1990年に世界的に認可されて、日本では2006年に認可されています。

それからドキシルは、先ほど少し説明しましたリモートローディングを用いています。リポソームに硫酸アンモニウムを入れておくことにより、抗がん剤のドキソルビシンが結晶化した形で中に入ります。さらに、リポソームの外側にPEGを付けてあるため、そのままがんのところに行って効くことになります。カポシ肉腫とか乳がんとか卵巣がんとか、様々使われていて、日本ではヤンセンファーマとか持田製薬から発売されています。

それ以外にも、網膜のところに新生血管ができる加齢性黄斑症に対し、ベルテポルフィンという光感受性の薬をリポソームに入れて打って、そこに届いたときにレーザーを当てて、新生血管を抑える薬も出ています。

日本ではこれらの3つが認可されていますが、世界的には20以上のリポソーム製剤が認可されています。

最近、リポソーム以外のものもDDSキャリアとして使われておりますが、それも少しお話しします。一つは、以前から使われておりますが、リピッドマイクロスフェア、

リピットナノスフェアと呼ばれるもので、脂肪乳剤ともいいます。これは周りに一重膜の脂質層があって、内側に中性脂肪を入れて、例えば脂溶性のビタミンEなどを運ぶために使われています。それから最近、リピッドナノパーティクル、脂質ナノ粒子と呼ばれるものが使われるようになってきています。これはリポソームの作り方とは少し違っていて、非常に細いマイクロ流路と呼ばれているものを使います。エタノールでリピッドを溶かしておいて、さらに何でもよいですけれど例えば遺伝子とか様々なもの、それをマイクロ流路で脂質と混ぜながら作るものです。今後さらに使われてくるかと思います。

ここまでが非常に基本的なところで、これから実際に、私がDDSを目的にやってきた研究の話をします。最初に海外に行った後に摂南大学へ行きました。ここでコーセーの内藤昇様、荒金久美様と一緒にお仕事をさせていただいたので、その話をしようと思います。実は、去年、静岡を辞める直前に薬学会があり、4月1日からは東京に出なければならないことから、ほとんど全部のスライドや資料を捨ててきたので資料がありませんでした。実際には、現摂南大学薬学部教授の山下伸二先生、それから今は大阪薬科大学の教授になっていますが、当時大学院在籍の岩永一範氏と私の3人で一緒にやらせていただきました。

何の研究をやったのかですが、当時リポソームを化粧品に使うときに、様々なヨーロッパの会社は特許を取っていましたが、界面活性剤みたいなものを入れていても平気で使っているようなところがあって、リポソームの化粧品といいながらリポソームが入っていない。リピッドは入っているけれどもリポソームになっていないようなものがあったりしたらしいです。

それで、当時の厚生省は、「リポソームの化粧品というためには、リポソームの形のものがちゃんとなければならないこと、それからリポソームの形であることがメリットであることを証明しなさい」といったとのことでした。それでリポソームを使うのをやめた化粧品会社もあったようですが、コーセーは、それらを証明して研究を進められたとのことです。当時、内藤様と様々なお話をさせていただきました。

そのときに、本当にリポソームが皮膚を透過するのかどうか、皮膚に対する作用を見てくれないかと相談があって、一緒に研究をやらせていただきました。コーセーでは、最終的にコスメデコルテのモイスチュアリポソームなどの、今でもすごく人気のあるすばらしい製品を作られたとお聞きしています。リポソームが入っていることを電顕で証明して、それからリポソームがモイスチャーとして働くことを証明して、すばらしい商品として出し続けていると聞いて非常に喜んでいます。

当時の研究の話にもどりますが、本当にリポソームが皮膚を透過するかは重要な問題ですので、それを調べることをやらせていただきました。マンニトールの放射標識を使って、フランツ型の拡散セルを用いて、どれぐらい皮膚を通るかを調べてみました。マンニトールだけだと8時間で0.1％程度皮膚を通りますが、リポソームにマンニトールを入れてやると、ポジティブチャージのリポソームでも、ネガティブチャージのリポソームでも、ニュートラルでもあまり通らないことから、リポソームが皮膚を透過することは多くなく、8時間で内封マンニトールの0.02％ぐらいしか透過しないことがわかりました。

次に皮膚を上からテープストリッピングをして、どの程度皮膚に入っているかを調べてみると、これよりは多く、リポソームは皮膚にはある程度入るが、皮下には通りにくいことがわかってきました。

さらに、リポソームのホスファチジルコリンをC14で放射標識して、マンニトールはH3で放射標識して、リポソーム自体は通るのか、マンニトールがフリーで通るのかなど、皮膚透過量と皮内に残る量を詳細に調べてみました(図3)。皮膚透過量はフリーのマンニトールが最も多く(○)、リポソームに入れても、多少は通りますがこの程度(●)です。さらにリポソーム自体は皮膚をほとんど透過していない(▲)ということがわかりました。また、リポソームが皮内に残る量は若干ありそのまま一定時間留まることがわかってきました(図3b)。

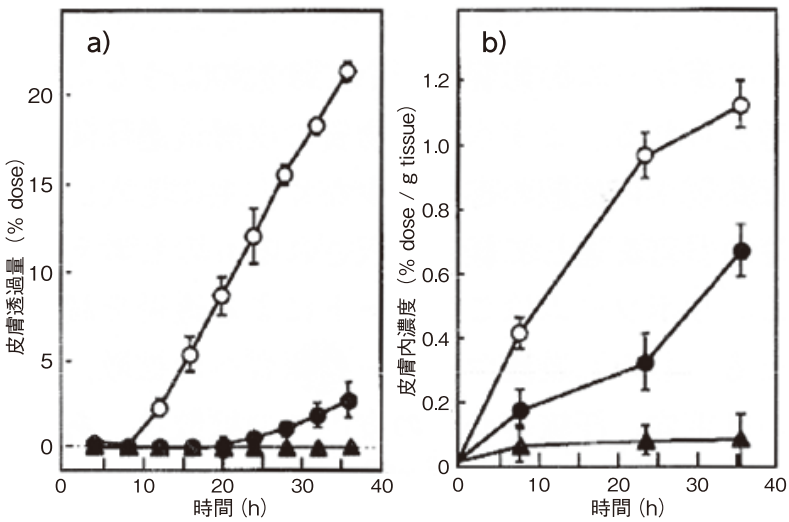


図3　リポソームの皮膚透過と皮内蓄積

[H-3]マンニトール内封[C-14]ホスファチジルコリン含有リポソームを用い、マンニトールとリポソームのモルモット皮膚透過量(a)と角質除去後の皮膚内蓄積量(b)をフランツ型拡散セルを用い求めた：○；遊離[H-3]マンニトール：●；リポソーム化[H-3]マンニトール: ▲; [C-14]ホスファチジルコリン.（リポソーム組成：卵黄PC/コレステロール/ジセチルリン酸）：奥直人、岩永一範、山下伸二：医薬におけるリポソームの応用と皮膚への作用 *J Soc Cosmet Chem Jpn*, 31, 254-262 (1997).

さらに、ラベルしたリポソームとマンニトールを入れた小さいプラスチック容器を皮膚に貼り付けて、実際に尿に出てくるリポソームを測ってみました。フリーのマンニトールだとある程度尿中に出てきますが、空のリポソームと一緒に入れるとマンニトールの出てくる量は減ります。そしてリポソームに入れたマンニトールは少量しか尿に出てこないことがわかりました。

当時考察した全体的にいえることとしては、普通の脂溶性の物質はある程度皮膚を通るが、水溶性の物質は皮膚を非常に通りにくいこと。それではどこから入るかですが、リポソームは毛穴とか汗腺を通って入っていくこと。そして、リポソームにマンニトールがある程度残ることを考えると、皮内にあるリポソームからマンニトールが横に流れていき溜まるだろうと考えたところまでを一緒にやらせていただきました。

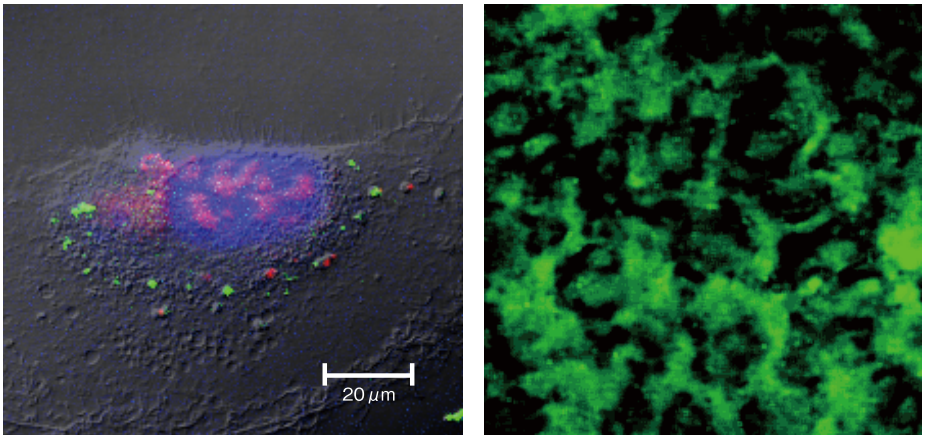
ここからまたリポソームの話に戻ります。最初にリポソームのDDSを始めるにあたり、どのようなことをやったのかをお話ししたいと思います。まず、様々なものを導入する場合に、どのようなリポソームがよいのかを考えてみました。リポソームに何かを修飾すれば細胞に入りやすいのではないかと考え研究を進めました、リポソームはマイナスチャージの脂質が多いのでポリカチオンであり、プラスチャージのポリエチレンイミンとかポリアリルアミンとかの影響を受けやすいと考え、それらをリポソームにかけてみるとリポソームが融合を起こすことがわかりました。そして、リポソームが少なければ少ないカチオンで融合するし、リポソームが多くなれば多くのカチオンが必要であることから、リポソームの表面にカチオンが一定量つくと、初めて融合が起こることがわかってきました。リポソームが細胞に入るときには、最初にエンドソームに入って、そこでpHが下がることがわかっていましたので、pHが下がることによりリポソームがカチオン性になるようにしておくことで、エンドソームの内部でカチオンになるとプラスになってエンドソームと膜融合を起こすだろうと考えました。その結果、物質が細胞質に行くので、例えば薬とか、それから核酸とか、様々なものを細胞質に送れるだろうと考えたわけです。

ちょうどそのときに、先ほどのポリエチレンイミンは、カチオン、すなわちプラスになるだけではなく、プロトンがいろいろ付いてくるので、マイナスチャージの、例えば塩素イオンなど様々なものが一緒に入ってくることがわかりました。ポリエチレンイミンがついていることにより、ただ単にエンドソームでpHが下がってプラスになるだけではなく、その場で、透過性の高いイオンなどが入ってくるためオスモラリティが上がって、エンドソームがある程度破裂して、物がより出やすくなることがわかりました。これを使うと様々なものを細胞質に送れるだろうと考えました。

実際に、何をやったかですが、下村先生がノーベル賞を受賞された緑色に光るタンパク質を作るEGFPプラスミドをリポソームに入れて、細胞にかけてみました。これは細胞の核ですが、それでリポソームのリピッド自体は緑色にしておいて、それからプラスミド、遺伝子そのものは赤くしたものをかけてみました。リポソームは細胞の核の周りに点在していて、これが先ほど説明したエンドソームです。ここまでリポソームが行って、ここでプラスミドが出てきて、プラスミドは核の中に入っていきました(図4左)。そうすると、核の中に入り発現するので、緑色のタンパク質ができると考えました。実際こういうものを作って。血中に打つと、肺に行って、肺で緑色のタンパク質ができるので、肺の細胞に入って遺伝子が発現していることがわかります(図4右)。

それから、門脈という血管、これは直接肝臓に行きますが、そこにこれを入れると、肝臓の中にGFPができることで、遺伝子が発現していることがわかりました。

この頃に話があって、静岡県立大学に移らせていただくことになりました。このようなことができるのであれば、遺伝子の導入で様々な治療ができる、遺伝子治療に持っていくことが考えられるわけですが、遺伝子治療はハードルが高いことがわかっていました。遺伝子治療を下手にするとがんになってしまうとか、様々なことがわかってきて、なかなか難しいところもありそうだと。



GFP プラスミド(赤)とNBD 脂質(緑)を含むリポソーム複合体を、HT1080 細胞に添加し培養。青色は DAPI で染色した核。*Biochim Biophys Acta* 1660, 24–30(2004).

GFP プラスミドリポソームをマウス尾静脈から投与し、24 時間後に肺を観察 *Biochim Biophys Acta* 1612, 136–143 (2003).

図4　遺伝子運搬リポソームの細胞内分布とGFP遺伝子導入

ちょうどその頃にRNA干渉が世界的にやられるようになってきました。このRNA干渉とは何かというと、大体21から23塩基対ぐらいの短いRNAがRNA干渉剤ですけれども、短いRNA、siRNA、スモールインターフェアリングRNAと呼んでいます。これを細胞質に入れてやると、相補的なメッセンジャーRNAを切っていくことがわかってきていました。それで多くの薬のターゲットは大体タンパク質ですが、そこに効く薬をずっと探していって薬を作ることがやられてきた方法ですが、全てのタンパク質に対して薬ができるわけでありません。ドラッガブルな標的とドラッガブルじゃない標的があるといわれていますが、こういうsiRNAのようなものを使えば、ほぼ全てのタンパク質を標的にすることができるので、目的が決まればこういうものができるだろうと考えられるわけです。

ではこれを薬にするためにどうしたらよいかですけれども、もちろん血液に打ったらすぐに血液中の酵素で分解されてしまう。だから細胞に行かないし、細胞に届いても、なかなか細胞質にこういうのが入っていかないと考えられました。そのためにDDSの技術が必要だろうと、つまりこれをリポソームに入れてやれば、簡単に目的の細胞に行くだろうと始めたわけです。

まずリポソームの周りにsiRNAをつけていく方法としては、カチオンを作ってポリマーを2本足にして、それでリポソームにつけてやることにより、リポソームの表面にsiRNAがつきます。GFPを発現する細胞にリポソームを入れて、そこにGFPを抑えるようなsiRNAを修飾してどうなるかを見ると、GFPの発現を抑えるものがたまに出てきます。抑えるものは大体ポリカチオンリポソームのような構造をしていて、ポリエチレンイミンと同じ格好です。普通に例えばプラスチャージだけの脂質のリポソームの周りにsiRNAを付けるだけだとなかなか効かないが、このようなものを使うと非常に効率よく、サイレンシングと呼びますが、siRNAが効くようになる。では何が違うのか、このような構造を持っている物は、pHが下がるとずっとカチオニックになってきます。プロテインなどが付いてカチオニックになってくる一方、このようなプラスのもの、例えばDOTAPが有名ですが、これは全然pHが変わっても変わらない。これがプラスになっていくことが一つの成果で、そういう物を使っていくと、非常にうまくsiRNAを運ぶことができます。

これは先ほどの説明のものですが、siRNAを緑色、それからリポソームを赤で染める。リポソームが細胞に入った後に、まずpHが下がる細胞のエンドソームに入っていき、siRNAも一緒に入っていく。最初は黄色になっていますが、徐々にsiRNAだけがここから抜けて細胞質に入っていくため細胞質全体が緑になってくる。リポソームは残り、siRNAがうまくエンドソームから脱出して、それで効くことがわかってきました。

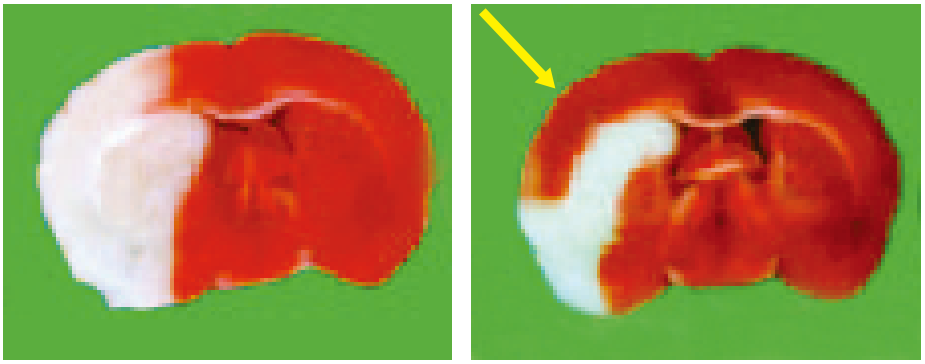
こういうものにつけて、周りにPEGを修飾して標的化するようなものを作れば、目的のところに行って効くだろうと考えたわけですが、なかなか外側につけておくと安定性が悪い。何とかこのsiRNAを内側に入れられないか、中に入れるためにはどうしたらよいのかですが、まずカチオニックコアを作っておいて、そこで一緒に入れる。実際には脂肪酸にカチオンが付いたものにsiRNAを入れてカチオニックコアを作っておき、リピッドの中に入れると中に入ります。

こういうものを、がんの治療に効かせるためにやりました。ただ、今度は外側にリポソームが出ているので標的化ができないため細胞に行かない。ではどうするかですが、細胞に行かせるために、細胞に付いているタンパク質を標的とするような抗体を付けてやる。抗体は大きいので、抗体の抗原認識サイトだけを付けました。ここで選んだのはHB-EGFで、婦人科がんによく出てくる抗原ですが、それに対する抗体を付けてやる。そうすると、乳がんとか子宮がんとかにつくだろうと考え、乳がんの細胞をネズミに植えておいて、そこに付けて打ちます。中に入れるものは、細胞の周期に関するキナーゼを抑えるpolo-like kinase 1で、これはがんで発現していますので、それを抑えてやればがんが抑えられるだろうと考えました。実際にがんが増殖するところに、こういうものを入れてやると抑えられることがわかりました。

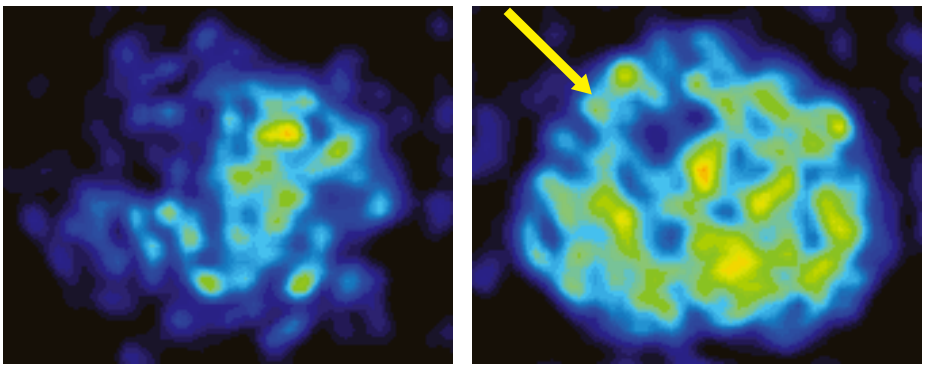
そのような研究の次にやったことは、がん以外に高齢社会で重要になるのは、やはり脳卒中だろうと、脳卒中を治せるものはないかを考えました。今、脳卒中は、脳梗塞が大体6～7割で、それから脳内出血、くも膜下出血があって、それらを脳卒中といっています。この脳梗塞ですが、初期の頃であれば血栓溶解剤で治りますが、なかなかよい薬がないのが現状です。それで、何とかしようと考えて始めたのが次の実験です。

これは、東海大学の川口章先生というお医者さんが始めたことです。テルモがヘモグロビンをリポソームに入れて人工赤血球を作っていました。この目的は例えば、病院に連れて行くと輸血ができるかもしれないけれども、すぐに輸血できない現場で輸血ができないときに、一瞬でもいいから輸血の代わりに人工赤血球を打てれば助かる人が多くなるのではないかと作ったものであると思います。これを脳梗塞モデルで、ここに脳梗塞を作ってやると、この白いところは脳の死んでいる部分ですけれども、TTC染色では生きているほうを染めていますが、このように人工赤血球を入れると、矢印の部位が助かることがわかってきました(図5)。

そのころ我々は、リポソームを簡単に標識するPETプローブを作っていて、それで人工赤血球の動態をみたいと話



右中大脳動脈塞栓再灌流後、右図ではヘモグロビン内封リポソームを投与、左図は対照、24時間後に TTC 染色。
右図では矢印部位の脳障害が回避されている。Kawaguchi, et. al., *Stroke* 38: 1626–1632 (2007)



上手と同様に処理、ただしヘモグロビン内封リポソームはポジトロン標識し、投与 60 分後に PET 測定。矢印の部位にリポソームが流入している。
Urakami, et. al. : In vivo distribution of liposome-encapsulated hemoglobin determined by positron emission tomography. *Artif Organs* 33, 164–168 (2009)

図5　リポソーム製剤による脳梗塞治療の可能性

がありました。PEG 修飾したリポソームを標識して見てやると、ここのちょうど助かっている部分ですけれども、リポソームが時間とともに入っていくことがわかりました。

つまり、リポソームは血栓ができても血栓を越えて患部に入っていく、それから脳組織内に入っていくことがわかってきました。実際に、ラット中大脳動脈に栓子を入れて血液を止め、栓子を引いて、また血液が流れますが、こういうモデルで血流を止めておいて、再灌流したときにリポソームを打つ。そのときにリポソームが入っていくのかを見ました。梗塞をして、再灌流していますが、ここにリポソームが溜まってくることがわかりました。リポソームが溜まるので、リポソーム化脳保護薬を使って効果を調べてみました。アシアロエリスロポエチンは脳細胞などを守る効果があるので、虚血を起こしておいて、アシアロエリスロポエチン付けたリポソームを打って、脳の障害がどれぐらい出るかを見る。あるいは、1 日後にこのサンプルを打って、脳梗塞だと運動能が下がりますので運動能がどうなるかを見ることをやってみました。

そうすると、例えば普通の脳梗塞を起こして虚血再灌流をすると、処理した側の脳は死んでしまいますけれども、アシアロエリスロポエチンリポソームを打ってやると死ぬ部分がすごく少なくなる。これは定量的に見たものですけれども、ある程度助かってくるというのがわかりました。それから運動能も普通だとドーンと下がります。スコアが下がることは、例えば、ぶら下がりができないとか、そういった様々な観点で点数が下がっていきます。一方、アシアロエリスロポエチンリポソームを打っておくと、スコアが健全なノーマルなラットの点数に戻ってくることがわかって、脳梗塞にも効くだろうことがわかりました。

もう一つ、最近やっていることで、これも面白いので、ちょっとだけお話ししますと、標的化というのは、よくリポソームに抗体とか、さっきも一つありましたが抗体などを付けて、それでがん細胞に行かせるとかありますが、逆転の発想で始めた研究です。抗体を付ける代わりに抗原をリポソームに付けたらどうなるか。抗原をリポソームに付けると、面白いことは、これは感作した動物でないと駄目ですけれども、感作した動物だと免疫細胞に抗体が出ていますよね。その免疫細胞が抗原を認識してリポソームを認識してくれるだろうと。それだったらここに薬を入れておいて、この感作した免疫細胞をやっつけてしまえば、例えば自己免疫疾患とか、それから花粉症とか、そういうものが治ると考えられます。

自己免疫疾患のモデルとして、自己免疫性の脳脊髄炎（EAE）マウスが使われます。ミエリンのオリゴデンドロサイト糖タンパク質に対する抗体ができて、ミエリンが壊れて脳の組織がやられる病気です。ここはモデルですけれども、この抗原になるようなミエリンのタンパク質を打ってやると、これに対する抗体とか免疫細胞ができ、実際にモデルマウスがだんだん動かなくなる形で臨床症状が出てきます。だんだんグレードが高くなっていくのがEAEマウスです。最初に打ってやると抗原が感作されて抗体とか免疫細胞が出てきて脳の神経細胞を傷つけます。そういったものを作っておいて、リポソームに抗原つけてやると、これが今の免疫細胞に働いて、ここでは関係ない抗がん剤を入れていますけれども、そうすると免疫細胞を傷害するだろうと考えました。実際に打ってみると、グレードが普

通に上がっていきますが、リポソームに抗原をつけたものを打ったものは全然上がりません。このように、免疫細胞が全部やられてしまうので助かるということになります。

最後にもう一つ、リポソームによる動脈硬化の検診についてお話しします。動脈硬化になるとマクロファージが溜まってくるような不安定プラークができますが、これらを認識するために、マクロファージに行くようなリポソームを作ります。マクロファージに行くと光るリポソームを作ってやるとどうなるか、実際の結果だけ出します。サルに高脂肪食を食べさせておくと動脈のところに不安定プラークができ、緑色にチカチカと見えるようになります。このようなものがあると動脈硬化の可能性がある。我々くらいの年になると、超音波で見て、それで危なかったらといわれますが、それをわかりやすくしたいと考えました。実際にサルに高脂肪食を食べさせ、頸動脈のところですがこのように光る。このようなものを使えば簡単に検診に用いることができるだろうと考えてやっています。なおこの研究は北海道大学の小川美香子先生とやらせていただきました。

リポソームは使い道がいろいろあるので、病気の治療とか、それから検診とか、病気の診断とか、様々なものに使えると考えて研究をやらさせていただいています。

さいごに共同研究者の方々に感謝致します。今は帝京大学で、むしろ教育に力を入れてやっています。このあたりで、雑ぱくでしたけれどもリポソームの話を終わりたいと思います。

どうもご静聴ありがとうございました。

コスメトロジー研究助成を受けて

2017 年度　研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

犬丸　啓

２年間にわたりコスメトロジー研究助成を頂き、大変ありがたく感じています。その理由の一つは、やや異分野のテーマに踏み出す機会を与えてくれたことです。私は無機材料化学の研究者ですが、コスメトロジーをキーワードとする研究にはこれまで縁がありませんでした。応募を思い立った時、自分の研究のスキルやフィロソフィーに基づいたうえで、自分にとっては新たなキーワードの元で研究を立案することは、研究者の視野を広げてくれることになります。私のような年齢（50 代後半）の研究者にとっても、このような作業は、研究の活性化につながると感じました。実際、今回の助成を受けて行った研究の中で、従来の延長とは異なる視点で研究を行ったことにより、逆に自身の得意の研究において従来持っていた考えを改訂すべきと思える結果を得ることができました。このような効果は、自分の得意分野で自分の研究目標に向かって直線的に進むような（例えば科研費でいえば基盤研究など）研究プロジェクトでは得にくい体験のように感じます。もう一つは、研究を続けていると、研究費の谷間というものがどうしてもできることがあり、そういった時に申請できると考えるだけで研究者にとっては有難く、ある意味、挑戦的に活動していくことを後押しして頂いている気がいたします。そういう意味でも、今回、単年度ではなく、助成期間を２年として頂けたことがとてもプラスになりました。また、授賞式についても研究分野を異にし、年齢も幅広い他の受賞者、さらには審査員の先生方との懇談の機会を得たことも、刺激になりました。最後になりましたが、審査頂いた先生方、事務局を含む財団ご関係の方々に改めて御礼申し上げ、筆をおくことといたします。

（広島大学大学院先進理工系科学研究科）

2017 年度　研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

井上　元基

本研究はシクロデキストリン（CD）を用いたサーファクタントフリーエマルションの実用化のため、エマルションの安定化メカニズムの解明を目的としました。本エマルションはこれまでの検討では、固体が水／油界面に吸着することで液滴を安定化するPickeringエマルションの一種であることが明らかになっていたものの、エマルション状態での界面における析出物の組成は明らかとなっていませんでした。医薬品の分析法としても一般化しつつあるラマン分光法を顕微鏡と組み合わせることでエマルション液滴表面の化学状態を検討しました。

油／水界面に吸着する固体化合物の分析を行ったところ、通常、Pickeringエマルションは乳化剤として用いた微粒子がそのままの状態で水／油界面に吸着するものの、本エマルションは水中に溶解したCDと油分子と包接複合体の析出を経て界面に吸着することで液滴を安定化すると推察しました。したがって、エマルションの形成条件は限定的で、形成される包接複合体の水または用いた油への溶解度が低く析出しやすいことに加え、表面自由エネルギーの値が水または油のいずれとも近くないこと（いずれの相にもぬれにくい）ことが明らかとなりました。本エマルションを医薬品や化粧品として応用するには、上記条件に加え、添加物との競合包接の可能性を考慮しなければならないと言えます。実用化にはまだまだ課題の多い本エマルションですが、包接複合体の溶解度ならびに表面自由エネルギー、包接のしやすさである安定度定数等のファクターを考慮した機械学習を用いることで実用化に近づける可能性があると考えています。

（明治薬科大学）

2017 年度　研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

内野　智信

この度、「ナノ粒子の物性の違いが角層作用過程におけるナノ粒子と角層の相互作用に与える影響の検討―放射光X線を用いたアプローチ―」に研究助成をしていただき、厚く御礼申し上げます。「ナノ粒子に薬物を封入し、皮膚から浸透させる」という研究は1990年代から盛んに行われておりますが、実際、「なぜナノ粒子に薬物を封入すると薬物の皮膚浸透性が向上するのか」というメカニズムに関する研究に関しては非常に多くの議論がいまだに続いていると感じておりました。私自身、Bouwstra教授（オランダ・ライデン大学）のもとに留学して以来、「ナノ粒子を用いた薬物皮膚浸透性の改善に関する研究」を続けておりますが、皮膚に適用するナノ粒子製剤は、製剤中に（薬物封入）ナノ粒子として存在していても、実際に皮膚に適用した後、製剤、薬物、皮膚がどのような状態になっているのか、そして結果的にどうして薬物の皮膚浸透性が改善されるのかを詳細に評価する手法がなかなかなく、研究の進歩に苦慮しておりました。そのような中、放射光X線を用いた角層研究の権威である八田一郎先生（名古屋産業科学研究所）、Bouwstra教授と2014年から大型放射光施設SPring-8にて2重層構造のベシクルを角層に適用した際の角層のラメラ構造とベシクル自身の構造変化についての知見を得ることができ、本助成金をエントリーするための基盤となる研究をすることが可能となりました。その後も、2重層構造をもつ多重層のベシクルは角層適用後に角層上で積層することを明らかにすることが可能となったり（本報告書）、2重層構造を持たない液晶構造のナノ粒子製剤への本系の応用が可能となってきたりと、この分野の研究が益々発展してきていると感じております。コスメトロジー領域におけるナノ粒子の利用は今後も増えていくことが予想されることから、今後もこの分野の発展に微力ながら寄与していきたいと考えております。末筆ながら、本研究にご支援いただいたことに重ねて感謝を申し上げるとともに、コーセーコスメトロジー研究財団の今後の益々の発展をお祈り申し上げます。

（静岡県立大学薬学部臨床薬剤学分野）

2017 年度　研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

岡本　浩明

この度は、コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成に採択していただきまして、誠に有り難うございました。今回採択していただいた研究テーマは、低分子量の有機化合物で、有機溶媒に加熱・溶解した後に放冷することで、結晶化することなく、有機ゲルを形成する有機ゲル化剤の開発を目的としています。この有機ゲル化剤は、サーモトロピック液晶材料の開発を進めている中で、偶然に発見した化合物で、従来から知られているゲル化剤とは大きく異なり、水酸基、カルボキシル基、アミノ基などの水素結合性の官能基を分子内に持たない単純な分子構造の化合物であり、何かしらの応用・展開ができるのではないかと考えておりました。すでに、アミノ酸系や高分子系の多種・多様な材料が化粧品へのゲル化剤・増粘剤として実用化されているようでもあり、そのようなニーズは、もはや存在しないとも考えておりました。一方、大学において、新しい物質や材料を研究・開発する際には、遠い目標として、例えば、「化粧品として応用できる」などとして多様な材料が開発されていますが、その目標や目的に、本当に社会的なニーズがあるのかと不安を覚えることが多々あります。

このような不安を抱えながら、最近、フッ素系油が水にも油にも相溶しないことから、化粧品に用いられており、低分子量のゲル化剤の研究例としてもフッ素系油を対象としたゲル化は稀有であることから、本研究課題の発想に繋がりました。本研究で開発した有機ゲル化剤は、リオトロピック液晶材料とは異なるメカニズムでのゲル化が示唆されていましたが、本研究助成を賜ったことで、形成したゲルに関するレオロジー特性に関する研究は大きく進展することができました。

新たな研究に対する駆動力を与えていただいたコーセーコスメトロジー研究財団と関係者各位には重ねて御礼申し上げます。

（山口大学大学院創成科学研究科）

2017 年度　研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

紀和　利彦

私たちは、「テラヘルツ波」と呼ばれる電磁波を用いた計測システムの開発に取り組んでいます。テラヘルツ波は、300 マイクロメートル程度と可視光に比べてはるかに長い波長を持っています。近年、半導体工学、レーザー工学の発展とともに簡単に利用できるようになってきました。

テラヘルツ波を用いる技術のひとつとして、断層を可視化することができます。波長が長いために、可視光に比べて散乱が少なく、皮膚などの複雑な構造を有するものに対してアドバンテージがありました。

コスメトロジー研究助成を受けて、原理実証、基礎基盤技術を確立することができました。これにより、化粧水が皮膚へ浸透するスピードを定量的に評価することが可能となりました。これにより従来に比べて化粧水の評価を迅速簡単に実施することができ、新しい化粧水の開発に貢献できると考えています。

現在化粧品・美容に関する論文が急増しています。しかしながら、科学研究予算の観点では我が国の支援は遅れており、今回いただいたような助成は、大変ありがたく、また分野発展に重要な役割を果たされていると感じています。

引き続き、財団のご発展を祈念しております。

（岡山大学大学院ヘルスシステム統合科学研究科）

2018 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

白神　慧一郎

水は我々の生活で最も身近な物質であり、なおかつ H_2O というシンプルな化学構造を持つため現代科学では水の容態を隅々まで理解できているとお考えの方も多いのではないでしょうか。しかし外面の良さの反面、物理的性質に起源を有する水の本質は謎に包まれており、例えば水の密度が 4℃で最大となる理由を巡って未だ長い論争が続いています。そのため、今日隆盛を極める分子生物学をもってしても生物中で振る舞う“水”の生物学的な役割や機能に関する知見はほとんど得られておらず、著名な教科書であっても生細胞内の大半を占める水に関する記述は数行程度しか見られないのが現状です。

私は 2011 年に学部生として研究を始めて以降、主にテラヘルツ分光を用いて細胞中の水の物性評価に従事してきました。光と電波の中間周波数領域に位置し、両者の性質を併せ持つテラヘルツ波は近年急速に応用開拓が進んでおり、テラヘルツ帯の分光情報が細胞・組織中の水の“質”を映し出すことに着目し、私は「生命に関わる水の役割を解き明かす」ことを目指して研究を行っています。皮膚は体内から水の損失を防ぐバリアとしての役割を持つだけでなく、皮膚そのものの機能が水の存在によって支えられています。さらに皮膚の潤いは外観にも影響を及ぼす重要な因子であるため、皮膚の中で振る舞う水を正しく理解することは皮膚科学のみならず化粧品学にも微力ながら貢献を果たせる可能性があると期待しています。最後になりましたが、本研究助成に採択していただいたコーセーコスメトロジー研究財団および関係者の皆様に心より感謝申し上げます。

（理化学研究所生命医科学研究センター）

2017 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

棚谷　綾

この度は、コスメトロジー研究助成に採択いただき、誠にありがとうございました。今回採択いただいた研究は、ビタミンDの新規誘導体を創製する医薬化学研究です。私は今は理学部に所属しておりますが、薬学部出身です。私の学位の研究は有機構造化学の基礎研究でしたが、学生時代の所属研究室ではビタミンAの医薬化学研究を行っており、合成化合物が皮膚疾患やがんの治療に有効性を示す様子や医薬品化される過程を目の当たりにしてきました。学位取得後は工学部でのポスドクや東大分生研での助手をへて現職に就き、現在、主宰する研究室では、構造有機化学と医薬化学研究を半々で行っています。医薬化学研究ではなかなか基礎研究の域を脱しませんが、今回のような研究助成に採択されたことを励みに、学生とともに創薬の夢を持って研究していきたいと感じています。

私が所属するお茶の水女子大学理学部化学科では、化粧品に興味があり、化粧品開発に携わりたいとあこがれる女子学生がたくさん入学してきます。ただ、学生の興味の大部分はメイク・ファッションとしての化粧品の領域に留まっており、素人レベルで空回りしていると感じています。今回の研究助成を受けたことをきっかけに、なんとか理学部でも、学生の意識や知識、技術の改革を行い、専門的な観点から化粧品に興味を持ち、将来、化粧品業界に貢献できる人材の育成ができないかと考えるようになりました。研究自体は、優秀な学生に支えられ、今回の研究助成の短い期間にも、手間のかかる誘導体の合成を幾つも達成することができました。精一杯頑張ってくれた学生達のためにも、研究成果を社会貢献につなげるとともに、彼女達を育て社会に送り出すことが大切な使命であるとつくづく実感いたしました。研究の推進と、このような思いを抱く機会を与えてくださいましたコーセーコスメトロジー研究財団に、心よりお礼申し上げます。

（お茶の水女子大学基幹研究院自然科学系）

2018 年度　研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

中島　章

筆者はこれまで「光触媒を用いた環境浄化」と「固体表面の濡れ制御」に関する研究を実施してきた。これらの知見から、一昨年、希土類を含むモリブデン酸複合酸化物であるLMOを合成空気下で焼成したところ、自己撥水性と抗菌活性だけでなく、優れた抗ウイルス活性を長期間、暗所下においても発現する、これまでにないまったく新しい酸化物環境材料であることを知見した。これらの研究を通じて抗菌・抗ウイルス活性の評価に関してKISTECとの共同研究体制を確立し、今回の申請に繋がった。

治療法が確立されていない、今回のCOVID-19のような新規ウイルスが我が国に入れば、国の存亡に拘わる危機となる。これら各種ウイルスに対しては、すべての人が免疫を持っていないため、世界的な大流行（パンデミック）が起きれば、大きな健康被害とこれに伴う社会的損失をもたらすことが、今回の事例で明らかになったと言える。

ウイルス感染症の治療法に関する研究は医療分野を中心に行われているが、その「予防」や「拡大抑制」に関する研究は、極めて限定的にしか行われていない。しかしながら一度ウイルスパンデミックが発生すると、ワクチンの接種が医療機関で可能になるのには6か月以上を要し、その間は各自が持ちこたえなければならない。「予防」や「拡大抑制」に関する研究は喫緊の課題である。また豚コレラ等の家畜へのウイルスの広がりも、人類の食糧供給に深刻な危機をもたらす。たとえワクチンが開発・入手できても、耐性ウイルスの発生や、ワクチン投与による食肉の信頼性低下を招く。ウイルスとの攻防で今人類に必要なのは、ワクチン頼みの発想や体制からのゲームチェンジであり、本研究で開発できた抗ウイルス材料は、その切り札となり得る。

今回の貴財団から頂いた助成は、筆者にとっても、この内容に関する研究費が不足していた折であり、非常に有り難かった。頂いた経費を活用させて頂き、LCMOという新規の抗ウイルス材料を開発することができた。本研究の成果はウイルス対策における単なる経済効果だけでなく、人間社会がウイルスとの戦いにおいて新たな盾を手にすると

いう点において、極めて重要であると考える。さらに、近年我が国で頻発する大規模自然災害等の被災地での衛生環境確保の面においても、本研究の成果は有効な材料技術を与えることになると確信している。

（東京工業大学物質理工学院）

2017 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

平井　洋平

このたびは、貴財団から研究助成を賜りまして心より感謝いたします。採択頂いた課題は表皮前駆細胞から様々の表皮由来細胞へ分化誘導できる因子のスクリーニング系をiPS細胞から構築するといったものでした。これは、化粧品原料の活性評価には実験動物が使えず、また、表皮幹細胞の未分化状態は安定して維持できないことを鑑みての提案でした。おかげさまで、dox/tetによるBMP4の発現誘導系と、目的分化を遂げた時に発現開始される物質のプロモーターを用いることで安定に維持・増殖できるiPS細胞から単純な処理で表皮由来の分化細胞が調製できることがわかりました。

もともと私がこれまでに行ってきたのは、体中の様々な細胞・組織の形態形成や、それに続く機能発現機構に関するものでした。その中で、皮膚の細胞としてはHaCaT細胞や初代表皮細胞を用いた経験があったのですが、培養下でのそれらの細胞挙動があまりにも違っているために、得られた知見をそのまま産業利用するのは危険ではないかと気になっておりました。また、現在は初代の表皮前駆細胞も入手可能な状況にはありますが、この細胞も極めて不安定で高精度の実験が困難である可能性が指摘されていました。今回得られた細胞は、正常な万能細胞を出発材料にしたもので、そういった意味では生体の表皮前駆細胞の挙動を調べるのに最適ではないかと考えています。ただし、今回用いたのはマウスのiPS細胞なので所謂プロトタイプに相当し、実用化にはヒトES/iPS細胞の系が必要になると思われます。

コスメトロジーという概念は、皮膚科学を含む極めて広範囲からのアプローチを受け入れるものであり、その中に発生生物学や分子生物学も含まれると思います。これからも細胞の分化制御機構研究の深化が「コスメトロジー」の発展に大きく寄与できることを心より願います。

（関西学院大学理工学部生命医化学科）

2018 年度　研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

五十里　彰

この度、2018年度研究助成をいただきありがとうございました。皮膚顆粒層のバリア形成には、タイトジャンクションに発現するクローディンが重要な役割を担うことが知られていましたが、その発現や機能の調節機構は大部分が不明でした。クローディンには27種類のサブタイプが同定されており、組織選択的に各サブタイプが発現しています。クローディン-1ノックアウトマウスは、脱水症状によって生後まもなく死亡することが報告され、顆粒層バリアの形成にクローディン-1が重要な役割を果たすことが明らかになっています。また、クローディン-1の発現量がアトピー性皮膚炎の症状と逆相関することが報告され、皮膚疾患との関連も明らかになってきました。敏感肌・乾燥肌の保湿ケアにおけるコスメトロジーの観点及びアレルギー性皮膚疾患の治療補助としてのファーマコロジーの観点から、クローディン-1を起点とした顆粒層バリアの維持機構の解明が必要であると考えました。

本研究助成において、細胞障害をほとんど誘発しない程度の紫外線照射や過酸化水素処理により、クローディン-1の発現量は変化しませんが、細胞局在が異常になることを見出しました。この異常機構を解析し、プロテインキナーゼCの阻害による脱リン酸化機構が重要な役割を果たすことを解明しました。また、E3-ユビキチンリガーゼによるユビキチン化が、クローディン-1の局在異常に関与することを突き止めました。クローディン-1の発現低下

を抑制するだけでなく、その細胞局在の異常を改善する化合物は、皮膚の保湿ケアに有用であると考えられるため、今後のさらなる検討が期待されます。公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団におかれましては、斬新な発想で重要な課題解決に挑戦するような研究課題を積極的に助成していただき、コスメトロジーのさらなる発展に寄与していただくことを期待しております。１年間大変お世話になり、ありがとうございました。

（岐阜薬科大学生命薬学大講座）

2018 年度　研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

伊藤　敦

このたびはコスメトロジー研究助成に採択していただき心より感謝申し上げます。申請課題はＸ線顕微鏡による毛髪のUV酸化ダメージの可視化に関する研究です。実験室内での研究と異なり、大型加速器である放射光の共同利用実験に参加するため、施設までの交通費、滞在費など、また、特殊な薄膜上に試料を装着するために特注品の薄膜に当初よりかなりの費用がかかるなど、通常の実験にくらべて予算項目が随分偏ったものとなりました。しかし、本研究助成では多様な研究方法にも柔軟に対応していただけた点は大きな特徴で、大変有り難く感じております。１年間の助成ではありましたが、幸い夏前の第１回目の加速器利用実験からデータが得られはじめ、何とか秋の学会に成果を発表することができました。さらに短報でも学術雑誌に投稿できればと考えております。

私たちはＸ線を用いて、毛髪の酸化ダメージをサブミクロンの高解像度で画像化することを行っております。酸化ダメージ産物を試料を破壊することなく高解像度で分布観察することは他の手段では困難なＸ線顕微鏡特有の観察方法です。本研究ではUVによる酸化ダメージにその手法を適用し、さらにUVA、UVBによって区別される波長領域によるダメージの違いを明らかにすることを目的としました。結果として、UVの透過度に応じて毛髪表面からのダメージ分布の違いを示すことができました。加えて、通常の太陽光照射試料においてもダメージが検出されました。このようなデータに基づいて将来的には、皮膚のUV障害防止にUVA、UVBそれぞれに対応したサンスクリーン剤が使用されているように、毛髪においてもそれぞれのUVを考慮した防護剤が開発されるなど、さらにUV防護の研究開発が進展することを願っています。

（東海大学工学部原子力工学科）

2018 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

小暮　健太朗

我々の研究をご支援いただき、ありがとうございました。本研究は、通常の文科省科研費などでは、助成対象になり難いテーマであるため、研究をご支援いただきとても助かりました。これまで我々は、イオントフォレシス（イオン導入）による経皮薬物送達研究に取り組み、高分子化合物やナノ粒子の非侵襲的皮内送達に成功するとともに、イオントフォレシス時の微弱電流が組織細胞の生理機能を変化させ組織細胞間隙の開裂や細胞取り込み誘導が起こることを明らかにしてきました。これらのことから、イオントフォレシスが皮膚組織を様々に活性化するのであれば、炎症なども誘起されるのではないかと常々思っておりました。さらに、イオントフォレシスは美容領域において「イオン導入」として認知され汎用されているようですが、ヒトへの安全性に問題はないのかと疑問に思っておりました。しかし、それらの検討には経済的問題があったのですが、科研費や一般の助成では、採択されることはありませんでした。そのような状況下で、貴財団のコスメトロジー研究助成に採択していただき、イオントフォレシスによる皮膚への影響を評価することで、微弱電流処理が皮膚に炎症などを惹起しない可能性が示唆され、安全な技術であることが確認できたと考えております。我々は、本研究によってイオントフォレシスの負の効果が否定されたと考えておりま

すが、正の効果についても調べる価値があると考えております。すなわち、微弱電流によって皮膚組織細胞のシグナル伝達系が活性化されることで、皮膚の機能性関連因子、例えばセラミドやコラーゲン・エラスチンなどの発現が誘導され皮膚機能性が向上するのではないかと期待しております。今後、これらの点にも着目して微弱電流の皮膚組織に及ぼす影響を詳細に検討したいと思っております。今後も、私共の研究へのご高配を賜りますようお願い申し上げます。

（徳島大学大学院医歯薬学研究部）

2017 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

佐々木　栄太

この度は、コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成に採択いただき、誠にありがとうございました。財団および関係者の方々に深く御礼申し上げます。海外でのポスドク期間を経て、日本で助教として新しい研究プロジェクトを開始した直後のタイミングでこのような助成をいただけたことは、大変ありがたく、また励みとなりました。

私のこれまでの人生においては、コスメトロジーという言葉自体にあまり馴染みがなく、まずはその意味を検索するところから始めました。公募要領の対象課題分野や過去の研究報告を調べると、実にさまざまな研究に関連することがわかり、財団の懐の深さに敬服するとともに、コスメトロジーという分野に興味が湧いてきました。折しも私生活においても、30 代半ばを過ぎ、人は見た目も大事と説く妻から、肌の手入れについてレクチャーされるような日々でありました。研究助成の採択を一緒に喜んでくれた妻も、まさか私がコスメトロジー関連の研究に応募していたとは思いもよらなかったようで、大変な驚きようでした。今後は当財団の研究助成者の名に恥じぬよう、自らの肌ケアにも注意しなければと思う所存です。

さて、本研究課題においては、脂質過酸化物感受性蛍光プローブを創出し、さまざまな酸化ストレスによって細胞内で生成する脂質過酸化物をイメージングする手法の開発を目指しました。コスメトロジーにおいては、これらの酸化ストレス状態の予防や、酸化ストレス状態から正常状態への回復が重要な課題であると認識しております。実用的なプローブ開発にはまだ道半ばですが、将来的には活性酸素を分解する働きを持つ抗酸化酵素や、内因性・外因性の抗酸化物質による肌機能の維持や回復の効果を検証するためにも、このような手法が有効なのではないかと考えています。今後もコスメトロジー関連の研究動向に注目しつつ、研究を進めていきたいと考えております。末筆ながら、コーセーコスメトロジー研究財団の益々のご発展をお祈り申し上げます。

（東京大学大学院農学生命科学研究科）

2017 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

清水　史郎

この度は、貴財団の研究助成に採択していただき、誠にありがとうございました。新たな共同研究として発展することができる挑戦的なテーマに取り組むことができました。以下、多少抽象的ではありますが 2 年間の雑感を記したいと思います。

ご存知の通り、質量分析法の発展により微量なタンパク質翻訳後修飾の検出が可能となり、網羅的な解析がなされるようになってきましたが、個々のタンパク質に対する検証はまだ十分ではありません。私は、所属している学会が「日本癌学会」「日本がん分子標的治療学会」「日本がん転移学会」など“がん”に関連しているものが多く、必然的に研究対象タンパク質が、がんに関連したものになりがちです。中でも着目している研究は *C*-mannosylation というタンパク質の糖修飾で、これまでにいくつかのがん関連タンパク質を解析してきました。そんな時に研究室の学生から「このタンパク質の解析をしたい」とがんに関係ないコスメトロジー分野の提案を受け、「やってみよう！」と思いスタートしたのが本研究課題です。運よく、目的タンパク質は

C-mannosylationされており一安心でしたが、がん関連タンパク質ではないので研究の進め方がこれまでと異なり、解析が止まりそうになりました。そんな折、学外の多くの共同研究者の先生方との縁で、やっと研究のゴールが見えてきました。私のコスメトロジー研究は始まったばかりですので、これからも様々なものを吸収していきます。

（慶應義塾大学理工学部応用化学科）

2017年度　研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

下田　浩

解剖学の教育と研究を生業とする小生のバックボーンとなっているものの一つに「Beauty is truth, truth beauty」という言葉があります。イギリスの詩人John KeatsのOde on a Grecian Urnの末節に記された言葉ですが、彼は自然や人間の美をこよなく愛し、追求したとされています。人（自然）の形態を研究対象とする解剖学はまさに人（自然）の美を追究する学問であり、研究結果が真実かどうか迷う時は常にその言葉をもって美しいものが真実であると信じています。そして、その思いは数十年来全く尽きることがありません。人の美と健康を探究するという姿勢は解剖学とコスメトロジーに共通するものと感じ、今回「革新的ハイブリッド型三次元ヒト皮膚モデルの開発」について研究助成申請をさせて頂きました。

解剖学は一般的に人体の成り立ちを分解していくイメージが強いように思われますが、私たちはそこで得られた知見を基に人体の美しい組織を創り出す、これまでとは逆向きのベクトルをもった創る解剖学を目指しています。そこで作られるプロダクトは薬剤・再生医療材料・化粧品・化成品の開発や実験動物代替研究モデルへの応用が期待されます。これまで独自の細胞集積法を用いて様々な組織を創出してきましたが、この度拝受いたしました研究助成で脈管網を有するヒト皮膚に類似した立体組織を短期間で簡便に作製できる新たな手法を開発し、血管網の付与が皮膚組織全体の形態・機能の成熟化に有効に働くことも確認することが出来ました。これもひとえにコーセーコスメトロジー研究財団の多大なるご支援によるものであり、関係者の皆様に改めて深謝申し上げます。美しい皮膚組織の再現には未だ改善すべき点も多く、道半ばですが、私共の三次元皮膚モデルが近い将来必ずやコスメトロジーの発展に貢献できますように、今後も精進していく所存です。

（弘前大学大学院医学研究科生体構造医科学講座／神経解剖・細胞組織学講座）

2017年度　研究助成

日焼け止め化粧品、肌荒れと日焼けの悩ましい二択

白土　明子

海外でポスドクをしている友人を訪ねた際、一番喜ばれたのは、彼女の地元の和菓子でもお茶でもお箸でもなく、旅行カバンに入れたまま使わずにいた日本製の日焼け止めでした。友人曰く、こちらは日差しが強く日焼け止めが必要だが、どれを使っても肌が荒れてしまうそうなのです。私自身も日焼け止めで皮膚がかぶれたりかゆみが出ることが多く、サンプルをいくつも試した上で、今は子供用を使っています。一方で、日焼け止めは防水効果も強く、日焼け止めを洗い流すためには洗顔料でしっかり洗う必要があります。「皮膚の表面には常在細菌が住んでいてバリアを作ってお肌を守っています。洗顔しすぎるとこのバリアが壊されるので強くこすらないようにしましょう」化粧品のパッケージには、このような注意書きがあります。「日本製は肌にやさしいのよ、どうしてかしらね」と友人と話すうちに、日焼け止め成分が皮膚の細菌に作用して、バリアではなく良からぬ物質を作って肌を刺激しているかもしれないと、肌に保湿剤を塗りながらおしゃべりしていました。その後に貴財団の助成金に採択いただくことができ、子供の頃からの「日焼け止めを塗ると肌が痒くなる、塗らないと焼けてヒリヒリする、悩ましい問題」への、小さな仮説を調べる機会をいただきました。今回の研究でその全てに答えることはできませんでしたが、日焼け止め成分が、細

菌の受容体経路の活性と遺伝子発現を変化させること、そのような経路には細菌毒性を担う種類が含まれていたことがわかりました。日焼け止めはおしゃれのために肌を白く保つことよりも、昨今は皮膚がんをはじめとした健康上のリスクを減らすために老若男女多くの方が使っています。肌で生じた各種のラジカル群やタンパク質分解酵素などの、肌の恒常性を乱す因子が生じないよう、皮膚の常在菌にも着目することにより、これまで以上に安心して利用できる日焼け止め化粧品が開発されることを、消費者の一人として心待ちにしています。

（北海道公立大学法人札幌医科大学）

2017 年度　研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

世戸　孝樹

この度は、コーセーコスメトロジー研究財団（旧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、厚く御礼申し上げます。今回、助成対象としていただきました研究は化学物質による光毒性リスク予測に関する研究でございます。近年強い関心を集めている動物福祉の観点から、光安全性評価においても動物実験に依存しない評価手法を開発し、社会に貢献したいという一心で研究に取り組んでおります。特に 2019 年に私が所属している研究室にて開発しましたreactive oxygen species（ROS）assayがOECD TG495 として採用され、多くの化学物質の光安全性試験に適用できるようになりました。本手法は光毒性化合物の特性の一つである化学物質の光化学的な反応性を評価することで光毒性リスクを予測することができます。一方で皮膚や眼などの露光部位への分布や蓄積も化学物質による光毒性惹起の重要なファクターとして知られております。露光部位への曝露について信頼性の高い評価を達成するには未だ動物実験あるいは今回の研究で使用した動物組織を用いた実験が避けられないのが現状です。しかしながら、科学技術の発展により生体内の組織を模倣した 3D 培養組織、あるいはヒト皮膚などの生体膜を模倣した人工膜の開発も進んでおり、これらを利用した in vitro 皮膚曝露評価法の確立により、完全に実験動物を使用しない評価系の構築が可能になってきつつあります。今後も様々な技術を応用し、化学物質による光毒性のメカニズムの解明ならびに実験動物に依存しない光安全性評価系の構築を目指し、さらなる検討を推進し、光安全性に優れた製品開発に貢献していきたいと考えております。

（静岡県立大学薬学部薬剤学分野）

2018 年度　研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

田中　沙智

この度は、コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成に採択していただき、誠にありがとうございました。コスメトロジーに関連する研究を進めるにあたり、貴財団より大変心強いご支援を賜りましたことを心より感謝申し上げます。

私は、食品由来成分の免疫系に対する影響について免疫学・食品科学の視点から明らかにする研究を展開しており、食による免疫機能調節効果および免疫関連疾患の予防法の確立を目指して研究を進めています。その中で、食品由来成分の一つであるポリフェノールの化学構造と生理作用に関する研究を進めており、りんごやブドウ、緑茶などに含有し、ポリフェノール類の一種であるプロシアニジンB2（PCB2）とガレート基を有するPCB2 に着目し、これらのT細胞の機能制御への関与について解析を行ってきました。その結果、PCB2 ガレートはT細胞に直接作用し、慢性炎症や自己免疫疾患に関わるサイトカインの産生を抑えることを明らかにしました。本研究では、これらの知見を生体内で評価するための実験系を確立するために、イミキモド誘発乾癬モデルマウスをつくり、ポリフェノール類の摂取による乾癬抑制効果について検討を行いました。今後は、PCB2 ガレートによる乾癬抑制のメカニズムについて詳細を明らかにしたいと考えています。ご協力くださいました

共同研究者の先生方や研究室の学生に深く感謝するとともに、今後は、研究成果を論文や学会などで発表し、その成果を社会に還元できるよう邁進していきたいと思っております。

最後に、本研究をご支援いただいたコーセーコスメトロジー研究財団および関係者の皆様に心より御礼申し上げます。

（信州大学農学部）

2017 年度　研究助成

視野を広げたコスメトロジー研究助成

野口　範子

私は、生体の酸化ストレス障害のメカニズムと、ビタミンEをはじめ様々な抗酸化物質の酸化障害抑制メカニズムに関する研究を行ってきました。2000 年前後から、血管の内皮細胞を様々な脂質酸化生成物や抗酸化物質で刺激した時の遺伝子発現について、DNA マイクロアレイを用いて網羅的解析を行い、動脈硬化を促進もしくは抑制する因子の発見に努めてきました。その後、研究対象が動脈硬化からアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患に移行しました。そんな中で、コスメトロジー研究助成に出会い、自分の知識や経験そして技術を活かして、どのようにコスメトロジーに貢献できるか深く考える機会を得て、視野が広がり、また新しい分野に挑戦することができました。今回採択いただいた研究は、皮膚の細胞で保護作用を示すことが明らかになったDJ-1 というタンパク質の分泌機構を明らかにすることを目指したものです。2016 年に大隅良典先生がノーベル生理学・医学賞を受賞された“オートファジー”が関与する非典型的な分泌機構により、DJ-1 が分泌されることを明らかにしました。今後さらに研究を重ね、発信をすることにより、DJ-1 というタンパク質を介してコスメトロジーへの関心が高まるよう努力を続けたいと考えています。私の研究室では、DJ-1 は家族性パーキンソン病の発症に関係する遺伝子がコードするタンパク質として注目してきました。研究は思わぬところでつながっていたり、面白い流れができたりするものであることを、コスメトロジー研究助成を受ける中で体験することができました。最近、私の研究室の学生が就職する業種に化粧品関係が増えてきています。興味深いことに、本人の研究は、直接コスメトロジーをテーマにしているわけではないのです。おそらく研究室のゼミにおいてコスメトロジーが話題に出る中で、学生の視野も広がっているのではないかと推察しています。

（同志社大学生命医科学部）

2018 年度　研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

原口　省吾

私はもともと神経科学系の研究を行っており、脳内で合成されるステロイドホルモン、ニューロステロイドについて研究を行っておりました。しかし現所属である昭和大学医学部生化学講座に着任したのを期に、それまでとは異なる研究を立ち上げようとしてはじめたのが、本研究助成を頂くことになった皮膚でつくられるステロイドホルモンの研究です。

ステロイドホルモンというと精巣、卵巣、副腎でつくられることがよく知られていると思いますが、ヒトのほとんどの臓器にはステロイドの代謝に関わる酵素が発現しています。これらの臓器で発現しているステロイド代謝酵素は、生殖腺や副腎から血流に乗ってやってきたステロイドホルモンを基質として臓器特異的な代謝を行うことで、臓器の機能発現を助けています。

皮膚機能の制御にもステロイドホルモンが重要なことはよく知られており、女性ホルモンであるエストラジオールがコラーゲン産生を促すことから、女性ホルモン様の作用を持つ大豆イソフラボンが化粧品に使われたりしています。他にも男性型脱毛症において頭皮の5α-リダクターゼにより代謝されてできる5α-DHT が脱毛を引き起こすことから、5α-リダクターゼ阻害剤が治療に使われています。

一方で、皮膚にステロイド産生系が存在することは以前

より分かっていましたが、血流にのり皮膚にやってくるステロイドの働きと、皮膚がつくるステロイドの働きの切り分けが難しく、皮膚のステロイド産生系の意義には良くわからない部分も多くありました。しかし、本助成により行った研究から、皮膚のステロイド産生系はステロイド濃度の変化を感知するセンサーとしての役割があり、皮膚のステロイド量の恒常性を維持しようとする機能があることが分かってきました。今後は古くから存在が知られていた割に何をしているのかよく分かっていなかった皮膚ステロイド産生系の機能解析を進めることで、皮膚の健康や美に貢献できるような研究を展開していきたいと思います。

最後になりましたが、ご支援を頂きましたコーセーコスメトロジー研究財団に改めて感謝申し上げます。

（昭和大学医学部生化学講座）

2017 年度　研究助成

妊娠中の化粧品との上手な付き合い

樋浦　仁

妊娠中に使用する化粧品、薬剤は胎盤を通して、長期間蓄積し、胎児へと移行する。そのため胎児の発育や出生後の成長、精神・神経学的な発達に影響を及ぼす可能性をはらんでいます。また、我々を含め世界中の数多くの研究者が、ヒト胎盤に関する研究を行っています。しかし、胎盤組織は母体組織の混入が多いため、研究結果に再現性が見られず、研究者間で報告が異なることがしばしば見られます。また胎盤の機能解析には、従来初代培養細胞や絨毛癌細胞を使用し、それより得られた様々な情報から正常細胞での機能を類推するという方法あるいは遺伝子変異マウス胎盤の病理組織学的解析により行われてきました。しかし、これらの研究結果をそのまま正常の機能と考えるには無理があります。ヒト胎盤幹細胞は、これらの問題を克服し、ヒト胎盤の発生、機能に関する研究を行う上で必須な細胞ツールとなると考えられます。本研究成果では、ヒトTS細胞を用い、胎児への有害事項を明らかにすることです。仮に有害であることが判った場合、そのリスク情報を公表し、ばく露回避に必要な基礎資料として活用することで、リスク管理を実現することが可能と考えられます。また、出生児の健康問題に不安を抱く両親に対し適切な情報を提供することもでき、その社会的にも意義は大きいと考えられます。また、妊娠中の安全な化粧品の開発に大きく貢献するだけでなく、周産期異常をもたらす他の疾患のモデル細胞作製および病態解明へと道を開くものと確信しています。

最後に、ごく最近、国内の化粧品会社の研究員から相談を受け、当研究室で一緒に研究したいとの依頼を受けました。大学との話し合いの結果、本年4月からクロスアポイントメント制度を利用し、教員として働くことになりました。今回の申請の成果が若手人材育成につながったものと信じています。今回コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成に採択頂き、深く感謝申し上げます。今後更なる努力を続け、ヒトの健康に関わる成果を上げたいと考えています。

（東北大学大学院医学系研究科）

2018 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

藤井　博

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成をいただき、深謝いたします。

本研究は、皮膚の恒常性維持において重要な表皮基底層幹細胞およびTA細胞のマーカー遺伝子として同定された上皮細胞型脂肪酸結合タンパク質（FABP5）に着目し、表皮角化細胞におけるこの遺伝子の発現と機能制御機構の解明を目指したものです。得られた研究成果は、保湿効果やアンチエイジング作用を有する化粧品の開発など、コスメトロジーの発展に貢献する可能性が期待されます。

FABP5は、脂肪酸の細胞内輸送に関与しており、表皮有棘層、顆粒層および皮脂腺などで発現し、皮膚の水分保護バリアー形成や脂質代謝制御において重要な機能を果たしていることが示唆されていますが、詳細な分子機構は解

明されていません。幹細胞が分化したTA細胞は、幹細胞に比べて高い増殖・分化能をもち、皮膚の創傷治癒力や老化において極めて重要な機能を果たしていることから、皮膚の表皮基底層幹細胞・TA細胞および表皮角化細胞の恒常性維持機構（維持・増殖・分化機構）の解明は、コスメトロジーの発展に貢献するだけではなく、生命現象の基本的メカニズムの解明にもつながる可能性が期待されます。さらに、本研究課題の所期成果は、FABP5および核内受容体シグナル（PPARβ/δ, ERRαなど）の破綻に起因する皮膚疾患（がん、乾鮮、炎症など）の予防・治療法の開発や老化メカニズムの解明にも貢献する可能性が期待されます。

また、がん細胞の起源は組織幹細胞であるとする説が提唱されていますが、本研究課題の成果は、正常皮膚幹細胞の老化やがん化のメカニズムの解明にもつながる可能性が期待されます。このように、本研究課題の所期成果は、コスメトロジーおよび医療分野におけるイノベーション創出に貢献する可能性が期待されます。本研究課題をさらに発展させるために、今後より詳細な解析を続けたいと考えています。

（信州大学先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所）

2017年度　研究助成

Treg研究とコスメトロジー

堀　昌平

このたびはコーセーコスメトロジー研究財団の2017年度研究助成に採択していただき、誠にありがとうございました。私はこれまで専ら免疫学分野において制御性T細胞（Treg）という免疫応答を抑制的に制御するTリンパ球サブセットの研究に取り組んでまいりました。Tregの異常は自己免疫疾患、炎症性腸疾患、アレルギー、がんなど様々な疾患の発症に深く関わっていることから、近年世界的に大きな注目を集めており、研究が進んでいます。マウスにおいてもヒトにおいてもTreg分化と機能を司る“マスター転写因子”Foxp3の遺伝子変異により激しい皮膚炎が発症することからも、皮膚における炎症制御にTregが中心的な役割を担っていることがわかります。また近年、皮膚にはTregが多数存在しており、その役割は免疫制御を超えて、毛包幹細胞の維持や創傷治癒など、皮膚の恒常性維持においても重要な役割を担っていることが明らかにされています。このことからも、Treg研究はコスメトロジーの世界においても今後重要になってくるのではないかと思っております。私がTreg研究に取り組み始めたのは22年前になりますが、当時このような研究の広がりを見せようとは夢にも思いませんでした。今回いただいた助成金は専ら皮膚におけるTregの集積機構と炎症制御機構の解析に使わせていただきましたが、得られた知見をさらに発展させ、コスメトロジーの発展に貢献できればと思います。最後になりましたが、本研究をご支援いただいたことに改めて深く御礼申し上げるとともに、コーセーコスメトロジー研究財団のますますのご発展を祈念申し上げます。

（東京大学大学院薬学系研究科）

2018年度　研究助成

有機化学と食品化学の融合がもたらしたもの

水野　雅史

この度は、コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成事業に採択頂き、誠に有り難うございました。今回採択頂いた課題は、皮膚改善効果を有することが知られているセラミド中のスフィンゴイド塩基に相当するスフィンゴジエンの立体異性体のうちどの構造が生理活性を有するのかを明らかにするため、有機合成分野と食品化学分野が融合して解明にあたった当研究室として初めての試みであった。

我々の研究室では、これまで腸管からの吸収状態を反映させた疑似モデルを開発し、炎症やアレルギーが発症した条件下での食品因子の機能を明らかにしてきた。その成果としては、キノコ由来の高分子多糖であるβ-グルカンが腸上皮細胞に発現しているグルカン受容体を介して認識され、基底膜側に存在する腫瘍壊死因子（TNF）-αを認識するTNF受容体の発現を抑制することで、炎症状態への反

応を緩和していることなどを明らかにしてきた。また、植物由来のグルコシルセラミドに関しても腸上皮細胞から吸収・代謝されて生成されたスフィンゴイド塩基が活性成分であることを明らかにしてきた。しかしながらこのスフィンゴイド塩基の部分には立体異性体が存在していて、どの構造が活性に寄与しているかを明らかにする手段がなかった。しかしながら今回申請をするにあたって、同研究科の他分野（有機合成）と初めて共同研究をすることで、シス・シス体が最も活性を有していることを明らかにすることができた。このことは、今後我々の研究室における研究発展の礎になる共同研究として位置づけられ、貴財団研究助成のお陰と感謝している次第です。

最後になりましたが、本研究に対してご支援下さいました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団および関係者の皆様に感謝いたしますと共に、化粧品学の発展をお祈り申し上げます。

（神戸大学大学院農学研究科食品・栄養化学）

2017 年度　研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

村田　光麻

このたびは、コーセーコスメトロジー研究財団より大変貴重な研究助成をいただき、心より感謝申し上げます。

私事ではありますが、大学院博士課程3年次（2014年8月）に、第一子が誕生しました。双方の両親は遠方に在住し、妻も研究者として働いていることから、2014年10月－2015年3月の半年間、休学して育児に専念し、その後も均等に育児をしています。そのため、博士論文の提出が遅れ（博士過程5年次：2017年3月）、十分な就職活動ができず、2017年4月時点では、自費研修員の立場で、大学病院で医師として臨床業務を併務しながら研究を継続していました。その状況では研究に十分な時間をとれなかったため、学術振興会の特別研究員（RPD）に申請するとともに、本研究助成にも応募しました。

このような、不安定な状況の駆け出しの研究者に対しても、十分な研究の機会をいただけた財団の懐の深さに感銘を受け、なんとか研究者として自立したいと考えてこの期間を過ごしました。今後も、申請者の立場に寄り添った支援を続けていただけると大変嬉しく思いますし、さらなる支援の拡大への期待をもって所感といたします。

（京都大学大学院医学研究科皮膚科学講座）

2017 年度　研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

茂木　精一郎

この度は、コスメトロジー研究助成に採択頂きまして誠にありがとうございました。お蔭で今後の研究の基盤となる研究成果を得ることができまして、関係者の皆様に心より感謝致します。

既に人口の4分の1が65歳以上という超高齢者社会を迎えている我が国においては、人口の高齢化に伴って、皮膚の虚血障害によって生じる病変（褥瘡や末梢循環障害など）を有する患者数も増大し、予防・治療・管理の重要性はこれまで以上に高まると考えられます。老化による皮膚の虚血、酸化ストレス障害に注目し、その後の皮膚障害・皮膚潰瘍の発生を少しでも予防、抑制できるような薬剤を開発することができれば、医療費や人件費、労働量の削減につながるのではないかと考え今回の研究を着想しました。さらに今回の研究成果によって、紫外線などで誘導される皮膚酸化ストレス障害によって促進される皮膚老化を予防できるような革新的な薬品、化粧品の開発に貢献できれば幸いです。

（群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学）

2017 年度　研究助成

コスメトロジー研究助成を拝受して

森山　博由

本研究助成は、これまで我々が培ってきた基礎皮膚科学の研究の歩を支援していただけたことに限らず、いくつかの基礎研究成果を実効性の高い実用化研究へ応用することへの思慮を真に見出す契機にもつながるなど、その効果は資金面から社会貢献の在り方にまで波及するたいへん有り難い福音となった。

基礎研究を推進するには当然にその研究資金の効果的な配分が必須であり、同時に何をどのように優先的に進めていくのかが肝要になる。この方向性を再確認させていただいたのも本研究助成の支援が大きい。公的な資金との棲み分けや関連性を意識しながら、研究の歩を着実とするための連携・連動性について、改めて認識を深め、適時適所の再構築を施すことができた。これにより律速があった実験もある程度円滑に稼働できるようになったことは大きく、ある種研究室を運営する体制づくりの再構成にも貢献した。さらに、そこから紡ぎ出せた結果について、それらが例え芽吹く程度のものであったとしても、実社会での何らかのニーズを満たす効能効果にアクセスすることが可能か否かについて考えを議論する場を与えるなど、若い研究者の卵を巻き込んで、基礎研究が社会貢献につながる可能性にも考えを巡らすことができるようになったことは、まさに“新たな再発見”であった。このようなタイプの研究助成のご支援があるからこそ、基礎研究と社会がつながるきっかけが生まれ、社会に寄り添う科学の種が芽吹くのだと実感した。

本研究助成には是非今後も多くの研究を支援していただき、香粧品学の裾野を広げる活動から新規性の高い開発型の画期的な研究成果を生み出す原動力となるよう、心からの御礼とともに今後の研究支援のご事業の発展を心よりお祈り申し上げる。

（近畿大学薬学総合研究所）

2017 年度　研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

山上　淳

このたびはコスメトロジーの研究助成をいただき、誠にありがとうございました。この研究課題は、表皮細胞間接着分子の発現増強条件の検討から総合的に皮膚機能を評価する計画で、得られた成果はさまざまな側面からコスメトロジーの発展に貢献できると考えております。

表皮細胞間接着は皮膚の基礎機能であり、より強固な接着機能を持つ皮膚を保つにはどうすればよいかという知見から、長く皮膚の健康を維持するための情報を蓄積していくことが不可欠です。今回の研究で、ステロイドが表皮細胞間接着分子の発現の増加を通じて、細胞間接着の強化に関与することが解明されたことから、ステロイドと同様の効果を発揮しうる化合物を探索することにより、新たな化粧品開発戦略・製品品質管理に関する新しい情報を発信できる、という可能性を提示できました。コスメトロジーに関わりの深い分野として、角層が皮膚のバリア機能の最前線を担い、真皮の膠原線維と弾性線維が皮膚の弾性に主要な役割を果たしていることが知られています。しかし、その一方で今まで表皮における細胞間接着が注目されることは少なく、今回の研究が新しい分野を開拓する一つのきっかけになればと考えております。これからの日本は、かつてないほどの高齢化社会を迎えることになります。老齢の域に達しても健康でみずみずしい皮膚を保持するのは、すべての日本人にとって大きな関心事になってくるでしょう。今回の研究から得られた表皮細胞間接着強化の条件検討の結果は、将来の日本人の皮膚の健康維持において重要なデータとなることが期待されます。

今回の研究助成をいただいたことへの感謝を忘れず、これからますます多様化が求められるコスメトロジーに少しでも貢献できるよう努力してまいります。

（慶應義塾大学医学部皮膚科学教室）

2017 年度　研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

山本　圭

このたびは、コスメトロジー研究・研究助成金をいただきまして、ありがとうございました。研究室を 2016 年に立ち上げ 2 年目となる時期に貴財団からの研究助成は大きな励みになりました。私はこれまでに脂質に着目した基礎研究を続けてきたため皮膚を対象とした皮膚科学やコスメトロジーとは全く無縁でした。大学院の修士課程では屠畜場からいただいてきたブタの血液から精製した脂質代謝酵素の性質を、放射標識した脂質を基質として調べる研究をおこないました。博士課程では研究材料はブタから培養細胞にかわりましたが、基質とする脂質は相かわらず放射標識した脂肪酸でした。大学院を卒業し留学や研究所を渡り歩き、2005 年頃からは脂質代謝酵素ホスホリパーゼ A_2 の生体内機能を遺伝子改変マウスや質量分析装置を駆使して解明する研究に取り組みました。初めて出会った遺伝子改変マウスが「禿げ」であったことから皮膚科学領域に興味を持ち、10 年かけて皮膚バリアを制御する新しい生理活性脂質リゾプラズマローゲンの発見に至りました。遺伝子改変マウスの表現型解析は派手な表現型が論文として纏めやすく、しかも病態に直結すればなおさらのことです。今回、コスメトロジーという観点からこれまでの研究を見直すとリゾプラズマローゲンに隠れて皮膚の恒常性を制御する新しい生理活性脂質の影が見えてきました。今回の研究報告には載せることは出来ませんでしたが、近いうちに発表しコスメトロジー分野に貢献していきたいと考えています。

（徳島大学大学院社会産業理工学研究部（生物資源産業学域））

2017 年度　研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

善本　隆之

2013 年に発表された EU での化粧品開発における動物実験の全面的禁止により、近年、医薬品や化学物質等の安全性評価に関する in vitro 試験代替法の開発が産業界のみならず社会的にも急務とされている。接触皮膚炎を誘導する作用機序は、比較的よくわかってきており、その有害性発現経路（AOP）も既に報告されている。それ故、そのAOP に基づいた複数の動物実験代替法が既に OECD のテストガイドライン（TG）に採択され、正に今日、実際にこれらの TG を用いたデータが認可の判断として使われつつある。ところが、これらの代替法は、それぞれ単独では、従来の動物を用いる試験法を代替することは不可能であるとされ、そのため、AOP に基づいた複数の方法の組み合わせ（IATA）によるより厳密な評価が必要とされている。つまり、OECD の TG は、特殊技能は不要で誰にでもできる単純な試験法であることが必要不可欠ではあるが、免疫反応は複雑で、免疫細胞が時空間的に体全体を移動することにより起こる現象であるため、それを培養細胞系で再現するには、より工夫が必要である。例えば、皮膚で抗原刺激を受けた樹状細胞は、所属リンパ節に移動して初めてその抗原特異的なナイーブ $CD4^+$T 細胞に遭遇し、活性化し増殖と分化を誘導する。さらに、免疫毒性試験法のゴールドスタンダードと考えられている T 細胞依存性抗体産生（TDAR）試験法では、さらに抗原に刺激された $CD4^+$T 細胞が B 細胞を刺激し、抗体産生細胞に分化誘導し、産生される抗体量を測定する方法である。いずれにおいても、免疫細胞の移動を in vitro でも考慮することは重要である。最近、この点も考慮可能なマイクロ流路で繋いだチップ上で人体の生体システム全体を再現する Human-on-a-chip に関する研究も盛んであり、近い将来には究極の動物実験代替法になるのかも知れない。

最後に、私どもの研究に対してご支援を賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団および関係者の皆様に、心より感謝申し上げます。

（東京医科大学医学総合研究所免疫制御研究部門）

2018 年度　研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

若松　一雅

今回の助成のテーマを考えたきっかけは、2013 年にロドデノールを含有する化粧品による「まだら白斑」の発症例が起きたことによります。ロドデノール（RD）は、美白成分として化粧品に含有されていました。なぜ白斑が起こるのか、その原因を探るために、RD 代謝物を化学的に検討することになりました。この誌面を借りて当時の RD 研究を総括したい。

2013 年 RD を配合した薬用化粧品の使用者に白斑の症例が確認され、製品との関連が疑われたためメーカーによる製品自主回収が行われました。RD はメラニン生成を抑制する医薬部外品の有効成分（いわゆる美白剤）として開発され、2008 年の承認後 2 % 配合の薬用化粧品が上市されていました。問題を受け、厚生労働省研究班、日本皮膚科学会を中心に、原因究明のための基礎研究、臨床研究及び疫学調査が進められ、これらの結果、RD の白斑発症機序が徐々に明らかになってきました。

RD は、メラニン生成の出発物質 L-チロシンに似た構造を持ち、チロシナーゼ活性を阻害し、メラニン生成を抑制します。しかし、RD 白斑部位の病理組織所見では、脱色素斑病変部ではメラニンだけでなく、メラニンを生成するメラノサイトそのものが減少、消失していました。このメラノサイトの減少は、メラノサイト内のチロシナーゼが RD を代謝し RD-キノンおよびヒドロキシ-RD を生じ、その強い細胞毒性によって細胞死がもたらされた可能性が示唆されました。この RD からの *o*-キノン体の生成はチロシナーゼ活性と相関するため、チロシナーゼ活性が高い細胞ほど強い細胞傷害を受けることがわかりました。メラノサイトが特異的に傷害される詳細な機序には、1）RD の *o*-キノン体がグルタチオンやタンパク質の SH 基に付加し、修飾されたタンパク質が抗原となって免疫応答が誘導されメラノサイトを特異的に攻撃すること、2）*o*-キノン体が小胞体ストレスを誘導しメラノサイトのアポトーシスを誘導すること、3）RD の脱色素斑病変部に認められた CD4 あるいは CD8 陽性細胞などの免疫細胞浸潤から細胞傷害性 T 細胞がメラノサイトを特異的に攻撃することなど様々な報告や考えがありますが、いずれもその引き金となるのはチロシナーゼの働きで生ずる反応性の高い *o*-キノン体であると考えられました。

皮膚への接触性白斑や色素脱失を誘発する化学物質は L-チロシンに似た構造を持つフェノールもしくはカテコール類であると言われています。先にも述べましたが、接触性白斑の作用機序は単一の経路ではなく、また *o*-キノン体の生成反応以外にも化合物の経皮吸収性や代謝物の細胞内蓄積など、化合物の白斑誘発リスクの評価に際して考慮すべき要素は複数あります。今回のレスベラトロールおよびエクオールの研究は、RD の上記の研究結果を元に行うことができました。今後もフェノール性化合物がチロシナーゼの基質になり、毒性代謝物の産生を証明し、これらの化合物を皮膚へ塗布する危険性について注意を喚起したいと思います。

（藤田医科大学）

2017 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

麻生　典

この度はコーセーコスメトロジー研究財団研究助成を頂きまして誠にありがとうございました。私の専門は法律ですが、化粧品学との関係でも法律は切り離せません。その中でも私は知的財産法を専門としており、この度は香りの法的保護について研究助成を頂きました。

研究助成を頂き、フランスでの香水の調香現場の調査を行うことができました。フランスでの香水の文化的意義や調香手法などを調香師から直接伺い、香水に限定はされるものの、現在のフランスの香気に関する産業の一断面をうかがい知ることができました（フランスにおける香水の調香を知るには、エドモン・ルドニツカ（著）曽田幸雄（訳）『香りの創造（文庫クセジュ）』（1988 年、白水社）が非常に良い本です）。フランスは我が国よりも香りに関する関心が産業的観点からも非常に高く、その価値を法的に保護しようとする指向も強い国です。実際、香りの法的保護について多くの論文が公表され（テーズと呼ばれる博士論文も存

在しています)、定期的に、その保護のあり方についてシンポジウムで取り上げられています。

他方、我が国においては、香水だけでなく化粧品等も含め、その香りの法的保護についての議論は低調です。特許権で芳香物質を保護するということは行われていますが、著作権や商標権（我が国では今のところ商標権では保護対象になっていません）での保護についての議論は盛り上がる気配を見せません。文化的には香道なども存在するにもかかわらず、そして、産業的にも市場規模は小さくないにもかかわらず、不思議とその保護を指向する動きが加速する気配はありません。

今回の研究では、諸外国の法的保護等の探究に留まり、我が国でそうした議論が盛り上がらない産業的背景までは十分にフォローできませんでしたが、今後も研究を継続していきたいと思います。

改めて、コーセーコスメトロジー研究財団研究助成を頂き、香りの法的保護について検討する機会を頂きましてありがとうございました。　　（九州大学芸術工学研究院）

2017 年度　研究助成

コスメトロジーと私のマレーシア研究

小井川　広志

伝統あるコーセーコスメトロジー研究財団研究助成の栄に浴しましたこと、記して感謝申し上げます。多くの申請の中で私の問題意識が認められましたことは、何よりの励みとなりました。光栄に存じます。研究助成金のおかげで、有意義な研究活動を進めることができました。改めて、お礼申し上げます。

開発経済学を専門とする立場から、途上国研究、中でも東南アジア地域研究を続けてきた私にとって、今回の研究課題が認められたことは大きな喜びであると同時に、実はプレッシャーにもなりました。というのも、香粧品科学に関する専門的な知識がなければ、意味ある研究成果が得られないと思われたからです。元々はマレーシア地場企業のフィールドワークを続けていた私が、マレーシアのリーディング産業であるパーム油に関心を持ち、歴史的、経済学的、経営史的視点から研究を開始してまだ数年足らずでした。パーム油の利用は多岐にわたっているのですが、化粧品に関する応用分野は特に高度な化学的知識が要求されるため、本格的な研究をこれまで避けてきたセグメントでした。図らずも、パーム油の化粧品分野での応用可能性をテーマとした今回の応募が認められたことにより、この分野の研究のきっかけを与えられたことは大きな収穫でした。改めて感謝申し上げます。

しかしながら、私の怠惰と能力不足もあり、当初意気込んだ研究成果につながっているか、甚だ心許ないところもございます。まだまだ、この研究テーマでの探究の手を緩める訳にはいきません。しかし、おかげさまで新しい研究テーマの発掘にも結びつきました。マレーシアを窓口にした、ハラル化粧品の世界展開です。これには、インドネシアなどの東南アジア・イスラム国も研究の対象となります。コスメトロジーという切り口で、新たな研究領域に関心を広げる機会を頂けたことをありがたく思います。

最後に、2018.9.～2019.9.の一年間、在外研修の機会を得てイギリスにて別のプロジェクトに従事していました。そのため、研究期間の後半には実質的な研究の進展をはかることができず、また、帰国後は不在分の公務が押し寄せたことと、さらに、研究の最終盤にはコロナ禍で研究が計画通りに進まず、研究成果報告の締め切りを大幅に超過してしまいました。その結果、事務局の方々に多大な迷惑をおかけしたことを謹んでお詫び申し上げます。

（関西大学商学部）

2017 年度　研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

大場　健太郎

この度は、コスメトロジー研究助成をいただきましたことに感謝申し上げます。私は懐かしさを伴う自伝的記憶の心理効果や脳メカニズムに関する研究を行っております。これまでは主に視覚的手がかりを用いて懐かしさを誘導す

る方法を用いてきましたが、それは実験手続き的に容易だから、というのが大きな理由の一つです。しかし香りや匂いによって引き起こされる懐かしさがどれだけ強力で魅力的な感覚であるかは自分自身でも経験しており、嗅覚を対象にした研究を行いたいと考えていたタイミングでコスメトロジー研究助成に採択いただきました。

香りを用いたヒト脳研究は他の感覚に比べ圧倒的に少ないのが現状です。今回初めて香りの実験をさせていただき、その難しさも実感しましたがそれ以上に実験に参加してくださった被験者の方々の反応から香りが持つ効果や作用の面白さ・不思議さを改めて実感することができました。トラブルもありましたが、懐かしい香りがもたらす心理・生理作用の脳メカニズムの一端が解明できたと考えております。この経験と知見を元に、さらに香りと記憶の関係の研究を深めていければと思っています。

最後になりましたが、公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団、および当初予定通りに研究が進まない時もサポートを続けてくださった事務局の方々に心より御礼申し上げます。

（東北大学加齢医学研究所）

2018 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

廣原　志保

この度は、コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成に採択していただき、誠にありがとうございました。この研究に携わりました教員だけでなく、本校の物質工学科ならびに経営情報学科の卒研生、特研究生の異分野融合による研究スキルアップできましたこと心から感謝いたします。

私はこれまでに、ポルフィリン誘導体とレーザー光を用いたがん医療薬の開発を行っておりました。ポルフィリン誘導体は、ご存じの通りがん医療だけでなく、サプリメント等、様々な分野に用いることができ、常々ポルフィリン誘導体を用いた化粧品開発ができないかなと考えておりました。本助成金のテーマでは残念ながらそこまで発展させることができませんでしたが、本校の経営情報学科の教員の協力のもと、高専という幅広い年齢層の学生、男子学生が多いという利点を生かし、男子学生すなわち若年層男性をターゲットとした化粧品開発に取り組ませていただきました。本研究では、まず物質工学科の男子学生にどんな化粧品なら使いたいかを調査したところ、実験等で手が荒れるので一番ハンドクリームが工学系の男子学生達には普及しやすいはずというコメントよるハンドクリームの開発を行いました。私と物質工学科の卒研生達と果皮よりオイルを抽出し、ハンドクリームの試作品を調製しました。この試作品に対するアンケート調査を行いました。アンケートは経営情報学科の教員と経営情報学科の卒研生達が考えてくれ、アンケートの解析・分析を担当していただきました。異なる分野の方と研究を進めていくことで、物質工学科の人間は市場調査法や今後どうやったら製品化できるか等のノウハウを学ぶことができました。また、経営情報学科の人間は、オイルの抽出法、試作品を作る過程で雑菌処理をする必要がある等学ぶことができ、お互いに刺激しあい研究の幅が広がったのではないかと思います。来年度以降もこの研究を継続し、若年層男性に受け入れられるハンドクリームを作っていきたいと思います。

（宇部工業高等専門学校物質工学科）

2018 年度　研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

藤原　圭志

この度はコーセーコスメトロジー研究財団からご支援を賜り、心より御礼申し上げます。

私の研究テーマである顔面神経麻痺は、治療法の進歩により治癒率は向上しているものの、一定の割合で後遺症が認められます。後遺症が残った場合、整容面に影響を及ぼし、特に女性において生活の質（QOL）が大きく低下します。後遺症に対してすでにいくつかの治療法が行われていますが、侵襲や費用の面からどなたにも適応できるもので

はありません。今回は、顔面の左右非対称を軽減させる目的でメーキャップ治療を行い、QOLや精神状態を改善させることができるかを検討いたしました。成人の女性であれば多くの方がほぼ毎日自身でメーキャップを行っており、導入するハードルとしては低くなります。ただ、通常のメーキャップと異なる点としては、通常は左右同じようにメーキャップを行いますが、顔面神経麻痺の後遺症に対する場合は左右差を減らすために、患側と健側で異なるテクニックを要する点となります。慣れるまでには多少の訓練が必要ではありますが、メーキャップ治療を行うことによって、表情が明るくなった症例や、外出の機会が増えたとおっしゃる症例を経験し、QOLの改善に寄与できたと考えております。

左右差を完全に消失させるわけではありませんが、その簡便性や費用対効果の面から、メーキャップ治療は顔面神経麻痺の後遺症に対して有用であると今回の研究で確信しました。今後は部分的なメーキャップを用いることによって、小児や男性例への導入が可能かを検討していきたいと考えています。

末筆になりましたが、コーセーコスメトロジー研究財団の益々のご発展を心より祈念申し上げます。この度は誠にありがとうございました。

（北海道大学大学院医学研究院耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室）

2017 年度　研究助成

化粧をすると脳波活発になるの？

藤原　寿理

このたびはコーセーコスメトロジー研究財団の研究助成に採択いただき、誠にありがとうございました。私は日ごろヒトの意思決定や価値判断について社会性を取り入れた脳機能イメージング研究を行っています。2016 年度に初めて当研究助成をいただき、それから化粧の価値についての研究に携わらせていただけることとなりました。その際には「化粧をすることで自分に自信が持てる？」という疑問に対してその答えとなる行動データを示すことで化粧の意義に説得力を与えることができました。しかしながら、私の最も興味のある脳機能については未だ解明できずにおりました。せっかく分かりかけてきた疑問をこのまま放置するわけにはいかないという思いが強く、再度研究助成申請をするに至りました。前回の成果も後押ししてくれていたので、実験手法には自信がありました。そこで、別な研究として考えていた社会性を取り入れ、より具体的な状況設定をすることを思いつきました。例えばみんなと違っていると不安で自信がなくなる一方で、みんなと一緒だと安心して自信が強まるといった他者の影響です。これを化粧と組み合わせてみることにしました。結果、予想通り多数派でいることが自信を高めるのはもちろん、化粧をしていることがその自信をさらに高めるという相乗効果があることが分かりました。脳活動も、これまでに知られていた自信に関係した領域の賦活に加え、多数派でいることが報酬や価値関連領域の賦活をもたらし、さらにその賦活が化粧によって強まることが示されました。これらの領域がネットワークとして働いている可能性を示すことができたのは非常に重要な成果だったと思います。「化粧をすると脳は活発になるの？」という疑問に対して、「少なくともしていない時に比べてより複雑に、ポジティブな意味で活動が増加する」と答えることはできそうです。まだまだ解明できていない部分はありますが大きな前進となりました。本研究を遂行できたのも、コーセーコスメトロジー研究財団が化粧に関する研究を化学的・分子生物学的側面だけでなく精神・文化的側面までサポートしてくださったおかげだと強く思います。心より御礼申し上げます。

（福島県立医科大学医学部システム神経科学講座）

2018 年度　研究助成

機能と審美の両立をめざして

山田　朋弘

今回、「ハイブリッド相同モデルによる result-oriented な顎顔面手術シミュレーション法の開発」ということで 1 年間の研究助成をいただきました。私は大学の口腔外科に所属しており様々な口腔顎顔面疾患の手術を担当しておりますが、顔貌に与える影響が大きい分野です。美容目的の手術はあまりありませんが、咬合改善のための手術は多く、機能の改善に主眼が置かれます。機能と審美は車の両輪ですが、機能的あるいは骨格的観点から手術計画をたてると、時に審美的結果が不十分なことがあります。

本研究では審美的要件を満たした状況を想定して、そこから骨組織の手術シミュレーションを行う試みであり、これまでに同様の報告はありませんでした。約 1 年間の研究期間で臨床活動を行いながらの研究でしたが、本助成金でなんとか一定の成果を挙げることができました。まだまだ本格的な臨床応用までには乗り越えなければならないハードルは多くありますが、今回の研究をさらに発展させるべく今後も頑張りたいと思います。

（九州大学大学院歯学研究院口腔顎顔面病態学講座口腔顎顔面外科学分野）

● 国際交流助成（1件）

2019年度　国際交流助成

コスメトロジーとの国際交流支援助成の結びつきに関する雑感文

小嶋　肇

欧州の規制により、動物実験を用いない化粧品の製造・販売の禁止が施行されてから、6年が経つ。この間に国際的な市場確保の思惑もあり、十分に動物実験代替法が開発されていないにも関わらず、日本の多くの化粧品企業も動物実験の利用を禁止せざる得ない状況になっている。

十分に動物実験代替法が開発されていないことはない、例えば、眼刺激性試験代替法はすでにOECD（経済協力開発機構）で試験法が複数標準化されており、選択肢も多いとの意見が聞こえてきそうである。しかし、実際開発されている試験法は、無刺激性物質または腐食性・強刺激性物質の評価が可能なものだけである。新規界面活性剤や、洗顔剤およびシャンプーなどの化粧製品で生じる可能性がある化粧品原料や製品の弱い眼刺激性を評価できない。これでは、各社とも十分に新製品の安全性を担保できているとは言い切れない現状である。

現在、弱い眼刺激性を評価できる最も可能性が高い試験法が、OECD試験法ガイドライン（TG）No.437：ウシ摘出角膜の混濁度および透過性試験法（BCOP）である。現在、この試験法に病理組織学的評価を組み込み、弱い刺激性を評価する研究が株式会社 化合物安全性研究所（化安研）で進められている。これまでの研究の結果、その可能性が示唆されてきたことを受け、私は2017年にOECDにTG437の改定を提案している。この提案に対し、OECDの専門家より、病理学的評価のピアレビュー（第三者検証）が求められた。そこで、米国の本試験法の専門家であるInstitute for In Vitro Sciences, Inc.（IIVS、米国）に病理標本の第三者検証を依頼した。

この度、コーセーコスメトロジー研究財団の国際交流支援助成を得て、IIVSの副社長であるDr. Hans Raabeを化安研に招聘し、日米の病理専門家が所見や判定基準について議論し、OECDに提出する資料を検討した。この議論で合意が得られた基準は、OECDに報告書として提出する予定であり、OECD TG437の改定に有用であると確信している。この場をお借りして、コーセーコスメトロジー研究財団のご支援に感謝を申し上げる。

（国立医薬品食品衛生研究所）

● 学術集会支援助成（３件）

2019 年度　学術集会支援助成

第11回プロテオグリカン国際会議を終えて

渡辺　秀人

令和元年 9 月 29 日から 10 月 3 日の日程で石川県金沢市の石川県立音楽堂にて第 11 回プロテオグリカン国際会議を開催しました。本会議は西暦奇数年に各国持ち回りで行われ、第 1 回が日本、その後はイギリス、イタリア、スウェーデン、ブラジル、フランス、オーストラリア、ドイツ、韓国、イタリアと続いて今回 20 年ぶりに日本で開催することとなりました。

参加者は合計 168 名でした。そのうち 69 名が外国人で、合計 20 カ国（出身国を入れると合計 23 カ国）からの参加者が集まり、極めて国際色豊かな会議となりました。

発表内容に関しては、ヘパラン硫酸の機能に関する発表が目立ちました。その他としてヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸の研究成果、コアタンパク質については主としてシンデカンの研究成果が発表されました。日程的な流れとして、最新の知見に関するセッションから始まり、ヘパラン硫酸やヒアルロン酸の合成・分解機構に関する発表、炎症や癌におけるグリコサミノグリカン、プロテオグリカンの役割に関する発表へと続き、最後に治療戦略に関する発表がなされました。

今回目立ったのは若い外国人の発表です。皆さん十分に準備していたようで発表内容は充実していて聴きごたえのあるものばかりでした。本国際会議の重要な目的の一つは若手研究者の育成です。この点で本会議の目的は十分に果たせたと自負しております。

主催者としてつくづく感じたのは、皆さんが積極的に助けてくださったことです。特に国際組織委員の先生方は忌憚のない建設的な意見をたくさん伝えてくださり、たいへん参考になりました。また開催地が日本だったことも大きな利点だったと思います。日本は清潔で治安が良く、公共交通機関は時間どおりに運行し、日本人は親切だという評判をよく耳にしました。「日本だから参加する」という人も多かったと思います。

さて次回の第 12 回は英国にて開催予定です。同研究分野には英国の研究者がたくさんいますので、充実した会議になるであろうと今から期待しています。

（愛知医科大学分子医科学研究所）

2019 年度　学術集会支援助成

第24回日本病態プロテアーゼ学会学術集会を終えて

井上　紳太郎

2019 年 8 月 2 日から 2 日間、岐阜大学サテライトキャンパスで開催された、第 24 回日本病態プロテアーゼ学会（JSPP）学術集会は、盛会のうちに終えることができました。

ここに、本学術集会開催にあたりご助成頂きました、コーセーコスメトロジー研究財団に深く御礼申し上げます。

本学会は、臨床・基礎・企業のプロテアーゼとインヒビター研究者がお互いに同等の立場から意見を交換し、この領域の研究を発展させ、社会に貢献することを目標に活動しております。この度、第 24 回 JSPP 学術集会を「新たなターゲットプロテアーゼの探求」をテーマとし、「皮膚：美と健康のためのプロテアーゼ」についてのワークショップ（化粧品領域、皮膚アレルギー領域）の開催や、シンポジウムでのケロイドに関与するプロテアーゼ、およびランチョンセミナーでの皮膚における肥満細胞由来トリプターゼの役割など、これまで本学会ではあまり取り上げられてこなかった話題を参加者に提供しました。また、教育講演では「実用化に向けた再生医療研究の現状と今後」について皮膚を中心とした最新の情報を取り上げました。

お陰様で、この 5 年間では最多数のご参加を頂き、学術集会後も多くの先生方より新鮮で大変面白い学会だったとお褒めの言葉を頂いております。この学術集会運営では、貴財団の助成金が大変助けになりました。関係各位に深く御礼申し上げます。

末筆になりましたが、昨今種々の要因により学会運営や学術集会開催に対する寄付や助成金の支援が減少し、経済的困難性が研究者の士気にも関わる問題となっています。

貴財団におきましては日本が研究開発立国として国際的な競争を勝ち抜くための重要な社会的貢献をされていると思いますので、今後とも引き続きのご支援を宜しくお願い致します。

(岐阜薬科大学香粧品健康学講座特任教授／学術集会会長)

2019 年度　学術集会支援助成

第37回日本歯科東洋医学会学術大会を終えて

長野　哲雄

この度、第 37 回日本歯科東洋医学会学術大会が広島県歯科医師会館で、2019 年 10 月 5 日(土)、6 日(日)の両日開催されました。

今回の学術大会は「未病」をテーマに取り上げており、特別講演 1 件、教育講演 4 件、ワークショップ 6 件、ポスター発表 12 件そしてランチョンセミナー 2 件の計 25 件行われ、いずれの講演も参加者に大変好評で、最終日の最後のワークショップまで会場は満室の盛況ぶりでした。特に、歯科分野では最近口腔機能の軽微な低下などを含むオーラルフレイルが注目されていますが、口腔機能の維持に心身の内面からの若々しさを作り出す化粧・美容の重要性も提起されています。「オーラルフレイル」については山口孝二郎先生による教育講演が行われ、さらに「美容にも有効なツボ」(志字良太先生) あるいは「美容を目的とした鍼灸治療(美顎鍼)」(関根陽平先生)についてのワークショップも行われ、【コスメトロジー】と深く関係した大会となったことが大きな特徴です。

実行委員会は 1 年以上前から 10 数回に及ぶ打合せ会議を重ね、今まで学術大会の開催経験のない実行委員が、まさに手探りで開催に向けて準備を行ってまいりました。

その結果、予約参加者 197 名そして当日参加者 51 名の計 248 名の多数の方々に参加して頂き、本学会の学術大会としては、まれに見る盛会になったことを大変ありがたく思っております(写真)。更に、「冷えという未病」がテーマの市民公開講座は 300 名を超える参加者が集まり、会場から人があふれ、急遽別室にモニターを設置して何とか急場を凌ぎました。まさに、予想を超える市民講座となりました。

今回の学術大会で特に印象に残りましたことは、一般市民を含む参加者の皆様がご自身の健康とともに美容に強い関心を持っていることです。健康で、かつ美しく長生きしたいという要望に対して、本学会がどのように応えていくことができるかが問われており、今後のこの学術大会の目指すべき方向が明確になった気が致します。

終わりにあたり、コーセーコスメトロジー研究財団から多額の研究助成金を頂きましたことを厚く御礼申し上げます。今回の学術大会では、中四国支部としてはじめての開催であったため、開催経費および参加者等の予想が全く立たなかった中で、貴財団からの助成は何よりも力強い支援となりました。実行委員一同、大変に感謝しているところです。改めて御礼申し上げる次第です。

末筆になりましたが、貴財団の益々のご隆盛を心より祈念しております。

(第 37 回日本歯科東洋医学会学術大会 実行委員)

学術大会の会場

付　　録

事業報告書
役　　員

事 業 報 告 書

（自 2019 年 4 月 1 日　　至 2020 年 3 月 31 日）

《研究助成関連》

2019	5	7	公募開始	全国 637 の大学、病院、研究機関等へ公募要領および推薦書を送付、関連学術雑誌 2 誌、当財団 HP 他 12 機関 HP に公募要領を掲載
	7	8	公募締切り	応募総数125件
	7/17 ～ 8/23			各選考委員による個別審査
	9	5	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	10	選考委員会(第１分科会)	素材、物性に関する分野の選考
	9	12	選考委員会(第３分科会)	精神、文化に関する分野の選考
	9	30	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37課題を選考
	10	9	臨時理事会（書面）	本選考委員会より答申、助成課題決定
	11	19	第30回 表彰・贈呈式	研究助成対象37課題の代表者へ、助成金贈呈書を授与
			記念講演	演題：リポソーム研究の魅力 講演者：奥 直人先生　帝京大学薬学部長・教授
	12	10	助成金交付	採択課題に対し研究助成金を交付　総額5,000万円
2020	2	7	選考委員への報告(書面)	2020年度研究助成公募要領他

《国際交流助成関連》

2019	3	20	審査	国際交流（招聘）：㈱化合物安全性研究所会議への招聘
	4	25	助成金交付	国際交流助成金　50万円
	6	21	審査	国際交流（派遣）：米国スタンフォード大学病院皮膚科へ派遣
	7	25	助成金交付	国際交流助成金　50万円

《学術集会支援助成関連》

2019	1	8	審査	学術集会支援：　第24回日本病態プロテアーゼ学会学術集会
	4	25	助成金交付	学術集会支援助成金　50万円
	3	29	審査	学術集会支援：第11回プロテオグリカン国際会議
	4	25	助成金交付	学術集会支援助成金　50万円
	5	9	審査	学術集会支援：日本歯科東洋医学会 第37回学術大会
	5	25	助成金交付	学術集会支援助成金　50万円

《理事会関連》

2019	5	23	第一回通常理事会	平成30年度事業報告および収支決算報告（含監査報告）の承認 法人名称の変更に関する件 任期満了に伴う評議員候補者の選出に関する件 選考委員の選任に関する件 「事務所購入資金取扱規程」の制定、および「30周年記念事業準備資金取扱規程」の一部改定に関する件 30周年記念事業計画を承認する件 株主としての議決権行使について、報告事項
	10	9	臨時理事会（書面）	定款の一部変更の件 2019年度（第30回）研究助成者等を承認する件
	11	19	第二回通常理事会	事務所所在地の移転に関する件 2019年度収支予算書の一部変更を承認する件 2020年度事業計画および予算案を承認する件

《評議員会関連》

2019	6	7	定時評議員会	平成30年度事業報告および収支決算報告（含監査報告）の承認 任期満了に伴う評議員の選任
	10	17	臨時評議員会（書面）	定款の一部変更の件 評議員会長の互選に関する件
	11	22	評議員への報告（書面）	第二回通常理事会議題、報告事項について

《その他》

1）報告書発行

2019	5	1	中間報告書	研究業績　中間報告集　第28号
	9	1	完了報告書	コスメトロジー研究報告　Vol. 27（2019）、CD版を作成

2）行政届出関連

2019	6	14	内閣府へ平成30年度事業報告書等の提出
	6	28	内閣府へ変更の届出（評議員の改選）
	11	8	内閣府へ変更の届出（法人名称の変更）
	12	16	内閣府へ変更認定申請（公２表彰事業の追加）
2020	1	9	内閣府へ変更の届出（公１研究助成事業の追加）
	2	19	内閣府へ変更の届出（事務所所在地の変更）
	2	24	内閣府へ令和2年度事業計画書等の提出

3）情報公開（当財団HP）

2019	4	8	公募要領	2019年度コスメトロジー研究助成公募要領を掲載
	7	3	事業報告および収支決算	2018年度事業報告書、収支決算報告書および新役員等を掲載
	9	2	研究報告書	「コスメトロジー研究報告Vol.27（2019）」を掲載
	11	19	予算書一部修正	2019年度予算書の一部修正を掲載
	11	19	財団名称変更	財団名称変更を掲載
	11	29	研究助成者および課題名	2019年度コスメトロジー研究助成者等を掲載
	12	2	公募要領	大学講座研究助成公募要領を掲載
2020	2	17	財団事務所所在地変更	財団新所在地電話番号を掲載
	3	2	事業計画および収支予算	2020年度事業計画および収支予算書を掲載

2019年度　助成を受けられた方々

(1) 第 29 回研究助成（37 名）

第 1 分野：素材、物性に関する分野（13 名）

氏　名	所　属	職位	研究課題
殷　澍	東北大学多元物質科学研究所	教授	カラフルな酸化チタン無機顔料の創製と化粧品材料としての機能評価
上沼駿太郎	東京大学大学院新領域創成科学研究科	博士3年生	環状オリゴ糖から成る自己組織性ナノシートの薬物担持・徐放特性と接着挙動
小谷　仁司	島根大学医学部医学科免疫学講座	講師	皮膚老化改善作用を持つ天然植物成分の探索と機能解析
佐藤　康治	北海道大学大学院工学研究院	助教	強力な抗酸化物質ヒドロキシチロソールの生産基盤開発
田村　篤志	東京医科歯科大学生体材料工学研究所	准教授	超分子架橋による高保水性コラーゲン微粒子の創製
中橋　明子	大阪産業技術研究所	主任研究員	楕円状ポリイミド微粒子の紫外線防御剤への応用
中林　孝和	東北大学大学院薬学研究科	教授	全反射ラマン顕微鏡を用いた生体膜近傍の水の選択的観測
中村　真紀	産業技術総合研究所ナノ材料研究部門	主任研究員	リン酸カルシウムナノ粒子によるサイトカインの経皮送達システム
檜垣　勇次	大分大学理工学部共創理工学科	准教授	高分子ベシクル積層膜の秩序構造とダイナミクス
福井　有香	慶應義塾大学理工学部応用化学科	専任講師	積層型ナノカプセルを用いたコスメティックデリバリーシステムの開発
松浪　勝義	広島大学大学院医系科学研究科	教授	アクネ桿菌（Propionibacterium acnes）などの皮膚常在菌代謝産物の解析
矢田　詩歩	奈良女子大学研究院自然科学系	助教	ポリオキシエチレン系非イオン界面活性剤を用いた泡のミクロ構造に関する革新的評価技術の確立
和田　俊一	公益財団法人微生物化学研究会	上級研究員	放線菌由来難分解性trehalose類縁体化合物の物性評価と利用法の検討

第 2 分野：生体作用、安全性に関する分野（19 名）

氏　名	所　属	職位	研究課題
稲垣　絵海	慶應義塾大学医学部眼科学教室	助教	ヒトiPS由来神経堤細胞による革新的線維芽制御方法の開発
宇賀神つかさ	東京医科歯科大学皮膚科学分野	講師	毛染め・化粧品アレルギー患者の原因検索における好塩基球活性化試験の有用性の検討と染毛剤アレルギー患者における痒疹反応の病態解析
内山　明彦	群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学	医員	転写因子SOX2による皮膚虚血再灌流障害（急性期褥瘡）における制御機構の解明および新規治療法の開発
太田　茜	甲南大学理工学部	特別研究員	皮膚で発現する化学物質受容体が体の温度適応に与える影響
大沼　清	長岡技術科学大学	准教授	ヒト胚の巨視的パターンの模倣によるin vitro催奇形性テスト法の開発
小林　翔	山形大学大学院医学系研究科	助教	ロドデンドロールによる細胞死へのフェロトーシスの関与の可能性

氏　名	所　属	職位	研究課題
齋藤　康太	秋田大学大学院医学系研究科情報制御学・実験治療学講座	教授	概日リズムによるコラーゲン分泌制御機構の解析
武尾　真	理化学研究所生命機能科学研究センター	研究員	皮膚付属器官を有する三次元再生皮膚器官系の開発
武元　宏泰	東京工業大学科学技術創成研究院	助教	常在菌フローラ育成を目指す肌表面微小環境応答性ポリアミノ酸の開発
立松　健司	大阪大学産業科学研究所	助教	ヒト嗅覚受容体センサーによる匂いのデジタル化を応用した香水設計手法の確立
西江　渉	北海道大学大学院医学研究院皮膚科学教室	准教授	網羅的ゲノム編集を用いた表皮基底細胞XVII型コラーゲン発現制御機構の解明
深田　俊幸	徳島文理大学薬学部薬学科	教授	亜鉛シグナルはどのように表皮バリア機能を制御しているのか？―ZIP10を標的とするバリア機能制御物質の探索―
松本　靖彦	明治薬科大学微生物学研究室	准教授	無脊椎動物を用いた革新的な皮膚感染モデルの確立とin vivo薬効評価系の構築
的場　康幸	安田女子大学薬学部薬学科	准教授	X線結晶構造解析に基づくチロシナーゼの成熟化および反応機構の解明
三浦　恭子	熊本大学大学院先導機構／大学院生命科学研究部	准教授	最長寿・老化耐性齧歯類を利用した新たな皮膚の老化予防方法の開発
南　彰	静岡県立大学大学院薬学研究院	講師	シアリダーゼの皮膚における機能解明と経皮送達技術の開発
村上　良子	大阪大学微生物病研究所	籔本難病解明寄附研究部門	先天性GPI欠損症に合併する魚鱗癬の病態解析と治療法の開発
矢嶋伊知朗	芝浦工業大学システム理工学部生命科学科	教授	皮膚角化及びメラニン沈着と毛髪中microRNA量の関連性解析
山本　博之	日本薬科大学薬学部薬学科	准教授	非視覚組織に発現する光受容体の機能の解析 ―皮膚は色を識別できるのか？―

第３分野：精神、文化に関する分野（５名）

氏　名	所　属	職位	研究課題
青柳　秀紀	筑波大学生命環境系生物機能科学専攻	教授	ウグイス糞の諸特性と細菌叢の解析とその利用
柴藤　淳子	星薬科大学先端生命科学研究所	寄附講座等客員助教	サボテンセルエキストラクトの育毛作用と成分分析
臺　美佐子	東京大学大学院医学系研究科	特任講師	後期高齢者に頻発するスキン-テアの予測方法の考案
中村　航洋	早稲田大学理工学術院	日本学術振興会特別研究員PD	統計的顔画像解析によるメイクアップ効果の数理モデル化
峯　裕一	広島大学大学院医系科学研究科	講師/部門長	匠の技の定量化 ―Deep Learningによる先駆的顎顔面補綴支援システムの開発

(2) 国際交流助成（2件）

実施責任者	派遣・招聘者	招聘目的
国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 小島　肇	Institute for In Vitro Sciences, Inc. Hans Antony Raabe MS	㈱化合物安全性研究所へ招聘 （2019年5月13日から2019年5月17日　札幌市）
慶應義塾大学医学部皮膚科 天谷　雅行	慶應義塾大学医学部 雁金　詩子	米国スタンフォード大学病院皮膚科（Chang 准教授）へ 派遣（2020年1月～ 2020年12月　米国カリフォルニア州）

(3) 学術集会支援助成（3件）

実施責任者	所　属	助成集会
井上　紳太郎	岐阜薬科大学 香粧品健康学講座	第24回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 （2019年8月2日～ 2019年8月3日　岐阜市）
渡辺　秀人	愛知医科大学 分子医科学研究所	第11回プロテオグリカン国際会議 （2019年9月29日～ 2019年10月3日　金沢市）
岩崎　嘉代	岩崎歯科医院	日本歯科東洋医学会　第37回学術大会 （2019年10月5日～ 2019年10月6日　広島市）

役　　員

2020 年 7 月現在

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	亀山　浩一	（常勤）
理　事	岩橋　槇夫	北里大学名誉教授
理　事	関根　　茂	日光ケミカルズ株式会社　代表取締役名誉会長
理　事	長野　哲雄	東京大学創薬機構　客員教授
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	宮地　良樹	静岡県立総合病院参与
監　事	小林　久美	公認会計士
監　事	村上　　實	弁護士
評議員会長	内藤　　昇	元株式会社コーセー　常務取締役
評議員	伊藤　正俊	東邦大学　名誉教授
評議員	奥　　直人	帝京大学　薬学部教授
評議員	齊藤　　勲	元厚生省大臣官房審議官
評議員	齋藤　美穂	早稲田大学　常任理事
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	兵庫医科大学　常務理事
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 コーセーコスメトロジー研究財団

〒103-0028　東京都中央区八重洲一丁目5番17号
八重洲香川ビルディング4階
電話 03(6860)2190

コスメトロジー研究報告　Vol. 28／2020　　非売品

2020年9月1日発行

編集責任者　亀山 浩一
発　　行　公益財団法人 コーセーコスメトロジー研究財団
〒103－0028　東京都中央区八重洲一丁目5番17号
電話　03(6860)2190
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　株式会社プラスコミュニケーション

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

©2020　　不許複製　禁無断転載