

ISSN 2188-563X

コスメトロジー研究報告

Annual Report of Cosmetology

COSMETOLOGY

2022

- 素材、物性に関する分野
- 生体作用、安全性に関する分野
- 精神、文化に関する分野

volume 30



Ascorbic Acid

ごあいさつ



公益財団法人 コーセーコスメトロジー研究財団
理事長

小林 一俊

本財団は、1990年に株式会社コーセーの創業者小林孝三郎により設立され、以来コスメトロジー（化粧品科学）の確立と発展をめざして研究助成活動を展開してまいりました。

このたび、小林保清前理事長の後任として、当財団の理事長に就任いたしました。当財団設立の理念を引き継ぎながら、さらに活動を充実させていく所存でございますので、なにとぞ一層のご支援を賜りますようお願い申し上げます。

化粧品科学は、医学、生命科学、化学、心理学、社会学など幅広い学問領域を基盤に成り立っています。これら様々な専門分野の研究者が一堂に集って化粧品分野の研究テーマに取り組むことで、今日のコスメトロジーが体系づけられてきたといえます。

本財団が助成した研究テーマも、化粧品の新素材や物性評価など工学的なテーマから、健康な皮膚、美容のための皮膚科学や安全性の研究、さらには化粧心理や化粧文化といった化粧行為を対象にしたものなど多岐にわたります。

今回の研究報告書は、2019年度から2020年度に助成を受けられた研究者37名の研究報告を収載しております。また、昨年秋の第32回表彰・贈呈式でご講演いただいた黒田玲子中部大学特任教授・東京大学名誉教授の講演録を掲載しています。

皆様には、この研究報告書 COSMETOLOGY 誌をご高覧いただきまして、本誌をコスメトロジーの更なる発展に向けてご活用いただければ幸いです。

引き続き、本財団は、コスメトロジー分野の独創的で発展性ある研究テーマを積極的に助成してまいります。今後とも皆様の温かいご理解とご協力をお願い申し上げます。

令和4年9月

目 次

■ごあいさつ

■記念講演

- ・第32回表彰・贈呈式記念講演
「科学の醍醐味—左右性から見る自然界の不思議」…………… 3
中部大学先端研究センター特任教授、東京大学名誉教授 黒田 玲子

■コーセーコスメトロジー奨励賞

- ・2021年度 コーセーコスメトロジー奨励賞…………… 19
名城大学理工学部教授 景山 伯春

■コスメトロジー研究助成報告

I. 素材、物性に関する分野

- ・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…………… 24
東北大学多元物質科学研究所 殷 澍
- ・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…………… 32
東京大学大学院新領域創成科学研究科物質系専攻 上沼駿太郎
- ・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…………… 40
島根大学医学部医学科免疫学講座 小谷 仁司
- ・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…………… 48
北海道大学大学院工学研究院 佐藤 康治
- ・楕円状ポリイミド微粒子の紫外線防御剤への応用…………… 55
地方独立行政法人大阪産業技術研究所 中橋 明子
- ・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…………… 62
東北大学大学院薬学研究科 中林 孝和
- ・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…………… 68
国立研究開発法人産業技術総合研究所ナノ材料研究部門 中村 真紀
- ・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…………… 73
慶應義塾大学理工学部 福井 有香
- ・アクネ桿菌 (*Propionibacterium acnes*) などの皮膚常在菌代謝産物の解析…………… 78
広島大学大学院医系科学研究科 松浪 勝義
- ・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…………… 84
奈良女子大学 矢田 詩歩
- ・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…………… 90
公益財団法人微生物化学研究会微生物化学研究所 和田 俊一

II. 生体作用、安全性に関する分野

- ・ヒト iPS 細胞由来神経堤細胞による革新的線維芽制御方法の開発…………… 100
慶應義塾大学眼科学教室 稲垣 絵海
- ・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…………… 103
東京医科歯科大学大学院皮膚科学分野 宇賀神つかさ
- ・ヒトの視覚と嗅覚を制御する新しい抽出分離素材の開発…………… 105
東北大学大学院環境科学研究科先端環境創成学専攻
環境創成計画学講座環境分子化学分野 大田 昌樹

・ ヒト胚の巨視的パターンの模倣による <i>in vitro</i> 催奇形性テスト法の開発	109
長岡技術科学大学技術科学イノベーション専攻 大沼 清	
・ 皮膚の偽アレルギーを誘導する分子のスクリーニング法開発	117
順天堂大学大学院医学研究科アトピー疾患研究センター 北浦 次郎	
・ イオン導入時の微弱電流による皮膚への安全性の厳密な検証と美容効果の検討	122
徳島大学大学院医歯薬学研究部 小暮 健太郎	
・ 乳酸菌がもつ抗酸化作用の分子基盤解明	127
筑波大学医学医療系 小林 麻己人	
・ 概日リズムによるコラーゲン分泌制御機構の解析	131
秋田大学大学院医学系研究科 齋藤 康太	
・ 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析	136
北海道大学大学院医学研究科皮膚科学教室 西江 渉	
・ 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 —	139
徳島文理大学薬学部病態分子薬理学研究室 深田 俊幸	
・ 無脊椎動物を用いた革新的な皮膚感染モデルの確立と <i>in vivo</i> 薬効評価系の構築	142
明治薬科大学微生物学研究室 松本 靖彦	
・ 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	147
安田女子大学薬学部薬学科 的場 康幸	
・ 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	151
熊本大学大学院生命科学研究部老化・健康長寿学講座 三浦 恭子	
・ 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	156
静岡県立大学大学院薬学研究院生化学講座 南 彰	
・ 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	164
大阪大学微生物病研究所 村上 良子	
・ 皮膚角化及びメラニン沈着と毛髪中 microRNA 量の関連性解析	170
芝浦工業大学システム理工学部生命科学科分子細胞毒性研究室 矢嶋 伊知朗	
・ 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？—	176
日本薬科大学薬学部生命科学薬学分野 山本 博之	

Ⅲ. 精神、文化に関する分野

・ がん薬物療法に伴う爪の変化に対するアピアランスケアの検証	182
聖路加国際大学成人看護・がん看護学臨床准教授 がん看護専門看護師 逢阪 美里	
・ サボテンセルエキストラクトの育毛作用と成分分析	190
星薬科大学 柴藤 淳子	
・ 後期高齢者に頻発するスキン-テアの予測方法の考案	195
藤田医科大学研究推進本部社会実装看護創成研究センター 臺 美佐子	
・ 顔の動画解析による脈波の多点抽出と皮下の血行動態の評価法の開発	201
福島大学共生システム理工学類 田中 明	
・ 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	206
ウィーン大学心理学部, 日本学術振興会, 早稲田大学理工学術院総合研究所 中村 航洋	
・ 木の香りによる作業効率への影響解析	211
国立研究開発法人森林研究・整備機構森林総合研究所複合材料研究領域 松原 恵理	

・ 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	217
広島大学大学院医系科学研究科医療システム工学 峯 裕一	
・ 分光イメージング装置を用いた天然歯のグラデーションの数理解析	221
大阪大学歯学部附属病院 若林 一道	
IV. コスメトロジー研究助成を受けて	228
■学術集会支援助成、国際交流助成	249
■付 録	
事業報告書	259
2021 年度 表彰および助成を受けられた方々	261
役員一覧	264

記念講演

●
第 32 回表彰・贈呈式記念講演 黒田 玲子
●

科学の醍醐味—左右性から見る自然界の不思議

中部大学先端研究センター特任教授、東京大学名誉教授

黒田 玲子



くろだ・れいこ

キラリティ、化学構造の左右性に着目し、自然界に広く現れる左右非対称性を明らかにする研究を進め、この分野での世界的リーダーとして知られている。

1993年猿橋賞、2009年文部科学大臣表彰、2013年にはロレアル-ユネスコ化学賞をはじめ多数の表彰を受賞。国内外の科学技術政策や環境問題への取り組みにも貢献し、永年にわたり政府の審議会や国際科学会議 (ICSU) 副会長など多くの公職を歴任されています。世界科学アカデミー TWAS フェロー、スウェーデン王立アカデミー会員、また2021年6月にイギリスで開かれたG7サミットで男女共同参画諮問委員会のメンバーに選ばれるなど、科学と社会との関係づくりや男女共同参画社会の実現に向けて、日本を代表して国際的に活躍されています。

I. はじめに

皆さんこんにちは。今日は「科学の醍醐味—左右性から見る自然界の不思議」という題名でお話をさせていただきます。ここに変わった絵を描いています (Fig. 1)。中央に巻貝です。私が扱っているヨーロッパモノアラガイ (*Lymnaea stagnalis*) と、左上がその4細胞期の胚です。その下にアミノ酸が描いてあって、中央下にあるのがパストールの酒石酸ナトリウムアンモニウム塩の結晶模型です。また、分光装置があります。これは私が開発した固体状態でのキラリティも測定できる装置で、2つ角が出ていますが、光電子増倍管を2台搭載しているすごく変わった装置です。特許も取っています。化学の分野では固体状態におけるキラリティの化学を開拓しています。生物の分野では動物の体の左右性決定のメカニズムの解明に挑戦しています。両分野の研究を行っています。今日は、駆け足で左右性をめぐる多様なお話をいたします。

I-1. 『鏡の国のアリス』

まずは『鏡の国のアリス』から始めます。高山宏訳からの抜粋です。

「さあキティ、鏡のおうちのことをお話してあげますよ。まずね、鏡の向こうにお部屋が見えるでしょう。こちらの客間とまるで同じお部屋だけど、家具がみんなあべこべだね。……うちの本そっくりな本もあるけど、字があべこべね。……鏡の国で暮らすのはどうキティ？ あっちでミルク、もらえるかしら？ 鏡の国のミルクってきっとおいしくないわよ。……通り抜けて鏡のおうちへ出られるといいわね。あらあら、本当に鏡がもやみたいになっていくわ。

次の瞬間アリスは、鏡を通り抜けていて、軽々と鏡のお部屋に飛び降りていました。」

さてこの本の原題は『Through the Looking Glass and what Alice found there』というものです。ルイス・キャロルのこの本は1871年12月27日に初版が発刊されました。つまり今年は150周年記念なのです。そこで、いろいろ

コーセー コスメトロジー研究財団 第32回表彰・贈呈式 記念講演20211125

科学の醍醐味— 左右性からみる自然界の不思議

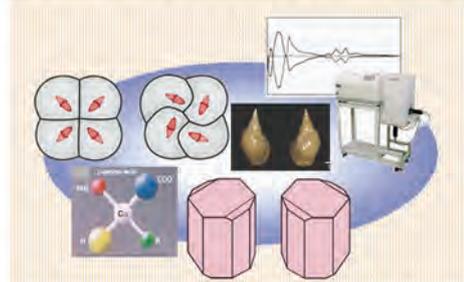


Fig.1 黒田玲子 中部大学特任教授/東京大学名誉教授

な催しが行われました。たとえば、Victoria and Albert Museum というロンドンのミュージアムは「Curiouser and Curiouser!」——これは『不思議の国のアリス』に出てくる言葉なのですが——という展示を今年いっぱい行っています。残念ながらとても行けません。それから The Lewis Carroll Society という協会があって、そこが学会誌を出しています。その35・36号を合体した150周年記念特集号がおそらく今週に発刊されると思います。私もひょんなことから執筆を依頼され、今日皆さんにお話しする鏡の国の化学と生物について書きました。普通は文学関係の論文、エッセイがほとんどで、ルイス・キャロルが数学者であったことから数学関係のものもたまにありますが、どんな本になって出版されるのか楽しみにしています。

ところで、鏡の国では何が違うのでしょうか。「家具や文字があべこべみたい、ミルクはきっとおいしくない」とアリスは言っていましたが、それに、私の講演のタイトルにある「左右性」って何なのでしょう？ 私の講演には鏡像と実像、左右非対称、不斉、キラリティなどいろいろな言葉が出てきますが、これらは何なのでしょう？ キラリティはマクロなレベルにもミクロなレベルにも、つまり分子(素粒子の場合はパリティということになります)にも現れてきます。でも、皆さんはこんな質問をされ

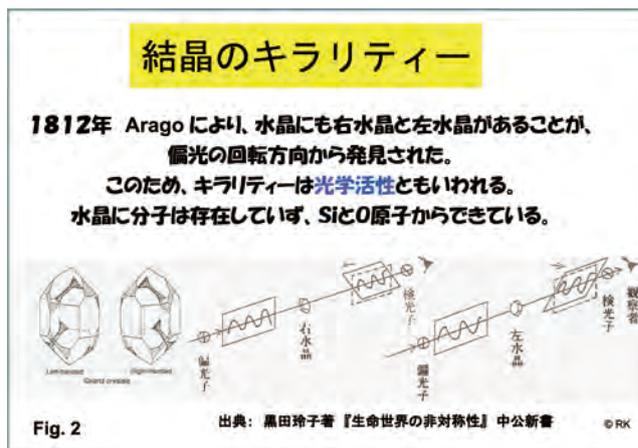
るかもしれません。「右と左の違いなんてどうでもいいのに。なぜ重要な？」って。今日の聴衆の皆様はレベルが高すぎて、そんなことを訊く人はいらっしやらないかもしれませんが、そんな問いに答えるために、「靴と靴下の原理」なんて変なものをつくってしまいました。あとでご紹介します。

I-2. キラル、キラリティーとは？名づけ親は誰？

さて、キラリティー（キラル）とは何でしょうか？「KOSE」という文字を鏡に映します。こんな文字になります。KOSÉ 鏡に映してみると ЭЗОК。Oだけ普通ですけれど、あとは鏡文字ですね。つまり、鏡に映して変わるものと変わらないものがあることに気がつきます。キラリティーは3次元の世界で定義されることなので、ちょっと3次元の世界に行ってみましょう。鏡像と実像が別のものをキラル（カイラル・Chiral）といいます。たとえば手とか足です。右手を鏡に映すと左手です。つまり鏡像と実像はスーパーインポーズできない（重ねられない）別のものです。足も靴も、そして分子にも、もちろんあります。例えば、ほとんどのアミノ酸は鏡に映すと別のものになります。分子のキラルな性質を不斉といいます。そして分子の構造の不斉を表すのに、ラテン語の右、左を表す言葉（Dextro, Levo）、（Rectus, Sinistral）の頭文字をとったD, LあるいはR, Sを用います。電磁波にもキラルな性質をもつものがありますが、キラルな分子との相互作用の結果、電磁波の偏光面が回転する方向を使って、分子の右型・左型を（+）・（-）で表すこともあります。

鏡像と実像が同じものをアキラル（achiral）といいます。もちろん、この例もたくさんあります。靴下、動物の外観、分子、電磁波など、こちらのほうが多いと思います。

じゃあキラリティー（chirality）の語源は何なのでしょう？ 誰が名づけたのでしょうか？ これは古代ギリシャ語のcheirという言葉からきていて、これは手を意味します。例えば英語で手相観のことをカイロマンシー（chiromancy）といいます。では誰が決めたの？ といいますと、ウィリアム・トムソンが1884年の講演で「鏡像と実像がスーパーインポーズされないものをキラルと言おう」と定義しました。さて、J. J. トムソンなら電子の発見者として知っているけれど、ウィリアム・トムソンなんて知らないと思われるかもしれませんが、実は皆さんがよく知っている人なんです。この人は爵位をもらって「ロード・ケルビン」（ケルビン卿）となった人、絶対温度の単位K（ケルビン）の由来となった人なのです。グラスゴー大学の物理学の教授で、いろいろ優れた業績を上げた人です。グラスゴー大学の中に石像があり、周りの花壇にはきれいな花が植えられていました。ケルビンという名の由来ですが、大学の中にケルビン川という小さな川が流れています。こ



の一带はケルビン公園と呼ばれています。ですからLord KelvinではなくLord Thomsonとなっていたら、絶対温度はTで書いたかもしれません。

I-3. 水晶にもキラリティーがある

結晶にもキラリティーがあります。1812年、哲学者のアラゴが水晶には右水晶と左水晶があるということ、偏光面の回転方向から見つけました（Fig. 2）。このため、キラリティーを光学活性といういい方をすることがあります。水晶には分子はありません。SiとO原子からできているのですが、その並び方が螺旋状になっていて、右型と左型があるのです。だいぶん前のことですが、「東大寺のすべて」という大展示会が奈良国立博物館でありました。2002年です。これは東大寺の盧舎那仏開眼 1250周年を記念したものでした。これに行ってきましたが、このとき不空鞞索観音立像が一般公開されていました。この像の合掌する手の間に水晶が入っています。でもこれは後からつけ加えられたという説もあります。それから観音様の眉間にある白毫ですね。これが水晶だといわれています。この観音像が一番有名なのは宝冠です。この非破壊分析が行われ、6割が奈良時代につくられた鉛ガラスだったけれど、3割が弥生古墳時代におそらく韓国から輸入された貴重なアルカリガラス、残り1割が翡翠や水晶、琥珀だったとわかり、大きなニュースとなりました。これを見て私は、この観音様に使われている水晶は、右水晶かな、左水晶かな、何で調べてくれなかったんだろうと思いました。

I-4. 動物の体のキラリティー

動物の体にもキラリティーがあります。羊の角の巻き方は真ん中で左右対称になっています。人の体も左右対称です。一般に外観はキラルではないのですが、体内構造、内臓器官はキラルです。心臓は左側にあるし、腸は一方に巻いている。人でも1万人に一人は、内臓逆位の人があります。体内構造の左右性が完全に逆転していれば、何も不都合は起きませんので普通に暮らせます。健康診断のときにお医者

さんがびっくりするくらいです。私は内臓のキラリティが外にも現れている巻貝を研究対象にしています。

I-5. 分子の世界のキラリティ

分子の世界にもキラリティがあります。皆さん、DNA には、CとG、AとTの塩基対があることはご存じだと思います。塩基対の外側に糖リン酸骨格があるのですが、この糖はD-デオキシリボースで右型です (Fig. 3)。タンパク質はアミノ酸からできているのですが、それをつくっているのはL-アミノ酸、左型だけです。地球上のすべての生物が使う分子のキラリティは共通していて、おそらく 40 億年前に地球上に最初の生物が生まれたときから同じキラリティだっただろうといわれています。このことを「ホモキラルな生命世界」といいます。鏡に映したL型とD型の分子があるにもかかわらず、DNAやRNAはD型のリボースを使っている。タンパク質もD型とL型アミノ酸があるにもかかわらずL型しか使わない。なぜなのか、とても不思議です。生命世界がホモキラルであることが実生活にはとても重要であることを、わたしがつくった「靴と靴下の原理」でご説明したいと思います。

I-6. 「靴と靴下の原理」

熱力学の法則と同じように3つ作ってみました (Fig. 4a)。

原理の1. 靴の左右を履き違えると、すぐにわかるが、靴下ではそのようなことはない。足袋は別ですよ。足袋には右と左の違いがあります。

原理の2. 小さな子どもが大人の靴を履いた場合は、左右を履き違えても差はわからない。

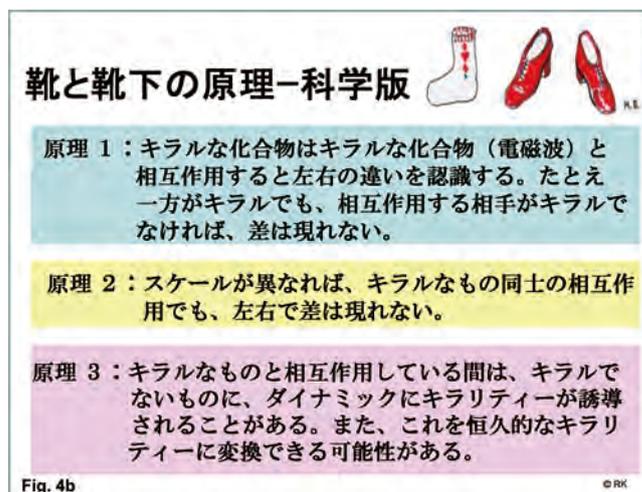
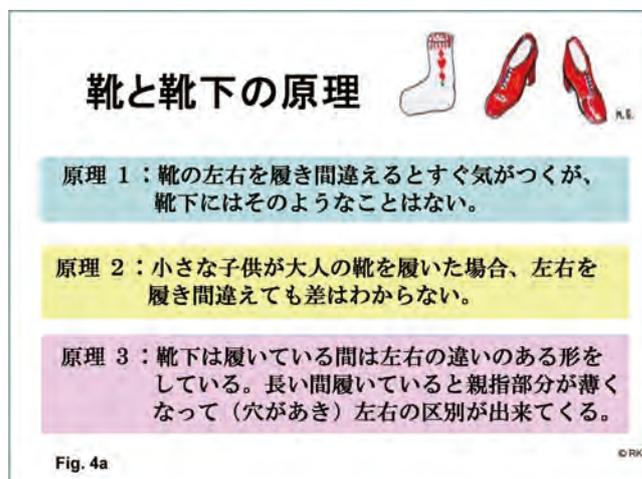
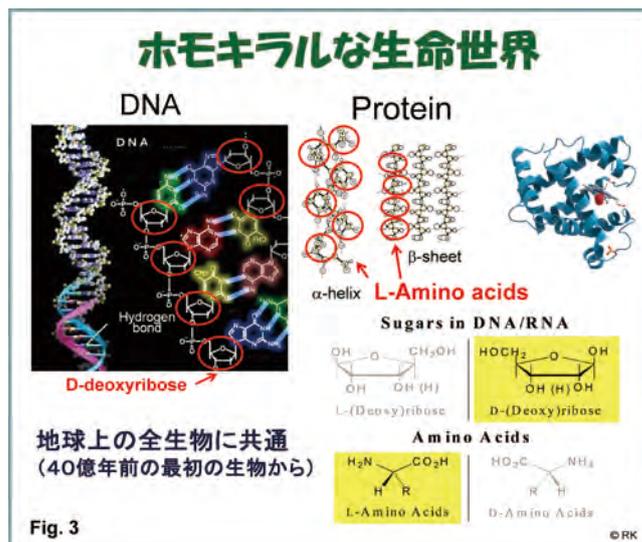
原理の3. 靴下は履いている間は左右の違いのある形をしている。でも、脱ぐと左右の違いのない形になります。これはダイナミックキラリティなのですね。でも長い間履いていると親指部分が薄くなって穴が開いて、左右の区別ができてしまいます。

私はこんな研究をしているのです。といっても、これだけでは皆さんだいたい馬鹿にしますから、ちゃんと科学版をつくってあります。

靴と靴下の原理の科学版第1 (Fig. 4b)。キラルな化合物は、キラルな化合物やキラルな電磁波と相互作用すると、左右の違いを認識する。たとえ一方がキラルでも相互作用する相手がキラルでなければ差は現れない。足と靴・靴下ですね。

靴と靴下の原理の科学版第2。スケールが異なれば、キラルなもの同士の相互作用でも差は現れない。小さな子どもがお父さんの靴を履いた場合です。これは分子レベルどうしで比較しているのか、電磁波ならどういう波長の電磁波との相互作用を見ているかがポイントとなります。

靴と靴下の原理の科学版第3。キラルなもの同士の相互作用



をしている間は、キラルでないものにダイナミックにキラリティが誘導されることがある。たとえば、DNAにキラルでない化合物が結合すると、キラリティが誘導されます。そのキラリティを分光法で測定してその化合物がDNAにどのように結合しているのかを調べる方法を編み出したのは私ですが、今日はその話はしません。また、ダイナミックキラリティを恒久的なキラリティに変換できる可能性が

あります。分子の構造変換や動きを止めた結晶中で光反応を行い、キラリティ選択的に新しい結合をつくってみました。時間がありましたら後ほど少しお話をします。

I-7. 右型、左型で違う味、香り、薬効—靴と靴下の原理 1, 2 (Fig. 5)

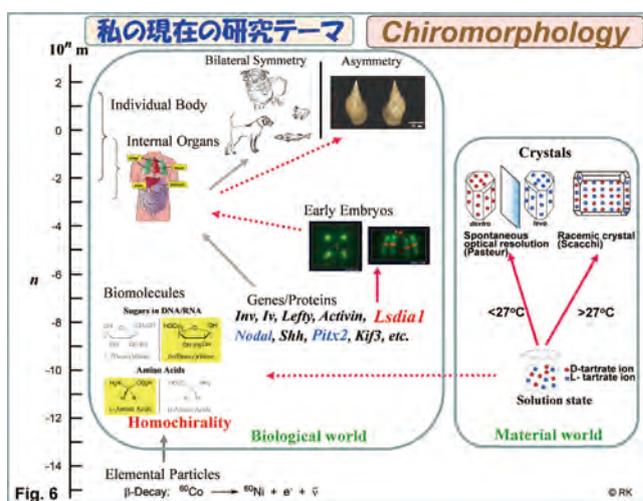
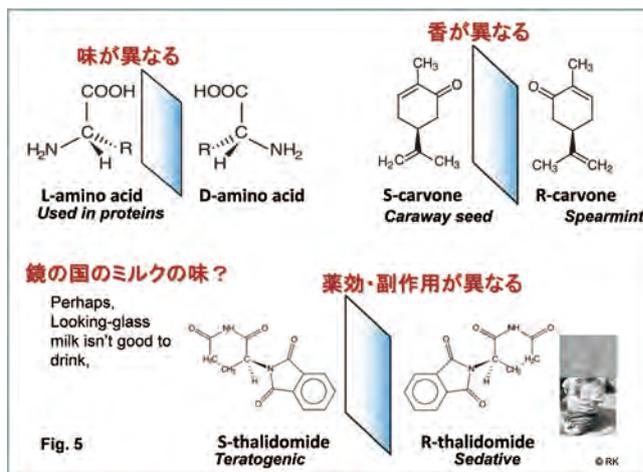
さて、この原理の1と2があるので、左右はとっても重要だということになります。L-アミノ酸でタンパクはできていますが、タンパク質以外ではD-アミノ酸もあって、なめてみるとD-アミノ酸はどちらかという甘いのです。でも鏡に映しただけなのにL-アミノ酸は味がなかったり、苦かったりします。これは私たちの味を感じる味蕾がキラルな構造をしているからなのです。鏡の国のミルクの味は、訳本では「おいしくないわよ」となっていますが、おいしいって何なのだろうと考えました。もしカゼインがD-アミノ酸でできていたら消化できないと思いました。この部分を原著で見ると「Perhaps, Looking-glass milk isn't good to drink」で「飲まないほうがいいよ」です。こちらのほうが科学的に正しいと思います。訳としては「おいしい、おいしくない」のほうが一般向けでいいけれど、ちょっと違うよなど、科学者として余計なことにこだわりました。

香りについても、カルボンという物質はひとつがキャロウェイの種の香りがするの、その鏡像体はスペアミントの香りがします。もっと深刻なのは薬効とか副作用です。皆さんはサリドマイド事件をご存じだと思います。つわり止めのために妊娠中のご婦人が摂った結果、手足に奇形のあるお子さんが生まれました。これはS型だけが奇形を生じR型はそうではないということが動物実験から知られています。農薬もそうで、右型と左型で効き方がまったく違うことがあります。ということで、右左の違いがとても重要だということがわかっていただけたかと思います。

II. カイロモルフォロジー研究

私はカイロモルフォロジー (Chiromorphology) 研究という舌をかみそうな名前の研究をしています。これは私がつくった単語で、キラル (カイラル・Chiral) + 形態 (Morphology) からつくっています。そしてキラリティを切り口にマイクロとマクロのリンクを探る、つまり分子が集まってどうやってマクロな結晶となるのか、あるいは生物の階層構造を経て分子からどうやって究極の生物個体ができていくのかを調べるのにキラリティを使いたいと思っています。あるいは生物界と非生物界のリンクも探れたいと思っています (Fig. 6)。

何で化学と生物の両方とも研究しているのか不思議に思われるかもしれませんが、私は元々物理化学出身で、金属錯体のキラリティに関する結晶学と分光光学で博士号を取りました。日本では女性研究者はお呼びではなかった時代で



したのでイギリスへ行って、最初は化学科で分光光学、結晶学の分野でキラリティの研究を続けていたのですが、ひょんなことから生物物理学科に移ってDNAと抗がん剤、発がん物質との相互作用を結晶構造解析法を使って調べるようになりました。しかし、そのうち、それだけではつまらないと考えるようになり、土・日に別の研究室へ行って分子生物学の手法を学び、DNAと抗がん剤、発がん物質との相互作用の研究に適用しました。日本に帰ってきてからしばらくは結晶学と分光光学、分子生物学の研究をやっていたのですが、1個の遺伝子で左右の巻型が決まる巻貝に惚れ込んでしまい、ついに、生きた生物を扱う発生生物学分野の研究も始めてしまったのです。どれも面白いです。一貫して、左右性の研究をしています。

絵で描きますと、今私がやっている研究テーマはFig. 6のようになります。縦軸は対数スケール、 10 の n 乗 m で、 $n=2$ と書いてあるところが 100 m、鯨くらいですね。私たちは 0 の目盛りのところの大きさです。 10 のマイナス 10 乗 m がオングストローム、 10 のマイナス 15 乗 m は素粒子の世界です。図の左側は生物界です。先ほどお話ししましたように、遺伝子やたんぱく質では左右一方の分子しか使われていません。図には体の左右性構築に関係する遺伝子

名が書いてありますが、その中でも *nodal* と *Pitx2* という 2 つの遺伝子は、私たち脊椎動物の心臓を左におくか、腸をどっちに巻くかを決めていることで知られている重要な遺伝子です。私はそれが巻貝にもあることを見つけています。そして、*Lsdiall* という遺伝子が巻型を決定しており、この遺伝子が *nodal*, *Pitx* 遺伝子の発現場所も制御していることを発見したのですが、そのことについては後でお話をします。細胞から器官ができ、個体ができあがっていく、そのプロセスの発端を明らかにしたいと思っています。

図の右側は物質世界です。結晶化の例として、酒石酸アンモニウムナトリウム塩をあげています。右と左の分子がビーカー内の溶液中で飛び回っています。そして温度が 27℃ 以下だと、右型の分子だけが集まって結晶をつくり、また左型の分子だけが集まってキラルな結晶をつくります。こういう現象を自然分晶といいます。パスツールが初めて見つけました。そして温度が 27℃ 以上では右型と左型の分子が同じ数だけ集まったアキラルな結晶ができます。これはイタリアのスカッチがやった仕事です。もう少しフランスが赤道に近かったら実験室の温度が 27℃ 以上で、パスツールがこの発見をしなかったかもしれません。「もう少しクレオパトラの鼻が低かったら」などと同じような言い回しですが、そうだったかもしれません。

Ⅲ. 話の流れ

さて、今日の話の流れです。まず、「Ⅰ. はじめに」で、キラル、キラルティとは何か、そして靴と靴下の原理の話。これは既にしました。分子レベルで眺めてみると生物世界はほぼ左右一方に偏っていてホモキラルですが、物質世界はほぼ左右が同数ある(ラセミ)というお話もしました。いよいよ、化学の世界のわたくしの研究、「Ⅳ. 化学の世界のカイロモルフォロジー研究」の話です。キラル識別が強く現れる固体状態の研究です。溶液ですと分子は溶媒に囲まれていてお互いのキラルティを容易に認識しません。ですから固体での研究をやりようと思いました。そこでキラリ

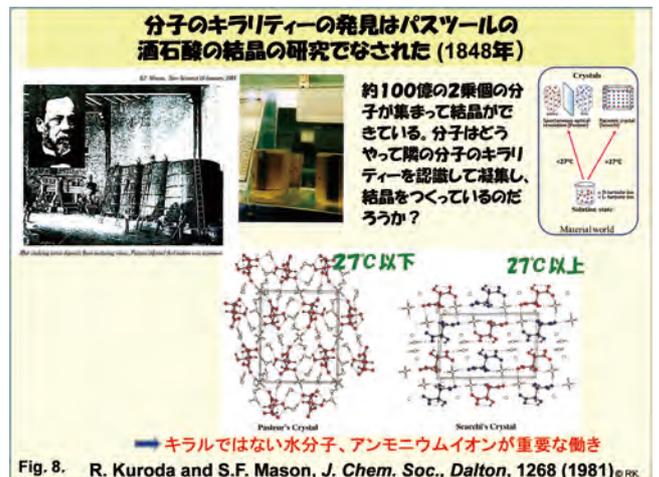
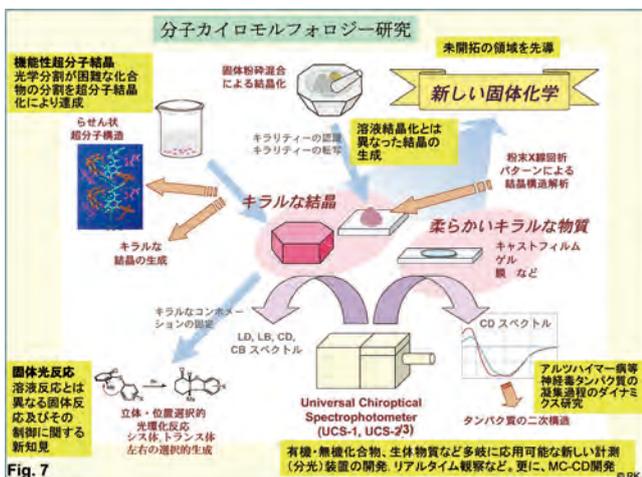
ティの認識、創成、転写、増幅など溶液化学とは異なった新しい化学を展開しました。そして固体状態のキラリティを測定するために必要な新しい分光装置も開発してしまい、それを使って無機・有機化合物、アルツハイマー病やパーキンソン病に関連するタンパク質の研究にも展開していきました。そして「Ⅵ. 生物の世界のカイロモルフォロジー研究」では巻貝の巻型を決める 1 個の遺伝子を同定することができ、現在、そのメカニズムを明らかにしたいと研究しています。これは、化学の話の後にお話いたします。

Ⅳ. 化学の世界のカイロモルフォロジー研究

まず化学の話です。皆さんは化学分野の研究者が多いのでしょうか？ なぜ右左が重要かということは 2001 年のノーベル化学賞が触媒による不斉合成に、今年のノーベル化学賞も有機不斉触媒に授与されたことから明らかです。私がやっているのは左右一方を作る不斉合成ではなく、左右の混合物を分ける、左右どちらかに変換する、ということです。あるいは左右に関する情報を使って構造を知る、そんな研究をやっています。絵で描くと Fig. 7 のようになりますが、今日はとても時間がないので一部だけをごく簡単にお話をします。

Ⅳ-1. 溶液からの結晶化でキラリティ識別

まず Fig. 7 の左上の、溶液からの結晶化です。Fig. 8 は先ほどお話したパスツールの結晶の話なのですが、酒石酸の結晶の研究から分子にもキラリティがあるに違いないと洞察したのがパスツールです。Fig. 8 の左上の写真に見えるのがワインを熟成させる醸造の樽です。その底にできてくる結晶から研究が始まりました。真ん中の図はパスツール博物館にある右と左の結晶の模型です。結構大きいです。結晶面の出方(半面像)に左右性があるので、区別がつかます。実験室で合成すると右型と左型分子が同じ数だけできてきます。そして 27℃ 以下で結晶化させると自然分晶が起き、27℃ 以上だとアキラルなラセミ結晶ができ



てくるのです。ワインの醸造では微生物の働きによるので、右型の分子しかできてきません。ワインの醸造タンクの底にできてくる結晶は、27℃以下の温度で起きた自然分晶のうち、左側の結晶、赤い丸が詰まったほうの結晶です。パスツールは結晶の示す右型、左型の違いは、結晶を構成している分子に右型と左型があるからだろうと、洞察したのです。

100億の2乗個の分子が集まって結晶ができてくる。分子はどうやって隣の分子のキラリティを認識して凝集して結晶を作るのか？ この不思議を理解したいと思ってパスツールとスカッチの結晶を作り構造解析したのは実は私です。1848年からずいぶんたっていました。格子エネルギーの計算もしたのですが、片方は4水和物、片方は1水和物で簡単ではありませんでした。ひとつわかったのは、キラルではない水分子とアンモニウムイオンが重要な役割を果たしてキラリティ認識をしているということです。

2級のアルキルアルコールは右型と左型を分けるのがとても難しく、いろいろな人がアルコール分子に修飾を試みたり温度を上げたりといろいろなことをやっていましたが、なかなかうまくいきませんでした。私は発想を転換して右型と左型を同数含むアルコールを溶媒として使ってみました(Fig. 9)。当時、ポストドクだった今井喜胤博士(現在、近畿大学准教授)がやってくれました。右と左が混じったアルコールの中にキラルなジアミンとプロキラルなジカルボン酸という2つの化合物を溶かし、「果報は寝て待て」で、1日か2日待つと結晶が出てきます。その結晶を見てもとジアミンのキラリティにより、左右のほとんど一方だけのアルコールがトラップされていました。この場合にも、パスツールの酒石酸塩の結晶のように、キラルでない水分子の関与が重要な事が分かりました。結晶を集めてアルコールをとりだすことで、簡単に左右一方のアルコールを得ることができます。おまけにちょっと工夫がしてあって、ルシャトリエの法則ですが、ジカルボン酸のキラルなコンフォメーション (*aS*と*aR*) が容易に逆転できるので、

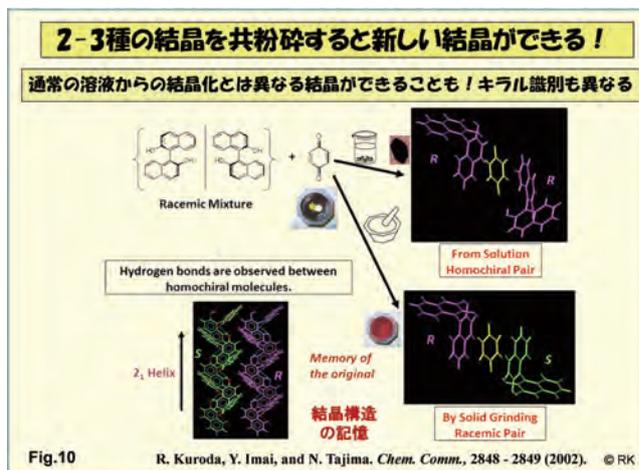
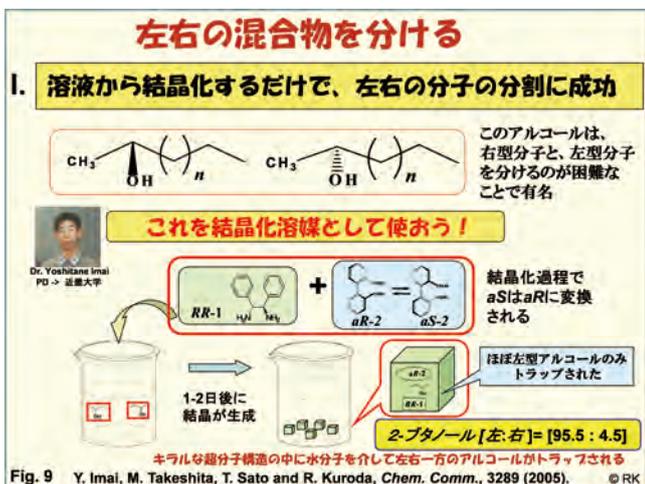


記念講演 (2021年11月25日) より

溶液中のジカルボン酸全部が*aS*か*aR*に変換されるようになっています。ですから、収率が50%ではなく100%になります。こんなことを考えて研究をやっています。

IV-2. 結晶共粉碎でユニークな結晶・分子を作る

それから、Fig. 7の中央上の図に示した、結晶と結晶をこするという話です (Fig. 10)。キラルな1-1'ビスベータナフトールの白いラセミ結晶とアキラルなパラベンゾキノンの黄色い結晶をピーカー内の溶媒に溶かすと赤い結晶ができてきます。その結晶構造を決めると(*R*)-1-1'ビスベータナフトールと(*R*)-1-1'ビスベータナフトールがベンゾキノンをサンドイッチしている電荷移動錯体ができていました。ほかのところでは(*S*)と(*S*)がサンドイッチしている

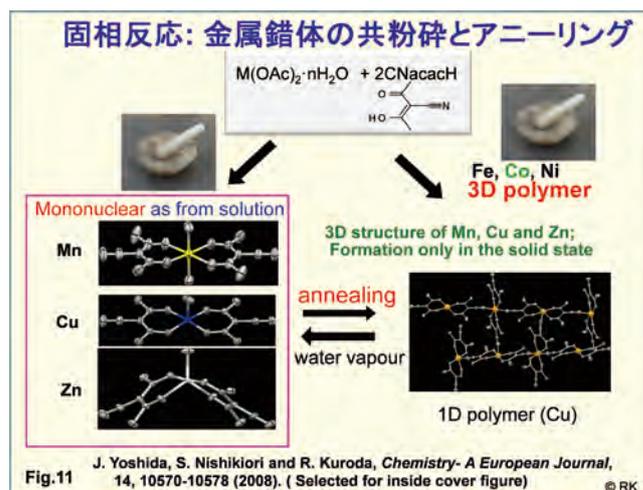


ので、結晶全体としてはSとRが同数ありアキラルですが、ホモカイ(キ)ラルペアが電荷移動錯体をつくっているのです。ところが乳鉢でこの白い結晶と黄色い結晶をゴリゴリとこすると、驚くことに融解状態を経ずに赤い結晶ができます。そんなことはありません、嘘だろうといわれて2年間ぐらい論文にならず、また、その間に誰かにパクられるし、いやな思いをしましたが、今では類似の例がたくさん報告されています。結晶共粉碎では、(R)と(S)のラセミックペアがベンゾキノンを手ドイチしています。結晶の色はそっくりですが、まったく違う構造です。なぜこのようなことが起きるかというのは、結晶共粉碎の場合には、元の結晶構造の記憶があるからだと思います。溶液の場合、分子の集合体は一旦溶液中でばらばらになり、そこから自由エネルギーが一番低い結晶ができてくるのですが、固体状態では、元の結晶構造をある程度保ちながら新しい構造をつくるので、元の結晶構造を記憶しているということなのです。そうすると、溶液から赤い結晶ができるのに、固体結晶化だと青色の結晶ができてくるという化合物の組み合わせもあります。本当におもしろいです。カメレオン結晶化と名付けて喜んでいたのですけれど、この話はここで止めておきます。

金属錯体でも同様の面白いことが起きます。水溶液からつくるとどうしても水が配位した錯体分子ができてしまうし、金属によってはゴリゴリこすっても水分子の配位した錯体分子ができます (Fig. 11)。しかし、さらにこの錯体をこすりながら加熱してやると水分子が飛んでポリマーができます。でも放っておくと空気中の水分を吸ってまたモノマーに戻る。これを30回くらい行ったり来たりできました。こんなことができるって面白いです。これらの仕事は雑誌の表紙にもなったりしました (Fig. 12)。ずいぶん昔の話です。

IV-3. 結晶中の光反応

さて、Fig. 7の左下の固体反応です。右型と左型の分子構造が溶液中で簡単に変換できる物質があります (Fig. 13)。光反応が起きると新しい炭素-炭素結合ができ、もはや右型、左型間の変換は起きなくなります。溶液で光反応を起こすと、右型にねじれた出発分子からは右型の生成物が、左型にねじれた出発分子からは左型の生成物ができ、全体としてはラセミック混合物が生じます。一方、固体の中では分子構造の変換は簡単に起きません。それで、結晶を使って反応してみました。結晶状態での反応でも、ラセミック結晶の場合にはどっちみち右型、左型にねじれた出発分子が同数あるので、それから右型、左型の生成物ができます。一方、キラルな結晶には、通常、一方のキラリティの出発物質しか含まれていません。今の場合には一方にねじれた出発物質だけです。そこで、キラルな結晶に光反応をす



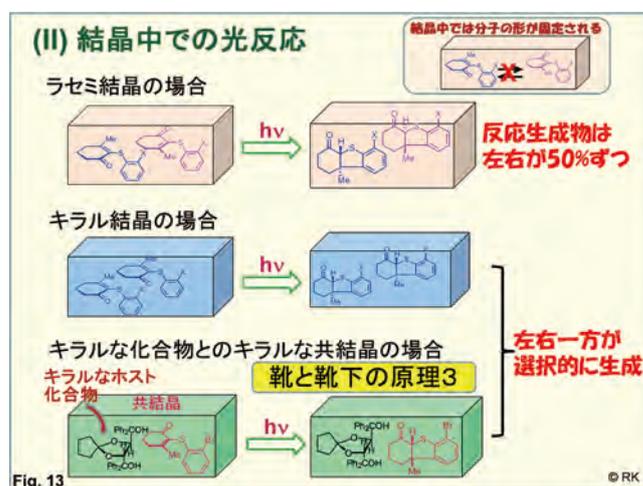
国際学術雑誌の表紙(cover+inside cover)を飾った研究

ChemComm
2段階超分子結晶生成による
2種の化合物の光学分割

Self-assembly in the solid state
Chem. Eur. Journal 2008
Grinding/annealingによる
金属錯体の3-D polymer合成

CrystEngComm
Grinding/annealingによる
金属錯体のキラリティー転写と
3-D polymer合成

Fig.12 © RK



れば、一方のキラリティの生成物を得ることができるはずです。しかしながら、キラルな結晶というのは、なかなかできないのです。そこで、キラルな化合物と共結晶をつくるということをやりました。キラルなホスト化合物の影響で、分子は一方にねじれた形で結晶化します。これはちょうど靴下を足に履かせたということになります。足に履いたところで、親指のところに穴が開くように光を当てる。そうすると足から取っても靴下はキラルなものになってしまっています。そのような固体化学反応もやっていました。

さらに、固体と溶液とでは反応ルートが違う場合があることもみつけました。時間がありませんので今日はこの話はできませんが、溶液では一旦trans体ができてからcis体に変換していくのに対し、結晶中では、重原子があるとスピン・オービット・カップリングのために最初からcis体を生じるルートをとることを見つけています。この仕事は現在広島大学で准教授をやっている関谷亮博士が助手のときにやってくれました。

V. 分光装置の開発

そして装置開発です (Fig. 7 右下)。フロンティアの研究は装置の開発からです (Fig. 14)。溶液とは異なる固体状態でのキラリティーや固体状態で初めて現れるキラリティーの測定をしたい。でも固体状態でのキラリティーは市販の装置では正しい測定ができない。そこで、固体CD測定装置の開発が必要でした。CDというのはコンパクトディスクではなく、クリスチャン・ディオールでもなく、サーキュラー・ダイクロイズム (Circular Dichroism, 円二色性) というキラリティーの属性を表す言葉で、これを測定してキラリティーの情報を得ることができます。福井大学の神藤洋爾先生、それに、先生の修士の学生さんだった原田拓典君が私のところに博士課程の学生として入ってくれ、その後ポストドクとしても一緒に装置開発をやってくれました。日本分光(株)と一緒に開発しました。固体状態を測定できる市販の装置がなかったら自分たちで作ってしまおう、作ってしまったら、この装置を使ってでないとできないような研究を展開しようという意気込みでした。

V-1. UCSの測定原理と設計

Fig. 15の式からわかるように、50kHzのシグナルには、測りたいCDシグナル以外にたくさんの項があります。セル、光電子増倍管とか光弾性変調器 (フォトエラストックモジュレータ (PEM)) とか高品質のものをいろいろ選び、装置を調整しても、Fig. 15の黄色で囲まれた式 (1) にしかなりません。

この式にも、CD以外の、LD (Linear Dichroism)、LB (Linear Birefringence) が含まれています。溶液ではこれらは平均されてゼロになるのですが、固体状態ではこれらの巨視的異方性が大きくてCDの500倍とか1000倍になることもあるのです。気をつけなければいけません。試料を光に垂直な面で回転させて測定し、 θ で平均すればいいとある著名な研究者が論文に書いたために多くの人信じてしまったのですが、それは正しくありません。式 (1) 上の行には θ がかかっていない項がありますので、回転してスペクトルを平均しても異方性によるシグナルは除去できないのです。私たちはこの式から出発し、Stokes-Muller matrixを使って、CDもLDもLBもCBも測れる装

フロンティアの研究は装置の開発から 固体CD装置の開発

- 溶液とは異なる固体状態でのキラリティーや、固体状態ではじめて 現れるキラリティーの測定をしたい。
- しかし、固体状態のキラリティーは、市販の装置では正しい測定が不可能

↓ **CD = Circular Dichroism, 円二色性**

**市販の装置がなかったら、自分たちで作ってしまおう、
この装置でしかできない研究を展開しよう**

装置と測定法を開発



Dr. T. Harada (博 土曜館大学館生一) 福井大学 Prof. Yoji Shindo 日本分光

© RK

Improvement of CD spectrophotometer

$$50 \text{ kHz signal} = G_1(P_x^2 + P_y^2) \{ -(LD' \cos 2\theta + LD \sin 2\theta) [LB_{C1} + CD + 1/2(LD'LB - LDLB')] + (LD' \sin 2\theta - LD \cos 2\theta) [LB'_{C1} + \sin \alpha] \} + G_1(P_x^2 - P_y^2) \sin 2\alpha \{ -LB_{C2} - LB \cos 2\theta + LB' \sin 2\theta + (LB'_{C1} - \sin \alpha) [CB + 1/2(LD^2 + LD'^2 + LB^2 - LB'^2) \sin 4\theta + (LDLD' + LBLB') \cos 4\theta] \} + G_1(P_x^2 - P_y^2) \cos 2\alpha \{ [LB'_{C2} + LB_{C1}] [CB + 1/2(LD^2 - LD'^2 + LB^2 - LB'^2) \sin 4\theta + (LDLD' + LBLB') \cos 4\theta] - LB \sin 2\theta + LB' \cos 2\theta + LB'_{C1} - \sin \alpha \}$$

Improvements*

1. Set an optical axis of PM as $\cos 2\alpha = 0$
2. Selection of the optical head having the least residual birefringence ($\alpha = 0.2^\circ$)
3. Selection of quartz cells (residual birefringence $< 10^{-3}$ OD)
4. Selection of PM with the least polarization characteristics

$$50 \text{ kHz signal} = G_1(P_x^2 + P_y^2) \{ CD + 1/2(LD'LB - LDLB') \} + G_1(P_x^2 - P_y^2) \sin 2\alpha \{ -LB \cos 2\theta + LB' \sin 2\theta \} \quad (1)$$

Stokes-Mueller matrix analysis → **True CD**

© RK

固体状態の測定も可能なCD分光測定装置と測定法 の開発: UCS-1: J800KCM

50 kHz = $G_1(P_x^2 + P_y^2) \{ CD + 1/2(LD'LB - LDLB') \} + G_1(P_x^2 - P_y^2) \sin 2\alpha \{ -LB \cos 2\theta + LB' \sin 2\theta \}$ LD, LB, CDを測定して、演算でCD信号を取り出す



Sample Chamber Sample holder



巨視的異方性のあるサンプルのキラリティー測定が可能な汎用装置 (CD, CB, LD, LBをすべて測定). 溶液および固体試料 特許保持 世界唯一

© RK

置をつくって、その測定方法も考案しました。何でも測れるのでUCS (Universal Chiroptical Spectrophotometer) という名をつけました。J800を改良したので日本分光(株)はJ800KCMという名をつけました (KCM = Kuroda ChiroMorphology)。

外観はFig. 16のようで、市販品と変わらないように見えますけれど、右下の回路から明らかのように、いろいろ工夫がしてあります。50kHzと100kHzのロックイン増幅器を2つ持っている、アナライザーを抜き入れできる、回

転しながらスペクトルを測れるなど、いろいろな工夫がされています。サンプルホルダーも別に特許を取っています。

V-2. UCSで測定した固体状態のCDの例

実際のスペクトルをお見せしましょう (Fig. 17)。キラルではないにもかかわらず、偽の強いシグナルが検出されることがありますが(左側、青い背景のスペクトル)、UCSで測定し、演算をしますと右側の黄色い背景のスペクトルとなります。CD強度がほぼゼロの正しいスペクトルが得られました。

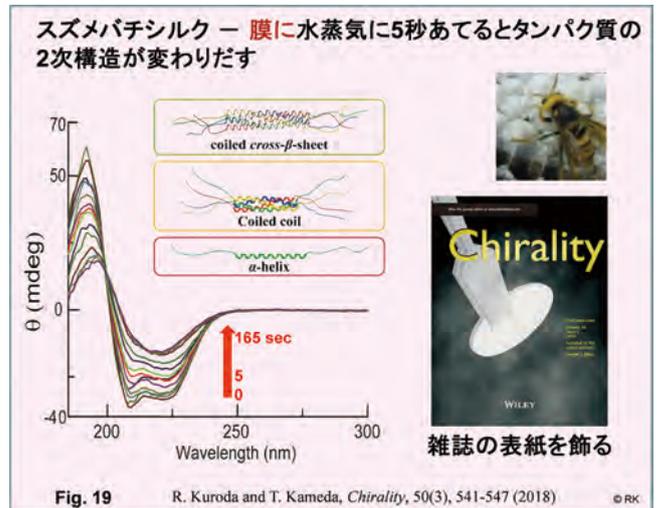
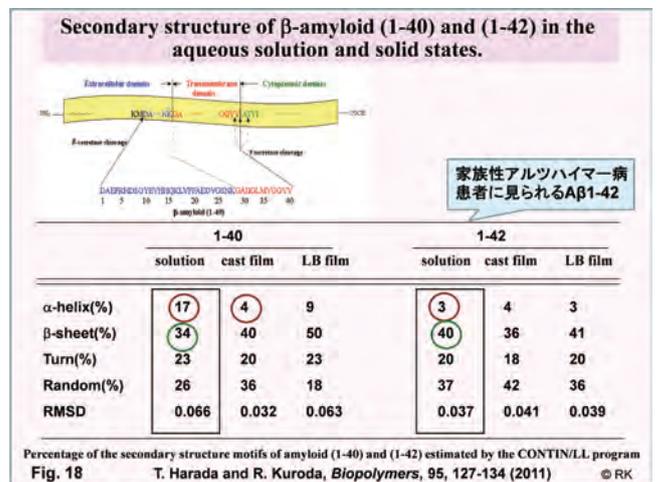
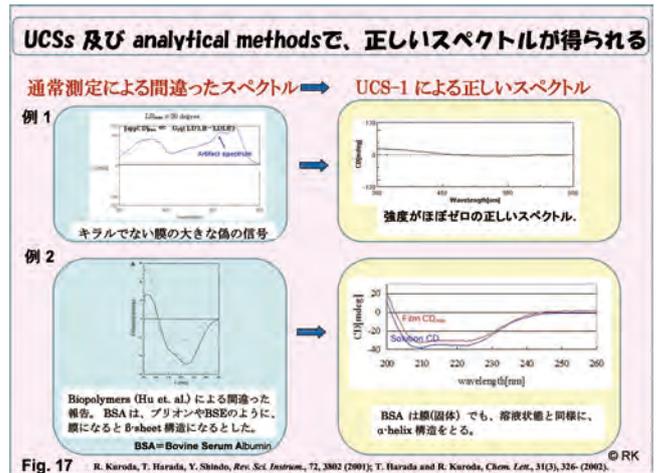
あるいは BSA (Bovine Serum Albumin) はプリオンや狂牛病と同じように膜になるとβ-sheetに変わるという論文が出ていますが(左側青い背景の図のスペクトル)、これは異方性に起因する偽の信号を測ったためで、私たちの測定の方法では、溶液状態と同様にきれいなα-helix構造をしていました(右側の黄色い背景のスペクトル)。そのほか、先ほどお話ししたキラルな結晶中にトラップされたプロキラルな化合物の光反応を追いかけるなど、いろいろなことをやっていますが今日は時間がなくて割愛します。

おそらく皆さんが興味をもたれると思うのはアミロイドタンパク Aβ (1-40) ですね (Fig. 18)。溶液ではα-helixが17%、β-sheetが34%。β-sheetになるとプラークをつくりやすくなります。これをキャストフィルムやLB (ラングミュア-プロジェット) 膜にします。膜にするとα-helixが4%と大幅に減少し、β-sheetが40%になっています。このAβ(1-40)は、プリカーサー (前駆体) といわれる大きなトランスメンブレイン (膜を貫通する) タンパク質からβ-セクレターゼとγ-セクレターゼによって切り出された、40個のアミノ酸残基から成るペプチドです。ところがアルツハイマー病になりやすい家系があって、その家系の人々はγセクレターゼがC端方向にアミノ酸残基2個分ずれたところでプリカーサーを切断します。つまり結果として42個の長さのAβ(1-42)ができるのです。このペプチドを調べてみると、何と溶液状態からα-helixが3%しかない。40%がプラークをつくりやすいβ-Sheet構造になっていることが明らかになりました。こんなことも、10年くらい前に発表しました。

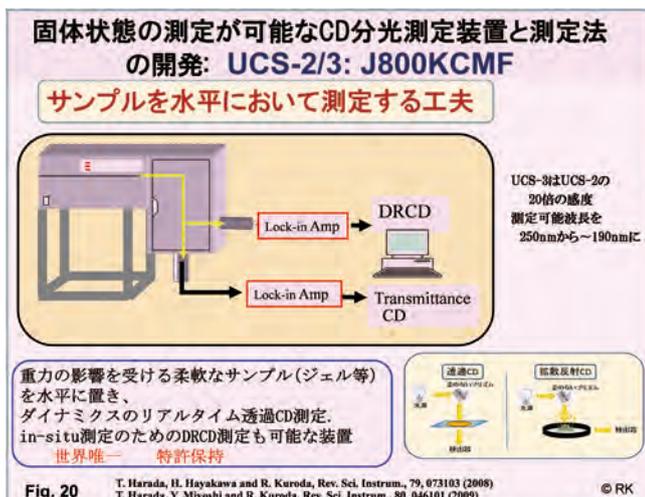
もっと最近の話になりますと、スズメバチシルクの膜ですが、見た目は変わらないのですが、膜に水蒸気を5秒当てるだけでタンパク質の高次構造が変わっていきます (Fig. 19)。α-helixからcoiled coilそしてcoiled cross-β-sheetへとあっという間に変わっていくことを発見して、これも雑誌の表紙になっています。

V-3. 試料を水平に置いてCD測定できる装置の開発 UCS-2, UCS-3

また、吹っ飛んだ発想をし、水平思考といっているの



すけれど、どうしてもジェルとか軟らかいものは重力の影響を受けるからサンプルを水平に置くほうがよいと考えて、こんな変わった装置を作りました (Fig. 20)。これが講演の最初に写真でお見せした分光計なのですが、2つ光電子増倍管があります。サンプルを水平において光を直角に曲げて透過CDを測定する、もう一つは粉を積分反射球の中に置いてDRCD (拡散反射) CDスペクトルを測ることができます。これも特許を取っています。

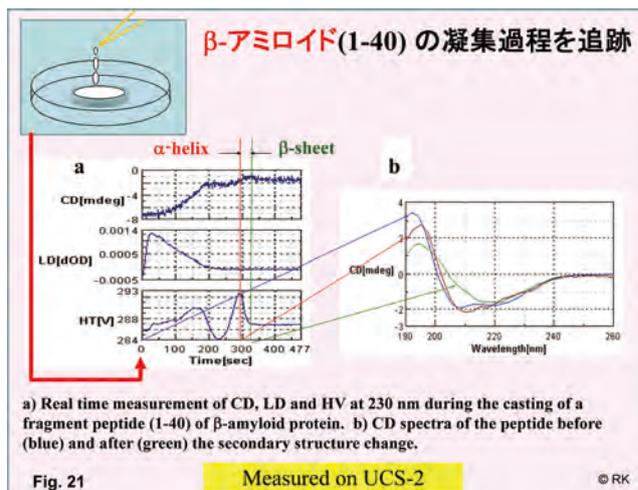


この装置を使うと、先ほどのアミロイドですが、ぽたっと液を落としますと (Fig. 21)、出発は溶液です。グラフの横軸は時間です。液滴が時間の経過とともに乾燥して膜になるのですがその過程を追っています。この赤い縦の線のところまではまだ α -helix構造ですが、この短い時間で一挙に β -sheet構造に変わるなんていう面白いことを追跡できるようになりました。

V-4. 新概念によるCD装置の開発 一波長スキャン不要、異方性信号除去不要

でも、波長をスキャンしている間にどうしても速いダイナミクスでは構造変化が起きてしまう。それだったら、波長スキャンなしで測れる装置がほしいと思い、かつ、異方性LD、LBを取り除くのがすごく大変なので、それなら最初からLD、LBのシグナルが混入しない観測の仕方ができないかと考えました。これも試作機を作り、アメリカの特許も取りました。マルチチャンネルCD分光装置の設計では、白色光を偏光板で偏光し、PEMで変調し、試料通過後、回折格子で分光し、エレクトリックシャッターで円偏光のみをとりだし、マイクロチャンネルプレートで増幅。右巻円偏光と左巻円偏光のCCDイメージの差をとることでCDスペクトルを得るというものです。その結果得られたCDスペクトルは、UCSで測定したスペクトルと大変よく似ています。ただし、SN比が悪いです。測定にどれだけの時間がかかったかという、UCSは5分、でもマルチチャンネル法では7秒。もっと短くできるだろうと思っています。現在は当時と比べるとっと良い品質の光ファイバーやCCDがあるはずですが、今となっては、資金も人手もなくて、開発を進めることができませんし、東大にも海外の特許は高いといわれて切られてしまいました。

化学分野では、今日お話した以外にも、これから展開したいおもしろい現象をいくつか見つけています。固体状態のキララ分光も現在、岡崎の分子科学研究所やエストニアの大学の先生と共同研究を行っています。



そして、それから、これから話す巻貝の研究分野の試料も、いずれin vitroで我々のCD分光法などで調べられないかなと考えています。

VI. 生物の世界のカイロモルフォロジー研究 —巻貝の巻型を決める1個の遺伝子の同定

さて、巻貝の研究の話です。巻貝の巻型を決める分子機構を調べたいと思いました。なぜ巻貝なのかというと、とてもユニークな特徴があるからです。でもあまり研究している人がなくて、どうやって飼育するのか？ DNAやRNAをどうやって抽出するのか、どうやって胚操作をするのかなどがわからなくて、本当に苦労しました。ユニークな特徴とは、体内構造の左右性が体の外にも現れていて左右性の観察が楽なこと；*Lymnaea*属にはなぜか、右巻と左巻の両方が天然にいること；右対左が98対2くらいです。雌雄同体で、自家受精と他家受精の両方を行いますので遺伝学の研究がやりやすいこと；世代交代が短く、3ヵ月から4ヵ月で次世代を産みます。もっと長かったら私は150歳から200歳まで生きて研究しなければなりません。また、巻貝の巻型が発生のごく初期に決まるということです。1894年にCramptonが4細胞期から8細胞期になる第3らせん卵割時に、小割球が右旋すると右巻貝に、左旋すると左巻貝になることを、異なった右巻種と左巻種の貝を観察して報告しています。1923年に巻型は遅滞遺伝し、母貝の1個の遺伝子で巻型が決まると報告されました。—これは実はワトソン、クリック、ウイルキンスらによるDNA発見のはるかに前のことで、今の定義の遺伝子ではありません。しかし、遺伝が大変シンプルであることを示唆していると思いました。

そこで私はERATO研究助成に応募したときに、現代の遺伝子でも1個の遺伝子で決まっているのか？ そうなら、巻型決定遺伝子とは何なのか？ 卵割時の割球の回転方向はどのようなメカニズムで決まるのか？ 遺伝子がどう関わって目で見える体の左右を決めているの？ほかの生物

種との共通点・相違点はあるのか？ このような疑問に答えたいと応募しました。最初の2つの疑問には答えることができました。残りの3つの疑問もかなりわかってきましたが、研究はまだ続いています。プロジェクトを始めたときは、巻貝の飼育方もわからず、熱帯魚屋さんにご相談しつつ大きな飼育システムまでつくりました。手探りでシステムを維持し、コンジェニックシステムも作りしました。今は研究資金もなく、人もいなくて小さな水槽でしか飼っていませんが、細々ながら大きなテーマに挑戦しています。分子生物学、発生生物学、細胞生物学と幅広く手がけました。

VI-1. 左右対称性の破れ

最初の発見です。すべての発生生物学の教科書には「右巻貝と左巻貝は、初期らせん卵割過程もそれ以降の形態形成も鏡像対象に進行する」と書かれています (Fig. 22)。ところが、それが違っていました。違うところが重要なのだということに気がつきました。動画をお見せします。上段が左巻貝の胚で第3卵割で小割球が左にくると回るのがわかるでしょう。右巻貝の胚では右にくると回りますね (本報告書では動画は割愛)。これが、Cramptonが観察したことで、多くの教科書に載っている図はそれを描いています。

でも実は丁寧に観察すると (Fig. 23 left)、第3卵割のときに左巻胚のほうは真上に小さな割球がでてきて、それから左に回る。右巻胚のほうは最初かららせん状に細胞の形が変形し (SD)、スピンドルも傾いて (SI)、早い段階でキラリティが決まっているのです。SD (Spiral Deformation)、SI (Spindle Inclination) と名づけました。じゃあこれが何で引き起こされているのかというと、微小管ができなくても非常に強くキラリティが現れるけれど、アクチンの重合を阻害する薬剤で処理をするとキラリティがなくなることから、アクチンが関係しているのだというヒントをこのときに得ました (Fig. 23 right)。この研究成果は、『Current Biology』の表紙にもなりましたし、『Dispatch』という紹介記事も出ました。それを見て「exiting and elegant new study」とコメント書いてくれた人もいますし、『Science』誌も紹介記事を書いてくれました。結構日本の新聞も書いてくれました。これはわたくしの発生生物学の論文としては、ほぼ初めてのものです (Fig. 24)。

VI-2. メカノジェネティクス — 物理的胚操作で逆巻の貝を作成

第二の発見は「あそこできると回るのが重要なことから、手で逆に回してみたらどうなるだろうか、やってみよう」と発想したことから始まりました。私はよく吹っ飛んだアイデアをいう人間なので、そういいましたら、研究室のみんなが声を上げて笑いました。でも遠藤さんという器用なテクニシャンがいて、彼は顕微鏡下でガラス棒でそっ

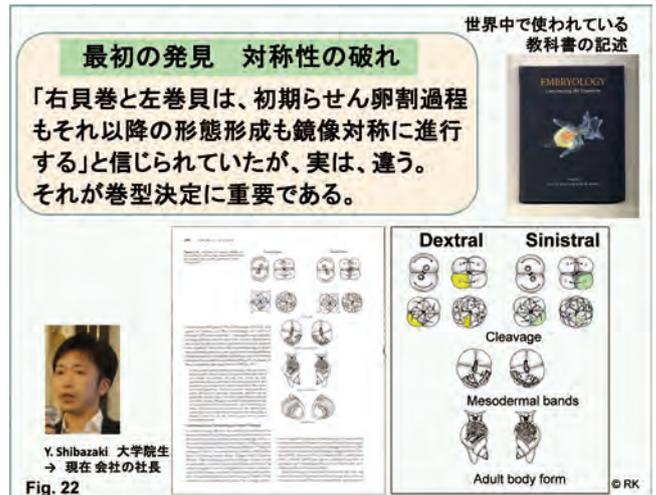


Fig. 22

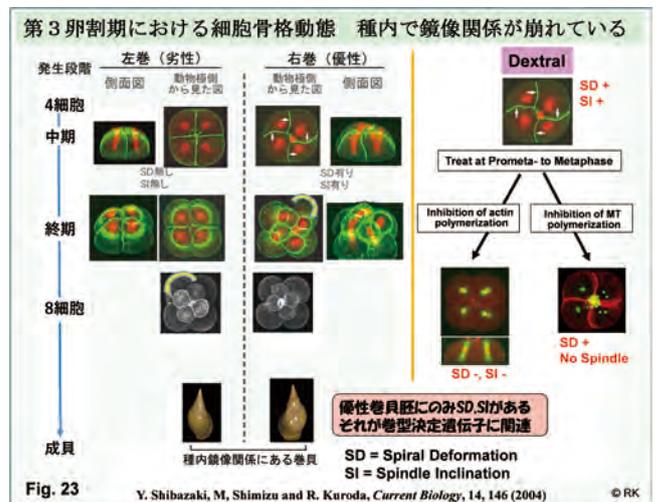


Fig. 23

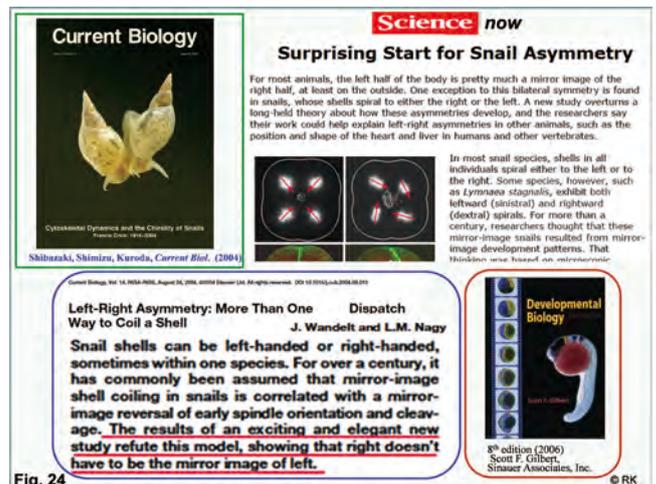
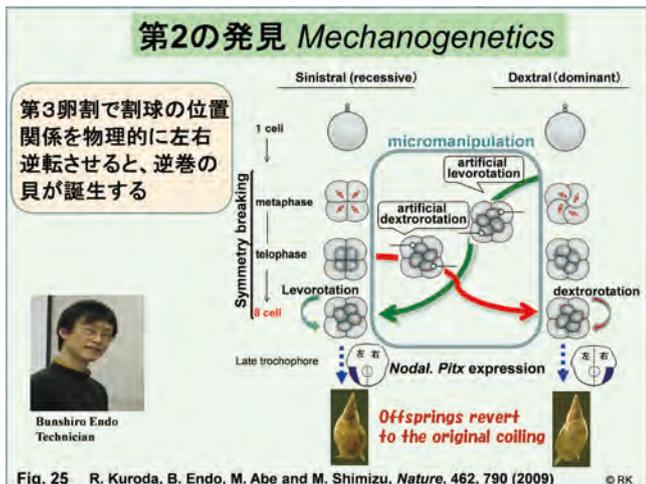


Fig. 24

と割球を押す実験とその後の卵外人工胚培養に見事に成功してくれました。左巻胚ではまず、小割球が中立に真上にできてくるのでそこから押し始め、右巻胚では早くからキラリティが決まりだすから早くから押し、細胞接着構造が固定してしまうまで押し続けました (Fig. 25)。

脊椎動物の体の左右性構築には共通して *nodal*、*Pitx* 遺伝子が働いていることが知られています。マウスでよく調べられていて、*nodal flow* が起きて *nodal* 遺伝子が発現す



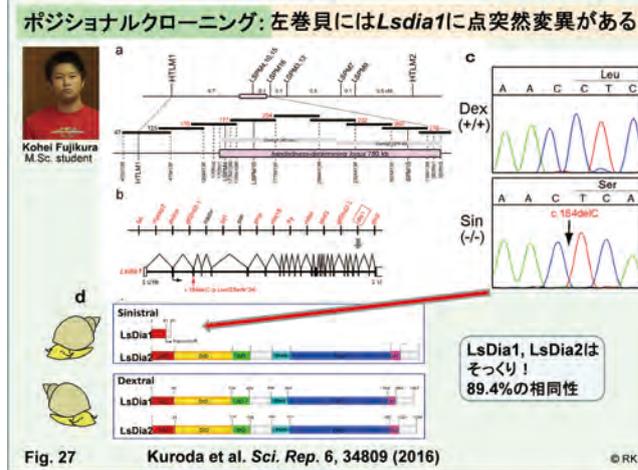
るとそちらが左に定義されます。軟体動物の貝にはこれらの遺伝子は存在しないと報告されていたのですが、実はあることを見つけ、右巻貝の胚では胚の右側、左巻貝の胚は左側で発現することを突き止めました。図の青くなったところがその遺伝子が発現しているところです。(巻貝におけるこの遺伝子の存在はほとんど同時にGrandeのグループからも報告されました)。そして、このように物理的に8細胞期の割球の位置関係の左右性を逆転させると、nodal, Pitx 遺伝子の発現場所も左右逆転し、その結果、逆巻きの貝が誕生したのです。子どもを産むことができる健康な巻貝でした。遺伝子は操作していないので、当然ながら次の世代は、遺伝子に則った元の巻型に戻ったのです。

この論文はクレームがほとんどなしで『Nature』誌に掲載され、『NEWS & VIEWS』で紹介されました。フランス人はエスカルゴが好きのためか、フランスの新聞、『Le monde』が書いてくれましたし、また「elegant」な研究と書いてくれた記事もあり、とても嬉しかったです(Fig. 26)。

ただ、右と左の両方の巻型が天然にいる種だから物理的操作で逆巻にできるのは当たり前じゃないかといわれるかもしれないので、天然に左巻しかない *Physa acuta* で同様の物理操作実験をやってみたのです。そうしたらこれまで誰も見たことがない右巻の *Physa acuta* 貝ができたのです。そしてその子はまた左巻に戻るということも確認しました。巻貝の巻型を決めるプロセスには共通のメカニズムがあることを示唆しています。

VI-3. 巻型は1個の遺伝子座で決まっている

コンジェニックというのですが、連続戻し交配という手法で、どんどん右巻のゲノムの比率を薄くして行って左巻のゲノムに置換していきます。右巻のゲノムの中の巻型決定遺伝子を受け継いでいるものは右巻の子どもを産みますので、それを選び、交配を続けていきます。F2, F3, F4...と戻し交配を行い、右巻ゲノムの割合を減らしていきます。そうして、0.1%右巻のゲノムで、99.9%左巻のゲノ



ムという F10 世代系統をつくり、その 0.1% に巻型決定遺伝子を受け継いでいると必ず SD, SI があって第 3 卵割で右旋性をして右巻の貝になることをつきとめました。ですから現代の定義による遺伝子でも、1 個の遺伝子座によって、巻型が決まっていることになります。世界で使われている教科書(2016 年版)が『Current Biology』, 『Nature』誌に乗った成果を因入りで結構大きく取り上げてくれ、章の扉にも私の貝の写真が載りました。

VI-4. 巻型決定遺伝子候補の同定

では、この 1 個の遺伝子とは何なのでしょう？ 世界中で 1 世紀近く、この遺伝子を同定すべく、研究が行われてきました。我々も、非常に長い時間をかけましたが、BAC ライブラリーの作製から始め、AFLP マーカーを作り、ポジショナルクローニングで領域を狭め、15 個の遺伝子候補に絞りました (Fig. 27a)。その中から、アクチンが関係して母性遺伝する遺伝子 5 個を選び、右巻貝と左巻貝で差があるかを塩基配列を決めて調べたのです。その結果、左巻の貝には、Lsdial と名づけた遺伝子の両方の対立遺伝子に 1 個突然変異が入っていて、その結果すぐ終止コドンとなってタンパク質が作られていないことが明らかになりました。それ以外の遺伝子には右巻、左巻で差

はありませんでした。Fig. 27cを見ると右巻貝では緑(A)、緑(A)、青(C)、青(C)、赤(T)の順にピークが並んでいるのに、左巻貝では、緑(A)、緑(A)、青(C)、赤(T)と、青(C)が1個抜けています。これだけで右巻左巻が決まるのでしょうか？ Western blotをやっても確かにLsDial タンパク質は左にはないということも確認しました。

Fig. 27bからあきらかなように、*Lsdial1* と *Lsdial2* の2つの遺伝子がタンデムに並んでいます。しかもこの2つのタンパク質には89.4%も相同性があるのです。LsDial1, LsDial2の2つのタンパク質があると右巻きに、LsDial2だけですと左巻になるという結果です(Fig. 27d)。(我々とほぼ同時に同じ遺伝子を候補とした論文が出ましたが、その根拠となっている実験やゲノム配列には残念ながら重大な間違いがあります)。これはまだ、巻型決定遺伝子の候補にすぎません。他にも遺伝子があるかもしれませんし、他の遺伝子と協働して左右が決まっている可能性もあります。

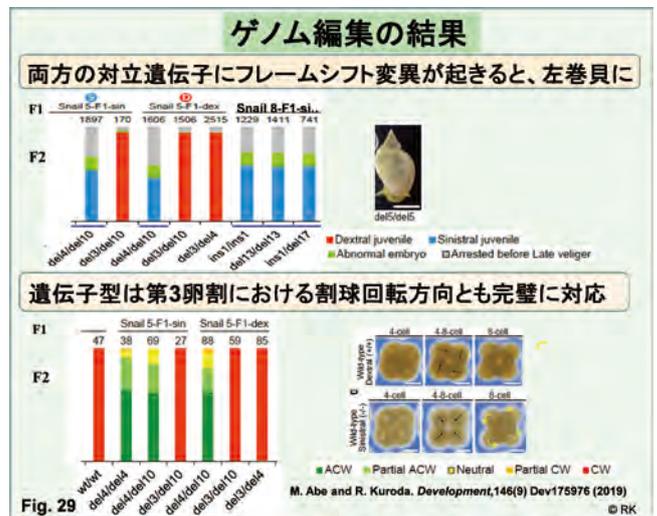
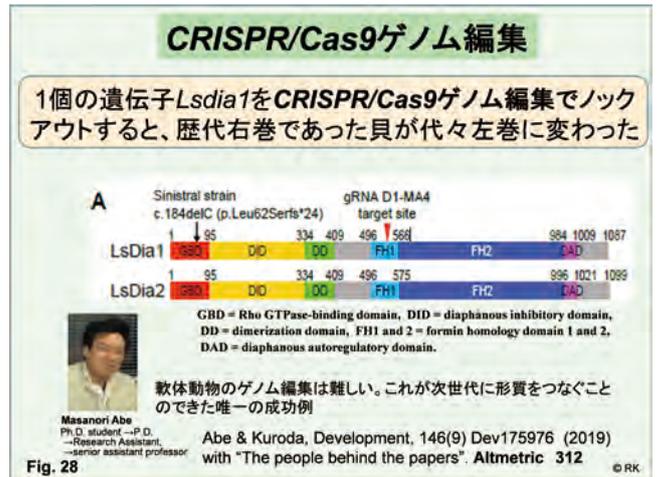
VI-5. 巻型決定遺伝子の同定に成功 — CRISPR/Cas9 ゲノム編集で

そこで、この遺伝子をCRISPR/Cas9ゲノム編集でノックアウトしたらどうなるかを調べました。Fig. 28のLsDial配列の左に示した黒矢印は天然に入っている点突然変異の位置です。ゲノム編集のターゲットをそこには設定できず、右巻、左巻の塩基配列で差の大きな真ん中のFH1のところ(赤矢頭)をターゲットにして右巻貝の胚にノックアウト実験をやってみました。その結果、遺伝子型に対応した大変クリアな結果になりました(Fig. 29)。両方の対立遺伝子にフレームシフト変異が起きると、左巻貝に

と右巻のはずの貝が左巻になりました。それ以外の変異では右巻です。第3卵割の割球の回転方向も完全に*Lsdial1*の遺伝子型と対応しますし、Western blotでLsDial1タンパク質があるかないかを確認しましたが、これも完全に遺伝子型と対応していることがわかりました。

まとめるとLsDial1, LsDial2両方があると右巻なのに、その中の1個、*Lsdial1* 遺伝子をノックアウトすると代々左巻になります。今はF7世代まで行っています。それから、受精卵ですでに左右性が決まっていることも突き止めました。

これまでに、



- ・LsDial1 が受精卵から左右性を決定している。
 - ・90%相同性のあるLsDial1, LsDial2両方があると右巻、LsDial2のみになると左巻になることを明らかにしました。
 - ・世界唯一の系統を樹立・維持し、巻貝のゲノム編集技術も世界で初めて確立しました。
- しかし、分子レベルでは左右性はいつ、どこで、どのようにして決められているのでしょうか？ 多くのことを明

らかにしてきましたが、実はまだ出発点に立ったばかりじゃないか、これからじゃないかと思っています。SD、SIの役割は謎です。*dia*という遺伝子は真核生物すべてがもっている基本遺伝子で、アクチン線維の伸張に関わる遺伝子です。いったい何をやっているのか、現在、その研究を始めています。

脊椎動物の発生初期の左右性決定はほとんどわからないことばかりです。マウスの場合には7.5日齢になって *nodal* flow が起こり、8.25日齢になってはじめて *nodal* 遺伝子が発現してきます。人も1万人に一人くらい内臓逆位の人があります。私が研究している貝では、1細胞期で左右性が決まっています、3時間で左右性が確立し、5.5時間後の24細胞期で細胞運命が決まっており、12時間後の49細胞期で *nodal* が発現することを明らかにできましたので、この系でこそ左右形態形成の謎を解明する研究ができるはずと思っています。

さらに、軟体動物のCRISPR/Cas9ゲノム編集は意外に難しく、成功したのは今のところ我々だけなのです。左右性決定の謎をさらに追及するとともに、今後は医療分野にも展開したいと考えています。ヒト住血吸虫症はマラリアの次に重篤な感染症ですが、その制御に貢献したいと思っています。寄生虫がヒトに感染するためには中間宿主内で変態することが必要ですが、中間宿主は、これまで左右性の研究対象としてきた巻貝とそれほど遠くない巻貝種なのです。これまでの経験を生かして、感染耐性を理解しようと考えています。幸い、科研費挑戦的萌芽に採択され、嬉



しく思っています。認知症の研究についても計画中です。ある意味では、やっと出発点に立てた感じです。これからやりたいテーマが満載です。

VII. 共同研究者、所属機関、資金提供くださったJSPSに深謝

共同研究者です。先ほどから、各項目で何人かの中心的に実験をしてくれた人の名前と写真をお見せしたのですが、それ以外にもたくさんの人が貢献してくれました。JST ERATO/SORSTプロジェクト研究をやらせていただいたこと、研究場所となった、東大、理科大と今の中部大学にも心から感謝します (Fig. 31)。

ご清聴ありがとうございました。

コーセーコスメトロジー 奨励賞

2021 年度 コーセーコスメトロジー奨励賞

● 奨励賞の趣旨

「コーセーコスメトロジー奨励賞」は、2020 年の本財団創立 30 周年にあたり創設された表彰制度で、本財団の研究助成採択者の中から、論文発表を通してコスメトロジー研究の発展に功績があった研究者を表彰するものです。

これにより助成課題の更なる発展を期待するとともに、これをインセンティブとして、コスメトロジー研究の学術論文による成果公表を奨励し、研究成果の社会還元を一層促進することを目的にしています。

そのため本財団は、コスメトロジー研究助成を受けられた研究者から助成課題に関する論文の提出を受けて、論文実績に基づく選考を行い毎年の最優秀者を表彰してまいります。

● 選考の経過

2021 年 4 月、2018 年以降のコスメトロジー研究助成採択者全員に、本表彰の趣意書を送付しました。8 月末日の締切日までに 14 名の研究者から助成課題の研究成果を発表した論文延べ 21 報の提出を受けました。

本表彰受賞者の選考にあたり、提出されたそれぞれの論文について論文実績の客観的指標として被引用件数を調査しました。この調査結果から、最も論文実績が優れた研究者 1 名を選考委員会において表彰候補者として選出し、理事会の承認を得て、本年度の受賞者を決定しました。

● 受賞者

景山 伯春（名城大学理工学部 教授）

- ・ 第 29 回コスメトロジー研究助成受賞（2018）
- ・ 研究課題：天然スキンケア原料としてのマイコスポリン様アミノ酸：生産基盤開発と機能解明



中央：景山 伯春（名城大学理工学部教授）
左：小林 保清（前 理事長）・右：小林 一俊（現 理事長）

コスメトロジー研究助成報告

- 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
- IV. コスメトロジー研究助成を受けて

I . 素材、物性に関する分野

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

東北大学多元物質科学研究所

殷 澍

B and N co-doped anatase(BN-Ana), rutile(BN-Rut), and brookite(BN-Bro) TiO₂ were successfully synthesized by a hydrothermal assisted nitridation method. The apparent color of as-obtain BN-Ana, BN-Rut and BN-Bro was red, cyan and yellow-green, respectively. The mechanisms of various coloring were concluded as the different band gap configurations and the formation of covalent B-N bonding. The nitridation time expressed less effect on changing the color. On the contrary, the nitridation temperature enabled the distinct color changes by altering the brightness. The lower temperature, the fewer doping concentration, and brighter apparent color, vice versa. Through tuning the brightness, a gradient of yellow-orange-red was achieved in the case of BN-Ana, as well the transitions of grey-to-cyan and white-to-green-yellow were achieved in BN-Rut and BN-Bro, respectively. This research proposed a method for the synthesis of color-full titania pigment without the addition of other toxic transition metal elements. It was also found that the color titania with various phase composition possessed different photocatalytic activity. The results indicated that BN-Bro was the most active species, showed almost the same level photocatalytic activity as Degussa P-25 titania under UV light ($\lambda > 290$ nm) or blue-free visible light ($\lambda > 500$ nm) irradiation, while it shows higher activity under $\lambda > 400$ nm irradiation. The photocatalytic durability of BN-Bro decreased to about 44 % of its original activity after five times cycling test. On the other hand, the photocatalytic activity of BN-Ana and BN-Rut show quite low photocatalytic deNO_x activity, indicating that BN-Ana and BN-Rut are potential candidates for toxic-free pigment or cosmetic applications

1. 緒言

遷移金属化合物は多彩な色を示すことで知られている。これは遷移金属元素のd軌道やf軌道が電子によって完全に満たされていないことに起因し、分裂したd軌道間の電子遷移(d-d遷移)、局在した軌道間の電子遷移(電荷移動遷移)等に由来すると知られている。しかしながら、遷移金属元素は、毒性を持つものが多く、医薬用途等制限されるケースが多い¹⁾。一方、酸化チタンは無毒で、高い化学的安定性を有するため、化粧品をはじめ、食品添加剤等にも広く利用されている無機材料である。一般に、遷移金属イオンのドーピングにより、白色の酸化チタンを着色させることは可能であるものの、遷移金属に由来する生体毒性を回避することが難しいと思われる。通常酸化チタンは屈折率が高く、優れた隠ぺい力を有し、化学的安定かつ無害で、化粧品の重要な原料である。一般に、酸化チタンのバンドギャップ3.0-3.2eVであり、白色である。酸化チタンの色制御は塗料等における応用だけでなく、様々な新規機能材料としての応用も期待される。窒素アニオンを酸化チタンの格子にドーピングすると、酸化チタンのバンドギャップが狭くなり、可視光を吸収し、黄色を呈すること

が知られているが、酸化チタン単独組成では、赤や緑等カラフルな色を示すことは難しい^{2,3)}。尚、これまでの赤色無機顔料としては、鉄イオンを利用することが殆どであり、鮮やかな赤色の実現は困難であった。本研究は、環境に優しいソルボサーマル反応を利用し、貴金属及びチタン以外の遷移金属フリーなカラフル酸化チタン無機顔料を合成し、紫外線遮蔽や触媒活性評価を行い、化粧品としての機能評価とその応用を検証した。酸化チタンは白色や黄色だけではなく、鉄イオンフリーな赤色無機顔料、並びにグレー、緑色、紫色、黒色等、様々な色を有する無機顔料を酸化チタンのみで実現できることを検証した。

2. 方法

本研究では、溶液ベースソルボサーマル反応及びガス雰囲気中での処理により、単一アニオン及び複合アニオンドーピング酸化チタンの合成を行い、アニオンドーピングによるバンドギャップの精密制御を施し、酸化チタンへの様々な着色を実現した。尚、ソルボサーマル反応の反応条件を変化させることにより、3つの異なる結晶相を有する酸化チタンを選択的に合成し、さらなる熱処理雰囲気制御による色の精密制御の可能性を検証した⁴⁾。代表的な合成プロセスをScheme 1に示す。アナターゼ(BN-Ana)の場合、200mMのTiB₂を0.5M Na₂SO₄を含む0.5M H₂SO₄溶液中で180℃、24時間水熱処理し、50mL/minアンモニア気流中で600℃、1時間窒化処理を行うことで合成した。ルチル(BN-Rut)の場合80mLの0.5M HCl中で水熱処理し、ブルックイト(BN-Bro)の場合2M尿素溶液と3mLのDL-乳酸ナトリウム溶液中で水熱処理し、同じ窒化条件で処理



Creation of Colorful Titanium Oxide Inorganic Pigments and Functional Evaluation as Cosmetic Materials

Shu Yin

Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University

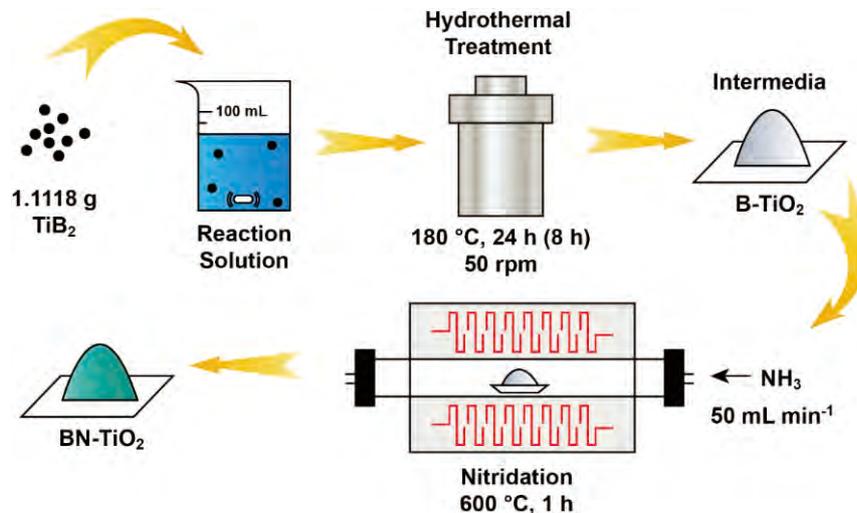
することにより合成した。尚、窒化処理時間及び窒化処理温度による影響も検証した。XRD、DRS、XPS、SEM等を用い、得られたサンプルの物理化学特性評価を行った。粉末の色彩は3次元色空間CIELABシステムによって評価し、光触媒活性は異なる波長(>510nm, >400nm, >290nm)照射におけるNO_xガスの連続分解によって評価した。

3. 結果と考察

Fig. 1は、異なる条件下で水熱処理を行い、得られたアナターゼ、ルチル、ブルッカイト相ベース酸化チタン粉末をさらに500～700℃のアンモニアガス中で窒化処理したもののXRDパターンを示す。一次相がアナターゼベースの場合(BN-Ana)、窒化温度が600℃以下では、若干のTiB₂不純物が存在し、600～700℃には不純物TiB₂は完全に消失した。700℃以上では窒化物(TiN)が生成する可能性が高くなり、単一相を得るため、700℃以下での処理は適切と言える。これに対し、ルチル相(BN-Rut)及びブルッカイト相(BN-Bro)はTiB₂不純物ピークがなく、500

～700℃の範囲で変化する窒化温度は、結晶構造に実質的な影響を与えないことが分かった。500～700℃での窒化では、ルチル相が単一相として存在するが、ブルッカイト相にはわずかなルチル相が存在する。700℃以上では、ブルッカイトからルチルへの相転移が進行し、27°付近の回折ピーク強度の増加が観察された。

Fig. 2には、600℃の窒化温度で合成された異なる結晶相を有する着色酸化チタンの拡散反射スペクトル、SEMと色彩イメージ及びバンドギャップ値を示す。バンドギャップ(E_g)の値は、UV-vis吸収スペクトルに基づくTauc-plot法⁵⁾により算出した。3つの相を有するBN-TiO₂は、いずれも数百ナノのサイズを有し、赤(BN-Ana, $E_g=1.85$ eV)、シアン(BN-Rut, $E_g=2.06$ & 2.89 eV)、黄緑(BN-Bro, $E_g=2.28$ eV)色を示し、優れた可視光吸収能力を有する。Fig. 2に示すように、BN-Anaの光吸収は全体的に750nmあたりまで広がっており、青色光を強く吸収し、見かけ上は赤色に着色した。一方、BN-Rutは200～2000nm範囲内では3段階の吸収を示す。<400nm(UV光)での吸収は、TiO₂固有のバンドギャップに由来し、



Scheme 1 Flowchart for the typical synthesis process of B/N co-doped TiO₂.

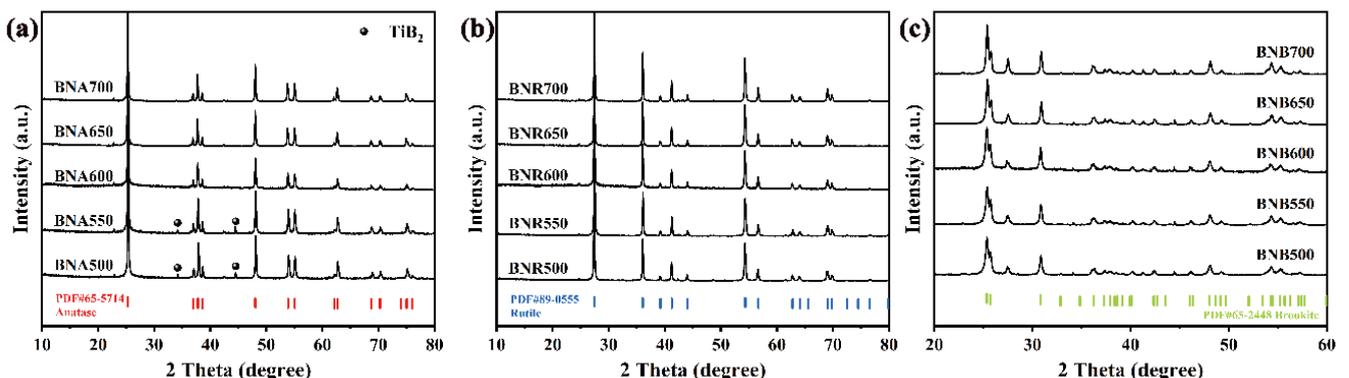


Fig. 1 XRD patterns of (a) BNA, (b) BNR, (c) BNB synthesized with different nitridation temperatures (500–700℃)

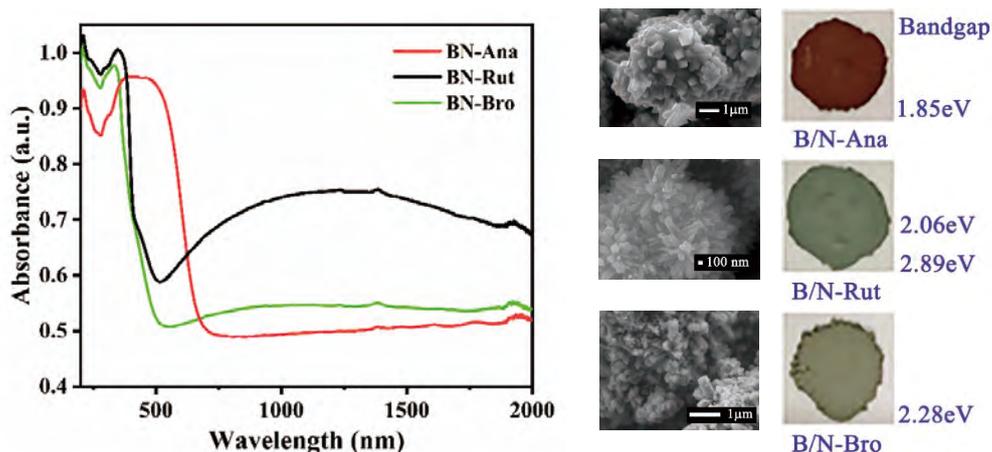


Fig. 2 DRS spectra, SEM images, related color and bandgap values of (a) B/N-Ana, (b) B/N-Rut, (c) B/N-Bro synthesized with nitridation temperatures at 600°C

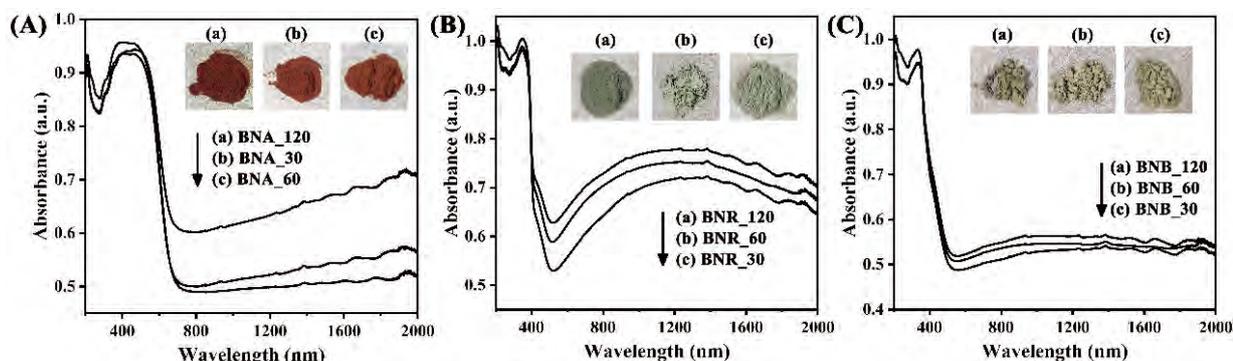


Fig. 3 The UV-vis spectra of (A) B/N-Ana, (B) B/N-Rut and (C) B/N-Bro samples synthesized by nitridation at 600°C for (a) 30, (b) 60, and (c) 120 min., respectively. The inserts are the photographs used to present the apparent color of each sample.

400-500nmの可視光領域では、短波長側の小さな膨らみは、格子間N (Nint) 状態の電子励起によるものである^{2,6)}。一方、スペクトルは近赤外(NIR)領域のほぼ全体をカバーし、波長中心が1000nmの広いピークは、Ti³⁺欠陥に由来すると思われる^{7,8)}。BN-BroはBN-Rutと同様な光吸収範囲を有するが、近赤外(NIR)領域にBN-Rutほどの強い吸収を示さない。

Fig.3 には、600°Cで異なる窒化時間により合成された3つの結晶相を有する着色酸化チタンの拡散反射スペクトルと色彩イメージを示す。関連する色空間の結果(L*a*b*色座標情報)をTable 1及びFig. 4にまとめた。いずれのサンプルも窒化温度600°Cでは+L*が最大値になり、さらに窒化温度が高くなるにつれ、明るさが減少した。窒化温度の増加に伴い、BNAの+a*及び+b*が減少し、赤みと青みが単調に減少した。BNRの-a*が増加、+b*が減少傾向となり、緑調及び青みが減少した。BNBに関して、窒化温度変化による-a*と+b*の変化がそれほど大きくない傾向となった。基本的には、窒化時間は結晶相及び色ベースに対する影響が少ないが、光吸収と色彩の度合いに影響をもたらす、窒化時間を変化させることにより、粉体色

調の微細制御ができることを明らかにした。さらに異なるガス雰囲気制御と熱処理条件の精密制御により、酸化チタンの結晶構造を保持しながら、さらなる繊細な色制御できる可能性が期待される。

酸化チタンに窒素をドーブする場合、新たなN2p準位を形成することにより、鮮やかな黄色を生み出すことができることが知られ、N2pのバンドがO2pバンドと混成せず、独立に存在するとされる^{2,3,9)}。異なるアニオン種類

Table 1 Color parameters of samples with different nitridation times (30, 60 and 120 min) in terms of CIELAB system

Groups	Samples	L*	a*	b*	h°	C
Ana.	BNA_30	39.15	10.01	6.29	32	12
	BNA_60	39.61	9.01	6.17	34	11
	BNA_120	37.36	7.75	4.51	30	9
Rut.	BNR_30	53.44	-4.12	4.03	316	6
	BNR_60	60.52	-3.83	4.54	310	6
	BNR_120	47.70	-3.32	2.69	321	4
Bro.	BNB_30	56.63	-3.28	7.12	295	8
	BNB_60	60.41	-2.92	6.61	294	7
	BNB_120	54.60	-3.35	6.99	296	8

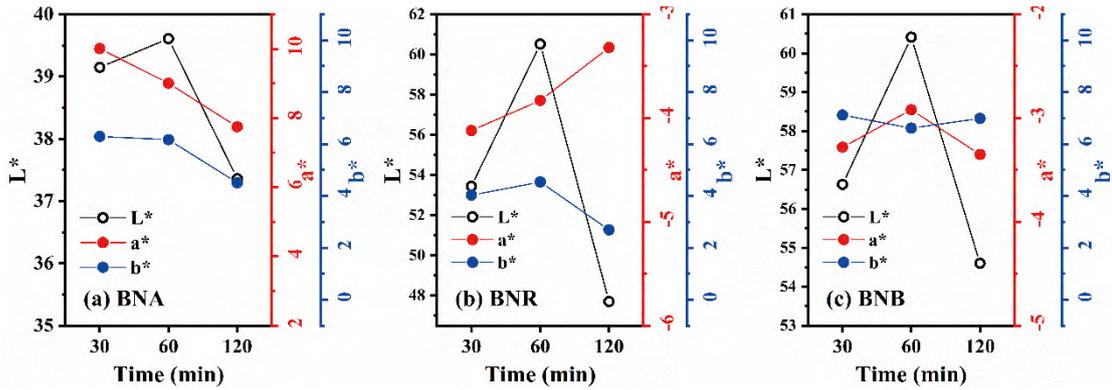


Fig. 4 The dynamic changes in L^* a^* b^* parameters were drawn as the function of nitridation time

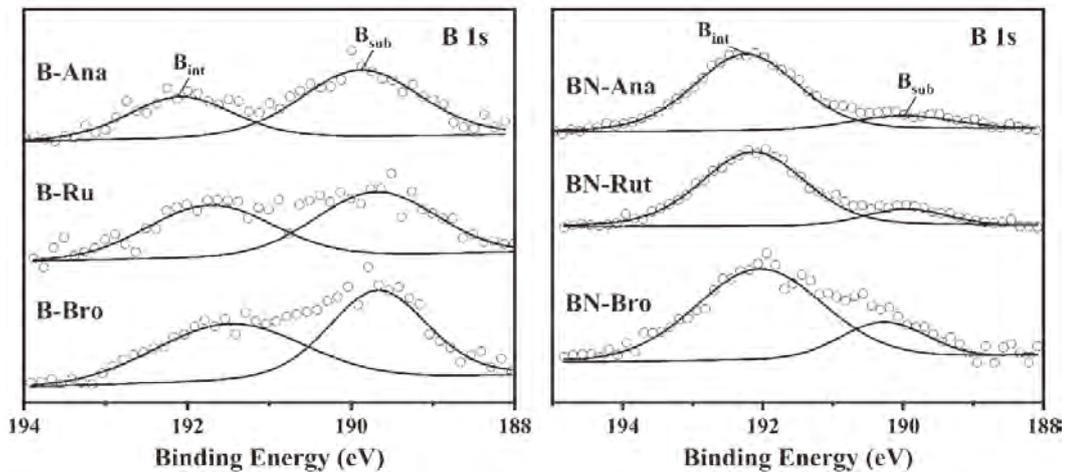


Fig. 5 The B 1s XPS spectra of three B-TiO₂ before (left) and after (right) nitridation at 600°C

に変えることにより、複合イオン共ドーピング酸化チタンは赤色や緑色等をもたらすことが可能である⁴⁾。Fig. 5に窒化処理前後のサンプルのB1s XPSスペクトルを示す。結合エネルギーが190eV付近のピークは、置換型B (B_{sub})¹⁰⁾に対応し、192 eV付近のピークは格子間型B (B_{int})⁶⁾に由来する。窒化処理後ピーク強度が逆転し、B_{sub}/B_{int}の比率が大きく変化した。すなわちNの導入により、格子間型B (B_{int})の生成が促進されることが分かった。また、窒化処理後のサンプルのN1sスペクトルより、B/N-Ana、B/N-Rut、B/N-BroのいずれもTi³⁺の存在(点線)を示唆した(Fig. 6)。

Table 2には、XPS測定により同定した3種のBN-TiO₂の表面元素組成を示す。BとNはいずれも格子間型(int)と置換型(sub)ドーピングが存在し、アナターゼ相の場合4.4at.%Bと1.31at.%Nが含まれており、ルチル相とブルッカイトの場合、それぞれ、3.5at.%B、1.7at.%Nと1.92at.%B、1.43at.%Nを含有し、結晶相によって、ドーピングされた量が変化することが分かった。さらに窒化温度の上昇により、BとNのドーピング量が上昇し、700°C窒化処理では、BNA、BNR、BNBにおけるBとNのドーピング量はそれぞれ6.25、3.20、5.85at.%B及び2.15、2.34、2.46at.%Nとなった。異なる着色はホウ素と窒素

ドーピングのドーピング状態及び各結晶の構造とエネルギーバンド構造に依存し、ドーピング量の精密制御により、さらなる詳細な色制御できることが期待される。

Fig. 7にN-TiO₂とBN-Ana、BN-Rut、BN-Bro 3つの相を有するBN-TiO₂のバンドギャップ構造と粉体のカラーイメージを示す。アニオン元素ドーピングはTiO₂中に2種類の原子状態(格子間型(N_{int}, B_{int})と置換型(N_{sub}, B_{sub})を引き起こし、格子間窒素とホウ素の濃度は、B及びNエネルギー準位の統合の程度に影響を与え、これが可視光領域の吸収の主な原因と考えられる。単一窒素ドーピング酸化チタンは価電子帯の上方0.59-0.75eVのところN1s準位が形成され、粉体は黄色を示す^{2-3,9)}。一方BとN共ドーピングした酸化チタンの価電子帯の上方にN1s準位のほか、格

Table 2 Surface elemental composition of three BN-TiO₂ measured by XPS without Ar⁺ sputtering treatment

Samples	B at. %			N at. %		
	Tot.	B _{int} [*]	B _{sub} [*]	Tot.	N _{int}	N _{sub}
BN-Ana	4.40	3.71	0.66	1.31	0.37	0.94
BN-Rut	3.51	3.00	0.51	1.70	0.58	1.12
BN-Bro	1.92	1.34	0.58	1.43	0.48	0.95

*int./sub.: intermediate / substitutional doping

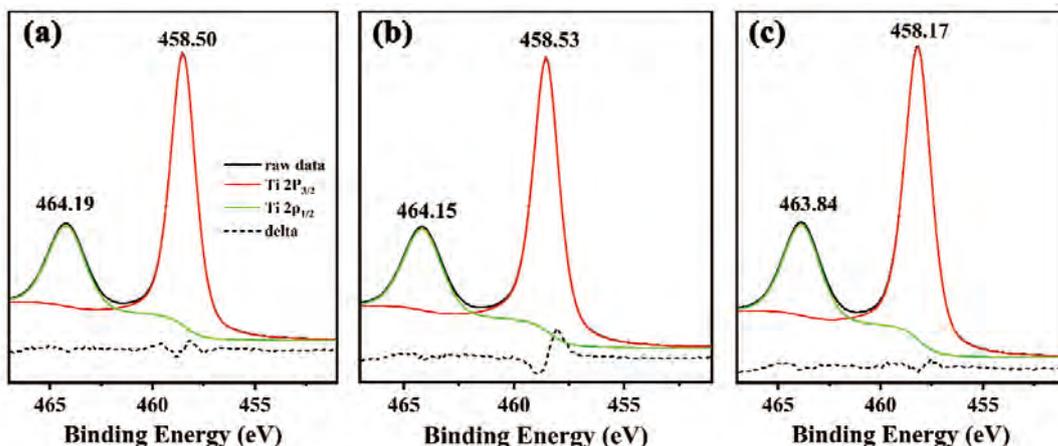


Fig. 6 The N1s XPS spectra of (a) B/N-Ana, (b) B/N-Rut, (c) B/N-Bro fitted by Ti^{4+} . The deviations (dash line) mean the existence of Ti^{3+}

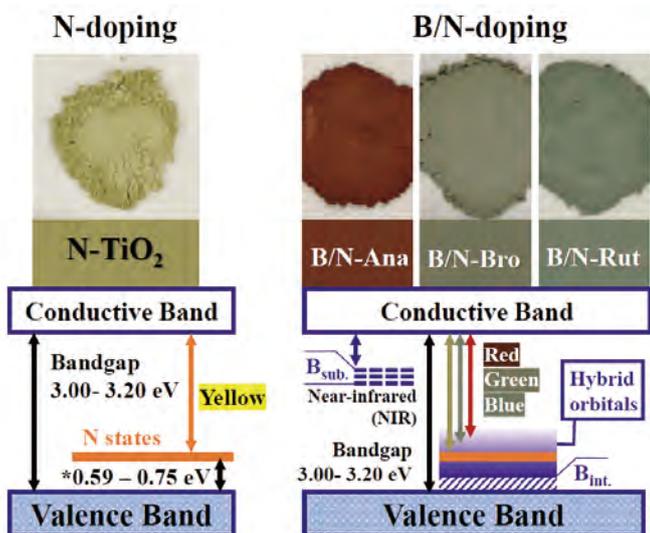


Fig. 7 Predicted band gap structures and color images of N-TiO₂ and three phases of BN-TiO₂ (B/N-Ana; B/N-Rut; B/N-Bro)

子間 B_{int} も存在し、N1sと格子間型 $B1s$ (B_{int})が幅広いハイブリッド準位が形成され、伝導体下方に置換型 B (B_{sub})が存在する。同時に、アナターゼ、ルチル、ブルッカイト本来の価電子帯レベルにもわずかな差が存在することが関わり、結果として異なる結晶相を有する酸化チタンに遷移金属フリーなカチオンドープすることにより、赤や緑等カラフルな酸化チタン粉体を得ることができた。BN-Ana及びBN-BroのNとB間の相互作用は、広いハイブリッドエネルギーレベルを形成し、400～750 nmでの広範な吸収をもたらす。

尚、Table 2に示すように、BN-Broの B_{int} の量(1.34 at.%)は、BN-Ana(3.71 at.%)と比較して非常に少なく、BN-Broの吸収端の拡張は限定的になり、400～750 nmの範囲での吸収強度はBN-Anaよりも低くなった。また、BN-Rutでは、Nドープ量は1.70 at.%に達しており、BN-Ana及びBN-Bro(1.31-1.43 at.%)より高く、独立したN

Table 3 Color parameters in terms of CIELAB system and color images for BNA, BNR and BNB samples synthesized at various temperatures

Groups	Samples*	L*	a*	b*	h°	C	Color images
Ana.	BNA500	44.77	5.00	9.49	62	11	
	BNA550	39.73	8.95	7.04	38	11	
	BNA600	39.61	9.01	6.17	34	11	
	BNA650	37.39	6.55	4.34	34	8	
	BNA700	34.28	0.92	0.47	27	1	
Rut.	BNR500	57.98	-2.89	2.41	320	4	
	BNR550	52.93	-3.66	2.81	322	5	
	BNR600	60.52	-3.83	4.54	310	6	
	BNR650	40.06	-2.41	0.30	353	2	
	BNR700	35.69	-1.56	-2.18	54	3	
Bro.	BNB500	62.89	-2.53	5.93	293	6	
	BNB550	61.50	-3.08	6.78	294	7	
	BNB600	60.41	-2.92	6.61	294	7	
	BNB650	48.96	-2.55	4.39	300	5	
	BNB700	43.85	-1.88	0.27	352	2	

*Number in the sample name denoted the nitridation temperatures.

準位の形成傾向が強い。尚、 B_{sub} は、伝導帯(CB)に近い浅いトラップ状態であり、赤外線吸収を引き起こし、1,000 nm近辺、ルチルに多めに存在する Ti^{3+} (Fig. 6(b))と B_{sub} の連携により、可視光領域で顕著な吸収をもたらす^{7,8)}。しかしながら、BN-Anaは、 Ti^{3+} の量が少なく、長波長領域光に対する吸収が少なく、800 nmを超える波長範囲ではスペクトルは平坦であり、多量の B (B_{sub} と B_{int} 合計4.4 at.%)が存在するため、バレンスバンド(VB)に連続したハイブリッド準位の存在による吸収波長の明確なシフトをもたらしたと考えられる⁶⁾。

Table 3には様々な窒化温度で合成されたBNA、BNR、BNBサンプルの色空間CIELAB指数と粉体カラーイメージを示す。BNAシリーズサンプルは黄-オレンジ-赤色

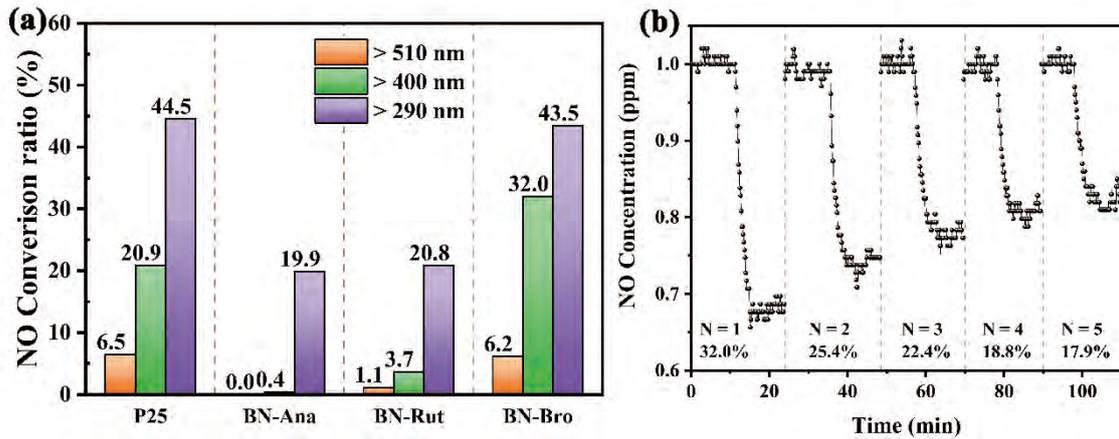


Fig. 8 (a) NO photodegradation capacity of various photocatalysts. Degussa P25 was regarded as reference to evaluate the photocatalytic activity of each BN-TiO₂. The columns with orange, green and purple color represent the different degradation ability under $\lambda > 510\text{nm}$, $\lambda > 400\text{nm}$ and $\lambda > 290\text{nm}$ light irradiation, respectively. (b) The results of five times cycling experiments under successive visible light irradiation ($\lambda > 400\text{nm}$). N is cycling times. The NO conversion ratios were acquired by solving the average for NO concentration nearby the lowest level.

調が中心となり、窒化温度の上昇により、明るさ(+L*)と黄色(+b*)色調が減少傾向となり、赤み色調(+a*)は500–600℃窒化処理時最大値(～9)を示した。BNRシリーズサンプルは灰色からシアン色調が中心となり、600℃窒化処理時では、明るさ(+L*)と黄色(+b*)が最大となるが、700℃窒化処理では、明るさ(+L*)が減少し、青み(-b*)が急激に増える結果となった。BNBシリーズサンプルは黄緑色調が中心であり、窒化温度の上昇により、明るさ(+L*)と黄色(+b*)が減少傾向だが、赤み(+a*)が増加した。通常の白色酸化チタンは、優れた光触媒活性を有することが知られている。しかしながら、顔料や化粧品として利用される際に、光照射を受け、価電子帯と伝導体にホールと電子が生成され、そのホールの酸化力と電子の還元力に由来する光触媒活性は有機物や皮膚のDNA等に対し化学反応を起こし、ダメージを与えてしまうことが懸念される。

Fig. 8に合成された各種着色酸化チタンの光触媒活性を示す。比較のため標準サンプルとしてDegussa-P25酸化チタンも用いて評価した。照射光は各種フィルターを掛けることにより $\lambda > 510\text{nm}$ 、 $\lambda > 400\text{nm}$ 、 $\lambda > 290\text{nm}$ に制御し、それぞれ青色光を含まない可視光、可視光及び紫外線(+可視光)を見なすことができる。NO変換率は、初期濃度及び分解後NO濃度の平均最低値によって算出された。波長が短くなると、光のエネルギーが強くなり、見かけ上の光触媒活性が高くなる。BN-BroはDegussa-P25酸化チタンと同程度の紫外($> 290\text{nm}$)と青色を含まない可視光($\lambda > 510\text{nm}$)励起活性を有するが、 $\lambda > 400\text{nm}$ 可視光照射下では、32.0%のNOx(1ppm, 200mL/cm³)を連続的に分解でき、P-25を超える高い触媒活性を有することが分かった。また、BN-Broの光触媒耐久性についても検証し、 $\lambda > 400\text{nm}$ 連続可視光照射下で5回サイクル実験を行

った結果、テスト後に触媒活性は約17.9%に落ち、初期活性の約44%が低下した。一方、BN-AnaとBN-Rutの光触媒活性は、非常に低い光触媒活性を示し、BN-AnaとBN-Rutが無毒顔料及び化粧品用途における潜在的な候補材料であることを示唆した。

Fig. 9に様々な窒化温度で合成された各種着色酸化チタンの光触媒活性を示す。比較のためDegussa-P25酸化チタンを参照として用いた。合成したサンプルの触媒活性は窒化温度によって変化することが分かった。 $\lambda > 510\text{nm}$ における触媒活性に関して、BN-Anaシリーズサンプルは全く活性を示さないことに対し、BN-Rutシリーズは僅かな活性、BN-Broシリーズは比較的高い活性を示した。尚、600℃窒化温度で得られたサンプルの光触媒活性は最大値

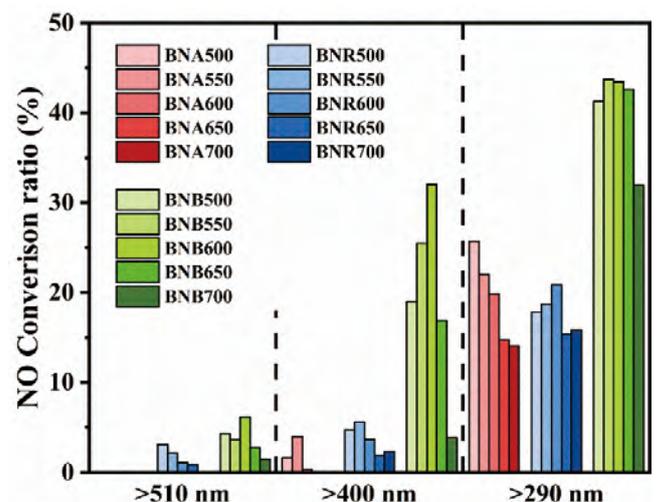


Fig. 9 Light-driven NO decomposition ability of each prepared sample. The columns are grouped by crystal phases. Red is for anatase, blue is for rutile and green is for brookite.

を示した。 $\lambda > 400\text{nm}$ における触媒活性に関して、同様に 600°C 窒化温度で得られたサンプルの光触媒活性は最大値を示した。 $\lambda > 290\text{nm}$ の紫外線励起触媒活性は、BN-Ana シリーズサンプルは触媒活性の変化傾向が変わり、窒化温度上昇に伴い、触媒活性が単調に低下した。BN-Rut 及びBN-Bro シリーズサンプルは、 600°C 窒化温度で得られたサンプルの光触媒活性は最大値を示した。Fig. 8 同様、BN-Ana と BN-Rut の各サンプルは、非常に低い光触媒活性を示し、顔料としての有効性をうかがえる。

4. 総括

酸化チタンは光触媒や白色顔料としての応用が知られている。これまで、光触媒の機能性を向上及び無機顔料の色付与は、様々な遷移金属元素の添加が利用されている。しかし、金属イオンドープにより酸素欠陥等を生じ、光触媒活性向上の妨げになるケースが多く存在すると共に、遷移金属イオンの毒性により、化粧品原料として利用するには安全性リスクが懸念される。本研究では、酸化チタン以外の遷移金属を利用することがなく、アニオンドープによる材料の修飾及び機能性の大幅向上を実現し、様々な色を有するカラフルな酸化チタンを合成できる手法を確立した。また、異なる相組成による色制御メカニズムを解明し、光触媒活性の有無を制御・作り分けが可能であり、触媒活性を抑制することにより、化粧品を含む様々な無機顔料としての応用が大きく期待される。さらなる色バリエーションの拡張及び化粧品としての詳細な適応性評価は今後の課題であるが、複合アニオンによるバンドギャップ制御技術の確立により、多くの他の無機酸化物への適用が期待され、コスメトロジーだけでなく、顔料、塗料等を含め、光触媒等様々な新規機能性創出及びその原理の究明により、学術的だけでなく、産業界にも大きなインパクトが期待され、社会インフラのグリーン化において重要な役割を果たしグリーンイノベーションの推進・豊かな生活環境の構築に貢献すると期待される。

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によりご助成いただきましたことに心より感謝申し上げます。

本研究助成により得られた成果

- 1) Jingdi Cao, Yusuke Asakura, Takuya Hasegawa, and Shu Yin, Synthesis and Photochemical Performance Evaluation of Colorful Three Phases TiO_2 , 公益社団法人日本セラミックス協会 2020 年年会、東京、2020.3.18-20, (2Q02).
- 2) Jingdi Cao, Takuya Hasegawa, Yusuke Asakura and

Shu Yin, Synthesis of colorful nonmetal doped TiO_2 and the achievement of corresponding color gradation by crystal-phase engineering, 2020 年度 東北大学環境科学討論会, 仙台, 2020.10.30.

- 3) 殷シユウ、曹ジンヂ、朝倉祐介、長谷川拓哉、PCT/JP2021/028401 (特願 2020-130912), 二酸化チタン着色粒子及びその製造方法、並びに酸化チタン粒子混合物、2021 年 7 月 30 日.
- 4) Jingdi Cao, Takuya Hasegawa, Yusuke Asakura, Shu Yin, Synthesis of B and N Co-doped Anatase, Rutile and Brookite TiO_2 with Diverse Characteristic Optical Properties, 日本セラミックス協会 基礎科学部会、第 59 回 セラミックス基礎科学討論会 (オンライン) 2021.1.7-1.8, CBS2021-H11
- 5) Jingdi CAO, Takuya HASEGAWA, Yusuke ASAKURA, Peng SUN, Shuo YANG, Bin LI, Wenbin CAO, and Shu YIN, Synthesis and Color Tuning of Titanium Oxide Inorganic Pigment by Phase Control and Mixed-Anion Co-doping, *Adv. Powder Technol.*, 33, 103576, 2022.
- 6) Jingdi CAO, Takuya HASEGAWA, Yusuke ASAKURA, Akira YAMAKATA, and Shu YIN, Synthesis of Crystal-Phase and Color Tunable Mixed Anion Co-Doped Titanium Oxides and their Controllable Photocatalytic Activity, Submitted and under review.

(引用文献)

- 1) A. Y. Nazarova and N.I. Radishevskaya, Inorganic pigments based on transition-metal oxometallates for protective and decorative aluminophosphate-bonded coatings, *J. Physics: Conf.Ser.*, **1459**, 012018, 2020.
- 2) R. Asahi, T. Morikawa, T. Ohwaki, K. Aoki and Y. Taga, Visible-light photocatalysis in nitrogen-doped titanium oxides, *Science*, **293**, 269-271, 2001.
- 3) S.Yin, Y. Aita, M. Komatsu, and T. Sato, Visible-Light Induced Photocatalytic Activity of $\text{TiO}_{2-x}\text{N}_y$ Prepared by Solvothermal Process in Urea - Alcohol System. *J.Euro.Ceram.Soc.*, **26**, 2735-2742, 2006.
- 4) J.Cao, T. Hasegawa, Y. Asakura, P. Sun, S. Yang, B. Li, W. Cao, and S. Yin, Synthesis and Color Tuning of Titanium Oxide Inorganic Pigment by Phase Control and Mixed-Anion Co-doping, *Adv. Powder Technol.*, 33, 103576, 2022.
- 5) J. Tauc, Optical properties and electronic structure of amorphous Ge and Si, *Mater. Res. Bull.*, **3**, 37-46, 1968.
- 6) G. Liu, L.-C. Yin, J. Wang, P. Niu, C. Zhen, Y. Xie,

- and H.-M. Cheng, A red anatase TiO₂ photocatalyst for solar energy conversion, *Energy Environ. Sci.*, **5**, 9603–9610, 2012.
- 7) P.Wang, C. Jia, J. Li, and P. Yang, Ti³⁺-doped TiO₂(B)/anatase spheres prepared using thioglycolic acid towards super photocatalysis performance *J. Alloys Compd.*, **780**, 660–670, 2019.
- 8) C. Di Valentin, G. Pacchioni, and A. Selloni, Reduced and n-Type Doped TiO₂: Nature of Ti³⁺ Species, *J. Phys. Chem. C*, **113**, 20543–20552, 2009.
- 9) S.Yin, Y. Aita, M. Komatsu, J.Wang, Q. Tang, and T. Sato, Synthesis of Excellent Visible-light Induced TiO_{2-x}N_y Photocatalyst by Homogeneous Precipitation–Solvothermal Process. *J.Mater.Chem.*, **15**, 674–682.2005,
- 10) E. Finazzi, E., C. Di Valentin, and G. Pacchioni, Boron-Doped Anatase TiO₂: Pure and Hybrid DFT Calculations, *J. Phys. Chem. C*, **113**, 220–228, 2008.

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

東京大学大学院新領域創成科学研究科物質系専攻

上 沼 駿太郎

We recently reported the formation of a pseudo-polyrotaxane nanosheet (PPRNS), which possesses a self-assembled nanosheet structure bearing a pseudo-polyrotaxane (PPR) consisting of β -cyclodextrins (β -CDs) and a carboxyl-terminated poly(ethylene oxide)₇₅-*b*-poly(propylene oxide)₂₉-*b*-poly(ethylene oxide)₇₅ triblock copolymer (EO₇₅PO₂₉EO₇₅-COOH). In this study, we investigate the ability of PPRNS to load fluorescent probes, the dissolution mechanism of PPRNS into solvent by heating, and the adhesion behavior of PPRNS to uneven material surfaces. The fluorescent probes without methyl groups were not absorbed by PPRNS. These results indicate that PPRNS has a molecular recognition property based on the host-guest interaction of the functional groups on probe molecules and molecular-sized spaces of PPRNS surfaces, which may be vacant β -CDs and voids between β -CD columns. The dissolution mechanism of PPRNS was investigated from the viewpoint of crystallinity, particle morphology, and PPRNS concentration through proton nuclear magnetic resonance spectroscopy, scanning electron microscopy, and X-ray scattering analysis. The results revealed that the PPRNS dissolved in two steps during heating. First, β -CDs of the PPRNS de-threaded from the axis and the PPRNS dissolved in the out-of-plane direction thinned while maintaining the rhombic structure. Upon further heating, both β -CD and the PPR dissolved, collapsing the rhombic structure of the PPRNS in the in-plane direction—this occurred upon the melting of the β -CD crystals of the PPRNS—thereby achieving an amorphous state. Finally, we could achieve observing the adhesion behavior of PPRNS to the Blu-ray disk substrate (1D bending), polystyrene spherical beads (2D bending), and random rough surface of pork skin. In the future, we will further elucidate the basic mechanism, investigate molecular loading and sustained-release capabilities, and discover the potential of this material as DDS material.

1. 緒言

膜厚が100 nm以下で大面積を有する粒子はナノシートと呼ばれる。材料は薄いほど柔軟であり、ナノシートは特に大きな柔軟性を有するため、標的物の凹凸に対してフレキシブルに追従できる。これにより密接に大面積で材料表面と近距離相互作用することで強力な接着特性を示す。近年、ナノシートに薬剤を担持させることで、高接着性の農薬・生体・化粧品材料への応用を目指した研究が注目されている。しかし従来のナノシート材料は無機物質から成り、生体安全性が懸念されている。

我々はごく最近、高生体安全性と分解性を同時に有する全く新しいナノシート材料である擬ポリロタキサンナノシート (PPRNS) の作成に成功した¹⁻³⁾。環状オリゴ糖である β -シクロデキストリン (CD) と生体適合性の高い poly(ethylene oxide)₇₅-*b*-poly(propylene oxide)₂₉-*b*-poly(ethylene oxide)₇₅ (EO₇₅PO₂₉EO₇₅; 下付き文字はユニット数) トリブロックコポリマーを室温の水中で混合するだけでPPRNSは自発的に形成される (Fig. 1a)。 β -CDはブロックコポリマー中央のPO部位のみを選択的に包接

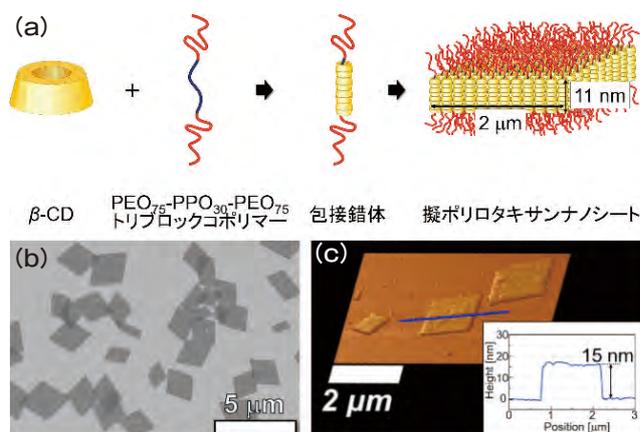


Fig. 1 PPRNS の形成モデルと構造

し、その後 β -CDの直径方向にのみ結晶が成長することでPPRNSが形成される。走査型電子顕微鏡観察 (SEM) や原子間力顕微鏡 (AFM) 測定により詳細な構造が明らかとなっている (Fig. 1b, c)¹⁾。本研究では、生体材料やドラッグデリバリーシステム (DDS) としての応用を見据えて、PPRNSの低分子担持能力、PPRNSの溶解挙動、およびPPRNSの材料表面への接着挙動について明らかにした。

2. 方法

2.1. PPRNSの作成

重水を溶媒に用いたPPRNSの作成手順を次の通りである。16 mg/mLの β -CDを重水中に加え、加熱することでほぼ完全に溶解させた。この β -CD重水溶液を室温に戻したあと、4 mg/mLの両末端カルボン酸化EO₇₅PO₂₉EO₇₅



Self-Assembled Nanosheet Composed of Cyclic Oligosaccharides: Drug loading and release properties and adhesion behavior

Shuntaro Uenuma

Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo

(EO₇₅PO₂₉EO₇₅-COOH)を溶解させ、数日間静置することでPPRNS重水分散液を作製した。またPPRNS濃度を濃縮した試料を次のように作成した。遠心分離によってPPRNSを沈殿させ、75vol%の上澄みを除去することでPPRNS濃度を4倍に濃縮した。低分子担持と溶解機構解明の実験ではこのPPRNSを用いた。また両末端アミノ化EO₇₅PO₂₉EO₇₅(EO₇₅PO₂₉EO₇₅-NH₂)を用いてPPRNS試料を同様に準備し、材料表面への付着実験ではこのPPRNSを用いた。

2.2. PPRNSへの低分子担持実験と定量

PPRNSへ担持させるモデル分子として、蛍光分子であるローダミン(R)6G、R123、R590、Uranine、RB、R640をPPRNSの分散液に加えて蛍光顕微鏡観察を行い、これらの色素のH₂O-PPRNSへの担持の可否を調べた。またR6GとR590は重水中のPPRNSに担持されたので、遠心分離により沈降として回収し、上澄みを紫外可視吸収スペクトル(UV-vis)測定することでR6GとR590がPPRNSへ担持された量を調べた。

2.3. 加熱によるPPRNSの溶解の機構

PPRNSの重水分散液は加熱することで溶解する。各温度においてPPRNSの重水分散液に対してプロトン核磁気共鳴(¹H NMR)測定を行うことで、加熱によるPPRNSからのβ-CDとEO₇₅PO₂₉EO₇₅-COOHの溶解量の定量を行った。マレイン酸を標準物質として使用し、PPRNS分散液とマレイン酸重水溶液が混合しないように特殊NMR管(二重NMR管)を用いて測定を行った。内管に少量のマレイン酸標準物質の重水溶液を、外管に600μLのPPRNS重水分散液を封入することで両者が混合しないので、分子が互いに干渉することなく¹H NMRを測定することができる。EO₇₅PO₂₉EO₇₅-COOHおよびβ-CDの濃度の算出にあたっては、EO₇₅PO₂₉EO₇₅-COOHのPO部位のメチル基に由来する1ppm付近のピークと、β-CDの2つのO原子が結合しているC1Hに由来する5-6ppmのピークの積分値を用いた。

2.4. PPRNSの材料表面への付着

PPRNSをブルーレイディスク(BD)や半径約1.43μmのポリスチレン球、豚皮などの凹凸・曲面を有する材料表面上にPPRNSを付着させ、SEM観察またはAFM測定を行うことでPPRNSの付着挙動を調べた。PPRNSを各材料表面に付着させる方法は次の通りである。BD: BD表面のフィルムを粘着性テープで剥がし、ディスク記録層を露出させPPRNSの付着対象とした。BDをPPRNS水分散液に2秒間浸した後、表面を水で2秒間ほど洗浄し、乾燥させた。ポリスチレン球: ポリスチレン球の水分散液(30μL)

をSi基板上にドロップキャストし、次にPPRNS水分散液30μLを滴下してポリスチレン球上にPPRNSを載せた。豚皮: PPRNS水分散液30μLを豚皮上に滴下し乾燥させた。

3. 結果

3.1. PPRNSへの低分子担持⁴⁾

種々の蛍光分子をPPRNS重水分散液に添加した後の蛍光顕微鏡観察像をFig. 2に示す。輝度が高い粒子は蛍光分子を担持したPPRNSであり、輝度の低い粒子は蛍光分子を排斥していることを示す。これらの結果から、化学構造のわずかな違いによってPPRNSへの担持の可否が異なることがわかった。

PPRNSに担持されたRGとR590に対し、担持量の定量解析を行った。その結果、RGとR590の担持量はPPRNSを構成するCDのmol量に対してそれぞれ2.7mol%および4.3mol%であった。

PPRNSへの蛍光分子の担持において、Fig. 2中の化学構造に赤線で示した官能基が重要な役割を果たしていると考えられる。これらの官能基は立体的に小さく疎水的である。PPRNSの表面にはCDの結晶構造に由来する分子サイズの空孔が存在するため、それらの空孔と官能基が相互作用したと考えられる(Fig. 3)。蛍光分子はサイズの観点からPPRNSの内部に侵入することは難しいため、低分子はPPRNSの表面のみに付着したと考えられる。それにも関わらず有意な量の分子担持を実現できたことは、表面積が極めて大きいナノシート形状の恩恵と言える⁴⁾。

3.2. PPRNSの溶解機構⁵⁾

PPRNSはDDS材料などへの利用が展望されている。薬物の徐放性を制御するために、PPRNSの溶解機構の理解は重要である。本研究では、PPRNSが加熱により溶解する際の機構を¹H NMRによる組成解析や種々の構造解析手法を用いて調べた。

重水(D₂O)を用いて作成したPPRNS分散液において、PPRNSは加熱により溶解する。PPRNSから溶解したβ-CDとEO₇₅PO₂₉EO₇₅-COOHの量を定量するために¹H NMR測定を用いた。¹H NMR測定によって溶解した成分は検出されるが、固体であるPPRNSは検出されない⁴⁾。PPRNSが溶解した場合、¹H NMRスペクトルのβ-CDとEO₇₅PO₂₉EO₇₅-COOHのPO部位に由来するピークの積分値の増加は、PPRNSからの溶解量を示す。

Fig. 4a, bはそれぞれβ-CDとEO₇₅PO₂₉EO₇₅-COOHを混合した直後の溶液と混合後1週間経過した重水溶液の¹H NMRスペクトルである。β-CDとEO₇₅PO₂₉EO₇₅-COOHに由来するピークの積分値が時間とともに減少したことから、PPRNSが形成したことがわかる。次に23°Cで1週間形成させたPPRNSを90°Cに加熱し¹H NMR測定を

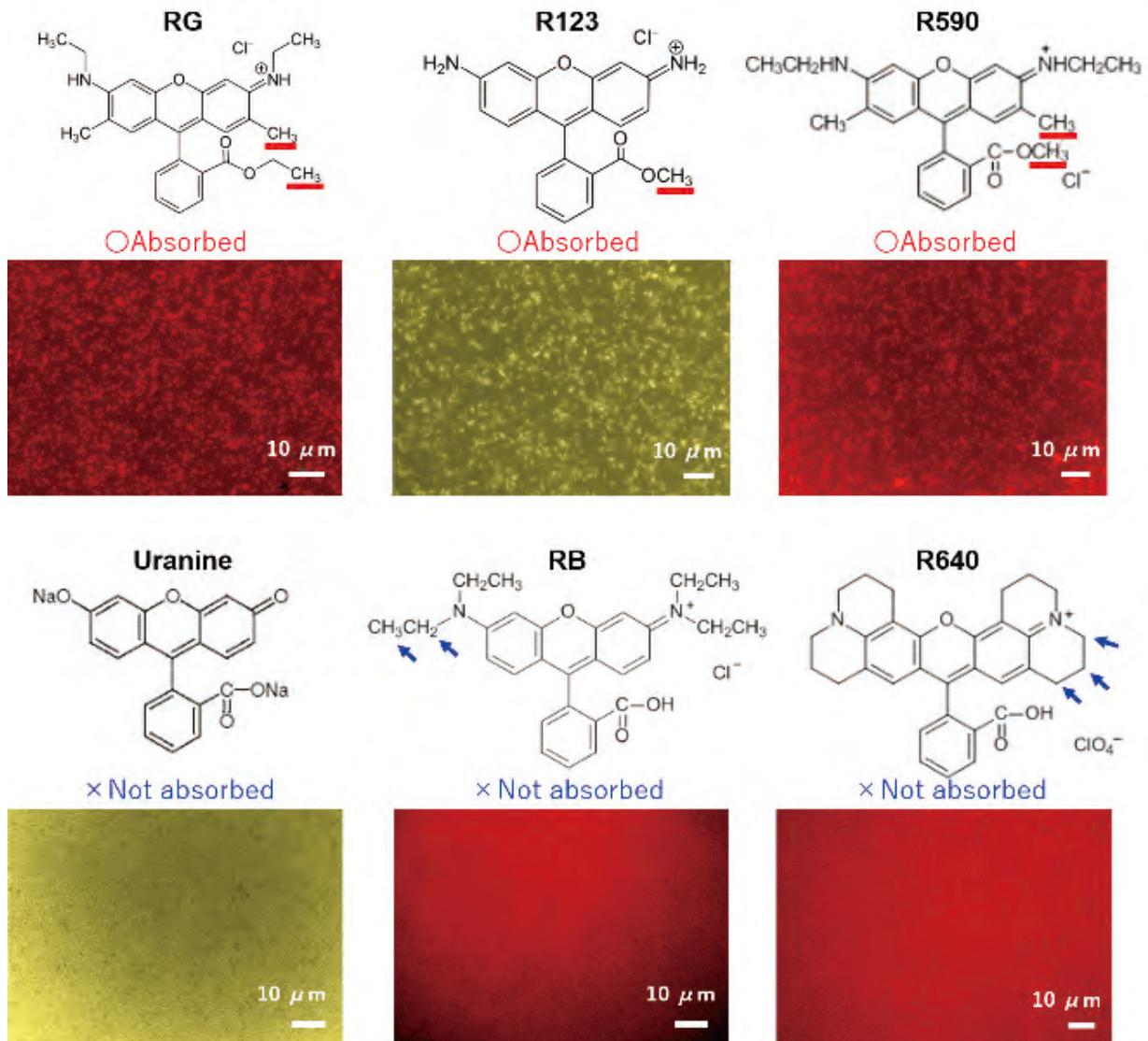


Fig. 2 化学構造が異なる蛍光分子を PPRNS 分散水に添加した後の蛍光顕微鏡観察像

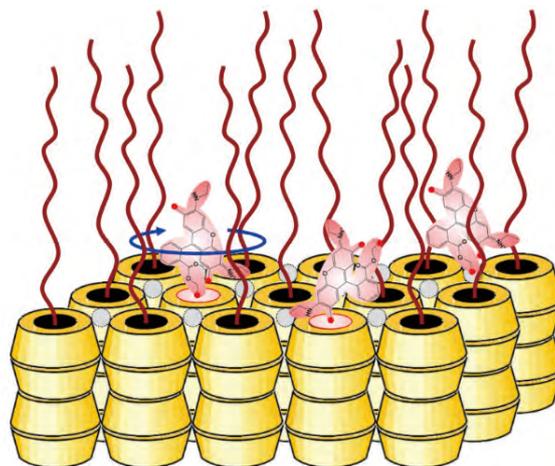


Fig. 3 Schematic illustration of the interaction between the methyl groups a and c of R6G and the PPRNS surfaces. Only the movement of groups a and c are constrained.

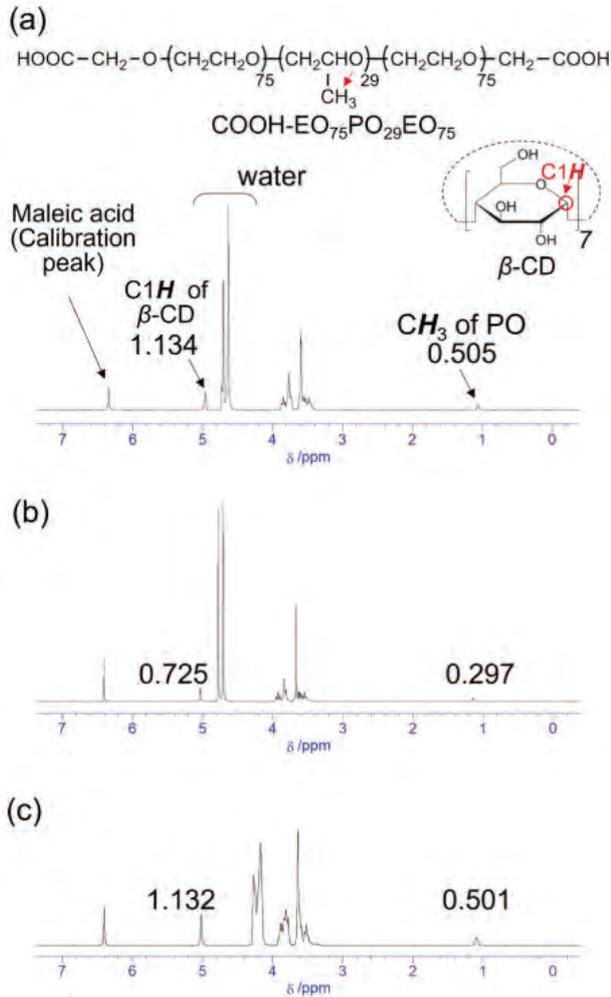


Fig. 4 ^1H NMR spectra of PPRNS (a) immediately after mixing $\beta\text{-CD}$ and $\text{EO}_{75}\text{PO}_{29}\text{EO}_{75}\text{-COOH}$ in D_2O , (b) 1 week after its formation, and (c) heated to 90°C

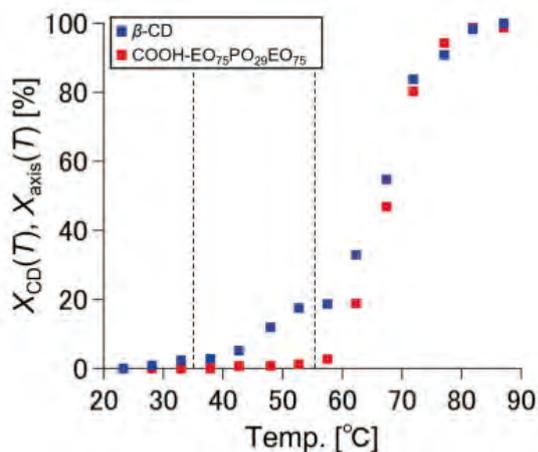


Fig. 5 Plots of $X_{\text{CD}}(T)$ and $X_{\text{axis}}(T)$ of PPRNS D_2O dispersion as a function of temperature.

行った (Fig. 4c)。 $\beta\text{-CD}$ の C1H プロトンと $\text{EO}_{75}\text{PO}_{29}\text{EO}_{75}\text{-COOH}$ の CH_3 プロトンのピークの積分値は加熱により増加した。ここで、 23°C の形成開始時 ($t=0$) における溶液の $\beta\text{-CD}$ の C1H と $\text{EO}_{75}\text{PO}_{29}\text{EO}_{75}\text{-COOH}$ の CH_3 の積分値をそれぞれ I_{CD} 、 I_{axis} とし、形成開始から 1 週間後の溶液においてそれぞれ $I_{\text{CD}}(23^\circ\text{C})$ 、 $I_{\text{axis}}(23^\circ\text{C})$ とする。同様に温度 T におけるそれぞれの積分値を $I_{\text{CD}}(T)$ および $I_{\text{axis}}(T)$ とする。各温度における PPRNS 中の $\beta\text{-CD}$ と軸の溶解度 ($X_{\text{CD}}(T)$ 、 $X_{\text{axis}}(T)$) は以下のように示される。

$$X_{\text{CD}}(T) = \frac{I_{\text{CD}}(T) - I_{\text{CD}}(23^\circ\text{C})}{I_{\text{CD}} - I_{\text{CD}}(23^\circ\text{C})} \times 100 [\%] \quad \dots\dots (1)$$

$$X_{\text{axis}}(T) = \frac{I_{\text{axis}}(T) - I_{\text{axis}}(23^\circ\text{C})}{I_{\text{axis}} - I_{\text{axis}}(23^\circ\text{C})} \times 100 [\%] \quad \dots\dots (2)$$

ここで、 $I_{\text{CD}} - I_{\text{CD}}(23^\circ\text{C})$ 、 $I_{\text{axis}} - I_{\text{axis}}(23^\circ\text{C})$ は、 23°C において PPRNS を構成する $\beta\text{-CD}$ と $\text{EO}_{75}\text{PO}_{29}\text{EO}_{75}\text{-COOH}$ の量に対応する。また $I_{\text{CD}}(T) - I_{\text{CD}}(23^\circ\text{C})$ 、 $I_{\text{axis}}(T) - I_{\text{axis}}(23^\circ\text{C})$ は、各温度への加熱により PPRNS から溶解した $\beta\text{-CD}$ および $\text{EO}_{75}\text{PO}_{29}\text{EO}_{75}\text{-COOH}$ の量に対応する。Fig. 5 は $X_{\text{CD}}(T)$ と $X_{\text{axis}}(T)$ の温度に対するプロットである。このプロットから、PPRNS の $\beta\text{-CD}$ と $\text{EO}_{75}\text{PO}_{29}\text{EO}_{75}\text{-COOH}$ は加熱により溶解し、 80°C 以上で $X_{\text{CD}}(T)$ と $X_{\text{axis}}(T)$ はほぼ 100% に達することがわかる。さらに PPRNS を構成する $\beta\text{-CD}$ と $\text{EO}_{75}\text{PO}_{29}\text{EO}_{75}\text{-COOH}$ の量を求めることができ、 18.8mg mL^{-1} (16.5mmol L^{-1}) の $\beta\text{-CD}$ と 7.0mg mL^{-1} (0.83mmol L^{-1}) の $\text{EO}_{75}\text{PO}_{29}\text{EO}_{75}\text{-COOH}$ であることがわかった。

PPRNS の $X_{\text{CD}}(T)$ と $X_{\text{axis}}(T)$ の温度に対するプロット (Fig. 5) から、 $23\text{--}35^\circ\text{C}$ の範囲では $\beta\text{-CD}$ と $\text{EO}_{75}\text{PO}_{29}\text{EO}_{75}\text{-COOH}$ は溶解しないことがわかる。一方で中温域 ($35\text{--}55^\circ\text{C}$) では、 $X_{\text{CD}}(T)$ は 17%、 $X_{\text{axis}}(T)$ は 1.2% (53°C) となった。 $\beta\text{-CD}$ が $\text{EO}_{75}\text{PO}_{29}\text{EO}_{75}\text{-COOH}$ に比べて優先的に溶解しており、PPRNS 中の $\beta\text{-CD}$ が軸から脱包接したことを示唆する。さらに加熱して 55°C 以上になると溶解が急激に加速し、 82°C で $X_{\text{CD}}(T)$ と $X_{\text{axis}}(T)$ はほぼ 100% に達した。この結果から、PPRNS の溶解過程は 3 段階 ($23\text{--}35^\circ\text{C}$ 、 $35\text{--}55^\circ\text{C}$ 、 55°C 以上) に分けられることがわかった。

PPRNS の構造変化を解析するために、PPRNS の重水分散液を 30 、 50 、 60 、 70 、 95°C に加熱して 5 分間保持し、PPRNS を Si 基板上に載せ SEM 観察を行った (Fig. 6)。PPRNS は 30 、 50 、 60°C では単斜晶構造を反映した菱形が観察された。一方で 70°C では菱形構造が乱れ、 95°C では構造体がほとんど観察されなかった。PPRNS の構造変化を定量的に解析するために、各温度の PPRNS について $300\text{--}400$ 個の粒子をカウントして平均面積を求め温度に対してプロットした (Fig. 6)。平均面積は 50°C まではほとんど変化せず、 60°C で平均面積は減少した。これは面内方向の分解が進行したことを示しており、 70°C に加熱し

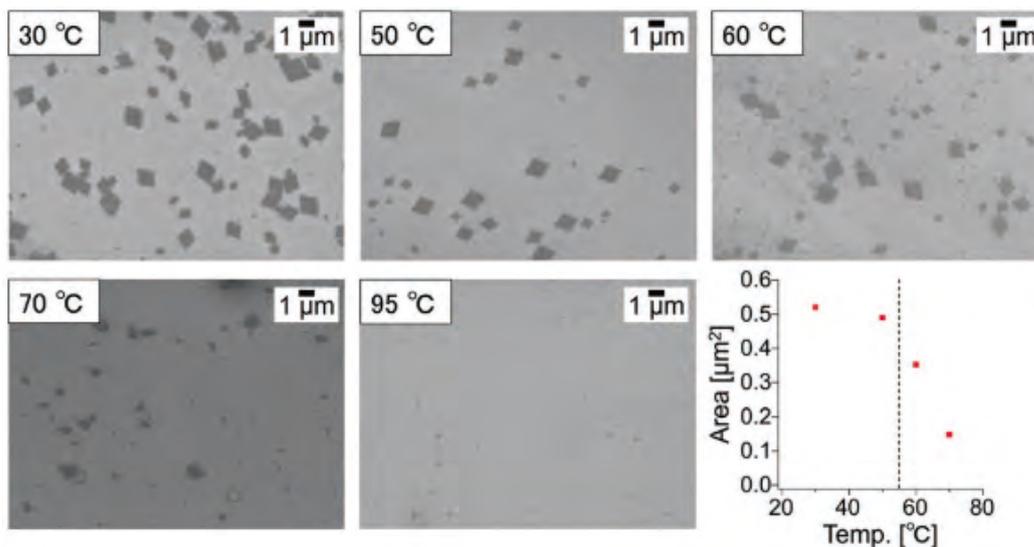


Fig. 6 SEM images of PPRNS prepared at 30, 50, 60, 70, and 95°C and the average area of PPRNS as a function of temperature.

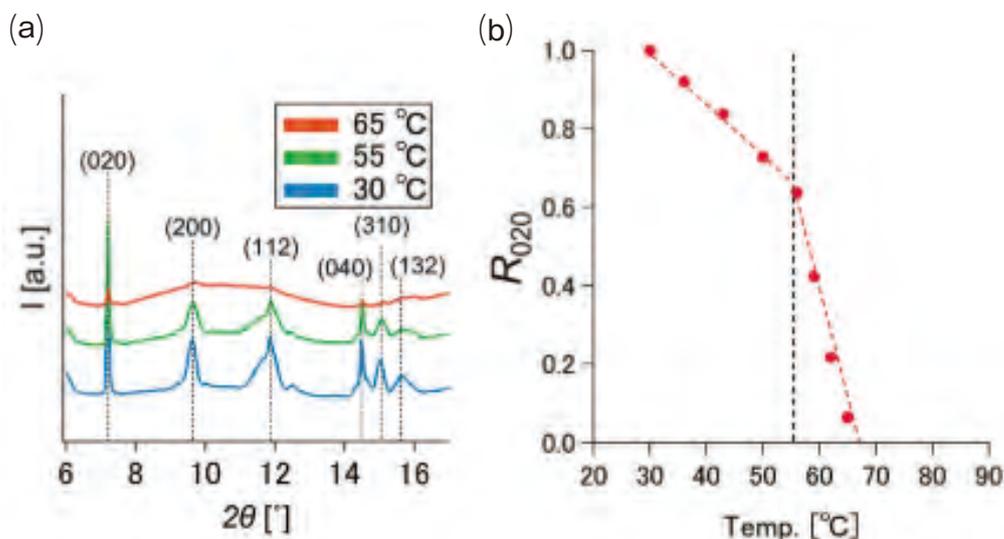


Fig. 7(a) WAXS patterns of PPRNS D₂O dispersion at different temperatures. (b) The relative peak area of the 020 plane (R_{020} , the initial value is 1) as a function of temperature.

たPPRNSの平均面積はさらに減少した。95°Cでは、ほとんどすべての粒子が溶液中に溶解した。これらの結果はPPRNSの溶解が温度の上昇に伴って促進したことを示しており、¹H NMRの結果と整合している。

加熱によるPPRNSの結晶化度の変化をWAXSにより測定した(Fig. 7a)。30°Cにおいて $2\theta=7.3^\circ$ 、 9.8° 、 12.0° 、 14.6° 、 15.3° 、 17.7° 、 19.7° に回折ピークが観察された。これらのピークはそれぞれβ-CDの単結晶構造の(020)、(200)、(112)、(040)、(310)、(240)、(241)面に対応する。そして加熱によりこれらのピーク面積は減少した。これらのピーク面積の減少はβ-CD結晶が非晶化または溶解したことを示す。PPRNSについて、020面の相対ピーク面積(R_{020} , 30°Cにおける020面のピーク面積を初期値1とする)

を温度に対してプロットした(Fig. 7b)。 R_{020} は55°Cまで徐々に減少し、55°C以上では急速に減少した。65°Cになると R_{020} はほとんど消失した。約55°Cを境に R_{020} の温度依存性が異なることから、PPRNSのβ-CD結晶の溶解には2種類の機構が存在することが示唆された。

小角X線散乱(SAXS)測定を用いて重水中のPPRNSの構造と加熱による構造変化を調べた(Fig. 8)。30°CのPPRNS重水分散液のSAXSプロファイルにおいて、ナノシートの形状因子が観測された。PPRNSにおいてβ-CD結晶層の電子密度が高いため、SAXSプロファイルにはβ-CD結晶層に由来する散乱が主に観測される。このことからβ-CD結晶層がナノシート形状をとっていることがわかった。さらにフィッティングにより、このナノシート

厚さは約 10.5 nm と評価された。

PPRNS 重水分散液を 55°C に加熱したところ、形状因子のフリンジ (落ち込み) の位置は high q 側へシフトした。フィッティングにより、PPRNS の β -CD 結晶層の厚さが 10.5 nm から 9.0 nm に減少したことがわかった。PPRNS 中の β -CD が軸から脱包接することで β -CD 結晶層が薄くなったと考えられる。この結果は、 ^1H NMR 測定で得られた、中温域 (35–55°C) では β -CD のみが PPRNS から溶

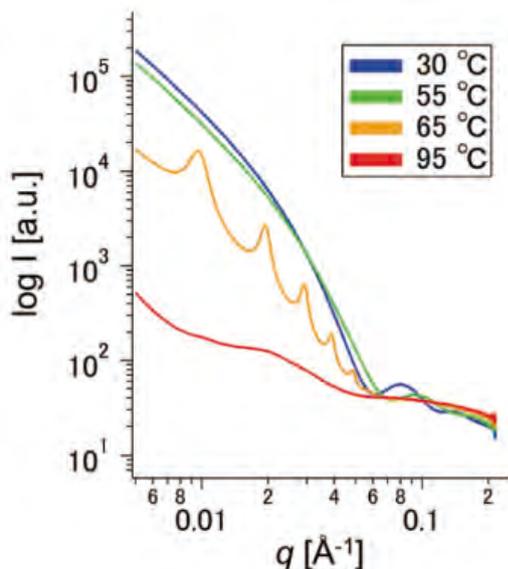


Fig. 8. SAXS patterns of PPRNS D_2O dispersion at different temperatures.

解するという結果と一貫する。PPRNS 重水分散液を 65°C に加熱すると、構造因子に由来するピークが観測された。二次ピークの q 値は一次ピークの q 値の 2 倍であることから、ラメラ構造が形成されたことがわかった。さらに一次ピークの位置 ($q = 0.0099 \text{ \AA}^{-1}$) から周期長が 63 nm であることがわかった。この値は $\text{EO}_{75}\text{PO}_{29}\text{EO}_{75}$ -COOH の伸びきり鎖長である 63 nm と等しいことから、 $\text{EO}_{75}\text{PO}_{29}\text{EO}_{75}$ -COOH が伸びきった状態で積層していることが示唆される。ここで、65°C では PPRNS の β -CD 層は非晶質であることが WAXS 測定からわかっている。 β -CD 層が非晶化することにより、 β -CD が PO 鎖だけでなく EO 鎖の一部も覆い、軸全体に分散した β -CD が軸を引き伸ばしたと考えられる。95°C の PPRNS 重水分散液の SAXS プロファイルでは、ナノシートの形状因子は消失し、low q 領域 ($q = 0.02 \text{ \AA}^{-1}$ 以下) の散乱強度が大きく減少した。同時に、 $q \approx 0.02 \text{ \AA}^{-1}$ にブロードなピークが観測され、数十ナノメートルオーダーのミセルが形成されたことが示唆された。実際、同じ濃度の $\text{EO}_{75}\text{PO}_{29}\text{EO}_{75}$ -COOH 溶液について 95°C で SAXS 測定を行ったところ同様の散乱パターンが観測された。 $\text{EO}_{75}\text{PO}_{29}\text{EO}_{75}$ は水中で、PO 鎖の疎水凝集によるミセルを形成することがよく知られている⁶⁾。

加熱による PPRNS の構造変化のまとめを Fig. 9 に示す。23°C から 30°C では、PPRNS の構造変化はほとんど見られない。中温域 (35–55°C) では、PPRNS 中の β -CD が $\text{EO}_{75}\text{PO}_{29}\text{EO}_{75}$ -COOH から脱包接して溶解し、PPRNS の

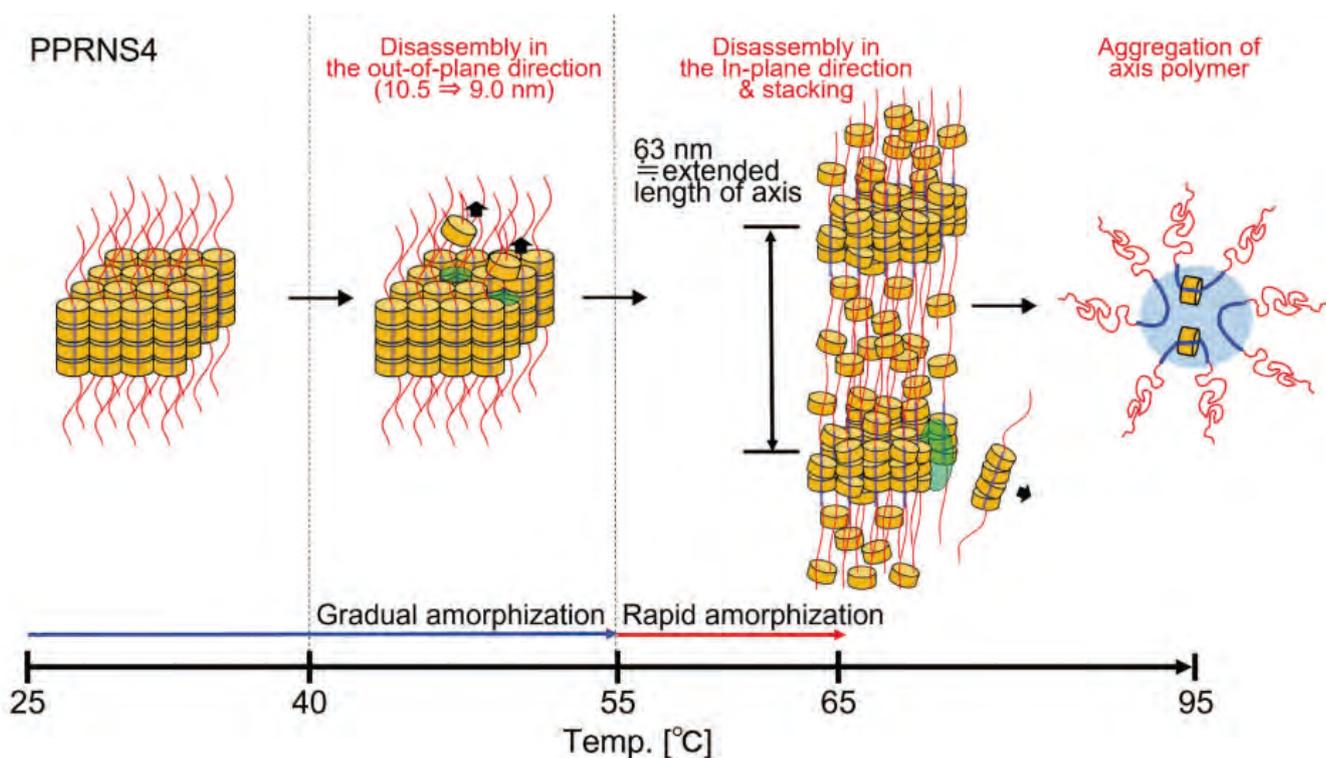


Fig. 9 Schematic illustrations of the structural changes PPRNS in D_2O upon heating.

結晶性と菱形構造は維持されているものの薄層化が進行する。55℃以上ではPPRNSの結晶性が低下し、菱形構造が大きく崩れ、EO₇₅PO₂₉EO₇₅-COOHとβ-CDが溶媒中に大きく溶解する。この二段階の分解は、PPRNSにおけるβ-CDのトポロジカルな拘束の異方性に基づく。PPRNSの面外方向の分解は、β-CDが軸から1つずつ外れることにより生じるため、より低い温度で起こる。一方で面内方向の分解は、β-CDが軸上で積層したカラムナー構造体(約10個のβ-CDから成る)間の水素結合を同時に切断する必要があり、β-CDが1つずつ脱包接するよりも高いエネルギーが必要であるため、より高い温度で生じる。さらに加熱して65℃になると、PPRNS中のβ-CD層は非晶化した。このときβ-CDは主にPO鎖上に、一部はEO鎖上に存在しており、EO₇₅PO₂₉EO₇₅-COOHは引き伸ばされたコンフォメーションをとり、面間隔63nmのラメラ構造を形成した。

3.3. PPRNSの材料表面への付着⁷⁾

ナノシート材料は一般に曲げ剛性が小さく柔軟に折れ曲がることのできるため、付着性が高いことが知られている。

PPRNSも同様に、凹凸のある材料表面に対して柔軟に折れ曲がり追従し、高い付着性を示すことが期待される。周期的な凹凸(高さのギャップ=25nm、ピッチ=200nm)を有するブルーレイディスク(BD)基板に付着したPPRNSに対してAFM測定を行った(Fig. 10a)。またAFM像中の線に沿った高さプロファイルを図10bに示す。PPRNSは表面の凹凸に追従して一次元的に曲がっていることが確認された。円の関数のフィッティングにより、曲げ半径は200nmであることがわかった。さらに半径1.43μmのポリスチレン球にPPRNSを付着させSEM観察を行ったところ(Fig. 10c)、PPRNSは二次元的に屈曲し球に対して密接に付着することが明らかになった。最後にPPRNSを豚皮に付着させSEM観察を行ったところ(Fig. 10d)、PPRNSはランダムな凹凸を有する表面にも追従することがわかった。PPRNSの曲げの駆動力は、乾燥過程での液架橋力とそれに続くファンデルワールス相互作用と考えられる。PPRNSは溶液中でシート形状を維持できるほどの硬さを有しているが、基板表面に付着したときには壊れずに折れ曲がることのできる適度な柔軟性を有している。

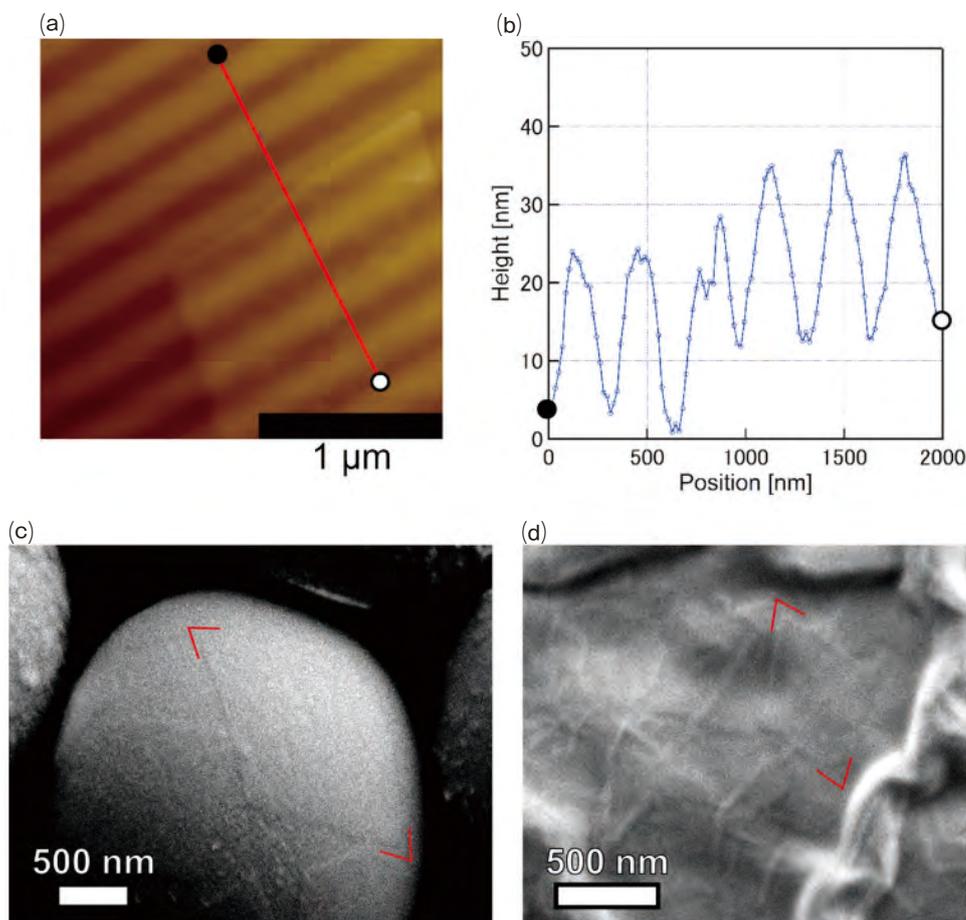


Fig. 10 (a) AFM image and (b) height profile of PPRNS on a BD substrate (1D bending); (c) SEM image of PPRNS on a polystyrene spherical bead (2D bending) with a radius of 1.43 μm; and (d) SEM image of PPRNS on a rough pork skin.

4. 考 察

本研究では当研究室にてごく最近見出された新材料である擬ポリロタキサンナノシート (PPRNS) を用いて、生体材料やドラッグデリバリーシステム (DDS) への応用を見据えて、PPRNSの低分子化合物担持能、加熱によって液中へ溶解する機構、凹凸のある材料表面への付着挙動を明らかにした。今後はさらに詳細な基礎的機構を明らかにするとともに、分子担持や徐放能を調べて、DDS材料としての可能性を見出していきたいと考えている。

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よりご助成いただきましたことに心より感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Uenuma, S.; Maeda, R.; Yokoyama, H.; Ito, K. Autonomously Isolated Pseudo-Polyrotaxane Nanosheets Fabricated via Hierarchically Ordered Supramolecular *Self-Assembly*. *Chem. Commun.* **2019**, 55 (29), 4158-4161.
- 2) Uenuma, S.; Maeda, R.; Yokoyama, H.; Ito, K. Formation of Isolated Pseudo-Polyrotaxane Nanosheet Consisting of α -Cyclodextrin and Poly (Ethylene Glycol). *Macromolecules* **2019**, 52(10), 3881-3887.
- 3) Uenuma, S.; Maeda, R.; Yokoyama, H.; Ito, K. Formation of Well-Defined Supramolecular Microstructures Consisting of γ -Cyclodextrin and Polyether—Rods, Cubes, Plates, and Nanosheets—Guided by Guest Polymer Structure. *Polymer*. **2019**, 179, 121689.
- 4) Uenuma, S.; Maeda, R.; Yokoyama, H.; Ito, K. Molecular Recognition of Fluorescent Probe Molecules with a Pseudopolyrotaxane Nanosheet. *ACS Macro Lett.* **2021**, 10 (2), 237-242.
- 5) Ando, N.; Uenuma, S.; Yokoyama, H.; Ito, K. Thermally Induced Disassembly Mechanism of Pseudo-Polyrotaxane Nanosheets Consisting of β -CD and a Poly (Ethylene Oxide) -b- Poly (Propylene Oxide) -b- Poly (Ethylene Oxide) Triblock Copolymer. *Polym. Chem.* **2022**, 13 (4), 501-507.
- 6) Alexandridis, P.; Holzwarth, J. F.; Hatton, T. A. Micellization of Poly (Ethylene Oxide) -Poly (Propylene Oxide) -Poly (Ethylene Oxide) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions: Thermodynamics of Copolymer Association. *Macromolecules* **1994**, 27(9), 2414-2425.
- 7) Uenuma, S.; Endo, K.; Yamada, N. L.; Yokoyama, H.; Ito, K. Polymer Brush Formation Assisted by the Hierarchical Self-Assembly of Topological Supramolecules. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, 13 (50), 60446-60453.

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

島根大学医学部医学科免疫学講座

小谷 仁司

Skin aging is one of the important problems in the cosmetics field that is difficult to control or improve. In recent years, it has become clear that the functional deterioration due to skin aging is due to the SASP factor secreted by aging cells. Therefore, we decided to search for a plant extract that specifically removes senescent cells in the skin by means of senolysis. In this study, we screened the senolytic effect of many plant extracts. Among them, we focused on the ginger extract and performed a detailed analysis, but unfortunately, we could not clarify the selective activity of senescent cells. However, it was suggested that the combination of some flavonoids and the anticancer drug dasatinib has a senolytic effect. In the future, we would like to further search for the remaining plant extracts and contribute to the development of cosmetics that are useful for improving skin aging.

1. 緒言

皮膚の老化は美容にとって最も目立つとともに、抑制・改善が難しい問題点の1つとなっている。加齢による皮膚細胞の老化だけでなく、日々の生活において、肌は日光によりUV照射され、皮膚の細胞は酸化ストレスを生じ、DNAの損傷をはじめ皮膚細胞の老化が非加齢的にも生じている。また、酸化ストレスによる皮膚の老化だけでなく、皮膚のシミが生成することなどを気にするため、日焼け止めを塗り、日傘をさし、日光を避けるというのが現状における防御策となっている。本研究では、近年注目されてきている老化細胞除去薬 (senolytic drug) という概念を、皮膚の老化改善に適用することにより、新たな皮膚老化改善に有用な天然植物成分を見出すことができるのではないかと考え研究に取り組むことにした。これまでの皮膚老化抑制などの方法論は、老化を起こす原因となる紫外線照射を防ぐ日焼け止めや、DNA損傷を起こす酸化ストレスの抑制を目的に、抗酸化物質などが注目されていた。しかし、皮膚の機能低下は老化細胞が産生する老化細胞分泌因子 (インターロイキン6: IL-6をはじめとする炎症性サイトカインなど) に大きく制御されていることから、老化細胞の増加を抑制するのではなく、老化細胞を特異的に取り除くという新たな方法論で皮膚機能を健康的に維持することを目指し、老化細胞除去活性を有する天然植物成分の探索を進めることとした。



Search and functional analysis of natural plant components that improve skin aging

Hitoshi Kotani

Department of Immunology Shimane University Faculty of Medicine

Senolytic drugによる皮膚老化改善

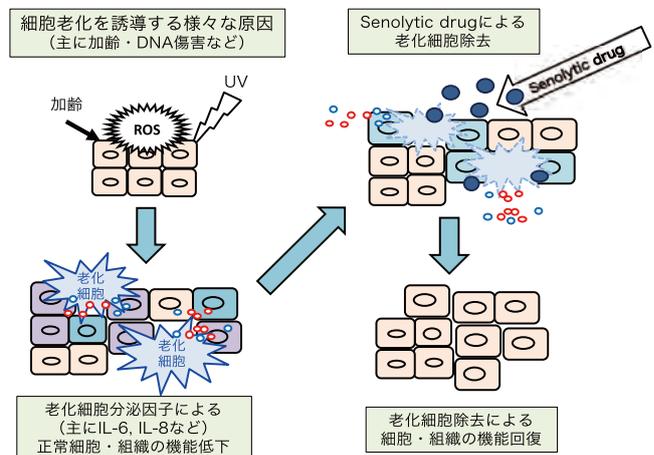


Fig. 1 細胞老化メカニズムと老化細胞除去薬 (senolytic drug) による皮膚老化改善作用

2. 方法

本研究では、株化培養細胞のケラチノサイトを用いて、細胞老化を誘導し、in vitroにおいて老化ケラチノサイトと非老化ケラチノサイトに対する細胞生存率や細胞死誘導活性を比較することにより老化細胞特異的に細胞死を誘導 (老化細胞除去) する天然植物成分を探索・機能解析することとした。また、これまでの研究で抗癌剤誘導性の細胞老化を起こすヒト癌細胞株に関しても同様の評価をおこなうことにより、老化細胞除去活性を持つ天然植物成分の絞り込みをおこなうこととした。

2.1. 使用細胞株

株化されたヒトケラチノサイトであるHaCaT細胞はドイツ連邦共和国ガン研究センターより入手した。比較対象として使用するヒト癌細胞株は肺癌細胞株であるA549細胞または乳癌細胞株であるMDA-MB-231細胞を使用し

た。HaCaT細胞およびMDA-MB-231細胞はDMEM培地(高グルコース)に10%FBSと抗生物質のゲンタマイシンを添加した培地を用いて37℃ 5%CO₂存在下での培養をおこなった。A549細胞はRPMI1670培地に10%FBSと抗生物質のゲンタマイシンを添加した培地を用いて37℃ 5%CO₂存在下での培養をおこなった。

2.2. 使用植物エキス

本研究で使用する植物エキスは、生薬約150種類のメタノール抽出エキスおよび、共同研究者により採取された沖縄・奄美産植物エキスの80%メタノール抽出エキスを利用し、100μg/mLとなるように調製して、細胞生存率を指標として非老化細胞と老化細胞の比較をおこなうことにより老化細胞除去活性をスクリーニングした。

2.3. ウェスタンブロット法

細胞を回収し、PBSで洗浄した後にRIPA bufferを添加し、氷上で30分かけてタンパク抽出をおこなった。タンパク定量をおこない、同タンパク量となるようにポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動をおこなった。その後、PVDF膜に転写し、5%スキムミルク溶液でブロッキングした後、1次抗体および2次抗体と反応させ、画像解析装置Amersham imageQuant 800 (Cytiva)によりタンパク発現を測定した。

2.4. Senescence associated beta galactosidase (SA-β-gal) 染色とFACS解析

SA-β-gal染色とその測定は、4%パラホルムアルデヒドで固定した細胞に基質であるSPiDER-βGal(同仁化学)を添加した後、フローサイトメーター(FACS)CytoFLEX(BECKMAN COULTER)を用いて測定した。

2.5. RNA抽出とrealtime RT-PCR

細胞を回収し、Nucleo ZOL(Takara)を用いてRNA抽出をおこない、さらにReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(TOYOBO)を用いて逆転写をおこない、作成したcDNAを用いて、realtime RT-PCRをおこなった。Realtime RT-PCRはTHUNDERBIRD SYBR qPCR Mix(TOYOBO)を用いてThermal Cycler Dice TP900(Takara)により測定し、 $\Delta\Delta C_t$ 法により各mRNA発現量の解析をおこなった。

2.6. 細胞の生存率の測定 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay

細胞の生存率の測定は、96 well plateを用いてサンプル添加し培養したのち、細胞の入ったwellにCCK-8試薬(同仁化学)を添加し、1~2時間後に各wellの吸光度をマイ

クロプレートリーダーにより測定した。

2.7. 細胞死の評価 Annexin V & PI染色とFACS解析

細胞死の測定は、APC蛍光ラベルされたAnnexin VとPropidium Iodide(PI)を回収した細胞に添加し、FACSを用いて測定をおこなった。

2.8. 細胞老化の誘導方法

他の研究者により既にHaCaT細胞での細胞老化誘導が報告されているBromodeoxyuridine(BrdU)の添加での方法¹⁾でおこなうこととした。具体的には、BrdU 45μMを含む培地で7日間培養をおこなうことで細胞老化を誘導した。比較対象とする癌細胞株の細胞老化誘導に関しては、我々の研究室で既に確立しているDNAポリメラーゼ阻害剤の1つであるaphidicolin 500nMを含む培地で5日間培養をおこなうことで細胞老化を誘導した。これらの細胞老化が誘導されたことの確認は、老化細胞の指標となるp21タンパクの発現やSA-β-gal染色、細胞の肥大化などにより確認をおこなった。

3. 結果

皮膚の老化改善作用を調べるために、in vitroでの細胞老化誘導をヒトケラチノサイトであるHaCaT細胞株に対してBrdUを添加し、7日間培養をおこない細胞老化を誘導した。その結果、老化細胞の指標の1つであるp21のタンパク発現がBrdUの濃度依存的に増化していることが確認された(Fig. 2)。さらに、老化細胞が産生するSA-βgalの発現を基質となるSPiDER-βGalを用いて確認をおこなったところ、BrdU 45μM添加後7日の細胞においてSA-β-gal活性の増化が確認されるとともに、老化細胞の特徴である細胞の肥大化が確認された(Fig. 2)。この細胞の肥大化に関しては、顕微鏡での形状観察とFACSによる細胞サイズをあらわすforward scatter(FSC)の増大で確認した。

次に老化細胞除去活性を持つ天然植物エキスのスクリーニングをおこなうにあたり、HaCaT細胞だけでなく他の老化細胞を同時にスクリーニングして、活性を持つ植物の絞り込みをおこないやすくするため、ヒト肺癌細胞株であるA549細胞を用いて、既に我々の研究室で確立されているaphidicolin誘導性細胞老化を利用することとした。このaphidicolinはセファロスポラム・アフィジコラという菌類から単離された抗生物質の1つであり、DNAポリメラーゼ阻害作用を持つ化合物である。A549細胞にaphidicolin 500nMを添加し、5日間培養することにより細胞老化誘導をおこなった。A549に関しても細胞老化の確認のため、SA-β-galの発現確認とp21タンパクの発現確認をお

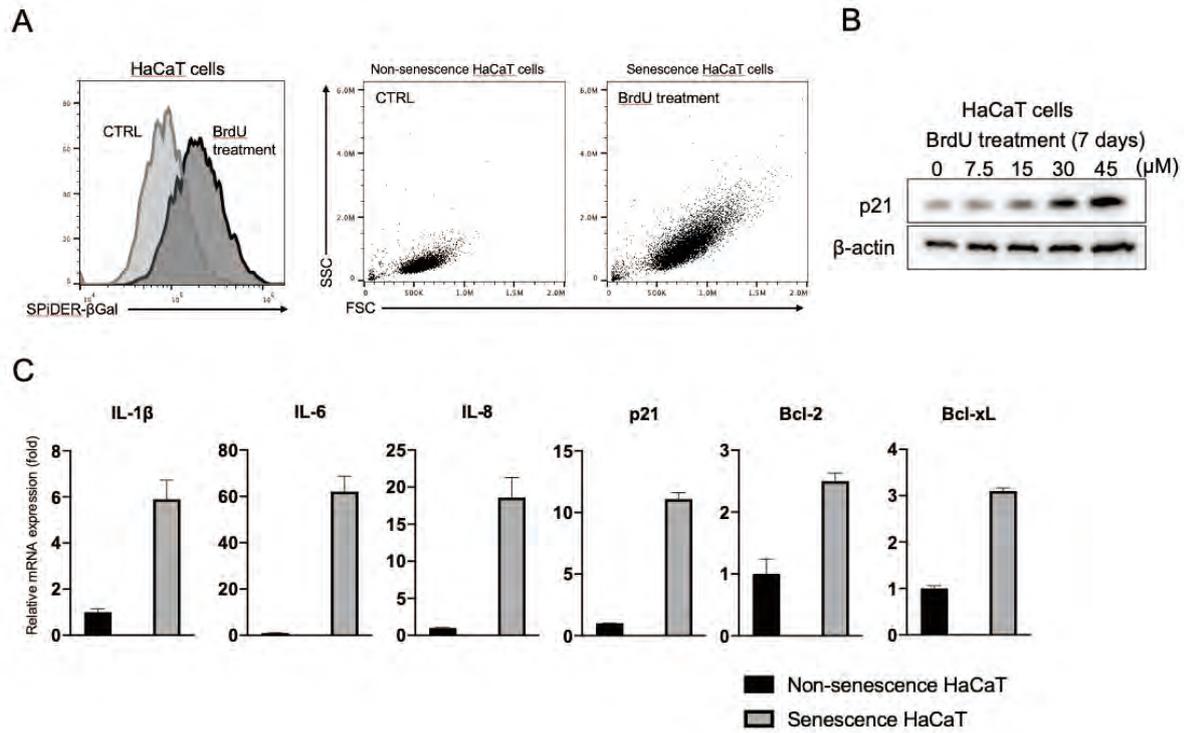


Fig. 2 BrdU 添加により細胞老化誘導した HaCaT 細胞の解析
 A. SA-β-gal 活性・細胞サイズの FACS 解析 B. p21 タンパク発現解析
 C. SASP および抗アポトーシスタンパクの mRNA 発現解析

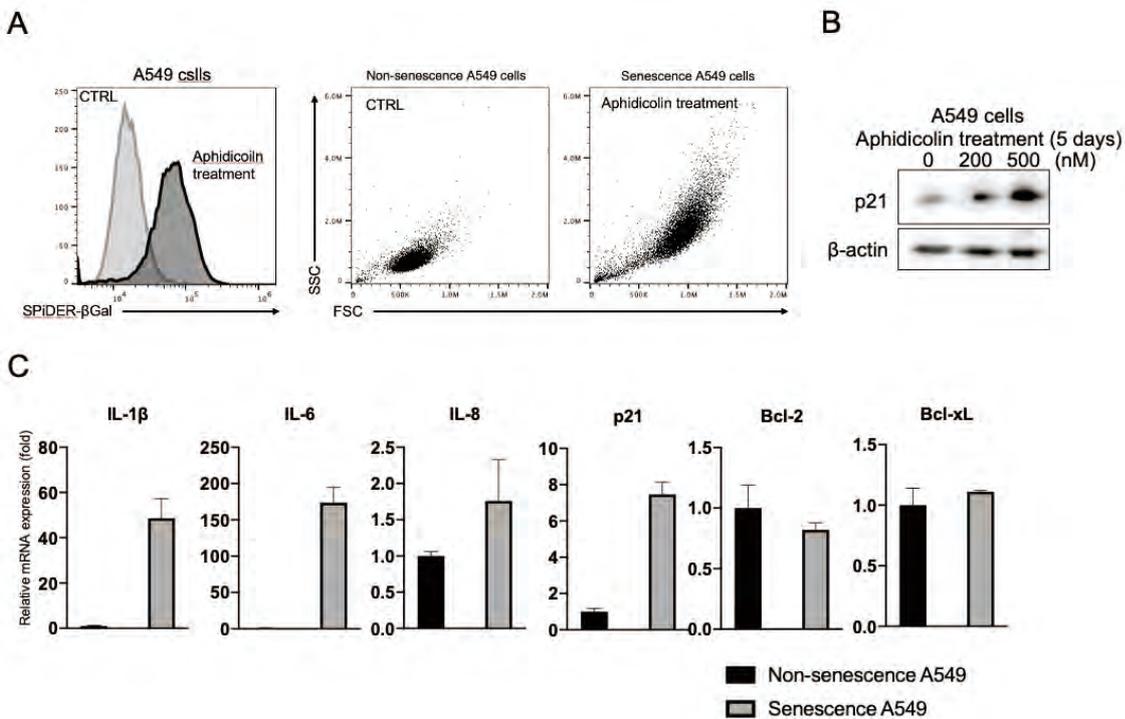


Fig. 3 Aphidicolin 添加により細胞老化誘導した A549 細胞の解析
 A. SA-β-gal 活性・細胞サイズの FACS 解析 B. p21 タンパク発現解析
 C. SASP および抗アポトーシスタンパクの mRNA 発現解析

こなった (Fig. 3)。さらに、細胞老化を誘導した HaCaT 細胞および A549 細胞に関して、組織の機能低下を起こす原因となることが示唆されている老化細胞分泌因子 (SASP

factor)²⁾ の mRNA 発現を調べるために RNA 抽出をおこない、realtime RT-PCR 法を用いて mRNA 発現量を非老化細胞と比較した (Fig. 2, 3)。その結果、HaCaT 細胞におい

て老化誘導された細胞でインターロイキン(IL)-1 β 、IL-6、IL-8などの炎症性サイトカインのmRNA発現が増化しているとともに、細胞周期に関わるp21や抗アポトーシスタンパクであるBcl-2およびBcl-xLなどのmRNA発現も増化していることが明らかになった。同様にA549に関しても老化細胞でIL-1 β 、IL-6、p21などのmRNA発現増化が確認されたが、Bcl-2やBcl-xLのmRNA発現はほとんど変化していなかった。

これらの細胞老化誘導したHaCaT細胞とA549細胞を用いて、非老化細胞と比較をおこないながら植物エキス100 μ g/mLを48時間添加した時の細胞の生存率をCCK-8 assayによりスクリーニングをおこなうことで、老化細胞特異的に細胞傷害を示すという老化細胞除去活性を持つ植物エキスを探索することとした。当初の研究計画では、HaCaT細胞に蛍光タンパクを定常発現させ、赤色蛍光タンパクと緑色蛍光タンパクを発現させた細胞で、非老化細胞と老化細胞を色分けし、同じwell内で植物エキス添加をおこない、蛍光タンパクの色の比率で老化細胞を特異的に細胞傷害する活性を持つものを探索する予定としていたが、HaCaT細胞を入手するのに時間がかかったため、CCK-8 assayという簡便な細胞生存率を測定する方法で、

比較検討をおこなう方法として進めた。ここでは、既に老化細胞除去薬として報告のあるBcl-2およびBcl-xL阻害剤であるABT-263³⁾という化合物をポジティブコントロールとして使用した。使用した植物エキスは生薬メタノール抽出エキス150種類と奄美産植物80%メタノール抽出エキス560種類であり、現在もスクリーニングを完了していない沖縄産植物80%メタノール抽出エキスについて継続的に探索をおこなっている。スクリーニングの結果、生薬抽出エキスではオウバク、カシュウ、カンキョウ、シンイ、ウワウルシなどで、HaCaT細胞の老化細胞での生存率が低い結果が得られた。(Fig. 4) さらに、A549細胞においても老化細胞での生存率が低い結果が得られた生薬エキスに、カンキョウが見出された。

このカンキョウという生薬は食品で知られる生姜をもととした生薬であり、同じ生姜をもととしたショウキョウと呼ばれる生薬と区別して使われている。ショウキョウのほうはあまり老化細胞と非老化細胞での生存率に変化はなく、同じ生姜由来でこのように結果が異なることに興味を持ち、少し調べることにした。カンキョウは生姜を蒸してから乾燥させるという漢方医学的な修治という処理がおこなわれている生薬であり、蒸さずに乾燥させたものをショウ

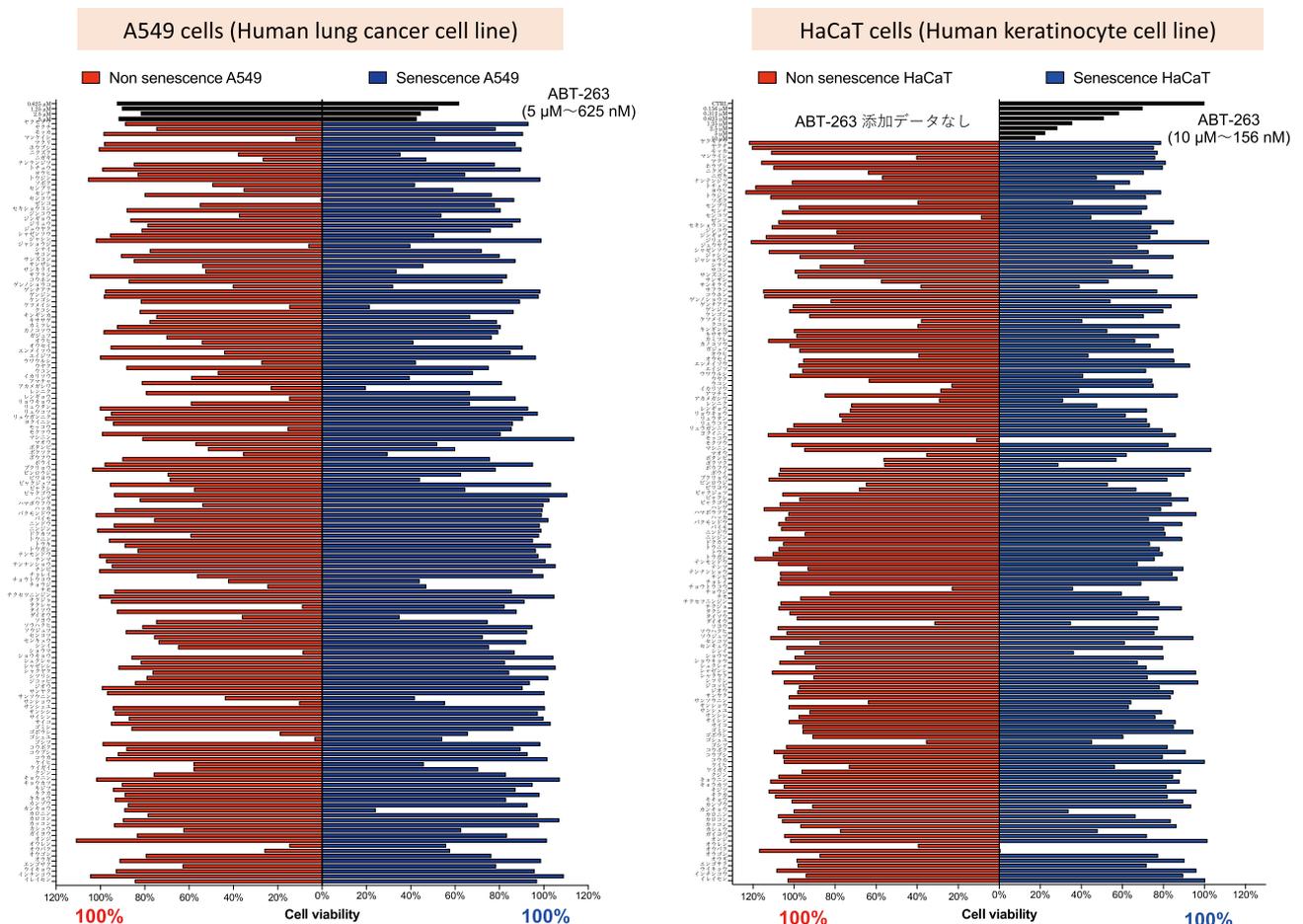


Fig. 4 老化誘導細胞と非老化誘導細胞を用いた生薬抽出エキスの老化細胞除去活性スクリーニング結果

キョウと呼んでいる。では、この蒸すという処理で何が起きているかについてだが、生姜に多く含まれる gingerol という化合物が、この処理により shogaol という化合物に化学変化し、shogaol の含有量が増加するということが知られている。そこで、カンキョウおよびショウキョウの比較と、市販で購入することができる 6-gingerol と 6-shogaol を用いて、HaCaT 細胞の非老化細胞と老化細胞に対する apoptosis 誘導に関して比較をおこなうこととした (Fig. 5)。その結果、アポトーシス誘導により活性化する PARP と annexin V の発現をウエスタンブロット法と FACS で解析したところ、スクリーニングの時の結果に反し、非老化細胞でのアポトーシス誘導がカンキョウエキスで強く見

られ、さらに、カンキョウに多く含まれる 6-shogaol での apoptosis が annexin V の発現割合を見ると、老化細胞のほうがほんの少し apoptosis の割合が多いが、非老化細胞でも濃度依存的に apoptosis が誘導され、グラフには記載されていないが、6-shogaol の 40 μM ではそのほとんどの細胞が apoptosis するほどであることが明らかとなった。

次に、奄美産植物エキスにおけるスクリーニング結果の一部を紹介する。奄美産植物エキスは 560 種類ほどあり、その中から老化細胞のほうで細胞生存率が低く見られたトベラ、ヒメガマ、アイダクグ、ナチシダ、キツネノマゴをグラフで示す (Fig. 6)。これらの植物エキスに関する詳細な解析をおこなう必要があるが、これらの奄美産植物エキ

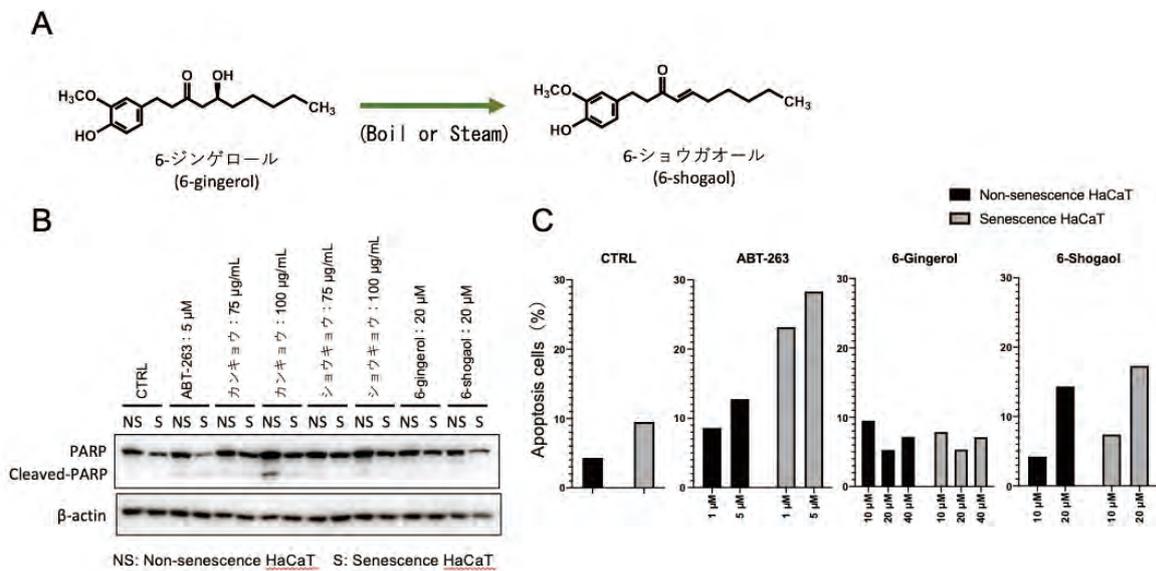


Fig. 5 生姜含有成分(6-gingerol および 6-shogaol)の HaCaT 細胞への apoptosis 誘導活性評価
 A. 生姜含有成分の化学構造と修治 (boil or steam) による化学変化
 B. 生姜エキス(カンキョウ・ショウキョウ)とその成分による PARP の活性化のウエスタンブロット解析
 C. 生姜含有成分による apoptosis 細胞(Annexin V 陽性細胞)の FACS 解析

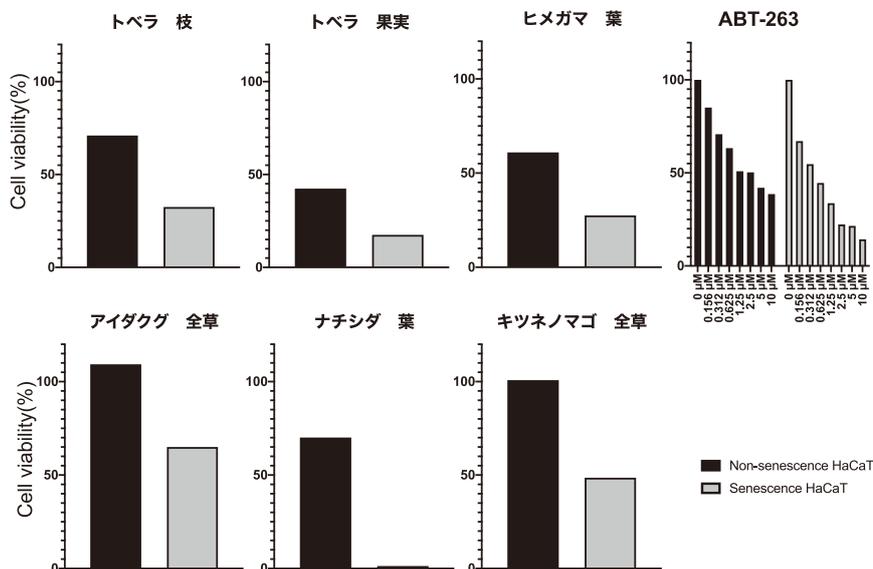


Fig. 6 HaCaT 細胞での奄美産植物抽出エキス(100μg/mL)の老化細胞除去活性スクリーニング結果の一部

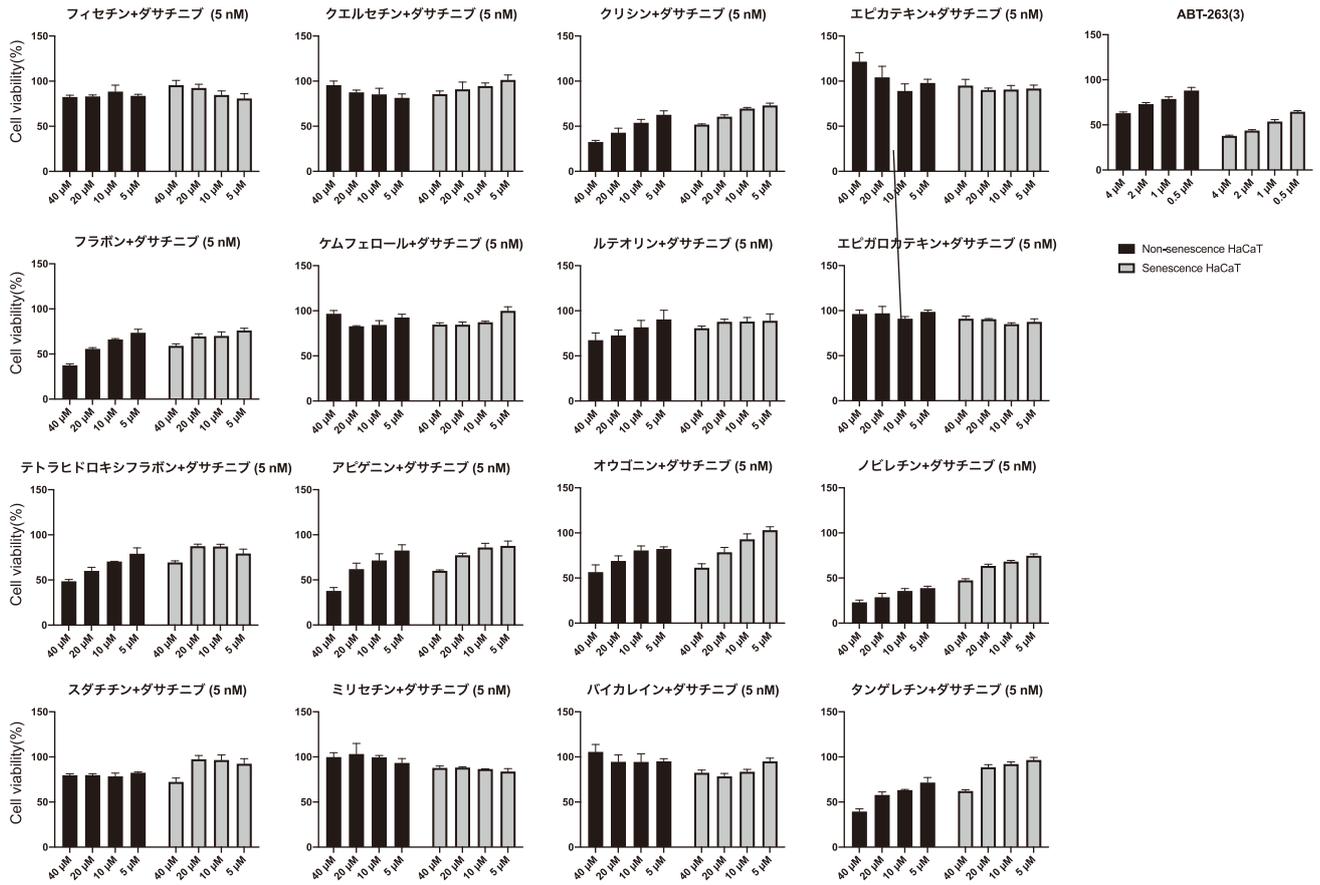


Fig. 7 HaCaT 細胞でのフラボノイド + ダサチニブによる老化細胞除去活性評価

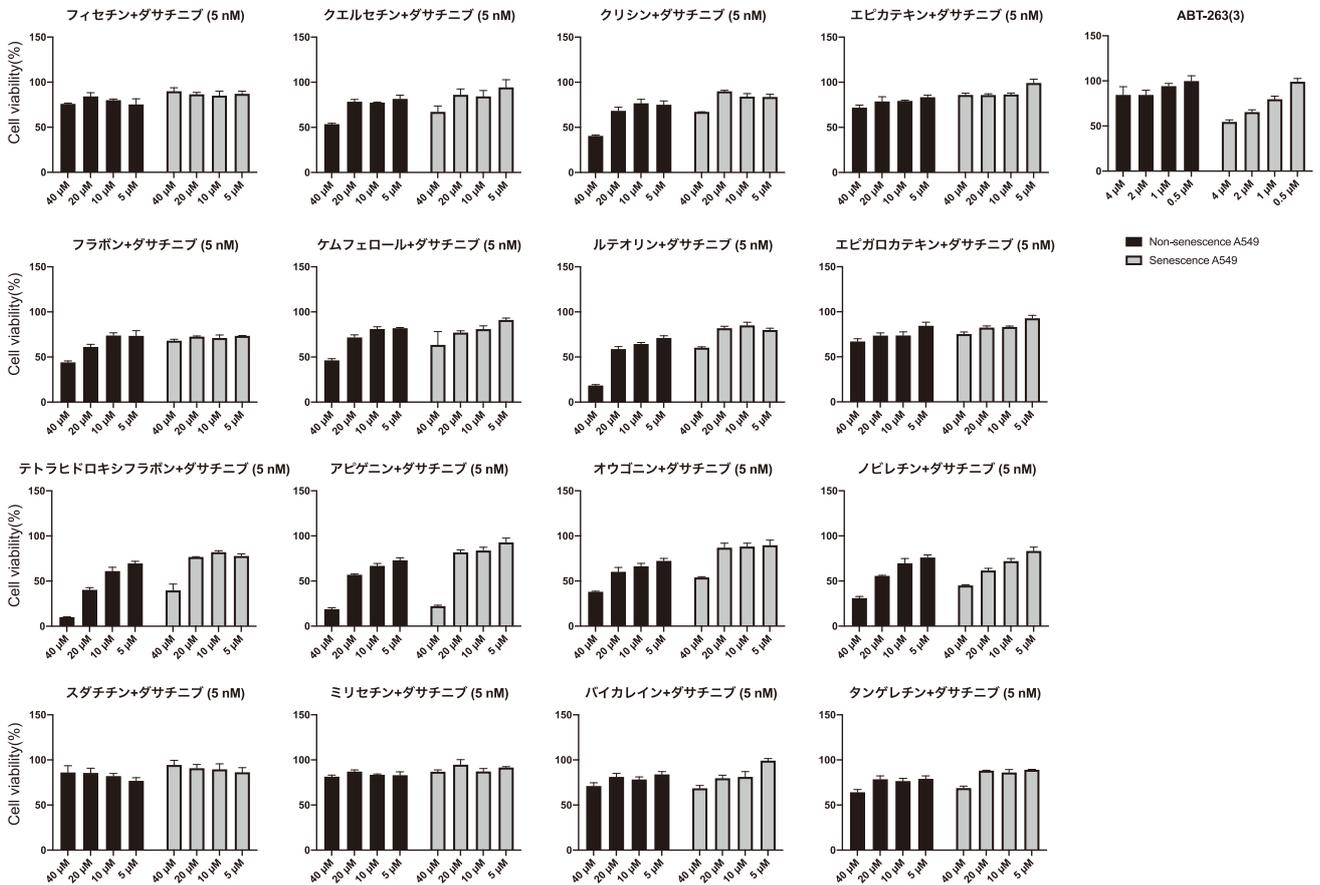


Fig. 8 A549 細胞でのフラボノイド + ダサチニブによる老化細胞除去活性評価

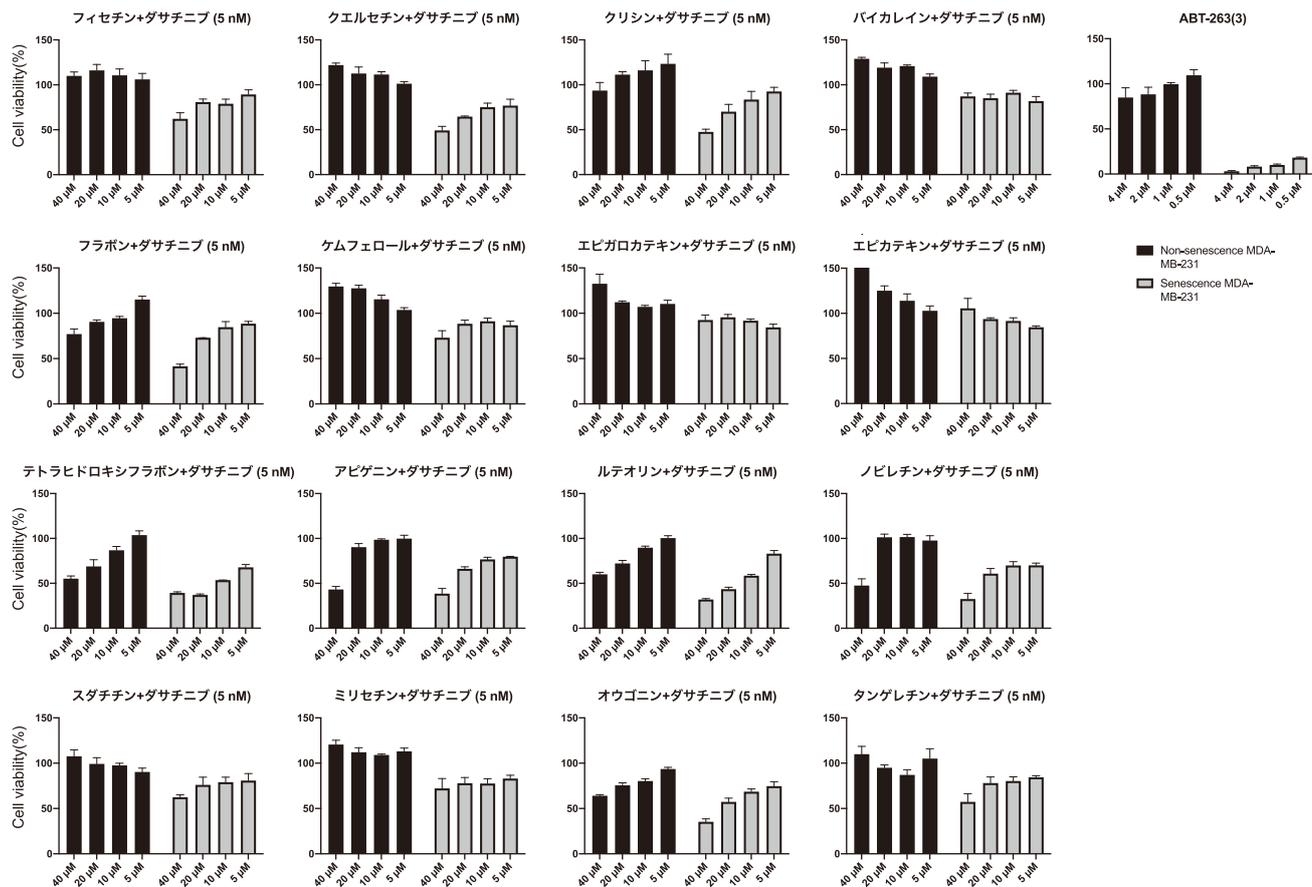


Fig. 9 ヒト乳癌細胞株(MDA-MB-231 細胞)でのフラボノイド + ダサチニブによる老化細胞除去活性評価

ス共同研究者により、採取された植物であり、さらにエキスを増やして様々な解析をおこなうためには、奄美での植物採取をおこなう必要が出てくることから、現在の新型コロナウイルス感染に関わる社会情勢から、植物採取のために移動することが難しいことから、詳細な解析は一旦保留とし、残っている沖縄産植物エキスのスクリーニングを進めていくこととした。

さらに、老化細胞除去活性を持つ天然由来化合物を探索するために、他の研究者により既に報告⁴⁾がある、フラボノイドのクエルセチンと抗癌剤のダサチニブの組み合わせを参考に、様々なフラボノイドとダサチニブの組み合わせで老化細胞除去活性を持つものがないか調べることにした。ここでは、HaCaT細胞とA549細胞、さらにヒト乳癌細胞株のMDA-MB-231についてCCK-8assayによる細胞生存率を指標として比較をおこなった(Fig. 7-9)。その結果、ポジティブコントロールとして利用したABT-263の老化細胞に対する特異性がMDA-MB-231細胞で特に高いことが明らかとなった。さらに、HaCaT細胞は非老化細胞でもABT-263に濃度依存的な生存率抑制効果があり、老化細胞特異的な活性を調べるのが難しいことが明らかとなった。フラボノイドの結果では、MDA-MB-231細胞で既に報告があるフィセチンとクエルセチンで老化細胞の生

存率が特異的に低下する結果が得られ、その他にもクリシンやアピゲニン、ルテオリンやノビレチンなどをダサチニブと組み合わせることで、老化細胞での細胞生存率が低下している傾向が見られた。しかし、HaCaT細胞やA549細胞では老化細胞より非老化細胞での細胞生存率が低下する傾向が多く見られ、その結果の解析が難しいこととなった。

4. 考 察

本研究では、スクリーニング結果からのヒットエキスとしてカンキョウエキスに注目して、その特徴的な成分の解析などもおこなったが、残念ながら非老化細胞でも細胞傷害を示す結果となってしまった。このカンキョウエキスを詳細に解析する際には、新たにカンキョウの購入から抽出までおこなっており、スクリーニング時のカンキョウとロットが異なるという原因も影響している可能性が考えられる。生姜という素材であることから、幅広いロットの抽出エキスでの検討と成分分析をおこなったものでの評価も今後おこなっていくべきであると考えられる。さらに、今回の老化細胞と非老化細胞の比較という方法では多くの問題点も明らかとなった。老化細胞は細胞周期が止まり増殖しなくなり、細胞も肥大化するが、非老化細胞は細胞増殖が起き

ることから、薬剤添加から解析までの時間が経つほど細胞増殖の影響が大きく影響するという同じ細胞数で実験を行うとしても、CCK-8 assay など細胞サイズの異なるものを同じように評価するのは問題ないのかなど、考慮すべき内容はたくさん存在する。これらの点に注意をしながらさらに研究を進めていく予定である。

5. 総括

本研究により、皮膚の老化改善に有効となる天然植物エキスを明らかにすることはできなかったが、老化細胞除去活性を持つ植物エキスの探索がスタートするとともに、問題点などを明らかにさせながら進めていくことができるようになった。まだ、奄美産植物のナチシダのように非常に老化細胞に特異的な植物エキスも残っており、まだスクリーニング中の沖縄産植物エキスもあるため、より老化細胞に特異性の高い植物エキスおよびその活性成分の探索を継

続的に実施し、皮膚の老化改善に役立つ製品として研究成果を社会に還元していきたいと考えている。

(引用文献)

- 1) E. Michishita, N. Matsumura, T. Kurahashi, T. Suzuki, H. Ogino, M. Fujii, D. Ayusawa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66 (4), 877-879 (2002)
- 2) Xu, M., Pirtskhalava, T., Farr, J.N., Weigand, B.M., Palmer, A.K., Weivoda, M.M., Inman, C.L., Ogrodnik, M.B., Hachfeld, C.M., Fraser, D.G., et al. *Nat. Med.*, 24, 1246-1256. 2018
- 3) Kota Sato, Soichiro Iwasaki, Hironori Yoshino *Int J Mol Sci.* 22 (24):13233. 2021
- 4) Hidetaka Ota, Ayuto Kodama *Sci Rep.* 12 (1):2425. 2022

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

北海道大学大学院工学研究院

佐藤 康治

Hydroxytyrosol (HT) obtained from olives is an antioxidant with multiple health benefits for human. Because of its low content in olives, fermentative processes with engineered microorganisms have been developed as alternative sources. We for the first time succeeded in HT production from glucose with *Escherichia coli* engineered an artificial pathway employed tyrosine (Tyr) hydroxylase (TyrH), dihydroxyphenylalanine (DOPA) decarboxylase (DDC), and monoamine oxidase (MAO). In the pathway, central metabolic Tyr is converted into HT as follows: (i) hydroxylation of Tyr by TyrH, (ii) decarboxylation of DOPA by DDC, (iii) oxidation of dopamine by MAO, and (iv) reduction of dihydroxyphenylacetaldehyde by endogenous alcohol dehydrogenase(s). However, the productivity was quite low. For high HT production, enhanced Tyr-supply in the cells is needed. Here, we established a Tyr-supplying pathway using a bacterial phenylalanine (Phe) hydroxylase together with a cofactor-recycling system in *E. coli* and the titers of Tyr reached 2.9 g/L from Phe. Even though the strain was applied to the HT production, the productivity was still low unexpectedly. We therefore need further improvements to accomplish practical HT production.

1. 緒言

ヒドロキシチロソール (HT、図1) は、オリーブなどに含まれる強力な抗酸化物質で、その効果はビタミンCの10倍ともいわれる。抗酸化作用のほか、抗炎症・抗菌作用、メラニン産生や紫外線によるDNA損傷の抑制効果などが知られ、化粧品やスキンケア用品の有効成分として使用されている^{1,2)}。また、体の外側からだけでなく、美肌やアンチエイジング効果が期待されるサプリメントとして、内側からのケアにも利用されている。さらに抗ウイルス活性も知られており、最近では現在パンデミックを引き起こしている新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の感染予防効果が注目されている³⁾。

我々はHTを食事から摂取している。主な摂取源はバージンオリーブオイルであるが、含有量が低いため十分な健康効果が得られておらず、近年の健康志向の高まりもあり、食品添加物やサプリメントとしての利用が拡大している。現在は、オリーブ果汁や葉エキスの濃縮物が使用されている。しかし、含有量の低さ、不純物の混在、個体・栽培エリアによるバラつき、季節性などから、高純度での配合や通年の安定供給に課題がある。また、HTはオレウロペインの部分構造として生合成されるため(図1)、加水分解し遊離する必要があり、製造工程をより煩雑にする²⁾。高純度品も販売されているが、化学合成品で非常に高価なだけ

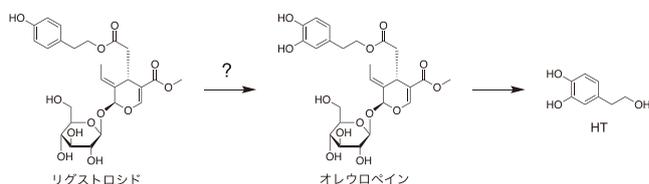


図1 オリーブにおけるHT生合成経路

でなく、近年の世界的な環境意識の高まりから、石油に依存する化学原料や有害な金属触媒の使用、さらには高温・高圧条件下で合成するプロセスは敬遠され、新たな供給ルートが模索されている。このほかに、オリーブオイル製造時に発生する排水からの精製も検討されてはいるが、効率が低く、実用化には至っていない⁴⁾。

2015年、持続可能な社会を実現するための世界目標(持続可能な開発目標、SDGs)が決定された。その達成に向け、経済活動と環境保全が両立した新しいプロセス開発が要請され、従来の化学工業的製法とは異なり、省エネルギー・低環境負荷で目的化合物を製造できるバイオテクノロジーは、その一端を担う重要な技術として注目されている。特に微生物や酵素のもつ優れた物質変換能を活用した有用物質生産は、今後、ますます重要な技術になると期待される。このような背景から、HTを生体触媒である酵素を用い合成する手法も報告されている⁵⁻⁷⁾。例えば、メラニン色素合成に関与するチロシナーゼの利用がある⁵⁾。本酵素は酸素を酸化剤としてタンパク質アミノ酸であるチロシン (Tyr) を水酸化し、ジヒドロキシフェニルアラニン (DOPA) を生成する(図2上段)。キノコ由来チロシナーゼはTyrと同じくフェノール構造をもつチロソールも水酸化できるため、HT合成に利用された(図2下段)。しかし、本酵素はジオキシゲナーゼであり、水酸化反応に加えてキノン体への過剰な酸化反応も触媒するため、アスコルビン



Development of production systems of a powerful antioxidant hydroxytyrosol

Yasuharu Satoh

Division of Engineering, Hokkaido University

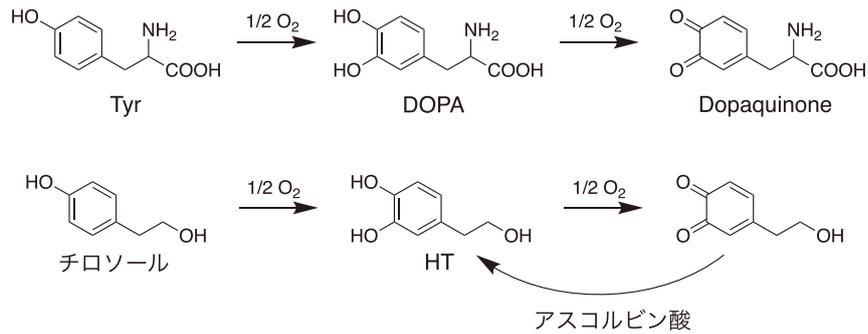


図2 チロシナーゼを利用したHT合成
上段：Tyr水酸化反応、下段：HT合成反応

酸による還元プロセスが必要となる。このほかに、フラビン依存性ヒドロキシフェニル酢酸モノオキシゲナーゼやトルエンモノオキシゲナーゼを用いたチロソールのHTへの変換プロセスも報告されている^{6,7)}。これらの酵素合成法はいずれも化学合成された原料を用いるため、持続可能な開発目標SDGsの達成の観点から改善が求められる。

そこで我々は、再生可能で安定供給が可能なバイオマスを原料に、常温・常圧下で物質生産が可能な微生物による発酵生産法の開発に着手した。これまでにHT高生産菌の報告はなかったため、HT生合成経路を実装した遺伝子組換え大腸菌による発酵生産について検討した。大腸菌はゲノム情報や遺伝子機能に関する知見などが充実し、さらにプラスミドベクターや遺伝子ライブラリーなどの遺伝子工学ツールが豊富、遺伝子導入や破壊が容易など、ほかの宿主微生物よりも非常に扱いやすいという利点があり、物質生産に広く用いられている。まずは、導入するHT生合成経路を検討した。オリーブから得られるHTは、オレウロ

ペインの加水分解によって生成される(図1)。オレウロペインはチロソールを部分構造にもつリグストロシドの水酸化によって生合成されると予想されているが²⁾、関与する酵素は同定されておらず、新たな経路をデザインすることとした。

我々はTyrを原料に脱炭酸とそれに続くアミノ基の酸化、生成したアルデヒド基の還元反応を経てチロソールへ変換する植物および微生物由来酵素を用いた人工的な代謝経路を設計し、合成生物学的アプローチで大腸菌へ実装することに成功していた⁸⁾(図3)。この成果に基づき、Tyrに代えてDOPAを出発化合物とすることでHTが合成可能になると考え、検証した⁹⁾(図3)。チロソール合成で採用した植物由来Tyr脱炭酸酵素(TDC)はDOPAの脱炭酸反応も触媒するためHT合成に利用できる。しかし、Tyrが存在する大腸菌内ではチロソールが副生される。後述のように、TyrはDOPA合成の基質でもありHT収率の低下を招く。酵素は多種多様な化合物が混在する生体内で特定の

Biomass (glucose, glycerol, etc)

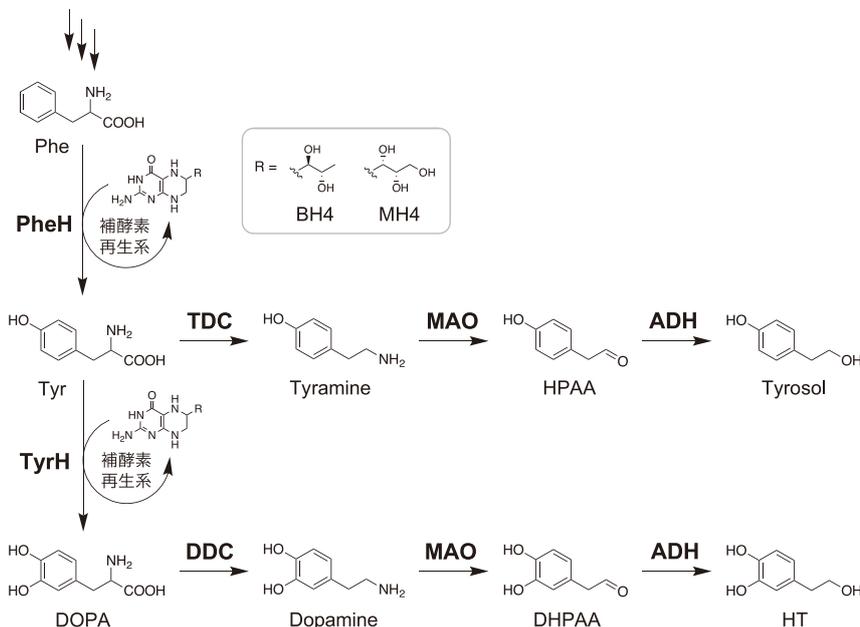


図3 構築したHTおよびチロソール生合成経路
BH4：テトラヒドロビオプテリン、MH4：テトラヒドロモナプテリン、HPAA：ヒドロキシフェニルアセトアルデヒド、DOPA：ジヒドロキシフェニルアラニン、DHPAA：ジヒドロキシフェニルアセトアルデヒド、HT：ヒドロキシチロソール、PheH：Phe水酸化酵素、TyrH：Tyr水酸化酵素、TDC：Tyr脱炭酸酵素、MAO：モノアミン酸化酵素、ADH：アルコール脱水素酵素、DDC：DOPA特異的脱炭酸酵素

化合物と反応する高い基質特異性をもつため、動物由来のDOPA特異的脱炭酸酵素(DDC)を用いることで、HT選択的合成を達成した。

続いて、大腸菌でのDOPA合成を検討した⁹⁾。DOPA合成活性をもつ酵素として前述のチロシナーゼがあるが、DOPAは中間体であり、さらに酸化されたドパキノン還元する必要がある(図2)。このほかに、動物が神経伝達物質ドパミンやアドレナリンの生合成に用いるTyr水酸化酵素(TyrH)も知られていた。しかし本酵素は動物に特異的な補酵素であるテトラヒドロbiopterin(BH4)を要求するため、微生物による物質生産には利用されていなかった。このような背景下、我々はマウス由来酵素を大腸菌で異種宿主発現させ種々検討したところ、大腸菌に内在するテトラヒドロモノプテリン(MH4)が補酵素として機能することを明らかにした。MH4やBH4は反応の進行により酸化され消費される。ヒトはBH4再生系をもち、生体内でのTyr水酸化反応の進行には、その両方が必須である。そこでBH4再生関連酵素も大腸菌で共発現させた結果、DOPA合成反応が効果的に進行することがわかった。最終的に、全ての遺伝子を導入した大腸菌でグルコースを原料にHTの発酵生産に成功した(図3)。これは安価で再生可能な糖(グルコースなど)を原料に、有害な化合物を使用せず、常温・常圧下で製造する持続可能なプロセスである。しかし、現状の生産性は12 mg/L (0.08 mM)と非常に低い。そこで本研究では、HT生産性を改善し、実用生産の可能性を検証した。

2. 方法

2.1. プラスミド構築

ラット由来PheH遺伝子、ヒト由来PCDおよびDHPR遺伝子は、大腸菌のコドンに最適化した配列で遺伝子合成し取得した。細菌由来PheH遺伝子は、当研究室の保存株より調製したゲノムDNAを鋳型としたPCRで増幅した。得られたDNAは該当の発現プラスミドへそれぞれクローニングし、各試験に使用した。

2.2. 生産試験

生産試験には、M9Y培地(0.1% [w/v] 酵母エキスを含むM9最少培地。炭素源としてグルコースまたはグリセロールを1.0% (w/v) 含む。)に5g/L Pheおよび20mg/L FeSO₄を添加した培地を使用した。この試験培地3mLに一晩培養した組換え大腸菌培養液をOD(濁度)が0.15となるように植菌し、30℃、200rpmで培養した。タンパク質発現を誘導するため、培養開始から3時間経過後にイソプロピル-β-チオガラクトピラノシドを最終濃度が0.5mMとなるように添加した。各時間に培養液をサンプリングし、菌体濃度はOD測定、生産物はHPLC解析した。

サンプル数はN=3とし、データは平均値 ± 標準偏差で記載した。

HPLC解析は、GLサイエンス社製InertSustain C18カラム(15cm × 2.1mm ID, 3μm)を連結した島津製作所社製HPLCシステムで行った。各培養液は1N塩酸水溶液で5倍に希釈し、2μLをインジェクションした。化合物は下記の条件で分離し、210nmの吸収に基づき定量した。移動相A: 0.1% (v/v)ギ酸水溶液、移動相B: 0.1% (v/v)ギ酸含有メタノール、流速: 0.2mL/min、カラム温度: 35℃、グラジエント条件: 5%, 0-2min、5-30%、2-22min。

3. 結果と考察

3.1. HT生産における律速反応の解明とTyr供給の強化

グルコース(1.0% [w/v])からのHT生産量は12mg/L (0.08mM)と低く、またTyrを181mg/L (1mM)添加した培地を用いた場合でも29mg/L (0.19mM)と低かった⁹⁾。後者においてTyrの残存が確認されたことから、TyrからDOPAへの変換率の低さが原因と考えられた。本反応はTyrHが担うが、大腸菌内で反応を進行させるには補酵素MH4の供給も欠かせず、TyrHと補酵素再生系の両方の活性を評価する必要がある。

微生物の培養試験では、雑菌の混入を避けるため、試験培地を蒸気滅菌や濾過滅菌し使用する。しかし、Tyrの水への溶解度は453mg/L (2.5mM)と低いため、高濃度Tyr添加培地の調製に濾過滅菌は不適である。蒸気滅菌は、処理中にTyrがほかの培地成分と予期せぬ反応を引き起こすため適用できない。ヒトにとってPheは必須アミノ酸であるが、Tyrは非必須アミノ酸である。これはヒトがPhe水酸化酵素(PheH)をもち、PheからTyrを合成できるからである。本反応を担うPheHもTyrHと同じプテリン依存性芳香族アミノ酸水酸化酵素の一種である。Pheの水への溶解度は26,900mg/L (163mM)とTyrのそれと比較して非常に高い。そこで、本酵素を用いたPheからTyr変換経路を構築することで、高濃度でのTyr供給が可能になるだけでなく、MH4再生系の効率評価も可能になると考え検証した。

MH4再生には、ヒト由来プテリン-4α-カルビノールアミン脱水素酵素(PCD)とジヒドロプテリジン還元酵素(DHPR)を用いた。本遺伝子はPCD-DHPRの順のオペロンとなるように、中コピーベクターであるpSTV28のlacプロモーター下流にクローニングした(pSTV-BH4R、図4)。構築したプラスミドで大腸菌を形質転換し、タンパク質発現をSDS-PAGE解析したが、明白なバンドは確認できなかった(図5A)。そこで、各酵素に対する抗体を用いたWestern blot解析した結果、図5BおよびCに示すように、可溶性画分に両タンパク質の発現が確認できた。

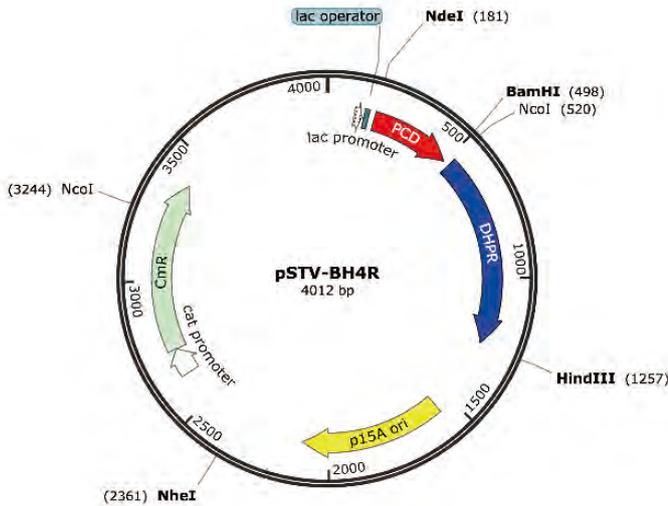


図4 プラスミド pSTV-BH4R のマップ

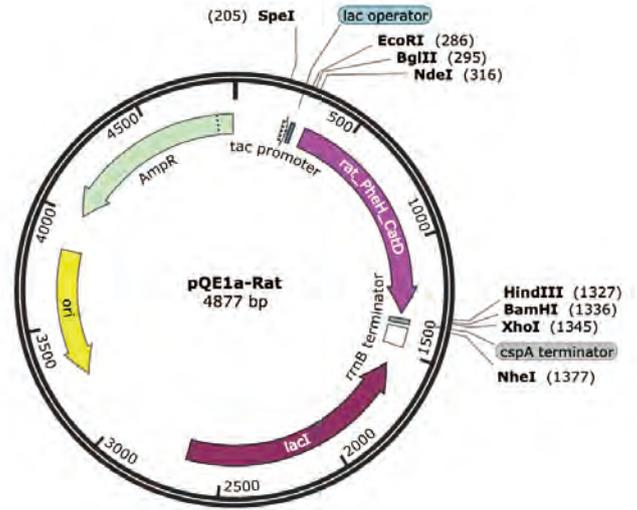


図6 プラスミド pQE1a-Rat のマップ

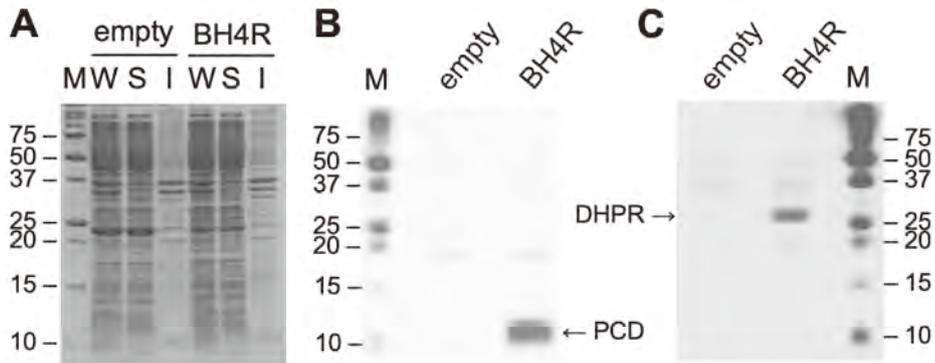


図5 大腸菌でのPCDおよびDHPR発現の検証

A: SDS-PAGE 解析、B: 抗 PCD 抗体を用いた Western blot 解析、C: 抗 DHPR 抗体を用いた Western blot 解析、empty:pSTV28 (コントロール)、BH4R:pSTV-BH4R、M: 分子量マーカー、W: 菌体破砕物、S: W の可溶性画分、I: W の不溶性画分
Western blot 解析では、活性な酵素が存在する可溶性画分を分析。

次に、PheH との共発現を検討した。PheH は大腸菌での発現が確認されているラット由来酵素の触媒ドメイン領域を高コピーベクター pQE1a の強力な tac プロモーター下にクローニングした (図6)。この際、宿主自身が産生した Tyr の混入を避けるため、Tyr 合成に必須な TyrA 遺伝子を破壊した大腸菌 (Y0 株) を用いた。その結果、Phe (分子量 165.19) を 5,000mg/L (30.3mM) 添加した培地を用い試験した結果、培養 48 時間で 79.7 ± 5.4 mg/L (0.44 ± 0.03 mM) の Tyr (分子量 181.19) 生産が確認されたが、変換率は 1.6% と低かった。DHPR は MH4 再生時に補酵素 NAD(P)H を用いる。その供給には炭素源としてグルコースよりもグリセロールの方が適していることが知られており、グルコースに代えてグリセロールを用い評価した。その結果、Tyr 生産量は約 2.5 倍 (197 ± 34 mg/L, 1.09 ± 0.19 mM) に向上した。SDS-PAGE 解析で PheH の発現が確認できたにも関わらず、変換率は 3.6% と依然として低かったため、ほかの酵素の利用を検討した。

一部の微生物も PheH をもつ¹⁰⁾。そこで、7 種の細菌から PheH 遺伝子を取得し、上記と同様の手法で評価した。その結果、当研究室で単離した *Gulbenkiania* 属細菌由来 PheH (GsPheH、図7) を発現した株で最も高い変換能が確認され、培養 72 時間で $5,236 \pm 598$ mg/L (28.9 ± 3.3 mM、図8) に達した。したがって、以降の検討には GsPheH を用いた。

2つのプラスミドの使用は、2種の抗生物質への耐性獲得やプラスミド DNA 合成による負担 (代謝負荷) の増加により、変換能が低下することが知られている。その影響を軽減するため、プラスミド pSTV-BH4R (図4) 中の lac プロモーターと補酵素再生関連遺伝子 (PCD と DHPR) を含む領域を PCR で増幅し、プラスミド pQE1a-Gs の NheI サイトに挿入した (pQE1a-Gs-BH4R、図9)。本プラスミドで形質転換した Y0 株の Tyr 生産量は、培養 72 時間で $5,852 \pm 471$ mg/L (32.3 ± 2.6 mM) に達した (図10)。この Tyr 生産量は添加した Phe を超過しているが、大腸菌

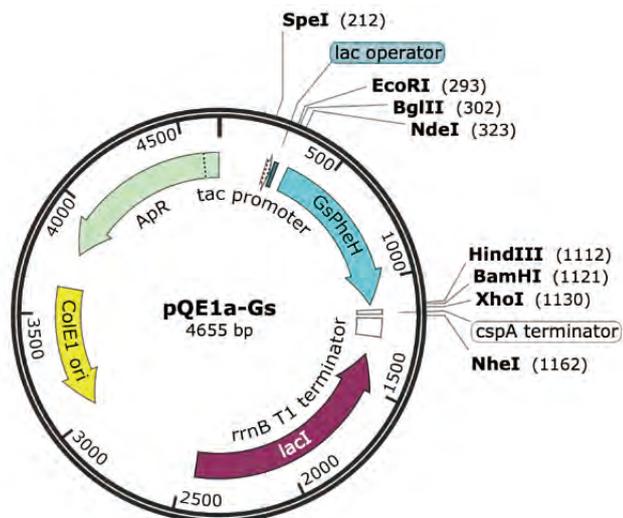


図7 GsPheH 発現プラスミド pQE1a-Gs のマップ

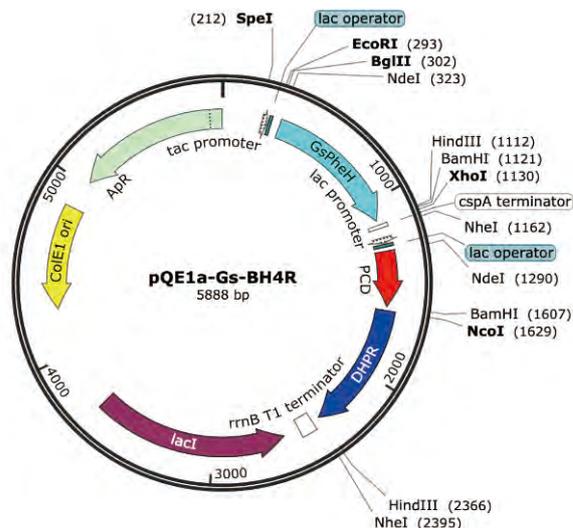


図9 プラスミド pQE1a-Gs-BH4R のマップ

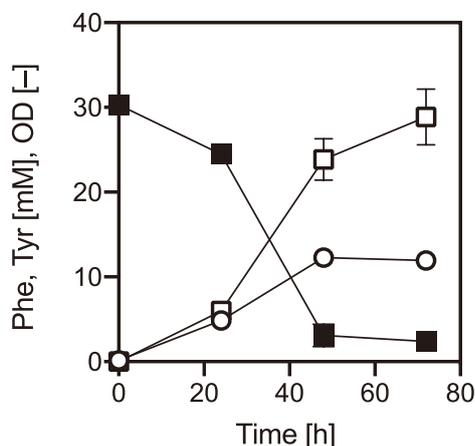


図8 pQE1a-Gs と pSTV-BH4R を導入した Y0 株の Tyr 生産試験 ■ : Phe、□ : Tyr、○ : OD

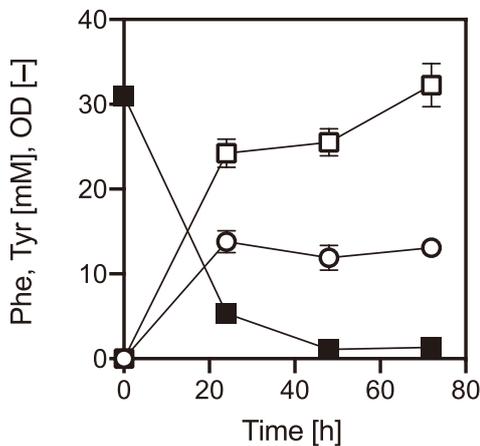


図10 pQE1a-Gs-BH4R を導入した Y0 株の Tyr 生産試験 ■ : Phe、□ : Tyr、○ : OD

自身が産生した Phe が変換されたことが原因と考えられた。また、先の2つのプラスミドを導入した株(図8)と比較して、培養24時間時点の Tyr 生産量が大きく増加していた。これはプラスミド数削減によって代謝負荷が軽減し、生産速度が向上したためと考えられた。さらに、Tyr 高生産が確認されたことから、補酵素再生系も効率的に機能することが分かった。

プラスミド pQE1a-Gs-BH4R は、以前の HT 生産研究で構築した TyrH 発現プラスミド pBbE1k-3⁹⁾(図11)と同種の複製開始点(ori)をもつため、大腸菌内で同時に保持させることができない。また HT 生産には、さらに DDC とモノアミン酸化酵素(MAO) 遺伝子の導入が必須であり、多数のプラスミドの使用による宿主への代謝負荷の増大が懸念された。そこで、Tyr 生産に関与する PheH と補酵素再生遺伝子は、大腸菌ゲノムへ組込むこととした。プラスミド pQE1a-Gs-BH4R から PheH、PCD と DHPR 遺伝子を含む領域(Tyr 生産遺伝子カセット)を PCR で増幅し、Tyr

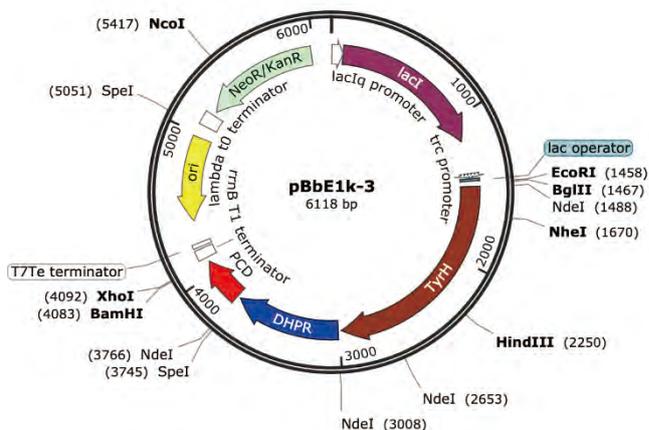


図11 プラスミド pBbE1k-3 のマップ

要求性大腸菌(Y0株)の TyrA 遺伝子破壊領域へ導入した(Gs1株)。その培養48時間の Tyr 生産量を評価したところ、 $45.3 \pm 1.8 \text{ mg/L}$ ($0.25 \pm 0.01 \text{ mM}$) と非常に低かった

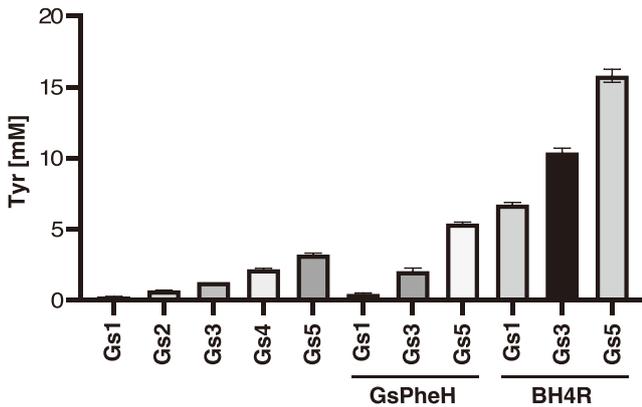


図 12 Tyr 生産遺伝子カセット組み込み株とそれらに pQE1a-Gs または pSTV-BH4R を導入した株の Tyr 生産試験
Gs1 ~ Gs5: Tyr 生産遺伝子カセットを 1 ~ 5 個組込んだ株

(図 12)。ゲノム組み込みでは、大腸菌内で遺伝子は 1 コピーであるのに対し、プラスミド pQE1a-Gs-BH4R は約 30 コピーになる。Tyr 生産量の低下は、遺伝子コピー数の減少が影響していると考えられたため、Tyr 生産遺伝子カセットを大腸菌ゲノムの FeaB 遺伝子座へ追加で組込んだ (Gs2 株)。その結果、Tyr 生産量は約 2.8 倍に向上したが、依然として低かった (図 12)。そこで、大腸菌ゲノムに組み込む遺伝子カセット数を 3、4、5 個とさらに増加させた株 (Gs3、Gs4 および Gs5 株) を構築し評価した結果、遺伝子カセット数に比例した Tyr 生産量の増加が確認された (図 12)。しかし、プラスミド発現時 (図 10) よりも大きく減少した。Phe の Tyr への変換反応は、Phe 水酸化と補酵素再生という 2 種の反応が必要なため、どちらかが律速反応になっていると予想した。この検証のため、Tyr 生産遺伝子カセットをゲノムに組み込んだ株に、先に構築した GsPheH 発現プラスミド pQE1a-Gs (図 7) または補酵素再生遺伝子発現プラスミド pSTV-BH4R (図 4) をそれぞれ導入し検証した (図 12)。その結果、GsPheH 遺伝子の導入では Tyr 生産量は $978 \pm 18 \text{ mg/L}$ ($5.4 \pm 0.10 \text{ mM}$) であったのに対し、BH4 再生遺伝子導入では $2,862 \pm 83 \text{ mg/L}$ ($15.8 \pm 0.46 \text{ mM}$) へと大きく向上した。よって、補酵素再生系が律速反応と判明した。このように Tyr 生産遺伝子カセット 5 個をゲノムに組み込んだ Gs5 株は、補酵素再生遺伝子の導入により物質生産において十分な Tyr 供給が可能であったことから、以降の検討に用いた。

3.2. HT 生産の検証

高い Tyr 供給が可能になったため、次の反応ステップである DOPA 変換について検証した。上述のように補酵素再生系の律速を回避するためには、その遺伝子の発現強化が必要であったため、以前の研究で構築したマウス由来 TyrH 遺伝子と BH4 再生関連遺伝子をオペロンとして発

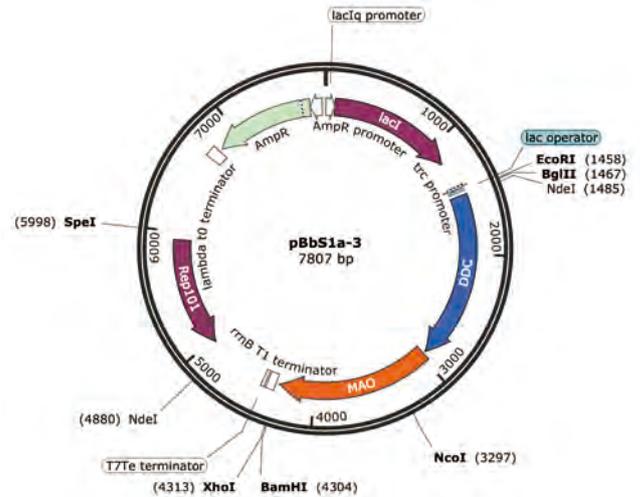


図 13 プラスミド pBbS1a-3 のマップ

現するプラスミド pBbE1k-3⁹⁾ (図 11) を用いた。その結果、期待通り DOPA 生産 ($1,033 \pm 12 \text{ mg/L}$; $5.2 \pm 0.06 \text{ mM}$) が確認された。

グラムオーダーでの DOPA 供給が可能であったため、HT 生産を試みた。以前、我々が HT 生産時に使用したブタ由来 DDC 遺伝子と *Micrococcus luteus* 由来 MAO 遺伝子をオペロンとして発現するプラスミド pBbS1a-3⁹⁾ (図 13) を上記の pBbE1k-3 を含む Gs5 株に導入し評価した。その結果、予想に反し、HT だけでなく DOPA も検出されず、約 30mM の Phe が未反応のまま残存していた。このように反応が全く進行しなかった原因として、3 章 1 節で確認された複数プラスミドの導入による宿主の代謝負荷の増大が考えられた。

4. 総括

強力な抗酸化活性をもつ HT の化粧品原料としての利用価値は非常に高い。近年は COVID-19 の感染予防効果も注目されており、高純度品を安価に安定供給するルートが模索されている。我々は、その 1 つとして組換え大腸菌による発酵生産法を提案した⁹⁾。本研究では、その生産性向上を目指し、まずは基質となる Tyr 供給の強化に取り組み、成功した。そこで、Tyr 供給を強化した大腸菌へ以前の研究で構築した HT 生産用プラスミドを導入したが、HT 生産を達成できなかった。この原因として、複数プラスミドの導入による宿主の代謝負荷の増加が考えられた。今後は代謝負荷の軽減のため、HT 合成に必要な遺伝子全てを大腸菌ゲノムへ組み込む必要があると考えている。

謝辞

本研究の遂行にあたり、御援助を賜りました公益財団法人コーセー化粧品研究財団に深く感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) L. Martínez-Zamora, R. Peñalver, G. Ros, G. Nieto. Olive tree derivatives and hydroxytyrosol: their potential effects on human health and its use as functional ingredient in meat. *Foods* 10, 2611 (2021)
- 2) S. H. Omar. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Sci. Pharm.* 78, 133-154 (2010)
- 3) S. Paolacci, M. C. Ergoren, D. De Forni, E. Manara, B. Poddesu, G. Cugia, K. Dhuli, G. Camilleri, G. Tuncel, H. Kaya Suer, N. Sultanoglu, M. Sayan, M. Dundar, T. Beccari, M. R. Ceccarini, I. S. Gunsel, A. Dautaj, T. Sanlidag, S. T. Connelly, G. M. Tartaglia, M. Bertelli. In vitro and clinical studies on the efficacy of α -cyclodextrin and hydroxytyrosol against SARS-CoV-2 infection. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 25, 81-89 (2021)
- 4) N. Kalogerakis, M. Politi, S. Foteinis, E. Chatzisyneon, D. Mantzavinos. Recovery of antioxidants from olive mill wastewaters: a viable solution that promotes their overall sustainable management. *J. Environ. Manage.* 128, 749-758 (2013).
- 5) J. C. Espín, C. Soler-Rivas, E. Cantos, F. A. Tomás-Barberán, H. J. Wichers. Synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol using tyrosinase as biocatalyst. *J. Agric. Food Chem.* 49, 1187-1193 (2001)
- 6) P. P. Liebgott, A. Amouric, A. Comte, J. L. Tholozan, J. Lorquin. Hydroxytyrosol from tyrosol using hydroxyphenylacetic acid-induced bacterial cultures and evidence of the role of 4-HPA 3-hydroxylase. *Res. Microbiol.* 160, 757-766 (2009)
- 7) M. Brouk, A. Fishman. Protein engineering of toluene monooxygenases for synthesis of hydroxytyrosol. *Food Chem.* 116, 114-121 (2009)
- 8) Y. Satoh, K. Tajima, M. Munekata, J. D. Keasling, T. S. Lee. Engineering of a tyrosol-producing pathway, utilizing simple sugar and the central metabolic tyrosine. *J. Agric. Food Chem.* 60, 979-984 (2012)
- 9) Y. Satoh, K. Tajima, M. Munekata, J. D. Keasling, T. S. Lee. Engineering of L-tyrosine oxidation in *Escherichia coli* and microbial production of hydroxytyrosol. *Metab. Eng.* 14, 603-610 (2012)
- 10) A. Pribat, I. K. Blaby, A. Lara-Nunez, J. F. Gregory III, V. de Crecy-Lagard, A. D. Hanson. FolX and FolM are essential for tetrahydromapterin synthesis in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 192, 475-482 (2010)

楕円状ポリイミド微粒子の紫外線防御剤への応用

地方独立行政法人大阪産業技術研究所

中橋 明子

It was reported that polymer particles of ellipsoidal and needle shape have high UV-ray scattering effect. In most cases, polymer particles prepared by emulsion and precipitation polymerization are spherical shapes, which are thermodynamically stable shapes. To obtain nonspherical polymer particles, complicated methods are necessary. In a few cases, the ratio of several kinds of solvents, monomers, and emulsifiers are precisely controlled to obtain nonspherical particles during polymerization. On the other hand, nonspherical particles are transformed from spherical particles by complicated processes.

Polyimide (PI) fine particles prepared by precipitation polymerization has already reported. Recently, it has been found that the PI particles transform from spherical to ellipsoidal by stirring in a solvent. In this study, the stirring conditions for transformation from spherical to ellipsoidal were investigated. Furthermore, the thermal stability and optical properties of the resulting ellipsoidal PI particles were evaluated.

Various kinds of stirring bar were applied, and cylinder-shape stirring bar was most effective to transform PI particles. Destruction of particles were observed when the dispersion of PI particles stirred with a glass stirring bar in a glass bottle. Transformed PI particles were not obtained in chloroform, ethylene glycol, and isopropyl alcohol. These results suggested that PI particles transformed at the clearance between the stirring bar and the vessel. Ellipsoidal PI particles with around 0.6 times the thickness and around 1.3 times the axial length of the original size were obtained by optimizing the stirring condition.

The shape of ellipsoidal PI particles was retained after heating at 150 °C for 2 h. The dispersion of ellipsoidal PI particles showed lower UV-Visible transmittance than that of spherical particles. The transmittance of acrylic polymer films with PI particles dispersed on surface or inside was also measured. Under both conditions, ellipsoidal PI particles showed lower UV transmittance than that of spherical PI particles.

1. 緒言

近年、太陽光に含まれる紫外線 (UV) が人体に悪影響を及ぼすことが周知され、紫外線防御の重要性について、認識が高まっている。現在、化粧品は、紫外線防御剤として、酸化チタンや酸化亜鉛などの無機微粒子および桂皮酸誘導体やベンゾフェノン誘導体などの有機低分子化合物が使用されている。無機微粒子は、紫外線防御剤中、UV 散乱剤に分類され、UV を散乱または反射させることにより防御剤として機能する。しかし、無機微粒子は屈折率が高く、化粧品材料として使用すると白浮きするため、その回避策として一般的に 100 nm 以下の微細微粒子が用いられる。粒子の微細化に伴い凝集が進行しやすく、水や油などに対し、一次粒子の状態での分散が難しくなり、紫外線防御効果は低下する。そのため、微細な無機微粒子を化粧品中に分散させ、その分散を長期間に亘って維持するためには、より多くの界面活性剤が必要となる。その結果、人体に対しては、肌荒れや皮膚老化を誘発させる可能性が大き

くなり、好ましくない。一方、桂皮酸誘導体やベンゾフェノン誘導体などの有機低分子は、UV 吸収剤として用いられる。これらの有機低分子は、添加量を多くすれば効果が向上するが、保存あるいは使用中の分解、皮膚への刺激に加え、毒性などが懸念され、使用量に一定の制限がある。したがって、従来の紫外線防御剤を日焼け止め料やファンデーションに配合する際には、防御剤それぞれの特性を考慮し、安全性や紫外線遮蔽性の観点から数種類の紫外線防御剤を組み合わせる必要がある。そのため、無機微粒子や有機低分子に替わる新規紫外線防御剤の創出によって、それらを含む化粧品設計の幅を大きく拡大させることができると考え、本研究の実施に至った。

新たな紫外線防御剤の作製指針として、高分子材料を用いた紫外線防御においては、高分子微粒子の形状を楕円体状または針状にすることで、UV に対し、高い散乱効果が認められるとの報告がある¹⁾。一般的に、乳化重合や沈殿重合などにより調製される高分子微粒子は、そのほとんどが熱力学的に安定な球状である。そのため、非球状の微粒子を得るには、微粒子を調製する際に特定の条件に精密制御する、あるいは煩雑な変形操作によって球状微粒子から変形させる必要があった²⁻⁴⁾。

当研究所では、これまで、ポリイミド (PI) の球状微粒子の研究開発を行ってきた^{5,6)}。モノマーであるジアミンと酸無水物を用い、溶液中での沈殿重合によって、数十 nm ~ 数 μm の粒子径を有する単分散球状 PI 微粒子の作製に成



Ellipsoidal polyimide particles for UV protective agents

Akiko Nakahashi

Osaka Research Institute of Industrial Science and Technology

功している。PIは高い耐熱性、耐薬品性、および耐候性を有し、電子材料分野や航空宇宙分野などにおいては必須の重要な材料である。さらに、PIは芳香環を高い割合で含む有機高分子であることから、400nm以下の短波長光の吸収が大きい材料である。また、PI自体は為害性が低く、医療器具としても用いられる材料である。しかし、その高い耐熱性、耐薬品性のために、汎用高分子に比べて加工性が極めて悪い。この加工性を改善するために鋭意検討した結果、PIを微粒子状にすることで、配合や成型の際に自在に適用することが可能となり、PIの様々な分野への応用について、その可能性を大きく広げた。

筆者は、これまでの研究開発において、液中に分散させた球状PI微粒子を攪拌することで、球状微粒子が楕円体状に変形することを見出した。得られた楕円体状PI微粒子は、材料由来の高いUV吸収に加え、そのユニークな形状から優れたUV散乱特性が期待できることから、この楕円体状PI微粒子の紫外線防御剤への応用について着想した。また、球状PI微粒子が楕円体状に変形するメカニズムについて、明らかになっておらず、そのメカニズムの解明がUV散乱特性の更なる向上に繋がることは確かであり、メカニズムの解明についても精力的に行った。

本研究では、まず、球状PI微粒子を楕円体状PI微粒子へ変形させるための条件について詳細に検討した。さらに、得られた楕円体状PI微粒子の耐熱性および光学特性を調べ、紫外線防御剤への応用の可能性について評価した。

2. 方法

2.1. 球状PI微粒子の調製

文献6を参考に、まず球状PI微粒子を調製した。3,3',4,4'-ベンゾフェノンテトラカルボン酸二無水物(BTDA)のアセトン溶液、BTDAに対し80mol%の4,4'-ジアミノジフェニルエーテル(DPE)のアセトン溶液および20mol%の2,4,6-トリアミノピリミジン(TAP)のメタノール/アセトン溶液を混合した後、超音波を照射し、球状ポリアミック酸微粒子を沈殿物として得た。得られたポリアミック

酸微粒子をドデカンに分散し、加熱イミド化を行い、球状PI微粒子を調製した。本研究では平均粒径が約1.4 μ mのPI微粒子を調整し、使用した(図1(a))。

2.2. 楕円体状PI微粒子の調製

ガラス製サンプル瓶中で、2.1.で得られた球状PI微粒子を種々の溶媒に分散し、フッ素樹脂(PTFE)製攪拌子およびマグネティックスターラーを用いて攪拌を行った。1週間後、遠心分離によって微粒子を回収し、楕円体状PI微粒子を得た。なお、今回の研究において、この攪拌操作条件について最適化を行った。具体的には、用いる溶媒の種類、量、および攪拌子の形状などを変化させたとき(表1)に得られる粒子形状を確認することで、楕円体状PI微粒子の形成メカニズムを考察した。

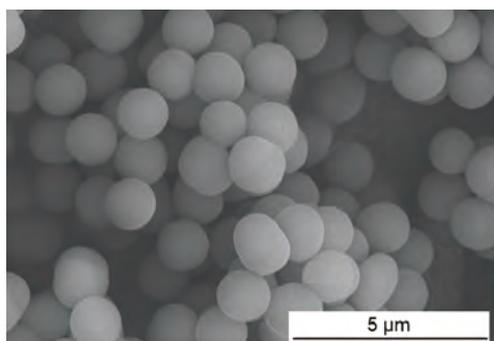
2.3. PI微粒子の変形評価

攪拌条件による変形の程度を評価するために、FE-SEMを用いてPI微粒子の大きさや形状を観察した。観察対象となる球状または楕円体状PI微粒子について、少量をアセトンに分散後、アルミホイル上に分散液を滴下し乾燥させた。この操作により、粒子同士の重なりが少なくなり、楕円体の広い面が平面方向に配列する。調製したサンプルについて、粒子の長軸および直行する軸の長さをそれぞれXおよびY値としてプロットした。変形操作前後のX、Yプロットの分布を比較することで、球状PI微粒子の変形について評価した。

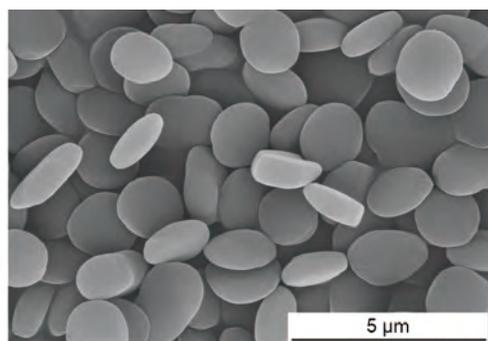
2.4. PI微粒子の紫外可視透過率(全光線透過率)測定

球状PI微粒子および楕円体状PI微粒子について紫外可視透過率測定を行い、粒子形状による差異を確認した。なお、紫外可視透過率測定には、以下のサンプル①~③を用いた。

サンプル①: PI微粒子をそれぞれ流動パラフィン中(0.01 wt%)に加え、超音波照射を行うことで分散液を作製し



(a) 球状PI微粒子



(b) 楕円体状PI微粒子

図1 PI微粒子のSEM画像

た。次に、得られた分散液を 10mm 角型石英セルに入れ、透過率を測定した。

サンプル②：アクリルポリマーを溶かした酢酸エチル溶液（固形分濃度 36%）と PI 微粒子を含むアセトン分散液からなる混合液を石英板上に塗布し、バーコーターにてポリマー層を作製後、乾燥させた。なお、ポリマー層の乾燥後の厚さは 17 μm であった。また、アクリルポリマー溶液の重量と混合した PI 微粒子の重量の比からポリマー層は 1.8wt% の PI 微粒子を含むことがわかった。次に、積分球を用い、作製したポリマー層について全光線透過率測定を行った。

サンプル③：石英板上でアクリルポリマー溶液を塗布乾燥することで、石英板上に粘着性を有するアクリルポリマーフィルムを作製した。次に、得られたフィルム上に PI 微粒子を載せ、手袋を装着した指で扱った。十分に

扱った後、エアダスターを用いて固定されていない PI 微粒子を除去し、透過率測定試料とした。サンプル②と同様に、積分球を用い、調製した試料について全光線透過率測定を行った。

3. 結果

3.1. 楕円体状 PI 微粒子の調製条件の検討

サンプル瓶中、球状 PI 微粒子を含むアセトニトリル分散液をシリンダー型 PTFE 攪拌子で 1 週間攪拌すると、楕円体状 PI 微粒子が得られた（図 1 (b)）。この攪拌条件で変形を評価するため、まず、種々の形状の攪拌子を用いて攪拌操作を行い（表 1、run 1-4）、変形程度を比較した。変形操作後、2. 3. の方法で SEM 観察用試料を調製し、粒子の長軸および直交する軸の計測値を X および Y 値としてプロットしたものを図 2 (a)~(d) に示す。変形操作後のプロット

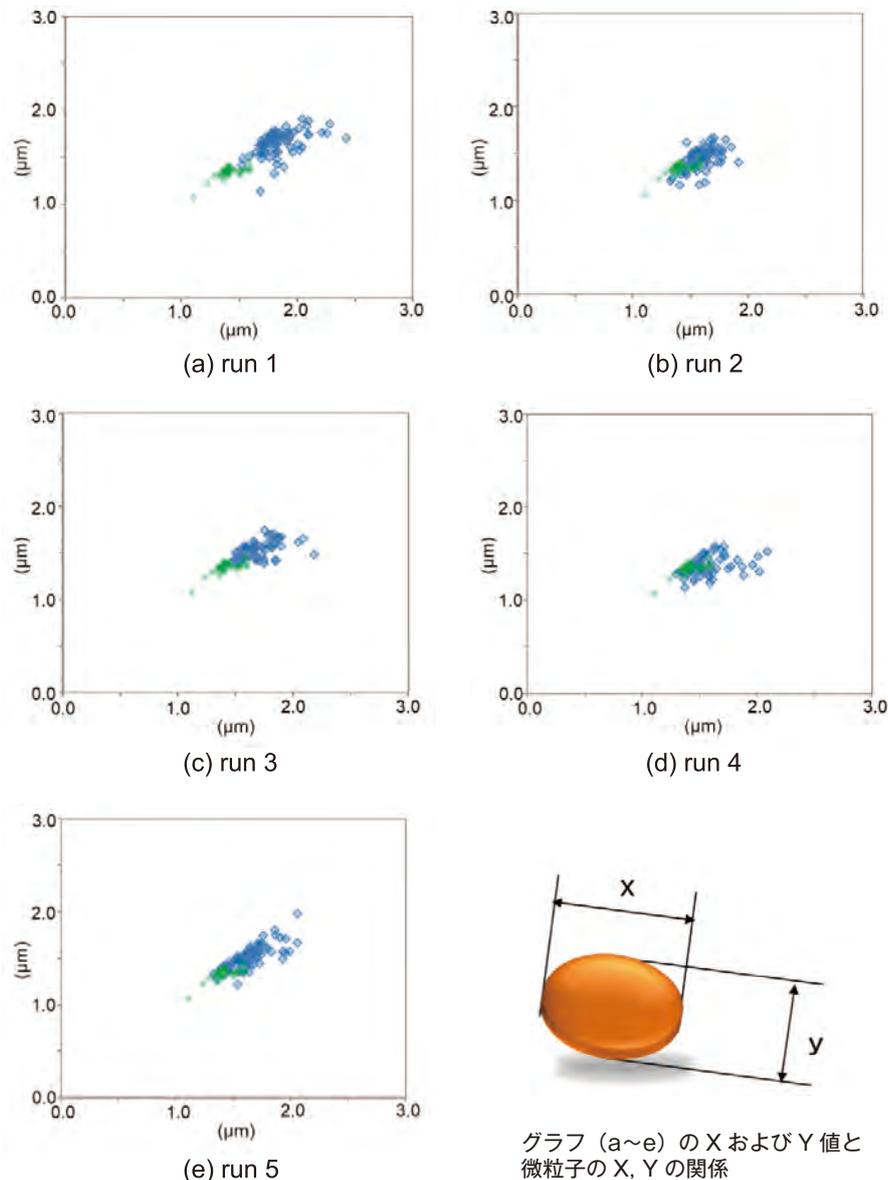


図 2 攪拌後 SEM 観察で計測した粒子サイズの分布

表1 球状PI微粒子分散液の攪拌条件検討

run	stirring bar	vessel	solvent (ml)	PI particle (g)
1	10 mm シリンダー型	20 ml サンプル瓶	acetonitrile	0.5
2	クロスヘッド回転子	20 ml サンプル瓶	acetonitrile	0.5
3	トライアングル回転子	20 ml サンプル瓶	acetonitrile	0.5
4	クロスヘッド回転子	2 ml サンプル管瓶	acetonitrile	0.2
5	10 mm シリンダー型	20 ml サンプル瓶	acetonitrile	2.5
6	10 mm シリンダー型	20 ml サンプル瓶	acetone	2.5
7	10 mm シリンダー型	20 ml サンプル瓶	water	2.5
8	10 mm シリンダー型	20 ml サンプル瓶	hexane	2.5
9	10 mm シリンダー型	20 ml サンプル瓶	chloroform	2.5
10	10 mm シリンダー型	20 ml サンプル瓶	isopropyl alcohol	2.5
11	10 mm シリンダー型	20 ml サンプル瓶	ethylene glycol	2.5

ト分布が球状PI微粒子のプロットから右上にずれるほど、軸が長くなり、すなわち変形が大きいことが認められる。run1～4においては、run1の場合が最も変形の程度が大きく、シリンダー型攪拌子を用いた場合に最も効率よく変形することがわかった。そのため、以降の検討ではシリンダー型攪拌子を使用した。分散微粒子の濃度が低い場合、run 1と同じ攪拌子と容器を用いても変形度が小さいことが認められた(表1、run 5。図2(e))。次に、ガラスサンプル瓶中でガラス製攪拌子を用いた変形についての検討を行った。この場合、微粒子が粉々になり、目的とする楕円体状PI微粒子が得られなかった。一方、フッ素樹脂(PFA)容器中、PTFE攪拌子を用いて攪拌した場合はほとんど変形が起らなかった。以上の結果から、PI微粒子の変形操作は、攪拌に用いる器具の形状および材質の影響を大きく受けることが明らかになった。そのため、PI微粒子の変形は攪拌子と容器との間で起こっていると推察された。

次に、アセトニトリルと異なる分散媒に微粒子を分散させ、変形操作を行った。分散媒として用いた溶媒の比重と粘度を表2にまとめた。分散媒にアセトン、ヘキサン、および水を用いた場合は楕円体状PI微粒子が得られたが、クロロホルム、イソプロピルアルコール(IPA)やエチレングリコール(EG)を用いた場合、変形がほとんど進行しなかった。そのため、楕円体状微粒子を調製する上で分散媒の種類も影響を及ぼすことが明らかとなった。表2から、クロロホルムは、今回用いた他の溶媒に比べ比重が大きく($d: 1.48$)、IPAやEGは他の溶媒に比べ粘度が高いことがわかる。これらの溶媒では、球状PI微粒子の変形が起らなかったことから、分散媒の比重および粘度がPI微粒子の変形に影響を与える因子の一つになっていると考えられる。PIの比重は1.5程度であり、クロロホルムの比重に近い場合、他の分散媒中に比べてクロロホルム中ではPI微粒子が沈降しにくい状態といえる。そのため、クロロホルムを分散媒とした場合、攪拌子と容器との間に微粒子が入り込む確率が下がり変形が進まなかった、と考

表2 用いた有機溶媒の比重と粘度

solvent	density (g/l)	viscosity (cp)
acetonitrile	0.78	0.34
acetone	0.79	0.30
hexane	0.66	0.30
water	1.00	0.89
isopropyl alcohol	0.79	1.9
ethylene glycol	1.11	16.5

えられる。また、IPAやEGのように粘度が高い分散媒を用いた場合においても、媒体中での微粒子の動きが制限され、クロロホルムの場合と同様に攪拌子と容器との間に微粒子が入り込みにくくなり、変形できなかったと推察される。

種々の条件を検討した結果、run 1の場合に最も変形が大きく、長径が元の1.3倍程度、側面の厚さが0.6倍程度の楕円体状PI微粒子が得られた。なお、得られた楕円体状PI微粒子を150℃にて、2h熱処理を行っても楕円体状を保っていることがわかった。このことは、ヒトの生活環境においては形状変化なく十分に利用できることを示している。

3.2. 楕円体状PI微粒子の紫外線防御能の評価

変形前の球状PI微粒子および最適化条件によって得られた楕円体状PI微粒子の紫外可視透過率を測定した。サンプル①(流動パラフィン中にPI微粒子を分散)について、球状PI微粒子分散液の280nmにおける透過率は65%程度であった。一方、楕円体状PI微粒子分散液の透過率は40%程度であり、280-800nmの測定領域全体においては楕円体状PI微粒子の方が低い透過率であった(図3)。次に、サンプル②の透過率測定を行った(図4)。この系では400nmより長波長の領域では顕著な差は見られなかったが、紫外光領域の透過率は楕円体状PI微粒子の方が低い

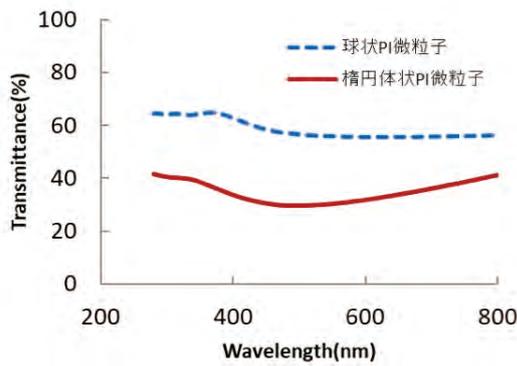


図3 サンプル①（流動パラフィン中に分散させたPI微粒子）の紫外可視透過率

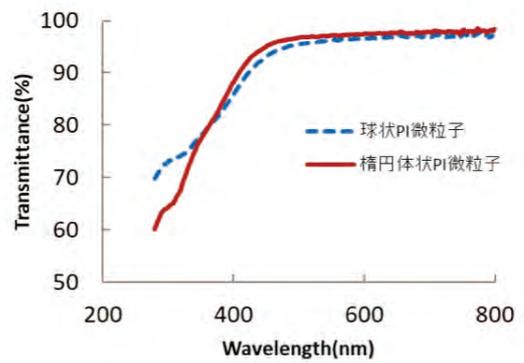


図4 サンプル②（アクリルポリマー中に分散させたPI微粒子）の紫外可視透過率

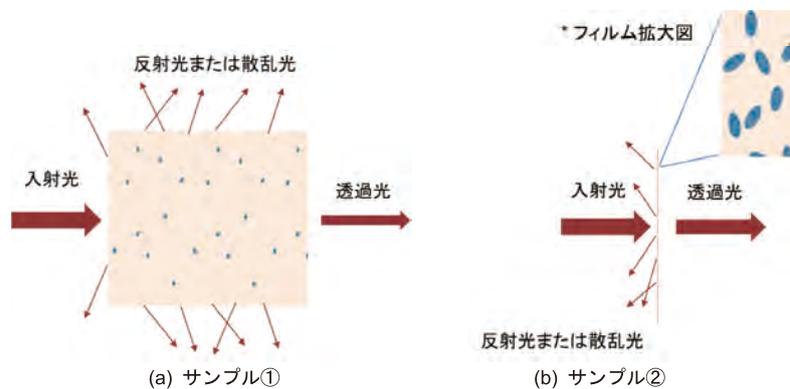


図5 測定試料の模式図

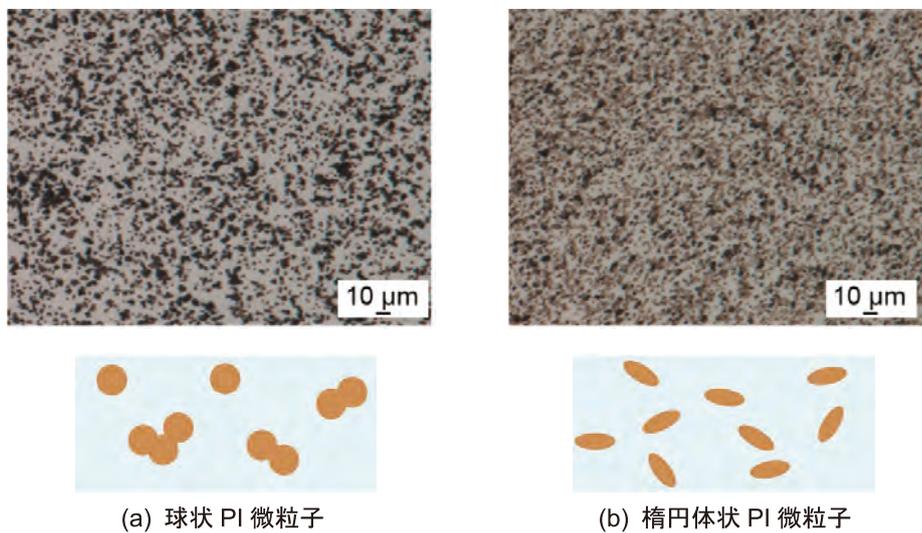


図6 サンプル②の光学顕微鏡像およびそれぞれの模式図

ことがわかった。

サンプル①と②の測定試料の模式図を示す(図5)。サンプル①では粒子が液体中で自由に動き、また、透過する粒子分散体の距離が長い(図5(a))。サンプル①と②では、微粒子の運動性と光路長が異なり、粒子の散乱パターンや反射散乱に関与する粒子数の違いが透過率スペクトルの差に

現れたと考えられる。

サンプル②について、測定試料をシート表面から観察した光学顕微鏡像を図6に示す。とくに、球状PI微粒子では粒子の凝集体が比較的多く観察された(図6(a))。

サンプル①および②の結果から、粒子が媒体に分散している状態では、楕円体状微粒子の方が球状微粒子よりも低

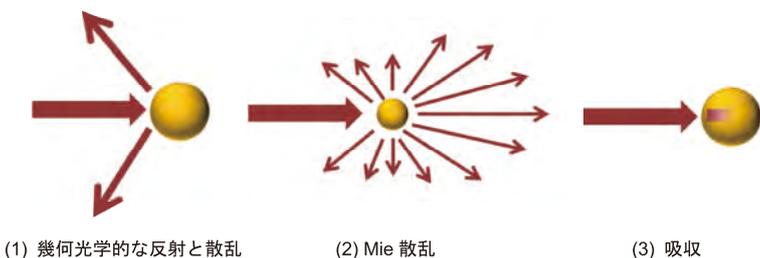


図7 光透過の阻害

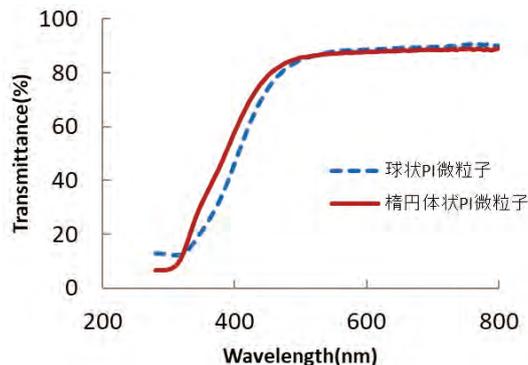


図8 サンプル③ (アクリルポリマーフィルム上に塗布されたPI微粒子)の紫外可視透過率

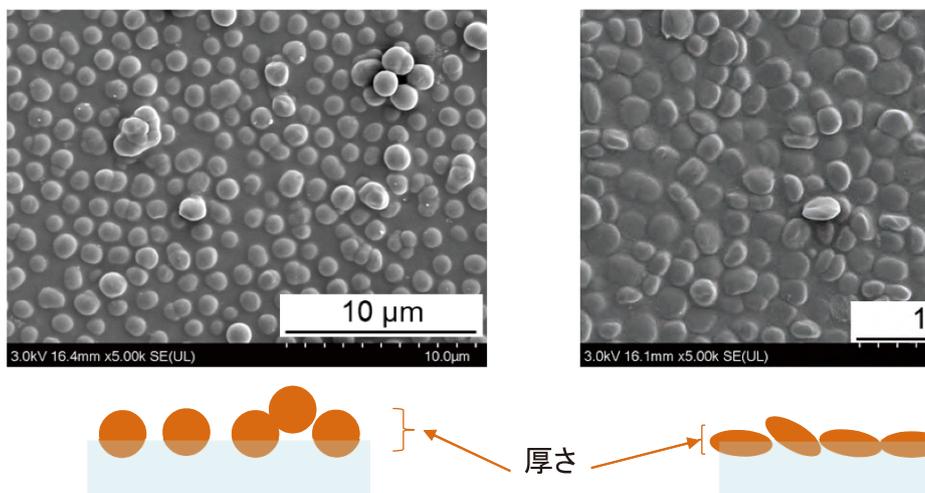


図9 サンプル③のSEM画像

い紫外線透過率となることが認められた。なお、微粒子分散状態では、PI微粒子は、(1)幾何光学的な反射と散乱、(2)Mie散乱、および(3)粒子(PI)の光吸収の3つの作用で光の透過を妨げると考えられる(図7)。(1)は粒子径が光の波長に比べ大きい場合に寄与が大きく、遮蔽効果は粒子の断面積に比例する。(2)は光の波長と同程度の粒子径を有する場合に寄与が大きく、前方散乱の量が多い。球状PI微粒子(図6(a))では凝集体が多く存在したが、凝集体は粒径が大きい粒子に相当し、そのため、凝集体は、透過率測定における(1)の寄与が大きくなり光の透過を妨げると考えられる。他方、凝集体の形成により、光路に粒子が全く存在しない部分が生じ、光が直線透過できる面積の比率が大きい構造体となっていることが光学顕微鏡像からも認められる。さらに、楕円体状PI微粒子では球状PI微粒子の場合よりも媒体中での分散が良く、光が直線透過できる面積の比率が小さいにもかかわらず、光学顕微鏡像から、楕円体状PI粒子が存在している領域においても完全に可視光を遮断できていない部分が存在することがわかる。これは1

次粒子で分散した状態では粒径が可視光の波長に近く、可視光の波長の光透過においては、凝集体と比べると(2)のMie散乱による前方散乱量の影響が大きいためと推察される。この影響により、楕円体状PI微粒子においては可視光領域の透過率は大きく減らなかつたと考えられる。一方、紫外光領域波長の光は可視光より波長が短く、(2)の寄与が小さくなり、紫外光が直線透過できる面積の大きさに応じた光透過性を示し、楕円体状PI微粒子の方がより紫外線透過率が低くなつたと推察される。

サンプル③のようにPI微粒子をポリマーフィルム上に広げた試料の透過率を測定すると、300-400nmでは球状PI微粒子の方が、また、280nm-300nmでは楕円体状PI微粒子の方が低い透過率であった(図8)。塗布後のPI微粒子の状態を確認したところ、球状微粒子の方が粒子間の隙間は多く存在したため、楕円体状粒子の方が塗布後の被覆面積は大きかつた(図9)。加えて、楕円体状PI微粒子はポリマーフィルム上にほぼ1層で粒子が積層し、そのほとんどがフィルムの平面方向に配列していることがわかつた。

この系については、先述の(1)~(3)の光透過を妨げる因子の中では、(1)は光透過の面積、(3)は光透過の面積とPI微粒子が形成する層の厚さがその作用の大きさを決定すると考えられる。(2)のMie散乱に関しては、球状と楕円体状PI微粒子では、微粒子の凝集が同程度であることから、形状による差は小さく、(2)の影響が大きくなる長波長領域で前方散乱を妨害する(3)の効果が高い方が透過率は低くなると考えられる。なお、300-400nmの領域では、塗布したPI微粒子が形成する層の厚さ(図5の厚さ)の影響が大きい球状微粒子において、透過率が低くなったと考察される。さらに、300nm以下の紫外線領域では、(1)が支配的となり、楕円体状微粒子の方が低い紫外線透過率になったと推察される。

以上、粒子形状が光吸収や光散乱などに与える影響について述べた。とくに、紫外線領域において楕円体状PI粒子の方が低い透過率となることがわかった。サンプル②は肌にオイル分散液を、サンプル③は肌にパウダーを塗った状態に近いと考えられ、本研究によって楕円体状PI微粒子の方が紫外線防御の効果が高い可能性が明らかになった。

4. 総括

従来、微粒子を楕円体状に変形させるためには、シート中に微粒子を分散、固定し、シートに圧力を印加後にシートを溶解除去し、楕円体状微粒子を回収する、といった煩雑な操作に加え、変形条件においては厳密な制御が必要であった。本研究を通じて、分散媒中でPI微粒子を攪拌するだけで、簡単に楕円体状PI微粒子が調製可能であることがわかった。とくに、攪拌条件を種々変化させることで、調製の際に影響の大きい因子を抽出することに成功した。今回の結果から、微粒子の変形は分散媒の剪断力によって起こるのではなく、微粒子が容器や攪拌子と物理的に接触し、変形することが推察された。得られた楕円体状PI微粒子は、150℃、2hの環境下でも形状を十分に維持することを確認した。また、紫外可視吸収測定において、光吸収や光散乱などの挙動が粒子形状によって異なることを明らかにした。

本研究で使用した球状および楕円体状PI微粒子は、高分子材料でありながら、ヒトの生活環境においては変形や溶融することなく容易に用いることができるため、材料としての混合もしくは保管時においても雰囲気温度を気にすることなく使用可能である。したがって、高耐熱性UV防御剤としての応用展開が期待できる材料であることが明らかになった。

謝辞

本研究の実施にあたり、助成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深く感謝いたします。また、本研究の遂行にあたり有益なご助言をいただきました、神戸大学大学院工学研究科の南秀人教授、鈴木登代子助教に御礼申し上げます。

本研究助成により得られた成果

・学会発表

「非球状ポリイミド微粒子の調製」 日本化学会 第101春季年会

「扁平なポリイミド微粒子の調製」 第70回高分子学会年次大会

「楕円体状ポリイミド微粒子」 第30回ポリマー材料フォーラム

「非球状ポリイミド微粒子を簡単に調製」 産業技術支援フェア in KANSAI 2021

・依頼講演

「ポリイミド微粒子の調製とその応用」 2021年度関西接着ワークショップ 第1回研究会

・論文等発表

「ポリイミド微粒子の調製とその表面修飾」コロイドおよび界面化学部会ニューズレター *C & I Commun.*, 45(3), 47-49 (2020).

「簡単な楕円体状ポリイミド微粒子の調製」 令和3年度大阪技術研テクノレポート

(引用文献)

- 1) Japan patent JP5780285B.
- 2) J.A.Champion, Y. K. Katare, S. Mitragotri. *PNAS*, 104, 11901-11904, (2007).
- 3) H. Zhang, W. Tuntanatewin, K. Ishikura, D. Sogabe, K. Sugawara, A. Tokui, A. Nakagawa, Y. Okamura. *ACS Applied Polymer Materials*, 2(8), 3355-3364, (2020).
- 4) W. Li, T. Suzuki, H. Minami, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 57, 9936-9940, (2018).
- 5) K. Asao. *J. Photopolym. Sci. Technol.*, 27, 181-185. (2014).
- 6) Japan patent JP3478977B.

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

東北大学大学院薬学研究科

中林 孝和

Recently, Raman microscopy has attracted much attention as a label-free technique for observing living cells. We have focused on intracellular water, an intracellular molecule that cannot be labeled, as a label-free detection by Raman microscopy. This study investigated water molecules around biomembrane interfaces using Raman microscopy. The states of water molecules around biomembranes are proposed to be important for membrane functions; however, the detailed nature of water around membranes is still unknown because of insufficient measurement techniques. In this study, we constructed a total internal reflection (TIR) Raman microscope that can selectively observe molecules around membrane interfaces. Only molecules near the interface can be monitored using evanescent light generated under a TIR condition. The microscope was constructed with an objective lens-type configuration using an inverted confocal microscope and a high NA objective lens, which enables the measurement of a living cell incubated in a glass-bottomed dish. The absence of spectral distortion associated with the TIR condition was confirmed by the fluorescence of the nanoparticle. The constructed microscope was applied to the observation of water on a self-assembled monolayer fabricated on a cover glass, and the C-H stretching bands of the monolayer were observed to be enhanced under the TIR condition. We then measured TIR Raman spectra of a cultured HeLa cell and the obtained results were discussed based on the previous report on the TIR spectra of water using a prism-type configuration.

1. 緒言

近年、ラマンイメージングを用いた細胞計測が広く行われている。分子の振動をラマンバンドとして直接観測するラマンイメージングは、細胞内にある分子やタンパク質を蛍光色素や蛍光タンパク質で染色することなく観測できる特徴を持つ。細胞内にある脂質やタンパク質、または細胞内に導入した分子の細胞内分布や細胞内での反応・代謝に関する情報をラベルフリーで得ることができる¹⁻³⁾。

我々は、ラマンイメージングによる細胞内ラベルフリー検出として、ラベル化できない細胞内分子、「細胞内の水分子」に着目した研究を進めている⁴⁻⁶⁾。水は最も重要な細胞内成分であるが、細胞内での水の理解は未だ十分ではなく、オルガネラ間での水の密度の差も不明であった。我々は、 3400cm^{-1} 付近にある水分子のブロードなO-H伸縮振動バンドのラマンイメージングから、細胞内の水の密度の定量が行えることを提案し、核の方が細胞質よりも水の濃度が高く、またO-H伸縮振動バンドの形状も核、細胞質、細胞周囲の水で異なることも示した。水分子のO-H伸縮振動バンドの形状は、水分子間の水素結合様式を反映しており、我々の結果は、細胞内外で水素結合様式が異なる可能性を示唆している。また、細胞周期に伴う細胞内の水の

密度変化、水分子のO-H伸縮振動ラマンバンドの形状解析から細胞内温度の測定ができることも提案した。これらの研究を通して、「細胞内の水」が細胞を理解する新たなパラメータとなり得ることを示すことができた。

本研究は、ラマン顕微鏡を用いたO-H伸縮振動バンドの測定を界面水⁷⁾に応用し、細胞膜や皮膚界面にある水分子の選択的計測および水素結合様式の解明を目的とする。ラマン分光法の皮膚計測の応用は古くから行われており、水のラマンバンドから皮膚の水分量なども求められている。しかし、深さ分解能は $2\mu\text{m}$ 程度が限界であり、界面水と呼ばれる皮膚表面や細胞膜の近傍の水の選択的測定は行うことができなかった。脂質膜近傍の水分子のO-H伸縮振動バンドについては、和周波発生法(Sum frequency generation, SFG)によって測定されているが⁸⁾、SFGでは高強度のパルスレーザーを用いるために、細胞膜などの生体膜に適用することが難しい。生体膜界面の水の振動バンドを観測する適切な分光法がないのが現状である。

そこで本研究では、生細胞や皮膚組織を対象とした全反射ラマン顕微鏡を製作し、膜界面の水測定を行うことを目指す。全反射ラマン顕微鏡は、エバネッセント波と呼ばれる微弱光によって、表面近傍のみのラマン散乱光を測定することができる。そのために、試料の損傷を最小限に抑え、膜近傍の約 100nm の範囲の水分子や生体分子の挙動を選択的に議論できる^{9,10)}。全反射ラマン顕微鏡は、染色を行わずに分子情報を得ることができ、主成分分析などの統計解析手法と組み合わせることで生体膜界面の分子構造を知る有用な手法になることができる。本研究を通して、全反射ラマン顕微鏡が皮膚や細胞膜近傍の構造を観測する適切な手法であり、コスメトロジーを発展させる汎用な手法と



Selective Observation of Water near Biological Membranes using Attenuated Total Reflection Raman Microscopy

Takakazu Nakabayashi

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University

なり得ることを提案したい。

2. 方法

2.1. 全反射

全反射とは、屈折率が高い媒質から低い媒質へと光を入射する際に、入射角が臨界角を超えると光が屈折することなくすべて反射される現象を指す。この全反射過程において、界面からはエバネッセント波と呼ばれる光が染み出し、界面近傍の物質と相互作用する。界面からの深さ z におけるエバネッセント波の強度 $I(z)$ は以下の式で与えられる。

$$I(z) = I_0 \exp\left(-\frac{z}{d}\right)$$

d はエバネッセント波の強度が入射光(I_0)に対して $1/e$ となる深さであり、しみ出し深さといわれる。 d の値は入射光の波長を λ 、屈折率が高い媒質の屈折率を n_1 、屈折率が低い媒質の屈折率を n_2 、入射角を θ として、次式で求められる。

$$d = \frac{\lambda}{2\pi} \cdot \frac{1}{\sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2}}$$

図1に全反射としみ出し深さの模式図を示す。このエバネッセント波を励起光としてラマンスペクトルを得る手法を全反射ラマン分光法と呼ぶ。励起光を可視光の領域とすると、エバネッセント波の染み出し深さは約100 nmとなり、100 nmの深さの範囲のみのラマン散乱光が得られる。

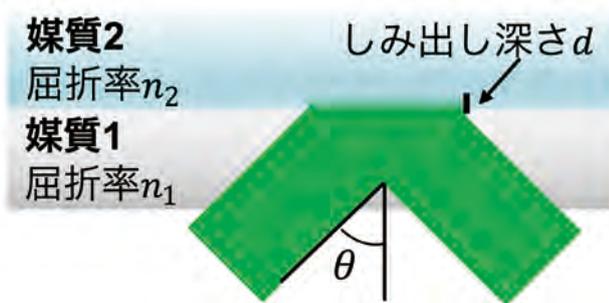


図1 全反射の模式図

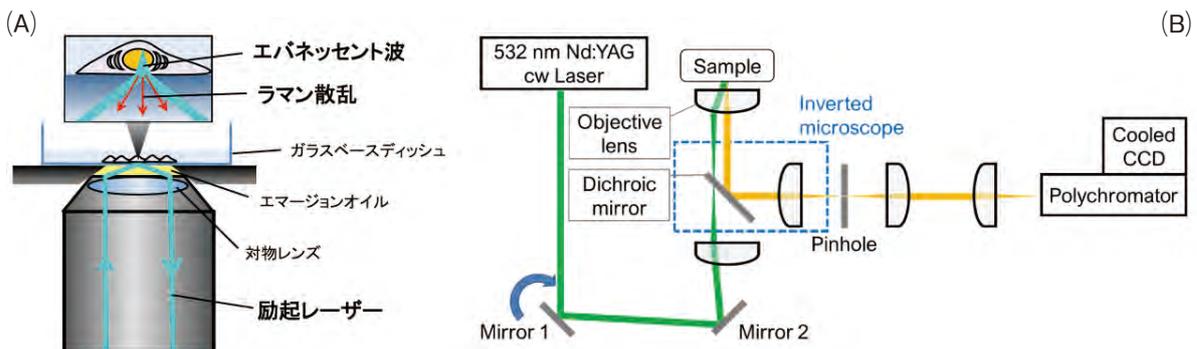


図2 全反射ラマン顕微鏡の(A) 試料部分、(B) 光学系の概略図

共焦点光学系を用いて励起光源を回折限界まで絞ったときの照射領域は軸長1-2 μm 程度の円筒となるため、全反射照明では回折限界を超えた深さで分子を励起できる。

全反射照明とするには、基板と試料の間に相応の屈折率の差が必要である。顕微鏡においては、屈折率の高いプリズムを利用して光学系を組むプリズム型と、開口数の大きな対物レンズの辺縁部から励起光を導入し、基板と試料の境界面で全反射を起こす対物レンズ型がある。プリズム型全反射顕微鏡は屈折率の高いプリズムを用い、比較的安価に構築できる。しかし、細胞の測定においては細胞をプリズム上で培養する必要があるため、汎用性は低い。そこで本研究では対物レンズ型を用いた。対物レンズ型は、開口数の高い対物レンズが必要であるが、試料操作が容易でありガラスベースディッシュ上で培養した生細胞の測定を行うことができる。対物レンズ型の試料部分を図2Aに示す。

2.2. 全反射ラマン顕微鏡

製作した装置の概略図を図2Bに示す。測定配置は通常の倒立顕微鏡と同一であり、ディッシュ上の皮膚組織、培養細胞など、様々な生体試料のラマンイメージングを行うことができる。励起光には既存の532 nmのcw Nd:YAGレーザーを用い、倒立顕微鏡(OLYMPUS)上で試料が励起される構成とする。試料からのラマン散乱光は、ポリクロメーター(ACTON)によってエネルギー分散され、電子冷却CCD(ANDOR)によって検出される。顕微鏡にXY自動ステージ(Physik Instrumente)を組み込み、サンプル側を二次元走査することでイメージング測定も行えるようにした。ガラスベースディッシュ上に水溶液や高分子を入れ、またはディッシュ上に細胞を培養させ、倒立型の配置でラマン測定を行った。対物レンズには、100倍、NA 1.49の油浸対物レンズ(UAPON 100XOTIRF, OLYMPUS)を用い、入射光に角度をつけて全反射条件での測定を行った。

図2Bにおいて、Mirror 1の角度をマイクロメーターによって微調整できるようにし、試料に照射される励起光の角度を変化させられるようにした。この角度を変化させ、

対物レンズに励起光が垂直に入射すると広視野顕微鏡になり、大きく角度をつけることで全反射条件になる。また広視野顕微鏡の条件でMirror 2直後のレンズを外すと共焦点顕微鏡となる。全反射ラマン顕微鏡では、励起レーザー光の対物レンズ内の光路を精密に制御しなければならず、また広視野や共焦点での測定も行える必要がある。製作したシステムはそれらの要請をすべて満たし、全反射と広視野のスペクトルの比較などを容易に行える。

3. 結果

3.1. 励起光の入射角の決定

蛍光色素である Rhodamine 6G 水溶液をガラスベースディスプレイに加え、Mirror 1 のマイクロメーターの移動メモリと励起光の入射角との関係を蛍光から検討した(図3)。マイクロメーターのメモリと入射角はほぼ直線関係となることがわかる。細胞の屈折率を 1.38 とすると、ガラスと細胞の間の臨界角は 65.2° となる。そのため、細胞を観察するとき、マイクロメーターを 105 以上動かすと全反射条件になる。

3.2. 入射角の変化によるスペクトル歪みの確認

全反射ラマンスペクトルの測定において、比較対象とする広視野や共焦点の測定とは励起光の入射角が大きく異なるため、光軸の違いがスペクトル形の変化として現れる可能性がある。本研究では水の O-H 伸縮振動バンドを検討することから、O-H 伸縮振動バンドと同一の波長域に蛍光を示す蛍光性ナノ粒子 (Qdot 655) を用いて、光の照射方法の違いによるスペクトル形の変化を検討した。Qdot 655 は 655 nm 付近に蛍光の極大波長を持ち、蛍光スペクトルの波長範囲 (620-680nm) は 532nm の光を励起光とした場合の O-H 伸縮振動バンドの範囲に相当する。

Qdot 655 を Milli-Q に溶解させ、ディスプレイ上に導入し、蛍光スペクトルの入射角依存性を測定した。ガラス界面にある粒子からの蛍光がバルク水溶液中の蛍光と異なる可能性を考慮し、共焦点系と広視野照明、複数条件の全反射照明に加え、全反射直前の条件での測定も行った。図4に共焦点系と広視野照明、広視野照明でミラーを動かしたときの Qdot 655 の蛍光スペクトルを示す。共焦点、広視野照明、広視野照明でミラーを動かした場合のいずれの蛍光スペクトルもその形状が一致した。光学系を変えてもスペクトル形状が変化しないことがわかった。全反射と共焦点においてスペクトル形状が異なった場合、入射角の違いによるスペクトル形の変化ではなく、全反射による界面付近の選択測定による効果であると言える。

3.3. 高分子膜の測定

実験では初めに高分子薄膜を用いて全反射条件の最適化

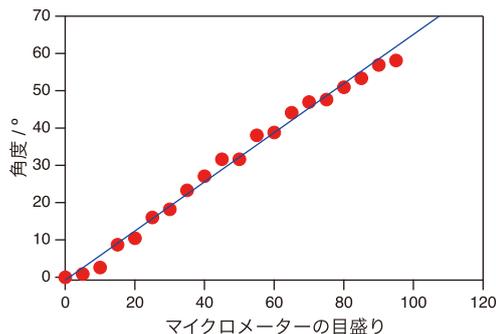


図3 マイクロメーターの目盛りと入射角度との関係(赤)と回帰直線(青)

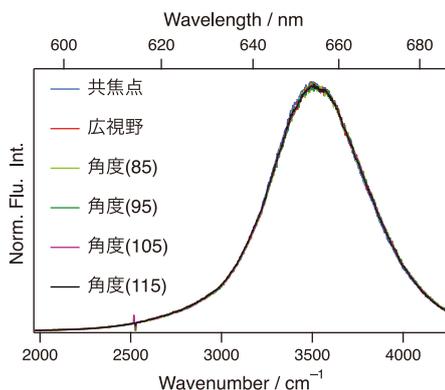


図4 共焦点系と広視野照明、広視野照明からミラーをマイクロメーターのメモリで 85、95、105、115 動かしたときの Qdot 655 の蛍光スペクトル。横軸は上が波長、下がラマンスペクトルとした時の波数表示としている。

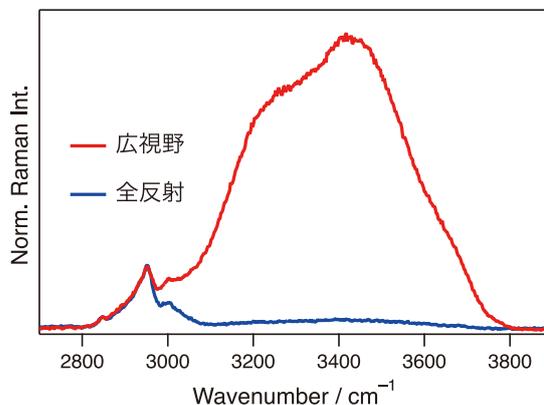


図5 PMMA-水系のラマンスペクトル
赤：広視野、青：全反射条件

などを行った。PMMA (Polymethyl methacrylate) の高分子薄膜をカバーガラス上に作成・その上に水滴を載せ、広視野条件と全反射条件でのラマンスペクトルの比較を行った(図5)。3400cm⁻¹を中心とするブロードな水のO-H伸縮振動とPMMA膜に由来する2900cm⁻¹のC-H伸縮振動バンドが観測されている。これらの2つのバンドの強度比が角度によって異なり、全反射条件では水のラマンバンドが大きく減少し、薄膜のC-H伸縮振動バンドが選択的

に観測された。O-H伸縮振動バンドに対するC-H伸縮振動バンドの強度は、全反射条件では広視野条件の約1/40となり、全反射条件ではPMMA膜を選択的に観測できることがわかった。PMMA膜と水との界面で全反射が生じ、屈折率の値から界面から約80nmまでを観測していると考えられる。

3.4. 自己組織化単分子膜の測定

次に水の全反射ラマンスペクトルの評価として、自己組織化単分子膜をカバーガラス上に作成し、角度依存性の測定を行った。自己組織化単分子膜は、カバーガラス上にオクタデシルトリメトキシシランを用いて単分子膜を作成した。

観測しているラマンスペクトルには、油浸対物レンズに用いるオイル (immersion oil) や基板となるガラスからの微弱発光成分を含み、これらの寄与が入射角度によって異なり、スペクトルの角度依存性の解析を妨害する。特にimmersion oilと単分子膜のC-H伸縮振動バンドが重なっている。そこでこれらの寄与を適切に取り除くために、内部標準としてベンゾニトリルをimmersion oilに加えた。ベンゾニトリルのニトリル基の伸縮振動バンドは、細胞のラマンスペクトルではバンドが現れない約 2300cm^{-1} にピークを示す。そのために容易にニトリル基の伸縮振動バンドを検出することができ、ニトリル基のバンドが消えるようにベンゾニトリルを含んだimmersion oilのラマンスペクトルをバックグラウンドとして引くことで単分子膜のラマンスペクトルを得た。

自己組織化単分子膜/水 (ハンクス平衡塩溶液 (HBSS))

のラマンスペクトルの励起光角度依存性を図6に示す。プリズム型を用いた自己組織化単分子膜上の水的全反射ラマンスペクトルは報告されており、本システムで得られた結果との比較を行った。励起光の角度が増加するにつれて、O-H伸縮振動バンドに対するC-H伸縮振動バンドの強度が増加し、バルクに存在する水由来の情報が減少し、界面由来の情報が相対的に増加している。Mirror 1のマイクロメーターが80のときのラマンスペクトルを基準とし、差スペクトルとして全反射ラマンスペクトルを評価すると、O-H伸縮振動バンドの一部にあたる 3500cm^{-1} 付近が僅かに減少した形で差スペクトルが得られた。プリズム型で報告されている結果¹⁰⁾では、統計解析の手法の一つである主成分分析を行うことで第2主成分にC-H伸縮振動バンドの変化と同じ方向に 3600cm^{-1} 付近に比較的鋭いピークが現れていた。今回の結果では、C-H伸縮振動バンドと逆の方向に 3500cm^{-1} 付近の変化が現れており、報告されたスペクトルとは同一の変化ではなかった。この理由は、考察項で検討する。

3.5. HeLa細胞の測定

人のがん細胞由来の細胞株であるHeLa細胞を用いて細胞-水界面の全反射ラマンスペクトルを測定した。ガラスベースディッシュ上にHeLa細胞を培養し、蛍光を示さないHBSSに培地を置換して全反射ラマンスペクトルを測定した。得られた代表的なラマンスペクトルを図7に示す。O-H伸縮振動バンドにあたる $3050\text{--}3800\text{cm}^{-1}$ の積分強度で規格化し、全反射照明と共焦点系の差をとるとC-H伸縮振動バンドに負のピークが現れた。しかしこの傾向の再

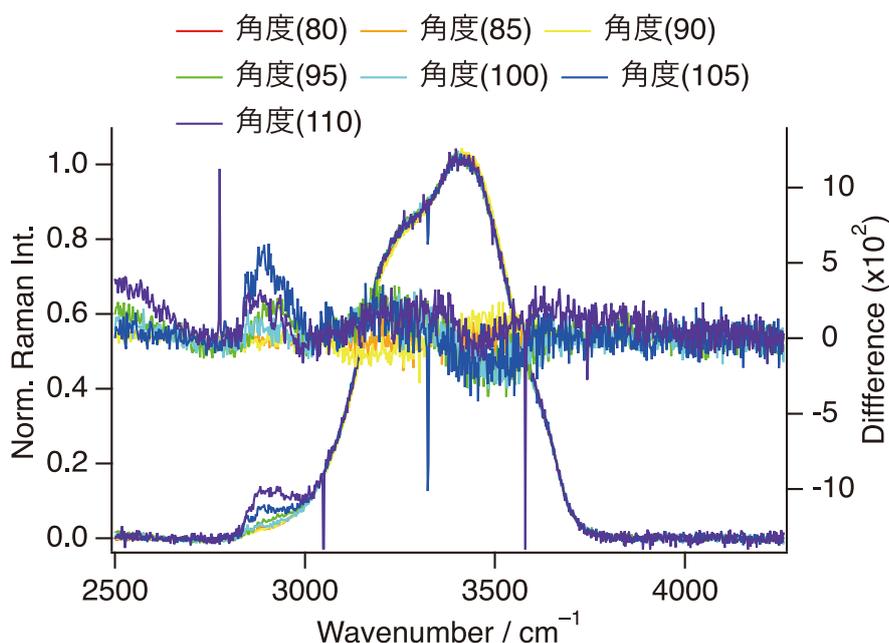


図6 自己組織化単分子膜のラマンスペクトルの入射角依存性

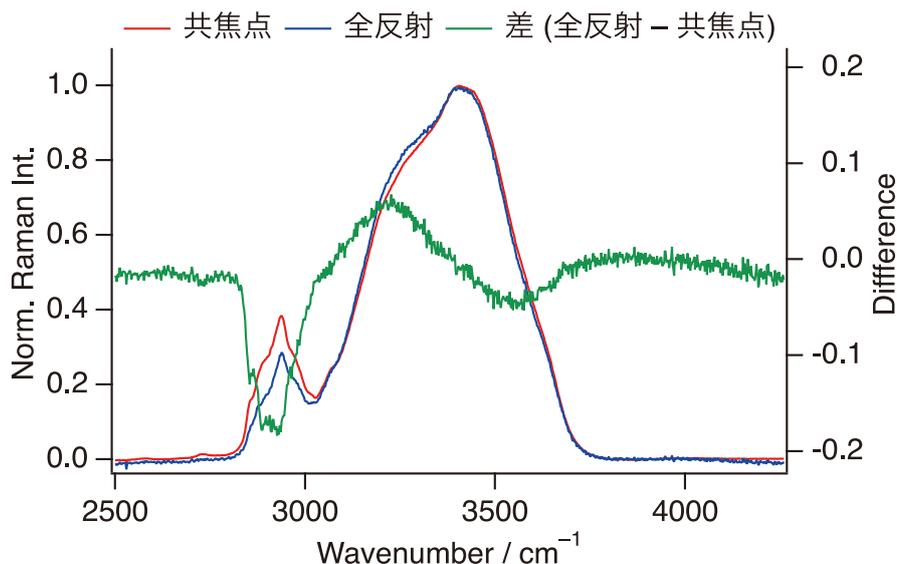


図7 HeLa細胞のラマンスペクトル
(赤) 共焦点、(青) 全反射、(緑) 差スペクトル

現性は低く、測定した全ての細胞で現れてはいない。一方、O-H伸縮振動バンド領域の差スペクトルの形状に着目すると、高波数側で強度低下、低波数側で強度上昇が観測され、自己組織化単分子膜と似た差スペクトルが得られた。

4. 考 察

自己組織化単分子膜の界面測定において、励起光の角度増加に伴いO-H伸縮振動バンドに対するC-H伸縮振動バンド強度の上昇が明瞭に観測された。C-H伸縮振動バンド強度の上昇は、Mirror 1のマイクロメーターを100から105に動かしたときに大きく増加している。これは100から105の間に入射角が臨界角を超えたために、エバネッセント波で励起されたラマン散乱光だけが観測されたためであると考えている。O-H伸縮振動バンド領域では、マイクロメーターを80まで動かしたときのスペクトルを基準とし、それぞれのスペクトルとの差をとると 3500cm^{-1} 付近に負のピークが見られた。得られた結果は、上述のようにOtaによって報告されたプリズム型の全反射ラマンスペクトルと形状が異なっていた¹⁰⁾。Otaは主成分分析を用いて全反射ラマンスペクトルを解析し、主成分の第2成分では、C-H伸縮バンドと同じ変化方向に 3600cm^{-1} 付近の鋭いピークが現れている。今回得られた図7では、C-H伸縮バンドとO-H伸縮振動バンドの変化の正負は逆であった。再現しない理由として主成分分析と差スペクトルによる解析の違いを上げることができる。Otaは主成分分析で得られた結果について、どの程度の厚さの分子を観測しているのか見積もっており、オクタデシルトリメトキシシランの鎖長に対応する数ナノメートルの範囲の分子種を第2

成分で観測していると考察している。C-H伸縮バンドと同じ変化方向に現れた 3600cm^{-1} 付近の鋭いピークにシラノール基の寄与があるとし、自己組織化単分子膜に生じたナノサイズの間隙に入った水分子の寄与も大きいとしている。今回のような差スペクトルの場合、数十ナノメートルの範囲の水分子を観測しており、異なる状態の水分子を観測しているために、Otaの結果を再現できなかったと考えられる。また、自己組織化単分子膜の状態もOtaとは一致していない可能性もある。

プリズム型は変化させる角度範囲が広く、様々な角度での測定が容易に行えるのに対し、対物レンズ型は角度の変化範囲が狭く、主成分分析が行えるほどの角度依存性を測定することが難しい。しかし、界面のみの情報を得るためには主成分分析をはじめとする統計解析手法が必要であると考えられ、今後の検討課題である。

構築した全反射ラマン顕微鏡でHeLa細胞を測定した結果、共焦点系で測定した場合に比べて低波数側の強度上昇が観測された。水のO-H伸縮振動バンドは他の振動バンドに比べて非常にブロードであり、水の多様な水素結合様式を反映している。今後、細胞培養を行うディッシュの基板依存性などの詳細を検討し、得られたスペクトルが何に基づいているのかを明らかにする。

5. 総 括

全反射ラマン顕微鏡の製作に成功し、装置の特性評価、自己組織化単分子膜、HeLa細胞の全反射ラマンスペクトルの測定を行った。界面近傍の分子観測には成功しているが、十分には膜界面の水の状態を観測しきれていないと考えている。考察項で記したように、統計解析の手法を組み

合わせ、生体膜界面の水を捉える研究を続けていきたい。

(引用文献)

- 1) C. Krafft, M. Schmitt, I. W. Schie, D. Cialla-May, C. Matthäus, T. Bocklitz, J. Popp, Label-Free Molecular Imaging of Biological Cells and Tissues by Linear and Nonlinear Raman Spectroscopic Approaches. *Angew. Chem. Int. Ed.* **56**, 4392-4430 (2017).
- 2) K. Aljakouch, T. Lehtonen, H. K. Yosef, M. K. Hammoud, W. Alsaïdi, C. Kötting, C. Mügge, R. Kourist, S. F. El-Mashtoly, K. Gerwert, Raman Microspectroscopic Evidence for the Metabolism of a Tyrosine Kinase Inhibitor, Neratinib, in Cancer Cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**, 7250-7254 (2018).
- 3) H. Takahashi, A. Yanamisawa, S. Kajimoto, T. Nakabayashi, Observation of the changes in the chemical composition of lipid droplets using Raman microscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **22**, 21646-21650 (2020).
- 4) M. Takeuchi, S. Kajimoto, T. Nakabayashi, Experimental Evaluation of Density of Water in a Cell by Raman Microscopy. *J. Phys. Chem. Lett.* **8**, 5241-5245 (2017).
- 5) T. Sugimura, S. Kajimoto, T. Nakabayashi, Label-free imaging of intracellular temperature by using the O-H stretching Raman band of water. *Angew. Chem. Int. Ed.* **59**, 7755-7760 (2020).
- 6) D. Shibata, S. Kajimoto, T. Nakabayashi, Label-free tracking of intracellular molecular crowding with cell-cycle progression using Raman microscopy. *Chem. Phys. Lett.* **779**, 138843 (2021).
- 7) E. Yamamoto, T. Akimoto, M. Yasui, K. Yasuoka, Origin of subdiffusion of water molecules on cell membrane surfaces. *Sci. Rep.* **4**, 4720 (2014).
- 8) J. D. Cyran, E. H. G. Backus, Y. Nagata, M. Bonn, Structure from Dynamics: Vibrational Dynamics of Interfacial Water as a Probe of Aqueous Heterogeneity. *J. Phys. Chem. B* **122**, 3667-3679 (2018).
- 9) F. Ishizaki, M. Kim, Near-Infrared Attenuated Total Reflection Raman Spectroscopy for Polymer Surface Observation. *Jpn. J. Appl. Phys.* **47**, 1621-1627 (2008).
- 10) C. Ota, Investigation of the Structure of Water at Hydrophobic and Hydrophilic Interfaces by Angle-Resolved TIR Raman Spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **17**, 26435-26442 (2015).

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

国立研究開発法人産業技術総合研究所ナノ材料研究部門

中村 真紀

Transdermal delivery system of cytokines by calcium phosphate (CaP) nanoparticles would be useful in the cosmetic and medical fields. In this study, we aimed to fabricate CaP nanoparticles containing a clinically approved cytokine, basic fibroblast growth factor (FGF-2). First, we used cytochrome C as a model basic protein, which has similar characteristics (isoelectric point and molecular weight) to FGF-2. Negatively charged heparin was co-immobilized within CaP nanoparticles as a dispersant. The CaP nanoparticles immobilizing both cytochrome C and heparin were fabricated from a reaction solution containing calcium ions, phosphate ions, carbonate ions, heparin, and cytochrome C. The immobilization efficiencies of cytochrome C in the CaP nanoparticles with heparin were about three times higher than those in the CaP nanoparticles without heparin, indicating that heparin improved immobilization efficiencies of cytochrome C within CaP nanoparticles. This might be due to the interaction between negatively charged heparin and basic protein, cytochrome C. The role of heparin as a dispersant was also confirmed: the cytochrome C-CaP nanoparticles with heparin were dispersed in water, whereas those without heparin did not. Next, we fabricated CaP nanoparticles immobilizing both FGF-2 and heparin in the same manner. The resulting nanoparticles slowly released FGF-2 in a culture medium for at least two days. These results indicate the potential of the resulting nanoparticles as cosmetic and medical materials, which are capable of releasing FGF-2.

1. 緒言

皮膚内へ有効成分を浸透させる経皮薬物送達システム(DDS)は、低侵襲であることから、美容ならびに医療の分野で注目されている。線維芽細胞増殖因子(FGF)等のサイトカイン(細胞から分泌され、細胞間の情報伝達等に関与するタンパク質)は、細胞増殖促進作用等を有することから、化粧品や医薬品の成分としても有用である。しかし、親水性のサイトカインの場合、細胞が密に並び強固なバリア機能を持つ皮膚表面の疎水性の角層を透過するのは容易ではない。皮膚を透過することのできるナノ粒子等のキャリア(運搬体)にサイトカインを複合化できれば、サイトカインを真皮層まで送りこむことができると期待される。

リン酸カルシウムは、歯や骨の主要無機成分であり、ファンデーション等のコスメトロジー素材としても使用されている。優れた生体親和性と生体吸収性(例外もあり)を示し、汎用的な無機塩と水のみで合成できることから、安価で安全性に優れるDDS用のキャリアとして注目されている。著者らはこれまで、リン酸カルシウムをキャリアとするDDSについて研究を進め、様々な機能性物質(DNA、磁性酸化鉄ナノ粒子、銀ナノ粒子等)を複合化したリン酸カルシウムナノ粒子の液相合成技術を開発し、得られたナ

ノ粒子のDDS応用の可能性について検討してきた^{1,2)}。

本研究では、サイトカインを真皮層まで送りこむことのできる経皮DDS構築に向けて、リン酸カルシウムとサイトカインの複合ナノ粒子の合成を試みた。著者らのリン酸カルシウムナノ粒子合成技術を発展させ、粒子構造や表面特性を制御することで、DDSに適した分散性ナノ粒子の設計を目指した。サイトカインとしては、褥瘡(床ずれ)・皮膚潰瘍治療剤等として臨床応用されているFGF-2を選択した。また、粒子の分散性向上を期待して、負電荷を有し、血液凝固阻止剤として臨床応用されているヘパリンの共担持を試みた³⁾。まず、FGF-2のモデルタンパク質としてシトクロムc(FGF-2と類似した等電点・分子量を有し、安価で取り扱いや分析が容易)を用いた予備的な条件検討を行い、続いてFGF-2を用いた検討を行った。さらに、得られたナノ粒子からのFGF-2放出挙動について、予備的な評価を行った。

2. 方法

2.1. シトクロムc担持リン酸カルシウムナノ粒子の合成

塩化カルシウム溶液(500mM)、リン酸水素二カリウム溶液(500mM)、生理食塩水(0.9w/v%)は、無菌性・エンドトキシンフリーといった安全性の担保されている医療用注射液を用いた。炭酸ナトリウム、ヘパリンナトリウムは一般用試薬を用い、それぞれ、超純水、生理食塩水に溶解させた溶液を用いた(炭酸ナトリウム溶液:500mM、ヘパリンナトリウム溶液:5mg/mL)。まず、塩化カルシウム溶液、ヘパリンナトリウム溶液、生理食塩水を混合したA液(カルシウムイオン濃度:80mM、ヘパリン濃度:0、



Transdermal delivery system of cytokines by calcium phosphate nanoparticles

Maki Nakamura

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

1.0、2.0、2.5、3.0mg/mL)、ならびに、リン酸二カリウム溶液、炭酸ナトリウム溶液、生理食塩水を混合したB液(リン酸イオン濃度:80mM、炭酸イオン濃度:80mM)を調製した。また、シトクロムcを生理食塩水に溶解させた溶液をC液とした(シトクロムc濃度:2mg/mL)。15mLチューブに、B液1mL、C液1mL、A液2mLの順に加え、1分間ボルテックスで攪拌した後、振とう機(25℃、150rpm)で0、1、3、6、24、48、75時間反応させた。振とう後(振とう時間0時間では振とうせずに攪拌後すぐ)、遠心操作により析出物を回収した。また、遠心後の上澄みを希釈し(上澄み希釈液)、シトクロムcの担持量算出に用いた(詳細は2.3.)。

2.2. FGF-2 担持リン酸カルシウムナノ粒子の合成

A液ならびにB液は、2.1.と同様に調製した。FGF-2を遺伝子組み換えしたトラフェルミン製剤(褥瘡・皮膚潰瘍治療剤)を生理食塩水に溶解させた溶液をC液とした(FGF-2濃度:0、10、20、50、100 μ g/mL)。反応の際にタンパク質低吸着性の15mLチューブを用いた以外は、2.1.と同様の手順で反応を行い、析出物を回収した。

2.3. 構造・組成評価

得られた試料をシリコン基板上で乾燥させ、走査電子顕微鏡(SEM)観察ならびにエネルギー分散型X線分光法(EDX)による元素分析を行った。SEM観察においては、試料に金蒸着を行った。シトクロムc担持粒子では、紫外可視分光光度計により上澄み希釈液の吸光度(409nm)を測定し、検量線を用いて上澄みに含まれるシトクロムc量を算出、反応液中のシトクロムc量(2mg)との差分を担持量として算出した。担持率は、(粒子に担持されたシトクロムc量)/(反応液中のシトクロムc量:2mg) \times 100(%)として算出した。また、得られた試料を超純水に懸濁させ、粒子径分布およびゼータ電位を、動的分散乱法(DLS)および電気泳動光散乱法(ELS)により調べた。

2.4. FGF-2の放出挙動評価

2.2.で得られた試料を細胞培養用の培地に懸濁し、懸濁後すぐ(0時間)ならびに37℃で24、48時間静置後に培地中に放出されたFGF-2の濃度をELISA(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)で測定した。

3. 結果

3.1. シトクロムc担持リン酸カルシウムナノ粒子

3.1.1. ヘパリンの有無の影響

ヘパリンの有無がシトクロムcの担持率や粒子分散性に与える影響を検討するため、A液のヘパリン濃度を2.5mg/mL(Hep(+))あるいは0mg/mL(Hep(-))として試

料を得た。振とう時間は0時間あるいは24時間とした。

振とう時間0時間では、ヘパリンの有無にかかわらず、一次粒子径50nm程度の球形に近い形状のナノ粒子が得られた(図1上)。EDXスペクトルでは、いずれの試料にもカルシウム(Ca)、リン(P)、酸素(O)の大きなピークが検出され、ヘパリンを添加して得られた試料では、ヘパリン特有の元素である硫黄(S)の小さなピークも検出された(図2)。これにより、ヘパリンがこれらの粒子中に担持されたことを確認できた。炭素(C)の小さなピークの一部は、担持されたヘパリンやシトクロムcに由来するものと考えられる。シトクロムc担持率は、ヘパリンを添加して得られた試料で37%、添加せずに得られた試料で13%と、ヘパリン添加により大きく増加した(図3)。負電荷を有するヘパリンと、塩基性タンパク質であるシトクロムcの静電的相互作用により、シトクロムcがヘパリンと共に粒子に

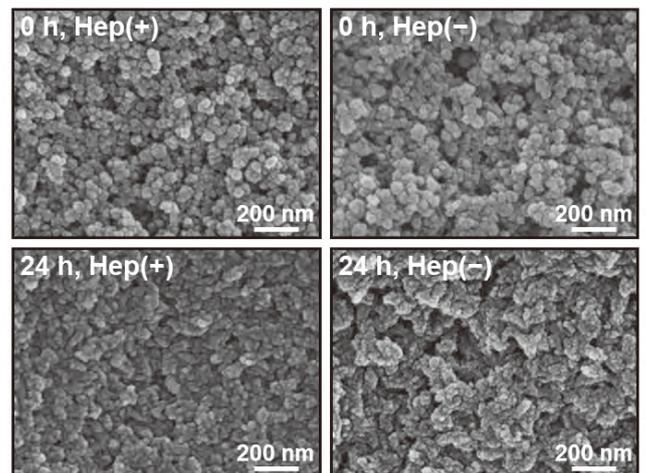


図1 得られた試料のSEM像

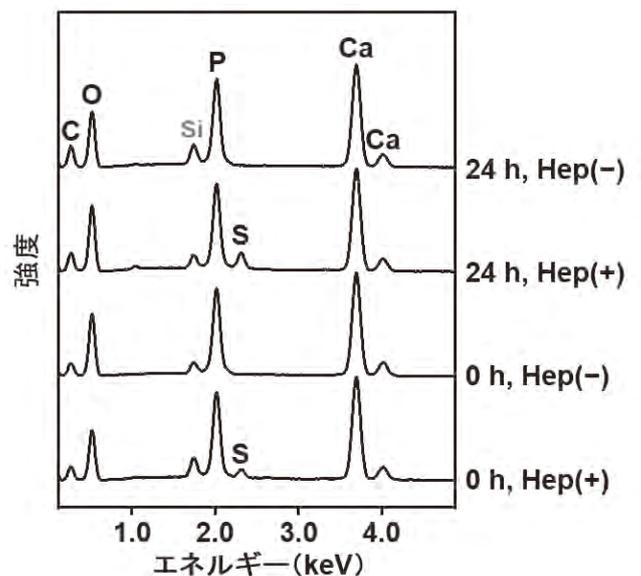


図2 得られた試料のEDXスペクトル(シリコン(Si)は基板由来)

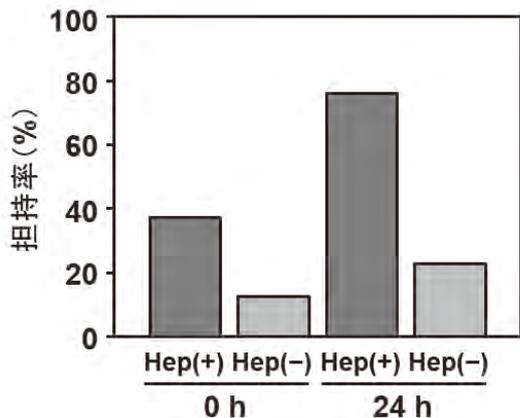


図3 得られた試料のシトクロムc 担持率

表1 得られた試料の平均粒子径およびゼータ電位

振とう時間	ヘパリン濃度	平均粒子径	ゼータ電位
0 h	2.5 mg/mL	143 nm	-15 mV
0 h	0 mg/mL	-	+6 mV
24 h	2.5 mg/mL	162 nm	-22 mV
24 h	0 mg/mL	-	+6 mV

担持されやすい状態となり、より多くのシトクロムcが担持されたと考えられた。DLS測定によると、ヘパリンを添加して得られた試料の平均粒子径は140nm程度であったが、添加せずに得られた試料は水中で沈降しやすく、信頼できる粒子径は得られなかった(表1)。また、ヘパリンを添加して得られた試料のゼータ電位は-15mVであり、添加せずに得られた試料の+6mVよりも絶対値が大きくなった(表1)。ヘパリンを添加して得られた試料では、粒子間の静電的反発が粒子の分散性に寄与したと考えられた。

振とう時間24時間では、ヘパリンの有無にかかわらず不定形の粒子が得られた(図1下)。EDXスペクトルでは、振とう時間0時間と同様に、カルシウム(Ca)、リン(P)、酸素(O)の大きなピークが検出され、ヘパリンを添加して得られた試料では硫黄(S)の小さなピークも検出された(図2)。ヘパリンを添加して得られた試料におけるS/Ca元素比(EDXピークにより算出)は、振とう時間0時間(S/Ca=0.068)よりも振とう時間24時間(S/Ca=0.116)で大きくなり、より多くのヘパリンが担持されたと考えられた。シトクロムc担持率は、ヘパリンを添加して得られた試料で76%、添加せずに得られた試料で23%と、ヘパリン添加により大きく増加し、さらに振とう時間0時間よりも増加した(図3)。DLS測定によると、ヘパリンを添加して得られた試料の平均粒子径は160nm程度であったが、添加せずに得られた試料は水中で沈降しやすく、信頼できる粒子径は得られなかった(表1)。ヘパリンを添加して得られた試料のゼータ電位は-22mVであり、添加せずに得られ

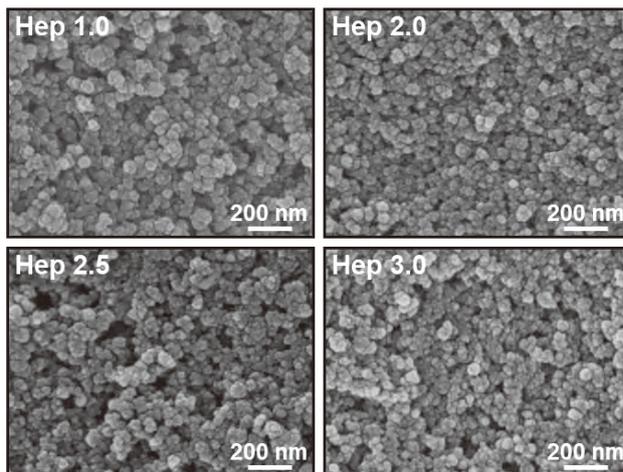


図4 ヘパリン濃度を変化させて得られた試料のSEM像

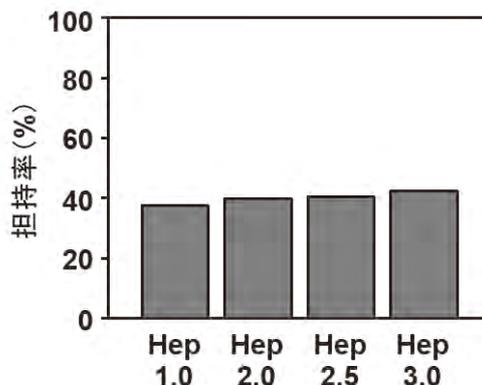


図5 ヘパリン濃度を変化させて得られた試料のシトクロムc 担持率

た試料の+6mVよりも絶対値が大きくなった(表1)。振とう時間0時間で得られた試料と同様、ヘパリンを添加して得られた試料では、粒子間の静電的反発が粒子の分散性に寄与したと考えられた。

以上より、ヘパリンは、シトクロムcの担持率向上ならびに生成粒子の分散性向上に大きく寄与することが示された。

3.1.2. ヘパリン濃度の影響

ヘパリンの濃度がシトクロムcの担持率や粒子分散性に与える影響を検討するため、A液のヘパリン濃度を1.0、2.0、2.5、3.0mg/mL(Hep 1.0、2.0、2.5、3.0)と変化させて試料を得た。振とう時間は0時間とした。

SEM観察によると、ヘパリン濃度にかかわらず、一次粒子径50nm程度の球形に近い形状のナノ粒子が得られた(図4)。シトクロムc担持率は、ヘパリン濃度が増加するにつれてわずかに増加した(図5)。DLS測定によると、得られた試料の平均粒子径は130~180nm程度、ゼータ電位は-17~-16mV程度であり(表2)、ヘパリン濃度により大きな違いは見られなかった。

表2 ヘパリン濃度を変化させて得られた試料の平均粒子径およびゼータ電位

ヘパリン濃度	平均粒子径	ゼータ電位
1.0 mg/mL	176 nm	-16 mV
2.0 mg/mL	131 nm	-17 mV
2.5 mg/mL	165 nm	-17 mV
3.0 mg/mL	161 nm	-16 mV

以上より、今回変化させたヘパリン濃度の範囲内では、ヘパリン濃度はシトクロムcの担持率や粒子分散性に大きな影響を与えないことが示された。

3. 1. 3. 振とう時間の影響

振とう時間がシトクロムcの担持率に与える影響を検討するため、振とう時間を0、1、3、6、24、48、75時間と変化させて試料を得た。A液のヘパリン濃度は2.5mg/mLとした。

振とう時間1、3、6時間で得られた試料のSEM観察によると、振とう時間0時間(図1左上)と同様、一次粒子径50nm程度の球形に近い形状のナノ粒子が得られた(図6)。すなわち、振とう時間6時間から24時間(図1左下)にかけて不定形に形状が変化すると考えられた。この形状変化の理由の1つとして、長時間の反応によるリン酸カルシウムの結晶構造の変化が推測されることから、今後結晶構造解析を行う予定である。なお、シトクロムc担持率は、0時間から24時間では振とう時間が増加するにつれて増加したが、24時間以降はほぼ同じであった(図7)。

以上より、振とう時間が24時間あれば、シトクロムcを十分に担持できることが示された。

3. 2. FGF-2 担持リン酸カルシウムナノ粒子

3. 2. 1. FGF-2濃度の影響

3. 1.のシトクロムcに代えて、FGF-2の担持を試みた。その際、C液のFGF-2濃度を0、10、20、50、100 μ g/mLと変化させて試料を得た。A液のヘパリン濃度は2.5mg/mL、振とう時間は0時間あるいは24時間とした。

FGF-2濃度100 μ g/mLで得られた試料では、振とう時間にかかわらず、水中で沈降しやすく、DLS測定において信頼できる粒子径は得られなかった。FGF-2濃度0~50 μ g/mLで得られた試料では、振とう時間0時間で平均粒子径140~220nm程度、振とう時間24時間で平均粒子径150~240nm程度となった(表3)。ゼータ電位は、振とう時間0時間で-18~-15mV程度、振とう時間24時間で-24~-17mV程度となり、FGF-2濃度の低い方がゼータ電位の絶対値が大きくなる傾向にあった。

FGF-2濃度100 μ g/mLで得られた試料が沈降しやすかった理由として、FGF-2原料として用いた製剤に含まれ

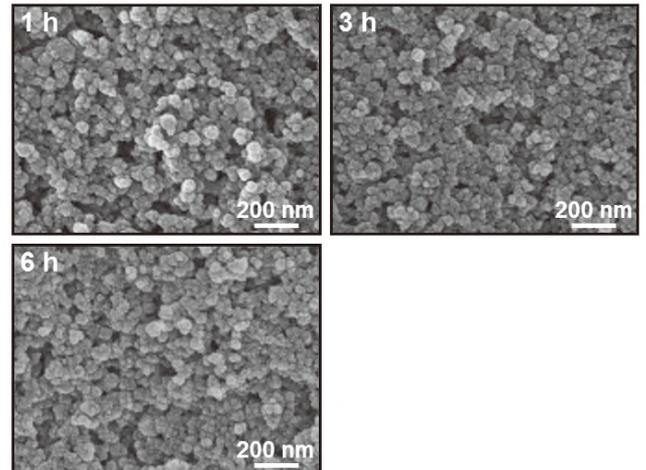


図6 振とう時間を変化させて得られた試料のSEM像

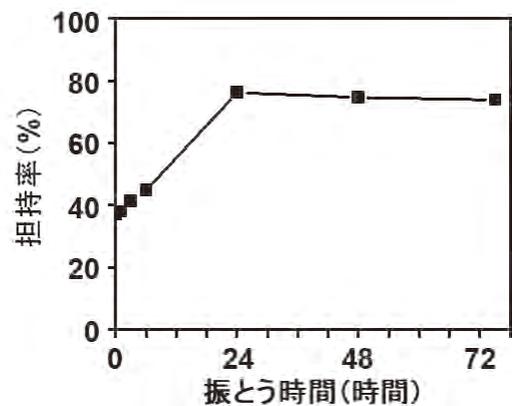


図7 振とう時間を変化させて得られた試料のシトクロムc担持率

表3 FGF-2濃度を変化させて得られた試料の平均粒子径およびゼータ電位

振とう時間	FGF-2濃度	平均粒子径	ゼータ電位
0 h	0 μ g/mL	143 nm	-18 mV
0 h	10 μ g/mL	172 nm	-17 mV
0 h	20 μ g/mL	170 nm	-17 mV
0 h	50 μ g/mL	218 nm	-17 mV
0 h	100 μ g/mL	-	-15 mV
24 h	0 μ g/mL	187 nm	-24 mV
24 h	10 μ g/mL	183 nm	-24 mV
24 h	20 μ g/mL	154 nm	-23 mV
24 h	50 μ g/mL	235 nm	-21 mV
24 h	100 μ g/mL	-	-17 mV

る添加物(エデト酸ナトリウム水和物等)の影響が考えられる。添加物を含まないFGF-2を用いた検討は今後の課題としたい。

3. 2. 2. FGF-2の放出挙動

C液中のFGF-2濃度10、20、50 μ g/mLで得られた試料について、培地中でのFGF-2放出挙動を評価した。振と

う時間0時間で得られた試料では、粒子を懸濁させた直後の培地中に、14ng/mL (C液中FGF-2濃度=10 μ g/mL)から70ng/mL (C液中FGF-2濃度=50 μ g/mL)のFGF-2が検出された。しかし、いずれの試料でも、24、48時間後にはほとんどFGF-2が検出されなくなった(図8左)。これは、培地中に放出されたFGF-2が構造変化を起こしたことによると考えられる(培地中でFGF-2が構造変化し、ELISAで検出される濃度が急減することが知られている)。従って、振とう時間0時間で得られた試料では、FGF-2が粒子より速やかに放出されたものの、持続的なFGF-2放出はなかったと考えられた。一方、振とう時間24時間で得られた試料では、24、48時間後であってもFGF-2が放出初期と同程度の濃度で検出されたことから(図8右)、FGF-2の放出が、24、48時間後でも継続していたと考えられた。後者の試料では、長時間の反応によって、表面だけでなく内部にもFGF-2の担持されたリン酸カルシウムナノ粒子が生成したと推定される。

以上より、振とう時間によってFGF-2の放出挙動が大きく変化すること、ならびに、振とう時間24時間で得られた試料ではFGF-2を少なくとも48時間にわたって徐放できることが示された。

4. 総括

著者らのリン酸カルシウムナノ粒子合成技術をもとに、塩基性タンパク質であるシトクロムc (FGF-2のモデルタンパク質として条件検討に使用)ならびにFGF-2を担持した分散性リン酸カルシウムナノ粒子を合成した。ヘパリンの共担持が、タンパク質の担持率向上(本研究ではシトクロムcでのみ確認)や粒子分散性向上に大きく寄与することが明らかとなった。得られたナノ粒子は、FGF-2を持続的に放出できることから、美容や医療の分野への応用が期待される。今後の課題としては、皮膚の透過に適したナノ粒子構造の最適化等が挙げられる。

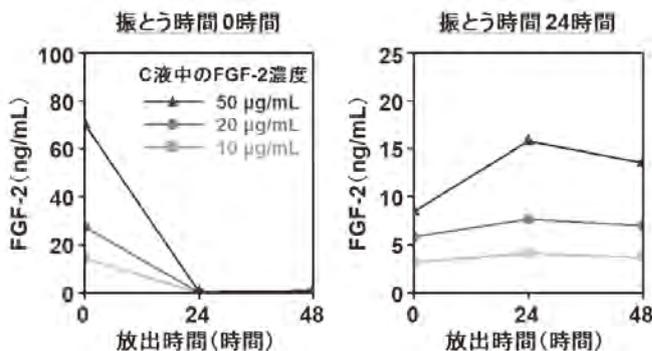


図8 FGF-2濃度を変化させて得られた試料のFGF-2放出挙動

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の助成を受けて行われたものである。研究の実施に当たっては、産業技術総合研究所の大矢根綾子博士、分領和歌子氏、黒岩輝代子氏、荒木裕子氏をはじめ、関係各位にご指導・ご協力を頂いた。

(引用文献)

- 1) 中村 真紀, 大矢根 綾子, 「機能性リン酸カルシウムナノ粒子の液相合成とバイオメディカル応用」, セラミックス, 55, 189-192 (2020).
- 2) 中村 真紀, 大矢根 綾子, 「遺伝子や造影剤を細胞へ送達するリン酸カルシウムナノ粒子の簡便・迅速な作製技術の開発」, NEW GLASS, 36, 22-24 (2021).
- 3) M. Nakamura, A. Oyane, K. Kuroiwa, Y. Shimizu, A. Pyatenko, M. Misawa, T. Numano, H. Kosuge, "Facile one-pot fabrication of calcium phosphate-based composite nanoparticles as delivery and MRI contrast agents for macrophages", *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 162, 135-145 (2018).

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

慶應義塾大学理工学部

福井 有香

In this research, we carried out internal and surface modifications of liposomes to prepare nanosized capsules with various functional properties including improved incorporation of active agents and controlled release of cargo in response to external stimuli. For internal modification of liposomes, anionic polymers were generated within liposomes by living radical polymerization. The obtained nanocapsules showed good absorption and retention of chemical substances depending on the binding ability to the incorporated polymers, and the absorption capacity could be controlled by the length and dissolved state of the polymer chains. In addition, surface modification of liposomes was carried out by the layer-by-layer deposition of enzymes and polysaccharides to prepare capsule walls with enzymatic degradability. First, lysozyme (Lyso) and phosphorylated chitosan (P_{CHI}), which is cleavable by Lyso, were deposited over the liposome. Then, hyaluronic acid (HA) was deposited as an outermost layer. The degradation of the inner layer consisting of P_{CHI} allowed the release of the outermost layer consisting of HA. Also, degradation of the P_{CHI} layer led to the exposure of the lipid membrane, which facilitated the release of cargo from the inner cavity of the liposome. We expect that polymer-deposited nanocapsules would open up application potential as a carrier for delivery of active agents to the targeted skin region.

1. 緒言

ナノサイズのカプセルは、組織への浸透性に加えて、カプセル層と内部のキャビティへの物質の保持能を有しており、細胞、組織、皮膚、頭皮、毛髪などをターゲットとしたキャリア素材として注目されている。中でも、リン脂質分子からなる閉鎖小胞(リポソーム)は、生体安全性に優れ、中空部(水相)には水溶性の物質と脂質膜部には脂溶性の物質を同時に封入可能で、医薬品、化粧品および食品用のカプセル素材として応用研究が行われている。これまでに申請者らは、リポソーム表面に天然物質(ポリマーおよびミネラル)を積層(layer-by-layer, LbL)することで、全てバイオ由来素材からなるカプセル素材(リポナノカプセル)の開発を行ってきた^{1,2)}。この方法は、ポリマーの種類や吸着の量・形態・分布の調節から、吸着層の厚み、組成など、ナノスケールにおける積層構造の精密なデザインが可能であり、膜安定性、分散安定性、物質保持能、標的指向性などの機能を組み込むこと(機能プログラミング)も可能である。また、この積層構造に着目した機能設計として、カプセル層の分解・剥離による担持物質の放出、表面性状の変化、および内包物の放出について検討を始めている。実際に、カプセル層にバイオポリマーとその分解酵素を組み合わせることで、酵素によるバイオポリマーの分解と剥離に

よって、カプセルの表面状態を段階的に変化できることを報告している³⁾。この研究から、カプセル層の環境に応答した再構築によって、物質放出の促進や目的部位に対するアフィニティの表面提示といった新しい機能発現の可能性が示された。

本研究では、リポソームとポリマーの複合ナノカプセル(リポナノカプセル)の化粧品用キャリア素材への応用展開に向けて、リポナノカプセルの①表面と②内部の改質による機能開拓に挑戦した。図1に示すように、まず、①リポソーム表面にバイオポリマーとその分解酵素を積層化することで、皮膚近傍の環境に応答して、積層膜の分解・剥離を起こすことによって、リポソーム内部とカプセル層からの有効成分の放出について検討を行った。さらに、②リポソームの内部にポリマーを複合化することで、ポリマーとのアフィニティを利用した有効成分の保持能の付与を行った。

2. 方法

2.1. リポソーム表面への積層膜の構築膜の構築

アニオン性リン脂質である Dilauroyl phosphatidylacid (DLPA) と中性リン脂質である Dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC) を用いて、単純水和法とエクストルージョン法(pore size: 100nm)により、アニオン性のリポソーム(Lipo)を作製した。カチオン性多糖であるキトサン(MW:8.2 × 10⁴Da, pKa=6.5)にリン酸基を導入するために、メタンスルホン酸存在下で五酸化二リンを反応させてリン酸化キトサン(P_{CHI})を合成した。次に、 P_{CHI} がカチオン性を示すpH3.0において、アニオン性リポソーム(Lipo)の表面に P_{CHI} の吸着を行った(Lipo- P_{CHI})。 P_{CHI} の吸着量は、アミノ基の定量法であるフルオレスカミン法を用いて測定した。



Preparation of Polymer-deposited Nanocapsules for Cosmetic Delivery System

Yuuka Fukui

Faculty of Science and Technology, Keio University

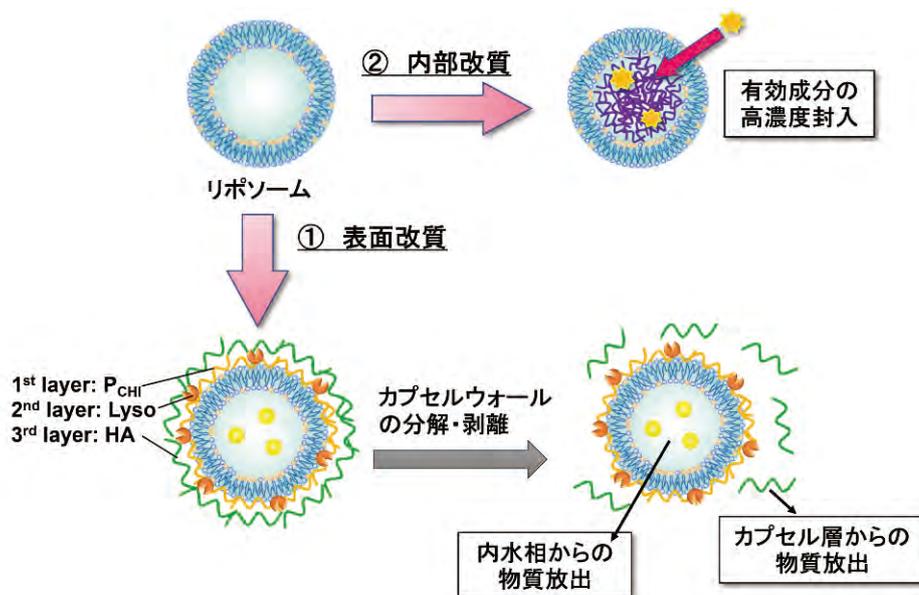


図1 リポソームの表面と内部へのポリマー複合化によるリポナノカプセルの作製とコスメティックデリバリーシステムへの応用

次に、P_{CHI}の分解酵素としてリゾチーム (Lyso) を選択し、pH7.4において、Lipo-P_{CHI}の表面にLyso (pI:11.10~11.35) の吸着を行った (Lipo-P_{CHI}-Lyso)。Lysoの吸着量は蛍光ラベル化したLysoによって定量した。さらに、この表面が正電荷を示す条件において、アニオン性のヒアルロン酸 (HA) の吸着を行った (Lipo-P_{CHI}-Lyso-HA)。得られたカプセルについて、動的光散乱法による水中粒径測定、電気泳動光散乱法によるゼータ電位測定、さらに透過型電子顕微鏡 (TEM) による形状観察を行った。

2.2. 積層膜の分解・剥離に伴う物性の変化と内包物質の放出

LysoによるP_{CHI}の酵素分解性を評価するため、Lipo-P_{CHI}-LysoとLipo-P_{CHI}-Lyso-HAを種々のpH条件下 (pH5.0, 6.2, 7.4) において、37℃で24時間インキュベートした。その後、分解によって生じたP_{CHI}断片を回収し、フェリシアン化カリウムを用いてP_{CHI}の還元末端を検出した。また、酵素分解後にLipo-P_{CHI}-Lyso-HAの分散液を透析することで、剥離したHAを回収し、ゲル浸透クロマトグラフィ法 (GPC) によって分子量の測定を行った。次に、酵素分解前後の膜物性評価として、1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) を用いて、蛍光偏光消滅測定により脂質膜の流動性を評価した。次に、アニオン性の蛍光物質のHPTSを封入したLipoを作製し、その表面にP_{CHI}、LysoおよびHAを積層化した後、種々の条件下で酵素分解を行い、放出されたHPTSの蛍光強度測定より、放出量を算出した。

2.3. リポソーム内部へのポリマー複合化と物質保持機能の付与

2.1.項と同様の方法でアニオン性のリポソーム (Lipo) を作製した。次に、リポソーム内部に光リビング開始剤であるイニファーターとアニオン性モノマーである2-acrylamido-2-methyl-sulfonic acid (AMPS) を封入し (AMPS-in-Lipo)、UV照射 (高圧水銀灯) による光リビングラジカル重合を行った。得られたAMPSポリマー (PAMPS) 内封リポソーム (PAMPS-in-Lipo) について、水中粒径測定、ゼータ電位測定、およびTEMによる形状観察を行った。次に、内部のPAMPSを利用した物質の吸収と保持について検討を行った。まず、吸収挙動を検討するために、PAMPS-in-Lipo分散液にカチオン性物質 (Rhodamine 6G (Rho6G)、Acridine Orange (AO)) とアニオン性物質 (Hydroxypyrene-3,6,8-trisulfonic acid (HPTS)) を加え、種々の条件でインキュベーションを行った。遠心分離によってPAMPS-in-Lipoを回収した後、界面活性剤を加えてPAMPS-in-Lipoを崩壊させて、封入された各蛍光物質の定量を行った。

3. 結果

3.1. リポソーム表面への積層膜の構築

作製したP_{CHI}は両性 (pI=5.0) であり、低pHで正電荷、高pHで負電荷を帯びる。そこで、アニオン性のLipo (粒径: 90 ± 31 nm) に対して、P_{CHI}が正電荷を帯びるpH条件において吸着を行ったところ、仕込みのP_{CHI}濃度に応じて、吸着量が増大した (Lipo-P_{CHI})。飽和吸着となるように作製したLipo-P_{CHI}の粒径は、90 ± 31 nm から 141 ± 30 nm と大

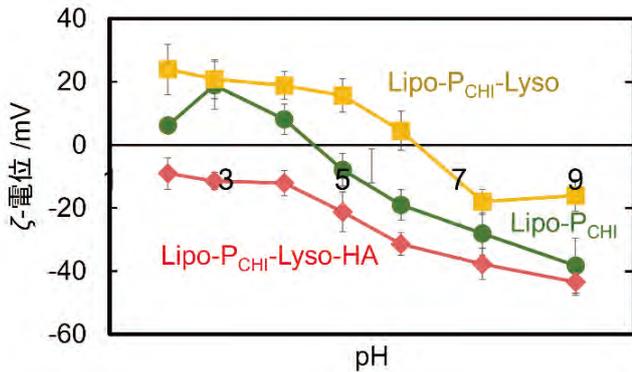


図2 異なる pH 条件下における各種ナノカプセルのゼータ電位

きくなった。また、ゼータ電位は pH とともに正から負へと変化し、両性を示すことがわかった(図2、緑色)。そこで、Lipo-P_{CHI} が負電荷を帯びる条件 (pH7.4) において、Lyso の吸着を行ったところ、Lyso の仕込み濃度に応じて吸着量が増加することがわかった (Lipo-P_{CHI}-Lyso)。カプセル表面の 100nm² 当たりには 1.4 個の Lyso が吸着した Lipo-P_{CHI}-Lyso において、粒径は 169 ± 32nm となり、等電点は Lipo-P_{CHI} よりも高 pH 側にシフトすることがわかった(図2、黄色)。次に、Lipo-P_{CHI}-Lyso が正電荷を示し、Lyso の至適 pH より低い pH2.0 において、アニオン性の HA の吸着を行ったところ、粒径は 124 ± 62nm となり、ゼータ電位は負に反転した (Lipo-P_{CHI}-Lyso-HA)。また、得られた Lipo-P_{CHI}-Lyso-HA は、いずれの pH 環境においても HA 由来の負電荷を呈するようになった(図2、赤色)。これより、表面が HA で覆われたことが示された。TEM 観察より、作製したナノカプセルはリボソーム由来の球形で中空構造を維持していた。

3.2. 積層膜の分解・剥離に伴う物性的変化と内包物質の放出

次に、酵素によるカプセル層の分解を確認するため、Lipo-P_{CHI}-Lyso と Lipo-P_{CHI}-Lyso-HA を種々の pH 条件下

で 24 時間静置したところ、Lyso の至適 pH (pH5.0-6.0) 付近においてともに P_{CHI} の分解が促進された。Lipo-P_{CHI}-Lyso については、ゼータ電位 (pH6.2) が +4.5 ± 4mV から -45 ± 2mV と正から負に反転した。これは、表面から P_{CHI} 断片が剥離して、脂質膜が露出したことによると考えられた。次に、Lipo-P_{CHI}-Lyso-HA については、酵素分解によって HA 断片が剥離し、低分子量化していることが確認された。HA は分子内に、Lyso の基質である N-アセチルグルコサミン残基を有しているため、Lyso によって分子が切断される。これらの結果から、酵素分解によってカプセル層に担持した物質の放出が可能であることを見出した。

次に、3.1.項で作製したナノカプセルの酵素分解に伴う膜物性評価を行った。脂質膜の流動性による影響について、蛍光プローブである DPH を用いて、蛍光偏光解消測定により検討した。DPH は長い棒状の分子であるため、脂質分子の分子軸に沿って配向する。脂質の運動が束縛されている場合は、DPH の蛍光偏光 (蛍光異方性) は保たれ、脂質の流動性が上がると蛍光偏光は素早く解消される。各種ナノカプセルに DPH を加えて、蛍光偏光解消を測定したところ、リボソームでは、昇温すると 35-45°C で蛍光異方性の急激な減少が見られた(図3)。これは、この温度領域で脂質膜のゲルから液晶への転移が起これ、膜内の DPH の運動性が上がったことによると考えられる。一方、Lipo-P_{CHI}-Lyso (酵素分解前) と Lipo-P_{CHI}-Lyso-HA (酵素分解前) については、広い温度領域において蛍光異方性は高い値となり、リボソームと比較して膜流動性が低い状態となっていることがわかった。これは、脂質膜表面へポリマーが吸着することで、脂質膜の流動性が低下したことによると考えられる。さらに、Lipo-P_{CHI}-Lyso と Lipo-P_{CHI}-Lyso-HA について、Lyso の至適条件 (pH6.2, 37°C) 近傍において 24 時間インキュベートを行ったところ、脂質膜のゲル-液晶相転移が明確に観察されるようになり、蛍光異方性が低下した。このことから、カプセル層の酵素分解によって膜流動性が增大することが示された。

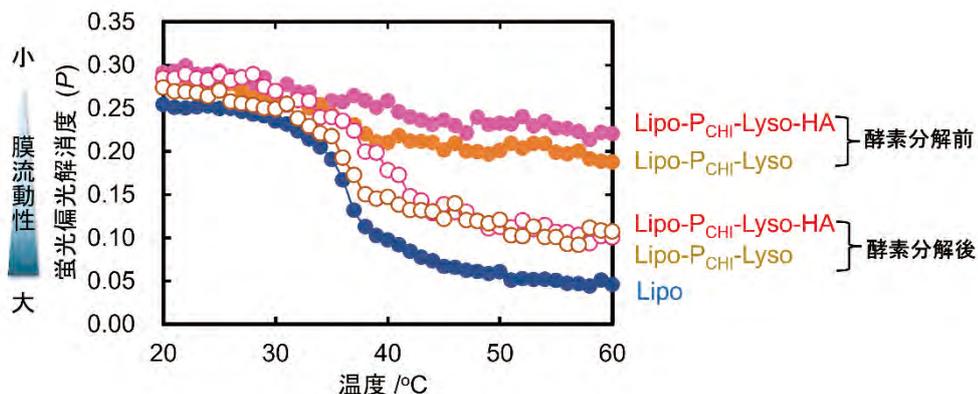


図3 蛍光偏光解消測定による各種ナノカプセルの膜流動性の評価

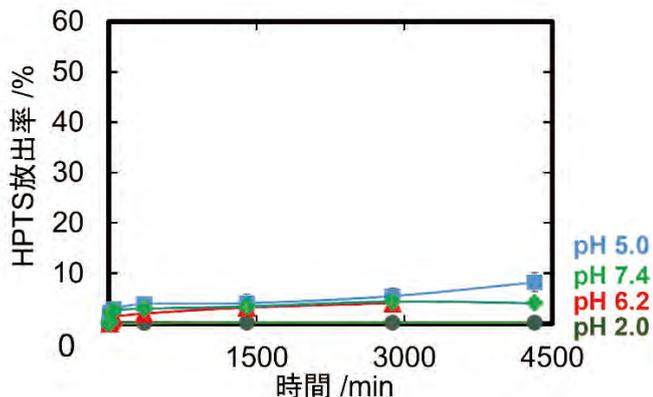


図4 異なる pH 条件下における Lipo-P_{CHI} からの HPTS 放出挙動

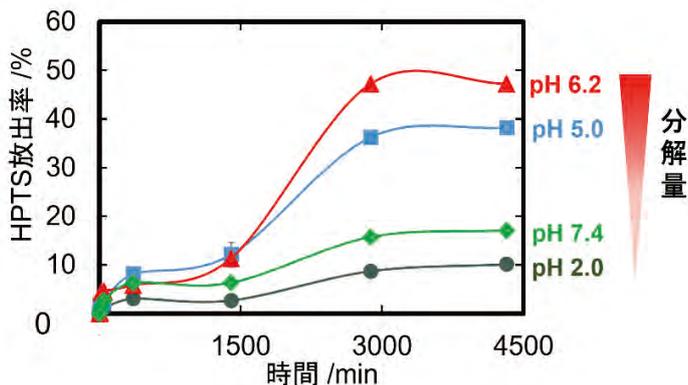


図5 異なる pH 条件下における Lipo-P_{CHI}-Lyso からの HPTS 放出挙動

次に、カプセル層の酵素分解に伴う物質の放出について検討を行った。Lipoに蛍光物質であるHPTSの封入を行った後、カプセル層の構築を行った。Lipoの場合には素早い放出が見られ、24時間後には放出率が60%に達した。一方、Lipo-P_{CHI}ではpHによらず放出は5%以下に抑制された(図4)。上述したように、リボソーム表面にポリマーを被覆することで、脂質膜の流動性が低下するため(図3)、内封物質の物質透過性が低下したことによると推察している。Lipo-P_{CHI}-Lysoについては、Lysoの至適条件(pH5.0-6.0)近傍において放出の促進が見られ、pH6.2では、24時間後に10%、48時間後に約50%の放出が観察された(図5)。同様に、Lipo-P_{CHI}-Lyso-HAについても、放出の促進が見られた。酵素分解によるP_{CHI}とHAの分解と剥離に伴って脂質膜の流動性が増大し(図3)、カプセル層の物質透過性が増大したことによると考えられる。

3.3. リボソーム内部へのポリマー複合化と物質保持機能の付与⁴⁾

次に、リボソーム内部においてリビングラジカル重合によってポリマーを生成し、このポリマーとのアフィニティを利用した物質のカプセル内への封入を行った。リビングラジカル重合は、開始点(開始剤)の数と重合時間により、ポリマーの数、鎖長および化学組成を精密に制御することが可能である。¹H NMR測定よりPAMPSの生成が確認でき、重合時間が300分の場合の分子量は36,000 g/molと算出された。また、重合前後においてカプセルの粒径は84 ± 26 nmから84 ± 29 nm、ζ-電位は-46 ± 6 mVから-42 ± 4 mVとなり、TEM観察から球形で中空構造を維持したままであることが確認された。

作製したPAMPS-in-Lipoへのアニオン性のHPTSの吸収については、未処理のリボソームよりもPAMPS-in-Lipoの方が低い値となった。これは、内部のPAMPSによる静電反発によってHPTSの吸収が抑制されたと考えている。一方、カチオン性物質の吸収については、未処理のリ

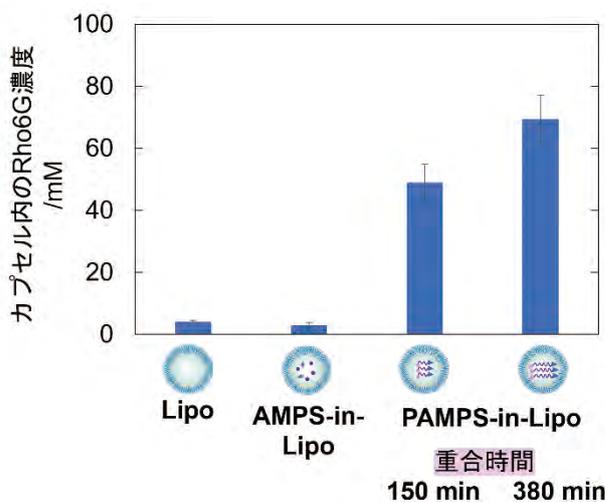


図6 各種ナノカプセルの Rho6G 封入量

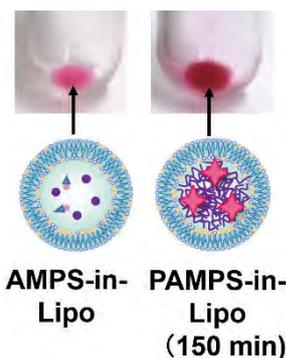


図7 Rho6G 封入ナノカプセルを遠心濃縮した後の写真

ポソームと重合する前のリボソーム (AMPS-in-Lipo) と比較して、PAMPS-in-Lipoへの吸収量は高い値となった(図6)。また、重合時間(ポリマー鎖長)を150分から380分にする事で吸収量が増加することもわかった。AMPS-in-Lipoに比べてPAMPS-in-Lipoの方が濃く染まる事が観察できた(図7)。また、図6より、PAMPS-in-Lipo(重合時間:380min)内部のRho6G濃度は、外水相の約70倍となり、内部のポリマーによって物質を高濃度に封入できることがわかった。

4. 総括

本研究では、リボソームの表層と内部にポリマーを複合化することで、カプセル層の分解と剥離による表面性状の変化と物質の放出を可能とする機能性ナノカプセルの創製、さらに内部への有効成分の濃縮を行った。すなわち、リボソーム表面にバイオポリマーとその分解酵素を積層化することで、皮膚表面の弱酸性環境に反応して、封入物質の放出とカプセル層からの有効成分(HA)の放出を調節することが可能となった。また、粒径約100nmのリボソーム内部において、アニオン性ポリマーを複合化することで、外水相に添加したカチオン性の化合物を内部に濃縮可能であることを見出した。以上のように、リボソームと複合化するポリマーの種類と組み合わせを選択することで、目的・用途に応じたカプセル素材の構築が可能であり、皮膚内の目的部位に有効成分を効果的にデリバリー可能なコスメテ

ィックデリバリーシステムの開発が期待できる。

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深く御礼申し上げます。

(引用文献)

- 1) Fujimoto, K., Toyoda, T., Fukui, Y., *Macromolecules*, 40, 5122-5128 (2007).
- 2) Fukui, Y., Fujimoto, K., *Langmuir*, 25, 10020-10025 (2009).
- 3) Fukui, Y., Otsuka, H., Fujimoto, K., *Polymer Journal*, 51, 1223-1230 (2019).
- 4) Fukui, Y., Fukui, A., Fujimoto, K., *Polymer Journal*, published online.

アクネ桿菌 (*Propionibacterium acnes*) などの 皮膚常在菌代謝産物の解析

広島大学大学院医系科学研究科

松浪 勝義

Propionibacterium acnes is a Gram-positive anaerobic rod-shaped bacteria found on the skin and in the intestinal tract. It is widely known as the causative agent of acne vulgaris, but has recently attracted attention for its involvement in pustulosis, prostatitis, hyperostosis, synovitis, sarcoidosis (granuloma), and implant-related infections. Therefore, it is an important issue to clarify what mechanisms influence pathogenesis. In this study, we investigated the cytotoxicity of culture extracts obtained under various culture conditions together with *Staphylococcus aureus* against human skin-derived fibroblast cell line KMST-6. The results showed that the cytotoxicity of the culture extracts varied depending on the culture medium. For example, *S. aureus* was active in LB and MH media, but not in GAM and BHI media, which suggests that the culture conditions, including the culture medium, are important in the study of metabolites. As no significant differences were observed in TLC and LC-MS analyses, it is possible that the compounds that are primarily responsible for the activity are trace amount that is difficult to isolate and purify, or that the difference in activity is not dependent on a specific compound but on the overall activity of various compounds such as lipids that have weak activity. However, as observed in the co-culture in LB medium, the activity was stronger in the co-culture than in the monoculture, this observation may provide an interesting feature for future research on the interaction of these indigenous skin bacteria.

1. 緒言

ヒトの皮膚表面には皮膚常在菌と呼ばれる細菌や酵母が存在し均衡状態を保っている。皮膚常在菌は肌を弱酸性に保ち、病原菌の侵入に対しバリア機能の役割を果たす一方、バランスが崩れ、ある種の菌が多量に増殖すると種々の皮膚炎症を引き起こす。代表的な皮膚常在菌は表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、アクネ桿菌 (*Propionibacterium acnes*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) である^{1,2)}。表皮ブドウ球菌は黄色ブドウ球菌の増殖を防ぐ抗菌ペプチドや皮膚のバリア機能を高めるグリセロールを産生することが知られている。一方、黄色ブドウ球菌は皮膚炎や創傷部位の化膿を引き起こし、アクネ菌はニキビの誘発に関係が深い。しかし、代謝産物としてはこれまでに histamine, tryptamine, propionic acid などの短鎖脂肪酸などが報告されているが^{2,3)}、いずれも HPLC によるあらかじめ想定した標品との比較によるもので化学的研究は十分ではない。一方、放線菌などのゲノム配列研究の結果、単一の培養条件では一部の2次代謝産物遺伝子しか活性化しておらず眠っている遺伝子 (cryptic genes) から本来さらに多様な2次代謝産物を産生する能力があることが報告されている。そのため、培地などの培

養条件の変更や他の微生物との共培養などで休眠遺伝子の活性化⁴⁾を行うなど詳細に代謝産物を検討することが必要である。

以上の観点から、美容などのコスメトロジー領域において重要な疾患であるニキビに注目し、その原因菌であるアクネ桿菌 (*P. acnes*) や黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) について種々の条件で培養 (単独および共培養) を行い、皮膚細胞に対する細胞毒性を評価することとした。

2. 方法

2.1. 微生物株および培養について

使用菌株アクネ菌 *Propionibacterium acnes* (GTC 00154、嫌気性グラム陽性桿菌) は岐阜大学の微生物コレクションから分与いただいた。アクネ菌 (*P. acnes*) は嫌気性細菌のため角型ジャー・ケンキシステム (三菱ガス化学, A-41) あるいはパウチ袋 (三菱ガス化学, A-94) に入れ、アネロパック・ケンキ (三菱ガス化学, 脱酸素剤 A-04) による嫌気培養を行った。黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* (JCM 20624、理研微生物材料開発室 (RIKEN BRC)) は好気性のため前培養は通常の好気条件下 (35℃, 150rpm) で培養を行った。共培養の場合は、それぞれの菌株を上記条件にて前培養後に混合し、嫌気培養条件で培養した。使用培地は、嫌気性細菌用培地 (GAM : Gifu Anaerobic Medium) や一般的な細菌類の培養に用いられる Luria-Bertani Broth Medium (LB) 培地、Mueller Hinton Broth (MH) 培地、Brain Heart Infusion (BHI) 培地をベースに人工皮脂としてヒト皮脂の代わりに入手しやすい馬油 (井藤漢方製薬, 純馬油) を 0.5w/v% 添加し培養した。LB 培地を用いたアクネ菌と黄色ブドウ球菌の共培養については 1



Chemical analysis of secondary metabolites of *Propionibacterium acnes*
Katsuyoshi Matsunami

Department of Pharmacognosy,
Graduate School of Biomedical and
Health Sciences, Hiroshima University

週間にわたって毎日一部を回収、抽出、乾固して被験物質とし、以下に示す方法でヒト皮膚由来線維芽細胞 KMST6 に対する細胞毒性を MTT 法により評価した。

抽出は培養液と等量の酢酸エチルを加え、十分に攪拌、静置の後、上層を酢酸エチル可溶画分として回収した。また、エマルジョンを形成した培養物についてはスクリュウキャップ付き試験管に入れ、遠心操作 (2000rpm) により十分に分離させた上で上層を回収し、減圧下で溶媒を除去することで抽出物を得た。

また、大量培養については、1L の三角フラスコ 2 本にそれぞれ 500mL の培地を調製し、オートクレーブにより滅菌した培地を用いて行った。まず、平板培養から得たコロニーを、試験管培地 (2mL) に摂取し前培養 (増殖に差があるため *S. aureus* は好気下で 1 日、*P. acnes* は嫌気下で 5 日、35℃) を行った。そのうち 1mL を 100mL フラスコ (培地 20mL) に接種し同様の条件で中間培養を行い、最後にこの中間培養物 10mL を摂取することで、上記 1L のフラスコを用いて大量培養を行った。抽出は等量の酢酸エチルを加え、分液ロートでよく攪拌、混合したのち、静置し、必要に応じて遠心操作 (2000rpm) により上層を酢酸エチル可溶画分として回収した。さらに、エバポレーターで濃縮を行い、残存した水分をオイルポンプで除去することで抽出物を得た。

2.2. HPLC 分析および分離精製について

少量培養抽出物はメタノールに溶解あるいは懸濁し、Sep-pack C18 カートリッジ (Waters) に通液したものをサンプルとした。HPLC の使用カラムは Inertsil ODS-3 (6.5mm×250mm、GLサイエンス) で分離を行った。得られた化合物の同定は Bruker Avance III 500 核磁気共鳴装置 (Bruker) (共鳴周波数 ^1H NMR : 500MHz、 ^{13}C NMR : 125MHz) を使用し、溶媒中の D シグナルを internal lock signal とした。ケミカルシフト値の表示は調製に用いた重水素化溶媒の残存軽水素シグナルの δ 値 (ppm) で補正した。また、ハイブリッド型質量分析システム LTQ Orbitrap X (Thermo Fisher Scientific) を使用し質量分析を行った。また、活性の見られた抽出物との代謝物の差異を見るため LC-ESI-MS による分析を行った。使用カラムは上記と同様に Inertsil ODS-3 (6.5mm×250mm、GLサイエンス) を用い、移動相 A (0.1% 酢酸-H₂O)、移動相 B (0.1% 酢酸-アセトニトリル)、流速 0.5mL/min、0-10min (A: 90%, B: 10%)、10-120min (A: 90%, B: 10% から A: 0%, B: 100%、グラジエント溶出)、イオン化: ESI, positive モード、Spray voltage: 5kV、Sheath gas flow rate: 60、Aux gas flow rate: 20 で分析を行った。

2.3. ヒト皮膚由来線維芽細胞株に対する細胞毒性評価

抽出物添加条件での培養および吸光度測定には平底 96well plate (Nunc microwell 167008, Thermo Fisher Scientific) を使用した。ヒト皮膚由来線維芽細胞株 KMST-6 (RCB1955, Riken BRC 細胞材料開発室) は培地として Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, D5796, SIGMA) に非働化済み牛胎児血清 10%、Amphotericin B (SIGMA A9528)、Kanamycin sulfate (WAKO 119-00703) をそれぞれ、5.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるよう加えたものを使用した。5% CO₂、37℃、湿度 95% の条件下で培養を行い、0.05% Trypsin-EDTA 溶液により細胞をはがし、得られた細胞懸濁液を継代およびアッセイに使用した。培養抽出物は DMSO に溶解し、培地を加えることで終濃度 500、200、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度に調整した。各 well には 5×10^3 個の細胞を播種し、化合物を添加後 72 hr 培養を行った。終濃度 1% の DMSO 溶液のみで培養した well を比較対象として、抽出物の有無による細胞増殖率の変化を吸光度測定により評価した。具体的には、72 hr の培養の後、上清を吸引除去し、MTT (0.5mg/mL) を含む培地を 100 μL 加え、さらに 1.5 hr 培養を行った。その後培地を吸引し、生成した MTT formazan を DMSO 100 μL を加えることで溶解し、マイクロプレートリーダーにより 540nm の吸光度を測定した。また、細胞の形態変化を調べるため、通常の明視野観察に加えて、細胞の染色像として MTT を添加・培養したものについても写真撮影を行った。

増殖抑制率は下記の式を用いて算出し、細胞毒性を評価した。

$$\begin{aligned} \text{増殖抑制率}(\%) &= [1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{blank}})] \times 100 \\ A_{\text{sample}} &: \text{サンプルを添加して培養した場合の吸光度} \\ A_{\text{blank}} &: \text{Plate や培地に由来する吸光度} \\ A_{\text{control}} &: \text{DMSO を添加して培養した場合の吸光度} \end{aligned}$$

3. 結果

3.1. KMST-6 に対する増殖阻害活性の経時変化

まず、一般的な細菌用培地である LB 培地を用い、*P. acnes* と *S. aureus* の共培養条件下で、培養日数による活性の変化について検討を行った。前培養で十分増殖したそれぞれの培養液を混合し (Day1)、35℃ の嫌気培養下で Day7 まで培養を継続した。培養期間中、一日ごとに培養液の一部を回収し、酢酸エチルを加えて混合し、静置して得られた上層を酢酸エチル可溶画分として回収した。減圧下で有機溶媒を留去し、得られた培養粗抽出物のヒト KMST-6 細胞に対する細胞増殖抑制率を MTT 法により求めた (図 1)。その結果、培養開始の初期 (Day1-2) にはそれほど活性は見られないが、培養 4 日目あたりで十分な

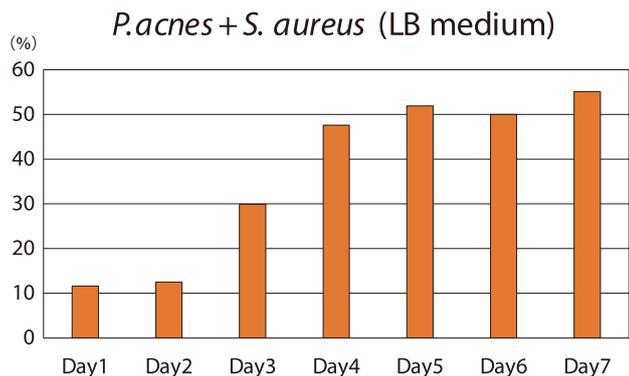


図1 ヒト皮膚由来線維芽細胞 KMST-6 に対する増殖阻害活性 *P. acnes* と *S. aureus* との共培養代謝産物の経時変化(35°C、嫌気培養)。抽出物濃度：500µg/mL, LB (Luria-Bertani) 培地

活性が見られるようになり、その後はほとんど活性の変化はなかったことから、培養は4-7日で行えば十分に活性が見いだされることが示された。そこで、今後の実験では7日間の培養期間で活性を評価することとした。一方、500µg/mLの濃度では活性が見られたが、200µg/mL以下では活性は見いだされなかったことから、それほど強い毒性ではなく、さらに、培地の変更や単独培養についても併せて検討を行うこととした。

3. 2. 種々の培地条件における単独および共培養による活性の変化

培養条件の違いにより代謝産物に変化することが知られていることから⁵⁾、LB培地に加え、動物脳と心臓組織由来のBrain Heart Infusion broth (BHI培地)や牛肉、カゼ

インにデンプンを加えたMueller-Hinton broth (MH培地)、嫌気性細菌用培地のGifu Anaerobic Medium (GAM培地)など組成が大きく異なるものを用い、単独培養および共培養を行い、KMST-6に対する細胞毒性評価を行った(図2)。それぞれの菌株の至適条件を考慮し、*P. acnes*単独(PA)および*P. acnes*と*S. aureus*の混合培養(PA+SA)は嫌気培養、*S. aureus*(SA)は前培養のみ好気下で行った。培養は上述の結果をもとに7日間、35°Cで行った。

LB培地では図1同様に共培養で活性が見られ、500µg/mLの濃度で阻害率46.5±7.6%の増殖阻害活性を示したが、*S. aureus*単独でも34.8±3.3%の活性が見られることから主に*S. aureus*に由来する代謝産物であると考えられた(図2、3)。一方、MH培地では*S. aureus*で95.0±0.01%の阻害活性が見られたが、200µg/mLでは活性は見られなかった。一方、共培養条件(PA+SA)では活性が見られなかったことから、*S. aureus*単独による条件が重要であると考えられた。逆に、嫌気培養用培地であるGAM培地では*P. acnes*単独培養のみ活性が見いだされた(抑制率82.1±11.9%)。共培養では細胞毒性を示さなかったことから*S. aureus*の共存により*P. acnes*による2次代謝に変化が起こったか、*S. aureus*による毒性成分の代謝が起こった可能性がある。このGAM培地での*P. acnes*単独培養では200µg/mLで17.3±1.0%の細胞毒性が示されたが100µg/mLでは毒性は見られなかった(図2)。また、増殖率には影響しなかったが、BHI培地(SA, PA+SA)でも細胞形態の変化は見られ、同様の形態変化はGAM(SA, PA+SA), LB(PA, SA, PA+SA), MH(PA, PA+SA)の場合でも観察されたことから、何らかの影響を及ぼしている

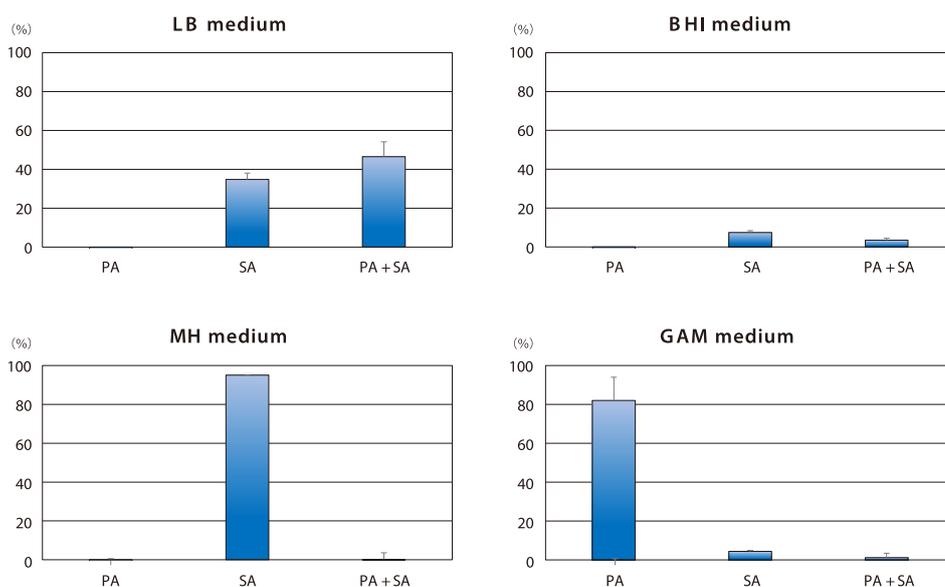


図2 各種培地における単独培養および共培養代謝産物の KMST-6 に対する増殖阻害活性 PA:*P. acnes*, SA:*S. aureus*, PA+SA: 混合培養, LB:Luria-Bertani medium, MH: Mueller-Hinton medium, BHI:Brain Heart Infusion medium, GAM:Gifu Anaerobic Medium, 35°C, 抽出物濃度:500µg/mL, n=3

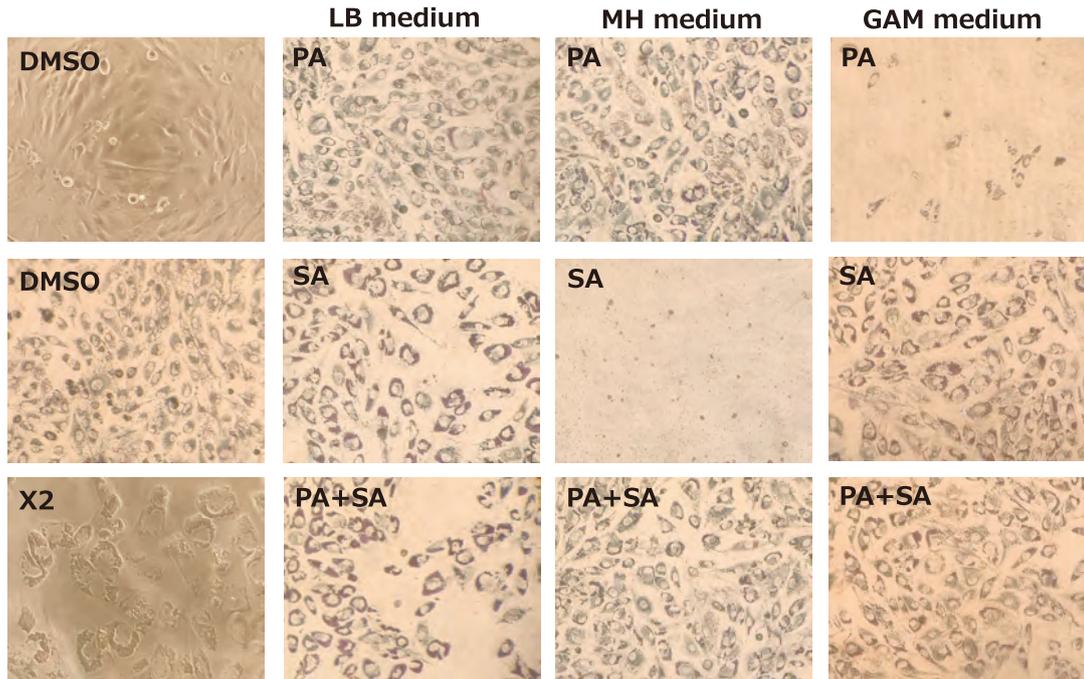


図3 各種培地における単独培養および共培養代謝産物の KMST-6 に対する影響

PA: *P. acnes*, SA: *S. aureus*, PA+SA: 混合培養, LB: Luria-Bertani medium, MH: Mueller-Hinton medium, BHI: Brain Heart Infusion medium, GAM: Gifu Anaerobic Medium, 35 °C, 抽出物濃度: 500µg/mL, DMSO: 通常の見視野観察像と MTT 発色後, X2: PA+SA に見られる形態変化(通常見視野, X 2 倍に拡大, 同様の形態変化は BHI 培地 (SA, PA+SA), GAM (SA, PA+SA), LB (PA, SA, PA+SA), MH (PA, PA+SA) にも観察される。

ことが示唆された(図3)。以上の結果から、最も強い細胞毒性の見られたMH培地による *S. aureus* の単独培養、およびGAM培地による *P. acnes* の単独培養に注目し、代謝物について検討を行うこととした。

3.3. 培養抽出物に含まれる代謝産物の解析

次に細胞毒性の見られたMH培地による *S. aureus* 培養抽出物(MH-SA)、およびGAM培地による *P. acnes* 培養抽出物(GAM-PA)について含有化学成分の化学的解析を行うこととした。まず、MH培地による *S. aureus* の大量培養の後、得られた抽出物についてシリカゲルTLC分析(CHCl₃:MeOH=20:1および7:1で展開後、0.5%硫酸/加熱発色)を行い、確認されたスポットについて高分解能TLC(HPTLC)を用いて薄層分取を行った。次に得られた成分について¹Hおよび¹³C NMR、MSの測定を行い化合物の同定を試みたところジグリセリドの混合物であると推定された。さらにHPLCなどで分離を試みる必要があるが、培地の添加物として馬油を用いていることから、*S. aureus* に由来するものかについても含めて今後詳細に検討する必要がある。一方、上述の3.2.の結果(図2)から、MH培地による *P. acnes* 培養抽出物(MH-PA)、および、GAM培地による *S. aureus* 培養抽出物(GAM-SA)に毒性が見られなかったことから、グラジエント溶出によ

るHPLCクロマトグラムの比較により、活性に関わる成分が見い出せないか検討することとした。培養抽出物をメタノールに溶解あるいは懸濁し、Sep-pack C18カートリッジに通液することでメタノール溶出液を得た。0.1%のギ酸存在下、10%アセトニトリルから100%アセトニトリルまで溶出強度を変化させてグラジエント溶出を行った。クロマトグラムはLC-ESI-MSによるTIC(Total Ion Count)でプロットしたクロマトグラムプロファイルを比較したものを図4に示す。溶出時間43.6、46.9、100.5、115.6minなどの主要な成分は毒性の見られたGAM-PAおよび毒性の見られなかったGAM-SAで共通に存在することから細胞毒性に関与するとは考えにくい。その他、マイナー成分についても顕著な差異を見出すことは難しく、前処理条件や分析条件を検討する余地はあるものの、毒性に関係する成分は検出されない程度の微量であることが示唆され、同定は困難であると予想される結果となった(図4)。なお、MH培地を用いた *S. aureus* の毒性成分についても同様にLC-MS分析を行ったが、差異を見出すことは困難であった。

4. 考察

Propionibacterium acnes (ゲノム解析により *Cutibacterium acnes* に変更⁶⁾) はグラム陽性嫌気性桿菌で、皮膚や腸管などに存在するヒトの常在菌の一つである。ニキビ(尋常性

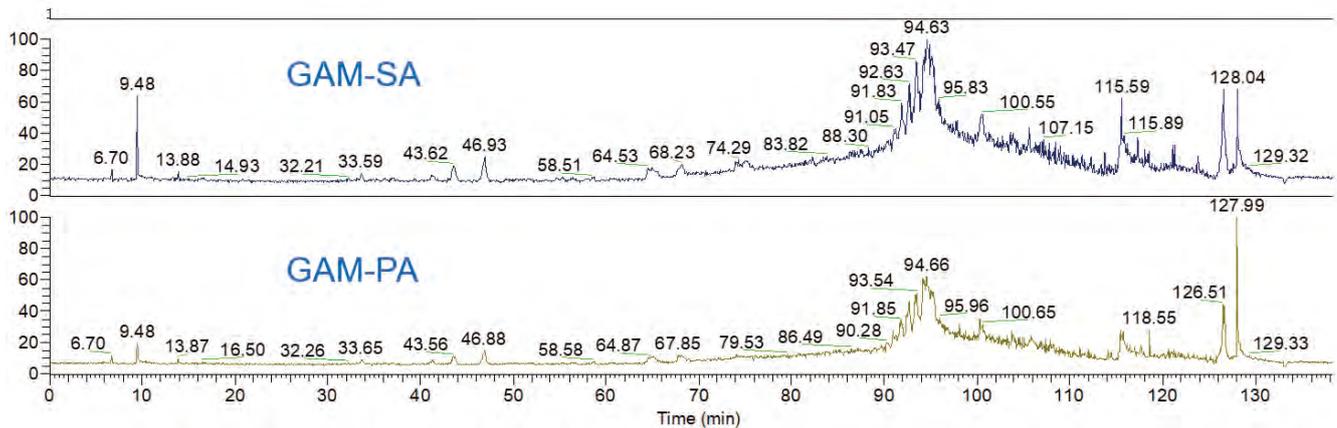


図4 *S. aureus* (GAM-SA) および *P. acnes* (GAM-PA) 培養代謝産物の LC-ESI-MS クロマトグラム
 GAM 培地, 嫌気培養, 35°C, 10% アセトニトリルから 100% アセトニトリルでグラジエント溶出。縦軸は Total ion count の相対値を示す。横軸は溶出時間。

瘡)の原因菌として広く知られるが、近年、前立腺がんの原因にもなる前立腺炎、滑膜炎、膿疱症、骨化過剰症、骨炎症候群、サルコイドーシス(肉芽腫)、坐骨神経痛、インプラント関連感染症に関与するとして注目されている⁷⁾。そのため、どのような機構が発症に影響するかを明らかにすることは重要な課題となっている。本研究では、同じく皮膚常在菌の一つである黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* と合わせて種々の培養条件で得られる培養抽出物についてヒト皮膚由来線維芽細胞株 KMST-6 に対する細胞傷害、LC-ESI-MS による含有代謝物の基礎的解析を行った。

その結果、種々の培地にて培養産物を得たところ、培地によって細胞毒性が変化することが示された。例えば、*S. aureus* については LB や MH 培地では活性が見られるものの、GAM や BHI 培地では活性が見られなかった。一方、*P. acnes* については GAM 培地で活性が見られたものの、他の3種の培地では活性が見られなかったことから代謝産物の研究にあたっては培地を含めた培養条件の検討が重要であることを示している。しかし、GAM 培地の組成には LB 培地にも含まれるペプトン類や BHI や MH 培地に含まれるような動物組織由来の抽出物も含まれるなど炭素源や窒素源は他の培地と類似しているともとれる。大きな違いとしてはシステインやチオグリコール酸などの還元性の成分が含まれることから、嫌気的環境が細胞毒性成分の生成には重要である可能性がある。今回は活性本体の同定には至らなかったが、過去の論文ではグリセロリン脂質やホスファチジルイノシトールが、また、同属の *P. propionicum* からは糖脂質が報告されている⁸⁾。これら脂質類は一般の細菌にも見られる膜成分であるが、培養動物細胞の細胞膜に影響することから細胞毒性成分として同定されることも多い。そのため、今回の研究で見出された培養条件の違いによる細胞毒性活性の発現の差異は含有脂質成分の種類お

よび量の差に起因する可能性がある。実際、細胞毒性が見られた濃度は 500 µg/mL と比較的高い濃度であり、また、TLC 分析および LC-MS 分析で目立った差異が見られなかったことから、活性を中心的に担う成分は単離・精製が難しい微量成分であるか、または、特定成分に依るのではなく、弱い活性をもつ脂質などの種々の成分の活性が総合的に差異となって現れた可能性がある。今後のより網羅的なメタボローム解析手法などにより詳細が明らかになることを期待する。

5. 総括

皮膚の表面にはアクネ菌や黄色ブドウ球菌が常在し、皮脂などを代謝することで様々な代謝物を産生している。ヒト皮膚由来細胞に対する細胞毒性は、これらの微生物の皮膚に対する炎症などに関係すると考えられ、活性化化合物を明らかにすることは皮膚科学、コスメトロジー研究にとって重要であり、創薬標的の発見も期待できると期待される。今回の結果から、抗生物質産生菌に見られるような特定物質の産生は見られないか、あるいは微量なため活性本体を明らかにすることが困難な可能性が示唆された。しかし、LB 培地での共培養で見られたように単独培養よりも共培養の方が活性が強く見られた結果も得ており、これら皮膚常在菌の相互作用について今後の研究に興味をもたれる結果となった。

(引用文献)

- 1) Alexandra P, Peter L, Propionibacterium acnes: infection beyond the skin, Expert Rev Anti Infect Ther, **9** (12):1149-56, (2011). doi: 10.1586/eri.11.137.
- 2) Allaker RP, Greenman J, Osborne RH, The production of inflammatory compounds by *Propionibacterium acnes* and other skin organisms, Br J Dermatol, **117**: 175-183

- (1987). doi.org/10.1111/j.1365-2133.1987.tb04114.x
- 3) Tax G, Urbán E, Palotás Z, Puskás R, Kónya Z, Bíró T, Kemény L, Szabó K, Propionic acid produced by *Propionibacterium acnes* strains contributes to their pathogenicity. *Acta Derm Venereol*, **96**: 43-49 (2016).
 - 4) Abdelmohsen UR, Grkovic T, Balasubramanian S, Kamel MS, Quinn RJ, Hentschel U, Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes, *Biotech Adv*, **33**: 798-811 (2015).
 - 5) Pan R, Bai X, Chen J, Zhang H, Wang H, Exploring Structural Diversity of Microbe Secondary Metabolites Using OSMAC Strategy: A Literature Review, *Front Microbiol*, **10**: 294 (2019). doi: 10.3389/fmicb.2019.00294.
 - 6) Christian FPS, Mogens K, The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov. and *Pseudopropionibacterium* gen. nov., *Int J Syst Evol Microbiol*, **66** (11):4422-4432 (2016). doi: 10.1099/ijsem.0.001367.
 - 7) Aubin GG, Portillo ME, Trampuz A, Corvec S, *Propionibacterium acnes*, an emerging pathogen: from acne to implant-infections, from phylotype to resistance, *Med Mal Infect*, **44** (6):241-50 (2014). doi: 10.1016/j.medmal.2014.02.004.
 - 8) Mariola P, Otto H, Buko L, Halina M, Andrzej G, Novel bacterial polar lipids containing ether-linked alkyl chains, the structures and biological properties of the four major glycolipids from *Propionibacterium propionicum* PCM 2431 (ATCC 14157T), *J Biol Chem*, **278** (6):3948-56 (2003). doi: 10.1074/jbc.M206013200.

ポリオキシエチレン系非イオン界面活性剤を用いた 泡のマイクロ構造に関する革新的評価技術の確立

奈良女子大学

矢田 詩歩

Small-angle neutron scattering, which has not been extensively utilized for foam characterization, can provide important insights into the microstructure of surfactant-stabilized foam. Small-angle neutron scattering in combination with several other techniques was herein employed to determine the microstructure of foams stabilized by homogeneous polyoxypropylene-polyoxyethylene alkyl ether type nonionic surfactants ($C_{12}EO_8PO_y$, $y = 1, 2, 3$), alkoxy-group-modified homogeneous polyoxyethylene alkyl ether nonionic surfactants ($C_{12}EO_xOR$, $R = OCH_3, OC_2H_5$) and homogeneous polyoxyethylene alkyl ether sulfate sodium salt anionic surfactants ($C_{12}EO_xSO_4Na$, $x = 2, 4, 6, 8$).

1. 緒言

ポリオキシエチレン (EO) 鎖を親水基に有する EO 系非イオン界面活性剤は、他の種類の界面活性剤に比べて、産業分野での生産や消費などの面で最も需要がある。近年著者は、既存の EO 系非イオン界面活性剤に対してさらなる性能の向上や高機能性の発現を目指して、新しい構造の末端基修飾型単鎖長 EO 系非イオン界面活性剤を開発した。これまでに EO 系界面活性剤の EO 鎖の末端にポリオキシプロピレン (PO) 鎖やアルコキシ基を修飾した単鎖長 EO 系非イオン界面活性剤 ($C_{12}EO_8PO_y$, $y = 1, 2, 3$, $C_{12}EO_8R$, $R = OCH_3$ (OMe), OC_2H_5 (OEt), Figure 1) を新規に合成し、これらの末端基修飾型 EO 系界面活性剤が既存の EO 系界面活性剤に比べて、優れた表面張力低下能やミセル形成能を有し、高濃度の水溶液においてヘキサゴナル液晶の形成を制御できることを明らかにした¹⁻²⁾。

また、界面活性剤が形成する泡沫は、日々の生活や工業プロセスにおいてさまざまなアプリケーションとして使用されている。このような泡沫に対してさまざまな評価が行

われてきたが、時々刻々と変化する泡のマイクロ構造について定量的に調べた研究はほとんどないのが現状である。そこで著者は、アミノ酸系界面活性剤が形成する泡沫の構造を、中性子小角散乱 (SANS) を中心に用いて調べ、泡膜中のミセルの存在状態や、泡膜の厚み、総量、泡沫中の界面活性剤の体積分率の時間に依存した情報が定量的に得られることを明らかにした³⁾。

本研究では、末端基修飾型単鎖長 EO 系非イオン界面活性剤 (Figure 1) が形成する泡沫の構造や特性を、SANS や溶液安定性評価、界面粘弾性、粘度、ラメラ長、動的表面張力などの測定を組み合わせることで、詳細に検討した。また、EO 系非イオン界面活性剤の EO 鎖の末端に硫酸エステル基を修飾した単鎖長ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸ナトリウム ($C_{12}EO_xSO_4Na$, $x = 2, 4, 6, 8$ および $C_{14}EO_8SO_4Na$, Figure 2) についても新規に合成し、同様の測定を用いて泡沫特性を検討し、泡沫特性に及ぼす EO 鎖の末端基構造や EO 鎖長、アルキル鎖長の影響について調べた。

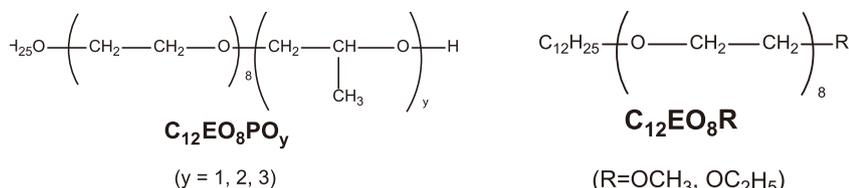


Figure 1 Structure of $C_{12}EO_8PO_y$ ($y = 1, 2, 3$) and $C_{12}EO_8R$ ($R = OCH_3$ (OMe), OC_2H_5 (OEt))



Establishment of innovative evaluation for microstructural characterization of foam formed by polyoxyethylene type nonionic surfactant

Shiho Yada

Nara Woman's University

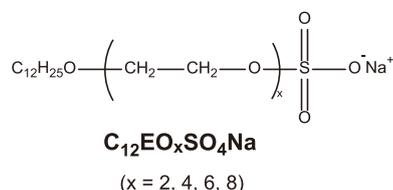


Figure 2 Structure of $C_{12}EO_xSO_4Na$ ($x = 2, 4, 6, 8$)

2. 方法

2.1. 合成

ポリオキシプロピレン (PO) 鎖を修飾した単一鎖長 PO-EO系非イオン界面活性剤は、まずオクタオキシエチレンドデシルエーテルに塩化

-トルエンスルホンル、次いでポリプリピレングリコール (PO_x, x = 1, 2, 3) を作用させることで得た (Scheme 1)。構造は¹H NMR, ESI-MS, 元素分析により確認した。末端基修飾型 EO系界面活性剤 C₁₂EO₈PO₁, C₁₂EO₈PO₂, C₁₂EO₈PO₃ はそれぞれ収率 12, 16, 13% で得た。

アルコキシ基を修飾した単一鎖長アルコキシ-EO系非イオン界面活性剤は、まずヘキサオキシエチレンドデシルエーテルに塩化

-トルエンスルホンル、次いでエチレングリコールモノメチルエーテルまたはエチレングリコールモノエチルエーテルを作用させることで得た。構造は¹H NMR, ESI-MS, 元素分析により確認した。末端基修飾型 EO系界面活性剤 C₁₂EO₈OMe, C₁₂EO₈OEt はそれぞれ収率 15, 26% であった。

2.2. 泡沫の構造および安定性評価

2.2.1 溶液安定性評価

泡沫の安定性は、溶液安定性評価装置 Turbiscan Tower (Formulation, Toulouse, France) を用いて行った。各種界面活性剤水溶液 10, 50, 100 mmol dm⁻³, 1.5 mL を円筒形セル (直径 12 mm, 高さ 140 mm) に入れ、エアポンプによりセルの底から 6 cm の高さまで起泡させた後、波長 850 nm の光を照射し、セルの各高さ (40 μm 毎) における透過率と後方散乱率 (散乱角 135°) を一定時間毎に測定した。測定は 2 時間 (最初の 1 時間は 2 分毎, 次の 1 時間は

5 分毎) 行った。

2.2.2 動的表面張力

動的表面張力は、Krüss BP2 bubble pressure tensiometer (Hamburg, Germany) を用いて測定した。

2.2.3 粘度

各種界面活性剤水溶液の粘度は、コーンプレート型粘度計 LV DV 2T Viscometer (BROOK FIELD) を用いて測定した。コーンは CP-40 を用いて回転数 0.1 ~ 20 rpm で 30 秒毎に回転数を上げながら 25°C で測定を行った。

2.2.4 界面粘弾性

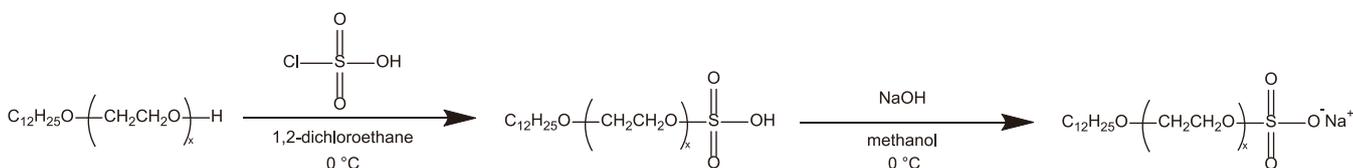
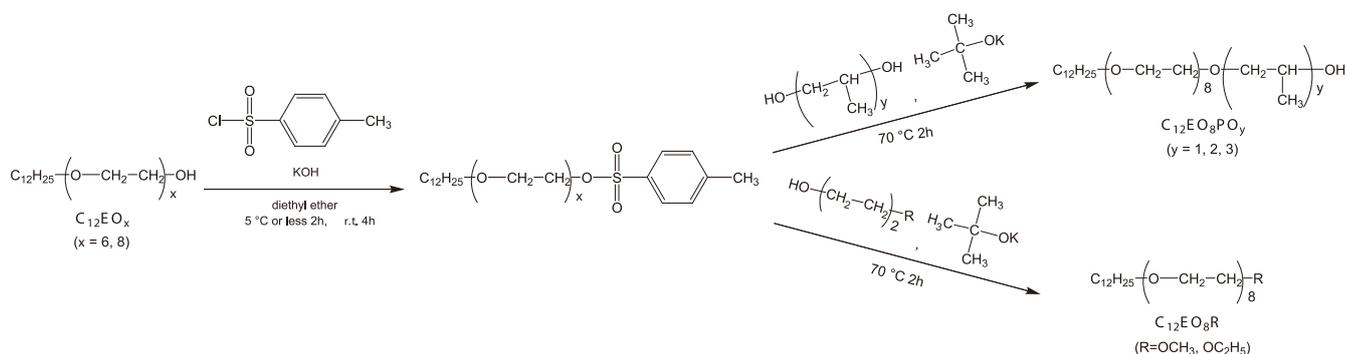
気/液界面における界面粘弾性は、界面粘弾性装置 TECLIS Tracker (Civrioux-d'Azergues, France) を用いて行った。振動面積は初期面積の 20%, 周波数は 0.1 Hz とした。測定は 5 回行い、平均値と標準偏差を求めた。

2.2.5 ラメラ長

ラメラ長の測定は、Krüss K100C を用いて行った。伸び速度は 6.0 mm min⁻¹ とした。測定は 3 回行い、平均値と標準偏差を求めた。

2.2.6 中性子小角散乱

泡沫の中性子小角散乱は、J-PARC のビームライン BL15 に設置された中性子小角散乱装置 TAIKAN を用いて、泡沫の中性子小角散乱の測定を行った。測定に用いた試料セルのイメージを Figure 3 に示す。試料セルに界面活性剤の D₂O 溶液 10, 50 mmol dm⁻³, 25 mL を注ぎ、電動エアポンプで一定流速の空気をガラスフィルターから流して起泡させた。試料セルが泡沫で満たされたことを確認した後、エアポンプを止め、高さ 25 cm のところに中性子を 30 分間照射して SANS の測定を行った。データは 30 秒毎に処理した。



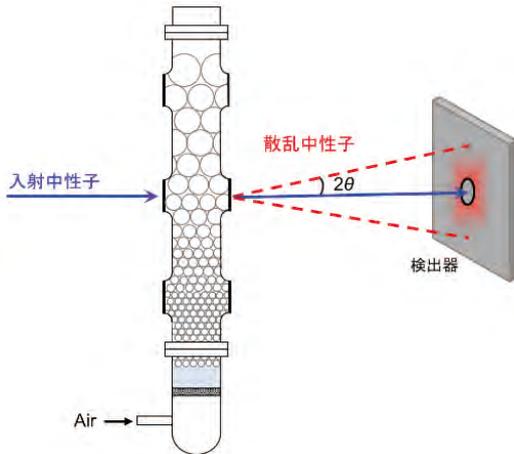


Figure 3 Schematic illustration of the sample cell used for SANS measurements

3. 結果

3. 1. 非イオン界面活性剤の泡沫の構造および安定性評価

3. 1. 1. 溶液安定性評価

末端基修飾型EO系界面活性剤の泡沫安定性を調べるために、溶液安定性評価装置タービスキャンによる透過光の測定を行った。末端基修飾型単鎖長EO系界面活性剤水溶液 (10, 50, 100 mmol dm⁻³) が形成する泡沫の割合と時間の関係を Figure 4 に示す。ここで、泡沫の割合は起泡直後の泡沫の高さに対する時間 *t* 分後の泡沫の高さを示す。50 mmol dm⁻³ の水溶液における泡沫安定性は、C₁₂EO₈, C₁₂EO₈OEt, C₁₂EO₈PO₁, C₁₂EO₈PO₂, C₁₂EO₈PO₃, C₁₂EO₈OEt の順で低下した。いずれの濃度においても C₁₂EO₈OEt が最も低い泡沫安定性を示した。これより、EO鎖の末端にPO鎖やアルコキシ基の疎水性の末端基を導入することで泡沫安定性が低下することがわかった。

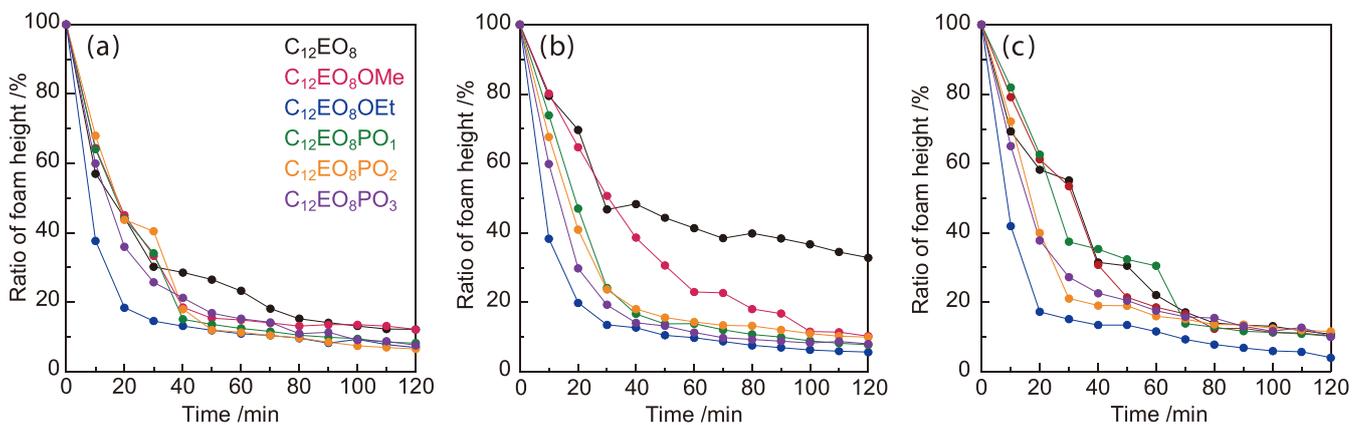


Figure 4 Relationship between ratio of foam height and time for C₁₂EO₈, C₁₂EO₈OMe, C₁₂EO₈OEt, C₁₂EO₈PO₁, C₁₂EO₈PO₂ and C₁₂EO₈PO₃ (a) 10 mmol dm⁻³, (b) 50 mmol dm⁻³, (c) 100 mmol dm⁻³

3. 1. 2 動的表面張力

気/液界面への吸着ダイナミクスを調べるために、動的表面張力の測定を行った。末端基修飾型EO系界面活性剤 C₁₂EO₈, C₁₂EO₈PO₁, C₁₂EO₈PO₂, C₁₂EO₈PO₃ の臨界ミセル濃度 (CMC) における動的表面張力と表面寿命の関係を Figure 5 に示す。ここで、C₁₂EO₈, C₁₂EO₈PO₁, C₁₂EO₈PO₂, C₁₂EO₈PO₃ の CMC はそれぞれ 0.102, 0.0321, 0.0397, 0.0480 mmol dm⁻³ である¹⁾。C₁₂EO₈ は末端基を修飾した C₁₂EO₈PO_y に比べて、短い表面寿命で表面張力が低下することがわかった。これより、C₁₂EO₈ は C₁₂EO₈PO₃ に比べて気/液界面に速く吸着することがわかった。動的表面張力と起泡力の間には相関があることが知られており⁴⁾、C₁₂EO₈ の起泡力は C₁₂EO₈PO₃ よりも高いことが考えられる。今後、動的フォームアナライザや改良 Ross-Miles 法を用いて起泡力を評価する。また、C₁₂EO₈OMe および C₁₂EO₈OE の動的表面張力についても今後同様に測定する予定である。

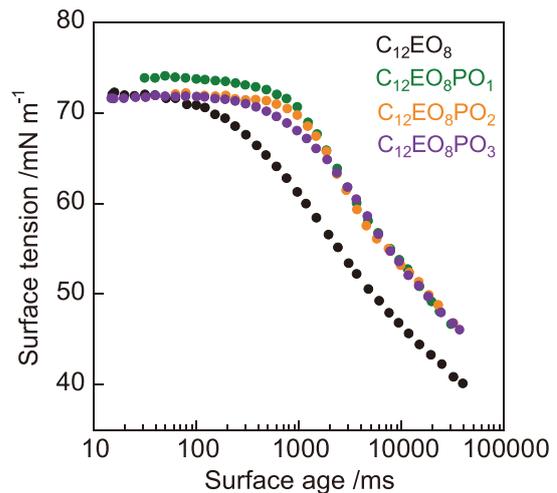


Figure 5 Dynamic surface tension of C₁₂EO₈, C₁₂EO₈PO₁, C₁₂EO₈PO₂ and C₁₂EO₈PO₃ at CMC

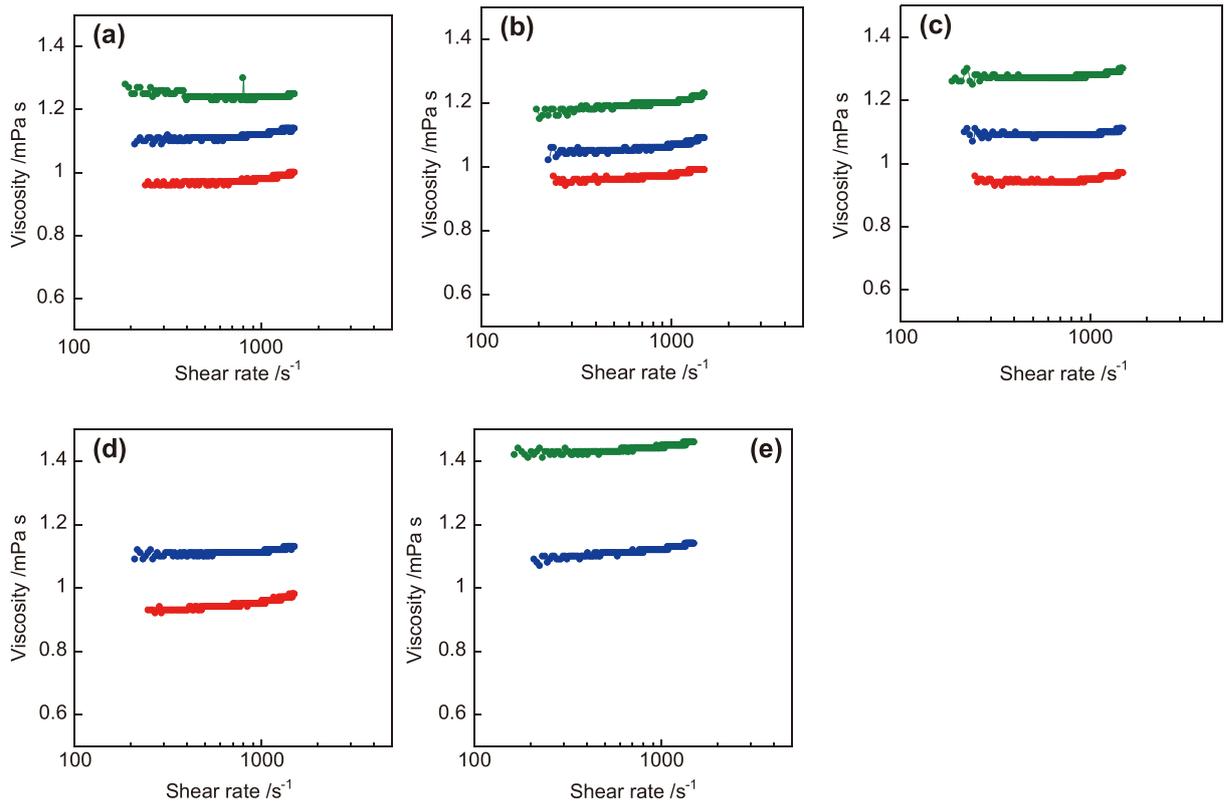


Figure 6 Variation in viscosity with shear rate for nonionic surfactant solution at (●) 10mmol dm^{-3} , (●) 50mmol dm^{-3} and (●) 100mmol dm^{-3} (a) C_{12}EO_8 , (b) $\text{C}_{12}\text{EO}_8\text{OMe}$, (c) $\text{C}_{12}\text{EO}_8\text{OEt}$, (d) $\text{C}_{12}\text{EO}_8\text{PO}_2$, and (e) $\text{C}_{12}\text{EO}_8\text{PO}_3$

3. 1. 3 粘 度

泡沫安定性に及ぼす泡膜内の溶液の粘度の影響を調べるために、界面活性剤水溶液の粘度を調べた。末端基修飾型EO系界面活性剤 C_{12}EO_8 、 $\text{C}_{12}\text{EO}_8\text{OMe}$ 、 $\text{C}_{12}\text{EO}_8\text{OEt}$ 水溶液 (10 、 50 、 100mmol dm^{-3})の粘度とずり速度の関係をFigure 6に示す。 10mmol dm^{-3} において、いずれも粘度は水とほぼ同じ値を示し、ニュートン流動であった。これより、いずれの界面活性剤も数ナノメートルサイズの小さなミセルを形成していることが考えられる。濃度が増加すると、いずれの界面活性剤も粘度は増加したが、ニュートン流動のままであった。これより、濃度の増加に伴い水溶液中に存在するミセルの数は増加するものの、会合体の構造は大きく変化しないことが考えられる。 100mmol dm^{-3} において、 $\text{C}_{12}\text{EO}_8\text{PO}_3$ の粘度は他に比べてわずかに高い値を示した。今後、動的光散乱やX線小角散乱などの測定により会合体の構造を詳細に明らかにする予定である。

3. 1. 4. ラメラ長

界面活性剤水溶液のラメラ長について検討した。Figure 7にラメラ長と濃度の関係を示す。末端基修飾型EO系界面活性剤の $0.1 \sim 100\text{mmol dm}^{-3}$ の水溶液におけるラメラ長は、いずれも $4.7 \sim 5.0\text{mm}$ であり、EO鎖の末端基構造と濃度に依存しないことがわかった。これより、ラメラ長と泡沫安定性との間に相関は認められないことがわかつ

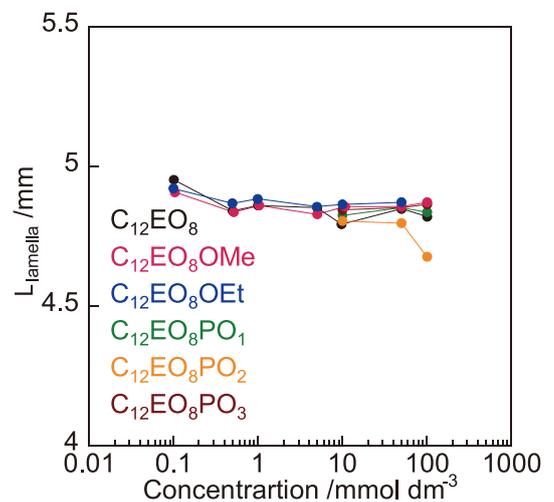


Figure 7 Variation in lamella with concentration for nonionic surfactants

た。

3. 1. 5. 界面粘弾性

各種界面活性剤水溶液の気/液界面における界面粘弾性 (E) と界面活性剤の濃度の関係をCMCとともにFigure 8に示す。いずれも界面活性剤の濃度の増加に伴い E は増加し、ある濃度を境に急激に減少した。 E が極大となる界面活性剤の濃度は、いずれの系もCMCよりも低くなった。

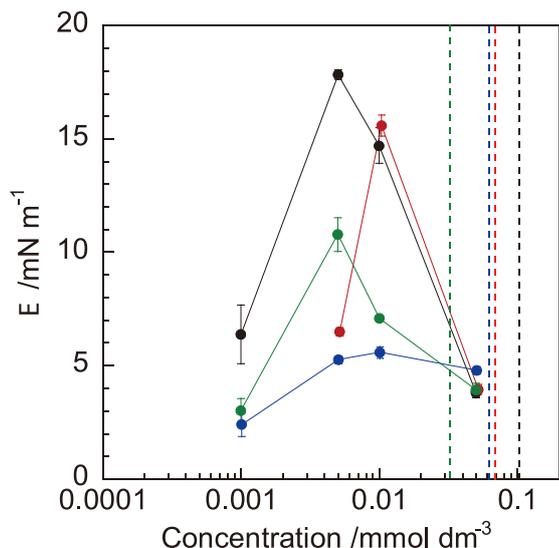


Figure 8 Effect of concentration on the viscoelastic modulus E for nonionic surfactants (●) $C_{12}EO_8$, (●) $C_{12}EO_8OMe$, (●) $C_{12}EO_8OEt$, and (●) $C_{12}EO_8PO_1$. Dotted lines correspond to the CMC determined from surface tension measurement

界面活性剤の濃度が非常に低い場合、気泡を変形させる以前の界面活性剤の吸着量が少ないため、気泡を変形させても大きな表面張力の勾配を得ることができず、 E は小さくなったと考えられる。CMCより高い濃度の場合、界面が飽和吸着した状態から気泡を変形させるため、表面張力の勾配は一時的に大きくなるが、新たな界面にバルクからの界面活性剤がすばやく吸着するため、表面張力の勾配は消失し、 E は小さくなったと考えられる。これは、その他のさまざまな界面活性剤を用いた実験でも同様の挙動が得られており⁵⁻⁹⁾、この現象は、Van den tempelとLucassenによって提案された理論モデル¹⁰⁾と一致した。また、泡沫安定性の高い界面活性剤において、界面粘弾性が高くなり、泡沫安定性と界面粘弾性との間に相関がみられた。

EO系界面活性剤のEO鎖の末端にPO鎖やアルコキシ基を導入することで、泡沫安定性が低下することがわかった。今後、泡沫のナノ構造を明らかにするためにSANSの測定を行う予定である。

3. 2. アニオン界面活性剤の測定

3. 2. 1. 中性子小角散乱

$C_{12}EO_xSO_4Na$ ($x=0, 2, 4, 6, 8$) および $C_{12}EO_8$ (10, 50 mmol dm^{-3} 重水溶液) が形成する泡沫のSANS測定を行った。 $C_{12}SO_4Na$ の10 mmol dm^{-3} 重水溶液が形成する泡沫のSANSプロファイルを図9に示す。散乱ベクトル $q=0.2 \sim 1.0 \text{ nm}^{-1}$ において、散乱プロファイルはおよそ q^{-4} に従った。いずれの時間においても $q=0.2 \sim 1.0 \text{ nm}^{-1}$ において、3つの振動が確認された。泡沫のSANSの結果は、泡膜の反射と泡膜内部の溶液の散乱の重ね合わせであり¹¹⁾、

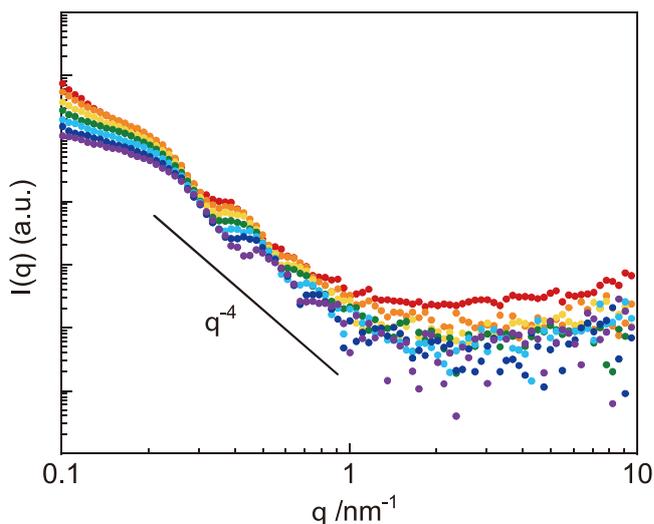


Figure 9 SANS profiles of $C_{12}SO_4Na$ -stabilized foams in D_2O at 10 mmol dm^{-3} acquired at a height of 250 mm from the cell bottom

● : 0-30, ● : 300-350, ● : 600-650, ● : 900-950, ● : 1200-1250, ● : 1500-1530, ● : 1800-1830 sec

この振動は泡沫の気/液界面の反射率由来する¹²⁻¹³⁾。振動周期 Δq を用いると、泡の膜厚 T を $T=2\pi/\Delta q$ の関係から求めることができる¹²⁻¹³⁾。Figure 9において、振動周期 Δq は時間の経過に伴い増加した。これより、時間の経過に伴い泡の膜厚が減少していることが考えられる。これは時間の経過に伴い重力による排水が進行するためと考えられる。また、散乱強度は時間の経過に伴いわずかに減少した。これより、泡膜の数が時間の経過に伴い減少していることが考えられる¹⁴⁾。

アニオン界面活性剤のEO鎖長が2, 4, 6, 8と増加すると、振動の数は減少した。またEO鎖長が長くなると、散乱強度は時間の経過に伴い大幅に減少した。これより、EO鎖長の増加に伴い泡沫安定性が低下することが考えられる。これは目視観察の結果とも一致した。今後、SANSプロファイルの詳細な解析を行い、泡の膜厚や比表面積などを算出する予定である。

4. 考 察

本研究では、末端基修飾型単鎖長EO系非イオン界面活性剤が形成する泡沫の構造や特性を、SANSや溶液安定性評価、界面粘弾性、粘度、ラメラ長、動的表面張力などの測定を組み合わせることで、詳細に検討した。また、EO系非イオン界面活性剤のEO鎖の末端に硫酸エステル基を修飾した単鎖長ポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸ナトリウムについても新規に合成し、同様の測定を用いて泡沫特性を検討し、泡沫特性に及ぼすEO鎖の末端基構造やEO鎖長、アルキル鎖長の影響について調べた。本研究から得られた情報は、洗浄や食品、化粧品などの産業分野において

重要である。今後もさまざまな分子構造の界面活性剤を用いた泡沫の構造解析に関する研究が進み、泡沫特性に及ぼす界面活性剤の分子構造の影響について体系的な理解が深まることを願いたい。

謝 辞

本研究は、奈良女子大学大学院自然科学系化学領域 吉村倫一教授の協力のもと行われました。心より感謝申し上げます。

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) Yada, S.; Suzuki, T.; Hashimoto, S.; Yoshimura, T., Adsorption and Aggregation Properties of Homogeneous Polyoxypropylene-Polyoxyethylene Alkyl Ether Type Nonionic Surfactants. *Langmuir* **2017**, *33* (15), 3794-3801.
- 2) Yada, S.; Suzuki, T.; Hashimoto, S.; Yoshimura, T., Adsorption dynamics of homogeneous polyoxypropylene-polyoxyethylene alkyl ether nonionic surfactants at the air/water interface. *Journal of Molecular Liquids* **2018**, *255*, 208-214.
- 3) Yada, S.; Shimosegawa, H.; Fujita, H.; Yamada, M.; Matsue, Y.; Yoshimura, T., Microstructural Characterization of Foam Formed by a Hydroxy Group-Containing Amino Acid Surfactant Using Small-Angle Neutron Scattering. *Langmuir* **2020**, *36* (27), 7808-7813.
- 4) Pandey, S.; Bagwe, R. P.; Shah, D. O., Effect of counterions on surface and foaming properties of dodecyl sulfate. *Journal of Colloid and Interface Science* **2003**, *267* (1), 160-166.
- 5) Sun, H.-Q.; Zhang, L.; Li, Z.-Q.; Song, X.-W.; Cao, X.-L.; Zhang, L.; Zhao, S.; Yu, J.-Y., Effect of alkyl chain length on the surface dilational rheological and foam properties of N-acyltaurate amphiphiles. *Colloid and Polymer Science* **2012**, *290* (1), 31-40.
- 6) Hofmann, M. J.; Motschmann, H., Surface rheology and its relation to foam stability in solutions of sodium decyl sulfate. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2017**, *532*, 472-475.
- 7) Yan, F.; Zhang, L.; Zhao, R.-H.; Huang, H.-Y.; Dong, L.-F.; Zhang, L.; Zhao, S.; Yu, J.-Y., Surface dilational rheological and foam properties of aromatic side chained N-acyltaurate amphiphiles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2012**, *396*, 317-327.
- 8) Lai, L.; Mei, P.; Wu, X.-M.; Cheng, L.; Ren, Z.-H.; Liu, Y., Interfacial Dynamic Properties and Dilational Rheology of Sulfonate Gemini Surfactant and its Mixtures with Quaternary Ammonium Bromides at the Air-Water Interface. *Journal of Surfactants and Detergents* **2017**, *20* (3), 565-576.
- 9) Zhu, Y.; Xu, G.; Xin, X.; Zhang, H.; Shi, X., Surface Tension and Dilational Viscoelasticity of Water in the Presence of Surfactants Tyloxapol and Triton X-100 with Cetyl Trimethylammonium Bromide at 25 °C. *Journal of Chemical & Engineering Data* **2009**, *54* (3), 989-995.
- 10) Lucassen, J.; Van Den Tempel, M., Dynamic measurements of dilational properties of a liquid interface. *Chemical Engineering Science* **1972**, *27*(6), 1283-1291.
- 11) Micheau, C.; Bauduin, P.; Diat, O.; Faure, S., Specific Salt and pH Effects on Foam Film of a pH Sensitive Surfactant. *Langmuir* **2013**, *29* (27), 8472-8481.
- 12) Schmidt, I.; Novales, B.; Boué, F.; Axelos, M. A. V., Foaming properties of protein/pectin electrostatic complexes and foam structure at nanoscale. *Journal of Colloid and Interface Science* **2010**, *345* (2), 316-324.
- 13) Axelos, M. A. V.; Boué, F., Foams As Viewed by Small-Angle Neutron Scattering. *Langmuir* **2003**, *19* (17), 6598-6604.
- 14) Ropers, M. H.; Novales, B.; Boué, F.; Axelos, M. A. V., Polysaccharide/Surfactant Complexes at the Air - Water Interface - Effect of the Charge Density on Interfacial and Foaming Behaviors. *Langmuir* **2008**, *24* (22), 12849-12857.

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

公益財団法人微生物化学研究会微生物化学研究所

和田 俊一

Nonreducing disaccharide trehalose is used as a stabilizer and humectant in various products including cosmetics and skincare products. However, its use has some problems. Trehalose is hydrolyzed by trehalase, a widely expressed enzyme in multiple organisms including microbes on the skin and environment. When trehalose is hydrolyzed, two glucose molecules are released, and it can be a nutrient of the microbes and promote their growth. It may disturb the microbial flora on the skin and may be a cause of the deterioration and putrefaction of products containing it. The released glucose can glycate proteins and lipids in the skin cells and accelerate the aging of the skin. New trehalose analogs that have adequate moisture retention and protective activities and cannot be hydrolyzed and digested by trehalase and microbes are expected. More than 40 trehalose analogs were prepared including microbial metabolites and synthetic compounds. Among them, a mass-producible metabolite of an actinomycete 4-trehalosamine and its derivative detergent compounds IMCTA-Cns (n=8-15) were selected to be analyzed their properties in this study. Compared with trehalose, 4-trehalosamine exhibited better or comparable protective activities on a starch, proteins, and microbial cells. 4-Trehalosamine also exhibited a high buffer capacity around the neutral pH. 4-Trehalosamine was biologically stable that was not assimilated by microbes and not hydrolyzed by mammalian trehalases. While IMCTA-Cn detergents could be effectively used in membrane protein extraction without the denaturing activity, long-chain detergents IMCTA-C13 – IMCTA-C15 showed 1000–3000-fold stronger autophagy-inducing activity in cultured cells than trehalose and are expected to become a drug lead and research reagent. These results indicate that 4-trehalosamine and the derivative detergents are potential trehalose substitute for various purposes. They can be useful ingredient of cosmetics and skincare products.

1. 緒言

Trehalose は glucose 二分子が 1,1 結合した二糖である。Glucose の還元末端同士が結合により相殺されているため非還元性となる。還元糖は反応性の高いアルデヒドやケトンをも有するため、タンパク質や脂質など多種の分子に結合し構造や活性に悪影響を及ぼすが、非還元糖である trehalose はそうした反応性が低く、分子量が小さい安定な親水性ユニットの一種として考えることができる。保湿作用や水分子代替能の強さによるものと思われるが、trehalose はタンパク質、多糖、細胞、組織などの保護、品質維持機能に優れている。多くの動植物や微生物が保有し、乾燥条件下での保護物質、浸透圧調節物質、あるいは貯蔵糖などとして利用されている。ヒトは trehalose を産生しないが、特異的分解酵素 trehalase を小腸や腎臓などで発現させており、食事から摂取した trehalose は分解して glucose にし、エネルギー源とすることができる。また、trehalose は、保湿、保護作用をもとに、現在、様々な製品の添加物として利用されている。スキンケア分野でも、

乾燥肌や皮膚炎の緩和、創傷被覆、あるいは皮膚再生能の向上などの効果が期待でき、化粧品や保湿クリームに広く利用されている。

しかしながら、trehalose は多くの微生物にも発現の見られる trehalase により分解され、微生物の栄養源となり得るため、スキンケア製品への利用においては皮膚常在微生物叢への悪影響や、保管時の製品腐敗、劣化に注意が必要となる。また、分解産物である glucose は皮膚組織の糖化を促し、老化の原因ともなり得る。このため、保湿、保護作用などの期待される機能を維持しつつ分解されにくい新たな trehalose 類縁体化合物の開発が期待される。

我々はこれまでに放線菌より新規 trehalose 類縁体 lentsztrehalose A, B, C を発見し、これらが trehalase や各種微生物に分解されず安定であることを明らかとてきた¹⁻³⁾。さらに、他の難分解性類縁体の探索、合成も行い、現在は 40 種余りを保有している。これらの類縁体の化粧品を含めた様々な製品への利用を目指して、保湿、保護作用や生産条件などに関する検討を行うこととした。特に、工業スケールでの大量生産が可能と見込まれた 4-trehalosamine とその誘導体化合物 IMCTA-C14 について(図 1)⁴⁾、本研究での主な検討対象とすることとした。

2. 方法

2.1. 4-Trehalosamine 増産法の検討

微生物化学研究所で保有する放線菌のうち、生産菌候補と考えられた約 50 株を培養し、その抽出物を



Characterization and application of enzyme-stable trehalose analogs derived from actinomycetes

Shun-ichi Wada

The Microbial Chemistry Research Foundation Institute of Microbial Chemistry

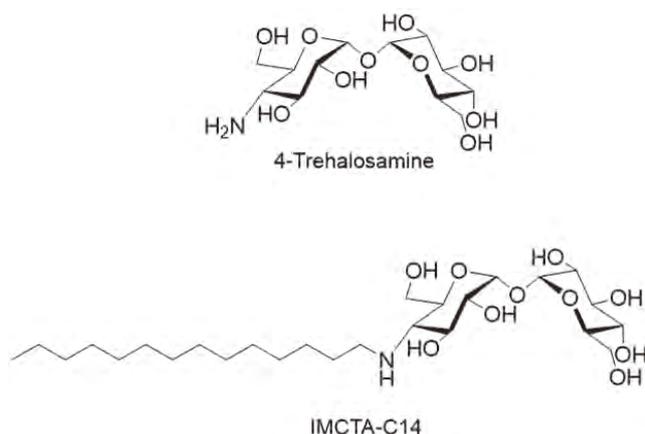


図1 4-Trehalosamine と IMCTA-C14

薄層クロマトグラフィーおよびLC-MSにより分析し、4-trehalosamineの高生産株を選抜した。また、基本液体培地の成分組成を調整し、高生産条件について検討を行った。

2.2. 4-Trehalosamine のでんぷん老化抑制作用の検討

β -アミラーゼを用いた酵素法と動的粘弾性測定法により、4-trehalosamineによるコーンスターチゲル老化抑制作用について検討した。

2.3. 4-Trehalosamine のタンパク質および微生物の乾燥保護作用の検討

ウシalkaline phosphatase (CIP)、酵母 alcohol dehydrogenase (ADH)、およびウシ collagen Type I を 4-trehalosamine や trehalose など各種の糖を加えた条件で凍結乾燥した。凍結乾燥後、元の量の水を加え、酵素2種については活性を測定し、collagen Type IについてはSirius redの取り込みによる立体構造の維持を評価した。微生物については、大腸菌および酵母に対してタンパク質同様凍結乾燥実験を行った。凍結乾燥物を再懸濁して寒天プレート上にまき、生えたコロニー数を測定して各糖による微生物の乾燥保護効果を評価した。

2.4. 4-Trehalosamine のpH緩衝作用の評価

10mM 4-trehalosamine水溶液に1M HClあるいは1M NaOHを滴定し、pH緩衝能を評価した。

2.5. 4-Trehalosamine の微生物による分解、資化性の評価

グラム陽性菌、陰性菌、抗酸菌、および真菌を含む12種類の微生物の最低栄養培養液中に glucose、trehalose、4-trehalosamineなどを加え、菌の増殖を測定し、各糖に対する資化性の有無を評価した。

2.6. 4-Trehalosamine の哺乳類 trehalase に対する分解耐性

4-Trehalosamine や lentztrehalose A などの trehalose 類縁体化合物をブタ腎臓由来 trehalase やヒト trehalase 発現細胞抽出液により反応させ、分解の有無を調べた。

2.7. IMCTA-Cn 化合物の界面活性剤としての評価

4-Trehalosamine に脂肪属アルデヒドを結合させ還元し、界面活性剤化合物群 IMCTA-Cn ($n=8-15$) を合成した。各化合物の臨界ミセル化濃度は測定キットにより評価した。ミセルサイズは動的光散乱法により測定した。HLB値はグリフィン法により計算した。また、ヒト培養細胞 OVK18 からのタンパク質抽出量を調べ、各化合物によるタンパク質可溶性を評価するとともに、抽出タンパク質のフォスファターゼ活性を調べ、タンパク質変性の有無についても評価を加えた。

2.8. 4-Trehalosamine および IMCTA-C14 によるオートファジー誘導能の評価

ヒト培養細胞 OVK18 や Mewo などを 4-trehalosamine や IMCTA-C14 を含む各種の trehalose 類縁体により処理し、オートファジー関連タンパク質の発現、修飾、および局在についてウェスタンブロットティングや免疫染色により調べた。

3. 結果

3.1. 4-Trehalosamine 増産法の検討

予備実験において 4-trehalosamine の生産菌株候補として考えられた約 50 株のうち、4-trehalosamine の生産が確認されたのは 3 株であった。このうち、生産量が最も多かった *Streptomyces* sp. MK186-mF5 株を以降の実験に使用することとした。初期の培地での生産量は液体培養物中で 0.5g/L 程度 (未精製物の含有量として) であった。培地成分を調整した結果、最適な培地、培養条件下では 5.48 g/L まで生産量が上昇した (図2)。ファーメンターによる大量培養物からの精製を試みた結果、純度 97% 以上、1 水和物と考えられる精製物が 540g 得られた。

3.2. 4-Trehalosamine のでんぷん老化抑制作用の検討

でんぷんの老化 (硬化) 抑制は、trehalose の代表的な機能として知られるものである。これにより、現在 trehalose は多くのでんぷん加工食品に添加利用されている。4-Trehalosamine について、でんぷんの老化抑制作用を調べ、trehalose による作用との比較を試みた。2つの系により 96 時間低温保存後のコーンスターチゲルの老化度の比較を行ったところ、4-trehalosamine を加えて調製

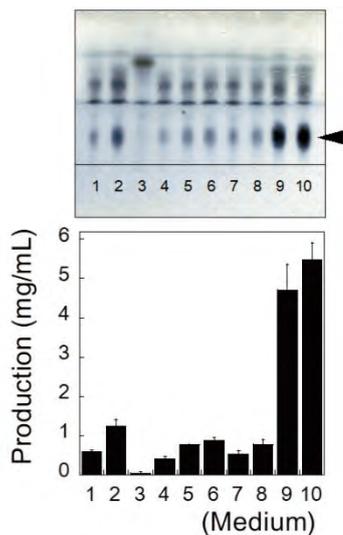


図2 4-Trehalosamine 増産法の検討
元の培地(1)の成分量を1つずつ変え(2-8)、生産量が増加する条件を組み合わせた(9, 10)。上は薄層クロマトグラフィーによる検出結果、下はLC-MSによる4-trehalosamineの測定結果を示す。

したゲルは trehalose、sucrose、あるいは glycerol を加えたものにくらべて有意に老化の進行が遅くなることを確認された(図3)。酵素法(EA)では、4-trehalosamine を加えた場合、老化が抑制され、酵素の反応性が高く維持されることが確認された。一方、直接的なゲルの硬さや粘度を評価する動的粘弾性測定法(DV)では、他の糖を加えたゲルでは一つの指標である Tan δ 値が硬化を示す減少傾向を見せたのに対し、4-trehalosamine を加えたものでは若干の

増加傾向を見せた。

3.3. 4-Trehalosamine のタンパク質および微生物の乾燥保護作用の検討

Trehalose の機能としてよく知られたものの一つが、タンパク質の乾燥からの保護作用である。凍結乾燥時に 4-trehalosamine を加えた場合、CIP と ADH では、他の糖を加えた場合にくらべて活性の保護作用が高く見られた(図4)。一方、collagen Type I では、4-trehalosamine 添加による立体構造の維持効果は見られなかった。また、細胞、組織の乾燥からの保護作用を評価していくための前段階の実験として、微生物の乾燥からの保護作用について検討した。微生物では、大腸菌、パン酵母ともに 4-trehalosamine を加えた場合では、他の糖を加えた場合にくらべて若干、菌の生存率が上昇することが確認された(図5)。

3.4. 4-Trehalosamine の pH 緩衝作用の評価

Tris との部分構造の類似性から、4-trehalosamine の pH 緩衝能について検討を行った。4-Trehalosamine には Tris、MES、あるいは HEPES といった代表的な緩衝物質と同程度に強力な pH 緩衝作用があることが明らかとなった。緩衝 pH 範囲は Tris より 1.0 ほど低く、pH 7.0 付近で最も強

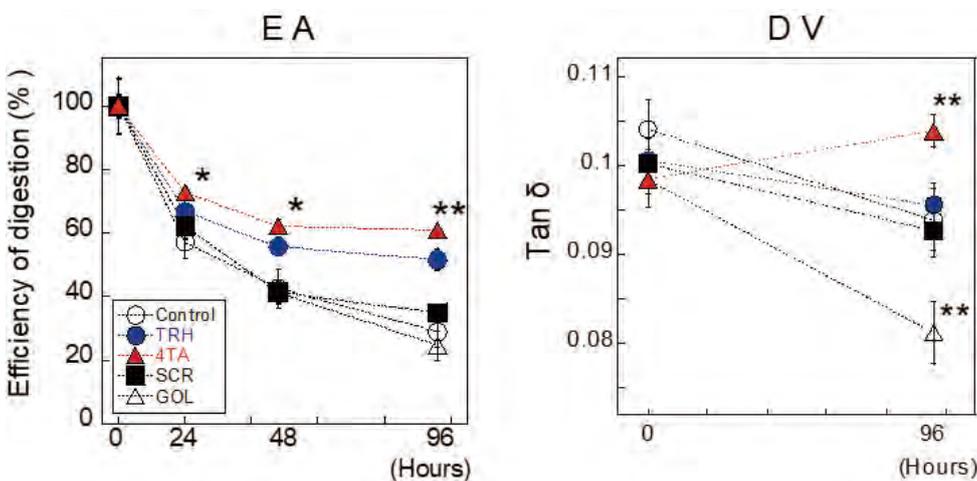


図3 4-Trehalosamine のでんぷん老化抑制作用の検討
15% コーンスターチゲル作製時に 10% trehalose (TRH)、4-trehalosamine (4TA)、sucrose (SCR)、glycerol (GOL) を加え、24、48、および 96 時間後の老化度を酵素法(EA)と動的粘弾性法(DV)により測定した。

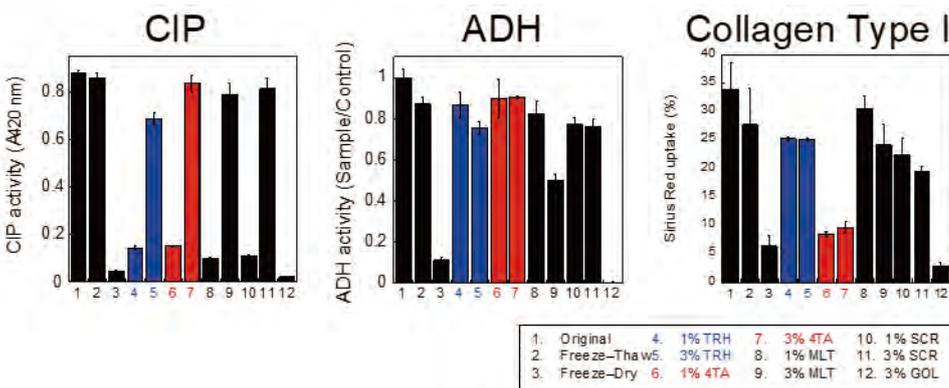


図4 4-Trehalosamine のタンパク質の乾燥保護作用の検討
CIP、ADH、Collagen Type I の水溶液を、trehalose (TRH)、4-trehalosamine (4TA)、maltose (MLT)、sucrose (SCR)、あるいは glycerol (GOL) を混ぜて凍結乾燥したのち、元の量の水を加え、酵素活性と立体構造の維持について検討を行った。

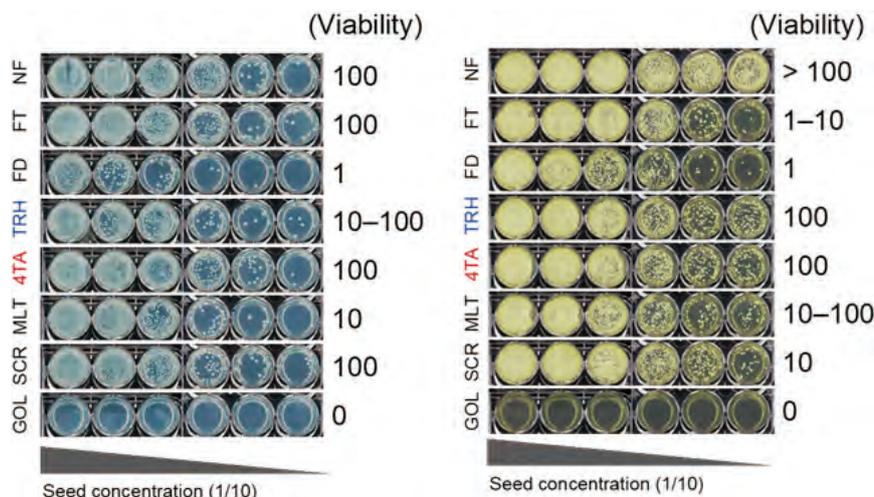


図5 4-Trehalosamine の微生物の乾燥保護作用の検討

大腸菌(左)とパン酵母(右)の水懸濁液中に trehalose (TRH)、4-trehalosamine (4TA)、maltose (MLT)、sucrose (SCR)、および glycerol (GOL) を加え凍結乾燥 (FD) したのち、元の量の水を加え、1/10 の希釈系列で作製した懸濁液を寒天プレート上にまいた。NF は凍結していない元の微生物懸濁液、FT は凍結後そのまま解凍した懸濁液。Viability は、糖を加えずに凍結乾燥した場合のコロニー数を1としたときの、それぞれのコロニー数を示す。

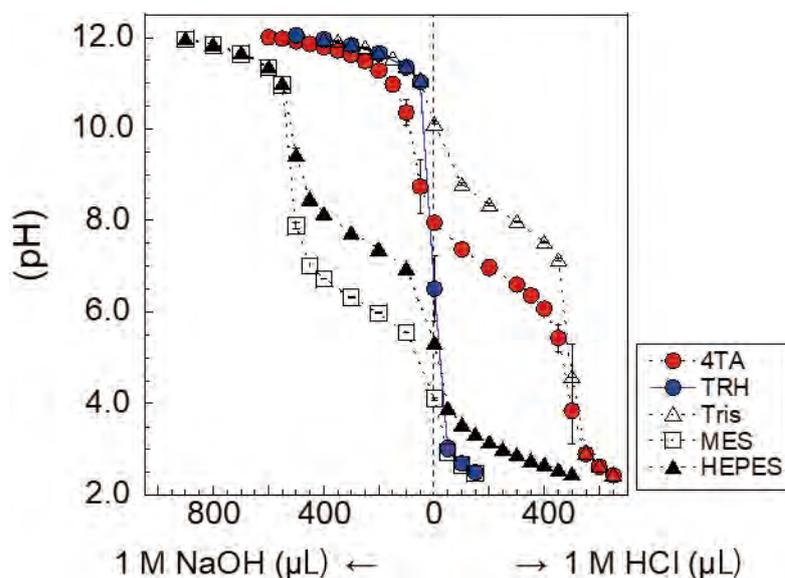


図6 4-Trehalosamine の pH 緩衝作用の評価

4-Trehalosamine (4TA)、trehalose (TRH)、Tris、MES、および HEPES の 10mM 水溶液に 1 M HCl または 1 M NaOH を滴定し、pH の変化を調べた。

力な緩衝能を発揮した(図6)。

3.5. 4-Trehalosamine の微生物による資化性の評価

4-Trehalosamine が微生物に分解され栄養源となるのか調べることにした。12種類の各種微生物それぞれに対し、炭素源の不足した最低栄養培地を用意し培養を行った(図7bar 1)。いずれの場合も glucose の添加(bar 2)により菌の増殖率の上昇が見られる培地とした。Glucose の代わりに trehalose を添加した場合(bar 3)でも、6種類ほどの菌では増殖率の上昇が確認された。4-Trehalosamine を添加した場合(bar 4)ではどの菌でも増殖率の上昇は見られず、微生物の栄養源とはならないことが示された。

3.6. 4-Trehalosamine の哺乳類 trehalase に対する分解耐性

ブタ trehalase(図8A)を反応させた場合では、trehalose

のみ分解産物の glucose の産生が見られ、4-trehalosamine と他の trehalose 類縁体では glucose の産生は見られなかった。また、ヒト trehalase 発現細胞抽出液を用いた実験(図8B)では、抽出液反応後の trehalose 類縁体化合物の残存量を測定したが、やはり trehalose のみが分解され、他の類縁体は分解されないことが確認された。4-Trehalosamine は哺乳類 trehalase に分解されないことが示された。

3.7. IMCTA-Cn 化合物の界面活性剤としての評価

4-Trehalosamine を原料として合成した化合物 IMCTA-Cn (n=8-15) について、界面活性剤としての性質を調べた。IMCTA-C12 と n-dodecyl-β-D-maltoside (DDM) の同じ長さの脂肪鎖をもつものの比較では、

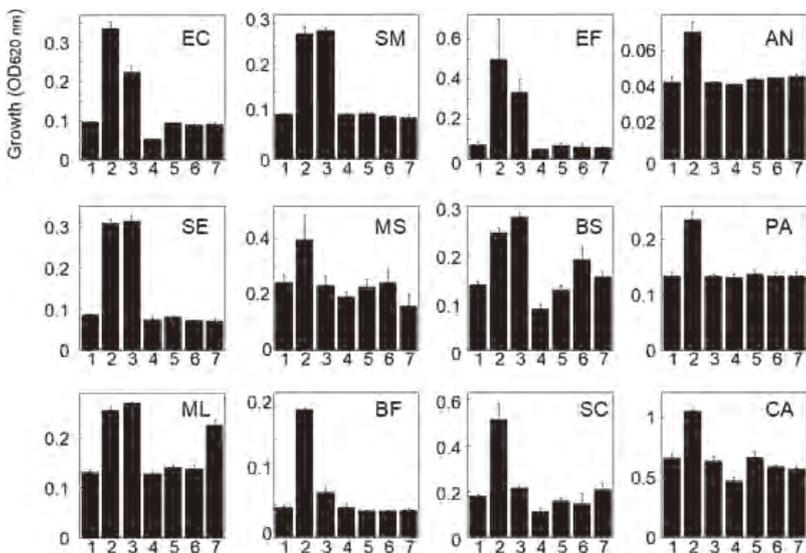


図7 4-Trehalosamineの微生物による資化性の評価
12種類の微生物それぞれの最低栄養培地 (bar 1) に、glucose (bar 2)、trehalose (bar 3)、4-trehalosamine (bar 4)、およびその他のtrehalose類縁体 (bars 5-7) を加え、各菌の増殖を測定した。

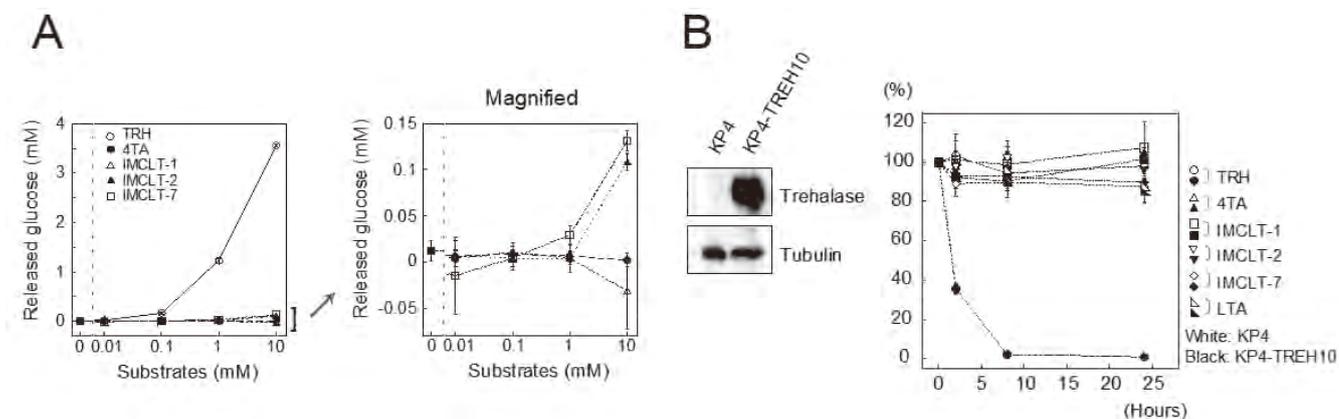


図8 4-Trehalosamineの哺乳類trehalaseに対する分解耐性

A. ブタ腎臓由来 trehalase を trehalose (TRH)、4-trehalosamine (4TA)、およびその他の trehalose 類縁体化合物に反応させ、分解産物である glucose の放出量を測定した。右は 4TA とその他の類縁体のプロットの重なりを拡大したもの。
B. ヒト培養細胞 KP4 でヒト trehalase を発現させ、その抽出液による trehalose 類縁体の分解について調べた。KP4-TREH10 は trehalase 安定発現株。グラフ中、白印は親株 KP4 抽出液で trehalose 類縁体を反応させたもの。黒印は KP4-TREH10 抽出液で反応させたもの。

IMCTA-C12の方が臨界ミセル濃度が高く、ミセルサイズが大きかった(図9A)。培養細胞からのタンパク質抽出、可溶化効率について調べた結果、IMCTA-C11-C14は効率が高く、特にIMCTA-C13ではSDSと同等に高い効率を示した(図9B)。抽出液中のEGFR、TRPV6、あるいはNa⁺/K⁺ATPaseの存在量を確認した結果、これらの化合物では膜タンパク質の抽出も効率よくできていることが明らかとなった(図9C)。一方、抽出液のフォスファターゼ活性を調べたところ、SDSで抽出したものでは、フォスファターゼが変性し活性が低下していたが、IMCTA-Cnではフォスファターゼ活性が維持されており、これらがタンパク質変性作用を示さない界面活性剤であることが確認された(図9D)。

3. 8. 4-TrehalosamineおよびIMCTA-C14によるオートファジー誘導能の評価

Trehalose類の生理機能として、50-100mM程度の高濃度で用いた場合に細胞にオートファジーを誘導することが知られている。4-TrehalosamineとIMCTA-Cn化合物のオートファジー誘導能の有無について調べた。4-Trehalosamineによる処理では、trehaloseより強いオートファジーマーカーLC3-IIの発現が確認された(図10A)。IMCTA-Cn類はさらに強いオートファジー誘導能を示した。IMCTA-C13-C15では、trehaloseの1/3000-1/1000ほどの濃度で、Trehaloseよりも強くオートファジーマーカーの発現が確認された。4-TrehalosamineやIMCTA-Cnによる処理時、rapamycinの場合と異なりp70S6Kの脱リン酸化が確認されていなかった(図10B)

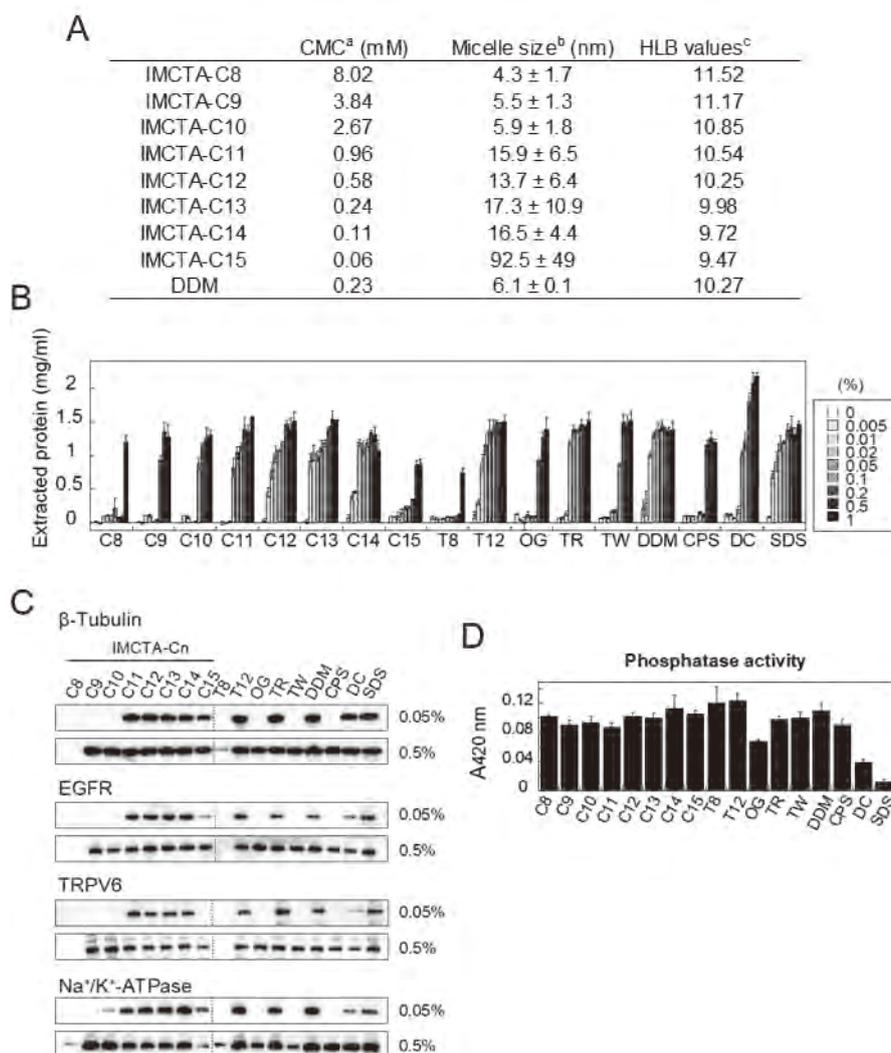


図9 IMCTA-Cn 化合物の界面活性剤としての評価

- A. IMCTA-Cn (n=8-15) 化合物の臨界ミセル濃度、ミセルサイズ、およびHLB値を示す。
- B. IMCTA-Cn (C8-C15) と各種界面活性剤を右に示す濃度で使用した際のOVK18細胞抽出液中のタンパク質濃度をBCA法により測定した。
- C. Bの抽出液の一部をウェスタンブロッティングにより分析し、各化合物による膜タンパク質の抽出、可溶化効率を確認した。
- D. 各化合物抽出液のフォスファターゼ活性を測定し、タンパク質変性を検討した。

ことから、これらも trehalose と同様、mTOR 非依存的にオートファジーを誘導するものと考えられた。また、4-Trehalosamine と IMCTA-C14 は trehalose 同様、細胞内の凝集性ペプチドを減少させ (図 10C)、オートファジー関連転写因子 TFEB の核移行を促進させた (図 10D)。

4. 考察

本研究は我々が長期的に行っている難分解性 trehalose 類縁体化合物の実用化に向けた検討の一環として行われたものである。本研究期間においては4-trehalosamineの産業的大量生産が期待される結果が得られたため、これを中心に利用法の検討を行うこととした。

4-Trehalosamine については本研究での検討により、現段階で実験室レベルの設備と1か月ほどの作業により、500g以上生産することが可能となった。今後は変異原物質を用いた生産菌育種や新たな培地、培養条件の検討により、更なる増産にも期待することができる。また、trehalose や各種アミノグリコシド化合物の生合成機構を考慮すると、4-trehalosamine は数種類程度の酵素により生合成されてい

るものと考えられる。現在その酵素については未同定であるが、将来的にはその応用により、でんぷんからの trehalose の生産と同様、安価な材料物質を数種の酵素で処理することで大量生産することができる可能性があり期待される。

4-Trehalosamine には collagen type I の乾燥からの保護作用はほとんど見られなかったが、でんぷんの老化抑制作用に関しては trehalose や他の糖類に比べて有意に強く見られ、また、CIP や ADH といった酵素や、大腸菌や酵母などの微生物の乾燥からの保護作用も他の糖より強いのか、あるいは同程度に確認された。哺乳類の細胞や組織に対する保護効果に関しては、まだ予備実験段階であるが、マウス皮膚の再生や創傷治癒作用についても、少なくとも trehalose と同程度の効果が認められている。本研究において4-trehalosamine は強い pH 緩衝能を示し、微生物に資化されず、trehalase に分解されない、といった trehalose には無い長がいくつか確認された。Trehalose は保湿保護物質として優れた特性を有し、現在多くの製品に使用されているが、その一方で、一般的に流通している類縁体化合物が存在しないため、製品開発段階において性能を比較し、より良いものを選択すると

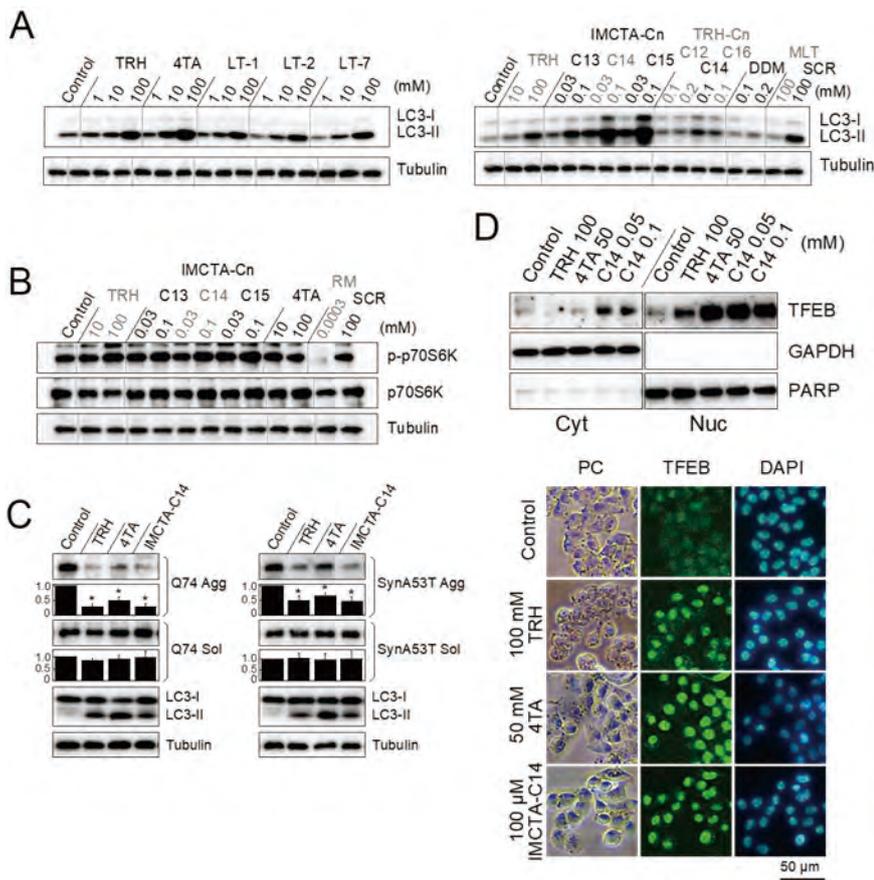


図10 4-Trehalosamine および IMCTA-Cn によるオートファジー誘導能の評価

- A. Trehalose 類縁体処理細胞内でのオートファジーマーカータンパク質 LC3-II の発現上昇について調べた。LT-1、-2、-7 は、別のトレハロース類縁体。TRH-Cn は trehalose の 6 位に脂肪酸が結合したエステル。
- B. mTOR の基質である p70S6K のリン酸化状態を調べ、4-trehalosamine と IMCTA-Cn によるオートファジー誘導が mTOR 依存性のものであるかどうか調べた。RM は mTOR 阻害剤 rapamycin。
- C. Trehalose 類で処理した際の、凝集性ペプチド Q74 と SynA53T の細胞内での存在量を調べた。低浸透圧液を使用し、凝集物画分(Agg)と可溶物画分(Sol)に分けて評価を行った。
- D. Trehalose 類で処理した際のオートファジー関連転写因子 TFEB の発現量と核移行についてウェスタンブロットと免疫染色により調べた。

ということができない。化粧品、スキンケア製品開発において、4-trehalosamine には、まずは trehalose との比較対象として使用されることから期待したい。

Trehalose 類縁体化合物の一般的な流通が進まない理由の一つとして、誘導体化合物の安価な大量生産が困難である点が挙げられる。分子内に 8 個含まれる水酸基のうち、特定のものを修飾、構造変換することは産業レベルでは困難である。4-Trehalosamine に関しては、4 位に限定されるものの、水酸基とは反応性の異なるアミノ基を利用することで容易に多数の誘導体化合物を合成することが可能である。本研究では、当初、構造生物学分野での膜タンパク質研究への利用を考えて、4-trehalosamine 誘導体である IMCTA-Cn 化合物を合成した。IMCTA-C13 を中心とした脂肪鎖が長めのものについてはタンパク質可溶化作用が強く認められる一方で、変性作用は示さないマイルドな界面活性剤であることが確認された。化粧品分野では乳化剤としての利用が期待される。また、強いオートファジー誘導能が確認されたことから、実用化には更なる慎重な検討が必要であるが、皮膚組織の新陳代謝を促進するような効果が得られることも期待される。

5. 総括

1990 年代半ばに日本の製糖企業株式会社林原によって、でんぶんの酵素処理による安価な大量生産法が開発された

trehalose は、その後 25 年ほどで年間 4-5 万トン生産されるようになり、現在では食品以外にも多くの製品に添加、使用されるようになった。我々が日々消費する様々な製品の原材料欄を見ると、単一の糖または糖アルコールとして最も頻繁に含有が確認できるものの一つが trehalose である。それ以前も酵母から抽出された少量のものが一部の化粧品や研究試薬などに使用されていたようではあるが、生産、利用規模は革命的な変化を見せてきた。林原による trehalose のこれまでの生産、販売展開の軌跡は、「人類が利用可能な新たな糖」の一つが発見されるということが産業史上いかに重大な意義をもつのかを示す特筆すべき事例であるものと言える。

4-Trehalosamine は産業的な大量生産が可能であるものと考えられ、trehalose より優れた幾つかの性質を示すため、正に「人類が利用可能な新たな糖」の一つとなり得るものと期待される。近い将来我々の生活に深く浸透していくものになる可能性がある。

また 4-trehalosamine は合成原料としての有用性にも期待が集まる。本研究で開発された IMCTA-Cn 化合物の一部は乳化剤や洗剤としての利用以外に、trehalose タイプの強力なオートファジー誘導剤として神経変性疾患や肝疾患の治療薬あるいはリード化合物としての開発、利用も期待される。また、現在はまだ着手していないが、4-trehalosamine を規則的に結合させた、保湿、保護効果を有した樹脂、繊維、接着剤

などの高分子物質の開発にも今後興味もたれる。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、多大な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。

本研究は、有村帆波美氏、吉田温子氏、永吉美穂氏、松波さくら氏、柳澤諒氏、五十嵐雅之博士、大庭俊一氏、澤竜一博士、久保田由美子氏、大石智一博士、原川晃子氏、清水孝雄博士をはじめ、微生物化学研究所の多くの方々のご協力により進めてまいりました。厚く感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Wada S et al. Stability and bioavailability of lentztrehaloses A, B, and C as replacements for trehalose. *J. Agric. Food Chem.* 64, 7121-7126. (2016)
- 2) Wada S et al. Novel autophagy inducers lentztrehaloses A, B and C. *J. Antibiot.* 68, 521-529. (2015)
- 3) Wada S et al. Structure and biological properties of lentztrehalose: a novel trehalose analog. *J. Antibiot.* 67, 319-322. (2014)
- 4) Wada S et al. Rediscovery of 4-trehalosamine as a biologically stable, mass-producible, and chemically modifiable trehalose analog. *Adv Biol (Weinh)*. <https://doi.org/10.1002/adbi.202101309> (2022)

Ⅱ． 生体作用、安全性に関する分野

ヒト iPS 細胞由来神経堤細胞による革新的線維芽制御方法の開発

慶應義塾大学眼科学教室

稲垣 絵海

With the advent of an aging society, the importance of prevention and treatment of various chronic diseases has been pointed out. Inflammation and fibrosis control are considered to be important as the underlying pathology common to chronic diseases. We focused on the wound healing mechanism during the embryonic period and investigated neural crest cells (NC) that have the ability to migrate during the embryonic period. In this study, we focused on neural crest cells derived from iPSCs to overcome disease phenotypes, and found that they secrete a secretome that acts in an inhibitory manner against inflammation and is useful in disease models. Since neural crest cells derived from living organisms have a relatively limited capacity, induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived neural crest cells may be advantageous for cell therapy and may enhance regenerative functions. However, there are some barriers to clinical application, such as standardization of production methods, product quality control and standardization, and in vivo viability, when considering extrapolation as a regenerative medicine product, but the potential as a new cell source with interesting possibilities is promising.

1. 緒言

世界的な高齢化社会を迎え、基礎研究分野でも加齢に伴う疾病の克服に向けた新たな時代が到来している。人間の老化や加齢に伴う疾病のメカニズムや治療法の解明という問題は、差し迫った高齢化社会を反映し、新たな局面を迎えている。老化の詳細なメカニズムは依然として不明な点があり、複数の調節機構の関与が報告されている¹⁻³⁾。このなかで臓器線維化は慢性炎症に伴い生じ、主要臓器では致死を招く病態である。皮膚や角膜は強く損傷すると瘢痕を残して治癒し、決して元の状態には再生されない。しかし、胎生期のある時期までは、たとえどのような深い傷を追っても瘢痕を全く形成することなく完全に元の状態に再生され、この機構は胎仔創傷治癒機構 (scarless wound healing) といわれる⁴⁻⁷⁾。我々は、これまでの知見で生来における神経堤由来の細胞の局在について検討を実施、移植細胞源としての有用性を実証してきた^{8,9)}。2006年と2007年に、高橋らはマウスとヒトの体性線維芽細胞から人工多能性幹細胞 (iPSC) を作製する技術を報告した^{10,11)}。以来iPS細胞を用いた組織分化のメカニズムやヒト疾患の病態生理を解明する病態解析の試験管モデルとしての有用性と共に細胞置換療法としての移植治療が着目され病態解明や新規治療法開発が実施されている¹²⁻¹⁴⁾。本研究ではiPS由来誘導神経堤細胞の移植細胞源としての特性を明らかにする目的で実施を行った。

2. 方法

我々は既報に準じた神経堤細胞の誘導法を改善し、現在では90%以上の誘導効率を担保する誘導系を確立した^{15,16)}。誘導したiPS由来誘導細胞において神経堤細胞マーカーの遺伝子発現解析についてはDNAマイクロアレイを用いて検証した。分泌している液性因子に関してはサイトカインアレイを用いて上清成分の定量化および解析を実施した。

3. 結果

施行した遺伝子解析においては誘導の過程においてNGFR, SNAIL, SOX9, SOX10, TFAP2Aなどの神経堤マーカーの発現上昇を確認した。ウェスタンブロッティングにて検証した蛋白定量においてもNGFR, SOX9らの発現を確認した。またDNAマイクロアレイの解析において誘導細胞が神経堤マーカーの発現が高いことを確認した。また同細胞の培養液上清を用いて志向したサイトカインアレイの結果より複数の候補因子群を抽出した。さらに実際の生体における創傷治癒機構を解明するため、げっ歯類における眼疾患モデルを用いこれらの候補因子の有効性について検討を行った。結果として単一因子としては優位な瘢痕抑制を認めることはできなかったが、培養上清の添加によって効果を認めたことから培養上清中に分泌される複数の因子が作用していることが示唆された。

4. 考察

我々の解析により今回iPS細胞由来誘導神経堤細胞から分泌される液性因子による新しい瘢痕抑制効果を見出した。想定される奏功機序に寄与した液性因子が線維芽細胞に作用し細胞外基質や蛋白分解酵素の発現の修飾をする予備知見を得ており、神経堤の形質を有する本誘導細胞が炎症に関して収束的な役割に寄与することを推察している。



Development of an Innovative Method for Modulating Fibrosis by Human iPSC Cell-Derived Neural Crest Cells

Emi Inagaki

Keio University, School of Medicine, Department of Ophthalmology

5. 結論・まとめ

神経堤 (neural crest: NC) 細胞は胎生期から成体にかけて軟骨や骨、皮膚など結合織をはじめとして驚異的に様々な種類の細胞系譜への可能性を秘めかつ、成体になっても持続する自己複製能力を有する細胞である¹⁷⁻¹⁹⁾。近年同細胞を細胞治療用に探索する試みも報告されつつある^{20, 21)}。同細胞を用いて治療の標的としては神経堤から分化するような組織における組織構築に関する貢献を期待する場合、もう一つは疾患特異的な修復を期待する場合である。今回標的とした角膜実質は神経堤由来の誘導組織と報告されているが、我々もヒト NC 由来の多能性前駆細胞をヒト成体から単離した場合に、年齢依存的な変化を呈しており自己複製能力と多能性に関しては制限されていることなどを報告している²²⁾。よって移植細胞として用いる場合にはより幼若な iPS 細胞あるいは ES 細胞のような細胞源が適切とも考えられる。本研究では主に組織修復における有用性を検証したが、ヒルシュスプリング病など神経堤由来細胞の発生異常関連疾患においても寄与することが期待できる。再生医療においては長期的な安定性を厳密に管理することが重要であると考えられる。たとえば規格化などの点においては代表的な神経堤細胞表面抗原である p75 を使用することが推定されるが、複数の適切な表面抗原の選定が必要である。iPS 由来誘導細胞を用いた新しい細胞治療を構築するには、有効性評価の確立、細胞の安全性、毒性評価、投与方法の最適化を踏まえる必要がある^{23, 24)}。もし同等の効果を有する場合に液性因子のみを投与するような試みも十分に考える。本領域においてはモデル動物での検討と iPS 由来誘導細胞において互いに補完して研究を進めていくことが有用であると考えられる。今後も当該領域において進歩がなされることを期待する。

(文 献)

- 1) Harman, D., *The aging process*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78** (11) : p. 7124-8.
- 2) Haigis, M.C. and B.A. Yankner, *The aging stress response*. Mol Cell, 2010. **40** (2) : p. 333-44.
- 3) López-Otín, C., et al., *The Hallmarks of Aging*. Cell, 2013. **153** (6) : p. 1194-1217.
- 4) Larson, B.J., M.T. Longaker, and H.P. Lorenz, *Scarless fetal wound healing: a basic science review*. Plast Reconstr Surg, 2010. **126** (4) : p. 1172-1180.
- 5) Schwartzfarb, E. and R.S. Kirsner, *Understanding scarring: scarless fetal wound healing as a model*. J Invest Dermatol, 2012. **132** (2) : p. 260.
- 6) Lo, D.D., et al., *Scarless fetal skin wound healing update*. Birth Defects Res C Embryo Today, 2012. **96** (3) : p. 237-47.
- 7) Pratsinis, H., E. Mavrogonatou, and D. Kletsas, *Scarless wound healing: From development to senescence*. Adv Drug Deliv Rev, 2019. **146**: p. 325-343.
- 8) Yoshida, S., et al., *Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea*. Stem Cells, 2006. **24** (12) : p. 2714-22.
- 9) Inagaki, E., et al., *Skin-Derived Precursors as a Source of Progenitors for Corneal Endothelial Regeneration*. Stem Cells Transl Med, 2017. **6** (3) : p. 788-798.
- 10) Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126** (4) : p. 663-76.
- 11) Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131** (5) : p. 861-72.
- 12) Liu, G.H., Z. Ding, and J.C. Izpisua Belmonte, *iPSC technology to study human aging and aging-related disorders*. Curr Opin Cell Biol, 2012. **24** (6) : p. 765-74.
- 13) Okano, H. and S. Yamanaka, *iPS cell technologies: significance and applications to CNS regeneration and disease*. Mol Brain, 2014. **7**: p. 22.
- 14) Okano, H. and D. Sipp, *New trends in cellular therapy*. Development, 2020. **147** (18).
- 15) Lee, G., et al., *Isolation and directed differentiation of neural crest stem cells derived from human embryonic stem cells*. Nat Biotechnol, 2007. **25** (12) : p. 1468-75.
- 16) Chambers, S.M., et al., *Dual-SMAD Inhibition/WNT Activation-Based Methods to Induce Neural Crest and Derivatives from Human Pluripotent Stem Cells*. Methods Mol Biol, 2016. **1307**: p. 329-43.
- 17) d'Aquino, R., et al., *Human neural crest-derived postnatal cells exhibit remarkable embryonic attributes either in vitro or in vivo*. Eur Cell Mater, 2011. **21**: p. 304-16.
- 18) Achilleos, A. and P.A. Trainor, *Neural crest stem cells: discovery, properties and potential for therapy*. Cell Res, 2012. **22** (2) : p. 288-304.
- 19) Griswold, S.L. and P.Y. Lwigale, *Analysis of neural crest migration and differentiation by cross-species transplantation*. J Vis Exp, 2012 (60).
- 20) Li, L.K., et al., *Intramuscular delivery of neural crest stem cell spheroids enhances neuromuscular regeneration after denervation injury*. Stem Cell Res Ther, 2022. **13** (1) : p. 205.

- 21) Brizi, V., et al., *Human iPSC-derived neural crest stem cells can produce EPO and induce erythropoiesis in anemic mice*. *Stem Cell Res*, 2021. **55**: p. 102476.
- 22) Hatou, S., et al., *Functional corneal endothelium derived from corneal stroma stem cells of neural crest origin by retinoic acid and Wnt/beta-catenin signaling*. *Stem Cells Dev*, 2013. **22** (5) : p. 828-39.
- 23) Blau, H.M. and G.Q. Daley, *Stem Cells in the Treatment of Disease*. *N Engl J Med*, 2019. **380** (18) : p. 1748-1760.
- 24) Madl, C.M., S.C. Heilshorn, and H.M. Blau, *Bioengineering strategies to accelerate stem cell therapeutics*. *Nature*, 2018. **557** (7705) : p. 335-342.

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

東京医科歯科大学大学院皮膚科学分野

宇賀神 つかさ

The incidence of hair dye and cosmetics allergy have increased considerably among young people. Contact hypersensitivity commonly occurs with hair dye exposure, manifesting as urticaria or eczematous eruptions in localised exposed areas. However, in some cases, prurigo can be diffusely occurred. Neither the histopathology nor molecular mechanisms of hair dye-induced prurigo have been elucidated.

Basophil activation test (BAT) is a safe, ex vivo assay to confirm allergy diagnosis. In this study, we first examined the utility of BAT for diagnosing hair dye allergy by analyzing the results of BAT performed in four cases (two cases, contact eczema; one case, contact urticaria; one case, prurigo) that have positive patch test reactions to p-phenylenediamine (PPD). Basophils isolated from two cases (one case, contact eczema; one case, contact urticaria) were non-responder. Responder basophils from two residual cases (one case, contact eczema; one case, prurigo) did not respond to PPD. Therefore, in cases of delayed-type reaction against PPD including prurigo, PPD and PPD specific IgE-induced basophil activation might not be involved. However, the utility of BAT in diagnosis of immediate-type PPD allergy such as contact urticaria could not be elucidated in this study.

We further showed the histological features of hair dye-induced prurigo, including the characteristics of an immune cell infiltrate. The histopathology exhibited hyperkeratosis, acanthosis, and subcorneal collection of neutrophils. Immunohistochemical staining revealed moderate basophil infiltration in subcorneal microabscesses with infiltration of CD4+ cells, IL-17+ cells, and Foxp3+ cells beneath microabscesses and perivascular area in upper dermis. Together, whereas basophil activation was not observed following exposure to PPD, basophil was infiltrated in central portion of the lesions. Further studies are necessary to reveal the role of basophils in hair dye-induced prurigo.

1. 緒言

近年、毛染めや化粧品の使用に伴うスキントラブルは、若年層での広がりを見せており、患者数は増加している。化粧品の使用に伴うスキントラブルは、接触皮膚炎や接触蕁麻疹など接触部に留まるアレルギー反応が主体である。一方、染毛剤は接触皮膚炎や接触蕁麻疹に加え、アナフィラキシーショック、痒疹など、全身性に多彩な臨床症状を呈することが知られるが、その病態の詳細は不明である。アレルギー精査においては、遅延型アレルギーであればパッチテスト、即時型アレルギーであればプリックテストやオープンテストが施行されるが、後者は、アナフィラキシーなどの重篤な症状が誘発されるリスクがあり、安全性には十分な配慮が必要である。好塩基球活性化試験は、安全な ex vivo の検査であり、アレルギー診断に有用であることが知られている。本研究では毛染めアレルギーにおける好塩基球活性化試験の有用性を検討した。また、当科の先行研究では、一般的な慢性痒疹の病態には、IgE抗体や好塩基球が深く関与することが明らかになっている¹⁻²⁾。そ

こで、本研究ではさらに、染毛剤アレルギーによる痒疹反応における好塩基球や種々の免疫細胞の関与を病理組織学的に解析した。

2. 方法

2.1. 染毛剤アレルギーにおける好塩基球活性化試験の有用性

東京医科歯科大学皮膚科を受診し、染毛剤アレルギーが疑われ、精査を施行した症例を対象に検討した。症例は、臨床症状より病型分類した。染毛剤とジャパニーズスタンダードシリーズのp-phenylenediamine (PPD)を用いたパッチテストあるいはオープンテストの結果を検討した。BATはPPDの希釈系列の付加による末梢血好塩基球の活性化 (CD203c)の有無をフローサイトメトリーにて解析した結果を検討した。さらに、臨床症状と精査結果を比較検討することで、染毛剤アレルギーにおけるBATの有用性について検討した。

2.2. 染毛剤アレルギーによる痒疹の病態解析

診断のために採取した染毛剤アレルギーによる痒疹の病理組織標本を用いて、好塩基球の他、各種免疫細胞の浸潤を病理組織学的に評価した。好中球や好酸球はヘマトキシリンエオジン (HE) 染色で、肥満細胞はアルーシャンブルー染色で検出した。好塩基球は、顆粒特異的抗体を用いて、リンパ球はCD4・CD8・Forkhead box protein P3 (FoxP3) 抗体を用いて、interleukin (IL)-17産生細胞は抗IL-17抗

Analysis on the utility of basophil activation test in the diagnosis of hair dye and cosmetics allergy and the mechanism of prurigo reaction caused by hair dye

Tsukasa Ugajin

Department of Dermatology, Tokyo Medical and Dental University



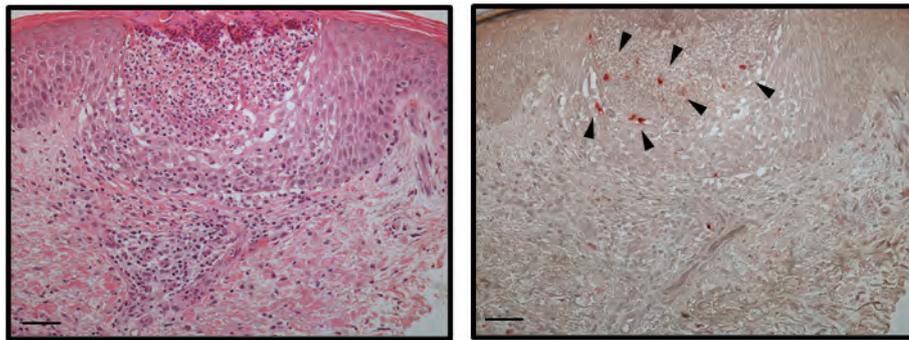


図1 左：染毛剤による痒疹反応 HE染色、右：同 好塩基球特異的抗体による免疫染色 (200倍) Scale bar, 50 μ m 文献5)より引用し、改編

体を用いて免疫組織染色で検出した。

3. 結果

染毛剤アレルギーが疑われ、当科で精査を施行した症例12症例(男性2例、女性10例)について検討した。12症例の内、4例は、PPDあるいは染毛剤のパッチテスト陽性だった。4例の臨床症状は、2例が接触皮膚炎、1例が接触蕁麻疹、1例が痒疹だった。PPDを用いたBATでは、2例(接触皮膚炎と接触蕁麻疹が各1例)はanti-IgE抗体による陽性コントロールでも好塩基球におけるCD203cの発現変動が見られず non-responderであったと考えられた。残り2例(接触皮膚炎と痒疹が各1例)は responderであったが、PPDの付加で好塩基球におけるCD203cの発現に変動は見られなかった。

染毛剤アレルギーによる痒疹の病態解析として、病変部より採取した病理組織標本を用いて、免疫組織学的な解析を行った。表皮の肥厚、表皮内には好中球と比較的多くの好塩基球の浸潤が見られた(図1)。一方、肥満細胞の増殖は確認できなかった。リンパ球は、CD4陽性細胞が大半を占め、IL-17陽性、FoxP3陽性細胞を混じていた。

4. 考察

PPDに対するパッチテストが陽性反応を示した4症例の内、responderの好塩基球を有する2症例は接触皮膚炎と痒疹型の患者であったが、この2症例においてPPDによるBATは共に陰性の結果であった。少なくとも痒疹型を含む遅延型のPPDアレルギーの患者においては、PPDの曝露による好塩基球の活性化は見られないこと、PPD/特異的IgE抗体の反応が関与しない可能性が考えられた。PPDによる即時型アレルギー(接触蕁麻疹)の1症例においても、BATが検討されたが、non responderの好塩基球を有しており、診断におけるBATの有用性については明らかにならなかった。今後さらなる症例の蓄積が必要である。

染毛剤アレルギーによる痒疹の病理組織では、病変部の中心部である表皮において、好中球の他、多くの好塩基球浸潤が認められた。また、その周囲や真皮上層には、IL-17産生細胞・制御性T細胞の浸潤が見られた。過去に

当研究室で樹立した染毛剤アレルギーのモデルマウスは³⁾、3日間連日抗原感作した後、抗原をチャレンジするというものであるが、IgE上昇を伴うSTAT6依存性の2型免疫応答が誘導される。近年、別の手法を用いたモデルマウスにおいて、IL-17産生細胞や制御性T細胞がリンパ節において誘導されることが報告された⁴⁾。染毛剤アレルギーにおける痒疹は、後者のモデルに類似すると考えられ、これを論文報告した⁵⁾。

本研究の成果より、染毛剤アレルギーによる痒疹反応ではPPDの曝露による好塩基球活性化は確認できなかったが、痒疹病変の中心部には好塩基球の浸潤を認めていた。今後、染毛剤アレルギーによる痒疹反応における好塩基球機能を解明していくためには、さらなる解析が求められる。

5. 総括

結論、まとめを考察に含める。

(引用文献)

- 1) Ugajin T, Yokozeki H. Efficacy of anti-immunoglobulin E therapy in patients with prurigo: a pilot study. *J Cutan Immunol Allergy* 2019, DOI: 10.1002/cia2.12061
- 2) Inui K, Ugajin T, Namiki T, Yokozeki H. Chronic prurigo: A retrospective study of 168 cases. *J Dermatol*. 47:283-9, 2020
- 3) Yokozeki H, Wu MH, Sumi K et al. Th2 cytokines, IgE and mast cells play a crucial role in the induction of para-phenylenediamine-induced contact hypersensitivity in mice. *Clin Exp Immunol* 132: 385-92, 2003
- 4) Rubin IMC, Dabelsteen S, Nielsen MM et al. Repeated exposure to hair dye induces regulatory T cells in mice. *Br J Dermatol* 163: 992-8, 2010
- 5) Ugajin T, Namiki T, Yokozeki H. A case of prurigo caused by hair dye containing p-Phenylenediamine: Histopathological finding. *Eur J Dermatol* 31:103-4, 2021

ヒトの視覚と嗅覚を制御する新しい抽出分離素材の開発

東北大学大学院環境科学研究科先端環境創成学専攻環境創成計画学講座環境分子化学分野

大田 昌樹

Measurements of vapor-liquid distribution coefficients (K-values) of compounds contained in hops-extract ethanol solution in high pressure CO₂ system were carried out at temperatures of 313–373 K and pressures of 5–14 MPa with a continuous flow apparatus for fractionation of hops-extract by using supercritical counter-current extraction process. Using available experimental data for 105 K-values, a correlation equation for the vapor-liquid distribution coefficient of solutes was constructed based on entropy-based solubility parameter (eSP) and dimensionless temperature. The dimensionless distribution equation that takes into account the eSP concept, originally developed in the previous work (Ota et al., 2017), was also applied to the available experimental data, and four universal constants were re-determined. From the established calculation methods, the K-values of solutes could be applied to the counter-current extraction systems with supercritical CO₂.

1. 緒言

従来一緒に抽出されてきた天然・合成化合物を分離する技術には、時代に左右されない一定の需要があるものとする。例えば、最近、飲料関連の市場を賑わせている一見透明な水に見えるが、オレンジジュースの味や香りがする飲料等は正にその例といえよう。これは、従来のオレンジジュースがもつ特有のβクリプトキサンチン等のカロテノイド色素を除いた飲料と言い換えることができ、これまでの世間の常識の範疇を超えた応用事例であろう。著者がオリジナル開発した亜臨界溶媒分離技術¹⁻⁵⁾は、こうした応用事例に正に適用可能であり、将来的には、医薬食品・飲料の他、化粧品や化成品への応用も視野に入れている。今回の実験対象としたのは、ホップ (*Humulus lupulus*) である。ホップは、麦芽、水、酵母と並ぶビールの重要な原料であり、多くの香り成分や精油、樹脂成分や色素を含んでいる (Canbas et al., 2001)。ビールの製造において、ホップは少量の添加により飲料の味および香りを調整できるだけでなく、ビールに対する清澄作用や殺菌作用を示す。一般に、ホップは抽出分離操作により目的成分が濃縮されたホップエキスの状態で利用される。最近では、このような天然材料中の含有成分抽出・分画手法として、抽出物に有害な溶媒が残留する恐れがなく、抽出時に成分の酸化劣化を防ぐことができる等の利点を有する超臨界・亜臨界流体抽出が注目されている。

これまで著者らは、超臨界二酸化炭素抽出に精留機構を組み合わせた半回分プロセスにより天然由来成分の分画を検討してきたが、本法は半回分式ゆえに固体原料の仕込み直しに手間がかかるという課題があった。そこで、常温常圧にて産業上汎用される液体原料を溶媒と連続的に向流接触させる抽出法(向流接触抽出法)を例に、高压系への拡張を目指した研究を展開し、まず高压フラッシュ平衡測定を可能とする気液平衡比測定装置を開発した。二酸化炭素-エタノール-ホップエキス系に本装置を応用した結果、主要7溶質についての基礎データを蓄積するとともに溶解度パラメータに基づく気液平衡比の推算式を報告している¹⁾。この基礎データに基づき、超臨界二酸化炭素を用いたホップエタノールエキスの向流接触抽出実験を実施した結果、高温、高压かつ抽剂/原溶媒比(S/F比)が大きいほど香り成分とレジン成分の分離効率が高いことがわかった²⁾。このことは、一般的な二酸化炭素-エタノール-精油系の気液平衡比データの傾向とも一致した³⁾。

しかしながら、これまでの既往の研究では、実験の温度および圧力条件がそれぞれ323–343Kおよび圧力8–10MPaと狭く¹⁾、得られた気液平衡比データ数も計7溶質で35データと限られていた。そこで本研究では、さらなるデータの拡充のため実験条件範囲の拡大を目的とし、CO₂-ethanol共溶媒系におけるホップエキス含有成分の気液平衡比の測定を、温度および圧力条件をそれぞれ313–373Kおよび5–14MPaとして実施した。さらに、得られた気液平衡比の傾向を定量的に表現する相関式を提案し、著者らが以前に開発した溶解度パラメータに基づく推算式¹⁾と比較した。これらの検討より、従来一緒に抽出されてきた成分の効率的な分離を実現するための温度・圧力条件による気液平衡比の予測法を構築することを目的とした。なお、この報告書は、投稿論文として寄稿した化学工学論文集の内容⁴⁻⁵⁾からの抜粋であることをご了承いただきたい



Development of new extract-materials from separation of natural products including pigments and flavors

Masaki Ota

Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University

い。

2. 方法

2.1. 実験資料

溶媒にはCO₂(大陽日酸株式会社, 純度 99.5%) および ethanol (富士フィルム和光純薬工業株式会社, 純度 99.5%) を使用した。溶質となるホップ試料にはBarthHaas社製のホップエキス(品種: Perle)を使用した。

2.2. 実験装置・方法

気液平衡比の流通式測定装置は、以前報告したものと同一のものを使用した⁶⁾。本装置は、供給部、平衡到達部、組成分析部から構成され、設計最高温度、最高圧力は373K, 25MPaである。

供給部では、ホップエキス濃度0.5wt%となるように調製されたethanol溶液がHPLCポンプ(日本分光(株)製, PU-2085)により装置内に供給される一方、CO₂は冷却機能が搭載されたHPLCポンプ(日本分光(株)製, PU-2080-CO₂)により装置内に供給される。平衡到達部では予熱コイル、ミキサー、気液分離セルが空気恒温槽内に設置され、系内の温度が所定温度に制御される。圧力が作動時間間隔を調整した連動式背圧弁によりコントロールされるとともに、気液界面の位置が一定に保持される。気相および液相のサンプルは、それぞれアセトン-ドライアイスからなる冷却トラップを用いて採取される。

CO₂流量は気相側では乾式ガス流量計、液相側では湿式ガス流量計により定量し、ethanol溶液は秤量により定量した。なお、ethanol溶液中の着目溶質はホップエキス含有成分のうち、含有組成の大きい7成分(myrcene, caryophyllene, humulene, cohumulone, humulone, colupulone, lupulone)とした。各名称の略称をTable 1に示す。略称の頭文字F, RはそれぞれFlavor(香り)成分, Resin(レジン)成分とした。このうち、myrceneについては以前測定したCO₂-ethanol-myrcene系気液平衡の文献値³⁾より $K_{solute} (=y_{solute}/x_{solute})$ を算出した。myrcene以外の6成分についてはGC-FIDおよびHPLC-UVによる本研究での測定結果から溶質気液平衡比 K_{solute} を算出した。

Table 1 Name and abbreviation for the targeted compounds

Compound	Abbreviation
myrcene	F_myrc
caryophyllene	F_car
humulene	F_hum
cohumulone	R_coh
humulone	R_hum
colupulone	R_col
lupulone	R_lup

実験条件は温度313-373K, 圧力5-14MPaとした。なお、気液共存領域での操作とするため温度によって圧力範囲は異なる。また、Feedモル組成は溶質-freeの値で、抽剤:原溶媒として、二酸化炭素:エタノールの物質質量流量を80:20とし、かつ合計を0.075mol/minとなるように設定した。

3. 結果

ホップ含有7成分の高圧CO₂-ethanol共溶媒系における気液平衡比測定結果のうち、1例として温度353K, 圧力5-12MPaおよび温度333-373K, 圧力10MPaにおける K_{solute} 測定結果をFig. 1aおよび1bにそれぞれ示す。Fig. 1aより、 K_{solute} の圧力依存性は香り成分とレジン成分で異なる挙動を示した。すなわち、香り成分では圧力とともに K_{solute} が単調に増加する一方、レジン成分では6MPa付近で K_{solute} が極小となった。これらはFig. 2に示す溶媒のK値(K_{CO_2} および $K_{ethanol}$)から説明できるものと考えられる。つまり、香り成分はレジン成分よりも低極性で揮発性が高いため、Fig. 2の K_{CO_2} に見られるような単調な圧力依存性を示したが、レジン成分は高極性で難揮発性物質であることから、極性成分であるエタノールの分配($K_{ethanol}$)、すな

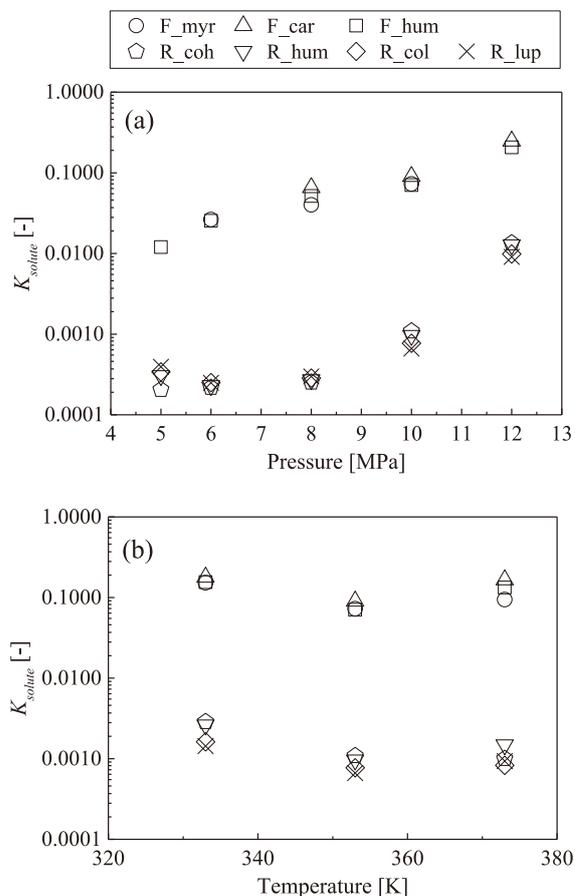


Fig. 1 Experimental results of K_{solute} in CO₂ (1)-ethanol (2) systems ((a) Pressure dependence at 353 K and (b) Temperature dependence at 10 MPa)

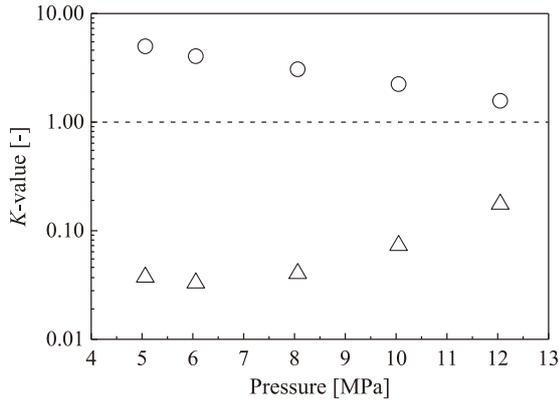


Fig. 2 Pressure dependence of K_{CO_2} and $K_{ethanol}$ measured at 353 K. Circle and triangle symbols show CO_2 and ethanol, respectively.

わち高圧ほど気相中のエタノール組成が増大する影響を受けたものと考えた。

次に、Fig. 1bより、 K_{solute} の温度依存性は、香氣成分およびレジン成分ともに353 Kで極小を示した。これは温度上昇に伴う気相密度の低下と、溶質成分の昇華圧の増加が拮抗した結果と考える。この結果から、後述する本系におけるホップエキス含有成分の K_{solute} の相関式化に際しては、気相密度などの諸物性の他、ethanolの気液分配による影響などを考慮する必要があるものと考えた。

4. 考察

実測した K_{solute} を任意の条件で予測するためには、 K_{solute} と操作条件との定量的な相関式が必要となる。特に、将来的な向流接触抽出モデルへの応用に向けては、より高い精度での気液平衡比の相関が必要である。この相関式の構築にあたり、Fig. 1および2より、香氣成分では K_{CO_2} 、レジン成分では $K_{ethanol}$ の影響が顕著であったので、これらの影響を相関式に反映させることが必要と考えた。そのためには、溶媒特性のうち極性の影響の定量化が必要と考え、Hildebrand溶解度パラメータに対して、高温高圧混合系に拡張したeSP (δ_S) 値⁷⁾に着目して K_{solute} の整理を行った。

$$K'_{solute} = \frac{y'_{solute}}{x'_{solute}} = \frac{\exp\left(-\frac{(\delta_{S,V} - \delta_{S,Solute})^2}{2\sigma_y^2}\right)}{\exp\left(-\frac{(\delta_{S,L} - \delta_{S,Solute})^2}{2\sigma_x^2}\right)} \quad (\delta_{S,V} < \delta_{S,Solute} < \delta_{S,L}) \quad \dots\dots(10)$$

$$K'_{solute} = \frac{y'_{solute}}{x'_{solute}} = \frac{\exp\left(-\frac{(\delta_{S,V} - \delta_{S,Solute})^2}{2\sigma_y^2}\right)}{\exp\left(-\frac{(\delta_{S,L} - \delta_{S,Solute})^2}{2\sigma_y^2}\right)} \quad (\delta_{S,V} < \delta_{S,L} < \delta_{S,Solute}) \quad \dots\dots(11)$$

$$\ln K_{solute,calc} = A K'_{solute} + B \quad \dots\dots(12)$$

eSP値はMaxwellの関係を利用してEq.(1)で定義され、本研究ではEqs. (2)-(8)に示すPeng-Robinson (PR-EoS) 状態方程式中の圧力を体積一定のもと温度で偏微分することで算出した。なお、PR-EoSにおける CO_2 およびエタノールの臨界定数、偏心因子、2成分間相互作用パラメータ k_{ij} および l_{ij} は以前に報告した文献値⁶⁾の値をそのまま用いた。また、溶質は希薄なので CO_2 -ethanol 2成分系気液平衡関係には影響を与えないものとして計算を行った。

構築した気液平衡比の相関式をEq.(9)に示す。式中の変数としては気液両相における溶質freeの溶媒についてのeSP値比の他、無次元温度(T/T_0)を用いた。なお、式中の基準温度 T_0 は298.15 Kとした。また、式中の A_i および B_i はフィッティングパラメータであり各成分に対して実験値との相関により決定した。

決定したパラメータをTable 2、 K_{solute} の相関結果をFig. 3およびFig. 4にそれぞれ示す。図より、 K_{solute} はEq.(9)により良好に表現できており、任意の条件において2成分系共溶媒のeSP値から K_{solute} の算出が可能となった。これにより、先の7個のホップエキス含有成分における全実験データを相対平均偏差45.2%で相関することができた。た

$$\delta_S^2 = \left(\frac{\partial S}{\partial v}\right)_T = \left(\frac{\partial P}{\partial T}\right)_v \quad \dots\dots(1)$$

$$P = \frac{RT}{v-b} - \frac{a\alpha}{v(v+b)+b(v-b)} \quad \dots\dots(2)$$

$$a = \frac{0.45724R^2T_c^2}{P_c} \quad \dots\dots(3)$$

$$b = \frac{0.07780RT_c}{P_c} \quad \dots\dots(4)$$

$$\alpha = \left\{1 + m(1 - T_r^{0.5})\right\}^2 \quad \dots\dots(5)$$

$$m = 0.3764 + 1.54226\omega - 0.26992\omega^2 \quad \dots\dots(6)$$

$$a_{mix} = \sum_i \sum_j x_i x_j (1 - k_{ij}) \sqrt{a_i a_j} \quad \dots\dots(7)$$

$$b_{mix} = \sum_i \sum_j x_i x_j (1 - l_{ij}) \frac{(b_i + b_j)}{2} \quad \dots\dots(8)$$

$$K_{solute} = A_i \cdot \left(\frac{\delta_{S,V}^V \cdot T}{\delta_{S,L}^L \cdot T_0}\right)^{B_i} \quad \dots\dots(9)$$

Table 2 The obtained constants in Eq. (9)

Compound	A_i [-]	B_i [-]	R^2
myrcene	0.8371	2.2256	0.8222
caryophyllene	2.4664	2.5202	0.8555
humulene	2.5728	2.7430	0.9022
cohumulone	0.0729	3.6522	0.9435
humulone	0.1102	4.3055	0.9231
colupulone	0.0665	4.0611	0.9040
lupulone	0.0737	4.3372	0.8857

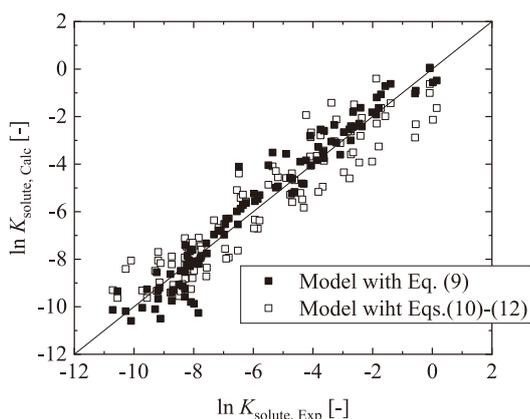


Fig. 3 K_{solute} correlated by Eq. (9) or Eqs. (10) - (12)

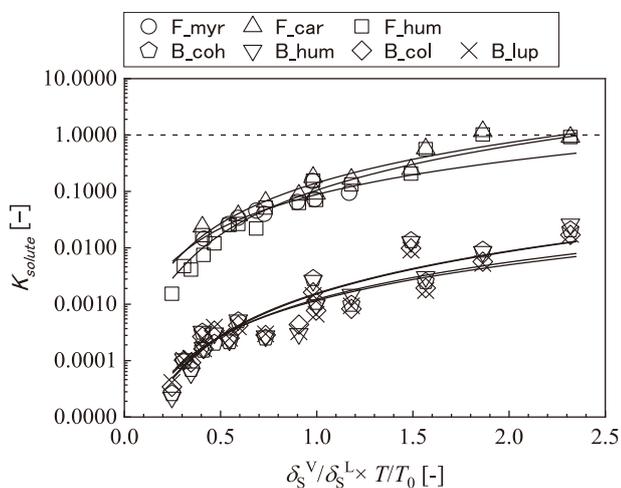


Fig. 4 Experimental K_{solute} correlated by Eq. (9)

だし、この相関式は高精度の計算が可能となるが、各溶質につきフィッティングパラメータを2つ含む表現となっている。

その一方で、以前に構築したCO₂-ethanol共溶媒系におけるホップエキス含有7成分の気液平衡比の推算式¹⁾は、各溶質に依存するフィッティングパラメータがないことが特徴である。そこで本研究で測定した計105の実験データにEqs.(10)-(12)に示す推算式を適用してみた。

ここで、Eq.(10)およびEq.(11)中の $\delta_{s,V}$ 、 $\delta_{s,L}$ および $\delta_{s,Solute}$

はそれぞれ気相、液相および溶質のeSP値を示す。なお、Eq.(10)およびEq.(11)中の分母は液相組成、分子は気相組成をそれぞれ示し、各組成は溶質のeSP値を基準にガウス分布により表現されている。このうち、Eq.(10)では、溶質のeSP値が気相と液相に挟まれる場合($\delta_{s,V} < \delta_{s,Solute} < \delta_{s,L}$)、Eq.(11)では、溶質のeSP値が気相と液相の各値よりもそれぞれ大きい場合($\delta_{s,V} < \delta_{s,L} < \delta_{s,Solute}$)を示している。なお、式中に存在する4つのパラメータ(σ_s 、 σ_r 、 A 、 B)は気液平衡比の実験データに合わせてそれぞれ決定する必要があるが、今回最小自乗法によりそれぞれ(582.8, 522.6, 13.9, -11.4)と再決定することができ、このとき実験値と計算値における相対平均偏差は149.9%となった。これは、既報(Ota *et al.*, 2017)の推奨値(308.1, 167.7, 16.6, -7.10)を本実験データに適用したときの相対平均偏差356.8%を大幅に下回る数値であった。得られた実験値と計算値の比較結果をFig. 3に示す。

これらの結果をまとめると、推算式において再決定したパラメータを用いた偏差(149.9%)は、先の前相関式での値(45.2%)に比べて大きかったが、前者の推算式では一度パラメータを決めてしまえばこれらを定数として取り扱うことができる点がメリットとなる。すなわち、未知物質を想定した場合に、その物質のeSP値さえわかれば、気相と液相のeSP値を実験条件として入力することができ、結果としてEqs.(10)-(12)の推算式より気液平衡比を計算できることになる。

5. 総括

本研究にて構築した相関式では本研究で対象とした成分においては高精度な予測が可能となることがわかった。その一方で、モデルパラメータとして定数を見直した推算式では、溶質のeSP値さえわかれば、気相および液相のeSP値と照合させて気液平衡比を定量的に把握できるようになることがわかった。

(引用文献)

- 1) M. Ota et al., Fluid Phase Equilibria, 434, 44-48, 2017.
- 2) Y. Hoshino et al., The Journal of Supercritical Fluids, 136, 37-43, 2018
- 3) Y. Obonai et al., Kagaku Kogaku Ronbunshu, 45 (6), 238-243, 2019
- 4) Y. Hoshino et al., Kagaku Kogaku Ronbunshu, 47(2), 17-22, 2021
- 5) Y. Ueno et al., Kagaku Kogaku Ronbunshu, 47 (2), 23-27, 2021
- 6) Y. Maeta et al., Fluid Phase Equilibria, 405, 96-100, 2015
- 7) M. Ota et al., Fluid Phase Equilibria, 425, 65-71, 2016

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

長岡技術科学大学技術科学イノベーション専攻

大沼 清

Safety is one of the most fundamental criteria that cosmetics must fulfill. People, who may become pregnant, are concerned about the safety of themselves and the fetus. Recently, human pluripotent stem cells have gained attention for developing in vitro tests of teratogenicity and malformation because using animals for testing cosmetics is prohibited now. However, the effect of toxicity on the whole body (teratogenicity) is not easy to assess because it is difficult to form a macroscopic spatial pattern from human pluripotent stem cells (hPSCs). The cause of the difficulty is that the movement of morphogens, which are responsible for the cell-cell interaction and cell differentiation, cannot be controlled by a standard culture dish. We previously applied unidirectional-microfluidics to control the advection-diffusion of the morphogen and succeeded in making a macroscopic pattern where the upstream cells differentiated but downstream cells did not. However, the mechanism is not well understood.

We made an "in vitro organizer formation hypothesis" and tested it. In vivo, the organizer secretes inhibitors of mesoderm induction signal, which form a concentration gradient of signal, resulting in a macroscopic differentiation pattern. To test the hypothesis, we measured the signaling inhibitors in the supernatant of the cultured hPSCs. We found that the cells secrete a BMP inhibitor, Noggin, secreted from the organizer. However, the concentration of secreted Noggin is too low to inhibit BMP action. Thus, we assumed that diffusion on the cell surface is slow because proteoglycans such as heparan sulfate bind Noggin and BMP. Based on this assumption, experimental results could be explained by the reaction advection-diffusion model, supporting our hypothesis. Moreover, using a potent teratogen, thalidomide, we found that many genes, including cardiomyocyte marker ACTC1, were up- and down-regulated, suggesting these genes could be used as teratogenicity markers.

Our findings may use to develop in vitro tools that help the safety test of cosmetics.

1. 緒言

安全性は、化粧品の満たすべき基本条件である。特に、妊娠の可能性のある女性にとっては、自身はもちろんのこと、胎児への影響も気になる。したがって、妊娠の可能性のある女性にも安心して使用してもらうためには、成人に対してだけでなく胎児や胚に対しても、材料となる成分の毒性(催奇形性)テストが必要となる。ところが近年、動物愛護の点から化粧品の動物実験は禁止されている。そこで、胎児の体になる部分(胚盤葉上層)に近い性質をもつヒトの胚性幹細胞や人工多能性幹(induced pluripotent stem: iPS)細胞などの多能性幹(pluripotent stem: PS)細胞を用いて胚を模倣し、催奇形性のテストをする方法が注目されている¹⁾。ところが、ヒトPS細胞は、空間的な巨視的パターンができにくいという欠点がある。つまり、全身のパターン形成への影響がわからない。その原因は、通常の培養皿を用いては、細胞間の相互作用を担う分泌タンパクなどの移動拡散の制御ができない点にある。

近年、マイクロ加工技術によりヒトPS細胞を制御し、全身のパターン形成を模倣する研究が試みられている²⁾。我々もこれまで、ヒトiPS細胞を無血清培養やマイクロ流路で制御する手法を研究してきた³⁻⁵⁾。そして、一方向性のマイクロ流路を用いて、分化途中のヒトiPS細胞からの分泌タンパクの移動拡散を一方向化し、ヒトiPS細胞から巨視的な空間パターンをもって分化させることに成功した⁵⁾。そして以上の実験から我々は、以下の「in vitro オーガナイザー形成仮説」を考えている(図1)。この仮説ではまず、上流からBMPを流すと、上流のヒトiPS細胞が中胚葉に分化する。次に、中胚葉の細胞がBMP阻害剤である

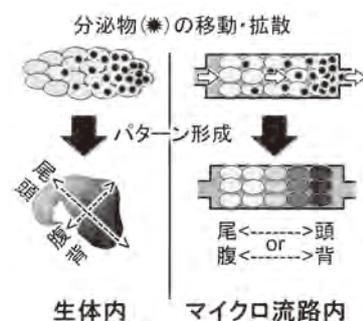


図1 「in vitro オーガナイザー形成仮説」概念図

細胞が中胚葉分化シグナルの阻害タンパク質を分泌することで、生体内では背腹・頭尾の軸が決定するように、マイクロ流路内でも巨視的パターンが出現する。この現象を利用することで、マイクロ流路内で胚を模倣する“Embryo-on-a-chip”を構築することが可能となる。



Development of in vitro teratogenicity test method by imitating macroscopic pattern of the human embryo

Kiyoshi Ohnuma

Department of Science of Technology Innovation, Nagaoka University of Technology

Noggin、ChordinなどのBMP阻害剤を放出し、オーガナイザーとしての役割を担う。最後に、上流より分泌された阻害剤が、下流のヒトiPS細胞の分化を抑制する。つまり、生体内におけるオーガナイザーによる体軸形成と同様の現象が起きていると考えている。

本研究の目的は、大きく分けて2つある。1つ目は、仮説の検証である。細胞からの分泌物の実測と、シミュレーションとを行い、「in vitroオーガナイザー形成仮説」を検証する。2つ目は催奇形性テストの実証である。心筋分化実験と、サリドマイド添加を行い、催奇形性の試験に応用可能なことを実証する。

2. 方法

2.1. 細胞培養

ヒトiPSCの培養hPSC細胞株201B7⁶⁾は、理研BRCセルバンク(HPS0063、つくば)から、文部科学省のナショナルバイオリソースプロジェクトを通じて入手した。細胞は、Y-27632(ロック阻害剤、最終濃度5 μ M、036-24023、フジフィルム和光純薬株式会社)および2.5 μ g/cm²ラミニン断片(iMatrix-511-シルク、タカラバイオ株式会社)を含む維持培地(StemFit AK02 N、味の素、東京)を用い、製造元のプロトコルに従って培養した。

2.2. 培養上清のEnzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

回収した培養上清(120 μ L)は凍結保存した。解凍した培養上清を、1000 \times gで2分間遠心分離し、Noggin測定用のELISAキット(SEC130Hu、Cloud Clone Corp.、ヒューズトン、米国)を製造元のプロトコルに従い測定した。吸光度の測定には、マイクロプレートリーダー(モデル680、Bio-Rad、カリフォルニア)を用いて450nmで測定した⁷⁾。

2.3. 免疫染色

細胞を4%パラホルムアルデヒド(163-20145、和光)で固定し、透過処理し、0.2% TritonXとおよび1%ウシ血清アルブミン(BSA)(019-27051、和光、大阪、日本)入りのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)でブロックした。続いて、細胞をブロッキングバッファーで一次および二次抗体を薄めてから反応させた(補足表TS2)。細胞は、蛍光顕微鏡(BZ-8100、キーエンス、大阪)を用いて撮影した。

2.4. シミュレーション

BMP4とNogginは1対1で反応(BMP+Noggin \leftrightarrow BMP-Noggin)することで、BMP4の不活性型であるBMP4-Noggin複合体(BMP4-Noggin)を生成しつつ、移流拡散する。BMP、Noggin、BMP4-Nogginの濃度をそれぞれ[B]、[N]、[BN]で表すと、以下の式となる。

$$\frac{\partial[N]}{\partial t} = D_N \nabla^2 [N] - q \cdot \nabla [N] - k_1 [N][B] + k_2 [NB]$$

$$\frac{\partial[B]}{\partial t} = D_B \nabla^2 [B] - q \cdot \nabla [B] - k_1 [N][B] + k_2 [BN]$$

$$\frac{\partial[BN]}{\partial t} = D_{NB} \nabla^2 [BN] - q \cdot \nabla [BN] + k_1 [N][B] - k_2 [BN]$$

ここで、 t は時間、 D_N 、 D_B 、および D_{NB} はそれぞれ、Noggin、BMP4、およびBMP4-Noggin複合体の拡散係数であり、 q は一方向の灌流マイクロチャンバーを使用したときの流速である。

細胞の分化は、細胞表面のBMP4が曝露された積算値[総曝露BMP](h ng/mL)が閾値を超えた時点で起こると仮定した。[総曝露BMP]は、最初($t=0$ s)でゼロとし、BMP4濃度(ng/m)の時間(h)で積分していき、閾値として定めた100h ng/mL BMP4を超えたときに、細胞の分化マーカータンパク質の発現が変化すると仮定した。培養上清中のNoggin濃度は、培地の下限(細胞表面の拡散の抑制構造の上部、 $y=y_{\min}$)から上限(培地表面、 $y=y_{\max}$)の間のNogginの空間平均した濃度($[N(y_{\min} < y < y_{\max})]$)として計算した。 x と y は、それぞれ培養容器の水平方向と垂直方向である^{7,8)}。

2.5. サリドマイドの添加

未分化のhiPSCを単一細胞に分離して播種した。未分化hiPSCの場合、播種の1日後からサリドマイドを添加し、4日目に回収した。中胚葉条件では、播種1日後に培地を50ng/mLアクチビン、3 μ M CHIR99021(R&D Systems)、およびY-27632を含むhESF6培地に交換した(図2A)。1日目にCHIR99021を除去し、3日目にY-27632を除去し、0日目に0.1%ジメチルスルホキシド(DMSO)で調製したサリドマイドで細胞を処理した。5日目に細胞を回収した⁹⁾。

2.6. RT-qPCRアレイ分析

採取した細胞からRNAを抽出し、cDNAを合成した後、RT2SYBRGreen ROX qPCR Mastermix(330404、Qiagen)の混合物をRT2 Profiler PCRアレイヒト人工多能性幹細胞(PAHS-092ZE-4、Qiagen)に添加し、7900HT FastReal-TimePCR(Applied Biosystems、CA、USA)で解析した。45個のhiPSC遺伝子、16個のESC遺伝子、4個の内胚葉遺伝子、6個の中胚葉遺伝子、9個の外胚葉(神経幹細胞を含む)遺伝子などを含む84個の遺伝子を標的とした⁹⁾。

3. 結果

3.1. 細胞からの分泌物の実測

BMP4の添加により分化誘導した細胞の培養上清に分泌されるNogginをELISAを用いて定量した。Nogginを含まない無血清・フィーダーフリー条件下で、BMP4添加・無添加の状態、低細胞密度播種条件 (1×10^4 cells/cm²) と高細胞密度播種条件 (5×10^4 cells/cm²) でhPSCを培養し、1日ごとに培養上清を回収して測定し、3日目に免疫染色して細胞状態を確認した。BMP4は低細胞密度播種条件で細胞分化を誘導したが(SSEA-1陽性)、高細胞密度播種条件で未分化(SOX2陽性)のままであった(図2AB)。この結果は、細胞が分化阻害剤を分泌しており、高細胞密度ではその分化阻害剤が細胞分化を抑えるのに十分な濃度に達したことを示唆している⁵⁾。

そこで、高細胞密度播種条件のときに上清中へと分泌されたNogginをELISA測定した結果、Nogginの平均濃度はBMP4の有無にかかわらず6つの条件すべての平均値は0.69ng/mLであることがわかった(図2C)。6つの条件の平均値の間に有意差はなかった(P=0.54~0.99、スチューデントt検定)。したがって、BMP4の有無に関係なく、細胞は常に約0.69ng/mLのNogginを分泌していたことを示唆している。

このNogginの濃度は、予想を大きく下回るものであった。添加したBMP4は50ng/mLに対して、0.69ng/mLのNogginしか検出されていないため、濃度差が70倍もある。以前の実験では、BMP4の濃度が10ng/mLでも同じ

ような結果が得られているが、それでも14倍の差がある。BMP4とNogginは1対1で反応してBMP4が不活性化状態になる(BMP4-Noggin)場合、このNogginの放出量は非常に低く、BMP4による分化を抑えることは難しいと予想される。実際、シミュレーションしてみても、やはり分化を抑えるためには、Nogginの放出量が数十倍足りないことが明らかとなった⁷⁾。したがって、われわれが以前に報告したような高細胞密度での分化の抑制や一方向性のマイクロ流路による下流の分化の抑制などの実験結果は⁵⁾、単純なBMPとNogginの単純な反応・拡散を仮定しては説明がつかない。

3.2. 静置培養における拡散障壁の影響

分化抑制現象を説明するのに必要なNogginの分泌量が足りない問題に対処するため、細胞表面で拡散が遅くなる現象に着目した。細胞の表面は、ヘパラン硫酸を含む様々な糖タンパク質が密集しており、BMPやNogginを含む多くのシグナル伝達分子はこれらに結合する¹⁰⁾。このNogginとHSPBの結合は生理的塩濃度では非常に強いが、少しずつ乖離・結合を繰り返すことで、結果としてNogginがゆっくりと拡散する¹¹⁾。ヘパリンを修飾したビーズ表面でNogginの拡散係数は、水中と比較して1/400 (0.2μm/s²) に低下することが報告されている¹¹⁾。更に、ヒトPS細胞の円形コロニーを用いてやはりNogginによる分化抑制効果を調べているグループも、現象を説明するためには拡散速度を水中の1/10に減らすと良いとの報告をしている¹²⁾。そこで我々は、「HSPGなどの細胞表面の高

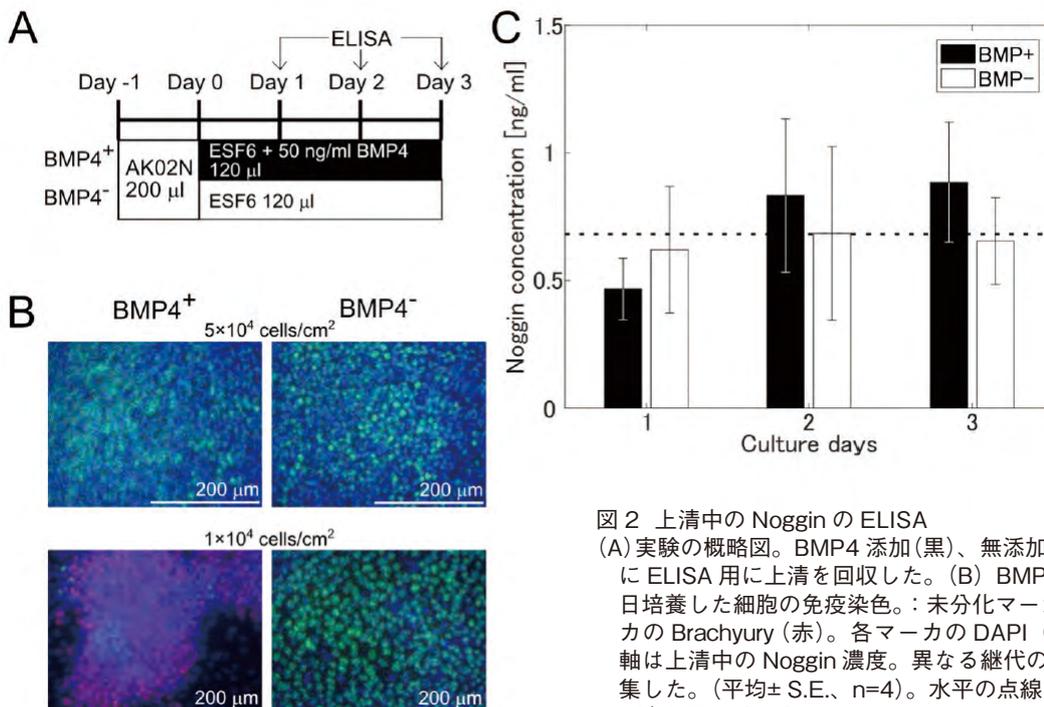


図2 上清中のNogginのELISA

(A) 実験の概略図。BMP4添加(黒)、無添加(白)の条件で、1、2、3日目にELISA用に上清を回収した。(B) BMP4添加(左)、無添加(右)で3日培養した細胞の免疫染色。: 未分化マーカーのSOX2(緑)。中胚葉マーカーのBrachyury(赤)。各マーカーのDAPI(青)。(C) ELISAの結果。縦軸は上清中のNoggin濃度。異なる継代の異なる細胞培養から上清を収集した。(平均±S.E., n=4)。水平の点線は、全データの平均(0.69ng/mL)を示している。

分子が拡散の抑制構造として働くことで、細胞から分泌されたNogginは細胞表面付近長く・高濃度でとどまるため、BMP4による細胞分化を抑制するとともに培養上清中のNoggin濃度が低くなる(図3A)」との作業仮説を新たに立てた。

この仮説を検証するために、2つの仮定を新たに加えてシミュレーションをした。一つ目の仮定は、Noggin、BMP4、およびNoggin-BMP4複合体の拡散係数が細胞表面で1/400になるとした。2つ目の仮定は、前培養(Day-1)ではBMP4を含まない培地で細胞を培養したため、分化開始時(Day 0)においては、拡散の抑制構造内にはNogginのみが存在してBMP4は存在してないとした。この新しい2つの仮定を追加して計算をした。横軸は細胞表面がBMP4が曝露された積算値([総曝露BMP]=100h ng/mL以上で細胞が分化する)、縦軸はバリアより上の培地内におけるNogginの濃度の平均値([N(barrier thickness<y<y_{max})] =0.69がELISA結果)として、計算結果をプロットした(図3B)。未分化・分化の閾値の垂直線(総露出BMP4=100h ng/mL)との交点は、バリアがないときは約70ng/mLだったが、バリアが高くなるに従い低下して、160μmバリアにおいてはELISA結果(0.69ng/mL)とほぼ同じ値となった(図3B)。したがって仮説通り、細胞表面のHSPGなどにより拡散が制限されれば、分泌されたNogginによりBMP4による分化を抑制できる可能性が示唆された。

3.3. 灌流培養における、細胞表面の拡散抑制の効果

前節で仮説を、一方向灌流マイクロチャンバーを使用し

た実験でも検証してみた。私たちは、ヒトPS細胞をタンパク質が一方向に輸送される一方向灌流培養チャンバー内でBMP4とともに培養した結果、上流の数ミリメートル以内の細胞が分化し、下流の分化が阻害することを示した⁵⁾。この結果を、拡散の抑制構造を含む反応・移流拡散の仮説で説明できるかを計算した(図4AB)。静培養の計算で使用した2つの仮定に加えて、HSPG内でのNogginの流速も水の1/400に減少するという仮定を新たに追加した。この仮定については文献がなかったため、拡散と同様減少するとした(バクレ数が一定)。細胞からのNoggin分泌速度は、静置培養の結果から 2×10^{-4} から 2×10^{-3} amol/cell/s とした。

その結果、拡散の抑制構造がない場合は、 2×10^{-4} amol/cell/sのNoggin分泌速度のときはすべての領域が分化したが、 5×10^{-4} 、 1×10^{-3} 、 2×10^{-3} amol/cell/sのNoggin分泌速度のときは上流の細胞の約5、2、1mmが分化した(図4CD)ため、広範囲のNoggin分泌速度で実験結果が定性的に再現できることを示唆している。それに対して、拡散の抑制構造が20μm、40μm、160μmと厚くなるにしたがって、Noggin分泌速度が少し変化するだけで、分化する部分の長さが大きく変化するとともに上流の狭い範囲内に限定された(図4CD)。ヒト胚の大きさが数百μmであり、その中に様々な細胞が分化・配置されることを考えると、この急激な変化はむしろ生体内に近い変化を示していることとなる。

3.4. サリドマイドを用いた、心筋分化への影響

サリドマイドは優れた鎮静剤として販売されたが、催奇形性が高いため、1960年代に使用が中止された¹³⁾。最近、ヒ

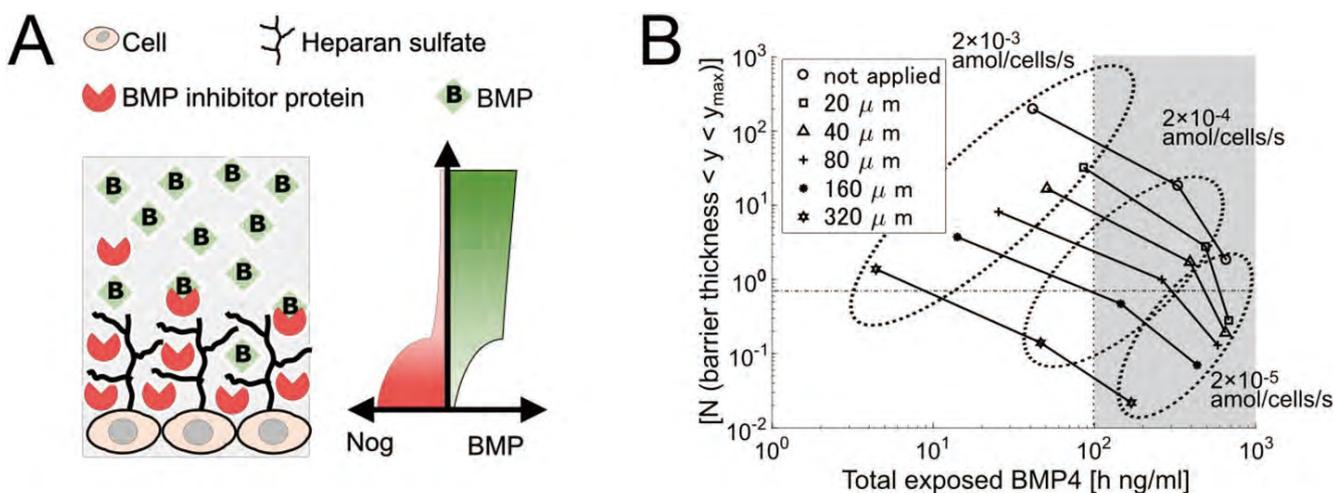


図3 拡散バリアを備えた静的培養のシミュレーション

(A) ヘパラン硫酸などのバリア構造の概念図。細胞表面はヘパラン硫酸により覆われており、Noggin、BMP4、およびNoggin-BMP4の拡散定数は、ヘパラン硫酸の中では1/400に設定した。(B) 縦軸はヘパラン硫酸などのバリア構造の上にある培地内の平均Noggin濃度で、水平の点線はELISAでの測定値(0.69ng/mL)を表す。横軸は細胞が10ng/mLのBMP4に72時間曝露された積算値で、垂直の点線は、細胞分化の閾値を示しており、その右側では細胞が分化する。ヘパラン硫酸などの厚さは、0、40、80、160、320μmとした。

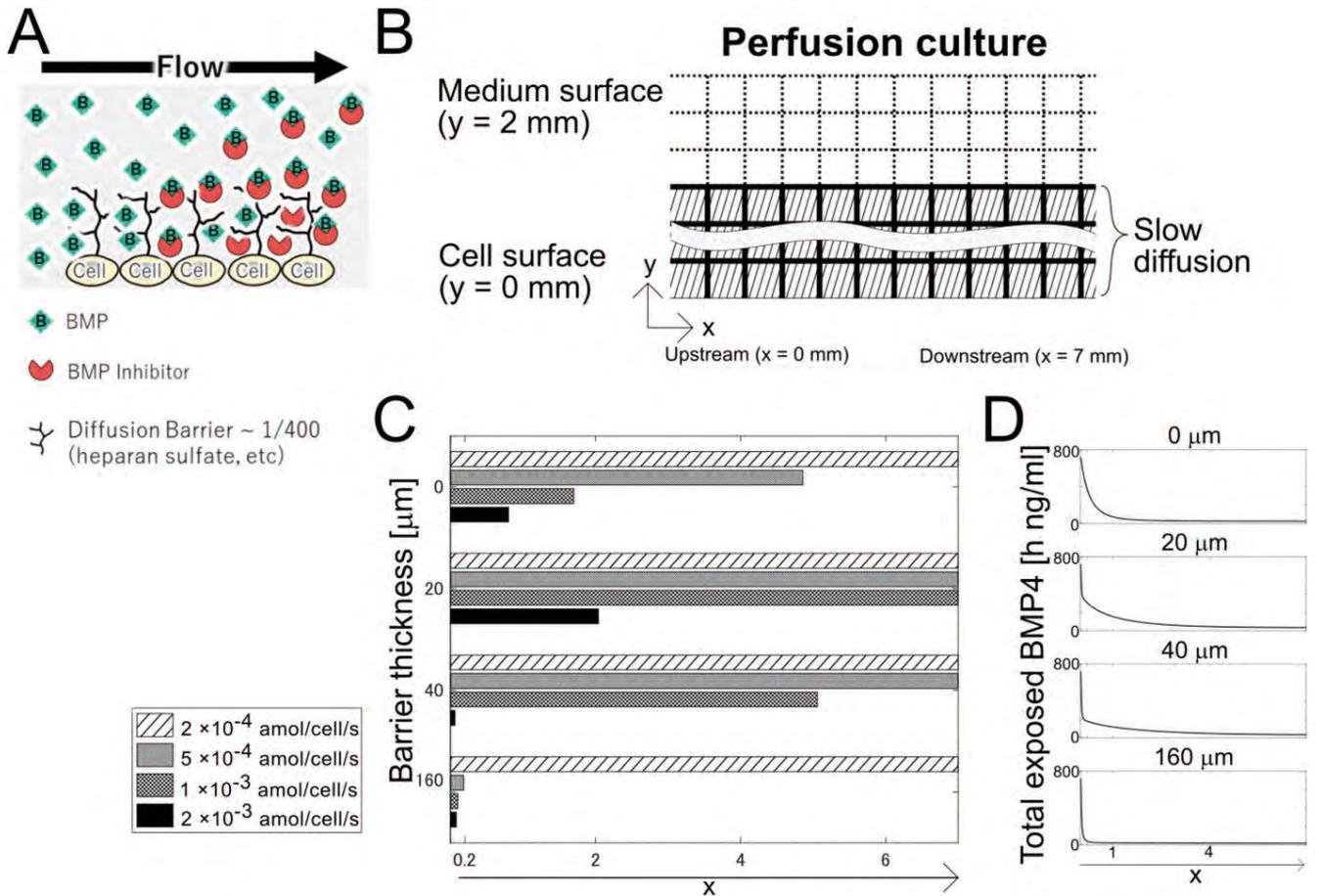


図4 拡散の抑制を使用した一方灌流培養のシミュレーション

(A) HSPGを使用したバリア構造のスキーム。(B) 灌流培養のシミュレーションの概略図。下部に配置された細胞 ($y = 0$) は培地で覆われている ($y > 0$)。媒体は $x=0$ で流入し、 x 方向に流入する。各正方形は $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ 。影付きの領域は、拡散と流れが $1/400$ であった拡散の抑制領域を示している。(C) 上流からの分化した細胞の面積が示されている。縦軸は拡散の抑制の厚さ 0 (未適用)、 20 、 40 、 $160\mu\text{m}$ 。横軸は分化した細胞の面積。(D) $t=72$ 時間での総曝露 BMP4。縦軸は総露出 BMP4。横軸は上流からの距離。

トのサリドマイドの催奇形性をテストするために、多くのグループがヒトPS細胞を使用している¹⁴⁾。我々も以前、サリドマイドが未分化のヒトPS細胞と中胚葉(心筋への分化の前段階)のアポトーシスを増加させることを示しました^{15,16)}。今回は、RT-qPCRアレイを使用して、ヒトPS細胞の多能性幹細胞マーカーと初期分化マーカーを含む84個の遺伝子の発現を調べ、どの遺伝子発現を目安に催奇形性を調べると良いかを検討した。

その結果、未分化維持条件で大きく(4倍以上)変化した遺伝子として、上方制御されたのは *LEFTY2* (初期発生に重要な $\text{TGF-}\beta$ の抑制タンパク質) と *SOX17* (初期の内胚葉分化マーカー) の2つであり(図5A)、下方制御されたのは *FABP7* (脂肪酸結合タンパク質ファミリーのメンバーで、主に脳で発現し、レチノイン酸シグナルに関係し、神経発達に関与する) だった^{17,18)} (図5B)。驚いたことに、*FABP7* はサリドマイドによって強く(平均で約300倍)下方制御されており、サリドマイドが未分化hiPSCでの

FABP7 発現を強力に阻害することを示唆している。更に、中胚葉分化条件で大きく(4倍以上)変化した遺伝子として、上方制御されたのは *EMX2* (empty spiracles homolog 2 をエンコードする。脳の神経分化と細胞増殖、および四肢の形成に関連する) のみだったが、下方制御された遺伝子は *ACTC1* (心筋のアルファアクチン)、*FOXD3* (forkhead box protein D3, ヒトPS細胞マーカーの一つである転写因子)、*FGF4* (線維芽細胞成長因子4、肢芽の発達を含む発達に関連、ヒトPS細胞マーカーの一つ)、*CDH1* (未分化ヒトPS細胞の細胞間接着を担うE-カドヘリン発現の関連)、*FOXA2* (初期の内胚葉分化マーカー) であった。以上より、心筋関連の遺伝子で *ACTC1* が大きく下方制御されることが明らかとなった。

4. 考察

今回の研究開発では、2つの目標を定めていた。1つ目の目標は、細胞からの分泌物の実測と、シミュレーショ

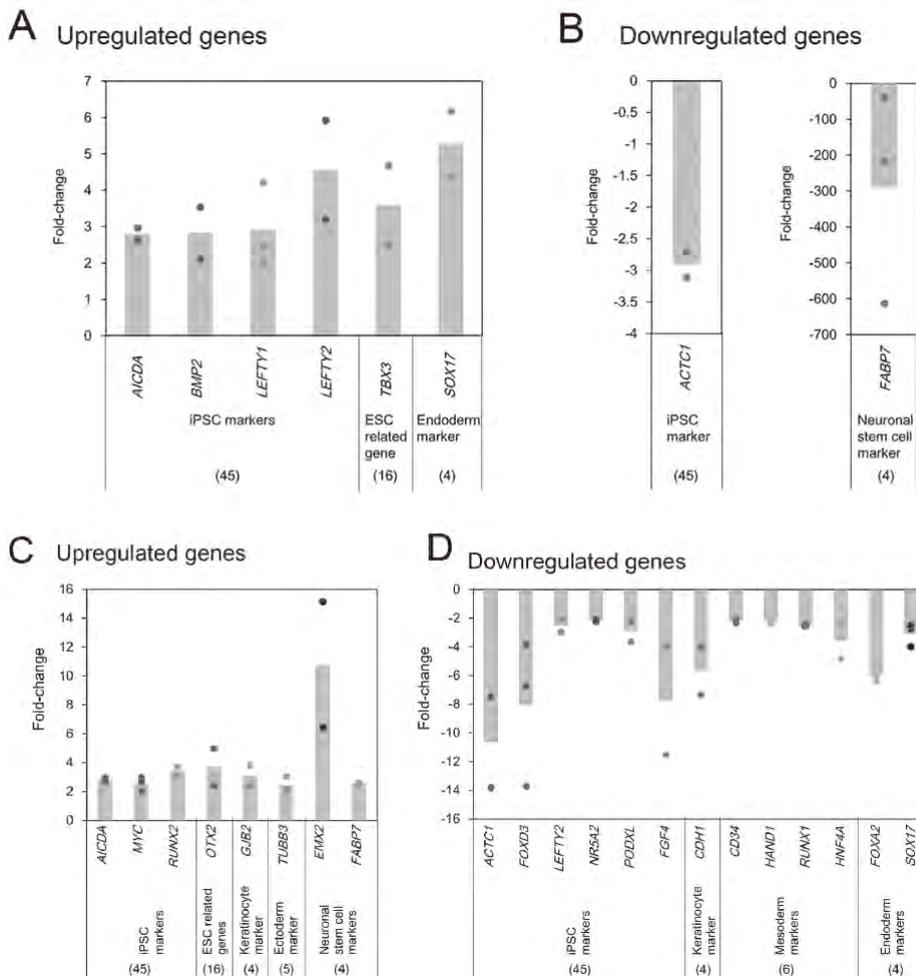


図5 サイドマイドによる未分化・分化マーカーの変化
未分化なヒト iPS 細胞(AB)と中胚葉分化した細胞(CD)において、上方制御された遺伝子(BC)および下方制御された遺伝子(BD)。

ンを行い、「in vitro オーガナイザー形成仮説」を検証することであった。ELISAにより分泌物を測定したところ、BMP4抑制シグナルとし最も有力なNogginが検出された。しかしその濃度はBMP4の添加に関係なく0.69ng/mLであり、予想より数十倍低い濃度だった。そこで、細胞表面に拡散が遅い層(HSPGなどによる結合)があるとの仮説の下でシミュレーションした結果、実験結果を説明できることが明らかとなった。BMP4阻害分子に関しては、Noggin以外にも分泌している可能性があるため、それらの測定が必要となる。また、HSPGなどの細胞表面の拡散が遅い層に関しては、実際にどれだけの厚みがあるかの測定とともに、その中のシグナル分子の拡散係数や移動速度が必要となる。これらの限界はあるために定量的な結果とはいえないが、定性的には胚発生過程において中胚葉分化に続いて中胚葉分化シグナルの阻害剤が分泌されるオーガナイザーが形成されることと同様のことが培養皿内で起っていること、つまり「in vitro オーガナイザー形成仮説」

を支持しているといえる。

2つ目の目標は、催奇形性テストであった。強い催奇形性をもつサリドマイドを心筋分化初期(中胚葉分化)に添加することで、催奇形性の試験に使えるような大きく発現が変化する遺伝子を探索した。その結果、心筋分化に関する遺伝子として、*ACTC1*が大きく下方制御されることが明らかとなった。今回の報告書には掲載しなかったが、ヒトiPS細胞から心筋分化をしたところBMP4分化と似た現象が観察されている^{19,20}。心筋の分化には、Wntシグナルの活性化とそれに続く抑制が必要であるが、私たちは細胞がWntシグナルの阻害タンパク(DKK1, DKK4, CER1)を分泌していることと、それが心筋分化を促進していることを明らかにした。今後は、上述のマイクロ流路において心筋分化をし、その過程で*ACTC1*などの発現を指標にすれば、分化初期における催奇形性を調べる良い系となることが予想される。

5 総括

本研究では、マイクロ流路とヒト iPS 細胞を利用して胚を模倣して催奇形性のテストをする方法の研究・開発をした。そして、マイクロ流路ないのヒト iPS 細胞のふるまいが「in vitro オーガナイザー形成仮説」で説明できること、つまり、胚発生における体軸形成と同様の現象が起きていることを明らかにした。また、強い催奇形性をもつサリドマイドを添加したときに、様々な遺伝子が変化することを明らかにした。胚の状態を模倣し、催奇形性をテストできるシステム“Embryo-on-a-chip”の実現に一步近づけた。本研究を継続し「すべての人に安全・安心なコスメトロジー」の実現の一助としたい(図6)。

(引用文献)

- 1) Genschow, E. *et al.* The ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models. *ATLA-NOTTINGHAM-* **30**, 151-176 (2002).
- 2) Shahbazi, M. N., Siggia, E. D. & Zernicka-Goetz, M. Self-organization of stem cells into embryos: A window on early mammalian development. *Science* **364**, 948-951 (2019).
- 3) Yoshimitsu, R. *et al.* Microfluidic perfusion culture of human induced pluripotent stem cells under fully defined culture conditions. *Biotechnology and Bioengineering* **111**, 937-947, (2014).
- 4) Kondo, Y. *et al.* Compartmentalized microfluidic perfusion system to culture human induced pluripotent stem cell aggregates. *J Biosci Bioeng* **124**, 234-241, (2017).
- 5) Tashiro, S. *et al.* High cell density suppresses BMP4-induced differentiation of human pluripotent stem cells to produce macroscopic spatial patterning in a unidirectional perfusion culture chamber. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **126**, 379-388 (2018).
- 6) Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-872, (2007).
- 7) Nakatani, E., Okajima, R. & Ohnuma, K. Slow diffusion on the monolayer culture enhances auto/paracrine effects of Noggin in differentiation of human iPS cells induced by BMP. *Biochemistry and biophysics reports* **29**, 101195, (2022).
- 8) Nakatani, E., Yamazaki, W., Sugiura, S., Kanamori, T. & Ohnuma, K. Modeling of differentiation pattern formation in human induced pluripotent stem cells mediated by BMP4 and its inhibitor noggin secreted from cells. *Biochemical Engineering Journal* **176**, 108159, (2021).
- 9) Shimizu, M. *et al.* Thalidomide affects limb formation and multiple myeloma related genes in human induced pluripotent stem cells and their mesoderm differentiation. *Biochemistry and biophysics reports* **26**, 100978, (2021).
- 10) Häcker, U., Nybakken, K. & Perrimon, N. Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development. *Nature reviews Molecular cell biology* **6**, 530-541 (2005).
- 11) Nesterenko, A. M. *et al.* Affinity of the heparin binding motif of Noggin1 to heparan sulfate and its visualization in the embryonic tissues. *Biochemical and biophysical research communications* **468**, 331-336 (2015).
- 12) Etoc, F. *et al.* A Balance between Secreted Inhibitors and Edge Sensing Controls Gastruloid Self-Organization. *Developmental Cell* **39**, 302-315 (2016).
- 13) Melchert, M. & List, A. The thalidomide saga. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 1489-1499, (2007).
- 14) Xing, J., Toh, Y. C., Xu, S. & Yu, H. A method for human teratogen detection by geometrically confined cell differentiation and migration. *Sci Rep* **5**, 10038, (2015).
- 15) Tachikawa, S., Nishimura, T., Nakauchi, H. & Ohnuma, K. Thalidomide induces apoptosis in undifferentiated human induced pluripotent stem cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* **53**, 841-851, (2017).
- 16) Tachikawa, S., Shimizu, M., Maruyama, K. & Ohnuma, K. Thalidomide induces apoptosis during early mesodermal differentiation of human induced pluripotent stem cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* **54**, 231-240 (2018).
- 17) Storch, J. & Thumser, A. E. Tissue-specific functions

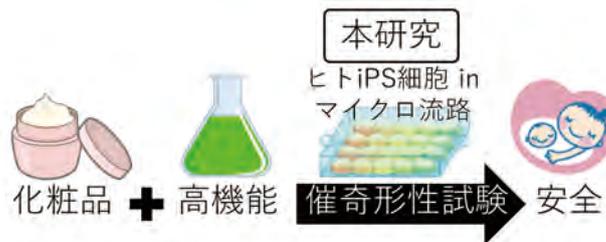


図6 本研究の最終目標

ヒト iPS 細胞由来の各種細胞とマイクロ流路を組み合わせ、催奇形性試験を行うシステムを開発することで、すべての人に安心・安全なコスメトロジーの発展に貢献する。

- in the fatty acid-binding protein family. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 32679–32683 (2010).
- 18) Sharifi, K. *et al.* FABP7 expression in normal and stab-injured brain cortex and its role in astrocyte proliferation. *Histochemistry and cell biology* **136**, 501 (2011).
- 19) Le, M. N. T., Takahi, M., Maruyama, K., Kurisaki, A. & Ohnuma, K. Cardiac differentiation at an initial low density of human-induced pluripotent stem cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* **54**, 513–522 (2018).
- 20) Le, M. N. T., Takahi, M. & Ohnuma, K. Auto/paracrine factors and early Wnt inhibition promote cardiomyocyte differentiation from human induced pluripotent stem cells at initial low cell density. *Scientific Reports* **11**, 21426, (2021).

皮膚の偽アレルギーを誘導する分子のスクリーニング法開発

順天堂大学大学院医学研究科アトピー疾患研究センター

北浦 次郎

Recently, it was reported that many cationic drugs (e.g., antibiotics) directly activate connective tissue mast cells, which leads to drug-induced pseudo-allergy via Mas-related G-protein coupled receptor X2 (MRGPRX2) in humans and Mrgprb2 in mice. On the other hand, a variety of cationic peptides/proteins (e.g., host defense peptides and neuropeptides) have been identified as endogenous ligands of MRGPRX2/Mrgprb2. Of these, many show a significantly lower EC₅₀ against MRGPRX2 than against Mrgprb2. Accordingly, we hypothesize that unknown cationic molecules contained in cosmetics or foreign matters which can come into contact with skin could activate connective tissue mast cells via MRGPRX2, resulting in skin pseudo-allergy. The objective of the current study is to develop a screening method for the identification of molecules that can induce pseudo-allergy in skin. For this end, we used newly-bred MRGPRX2 knock-in (MRGPRX2-KI) and Mrgprb2 knock-out (Mrgprb2-KO) mice as well as wild-type (WT) mice. We found that peritoneal mast cells from WT and MRGPEX2-KI mice, but not from Mrgprb2-KO mice, degranulated in response to stimulation with compound 48/80, a known MRGPRX2/Mrgprb2 ligand, although MRGPEX2-KI mast cells more strongly activated than WT mast cells. In addition, WT and MRGPEX2-KI mice, but not Mrgprb2-KO mice, exhibited skin pseudo-allergic reactions in response to intradermal injection of compound 48/80. Moreover, skin pseudo-allergic reactions were stronger in MRGPRX2-KI mice than in WT mice. Thus, we were able to develop both *in vitro* and *in vivo* methods to identify MRGPRX2 ligands, which will help uncover the molecular mechanisms underlying skin pseudo-allergy and test the safety of cosmetics and therapeutic drugs.

1. 緒言

非常に多くのカチオン性薬剤(抗菌薬など)が皮膚の結合組織型マスト細胞を直接活性化(脱顆粒)させて皮膚の炎症やかゆみを誘導することが知られている。これが偽アレルギーと呼ばれるのは、その症状がIgEと抗原によるマスト細胞の活性化(脱顆粒)に依存する即時型アレルギーの症状と類似するためである。最近、マウスの結合組織型マスト細胞に発現するGタンパク共役型受容体Mas-related G protein-coupled receptor b2(Mrgprb2)(ヒトではMRGPRX2)がカチオン性薬剤により活性化して偽アレルギーを引き起こすことが判明した¹⁾。また、ヒトMRGPRX2(マウスMrgprb2)は多くの内因性リガンド(カチオン性の抗菌ペプチドや神経ペプチドなど)を有することも明らかになった²⁻⁷⁾。これらの結果は、皮膚に塗布される化粧品や皮膚に付着する動植物成分の中にも偽アレルギーを誘導する分子が存在する可能性を示唆した。

研究の目的は、ヒトMRGPRX2に着目して偽アレルギーを誘導する分子を*in vitro*及び*in vivo*でスクリーニングする系を確立して、皮膚に塗布する医薬品・化粧品の安全

性を向上させることである。

Mrgprb2ノックアウト(Mrgprb2-KO)マウスの解析はMRGPRX2の機能を想定するのに役立つが、ヒトMRGPRX2の生体内機能を解明するには不十分である。また、MRGPRX2とMrgprb2に共通する既知リガンドに対するMRGPRX2のEC₅₀はMrgprb2と比較して低いことから、MRGPRX2はヒトの皮膚で多くのリガンドを鋭敏に認識してより重要な役割を担うと考えられた。そこで、申請者は、世界に先駆けてMRGPRX2ノックイン(MRGPRX2-KI)マウス(Mrgprb2の代わりにMRGPRX2を発現するマウス)を作製した。本研究では、野生型(WT)、Mrgprb2-KO、MRGPRX2-KIマウスから結合組織型マスト細胞を分離・誘導して、マスト細胞の脱顆粒を指標としてMRGPRX2リガンドを*in vitro*でスクリーニングする系の確立を目指した。さらに、WT、Mrgprb2-KO、MRGPRX2-KIマウスの耳介における偽アレルギー反応を指標としてMRGPRX2リガンドを*in vivo*でスクリーニングする系の確立を目指した。多くの医薬品・化粧品の成分や皮膚に付着する動植物成分をスクリーニングすることにより、偽アレルギーを誘導する分子の同定が可能になる。また、動植物成分の中からMRGPRX2リガンドが同定されれば、皮膚における炎症やかゆみの新規病態機序の解明につながる。最終的な目標は、*in vitro*及び*in vivo*のスクリーニング系を利用してMRGPRX2リガンドを同定して、皮膚における偽アレルギーの予防法を開発することである。



Development of a screening method for the identification of molecules that can induce pseudo-allergy in skin

Jiro Kitaura

Atopy (Allergy) Research Center,
Juntendo University Graduate School of
Medicine

2. 方法

2.1. マウスから腹腔マスト細胞や骨髄由来マスト細胞の誘導

WT, Mrgprb2-KO, MRGPRX2-KIマウスの腹腔をPBSで洗浄して採取した腹腔細胞をIL-3 (10ng/mL) とSCF (100ng/mL) の存在下で10日間培養した。flow cytometryにより、細胞の90%以上がFcεRIα陽性・c-Kit陽性の腹腔マスト細胞であることを確認した。WT, Mrgprb2-KO, MRGPRX2-KIマウスの脛骨から採取した骨髄細胞をIL-3 (10 ng/mL) の存在下で5週間培養した。flow cytometryにより、細胞の95%以上がFcεRIα陽性・c-Kit陽性の骨髄由来マスト細胞 (bone marrow-derived mast cell: BMMC)であることを確認した⁸⁾。

2.2. マスト細胞の脱顆粒率の*in vitro*測定法

既知のMrgprb2/MRGPRX2リガンドを含む種々の分子(薬剤など)で、WT, Mrgprb2-KO, MRGPRX2-KIマウス由来の腹腔マスト細胞あるいはBMMCを刺激した。また、上記のマスト細胞をanti-TNP IgE (0.5 μg/mL)で感作(24h)した後、TNP-HSA (10ng/mL)で刺激した。刺激1時間後のマスト細胞の脱顆粒率をβ-hexosaminidase assay (細胞内から細胞外に放出されたβ-hexosaminidaseの割合を解析する)やflow cytometry (マスト細胞表面にCD63を発現する細胞の割合を解析する)により測定した⁸⁾。

2.3. 皮膚における偽アレルギーの*in vivo*評価法

WT, Mrgprb2-KO, MRGPRX2-KIマウスの耳介に既知のMrgprb2/MRGPRX2リガンドを含む種々の分子(薬剤など)を皮下注射し、その直後に、色素(エバンスブルー)を静脈注射した。1時間後に採取した耳介に含まれる色素

漏出量を定量化した(通常の受動的皮膚アナフィラキシー反応の評価法と同様⁸⁾)。色素漏出量は、マスト細胞の脱顆粒により上昇する血管透過性と比例するので、偽アレルギーの程度を評価できる。

3. 結果

3.1. MRGPRX2リガンドを*in vitro*でスクリーニングする系の確立

WT, Mrgprb2-KO, MRGPRX2-KIマウスから誘導した腹腔マスト細胞表面におけるFcεRIαやc-Kitの発現レベルに有意な差はなかった(図1)。抗MRGPRX2抗体による細胞表面染色により、MRGPRX2-KIマウス由来腹腔マスト細胞表面にMRGPRX2の発現が確認された。IgEと抗原で刺激したときの腹腔マスト細胞の脱顆粒率に有意な差は認められなかった。他方、compound 48/80(既知のMRGPRX2/Mrgprb2リガンド)で腹腔マスト細胞を刺激すると、WT及びMRGPRX2-KI腹腔マスト細胞は濃度依存的に脱顆粒した。しかし、Mrgprb2-KO腹腔マスト細胞の脱顆粒は認められなかった。また、WT腹腔マスト細胞と比較して、MRGPRX2-KI腹腔マスト細胞は同じ濃度のcompound 48/80に対してより強く脱顆粒した(図2)。

WT, Mrgprb2-KO, MRGPRX2-KIマウスから誘導したBMMC表面におけるFcεRIαやc-Kitの発現レベルに有意な差はなかった。抗MRGPRX2抗体による細胞表面染色により、MRGPRX2-KIマウス由来BMMCにMRGPRX2の発現は認められなかった。つまり、MRGPRX2は結合組織型マスト細胞表面に発現するが、未熟な粘膜型マスト細胞(BMMC)表面に発現しないことが確認された。IgEと抗原で刺激したときのBMMCの脱顆粒率に有意な差は認められなかった。また、compound 48/80でこれらのBMMCを刺激しても脱顆粒しないこと

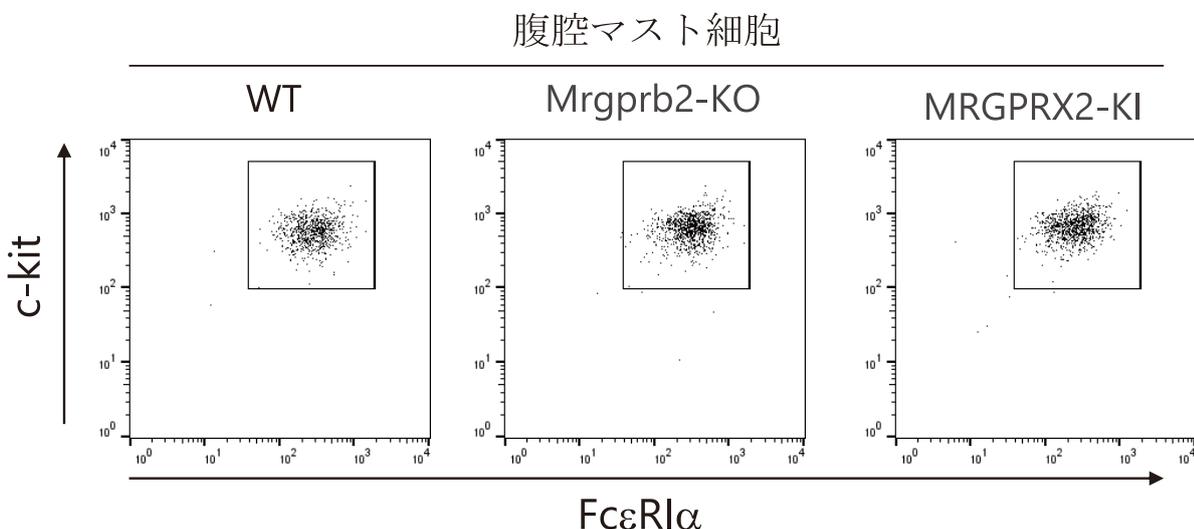


図1 WT, Mrgprb2-KO, MRGPRX2-KI マウス由来腹腔マスト細胞における FcεRIα と c-Kit の(細胞表面)発現レベル

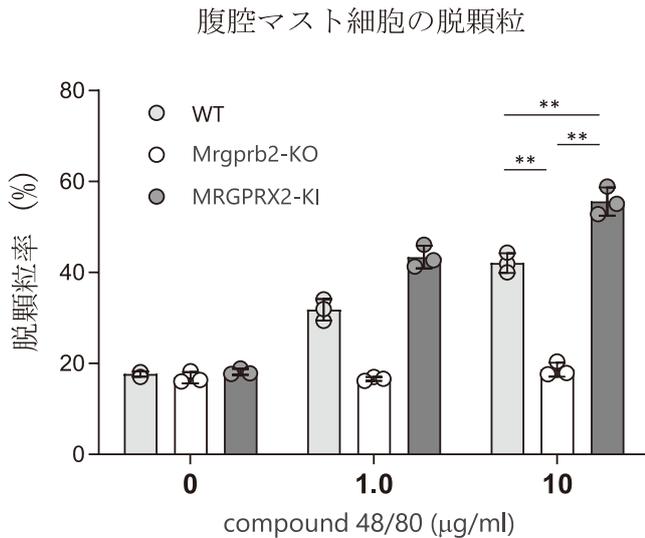


図2 WT、Mrgprb2-KO、MRGPRX2-KI マウス由来腹腔マスト細胞の compound 48/80 に対する脱顆粒率 (β -hexosaminidase assay)

が確認された。

このように、WT、Mrgprb2-KO、MRGPRX2-KI マウスから誘導した腹腔マスト細胞の脱顆粒を指標に、MRGPRX2リガンドを同定するための *in vitro* スクリーニング法が確立された。Mrgprb2リガンドとして作用しないがMRGPRX2リガンドとして作用する分子、Mrgprb2リガンドとしての作用は弱いMRGPRX2リガンドとしての作用が強い分子を *in vitro* で同定することが可能になった。

3.2. MRGPRX2リガンドを *in vivo* でスクリーニングする系の確立

WT、Mrgprb2-KO、MRGPRX2-KI マウスの成長・発達に差は認められなかった。また、定常状態における(マスト細胞を含む)血球系細胞の組織分布や数に有意な差は認められなかった。次に、WT、Mrgprb2-KO、MRGPRX2-KI マウスの耳介に compound 48/80 を皮下注射した直後に色素を静脈注射し、1時間後の耳介における色素漏出量を定量化した。その結果、WTマウスの耳介で認められた色素漏出はMrgprb2-KOマウスではほとんど認められなかった。また、WTマウスと比較してMRGPRX2-KIマウスの耳介における色素漏出量は多かった(図3)。これらの結果は、compound 48/80 による(耳介の)組織型マスト細胞の脱顆粒による偽アレルギー反応がMrgprb2/MRGPRX2 依存的であること、生体内でMRGPRX2はMrgprb2より鋭敏に compound 48/80 を認識して偽アレルギーを誘導することが示された。このように、MRGPRX2リガンドとして作用する分子を *in vivo* で同定することが可能になった。

偽アレルギー反応 (マウス)

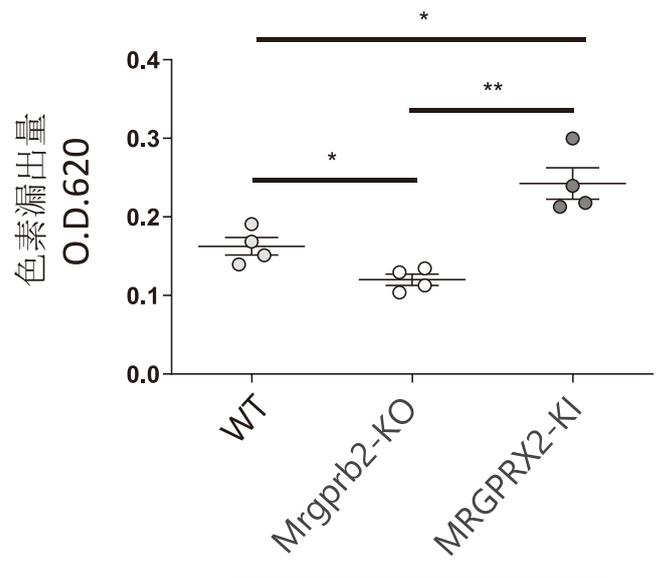


図3 WT、Mrgprb2-KO、MRGPRX2-KI マウスの耳介に compound 48/80 を皮下投与したときの偽アレルギー反応

皮下投与 (compound 48/80)

4. 考察

マウスやヒトのマスト細胞(株)の解析、Mrgprb2やMRGPRX2を一過性に過剰発現させた細胞の解析などから、(compound 48/80を含む)多くの共通リガンドに対するMRGPRX2のEC₅₀はMrgprb2より低いことが報告された。今回、WT、Mrgprb2-KO、MRGPRX2-KIマウス由来の腹腔マスト細胞を利用する *in vitro* スクリーニング法により、同じ条件下で容易にMrgprb2/MRGPRX2リガンドの同定及びリガンドとしての強さの評価が可能になった。腹腔マスト細胞における脱顆粒の強さが、

- ①MRGPRX2-KI \approx WT > Mrgprb2-KO
- ②MRGPRX2-KI > WT > Mrgprb2-KO
- ③MRGPRX2-KI > WT \approx Mrgprb2-KO

の場合などが想定される。いずれもMRGPRX2リガンドであるが、③の場合はヒトでのみ重要な作用を有すると考えられる。また、腹腔マスト細胞の脱顆粒を誘導しないが、BMDCの脱顆粒を誘導する場合、その分子はMrgprb2/MRGPRX2とは異なる受容体(粘膜型マスト細胞に発現する)のリガンドとしてマスト細胞を脱顆粒させると想定される。Mrgprb2やMRGPRX2の発現とは無関係に腹腔マスト細胞が脱顆粒する場合、その分子は(結合組織型マスト細胞に発現する)Mrgprb2/MRGPRX2とは異なる受容体のリガンドとして作用すると想定される。

さらに、MRGPRX2リガンドの*in vivo*スクリーニング法の確立により、上記の*in vitro*スクリーニング法で同定されたりガンド分子が生体内でMRGPRX2依存的な偽アレルギーを誘導するか否かを評価することが可能になった。偽アレルギーの強さがMRGPRX2-KI > WT ≒ Mrgprb2-KOの場合、その分子はヒトでのみMRGPRX2依存的な偽アレルギーを誘導する可能性が高い。他方、MRGPRX2-KI腹腔マスト細胞を脱顆粒させない分子が*in vivo*でMRGPRX2依存的に偽アレルギーを誘導する場合、この分子は皮膚でマスト細胞以外の細胞に作用して、そこで放出される内因性MRGPRX2リガンドが組織型マスト細胞に作用して脱顆粒を引き起こすと考えられる。実際、ダニに含まれるプロテアーゼが神経細胞に作用し、活性化した神経細胞の放出するサブスタンスPが組織型マスト細胞を脱顆粒させて、皮膚炎症を増悪させることが報告されている⁹⁾。また、MRGPRX2リガンドの*in vitro*及び*in vivo*スクリーニング系において、サブスタンスPはcompound 48/80 とほぼ同じような傾向(MRGPRX2-KI > WT > Mrgprb2-KO)を示すことが確認されている。いずれにせよ、本研究で確立した、MRGPRX2リガンドの*in vitro*及び*in vivo*スクリーニング法を活用して、偽アレルギーを誘導する分子の同定及び偽アレルギーの分子機序の解明が期待される(図4、5)。

5. 総括

WT、Mrgprb2-KO、MRGPRX2-KI マウス由来の腹腔マスト細胞の脱顆粒を指標とするMRGPRX2リガンドの*in vitro*スクリーニング法とWT、Mrgprb2-KO、MRGPRX2-KIマウスの偽アレルギー反応を指標とするMRGPRX2リガンドの*in vivo*スクリーニング法が開発された。現在、様々な生体内外分子をスクリーニングしており、今後、皮膚の偽アレルギーの全貌を明らかにする予定である。

主に皮膚に塗布される化粧品は美容に貢献し健康的な生活に不可欠な存在であるがゆえに、偽アレルギーを誘導する成分の混入を避けることは不可欠である。従って、本研究の成果がコスメトロジーの進歩・発展に貢献することが期待される。

(引用文献)

- 1) McNeil BD, Pundir P, Meeker S, Han L, Undem BJ, Kulka M, Dong X. Identification of a mast-cell-specific receptor crucial for pseudo-allergic drug reactions. *Nature*. 2015 519, 237-241 (2015).
- 2) Bader M, Alenina N, Andrade-Navarro MA, Santos RA. *Pharmacol Rev*. MAS and its related G protein-coupled receptors, Mrgprs. 66, 1080-105 (2014).
- 3) Alkanfari I, Freeman KB, Roy S, Jahan T, Scott RW,

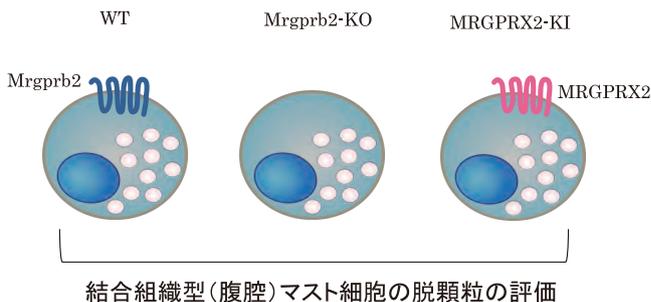


図4 MRGPRX2リガンドの*in vitro*スクリーニング法

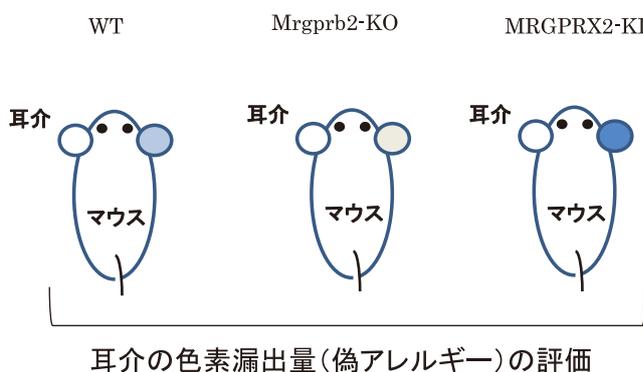


図5 MRGPRX2リガンドの*in vivo*スクリーニング法

Ali H. Small-Molecule Host-Defense Peptide Mimetic Antibacterial and Antifungal Agents Activate Human and Mouse Mast Cells via Mas-Related GPCRs. *Cells*. 8, 311 (2019).

- 4) Roy S, Chompunud Na Ayudhya C, Thapaliya M, Deepak V, Ali H. Multifaceted MRGPRX2: New insight into the role of mast cells in health and disease. *J Allergy Clin Immunol*. 148, 293-308 (2021).
- 5) Kühn H, Kolkhir P, Babina M, Düll M, Frischbutter S, Fok JS, Jiao Q, Metz M, Scheffel J, Wolf K, Kremer AE, Maurer M. Mas-related G protein-coupled receptor X2 and its activators in dermatologic allergies. *J Allergy Clin Immunol*. 147, 456-469 (2021).
- 6) McNeil BD. MRGPRX2 and Adverse Drug Reactions. *Front Immunol*. 12, 676354 (2021).
- 7) Subramanian H, Gupta K, Ali H. Roles of Mas-related G protein-coupled receptor X2 on mast cell-mediated host defense, pseudoallergic drug reactions, and chronic inflammatory diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 138, 700-710 (2016).
- 8) Takamori A, Izawa K, Kaitani A, Ando T, Okamoto Y, Maehara A, Tanabe A, Nagamine M, Yamada H,

Uchida S, Uchida K, Isobe M, Hatayama T, Watanabe D, Ando T, Ide T, Matsuzawa M, Maeda K, Nakano N, Tamura N, Ikeda K, Ebihara N, Shimizu T, Ogawa H, Okumura K, Kitaura J. Identification of inhibitory mechanisms in pseudo-allergy involving Mrgprb2/MRGPRX2-mediated mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol.* 143, 1231-1235 (2019).

9) Serhan N, Basso L, Sibilano R, Petitfils C, Meixiong J, Bonnart C, Reber LL, Marichal T, Starkl P, Cenac N, Dong X, Tsai M, Galli SJ, Gaudenzio N. House dust mites activate nociceptor-mast cell clusters to drive type 2 skin inflammation. *Nat Immunol.* 20, 1435-1443 (2019).

イオン導入時の微弱電流による皮膚への安全性の厳密な検証と美容効果の検討

徳島大学大学院医歯薬学研究部

小暮 健太郎

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. Based on the previous our research, it was predicted that iontophoresis will induce some negative effects such as inflammation via activation cell signaling. In this study, we tried to study the effect of weak electric current at iontophoresis on the safety and functionality of each skin under cathode and anode. Morphological damage was not observed in the skin after iontophoresis. The amounts of mRNAs relating inflammation, tumor necrosis factor- α and interleukin (IL)-6 and anti-inflammatory cytokine IL-10 and transforming growth factor (TGF)- β . The amounts of these mRNAs were not affected by iontophoresis under normal conditions (0.34 mA/cm²). However, iontophoresis under more intense conditions (1.0 mA/cm²) showed an increasing trend of IL-6 and IL-10 mRNA. The skin functional components collagen and ceramide were increased by iontophoresis under normal conditions. From these results, it was suggested that iontophoresis under normal conditions does not induce any inflammation in the skin tissue. In conclusion, iontophoresis is a safety and useful technology for transdermal drug delivery and skin beauty.

1. 緒言

イオントフォレシスは、微弱な電流 (0.3 ~ 0.5 mA/cm²) 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古くから知られている。美容領域においては、「イオン導入」という呼称で認知されており、様々なデバイスが開発され、美容整形外科などで用いられている。イオントフォレシスに関する研究は、従来抗炎症剤などの低分子薬物を対象としたものが盛んに行われてきた。それらの研究では、動物皮膚切片および市販のヒト皮膚切片をフランツ型セルに装着し、上層に添加した薬物が皮膚を透過して下層に移行する量を定量することで皮膚透過性を評価する研究が主であった。加えて、現在多くの化粧品企業において、動物個体を用いた研究が実施できない状況にある。そのため、それらの研究には「死んだ皮膚」が多く用いられている。イオントフォレシス研究において、皮膚の物理的損傷に関する検討は容易であるが、死んだ皮膚を用いるため生理的な影響、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などを観察することはできない。ヒトの皮膚でモニターを行う場合も、皮膚表面の発赤くらいしか評価することはできない。しかしながら、イオントフォレシス(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ためには、「活きた皮膚」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ついては個体レベルで評価すること

が重要である。WEBなどでイオン導入に関する記事を目にするが、その多くは「ビタミンCなどの美容成分を皮内に導入できる」という点のみに触れたものであり、イオン導入(微弱電流処理)が皮膚に対して及ぼす影響に関するものは皆無である。すなわち、薬学的観点および化粧品開発の観点においては、イオン導入の皮膚に及ぼす影響については、ほとんど手付かずであった。

我々は、これまでイオントフォレシス(イオン導入)による siRNA や抗体などの高分子薬物の皮内送達研究に取り組んできた¹⁻⁵⁾。研究開始当初は、切り取った(死んだ)皮膚を用いて、抗炎症剤などの低分子薬物の皮膚透過について検討を行っていた。ところが、皮内での徐放効果を期待して、主たる研究者の専門テーマであったナノ粒子(リポソーム)とイオントフォレシスとの組み合わせの検討過程において、動物個体(活きた皮膚)を用いた時に、それまで不可能だと考えられていたナノ粒子が、イオントフォレシスによって皮内送達可能であることを発見した^{2,4,5)}。従来、イオントフォレシスによる皮内薬物送達メカニズムは、電極と荷電性薬物との電氣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。しかし、主たる研究者らによる検討の結果、微弱電流によって細胞内 Ca²⁺ 濃度が上昇することで、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り、高分子などが皮内に浸透できるようになることを発見した⁶⁾。すなわち、微弱電流による皮膚組織の生理機能変化が、イオン導入(イオントフォレシス)による高分子の皮内浸透メカニズムであることを明らかにしている。さらに我々は、培養細胞を用いた検討によって、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、ユニークな細胞取り込み機構(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とともに、細胞質に漏出させること



Verification of skin safety and examination of cosmetological effects by weak electric current of iontophoresis

Kentaro Kogure

Graduate School of Biomedical Sciences, Tokushima University

も発見している⁷⁻¹⁰⁾。これらの知見から、イオントフォレシス(イオン導入)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、組織レベルだけでなく細胞レベルでの生理機能を変化させることで、高分子などの皮内薬物送達が可能になっていることが示唆されている。これらのことから我々は、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。この仮説に基づき、主たる研究者の小暮は、2018年度に貴財団に採択いただき、動物皮膚に対するイオン導入(微弱電流処理)によって、炎症性サイトカイン産生や皮膚組織変化など負の影響は誘導されないこと、つまりイオン導入は安全性の高い薬物送達技術である可能性を見出した。予定研究期間終了後も、微弱電流処理による安全性評価を継続したところ、用いる電極の陽極と陰極において炎症性サイトカインなどの発現が異なる傾向を見出した(論文投稿準備中)。このことは、科学的に理にかなっており、陽・陰電極の下で起こる事象を個別に評価する必要性を示唆している。そのため、「安全だ」と断言するためには、より厳密な評価が必要であると考えた。そこで本研究では、美容領域などで汎用されているイオン導入(微弱電流による皮膚処理)において、陽・陰電極貼付下の皮膚で個別に起こっている事象を正確に捉え、安全性を厳密に検証したいと考えた。さらに、主たる研究者の小暮は、2019年度にイオン導入(微弱電流処理)による動物皮膚(特に表皮領域)中のセラミド量の増加を世界で初めて見出している¹⁰⁾。また、これまでの安全性評価過程において、皮内コラーゲンが微弱電流処理によって増える可能性も見出している(論文準備中)。これらの結果は、これまで局所麻酔剤やビタミンCなどの物質の皮内送達技術として捉えられてきたイオン導入(イオントフォレシス)が、それ単独で皮膚の保湿改善や弾性向上を誘導可能な美容技術となる可能性を示唆している。本研究では、微弱電流処理時の安全性の厳密な評価と同時に、皮膚機能性に関与する皮内コラーゲンおよびセラミド産生誘導を定量的に評価することで、イオン導入(微弱電流処理)が安全性の高い美容技術となり得ることを証明したいと考えた。

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ラットの背部皮膚の毛を刈り、露出した皮膚上にPBSを浸漬させた脱脂綿を貼付し、その上にヒト心電図用のAg/AgCl電極を設置して、過去の検討で用いてきた通電条件(0.34mA/cm²、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により凍結切片とした。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を評価した。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HE染色後、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

Wisterラットの毛を刈った背部皮膚上にヒト心電図用Ag/AgCl電極を設置し、微弱電流処理(0.34mA/cm²、1時間)を行った。微弱電流処理後、陽極および陰極貼付部分の皮膚をそれぞれ回収し、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など(腫瘍壊死因子(TNF)- α 、インターロイキン(IL)-6)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、回収したRNAについて解析を行った。さらに、電流強度を増大させた条件(1.0mA/cm²、1時間)において処理したラット皮膚について、上記と同様に陽極および陰極貼付部分の皮膚を回収し、処理後3時間と24時間後における炎症性サイトカインなど(IL-6、IL-10、TNF- α 、TGF- β)のmRNA発現をReal-time PCR法によって定量解析した。

2.3. 微弱電流処理した皮膚におけるコラーゲン量変化の検討

Wisterラットの毛を刈った背部皮膚上にヒト心電図用Ag/AgCl電極を設置し、微弱電流処理(0.34mA/cm²、1時間)を行った。微弱電流処理後、陽極および陰極貼付部分の皮膚をそれぞれ回収し、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により凍結切片とした。得られた切片に対して、ピクロシリウスレッド溶液を添加し、60分間室温でインキュベートした。その後、酢酸およびエタノールで洗浄し、キシレンに15分間、3回浸すことで透徹処理を行った。キシレンが乾く前に疎水性マウント剤をマウントし、カバーガラスで封入した。マウント剤乾燥後、倒立型顕微鏡を用いて観察を行った。得られた画像について、画像解析ソフトを用いてコラーゲンに相当する赤色部分を数値化した。また、コラーゲンの主成分であるヒドロキシプロリン量を評価するために、イオントフォレシス処理をしたラット背部から皮膚を回収し、ヒドロキシプロリン染色アッセイキットを用いて、皮内のヒドロキシプロリン量を定量した。検量線を用いて吸光度からヒドロキシプロリン濃度を測定した。

2.4. 微弱電流処理した皮膚におけるセラミドの定量と分子種同定の検討

Wisterラットの毛を刈った背部皮膚上にヒト心電図用

Ag/AgCl電極を設置し、微弱電流処理 ($0.34\text{mA}/\text{cm}^2$ 、1時間)を行った。微弱電流処理後、陽極および陰極貼付部分の皮膚をそれぞれ回収し、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により凍結切片とした。得られた切片に対して、1次抗体として抗セラミド抗体を用い、2次抗体として蛍光色素結合抗IgG抗体を用いて、免疫染色を行った。免疫染色後、共焦点レーザー顕微鏡により切片中の蛍光を観察した。得られた画像について、画像解析ソフトを用いてセラミドに相当する蛍光量を数値化した。また、培養細胞を微弱電流処理 ($0.34\text{mA}/\text{cm}^2$ 、15分間)した後、回収した細胞についてLC-MS/MSによる質量分析解析を行い、微弱電流によって増加したセラミドの分子種の同定を試みた。

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、陽極および陰極貼付部分から回収した皮膚について、HE染色を行い顕微鏡観察したところ、写真で示すように、まず微弱電流処理3時間後の皮膚切片は、陽極貼付および陰極貼付下の皮膚ともに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時間後においても陽極貼付下および陰極貼付下の皮膚の組織像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影響は陽極・陰極いずれにおいても認められなかった(図1B)。炎症皮膚病態(アトピー性皮膚炎や乾癬、紫外線障害など)では、表皮肥厚化が誘起さ

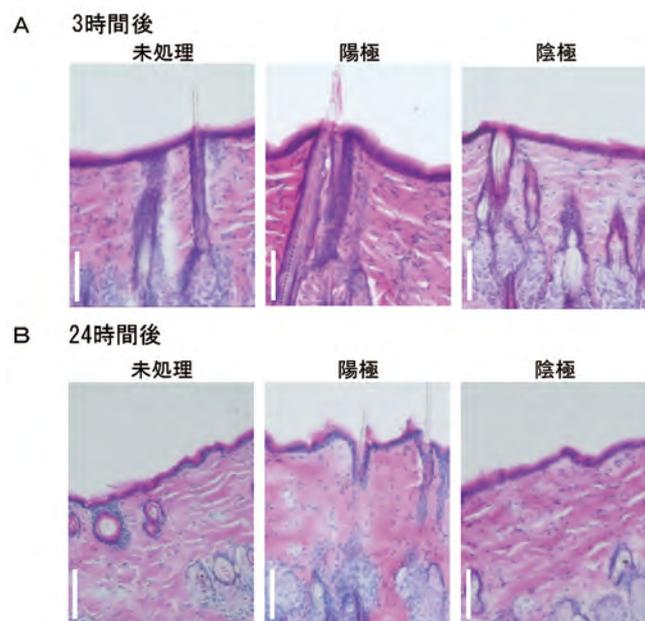


図1 微弱電流処理下皮膚の組織学的変化
白バーは100 μm を示す。

れることが知られているが、今回示したように微弱電流処理後の皮膚においては、肥厚化は確認されなかった。

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

微弱電流処理後の陽極貼付下および陰極貼付下の皮膚をそれぞれ回収し、RNAを抽出した後、Real-time PCR法によって炎症性サイトカインなどの炎症関連因子(TNF- α 、IL-6)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時間後における陽極貼付下および陰極貼付下の各皮膚組織中の各因子mRNAを比較すると、ばらつきがあるものの、IL-6、TNF- α およびTGF- β については、陽極および陰極に関わらず目立った変動は認められなかった。しかし、IL-10については、陽極貼付下皮膚では、変動は見られなかったが、陰極貼付下の皮膚において、統計的に有意ではないが、増加する傾向が認められた。さらに、微弱電流処理24時間後における陽極貼付下および陰極貼付下の皮膚における各因子mRNAについて定量した結果、IL-6、TNF- α およびTGF- β については、3時間と同様に陽極および陰極に関わらず目立った変動は認められなかった。IL-10については、3時間とは逆に、陰極貼付下皮膚では、変動は見られなかったが、陽極貼付下の皮膚において、統計的に有意ではないが、増加する傾向が認められた。加えて、通常のイオン導入条件よりも強力な条件($1.0\text{mA}/\text{cm}^2$)で1時間処理した場合についても検討を行った。その結果、微弱電流処理3時間後においては、IL-6が陽極貼付下および陰極貼付下の両方の皮膚において増加傾向を示した。その他のIL-10、TNF- α およびTGF- β についてもIL-6ほどではないが、増加の傾向を示した。ところが24時間後には、陰極貼付下の皮膚において、ばらつきが大きいものの、IL-10が大きく増加していた。

3.3. 微弱電流処理した皮膚におけるコラーゲン量変化の検討

微弱電流処理後の陽極貼付下および陰極貼付下の皮膚をそれぞれ回収し、組織切片についてピクロシリウスレッド染色を行い、組織切片染色画像の画像解析からコラーゲン量を定量したところ、3時間後の陰極貼付下皮膚におけるコラーゲン量が未処理皮膚よりもわずかではあるが増加している結果が得られた。さらに、24時間後の陽極貼付下および陰極貼付下皮膚中のコラーゲン量を評価したところ、3時間時点ほどではないが陰極貼付下皮膚において増加する傾向が認められた。さらに、コラーゲンの成分として知られるヒドロキシプロリンについて、陽極貼付下および陰極貼付下皮膚中の定量を行ったところ、ピクロシリウスレッド染色の結果とは異なり、3時間後の陽極貼付下皮膚に

において増加していることが確認された。しかし、24時間後には、陰極貼付下の皮膚において、有意ではないがヒドロキシプロリンの増加傾向が認められたが、陽極貼付下の皮膚では大きな変化は認められなかった。

3.4. 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

微弱電流処理後の陽極貼付下および陰極貼付下の皮膚をそれぞれ回収し、組織切片について抗セラミド抗体を用いて、組織中セラミド量の変化を評価した。その結果、陽極貼付下の皮膚においては、微弱電流処理直後からセラミド量が増加する傾向が認められた。一方、陰極貼付下の皮膚においては、3時間後にセラミド量の増加傾向が見られ、12時間後および24時間後には有意なセラミド量の増加が確認された。陰極貼付下の皮膚におけるセラミド量は、最大で2倍弱にまで増大した。培養細胞を用いて、微弱電流処理により増大するセラミドの分子種を質量分析手法によって解析したところ、炭素数16のセラミドが有意に増大することが明らかとなった。

4. 考 察

本研究では、イオン導入実施(微弱電流処理)時における、皮膚への影響を厳密に評価するため、陽極貼付下および陰極貼付下の皮膚に分けて、それぞれの皮膚における組織学的変化、炎症性サイトカインなどの発現、コラーゲンおよびセラミドの産生について詳細な検討を行った。まず、微弱電流処理した皮膚の組織学的変化の検討を行った結果、微弱電流処理3時間後および24時間後において、陽極貼付下および陰極貼付下の皮膚における組織損傷などは認められず、また炎症発生時に生じる表皮の肥厚化も全く認められなかった。これらのことから、微弱電流処理は、皮膚への組織学的変化を誘導しないことが確認された。

さらに、炎症性サイトカインなどの炎症関連因子(TNF- α 、IL-6)および抗炎症性サイトカイン(IL-10、TGF- β)のmRNA量を定量解析した結果、これらの遺伝子発現には大きな変動は認められなかったことから、通常のイオン導入条件(0.3-0.5mA/cm²)では、1時間に及ぶ処理であっても、炎症性サイトカイン(IL-6、TNF- α)発現誘導は見られず、大きな負の影響は示さないことが示唆された。さらに、抗炎症性サイトカインIL-10の発現が、時間によって陰極と陽極の違いはあったが、増加傾向を示したことから、微弱電流処理は炎症を抑える方向で作用する可能性が推察された。さらに通常のイオン導入条件よりも強力な条件(1.0mA/cm²)で1時間処理した場合、微弱電流処理3時間後においては、各遺伝子発現が増加傾向を示し、さらに24時間後には、陰極貼付下の皮膚において、IL-10が大きく増加していた。このことは、通常のイオン導入条件

よりも強力な電流で微弱電流処理を行う場合、特に陰極貼付下の皮膚に炎症などを誘起する可能性を示している。皮内への物質浸透は、電流強度に依存すると考えられるが、物質浸透を促進するために電流強度を上げることは、皮膚障害を誘起する危険性があることが明らかとなった。興味深い点は、電極の違いによって、誘起される影響が異なることであり、今回の検討によってはじめて明らかになったことである。

今回、微弱電流処理による皮膚の機能性への影響を検討するため、弾力性など皮膚の構造維持に重要なコラーゲン量の変化を評価した。その結果、微弱電流処理後の陰極貼付下の皮膚において、コラーゲン量がわずかに増加していた。また、コラーゲン成分であるヒドロキシプロリン量が陽極貼付下の皮膚において増加していた。いずれもバラつきもあり、より詳細な検討が必要ではあるが、コラーゲン量やヒドロキシプロリン量が減少するのではなく増加していたことから、イオン導入における微弱電流処理によって皮膚の機能性が負の影響を受けることなく、改善される可能性が示された。

また、微弱電流処理後の皮膚における組織中セラミド量の変化を評価した結果、セラミド量が増加することが確認された。特に、陰極貼付下の皮膚においては、セラミド量は、最大で2倍弱にまで増大することが明らかとなった。セラミドは、肌の保湿に重要な役割を果たすことから、イオン導入時の微弱電流処理によって、皮膚中のセラミド量が大きく増大することで、肌の保湿機能が向上する可能性が示された。さらに、培養細胞を用いた検討から、微弱電流処理によって増大するセラミドの分子種が、炭素数16のセラミド分子であることが明らかとなり、ある決まった分子種の生成が微弱電流処理によって誘導される可能性が示唆された。

以上をまとめると、イオン導入時の微弱電流処理は、通常の条件(0.3-0.5mA/cm²)であれば、懸念された炎症性サイトカインなどの発現を誘導する可能性は極めて低いことが確認された。しかし、皮内への物質送達の効率を向上させるために電流値を増大させると、炎症性サイトカインの誘導を引き起こす危険性があることも明らかとなった。また、皮膚の機能性を担うコラーゲンが微弱電流処理によって増大する可能性が示された。さらに、皮膚の保湿成分であるセラミドが微弱電流処理後の皮膚において増加することを見出した。すなわち、微弱電流処理によって、皮膚の機能性(弾力性と保湿性)が改善される可能性が見出された。今後さらなる検討により、薬物送達技術であったイオン導入が、安全で理想的な肌の美容技術となることが期待される。

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) Hasan M, Khatun A, Fukuta T, Kogure K. Noninvasive transdermal delivery of liposomes by weak electric current. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 154-155, 227-235 (2020).
- 5) Hasan M, Khatun A, Kogure K. Iontophoresis of Biological Macromolecular Drugs. *Pharmaceutics* **14**, 525 (2022).
- 6) 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).
- 7) 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).
- 8) 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).
- 9) 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).
- 10) 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).

乳酸菌がもつ抗酸化作用の分子基盤解明

筑波大学医学医療系

小林 麻己人

Heat-treated cells of *Lactococcus lactis* strain H61 have been reported to exhibit anti-aging effects on human skin and being considered for application in cosmetics. However, the mechanism of the effects is not clear. I have been studying the antioxidant effects of various dietary phytochemicals using zebrafish as a model animal. In this study, I tried to evaluate the antioxidant effect of *Lactococcus lactis* strain H61 by utilizing zebrafish. As a result, I found that strain H61 exerts its antioxidant effect in zebrafish larvae, in which the relationship between biological effects and genetic mutations is easy to analyze. Using this system, the antioxidant effect of strain H61 was shown to be not mediated by the Nrf2 pathway, which is the master mechanism of cellular antioxidant response. Furthermore, we generated zebrafish mutants that disrupted key genes in the mitochondrial biosynthesis pathway or the innate immune response pathway, paving the way to identify this unknown mechanism.

1. 緒言

65歳以上の高齢者人口が1/3を占めるようになり、本邦はいよいよ超高齢化社会を迎えようとしている。その中で、抗酸化活性をもつ食品やサプリメントが生活習慣病の予防に有効と注目され、中でもNrf2経路というストレス防御システムを活性化させる食品成分の研究が国内外で進んでいる^{1,2)}。ところが最近、Nrf2経路はがん増進にも働くことが報告され、安全性が危惧されるようになってきた。また、Nrf2経路は年齢を重ねるにつれ、活性化力が減弱するという報告もされている。これらのことは、健常人、特に健常な高齢者にとって、Nrf2経路以外の抗酸化経路を活性化させる食品やサプリメントの摂取の方が望ましいことを示唆するが、そのような経路はまだ見つかっていない。

化粧品に関しても抗酸化成分を含有する商品のニーズが高まっており、実際、ビタミンCやE等の抗酸化物質を含有する商品が多く市販されている。ただし、これらは酸化ストレスを直接除去する抗酸化成分であり、安定性が低い上、量的に多く必要とされる。一方、Nrf2経路等を活性化して、細胞内部の抗酸化物質や抗酸化タンパク質を誘導する間接型の抗酸化成分は、持続性が高く、少量でも効果があることが期待される。Nrf2経路の活性化がUVから肌を守ることは示されており、既にNrf2経路を活性化させる植物成分を配合した化粧品も市販され始めている。ただし、前述の通り、Nrf2経路にも問題があり、Nrf2経路以

外の抗酸化経路を活性化させる化粧品の開発が期待される。

乳酸菌は腸内細菌叢を調整するプロバイオティクスとして注目を集めてきたが、最近では菌体成分そのものもつバイोजェニクスとしての機能にも注目が集まっている。実際、乳酸菌成分入りの化粧品も市販され始めている。本研究課題で研究対象となっている乳酸菌H61株もその一つである³⁾。乳酸菌成分の効果の一端は皮膚細胞に対する抗酸化作用と考えられているが、その分子メカニズムに関してはほとんどわかっていない。

研究代表者は、Nrf2経路を介する抗酸化活性の研究をゼブラフィッシュというモデル動物を用いて長年行ってきた⁴⁻⁶⁾。この過程で、様々な食品成分がNrf2を活性化し、動物個体内で抗酸化活性を発揮させることを見出してきた⁷⁻⁹⁾。一方、農研機構の木元広実博士は乳酸菌研究の第一人者で、多くの菌株を保持・解析すると同時に、機能性の高い菌株に関しては特許を取得し、動物試験・ヒト介入試験を行い、女性の肌健康への効用を実証した上で、H61株含有ヨーグルトの商品化に導いている¹⁰⁾。加えて最近では、ヒト表皮角化細胞への直接添加でUVダメージからの保護効果を示し、化粧品成分への応用の可能性も示している¹¹⁾。本課題研究では木元博士に乳酸菌H61株をご提供いただき、その抗酸化作用の実体同定を目的にゼブラフィッシュを用いた解析を試みた。

2. 方法

2.1. ゼブラフィッシュに対する乳酸菌の抗酸化作用の解析

抗酸化作用の測定は遠藤らの方法⁹⁾に従い、受精後3.5日のゼブラフィッシュ稚魚24匹に対し、乳酸菌溶液を12時間前処理後、洗浄し、新たに酸化ストレス剤として過酸化水素溶液を48時間処理し、12時間ごとの生存率を計測した。ゼブラフィッシュ系統には野生型AB系統とNrf2



Elucidation of the molecular basis of antioxidant effects of lactic acid bacteria

Makoto Kobayashi

Faculty of Medicine, University of Tsukuba

変異型 *nfe2l2a^{fh318}* 系統⁷⁾を用いた。乳酸菌は農研機構・木元博士からご供与いただいたH61株とG50株の加熱処理菌体の凍結乾燥品を用いた。

2.2. CRISPR-Cas9によるゲノム編集

CRISPR-Cas9によるゲノム編集は小谷らの方法¹²⁾で行った。標的配列に相補的なcrRNA、Cas9との結合に必要なtracrRNA、Cas9タンパク質の3者を1細胞期のゼブラフィッシュ胚に注入した。注入胚を成魚まで育成し、PCR及びDNAシーケンスを用いたジェノタイピングで目的の遺伝子破壊に成功したF0世代を選び出し、野生型成魚との交配でF1世代を作出した。

2.3. 遺伝子発現解析

乳酸菌等を処理したゼブラフィッシュ稚魚における遺伝子発現変動をqPCR及びRNA-seqにより行った。いずれも乳酸菌等を処理した稚魚の抽出total RNAを用いた。qPCRは、total RNAを鋳型として合成したcDNAを用いてSYBR Green法で行った。RNA-seqはつくばi-Laboratoryで実施した。一次解析データをもとに、野生型とNrf2変異型稚魚の両方で無処理のコントロールよりも1.5倍以上の発現上昇が見られた遺伝子に着目した。これらをヒト遺伝子名に変換し、DAVIDによるパスウェイ解析を行った。

3. 結果

3.1. ゼブラフィッシュに対する乳酸菌の抗酸化作用

野生型4日稚魚に対し過酸化水素処理をしたところ、24時間後には75%以上が致死となった(図1)。この条件下で乳酸菌H61株を12時間前処理すると有意に生存率が上が

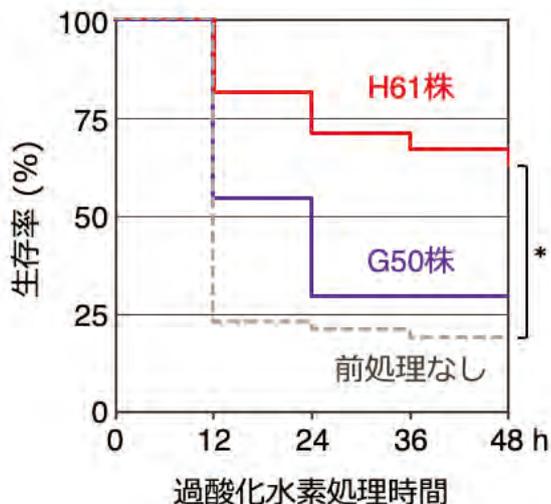


図1 乳酸菌株の抗酸化作用
野生型3.5日稚魚にH61株またはG50株の125µg/ml溶液を12時間前処理した後、2.8mM過酸化水素溶液を曝露させ12時間ごとに生存率を測定した。* p<0.05。

り、致死率が25%程度に下がった。この結果は、H61株の前処理がゼブラフィッシュ体内の抗酸化力を高めることを示唆する。一方、G50株ではこの効果が観察されなかったことから、H61株特異的な作用であることが示された。

3.2. Nrf2変異型ゼブラフィッシュ系統を用いた解析

直接的抗酸化剤であるビタミンCやEではこうした効果は観察されないことから、H61株の抗酸化作用はゼブラフィッシュ体内の抗酸化経路を活性化する間接的作用と推測された。細胞や動物の抗酸化力を間接的に高めるしくみとしてNrf2経路が知られている。そこでH61株の抗酸化作用がNrf2経路の活性化を介するものかをNrf2変異型系統(*nfe2l2a^{fh318}*)で検証した(図2)。*nfe2l2a^{fh318}*ホモ変異型稚魚を用いてH61株の抗酸化作用を解析したところ、Nrf2ホモ変異型稚魚においてもH61株の前処理がコントロールに比べて有意に生存率を向上させた。この結果は、H61株の抗酸化作用がNrf2経路の活性化を介さないものである可能性を示唆した。

3.3. H61株処理による遺伝子発現変動

H61株の抗酸化作用がどのような生体経路を介するかを調べるために、H61株処理により発現変動する遺伝子群をRNA-seq法で探索した。浮かび上がった遺伝子群を用いてパスウェイ解析を行ったところ、ミトコンドリアタンパク質をコードする遺伝子群の多くが発現亢進していた。検証のために、いくつかのミトコンドリアタンパク質遺伝子に対してqPCR解析を行ったところ、弱いながらもH61株により発現誘導される傾向があることがわかり(図3)、

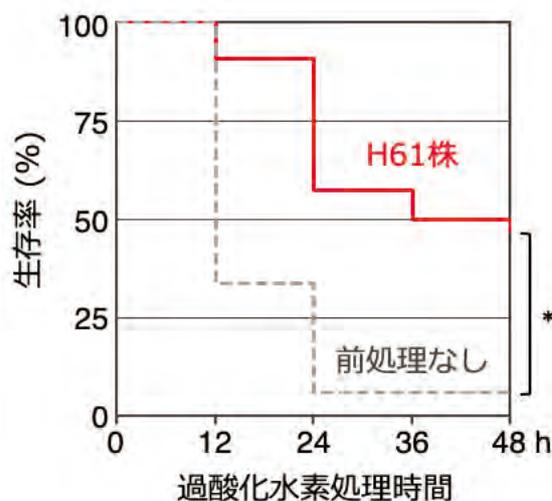


図2 Nrf2変異型稚魚に対するH61株の抗酸化作用
*nfe2l2a^{fh318}*ホモ変異型3.5日稚魚にH61株を12時間前処理した後、2.2mM過酸化水素溶液を曝露させ12時間ごとに生存率を測定した。* p<0.05。

ミトコンドリア生合成が亢進している可能性を示唆された。

製をCRISPR-Cas9を用いて試みた。その結果、Myd88破壊系統の作製にも成功した。

3.4. 遺伝子破壊ゼブラフィッシュ系統の作製

H61株によるミトコンドリア生合成亢進が抗酸化作用に関与する可能性が浮かび上がったので、ミトコンドリア生合成経路が異常な時に、H61株の抗酸化作用がどうなるかを検証することにした。そのために、まずミトコンドリア生合成に関わる転写因子Sirt1及びPGC-1 α の遺伝子破壊ゼブラフィッシュをCRISPR-Cas9を用いて作製した。いずれもゲノム編集に成功したが、Sirt1破壊系統に関してはF1世代まで系統化できた。この*sirt1*^{it326}系統は7bpの塩基欠損が導入されたフレームシフト変異系統であり、その産物は酵素活性ドメインを失うと予想される(図4)。

H61株には免疫賦活作用があることも知られており³⁾、その作用は自然免疫応答機構を介すると予想されている。H61株による抗酸化作用にも自然免疫応答が必要である可能性もあり、その検証のために自然免疫応答が減弱したゼブラフィッシュを用いた解析を試みることにした。乳酸菌による自然免疫応答はToll様受容体-Myd88経路を介するので、Myd88を破壊したゼブラフィッシュ系統の作

4. 考 察

本研究により、乳酸菌H61株がゼブラフィッシュの抗酸化作用を高めることを明らかにできた。このことは、より高抗酸化力のある乳酸菌探索にゼブラフィッシュが有用であることを示すとともに、遺伝子破壊系統の活用により作用メカニズムを遺伝学的に解明できる可能性が示唆された。実際、Nrf2変異型系統を用いた解析の結果、H61株の抗酸化作用はNrf2経路以外の生体経路を介すると推測された。Nrf2経路とがん増進の関係が危惧されているため、H61株がNrf2以外の経路を介して抗酸化作用を発揮することは、化粧品の開発応用を考える上で朗報となりうる。

次にH61株の抗酸化作用を介する生体経路を明らかにするために、H61株処理により発現変動する遺伝子群をRNA-seq解析で探索し、ミトコンドリア生合成が関与する可能性を見いだした。その検証のためにSirt1及びPGC-1 α 遺伝子を破壊したゼブラフィッシュ系統を作製し

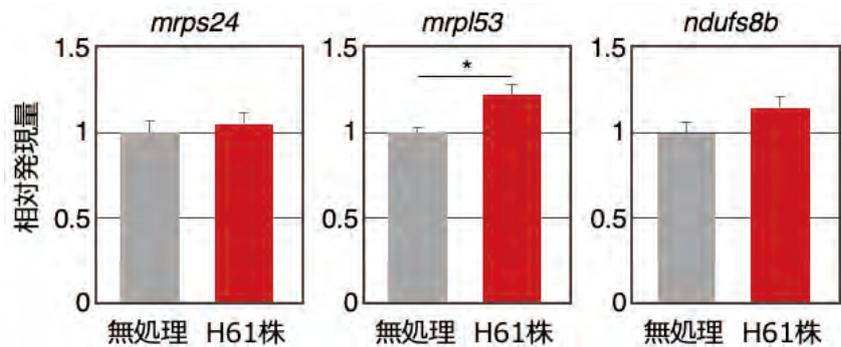


図3 ミトコンドリア関連遺伝子の発現誘導
H61株を12時間前処理した野生型4日稚魚を用いて*mrps24*、*mrpl53*、*ndufs8b*遺伝子の発現解析をqPCRにより行い、無処理稚魚を1とした時の相対発現量を解析した。* p<0.05。

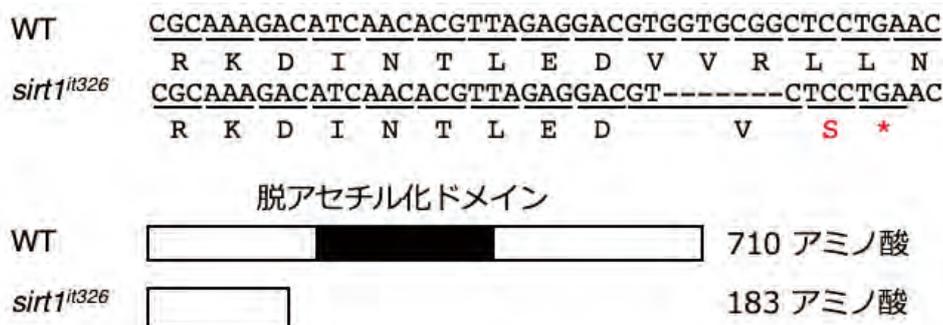


図4 Sirt1破壊系統の作製
CRISPR-Cas9によりSirt1遺伝子領域に7bp欠損のフレームシフト変異を導入した(*sirt1*^{it326})。生じるタンパク質は脱アセチル化ドメインを含むC末3/4が欠失していると予想される。

た。ただ、抗酸化作用の解析までには至らず、今後の課題として残った。一方、H61株が自然免疫応答遺伝子群を弱いながらも誘導することがRNA-seq解析によりわかった。そこで自然免疫の関与を検証するためにMyd88破壊系統も作製したが、こちらの解析も今後の課題である。今回のRNA-seq解析ではミトコンドリア生合成以外の経路は浮かび上がらなかった。技術的な問題である可能性もあり、別手段としてマイクロアレイ解析も現在行っている。

H61株の作用が遺伝子発現変動を伴わない可能性もある。その場合は遺伝子発現解析を基盤とした戦略では作用機構に迫ることができない。そこで現在、乳酸菌側から迫る戦略も開始している。具体的にはH61株を成分分離し、どの成分に抗酸化作用があるか絞り込むアプローチと、H61株の変異株を作製・解析し、どのような乳酸菌遺伝子が抗酸化作用に関与するかを探索するアプローチである。まだ開始したばかりで今後の結果が待たれる。

(引用文献)

- 1) M. Kobayashi & M. Yamamoto: Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxid. Redox Signal.* **7**: 385-394 (2005).
- 2) M. Kobayashi & M. Yamamoto: Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv. Enzyme. Reg.* **46**: 113-140 (2006).
- 3) H. Kimoto-Nira: New lactic acid bacteria for skin health via oral intake of heat-killed or live cells. *Anim. Sci. J.* **89**: 835-842 (2018).
- 4) M. Kobayashi *et al.*: Identification of the interactive interface and phylogenetic conservation of the Nrf2-Keap1 system. *Genes Cells* **7**: 807-820 (2002).
- 5) M. Kobayashi *et al.*: The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds. *Mol. Cell. Biol.* **29**: 493-502 (2009).
- 6) K. Mukaigasa *et al.*: Nrf2 activation attenuates genetic endoplasmic reticulum stress induced by a mutation in the phosphomannomutase 2 gene in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **115**: 2758-2763 (2018).
- 7) K. Mukaigasa *et al.*: Genetic evidence of an evolutionarily conserved role for Nrf2 in the protection against oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.* **32**: 4455-4461 (2012).
- 8) Y. Fuse *et al.*: Nrf2-dependent protection against acute sodium arsenite toxicity in zebrafish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **305**: 136-142 (2016).
- 9) Y. Endo *et al.*: Evaluation of antioxidant activity of spice-derived phytochemicals using zebrafish. *Int. J. Mol. Sci.* **21**: 1109 (2020).
- 10) H. Kimoto-Nira *et al.*: Effects of ingesting milk fermented by *Lactococcus lactis* H61 on skin health in young women: a randomized double-blind study. *J. Dairy Sci.* **97**: 5898-5903 (2014).
- 11) H. Kimoto-Nira *et al.*: Towards application of water extract from heat-killed *Lactococcus lactis* H61 as a cosmetic ingredient. *Lett. Appl. Microbiol.* **68**: 530-536 (2019).
- 12) H. Kotani *et al.*: Efficient multiple genome modifications induced by the crRNAs, tracrRNA and Cas9 protein complex in zebrafish. *PLoS One* **10**: e0128319 (2015).

概日リズムによるコラーゲン分泌制御機構の解析

秋田大学大学院医学系研究科

齋藤 康太

Proteins synthesized within the ER is exported via COPII-coated vesicles to the Golgi for secretion. We have found that TANGO1 is not only collagen cargo receptor at ER exit sites but it organizes the formation of ER exit site via interacting with Sec16. In this analysis, we have found that TANGO1 is phosphorylated by casein kinase 1 and dephosphorylated by PP1 in a cell-cycle dependent manner and the phosphorylation regulates the organization of ER exit sites. CK1 activity is involved in the regulation of circadian rhythm, so that our analysis would lead to the future investigation on the regulation of collagen secretion with circadian rhythm.

1. 緒言

受容体の脱感作をはじめ、シグナルによるエンドサイトーシス経路の制御については盛んに研究が行われている。一方で全タンパク質の約3割が関与する小胞体からの分泌に関しては、シグナルによる制御機構はほとんどわかっていない(図1)。分泌は、細胞内で合成されたタンパク質が細胞外や細胞表面に出るまでの一連の過程である。インスリンなどのペプチドホルモンや、コラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスなど、生体内の多くの因子は分泌されて機能する。これらのタンパク質は、小胞体内で合成された後、ゴルジ体へ輸送され、トランスゴルジ網を經由して最終的に細胞膜表面へ到達する(図1)。

これまでわれわれは、分泌経路の初期段階である小胞体-ゴルジ体間のタンパク質輸送に着目してきた。小胞体からゴルジ体へ分泌タンパク質を輸送するCOPII小胞は、小胞体上の特殊な領域である“ER exit site”で形成される。ER exit siteにはCOPII小胞の被覆因子であるSec23/24複合体、Sec13/31複合体がSec16依存的に集積している¹⁾。われわれはこれまで、高等真核生物のER exit siteに局在する新規因子Transport and Golgi organization 1 (TANGO1)の機能解析を行ってきた。TANGO1はショウジョウバエ由来のS2細胞を用いた分泌スクリーニングによって単離された膜貫通型タンパク質である²⁾。われわれはTANGO1がER exit siteにおいて、コラーゲンの積荷受容体として機能することを見出した³⁾。さらにTANGO1がcTAGE5と共受容体として機能することを

明らかにした⁴⁾。また、cTAGE5に低分子量Gタンパク質Sar1の活性化因子であるSec12が結合することで、ER exit siteにおけるSar1の効率的な活性化を介し、ER exit siteからのコラーゲンの分泌を担っていることを見出した(図2)⁵⁻⁷⁾。続いて脊椎動物においてTANGO1に長鎖

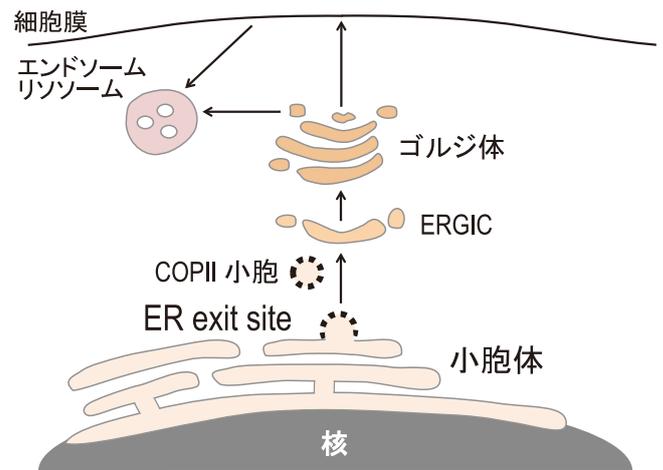


図1 細胞内分泌経路

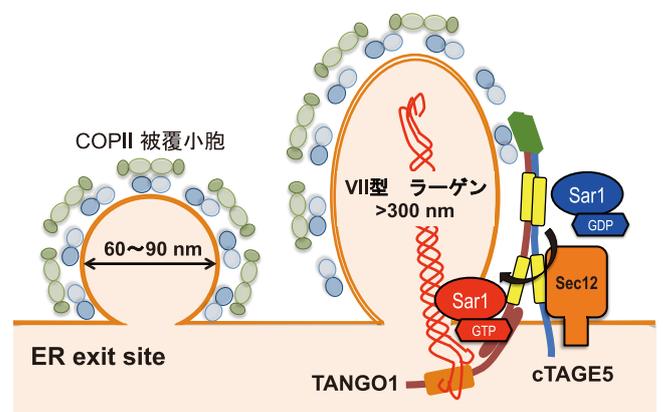


図2 cTAGE5/TANGO1/Sec12複合体によるVII型コラーゲン分泌モデル



Mechanisms of collagen secretion regulated by circadian rhythm

Kota Saito

Akita University, Graduate School of Medicine

(TANGO1L)と短鎖(TANGO1S)の2つのアイソフォームが存在することを明らかにし、両者がSec16と結合することで、協調してER exit siteの場を決定するオーガナイザーとしての役割を有することを明らかにしてきた^{8,9)}。またER exit siteを超解像顕微鏡により観察することにより、ER exit siteの構成因子がドメインを形成して存在することを明らかにした¹⁰⁾。

最近われわれはCK1 δ , ϵ による TANGO1 のリン酸化によって、ER exit site が崩壊することを見出した。CK1 δ , ϵ は概日リズムの制御に関与し、CK1 δ , ϵ を阻害したマウスでは概日リズムが障害されることが明らかになっている。以上のことは、TANGO1によるコラーゲン分泌がCK1 δ , ϵ によって制御されている可能性を強く示唆している。事実、最近コラーゲンの分泌が概日リズムによって制御されている可能性が見出されつつあるが、分子メカニズムの全貌は未解明であった。

2. 方法

2.1. 免疫染色

冷メタノール固定した細胞を5% BSA/PBS/0.1% Triton X-100にてブロッキング後、一次抗体およびAlexa Fluor標識した二次抗体によって染色した。核染色には DAPIを用いた。観察は共焦点顕微鏡 LSM700 (Zeiss)によって行った。

2.2. *in vitro* キナーゼアッセイ

GST-TANGO1 PRDリコンビナントタンパク質にCK1 δ (1-351 aa.)を添加し、20mM Tris-HCl (pH7.4)、150mM NaCl、0.1% Triton X-100、2mM MgCl₂、25 mM [γ -32P] ATP 水溶液中で30℃、1時間反応させた。リン酸化反応はLaemmli Sample bufferと混合し加熱することで停止させた。SDS-PAGE後、オートラジオグラフィーにてリン酸化を検出した。

2.3. 免疫沈降実験およびウエスタンブロット

293T細胞へのトランスフェクションはPEIを用いた。20mM Tris-HCl (pH7.4)、100mM NaCl、1mM EDTA、1% TritonX-100およびプロテアーゼ阻害剤によって破碎した細胞を15,000rpm、15min遠心した上清を細胞抽出液とし、抗FLAG抗体による免疫沈降した。TBS/0.1% TritonX-100で5回洗浄後、0.2mg/ml FLAGペプチドによって溶出した。サンプルはLaemmli Sample bufferと混合し、5分間煮沸後、SDS-PAGEし、PVDF膜に転写後、各抗体によってウエスタンブロットを行った。二次抗体はHRP標識されているものを用い、ルミノール・ペルオキシド基質を用いLAS4000 mini (cytiva)によって検出した。

2.4. 細胞周期の同調

細胞周期の同調は、ダブルチミジン法あるいはノコダゾール法を適宜用いた。

3. 結果

3.1. TANGO1のPPS領域におけるリン酸化修飾はTANGO1とSec16の結合親和性を減弱させ、ER exit siteを崩壊させる

TANGO1の各アミノ酸残基におけるタンパク質修飾について、PhosphositePlusを用いて調べた結果、TANGO1の細胞質側領域の一部にリン酸化報告が多数存在する残基を見出した。この領域(TANGO1L:1651-1750, TANGO1S:529-628 aa.)をphosphorylation predicted sequences(PPS)と命名し、種間保存性を調べた結果、PPS領域内の配列は他の領域に比較して種間保存性が高いことが明らかになった。またPPSはSec16とTANGO1の相互作用領域であるSIR (Sec16 Interaction Region)の近傍に存在した。

次に、TANGO1SのPPS内にリン酸化候補残基をアラニンに置換した非リン酸化変異体(SA変異体)および、グルタミン酸に置換したリン酸化模倣変異体(SE変異体)を作出し、Sec16との結合について検討した。その結果、SE変異体においては、野生型TANGO1Sに比べSec16との結合が減弱していた一方で、SA変異体は野生型よりも結合が増強していた。したがってTANGO1のPPS領域がリン酸化されることでSec16とTANGO1の結合親和性が減弱することが明らかになった。

次に、内在のTANGO1LおよびTANGO1Sを発現抑制した細胞に、TANGO1S各変異体をそれぞれ発現させER exit siteの形成能を評価した。TANGO1LおよびTANGO1Sを発現抑制した細胞においては、以前報告したようにSec16とSec31が一部乖離して存在するが、野生型TANGO1SやSA変異体を発現した細胞においてはSec16, Sec31の共局在が回復した。一方でSE変異体を発現した細胞においては、Sec16とSec31は一部乖離したままとなった。また、SE変異体を発現する細胞では小胞体からのVSVGの輸送が遅延していた。以上の結果から、TANGO1のPPS領域がリン酸化されることで、Sec16との結合親和性が減弱し、ER exit siteの崩壊と分泌の阻害が生じることを示唆している。

3.2. CK1 δ はTANGO1を直接リン酸化し、ER exit siteを崩壊させる

次に、TANGO1のPPS領域をリン酸化するキナーゼを探索した。先行知見としてCK1 δ が小胞体-ゴルジ体間のタンパク質輸送に関与することが明らかになっていたため、CK1 δ がTANGO1を直接リン酸化するかを γ -32P-ATPを用いた*in vitro*の評価系で検証した。TANGO1はPPS領

域を含むC末端 257 アミノ酸領域部分をリコンビナントとして調製し、CK1 δ は自己リン酸化による活性減弱を防ぐため、触媒ドメイン部分のリコンビナントを調製して用いた。結果、TANGO1はCK1 δ 存在下でリン酸化されたが、TANGO1のSA変異を含むリコンビナントにおいて 32 Pはほとんど検出されなかった。以上の結果より、CK1 δ によってTANGO1のPPS領域が直接リン酸化されることが明らかになった。

さらに、CK1 δ がER exit siteの構成や形態に与える影響を評価した。CK1 δ を過剰発現させた細胞ではSec16とSec31は乖離し、TANGO1SのSE変異体を発現させた際と同様の表現型が観察された。一方、キナーゼ活性を有さないCK1 δ K38R変異体を発現させた細胞では、ER exit siteの乖離は認められなかった。また、CK1 δ の阻害剤であるIC261を添加した細胞およびCK1 δ およびCK1 ϵ をノックダウンした細胞において、ER exit siteは肥大化していた(図3)。以上の結果より、CK1 δ がキナーゼ活性によりER exit siteの形態に影響を与え得ることが明らかになった。

3.3. TANGO1はPP1によって脱リン酸化される

H61株の抗酸化作用がどのような生体経路を介するかを調べるために、H61株処理により発現変動する遺伝子群をRNA-seq法で探索した。浮かび上がった遺伝子群を用いてパスウェイ解析を行ったところ、ミトコンドリアタンパク質をコードする遺伝子群の多くが発現亢進していた。検証のために、いくつかのミトコンドリアタンパク質遺伝子に対してqPCR解析を行ったところ、弱いながらもH61株により発現誘導される傾向があることがわかり(図3)、ミトコンドリア生合成が亢進している可能性を示唆された。

3.4. 細胞分裂期におけるTANGO1のリン酸化亢進によってER exit siteは崩壊する

細胞分裂期において、分泌の停止に伴ってER exit siteも崩壊し、Sec16とSec31は分裂前期から後期にかけて局在が乖離することが報告されている。しかし、この一時的なER exit site崩壊の分子メカニズムは不明だった。Sec16とSec31の乖離はTANGO1のリン酸化模倣変異体発現時や、CK1 δ の過剰発現時、PP1の活性抑制時においても観察されたこと、PP1は細胞分裂期に一時的に活性低下することから、我々は細胞分裂期においてTANGO1のPPS領域におけるリン酸化が亢進し、Sec16との結合が外れることがER exit siteの崩壊の契機となる仮説を考え、その検証を行った。まず、間期と分裂期それぞれにおけるTANGO1Sのリン酸化量をphos-tagにより定量した。その結果、nocodazoleで細胞分裂期に同調させた培養細胞において野生型TANGO1Sのリン酸化量は増加していたが、一方でTANGO1S SA変異体は細胞分裂期においてもリン酸化量が変化しなかった。したがって、細胞分裂期にはTANGO1のPPS領域においてリン酸化が亢進することが明らかになった。

さらに、野生型TANGO1SあるいはTANGO1S SA変異体を発現する安定発現株での細胞分裂期におけるER exit siteの様子を観察した。野生型TANGO1Sを発現する細胞では、親株のHeLa細胞と同様に、分裂中期においてSec16/Sec31の局在が乖離していた。一方、TANGO1S SA変異体を発現する細胞では、分裂中期においてもSec16とSec31が共局在する点が多数認められた。この結果は、細胞分裂期におけるER exit siteの崩壊にはTANGO1のPPS領域におけるリン酸化が必要であることを意味している。

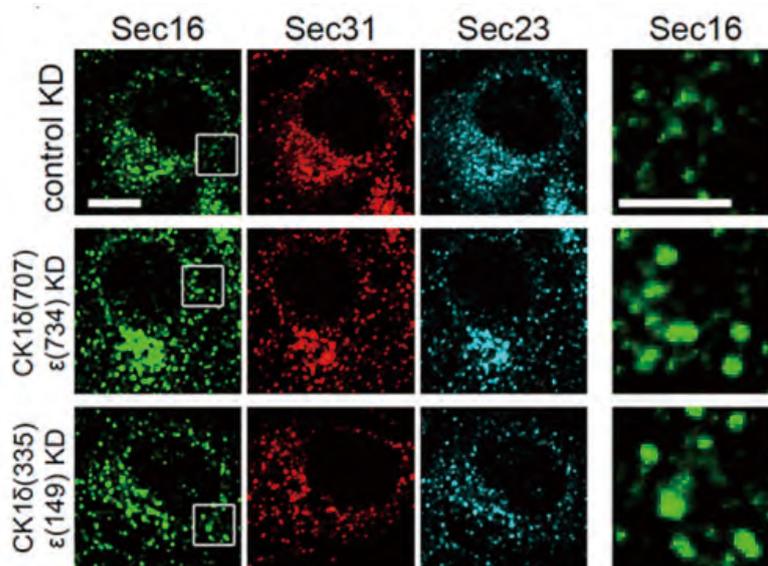


図3 CK1 δ/ϵ のノックダウンによりER exit siteが肥大化する

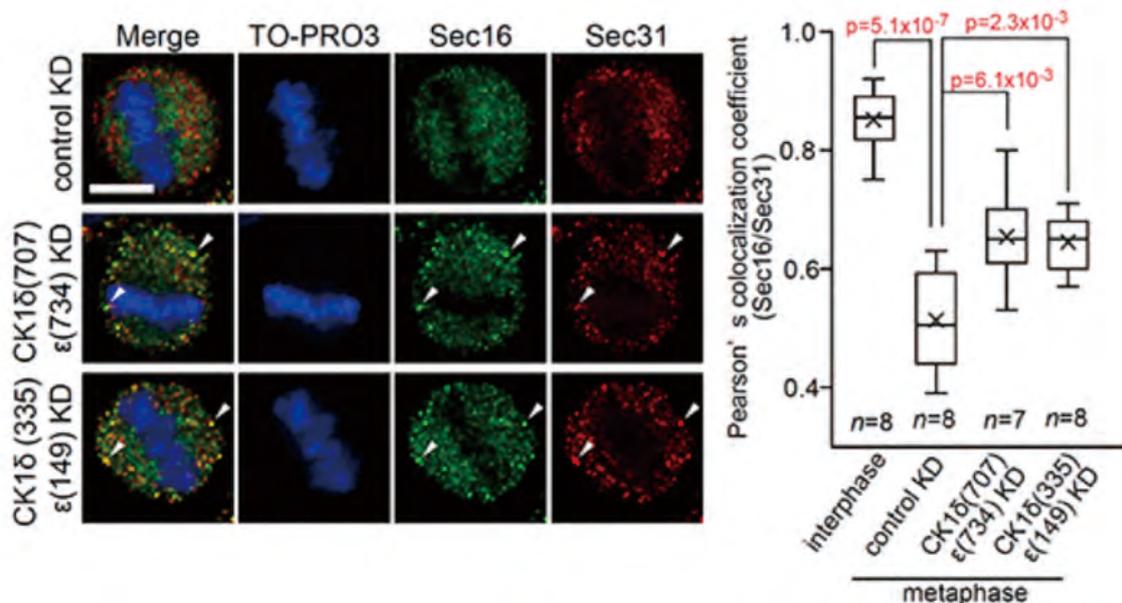


図4 CK1δ,εは細胞分裂中期におけるER exit siteの崩壊に重要である
CK1δおよびCK1εをノックダウンした細胞をダブルチミジン法により同調させた後、細胞分裂期の細胞を免疫染色した(スケールバー:10μm)。箱ひげ図はSec16/Sec31の細胞ごとの共局在率を示す。

さらに、細胞分裂期におけるER exit siteの崩壊にCK1δが関与する可能性を検討するため、CK1δ/εを発現抑制した細胞でのER exit siteを観察した。その結果、TANGO1S SA変異体安定発現株と同様、CK1δ/εを発現抑制した細胞においてはSec16とSec31が共局在する点が認められた(図4)。以上の結果から、細胞分裂期におけるER exit siteの崩壊はCK1δによるTANGO1 PPS領域のリン酸化によって生じる可能性が強く示唆された。

4. 考察

本研究により、TANGO1のPPS領域をCK1δがリン酸化し、PP1が脱リン酸化することが明らかになった。CK1δの活性は細胞周期を通じて一定であるが、PP1の活性は細胞分裂期にCdk1-CyclinB1複合体によってリン酸化されることで減弱する。したがって間期においてTANGO1のリン酸化状態は、CK1δによるリン酸化とPP1による脱リン酸化の平衡状態にあるが、細胞分裂期においてはPP1の脱リン酸化活性のみが低下するために、TANGO1のリン酸化が亢進すると考えられる^{11,12)}。

またER exit siteは細胞外環境や概日リズムに応じてその数や大きさを変化させ、分泌を調節することが報告されている。TANGO1とSec16の結合はER exit siteの形成起点となることから、細胞分裂期以外のER exit siteの適応メカニズムにおいても今回得た知見と同様の制御機構が関与する可能性が考えられる。特にCK1δ, εは概日リズムの制御に関与し、CK1δ, εを阻害したマウスでは概日リズムが障害されることが明らかになっている。よって概日

リズムに応じたTANGO1のリン酸化状態等を検証していくことにより、今後、さらにER exit siteのシグナルによる形成制御機構を明らかにすることができると考える。

(引用文献)

- 1) Saito, K.* and Katada, T. Mechanisms for exporting large-sized cargoes from the endoplasmic reticulum. *Cell. Mol. Life Sci.* 72 (19), 3709-20. (2015)
- 2) Bard, F., Casano, L., Mallabiabarrena, A., Wallace, E., Saito, K., Kitayama, H., Guizzunti, G., Hu, Y., Wendler, F., Dasgupta, R., Perrimon, N. and Malhotra, V. Functional genomics reveals genes involved in protein secretion and Golgi organization. *Nature*, 439, 604-7. (2006)
- 3) Saito, K., Chen, M., Bard, F., Chen, S., Zhou, H., Woodley, D., Polischuk, R., Schekman, R. and Malhotra, V. TANGO1 facilitates cargo loading at endoplasmic reticulum exit sites. *Cell*, 136, 891-902. (2009)
- 4) Saito, K., Yamashiro, K., Ichikawa, Y., Erlmann, P., Kontani, K., Malhotra, V. and Katada, T. cTAGE5 mediates collagen secretion through interaction with TANGO1 at endoplasmic reticulum exit sites. *Mol. Biol. Cell*, 22, 2301-8. (2011)
- 5) Saito, K., Yamashiro, K., Shimazu, N., Tanabe, T., Kontani, K. and Katada, T. Concentration of Sec12 at ER exit sites via interaction with cTAGE5 is required for collagen export. *J. Cell. Biol.*, 206(6), 751-62. (2014)
- 6) Tanabe, T., Maeda, M., Saito, K., and Katada, T.

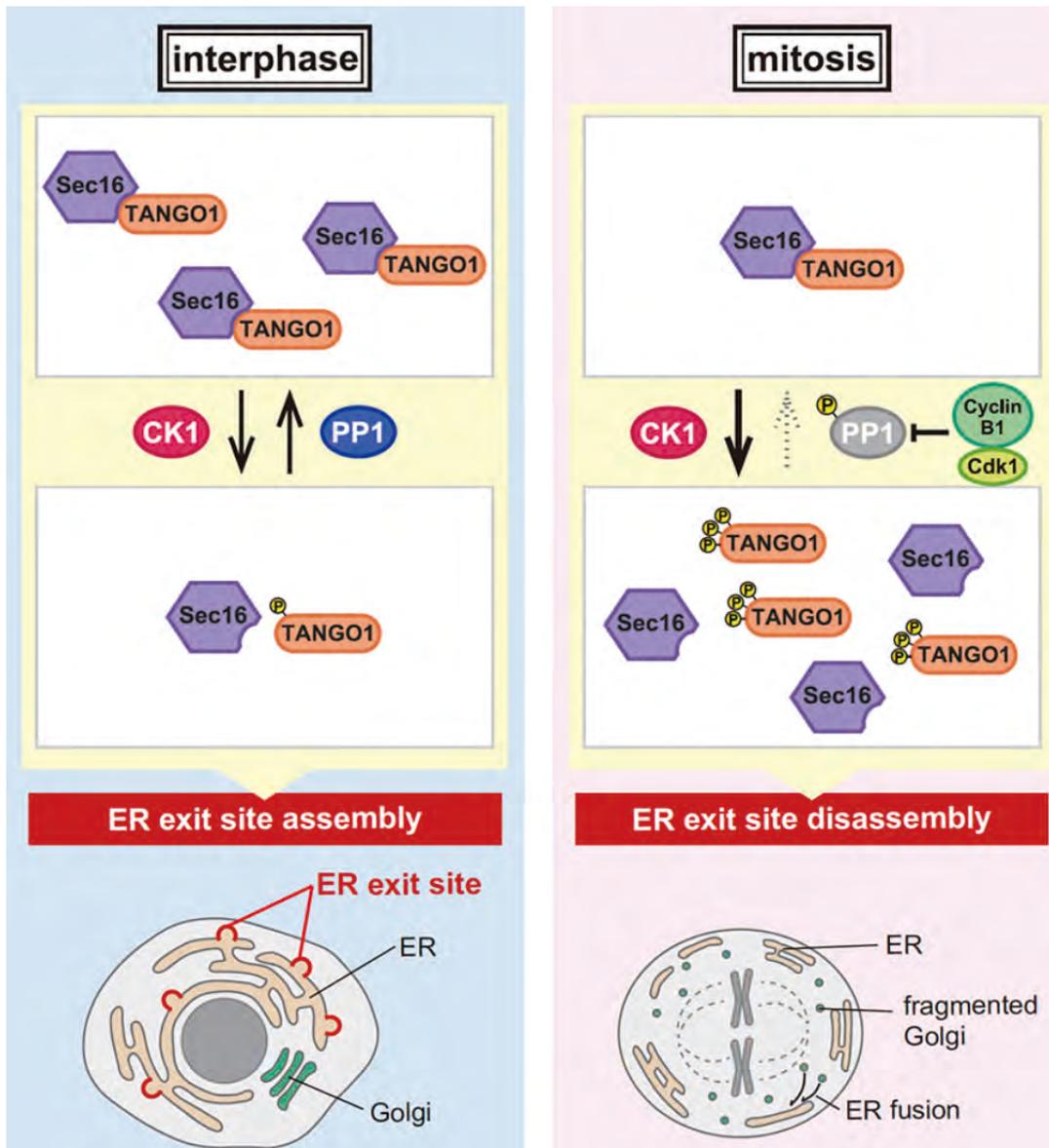


図5 細胞分裂期におけるER exit siteの形成と崩壊の分子メカニズム

- Dual function of cTAGE5 in collagen export from the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell*, 27, 2008-13 (2016)
- 7) [Saito, K.*](#), Maeda, M. and Katada, T. Regulation of the Sar1 GTPase Cycle Is Necessary for Large Cargo Secretion from the Endoplasmic Reticulum. *Front. Cell Dev. Biol.* 5, 75 (2017)
- 8) Maeda, M., [Saito, K.*](#), and Katada, T. Distinct isoform-specific complexes of TANGO1 cooperatively facilitate collagen secretion from the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell*, 27, 2688-96 (2016)
- 9) Maeda, M., Katada, T. and [Saito, K.*](#) TANGO1 recruits Sec16 to coordinately organize ER exit sites for efficient secretion. *J. Cell Biol.*, 216(6) 1731-43 (2017)
- 10) Maeda, M., Kurokawa, K., Katada, T., Nakano, A. and [Saito, K.*](#) COPII proteins exhibit distinct subdomains within each ER exit site for executing their functions. *Sci. Rep.*, 9, 7346 (2019)
- 11) [Maeda M.](#), Komatsu Y. and Saito K. "Mitotic ER exit site dynamics: Insights into blockade of secretion from the ER during mitosis." *Mol. Cell. Oncol.*, 7 (6), 1832420 (2020)
- 12) [Maeda M.](#), Komatsu, Y. and [Saito, K.](#) Mitotic ER Exit Site Disassembly and Reassembly Are Regulated by the Phosphorylation Status of TANGO1. *Dev. Cell*, 55, 237-250, 1731-43 (2020)

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析

北海道大学大学院医学研究院皮膚科学教室

西江 渉

Collagen XVII (COL17) is one of the major components forming hemidesmosomes in basal keratinocytes, which functions adhesion between the epidermis and the dermis. Loss of function of COL17 due to gene mutations coding *COL17A1* or autoimmunity to COL17 both read to blistering diseases including epidermolysis bullosa and bullous pemphigoid. In addition, COL17 is known to play important roles for keeping stemness in keratinocytes. Therefore, identification of genes regulating COL17 expression must be helpful for developing new therapies for blistering diseases and elucidating regulation mechanisms of keratinocyte stemness. In this study, we tried to identify key genes upregulating COL17 expression by CRISPR/Cas9-mediated genome-wide screening. First, as a positive control study, collagen VII (COL7) promoter was introduced upstream of the destabilized GFP (dscGFP) gene in HaCaT immortalized keratinocytes. This method was able to visualize COL7-related GFP expression in HaCaT keratinocytes. However, COL17 gene expression was not high enough for performing FACS-sorting when COL17 promoter was introduced upstream of the dscGFP gene in HaCaT keratinocytes. Therefore, we are analyzing HaCaT keratinocytes in which COL17 promoter was introduced upstream of the hygromycin resistant gene.

1. 緒言

皮膚の表皮基底細胞ヘミデスモゾーム構成分子のひとつであるXVII型コラーゲン(COL17)は、表皮真皮間接合に重要な生理機能を担っている。先天的な遺伝子変異に伴うCOL17の機能障害によって容易に水疱を生じる接合部型表皮水疱症を発症し、COL17に対する後天的な自己免疫反応が生じると水疱性類天疱瘡を発症する。またCOL17は、色素幹細胞の維持や皮膚の老化にも関与する分子であり、皮膚におけるCOL17発現量を制御し増加できると水疱性皮膚疾患だけでなく皮膚の抗老化など様々な応用が期待できる。さらにCOL17は皮膚表皮細胞の幹細胞マーカーのひとつであるため、COL17発現量の増加は表皮幹細胞の効率的な培養法確立へ発展する可能性も予想される。遺伝子の発現量はプロモーター活性に依存するため、COL17プロモーター活性の制御分子の同定は様々な応用性と発展性が期待できる。そこで、COL17発現を亢進する分子を、ゲノム編集を応用した網羅的スクリーニング法¹⁾で同定する研究を計画した。

2. 実験

網羅的ゲノム編集によって1細胞あたり1遺伝子(合計約20,000遺伝子)を網羅的にノックアウトした表皮角化細

胞集団を作製し、COL17プロモーター活性が増加した細胞集団を解析しノックアウトされた遺伝子を同定する手法を計画した。最初に、lentiCas9-Blastベクター(Addgene, Blasticidin耐性)を293TN細胞へ遺伝子導入し作成したレンチウイルス粒子を不死化表皮角化細胞であるHaCaT細胞へ感染させ、Cas9タンパク安定発現HaCaT細胞株を作成する。次に、COL17プロモーター領域(-1251 to +379)をクローニング後pGreenFire lenti-reporterベクター(SBI, puromycin耐性)へ導入し、COL17遺伝子プロモーター下でdestabilized GFP (dscGFP)とLuciferaseを発現するベクターを作成する。その際、VII型コラーゲン(COL7)遺伝子プロモーター領域(-1351 to +145)も同様にクローニングし、陽性コントロールとして作成した(図1、A)。さらに中間報告の結果を踏まえ、ヒグロマイシン耐性遺伝子(HygR)を同様にCOL17プロモーター下に導入したコンストラクトも作成した。網羅的ゲノム編集で用いる約20,000種の遺伝子を標的とするgRNA発現コンストラクトは、レンチウイルスで導入後puromycinによるセクションが必要なため¹⁾、作成したCOL17あるいはCOL7発現レポーターコンストラクトとCas9タンパクを同時発現するHaCaT細胞へ、puromycinを標的とするgRNA(5'-ATCCGGACCGCCACATCGAG-3')を遺伝子導入しpuromycin感受性株を得る。最後に、ノックアウトgRNAライブラリー(GeCKO v2, Addgene)を低濃度(MOI=0.2~0.4)のレンチウイルスで感染させ、puromycinでセクション後GFP蛍光が増強した細胞群をFACSソーティングする。HygRをCOL17プロモーター下に導入したコンストラクト導入細胞では、FACSソーティングではなくヒグロマイシンを培地へ添加し耐性株をセクション可能である。COL17プロモーター活性が上がった細胞群から抽出し



Regulation mechanism of collagen XVII: elucidation by CRISPR/Cas9-mediated genome-wide screening

Wataru Nishie

Department of Dermatology, Hokkaido University Graduate School of Medicine

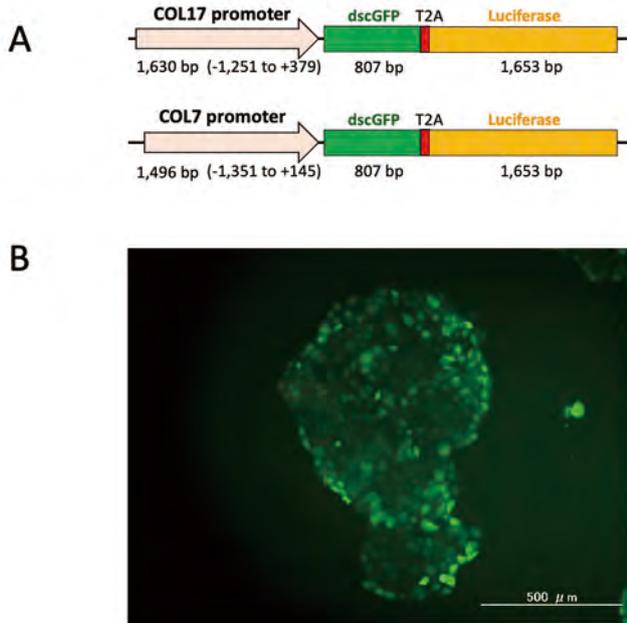


Fig. 1 GFP 蛍光下で COL17 および COL7 プロモーター活性を可視化するコンストラクト(A)。COL7 プロモーター活性を可視化した HaCaT 細胞。細胞辺縁で発現量が増加している(B)。

たDNAをテンプレートに用い、導入されたGeCKO v2のgRNA配列領域をPCR法で増幅後、次世代シーケンサー(Miseq)でアンプリコンシーケンスを行う。シーケンスデータ(FASTQファイル)をMAGeCKFlute²⁾で解析し、COL17あるいはCOL7発現増強に関与する遺伝子を同定する。

3. 結果

コントロールとしてCOL7レポーターコンストラクトをレンチウイルスで導入したCas9発現HaCaT細胞では、コロニーの辺縁にdscGFP発現が増強した細胞群が確認された(図1、B)。一方、COL17レポーターコンストラクトを導入したCas9発現HaCaT細胞では、予想に反し明瞭なGFP蛍光を発する細胞は認めなかった。作成したCOL17レポーターコンストラクトを293細胞へ一過性にトランスフェクションしたところGFP蛍光を確認したため、可視下で確認可能な発現量ではない可能性を考えた。FACSソーティングでの細胞分離が困難と判断し、抗生剤でのセレクションを考えた。そこでCOL17プロモーター下にHygRを発現する系を新たに作成し(図2、A) lentiCas9-Blast発現HaCaT細胞へレンチウイルスで導入したところ、比較的高濃度のヒグロマイシン下でも耐性となるクローンを複数認め薬剤でのセレクションが可能と判断した(図2、B)。

4. 考察

今回クローニングしたCOL17プロモーター領域は、HaCaT細胞ではGFP蛍光を目視できない程度の低レベルであると予想された。そこで薬剤耐性遺伝子(ヒグロマイシン耐性遺伝子)を用い、COL17プロモーター活性が増強した細胞を採取する新たな手法を検討したところ、複数の薬剤耐性クローンの樹立に成功した。薬剤耐性遺伝子を用いるとセレクション濃度を最適化が容易なため、COL17

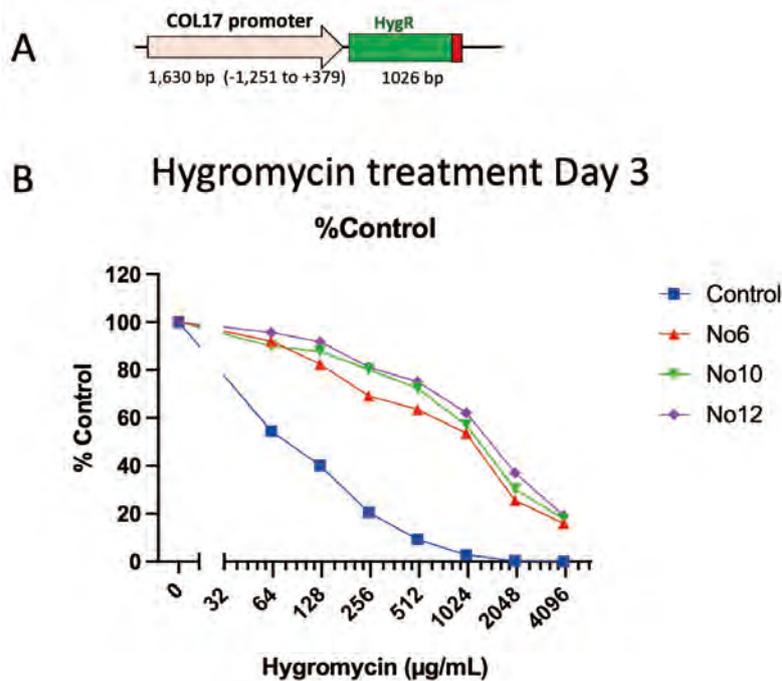


Fig. 2 COL17 プロモーター下でヒグロマイシン耐性遺伝子(HygR)を発現するコンストラクト(A)。ヒグロマイシン耐性クローンを複数確認した(No.6, 10, 12、B)。

プロモーター活性が上がった細胞群をFACSソーティングより簡便に分離できることが期待できる。本研究期間内では細胞群の採取まで至らなかったが、今後機会があれば実験を継続したいと考えている。一方、COL7レポーターコンストラクトを導入したHaCaT細胞ではコロニー辺縁の細胞群で発現が増強していた(図1、B)。本所見はCOL7遺伝子発現がTGF- β で制御されるという過去の報告に矛盾せず³⁾、培養下でCOL7の発現量を間接的に可視化可能な画期的な実験系である。今後、細胞の遊走や創傷治癒におけるCOL7の機能解析など、様々な研究に応用されることが期待される。

5. まとめ

今回作成した遺伝子改変HaCaT細胞は、遺伝子の発現

量を蛍光で確認できるため非常に有用と思われる。既にCas9タンパクを発現しているため、標的となる遺伝子のgRNAを導入するだけで網羅的ゲノム編集が可能である。予想に反してCOL17プロモーター活性はGFP蛍光を可視化可能なほど十分ではなかったが、抗生物質耐性遺伝子を発現することは可能であった。今後、ヒグロマイシン濃度を最適化した後にCOL17発現を制御する新規遺伝子が同定されることを期待している。

(引用文献)

- 1) Joung J, et al. Nat Protoc 12: 828-863, 2017.
- 2) Wang B, et al. Nat Protoc 14: 756-780, 2019.
- 3) Akasaka E, et al. J Invest Dermatol 141: 1450-1460, 2021.

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 －

徳島文理大学薬学部病態分子薬理学研究室

深田 俊幸

Zinc is an essential trace element for life, and zinc deficiency causes numbers of symptoms including dermal inflammation and immune deficiency, so that zinc homeostasis must be tightly fine-tuned via zinc transporters, however, the investigations for the involvement of zinc transporters in skin and immunological homeostasis have not been conducted in detail so far.

Previously, we have demonstrated that zinc transporter SLC39A10/ZIP10 plays important roles in early B cell development and B cell-mediated immune responses. Further, we have found that ZIP10 is highly expressed in the hair follicles, which is required for skin and hair follicles formation, however, there is limited information on ZIP10-expressing cells about their physiological roles, their fate determining, and the molecular events controlled by zinc transporter ZIP10.

To clarify the physiological functions of ZIP10 and the profiles of ZIP10 expressing cells *in vivo*, we have generated *Zip10-IRES-GFP* knock-in (*Zip10-GFP-KI*) mouse, which was further crossed with *Rosa26 Tomato*-KI mouse to generate *Zip10-GFP/Tomato*-KI mouse. The GFP expression was detected in the hematopoietic stem cell and ZIP10-expressing pre-/pro-B cell populations in the bone marrow cells from the *Zip10-GFP-KI* mice. Tomato expression was also detected in part of the ZIP10-expressing pre-/pro-B cell populations, indicating that Tomato expressing pre-/pro-B cells were derived from ZIP10-expressing progenitor cells. In skin of the mice, GFP and Tomato were detected around the lower and upper bulge regions, respectively. The hair follicle stem cell populations also contained GFP and GFP/Tomato expressing cells.

These findings indicated that both *Zip10-GFP-KI* and *Zip10-GFP/Tomato*-KI mice are valuable tools to investigate the functions of ZIP10 and the fate of the ZIP10-expressing cells *in vitro* and *in vivo*, which will bring us numbers of opportunities for better understanding of the dermatology and the cosmetology in the future.

1. 緒言

亜鉛は生命の維持に不可欠な微量元素であり、細胞内外における亜鉛の恒常性は亜鉛トランスポーターが担っている。亜鉛トランスポーターが輸送する亜鉛イオンは、カルシウムイオンのようにシグナル因子(=亜鉛シグナル)として細胞機能を制御する¹⁾。代表研究者は、亜鉛トランスポーター ZIP10 の亜鉛シグナルが表皮バリア機能に必要であることを見出し、ZIP10 が皮膚領域における重要な研究対象であることを示した²⁾。一方、ZIP10 の亜鉛シグナルが表皮バリア機能をどのように制御しているのか、その詳細な分子機序はまだ解明されていない。

本研究は、「ZIP10 の亜鉛シグナルは、表皮バリア機能にどのような役割を演じているのか」について解明し、ZIP10 を標的とする表皮バリア機能に有用な新しい素材を探索することを目標に設定した。ZIP10 は血球系細胞にも発現すること^{3,4)}、表皮バリア機能には血球系細胞の関与も示されていることから、造血幹細胞も研究対象に加えて解析した。現時点で、毛包幹細胞および造血幹細胞が

ZIP10 を発現することを見出したので、以下にその内容を報告する。

2. 方法

2.1. *Zip10-GFP-KI* マウスと *Zip10-GFP/Tomato-KI* マウスの作成

ZIP10 発現細胞の特徴を解析するために、*EGFP-IRES-CreERT2* 遺伝子カセットを *Zip10* プロモーター下流に挿入 (knock-in: KI) した *Zip10-GFP-KI* マウスを作成した (図 1: 未発表)。

ZIP10 発現細胞の子孫細胞を可視化するために、*Zip10-GFP-KI* マウスと *Rosa26* 領域に loxp 配列で挟まれた *Tomato* 遺伝子を挿入した *Tomato-KI* マウスを交配して *Zip10-GFP/Tomato-KI* マウスを作成した。

Zip10-GFP/Tomato-KI マウスの ZIP10 発現細胞は、タモキシフェン依存的に活性化される CreERT2 が発現するため、当該マウスをタモキシフェンで処理すると、ZIP10 発現細胞は Tomato を発現して赤色発光し、ZIP10 発現が消失した後も Tomato を発現する。したがって、*Zip10-GFP/*



How does zinc signaling control the skin barrier functions?

Toshiyuki Fukada

Molecular and Cellular Physiology,
Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Tokushima Bunri University



図 1 *Zip10-GFP-IRES-CreERT2-KI* (*Zip10-GFP-KI*) マウスのゲノムマップ

Tomato-KIマウスを用いることにより、ZIP10を発現する細胞とその子孫細胞を可視化することができる。

2.2. 毛包に関する解析

Zip10-GFP-KIマウスの背部皮膚試料を蛍光顕微鏡で観察し、毛包におけるGFPの発現を精査した。ZIP10発現細胞の子孫細胞を可視化するために、*Zip10-GFP*-KIマウスと*Tomato*-KIマウスを交配した*Zip10-GFP/Tomato*-KIマウスにタモキシフェンを腹腔内投与し、皮膚の毛包幹細胞におけるGFPとTomatoの発現をFACSで解析した。

2.3. 血球系細胞に関する解析

Zip10-GFP-KIマウスの骨髄由来細胞を用いて、造血幹細胞およびB前駆細胞画分におけるGFPの発現をFACSで解析した。

3. 結果

3.1. 毛包に関する解析

Zip10-GFP-KIマウスの皮膚毛包に、GFPの発現を確認した(図2:未発表)。さらに、タモキシフェン処理した*Zip10-GFP/Tomato*-KIマウスの毛包および上部バルジ領域にTomatoの発色を確認した(図3:未発表)。加えて、FACSによる毛包幹細胞分画の解析により、GFPおよびTomatoの発現を確認した(図4:未発表)。すなわち、ZIP10発現細胞およびZIP10発現細胞の子孫細胞が、毛包幹細胞分画に存在することが示唆された。

3.2. 血球系細胞に関する解析

Zip10-GFP-KIマウスの造血幹細胞に、GFPの発現を

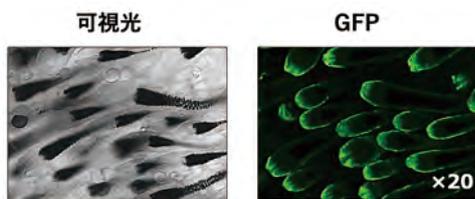


図2 *Zip10-GFP*-KIマウスの皮膚組織における毛包周囲のGFPの検出

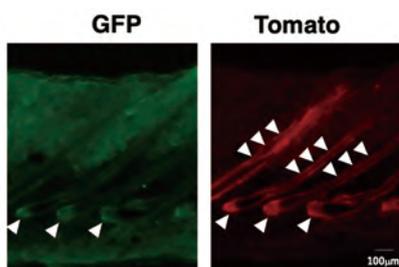


図3 タモキシフェン処理した*Zip10-GFP/Tomato*-KIマウスの毛包周囲組織におけるGFPとTomatoの検出

確認した(図5:未発表)。さらに、タモキシフェン処理した*Zip10-GFP/Tomato*-KIマウスのB前駆細胞には、GFP陽性細胞とGFP/Tomato共陽性細胞が存在することを確認した(図6:未発表)。

これらの結果は、造血幹細胞群またはその亜集団にZIP10発現細胞が存在すること、B前駆細胞がZIP10を発現することを示すとともに、B前駆細胞がZIP10を発現していた細胞から分化した可能性を示唆するものと考えられる。

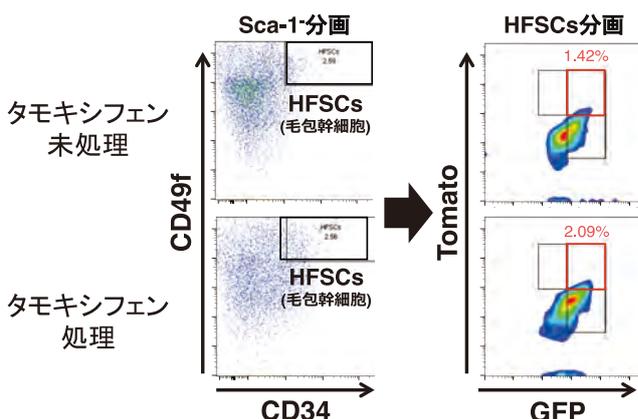


図4 タモキシフェン処理した*Zip10-GFP*-KIマウスの毛包幹細胞(HFSCs)におけるGFPとTomatoの検出

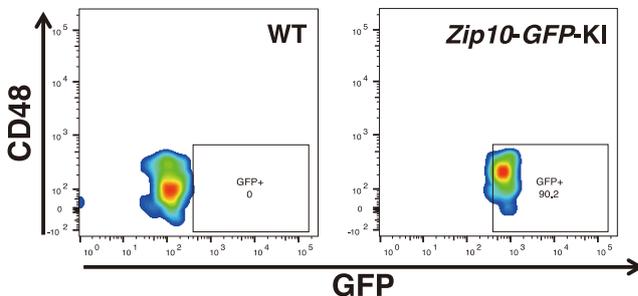


図5 *Zip10-GFP*-KIマウスの造血幹細胞におけるGFPの検出

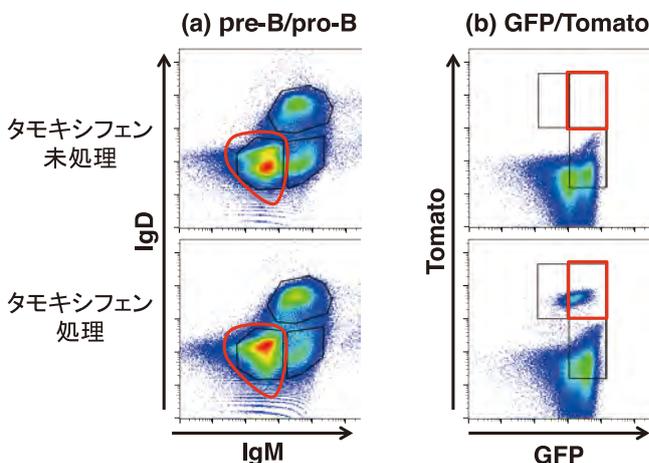


図6 *Zip10-GFP/Tomato*-KIマウスにおける(a) B前駆細胞(preB/proB分画)と(b) GFP/Tomato共陽性細胞の検出

4. 考 察

毛包幹細胞分画にZIP10発現細胞の子孫細胞が存在することから、ZIP10が毛包幹細胞の分化や維持に関与する可能性が示された。一方、ZIP10が造血幹細胞に発現することから、ZIP10が造血幹細胞の細胞増殖や維持等に関与することが示唆された。

今後は、毛包幹細胞や造血幹細胞におけるZIP10の役割を解明するために、*Zip10-GFP/ Tomato*-KIマウスからZIP10を発現する毛包幹細胞および造血幹細胞をGFPとTomatoを指標にしてソーティングし、RNA-sequenceやsingle cell analysisによって遺伝子発現様式を精査して、これらの細胞の特徴を解析する。さらに、ZIP10の亜鉛シグナルを制御する化合物を探索して、毛包と表皮の形成に係る創薬研究のための実験を実施する。

5. 総 括

我々が開発したZIP10発現細胞とその子孫細胞を可視化することができる*Zip10-GFP*-KIマウスと*Zip10-GFP/ Tomato*-KIマウスは、「亜鉛トランスポーターZIP10の亜鉛シグナルは、表皮バリア機能にどのような役割を演じているのか」を究明する上で極めて有用なツールであり、本研究ではこれらのマウスに由来する細胞の解析を進めることにより、ZIP10を発現する毛包幹細胞等の特徴と役割の解析を実施した。

本研究期間には、アトピー性皮膚炎患者の皮膚ではZIP10の発現が減少していること⁵⁾、亜鉛シグナルは表皮におけるエピジェネティックな遺伝子発現の制御に関与することを見出している⁶⁾。今後の研究において、*Zip10-GFP*-KIマウスと*Zip10-GFP/ Tomato*-KIマウスを様々な実験に適用することにより、亜鉛トランスポーターZIP10が関わる皮膚科学の理解と、亜鉛が関与する健康的

な皮膚の形成と維持を科学する Cosmetology の発展に貢献したいと考えている。

謝 辞

コロナ禍の影響を多大に受けた研究期間でありましたが、貴財団のご援助により、本研究を大きく進展させることができました。得られた研究成果を基盤にして、本研究をさらに発展させるべく邁進する所存です。貴財団の御高配に心よりお礼申し上げます。

(引用文献)

- 1) Fukada T. and Kambe T. *Zinc Signaling* (editor), Springer Nature Singapore Pte Ltd.2019
- 2) Bin BH, et al. Requirement of zinc transporter ZIP10 for epidermal development: Implication of the ZIP10-p63 axis in epithelial homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114: 12243-12248, 2017
- 3) Miyai T, et al. Zinc transporter SLC39A10/ZIP10 facilitates antiapoptotic signaling during early B-cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: 11780-85, 2014
- 4) Hojyo S, et al. Zinc transporter SLC39A10/ZIP10 controls humoral immunity by modulating B cell receptor signal strength. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: 11786-11791, 2014
- 5) K.Nakajima, et al. Possible involvement of zinc transporter ZIP10 in atopic dermatitis. *J.Dermatol.* 47:e51-e53, 2020
- 6) Lee MG, et al. Implication of the zinc-epigenetic axis in epidermal homeostasis *J.Dermatol. Sci.* 98: 203-206, 2020

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

明治薬科大学微生物学研究室

松本 靖彦

Cutibacterium acnes is a causative agent of inflammatory skin diseases such as acne vulgaris. In this study, we established a silkworm infection model to evaluate the host toxicity caused by *C. acnes*, and the efficacy of antibacterial drugs. Silkworms infected with *C. acnes* died when reared at 37°C. The dose of injected bacterial cells required to kill half of the silkworms (LD₅₀) was determined under rearing conditions at 37°C. The viable cell number of *C. acnes* was increased in the hemolymph and fat body of the infected silkworms. The survival time of silkworms injected with *C. acnes* was prolonged by the injection of antibacterial drugs such as tetracycline and clindamycin. Acute melanization, an innate immune response of silkworm, was induced by infection of *C. acnes*, but not by that of *Staphylococcus aureus* that causes a skin disease such as atopic dermatitis. Co-infection of *C. acnes* and *S. aureus* on the skin surface of silkworms led to skin melanization. These findings suggest that the silkworm *C. acnes* infection model can be used to evaluate host toxicity and innate immune response caused by *C. acnes*.

1. 緒言

皮膚は多数の細菌から構成される細菌叢によって健全な皮膚バリア機構を維持している。しかし、バランスを保っている皮膚細菌叢が何らかの原因によって崩壊することで尋常性ざ瘡やアトピー性皮膚炎などの炎症性皮膚疾患が発症する。*Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) が尋常性ざ瘡の起原菌であると考えられており、これまでにマウスを用いた尋常性ざ瘡の実験モデルが確立されている¹⁾。このような動物を用いた化合物の評価系は化粧品や医薬品の開発に重要である。

哺乳動物を使った動物実験の場合、国際指針である3Rs (Reduction, Refinement, Replacement) を遵守して研究を遂行しなければならない²⁾。すなわち、多数の哺乳動物を用いて実験を行うことは動物愛護などの倫理的側面から困難になってきており、有効な化合物の探索研究などの基礎研究を行う上で生じる倫理的な問題が今後はもっと深刻になると予想される。

我々は、これらの問題点を克服する方法の一つとして、無脊椎動物であるカイコの利用を提案している。無脊椎動物であるカイコを用いることは、Replacementの中で記載されている下等生物を用いた代替実験手法の確立 (Relative Replacement) のコンセプトと合致している。よって、カイコは哺乳動物を用いた基礎研究を行うことが困

難な化粧品開発において重要な代替動物になると考えられる。一般にカイコなどの無脊椎動物は、哺乳動物と比べて、

- 1) 動物を飼育するためのコストが低い
- 2) 狭いスペースで大量の個体が飼育可能
- 3) 脊椎動物に比べ殺傷に対する倫理的問題が少ない
- 4) 個体サイズが小さく、実験に必要なサンプル量が少ない

などの利点が挙げられる。また、化合物のカイコへの毒性や抗生物質の治療効果は、マウスやラットなどの哺乳動物と類似している^{3,4)}。よって、カイコは、化合物の薬効や毒性に関する研究を行う上で有用な実験動物である⁵⁾。しかし、これまでにカイコを用いた炎症性皮膚疾患モデルは確立されていない。

カイコにおける自然免疫機構の一つに体液のメラニン化反応がある。メラニン化は、細菌や真菌などの外來の異物が体内に侵入すると体液内でメラニンを生成させて、侵入した異物を凝集させる反応である。このカイコにおける体液のメラニン化と Toll 経路を介した免疫応答は同じシグナル伝達経路を介する⁶⁾。よって、カイコにおけるメラニン化反応は、自然免疫誘導の指標となり得る。

本研究で我々は、カイコを用いて *C. acnes* に対する治療薬の薬効を評価できるカイコ感染モデルを確立した。また、カイコの体液のメラニン化を指標とした *C. acnes* の免疫活性化の評価系を構築した。さらに、*C. acnes* と黄色ブドウ球菌の共感染によるカイコの皮膚のメラニン化が誘導される感染実験系を確立した。

2. 方法

2.1. 菌の培養

本研究で我々は、*C. acnes* ATCC6919 株、及び黄色ブドウ球菌 Newman 株を使用した。*C. acnes* ATCC6919 株の培



Development of an *in vivo* drug efficacy evaluation system and a skin infection model using an invertebrate

Yasuhiko Matsumoto

Meiji Pharmaceutical University

養では、菌をGAM寒天培地に塗布し、嫌気条件、37°Cにおいて3日培養した。黄色ブドウ球菌Newman株の培養では、菌をTSB寒天培地に塗布し、好気条件、37°Cで1日培養した。

2.2. カイコ感染実験

カイコの卵は、愛媛蚕種から購入して、消毒後に25°Cで孵化させた。カイコは、Silkmate 2Sという抗生物質を含む人工餌を与えられた。5齢のカイコを実験に用いた。5齢のカイコに人工餌であるSilkmate 2Sを1日給餌させた。GAM寒天培地上で生育した*C. acnes*を生理食塩水で懸濁した。*C. acnes*の懸濁液50 μ Lを1mLツベルクリンシリンジを用いてカイコに接種した。*C. acnes*を接種したカイコを27°C、もしくは37°Cで飼育し、カイコの生存数、もしくは体液中の*C. acnes*の生菌数を測定した。

2.3. カイコの体液のメラニン化試験

人工餌を一晩摂食した5齢のカイコに*C. acnes*や黄色ブドウ球菌の菌液を注射後にカイコの体液を回収した。96ウェルマイクロプレートにカイコの体液を50 μ Lと生理食塩水を50 μ Lを添加した。BaioRadのiMarkTMマイクロプレートリーダーを用いて490nmの吸光度(A₄₉₀)を測定した。

2.4. カイコの表皮感染によるメラニン化

人工餌を一晩摂食した5齢のカイコの背面の体表を70%エタノールで清拭し、30分間室温に置いた。*C. acnes*と黄

色ブドウ球菌の生菌をオリーブオイルで懸濁して、ガーゼに染み込ませて消毒した部位に貼付した。カイコを37°Cで飼育し、24時間後にガーゼを剥がしてカイコの背面の写真撮った。

3. 結果

3.1. カイコ感染モデルの開発

変温動物であるカイコは、飼育温度を変えることでカイコの体温を調節でき、病原微生物ごとにカイコに対する病原性に至適な飼育温度が異なる⁷⁾。*C. acnes*は皮膚上ではおよそ32°Cで生存し、ヒトの体内では37°Cで生存する。そこで我々は、*C. acnes*がカイコに対して病原性を示す飼育温度を検討した。*C. acnes*のカイコへの接種後37°Cでの飼育では、カイコに*C. acnes*を接種して40時間後に全てのカイコが死亡し、32°Cでの飼育条件より早くカイコが死亡した(図1A、B)。37°Cでの飼育条件における*C. acnes*のカイコを半数を死亡させるために必要な接種菌量であるLD₅₀値は、1-4 \times 10⁸細胞であった(図1C)。これらの結果から、37°C飼育条件の方が、*C. acnes*の接種によりカイコが死亡しやすく、その条件で定量的な病原性の評価に利用できるLD₅₀値が算出できることが示唆された。次に我々は、*C. acnes*の接種によるカイコの死が、カイコの体内での菌数の増加による感染であるか検討した。*C. acnes*をカイコに接種して1時間後より24時間後の方がカイコの体液中、及びカイコの脂肪組織である脂肪体での*C. acnes*の生菌数が多かった(図2)。また、*C. acnes*のオートクレーブ処理

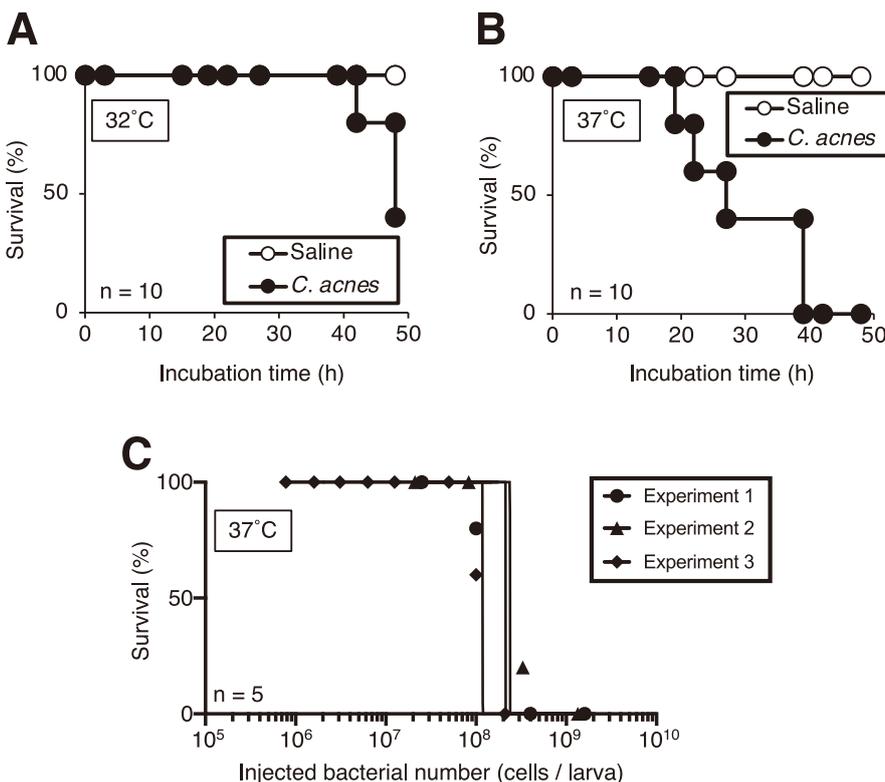


図1 *C. acnes*によるカイコの感染死
カイコに*C. acnes*を接種後に32°C (A)、及び37°C (B)で飼育し、それぞれの条件におけるカイコの生存率を経時的に測定した。(C)カイコ感染実験における*C. acnes*の用量依存性試験。独立した3回の実験結果を示した。

菌体ではカイコが死亡しなかった(図3)。これらの結果から、カイコに対する *C. acnes* の病原性が細胞壁などの菌体成分によるショック死ではなく、生菌であることが必要な感染であることが示唆された。

3. 2. カイコ感染モデルを用いた抗菌薬の評価

次に我々は、*C. acnes* によるカイコに対する病原性に対して抗菌薬が効果を示すか検討した。*C. acnes* を接種した

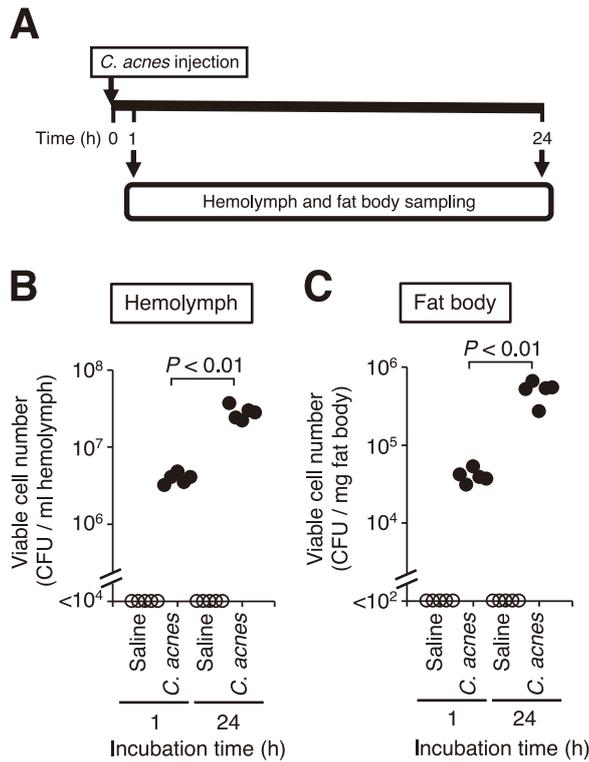


図2 カイコの体液、及び脂肪体における *C. acnes* の増殖 (A) コ感染実験のスケジュールを示した。カイコに *C. acnes* を接種して1時間後、及び24時間後に体液 (B)、及び脂肪体 (C) を採取し、*C. acnes* の生菌数を測定した。

カイコに抗菌薬であるテトラサイクリンやクリンダマイシンを投与すると、カイコの生存時間が延長した(図4)。この結果から、*C. acnes* のカイコ感染モデルを用いて *in vivo* での抗菌薬の薬効評価が行えることが示唆された。

3. 3. *C. acnes* によるカイコの体液のメラニン化

C. acnes によるカイコの体液のメラニン化を免疫誘導能の指標として評価できる条件の検討を試みた。*C. acnes* の

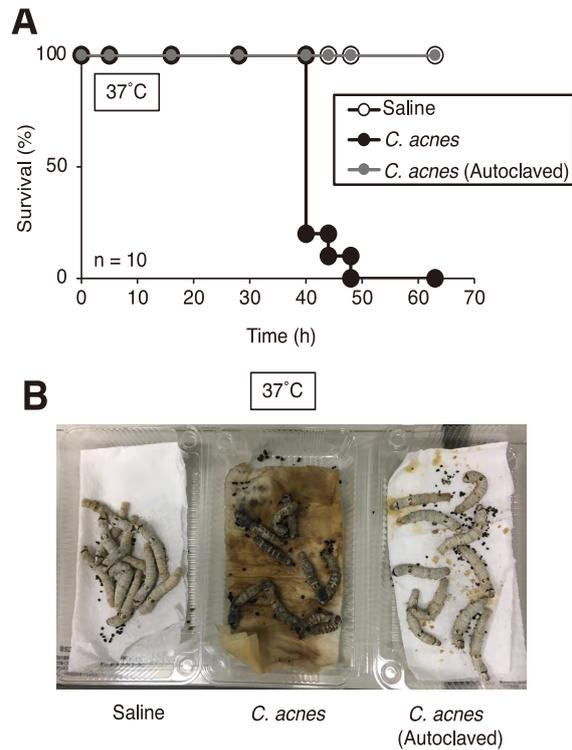


図3 熱処理による *C. acnes* のカイコに対する毒性の消失 (A) カイコに *C. acnes* の生菌、及び高圧蒸気滅菌した *C. acnes* を接種してカイコの生存率を経時的に測定した。(B) *C. acnes* の菌体サンプルを接種して48時間後のカイコを示す。

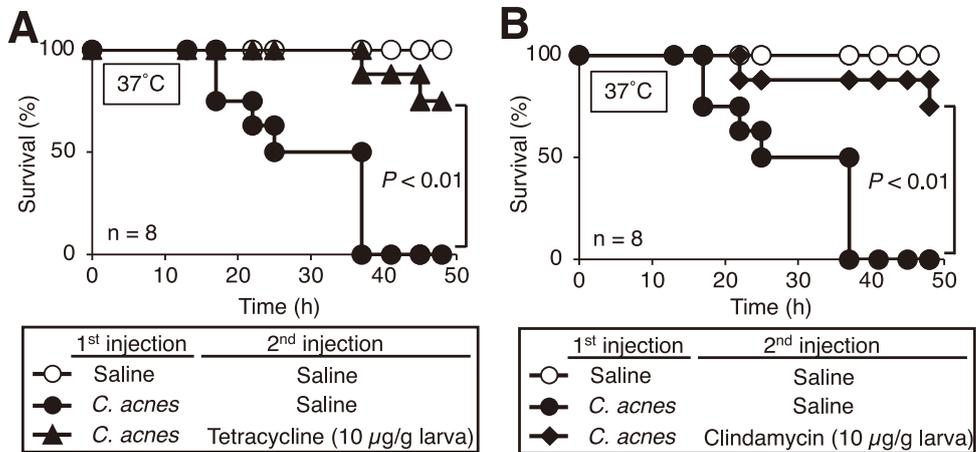


図4 抗菌薬の投与による *C. acnes* が感染したカイコの延命効果
カイコに *C. acnes* を接種後、すぐにテトラサイクリン(A)、及びクリンダマイシン(B) を接種し、生存率を経時的に測定した。

カイコへの接種後に 37°C の飼育条件で 3 時間以内にカイコの体液の黒色化が確認された (図 5)。次に *C. acnes* 以外のグラム陽性細菌と免疫誘導能を比較するために、表皮に存在してアトピー性皮膚炎の増悪化に関わる黄色ブドウ球菌を用いて検討した。*C. acnes* を接種した方が黄色ブドウ球菌よりカイコの体液のメラニン化が亢進していた (図 6)。以上の結果は、*C. acnes* が黄色ブドウ球菌よりカイコの免疫を強く誘導する活性があることを示唆している。

3. 4. *C. acnes* と黄色ブドウ球菌の共感染によるカイコの皮膚のメラニン化

C. acnes の菌体をカイコの皮膚に塗布することでカイコの皮膚でのメラニン化が起こるか検討した。*C. acnes* や黄色ブドウ球菌の単独感染ではカイコの皮膚上のメラニン化の誘導は起こらなかった (図 7)。一方、*C. acnes* と黄色ブドウ球菌をカイコの皮膚上で共感染させることでカイコの

皮膚でのメラニン化が誘導された (図 7)。これらの結果は、*C. acnes* によるカイコの皮膚上でのメラニン化の誘導に黄色ブドウ球菌が補助的な役割を演じる可能性を示唆している。

4. 考 察

本研究で我々は、*C. acnes* の宿主障害性を評価するための実験条件を見出し、*C. acnes* のカイコ感染モデルを用いた抗菌薬の薬効評価系を確立することができた。また、カイコの免疫応答であるメラニン化の亢進を指標に *C. acnes* の過剰免疫応答を評価できることが示唆された。さらに、*C. acnes* と黄色ブドウ球菌の共感染により、カイコの皮膚にメラニン化が起こる条件を見出した。我々は、*C. acnes*

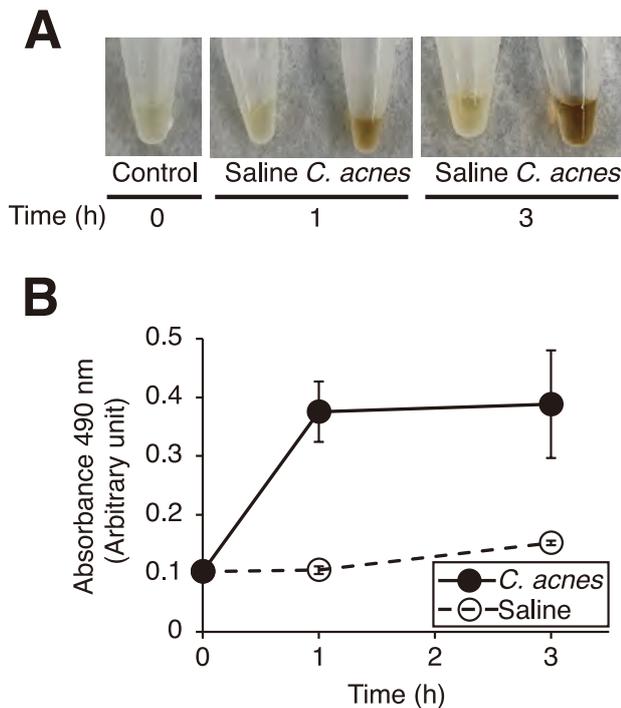


図 5 *C. acnes* によるカイコの体液のメラニン化
カイコに *C. acnes* を接種し、カイコの体液を経時的に採取し、490 nm の吸光度を測定した。

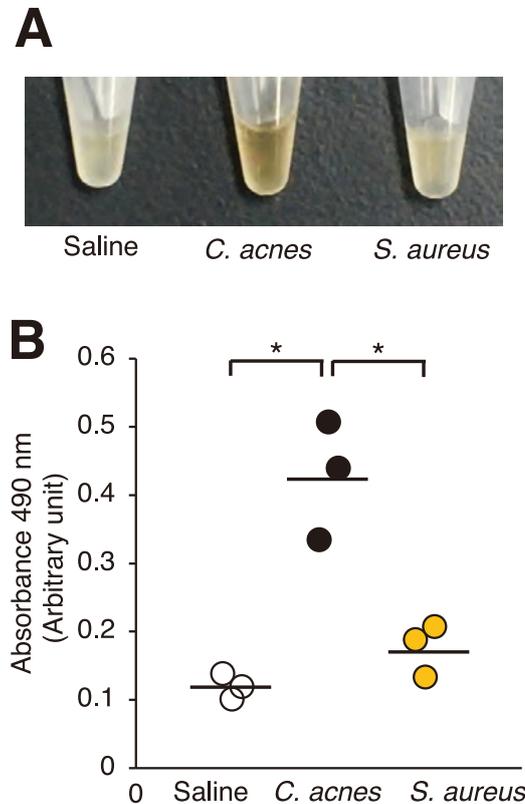


図 6 カイコの体液のメラニン化の誘導における細菌間の比較
カイコに *C. acnes*、及び黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) を接種して 3 時間後にカイコの体液を採取し、490nm の吸光度を測定した。



図 7 *C. acnes* と黄色ブドウ球菌の共感染によるカイコの体表のメラニン化
C. acnes、及び黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) をオリーブオイルで懸濁してガーゼに染み込ませてカイコの体表に貼付した。感染させて 24 時間後のカイコの体表を示す。

のカイコ感染モデルを用いた抗菌薬の評価やカイコのメラニン化を基軸とした皮膚感染モデルの確立ができたと考えている。

カイコに病原性微生物を接種させた時に菌体成分によるショック死が起こることがある⁸⁾。菌周病菌をカイコに接種するとカイコは死亡するが、その熱処理死菌でもカイコは死亡する⁸⁾。このショック死の条件だと抗生物質で治療することはできない⁸⁾。本研究での*C. acnes*のカイコ感染モデルでは、熱処理死菌の投与ではカイコが死なず、また抗菌薬で治療ができることから、カイコの体内で*C. acnes*が増殖することがその病原性に重要であることが考えられる。

尋常性ざ瘡は*C. acnes*による過剰免疫応答による疾患である。哺乳動物細胞において、この*C. acnes*の菌体成分による過剰免疫応答にはToll like Receptorが関与している。カイコのメラニン化反応も菌体成分を認識してToll経路の活性化と並行して起こる免疫応答である⁶⁾。よって、我々はカイコのメラニン化反応を定量することで*C. acnes*の免疫誘導活性を評価できるのではないかと考えている。さらに、*C. acnes*と黄色ブドウ球菌をカイコの皮膚上で共感染させることでカイコの皮膚でのメラニン化が誘導された。黄色ブドウ球菌は、溶血毒素やプロテアーゼなどの表皮細胞を障害するタンパク質を放出する。黄色ブドウ球菌が表皮細胞を障害した後に*C. acnes*のメラニン化の誘導物質が真皮に届き、メラニン化を誘導した可能性があると考えている。

本研究では、カイコで炎症性皮膚疾患を引き起こす*C. acnes*の宿主障害性や免疫誘導活性の評価ができる可能性が示された。今後は抗菌薬や化粧品の候補となる化合物の薬効評価が行えるかが課題となるだろう。

5. 総括

本研究で我々は、*C. acnes*の体液内への摂取によりカイコが死亡すること、並びにそのカイコ感染モデルを用いて抗菌薬の薬効評価が行えることを見出した。我々の知見は、カイコ感染モデルが*C. acnes*の感染における病原性や抗菌薬の薬効評価に有用であることを示唆している。カイコを用いた実験は哺乳動物を用いた実験より倫理的な問題を回避する上で有用であると考えられる。今後さらに厳しくなる動物実験の制限に対応する上で、カイコを実験動物とし

て採用することは次世代の化粧品開発の基盤的技術として重要性は高いと考えられる。

謝辞

本研究の遂行にあたり、ご支援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深く感謝申し上げます。

本研究助成により得られた成果

Matsumoto Y, *et al*, Evaluation of Antibacterial Drugs Using Silkworms Infected by *Cutibacterium acnes*. *Insects*, **12**:619 (2021)

(引用文献)

- 1) Kolar SL, *et al.*, *Propionibacterium acnes*-induced immunopathology correlates with health and disease association. *JCI Insight*, **4**:e124687 (2019)
- 2) Weihe WH. Use and misuse of an imprecise concept: alternative methods in animal experiments. *Lab Anim.*, **19**:19-26 (1985)
- 3) Usui K, *et al.*, Acute oral toxicity test of chemical compounds in silkworms. *Drug Discov Ther.*, **10**:57-61 (2016)
- 4) Paudel A, *et al.*, Pharmacokinetic parameters explain the therapeutic activity of antimicrobial agents in a silkworm infection model. *Sci Rep.*, **8**:1578 (2018)
- 5) Matsumoto Y. Facilitating Drug Discovery in Human Disease Models Using Insects. *Biol Pharm Bull.*, **43**:216-220 (2020)
- 6) Geng T, *et al.*, Lineage-specific gene evolution of innate immunity in *Bombyx mori* to adapt to challenge by pathogens, especially entomopathogenic fungi. *Dev Comp Immunol.*, **123**:104171 (2021)
- 7) Matsumoto Y, and Sekimizu K, Silkworm as an experimental animal for research on fungal infections. *Microbiol Immunol.*, **12**:619 (2019)
- 8) Ishii K, *et al.*, *Porphyromonas gingivalis* peptidoglycans induce excessive activation of the innate immune system in silkworm larvae. *J Biol Chem.*, **285**:33338-47 (2010)

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

安田女子大学薬学部薬学科

的場 康幸

Tyrosinase (Ty) and catechol oxidase (CO) are members of type-3 copper enzymes. While Ty catalyzes both phenolase and catecholase reactions, CO catalyzes only the latter reaction. In the present study, Ty was found to catalyze the catecholase reaction, but hardly the phenolase reaction in the presence of the metallochaperon called “caddie protein (Cad)”. The ability of the substrates to dissociate the motif shielding the active-site pocket seems to contribute critically to the substrate specificity of Ty. In addition, a mutation at the N191 residue, which forms a hydrogen bond with a water molecule near the active center, decreased the inherent ratio of phenolase versus catecholase activity. Unlike the wild-type complex, reaction intermediates were not observed when the catalytic reaction toward the Y98 residue of Cad was progressed in the crystalline state. The increased basicity of the water molecule may be necessary to inhibit the proton transfer from the conjugate acid to a hydroxide ion bridging the two copper ions. The deprotonation of the substrate hydroxyl by the bridging hydroxide seems to be significant for the efficient catalytic cycle of the phenolase reaction.

1. 緒言

メラニン色素生成に関わる酵素としてチロシナーゼ (Ty) が知られている。本酵素は、アミノ酸の一種であるチロシンをメラニン前駆物質であるドーパキノンへと変換する反応を触媒する。この反応は皮膚や毛髪のメラニン色素合成に関わっており、皮膚で過剰にメラニンが生成するとシミやソバカスの原因となる。このため、Ty 活性を阻害すれば、メラニン色素の生成を抑制できる。Ty は、その活性中心に2個の銅イオンを含むⅢ型銅結合酵素であり、ヒトから細菌に至るまで広く分布している。また、本酵素の活性中心部位を含む約250アミノ酸からなる領域は、生物種を超えてアミノ酸配列上での相同性が認められる。Ty は、チロシンやチラミンをはじめとするフェノール基質、および、ドーパやドーパミンをはじめとするカテコール基質に作用し、両者をオルトキノンに変換する。それぞれの酵素活性をフェノラーゼおよびカテコラーゼ活性という。一方、Ty と同じⅢ型銅結合酵素であるカテコールオキシダーゼ (CO) は、フェノールを基質とすることができず、カテコラーゼ活性のみ有する。

Ⅲ型銅結合酵素の活性中心は、デオキシ型、オキシ型、メト型という3つの構造をとる。デオキシ型では活性中心にある2つの銅イオンが還元されており、分子状酸素と結合してオキシ型を生じる。メト型は、活性中心にある2つ

の銅イオンが酸化されているものの、分子状酸素とは結合していない構造を指す。Ty のフェノラーゼ活性はオキシ型酵素によって触媒されるが、カテコラーゼ活性はオキシ型でもメト型でも触媒される。オキシ型酵素がフェノラーゼ活性を触媒すると、デオキシ型に変換され、次の触媒サイクルに向かう。一方、オキシ型酵素がカテコラーゼ活性を触媒するとメト型に変換され、メト型酵素がカテコラーゼ活性を触媒すると、デオキシ型に変換される。このため、Ty と CO の酵素学的違いとは、オキシ型酵素がフェノラーゼ活性を持つかどうかという点に集約できる。

研究対象としている放線菌由来 Ty は、特異的な銅輸送タンパク質 (Cad) との複合体として産生される。この複合体に銅イオンを添加すると、Ty の活性中心に銅イオンが取り込まれ、Ty は活性型に変化する。その一方で、Cad は複合体から解離し、解離した Cad は重合して凝集体を形成する。Ty・Cad 複合体の結晶構造 (図1) においては、

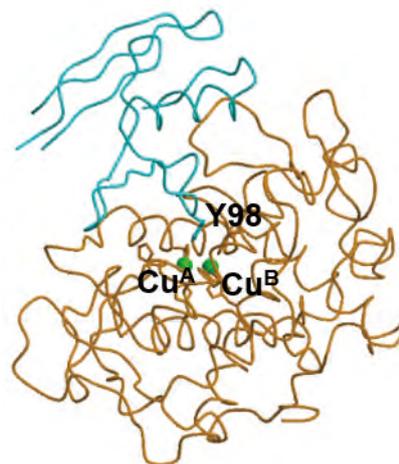


図1 Ty・Cad 複合体の結晶構造
Ty をオレンジで、Cad をシアンで示している。



Elucidation of maturation and catalytic mechanisms of tyrosinase based on the crystal structure

Yasuyuki Matoba

Faculty of Pharmacy, Yasuda Women's University

CadのY98残基が、Tyの活性中心にフタをするように位置している¹⁾。筆者は、CadのY98残基がTyの触媒作用により、ドーパキノンへと変換されることを発見した²⁾。また、Y98残基に対する酸化反応を時間分割X線結晶構造解析で観察することにより、触媒機構を予測することに成功した³⁾。一方、海外グループの研究により、活性中心近傍に存在するシールドモチーフや水分子がTyのフェノラーゼ活性に重要であると指摘されている⁴⁾。

本研究では、放線菌由来Tyを研究対象とし、その成熟化機構と反応機構を構造学的に明らかにすることを試みる。得られた知見は、より高等な生物の持つTyにおいても共通していることが予想され、ヒトのTyを対象にした効果的な阻害剤開発に役立つと考えられる。

2. 方法

本研究では、活性中心近傍に存在する水分子Wat4に着目した(図2)。放線菌Tyにおいて、この水分子はE182とN191残基の側鎖と水素結合している。各種Ⅲ型銅結合酵素のアミノ酸配列を比較すると、放線菌TyのE182に対応する残基はグルタミン酸であり、高度に保存されている。一方、N191に対応する残基は、Tyでは保存されている場合が多いが、COではグリシンになっている場合が多い。そこでN191残基をグリシンに置換したN191G変異体を作成した。この変異体の酵素活性を調査するとともに、そのX線結晶構造解析を実施した。なお、本研究で使用したNH₂OHは、酵素に結合した銅イオンを還元する作用を持つため、分子状酸素存在下でNH₂OHを加えると、オキシ型酵素を生じさせることができる。

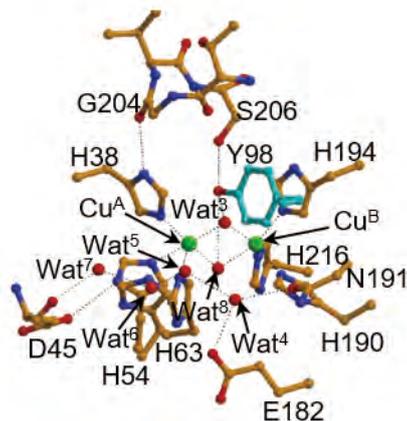


図2 Ty・Cad複合体におけるTyの活性中心の構造
Tyをオレンジで、Cadをシアンで示している。

3. 結果

Cadと結合していない野生型Tyは調製できたが、N191G変異型Tyは調製できなかった。そこで、Cadと複合体を形成している野生型もしくはN191G変異型Tyに、0.1mM CuSO₄と1mM NH₂OHを添加し、30℃で5分間放置することで、Tyを活性化した。その後、種々の濃度の基質を加え、470nmの吸光度の増加を経時的に測定した。なお、フェノール基質としてチラミン、カテコール基質としてドーパミンを用いた。得られたカイネティクスパラメーターを表1に示す。

野生型複合体およびN191G変異型複合体の結晶を作成し、1mM CuSO₄と10mM NH₂OHを含む溶液中で24時間ソーキングした後に回折強度を測定し、その結晶構造を決定した。その結果、両複合体でY98残基に対する反応が

表1 Tyのカイネティクスパラメーター

Parameters	Wild type*	N191G*	Cad-free Ty
Dopamine catecholase activity			
k_{cat} (s ⁻¹)	42 ± 5	2.6 ± 0.2	135 ± 9
K_m (mM)	14 ± 3	4.5 ± 0.8	4.1 ± 0.8
k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)	3.1 ± 0.7	0.58 ± 0.12	33 ± 7
Tyramine phenolase activity in the absence of dopamine			
k_{cat} (s ⁻¹)	0.047 ± 0.002	0.038 ± 0.004	9.7 ± 0.9
K_m (mM)	3.9 ± 0.6	4.4 ± 1.6	14 ± 3
k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)	0.012 ± 0.002	0.0084 ± 0.0032	0.70 ± 0.19
Tyramine phenolase activity in the presence of dopamine			
k_{cat} (s ⁻¹)	3.6 ± 0.1	0.073 ± 0.009	
K_m (mM)	15 ± 2	79 ± 14	
k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)	0.23 ± 0.02	0.00092 ± 0.00020	

* 銅非結合型複合体にCu(II)とNH₂OHを添加し5分後に基質を添加した。

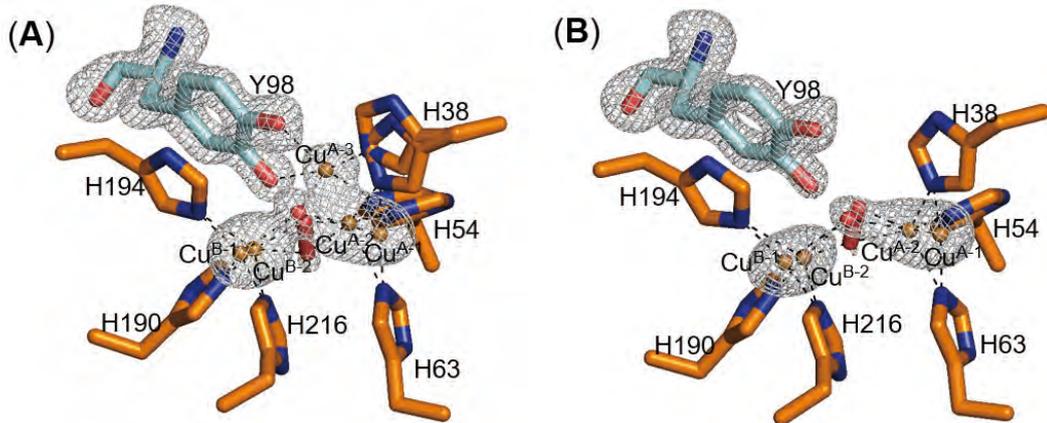


図3 Ty・Cad複合体におけるY98、Cu^AおよびCu^Bの電子密度
(A)は野生型、(B)はN191G変異型のものを示している。Tyをオレンジで、Cadをシアンで示している。

進行していることが観察された(図3)。しかしながら、野生型複合体では、Cu(II)結合型ドーパセミキノンを含む中間体と、架橋部位に水酸化物イオンを持つデオキシ中間体(デオキシ2型)の存在が示唆されたが、N191G変異型複合体ではこれらの中間体が見いだされなかった。

4. 考察

Cadと結合していない野生型Tyを用いたときと比べ、Cadが存在するとTyのカテコラーゼ活性およびフェノラーゼ活性は減少した(表1)。ただし、フェノラーゼ活性の減少の方が顕著である。一方、ドーパミンを共存させると、Cad存在下における野生型Tyのフェノラーゼ活性が増加した。CadはTyに銅を輸送するだけでなく、活性中心をシールドする役割を持つと考えられる。すなわち、本実験結果は、フェノールに比べカテコールの方が、活性中心近傍にあるシールド部分を引きはがす能力が高いことを示唆している。またこのことは、Tyの成熟化の最終段階において、カテコール基質が基質結合ポケットに侵入し、シールド部分を取り除く作用を持つこと、および、シールド部分の存在が酵素の見かけ上の基質特異性に影響を及ぼすことを示している。一方、N191G変異型Tyはカテコラーゼ活性を有していたものの、ドーパミン添加の有無に関わらず、フェノラーゼ活性が極めて低かった。このことは、シールド部分だけでなく、活性中心近傍における水分子の安定性・塩基性も、基質特異性に影響を及ぼしていることを示唆する。

筆者らが行ったCadのY98残基に対する時間分割X線結晶構造解析³⁾から、Tyのフェノラーゼ活性においては、オキシ型酵素による酸素添加反応後にCu(II)結合型ドーパセミキノンが生じる。その後、電子移動を伴って、デオキシ2型とドーパキノンへと変換されることが示唆された。Cu(II)結合型ドーパセミキノンの生成時には、2つの銅イオンのうちCu^Aが大きく位置を変え、基質の水酸基の方へ

と近づく。一方、デオキシ2型においては、Cu^Aは元の位置に戻る。ただし、触媒サイクルで酸素分子と結合するデオキシ型では2つの銅イオン間の架橋分子が水であるのに対し、デオキシ2型では水酸化物イオンであり、Cu^AとCu^Bの間の距離が短くなる。

Tyのモデル錯体を利用した研究から、Tyのフェノラーゼ活性は、基質のフェノール性水酸基が脱プロトン化しているときに効率よく触媒されることが示されている⁵⁾。今回、フェノラーゼ活性が低いN191G変異体では、Cu(II)結合型ドーパセミキノンとデオキシ2型中間体が見られなかった。このことは、Tyのフェノラーゼ活性が効率よく回転するためには、架橋位置に水酸化物イオンが存在するデオキシ2型中間体の生成が必要であり、この中間体の水酸化物イオンが、次のフェノール基質を脱プロトン化するのではないかと示唆される。野生型Tyにおいて、Wat4はE182とN191残基と相互作用し安定化されるとともに、塩基性が高くなっている。また、フェノラーゼ活性の触媒サイクルで水素イオンが生じる。これらのことを合わせて考えると、野生型ではWat4の部位で酵素反応中に生じた水素イオンが保持され、架橋部位が水分子に変換されるのを妨げていると推測される。一方、N191G変異体ではWat4の位置で水素イオンを保持できず、デオキシ2型が速やかに消失し、効率的な触媒サイクルを維持できないのではないかと考えられる。

5. 総括

本研究を通じて、カテコール化合物がTyの成熟化を促進していること、および、活性中心近傍の水分子の安定性・塩基性により、Tyのフェノラーゼ活性が制御されていることが明らかとなった⁶⁾。これらの知見は美白化粧品開発に役立つものと考えられる。

(引用文献)

- 1) Matoba Y, Kumagai T, Yamamoto A, Yoshitsu H, Sugiyama M. Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. *J. Biol. Chem.* **281**, 8981–8990, 2006.
- 2) Matoba Y, Kihara S, Muraki Y, Bando N, Yoshitsu H, Kuroda T, Sakaguchi M, Kayama K, Tai H, Hirota S, Ogura T, Sugiyama M. Activation mechanism of the *Streptomyces* tyrosinase assisted by the caddie protein. *Biochemistry* **56**, 5593–5603, 2017.
- 3) Matoba Y, Kihara S, Bando N, Yoshitsu H, Sakaguchi M, Kayama K, Yanagisawa S, Ogura T, Sugiyama M. Catalytic mechanism of the tyrosinase reaction toward the Tyr98 residue in the caddie protein. *PLoS Biol.* **16**, e3000077, 2018.
- 4) Pretzler, M, Rompel, A. What causes the different functionality in type-III-copper enzymes? A state of the art perspective. *Inorg. Chim. Acta* **481**, 25–31, 2018.
- 5) Itoh S, Kumei H, Taki M, Nagatomo S, Kitagawa T, Fukuzumi S. Oxygenation of phenols to catechols by a $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ dicopper (II) complex: mechanistic insight into the phenolase activity of tyrosinase. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 6708–6709, 2001.
- 6) Matoba Y, Oda K, Muraki Y, Masuda T. The basicity of an active-site water molecule discriminates between tyrosinase and catechol oxidase activity. *Int. J. Biol. Macromol.* **183**, 1861–1870, 2021.

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

熊本大学大学院生命科学研究部老化・健康長寿学講座

三浦 恭子

The naked mole-rat (NMR) is an African rodent that forms a eusocial colony in subterranean environments. The NMR shows an extraordinary longevity with a maximum lifespan of more than 37 years, although its body mass is similar to that of the laboratory mouse. The NMR also displays delayed aging phenotype and cancer resistance. Cellular senescence plays an important role in the aging and carcinogenesis processes, suggesting that NMRs may have species-specific mechanisms to prevent the accumulation of senescent cells. Here we show that upon induction of cellular senescence, NMR fibroblasts progressively activate cell death including apoptosis through activation of the INK4a-Retinoblastoma protein (RB) pathway in a mechanism we termed “INK4a-RB cell death”. We show that INK4a-RB cell death is independent of p53 activity and not observed in mouse fibroblasts. NMR fibroblasts uniquely accumulate serotonin and are inherently vulnerable to hydrogen peroxide (H₂O₂). Upon activation of the INK4a-RB pathway, NMR fibroblasts increase monoamine oxidases (MAOs) levels, which oxidize monoamine including serotonin and produce H₂O₂, resulting in increased oxidative damage and activation of cell death. The INK4a-RB cell death may potentially contribute to the suppression of senescent cell accumulation in NMRs. Our findings provide novel insights into the mechanisms of delayed aging and cancer resistance in NMRs.

1. 緒言

本研究は、最長寿かつ老化耐性を持つ齧歯類、ハダカデバネズミ (Naked mole-rat; NMR、図1) における皮膚線維芽細胞の老化抑制機構の解明を目指すものである。この機構を解明することで、将来的に新規の皮膚老化予防薬の開発に繋がると考えられる。

ハダカデバネズミは、哺乳類では極めて珍しい、昆虫のアリやハチに類似した「真社会性」と呼ばれる分業制の社会を形成し、エチオピア・ケニア・ソマリアのサバンナの地下に、トンネル状の巣を形成して集団で生息している。この地下トンネルは、場所によっては酸素濃度が約7%となるため、ハダカデバネズミは低酸素環境に適応しており、酸素消費量はマウスの3分の2程度と低く、ヘモグロビンの酸素親和性が高い。さらに最近、ハダカデバネズミ個体は無酸素状態に顕著な耐性があり、フルクトースを直接用いる解糖系代謝が関係することが報告されている¹⁾。ハダカデバネズミはマウスと同程度の大きさながら、最大寿命が37年(この37歳のハダカデバネズミは現在も生存)と報告されている異例の長寿動物である。驚くべきことに、ハダカデバネズミでは加齢に伴う死亡率の上昇が認められないことが報告されており、さらに生存期間の約8割の間は、皮膚を含む各種組織・臓器の老化や機能低下が起らない



図1 最長寿齧歯類ハダカデバネズミ

老化耐性の特徴を持つ^{2,3)}。また、今まで自然発生腫瘍が数例しか確認されたことがない、顕著ながん化耐性を示す⁴⁾。

皮膚において、コラーゲン等の細胞外基質を産生する線維芽細胞は、加齢に伴いDNA損傷等の様々なストレスにより、細胞老化と呼ばれる不可逆的な分裂停止を引き起こすことが知られている。細胞老化は異常な細胞がそれ以上分裂することを防ぐ機構であり、がん抑制機構として働くことが知られている。さらに発生過程においても細胞老化が形態形成に寄与すること⁵⁾、損傷治癒過程においても老化細胞の出すPDGF-AA (platelet-derived growth factor AA) が筋線維芽細胞への分化を引き起こすことで治癒を早めることが報告されている⁶⁾。しかし一方で、長期にわたり老化細胞が組織中に存在すると、老化細胞は炎症性サイトカインや活性酸素(ROS)等を分泌するSASP (senescence-associated secretory phenotype) と呼ばれる現象を引き起こし、これにより周辺細胞に悪影響を及ぼす。Bakerらは細胞老化マーカーでサイクリン依存性キナーゼインヒビターの1種であるInk4aのプロモーター下流に、薬剤投与でアポトーシスを引き起こす遺伝子を連結したトランスジェニックマウスを作製した。このマウスを用いて、老化細胞をアポトーシスで排除することにより、個体の老化が減弱することを報告し、老化細胞の蓄積と個体老化に直接的な



Development of a new method to prevent skin aging using the longest-lived and aging-resistant rodent

Kyoko Miura

Kumamoto University, Faculty of Life Sciences, Department of Aging and Longevity Research

関係があることを示した^{7,8)}。このように、老化細胞の増加が組織の老化・機能低下やがん化に大きな役割を果たすことが明らかとなってきた。

では、老化耐性を持つハダカデバネズミの細胞老化はどのようなのだろうか。これまでに、ハダカデバネズミの線維芽細胞はがん遺伝子の導入、放射線照射により細胞老化を起こすことが報告されている⁹⁾。一方、ハダカデバネズミの脳において加齢に伴うINK4aの発現上昇が起こりにくいことが示されている¹⁰⁾。これらの結果から我々は、ハダカデバネズミには老化細胞が蓄積されにくいメカニズムがあるのではないかと考えた。

これまでに我々は、老化耐性ハダカデバネズミの皮膚線維芽細胞において、細胞老化誘導によりハダカデバネズミ特異的細胞死が生じることを見出した。この現象はヒトやマウスでは全く認められない。ハダカデバネズミでは種特異的な本現象により老化細胞が除去されることで、皮膚の老化が抑制されていると考えられる。しかしこのハダカデバネズミ特異的な細胞死の誘導機構はいまだ不明であり、解明することで、全く新規の皮膚老化予防薬の開発に繋がりうる。そこで本研究では、ハダカデバネズミ特異的細胞死のメカニズム・誘導遺伝子を解明することを目的とし、研究を行った。また研究成果は現在論文投稿中である。

2. 方法

2.1. 実験動物

1-2歳の成体ハダカデバネズミは熊本大学で維持し、6週齢の成体C57BL/6Nマウスは日本クレアから購入した。この研究は、熊本大学動物実験委員会によって承認されたプロトコルに従って実施した。

2.2. 皮膚線維芽細胞の樹立および細胞老化誘導

1-2歳の成体ハダカデバネズミおよび6週齢の成体C57BL/6Nマウスの背部皮膚を採取し、初代皮膚線維芽細胞を分離した。組織は、1%ペニシリン/ストレプトマイシン(富士フイルム和光)およびアンフォテリシンB(富士フイルム和光)を含む氷冷したPBS(ナカライテスク)で洗浄後、細断した。組織片を15%ウシ胎児血清(FBS)(NMR線維芽細胞用)または10%FBS(マウス線維芽細胞用)を含むDMEM培地に懸濁し、ゼラチンコートした10cm細胞培養皿(IWAKI)に播種、32℃、5%CO₂、5%O₂条件で培養した。遊走してきた線維芽細胞を回収し、初代線維芽細胞として使用した。線維芽細胞は5回継代以内で使用し、培地は2日おきに交換した。

サブコンフルエントになったマウスおよびハダカデバネズミ線維芽細胞に、DNA傷害剤であるドキシソルピシン(DXR;富士フイルム和光)を100nMの濃度で含む培地を添加した。24時間後、培地を新しく調製したDXR含有培

地に交換し、さらに24時間培養した。その後、細胞を洗浄し、新鮮な培地で21日間、2日ごとに培地交換をしながら培養を行い、細胞老化を誘導した。

2.3. 皮膚線維芽細胞への遺伝子導入

マウスおよびハダカデバネズミ線維芽細胞にレンチウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行った。目的遺伝子発現ベクターおよびウイルスパッケージングベクター2種を、HEK293細胞にPEI MAX transfection reagent(Polysciences)を用いてトランスフェクションした。9時間後に培地交換を行い、その後24時間培養した培養上清を0.45μmシリンジフィルター(ザルトリウス)で濾過し、ウイルス含有conditioned mediumとした。このconditioned mediumを培養培地で2倍希釈し、線維芽細胞へのウイルス感染に使用した。

2.4. ウェスタンブロッティング

細胞をPBSで洗浄し、2×サンプルバッファー(125mM Tris-HCl, pH6.8, 4% SDS, 10% sucrose)で溶解し、5分間煮沸した。BCA Protein Assay Kit(TaKaRa)を用いてタンパク質濃度を測定したのち、10μgのタンパク質を用いてSDS-PAGEを行い、Trans-Blot Turbo Transfer System(Bio-Rad)を用いてPVDFメンブレンにトランスファーした。以下に示した一次抗体にて4℃でover night反応させ、TBSTで洗浄したのち、二次抗体を反応させた。ECL Western Blotting Detection SystemまたはECL Prime Western Blotting Detection Reagent(Amersham)で可視化した。シグナル検出にはLAS-4000miniイメージングシステム(FUJIFILM)を、データ解析にはMulti Gauge V3.0ソフトウェア(FUJIFILM)を使用した。一次抗体には、RB(CST; 9309; 1:1000 for NMR, CST; 9313; 1:1000 for mouse)、pRB(CST; 8516; 1:1000)、MAO-A(abcam; ab126751; 1:1000)、MAO-B(Novus Biologicals; NBP1-87493; 1:1000)およびβ-Actin(CST; 4970; 1:2000)を使用した。二次抗体は、HRP標識抗ウサギ(CST; 7074; 1:1000)または抗マウス(CST; 7076; 1:1000)IgG抗体を使用した。

2.5. RNA-sequencingとMetabolome analysis

細胞老化誘導時にハダカデバネズミ特異的に発現変動する候補遺伝子群を抽出するために、ハダカデバネズミおよびマウス皮膚線維芽細胞に細胞老化誘導(INK4aを過剰発現)を行った後TRIzol reagent(Invitrogen)に溶解した。RNA抽出後ライブラリーを調製、Novaseq 6000にてRNA-sequencingを実施(Novogene Bioinformatics Institute)し、変動遺伝子について種間比較を行った。また、一般的に老化細胞では代謝状態が大きく変動するが、老化ハダカデバネズミ細胞における代謝状態を解析するために、ハダカデ

バネズミおよびマウス皮膚線維芽細胞に細胞老化誘導し、液体窒素で凍結後氷冷メタノールで回収し、メタボローム解析を行った。

3. 結果

3.1. 細胞老化誘導時のハダカデバネズミ細胞の挙動

マウスおよびハダカデバネズミ線維芽細胞に低濃度(100nM)のドキシソルピシン(DXR)を添加し、細胞老化を誘導してその後の挙動を経時的に3日おき、21日まで解析した。その結果、ハダカデバネズミ、マウスともに細胞老化マーカーであるSA-β-Gal陽性細胞の増加、細胞増殖の停止を示すBrdU取り込みの低下、細胞老化マーカー遺伝子であるINK4aおよびp21の発現上昇が認められた。興味深いことに、マウスでは細胞死の上昇は見られないのに対し、ハダカデバネズミではDXR処理後12日目以降に細胞死が有意に上昇した(図2A, B)。また、細胞死の上昇とINK4aの発現上昇が同時期に起こっていた。さらにハダカデバネズミ線維芽細胞でINK4aをノックダウンすると、DXR処理して21日後の細胞死が有意に減少した。これらの結果から、ハダカデバネズミ線維芽細胞において、INK4aの発現上昇が細胞死の増加に寄与していると考えられた。

3.2. INK4aの発現上昇はハダカデバネズミ線維芽細胞に細胞死を引き起こす

INK4aの発現上昇がハダカデバネズミ線維芽細胞に細胞死を引き起こすのかを調べるために、レンチウイルスベクターを用いてマウスおよびハダカデバネズミ線維芽細胞にINK4aを過剰発現した。DXR老化誘導時と同様にマウスおよびハダカデバネズミ細胞で、SA-β-Gal陽性細胞の増加、BrdU取り込みの低下が認められた。INK4aはサイクリン依存性キナーゼであるCDK4/6を阻害することにより、RBの脱リン酸化(活性化)を起こし、細胞周期停止を引き起こす。ウェスタンブロッティングにより解析を行ったところ、マウスおよびハダカデバネズミ細胞でRBの脱リン酸化が見られた。このように両種の細胞で細胞老化の特徴を示す一方、ハダカデバネズミ細胞のみで細胞死が上昇した(図3)。これらの結果から、INK4aの発現上昇がハダカデバネズミ線維芽細胞に細胞死を引き起こすことが明らかとなった。

3.3. ハダカデバネズミ線維芽細胞において、INK4aの発現上昇はp53とは無関係にRBを介して細胞死を引き起こす

一般的に細胞へのダメージが大きい場合は細胞死が、小

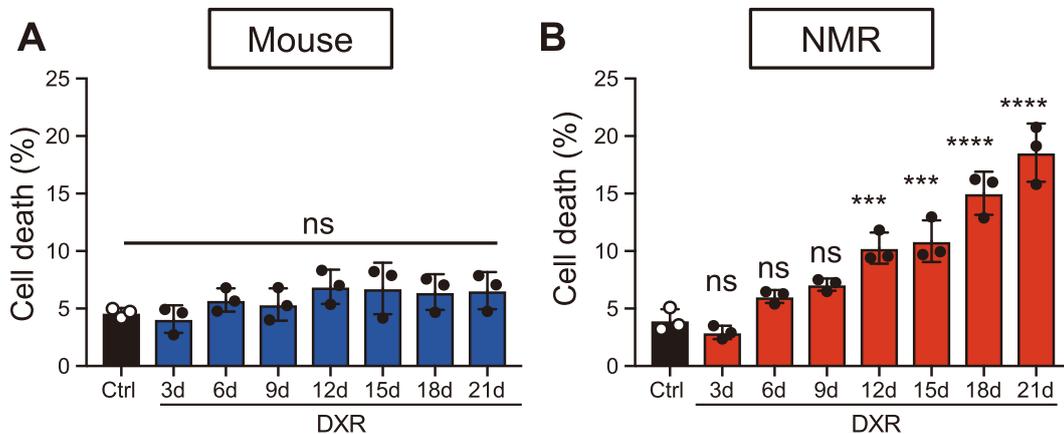


図2 細胞老化誘導時のハダカデバネズミ細胞の挙動

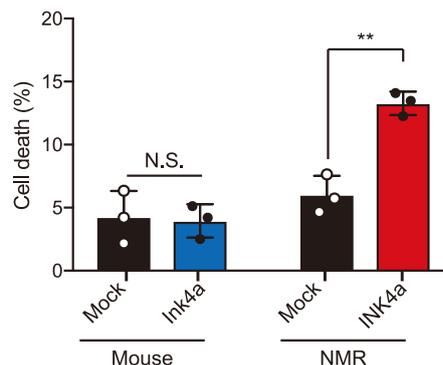


図3 INK4aの発現上昇はハダカデバネズミ線維芽細胞に細胞死を引き起こす

さい場合は細胞老化が引き起こされ¹¹⁾、図4Aに示すように、がん抑制遺伝子であるp53はアポトーシスの誘導に大きく寄与している。本研究で見られたハダカデバネズミ特異的細胞死がp53に依存するのかを調べるために、ウイルス由来のSV40 Large T antigen (LT) タンパクとその変異体を使用した。野生型LTはp53とRBの両方を阻害し、その変異体LTΔ434-444 (LTΔ)はRBのみを、LTK1変異体(LTK1)はp53のみを阻害する。これらとINK4aをハダカデバネズミ線維芽細胞に過剰発現させ、細胞死を解析した。その結果、LTとLTΔは顕著に細胞死を抑制し、LTK1は細胞死を抑制しなかった(図4B)。また、DXR処理ハダカデバネズミ細胞においても同様の結果が得られた。これらの結果から、ハダカデバネズミの細胞老化誘導時の細胞死はp53非依存的、RB依存的に起こっていることが明らかとなった。そこで我々はこの細胞死をINK4a-RB cell deathと命名した。

3. 4. ハダカデバネズミ線維芽細胞において、固有のH₂O₂への脆弱性がINK4a-RB cell deathに寄与している
INK4a-RB cell deathのメカニズムを解析するために、

ハダカデバネズミおよびマウス皮膚線維芽細胞にINK4a過剰発現による細胞老化誘導を行い、mRNA-seqを実施した。ハダカデバネズミの老化細胞で発現上昇していた遺伝子群についてgene ontology (GO) 解析を行ったところ、老化および細胞死を反映していると考えられるGO term: “SASP” や“aging”、“positive regulation of cell death”とともに、“hydrogen peroxide metabolic process”に関わる遺伝子群が濃縮されていた(図5)。ハダカデバネズミはこれまでにhydrogen peroxide (H₂O₂) に対して顕著な脆弱性¹²⁾を持つことが報告されている。我々はハダカデバネズミ線維芽細胞がマウス線維芽細胞と比べて、これまでの報告通り、顕著にH₂O₂に対して脆弱であることを見出した。このことから、我々はハダカデバネズミのINK4a-RB cell deathには、酸化ストレスの亢進が関与しているのではないかと考えられた。実際、INK4a-RB cell deathを起こしているハダカデバネズミ細胞において、2', 7'-dihydro dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)を用いて活性酸素種(ROS)が増加しているかを解析したところ、ROSレベルの上昇が認められた。

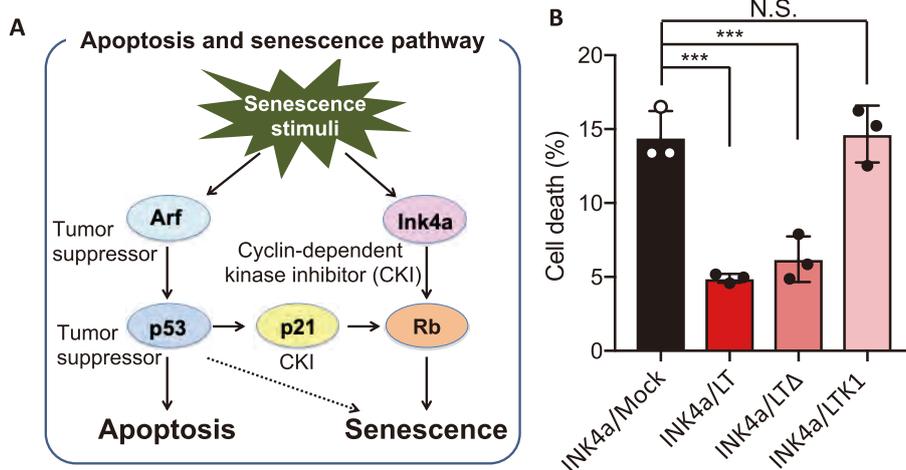


図4 ハダカデバネズミ線維芽細胞において、INK4aの発現上昇はp53とは無関係にRBを介して細胞死を引き起こす

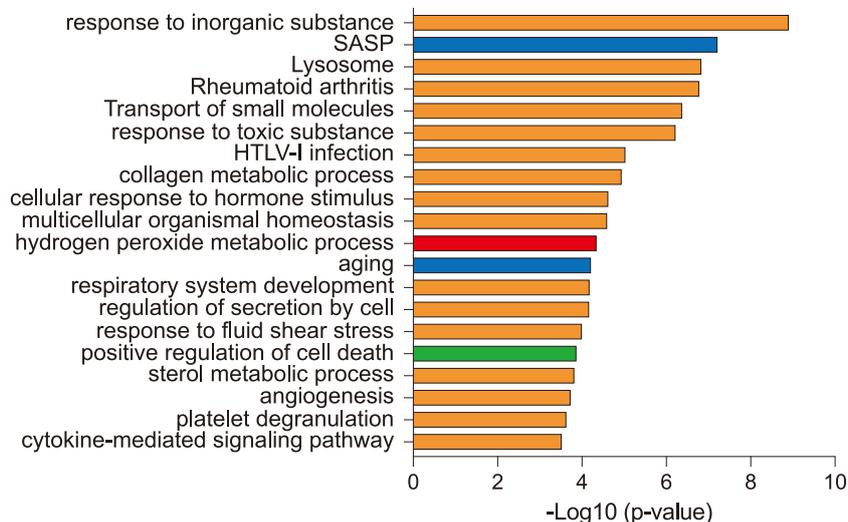


図5 INK4a過剰発現ハダカデバネズミ線維芽細胞のgene ontology (GO) 解析

次にメタボローム解析を行ったところ、興味深いことに、老化していないハダカデバネズミ線維芽細胞では種特異的にserotoninが顕著に蓄積しており、老化したハダカデバネズミ細胞ではその代謝産物である5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA)が有意に増加していた。Serotoninから5-HIAAへの代謝経路は大量の H_2O_2 を産生することが知られており、その代謝経路にはmonoamine oxidase(MAO)が寄与している。上述のmRNA-sequencingの結果においても“hydrogen peroxide metabolic process”にはMAO-Bが含まれていた。さらにINK4aを過剰発現させたハダカデバネズミ線維芽細胞ではMAO-AおよびMAO-Bタンパクの発現が上昇していた。これらの結果から、ハダカデバネズミのINK4a-RB cell deathにはMAOによる H_2O_2 の産生が寄与している可能性が考えられた。 H_2O_2 を含むROSの増加がハダカデバネズミ細胞にINK4a-RB cell deathを引き起こしているのかを明らかにするために、INK4a-RB cell deathを誘導したハダカデバネズミ細胞に抗酸化剤であるNAC、Trolox、Tempolを投与した。その結果、INK4a-RB cell deathは有意に減弱した。これらのことから、ハダカデバネズミ細胞が持つ生来の H_2O_2 への脆弱性と、細胞老化時に H_2O_2 を大量に産生するような代謝状態への変化によって、INK4a-RB cell deathが起きていると考えられた。

4. 考察とまとめ

酸化ストレス仮説は個体老化のメカニズムの1つとしてよく知られている。酸化ストレス仮説とは、ROSによる酸化的ダメージが加齢とともに蓄積し、それに起因する細胞障害が個体の機能低下をもたらすという考え方である。ハダカデバネズミは老化耐性動物であることから、酸化ストレス仮説に基づいた検証が積極的に行われてきたが、ROSに対して抵抗性を持っているとする報告やROSに対する防御機構の低さを示す報告といった相反する結果が報告されており、これまで一定の見解は得られていない。本研究は、ハダカデバネズミ線維芽細胞においてINK4a-RB経路が活性化し、 H_2O_2 産生代謝経路が活性化することと、ハダカデバネズミ線維芽細胞が生来持つROSの1種である H_2O_2 に対する脆弱性が協調してINK4a-RB cell deathを引き起こしていることを明らかにした。この機構により、ハダカデバネズミにおいて老化細胞が除去され、皮膚をはじめとする個体の老化耐性に寄与しているのではないかと考えられる。本研究は、ハダカデバネズミにおける H_2O_2 に対する脆弱性と老化耐性を結びつけた初めての報告である。近年、老化防止薬として老化細胞を除去する“senolytic drug”の開発が進んでいるが、老化細胞は個体にとって有益な側面も持っており、老化細胞の除去が本当に安全なのかは議論の余地がある。ハダカデバネズミは進化の過程で獲得した“naturally senolytic

phenotype”を持っており、今後研究を進めることで、真に安全な“senolytic drug”の開発に寄与する可能性がある。

(引用文献)

- 1) Park, T. J. *et al.* Fructose-driven glycolysis supports anoxia resistance in the naked mole-rat. *Science* **356**, 307-311 (2017).
- 2) Edrey, Y. H., Hanes, M., Pinto, M., Mele, J. & Buffenstein, R. Successful aging and sustained good health in the naked mole rat: A long-lived mammalian model for biogerontology and biomedical research. *ILAR J.* **52**, 41-53 (2011).
- 3) Ruby, J. G., Smith, M. & Buffenstein, R. Naked mole-rat mortality rates defy gompertzian laws by not increasing with age. *Elife* **7**, 1-18 (2018).
- 4) Buffenstein, R. Negligible senescence in the longest living rodent, the naked mole-rat: insights from a successfully aging species. *J. Comp. Physiol. B.* **178**, 439-45 (2008).
- 5) Storer, M. *et al.* Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* **155**, 1119 (2013).
- 6) Demaria, M. *et al.* An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev. Cell* **31**, 722-733 (2014).
- 7) Baker, D. J. *et al.* Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* **479**, 232-236 (2011).
- 8) Baker, D. J. *et al.* Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* **530**, 184-189 (2016).
- 9) Zhao, Y. *et al.* Naked mole rats can undergo developmental, oncogene-induced and DNA damage-induced cellular senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, 1801-1806 (2018).
- 10) Lee, B. P., Smith, M., Buffenstein, R. & Harries, L. W. Negligible senescence in naked mole rats may be a consequence of well-maintained splicing regulation. *GeroScience* **42**, 633-651 (2020).
- 11) Childs, B. G. *et al.* Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Rep.* **15**, 1-15 (2014).
- 12) Salmon, A. B., Akha, A. A. S., Buffenstein, R. & Miller, R. A. Fibroblasts from naked mole-rats are resistant to multiple forms of cell injury, but sensitive to peroxide, ultraviolet light, and endoplasmic reticulum stress. *Journals Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* **63**, 232-241 (2008).

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

静岡県立大学大学院薬学研究院生化学講座

南 彰

Sialidase is a hydrolase that cleaves a sialic acid residue from sialoglycoconjugate. We have previously developed a fluorescent probe (BTP-Neu5Ac) that allows highly sensitive visualization of the enzymatic activity of sialidase on tissue. Staining of the rat skin using BTP-Neu5Ac revealed intense sialidase activity in the lower layers of the dermis. However, the role of sialidase in the skin is not well understood. In the present study, we investigated the role of sialidase in the skin and developed the transdermal delivery technology of sialidase. We first examined changes in sialidase activity with aging and found that sialidase activity increased with growth and decreased with aging. Next, to investigate the role of sialidase, we delivered the sialidase to the dermis and studied its effect on elastin which gives skin elasticity. The barrier function of the skin is high and cannot allow substances with a molecular weight of 500 or more to pass through. Therefore, we used choline and geranate (CAGE), one of the ionic liquids, to deliver sialidase transdermally. CAGE can provide the sialidase subcutaneously while maintaining the enzymatic activity. The elastin level in the dermis was increased by applying sialidase from *Arthrobacter ureafaciens* with CAGE on the skin for five days in rats and senescence-accelerated mice prone 1 and 8. Sialidase activity in the dermis was considered to be mainly due to Neu2 based on the expression level of sialidase isozyme mRNA. Transdermal administration of Neu2 with CAGE also increased the level of elastin in the dermis. Therefore, Neu2 would be involved in elastic fiber assembly. The reduction of elastin in the skin causes various skin diseases as well as wrinkles and sagging with aging. Thus, transdermal administration of sialidase is expected to be helpful for the improvement of wrinkles and skin disorders due to the loss of elastic fibers.

1. 緒言

シアリダーゼは、糖タンパク質や糖脂質などの糖鎖構造からシアル酸を脱離する加水分解酵素である。研究代表らはこれまでに、組織においてシアリダーゼの酵素活性をイメージングすることができる蛍光プローブ Benzothiazolylphenol-based sialic acid derivative type 3 (BTP3-Neu5Ac) を開発した(図1)¹⁻³⁾。BTP3-Neu5Ac は抗体を利用してタンパク質を検出する免疫組織染色とは異なり、酵素活性を検出できる利点がある。BTP3-Neu5Ac は無蛍光で水に可溶性であるが、シアリダーゼによる加水分解を受けるとBTP3を遊離する。BTP3は150nm程度の大きなストークスシフトをもつ強い緑色蛍光物質であり、水に不溶であるため組織に沈着することで染色される。染色方法は比較的簡便であり、BTP3-Neu5Ac (10-1,000 μM) を含む緩衝液中で30分程度インキュベートした後、組織や切片を緩衝液で洗浄することで完了する。

BTP3-Neu5Ac でラット脳を染色すると、脳梁や内包といった白質領域が強く染色される。また、記憶領域であ

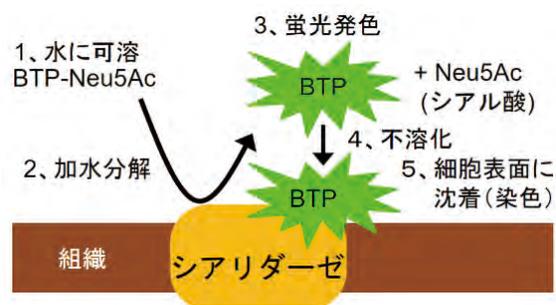


図1 BTP3-Neu5Acの染色原理

る海馬においては、主要な興奮性神経線維である苔状線維の神経終末が強く染色される。このような脳におけるシアリダーゼ活性の分布情報を利用して、シアリダーゼが認知機能に不可欠であることが見いだされている⁴⁻⁶⁾。また、BTP3-Neu5Acでマウス膵臓を染色したところ、インスリンを分泌する膵臓のランゲルハンス島に比較的強いシアリダーゼ活性があることが分かった。このイメージング情報を利用して、シアリダーゼがインスリンの分泌に関与することや、シアリダーゼ阻害剤2,3-dehydro-2-deoxy-N-acetylneuraminic acid (DANA) がインスリン分泌を促進することが見出された⁷⁾。DANAは低血糖時にはインスリン分泌に影響しないことから、低血糖の副作用を回避することができる糖尿病の治療薬として実用化できると期待されている。これまでに大腸癌は強いシアリダーゼ活性を持つことが報告されている。そこでBTP3-Neu5Acでヒトの大腸癌を染色したところ、大腸癌を高感度で検出され



Role of sialidase in the skin and transdermal delivery technology of sialidase

Akira Minami

Department of Biochemistry, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka

た²⁾。現在、内視鏡で腸癌と思われる部位に吹きかけることによって、癌細胞を取り残すことなく除くことができる技術の開発を目指している。最近では、BTP3-Neu5Acがインフルエンザウイルスに感染した細胞の検出や薬剤耐性株の検出に活用することができることが分かった⁸⁾。

様々な組織をBTP3-Neu5Acで染色する過程で、皮膚の真皮に強いシアリダーゼ活性があることを見出した。皮膚は、コラーゲンやヒアルロン酸、エラスチンなどの細胞外マトリックス成分で構成される。細胞外マトリックスの最も巨大な構造はエラスチンで、皮膚、肺、動脈などの組織に豊富に存在している。長期間の日光曝露により損傷を受けた皮膚では、エラスチン含有物質が真皮に蓄積し、最終的に弾力性の欠如に至る(光老化)。逆に、太陽光から保護された皮膚では、エラスチン線維は加齢とともに減少し、シワやたるみ、皮膚障害の原因となる(図2)。エラスチンのターンオーバーには長い時間がかかるため、失ったエラスチンを再生することは難しい。

哺乳類のシアリダーゼにはNeu1、Neu2、Neu3、Neu4の4つのアイソザイムが存在する(図3)。これらの4つのアイソザイムは、発現する組織や細胞内局在、基質特異性、至適pHが異なる。主にリソソームに局在するシアリダーゼアイソザイムNeu1は、細胞表面においてエラスチン結合タンパク質(EBP)と複合体を形成することが報告されている。Neu1によるミクロフィブリルからのシアル酸の遊離は、エラスチン集合を促進する。このことから、真皮に検出されるシアリダーゼ活性は、エラスチン産生に関与すると考えられる。真皮におけるシアリダーゼの機能を解明する過程で、皮膚におけるシアリダーゼ活性が加齢とともに著しく低下することが明らかとなった。真皮にシアリダーゼを送達することで、加齢に伴うエラスチンの減少を回復させることができると考えられる。

本研究では初めに、皮膚におけるシアリダーゼ活性の分布と加齢によるシアリダーゼ活性の変化について検討した。また、シアリダーゼの経皮送達がエラスチン産生に及ぼす影響について検討した。経皮投与では角質層が皮膚のバリアとなり、一般的に分子量500以上の物質を透過することができない。効果的かつ非侵襲的な経皮吸収のためには、最適な経皮輸送基剤の選択が必要となる。イオン液体は、陽イオンと陰イオンからなる低融点溶解塩として知られている。イオン液体のうちCholine and geranate (CAGE)は低分子化合物からペプチドやタンパク質などの高分子化合物まで様々な種類の薬剤を効率的に経皮投与できる(図4)。ここでは、経皮送達基剤としてCAGEを利用した。

2. 方法

2.1. シアリダーゼ活性のイメージング

Wistar系雄性ラット(12週齢、日本SLC)から皮膚、筋肉、



図2 皮膚の老化に伴うエラスチン量の減少

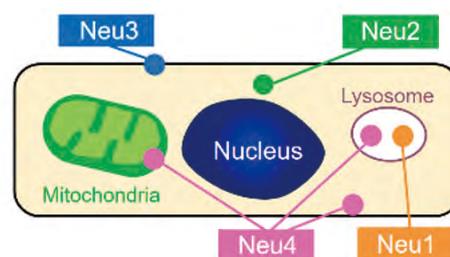


図3 哺乳動物のシアリダーゼアイソザイム

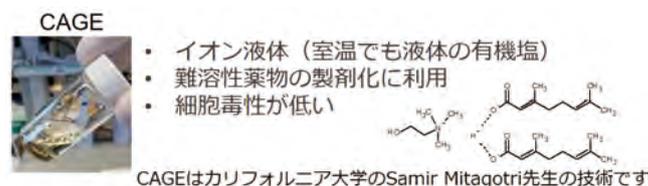


図4 経皮酵素送達基剤CAGE

皮下脂肪を含む腹側部組織を採取し、Tissue-Tek OCTコンパウンド(サクラファインテックジャパン)で包埋した。凍結後、100-300 μ m厚の切片を作製した。1mM BTP3-Neu5Ac (27 $^{\circ}$ C)で染色した後、PBSで洗浄し、蛍光顕微鏡(ex/em: BP330-385/BA510IF、またはBP340-380/BA500-550)で蛍光を観察した。カメラの検出感度は染色していない皮膚切片のバックグラウンド蛍光を検出しないレベルに設定した。写真を撮った後、スライスに4%パラホルムアルデヒドで固定し、ヘマトキシリン・エオジンで染色した。

2.2. シアリダーゼ活性の測定

ラット皮膚のホモジネートを96ウェルプレートに移し、10 μ M 4MU-Neu5Acを含むPBS中で27 $^{\circ}$ C、60分間インキュベートした。炭酸ナトリウム緩衝液(500mM、pH10.7)を加えた後、マイクロプレートリーダー(ex/em, 355nm/460nm)を用いて遊離した4MUの蛍光強度を測定した。

2.3. CAGE中のシアリダーゼの安定性評価

Arthrobacter ureafaciens由来シアリダーゼ(AUSA)を10mU/mLでCAGEまたはPBSに溶解し、27 $^{\circ}$ Cで28日間静置した。その後、4MU-Neu5Acでシアリダーゼの酵素活性を測定した。

2. 4. シアリダーゼの経皮投与

ラットやSAMP1、SAMP8の腹側部の皮膚を剃毛した後、CAGEに溶解したシアリダーゼAUSA (1U/mL)を1日2回、5日間にわたって塗布した。真皮組織を採取し、ホモジナイズした。ホモジネート中のシアリダーゼ活性は、4MU-Neu5Ac (40 μ M)を用いて測定した。真皮から抽出したエラスチン含有量は、定量色素5, 10, 15, 20-tetraphenyl-21, 23-porphine tetra-sulfonate (Fastin Elastin Assay Kit)を利用して測定した。

2. 5. 免疫組織化学染色

真皮の伸展切片を4%パラホルムアルデヒドで固定した後、2%ヤギ血清でブロッキングした。エラスチンの染色では、切片をウサギ抗エラスチンポリクローナルIgG (Bioss Antibodies) およびFITC標識ヤギ抗ウサギIgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories)により染色した。Neu2の染色では、切片をウサギ抗Neu2ポリクローナルIgG (Rockland, Gilbertsville, PA) およびHiLyte Fluor 555標識ヤギ抗ラビットIgG (Anaspec, Fremont, CA)で染色した。また、DAPI (1g/mL)で対比染色を行い、蛍光顕微鏡BZ-X710で観察した。蛍光のバックグラウンドレベルは、二次抗体のみで染色した切片を利用して決定した。すべてのイメージングは少なくとも2回実施し、再現性を確認した。

2. 6. エラスチンの自家蛍光の観察

真皮切片を4%パラホルムアルデヒドで固定した後、蛍光顕微鏡 (BZ-X810, ex/em: BP450-490/BA500-550)で自家蛍光を観察した。

2. 7. リアルタイムRT-PCR

TRIzol 試薬 (Life Technologies)を用いて、ラットの腹側部の皮膚や脂肪などの組織からmRNAを抽出した後、サーマルサイクラーシステム (Thermal Cycler Dice Real-Time System Lite, タカラバイオ)とOne-Step SYBR PrimeScript PLUS RT-PCR キット (Perfect Real Time, タカラバイオ)を利用してmRNAを定量した。グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)のmRNAを内部標準として利用した。以下に使用したプライマーの配列を示す。

Neu1: 5'-CCCATCCCGAGTACCGAGT-3'と5'-CCCGGCC CACA ACTGGAC-3'

Neu2: 5'-GAGCCACCAACCATGTCAAG-3'と5'-AAG GGACATGATTCATGGAG-3'

Neu3: 5'-CGGAGCTGTGAGCTGAG-3'と5'-CCTGCTGG AACAGTGCTG-3'

Neu4: 5'-TCTGGAGTGCCAACTGGC-3'と5'-AAGGAA GTGCCTTCATCAGCAC-3'

エラスチン: 5'-GCTTAGAGTCTCAACAGGTGC-3'と5'-CGGAACCTTGGCCTTGACTC-3'

GAPDH: 5'-TGAACGATTTGGCCGTATCGG-3'と5'-TC AATGAAGGTCGTTGATGG-3'

2. 8. Neu2の経皮投与

先に樹立したラットNeu2を安定に発現するC6ラットグリオーマ細胞から分泌されたNeu2を、限外ろ過フィルター (Amicon Ultra)を用いて回収した。4MU-Neu5AcでNeu2のシアリダーゼ活性を測定した。Neu2 (21.3nmol/min/mL)とCAGEを3:7の割合で混合した。剃毛後、Neu2とCAGEの混合物60 μ Lをラット (12週齢)の側腹部皮膚に塗布した。または、Neu2を18 μ L塗布した後、CAGEを42 μ L塗布した。塗布は1日2回、5日間行った。真皮に含まれるエラスチンは、2.4.と同様の方法で定量した。

2. 9. 統計解析

統計解析は、Bonferroniの多重比較検定を伴う一元配置分散分析、およびt検定を利用した。2群間の分散が異なる場合は、Welchの補正を加えたt検定を利用した。

3. 結果

3. 1. 皮膚組織におけるシアリダーゼ活性の加齢に伴う変化

皮膚におけるシアリダーゼ活性の分布を調べるために、12週齢のラット腹側部を100 μ M BTP3-Neu5Acで染色した。ヘマトキシリン・エオジン染色で確認された真皮下層や筋肉に強いシアリダーゼ活性は検出された (図5A)。また、皮膚におけるシアリダーゼ活性の加齢による変化を調べたところ、胎生19日から12週齢にかけて上昇した。21ヶ月齢以上のラット皮膚におけるシアリダーゼ活性は、12週齢のラット皮膚における活性と比較して著しく減弱した (図5B)。

3. 2. シアリダーゼの経皮送達による皮膚エラスチン量の増加

次に、シアリダーゼの経皮投与がエラスチン量に及ぼす影響について検討した。初めに、経皮輸送基剤CAGEによって酵素活性が変化しないことを確認した (図6A)。次に、経皮輸送基剤CAGEを使用してシアリダーゼ (AUSA)を1日2回、5日間皮膚に塗布すると、ラット皮膚におけるシアリダーゼ活性が増加した (図6B)。また、ラット皮膚に含まれるトロポエラスチンを含むエラスチンの総量を測定したところ、エラスチン量が増加した (図6C)。

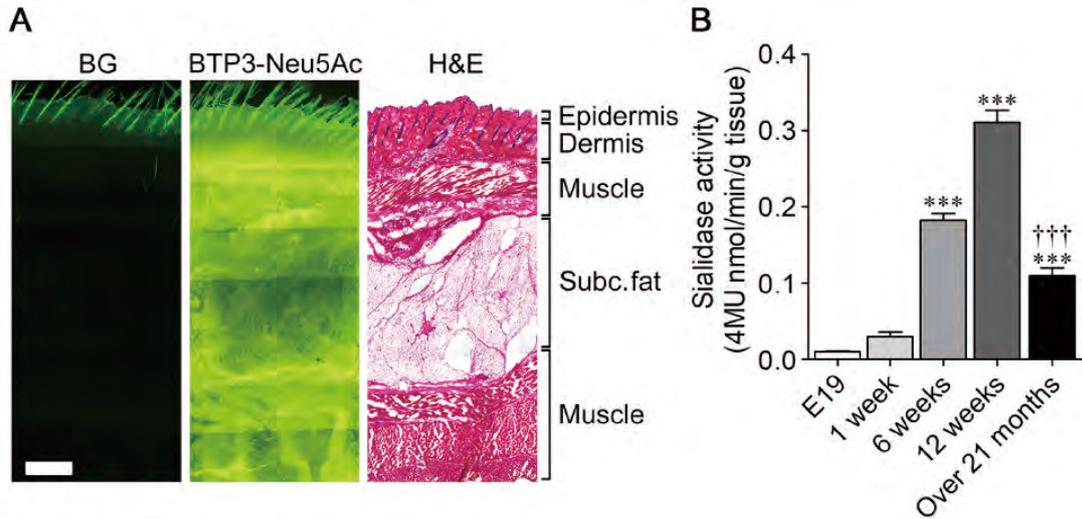


図5 ラット皮膚におけるシアリダーゼ活性の分布と加齢に伴う変化
(A) BTP3-Neu5Acによるラット皮膚のイメージング、(B) 老化に伴う皮膚シアリダーゼ活性の減弱

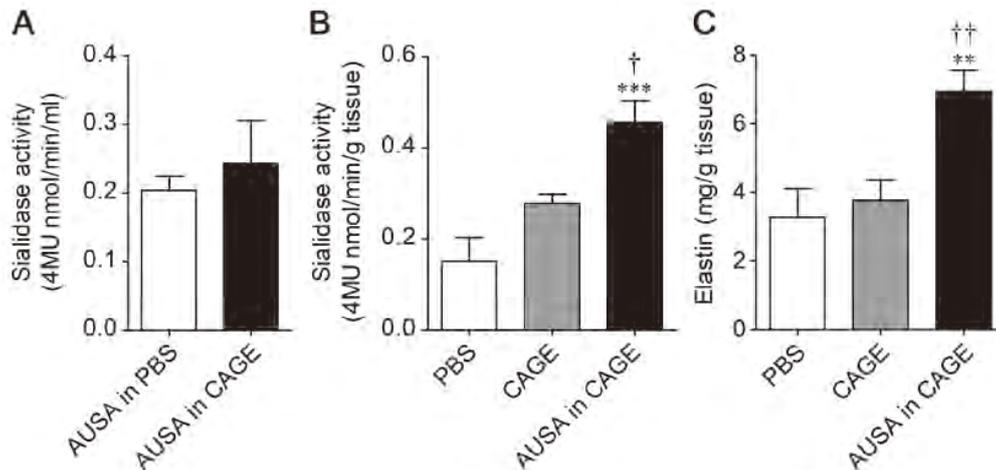


図6 シアリダーゼの経皮送達によるエラスチンの増加
(A) CAGEがシアリダーゼ活性に及ぼす影響、(B, C) シアリダーゼの経皮送達後における真皮のシアリダーゼ活性(B) およびエラスチン量(C) の増加

BTP3-Neu5Acによるシアリダーゼ活性のイメージングにおいても同様に、AUSAを経皮投与すると真皮に強いシアリダーゼ活性が観察された(図7A)。また、伸展切片の免疫組織染色およびエラスチン自家蛍光の観察において、AUSA投与後の真皮にエラスチンの高い発現が認められた(図7BおよびC)。

3. 3. シアリダーゼの経皮送達による老化促進マウスの皮膚エラスチン量の増加

老化促進モデルマウス(SAM)は、寿命が短く、老化症状の早期出現と急速な進行を特徴とするマウスであり、AKR/J系統の近親交配により、これまでに9系統の老化促進マウス(SAMP)と3系統の老化抵抗性マウス(SAMR)が確立されている。SAMP1系統は、老化アミロイドシ

スと免疫不全が特徴である。SAMP1系統は、12-18ヶ月齢でエラスチンと表皮の厚みが増加し、明らかなエラストーシスに発展し、その特徴はヒトの光老化と類似している。SAMP8系統は、アルツハイマー病様の神経変性と認知障害および概日リズム障害を特徴とする。SAMP8マウスは野生型マウスの老化と比較的類似した老化症状を示す。

本研究では、SAMP1およびSAMP8を用いて、エラスチン量に及ぼすAUSAの影響を検討した。AUSAを含むCAGEを1日2回、5日間経皮投与したところ、SAMP1およびSAMP8でエラスチン量が有意に増加した(図8AおよびB)。

3. 4. 皮膚におけるシアリダーゼアイソザイムの発現

真皮における強いシアリダーゼ活性が哺乳動物シアリダ

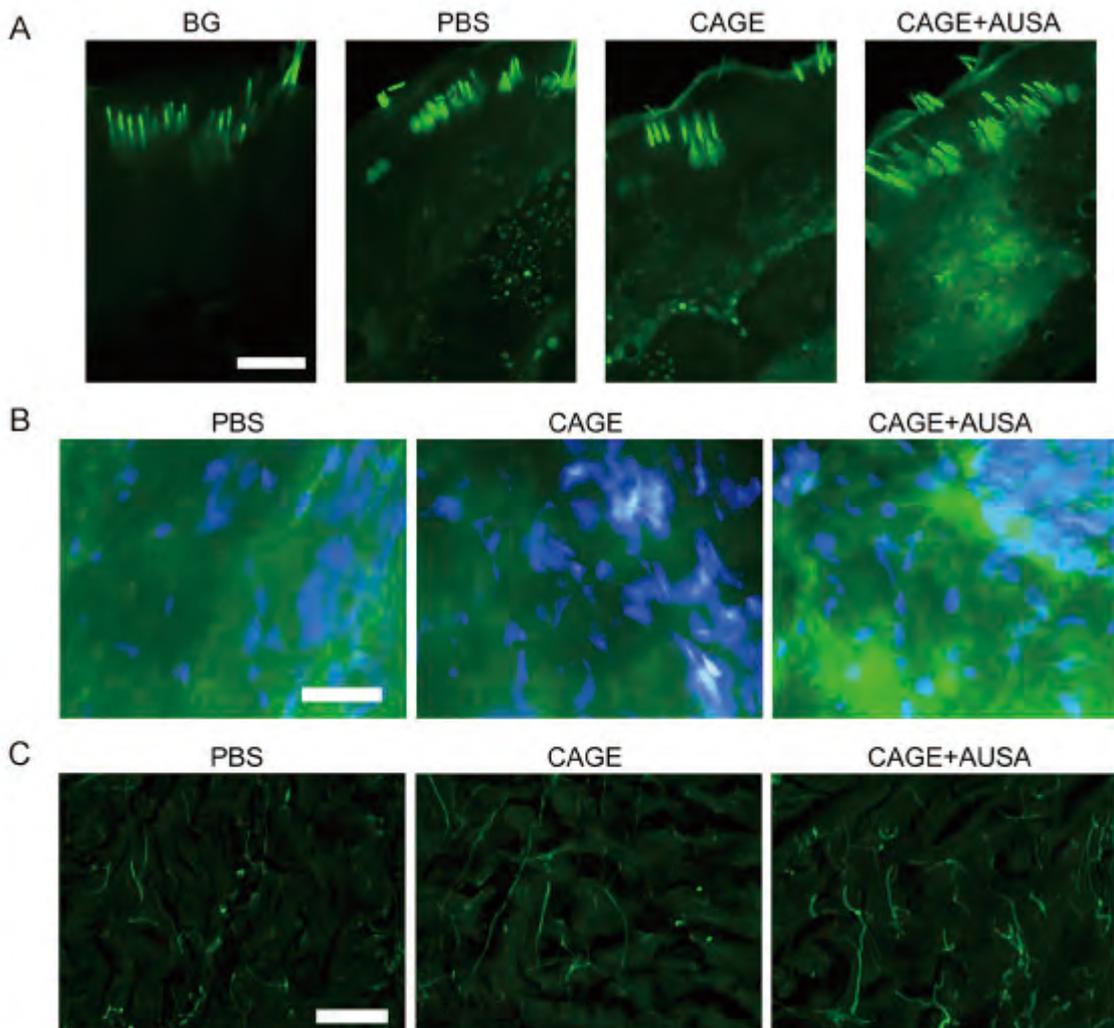


図7 シアリダーゼの経皮送達によるエラスチンの増加
 (A-C) シアリダーゼの経皮送達後における真皮のシアリダーゼ活性(A)、およびエラスチン量(B: 免疫組織染色; C: 自家蛍光観察)の増加

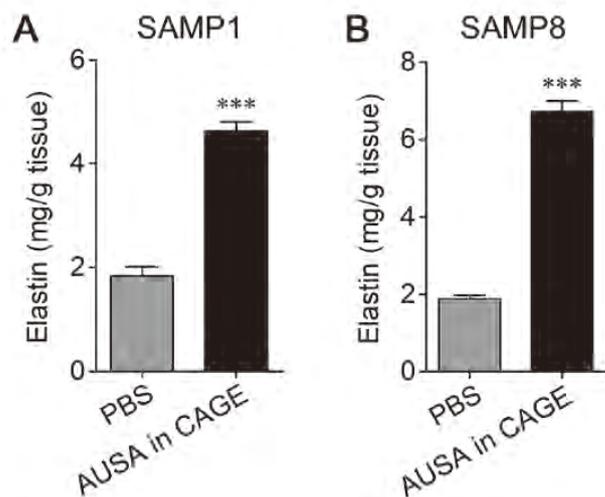


図8 シアリダーゼの経皮送達による老化促進モデルマウスの真皮におけるエラスチンの増加
 (A) SAMP1 (B) SAMP8

ーゼの4つのアイソザイムの内、どのアイソザイムに起因するのかを明らかにする目的で、ラットの皮下組織におけるシアリダーゼアイソザイムの発現を比較した。Neu2 mRNAの発現量は、脂肪組織よりも真皮や筋肉などの組織で顕著に高かった(図9A-D)。一方、Neu1、Neu3、Neu4の発現量は、真皮と筋肉を含む組織よりも脂肪組織で高かった。

3. 5. Neu2の経皮投与による皮膚エラスチンの増加

腹側部における免疫組織染色において、Neu2は皮下脂肪に比べ真皮と筋肉に多く発現していた(図10A)。Neu2がエラスチン産生に及ぼす影響は不明であることから、C6ラットグリオーマ細胞で作製したラットNeu2を用いて、Neu2が皮膚のエラスチン量に及ぼす影響を検討した。Neu2の経皮投与においては、Neu2を含むCAGEをラット皮膚に塗布する方法、または、Neu2を先に皮膚に塗布し、その後CAGEを塗布する方法の2通りで試した。Neu2の塗布を1日2回、5日間行った結果、どちらの方

法でも皮膚のエラスチンレベルが上昇することが見出された(図10B)。また、皮膚のエラスチンmRNAレベルは、Neu2を適用しても有意な影響を受けなかった(図10C)。

4. 考 察

本研究では、皮膚におけるシアリダーゼの酵素活性の分布や発現するアイソザイム、加齢に伴う発現量の変化など、シアリダーゼに関する基礎的知見を得た。ラット側腹部の組織をpH7.3のBTP3-Neu5Acで染色すると、脂肪組織と比較して真皮と筋肉に強いシアリダーゼ活性が検出された。BTP3-Neu5AcはpH7.3ではシアリダーゼアイソザイムのNeu2とNeu4によって優先的に加水分解され、Neu1とNeu3によって弱く加水分解される⁶⁾。従って、pH7.3の真皮と筋肉における強いシアリダーゼ活性は、Neu2によるものと推定された。また、pH4.6におけるシアリダーゼ活性の分布は、pH7.3における分布と大きな違いはなかった。pH4.6では、BTP3-Neu5AcはNeu1とNeu3によって効率よく加水分解されるが、Neu2と

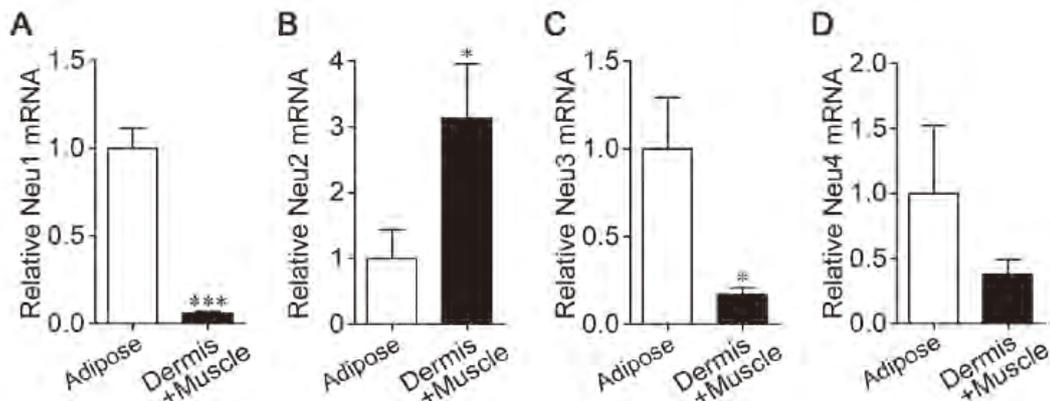


図9 皮膚におけるシアリダーゼアイソザイムの発現比較

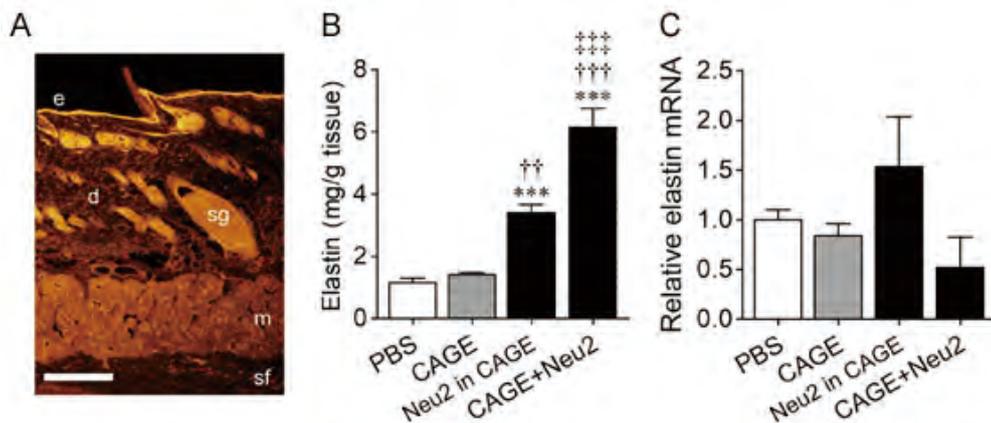


図10 Neu2の経皮投与による皮膚エラスチンの増加

(A) 皮膚におけるNeu2の発現分布(B, C) Neu2の経皮投与がエラスチン(B) やエラスチンmRNA(C)の発現に及ぼす影響

Neu4によっても分解される⁶⁾。pH4.6でも皮膚におけるシアリダーゼ活性のイメージングには主にNeu2が寄与していると思われる。

皮膚の老化は、真皮のコラーゲン、エラスチン、グリコサミノグリカンなどの質的・量的な変化に起因している。皮膚エラスチンの減少によって、皮膚の弾力性が失われる。本研究では、4MU-Neu5Acを用いてpH7.3で測定したシアリダーゼ活性が老化によって低下することを明らかにした。シアリダーゼはエラスチン集合を促進することから、加齢に伴うエラスチンの減少は、シアリダーゼ活性の低下と関係している可能性がある。

CAGEを用いてシアリダーゼを経皮投与したところ、真皮におけるシアリダーゼ活性は経皮投与後に増加した。CAGEが酵素活性を維持したまま酵素を経皮投与できることを示唆している。今回、シアリダーゼの経皮投与によって、皮膚のエラスチン量を増加させることが見いだされた。Neu1はエラスチンの集合を促進するだけでなく、エラスチン由来ペプチドの分解調節に関与することが報告されている。シアリダーゼの経皮投与によりエラスチン量が増加したことから、外因性のシアリダーゼはエラスチンの分解促進ではなく、エラスチン集合の促進に主に寄与すると考えられる。

バクテリア由来のシアリダーゼのみならず、Neu2を経皮投与することによっても皮膚のエラスチン量が増加した。エラスチン産生にはNeu1だけでなくNeu2も関与していると考えられる。皮膚中のエラスチンmRNA量はNeu2塗布による有意な影響は見られなかった。従って、シアリダーゼによるエラスチンの増加は、ミクロフィブリルからのシアル酸脱離によるエラスチンの集合の促進によると考えられる。Neu1はリソゾーム酵素であり、至適pHは4.4-4.6である。Neu2は糖タンパク質、オリゴ糖、ガングリオシドを加水分解し、至適pHは6.0-6.5である。Neu2は細胞外の中性pHで作用するので、Neu2を経皮投与すると細胞外空間のミクロフィブリルからシアル酸が効率的に遊離すると思われる。Neu2を経皮投与した皮膚において、光老化皮膚に見られるような重度の皮膚エラストーシスは観察されなかった。しかし、シアリダーゼが皮膚エラストーシスを誘導しないことを厳密に確認するためには、より詳細に検討する必要がある。

エラスチンは、皮膚の老化に伴って減少する。加齢のほか、皮膚弛緩症や弾性線維性仮性黄色腫、Williams-Beuren症候群、肥満による皮膚障害などによって、皮膚環境が悪化するとエラスチンが減少することが明らかにされている。皮下脂肪組織の増加は、真皮エラスチンの分解を促進させる。エラスチンのターンオーバーには長い時間を要するが、シアリダーゼの経皮投与によりエラスチンを回復させることで皮膚環境が改善されると考えられる。

5. 総括

皮膚の真皮にはNeu2に起因する強いシアリダーゼ活性があり、加齢とともに活性が低下することが示された。また、経皮輸送基剤CAGEは、シアリダーゼの酵素活性を維持したまま経皮投与できる有用性が確認された。CAGEはシアリダーゼだけでなく、様々な酵素の経皮投与に有用であると考えられる。さらに、CAGEを用いたシアリダーゼの経皮投与により、皮膚エラスチンが増加することを明らかにした。シアリダーゼの経皮投与は、エラスチンの減少によるシワや皮膚障害の改善に有用であると期待される。

(本研究により得られた成果)

・ Akira Minami, Yuka Fujita, Jun Goto, Ayano Iuchi, Kosei Fujita, Yasuyo Mikami, Mako Shiratori, Ami Ishii, Samir Mitragotri, Yasunori Iwao, Hiroaki Kanazawa, Yuuki Kurebayashi, Tadanobu Takahashi, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda, Takashi Suzuki: Enhancement of elastin expression by transdermal administration of sialidase isozyme Neu2. *Sci. Rep.*, **11**, 3302 (2021).

(引用文献)

- 1) Minami A, Kurebayashi Y, Takahashi T, Otsubo T, Ikeda K, Suzuki T: The Function of Sialidase Revealed by Sialidase Activity Imaging Probe. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, (2021).
- 2) Minami A, Otsubo T, Ieno D, Ikeda K, Kanazawa H, Shimizu K, Ohata K, Yokochi T, Horii Y, Fukumoto H, Taguchi R, Takahashi T, Oku N, Suzuki T: Visualization of sialidase activity in Mammalian tissues and cancer detection with a novel fluorescent sialidase substrate. *PLoS One*, **9**, e81941 (2014).
- 3) Minami A, Shimizu H, Meguro Y, Shibata N, Kanazawa H, Ikeda K, Suzuki T: Imaging of sialidase activity in rat brain sections by a highly sensitive fluorescent histochemical method. *Neuroimage*, **58**, 34-40 (2011).
- 4) Minami A, Ishii A, Shimba S, Kano T, Fujioka E, Sai S, Oshio N, Ishibashi S, Takahashi T, Kurebayashi Y, Kanazawa H, Yuki N, Otsubo T, Ikeda K, Suzuki T: Down-regulation of glutamate release from hippocampal neurons by sialidase. *J. Biochem.*, **163**, 273-280 (2018).
- 5) Minami A, Meguro Y, Ishibashi S, Ishii A, Shiratori M, Sai S, Horii Y, Shimizu H, Fukumoto H, Shinba S, Taguchi R, Takahashi T, Otsubo T, Ikeda K, Suzuki T:

- Rapid regulation of sialidase activity in response to neural activity and sialic acid removal during memory processing in rat hippocampus. *J. Biol. Chem.*, **292**, 5645-5654 (2017).
- 6) Minami A, Saito M, Mamada S, Ieno D, Hikita T, Takahashi T, Otsubo T, Ikeda K, Suzuki T: Role of sialidase in long-term potentiation at mossy fiber-CA3 Synapses and hippocampus-dependent spatial memory. *PLoS One*, **11**, e0165257 (2016).
- 7) Minami A, Fujita Y, Shimba S, Shiratori M, Kaneko YK, Sawatani T, Otsubo T, Ikeda K, Kanazawa H, Mikami Y, Sekita R, Kurebayashi Y, Takahashi T, Miyagi T, Ishikawa T, Suzuki T: The sialidase inhibitor 2,3-dehydro-2-deoxy-N-acetylneuraminic acid is a glucose-dependent potentiator of insulin secretion. *Sci. Rep.*, **10**, 5198 (2020).
- 8) Kurebayashi Y, Takahashi T, Miura T, Otsubo T, Minami A, Fujita Y, Sakakibara K, Tanabe M, Iuchi A, Ota R, Ikeda K, Suzuki T: Fluorogenic probes for accurate in situ imaging of viral and mammalian sialidases. *ACS Chem. Biol.*, **14**, 1195-1204 (2019).

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

大阪大学微生物病研究所

村上 良子

Inherited GPI deficiency (IGD) is caused by the mutations of the genes involved in the GPI biosynthesis. There are at least 150 kinds of GPI anchored protein in the mammalian cell, and they play various important roles, such as neurological development. IGD patients are often suffered from developmental delay and intractable seizures and in severe cases, some of them have ichthyosis. In the skin specific *Piga* KO mice, secretion of glucosylceramide (GlcCer), packed into the lamellar bodies of keratinocytes was impaired, leading to disruption of skin barrier function, which caused the early neonatal death. *PIGA* is the catalytic component of the GPI-N-acetylglucosaminyltransferase, the first step enzyme of GPI biosynthesis. This phenotype is similar to *ABCA12* KO mouse model, in which GlcCer could not be packed into the lamellar body, leading to the defect in secretion of GlcCer. To elucidate the mechanism of the defect in the secretion of GlcCer in the *Piga* KO model, we made the *PIGA* knockout and its *PIGA* rescued HaCaT cell, a human keratinocyte cell line. We also made the *ABCA12* KO cell to compare the phenotypes. Anti-GlcCer antibody could not show the clear localization in the either cell, however anti-ceramide antibody showed difference in the localization of ceramide between in *Piga* KO and its rescued cells and more clearly in *ABCA12* KO cells. According to these evidences, we will further investigate the pathogenic mechanism of ichthyosis in *PIGA* deficiency and develop its treatment using synthesized GlcNAcPI, the first step product.

1. 緒言

哺乳細胞では GPI (glycosylphosphatidylinositol) という糖脂質で細胞膜につながれている GPI アンカー型タンパク質 (GPI-AP) が約 150 種知られており、酵素や受容体、接着因子、補体制御因子など受精、個体発生、神経発達、免疫機能などにおいて重要な働きをしている。GPI-AP は小胞体 (ER) でタンパク質部分と GPI が別々に合成され、完成した GPI が GPI 付加シグナルを持つ前駆タンパク質のカルボキシル末端に付加される。その後も小胞体とゴルジ体で修飾を受け、細胞膜のコレステロールに富む領域に運ばれる。このような GPI-AP の生合成と修飾に 30 個の遺伝子が関与している¹⁾。先天性 GPI 欠損症 (IGD) は近年見つかった潜性遺伝性疾患で、これらの遺伝子に変異がおり重要な機能を担う種々の GPI アンカー型タンパク質 (GPI-AP) の細胞膜上の発現低下や構造異常により、精神運動発達の遅れ、てんかん、多臓器奇形などを来す^{2, 3)}。現在までに海外で約 400 例、国内で約 50 例の報告がある。厚生省難治性疾患の研究班により診療ガイドラインを作成し、2017 年より指定難病に認定され、2018 年より小児慢性特定疾病となっている。

本研究では重症例でしばしば見られる魚鱗癬様の皮膚病変³⁾の病態解析と治療法の開発を目的とした。以前我々は、

皮膚における GPI アンカーの役割を調べるために、K5-Cre マウスと *Pigafloxed* マウスを交配することにより表皮特異的な *Piga* ノックアウト (KO) マウスを作製した。完全欠損となるオスのマウスは乾燥した皺の多い皮膚を呈し、生後数日で死亡した。表皮のバリア機能の消失によって水分保持能が低下し、角質細胞の水和が阻害されて古い角質層がはがれないため、角質が著しく肥厚していた⁴⁾。その後の解析により角質細胞内に形成される層板顆粒 (lamellar body) の異常や分泌される lamellar body の消失など GPI-AP が、表皮の正常な分化に必須であることが明らかになった⁵⁾。この症状は、重篤な皮膚疾患である Harlequin-type ichthyosis の病態に極めて類似している。この疾患は脂質の lamellar body への輸送に関わる *ABCA12* (ATP Binding Cassette Subfamily A Member)¹²⁾ 遺伝子の変異によっておこることが知られている⁶⁾。角質層の直下にある顆粒層に存在する lamellar body は、TGN (trans Golgi network) に由来するとされているが、その内部にグルコシルセラミド (GlcCer) やスフィンゴミエリンを取り込み、角層と顆粒層の界面に放出する。放出されたグルコシルセラミド、スフィンゴミエリンは、酸性型の β -グルコセレブロシダーゼとスフィンゴミエリナーゼによりそれぞれ加水分解を受け、セラミドに変換される。生成したセラミドは脂肪酸やコレステロールとラメラ構造体を作り、表皮透過バリアを形成する⁷⁾。これらの脂質の合成と分泌過程に GPI-AP が何らかの形で関わっていると考えられ、表皮における GPI-AP の機能の解明が、両疾患の病態解明につながる可能性がある。



Pathological analysis of ichthyosis associate with Inherited GPI deficiency
Yoshiko Murakami
Research Institute for Microbial Diseases

2. 方法

2. 1.

PIGAはGPI生合成の最初のステップに関係するX染色体上の遺伝子で、その変異により機能が低下すると、すべてのGPI-APの細胞表面における発現が低下する¹⁾。ドイツのグループとの共同研究によりPIGAの産物であるGlcNAcPIを合成した(図1A)。PIGA欠損のHEK293細胞を無血清培地に2 μ MのGlcNAcPIを加えた培養液で24時間培養し、フローサイトメトリーによりGPI-APの発現の回復を解析した。GlcNAcPIは効率よく次のステップのPIGLの基質として使われGPI-APであるCD59とDAFの発現が正常の60%まで回復した(図1B)⁸⁾。フローサイトメトリー解析にはmouse anti-human CD59 (5H8), -DAF (IA10, Biolegend)と2次抗体としてPhycoerythrin conjugated anti-mouse IgGを使用した。

2. 2.

まずヒト表皮角化細胞株であるHaCaT細胞を使ってin vitroの実験系を樹立した。Cas9とguideRNAを発現するベクター(px330 Addgene #42230)にPIGA遺伝子のターゲット配列(ACACTCTCTCGGGTTAGCCC)を挿入したプラスミドをリポフェクション(lipofectamine 2000, Thermo Fisher Scientific)によりHaCaT細胞に導入してPIGAをノックアウトし、PIGA KOクローン#11, 12を樹立した。フローサイトメトリー解析により、野生株の細胞表面に発現するGPI-APがKO細胞で欠損していることを確認した。さらにKO細胞にPIGA cDNAをレトロウイルスベクター(pLIB-hyg-FLAG-PIGA)を使って導入した後、ハイグロマイシン200 μ g/mlを含む選択培地で培養してレスキュー細胞を作製し、正常コントロールとした(図2)。次にGlcNAcPIの効果を確認するために、2.1.と同様の方法で培養液中に加えて細胞膜上のGPI-APの回復を

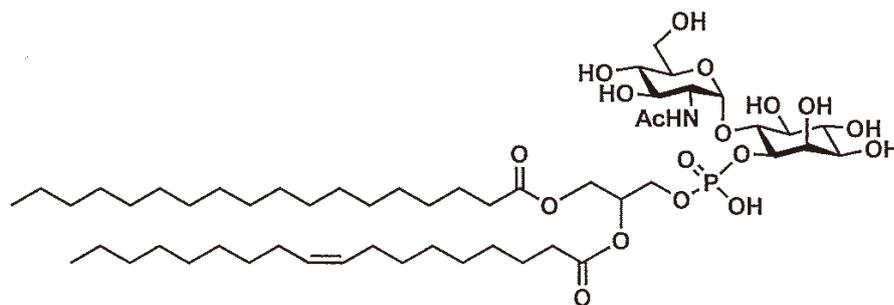


図1A 合成GlcNAcPI (18:0, 18:1)の構造

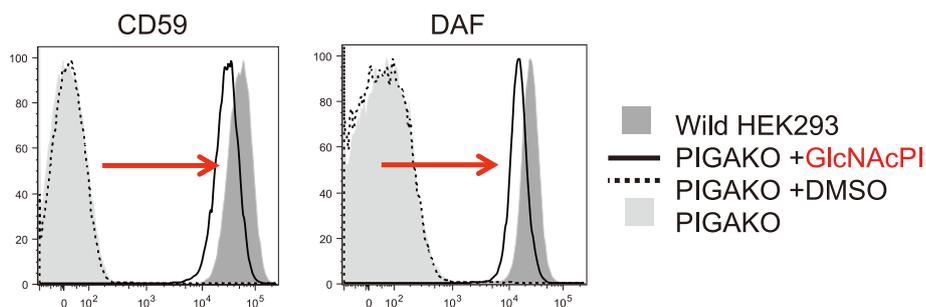


図1B PIGAKOのHEK 293細胞を無血清培地に2 μ MのGlcNAcPIを加えた培養液で24時間培養後フローサイトメトリーによりGPI-AP (CD59, DAF)の発現の回復を解析した。

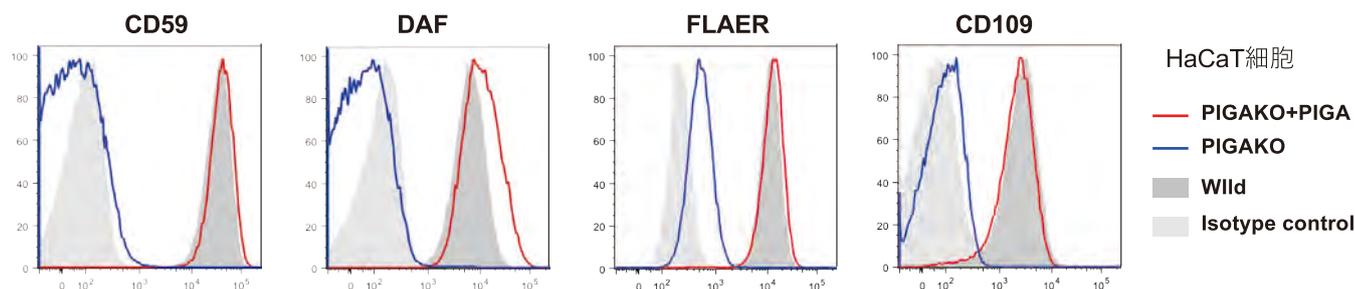


図2 PIGA KOとPIGAをレスキューしたHaCaT細胞のフローサイトメトリー解析

フローサイトメトリーで解析した(図3)。FLAER (fluorescent-labeled inactive toxin aerolysin, CEDARLANE) はGPI-APに結合する毒素の変異体に Alexa488 の蛍光ラベルを付加したプローブで、GPI-AP の発現量を示す。CD109 の発現は mouse anti-CD109 (Biolegend) を使用して解析した。

2. 3.

細胞内GlcCerの蓄積を比較観察するためHaCaT細胞の *ABCA12* 遺伝子のKO細胞クローンを2. 2. と同様の方法で作製した。ターゲットサイトは2箇所設計し(5'-CAAAGGATTTCG GGGCAATAT, 5'-AAACAGAAAAG TCGTCAAGC)、KO細胞クローンを樹立したのちに、ゲノムの配列を読んで完全なKO細胞であると確認できた細胞クローン #27, 30 を *ABCA12* KO細胞として使用している。

2. 4.

この3種類の細胞 (*PIGA* KO + *PIGA* rescued, *PIGA* KO + empty vector, *ABCA12* KO) におけるGlcCerの局在を確認するために、角化細胞に分化させる条件を検討した。HaCaT細胞は高Caの濃度で角化細胞に分化することが知られている⁹⁾。異なるCa濃度で細胞を培養して形態を観察した結果、角化細胞に分化させる高Caの条件を2.8mMとし、分化しない低Caの条件を0.03mMとした。低Caの条件はCa添加のないDMEM培地に透析したFCSを10%加えたものにCaCl₂を加えてfinal 0.03mMとした。

2. 5.

これらの3種の細胞を、poly-L-Lysineをコートしたカバーガラス上で培養し、高Caの条件で角化細胞に分化させた上で、rabbit anti-GlcCer (RAS_0011, Glycobiotech) mouse anti-ceramide (-Cer) (C8104, Sigma), rabbit anti-keratin1 (Biolegend), 2次抗体としてFITC conjugated

donkey anti-rabbit IgG (Jackson), Alexa488 conjugated goat anti-mouse IgG (Biolegend) を使って、その局在の違いを顕微鏡で観察した (KEYENCE BZ-X800)。メタノールあるいはパラホルムアルデヒド (PFA) で固定した細胞は Anti-GlcCer, -Cerによる免疫染色に適さないことがわかったので、既報の手法を踏襲して無固定で0.1% TritonX100, 1% donkey serum in PBSで処理して1次抗体、2次抗体で2段階で染色し、4% PFAで後固定して観察した。

3. 結果

3. 1.

PIGA 欠損のHEK293細胞の培養液に合成したGlcNAcPIを2μM加えたところ図1BのようにGPI-APであるCD59, DAFが、ともに正常の60%まで発現量が回復した。これに関連する結果は報告した (ACS Chem Biol. 2021 19; 16 (11): 2297-2306)。

3. 2.

HaCaT細胞膜上に発現するGPI-APが *PIGA* KOクローンでは完全にその発現が消失し、さらに *PIGA* cDNAを導入することによって発現が完全に回復していることを示す(図2)。

さらに3. 1. と同様に合成基質GlcNAcPI 3μMの添加により、GPI-APであるCD59とDAFの発現が正常の10%程度まで回復することがわかった。回復の効率はHEK293細胞に比べて低かったが、ピークとなる時間は24時間と同じであったことから、取り込みの効率、あるいは小胞体での利用の効率がHEK293細胞に比べて低いと考えられる(図3)。

3. 3.

ABCA12 KOの作製と完全なノックアウト細胞である

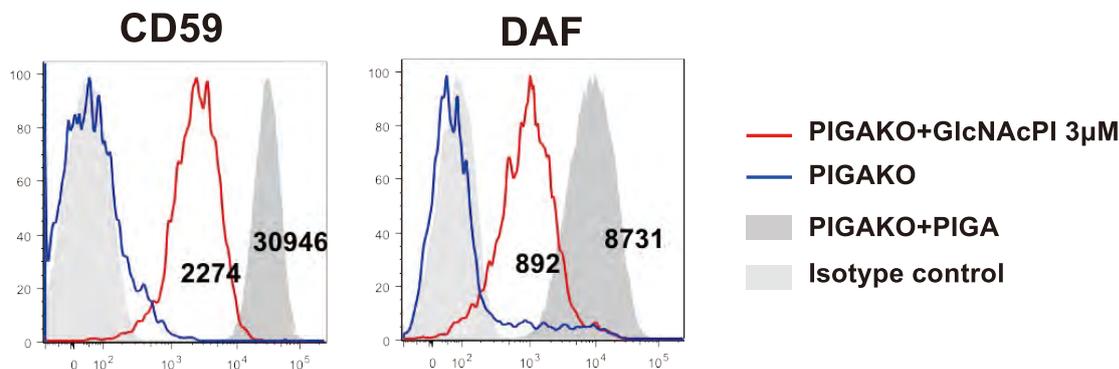


図3 *PIGA* KO HaCaT細胞を無血清培地に3μMのGlcNAcPIを加えた培養液で24時間培養し、フローサイトメトリーによりGPI-AP (CD59, DAF) の発現を解析した。

ことをゲノム配列の解析により確認した(図4)。

3. 4.

文献によると正常の角質細胞ではGlcCerの分布が細胞質全体に分布しているのに対し、*ABCA12* 遺伝子に変異をもつ Harlequin-type ichthyosis の患者の角質細胞ではGlcCerがlamellar bodyに運ばれずに核の周囲の塊として存在し、分布に異常をきたしている。

作製した*ABCA12* KO細胞のGlcCerとセラミドの分布を positive controlとして3種類の細胞の免疫染色のパターンを比較した。GlcCerは図5Aのように染色が弱く、

ABCA12 KOについては既報のデータの再現性は得られず、*PIGA* KOとレスキュー細胞の間にも局在のパターンに差は見られなかった。一方セラミドの分布については、*PIGA* レスキュー細胞では一部細かい繊維状の染色が目立つ細胞はあるが、主に細胞膜と細胞質にdot状に分布しているのに対し、*PIGA* KO細胞(#11, 12)では繊維状の染色パターンの細胞の割合が増加しており、*ABCA12* KO(#27, 30)ではほぼすべての細胞が網目状に伸びた荒い繊維状の染色パターンを示していた。*PIGA* KO細胞にGlcNAcPI 3μMを添加するも、明瞭な変化はみられなかった(data not shown)。

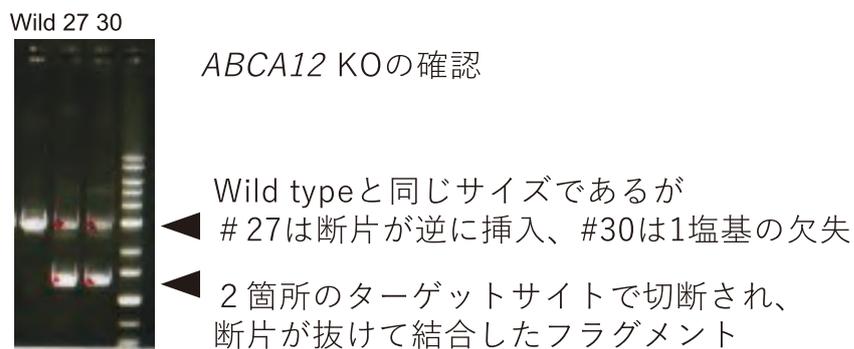


図4 *ABCA12* KO細胞のゲノムのターゲットサイトの解析

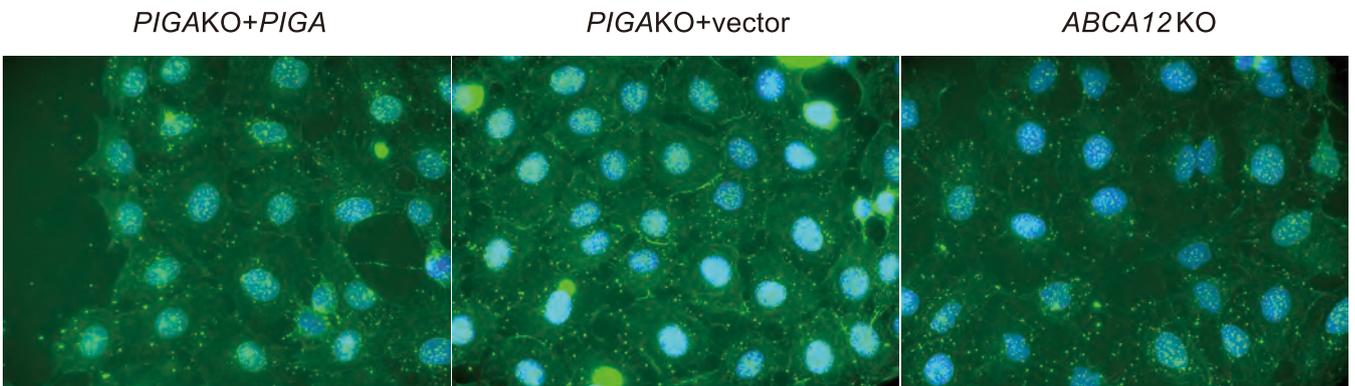


図5A *PIGA*KO細胞(#11)、そのレスキュー細胞、*ABCA12*KO細胞(#27)を高Caの条件で分化させてanti- GlcCer抗体でGlcCerの局在を確認した。他のクローンも同様であった。

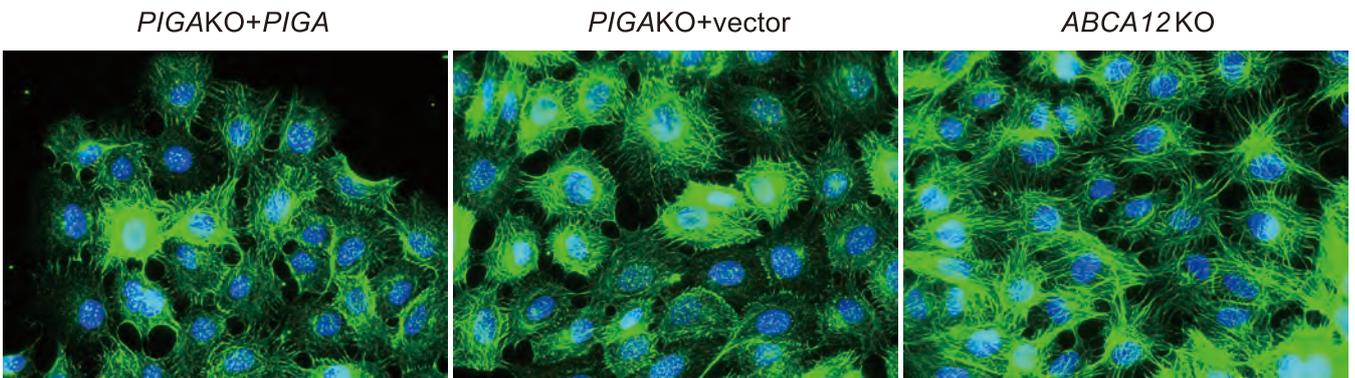


図5B *PIGA*KO細胞(#11)とそのレスキュー細胞、*ABCA12*KO細胞(#27)を高Caの条件で分化させてanti- Cer antibodyでCerの局在を確認した。他のクローンも同様であった。

4. 考察および総括

セラミドは小胞体で合成され、多くは小胞輸送によりゴルジ体に運ばれ、細胞質側でGlcCerに合成されて細胞膜のラフトに運ばれる。一部のセラミドはCeramide Transport protein (CERT) により小胞体膜から引き抜かれてゴルジ体に運ばれ、内腔にフリップしたのちにスフィンゴリエリンに合成されて、同様に細胞膜のラフトに運ばれる¹⁰⁾。lamellar bodyはTGN由来の小胞であるとされているが、その内部にGlcCerやスフィンゴリエリンを蓄積しており角層に分泌されたのちに酵素により再びセラミドとなって皮膚のバリア機能を発揮する。ABCA12はlamellar bodyの膜上であってGlcCerのトランスポーター、あるいはGlcCerをゴルジ体膜の細胞質側から内腔側に移す働きがあるとされているが¹¹⁾、実証されておらず、その作用部位は明らかでない。ABCA12が欠損するとlamellar bodyにGlcCerが積み込まれず、その結果角層のセラミドが欠損し皮膚のバリア機能が障害される。本プロジェクトではヒトの皮膚の角質細胞から樹立された細胞株HaCaT細胞をモデル細胞として使用して前述のように3種の細胞株を樹立し、主にGlcCerとセラミドの局在を観察することでそのフェノタイプを解析した。GlcCerの局在に関しては、抗体に問題があり解析が困難であった。既報によるとABCA12変異角質細胞ではGlcCerは細胞の核周囲に局在するとされている⁶⁾。蛍光標識したセラミドを外から加えると、核周囲に集結することが報告されているが、その分布はCERTの分布に一致する¹²⁾。すなわち核周囲の集積はゴルジ体での蓄積の可能性が高い。TGNから生じる小胞、Lamellar bodyにGlcCerが積みこまれないせいであると考えられる。一方で荒い繊維状の染色パターンを示したceramideの局在は、ERの可能性が考えられるがERマーカーの局在と比較する必要がある。GlcCerの輸送障害のためにその前のステップのセラミドの輸送も障害されている可能性がある。角層に含まれる7種のセラミドは6種のグルコシルセラミドとアシルグルコシルセラミド(Epidermoside)から産生されるが、スフィンゴリエリンからは2種のセラミドの産生にとどまる。グルコセレブロシダーゼの異常によるゴーシェ病においてはグルコシルセラミドからセラミドを産生できず皮膚透化バリアの形成不全を起こす。一方スフィンゴリエナーゼの異常によるニーマン・ピック病においては皮膚症状は報告されていない。すなわちグルコシルセラミド由来のセラミドがバリア形成に重要であることがわかる⁷⁾。GlcCerから産生される角層のセラミドのアミド基に付加されている脂肪酸は多くがC22からC26の長鎖脂肪酸である⁷⁾。GPI生合成の初期の遺伝子の欠損細胞で長鎖脂肪酸を含むGlcCerが減少しているというリピドミクスのデータがあり、GPI-APある

いはGPI中間体とGlcCerのERからゴルジ体への輸送が連動している可能性を示唆している¹³⁾。

今後はHaCAT細胞におけるセラミドの分布の違いを、オルガネラマーカーを加えて解析しGPI欠損による病態を解明する。角化細胞は基底細胞、有棘細胞、顆粒細胞、角質細胞と分化していくが、lamellar bodyを分泌するのは顆粒細胞である。HaCaT細胞はヒト角化細胞株で、有棘細胞、顆粒細胞、角質細胞のいずれにも分化できるとされている。それぞれの分化マーカーが知られているので顆粒細胞に分化させた上で、GlcCerやセラミド、ABCA12の分布を観察するとともに、western blotによりそれらの量を比較する。また電子顕微鏡によりlamellar bodyの形態を3者で比較する。NBDラベルのセラミドをこれらの細胞に投与し、その局在や運搬、GlcCerへの変換を確認する。HaCaT細胞は3次元培養できるので、マウスのフェノタイプが再現できるかを確認する。今回はin vitroでのGlcNAcPIの投与による効果が見えなかったため、マウスの実験までは進めなかったが、上記により病態解析が進めば、効果判定の指標がよりはっきりするので、それをもとにGlcNAcPIの投与による治療を試みる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御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を申し上げます。

(引用文献)

- 1) Kinoshita, T. Biosynthesis and biology of mammalian GPI-anchored proteins. *Open Biol* **10**, 190290, doi: 10.1098/rsob.190290 (2020).
- 2) Kuki, I., Yukitoshi Takahashi, Shin Okazaki, Hisashi Kawawaki, Eiji Ehara, Norimitsu Inoue, Taroh Kinoshita and Yoshiko Murakami Case report on vitamin B6 responsive epilepsy due to inherited GPI deficiency. *Neurology* **81**, 1467-1469., doi: DOI: 10.1212/WNL.0b013e3182a8411a (2013).
- 3) Tanigawa, J., Mimatsu, H., Mizuno, S., Okamoto, N., Fukushi, D., Tominaga, K., Kidokoro, H., Muramatsu, Y., Nishi, E., Nakamura, S., Motooka, D., Nomura, N., Hayasaka, K., Niihori, T., Aoki, Y., Nabatame, S., Hayakawa, M., Natsume, J., Ozono, K., Kinoshita, T., Wakamatsu, N. & Murakami, Y. Phenotype-genotype correlations of PIGO deficiency with variable phenotypes from infantile lethality to mild learning difficulties. *Hum Mutat* **38**, 805-815, doi: 10.1002/humu.23219 (2017).
- 4) Tarutani, M., Itami, S., Okabe, M., Ikawa, M., Tezuka,

- T., Yoshikawa, K., Kinoshita, T. & Takeda, J. Tissue specific knock-out of the mouse Pig-a gene reveals important roles for GPI-anchored proteins in skin development. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 7400-7405 (1997).
- 5) Hara-Chikuma, M., Takeda, J., Tarutani, M., Uchida, Y., Holleran, W. M., Endo, Y., Elias, P. M. & Inoue, S. Epidermal-specific defect of GPI anchor in Pig-a null mice results in Harlequin ichthyosis-like features. *J Invest Dermatol* **123**, 464-469, doi: 10.1111/j.0022-202X.2004.23227.x (2004).
- 6) Yanagi, T., Akiyama, M., Nishihara, H., Sakai, K., Nishie, W., Tanaka, S. & Shimizu, H. Harlequin ichthyosis model mouse reveals alveolar collapse and severe fetal skin barrier defects. *Hum Mol Genet* **17**, 3075-3083, doi: 10.1093/hmg/ddn204 (2008).
- 7) Hamanaka, S., Hara, M., Nishio, H., Otsuka, F., Suzuki, A. & Uchida, Y. Human epidermal glucosylceramides are major precursors of stratum corneum ceramides. *J Invest Dermatol* **119**, 416-423, doi: 10.1046/j.1523-1747.2002.01836.x (2002).
- 8) Guerrero, P. A., Murakami, Y., Malik, A., Seeberger, P. H., Kinoshita, T. & Varon Silva, D. Rescue of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Protein Biosynthesis Using Synthetic Glycosylphosphatidyl inositol Oligosaccharides. *ACS Chem Biol* **16**, 2297-2306, doi: 10.1021/acscchembio.1c00465 (2021).
- 9) Wilson, V. G. Growth and differentiation of HaCaT keratinocytes. *Methods Mol Biol* **1195**, 33-41, doi: 10.1007/7651_2013_42 (2014).
- 10) Ishibashi, Y., Kohyama-Koganeya, A. & Hirabayashi, Y. New insights on glucosylated lipids: metabolism and functions. *Biochim Biophys Acta* **1831**, 1475-1485, doi: 10.1016/j.bbaliip.2013.06.001 (2013).
- 11) Mitsutake, S., Suzuki, C., Akiyama, M., Tsuji, K., Yanagi, T., Shimizu, H. & Igarashi, Y. ABCA12 dysfunction causes a disorder in glucosylceramide accumulation during keratinocyte differentiation. *J Dermatol Sci* **60**, 128-129, doi: 10.1016/j.jdermsci.2010.08.012 (2010).
- 12) Charruyer, A., Bell, S. M., Kawano, M., Douangpanya, S., Yen, T. Y., Macher, B. A., Kumagai, K., Hanada, K., Holleran, W. M. & Uchida, Y. Decreased ceramide transport protein (CERT) function alters sphingomyelin production following UVB irradiation. *J Biol Chem* **283**, 16682-16692, doi: 10.1074/jbc.M800799200 (2008).
- 13) Loizides-Mangold, U., David, F. P., Nesatyy, V. J., Kinoshita, T. & Riezman, H. Glycosylphosphatidylinositol anchors regulate glycosphingolipid levels. *J Lipid Res* **53**, 1522-1534, doi: 10.1194/jlr.M025692 (2012).

皮膚角化及びメラニン沈着と毛髪中 microRNA 量の関連性解析

芝浦工業大学システム理工学部生命科学科分子細胞毒性研究室

矢嶋 伊知朗

Skin is exposed to various environmental factors and various stresses in addition to natural aging, which in turn causes various types of damage to the skin. Ultraviolet rays are one of the environmental factors well known to cause skin damage, and are known to induce skin keratinization and melanin pigmentation, resulting in adverse effects such as wrinkles, spots, and freckles. It is also known that various heavy metals contained in drinking water and food can adversely affect the skin. In particular, arsenic is contained in large amounts in marine products (especially hijiki) that Japanese people consume on a daily basis, and many cases of chronic exposure of arsenic inducing skin keratinization and melanin pigmentation have been reported in the whole world. The purpose of this study was to 'clarify the expression pattern of miRNAs related to skin keratinization and melanin pigmentation in body hair and the relationship between UV irradiation and arsenic-induced skin keratinization and melanin deposition'. We focused on 11 miRNAs and analyzed their expression patterns in mouse body hair and cultured cell lines derived from skin tissues. In body hairs, miRNAs showed characteristic expression patterns in response to UV and arsenic exposure, and common expression patterns were also observed. In the cell culture experiments, a human skin keratinocyte cell line (HaCaT) and a melanocyte-based cultured cell line (B10F10) were used to analyze miRNA expression patterns. Keratinocyte-specific or melanocyte-specific expression patterns were identified, as well as miRNAs which expression was significantly altered by combined exposure to UV light and arsenic. These results suggest that analysis of miRNA expression patterns using body hair may contribute to the prevention and therapy of skin diseases caused by UV and arsenic exposure.

1. 緒言

皮膚は様々な環境因子に曝され、加齢などの自然老化に加えた様々なストレスを受け、それにより皮膚は様々なダメージを受けている。例えば紫外線は誰もが知る皮膚ダメージを引き起こす環境因子の一つであり、皮膚角化やメラニン沈着を誘導し、しわ・シミ・ソバカスなどの悪影響を引き起こすことが知られている。我々もこれまでの研究において、紫外線照射が皮膚ダメージ、特にDNA損傷を誘発することをヒト及びマウスのレベルで実証している¹⁾。

また、飲用水や食品に含まれる様々な重金属が体内から皮膚に悪影響を及ぼすことも知られている。特にヒ素は、例えば日本人が日常的に摂取する海産物(特にヒジキ)に多量に含まれており、海外ではヒ素の慢性的な摂取が皮膚角化やメラニン沈着を誘発するケースが多数報告されている。我々の研究でも、ヒ素曝露と皮膚疾患、皮膚メラニン沈着の関連性をヒトレベルで明らかにし、さらにマウスモデルの樹立にも成功している^{2,3)}。

これまでの様々な研究により、環境因子による皮膚のしわ・シミ・ソバカスなどの発症機構が明らかにされつつあ

るものの、同じしわ・シミ・ソバカスであっても、環境因子によってその発症機構には大きな違いが存在し、発症原因とその機構をあらかじめ知っておくことが、より良い予防や治療には必要不可欠である。

近年、リボ核酸(RNA)の一種で極めてサイズの小さい、マイクロRNA (microRNA, miRNA) が体内で数千種類発現しており、様々な疾患の発症や抑制に作用していることが明らかにされている、様々なmiRNAの組み合わせで検出することにより、多種の疾患を診断、或いは予知することが可能となっている。また、毛髪中(非侵襲的に採取可能)に含まれるmiRNAの量と種類のパターンが、様々な皮膚疾患の診断に利用可能であることが近年報告されている。

我々はこれまでの実験マウスを用いた予備的検討から、紫外線曝露・ヒ素曝露によって体毛中のmiRNA発現(正確には「含有量」だが、ここでは「発現量」に統一する)パターンに変化が生じ、特に皮膚角化やメラニン沈着に關与するmiRNAが大きく変化していることを発見した(図1参照)。

我々は、他研究者による研究や、我々自身の予備的検討結果から、非侵襲的に毛髪を採取(毛根は含まない)しmiRNA発現パターンを明らかにすることで、皮膚に現れている(或いはこれから現れるであろう)しわ・シミ・ソバカスの発症原因やその発症機構をオーダーメイドで明らかにすることが可能となり、様々な予防法や治療法を提供可能になるのではないかと着想した。この将来的なゴールを見据え、本研究では、皮膚角化やメラニン沈着関連miRNAの体毛での発現パターンと紫外線照射及びヒ素誘



Analysis of the relationship between skin keratinization and melanin pigmentation and microRNA levels in hair

Ichiro Yajima

Molecular and Cellular Toxicology, Department of Bioscience and Engineering, College of Systems Engineering and Science, Shibaura Institute of Technology

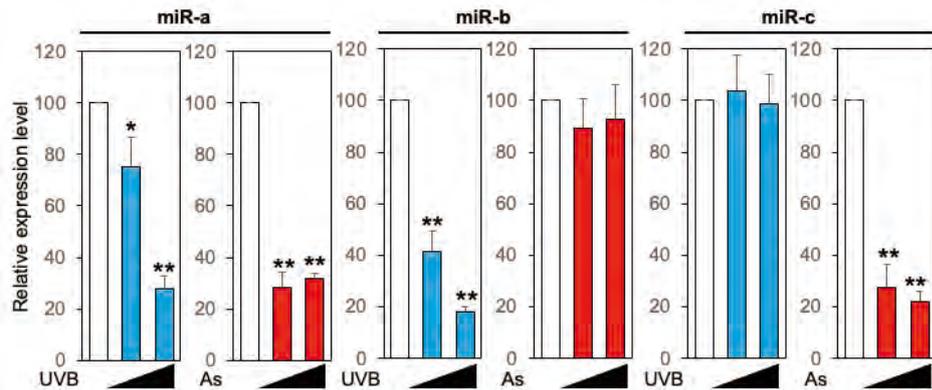


図1 皮膚角化・メラニン沈着関連miRNAの体毛中miRNAの紫外線曝露 (UVB) 及びヒ素曝露 (As) による変化 (QPCRによる解析)。同じmiRNAでも、環境因子によって体毛中レベルの変化は異なっている。

発性皮膚角化及びメラニン沈着の関連性を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

2.1. マウス体毛からのmiRNA精製

マウス背側体毛を剪毛し、エタノールにて洗浄・乾燥後1.5ml tubeに移し、凍結保存した。miRNAの精製はHigh Pure miRNA Isolation Kit (Roche)及びTRIzol RNA Isolation Reagents (Thermo Fisher)を使用し、プロトコールに沿って精製を行った。精製したmiRNAは -80°C にて保存した。

2.2. 培養細胞と培養方法

細胞はヒト正常皮膚角化細胞株 (HaCaT)、マウスメラノーマ細胞株 (B10F10) を用いた。HaCaTの培養液はDMEM+10% FBS、B16はRPMI-1640+10% FBSで 37°C 、 CO_2 5%の環境下で培養を行った。曝露試験においては6-well plateまたは24-well plateに細胞を規定量播種し、24時間後に1% FBS入り培養液に置換した。その24時間後より曝露を開始した。ヒ素曝露については100mM stock溶液を作成、培養液にて希釈して曝露を行った。紫外線曝露では、細胞をPBSで洗浄後、PBSを2ml/well加え、紫外線照射 (UVB (365nm) $15\text{mJ}/\text{cm}^2$ または $20\text{mJ}/\text{cm}^2$) を行った。紫外線照射後、PBSをアスピレーターで吸収し、1% FBS入り培養液に置換した。その後 37°C 、 CO_2 5%の環境下で24時間培養を行った。

2.3. 細胞生存率測定とメラニン量測定

細胞生存率測定はCell Counting Kit-8 (DOJINDO) を用いて行った。メラニン量測定は以下の通り。曝露試験を行った細胞をPBSで2回洗浄しPBSを吸引後PBSを500 μl ずつ加え、スクレイパーで細胞を1.5ml tubeに回収する。2000g, 1minの条件で遠心を行い、上清を捨て500 μl の

1N NaOH/10% DMSOを加え、軽くボルテックスをおこなった後、 80°C で2時間処理を行う。2時間後、96well plateに各チューブから100 μl ずつ分注し、405nmで吸光度を測定、メラニン産生量を算出する。細胞生存率データによる補正を行うことで、細胞あたりのメラニン量を計算する。

2.4. cDNA合成とQPCR

細胞からのmiRNAを含むtotal RNAの精製はHigh Pure miRNA Isolation Kit (Roche) を用いて行った。miRNAのcDNA及びQPCRはMir-X™ miRNA qRT-PCR TB Green® Kit (TaKaRa)を使用した。

3. 結果

3.1. 皮膚角化・メラニン沈着関連miRNAの毛髪中発現量の測定

我々の予備的検討結果より、皮膚角化とメラニン沈着両方に関与するmiRNA (miR-a, -b, -cが紫外線及びヒ素曝露によって体毛中のパターンに変化が起きることが明らかとなっている (図1参照)が、まだ未解析の同様の機能を有する他のmiRNA (miR-d, -e, -fなど)の解析を行った。マウスに対し、脱毛部への紫外線照射またはヒ素飲水投与を6ヶ月間実施し、回収した体毛 (毛根は含まないため抜毛ではなく剪毛。非侵襲的)を用いて、QPCRによって目的のmiRNA量及びパターンをQPCR法にて解析を行った (図2-1, 2-2)。miR-dは紫外線曝露及びヒ素曝露によって有意に減少し、濃度依存的な傾向が観察された。miR-eは紫外線曝露及びヒ素曝露によって有意に減少し、濃度依存的な傾向が観察された。miR-fは紫外線曝露では有意に減少し、ヒ素曝露によって有意に上昇した。miR-gは紫外線曝露によって非常に強く発現量の上昇が観察されたが、ヒ素曝露では変化は認められなかった。miR-hは紫外線曝露では紫外線強度依存的に有意に減少したが、ヒ素曝露では濃

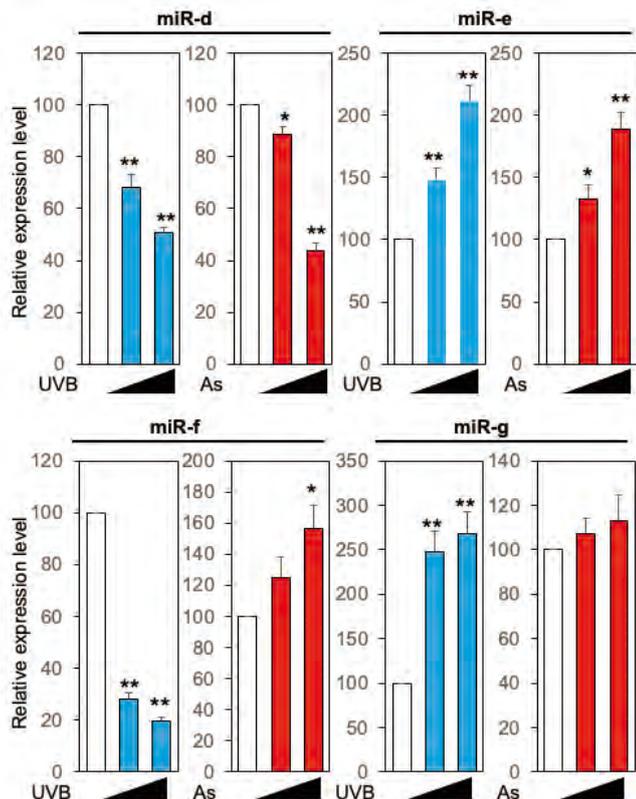


図 2-1 皮膚角化・メラニン沈着関連 miRNA (miR-d, -e, -f, -g) の体毛中 miRNA の紫外線曝露 (UVB) 及びヒ素曝露 (As) による変化。

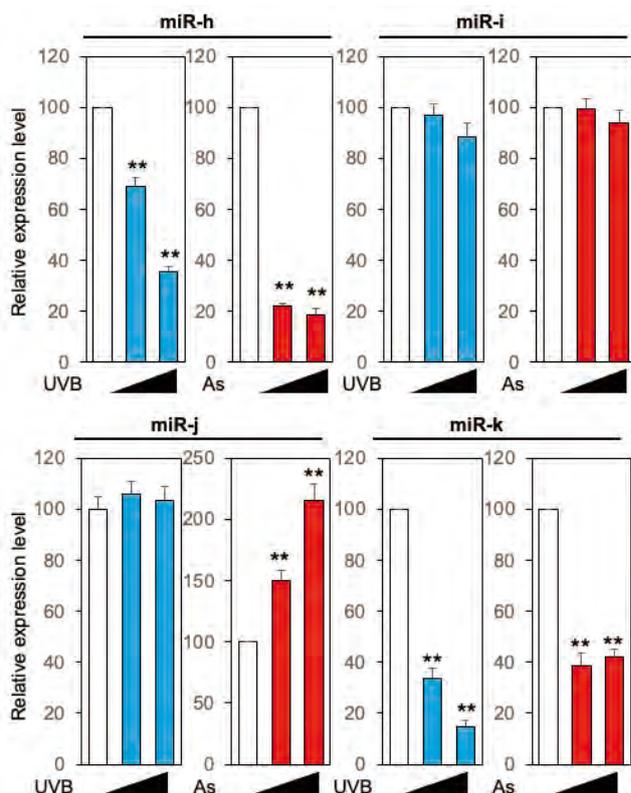


図 2-2 皮膚角化・メラニン沈着関連 miRNA (miR-d, -e, -f, -g) の体毛中 miRNA の紫外線曝露 (UVB) 及びヒ素曝露 (As) による変化。

度に関係なく、強い発現低下が観察された。miR-iでは紫外線曝露、ヒ素曝露ともに発現量の有意な変化は認められなかった。miR-jは紫外線曝露による発現変化は認められなかったが、ヒ素曝露では有意な濃度依存的発現上昇が観察された。miR-kは紫外線曝露による濃度依存的発現上昇が観察され、ヒ素曝露では濃度に関係なく、強い発現低下が観察された。

3. 2. 培養細胞株における紫外線曝露及びヒ素曝露によるmiRNA発現パターン解析

in vivo 実験より同定された体毛中の miRNA がどのような機構で発現制御されているのかを、培養細胞を用いて解析をおこなった。紫外線曝露やヒ素曝露による皮膚疾患は皮膚角化細胞及びメラノサイトでの発症が大きく、本研究ではそれらの影響を細胞レベルで解明するために、ヒト皮膚角化細胞株 (HaCaT) 及びマウス B16F10 メラノーマ細胞株に対して紫外線及びヒ素を個別及び複合曝露し、miRNA の発現パターンを解析した (図 3, 4)。まず、メラノサイトへの影響を調査するためにメラノサイトのモデル細胞として多用されている B16F10 細胞株を用いた発現パターン解析を行った (図 3-1, 3-2)。なお、本実験では 3. 1. で調査した miRNA のうち、発現パターンに大きな

変化が観察された miR-a, b, c, d, e, f, h, k の 8 種類を対象とした。miR-a は紫外線、ヒ素曝露ともに発現量が有意に低下し、複合曝露でも同程度の低下が観察された。miR-b は紫外線曝露によって発現量が有意に低下し、ヒ素曝露では有意な変化は観察されなかった。複合曝露では有意な低下が見られた。miR-c では、紫外線曝露、ヒ素曝露、複合曝露ともに有意な変化は観察されなかった。miR-d では、紫外線曝露によって有意な発現低下が観察され、ヒ素曝露では低レベルではあるが、有意な発現上昇が観察された。複合曝露では発現量に有意な減少が観察された。miR-e は紫外線曝露及びヒ素曝露とともにわずかな発現上昇が観察され、複合曝露では極めて強い発現の上昇が観察された。miR-f は、紫外線曝露では発現が強く抑制され、ヒ素曝露では変化は観察されなかった。複合曝露では発現が強く抑制された。miR-h では紫外線曝露、ヒ素曝露ともに発現量の有意な低下が観察され、複合曝露では最も強く発現が抑制された。miR-k では紫外線曝露、ヒ素曝露ともに発現量の有意な低下が観察され、複合曝露では最も強く発現が抑制された。

次に、皮膚角化細胞への影響を調査するために、角化細胞モデルである HaCaT 細胞を用いた発現パターン解析を行った (図 4-1, 4-2)。miR-a では、紫外線曝露、ヒ素曝露、

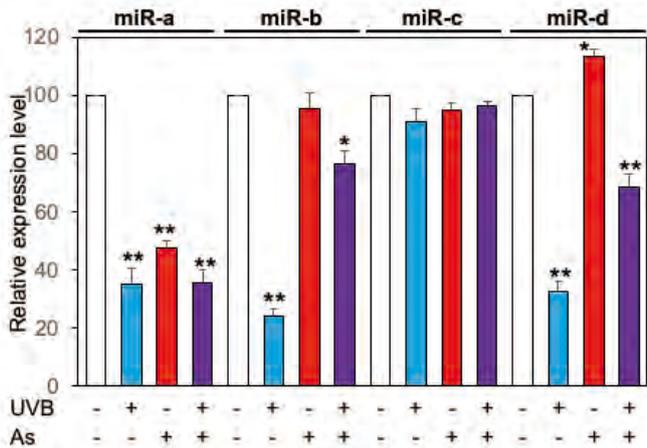


図3-1 皮膚角化・メラニン沈着関連miRNA (miR-a, -b, -c -d) のB16細胞中miRNAの紫外線曝露 (UVB) 及びヒ素曝露 (As)による変化。

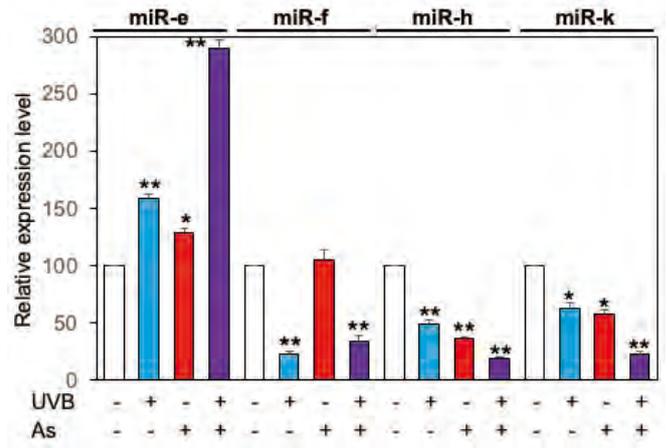


図3-2 皮膚角化・メラニン沈着関連miRNA (miR-e, -f, -h, -k) のB16細胞中miRNAの紫外線曝露 (UVB) 及びヒ素曝露 (As)による変化。

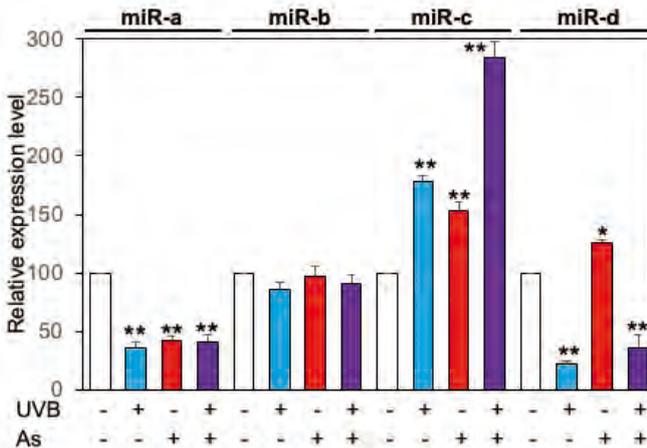


図4-1 皮膚角化・メラニン沈着関連miRNA (miR-a, -b, -c -d) のHaCaT細胞中miRNAの紫外線曝露 (UVB) 及びヒ素曝露 (As)による変化。

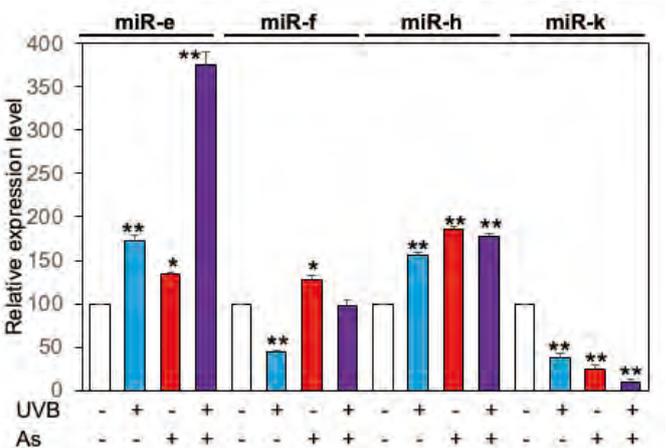


図4-2 皮膚角化・メラニン沈着関連miRNA (miR-e, -f, -h, -k) のHaCaT細胞中miRNAの紫外線曝露 (UVB) 及びヒ素曝露 (As)による変化。

複合曝露ともに同レベルで有意な発現低下が観察された。miR-bでは紫外線曝露、ヒ素曝露、複合曝露ともに有意な変化は観察されなかった。miR-cでは紫外線曝露、ヒ素曝露ともに有意な発現上昇が観察され、複合曝露ではより強い発現上昇が観察された。miR-dでは、紫外線曝露では強い発現低下が観察され、ヒ素曝露ではわずかな発現上昇が観察された。複合曝露では強い発現低下が観察された。miR-eでは紫外線曝露、ヒ素曝露ともに僅かな発現上昇が観察され、複合曝露では非常に高いレベルでの発現上昇が観察された。miR-fでは紫外線曝露では有意に発現量が低下し、ヒ素曝露では有意に上昇した。複合曝露では有意な発現変化は観察されなかった。miR-kでは紫外線曝露、ヒ素曝露、複合曝露ともに発現量の有意な低下が観察された。その中でも、複合曝露が最も発現量の低下が観察された。

4. 考 察

4. 1. 皮膚角化・メラニン沈着関連miRNAの体毛中miRNAの紫外線曝露 (UVB) 及びヒ素曝露 (As) による変化

本研究では、皮膚角化やメラニン沈着関連miRNAの体毛での発現パターンと紫外線照射及びヒ素誘発性皮膚角化及びメラニン沈着の関連性を明らかにすることを目的として、曝露実験によるマウス体毛内のmiRNAの定量を行った。miRNAの種類によって紫外線曝露とヒ素曝露が同じ発現パターンを示す場合もあれば、逆のパターン(片方が発現上昇し、もう片方が発現低下)もあり、非常に多様な発現制御機構を持つことが考えられる。miR-eは今回の候補miRNAの中で唯一紫外線曝露でもヒ素曝露でも発現量

が上昇し、かつ濃度依存性を示していることから、miR-eは紫外線曝露とヒ素曝露による疾患の発症メカニズムに共通して関与している可能性を示唆している。一方で、miR-a, -d, -h, -kは紫外線曝露でもヒ素曝露でも発現量が有意に減少しており、紫外線曝露とヒ素曝露による疾患の発症に共通するメカニズムではこれらmiRNAの発現を減少させること、つまりはターゲット遺伝子の発現を阻害することが重要な役割を果たすと考えられる。miR-b, -gは紫外線曝露でその発現量をそれぞれ低下、上昇させるが、ヒ素曝露での変化は観察されなかったことから、これらのmiRNAは紫外線曝露関連疾患にのみ関与していることが示唆される。一方、miR-c, jはヒ素曝露でその発現量をそれぞれ上昇、低下させるが、紫外線曝露での変化は観察されなかったことから、これらのmiRNAはヒ素曝露関連疾患にのみ関与していることが示唆される。

4. 2. 皮膚角化・メラニン沈着関連miRNAの培養細胞中miRNAの紫外線曝露 (UVB) 及びヒ素曝露 (As)による変化

皮膚及び体毛などを対象とした実験は個体への影響を解析するためには有用だが、細胞種ごとの解析には不適である。そのため我々は紫外線曝露やヒ素曝露による皮膚疾患で影響を受けやすい細胞である角化細胞とメラノサイト系譜細胞株を用いた細胞種特異的な発現パターン解析を行った。メラノサイト系譜であるB16F10細胞では曝露の種類や複合曝露による大きな変化が観察された。miR-a, -h, -kでは紫外線曝露、ヒ素曝露、複合曝露ともに発現量の有意な低下が観察され特にmiR-kは各単独曝露の影響が加算されて複合曝露に対する影響となって現れたと考えられた。これらのmiRNAは紫外線曝露、複合曝露関連疾患に共通し、メラノサイトを通じて関与している可能性が示唆された。miR-b, -d, -fは紫外線曝露では共通して発現量が大きく減少している一方、ヒ素曝露では変化しないあるいはわずかに発現上昇しているのみであることから、これらのmiRNAはメラノサイトでは紫外線曝露に対してのみ応答、機能している可能性が示唆される。miR-eは紫外線曝露、ヒ素曝露ともに発現が僅かに上昇している程度だが、複合曝露ではその発現量が大きく増大している。これらの結果は、miR-eが特に複合曝露によって発現誘導されること、複合曝露による疾患発症に特に関与している可能性を示唆している。

角化細胞系譜であるHaCaT細胞でもまた、細胞系譜特異的な発現パターンが観察された。miR-a, -hは紫外線曝露、ヒ素曝露、複合曝露ともに同程度のレベルで発現がそれぞれ減少、上昇していた。miR-bは変化が認められなかったことから、B16F10細胞での紫外線曝露特異的な発現変化という結果とともに考えると、紫外線曝露によるメラノ

サイトを起点とする疾患発症に関与していると考えられる。miR-d, -fはB16F10細胞におけるmiR-b, -d, fと類似したパターン、すなわち紫外線曝露による発現の減少に大きく寄与していることから、特にmiR-d, -fはメラノサイトと角化細胞の紫外線曝露に対する応答に共通して機能していることを強く示唆している。

4. 3. *in vivo*研究と*in vitro*研究の相違について

体毛は角化細胞からのケラチン産生とメラノサイトからのメラニン産生により構成されていることから、体毛でのmiRNAの量的パターンと角化細胞及びメラノサイトでのパターンには類似性が存在すると考えられる。本研究では、このような類似性についても検討した。miR-aは体毛、メラノサイト、角化細胞のいずれでも紫外線曝露、ヒ素曝露で発現低下が観察され、miR-e, -kは体毛、メラノサイト、角化細胞のいずれでも紫外線曝露、ヒ素曝露で発現上昇が観察されており、miR-a, -e, -kを体毛で検出、解析することは皮膚での各細胞の現象を検出することとなり、関連疾患マーカーとして有望であると考えられる。miR-bは体毛とメラノサイトでの発現パターンが類似していることから、体毛での検出によりメラノサイトでの現象のみを検出するマーカーとして有効であると考えられる。

4. 4. 複合曝露とmiRNA発現パターンについて

本研究では、培養細胞実験において紫外線曝露とヒ素曝露の複合曝露実験も実施した。ヒ素曝露は主に経口摂取より皮膚に蓄積し、紫外線曝露は屋外活動により日常的に引き起こされることから、ヒ素曝露地域では自ずと複合曝露が誘発されることになる。今回解析したmiRNAのうちmiR-eはメラノサイトでも角化細胞でも、単独曝露による効果よりも複合曝露による効果が非常に強く、両曝露に関連する疾患に共通するメカニズムに深く関与していることを示唆している。また、複合曝露が特定のmiRNAの発現を相乗的に変化させることを示しており、miRNAの解析においても複合曝露を念頭に置いた新たな解析手法が必要であることを示唆している。

4. 5. まとめ

今回用いた11種類のmiRNAに対する解析では、4種類の疾患マーカーとしての有望な候補が見いだされた。本研究では11種類であったが、他にも皮膚疾患に関連すると考えられるmiRNAは多数存在しており、これらの候補を網羅的に検証することでより多くの疾患マーカーの同定が可能となると期待できる。本研究で同定されたmiRNAは直接疾患発症に機能的に関与している可能性もあり、miRNAやmimic RNAを使用した研究を今後実施することで、機能との直接的な関わりを証明できると期待できる。

将来的には本研究と今後の応用的研究が皮膚疾患の余地・予防に大きく寄与することを期待している。

(引用文献)

- 1) Masashi Kato, Machiko Iida, Yuji Goto, Takaaki Kondo, Ichiro Yajima Kato M. and Yajima I. Sunlight exposure-mediated DNA damage in young adults. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 20: 1622-1628. 2011.
- 2) Ichiro Yajima, Mayuko Y Kumasaka, Machiko Iida, Reina Oshino, Hiroko Tanihata, Aeorangajeb Al Hossain, Nobutaka Ohgami, Masashi Kato. Arsenic-mediated hyperpigmentation in skin via NF-kappa B/ endothelin-1 signaling in an originally developed hairless mouse model. *Arch Toxicol*. 91: 3507-3516. 2017.
- 3) Ichiro Yajima, Mayuko Y Kumasaka, Shoko Ohnuma, Nobutaka Ohgami, Hisao Naito, Hossain U Shekhar, Yasuhiro Omata, Masashi Kato. Arsenite-Mediated Promotion of Anchorage-Independent Growth of HaCaT Cells through Placental Growth Factor. *J Invest Dermatol*, 135: 1147-1156. 2015.

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?—

日本薬科大学薬学部生命科学薬学分野

山本 博之

The skin is the most external part of the body and is strongly influenced by light. Previous study, the effects of light on the skin have been evaluated mainly in terms of the biological effects of UV light, which has high energy, but the mechanisms of skin tissue response to visible light are still unclear. In this study, we investigated the light response of skin, a non-visual tissue, focusing on photoreceptors. Photoreceptor expression in skin tissue and skin keratinocytes was evaluated by RT-PCR, and multiple opsin receptor mRNA expressions were found in rat skin tissue and FRSK cells. The expression of enzymes related to the visual cycle, which is involved in the maintenance of photoreceptor activity, was also examined by RT-PCR. The results showed that all enzymes involved in the visual cycle were expressed in rat skin tissue. Retinal metabolites in FRSK cells after light exposure were detected by HPLC. The results showed that 11-cis-retinal was converted to all trans-retinal by exposure to light. These results indicate that photoreceptors expressed on keratinocytes are modulated in their activity by exposure to light.

1. 緒言

皮膚は最も外側に位置する組織であり、外界から様々な物理的的刺激を受けている。それらの刺激の中でも光は生活する上で避けることができないものである。生体に対する光の影響は、エネルギーの大きな紫外線の影響を中心に評価がされてきた。紫外線は組織において活性酸素種の増加やDNA障害などを介して、色素沈着や細胞外マトリックスの分解、炎症の惹起などを引き起こす¹⁾。紫外線により引き起こされるこれらの応答は、シミやしわといった皮膚の老化現象と類似していることから光老化と呼ばれる。一方、紫外線よりも長波長の可視光線は皮膚の美容領域で利用されており、皮膚に存在する細胞は表1のように、浴びる光の波長によりペプチドやプロテアーゼの産生、セラミド合成、メラニン産生などの細胞応答が起こることが報告されている。このような光線の曝露から細胞応答が起きる反応には、光線の刺激が化学シグナルに変換されて細胞応答が起こると考えられるが、皮膚における光応答の仕組みは不明な点が多い。皮膚が光を認識する機構として、光受容体として機能するオプシタンパク質の研究が進められている²⁾。オプシタンパク質はGタンパク質共役型受容体に分類され、サブタイプの違いによって認識する波長が異なる。眼の網膜では、青、緑、赤の波長を受容するオプシタンパク質が網膜の錐体細胞に発現しており外界からの光の色の違いを識別している。また、その活性には、オ

プシタンパク質に11-cis レチナールが結合していることが重要である。オプシタンパク質に結合する11-cis レチナールは光線の曝露によってall trans-レチナールに変換された後、オプシタンパク質から解離される。そのため、11-cis レチナールを失ったオプシタンパク質は失活する。眼では解離したall trans-レチナールが再び11-cis レチナールとなりオプシタンパク質に結合する経路(図1 視サイクル)が存在し、オプシタンパク質が活性を持続できる環境が整っている³⁾。そこで本研究では、光線の曝露による皮膚の活性化機構についてオプシタンパク質に着目し、初めに皮膚に発現するオプシン類の探索を

表1 波長による皮膚由来細胞の応答の違い

	紫外	青色	緑色	赤色
コラーゲン合成	↓			↑
プロテアーゼ産生	↑	↑	↑	
セラミド合成				↑↑
ヒアルロン酸合成				↑↑
メラニン産生	↑	↑		↓

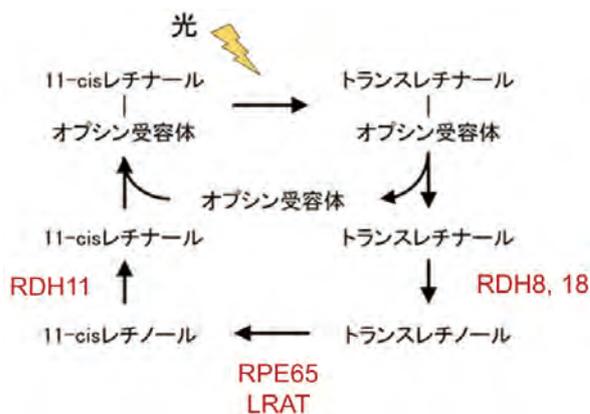


図1 視サイクル



Activation mechanism of photoreceptors expressed in skin tissue

Hiroyuki Yamamoto

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nihon Pharmaceutical University

行った。また、皮膚に発現するオプシンが光を受けて活性を維持するために必要な視サイクルが皮膚においても存在しているのかを検証した。さらに、皮膚に発現するオプシントタンパク質が光を受けて活性を調整しているのかをレチナール代謝産物を検出することで評価した。

2. 方法

2.1. 実験動物と培養細胞

実験には、Sprague-Dawley ラット (SDR) および弘前小眼球ラット (Hirosaki Small Eye Rat; HiSER) を用いた。HiSER ラットは、SDR より自然突然変異により発生したラットであり、常染色体劣性遺伝性かつ進行性の水晶体の白濁や退縮、網膜の剥離などの異常を示すラットである⁴⁾。ラットの飼育は、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 50%、明暗を 12 時間サイクルに維持された飼育室にて、摂餌・飲水は自由に摂取できる環境で飼育した。本実験は日本薬科大学動物実験倫理委員会によって承認を受けて実施した。

また、実験に用いたラット胎児角化細胞 (FRSK) は、JCRB 細胞バンク (国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所) より分譲されたものを用いた。FRSK 細胞は、10% FCS を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) で、 CO_2 インキュベーターを用いて 5% CO_2 、 37°C の条件で培養した。

2.2. ラット胎児角化細胞に発現する光受容体および視サイクル関連酵素 mRNA 発現の検討

FRSK 細胞を 10cm シャーレに 1×10^7 細胞となるように播種した。24 時間後、培地を除去した後、RNA 抽出用試薬 Isogen を用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA は、逆転写酵素 (ReverTra Ace、東洋紡) を用いて cDNA を合成した。また、SDR および HiSER より背部皮膚と眼組織を採取し、FRSK 細胞と同様に cDNA を調製した。調製した cDNA を用いて、光受容体および視サイクル関連酵素遺伝子の発現を PCR 法により検討した。光受容体は、OPN1-SW、OPN1-MW/LW、OPN2、OPN3、OPN4 および OPN5 mRNA の発現を PCR 法により検討した。また、視サイクル関連酵素はレチノールデヒドロゲナーゼ (RDH) 8、RDH12、RDH11、レシチン-レチノールアシルトランスフェラーゼ (LRAT) およびレチノイドイソメロヒドロラーゼ (RPE) 65 mRNA の発現を PCR 法により評価した。

2.3. ラット胎児角化細胞に発現する RPE65 タンパク質の検出

FRSK 細胞を 10cm シャーレに 1×10^7 細胞となるように播種した。24 時間後、培地を除去した後、PBS で細胞を洗浄後、RIPA 緩衝液で細胞を可溶化してタンパク質を抽

出した。抽出液は遠心分離後、上清を回収してウエスタンブロットの試料とした。ウエスタンブロットは、12% アクリルアミドゲルにて試料を電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。転写したニトロセルロース膜は、スキムミルクでブロッキング後、抗 RPE65 抗体 (3,000 倍、GeneTex 社)、2 次抗体として HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (10,000 倍、SeraCare 社) で反応させたのち、RPE65 タンパク質をイムノスターゼータ (和光純薬) で検出した。

2.4. レチナール代謝産物の検出

10cm シャーレに 1×10^7 細胞となるように播種した。24 時間培養後、細胞を 350nm-850nm の波長を含む LED 光で 15 分間、曝露した。曝露後、10 分および 30 分の細胞からレチナール代謝産物およびレチノール代謝産物を抽出した。また、LED 光で曝露していないものを非照射細胞として用いた。レチナール代謝産物は、ホルムアルデヒド法⁵⁾、レチノール代謝産物はヘキサノール⁶⁾により抽出した。すなわち、レチナール代謝産物は、PBS で洗浄後、6M ホルムアルデヒドで固定した後、レチナール代謝産物をジクロロメタン/n-ヘキサノールで分配抽出した。抽出物は遠心エバポレーターにて乾固させた。また、レチノール代謝産物は、PBS で洗浄後、エタノールで除タンパク質した後、ジクロロメタン/n-ヘキサノール溶液によりレチノールを抽出した。抽出物は遠心エバポレーターにて乾固させた。抽出したレチナール代謝産物とレチノール代謝産物はメタノール/リン酸緩衝液で溶解後、逆相カラム (コスモシール Cholesterol カラム、ナカライテスク) を用いた高速液体クロマトグラフィーにより分離し、溶出時間からレチノールおよびレチナール代謝産物の分子型を評価した。

3. 結果

3.1. 角化細胞および皮膚組織に発現する光受容体の探索

皮膚組織に発現する光受容体の探索を行った。その結果、ラット背部の皮膚組織には OPN1-SW、OPN3、OPN4 および OPN5 mRNA の発現が認められた (図 2-A)。ラットの皮膚に発現する光受容体の波長と活性の関連を図 2-B に示す。このことから、皮膚組織には UV-A に相当する 380nm 付近から緑色の 550nm 付近の波長に反応する光受容体が発現することが示された。紫外線や青色光などの短波長の光は組織への透過力が弱く表皮や真皮にまでしか到達しない。そこで、皮膚で最も外部に位置する表皮の主要な細胞である角化細胞に与える影響が大きいと考え、角化細胞に発現する光受容体を RT-PCR 法にて解析した。その結果、FRSK 細胞には OPN1-SW、OPN2、OPN3 および OPN5 mRNA の発現が認められた (図 2-A)。FRSK 細胞に発現する光受容体と活性化される波長の関係から、皮膚組織と

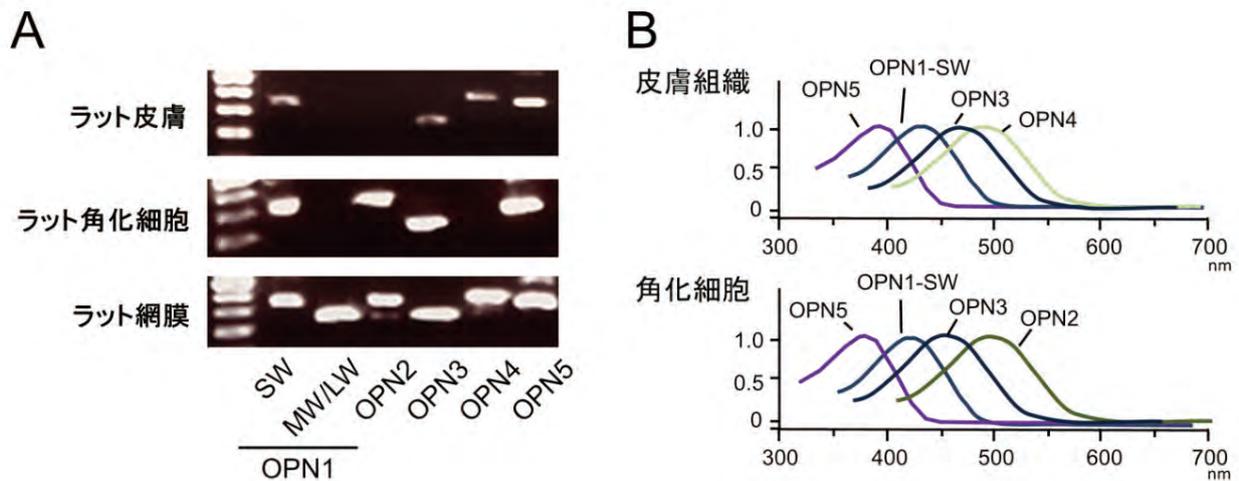


図2 ラット皮膚および皮膚角化細胞における光受容体遺伝子の発現検討

A: RT-PCR法によるラット皮膚およびラット角化細胞に発現する光受容体mRNAの検討
 B: 皮膚組織および角化細胞に発現する光受容体と応答する波長の関係

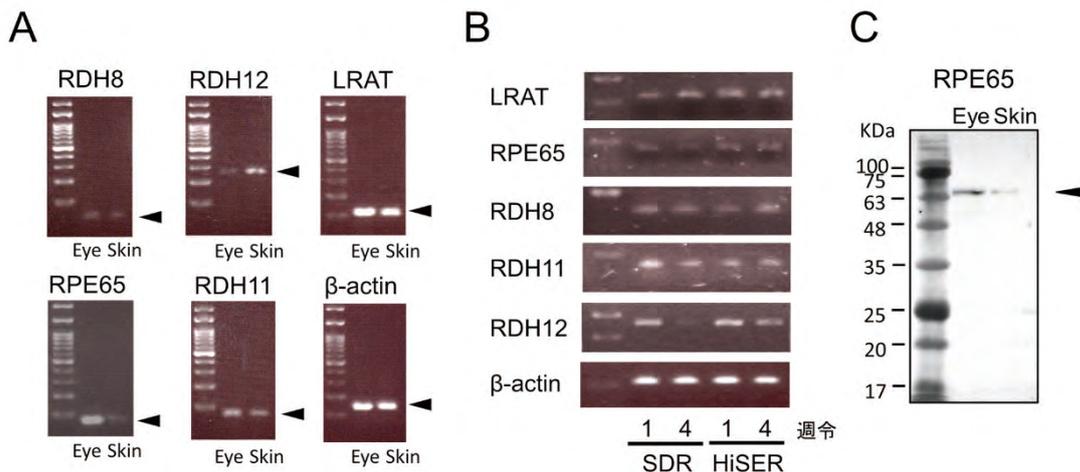


図3 ラット皮膚および皮膚角化細胞での視サイクル関連酵素の発現検討

A: RT-PCR法によるラット皮膚および眼組織に発現する視サイクル関連酵素発現の検討
 B: 皮膚に発現する視サイクル関連酵素発現の系統の違いに関する検討
 C: ウエスタンブロットによるRPE65タンパク質発現の検討

同様にFRSK細胞は380nmから550nm付近の光線を認識する光受容体が発現していることが示唆された(図2-B)。

3. 2. 皮膚組織に発現する視サイクル関連酵素の探索

ラットの皮膚組織や表皮角化細胞に複数の光受容体が発現していることが示唆された。そこで、光受容体が活性を維持するために必要な視サイクルに関わる酵素が皮膚組織に発現しているかを確認するために、RT-PCR法にて検討した。その結果、図3-Aに示すように眼組織と同等に皮膚組織においても視サイクルに関わるRDH8、RDH12、RDH11、LRATおよびRPE65 mRNAの発現が認められた。この結果は光の曝露により光受容体から遊離したall

trans-レチナールがall trans-レチノール、11 cis-レチナールを介して11 cis-レチノールに変換されるのに必要なすべての酵素が発現していることを示している。また、視サイクルに関わる酵素の発現が週齢やラットの系統により違いがあるのかについても検討を行った(図3-B)。その結果、SDRおよびHiSERラットのいずれの系統においても、視サイクルに関わる酵素の発現が認められた。また、酵素の発現は1週齢から4週齢にかけて大きな変化は認められなかった。さらに、all trans-レチノールを11 cis-レチナールに変換するRPE65タンパク質の発現をウエスタンブロット法にて検出した。その結果、ラット皮膚においても眼組織と同様にRPE65が発現していることが示された(図3-C)。

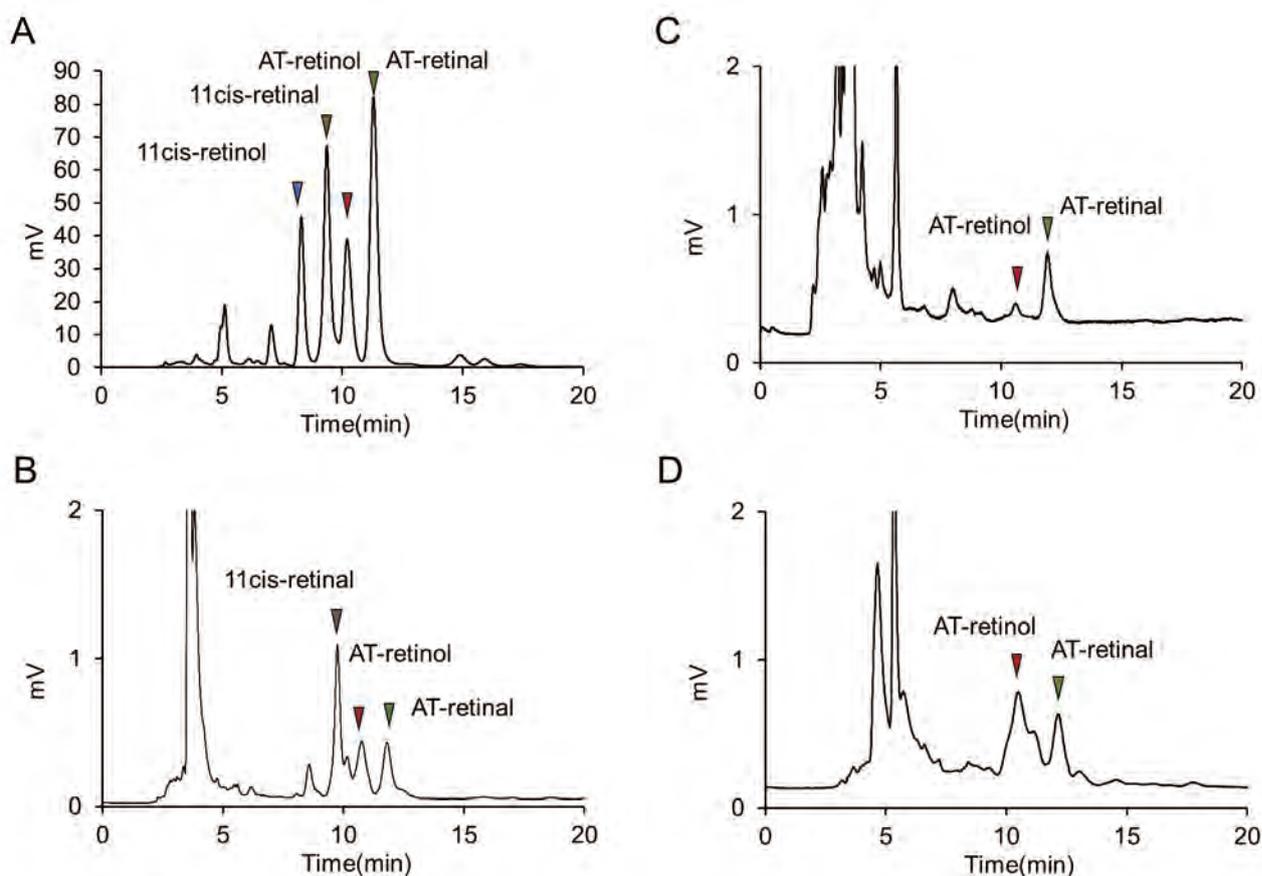


図4 光線曝露後の角化細胞内のレチノールおよびレチナル代謝産物の検出

A: 標準物質の溶出位置、B: 光線非曝露細胞、C: 光線曝露10分後、D: 光線曝露30分後

3. 3. 角化細胞における光線曝露後のレチナル代謝

ラットの皮膚組織や表皮角化細胞に光受容体が発現しており、その活性の維持に関わる視サイクルが存在していることが示唆された。そこで、FRSK細胞が光線の曝露を受けたときに、細胞に発現する光受容体が活性化されているのか、また、光受容体の活性を維持するためにレチノールおよびレチナル関連分子が代謝を受けているのかを明らかにすることを目的に光線曝露後のレチナル代謝産物の経時変化を解析した。図4-Aに視サイクルで生成されるレチナルおよびレチノール代謝産物の標準物質のクロマトグラムを示す。本実験条件では11cis-レチナル、11cis-レチノール、all trans-レチナルおよびall trans-レチノールはそれぞれ、9.1分、8.1分、11.0分および10.0分付近に溶出された。LED光で細胞を曝露する前には、11cis-レチナルの存在割合が大きく、11cis-レチノール、all trans-レチナルおよびall trans-レチノールは検出されるものの存在割合は小さかった(図4-B)。次に、LED光線曝露10分後では、11cis-レチナルはほとんど検出されなくなり、all trans-レチナルの存在割合が最も高くなった(図4-C)。さらに、LED光線曝露後30分に

なると、all trans-レチナルのピークは減少し、all trans-レチノールの割合が大きくなった(図4-D)。

4. 考 察

以上より皮膚組織においても眼と同様に光受容体であるオプシントリプタンパク質の発現が認められ、可視光線を受容することが示唆された。皮膚組織に発現する光受容体の応答波長をまとめると皮膚は紫外光から緑色光にわたり、広い範囲の波長で光を受容することが可能であると考えられた。これまでに、角化細胞や毛乳頭細胞において青色光により活性化されるOPN3の発現が報告されており、角化細胞では分化を抑制することにより表皮を厚くすることで皮膚の保護作用を亢進すること⁷⁾や毛乳頭細胞では毛髪の成長速度を促進すること⁸⁾が報告されている。紫外光や青色光は短波長の光線に分類され、皮膚の透過性は小さく、組織に与える影響が大きい波長である。そのため、これらの応答は光線曝露からの生体の防御応答と考えられた。一方、赤色光の長波長を認識する光受容体は検出されておらず、オプシントリプタンパク質以外に光を認識する仕組みの存在が予想された。

皮膚組織においてオプシタンパク質の活性維持に必要な酵素の発現も認められ、皮膚に発現するオプシタンパク質が機能していることが強く示唆された。また、皮膚角化細胞に光線を曝露すると一過性に all trans-レチナールが増加し、その後 all trans-レチノールの増加が見られたことから、皮膚角化細胞においても視サイクルと同様の代謝が行われていることが示された。さらに、光線の曝露によって all trans-レチナールが増加したことは、皮膚角化細胞に発現するオプシン受容体が曝露された光線に反応していることを示している。本研究では、350 から 850nm の波長を示す LED 光を用いているため、いずれの波長がオプシン受容体の活性調節に関わっているかまでは明らかになっていない。今後は、単一波長の LED 光で曝露した時のレチナール代謝産物を検出することにより、細胞が認識する波長の同定に取り組む予定である。

5. 総括

近年は、光を利用した病気の治療や美容分野での応用が進んでいる。これらの治療には、局所に高いエネルギーを照射できる紫外光や生体の深部まで到達可能な近赤外光が利用されているが、その作用発現の機序は不明な点が多く残っている。本研究を進めることにより、効果的で安全な光の利用を可能にできるものと考えている。

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のご支援をいただきましたことに心より感謝申し上げます。また、ここで報告した研究は、当研究室のメンバーの協力による成果です。メンバー各位に御礼申し上げます。

(引用文献)

1) Moriwaki S. Light-emitting diodes as a new medical tool in aesthetic dermatology. *Photomed. Photobiol.*

2017, 39, 1-5.

- 2) Suh S, Choi EH, Atanaskova Mesinkovska N. The expression of opsins in the human skin and its implications for photobiomodulation: A Systematic Review. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2020, 36, 329-338.
- 3) Choi EH, Daruwalla A, Suh S, Leinonen H, Palczewski K. Retinoids in the visual cycle: role of the retinal G protein-coupled receptor. *J Lipid Res.* 2021, 62, 100040.
- 4) Yamada T, Nanashima N, Shimizu T, Nakazawa Y, Nakazawa M, Tsuchida S. Establishment of a recessive mutant small-eye rat with lens involution and retinal detachment associated with partial deletion and rearrangement of the Crybal gene. *Biochem J.* 2015, 471 (2), 293-305.
- 5) Suzuki T, Fujita Y, Noda Y, Miyata S. A simple procedure for the extraction of the native chromophore of visual pigments: the formaldehyde method. *Vision Res.* 1986, 26 (3), 425-9.
- 6) Kane MA, Folias AE, Napoli JL. HPLC/UV quantitation of retinal, retinol, and retinyl esters in serum and tissues. *Anal Biochem.* 2008, 378 (1), 71-9.
- 7) Buscone S, Mardaryev AN, Raafs B, Bikker JW, Sticht C, Gretz N, Farjo N, Uzunbajakava NE, Botchkareva NV. A new path in defining light parameters for hair growth: Discovery and modulation of photoreceptors in human hair follicle. *Lasers Surg Med.* 2017, 49 (7), 705-718.
- 8) Castellano-Pellicena I, Uzunbajakava NE, Mignon C, Raafs B, Botchkarev VA, Thornton MJ. Does blue light restore human epidermal barrier function via activation of Opsin during cutaneous wound healing? *Lasers Surg Med.* 2019, 51 (4), 370-382.

Ⅲ. 精神、文化に関する分野

がん薬物療法に伴う爪の変化に対するアピランスケアの検証

聖路加国際大学成人看護・がん看護学臨床准教授 がん看護専門看護師

逢 阪 美 里

We conducted 1) a prospective observational study of finger nail findings, skin around nails and quality of life in breast cancer patients undergoing pre- and postoperative adjuvant chemotherapy, and 2) an online nail care intervention study to evaluate the impact of the study.

A prospective observational study showed that peri- and peri-nail skin symptoms appeared before the start of cancer drug therapy, increased during treatment, and gradually improved after treatment, and that the course of nail symptoms differed according to regimen schedule. The present data could not fully explain the relationship between nail symptoms and quality of life, so further accumulation and validation of data is necessary.

In the online nail care intervention study, there was not an increase the Quality of Life score at each time point after the intervention compared to the pre-intervention time point, and the study participants' impressions indicated that they enjoyed performing nail care, felt more positive about treatment, gained self-care, and gained more consideration for their surroundings. The results of the study showed that the Future studies of the effects of this study in patients of different ages and undergoing different treatment regimens will help to support cancer patients in clinical practice.

1. 緒 言

がん薬物療法による爪および爪周囲組織への副作用の機序は明らかにされていないが、薬物投与による直接的な爪母や爪床上皮への細胞毒性や、タキサン系薬剤による血管新生抑制作用や神経原性炎症などが起こることで爪および爪周囲の変化が起こると推測されている¹⁾。手の爪は指先に位置することで、自分自身または周囲の人の目につきやすい存在である。がん薬物療法中に爪の副作用が起こることで患者は指先での作業に支障が生じ、見た目の変化により、患者にとって落ち込みなどの心理的苦痛だけでなく、外出を控えるといった社会生活への影響ももたらす副作用である。

しかしながら爪に起こる副作用は、重症化したとしても生命をおびやかすことにつながりにくいことから、これまで調査研究が十分になされず医療的なサポートの確立がなされなかった。外見変化に対する効果的なケアの方法論についての根拠の乏しさも指摘されており、とくに爪の変化に対し安全な整容方法は確立されていない。日本において外見ケアに関する手引きが作成されたが、がん薬物療法中の爪の変色や変形に対するケアや整容方法に関する根拠は十分でない。つまり爪のケアに関しては整容を行うことの安全性、留意点を説明するための十分なエビデンスが乏し

く、そのことにより患者の爪の整容が制限されていると考える。

2. 目 的

本研究では、乳がんで化学療法を受ける女性を対象に術後化学療法中に、爪の変化とQuality of Lifeがどのように変化し影響しているか調査する。またオンラインネイルケアによりQuality of Lifeにどのような効果をもたらすのか検証する。

3. 研究の意義

日本におけるがん対策の中でがんサバイバーの支援の充実が掲げられているが、コロナ禍において、がん患者の治療環境、支援方法は大きく変化した。過去には体験者同士が同じ場所に集う対面での交流会が多く開催されていたが、同じ悩みを分かち合い治療の副作用への対処方法を意見交換する場が減っている。このような中、不安や孤独を感じる患者が増えていることが推測され、現状に応じたがん薬物療法中のアピランス支援を工夫する必要があると感じている。

本研究では、がん薬物治療に関わる乳腺外科医、腫瘍内科医、診療科看護師、また治療中の爪や皮膚の副作用に対応されている皮膚科医と共同し実施することで、より専門的な知識にもとづく爪の変化の情報収集や、爪の変化への対処の提案につながると考える。

また乳がん補助化学療法中の爪症状の前向き調査により、治療開始後の爪症状に関する経時的変化に関する知見を得ることができる。またオンラインネイルケアの介入による爪症状、Quality of Lifeへの影響を明かにすることで、具体的な対処やケアの提供につながると考えられる。



Research of nail care during cancer chemotherapy

Misato Osaka

RN, MSN, Certified Nurse Specialist in Oncology, Clinical Associate Professor, Oncology Nursing, St. Luke's International University

4. 研究方法

本研究は乳がんで術前・術後の補助化学療法を受ける患者を対象に、①爪周囲の皮膚および爪症状と Quality of Life に関する観察研究、②オンラインネイルケア介入研究による効果の検証。

5. 研究デザイン

5.1. 乳がん補助化学療法中の爪症状と Quality of Life の前向き観察研究

乳がん術前後補助化学療法を受ける患者を対象に前向き観察研究を実施した。観察研究は治療開始前 (T1)、治療中3週間ごと (T2-8)、治療後1、3、6 (T9-11) か月後の計11回の時点で、両手爪症状の観察を実施し、爪の症状についての悩み、Quality of Life に関するアンケート調査を行った。

各時点で両手指に写真を撮影し、これを共同研究者の皮膚科医が爪変化の判定シートを用い爪症状を得点化し、同時に手の皮膚乾燥、指関節の色素沈着を「あり」「なし」で評価した。爪症状の判定シートは、爪母・爪床を4分割し、爪母を点状陥凹、爪塑造、爪甲白濁、爪半月の紅色点の有無、爪床を爪甲剥離、線状出血、油滴状爪、爪甲下角質増殖の有無を確認し、0 (なし) または1 (あり) で評価し、爪母 (0-4点) 爪床 (0-4点) これを合わせた爪症状得点 (0-8点) とした。

Quality of Life は The Functional Assessment of Cancer Therapy scale (以下 FACT) Breast および FACT-Taxane を使用した。質問項目は身体面 (PWB) 社会面 (SWB) 心理面 (SWB) 活動面 (FWB) の計20項目、乳がん特異面 (Breast) 9項目、タキサン系毒性特異面 (Tx) 16項目のサブスケールで構成されており、点数が高いほど QOL が高いことを示す。サブスケール点数は身体面 0-28点、社会面 0-28点、心理面 0-24点、活動面 0-28点、乳がん特異面 0-40点、タキサン系毒性特異面 0-64点であり各時点での平均点を比較した。

本研究のデータは、がん薬物療法を受ける患者の介入前後の前向き観察研究であり、対象者1名につき最大11回の繰り返しデータがある。観察の過程において、対象者の Quality of Life 得点はがん薬物療法の副作用や生活状況の変化などに影響され、個人差があることが想定された。そのため治療開始前の Quality of Life が各時点でどのように変化するか、線形近混合モデルを用い検討した。

5.2. オンラインネイルケア介入研究

乳がん術前術後補助化学療法として週に1回のパクリタキセルを受ける患者を対象に、オンラインネイルケアプログラムを4回実施し介入前後に Quality of Life、爪の症状

を調査した。オンラインネイルケアプログラムは、(1) 看護師による治療中の爪の変化およびセルフケア方法に関する情報提供、(2) ネイリストによる手の爪のネイルケア方法のレクチャー、(3) 患者が自身でネイルケアを実施する、30分程度の内容とした。オンラインネイルケアプログラムの内容は、研究者と共同研究者が開発したものをがん薬物療法中の患者のケアの経験を有する看護師を対象にパイロットプログラムを実施し、内容を精査した。がん化学療法患者に対するネイルケアの経験を有するネイリストによるレクチャーでは、手の爪の整え方、ネイルオイルを用いた爪および周囲の皮膚の保湿方法、水性ネイルを用いたネイルカラーを実施した (図1)。

オンラインネイルケアの実施は、対象者のプライバシーが確保できる個別スペースにおいて、パクリタキセル投与2、5、8、11回目投与時の計4回とした。プログラム実施当日は、開始前に研究担当者が体調、爪および周囲皮膚の感染などの有無を確認し、プログラムが実施可能かどうか判断した。

介入前、介入中、介入後に手の爪症状、Quality of Life に関する質問紙調査を行い、前後の変化について検討した。爪の症状の観察、爪の症状の悩み、Quality of Life に関する質問紙調査は、前述「①爪の変化と Quality of Life 観察研究」と同様の質問紙を用い測定し、観察研究の結果と比較した。

またオンラインネイルケアプログラム実施後は、研究担当者が作成したインタビューガイドに沿ってプログラムを受けた感想を聞き取り、質的に解析した。

倫理的配慮

研究対象者には研究の目的、内容および方法、研究参加の自由意思による参加の保証について書面を用い説明した。研究で得られたデータは匿名化し個人が特定されないよう保管した。本研究は聖路加国際大学研究倫理審査委員会の



図1 オンラインネイルケアプログラム

承認を得て実施した。

6. 研究結果

6.1. 爪の症状、Quality of Lifeに関する前向き観察研究

6.1.1. 対象者の概要

対象者は64名で平均年齢47.9歳、年代で多かったのは40歳代28名であった。既婚者は42名、独身者は10名で、同居者は夫が55名、子供が27名だった。就業状況はフルタイム23名、パートタイム9名であった。術前化学療法

表1 対象者の概要

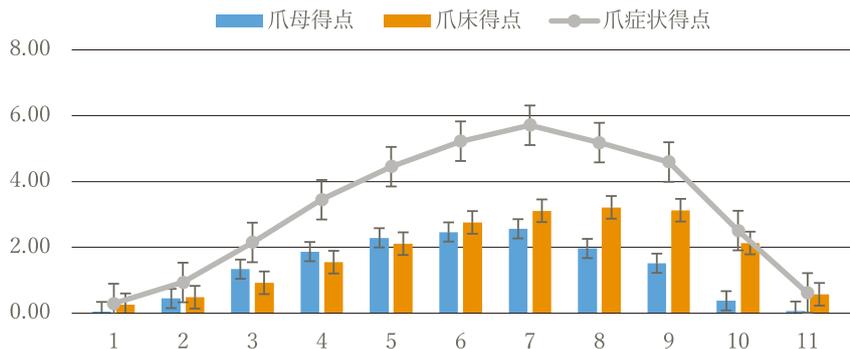
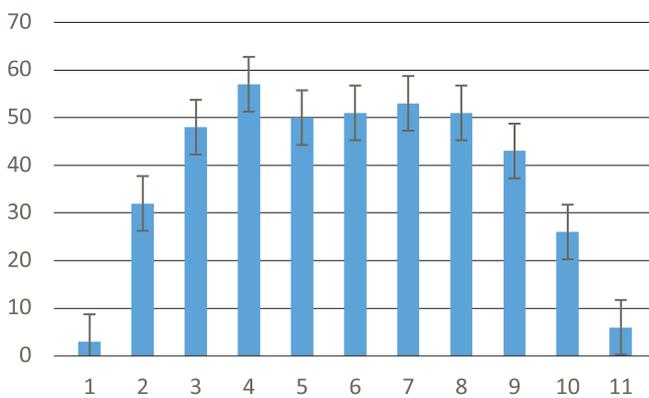
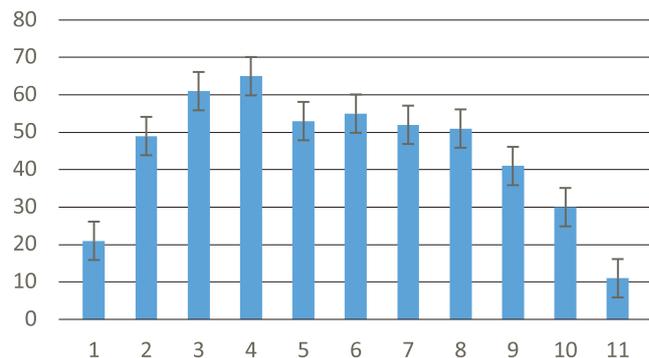
対象者		人数	
年代	30歳代	12	
	40歳代	28	
	50歳代	15	
	60歳代	5	
	70歳代	4	
婚姻状況	既婚	42	
	独身	10	
	離婚	10	
	死別	1	
	同居パートナーあり	1	
仕事状況	フルタイム	30	
	パートタイム	13	
	主婦	16	
	無職・その他	5	
同居家族	夫	38	
	子供	31	
	なし	8	
治療状況	術前化学療法	27	
	術後化学療法	37	
治療レジメン	アントラ先行	ACのみ(タキサン系投与なし)	1
		ACよりドセタキセル	22
		ACよりパクリタキセル	21
		ddACよりパクリタキセル	3
		ECよりドセタキセル	1
	タキサン先行	FECよりパクリタキセル	1
		ドセタキセルよりAC	2
		パクリタキセルのみ	1
		パクリタキセルよりAC	8
		パクリタキセルよりEC	4

A: アドリアマイシン E: エピルビシン C: シクロホスファミド
F: 5FU

中は27名、術後化学療法中は37名で、アントラサイクリン系薬剤を含む治療後にタキサン系薬剤を含む治療を受けた患者は49名、タキサン系薬剤を含む治療後にアントラサイクリン系薬剤を含む治療を受け対象者は15名であった(表1)。

6.1.2. 手の皮膚、爪症状の経時的変化

治療開始後、皮膚乾燥および関節部位の色素沈着は次第に増え、皮膚乾燥は6時点目、関節部位の色素沈着は7時点目をピークにその後次第に低下していた。爪症状は治療後次第に上昇し7時点目をピークにその後次第に低下して



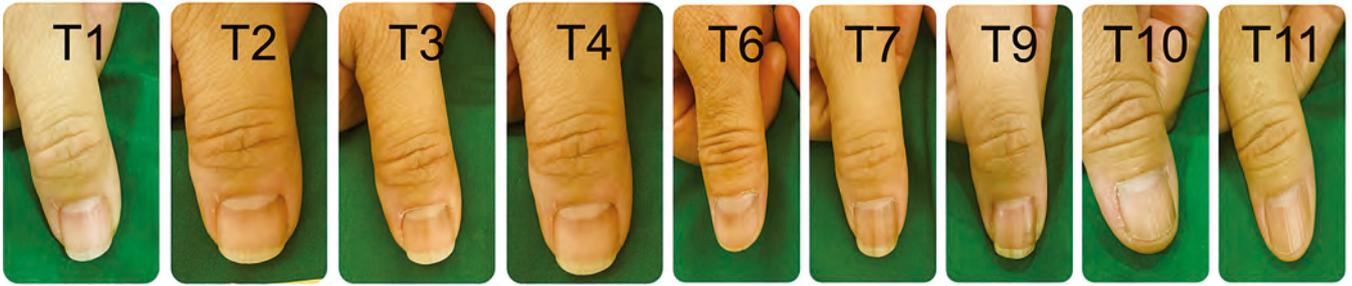


図5 観察時点の爪写真

いた(図2-5)。

6. 1. 3. レジメンスケジュールによる手の皮膚、爪症状の経時的変化

レジメンスケジュールにより手の皮膚症状、爪症状の推移は異なっていた。

皮膚乾燥は、アントラサイクリン系薬剤を含む治療先行グループは、開始後上昇し6、7時点目におおよそ70%とピークとなりその後11時点目に低下していた。タキサン系薬剤を含む治療先行グループは、開始時5.2%でその後ゆるやかに上昇し6時点目に19%とピークとなりその後低下していた(図6)。

関節部位の色素沈着は、アントラサイクリン系薬剤を含む治療先行グループは、開始時0%が2時点目41.4%と上昇し7時点目にピークとなりその後11時点目に8.5%に低下していた。タキサン系薬剤を含む治療先行グループは、開始時ゆるやかに上昇し8時点目にピークとなりその後低下していた(図7)。

爪症状は、アントラサイクリン系薬剤を含む治療先行グループは、皮膚症状と同じく2時点目より上昇し7時点目にピークをむかえその後低下しており、タキサン系薬剤を含む治療先行グループは、開始時ゆるやかに上昇し9時点目にピークをむかえとなりその後低下していたが11時点目も開始時より高かった(図8)。

6. 1. 4. 爪症状とQuality of Lifeの関連

Quality of Lifeの得点であるFACTの各サブスケール得点が、時点、レジメンスケジュールに影響されるか検定した。皮膚乾燥が強い者ではQOLサブスケールの社会面、活動面、乳がん特異面の得点が有意に低かった。

爪症状得点が高い者では、QOLサブスケールの身体面、乳がん特異面、QOLトータル、タキサントータル、乳がんトータルが有意に低かった(表2)。

6. 2. オンラインネイルケア介入研究

6. 2. 1. 対象者の概要

対象者はパクリタキセル投与を受ける23名で、30歳代2名、40歳代9名、50歳代8名、60歳代4名だった。術前化学療法中の対象者は12名、術後化学療法中の対象者

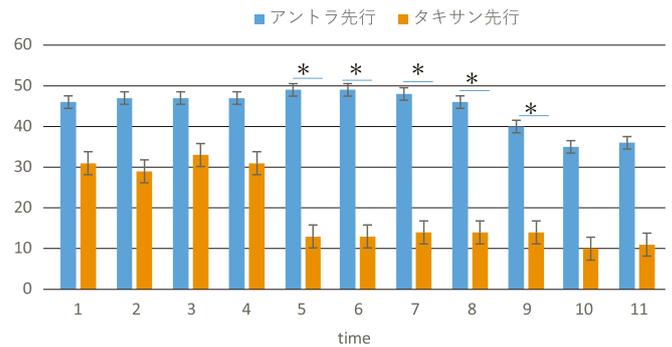


図6 レジメンスケジュールごとの皮膚乾燥の推移

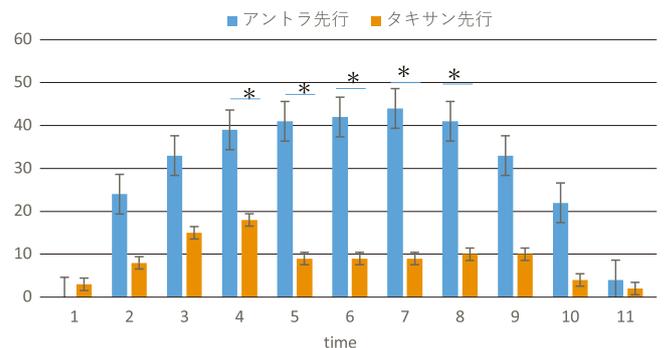


図7 レジメンスケジュールごとの関節部位色素沈着の推移

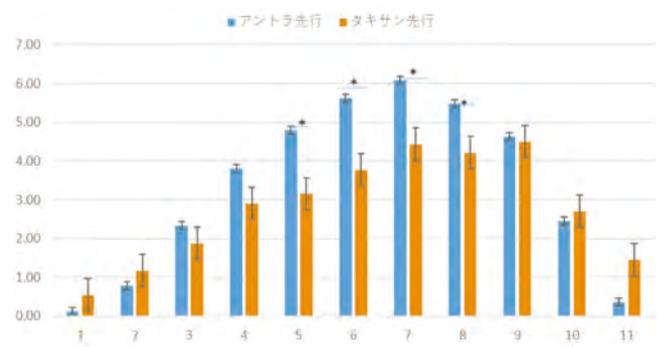


図8 レジメンスケジュールごとの爪症状得点の推移

は10名で、術後化学療法中の対象者のうち4名はパクリタキセル治療の前にアントラサイクリン系薬剤を含む治療レジメンの治療を受けていた。前述観察研究対象者と比較し年齢構成はほぼ同じだったが、アントラサイクリン系薬

表2 爪症状とQOLの関連

	身体面		社会面		精神面		活動面		乳がん特異面	
	推定値	P値								
皮膚乾燥	-0.88453	0.134	-0.70761	0.045	-0.63129	0.073	-0.87188	0.039	-1.59526	0.025
爪症状得点	-0.30752	0.011	-0.01145	0.885	-0.10562	0.177	-0.13377	0.157	-1.12141	0.025

	タキサン特異面		QOLトータル		タキサントータル		乳がんトータル	
	推定値	P値	推定値	P値	推定値	P値	推定値	P値
皮膚乾燥	0.278141	0.516	-1.57665	0.358	0.278141	0.516	-1.82737	0.455
爪症状得点	-0.79677	0.409	-0.85627	0.015	-1.11529	0.01	-1.12141	0.025

調査時点、各QOL得点のベースライン得点で制御した一般線形制御モデルによる推定値

表3 オンラインネイルケア介入 対象者の概要

対象者		人数
年代	30歳代	2
	40歳代	9
	50歳代	8
	60歳代	4
	70歳代	0
婚姻状況	既婚	18
	離婚	1
	死別	1
	独身	3
仕事状況	フルタイム	12
	パートタイム	7
	主婦	4
同居家族	夫	17
	子供	13
治療状況	術後補助化学療法	10
	術前補助化学療法	13
事前治療レジメン	アントラ系薬剤	4
	なし	19

剤を含む治療先行グループの割合は少なかった(表3)。

6.2.2. 手の皮膚爪の症状の経時的変化

オンラインネイルケアを受けた参加者の、介入前後の爪周囲の皮膚乾燥、関節部位の色素沈着の有無、爪症状の得点を比較した。皮膚の乾燥および関節部位の色素沈着が認められる数は増え、平均点は介入前に比べ介入後次第に上昇していた(図9-11)。

6.2.3. オンラインネイルケアとQuality of Lifeの変化の関連

観察研究対象者とオンラインネイル介入研究対象者のQuality of Life得点を比較するため、観察群のうちパクリタキセル治療先行を受けた対象13名と、オンラインネイルケア介入対象者16名を抽出し、各QOL得点のベースライン得点で制御した一般線形混合モデルによる推定値と比較した。オンラインネイルケア介入群のサブスケールで有意な上昇はなかった(図12)。

6.2.4. オンラインネイルケアを受けた対象者の感想

オンラインネイルケアを受けた対象者に介入後の感想を

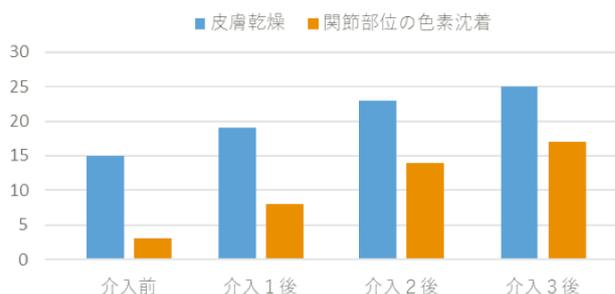


図9 オンラインネイルケア介入前後の皮膚乾燥 関節部位の色素沈着

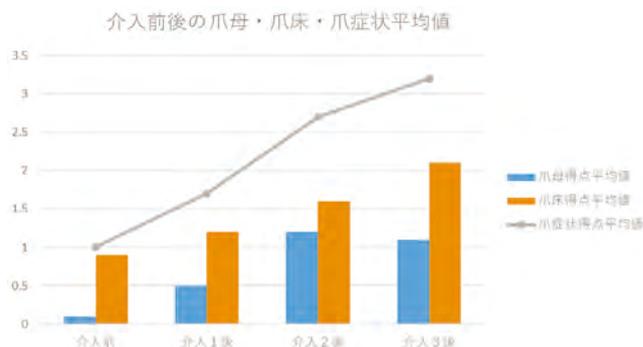


図10 オンラインネイルケア介入前後の爪症状



図11 オンラインネイルケア3回目参加者の介入前後の爪写真

聞き取り、その内容をカテゴリー化し4つのカテゴリーが抽出された。カテゴリー「前向きさの獲得」は、「毎週治療に来ていますが、ネイルの日は「今日はネイルの日だな」って少し楽しみになります」「ピカピカになって気分が良かったです」とネイルケアを受けることの楽しさを実感し

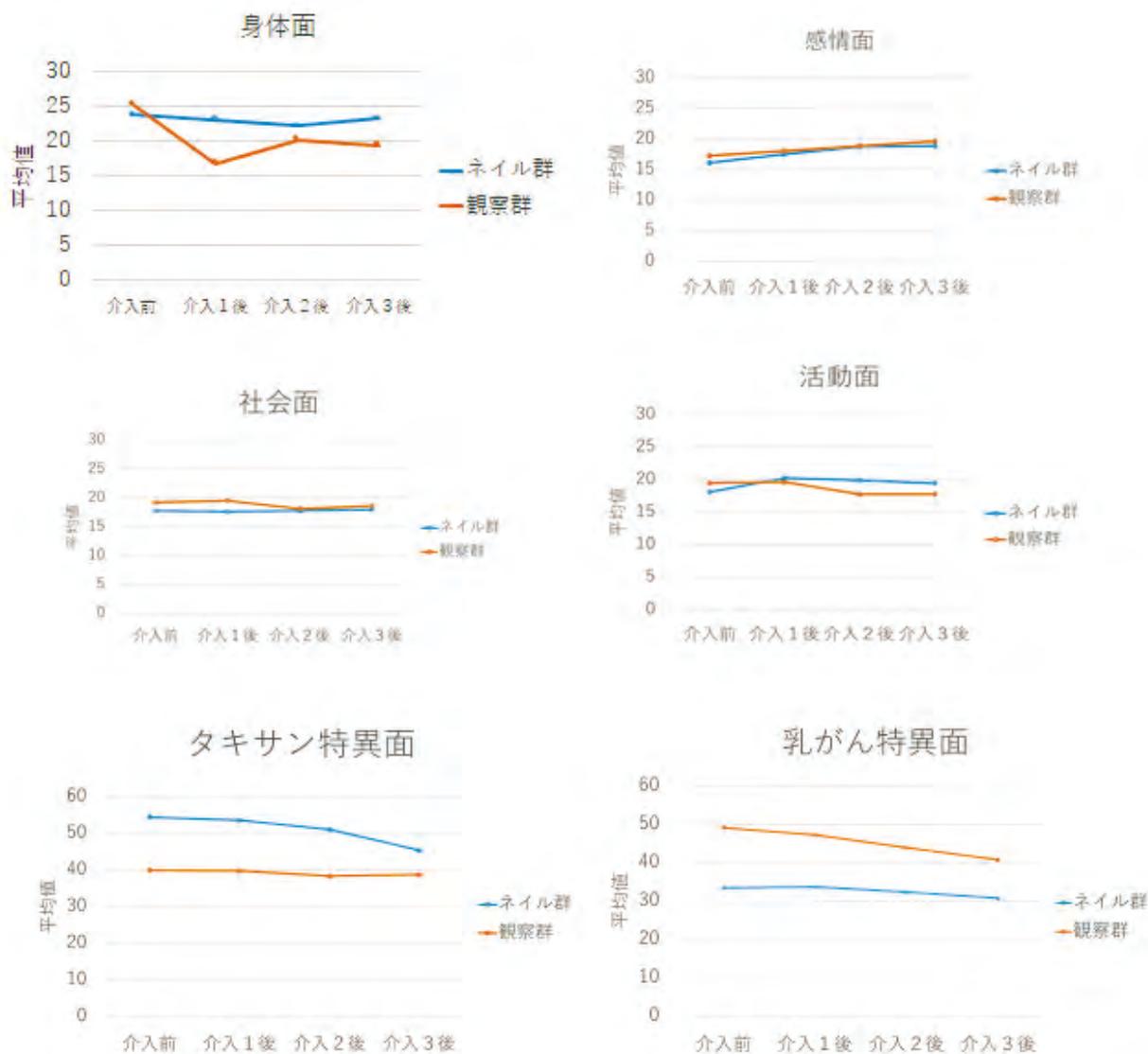


図12 オンラインネイルケア介入前後のQuality of Life得点

楽しみにしているという感想があった。カテゴリー「治療中の不安感の軽減」では「夢中になってネイルをしていました。こんなに夢中になる時間は最近なかったのでとてもよかった」という感想があり、オンラインネイルケアの時間は自身でネイルケアを行うことに夢中になり治療のことから解放されたという内容だった。カテゴリー「周囲の心配の解消」では、オンラインネイルケアを受け実際にネイルカラーを行う生活において「子供が私の見た目かわることをなんとなく気にしているので、私もどんなふうになればきれいに普通どおりになるかなって考えてるときで、対処方法をきけてよかった。」と爪の変化をカバーするという対処方法で周囲の人へ配慮できることの獲得につながっていた。カテゴリー「爪のセルフケア方法の獲得」では、対象者は介入後実際にオンラインネイルケア後ネイルケアが習慣になったと話しており、「前回教えてもらったので仕

事中にもオイルを塗ったりするようになりました。」と日常生活の中でネイルケアを行う機会ができたという感想があった(表4)。

7. 考 察

本研究の観察研究の対象者は、乳がん術前後の補助化学療法を受ける女性であり、研究で測定したQOL得点は治療による副作用、治療を受けることによる生活の変化が大きく影響されたものを反映していると考えている。また研究の目的とした爪の症状がQOLとの関連を検討するために十分な対象者数とはいいきれず、研究の限界と考える。

7. 1. 乳がん補助薬物療法中の爪とQuality of Life前向き観察研究に関する考察

治療開始前と比較し治療中治療後の時間経過において、

表4 オンラインネイルケア感想

カテゴリーテーマ	サブカテゴリー	感想
前向きさの獲得	気持ちが明るくなった	・毎週治療に来ていますが、ネイルの日は「今日はネイルの日だな」って少し楽しみになります。 ・ピカピカになって気分があがりました。
治療中の不安感の軽減	夢中になって治療のことから解放された	・夢中になってネイルをしていました。こんなに夢中になる時間は最近なかったのでもとてもよかった。
周囲の人への配慮の獲得	家族の心配を解消できた	・子供が私の見た目がかわることをなんとなく気にしているので私もどんなふうにすればきれいに普通どおりになるかなって考えてるときで対処方法をきけてよかった。
爪のセルフケア方法の獲得	オンラインネイルケア後ネイルケアが習慣になった	・前回教えてもらったので仕事にもオイルを塗ったりするようになりました。

爪母および爪床の症状の得点は増加し、治療後次第に低下し、治療後6か月(T11)にはほぼ治療開始前の得点に回復していた。正常な手の爪は1か月あたり3mm程度成長し4-6か月で新しい爪に置き換わるとされており、本観察研究においても対象者の多くは治療期間中にダメージが起きたとしても6か月程度で正常に戻ることを示唆された。

レジメンスケジュールによる比較では、アントラサイクリン系薬剤を含む治療先行グループがタキサン系薬剤を含む治療先行グループより皮膚乾燥、関節部位の色素沈着、爪症状すべてにおいて治療開始後すぐに急激な上昇がみられた。

がん薬物療法による爪および爪周囲組織への副作用の機序は明らかになっていないが、薬物投与による爪母の直接的な爪母や爪床上皮への細胞毒性や、タキサン系薬剤では薬剤による血管新生抑制作用や神経原性炎症などが起こることで爪および爪周囲の変化が起こると推測されている^{1,2)}。がん薬物投与により、爪甲下角質増加やネイルマトリックスの障害によりビュー線の発生、爪母細胞のメラノサイトの活性化や光過敏による爪甲の線状の色素沈着、爪甲下出血などが考えられている。またがん薬物療法のサイクル数が増えることで爪の症状が増加することが報告されている³⁻⁷⁾。アントラサイクリン系薬剤を含む治療レジメンは多剤併用治療であり吐き気や嘔吐などの消化器症状のほか脱毛が起こる頻度も高い。おそらく皮膚細胞や爪母細胞が強く傷害されることで、手の皮膚乾燥や爪症状の頻度も高い結果となったと考えられる。

観察研究では皮膚乾燥や爪症状は、Quality of Lifeの心理面、精神面との関連が示唆されたが、前述のようにがん薬物療法を受ける中での様々な副作用や生活の変化が得点に反映されたと推測され、手の皮膚や爪症状がQuality of Lifeに直接的に影響するかどうか説明は難しい。今後の手に皮膚や爪症状による見た目の変化がどのように患者の悩みや生活上の困りごとに影響しているのか、さらに調査を継続して明らかにしたい。

がん薬物療法による爪に起こる副作用に関して、事前に

治療中に起こる変化について情報提供を行うことが提案されている⁸⁾。本観察研究において、使用している薬剤や、治療後の時期において爪症状が変化していることが明らかとなったため、治療や時期など具体的な情報提供に活用できると考える。

7.2 オンラインネイルケア介入に関する考察

皮膚乾燥、関節部位の色素沈着、爪症状はオンラインネイルケア介入前より介入後の時点で上昇していたが、観察群でも同様の変化が認められたため、介入によって得点が上昇したのではなく治療を開始したことによる皮膚および爪の変化であると考えられる。

観察群とオンラインネイルケア介入群のパクリタキセルを先行投与したグループ同士のQuality of Lifeの得点比較では、有意な違いはなかった。しかしオンラインネイルケア介入後の参加者の感想から、オンラインネイルケアを受けたことで楽しさを感じ、前向きさを獲得や不安感の軽減を得られたことが明らかとなった。

参加者は40～50歳代が多く、子育てや就労しながら治療を継続していた。このような社会生活を送る中、爪の外見変化は自身だけでなく家族や周囲から見られることで、治療の副作用を周囲に知られることを気がかりに感じる機会も多いと推測される。がん治療を受ける中で、治療や副作用に対する不安や見通しが立てられない状況の中でオンラインネイルケアをうけることにより、爪の変化という副作用への対処を実践することで安堵感になっていたのではないかと考える。またネイリストとの対話や自分のネイルケアを行う行為に集中し不安感からの解消した感想も得られ、治療に対し前向きに取り組む気持ちにつながっていたと考える。

介入研究参加者からの感想には「普段からネイルケアを行うようになった」とあり、日常でのセルフケアの実践につながっていた。介入内容では看護師からの爪の変化についての情報提供とネイリストからのケア方法の詳細な内容が含まれており、参加者のセルフケアへの動機付けとなり

継続につながっていたと考える。本介入研究は短期間の効果のみの検証であったがケアを継続することでの効果の検証も必要と考える

共同研究機関

ikus医療美容ケア研究会

(引用文献)

- 1) 東 禹彦 爪 第2版 基礎から臨床まで 2016 金原出版
- 2) Ralph Peter Braun et al. Diagnosis and management of nail pigmentations J Am Acad Dermatol. 2007 May; 56(5) : 835-47.
- 3) Peter Gilbar, Alice Hain, Veta-Marie Peereboom. Nail toxicity induced by cancer chemotherapy J Oncol Pharm Pract. 2009 Sep; 15(3) : 143-55.
- 4) Hong J, Park SH, et al. Nail toxicity after treatment with docetaxel: a prospective analysis in patients with advanced non-small cell lung cancer. Jpn J Clin Oncol. 2007 Jun; 37(6) : 424-8.
- 5) Almagro M, et al. Nail alterations secondary to paclitaxel [corrected] therapy. Eur J Dermatol. 2000 Mar; 10(2) : 146-7
- 6) A M Minisini I, et al. Taxane-induced nail changes: incidence, clinical presentation and outcome Ann Oncol. 2003 Feb; 14(2) : 333-7.
- 7) Dorte Winther et al. Nail changes due to docetaxel-a neglected side effect and nuisance for the patient. Support Care Cancer. 2007 Oct; 15(10) : 1191-7.
- 8) Baker J, et al. Docetaxel-related side effects and their management. Eur J Oncol Nurs. 2009 Feb; 13(1) : 49-59.

(参考文献)

- 9) Nozawa K, Shimizu C. et al. Quantitative assessment of appearance changes and related distress in cancer patients. Psycho oncology. 2013 Sep; 22(9) : 2140-7.
- 10) 野澤桂子、藤間勝子編、臨床で活かすがん患者のアピアランスケア 南山堂 2017

サボテンセルエキストラクトの育毛作用と成分分析

星薬科大学

柴藤 淳子

In recent years, the population of people with thinning hair has been increasing due to a variety of reasons, including stress from work, relationships, diet, etc. Since hair greatly influences one's appearance and age, interest in hair growth in the hair care market is growing among both men and women. Since the psychological impact of thinning hair is particularly serious, the development of an effective hair-growth product will contribute to the maintenance and improvement of consumers' mental and physical health, and thus an epoch-making hair-growth product is expected to be developed. However, in reality there are few products that provide sufficient hair-growth effects and for which the scientific basis for the hair-growth effects has been clarified. Moreover, the problematic side effects caused by chemical substances in 'hair growth products' remains a serious issue that cannot be ignored.

We have been paying attention and researching since long on the hair-growing effects of cactus cell extracts obtained through low-temperature vacuum extraction. Compared to the conventional steam distillation method, the cell extract obtained by low-temperature vacuum extraction is 100% plant-derived, and we believe that it can contribute to the provision of materials for hair-growth agents with high safety. Since ancient times, Japanese women have valued the beauty of their hair. Since beautiful hair has always been a longing of women, we hope to develop hair growth products that also care for beautiful hair by clarifying the mechanism of action of cactus cell extract on hair growth and the ingredients involved in nurturing beautiful hair.

1. 緒言

近年、仕事や人間関係などのストレスによる薄毛人口が増加している。毛髪は見た目年齢を大きく左右するためヘアケア市場における育毛関連の関心は男女問わず高まっている。特に薄毛が及ぼす精神面への影響は深刻で、効果のある育毛剤が開発されれば消費者の心身の健康維持・増進にも貢献することから画期的な育毛剤が期待されている。しかしながら十分な育毛効果が得られ、さらに育毛作用の科学的根拠が明らかにされている製品は少なく、化学物質による副作用などの問題も無視できない課題である。

我々は以前より低温真空抽出法で得られたサボテンセルエキストラクトの育毛効果に注目してきた。従来の水蒸気蒸留法と比べ溶剤を使用しないので低温真空抽出法で得られるセルエキストラクトは100%植物由来であり、安全性の高い育毛剤の素材提供に貢献できると考えている。古来より日本の女性たちは髪的美しさを大切にしてきた。美しい髪はいつの時代も憧れであることから、サボテンセルエキストラクトの育毛作用メカニズムや美髪に関与する成分を明確にすることで、美髪ケアも兼ねた育毛商品の開発を目指せればと考えている。



Hair Growth Activity and Ingredient Analysis of Cactus Cell Extract

Junko Shibato

School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Hoshi University

2. 方法

2.1. マウス育毛評価実験

実験には青王丸 (*Notocactus ottonis*) から低温真空抽出法 (Yoshimi Medical Farm Co., Ltd.) により得られたセルエキストラクト (N-CE) を用いた。C57BL/6J雄マウスは、 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、6:00-18:00、12時間/12時間の明/暗サイクルで自由摂取により飼育された。ミノキシジル (MXD) は脱毛症の治療に使用され、多くの毛髪研究でポジティブコントロールとして使用されていることから比較として用いた。プロピレングリコール：エタノール：水 (5:3:2) を Vehicle 対照群 (VC) とし、予備実験を行ったところ N-CE 10% 濃度で良好な育毛促進が確認された。よって C57BL/6J マウスを N-CE 10%、MXD 3%、VC の3つのグループ (6匹/グループ) に分け、雄マウスの背部の毛を剃って1週間後に再度毛を剃ることで毛周期を合わせ、調整試料 200 μL を毎日背部に塗布し観察および写真撮影を行った。写真画像は ImageJ ソフトウェアを使用し画像解析した。マウスの剃毛領域に対する育毛領域の割合を算出し育毛率 (%) を測定した。

2.2. マウス毛包観察

C57BL/6J雄マウスの背部全層皮膚組織を4%パラホルムアルデヒド溶液で固定し、PBSに置換した。パラフィンに包埋するために脱水しキシレン浸透させた。5 μm のパラフィン切片をヘマトキシリン/エオシン染色処理後、脱水のち透徹しカバーガラスで封入した。切片画像は、BZ-X 710 明視野システム (Keyence) によって $\times 20$ 倍率で

写真撮影し、画像はImageJソフトウェアを使用し解析した。切片写真の真皮と皮下組織における毛包総数と皮下組織のみにおける毛包数を測定し、平均毛包数を算出した。

2. 3. 育毛成分のスクリーニング分析

N-CEの育毛成分のスクリーニング法としてメタボローム解析法を採用した。N-CEをエバポレーターで400倍に濃縮し、80 μ Lの試料に対し内部標準物質の濃度が1,000 μ Mとなるように調製した20 μ Lの水溶液を加えて攪拌し、限外ろ過処理を行った。サンプルはCE-TOFMS (Agilent Technologies)、による測定に供した。検出されたピークはHMT代謝物質ライブラリおよびKnown-Unknownライブラリに登録された全物質との照合検索を行った。

2. 4. マイクロアレイ解析

マウス育毛評価実験において調整試料塗布後1週間ごとに3週間目までのマウス背部全層皮膚組織をサンプリングし-80 $^{\circ}$ Cで保存した。組織からRNAを抽出し、マイクロアレイ解析はWhole Mouse GenomeオリゴDNAマイクロアレイキット4x44K (Agilent)を用いDye-swap法によりVCと比較して発現変動した遺伝子(アップレギュレーション: Up (≥ 1.5 -fold)、ダウンレギュレーション: Down (≤ 0.75 -fold))をリスト化した。

2. 5. プロテオーム解析

-80 $^{\circ}$ Cで保存したマウス皮膚組織からタンパク質を抽出し、トリプシン消化処理をした。消化サンプルをTMT標識し、HLB OASISカラムで脱塩後、POROS 20 R2逆相レジンを使用して5-100% ACN Buffer (pH10)で12分画を溶出した。Q-Exactive MS分析はUHPLC Dionex UltiMate $^{\circ}$ 3000 (Thermo Fisher Scientific)を使用した逆相クロマトグラフィーで分離し、データベース(MaxQuant

ソフトウェア、PerseusおよびRプログラム)でタンパク質同定ならびに相対定量数値化を行った。その後VCと比較して発現変動したタンパク質(アップレギュレーション: Up (≥ 2.0 -fold)、ダウンレギュレーション: Down (≤ 0.5 -fold))をリスト化した。

2. 6. カテゴリー解析

リスト化した遺伝子およびタンパク質の生物学的機能カテゴリー(エンリッチメント)解析はDatabase for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.8を用いて行った。

3. 結果

3. 1. マウス実験におけるN-CEの育毛効果

マウスを用いた育毛実験の調整試料塗布後14および27日後の育毛領域の割合をFig. 1に示した。14日後では3% MXDと比較して10% N-CEの育毛率はやや低かったが、27日後では3% MXDと同程度の高い育毛促進効果が確認できた(Fig. 1)。さらにマウス背部全層皮膚組織の毛包総数は3% MXDより増加傾向にあることが確認できた(Fig. 2)。

3. 2. N-CEの育毛成分分析

N-CEに含まれる育毛成分のメタボローム解析によるスクリーニング分析の結果から、育毛剤やシャンプーなどのヘアケア製品に使用されている物質が検出された(Table 1)。育毛剤関連ではアデノシン、アゼライン酸、ジベレリン酸、プロスタグランジンE2の他にリボフラビン、ニコチン酸、パントテン酸、ピリドキサル、ピリドキサミン、ピリドキシンなどビタミンB群がスクリーニングされた(Table 1)。

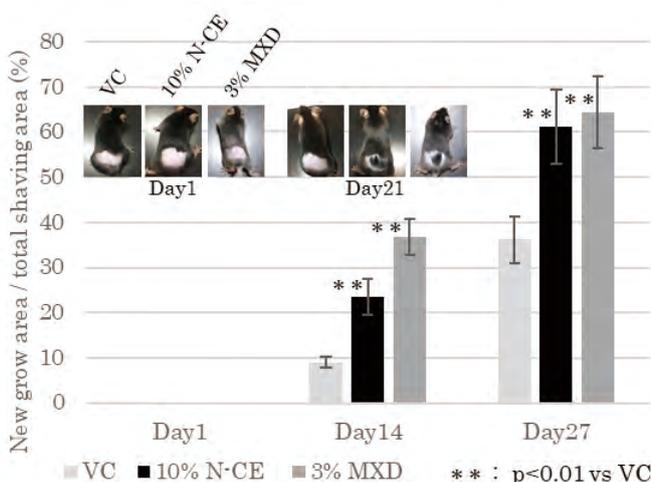


Fig. 1 マウスによる育毛実験

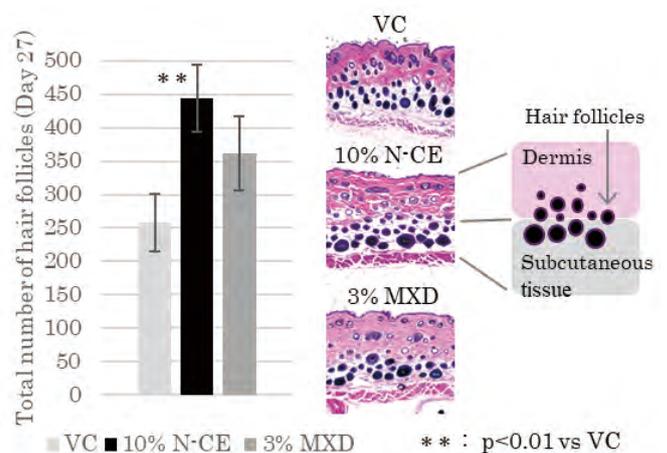


Fig. 2 マウス背部皮膚組織の毛包数測定実験

Table 1 N-CEに含まれる育毛関連代謝化合物

育毛剤関連	ヘアケア関連
Adenosine	Carnitine
Azelaic acid	Diethanolamine
Gibberellic acid	Triethanolamine
Prostaglandin E2	Glycerol
Riboflavin	Threonine
Nicotinic acid	cis-4-Hydroxyproline
Pantothenic acid	Glutamic acid
Pyridoxal	Thymidine
Pyridoxamine	Urocanic acid
Pyridoxine	Decanoic acid
Glucosamine	Gluconic acid
Citric acid	

3. 3. 育毛関連因子の同定

マイクロアレイ・プロテオーム解析から得られた発現変動遺伝子およびタンパク質データの上位20を調査した結果、幾つかの育毛関連因子が同定された。

3. 3. 1. 3% MXD マイクロアレイ解析

発現増加遺伝子群の多くがサイトカイン、ケラチン、細胞接着、細胞増殖のカテゴリーに分類されるものだった。育毛関連ではLef1(毛乳頭細胞マーカー¹⁾)、Dsg4(毛包ケラチノサイト細胞接着の重要なメディエーター²⁾)の発現増加が確認された。発現減少遺伝子群では筋収縮、鉄恒常性・細胞増殖に分類されるものが多く、その他にオートファゴソーム、凝固に関連する遺伝子もあった。

3. 3. 2. 3% MXD プロテオーム解析

塗布から1週間目においてはサイトカイン、好中球、ケラチン、血液凝固・フィブリン血餅形成のタンパク質発現増加が多く見られたが、2および3週間目ではケラチン関連が大多数になっていた。育毛関連ではTchhl1(ケラチノサイト増殖、毛髪形成^{3,4)})、Tchh(毛幹形成⁵⁾)、Padi3、Padi1(PADI1/3を介したTCHHのシトルリン化による毛幹分化⁶⁾)、Padi4(毛髪幹細胞再生と増殖の調整⁶⁾)の発現増加が確認された。発現減少タンパク質においてはいずれも筋収縮関連が殆どであった。

3. 3. 3. 10% N-CE マイクロアレイ解析

発現増加遺伝子のカテゴリーは、血管新生、オートファジー、成長・分化、筋収縮、細胞接着が多く、育毛関連はFGF2(毛包の成長・発達⁷⁾)、PAX6(メラニン形成⁸⁾)が確認された。発現減少遺伝子はサイトカイン、メラノサイト、凝固、鉄恒常性などが多かった。

3. 3. 4. 10% N-CE プロテオーム解析

発現増加タンパク質のカテゴリーはエンドサイトーシス、オートファジー、筋収縮があり、育毛関連ではLdb1(毛包幹細胞の維持⁹⁾)、Kctd1(皮膚や髪の発達¹⁰⁾)、Myo5a(毛

色に関与^{11,12)})が同定された。発現減少タンパク質のカテゴリーはケラチン、鉄結合、アクチン結合があった。

3. 4. 生物学的機能エンリッチメント解析

DAVIDツールにより得られた生物機能解析(Functional Category Term)の結果は有意(p値≤0.05)であり、さらに例えば“Signal”や“Activator”というような分類される遺伝子数が膨大になるようなTermは省いてTable 2, 3に示した。MXDによる発現増加遺伝子(3% MXD UP: Microarray)カテゴリーのトップはケラチンで、角質化、メラニン生合成など毛髪に関与するものが含まれていた。発現減少遺伝子(3% MXD Down: Microarray)では筋タンパク、ミオシン、筋小胞体など筋収縮に関与するものが多かった。この結果はタンパク質の場合でもほぼ同じことが確認できた(Table 2)。

一方N-CEによる発現増加遺伝子(10% N-CE UP: Microarray)カテゴリーは免疫、サイトカイン、炎症、ゴルジ体、シトルリン化、ホメオボックスなどがあり、発現減少遺伝子(10% N-CE Down: Microarray)カテゴリーにはケラチン、メラニン生合成、筋タンパクなどが含まれていた。またタンパク質の場合は発現増加および発現減少のいずれにおいてもケラチン、筋タンパクが多く含まれていることが確認できた(Table 3)。

4. 考 察

MXDでは遺伝子およびタンパク質共にケラチン、メラニンなど毛髪関連が発現増加を示し、筋収縮関連の発現減少が確認された。これはMXDの育毛作用メカニズムとされている血管平滑筋弛緩(血管拡張)→血流改善→育毛促進が実際に生じた結果によるものと考えられた。しかしながらN-CEではMXDとは異なるカテゴリーが多く確認できた。成分分析の結果、N-CEには育毛に関与する物質が多数含まれていたことから、MXDとは異なる育毛作用機序の存在が示唆された。

育毛効果のある成分から検討すると、アデノシンの関与が考えられた。アデノシンはアデノシンA2A受容体を介した血小板内Cyclic AMP濃度の上昇による血小板凝集抑制、血管平滑筋弛緩、血管新生、成長因子促進などが育毛作用とされており資生堂から育毛剤“アデノゲン”が販売されている。今回の結果ではN-CEによる凝固関連の減少、血管新生や成長因子の増加は確認されたが、MXDのような明確な筋収縮関連の減少は確認できなかった。この結果はアデノシンには血管拡張作用があるが、同時に血管収縮作用もあることに起因している可能性が示唆された¹³⁾。

次に考えられるのはオートファジーの関与であった。最近ではオートファジー活性化による発毛促進の報告は多数されている。オートファジーを誘発することによって毛包

Table 2 3% NXDによる発現変動遺伝子およびタンパク質のカテゴリー解析

3% MXD UP : Microarray			3% MXD UP : Proteome		
1W	2W	3W	1W	2W	3W
Keratin	Keratin	Keratin	Keratin	Keratin	Keratin
Disulfide bond	Cell division	Melanin biosynthesis	Intermediate filament	Intermediate filament	Intermediate filament
Keratinization	Cell cycle	Albinism	Lysosome	Lipid biosynthesis	Fatty acid metabolism
Collagen	Intermediate filament	Kinetochores	Lipid metabolism	Lipid metabolism	Protein phosphatase
Inflammatory response	Citrullination		Acyltransferase	Fatty acid metabolism	Lysosome
Chemotaxis	Microtubule		Cell adhesion	Cell cycle	Fatty acid biosynthesis
Cell adhesion	Centromere		Hemostasis	Acyltransferase	Lipid metabolism
Myosin	Melanin biosynthesis		Blood coagulation	Lysosome	Pyridoxal phosphate
Intermediate filament	Disease mutation		Cysteine biosynthesis	Fatty acid biosynthesis	Lipid biosynthesis
Cytokine	Wnt signaling pathway		Cytoskeleton	Pyridoxal phosphate	Cysteine biosynthesis
Melanin biosynthesis	Keratinization		Fatty acid metabolism	Protein phosphatase	Cell junction
Acute phase	DNA repair		Disulfide bond	Cell junction	
Albinism	Actin-binding		Amino-acid biosynthesis	Cysteine biosynthesis	
Amidation	Homeobox			Cytoskeleton	
Proteoglycan	Albinism			Heparin-binding	
Antimicrobial	Lipid-binding			Cell division	
	Zinc transport			Endoplasmic reticulum	
	Tyrosine protein kinase			Proteoglycan	

3% MXD Down : Microarray			3% MXD Down : Proteome		
1W	2W	3W	1W	2W	3W
Muscle protein	Disulfide bond	Disulfide bond	Muscle protein	Muscle protein	Muscle protein
Lipid metabolism	Muscle protein	Muscle protein	Keratin	Endocytosis	Calmodulin-binding
Lipid biosynthesis	Sarcoplasmic reticulum	Actin-binding	Intermediate filament	Sarcoplasmic reticulum	Myosin
Thick filament	Lectin	Sarcoplasmic reticulum	Myosin	Thick filament	Respiratory chain
Fatty acid metabolism	Actin-binding	Cell adhesion	Thick filament	Calmodulin-binding	Sarcoplasmic reticulum
Calmodulin-binding	Cytokine	Collagen	Calmodulin-binding	Myosin	Thick filament
Oxidoreductase	Inflammatory response	Thick filament	Actin-binding	Lysosome	Actin-binding
Sarcoplasmic reticulum	Myogenesis	Growth factor	Metal-binding	Actin-binding	Cytoskeleton
Actin-binding	Calmodulin-binding	Sugar	Endoplasmic reticulum	Mitochondrion	Metal-binding
Myosin	Lipoprotein	Heme	Endocytosis	Cytoskeleton	Lysosome
Fatty acid biosynthesis	Thick filament	Calmodulin-binding	Cell division		Prenylation
Heme	Growth factor		Iron		Disulfide bond
Growth factor	Heme		Lysosome		
Lipid	Lipid metabolism				
Disulfide bond	Myosin				
Acylferase	Chemotaxis				
Lipoprotein	Osteogenesis				
Glucose metabolism	Heparin-binding				

Table 3 10% N-CEによる発現変動遺伝子およびタンパク質のカテゴリー解析

10% N-CE UP : Microarray			10% N-CE UP : Proteome		
1W	2W	3W	1W	2W	3W
Immunity	Homeobox	Citrullination	Keratin	Keratin	Keratin
Lectin	Disease mutation	Cell adhesion	Intermediate filament	Lysosome	Intermediate filament
Disulfide bond	Developmental protein	Disease mutation	Metal-binding	Lipid biosynthesis	Lysosome
Innate immunity	Spermatogenesis	Acetylation	Calmodulin-binding	Cytoskeleton	Cytoskeleton
Cytokine	Zymogen	Homeobox	Hemostasis	Cell adhesion	Keratinization
Inflammatory response			Blood coagulation	Lipid metabolism	Calmodulin-binding
Chemotaxis			Muscle protein	Fatty acid metabolism	Cysteine biosynthesis
Antiviral defense			Actin-binding	Cell cycle	Proteoglycan
Acute phase			Cytoskeleton	Sarcoplasmic reticulum	Myosin
Golgi apparatus			Disease mutation	Cysteine biosynthesis	Actin-binding
			Myosin	Intermediate filament	Acyltransferase
			Endocytosis	Proteoglycan	Aminopeptidase
			Lipid-binding	Myosin	Protein phosphatase
				Prenylation	
				Cell division	

10% N-CE Down : Microarray			10% N-CE Down : Proteome		
1W	2W	3W	1W	2W	3W
Keratin	Lectin	G-protein coupled	Keratin	Keratin	Muscle protein
Cell cycle	Disulfide bond	Disulfide bond	Fatty acid metabolism	Intermediate filament	Metal-binding
Mitosis	Muscle protein	Olfaction	Lysosome	Muscle protein	Sarcoplasmic reticulum
Cell division	Pheromone-binding	Sensory transduction	Intermediate filament	Lipid-binding	Fatty acid metabolism
Kinetochores	Calmodulin-binding	Cell adhesion	Lipid biosynthesis	Metal-binding	Fatty acid biosynthesis
Intermediate filament	Oxygen	Sulfation	Muscle protein	Myosin	Lipid biosynthesis
Microtubule	Lipoprotein	Lectin	Fatty acid biosynthesis	Endocytosis	Lipid metabolism
DNA repair		Adaptive immunity	Lipid metabolism	Keratinization	Endocytosis
DNA replication		Heme	Cysteine biosynthesis	Actin-binding	Keratin
Melanin biosynthesis		Hormone	Cell cycle	Calmodulin-binding	
Calmodulin-binding		Immunity	Cell adhesion		
Citrullination		Iron transport	Proteoglycan		
Albinism		Homeobox			
Wnt ing pathway		Myogenesis			
Helicase		Cytokine			
Osteogenesis		Zymogen			
Muscle protein		Actin-binding			

サイクルの成長期への誘導や成長期の延長をもたらすとされている。さらにオートファジー阻害剤である抗マラリア剤クロロキンが髪色の変化や脱毛などを誘発する可能性があることも示されている¹⁴⁾。N-CEによるオートファジーやオートファゴソーム関与因子の発現変動が多く確認されたことから、N-CEはオートファジー誘発による育毛作用を有している可能性も高いと思われた。

5. 総括

今回のマイクロアレイ解析とプロテオーム解析からN-CEによる育毛作用はMXDの作用機序とは異なる可能性が確認できた。今後は膨大なデータを基にさらなる生物学的な機能の解釈やパスウェイ解析を行うことでN-CEによる育毛作用や美髪効果などについて明らかにしていくとともに、N-CEとMXDの併用によるより効果的な育毛条件の検討を進めることで臨床試験移行に貢献できればと考えている。

(引用文献)

- 1) Yi Zhang et al., Lef1 contributes to the differentiation of bulge stem cells by nuclear translocation and cross-talk with the Notch signaling pathway, *Int J Med Sci.* Apr 17; 10 (6) : 738-46 (2013)
- 2) Kljuic A, et al. Desmoglein 4 in hair follicle differentiation and epidermal adhesion: evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris. *Cell.* Apr 18; 113 (2) : 249-60 (2003)
- 3) Teruhiko Makino et al., Trichohyalin-like 1 protein plays a crucial role in proliferation and anti-apoptosis of normal human keratinocytes and squamous cell carcinoma cells. *Cell Death Discov*; 6: 109. (2020)
- 4) Wu Z et al., Identification of trichohyalin-like 1, an s100 fused-type protein selectively expressed in hair follicles. *J Invest Dermatol.* Aug; 131(8): 1761-3. (2011)
- 5) F Buket Ü Basmanav et al., Mutations in Three Genes Encoding Proteins Involved in Hair Shaft Formation Cause Uncombable Hair Syndrome. *Am J Hum Genet.* Dec 1; 99 (6) : 1292-1304. (2016)
- 6) Kim Vikhe Patil et al., A Hairy Situation – PADIs in Regeneration and Alopecia. *Front Cell Dev Biol.* Dec 13; 9: 789676. (2021)
- 7) Kyung-A Hwang et al., Adenosine stimulates growth of dermal papilla and lengthens the anagen phase by increasing the cysteine level via fibroblast growth factors 2 and 7 in an organ culture of mouse vibrissae hair follicles. *Int J Mol Med.* Feb; 29 (2) :195-201. (2012)
- 8) Raviv S, et al., PAX6 regulates melanogenesis in the retinal pigmented epithelium through feed-forward regulatory interactions with MITF. *PLoS Genet.* May 29; 10 (5) (2014)
- 9) Xiaoman Xu et al., Co-factors of LIM domains (Clms/Ldb/Nli) regulate corneal homeostasis and maintenance of hair follicle stem cells. *Dev Biol.* Dec 15;312 (2): 484-500. (2007)
- 10) Xiaoling Chen et al., The phenotypic characteristics of patients with athelia and tooth agenesis. *Ann Transl Med.* Oct; 9 (20) : 1583. (2021)
- 11) Christen M et al., MYO5A Frameshift Variant in a Miniature Dachshund with Coat Color Dilution and Neurological Defects Resembling Human Griscelli Syndrome Type 1. *Genes (Basel).* Sep 23; 12 (10) : 1479. (2021)
- 12) Hui Zhang et al., Novel mutations in the Myo5a gene cause a dilute coat color phenotype in mice. *FASEB J.* Apr;35 (4) : e21261. (2021)
- 13) Joana Beatriz Sousa and Carmen Diniz, The Adenosinergic System as a Therapeutic Target in the Vasculature: New Ligands and Challenges. *Molecules.* May 6; 22 (5) : 752. (2017)
- 14) Min Chai et al., Stimulation of Hair Growth by Small Molecules that Activate Autophagy. *Cell Rep.* Jun 18; 27 (12) : 3413-3421. e3. (2019)

後期高齢者に頻発するスキン-テアの予測方法の考案

藤田医科大学研究推進本部社会実装看護創成研究センター

臺 美佐子

Aim: Because painful skin tears frequently occur in older patients, the prevention of skin tears is fundamental to improve their quality of life. However, a risk assessment tool for skin tears has not been established yet in Japan. Therefore, we aimed to propose a risk scoring tool for skin tears in Japanese older adult.

Methods: We conducted a prospective cohort study with 6-month follow-up in two long-term care hospitals in Japan. A total of 257 inpatients were recruited. Patient and skin characteristics were collected at baseline, and the occurrence of forearm skin tears were examined during follow-up. To develop a risk scoring tool, we identified risk factors, and converted their coefficients estimated in the multiple logistic regression analysis into simplified scores. The predictive accuracy of the total score was evaluated.

Results: Of 244 participants, 29 developed forearm skin tears during the follow-up period, a cumulative incidence of 13.5%. Senile purpura, pseudoscar, contracture, and dry skin were identified as risk factors for skin tears. Their weighted scores were 6, 4, 5, and 6, respectively. The area under the receiver operating characteristic curve of the total score was 0.806. At a cut-off score of 12, the sensitivity was 0.86, and the specificity was 0.67.

Conclusion: Our forearm skin tear risk scoring tool showed high accuracy, whereas specificity was low. This tool can contribute to prevent forearm skin tears in Japanese older adults.

1. 緒言

スキン-テアは、主に高齢者の四肢に生じる、摩擦や剪断による部分的または全面的な創傷と定義される¹⁾。疼痛と外観の審美性が損なわれることが高齢者に大きな苦痛を与えることから、スキン-テア予防は高齢者の生活の質(QOL)向上のために重要である^{2,3)}。近年、日本人高齢者におけるスキン-テアの危険因子が明らかになったが^{5,6)}、予測妥当性のあるリスク評価ツールはまだ確立されていない。そこで、本研究では、日本人高齢者を対象とした新たなスキン-テアの予測モデルを開発した。

これまでの研究ではオーストラリア、カナダ、デンマークでは、スキン-テアの有病率は11.4～22%で⁷⁻¹⁰⁾、転倒歴、スキン-テアの既往、日常生活自立度、紫斑、血腫、線維化がスキン-テアと関連していた¹¹⁻¹³⁾。一方、日本では、有病率は3.9%と欧米諸国より低く、危険因子はスキン-テアの既往とブレイデンスケールのみであった⁴⁾。このような日本と欧米諸国との相違は、民族、環境、医療状況などの条件の違いが影響を与えていることを示唆している。

Raynerらは、これまでの研究をもとに、スキン-テア予測モデルを提案し¹⁴⁾、ROC (receiver-operating characteristic)

分析における曲線下面積(AUC)が0.854と、高い診断精度を示していた。しかし、この予測モデルは、前述のように欧米と日本では異なるため、日本人集団への適用には疑問がある。そこで、我々は、日本人集団におけるスキン-テアの予測には、別のモデルが必要であると考えた。

本研究では、対象者の前腕部だけに着目した。これは、我々の以前の研究⁵⁾において、日本人高齢者のスキン-テアの半数(56.4%)は前腕部に発生していたからである。スキン-テアの関連因子は、解剖学的部位によって異なる可能性がある。したがって、危険因子を特定するためには、特定の部位に着目することが有効な方策であると考えられる。

本研究の目的は、日本人高齢者の前腕部におけるスキン-テアの発生に関連する因子を特定し、日本人に適したスキン-テア予測モデルを提案することとした。

2. 方法

研究デザイン：前向きコホート研究(6カ月間)

対象者：長期療養型医療施設2施設に入院・入居する高齢者(65歳以上)の前腕の内側・外側を観察対象部位とした。除外基準として、炎症性皮膚疾患(アトピー性皮膚炎、乾癬など)を有する者とした。

調査項目：初回時に、基本情報ならびにスキン-テア発生要因と考えられる指標を診療録及び視診と触診により得る。具体的には、性別、年齢、病歴、日常生活自立度、転倒歴、拘縮状況、日光曝露に関わる職歴、服薬、喫煙歴、スキン-テア既往歴、皮膚の特徴(皮膚の色調・色素沈着・紫斑・瘢痕・乾燥・皸・たるみ・硬さ)とし、追跡は、2週間後、1ヶ月後、2ヶ月後、3ヶ月後、4ヶ月後



Risk scoring tool for forearm skin tears in Japanese older adults: A prospective cohort study

Misako Dai

Research Center for Implementation Nursing Science Initiative, Research Promotion Headquarters, Fujita Health University

月後、5ヶ月後、6ヶ月後に、スキン-テアの発生有無をスキン-テア評価に精通した、皮膚・排泄ケア認定看護師資格を有する看護学研究者にて判定した。

分析：6ヶ月間の累積皮膚スキン-テア発生率(%)は、追跡期間中にスキン-テアが発生した参加者数をベースラインでの参加者総数で除算し算出した。

連続変数は平均標準偏差(SD)で示し、t検定で解析した。カテゴリー変数は頻度(%)で示し、個人と皮膚の特徴に関する記述統計ではカイ二乗検定またはFisherの正確確率検定で解析した。p値が0.05未満の場合は有意とした。また、スキン-テアの危険因子候補を同定するため、単変量ロジスティック回帰分析を行った。多重共線性を考慮した結果、単変量解析でp値が0.6未満となった変数と年齢を多変量ロジスティックモデルに組み入れた。スキン-テアの発生率との関連の強さは、オッズ比(OR)及び95%信頼区間(CI)で表した。多変量回帰分析で有意な関連を示した危険因子は、先行研究¹⁸⁾に従って回帰係数をもとに重み付けを行った。重み付けした危険因子の合計スコアの予測精度をROC解析により評価した。カットオフスコアの決定後、感度、特異度、positive predictive value (PPV) 及び negative predictive value (NPV) を算出した。解析にStata/SE version 14.2 (StataCorp LLC, College Station, Texas)を使用した。

倫理的配慮：東京大学医学部倫理審査委員会の承認を得て(# 12067-1)、倫理規定に準じて実施した。

3. 結果

3.1. 対象者

257名の入院患者のうち、除外基準に合致した者を除き、244名が分析対象者となった。

3.2. スキンテア発生率

244名のうち、6ヶ月間の追跡期間中に前腕部に皮膚断裂が発生したのは29名で、累積発生率は13.5%(Fig. 1)、STARによるスキン-テア分類は1aが最多であった(Table 1)。

3.3. 対象者の基本的特徴

Table 2にベースラインの基本特徴を示した。スキン-テア発生群は、非発生群と比較し年齢、拘縮の頻度は有意に高く(p=0.032, 0.015)、認知症の頻度は有意に低かった(p=0.042)。

Table 3にベースライン時の対象者の皮膚特性を示す。紫斑と癬痕の頻度は有意に高く(p<0.001, p=0.004)、皮膚の乾燥は、割合の高い傾向があった(p=0.052)。

3.4. スキン-テアモデルの予測

スキン-テアのリスクファクターを特定するためのロジスティック回帰分析を示す(Table 4)。紫斑、拘縮、癬痕の有無は有意に関連し(p=0.002, 0.023, 0.027)、年齢調整後の皮膚の乾燥はスキン-テアと関連する傾向があった(p=0.051)。

予測モデルを作成するために、リスクファクターを回帰係数に基づいて紫斑6、皮膚の乾燥6、拘縮6と重み付けした。合計スコアのROC解析では、AUCは0.806であった(Fig. 2)。カットオフスコアを12点以上とした場合、感度は0.86、特異度は0.67、陽性的中率は0.26、陰性的中率は0.97であった(Table 5)。

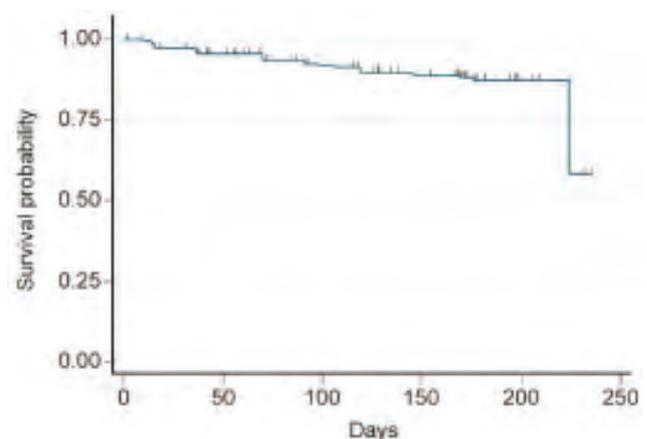


Fig. 1 Kaplan-Meier curve for forearm skin tear incidence in a sample of Japanese older adults

Table 1 Skin Tear Audit Research (STAR) classification

Classification category	Number	(%)
1a	10	(34.5)
1b	6	(20.7)
2a	5	(17.2)
2b	3	(10.3)
3	4	(13.8)
Unknown	1	(3.4)

Table 2 Participant characteristics at baseline

Characteristic	Total	With skin tears	Without skin tears	p
	Mean \pm SD or n (%)	Mean \pm SD or n (%)	Mean \pm SD or n (%)	
Age (n = 244)	88.1 \pm 1.0	90.7 \pm 2.8	87.7 \pm 1.1	0.032
Sex (female) (n = 244)	180(73.8)	20(11.1)	160(88.9)	0.781
Body mass index (n = 244)	18.1 \pm 0.4	17.8 \pm 1.5	18.1 \pm 0.4	0.659
Braden Scale (n = 241)	13.4 \pm 0.4	12.2 \pm 1	13.6 \pm 0.5	0.975
Self-repositioning (n = 189)	59(31.2)	4(6.8)	55(93.2)	0.593
Contracture (n = 242)	151(62.4)	24(15.9)	127(84.1)	0.015
Paralysis (n = 242)	59(24.4)	8(13.6)	51(86.4)	0.668
Dementia (n = 243)	101(41.6)	7(6.9)	94(93.1)	0.042
Medical history				
Heart disease (n = 243)	80(32.9)	11(13.8)	69(86.3)	0.541
Respiratory diseases (n = 243)	75(30.9)	10(13.3)	65(86.7)	0.653
Renal disease (n = 243)	28(11.5)	3(10.7)	25(89.3)	1.000
Skin cancer (n = 243)	2(0.8)	1(50.0)	1(50.0)	0.225
Medication				
Steroid ointment (n = 244)	10(4.1)	2(20.0)	8(80.0)	0.338
Anticoagulants (n = 243)	9(3.7)	0(0.0)	9(100.0)	0.605
Antiplatelets (n = 243)	17(7.0)	0(0.0)	17(100.0)	0.235
Sedatives (n = 243)	62(25.5)	9(14.5)	53(85.5)	0.467
Antihypertensive (n = 243)	112(46.1)	13(11.6)	99(88.4)	0.884
Skin moisturizer (n = 238)	131(55.0)	11(8.4)	120(91.6)	0.074
Mobility (n = 242) ^a				
Assistance required	10(4.1)	9(4.2)	1(3.5)	0.269
Nearly bedridden	69(28.5)	65(30.4)	4(14.3)	
Completely bedridden	163(67.4)	140(65.4)	23(82.1)	
History of falls (n = 244)	24(9.8)	0(0.0)	24(100.0)	0.089
History of skin tears (n = 233)	28(12.0)	6(21.4)	22(78.6)	0.109

AbbreviationsSD, standard deviation.

^a Patient mobility was evaluated using Japanese long-term care insurance system criteria [21].

Table 3 Skin characteristics of participants at baseline

Characteristic	Total (n = 244)	With skin tears (n = 29)	Without skin tears (n = 215)	p
	n (%)	n (%)	n (%)	
Senile purpura	92(37.7)	21(22.8)	71(77.2)	<0.001
Thin skin	149(61.1)	20(13.4)	129(86.6)	0.353
Pseudoscar	99(40.6)	19(19.2)	80(80.8)	0.004
Wrinkle	216(88.5)	28(13.0)	188(87.0)	0.217
Pigmentation	194(79.5)	25(12.9)	169(87.1)	0.464
Dry skin	191(78.3)	27(14.1)	164(85.9)	0.052
Elastosis	1(0.4)	0(0.0)	1(100.0)	1.000

Table 4 Logistic regression analysis result

Variable	Crude OR (95% CI)	p	Adjusted OR (95% CI)	p	Coefficient
Age	1.05 (0.99-1.11)	0.065	1.05 (0.98-1.11)	0.155	—
Senile purpura	5.32 (2.24-12.61)	0.000	4.28 (1.72-10.65)	0.002	1.45
Contracture	3.25 (1.19-8.85)	0.021	3.38 (1.18-9.67)	0.023	1.22
Pseudoscar	3.20 (1.42-7.24)	0.005	2.67 (1.12-6.39)	0.027	0.98
Dry skin	4.19 (0.96-18.26)	0.056	4.73 (1.00-22.50)	0.051	1.55

Abbreviations: CI, confidence interval; OR, odds ratio.

Table 5 Prediction of skin tear occurrence by the total score of risk factors

Score	With skin tears n (%)	Without skin tears n (%)	Total n (%)
≥12	25(86.2)	71(33.0)	96(39.3)
<12	4(13.8)	144(67.0)	148(60.7)
Total	29(100)	215(100)	244(100)

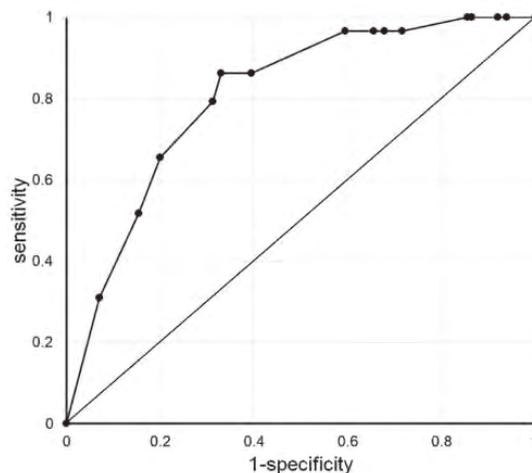


Fig. 2 Receiver operating characteristics curve for the forearm skin tear prediction model in a sample of Japanese older adults

4. 考 察

本研究では、日本人高齢者において、紫斑、拘縮、癬痕、乾燥が前腕部スキン-テアのリスクファクターであることを明らかにした。さらに、予測モデルを提案し、その感度、特異度、PPV、NPVはそれぞれ0.86、0.67、0.26、0.97であった。

先行研究で、我々は長期療養型病院の日本人高齢入院患者410名を対象に、スキン-テアの発生率を調査した⁴⁾。3ヶ月間の累積罹患率は3.8%であり、STAR分類の大分類は1b(57.1%)であった。本研究は、前報と比較して追跡期間が長いにもかかわらず、6ヶ月累積発症率が13.5%と高く、STAR分類も1aが34.5%、2aが17.2%と大きく異なった。STAR分類の大分類が1b(淡色、くすみ、黒ずみ)から1a(正常皮膚色)に変化したことは、スキン-テアの重症度が低下したことを示し、累積罹患率の上昇は、医療従事者のスキン-テアに対する認識の向上を反映していると考えられる。

日本人の高齢者では前腕のスキン-テアが半数以上を占めていること⁴⁾、解剖学的部位によって関連因子が異なる可能性があることから¹³⁾、本研究では前腕のみに注目した。本研究では、紫斑、拘縮、癬痕、皮膚の乾燥の4つの前腕部スキン-テアのリスクファクターを特定でき、前腕部への予測指標として使用が期待される。

紫斑は、Batemanの紫斑病や光線性紫斑病としても知られ、四肢の光線性皮膚に生じる紫色の斑点や病変である¹⁹⁻²¹⁾。老人性紫斑病は、血管の減少、真皮の菲薄化を伴う^{22, 23)}。偽癬痕は、白色の、星状または線状の癬痕様皮膚病変である^{24, 25)}。これらは、高齢者の皮膚にしばしば観察され、高齢者の皮膚の脆弱性に関連している^{21, 26)}。したがって、この2つの皮膚特性が、いくつかの研究においてスキン-テアのリスクファクターとして同定されたことは妥当である^{11-13, 27)}。一方、オーストラリアで報告されてきた線維化^{13, 15)}は地域特異的であると考えられる。これは、紫外線曝露により真皮に線維が大量に蓄積する現象である²⁸⁾。これらの結果は、異なる環境条件がスキン-テアに影響するため、地域別の予測モデルの必要性を示唆するものであった。

本研究の限界は、限定的な部位の観察、症例数、2施設に限られたことである。本研究の結果を標準化するには、複数の施設や環境での大規模な研究が必要である。

5. 結 論

我々は、日本の高齢者人口に適応した新しい前腕スキン-テア発生予測モデルを開発するために、2つの長期療養型病院において前向きコホート研究を実施した。その結果、紫斑、偽癬痕、拘縮、皮膚の乾燥の4つの危険因子が同定

された。その結果、前腕部皮膚断裂の予測モデルは高い精度を示したが、特異度と陽性適中率は低かった。今後、多部位・多施設での調査により予測モデルの改善が期待される。

(引用文献)

- 1) LeBlanc K, Baranoski S. Skin tear: State of the science: Consensus statements for the prevention, prediction, assessment, and treatment of skin tears. *Adv Skin Wound Care*. 2011; 24 (9 suppl) : 2-15
- 2) Payne RL, Martin ML. The epidemiology and management of skin tears in older adults. *Ostomy Wound Manage* 1990; 26: 26-37
- 3) Malone ML, Rozario N, Gavinski M, Goodwin J. The epidemiology of skin tear in the institutionalized elderly. *J Am Geriatr Soc*. 1991; 39 (6): 591-595
- 4) Sanada H, Nakagami G, Koyano Y, Iizaka S, Sugama J. Incidence of skin tears in the extremities among elderly patients at a long-term medical facility in Japan: A prospective cohort study. *Geriatr Gerontol Int*. 2015;15 (8): 1058-1063
- 5) Koyano Y, Nakagami G, Iizaka S, Minematsu T, Noguchi H, Tamai N, Yamamoto Y, Kitamura A, Tabata K, Abe M, Murayama R, Sugama J, Sanada H. Exploring the prevalence of skin tears and skin properties related to skin tears in elderly patients at a long-term medical facility in Japan. *Int Wound J*. 2016;13 (2): 189-197
- 6) Koyano Y, Nakagami G, Iizaka S, Sugama J, Sanada H. Skin property can predict the development of skin tears among elderly patients: A prospective cohort study. *Int Wound J*. 2017;14 (4): 691-697
- 7) Carville K, Smith JA. Report on the effectiveness of comprehensive wound assessment and documentation in the community. *Prim Intent*. 2004; 12: 41-48
- 8) Leblanc K, Christensen D, Cook J, Culhane B, Gutierrez O. Prevalence of skin tears in a long-term care facility. *J Wound Ostomy Continece Nurs*. 2013; 40 (6): 580-584
- 9) Woo K, LeBlanc K. Prevalence of skin tears among frail older adults living in Canadian long-term care facilities. *Int J Palliat Nurs*. 2018; 24 (6): 288-294
- 10) Bermark S, Wahlers B, Gerber AL, Philipsen PA, Skiveren J. Prevalence of skin tears in the extremities in inpatients at a hospital in Denmark. *Int Wound J*. 2018; 15 (2) : 212-217
- 11) Lewin GF, Newall N, Alan JJ, Carville KJ, Santamaria NM, Roberts PA. Identification of risk factors

- associated with the development of skin tears in hospitalised older persons: a case-control study. *Int Wound J.* 2016;13 (6) : 1246-1251
- 12) Newall N, Lewin GF, Bulsara MK, Carville KJ, Leslie GD, Roberts PA. The development and testing of a skin tear risk assessment tool. *Int Wound J.* 2017; 14(1) : 97-103
- 13) Rayner R, Carville K, Leslie G, Dhaliwal SS. A risk model for the prediction of skin tears in aged care residents: A prospective cohort study. *Int Wound J.* 2019; 16 (1): 52-63
- 14) Rayner R, Carville K, Leslie G, Dhaliwal SS. Models for predicting skin tears: A comparison. *Int Wound J.* 2020; 17 (3): 823-830
- 15) Rayner RL, Carville KJ, Leslie GD, Dhaliwal SS. Clinical purpura and elastosis and their correlation with skin tears in an aged population. *Arch Dermatol Res.* 2019; 311 (3): 231-247
- 16) Bergstrom N, Braden BJ, Laguzza A, Holman V. The Braden Scale for Predicting Pressure Sore Risk. *Nurs Res.* 1987; 36 (4): 205-10
- 17) Carville K, Lewin G. STAR: A consensus for skin tear classification. *Prim Intent.* 2007; 15: 18-29
- 18) Sanada H, Iizaka S, Matsui Y, Furue M, Tachibana T, Nakayama T, Sugama J, Furuta K, Tachi M, Tokunaga K, Miyachi Y, Scientific Education Committee of the Japanese Society of Pressure Ulcers. Clinical wound assessment using DESIGN-R total score can predict pressure ulcer healing: pooled analysis from two multicenter cohort studies. *Wound Repair Regen.* 2011; 19 (5): 559-567
- 19) Bateman T. A practical synopsis of cutaneous diseases, 3rd edn. London, Longmans, 1813
- 20) Menditto V, Borrelli L. Bateman's disease. *Pahologica.* 1994; 86 (6): 645-648
- 21) Karadag AS, Parish LC, Lambert WC. Senile purpura as a stage of dermatoporosis. *Skinmed.* 2017; 15 (2) :91-92
- 22) McKnight B, Seidel R, Moy R. Topical human epidermal growth factor in the treatment of senile purpura and the prevention of dermatoporosis. *J Drugs Dermatol.* 2015; 14 (10): 1147-1150
- 23) Borroni RG, Grassi S, Concardi M, Agozzino M, Caspani C, Giordano C, Vignini M, Arbustini E. Involvement of dermal vascular basement membrane in senile purpura: Quantitative immunohistochemical study. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2016; 30 (10) : e63-e65
- 24) Kobayashi K, Tanaka M, Ito H, Harada T, Aiba M. Dermoscopic features of stellate spontaneous pseudoscars in five Japanese men. *Br J Dermatol.* 2008; 159 (2): 479-480
- 25) Kaya G, Saurat JH. Dermatoporosis: A chronic cutaneous insufficiency/fragility syndrome. Clinicopathological features, mechanisms, prevention and potential treatments. *Dermatology.* 2007; 215 (4): 284-294
- 26) Menzinger S, Saurat JH, Kaya G. Morphological Analysis of Dermatoporosis by in vivo Reflectance Confocal Microscopy and Ultrasonography. *Dermatopathology.* 2020; 6 (4) : 279-287
- 27) Wick JY, Zanni GR. Skin tears: Prevention and treatment. *Consult Pharm.* 2008; 23 (7) : 508-510
- 28) Uitto J. The role of elastin and collagen in cutaneous aging: Intrinsic aging versus photoexposure. *J Drugs Dermatol.* 2008;7 (2 suppl) : s12-s16

顔の動画画像解析による脈波の多点抽出と皮下の血行動態の評価法の開発

福島大学共生システム理工学類

田中 明

In recent years, video plethysmography (vPPG) which is pulse wave derived from the skin video image has attracted attention as a non-contact heart rate measurement technique. vPPG may be used to evaluate not only heart rate but also local hemodynamics by simultaneously obtaining vPPG from multiple regions. In this study, a two-dimensional evaluation of facial subcutaneous hemodynamics was performed by means of the features of vPPG. The facial video and ear PPG were measured before and after facial massage in experiments. The facial video was divided into small grid regions of interest (ROI), and vPPGs were extracted at each ROI using repetitive periodic component analysis (r-PiCA). PiCA is a technique to extract the most periodic components from a set of multichannel recordings. The three features which were crest time, the time to reach 50% of the pulse wave area and lag of vPPG from PPG were calculated from vPPG of each ROI. The feature values wave changed significantly with facial massage. The results indicate the possibility to evaluate of subcutaneous hemodynamics aspects of face using vPPG.

1. 緒言

近年、通常のカラーカメラで撮影された顔などの人の肌の映像から、皮膚の色の変化を解析することによって脈波成分(映像脈波; Video Plethysmography (vPPG))が抽出可能であり、そこから心拍数や脈波伝播時間などの生理指標を得る手法が提案され、様々な応用が期待されている。これは、皮下の光の吸収量の特性を利用したものであり、特にRGB成分のうち、ヘモグロビンによる吸収量の多い緑成分(G)は皮下の血液容積の変化の影響を強く受けて変化するため、緑成分の時間変化に対して簡単な帯域通過フィルタを適用するだけで平均心拍数などの情報を得ることが可能である¹⁾。

vPPGはその計測の原理から、臨床や健康分野で利用されている接触式の容積脈波に近い情報を含んでいることが期待できることから、もし映像脈波が精度よく得られれば、脈波から得られる様々な生理指標が非接触で得られ、血行動態の評価に利用できる可能性がある。また、vPPGの利点は、非接触計測が可能だけでなく、映像に写っている複数の部位の脈波を同時に得られることであり、心拍数だけでなく、複数の関心領域(ROI)間の脈波の伝播特性や脈波形状の部位による違いといった血行動態に関する新たな情報が抽出できる可能性もある。

しかし、肌の皮下の血行動態を面で評価するためには、

評価対象の肌表面内を細かく分割してそれらの部分で脈波を抽出する必要があるが、抽出が比較的容易な顔であっても、内部散乱光の状態は部位によって異なり、信号のSN比も場所によって大きく異なる。さらに、脈波の抽出精度は、照明、カメラの性能や体動などの影響を大きく受けることなど、血行動態を解析するためには、脈波の形を維持した安定的な抽出法の開発が必要である。

本研究では、周期成分分析(PiCA)を応用した、vPPG抽出方法を顔の映像に適用し、得られたvPPGの特徴量を利用した顔表面の皮下の血行動態解析を目的とした。

2. 方法

2.1. 周期成分分析を利用した脈波抽出

上述したように、RGB信号で記録された肌の映像には脈波成分が含まれており、それを抽出することによって容積脈波に近い情報を得られる可能性がある。それはあたかも無数の脈波センサを皮膚表面に設置していることに相当し、異なる部位の脈波を同時に得られることで、脈波の伝播特性や部位の違いを積極的に活用した新たな血行動態解析の可能性もある。

しかし、vPPGはその撮影環境や部位、さらには体動などのアーチファクトの影響を大きく受けるため、ノイズ除去などの信号処理は不可欠であるが、狭帯域の帯域通過フィルタなどにより過度なフィルタ操作は波形を歪ませてしまい、脈の立ち上がり点の位置や波形そのものに含まれる有用な情報が失われてしまう可能性がある。したがって、脈波解析に利用できる精度でvPPGを得るためには、脈波の高調波成分をできる限り維持して抽出する必要がある。帯域通過フィルタ以外の脈波抽出法として、これまで、クロミナンスに着目しRGB信号に対する線形変換を用いるもの²⁾、RGB信号に対して独立成分分析を適用して脈波



Extraction of multipoint pulse wave and evaluation of subcutaneous hemodynamics by analysis of facial videos

Akira Tanaka

Faculty of Symbiotic Systems Science, Fukushima University

成分を抽出する方法³⁾などが報告されている。

本研究では、周期成分分析を利用した方法を用いて vPPG を抽出する。周期成分分析 (PiCA) とは、既知の位相情報を基に、同時に記録された多チャンネルの信号に対して適当な変換行列を適用させることによって、既知あるいは想定される周期に近い周期成分を多く含む信号から順に分離する手法である⁴⁾。Reza らは PiCA を用いて妊婦から得た複数チャンネルの心電図波形から母体と胎児の双方の心電図波形を分離できること、ICA (JADE 法) における一般的な問題である分離信号の順序の不定性を回避できることを報告している⁵⁾。

周期成分分析は疑似周期信号に対して適用可能ではあるが、あらかじめ位相情報、すなわち拍毎の心周期の情報が必要である。そこで本研究では、初めに仮の心周期を算出し、PiCA による脈波抽出と心周期情報の更新を繰り返し実行することによって最終的に vPPG を得る、繰り返し周期成分分析 (r-PiCA) を用いて抽出する⁵⁾。

本手法の手順を図 1 に示す。まず、関心領域 (ROI) の平均 RGB 信号について、G 信号のパワースペクトルから推定される平均心拍数を中心周波数とする帯域通過フィルタによって脈波信号を抽出し、心周期を拍毎に求め、それを仮の心周期とする。次に、ROI を複数の領域 (subROI) に分割し、それぞれの subROI における RGB 信号で観測信号ベクトルを構成する。したがって信号のチャンネル数は subROI の数 \times 3 となる。初めに求めた仮の心周期を利用して PiCA を行い、得られた変換信号の中から心周期の成分を最も多く含む系列を選択し、それを vPPG とする。得られた脈波を基に再計算された心周期情報を用いて再び PiCA によって脈波を更新する。これを心周期のばらつきがある程度収束するまで繰り返して最終的な vPPG を算出する。

2. 2. 顔の映像脈波による皮下の血行動態の評価方法

顔表面の血行動態を評価するために、まず、顔の映像を格子状に分割し、その中の肌の部位に関心領域 (ROI) とし、各 ROI の RGB 信号について繰り返し PiCA を使用して vPPG を抽出する。

得られた脈波は輝度情報に含まれる脈動成分から抽出されるため、その振幅は照明、肌の吸光特性、肌の表面反射やカメラの感度などの影響を受ける。したがって、vPPG の波高値の情報を用いて血行動態を評価する場合には注意が必要である。本研究では脈波の形状における時間情報に着目する。すなわち、図 2 に示す vPPG の各拍の脈の立ち上がり点を結んだ基線を除去した波形について、以下の 3 つの特徴量を算出する。

(1) 立ち上がり時間 (T_C)

脈波の立ち上がりから最初の極大点までの時間 (crest

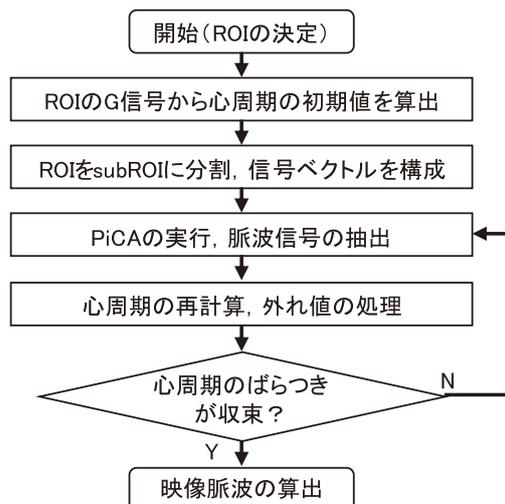


図1 繰り返しPiCAによる映像脈波抽出手順

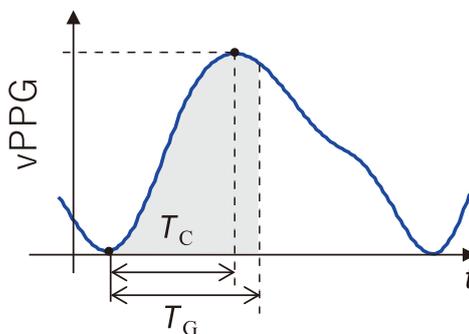


図2 基線を除した映像脈波と特徴量

time)。

(2) 脈波面積が半分になる時間 (T_G)

図 2 に示す脈波において、立ち上がりから脈波の積分値が一拍の脈波面積の半分に達するまでの時間。

(3) 耳朶の脈波との伝播時間差 (ΔT)

耳朶に取り付けた接触式の光電容積脈波 (PPG) と vPPG との相互相関関数から算出される映像脈波の遅れ時間。

2. 3. 顔のマッサージを利用した検証実験

実験対象は 21 歳から 22 歳までの健常者 10 名 (男性 4 名、女性 6 名、平均年齢 21.6 ± 0.5 歳) であり、それぞれに左頬をマッサージする試行と右頬をマッサージする試行の 2 種類の実験を実施した。実験の概要を図 3 に示す。被験者は椅子に座り、顔を顎台に乗せて安静にしてもらい、12 秒を 1 セットとして計測を行った。計測は、マッサージ側の耳朶容積脈波 (PPG) および顔映像であり、PPG はサンプリング周波数 1 kHz で記録した。顔映像はカラーカメラを用いて、フレームレート 100 fps で撮影した。

まず、実験当日の体調確認のため上腕で血圧を計測し、センサを装着した後、マッサージ前の安静状態を計測した。その後、図 4 に示すように、片側の頬のみをマッサージロ

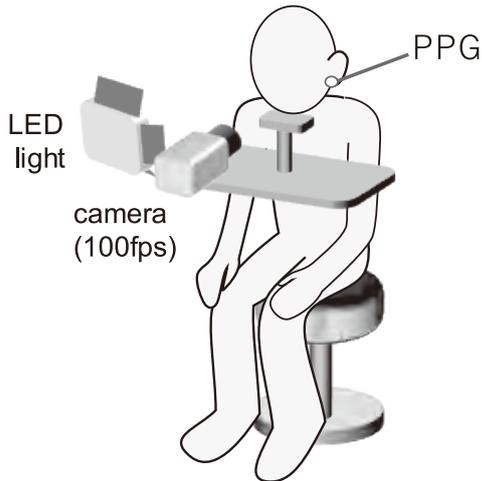


図3 実験の概要

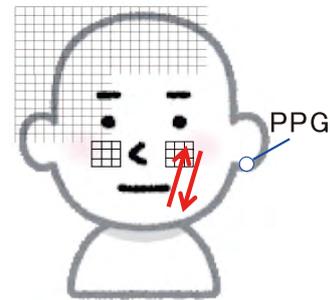


図4 マッサージ位置と特徴量の左右比較をしたROIの位置

ーラで、口元から目の下の位置を上下に2分間マッサージを行った。マッサージは強さ(押圧)を任意とし、一往復当たりおよそ2秒で行うよう指示した。マッサージ後、再び顎台に顔を乗せてもらい、マッサージ終了後1分から1分おきに5回の計測を行った。さらに、異なる日に反対側の頬をマッサージする同様の実験を行った。

得られた映像の格子状の各ROIで上述の特徴量を算出し、各セット(12秒間)の平均値を求めた。また、マッサージの効果を明確にするために、図4に示すように、左右の目の下方に約 $3\text{cm} \times 3\text{cm}$ のROIを設け、特徴量の平均値を算出し、マッサージをした側からしていない側の値を減じた左右差を計算し、この値のマッサージ前からの変化量を評価した。

3. 結果

図5はある被験者のマッサージ前後の T_C 、 T_G および ΔT の顔表面の分布を示したものである。マッサージ前の結果では、 T_C 、 T_G および ΔT は両頬のあたりで値が低く、額で大きな値になっており、脈が各ROIに至るまでの血管インピーダンスおよび脈波伝播時間が反映されている。特に ΔT は心臓からの距離にも依存するため、額で高値となっていると考えられる。また、本被験者では、マッサージ前であってもすでに左右差や局所的な指標の違いが見取れることから、各ROIの支配血管の特性や組織の血管床の特性の違いが現れていると考えられる。

マッサージ後はそれぞれの特徴量がマッサージ側で減少しており、特にあご付近で減少量が大きい結果となった。これは、あご付近でマッサージローラの押圧が最も高くなっていること、骨と顔表面との間の組織の厚みなどの影響であると考えられる。また、マッサージ後数分経っても変化は元に戻らない、あるいはさらに変化が大きくなる傾向が見てとれる。

図6(a)～(c)は各特徴量の頬の部分の平均値の左右差(マッサージしていない方を基準とした差)の変化を示したものである。マッサージ終了直後から時間の経過とともに減少傾向を示しており、マッサージ直後よりも数分後のほうがマッサージ前に比べて優位に値が減少している。これは、マッサージが皮下の血行動態を変化させたこと、血行動態がマッサージ終了後も変化し続けていることを示している。しかし、本実験結果からは、この変化がどの程度継続するかは不明であった。

4. 考察

図5の結果は、顔の皮下の局所的な血行動態が捉えられていることを示しており、マッサージ前の安静状態であっても特徴量は局所的に異なる値になっており、もともとの皮下の血流の偏りなどを捉えられる可能性がある。マッサージの効果では、マッサージローラの押圧などの違いと思われる変化も現れており、適切なマッサージとその効果の評価が行える可能性がある。

図5および図6の結果から、マッサージによって、 T_C 、 T_G および ΔT の減少が生じた。一般にマッサージの効果として血行が良くなることが挙げられるが、脈の伝播特性をRC回路による集中定数型の電気回路モデル(ローパスフィルタ)で表現できると仮定すると、本結果が、末梢組織に至る血管抵抗が減少し、立ち上がり時間の減少(時定数の減少)とカットオフ周波数の増加によって生じたと考えられることと矛盾しない。

一方、本研究で採用した特徴量は、末梢の血行動態だけでなく、心機能や血圧などの影響も受けることから、顔内の相対的な違いは末梢の血行動態の違いとして評価できるが、特徴量の絶対値から組織の血行動態を表することは困難である。今後、脈波の2階微分値である加速度脈波解析による反射波の解析の応用や、姿勢変化などなんらかの刺

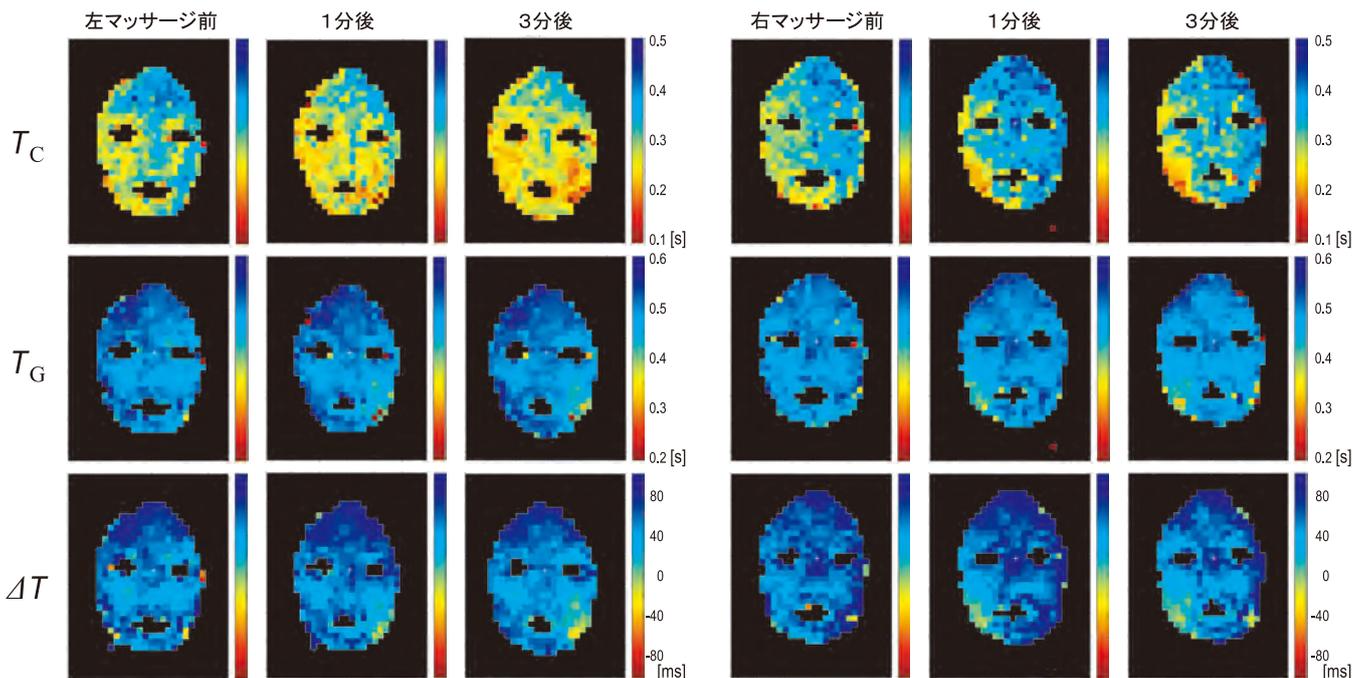


図5 顔の映像脈波から算出された特徴量のマッサージ前後の変化

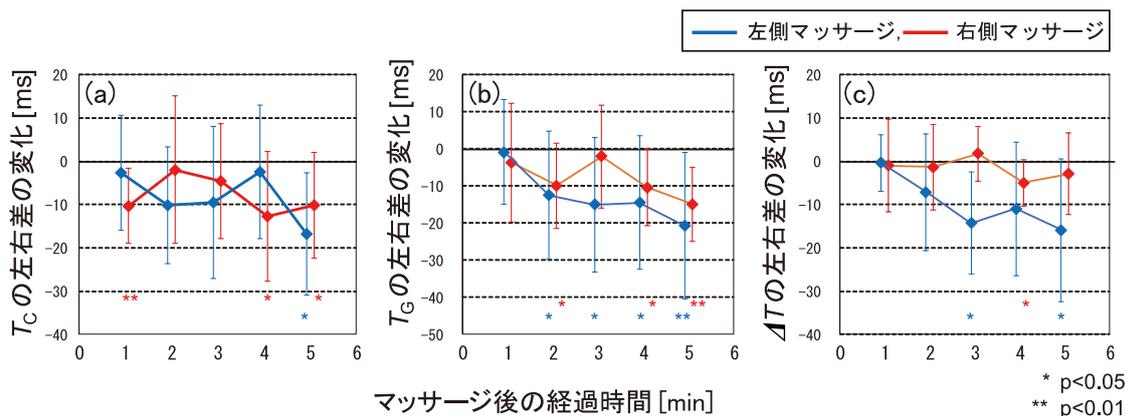


図6 頬の特徴量の左右差の経時的変化 ((a) T_c , (b) T_g , (c) ΔT)

激あるいは負荷に対する応答で評価するなどの工夫が必要である。

5. 総括

本研究では、顔を対象とした映像脈波vPPGによる二次元的な皮下の血行動態解析を目的とし、顔のマッサージによる血行動態の変化を、顔を細かいROIに分割し、r-PiCAを用いて抽出したvPPGの脈波波形から皮下の血行動態を評価した。評価指標として、vPPGの立ち上がり時間、脈波面積の50%となる時刻、耳朶の容積脈波との脈波伝播時間差を用いて評価したところ、マッサージによって各特徴量が有意に減少し、vPPG解析によって皮下の血管抵抗の変化を評価できる可能性が示唆された。また、マッサー

ジ前であっても顔の部位によって指標に特徴的な違いがあり、血管の支配や特性の違いも評価できる可能性も示された。しかし、脈波形状は末梢血管特性だけでなく、心機能、組織までの血管性状および血圧なども影響すると考えられるため、今後、値の相対的な評価だけでなく、脈の伝播の物理モデルを考慮した解析が必要である。

(引用文献)

- 1) M. Yoshizawa, N. Sugita, et al.: Blood perfusion display based on video pulse wave, *Proc. 38th Annual Conference of IEEE Engineering in Medicine Biology Society* 2016, 4763-4767 (2016).
- 2) G. de Haan and V. Jeanne: Robust Pulse Rate From

- Chrominance-Based rPPG, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 60 (10), 2878-2886 (2013).
- 3) M. Poh, et al.: Non-contact, automated cardiac pulse measurements using video imaging and blind source separation, *Optics Express*, 18(10), 10762-10774 (2010).
- 4) L. K. Saul and J. B. Allen: Periodic component analysis: An eigenvalue method for representing periodic structure in speech, *Proc. Advances in Neural Information Processing Systems 13 (NIPS 2000)*, 807-813 (2000).
- 4) S. Reza, et al.: Multichannel Electrocardiogram Decomposition Using Periodic Component Analysis, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 55 (8), 1935-1940 (2008).
- 5) A. Tanaka, M. Kumagai and M. Yoshizawa: Non-contact Assessment of Peripheral Hemodynamics by Using Video Plethysmography, *Proc. IEEE 8th Global Conference on Consumer Electronics (GCCE)*, 131-133 (2019).

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

ウィーン大学心理学部, 日本学術振興会, 早稲田大学理工学術院総合研究所

中村 航洋

Millions of people wear cosmetic makeup every day to make their faces look more attractive, feminine, and healthier. Accumulated evidence from research indicates that several cosmetic practices accentuate perceived femininity and attractiveness. However, the quantitative link between facial appearance modification through cosmetic makeup and perceived facial impressions remains unclear. This study aimed to build a mathematical model of Japanese women's everyday facial makeup using a statistical image quantification technique (Study 1). In addition, it sought to identify psychological factors underlying the cosmetic effect on facial attractiveness (Study 2). In Study 1, 16 Japanese women's faces were photographed before and after applying facial makeup. The facial images were analyzed using principal component analysis to quantify the change in the facial surface associated with the cosmetics. The statistical image quantification enabled visualization of facial appearance linked to makeup. It revealed that cosmetics exaggerated the luminance contrasts between facial parts (i.e., eyes, eyebrows, and lips) and surrounding facial areas. The validation test confirmed that perceived attractiveness, health, and naturalness were curvilinearly changed due to the facial makeup exaggeration. Study 2 demonstrated a sex difference in the luminance contrast of facial parts (53 women and 54 men), suggesting these traits are sexually dimorphic. The results indicated that widely used cosmetic makeup among Japanese women accentuates facial features that signal femininity and youthfulness by heightening the luminance contrasts of facial parts.

1. 緒言

メイクアップは健康的な美しさや個性を魅力的に演出する方法として、人々の間で広く用いられている。化粧による顔の印象の演出には、個性や社会的地位、思想などの社会的表示機能と、普遍的に顔印象を美化する機能の両方があると考えられている¹⁾。化粧がつくりだす印象の美化効果には、幾何学的錯視効果によって顔形状の知覚に作用するものもあるが、肌表面の明るさや色の空間的分布、コントラストに作用して、印象を演出するものもある²⁻⁴⁾。化粧品を用いたメイクアップにより顔の印象が変容することは日常の実践と経験知としてはよく知られており、アイメイクやベースメイクには、顔の魅力印象を高める効果があることが報告されている⁵⁾。

化粧による顔印象の演出効果については、これまで女性の顔を対象とした実証研究が複数行われており、目元や口元にメイクアップを施すことで、若さや女性らしさの印象が強調され、魅力印象が高まると考えられている^{1,6)}。特に、多くの人々が用いるメイクアップ方法には、目元、口元とその周辺の肌色のコントラストを強調するように作用するものが多い。目、唇とその周辺の肌色のコントラストには、生物学的な女性と男性の間で性差があり、性的二型特徴で

あると考えられている。生物学的な女性と男性の顔を比較すると、女性の顔の方が明るいトーンの肌を持つため、目や唇などの顔パーツとその周辺の肌色に大きなコントラストが生じる⁷⁾。したがって、多くの女性に共通するメイクアップは、女性の顔が持つ女性的な特徴を強調することで、魅力印象を高める効果を持つのではないかと考えられている^{2,7)}。

このように、メイクアップによる顔の局所的な表面特徴の変化から、顔印象の演出効果が生み出されていることはある程度明らかになっているが、女性が日常的に行うメイクアップが顔全体の顔表面特徴をどのように変化させ、それが見た目の印象にどのように影響しているのかを定量的に示した研究はこれまでにほとんど存在しない。メイクアップの視覚効果を科学的手法で解析することは、さまざまなメイクアップ方法の背後で共通する心理的な効果を明らかにし、個性を魅力的に演出するメイクアップを考案することにも繋がる⁶⁾。

そこで本研究では、日本人が日常的に行っているメイクアップの視覚効果を統計的顔画像解析によって定量化し、メイクアップが見た目の印象に及ぼす影響とその背景要因を明らかにすることを目的とした。まず、研究1では、日本人女性が自らの顔に施したメイクアップによって変容する肌表面特徴を統計的顔画像解析によって特定し、その特徴を定量的に操作した際に、見た目の顔印象がどのように変化するかを心理学実験によって検証した。研究2では、目、眉、唇の3箇所の顔パーツとその周辺のコントラストの変化を画像解析によって測定し、日本人女性のメイクアップに、性的二型特徴を誇張するような視覚効果が存在するかを検証した。



Modelling facial makeup by statistical image analysis

Koyo Nakamura

Faculty of Psychology, University of Vienna, Japan Society for the Promotion of Science, Faculty of Science and Engineering, Waseda University

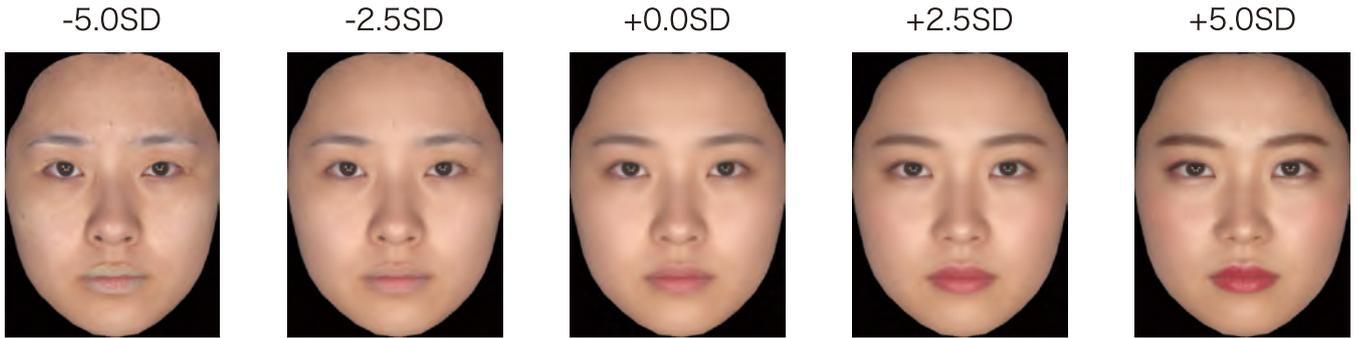


図1 統計的顔画像解析に基づくメイクアップの視覚効果の可視化 (SD値が大きいくほど、メイクアップによる肌表面特徴の変化が強調される)

2. 研究1：統計的顔画像解析による日本人女性のメイクアップ効果の定量化

2.1. 方法

日本人女子大学生16名(平均年齢20.43, SD=1.22)に協力を依頼し、メイクを施していない状態と各自が自分を最も魅力的に見せるメイクアップを施した状態で、顔画像の撮影を行った。顔画像の撮影は、一眼レフカメラ(Nikon D850)を用いて、照明光を厳密に統制した環境で行われた。撮影された顔画像には色補正を施し、顔面形状を正規化した後、主成分分析により顔の表面特徴量を表す固有空間を算出した。この表面特徴の固有空間には、肌表面特徴の個人差やメイク前後での肌表面の変化も含まれており、本研究では、メイク前後における肌表面の変化に関わる特徴量をさまざまな重み付けで強調することで、メイクアップによる肌表面特徴の変化を可視化した⁸⁾。本研究では、メイクアップによる表面特徴変化を強調する変換を16名の各顔画像に適用し、顔画像を再構成した。その際、標準偏差(SD)を単位として強調度を定義した。図1は平均顔に対してメイクアップの視覚効果を強調した画像を示している。

メイクアップの視覚効果の強調度が見た目の顔印象に及ぼす影響を検討するため、日本人大学生24名(平均年齢20.45歳, SD=2.30, うち男性12名)に、5段階(-5.0 vs. -2.5 vs. 0 vs. +2.5 vs. +5.0 SD)に強調された16名の顔画像を提示し、魅力、見た目の健康さ、見た目の自然さの3項目について9件法で評価することを求めた。

2.2. 結果と考察

統計的顔画像解析の結果、メイクアップにより、目と眉の明暗コントラストが強調され、頬部と唇の赤みが強調されることが明らかになった。ヨーロッパ文化圏の人々を対象とした研究からは、目と唇とその周囲のコントラストを強調し^{2,7)}、唇の赤みを強調することで⁴⁾、女性らしさや魅力の印象を高める効果があることが報告されていたが、日本人女性が行うメイクアップにおいても同様の視覚効果が認められることが分かった(図1)。

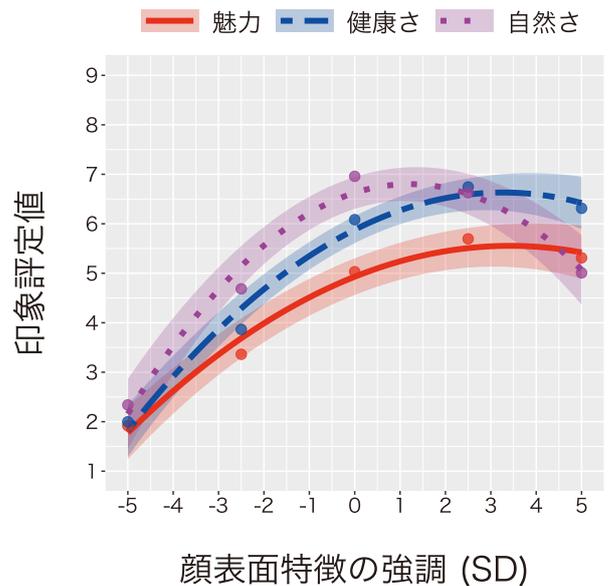


図2 メイクアップの強調度と顔印象評価

点は評定平均値、曲線は階層ベイズ回帰分析における事後予測平均値、誤差範囲は95%信用区間を示す。

さらに、メイクアップの視覚効果を段階的に強調すると、魅力、見た目の健康さ、見た目の自然さの印象が曲線的に高まっていくことも明らかになった(図2)。これら3つの印象の間では、印象が最大に到達する強調度が異なっており、自然さの印象よりも魅力や見た目の健康さの印象において印象が最大化する強調度が高いことが確認された。このことは、演出したい見た目の印象の内容によって、最適なメイクアップの強度が異なることを示唆している。

メイクアップによる視覚効果をモデル化し可視化すると、日本人女性が日常的に行うメイクアップは、顔全体の色の分布と局所的なコントラストの両方を変化させていることが分かる。顔の上部においては、アイシャドーやアイライナー、マスカラなどを用いたアイメイクにより、目元とその周囲の明暗コントラストが強調されていることが窺える。加えて、アイブローによる眉のコントラストも強調されていることが分かる。顔の下部では、リップに鮮やかな赤み

を添えることで、口元とその周囲のコントラストが強調される効果が生み出されているように見える。したがって、日本人のメイクアップによる視覚効果には、目、眉、唇とその周囲のコントラストの強調が顕著に認められると言えるだろう。

目元と口元のコントラストを強調することで、女性らしい印象を強調し、顔印象の美化効果を期待できることは既に触れた^{2,7)}。生物学的な女性と男性の肌色を比較すると、女性の肌のトーンは男性よりも平均的に明るいのが、目や唇の色そのものの性差は比較的小さいため、女性の顔においては、目とその周辺、唇とその周辺で明るさに大きなコントラストが生じる。したがって、コントラストが強調された目元や口元は、誇張された女性らしさとして知覚され、それが魅力印象を高めていると考えられている⁷⁾。しかしながら、眉のコントラストについては、男性の方が濃い眉を持つため、その周囲の肌色と大きなコントラストが生じることが知られている⁹⁾。したがって、日本人女性のメイクアップにおいて、眉のコントラストが強調されている点については、むしろ男性らしい特徴が強調されているように見える。眉のコントラストは性的二型特徴である一方で、加齢によって変化する特徴であることも知られている。実際に、加齢に伴って眉は薄くなるため、眉コントラストは低くなっていく⁹⁾。したがって、眉のコントラストは年齢の手がかりであり、コントラストの高い眉は若々しい印象を与えると予測される。

研究2では、日本人の目、眉、唇の3箇所のコントラストの性差を測定し、メイクアップによって女性らしい顔特徴が強調されているという仮説^{2,7)}について検証することを目的とした。

3. 研究2：目、眉、唇領域のコントラストの性差とメイクアップによるコントラストの変化

3.1. 方法

日本人大学生を対象に、女性53名(平均年齢20.94歳, SD=1.63)、男性54名(平均年齢21.13歳, SD=2.41)に顔画像の撮影協力を依頼した。参加者は、顔にメイクアップを施していない状態で撮影に協力し、女性参加者のうち49名は各自が自分を最も魅力的に見せるメイクアップを施した状態での撮影にも協力した。顔画像の撮影は、一眼レフカメラ(Nikon D850)を用いて、照明光を厳密に統制した環境で行われた。撮影された顔画像には色補正を施し、顔面形状を正規化することで、表面特徴を直接比較することができるように前処理を施した。

顔パーツとその周辺領域のコントラストを計測するために、顔画像のRGB値をCIE L*a*b*に変換し、両目、両眉、唇の領域内のL*(輝度)の平均値を算出した。さらに、両目の2倍、両眉の1.5倍、唇の1.5倍のサイズのエリアを、

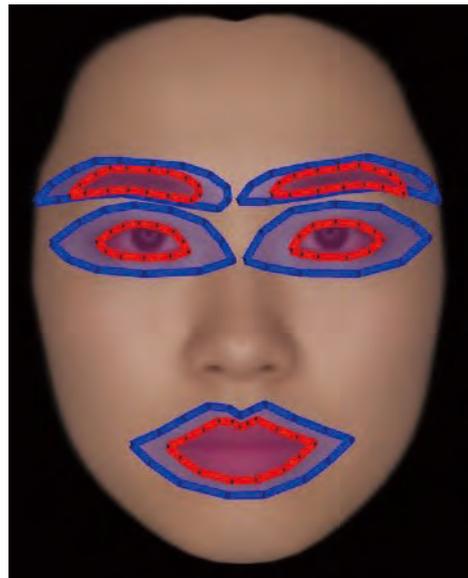


図3 目、眉、唇とその周囲のコントラスト
(赤：顔パーツ内の領域、青：周辺の領域)

各顔パーツの周辺領域として定義し、その領域内のL*の平均値を取得した(図3)。各パーツとその周囲のコントラストは、(周辺のL* - パーツのL*) / (周辺のL* + パーツのL*)によって算出した。コントラストは-1から+1の値を取り、正の値は周辺領域がパーツ内部よりも高い輝度を持つことを示す。

ここでは、生物学的な女性と男性の顔パーツのコントラストを比較するために、メイクアップを施していない状態でのコントラストの計測を行った。さらに、メイクアップによってコントラストがどのように変化するかを検討するために、女性のメイク前とメイク後の顔コントラストの比較を行った。

3.2. 結果と考察

目、眉、唇の3つの顔パーツとその周囲のコントラストの性差を検討した結果、女性の顔は、目と唇領域において男性の顔よりもコントラストが高いことが示された(図4)。その一方で、男性の顔においては眉が濃く、それによって眉領域におけるコントラストが高いことが確認された。したがって、日本人大学生の顔においては、目と唇領域におけるコントラストの高さが女性の顔の典型的特徴であり、眉領域のコントラストの高さが男性の顔の典型的特徴であると言えるだろう。

次に、メイクアップによる女性の顔パーツのコントラストの変化を分析した結果、メイクアップによる目領域の顕著な変化は認められなかったものの、眉と唇領域において顕著なコントラストの増大が確認された(図5)。このコントラストの増大は、アイブロウとリップカラーによりそれぞれのパーツが周辺領域よりも暗くなったために生じた

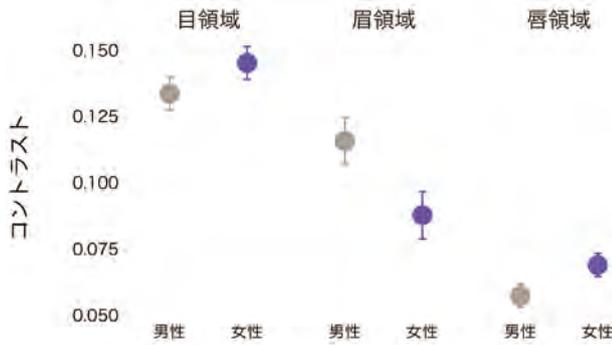


図4 顔パーツとその周辺のコントラストの性差

点はベイズ回帰分析における事後予測平均値，誤差範囲は95%信用区間を示す。

推察される。唇領域の化粧によるコントラストの増大は，女性の顔に典型的な特徴が誇張されたものであり，化粧は女性の顔が本来的に持つ特徴を誇張することで，魅力の印象を演出しているという仮説を支持するものであるように見える⁷⁾。その一方で，眉領域の化粧においてもコントラストの増大が認められ，一見すると男性に典型的な特徴を誇張したものであるように見えるが，周辺の肌とのコントラストの高い眉は若々しい印象を与えるため，日本人大学生に共通する眉メイクは，アンチエイジング効果によって印象を演出している可能性がある。

4. 総合考察

本研究では，統計的顔画像解析により，日本人が魅力を演出する目的で行うメイクアップに共通した特徴を可視化することができた。特に，目，眉，唇とその周囲で強調された明暗コントラスト，口元に添えられた鮮やかな赤みが顕著であり，化粧品の使用によって女性の顔に本来備わる女性らしい特徴や若々しさの手がかりが誇張されていることが示唆された⁶⁾。さらに，統計的顔画像解析によってメイクアップの視覚効果を定量化したことで，メイクアップの強調度を段階的に操作し，見た目の印象との数量関係を明らかにすることができた。さらに，日本人の目，眉，唇とその周囲の肌のコントラストには性差が存在し，女性のメイクアップは，女性らしい顔特徴を強調しているという仮説を裏付ける知見を得ることができた⁷⁾。これらの結果から，日本人女性が魅力を演出する目的で行うメイクアップには，顔パーツのコントラストを高めることで，女性らしさと若々しさを同時に強調する効果があることが示唆された。

本研究では，集団に共通したメイクアップの一般的傾向を特定することを目的としていたが，化粧によってどのように顔を装うか，そこには大きな多様性があると考えられる。化粧は，必ずしも顔への生物学的選好(例えば，顔形

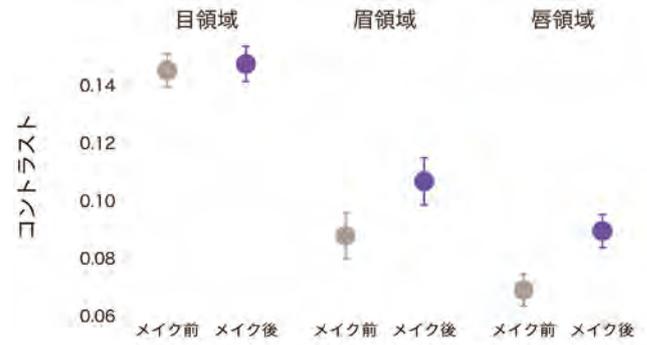


図5 メイク前後での顔パーツとその周辺のコントラストの変化

点はベイズ回帰分析における事後予測平均値，誤差範囲は95%信用区間を示す。

状のシンメトリー性や性的二型特徴)を高める目的で行われるわけではない。多様な美のあり方を受け入れる新しい文化に移行しつつある現代社会では，個性の視覚表現としての化粧や社会的表示機能としての化粧の役割がより大きくなっていく可能性がある。本研究の成果は，多様な印象を演出するメイクアップの科学的理解に寄与するのみならず，画像解析に基づくメイクアップ・シミュレーション技術の開発や個性的な美を表現するためのメイク手法の提案など，応用的価値の創出にも繋がると考えている。今後はこれまでの研究を継続し発展させると同時に，画像解析的アプローチを男性のスキンケアやメイクアップの研究に応用し，見た目の肌質や印象に悩みを感じる人へのケアと支援を目指した研究にも取り組みたい。

(引用文献)

- 1) R. Russell, Why cosmetics work, in *The Science of Social Vision*, R. B. Adams, N. Ambady, K. Nakayama, S. Shimojo, Oxford University Press, 186-203, 2011.
- 2) R. Russell, Sex, beauty, and the relative luminance of facial features, *Perception*, 32 (9), 1093-1107, 2003.
- 3) A. L. Jones, R. Russell, and R. Ward, Cosmetics alter biologically-based factors of beauty: Evidence from facial contrast, *Evol. Psychol.*, 13 (1), 210-229, 2015.
- 4) I. D. Stephen and A. M. McKeeganh, Lip colour affects perceived sex typicality and attractiveness of human faces, *Perception*, 39 (8), 1104-1110, 2010.
- 5) R. Mulhern, G. Fieldman, T. Hussey, J. L. Lévêque, and P. Pineau, Do cosmetics enhance female Caucasian facial attractiveness?, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 25 (4), 199-205, 2003.
- 6) 中村航洋・小林麻衣子・渡邊克巳，進化心理学の視点から見た化粧の視覚効果，FRAGRANCE JOURNAL 2020/4月号【特集】化粧がもたらす心身機能への効果，

- 30-37, 2020.
- 7) R. Russell, A sex difference in facial contrast and its exaggeration by cosmetics, *Perception*, 38 (8), 1211-1219, 2009.
- 8) K. Nakamura and K. Watanabe, Data-driven mathematical model of East-Asian facial attractiveness: The relative contributions of shape and reflectance to attractiveness judgements, *R. Soc. Open Sci.*, 6 (5), 182189, 2019.
- 9) A. Porcheron, E. Mauger, and R. Russell, Aspects of facial contrast decrease with age and are cues for age perception, *PLoS ONE*, 8 (3), e57985, 2013.

木の香りによる作業効率への影響解析

国立研究開発法人森林研究・整備機構 森林総合研究所複合材料研究領域

松原 恵理

Several studies have reported that wood odor has a relaxing effect on humans. This study aims to examine the effects of wood odor on workers' relaxation and the ability to maintain moderate concentration in an office space. Therefore, the effects of wood odor on the performance of multiple tasks and physiological and psychological aspects during work were investigated. Two commercially available essential oils made from cypress were selected as experimental materials. The experimental subjects were 20 university students, who completed five simulated tasks in the experiment. Autonomic nervous activity and salivary oxytocin levels of the subjects were used as physiological indices, and the stress response scale and a subjective questionnaire were used as psychological indices. A gas chromatograph-mass spectrometer was also used to qualitatively and quantitatively analyze the volatiles. The results showed that α -pinene and 1,8-cineole were the main compounds in the experimental room. On comparing the rooms with essential oils to the control room, the number of correct responses increased and the error rate decreased. The participants were more relaxed during the tasks performed in the essential oil room according to the results of the physiological indice analysis. These results suggest that wood odor can help people relax and improve work efficiency and can be used in offices.

1. 緒言

業種を問わず、長時間労働は働く人の心身に大きな影響を与えることが報告されており¹⁾、労働時間を減らすことが必要とされている。さらに、2019年4月に「働き方改革」関連法の一部が施行されて就業スタイルの多様性が増えていくとともに、労働生産性の向上に対する関心はより高まってきたと言える。

労働生産性の向上に対して、作業工程を見直して無駄を省き、通信インフラの整備や人工知能の活用などの技術的な投資も重要とされる一方で、個人の能力を引き出して集中力の持続を促し、時間あたりの労働生産性を向上させる取り組みも有効とされている。例えば、集中力の持続が必要な会議室への香り導入などを始めている企業があり、様々な効果を持つ植物由来の香り²⁻⁵⁾の活用に注目が集まっている。

これまで私たちは、樹木の香り成分が作業ストレスの緩和に有用であることを明らかにしてきた^{6,7)}。古来より生活の様々な場面で木を使い、木に親しんできた文化が根付いている日本人は、樹木の香りに対して落ち着きや安心などを感じやすいことが知られている。このことから、オフィス空間に樹木の香りを漂わせることで、働く人がリラックスして適度に集中力を維持でき、労働生産性の向上にも

つながる可能性があると考えた。

一般的なオフィスでは、データ入力などの実務的な作業から商品開発のような創造性が必要とされる作業など、様々な業務内容がある。単調な計算作業時における樹木の香りの効果についてはこれまでに報告はあるが、創造的な作業時での調査はほとんど報告されていない。そこで本研究では、複数の模擬作業課題を設定して作業成績を検討するとともに、作業従事時の人の生理心理面への影響を解析し、樹木の香りの有用性について検討することを目的とした。

2. 方法

2.1. 供試材料および供試方法

市販の精油を2種類(試料1、2)選定して実験に供した。精油の主原料はいずれもヒノキ科樹木であり、そのほかの原料として試料1にはマツ科樹木、試料2にはマツ科やクスノキ科樹木などが含まれている。精油は、ディフューザの取扱説明書に従い、適宜、希釈液にて調整して実験室内に噴霧した。対照は、希釈液のみを供試した。

2.2. 香りの成分分析

ガスクロマトグラフ質量分析計を用いて、精油に含まれる成分と組成比を明らかにした。次に、実験室内に噴霧した香りについて、携帯型空気吸引ポンプと捕集管を用いてアクティブサンプリング法により捕集し、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いて定量分析を実施した。成分捕集の様子を図1に示す。

2.3. 実験対象者および実験スケジュール

本研究は、国立研究開発法人森林研究・整備機構森林総



Analysis of the effects of wood odor on work efficiency

Eri Matsubara

Department of Wood-Based Materials, Forestry and Forest Products Research Institute



図1 成分捕集の様子

合研究所倫理審査委員会の審査・承認を得て実施した。実験を始める前に、実験対象者に対して実験の目的や手順などに関する説明を十分に行い、実験参加に対する同意を得た。

実験対象者は、女子大学・大学院生 20 名(平均年齢: 22.0 ± 1.3 歳)であった。実験対象者に対しては事前に心身の健康に問題がないこと、薬を服用しておらず、喫煙者

でないこと。また、実験前に嗅覚感度を判定する試験を実施し嗅覚に異常がないことを確認した。

実験は、研究所内の耐震・快適性工学実験棟(RC造)2階の一室にて、一度に2名ないし3名一組を対象に実施した。実験の様子の例を図2、および実験スケジュールを図3に示す。ちなみに、図2の写真は実験とは別日に撮ったものであり、新型コロナウイルス感染症拡大防止のためにマスクを着用したままであったが、本実験実施時には実験中のみマスクを外していただいた。さらに、当該感染症拡大防止策の一環として実験中は実験室の窓とドアを少し開けた状態にした。

実験スケジュールの概要を以下に示す。まず初めに、実験前室にて実験対象者に心拍センサを取り付けた。その後、実験対象者を実験室に入室させ、作業前のだ液を採取して心理反応尺度に記入させた。続いて、椅子に座ったまま安静状態で試験開始の音声スピーカーから流れるのを待たせた。実験開始後、実験対象者にはスピーカーの音声に従い計5つの作業課題を順に実施させ、全ての課題が終了した後は、直ちにだ液を採取し心理反応尺度および主観調査票に記入させ、その後、適宜、退室させた。本研究では、計3回の実験を同一日に実施した。実験対象者には午前9



図2 実験風景

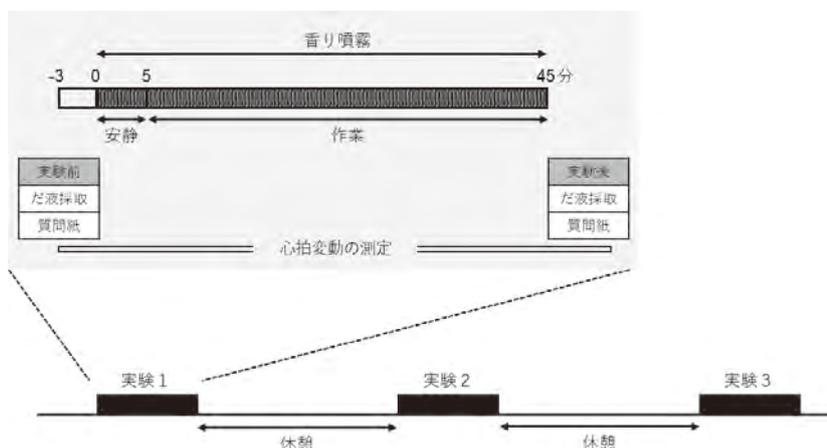


図3 実験スケジュール

時半頃に集合させ、各実験の間で2時間ずつの休憩時間を挟みながら実験を実施し、おおよそ17時半に全実験を終了した。

実験に使用した試料は、精油2種類および対照(香り無)であり、いずれも実験を開始する直前に噴霧を開始し、実験対象者が退室するまで継続した。また、試料の供試順はランダム化し、実験対象者には3つの試料条件すべてに参加させた。

2. 4. 作業課題および作業成績の算出

先行研究⁸⁻¹¹⁾を参考にして、計5つの模擬作業課題を作成した。本研究では、加算テスト(課題1)とd2テスト(課題2)を単純業務の模擬課題とし、RAT(Remote Associates Task)課題(課題3)とアナグラム課題(課題4)、マインドマップ(課題5)を創造性が必要な業務の模擬課題とした。図4に各課題の例を示す。いずれも同程度の難易度に揃えた課題用紙を3パターン準備して3回の実験に供した。各課題の回答時間については、課題1、2、4は5分間、課題3は10分間、課題5は15分間と設定した。各作業の成績については、課題1、3、4は正答数、課題2は達成率とミス率、課題5は回答数を算出した。

2. 5. 生理心理学的な指標

生理学的な指標には、自律神経活動(交感神経、副交感神経)量およびだ液中のオキシトシン量を用いた。自律神経活動量については心拍センサを用いて連続データを採取し、実験開始前の安静時と実験開始後から終了までの時間帯に分けて解析した。オキシトシン量は実験開始前と終了時に採取しただ液を、ELISAキットを用いて分析した。また、心理学的な指標については、ストレス反応尺度(SRS-18)および主観調査表(香りの印象や香りの強さ、快-不快度、自覚的な疲労感や眠気の程度に関する質問項目を含む)を用いて調査した。

2. 6. 統計的な解析

統計学的には、作業課題および生理学的な指標は一元配

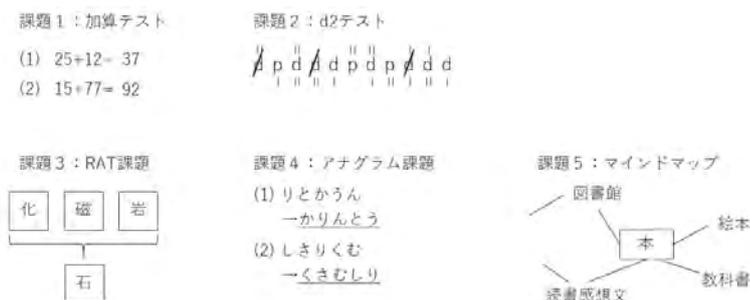


図4 作業課題の例

置分散分析およびBonferroniの多重比較、ストレス反応尺度はWilcoxonの符号付き順位検定、香りの印象や強さ、快-不快度、主観的な疲労感や眠さの評価はKruskal-Wallisの検定により検討した。統計解析ソフトはIBM SPSS Statistics ver.27を用い、すべての検定の有意水準は危険率5%以下とし、10%以下を有意傾向とした。

3. 結果

3. 1. 香りの定性・定量分析の結果

2種類の精油の定性分析の結果として、ライブラリとの類似度90%以上の化合物名および含有割合を表1に示す(Trは含有割合0.05%以下)。試料1の主成分は α -ピネンであり、そのほかにリモネンや1,8-シネオールが比較的多く含まれていた。試料2は α -ピネンと1,8-シネオールが主成分であり、リナロールも比較的多く含まれていた。

さらに実験室内に噴霧した香りの定性・定量分析の結果、試料1の成分として α -ピネンやカンフェン、リモネン、1,8-シネオール、*p*-シメンなどが検出され、試料2の成分として α -ピネンやカンフェン、リモネン、1,8-シネオール、*p*-シメン、リナロールなどが検出された。香りの総量は試料1、2ともに約500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であったが、試料1と2で異なる点として試料1は α -ピネンが約3割を占め、試料2は α -ピネンと1,8-シネオールがいずれも約3割を占めていたことが分かった。

3. 2. 作業成績の分析結果

単純業務の模擬課題とした課題1および2の作業成績について図5aに示す。いずれの課題も、実験条件間での統計的な有意差はないが、精油を噴霧した室内では対照よりも正答数が増加、達成率が向上し、ミス率が低下すること

表1 精油成分および含有割合(%)

化合物名	試料1	試料2	類似度
α -Pinene	47.2	27.4	96
Camphene	0.7	0.4	96
Sabinene	0.9	Tr	94
β -Pinene	1.7	0.9	96
Myrcene	1.1	0.5	92
δ -3-Carene	1.1	Tr	94
<i>p</i> -Cymene	0.6	0.8	92
Limonene	7.0	6.9	92
1,8-Cineole	7.6	26.6	90
Linalool	—	16.2	96
Camphor	0.3	1.0	90
α -Terpineol	0.8	1.1	94
Bornyl acetate	1.0	Tr	94
Isobornyl acetate	1.5	1.8	92
γ -Muurolole	1.2	0.6	91
γ -Himachalene	0.6	0.2	91
γ -Cadinene	3.2	1.7	91
epi- α -Muurolole	1.7	0.9	90
α -Cadinol	2.8	1.5	91

が分かった。また、創造性が必要な業務の模擬課題とした課題3、4、5の作業成績について図5bに示す。課題4のアナグラムでは試料1のみ対照よりも正答数が少なかったが、そのほかの課題においては単純な業務課題と同様に、精油を噴霧した室内では対照よりも正答数や回答数が増加することが分かった。

3.3. 生理心理学的な指標の解析結果

生理学的な指標として、作業中の自律神経活動(交感神経、副交感神経)の量を安静時と比較して、変化量を算出した(図6)。精油を噴霧した室内では対照よりも交感神経活動が低下し、副交感神経活動が増加することが分かった。なかでも、有意傾向ではあるが、副交感神経活動については実験条件間で差があり、特に試料1条件では対照と比較して作業中の副交感神経活動が優位であったことが分かつ

た。また、だ液中に含まれるオキシトシン量については、作業後と作業前の値の差を取り変化量を算出した。その結果、実験条件間での統計的な有意差はなかったが、精油を噴霧した室内では対照よりも変化量が小さく、対照条件で最もオキシトシン分泌が促進していたことが分かった。

心理学的な指標について、実験前後の心理的なストレス反応の結果を図7に示す。精油を噴霧した室内では、統計的に有意または有意傾向ではあるが、抑うつ・不安や無気力の得点が低下することが分かった。香りの印象に関しては、“好きな-嫌いな”、“気分が安らぐ-気分が高まる”、“平凡な-個性的な”、“落ち着く-落ち着かない”の評価において実験条件間の有意な差があることが分かった。また、香りの強さおよび快-不快度については、対照が「無臭~ややと感知できる、快でも不快でもない~やや快」、試料1および2は「弱い~楽に感知できる、やや快~快」であり、

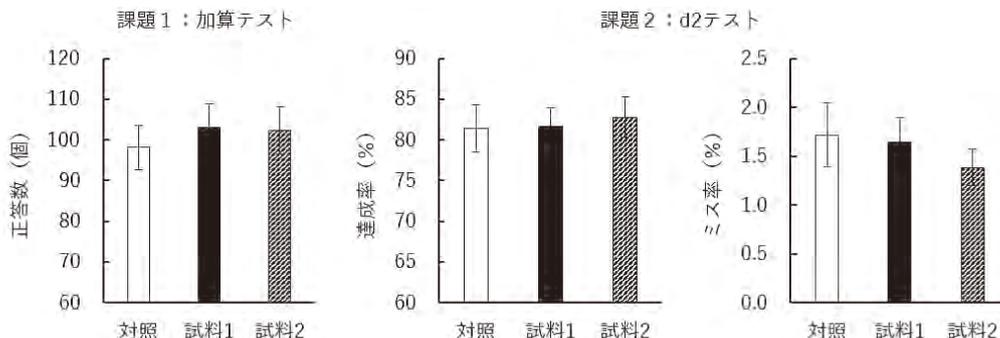


図5a 単純課題の成績

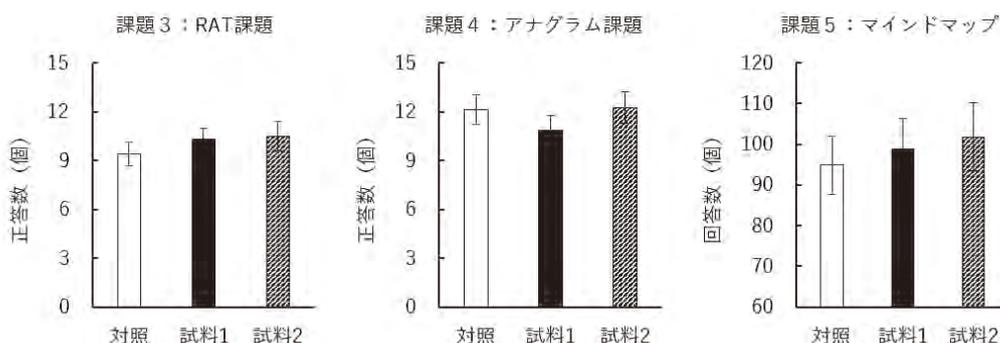


図5b 創造性課題の成績

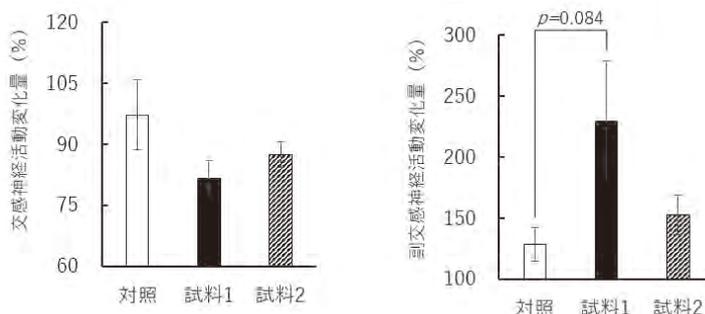


図6 作業中の自律神経系活動量

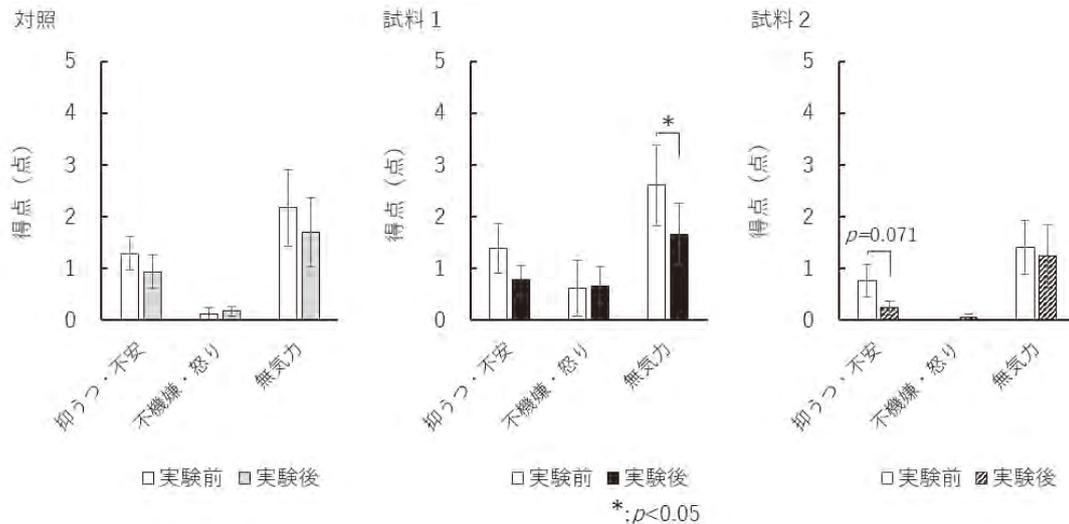


図7 実験前後の心理的ストレス反応

精油を噴霧した室内では対照よりも実験後の疲労感が低く、眠気も生じにくかったことも分かった。

4. 考 察

職場の労働生産性の向上に対する関心が高まる中で、気持ちを落ち着かせたり集中力を高めたりする効果のある植物由来の香りに対しても注目が集まっている。そこで本研究では、日本人が古来より慣れ親しんできた木を主原料とした香りを用いた空間において、実務的な単純業務とより創造性が必要な業務を模した作業を行わせ、その成績や生理心理的な面への影響について分析し有用性を検討した。

作業成績の分析結果、統計的な有意差は得られなかったが、樹木由来の香りが作業空間にあることで、多くの課題で成績が良くなることが示唆された。特に、本研究で用いた試料2については単純な業務から創造的で複雑な思考を必要とする業務の遂行時においても、十分に活用可能性が高いことが推察された。香り成分の分析より、試料2は α -ピネンと1,8-シネオールが多く含まれることが分かっている。先行研究から、1,8-シネオールが前頭葉の活動を増加させること、また、1,8-シネオールを含む植物の香りが作業成績の向上に効果的であること^{4, 12, 13)}が報告されており、本研究結果はそれらの先行研究と同様であったと考えられた。

生理的な指標を解析した結果、精油を噴霧した室内では交感神経活動の低下と副交感神経活動の増加が見られた。一般的に、交感神経活動は緊張状態のとき、副交感神経活動はリラックス状態のときに優位になることが知られている。本結果から、実験対象者は香りを嗅ぐことでリラックスして作業に従事できたことが推察された。また、心理学的には、作業後に抑うつや不安、無気力感の低下、疲労感

や主観的な眠気の低下が見られた。先行研究において、ヒノキ材部の香りは嗅ぎ始めてすぐに脳の活動を鎮静化させ、主観的にも好まれること、さらに、単調な計算作業を実施している間もリラックスしていたことを報告している^{14, 15)}。また、ヒノキ材部の香りにも含まれる α -ピネンやリモネンは本研究で用いた試料の香りにも含まれる成分であり、 α -ピネンやリモネン、リナロールなどによる人の心や身体への機能性がたくさん報告されている^{5, 16, 17)}。これらのことから、本研究結果は先行研究ともよく一致すると考えられた。

5. 総 括

アロマテラピーは、植物から抽出した精油で身体と心の機能回復を促し、健康や美容面に役立てていく自然療法と言われる。今回の検討からは、樹木の香りが人の心や身体の状態をより良くすることで、結果として仕事効率の向上につながる可能性が推察された。本研究の成果は今後、様々な形での応用が可能であると考えられるが、例えば、ハンドクリームなどへ添加し、仕事の場で使うことでどのような影響があるのか、実際のオフィス空間で働く方々を対象とした継続研究へとつなげていきたい。化粧品と森林資源を結び付けて従来の製品に新たな価値を付与することで、コスメトロジー研究および森林資源の利用に少しでも貢献していくことができれば大変幸いである。

謝 辞

本研究の実験に参加して下さった実験対象者の皆様に心より感謝申し上げます。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のご支援を賜りましたことに深く御礼申し上げます。

(引用文献)

- 1) 独立行政法人 労働政策研究・研修機構. 第3回日本人の就業実態に関する総合調査(2018年度調査). (2020)
- 2) Moss M, Cook J, Wesnes K, Duckett P. Aromas of rosemary and lavender essential oils differentially affect cognition and mood in healthy adults. *Int J Neurosci*, doi.org/10.1080/00207450390161903 (2003)
- 3) Heuberger E, Ilmberger J. The Influence of Essential Oils on Human Vigilance. *Nat Prod Commun*, 5 (9), 1441-1446 (2010)
- 4) Matsubara E, Fukagawa M, Okamoto T, Fukuda A, Hayashi C, Ohnuki K, Shimizu K, Kondo R. Volatiles emitted from the leaves of *Laurus nobilis* L. improve vigilance performance in visual discrimination task. *Biomed Res (Tokyo)*, 32 (1), 19-28 (2011)
- 5) 鈴木桂輔, 五藤光, 田中尚. ドライバへの α -ピネン供給による心理的ストレスの低減効果. 自動車技術会論文集, 40 (1), 193-198 (2009)
- 6) Matsubara E, Tsunetsugu Y, Ohira T, Sugiyama M. Essential oil of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) wood increases salivary dehydroepiandrosterone sulfate levels after monotonous work. *Int J Environ Res Public Health*, 14 (1), 97, doi:10.3390/ijerph14010097 (2017)
- 7) Matsubara E and Ohira T. Inhalation of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) wood odor causes psychological relaxation after monotonous work among female participants. *Biomed Res (Tokyo)*, 39 (5), 241-249 (2018)
- 8) 市原真希, 張本和芳, 伊香賀俊治, 佐藤啓明, 割田智裕. 照明計画と知的生産性に関する研究. 大成建設技術センター報, 43, 54-1-8 (2010)
- 9) 吉本梨紗 山中俊夫, 竹村明久. 臭気質が在室者の主観評価・知的生産性に及ぼす影響(その1) 複数の知的作業テストと嗅覚閾値. 日本建築学会近畿支部研究報告集, 58, 257-260 (2018)
- 10) 市村賢士郎, 河村悠太, 高橋雄介, 楠見孝. ラーニング commons の環境要因と創造性課題の成績との関連. 日本教育工学会論文誌, 42 (1), 55-64 (2018)
- 11) 北田華世, 有光興記. グレープフルーツとベルガモットの香りがアナグラム課題に対する心理生理学的ストレス反応に及ぼす影響. 関西学院大学心理科学研究, 45, 83-89 (2019)
- 12) Amobrosch S, Duliban C, Heger H, Moser E, laistler E, Windischberger C, Heuberger E. Effects of 1,8-Cineole and (-)-Linalool on Functional Brain Activation in a Working Memory Task. *Flavour Frag J*. 33 (3) doi: 10.1002/ffj. 3436 (2018)
- 13) Moss M, Oliver L. Plasma 1,8-cineole correlates with cognitive performance following exposure to rosemary essential oil aroma. *Ther Adv Psychopharmacol*, doi: 10.1177/2045125312436573 (2012)
- 14) 松原恵理. 木材精油の香気成分組成分析と脳血流量変動への影響解析. 日本味と匂学会誌 第52回大会 *Proceeding*集, S105-S106 (2019)
- 15) Matsubara E, Matsui N, Ohira T. Evaluation of the psychophysiological effects of the Cupressaceae family wood odor. *Wood Sci Technol*, 54, 269-286 (2020)
- 16) Kuroda K, Inoue N, Ito Y, Kubota K, Sugimoto A, Kakuda T, Fushiki T. Sedative effects of the jasmine tea odor and (R)-(-)-linalool, one of the major odor compounds, on autonomic nerve activity and mood states. *Eur J Appl Physiol*, 95, 107-114 (2005)
- 17) Hoenen M, Müller K, Pause B M, Lübke K T. Fancy citrus, feel good: positive judgment of citrus odor, but not the odor itself, is associated with elevated mood during experiences helplessness. *Front Psychol*, doi:10.3389/fpsyg.2016.00074 (2016)

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

広島大学大学院医系科学研究科医療システム工学

峯 裕一

Maxillofacial prosthetic rehabilitation replaces missing structures to recover the function and aesthetics relating to facial defects or injuries. Deep learning is rapidly expanding with respect to applications in medical fields. In this study, we apply the artificial neural network (ANN)-based deep learning approach to coloration support for fabricating maxillofacial prostheses. We prepared 52 silicone elastomer specimens of varying colors and measured the CIE 1976 L* a* b* color space information using a spectrophotometer and an application for mobile device. We constructed the deep ANN using Python and implemented it using the Keras with TensorFlow as the backend. The deep ANN architecture consisted of three input variables, two hidden layers with 1000 nodes, and four output variables. The output of these algorithms indicated the compounding amount of four pigments. According to the algorithms' pigment compounding predictions, we prepared the specimens for validation analysis and measured the CIE 1976 L* a* b* values. We determined the color differences between the real skin color of ten research participants and that of the silicone elastomer specimens fabricated based on the algorithm predictions using the CIEDE00 ΔE_{00} color system. The color differences (ΔE_{00} value) between the real skin color and silicone elastomer validation specimens were 3.45 ± 0.87 (the algorithm trained using values of specimens measured with a spectrophotometer) and 8.93 ± 3.65 (the algorithm trained using values of specimens measured with an application for mobile device), which indicates that the deep ANN approach produced superior results with respect to the ΔE_{00} value. These results suggest that applying deep ANN is a promising technique for the coloration of maxillofacial prostheses.

1. 緒言

顎顔面領域の欠損は、外傷や悪性腫瘍に対する切除手術などにより生じる。症例によっては、咀嚼・嚥下・発音などの機能性のみならず、審美性に大きな障害をきたす場合が多い。また、外出を控えるようになるなど精神心理的苦痛を惹起し、著しいQOLの低下を招く。エピテーゼは、このような人体の一部に欠損が生じた症例に対し、補綴物を用いて形態的・審美的・心理的なりハビリテーションを行う治療法の一つである¹⁾。本邦はもちろんのこと、発展途上国などのリソースの限られた国々においてもその需要は高く²⁾、技術者の養成が期待されている。一般的には医療用シリコン樹脂を用いて製作されるが、患者の欠損部を正確に再現するには熟練を要する³⁾。これらを解決するために、3Dスキャナや3Dプリンタといったデジタル技術の応用が試みられており、その有用性に関する知見が蓄積されつつある^{4,5)}。しかしながら、これらにより効率化が期待できるのはエピテーゼの形状設計および製作工程の一部であり、エピテーゼ治療の成功に大きな影響を与える着色に関しては製作者の技術に依るところが大きい。エピテーゼの着色は一般的に、患者の肌の色を再現するために

シリコン樹脂用の顔料を混ぜ合わせ、試行錯誤を重ね最終的な配合量を決定する。

少子高齢化社会を迎えた本邦では、労働力の不足やワークライフバランスへの対応など喫緊の課題に直面している。このような状況の中で、人工知能があらゆる分野の業務の効率化に寄与することが期待されている。特に医療は、国民の健康福祉の増進はもとより、社会保障費用の増加を抑制し社会保障制度の持続可能性を担保する観点でも、患者と医療従事者の双方をサポートする人工知能の技術導入が期待されている分野である。米国においては糖尿病網膜症の画像診断などが、日本においては大腸がんの前がん病変である腫瘍性ポリープの画像診断などが、それぞれ医療機器として規制当局から認可されている^{6,7)}。人工知能の一手法である機械学習は、「データから規則性や判断基準を学習し、それに基づき未知のものを予測、判断する技術」⁸⁾とされており、客観的には伝え難い技術を定量することを可能とする。

そこで本研究課題では、いわゆる「匠の技」に依存していたエピテーゼの製作に対し、人工知能の分析技術である機械学習の中でも、Deep Learningと呼ばれる研究手法を応用することで、一般的な歯科技工士やエピテーゼ製作技術者であれば均質なエピテーゼ製作が可能となる手法を構築することを最終目的とする。

2. 方法

2.1. シリコン試料の作製

医療用シリコンとしてジーシーシルフィ(株式会社ジーシー、東京)を、顔料としてFunctional Intrinsic II (FactorII



Development of innovative support system for maxillofacial prosthesis using deep learning

Yuichi Mine

Department of Medical System Engineering,
Graduate School of Biomedical and Health
Sciences, Hiroshima University

Inc.、米国)のWhite、Monastral Red、YellowおよびBlueを用いた。以下、顔料は白、赤、黄、青と表記する。

Kiat-Amnuayらの報告⁹⁾を参考に、シリコン試料を作製した。ジーシーシルフィのシリコンベース50g、キヤタリスト5gおよびFunctional Intrinsic IIの白、赤、黄および青を、電子天秤(UniBloc;株式会社島津製作所、京都)を用いて秤量し混合した。顔料は、異なる分量(白、1.17-1.23g;赤、0.07-0.13g;黄、0.14-0.18g;青、0.03-0.07g)を組み合わせて、合計1.5gになるよう秤量し混合した。これらを真空攪拌器(モリタ東京製作所、埼玉)により真空下で練和し、縦3cm×横4.5cm×高さ0.7cmのプラスチック容器に流し込み、室温で24時間放置することで硬化させた。本研究では白、赤、黄および青の顔料の配合量を変えることにより、52通りのシリコン試料を作製した。

2. 2. トレーニングデータセットの構築

アルゴリズム学習のためのトレーニングデータセットの構築を目的として、シリコン試料の色を、CIE 1976 L*a*b*色空間¹⁰⁾により定量化した。測定には分光色差計(NF333;日本電色工業株式会社、東京)とモバイルデバイス向けの色差計アプリケーションであるColorMeter RGB Colorimeter(White Marten GmbH、ドイツ)を使用し、それぞれL*、a*およびb*の値を取得した。得られたL*、a*およびb*の値と対応するシリコン試料作製のために使用した顔料の配合量を対応させた値を、トレーニングデータセットとした。分光色差計とアプリケーションで取得した値を使用してデータセットを以下、トレーニングデータセット(色差計)およびトレーニングデータセット(App)と表記する。

2. 3. 人工知能アルゴリズムの構築

人工知能アルゴリズムとして、Deep Artificial Neural Network(Deep ANN)を構築した。ANNは生体の神経系のネットワークを模したモデルであり、階層型ANNは入力層、出力層とそれら層の間にある隠れ層と呼ばれる1層以上の中間層で構成される。構築にはPythonを使用し、ニューラルネットワークライブラリとしてKeras、TensorFlowをバックエンドとして使用した。構築したDeep ANNは、入力層がL*、a*およびb*の値を入力する3ユニット、出力層が白、赤、黄および青の顔料配合量を出力する4ユニットとし、隠れ層は1000ユニットを2層とした。また、オプティマイザーはStochastic gradient descentを採用した。これらに、トレーニングデータセット(色差計)およびトレーニングデータセット(App)を使用して、エポック数1,000にて学習させ、患者の皮膚色を再現するための顔料の配合量を決定するアルゴリズムを構築した。本実

験では、Intel Core i7-9750H 2.60GHz CPU(Intel、米国)、16.0GB RAMおよびNVIDIA GeForce RTX 2070 MAX-Q 8.0GB GPU(NVIDIA、米国)を搭載したPCを使用し実施した。

2. 4. 人工知能アルゴリズム有用性の検証

本研究は、広島大学疫学研究倫理審査委員会の承認のもと実施した(承認番号:E-1597)。構築した人工知能アルゴリズムの有用性を検証するために、計10名の研究協力者の皮膚(第一および第二中手骨間)のL*、a*およびb*の値を、分光色差計を使用し取得した。トレーニングデータセット(色差計)で学習した人工知能アルゴリズムの評価のために5名、トレーニングデータセット(App)で学習させたアルゴリズムの評価のために5名のL*、a*およびb*の値を取得した。学習済人工知能アルゴリズムは、取得した研究協力者のL*、a*およびb*の値を入力することにより、対象者の皮膚色を再現するための白、赤、黄および青の顔料配合量が出力される。

2. 4. 1. 検証用シリコンの作製

学習済人工知能アルゴリズムが予測した、研究協力者の皮膚色を再現するための白、赤、黄および青の顔料配合量をもとに、(2.1.)の方法で、検証用シリコンを作製した。これらを(2.2.)の方法で、分光色差計を使用して、それぞれL*、a*およびb*の値を取得した。

2. 4. 2. 色差の算出

人工知能アルゴリズムの有用性を検証するために、作製した検証用シリコンと研究協力者の皮膚から得られたL*、a*およびb*の値を使用し、以下の式を用いて色差 ΔE_{00} を算出した^{11,12)}。

$$\Delta E_{00} = \sqrt{\left(\frac{\Delta L^*}{k_L S_L}\right)^2 + \left(\frac{\Delta C^*}{k_C S_C}\right)^2 + \left(\frac{\Delta H^*}{k_H S_H}\right)^2 + R_T \left(\frac{\Delta C^*}{k_C S_C}\right) \left(\frac{\Delta H^*}{k_H S_H}\right)}$$

ここで、変数 ΔL^* 、 ΔC^* 、 ΔH^* は、それぞれ2つの物体間の明度、彩度、色相の差を表す。変数 k_L 、 k_C 、 k_H は実験条件に応じて調整される係数である。これらの係数は1に設定した。 S_L 、 S_C 、 S_H はそれぞれ、明度、彩度、色相に対する重み付け関数である。 R_T は彩度差と色相差の相互作用に依存する重み付け関数である。

2. 5. 統計解析

統計解析はIBM SPSS Statistics version 21.0 software(日本IBM株式会社、東京)を用いて、Mann-Whitney U検定により2値群の比較を行った。

3. 結果

3. 1. 異なるデバイスによるトレーニングデータセットの取得値の差異

分光色差計とモバイルデバイス向けアプリケーションで

取得したL*、a*およびb*値の比較を図1に示す。

分光色差計とモバイルデバイス向けアプリケーションでa*およびb*値を取得した結果、いずれも分光色差計による取得値が低く、モバイルアプリケーションで取得した値が高い傾向を示した。一方、L*値は同程度もしくは分光色差計による取得値が高い傾向を示した。

3. 2. 検証用シリコンと研究協力者の皮膚との色差

予測された顔料配合量をもとに検証用シリコンを作製し、研究協力者の皮膚との色差 ΔE_{00} を算出した(表1)。

トレーニングデータセットの取得に分光色差計を用いた場合、作製した検証シリコンと研究協力者の皮膚の平均色差は 3.45 ± 0.87 であり、良好な値を示した。一方、トレーニングデータセットの取得にモバイルデバイス向けアプリケーションを使用した場合の作製した検証シリコンと研究協力者の皮膚の平均色差は 8.93 ± 3.65 であり、分光色差計を用いた場合と比較して有意に高い値を示した。

4. 考 察

一般的に機械学習の精度はトレーニングデータとアルゴリズムに強く依存するとされ、どのような手法を用いるかは試行錯誤が求められる¹³⁾。本研究ではDeep ANNを採用し、一定の条件において皮膚色再現のために良好な結果が得られた。また、Deep ANNはネットワーク構造やハイパーパラメータを最適化することでさらなる精度の向上が期待できる。

一方、トレーニングデータセットの取得に用いたデバイスの違いが、検証用シリコンと皮膚色との色差に大きく

影響を与えることが明らかとなった。トレーニングデータセットの取得に分光色差計を用いた場合、作製した検証シリコンと研究協力者の皮膚の平均色差は 3.45 ± 0.87 であったのに対し、モバイルデバイス向けアプリケーションを使用した場合の作製した検証シリコンと研究協力者の皮膚の平均色差は 8.93 ± 3.65 であり高い値を示した。

近年、途上国においても、癌の発症率の増加や事故による外傷によりエピテーゼ治療のニーズが増加している。しかしながらリソースの限られた国々においては、使用できる材料の不足やエピテーゼの製作者・教育者の不在から十分な治療を受けることはできておらず、このようなリソースの限られた国においてもエピテーゼの提供や技術者の養成が期待される。

現在、スマートフォンをはじめとしたデジタルデバイスは、その普及率と相まって医療用途での応用が検討されている。特に、途上国においてもスマートフォンの普及は目覚ましく¹⁴⁾、電子マネー決済などを目的としインフラとして普及しており、医療応用の期待も大きい。

本研究では、アルゴリズム学習のデータセットを取得するために分光色差計とモバイルデバイス向けアプリケーションを用いた。分光色差計は、高精度にCIE 1976 L* a* b*色空間を含む各種表色系の測定が可能であること、また、常に同条件の測定が可能であるなど、優れた性能を示すと考えられる。一方、モバイルデバイス向けアプリケーションに関する文献的考察はほとんどなされていないのが現状である。本研究では分光色差計を用いて取得したトレーニングデータセットを利用して学習したアルゴリズムにおいて、良好に皮膚色を再現することができたものの、分光色

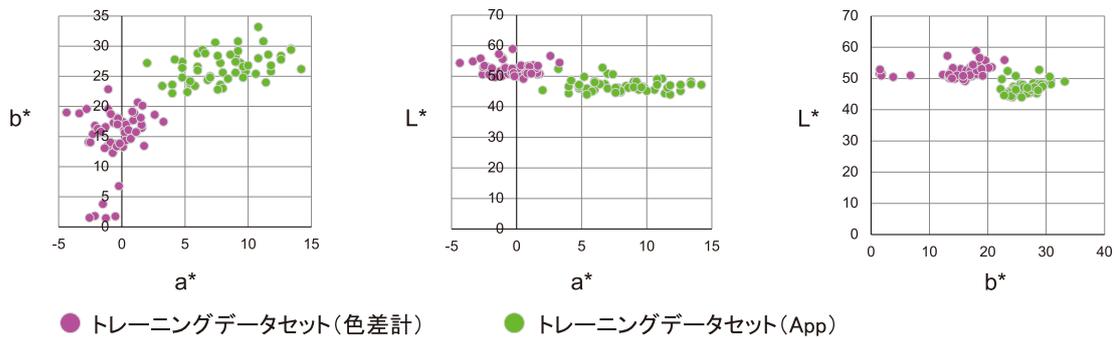


図1 分光色差計とモバイルアプリケーションで取得したL*、a*およびb*値

表1 検証用シリコンと研究協力者の皮膚との平均色差 ΔE_{00}

取得デバイス	平均色差 ΔE_{00} (±標準偏差)	最大値	最小値	P値*
色差計	3.45 ± 0.87	4.92	2.75	0.016
App	8.93 ± 3.65	13.61	4.21	

* Mann-Whitney U検定

色差計；分光色差計、App；モバイルデバイス向けアプリケーション

差計は一般的な医療機関に普及しているとは言い難く、患者の皮膚色の取得に使用するには一定の障壁が存在すると考えられる。分光色差計と比較して皮膚色の再現性に劣るものの、スマートフォンやタブレットなどのモバイルデバイス向けの色差計アプリケーションを使用した計測補正法を検討することにより、低廉で精度の高い顎顔面補綴支援システムの構築が可能になると考える。

(引用文献)

- 1) Dings JPJ, Merckx MAW, de Clonie Maclennan-Naphausen MTP, van de Pol P, Maal TJJ, Meijer GJ. Maxillofacial prosthetic rehabilitation: A survey on the quality of life. *J Prosthet Dent*. 2018; 120: 780-786.
- 2) Tetteh S, Bibb RJ, Martin SJ. Maxillofacial prostheses challenges in resource constrained regions. *Disabil Rehabil*. 2019; 41(3) : 348-356.
- 3) Mohammed MI, Cadd B, Peart G, Gibson I. Augmented patient-specific facial prosthesis production using medical imaging modelling and 3D printing technologies for improved patient outcomes. *Virtual Phys Prototyp*. 2018; 13: 164-176.
- 4) Unkovskiy A, Spintzyk S, Brom J, Huettig F, Keutel C. Direct 3D printing of silicone facial prostheses: A preliminary experience in digital workflow. *J Prosthet Dent*. 2018; 120: 303-308.
- 5) Jazayeri HE, Kang S, Masri RM, et al. Advancements in craniofacial prosthesis fabrication: A narrative review of holistic treatment. *J Adv Prosthodont*. 2018; 10: 430-439.
- 6) Muehlematter UJ, Daniore P, Vokinger KN. Approval of artificial intelligence and machine learning-based medical devices in the USA and Europe (2015-20): a comparative analysis. *Lancet Digit Health*. 2021; 3: e195-e203.
- 7) Aisu N, Miyake M, Takeshita K, Akiyama M, Kawasaki R, Kashiwagi K, et al. Regulatory-approved deep learning/machine learning-based medical devices in Japan as of 2020: A systematic review. *PLOS Digit Health*. 2022; 1: e0000001.
- 8) 総務省 ICTスキル総合習得教材 3-5: 人工知能と機械学習.
- 9) Kiat-Amnuay S, Lemon JC, Powers JM. Effect of opacifiers on color stability of pigmented maxillofacial silicone A-2186 subjected to artificial aging. *J Prosthodont*. 2002; 11: 109-116.
- 10) International Commission on Illumination. ISO 11664-4:2008 (E)/CIE S 014-4/E:2007: joint ISO/CIE standard: colourimetry — part 4: CIE 1976 l*a*b* colour space. 1976.
- 11) Luo MR, Cui G, Rigg B. The development of the CIE 2000 colour-difference formula: CIEDE2000. *Color Res Appl*. 2001; 26: 340-50.
- 12) Sharma G, Wu W, Dalal EN. The CIEDE2000 colour-difference formula: implementation notes, supplementary test data, and mathematical observations. *Color Res Appl*. 2005; 30: 21-30.
- 13) Waring J, Lindvall C, Umeton R. Automated machine learning: Review of the state-of-the-art and opportunities for healthcare. *Artif Intell Med*. 2020; 104: 101822.
- 14) Newzoo Global Mobile Market Report 2021.

分光イメージング装置を用いた天然歯のグラデーションの数理解析

大阪大学歯学部附属病院

若林 一道

Recently, dental CAD/CAM materials with gradation have been developed and are expected to be used in the aesthetic zone. In clinical practice, it is essential for dental prosthesis to match the transparency and color tone of natural teeth in order to achieve good aesthetics. However, there have been no studies that have mathematically evaluated the change in color tone (gradation) of the entire crown of a natural tooth. The aim of this study is to analyze the gradation of natural teeth of $L^*a^*b^*$ values by functionalization. The maxillary right central incisor of 35 adults without a history of dental treatment, caries, and staining were selected as experimental subjects. The $L^*a^*b^*$ values of 30 points from the cervical to the incisal region were calculated using a spectral imaging device, and linear, quadratic, cubic, exponential, and logarithmic functions were approximated for each L^* , a^* , and b^* value. About L^* and b^* values, the cubic function was the best fit for all subjects. About a^* value, the cubic function was the best fit for 29 subjects and the exponential function was the best fit for 6 subjects. In this research, the gradation from the cervical to the incisor region of the maxillary central incisor was mathematically analyzed. The results of this study were considered to be useful for the evaluation of the gradation of natural teeth and for the development of new dental CAD/CAM materials with a gradation similar to that of natural teeth.

1. 緒言

近年、グラデーションを付与したCAD/CAM用材料が開発され、広く臨床で用いられるようになった(図1)。歯科臨床において、天然歯と近似した色調を有する歯冠補綴装置を装着するためには、歯冠補綴装置と天然歯の色調が一致することが必要不可欠である¹⁾。これまで、天然歯や歯冠補綴装置の色調に関する研究では、特定の部位を計測して比較した研究報告が多く²⁻⁵⁾、歯頸部から切縁部にかけて、歯冠全体の色調の変化(グラデーション)を連続的に評価した研究は認められない。天然歯の色調と一致した歯冠補綴装置を作製するためには、天然歯の歯冠全体の色調を分析し、どのようにグラデーションが認められるかを客観的に解析することが必要である。

歯冠の部位の違いによる色調変化を連続的に評価するためには、歯冠全体の色調を正確に分析する必要がある。しかし、これまで、多くの研究で用いられてきた分光測色計や歯科用測色計は、測色の際に測色器を接触させる必要があり、加えて、特定の領域内においてのみの測色を行うため、立体物に対して正確に位置を規定して測色を行うことや、連続的な色の変化を観察することは不可能であった。

そこで、本研究では天然歯の連続的な色調を、正確に分析するため、分光イメージング装置を用いた測色器に着目した。

分光イメージングとは波長毎にデータを捉えることのできる液晶チューナブルフィルターと画素毎にデータを捉えることのできるCCDセンサーにより、画像としてデータを採取し、各波長における画像内のそれぞれの位置に対応した分光情報を解析可能にする技術である(図2)。分光イメージング技術は、非接触のまま精密に解析可能な特徴を生かし、歴史的遺跡の分析や、医科での検査、インク色の分析など様々な分野で応用されている⁶⁻⁸⁾。分光イメージング装置を用い、各ピクセルの分光情報を計測することで、選択領域におけるCIE Lab均等空間の $L^*a^*b^*$ 値、および、色を構成する3刺激値であるXYZ値を算出し、分布をグラフで表示したり、分光反射率を表示したりすることが可能となる。そのため、本装置は天然歯の歯頸部から切縁部にかけてのグラデーションを評価するのに有効であると考えられる。

本研究では、分光イメージング装置を用いて、天然歯の測色を行い、歯頸部から切縁部にかけての色調の変化(グラデーション)を比較することで、より審美性の高い歯科用材料開発への示唆を得ることを目的とし、天然歯の測色を行った。そして、グラデーションの程度を定量的に評価するため、色調の変化を数式にあてはめ、数理解析を行った。

2. 方法

2.1. 天然歯の測色

計測対象者として、上顎右側中切歯に歯科治療歴やカリエス、着色を有しない健康な成人男女35名(男性12人、女性23人、平均年齢 24.7 ± 2.1 歳)を選択した。計測対象者の上顎歯列をシリコンゴム印象材(ジルデフィット、松風、京都)で印象採得したのち、石膏模型を作製した。



Mathematical analysis of gradation of natural teeth using a spectral imaging device

Kazumichi Wakabayashi

Osaka University Dental Hospital

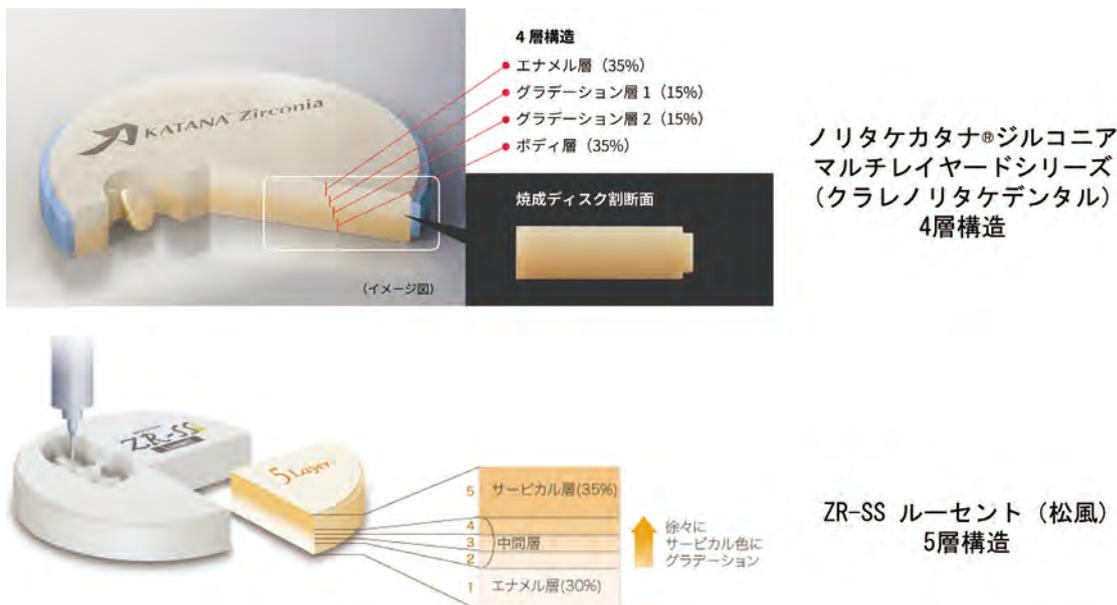


図1 グラデーションが付与された歯科用CAD/CAM材料 (図はメーカーの公式HPより引用)

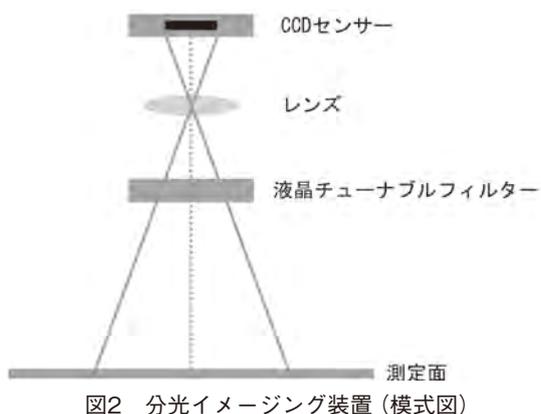


図2 分光イメージング装置 (模式図)



図3 計測対象者の上顎をシリコンゴム印象材で印象採得し、超硬石膏で石膏模型を作製した。作製した石膏模型で測定時に用いるマウスガードを作製した。

作製した石膏模型を用いて、測定時に用いる上顎右側中切歯の唇側面のみ切り取った、厚さ2.0mmの白色および黒色のマウスガード(Erkoflex ピュアホワイトおよびディープブラック、ERKODENT、オーストラリア)を作製した(図3)。白色および黒色マウスガードを装着後、視覚実験用顎台に額および下顎を固定し、ソフト開口器(Optragate、Ivoclar Vivadent、東京)で口唇を排除した状態で、分光イメージング装置(株式会社オフィス・カラーサイエンス、神奈川)を用いて測色を行った。測色の際には、測色計と天然歯の歯冠唇側面が平行となるように計測対象者の顔を固定し、カメラと対象歯の距離は17.5mmとなるように配置した。照明は人工太陽照明灯(SOLAX-iO、セリック株式会社、東京)を2台使い、照射角度は30度とした(図4)。分光イメージング装置を用いて歯冠全体の分光情報を採取後、測定したデータを専用解析ソフト(Image View、株式会社オフィス・カラーサイエンス、神奈川)を用いてL* a* b*値を取得した(図5)。



図4 測色時の様子



図5 測定範囲

なお、本研究は大阪大学大学院歯学研究科倫理委員会の

承認下で実施した(承認番号: H30-E6)。

2. 2. グラデーションの数理解析

分光イメージング装置で測色し得られたデータから、歯頸部から切縁部にかけての30点のL* a* b*値を算出した。そして、算出した30点のL*値、a*値、b*値をグラフ上にプロットし、一次関数($y = ax + b$)、二次関数($y = ax^2 + bx + c$)、三次関数($y = ax^3 + bx^2 + cx + d$)、指数関数($y = ae^{bx}$)、対数関数($y = a + b \cdot \log(1 + M - x)$)の近似曲線を取り、残差平方和を用い、どの関数が最も適合しているか分析を行った(図6)。

$$\text{残差平方和} = \sum_{i=1}^n (y_i - f(x_i))^2$$

3. 結果

解析により得られたL*値、a*値、およびb*値のデータ

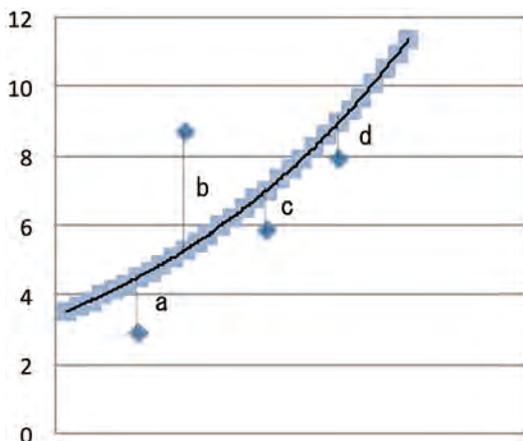


図6 残差平方和の算出方法

分布を図7に示す。L*値に関して、全ての計測対象者で+値(max: 80.37, min: 45.58)であった。その値は歯頸部から切縁部に向けて増加した後、減少した。a*値に関して、31名の計測対象者では、歯頸部から切縁部にかけて減少し続け、4名の計測対象者で、切縁部で増加しているのが認められた(max: 12.51, min: -4.74)。b*値に関して、31名の計測対象者では、歯頸部から切縁部にかけて減少し続け、4名の計測対象者で、切縁部で値が増加しているのが認められた(max: 31.42, min: -0.45)。加えて、全測定点1050点中999点で、a*値、b*値ともに+値であり、計測対象者17名で、計測対象者ごとに異なっているが、測定点の最多5点、最少1点において、a*値が-値、b*値+値であった。また、全計測対象者中1名において、2点でa*値が-値、b*値が-値であった。

回帰分析において、全計測対象者のうち、一次関数、二次関数、三次関数、指数関数、対数関数の中で、残差平方和が最も小さかった関数と人数を図8および表1に示す。L*値、b*値では、三次関数での残差平方和が全計測対象者で最も少なかった。a*値では、残差平方和が最も小さかった関数の計測対象者数は、三次関数が29名で、指数関数が6名であった。三次関数が最も適合していた計測対象者29名中18名は、全計測点で、a*値、b*値ともに+であった。残りの11名は、計測対象者ごとに異なるが、最多5点、最少1点で、a*値-、b*値+で、その他はa*値+、b*値+であった。指数関数が最も適合していた計測対象者6名中、5名においては、計測対象者ごとに異なるが、最多5点、最少2点が、a*値-、b*値+で、その他はa*値+、b*値+であった。残りの1名は、4点がa*値-、b*値+、2点がa*値-、b*値-、その他はa*値+、b*値+であった(図9)。

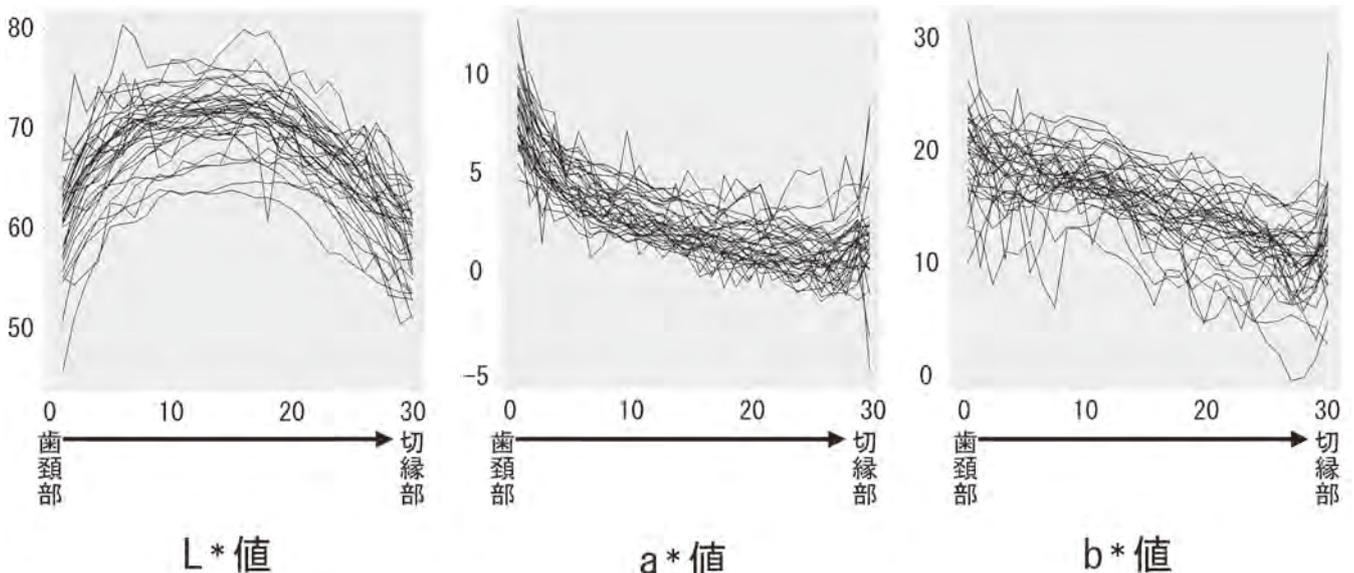


図7 データ分布

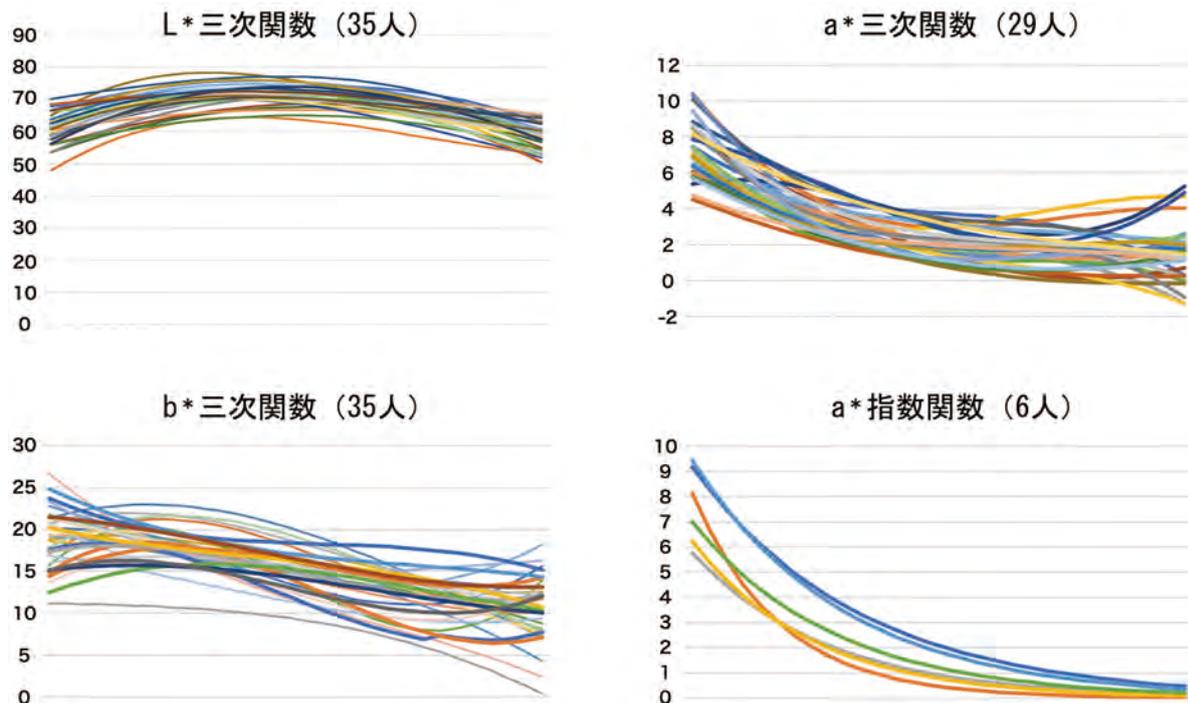


図8 全計測対象者のL*値、a*値、およびb*値に関数を当てはめた結果

表1 残差平方和が最も小さかった関数の計測対象者数

	L*値	a*値	b*値
三次関数	35	29	35
指数関数	0	6	0

(単位:名)



18名
L*値:三次関数
a*値:三次関数、全て+
b*値:三次関数、全て+



5名
L*値:三次関数
a*値:指数関数 数点で一、
その他は全て+
b*値:三次関数、全て+



11名
L*値:三次関数
a*値:三次関数、数点で一、
その他は全て+
b*値:三次関数、全て+



1名
L*値:三次関数
a*値:指数関数
b*値:三次関数
a*値+, b*値+ 2点
a*値-, b*値- 2点
a*値-, b*値+ 4点

図9 実際の写真

4. 考 察

実験1. 分光イメージング装置を用いたグラデーショ ン評価の有用性の検討

O'Brienら⁴⁾やHasegawaら⁵⁾は天然歯の歯頸部から切縁部にかけての部位間の色差を報告している。これらは特定の領域を測色し比較したものであり、歯冠の連続的な色の変化を捉えたものではない。そこで、本研究では試料全体の分光情報を採取することで、連続的な色調評価が可能な分光イメージング技術に着目した。これまで、分光イメージングを用いた歯の色調に関する研究は認められないため、分光イメージング装置のみで観察することのできる色の連続的な変化を測色し、数式を用いて天然歯のグラデーションの数理解析を行った。

天然歯に近似した歯冠補綴装置を作製するためには、口腔内における天然歯の歯頸部から切縁部にかけての色調変化を分析する必要がある。Wangら⁹⁾はオールセラミッククラウンでは人工歯肉の有無により歯頸部付近の色調が異なり、歯頸部付近では明度と黄味が減少し、赤味が増加すると報告している。明度を示すL*値の歯頸部から切縁部にかけての変化は、歯頸部から切縁部に向けて三次関数的に増加した後、減少していた。天然歯において、歯頸部から切縁部にかけてL*値の変化は、歯冠断面における唇側面形態と相似しており、L*値は歯冠唇側面形状の影響を受ける可能性があると考えられた。これは、歯冠が有する曲面により、計測器と各計測点の距離や、角度に差が生じ、光の反射が異なることによる可能性が考えられる。

色相を示すa*値、b*値においては、a*値は、切縁部にかけて三次関数的、指数関数的に減少し、b*値は、三次関数的に減少した。a*値は+の値が赤色、-の値が緑色、b*値は+の値が黄色、-の値が青色を示すことから、歯頸部から切縁部にかけて赤味や黄味が薄くなっていく。これは、天然歯に関する歯肉色の影響を定量的に考察した研究はこれまでにないが、口腔内の色調に歯肉色が関与している可能性があることに加え、エナメル質、象牙質のベースとなる色調と比率や形態が複合的に関与し変化している可能性が考えられた。

5. 総 括

本研究により、上顎中切歯の歯頸部から切縁部にかけての色調変化を数理的に解析することができた。本研究結果は、

天然歯における色調変化の評価や、天然歯に近似したグラデーションを有するCAD/CAM用ブロック、ディスクの開発に有用であるものと考えられた。

謝 辞

本研究の遂行にご助力賜りました大阪大学大学院歯学研究科クラウンブリッジ補綴学分野 並河雅也君、株式会社 オフィス・カラーサイエンス 大住雅之様、ならびに、ご支援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、厚く御礼申し上げます。

(引用文献)

- 1) Baldissara P, Wandscher VF, Marchionatti AME, Parisi C, Manaco C, Ciocca L. Translucency of IPS e.max and cubic zirconia monolithic crowns. *J Prosthet Dent.*, 120: 269-275 (2018)
- 2) Ueda K, Guth JF, Erdelt K, Stimmelmayer M, Kappert H, Beuer F. Light transmittance by multi-colored zirconia material. *Dent Mater.*, 34: 310-314 (2015)
- 3) Kolakarnprasert N, Kaizer MR, Kim DK, Zhang Y. New multi-layered zirconias: Composition, microstructure and translucency. *Dent Mater.*, 35: 797-806 (2019)
- 4) O'Brien WJ, Hemmendinger H, Boenke KM, Linger JB, Groh CL. Color distribution of three regions of extracted human teeth. *Dent Mater.*, 13: 179-185 (1997)
- 5) Hasegawa A, Motonomi A, Ikeda I, Kawaguchi S. Color of natural tooth crown in Japanese people. *Color Research and Application*, 25: 43-48 (2000)
- 6) 田口智子, 大住雅之, 桐野文良. 光学的手法および表面微細構造解析による江戸時代銀貨の色彩の検討. *日本色彩学会誌*, 38: 394-403 (2014)
- 7) Lu G, Fei B. Medical hyperspectral Imaging: a review. *J Biomed Opt.*, 19: 10901 (2014)
- 8) Chlebda DK, Rogulska A, Lojewski T. Assessment of hyperspectral imaging system for colour measurement. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.*, 185: 55-62 (2017)
- 9) Wang J, Lin J, Seliger A, Gil M, da Silva JD, Ishikawa-Nagai S. Color effects of gingiva on cervical regions of all-ceramic crowns. *J Esthet Restor Dent.*, 25: 254-262 (2013)

IV. コスメトロジー研究助成を受けて

コスメトロジー研究助成を受けて 殷 澍

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、財団並びに関係者の方々に深く感謝申し上げます。

約10年ころ前、貴財団より1回目の研究助成を受け、酸化セリウム板状粒子の合成とその機能性評価に関する研究を行いました。今回は2回目の研究助成となり、採択いただいた研究課題は前回同様に素材・物性に関する分野であり、白色顔料や紫外線遮蔽剤など化粧品としても広く利用される酸化チタンの着色に関する研究でした。顔料の着色は通常遷移金属イオンの添加により、簡単に実現できるケースがありますが、化粧品素材として利用される際に、素材の安全性評価・リスクの規制と管理が厳しく求められております。私どもの研究室では環境にやさしいクリーンなプロセスを用い、様々な無機材料の形態制御や新規環境応答機能の開発を行っており、特に材料の光応答機能につ

いて力を入れて研究を進めております。化粧品素材に関する様々なニーズにも応えるため、多彩な工学的手法を駆使し、化学・物理・工学・結晶学の知識を集約・活用することにより、化粧品の安全性と環境負荷を意識した機能性素材の開発にもフォーカスしております。今回は複合アニオンというコンセプトの下で、遷移金属フリーな酸化チタンの創製に成功してございまして、同手法を活用し、様々な他の無機材料や顔料の着色にも適用する可能性を検証し、様々な機能性素材開発に取り組んでいきたいと思っております。最後に、本研究を遂行するにあたり、共同研究を行っている研究室スタッフや学生に感謝すると共に、今回のご支援を賜りましたことを改めて御礼申し上げ、貴財団のますますのご発展を心より祈念いたします。

(東北大学多元物質科学研究所)

コスメトロジー研究助成を受けて 上沼 駿太郎

この度はコスメトロジー研究助成に採択いただきありがとうございます。博士学生の身分で採択いただき、その後同研究室にてポスドク、助教と身分が変わっていく中で自分が安定して使用できる研究費がほとんどありませんでしたので、貴重な研究費として使用させていただきました。重ねて御礼申し上げます。

当該研究課題の中心材料である環状オリゴ糖(シクロデキストリン)から成るナノシート(擬ポリロタキサナノシート)は、私が博士一年生の時に発見した材料です。当時の研究テーマは当研究室にて盛んに行われているポリロタキサン(わか状分子にひも状分子が貫通したネックレス状構造を有する超分子)を用いた力学材料の強靱化機構に関する研究であり、ナノシートとは全くの別物でした。当研究室ではこれまでナノシートに関する研究は行われておりませんが、環状オリゴ糖がナノシートを形成するということが2019年に見出されて以降、幸いにも研究を

続けさせていただいております。発見から3年が経過して、基礎的知見が徐々に集まってきております。私はコスメトロジーの専門外で浅学ではありますが、環状オリゴ糖から成るナノシートの研究の進行とともに、この材料のコスメトロジーとの相性の良さをますます実感しております。

“ナノシートはその薄さから、材料表面に対して高い付着性を示すはず”。この期待だけを根拠に2019年に課題申請させていただき、そして採択いただきました。当時(今もですが)黎明期で、応用については実験的証拠がほとんどなかったにも関わらず今回のように研究をご支援いただいたことは、実験の進行だけでなく、大変心の励みになりました。今後も基礎・応用の両面から研究を続けて精進してまいりたいと考えております。最後に、このような貴重な機会をいただきましたこと、深く御礼申し上げます。

(東京大学大学院新領域創成科学研究科物質系専攻)

2019年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

小谷 仁司

私は天然物の機能性成分の研究や免疫学を専門とした研究をこれまでおこなってきました。しかし、これらの研究分野がコスメトロジー研究に密接に関連しており、新たな化粧品やスキンケアのための製品開発に繋がるような研究であることを、これまであまり考える機会がありませんでした。過去に採択された友人の勧めで自身の研究内容とコスメトロジーへの発展に繋がるような研究テーマを考え、応募したところ、幸運にも採択していただき、皮膚の老化改善をテーマとした研究を実施することになりました。この皮膚の老化というのは、美容などにおいても多くの女性が気になるテーマであるだけでなく、男性にとっても年齢とともに変化する皮膚の質感は、無意識のうちにも気付くような変化です。これらを改善することが可能となれば、人々の活力が湧き、高齢になっても生き活きと働き、社会

生活を楽しんで生活することができるのではないかと考えています。植物成分の機能性を研究する上で、大学でおこなうことができる内容は、培養細胞を使った研究や実験動物を用いた研究です。しかし近年、食品や化粧品関連の企業では、実験動物を用いた製品開発研究をおこなわないという傾向があり、大学の研究者も動物実験を代替するような *in vitro* での実験を優先するよう進められてきております。そのような点からも、これからの研究の進め方を考え直すよい機会にもなったと思います。今回助成いただいた研究テーマはまだ完了したわけではなく、これからも私のコスメトロジー研究の入口として今後も引き続き発展させていき、研究成果を社会に還元することができるようにしていきたいと考えています。

(島根大学医学部医学科免疫学講座)

2019年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

佐藤 康治

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す。関係者の皆様には厚く御礼申し上げます。

2019年11月に開催されました第30回表彰・贈呈式では、今では夢のような対面での講演会や受賞者間の交流を図る懇親会があり、大変有意義な時間を過ごすことができました。年が明け、本格的に研究を開始した矢先、現在も収束の兆しが見えない新型コロナウイルス感染症のパンデミックが発生し、私たちはこれまでとは異なるライフスタイルへの移行を余儀なくされました。この未曾有の事態に、大学では手探り状態で学生の感染防止や講義のオンライン化などの対応が求められ、それに追われる日が続いております。

今回助成いただいた研究テーマは、強力な抗酸化物質ヒドロキシチロソール (HT) の発酵生産法の開発です。HTは化粧品やスキンケア用品の有効成分としてだけでなく、美肌やアンチエイジング効果が期待されるサプリメントと

しても利用されています。また、その抗ウイルス活性から、最近では新型コロナウイルス感染症の感染予防効果も報告され注目されています。現在は、HTを比較的高濃度で含有するオリーブ果汁や葉エキスの濃縮物が市販されています。しかし、含有量の低さ、不純物の混在、個体・栽培エリアによるバラつき、季節性などから、高純度品の安定供給に課題があり、我々は新たな供給ルートとして発酵生産法を提案しました。残念ながら現時点でのHT生産性は低く、実用化のレベルには至っておりません。HTはコスメトロジー分野の発展だけでなく、新型コロナウイルス感染症のパンデミックの終焉を加速させる化合物として期待されますので、実用生産の早急な実現を目指し、今後も尽力してまいります。

最後になりましたが、今回のご支援を賜りましたことに改めて御礼申し上げますと共に、貴財団のますますのご発展を心より祈念いたしております。

(北海道大学大学院工学研究院)

コスメトロジー研究助成を受けて

中橋 明子

この度はコスメトロジー研究助成にご採択いただき、誠にありがとうございました。本提案については、育休中に構想を練り、育休明けに申請し、ご採択いただきました結果、スムーズに研究活動に復帰でき、当該研究を着実に進めることができました。

本研究テーマで用いた「ポリイミド」は、機能材料として電子部品や航空宇宙用途では多く利用されていますが、コスメトロジー分野への応用については全く検討されてきませんでした。本研究では、私自身のこれまでのポリイミド微粒子に関する研究成果に、ポリイミドならではのUV吸収能を組み合わせることで、コスメトロジー分野におけるポリイミド微粒子の新たな展開を目指しました。とくに、楕円体状ポリイミド微粒子の紫外線防御剤への可能性を探った結果、多くの興味深い結果を得ることができました。球状ポリイミド微粒子から楕円体状ポリイミド微粒子への変形過程を明らかにし、球状微粒子と楕円体状微粒子の光

学物性の差異を示すことができました。

これまで、私は高分子の合成や応用、高分子微粒子の研究開発などに携わってきましたが、コスメトロジー分野に関しましては、興味はあったものの、携わる機会はありませんでした。今回の助成により、私自身にとっても、微粒子の応用、分散および紫外線防御剤の設計や評価など、異分野の知見を学ばせていただくきっかけとなり、研究の幅を大きく広げることができたと感じています。今後も多角的な視点を持ち精力的に研究を展開し、微力ではございますがコスメトロジー分野の発展に貢献できるように努めたいと思います。

最後になりましたが、本研究でのご支援をいただきました貴研究財団と関係者各位に改めて深謝いたしますとともに、貴研究財団のますますのご発展をお祈り申し上げます。

(地方独立行政法人大阪産業技術研究所)

コスメトロジー研究助成を受けて

中林 孝和

このたびは、私達の「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」の研究課題を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。私達は、分子の振動をラマンバンドとして直接観測するラマンイメージングの特徴を活かして、色素などで染色できない究極の細胞内分子「細胞内の水」の研究を行っています。ラマンイメージングを用いることで生細胞内にある水の定量や水素結合に関する情報を直接得ることができ、核や細胞質での水の密度を精度高く測定することに成功しています。細胞周期に伴う水の密度変化なども示し、「細胞内の水」が細胞を理解するパラメーターになりえることを提案しています。次のステップは膜界面の水であると考え、本研究を提案するに至りました。膜やタンパク質界面の水(界面水)は、束縛水、中間水と分けられるなど機能発現に重要であることが提案され、多くの研究が行われています。生体親和性高分子の物性理解において

も、高分子界面の水が重要であることが提案されています。しかし、特に分光学的な側面から観測する適切な手法がなく、その詳細は不明でした。そこで本研究では界面選択的な分光手法である全反射ラマン顕微鏡を製作し、実際に生細胞への適用を行いました。顕微鏡の立ち上げには成功しましたが、界面のみを精度高く測定するためには、更なる改良が必要です。本助成にて研究の土台となる部分を立ち上げることができましたので、引き続き取り組んでいきます。本当に有難うございました。皮膚組織や細胞内、膜界面にある水の理解は、コスメトロジー、そして生命科学の発展に必要不可欠です。全反射ラマン顕微鏡が皮膚や細胞膜近傍の界面水を観測する適切な手法となり、コスメトロジーを発展させる汎用な手法となり得ることを目指し、これからも研究を進めていきます。

(東北大学大学院薬学研究科)

2019年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

中村 真紀

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、2年間の研究をサポートしていただいたことに、心より感謝申し上げます。現職に就いてから、私は、機能性リン酸カルシウムナノ材料の合成技術開発とバイオメディカル応用をテーマとして研究を進めており、主に医療や歯科の分野で役立つ材料の創製を目指してきました。一方で、生体親和性や安全性に優れるリン酸カルシウムは、ファンデーションなどのコスメトロジー素材としても使用されているため、美容分野への展開を見据えた材料開発も興味深いのではと考え、今回の研究提案に至りました。本研究期間では、主に、美容効果も期待されるサイ

トカインである線維芽細胞増殖因子を内包した分散性リン酸カルシウムナノ粒子の合成技術開発に取り組むこととなり、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の構築という最終目標に向けて第一歩を踏み出すことができました。本研究で得られた知見をもとに、今後も研究を継続したいと思います。最後になりますが、本研究にご支援いただいたことに重ねて感謝申し上げますとともに、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お祈り申し上げます。

(国立研究開発法人産業技術総合研究所ナノ材料研究部門)

2019年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

福井 有香

私の専門は高分子コロイドであり、自然に触発されたものづくりの観点から、高分子微粒子とカプセルのデザイン、創製および機能化に取り組んでいます。その中でも、天然由来の脂質二分子膜(リポソーム)に高分子を複合化したナノカプセル(リポナノカプセル)の研究は、卒業研究から10年以上続けているテーマであり、指導教授による「リポソームの表面に化粧を施して顔を変える」という言葉から始まりました。高分子薄膜作製技術(layer-by-layer法)を駆使して、リポソームの表面に高分子を交互に積層化することで、目的・用途に応じて顔を自在に変えることが可能であり、分散安定性、標的指向性などの機能付与を行ってきました。また、高分子層を重ねてカプセル層を形成するため、各層に様々な物質を配合可能であり、リポソームにはない多機能性(機械的強度、環境応答性、物質保持放出能)を具備させることが可能となりました。この度、貴財団の

研究助成を賜ることで、リポソームの表層だけでなく、内部の微小空間も改質の場と捉えることで、ナノカプセルのデザイン性の幅をさらに拡げることができ、肌や毛髪の目的部位に有効成分を効果的に送達するコスメティックデリバリーシステムへの応用に向けた道筋を見出すことができました。コロナ禍で日々の研究が儘ならない中、こうして研究助成を受けられたことは大変励みになり、オンラインを駆使して、学生たちと話し合いながら地道に着実に研究を進めることができたことを心より感謝申し上げます。今後は、作製したナノカプセルに有効成分を担持して、皮膚深部への送達を可能にすることで、肌本来の機能に働きかけ、内側に秘められた本来の美と個性を創出できるようなコスメトロジー研究の発展に寄与していきたいと考えています。

(慶應義塾大学理工学部)

コスメトロジー研究助成を受けて

松浪 勝義

この度は貴財団の研究助成に採択いただき深く感謝申し上げます。

薬学部で教育、研究に携わる過程で、多くの学生、大学院生が医薬品だけでなく化粧品領域に興味を持っていることに気づきます。人々が豊かな人生を歩むために必要なこれらの研究分野は今も昔も変わらず引き続き魅力ある分野です。

当研究室では、植物や微生物の2次代謝産物を対象に種々の生物活性成分の探索研究を行っています。がん、炎症、感染症などの活性評価のほか、チロシナーゼ阻害活性や培養細胞およびゼブラフィッシュを用いたメラニン産生阻害活性の評価など多面的に研究を行っています。in vitroの活性評価や活性成分の単離、精製、スペクトルデータの解析による化学構造の解明など種々の技術、経験を駆使して少しでも多くの貢献をこの分野にできるよう学生ともども

日々楽しみながら研究をしています。私たちの研究分野である天然物化学は数ある薬学系研究分野の中でも比較的歴史のある学問分野です。生薬や漢方といった古代より人々の健康を支えてきた植物に魅力を感じ、当研究室の門をくぐった学生たちに少しでも良い研究経験を積ませることは、我々、教員の使命でもあり、また、大きなやりがいでもあります。しかし、大学の研究費はそれほど多くなく、また、種々の事務的作業に追われる毎日の中、今回の助成金は学生の教育および研究に非常に大きな助けとなりました。加えて、本研究を進める過程でご協力をいただきました共同研究者の方々にもこの場をお借りして深くお礼申し上げます。最後に、もう一度、この度、ご支援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心よりお礼申し上げます。今後の貴財団のますますの発展を祈念いたします。(広島大学大学院医系科学研究科生薬学)

コスメトロジー研究助成を受けて

矢田 詩歩

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。2019年4月より奈良女子大学大学院自然科学系化学領域の助教として採用されてもない時期に、今回の2年間にわたる助成をいただき研究を進めることができました。

今回採択された研究課題は、「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マイクロ構造に関する革新的評価技術の確立」です。私は学生時代からこれまで、ポリオキシエチレン (EO) 系非イオン界面活性剤を中心とした新規界面活性剤の合成と水溶液物性の評価に取り組んできました。また最近では、界面活性剤が形成する泡沫の構造や安定性を、前例の乏しい中性子小角散乱などのさまざまな測定を用いて調べてきました。今回の研究課題では、EO系非イオン界面活性剤のEO鎖の末端にポリオキシプロピレン鎖やアルコキシ基、硫酸エステル基を修飾した各

種界面活性剤を新規に合成し、これらの界面活性剤が形成する泡沫の構造や安定性をさまざまな手法を用いて詳細に調べました。結果として、さまざまな分子構造の界面活性剤の泡沫の構造と安定性の関係を理解することができました。本研究で得られた基礎研究の成果は、洗浄や食品、化粧品などの産業分野において重要であり、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。今後も継続して研究を行うことで、泡沫特性に及ぼす界面活性剤の分子構造の影響について体系的な理解を深めていきたいと思っています。

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ますとともに、コーセーコスメトロジー研究財団の今後のますますの発展をお祈り申し上げます。

(奈良女子大学大学院自然科学系化学領域)

2019年度 研究助成

微生物由来有用低分子化合物の利用について

和田 俊一

この度は、貴財団の研究助成に採択していただきまして誠にありがとうございました。おかげ様で2年間、研究予算に関する不安もなく、大変名誉に感じながら研究を進めることができました。私が所属しております微生物化学研究所は、カナマイシンの発見者である梅沢浜夫先生により約60年前に設立されました。それ以降、放線菌を中心とした微生物から抗菌、抗腫瘍抗生物質や免疫抑制剤など、主に医薬品としての開発を目指して有用低分子化合物の探索や利用法に関する研究を行ってきました。しかしながら近年は、発見可能な化合物は既にほとんど発見され尽くしてしまったかのようで、新たな有用化合物の発見が困難となっています。そのため、有用化合物の探索源や探索方法などについて、これまでになく新たな工夫が求められています。また、得られた化合物を無駄にしないために、その使い方についても様々な角度から検討する必要があります。こうした状況のなかで、私たちはtrehalose類縁体化合物

であるlentztrehalose類を発見しました。元々は別の化合物を精製していた際の夾雑物として得たものでしたが、新規物質であり比較的豊富に得られたため、これらを何らかの形で実用化につなげようと検討を始めました。Trehaloseは保湿、保護剤として化粧品に利用されておりますので、lentztrehalose類も、一つの方向として化粧品の成分として開発できればと考えておりました。当研究所ではこれまでに経験のない分野への挑戦となりましたが、今回、助成をいただいたことでこの研究を進めることができ、近い将来の実用化が期待できそうな類縁体化合物を開発することができました。また、細胞、組織を保護する新たな成分の探索を今後も積極的に行っていこうという意欲がわいております。どうもありがとうございました。貴財団の今後ますますのご発展を祈念しております。

(公益財団法人微生物化学研究会 微生物化学研究所)

2019年度 研究助成

研究助成を受けて

稲垣 絵海

向春の候、貴職におかれましてはますます御健勝のこととお喜び申し上げます。

皆様今もお新型コロナウイルスの対策で、大変な時期を過ごされているものとお察いたします。この感染の拡大が一日も早く終息に向かうことを祈るばかりです。この度私共の研究グループに研究助成をいただきまして誠に有難うございました。大学院を卒業し、個人研究を開始したところで、このような研究の機会をいただきましたこと、深く感謝しております。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は採択いただいてもなく、授賞式と交流会があり、採択者の中で様々な意見交換ができました。また付与くださいましたコーセー社の方々とも実際の化粧品開発についての知見をご教授いただくなど、いま

思えば本当にかげがえのないひと時を過ごさせていただきましたこと厚く御礼申し上げます。助成金は申請した研究を遂行するために使用させていただきましたが、まだ未熟な研究者として大きな一助となりました。

研究の個々の事項についてより精査された結果の報告、論文化へと実施が出来るように分析・執筆活動を進めて参ります。本研究の結果が、コスメトロジーのための基礎的研究の一助となれば幸いに存じます。今後も研究領域での学会発表や討議において忌憚のないご意見・ご批評をいただきながら、今後の研究に生かしたいと考えております。この度は誠に有難うございました。

(慶應義塾大学医学部眼科学教室)

コスメトロジー研究助成を受けて

宇賀神 つかさ

この度は、コスメトロジー研究助成をいただき、誠にありがとうございました。東京医科歯科大学の皮膚科の宇賀神と申します。私共、皮膚科医は、アレルギーの原因精査を担当させていただくことの多い診療科になります。助成いただいた研究は「毛染め・化粧品アレルギー」に関するもので、日々の診療の中で着想を得たものになります。染毛剤や化粧品のアレルギーは、近年、発症年齢が低年齢化し、発症頻度も増加し、問題視されておりますが、特に染毛剤アレルギーは、多様な臨床像を呈することから、医療者が疑わず、よって診断に至らず、見逃されているケースも少なからず存在しています。よって、染毛剤アレルギー

は、診断法の確立や病態の解明が望まれる分野であると考えておりました。そこで私は、助成をうけて、染毛剤アレルギーのより安全で簡便な検査の確立と、特に診断が困難な痒疹型染毛剤アレルギーに関して、病理組織学的に病態の解明を目指し、研究してまいりました。お蔭様で、染毛剤アレルギーの病態の断片を明らかにできたのではないかと考えております。この経験を励みに今後もコスメトロジー領域を含めたアレルギー診療に尽力してまいりたいと存じます。今後ともご指導ご鞭撻のほどをよろしくお願い申し上げます。
(東京医科歯科大学皮膚科)

公益社団法人コーセーコスメトロジー研究財団研究助成を受けて

大田 昌樹

この度は、多大なる研究助成を賜り、誠にありがとうございました。私共が開発した「亜臨界溶媒分離技術」の化粧品分野への応用をこれから新展開していくにあたり、正にきっかけとなる研究期間となりました。振り返れば、民間財団の研究助成においてそう多くはないまとまった金額の研究助成に、採択直後、この上ない喜びを抱いたことを思い返します。この助成は、主に貴財団への寄附金から成り立っていることに深く感謝を申し上げます。

今回、与えられた研究期間において、従来一緒に抽出されてきた成分を、化学物質の物理化学的特性（沸点や極性、溶解度パラメータなど）に応じて分離する手法へと展開することができました。特に、香氣成分とレジン成分の分離に着眼いたしました。二酸化炭素-エタノール-水共溶媒系において分離の選択性が向上することを確認いたしました。また、理論化の過程においても独自の2つのモデルを比較して、「精度の良い相関法」と「未知物質への対応に寄与する推算法」の使い分けの可能性を示すことができました。これらの研究成果は、人生において約1/3の

時間を研究に投資してきた事実を正当化するに余りあるものでした。

なお、この研究は、本学 八田四郎次名誉教授より続く化学工学という学問領域において、特に熱力学の研究分野を応用しています。斎藤正三郎名誉教授のもと、新井邦夫名誉教授、今野幹男名誉教授、阿尻雅文教授、猪股宏教授、スミス・リチャード教授、佐藤善之特任教授、渡邊賢教授などの背中を見て進むことができたことに深く感謝を申し上げます。薬学部の大泉康名誉教授、山國徹特任教授などのご支援も受けることができました。ここに感謝を申し上げます。学生諸氏の活躍にも大いに助けられました。精緻な実験データは、日本分光株式会社の実験装置があつてこそ深く感謝しています。研究資金は、当該研究助成のほか、文部科学省・日本学術振興会科学研究費補助金よりいただくことができました。

最後に苦しい状況でもいつも支えてくれた家族に感謝し、筆をおくことにいたします。

(東北大学大学院環境科学研究科)

2019年度 研究助成

すべての人に安心・安全なコスメトロジーをめざして 大沼 清

この度は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事業にご採択いただきまして、心より感謝申し上げます。採択頂いたのが2019年秋で、そのすぐ後にCOVID-19が始まり、思うように研究が進められない日々が長く続きました。しかし、本研究助成に採択いただいたことで、私の研究を応援して下さっていると安心感・責任感とともに、前に進む原動力を与えていただけ、研究を継続することができました。重ねて御礼申し上げます。

本研究は、「すべての人に安全・安心なコスメトロジー」ということを目指して推進しております。安全性は、化粧品の満たすべき基本条件です。特に、妊娠の可能性のある方にとっては、自身はもちろんのこと、胎児への影響も気になります。ところが近年、動物愛護の観点から化粧品の動物実験は禁止されており、代替となる安全性テスト技術の確立が急務となっております。我々の最終目標は、胎児の体になる部分に近い性質を持つヒトiPS細胞とマイクロ

流路を用いて、胚の状態を模倣して催奇形性をテストできるシステム“Embryo-on-a-chip”の開発です。本助成のおかげで、これまで構築したシステム内部でのメカニズムの解析と、催奇形性薬(サリドマイド)を用いたテスト法の開発において成果を上げられ、論文4報を公表することができました。大変に感謝しております。本助成期間は終了いたしました。本課題はまだ道半ばです。化粧品の安全性・有効性を安価・簡便・迅速に調べることができるようになる技術の開発を通じ、コスメトロジー研究への貢献ができるよう、一層精進してまいります。

本研究を遂行するにあたり、共同研究を行っていただいた先生方や、研究室の学生さんに深く感謝申し上げます。また、本課題の選考・支援に携わっていただいた関係者の皆様に重ねて感謝を申し上げますと共に、公益財団法人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お祈り申し上げます。(長岡技術科学大学)

2020年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて 北浦 次郎

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、心より感謝申し上げます。

私は長年、マスト細胞の活性化によるアレルギーの制御機構の解析を行ってきました。その過程で、多くのカチオン性分子がGタンパク共役型受容体のマウスMrgprb2(ヒトではMRGPRX2)に結合して結合組織型マスト細胞を活性化(脱顆粒)させ、偽アレルギーを誘導することに着目しました。皮膚に塗布される化粧品や皮膚に付着する動植物成分の中にも偽アレルギーを誘導する分子が数多く存在すると考え、皮膚の偽アレルギーを誘導する分子のスクリーニング法の開発を目指しました。目的を達成するために、野生型マウス、Mrgprb2ノックアウトマウスとともに、新規に作製したMRGPRX2ノックインマウスを利用しました。最終的に、*in vitro*及び*in vivo*でMRGPRX2リガン

ドをスクリーニングする方法を確立することができました。特に、*in vivo*でMRGPRX2リガンドとしての作用を評価できる系は、ヒトにおける偽アレルギーの病態機序解明にも大きく役立つと考えられます。主に皮膚に塗布される化粧品は美容に貢献し健康的な生活に不可欠な存在であるがゆえに、偽アレルギーを誘導する成分の混入を避けることは重要であり、本研究成果がコスメトロジーの発展につながることを期待します。

萌芽的な本研究を支えていただいた、コーセーコスメトロジー研究財団からの研究支援に対して、重ねて御礼申し上げます。多くの研究者を支援する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致します。(順天堂大学大学院医学研究科アトピー疾患研究センター)

コスメトロジー研究助成を受けて

小暮 健太郎

この度は、コーセーコスメトロジー研究助成に採択していただき、誠に感謝申し上げます。私は、2005年よりイオントフォレシスによる高分子物質の皮内送達に関する研究に取り組んでまいりました。従来、イオントフォレシスによる皮内送達に高分子物質、特にDNAなどの親水性高分子は適用できないと考えられてきましたが、siRNAなどの核酸医薬やリポソームなどのナノ粒子がイオントフォレシスによって皮内に送達できることを見出し、様々な物質に展開してきました。そのため我々は、皮膚内への物質送達ばかりに着目して研究を行ってきたのですが、安全性に関する検討が不十分である点が常に気になっておりました。ただ、安全性の検討だけでは、科研費や他の研究助成金を得ることは困難であるため、なかなか取り組むことができませんでした。このような状況下、コーセーコスメト

ロジー研究財団には、我々の研究に注目していただき、ご支援をいただきましたことは、とてもありがたいことであり、本研究助成のおかげにより、イオントフォレシスの安全性を検証することができるとともに、コラーゲンやセラミドなどの皮膚の機能性に関する物質に対してイオントフォレシスが良い影響を及ぼすことも見出すことができました。今後も、コスメトロジー研究を引き続き推進すること、本研究領域のさらなる発展に貢献できればと考えております。最後になりましたが、本研究にご支援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と関係者の皆様に改めて感謝申し上げますとともに、ますますのご発展をお祈り申し上げます。

(徳島大学大学院医歯薬学研究部)

コスメトロジー研究助成を受けて

小林 麻己人

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、本当にありがとうございました。本課題研究は、私が所属する筑波大学と同じつくば市内にある農研機構の木元博士とたまたま知り合う機会があり、意気投合して開始したものです。私は長年ゼブラフィッシュ遺伝学を用いた研究をしており、木元博士は乳酸菌研究者の第一人者の一人。当初、乳酸菌とゼブラフィッシュという組み合わせは、ヒトと魚類では細菌叢も違うし、そもそも温度環境が全く違うということで、共同研究をすることは全く考えもしませんでした。ところが話をよくよく伺ったところ、乳酸菌のアンチエイジング効果は、生菌である必要はなく、むしろ死菌の方が安定した効果を発揮すること、商品化されているものは死菌の方が多いこと、死菌であれば化粧品への応用もできること、など意外なことばかり。自分と一見関係なさそうに見える分野の話も、食わず嫌いにならずに聞いてみるものだと思います。

それであれば、乳酸菌とゼブラフィッシュという意外な組み合わせにより、思いもしない発見ができるかもと思いつきました。しかし思いついても、死菌はあっても先立つ資金がない。そうした中、貴研究財団が私のこの突飛なアイデアにご賛同いただき、研究助成の対象課題に採択していただきました。本当にありがたく思います。残念ながら、作用メカニズム解明を期間内に達成することはできませんでしたが、そのための準備は十分にさせていただきました。この成果を活かして、ぜひ画期的な発見ができればと思っています。化粧品の開発応用につながりそうな成果を出し、本研究助成に再度採択していただけるよう頑張りたいと思っています。その際はどうぞよろしくお願いいたします。

最後に、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いたします。(筑波大学医学医療系)

2019年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

齋藤 康太

この度は第30回(2019年度)の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大変ありがとうございました。2018年の2月より秋田大学大学院医学系研究科の情報制御学・実験治療学講座(旧薬理学講座)に着任し、研究室を新たに主宰するタイミングで本助成をいただくことができ、研究室のセットアップに必要なさまざまな機器および試薬の購入に大変有意義に研究費を使用させていただきました。

われわれは、これまで小胞体からの分泌小胞出芽部位であるER exit siteからのコラーゲン分泌機構を主に解析の対象としてまいりました。最近、コラーゲンの積荷受容体として我々が同定していた因子TANGO1がコラーゲン分

泌のみならず、ER exit siteそのものの形成にも関与していることがわかってまいりました。さらに今回の助成を得て、細胞分裂期のER exit siteの形態形成制御がTANGO1のリン酸化修飾の変化によって担われていることが明らかになってきました。今回見出したリン酸化修飾は概日リズムによっても制御される可能性があることから、今後も本助成の研究は継続して続けていきたいと考えております。最後になりましたが、本研究をご支援いただきましたコーセーコスメトロジー研究財団に改めて感謝致します。また貴財団のますますのご発展をお祈り申し上げます。

(秋田大学大学院医学系研究科)

2019年度 研究助成

研究生生活最後のプロジェクトにご助成くださり有り難うございました

西江 渉

この度は、助成していただき誠に有難うございました。本研究は、私が准教授として最も精力的に活動していた時に、大学院生の時から長年興味を持ち着目してきたXVII型コラーゲンの発現制御機構の解明を目指す計画を立てたものです。当時は先駆的な手法であったCRISPR screeningを解明するという壮大な内容です。ご助成いただくこととなり、毎日休みの時も研究のことばかり考え楽しく過ごしておりましたが、研究期間中に異動となり、その後は招聘教官として細々と遂行してきました。今後研究

活動を継続できなくなってしまうことは残念ですが、これまで得られた経験や知識を多少なりとも活かし、臨床の場で患者さんへ貢献していきたいと考えております。また、本研究では大学院生や医学部の学生さんにも手伝っていただきました。この場をお借りして感謝申し上げます。近い将来、彼ら彼女らが、臨床に直結する新知見を解明していくことを期待しています。

(北海道大学大学院医学研究院皮膚科学教室)

コスメトロジー研究助成によって実現した「亜鉛皮膚科学」への挑戦

深田 俊幸

コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成のご支援のもとで、私達の研究を実施できましたことに心より感謝申し上げます。本誌面をお借りしまして、貴財団関係者ならびに審査員の皆様に深くお礼申し上げます。

亜鉛が健康的な皮膚の維持に大切であることは半世紀以上も前に知られていましたが、なぜ亜鉛が皮膚の維持に必要なのか、明確な回答はありませんでした。今から10年ほど前に亜鉛トランスポーター ZIP10 が毛包に発現していることを偶然発見し、その美しい発現像から ZIP10 の皮膚科学に魅了されて、現在に至っております。ZIP10 の欠損が皮膚バリア機能の損傷を引き起こすことを見出し、「ZIP10 は、皮膚バリア機能にどのような役割を演じているのか」の命題を解明することを目標として、貴財団のご支援のもとで ZIP10 発現細胞とその子孫細胞を可視化することができる *Zip10-GFP-KI* マウスと *Zip10-GFP/Tomato-KI* マウスを開発しました。これらのマウスは、ZIP10 を

発現する毛包幹細胞等の特徴と役割の解明に極めて有用な研究ツールとして、今後の研究の発展に大きく貢献することと確信します。

本研究期間に、アトピー性皮膚炎患者の皮膚では ZIP10 の発現が減少していること、亜鉛は表皮におけるエピジェネティックな遺伝子発現の制御に関与することを報告しました。今後、*Zip10-GFP-KI* マウスと *Zip10-GFP/Tomato-KI* マウスを様々な実験に適用することにより、健康的な皮膚の形成と維持を科学する『亜鉛皮膚科学』の発展に貢献したいと考えております。

最後に、当研究を大きく進展する機会を頂きました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とともに、貴財団のますますのご発展を心より祈念申し上げます。

(徳島文理大学薬学部先端医療薬学コース病態分子薬理学研究室)

コスメトロジー研究助成を受けて

松本 靖彦

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。

これまでに私は、カイコを実験動物として用いた感染症研究を展開する中で、主に薬剤耐性や全身感染症が問題となる黄色ブドウ球菌を研究しておりました。一方、黄色ブドウ球菌は炎症性皮膚疾患であるアトピー性皮膚炎の増悪化に関わることも知られております。また、尋常性ざ瘡の原因となる *Cutibacterium acnes* や水虫の原因となる真菌を研究する機会がありました。さらに、動物愛護の問題から、化粧品などの開発に哺乳動物を用いて研究することが難しい旨のお話を聞きました。これらのことから私は、カイコを用いた皮膚感染症モデルの確立が今後のコスメトロジー研究に貢献するのではないかと考えました。

本研究では、*C. acnes* のカイコ感染モデルを確立し、抗菌薬であるテトラサイクリンやクリンダマイシンの薬効評価が行えることを示しました。さらに、昆虫の免疫応答の

一つであるメラニン化反応を指標として、*C. acnes* の免疫誘導の評価ができることを見出しました。また、*C. acnes* と黄色ブドウ球菌の共感染によるカイコの皮膚上でのメラニン化の誘導が起きました。これらの結果から、*C. acnes* によるカイコを用いた皮膚における過剰免疫応答を評価できる実験系が構築できたと判断しました。今後は、本研究で開発したカイコを用いた評価系により、*C. acnes* の免疫誘導機構の解明や阻害剤のスクリーニングを行いたいと思っております。本研究成果をコスメトロジー研究に貢献できるように研究を展開いたします。

本研究を遂行するにあたり様々なご助言をいただきました共同研究者の方々に深く感謝いたします。また、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。

(明治薬科大学微生物学研究室)

2019年度 研究助成

チロシナーゼの反応機構解明を目指して 的場 康幸

チロシナーゼは、シミやソバカスなどの皮膚疾患の原因酵素のひとつであり、美白用化粧品開発のためのターゲット酵素です。実際に、市販されている美白用化粧品にはチロシナーゼ阻害作用を謳うものが多くあります。チロシナーゼは創薬の観点から非常に興味深い酵素ですが、その三次元構造については、2006年に発表した筆者らの報告が最初のものでした。これを契機として、構造に基づくチロシナーゼ阻害剤のドラッグデザインが可能になったものと思います。

ただし、チロシナーゼにはもうひとつの重要なテーマが残されていました。それは反応機構についてです。筆者らの結晶構造では、チロシナーゼの活性中心近傍に別のタンパク質のチロシン残基が存在しており、反応機構の解明に役立つのではないかと考えていました。いろいろな試行錯誤を経て、このチロシン残基が酵素反応を受けるらしいことがわかるとともに、触媒サイクルで銅イオンが大きく動くのではないかと新しい知見を得ることができました。

ただし、この意見はなかなか世間には認められず、他の研究者を納得させるには、X線結晶構造解析だけではなく分光学的なアプローチも必要と方針を変えました。今は亡き小倉尚志先生(当時兵庫県立大学に所属)には、分光学的データを得るのにご協力いただきました。謹んでお礼申し上げます。

なお、分光学的データもそろい論文投稿をしようとしていたところ、日本の別の研究グループが同じような研究成果を持っていることを偶然知りました。その後は、急いで2報の論文を仕上げ、何とかそのグループに先んじて論文を出すことができました。今回の研究結果は、そこで予測した反応機構を補強するものになります。今後は、我々の出したデータに基づいた阻害剤が開発されることを望みます。

最後に、本研究を遂行するにあたり、研究助成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。(安田女子大学薬学部薬学科)

2019年度 研究助成

コスメトロジー助成を受けて 三浦 恭子

この度は、コーセーコスメトロジー研究財団コスメトロジー研究助成にて私どもの研究をご支援頂きましたこと、大変光栄であり、心からお礼申し上げます。

本研究では、最長寿命かつ老化耐性を持つ齧歯類、ハダカデバネズミ(デバ、Naked mole-rat)における皮膚線維芽細胞の老化抑制機構の解明を目指して、研究を行いました。

デバはマウスと同程度の大きさながら、報告されている最大寿命が37年以上の、異例の長寿動物です。また、皮膚を含む各種組織・臓器が老化耐性の特徴をもち、顕著ながん化耐性を示します。これらの特徴から、デバは、新たな皮膚の老化予防方法の開発のための動物として、有用と考えられます。

一方で、デバは長寿動物であるがゆえに繁殖が難しく、さらに非モデル動物であるため解析手法も一からの立ち上げが必要なことが多く、高額な飼育費・研究費を必要とします。苦しい状況の中、貴財団からご支援いただきました

おかげで、本研究を進め成果を出すことができました。

本研究では、デバ線維芽細胞において、老化細胞で細胞死が活性化することを見出し、解析を実施しました。結果として、細胞老化に重要なINK4a-RB経路が活性化すると、 H_2O_2 を産生するセロトニン代謝経路が活性化し、デバ線維芽細胞が生来持つROSの1種である H_2O_2 に対する脆弱性が、協調して老化細胞死を引き起こしていることを明らかにすることができました(河村、三浦ら、論文投稿中)。以上の結果から、デバは進化の過程で、内在的な老化細胞除去能力、すなわち“naturally senolytic phenotype”を獲得していると考えられます。これまでご支援頂きましたことを励みに、今後、デバ研究を推進することで、真に安全な“senolytic drug”、また老化を防止可能な化粧品の開発に貢献できるように、日々たゆまず努力していく所存です。この度は誠にありがとうございました。

(熊本大学大学院生命科学研究部)

コスメトロジー助成を受けて

南 彰

この度はコスメトロジー研究助成にご採択頂きまして誠にありがとうございました。私は糖鎖と認知機能を中心に研究を展開しています。これまで、脳において糖分解酵素シアリダーゼの機能を解析するためにBTP3-Neu5Acを開発しました。BTP3-Neu5Acは組織においてシアリダーゼの酵素活性をイメージングすることができます。脳におけるシアリダーゼ活性のイメージングを利用して、シアリダーゼが認知機能に不可欠であることを見出しています。このイメージングプローブを脳以外にも活用して、シアリダーゼの様々な生理機能が明らかになりつつあります。例えば、インスリンを分泌する膵臓のランゲルハンス島に比較的強いシアリダーゼ活性があることがわかりました。このイメージング情報を利用して糖尿病の治療薬を開発しました。また、大腸癌は強いシアリダーゼ活性を持つことから、BTP3-Neu5Acによってヒトの大腸癌を高感度で検出することができます。最近では、BTP3-Neu5Acがインフルエンザウイルスの検出に活用することができることがわかっています。

今回、皮膚のシアリダーゼ活性を検出したところ、真皮の下層に強いシアリダーゼ活性があることがわかりました。シアリダーゼの酵素活性分布として大変興味深い知見ではあるものの、当時は皮膚におけるシアリダーゼの働きを明らかにするための研究予算が不足していました。そのような背景の中で本助成金にご採択頂き、皮膚におけるシアリダーゼの機能解明を遂行することができました。現在シアリダーゼを活用したスキンケア製品の開発へと展開しています。このような機会を与えていただきましたコーセーコスメトロジー研究財団の皆様へ、心より感謝申し上げます。また、助成金の贈呈式において、学生の頃よりお世話になっている廣部先生や奥先生、山本先生と再会できたこともとても嬉しく、良い思い出となりました。現在はコロナ禍にあって厳しい状況にありますが、研究費に加えて、今後も引き続き研究交流の場をご提供いただければ幸いです。末筆ながら、コーセーコスメトロジー研究財団の今後ますますのご発展を祈念いたします。（静岡県立大学大学院薬学研究院生化学講座）

コスメトロジー助成を受けて

村上 良子

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、厚く御礼申し上げます。先天性グルコシルホスファチジルイノシトール (GPI) 欠損症 (IGD) は2006年に初めて私たちが報告した疾患で、てんかんや知能障害などの神経症状を主症状とする潜性遺伝性疾患です。細胞表面にはGPIという糖脂質で細胞膜にアンカーされているGPIアンカー型タンパク質 (GPI-AP) というタンパク質の1群が約150種発現しており、酵素、受容体、補体制御因子などとして重要な働きをしています。このGPI-APの生合成過程には30個の遺伝子が関与しており、これらの遺伝子の変異により様々なGPI-APの発現低下や構造異常が起こり、それに伴って種々の症状を来します。古くから研究されている発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH) は後天性の血液疾患で造血幹細胞におけるPIGA遺伝子の体細胞突然変異によって発症し、GPI-APである補体制御因子が欠損するので、補体の異常な活性化によって溶血発作を起こします。すなわちGPI欠損症といってもIGDと

PNHは全く異なる疾患です。私たちはGPIの基礎研究と並行してIGD患者のフローサイトメトリーによるスクリーニングや遺伝子解析を進めて患者情報を集積してきました。その中で重症例にしばしば魚鱗癬様の皮膚症状が見られることがわかってきました。これは以前に報告した皮膚特異的にPigaを欠損させたマウスモデルのフェノタイプに合致する症状で、論文ではマウスの皮膚について詳細な解析結果が示されています。今回ABCA12遺伝子の変異によって起こる道化師様魚鱗癬との類似性をもとに角化細胞株を使ってノックアウト細胞を作製し、まず細胞レベルでそのメカニズムを解明することにしました。残念ながら予想外に時間がかかってしまい、やっと最初の緒にたどり着いたところですが、今後これをもとにさらに研究を進めていきます。肌の潤いやバリア機能に必須のセラミドの分泌過程に関わるGPI-APを是非とも明らかにしたいと考えています。（大阪大学微生物病研究所）

2019年度 研究助成

コスメトロジー助成を受けて

矢嶋 伊知朗

この度は「皮膚角化及びメラニン沈着と毛髪中 microRNA 量の関連性解析」という研究課題としてコスメトロジー研究助成に採択いただき、財団ならびに関係者の皆様方に深く感謝申し上げます。私は大学4年生の時代から皮膚科学の研究を一貫して行ってきました。その中で感じていることは、「コスメトロジーという研究分野は単なる化粧品科学という分野を超えて、人々のQOLや場合によっては加齢や寿命にも影響を与える極めて必要な研究分野である」ということです。今回採択いただいた研究も、シミやしわといったコスメトロジー分野の研究とがんを含む皮膚疾患という医学的分野をつなぐ必要な研究内容であると考えています。本研究ではmicroRNA (miRNA) を用いた研究ですが、その研究の発展は主に医学分野で進んでおり、コスメトロジー分野ではまだまだこれから大きく発展する素地が残されています。特に体毛を用いた分析はあくまでも毛のシャフト部分を利用するため抜毛の必要がなく、被験者(ユーザー)に対する肉体的・精神的ストレスを限りなくゼ

ロの状態での分析が可能となるため、特にコスメトロジー分野では非常に有望なツールになりうると考えられます。本研究では体毛におけるmiRNAの量的変化と、皮膚に影響を与える代表的な環境因子である紫外線と重金属(ヒ素)の関連性を *in vivo* だけでなく、*in vitro* 研究の手法を用いて解析を行いました。この両面での研究が、miRNAの非常にユニークな発現パターンを発見するきっかけとなりました。今回の研究では体毛中のmiRNAを定量・分析することで、皮膚のシミやしわ、皮膚角化やメラニン沈着などのコスメトロジー分野で最も重要な皮膚の現象を、皮膚そのものを調べる必要なく、予知・分析できる可能性を強く示唆しています。近い将来、この分析手法は間違いなくコスメトロジー分野でも発展していくであろう技術であり、本助成金によって達成された今回の成果が新たなコスメトロジー研究の発展に少しでも寄与できれば望外の喜びと思っています。(芝浦工業大学システム理工学部生命科学科)

2019年度 研究助成

コスメトロジー助成を受けて

山本 博之

この度は、コーセーコスメトロジー研究財団より多大なご支援をいただき、心から御礼申し上げます。

皮膚は外界と接する最も大きな組織であり、常に様々な刺激を受けています。光は、生きていくうえで避けることができず、毎日、光を浴びて生活をしています。生体における光線の感受は、目の網膜でよく研究がされています。眼では、ロドプシンをはじめとする光受容体が色(光の波長)を識別し、様々な色を認識しています。一方で、古くから光を浴びることで皮膚の状態が変わることが知られていました。しかしながら、その仕組みについてはほとんど分かっていませんでした。今回助成していただいた研究は、皮膚において光が生体シグナルに変換される仕組みを明らかにすることを目的に行ってきました。本研究の成果から、皮膚に存在する細胞にも、目の網膜と同様に光受容体の発現が発現していることや光受容体が活性を維持するのに重

要なレチナールの代謝経路が皮膚にも存在していることを見出すことができました。これらの成果は、皮膚がどのように光を認識して生体応答が行われているのかを明らかにする大きな手がかりになると思っています。一方で眼では、1細胞に1つの波長を認識する光受容体が発現しているのに対し、皮膚の細胞では1つの細胞に複数の光受容体の発現が見られます。このことは、皮膚における色の区別は、眼よりも複雑な仕組みであることを意味しており、この謎を解き明かすことで、光により調節を受ける皮膚の恒常性の新しい仕組みを明らかにしたいと思っています。

最後になりましたが、重ねまして、ご援助をいただいたことに感謝申し上げます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お祈り申し上げます。

(日本薬科大学)

コスメトロジー助成を受け

逢坂 美里

このたびは貴財団の研究助成に採択いただきまして、心より深く感謝申し上げます。当初の研究手順において、対面でネイリストによりネイルケアを実施することを予定しておりましたが、新型コロナウイルス感染症の流行により対面での施術がかなわず、オンラインでネイルケアを行う内容に変更いたしました。まさか新型コロナウイルスの蔓延により、計画内容の修正を迫られることになるとは予想しておりませんでしたが、貴財団のご理解のもと、研究計画を見直し無事に研究終了を迎えることができました。

現在多くのがん患者さんは、仕事や生活を送りがながん薬物療法を受けておられます。治療により脱毛や皮膚や爪の色素沈着など外見の変化が起こり、爪は体の中では小さな部位ですが、患者さんはご自分の爪の変化に落ち込み、周囲にも目につきやすいことから、人前で手を差し出すことをため

らったりする方も多く、爪の変化に対するケアを考えたいと今回の研究にとりくむことにしました。オンラインネイルケア介入研究に参加された方からは、気分転換になった、外見が綺麗になり前向きになったという感想もあり、がん薬物療法による副作用を体験しながらも、そのひとらしく生活することにつながる支援の一步になったかと思います。これからも患者さんが治療中も自分らしい爪のケア、装いを支える医療やサポートに貢献していきたいと思います。

本研究に共同し、ご協力いただいた参加者の皆様、ikus.医療美容研究会の皆様、研究期間中、思慮深く専門的に継続のご支援をいただきました聖路加国際病院皮膚科新井達先生、善家由香理先生、プレストセンター山内英子、腫瘍内科山内照夫、聖路加国際大学大学院看護学研究科米倉祐貴先生に心から深く感謝申し上げます。(聖路加国際大学大学院看護学)

コスメトロジー研究助成を受けて

柴藤 淳子

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まして誠に有難うございます。私の研究室では低温真空抽出法という新しい技術を用いて得られた植物や果物のセルエキスに抗酸化能や抗炎症作用などの酵素活性が高く保持されていることを見出してきました。この低温真空抽出技術は規格外として廃棄されている植物や果物も有効に利用できることから、日本独自の自然素材を用いたサステナブル化粧品開発にも貢献できるのではないかと考えております。

採択頂きましたサボテンセルエキスの育毛作用と成分分析は、地域特有の農産物の機能性を明らかにし有効活用するための研究として、これまでは主に培養細胞レ

ベルにおける遺伝子発現等の実験を進めていました。今回の助成金のおかげで、費用的に困難であったメタボローム解析による育毛成分のスクリーニング分析や、マウスを用いたオミックス解析まで進めることができました。得られたデータが膨大であることからさらなる解析が必要ですが、育毛に関与する因子をいくつか見出すことができました。今後この研究のデータを活かすことで臨床研究まで進められるように努めてまいります。

最後になりましたが、このような機会をくださったコーセーコスメトロジー研究財団と関係者の皆様に重ねて感謝申し上げます。(星薬科大学)

2019年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて 臺 美佐子

この度は、コスメトロジー研究助成にて「後期高齢者に頻発するスキン-テアの予測方法の考案」にご支援くださり、誠にありがとうございました。私は、これまで皮膚の健康に着目し、看護学の視点から研究を行ってまいりました。皮膚の健やかさ、審美性は、人々の自尊心を維持し、生きること、暮らすことを支える基本的な要素であると感じます。そうした中、ある施設で、高齢者の腕や足に突然生じた創傷を見て、高齢者ご自身、ご家族、看護や介護に携わるスタッフが、驚き、悲しむ姿を知りました。これは、スキン-テアと呼ばれる皮膚裂傷で、患部の疼痛、皮膚外観の痛々しさに加え、虐待を疑われるケースもあり、まさに身体・心理・社会的影響を及ぼす問題でした。しかしながら、スキン-テアの国外の知見は、日本人の皮膚の特徴には合致せず、依然として解決策が見いだされない状況でした。

本研究支援は、この日本での臨床課題を解決すべく、教員6名、大学院生8名、そして高齢者施設の看護師から成るチームでの臨床調査、解析、公表を行う基盤を支えてくださいました。臨床調査は約1年間にわたり毎月前向き調査を行い、貴重な臨床データを得ることができました。その成果は、日本人高齢者に特有なリスクファクターから、予測スコアリング方法作成に繋がり、日本創傷オストミー失禁管理学会での英語セッション口演発表、Journal of Tissue Viabilityでの論文掲載にまで至りました。今後はハイリスク者に特化したスキンケア等によりスキン-テア発生数の減少が期待できます。

高齢者の皮膚の健やかさ、審美性を大切にしたいという本研究チームの看護学からの視点に、ご賛同・ご支援くださいましたこと、心より御礼申し上げます。

(藤田医科大学研究推進本部 社会実装看護創成研究センター)

2020年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて 田中 明

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まして、心より感謝申し上げます。申請課題は顔の動画画像解析による脈波の多点抽出と皮下の血行動態の評価法の開発です。映像脈波とは、カラーカメラで撮影された動画に含まれる肌色のわずかな変化から脈動成分を抽出して得られる脈波です。もし映像脈波が接触式センサで得られる容積脈波と同等の脈波として計測できると、それはあたかも無数の脈波センサを皮膚表面に設置していることに相当し、異なる部位の脈波を同時に得られることで、脈波の伝播特性や部位の違いを積極的に活用した新たな血行動態解析の可能性ががあります。

本研究では顔を対象として、映像脈波を利用して皮下の血行動態を評価することを試みたものです。評価実験ではマッサージによる血行動態の変化が現れるかに着目しましたが、他にもうっ血や温熱によって生じる血行の変化が捉

えられる可能性を確認しています。本研究期間において、新型コロナウイルス感染症のまん延が収束せず、人を対象とした実験の実施が極めて困難であったことが少し残念でしたが、今後も、パックやクリームなどの血行への効果も評価可能かについて検討をしていきたいと考えています。一方で、映像脈波は、テレビ、ビデオ、携帯動画そしてオンラインミーティング中の画面からも平均心拍数がわかるくらいには抽出可能ですが、その精度は計測環境や条件に大きく影響を受けることから、映像の撮影方法や信号処理方法についてさらなる改良を行う予定です。

最後に、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ますとともに、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。

(福島大学共生システム理工学類)

コスメトロジー研究助成を受けて

中村 航洋

この度は、コスメトロジー研究助成にご採択いただき、誠に有難うございました。私は認知心理学を専門とする研究者で、人が顔から様々な情報を読み取る仕組みについての研究に取り組んできました。顔はその人物のアイデンティティを表現する固有性をもちながらも、表情や装いによって異なる印象が立ち現れてくるほど、変化に富んだものでもあります。とりわけ、化粧品によって姿を美しく演出する装いは、古代から現代に至るまで人々の心を惹きつけてきたと言えるでしょう。人はどのように自らの個性を美しく装うのか。そこにはどのような法則性が働いているのか。こうした疑問に顔の研究者として真正面から取り組んでみたいという思いから、2019年に研究助成に応募させていただきました。

コスメトロジーについては深い知識を持ち合わせていない状態からのスタートとなりましたが、本研究に協力して下さった方々が、化粧品によって様々な装いを施す様子を統計的画像解析とモデル化によって詳細に研究していくうちに、人々の化粧品に共通した法則性とその後にある視覚効果について理解する緒が見えてきたように思います。経験

知や日常知として実践されてきたメイクアップを科学の視点から捉え直してみることで、個性美を演出するメイクアップ手法の提案や見た目の肌質や印象に悩みを感じる人々へのケアと支援など、応用的価値の創出に繋がる新たな研究課題を発見することもできました。

研究を助成いただいた期間には、世の中で様々な価値観の変化の波が到来しました。新型コロナウイルスの感染拡大により人々のコミュニケーションのあり方が変わり、SNSやマスメディアの発信を通じて人々の容姿に対する眼差しが以前とは大きく変容してきたように思います。美のニューノーマルが個性の美しさを包摂していく時代においては、人々が装うことの意義や価値を再定義するような新たな研究が必要になると感じています。本研究助成にきっかけを頂いた研究を今後もさらに継続し、コスメトロジー分野の発展に貢献したいと考えております。当初の予定を一部変更しながら研究を遂行することとなりましたが、その都度手厚くご支援くださいました、貴財団の皆様にご心より感謝申し上げます。(ウィーン大学心理学部)

コスメトロジー研究助成を受けて

松原 恵理

このたびは、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に採択いただきましたこと、心より御礼申し上げます。私はここ10数年、植物の香りが人の心や身体に与える影響について興味を持って研究を進めてきました。香気成分の定性・定量分析とともにヒトの心身の応答を解析していきながら、香りという目には見えないものの機能性について少しずつ明らかにしてこられたように思います。わずかながら基礎的な研究データを蓄積していく中で、どのようにしたら社会に還元できるかを考えていたときに本研究助成に採択いただき、新たな研究にチャレンジ

できましたことを大変ありがたく感じております。本研究は私にとって大きな転機でありました。今後は、本研究で得られました成果を関係の企業様との共同研究などを進めていくなかで何らかの形にしたいと考えております。また、微力ながらもコスメトロジー研究の一助となれば大変幸いです。最後になりましたが、貴財団のますますのご発展をお祈り申し上げます。この度は誠にありがとうございました。

(国立研究開発法人森林研究・整備機構 森林総合研究所 複合材料研究領域)

2019年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

峯 裕一

この度のコーセーコスメトロジー研究財団研究助成による支援に心より感謝申し上げます。

助成いただいた課題は、エピテーゼと呼ばれる、顎顔面領域の欠損に対するリハビリテーションに関する研究となります。エピテーゼは、一般的には医療用シリコン樹脂を用いて製作しますが、患者の欠損部を正確に再現するには熟練を要します。特にシリコンの着色は、自然な装着感を得る上でも非常に重要です。本研究では、このエピテーゼの製作過程に人工知能を応用し、熟練の技を定量化する手法の構築を目指すものです。また近年は、途上国においても癌の発症率の増加や事故による外傷により、エピテーゼ治療のニーズが増加しています。このような観点からも、エピテーゼの質を担保することができるようになるこ

とは重要な課題となります。エピテーゼ治療においては、人工物であるエピテーゼと患者の肌の境に化粧を施すこともあり、エピテーゼに関する研究はコスメトロジー研究の発展に寄与できるものと考えています。

研究に助成いただいた期間中はCOVID-19の流行化ということもあり、他のコスメトロジー研究者とディスカッションする機会が少なかったことを非常に残念に思います。本研究成果はオンライン学会ではありましたが、日本歯科技工学会で発表し、ポスター発表優秀賞を受賞することもできました。コーセーコスメトロジー研究財団の関係者の皆様には重ねて感謝申し上げますと共に、貴研究財団のますますのご発展を心よりお祈り申し上げます。

(広島大学大学院医系科学研究科医療システム工学)

2020年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

若林 一道

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す。

「初頭効果」という言葉がありますが、人の印象というものは、会ってから最初の0.6秒から6秒で決まり、そしてその時の印象は消えることはないといわれています。また、「明眸皓齒」という言葉もあります。これは瞳が澄んで(明眸)歯が白い(皓齒)という意味で、唐(現在の中国)の玄宗皇帝の寵愛を得て、皇后となった楊貴妃のことを指し、これが転じて美人を表す言葉として使われています。私たち審美歯科医療に携わるものにとって、患者さんに美しい歯を提供し、すばらしい笑顔を引き出すことは極めて大切なことであり、また、やりがいのある仕事であると思っています。

現在、一般歯科臨床では、様々な審美歯科材料が用いられ、そして、日々新しい材料が開発されています。しかし、歯科治療における歯の色については、歯科医師や歯科技工士の経験や主観に頼るところが大きいのが現状です。その

ため、歯の色を定量的に分析、評価することが重要ですが、これまで、多くの研究で用いられてきた測色計は、連続的な色の変化を観察することが不可能でした。そこで、本研究では天然歯の連続的な色調を、正確に分析するため、分光イメージングを用いた測色器に着目しました。本計測装置を用いることで、天然歯の連続的な色調を計測することができ、それにより、色調の変化を数式に置き換え評価することが可能となりました。本結果は、天然歯における色調変化の評価や、天然歯に近似したグラデーションを有する新たな歯科用材料の開発にきわめて有用であり、今後、世界に対し、日本が本領域におけるイニシアティブを握るための一助となるものと期待しています。

今回ご支援いただいた研究を、今後もさらに発展させ、さらに良い研究成果を出せるように精一杯努力したいと思います。繰り返しになりますが、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は心より御礼申し上げます。(大阪大学歯学部附属病院)

學術集会支援助成

•

國際交流助成

第30回 日本人間工学会 システム大会を終えて

衛藤 憲人

Ergonomicsの大家、E. Grandjean教授の名著タイトルでもある「Fitting the Task to the Man」(タスクを人間に適合させる)は、重要な人間工学の役割である。変わりゆくタスクへの社会的要求に対して、人間工学を含める戦略は、まだまだ改善する余地が多分に存在する。この課題に対し、国際交流助成を活用し、ヨーロッパ屈指の工科大学であるスイス連邦工科大学チューリッヒ校(ETH, Zurich)の人間工学部門長であるMarino Menozzi先生を招聘し、最新知見についてご教授いただく機会を計画した。同氏はE. Grandjean教授の最後の院生であり、人間工学分野の世界的第一人者である。さらにMenozzi先生を座長に、これからの人間工学と医療・コスメトロロジーの関わりについて深い討議を行う国際シンポジウムを計画した。前後二部構成の同シンポジウムには、学術・医療・産業、各界を代表する国内・国外の研究者を招聘し、医療・コスメトロロジーの実践に関わる計6つの報告を発表していただいた。具体的に第一部では、眼科手術用器具の術中の操作に関して手指の圧力について8人の手術医が実験に参加した結果の報

告、次いで執刀医用のイスのスライド式背当て開発の評価、眼科手術で用いるペダルの人間工学についての実践的内容が紹介された。第二部では、患者の体位交換へのハイブリッドデバイスの応用、手術訓練のためのAugmentation、静脈注射の訓練のためのAugmented Reality(AR)の応用といった医療・コスメトロロジーに関わる訓練・手技支援についての発表・討議が行われた。加えて総括として、Menozzi先生から、これからの実験研究・コスメトロロジーに関する新技術についての解説が行われた。

新型コロナウイルス感染拡大により、Menozzi先生をはじめ多くのシンポジストはオンライン発表となったが、会場・オンライン合わせて、のべ100名を超える参加者が集い、極めて盛況な基調講演・国際シンポジウムとなった。今回の国際交流は、E. Grandjean教授の業績を称えると同時に、若手研究者・学生が最新人間工学に触れることのできる場として成功裏に終了したと考える。

(東海大学工学部医工学科)

コスメトロジー国際交流助成を受けて 雁金 詩子

国際交流助成に採択いただき、ありがとうございます。COVID-19 パンデミックにより開始延期を余儀なくされたにも関わらず、多大なご配慮により充実した国際交流が叶いました。

私は皮膚科専門医として、身体的・精神的・審美的に患者様の Quality of Life (QOL) を損ねる皮膚疾患に対して、患者様の状況に応じた治療を心がけてまいりました。しかし、いまだ十分な治療手段がない病気が数多く残されており、臨床研究によって新たな治療や診断方法を生み出す必要性を感じていました。臨床研究の実施と解析には、十分な知識、経験および多職種連携が求められます。私は今回、米国屈指の研究が進められているスタンフォード大学皮膚科において、臨床研究の実施と解析を学ぶ機会に恵まれました。

主要プロジェクトとして「ランダム化第2相試験：遺伝性表皮水疱症の掻痒に対するNeurokinin 1 Receptor Antagonist (NK1RA)」の結果を解析しました。本疾患は、表皮～真皮

の接着分子が減少する稀な難治性疾患で、軽微な刺激で皮膚に損傷をきたします。痒みはQOLを低下させる主要因であるとともに、掻く行為により皮膚障害を悪化させます。いまだ効果的な治療法がなく、我々は新規治療薬NK1RAの効果を解析しました。治療薬群のうち約3割が、プラセボ群に比較して1カ月以内に掻痒を減少させたことがわかりました。本試験結果は、論文発表ならびに研究皮膚科学会学術大会(2022年5月米国)での発表を予定しています。また、サブプロジェクトとして、人工知能を用いた皮膚科画像診断の解析を補助し、論文がNature communicationsに掲載予定です。

1年間の活動後は、日本の皮膚科学・コスメトロジー分野において今回の経験を生かしてまいります。今後とも貴財団における調査研究が発展されますことを祈念するとともに、本助成に心より感謝申し上げます。

(慶應義塾大学医学部)

コロナ禍の天然薬物の開発と応用シンポジウムを終えて

脇本 敏幸

日本薬学会生薬天然物部会の主催シンポジウムとして「第23回天然薬物の開発と応用シンポジウム」を令和3年10月16日、17日の両日にわたり北海道大学薬学部臨床薬学講義室およびオンライン配信のハイブリッド形式によって開催しました。本シンポジウムは、薬用植物、微生物・海洋生物から見出された医薬シーズとしての生物活性物質からの創薬を目指して、隔年ごとに開催されてまいりました伝統あるシンポジウムです。

令和に入り初めての天然薬物の開発と応用シンポジウムは令和2年(2020年)秋の開催を予定しておりましたが、2020年初頭から発生した新型コロナウイルス感染症の世界的な感染拡大に伴い、従来の対面形式のシンポジウムの開催は困難になりました。そのため本シンポジウムは1年越しの令和3年10月にハイブリッド形式で開催する運びになりました。

本シンポジウムでは特別講演として、東京大学大学院薬学系研究科の阿部郁朗先生に「天然物生合成マシナリーの合理的再構築による次世代天然物創薬」という表題で生合成研究に基づく新規天然医薬品資源の探索研究を、また東京大学大学院農学生命科学研究科の松永茂樹先生から「生

物活性海洋天然物の単離・構造決定」という表題で特異な構造を有する海洋天然物の探索や構造決定の詳細についてご講演いただきました。また、令和2年度と令和3年度の2年分の生薬天然物部会奨励研究受賞講演を実施し、生薬・天然物分野の新進気鋭の若手研究者8名にご講演いただきました。さらに企画シンポジウムにて、北海道大学における天然薬物研究分野の第一線の研究者4名をお招きしました。

また一般演題では口頭発表13題、ショートプレゼンテーション18題の申込があり、その中には天然素材からの抗炎症や抗アレルギー活性物質の探索やその作用機序解析など、化粧品分野に関連する演題も複数ございました。発表演題の中から優秀発表賞として7演題を表彰いたしました。全体の参加者は100名を超え、そのうち40名程度の参加者が対面で会場にお越し下さいました。まさにハイブリッド形式が功を奏した形となり、無事にシンポジウムを開催することができました。貴財団より賜りましたこの度の多大なるご支援に厚く御礼申し上げます。

(北海道大学大学院薬学研究院)

第6回国際細胞老化研究会 (ICSA) 学術会議を終えて 原 英二

国際細胞老化研究会 (ICSA) は、加齢に伴う生体機能の低下や加齢性疾患発症のメカニズムを細胞レベルで解明することを通して健康長寿社会の実現に貢献することを目指した国際コンソーシアムです。2015年に設立以来、毎年1回、関連分野で世界をリードする研究者が一堂に会して最新の研究成果を発表し、議論し合う学術会議を開催してきました。第6回目は日本で開催したいとの要望が強く、大阪大学の原教授がICSA会長より依頼を受け、2020年11月に大阪市にて開催予定でしたが、新型コロナウイルス感染症拡大の収束の兆しが見えず、2021年12月に再延期後、学術会議の開催形式を、オンラインと対面式によるハイブリッド形式にて開催いたしました。

第6回国際細胞老化研究会 (ICSA) 学術会議では、細胞老化の関連分野で世界トップレベルの実績を有する研究者の方々に招待演者としてご講演いただき、それぞれの研究の現状のみならず、問題点や将来展望などについても議論することが叶いました。招待演者である東京医科歯科大学の西村栄美教授をはじめ、皮膚老化研究の第一人者の参加

が多数あり、様々な角度から老化研究を行う気鋭の研究者が集うことにより、皮膚老化のメカニズム解明のみならずコスメトロジーの内面の老化に及ぼす影響などについても議論を深められ、結果として今後の研究の方向性や国際共同研究の体制強化に貢献できたのではないかと自負しております。

また、ハイブリッド形式で開催したことにより400名を超える予想以上の参加登録者に恵まれ、このような学術会議を最も高齢化が進む日本がリーダーシップをとり世界へ発信するという重要な役割を担って開催できたことは意義深く、日本のみならず先進諸国が直面する加齢性疾患の対策などが議論され、実り多い学術会議となったことは喜ばしい限りです。今後もさらなる老化研究の発展により国際社会に貢献していきたいと考える次第です。

最後に、本学術会議を開催するにあたりご援助いただいた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。
(大阪大学微生物病研究所)

第30回日本色素細胞学会学術大会の開催を終えて

福田 光則

日本色素細胞学会 (JSPCR: Japanese Society for Pigment Cell Research) は、全米色素細胞学会 (PAPCR)、欧州色素細胞学会 (ESPCR)、アジア色素細胞学会 (ASPCR) と共に国際色素細胞学会連合 (IFPCS) を支える主要学会の1つで、色素細胞の研究の発展と会員相互の交流、及び国際的な連携の推進を目指しています。令和2年度には国際色素細胞学会学術大会 (IPCC2020) を日本色素細胞学会主催で山形にて開催(誌上開催)し、令和3年度には日本色素細胞学会から国際色素細胞学会連合の会長が選出され、日本色素細胞学会の活動が世界的にも広く認知されています。日本色素細胞学会の主要な活動のひとつが年次学術大会で、色素細胞に関する基礎・臨床・応用研究の進歩をはかるため、分野や立場の垣根を超えて情報交換を行う場となっています。令和3年度は、第30回の学術大会を10月23日(土)～24日(日)の日程で、仙台(東北大学片平キャンパス・さくらホール)にて開催を予定していましたが、新型コロナウイルス

スの感染拡大状況が芳しくないことから、初めてのオンライン開催となりました。直前まで現地開催を模索してのオンライン開催ではありましたが、例年通り、大学などの基礎の研究機関、病院の皮膚科、並びに化粧品メーカーなどの産業界などから様々なバックグラウンドを持つ多様な研究者が参加しました(参加人数106名[内、外国人研究者3名])。学術大会では、「メラニン、メラノソームの形成・輸送・分解、メラノーマ、白斑、肌色制御、白髪予防、毛髪再生への応用」などをキーワードとした幅広いシンポジウムや一般演題を開催し、活発な議論と情報交換が行われ、コスメトロジーの発展にも貢献できるような実り多い有意義な学術大会となりました。

最後になりますが、本学術大会の開催にサポート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の学術集会支援助成金に感謝申し上げます。

(東北大学大学院生命科学研究科)

第65回日本薬学会関東支部大会を終えて

伊藤 晃成

このたび、コーセーコスメトロジー研究財団の学術集会支援助成を受け、令和3年9月11日(土)、千葉市の千葉大学薬学部120周年記念講堂を大会実施本部とし、完全オンラインにて第65回日本薬学会関東支部大会を開催させていただきました。

本支部大会は、日本薬学会の地方支部の中でも最大の規模を誇る関東支部が毎年開催しているものです。薬学部の学部学生や薬局、病院の薬剤師等の参加にも配慮し、講義、実習、業務等の影響の少ない土曜開催を原則として続けてきた伝統ある大会で、今回で65回目の開催となります。関東近郊の薬学部を持つ大学が幹事校を努め、千葉大学は約20年ぶりに担当させていただきました。コロナ禍で完全オンラインとなりましたが、最終的に655名と非常に多くの方々にご参加いただきました。朝9時からの一般口頭発表では、10個のZoom会場を使い179演題の一般口頭発表が、午後は7個のZoom会場を使い32演題のシンポジウム発表が行われ、夕方には173演題の一般ポスター発表討論が行われました。これら全てを1日でこなす非常にタイトなスケジュールでしたが、皆さん手慣れた様子でオンライン会場を行き来し、終始活発な討論が交わされていま

した。

日本薬学会は有機化学、物理化学、生物化学、薬理学、製剤学、医療薬学といった基礎～応用まで広い分野の研究者で構成されており、今回もこれら全分野から発表がありました。多くが医薬品に関連する発表の中、中には天然物の有効成分同定や効率的な合成法開発に関する研究、さらには化学物質一般の毒性評価に関する研究、化粧品への応用を意図した皮膚でのドラッグデリバリーシステムの研究など、化粧品と直接的に関連する発表もありました。化粧品には天然物やその誘導体、または天然物関連の化学構造をもつ合成化合物などが含まれることから、医薬品の研究と手法的に重なる部分も多く存在します。化粧品を含む化学物質一般に対して薬学的視点から議論を深めることができた本大会は、参加者全員にとって大変有意義であったと考えます。

最後にご支援を賜ったコーセーコスメトロジー研究財団にあらためて感謝申し上げます。

(千葉大学大学院薬学研究院生物薬剤学／第65回日本薬学会関東支部大会実行委員会委員長)

日本ビタミン学会第73回大会を終えて

石神 昭人

この度、2021年6月19日から2日間を日本ビタミン学会第73回大会Part 1として一般演題のオンデマンド開催、そして2021年11月20日から2日間を日本ビタミン学会第73回大会Part 2として東京、芝浦工業大学芝浦校舎にて現地開催とオンライン視聴形式で開催しました。現地開催に際しては、最大限の感染対策をとり、会期終了後に参加者の方から新型コロナウイルス感染症の発症情報はなく、予想を超える多くの方々にご参加いただき、盛会裡に終了することができました。

本大会は、当初2021年6月19日から2日間の日程で、基調講演1件、特別講演3件、教育講演3件、受賞講演4件、シンポジウム5件、一般発表演題88件を芝浦工業大学芝浦校舎にて現地開催すべく準備を進めておりました。しかし、新型コロナウイルス感染症による第4波と重なってしまい、直前に現地開催を断念せざるを得ない状況になってしまいました。そのため、急遽、一般演題のみをオンデマンド配信による開催に変更させていただきました。一方、大会参加者や演者、そして学会、大会組織委員からの強い要望もあり、新型コロナウイルス感染症の状況はまったく先の予想もつきませんでした。11月20日から2日間の日程で基調講演、特別講演、教育講演、受賞講演、シンポジウムをPart 2として開催することが決まりました。幸いにも、ご講演なさる演者の先生方には全員にご快諾いただき、Part 2を現地開催とオンライン視聴形式で開催することができました。さらに、幸いにも、11月は日本では全国的

に新型コロナウイルス感染症による感染者数が激減し、東京でも緊急事態宣言が解除されていたことから、ほとんどの演者の先生方には現地会場にてご講演いただくことができました。また、大会参加者の皆様には、オンライン視聴形式の併用により、どこにいても講演が視聴可能となり、大会にご参加いただきました。

本大会のシンポジウムでは、「ビタミンを中心としたケミカルバイオロジー研究」、「エピジェネティクスから考えるビタミン・バイオフィクターの未来」、「ビタミンと脳神経機能」、「ビタミン誘導体による人工触媒系の開発および医療応用研究の最前線」、「企業シンポジウム」の5件を企画しました。化粧品には、各種ビタミンを含む商品が多く販売されており、その効能・効果が期待されています。一方、いまだ明らかになっていない各種ビタミンの知られざる効果も予想されることから、化粧品の製造や販売を行う会社の皆様にも多く、大会にご参加いただきました。本大会の発表内容が今後の化粧品開発に役立つことを期待しております。

末筆となりましたが、本学術集会の開催にあたりご助成いただきました、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。貴財団のますますのご発展を心より祈念しております。

(東京都健康長寿医療センター研究所 研究部長／日本ビタミン学会第73回大会大会委員長)

第28回日本歯科色彩学会学術大会を終えて

金子 潤

2021年6月26～27日の2日間にわたり、第28回日本歯科色彩学会学術大会を公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団の学術集会支援助成を受けて開催いたしました。本来であれば現地集合型の対面形式で行いたかったところでしたが、COVID-19感染拡大の影響により、Zoomを利用したWeb開催（ライブ配信）で実施することといたしました。無事に学術大会が終了できましたことを、関係各位に感謝申し上げます。

日本歯科色彩学会は、歯科審美を構成する3要素、すなわち「形態美」「機能美」「色彩美」のうち、「色彩美」を深く探求し歯科臨床に応用することを目的に活動を行っております。歯科色彩学は歯学教育の中で詳しく学ぶ機会も少なく、各個人が歯学部卒業後の臨床経験などに頼って歯科診療を行っているのが現状です。しかし、どんなに「機能的」で自然な「形態」を有する修復物や補綴装置でも、やはり最終的な「色彩」がマッチしていなければ、確実に不満の残る結果となることを臨床上しばしば経験します。また、昨今の歯科審美に対する社会的ニーズの高まりから、今後ますます歯科色彩学の重要性が認識されていくと予想しています。

第28回を数える本学術大会では、大会テーマを『チーム

歯科医療が支える口元の色彩美』とし、歯科医師・歯科衛生士・歯科技工士がワンチームで患者さんの口元の審美性を構築・維持するための議論の場を提供しました。特別講演では、明海大学歯学部クラウンブリッジ補綴学分野の三浦賞子先生に「審美補綴装置の色調再現性を高めるために」と題してご講演をいただき、基礎的研究の整理から豊富な臨床例を含めて詳細に解説していただきました。エビデンスに裏付けられた臨床がいかに重要かを再認識させられるご講演でした。また、恒例の講習会は3演題を準備し、カラーランド・Labの元呑昭夫先生、株式会社トクヤマデンタルの関野雅人先生、株式会社インテグラルの永岡庸平先生にそれぞれのお立場から歯科色彩学に関連するトピックをご紹介いただきました。会員口演発表においても、参加者の活発な議論の場を提供できたのではないかと考えております。

今回の学術大会で参加者の皆さんと共有できた多くの知識や技術を今後の歯科臨床に活かしていくとともに、学会開催に対してご支援賜っ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。

(明海大学保健医療学部口腔保健学科／第28回日本歯科色彩学会学術大会大会長)

付 録

●
事業報告書

2021 年度 表彰および助成を受けられた方々
役 員



事業報告書

(自 2021 年 4 月 1 日 至 2022 年 3 月 31 日)

《研究助成関連》

[コスメトロジー研究助成]

2021	5	10	公募開始	全国 655 の大学、病院、研究機関等へ公募要領を送付し、関連学術雑誌 3 誌及び 9 関連機関 HP と当財団 HP に公募要領を掲載
	7	9	公募締切り	応募総数133件、各分科会毎に選考委員による個別審査 (7/16 ~ 8/20)
	9	14	選考委員会第一分科会(書面)	第 1 分野の書類選考通過 10 課題の承認
	9	14	選考委員会第二分科会(書面)	第 2 分野の書類選考通過 17 課題の承認
	9	15	選考委員会第三分科会(書面)	第 3 分野の書類選考通過 5 課題の承認
	9	28	選考委員会	選考委員長による 2021 年度コスメトロジー研究助成採択候補 32 課題の承認
	10	8	臨時理事会(書面)	選考委員会から 2021 年度コスメトロジー研究助成候補課題の答申を受け採択者を決定
	11	25	第32回表彰・贈呈式	研究助成採択 32 課題の代表者に対し、助成金贈呈書を授与
	12	10	助成金交付	研究助成金を交付 総額 5,500 万円
2022	2	14	選考委員への確認・報告(書面)	2022 年度研究助成公募要領他

[大学講座研究助成]

2021	12	10	助成金交付	2020 年度採択 3 件に 2 年目の助成金交付 総額 8,000 万円
------	----	----	-------	---------------------------------------

[学術集会支援助成]

2021	10	8	臨時理事会(書面)	選考委員会で承認を得た学術集会支援助成 4 件について採択決定
------	----	---	-----------	---------------------------------

《表彰事業》

[コーセーコスメトロジー奨励賞]

2021	4	9	趣意書発送	2018年度以降のコスメトロジー研究助成採択者115名に趣意書を発送
	8	31	受付終了	提出論文21報の被引用件数を調査
	9	28	選考委員会	論文実績が優れた研究者を表彰候補者として選出
	10	8	臨時理事会(書面)	選考委員会から提案された候補者を受賞者に決定
	11	25	第32回表彰・贈呈式	受賞者1名に対し、表彰状と副賞200万円を贈呈

《表彰・贈呈式》

2021	11	25	第32回表彰・贈呈式	会場とオンライン同時配信によるハイブリッド形式で実施 記念講演 黒田玲子 中部大学特任教授・東京大学名誉教授 講演題目：「科学の醍醐味－左右性から見る自然界の不思議」 講演終了後、同会場において感染予防対策をとりながら「懇談会」開催
------	----	----	------------	---

《理事会関連》

2021	5	28	第一回通常理事会（書面）	2020年度事業報告及び収支決算報告（含監査報告）を承認する件 選考委員の選任に関する件 株主としての議決権行使について
	10	8	臨時理事会（書面）	2021年度コスメトロジー研究助成者等を承認する件 2021年度コーセーコスメトロジー奨励賞受賞者を承認する件
	11	25	第二回通常理事会	2021年度収支予算書の一部変更を承認する件 2022年度事業計画及び予算案を承認する件 株主としての議決権行使について 理事長、副理事長及び専務理事の職務執行状況の報告

《評議員会関連》

2021	6	18	定時評議員会（書面）	2020年度事業報告及び収支決算報告（含監査報告）を承認する件 役員及び評議員の報酬等並びに費用に関する規程を一部改定する件
	12	3	評議員への報告（書面）	第二回通常理事会議事等の報告

《その他》

1) 報告書発行

2021	5	1	中間報告書発行	研究業績中間報告集 第30号
	9	1	完了報告書発行	コスメトロジー研究報告 Vol.29（2021）、CD版を作成

2) 行政届出関連

2021	6	22	内閣府	令和2年度事業報告書等の提出
2022	2	9	内閣府	令和4年度事業計画書等の提出

3) 情報公開（当財団HP等）

2021	2	19	2021年度 事業計画等の掲載
	4	5	2021年度 コスメトロジー研究助成公募要領の掲載
	5	10	2021年度 コスメトロジー研究助成公募開始
	6	25	事業報告等の掲載
	7	9	2021年度 コスメトロジー研究助成公募終了
	9	1	コスメトロジー研究報告 Vol. 29 の発行及び掲載
	11	30	2021年度 表彰および研究助成受賞者の掲載
	12	1	2021年度 予算書の一部修正
2022	2	10	2022年度 事業計画等の掲載

2021年度 表彰および助成を受けられた方々

1) コーセーコスメトロジー奨励賞受賞者

氏名	所属	職位	研究課題
景山 伯春	名城大学理工学部	教授	2018年度コスメトロジー研究助成採択 天然スキンケア原料としてのマイコスポリン様アミノ酸：生産基盤開発と機能解明

2) コスメトロジー研究助成（32名）

第1分野：素材、物性に関する分野（10名）

氏名	所属	職位	研究課題
植田 圭祐	千葉大学大学院薬学研究院	助教	NMR及びCryo-TEM併用によるエマルジョン中の化粧品原料の分散・溶解状態の定量的評価基盤の確立
内田 紀之	東京農工大学工学部	特任助教	フォトリソグラフィ用レジスト：ほとんど水からなる色材化粧品
大山 陽介	広島大学大学院先進理工系科学研究科	教授	製品中の微量水分をピンポイントで検出・可視化する蛍光性水センサー材料の創製
門田 和紀	大阪医科薬科大学薬学部	准教授	多孔性金属錯体による化粧品成分の経皮DDS製剤の開発
桑折 道済	千葉大学大学院工学研究院	准教授	メラニン系構造色を基盤とする化粧品開発に向けた技術基盤構築
田中 祐圭	東京工業大学物質理工学院 応用化学系	助教	ペプチドマトリックスを用いた化粧品香料の超高感度センシング
徳留 嘉寛	佐賀大学リージョナル・イノベーションセンター 化粧品科学共同研究講座	特任教授	ヒアルロン酸・コラーゲンのナノ粒子化による新規皮膚浸透促進技術の開発とそのメカニズムの解明
真島 剛史	奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学領域	助教	多量体タンパク質のサブユニット間相互作用を利用した新規機能性ハイドロゲルの構築と薬剤徐放システムへの活用
水野 稔久	名古屋工業大学大学院工学専攻 生命・応用化学系プログラム	准教授	化粧品基材に利用可能なペプチド界面活性剤のバクテリア合成系構築
八波 利恵	東京工業大学生命理工学院	准教授	新規枝作り酵素による高保湿剤としての多分岐グルカンの合成と構造・物性解析

第2分野：生体作用、安全性に関する分野（17名）

氏名	所属	職位	研究課題
阿部 結奈	東北大学工学部・工学研究科	助教	表皮電位を指標とした皮膚バリア光治療法の時空間的評価
石田 竜弘	徳島大学大学院医歯薬学研究部 (薬学系)	教授	ポリエチレングリコール(PEG)含有化粧品によって誘導された抗PEG抗体によるCOVID-19-mRNAワクチン投与時のアナフィラキシー反応誘導現象の検証
今西 規	東海大学医学部基礎医学系 分子生命科学	教授	皮膚細胞ゲノムのメチル化測定による加齢マーカーの開発
岩田 浩明	北海道大学病院	講師	タイトジャンクションが角層形成に及ぼす影響の解明
白井 健二	甲南大学 フロンティアサイエンス学部	准教授	ペプチドビーズを用いた反応速度論による迅速・詳細なアレルギー感作試験法の開発
大野 祐介	北海道大学大学院薬学研究院	助教	ヒト特有の表皮セラミド合成経路および生理機能の解明

氏名	所属	職位	研究課題
押海 裕之	熊本大学大学院生命科学研究部	教授	自然免疫による炎症制御と新たな抗炎症性化合物の探索
佐々木 淳一	大阪大学大学院歯学研究科	講師	グリコサミノグリカンが脈管形成機構に及ぼす影響の解明
笹沼 博之	公益財団法人東京都医学総合研究所	副参事 研究員	紫外線による細胞老化と光老化を繋ぐ分子基盤の解明
菅波 孝祥	名古屋大学環境医学研究所	教授	加齢による皮下脂肪萎縮の分子基盤の解明
鈴木 亮	金沢大学医薬保健研究域薬学系	教授	新規アレルギー反応制御分子Ly6Gによる皮膚ホメオスタシス維持機構の解明
竹馬 俊介	慶應義塾大学医学部微生物学 免疫学教室	准教授	皮膚反応性T細胞のステムネスを標的とした、乾癬治療法の研究
富永 光俊	順天堂大学大学院医学研究科環境 医学研究所/ 順天堂かゆみ研究センター	先任 准教授	触覚を痒覚に変換するアロネーシス・パスウェイの分子神経基盤の解明と治療法の開発
長野 一也	和歌山県立医科大学薬学部	教授	経皮曝露されたナノ粒子の存在様式変化の理解と毒性発現を適切に解析・予測するための試験法の提案
福本 毅	神戸大学医学部附属病院	助教	iPS細胞を用いた色素細胞の老化機序の解明
本田 哲也	浜松医科大学皮膚科学講座	教授	角質層バリア形成および金属アレルギー発症におけるスプラバシンの機能解明
前川 大志	慶應義塾大学薬学部薬学研究科	専任講師	皮膚角化細胞の老化を防ぐ脂質分子種の網羅的探索とその分子機構

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
川崎 洋	理化学研究所生命医科学研究センター免疫器官形成チーム	上級 研究員	生活行動および心の健康が皮膚の性状・バリアに与える影響の解析研究
茂地 智子	九州大学病院臨床教育研修センター きらめきプロジェクト (消化器・総合外科)	特任 助教	化学療法中の乳がん患者へのメイクアップ指導によるQOL向上の検討
堀 龍介	藤田医科大学医学部 耳鼻咽喉科・頭頸部外科	准教授	三次元顔認証スマホアプリによる表情筋トレーニングの客観的指標の導入と末梢性顔面神経麻痺後遺症予防リハビリへの応用
前川 素子	東北大学大学院医学系研究科	講師	毛根細胞を用いた統合失調症発症予測因子の探索
丸山 千秋	公益財団法人東京都医学総合研究所 脳神経回路形成プロジェクト	プロジェクト リーダー	サブプレートニューロンから紐解く美意識の起源

3) 大学講座研究助成（2020年度採択2年目）

氏名	所属	職位	研究課題
天谷 雅行	慶應義塾大学医学部皮膚科	教授	表皮角層形成機序の解明と角層機能制御によるアレルギー疾患予防法の開発
椛島 健治	京都大学大学院医学研究科 皮膚科学	教授	アトピー性皮膚炎の発症機序の時空間的理解とアレルギー克服を目指した研究
月田 早智子	帝京大学先端総合研究機構	特任 教授	上皮バリアの分子細胞生物学的研究を基盤とした皮膚疾患の病態解明と治療予防法の開拓

4) 国際交流助成 2021年度の応募、採択なし

5) 学術集会支援助成 (4件)

実施責任者	所 属	学術集会
福田 光則	東北大学大学院生命科学研究科	第30回日本色素細胞学会学術大会 (2021年10月23 ~ 24日)
伊藤 晃成	千葉大学大学院薬学研究院	第65回日本薬学会関東支部大会 (2021年9月11日)
石神 昭人	東京都健康長寿医療センター研究所	日本ビタミン学会第73回大会 (2021年6月11 ~ 7月30日Part1、11月20 ~ 21日Part2)
金子 潤	明海大学保健医療学部	第28回日本歯科色彩学会総会・学術大会 (2021年6月26 ~ 27日)

役員

2022年7月現在

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 楨夫	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 名誉教授
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	京都大学 名誉教授・静岡社会健康医学大学院大学 学長
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	静岡県立大学 名誉教授・帝京大学薬学部長
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 名誉教授・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	東京医科歯科大学 名誉教授・兵庫医科大学 理事
評議員	宮崎 榮三	東京工業大学 名誉教授

*本財団についてのお問い合わせは下記に
お願いいたします。

公益財団法人 コ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. 30 / 2022

非売品

2022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
〒362-0034 埼玉県上尾市愛宕一丁目2番7号
電話 048(778)7943
印刷 株式会社サンセー

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

KOSÉ
COSMETOLOGY
RESEARCH FOUNDATION