

ISSN 2188-563X

COSMETOLOGY

2023_031

Annual Report of Cosmetology

——
コスメトロジー研究報告

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

ごあいさつ

コーセーコスメトロジー研究財団の31冊目の研究報告書をお届けします。

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、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。今日まで本財団がこの活動を滞りなく継続できましたことは、多くの関係者の皆様のご理解とご協力によるものと心より感謝申し上げます。

コスメトロジーは、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おり、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体系づけられてきたといえます。

これまでに本財団が助成した研究テーマも、化粧品の新素材や物性評価など工学的なテーマから、皮膚の健康や美容のための皮膚科学、化粧品の安全性、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、2017年度から2021年度に助成を受けられた研究者33名の最新の研究報告を収載しております。また、昨年秋の第33回表彰・贈呈式でコーセーコスメトロジー奨励賞を受賞された木原章雄北海道大学大学院薬学研究院教授の受賞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、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支援してまいります。

今後とも皆様のご理解とご協力をお願い申し上げます。

2023年9月

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

目 次

■ごあいさつ

■コーセーコスメトロジー奨励賞受賞記念講演

- ・アシル CoA 合成酵素 ACSVL4/FATP4 による皮膚バリア形成機構 3
北海道大学大学院薬学研究院 木原 章雄

■特別寄稿論文

- ・2023 年度国際交流助成報告 化粧品による副作用としての肝障害をきたす可能性に関する
ロンドン大学 Massimo Pinzani 教授との意見交換 9
東日本国際大学客員教授 岡崎 勲

■コスメトロジー研究助成報告

I. 素材、物性に関する分野

- ・刺激応答性 DNA ナノ構造体の構築 16
岐阜大学工学部 池田 将
- ・ソフトな界面分子膜を足場とした機能性ゲル薄膜構築手法の開発 21
お茶の水女子大学基幹研究院自然科学系 伊村 くらら
- ・紫外線応答型リボソームの膜融合性を用いた送達システムの開発 27
奈良工業高等専門学校物質化学工学科 宇田 亮子
- ・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 32
広島大学大学院先進理工系科学研究科 大山 陽介
- ・装着感のない皮膚貼付型ナノ透明薄膜の創製と芳香・消臭能の精密制御 43
東海大学工学部応用化学科／マイクロ・ナノ研究開発センター 岡村 陽介
- ・多孔性金属錯体による化粧品成分の経皮 DDS 製剤の開発 48
大阪医科薬科大学薬学部 門田 和紀
- ・多くの水分子を保持した機能性親水コロイドの開発 53
昭和薬科大学 唐澤 悟
- ・天然物由来高分子を利用した新規サンスクリーンカプセルの創出 60
大阪公立大学大学院工学研究科物質化学生命系専攻応用化学分野 北山 雄己哉
- ・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 64
千葉大学大学院工学研究院 桑折 道済
- ・多孔性高分子粒子を用いた自発的乳化技術の開発 68
山口大学大学院創成科学研究科 通阪 栄一
- ・毛根への薬物直接送達を可能とするナノ結晶ハイドロゲルの開発 73
近畿大学薬学部製剤学研究室 長井 紀章
- ・開閉制御可能なナノシャッター構造を有する高分子微粒子担体の開発 78
信州大学繊維学部 湊 遥香

II. 生体作用、安全性に関する分野

- ・皮膚細胞間バリアの破壊に関わる光センサーの解明と予防薬の開発 84
岐阜薬科大学薬学部 五十里 彰

・ 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	90
徳島大学大学院医歯薬学研究部 石田 竜弘	
・ 皮膚 - 免疫増幅サイクルの遮断によるアレルギー性皮膚炎の病態制御	95
愛媛大学大学院医学系研究科感染防御学講座 大森 深雪	
・ 病原体由来および自己由来二本鎖 RNA がインターフェロン非依存的にコラーゲン産生を抑制する機構の解明	100
大阪大学大学院薬学研究科分子生物学分野 櫻井 文教	
・ 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	103
大阪大学大学院歯学研究科顎口腔機能再建学講座 (歯科理工学教室) 佐々木 淳一	
・ 紫外線で誘導される制御性 T 細胞が創傷治癒を促進するメカニズムの解明	110
名古屋市立大学医学研究科免疫学分野 志馬 寛明	
・ 皮膚老化・美容に関わる生体内ヒアルロン酸代謝機構の解明	115
東京慈恵会医科大学病理学講座 下田 将之	
・ ヒアルロン酸とデスモソームタンパクとの新規結合が皮膚機能に及ぼす影響の解明	119
大阪公立大学医学研究科病態生理学 高杉 征樹	
・ 脂肪細胞移植治療応用に資する脂肪細胞多様性の単一細胞解析とエピジェネティクス制御を介した脂肪細胞機能調整法の開発	123
千葉大学大学院医学研究院分子病態解析学 田中 知明	
・ 新規変異評価システムを用いた長波長の紫外線 (UVA) による突然変異誘発機構の解明	128
広島大学大学院統合生命科学研究科 津田 雅貴	
・ 天然由来物質による claudin-1 を介した高分子送達の科学的基盤研究	134
筑波大学生命環境系 南雲 陽子	
・ 日本人における接触皮膚炎とバリア機能に關与する遺伝子変異の解析および 3D スキンモデルを用いた接触皮膚炎の最適な治療法の探索	140
新潟大学医歯学総合病院皮膚科 林 良太	
・ 加齢に伴い皮膚での産生量が減少する新規皮膚ステロイドの機能解明	143
昭和大学医学部生化学講座 原口 省吾	
・ コラーゲン合成に必須なビタミン C 輸送メカニズムの解明	149
岡山大学学術研究院医歯薬学域 日浅 未来	

Ⅲ. 精神、文化に関する分野

・ 他覚的定量評価を伴った嗅覚検査の開発	156
兵庫県立尼崎総合医療センター耳鼻咽喉科・頭頸部外科 石川 正昭	
・ リアルワールドパラダイムと脳機能イメージングによる顔印象認知の神経基盤の検討	161
東北大学大学院教育学研究科 伊藤 文人	
・ 瞳孔振動と心拍変動を用いた香りが自律神経に及ぼす影響	166
国際医療福祉大学保健医療学部視機能療法学科 鎌田 泰彰	
・ 顔魅力の知覚に服および行動の知覚が与える影響の検討	172
新潟大学人文学部 新美 亮輔	
・ 視覚障害者自らによる「化粧」が視覚障害者の Quality of Life に与える多面的な影響に関する研究	177
日本福祉大学社会福祉学部 横山 由香里	
・ 顔面神経麻痺に対する重症度診断 AI ソフトを用いたより効果的なメイクアップ法の開発	182
国立病院機構東京医療センター臨床研究センター 聴覚平衡覚研究部聴覚障害研究室／東海大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科 和佐野 浩一郎	

■コスメトロジー研究助成を受けて	188
■学術集会支援助成、国際交流助成	207
■付 録	
事業報告書	217
2022年度 研究助成を受けられた方々	219
役員一覧	222

**コーセーコスメトロジー奨励賞
受賞記念講演**

アシル CoA 合成酵素 ACSVL4/FATP4 による皮膚バリア形成機構

北海道大学大学院薬学研究院

木原 章雄



きはら・あきお

1993年京都大学理学研究科博士課程修了、2007年北海道大学大学院薬学研究院 生体機能化学研究室准教授、2008年北海道大学大学院薬学研究院 生化学研究室教授、2021年北海道大学大学院薬学研究院 研究院長(薬学部長)
・専門分野：セラミド研究、アトピー性皮膚炎やドライアイに対する治療薬の開発
・学術賞：日本生化学会奨励賞(2005年)、北海道大学研究総長賞奨励賞(2014年)、セラミド研究会JSCAward(2015年)、2018年第29回コスメトロジー研究助成受賞

このような大変光栄な賞をいただき、コーサーコスメトロジー研究財団の関係者の皆様方に厚くお礼申し上げます。

私は2018年に研究助成を賜り、そのときの研究課題が「アシルCoA合成酵素ACSVL4(別名为FATP4)による皮膚バリア形成機構」です(①②)。この課題による研究内容を2020年に学術論文として『*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*』に公表しています。今回、この話を簡単にさせていただきますが、キーワードとなるのは皮膚バリアとアシルセラミドになります。セラミドは化粧品に多く含まれていることから皆さんもご存じと思いますが、脂質の一種です。私は

このセラミドに関して20年来研究してまいりました。私の専門は脂質生化学になります。

皮膚には透過性のバリア(③)が存在していて外からの病原体やアレルゲンなどの物質の侵入を阻止するとともに、体内からの水分の損失を防止するという非常に重要な役割があります。そのため、このバリアの異常は様々な皮膚疾患を引き起こしますが、たとえば感染症、アトピー性皮膚炎、乾皮症、そして先天的にバリアの形成が不全となる病気に魚鱗癬があります(④)。皮膚の表皮には4層からなる層が存在し、その一番外側にあるのが角質層です。こ

コーサーコスメトロジー奨励賞受賞講演 2022.11.30.

アシルCoA合成酵素ACSVL4/FATP4による皮膚バリア形成機構

木原章雄
北海道大学大学院薬学研究院

皮膚に存在する透過性バリア ③

病原体, 有害物質, アレルゲンの侵入阻止 水分の損失を防止

第29回(2018年度)研究助成 ②

研究課題
アシルCoA合成酵素ACSVL4/FATP4による皮膚バリア形成機構

学術論文
Yamamoto H, Hattori M, Chamulitrat W, Ohno Y, Kihara A. (2020) Skin permeability barrier formation by the ichthyosis-causative gene *FATP4* through formation of the barrier lipid ω -O-acylceramide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 117, 2914–2922. セラミド/アシルセラミド

皮膚バリア異常による皮膚疾患 ④

バリア異常

感染症
アトピー性皮膚炎
乾皮症
先天性魚鱗癬

先天性魚鱗癬

画像提供:名古屋大学秋山博士

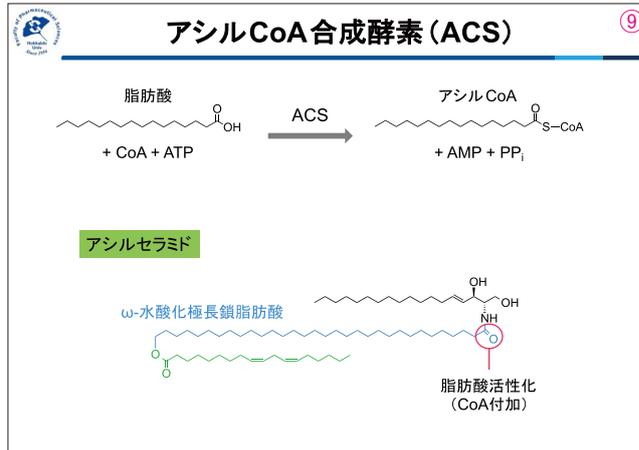
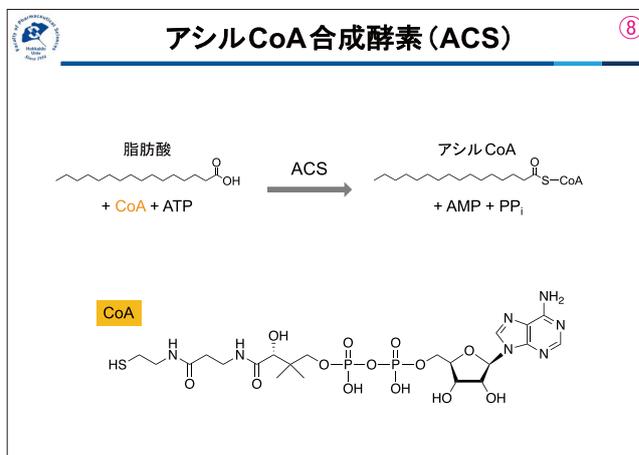
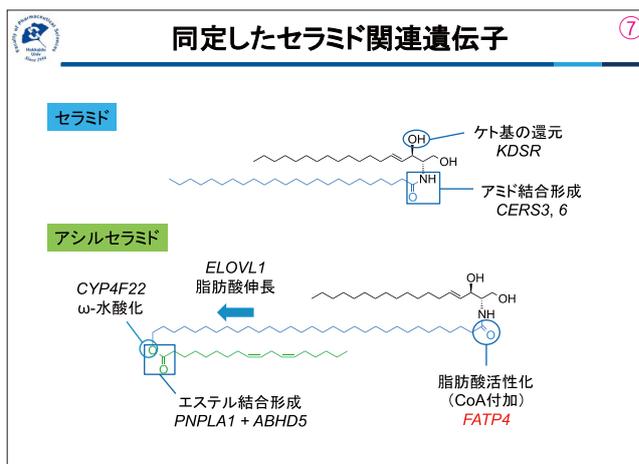
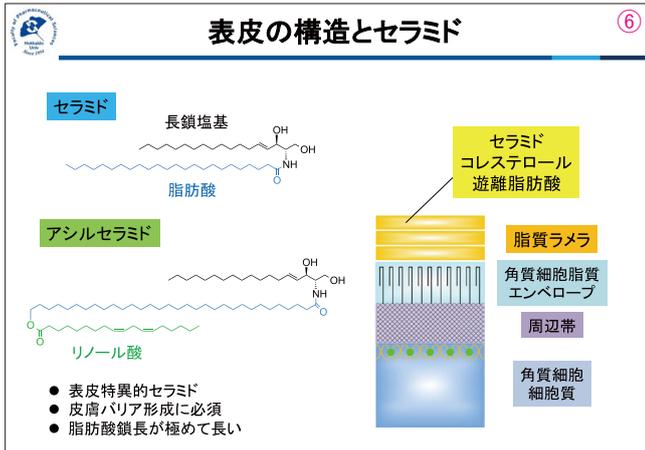
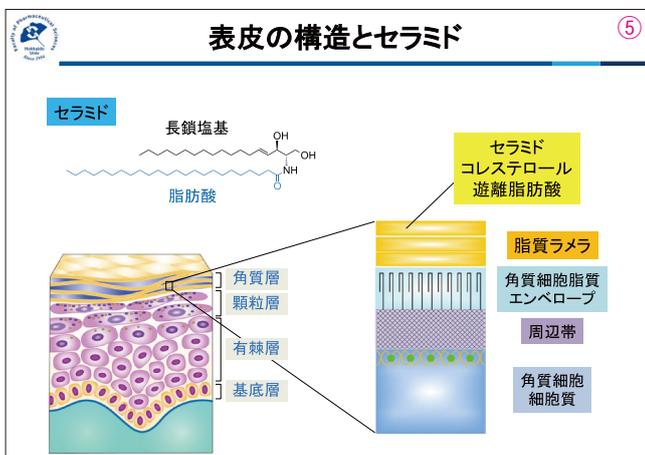
の角質層が皮膚バリア形成には最も重要であり、特に細胞の間に充填された脂質の多層構造体、脂質ラメラが重要です。セラミドはこの脂質ラメラの主要な構成成分の一つです。セラミドは長鎖塩基と脂肪酸がアミド結合した比較的簡単な構造をしています。実はヒトの表皮には23クラス1,500を超える分子種が存在していることを私たちは報告しています。その中でもアシルセラミドといわれる特殊なセラミドがこの皮膚バリア形成では最も重要です(5)。このアシルセラミドは脂肪酸の部分非常に長いという特徴があって、炭素数が30~36という生体で最も長い脂肪酸部分をもっています(6)。さらにそのオメガ末端は水酸化されて、リノール酸が付加した構造であり、その特殊な構造が脂質ラメラの形成と維持に重要です。

私たちはこれまでに様々なセラミド関連遺伝子の同定と解析を行ってきました。まず、2000年代には3位のケト基を導入するKDSRという遺伝子を同定しました(7)。これはセラミド合成の第2段階を触媒する酵素の遺伝子です。その後、6つあるセラミド合成酵素のうちの3番(CERS3)と6番(CERS6)の同定を行いました。2010年以降はアシルセラミドに着目して、その当時わかっていなかったアシルセラミドの生合成の詳細については明らかにすることができました。この過程で多くの遺伝子の同定に成功しましたが、たとえば脂肪酸伸長に関わるELOVL1、

脂肪酸のオメガ水酸化に関わるCYP4F22、エステル結合形成に関わるPNPLA1とADHD5、そして本課題のFATP4です。

FATP4は脂肪酸を活性化してその後のアミド結合を可能にする、つまり脂肪酸にCoA付加する反応に関わる遺伝子です。脂肪酸というのは脂質の構成要素となる前に一旦CoA(補酵素A)が付加することによって活性化されなければなりません。この反応を触媒する酵素をアシルCoA合成酵素、略してACSといいます(8,9,10)。

アシルセラミド合成では、オメガ位が水酸化された極長鎖脂肪酸部分がCoA付加を受ける必要があります。私たちは



その酵素の探索を行いました。

ヒトにはACSが26種類存在します。ACSのファミリーのメンバーは基質特異性に従っていくつかのサブファミリーに分類されますが、今回のこのFATP4 (ACSVL4)は極長鎖脂肪酸に特異的なサブファミリーに属するものです。

私たちはFATP4のみがアシルセラミド合成に関与することを明らかにしたわけですが、なぜFATP4に着目したかといいますと、それまでの研究からアシルセラミドの合成に関わる遺伝子の変異はいずれも魚鱗癬を引き起こすことが明らかとなっており(11)、目的のACSもきっと魚鱗癬の原因遺伝子の中に含まれるだろうと考え、実際、魚鱗

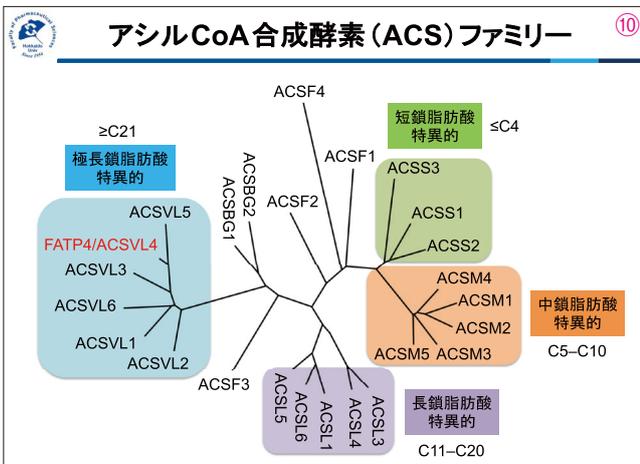
癬未熟児症候群の原因遺伝子がFATP4であったことから着目したわけです。

FATP4がアシルセラミド合成に関わることを証明するために私たちは、Fatp4のノックアウトマウスをCRISPR-Cas9を用いて作成しました(12)。生まれてきたマウスは新生致死であり、これは他のアシルセラミド合成に関わる遺伝子のノックアウトマウスと同様でした。

このノックアウトマウスの皮膚バリア機能を調べた結果、経皮水分蒸散量が野生型マウスに比べて非常に高い値でした。また、トルイジンブルー染色というのは青い色素にマウスを浸けるのですが、普段、皮膚バリアが正常であると青い色素に染まりませんが、このノックアウトマウスは濃く染まりました(13)。これらのことからFatp4ノックアウトマウスが重篤な皮膚バリア異常を示すことがわかりました。

このスライドでは形態観察としてヘマトキシリン/エオジン染色を行っています。この部分が野生型マウスの角質層です。ノックアウトマウスでは角質層の層の数が増えるという過角化が見られ、脂質ラメラの形成もうまくできておらず、魚鱗癬のような表現型が見られました(14)。

このスライドでは表皮の脂質の分析をしています。順相の薄層クロマトグラフィーでの解析とLC-MS/MSのいずれの解析においてもアシルセラミド量が野生型マウスに比



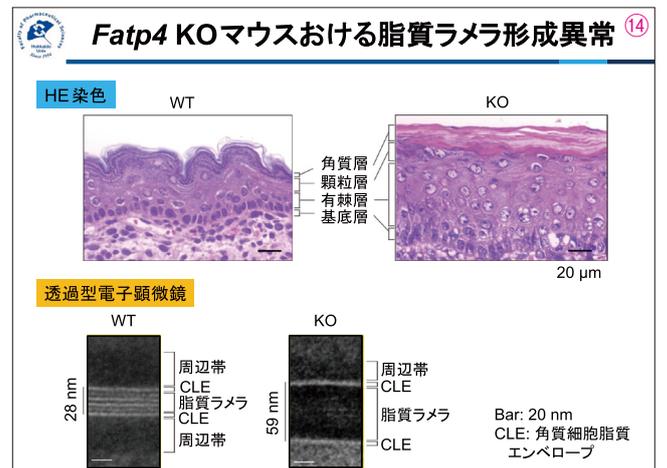
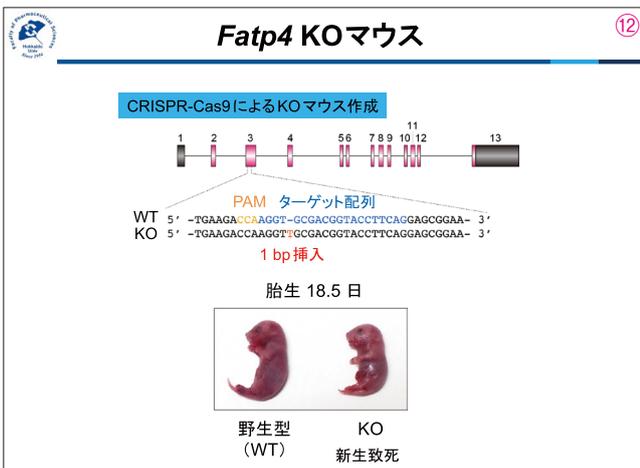
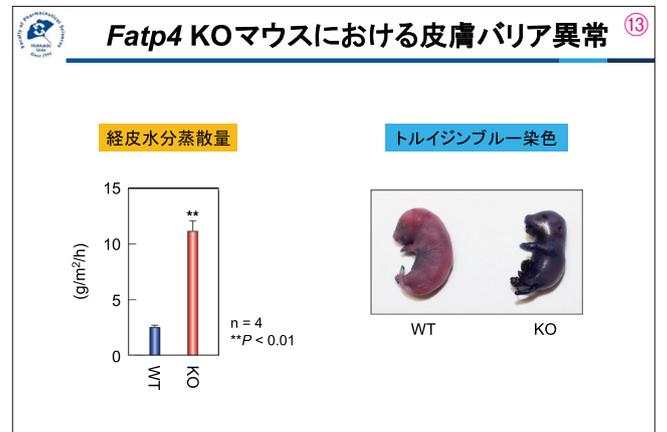
先天性魚鱗癬原因遺伝子

魚鱗癬	原因遺伝子
尋常性魚鱗癬	FLG
X連鎖性潜性(劣性)魚鱗癬	STS
常染色体潜性(劣性)先天性魚鱗癬	ABCA12, TGM1, CERS3
遺伝師様魚鱗癬	ALOX12B, ALOXE3, CYP4F22
葉状魚鱗癬	PNPLA1, NIPAL4, LIPN
先天性魚鱗癬様紅皮症	
表皮融解性魚鱗癬	KRT1, KRT10
表在性表皮融解性魚鱗癬	KRT2
シェーグレン・ラルソン症候群	ALDH3A2
ISQMR症候群	ELOVL4
ドルフマン・シャナリン症候群	ABHD5
魚鱗癬未熟児症候群	FATP4
IKSHD症候群	ELOVL1

発症原因 (産生/形成不全)
 アシルセラミド結合型セラミド脂質ラメラ周辺帯不明

非症候群性

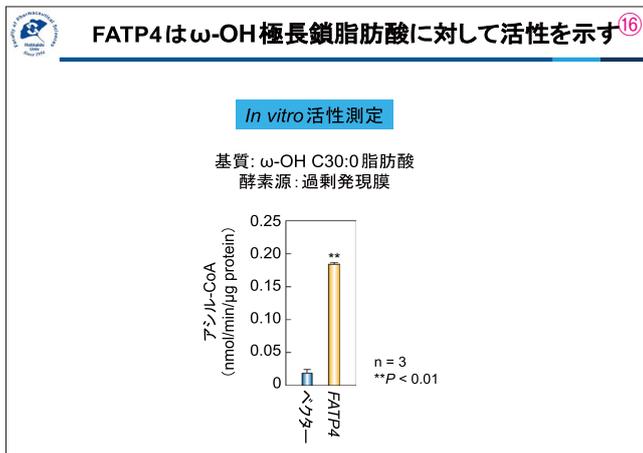
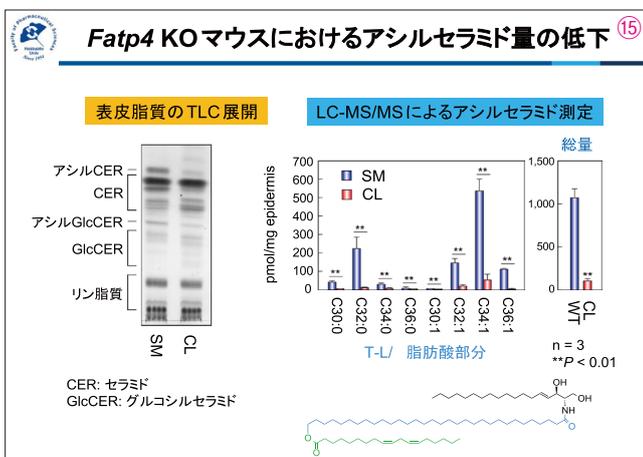
症候群



べて10分の1程度にまで減っているということで、確かにFATP4がアシルセラミド合成に関わるということがわかりました(15)。

このスライドでは酵素学的な解析を行っています。膜画分に対して今回想定される基質であるオメガ位が水酸化されたC30:0という非常に長い脂肪酸を加えてACS活性を測定しました。コントロールの膜画分に比べて、FATP4が過剰発現した膜画分は高い活性を示したことから、FATP4が確かにACSとして機能することがわかりました(16)。

データは以上になります。FATP4の名前の由来はFatty acid transporterであり、脂肪酸を輸送するトランスポーターとして、角化細胞に脂肪酸、特にアシルセラミド合成



に必要なリノール酸を供給するという役割が想定され、その異常が魚鱗癬未熟児症候群の魚鱗癬症状につながっていると考えられてきました。しかし、FATP4のアシルCoA合成活性は証明されているものの、脂肪酸トランスポーターとしての機能ははまだ証明されていません。実際、私たちがノックアウトマウスの表皮を解析しても脂肪酸量が少ないことは認められなかったため、この説は正しくないという結論に達しました。むしろ、今回見られたFatp4ノックアウトマウスの表現型はアシルセラミド合成に関与する遺伝子のノックアウトマウスとほとんど一緒であり、活性としてもACSとして働くことが証明できたということでした(17)。

最後に、「今回助成を受けられた方に一言」と言われたので、ここに記載しました。世の中には信頼性の低い論文があふれ返っています。そのような論文のデータに振り回されずに、正しい結果を見極める能力を身につけることが大切です。自身の信頼性の高い研究結果を信じ、既存の定説にとらわれない独自の考えや説を導き出し、科学の進歩に貢献してください(18)。それからこの助成には、このような奨励賞という研究者にとって励みになる賞がありますので、ぜひ皆さんもこの賞を獲得するようにそれぞれの課題の研究を邁進していただきたいと思います。

ご清聴ありがとうございました。

さいごに (17)

これまでの説

FATP4は脂肪酸トランスポーターとして角化細胞に脂肪酸(特にリノール酸)を供給する。

新しく解明したこと

FATP4はアシルCoA合成酵素としてアシルセラミド合成に関与する。

(18)

世の中には信頼性の低い論文が溢れかえっています。そのような論文のデータに振り回されず、正しい論文/結果を見極める能力を身につけることが大切です。自身の信頼性の高い研究結果を信じ、既存の定説にとらわれない独自の考え/説を導き出し、科学の進歩に貢献してください。

特別寄稿論文

(2023年度 国際交流助成報告)

化粧品による副作用として肝障害をきたす可能性に関する ロンドン大学 Massimo Pinzani 教授との意見交換

東日本国際大学客員教授

岡崎 勲

Massimo Pinzani, M. D., Ph. D., FRCP has been investigating the mechanism of signal transduction that results in the formation of liver fibrosis. Since Okazaki invited Professor Massimo Pinzani as a guest speaker in the International Conference on New Strategies for the Treatment of Liver Cirrhosis at the Tokyo International Forum in June of 2001, he kindly gave us update topic lectures every time when he visited Japan. This time we have discussed whether cosmetic agents may cause liver injury. In 2016 Japanese Government started the strict report system on the side effect of cosmetics. We debated the cause including allergic reaction, T cell dysregulation and others, and finally we agreed the possibility of drug-induced liver injury by cosmetics and the necessity of diagnostic tests for the proper treatment.

1. 概要

Massimo Pinzani 教授 (Sheila Sherlock Chair of Hepatology, University of College London, Institute of Liver & Digestive Health, Royal Free Hospital) は、本国際交流申請責任者岡崎が2001年6月に“International Conference on New Strategies for the Treatment of Liver Cirrhosis”を東京国際フォーラムとパレスホテルで開催した際にお招きし、体内炎症起炎化学物質の「シグナル伝達」をご講演戴いた。当時は世界の数人しか研究していない分野でイタリア、フィレンツェ大学から招聘した。同教授はその後EUの改革で英国ロンドンのSheila Sherlock Chair of Hepatologyの教授となり、岡崎が東海大学医学部教授を定年退職し、国際医療福祉大学山王病院に移った後も3回ご講演くださり、最近では東海大学医学部先端医療科学教授稲垣 豊 先生が東海医学会を2019年に開催した。今回は大阪公立大学客員教授として来日され、コーセーコスメトロジー研究財団の支援を受け、東日本国際大学、東海医学会および大阪公立大学大学院医学研究科肝胆膵病態学(河田 則文 教授)と合同で開催した。

近年の薬剤開発はワクチンも含めて各種病原体やサイトカインなど体内シグナル伝達物質に対する抗体を中心に研究が進められている。こうした化学物質は、生体内での化学的活性も強く、時に多くの人では問題が起こらない場合でも生命にかかわる異常をきたすことがある。皮膚科領域であっても、皮膚を介して微量な薬剤でアナフィラキシーを発症すれば肝不全をきたすことも想定しなければならない。最近のmRNAによる新規化学物質だけでなく、T細胞受容体(TCR)が自己タンパク質の抗原を変化させて、胸腺で抗体産生を惹起するPathogenic effector T細胞を生じ、自己免疫疾患をきたす可能性が指摘されている^{1,2)}。また栄養過多による肥満はmTORおよびそれによる末梢組織の代謝の過剰負担から免疫細胞に乱れを生じ、時に自己免疫疾患をきたす³⁾。COVID-19流行による自己免疫疾患

が見られた報告がなされている⁴⁾。Pinzani 教授は、こうした免疫異常の基盤として肥満による炎症を伴う脂肪肝などのMatrisomeの変化基盤が化粧品などの皮膚障害をきたす要因としての肝障害の可能性を指摘し、体全体で反応が起こることを未然に察知し、予防する検査法の発展が重要であることを指摘した。

今回の講演は、令和5年4月22日(土)午後4時よりパレスホテル東京で行われた。

2. 化粧品による肝障害はあるのか

岡崎は2006年より2019年の13年間、東京赤坂の山王病院(国際医療福祉大学関連病院)消化器内科(主として肝臓疾患)で勤務し、記憶に残る化粧品による肝障害の患者様は拝見しなかった。また同大学病院(那須塩原市)において、皮膚科外来医師から皮膚疾患があって、その治療薬でTNF α 抗体製剤投与後に中等度肝障害(外来で経過が追える)の患者様は何人も拝見したが、化粧品(香水、白粉、塗薬、服薬など)で皮膚科外来医師から肝機能障害で一人も依頼されなかった。しかし、テレビで皺をのぼす機能を有する遺伝子報道や、COVID-19 virus関連ワクチンに関する海外論文などから、機能を有するmRNAから生み出される化粧品がないとは言えず、また独善的に否定することも研究者に失礼であり、敢えてMassimo Pinzani教授の意見をお伺いしたく、財団事務局に同教授講演会開催の支援をお願いした。

3. 化粧品による副作用対策

平成26年(2014年)3月に厚生労働省医薬食品局から出された「医薬品・医療機器等安全性情報 No.311号」に[1. 医薬部外品および化粧品の副作用報告制度の改正について]があり、情報の概要の項目には、近年の薬用化粧品による副作用事例の発生を受けて、健康被害を早期に発見するため、平成26年4月1日より、医薬部外品および化粧品の製造販売業者から行政への副作用報告制度について、

個別の副作用症例も報告するよう制度を強化するため、その概要を紹介している。記事の1. はじめに薬用化粧品(医薬部外品)による皮膚障害(白斑)の発生など、販売開始前に想定されなかった副作用事例が発生していることから、医薬部外品および化粧品により健康被害が生じた事案を早期に発見し、対策を講じるよう、化粧品などの市販後安全対策の強化が求められ、企業には安全管理情報の収集義務の対象が追加された。

4. 化粧品による副作用の報告

上記厚生労働省が平成26年(2014年)に対策を取った皮膚障害(白斑)の発生などは当時メディアでも大きく報道されたが、肝障害があったとの情報はなかった。上記厚生労働省が平成26年(2014年)に対策を取って以後の報告について、岡崎がインターネットで調べてみて、PMDA(独立行政法人医薬品医療機器総合機構2004年4月1日設立)のデータベースで見当たらなかった。しかし、「平成22年3月(令和4年2月時点修正)重篤副作用疾患別対応マニュアル 薬剤による接触皮膚炎」と題する報告がある。対象事例で症状の重篤を分類し、補償の格付けをしている。

一般に化粧品による副作用で多いのは接触皮膚炎(Dermatitis contact)で、上記重篤副作用疾患別対応マニュアルには、接触皮膚炎(Dermatitis contact)を基本語としてその下層語として漆かぶれ、アレルギー性接触皮膚炎から36疾患名があげられている。この用語を用いて報告をする。その中に、「化粧品による皮膚炎(Dermatitis due to cosmetics)」、「化粧品過敏症(Cosmetics sensitivity)」、「化粧品皮膚炎(Dermatitis cosmetic)」が見られる。どのように具体的に区別するのは記載されていない。

今回の調査では統計的データは見いだせなかった。海外の文献では、平均して成人は6-12品目の化粧品(日用品を含むと思われる)を使用しており、パッチテストで確認してCosmetic Allergyは10%近く見られたという⁵⁾。化粧品による健康被害は香水、保湿剤、毛髪染料paraphenylenediamine(PPD)で見られる。特にPPDではアナフィラキシーをきたし、死に至る。

5. DILI (drug-induced liver injury)の観点から考察する

2023年3月号のHepatologyにFontana et al.⁶⁾が米国肝臓学会の薬剤・漢方薬・サプリメント(HDS)による肝障害に対処する診断・治療・予防の29頁に亘るガイドラインを公表した。平均的成人の米国人は年当たりHDSの6品目を使用し、HDSによる肝障害をきたす可能性が指摘されている。化粧品として直接特記した記載はない。文献検索でも見られなかった。DILIをきたしたと推測された時の診断に関する検査法として、症例のリンパ球と加害想定

物質と一緒に培養してリンパ球増殖が見られるかを検討する従来の方法、最近のヒト肝organoidsを用いて流血中のmacrophagesによる組織障害を直接観察する方法が紹介されている⁶⁾。

6. DILIにおけるT細胞障害からの考察

自己のタンパク質にはT細胞受容体(T cell receptor, TCR)が反応せず、MHCクラスIIとゆるい結合をし、胸腺髄質細胞により細胞死する(deletion in the thymus)(図1)。ところが最近Science誌に自己のタンパク質がcarboxyethylatedタンパク質になり、即ちprotein posttranslational modifications(PTMs)を受けて樹状細胞の抗原提示で胸腺皮質細胞によりpathogenic effector T cellsになり、自己免疫が形成される可能性が報告された^{1,2)}(図1右)。

さらに最近のScience誌(2023年3月31日号)には、体内の脂肪細胞の増加(欧米の極端な肥満を想定しますが)により、細胞内の栄養代謝が活性化され、mTORのような代謝処理経路が末梢組織に負荷をかけ免疫反応に異常をきたし自己免疫疾患をきたす³⁾(図2)。

COVID-19感染者で重い症状を呈した患者さんの中に、cytokinesおよびchemokinesに対する自己抗体を来して重症化した報告がある。自己抗体は毛細血管細胞、血液凝固因子、血小板、結合組織、細胞外マトリックス構成成分、肺・中枢神経・皮膚・消化管・その他の臓器を傷害する。今回のCOVID-19感染罹患者への注意が必要である⁴⁾。

7. 将来への対策

コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成金を受けた最近5年間の報告書を拝見し、以下の論文が見られた。

- ①神沼 修. アトピー患者に対する化粧品の皮膚刺激性・保護作用を評価する新規皮膚炎モデルの開発⁷⁾。コーセーコスメトロジー研究財団研究報告、29巻93-96頁
- ②北浦 次郎. 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⁸⁾。コーセーコスメトロジー研究財団研究報告、30巻117-121頁
こうした研究が副作用予防に繋がると考える。

8. まとめ

肝臓病学を専攻してきた医師として、今回のMassimo Pinzani教授講演会にコーセーコスメトロジー研究財団の支援を受けることができ、DILIの範疇に入る可能性がある化粧品による副作用について検討し、報告事例が少ないことおよび将来に備えて研究が成されていることを知り、Massimo Pinzani教授のコメントも報告できることにコーセーコスメトロジー研究財団の支援に深く感謝します。

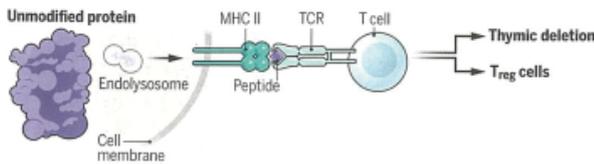
Autoimmunity to the modified self : Breaking tolerance with posttranslational modifications.

(L. Santambrogio, Science 17 March 2023; 379: 1092–3 based from Y. Zhai et al. Science 379: 1104, 2023)



Unmodified protein

Peptides from processed unmodified self proteins are presented by MHC II molecules. T cells with high affinity T cell receptors (TCRs) for the MHC II-peptide complex are deleted in the thymus or they generate Treg cells. T cells with low affinity TCRs for the MHC II-peptide complex may be present in the periphery but are suppressed by Treg cells.



Carboxyethylated protein

T cells specific for MHC II peptides from proteins that are carboxyethylated can escape thymic deletion and may clonally expand into pathogenic effector T cells when the protein posttranslational modification (PTM)-modified peptide is presented by a high-affinity MHC II haplotype, thereby inducing autoimmunity.

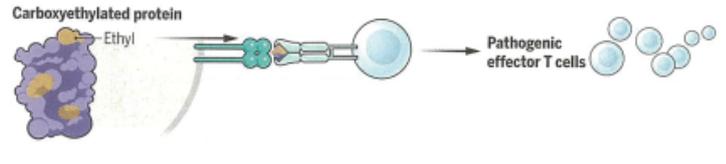
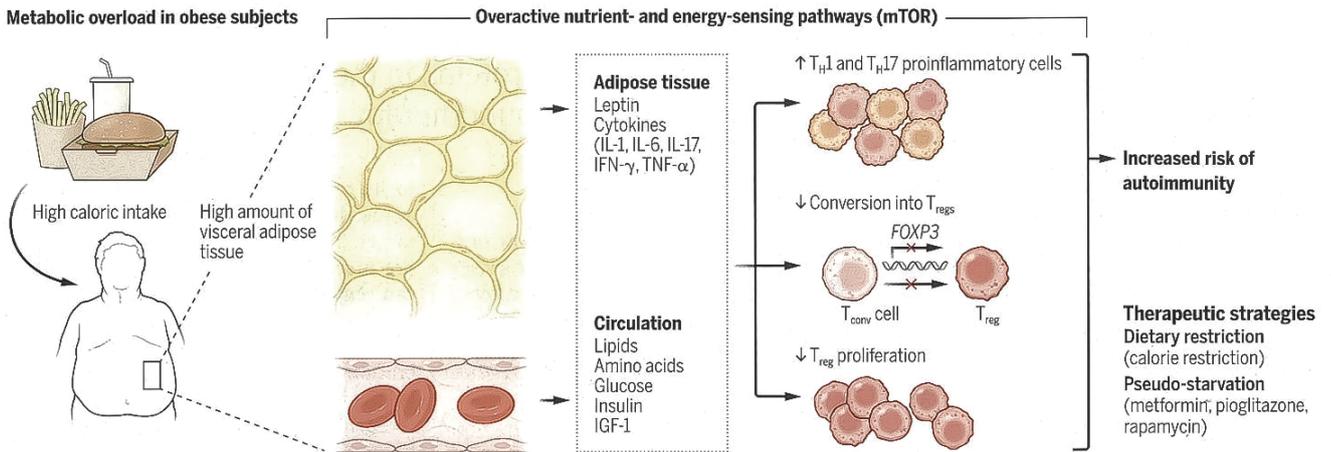


図1 転写後のタンパク質による免疫寛容の破壊 (Santambrogio L. Science 379: 1092–1093, 2023)



FOXP3, forkhead-box P3; IFN- γ , interferon- γ ; IGF-1, insulin-like growth factor 1; IL, interleukin; mTOR, mechanistic target of rapamycin; T_{conv}, conventional T; T_H, T helper; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; T_{reg}, regulatory T cell.

図2 肥満により変化した免疫状態から自己免疫疾患をきたす可能性

(引用文献)

- 1) Santambrogio L: Autoimmunity to the modified self. Protein posttranslational modifications can break tolerance to the self-proteome. Science 379: 1092–1093, 2023.
- 2) Zhai Y, Chen L, Zhu P, et al.: Cysteine carboxyethylation generates neoantigens to induce HLA-restricted autoimmunity. Science 379: 1104, 2023.
- 3) Matarese G: The link between obesity and autoimmunity. Science 379: 1298, 2023.
- 4) Wang E.Y, et al. Diverse functional autoantibodies in patients with COVID-19. Nature 585: 283–288, 2021.
- 5) DermNet content department: Contact reactions to cosmetics. February 2023.
- 6) Fontana, RJ, Liou I, Reuben A, et al.: AASLD practice guidance on drug, herbal, and dietary supplement-induced liver injury. Hepatology 77: 1036–1065, 2023.
- 7) 神沼 修: アトピー患者に対する化粧品の皮膚刺激性・保護作用を評価する新規皮膚炎モデルの開発, コーセーコスメトロジー財団研究報告 29: 93–96, 2021.
- 8) 北浦 次郎: 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, コーセーコスメトロジー財団研究報告 30: 117–121, 2022.

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

刺激応答性 DNA ナノ構造体の構築

岐阜大学工学部

池田 将

Nucleic acids have been employed as programmable building blocks in the construction of various DNA nanostructures through self-assembly, which is based on Watson–Crick base pairing. DNA nanostructures with stimuli-responsive properties have been used in various applications such as sensors, controlled release and delivery, and actuators. Here, we describe the design and synthesis of a new reduction-cleavable spacer (RCS) based on a nitrobenzene scaffold for constructing reduction-responsive oligonucleotides according to standard phosphoramidite chemistry. In addition, we demonstrate that the introduction of the RCS in the middle of an oligonucleotide (30 nt) enables the construction of a self-assembled microsphere capable of exhibiting a reduction-responsive disassembly. Since the preparation of RCS-based phosphoramidite reagent for the construction of oligonucleotides containing RCS is straightforward, the RCS could allow for the introduction of the reduction-responsiveness into various functional oligonucleotides and nucleic acid-based architectures toward therapeutic and diagnostic applications in near future.

1. 緒言

本研究の目的は、新規な刺激応答性DNAナノ構造体の創製である。特定の疾病に関係する生体内環境や外部環境を刺激として応答する機能をDNAナノ構造体に搭載できれば、バイオナノテクノロジー分野のブレークスルーの一つになる可能性がある。1953年に生命の遺伝情報を保存する重要な役割を担うDNAが二重らせん構造であるという発見以来、着実に精密化された原子・分子レベルの構造知見を基に、世界初の人工的に設計された立方体状DNAナノ構造体が創出されたのは1991年とされている¹⁾。近年では、DNAナノ構造体に関する研究は、ナノテクノロジーの中核分野へと発展し、DNA鎖の長さ・配列・組み合わせなどを設計することによって新たな形状の構造体が創出され続けている。しかしながら、その一方、狙った刺激に応答するDNAナノ構造体の構築とそのための化学的な方法論の開発は、ほぼ未着手のまま残されている。

近年、DNAナノ構造体には、トランスフェクション試薬を用いる必要がなく、そのまま細胞内に移行する性質を示すものがあると報告されている。ごく最近では、DNAナノ構造体が、経皮投与でのドラッグデリバリーにおけるキャリアとしても利用可能であることが示されている²⁾。したがって、DNAナノ構造体に狙った刺激に対する応答機能の付与が可能になれば、経皮投与でのドラッグデリバリーをより精密に達成できる可能性があり(図1)、ひいて

は、DNAナノ構造体の美容・医療応用につながり、コストロジ分野の進歩・発展に寄与できると期待される。加えて、DNAナノ構造体は、毒性が低い(生体適合性が高い)ことが期待され、本研究で開発する刺激応答性DNAナノ構造体はバイオ応用展開するうえで魅力的な素材といえる。

2. 方法

本研究では、低酸素状態依存的なオリゴDNA (ODN) の切断反応を可能にする新たな分子として、ニトロアリアル基³⁾を組み込んだスペーサ型モノマー分子 (RCS) を設計し、その有機合成手法を確立することから研究を計画した。ニトロアリアル基は、低酸素状態においてアミノ基などに還元されることが知られており、このことを利用することで、低酸素状態依存的なODNの切断反応が可能になると期待される。

2.1. 還元反応に応答して切断されるスペーサ型モノマー分子4 (Reduction cleavable spacer: RCS)の有機合成

図2に示す合成スキームにしたがって化合物4 (RCS) を合成した。得られた化合物4は、¹H, ¹³C, ³¹P NMRスペクトル、およびESI-TOF-HRMSスペクトルにより同定した⁴⁾。

2.2. RCSを組み込んだODN (s1^{RCS})の構築

合成したモノマー分子(化合物4, RCS)を用いて、核酸自動合成装置 (HTS H-Series H-6 G8A) によってRCSを組み込んだODN (s1^{RCS}) を構築した。具体的には、ホスホロアミダイト法の標準的条件にて、1 μmolスケールで合成を行い、天然型塩基のホスホロアミダイトは50 mM、合成したホスホロアミダイト化合物4 (RCS) は75 mMになるように乾燥アセトニトリルにそれぞれ溶解した。CPG



Construction of stimuli-responsive DNA nanostructures

Masato Ikeda

Faculty of Engineering, Gifu University

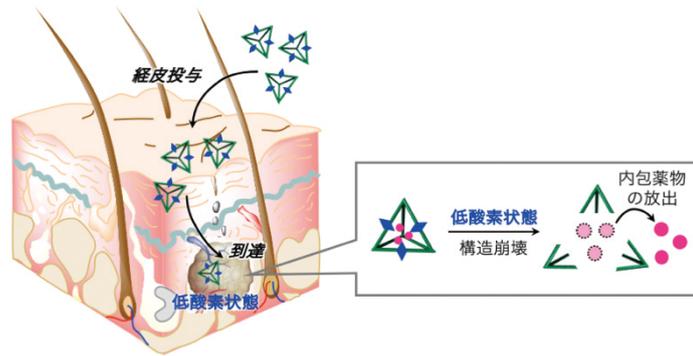


図1 低酸素状態に関連する還元刺激で構造崩壊する DNA ナノ構造体

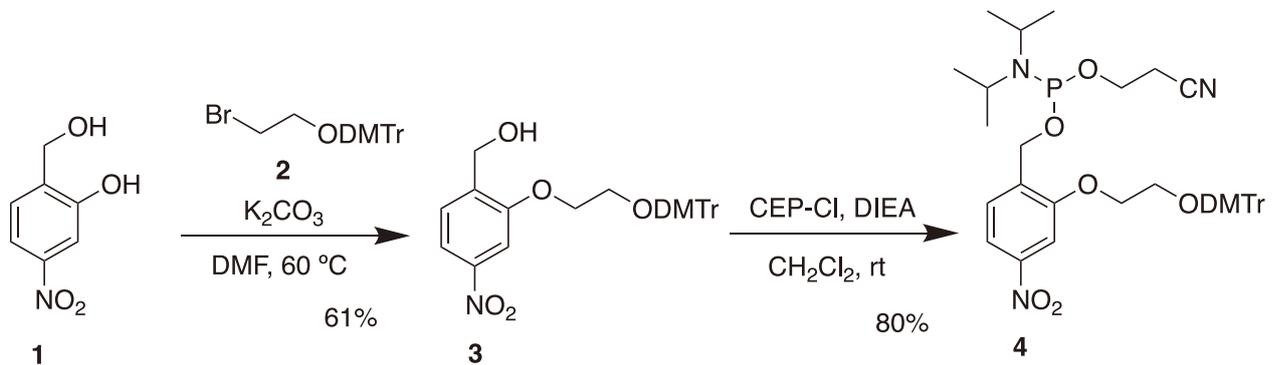


図2 還元反応に応答して切断されるスペーサ型モノマー分子 4 (Reduction cleavable spacer: RCS) の合成スキーム

樹脂は活性に基づき 1 μmol をカラムに量り取り、核酸自動合成機に取り付けた。なお、5'-末端の DMTr 基を脱保護せずに合成を終了させた。合成終了後、CPG 樹脂をサンプルストックチューブに移し、28% アンモニア水：40% メチルアミン水溶液 = 1：1 (1.5 mL) を加え、65 $^{\circ}\text{C}$ で 20 分静置した。冷蔵庫で 1 時間静置した後、樹脂と上清を分け、上清を減圧濃縮し、1.5 mL エッペンチューブに移し、IP-RP-HPLC にて精製した。分取したサンプルを減圧濃縮した後、80% 酢酸 (500 μL) を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で加熱した。15 分後、3.0 M 酢酸ナトリウム (50 μL) および、イソプロパノール (500 μL) を加え反転攪拌し、-80 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分間静置した。その後、15 分間遠心 (15000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$) した。沈殿物と上清液を分け、沈殿物に 70% エタノール (1.0 mL) を加え、15 分間遠心 (15000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$) した。沈殿物と上清液を分け、沈殿物に滅菌水 (1.0 mL) を加え、溶解させ、IP-RP-HPLC にて精製した。溶媒を減圧濃縮した後、1.5 mL エッペンチューブに移した。図 3 に示すように、IP-RP-HPLC の分析により、精製した $s1^{\text{RCS}}$ が十分な純度であることを確認した。さらに、MALDI-TOF-MS によって同定し、 $s1^{\text{RCS}}$ に帰属

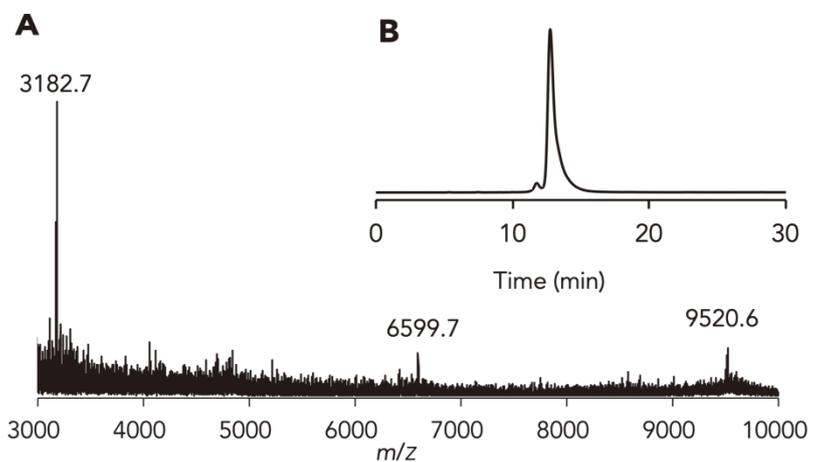


図3 $s1^{\text{RCS}}$ の (A) MALDI-TOF-MS (linear, negative, matrix: 3-HPA) スペクトルと (B) IP-RP-HPLC チャート

できるピーク ($m/Z=9520.6$) を検出した。また、イオン化に用いる UV レーザー光によって切断されたと想定されるピーク ($m/Z=3182.7$) も確認された。

2.3. 球状 DNA 構造体 1^{RCS} の構築と機能評価

図 4 に示した設計指針に沿って、また、水溶液中の 3 種類のオリゴ DNA 濃度 ($s1^{\text{RCS}}$, $s2$, $s3$) と Mg^{2+} 濃度を変化させ、球状 DNA 構造体 1^{RCS} の構築条件を検討した。具体的

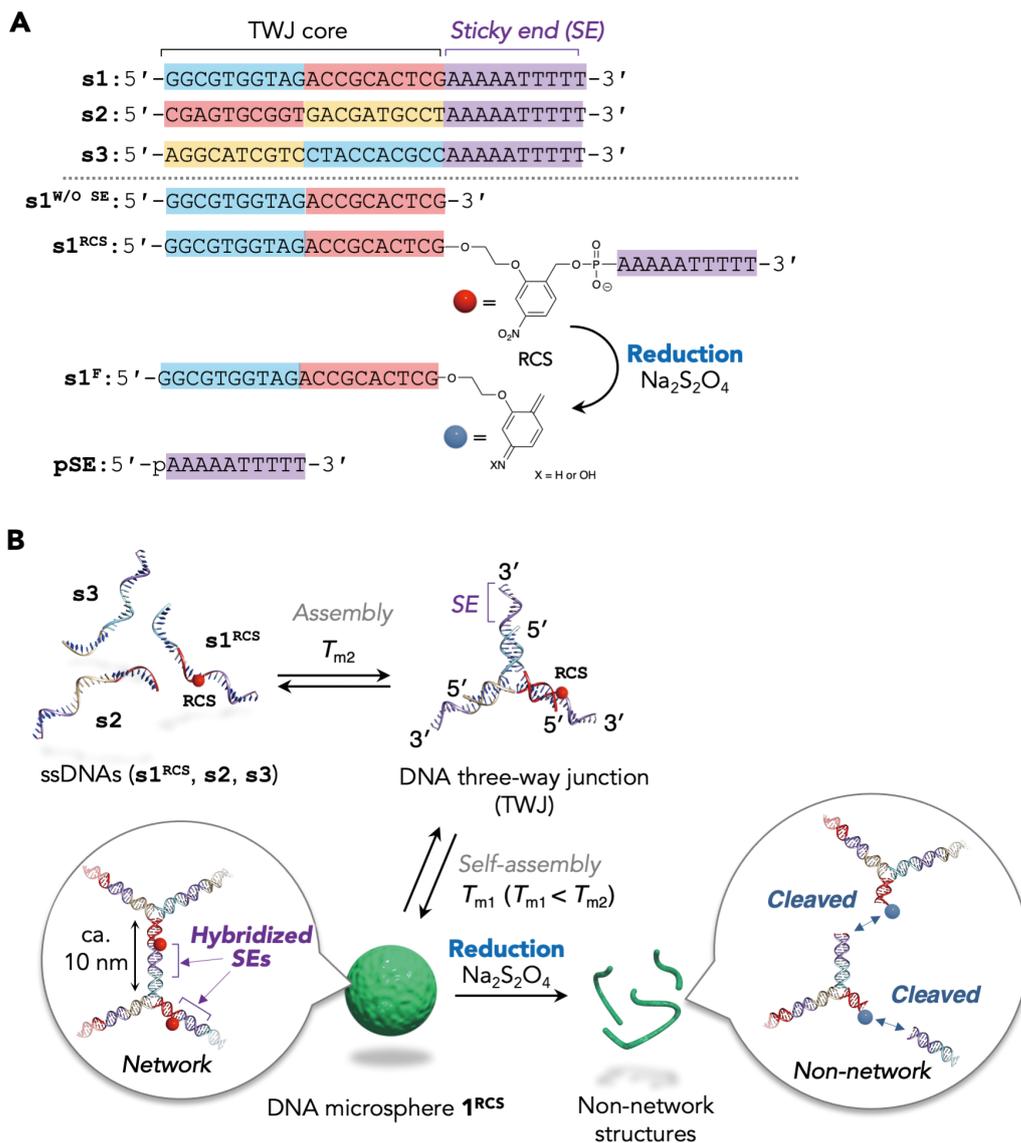


図4 低酸素状態に関連する還元反応にตอบสนองして構造が崩壊する球状 DNA 構造体 1^{RCS} の設計指針

には、3種類のオリゴDNA水溶液を混合し、加熱-冷却操作（サーマルアニーリング；70℃から10℃，冷却速度：1℃/min）を実行した。サーマルアニーリング後、蛍光性核酸染色剤（EvaGreen）を添加し、CLSM（confocal laser scanning microscopy）を用いて観察を行った。さらに、得られた球状DNA構造体1^{RCS}の還元応答機能の評価を行った。

3. 結果と考察

3.1. 球状DNA構造体1^{RCS}の構築

上記(2.3.)に記載した設計指針と方法に従ってCLSM観察を行った。その結果得られた画像を図5に示す。過去に報告⁵⁾されている3種類のオリゴDNA (s1, s2, s3)の組み合わせからなる球状DNA構造体1は、DNA濃度が2.5μMおよび10μMのいずれの条件においても球状構造体が観察された(図5B)。一方で、今回新たに設計した3

種類のオリゴDNA (s1^{RCS}, s2, s3)の組み合わせにおいては、DNA濃度が10μMかつMg²⁺濃度が25mMにおいて球状構造体が観察された(図5A)。この結果は、RCSがスペーサ部位として組み込まれることで、図4に設計指針を示すような球状構造を形成するために必要なネットワーク構造形成の安定性が低下したためであると考えられる。以降の実験では、球状構造体の形成が確認できた条件において評価を進めた。

3.2. RCSを組み込んだODN(s1^{RCS})および球状DNA構造体1^{RCS}の還元応答性の評価

RCSを組み込んだODN (s1^{RCS})の還元反応にตอบสนองした切断効率をPAGE分析によって評価した。図6Aに示すように、水中においてもニトロ基を還元できる還元剤であるNa₂S₂O₄を添加すると、低分子量側にシフトしたバ

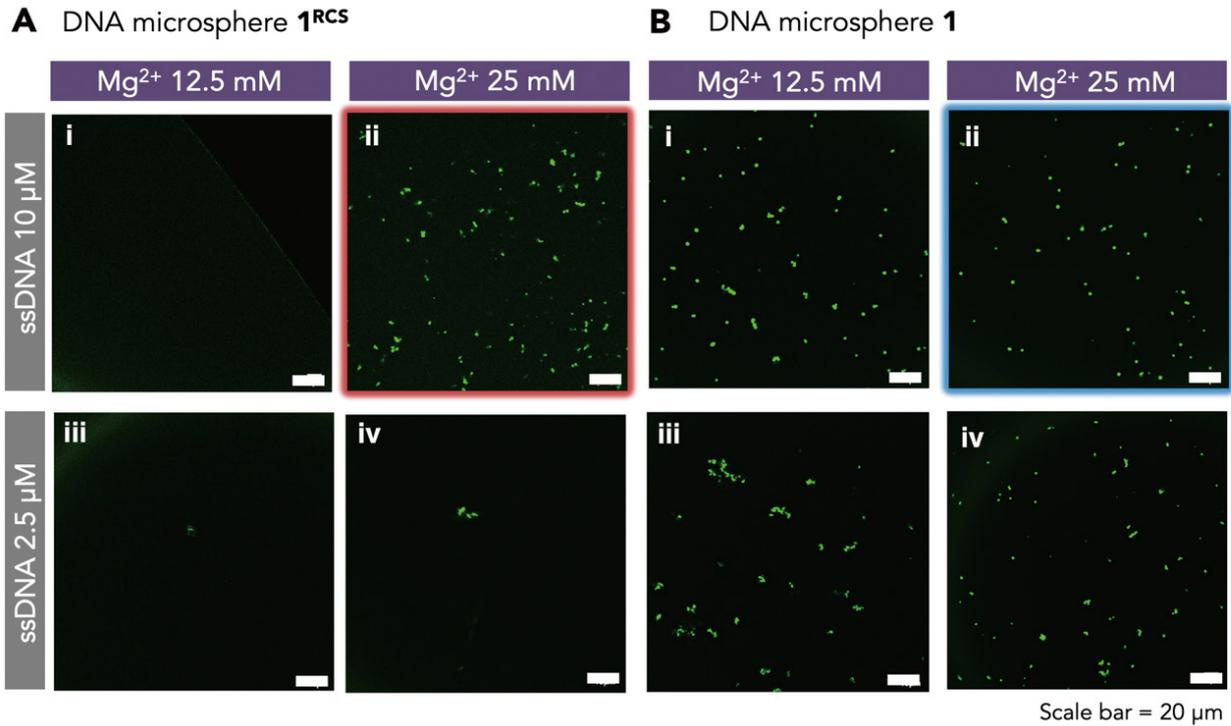


図5 球状 DNA 構造体 1 および 1^{RCS} の形成を評価した CLSM 画像

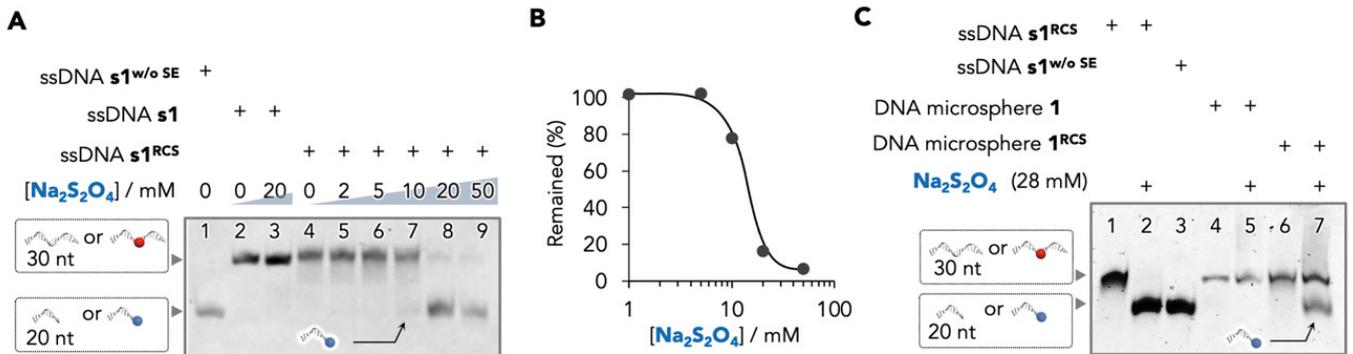


図6 s1^{RCS} および球状 DNA 構造体 1^{RCS} の還元応答性を評価した変性 PAGE 分析の結果

ンドが新たに観察された。その移動度は、RCS 部位で切断が進行したと想定される塩基数の ODN (20nt) と良い一致を示したことから、設計どおり (図 4) に切断反応が進行していることが示唆された。また、Na₂S₂O₄ の濃度依存性 (図 6B) から、切断を十分に進行させるためには、終濃度として約 30mM の Na₂S₂O₄ が必要であることも明らかになった。さらに、上記 (3. 1.) の実験によって明らかにした球状 DNA 構造体 1^{RCS} を形成している条件においても、Na₂S₂O₄ の効果 (終濃度として 28mM の Na₂S₂O₄ を添加) を調べたところ、s1^{RCS} 単独の結果と同様に低分子両側に新しいバンドが確認された (図 6C)。以下の CLSM 観察の還元応答性の評価においても、28mM になるように Na₂S₂O₄ を添加した。

3. 3. 球状 DNA 構造体 1 および 1^{RCS} の還元応答性の評価

球状 DNA 構造体 1 および 1^{RCS} が存在している水溶液に、還元剤である Na₂S₂O₄ とそのコントロール実験となる Na₂SO₄、DNA 加水分解酵素である DNase I、ニトロ基を還元する能力が不十分と考えられるチオール型の還元剤 GSH を、それぞれ添加した後に CLSM 観察を行った。図 7A に示すように、球状 DNA 構造体 1^{RCS} は、Na₂S₂O₄ の添加後に消失することが明らかになった。一方で、同濃度の還元力を持たない塩 Na₂SO₄ や GSH の添加では、球状構造体の消失は確認されなかった。これに対して、球状 DNA 構造体 1 は Na₂S₂O₄ の添加後も消失しなかった (図 7B)。また、いずれの球状構造体も DNase I の添加によって消失した。以上の結果は、球状 DNA 構造体 1^{RCS} が、設

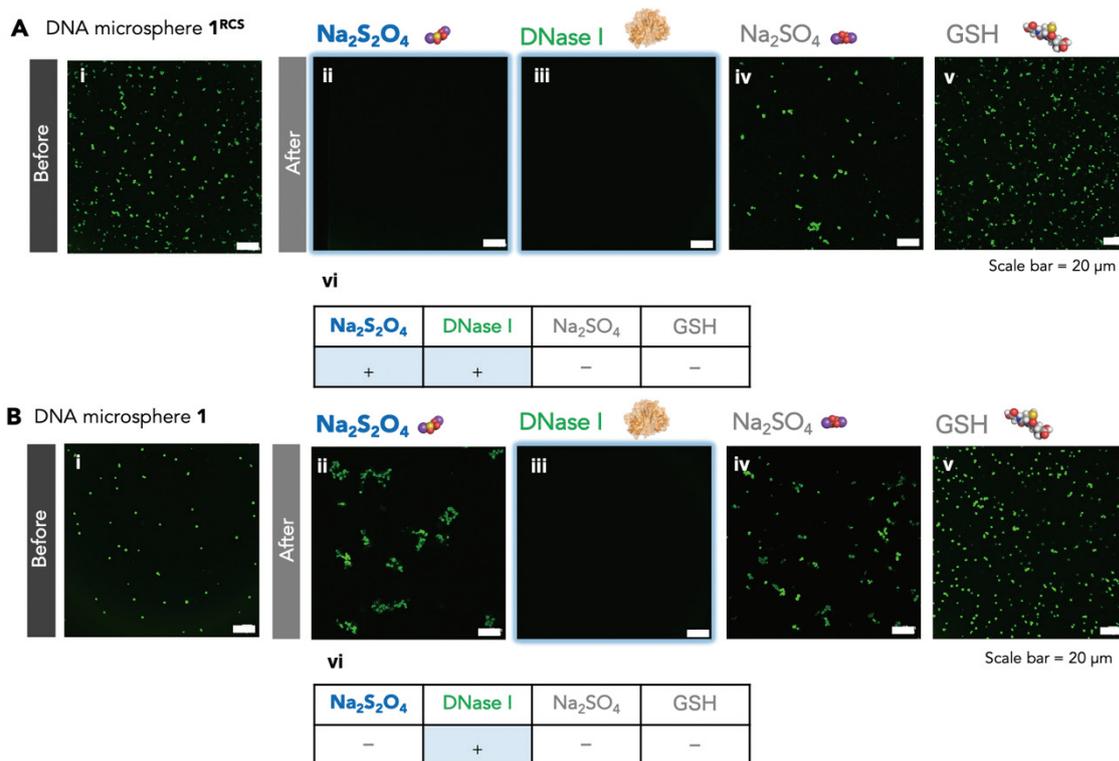


図7 球状 DNA 構造体 1 および 1^{RCS} の環境応答性を評価した CLSM 画像

計通りに、RCSの還元反応にตอบสนองした切断によって崩壊したことを強く支持している。

4. 総括

以上のように、低酸素状態に関連した還元反応によって切断反応が進行するODN (s1^{RCS}) の開発と、そのためのモノマー分子(RCS)を独自に設計・開発した。開発したモノマー分子を組み込んだODNから球状DNA構造体1^{RCS}の構築が可能であることを実証し、さらに、構築した球状DNA構造体が還元環境に選択的にตอบสนองした崩壊を示すことを明らかにした。以上の研究成果は、本研究の分子設計指針の妥当性と高い応用性を支持している。今後、さらなる研究を進めることで多様な形態とサイズのDNA構造体を構築できる可能性がある。今後の研究で構築する新たな還元刺激応答性DNAナノ構造体の機能を評価し、必要に応じて分子設計(例えば、スパーサの導入や配列の最適化)にフィードバックすることで各課題を合理的に解決することも可能である。そのような研究を通して、還元刺激応答性DNAナノ構造体の経皮投与でのドラッグデリバリー機能を追求できる。今後もそのような研究に力を尽くし、還元刺激応答性DNAナノ構造体の美容・医療応用を目指し、コスメトロジー分野の進歩・発展に寄与したいと考えている。

謝辞

本研究にご支援を頂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) J. Chen, N. C. Seeman, Synthesis from DNA of a molecule with the connectivity of a cube. *Nature*, **350**, 631-633 (1991).
- 2) C. Wiraja, Y. Zhu, D. C. S. Lio, D. C. Yeo, M. Xie, W. Fang, Q. Li, M. Zheng, M. V. Steensel, L. Wang, C. Fan, C. Xu, Framework nucleic acids as programmable carrier for transdermal drug delivery. *Nat. Commun.*, **10**, 1147 (2019).
- 3) M. Ikeda, M. Kamimura, Y. Hayakawa, A. Shibata, Y. Kitade, Reduction-responsive guanine incorporated into G-quadruplex-forming DNA. *ChemBioChem*, **17**, 1304-1307 (2016).
- 4) S. L. Higashi, A. Isogami, J. Takahashi, A. Shibata, K. M. Hirose, K. G. N. Suzuki, S. Sawada, S. Tsukiji, K. Matsuura, M. Ikeda, Construction of a reduction-responsive DNA microsphere using a reduction-cleavable spacer based on a nitrobenzene scaffold. *Chem. Asian J.*, **17**, e202200142 (2022).
- 5) K. Matsuura, K. Masumoto, Y. Igami, T. Fujioka, N. Kimizuka, In situ observation of spherical dna assembly in water and the controlled release of bound dyes. *Biomacromolecules*, **8**, 2726-2732 (2007).

ソフトな界面分子膜を足場とした機能性ゲル薄膜構築手法の開発

お茶の水女子大学基幹研究院自然科学系

伊村 くらら

Low molecular weight gelators (LMWGs) form self-assembled 3D networks via noncovalent forces, such as hydrogen bonding or hydrophobic interactions, and they occur in a sol-gel transition in stimulus-response. As their various functions, they attract much interest in the material fields such as drug delivery, sensing and tissue engineering. Amphiphilic compounds are also assembled in various shapes such as spherical micelles, rod-shaped micelles, and worm-like micelles in the solutions. Their molecular assembling behavior is useful as LMWGs and studies on the surfactant-based LMWGs have been intense so far. An amidoamine derivative amphiphile, C18AOH, shows intermolecular hydrogen bonding and acts as a hydrogelator. C18AOH hydrogel exhibits sol-gel transition upon temperature and pH. It is known that inorganic salts induced the change in the aggregation of biological matters such as proteins and polymers containing amide groups. The addition of electrolytes would be expected to affect the self-assembled morphology of amidoamine surfactants due to the weakening of the intermolecular hydrogen bonding between the amide groups. In this study, we aimed to control the gelation properties of C18AOH and investigated the effect of the addition of electrolytes on the amide moieties. Focused on the C18AOH air-water interface monolayer, we examined the effect of electrolytes on the two-dimensional molecular orientation of the C18AOH monolayer. The gelation properties were also studied by powder X-ray diffraction and Fourier transform infrared spectroscopy. It is indicated that intermolecular hydrogen bonding would be affected by the addition of hydrated cations. It was found that the C18AOH fibril became elongated in the presence of $MgCl_2$. In conclusion, the addition of the cations which promoted the hydration to the C18AOH modulated the intermolecular hydrogen bonding of amide groups, which is one of the driving forces for gelation and achieved the control of the hydrogel properties.

1. 緒言

両親媒性物質が形成する分子集合体は、化粧品や医薬品、食品といった様々な分野で幅広く活用されている¹⁾。その中でも、ひも状ミセルやリオトロピック液晶、 α ゲルといった粘弾性の高いゲル様の機能を示す分子集合体(界面活性剤ゲル)には、高分子ゲルには見られない両親媒性分子特有の優れた機能の発現が期待される。界面活性剤ゲルの多くは、二分子膜平面が多層に積み重なったラメラと呼ばれる構造からなる。構造の特定は比較的容易であり、各種のX線回折装置や偏光顕微鏡観察によっても同定が可能である。しかし、その熱力学的安定性や結晶多形は多様であり、これらの因子はゲルの物性へ多大な影響をおよぼす。これまでに両親媒性物質によるゲルとして、液晶相や α ゲルといった分子運動性の高いものから、低分子ゲルファイバーに分類されるような結晶性の比較的高いものなど多くの報告がなされてきた。近年、水素結合や疎水性相互作用、 π - π 相互作用などの非共有結合を介して自己会合し、高分子様の網目構造を取る低分子ゲルに注目が集まっている²⁾。これらは、温度やpHといった外部刺激に応答した

ゾル-ゲル転移を引き起こすなど多様な機能を持つことから、薬物輸送やセンシング、組織工学などの材料分野における利用が目されている。低分子ゲルの機能開発においても、他の界面活性剤ゲルと同様、その分子集合状態の制御はきわめて重要である。

さらに、これら界面活性剤ゲルは分子集合体の内部に多様な物質を取り込み包接することで、機能性複合ゲルを構築しうる。コスメトロジー分野における応用に向けては、より効率的なヒドロゲルの形成と分子包接が求められる。さらには、分子集合すなわちゲル化が可逆的に起こり、これらの機能を自在に制御できることが望ましい。界面活性剤の分子集合特性を鑑みれば、単一の分子構造でありながらも、分子集積制御を通じてゲル化特性を自在に操ることも可能である。本研究では、界面活性剤ゲルのより効果的な応用に向け、分子集合転移と制御の仕組みを気-液界面での分子集積に基づいて検証するものである。

界面活性剤の分子集合作用は低分子ゲルの構築を考える場合においても有用であり、これまでに界面活性剤由来の低分子ゲル化剤も多く報告されてきた³⁾。本来、界面活性剤の多くは水溶性であり水中ではミセルといった分子集合体を取り得る。ここに、長鎖炭化水素鎖の疎水性相互作用や官能基の分子間水素結合といった会合を強める因子を付加することで、ゲルファイバーの形成を促すことができる。これまでに、 $C_{18}H_{37}$ の炭化水素鎖を持つアミドアミン型界面活性剤 *N*-(2-hydroxy-ethyl)-3-[(2-(2-hydroxy-ethylcarbamoyl)-ethyl]-octadecyl-amino]propionamide (以下C18AOH、Fig. 1) は、親水部アミド



Fabrication of functional hydrogels based on the molecular membrane of amphiphilic gelator

Clara Imura

Ochanomizu University

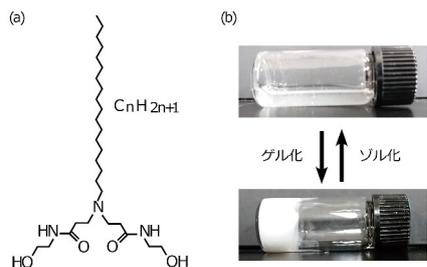


Fig. 1 アミドアミン型界面活性剤の(a) 分子構造ならびに(b) ヒドロゲルの形成

基の分子間水素結合に基づいてヒドロゲルを形成することが報告されている⁴⁾。また、気-液界面においては単分子膜の形成も示唆されている⁵⁾。C18AOHの物性はpHといった外的因子の影響を受けやすく、温度とpHといった外部刺激によって可逆的にゾル-ゲル転移をもたらす(Fig. 1)。しかし、マクロなゲル機能に紐づけながら分子集積構造を緻密に調整するには至っていない。先行研究により、C18AOHと類似構造を持つアミドアミン型界面活性剤では、塩化リチウムの添加によってアミド基の分子間水素結合が弱められ、分子集合形態が変化することが報告されている⁶⁾。無機塩の作用による分子集合状態の変化はタンパク質をはじめとしたアミド基を持つ高分子化合物においても観測されており、無機塩存在下では親水基の水和によって分子間相互作用に影響がおよぶことが指摘されてきた。

そこで本研究では、気-液界面における展開単分子膜の挙動に焦点をあて、界面活性剤ゲルとしての要求を満たすべくC18AOHゲルの分子集積の効果的な制御を目指した。親水基の分子間相互作用へ影響をおよぼす種々の添加物を組み合わせることで、C18AOH親水部への水和状態変化によるゲル形成作用の制御を検討した。まず、分子集合挙動に影響をおよぼす無機塩の探索と解析を行い、これらによってもたらされる界面活性剤ゲルの構造解析を実施した。

2. 実験方法

2.1. 両親媒性分子*N*-(2-hydroxy-ethyl)-3-[[2-(2-hydroxy-ethylcarbamoyl)-ethyl]-octadecyl-amino]-propionamideの合成

本研究で用いたアミドアミン型の両親媒性分子*N*-(2-hydroxy-ethyl)-3-[[2-(2-hydroxy-ethylcarbamoyl)-ethyl]-octadecyl-amino]-propionamide(以下、C18AOH)は、オクタデシルアミンを原料として合成し、再結晶したものをを用いた。

2.2. 気-液界面単分子膜の形成と評価

C18AOH気-液界面単分子膜は、Biolin Scientific社製ラングミュア・プロジェクトラフKSV-NIMA smallを

用いて、水面上に形成した。バリアで膜を圧縮しながらWilhelmyプレートをを用いて表面圧を測定し、表面圧-分子占有面積等温線(π - A 等温線)から、分子配向状態を検討した。このとき、下層液には5種の塩化物(KCl、LiCl、NaCl、CaCl₂、MgCl₂)をそれぞれ0~300mMとなるように添加した。いずれの場合も下層液の液性を中性とすることで、C18AOHは親水部アミンがプロトン化していない非イオン性の状態であるとみなした。全ての実験は、20℃から50℃の恒温環境にて実施した。

2.3. C18AOHヒドロゲルの形成と評価

C18AOHヒドロゲルは、最低ゲル化濃度以上のC18AOH熱懸濁液を室温で徐冷して得た。このとき、バイアルチューブを反転させ、流動性を失っているものをゲル、流動性が残っているものをゾルと判断した。ヒドロゲルには、5種の塩化物(KCl、LiCl、NaCl、CaCl₂、MgCl₂)をそれぞれ0~200mMとなるように添加した。

得られたゲルのファイバー形状は偏光顕微鏡(オリンパス製BX53)を用いて観察した。さらに、C18AOHヒドロゲルの分子集積構造は、粉末X線回折装置(リガク製Ultima IV)を用いて解析した。ゲル中でのC18AOHの分子間相互作用は、赤外分光光度計(日本分光製FT/IR-4700)を用いて測定した。

3. 結果

3.1. 気-液界面単分子膜の形成と添加無機塩の影響

無機塩存在下におけるC18AOHのゲル形成挙動を検証するにあたり、まずC18AOHのゲル形成作用における重要な因子となる親水部官能基の水素結合が、添加無機塩の影響を受けてどのように変化するかを調べた。これには、ヒドロゲル化剤分子の気-液界面単分子膜における、二次元的な分子配向の変化から検討を行うこととした。C18AOHはpH=6以上の環境では難水溶性の両親媒性物質であり、中性の水面上に展開単分子膜を形成することが可能である。界面活性剤ゲルに見られるラメラ構造は二分子膜の集合体であり、こうした展開単分子膜における分子間相互作用の知見はゲル形成においても有用となる。

まず、下層液に無機塩を含まない系でのC18AOHの気-液界面単分子膜における π - A 等温線を検証した。C18AOH単分子膜は液体膨張膜を形成していることが示唆された(Fig. 2a)。これは分岐してかさ高い親水部を有するC18AOHの分子構造に起因すると考えられた。下層液温度が20℃のとき、この π - A 等温線にはおよそ38mN/m付近で屈曲点が現れたが、圧縮を続けても表面圧は低下せず膜の崩壊は起こらなかった。この結果からも、C18AOHの分子膜は柔軟な性質を有していることがうかがわれる。

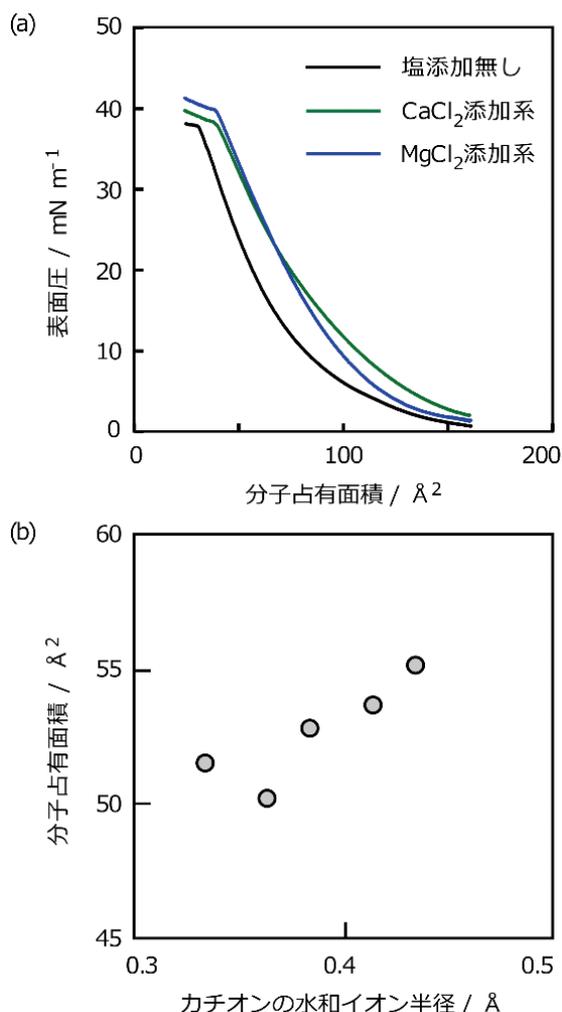


Fig. 2 気-液界面単分子膜における (a) π -A等温線および (b) 表面圧 30 mN/mでのC18AOH分子占有面積 (20°C、いずれも塩化物濃度を10 mMとした)

次いで、下層液に無機塩として塩化物を添加し、その π -A等温線を無機塩非添加系と比較した。無機塩を添加した場合でもC18AOH単分子膜は液体膨張膜を形成し、塩濃度を増すにつれて膜はさらに膨張することが示された。この膜膨張作用は塩化物の種類に依らず観測され、およそ塩濃度10mM以上で顕著な拡張が見受けられた。Fig. 2bに、下層液温度が20°C、表面圧が30 mN/mのときのC18AOH単分子膜の分子占有面積を示す。無機塩を添加していない系でのC18AOH分子占有面積41.52 Å²に対し、無機塩を10mM添加した場合の分子占有面積は50 Å²以上に広がった。興味深いことに、Fig. 2bに示すようにこの分子占有面積の増大は塩化物に含まれるカチオン種の水和イオン半径におよそ依存し、水和イオン半径が大きいほど強く現れることが分かった。特にMgCl₂添加系での分子占有面積は55.15 Å²となり、C18AOH単分子膜中での分子パッキングをより緩める作用を持つことが示された。このMgCl₂添加系のようにC18AOH分子間の距離を拡が

ると、水面上のC18AOH分子は直立できず傾斜した状態で並ぶようになると考えられる。すなわち、添加無機塩に含まれるカチオンは、C18AOHの分子配向に影響をもたらしていることが明らかになった。このような分子配向変化は、バルク中でのヒドロゲルの形成においても観測されると予想される。そこで、気-液界面単分子膜に対して、より強く影響をおよぼしたCaCl₂、MgCl₂に着目し、これらを添加した系でのC18AOHヒドロゲルの形成能の制御を試みた。

3.2. ヒドロゲル形成能に添加無機塩がおよぼす影響

C18AOHヒドロゲルにおいて、ゲル化に要する最小濃度(最低ゲル化濃度)は0.60wt%であることが分かっている⁴⁾。これに対し、CaCl₂およびMgCl₂を50mMの濃度となるように添加すると、最低ゲル化濃度はそれぞれ0.85wt%、0.80wt%まで上昇した。参照系としてNaClを添加した系の最低ゲル化濃度は0.65wt%であったことを考慮すると、前項の気-液界面単分子膜における挙動と同様に、カチオン種の違いに基づくヒドロゲル形成能への影響が生じていると言える。無機塩添加による最低ゲル化濃度の上昇はゲル形成作用が阻害されていることを意味し、この結果は気-液界面単分子膜にてCaCl₂やMgCl₂がC18AOH分子間のパッキングの緩和をもたらしたと矛盾しない。

添加無機塩がC18AOHのゾル-ゲル転移温度におよぼす影響も検討した。無機塩を添加しない場合の転移温度はpH=8条件においておよそ45°Cであったものの、50mMのMgCl₂を添加した系では49°Cまで上昇した。これもまた、無機塩の添加によりC18AOHの最低ゲル化濃度が上昇した結果と矛盾せず、無機塩がC18AOHのゲル形成能を緩める効果をもたらすことを示唆している。ただし、いずれの無機塩においても、C18AOHのゲル形成作用を打ち消すといった作用は示さず、低分子ゲル化剤として要求されるゲル形成力を十分に保持していることも確認された。

分子レベルでの配向状態の変化をマクロなゲル物性として引出し制御するには、分子集積構造に現れる挙動についても把握する必要がある。そこで次に、C18AOHヒドロゲルの分子集積構造に対して、添加無機塩の影響がどのようにおよんでいるかを検証した。ここではまず、C18AOH分子間に働く相互作用の状態を、フーリエ変換型赤外分光法(FT-IR)から調べた。Fig. 3に、C18AOHヒドロゲルのFT-IRスペクトルを、無機塩を含まない系とCaCl₂およびMgCl₂をそれぞれ添加した系と比較して示す。界面活性剤の疎水部炭化水素鎖におけるCH₂対称伸縮振動および逆対称伸縮振動は、それぞれ2850cm⁻¹付近と2920cm⁻¹付近に現れる。このバンドが高波数側に現れるほど炭化水素鎖の運動性が高い状態にあることが

分かり、界面活性剤由来のゲルであればおよそCH₂ 逆対称伸縮振動は 2918cm⁻¹ 付近に現れることが報告されている。C18AOH ヒドロゲルでは、これらのバンドはそれぞれ 2849cm⁻¹ と 2917cm⁻¹ に現れ、炭化水素鎖の運動性がゲル相の中でもやや低く水和結晶のものに近いことが示唆された。ここに濃度が 50mM となるように無機塩を添加しても、これらのバンドの波数は大きく変化しなかった。つまり、C18AOH ヒドロゲルの分子集積において、添加無機塩は疎水部炭化水素鎖には影響をおよぼしにくいと言える。次いで、親水部官能基相互作用への無機塩の影響を検討した。C18AOH の親水部にはアミド基とヒドロキシ基がそれぞれ 2 つずつ存在する。特に、アミド基は梯子様の分子間水素結合を形成することで、C18AOH のゲル化形成において重要な役割を果たしている。そこで、アミド基の水素結合状態を Amide I バンドから確認した。C=O 伸縮振動によるこのバンドの吸収波数はアミド基の水素結合状態に依存し、アミド基の水素結合が弱いほど高波数側に出現する。無機塩を添加していない C18AOH ヒドロゲルでは、アミド I バンドは 1638cm⁻¹ に現れた。この波数はおよそ既報^{4,7)} のアミドアミン誘導体型ゲル化剤による低分子ゲルで現れた波数とも一致し、C18AOH ヒドロゲルのアミド基は分子間で水素結合を生じていると判断し

た。一方で、無機塩を添加した系の FT-IR スペクトルでは、Amide I バンドに僅かながら高波数シフトが見られた。特に、CaCl₂ および MgCl₂ を添加した系では、吸収ピークよりも高波数側にて吸光度の増加が観測された。これらは、C18AOH アミド基の分子間水素結合が弱められていることを示唆するものである。添加塩が C18AOH ヒドロゲルにおよぼす作用は、主として疎水部炭化水素鎖ではなく親水部アミド基におよんでいることが確かめられた。

さらに、添加無機塩が C18AOH 分子集積にもたらす影響を、粉末 X 線回折法 (XRD) による構造解析からも検証した。得られたヒドロゲルの XRD パターンには周期的な構造を示すピークが現れ、いずれの系もラメラ構造をとることが分かった。Bragg 式から算出したラメラ面間隔を、それぞれの塩添加系について Table 1 に示す。無機塩を添加しないヒドロゲルでは 3.37nm であった面間隔は、CaCl₂ 添加系、MgCl₂ 添加系ではそれぞれ 3.35nm、3.32nm まで収縮した。Fig. 4 に、無機塩に含まれるカチオンの水和イオン半径に対する傾向を示す。いずれの塩化物でもラメラ面間隔を狭める作用を示したが、水和イオン半径が大きいものほど顕著にこの効果が現れることが分かった。

最後に、C18AOH ヒドロゲル中のファイバー形状に添

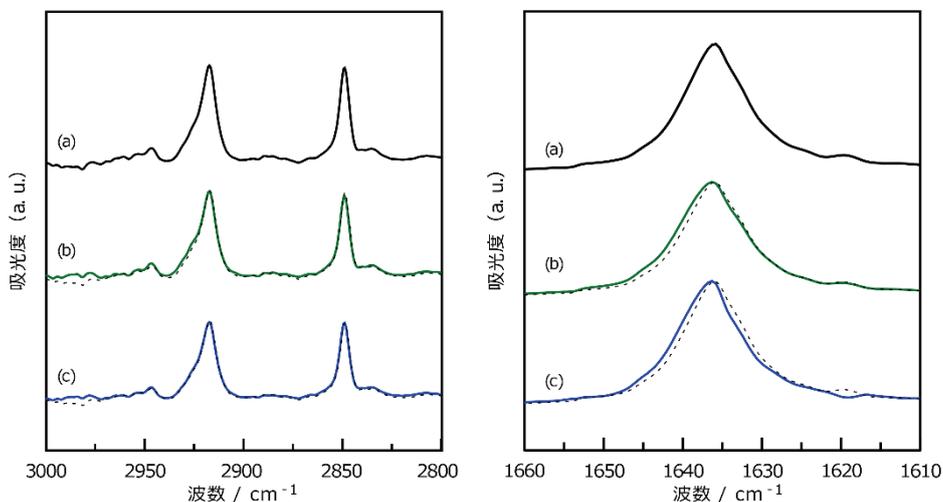


Fig. 3 C18AOH ヒドロゲルの FT-IR スペクトル
 (a) 塩添加無し、(b) CaCl₂ 添加系、(c) MgCl₂ 添加系。
 (b) および (c) では塩添加系と合わせて塩添加無しの場合のスペクトルを破線で示した。

Table 1 C18AOH ヒドロゲルの XRD パターンにおける回折ピークとラメラ面間隔
 (いずれの塩添加系も C18AOH 濃度 2wt% に対し塩化物濃度を 50mM とした)

添加塩化物	非添加	KCl	NaCl	LiCl	CaCl ₂	MgCl ₂
回折ピーク 2θ	2.62°	2.63°	2.62°	2.62°	2.64°	2.66°
	5.20°	5.18°	5.15°	5.26°	5.22°	5.26°
	7.79°	7.77°	7.74°	7.75°	7.84°	7.79°
面間隔 d/nm	3.38	3.36	3.37	3.37	3.35	3.32

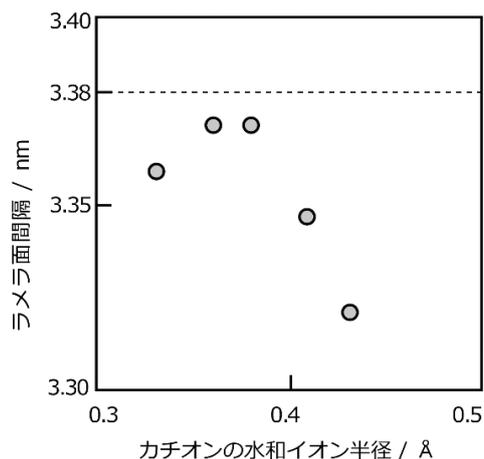


Fig. 4 塩化物濃度 50mM における C18AOH ヒドロゲルのラメラ面間隔とカチオンの水和イオン半径の関係

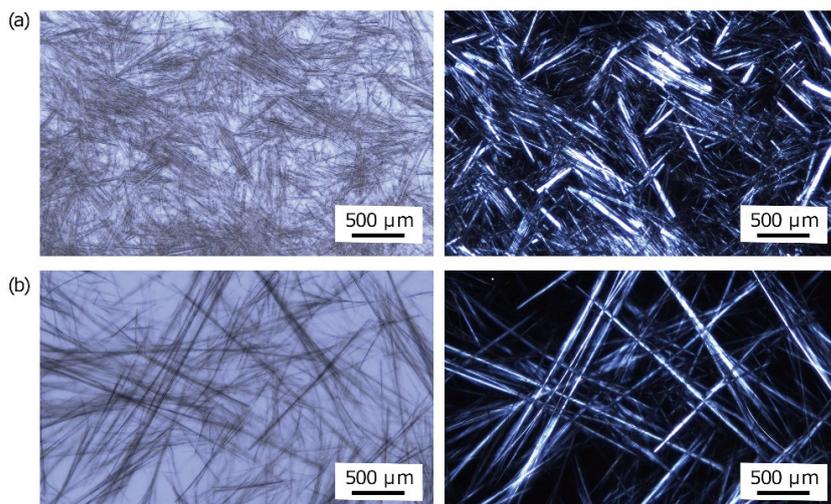


Fig. 5 直交偏光下における C18AOH ヒドロゲルの顕微鏡像
(a) $[MgCl_2] = 0mM$, (b) $[MgCl_2] = 50mM$

加塩がおよぼす影響を確かめた。偏光顕微鏡像 (Fig. 5) にて、C18AOH ヒドロゲルにはラメラ構造由来の複屈折性を示す針状のファイバーが観測され、これらが三次元ネットワークを形成していることが確認された。この形状は無機塩を添加した系では変化し、 $CaCl_2$ および $MgCl_2$ を添加したヒドロゲルではより細長く伸長した。ゲルファイバーの形態変化は、ゾル-ゲル転移温度といったゲルのマクロ物性と強い相関がある。効率的な三次元ネットワーク構築はゲル形成に要するゲル化剤量の低減につながり、ゲルのテクスチャーの制御にも有用である。

4. 考察とまとめ

アミドアミン型の両親媒性分子 C18AOH のヒドロゲル形成について、種々の塩化物を添加することで得られる効果を調査した。界面活性剤の親水部官能基に対して選択的に作用をおよぼしていることが明らかとなり、アミド基間の水素結合の緩和とそれによる分子間距離の拡大が示唆された。この作用は、塩化物に含まれるカチオンの水和イオン半径に強く依存しており、マグネシウムイオンといった水和イオン半径の大きなカチオンを含む系ほど効果的に分子間相互作用の緩和を誘起した。つまり、カチオン種によってゲル形成駆動力の調節が可能であることを意味している。こうした作用のメカニズムとして、カチオンが水和することによる水の分極の促進やゲル化剤官能基への直接的な付加が考えられる。

また、ゲルファイバーの分子集積にも大きな影響をもたらした。マグネシウムイオンといったカチオンを含む系では、C18AOH 分子膜における分子間距離が拡大するため、分子の傾斜が起りやすと考えられる。このような分子傾斜がラメラ構造中でも生じ、塩化物添加系でのヒドロゲ

ルにおけるラメラ面間隔の減少を引き起こしたと推測している。これにより、ファイバー成長にも差異を生じ、マグネシウムイオンを含む系ではよりしなやかで細長いゲルファイバーを形成することができた。これらの結果より、アミド基の水和を促進するカチオンの添加によって分子間水素結合の緩和が引き起こされ、ヒドロゲル形成作用を制御できることが示された。本研究で添加した塩化物は生体中でも存在するものであり、マクロなゲル機能に紐づけながら分子集積構造を緻密に調整する知見は、イオン種を含む環境下でのゲル応用にむけて有用であると考えている。

謝 辞

研究の遂行にあたって多大なるご支援を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篤く御礼を申し上げます。

(引用文献)

- 1) Sarkar, S.; Choudhury, P.; Dinda, S.; Das, P. K., Tailor-Made Self-Assemblies from Functionalized Amphiphiles: Diversity and Applications. *Langmuir* **2018**, 34 (36), 10449-10468.
- 2) Estroff, L. A.; Hamilton, A. D, Water Gelation by Small Organic Molecules. *Chem. Rev.* **2004**, 104 (3), 1201-1218.
- 3) Suzuki, M.; Yumoto, M.; Shirai, H.; Hanabusa, K., Supramolecular Gels Formed by Amphiphilic Low-Molecular-Weight Gelators of N^{α} , N^{ϵ} -Diacyl-L-Lysine Derivatives. *Chem. Eur. J.* **2008**, 14 (7), 2133-2144.
- 4) Morita, C.; Kawai, C.; Kikuchi, A.; Imura, Y.; Kawai, T., Effect of amide moieties for hydrogelators on

- gelation property and heating-free pH responsive gel-sol phase transition. *J. Oleo Sci.* **2012**, 41 (6), 603-605.
- 5) Morita-Imura, C.; Mita, S.; Shindo, H., Effect of the Air/Water Interfacial Properties of Amine Derivatives on the in Situ Fabrication of Microsized Gold Sheets. *Langmuir* **2019**, 35 (11), 4029-4036.
- 6) Morita, C.; Imura, Y.; Ogawa, T.; Kurata, H.; Kawai, T., Thermal-Sensitive Viscosity Transition of Elongated Micelles Induced by Breaking Intermolecular Hydrogen Bonding of Amide Groups. *Langmuir* **2013**, 29 (13), 5450-5456.
- 7) Morita, C; Kawai, C.; Tsujimoto, K.; Kasai, K.; Ogue, Y.; Imura, Y.; Kawai, T, High organogelation ability and soft-templating for ultrathin Au nanowires of long-chain amidoamine derivatives. *J. Oleo Sci.* **2013**, 62 (2), 81-87.

紫外線応答型リポソームの膜融合性を用いた送達システムの開発

奈良工業高等専門学校物質化学工学科

宇田 亮子

Liposomes are microscopic spheroidal capsules composed of phospholipids, and they have been extensively used as drug nano-carriers. Ideal drug delivery systems contain interacting groups that can respond to environmental stimuli. Light can be remotely applied with high spatial and temporal precision and we have therefore designed a triphenylmethane derivative as a photoresponsive amphiphile which undergoes photoionization to become an amphiphilic compound consisting of a hydrophilic triphenylmethyl cationic head group and a hydrophobic long alkyl chain tail. Under dark conditions, the head group of the triphenylmethane derivative is less polar than after irradiation, and it is thus sufficiently lipophilic to be solubilized in the lipid membrane. We have found that photoionization of the triphenylmethane derivative induced fusion between liposome membranes. Fusion between lipid membranes is one of the most important events in living cells for fertilization, cell fusion, endo- and exocytosis, reconstruction of damaged organelles, and cell division. The purpose of this work is to prepare photofusogenic liposomes containing the triphenylmethane derivative and to investigate the liposomes for transdermal delivery sensitive to UVB light. The liposomes encapsulating calcein were prepared for characterization. The encapsulation efficiency and photoinduced release were evaluated from the fluorescence of calcein. The morphology of the liposomes was observed by using transmission electron microscopy. The morphological changes in the liposomes indicated that UVB irradiation induced fusion between the liposomes. NR assay using HaCaT cells showed that the triphenylmethane derivative in the liposomes was almost noncytotoxic up to a concentration of 220 μM . From the observation of LabCyte EPI-Model treated with the liposomes encapsulating calcein, liposomes were permeated into the human skin model. We also found that the UVB irradiation promoted the permeation of the liposomes.

1. 緒言

リポソームは、リン脂質二分子膜から成る数十 nm ～数 μm の大きさの閉鎖小胞体である。化粧品製剤またはドラッグキャリアとして盛んに開発が進められており、リポソームの更なる多機能化が望まれている。ところで膜融合は、リポソームを細胞に作用させる際の重要な現象であり、エンドサイトーシスといった細胞現象とも関係し、内包薬剤を細胞質内に導入させるための重要な役割を果たしている。しかし元来脂質二分子膜は安定であり、膜融合性を持たせるためにタンパク質やペプチドをリポソームに付与すると、それによりリポソーム自身が不安定化してしまうという矛盾が生じる。そこで必要となるのは、標的膜と相互作用するまで安定性を保つ仕組みである。本研究では、外部刺激として紫外線に反応するトリフェニルメタン誘導体を用い光照射でリポソームに膜融合性を誘起させ、このリポソームを用いた照射細胞への薬物送達を行うことを目的とした。過度に紫外線を浴びると表皮はダメージを受け、肌の健康は損なわれてしまう。本研究では、紫外線に反応し薬剤や有効成分を表皮の細胞に届ける仕組みづくりを目指すこと

とした。

これまでに我々は、暗時では脂溶性であるが紫外光照射によってカチオン性界面活性剤となるトリフェニルメタン誘導体 (Fig. 1) を開発し、この分子を脂質膜に僅かに加えるだけで光融合性をリポソームに付与できることを明らかにしている¹⁾。トリフェニルメタン誘導体は親水基がかさ高い界面活性剤となるため、膜融合の中間体安定化に有利な構造を持つと言える²⁾。そこで本研究では、このトリフ

トリフェニルメタン誘導体

疎水性



UV ↓

両親媒性



トリフェニルメタン誘導体含有リポソーム



UV ↓



Fig. 1 トリフェニルメタン誘導体の光イオン化反応と膜融合



Development of photofusogenic liposomes for delivery system

Ryoko Uda

Department of Chemical Engineering,
National Institute of Technology, Nara
College

フェニルメタン誘導体を経皮リポソームに展開し、基礎物性評価に加えて送達システムへの展開を検討した。

2. 方法

2.1. リポソームの調製

リン脂質に非イオン性界面活性剤を加えた経皮性リポソームが報告されており³⁾、この報告を基に本研究のリポソームを調製した。まず卵黄レシチン(最終濃度0.112M)、Tween(最終濃度13.1g/L)、トリフェニルメタン誘導体を含む薄膜を作製した。これにPBS緩衝液(pH7.4)を加えて懸濁させ、超音波処理を行い、孔径100nmのフィルターを装着したエクストルーダーを用いた処理を経てリポソームを調製した。内包や放出実験には、200 μ Mカルセインを含むPBS緩衝液を用いて調製し、透析によって内包されなかった物質を除去した。内包率は、透析後のリポソーム50 μ Lに950 μ LのPBSと界面活性剤であるdodecyl trimethyl ammonium chlorideを0.2g加えて完全にリポソームを破壊させ、カルセインの515nmにおける蛍光強度から算出した。測定は独立して調整した3つのリポソームについて行い、結果は平均値 \pm 標準偏差で示した。ただしトリフェニルメタン誘導体の割合が高く調製が困難であったリポソームに関しては、1回分のデータを示した。

2.2. 細胞毒性試験

ヒト表皮角化細胞(HaCaT)は、Dulbecco's Modified Eagle Mediumに10%の牛胎児血清とペニシリン、ストレプトマイシンを添加した培地を用い、炭酸インキュベーター(37 $^{\circ}$ C、炭酸濃度5.0%)において培養した。HaCaT細胞に対するサンプルの細胞毒性をNeutral red(NR)取込み法によって評価した。96well細胞培養プレートにHaCaT細胞を 2×10^4 cells/wellの細胞密度で播種し、炭酸インキュベーターで培養を行った。約24時間後、2.1.で得られたリポソームを含む培地に交換し曝露培養を行った。陰性対照群には、10% PBSと0.1% DMSOを含む培地を添加した。24時間後、細胞から培地をアスピレーターで除去し、100 μ LのPBSで1回リンスし33 μ g/mLのNRを含む培地100 μ Lを添加した。炭酸インキュベーターで2時間培養を行い、生細胞にNRを取り込ませた。100 μ LのPBSで2回リンスし、NR抽出液(1%酢酸を含む50%エタノール水溶液)を100 μ Lずつwellに添加して室温で20分間振盪し、生細胞に取り込まれたNRを抽出した。抽出液の570nmの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定して、陰性対照群の細胞生存率を100%とした場合の各試料濃度での細胞生存率を以下の式で求めた。独立した6回の試験を行い、結果は平均値 \pm 標準偏差で示した。

$$\text{細胞生存率(\%)} = \left[\frac{\text{(試料添加群でのOD}_{570})}{\text{(陰性対照群でのOD}_{570})} \right] \times 100$$

2.3. リポソームへの紫外光照射

光源にはUVB(312nm BLX UV tubes, コスモバイオ)を用いた。UVBの照射強度はトプコンUVR-3036/S2を用い305nmにて評価した。調整したリポソーム懸濁液800 μ LにUVBを照射し、そのリポソーム懸濁液を700 μ Lを取り出しこれを内液とし、3mLのPBSを外液として25 $^{\circ}$ Cの恒温槽にて透析を17時間行った。その後外液の515nmにおけるカルセインの蛍光強度から次に従いカルセインの放出率を測定した。測定は独立して調整した3つのリポソームについて行い、結果は平均値 \pm 標準偏差で示した。

$$\text{放出率(\%)} = \left[\frac{\text{(外液中のカルセイン量)}}{\text{(内液のリポソームに含有されたカルセイン量)}} \right] \times 100$$

2.4. クライオ透過電子顕微鏡観察

調製したリポソームをPBSで10倍に希釈したものをサンプルとした。紫外光照射サンプルには、307mJ/cm²のUVBを照射した。クライオ透過電子顕微鏡(JEOL-JEM 2200FS)観察は奈良先端科学技術大学院大学にて実施した。

2.5. 3次元皮膚モデルを用いた浸透試験

3次元皮膚モデルにはLabCyte EPI-MODEL24(J-TEC社製)を用いた。ガラスバイアルにマグネチックスターラーとPBSを19.0mLを入れて培養カップごと皮膚モデルを装着した。32 $^{\circ}$ Cで30分間馴化した後、角層面に2.1.で作製した100 μ Lのリポソーム懸濁液またはカルセイン溶液(濃度はリポソーム内包量に相当)を曝露し32 $^{\circ}$ Cで4時間静置した。その後マイクロピペットでサンプルを除去し、UVB(312nm BLX UV tubes, コスモバイオ)を50mJ/cm²を照射した。その後PBSを20 μ L添加し、32 $^{\circ}$ Cで4時間静置してからPBSで10回洗浄し、培養カップから3次元皮膚モデルを取り出して蛍光顕微鏡にて角層面の観察を行った。また3次元皮膚モデル切片蛍光顕微鏡観察も行った。この3次元皮膚モデル1枚に対してPBS 1.0mLを添加して超音波ホモジナイザーでホモジナイズし、暗所で1時間振とうし、遠心分離を行い上清を回収した。上清200 μ Lをブラックプレートに移して、蛍光(Excitation: 485/20, Emission: 528/20)を測定しカルセイン濃度を求めた。

3. 結果と考察

3.1. リポソームの基礎物性

Fig. 2に含有トリフェニルメタン誘導体濃度を変化させた場合のカルセイン内包率を示す。レシチンに対するトリフェニルメタン誘導体濃度が4mol%以下では内包率にほとんど違いはないが、この濃度を超えると内包率は著しく低下した。また、4mol%を超える濃度のトリフェニルメ

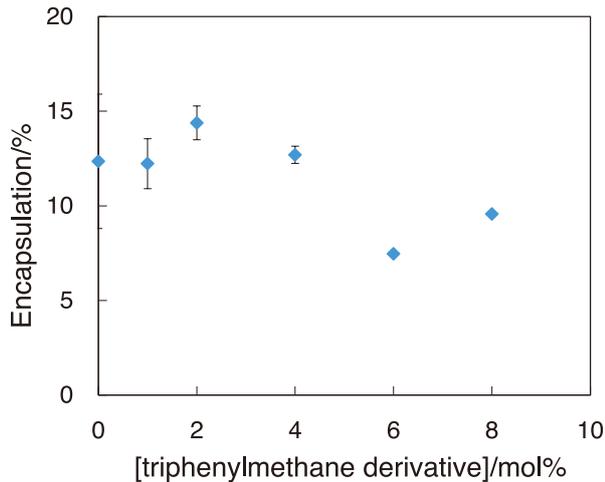


Fig. 2 リポソーム内包率のトリフェニルメタン誘導体濃度依存性
レシチンに対するモル濃度で表記.

タン誘導体を含むリポソームは調整しにくく、内包率算出に至ったリポソームは少なかった。トリフェニルメタン誘導体は暗時では脂溶性物質であるため、リポソーム二分子膜に溶解させる必要がある。トリフェニルメタン誘導体の量が増えると、二分子膜中に収容しきれなくなりリポソーム構造を保つことが困難になったのではないかと考えられる。またこれまでの我々の研究から、膜融合に最適なトリフェニルメタン誘導体濃度は2mol%程度であることを明らかにしている²⁾。そこで以降の実験では、トリフェニルメタン誘導体濃度はレシチンに対して2mol%のリポソームを用いることとした。

次にリポソームを透過型電子顕微鏡にて観察したところ、直径が数十～数百nmの球状リポソームが観察された (Fig. 3)。加えてFig. 3に矢印で示すような、球の一部が窪んだまたは扁平形状のリポソームも観られた。一般的なリポソームは剛直であるが、経皮性リポソームには角層を通過するための弾力性や柔軟性が不可欠である。そのためFig. 3のような変形したリポソームが観られたと考えられる。

作製したリポソームの生体適合性について調べるため、HaCaT細胞を用いた細胞毒性評価を行った。リポソーム自体の細胞毒性は低いと考えられるが、光応答性をもたらすトリフェニルメタン誘導体の評価が必要である。そこで比較のために、トリフェニルメタン誘導体を1%のDMSOを含むPBS緩衝液に溶解させたサンプルについても試験を行った。HaCaT細胞の生存率をFig. 4に示す。1% DMSO溶液中ではトリフェニルメタン誘導体濃度4.5 μ Mの時にHaCaT細胞の生存率は90%であったが、リポソーム中ではトリフェニルメタン誘導体濃度22 μ Mの時に99%となった。トリフェニルメタン誘導体の細胞毒性はリポソームに含有されることで軽減され、本研究で作製したリポソームの細胞毒性はトリフェニルメタン誘導体濃度

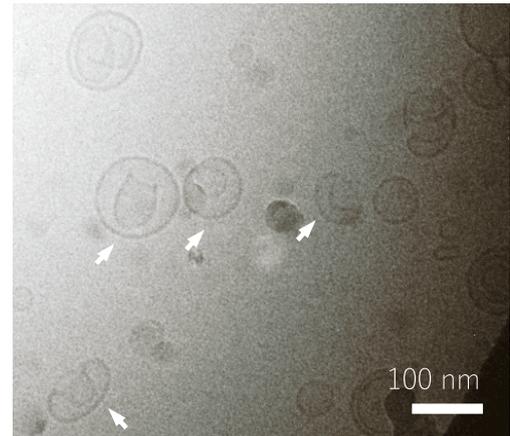


Fig. 3 調整したリポソームの cryo-TEM 像
矢印は変形したものを示す.

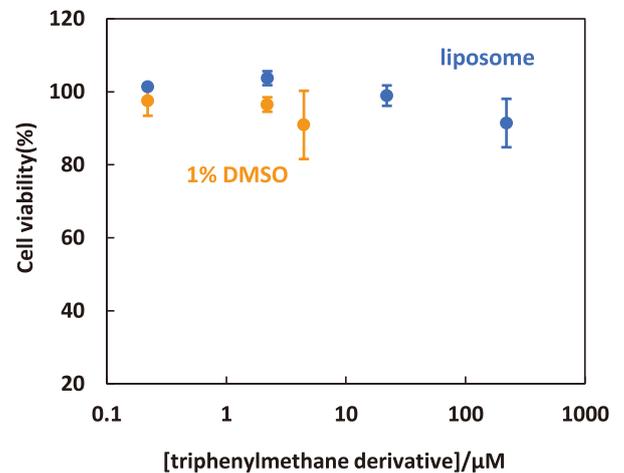


Fig. 4 トリフェニルメタン誘導体曝露時の HaCaT 細胞生存率

220 μ M以下では無視できる程度であることが分かった。

3. 2. 紫外光照射によるリポソームの変化

作製したリポソームの光化学反応について調べるために、UVB照射後の吸収スペクトルを測定した (Fig. 5)。積算光量が増加するとともに450nmと620nm付近の吸収ピーク強度が増大している。これらのピークはイオン化したトリフェニルメタン誘導体由来しており⁴⁾、UVB照射によってトリフェニルメタン誘導体のイオン化反応が促進したことが分かった。

次に内包したカルセインの紫外光照射による放出について検討した。Fig. 6に積算光量に対する放出率依存性を示す。UVB未照射でもリポソームからカルセインが漏出していることが分かる。UVB照射により放出率は増加したが、102mJ/cm²以上で放出率が飽和しており、これ以上照射を行っても放出されるカルセイン量にほとんど違いがないことが分かる。この結果はFig. 5の光イオン化反応が

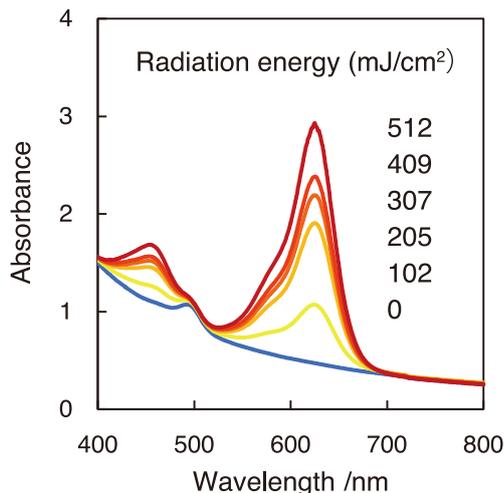


Fig. 5 UVB 照射によるリポソームの吸収スペクトル変化

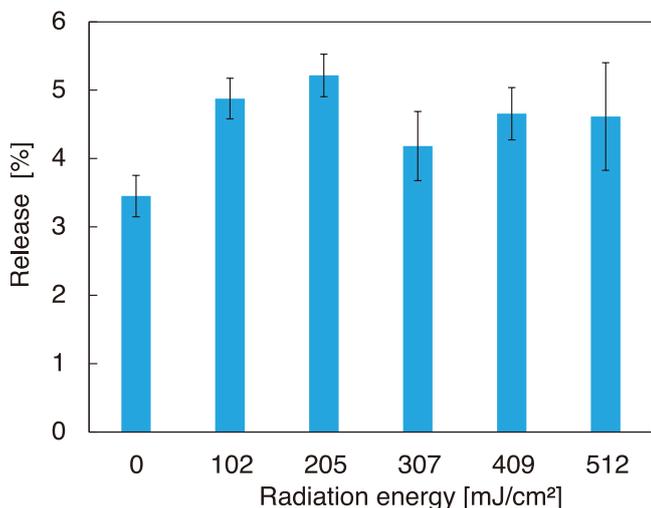


Fig. 6 UVB 照射によるリポソームからの内包カルセインの放出

積算光量に対して明確な依存性を見せたのと対照的である。307mJ/cm²のUVBを照射したリポソームのクライオ電子顕微鏡像をFig. 7に示す。Fig. 3のUVB未照射時に比べると、リポソームサイズが大きくなっていることが分かる。以前我々は、トリフェニルメタン誘導体への紫外光照射が引き起こす膜融合とそれに伴うリポソームのマルチラメラ化や粒子径の増大を報告している⁵⁾。また膜融合時には内包試薬の放出は僅かであることも明らかとした。つまりこれらの結果から、光イオン化反応が促進されているにもかかわらず内包物があまり放出されないのは、膜融合が起こっているためと考えられた。

3. 3. 3次元皮膚モデルを用いたカルセイン内包リポソームの浸透試験

カルセイン内包リポソームを曝露させた3次元皮膚モデルの角層面蛍光強度をFig. 8に示す。リポソーム懸濁液よりカルセイン溶液を曝露した時の方が、カルセイン由来の蛍光強度が高くなっていることが分かる。またリポソーム懸濁液にUVBを照射しても3次元皮膚モデル内のカルセイン濃度に変化は観られなかった。そこで3次元皮膚モデル内のカルセイン濃度を調べた(Fig. 9)。Fig. 8と類

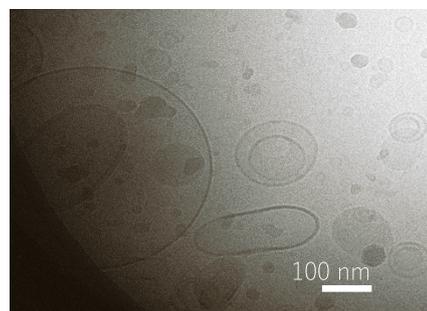


Fig. 7 UVB 照射後のリポソームの cryo-TEM 像

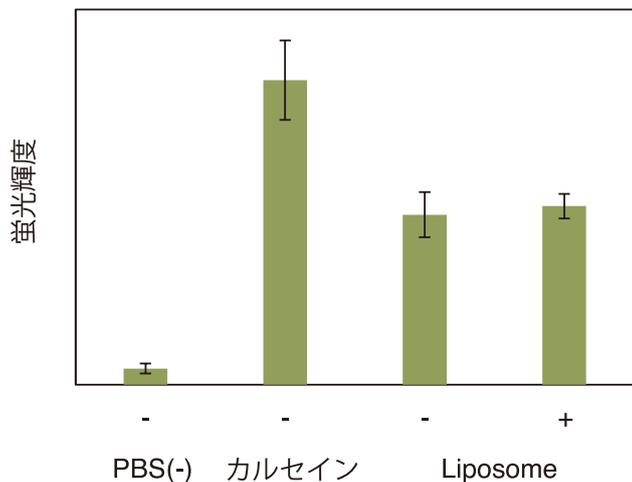


Fig. 8 3次元皮膚モデル角層面の蛍光強度

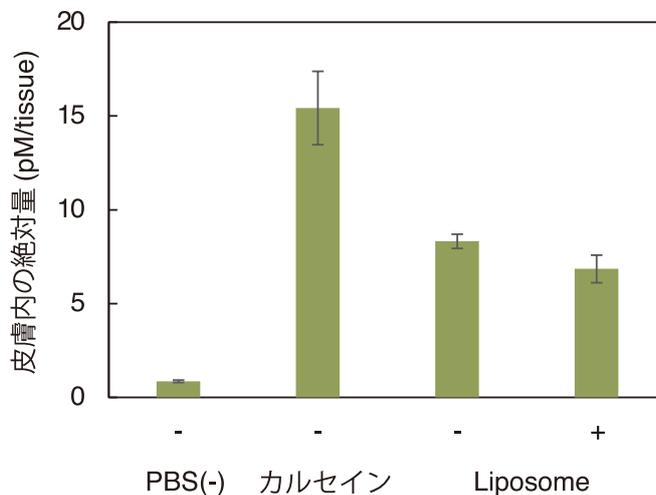


Fig. 9 3次元皮膚モデル内のカルセイン濃度

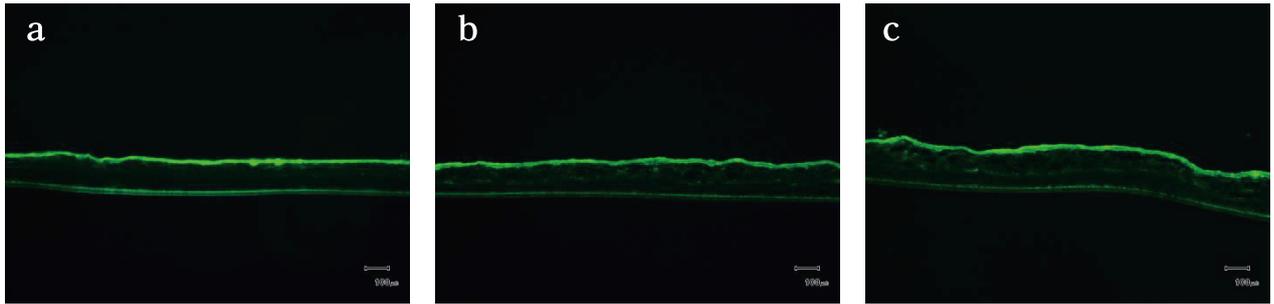


Fig. 10 3次元皮膚モデル切片の蛍光顕微鏡像
a) カルセイン溶液曝露、b) カルセイン内包リポソーム曝露、c) カルセイン内包リポソーム曝露後 UVB を照射

似した結果となり、リポソームやUVB照射の効果は観られなかった。表面に存在するカルセインの影響を受けているためではないかと考え、3次元皮膚モデルの切片観察を行った。カルセイン溶液のみを曝露した場合 (Fig. 10a) は、Fig. 8・9の結果と対応するように3次元皮膚モデル表面に強い蛍光が観察されたが、内部への浸透はあまり観られなかった。それに対し、リポソーム懸濁液を曝露した場合 (Fig. 10b) は3次元皮膚モデル内部でも蛍光が観察された。これより Fig. 3の結果から示される弾力性や柔軟性をもった本研究のリポソームは、3次元皮膚モデルへの浸透性に優れていることが明らかとなった。さらにUVB照射を行った皮膚モデルにおいてはより深部でも蛍光が確認できた (Fig. 10c)。つまり Fig. 8にてカルセイン溶液曝露の蛍光が強く観察されたのは表面に吸着したカルセインに由来しており、リポソームを用いた方が3次元皮膚モデル内部への送達が進められること、さらにUVB照射によってその送達が進められることが示された。

4. 総括

本研究では、紫外光応答型経皮用製剤としての融合性リポソームの開発を目指し、トリフェニルメタン誘導体を含むリポソームを作製しその評価を行った。リポソームには、内包薬剤の皮膚透過を制御し、皮膚中に比較的高濃度で薬剤を留める働きがある。必要となるまでは皮膚の細胞間に薬剤を留めておき外部刺激を受けて薬剤を細胞に届けるリポソームには、医薬品に加えて医薬部外品や化粧品への展開が期待できる。今後は、本研究の紫外線応答型融合性リポソームを更に進展させコスメトロジーの発展に貢献したい。

謝辞

本研究の実施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御礼申し上げます。

(引用文献)

- 1) K. Hayashi, M. Watanabe, T. Iwasaki, M. Shudou, R. M. Uda, Endosomal escape by photo-activated fusion of liposomes containing a malachite green derivative: A novel class of photoresponsive liposomes for drug delivery vehicles, *Photochemical & Photobiological Science* 18, 1471-1478 (2019).
- 2) R. M. Uda, Y. Yoshikawa, M. Kitaba, N. Nishimoto, Irradiation-induced fusion between giant vesicles and photoresponsive large unilamellar vesicles containing malachite green derivative, *Colloids and Surfaces B*, 167, 544-549 (2018).
- 3) Y.-K. Song, C.-K. Kim, Topical delivery of low-molecular-weight heparin with surface-charged flexible liposomes, *Biomaterials* 27, 271-280 (2006).
- 4) R. M. Uda, M. Oue, K. Kimura, Effective photocontrol of micelle formation by malachite green derivative carrying a long alkyl chain, *Chemistry Letters*, 33, 586-587 (2004).
- 5) R. M. Uda, E. Hiraishi, R. Ohnishi, Y. Nakahara, K. Kimura, Morphological changes in vesicles and release of an encapsulated compound triggered by a photoresponsive malachite green leuconitrile derivative, *Langmuir*, 26, 5444-5450 (2010).

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

広島大学大学院先進理工系科学研究科

大山 陽介

In order to elucidate a detection mechanism of photo-induced electron transfer (PET)-type fluorescent sensor for water, we have designed and developed anthracene-(aminomethyl)-4-cyanophenylboronic acid (AminoMeCNPhenylB(OH)₂) **TF-2** by the deprotection of pinacol ester (Pin) of anthracene-AminoMeCNPhenylBPin **OF-2**. For **OF-2** the PET takes place from the nitrogen atom of the Amino moiety to the photoexcited fluorophore (anthracene) skeleton in the absence of water, leading to fluorescence quenching (PET active state). When water was added to **OF-2** solution, a drastic enhancement of the fluorescence emission is observed due to the formation of the PET inactive (fluorescent) species **OF-2W** or **OF-2WH** by interaction with water molecules which has been determined by ¹H NMR spectral measurements. On the other hand, even in the absence of water **TF-2** exhibits intense fluorescence emission and the addition of water to **TF-2** solution shows a negligible change in the fluorescence intensity. The ¹H NMR spectrum of **TF-2** solution without the addition of water clearly indicated the formation of PET inactive (fluorescent) species **TF-2H** by the intramolecular OH⋯N hydrogen bonding between the hydroxyl group of B(OH)₂ moiety and the nitrogen atom of the Amino moiety. For **TF-2** the single-crystal X-ray structural analysis as well as density functional theory (DFT) calculations revealed the existence of the intramolecular OH⋯N hydrogen bonding, that is, the formation of **TF-2H**. Interestingly, the ¹H NMR spectra of **TF-2** solution with the addition of water showed the existence of the PET inactive (fluorescent) species **TF-2W** or **TF-2WH** by interaction with water molecules, as with the cases of **OF-2**. Consequently, it was found that for the PET-type fluorescent sensor based on anthracene-AminoMeCNPhenylBPin structure, the BPin moiety is essential not only to activate the PET in the absence of water, leading to fluorescence quenching, but also to form the PET inactive (fluorescent) species upon the addition of water. This work provides a direction in molecular design toward creating an effective PET-type fluorescent sensor for water as well as a conclusive detection mechanism of anthracene-AminoMeCNPhenylBPin structure for water.

1. 緒言

2019年末に発生し、世界各国へ急速に拡散した新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) は、人々に死の恐怖をもたらす新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) を発症させ、生活に極度の不安とストレスを与えただけでなく、著しい社会経済活動の停滞を招き世界を激変させた。感染性ウイルスは、感染者による咳やくしゃみから発生する飛沫とともに空気中に放出され、非感染者がそのウイルスを含んだ飛沫を鼻や口などから吸い込んで感染する (第一感染経路)。飛沫感染防護用のフェイスシールドやパーティションに付着した飛沫を裸眼で目視することができれば、迅速かつ的確に飛沫を拭き取る (ウイルスを除去する) ことができる。しかしながら、ウイルスを含む飛沫の大きさは5ミクロン以上であるが、実際に飛沫を裸眼で目視することは困難である。一方で、飛沫成分の90%以上が水分であることから、水を可視化する技術や手法は、ウイルスを含む飛沫を検出するための有用な手段である。したがって、水分子を認識

することで蛍光強度が増大する、あるいは蛍光発光波長が変化する蛍光性色素 (蛍光性水センサー) を開発することができれば、試料中や表面の微量水分を迅速、高感度かつリアルタイムで測定できるだけでなく、目視による可視化 (蛍光発光による画像化) も可能な水分検出・可視化材料の創製を図れるものと期待できる¹⁾。

そこで、我々は微量水分を検出・定量・可視化する蛍光性水センサーの分子設計において、蛍光性色素の光誘起電子移動 (Photo-induced Electron Transfer: PET) 特性に着目した。PETとは、光励起された蛍光発光母体とその近傍に存在する電子供与部あるいは電子受容部との間での電子移動過程を意味する²⁾。一般的なPET型蛍光性センサーは、アントラセンなどの蛍光発光母体にスパーサー (メチレン基: -CH₂-など) を挟んでアミノ基のような電子供与部兼カチオン結合部位 (レセプター) で構成される“蛍光発光母体-スパーサー-レセプター”構造である。すなわち、PET型蛍光性センサーを分子設計する上で重要なポイントとして、PETを発現させるためには、蛍光発光母体と電子供与部の間にスパーサーを導入することが必要である。PETに基づいたカチオン種の検出メカニズムをFig. 1に示す。カチオン種が存在しないFig. 1aの場合、電子供与部位 (アミノ基) から光励起された蛍光発光母体へと電子が移動し、蛍光発光を示さない (PET活性状態)。一方、カチオン種が存在するFig. 1bの場合、カチオン種が付加した電子供与部位 (アミノ基) から光励起蛍光発光母体のアン



Development of fluorescent materials for visualization and detection of a trace amount of water in products

Yousuke Ooyama

Graduate School of Advanced Science and Engineering, Hiroshima University

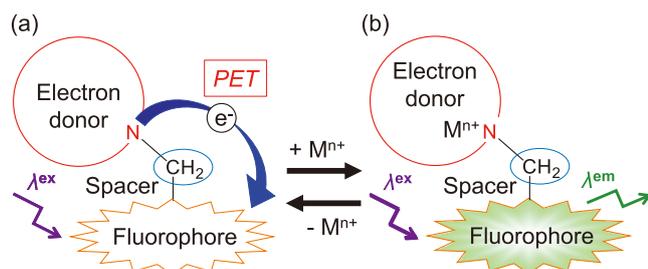


Fig. 1 Mechanisms of PET-type fluorescent sensors for detection of cations: (a) PET active state (non fluorescence) and (b) PET inactive state (fluorescence).

トラセンへと電子が移動することができず、その結果として、光励起蛍光発光母体が基底状態へと失活する際に蛍光発光を示す(PET不活性状態)。

これまでに我々は、溶媒中の微量水分を検出・定量化かつ可視化できるPET型蛍光性水センサーとして、アントラセン-(アミノメチル)-4-シアノフェニルボロン酸ピナコールエステル(Anthracene-AminoMeCNPhenylBPin)構造のOF-2を分子設計・合成し、PET活性状態(無蛍光性)のOF-2が水分子と接触することでPET不活性状態(蛍光性)のOF-2WあるいはOF-2WHを形成することを明らかにした(Fig. 2a)。すなわち、無蛍光性のOF-2溶液に水を添加すると蛍光性のOF-2WあるいはOF-2WH溶液へと変化し、その後除水することで無蛍光性のOF-2溶液に戻る可逆な蛍光スイッチング特性を示す。さらに、OF-2の水分検出限界(DL)は0.008wt%と低く、電気化学分析のカール・フィッシャー法のDL値に匹敵しており、OF-2は蛍光増強システムに基づいた微量水分検出用蛍光性水センサーとして機能することを実証した³⁻⁶。そこで本研究では、Anthracene-AminoMeCNPhenylBPin構造を有す

るPET型蛍光性水センサーのセンシングメカニズムを徹底的に解明し、得られた知見に基づいて蛍光性水センサー材料を創製することを目的として、OF-2のボロン酸エステル(BPin)をボロン酸(B(OH)₂)に変換したAnthracene-AminoMeCNPhenylB(OH)₂構造のTF-2(Fig. 2b)を分子設計・合成し、水分に対する蛍光センシング特性を調査した⁷。

2. 方法

2.1. TF-2の合成

OF-2(0.100g, 0.216mmol)のエタノール(12mL)/水(4mL)溶液を室温で4日間暗所に放置した。反応混合物を濾過して、TF-2(0.055g, 収率67%)を白色固体として得た。TF-2の生成は、FT-IR、¹Hと¹³C NMR測定およびHRMS分析から確認した。

2.2. TF-2の単結晶作製

TF-2の単結晶は、25%(v/v)アセトニトリル/水混合溶媒に溶解させたOF-2溶液を室温で数日間暗所に静置することでピナコールエステルの脱保護を経て、無色のブロック結晶として得ることができた。

3. 結果

3.1. TF-2の単結晶X線構造解析

TF-2の単結晶X線構造解析から、TF-2のホウ素(B)原子と窒素(N)原子間の原子間距離は3.294Åであり、これは通常のB-N結合長^{8,9}の1.57-2.91Åよりも著しく長いことからTF-2ではB-N結合の形成は見られない。一方、B(OH)₂の水酸(OH)基とアミノ部位の窒素原子間で分子内OH...N水素結合(O(2)H(2)...N(1)角度=169°, O(2)

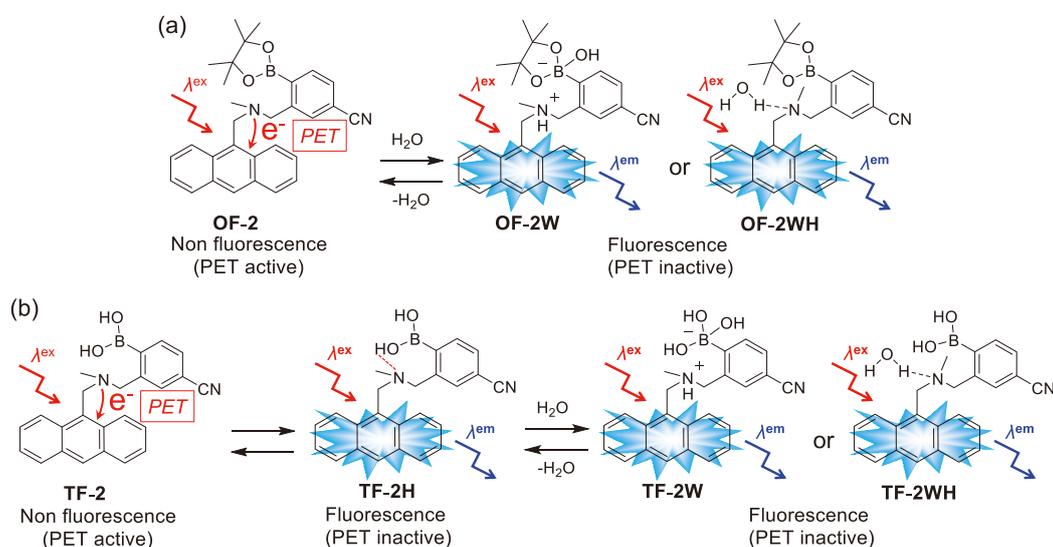


Fig. 2 Mechanisms of (a) PET-type fluorescent sensor OF-2 and (b) TF-2 for detection of water in organic solvents.

$\cdots\text{N}(1)$ 距離 = 2.703 Å) を形成して **TF-2H** の状態で存在することがわかった (Fig. 3a)。さらに、隣接する **TF-2** 分子は、 $\text{B}(\text{OH})_2$ の OH 基とシアノ (CN) 基の窒素原子間で分子間 $\text{OH}\cdots\text{N}$ 水素結合 ($\text{O}(1)\text{H}(1)\cdots\text{N}(2)^*$ 角度 = 168°, $\text{O}(1)\cdots\text{N}(2)^*$ 距離 = 2.883 Å) により連結した一次元分子鎖を構築していた (Fig. 4)。B3LYP/6-31G (d, p) レベルでの密度汎関数理論 (Density Functional Theo: DFT) 計算から、**TF-2** および **OF-2** のホウ素原子と窒素原子間の原子間距離はそれぞれ 3.329 Å と 3.224 Å であり (Fig. 3b, c)、さらに **TF-2** では、分子内 $\text{OH}\cdots\text{N}$ 水素結合 ($\text{O}(2)\text{H}(2)\cdots\text{N}(1)$ 角度 = 159°, $\text{O}(2)\cdots\text{N}(1)$ 距離 = 2.724 Å) の形成が示唆された。これらの結果から、**TF-2** と **OF-2** の両方において B-N 結合は形成されておらず、一方で、**TF-2** では分子内 $\text{OH}\cdots\text{N}$ 水素結合を形成していることが明らかとなった。

3.2. TF-2 の水に対する蛍光センシング特性

TF-2 の水に対する光学センシング特性は、低極性のテトラヒドロフラン (THF) および高極性のアセトニトリルおよびエタノールを用いて、様々な水分濃度 (10 wt% 以下の含水量領域) の **TF-2** 溶液中の光吸収および蛍光スペクトル測定から調査した (Figs. 5-7)。**OF-2** の場合と同様に (Fig. 5a)、使用した 3 つ全ての溶媒において、**TF-2** の光吸収スペクトルでは、300 ~ 400 nm にアントラセン骨格由来の振動構造を有する光吸収帯を示し、水分濃度の増大に伴い吸光度とスペクトルの形状にほとんど変化は見られなかった (Figs. 5c, 6a, 7a)。一方、溶媒中の水に対する **TF-2** の蛍光センシング特性は、**OF-2** の場合とは全く異なっていた。無水アセトニトリルおよび THF 中の **OF-2** の蛍光スペクトルでは、PET 活性状態のアントラセン骨

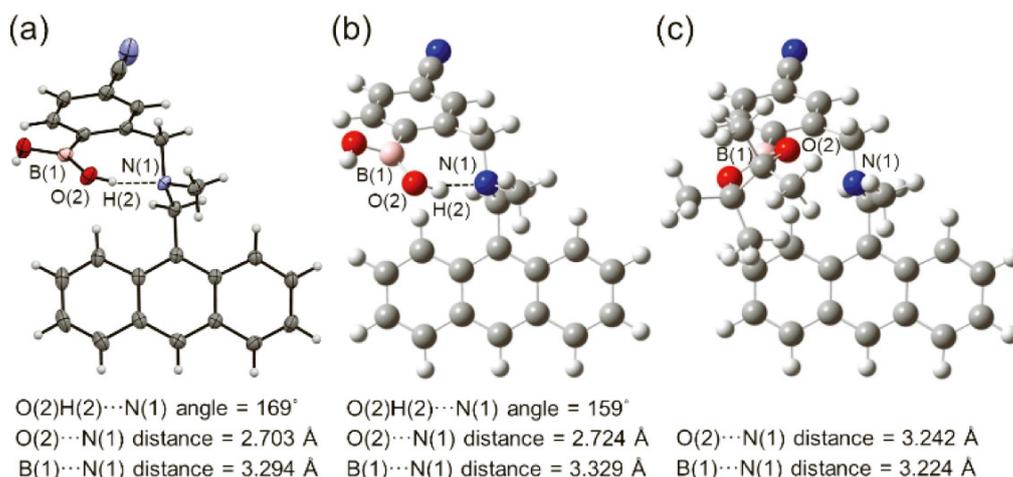


Fig. 3 (a) Crystal structure of **TF-2** and optimized geometries of (b) **TF-2** and (c) **OF-2** derived from DFT calculations at the B3LYP/6-31G (d, p) level.

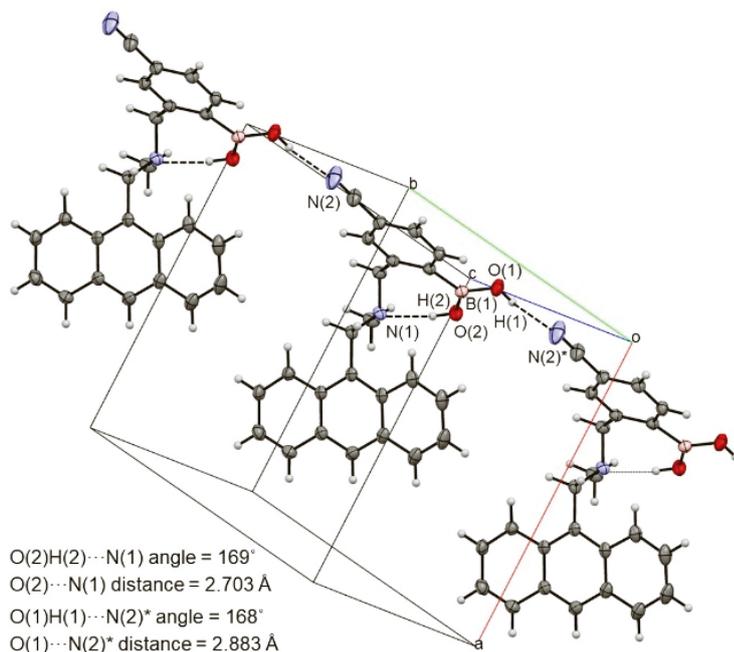


Fig. 4 Crystal packing and hydrogen bonding patterns of **TF-2**.

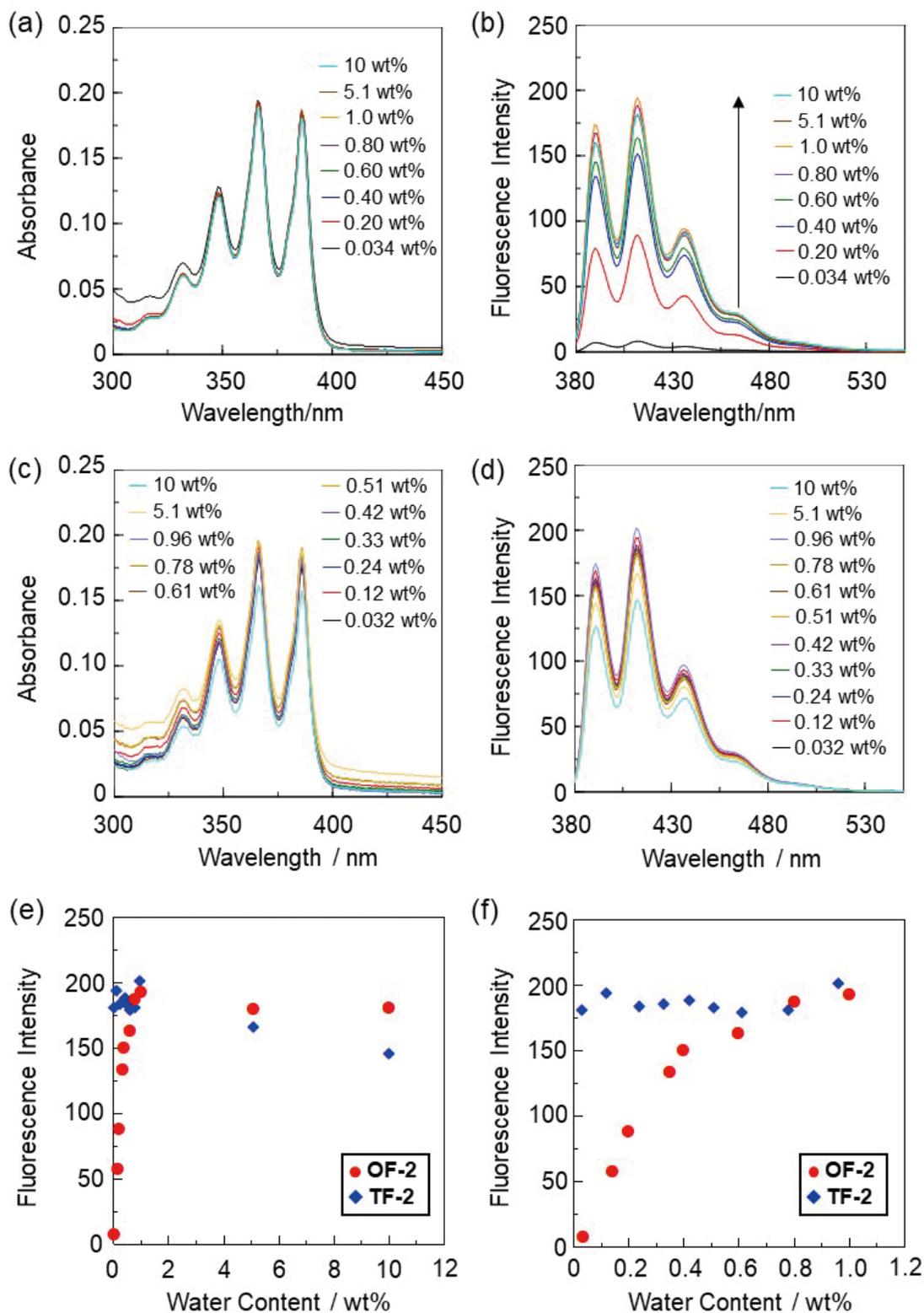


Fig. 5 (a) Photoabsorption and (b) fluorescence spectra ($\lambda^{\text{ex}}=366\text{nm}$) of OF-2 ($2.0 \times 10^{-5}\text{M}$) in acetonitrile containing water (0.034–10wt%). (c) Photoabsorption and (d) fluorescence spectra ($\lambda^{\text{ex}}=366\text{nm}$) of TF-2 ($2.0 \times 10^{-5}\text{M}$) in acetonitrile containing water (0.032–10wt%). Fluorescence peak intensity at around 415–420nm of OF-2 and TF-2 ($\lambda^{\text{ex}}=366\text{nm}$) as a function of water content below (e) 10wt% and (f) 1.0wt% in acetonitrile.

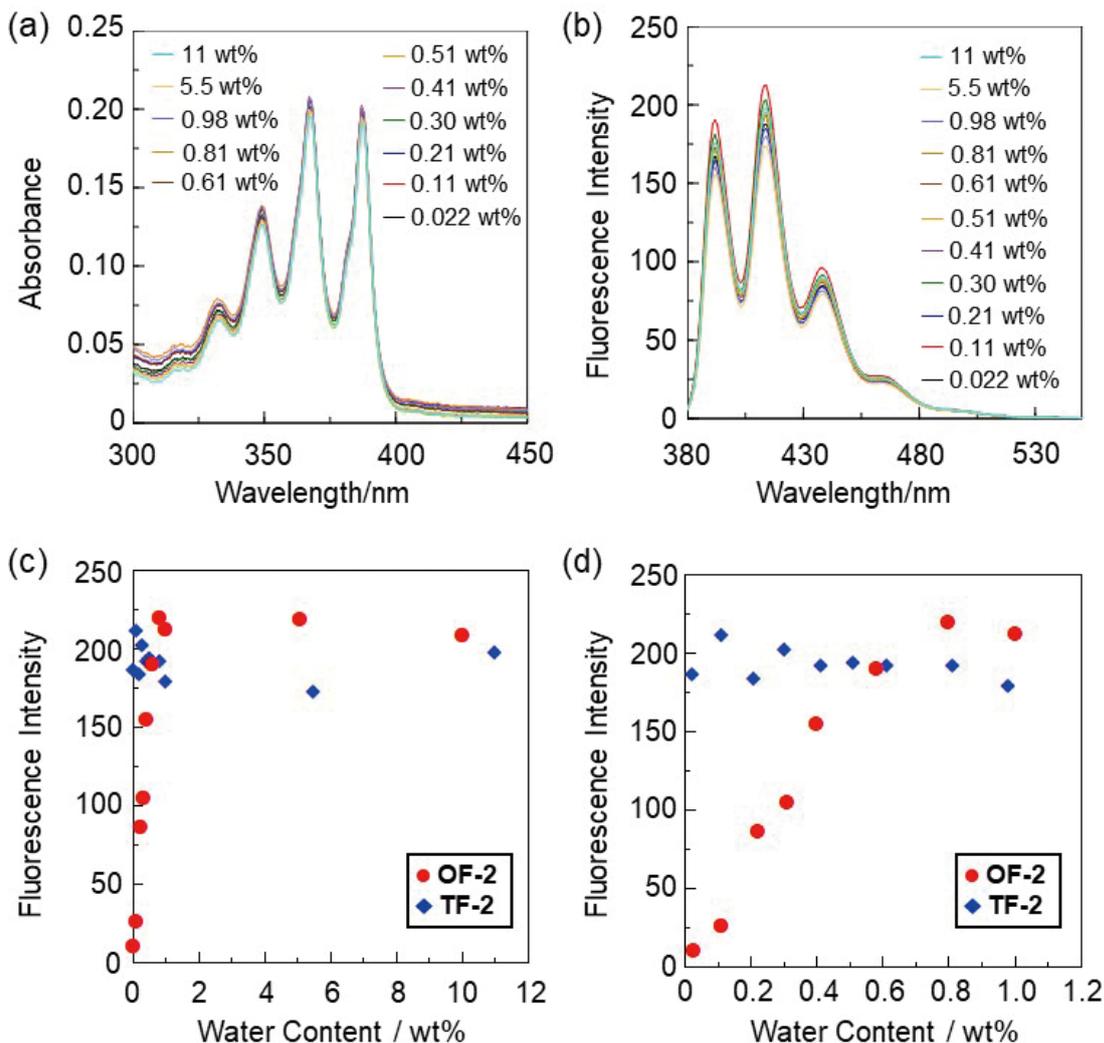


Fig. 6 (a) Photoabsorption and (b) fluorescence spectra ($\lambda^{\text{ex}}=366\text{nm}$) of TF-2 ($2.0 \times 10^{-5}\text{M}$) in THF containing water (0.022–11wt%). Fluorescence peak intensity at around 415–420nm of OF-2 and TF-2 ($\lambda^{\text{ex}}=366\text{nm}$) as a function of water content below (c) 11wt% and (d) 1.0wt% in THF.

格に由来する振動構造を有する微弱な蛍光発光帯が400～500 nm(蛍光極大波長 $\lambda^{\text{fl}}_{\text{max}}$ = 約420 nm)に出現した(Figs. 5b)。OF-2溶液の水分濃度の増加に伴い、水分子との相互作用によるPET不活性種OF-2WまたはOF-2WHを形成($^1\text{H NMR}$ 測定から確認)することで(Figs. 2a)、アントラセン骨格に由来する蛍光発光帯の強度の著しい増大が観察された。OF-2の水分量にする最大蛍光強度($\lambda^{\text{fl}}_{\text{max}}$ = 約420nm)のプロットから、1.0wt%以下の低水分領域では水分含有量の増加に伴って蛍光強度がほぼ直線的に増加することがわかった(Figs. 5f, 6d)。実際に、アセトニトリルとTHFのプロットは、ほぼ原点を通る直線であり、水分含有量が1.0wt%になると蛍光強度は飽和に達した(Figs. 5e, 6c)。一方、無水エタノール中のOF-2の蛍光強度は、無水アセトニトリルおよびTHF中での蛍光強度よりも強い(Figs. 7c, d)。これは、エタノール分子との分子間OH \cdots N水素結合によるOF-2EtOHの形成によるPET

抑制に起因していると考えられる。

一方、TF-2は、無水THF、アセトニトリル、エタノール(それぞれ含水量が0.034wt%、0.022wt%、0.045wt%)中のすべてにおいて、アントラセン骨格に由来する振動構造を有する強い蛍光発光帯($\lambda^{\text{fl}}_{\text{max}}$ = 約415nm)を示す。無水エタノール中のTF-2の蛍光強度は、無水アセトニトリルおよびTHFに比べて比較的弱く、無水エタノール中のOF-2の蛍光強度と同程度であった(Figs. 5d, 6b, 7b)。ここで特記すべきは、無水アセトニトリルまたはTHF中のTF-2の蛍光強度が、水分含有量1.0wt%のアセトニトリルまたはTHF中のOF-2の蛍光強度に匹敵することである(Figs. 5f, 6d)。さらに、TH-2において、アセトニトリルおよびTHF中の水に対する蛍光応答性が弱いのは対照的に、エタノール中では1.0wt%以下の低水分領域において水分含有量の増加に伴い蛍光強度が著しく増大した。このTF-2のエタノール中での蛍光発光挙動は、OF-2に

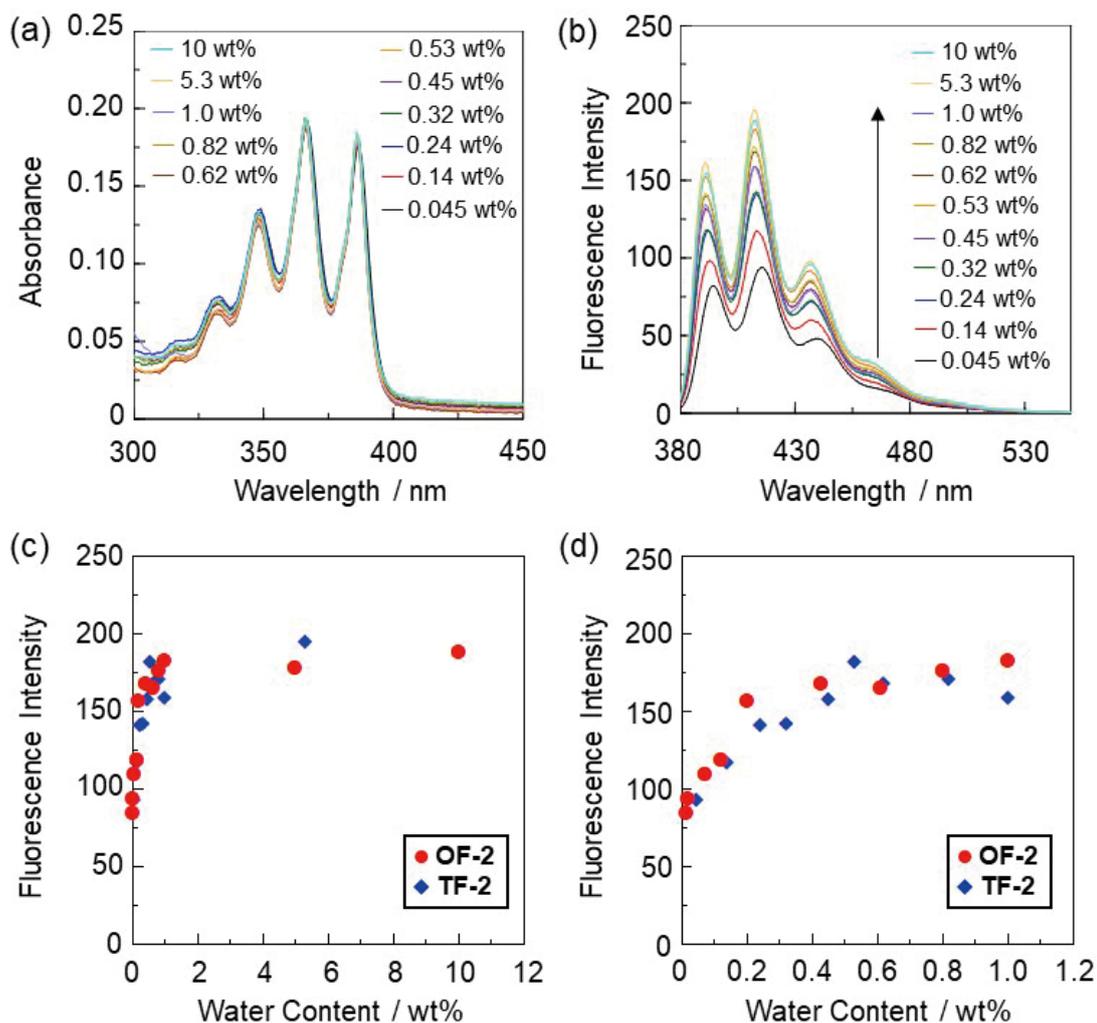


Fig. 7 (a) Photoabsorption and (b) fluorescence spectra ($\lambda^{\text{ex}}=366\text{nm}$) of TF-2 ($2.0 \times 10^{-5}\text{M}$) in ethanol containing water (0.045–10wt%). Fluorescence peak intensity at around 415–420nm of OF-2 and TF-2 ($\lambda^{\text{ex}}=366\text{nm}$) as a function of water content below (c) 10wt% and (d) 1.0wt% in ethanol.

において観察されたものとよく似ている。実際に、無水アセトニトリル中のTF-2の蛍光量子収率(Φ_f)は19%であり、無水アセトニトリル中のOF-2の Φ_f 値(<2.0%)よりも著しく高い。一方、含水量1.0wt%のアセトニトリル中でのOF-2とTF-2の Φ_f 値は、それぞれ13%と14%であり同程度であった。これらの結果は、無水非プロトン性溶媒中ではTF-2H、水分含有溶媒中ではTF-2WまたはTF-2WH、エタノール中ではTF-2EtOHなどのPET不活性(蛍光発光性)体を形成しており、さらに、TF-2WまたはTF-2WHはTF-2EtOHに比べてPETを効果的に抑制していることを強く示唆している(Fig. 2b)。

分子内水素結合と分子間水素結合間での変化がTF-2の蛍光発光特性に及ぼす影響をさらに調査するために、アセトニトリルとエタノールの混合溶媒中におけるTF-2の光吸収と蛍光スペクトル測定を行った。混合溶媒中のエタノール含有量の増加に伴い吸収スペクトルは殆ど変化しない

が(Fig. 8a)、対応する蛍光スペクトルでは蛍光強度の減少が見られた(Fig. 8b)。エタノール含有量に対する最大蛍光強度($\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}}=$ 約415nm)のプロットから、混合溶媒中のエタノール含有量が50wt%に達すると蛍光強度が飽和することがわかった(Fig. 8b inset)。したがって、TF-2の光吸収および蛍光スペクトル測定ならびに単結晶X線構造解析から、エタノールと分子間水素結合を形成したTF-2EtOHに比べて、分子内水素結合を形成したTF-2HのほうがPETを効果的に抑制し、一方で、TF-2HのPET抑制の程度は、水分子との相互作用により形成されるPET不活性種TF-2WまたはTF-2WHと同程度あることが明らかとなった。

TF-2のPET特性と蛍光発光特性との関係をさらに明らかにするために、酸としてトリフルオロ酢酸(CF_3COOH)および塩基としてトリエチルアミン($\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$)を添加したOF-2およびOF-2のアセトニトリル溶液の光吸収と蛍

光スペクトル測定を行った (Fig. 9)。TF-2 溶液の光吸収スペクトルは、N(C₂H₅)₃ を添加しても殆ど変化しないが、CF₃COOH を添加すると吸光度が減少した (Fig. 9a)。対応する蛍光スペクトルでは、TF-2 溶液に CF₃COOH を添加すると蛍光強度の著しい増大が引き起こされ、一方で、N(C₂H₅)₃ の添加では蛍光強度の劇的な減少が観測された (Fig. 9b)。実際に、CF₃COOH を添加した TF-2 のアセトニトリル溶液の ϕ_f 値 (47%) は、TF-2 の中性アセトニトリル溶液 (含水量 0.034wt%) の ϕ_f 値 (19%) よりも高く、一方で、N(C₂H₅)₃ を添加した TF-2 のアセトニトリル溶液の ϕ_f 値は 2.0% 未満であった。したがって、これらの結果は、TF-2 溶液への CF₃COOH の添加に伴う蛍光強

度の増大は、アミノ部位がプロトン化された PET 不活性種 TF-2P の形成に起因していることを示唆している。一方、N(C₂H₅)₃ を TF-2 溶液に添加すると、B(OH)₂ とアミノ部位間の分子内 OH...N 水素結合が解離し、PET 活性種 TF-2 が形成される。TF-2 における CF₃COOH によるアミノ部位のプロトン化と N(C₂H₅)₃ による分子内水素結合の解離を支持する他の実験結果として、OF-2 のアセトニトリル溶液に CF₃COOH を添加すると著しい蛍光強度の増大が観測されたことから、アミノ部位がプロトン化された PET 不活性種 OF-2P の形成が示唆され、一方で、N(C₂H₅)₃ を添加した場合には蛍光強度の顕著な変化は観測されなかった。この結果は明らかに、B(OH)₂ を有してい

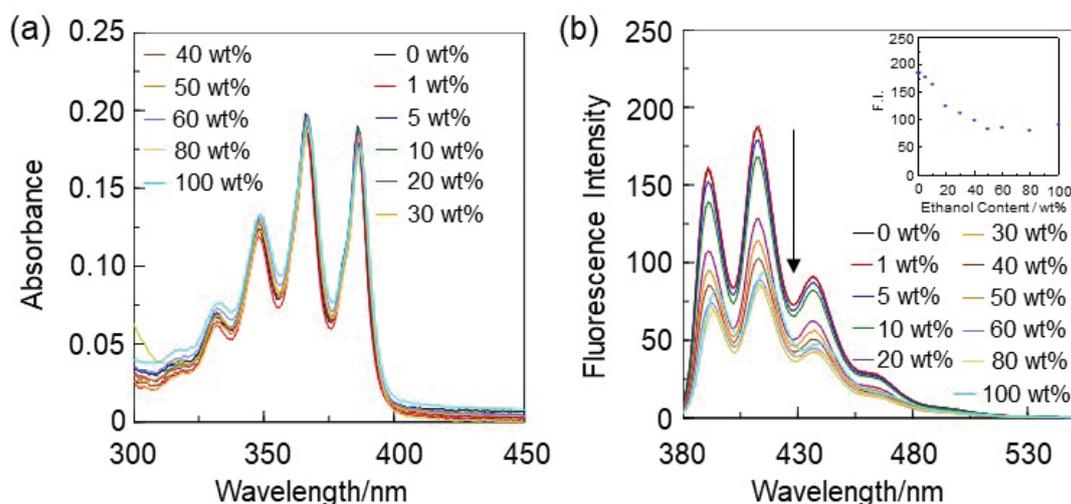


Fig. 8 (a) Photoabsorption and (b) fluorescence spectra ($\lambda^{ex}=366\text{nm}$) of TF-2 ($2.0 \times 10^{-5}\text{M}$) in a mixture of acetonitrile and ethanol (0-100wt% for ethanol content) ; the inset in (b) shows the fluorescence peak intensity at around 415nm of TF-2 ($\lambda^{ex}=366\text{nm}$) as a function of ethanol content in a mixture of acetonitrile and ethanol.

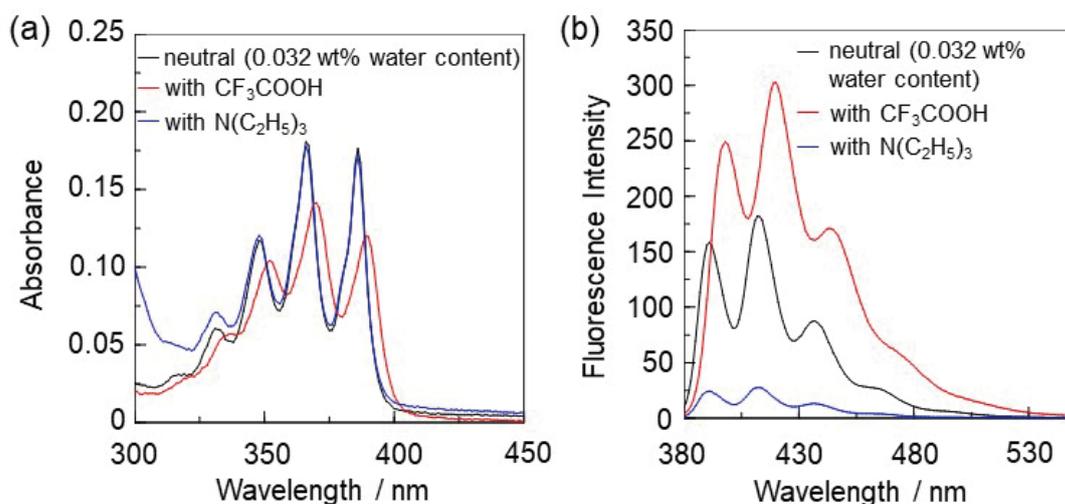


Fig. 9 (a) Photoabsorption and (b) fluorescence spectra ($\lambda^{ex}=366\text{nm}$) of TF-2 ($2.0 \times 10^{-5}\text{M}$) in neutral acetonitrile (0.032wt% water content) and in acetonitrile containing trifluoroacetic acid (0.2M) or triethylamine 0.2M).

ない **OF-2** が分子内 OH...N 水素結合を形成できない事実
起因している。

3.3. ^1H NMR スペクトル測定による様々な条件 での **TF-2** 化学種の同定

様々な溶液中における **TF-2** の化学種を確定するために、**TF-2** の ^1H NMR スペクトル測定を水添加前後のアセトニトリル- d_3 中、THF- d_8 中、およびエタノール- d_6 中、アセトニトリル- d_3 とエタノール- d_6 の 50/50wt% 混合溶媒

中、 CF_3COOH または $\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$ を添加したアセトニトリル- d_3 中で行った (Figs. 10, 11)。 **OF-2** の場合と比較して、水を添加しないアセトニトリル- d_3 (含水量 0.013wt%) 中での **TF-2** の ^1H NMR スペクトルにおいて、フェニル基の H_k 、アントラセン骨格の H_d およびメチレンの H_c のシグナルの低磁場シフトとアントラセン骨格の H_e および H_g のシグナルの高磁場シフトが観測された (Fig. 10a)。特に、メチレンの H_c のシグナルの顕著な低磁場シフトは、 $\text{B}(\text{OH})_2$ の OH 基と窒素原子間で分子内 OH...N 水素結合を形成して

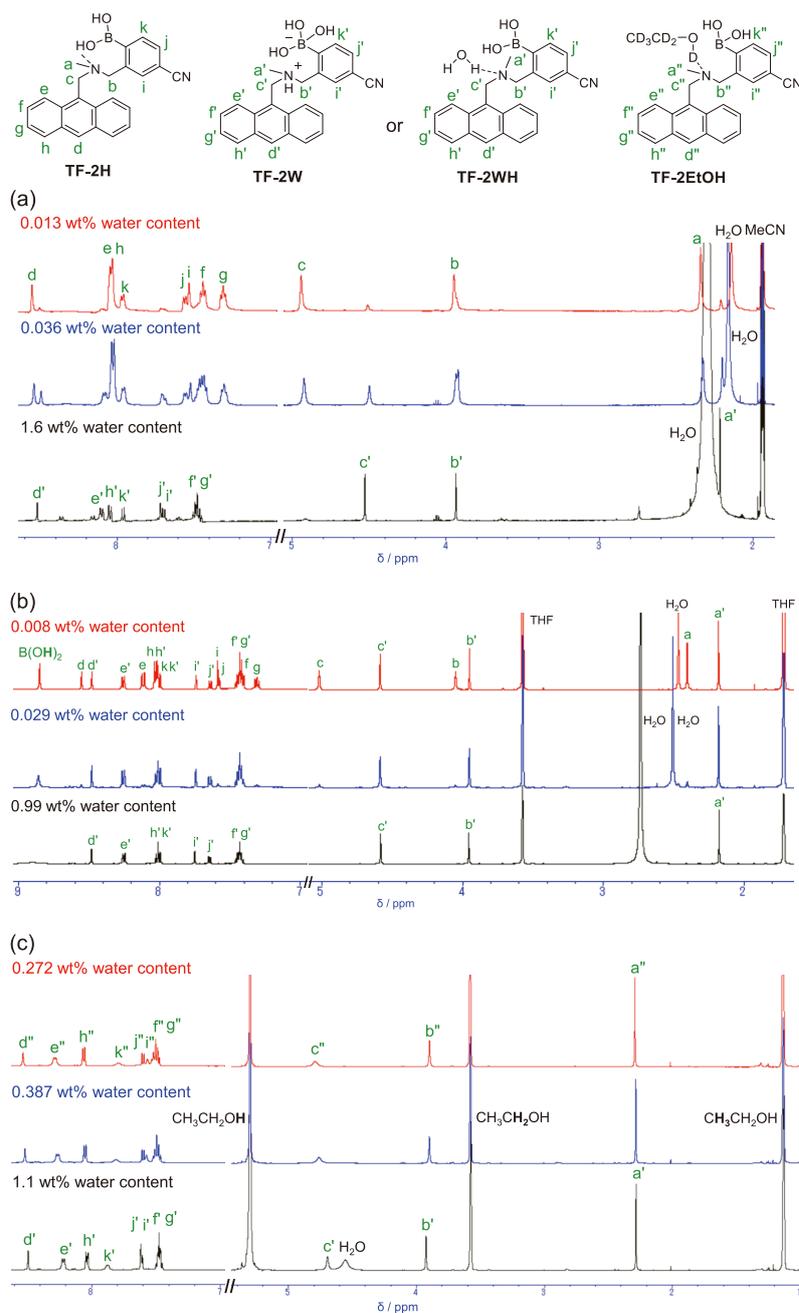


Fig. 10 ^1H NMR spectra of **TF-2** ($2.0 \times 10^{-2}\text{M}$) in (a) acetonitrile- d_3 with 0.013wt%, 0.036wt% and 1.6wt% water content, (b) THF- d_8 with 0.008wt%, 0.029wt% and 0.99wt% water content, and (c) ethanol- d_6 with 0.272wt%, 0.387wt% and 1.1wt% water content.

いる化学種 **TF-2H** が存在していることを示している。このことは、**TF-2** の単結晶 X 線構造解析からも示唆されている (Fig. 3a)。B(OH)₂ のプロトンのシグナルは、水を添加しないアセトニトリル-*d*₃ 中での **TF-2** の ¹H NMR スペクトルでは観察されなかった。この結果は、単結晶 X 線構造解析からの B(OH)₂ と隣接分子の CN 基間で分子間 OH...N 水素結合を形成している事実を考慮すると (Fig. 4)、分子内 OH...N 水素結合だけでなく、**TF-2** の B(OH)₂ とアセトニトリル溶媒の CN 基間での分子間 OH...N 水素結合の形成に起因していると考えられる。

興味深いことに、含水量が 0.036 wt% のアセトニトリル-*d*₃ 中での **TF-2** の ¹H NMR スペクトルにおいて、水を添加しない場合と比較して、脂肪族領域と芳香族領域の両方でいくつかの追加のシグナルが観測され、**TF-2H** だけでなく他の化学種の存在が示唆された。さらに、含有量が 1.6 wt% のアセトニトリル-*d*₃ 中での **TF-2** の ¹H NMR スペクトルでは、水を添加しない場合と比較して、アントラセン骨格の H_d、メチルとメチレンの H_a および H_c のシグナルは高磁場シフトを示し、フェニル基の H_i と H_j およびアントラセン骨格の H_g のシグナルは低磁場シフトを示した。実際に、水を添加したアセトニトリル-*d*₃ 中での **TF-2** の ¹H NMR スペクトルは、水を添加したアセトニトリル-*d*₃ 中での **OF-2** の ¹H NMR スペクトルと非常によく似ており、この結果は水分子との相互作用による PET 不活性種 **TF-2W** または **TF-2WH** の形成を示唆している (Fig. 2b)。

一方、特記すべきは、**TH-2** の B(OH)₂ のプロトンのシグナルが、水を添加していない THF-*d*₈ (含水量 0.008 wt%) 中の **TF-2** の ¹H NMR スペクトルにおいて観

察されたことである (Fig. 10b)。これは、アセトニトリル-*d*₃ 中での **TF-2** の場合とは異なり、B(OH)₂ と THF 分子との相互作用が存在していないことに起因していると考えられる。一方、Yatsimirsky らは、DMSO-*d*₆ などの極性溶媒中においても、分子内 OH...N 水素結合を形成した B(OH)₂ のプロトンに対するシグナルが観測されており、その結果として PET の抑制を引き起こすことを報告している¹⁰⁾。この事実は、無水の THF-*d*₈ 中においては **TF-2H** が存在していることを示唆している。アセトニトリル-*d*₃ 中での **TF-2** の場合と同様に、**TF-2** の THF-*d*₈ 溶液に水を添加すると、脂肪族および芳香族プロトンのシグナルのシフトと B(OH)₂ のプロトンのシグナルの消失が観測され、この結果は、**TF-2W** または **TF-2WH** が生成したことを示している。

水を添加していないエタノール-*d*₆ (含水量 0.272 wt%) 中での **TF-2** の ¹H NMR スペクトルでは、水を添加しないアセトニトリル-*d*₃ 中での **TF-2** の場合と比較して、フェニル基の H_k とメチレンの H_c のシグナルは高磁場シフトを示し、アントラセン骨格の H_e と H_g のシグナルは低磁場シフトを示した (Fig. 10c)。この結果は、エタノール分子の OH 基と **TF-2** のアミノ部位の窒素原子間での分子間 OH...N 水素結合による PET 不活性種 **TF-2EtOH** の形成を示唆している。一方、B(OH)₂ のプロトンのシグナルは、水を添加しないエタノール-*d*₆ 中の **TF-2** の ¹H NMR スペクトルでは観察されなかった。これは、**TF-2** の B(OH)₂ とエタノール分子間での分子間 BOH...O 水素結合の形成によるものと考えられる。一方、含水量が 1.1 wt% のエタノール-*d*₆ 中の **TF-2** の ¹H NMR スペクトル

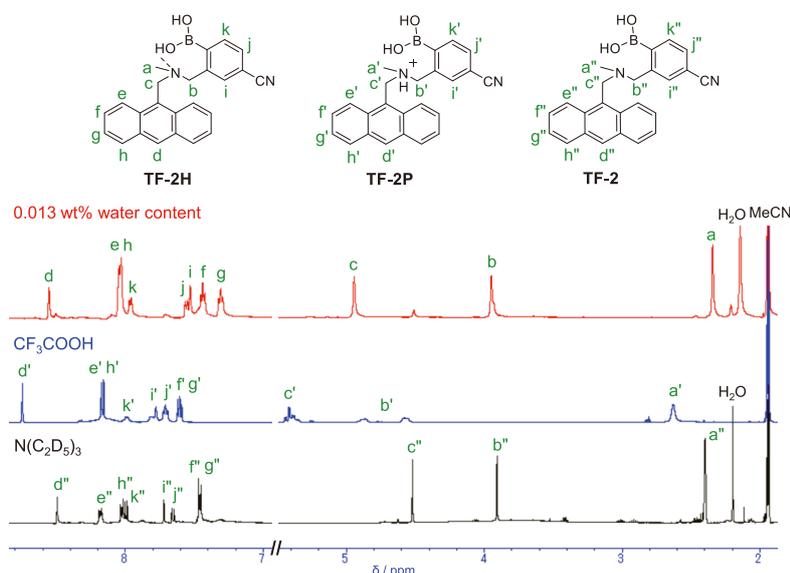


Fig. 11 ¹H NMR spectra of **TF-2** (2.0×10^{-2} M) in acetonitrile-*d*₃ with 0.013 wt% water content, CF₃COOH (2.0 M), and N(C₂D₅)₃ (2.0M).

の化学シフトは水を添加しない場合とはわずかに異なっており、この結果から水分子との相互作用によるPET不活性種 **TF-2W** または **TF-2WH** の形成が示唆される。興味深いことに、アセトニトリル- d_3 とエタノール- d_6 の 50/50wt% 混合溶媒中の **TF-2** の ^1H NMR スペクトルは、水を添加していないエタノール- d_6 の場合と似ており、このことは、**TF-2** のアセトニトリル溶液にエタノールを添加すると、分子内 $\text{OH}\cdots\text{N}$ 水素結合から分子間 $\text{OH}\cdots\text{N}$ 水素結合への変化、すなわち **TF-2H** から **TF-2EtOH** への変化が引き起こされることを示している。

一方、**TF-2** のアセトニトリル- d_3 溶液に CF_3COOH を添加すると、 ^1H NMR スペクトルのすべてのプロトンのシグナルが低磁場シフトした。これは、アミノ部位がプロトン化されたPET不活性種 **TF-2P** の形成に起因している (Fig. 11)。一方、**TF-2** のアセトニトリル- d_3 溶液に $\text{N}(\text{C}_2\text{D}_5)_3$ を添加した場合、 ^1H NMR スペクトルのすべてのプロトンのシグナルが高磁場シフトした。この結果は、**TF-2** 溶液に $\text{N}(\text{C}_2\text{D}_5)_3$ のような塩基を添加すると、**TF-2** の $\text{B}(\text{OH})_2$ とアミノ部位の窒素原子間での分子内 $\text{OH}\cdots\text{N}$ 水素結合が解離し、PET活性種 **TF-2** が形成していることを示唆している (Fig. 2b)。実際に、水、 CF_3COOH または $\text{N}(\text{C}_2\text{D}_5)_3$ の添加前後の **TF-2** 溶液の ^1H NMR スペクトルの化学シフトは、水、 CF_3COOH または $\text{N}(\text{C}_2\text{D}_5)_3$ の添加前後の **TF-2** の蛍光発光特性とよく一致している。これらの実験結果は、無水条件下ではPET不活性種 **TF-2H**、水存在下ではPET不活性種 **TF-2W** または **TF-2WH**、酸性条件下ではPET強不活性種 **TF-2P**、および塩基性条件下ではPET活性種 **TF-2** がそれぞれ形成されていることを強く示している。実際に、**TF-2H** の蛍光強度は、**TF-2W** または **TF-2WH** の蛍光強度とほぼ同程度であるが、**TF-2EtOH** よりも強く、一方で **TF-2P** よりも弱いことから、これらの結果は、 $\text{B}(\text{OH})_2$ 、水、アルコール、およびプロトン供与体であるブレンステッド酸 (CF_3COOH など) とアミノ部位間での相互作用の程度に応じて、PET不活性種間においてPETの抑制の程度に違いがあることも示唆している。

さらに、水分子との相互作用によるPET不活性な分子内 $\text{OH}\cdots\text{N}$ 水素結合構造 **TF-2H**、双性イオン構造 **TF-2W** および水素結合構造 **TF-2WH** の形成を調べるために、水添加前後のアセトニトリル- d_3 および $\text{THF}-d_8$ 中の **TF-2** の ^{11}B NMR スペクトル測定を行った。水を添加していないアセトニトリル- d_3 および $\text{THF}-d_8$ (含水量がそれぞれ 0.013wt% および 0.008wt%) 中の **TF-2** の ^{11}B NMR スペクトルでは、2つの ^{11}B シグナルが観測された：15ppm 付近の ^{11}B シグナルは、水素結合を形成している $\text{B}(\text{OH})_2$ を有する化学種 **TF-2H** または $\text{B}-\text{N}$ 配位した四面体平面構造種に帰属可能であるが、 ^1H NMR スペクトルおよび単結晶X

線構造解析の結果と一致していない。一方、30ppm 付近の ^{11}B シグナルは、非配位の三方平面ホウ素種に帰属することができる。実際に、アセトニトリル- d_3 中の **TF-2** の ^{11}B NMR スペクトルでは、15ppm 付近の ^{11}B シグナルは 30ppm 付近の ^{11}B シグナルよりも強いが、前者は水分含有量の増加に伴い弱くなった。一方、水を添加したアセトニトリル- d_3 および $\text{THF}-d_8$ (約 1.0wt% の含有量) 中の **TF-2** の ^{11}B NMR スペクトルは、約 30ppm に唯一の ^{11}B シグナルを示した。さらに、 CF_3COOH あるいは $\text{N}(\text{C}_2\text{D}_5)_3$ を添加した場合も、約 30ppm に唯一の ^{11}B シグナルを示した。この結果は、 ^1H NMR スペクトル測定 (Fig. 11) から示唆されたように、未配位の三方平面ホウ素種に由来する **TF-2P** と **TF-2** が存在していることを示している。したがって、水を添加した溶液中においては、双生イオン構造 **TF-2W** としてではなく、水素結合構造 **TF-2WH** として存在しているものと考えられる。**TF-2WH** または **TF-2W** の形成、および無水条件下での **TF-2H** の存在を確認するためにはさらなる研究が必要であるが、本研究結果から Anthracene-AminoMeCNPhenylBPIn 構造のPET型蛍光性センサーにおいて、BPIn は、水の不在下でPETを活性化して蛍光消光を引き起こすだけでなく、水の添加に伴いPET不活性(蛍光発光)体を形成するために必要不可欠な部位であることが明らかとなった。

4. 考 察

本研究では、アントラセン-(アミノメチル)-4-シアノフェニルボロン酸ピナコールエステル (Anthracene-AminoMeCNPhenylBPIn) 構造を有する光誘起電子移動 (PET) 型蛍光水センサー **OF-2** の水分検出メカニズムを解明するために、**OF-2** のボロン酸エステル (BPIn) をボロン酸 ($\text{B}(\text{OH})_2$) に変換した Anthracene-AminoMeCNPhenylB ($\text{OH})_2$ 構造の **TF-2** を分子設計・合成し、水分に対する蛍光センシング特性を調査した。水が存在しない場合、**OF-2** 溶液の蛍光発光性は、アミノ部位の窒素原子から光励起されたアントラセン骨格へのPETにより著しく消光されている。一方で、**TF-2** 溶液は、 $\text{B}(\text{OH})_2$ の水酸 (OH) 基とアミノ部位の窒素原子との間の分子内 $\text{OH}\cdots\text{N}$ 水素結合によるPET不活性(蛍光発光)体を形成しており、強い蛍光発光性を示した。**OF-2** 溶液に水を加えると、水分子との相互作用によるPET不活性(蛍光発光)体を形成することで、蛍光発光性の著しい増大が観察される。一方、**TF-2** 溶液では、水の添加による蛍光強度の変化はほとんど見られなかったが、水分子との相互作用によるPET不活性(蛍光発光)体が形成されていることがわかった。したがって、Anthracene-AminoMeCNPhenylBPIn 構造を有するPET型蛍光性センサーにおいて、BPIn は、水の不在下でPETを活性化

して蛍光消光を引き起こすだけでなく、水の添加に伴い PET 不活性 (蛍光発光) 体を形成するために必要不可欠な部位であることが明らかとなった。このように本研究では、Anthracene-AminoMeCNPhenylBPIn 構造の水分検出メカニズムを徹底解明することで、高感度な PET 型蛍光性水センサーの開発のための有用な分子設計指針を提供することができた。

5. 総括

本研究課題で得られた知見に基づいて、PET 型蛍光性水センサーを酸化チタン (TiO₂) に吸着あるいはポリマーに分散させたフィルムの作製および基板表面へ固定化し、水分に対する光応答性を調査することで、製品中や表面に存在する水分をピンポイントで検出および肉眼で目視できる光応答性材料の創製を図りたい。例えば蛍光性水センサーを吸着させた TiO₂ 微粒子を作製することができれば、TiO₂ を含む化粧品 (ファンデーション、日焼け止めクリームおよびパックなど) の製造過程における水分の分散状況をリアルタイムでモニタリングできる解析方法や、製品中における水分の分散状況や肌へ塗った際の広がり (塗ムラ) を追跡する試験手法など、化粧品中および表面の水分をピンポイントで検出・可視化する分析技術を提供できるものと考えている。

(引用文献)

- 1) H. S. Jung, P. Verwilt, W. Y. Kim, J. S. Kim, *Chem. Soc. Rev.*, **2016**, *45*, 1242-1256.
- 2) F. Jacob, *Molecular Fluorescence* (Ed. B. Valeur), WILEY-VCH, Weinheim, **2002**, Chap. 10, pp. 273-350.
- 3) Y. Ooyama, *Sustainable and Functional Redox Chemistry*, ed. Inagi, S., the Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, **2022**, Chap.13, pp. 300-330.
- 4) T. Fumoto, S. Miho, Y. Mise, K. Imato, Y. Ooyama, *RSC. Adv.*, **2021**, *11*, 17046-17050.
- 5) S. Miho, T. Fumoto, Y. Mise, K. Imato, S. Akiyama, M. Ishida, Y. Ooyama, *Mater. Adv.*, **2021**, *2*, 7662-7670.
- 6) S. Miho, K. Imato and Y. Ooyama, *RSC. Adv.*, **2022**, *12*, 25687-25696.
- 7) T. Fumoto, K. Imato, Y. Ooyama, *New, J. Chem.*, **2022**, *46*, 21037-21046.
- 8) M. A. Dvorak, R. S. Ford, R. D. Suenram, F. J. Lovas, K. R. Leopold, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 108-115.
- 9) M. Asakura, M. Ōki, S. Toyota, *Organometallics*, **2000**, *19*, 206-208.
- 10) L. R. Ortega-Valdovinos, J. Valdes-García, I. J. Bazany-Rodríguez, J. C. Lugo-González, A. Dorazco-González, A. K. Yatsimirsky, *New J. Chem.*, **2021**, *45*, 15618-15628.

装着感のない皮膚貼付型ナノ透明薄膜の創製と 芳香・消臭能の精密制御

東海大学工学部応用化学科／マイクロ・ナノ研究開発センター

岡村 陽介

Fragrant products have been paid much attention to improvement of quality of life. However, their effect is often insufficient due to flowing by sweats and short-term evaporation of odor molecules. We have proposed polymer ultra-thin films (often called nanosheet) with a film thickness of nanoscale. These nanosheets have shown an excellent adhesiveness on various interfaces via a physical adsorption. In this study, we proposed freestanding polysaccharide nanosheets and nanofibers and evaluate their control of fragrant and deodorant ability. For fragrant materials, free-standing crosslinked chitosan nanosheets carrying cyclodextrin (CD) were successfully fabricated by a spin-coating process. When linalool as a model was dropped on the CD nanosheets, volatilization of linalool was prolonged compared to the control. This prolonged effect of β -CD-nanosheet was higher than that of γ -CD-nanosheet. This result indicates the volatilization of linalool was controlled by β -CD on CS nanosheets. For deodorant materials, free-standing crosslinked nanofiber-sheets composed of chitosan were successfully fabricated by electrospinning, crosslinking, and sacrificial layer process. The obtained nanofiber-sheet were still transparent, and easily adhered onto skin. Based on detection of the amine groups using fluorescamine, *trans*-2-nonenal, which is a causative compound of the aged body odor, could be covalently bound via amino groups of chitosan-nanofiber-sheets.

1. 緒言

「におい」はヒトの生活と密接に関連している。におい分子は揮発性の低分子有機化合物であり、世の中には数十万種存在するといわれている¹⁾。嗅覚受容体が発見²⁾されて以来、これまで数多くの受容体が同定されており³⁾、におい分子の濃度がpM-nMレベルであっても嗅覚受容体を介して高感度に検知される⁴⁾。従って、においがそのヒトの第一印象を決定するといっても過言ではなく、においが注目される要因である。

近年、体臭(加齢臭・汗臭等)等の不快な臭いを消し、好みの香りをつけて個性を演出する等、肌に塗布・噴霧する消臭・芳香剤が市場を賑わしている。消臭剤は、加齢臭(*trans*-2-ノネナル、皮脂酸化物)や汗臭(アンモニア等)を標的とし、物理吸着法、化学吸着法、生物学的手法にて消臭する。芳香剤は香料を配合した香水が代表例であり、不快な臭いを香りでごまかす感覚的消臭法に分類され、しばしば前者と合わせて使用する。しかし、いずれも液状・粉末状であり肌に塗布あるいは噴霧する用法のため、有効成分は汗等で流れてしまうほか、におい分子は揮発性のため芳香・消臭能の持続性が不足しているという課題が残されている。

我々は、厚みをナノ寸法に制御した生体適合性高分子からなる2次元ナノ材料「ナノ薄膜」を提案してきた⁵⁻⁹⁾。興味深いことに、100nm以下の膜厚にすると、ナノ厚特有の柔軟性と平滑面ゆえに、貼りたい界面の凹凸に追従しながら面接触吸着でき、極めて高い接着性が発現するユニークな現象を見出した。このため、接着剤を使用せず物理吸着のみで肌に貼付できる。また、透明なため貼っても目視できず装着感すらないことも特筆すべき点である。さらに、極細径由来の高い比表面積を有するナノファイバーからなる自己支持性薄膜の調製にも成功している。

本研究では、におい分子の吸着・徐放を制御した「皮膚貼付型ナノ薄膜・ナノファイバー薄膜」を創製し、その芳香・消臭能評価を行うことを目的とした。ここでは、芳香あるいは悪臭におい分子モデルとして、それぞれリナロール(ラベンダー由来)、*trans*-2-nonenal(加齢臭の原因成分、不飽和アルデヒド)を選定した。芳香制御として、生体適合性を有するキトサンからなるナノ薄膜に、有効成分となるにおい分子包接体(シクロデキストリン, CD)を搭載し、におい分子の包接・徐放能を持続させる仕組みを提案する。消臭制御として、比表面積の向上を期待したキトサンナノファイバー薄膜を創製し、シッフ塩基を形成して*trans*-2-nonenalを捕集、消臭する仕組みを提案する。

2. 方法

2. 1. CD担持キトサンナノ薄膜の調製と芳香制御能評価

2. 1. 1. CD担持キトサンナノ薄膜の調製法

SiO₂基板(20×20 mm²)上にセルロースアセテートのジオキサン溶液(40 mg/mL)をスピコート(4,000 rpm, 20 s)



Fabrication of Adhesive and Transparent Nanosheets and Their Control of Fragrant and Deodorant Abilities

Yosuke Okamura

Department of Applied Chemistry,
School of Engineering, Tokai University
Micro/Nano Technology Center, Tokai
University

し犠牲膜とした。続いて、キトサン水溶液(10 mg/mL)をスピコート(6,000 rpm, 60 s)し、キトサンナノ薄膜を調製した。キトサン間の架橋並びにナノ薄膜にCDを担持するためにジフェニルメタンジイソシアネート(MDI)を用いた。MDI、 β -CDあるいは γ -CD、トリメチルアミンを混合したDMF溶液(0.5 mL)にキトサンナノ薄膜を基板ごと浸漬後、加熱(70°C, 1 h)した。DMFで洗浄後、アセトン中で犠牲膜を溶解させ、 β -CDあるいは γ -CD担持キトサンナノ薄膜を得た。なお、比較対照として、CDを担持させないキトサンナノ薄膜を調製した。ナノ薄膜の表面観察並びに膜厚測定は、走査型電子顕微鏡(FE-SEM S-4800, 日立ハイテク社製)、触針式表面形状測定器(DektakXT, ブルカー社製)を用いた。

2. 1. 2. におい分子包接能評価

リナロール(0.2 mL)を充填させた密閉瓶(容量 350 mL)中に、 SiO_2 基板上の β -CDあるいは γ -CD担持キトサンナノ薄膜(30×30 mm²)を静置した(r. t., 15 h)。その後、ナノ薄膜に包接したリナロールをアセトン(1 mL)で抽出した。抽出液をガスクロマトグラフィー分析(GC-8A, 島津製作所製)に供し、ナノ薄膜の単位面積当たりのリナロール包接量を定量した。

2. 1. 3. におい分子揮発制御能評価

β -CDあるいは γ -CD 担持キトサンナノ薄膜をポリエチレン基板(10 mm ϕ)上に貼付した。その上にリナロール溶液(30% (v/v), 10 μ L)を滴下し、恒温恒湿下(25°C, 湿度 40%)、開放系の状態で静置した。所定の時間(10 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 24 h)経過後、ナノ薄膜貼付PE基板をサンプル瓶に入れ、セプタムラバーで密閉した。5分間静置後、NeedleEx(信和化工社製)を取り付けた気体捕集ポンプを用いてサンプル瓶内の気体を採取し、ガスクロマトグラフィー分析に供して気相中のリナロールの揮発量を定量した。

2. 1. 4. ジボロン酸誘導体を架橋剤とした β -CD担持キトサンナノ薄膜の調製

SiO_2 基板(20×20 mm²)上にセルロースアセテートのジオキサン溶液(40 mg/mL)をスピコート(4000 rpm, 20 s)し、犠牲膜とした。次いで、キトサン(10 mg/mL)／ポリビニルアルコール(1 mg/mL)混合水溶液をスピコート(4000 rpm, 60 s)しキトサンナノ薄膜を調製した。得られた基板を1,4-フェニレンジボロン酸(PBA)のDMF溶液に浸漬した(r. t., 1 h)。DMFで洗浄後、 β -CD溶液にナノ薄膜を浸漬し(70°C, 24 h)、DMFで洗浄後に加熱乾燥した(60°C, 1 h)。最後に、アセトン中で犠牲膜を溶解させ、 β -CD担持キトサンナノ薄膜を得た。ナノ薄膜の膜厚は、触針式表面形状測定器(DektakXT)を用いて測定した。

2. 2. キトサンナノファイバー薄膜の調製と消臭制御能評価

2. 2. 1. キトサンナノファイバー薄膜の調製法

SiO_2 基板(30×30 mm²)上にポリスチレンスルホン酸ナトリウム水溶液(PSS: 200 mg/mL)をスピコート(4000 rpm, 60 s)し、犠牲層とした。次いで、電界紡糸法(NANON-03, メック社製)を用いて、キトサン溶液(5.6 wt% in TFA/CH₂Cl₂=4/1 (v/v))溶液をシリンジ(ノズル径 27G)に注入し、PSSを成膜した SiO_2 基板上をターゲットとして紡糸した(印加電圧: 30 kV, 送り速度: 1.0 mL/h, ノズルターゲット距離: 200 mm)。その後、1,4-フェニレンジボロン酸(PBA)溶液(30-250 mM)を用いて架橋を施し(r. t., 2 h)、エタノールにて洗浄した。その後、 SiO_2 基板ごと蒸留水に浸漬して犠牲層を溶解させ、キトサンナノファイバー薄膜を得た。

2. 2. 2. キトサンナノファイバー薄膜のFT-IR分析

キトサンナノファイバー薄膜のPBA架橋濃度を決定するため、アルミホイル上をターゲットとし、2. 2. 1.と同条件で電界紡糸した。ピンセットでファイバー薄膜を回収後、(PBA)溶液(30-250 mM)を用いて架橋を施した(r. t., 2 h)。その後、ホモジナイザー(NS-57, マイクロテック・ニチオン社製)を用いてキトサンナノファイバー薄膜をエタノール中にて裁断し、*t*-ブチルアルコールに置換して凍結乾燥した。得られた粉末を臭化カリウムと混合してペレットを作成し、FT-IR分析(FTIR-8400S, 島津製作所社製)に供した。この時、吸光度に変換し、キトサンがもつ*N*-アセチル基由来のC=O伸縮振動に対するPBAのベンゼン環由来のC-H伸縮振動の比を算出し、PBA架橋の進行具合を判定した。

2. 2. 3. *trans*-2-nonenalを吸着させた際のキトサンナノファイバー薄膜のアミノ基定量

上述した条件でキトサンナノファイバー薄膜を紡糸した SiO_2 基板を密閉容器(100 mL)内に置き、*trans*-2-nonenalのエタノール溶液(0.575 mM-57.5 mM)と接触させないように静置した(r. t., 20 h)。 SiO_2 基板を回収し、蒸留水(2 mL, 10 min)でキトサンナノファイバー薄膜を溶解させた。得られた溶液にフルオレスカミン(0.075 mg/mL, 670 μ L)を加え蛍光発色させた後(r. t., 1 h)、マイクロプレートリーダーを用いて蛍光強度を測定した。

3. 結果と考察

3. 1. CD担持キトサンナノ薄膜の調製と芳香制御能評価

3. 1. 1. CD担持キトサンナノ薄膜の調製と物性

キトサン及びCDの水酸基、キトサンのアミノ基を標的とし、架橋剤(MDI)のイソシアネート基を介した共有結合(ウレタン結合・ウレア結合)にて、 β -CDあるいは

γ -CD担持キトサンナノ薄膜を調製した。SiO₂基板ごとアセトン中に浸漬させたところ、犠牲膜であるセルロースアセテートが溶解し、基板の形状を維持した状態で透明性の高い自己支持性ナノ薄膜が得られた (Fig. 1a)。ナノ薄膜を水中に展開しても不溶であったことから、MDIによってナノ薄膜を構成するキトサンの架橋も進行したと考えられる。得られたナノ薄膜を走査電顕観察したところ、ナノ薄膜表面は破断なく平滑であった (Fig. 1b)。また、得られたナノ薄膜は肌に貼付することも可能であり、目立たず装着感すらないことも特筆すべき点であった。今回調製した β -CDあるいは γ -CD担持キトサンナノ薄膜の膜厚は、それぞれ 106 ± 9 nm、 110 ± 9 nm と算出された。この時、キトサン水溶液をスピコート際の回転数によって膜厚を制御可能であることも確認した。

3. 1. 2. β -CDあるいは γ -CD担持キトサンナノ薄膜の分子包接能

2. 1. 2. に記載の方法に従い、リナロールを充満させた密閉瓶中に各種ナノ薄膜を静置した際の包接されたリナロールを測定した。その結果、CD未担持キトサンナノ薄膜でも非特異的にリナロールが包接され、単位面積当たりのリナロール包接量は 0.30 ± 0.27 nmol/cm² であった (Fig. 2)。そこで、CD担持キトサンナノ薄膜で同様の試験を行ったところ、CD未担持体と比較してリナロール包接量

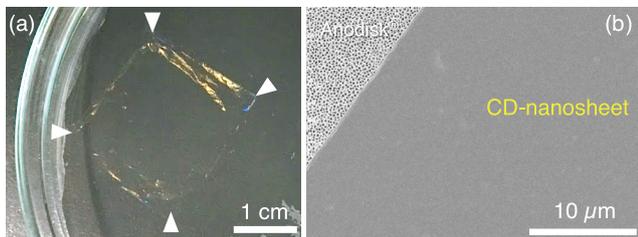


Fig. 1 (a) Macroscopic image of β CD-nanosheet composed of chitosan suspended in acetone. (b) SEM image of β CD-nanosheet attached on alumina porous filter (Anodisc®).

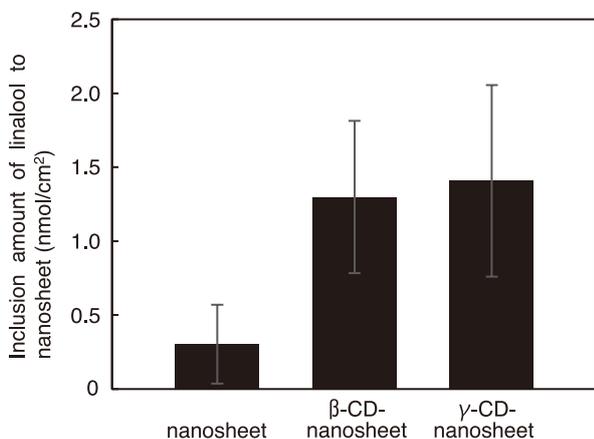


Fig. 2 Inclusion amount of linalool on β CD-or γ CD nanosheet under a closed condition (N=3, Mean \pm S.D.).

は4倍以上となった (β -CD担持キトサンナノ薄膜: 1.30 ± 0.52 nmol/cm²、 γ -CD担持キトサンナノ薄膜: 1.41 ± 0.65 nmol/cm²)。以上より、キトサンナノ薄膜に表面修飾されたCDによってリナロールが有意に包接されたことを支持しており、密閉系では β -CD、 γ -CDのリナロール包接能は同等であると判断した。

3. 1. 3. β -CDあるいは γ -CD担持キトサンナノ薄膜の分子揮発制御能

2.1.3.に記載の方法に従い、ポリエチレン基板に貼付した各種ナノ薄膜上にリナロール溶液を滴下し、開放系の状態で静置した。経時的に密閉したサンプル瓶内に基板を5分間静置し、気相中のリナロールの揮発量を定量した。まず、比較対照としてナノ薄膜を貼付しない基板に直接リナロールを滴下した場合、気相中のリナロール濃度は時間経過とともに顕著に減少した (Fig. 3, 黒カラム)。これと比較して、CDを担持していないナノ薄膜を貼付した場合、静置4時間以降、気相中のリナロール濃度が増大していた。これは、リナロールがナノ薄膜に非特異的に吸着して揮発が抑制され、緩やかに徐放されたためと考えられる (Fig. 3, 白カラム)。そこで、 β -CD担持キトサンナノ薄膜を貼付した場合、他群と比較して静置1時間以降から気相中のリナロール濃度が有意に増大した (Fig. 3, 赤カラム)。これは、リナロールがナノ薄膜表面の β -CDに一旦包接されて揮発が抑制され、時間経過とともに徐放する効果が発現したためと考えられる。しかし、 γ -CD担持キトサンナノ薄膜を貼付した場合、その効果は見られず、CDを担持していないナノ薄膜と同程度であった (Fig. 3, 灰色カラム)。これは γ -CDの内径がリナロールに対して大きく、包接はするものの徐放効果が見られなかったためと考えられる。以上より、 β -CD担持キトサンナノ薄膜はリナロールの揮発を制御し、長時間徐放できることを明らかにした。

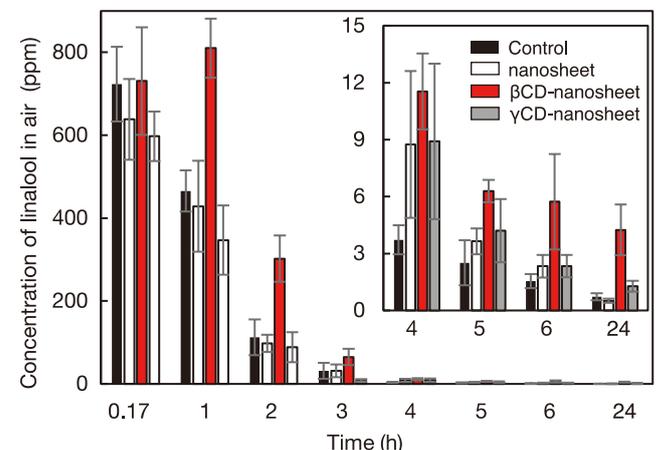


Fig. 3 Concentration of linalool released in air using β CD-or γ CD nanosheet (N=7, Mean \pm S.E.).

3. 1. 4. ジボロン酸誘導体を架橋剤としたβ-CD担持キトサンナノ薄膜の調製

上述までは、架橋剤 (MDI) のイソシアネート基を介した共有結合にてCD担持キトサンナノ薄膜を調製してきた。しかし、イソシアネート基は水で失活しやすい他、共有結合でCDと結合するため、ナノ薄膜表面のCD担持量を直接定量するのは難しい。そこで、ジオール骨格と反応し、弱酸性条件下ではその結合が解離することが知られているジボロン酸誘導体を架橋剤として着目した。表面に結合したCD担持量を定量化することを期待している。2. 1. 4. に記載の方法に従い、PBAを架橋剤としたβ-CD担持キトサンナノ薄膜の調製法を新たに検討した。SiO₂基板ごとアセトン中に浸漬させたところ、犠牲層であるセルロースアセテートが溶解し、基板の形状を維持した状態で透明性の高いナノ薄膜が得られた。得られたナノ薄膜を水中に展開しても不溶であったことから、PBAによってナノ薄膜を構成するキトサン・ポリビニルアルコールの水酸基を介して架橋されたことを支持した (Fig. 4)。今回調製したβ-CD担持キトサンナノ薄膜の膜厚は161 ± 11 nmであり、未架橋体 (148 ± 9 nm) と比較して約10 nm程度上昇した。今後は、酸性条件下でβ-CDを脱離させ、表面結合量を定量する計画である。

3. 2. キトサンナノファイバー薄膜の調製と消臭制御能評価

3. 2. 1. キトサンナノファイバー薄膜の調製と物性

キトサンナノファイバーの不溶化に向け、キトサンの水酸基に反応するジボロン酸誘導体 (PBA) を架橋剤に選定し、キトサンのアミノ基を潰さない戦略とした。実際、125 mMのPBAにて架橋後、キトサンナノファイバーをSiO₂基板ごと蒸留水に浸漬させたところ、犠牲層であるPSSが溶解し、基板の形状を維持した状態で透明なキトサンナノファイバー薄膜が得られ、架橋が十分進行して水に不溶化したと判断した (Fig. 5a)。実際、キトサンナノファイバー薄膜の表面を電顕観察したところ、繊維構造を維持していた (Fig. 5b)。この時、未架橋体の繊維径 (221 ± 51 nm) と比較して、架橋体 (350 ± 95 nm) では1.6倍増

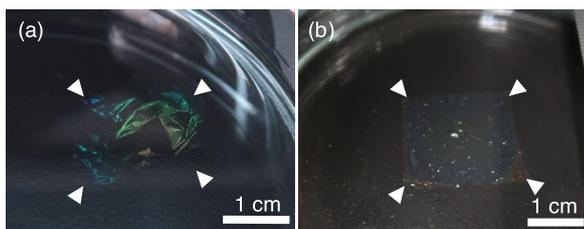


Fig. 4 Macroscopic image of (a) βCD-nanosheet without crosslinking with PBA suspended in acetone, and (b) βCD-nanosheet crosslinked with PBA suspended in water.

大したことから架橋は十分進行したと考えられる。そこで、FT-IR分析から、最適なPBA架橋濃度を判定した。具体的には、得られたスペクトルを吸光度に変換し、キトサンがもつN-アセチル基由来のC=O伸縮振動に対するPBAのベンゼン環由来のC-H伸縮振動の吸光度比を算出した。その結果、少なくともPBAを125 mM以上仕込めば、吸光度比が増大しそれ以上は変化しなかったことから、PBAの架橋濃度を125 mMと決定した。

3. 2. 2. trans-2-nonenalを吸着させた際のキトサンナノファイバー薄膜のアミノ基定量

キトサンナノファイバー薄膜 (未架橋) を蒸留水に溶解し、アミノ基定量試薬であるフルオレスカミンと反応させたところ蛍光発色したことから、アミノ基が確実に残存していることを確認した (Fig. 6)。そこで、濃度の異なるtrans-2-nonenalで充満させた密閉容器内にキトサンナノファイバー薄膜を静置して蒸留水で溶解させた後、同測定をしたところ、trans-2-nonenalの濃度の増大と共に蛍光強度は減少していた (Fig. 6)。これは、キトサンナノファイバー薄膜のアミノ基を介して、trans-2-nonenal (不飽和アルデヒド) と Schiff塩基を形成し、アミノ基が減少したためと考えられる。以上より、キトサンナノファイバー薄膜は

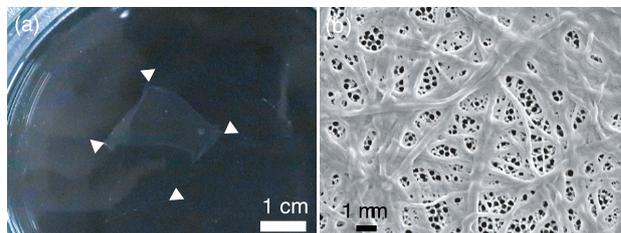


Fig. 5 (a) Macroscopic image of chitosan nanofiber-sheet crosslinked with PBA suspended in water. (b) SEM image of chitosan nanofiber-sheet attached on alumina porous filter (Anodisc®).

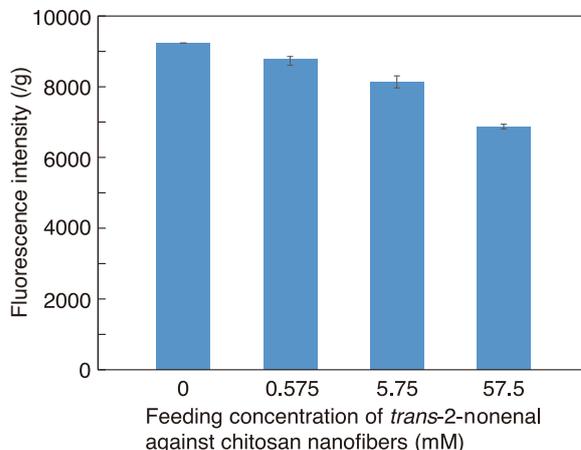


Fig. 6 Fluorescence intensities of chitosan nanofiber-sheet before after reaction with *trans*-2-nonenal by a fluorescamine assay.

trans-2-nonenalを化学吸着可能であることを間接的に実証した。

4. 総括

本研究では、におい分子の吸着・徐放を制御した「皮膚貼付型ナノ薄膜・ナノファイバー薄膜」を創製した。芳香制御として、 β -CDあるいは γ -CD担持キトサンナノ薄膜の調製法を確立した。得られたナノ薄膜は肌に貼付することも可能であり、目立たず装着感しないことも特筆すべき点であった。この時、 β -CD担持キトサンナノ薄膜はリナロールの揮発を制御し、長時間徐放できることを明らかにした。消臭制御として、比表面積の向上を狙いキトサンナノファイバー薄膜の創製法を確立した。得られたキトサンナノファイバー薄膜は*trans*-2-nonenalを化学吸着可能であることを実証した。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご支援を頂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。東海大学大学院工学研究科応用理化学専攻 土屋笙子氏、岩松宏徳氏、藤田峻平氏に記して謝意を表する。

(引用文献)

- 1) 東原和成. 進展する化学感覚の科学. 現代化学 **9**, 23-25 (2014).
- 2) L. Buck, R. Axel. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition *Cell* **65**, 175-187 (1991).
- 3) S. Ihara, K. Yoshikawa, K. Touhara. Chemosensory signals and their receptors in the olfactory neural system. *Neuroscience* **254**, 45-60 (2013).
- 4) U.B. Kaupp. Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities. *Nat. Rev. Neurosci.* **11**, 188-200 (2010).
- 5) Y. Okamura, K. Kabata, M. Kinoshita, D. Saitoh, S. Takeoka. Free-standing biodegradable poly (lactic acid) nanosheet for sealing operations in surgery. *Adv. Mater.* **21**, 4388-4392 (2009).
- 6) Y. Okamura, K. Kabata, M. Kinoshita, H. Miyazaki, A. Saito, T. Fujie, T. Ohtsubo, D. Saitoh, S. Takeoka. Fragmentation of poly (lactic acid) nanosheets and patchwork treatment for burn wounds. *Adv. Mater.* **25**, 545-551 (2013).
- 7) T. Komachi, H. Sumiyoshi, Y. Inagaki, S. Takeoka, Y. Nagase, Y. Okamura. Adhesive and robust multi-layered poly (lactic acid) nanosheets for hemostatic dressing in liver injury model. *J. Biomed. Mater. Res. B* **105**, 1747-1757 (2017).
- 8) H. Zhang, A. Masuda, R. Kawakami, K. Yarinome, R. Saito, Y. Nagase, T. Nemoto, Y. Okamura. Fluoropolymer nanosheet as a wrapping mount for high quality tissue imaging. *Adv. Mater.* **29**, 1703139 (2017).
- 9) H. Zhang, T. Aoki, K. Hatano, K. Kabayama, M. Nakagawa, K. Fukase, Y. Okamura. Porous nanosheet wrapping for live imaging of suspension cells. *J. Mater. Chem. B* **6**, 6622-6628 (2018).

多孔性金属錯体による化粧品成分の経皮 DDS 製剤の開発

大阪医科薬科大学薬学部

門田 和紀

A spray-dried cyclodextrin-based metal-organic framework (CD-MOF) with tunable physicochemical properties, such as crystallinity, porosity, and dissolution properties, was fabricated. The spray-drying precursor properties, including ethanol volume ratio, incubation time, and precursor concentration, were optimized for controlled crystallization. The spray-dried CD-MOF products exhibited various physicochemical properties in terms of morphology, X-ray diffraction (XRD) peak intensity, and specific surface area. Thus, amorphous, partially crystalline, and highly crystalline spray-dried CD-MOFs were identified. By introducing ketoconazole (KCZ) to the precursor, the surface area of the CD-MOF product was enhanced compared with that of the plain CD-MOF prepared using the same parameters. The presence of KCZ in the hydrophobic cavity between the two γ -CD molecules may facilitate CD-MOF crystal growth. As determined by the dissolution test, the CD-MOF particles exhibited different dissolution behaviors, which is attributed to the position of KCZ. Regarding flexibility, the design of tunable spray-dried CD-MOFs may contribute to various research fields. The spray-dried CD-MOF including drugs could be applied to the transdermal drug delivery systems of cosmetic ingredients.

1. 緒言

近年、皮膚から薬物を吸収させる経皮薬物送達システム (TDDS) が、低侵襲な薬物投与方法として注目されている¹⁾。一方、化粧品開発においては、経皮吸収ではなく、皮膚の角層へ適切な量の有効成分を適切な濃度で保つことが求められている。つまり、角層で留めておくような製剤開発が、有効性及び安全性において重要である。そこで、新たな化粧品製剤の素材となりうる、多孔性金属錯体 (metal-organic frameworks : MOF) に注目した。多孔質材料については、ナノスケールの細孔が規則正しく配列した構造をもつことから、薬物送達システムへの適用が期待されている²⁾。中でも、MOFは細孔の大きさや形を制御できることに加えて、有機と無機のハイブリッド化が織りなす特性を示すことから、従来の多孔質材料では成し得ない新奇物性・機能の創出が盛んに研究されている³⁻⁵⁾。構成する金属と有機配位子の組み合わせによっては、数万種類にも及ぶMOFを作製することが理論上において可能とされている。特に、製剤設計を考慮してMOFの中でも環状のオリゴ糖である γ -cyclodextrin (γ -CD) とカリウムから構成され、生体適合性や生分解性に優れたCD-MOF⁶⁾に着目した。CD-MOFは、6個の γ -CDから構成される立方体状の(γ -CD)₆ユニットが体心立方格子の結晶構造をとる。 γ -CDの環状分子構造の外部は親水的であるのに対して、内部は疎

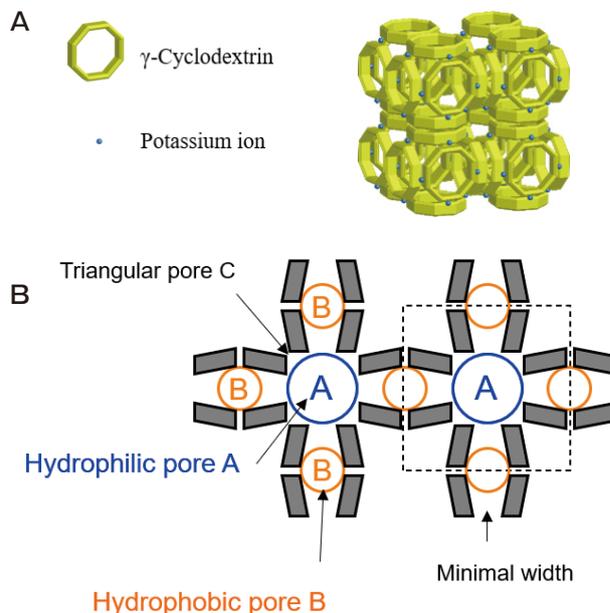


Fig. 1 Schematic illustrations of (A) CD-MOF and (B) detailed structure of CD-MOF

水的であるため、(γ -CD)₆ユニットの中央部には親水性細孔、ユニット間の接合部には疎水性細孔が形成され、それらが交互に連結している (Fig. 1)。この構造を利用することで、親水性及び疎水性の薬物を効率的に含有することが期待できる⁷⁾。本研究では、CD-MOFへの有効成分の高含量含む製剤作製方法およびその製剤化についての検討を実施した。

2. 方法

2.1. 試料

γ -Cyclodextrin (以下 γ -CD)、水酸化ナトリウム (以下KOH) をCD-MOFの原料として用いた。疎水性薬物とし



Development of transdermal drug delivery systems of cosmetic ingredients using metal-organic framework

Kazunori Kadota

Osaka Medical and Pharmaceutical University

て Ketoconazole (以下 KTZ) を用いた。KTZ については抗真菌薬のクリーム剤として使用されており、皮膚への適用を想定したモデル化合物として使用した。Fig. 2 に γ -CD 及び KTZ の構造式を示す。

2.2. 調製方法及び評価方法

空間分解プロセスであるバッチ合成に対して、噴霧乾燥法は連続フロー式の時間分解プロセスであり、合成規模は流量及び操作時間で決定される。Garzón-Tovar らは噴霧乾燥法を初めて MOF 合成に適用し、有機系の液体原料(スラリー)を粉末化して結晶性 MOF の凝集体が得られることを報告した⁸⁾。そこで、我々は CD-MOF について、固体濃度 (solid concentration, 以下 SC) を 3-27mg/mL、溶媒組成としてエタノール (以下 EtOH) を 0-40%、及び浸とう時間 (以下 Time) を 0-48h と設定し噴霧乾燥法により粒子を作製した。精製水に γ -CD 及び KOH を溶解させた後、溶液を 400rpm で攪拌してエタノールを加えて各溶媒組成に調整し、各浸とう時間を経てスプレードライヤー (Büchi mini Spray Dryer B-290) を用いて噴霧乾燥粒子 (Spray-dried particles : SDPs) を調製した。モデル化合物として使用した KTZ は、水への溶解性が非常に低いため、固体濃度が 4mg/mL (以下 KTZ=4) となるようにエタノールに溶解させ、溶液に加えた後に SDPs を調製した。噴霧乾燥条件は入口温度 130℃、出口温度 57-67℃、噴霧液速度 5.5mL/min、噴霧空気量 473L/h とした。得られた粒子の粒子形態については走査型電子顕微鏡 (Miniscope[®] TM3030)、結晶性については粉末 X 線回折測定 (Powder X-ray diffraction patterns : PXRD) を用いて評価した。また、Brunauer-Emmett-Teller (BET) 法により比表面積測定を行った。さらに、KTZ を封入した SDPs の薬物含有量を測定し、KTZ 濃度として 1mg/mL となる SDPs を用いて溶出試験を行い、溶出性についても評価した。

3. 結果

3.1. 噴霧乾燥法による CD-MOF の結晶性評価

従来の CD-MOF の合成法には、蒸気拡散法が利用されている⁹⁾。蒸気拡散法では γ -CD と KOH を $[K]/[\gamma\text{-CD}] = 8$ で調製した強塩基性水溶液に対してメタノールまたはエタノールを蒸気で供給することによって白色の結晶が得られる。しかし、この方法では結晶が析出するまでに数日から数週間に及ぶ比較的長い時間を要する。また、CD-MOF 内への薬物含量についても非常に低い。 γ -CD と KOH の強塩基性水溶液に CD-MOF が不溶な溶媒としてエタノールを直接添加する貧溶媒晶析法を用いれば、合成時間を相当短縮できるが、それでもなお 1 日程度かかり、薬物含量についても比較的小さい。そこで、筆者らは CD-MOF の合成に噴霧乾燥法を適用し、シングルミクロンの低密度で球形の微粒子を調製した⁷⁾。この方法で合成した CD-MOF は薬物含量も高く、製剤設計への展開が期待できる。一方で、噴霧乾燥法により粒子を作製するために、他の CD-MOF に比べると結晶性が低くなる。CD-MOF の結晶性向上を目的として、噴霧溶液にエタノールを添加して金属錯体の自己組織化促進を図ったところ、CD-MOF が結晶化することが確認された (Fig. 3)。結晶化は CD-MOF の比表面積と細孔容積の増加をもたらし、それに伴い薬物含有量も増加する。

そこで、Fig. 4 に各パラメータを変化させたときの CD-MOF の粉末 X 線回折測定の結果を示す。調製した SDPs では固体濃度 27mg/mL において、エタノール 40% のみ、浸とう時間 0、6、48 時間の各時間で CD-MOF 特有のピークがみられ、CD-MOF 結晶が形成されていることが確認された。KTZ を封入した SDPs ではエタノール 40% で CD-MOF 結晶が形成できていることが確認された。固体濃度 15mg/mL 以下、エタノール 20% 以下の粒子は CD-

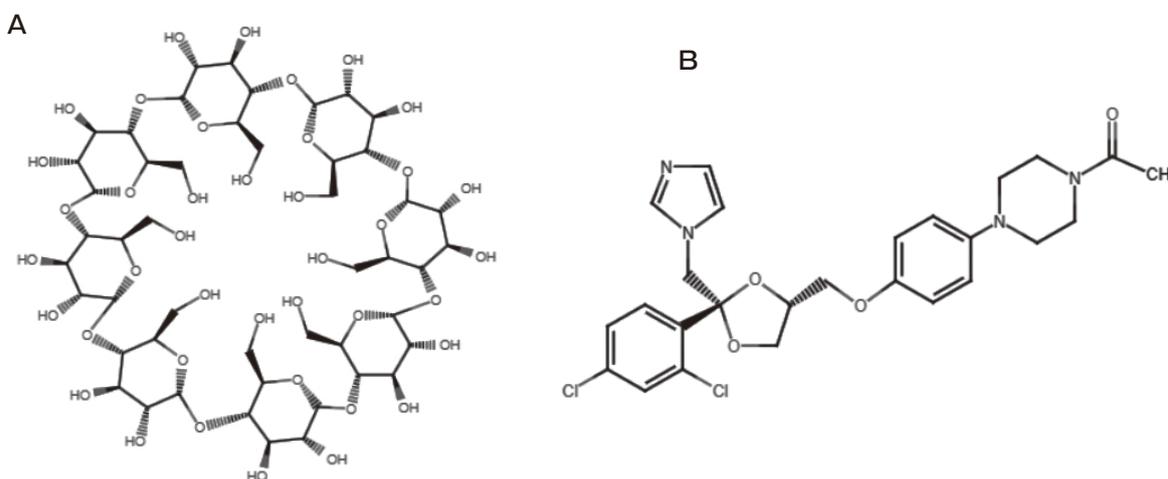


Fig. 2 Chemical structures of (A) γ -Cyclodextrin (γ -CD) and (B) Ketoconazole (KTZ).

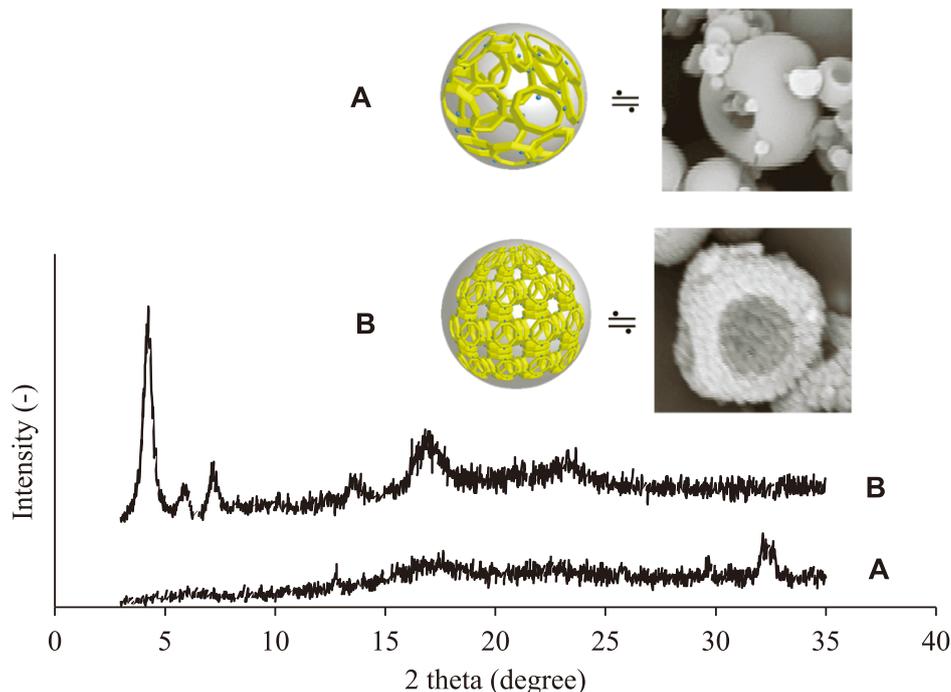


Fig. 3 Comparison between amorphous CD-MOF and crystallized CD-MOF.

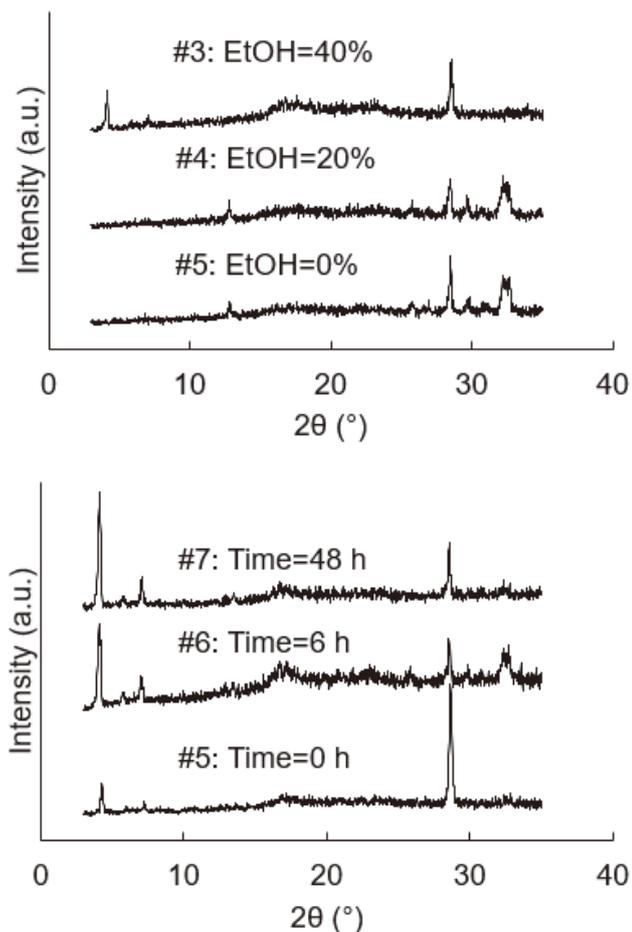


Fig. 4 PXRD patterns of CD-MOF powders prepared by varying CD-MOF precursor concentration (3, 15, 27mg/mL), ethanol volume ratio (0%, 20%, 40%), and incubation time (0h, 6h, 48h).

MOF特有のピークが認められず、アモルファスCD-MOFであることが示唆される。これは、固体濃度及び貧溶媒割合を上昇させることで、CD-MOF結晶の核生成が促進されると考えられる。さらに浸とう時間を増やすことで、CD-MOF結晶の成長が進行し、CD-MOF由来の特徴的なピークが確認できた。以上から、各パラメータがCD-MOFの結晶化に重要であることがわかる。

Fig. 5に各パラメータを変化させたときのSEM写真により確認された粒子形態の違いについて示す。固体濃度及びエタノール割合を変化させることで、各SDPsは粒子表面が滑らかな球体をとっているが、浸とう時間を長くすると、SDPsは時間経過とともに粒子表面にひび割れが確認でき、CD-MOFの結晶化が進んでいることが推測できる。さらに、薬物のKTZを封入したSDPsではエタノール40%で粒子表面に凹凸があり、時間経過とともに凹凸が増加したことが確認された。このことから、時間経過や薬物封入によって結晶化が促進されていることが示唆された。

3. 2. 噴霧乾燥CD-MOFに含有した薬物の放出挙動

Fig. 6にKTZを封入したSDPsの溶出試験の結果を示す。KTZ原末と比較して噴霧乾燥法により作製した粒子からのKTZは溶出性が向上していることが確認された。ただし、アモルファスCD-MOFからのKTZについては溶出性は、結晶化したCD-MOFからのKTZの溶出率に比べて低くなっている。さらに、噴霧乾燥前の振とう時間が長くなることでCD-MOFの結晶化が進むと、KTZのCD-MOF

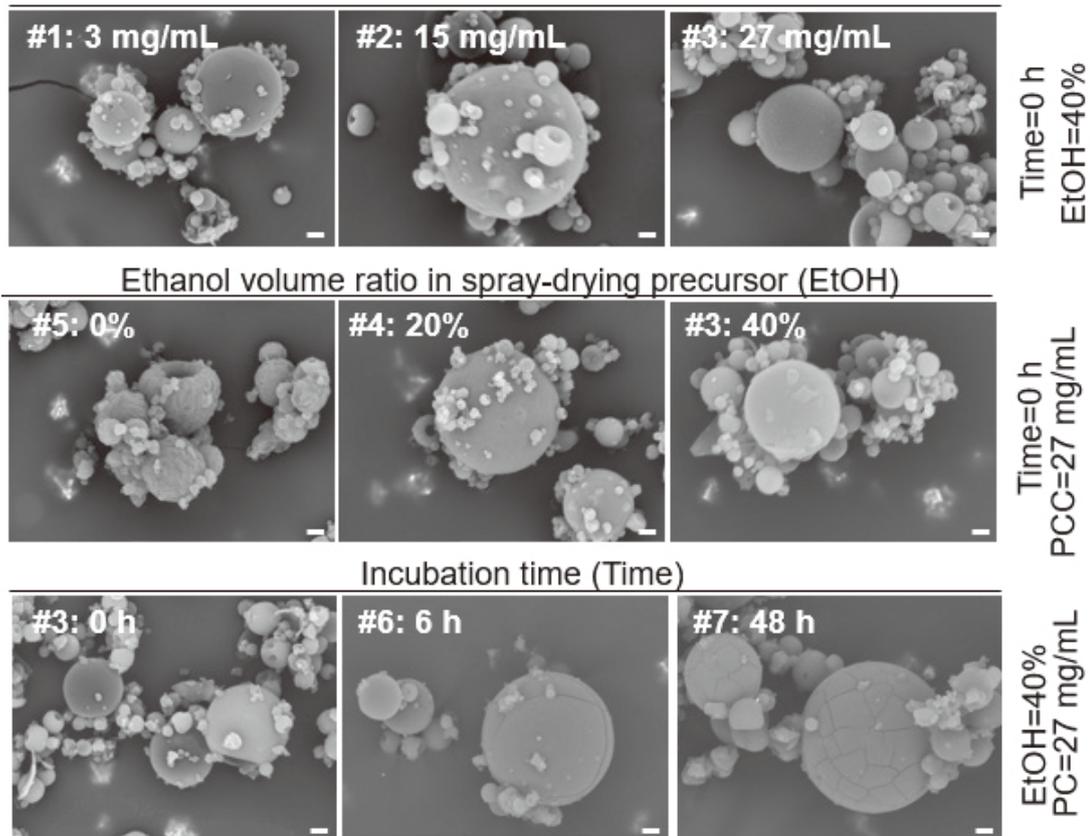


Fig. 5 SEM images of CD-MOF powders prepared by varying CD-MOF precursor concentration (3, 15, 27mg/mL), ethanol volume ratio (0%, 20%, 40%), and incubation time (0h, 6h, 48h).

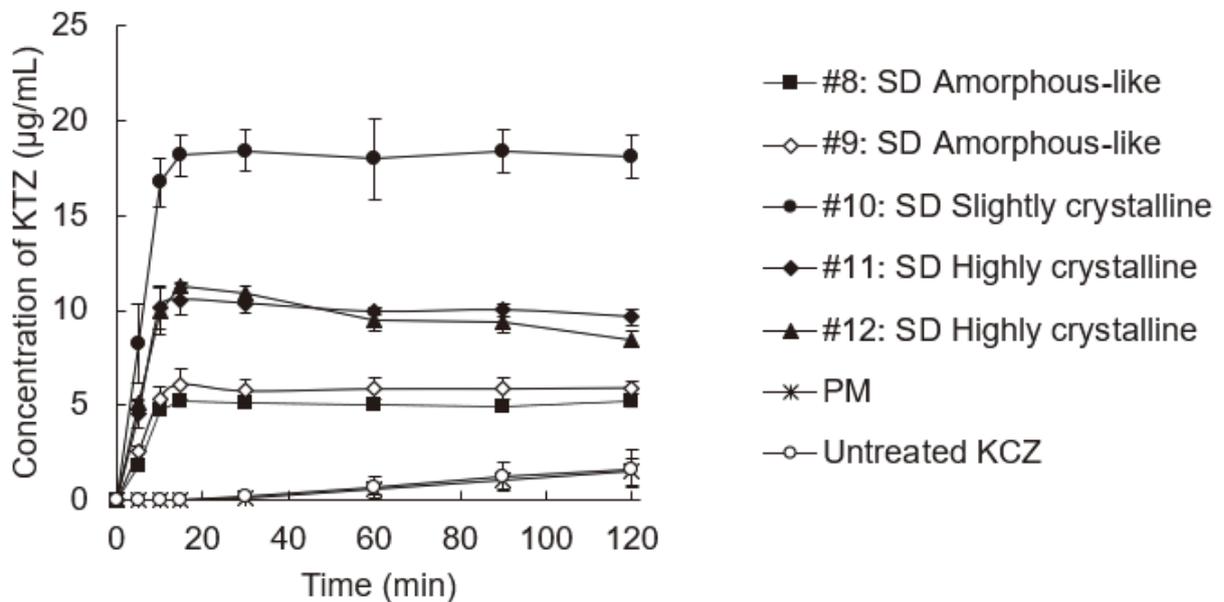


Fig. 6 Dissolution behavior of untreated KCZ, physical mixture (PM) of KCZ/γ-CD, and spray-dried KCZ/CD-MOF powders.

からの放出が遅くなり溶出速度が低下していることがわかる。つまり、CD-MOFの結晶化度の進行に伴い、薬物の放出速度及び溶出率を制御することが期待できる。

4. 考 察

噴霧乾燥法で粒子を作製する場合、液滴からの溶媒の蒸発速度が速いため、非晶質状態になることが多い。今回作製した γ -CDとKOHとにおいては、噴霧乾燥法で作製することで、当初非晶質構造であった。しかし、エタノールによる貧溶媒効果を利用して噴霧乾燥することで、CD-MOFの結晶構造を形成させることに成功した。さらに、この方法でモデル化合物であり、経皮への適用も考えられるKTZを使って粒子を作製すると、より結晶化が進むことも明らかとなった。特に、CD-MOFの結晶構造の違いにより、薬物の放出挙動が異なることが本研究で初めて明らかにすることができた。今後、このCD-MOFを使うことで、当初予定していた、水溶性であるビタミンCや脂溶性のビタミンEあるいはフラボノイド類など多数の成分を配合することが可能であると考えられる。さらに、結晶化を制御することで、pH応答性等の違いにも影響を与えることが考えられる。

5. 総 括

噴霧乾燥時のパラメータを変更することで結晶構造の異なるCD-MOFを形成することができ、結晶とアモルファスのCD-MOFを調製可能である。結晶化を促進させてKTZをCD-MOF粒子内に取り込むことで、CD-MOFの結晶性がさらに進行した。この結果により、噴霧乾燥パラメータを変更し、CD-MOFの結晶化及び結晶成長を制御することで、溶出特性を制御可能な製剤の調製が可能であることを示した。本研究成果によって、CD-MOFを化粧品での新たな素材として利用することで、新規商品開発の一助となりうる可能性を示すことができた。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご援助を賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深く感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) M. Hasan, A. Khatun, T. Fukuta, K. Kogure, Noninvasive Transdermal Delivery of Liposomes by Weak Electric Current. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **154-155**, 227-235, 2020.
- 2) H. D. Lawson, S. P. Walton, C. Chan, Metal-Organic Frameworks for Drug Delivery: A Design Perspective. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **13**, 7004-7020, 2021.
- 3) D. De, P. Sahoo, The Impact of MOFs in pH-dependent Drug Delivery Systems: Progress in the Last Decade. *Dalton Trans.*, **51**, 9950-9965, 2022.
- 4) X. Gao, M. Zhai, W. Guan, J. Liu, Z. Liu, A. Damirin, Controllable Synthesis of a Smart Multifunctional Nanoscale Metal-Organic Framework for Magnetic Resonance/Optical Imaging and Targeted Drug Delivery. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **9**, 3455-3462, 2017.
- 5) X. G. Wang, Z. Y. Dong, H. Cheng, S. S. Wan, W. H. Chen, M. Z. Zou, J. W. Huo, H. X. Deng, X. Z. Zhang, A multifunctional metal-organic framework based tumor targeting drug delivery system for cancer therapy. *Nanoscale*, **7**, 16061, 2015.
- 6) R. A. Smaldone, R. S. Forgan, H. Furukawa, J. J. Gassensmith, A. M. Z. Slawin, O. M. Yaghi, J. F. Stoddart, Metal-Organic Frameworks from Edible Natural Products. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **49**, 8630-8634, 2010.
- 7) J. Y. Tse, K. Kadota, T. Nakajima, H. Uchiyama, S. Tanaka, Y. Tozuka, Crystalline Rearranged CD-MOF Particles Obtained via Spray-Drying Synthesis Applied to Inhalable Formulations with High Drug Loading. *Cryst. Growth Des.*, **22**, 1143-1154, 2022.
- 8) L. Garzón-Tovar, M. Cano-Sarabia, A. Carné-Sánchez, C. Carbonell, I. Imaz, D. MasPOCH, A Spray-Drying Continuous Flow Method for Simultaneous Synthesis and Shaping of Microspherical High Nuclearity MOF Beads. *React. Chem. Eng.*, **1**, 533-539, 2016.
- 9) H. A. Patel, T. Islamoglu, Z. Liu, S. K. M. Nalluri, A. Samanta, O. Anamimoghdam, C. D. Malliakas, O. K. Farha, J. F. Stoddart, Noninvasive Substitution of K^+ Sites in Cyclodextrin Metal Organic Frameworks by Li^+ Ions. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 11020-11023, 2017.

多くの水分子を保持した機能性親水コロイドの開発

昭和薬科大学

唐澤 悟

Hydrophilic-gels and -nanoparticles are paid much attention in medicinal and cosmetic fields. Especially in the field of contrast agents such MRI, fluorescence and RI, the functional nanoparticles, which form approximately 100 nm size in solutions, are passively accumulated in tumor tissues, thus many researchers have reported the tumor-accumulating nanoparticles based on the 100 nm. This tumor-accumulating behavior utilizing the nanoparticles is known as Enhanced Permeability Retention (EPR) effect. Moreover, there is a deep relationship between MRI contrast agents and water molecules; the high contrast ability is derived from presence of many water molecules around the contrast agents. Thus, the hydrophilic nanoparticles, in which many water molecules are taken the core of the particle into, are promising as MRI contrast agents with a high contrast ability. We have studied on the MRI contrast agents utilizing the organic radical. Because the typical MRI contrast agents in clinical, which are consisted of Gadolinium ions (Gd) as a metal spin source, have some issues; renal disorder and brain accumulation by an excess usage. Accordingly, instead of Gd ion, the metal free contrast agents consisting of organic radical are planned. This time, three nanoparticles consisted of radical species are prepared and the physical parameters such rotational correlation time (τ_R) bases on the ESR signal intensity and width, T_1 -weighed image with T_1 -relaxation time, hydrodynamic diameter (D_H) by a dynamic light scattering (DLS), and morphology observations of nanoparticles using a transmission electron microscopy (TEM). Due to checks of the hydrophilicity of the nanoparticles, ClogP values of the nanoparticles were calculated by a ChemDraw Professional 16.0.

Three nanoparticles with organic radicals, **RNP-OHP**, **-OH**, and **OAc**, were prepared according to a previous our report. In the DLS of the aqueous solutions, D_H values for all **RNP-X** showed the similar 100 - 200 nm size-distribution. In contrast, TEM images of **RNP-OH** and **-OHP** showed the different morphology; film-like particles and spherical particles, for **RNP-OHP** and **-OH**, suggesting that the former and latter are vesicle-like and micelle-like particles, respectively. In the contrast agent ability, the relaxivities (r_1) of **RNP-OH** and **-OAc**, which are calculated by a slope of the plot of inverse T_1 relaxation times vs concentration of contrast agents, showed 0.17 and 0.31 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectively, indicating that the latter is more than 1.7 time larger than that of the former, and the highest value among the radical nanoparticles reported by our group. To reveal the relationship between r_1 value and hydrophilicity, ClogP values were estimated to be -0.38 and 1.4 for **RNP-OH** and **-OAc**, respectively. In the previous our report, the micelle-like nanoparticle, PRO2, possesses the smaller ClogP (-0.037) and r_1 (0.17 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) values rather than those of **RNP-OAc**. The above-mentioned results indicate that the morphology of the nanoparticles are control by the ClogP value: the value of approximately 1.0 as a borderline, the nanoparticles with the smaller and larger ClogP value rather than 1.0, would form the micelle and vesicle-like morphology. Accordingly, the vesicle-like nanoparticle based on own ClogP value caused the high r_1 value of **RNP-OAc**.

Considering the above-mentioned results, by controlling the suitable ClogP value, the construction of the metal-free MRI contrast with the high contrast ability (relaxivity: r_1) is underway.

1. 緒言

化粧品素材として、多くの水分子を保持できるハイドロゲルは魅力的であり、これらを基盤として化粧品素材研究が発展してきた経緯がある。親水性コロイドはハイドロゲルと同様に多くの水分子を保持できる点と、ハイドロゲルに比べて機能性を付与しやすい点で魅力的な素材である。我々のグループでは、機能性コロイド粒子の研究を進めており、最近では両親媒性側鎖を導入した超分子型ウレアベンゼン誘導体を基本骨格として、①MRI造影機能を有す

るガドリニウム錯体の導入、②金属を含まないメタルフリー造影剤のための有機ラジカルの導入、③マラリア・癌治療効果を有するアルテミシニン類縁体導入などを行い、それらコロイド粒子の機能性について報告してきた^{1,2)}。

MRI造影剤は水分子との間に非常に密接な関係があり、この関係性について我々が開発してきたナノ微粒子型造影剤に加え、ガドリニウム原子と有機ラジカルのスピン量子数 (S) を使って説明する³⁾。画像診断法においては、MRI造影剤が体内へ投与された組織画像はより強調される(輝度が高い白い画像と黒い画像のコントラスト比が大きい)のが一般的である。これは造影剤の造影能によって T_1 と T_2 緩和時間(縦緩和と横緩和)の短縮効果がバックグラウンドと比べて著しく大きいことを意味する。造影能を大きくする即ち緩和時間短縮には、電子スピン(不対電子)を有する分子即ち磁石のような物質がスピン源として働いている。短縮効果はスピン種のスピン量子数 (S) に対して強く反映するため、元素で最も大きい $S=7/2$ を有するガド



Development of Functional Hydrophilic Colloids Containing Many Water Molecules

Satoru Karasawa

Showa Pharmaceutical University

リニウムを含む造影剤がひろく臨床現場で用いられている。またガドリニウム錯体のような金属を含まないメタルフリーの造影剤では、代替として有機ラジカルを用いる戦略が示されており、ガドリニウム錯体で報告されているいくつかの副作用、例えば腎障害や脳蓄積などを示さない新しいタイプの造影剤構築を目指している。しかしながら有機ラジカルは $S=1/2$ と小さく、緩和時間短縮効果が著しく低い欠点がある。この欠点を克服するために、我々はナノ微粒粒子化と微粒粒子中の水分子に着目した研究を実施してきた^{3,4)}。先に緩和時間短縮効果には S の大きさが重要であると述べたが、それ以外の要因も重要であり1)分子の回転相関時間の延長、2)スピン結合水の最適化、などが挙げられる。1)や2)は複雑な要因が絡んだ結果示されるパラメータであるが、平たく言うと1)はスピンを含んだ分子のサイズが大きいほど分子運動が抑制されて回転相関時間が延長となる。即ちナノ微粒粒子化することで緩和時間短縮が予期される。2)については、短縮効果にはスピン源周辺に十分な水分子が必要であり、数が少ないと短縮効果が限定される。また、このスピン源周辺の水分子の拡散速度の最適化が必要である。この2)が、MRI造影剤と水分子との深い関係性を表すことになる。我々はFig. 1に示す2種類の五員環ProxylラジカルPRO1とPRO2を合成し物性を評価してきた⁵⁾。それぞれには水分子と水素結合することで知られているエチレングリコール鎖を導入しており、水分子を集める効果を狙った。PRO1はProxyl骨格のNOに対して左右にエチレングリコール鎖を導入し、一方PRO2ではNOに対して片方だけにエチレングリコール鎖を導入している。これらPRO1と2の緩和時間(T_1)の濃度変化を測定し、 T_1 の逆数を濃度に対してプロットした傾きから造影能の指標である緩和能(r_1)を評価した結果、PRO1は $0.27\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ に対してPRO2は $0.17\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ となり、同じエチレングリコール鎖を導入しても緩和能に差が生じることが分かった。次にPRO1とPRO2の緩和能の差を検証するために、動的分散乱(DLS)による水溶液中の微粒粒子のサイズと透過型電子顕微鏡(TEM)による微粒粒子の

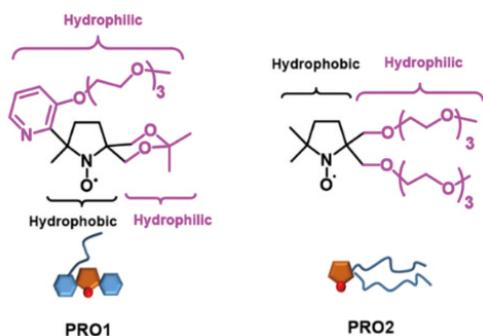


Fig. 1 PRO1とPRO2の分子構造。極性置換基であるエチレングリコールを紫色で強調している。

形態観察を行った。さらに、環境応答型蛍光分子N15ClをPRO1とPRO2中に導入し⁶⁾、ラジカル周辺の水環境について蛍光強度から考察を行った。その結果、PRO1は100nmサイズのナノ微粒粒子であり、混合したN15Clの蛍光強度低下やTEM観察より、ナノ微粒粒子はベシクル状構造であると判断した(Fig. 2と3)。一方PRO2について、同様に100nm程度のナノ微粒粒子であるが、TEM観察やN15Clの蛍光強度からミセル状構造のナノ微粒粒子であると判断した(Fig. 2と3)。ベシクル状のPRO1は水分子が微粒粒子内へ入り込んでいるため、スピン源であるNOと接触または水素結合しやすいのに対して、PRO2ではミセル状となるため、水分子が少ない疎水性部がナノ微粒粒子の内側に存在し、その疎水部へNOが配置された可能性を考えている。即ち、水分子が多く集まっている部位へNOが配置されたPRO1の緩和能は大きくなり、水分子が少ない部位へNOが配置されているPRO2は緩和能が小さくなると考えた。言い換えるとPRO1は親水性コロイドであるため緩和能増大を示し、PRO2は疎水性コロイドであるため緩和能低下を示した。

今回有機ラジカルを用いたメタルフリー造影剤に関して、疎水性コロイドのProxylラジカルPRO2の骨格に注目

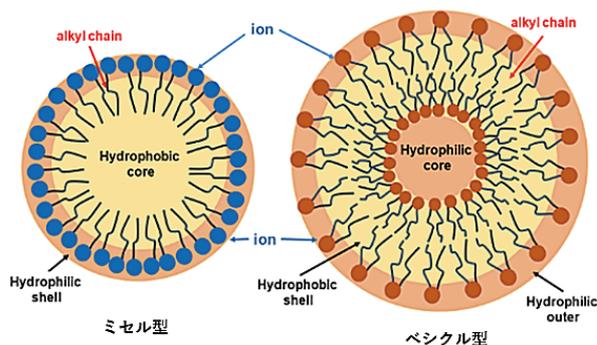


Fig. 2 ミセル型とベシクル型の微粒粒子の構造。親水性部(Hydrophilic part)にスピン源が配置している方が緩和能増大を示す可能性が高い。

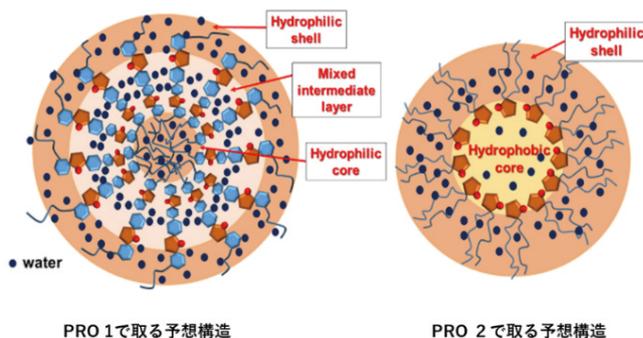


Fig. 3 PRO1とPRO2で予想されている形態と水分子が分散している様子。PRO1とPRO2のNO部が水分子と接触している方が緩和能増大を示す可能性が高い。

し、エチレングリコールの代わりに様々な置換基を導入したNOラジカルを合成した。置換基の疎水性度 (ClogP 値) に注目し、緩和能と ClogP とナノ微粒子 (コロイド) の形態との相関関係を明らかとした。即ち疎水性コロイド (PRO 2) を親水性コロイドへ変換するアプローチの検討を行った。

2. 方法

Proxyl ラジカルに様々な置換基を導入するため、メトキシエトキシテトラヒドロピラニル基 (OTHP) を導入した RNP-OTHP、メトキシエチルアセテート基 (OAc) を導入した RNP-OAc、メトキシエタノール基 (OH) を導入した RNP-OH を Fig. 4 の方法に従って合成した⁷⁾。2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol を出発物質とし 4 ステップでニトロロン体を得て、メチルマグネシウムブロミドによるグリニヤール反応によりラジカル体を得た。脱アセタール化後、目的とする置換基を変えた 3 種類のラジカル体を合成した。得られたラジカルの ESR 測定により、ラジカル種の性質をシグナル強度と線幅からケルソンの式に従って解析し、回転相関時間 τ_R を見積った。 τ_R から NO ラジカル種の回転相関時間を見積ることが可能であり、粒子のサイズと一定の相関関係を有する。また水溶液中における粒子径測定を動的光散乱法 (DLS) で見積った。透過型電子顕微鏡観察では (TEM)、水溶液試料をエラスチックカーボングリッドへ塗布後、陰染色剤であるリンモリブデン酸を加

えた後乾燥させ、サイズと形態観察を行った。MR 画像については 1.5 テスラの磁場を用いて、濃度の異なる試料の T_1 強調画像を撮像し、 T_1 緩和時間を見積った。得られた T_1 緩和時間の逆数を濃度でプロットし、直線の傾きから緩和能を算出した。またラジカル種の疎水性については ChemDraw Professional 16.0 を用いて ClogP を見積った。

3. 結果

3.1. RNP-X の ESR 測定と回転相関時間の算出

RNP-OTHP, -OH, -OAc の ClogP 値は、それぞれ 1.9, -0.38, 1.4 と見積られ、先に示した PRO 2 は -0.037 であった。1 mM 水溶液の ESR 測定によりシグナル強度と線幅から τ_R を見積った結果、それぞれ 18.6×10^{-11} s (OTHP)、 7.96×10^{-11} s (OH)、 9.38×10^{-11} s (OAc) が得られた。親水性基の水酸基が結合している RNP-OH が最も低い値を示し、値から $\text{OH} < \text{OAc} < \text{OTHP}$ の順となり ClogP 値との相関が得られた (Fig. 4)。

3.2. RNP-X の DLS 測定と TEM 観察による微粒子の形態の違い

DLS で得られた流体力学直径 (D_H) は、すべて 100 ~ 200 nm サイズのナノ微粒子形成が示され (Table 1)、RNP 間でサイズによる大きな違いは観測されなかった。一方微粒子の多分散指数 (PDI) では違いが観測され、RNP-OH は PDI が 0.1 以上で多分散な分布であったが、RNP-OAc

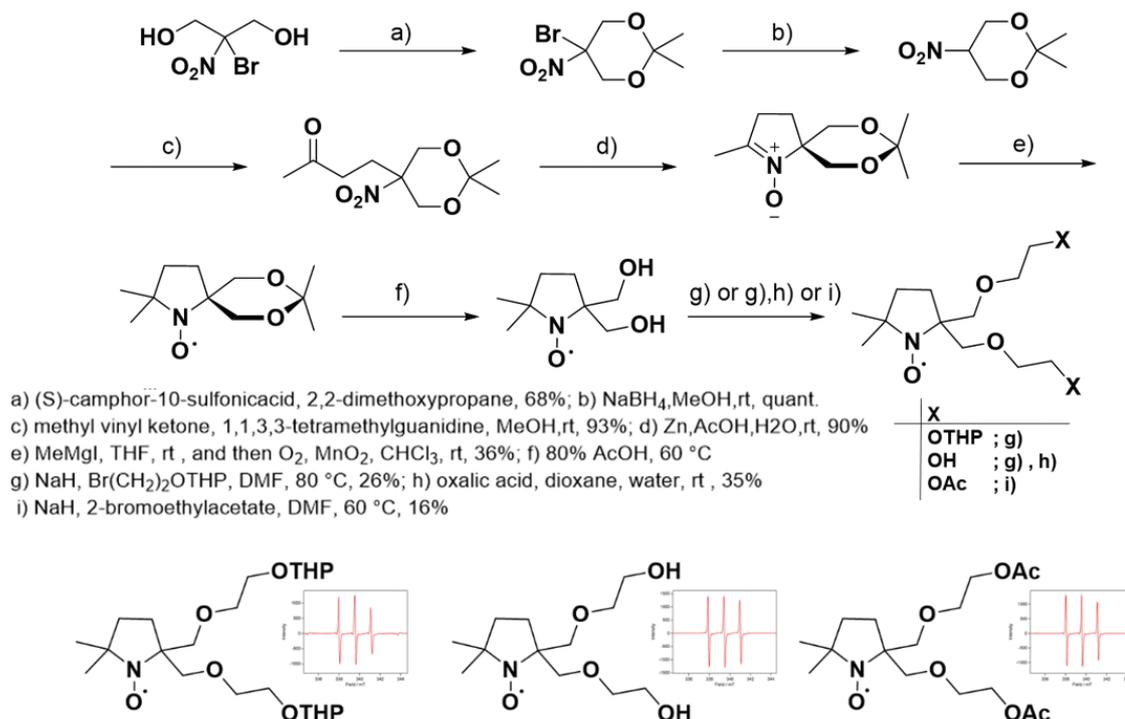


Fig. 4 RNP-X の合成ルート (上) と得られた RNP-X の水溶液中の ESR スペクトル (下)。

Table 1 RNP の物理化学的パラメータ (τ_R 、緩和能 (r_1)、臨海ミセル濃度 (CMC)、アスコルビン酸に対する消失速度と ClogP 値)、粒子径 (PDI) と形態学的特徴 (morphology)

RNP	τ_R/s ($\times 10^{-11}$)	$r_1/mM^{-1}s^{-1}$	size/nm (PDI)	CMC	rate / s^{-1}	ClogP	morphology
-OTHP	18.6	-	134 (0.071)	-	-	1.9	多層膜 orベシクル
-OH	7.96	0.13	154 (0.15)	5.5	0.034	-0.34	球状薄膜
-OAc	9.38	0.31	190 (0.057)	5.0	0.014	1.4	-
TEMPO		0.10-0.20		-	0.070	-	-

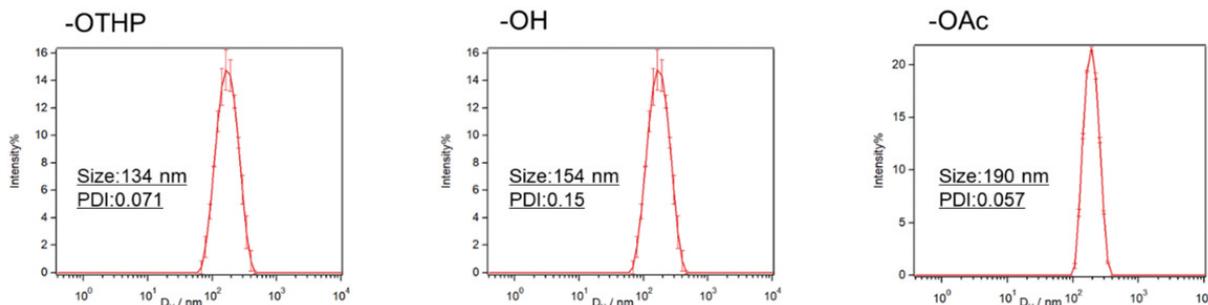


Fig. 5 DLSの結果。左から1mM RNP-OTHP, -OH, -OAc 水溶液中の粒子の数と流体力学直径 (D_H) の相関。PDI: 多分散指数。

と -OTHP は 0.1 以下の 0.057 と 0.07 であり、ClogP が大きい疎水性が高いほど水溶液中で単分散のナノ微粒子として存在することが明らかとなった⁸⁾。

TEM 観測では、試料として RNP-OTHP と -OH について観察した (Fig. 6)。サイズは DLS で得られた D_H と比較して大きな相違点は見られなかった。形態観察の結果、RNP-OH では球状のナノ微粒子の存在が示唆されたが、RNP-OTHP では球状が崩れた膜状物質が多く観察され、RNP-OH とは異なった集積構造であることが示唆された (Fig. 6)。

3.3. RNP-X の緩和時間測定と緩和能 (r_1) の算出

3 種類のラジカルについて T_1 緩和時間測定を行った (Fig. 7)。RNP-OH と -OAc については、1-10mM の濃度で、RNP-OTHP については 1mM 以下の試料について実施した。1mM 以下の RNP-OTHP については検出限度付近であったため、高濃度で調整した RNP-OH と -OAc について T_1 から r_1 を見積った。Fig. 7 に示すように、 T_1 強調画像は濃度に依存し、高濃度ほど輝度が強くなった。 r_1 について T_1 の逆数と濃度でプロットし、その直線の傾きから見積った結果 (Fig. 8)、興味深いことにより疎水性の高い RNP-OAc (ClogP=1.4) が $0.31mM^{-1}s^{-1}$ となり、親水性の高い RNP-OH (ClogP=2.1) が $0.17mM^{-1}s^{-1}$ となり、RNP-OAc が 1.7 倍以上高い値を示した。また RNP-OAc の $0.31mM^{-1}s^{-1}$ の値は、先で述べた PRO1 よりも大きな値であり、Proxyl 骨格を有するラジカルでは最も高い値

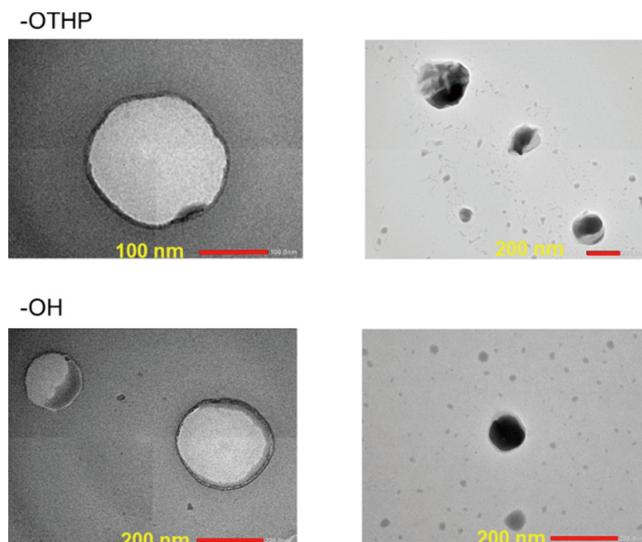


Fig. 6 RNP-THP (左) と -OH の TEM 画像。リンモリブデン酸による陰染色による測定。

を示した。

3.4. アスコルビン酸に対するラジカルの消失速度

Proxyl ラジカルなどの NO ラジカルは、生体内の還元物質に対して高い反応性を示し、還元されヒドロキシアミン (NOH) へ変換されるため、ラジカルとしての機能を失う。即ち、還元物質存在下では緩和時間短縮効果が抑制される。そこで、還元物質であるアスコルビン酸と共存させることでのラジカル消失速度を基準物質である TEMPO

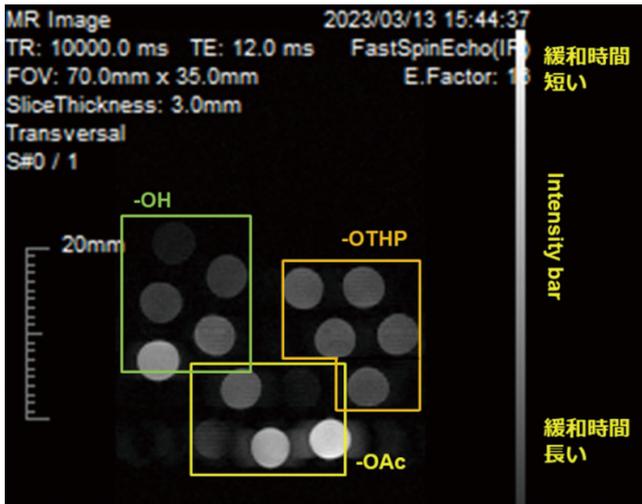


Fig. 7 試験管中のRNP-X水溶液の T_1 強調ファントム画像。
外部磁場: 1.5T, TR: 10000.0ms,
TE: 12.0ms, SliceThickness: 3.0mm.

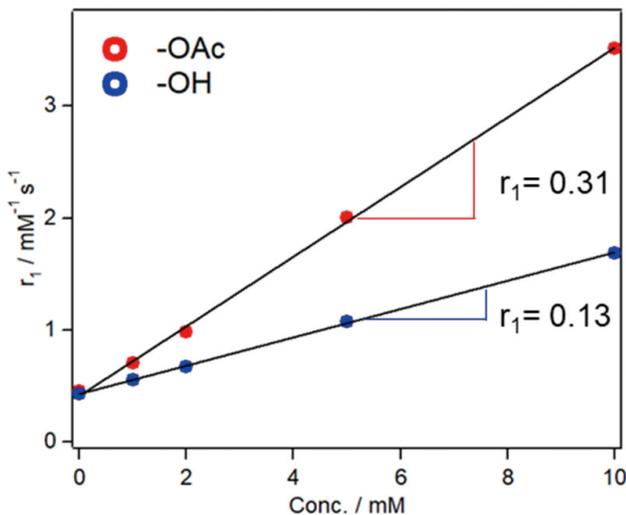


Fig. 8 RNP-OHと-OAc水溶液中の緩和時間の逆数と濃度プロット。直線の傾きから緩和能(r_1)が算出される。

ラジカルと比較した。1mMのRNP-OHと-OAcに対して、1mMのアスコルビン酸を加えESRシグナル強度の減衰を時間プロットし、一次式により消失速度定数 k を見積った (Fig. 9)。その結果、RNP-OHと-OAcはそれぞれ、 0.034 と 0.014s^{-1} を示したが、TEMPOは 0.070s^{-1} であり、RNP-Xの k は小さくなった。この結果は、ナノ微粒子を形成することでアスコルビン酸との反応性が抑制されたことを示唆している。

3.5. RNP-XのClogP値と緩和能と微粒子の形態との相関性

今回得られた物理化学的パラメータ、粒子径と形態学的情報を Table 1 にまとめた。緩和能について、疎水性の高いRNP-OAcが親水性の高い-OHよりも高い緩和能を示した。RNP-OAcの示した $0.31\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ の値は、PRO1 ($0.27\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)よりも大きくなり、我々が報告したラジカルナノ微粒子型造形剤で最も高い値であった点は評価できる。またRNPシリーズと類似骨格のPRO2と比較すると、PRO2の緩和能は $0.17\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ であり、RNP-OAcの値は顕著に大きな緩和能を示した。一方PRO2は先の研究からミセル状の微粒子を形成していることが明らかであり、ナノ微粒子の形態(ミセル状かベシクル状か)、緩和能とClogPとの間に相関関係があることが示唆された。PRO2のClogP値が -0.037 、RNP-OHが -0.38 、RNP-OAcが 1.4 であることから、Proxyl骨格を基本とした(PRO2やRNPの骨格)分子会合体がミセルまたはベシクルを形成するかの閾値はClogP値 $0.0 \sim 1.0$ 付近にあることが示唆される。PRO2やRNP-OHのようなミセル状のナノ微粒子はNOラジカルが疎水性部に存在することが予想され、その結果低緩和能を示す。一方RNP-OAcやPRO1のようなベシクル状のナノ微粒子はNOラジカル部周辺に水分子がミセル状ナノ微粒子よりも多く存在することから、高緩和能を示すことが示唆された。

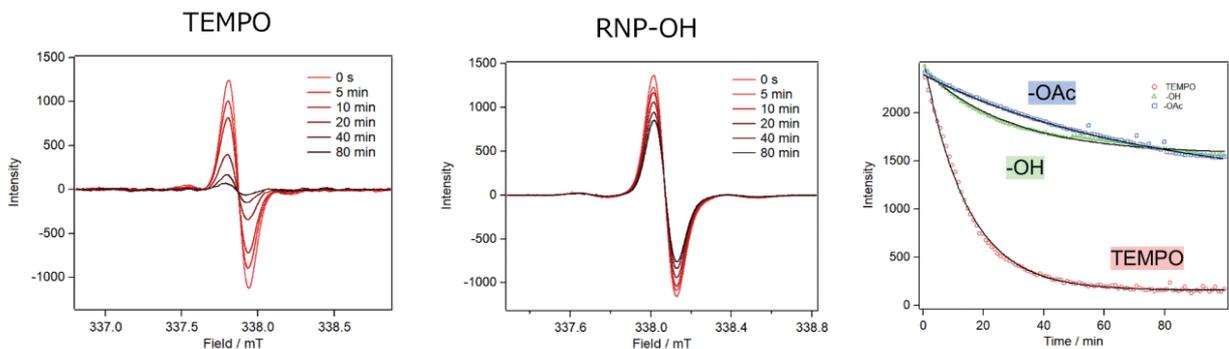


Fig.9 ラジカル 1 mM 水溶液 (RNP-OH, -OAc と TEMPO) に対してアスコルビン酸 1 mM 加えたときの ESR 強度変化と消失速度の算出: TEMPO と RNP-OH の ESR スペクトル中の最も低磁場側のシグナルの強度変化 (図左と真ん中)。強度変化の時間プロット (図右)。実線は減衰を 1 次式でフィティングした結果。

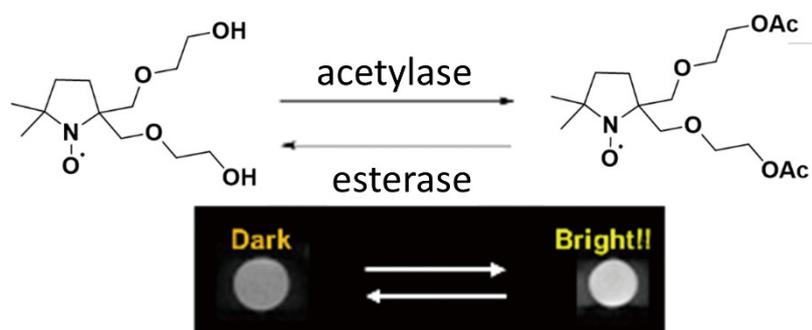


Fig. 10 予想される RNP-OH と -OAc を使った分子変換によるスイッチングと T_1 強調ファントム画像の変化。 T_1 緩和時間が長い RNP-OH へアセチラーゼを加えることで、 T_1 緩和時間が短い RNP-OAc へ変換されることで T_1 強調画像の輝度が高くなり白くなる (左から右)。一方、 RNP-OAc へエステラーゼを加えることで RNP-OH が生成し、輝度が下がった暗い T_1 強調画像が得られる様子 (右から左)。

4. 考察

今回、PRO2 と同様な Proxyl 骨格を有する有機ラジカルを使って、ClogP 値、ナノ微粒子の形態と緩和能についての相関性を調べた。その結果、ある閾値以上の ClogP 値を有するナノ微粒子はベシクル状となり高緩和能を示すことが明らかとなった。即ち ClogP 値を変えることによって、ナノ微粒子の形態を制御することが可能であることが示された。今回アセチル基を有する RNP-OAc が水酸基を有する RNP-OH と比較すると 1.7 倍以上の高緩和能を示した。このことを利用して Fig. 10 に示すように、生体内のアセチラーゼやエステラーゼにより緩和時間のスイッチングが可能となることが期待される。

また我々は、MRI 造影剤に加えて、蛍光性物質のナノ微粒子化の研究も行っている⁹⁾。疎水性の高い芳香族炭化水素にイオン性また非イオン性極性基を導入することによって、ナノ微粒子の形態を制御することに成功しており、今後疎水性コロイドと親水性コロイドの間のスイッチングや生体蛍光イメージングへ展開させたい。

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。

電子顕微鏡測定では、公益財団法人九州先端科学技術研究所の吉原大輔博士に有益なアドバイスをいただきながら測定ができましたことを厚く御礼申し上げます。

緩和時間測定では、すべての試料の測定を日本レドックス長沼辰弥博士に実施いただきました。厚く御礼申し上げます。

本研究内容は、昭和薬科大学 梅野智大博士、飯塚直子氏、

秋月唯花氏、馬場果奈恵氏、斎藤大朗氏をはじめ多くの研究室のメンバーのご協力のもと進めてまいりました。厚く御礼申し上げます。

(引用文献)

- 1) H. Hayashi, K. Ohkubo, S. Karasawa, and N. Koga Assemblies of Functional Small-Sized Molecules Having 4-Amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl Responsive to Heat and pH in Water and Their Water Proton Relaxivities *Langmuir* 27, 12709 (2011).
- 2) H. Koi, N. Takahashi, Y. Fuchi, T. Umeno, Y. Muramatsu, H. Seimiya, S. Karasawa and H. Oguri *Org. Biomol. Chem.* 18, 5339 (2020).
- 3) K. Morishita, S. Ueki, Y. Fuchi, S. Murayama, T. Kaneko, N. Narita, S. Kobayashi, G. Hirai, I. Aoki, and S. Karasawa Self-Assembled Biradical Ureabenzene Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging *ACS Appl. Nano Mater.* 1, 6967 (2018).
- 4) R. Shiraishi, T. Kaneko, K. Usui, T. Naganuma, N. Iizuka, K. Morishita, S. Kobayashi, Y. Fuchi, Y. Matsuoka, G. Hirai, K. Yamada, and S. Karasawa Effects of Substituents on the Properties of Metal-Free MRI Contrast Agents *ACS Omega* 4, 20715 (2019).
- 5) R. Shiraishi, S. Matsumoto, Y. Fuchi, T. Naganuma, D. Yoshihara, K. Usui, K. Yamada, and S. Karasawa Characterization and Water-Proton Longitudinal Relaxivities of Liposome-Type Radical Nanoparticles Prepared via a Supramolecular Approach *Langmuir* 36, 5280 (2020).
- 6) J. Hirota, K. Usui, Y. Fuchi, M. Sakuma, S. Matsumoto, R. Hagihara, and S. Karasawa Fluorescence Properties and Exciplex Formation of Emissive

- Naphthyridine Derivatives: Application as Sensors for Amines *Chem. Eur. J.* **25**, 14943 (2019).
- 7) T. Hirayama, M. Taki, M. Nakamura, T. Arata, Y. Yamamoto, Synthesis of a New Water Soluble 2,2-Bifunctionalized Spin Label and Its Application to Troponin C, *Chem. Lett.*, **35**, 834 (2006).
- 8) F. Babick *Suspensions of Colloidal Particles and Aggregates*, Springer, Switzerland, 2016, 40-44.
- 9) R. Hagihara, T. Umeno, S. Ueki, D. Yoshihara, Y. Fuchi, K. Usui, M. Sakuma, K. Yamada, and S. Karasawa Push-Pull Bisnaphthyridylamine Supramolecular Nanoparticles: Polarity-Induced Aggregation and Crystallization-Induced Emission Enhancement and Fluorescence Resonance Energy Transfer *Chem. Eur. J.* **27**, 3039 (2021).

天然物由来高分子を利用した新規サンスクリーンカプセルの創出

大阪公立大学大学院工学研究科物質化学生命系専攻応用化学分野

北山 雄己哉

Sunlight contains harmful ultraviolet light. Sunscreen materials are great important materials for skin protection from sunlight. Herein, hollow/capsule polymer particles possessing ultraviolet absorbance capability were fabricated by the interfacial photoreaction of spherical polymer particles possessing photoreactive cinnamoyl and coumarin groups. In the interfacial photocrosslinking approach, [2+2] photodimerization reaction between two cinnamoyl and coumarin groups proceeds under suitable wavelength lights, but the photodimerization reaction only proceeds at the particle interfacial region. Using this interfacial photocrosslinking approach, shell-crosslinked hollow polymer particles were obtained directly from simple spherical polymer particles via a facile procedure. Encapsulation of various molecules in the hollow polymer particles was achieved by post-introduction based on the solvent exchange procedure.

1. 緒言

サンスクリーン材料は、太陽光に含まれる有害な紫外線 (UV) から皮膚を保護するために用いられる。太陽光には、皮膚炎や光老化の原因となる UVB (280-320 nm)、DNA 損傷や皮膚がんの原因となる UVA (320-400 nm) が特に多く含まれるため、これらを効果的に遮蔽するサンスクリーン材料の開発は重要である。現在は、無機ナノ粒子や芳香族系有機低分子化合物がサンスクリーン材料として用いられている。しかし、前者は皮膚を透過し生細胞に侵入する上に、光触媒機能により活性酸素種を発生させ細胞毒性や老化の原因となる可能性がある。後者は、低分子であることから皮膚への浸透が懸念され炎症が生じる恐れがある。そのため、安全、低毒性かつ効果的に UV 光を遮蔽できるサンスクリーン材料の開発が望まれる。

植物に含まれる天然由来分子である桂皮酸は、UVB 領域 (280 nm) に高いモル吸光係数を有するだけでなく、適切な光照射により $[2\pi+2\pi]$ 二量化反応を示すことが知られている。以前の研究で、桂皮酸から誘導された 2-Cinnamoyl ethyl methacrylate (CEMA) を重合して作製した高分子微粒子に、UV 照射を行うと微粒子界面近傍限定的に Cinnamoyl 基間二量化反応 (ポリマー間架橋反応) が生じる「界面光架橋反応」を見出した¹⁻³⁾。この発見の後、微粒子内部に残存する未架橋ポリマーを洗浄除去することができ、内部に空隙を有する中空粒子が得られることを明らかにした (図 1)。これまでにも、テンプレート法⁴⁻⁵⁾や

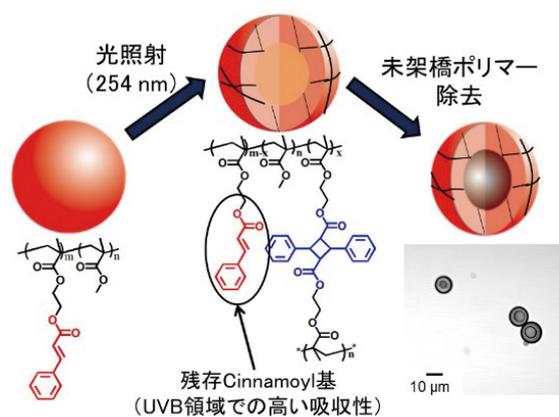


図 1 界面光架橋反応の概要図

相分離自己組織化法⁶⁾など様々な中空粒子調製法が報告されてきた⁷⁻⁸⁾が、本手法では、光照射と微粒子洗浄という簡便かつ安全なステップで中空粒子を作製できることを特徴としている。さらに、得られる中空粒子には、未反応の光反応性基が必ず残存するため非常に高い UVB 吸収を示す。

本研究では、界面光架橋反応を基盤技術とした UVA 領域に吸光を示す機能性サンスクリーンカプセルの創出を目指す。クマリンは植物などの天然に広く存在する芳香成分の一種であり、UVA 領域 ($\lambda_{\max}=320 \sim 330$ nm) 以上の波長に光吸収を示す。さらに、光反応性アルケン部位を有するため、光二量化反応が期待できる。そこで本研究では、UVA に光反応性・吸収性を示す新規天然物由来モノマーを創製し、界面光架橋反応を利用して UVA 吸収を示す中空粒子の作製を試みる。さらに、モデル分子として蛍光色素を内包したカプセルを調製できるか検討した。これにより、微粒子の界面光架橋反応を利用して様々な波長の吸収を示す高分子微粒子材料を創ることが出来るか検討した。



Preparation of Sunscreen Capsules Using Photoreactive Polymers Possessing Natural Compounds

Yukiya Kitayama

Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka Metropolitan University

2. 方法

2.1. クマリン誘導体モノマーの合成

UVA領域に吸収を示すクマリン基を光反応性部位としてもつモノマー (COMA) を以下のように合成した (図2)。具体的には、7-ヒドロキシクマリンおよび2-ブロモエタノールを炭酸カリウム存在下、アセトン中で反応させた。その後、シリカゲルクロマトグラフィによって精製し、7-(2-ヒドロキシエトキシ)クマリンを得た。さらに、7-(2-ヒドロキシエトキシ)クマリンをメタクリル酸クロリドとピリジンとを溶解させたテトラヒドロフラン (THF) 中で反応させた。その後、シリカゲルクロマトグラフィで精製することで、目的物である7-(2-メタクリロイルオキシエトキシ)クマリン (COMA) を光反応性モノマーとして得た。

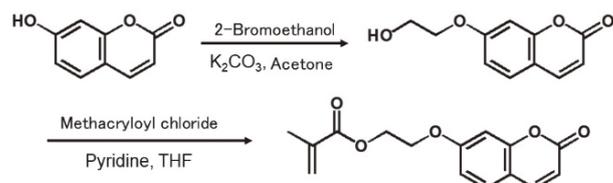


図2 COMAの合成ルート

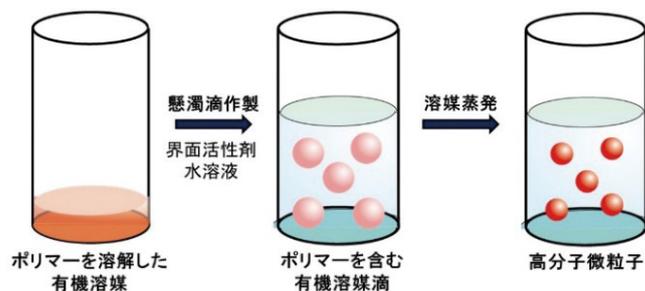


図3 溶媒蒸発法による微粒子合成プロセス

2.2. 桂皮酸誘導体モノマーの合成

リファレンス化合物としてUVB領域に吸収を示す桂皮酸を光反応性部位として有するモノマー (CEMA) を合成した。桂皮酸クロリドと2-ヒドロキシエチルメタクリレートとトリエチルアミン存在下、室温で一晩反応させ、シリカゲルカラムクロマトグラフィを用いて精製した。

2.3. シンナモイル構造およびクマリン構造を側鎖に有する光反応性ポリマーの合成

2,2'-アゾビスイソブチロニトリルを開始剤としたラジカル重合を用いて、CEMAとメタクリル酸メチル (MMA) のランダム共重合体 (P (CEMA-MMA)) をシンナモイル基含有光反応性ポリマーとして合成した。ポリマーは再沈殿により精製・回収した。さらに、2,2'-アゾビスイソブチロニトリルを開始剤としたラジカル重合を用いて、COMAとメタクリル酸メチル (MMA) のランダム共重合体 (P (COMA-MMA)) をクマリン基含有光反応性ポリマーとして合成した。ポリマーは再沈殿により精製・回収した。また合成石英基板上にキャスト法によりP (COMA-MMA) 薄膜を形成し、光照射 ($\lambda=365\text{nm}$) 後のUV-Vis測定を行い、スペクトルの経時変化を調査することでP (COMA-MMA) の光反応性を評価した。

2.4. 中空粒子の合成

得られたP (CEMA-MMA) およびP (COMA-MMA) をクロロホルムに溶解させ、ポリビニルアルコール (けん化度: 88%、重合度: 1000) 水溶液中にホモジナイザーを用いて分散させ、クロロホルムを蒸発させることにより真球状高分子微粒子を調製した (図3)。この真球状粒子に対して、水分散状態で光照射を行うことで界面光架橋反応を行い、THFを用いた遠心洗浄により未架橋ポリマーを除去

し、シェル部が架橋された中空粒子を作製した。

2.5. モデル蛍光分子を内包したカプセル粒子の合成

Rhodamine Bを溶解したTHF/DMSO混合液に中空粒子を分散させ、その後多量の純水に溶媒置換することにより、カプセル粒子の調製を行った。

3. 結果および考察

CEMAおよびCOMAの合成について、核磁気共鳴装置 ($^1\text{H-NMR}$) により評価したところ、それぞれ目的物の単離・精製ができていることを確認した。CEMAの吸収スペクトルを紫外可視分光光度計により測定したところ、極大吸収波長 λ_{max} を約280nmに有しており、UVB領域に吸収を示した。またCOMAの紫外可視分光光度計測定を行ったところ、 λ_{max} を約321nmに有しており、UVA領域に吸収を示すモノマーを得ることができた。

さらに、CEMAおよびCOMAをMMAとともに2,2'-アゾビスイソブチロニトリルを開始剤としたラジカル重合によって共重合体 (P (CEMA-MMA) およびP (COMA-MMA)) を合成した。再沈殿精製の後、 $^1\text{H-NMR}$ によるポリマー組成を評価したところ、ほぼ仕込み比通りに各モノマーが共重合されたポリマーであることがわかった。得られたポリマーの紫外可視分光光度計測定から、P (CEMA-MMA) は桂皮酸由来の $\lambda_{\text{max}}=280\text{nm}$ に有しており、P (COMA-MMA) はクマリン由来吸収を $\lambda_{\text{max}}=323\text{nm}$ に有していることがわかった。このことから、両ポリマーはそれぞれシンナモイル構造とクマリン構造を保持していることがわかった。

次に、P (CEMA-MMA) を合成石英基板上に薄膜状に

成形し、 $\lambda=254\text{nm}$ の光照射を行い、経時的な紫外可視分光光度計測定を行った。その結果、光照射時間の増加に伴い、シナモイル基由来の吸収が徐々に減少し、光反応が進行していることが示唆された。また、P (COMA-MMA)を石英基板上で薄膜状に成型し $\lambda=254\text{nm}$ の光照射を行った場合、クマリン由来吸光度の減少は観察されなかった。一方、P (COMA-MMA)に対して $\lambda=365\text{nm}$ の光照射を行った場合、照射時間とともにクマリン基由来の吸光度が減少し、本ポリマーが当該波長に対して光反応性を有していることがわかった(図4)。さらに、両ポリマーともに光照射後に吸光度が一定値に収束することから、一部のシナモイル基およびクマリン基が光照射後も残存していることがわかった。すなわち光反応性部位が、ポリマー光架橋後も光吸収部位として残存することが示唆された。この残存光反応性部位に由来して、中空粒子やカプセルはUVBやUVAに対する吸収を示すと期待できた。

次に、P (CEMA-MMA) およびP (COMA-MMA) 微粒

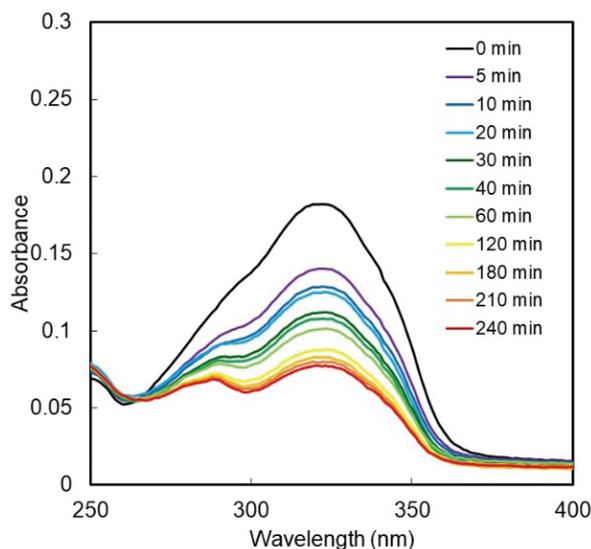


図4 P (COMA-MMA) 薄膜への種々光照射時間ごとの紫外可視分光光度計スペクトル ($\lambda=365\text{nm}$)

子の調製を溶媒蒸発法により実施した。溶媒蒸発法では、ポリマーを水が混和しない有機溶媒に一度溶解し、そのポリマー溶液を分散安定剤水溶液中で分散させた後、有機溶媒を蒸発させることにより真球状高分子微粒子を得ることができる。そこで、各ポリマーの有機溶媒への溶解性を評価した。P (CEMA-MMA) およびP (COMA-MMA) ともにクロロホルムに溶解したことから、クロロホルムを有機溶媒として用いた溶媒蒸発法により、微粒子化を試みた。得られた微粒子分散液を光学顕微鏡で観察したところ、マイクロメートルサイズの真球状高分子微粒子が観察でき、マイクロメートルサイズのP (CEMA-MMA) およびP (COMA-MMA) 微粒子を得ることができた(図5)。

次に、得られた高分子微粒子に対して界面光架橋反応による中空粒子化を試みた。P (CEMA-MMA) 微粒子には、薄膜形態で光反応が進行したことが示唆された $\lambda=254\text{nm}$ の光照射を行った。光照射前後では微粒子モルフォロジーに変化はなく、真球状高分子のままであったが、光照射後の粒子を、THFを良溶媒として用いた遠心洗浄を行ったところ、粒子内部からポリマーが除去された中空粒子が得られたことがわかった(図5)。一方、 $\lambda=365\text{nm}$ の光照射を行ったところ、P (CEMA-MMA) 粒子の架橋反応は進行しなかった。また、P (COMA-MMA) 微粒子には、 $\lambda=365\text{nm}$ の光照射を行ったところ、こちらも光照射前後で粒子形態に変化はなく真球状粒子のままであったが、THF洗浄後に中空粒子が得られていた(図5)。一方、 $\lambda=254\text{nm}$ の光照射を行ったところ、P (COMA-MMA) 粒子の架橋反応は進行しなかった。以上の結果から、シナモイル基やクマリン基を側鎖に有する高分子微粒子に適切な光照射条件による微粒子界面光架橋反応を適用することにより中空粒子を得ることができることが明らかになった。

次に、中空粒子のシェル厚み制御を試みた。微粒子界面光架橋反応は、粒子外部から光反応が進行するため、光照射時間に伴いシェル厚みが増加する可能性がある。そこで、P (COMA-MMA) 粒子に対する界面光架橋反応を異なる

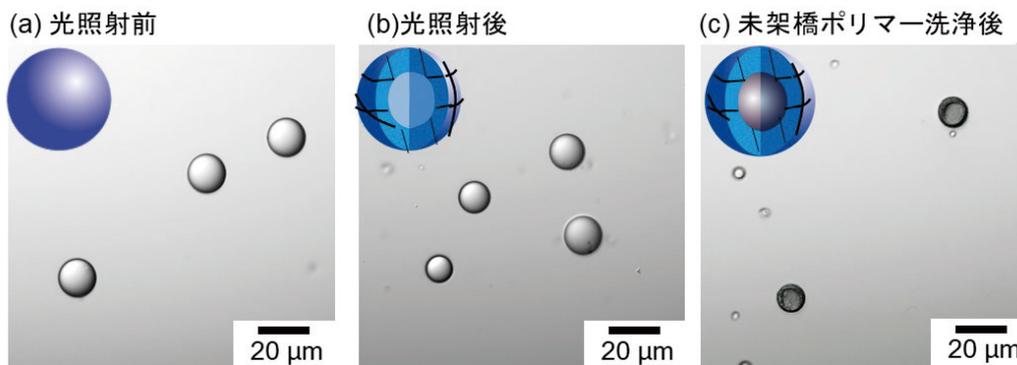


図5 光照射前(a)、光照射後(b) および未架橋ポリマー洗浄後(c)のP (COMA-MMA) 微粒子の光学顕微鏡写真($\lambda=365\text{nm}$)。

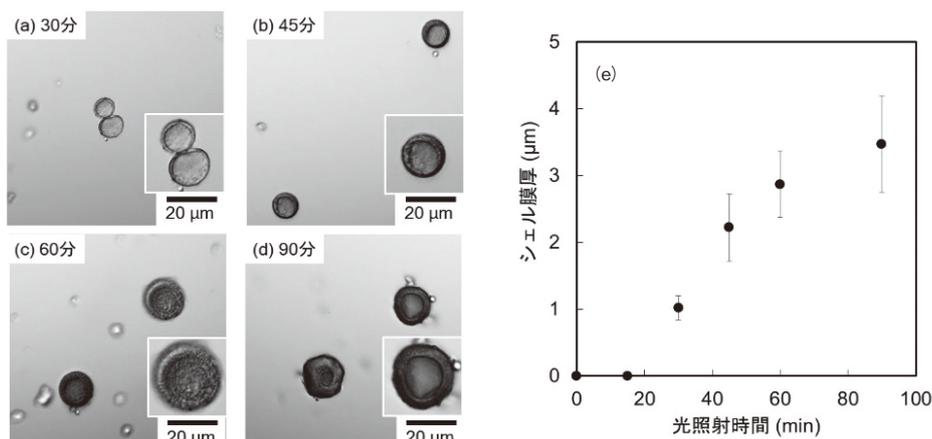


図6 光照射時間を変更した P(COMA-MMA) 中空粒子の光学顕微鏡写真(a-d)とシェル膜厚(e)

光照射時間で実施し、得られた中空粒子のシェル厚み制御を試みた。その結果、予想通り光照射時間の増加に伴い、P(COMA-MMA)粒子のシェル膜厚は増加していた(図6)。結果として、光照射時間で中空粒子のシェル厚みを制御できることが明らかになった。

次に、中空粒子内部への機能性分子内包によるカプセル化を試みた。得られた中空粒子はシェル部が架橋しているために、良溶媒中においても粒子形態を保持できるとともに、シェル部の膨潤と拡散により後天的に薬物等の分子を粒子内部に導入できる。その後、貧溶媒に溶媒を置換することでシェル部を取縮させ、粒子内部に物理的に種々の分子を封入することが可能となる。この溶媒交換法を利用することで、カプセル粒子の作製を試みた。ここでは、モデル分子として蛍光色素である Rhodamine B を用いて検討を進めた。具体的には、界面光架橋反応により調製した中空粒子を、Rhodamine B を溶解した THF/DMSO 混合溶媒中に浸漬しインキュベーション後、溶媒を PVA 水溶液に変更することによりローダミン B の内包を試みた。得られた粒子の共焦点レーザー顕微鏡観察を行ったところ、粒子のコア部に明確なローダミン B 由来蛍光を観察することができた溶媒置換法により作製した粒子の内部から、Rhodamine B 由来の蛍光が観察されたことから、カプセル粒子が得られたことがわかった。

4. 総括

以上のように、UVA 吸収性の Coumarin 基を含むモノマーおよびポリマーの合成に成功し、現在は本ポリマーを利用してサンスクリーン用微粒子材料の合成を引き続き推進している。本研究で得られる微粒子材料は、皮膚浸透性の低いマイクロサイズに調整できるだけでなく、天然物由来化合物の誘導体であり安全性が高い。そのため、本研究を遂行することで新しいサンスクリーン用微粒子材料の創製技術の確立が期待できる。

(引用文献)

- 1) Y., Kitayama, The Interfacial Photoreaction: An Efficient Strategy to Create Functional Polymer Particles. *Polym. J.*, 51 (10), 963-974 (2019)
- 2) Y. Kitayama, K. Yoshikawa, T. Takeuchi, Efficient Pathway for Preparing Hollow Particles: Site-specific Crosslinking of Spherical Polymer Particles with Photoresponsive Groups that Play a Dual Role in Shell Crosslinking and Core Shielding. *Langmuir*, 32 (36), 9245-9253 (2016)
- 3) Y. Kitayama, T. Takeuchi, Fabrication of Redox-Responsive Degradable Capsule Particles by a Shell-Selective Photoinduced Cross-Linking Approach from Spherical Polymer Particles. *Chem, Eur. J.*, 23 (52), 12870-12875 (2017)
- 4) A. P. R. Johnston, C. Cortez, A. S. Angelatos, F. Caruso, Layer-by-layer Engineered Capsules and Their Applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 11 (4), 203-209 (2006)
- 5) X. L. Xu, S. A. Asher, , Synthesis and Utilization of Monodisperse Hollow Polymeric Particles in Photonic Crystals. *J. Am. Chem. Soc.*, 126(25), 7940-7945(2004)
- 6) H. Minami, H. Kobayashi, M. Okubo, Preparation of Hollow Polymer Particles with a Single Hole in the Shell by SaPSeP. *Langmuir*, 21 (13), 5655-5658 (2005)
- 7) Y. Luo, H. Gu, A General Strategy for Nano-Encapsulation via Interfacially Confined Living/Controlled Radical Miniemulsion Polymerization. *Macromol. Rapid. Commun.*, 27 (1), 21-25 (2006)
- 8) F. Ishizuka, R. H. Utama, S. Kim, M. H. Stenzel, P. B. Zetterlund, RAFT Inverse Miniemulsion Periphery Polymerization in Binary Solvent Mixtures for Synthesis of Nanocapsules. *Eur. Polym. J.*, 73, 324-334. (2015)

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

千葉大学大学院工学研究院

桑折 道済

Melanin plays a vital role in structural coloration in nature. Recently, we have focused on using polydopamine, a melanin-like polymer, to produce structural color materials. The purpose of this study was to develop melanin-based structural color materials for cosmetic applications. Using artificial melanin particles, we developed crack-free structural color materials, simple synthesis of structural color films, and techniques for obtaining uniform structural color films over large areas. A water/ethanol mixture was used as a particle dispersant to relax internal stresses in the particles that cause cracking. We found that the addition of non-volatile ionic liquids is effective in maintaining particle-particle interactions after solvent drying. We have also established a simple method for producing flexible structural color films by hot-pressing freeze-dried particle aggregations of melanin particles coated on the surface with a polymer with a low glass transition temperature. Furthermore, a large-area, uniform structural color film composed of melanin particles was created by utilizing a dip-coating method. These resulting structural color materials may be useful for use in nail polish and cosmetic seals. Since polydopamine is a material that mimics melanin, which exists in the body in both composition and structure, it is considered to be highly biocompatible and is expected to be developed in a variety of fields, including cosmetics.

1. 緒言

光の波長程度の微細構造に光が当たると、干渉、回折、散乱などにより構造色が発現する。構造色は、従来の顔料系インクにはない、独特の光沢感と質感を有することから、化粧品開発においてもその需要は高い。最もよく使われているものは、雲母(マイカ)を粉砕した微細な粒子表面に二酸化チタンをコーティングして反射特性を付与した雲母粒子である。優れた材料である一方で、雲母は魚の鱗のような平板型粒子であるため、平板方面での反射のみが構造色に寄与することから異方性が高く、粒子サイズが小さくなると構造色を示さず、発色が薄い、という課題がある。

構造色は、生物の発色においてもしばしば見ることができる。例えば、目玉模様に入った青藍色の孔雀の鮮やかな羽毛の発色は、構造色として知られる¹⁾。通常、構造色が発現するサブミクロンサイズ(数百nm程度)の微細構造に光が当たると、光は様々な方向に散乱するため、色は白っぽく見える。孔雀の羽毛の構造色がはっきりとした色として見えるのは、微細構造を構築している素材に起因する。孔雀の羽毛内部では、ロッド状のメラニン顆粒が集積して微細構造が形成されている。メラニンは黒い材料であり光を吸収する²⁾。また、ヒトの髪の毛の黒の成分としても知られている。そのため、羽毛内部のメラニンが規則正

しい微細構造を構築するとともに、散乱光を適切に吸収し、鮮やかな構造発色を実現している。孔雀の発色のみならず、構造色の代表例としてよく知られるモルフォ蝶や玉虫の発色など、自然界での鮮やかな構造発色においては、しばしばメラニンが重要な役割を担っている。視認性の高い構造発色にはメラニンの存在が重要であるといえる。

我々はこれまでに、人工高分子のポリドーパミン(PDA)を成分とする人工メラニン粒子を独自に開発し、人工メラニン粒子の集積による高輝度な構造発色を初めて実現した³⁾。また、粒子の精密合成・集積構造の制御によるフルカラー化にも成功し、従来の顔料系インクでは成し得ない、光沢のあるインク状色材を開発した⁴⁻¹⁰⁾。真球状の人工メラニン粒子を集積する本系では、どの面から見ても構造色が得られる。粒子を集積して作成する従来の構造色材料は、光の散乱により乳白色で薄い発色になる。一方、人工メラニン粒子は、単分散な粒子による構造発色と、黒色による散乱光吸収を同時に達成することで、単一材料で高い視認性の構造発色が可能で、かつ粒子設計により構造色の光沢度や角度依存性を制御できる大きな特徴がある。しかし、分野共通の課題として、粒子分散溶液を乾燥して得られる構造色材料にひび割れ(クラック)が生じやすい、また、簡便かつ大面積での材料作成が困難である、という問題がある。

そこで本研究では、メラニン系構造色材料の化粧品用途への展開を目指し、クラックを抑制する技術と、大面積で均一な構造色を発現する技術を確認し、人工メラニン粒子を用いる鮮やかな構造色コーティングを達成することを目的とした。クラック生成の原因となる粒子に生じる内部応力の緩和のため、粒子分散媒に水/エタノール混合溶媒を用いた。溶媒乾燥後の粒子間相互作用の保持には不揮発性



Technological development of melanin-based structural color materials for cosmetic applications

Michinari Kohri

Graduate School of Engineering, Chiba University

のイオン液体の添加を試みた。また、乾燥状態の粒子集積体の熱プレスによる簡便な構造色フィルム作製ならびに、移流集積法を利用する大面積な構造色フィルム作成法の開発もあわせて検討した。

2. 方法

2.1. メラニン粒子からなるクラックフリーな構造色材料の作製

我々の既報にならい、ソープフリー乳化重合で作製したポリスチレン (PSt) 粒子の表面にPDAを被覆したPSt@PDA粒子を作製した⁴⁾。分散媒として水、または水/エタノール混合溶媒を用い、PSt@PDA粒子分散液に、イオン液体 2-hydroxy-3-methacryloyloxypropyltrimethylammonium bis (trifluoromethanesulfonyl) imide (IL) を任意の濃度で添加し、ペレット材料を作製した。ペレット材料のクラックの評価は光学顕微鏡観察、粒子配列の規則性の評価は走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察およびSEM像のフーリエ変換により行った。粒子間相互作用の調査は、粒子分散液の粘度測定により行った。

2.2. メラニン粒子からなる簡便な構造色フィルムの作製

酸化セリウム (CeO₂) 粒子をコア粒子として用いた¹¹⁾。原子移動ラジカル重合 (ATRP) 開始基を導入したドーパミン誘導体を合成し、コア粒子に被覆することによって、粒子表面に ATRP 開始基を有する CeO₂@PDA コア-シェル粒子を作製した。表面開始 (SI)-ATRP によってポリヒドロキシアクリル酸エチル (PHEA) 層を粒子表面に構築し、CeO₂@PDA@PHEA コア-シェル-ヘアリー粒子を作製した。凍結乾燥後の粒子を 50℃、5MPa の条件で熱プレスすることで、構造色フィルムを作製した。得られた材料の評価は、透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察、SEM 観察、圧縮試験機、および顕微反射測定により行った。

2.3. メラニン粒子からなる大面積な構造色フィルムの作製

PSt@PDA 粒子の水分散液を容器に入れ、分散液の表面を 5mL のシリコンオイルで覆った。ここに PET 基板を入れ、ディップコーティング装置を用いて成膜速度 0.3μm s⁻¹ で引き上げることで、基板上に構造色フィルムを得た。

3. 結果

3.1. クラックフリーなメラニン系構造色材料の作製

PSt@PDA 粒子水分散液に、任意の濃度の IL を添加して作製したペレット材料を光学顕微鏡で観察した。IL 無添加の材料表面では多数のクラックが観察されたが、IL 0.3wt% 以上の濃度で作製した材料においては、クラックフリーな表面が観察された (図 1a)。一方で、粒子の水への分散性は IL 濃度の増加とともに低下し、分散液中で凝集体を形成する様子が観察された。乾燥後のペレット材料の SEM 画像からも、IL 0.3wt% 以上の材料ではアモルファスな粒子配列構造がみられ、構造発色に特有の角度依存性は消失していた (図 1b)。任意の濃度の IL 水溶液および IL を含む粒子水分散液の粘度測定を行ったところ、IL 水溶液では IL の濃度による粘度の変化はみられなかった。一方、粒子存在下においては IL 0.3 wt% 以上の条件で粘度の増大が確認され、粒子間相互作用の向上が示唆された¹²⁾。クラックフリーとコロイド結晶構造の両立を実現するうえで、分散液中での IL 濃度が非常に重要であることが分かった。そこで、分散媒の表面張力を制御し、粒子に働く内部応力を抑制することで、少量の IL 添加でのクラックフリー化を目指した。分散媒として水/エタノールの混合溶媒を採用し、IL の添加量および水とエタノールの混合比を変更したペレット材料を作製した。作製した材料を光学顕微鏡で観察すると、IL 0.1wt%、かつエタノール分率が 70 および 80 vol% の条件でクラックフリー化を達成した (図 2a)。特に、エタノール分率 70 vol% の際は、コロイ

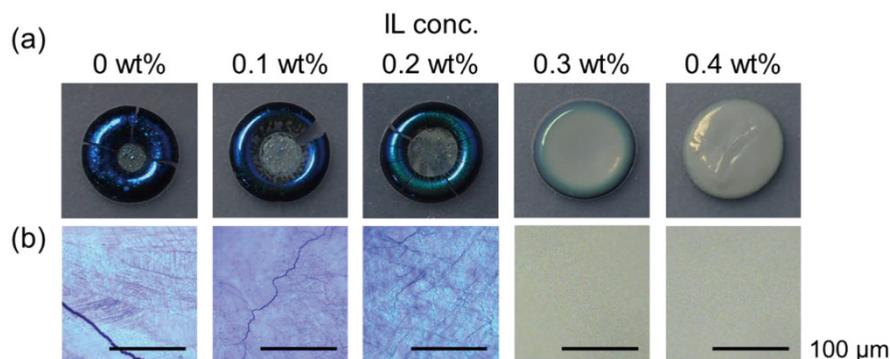


図 1 任意の濃度の IL を添加して作製したペレット材料の (a) 写真と (b) 光学顕微鏡による観察画像

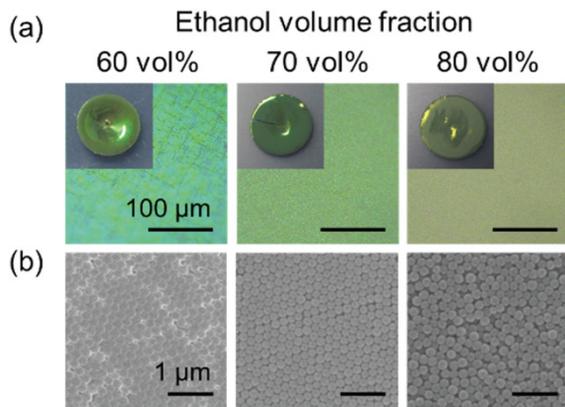


図2 IL 0.1wt%を加えた水/エタノール混合溶媒から作成したペレットサンプルの (a) 写真と光学顕微鏡画像、ならびに (b) SEM 画像

ド結晶構造を形成しており、クラックフリー化とコロイド結晶構造の両立を実現した(図2b)¹³⁾。

3. 2. 簡便なメラニン系構造色フィルムの作製

TEM観察から、反応進行に伴い粒径が増加し、約2nmのPDAシェル層と約16nmのPHEAヘアリー層の形成をそれぞれ確認した。得られたCeO₂@PDA@PHEA粒子の凍結乾燥体を50℃、5MPaの条件でプレスすることによって構造色フィルムを得た。プレス前の乾燥体は構造色を示さずメラニン粒子由来の茶色であったのに対し、プレス後は赤色のフィルムが得られた(図3)。フィルムの反射測定から、赤色に構造色に相当する約750nmにピークが観察された。フィルム表面のSEM観察から粒子が規則的に配列し、PHEA層が粒子間の空隙を埋めている様子が確認された(図3)。熱プレスによって粒子表面のPHEAヘアリー層(ガラス転移温度:15℃)が流動化し、粒子間空隙を埋めることで粒子の集積構造が固定化され、構造色フィルムが形成された。得られたフィルムは自立的でフレキシブルで加工性があり、圧縮試験による評価からも高い堅牢性を示した(図4)¹⁴⁾。

3. 3. 大面積なメラニン系構造色材料の作製

ディップコーティング法により得られたフィルムの写真を図5に示す。PETシート基板に10cm×10cmの比較的大面積で、均一な緑色の構造色フィルムの形成が観察された。PETシートの性質に由来する柔軟なフィルムが得られ、今回用いた手法は様々な基板に適用可能であることから、用途に合わせた性質を有する構造色フィルムの作製への展開が期待される。

4. 考 察

PSt粒子ならびにCeO₂粒子をそれぞれコア材とするメ

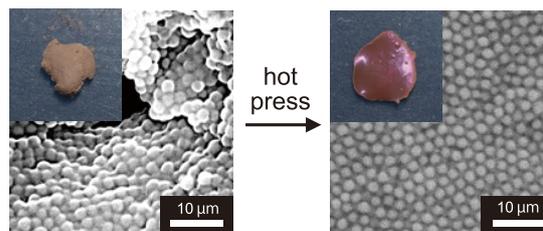


図3 ホットプレス前後のサンプルの写真とサンプル表面のSEM画像

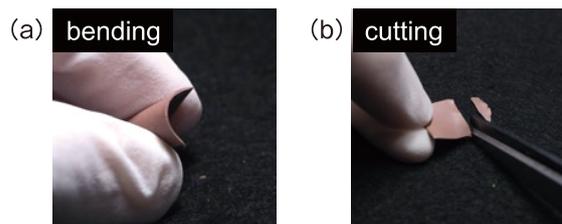


図4 (a) 折り曲げや(b) 加工が可能なフレキシブルで堅牢性の高い構造色フィルム

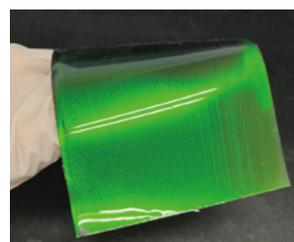


図5 大面積で均一な発色の構造色フィルム

ラニン粒子を作成した。粒子集積材料の作成時に使用する粒子分散媒の組成と添加物を最適化することで、クラックフリーな表面構造を有し、かつ観測角度により異なる色調が観測される虹色構造色を発現する構造色材料の作製に成功した。また、メラニン粒子表面に、ガラス転移温度の低い高分子層を付与することで、熱プレス法による簡便な構造色フィルム開発を行った。さらに、ディップコーティング法を適応することで、高品質かつ大面積での構造色フィルムの作成に成功した。これらの材料は、マニキュアや貼るコスメとしての利用が想定される。素材として活用したポリドーパミンは、生体内に存在するメラニンを成分/構造ともに模倣した材料であることから生体適合性も高いと考えられ、今後、化粧品をはじめとする多様な分野での応用展開が期待される。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、多大なるご支援を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感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Yoshioka, S.; Kinoshita, S. Effect of Macroscopic Structure in Iridescent Color of the Peacock Feathers. *Forma* **2002**, *17*, 169-181.
- 2) Zi, J.; Yu, X. D.; Li, Y. Z.; Hu, X. H.; Xu, C.; Wang, X. J.; Liu, X. H.; Fu, R. T. Coloration Strategies in Peacock Feathers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 12576-12578.
- 3) Kohri, M.; Nannichi, Y.; Taniguchi, T.; Kishikawa, K. Biomimetic Non-Iridescent Structural Color Materials from Polydopamine Black Particles that Mimic Melanin Granules. *J. Mater. Chem. C* **2015**, *3*, 720-724.
- 4) Kawamura, A.; Kohri, M.; Morimoto, G.; Nannichi, Y.; Taniguchi, T.; Kishikawa, K. Full-Color Biomimetic Photonic Materials with Iridescent and Non-Iridescent Structural Colors. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 33984.
- 5) Kawamura, A.; Kohri, M.; Yoshioka, S.; Taniguchi, T.; Kishikawa, K. Structural Color Tuning: Mixing Melanin-Like Particles with Different Diameters to Create Neutral Colors. *Langmuir* **2017**, *33*, 3824-3830.
- 6) Iwasaki, T.; Tamai, Y.; Yamamoto, M.; Taniguchi, T.; Kishikawa, K.; Kohri, M. Melanin Precursor Influence on Structural Colors from Artificial Melanin Particles: PolyDOPA, Polydopamine, and Polynorepinephrine. *Langmuir* **2018**, *34*, 11814-11821.
- 7) Kohri, M.; Yanagimoto, K.; Kawamura, A.; Hamada, K.; Imai, Y.; Watanabe, T.; Ono, T.; Taniguchi, T.; Kishikawa, K. Polydopamine-Based 3D Colloidal Photonic Materials: Structural Color Balls and Fibers from Melanin-Like Particles with Polydopamine Shell Layers. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 7640-7648.
- 8) Kohri, M.; Tamai, Y.; Kawamura, A.; Jido, K.; Yamamoto, M.; Taniguchi, T.; Kishikawa, K.; Fujii, S.; Teramoto, N.; Ishii, H.; Nagao, D. Ellipsoidal Artificial Melanin Particles as Building Blocks for Biomimetic Structural Coloration. *Langmuir* **2019**, *35*, 5574-5580.
- 9) Okoshi, T.; Iwasaki, T.; Takahashi, S.; Iwasaki, Y.; Kishikawa, K.; Kohri, M. Control of Structural Coloration by Natural Sunlight Irradiation on a Melanin Precursor Polymer Inspired by Skin Tanning. *Biomacromolecules* **2021**, *22*, 1730-1738.
- 10) Takahashi, S.; Kishikawa, K.; Kohri, M. External Stimulus Control of Structural Color Visibility Using Colloidal Particles Covered with a Catecholic Polymer Shell Layer. *Polym. J.* **2022**, *54*, 1039-1043.
- 11) Iwasaki, T.; Harada, S.; Okoshi, T.; Moriya, M.; Kojima, T.; Kishikawa, K.; Kohri, M. Effect of the Polydopamine Composite Method on Structural Coloration: Comparison of Binary and Unary Assembly of Colloidal Particles. *Langmuir* **2020**, *36*, 11880-11887.
- 12) Li, H. L.; Marlow, F. Solvent Effects in Colloidal Crystal Deposition. *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 1803-1810.
- 13) Urase, M.; Kishikawa, K.; Fudouzi, H.; Kohri, N. Crack-Free Structural Color Materials Prepared without Disrupting the Particle Arrangement by Controlling the Internal Stress Relaxation and Interactions of the Melanin Particles. Submitted.
- 14) Yoshioka, D.; Kishikawa, K.; Kohri, M. A Flexible and Robust Structural Color Film Obtained by Assembly of Surface-Modified Melanin Particles. *Nanomaterials* **2022**, *12*, 3338.

多孔性高分子粒子を用いた自発的乳化技術の開発

山口大学大学院創成科学研究科

通 阪 栄 一

A spontaneous emulsification method using porous polymer particles was used for the preparation of fine emulsions. Porous water-soluble polymer particles were prepared from EUDRAGIT® L100 by the spray freeze-drying technique and could absorb soybean oil via capillary action. When the particles were added to phosphate buffer, emulsification proceeded rapidly with the dissolution of the polymer. The addition of hydrophilic surfactants to soybean oil promoted the reduction of emulsion particle size. Furthermore, the addition of NaCl or mannitol to the polymer particles contributed to the enhancement of the emulsion micronization and emulsification rate. It is expected that this emulsification method would be used in the development of cosmetics in the future.

1. 緒 言

化粧品において、水分と油分を配合し、良好な使用感を与えることのできるエマルジョンが広く利用されている¹⁾。エマルジョンは物理化学的に準安定な状態であるため、常に保存時の安定性が課題となり、これを克服するために、組成、成分比、また均一で微細な液滴の調製技術などが検討されてきた。一方で、保存安定性への別のアプローチとして用時調製も検討されている。これは、保存時には水相と油相を分離しておき、使用直前に乳化することでエマルジョンの長期安定性の問題をクリアできる。

エマルジョン用時調製に最も利用されているのは自己乳化法である。この技術は、化粧品以上に難吸収性薬物の経口投与製剤の開発へ応用されており、Self-emulsifying drug delivery system (SEDDS)として知られている²⁾。特徴は、油と界面活性剤(ときには補助界面活性剤)の混合物に薬剤が溶解あるいは分散した油状製剤であり、水を加えると瞬時にエマルジョンを形成する点にある。近年では、より小さな粒子径からなる熱力学的に安定なマイクロエマルジョンを形成可能なSelf-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS)に関する研究も国内外で盛んに行われている³⁾。SEDDSとSMEDDSの基本的な組成は同じであるが、後者は特に熱力学的に安定で等方的な(光学的に均一な)系として定義されている。これらの技術は多量の親水性界面活性剤の混合が必須である。

筆者はこれまでに、主に経口投与のためのエマルジョン製剤の開発を指向し、物理化学的に不安定な分散系溶液で

あるエマルジョンの保存安定性を高める研究を行ってきた。その取り組みの1つに、ドライエマルジョンの開発がある。これは油滴を封入した固体粒子であり、一度O/W型エマルジョンを形成後に、水溶性あるいは疎水性固体キャリアとともに噴霧乾燥、あるいは凍結乾燥することで、油滴を封入した固体粒子を調製する⁴⁾。このドライエマルジョンを水に添加すると固体キャリアの溶解や膨潤作用により内部の油滴が放出され元のエマルジョンが再生される。筆者はこれまでに、油滴にバイオ医薬品の1つであるインスリンを封入したドライエマルジョンを開発している⁵⁾。

また、ドライエマルジョンとは異なる概念での乳化法として多孔質シリカ粒子の細孔に油相を封入した自発的乳化法を開発した。この手法はシリカ粒子内に封入された油が水と触れただけで自発的に乳化するため、外力を必要としない乳化方法である^{6,7)}。これを発展させた乳化法として、最近、親水性高分子からなる多孔質粒子に油相を含浸させた粒子を用いた乳化技術を開発した⁸⁾。これまでの検討において、親水性エチレンオキシドと疎水性のプロピレンオキシドの共重合体であるブルロニックなどの、水中で速やかに溶解し生体適合性の高い高分子を用いることで、低分子界面活性剤が無添加でも安定なエマルジョンを形成可能であることを確認している。調製した粒子を水相に添加するだけで、高分子の溶解とともに油滴が形成され乳化することから、使用時に特別な機器を必要とせず、非常に簡便にエマルジョンを調製可能である。そのため、界面活性剤をほとんど使用しない用時調製エマルジョン調製技術として、非常に有望であると考えている。また、この自発的乳化に必要な多孔質粒子の調製に、確実に細孔が形成できる噴霧凍結乾燥技術を利用した。得られた粒子を油相と混合するだけで油相の含浸ができることから、工業化もしやすい技術であると考えられる。加えて、液体ではなく、固体粒子として油相成分を保存できることもハンドリングの面で大きなメリットになると考えられる。このように、本技術はこれまでにない新規乳化技術であり、化粧品への応用に有



Development of a spontaneous emulsification technique using porous polymer particles

Eiichi Toorisaka

Graduate School of Science & Technology for Innovation, Yamaguchi University

望な技術であると考えている。

本研究では、多孔質粒子を用いた自発的乳化のメカニズムの検討とともに、成分や、多孔質粒子の特性の乳化への影響についての知見を得ることを目指した。

2. 方法

2.1. 噴霧凍結乾燥法による多孔質粒子の調製

0.4mol/Lの水酸化ナトリウム水溶液にオイドラギット L100 (Eud-L100) を加え、10wt%濃度の高分子水溶液を調製した。この水溶液を、噴霧装置(ノズル径：0.71mm、送液流量：5mL/min、噴霧圧力：120kPa)を用いて液体窒素に噴霧し、凍結させた液滴を凍結乾燥することで粒子を得た。また、粒子の溶解性の制御のために水溶性添加物としてNaCl、あるいはD-マンニトールをEud溶液に混合し噴霧凍結乾燥した粒子も調製した。調製した粒子は、白金コーティングした後に集束イオンビーム加工装置(JEOL：JEM-9320FIB)により加工し観察した。

2.2 自発的乳化製剤の調製

大豆油とアセトンを1：1wt%で均一に混合した混合液20μLを攪拌しているEu-L100粒子10mgに滴下し、十分に含浸した後に一晚静置することでアセトンを除去した。この粒子をリン酸緩衝液(pH7.4)1mLに添加後、静置条件下での乳化挙動を観察した。また同様の方法で、大豆油と親水性界面活性剤Tween80の混合液も多孔性粒子へ封入して乳化特性を評価した。乳化後のエマルションの粒子径は、レーザー回折式粒子径分布測定装置(島津製作所：SALD-7100)で測定した。また、微細エマルションは動的光散乱粒子径測定装置(Malvern：ゼータサイザー Ultra)を用いた測定も行った。

2.3. 乳化速度評価

2.1.で調製した自発的乳化製剤をリン酸緩衝液3mLの入った分光セルに添加して静置し、溶液の濁度変化を分光光度計(波長：600nm)で測定した。

2.4. 油分解酵素で調製した多孔質粒子による自発的乳化評価

水溶性高分子として油脂分解酵素であるリパーゼを用いて、2.1.と同様の方法で噴霧凍結乾燥法による粒子調製を行った。大豆油を含浸した粒子をリン酸緩衝液に添加後、得られたエマルションの粒子径をレーザー回折式粒子径分布測定装置で測定した。

3. 結果及び考察

3.1. 多孔質高分子粒子による乳化特性

水溶性高分子であるEudragit® L100 (Eud-L100)を用い

て、自発的乳化に用いる多孔質粒子調製した。メタクリル酸コポリマーであるEud-L100は、中性以上のpHで溶解する特性から腸溶性コーティング剤として多く利用されている。図1に噴霧凍結乾燥を利用して調製したEud-L100粒子の走査型イオン顕微鏡像を示す。表面観察、断面観察の写真から確認できるように、多孔質粒子が形成されていた。噴霧凍結乾燥法を利用することで、噴霧した水滴の形状がそのまま乾燥されるため、良好に球状粒子が形成でき、また、氷が昇華で除去されることによる空隙形成で容易に多孔質粒子が調製できた。

続いて調製したEud-L100多孔質粒子に大豆油を含浸させ、リン酸緩衝液に添加することにより乳化挙動を確認した。図2に示すように、粒子を緩衝液に添加後に速やかに乳化が進行し、形成されたエマルションは1日以上安定に維持されることが判明した。攪拌や振盪などの外力のない環境下で、このような安定な微細エマルション形成が実現できた要因として、水溶性高分子Eud-L100の溶解とともに水が引き込まれ、それにより油滴が水へ分散し、その後、溶解した高分子が界面活性剤として作用したためと考えられる。また、この方法はエマルションの微細化法としても有効であり、同量のEud-L100を溶解した緩衝液を用いて大豆油をホモジナイザー(10,000rpm)で乳化した場合よりも大幅に微細なエマルションを形成できることが判明した(図3)。このような効果は、高分子乳化剤としても知られているプルロニックF127で調製した多孔質粒子でも確認しているが、プルロニックでは油相含浸後の粒子強度が低かったことから、粉体制剤としてのハンドリング性においてEud-L100の方が優れていると考えられる。

3.2. 添加物の乳化特性への影響

エマルションを化粧品へ応用する場合において、粒子径は物性や皮膚浸透性に影響するため任意に制御することが重要となる。そこで、自己乳化技術で使用されている油相への親水性界面活性剤の添加の影響を評価した。表1に示すように、親水性界面活性剤として使用したTween80の含有量が多いほどエマルションが微細化された。興味深いことに、Tween80を含む油相をそのまま緩衝液に添加した場合の乳化より大幅に微細なエマルションが形成された。このことから、多孔質粒子の利用が油相の分散に効果的であることが確認された。

また、多孔質粒子を形成するEud-L100に、NaClあるいはマンニトールを混合して乳化特性を評価した。これらの添加物は、形成されるエマルションの微細化に影響したが、添加量で大きな差が生じることはなかった(図4)。一方、乳化速度においては、添加物量が多いほど大きくなる傾向が確認された(図5)。NaClにしても、マンニトールにしても、水への溶解性が高いため、その添加量が高分子

の溶解性へも影響し、その結果、エマルジョン形成を促進することが推察された。

3. 3. 油脂分解酵素を用いて形成した粒子による乳化特性

多孔質粒子により形成したエマルジョンのさらなる微細化の方法として、油脂分解酵素によるエマルジョンの分解を取り入れた乳化法を検討した。これを実行するために、油脂分解酵素であるリパーゼを多孔性粒子を形成する水溶性高分子として用いて粒子調製を行った。噴霧凍結乾燥を

用いて調製した粒子はEud-L100と同様に多孔質粒子であることが顕微鏡で確認された(図6)。この粒子に大豆油とTween80混合液を封入し乳化特性を評価したところ、Eud-L100で形成した粒子よりも微細なエマルジョン形成が可能となり、Tween80を20wt%以上含む油相を用いれば200nm以下のエマルジョンに制御できることが確認された(図7)。このことから、多孔質粒子による自発的乳化と酵素による油脂分解反応を組みあわせることで、わずかな界面活性剤の添加で微細エマルジョンを自発的(外力なしで乳化)可能であることが判明した。

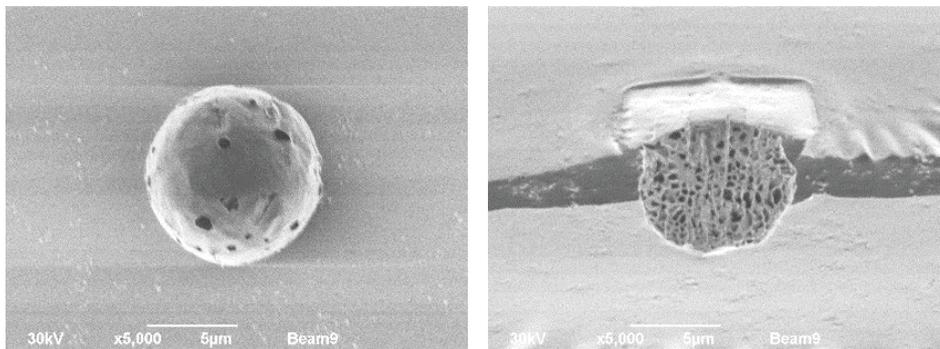


図1 噴霧凍結乾燥で調製した多孔質粒子 (左) 粒子表面, (右) 粒子断面



図2 多孔質粒子による乳化挙動

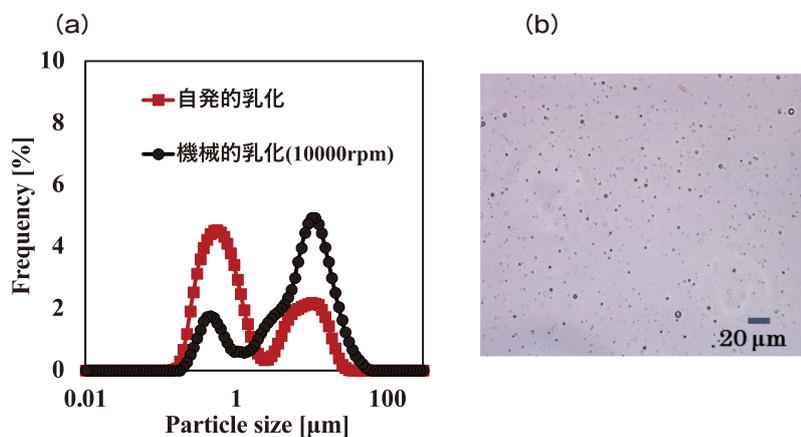


図3 自発的乳化と機械的乳化により形成したエマルジョン (a) 粒子径分布, (b) 自発的乳化で形成したエマルジョンの顕微鏡写真

表1 油相組成とエマルジョン粒子径の関係

油相組成 [wt%]		平均粒子径 [μm]	
大豆油	Tween80	粒子を用いた乳化	油相のみで乳化
100	0	3.92	-
90	10	1.38	41.42
80	20	1.14	66.26
60	40	1.89	21.25
40	60	0.94	22.68
20	80	0.44	6.51

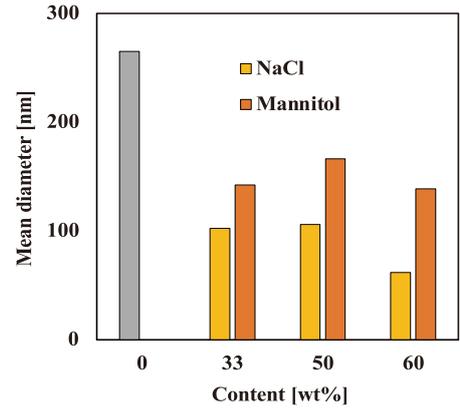


図4 多孔質粒子添加物のエマルジョン粒子径への影響

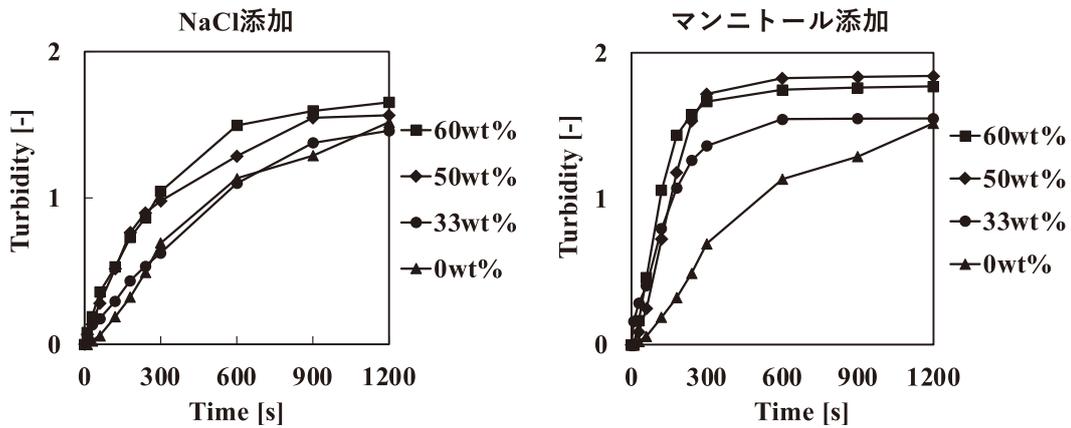


図5 多孔質粒子添加物のエマルジョン形成速度への影響

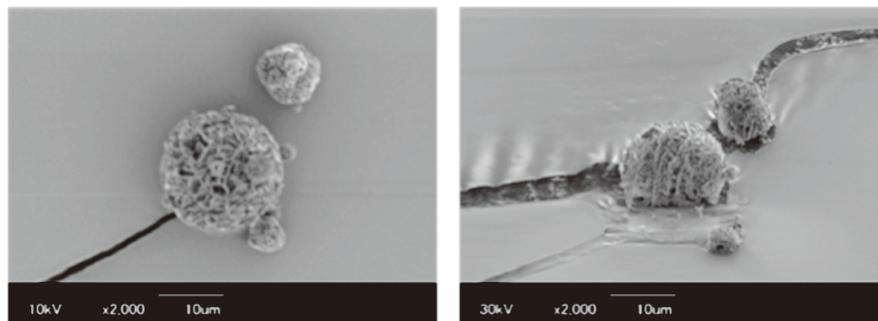


図6 リパーゼで形成した粒子のイオン顕微鏡観察写真
(左) 表面, (右) 断面

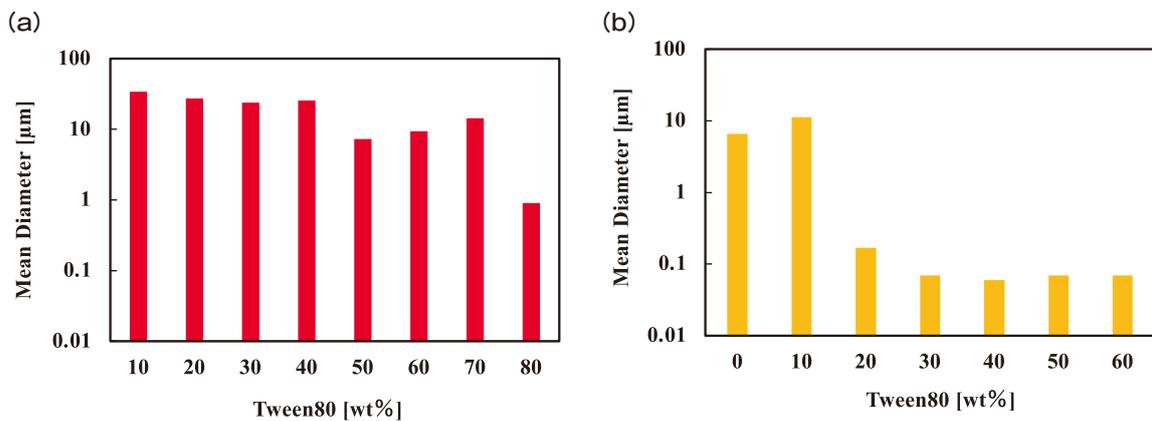


図7 多孔質酵素粒子による乳化特性
(a) 油相を添加した乳化, (b) 多孔質酵素粒子を用いた乳化

4. 総括

本研究では水溶性高分子から形成した多孔質粒子による自発的乳化法を汎用性の高い技術とするために、経口投与製剤添加物として利用されているオイドラギットL-100から粒子調製を行い、乳化特性を評価した。界面活性剤フリー、もしくは界面活性剤含有量の大幅低減した乳化技術として、そしてせん断応力を全く利用しない乳化技術として、一般的に知られている多量の水溶性界面活性を用いた自己乳化技術より利用価値が高いことが示唆された。この技術は、乳化成分として、水溶性高分子、油のみでエマルション調製が可能であり、また、粒子調製段階において有機溶媒などを使用しないことから、安全性の高いエマルションを提供可能である。また、水溶性高分子によって形成された粒子が乳化を促進するため、これまでになく処方エマルションを提供できる。本技術は用時調製用のエマルション調製技術であり、使用時まで油相を固体微粒子として保存できる。高い保存性と粉末化によるハンドリング性の良さは、これまでの乳化技術と異なる。

このような新しい乳化技術を提供することは、消費者ニーズにあうこれまでになく化粧品開発につながるものと考えられる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、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。

(引用文献)

- 1) M. N. Yukuyama, D. D. M. Ghisleni, T. J. A. Pinto and N. A. Bou-Chacra, *Int. J. Cosme. Sci.*, **38**, 13-24 (2016)
- 2) Chatterjee, S.M. Almurisi, A.A.M. Dukhan, U.K. Mandal, P. Sengupta, *Drug Deliv.*, **23** (9), 3639-3652 (2016)
- 3) S. Dokania and A.-K. Hoshia, *Drug Deliv.*, **22** (6), 675-690 (2015)
- 4) H. Takeuchi, H. Sasaki, T. Niwa, T. Hino, Y. Kawashima, K. Uesugi, M. Kayano, Y. Miyake., *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 1528-1531 (1991)
- 5) E. Toorisaka, M. Hashida, N. Kamiya, H. Ono, Y. Kokazu, M. Goto, *J Control Release*. **107**, 91-96 (2005)
- 6) E. Toorisaka, Y. Nakayama, *J. Oleo Sci.*, **69** (5), 455-460 (2020)
- 7) 通阪栄一, *ケミカルエンジニアリング*, **64**(8), 50-55(2019)
- 8) E. Toorisaka, D. Yamamoto, *J. Oleo Sci.*, **70** (8), 1103-1107 (2021)

毛根への薬物直接送達を可能とするナノ結晶ハイドロゲルの開発

近畿大学薬学部製剤学研究室

長井 紀章

In the present study, we designed a dermal formulation containing 5% minoxidil nanoparticles (MXD-NP) using the bead mill method, and investigated the hair-growth effect of MXD-NP and a commercially available MXD solution (CA-MXD). Hair growth and skin permeation studies were conducted using C57BL/6 mice. Moreover, we examined the MXD contents in the upper (hair bulge) and the lower hair follicle (hair bulb). The mean particle size of the MXD in the MXD-NP was 99 nm. The hair-growth effect of the MXD-NP was higher than that of CA-MXD, and the MXD content in the hair bulge of mice treated with MXD-NP was 7.4-fold of that in the mice treated with CA-MXD. On the other hand, the plasma MXD levels in the mice treated with MXD-NP was lower in comparison with CA-MXD. In conclusion, we showed that MXD-NP enable the accumulation of MXD in the upper hair follicles more efficiently than CA-MXD, leading the activation of hair growth.

1. 緒言

Androgenetic alopecia (AGA)とは、成人男性によくみられる髪が薄くなる状態であり、これら薄毛対策はコスメトロジー分野において極めて大きな課題である。ミノキシジル(MXD)はこれらAGAの治療薬の1つであり、その薬効は毛乳頭細胞の増殖作用、上皮系毛組織細胞(毛母細胞)などのアポトーシス抑制作用、毛組織血流改善作用に基づくことが報告されている。本MXDを配合した日本で初めての発毛剤はリアップ®(大正製薬)であり、壮年性脱毛症における発毛、育毛および脱毛進行予防に効果を持つ第1類医薬品である。さらに近年では、リアップ®の他に、MXDを主成分とする医薬品が次々に販売され、発毛、育毛および脱毛進行予防を示すMXD製剤の新たな処方設計や製剤技術が求められている。

一方、ナノ結晶化技術はこれら新剤型に繋がる製剤技術の1つであり、今日美容業界分野でも注目されている技法である。一般にナノ粒子とは、大きさが200nm以下の粒子を指し、医薬品をナノ結晶化した際に、溶解速度、分散性、製剤安定性の改善が可能となる。また、粒子径100nm程にすることでエンドサイトーシスを介して、角膜、腸膜、皮膚透過性といったドラッグデリバリーシステム(DDS)としての応用性も知られている¹⁾。申請者もまたこれらナノ結晶の製造や安全性、DDSへの応用性について検討を行っており、超微細ナノ結晶化技術を用いることで、薬物

が皮膚吸収を介さず、直接毛根中に到達する製剤開発の可能性を示してきた²⁾。さらに、これら製剤は従来のようにアルコールなど刺激性を有する溶媒を使用することなく調製可能である。本研究では、このナノ結晶化技術を応用したMXDナノ結晶ハイドロゲル製剤を作製し、毛根部への効果的な薬物送達を試みる。また、MXDナノ結晶ハイドロゲル製剤をモデル動物に適用することで、本技術が現在市販されている製剤以上の発毛効果が得られる手法であることを証明する。

2. 方法

2.1. MXD-NP製剤の調製

メチルセルロースおよびミノキシジル(MXD)を秤量し、乳鉢にて30分破碎を行い、それぞれ*p*-オキシ安息香酸メチル、*p*-オキシ安息香酸プロピル、D-マンニトールを含有した精製水で5mLにメスアップ後、スターラーにて一日攪拌を行った。その後、直径2.0mmのジルコニアビーズ2.0gを含む2.0mLチューブ中にてビーズミル破碎(5,500rpm、30sec×15回、4℃)を行った後、シェイクマスターネオ(1,500rpm)にて2時間破碎処理を施すことでMXDナノ製剤(MXD-NP)を調製した。これら製剤の組成はMXD5%、パラ安息香酸メチル0.026%、パラ安息香酸プロピル0.014%、D-マンニトール0.5%、メチルセルロース8%とした。また比較対象として、MXD粉末と同上添加剤を混合したものをMXDマイクロ製剤(MXD-MP)とした。さらに、溶液型の従来型MXD製剤としてリアップX5(CA-MXD、大正製薬、東京、日本)を用いた。

2.2. 薬物ナノ粒子の粒子径および粘度測定

MXDの粒子径測定にはSALD-7100(島津製作所、京都、日本)を用いた。SALD-7100の測定条件は散乱光強度の最大値が40~60%の範囲内、屈折率 $1.60 \pm 0.10i$ とした。



Design of Hydrogel Nanoparticles for Direct Drug Delivery to Hair Follicles
Noriaki Nagai
Faculty of Pharmacy, Kindai University

また、音叉振動式粘度計SV-1A (株式会社エー・アンド・デイ、東京、日本)を用い、20℃および36℃のそれぞれの温度において粘度測定を行った。

2.3. HPLCを用いたMXD濃度の測定

MXD濃度は調製したMXDの試料50μLに内標 γ -オキシ安息香酸エチル(1μg/mL、溶媒：メタノール)100μLを加え、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)装置(島津製作所、京都、日本)にて測定した。試料注入量は10μLとし、試料の注入にはオートインジェクターSIL-20ACを用いた。HPLC測定条件は、移動相にメタノール/精製水/3mMドキュセートナトリウム(45/54/1 v/v/v)を用い、カラムInertsil ODS-3(2.1×50mm、ジールサイエンス、東京、日本)、温度35℃(クロマトチャンバーCTO-20AC使用)、移動相の流速0.25mL/min、波長254nmとした。測定時間は16分とし、本研究では、MXDのピークが12~13分、内標のピークが4~5分の間に検出された。

2.4. 毛球、皮膚および血液への薬物移行性評価

薬剤投与前処置として、7週齢C57BL/6雄性マウスをイソフルラン麻酔下(流量1.0L/min、設定濃度2%)、背部の毛を電気バリカン(THRIVE、大阪、日本)にて剃毛し1日放置した。翌日、中央1cm²を切り取ったラミネートを背部に被せ、切り取った部分に各種MXD製剤を30μL塗布した。4時間後、イソフルラン吸入麻酔を行い、塗布部の毛髪をピンセットにて抜き、バルジおよび毛球部を採取した。また、製剤塗布部の皮膚組織を回収するとともに、頸動脈から血液を採取した。得られた血液は遠心分離(20,400g、20min、4℃)により、上清を分取した。これら各試料(バルジ、毛球部、皮膚、血液)をエタノール200μLにてホモジナイズし、遠心分離(20,400g、20min、4℃)後、上清を採取し、試料中のMXD濃度を上記に示したHPLC法にて測定した。またタンパク量の測定を行うことで、毛球滞留性(mol/μg protein)および皮膚滞留性(mol/g protein)を算出した。タンパク量測定にはBio-Rad Protein Assay Kit(Bio-Rad、カリフォルニア、USA)を

用いた。

2.5. 発毛効果の測定

薬剤塗布前処置として、7週齢C57BL/6雄性マウス背面を剃毛後、脱毛クリーム(epilat、Kracie、東京、日本)にて脱毛し、1日放置した。翌日、中央1cm²を切り取ったラミネートを背部に被せ、切り取った部分に各種MXD製剤を1日1回30μL、15日間連日塗布を行った。測定は1日1回行い、イソフルラン吸入麻酔下(流量1.0L/min、設定濃度2%)、マウス背面をデジタルカメラで撮影し、画像解析ソフトImage Jにて塗布部発毛面積を得た。また、発毛面積-時間曲線下面積(AUC_{0-16d})を台形法にて導いた。

3. 結果

3.1. MXD-NP製剤の物性評価

ビーズミル破碎処理前のMXD粉末の粒度分布を測定したところ、平均粒子径は5.83μmとマイクロサイズであった(図1A)。一方、ビーズミル破碎処理によりMXDは微細化され、その平均粒子径は99nmと、ナノサイズの粒子が確認できた(図1B)。図1Cにはビーズミル破碎処理後におけるMXDの画像を示す。50nm~200nm程度のナノ超微粒子が混在しているため、これら製剤の白色分散液であった。さらに、適用時にゲル化し、持続性拡大を目的にメチルセルロースを8%添加したハイドロゲル製剤化について検討した。その結果、常温である20℃では粘度は約30mPa·sであったが、36℃では約120mPa·sと体温付近で粘性の増加が認められた(図1D)。これらMXD-NPの溶解度は18.5μMであり、MXD-MP(2.1μM)より顕著に高値であった。

3.2. MXD製剤塗布による毛球、皮膚および血液への薬物移行性評価

図2は塗布4時間後の皮膚、バルジ領域部、毛球部および血中のMXD薬物滞留性を示す。皮膚および毛球への滞留性においてMXD-NP塗布群は、MXD-MP塗布群と比較し高値であったが、CA-MXD塗布群のそれに比

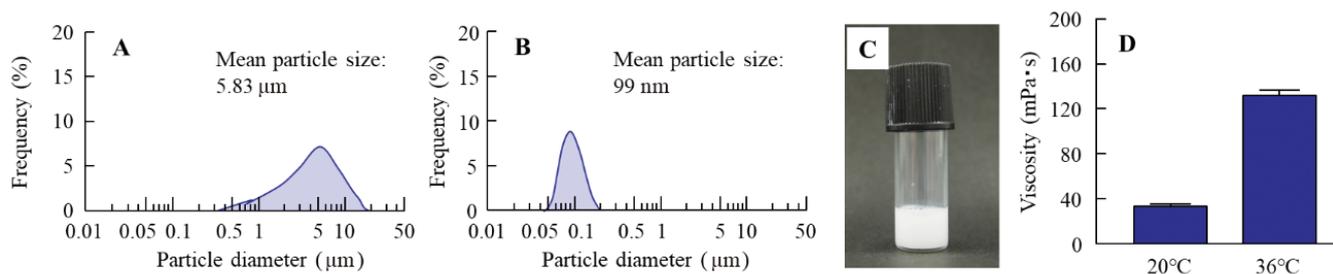


図1 ビーズミル処理前のMXD 粒度分布(A)、ビーズミル処理後のMXD 粒度分布(B)、ビーズミル処理後のMXD 画像(C)、20℃と36℃におけるMXD-NP 製剤の粘度(D)³⁾

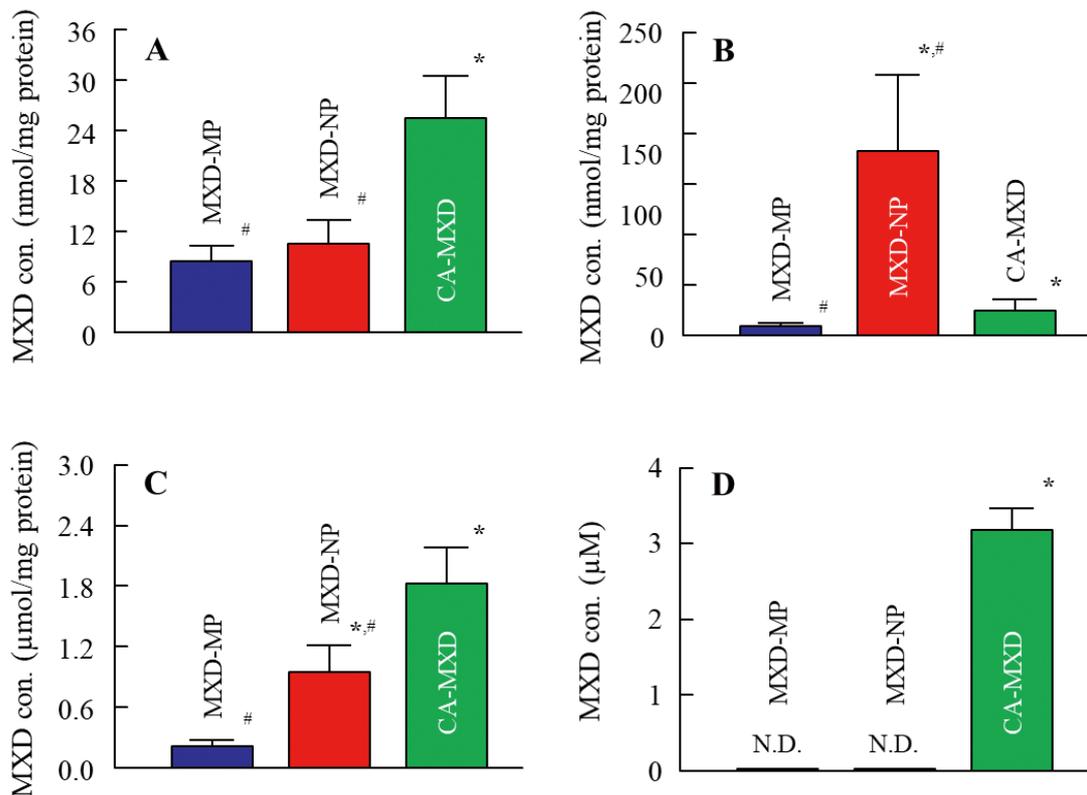


図2 MXD 製剤塗布 4 時間後の C57BL/6 マウスの皮膚組織 (A)、バルジ領域部 (B)、毛球部 (C) および血液 (D) 中の MXD 含有量³⁾
N.D. 検出限度以下。* $p < 0.05$ vs. MXD-MP。# $p < 0.05$ vs. CA-MXD。

べ、低値であった(図 2A および C)。一方でバルジ領域部においては、MXD-NP 塗布群は CA-MXD 塗布群と比較し高値を示し、その値は約 7.4 倍であった(図 2B)。これら結果から、MXD-NP は CA-MXD よりもバルジ領域へ吸収されやすいことが示唆された。一方、皮膚滞留性では、MXD-NP 塗布群と比較し CA-MXD 塗布群で高値を示し、その値は、約 1.9 倍であった(図 2A)。また、CA-MXD 塗布群では血中で MXD が検出されたが、MXD-NP 塗布群では血中への薬物移行は見られなかった(図 2D)。

3. 3. MXD 製剤適用時における発毛促進効果

図 3 は各種 MXD 製剤塗布後の代表的発毛経過画像を示す。また、図 4 は各種 MXD 製剤塗布後日数別に撮影した写真を Image J より解析した塗布部の発毛率(図 3A)と実験 16 日後までの AUC_{0-16d} (図 3B)を示す。Vehicle 塗布群では塗布後 11 日から発毛が認められ、MXD-MP 群でも同程度であった。一方、MXD-NP を塗布することで発毛開始が早まり、その時期は塗布後 7 日目であった。また、MXD-NP 塗布群では、従来品である CA-MXD 塗布群よりも発毛時期が早く、 AUC_{0-16d} においても MXD-NP 塗布群は、CA-MXD 塗布群と比較し有意に高値であった。

4. 考 察

臨床において、AGA の治療法として MXD の外用剤が用いられており、5% MXD 製剤の有効性は 1% や 2% の MXD 製剤より有意に高いことが知られている^{4,5)}。しかし、これまで MXD を高濃度(5%)含有する MXD 固体ナノ粒子製剤の設計は報告されていない。本研究では、分散状態を維持した MXD ナノ粒子を 5% 含有する製剤処方を開発するとともに、本製剤化が MXD を毛包(バルジ領域)に効果的に送達し、C57BL/6 マウスの発毛効果増強に繋がることを明らかにした。

まず、研究で調製した MXD-NP (MXD を高濃度(5%)含有するナノ粒子製剤)の特性を測定した。MXD-NP の粒子径は 50nm-200nm (平均粒子径、99nm、図 1B)であり、MXD-NP 中の固体 MXD の比率は 99% 以上であった。一般に、薬物濃度を上げると、製剤中の分散粒子の凝集が促進されることがある。しかし、MXD-NP 製剤では、22℃で 14 日経過しても凝集は検出されず、固体 MXD の比率にも変化は見られなかった。MXD-NP の粘度は 20℃で約 30mPa・s とメチルセルロース 8% 含有による高い粘度が MXD ナノ粒子の分散性を向上させたと考えられる。また、温度応答性ゲル化基剤であるメチルセルロースの性質

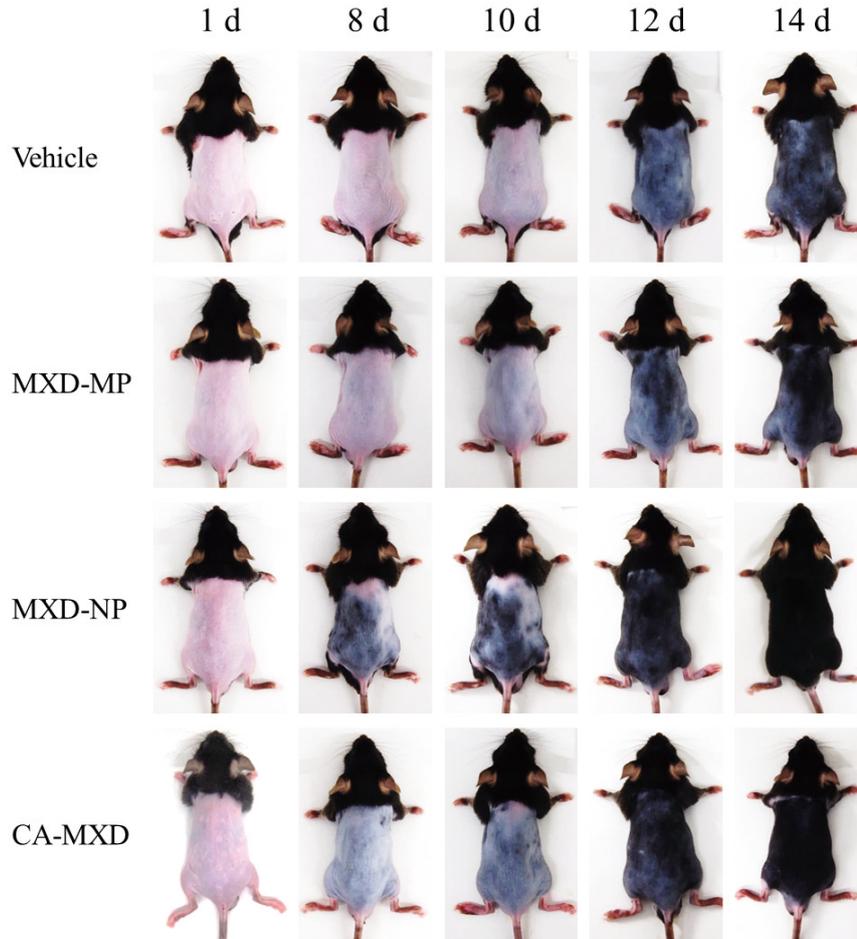


図3 MXD 製剤を反復投与(1日1回)した C57BL/6 マウスのデジタル写真³⁾

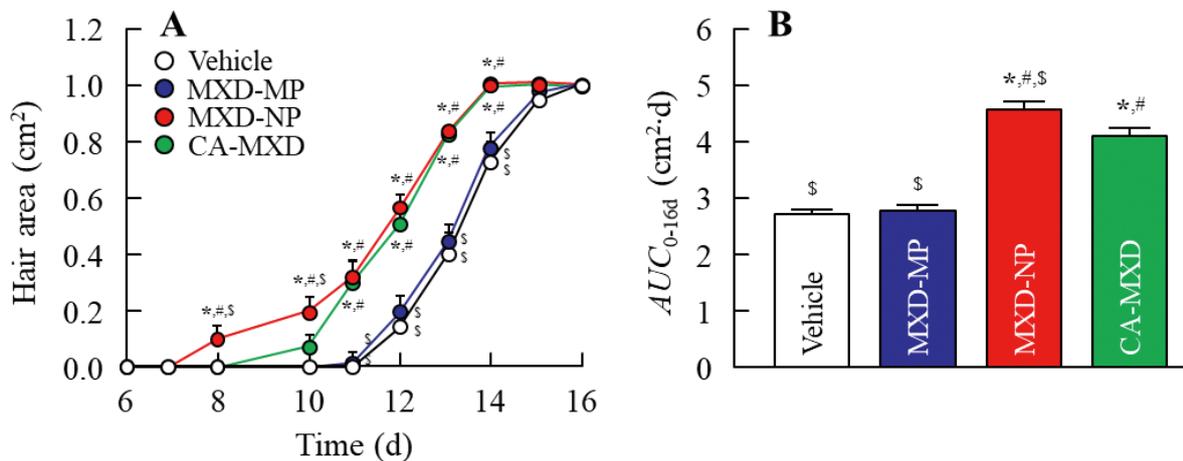


図4 C57BL/6 マウスにおける MXD 製剤の反復投与による毛髪成長への影響³⁾
 (A) MXD 製剤を反復投与(1日1回)した C57BL/6 マウスの毛髪面積 (A) と AUC_{0-16d} の変化 (B)。* $p < 0.05$ vs. Vehicle. # $p < 0.05$ vs. MXD-MP. \$ $p < 0.05$ vs. CA-MXD.

上、体温付近の36℃における粘度は約120mPa・sと、in situハイドロゲルとしての適応可能な製剤化に成功した。

次に、C57BL/6マウスを用いて、MXD-NPの発毛効果を評価した。MXD-NP塗布マウスはCA-MXD塗布マ

ウスに比べ、毛髪の成長が早く、MXD-NP群の AUC_{0-16d} は従来品のCA-MXD群のそれとに比較し有意に高値であった(図3および4)。これらの結果は、MXD-NPの発毛効果がCA-MXDの効果よりも優れていることを示してい

る。さらに、皮膚組織や血液中のMXD含有量の評価に加え、毛包を上部(バルジ領域部)と下部(毛球部)に分割した際の、毛包送達経路についても評価した。MXD-NP塗布マウスのバルジ領域部のMXD濃度はCA-MXD塗布群よりも高値を示したが、MXD-NP投与マウスの毛球部および皮膚組織内の含有量はCA-MXD塗布群よりも低値であった(図2BおよびC)。また、従来のCA-MXD塗布時においては血中へのMXD移行が確認されたが、MXD-NP塗布群においては血液中への薬物移行は検出されなかった(図2D)。一般に薬物の皮膚吸収経路は、連続した角質層を経由するルート1と付属器官を介して皮膚内に浸透するルート2の2種が大きな経路として知られている⁶⁾。なかでも、その広い面積から角質層を透過し、皮膚組織の深部および血中へ浸透するのが一般的な溶液型薬物(溶媒和された薬物)の主経路と考えられる。一方、角質層は外部からの異物侵入に対し高いバリア機構を有していることから、粒子径約200nm以上の薬物は角質層を通過することができず、溶媒和された薬物で見られるようなルート1を介した薬物浸透が困難であることが報告されている⁷⁾。本研究で用いたMXD-NP製剤においても、MXD-NP中の99%以上のMXDが固体粒子として存在し、その固体粒子径は70nm-200nmであることから、これらのサイズでは角質層を通過することが難しいと示唆される。このことが、MXD-NPでは、従来型CA-MXDと比較し、皮膚組織および血液中のMXD含有量が低いことに繋がるものと考えられる。一方、MXD-NP塗布群ではバルジ領域部分への高いMXD輸送を示したのは、ルート2のような付属器官(毛包)を介したためではないかと示唆された。このように、今回調製したMXD-NP製剤は、毛包への直接的な薬物取り込みが認められ、毛包DDSに有用であるものと考えられた。さらに、これらは血中への薬物輸送を軽減できることから、全身性副作用の軽減など安全面においても極めて有用であるものと考えられた。一方で、MXD-NP製剤は皮膚表面側のバルジ領域部には高い薬物供給が可能であったが、毛包深部である毛球部への薬物輸送能は十分ではなかった。したがって、今後さらなる改良が必要と考えられる。また、従来品(CA-MXD)のように毛球部の濃度を高めるよりも、バルジ領域部でのMXD濃度を高めた製剤(MXD-NP)のほうが、高い発毛効果を示したという本研究結果は、MXDがバルジ領域部で何らかの発毛機序を示していることを示唆した。バルジ領域の細胞は幹細胞の性質を持ち、この細胞が無毛期発症時に新しい毛幹を生成することが知られている⁸⁾。したがって、バルジ領域部で高まったMXDは毛包上皮幹細胞の活性化を誘発するのではないかと考える。しかし、MXDがどのように発毛を促進するのか、現時点での理解は限られており、MXDと幹細胞の直接的な相互作用についてはほとんど分かっていない。

MXDが幹細胞に直接作用するかどうかについて、今後さらなる研究を進める予定である。

5. 総括

MXDナノ結晶からなる高濃度(5%)MXD製剤の製造法を確立するとともに、メチルセルロースをベースとしたin situハイドロゲル処方を作成した。また、本MXD-NP製剤は従来品に比べ、毛穴を介した毛根中への薬物直接移行性が優れており、従来品より安全かつ高い薬効を有することを明らかとした。本成果を基盤とし、今後コスメトロジー分野における新たな技術ツールを生み出すとともに、国民の美容向上に貢献するような研究を進めていきたいと考える。

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を申し上げます。

(引用文献)

- 1) Nagai, N. *et al.* Involvement of Endocytosis in the Transdermal Penetration Mechanism of Ketoprofen Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, E2138 (2018).
- 2) Nagai, N. *et al.* Drug Delivery System Based On Minoxidil Nanoparticles Promotes Hair Growth In C57BL/6 Mice. *Int. J. Nanomedicine.* **14**, 7921-7931 (2019).
- 3) Oaku, Y. *et al.* Minoxidil Nanoparticles Targeting Hair Follicles Enhance Hair Growth in C57BL/6 Mice. *Pharmaceutics* **14**, 947 (2022).
- 4) Olsen, E. A. *et al.* A randomized clinical trial of 5% topical minoxidil versus 2% topical minoxidil and placebo in the treatment of androgenetic alopecia in men. *J. Am. Acad. Dermatol.* **47**, 377-385 (2002).
- 5) Tsuboi, R. *et al.* Randomized clinical trial comparing 5% and 1% topical minoxidil for the treatment of androgenetic alopecia in Japanese men. *J. Dermatol.* **36**, 437-446 (2009).
- 6) Barry, B. W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* **14**, 101-114 (2001).
- 7) Nagai, N. *et al.* Design of a transdermal formulation containing raloxifene nanoparticles for osteoporosis treatment. *Int. J. Nanomedicine.* **13**, 5215-5229 (2018).
- 8) Garza, L. A. *et al.* Bald scalp in men with androgenetic alopecia retains hair follicle stem cells but lacks CD200-rich and CD34-positive hair follicle progenitor cells. *J. Clin. Invest.* **121**, 613-622 (2011).

開閉制御可能なナノシャッター構造を有する高分子微粒子担体の開発

信州大学繊維学部

湊 遥香

In this present study, nanocomposite hydrogel particles with multiple layered structures have been created. To do this, first, hydrogel particles with thermo-responsive property were prepared by aqueous free radical precipitation polymerization. Using the obtained hydrogel particles as cores, seeded precipitation polymerization with various chemical species was investigated to obtain hydrogel particles with multiple layers. It is found that one-pot synthesis of multiple layered hydrogel particles was possible by modifying conventional precipitation polymerization for forming nanocomposite hydrogel particles with nano-scale shutters. The obtained particles were evaluated by dynamic light scattering, various microscopy including optical microscopy, scanning electron microscopy, and transmission electron microscopy.

1. 緒言

ハイドロゲル微粒子は、高分子鎖の三次元ネットワークを有し、水で高膨潤した柔らかいコロイド粒子である¹⁻⁴⁾。そのため、ポリスチレンやシリカなどの従来の硬い高分子微粒子と比較し、柔らかいゲル微粒子は、温度やpHなどの様々な環境変化に対する刺激応答性や、機能性分子の取込み・放出、生体適合性などの魅力的な特徴を有している^{3,4)}。さらに、優れた分散安定性を有することから、薬剤を安定に内包できる薬剤輸送システムとしての応用が着目されている。しかし、内包した薬剤が瞬時に放出されてしまうことや、内包物の放出に伴い微粒子の崩壊が生じてしまうことなど、課題が多く残されている現状である。こうした課題を解決するため、ゲル微粒子のナノ構造の精密制御が求められている。

そのような背景の中、様々な化学種から成るコアシェル(CS)構造が着目されている。これまで、ハイドロゲルのみから成るCSゲル微粒子や、ダブルシェル型CSゲル微粒子、中空ゲル微粒子などの様々なタイプのCS構造が開発されてきた⁵⁻⁷⁾。従来、これらのCSゲル微粒子は、主に水系のフリーラジカルシード沈殿重合により合成される。水溶性のシェルモノマーから形成されるポリマーは、重合中に水に不溶となり析出し、系内に存在するシード粒子(コアゲル微粒子)に付着することで、CSゲル微粒子が形成される。一連の合成方法により、母体となるコアゲル微粒子のみでは成し得ないより複雑な機能性の追求がなされてき

た。

そこで本研究では、シード沈殿重合法を発展させ、体温付近の温度刺激に対して開閉可能なシャッター構造をゲル微粒子内に導入できれば、微粒子に内包した有効成分を効果的に放出することが可能となり、より有用な薬剤輸送システムの開発に繋がると考え、複数の機能性シェル層を有するCSゲル微粒子の開発を試みた。

2. 方法

32℃付近に体積相転移温度を有するポリ*N*-イソプロピルアクリルアミド(pNIPAm)を主成分に選択し、モノマーを複数回に分けて添加するワンポット沈殿重合により、複数のシェルを有するCSゲル微粒子を合成した(スキーム1)。その際、NIPAmに対する反応性比が異なるモノマーを選択し、シェル層内の荷電基の空間分布を設計した。さらに、得られたCSゲル微粒子存在下の油性モノマーのシード乳化重合法により、ゲル微粒子内部の荷電基を避けて固体成分(例:ポリスチレン)が複合化する現象を活用し、ナノシャッター構造となる固体成分をゲル微粒子内に導入した。複数のシェル層を有するCSゲル微粒子の内部構造は、走査型電子顕微鏡(SEM)や透過型電子顕微鏡(TEM)による観察に加え、動的光散乱法(DLS)や電気泳動光散乱(ELS)などの手法で評価した。

3. 結果・考察

3.1. 複数のシェル層を有するCSゲル微粒子

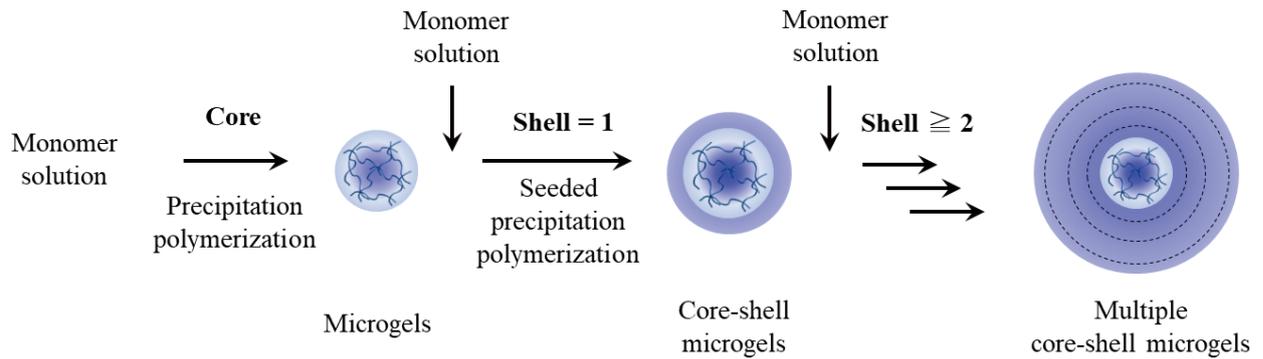
水系のフリーラジカル沈殿重合法において、一般に、ゲル微粒子は同心円状に形成されることが知られている。そのため、重合系内にモノマーを追加で添加し続ければ、複数のゲル層を有するCSゲル微粒子が得られると考えた(スキーム1)。このとき、主成分であるpNIPAmと反応性比の異なる荷電基モノマーを共重合することで、複数の荷電基層の導入を試みた。ここでは、NIPAmとの反応性が



Synthesis of Polymer Microspheres Including Nano-shutter Structures

Haruka Minato

Faculty of Textile Science & Technology, Shinshu University, Japan



スキーム1 多層ゲル微粒子の合成手法

高いメタクリル酸 (MAc)、および反応性の低いフマル酸 (FAc) を共重合した(それぞれを、NM、NFと表記)。

まず、追加添加するモノマー濃度の影響を検討した。一連の検討の結果、モノマー濃度の増加に従い、望まぬ二次粒子が形成されることが分かった。このことから、荷電基層の厚さを制御する場合には、モノマー添加の回数を変えることが効果的であると考えられた。次に、モノマーを添加するタイミングについて検討した。先に添加したモノマーが微粒子に導入される前に次のモノマーを添加してしまうと、各層の組成が混じり合うと考えたためである。そこで、サンプリングによりモノマー添加直後からの粒子サイズを測定した。すると、モノマー添加から1時間を過ぎた頃から粒子サイズの増加がみられなくなったため、対象とする系においては、十分にモノマーが消費される時間は1時間程度であることが示唆された。以上をふまえ、モノマーを連続添加するときの間隔を1時間とし、添加回数を変えることで、複数のゲル層を有するCSゲル微粒子を合成した。

シェルモノマーを1回添加したゲル微粒子を「CS1」とし、最大5回添加したCS5ゲル微粒子を合成した。5回以上はフラスコの容量が足りずモノマーの追加添加ができなかったが、フラスコサイズやモノマー量を調節することで、5回以上でもシェル層を導入できることを確認している。図2は、コアにpNIPAmゲル微粒子、1～4層目にNM、5層目にNFのシェル層を導入した典型的なCSゲル微粒子(N-NM-NM-NM-NM-NF)の顕微鏡像を示す。得られたCSゲル微粒子を電界放射形(FE-)SEMで観察した結果、各層を導入したゲル微粒子も比較的サイズの揃った粒子であり、モノマーを添加するにつれサイズ増加がみられた(図1(a))。

同様に、DLSにより算出された収縮状態のゲル微粒子の流体力学的直径(D_h)においても、段階的なサイズ増加がみられた(図1(b))。このとき、 D_h は合成開始およびモノマー添加したタイミングから徐々に増加し、約30分で

一定に達し、モノマーの添加回数に応じて複数回上昇を繰り返した。この結果から、供給されたモノマーは、モノマー添加から1時間以内にポリマーに変換され、粒子に吸着したと考えられる。

続いて、ELSにより、ゲル微粒子の表面電荷密度に 관련된電気泳動移動度(EPM)の時間依存性を評価した(図1(b))。得られたCSゲル微粒子は、各NM/NF層にカルボキシ基を有するため、脱プロトン化(pH3)/プロトン化(pH11)状態でそれぞれ評価した。コア粒子(N)の合成開始からEPMの絶対値はほぼ一定であったのに対し、1層目のNMモノマーを添加した直後、EMPの絶対値は大きく上昇した後、徐々に減少した。 D_h がまだ増加しているにもかかわらず、EPMの最大絶対値が重合初期(～10分)に記録されたことは、MAcがシェル層の中心部(内側)に局在していることを示す。2～4層目のNMモノマー添加後も同様の傾向がみられた。一方、5層目のNFモノマーを添加時には、徐々にEMPの絶対値は上昇した。これはNM層を導入した場合は異なり、層の表面(外側)付近に荷電基が帯電していることを示す。以上より、効果的にシェル層が導入されたCSゲル微粒子が得られたと考えられる。

3. 2. 複数のシェル層を有する複合化CSゲル微粒子とその機能性

続いて、シード乳化重合法により上記検討により得られたゲル微粒子内への固体成分を導入した。まず、2回モノマー添加したCSゲル微粒子(CS2)に対して、スチレンのシード乳化重合を実施した。FE-SEMより、望まぬポリスチレンの二次粒子が形成されることなく、ポリスチレン(PS)が複合化された粒子が形成されたことが確認された(図2左上)。粒子の表面構造には凹凸がみられており、更に、真空中においてもゲル微粒子が脱水に伴い変形されることなく、球形を保っていることが確認された。続いて、超薄切片像を確認すると、黒い層が階層的に連なる様子が

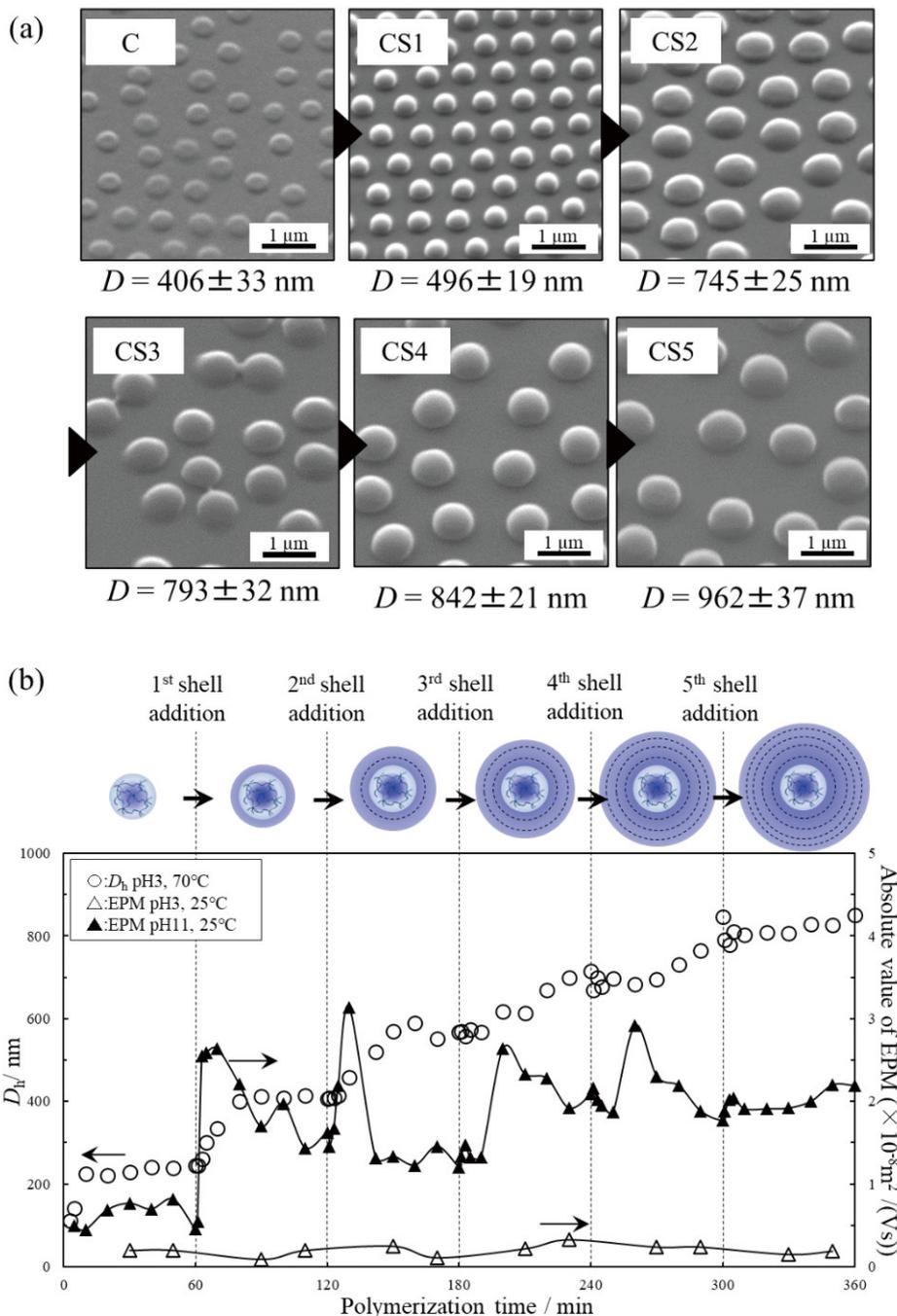


図1 (a) CS ゲル微粒子 (N—NM—NM—NM—NM—NF) の FE-SEM 像、(b) CS ゲル微粒子の収縮状態における D_h 、および、膨潤状態における EPM の時間依存性

確認された。このとき、PSを酸化ルテニウムにより染色することにより、PS部位が黒くみえていると考えられる。ゲル微粒子内部の電荷密度が高い部分に疎水的なPSが複合化されないため、コアおよび2～3回目に添加したモノマーが融合したpNIPAmリッチな層にPSが複合化され、その間の層にはPSが複合化されていないという、予想通りの構造が得られたことを確認した(図2左下)。

続いて、CS3に対するPSの複合化とその構造評価を行った。CS2と同様に、PSの複合化をFE-SEMにより確認

することができた(図2上中央)。更に、超薄切片像から、より複雑な階層構造を有することが観察された(図2下中央)。即ち、CS2に比べ、NM由来の高分子電解質層が1層増えたため、焦点のあった複合粒子にはPSが複合化していない2層の白い層が確認された。つまり、CS3においても予想通りの階層構造が得られることが分かった。

さらにゲル層を増したCS5に対してPSを複合化することにも成功した(図2右上)。超薄切片像からも、内部にPSが複合化されていない白い層が3層確認されたため、

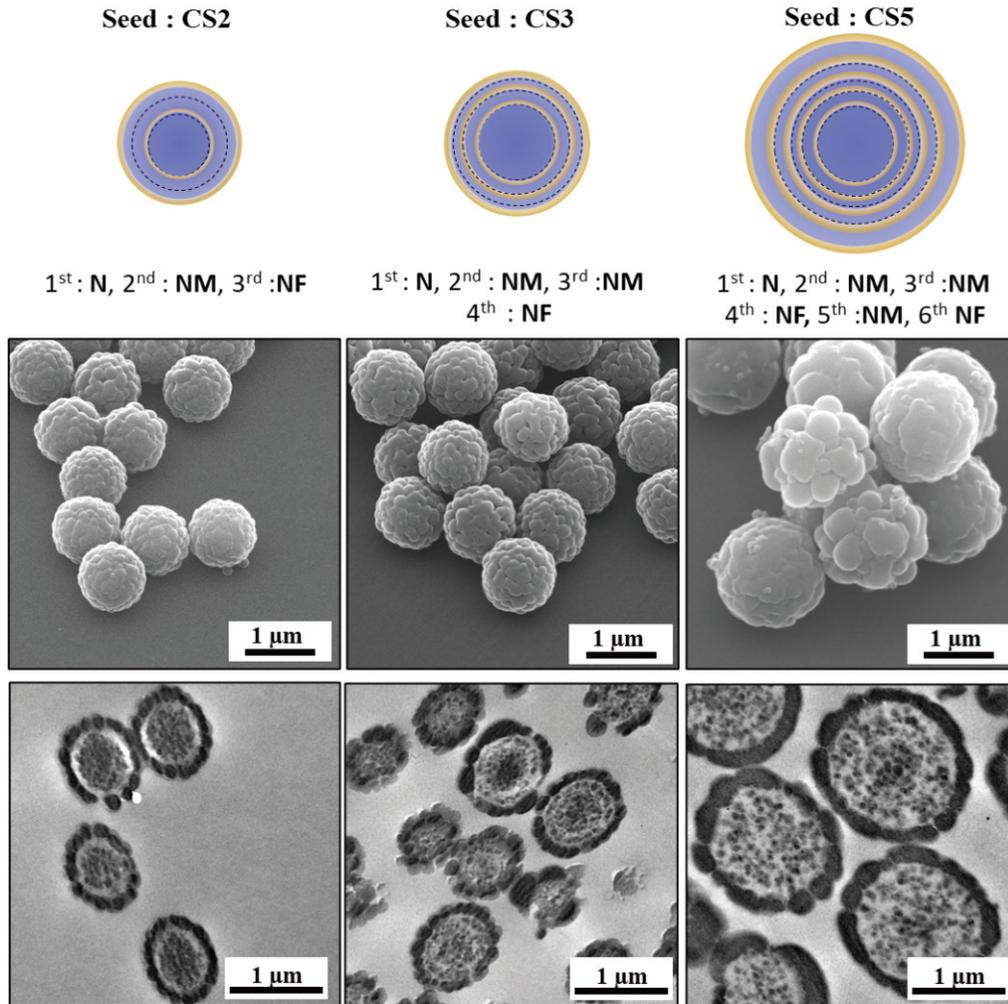


図2 CSゲル微粒子の存在下、スチレンのシード乳化重合によって形成されたPSシャッターを有した複合化ゲル微粒子。上段：FE-SEM像。下段：超薄切片的TEM像。

CS5においても目的とする階層構造を有することが分かった(図2右下)。

得られたゲル微粒子ならびにPSを複合化したゲル微粒子に対して、モデルとする染料をしみこませ、その拡散性について検討を実施した。カチオン性染料を用いると、PSが複合化されていない粒子内部のゲル層に静電相互作用を駆動力として担持されることを確認した。PSを複合化していないゲル微粒子においても同様な染料吸着挙動を確認した。その上で、微粒子分散液のpHを中性付近からカルボキシ基がプロトン化される酸性へと変化させると、いずれのゲル微粒子に取り込ませた場合も染料の脱着挙動が確認された。この挙動をより詳細に検討したところ、PSによるシャッターがある複合化ゲル微粒子の方が、同様の外部刺激の印加に伴う放出挙動時に、ゆっくりと微粒子外に染料を放出することが確認された。その際、PSの層数が増すにしたがって、その速度の低下が確認されたことから、層状に連なったPS層が微粒子内部からの低分子

基質の拡散の抑制に寄与していることが示唆された。

4. 総括

肌からの水分蒸発を抑制するため、水中油滴／油中水滴エマルジョンを使用した化粧品は多い。エマルジョンの調整には低分子界面活性剤が使用されてきたが、皮膚への刺激やアレルギー反応等を誘起することが問題視されていることから、低分子界面活性剤に比べ高い吸着エネルギーを有する微粒子を安定化剤としたエマルジョンや、有効成分を内包した微粒子の応用が試みられてきた。そのような中、本研究で用いるゲル微粒子は、高い分散安定性と界面活性能に加え、内部に多量の水もしくは油を内包できる。そのため、ゲル微粒子の化粧品への利用は、十分な保管安定性と滑らかな質感の提供が期待できる。さらに、体温付近の温度に応答して開閉するナノ障壁を配置したゲル微粒子の設計により、長時間にわたって内包した有効成分を放出することができれば、より持続的・効果的な有効成分の皮膚

吸収が期待できるなど、波及効果が見込まれる。

(引用文献)

- 1) H. Minato, M. Murai, T. Watanabe, S. Matsui, M. Takizawa, T. Kureha, D. Suzuki, *Chem. Commun.*, 54, pp932-935 (2018)
- 2) H. Minato, M. Takizawa, S. Hiroshige, D. Suzuki, *Langmuir*, 35, pp10412-10423 (2019)
- 3) D. Suzuki, H. Horigome, T. Kureha, S. Matsui, T. Watanabe, *Polym. J.*, 49, pp695-702 (2017)
- 4) M. Karg, M. A. Pich, T. Hellweg, T. Hoare, L. A. Lyon, J. J. Crassous, D. Suzuki, R. A. Gumerov, S. Schneider, I. I. Potemkin, W. Richtering, *Langmuir*, 35, pp6231-6255 (2019)
- 5) M. H. Smith, L. A. Lyon, *Acc. Chem. Res.*, 45, pp985-993 (2012)
- 6) F. A. Plamper, W. Richtering, *Acc. Chem. Res.*, 50, pp131-140 (2017)
- 7) J. Oberdisse, T. Hellweg, *Colloid Polym. Sci.*, 298, pp921-935 (2020)

Ⅱ． 生体作用、安全性に関する分野

皮膚細胞間バリアの破壊に関わる光センサーの解明と予防薬の開発

岐阜薬科大学薬学部

五十里 彰

In this study, we focused on red light, which may have a protective effect against ultraviolet ray (UVB) light, a light associated with skin barrier dysfunction. Red LED light irradiation did not alter the expression level of tight junction barrier-related factor claudin-1 (CLDN1), cellular localization of CLDN1, or cell proliferation signals including Akt and ERK. Irradiation with red LED light significantly suppressed the increase in reactive oxygen species (ROS) production induced by UVB irradiation. Pre-irradiation with red LED light significantly suppressed the increase in *NFE2L2*, *SFN* and *PPAR- δ* mRNA expression induced by UVB irradiation. Moreover, red LED light also significantly ameliorated the UVB irradiation-induced suppression of *PPAR- γ* mRNA expression. Red light, which has been considered to have little biological effect, has been shown to enhance the skin stress response and to attenuate oxidative stress, one of the mechanisms by which red light can attenuate oxidative stress. In human epidermis-derived cells, irradiation with red LED light was also shown to reduce UVB-induced increase in ROS production, which is associated with skin barrier disruption.

The establishment of scientific evidence may lead to the future development of technologies and devices that use red light to enhance the skin's stress response. Since it is becoming clear that light has different physiological effects depending on its wavelength, it is expected that new concepts for cosmetic materials will be developed that maintain the positive effects of sunlight on the skin while preventing only the negative effects on the skin barrier.

1. 緒言

皮膚において、脂質膜による角質層と細胞間接着因子による顆粒層の二種類のバリアが存在し、体内からの水分・イオンの漏出や外界からの微生物などの侵入を防いでいる^{1,2)}。過度の紫外線を受けると炎症や核酸損傷による皮膚がん発症リスクの増加だけでなく、乾燥などの皮膚バリア破綻を伴う光老化が生じる。光老化において、角質層の天然保湿因子との関与が明らかになっているが、顆粒層バリア破綻におけるメカニズムは不明である。

顆粒層バリアは隣接細胞の接着を担うタイトジャンクション (tight junction: TJ) によって形成される。TJは膜貫通型タンパク質であるクローディン (CLDN) や足場タンパク質であるZO-1などによって形成される。これまでに我々は、微弱紫外線照射や活性酸素種 (ROS) によって細胞間バリアが破綻する際に、CLDN1のリン酸化やニトロ化などの翻訳後修飾状態が変化し、クラスリン依存性エンドサイトーシスの促進によって内在化することを報告した^{3,4)}。さらに、微弱紫外線による皮膚バリア破綻において、光センサー受容体であるオプシントタンパク質および下流のカルシウム流入を伴う細胞内シグナルの関与を明らかにしており、光センサーを介する皮膚バリア破綻の細胞内シグナル

を標的として、新たな予防法の開発に繋がることが期待される。

光線照射を用いた生体へのアプローチはフォトバイオモジュレーションと呼ばれ、基礎から臨床まで幅広く研究が行われ、様々な有益な作用が報告されている⁵⁾。皮膚細胞において紫外線や可視光の中でも青色光などの短波長光はオプシンなどの光受容体タンパク質に受容されると考えられるが、赤色光をはじめとした長波長光の受容と作用機序については不明な点が多い^{6,7)}。興味深いことに、健常者皮膚に赤色LED光の前照射により紫外線誘発紅斑形成が抑制されることが知られ⁸⁾、皮膚バリア保護に関わる波長の光の存在が示唆されているため、赤色光による作用メカニズムの科学的エビデンスの確立が必要不可欠である。

本研究では、皮膚バリア破綻に関わる光である紫外線に対して保護的に作用する可能性のある赤色光に着目し検討した。

2. 方法

2.1. 細胞培養

ヒト表皮ケラチノサイト由来のHaCaT細胞を用いて各種検討を行った。細胞は5% ウシ胎児血清を含むDulbecco's modified Eagle Mediumで培養した。5% CO₂ インキュベーターを用いて、37℃にて培養を行った。0.5% trypsin-EDTA溶液を用いて3~4日ごとに継代し、実験に用いた。

2.2. 紫外線および赤色LED光の処理

7 × 10³ 個/ウェルの濃度で細胞を96ウェルプレート (Thermo Fisher Scientific社) に播種し、3日間培養した。



Elucidation of photosensors involved in the breakdown of the skin intercellular barrier and development of prophylactic agents

Akira Ikari

Gifu Pharmaceutical University

検討時に培地を Hanks' Balanced Salt Solution に置換し、LED array driver (バイオリサーチセンター株式会社) を用いて赤色 LED 光 (630 nm, 5-100 J/cm²) を照射後、UVP cross linker (Analytik Jena) を用いて紫外線 (UVB, 波長 302 nm, 50 mJ/cm²) を照射した。無血清培地に置換してさらに培養後、各種検討を行った。

2.3. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動とウェスタンブロット法

7 × 10⁴ 個/ウェルの濃度で細胞を 6 well plate に播種し、3 日間培養した。赤色 LED 光 (630 nm, 10 J/cm²) を照射した 24 時間後、セルスクレイパーを用いて細胞を回収した。Lysis buffer (1% Triton X-100, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH7.4) を用いて細胞内タンパク質を可溶化し、遠心により可溶性画分を抽出した。10% または 12.5% SDS-ポリアクリルアミドゲルにタンパク質サンプルをアプライし、30 mA で 80 分間電気泳動した。ゲルを PVDF 膜に転写後、2% スキムミルクで 30 分間処理し、ブロッキングを行った。各種一次抗体 (抗 CLDN1 抗体、抗 phospho-Akt (Ser473) 抗体、抗 Akt 抗体、抗 phospho-ERK1/2 抗体、抗 ERK 抗体) をそれぞれ 4℃ で一晩処理した。PVDF 膜の洗浄後、HRP 標識二次抗体を室温にて 60 分間反応させた。EzWestLumi plus (ATTO 社) を用いて各タンパク質のバンドを検出した。

2.4. 蛍光免疫染色法

カバーガラス上に培養した細胞に赤色 LED 光 (630 nm, 100 J/cm²) を照射してから 6 時間後、メタノールによる固定後、0.5% Triton X-100 含有 PBS で可溶化処理を行った。4% ブロックエースを用いてブロッキング処理を行った後、一次抗体 (抗 CLDN1 抗体) を 4℃ で一晩処理した。一次抗体を洗浄後、AlexaFluor 546 標識二次抗体を室温で 90 分間反応させた。4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を反応させ、細胞の核を可視化した。カバーガラスをスライドガラスに固定し、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM700, Zeiss 社) を用いて CLDN1 タンパク質の細胞局在を解析した。

2.5. 細胞生存率、細胞内 ROS 産生量、ミトコンドリア膜電位の解析

96 ウェルプレートに培養した HaCaT 細胞に、ROS 蛍光指示薬である 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) またはミトコンドリア膜電位の蛍光指示薬である MT-1 MitoMP Detection Kit (Dojindo) を取り込ませ、各種光源の照射 1 時間後に蛍光プレートリーダー (Infinite F200, Tecan) を用いて蛍光強度を測定した。また、cell counting kit-8 (CCK-8, Dojindo) を用いて 24 時間後における細胞生存率を測定した。

2.6. RNA 抽出とリアルタイム PCR

赤色 LED 光および UVB 照射から 6 時間後、TRI reagent (コスモバイオ社) を用いて細胞から total RNA を抽出した。ReverTra Ace (東洋紡社) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を調製した。定量的リアルタイム PCR 法では、Real time PCR Eco (アズワン社) を用いて mRNA 発現量を測定した。各遺伝子の発現量は、β-actin mRNA の発現量で標準化した。使用したプライマーを表 1 に示す。

3. 結果

3.1. 赤色 LED 光照射による CLDN1 タンパク質の発現および細胞局在

CCK-8 を用いた比色解析によって赤色 LED 光照射後の細胞生存率を検討したところ、顕著な細胞毒性は見られなかった。次に、表皮における TJ バリア形成に対する作用を解明するため、ウェスタンブロット法により皮膚 TJ 構成の必須因子 CLDN1 タンパク質の発現量を測定した。赤色 LED 光照射によって、CLDN1 タンパク質発現量は変化しなかった (図 1A)。蛍光免疫染色法により、CLDN1 タンパク質の細胞内局在を検討したところ、細胞接着領域における局在様式に変化は認められなかった (図 1B)。また、赤色 LED 光照射が細胞増殖能に及ぼす影響を明らかにするため、細胞生存・増殖シグナルである Akt および ERK1/2 のリン酸化量を検討したところ、いずれも変化は認められなかった (図 1A)。以上の結果から、赤色 LED 光照射による直接的な細胞増殖シグナルや TJ 形成能への作用はないことが示された。

表 1 リアルタイム PCR で使用したプライマー

	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
<i>NFE2L2</i>	CACCATGGGAATGGACTTG	TCATACTCTTTCCGTCGCTG
<i>Stratifin</i>	AGATGCCGCCACCAA	ATCTCGTAGTGAAGACGGAAAAG
<i>PPARδ</i>	CTCTATCGTCAACAAGGACG	GTCTTCTTGATCCGCTGCAT
<i>PPARγ</i>	CGACCAAGTAACTCTCCTCA	GTTCCGTGACAATCTGTCTG
<i>β-Actin</i>	CCTGAGGCACTCTCCAGCCTT	TGCGGATGTCCACGTCACTTC

3.2. 紫外線照射誘発 ROS 産生に対する赤色 LED 光照射の作用

UVB の照射によって細胞内 ROS 産生量が亢進し、細胞毒性が惹起されると、細胞間バリア機能も障害される³⁾。一方、赤色光を予め照射することで、紫外線暴露による紅斑形成が抑制されることが報告されている⁸⁾。そこで、我々の実験条件においても、赤色 LED 光の前照射によって UVB 照射による皮膚細胞へのダメージを減弱できるかどうかを検討した。我々のこれまでの検討において、5mJ/cm² 以下の線量の UVB 照射では ROS 産生量は増加しないが、50mJ/cm² 以上の線量では顕著に増加することを明らかにしているため³⁾、UVB 50mJ/cm² の照射条件を用いた。ROS 特異的な蛍光指示薬 H₂DCF を用いた ROS 産生量の解析を行った。UVB 50mJ/cm² の照射によって、Control (無処置サンプル) と比較して顕著に増加した ROS 産生量は、赤色 LED 光 (10J/cm²) の前照射によって有意に抑制された (図 2)。一方で、赤色 LED 光単独照射細胞において、

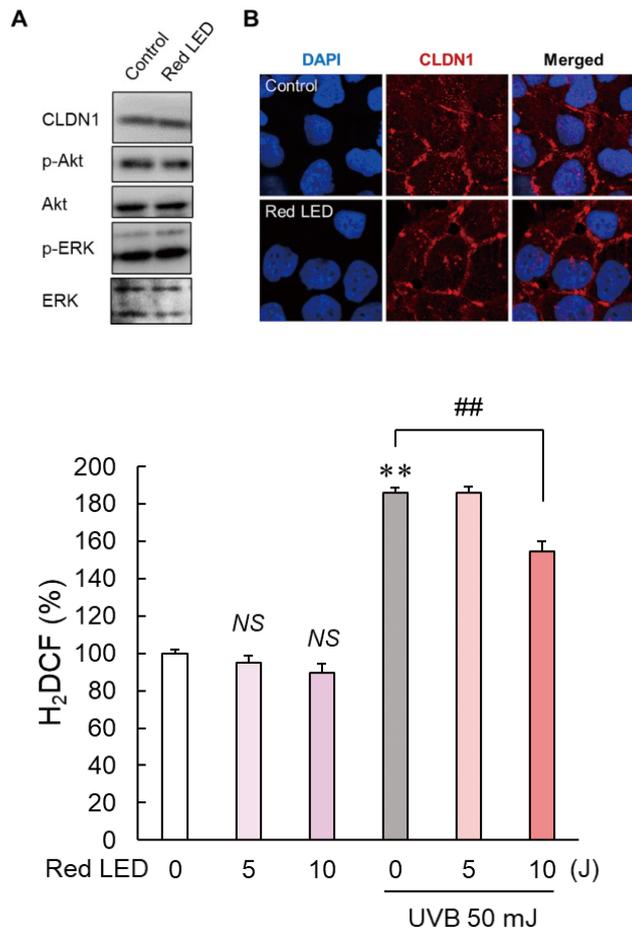


図 2 紫外線照射誘発 ROS 産生に対する赤色 LED 光照射の作用
赤色 LED 光照射 (5 or 10J/cm²) および紫外線 (UVB 50mJ/cm²) の照射 1 時間後の細胞における H₂DCF の蛍光強度を測定し、赤色 LED 光・紫外線未照射の細胞における蛍光強度を 100% とした。***P* < 0.01 and NS *P* > 0.05 vs control (non-UVB). ## *P* < 0.01 vs UVB only. n = 5-6.

ROS 産生量は減少しなかった。この結果から、赤色 LED 光の前照射によって、UVB 照射誘発 ROS 産生が抑制されることが示された。

3.3. ミトコンドリア膜電位に対する各種光源照射の作用

赤色 LED 光前照射による ROS 産生抑制のメカニズムを解明するため、細胞内の ROS 産生に関わる細胞内小器官でもあるミトコンドリアに着目した。特異的蛍光指示薬 MT-1 を用いて、ミトコンドリア膜電位を測定したところ、各種光源照射条件において、ミトコンドリアの膜電位は変化せず、赤色 LED 光による作用も認められなかった (図 3)。両光源照射によってミトコンドリアの膜電位が減少しており、何らかのダメージが生じた可能性があるが、原因は不明である。以上の結果から、紫外線照射に誘発される ROS 産生亢進および赤色 LED 光による改善作用はミトコンドリアを介さない機序によるものと考えられる。

図 1 赤色 LED 光照射後の CLDN1 タンパク質の発現量および細胞局在
(A) ウェスタンブロット法における結果。未処理または赤色 LED 光照射 (10J/cm²) の照射 24 時間後、各タンパク質の発現量を測定した。CLDN1、phospho-Akt (Ser473)、Akt、phospho-ERK1/2、ERK に対する一次抗体を用いた。
(B) 蛍光免疫染色法における蛍光撮影画像。赤:CLDN1、青:DAPI (核を染色)。赤色 LED 光照射 (10J/cm²) の照射 6 時間後の細胞を用いて、蛍光免疫染色を行った。

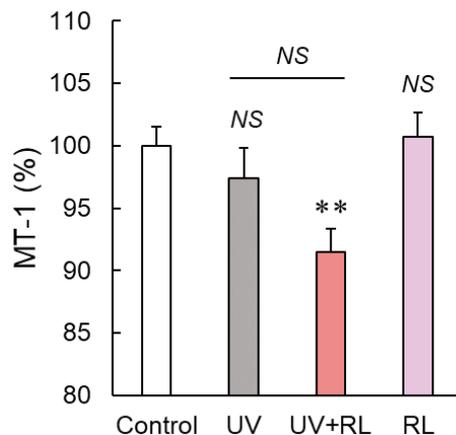


図 3 ミトコンドリア膜電位に対する各種光源照射の作用
赤色 LED 光照射 (10J/cm²) および紫外線 (UVB 50mJ/cm²) の照射 1 時間後、蛍光プレートリーダーを用いて MT-1 の蛍光強度を測定し、ミトコンドリア膜電位の指標とした。
***P* < 0.01 and NS *P* > 0.05 vs control (non-irradiated). Control: non-irradiated, UV: UVB (50 mJ/cm²), UV+RL: UVB(50mJ/cm²) +Red LED(10J/cm²), RL: Red LED(10J/cm²). n = 5-6.

3.4. ストレス応答因子の発現に対する各種光源照射の作用

赤色LED光前照射による酸化ストレスの抑制メカニズムを解明するため、ストレス応答に関わる因子のmRNA発現量をリアルタイムPCR法によって解析した。

酸化ストレス応答の主要因子であるNrf2は、抗酸化酵素であるヘムオキシダーゼ-1やキノン酸化還元酵素-1などの発現を制御する⁹⁾。Nrf2をコードする遺伝子である*NFE2L2* mRNAは紫外線照射によって増加傾向を示し、赤色LED光前照射によって顕著に減少した(図4A)。赤色LED光単独照射でも発現抑制の傾向がみられた。以上の結果から、紫外線照射による細胞内ROS産生の亢進は、Nrf2シグナルによる酸化ストレス応答を惹起することが示された。赤色LED光単独ではNrf2発現への影響が認められなかったため、赤色光によるNrf2発現誘導抑制作用は、ROS産生抑制による間接的な影響である可能性が考えられる。

14-3-3タンパク質ファミリーの一種であるstratifin(SFN)は、ヒト皮膚のケラチノサイトから分泌され、他の細胞の遺伝子発現に影響を与える¹⁰⁾。近年、紫外線照射によって光老化と呼ばれるヒト皮膚の早期老化が起

ることが知られ、紫外線照射されたケラチノサイトにおいて増加する*SFN* mRNA発現が、光老化皮膚の保水力やバリア機能の低下に関与することが報告された¹¹⁾。そこで、ストレス感受性因子として*SFN*の発現量を検討したところ、紫外線照射によって*SFN* mRNA発現量が増加し、赤色LED光前照射によって紫外線誘発効果は抑制された(図4B)。一方、赤色光単独では*SFN* mRNA発現量に影響を与えなかったため、*SFN*は赤色LED光の直接の標的分子ではないと考えられる。

核内受容体であるペルオキシソーム増殖剤活性化受容体(PPAR)- δ は、酸化ストレスに対する細胞応答に必須な役割を果たすことが知られている。皮膚線維芽細胞において、抗酸化酵素カタラーゼをコードする遺伝子は、PPAR- δ の標的であることが報告されている¹²⁾。紫外線照射によって*PPAR- δ* mRNA発現量が顕著に増加したが、赤色LED光前照射により抑制されなかった(図4C)。以上の結果から、赤色LED光はカタラーゼを含む遺伝子制御には影響を与えないことが示された。

紫外線照射は、PPAR- γ の発現抑制を介して、シクロオキシゲナーゼ-2発現やプロスタグランジンE2産生を亢進させ、皮膚に炎症反応を誘導することが知られている¹³⁾。

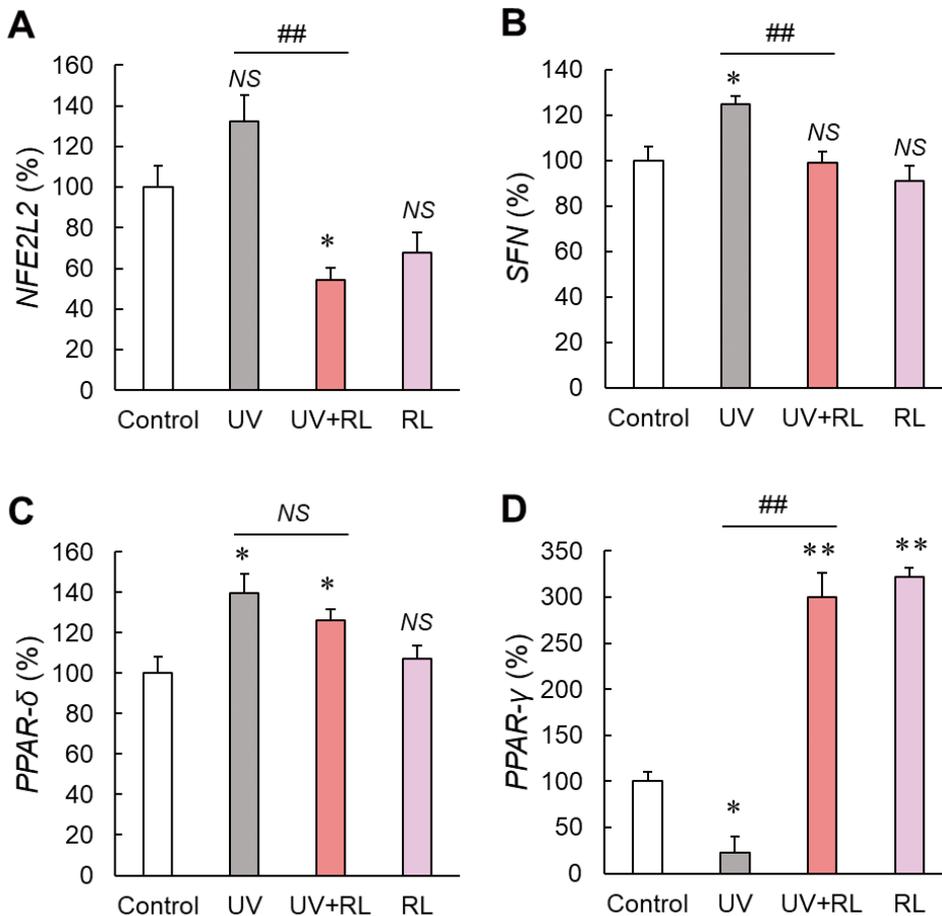


図4 各種光源照射におけるストレス応答因子 mRNA 発現量解析
赤色LED光照射(10J/cm²)および紫外線(UVB 50mJ/cm²)の照射6時間後の細胞における*NFE2L2*、*SFN*、*PPAR- δ* 、*PPAR- γ* mRNA発現量を、リアルタイムPCR法により解析した。各mRNA発現量は β -actin mRNA発現量で補正した。
* $P < 0.05$ vs control (non-UVB). # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ vs UVB only. NS $P > 0.05$ vs control or UVB only. Control: non-irradiated, UV: UVB (50mJ/cm²), UV+RL: UVB (50mJ/cm²) + Red LED (10J/cm²), RL: Red LED (10J/cm²). n=3-4.

本検討においても、紫外線照射によってPPAR- γ mRNA発現量が顕著に減少した(図4D)。赤色LED光の前照射によりPPAR- γ mRNA発現量が顕著に増加し、紫外線による発現抑制作用を抑制した(図4D)。興味深いことに、赤色LED光単独照射細胞において、PPAR- γ mRNA発現量が3倍程度に増加した。PPAR- γ のアゴニストは紫外線による皮膚損傷を軽減することが報告されており¹⁴⁾、赤色LED光による作用点の一つである可能性が示された。

4. 考察

赤色LED光を照射された表皮細胞において、皮膚バリア破綻に関わる紫外線誘発ROS産生増加を軽減することが示された。過去の報告において、黒色腫A2058細胞においてチトクロームcオキシダーゼが赤色光の受容体として機能して、ミトコンドリア膜電位が上昇することが細胞増殖促進の機序の一つであると提案されている¹⁵⁾。しかし、本検討において赤色LED光はミトコンドリア膜電位を増加させなかったことから、ミトコンドリア障害に対する保護作用ではないと考えられる。そのため、赤色光によるROS産生抑制のメカニズムは不明である。UVB照射によりNADPHオキシダーゼの活性化を介してROS産生が増加することが報告されているため、今後NADPHオキシダーゼなどの関与を検討する必要がある¹⁶⁾。遺伝子発現解析の結果、紫外線照射と赤色LED光照射による発現制御が逆方向となる因子としてPPAR- γ を同定した。今後、皮膚バリアを破壊する光(紫外線)の細胞内シグナルと、逆に保護する光(赤色光)の作用メカニズムとの関連を解析することで、光線による皮膚バリア制御の科学的エビデンスの確立に寄与していきたい。

5. 総括

これまでに我々は、皮膚細胞間のバリア機能の破壊に関わる光センサーとして、紫外線の受容に関わるセンサーとその機序を解明した³⁾。本検討では、その細胞内メカニズムとは異なる光受容を介して保護的に作用する可能性のある赤色光に着目した。赤色光は皮膚に対して有益とする報告はあるが^{5, 6)}、詳細なメカニズムは不明なままである。本研究により、PPARを含む数種類のストレス応答因子が赤色光照射による皮膚生理作用の一端を担う可能性が示された。

また、慢性的な太陽光の暴露によって生じる乾燥肌や肌トラブルに対する予防というコスメトロジーの観点から、光の受容から始まる細胞内シグナルとCLDN1を起点とした皮膚バリアの制御メカニズムの解明が必要である。加えて、紫外線照射によってもたらされる皮膚細胞への負の影響を打ち消す方法は、抗酸化剤の使用が有効と考えられるものの、全身性の影響を鑑みると未だ現実的ではない。特

定の波長の光線を照射することで皮膚疾患の症状を緩和させる方法は一部臨床でも用いられている。科学的エビデンスが確立されることによって、赤色光を用いて皮膚のストレス応答を高めるような技術・デバイスなどが将来発展していく可能性がある。光は波長によりそれぞれ異なった生理作用を持つことが解明されつつあるため、太陽光の持つ皮膚にとって良い影響を維持しながら、皮膚バリアにとって悪い影響のみを予防する新しいコンセプトの化粧品素材の開発に繋がることが期待される。

謝辞

本研究の遂行にご支援を賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に御礼申し上げます。

(引用文献)

- 1) Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2, 285-293 (2001)
- 2) Tsukita S, Tanaka H, Tamura A. The Claudins: From Tight Junctions to Biological Systems. *Trends Biochem. Sci.*, 44, 141-152 (2019)
- 3) Kobayashi M, Shu S, Marunaka K, Matsunaga T, Ikari A. Weak ultraviolet B enhances the mislocalization of claudin-1 mediated by nitric oxide and peroxynitrite production in human keratinocyte-derived HaCaT cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 21, 7138 (2020)
- 4) Marunaka K, Kobayashi M, Shu S, Matsunaga T, Ikari A. Brazilian green propolis rescues oxidative stress-induced mislocalization of claudin-1 in human keratinocyte-derived HaCaT cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 20, 3869 (2019)
- 5) Mosca RC, Ong AA, Albasha O, Bass K, Arany P. Photobiomodulation therapy for wound care: A potent, noninvasive, photochemical approach. *Adv. Skin Wound Care*, 32, 157-167 (2019)
- 6) 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.*, 36, 329-338 (2020)
- 7) Olinski LE, Lin EM, Oancea E. Illuminating insights into opsin 3 function in the skin. *Adv. Biol. Regul.*, 75, 100668 (2020)
- 8) Barolet D, Boucher A. LED photoprevention: reduced MED response following multiple LED exposures. *Lasers Surg. Med.*, 40, 106-112 (2008)
- 9) Ryšavá A, Vostálová J, Rajnochová Svobodová A.

- Effect of ultraviolet radiation on the Nrf2 signaling pathway in skin cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 97, 1383-1403 (2021)
- 10) Medina A, Ghaffari A, Kilani RT, Ghahary A. The role of stratifin in fibroblast-keratinocyte interaction. *Mol. Cell Biochem.*, 305, 255-264 (2007)
- 11) Lai A, Ghaffari A, Li Y, Ghahary A. Paracrine regulation of fibroblast aminopeptidase N/CD13 expression by keratinocyte-releasable stratifin. *J. Cell. Physiol.*, 226, 3114-3120 (2011)
- 12) Hur J, Kang ES, Hwang JS, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- δ -mediated upregulation of catalase helps to reduce ultraviolet B-induced cellular injury in dermal fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.*, 103, 167-175 (2021)
- 13) Yoshizaki N, Fujii T, Masaki H, Okubo T, Shimada K, Hashizume R. Orange peel extract, containing high levels of polymethoxyflavonoid, suppressed UVB-induced COX-2 expression and PGE2 production in HaCaT cells through PPAR- γ activation. *Exp. Dermatol.*, 23, 18-22 (2021)
- 14) Ramot Y, Mastrofrancesco A, Camera E, Desreumaux P, Paus R, Picardo M. The role of PPAR γ -mediated signalling in skin biology and pathology: new targets and opportunities for clinical dermatology. *Exp. Dermatol.*, 24, 245-251 (2015)
- 15) Hu WP, Wang JJ, Yu CL, Lan CC, Chen GS, Yu HS. Helium-neon laser irradiation stimulates cell proliferation through photostimulatory effects in mitochondria. *J. Invest. Dermatol.*, 127, 2048-2057 (2007)
- 16) Peloi KE, Ratti BA, Nakamura CV, Neal CJ, Sakthivel TS, Singh S, Seal S, Lautenschlager S. Engineered nanoceria modulate neutrophil oxidative response to low doses of UV-B radiation through the inhibition of reactive oxygen species production. *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 109, 2570-2579 (2021)

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

徳島大学大学院医歯薬学研究部

石田 竜弘

Polyethylene glycol (PEG) polymers are generally recognized as biologically inert and non-immunogenic. PEG is commonly used in bioconjugation and nano-formulations to improve the circulation half-life of the formulations and increase their stability. In cosmetics, PEG derivatives are also widely used as emulsifiers and skin penetration enhancers. Recently, the “pre-existing” anti-PEG antibodies have been reported in healthy individuals who have never received treatment with PEGylated formulations. In a murine study, topically applied PEG derivatives could efficiently penetrate the stratum corneum and reach the systemic circulation. Daily application of cosmetic PEG derivatives primed the immune system, inducing anti-PEG IgM production. Anti-PEG IgM was detected by Day 14 in mice with normal skin, while it was detected as early as Day 7 in mice with compromised skin. In addition, in mice with pre-induced anti-PEG IgM, topically applied PEG derivatives appeared to bind to the pre-induced anti-PEG IgM, lowering blood levels. Current results indicate that PEG derivatives in cosmetic products may be an important contributor to the source of the “pre-existing” anti-PEG antibodies that have been detected in healthy individuals.

1. 緒言

抗ポリエチレングリコール(PEG)抗体のキャリアにPfizer社およびModerna社製のワクチンを接種した場合、重篤なアレルギー反応が誘導される可能性が示唆されている。申請者らは、免疫原性がなく、化粧品や医薬品の添加剤などとして汎用されているPEGがタンパク製剤やナノ粒子などに修飾された場合、ハプテン効果によって抗PEG抗体が誘導されることを世界で初めて明らかにした¹⁾。

過去50年にわたり、自然抗体として抗PEG抗体を有するキャリア(正常人)が徐々に増えてきていることも報告²⁾されており、これはPEGが用いられてきた歴史と重なる。申請者らも、日本赤十字社から得た200例の献血血液中、37例で抗PEG抗体が存在することを確認している(未発表データ)。分子量が大きいPEGは皮膚や腸管から容易には吸収されないが、化粧品に含まれる比較的分子量のPEGが日常生活で生じる皮膚のわずかな傷や消化管の潰瘍部位などから体内に入り、抗体を誘導しているものと考えられている。しかしながら、動物レベルでこのことを実証した例はない。また、アメリカFDAも抗PEG抗体誘導の危険性を認識し、PEG修飾タンパク医薬品を開発する際には前臨床試験においてタンパクに対する抗体の誘導だけでなくPEGに対する抗体の誘導の有無も評価するようにrecommendation letterを発出している³⁾。このように、

PEGに対する抗体の存在は国際的にも注目を集めている。

新型コロナウイルスに対するワクチンが開発され、Pfizer社およびModerna社製のワクチンなどが投与された。Pfizer社ワクチンについて1,782件(100万回接種あたり6.1件)、Moderna社ワクチンについて215件(同2.6件)、武田社ワクチン(ノババックス)について1件(同3.5件)の報告があり、頻度は低いものの、重篤なアレルギー反応が報告されている。発生割合は低いものの、これまでに承認されたワクチンと比べると頻度が高いため、この原因として抗PEG抗体の関与がアメリカFDAで議論されている。これを受けてワクチンに含まれるPEGによる副反応に関する情報の周知が議論されてもいる。あまり知られていないが、Pfizer社およびModerna社製のワクチンのいずれにもmRNAの安定性とタンパクの発現誘導のためにPEG修飾脂質ナノ粒子(PEGylated lipid nanoparticle (PEG-LNP))が添加されている。

化粧品に含まれるPEG derivativesによって誘導された抗PEG抗体が、Pfizer社のCOVID-19ワクチン(コミナティ筋注)に含まれるPEGに反応してアナフィラキシー様反応を誘導しうるか、動物モデルおよびコミナティ筋注を模倣したmRNA含有PEG-LNPを用いて検証した。

2. 方法

2.1. 化粧品による抗PEG抗体誘導評価

市販の化粧品には、物性や目的の異なる多様な種類のPEG、例えば比較的高含量であるが親水性で皮膚透過性が低いとされる分子型PEGや、低含量であるが両親媒性を有し皮膚透過性を亢進させる目的で経皮投与製剤に用いられる界面活性剤型のPEG誘導体が添加されている⁴⁾。PEG含有市販乳液2種類(Polyoxyethylene (14) polyoxypropylene (7) dimethyl ether、polyoxyethylene



Polyethylene glycol (PEG) derivatives in cosmetic products induce anti-PEG IgM production in mice

Tatsuhiko Ishida

Department of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics, Institute of Biomedical Sciences, Tokushima University

(17) polyoxypropylene(4) dimethyl etherを含むAquaLabel Balance Care Lotion(Shiseido Japan Co.) と PEG-11-methyl-ether-dimethicone と PEG-40-hydrogenated-castor-oilを含むBioderma Sébium Lotion(Bioderma Co.)) を試料として購入した。これらを毎日剃毛したマウス腹部に塗布することで抗PEG-IgMが誘導されるかELISAで確認した。

2.2. PEG誘導体の皮膚透過性

蛍光標識 mPEG (FITC-mPEG、分子量 350 Da) 水溶液 20 µl (100 µg/ml) を剃毛したマウスの腹部に塗布した。塗布後、1, 2, 4, 6, 12, 24 時間後に血液を採取し、血中の FITC 由来の蛍光強度を測定した。また、24 時間後に塗布した部分の皮膚を採取し、凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡下、皮膚内への FITC-mPEG の浸透を観察した。

2.3. 誘導された抗 PEG 抗体によるコヒナティ筋注射模 mRNA 含有 PEG-LNP 投与によるアナフィラキシー様反応の検証

化粧品 (Bioderma Sébium Lotion) の 7 日間連続塗布 (皮

膚損傷あり) あるいはモデル PEG 修飾リポソームの静脈内投与 (投与 5 日後) によって抗 PEG 抗体を誘導したマウスを用い、これに調製した mRNA 含有 PEG-LNP を筋肉内投与した。投与後 30 分で採血し、PEG-LNP 投与による補体活性化の有無について特に C3 のフラグメント状況について Western blotting によって評価した。

3. 結果

様々な分子量の PEG 誘導体を含む AquaLabel Balance Care Lotion (Product A) と Bioderma Sébium Lotion (Product B) をそれぞれ毎日マウス腹部に塗布したところ、いずれのローションでも抗 PEG IgM の誘導が観察された (Fig. 1A and 1B)。興味深いことに、製品に関わらず、正常な皮膚をもつマウスでは、塗布開始後 7 日までは抗体の産生は観察されず、2 週間後に顕著な誘導が観察され、3 週間後には抗体はほぼ消失していた。一方、derma roller で皮膚に損傷を与えたマウスでは、塗布開始後 7 日目で既に抗 PEG IgM の産生が確認され、2 週間後ではほぼ消失していた。また、分子量 300 の PEG 溶液 (PEG-300) を塗布したところ、製品の塗布時と同様に、抗 PEG IgM の誘導

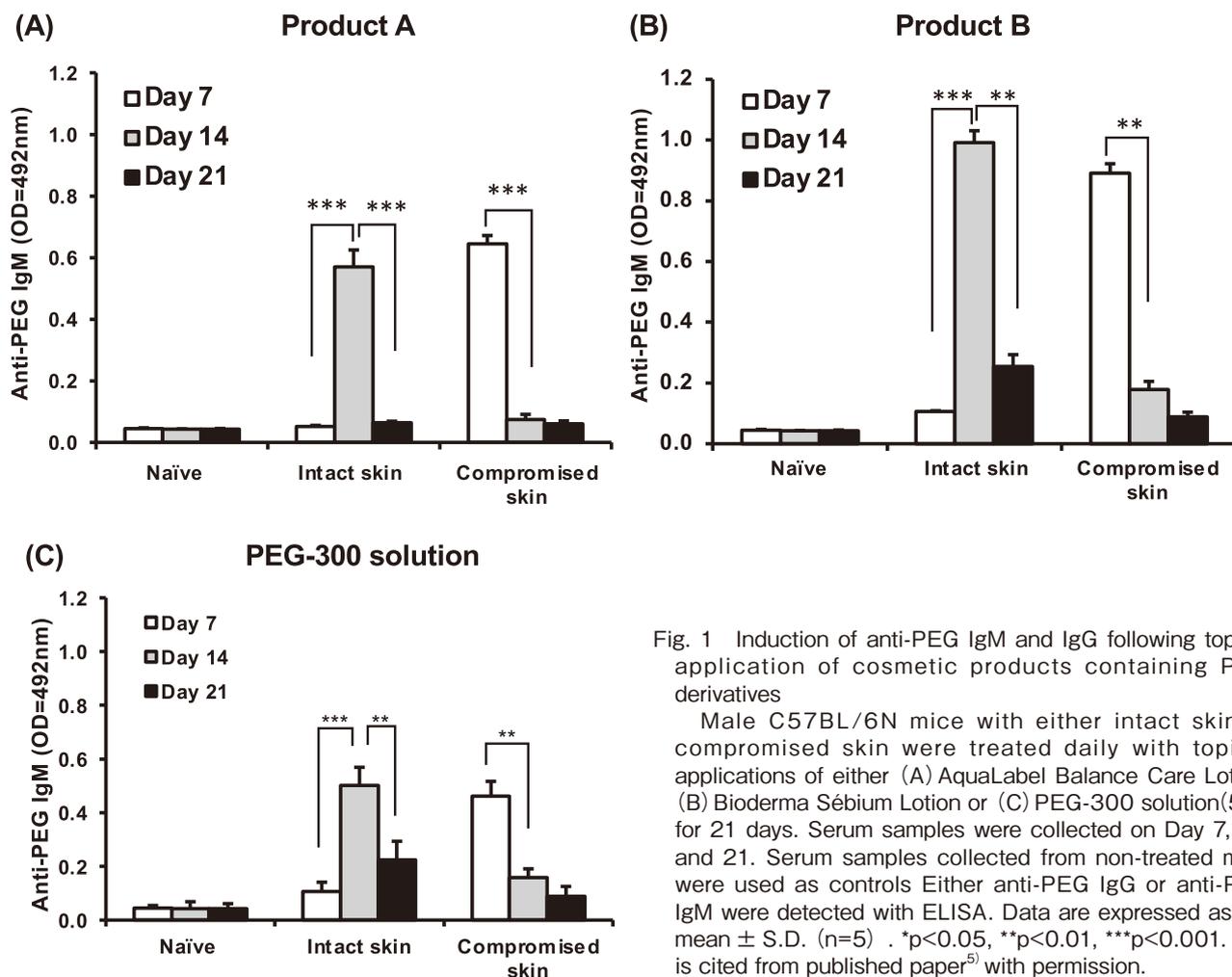


Fig. 1 Induction of anti-PEG IgM and IgG following topical application of cosmetic products containing PEG derivatives
Male C57BL/6N mice with either intact skin or compromised skin were treated daily with topical applications of either (A) AquaLabel Balance Care Lotion, (B) Bioderma Sébium Lotion or (C) PEG-300 solution (5%) for 21 days. Serum samples were collected on Day 7, 14, and 21. Serum samples collected from non-treated mice were used as controls. Either anti-PEG IgG or anti-PEG IgM were detected with ELISA. Data are expressed as the mean \pm S.D. (n=5). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. Fig. is cited from published paper⁵⁾ with permission.

が観察された (Fig. 1C)。この抗体の誘導は、正常の皮膚をもつマウスでは2週間後に顕著であり、3週間後には抗体はほぼ消失していた。一方、derma rollerで皮膚に損傷を与えたマウスでは、塗布開始後7日目まで顕著であり、2週間後にはほぼ消失していた。本検討を通して、抗PEG IgGは検出されなかった。

次いで、高分子のPEGが血中に移行しているかを蛍光標識したmPEG (分子量 350) をマウスに塗布し、経時的に血液を採取して評価した (Fig. 2)。正常な皮膚をもつ

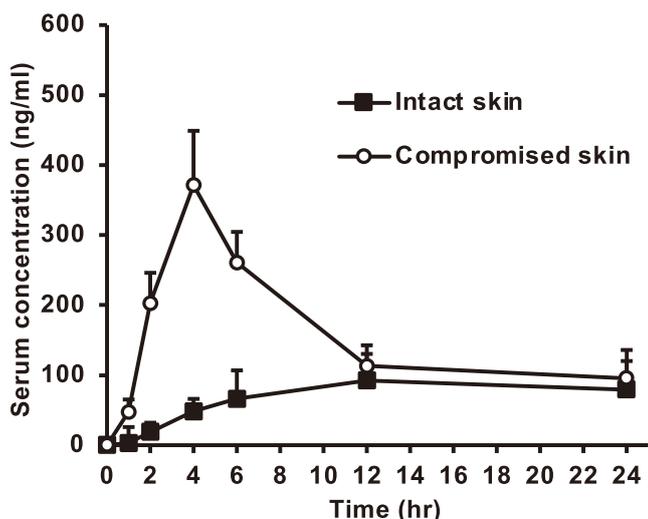


Fig. 2 Rate of percutaneous penetration of mPEG-FITC in mice with either intact skin or compromised skin
C57BL/6N mice were treated topically with mPEG-FITC solution on either intact skin or compromised dorsal skin. Blood samples were collected from the marginal tail vein at 1, 2, 4, 6, 12 and 24 h after topical applications. The fluorescence intensity in the serum was measured. Data are expressed as mean \pm S.D. (n=5). Fig. is cited from published paper⁵⁾ with permission.

マウスでは、mPEGの血中への移行は緩やかに生じ、およそ12時間かけて増加した後、約90ng/mlに達した後24時間まで一定であった。一方、derma rollerで損傷を与えた皮膚をもつマウスでは、塗布後2時間で多量のmPEGが血中に移行しており、4時間でピーク (約370ng/ml) に達し、その後漸次減少した。12時間後には正常な皮膚をもつマウスで観察されたのと同様に、約90ng/mlの濃度で24時間まで一定であった。次いで、FITC-mPEG塗布後24時間での皮膚中でのmPEGの分布を蛍光顕微鏡下で観察した (Fig. 3)。正常な皮膚では、FITC由来の強い蛍光が角質層および表皮で観察され、表面からおおよそ30.0 \pm 5.2 μ mまで浸透していた。一方、興味深いことに、derma rollerで損傷を与えた皮膚では、FITC由来の蛍光は観察されたものの、正常な皮膚よりその強度は低かった。しかしながら、表面からおおよそ120.0 \pm 10.7 μ mまで浸透しており、より皮膚中を拡散していることが示唆された。Fig. 2において、損傷皮膚ではmPEGの速やかな吸収が観察されており、損傷皮膚でmPEGがあまり観察されなかったのは、多量のmPEGが速やかに角質層および表皮を通過し、血中に移行したからであると考えられた。以上の結果から、化粧品に含まれるPEG誘導体も、皮膚を透過し、血中に移行することで免疫系を活性化し、抗PEG IgMを誘導している可能性が高いことが示唆された。

補体系は40種類以上のタンパク群からなり、侵入してきた病原体に対する最初の生体防御機構を担っている。これらの病原体に対して補体系タンパクが結合 (補体活性化) することでオプソニン化を生じ、マクロファージなどによる貪食作用を受けやすくすることが知られている。さらに、活性化の途中で産生されるC3a、C4b、C5aはアナフィラトキシンと呼ばれ、特にC5aはマスト細胞や好塩基球

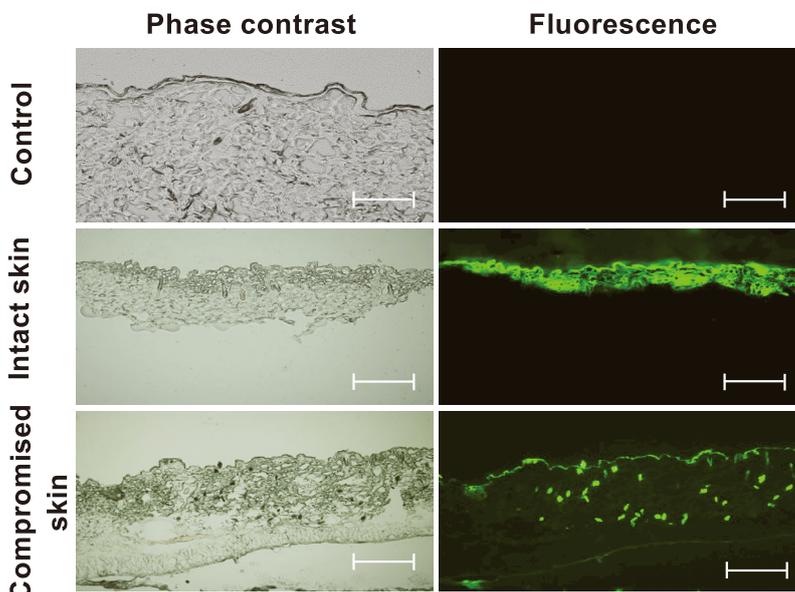


Fig. 3 Percutaneous penetration of mPEG-FITC in mice with either intact skin or compromised skin
C57BL/6N mice were treated topically with mPEG-FITC solution on either intact skin or compromised dorsal skin. At 24 h after the treatment, skin frozen sections were prepared and examined under a fluorescence microscope. A typical picture from skin obtained 4 individual animals in each group is presented. Scale bar indicates 50 μ m. Fig. is cited from published paper⁵⁾ with permission.

からのヒスタミン遊離を促進する。さらに、C5aは単球、好中球、好酸球などの走化性をも亢進することが知られている。COVID-19 mRNA 投与時に、抗PEG IgMを介した補体活性化が起これば、アナフィラキシーが誘導される可能性があることを明確に示すことができる。そこで、化粧品 (Bioderma Sébium Lotion) の塗布あるいはモデルPEG修飾リポソームの静脈内投与によって抗PEG抗体を誘導したマウスを用い、これに調製したmRNA含有PEG-LNPを筋肉内投与し、投与後30分での血中での補体活性化の有無について評価した (Fig. 4)。抗PEG IgMを保持するマウスに mRNA 含有PEG-LNPを筋肉内投与した場合にのみ、補体活性化の指標である補体第三成分 (C3) の分解が観察された。この結果から、筋肉内投与後の mRNA 含有PEG-LNPの一部が血液循環に移行し、これが異物として補体成分によってオプソニン化される過程でアナフィラトキシンの産生が誘導され、結果としてアナフィラキシーが誘導される可能性が高いことが示唆された。

4. 考察

PEGは化粧品や医薬品の添加剤・修飾剤としても汎用されている。本検討では、化粧品中のPEG誘導体が皮膚を透過し、血中に移行し、抗PEG IgMを誘導することを世界で初めて示した。我々はすでにPEGがタンパク製剤やナノ粒子などに修飾された場合、ハプテン効果によって抗PEG抗体が誘導されることを明らかにし¹⁾、この場合脾臓辺縁帯B細胞が重要な役割を果たすことを示している⁶⁾。しかし、分子量の比較的小さなPEG誘導体は、速やかに腎臓の子宮体でろ過され、尿中に排泄されると考えられ、脾臓を通過するもののその半減期の短さから脾臓辺縁帯B細胞とは接触しがたいものと考えられる。したがって、今回観察さ

れた抗PEG IgMの誘導が、タンパク製剤やナノ粒子などに修飾されたPEGと同じメカニズムで誘導されているかは不明であり、今後より詳細な検討が必要であると考えている。

COVID-19 mRNA ワクチンの投与による副反応に関して、添加されているPEGが原因である可能性が取り沙汰されているが直接的な証拠は未だ示されていない。アナフィラキシー誘導における抗PEG抗体の寄与、化粧品によって誘導される抗PEG抗体の寄与に関する情報は皆無であり、アナフィラキシー誘導メカニズムの解明が課題となっている。本検討で、筋肉内投与後の mRNA 含有PEG-LNP (mRNA ワクチン) の一部が血液循環に筋肉内から漏れ出し、この表面のPEGが抗PEG IgMが結合することで補体系を活性化し、この過程でアナフィラトキシンの産生が誘導され、結果としてアナフィラキシーが誘導されている可能性が高いことが示唆された。実際の症状の発現にはアナフィラトキシンへの感受性における個体差も大きく影響するものと考えられるが、これまで不明であった mRNA ワクチン投与時のアレルギー反応誘導機構の一端を明確に示すものであり、大変意義深い成果であると考えている。

従来、化粧品の安全性は、皮膚への刺激性や臓器毒性、発がん性などといった直接的な毒性を指標に評価されており、免疫反応についても、かぶれ、かゆみなどといった、皮膚に直接的に症状が現れるものを中心として評価されてきた。しかしながら、本検討で示されたように、化粧品中のPEG誘導体によって抗PEG IgMが誘導されたという事実は、がんや肝炎などの難治性疾患に対する有効な治療薬であるPEG修飾医薬品の効果減弱につながる可能性が極めて高く、PEG誘導体を含む化粧品の新たな安全性評価

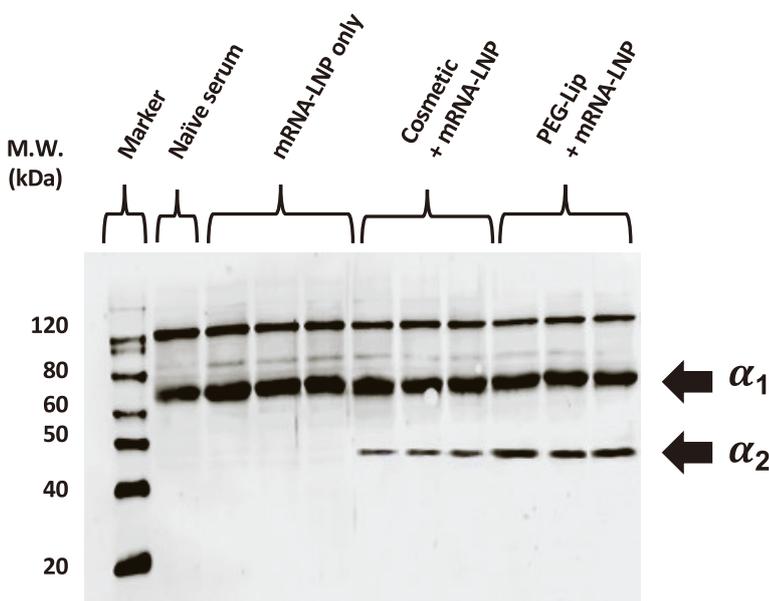


Fig. 4 Complement activation (C3 fragmentation) in pre-induced anti-PEG IgM bearing mice after i.m. administration with COVID-19 mRNA mimicked PEGylated LNP

C57BL/6N mice with compromised dorsal skin were treated topically with Bioderma Sébium Lotion for 7 days. C57BL/6N mice were injected intravenously with PEGylated liposomes (0.001 μmol phospholipids/kg) to induce anti-PEG IgM. On Day 7 for topical treatment or Day 5 for i.v. injection, mRNA-PEGylated LNP were i.m. injected. At 30 mins after the injection, sera were collected and Western blotting for detecting C3 fragmentation was carried out. A typical picture is presented.

項目の一つとすべきポイントになるものと考えられる。

一方、未曾有のCOVID-19パンデミックに際して、世界的にPfizer社やModerna社が開発したmRNAワクチンが投与された。このワクチンにはPEGで修飾したLNPがmRNA保護剤として添加されており、この投与によっても抗PEG抗体が誘導されている可能性が高い。これらの“抗PEG抗体を保有する一般人”がこれまで通りにPEG含有化粧品を汎用することで、想定外の皮膚症状が現れる可能性も大いに考えられる。Withあるいはafterコロナにおいて、嗜好品である化粧品を安全・安心に使用および開発する上で、抗PEG抗体との共存が必要になろう。

5. 総括

すでに多くのヒトが抗PEG抗体を保持していることが知られている。本研究からその原因の一つが、嗜好品である化粧品の使用であることが示唆された。抗PEG抗体を保持しているヒトにPEG修飾製剤を投与すれば、抗体がPEG修飾製剤と免疫複合体をつくり、補体系を強力に活性化してC3aやC5aなどのアナフィラトキシンを大量に放出させ、アナフィラキシーを誘導することは想像に難くない。しかしながら、化粧品中のPEG誘導体が皮膚から吸収されたのち、どのように抗PEG抗体を誘導しているのか、そのメカニズムは不明であり、今後その解明が必要である。

謝辞

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

本研究により得られた成果

Ibrahim, M., Shimizu, T., Ando, H., Ishima, Y., Elgarhy, H., Sarhan, H., Hussein, A., Ishida, T., Investigation of anti-PEG antibody response to PEG-containing cosmetic products in mice. *J. Control. Release*, **354**, 260-267 (2023).

(引用文献)

- 1) Ishida, T. *et al.* Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes. *J. Control. Release*, **112**, 15-25 (2006).
- 2) Chen, B. *et al.* Measurement of Pre-Existing IgG and IgM Antibodies against Polyethylene Glycol in Healthy Individuals. *Anal. Chem.*, **88**, 10661-10666 (2016).
- 3) Parenky, A. *et al.* New FDA draft guidance on immunogenicity. *AAPS J.*, **16**, 499-503 (2014).
- 4) Casiraghi, A. *et al.* The influence of the polar head and the hydrophobic chain on the skin penetration enhancement effect of poly (ethylene glycol) derivatives. *AAPS PharmSciTech.*, **13**, 247-253 (2012).
- 5) Ibrahim, M. *et al.* Investigation of anti-PEG antibody response to PEG-containing cosmetic products in mice. *J. Control. Release*, **354**, 260-267 (2023).
- 6) Ishida, T. *et al.* Spleen plays an important role in the induction of accelerated blood clearance of PEGylated liposomes. *J. Control. Release*, **115**, 243-50 (2006).

皮膚—免疫増幅サイクルの遮断によるアレルギー性皮膚炎の病態制御

愛媛大学大学院医学系研究科感染防御学講座

大森 深雪

Repeated exposures to a certain antigen onto the skin develop the pathogenesis of allergic contact dermatitis (ACD) with the itchy skin rash. For the treatment of ACD, topical steroids have commonly been used. However, the use of steroids induces a variety of adverse effects including skin thinning and atrophy, ecchymosis and impaired wound healing. Therefore, the development of any non-steroid drugs such as immunomodulatory drugs with minimized unfavorable effects have been expected to treat ACD. In this study, we have asked if any immunomodulatory drugs could have the potential to be used for the treatment of ACD.

The inflammatory responses to an allergen in ACD result in cascading events: the activation, differentiation and memory generation of antigen-specific T cells, the infiltration of inflammatory cells in the lesional skin by inflammatory cytokines and chemokines, and the disruption of epidermal structure and barrier functions. The impaired barrier of the epidermis could amplify the penetration of antigen. Since T cells play an essential role in the development of ACD, we evaluated several drugs whether each drug could have a potential to regulate functions of T cells. Consequently, we decided to focus on a Jak inhibitor in this study. The mice that received a Jak inhibitor on ACD showed milder skin symptoms, a lower number of T cells in the lesional skin and the skin-draining lymph nodes, a lower capability of inflammatory cytokine-productions in T cells, a lower number of neutrophils accumulated in the lesional skin than the control mice. In addition, differentiating T cells *in vitro* that were treated with a Jak inhibitor had lower levels of the extracellular acidification rate, the mTORC1 activity and the expression of genes that were related to glycolysis under the stimulation with recombinant IL-2. All the results suggested that a Jak inhibitor could be used for the treatment of ACD with a potential to down-regulate T cell-functions via interference of glycolysis.

1. 緒言

職業性皮膚疾患の主たる原因であるアレルギー性接触皮膚炎 (allergic contact dermatitis; ACD) は、低分子の化学物質が、バリア機能の低下した皮膚へ断続的に接触することで発症する。その原因となる物質 (抗原) は、職業上限られた人のみが扱う特定の物質のみならず、社会生活で広く使用される医薬品・日用品・化粧品などに含まれるごく一般的な物質であることもある。すなわち、ACDは、社会生活を営む誰もが罹患しうる炎症性皮膚疾患である。ACDの治療にはステロイド外用薬が広く使用されてきた。しかし、ステロイド剤の長期間の使用には、皮膚の菲薄化や萎縮、紅斑、創傷治癒障害など、さまざまな副作用を伴うことから、非ステロイド剤の開発が切望されている。

ACDの発症は、バリア機能が低下した表皮に浸透した抗原が、皮膚常在型の樹状細胞に捕定されることにより始まる。抗原を分子情報化 (ペプチド化) した樹状細胞は、所属リンパ節へと移動し、その分子情報をT細胞へと提示する。抗原分子を認識したT細胞は活性化し、分化して、抗

原を特異的に排除するための機能を獲得する。機能型T細胞が惹起する一過性の炎症応答は、その後、時間とともに収束し、抗原の分子情報を記憶したメモリーT細胞が体内に待機する状態となる。再び同じ抗原が表皮に浸透した際、抗原の接触部位周辺の皮膚には、抗原の分子情報を記憶したメモリーT細胞や、T細胞に引き寄せられた炎症細胞が集積する^{1,2)}。炎症局所のT細胞が分泌するタンパク質 (サイトカイン) は、表皮を構成するケラチノサイトの構造・機能を司るタンパク質の発現低下や表皮ケラチノサイト自体の自殺 (アポトーシス) を起こし、表皮バリアは脆弱なものとなる³⁾ (図1)。

以上のように、ACDの発症機構は基礎研究の進展とともに明らかになりつつあり、原理的には、掻痒を伴う皮膚症状は抗原への接触を取り除くことで制御することが可能であることがわかっている。しかし一方で、抗原と社会生活の密接さゆえに、ACDの背景には抗原への接触を回避することの難しさがあり、実際の病態管理では、積極的な医療の介入がしばしば必要となる。

健全な表皮では、最深の基底層にあるケラチノサイトの増殖、増殖した細胞の表層に向かう移動、バリア機能の獲得、細胞死が適切に調節されることにより、皮膚本来のバリア機能が担われているが、炎症が断続的に起こるACDの炎症局所では、表皮バリア機能の低下とメモリーT細胞の生体内での残存が『皮膚—免疫増幅サイクル』を生み出し、炎症が継続した場合には、構造的・機能的脆弱化を介して炎症が再燃・常態化しやすい微小環境が表皮で築かれ



Regulation of the pathogenesis of allergic dermatitis by the interference of amplification loop between skin and immune cells

Miyuki Omori-Miyake

Dept. of Infections and Host Defenses, Ehime University Graduate School of Medicine

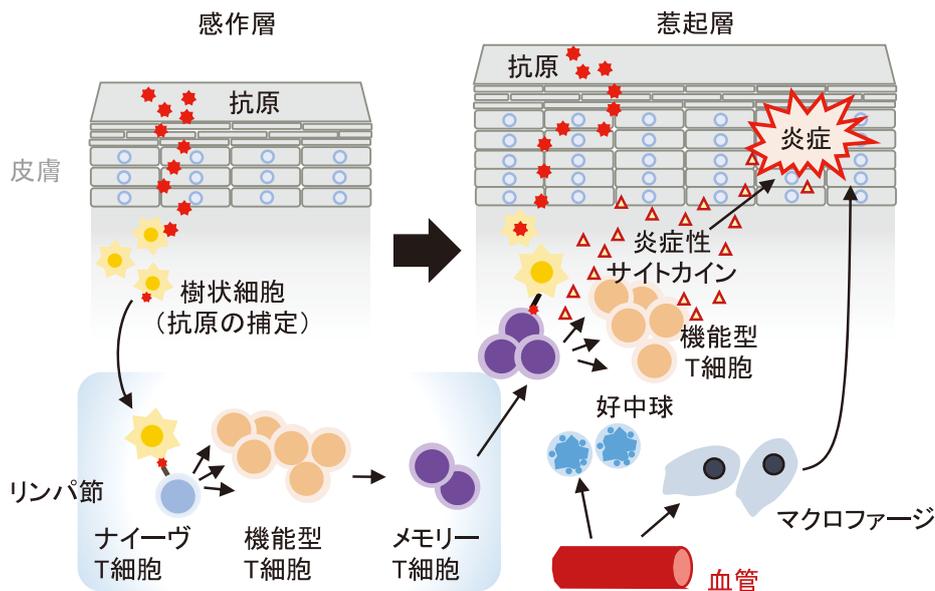


図1 ACDはT細胞を介して発症する

るものと考えられる。以上の背景から、本研究では、安全性が確認されている内服可能な既存薬剤に着目し、『皮膚—免疫増幅サイクル』の遮断を試みた。さらに、このサイクル遮断の分子機構の一端を解明することを通して、新たな仕組みを利用した病態制御の可能性を探ることを目指した。

2. 方法

2.1. ACDモデルマウスの作製と薬剤投与

実験動物には、C57BL/6 マウスを供した。ACDは、先行研究⁴⁾と同様に、麻酔したマウスの皮膚への低分子化合物 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) の反復塗布により、実験的に誘発した。実験群には olive oil:acetone (1:3) で濃度を調整した 0.15% DNFB を、対照群には olive oil:acetone (1:3) を用いた。Day 0 (感作層) には剃毛した腹部皮膚へ 100 μ L の溶液を塗布し、day 5, 10, 15 (惹起層) には剃毛した背部皮膚あるいは耳介皮膚へそれぞれ 50 μ L あるいは 25 μ L/片面を両面塗布した。惹起層に溶液を塗布する部位としては、リンパ節の解析の場合には背部皮膚、皮膚の解析の場合には耳介を用いた。

既存薬剤には、複数種の薬剤を検討した結果、慢性炎症性疾患で広く使用されている Jak 阻害剤を用いることとした。Jak 阻害剤は、経口的 (ジャカビ錠TM, ノバルティスファーマ) あるいは経皮的 (コレクチム軟膏 0.5%TM, 鳥居薬品) に投与した。投与量は、体重当たりの量がヒトと相当になるよう換算して用いた。皮膚の腫脹は、DNFB 塗布前後の耳介厚を測定することにより、厚みの変化として評価した。

2.2. 組織学的解析

4% パラホルムアルデヒドで固定した耳介をパラフィン包埋した。薄切した切片をヘマトキシリン・エオジン染色し、顕微鏡 (Keyence BZ-X800, キーエンス) にて形態観察した。

2.3. フローサイトメトリー

皮膚あるいはリンパ節から白血球を調整し、種々の蛍光標識モノクローナル抗体で多重染色した。細胞表面あるいは核内の分子発現を示す相対的蛍光輝度をフローサイトメーター (CytoFLEXTM, ベックマンコールター) でデータ化し、取得したデータを専用解析ソフト (FlowJoTM, 日本ベクトン・ディッキンソン) を用いて解析して図表化・数値化した。白血球の各サブセットは、lineage marker (Lin) を CD3、CD19 および CD49b として、好中球 (CD45⁺ Lin⁻ TCR β ⁻ CD11b⁺ Ly6G⁺)、単球 (CD45⁺ Lin⁻ Ly6G⁻ IA/IE⁻ SSC-A^{lo} CD11b⁺ CD64⁺)、マクロファージ (CD45⁺ Lin⁻ Ly6G⁻ IA/IE^{+/hi} CD11b^{int/hi} CD64⁺)、樹状細胞 (CD45⁺ Lin⁻ Ly6G⁻ IA/IE^{hi} CD11b^{int/hi} CD11c⁺ CD64⁻)、 $\gamma\delta$ T 細胞 (CD45⁺ SSC-A^{lo} CD3⁺ $\gamma\delta$ TCR⁺)、CD4 陽性 T 細胞 (CD45⁺ SSC-A^{lo} $\gamma\delta$ TCR⁻ TCR β ⁺ CD4⁺)、CD8 陽性 T 細胞 (CD45⁺ SSC-A^{lo} $\gamma\delta$ TCR⁻ TCR β ⁺ CD8⁺) として定義し、同定した。細胞数は、各ゲートの存在頻度 (%) と元々の細胞数から算出した。

2.4. ELISA

皮膚あるいはリンパ節から、細胞磁気分離装置 (Auto MACS, Miltenyi Biotec) を用いて CD4 陽性 T 細胞あるいは CD8 陽性 T 細胞を純化し、抗 T 細胞受容体抗体の刺激

存在下で16時間培養した。培養上清を回収し、上清中に含まれるサイトカイン (IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-13, GM-CSF) の濃度を、サンドウィッチELISA法により測定した。

2.5. 定量的RT-PCR

皮膚あるいはリンパ節から細胞時期分離装置を用いて純化したCD4陽性T細胞あるいはCD8陽性T細胞を、抗T細胞受容体抗体の刺激存在下で4時間培養した。刺激した細胞を回収し、total RNAを抽出後、逆転写反応によりcDNAを合成した。各遺伝子を特異的に検出できるプライマーおよびプローブを用いて、解糖系関連遺伝子 (*Slc2a1*, *Slc2a3*, *Hk2*, *Gapdh*, *Pgam1*, *Ldha*) の相対的発現量を測定した。内部標準とした *18S rRNA* の相対的発現量に対する比を取ることで、発現量を定量化した。

2.6. 代謝フラックス解析

細胞磁気分離装置を用いて純化したナイーブCD4陽性T細胞あるいはナイーブCD8陽性T細胞を、抗T細胞受容体抗体の刺激存在下で2日間、刺激を外してさらに2日間培養し機能型T細胞とした。その培養細胞を30分間Jak阻害剤で処置した後、リコンビナントIL-2の存在下で4時間刺激した。刺激した細胞を回収し、フラックスアナライザー (Seahorse Extracellular Flux Analyzer XFp, Agilent Technologies) を用いて、解糖活性 (細胞外酸性化速度) を測定した。

3. 結果

3.1. Jak阻害剤によるACD発症制御作用の評価

実験期間中Jak阻害剤を投与した実験群マウスと、水

を投与した対照群マウスでACDを発症させたところ、対照群に比べて、実験群では有意な腫脹の軽減が認められた。また、対照群の局所表皮では、ケラチノサイトの増殖像・肥大化、表皮の微小膿瘍が散見された。さらに局所真皮では、好中球・リンパ球・マクロファージ様の形態を持つ細胞の浸潤が実験群で多く見られた。一方、実験群では、これらの全ての病態が軽減されていた。

フローサイトメトリーを用いて、細胞表面抗原の発現でACDの局所皮膚に集積した細胞を同定し、Jak阻害剤を投与した実験群と対照群で比較したところ、実験群では、耳介に含まれる好中球およびCD8陽性T細胞の細胞数が対照群より有意に減少していた。また、皮膚所属リンパ節あたりのCD4陽性T細胞・CD8陽性T細胞の細胞数、CD4陽性T細胞で細胞あたりの炎症性サイトカイン (IFN- γ , IL-2, GM-CSF) 産生量が実験群で有意に減少していた。一方、CD8陽性T細胞では、細胞あたりの炎症性サイトカイン (IFN- γ , IL-2) 産生量はいずれも不変であった。

3.2. ACDの治療薬としてのJak阻害剤の可能性の検討

2020年6月、Jak阻害剤外用薬のアトピー性皮膚炎での使用が承認されたことを受け、Jak阻害剤外用薬をACD発症以降に経皮的に投与し、ワセリン投与した対照群マウスと、病態を比較した。その結果、DNFB塗布後の腫脹の有意な低下が認められた。また、炎症局所の組織観察では、真皮に一定の炎症細胞の浸潤を認めたものの、浮腫や表皮の膿瘍部位の減少など、病態の軽快傾向が認められた (図2)。

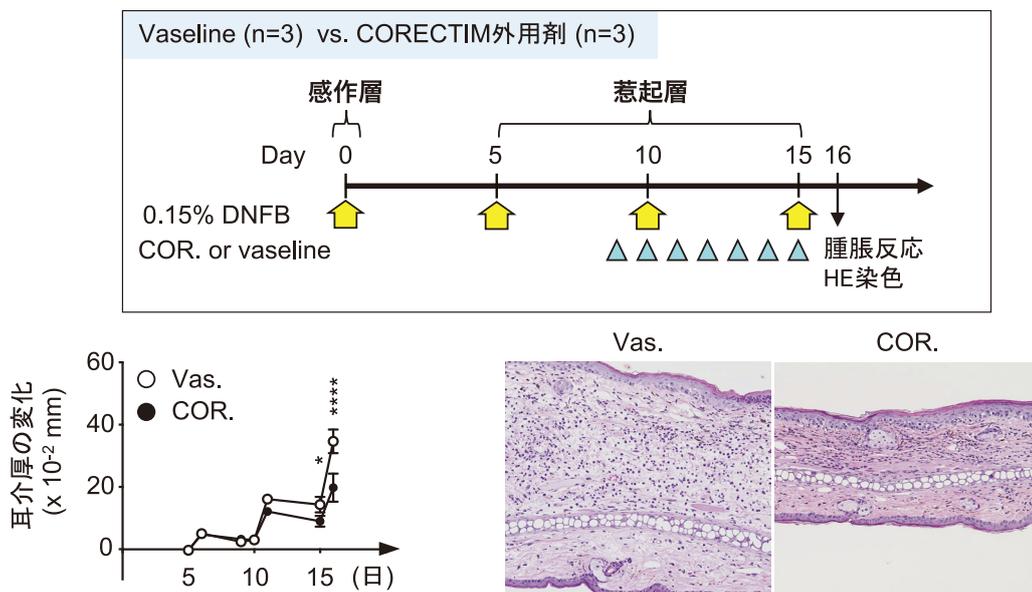


図2 Jak阻害剤外用薬のACD治療薬としての可能性

3. 3. T細胞代謝リモデリングにおけるJak 阻害剤の作用

ACDの発症はT細胞を介して起こり、なかでも、CD8陽性T細胞がACD実験モデルの主たるエフェクター細胞であるということが先行研究で報告されている⁵⁾。また、『T細胞の機能獲得・維持・記憶には代謝状態の変化(代謝リモデリング)が伴う』という現在のコンセンサスを受けて、T細胞の代謝リモデリングにおけるJak阻害剤の作用について*in vitro*培養系を用いて検討した。T細胞の機能獲得・維持・記憶には、糖、アミノ酸、脂肪酸など複数の代謝系の変化が伴うことが知られている。本研究では、T細胞の活性化・機能獲得に必須である解糖活性に着目して、Jak阻害剤の影響を検討した。その結果、CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞に関わらず、Jak阻害剤処理した機能型T細胞では、IL-2刺激で上昇する解糖活性の低下が認められた。また、活性化T細胞で見られる解糖活性の上昇に伴うmTORC1の活性を、S6のリン酸化をリードアウトとして検討したところ、S6のリン酸化状態もJak阻害剤処理によりキャンセルされることがわかった。

さらにIL-2の刺激により活性化T細胞で増加する解糖関連遺伝子(*Slc2a1*, *Slc2a3*, *Hk2*, *Gapdh*, *Pgam1*, *Ldha*)の発現を解析したところ、検討した全ての遺伝子発現がJak阻害剤処理により低下していた。

4. 考察および総括

本研究では、ACDの発症が『皮膚—免疫増幅サイクル』の形成とともに起こり、このサイクルの維持が、皮膚炎症の悪化や遷延をもたらすと仮定し、『皮膚—免疫増幅サイクル』の遮断によるACDの病態制御の可能性を検証した。その結果、Jak阻害剤は、ACDの腫脹と表皮の肥厚を有意に抑えることを見出した。皮膚の炎症局所に集積した白血球を解析したところ、Jak阻害剤によるACDの皮膚病態の軽快と相関して、特に、CD8陽性T細胞および好中球の数が減少していることを見出した。皮膚常在型のメモリーCD8陽性T細胞は、DNFBを用いたACDモデルにおいて好中球をリクルートするという報告⁵⁾がある。この知見から、Jak阻害剤投与下のマウスで皮膚に浸潤したCD8陽性T細胞数の減少は、好中球数の低下と関連している可能性が推測された。また、炎症局所に集積したCD4陽性T細胞の数には変化がなかった一方で、リンパ節のCD4陽性T細胞の数はJak阻害剤投与下のマウスで有意に減少しており、マクロファージの炎症応答を促進するIFN- γ やGM-CSF、T細胞の増殖に関わるIL-2といったサイトカインの産生能も著しく低下していた。すなわち、Jak阻害剤の経口投与は、T細胞を介したACDの局所皮膚への炎症細胞の集積や、T細胞由来サイトカインの産生を抑制し、それらを介した表皮性状の変化に対しても、抑制的に作用

することが予想された。さらに、ACD発症後にJak阻害剤を経皮投与した場合でもACDの病態制御に一定の効果が認められたことから、ACDの局所皮膚へ浸潤した炎症細胞の機能制御にもJak阻害剤が作用する可能性が推測された。

最後に、近年研究が急速に進展しているT細胞の細胞内エネルギー代謝へのJak阻害剤の作用について検討した。抗原情報を認識したT細胞では、活性化に伴って解糖系代謝が活発になる⁶⁾。その活性は、抗原非依存的にエフェクター機能を発揮する場面でも見られる。ACDの発症にはT細胞が必須である⁷⁾ことから、T細胞内のエネルギー代謝にJak阻害剤が作用する可能性を想定し、検証した。想定したとおり、サイトカイン受容体シグナルにより活性化するmTORC1のリン酸化や解糖関連遺伝子の発現は、Jak阻害剤により抑えられ、解糖活性自体も低下していた。我々の研究グループの先行研究では、T細胞の解糖能の欠損は、機能分化を阻害することが示されている⁸⁾。Jak阻害剤の存在は、T細胞の解糖系代謝を阻害することにより、炎症応答を制御できる可能性が示唆された。

本研究では、Jak阻害剤のT細胞代謝の制御を介したACDの病態制御について明らかにした。しかしJak阻害剤は、T細胞以外の免疫細胞や皮膚の非血球系細胞にも作用する。ACDの治療薬としてJak阻害剤の内服や外用を考えるには、これらの細胞における作用も明らかにする必要があると考える。今後の基礎研究の進展に期待したい。

本研究により得られた成果

Michiko Okamoto*, Miyuki Omori-Miyake*, Makoto Kuwahara, Masataka Okabe, Mariko Eguchi, Masakatsu Yamashita: The inhibition of glycolysis in T cells by a Jak inhibitor ameliorates the pathogenesis of allergic contact dermatitis in mice. *J. Invest. Dermatol.* (in press).
*共同第一著者

(引用文献)

- 1) T. Honda, G. Egawa, S. Grabbe, K. Kabashima: Update of immune events in the murine contact hypersensitivity model: Toward the understanding of allergic contact dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 133, 303-315 (2013).
- 2) A. K. Brys, L. G. Rodriguez-Homs, J. Suwanpradid, A. R. Atwater, A. S. MacLeod: Shifting paradigms in allergic contact dermatitis: The role of innate immunity. *J. Invest. Dermatol.* 140, 21-28 (2020).
- 3) 大森深雪: アトピー性皮膚炎の表皮における構造の質的变化. *日本皮膚アレルギー学会雑誌*. 1, 35-45 (2018).
- 4) T. Inoue, M. Omori-Miyake, S. Maruyama, M. Okabe,

- M. Kuwahara, H. Honda, H. Miura, M. Yamashita: The loss of H3K27 histone demethylase Utx in T cells aggravates allergic contact dermatitis. *J. Immunol.* 207, 2223-34 (2021).
- 5) A. B. Funch, V. Mraz, A. Ø. Gadsbøll, M. H. Jee, J. F. Weber, N. Ødum, A. Woetmann, J. D. Johansen, C. Geisler, C. M. Bonefeld: CD8⁺ tissue-resident memory T cells recruit neutrophils that are essential for flare-ups in contact dermatitis. *Allergy.* 77, 513-524 (2022).
- 6) G. O. Rangel Rivera, H. M. Knochermann, C. J. Dwyer, A. S. Smith, M. M. Wyatt, A. M. Rivera-Reyes, J. E. Thaxton, Chrystal M. Paulos: Fundamentals of T cell metabolism and strategies to enhance cancer immunotherapy. *Front. Immunol.* 12, 645242 (2021).
- 7) B. L. Gocinski, R.E. Tigelaar: Roles of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in murine contact sensitivity revealed by in vivo monoclonal antibody depletion. *J. Immunol.* 144, 4121-4128 (1990).
- 8) K. Toriyama, M. Kuwahara, H. Kondoh, T. Mikawa, N. Takemori, A. Konishi, T. Yorozyua, T. Yamada, T. Soga, A. Shiraishi, M. Yamashita: T cell-specific deletion of *Pgam1* reveals a critical role for glycolysis in T cell responses. *Commun. Biol.* 3, 394 (2020).

病原体由来および自己由来二本鎖 RNA がインターフェロン非依存的にコラーゲン産生を抑制する機構の解明

大阪大学大学院薬学研究科分子生物学分野

櫻井 文教

Production of extracellular matrices, including collagen and fibronectin, is highly important for not only beauty and moisturizing, but also biological defense system, such as maintenance of barrier ability and anti-inflammatory responses, in the skin. Dermal fibroblasts mainly produce extracellular matrices in the skin. Therefore, regulation of extracellular matrix production in the dermal fibroblasts is highly important. We previously found that double-stranded RNA (dsRNA) suppressed the expression of extracellular matrices in the activated hepatic satellite cells. Dermal fibroblasts are also exposed to not only pathogen-derived dsRNA but also endogenous dsRNA. These findings made us hypothesize that pathogen-derived and endogenous dsRNA activated innate immune responses in the skin fibroblasts, leading to reduction in extracellular matrix production in the skin. In this study, treatment with a synthetic dsRNA, polyI:C, resulted in significant reduction in the expression of extracellular matrices, without significant reduction in the viabilities of normal human dermal fibroblasts. Furthermore, a short dsRNA (19 bp) also induced down-regulation of fibrotic marker gene expression in normal human dermal fibroblasts. These results indicated that dsRNA is a hazard for skin by down-regulating the production of extracellular matrices.

1. 緒言

皮膚におけるコラーゲンやファイブロネクチンなどの細胞外マトリックスの産生は、皮膚の美容・保湿のみならず、バリア能の維持や抗炎症応答などの生体防御機構に極めて重要である¹⁾。皮膚において細胞外マトリックスは、主に線維芽細胞が産生しているが、線維芽細胞においては Transforming Growth Factor- β (TGF- β)/Smad シグナルが細胞外マトリックスの産生・分解制御に重要な役割を果たしている²⁾。したがって皮膚の健康・恒常性を保つためには細胞外マトリックスの産生・分解を適切に制御する必要があり、そのためには TGF- β /Smad シグナルの制御が重要と考えられる。

著者らは近年、肝線維化などの線維化治療に関する研究に取り組んでいる。線維化では、各組織の線維芽細胞において TGF- β /Smad シグナルが過剰に活性化し、細胞外マトリックスが過剰産生され蓄積することが原因となっている³⁾。線維化は、肝臓のみならず皮膚、腎臓、肺などあらゆる部位で発症し、多くの患者が苦しんでいるにもかかわらず、効果的な治療薬が極めて少ないことから、アンメットメディカルニーズの高い疾患となっている。著者は、活性化した肝星細胞(肝臓に局在する間葉系細胞で、肝線維化の原因となる細胞)に、合成二本鎖 RNA であ

る polyI:C や二本鎖 RNA をゲノムに持つレオウイルスを作用させることで、1 型インターフェロン (IFN) 非依存的に、TGF- β /Smad シグナルおよびコラーゲン産生を抑制し、線維化を解消することに成功した。

近年、皮膚も日常生活のなかで、様々な二本鎖 RNA に暴露されている。皮膚は、ウイルスや細菌など病原体に常に暴露されているが、ウイルスや一部の細菌は二本鎖 RNA を多量に産生する。また、ケラチノサイトでは紫外線照射により snRNA などのノンコーディング RNA が変性したのち放出され、二本鎖 RNA として Toll-like receptor 3 (TLR3) を介して炎症応答を誘導する⁴⁾。さらに最近では、ミトコンドリア DNA より二本鎖 RNA が産生させることが報告されている⁵⁾。このような背景から、皮膚の線維芽細胞などが、病原体もしくは自己由来の二本鎖 RNA に暴露することによって、1 型 IFN 非依存的に TGF- β /Smad シグナルが抑制され、コラーゲンなどの細胞外マトリックスの産生抑制や分解促進、ひいては皮膚の保湿・バリア能が低下するのではないかと考えた。そこで本研究では、病原体由来および自己由来の二本鎖 RNA による I 型 IFN 非依存的な細胞外マトリックス産生抑制の評価、およびそのメカニズム解明を目的として検討を行った。

2. 方法

2.1. 細胞培養

正常ヒト皮膚由来線維芽細胞は、Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (High glucose) (10% fetal bovine serum (FBS), antibiotics 含有) で培養した。ヒト肝星細胞株である LX-2 細胞は、Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (High glucose) (2% FBS, antibiotics 含有) で培養した。実験の際には、12 時間 FBS 非含有培地



Elucidation of mechanism of suppression of collage production by pathogen-derived and endogenous double-stranded RNA in an interferon-independent manner

Fuminori Sakurai

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

で培養したのち、TGF-βを終濃度2ng/mlで添加し16時間培養したのちに実験に使用した。尚、使用したFBSは、56℃、30分間の非働化処理を行った後に使用した。

2.2. レオウイルスの調製

レオウイルスをL929細胞に感染させ、2日後に細胞を回収・遠心後、HO buffer (1M Tris-HCl (pH7.5)、5M NaCl、10mM 2-mercaptoethanol) に懸濁した。超音波処理を4秒間行ったのち、凍結融解により細胞を破壊した。得られた細胞破砕液に、Vertrel (三井・デュポン フロロケミカル) を全液量の2/5加え、超音波処理を4秒間行い、さらに、同量のVertrelを加えて超音波処理を4秒行なった。これを9,000g、5分間遠心し、上清を新しいチューブに回収した。回収した液量の9/10量のVertrelを加えたのち、超音波処理を行い、9,000g、10分間遠心し、上清を回収した。超遠心機のスウィング・ローターのチューブに比重1.44g/cm³、1.22g/cm³の塩化セシウム溶液を順に重層し、その上に上記のレオウイルス懸濁液を加えて超遠心機を用いて27,000rpm、5.5時間遠心した。その後、レオウイルスのバンドを回収し、10mM Tris (pH7.5)、1mM MgCl₂、10% glycerolからなる透析バッファーで1時間、4℃で透析し、透析バッファーを交換した後、一晚透析した。回収した懸濁液をレオウイルス懸濁液として回収した。

2.3. 二本鎖RNAおよびウイルス作用

合成二本鎖RNAであるpolyI: Cを培地中に添加、もしくはLipofectamine RNAiMAXを用いてTransfectionした。また二本鎖RNAをゲノムに有するレオウイルスをMultiplicity of infection (MOI) 20、100で作用させた。19塩基長の短い二本鎖RNA (short dsRNA; sdsRNA) は、Lipofectamine RNAiMAXを用いてTransfectionした。

2.4. 細胞生存率の評価

正常ヒト成人皮膚線維芽細胞を1×10⁴ cells/wellで96well plateに播種した。翌日、polyI: C、polyI: C/Lipofectamine RNAiMAX複合体、sdsRNAおよびレオウイルスを作用した。作用48時間後にWST-8アッセイにより細胞生存率を評価した。

2.5. 遺伝子発現解析

上記と同様に、polyI: C、polyI: C/Lipofectamine RNAiMAX複合体、sdsRNA/Lipofectamine RNAiMAX複合体、およびレオウイルス作用48時間後にtotal RNAを回収し、定量的RT-PCRにより遺伝子発現解析を行った。また同様に蛋白質を回収し、Western blottingにより蛋白質発現解析を実施した。用いた抗体は以下の通りである。Anti-α-smooth muscle actin (α-SMA) antibody (Abcam,

1:1000), anti-β-actin antibody (Sigma-aldrich, 1:2500)。

3. 結果

まずはじめに正常ヒト皮膚線維芽細胞に二本鎖RNAおよびレオウイルス作用後の細胞生存率を検討した。polyI: C単独、polyI: C/Lipofectamine RNAiMAX複合体、およびレオウイルスを作用させたところ、用いた用量の範囲においては、正常ヒト線維芽細胞の細胞生存率に有意な低下は観察されなかった(図1)。そこで次に、ヒト線維芽細胞におけるコラーゲンやファイブロネクチンなどの細胞外マトリックスの遺伝子発現量を検討したところ、polyI: C/Lipofectamine RNAiMAX複合体群において、有意な低下が観察された(図2)。またELISAによって培養上清中のIFN-β産生量を検討したところ、polyI: C/Lipofectamine RNAiMAX群でのみ、有意なIFN-β産生が観察された(図3)。

次に同様の研究を短い塩基長のdsRNA (short dsRNA; sdsRNA) を用いて検討を行った。その結果、これらのsdsRNA作用時においてヒト皮膚線維芽細胞の細胞生存率の低下は観察されなかった。さらにこれらのsdsRNAにおいても、sdsRNAの濃度依存的に線維化マーカーの発現が有意に低下した。さらにWestern blottingによって様々な線維化マーカーの発現を解析したところ、こちらにおいても線維化マーカーの発現が低下した。さらにsdsRNAによる線維化マーカーの発現低下は、1型IFNの産生が抑制された条件下においても観察された。上記と同様の結果は、ヒト肝星細胞株であるLX-2細胞でも観察された。以上の結果より、二本鎖RNAは皮膚における細胞外マトリックスの産生を抑制することが示唆された。

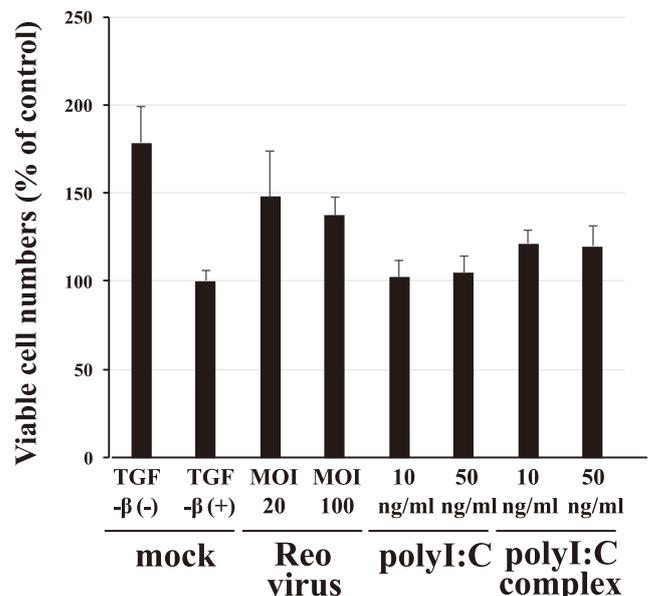


図1 polyI: C、polyI: C/Lipofectamine RNAiMax複合体、Reovirus作用後の正常ヒト皮膚線維芽細胞の細胞生存率

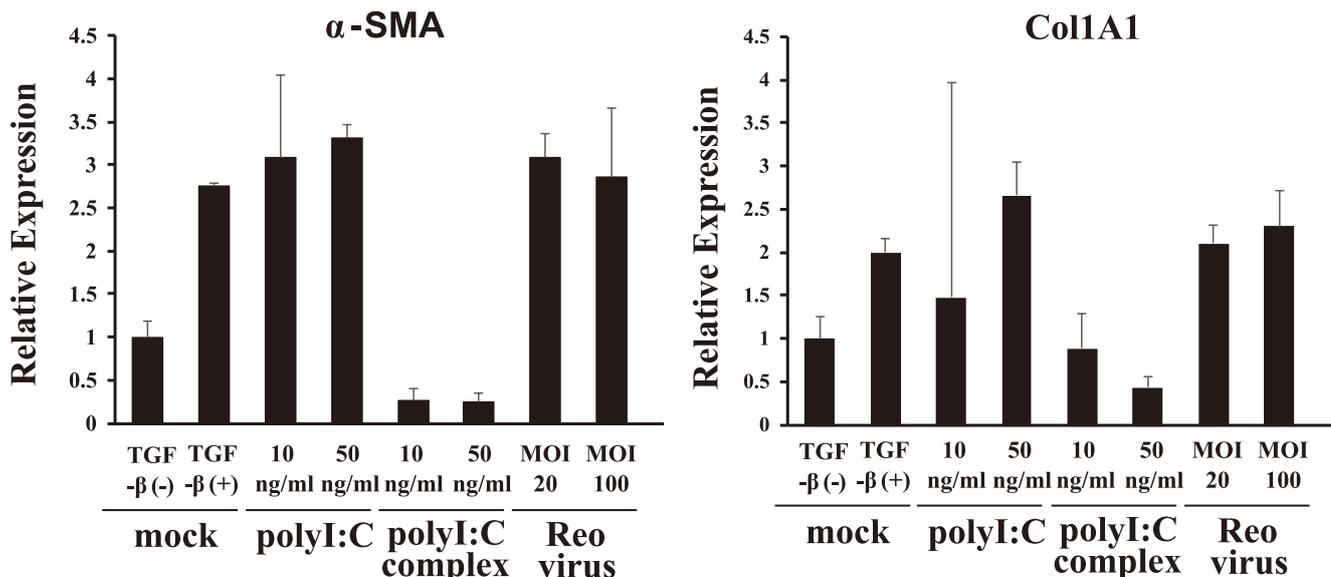


図2 polyI: C, polyI: C/Lipofectamine RNAiMax 複合体、Reovirus 作用後の正常ヒト皮膚線維芽細胞における線維化マーカーの発現レベル。TGF- β 非作用群の値を1とした。

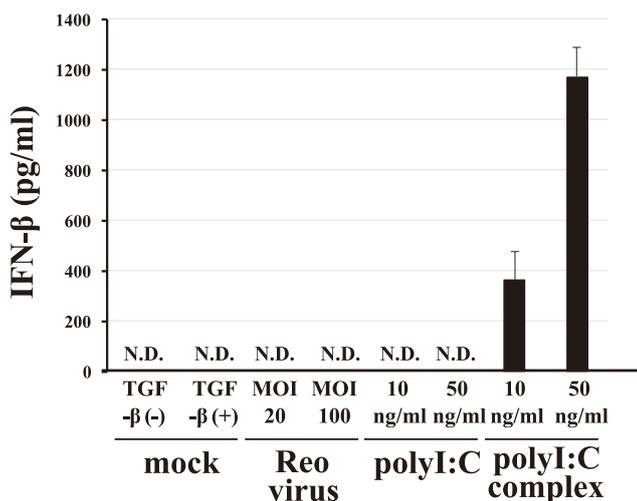


図3 polyI: C, polyI: C/Lipofectamine RNAiMax 複合体、Reovirus 作用後の正常ヒト皮膚線維芽細胞における IFN- β 産生量

4. 考察

今回、polyI: C/Lipofectamine RNAiMAX 複合体作用群において細胞外マトリックス遺伝子の発現が有意に低下した。細胞生存率については有意な低下は観察されなかったことから、この細胞外マトリックス遺伝子の発現低下は、細胞毒性によるものではないと考えられる。実際に、ハウスキーピング遺伝子の発現にも変化は見られなかった。

今回、レオウイルスおよびpolyI: C単独作用群においては、細胞外マトリックス遺伝子の有意な低下は観察されなかった。これは、細胞内に取り込まれたpolyI: Cやレオウ

イルスの量が少なかったためと考えられる。レオウイルスの感染受容体は、Junction adhesion molecule-A (JAM-A) であるが、線維芽細胞ではJAM-Aの発現が低いことが知られている。そのため、レオウイルスの細胞内取り込み量が少なかったと考えられた。

今回の二本鎖RNAによる線維化マーカー遺伝子の発現抑制メカニズムであるが、二本鎖RNAが何らかの細胞側因子に認識されることで誘導されているものと予想される。実際に種々の細胞側因子をsiRNAを用いてノックダウンしたが、関与する分子の同定には至らなかった。現在、さらに多くの標的遺伝子をノックダウンし、検討を継続している。

(引用文献)

- 1) Chambers, E. S. & Vukmanovic-Stejić, M. Skin barrier immunity and ageing. *Immunology* **160**, 116-125 (2020).
- 2) Flanders, K. C. Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *Int J Exp Pathol* **85**, 47-64 (2004).
- 3) Frangogiannis, N. G. Transforming growth factor- β in tissue fibrosis. *Journal of Experimental Medicine* **217**, e20190103 (2020).
- 4) Bernard, J. J. *et al.* Ultraviolet radiation damages self noncoding RNA and is detected by TLR3. *Nat Med* **18**, 1286-1290 (2012).
- 5) Ren, B., Guan, M.-X., Zhou, T., Cai, X. & Shan, G. Emerging functions of mitochondria-encoded noncoding RNAs. *Trends in Genetics* **39**, 125-139 (2023).

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

大阪大学大学院歯学研究科顎口腔機能再建学講座（歯科理工学教室）

佐々木 淳一

Vasculogenesis is referred to as the assembling of stem cells and endothelial progenitor cells into endothelium and subsequent formation of nascent capillaries. The elucidation of vasculogenesis of stem cells will facilitate control of neovascularization and further development of novel cosmetics as well as tissue regenerative therapies. Heparan sulfate (HS) proteoglycans, which are composed of HS glycosaminoglycan chains and covalently attached core protein, are a widely distributed constituent of extracellular matrices in all mammalian tissues. HS could enhance the binding affinity between growth factors and related receptors to modulate a variety of biological activities, however little is known about the role of HS in endothelial differentiation and neovascularization of mesenchymal cells. Dental pulp stem cells (DPSCs), which are classified as mesenchymal stem cells, are highly proliferative and exhibit a multipotent differentiation ability. Notably, owing to constitutive expression of vascular endothelial growth factor receptor 1, DPSCs more readily differentiate into vascular endothelial lineages compared with other mesenchymal cells. In this study, we hypothesized that HS highly orchestrates vasculogenesis of mesenchymal stem cells and the role of HS on endothelial differentiation was investigated by using DPSCs. It was revealed that an HS antagonist suppressed the sprouting ability and endothelial differentiation of DPSCs. Silencing of *exostosin-1 (EXT1)*, a crucial glycosyltransferase for HS biosynthesis, in DPSCs significantly altered their gene expression profile. In addition, EXT1-silenced DPSCs expressed lower levels of endothelial differentiation markers and displayed a reduced vascular formation capacity compared with control DPSCs transduced with scrambled sequences. Collectively, these findings indicate the crucial role of HS on endothelial differentiation and vasculogenesis of mesenchymal stem cells, opening new perspectives for the application of HS to novel cosmetics and regenerative medicine.

1. 緒言

血管は健康の維持・増進に重要であるとされ、特に、血管の95%以上を占める直径20 μ m以下の毛細血管は免疫や創傷治癒に大きく関わっていることが知られている。一方で、毛細血管の数は加齢によって減少することが報告されており、真皮毛細血管の密度や機能の低下は皮膚の老化を招く。

体内における血管形成の過程には、Angiogenesis（血管新生）とVasculogenesis（脈管形成）の2種類がある。血管新生は、既存の血管が分枝を形成することで新規の血管が形成される事象を指し、脈管形成は、血管前駆細胞から分化した血管内皮細胞が血管非存在下の領域に血管を形成することをいう。これまで、脈管形成は初期胚から循環系の発生段階のみで見られるプロセスと考えられていたが、近年、成人の血液中で血管前駆細胞が発見され、脈管形成がヒトの血管形成においても作用していることが分かってきた。そういったなか、これまでに我々は、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）や肝細胞増殖因子が特異的レセプターに結

合することで、間葉系幹細胞の血管内皮細胞分化が開始し、脈管形成能が発揮されることを報告してきた^{1,2)}。しかし、これら血管の形成を促進する増殖因子やサイトカインが多く発見されている一方で、その精製タンパク質は非常に高価なうえに、強い薬理作用が故の生体安全性の問題から血管再生療法への適用は大きく制限されている。

近年の糖鎖生物学の発展によって、糖鎖と幹細胞分化の関係性が徐々に解明されつつあり、強い負電荷を有するプロテオグリカンが細胞周囲の増殖因子を捕捉することで、細胞分化を制御していることが報告された。プロテオグリカンは、1本のコアタンパク質に複数本のグリコサミノグリカンが共有結合した構造をもち、プロテオグリカンの負電荷はグリコサミノグリカンの硫酸基に由来する。すなわち、硫酸化多糖鎖であるグリコサミノグリカンの強い負電荷は、生体内で増殖因子の安定化や受容体への結合についての重要な働きを担っている³⁾。また、ヘパラン硫酸はグリコサミノグリカンのなかでも特に強い負電荷をもち、さらには間葉系幹細胞の細胞外基質にも含まれていることから、我々はヘパラン硫酸が間葉系幹細胞の脈管形成能に関与しているのではないかと着想した。

ところで、歯髄幹細胞（DPSCs）は、俗に歯の神経と呼ばれる歯髄に存在する間葉系幹細胞であり、高い増殖能と象牙芽細胞などへの分化能を有していることが知られている。また、DPSCsはVEGFのレセプターを常に発現していることから、骨髄や脂肪由来の間葉系幹細胞と比較して高い脈管形成能をもつことが報告されている。このように、



The Role of Glycosaminoglycan on Vasculogenesis

Jun-Ichi Sasaki

Department of Biomaterials Science,
Osaka University Graduate School of
Dentistry

DPSCsは*in vitro*で簡便に血管内皮細胞に分化誘導することが可能であり、DPSCsの脈管形成能を評価する手法も確立されている⁴⁾。

以上を背景として、本研究では、グリコサミノグリカンが間葉系幹細胞の脈管形成能を制御していると仮説を立て、DPSCsを用いてヘパラン硫酸の産生抑制が脈管形成能に及ぼす影響を*in vitro*および*in vivo*で検討することを目的とした。

2. 方法

2.1. ヘパラン硫酸合成阻害が脈管形成能に与える影響

DPSCsの脈管形成能発現におけるヘパラン硫酸の役割を検討するために、ヘパラン硫酸の合成阻害剤である bis-2-methyl-4-amino-quinolyl-6-carbamide (surfen) を添加した培地でDPSCsを培養し、細胞増殖や分化に与える影響を評価した。具体的には、血管内皮細胞分化誘導(ED)培地に1~10 μ Mのsurfenを添加し、培養皿で最長5日間培養した後に、細胞数をMTT assayで検討した。また、同様に7日間培養したDPSCsについて、血管内皮細胞分化マーカーである *VEGFA*、および幹細胞マーカーである *Nanog* の mRNA 発現量を Real-time PCR 法によって評価した。

さらに、マトリゲルを用いた三次元培養によってDPSCsの脈管形成能を評価した。細胞培養用24ウェルプレートに300 μ Lのゾル状のマトリゲルを注ぎ、37 $^{\circ}$ Cで1時間静置することでゲル化させた。このマトリゲル上にDPSCsを播種し、分化誘導によって形成された網目状構造を光学顕微鏡で最長14日間観察した。網目状構造の分岐の数および長さは、画像解析ソフトウェアImageJを用いて定量評価した。また、マトリゲルで三次元培養したDPSCsに対してLive/Dead染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。

2.2. Exostosin-1(EXT1)発現阻害が血管内皮細胞分化に与える影響

ヘパラン硫酸の産生を抑制したDPSCsを作製するために、糖転移酵素 *EXT1* に対する short hairpin RNA (shRNA) をレンチウイルスベクターによって導入し、DPSCsの *EXT1* 発現をノックダウンした。また、コントロールとして、スクランブル配列と緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子を導入したDPSCs (shCon-DPSCs) を用意した。 *EXT1* をノックダウンした細胞 (shEXT1-DPSCs) あるいは shCon-DPSCs を ED 培地で7日間および14日間培養し、 *EXT1* 発現量を Real-time PCR 法で、ヘパラン硫酸産生量を Enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) 法で検討した。

また、 *EXT1* のノックダウンがDPSCsの遺伝子発現に及ぼす影響を網羅的に解析した。すなわち、ED培地で14日間培養した shEXT1-DPSCs、shCon-DPSCs から mRNA を抽出し、Novaseq 6000 を用いて次世代シーケンズ解析を行った。さらに、ED培地で7日間および14日間培養したこれら細胞について、 *VEGFA* および *Nanog* の mRNA 発現量を Real-time PCR 法によって評価した。

2.3. EXT1発現阻害が脈管形成能に与える影響

EXT1 のノックダウンがDPSCsの細胞増殖能に与える影響を検討することを目的として、遺伝子導入した細胞を通常培養(GC)培地あるいはED培地を用いて二次元培養下で最長5日間培養し、細胞数を測定した。

さらに、shCon-DPSCsとshEXT1-DPSCsをマトリゲル上でED培地を用いて最長14日間培養し、形成された網目状構造の分岐の数および長さをImageJを用いて定量評価した。また同時に、100 μ g/mLのヘパラン硫酸を添加したED培地を用いてshEXT1-DPSCsを培養し、ヘパラン硫酸添加が網目状構造形成能に与える影響を検討した。

2.4. EXT1発現阻害が*in vivo*血管形成に与える影響

EXT1 のノックダウンがDPSCsの血管形成に与える影響を *in vivo* で評価するために、マウス血管新生モデルを用いた検討を行った。具体的には、内径8mmのポリエチレンチューブ内腔に多孔性のポリ乳酸スキャフォールドを作製し、厚さ1mmに切り出した。その内部にshCon-DPSCsあるいはshEXT1-DPSCsを播種し、重症複合免疫不全マウスの背部皮下に移植した。移植5週間後に試料を回収し、パラフィン包埋薄切切片を作製後、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行った。また、薄切切片に対して血管内皮細胞の分化マーカーであるCD31あるいはvon Willebrand Factor (vWF) と GFP の多重免疫染色を行い、スキャフォールド内に形成された血管数を評価するとともに、分化マーカー陽性細胞と GFP の局在についても検討した。

3. 結果と考察

3.1. HS合成阻害が脈管形成能に与える影響

ヘパラン硫酸合成阻害剤 surfen を加えたGC培地あるいはED培地を用いてDPSCsを培養したところ、培養5日目においてED培地では surfen 濃度依存的に細胞増殖が抑制されることが分かった(図1A)。一方、GC培地では培養5日目においても surfen の培地添加によって細胞増殖に有意な変化は認められなかった。また、surfen含有ED培地で培養したDPSCsの血管内皮細胞分化を検討した結果、surfenの濃度が増加するにつれて *VEGFA* の mRNA

量は減少するが、幹細胞マーカー *Nanog* の発現量は増加することが分かった (図 1B)。ヘパラン硫酸は増殖因子と電氣的に結合することで、増殖因子の細胞表面の受容体への結合を補助していることが知られている。このことから、DPSCs のヘパラン硫酸合成阻害によって ED 培地に含まれる増殖因子が細胞に作用しづらくなったため、細胞増殖や血管内皮細胞分化が抑制されたと考えられた。一方、GC 培地については、DPSCs を栄養する主体が血清成分であり、増殖因子を多く含む ED 培地に比べてヘパラン硫酸産生阻害の影響が少なく、surfen は GC 培地環境下では細胞増殖に変化を与えなかったと考えられた。

マトリゲル上で DPSCs を血管内皮細胞に分化誘導した結果、毛細血管様の網目状構造が形成された (図 2A)。次に、surfen を培地に加えて三次元培養したところ、培養 3 日目以降で surfen の濃度が増加するにしたがって DPSCs によって形成される網目状構造の分岐の数および長さが有意に減少することが分かった (図 2B)。一方で、DPSCs が surfen の影響で細胞死した場合、マトリゲル上に網目状構造が形成されなくなると考えられる。そこで、マトリゲル上で DPSCs の Live/Dead 染色を行ったところ、

10 μ M の surfen を含む ED 培地で 14 日間培養した後においても、多くの細胞が生存していることが明らかとなった (図 2C)。これらのことから、DPSCs を surfen 添加培地で培養することで、血管内皮細胞分化および網目状構造を形成する能力、すなわち脈管形成能が低下したことが示唆された。

3. 2. EXT1 発現阻害が血管内皮細胞分化に与える影響

EXT1 発現を shRNA でノックダウンできているか調べたところ、培養 7 日目、14 日目のいずれにおいても、shEXT1-DPSCs の *EXT1* 発現量は shCon-DPSCs と比較して有意に低かった (図 3A)。さらに、ELISA 法の結果からも、shEXT1-DPSCs のヘパラン硫酸産生量が減少していることが分かった (図 3B)。これらの結果から、shRNA によって DPSCs の *EXT1* 発現がノックダウンされ、ヘパラン硫酸の産生が阻害されていることが分かった。

次に、次世代シーケンス解析を行ったところ、*CD106* や *TGF- β 1*、ケモカインなど接着因子や炎症反応に関わる遺伝子群の発現が shEXT1-DPSCs で有意に減

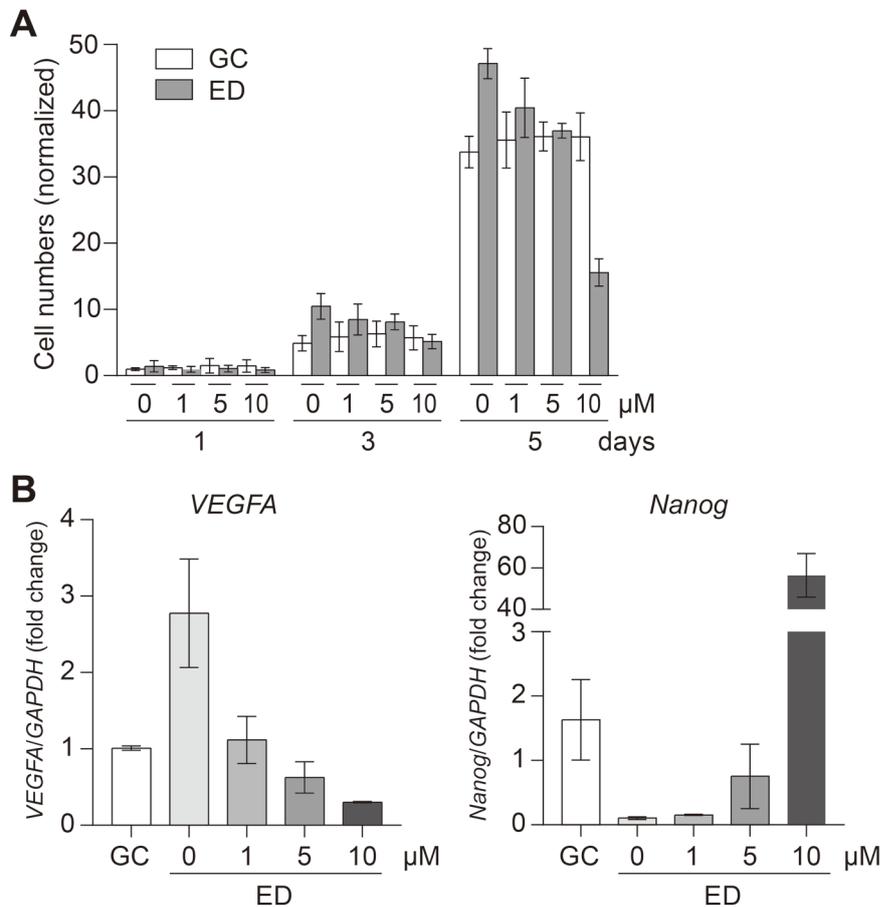


図 1 Surfen が DPSCs の細胞増殖と血管内皮細胞分化に与える影響
A. 細胞増殖試験 B. Real-time PCR 法

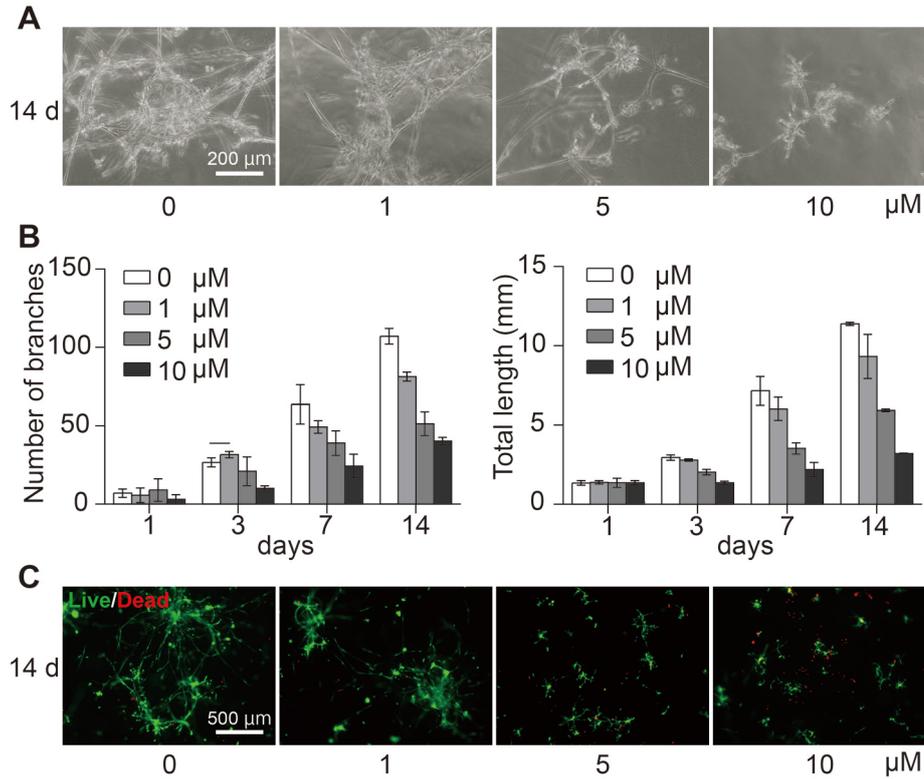


図2 Surfenが三次元培養環境下のDPSCsに与える影響
A. 光学顕微鏡像 B. 網目状構造の定量評価 C. Live/Dead染色

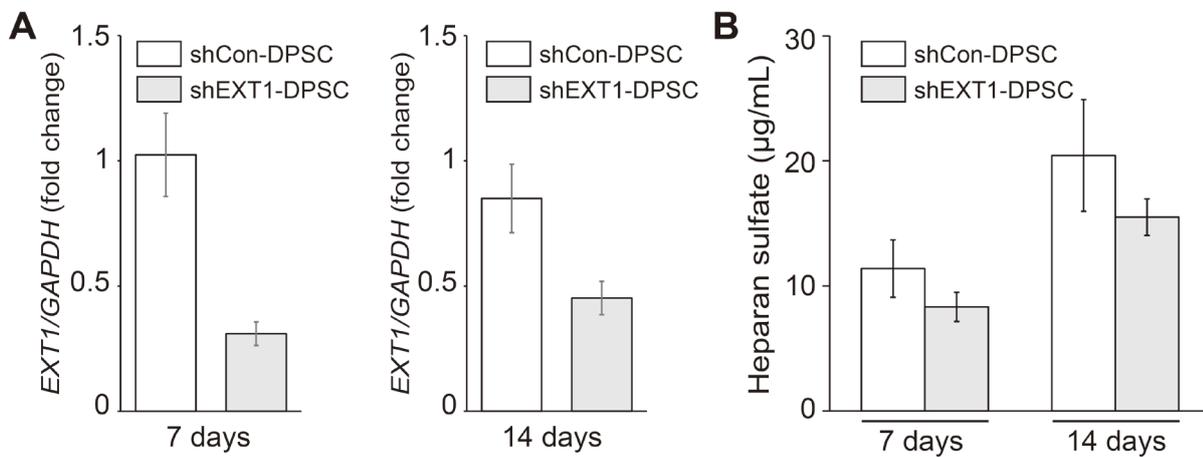


図3 DPSCsのEXT1ノックダウン
A. EXT1発現量 B. ヘパラン硫酸産生量

少していることが明らかとなった(図4A)。また、Real-time PCRで血管内皮細胞分化に関連する遺伝子発現を調べた結果、surfenを作用させた場合と同様に、shEXT1-DPSCsで*VEGFA*発現量が減少し、*Nanog*が増加していることが分かった(図4B)。このことから、*EXT1*のノックダウンによってヘパラン硫酸の産生を抑制することは、DPSCsの血管内皮細胞分化のみならず細胞接着や免疫といった様々な細胞機能に影響を与える可能性が考えられた。

3.3. EXT1発現阻害が脈管形成能に与える影響

shRNAを用いた逆遺伝学的アプローチによって、shEXT1-DPSCsではヘパラン硫酸の産生が減少し、血管内皮細胞分化が抑制されることが明らかとなった。そこで、三次元培養系でshEXT1-DPSCsが形成する網目状構造を観察したところ、shCon-DPSCsと比較して分岐の数や長さが減少することが明らかとなった(図5)。一方、ヘパラン硫酸を添加したED培地でshEXT1-DPSCsを培養する

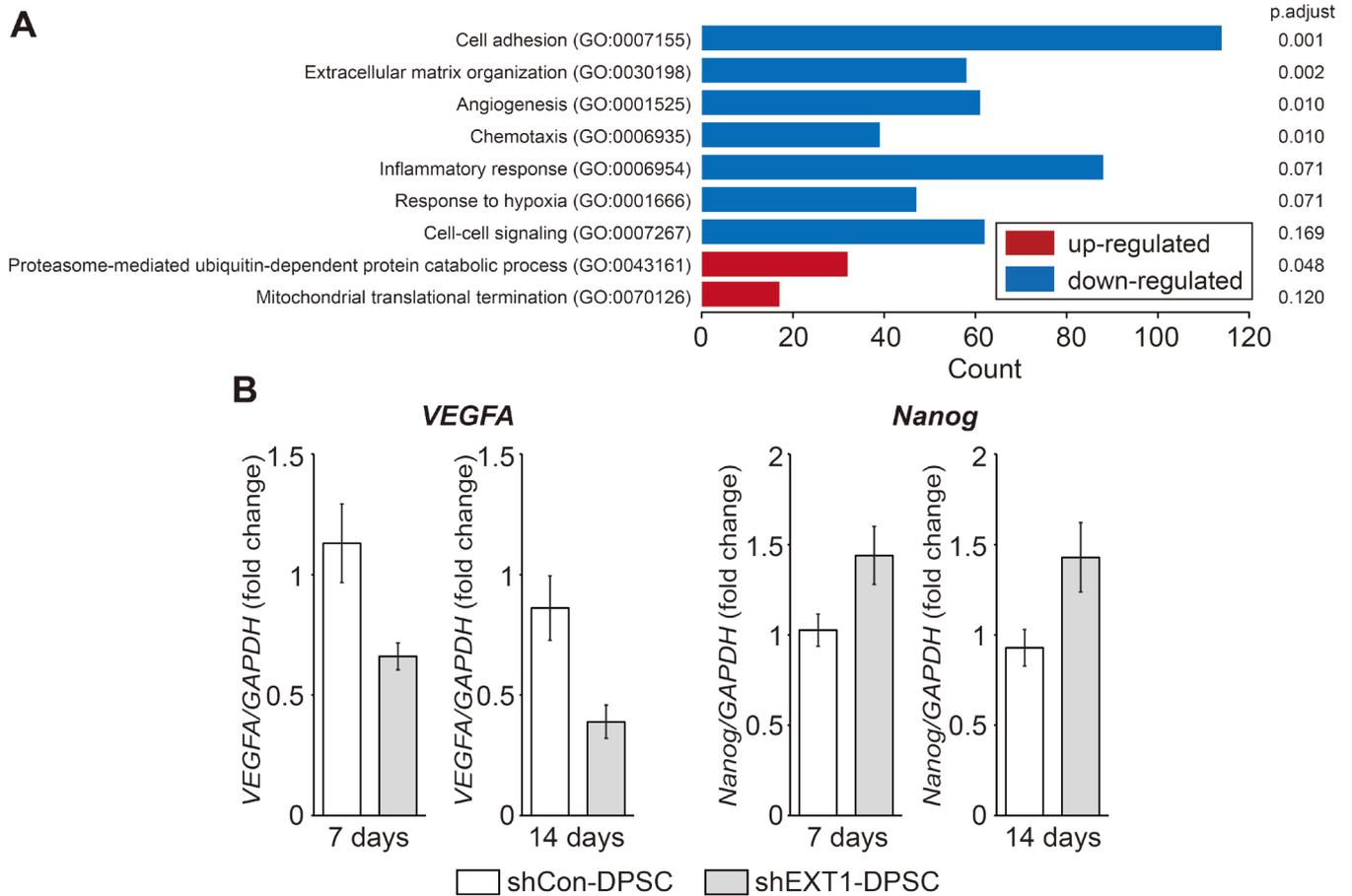


図4 EXT1 ノックダウンによる DPSCs の遺伝子発現変化
A. 次世代シーケンス解析 B. Real-time PCR 法

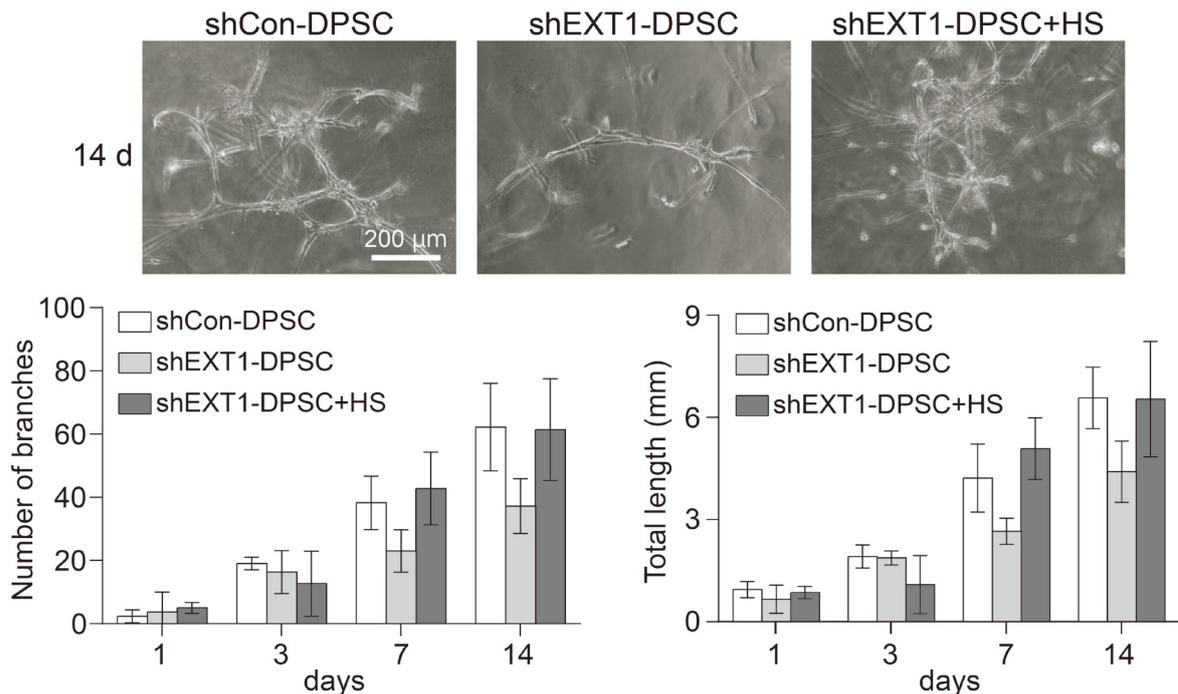


図5 shEXT1-DPSC の網目状構造形成能とヘパラン硫酸(HS)添加の効果

と、shCon-DPSCsが形成する網目状構造と比べて、その数や長さに有意な差が認められなくなった。この結果は、EXT1のノックダウンによって低下したDPSCsの網目状構造形成能が培地中に添加したヘパラン硫酸によってレスキューされたことを示しており、この結果は、DPSCsの脈管形成能にヘパラン硫酸が関与していることを示唆している。

3. 4. EXT1 発現阻害が *in vivo* 血管形成に与える影響

これまでの結果から、DPSCsの脈管形成能の発現には、ヘパラン硫酸が重要な役割を担っていることを *in vitro* の実験系で示すことができた。そこで、これらの *in vitro* で見られた現象が *in vivo* でも生じることを確認するために、マウス血管新生モデルを用いた評価を行った。その結果、shEXT1-DPSCsを播種したスキャフォールド内に形成された血管の数は、shCon-DPSCsを移植した試料と比較して有意に減少することが分かった(図6A)。さらに、多重免疫染色の結果、移植した試料内にCD31やvWFといった血管内皮細胞分化マーカーとGFPを共発現しているDPSCsが存在していることが明らかとなった(図6B)。このことは、移植したDPSCsが血管内皮細胞に分化したこ

と、さらにはDPSCsのヘパラン硫酸産生を阻害することで血管の形成量が減少したことを示している。これらの結果から、生体内においてヘパラン硫酸がDPSCsの脈管形成能を制御している可能性が示された。

4. 総括

本研究では、グリコサミノグリカンの一つであるヘパラン硫酸が脈管形成に与える影響を間葉系幹細胞の一つであるDPSCsを用いて検討した。その結果、DPSCsによるヘパラン硫酸の産生を阻害することで、DPSCsの脈管形成能が低下し、DPSCsによって形成される血管量が減少することが示された。このことは、ヘパラン硫酸がDPSCsの血管形成、すなわち間葉系幹細胞の脈管形成能の発現に重要であることを示唆している。以上のことから、ヘパラン硫酸が間葉系幹細胞由来の血管の増生に有効であり、本研究で得られた知見が、新たな血管再生療法の確立や血行を促進する化粧品の開発に応用できる可能性が示された。

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。

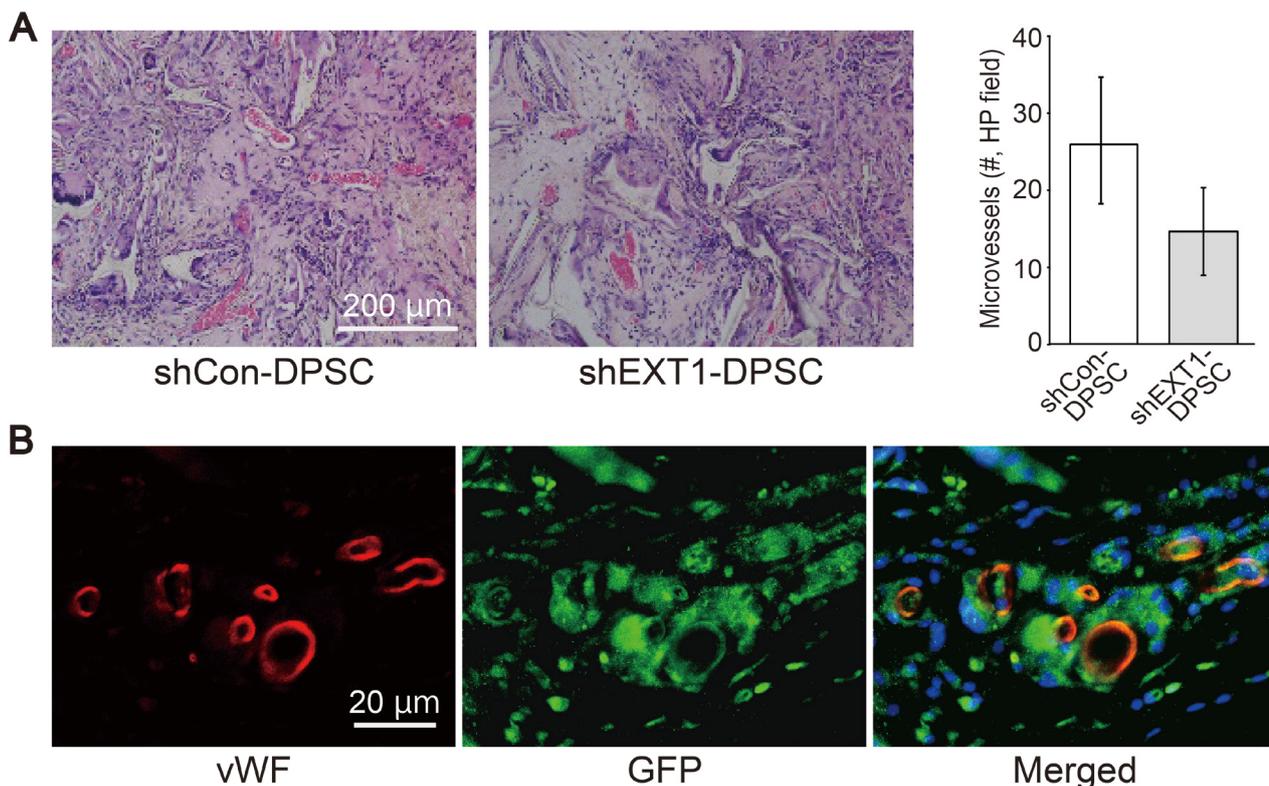


図6 shEXT1-DPSCの *in vivo* 脈管形成能
A. HE染色および血管形成量評価 B. vWFとGFPの多重免疫染色

(引用文献)

- 1) Sasaki JI, Zhang Z, Oh M, Pobocik AM, Imazato S, Shi S, Nör JE. VE-cadherin and anastomosis of blood vessels formed by dental stem cells. *J Dent Res* 99 (4), 437-445, 2020.
- 2) Zhang Z, Oh M, Sasaki JI, Nör JE. Inverse and reciprocal regulation of p53/p21 and Bmi-1 modulates vasculogenic differentiation of dental pulp stem cells. *Cell Death Dis* 12 (4), 644, 2021.
- 3) Li A, Sasaki JI, Inubushi T, Abe GL, Nör JE, Yamashiro T, Imazato S. Role of heparan sulfate on vasculogenesis of dental pulp stem cells. *J Dent Res* 102 (2), 207-216, 2023.
- 4) Katata C, Sasaki JI, Li A, Abe GL, Nör JE, Hayashi M, Imazato S. Fabrication of vascularized DPSC constructs for efficient pulp regeneration. *J Dent Res* 100 (12), 1351-1358, 2021.

紫外線で誘導される制御性 T 細胞が創傷治癒を促進するメカニズムの解明

名古屋市立大学医学研究科免疫学分野

志馬 寛明

Skin wound healing is a highly organized process that maintains tissue integrity and function. We found that ultraviolet-B (UVB) irradiation promotes skin wound healing. However, the mechanism by which UVB regulates the repair process is not fully understood. Regulatory T cells (Tregs) play a pivotal role in maintaining immune homeostasis. Skin exposure to UVB induces the expansion of Foxp3⁺ regulatory T cells. UVB-expanded Tregs (UVB-skin Tregs) enhance re-epithelialization by producing proenkephalin (PENK) and Areg, promoting wound healing of the skin. In this study, we further investigated the mechanisms by which UVB-skin Tregs interact with other immune cells and inflammatory mediators to regulate wound healing. Full-thickness wounds were made on the back skin of mice irradiated with UVB before 30 minutes or 6 days and compared to wounds of non-irradiated mice. UVB irradiation before 6 days promoted wound healing in mice, whereas UVB irradiation before 30 minutes rather delayed wound healing. Flow cytometric analysis showed that UVB-skin Tregs highly accumulated in the wounds of mice irradiated with UVB before 6 days but not 30 min. UVB-skin Tregs strongly expressed activation markers such as KLRG1, indicating that they were highly activated in the wounds. UVB irradiation also induced an inflammatory response in the wounds that negatively regulates tissue repair. Pro-inflammatory cytokine expression and inflammatory macrophage accumulation in the wounds were enhanced by UVB irradiation and those were partially suppressed by UVB-skin Tregs. These results suggest that UVB irradiation has both positive and negative impacts on the tissue repair function of the skin. Controlling these responses might enhance UVB-promoted skin wound healing.

1. 緒言

皮膚は、擦り傷や切り傷、火傷などの様々な外傷を受ける。傷が素早く修復されるかどうかは、皮膚のバリア機能、すなわち角質層下の水分の保持や損傷部位からの感染に対する防御能を維持する上で非常に重要である¹⁾。傷の修復過程が終了した後でも、その部位が傷痕(癍痕)として残ると外見に大きく影響する場合があるため、元の組織構造に可能な限り近づけることも重要視される。また、糖尿病患者や寝たきりの高齢者の増加に伴って、創傷治癒過程の遅延に起因する難治性潰瘍を患う人々は増加しており、国内では約130万人もの患者がいるとされている。事故や手術による創傷を早く修復することができれば、入院時間を短縮し、早期に日常生活に復帰することが可能となる。しかし、創傷治癒に対する治療法は限られており、新たな手段の開発が求められている。創傷治癒過程は、炎症期、増殖期、再構築期に分けられ、各過程が重複しながら進行していく¹⁾。炎症期には免疫細胞の集積により感染や異物を除去することで傷が清浄化され、増殖期にはケラチノサイトによる再上皮化、線維芽細胞によるコラーゲンの産生や血管形成誘導により創傷部位が埋められる。さらに再構築期

では、結合組織の再構成により強度が増加する。これら一連の過程は、免疫系による制御を受ける。マクロファージやリンパ球、制御性T細胞(regulatory T cell, Treg)、自然免疫細胞など多種類の免疫細胞とケラチノサイトや線維芽細胞などの非免疫細胞との相互作用により、創傷治癒過程が制御されていると考えられているが、その機序は十分に解明されていない²⁾。

我々は、紫外線が皮膚の免疫機能に与える影響を解析してきた。皮膚が紫外線に長時間暴露すると、サンバーン(日焼け)やサンタン、光老化(シミ、しわ、たるみ)、皮膚がんの誘発など多くの害をもたらす(図1)。そのため一般的には、紫外線への暴露を避けることが健康を保つために重要であると考えられている。その一方で、適切にコントロールされた紫外線照射は、人体に有益な影響を与える。例えば、乾癬やアトピー性皮膚炎などの皮膚免疫疾患に対して紫外線照射による治療が有効である。照射波長の範囲を限定したナローバンドUVBは、治療効果が高く、前述の副作用が少ないため急速に普及した。しかし、紫外線が人体に与える影響には未だ不明な点が多い。紫外線がもつ有益な作用を見出し、作用機序を明らかにすることによって、その有益な作用を選択的に利用できることが期待される。最近我々は、紫外線を照射したマウスの皮膚で創傷治癒能(組織修復)が亢進することを見出した³⁾(図1)。

Tregは、免疫機能の過剰な応答を抑制することで自己免疫反応の抑制や炎症反応の調節を担う免疫細胞である。健康人では、末梢のCD4陽性T細胞のうち5~10%をTregが占めるが、炎症やがんなどではその割合が増加する。組織に分布したTregは、免疫抑制に関わる基本的



Elucidation of the mechanism by which UV-expanded regulatory T cells promote skin wound healing

Hiroaki Shime

Department of Immunology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

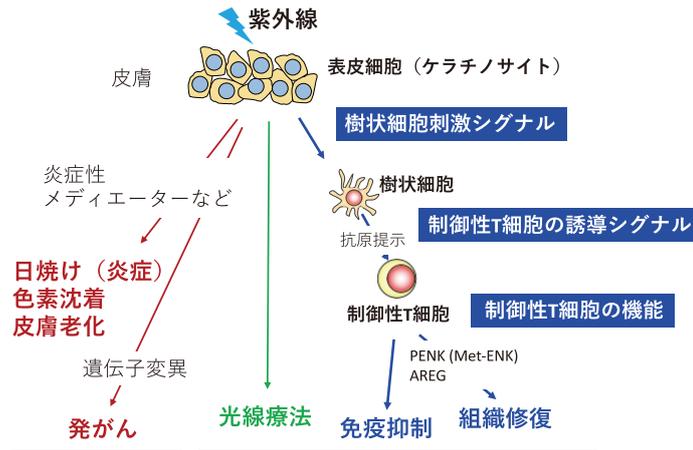


図1 紫外線の有害な作用と有益な作用
紫外線で Treg が増加する。Treg の働きによる有益な作用を明らかにして、選択的に利用し、健康増進に役立てることを目指す。

な機能は維持しながらも組織ごとに特徴的な性質を示すことから、リンパ組織の Treg と区別して組織 Treg と呼ばれ、それぞれの組織の恒常性の維持における役割が注目されている⁴⁾。皮膚に常在する Treg は、微生物感染に対する免疫応答の制御や皮膚炎症性疾患の抑制のみならず、創傷治癒や毛包幹細胞の維持など多様な役割を果たすが、皮膚での細胞数や機能およびその調節に関するメカニズムは不明である⁵⁾。

紫外線 B 波 (ultraviolet-B, UVB) の照射を受けると、皮膚や全身の免疫機能が抑制されることは以前から知られてきた⁶⁾。紫外線照射を受けた皮膚では、7 日目をピークに Foxp3 陽性 Treg が通常の 3～5 倍にまで増加することから、免疫抑制が起こる原因となると考えられている⁷⁾。紫外線による Treg 増加の機序の全容は明らかになっていないが、皮膚の樹状細胞が必須であり、特に CD11b 陽性樹状細胞が中心的な役割を持つと考えられている⁸⁾。紫外線により増加した皮膚の Treg (UVB-skin Treg) は特徴的な遺伝子発現パターンを示すことから、皮膚の恒常性維持に寄与する生理的役割を持つことが予想されたものの、免疫抑制以外の機能は不明であった。我々は、紫外線による皮膚の創傷治癒の促進に UVB-skin Treg が必須であることを明らかにした³⁾。UVB-skin Treg は、皮膚のバリア機能の維持に重要な再上皮化を促進する。プロエンケファリン (proenkephalin, PENK) や Areg の産生により、ケラチノサイトの伸展を促進することによって創傷部位の再上皮化を促進することがわかった。他にも UVB-skin Treg は、血管新生因子や組織再構築に関わるプロテアーゼの産生により創傷治癒を促進することが示唆されているものの、再上皮化以外の過程に与える影響は不明である。本研究では、UVB-skin Treg による創傷治癒促進効果のメカニズムの

さらなる解明を目的とした。

2. 方法

2.1. 創傷治癒モデルおよび皮膚免疫細胞解析

C57BL/6J マウスまたはジフテリア毒素 (DT) の投与で Foxp3 陽性 Treg を除去できる Foxp3-DTR-GFP マウスに紫外線 B 波を 500 mJ/cm^2 照射した。6 日経過後に、組織損傷が真皮層を越して皮下組織まで及ぶ全層創傷 (full-thickness wound、直径 6mm) を背中 of 皮膚に作成し、経時的に創傷を写真撮影した。Image J ソフトウェアを用い、シングルブラインド方式で創傷部位の面積を計測した。また、創傷部位を採取し、細かく切断したのち、リベラーゼまたはコラゲナーゼを 37°C 、60 分間作用させて単一細胞懸濁液を調製した。Treg、マクロファージなどの表面マーカーを蛍光標識抗体で染色し、フローサイトメトリーで細胞集団の割合を解析した。

2.2. skin explant assay

紫外線照射および未照射マウスの耳の皮膚を直径 3mm の円形に切り出し、24 穴プレートに付着させた後、培養した。一日後に培養液を追加してさらに一日培養後、皮膚片から進展したケラチノサイトを顕微鏡下で撮影し、皮膚切片の端からケラチノサイトが移動した距離および面積を計測した。

2.3. 皮膚の遺伝子発現解析

マウスの皮膚から全層創傷部位または近傍の正常な皮膚を回収し、RNA を抽出した。定量的 PCR 法により各遺伝子の発現レベルを測定した。

3. 結果

紫外線照射のタイミングと創傷治癒の促進効果の関係について明らかにするために、紫外線照射直後または、紫外線照射6日経過後のマウスの皮膚に全層創傷を作製した。同様に紫外線未照射のマウスにおいても創傷を作製した。前もって紫外線照射をしておいたマウスは、未照射の皮膚よりも傷の面積が早期に縮小(治癒)したのに対して、紫外線照射直後の皮膚に作製した場合は、未照射マウスよりも治癒が遅延し、むしろ悪影響を及ぼすことがわかった(図2)。傷を受けて早期に開始される炎症期の増大は創傷治癒の遅延をもたらす。紫外線照射は一過性の炎症反応を誘導するため紫外線照射して6時間から24時間経過後、皮膚の炎症性サイトカイン遺伝子の発現を調べたが、ほとんど変化していなかった。すなわち、紫外線照射直後に創傷治癒が遅延する原因は炎症の増大によるものではないと考えられた。

創傷部位を単離してフローサイトメトリー解析を行い、免疫細胞の集積を調べたところ、前もって紫外線照射した皮膚に作製した傷は、照射直後に作製した傷に比べてUVB-skin Tregが多く集積していた。また、それらはKLRG1などの活性化マーカーを強く発現していたことから、強い活性化状態にあることがわかった(図3)。さらに、他の免疫細胞についても同様に解析を行った。マクロファージの集積やその性質を反映するM1/M2マーカーの発現に大きな違いはなかった。マクロファージ欠損マウスで見られる創傷治癒の遅延は、紫外線照射により改善した。また、ケラチノサイトの皮膚切片からの伸展も誘導された。さらなる詳細な解析が必要であるが、紫外線で増加した皮膚のTregは、マクロファージと相加的に働き、創傷治癒を制御することが示唆された。また、CD8陽性T細胞のICOS発現が低下し、ジフテリア毒素の投与でTregを除

去したFoxp3-DTR-GFPマウスに紫外線照射した場合は、ICOS発現が上昇した。すなわち、紫外線によって増加したUVB-skin TregによりCD8陽性T細胞の活性が抑制されることが示唆された。

紫外線照射した皮膚では、日数を経るに従ってUVB-skin Tregの増加が徐々に起こり、7日でピークを迎える。それとともにTNF- α , IL-6, IL-1 β などの炎症性サイトカインの発現誘導も起こる。創傷部位でも検討したところ、これらの反応は正常皮膚と同様に起こることがわかった。また、炎症性ミエロイド系免疫細胞について解析したところ、Ly6C陽性炎症性マクロファージが増加していた(図3)。さらに、創傷部位には好中球の浸潤も見られた。ジフテリア毒素を投与してTregを除去したFoxp3-DTR-GFPマウスでは、傷を受ける6日前に紫外線を照射しておいても創傷治癒は遅延し、これらの炎症応答がさらに増大した。よって、UVB-skin Tregはケラチノサイトによる再上皮化を促進する一方で、紫外線照射によって誘導されるこれらの炎症反応を抑制しているものの、その抑制は十分でないことが示唆された。

4. 考察

紫外線の照射が皮膚や全身性の免疫抑制を誘導することは広く知られてきたが、創傷治癒を促進することはこれまで知られていなかった。創傷治癒と免疫系の関連については、特にマクロファージによる制御に関して多くの報告があるものの、Tregの役割には不明な点が多い。本研究により、紫外線は皮膚で増加するTregを介した再上皮化の促進により創傷治癒を早めると同時に、一過性に誘導される炎症反応が創傷治癒を遅延させる一面もあることが示唆された。

紫外線照射のタイミングと創傷治癒との関係については、紫外線照射直後の皮膚に傷を作成した場合に治癒の促進効

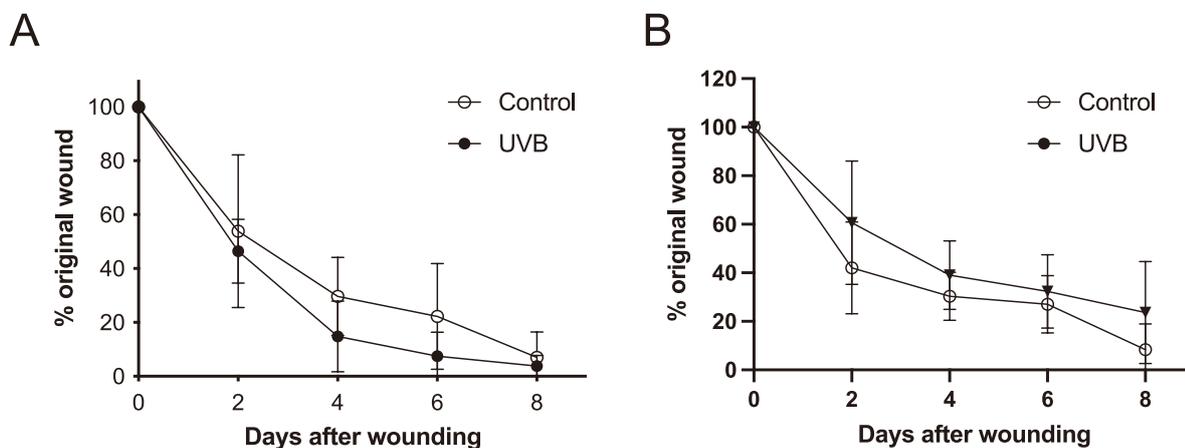


図2 紫外線照射のタイミングと創傷治癒促進作用
(A) 紫外線照射6日後に傷を作成 (B) 紫外線照射直後に傷を作成

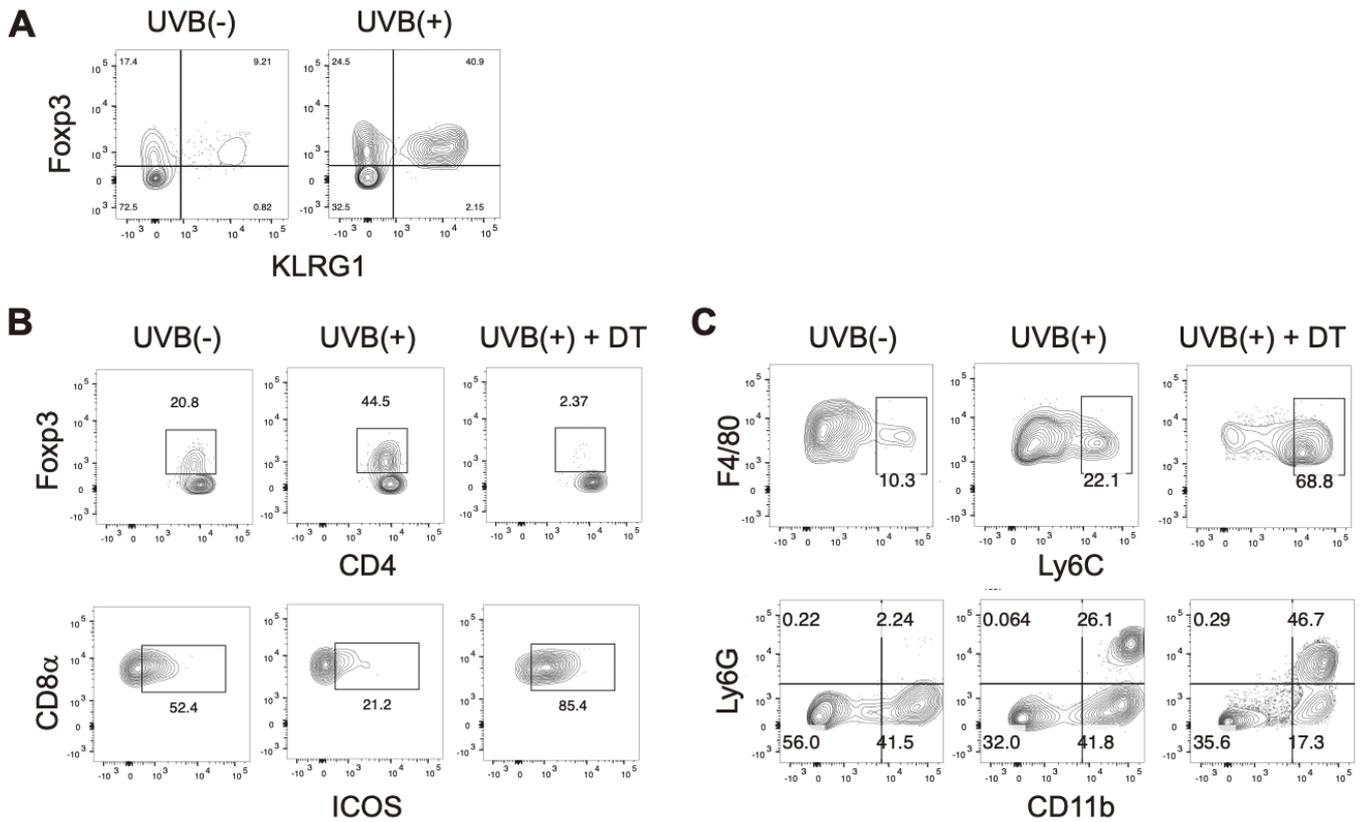


図3 創傷部位の免疫細胞

(A) Fxp3 陽性 Treg、(B) Fxp3 陽性 Treg (上段)および CD8 陽性 T 細胞 (下段)、(C) Ly6 陽性マクロファージ (上段)および好中球 (下段)

果が見られなかったことから、創傷治癒の促進効果を期待する場合、紫外線照射のタイミングは極めて重要であることが示唆された。炎症性サイトカインの産生は、炎症期を持続させ、治癒過程を遅延させる。紫外線照射により誘導される炎症性サイトカイン遺伝子の発現は数日経過した後起こることから、創傷治癒過程の炎症期に重なって、紫外線によって急性炎症反応が高まるのが原因ではなく、傷を受ける際に Treg の集積が十分に起きていないためであると考えられた。一方、紫外線照射して6日経過後に傷を作製するモデルでは、紫外線照射により炎症性サイトカインの産生が起こると同時に Ly6C 陽性マクロファージや好中球が創傷部位で増加することから、傷の作成時に皮膚の炎症反応がすでに起こっていることになる。Treg の除去によりサイトカイン産生がさらに増強したことは、紫外線照射により増加した活性化 UVB-skin Treg は並行して誘導される炎症反応に対して抑制的に働いているものの、作用が十分ではないことを示唆する。また、CD8 陽性 T 細胞の活性化は Treg を介して抑制されていた。創傷治癒における CD8 陽性 T 細胞の役割はよくわかっていないが、IFN- γ の産生によって炎症を持続させることにより負に働くことが予想される。紫外線によるこれらの影響を取り除

くことで、UVB-skin Treg を介した治癒効果を高めることが期待できる。

日常生活を送る中で皮膚が創傷を受ける機会が多い。創傷部位を素早く修復するだけでなく、瘢痕を残さずに治癒させることに対する世間一般の関心は非常に高い。皮膚の創傷治癒は、単に皮膚機能を正常化させることだけでなく、美容面や精神状態の健全性にまで影響する点で重要である。もともとヒトは他の生物と比較して傷が治りにくいといわれるなか、創傷治癒過程を遅延なく進行させることを目指して、創傷の種類に応じた様々な治療が行われている。しかし、外用薬や湿潤療法などの効果には限界があるため、皮膚の修復メカニズムの理解に基づいて、分子レベルでの制御により、早くきれいに治す治療方法の開発が求められている。本研究は、免疫機能の制御により、治癒能力を増強する方法を見出すことを目指している。紫外線で誘導される UVB-skin Treg を介した創傷治癒の促進機序を明らかにすることにより、皮膚のバリア機能を早期に回復させることに加え、外見に影響する瘢痕の形成を抑えた治療法の開発につながる知見を得られる可能性がある。

(引用文献)

- 1) Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y. & Longaker, M. T. Wound repair and regeneration. *Nature* **453**, 314-321 (2008)
- 2) Brancato, S. K. & Albina, J. E. Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function. *Am. J. Pathol.* **178**, 19-25 (2011)
- 3) Shime, H. *et al.* Proenkephalin⁺ regulatory T cells expanded by ultraviolet B exposure maintain skin homeostasis with a healing function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 20696-20705 (2020)
- 4) Muñoz-Rojas, A. R. & Mathis, D. Tissue regulatory T cells: regulatory chameleons. *Nat. Rev. Immunol.* **21**, 597-611 (2021)
- 5) Boothby, I. C., Cohen, J. N. & Rosenblum, M. D. Regulatory T cells in skin injury: At the crossroads of tolerance and tissue repair. *Sci Immunol* **5**, (2020)
- 6) Bernard, J. J., Gallo, R. L. & Krutmann, J. Photoimmunology: how ultraviolet radiation affects the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **76**, 6591-6514 (2019)
- 7) Yamazaki, S. *et al.* Ultraviolet B-Induced Maturation of CD11b-Type Langerin- Dendritic Cells Controls the Expansion of Foxp3⁺ Regulatory T Cells in the Skin. *J. Immunol.* **200**, 119-129 (2018)
- 8) Yamazaki, S. *et al.* Homeostasis of thymus-derived Foxp3⁺ regulatory T cells is controlled by ultraviolet B exposure in the skin. *The Journal of Immunology* **193**, 5488-5497 (2014)

皮膚老化・美容に関わる生体内ヒアルロン酸代謝機構の解明

東京慈恵会医科大学病理学講座

下田 将之

Hyaluronic acid (HA) is a type of extracellular matrix (ECM) composed of linear glycosaminoglycans, which are present in tissues and body fluids and are actively involved in tissue formation and homeostasis. The mechanism of hyaluronan metabolism is of great importance in understanding the tissue microenvironment in pathological tissues. However, the landscape of the *in vivo* hyaluronan-degradation system has not yet been elucidated. In this study, we investigated the role of HYBID (HYaluronan-Binding protein Involved in hyaluronan Depolymerization) that plays a central role in hyaluronan degradation *in vivo*, and to elucidate the role of the HYBID-HA degradation system in skin and intestinal homeostasis, aging, and biological defense using *Hybid*-deficient mice. The results of this research are significant in that they may provide new insights into skin and intestinal homeostasis, aging, and biological defense, contributing to the search for new anti-aging and anti-inflammatory drugs focusing on the HYBID-HA degradation system.

1. 緒言

ヒアルロン酸 (Hyaluronic acid = HA) は、グリコサミノグリカンからなる細胞外マトリックスの一種で、組織や体液中に存在し、組織形成や恒常性維持に重要な役割を担っている。高分子量HAは皮膚、硝子体、関節滑液、軟骨組織などに高濃度で含まれており、皮膚では老化に伴うHAの合成低下および分解による低分子化がシワやたるみの形成と深く関連していることが報告されている。また、低分子化したHAは種々のシグナルカスケードを惹起して血管新生や炎症を促進することが知られていることから、皮膚組織におけるHA代謝メカニズムの解明は高齢者の皮膚健康維持・美容・老化防止において必須と考えられるものの、生体内におけるHA分解機構の詳細なメカニズムについては十分解明されていないのが現状である。

本研究テーマであるHA代謝研究は歴史が古く、ヒトではこれまでに6つのHA分解酵素(様)遺伝子(HYAL1 (hyaluronidase 1), HYAL2, HYAL3, HYAL4, HYALP1, SPAM1)が見出されている。現在までに提唱されているHA分解仮説モデルとして、CD44 (HA受容体)と2種類のHA分解酵素 (HYAL1およびHYAL2)が共同的に働くというCD44/HYAL1/HAYL2-HA分解仮説が有力であるが、CD44/HYAL2/HYAL1-HA分解系は線維芽細胞では十分機能しないほか、*Hyal1*あるいは*Hyal2*遺伝子欠損マウスでは組織での顕著なHAの蓄積が認められない

など問題点も多く、これまで生体内HA代謝系の全貌は不明であった。申請者所属の研究室では、本仮説に代わる生体内HA分解に中心的役割を果たす新規糖鎖分解酵素としてHYaluronan-Binding protein Involved in hyaluronan Depolymerization (HYBID; 別名KIAA1199)を世界に先駆けて見出し、皮膚線維芽細胞および変形性関節症の滑膜線維芽細胞でHA分解に必須であることを実証した¹⁾。さらに、代表研究者が中心となって*Hybid*遺伝子欠損マウスの開発に成功し、骨端板での高分子HA蓄積によりVEGF誘導性血管新生が抑制されることを示すとともに²⁾(図1)、ヒト変形性関節症での関節軟骨ではTNF- α で過剰発現したHYBIDが関節軟骨HA分解に関わることを証明してきた³⁾。*Hybid*遺伝子欠損マウスでの実験では、HAが海馬における神経幹細胞維持に重要であり、HA代謝異常で記憶障害が出現することも明らかにしており^{4,5)}、これらのデータはHYBIDが生体内での高分子HA分解に深く関与している可能性を示唆している。また、共同研究者の岡田ら

HYBIDは生体内のHA分解に関与し、HYBID-HA分解系は骨や脳の発達に関与する

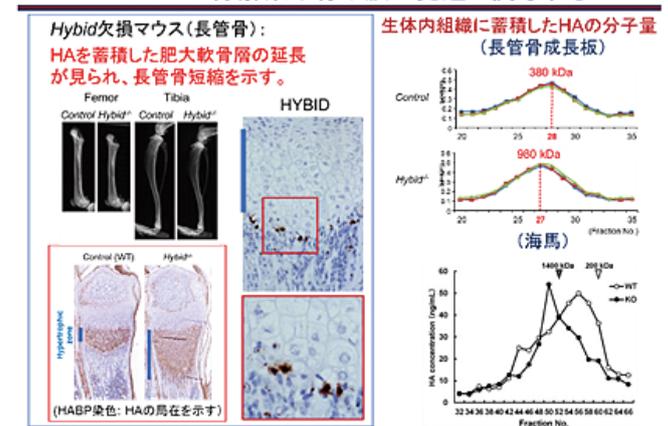


図1



Involvement of hyaluronic acid metabolism in skin aging and cosmetics

Masayuki Shimoda

Department of Pathology, The Jikei University School of Medicine

は光老化皮膚シワ形成に真皮でのHYBID発現亢進によるHA分解・減少が重要であることを示しているとともに^{6,7)}、早老症の一つであるWerner症候群の患者皮膚線維芽細胞はHYBIDを高発現し、HAを低分子化し、血中や尿中に低分子化HAが高濃度で蓄積することから^{8,9)}、HYBIDによるHA分解が皮膚を含む生体内での老化機序に深く関わっていることが推測される。

本研究では、*Hybid* 遺伝子欠損マウスを用いて、皮膚の恒常性維持・美容や老化現象に関わるHYBID-HA分解系の役割を明らかにすることを目的とする。本研究成果は、未だ十分に解明されていない皮膚の恒常性維持・美容・老化現象の理解に新知見を提供するとともに、HYBID-HA分解系に着目したこれまでとは異なるアプローチによる新しい皮膚老化防止医薬の探索、コスメトロジーの進歩・発展、さらには国民の健康維持・増進に貢献する可能性がある点で研究意義があると考えている。

2. 方法

本研究では、以下の3主要研究項目 (I)「*Hybid* 遺伝子欠損マウスを用いた加齢と皮膚表現型およびHA代謝解析」、(II)「皮膚老化におけるHYBID-HA分解系を介した皮下脂肪生成制御の解析」、(III)「HYBID-HA分解系を標的とした皮膚恒常性維持・抗皮膚老化薬の探索」を立てて、計画を遂行している。

① *Hybid* 遺伝子欠損マウスを用いた加齢と皮膚表現型およびHA代謝解析：

本項目では、幼若・高齢 *Hybid* 遺伝子欠損マウスの皮膚形状やその組織学的な形態変化を明らかにするとともに、皮膚老化に関わる各種遺伝子発現解析を行い、HYBIDと皮膚老化との関連を解析した。また、免疫染色法などを用いて、HYBID発現細胞の同定やHA沈着部局在解析を行った。また、老化では皮下組織の菲薄化や皮下脂肪の減少が見られ、たるみが生じることが知られているが、高齢 *Hybid* 遺伝子欠損マウスでの皮下組織内 HA代謝と脂肪生成との関連について解析を行った。

② HYBID-HA分解-脂肪細胞分化制御と生体防御作用機序の解析：

本項目では、野生型および *Hybid* 遺伝子欠損マウスを用いて、上皮バリア破綻をきたす黄色ブドウ球菌表皮感染モデルあるいはDSS大腸炎モデルを作製し、炎症の重症度、皮下組織あるいは粘膜下層の脂肪組織変化や上皮バリア機能等を比較・検討した。また、炎症組織中のHA量・分子量をELISAやHPLC法を用いて解析するとともに、免疫染色法やreal-time PCR法を用いて、HYBID-HA分解系による脂肪細胞分化制御と生体防御機序との関連を検討した。

③ HYBID-HA 分解系を標的とした抗皮膚老化薬の探索：

本項目では、これまで同定した数種のHYBID阻害候補物質を用いて、DSS誘導性腸炎に対する薬効を評価した。具体的には、DSS投与中の野生型マウスにHYBID阻害候補物質を持続的に経肛門投与し、体重減少の改善および腸管内HA蓄積量を比較・検討した。

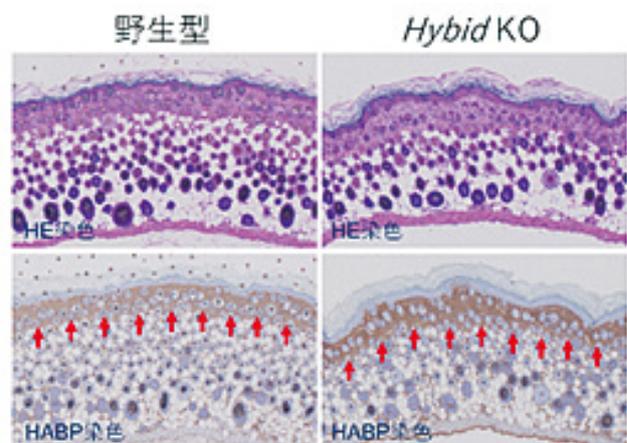
3. 結果

① *Hybid* 遺伝子欠損マウスを用いた加齢と皮膚表現型およびHA代謝解析：

生後早期の幼若 *Hybid* 遺伝子欠損マウスでは、皮膚真皮内に高分子 HA 蓄積増加が見られる(図2)。また、これまでの実験では、野生型と *Hybid* 遺伝子欠損マウスの寿命には大きな差は見られないものの、加齢に伴いマウスの皮膚形状や体重に違いが見られ、組織学的に皮下組織内 HA代謝と脂肪生成との関連を見出し、さらに研究を継続している。

② HYBID-HA分解-脂肪細胞分化制御と生体防御作用機序の解析：

野生型および *Hybid* 遺伝子欠損マウスを用いて、上皮バリア破綻をきたす黄色ブドウ球菌表皮感染モデルを用いた解析では、HYBID-HA分解系が脂肪細胞分化を制御し細菌感染防御に関わることを報告した¹⁰⁾。一方、ヒト潰瘍性大腸炎のマウスモデルであるDSS誘導性大腸炎モデルを用いた解析では、*Hybid* 遺伝子欠損マウスは野生型マウスと比較して体重減少が軽度であるとともに、生存率の改善傾向が認められた。組織学的解析では、*Hybid* 遺伝子欠損マウスにおいても大腸に潰瘍性病変が見られたものの、腸管組織内のHA蓄積量の増加や炎症細胞浸潤数に変化が



Hybid KOマウスでは、野生型マウスと比べて、真皮における高分子ヒアルロン酸沈着増加が認められる(茶色部：矢印)。

図2 幼若マウスの皮膚

認められた。また、高分子蛍光標識デキストラン (FITC-Dextran) の腸管から血中へのトランスロケーションを用いた腸管透過性評価では、*Hybid* 遺伝子欠損マウスでは DSS 投与後も上皮細胞障害および腸管バリア破綻が抑制されていることが示された。さらに、DSS 誘導性大腸炎組織およびヒト潰瘍性大腸炎手術検体を用いた組織学的な検討から、HYBID は主に間質細胞に発現していることを見出した。*Hybid* 遺伝子欠損マウスおよび野生型マウスより間質細胞を単離・培養し、ゲル濾過カラムを用いて培養上清中の HA 蓄積量・分子量を解析すると、*Hybid* 遺伝子欠損間質細胞ではより高分子量 HA が培養上清中に蓄積している傾向が認められた。以上の結果から、HYBID-HA 代謝系が大腸炎の進展に寄与している可能性が示唆された。

③HYBID-HA分解系を標的とした抗皮膚老化薬の探索:

本項目では、HYBID 阻害候補物質の DSS 誘導性腸炎に対する薬効を評価した。DSS 投与中の野生型マウスに数種の HYBID 阻害候補物質を持続的に経肛門投与し比較・検討したところ、一部の植物抽出物に関して、コントロールマウスと比べて、体重減少の改善および腸管内 HA 蓄積量の増加傾向が認められた。今後、さらに HYBID 阻害候補物質を野生型マウス皮膚に定期的に塗布後皮膚形状やその組織学的な形態変化などを解析し、皮膚のシワ・たるみ形成を抑制する予防的な抗皮膚老化医薬としての可能性を検討する予定である。

4. 考 察

HA は、グリコサミノグリカンからなる ECM の一種で、組織や体液中に存在し、組織形成や恒常性維持に深く関わっている。近年 ECM の分解産物が腫瘍進展などに関わる分子として注目されており、低分子 HA はその代表的分子として知られている。ハダカデバネズミにおいて高分子 HA は発がん抑制に関与する一方で、低分子化した HA は種々のシグナルカスケードを惹起して血管新生や炎症を促進することが知られており、生体内における HA 産生・分解は組織内微小環境を理解する上で非常に重要と考えられる。近年研究代表者所属の研究室では HA 分解に中心的役割を果たす新規糖鎖分解酵素として HYBID を同定し¹⁾、研究代表者が中心となって *Hybid* 遺伝子欠損マウスの作製に成功した。*Hybid* 遺伝子欠損マウスは外見上の大きな異常は示さないものの、長管骨の骨端板肥大軟骨層延長や記憶障害をきたし、そのメカニズムとして、HYBID が生体内での HA 代謝において中心的な役割を果たしている可能性を見出している²⁾。さらに、近年 *Hybid* 遺伝子欠損マウスを用いて、マウス変形性関節症モデルの作製・検討を行い、HYBID が関節軟骨破壊における HA 分解に関わることを証明してきた¹⁾。本研究では、高齢 *Hybid* 遺伝子欠損マウスでの皮下組織内 HA 代謝と脂肪生成との関連を見

出すとともに、上皮バリア破綻をきたす黄色ブドウ球菌表皮感染モデルを用いて、HYBID-HA 分解系が脂肪細胞分化を制御し細菌感染防御に関わることを明らかにした。また、ヒト潰瘍性大腸炎のマウスモデルである DSS 誘導性大腸炎モデルおよびヒト潰瘍性大腸炎手術検体を用いて、HYBID-HA 分解系が大腸炎進展に寄与することを見出した。腸管内脂肪組織代謝変化が大腸炎の進展や腸内細菌叢変化に影響を与えている可能性も考えられる。一部の HYBID 阻害候補物質が DSS 誘導性大腸炎マウスモデルにおける体重減少の改善および腸管内 HA 蓄積量の増加傾向を誘導することから、本物質は抗炎症性作用を有している可能性が考えられる。今後さらに詳細な解析を進めていく予定である。

現在高分子 HA は変形性関節症治療薬剤、皮膚シワ改善用注射剤などとして実用化されており、細胞外マトリックス成分の中では実用化に成功した分野である。従って、生理的・病的状態において多岐にわたる作用を発揮することが示唆される HYBID-HA 分解系機構の解明は、生理的現象のみならず、炎症や癌を含めた様々な疾患の治療や予防に役立つ可能性があると考えられる。今回見出した *in vivo* における HYBID 阻害候補物質に関しても、HA 分解に関わる炎症や老化などに対する新規創薬となりうる可能性がある。生理的・病的組織での HYBID-HA 分解機構の解明は、今後様々な分野の疾患の理解にインパクトを与え、HA 代謝制御に基づく治療法開発の基礎的データとなりうる可能性があると考えている。

5. 総 括

皮膚真皮の主要な細胞外マトリックス成分である HA は、その優れた保水性・粘弾性・膨潤性や生体適合性(安全性)の高さが注目され、化粧品だけでなく、変形性膝関節症や肩関節周囲炎の治療を目的とした関節内注射薬、内視鏡的粘膜下組織切除術時の粘膜隆起剤、白内障手術補助剤にも応用されている。また、シワの改善やリフトアップを目的とした HA 注入が美容医療分野でも広く実施されていることから、近年その知名度は老若男女を問わず高まっており、細胞外マトリックス成分の中でも大きく実用化に成功した分野といえる。しかしながら、HA の生体内での代謝機構は今なお神秘的なベールに包まれており、基本的な HA の分解を担う分子実体すら十分に明らかにされていないのが現状である。近年申請者が明らかにした HYBID が司る新規の生体内ヒアルロン酸分解機構はこれまで立ち遅れていた HA 分解研究の急展開を引き起こす可能性が十分に考えられる。従って、我々が独自に解析を進めている HYBID-HA 分解機構解明は HA 研究分野で注目されているきわめて重要な課題であり、阻害剤探索・開発研究はなお挑戦的研究ではあるが、成功すれば基礎・臨床医学研究に留まら

ず、コスメトロジーへのインパクトも大きいと考えられる。また、生理的・病的状態において多岐にわたる作用を発揮することが示唆されるHYBID-HA分解系機構の解明は、皮膚の健康維持・老化防止のみならず、生活習慣に関連した癌、関節疾患、神経疾患などの様々な疾患の治療や予防に役立つ可能性があると考えられる。今回の研究において、一部の植物抽出物が腸炎におけるHA代謝を制御する可能性を見出したことから、今後皮膚老化を予防する新規医薬となりうるかについても検証を行い、皮膚のシワ・たるみ形成を抑制しうる新たな抗皮膚老化薬・化粧品としての可能性を検討したいと考えている。

(引用文献)

- 1) Yoshida H, Nagaoka A, Kusaka-Kikushima A, et al. KIAA1199, a deafness gene of unknown function, is a new hyaluronan binding protein involved in hyaluronan depolymerization. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 612-617, 2013.
- 2) Shimoda M, Yoshida H, Mizuno S, et al. Hyaluronan binding protein involved in hyaluronan depolymerization controls endochondral ossification through hyaluronan metabolism. *Am J Pathol* 187:1162-1176, 2017.
- 3) Shimizu H, Shimoda M, Mochizuki S, et al. Hyaluronan-binding protein involved in hyaluronan depolymerization is up-regulated and involved in hyaluronan degradation in human osteoarthritic cartilage. *Am J Pathol* 188:2109-2119, 2018.
- 4) Yoshino Y, Ishisaka M, Tsuruma K, Shimazawa M, Yoshida H, Inoue S, Shimoda M, Okada Y, Hara H. Distribution and function of hyaluronan binding protein involved in hyaluronan depolymerization (HYBID, KIAA1199) in the mouse central nervous system. *Neuroscience* 347: 1-10, 2017.
- 5) Yoshino Y., Shimazawa M., Nakamura S., Inoue S., Yoshida H., Shimoda M., Okada Y., Hara H. Targeted deletion of HYBID (hyaluronan binding protein involved in hyaluronan depolymerization/KIAA1199/CEMIP) decreases dendritic spine density in the dentate gyrus through hyaluronan accumulation. *Biochem Biophys Res Commun* 503: 1934-1940, 2018.
- 6) Yoshida H, Nagaoka A, Komiya A, Aoki M, Nakamura S, Morikawa T, Ohtsuki R, Sayo T, Okada Y, Takahashi Y. Reduction of hyaluronan and increased expression of HYBID (alias CEMIP and KIAA1199) correlate with clinical symptoms in photoaged skin. *Br J Dermatol* 179: 136-144, 2018.
- 7) Yoshida H., Komiya A., Ohtsuki R., Kusaka-Kikushima A., Sakai S., Kawabata K., Kobayashi M., Nakamura S., Nagaoka A., Sayo T., et al. Relationship of hyaluronan and HYBID (KIAA1199) expression with roughness parameters of photoaged skin in Caucasian women. *Skin Res Technol* 24: 562-569, 2018.
- 8) Michishita E, Garcés G, Barrett JC, Horikawa I. Up-regulation of the KIAA1199 gene is associated with cellular mortality. *Cancer Lett* 239: 71-77, 2006.
- 9) T Nakamura, et al., Hyaluronate synthesized by cultured skin fibroblasts derived from patients with Werner's syndrome. *Biochim Biophys Acta* 1139, 84-90, 1992.
- 10) Dokoshi T, Zhang LJ, Li F, Nakatsuji T, et al. Hyaluronan degradation by cemip regulates host defense against staphylococcus aureus skin infection. *Cell Rep* 30:61-68.e4, 2020.
- 11) Momoeda M, de Vega S, Kaneko H, et al. Deletion of hyaluronan-binding protein involved in hyaluronan depolymerization (HYBID) results in attenuation of osteoarthritis in mice. *Am J Pathol* 191: 1986-1998, 2021.

ヒアルロン酸とデスモソームタンパクとの新規結合が皮膚機能に及ぼす影響の解明

大阪公立大学医学研究科病態生理学

高杉 征樹

Hyaluronan (HA), a linear polysaccharide and a major component of the extracellular matrix, plays a role in supporting tissue structure and regulating cellular signaling pathways depending on its size. Here, we identified proteins that are associated with HA in the extracellular space and found that desmosome proteins, especially desmoplakin, were associated with HA. Our results suggest that HA is associated with desmoplakin in the blood, where HA is partially degraded. However, although such low molecular weight (LMW) HA is considered to be pro-inflammatory based on many *in vitro* studies, mouse transplanted with LMW-HA-releasing capsule did not show any differences in the transcriptome of liver, kidney, and spleen after 1 week of transplantation. In order to reveal the role of association between HA and desmoplakin, we need to understand the function of LMW HA and thus we generated transgenic mouse that has extra copy of hyaluronan synthase 2 (HAS2) gene. Long-term evaluation of this transgenic mouse will lead to understanding of the function of LMW-HA in the blood, and will ultimately allow us to investigate the role of association of hyaluronan and desmoplakin.

1. 緒言

ヒアルロン酸 (Hyaluronan : HA) は直鎖状のグリコサミノグリカンで細胞外マトリックスの主要な構成要素の一つであり、高分子ポリマーとして主に皮膚・筋肉・支持組織中に存在している。これらの高分子HAは高い保水作用を有し構造的な役割を果たすだけでなく、CD44などの受容体との結合により制御されるシグナル伝達を介して様々な細胞機能を調節している。HAは肌に弾力を与える成分として、既に化粧品や美容品に広く用いられている物質であり、その保水作用に留まらない複雑な生理作用が詳細に解明されればHAの利用を最適化し、これを含む化粧品や美容品の改善に繋げていく事が可能となる。重要な事に、HAが細胞に及ぼす機能はそのポリマー長(分子量)に大きく依存する。

しかし、ヒアルロン酸の大きさを規定するのは、単一のヒアルロン酸分子のポリマー長だけではない事が近年明らかになりつつある。生体内の細胞外マトリックス中のHAはタンパク質による架橋を受ける場合があり¹⁾、したがってHAとタンパクの相互作用を包括的に捉える事がHAの生体機能を正しく理解する上で重要である。我々は細胞培養上清においてHAと結合する細胞外マトリックス成分を質量分析により初めて網羅的に解析し、デスモソーム構成因子、特にデスモブラキンを強くHAと結びついている事を見出した。興味深い事にデスモソームは接着斑とも呼ば

れ、表皮の細胞接着に重要な役割を果たし、HA同様皮膚中に多く存在している事が知られている。細胞内においてデスモブラキンはデスモコリンやデスモグレインといった細胞接着分子と中間径フィラメントを結びつける役割を果たしている。このようにデスモブラキンは主には細胞内で機能すると考えられているものの、一方で意義は不明ながらデスモブラキンは細胞外マトリックス中にも存在する事が確認されている²⁾。細胞外に放出されたデスモブラキンは多量体化する場合、デスモブラキンを介してHAが架橋され、その事によってHAの大きさが変化し機能にまで変化が生じる可能性が考えられる。また基本的に細胞内に存在するデスモブラキンは一部細胞外にも存在しているように、通常細胞外に存在するヒアルロン酸についても一部細胞内に存在している事が報告されている³⁾。したがって、細胞内におけるHAとデスモブラキンのデスモソーム構成タンパクとの結合がデスモソームの形成や機能に影響を及ぼしている可能性も考えられる。そこで本研究では細胞外マトリックスにおけるタンパク質との相互作用に基づくHAの機能調節の実態、および細胞内のHAの意義を明らかにし、それらの皮膚機能との関係を解明する事を目指した。

2. 方法

2.1. HEK293T細胞の培養とトランスフェクション

HEK293T細胞はATCCより入手し、10% FBSを含むDMEMの中で37℃、5% CO₂の条件下で培養を行った。デスモブラキン発現ベクターは、HEK293T細胞よりKOD FX DNAポリメラーゼ (TOYOBO) を用いてクローニングしたデスモブラキン遺伝子をIn Fusion kit (Takara) によってpEF vectorに組み込んだものを使用した。pEF-3xFLAG-デスモブラキンはPEI-Maxを用いてHEK293Tにトランスフェクションし、トランスフェクション後48~72



Investigation of the role of association of hyaluronan and desmosome proteins on skin function

Masaki Takasugi

Department of Pathophysiology, Osaka Metropolitan University Graduate School of Medicine

時間の細胞をスクレーパーで剥がして1% Triton bufferに溶解して細胞ライセートを調製した。

2. 2. ELISAによるHAとデスモプラキンの結合の解析

マルチソープ 96 ウェルプレートに10mg/ml、100μlのLMW-HAまたはPBSを分注し、16時間静置しコーティングを行った。0.02% TBSTで1回洗浄後、2% milk/2% Triton-X100 100μLを加え4℃で16時間ブロッキングを行った。pEF-3xFLAG-デスモプラキンをトランスフェクションしたHEK 293Tをスクレーパーで剥がして2% tritoni bufferに溶解したライセート(タンパク質濃度0.13mg/ml)にHRP-conjugated anti-FLAG antibody (SIGMA)を1:1000倍希釈で添加し4℃で16時間反応させたものをサンプルとし、これをブロッキング液を除いた96ウェルプレートに100μl加えた。4℃で2時間反応させ、2% Triton bufferで4回洗浄を行ったのち、ECL mixture 100μlを加え、発光を計測した。

3. 結果

ヒトの皮膚の中でヒアルロン酸が細胞外マトリックス中でどのようなタンパク質と相互作用しているのかを明らかにするため、まず広範に使われる細胞株である正常ヒト線維芽細胞IMR90を通常のEMEM培地中で培養し、そこにビオチン標識したHAを加えて24時間培養を続けた後、培地中でビオチン標識HAに結合しているタンパク質を回収・同定する事を試みた。培地中のビオチン標識HAとそれに付随するタンパク質はストレプトアビジン標識マグネットビーズとマグネットスタンドを用いた沈降法によって回収し、回収されたタンパク質は質量分析によって同定した。コントロールとしてビオチン標識HAでなく同量のビオチンのみを加えて実験を行った結果、コントロールで検出されずビオチン標識HAを用いた場合にのみ検出される

タンパク質を10種類同定した。最もHAとの結合量が多い(質量分析で多く検出された)タンパク質はデスモソームの重要な構成因子であるデスモプラキン (DESP)であり、驚いた事に同定した10種類のタンパク質中4種類のタンパク質がデスモソームの構成因子であった(DESP、PLAK、DSC1、DSG1)。HAとの結合量が2番目に多いタンパク質は既にHAと結合する事が報告されているITIH2であった事から、本実験はHAと結合するタンパク質を確かに回収する事ができていると考えられる。したがってこれらの結果から細胞外マトリックスにおいてHAがデスモソーム構成タンパク質、特にデスモプラキンと相互作用している事が強く示唆された(図1A、B)。デスモソームは細胞内において他のデスモソーム構成タンパクとの結合を介して局所に集積する事が知られており、同様な集合・多量体化が細胞外でも起こっているとすれば、そこに結合するHAも架橋されるものと予想される(図1C)。

しかしながら、1回の質量分析の結果だけでは、実験者の手指上にも多く存在し実験環境におけるコンタミネーションのリスクが比較的大きいと考えられるデスモプラキンが本当にHAと結合しているかどうかを結論する事はできないと考えられた。そこでデスモプラキンとHAとの結合を裏付けるため、HEK 293T細胞にデスモプラキン発現プラスミドをトランスフェクションしデスモプラキンを一過的に過剰発現させ、そのライセートをビオチン標識HAと混合した後、ビオチン標識HAとそれに結合するタンパク質をストレプトアビジン標識マグネットビーズとマグネットスタンドを用いて回収した。回収されたタンパク質をウェスタンブロットにより解析したところ、デスモプラキンが回収されている事が確認され(図2A)、したがって質量分析の結果を裏付ける事ができた。次に、両者の結合がHAに付加したビオチンに由来する実験的アーティファクトでない事を確認するために、ストレプトアビジンビーズ

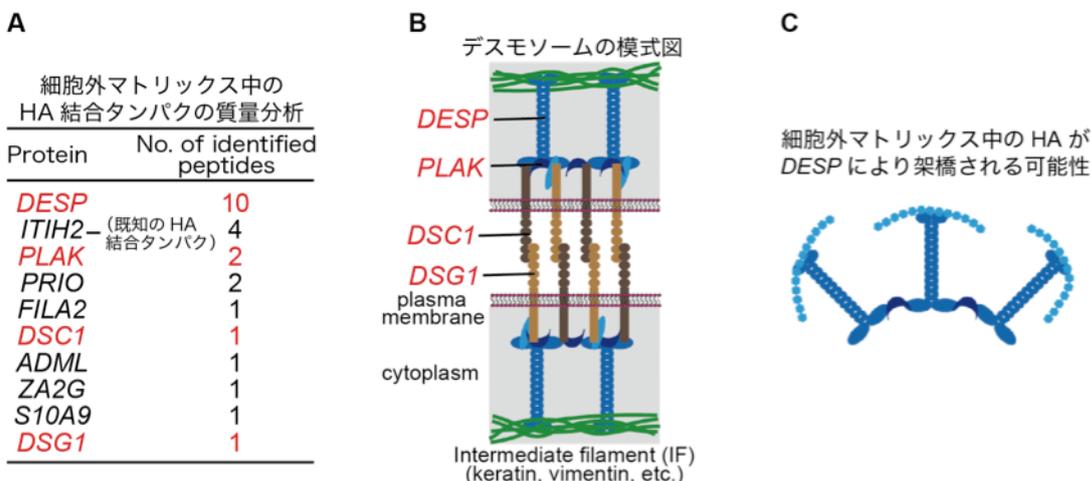


図1 HAと細胞外マトリックスタンパクとの結合

を用いた共沈降実験はなく、プラスチックプレートに無標識のHAを吸着させ、そこにデスモプラキンを過剰発現させたHEK293T細胞のライセートを反応させた。プレート上のHAにトラップされたデスモプラキンの量をELISAにより調べたところ、無標識のHAであってもデスモプラキンと結合をする事が確認できた(図2B)。最後に、デスモプラキンがどのようにして細胞外マトリックスに現れるのかを調べるため、最初に実験に用いたIMR90の遺伝子発現プロファイルをRNA-Seqにより確認したところ、そもそもこの細胞は全くデスモプラキンを発現していない事が分かった。実は、培養上清中のデスモプラキンはFBS由来のものであり、マウスの血清にも同様に多量のデスモプラキンが含まれている事が確認できた。実はヒトにおいても、腸で発現するデスモプラキンが血中に流れ込む事が過去に報告されている⁴⁾。したがって、HAとデスモプラキンの結合はデスモソーム中のデスモプラキンが豊富な皮膚など一部の組織に限局して起こっているのではなく、血管の通う全身の組織で起こっているものである事が考えられた。血中のHAは基本的に組織中で生産されたHAが部分的に分解されて生じた比較的小分子の小さいものである事が知られており、そのような分子量の小さなHAはしばしば細胞に対して炎症応答を促進させる作用を発揮する事が報告されている。そこで、血中の小分子HAとデスモプラキンとの相互作用の生理的意義を探るにあたり、まずは血中小分子HAそのものが生体に及ぼしている影響を評価する事とした。この事を目的として、内容物を徐放する小型のAlzet浸透圧ポンプに高濃度の小分子HAを含むPBSを満たし、マウスの背部に埋め込み、1週間後に解析を行った。マウスの生体内において小分子HAを代謝する役割を担っている肝臓、腎臓、脾臓について、小分子HAを投与したマウスとPBSだけを投与したマウスそれぞれ4個体の遺伝子発現プロファイルをRNA-Seqにより比較したところ、HAの投与により血中のHAレベルは持続的に2倍程度に上昇している事が確認されたにも関わらず、統計

的に有意に発現レベルが変化している遺伝子はなんと一つも認められなかった。しかしながらこの結果は必ずしも血中小分子HAとそのデスモプラキンに対する結合が無意味である事を意味していない。そこで、1週間の間だけ血中小分子HAのレベルを上昇させてその影響を見ようとするのではなく、ヒアルロン酸合成酵素HAS2をコードする遺伝子を余分に持ち、血中を含め全身でHAレベルが恒常的に上昇しているHAS2トランスジェニックマウスを大阪大学 発生工学研究会の助力を得て作出した。現在、HAS2トランスジェニックマウスの複数の組織でHAS2遺伝子の発現レベルが野生型のマウスに比べ確かに上昇している事の確認を終え、本トランスジェニックマウスを利用した実験の展開に向けて交配によりマウスを増やしている最中である。今後、本マウスが寿命を迎えるまで飼育し、老化、寿命、その他様々な生理機能について評価を進め、まずは血中性分子HAを含むHAの生体内の機能について評価を進め、その後改めてその機能がHAとデスモプラキンとの結合によってどのように影響されるかを調べていく事を予定している。

4. 考察

本研究を通じて、HAとデスモプラキンの結合を裏付ける事ができたという点においては一定の成功を収める事ができたと考えられるものの、デスモプラキンが主に結合していると考えられる血中小分子HAについては、それ自体の機能を十分に捉える事ができておらず、今後トランスジェニックマウスを使った多面的な評価をじっくり進めていく必要があり、その結果HAとデスモプラキンの結合が持つ生理機能の解明という本研究の最終目標については、目標に向けて進み続ける事はできているものの、その都度ゴールポストが遠のくといった具合で、まだまだ時間がかかってしまうものと思われる。とはいえ、細胞外マトリックス中のデスモプラキンの由来が血中由来であったことは、HAとデスモプラキンの相互作用が皮膚に限らず全身性に

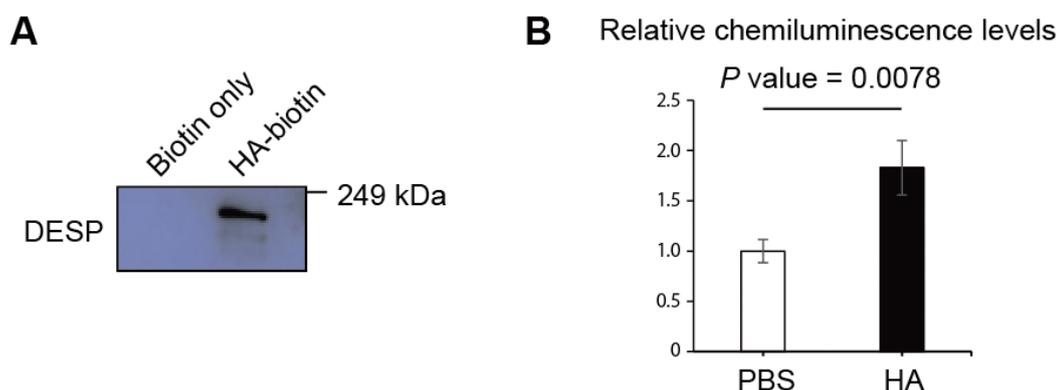


図2

起こりうる事を意味するものであり、本研究の波及効果を高めるものであると考えられる事から、予想外の遅延を生じているとはいえ、研究の有益性が損なわれているという訳ではないと考えられる。また血中小分子HAのレベルはヒトでもマウスでも加齢に伴い大幅に増加していく事が知られており、少なくとも *in vitro* では小分子HAの炎症促進作用が多く研究室で確認されている事から、血中小分子HAの生体内における機能と、それが血中小分子HAとデスモプラキンの結合によってどう調節されるかを明らかにする事ができれば、高齢化社会が進む中で重要性が高まりつつある抗加齢医学の発展にも寄与できる可能性が考えられる。今後HAS2トランスジェニックマウスを用い血中小分子HAレベルが長期にわたって上昇した場合にマウスに生じる影響を明らかにし、それに基づいて血中小分子HAの機能がデスモプラキンの結合によりどのように影響されるかを評価していく。

5. 総括

本研究を通じて細胞外のHAが同定しているタンパク質を明らかにし、HAが特にデスモプラキンを始めとするデスモソーム構成タンパクと結合している事が複数の実験から裏付けられた。当初の予定と異なりHAとデスモプラキンの結合は皮膚などの局所ではなく主に血中で起こっている事が示され、当研究の波及効果の高さが示唆された。しかしながら、血中小分子HAは *in vitro* の実験からは炎症促進作用が示されているものの、そのレベルを生体内で1

週間にわたり2倍程度まで高めただけでは、肝臓や腎臓、脾臓の遺伝子発現プロファイルには影響が認められず、したがって血中小分子HA自体がそもそも生体内でどのような働きをしているのかが不明なままで、現状血中小分子HAにデスモプラキンが結合する事の意義を問えずにいる。しかしながらその解明に向けて既にHAS2トランスジェニックマウスを作成しており、今後このマウスを用いてまずは長期の血中小分子HAレベルの上昇がもたらす影響を解明し、次いでその影響がHAとデスモプラキンの結合によってどのように調節されるかを明らかにしていく予定である。

(引用文献)

- 1) Lesley *et al.* TSG-6 modulates the interaction between hyaluronan and cell surface CD44. *J Biol Chem* 279, 25745-54 (2004)
- 2) Schiller *et al.* Time- and compartment-resolved proteome profiling of the extracellular niche in lung injury and repair. *Mol Syst Biol* 11, 819 (2015)
- 3) Skandalis *et al.* Intracellular hyaluronan: Importance for cellular functions. *Semin Cancer Biol* 62, 20-30 (2020)
- 4) Yau *et al.* Serological Epithelial Component Proteins Identify Intestinal Complications in Crohn's Disease. *Mol Cell Proteomics* 16 (7), 1244-57 (2017)

脂肪細胞移植治療応用に資する脂肪細胞多様性の単一細胞解析とエピジェネティクス制御を介した脂肪細胞機能調整法の開発

千葉大学大学院医学研究院分子病態解析学

田中 知明

With the advent of single cell analysis, it has become possible to understand the characteristics of diverse cell populations and differences in molecular biological properties of individual cells in an integrated manner, which could not be captured by conventional bulk analysis. On the other hand, we have studied the mechanisms of adipocyte aging, functional and epigenetic regulation through bulk NGS analysis of human adipose tissue, with the aim of applying our findings to the development of innovative therapeutic methods for adipose transplantation. Indeed, we have also shown that fractionation of undifferentiated mesenchymal cells, including adipocyte progenitors, in adipose tissue by a ceiling culture method may lead to improved transplantation rates, and that differences in epigenetics including CpG DNA methylation and H3K4me3 in *PPARG* promoter have been shown to produce differences in cellular function and adipogenic differentiation potential. However, tissue-derived cell populations showed greater diversity than expected, limiting previous bulk analysis alone. Here, we performed FACS and single-cell RNA sequencing analysis (scRNA-seq) of human subcutaneous adipose tissue to investigate the cellular lineage diversity of and their molecular basis. FACS analysis identified $DPP4^+/CD34^+$ fractions, a progenitor marker of adipocytes, and that of the total number of adipocytes, 74.9% were detected. UMAP by scRNAseq classified adipose tissue into nine clusters. The $CD34^+/PDGFRA/B^+$ mesenchymal cell population, including adipocytes, was classified into four subclusters, one of which was the $DPP4^+$ adipocyte progenitor. Gene Ontology analysis with differentially expressed genes, specifically expressed in each cluster, demonstrated that the differences in each cluster characteristics were enriched while having commonality as mesenchymal cells. Thus, these results indicate that scRNA-seq using human adipose tissue can reveal the cellular diversity and molecular biological characteristics of subcutaneous adipose tissue-derived cells, and that detailed analysis of the diverse subclusters may detect the underlying molecular mechanisms that regulate differentiation induction efficiency.

1. 緒言

脂肪組織を含めて生体組織には多種多様な細胞が存在する。それらは、発生分化プロセスを通じて、異なる系譜と機能を持って組織や臓器を構築することで、生体を生命体たらしめている。また、細胞内外からのシグナルや環境変化に応答して、相互反応や細胞間コミュニケーションを介して生命活動を営む。「シングルセル解析」は、これまでの1細胞レベルでの解析を大きく飛び越えて、分子生物学的なオミクス研究を1細胞レベルで、かつ、多様な細胞集団の視点で統合的に捉えようとするものである。

一方、我々は脂肪移植の革新的治療法開発への応用を目指すため、ヒト脂肪組織のbulk NGS解析を通じて、脂肪細胞の老化や機能制御、エピジェネティクス制御機構の研究を推進してきた。そして、脂肪組織中の未分化な間葉系細胞 (adipocyte progenitorを含む) を天井培養法により分画したり、深層と浅層に分けることで、より脂肪分化能の高い細胞群を抽出し、脂肪細胞の移植率向上につながる可

能性を示してきた^{1,2)}。さらに、そのメカニズムとして、PPARG promoterにおけるCpGのDNAメチル化やH3K4me3などのエピジェネティクスの違いが細胞機能差と脂肪分化誘導能の差異を生み出していることを明らかにした^{1,2)}。しかしながら、天井培養の分画でも個々の細胞には大きな多様性が認められ、これまでのbulk RNA-seqやbulk ChIP-seqのNGS解析だけでは、分化効率・成熟度を飛躍的に向上させるには限界があった。そこで、本研究では、ヒト脂肪組織を用いたシングルセル解析 (single cell RNA-seq) を行い、皮下脂肪組織由来細胞の細胞起源と系譜の多様性と分子基盤を明らかにすることとした。これらの知見を通して、従来の方法ではなしえなかった脂肪細胞移植治療の向上効果 (分化能・生着) に資する新たな脂肪細胞機能調整法の開発に発展させることを目指す。

2. 方法

対象は、千葉大学医学部附属病院形成外科において、手術にて摘出したヒト腹部皮下脂肪組織検体 (女性)。これまでの既報のプロトコール^{1,2)}を用いて、コラゲナーゼ処理を行いFACSによる細胞表面マーカーのプロファイリングを施行した。また、遠心分離後に、天井培養 (ccdPA) を行い、分化誘導にてin vitroでの分化誘導のシステムを構築した。分化の評価はoil-redO染色を用いた。ヒト脂肪組織を用いたシングルセル解析の条件検討として、Chromium Controllerを用いて、scRNAseq解析を施行した。データ



Single cell analysis of adipocyte diversity for therapeutic application of adipocyte transplantation and development of methods to regulate adipocyte function through epigenetic regulation

Tomoaki Tanaka

Department of Molecular Diagnosis, Chiba University Graduate School of Medicine

解析は、R package Seurat2を用いた。

3. 結果

ヒト皮下脂肪組織を用いて、FACS解析を行った(図1)。CD45-の非血球細胞をgatingして、血管内皮はtriple positive (CD31+CD34+CD146+)を指標に、mural cellsはCD146 single positive (CD31-CD34-CD146+)、adipocyte progenitorはCD34 single positive (CD31-CD34+CD146-)で検出した。比較的最近用いられるようになった脂肪細胞のprogenitor markerであるDPP4が、CD34 single positive fractionのうち、74.9%に検出された。

次に、ヒト脂肪組織を用いたscRNA-seq解析を行った。約2万細胞の生存細胞を採取し、エマルジョン作成を施行した。今回、エマルジョンクログにより、解析対象細胞数の減少を生じた。ライブラリー作成を実施し、シーケンスした後に、

シングルセルのvalidationを行った。その結果、nFeature_RNA、nCount_RNA、percent mitochondriaは比較的良好的な分布パターンを示した(図2A)。そこで、QC cutoff値を、 $200 < nFeature_RNA < 2500$ 、 $percent\ mitochondria < 4$ に設定し、合計1606細胞を解析細胞数とした。

UMAPによるクラスター分類では、9つのクラスターに分類された(図2B)。また、各種クラスターの発現変動遺伝子解析では、血管内皮マーカであるPECAM1(CD31)やCDH5、組織マクロファージマーカであるCD68やCD14・CD163、脂肪細胞を含む間葉系細胞のマーカであるCD34やPDGFRA・PDGFRBが検出された。そこで、Find all markerを用いて各クラスターに特異的に発現する遺伝子DEGs(differentially expressed genes)を抽出してHeat mapを作成した(図2C)。これらは、各クラスター特性を反映する遺伝子シグニチャーを示している。

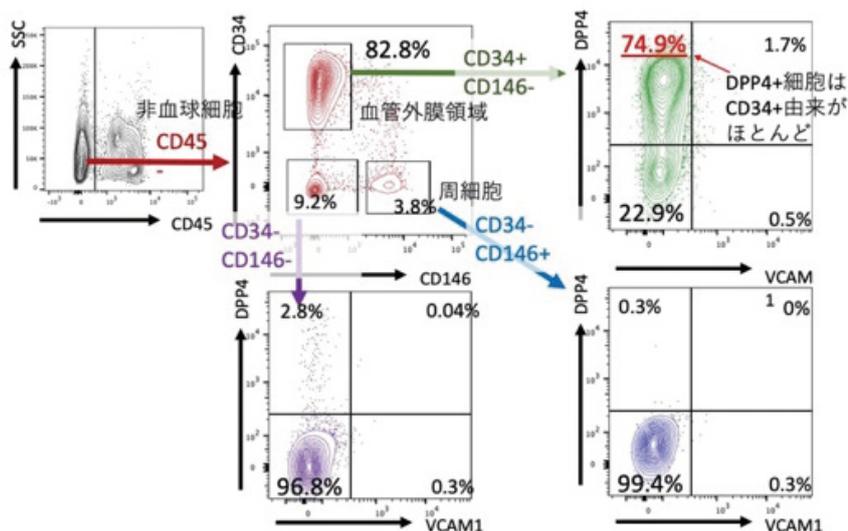


図1 ヒト脂肪組織のFACS解析

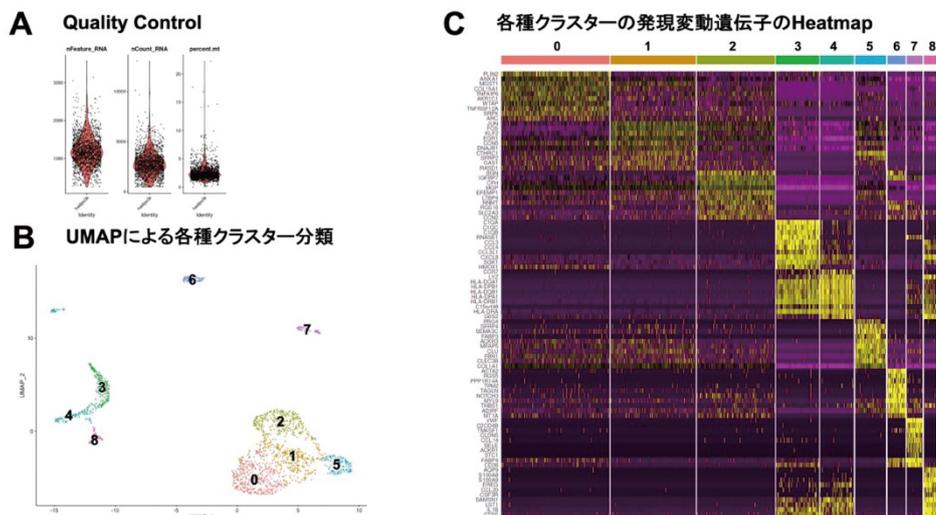


図2 ヒト脂肪組織のsingle cell RNA-seq解析

次に、各クラスターにおける細胞特異的マーカーがどのように分布しているかを確認する目的で、重要な細胞マーカー16遺伝子につき、Featured plotを作成した(図3)。その結果、各種クラスターの細胞種を同定した。具体的には、クラスター7は、*PECAM1* および *CDH5* が特異的に発現しており、血管内皮(Endothelial cell)クラスターと同定した(図3左上：青の円)。クラスター3, 4, 8は、*CD68* および *CD163* 陽性であり、マクロファージ(MΦ)のクラスターと同定した(図3下：緑の円)。クラスター0, 1, 2, 5は、間葉系細胞のマーカーである *PDGFRB* および *CD34* が発現しており、脂肪細胞を含むMesenchymal cellクラスターとアノテーションした(図3の2段目パネル：赤の円)。特に重要な結果として、比較的新たな脂肪細胞のprogenitor markerである *DPP4* は、Mesenchymal cellクラスター(クラスター0, 1, 2)に隣接するクラスター5に集約していることが判明した(図3の2段目右：赤矢印)。

そこで、これらのMesenchymal cellクラスター、特に *DPP4* を発現するprogenitor様の細胞特性を明らかにする目的で、各クラスターのDEGsのtop50遺伝子に対して、Gene Ontology解析を試行した(図4)。その結果、クラスター0は、collagen-containing extracellular matrix, endoplasmic reticulum lumen, collagen trimer, extracellular matrix structural constituentなどがエンリッチしていた。クラスター1は、response to reactive oxygen species, positive

regulation of miRNA transcription, , endoplasmic reticulum lumen, collagen trimerなどがエンリッチしていた。クラスター2の特性は、collagen-containing extracellular matrix, glycosaminoglycan binding, sulfur compound binding, extracellular matrix structural constituentがエンリッチしていた。これらの結果は、Mesenchymal cellクラスターの細胞種としての共通性を示すと同時に、それぞれのクラスター特性の違いを表している。特に、より未分化な *DPP4* 陽性であるクラスター5に関しては、cell adhesion mediated by integrin, microfibrilのGOがエンリッチしていた。

4. 考察

皮下脂肪組織から採取される細胞群を用いた脂肪移植は、組織増量のみならず血管新生促進や癒痕成熟を促し組織を再構築させる優れた方法として用いられる。しかしながら、脂肪移植治療の本質的な問題点として、生着率の低さや、血管新生能や基質分解能・脂肪分化能を十分に発揮できないことなど、即ち移植細胞の多面的機能を制御できない点が挙げられる。今回のヒト脂肪組織を用いた検討において、FACSおよびscRNAseq解析から、組織を構成する多様な細胞集団とその細胞種の特定を明確に行うことが可能となった。実際に、脂肪組織中の *CD34*・*PDGFRA/B* 陽性であるMesenchymal Cell集団が、シングルセル遺伝子プロ

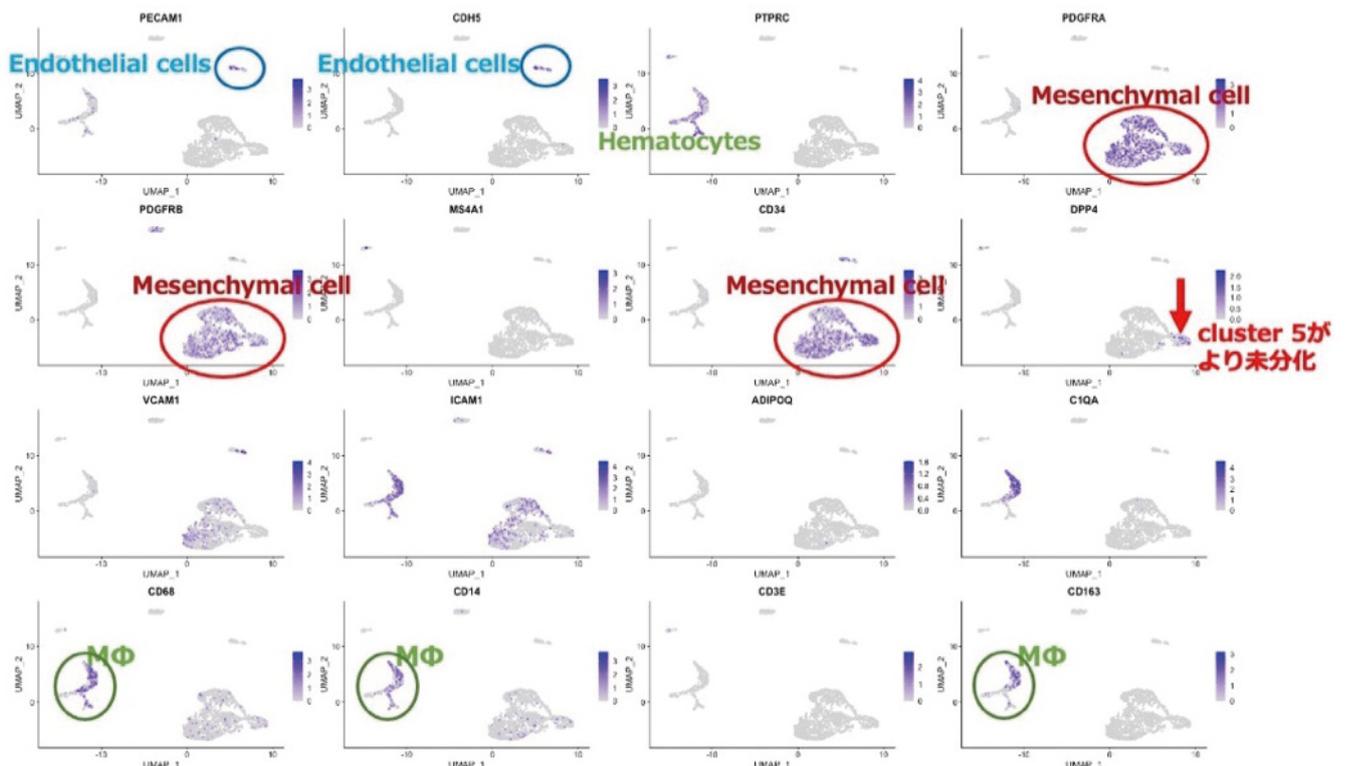


図3 ヒト脂肪組織scRNAseq解析における各種細胞マーカー発現

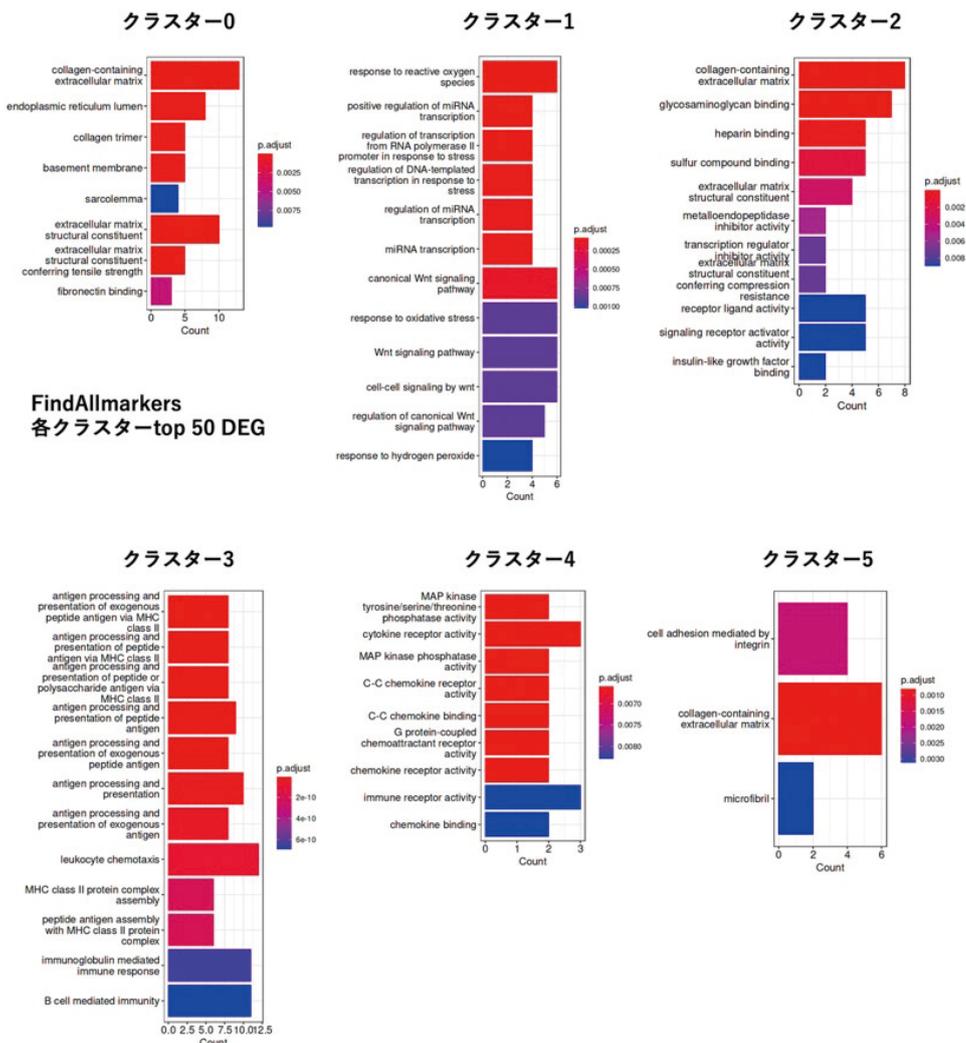


図4 GO解析を用いたMesenchymal cellクラスター特性

ファイルにより4つのサブクラスターに分類することができた。特に、adipocyte progenitorが明確に同定され、かつscRNAseqの解析基盤からその中でもDPP4+の特定のクラスターを特定できたことは、重要な結果と考えられる。最近の報告では、新規adipocyte progenitorマーカーであるDPP4発現群が多分化能を有すると規定している³⁾ものの、逆に脂肪分化効率が低いなど不確かな部分が多い。今後、幹細胞マーカーとされるCD34陽性細胞の中からDPP4陽性・陰性で分け、CD34陰性細胞と比較しながら、ChIP-sequenceとbulk ATACseqを用いてH3K4me3やH3K27me3などのエピジェネティックな状態の違いを評価することで、これらのサブクラスターごと脂肪分化能のpotencyがどのように異なるかを明らかにする必要がある。さらに、分化誘導後の脂肪定量評価とシングルセルマルチオーム解析(scRNA-seq+scATAC-seqの同時解析)を組み合わせることで、エピジェネティクスの違いがもたらすクラスターの違いをシングルセルレベルで明らかにすることができ、その結果分化効率を規定する重要なエピジェネテ

ィック領域を、シングルセル解析によるサブクラスターとして同定することができるであろう。これは、これまでのbulk解析では捉えることができなかった細胞分類であり、新たなメカニズムや治療標的の発見に繋げることができる。従って、創薬の視点からは細胞機能に直接働きかける治療標的として応用が期待できるので、研究成果はより効率的で質の高い「エピジェネティクス修飾制御による脂肪移植法開発」の基盤となることが期待できるであろう。

結論として、ヒト脂肪組織を用いたシングルセル解析(single cell RNA-seq)を行うことで、皮下脂肪組織由来細胞の細胞の多様性とその分子生物学的特性を明らかにすることができた。中でも、未分化なprogenitor様の細胞集団が含まれており、これらの多様なサブクラスターを詳細に解析することで、分化誘導効率を制御する分子基盤や分化誘導効率が低いメカニズムを検出するために役立つツールになることが明らかとなった。これらの研究成果と解析技術を基に、症例を積み重ねてさらに発展させることで、従来の方法ではなしえなかった脂肪細胞移植治療の向上効

果(分化能・生着)に資する新たな脂肪細胞機能調整法の開発につながるができる。さらに、ヒト脂肪組織の単一細胞解析データベースを構築することにより、脂肪細胞移植治療法において、いままでの懸案事項であった分化能および生着率増加を予測したり、評価することが可能となり、脂肪細胞移植治療法の生着率の術前診断やマーカー開発に応用することが期待できる。

(引用文献)

- 1) Adipose-Derived Stem Cells and Ceiling Culture-Derived Preadipocytes Cultured from Subcutaneous Fat Tissue Differ in Their Epigenetic Characteristics and Osteogenic Potential. Sasahara Y, Kubota Y, Kosaka K, Adachi N, Yamaji Y, Nagano H, Akita S, Kuroda M, Tanaka T, Bujo H, Mitsukawa N. *Plast Reconstr Surg.* 2019 Sep; 144 (3) : 644-655. doi: 10.1097/PRS.0000000000005913. PMID: 31461020
- 2) Epigenetic modifications underlie the differential adipogenic potential of preadipocytes derived from human subcutaneous fat tissue. Kubota Y, Nagano H, Kosaka K, Ogata H, Nakayama A, Yokoyama M, Murata K, Akita S, Kuriyama M, Furuyama N, Kuroda M, Tanaka T, Mitsukawa N. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2021 Sep 1;321 (3) : C596-C606. doi: 10.1152/ajpcell.00387. 2020. Epub 2021 Jul 28.
- 3) Are Perivascular Adipocyte Progenitors Mural Cells or Adventitial Fibroblasts? Guimarães-Camboa N, Evans SM. *Cell Stem Cell.* 2017 May 4;20 (5) : 587-589. doi: 10.1016/j.stem.2017.04.010. PMID: 28475883

新規変異評価システムを用いた長波長の紫外線 (UVA) による突然変異誘発機構の解明

広島大学大学院統合生命科学研究科

津田 雅貴

UVA increases the risk of human cancer. One of the mutation patterns, mainly found in cancers derived from tissues directly exposed to UVA, is attributable to misreplication of DNA damage caused by 7,8-dihydro-8-oxoguanine(8-oxoG). However, little is known the mechanism of UVA mutagenesis. I previously developed the piggyBlock system. The system employs the random integration of UV damage (CPD) into the genome of cells using the 'piggyBac' transposon-based vector assay. I measured the mutation rate in human TK6 cells at a chemically synthesized 8-oxoG and CPD integrated into genomic DNA. I transfected the piggyBlock vector carrying CPD into *wild-type*, *RAD18*^{-/-}, and *POLη*^{-/-} cells. I then selected cells with puromycin, PCR amplified nucleotide sequences over the CPD site in individual puror clones. I found that the mutation rate of *RAD18*^{-/-} cells was comparable to that of wild-type. Phenotype of *RAD18*-deficient cells is almost all normal, in rate of the bypass of CPD site, suggesting that some redundant pathways might operate the mutation induced by CPD.

Topoisomerase I (TOP1) resolves DNA topology during replication and transcription. The enzyme forms an intermediate TOP1 cleavage complex (TOP1cc) through transient TOP1-DNA-protein crosslinks. Some anticancer drugs and carcinogen freeze this reaction intermediate. However, it is not known whether UVA generates TOP1cc. Thus, I developed an assay system to estimate the TOP1cc using anti-TOP1 antibody. In future, I will analyze the TOP1cc removal mechanism using this assay system genome editing cells.

1. 緒言

紫外線はDNAに突然変異を引き起こしうる。突然変異は発がんの発生につながる。紫外線は波長により、短波長(UVC: 190-280nm)、中波長(UVB: 280-320nm)、長波長(UVA: 320-400nm)に分類される。多くの研究者が、エネルギーが高いUVCを用いて突然変異誘発機構を調べてきた¹⁾。しかし、UVCは、オゾン層や大気に吸収され地上に到達しないので、人体に突然変異を引き起こす因子とは考えにくい。一方、UVAは、ほとんどのエネルギーが地表に到達している。UVAは、透過力が大きく、ほとんどが表皮を通過し、真皮もしくは皮下組織まで到達する。しかし、UVAはエネルギーが弱いという理由から、突然変異に関して解析されてこなかった。ところが、近年、UVAが突然変異を誘発することが示された²⁾。その原因は、UVAが活性酸素種やラジカルを生成し、7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG) というDNA損傷を引き起こすからだと推定されている。本研究の目的は、新規変異評価システム(piggyBlockシステム)を用いて、8-oxoG損傷箇所の突然変異発生を引き起こすDNA合成酵素やその制御因子を見つけ出すことである。

最近、UVCによって生成するシクロブタン型ピリミジ



Elucidation of Mutagenesis Mechanism by UVA Using a Novel Mutagenesis Assay

Masataka Tsuda

Graduate School of Integrated Sciences for Life, Hiroshima University

ンダイマー (CPD) というDNA損傷箇所、PDIP38というタンパク分子が変異を促進することを、新規変異評価システム(piggyBlockシステム)とヒトゲノム編集細胞を用いて、明らかになった³⁾。piggyBlockシステムは、これまで使われていた変異評価手法と異なり、人工的に合成したDNA損傷をゲノムDNAに挿入し、ゲノム上で起こる変異の頻度(変異率)とどのような変異が起きるかを直接調べる手法である(図1)⁴⁾。piggyBlockを用いれば、UVAによって生成するDNA損傷箇所での突然変異誘発分子を見つけることが可能である。本研究では、コントロールとして、CPD損傷入りpiggyBlockも解析を行う。

DNAの複製や転写の際に生じるスーパーコイルは、トポイソメラーゼ1(TOP1)という酵素がDNAに一本鎖切断を引き起こすことで解消する⁵⁾。この反応の際に、TOP1は一過的にDNAの3'末端に共有結合する。スーパ

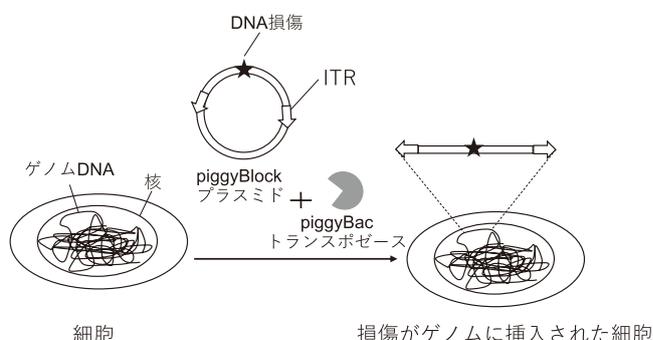


図1 piggyBlockシステムとは？

DNA損傷の両端にITRという配列を入れたプラスミドDNAを用意する。このITRの間の配列がトランスポゼースという酵素によって細胞のゲノムDNAに挿入される。DNA複製後にゲノム抽出をし、損傷箇所の塩基配列を調べ、変異率を算出できる。

ーコイルが解消されると、TOP1はDNA末端から離れ、再結合する。しかし、一部の抗がん剤や環境変異原によって、TOP1はDNA末端にトラップされてしまうことがある。このDNAとTOP1の複合体をTOP1ccという。本研究では、UVAによって発生するDNA損傷がTOP1ccを形成させるのかを検討する。

2. 方法

2.1. 細胞培養

ヒトBリンパ芽球細胞由来のTK6細胞はRPMI1640培地(富士フィルム和光純薬株式会社)に、非働化したウマ血清(Thermo Fisher Scientific)を5%、L-グルタミン(ナカライテスク株式会社)、ピリビン酸ナトリウム(Sigma-Aldrich)を0.2mg/mL、ペニシリン(ナカライテスク株式会社)を100U/mL、ストレプトマイシン(ナカライテスク株式会社)を100mg/mLになるように加え、CO₂濃度5%、37°Cで培養した。

2.2. RAD18/POL η 遺伝子欠損細胞の作製

RAD18遺伝子を破壊する為に、ターゲティングベクターとしてRAD18-HYG^RとRAD18-NEO^Rを作製した。このベクターを作製するために、ゲノムDNAを鋳型に、プライマーとして、5'-GCCAATTGGGTACCGGGCCGTTAATACAGCATAA-3'と5'-CTGGGCTCGAGGGGGGCC TTGGGCAGCGCTTC-3'を用いてレフトアームをPCR増幅した。また、5'-TGGGAAGCTTGTCGACTTAATAAATCAGGTAAAGTAAT-3'と5'-CACTAGTAGGCGCGCCTTAAAGCAACAAAATGAA-3'を用いて、ライトアームをPCR増幅した。レフトアームとライトアームは、DT-ApA/HYG^RベクターおよびDT-ApA/NEO^RのApaIサイトとAflIIにGENEART Seamless Cloningキットを用いてそれぞれ挿入した。また、RAD18遺伝子のエキソン7を標的とするgRNAを発現させるために、pX330ベクターに5'-GAGCATGGATTATCTATTC-3'をライゲーションで挿入し、CRISPR-RAD18を作製した。POL η 遺伝子欠損細胞に、2 μ gのRAD18-HYG^R、2 μ gのRAD18-PURO^R、6 μ gのCRISPR-RAD18をNEONトランスフェクションシステム(1350V, 10msec, 3pulse)で遺伝子導入した。48時間後、ピューロマイシンとハイグロマイシンを加え、細胞を96穴プレートに播いた。7~10日後に、シングルコロニーをピックアップし、候補の細胞のゲノムDNAを抽出した。標的組換えが起きているかを、ゲノミックPCRで確認した。さらに、作製した細胞から、PURO^R遺伝子を取り除くために、Cre組換え酵素を一過性発現させ、ピューロマイシン感受性の細胞を獲得した。

2.3. RAD18/POL η 遺伝子欠損細胞における紫外線損傷(CPD)箇所における変異解析

以前作製した³⁾、CPDが結合したpiggyBlockプラスミド10ngと1 μ gのTransposase発現プラスミドを同時にNEONトランスフェクションでPOL η 遺伝子欠損細胞およびPDIP38遺伝子欠損細胞に導入しに遺伝子導入した。96well plateに細胞を播き、トランスフェクション30時間後にピューロマイシンで、BPDG損傷がゲノムにインテグレーションされた細胞のみをセクションした。10日後、ピューロマイシン耐性コロニーからゲノムDNAを抽出した。

2.4. 塩化セシウム密度勾配遠心法によるゲノムDNAの精製

5.0 \times 10⁷ TK6細胞を900mLのLysisバッファー(10mMリン酸バッファー[pH7.5], 1mM EDTA, RNaseA [20mg], プロテアーゼインヒビターカクテル)で懸濁し、10分間氷上でインキュベートした。サルコシルを終濃度1%になるように添加し、30分間氷上でインキュベートした。ゲノムDNAを剪断する為に、23ゲージの針で20回、通過させ10mMリン酸バッファー[pH7.5]でサンプル全量を9mLとし、9.3gのCsClを混ぜ、694,000 \times gで17時間遠心した。遠心後、500mLずつ分取し、ゲノムDNAが含まれるフラクションを回収し、アガロースゲル電気泳動で調べ、10mMリン酸バッファー[pH7.5]、1mM EDTAが含まれたバッファーで透析した。もう一度、塩化セシウム密度勾配遠心法を行った。ゲノムDNAが含まれるフラクションを回収し、10mMリン酸バッファー[pH7.5]、1mM EDTAが含まれるバッファーで3時間透析し、これを2回行った。さらに、2M NaCl, 10mMリン酸バッファー[pH7.5]、1mM EDTAが含まれるバッファーで3時間透析し、これを2回行った。最後に、MilliQ水で3時間透析し、これを2回行った。遠心濃縮を用いてサンプルボリュームを減らした。ナノドロップを用いて、260nmの波長でDNA濃度を測定した。

2.5. ウェスタンブロットを用いたTOP1ccの検出

2.4.の方法で精製したゲノムDNAを30mg用意し、10mMのTris-HCl(pH7.6)、25mMのMgCl₂、0.5mMのCaCl₂を含むDNaseIバッファーに溶かし、全量が33mLになるように3ユニットのDNaseI(New England Biolabs)で37°C、2時間インキュベートした。サンプルをレムリサンプルバッファー(BIO-RAD)で変性させ、7.5%のSDS-PAGEゲルで分離させた。その後Trans-Blot Turbo(BIO-RAD)を用いてメンブレンに写し取り、1次抗体として、抗TOP1抗体および抗マルチユビキチン抗体を用い、HRP標識二次抗体で反応させた。ECLで化学

発光させ、ChemiDocイメージングシステムで検出した。

2. 6. スロットプロットを用いたTOP1ccの検出

2. 4. の方法で精製したゲノムDNAを2mg用意し、ECLニトロセルロースメンブレン (GE Healthcare) にスロットプロットを用いて吸着させた。ゲノムDNAを吸着したメンブレンをTrisバッファーで洗浄した。抗TOP1抗体および抗TOP1cc抗体を用いて、ウェスタンブロットと同様の方法で検出した。

3. 結果

3. 1. CPD損傷箇所における突然変異解析

CPD損傷入り piggyBlock プラスミドをPOL η /RAD18 遺伝子欠損細胞に遺伝子導入し、ピューロマイシン耐性クローンを獲得した。これらのクローンは、CPD損傷が挿入された親細胞のワトソン鎖およびクリック鎖のどちらかを受け継ぎ、クローン内でモザイク状となる。従って、このアッセイにおいて、エラーフリーのテンプレートスイッチ

チカ損傷乗り越えによる複製ブロックの解除は、区別することができる。TLSが起きるとApA (正確なTLS) か他の塩基が挿入 (不正確なTLS, 突然変異) され、ダブルピークとして検出される (図2A左)。テンプレートスイッチによる解除では、CPD損傷箇所ではGpCが挿入され、シーケンス解析ではGCのシングルピークとして検出される (図2A右)。

この原理に基づいて、TLSとテンプレートスイッチの発生頻度を調べた。POL η の遺伝子欠損により、TLSの頻度は、4.7%から11.6%に増加した (図2B)。突然変異の正体である、不正確なTLSの頻度は、0%から3.6%に増加した (図2C)。一方、RAD18 遺伝子の欠損により、TLSの頻度および不正確なTLSの頻度は野生型と同じであった。POL η /RAD18 遺伝子欠損細胞は、TLSの頻度はPOL η 遺伝子欠損細胞とほぼ同じであったが、不正確なTLS (突然変異) は5.8%に上昇した。従って、RAD18は、POL η が存在しない状況では、正確なTLSを促進する。

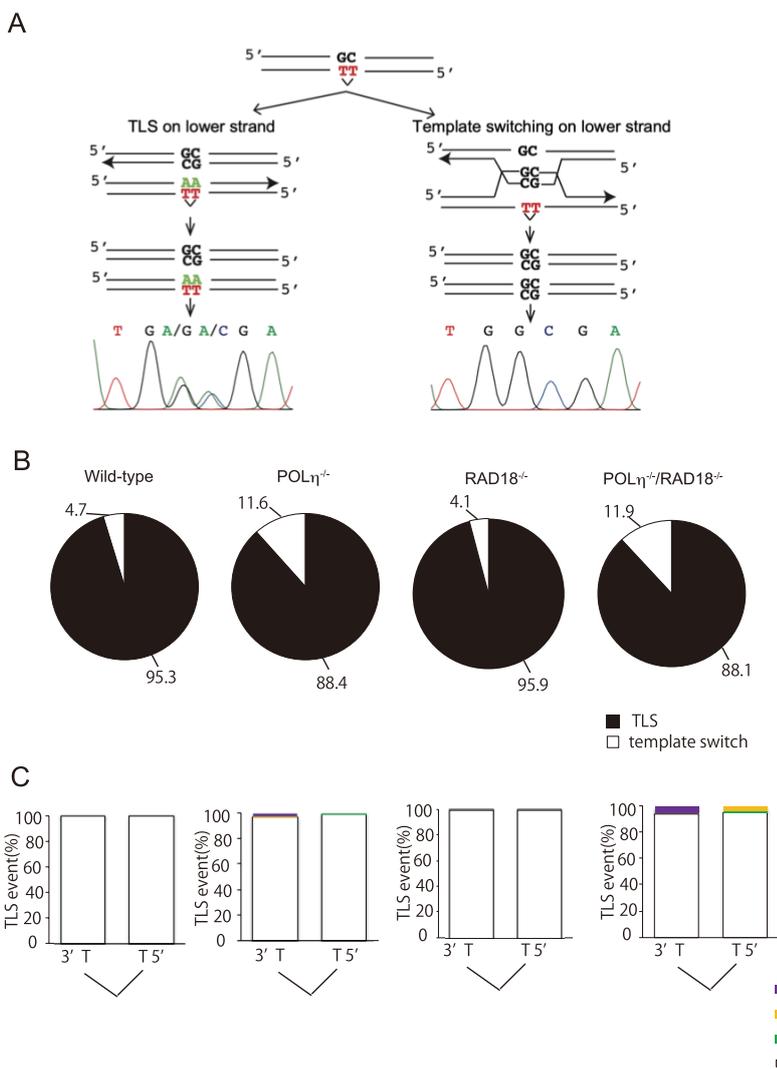


図2 piggyBlock解析の結果

3. 2. TOP1ccの定量

細胞内のTOP1ccを正確に定量するために、塩化セシウム密度勾配遠心法を2回繰り返し、細胞抽出液からDNAが結合していないTOP1とTOP1ccを分離した。その後、精製したゲノムDNAにDNaseIを添加しゲノムDNAを分解し、ウェスタンブロットでTOP1ccの検出を試みた。メンブレンに転写した後、抗TOP1抗体を用いて検出した。CPTを処理した細胞のTOP1ccは、予想されるTOP1のバンドの位置 (TOP1 = 91kDa) より高分子側に、スミアなシグナルとして検出され、このシグナルは処理したCPTの濃度依存的に強くなった (図3, 左のパネル)。TOP1ccのバンドよりも高分子側に検出されたシグナルは、翻訳後修飾が起こった可能性が高い。そこで、同じサンプルを抗マルチユビキチン抗体で調べたところ、CPTの処理濃度依存的に、ポリユビキチン化の量が増えていた (図3, 右のパネル)。CPTはTOP1のポリユビキチン化を促進することはすでに報告されている。従って、TOP1ccはCPTの処理によってポリユビキチン化を受けている可能性がある。このようにウェスタンブロットによる分析では、TOP1ccはスミアとして検出されるので、バンドの定量は難しい。そこで、DNaseIを使用せず、スロットブロットした。スタンダードのTOP1タンパク質と

2 μ gのゲノムDNAをスロットブロットし、シグナルを検出した (図4A, B)。その結果、TK6細胞にCPTを0.4、1.9、7.1mM処理した場合、それぞれ、ゲノムDNA 10⁷bpに当たりTOP1ccが102、297、469個生成していたことが分かった。細胞内にある全TOP1タンパク質の内、TOP1ccの割合を計算する為に、ウェスタンブロットを用いて細胞内の全TOP1タンパク量を求めた。CPTを0.4、1.9、7.1mM処理した細胞内の全TOP1の量はそれぞれ5.5 \times 10³細胞あたり13.5、12.7、9.3ngであった (図4)。従って、細胞内の全TOP1タンパク分子の内、TOP1cc分子の割合は、CPTを0.4、1.9、7.1mM処理した細胞でそれぞれ0.8、1.2、1.7%であった。

3. 3. TOP1cc修復の各ステップの除去動態を個々に計測する方法の確立

本研究では、エピトープの異なる2つの抗体 (抗TOP1抗体と抗TOP1cc抗体) を用いて、TOP1cc修復の各ステップの除去動態を個々に計測できると考えた。これまでの実験で用いた抗TOP1抗体は、TOP1タンパク質の表面を認識する。このエピトープはプロテアソームによるタンパク質分解を受けるので、TOP1cc修復の1段階目を評価できる。一方、抗TOP1cc抗体は、TOP1活性部位前後

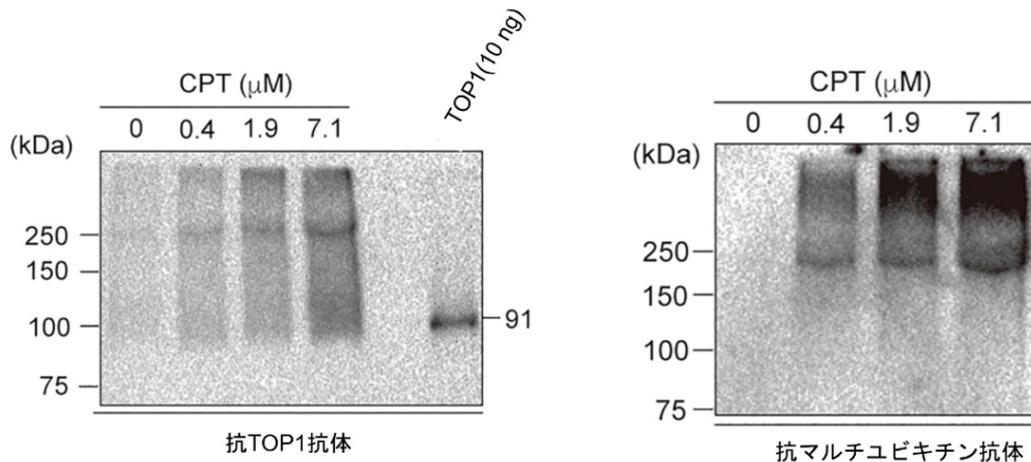


図3 CPT処理した野生型細胞のゲノムDNAを用いたウェスタンブロット解析

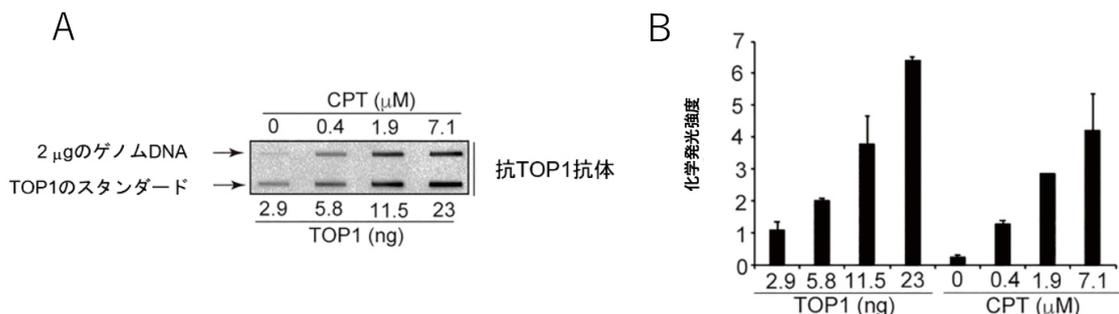


図4 CPTによって生成するTOP1ccの定量

15 アミノ酸とホスホチロシン結合を認識する抗体である⁶⁾。この抗体のエピトープは、TOP1cc修復における2段階目で除去される箇所である。従って、この抗体を用いれば2段階目の修復動態を評価できる。実際に、私は、これらの抗体が、報告されているエピトープを認識するかを検証する為に、CPTで処理した野生型細胞から精製したゲノムDNAを用いて、スロットプロットで分析した。このサンプルをプロテイナーゼK (ProK) およびV8プロテアーゼで消化し、ニトロセルロース膜にスロットプロットし、抗TOP1抗体および抗TOP1cc抗体で検出した。ProKは、脂肪族アミノ酸と芳香族アミノ酸のC末端側のペプチド結合を切断する。従って、両抗体の認識箇所は消化される。実際、いずれの抗体においてもシグナルは検出されなかった。一方、V8プロテアーゼは、アンモニウムイオン存在下でグルタミン酸のC末端側のペプチド結合を切断し、抗TOP1抗体のエピトープは消化されるが、抗TOP1cc抗体のエピトープは消化されない。実際、抗TOP1抗体ではシグナルは検出されなかったが、抗TOP1cc抗体ではシグナルが検出された。これらの結果から、抗TOP1抗体および抗TOP1cc抗体を用いて、TOP1cc修復の1段階目および2段階目を区別して除去動態を評価できることが分かった。

4. 考 察

POL η はCPD損傷箇所における正確な損傷乗り越えを行う。これは、今回行った実験結果とも一致する。野生型細胞にRAD18遺伝子を欠損させた場合、この損傷乗り越えの頻度および変異スペクトラムに変化は見られていない。しかし、POL η 遺伝子にRAD18遺伝子を欠損させた場合、不正確なTLS(突然変異)は上昇した。RAD18は、ユビキチンライゲースE3として知られており、PCNAのモノユビキチン化を引き起こす⁷⁾。このモノユビキチンにポリメラーゼ η (Pol η) がリクルートされる⁸⁾。試験管内でPol η は、紫外線損傷箇所を鋳型にDNA合成でき、正確な塩基を挿入する(例:チミン二量体を形成している場合、AAが挿入)。従って、Rad18を欠損させた場合、Pol η がリクルートされないの、紫外線損傷箇所を鋳型として正確にDNA合成できず、変異が誘発されると考えられる。本研究結果から、POL η はRAD18の有無に関わらず、紫外線損傷箇所のTLSには影響を与えないことが分かった。POL η とRAD18のどちらも存在しない時は、不正確なTLSが増加したことから、損傷乗り越えポリメラーゼであるPol ι , Pol κ , Rev1等が突然変異を誘発している可能性がある。また、TOP1ccを検出する実験系を構築することができた。今後は、UVA暴露で誘発するTOP1cc修復を、ゲノム編集細胞を用いて解析していく予定である。

謝 辞

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

(引用文献)

- 1) Ikehata H, Ono T. The mechanisms of UV mutagenesis. *J Radiat Res.* 2011;52 (2) : 115-25. Epub 2011/03/26. doi: 10.1269/jrr. 10175. PubMed PMID: 21436607.
- 2) Kucab JE, Zou X, Morganello S, Joel M, Nanda AS, Nagy E, et al. A Compendium of Mutational Signatures of Environmental Agents. *Cell.* 2019; 177 (4) : 821-36. e16. Epub 2019/04/16. doi: 10.1016/j. cell. 2019. 03. 001. PubMed PMID: 30982602; PubMed Central PMCID: PMC6506336.
- 3) Tsuda M, Ogawa S, Ooka M, Kobayashi K, Hirota K, Wakasugi M, et al. PDIP38/PolDIP2 controls the DNA damage tolerance pathways by increasing the relative usage of translesion DNA synthesis over template switching. *PLoS One.* 2019; 14 (3): e0213383. Epub 2019/03/07. doi: 10.1371/journal. pone. 0213383. PubMed PMID: 30840704; PubMed Central PMCID: PMC6402704.
- 4) Hirota K, Tsuda M, Mohiuddin, Tsurimoto T, Cohen IS, Livneh Z, et al. In vivo evidence for translesion synthesis by the replicative DNA polymerase δ . *Nucleic Acids Res.* 2016; 44 (15): 7242-50. Epub 2016/05/18. doi: 10.1093/nar/gkw439. PubMed PMID: 27185888; PubMed Central PMCID: PMC6509730.
- 5) Pommier Y, Sun Y, Huang SN, Nitiss JL. Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016; 17 (11): 703-21. Epub 2016/10/21. doi: 10. 1038/nrm. 2016. 111. PubMed PMID: 27649880; PubMed Central PMCID: PMC6509248348.
- 6) Patel AG, Flatten KS, Peterson KL, Beito TG, Schneider PA, Perkins AL, et al. Immunodetection of human topoisomerase I-DNA covalent complexes. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44 (6): 2816-26. Epub 2016/02/27. doi: 10. 1093/nar/gkw109. PubMed PMID: 26917015; PubMed Central PMCID: PMC6504824114.
- 7) Geng L, Huntoon CJ, Karnitz LM. RAD18-mediated ubiquitination of PCNA activates the Fanconi anemia DNA repair network. *J Cell Biol.* 2010; 191 (2): 249-57. Epub 2010/10/13. doi: 10.1083/jcb. 201005101. PubMed PMID: 20937699; PubMed Central PMCID:

PMCPMC2958487.

8) Watanabe K, Tateishi S, Kawasuji M, Tsurimoto T, Inoue H, Yamaizumi M. Rad18 guides poleta to replication stalling sites through physical interaction

and PCNA monoubiquitination. *Embo j.* 2004; 23(19) : 3886-96. Epub 2004/09/11. doi: 10. 1038/sj. emboj. 7600383. PubMed PMID: 15359278; PubMed Central PMCID: PMCPMC522788.

天然由来物質による claudin-1 を介した高分子送達の科学的基盤研究

筑波大学生命環境系

南雲 陽子

Tight junctions (TJ) are intercellular barriers between epithelial cells that separate the internal and external environments of cellular sheets, and control invasion of foreign substances and a diffusion of solutes and water across the epithelium. Macromolecules such as biologics with high molecular weight and hydrophilicity are unable to diffuse through the lipid bilayer of the cell membrane. Control of TJ opening by attenuating the barrier function of TJ has proved to be attractive because it could allow safe and controllable transdermal administration of macromolecules.

MA026, a cyclic depsipeptide with 14 amino acid residues, is a natural product isolated from *Pseudomonas* sp. RtIB026 as an antiviral compound. It was recently suggested that MA026 binds to claudin-1. Because claudin is the essential component of tight junction complex, we investigated the effects of MA026 on TJ and found that MA026 opens TJ of MDCK II cell monolayer, reversibly. This result suggests that MA026 is a candidate for TJ reversible opener.

Here, we report the binding specificities and activity of MA026 toward claudin-1 and other claudin family proteins revealed by several methods, and the 3-dimensional structure of MA026. Our results not only reveal the mode of action of TJ regulator MA026 with novel binding site but also are useful for transdermal administration of large hydrophilic biologics.

1. 緒言

スキンケア用品の作用には、保湿から皮膚トラブルの予防や治療など様々なものがある。特に近年では美白や肌の新陳代謝促進など、より特異的な効果を狙うものも見受けられる。そのような特異的作用を狙う場合、各種有効成分を作用対象であるメラノサイトや基底細胞が存在する基底層付近まで届ける必要がある。しかしながら、元来皮膚の最も重要な機能は水分が外に逃げるのを防ぐと同時に雑菌などの外部刺激から守るバリア機能であり、LogP値などにも依存するものの、500Da以上の分子は皮膚透過性が乏しいことが知られている¹⁾。従って有効成分が500Da以上の場合、作用部位に効率的に浸透させるための工夫が必要だと考えられる。

皮膚のバリア機能には、角質層による静的なバリアと、その下層の生細胞層(顆粒層)に存在するタイトジャンクション(TJ)による動的なバリアがあり、後者の重要性は近年ますます増加している。角質層への浸透はナノカプセル化など製剤を工夫するアプローチがとられているが、TJへのアプローチは検討例が少ない^{2,3)}。その理由の一つとして、TJへのアプローチは角質より下層へのアクセスを可能にするため、細胞障害性や異物の侵入を抑えるなど、相反する目的を満たすための慎重な研究開発が必要となる

点が挙げられる。

これまで我々は、上皮細胞層TJを可逆的に開口させる薬剤(可逆的TJ開口剤)について研究を行ってきた⁴⁻⁷⁾。可逆的TJ開口剤は、有効成分投与時のみ短時間TJを開口させ、その後、速やかに閉口させることができるため、異物の侵入を抑えつつ、有効成分の浸透を促進することが可能になると考えられる。MA026(図1A)は*Pseudomonas* sp.から単離された環状デプシペプチドである⁸⁾。抗C型肝炎ウイルス(HCV)活性を有しており、HCV感染に必要なタンパク質claudin-1の部分配列に結合する報告がなされていた⁹⁾。Claudin-1はTJの主要構成因子であり、皮膚バリア機能に不可欠なタンパク質である¹⁰⁾。そこで我々は本化合物によるTJへの影響を検討したところ、大きな細胞障害性を示すことなく、処理後約1時間で強くTJ開口を引き起こし(開口期)、その後徐々に閉口していく(閉口期)可逆的TJ開口作用を見出すことができた(図1B, C)¹¹⁾。その後、既報のMA026の構造に誤りがあることが明らかになり、構造を訂正するとともに特許を取得した^{12,13)}。本化合物の実用化のためにはMA026のターゲットの特定、標的分子への作用を介してTJを開口するというproof of conceptが必要である。そこで本研究では、1) MA026のclaudin-1を介した作用メカニズム解析、2) MA026とclaudin-1及び他のclaudin family proteinとの結合解析、3) MA026のX線結晶構造解析を行い、MA026のTJ開口活性についての分子標的・作用機構解析を目的とした。

2. 方法

2.1. FITC 4 kDa dextran 透過促進活性測定(図2)

イヌ腎臓上皮細胞MDCK IIをtranswell insert(Corning)に播種し、7日間培養し単層形成させた。Insertのapical



Scientific research on claudin-1-mediated macromolecular delivery by naturally derived compound

Yoko Nagumo

Institute of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

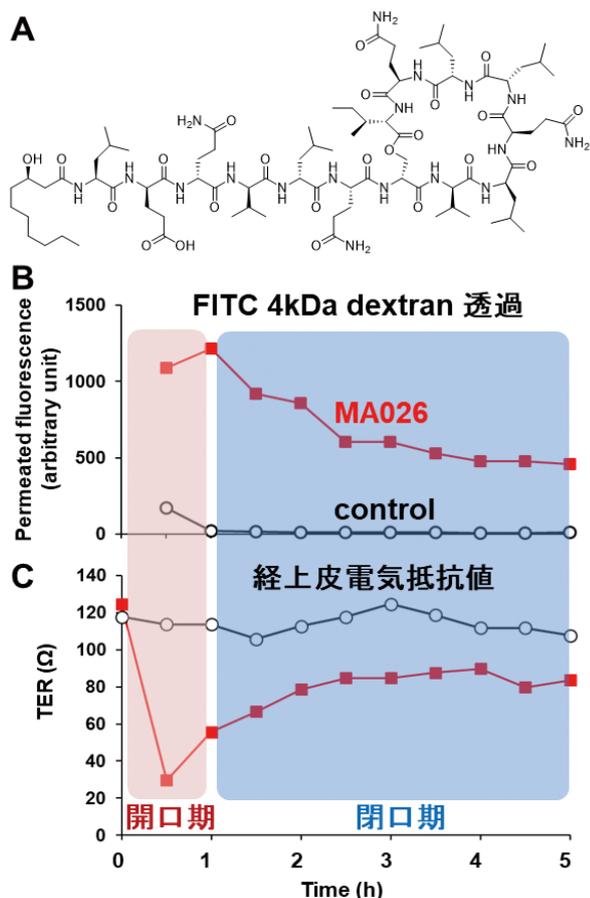


図1 MA026の構造とTJ透過促進能

(A) MA026化学構造、(B) FITC 4kDa dextran透過、(C) 経上皮電気抵抗値(TER) に対するMA026の作用。TJ開口の後、MA026を取り除かなくとも自然に閉口してることがわかる。

側にのみFITC 4kDa dextran (FD-4, Sigma) 溶液を加えたのち、MA026 やその類縁体 (3 μ M) を処理した。Insertのbasal側の溶液を経時的に回収し、その蛍光をWallac 1420 ARVO Multilabel Counter (Perkin Elmer, Ex/Em=485/528nm) で測定することで、insertを透過したFD-4を検出した。

ペプチド競合阻害実験の場合には、予めMA026 (3 μ M) とペプチド (150 μ M) を混ぜておき、その混合物を細胞に処理した。

2. 2. 蛍光染色

単層状に培養したMDCK II細胞にビオチン化MA026を処理し、ホルマリン固定した。Fluorescein avidin (A2011, Vector Laboratories) により染色し、観察はLeica AF 6000 fluorescence microscope (Leica Microsystems) により行った。

2. 3. SPR分子間相互作用解析

CM5センサーチップ (Cytiva) に claudin-1 の部分配列

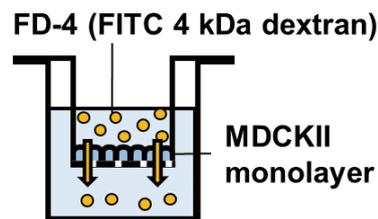


図2 Transwell を用いたFITC 4kDa dextran (FD-4) 透過促進活性測定模式図

ペプチドQCK-VFDSL-LNLSSを、lysineのアミノ基を介してアミノカップリング法により固定化した。74.5RUの固定化量を得、種々濃度のMA026をアナライトとして流しBiacore X100 (Cytiva) で解析した。

2. 4. 各種claudin安定発現細胞株作成

複数の蛍光タンパク質を融合させたヒト claudin-1 や他のヒト claudin ファミリーの遺伝子配列を pEF1 vector (Thermo Fischer Scientific) に入れたコンストラクトを作成した。MDCK II細胞に発現している claudin-1, -2, -3, -4, -7を欠損させたquin KO MDCK II細胞 (quinKO細胞、生理学研究所古瀬教授よりご供与) に対し、Fugene (Promega) を用いてトランスフェクションした。2日後よりG418 (Nacalai Tesque) による薬剤選択を10日程度行い、遺伝子導入しなかったコントロール細胞が死滅したところで、遺伝子導入細胞群を限界希釈法により96穴プレート (Iwaki) に播種した。蛍光顕微鏡観察により蛍光タンパクの発現、局在などを確認した。さらに細胞抽出液を回収し、WB法で抗 claudin-1 抗体 (Proteintech) を用いて検出することにより、蛍光タンパク質と融合した claudin-1 を検出した。

3. 結果と考察

3. 1. MA026のclaudin-1を介した作用メカニズム解析

MA026は claudin-1 の部分配列 VFDSL-L と結合することが示唆されている¹⁾。Claudinは、TJ形成に必須な膜タンパク質であり、隣接する細胞の細胞膜上で claudin 同士が集積して形成される TJ ストランドと呼ばれる紐状の細胞密着構造を形成することでバリアを形成している (図3)。VFDSL-L 相同領域を含むドメインは TJ ストランドを形成する claudin 同士の cis 結合に関与する部位と考えられているため、MA026がVFDSL-L領域に結合し、cis結合を乱すことでTJ開口させている可能性が考えられる。そこでVFDSL-Lペプチドを合成し、ペプチドによりMA026のTJ開口活性が競合阻害されるか検討した。MA026とペプチドの混合物を細胞に処理した結果、VFDSL-L配列を逆

Claudin-1 の細胞外ドメインに存在する MA026結合配列 VFDSL L 相同領域

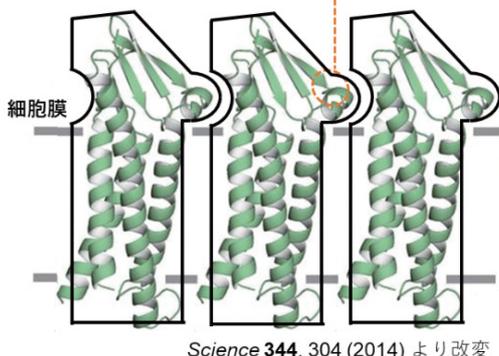


図3 Claudinストランド模式図

向きにしたLLSDFVペプチドはMA026のTJ開口活性に影響を示さなかったのに対し、VFDSL Lペプチドは1/20以下まで顕著に減少させることがわかった(学術論文作成中)。この結果はMA026がclaudin-1細胞外ドメインとの相互作用を介してTJ開口活性を示していることを示唆している。

MA026はClaudin-1のVFDSL L配列と結合し、TJストランドを形成するclaudin-1のcis結合を阻害している可能性が考えられたことから、MA026とVFDSL Lペプチドとの直接の相互作用をSPRにより検討した。VFDSL Lとその前後を含む13残基ペプチドQCK-VFDSL L-NLSSを合成し、アミノカップリング法によりCM5センサーチップに固定化した。アナライズとして種々濃度のMA026を用いて検討を行ったものの、MA026が高濃度の条件においても弱い結合しか見られず、ペプチド-低分子間の弱い相互作用であることが示唆された。MA026は可逆的にTJ開口を誘導すること、また強い相互作用で長時間結合するTJ結合物質の場合、TJを長時間開口させてしまう可能性が考えられることから、MA026とVFDSL L部位との相互作用が弱いことがTJ開口の可逆性に重要である可能性が考えられる。今後はclaudin-1を固定化しMA026をアナライズとして流し特異的結合を確認した後、VFDSL Lペプチドでの結合阻害を見る定性的な解析を考えている。

ところで、ヒトclaudinには20種類以上のファミリーが存在し、1個の細胞に複数種のclaudinが発現、細胞や臓器の特異性に関与していると考えられている。今回我々がMA026のTJ開口活性に重要であることを見出したVFDSL L配列部分は、ヒトclaudinファミリー内で保存性がさほど高くない(図4)。そこでMA026のclaudinファミリーに対する特異性を検討することにした。

各ヒトclaudinのVFDSL L相同領域ペプチドを合成し、MA026のTJ開口活性に影響を与えるか競合阻害実験に

Claudin	Protein sequence	重要機能果たす細胞・組織例
1	QCKV FDSL LNLS-SS	皮膚
2	QCDIYST LL GL-PA	
3, 4, 6, 9	QCKV YDSL LAL-PQ	4: 尿路上皮
5	QCKV YDSV LAL-ST	血液脳関門
7	SCKM YDSV LAL-SA	
8	QCKI YDSL LAL-SP	
10	NCKD FP SMLAL-DG	
11	HCKPLVD LI L-PG	血液精巣関門
12	DCLMY D TTWYS-SV	
14	QCQIVR SLL LAL-PQ	有毛細胞
15	NCWE FP SMLAL-SG	
16	TCDEY DSI LAEHPL	腎臓
17	QCKFY SLL LAL-PP	
18.1	ECRPYFT IL GL-PA	肺
18.2	ECRGYFT LL GL-PA	胃・がん化細胞
19	QCKLY DSL LAL-DG	シュワン細胞

図4 ヒトclaudinファミリータンパク質のVFDSL L相同領域アラインメントと機能

より検討した。その結果、claudin-1のVFDSL Lペプチドが最も強くMA026のTJ開口活性を阻害すること、また各claudinのペプチド配列によって阻害活性が異なることがわかった(学術論文作成中)。中にはVFDSL L配列がごく一部異なるだけで阻害活性がほぼ完全に失われるものもあれば、VFDSL L配列のほとんどが異なってもある程度阻害活性があるものもあり、配列特異性の高さを示す興味深い結果となった。解析の詳細は現在作成中の学術論文にて記載するが、以上の結果はMA026がclaudin-1に対して高い特異性を示すこと、またclaudin-1以外のclaudinファミリータンパク質に対しても、VFDSL L相同領域を介してある程度相互作用し、TJ開口を誘導できる可能性を示唆している。今後、MA026とVFDSL L相同配列との詳細な相互作用解析を行うことにより、claudin発現部位ごとに組織選択的な透過促進剤の開発が期待できる。

3.2. MA026とclaudin-1の結合解析

我々はこれまでにMA026の構造活性相関研究を行い、MA026を構成する14アミノ酸のうち、TJ開口活性に必要なアミノ酸残基や置換しても大きな影響がないアミノ酸残基について明らかにしている(論文査読中)。これら情報に基づき、TJ開口活性に影響が少ないと考えられるアミノ酸残基1か所をリジン残基に変換し、ビオチンを結合させた化合物を合成した。このビオチン化MA026のTJ開

口活性を測定したところ、十分な TJ 開口活性を確認できたことから (図 5)、このビオチン化体を MDCK II 細胞に処理し fluorescein avidin を用いた蛍光染色を試みた。しかしながら非特異的な細胞内シグナルが強く、ビオチン化 MA026 特異的なシグナルの検出が難しかった。そこで新たに TJ 開口活性に影響が少ないと考えられるアミノ酸残基 3 か所を選び、それぞれをリジン残基に変換した上にポリエチレングリコールリンカーを介してビオチンを導入した。これらビオチン化 MA026 の TJ 開口活性を同様に測定したところ活性を確認できたため、そのうちの一つを用いて同様に蛍光染色を試みたところ、ビオチン化 MA026 由来と考えられるシグナルが検出された (学術論文発表予

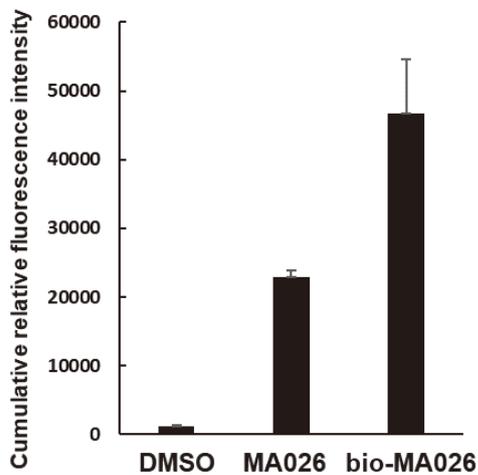


図 5 ビオチン化 MA026 の TJ 開口活性
DMSO コントロール、MA026、ビオチン化 MA026 (bio-MA026) の FD-4 累積透過量 (5 時間処理)。ビオチン化 MA026 は TJ 開口活性を示した。

定)。今後は抗 claudin-1 抗体染色との共局在検討、pull down assay などを試みる予定である。

次に、claudin を発現していない上皮細胞に蛍光タンパク質融合ヒト claudin-1 や他のヒト claudin ファミリータンパク質を導入した細胞を作成し、MA026 処理時の変動を検出することで作用メカニズムを解析することとした。MDCK II 細胞で発現している claudin-1, -2, -3, -4, -7 を欠損することにより TJ バリアが失われた quin KO MDCK II 細胞 (quinKO 細胞) を生理学研究所古瀬教授よりご供与いただき¹⁴⁾、蛍光ヒト claudin-1 のみを発現する細胞を構築した。これらの細胞では claudin-1 の細胞膜領域での局在が観察されており、部分的なバリア機能が確認できた (図 6)。今後、TJ バリア機能に対する MA026 の作用や、共培養における共局在、MA026 処理時の局在変動観察を検討する。並行して claudin ファミリーを個別に導入した細胞の TJ バリア機能検討を進めており、今後は他の claudin ファミリータンパク質導入細胞単独、または claudin-1 導入細胞との共培養における検討、及びその MA026 による TJ 開口活性などを検討することで claudin 特異性などの検討を行う予定である。

3.3. MA026 の X 線結晶構造解析

生理活性物質とその標的タンパク質との相互作用を分子レベルで解析するには、双方の立体構造が明らかになっていることが重要である。そこで我々は MA026 の結晶化を行い、その X 線結晶構造を得ることに成功した (論文査読中)。MA026 は全体的な構造としては左巻き α ヘリックス構造をとっていた。その結果、図 7 に示すように N 末に存在するアシル鎖と疎水性アミノ酸残基が化合物の片側に集

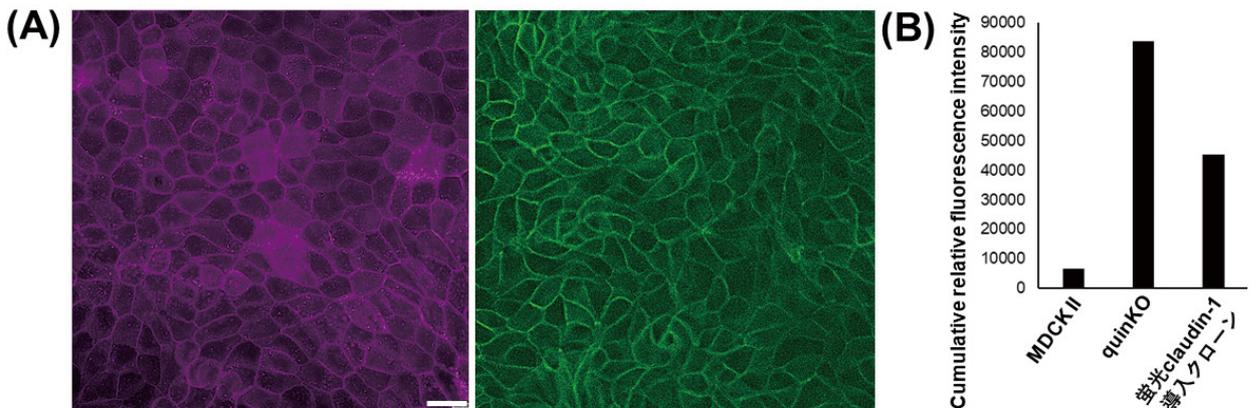


図 6 蛍光タンパク質融合ヒト claudin-1 発現 quinKO 細胞
(A) mCherry-claudin-1 発現 quinKO 細胞 (左)、YFP-claudin-1 発現 quinKO 細胞 (右) における蛍光タンパク質発現局在。TJ が作られる細胞間隙に主に発現が見られる。Bar, 20 μ m。 (B) MDCK II 細胞、quinKO 細胞、蛍光タンパク質融合 claudin-1 を発現した quinKO 細胞クローンの FD-4 累積透過量 (2 時間処理)。複数の claudin ファミリータンパク質を発現し正常なバリア機能を有する MDCK II では FD-4 透過量が少ないのに対し、MDCK II から 5 種類の claudin ファミリータンパク質を欠損させた quinKO 細胞ではバリア機能が失われ、FD-4 透過量が上昇する。蛍光 claudin-1 導入 quinKO クローンでは部分的ではあるが FD-4 透過量の減少が観察される。

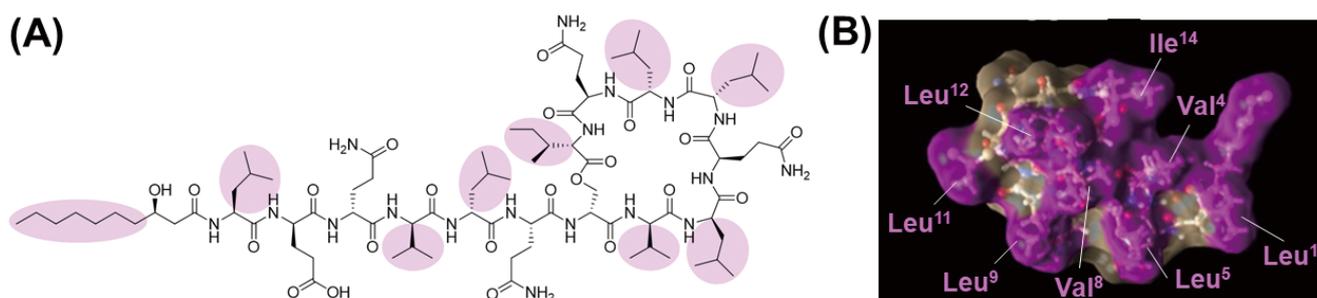


図7 MA026 X線結晶構造解析結果

(A) MA026の化学構造のうち、N末アシル鎖と疎水性残基をマゼンタで示した。(B) MA026の結晶構造。(A)で示した疎水性部分であるN末アシル鎖と疎水性残基が片側に集積し疎水性クラスターを形成していることがわかった。

積しており、疎水性クラスターを形成していることが明らかとなった。これまでの構造活性相関解析から、MA026のTJ開口活性には疎水性アミノ酸が重要であることが示されていることから（論文査読中）、MA026の疎水性クラスター領域がclaudin-1のVFDSL配列と相互作用していると考えられる。今後、MA026の結晶構造と、現在得られているclaudinファミリーのX線構造解析結果を用いて結合モデル作成・相配列領域比較などを行い、相互作用や特異性に重要な部分構造について検討を進める予定である。

4. 総括

本研究では主にMA026のclaudin-1を介した作用メカニズム解析、特にclaudin-1の部分配列であり、MA026が結合すると示唆されていたVFDSL配列ペプチドとの相互作用解析を行った。VFDSLペプチドにより、MA026のTJ開口活性が失われたことは、MA026がclaudin-1を介してTJ開口していることを強く示唆するものであった。さらにclaudinファミリーのVFDSL相同領域ペプチド競合阻害実験ではVFDSL配列がごく一部異なるだけで阻害活性がほぼ完全に失われるものや、VFDSL配列のほとんどが異なっている程度阻害活性があるものもあるなど興味深い結果が得られた。これらの結果により、MA026のclaudin-1特異性の高さとともに、他のclaudin特異的な阻害活性を示すMA026類縁体が合成できる可能性が見出され、組織選択的透過促進剤という新たなコンセプトを得ることができた。各種claudinを導入したquinKO細胞も取得できており、claudinを介した作用のメカニズム解析を進めている。

今回、MA026プローブを用いたclaudin-1の結合解析では、結合の証明までには至らなかったが、結合解析に有用なプローブ化に成功したことは今後の研究に大きく寄与すると考えられる。さらにSPRを用いた相互作用解析からMA026とVFDSLペプチドとの結合が弱い相互作用

であることが示唆された。このことから今後は定性的な解析となるが弱い相互作用でも検出できる手法の検討にシフトする。今回のペプチド競合阻害実験から明らかとなったように、選択性は高いがペプチド-中分子間の弱い相互作用であることがTJ開口の可逆性に寄与している可能性も考えられるため、詳細に検討していく必要があると考えている。

最後にMA026のX線結晶構造が得られたことで、構造活性相関検討の結果を統一的に理解するための基盤が得られた。今後、VFDSLペプチドや相同領域配列との相互作用を明らかにすることで、MA026を用いた非侵襲的薬剤送達の科学的基盤を確立する重要な知見となることが期待できる。

皮膚研究の進展に伴い、皮膚トラブルの原因や老化に伴う皮膚変性メカニズムが明らかになってきている。また、高齢社会における美しさ・若々しさに対するニーズから美容皮膚研究が進展し、老化に伴うしみ・しわなどの生成メカニズムについても明らかになっている。その結果、これらのトラブルやニーズに対応する成分などが研究開発され新たに上市されている。この流れは今後も加速していくと考えられる。さらに科学技術の進歩により複雑な生体高分子の生産が容易になってきており、医療分野以外でも利用されるようになってきた。近年耳にすることが多くなった「医薬部外品」では、医薬品のように治療には至らないまでも、高い効果・効能が期待されるような成分が配合され、皮膚を介してさらに奥の作用部位に有効成分を届けることが必要となってきている。上記のような有効成分には親水性の中・高分子化合物も多く存在するため、MA026をはじめとする透過補助剤により、有効成分をその作用部位まで浸透させる技術も同時に進展していく必要があると考える。本助成の成果をMA026を用いた非侵襲的経皮投与による有効成分送達に繋げ、皮膚の健康促進に貢献する予定である。

(引用文献)

- 1) Bos J.D., Meinardi M.M., The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp. Dermatol.* **9**, 165 (2000).
- 2) Singh N., Kalluri H., Herwadkar A., Badkar A., Banga A.K., Transcending the skin barrier to deliver peptides and proteins using active technologies. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **29**, 265 (2012).
- 3) Wallis L., Kleynhans E., Du Toit T., Gouws C., Steyn D., Steenekamp J., Viljoen J., Hamman J., Novel non-invasive protein and peptide drug delivery approaches. *Protein Pept. Lett.* **21**, 1087 (2014).
- 4) Mukaiyama M., Usui T., Nagumo Y., Non-electrophilic TRPA1 agonists, menthol, carvacrol, clotrimazole, open tight junctions via TRPA1 activation. *J. Biochem.* **168**, 407 (2020).
- 5) Mukaiyama M., Yamasaki Y., Usui T., Nagumo Y., Transient receptor potential V4 channel stimulation induces reversible epithelial cell permeability in MDCK cell monolayers. *FEBS Lett.*, 593, 2250 (2019).
- 6) Kanda Y., Yamasaki Y., Sasaki-Yamaguchi Y., Ida-Koga N., Kamisuki S., Sugawara F., Nagumo Y., Usui T., TRPA1-dependent reversible opening of tight junction by natural compounds with α , β - unsaturated moiety and capsaicin. *Sci. Rep.*, **8**, 2251 (2018).
- 7) Shiobara T., Usui T., Han J., Isoda H., Nagumo Y., The reversible increase in tight junction permeability induced by capsaicin is mediated via cofilin-actin cytoskeletal dynamics and decreased level of occludin. *PLoS One*, **8**, e79954 (2013).
- 8) *PCT WO 02/062831* (2002).
- 9) Shimura S., Ishima M., Nakajima S., Fujii T., Himeno N., Ikeda K., Izaguirre-Carbonell J., Murata H., Takeuchi T., Kamisuki A., Suzuki T., Kuramochi K., Watashi K., Kobayashi A., Sugawara F., Total Synthesis and Anti-Hepatitis C Virus Activity of MA026. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 18949 (2013).
- 10) Kubota K., Furuse M., Sasaki H., Sonoda N., Fujita K., Nagafuchi A., and Tsukita S., Ca^{2+} -independent cell-adhesion activity of claudins, a family of integral membrane proteins localized at tight junctions. *Curr. Biol.* **9**, 1035 (1999).
- 11) Kanda Y., Yamasaki Y., Shimura S., Kamisuki S., Sugawara S., Nagumo Y., Usui T., MA026, an anti-hepatitis C virus compound, opens tight junctions of the epithelial cell membrane. *J. Antibiot.* **70**, 691 (2017).
- 12) Uchiyama C., Fukuda A., Mukaiyama M., Nakazawa Y., Kuramochi Y., Muguruma K., Arimoto M., Ninomiya A., Kako K., Katsuyama Y., Konno S., Taguchi A., Takayama K., Taniguchi A., Nagumo Y., Usui T., Structural revision of natural cyclic depsipeptide MA026 established by total synthesis and biosynthetic gene cluster analysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **60**, 8792 (2021).
- 13) 特許第 6975437 号 PCT/JP2020/012446 「細胞層透過促進剤、薬剤吸収補助用組成物、及び医薬組成物」
- 14) Otani T., Nguyen T.P., Tokuda S., Sugihara K., Sugawara T., Furuse K., Miura T., Ebnet K., Furuse M., Claudins and JAM-A coordinately regulate tight junction formation and epithelial polarity. *J. Cell Biol.* **218**, No. 10 3372 (2019).

日本人における接触皮膚炎とバリア機能に関与する遺伝子変異の解析 および 3D スキンモデルを用いた接触皮膚炎の最適な治療法の探索

新潟大学医歯学総合病院皮膚科

林 良太

Contact allergy (CD) is an allergy reaction caused by exposure to a substance and the patients with CD is suffer from pain and itchy. We usually perform patch test to identify cause of CD. However, there are many causes of CD including metal, detergent and flavoring. While it take a lot of time to perform patch test and it is difficult to perform it in all clinic. If we can predict a risk of CD, the patients with CD may be decreased. Recent study demonstrated that the genes of barrier function including *FLG* were related with CD. However, it is not clear the relationship between CD and genes of barrier function in Japanese population.

Therefore, we performed mutation analysis of the genes related with barrier function including *FLG*, *FLG2* and *TGM5*. We could not perform sufficient number of cases, and it was difficult to conclude the relationship between CD and genes of barrier function in Japanese population at this point. While the mutations in the *FLG2* gene were identifies in several patients with CD. We need further studies to clear the relationship between *FLG2* gene and CD.

We also tried to establish 3D skin model of CD. It was difficult to use cells of the patients with CD, and we tried to make 3D skin models using normal keratinocytes, cytokines including IL-4, and metal.

1. 緒言

接触皮膚炎は外界の刺激、物質に対するアレルギー反応によって生じる。かゆみや疼痛といった症状の他、見た目
の問題から精神的苦痛を生じる場合もある。症状が酷い患者では、パッチテストにより原因物質を特定し、原因物質を除去することで症状の緩和を目指している。しかし、接触皮膚炎の原因は金属アレルギー、洗剤、ハンドクリームなどの使用品、香料など多岐にわたり、原因となるアレルゲンを調べるためには検査を行う人数の確保、多大な時間の確保が必要であるため全ての施設で行うことは難しい。よって、事前に接触皮膚炎のリスクとなる原因物質が分かれば、接触皮膚炎の患者数を減少することが可能となる。皮膚バリア機能に関与する遺伝子の代表例がフィラグリンをコードする *FLG* 遺伝子であり、日本人のアトピー性皮膚炎患者の 30% 程度に *FLG* 遺伝子変異が同定される。また、近年 *FLG* 遺伝子とニッケルなどの金属アレルギーの関与が指摘されている¹⁾。

しかし、日本人における *FLG* 遺伝子とアレルゲンの関連を検討した論文はなく、*FLG* 遺伝子以外のバリア機能に関与する遺伝子の変異とアレルゲンの関連は明らかでない。本研究の第一の目的は、日本人における接触皮膚炎の原因物質とバリア機能に関与する遺伝子変異/多型との関

連を特定することを最大の目的とした。この関連性を明らかにすることでパッチテストを行わずに原因物質を予想し、原因物質を除去することで症状が改善する可能性がある。

申請者は遺伝性皮膚疾患患者の皮膚を用いた 3D スキンモデルの作製を行っており、様々な皮膚疾患の患者細胞を用いた 3D スキンモデルの作製を試みている。この手法を用いて、3D スキンモデルに様々な薬剤を添加することで患者に最適な治療の探索を目指している。本研究では、バリア機能に関与する遺伝子に変異/多型が同定された接触皮膚炎患者の皮膚を用いた 3D スキンモデル作製を試みた。

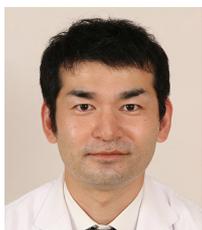
2. 方法

2. 1. 遺伝子解析による病的変異および遺伝子多型の検索

遺伝子解析に関して同意説明を行い、同意いただいた接触皮膚炎患者の血液 2mL を用いて DNA を抽出した。患者 DNA を用いて *FLG* 遺伝子、*TGM5* 遺伝子、*LOR* 遺伝子など皮膚のバリア機能に関与する遺伝子を Polymerase chain reaction (PCR) 法により増幅し、direct sequence 法により全エクソンおよびエクソン・イントロン境界部を解析し、病的変異/多型の有無を確認した。一部の患者においてはエクソーム解析によりこれらの遺伝子の変異の有無を確認した。

2. 2. 接触皮膚炎 3D スキンモデルの作製

接触皮膚炎患者の表皮細胞および線維芽細胞を用いて 3D スキンモデルを作製することが理想的ではあるが、接触皮膚炎において皮膚生検を行う機会が少ないため、接触皮膚炎患者組織を用いて 3D スキンモデルを作製することが難しい。よって、健常皮膚を用いた 3D スキンモデルを



Mutation analysis for the genes related with contact dermatitis and barrier function in the Japanese population, and analysis for the optimal treatment of contact dermatitis using 3D skin model

Ryota Hayashi

Niigata University Medical and Dental Hospital, Division of Dermatology

作製し、サイトカインなどを添加することにより接触皮膚炎の3Dスキンモデル作製を目指した。健常人由来の皮膚を用いた3Dスキンモデル作製法は以下の通りである。

健常人由来の線維芽細胞と1型コラーゲン、Fetal Bovine Serum (FBS)、 NaHCO_3 などの混合液を混和し、培養容器に入れ、真皮成分のコンストラクトを作製した。数日間、線維芽細胞用培養液で培養を行い。数日後に健常人に由来の表皮細胞を真皮成分のコンストラクト上層に添加した。以後は Ca^{2+} 非含有ケラチノサイト用培養液で培養を行った。3-5日後に Ca^{2+} 含有のケラチノサイト用培養液に変更し、培養を行うことで3Dスキンモデルを作製した。さらに培養液中にIL-4などのサイトカインの他、様々な金属を表皮側に添加することにより接触皮膚炎様の3Dスキンモデルが再現出来るかどうかについて検討した。

3. 結果

3.1. 接触皮膚炎患者の遺伝子解析

現段階では遺伝子解析を施行した患者数が少なく、日本人におけるバリア機能に関与する遺伝子と接触皮膚炎の関連を明確に言えるほど明らかにすることは出来なかった。接触皮膚炎の原因が同定された患者で*FLG* 遺伝子、*TGM5* 遺伝子、*LOR* 遺伝子などのバリア機能関連遺伝子に変異が同定されなかった患者がいる一方で、若年で金属アレルギーを有する難治性手湿疹の患者においては*FLG* 遺伝子に病的変異を有する症例も存在した。*TGM5* 遺伝子、*LOR* 遺伝子に明らかな病的変異をもつ症例はなかった。

一方、一部の患者において*FLG2* 遺伝子にナンセンス変異がみられたが、現段階では接触皮膚炎と関与するかどうかは症例数が少ないため不明である。

3.2. 接触皮膚炎患者細胞を用いた3Dスキンモデルの作製

本来は、接触皮膚炎患者の生検検体の余剰皮膚を用いた表皮細胞、線維芽細胞を用いて3Dスキンモデルを作製することが理想ではあったが、接触皮膚炎患者において皮膚

生検を行うことが少ない点からも、残余健常皮膚を用い、サイトカインを添加することにより接触皮膚炎3Dモデルの作製を行う方針とした。健常人由来の細胞を用いた検体の作製法は上記の通りであり、作製した3DスキンモデルのHematoxyrin Eosin (HE) 染色は図のように正常な角層、顆粒層、有棘層、基底層を有する表皮構造となった。一方、真皮成分はある程度構成はされているものの、我々が普段見慣れている健常皮膚のHE染色よりも細胞密度が乏しく、更なる改善をする必要があると思われる。

過去の報告では、HaCaT細胞で作成した3DスキンモデルにIL-4、IL-13を添加することによりアトピー性皮膚炎様の表皮変化を伴う3Dスキンモデルが出来ることが明らかになっている⁴⁾。申請者も健常人皮膚を用いた3Dスキンモデルの培養液中にIL-4やIL-13もしくは両サイトカインを添加した。IL-4、IL-13の濃度による影響もあるかもしれないが、現段階では安定してアトピー性皮膚炎様の表皮変化を伴う3Dスキンモデルを作製することが出来なかった。

4. 考察

アトピー性皮膚炎において皮膚のバリア機能は極めて重要であるが、アトピー性皮膚炎患者では接触皮膚炎を合併することが多いこと、アトピー性皮膚炎患者の30%程度が*FLG* 遺伝子に変異を有すること、*FLG* 遺伝子変異とニッケルなどの金属アレルギーの関与があること、などから接触皮膚炎と*FLG* 遺伝子などのバリア機能関連遺伝子との関連があると考えられる¹⁾。一方で、日本人においては接触皮膚炎患者で遺伝子解析が行われることは多くないと想定され、研究自体がほとんどないのが現状である。

我々が行っている研究も検体数が少ないため、現段階で日本人における接触皮膚炎患者とバリア機能関連遺伝子の変異の有無については明らかなことがいえる状況ではない。一方、若年の難治性手湿疹で当初acral peeling skin syndromeの可能性も考え、原因遺伝子である*TGM5* 遺伝子を解析したが変異が同定されなかった患者が後に金属ア

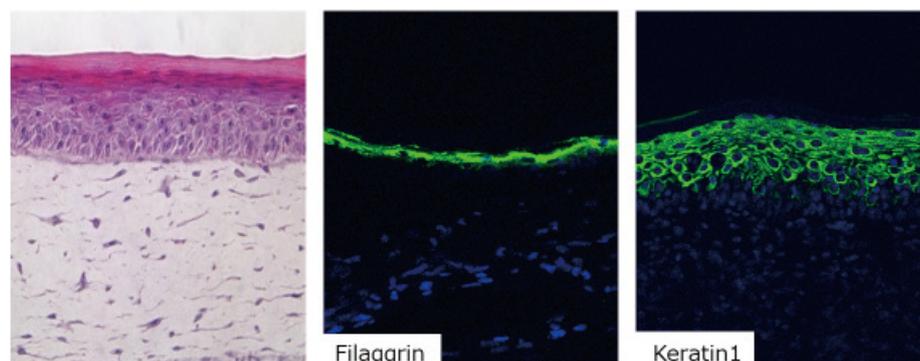


図 健常人細胞を用いた3Dスキンモデル

レルギーを有していることが明らかになった。この患者は *FLG* 遺伝子に機能喪失型変異を有しており、*FLG* 遺伝子変異が金属アレルギーの発症に関与していた可能性は否定できない。今後、症例数を増やすことにより日本人における *FLG* 遺伝子と金属アレルギーの関連が明らかになる可能性があり、研究を継続したいと考えている。

一方、今回の解析で接触皮膚炎を有した患者に一定数 *FLG2* 遺伝子にナンセンス変異を有していることが明らかになった。*FLG* 遺伝子と同様に *FLG2* 遺伝子もバリア機能に関与することが知られており、アトピー性皮膚炎との関連や皮膚が剥脱しやすくなる Peeling Skin Syndrome の原因遺伝子として報告されているが^{2, 3)}、*FLG* 遺伝子と違い、皮膚のバリア機能との関連がはっきりとしている訳ではない。実際に、今回の研究とは関連しないが申請者が以前に他疾患の診断確定のためにエクソーム解析を施行した際にも *FLG2* 遺伝子に変異が同定されることも多く経験している。*FLG2* 遺伝子が接触皮膚炎の疾患感受性遺伝子であるかどうかについては大規模な症例検討を行う必要がある。

3D スキンモデル作製に関しては元々予定をしていた接触皮膚炎患者細胞を用いることは難しく、健常人の細胞および IL-4 や IL-13、金属を添加することにより接触皮膚炎類似の 3D スキンモデルを作製した。前述の通り健常人の細胞を用いて作製した 3D スキンモデルの真皮成分はやや疎な印象はあるが、表皮に関しては我々が皮膚病理組織を観察する正常の表皮と類似している。しかし、健常人の細胞を用いた場合には表皮はややアトピー性皮膚炎様に肥厚する場合があります、IL-4 や IL-13 を添加した場合とそれほど差が出ない場合もあることから安定して接触皮膚炎様の表皮変化を伴う 3D スキンモデルの作製が出来ていない。今後は *FLG* 遺伝子に変異を有する患者細胞を用いること

でより安定した 3D スキンモデルを作製することが出来るかどうかについて検討を重ねていく。

5. 総括

本研究の最大の目的である日本人におけるバリア機能関連遺伝子と接触皮膚炎の関連および接触皮膚炎モデルとなり得るについてはまだ結論が出ていない状態である。しかし、コーセーコスメトロジー研究財団の助成により、本研究の活動を開始することが出来た。これからも本研究のテーマを継続し、最終的には目的を達成したいと考えている。

(引用文献)

- 1) Lagrelius M, Wahlgren CF, Bradley M et al. Filaggrin gene mutations in relation to contact allergy and hand eczema in adolescence. *Contact Dermatitis* 82: 147-152, 2020.
- 2) Margolis DJ, Gupta J, Apter AJ, et al. Filaggrin-2 variation is associated with more persistent atopic dermatitis in African American subjects. *J Allergy Clin Immunol*; 133: 784-9, 2014.
- 3) Mohamad J, Sarig O, Godsel LM, et al. Filaggrin 2 Deficiency Results in Abnormal Cell-Cell Adhesion in the Cornified Cell Layers and Causes Peeling Skin Syndrome Type A. *J Invest Dermatol*; 138: 1736-1743, 2018.
- 4) Clarysse K, Pfaff CM, Marquardt Y et al. JAK1/3 inhibition preserves epidermal morphology in full-thickness 3D skin models of atopic dermatitis and psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 33: 367-375, 2019.

加齢に伴い皮膚での産生量が減少する新規皮膚ステロイドの機能解明

昭和大学医学部生化学講座

原口 省吾

The skin, like the gonads and adrenal glands, synthesizes steroid hormones on its own. Steroids synthesized in the gonads and adrenal glands circulate and exert their effects throughout the body. In contrast, those synthesized in the skin are thought to exert their effects locally in the skin. Although there have been many studies on steroid synthesis in the skin, we have newly identified two new cutaneous steroids synthesized in the human epidermis (let us call them Steroid X and Steroid Y). In this study, we aimed to reveal the functions of these two newly identified cutaneous hormones. First, transcriptome analysis was performed to determine what gene expression changes this new cutaneous steroid causes in epidermis-derived skin cell lines. The results suggest that steroid Y causes expression changes in a group of genes involved in the regulation of translation initiation and has a suppressive effect on translation initiation. On the other hand, Steroid X altered the expression of many long noncoding RNAs and transcripts of unknown function, but what kind of cellular functions are involved remains unknown. Therefore, we focused our analysis on steroid Y. We found that steroid Y repressively regulates translation initiation through the regulation of ribosomal protein small subunits (RPSs) and eukaryotic translation initiation factors (eIFs). Epidermal thickening was observed in mice in which this steroid Y synthase was knocked out in the epidermis. When epidermal tissue isolated from human skin was used to analyze the effects of steroid Y, changes in inhibitory regulation of translation initiation were observed. These results suggest that steroid Y suppresses excessive cell differentiation and proliferation in the epidermis, and thus helps to form an appropriate epidermal layer and to prevent skin cells from becoming cancerous.

1. 緒言

性腺や副腎と同様に、皮膚でもコレステロールを材料にして様々なステロイドホルモンが合成されている。皮膚でステロイド合成を行っている細胞は、表皮の角化細胞や真皮の皮脂腺細胞、線維芽細胞などが知られている¹⁻³⁾。これらの細胞によって、皮膚は独自に男性ホルモン(テストステロンや5 α -ジヒドロテストステロンなど)や女性ホルモン(エストラジオールなど)を合成し、性腺で合成され循環して皮膚に到達する性腺由来の性ホルモンと皮膚において協働することで、皮膚機能を精緻に制御している(図1)。これらの研究成果を応用した例として、男性型脱毛症(androgenetic alopecia: AGA)の治療で用いられるフィナステリドや、美肌を目指した化粧品などに配合されるイソフラボン等がある。

しかしながら、性ホルモンはステロイド骨格をベースにした共通性の高い構造を示し、正反対の作用を示す男性ホルモン・テストステロンと女性ホルモン・エストラジオールであっても非常に似通った構造を持つ(図2)。さらに、皮膚で合成される性ステロイドと性腺で合成される性ステ

精巣と卵巣は、どちらも男性ホルモンと女性ホルモンを合成しており、その量・比が身体機能の性差・個人差を産み出す

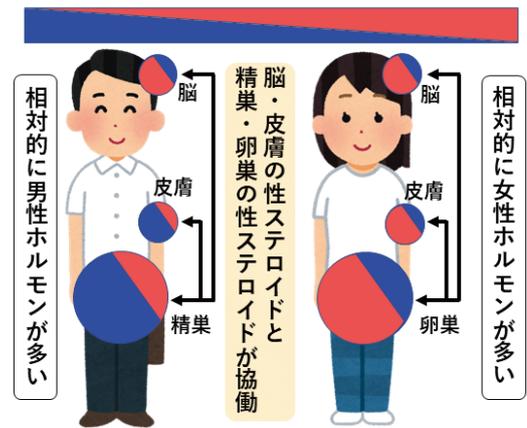


図1 性腺と脳・皮膚の性ステロイドが協働し、脳・皮膚の機能を精緻に制御しているが、加齢による性腺機能低下はバランスを崩壊させる

ロイドに構造的な違いはないため、皮膚で合成される性ステロイドの生理的意義に関しては不明確な点も多い。そこで性腺において性ステロイド合成量が減少する高齢時のマウスをモデルとして、皮膚ステロイド合成系の生理的意義解明を目的とした研究を行った。その結果、高齢時の皮膚機能低下を引き起こす要因の一端に、性腺で合成される性ステロイドと皮膚で合成される性ステロイドのバランスが乱れ、皮膚局所におけるホルモンの協調的な働きが崩壊することにあることを明らかにした(図1、投稿中)。

このように高齢時の皮膚内分泌系を詳細に解析する過程



Functional analysis of a novel epidermal steroid hormone decreasing in the skin with advancing age

Shogo Haraguchi

Department of Biochemistry, Showa University School of Medicine

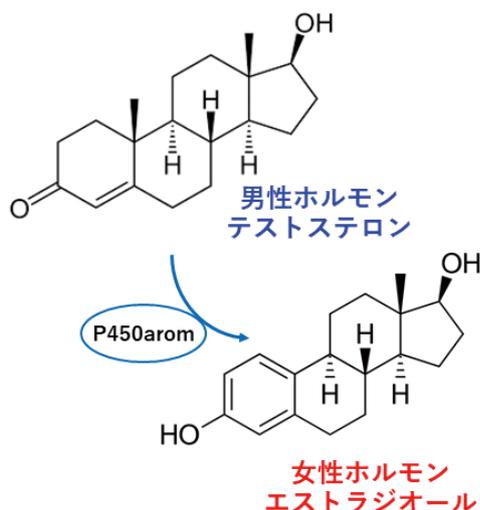


図2 生理作用は大きな違いを示すテストステロンとエストラジオールだが、代謝経路上で見ると隣り合っている

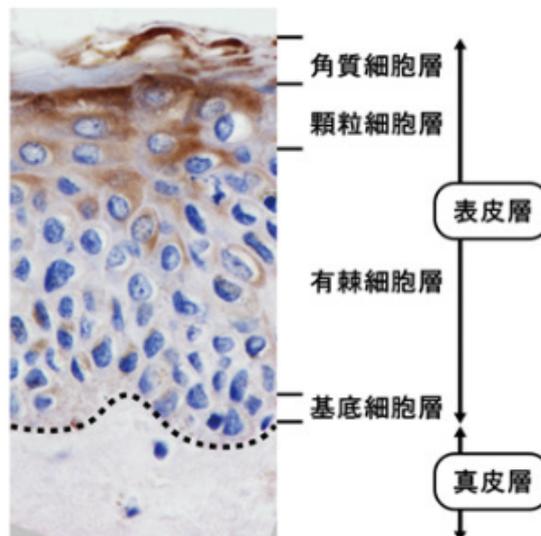


図3 ステロイド合成酵素Zはヒト表皮では主に有棘層から顆粒層に発現が見られた

で、ヒトの皮膚には未報告のステロイド合成経路が存在することを発見した。そこで、研究代表者のこれまでのステロイド研究の経験に基づき質量分析やメタボローム解析を駆使した解析を行い⁴⁻⁶⁾、ヒト表皮で合成される2つの新規ヒト皮膚ホルモン(便宜的に新規皮膚ステロイドXと新規皮膚ステロイドYとする)を同定した。この2つのステロイドは、同一のステロイド合成酵素(便宜的にステロイド合成酵素Zとする)により産生され、ステロイド合成酵素Zはヒト表皮の有棘層・顆粒層に発現していた(図3)。また、ステロイド合成酵素Zの発現量と表皮で合成されるステロイドXとステロイドYの量は加齢に伴い減少した。従って、この2つの新規皮膚ステロイドは表皮において、何らかの生理機能を持ち、その減少が高齢者の皮膚疾患や皮膚症状の発症や悪化に関わる可能性が考えられた。そこで、本研究は2つの新規皮膚ステロイドの機能解明を行うことで、老人性皮膚疾患に対する新たな治療法開発や、高齢者の皮膚の健康維持に関わる化粧品の開発を行うことを目的とした。

2. 方法

2.1. 皮膚由来細胞株に対する新規皮膚ステロイドの作用解析

ステロイドXとステロイドYの皮膚に対する作用は未知であり、受容体も未同定であり、どのような細胞に対して、どのような作用を働きかけるのかは推測が困難であった。しかし、組織局所で合成されるステロイドは一般的に循環しないため^{7,8)}、ステロイドXとステロイドYは合成部位である表皮、またはその近傍で機能しているであろうと考えられた。そこで、ヒト角化細胞株HaCaT細胞、ヒト皮膚線維芽細胞、マウスメラノーマ由来のB16F10細胞に

対して、ステロイドXあるいはステロイドYを作用させ、発現変動を示す遺伝子を網羅解析することで作用解明の手掛かりとすることにした。

HaCaT細胞、線維芽細胞、B16F10細胞を培養し、それぞれの細胞に対して溶媒添加(コントロール群)あるいはステロイドX添加(実験群1)、ステロイドY添加(実験群2)を行った。3種類の細胞はステロイド処理後3時間で細胞の回収を行った。回収した細胞からtotal RNAを抽出し、トランスクリプトーム解析(受託解析)とバイオインフォマティクス解析(サントリー生命科学財団・佐竹炎主幹研究員らの支援を受けた)を行った。バイオインフォマティクス解析では、Gene Ontology (GO) 解析、GO エンリッチメント解析を行うことで、新規皮膚ステロイドがどのような皮膚機能に関与しているのか予測を行った。

2.2. ステロイドYによる翻訳活性制御、細胞代謝活性の解析

2.1.の解析より、ステロイドYはタンパク質の翻訳開始制御に関わる遺伝子群を大きく変動させ、さらにバイオインフォマティクス解析により翻訳開始を抑制する向きの作用を持つことが示唆された。そこで、HaCaT細胞を用いてステロイドYにより発現が抑制されることが示唆されたタンパク質に実際に発現変化が生じるのかをウエスタンブロットングにより解析した。細胞の調製は2.1.に従ったが、タンパク質レベルでの変化を検出するためステロイド処理の時間は48時間とした。ウエスタンブロットングは定法に従った(抗体は、Proteintech、Cell Signaling Technology、Abcamなどから購入した)。

加えて、タンパク質の翻訳が抑制され、細胞の代謝活性に変化が生じることが予測されたため、細胞の増殖(同仁

化学研究所)、グルコースと乳酸(同仁化学研究所)、ATP産生(同仁化学研究所)、ADP/ATP比(同仁化学研究所)、NADP/NADPH比(同仁化学研究所)などを解析した。

2. 3. ステロイドYの受容体探索

2. 1. の解析から、ステロイドYはタンパク質の翻訳開始制御に関わることが示唆された。この結果はHaCaT細胞の解析結果から得られたが、一方で、B16F10細胞ではタンパク質の翻訳開始制御に関わる遺伝子に発現変動は見られなかった。このことは、ステロイドYの受容体はHaCaT細胞に高発現し、B16F10細胞では発現量が低いことを示唆する。どのようなタイプの受容体がステロイドY受容体として機能しているのか不明であったが、従来からステロイド受容体として知られている核内受容体と、新たなステロイド受容体として報告が相次いでいるGタンパク質共役型受容体(G protein-coupled receptor : GPCR)を候補として考えた⁹⁻¹¹⁾。

そこでGPCRがステロイドYの受容体として機能するのか明らかにするために、HaCaT細胞にステロイドYを作用させ、1細胞イメージングにより細胞のカルシウム変化とcAMP変化を解析した。本解析では東京大学総合文化研究科・坪井貴司教授らの協力を得た。

また、2. 1. のトランスクリプトーム解析のデータから、HaCaT細胞で高発現する核内受容体かつB16F10細胞では発現量が低い核内受容体のリストアップを行った。

2. 4. ステロイド合成酵素Zの表皮特異的ノックアウトマウスの表現型解析

ステロイドXとステロイドYの合成に関わるステロイド合成酵素Zのコンディショナルノックアウトマウスを作製するために、ステロイド合成酵素Zのfloxマウスを作製した(Floxマウスの作製は先端モデル動物支援プラットフォームによる支援を受けた)。このfloxマウスをIv1-CreERT2マウス(The Jackson laboratory)あるいはK14-Creマウス(The Jackson laboratory)と掛け合わせて、表皮特異的ステロイド合成酵素Zのノックアウトマウスを作出した。このマウスを用いて、皮膚の形態学的解析を行った。

2. 5. ヒト皮膚組織を用いたステロイドYの作用解析

上記の2. 1. ~ 2. 4. は、ヒトやマウスの細胞株やマウス個体を用いた解析であるため、実際にヒトの皮膚でもステロイドYが翻訳活性制御に関わるような作用を発揮するのかを明らかにするために昭和大学整形外科と連携し、ヒト皮膚組織で解析を行った。

昭和大学病院より手術直後にでた余剰検体組織から、皮下組織を可能な限り目視で取り除き、表皮層と真皮層を含

んだ組織を4℃、オーバーナイトで酵素処理(Miltenyi Biotec)し、表皮層のみを回収し培養した。無血清培地で培養したヒト表皮は2つに切り分け、溶媒群とステロイドY添加群を作製した。表皮に発現するmRNAやタンパク質の発現変化は、48時間のステロイドY処理後に解析した。さらに1週間ステロイドY処理を行った表皮を用いて形態学的な解析も行った。

3. 結果

3. 1. 皮膚由来細胞株に対する新規皮膚ステロイドの作用解析

コントロール群とステロイドX添加群、あるいはコントロール群とステロイドY添加群で解析を行ったところ、ステロイドXのみ、あるいはステロイドYのみで変動する遺伝子群が見つかったが、一方で、ステロイドXでもステロイドYでも同様の発現変動を示す遺伝子群も見つかった。これは当初から想定していた結果であり、ステロイドはその高い構造的類似性から受容体への結合において、ほかのホルモンほど厳密な特異性は示さない¹²⁾。また、本実験を行う時点においては、ヒトやマウスの皮膚組織におけるステロイドXやステロイドYの生理的濃度に関しても断片的な知見しかなく、ほかのステロイドホルモンに関する研究例を参考にしていない段階であった。そこで、ステロイドXとステロイドYで同様の増減を示した遺伝子群は、ステロイド合成酵素Z依存的な部分構造による非特異的な変化だと想定して解析を進めた。

その結果、ステロイドXはHaCaT細胞やB16F10細胞に作用させた場合、多くの長鎖ノンコーディングRNA(long non-coding RNA : lncRNA)や機能未知の転写産物(transcripts of unknown function : TUFs)¹³⁾を増加させた。何かしら転写制御に関わるような機能がステロイドXにあるのかもしれないが、ステロイドXの機能解明に関しては行き詰まった。

一方で、ステロイドYはHaCaT細胞に作用させた場合、リボソームタンパク質小サブユニット(ribosomal protein small subunit : RPS)や真核生物翻訳開始因子(eukaryotic translation initiation factor : eIF)に顕著な発現変動が見られ、GOエンリッチメント解析でも翻訳開始制御をネガティブに制御することが示唆された。一方で、B16F10細胞にステロイドYを添加しても、このような翻訳開始に関連する因子群に変動は見られず、B16F10細胞はステロイドY受容体の発現が極めて低いことを示唆した。

3. 2. ステロイドYによる翻訳開始関連因子の発現抑制作用

前述のようにステロイドXはTUFsを変化させたが、その意義を解析するには更に十分な検討と予備的な解析など

が必要となると考えられた。そこで、これ以降はステロイドYの解析を主として進めた。ステロイドYの翻訳活性制御に関わる因子群に対する発現抑制作用がタンパク質レベルでも再現できるのかをウエスタンブロッティングにより解析を行い、ステロイドY処理後48時間でRPSsやeIFsの低下が検出された。さらに、同様の処理を行ったHaCaT細胞では48時間後に、細胞数に有意な差は認められなかったが、細胞中のグルコース消費量が40%以上減少し(図4)、ATP産生量が有意に減少していた。一方で乳酸に変化は認められなかった。

3. 3. ステロイドY受容体探索

詳細な機序は不明だが、ステロイドYはHaCaT細胞に対して作用すると翻訳開始関連因子の抑制と、グルコース消費量、ATP産生量の減少を引き起こしたため、何かしらのシグナルを介してHaCaT細胞に意味のある変化を引き起こしていると考えられた。そこで、次に受容体の探索に取り組んだ。解析では、ステロイドの作用標的として知られている核内受容体とGPCRを主たる解析対象とした。

トランスクリプトーム解析の結果から、ステロイドY処理により3時間でmRNA発現量が有意に変化するため、3時間以内に何らかの変化を細胞に引き起こすはずである。そこでGPCRを標的とした解析では、ステロイドYによってHaCaT細胞内のcAMPやカルシウムが3時間以内に変動を示すのかを1細胞イメージングにより解析を行った。その結果、1時間以内ではHaCaT細胞においてcAMPとカルシウムに変動は見られなかった。現在、ステロイド処理後3時間までの解析を進めている。

核内受容体に関しては、3. 1. の結果からステロイドY処理後3時間で発現量が3倍以上に増加する遺伝子が見つかったため、この遺伝子を核内受容体のスクリーニングを行う際の指標として用いることにした。HaCaT細胞とB16F10細胞に発現している核内受容体をすべてリストアップし、その中からmRNA発現量の比がHaCaT細胞/B16F10細胞で10以上の遺伝子をスクリーニング対象とした。その結果、リガンド既知の受容体が4つ、リガンド未同定のオーファン受容体が3つ候補として浮かび上がった。そこで、これらの受容体とステロイドYの結合試験、受容体のノックダウン、質量分析を用いたノンターゲットな受容体探索など、複数の手法を組み合わせることでステロイドY受容体の同定を目指して解析を進めている。

3. 4. ステロイド合成酵素Z表皮特異的ノックアウトマウス皮膚の形態学的解析

ステロイド合成酵素ZのfloxedマウスとIvl-CreERT2マウスを掛け合わせ、出生後4週目の雄マウスへ1日おきに1週間タモキシフェンの腹腔内投与を行った。雌マウスは

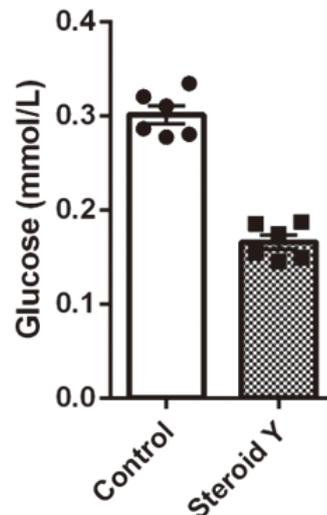


図4 ステロイドY処理を48時間行った細胞では、細胞中のグルコース消費量が顕著に減少していた

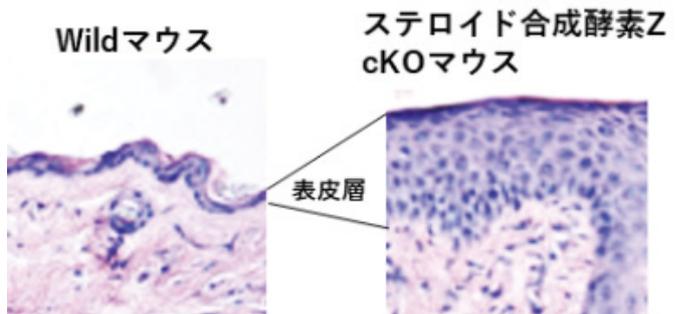


図5 ステロイド合成酵素Zの表皮特異的ノックアウトマウスでは、表皮が乾癬様に肥厚した

性周期を考慮する必要があり、データの解釈が複雑になるため、現時点では解析を見送った。その後、6週齢になったマウスの皮膚を形態学的に解析した。その結果、タモキシフェン投与により表皮でステロイド合成酵素Zをノックアウトしたマウスでは、表皮が乾癬様に肥厚していた(図5)。

3. 5. ヒト皮膚組織におけるステロイドYの作用解析

3. 1. ~ 3. 4. の解析からステロイドYは、翻訳開始関連因子の発現を抑制し、その結果として表皮の肥厚を引き起こすことが示唆された。この結果が、ヒト表皮でも同様に起きるのかをヒト皮膚組織を用いて解析を行った。その結果、ヒト表皮においてもステロイドY処理48時間後に翻訳開始制御に関わる因子群の発現低下が見られた。一方で、ステロイドY処理を1週間行った表皮ではヘマトキシリンにより染色される細胞核の数の減少が見られた(図6)。

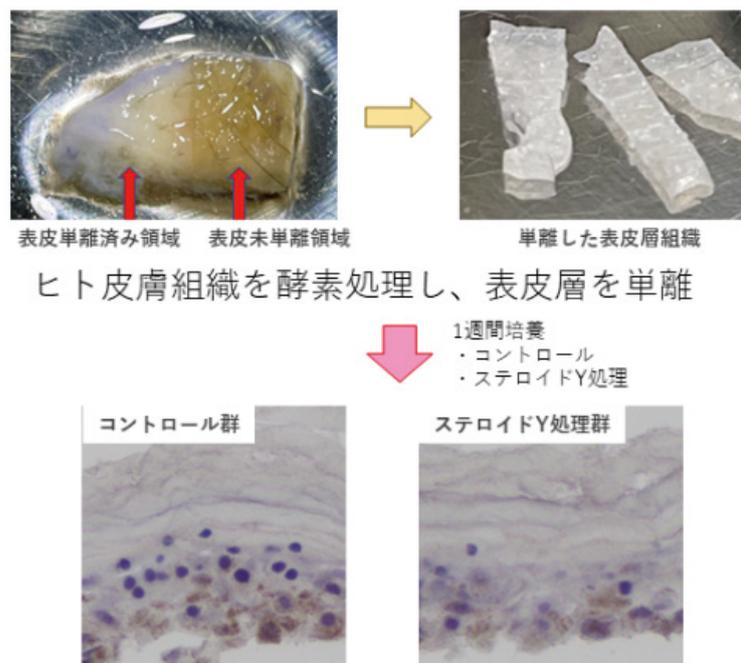


図6 単離したヒト表皮をステロイドY添加下で1週間培養し、形態学的変化を解析した

4. 考 察

本研究はヒト表皮には未報告のステロイド代謝経路が存在することを発見し、その発見に基づいて新規皮膚ステロイド2つを同定した研究結果に基づいて研究を行った。本解析からステロイドXが皮膚で何をしているのかは依然として不明ながら(何かしらの生理的に意味のある作用を持つのかも現時点では不明である)、ステロイドYに関してはRPSsやeIFsといった翻訳開始制御に関わる因子の抑制、ステロイド合成酵素Zをノックアウトすると表皮に肥厚が見られ、ステロイドYを添加した培養液で1週間培養したヒト表皮では細胞数の減少が見られた。

ステロイドYに関してはリボソームタンパク質の減少を引き起こすため、新たなタンパク質の合成を低下させる作用があると考えられる。ステロイドYはRPSsやeIFsであれば何でも減少させるわけではなく、特定のRPSsやeIFsの減少を引き起こす。そのため、ステロイドYにより合成量が減少するタンパク質は、特定のRPSが合成に関わるタンパク質群であることが推測される。従って、今後、この特定のRPSをノックダウンしトランスクリプトーム解析を行うことや、リボソームプロファイリング法による解析を行うことで、ステロイドYがRPSsやeIFsを介して細胞内のどのような機能を制御しているのか、より明快にできるのではないかと考えている。

また、核内受容体がステロイドYの受容体の可能性が高いと現時点では考えているが、核内受容体と翻訳開始制御

に関わる因子の間にはどのようなシグナルが介在しているのかは不明である。受容体が同定できていない現状では、ステロイドYの表皮における標的細胞の同定や、詳細なシグナル伝達経路の解析は困難であり、現在、共同研究者らの知見や技術的な協力を得ながら解析を進めている。ステロイド受容体の研究に関しては、テキサス大学のPeter Thomas教授らが最も実績があるがコロナ禍において共同研究には限界があった。幸いにも今後は受容体同定に向けた共同研究を実施しやすくなると期待でき、受容体を同定することでステロイドYと翻訳開始制御因子間に介在する謎の解明に迫りたい。

翻訳開始を抑制的に制御するステロイドYが欠落した場合に、ノックアウトマウスでなぜ皮膚の肥厚が起きたのか?であるが、表皮基底層の幹細胞の過剰な分化・増殖は表皮の肥厚やがん化を引き起こす。従って、ステロイドYは有棘層・顆粒層で合成されると傍分泌(paracrine signaling)により表皮幹細胞に作用し、表皮幹細胞が適切なスピードで分化・増殖することを助け、適切な表皮層形成やがん化抑制に関わるホルモンなのかもしれない。最初に述べたようにステロイドYは高齢者で減少するため、高齢者に好発する表皮のバリア機能低下に起因した掻痒症や乾癬、あるいは基底細胞癌の治療に有効であるかもしれない。また、リボソーム機能の異常に起因した疾患であるリボソーム病(ribosomopathy)への関与も考えられる。現在、リボソーム病としての病態が明らかになっている疾患はダ

イアモンド・ブラックファン貧血(指定難病284)など一部に限られているが、リボソームの生合成機序は未だ研究が始まったばかりであり、表皮には未知のリボソーム病が潜んでおり、それが皮膚の難治性疾患とされる様々な病気の発症や悪化に関わっていることも考えられる。現在は、このような視点から、翻訳開始制御因子の抑制がどのような皮膚機能に関わる可能性があるのか検討を進めている。

(引用文献)

- 1) Thiboutot D, Jabara S, McAllister JM, Sivarajah A, Gilliland K, Cong Z, Clawson G. Human skin is a steroidogenic tissue: steroidogenic enzymes and cofactors are expressed in epidermis, normal sebocytes, and an immortalized sebocyte cell line (SEB-1). *J Invest Dermatol.* 120, 905-914 (2003).
- 2) Slominski AT, Li W, Kim TK, Semak I, Wang J, Zjawiony JK, Tuckey RC. Novel activities of CYP11A1 and their potential physiological significance. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 151, 25-37 (2015).
- 3) Slominski A, Zbytek B, Nikolakis G, Manna PR, Skobowiat C, Zmijewski M, Li W, Janjetovic Z, Postlethwaite A, Zouboulis CC, Tuckey RC. Steroidogenesis in the skin: implications for local immune functions. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 137, 107-123 (2013).
- 4) Haraguchi S, Hara S, Ubuka T, Mita M, Tsutsui K. Possible role of pineal allopregnanolone in Purkinje cell survival. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109, 21110-21115 (2012).
- 5) Ubuka T, Haraguchi S, Tobar Y, Narihiro M, Ishikawa K, Hayashi T, Harada N, Tsutsui K. Hypothalamic inhibition of socio-sexual behaviour by increasing neuroestrogen synthesis. *Nat Commun.* 5, 3061 (2014).
- 6) Haraguchi S, Kamata M, Tokita T, Tashiro KI, Sato M, Nozaki M, Okamoto-Katsuyama M, Shimizu I, Han G, Chowdhury VS, Lei XF, Miyazaki T, Kim-Kaneyama JR, Nakamachi T, Matsuda K, Ohtaki H, Tokumoto T, Tachibana T, Miyazaki A, Tsutsui K. Light-at-night exposure affects brain development through pineal allopregnanolone-dependent mechanisms. *eLife.* 8, e45306 (2019).
- 7) Mellon SH, Griffin LD. Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends Endocrinol Metab.* 13, 35-43 (2002).
- 8) Do Rego JL, Seong JY, Burel D, Leprince J, Luu-The V, Tsutsui K, Tonon MC, Pelletier G, Vaudry H. Neurosteroid biosynthesis: enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. *Front Neuroendocrinol.* 30, 259-301 (2009).
- 9) Thomas P, Pang Y, Dong J, Groenen P, Kelder J, de Vlieg J, Zhu Y, Tubbs C. Steroid and G protein binding characteristics of the seatrout and human progesterone membrane receptor alpha subtypes and their evolutionary origins. *Endocrinology.* 148, 705-718 (2007).
- 10) Dennis MK, Burai R, Ramesh C, Petrie WK, Alcon SN, Nayak TK, Bologa CG, Leitao A, Brailoiu E, Deliu E, Dun NJ, Sklar LA, Hathaway HJ, Arterburn JB, Oprea TI, Prossnitz ER. In vivo effects of a GPR30 antagonist. *Nat Chem Biol.* 5, 421-427 (2009).
- 11) Prossnitz ER, Barton M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat Rev Endocrinol.* 7, 715-726 (2011).
- 12) Funder JW, Pearce PT, Smith R, Smith AI. Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science.* 242, 583-585 (1988).
- 13) Gingeras TR. Origin of phenotypes: genes and transcripts. *Genome Res.* 17, 682-690 (2007).

コラーゲン合成に必須なビタミン C 輸送メカニズムの解明

岡山大学学術研究院医歯薬学域

日浅 未来

Collagen is abundant in skin and blood vessel walls and provides mechanical strength and flexibility to tissues and organs. Collagen is a protein synthesized by mesenchymal cells; it is synthesized intracellularly as procollagen, which is secreted extracellular space and then polymerized. In procollagen biosynthesis, proline is hydroxylated in the endoplasmic reticulum by proline hydroxylase, an enzyme that requires ascorbic acid, so-called vitamin C, as a coenzyme, to convert it to hydroxyproline. Hydroxyproline contributes to the stability of the triple helix structure, and a deficiency of vitamin C or proline hydroxylase results in immature collagen. Vitamin C is essential for collagen synthesis and maturation, but the mechanism by which vitamin C is transported to the endoplasmic reticulum, the site of proline hydroxylation, is not clear. In this study, we focused on glucose transporters (GLUTs) belonging to the SLC2A family as transporters that accumulate vitamin C in the endoplasmic reticulum. There are 13 subtypes of GLUTs, which are classified into Classes I-III based on amino acid sequence homology. GLUTs belonging to Class III have not been well studied, but they are intracellular membrane-localized transporters that recognize DHA, an oxidized form of vitamin C, as a substrate. The aim of this study is to demonstrate that GLUTs function as vesicular DHA transporters and to elucidate their physiological actions. We investigated GLUTs that are mainly expressed in collagen-secreting vascular smooth muscle cells and found that GLUT8, 10, and 12 are expressed in vascular smooth muscle cells (VSMCs). The fact that GLUT10 and 12 are well expressed in the endoplasmic reticulum and the low expression of GLUT12 suggests that GLUT10 is the GLUT that can function in the ER in VSMCs. To elucidate the physiological functions of GLUT10 as a vesicular DHA transporter, we plan to examine DHA transport activity and quantification of collagen and hydroxyproline in GLUT10 knockdown cells.

1. 緒言

コラーゲンは、皮膚や腱、軟骨、骨、血管壁に多く存在し、組織や器官に機械的な強さや柔軟性を賦与する。コラーゲンは間葉性細胞が合成するタンパク質であり、細胞内でプロコラーゲンとして合成され、細胞外に分泌された後に重合化して線維が形成される。細胞内のプロコラーゲン合成過程において、小胞体でペプチド鎖中の Y 位のプロリンがプロリンヒドロキシラーゼの作用により水酸化され、ヒドロキシプロリンへと変換される。この酵素は補酵素としてアスコルビン酸、いわゆるビタミン C を必要とする。このヒドロキシプロリンはコラーゲンを特徴づけるトリプルヘリックス構造の安定性に寄与しており、ビタミン C の不足やプロリンヒドロキシラーゼが欠損するとコラーゲンが成熟できない。実際に個体レベルでビタミン C が不足するとコラーゲン形成が障害され、血管壁の損傷や出血を伴う壊血病や骨形成異常を示す。以上のようにコラーゲン合成・成熟にはビタミン C が必須であるが、プロリン水酸化の場である小胞体へとビタミン C を供給するメカニズムは明らかになっていない。本研究では、小胞体内にビタミン

C を蓄積するトランスポーター（輸送体）として、SLC2A ファミリーに属するグルコーストランスポーター（GLUT）に注目した。

GLUT は細胞膜に局在し、細胞内にグルコースを供給することで生体恒常性の維持に関与している。GLUT には 13 種のサブタイプが存在し、アミノ酸配列の相同性からクラス I ~ III に分けられる¹⁾。クラス I には、GLUT 1, 2, 3, 4 が属している。GLUT 1 をはじめとして、現在最も研究が進んでおり、その生理学的役割も確認されている。GLUT 1 は脳血液関門のグルコース輸送を担っており、遺伝的欠損によって小児性のてんかんや発達遅延が発症することがわかっている²⁾。また、GLUT 2 は SGLT 2 と共役し、

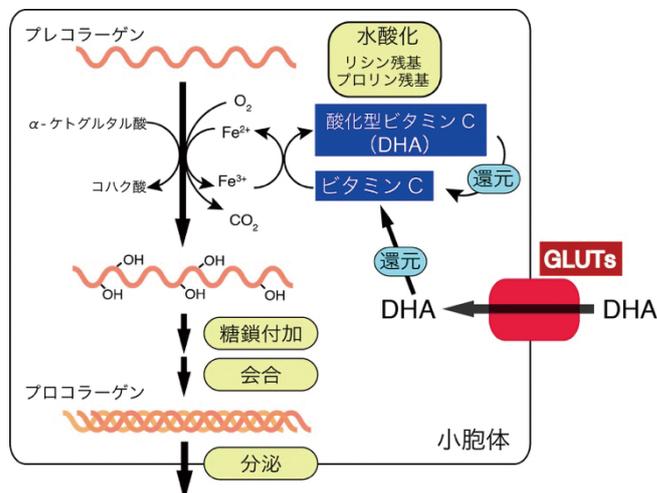


図1 小胞体におけるコラーゲン合成とGLUTs



Transport mechanism of vitamin C essential for collagen synthesis

Miki Hiasa

Okayama University, Faculty of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

腎臓の近位尿細管においてグルコースの再吸収に関与している。そのため、GLUT2の欠損はグリコーゲン貯留や高血糖からなる肝腫大を引き起こすファンコニー・ビッケル症候群を発症することが知られている³⁾。クラスIIには、GLUT5, 7, 9, 11が属しており、フルクトース輸送能をもつという特徴がある⁴⁾。さらにGLUT9は腎臓や肝臓で尿酸を輸送するため、遺伝的欠損によって、腎性低尿酸血症の原因になることが報告されている^{5, 6)}。一方で、クラスIIIには、GLUT6, 8, 10, 12, 13が属しており、他のクラスと比較すると研究が進んでいない。また、このクラスは細胞内膜への局在モチーフをもつため、細胞膜上でなく細胞内に局在するという特徴をもっている^{7, 8)}。クラスIIIに属するGLUTのうち、GLUT8は、酸化型ビタミンCであるデヒドロアスコルビン酸(DHA)を輸送することが強く示唆されている⁹⁾。また遺伝子レベルで精巣、脳、副腎、肝臓、脾臓、肺に発現することが示されている¹⁰⁾。GLUT12は、心臓や骨格筋などの組織に発現し、GLUT4同様にインスリン感受性が示唆されている¹¹⁾。さらに当研究室での解析により、DHAを基質とすることが示唆されている¹²⁾。しかし、組織での詳細な局在や機能は不明である。GLUT10は、GLUT8と同じようにグルコース以外にもDHAを輸送することが報告されている¹³⁾。さらに、動脈の蛇行や拡張、狭窄を引き起こす動脈蛇行障害(Arterial Tortuosity Syndrome, ATS)の原因遺伝子であることが判明している⁸⁾。しかしGLUT10ミスセンス変異マウスを用いた実験では、動脈系の異常が見られない報告もあり^{14, 15)}、GLUT10欠損によってどのようにATSが引き起こされるか不明である。また、GLUT10が発現する細胞や細胞内の局在についても線維芽細胞や血管平滑筋細胞、小胞体やミトコンドリアなどが報告されており、はっきりしない^{13, 16)}。

以上のように、クラスIIIに属するGLUTsについては機能や局在がよくわかっていないが、細胞内膜局在型のトランスポーターであり、基質として酸化型ビタミンCであるDHAを認識している。クラスIIIに属するGLUTsがコラーゲン産生細胞の小胞体に局在し、DHAを小胞体内へ輸送・蓄積する働きを担っているのではないかと考えられる。本研究はGLUTsが小胞型DHAトランスポーターとして機能することを証明し、その生理作用を明らかにすることを目的としている。クラスIII型GLUTsのうち、GLUT13(HMIT)は主に脳の神経に発現し、プロトン駆動力としてミオイノシトールを輸送することが知られており^{17, 18)}、グルコースの輸送には関与していないとされている。加えてGLUT6はリソソームに存在していることがわかっているため¹⁾、GLUT6, 13は除外し、残りのGLUT8, 10, 12について検証を行った。コラーゲン産生細胞である、血管平滑筋細胞(VSMC)を用いて実験を行った。

2. 方法

2.1. マウス血管平滑筋細胞(VSMC)初代培養

安楽死させたC57BL/6マウスより大動脈を摘出し、PBSで血液を洗浄した。その後、10% FBSを含むDMEM培地中で中膜を採取した。採取した中膜を1mm²程度にカットし、コラゲナーゼ溶液(3.0mg/mLコラゲナーゼタイプIIを添加したDMEM培地)に回収し、37℃、5% CO₂存在下で6時間保温した。DMEM培地で洗浄し、1250rpm、室温で5分間遠心した。得られた沈殿物をDMEM培地で洗浄し、さらに1250rpm、室温で5分間遠心した。沈殿物をDMEM培地で懸濁し、37℃、5% CO₂存在下で5日間培養した。継代し、血管平滑筋細胞を得た。

2.2. 免疫組織化学

ポリ-L-リジンでコートしたカバーガラス上で培養した血管平滑筋細胞をPBSで洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで室温にて30分間固定した。PBSで洗浄した後、0.2%サポニン、2%ヤギ血清、1%BSAを含むPBSで室温、15分間反応させた。0.5%BSAを含むPBSで希釈した一次抗体を室温で1時間反応させ、PBSで洗浄後、0.5%BSAを含むPBSで希釈した二次抗体を室温で1時間反応させた。切片を封入後、生物用共焦点レーザー走査型顕微鏡FV1200-IX83(OLYMPUS)で観察した。

2.3. ビタミンC処理によるコラーゲン量変化の定量

VSMCを、FBSを含まない培地へ培地交換した。100µg/mL L-アスコルビン酸2-リン酸セスキマグネシウムを添加し、5日間培養した。ピクロシリウスレッド染色液1mLに培養上清を100µL添加し、ローテーターで30分間攪拌した。12,000rpm、10分間遠心後、沈殿物を0.5M水酸化ナトリウムにて溶解し、吸光度(540nm)測定した。検量線を用いて吸光度からコラーゲンを定量した。

3. 結果

3.1. マウス血管平滑筋細胞(VSMC)の単離とGLUTsの発現

大動脈の中膜には、血管平滑筋細胞(VSMC)が多く存在している。マウス大動脈の中膜からコラゲナーゼによりVSMCを単離した。VSMCのマーカーである抗α-SMA抗体を用いた免疫染色によりVSMCが単離できたことを確認した。RT-PCR法を用いて単離VSMCにおけるGLUT8, 10, 12の発現を確認した。GLUT12のmRNA発現はGLUT10, 12と比較して少ないことが示唆された。

3. 2. マウスVSMCオルガネラにおけるGLUTsの局在

次いで、間接蛍光抗体法を用いて免疫染色を行った。その結果、GLUT8, 10, 12はVSMCに発現することが示されたが、GLUT12のシグナルは弱かった。クラスⅢのGLUTsについて、その局在が細胞種で小胞体、ゴルジ体、ミトコンドリア等異なることが報告されているため、VSMCでのGLUT8, 10, 12の局在を確認した。GLUT8, 10, 12特異的抗体と小胞体、ゴルジ体、ミトコンドリアのマーカであるPDI, GM130, COX IVを用いて二重染色を行った(図2)。得られた画像から、ピアソンの相関係

数を算出した(図3)。その結果、GLUT8は、PDI, GM130, COX IVのいずれにおいてもほとんど共局在しておらず、ピアソンの相関係数は、COX IV : 0.22, GM130 : 0.25, PDI : 0.07であった。GLUT10は、PDIと多く共局在しており、COX IVともわずかに共局在していたがGM130とはほとんど共局在していなかった。ピアソンの相関係数は、COX IV : 0.29, GM130 : 0.16, PDI : 0.56であった。GLUT12は、PDIと多く共局在していた。Cox IVも部分的に共局在が観察されたが、GM130とはほとんど共局在していなかった。ピアソンの相関係数はCOX IV : 0.42, GM130 : 0.05, PDI : 0.61であった。

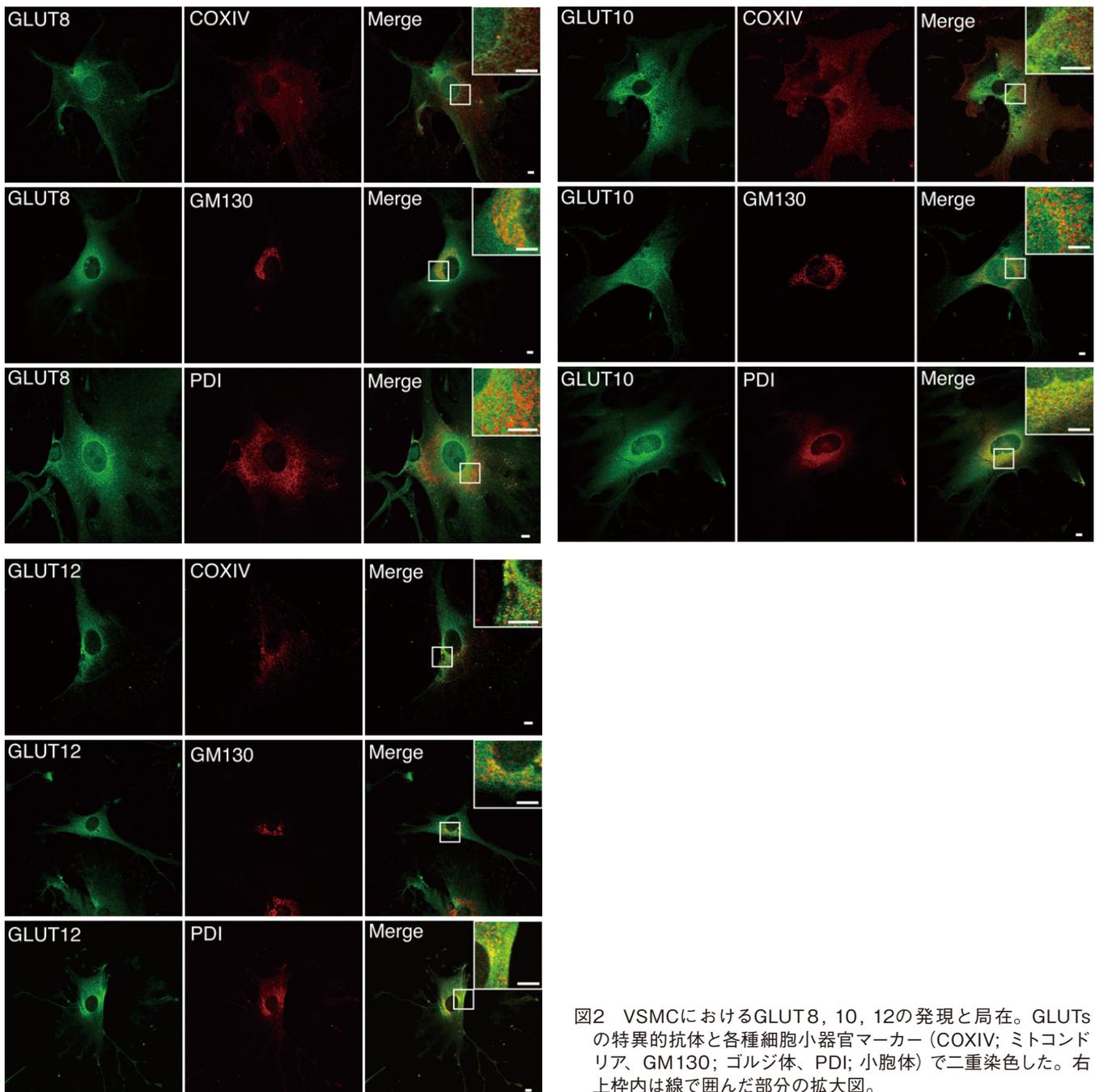


図2 VSMCにおけるGLUT8, 10, 12の発現と局在。GLUTsの特異的抗体と各種細胞小器官マーカー(COXIV; ミトコンドリア, GM130; ゴルジ体, PDI; 小胞体)で二重染色した。右上枠内は線で囲んだ部分の拡大図。

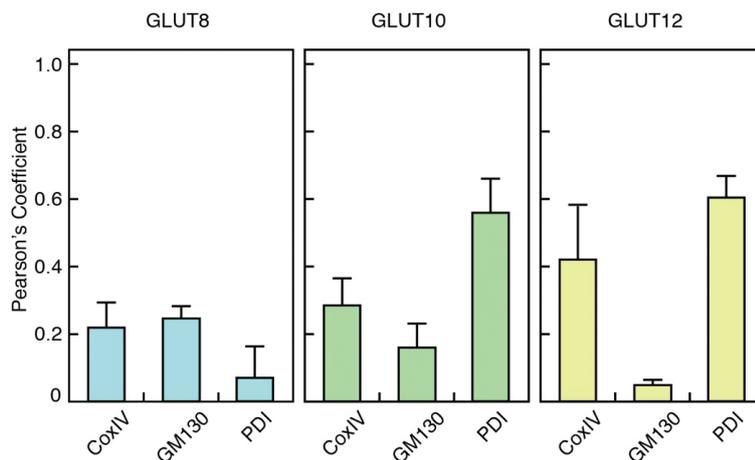


図3 VSMCをGLUT8, 10, 12特異的抗体と各種細胞小器官マーカー (COXIV; ミトコンドリア, GM130; ゴルジ体, PDI; 小胞体) で二重染色した写真から、Image Jを用いてピアソンの相関係数を算出し、グラフとして表示した。

3. 3. マウスVSMCのコラーゲン産生能の検討

VSMCにおけるコラーゲン産生能の変化について検討した。アスコルビン酸で5日間処理したVSMCでは、アスコルビン酸処理していない細胞に比べて培地中のコラーゲン量が増加していた。細胞内のコラーゲン量についても検討したところ、増加を確認した。ヒドロキシプロリン量やエラスチン量についても検討中である。

4. 考 察

本研究より、コラーゲン産生細胞であるVSMCにおいてGLUT8, 10, 12が発現していることが示された。GLUT8はVSMCにおいて、ゴルジ体、粗面小胞体、ミトコンドリアのいずれにおいてもほとんど局在していなかった。GLUT8は後期エンドソーム/リソソーム局在化モチーフを持ち、精巣の精母細胞、精子細胞においてリソソームに局在することが報告されている¹⁹⁾。VSMCにおいてもリソソームに局在する可能性が考えられる。GLUT12についても、VSMCではRT-PCR法、間接蛍光抗体法ともにシグナルは弱く発現量は少ないと考えられる。VSMCは動脈の中膜にて弾性線維の間に層状に存在し、血管の収縮・弛緩を担う細胞である。また、 α -アクチンを発現しており血管収縮としての機能をもつ収縮型(分化型)と、動脈硬化発症の引き金となる内膜肥厚を形成する合成型(増殖型)の2つの表現型をもつという特徴がある。GLUT12は合成型VSMCでは収縮型VSMCと比較して3倍近く発現量が多いことが報告されている²⁰⁾。病態や血管壁の状態によってはGLUT12が機能することが示唆される。GLUT10はVSMCにおいて発現し、小胞体とわずかにミトコンドリアに局在するが、ゴルジ体ではほとんど局在していなかった。一方で、VSMCにおいてGLUT10はミトコンドリアに局在し、過酸化水素処理による酸化ストレス

条件下や加齢条件下ではミトコンドリアに局在するGLUT10が増えることが報告されている²⁰⁾。このことから、GLUT10はDHAをミトコンドリア内に輸送することで、活性酸素に対して抗酸化作用を有するアスコルビン酸の量を増やすことが示唆されてきた。本研究では、GLUT10はミトコンドリアにわずかに局在していたが、本来は小胞体に局在するものと考えられる。

GLUT10, 12が小胞体によく発現すること、またGLUT12の発現が少ないことから、VSMCにおいて小胞体で機能するGLUTはGLUT10であることが示唆された。GLUT10はVSMC以外にも、ヒト線維芽細胞において小胞体に局在することが報告されている²¹⁾。ATSでは、血管系の症状以外にも皮膚や結合組織の弛緩が確認されている⁸⁾。以上のことから、GLUT10が普遍的に、VSMCや線維芽細胞の小胞体においてコラーゲン合成に関連していることが示唆される。しかし、実際にGLUT10のDHA輸送とヒドロキシプロリン量及びコラーゲン量について直接的に示したものはない。現在、GLUT10をノックダウンした細胞株においてDHA輸送能、コラーゲン及びヒドロキシプロリンの定量を検討している。

5. 総 括

線維芽細胞や血管平滑筋細胞が合成するコラーゲンは、皮膚や結合組織の弾性を保ち、人々の健康に寄与する重要なタンパク質である。コラーゲンやビタミンCが健康に重要な役割をもつということは周知の事実であり、ビタミンCがコラーゲン合成に寄与するメカニズムについても広く知られている。しかし一方で、摂取したビタミンCがコラーゲン合成の場へどのように運ばれるか、についてはまだ不明な点が多い。本研究は、コラーゲン合成に必須であるビタミンCを産生細胞の小胞体という、まさに合成の場へ

どのように輸送しているか、トランスポーターの観点から解明を目指すものである。本研究より、GLUT10がVSMCや線維芽細胞の小胞体においてコラーゲン合成に関連しているのではないかと示唆された。血管壁だけでなく、皮膚やその他結合組織でも同様にGLUT10がコラーゲン合成に関与すると考えられる。本研究がコスメトロジー分野において貢献できる可能性は極めて高いと考えられる。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、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)

- Augustin, R. (2010). The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. *IUBMB life*, 62 (5), 315-333.
- Klepper, J. Glucose transporter deficiency syndrome (GLUT1DS) and the ketogenic diet. *Epilepsia*, 49, 46-49 (2008).
- Sharari, S., Abou-Alloul, M., Hussain, K., & Ahmad Khan, F. Fanconi-bickel syndrome: A review of the mechanisms that lead to dysglycaemia. *Int J Mol Sci*. 21 (17), 6286 (2020).
- Manolescu, A. R., Witkowska, K., Kinnaird, A., Cessford, T., & Cheeseman, C. Facilitated hexose transporters: new perspectives on form and function. *Physiology*, 22 (4), 234-240 (2007).
- Bibert, S., Hess, S. K., Firsov, D., Thorens, B., Geering, K., Horisberger, J. D., & Bonny, O. Mouse GLUT9: evidences for a urate uniporter. *Am J Renal Physiol*. 297, F612-619 (2009).
- Dinour, D. *et al.* Homozygous SLC2A9 mutations cause severe renal hypouricemia. *J Am Soc Nephrol*. 21 (1), 64-72 (2010).
- Mueckler, M., & Thorens, B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol Aspects Med*. 34 (2-3), 121-138 (2013).
- Coucke, P. J. *et al.* Mutations in the facilitative glucose transporter GLUT10 alter angiogenesis and cause arterial tortuosity syndrome. *Nat Genet*. 38 (4) 452-457 (2006).
- Corpe, C. P., Eck, P., Wang, J., Al-Hasani, H., & Levine, M. Intestinal dehydroascorbic acid (DHA) transport mediated by the facilitative sugar transporters, GLUT2 and GLUT8. *J Biol Chem*. 288(13) 9092-9101 (2013).
- Ibberson, M., Uldry, M., & Thorens, B. GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues. *J Biol Chem*. 275 (7) 4607-4612 (2000).
- Stuart, C. A., Howell, M. E., Zhang, Y., & Yin, D. Insulin-stimulated translocation of glucose transporter (GLUT) 12 parallels that of GLUT4 in normal muscle. *J Clin Endocrinol Metab*. 94 (9) 3535-3542 (2009).
- Matsuo, S., Hiasa, M., & Omote, H. Functional characterization and tissue localization of the facilitative glucose transporter GLUT12. *J Biochem*. 168 (6) 611-620 (2020).
- Lee, Y. C., Huang, H. Y., Chang, C. J., Cheng, C. H., & Chen, Y. T. Mitochondrial GLUT10 facilitates dehydroascorbic acid import and protects cells against oxidative stress: mechanistic insight into arterial tortuosity syndrome. *Hum Mol Genet*. 19 (19) 3721-3733 (2010).
- Callewaert, B. L. *et al.* Absence of arterial phenotype in mice with homozygous slc2A10 missense substitutions. *Genesis*. 46 (8) 385-389 (2008).
- Cheng, C. H. *et al.* Mutations in the SLC2A10 gene cause arterial abnormalities in mice. *Cardiovasc Res*. 81 (2) 381-388 (2009).
- Gamberucci, A. *et al.* GLUT10—lacking in arterial tortuosity syndrome—is localized to the endoplasmic reticulum of human fibroblasts. *Int J Mol Sci*. 18 (8) 1820 (2017).
- Uldry, M. *et al.* Identification of mammalian H⁺-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain. *EMBO J*. 20 (16) 4467-4477 (2001).
- Di Daniel, E. *et al.* Evaluation of expression and function of the H⁺/myo-inositol transporter HMIT. *BMC Cell Biol*. 10 (1) 1-12 (2009)
- Diril, M. K. *et al.* Lysosomal localization of GLUT8 in the testis—the EXXXLL motif of GLUT8 is sufficient for its intracellular sorting via AP1-and AP2-mediated interaction. *FEBS J*. 276 (14) 3729-3743 (2009).
- Syu, Y. W., Lai, H. W., Jiang, C. L., Tsai, H. Y., Lin, C. C., & Lee, Y. C. GLUT10 maintains the integrity of major arteries through regulation of redox homeostasis and mitochondrial function. *Hum Mol Genet*. 27 (2) 307-321 (2018).
- Gamberucci, A. *et al.* GLUT10—lacking in arterial tortuosity syndrome—is localized to the endoplasmic reticulum of human fibroblasts. *Int J Mol Sci*. 18 (8) 1820 (2017).

Ⅲ. 精神、文化に関する分野

他覚的定量評価を伴った嗅覚検査の開発

兵庫県立尼崎総合医療センター耳鼻咽喉科・頭頸部外科

石川 正昭

Clinical assessment reflecting olfactory function with objective indicators can provide novel insights for the diagnosis of olfactory dysfunction. Initial pupil size (INIT) can be affected by olfactory stimulation and psychological states, being the candidate of the indicator. However, the effects of changes in the psychological state related to olfactory stimulation on INIT remain unclear. We investigated the effects of olfactory stimulation-induced psychological changes on INIT, using a double-blind study design with repeated measurements. We collected data on INIT and six mood subscales of the Mood States Profile from 28 healthy subjects. Subjects underwent a 10-min olfactory stimulation on different days with six odors available with the T&T olfactometer. Olfactory stimulation using the no-odor liquid (a control odorant) did not affect mood states and INIT. The sweat odorant significantly worsened five mood subscales, including fatigue-inertia (Fatigue) and decreased INIT compared to the control odorant. When comparing INIT responses related to changes in mood subscales between the control and the sweat odorant, worsened Fatigue were associated with decreased INIT in the sweat odorant. Fatigue can be regarded as an indicator of mental fatigue. Thus, methodology focusing on decreased INIT related to mental fatigue after olfactory stimulation might be a key factor to establish the objective indicators.

1. 緒言

COVID-19による感染症¹⁾や神経変性疾患の一部^{2,3)}では、嗅覚障害が最初の臨床症状の1つであり、嗅覚障害を定量的に診断するツールが臨床的に求められている。現在、嗅覚閾値/同定検査を中心に様々な嗅覚検査が嗅覚障害の定量的診断を可能にするツールとして広く用いられている⁴⁾。しかし、臨床的に使用されている嗅覚検査には限界がある。これらは、患者の積極的な参加と良好な言語能力を必要とする自覚的な検査である⁵⁾。COVID-19の患者では、味覚評価に対する自覚的な検査は、客観的検査よりも低い感度になることが報告されている⁶⁾。発話や積極的な参加を必要とせず、嗅覚能力を他覚的定量評価できる代替的なアプローチの確立は、嗅覚障害の評価に新たな知見をもたらすかもしれない。

他覚的定量評価を伴った嗅覚検査の開発のために、脳や瞳孔に焦点を当てたレビューが報告されている⁷⁾。このレビューでは、嗅覚刺激による瞳孔拡張を報告した人を対象とした研究は2件ある^{5,8)}。これらの研究では、嗅覚刺激により初期瞳孔径が大きくなる(散瞳)事が報告されている。申請者は、これまでに瞳孔とストレスの関連性に焦点を当てた臨床研究を行い、幾つかの知見を得ている。例えば、患者に疼痛が生じると、精神的疲労が生じ、それにより縮

瞳が起こる^{15,16)}。これまで痛み刺激により散瞳する事は知られていたが^{9,10)}、疼痛由来の精神的疲労による縮瞳という知見は報告がなく、瞳孔が心理学的側面に影響を受ける重要な知見であった。前述した嗅覚刺激による散瞳を報告した研究では、嗅覚刺激による心理学的変化は評価しておらず、散瞳において心理学的側面の影響があったかは不明である。

本研究の目的は、臨床的に利用可能な嗅覚検査と心理状態の評価に用いられる国際的な質問票を用いて、嗅覚刺激由来の心理学的変化が初期瞳孔径にどのような変化を生じさせるかを評価する事である。

2. 方法

本研究は、尼崎総合医療センター倫理委員会の承認を得て(No2-183)、倫理規定に準じて実施した。

研究デザイン: 繰り返し測定デザイン

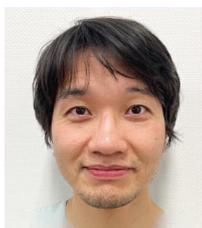
使用した検査: T&T オルファクトメーター(第一薬品産業株式会社, 最高濃度の花のにおい、甘いにおい、腐敗臭、果実臭、糞臭、無臭)、瞳孔対光反射測定機器(PLR3000, NeuroOptics社, USA)、日本語版 Profile of Mood States 2nd edition (POMS2)

被験者:

60歳以下のBody mass indexが $18.5\text{kg}/\text{m}^2$ 以上、 $25.0\text{kg}/\text{m}^2$ 未満、嗅覚障害や中枢神経疾患、慢性副鼻腔炎を伴わない健康者(嗅覚障害の定義は、T&T オルファクトメーターにより、5種類の匂いの認識力の平均点を算出し、1.1点以上)

評価方法:

被験者には、検査開始前にPOMS2を施行し、6つのサブスケールを評価した; anger-hostility (Anger), confusion-



The development of olfactory tests with objective assessments

Masaaki Ishikawa

Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Hyogo Prefectural Amagasaki General Medical Center

bewilderment (Confusion), depression-dejection (Depression), fatigue-inertia (Fatigue), tension-anxiety (Tension), and vigor-activity (Vigor)。得られた各スケールのスコアはPOMS2の付録を用いた年齢・性別による点数標準化を行い、標準化スコアを評価に使用した。

POMS2測定後に、被験者にはマスク (Pro Care, A.R. Medicom. Inc. (Asia) Ltd.) を装着してもらい、部屋を暗室にした。暗室にしてから5、10分後に左眼、右眼の順で初期瞳孔径を4回ずつ測定した。得られた2時点での初期瞳孔径と1時点のPOMS2データは、嗅覚刺激前データとして扱った。次に暗室にしたままで、T&Tオルファクトメーターの溶液を浸した1cm×1cmのガーゼをマスクに挟み込み、嗅覚刺激を10分間行った。初期瞳孔径を8回測定したのちに部屋を明るくして、POMS2の測定を行った。この時得られた1時点での初期瞳孔径と1時点のPOMS2データは、嗅覚刺激後データとして扱った。

なお、T&T オルファクトメーターは前述した6種類のおい物質から構成される¹¹⁾。嗅覚刺激による心理学的変化を促すためにいずれも最高濃度を検査に用いた。初期瞳孔径に対する各におい物質の嗅覚刺激効果を正確に評価するために、6回の測定はいずれも異なる日程で行った。また個体間・内差を少なくするために16時から19時の間に行われ、各被験者は2週間以内に6回の測定を終了する事にした。

概要を図1に示す。

統計解析：

本研究では、<1-1>無臭物質を用いた嗅覚刺激後の心理学的変化、<1-2>無臭物質を用いた嗅覚刺激後の初期瞳孔径変化、<2-1>におい物質別での嗅覚刺激後の心理学的変化、<2-2>におい物質別での嗅覚刺激後初期瞳孔径変化、<3>嗅覚刺激後の心理学的変化と初期瞳孔径の

関連性を評価した。<1-1>では、POMS2サブスケール値の嗅覚前後の変化をMann-Whitney検定で評価した。<1-2>、<2-1/2>、<3>では線形混合効果モデルを使用した。このモデルは、固定効果とランダム効果から構成される線形回帰である¹²⁾。固定効果は興味のある因子を説明変数に指定するだけで、通常の線形回帰モデルと同じである。一方でランダム効果に被験者番号を指定すれば、個体差を調整できる。初期瞳孔径は左右から複数回得るデザインにしているため、同一個体でも嗅覚刺激前後のみならず、嗅覚刺激前でも差が生じる可能性がある。またPOMS2サブスケールでも同じ被験者が異なるにおい物質による嗅覚刺激を受けるデザインにしているため、POMS2サブスケールの変化に個体間差のみならず個体内差も生じるようになる。つまり、得られたデータはクラスタ化しており、個体差を含んだデータとみなす事ができる。過去に我々はこの個体差を調整する事で、応答変数における説明変数の偽陽性のリスクを減らせる事を報告している¹³⁾。<1-2>では、初期瞳孔径を応答変数とし、年齢、性別、Brinkman indexを用いた喫煙指数、測定眼(左右)を固定効果に、被験者番号をランダム効果に指定した。<2-1>では、POMS2サブスケールの変化値を応答変数とし、年齢、性別、におい物質、嗅覚刺激前のPOMS2サブスケール値を固定効果に、被験者番号をランダム効果に指定した。<2-2>では、嗅覚刺激後初期瞳孔径変化は応答変数に、年齢、性別、Brinkman indexを用いた喫煙指数、測定眼(左右)、におい物質、嗅覚刺激後POMS2サブスケール変化値、嗅覚刺激前初期瞳孔径を説明変数に指定し、各被験者番号をランダム効果に指定した。<3>では、嗅覚刺激後の初期瞳孔径変化を応答変数に、年齢、性別、におい物質×嗅覚刺激後のPOMS2サブスケール変化値を固定効果に、被験者番号をランダム効果に指定した。<2-1/2>と<3>

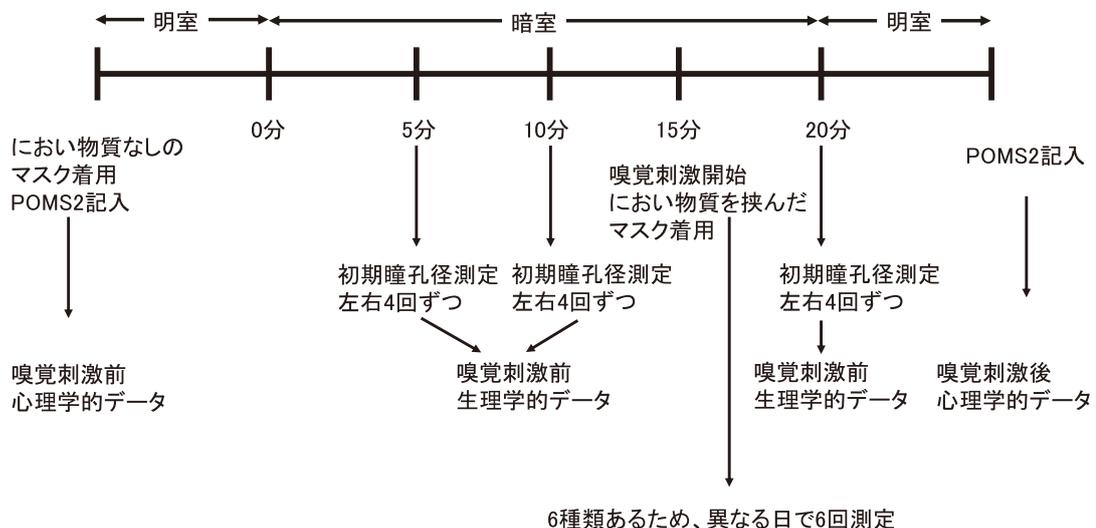


図1 研究方法

において固定効果に指定したにおい物質では、無臭を reference とした。市販解析ソフト R を使用し、全ての検定の有意水準は 5% 以下とした。

3. 結果

<1-1>: 無臭物質を用いた嗅覚刺激前後の比較において、POMS2 全サブスケールで有意な変化を認めなかった (表 1)。

<1-2>: 無臭物質を用いた嗅覚刺激において、嗅覚刺激前の 2 時点と嗅覚刺激後の 1 時点で有意な初期瞳孔径変化は認めなかった (表 2)。

<2-1>: 無臭物質を reference に定義して他のにおい物質と比較したところ、5 つの POMS2 サブスケール (Anger/Confusion/Fatigue/Tension/Vigor) において、腐敗臭に有意な変化を認めた。腐敗臭は無臭と比較すると、Anger/Confusion/Fatigue/Tension においてスコア増加、Vigor

ではスコア減少を認めた。これは、有意な変化を示したサブスケールの増悪を示唆する所見であった (表 3)。

<2-2>: 嗅覚刺激後の初期瞳孔径変化では、腐敗臭にのみ有意な縮瞳を認めた (表 4)。

<3>: 腐敗臭による嗅覚刺激が POMS2 サブスケールに一番影響を与える物質であったため、腐敗臭と無臭を対象にし、腐敗臭においてどのサブスケールが縮瞳に関連したかを検証した。結果、腐敗臭と無臭の反応の差を反映する交互作用が有意であったのは、Anger と Fatigue であった (表 5)。

表 5 のデータを Anger と Fatigue を対象に図示化すると、無臭では平坦であったのに対して、Anger では正の傾きをとる事・腐敗臭では Fatigue 値の増加で負の傾きをとる事が確認された (図 2)。これは Anger 増悪は散瞳と関連、Fatigue 増悪は縮瞳と関連を示唆するものであった。

表1 無臭物質を用いた嗅覚刺激がもたらすPOMS2サブスケール変化

		Anger	Confusion	Depression	Fatigue	Tension	Vigor
		平均値 (標準偏差)					
嗅覚刺激	前	42 (7)	44 (7)	44 (7)	43 (9)	42 (8)	48 (10)
	後	40 (6)	42 (5)	43 (5)	41 (9)	41 (7)	50 (8)
P値		0.3	0.4	0.8	0.2	0.8	0.4

表2 無臭物質を用いた嗅覚刺激における初期瞳孔径の変化

	測定時点	回帰係数 (95% 信頼区間)
嗅覚刺激前	5分	Reference
	10分	-2.1 (-11.0 to 6.8) × 10 ⁻²
嗅覚刺激後	20分	-5.1 (-14.0 to 3.8) × 10 ⁻²

表3 におい物質の違いがもたらすPOMS2サブスケール変化

	Anger	Confusion	Depression	Fatigue	Tension	Vigor
	回帰係数 (95% 信頼区間)					
無臭	Reference					
花のにおい	-0.2 (-1.7, 1.4)	0.1 (-1.9, 2.2)	0.7 (-1.4, 2.7)	-0.6 (-3.0, 1.9)	-2.0* (-3.8, -3.3)	-1.0 (-3.1, 1.1)
甘いにおい	-0.1 (-1.7, 1.5)	0.0 (-2.0, 2.1)	-0.1 (-2.1, 2.0)	-0.1 (-2.5, 2.4)	-1.7 (-3.4, 0.1)	-0.6 (-2.7, 1.5)
腐敗臭	1.9* (0.4, 3.6)	3.4** (1.4, 5.5)	-2.0 (-0.1, 4.0)	3.6** (1.2, 6.2)	2.4** (0.7, 4.2)	-5.0*** (-7.1, -2.9)
果実臭	0.6 (-0.9, 2.2)	1.0 (-1.1, 3.1)	0.1 (-1.9, 2.2)	0.5 (-1.9, 3.1)	-1.4 (-3.1, 0.4)	-0.7 (-2.8, 1.4)
糞臭	0.9 (-0.7, 2.5)	1.1 (-1.0, 3.2)	-0.4 (-2.5, 1.6)	1.8 (-0.6, 4.4)	-0.6 (-2.3, 1.1)	-1.5 (-3.6, 0.6)

*, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001.

表4 におい物質の違いがもたらす初期瞳孔径変化の比較

	無臭	花のにおい	甘いにおい	腐敗臭	果実臭	糞臭
	回帰係数 (95% 信頼区間)					
Reference		0.0 (-0.7, 0.6)	-0.6 (-1.2, 0.0)	-1.2** (-1.8, -0.5)	0.3 (-0.4, 0.9)	-0.3 (-0.9, 0.4)

** , p < 0.01.

表5 腐敗臭と無臭物質における嗅覚刺激におけるPOMS2サブスケール変化に対する初期瞳孔径変化の比較

	Anger	Confusion	Depression	Fatigue	Tension	Vigor
	回帰係数 (95% 信頼区間)					
POMS2	-6.7	34.1 **	-4.2	-8.1	-3.8	9.4 *
効果	(-19.4, 5.5)	(11.5, 57.0)	(-2.6, 1.7)	(-20.9, 4.5)	(-26.9, 19.3)	(0.8, 17.7)
におい物質	-0.7 (-1.5, 0.1)					
交互作用	36.3 ***	8.5	-15.4	-18.8 *	1.6	3.3
	(21.1, 51.6)	(-19.8, 36.5)	(-40.4, 10.0)	(-34.5, -3.1)	(-21.2, 24.2)	(-4.4, 11.2)

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

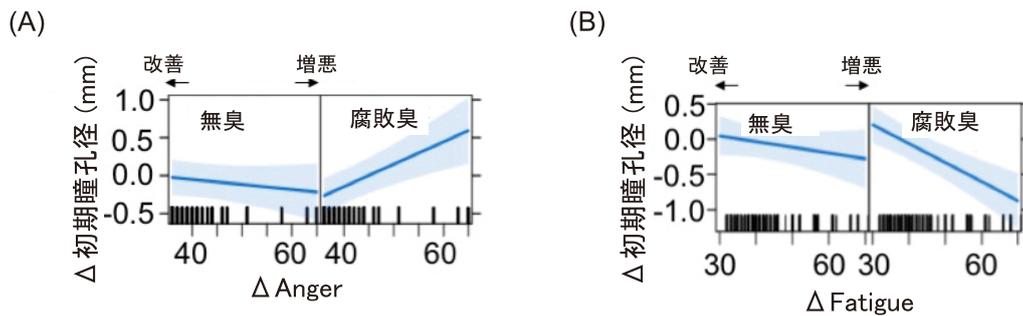


図2

4. 考察

本研究より、無臭物質を用いた嗅覚刺激では心理生理学的な変化を生じない事・腐敗臭による嗅覚刺激では多様な心理学的増悪変化が生じると同時に、縮瞳が起こる事が明らかとなった。腐敗臭における縮瞳と心理学的変化の関連性を検証したところ、Fatigueの増悪が縮瞳と関連する事が明らかとなった。

本研究では、マスクによる嗅覚刺激を行った。〈1-1/2〉で示されたように無臭物質では、心理学的・初期瞳孔径に変化が起きなかった。つまり、本研究で用いた嗅覚刺激方法自体は心理生理学的な影響を与えない事を示唆するものであり、刺激方法として適切なものであると考える。

POMS2のFatigueやVigorは、精神的疲労の指標として使用できる事が報告されている¹⁴⁾。つまり、腐敗臭による嗅覚刺激は精神的疲労を起こす事を示唆している。一方で、〈3〉ではFatigueに有意な交互作用があったが、Vigorにはなかった。これは、縮瞳を反映させる指標として、Fatigueの方がVigorよりも鋭敏である事を示唆しているのかもしれない。またAngerとFatigueの傾きを見た際に(図2)、Fatigueの増悪のみが縮瞳と関連している事がわかった。腐敗臭による嗅覚刺激は、Fatigue、Angerを含む5つのPOMS2サブスケール増悪を生じさせるため、Fatigue増悪(精神的疲労)が縮瞳と関連していると結論づけられる。

過去に我々は、疼痛由来の精神的疲労により縮瞳が生じ

る事を報告している^{15, 16)}。腐敗臭による嗅覚刺激で精神的疲労が生じ縮瞳が起こるのであれば、精神的疲労を起こさせる嗅覚刺激条件は、初期瞳孔径に着目した他覚的定量評価をできる嗅覚検査の開発において重要なキーファクターとなり得る。しかしながら、〈2-1〉で個々の症例を見てみると、腐敗臭による嗅覚刺激由来の精神的疲労が全症例に生じている訳ではなかった(未公表)。今後の臨床応用を考慮すると、一般化可能性を伴った精神的疲労を生じさせる嗅覚刺激条件の追求が求められる。

5. 総括

臨床で使用できる腐敗臭を用いた嗅覚刺激は、精神的疲労を起こす。嗅覚刺激後に認める縮瞳は、この精神的疲労と関連している可能性がある。他覚的定量評価を伴った嗅覚検査を確立するためには、精神的疲労を生じさせる嗅覚刺激条件の追求が有用かもしれない。

(引用文献)

- 1) Nakagawara K, Masaki K, Uwamino Yet al. Acute onset olfactory/taste disorders are associated with a high viral burden in mild or asymptomatic SARS-CoV-2 infections. Int J Infect Dis 2020; 99:19-22.
- 2) Hakyemez HA, Veyseller B, Ozer Fet al. Relationship of olfactory function with olfactory bulbus volume, disease duration and Unified Parkinson's disease rating scale scores in patients with early stage of idiopathic

- Parkinson's disease. *J Clin Neurosci* 2013; 20:1469-1470.
- 3) Serby M, Larson P, Kalkstein D. The nature and course of olfactory deficits in Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry* 1991; 148: 357-360.
 - 4) Patel ZM, Holbrook EH, Turner JH et al. International consensus statement on allergy and rhinology: Olfaction. *Int Forum Allergy Rhinol* 2022; 12: 327-680.
 - 5) Aguilon-Hernandez N, Naudin M, Roche Let et al. An odor identification approach based on event-related pupil dilation and gaze focus. *Int J Psychophysiol* 2015; 96: 201-209.
 - 6) von Bartheld CS, Hagen MM, Butowt R. Prevalence of Chemosensory Dysfunction in COVID-19 Patients: A Systematic Review and Meta-analysis Reveals Significant Ethnic Differences. *ACS Chem Neurosci* 2020; 11: 2944-2961.
 - 7) Peinkhofer C, Knudsen GM, Moretti R, Kondziella D. Cortical modulation of pupillary function: systematic review. *PeerJ* 2019; 7:e6882.
 - 8) Schneider CB, Ziemssen T, Schuster B, Seo HS, Haehner A, Hummel T. Pupillary responses to intranasal trigeminal and olfactory stimulation. *J Neural Transm (Vienna)* 2009; 116: 885-889.
 - 9) Szabadi E. Modulation of physiological reflexes by pain: role of the locus coeruleus. *Front Integr Neurosci* 2012; 6: 94.
 - 10) Szabadi E. Functional Organization of the Sympathetic Pathways Controlling the Pupil: Light-Inhibited and Light-Stimulated Pathways. *Front Neurol* 2018; 9:1069.
 - 11) Takagi SF. A standardized olfactometer in Japan. A review over ten years. *Ann N Y Acad Sci* 1987; 510: 113-118.
 - 12) Harrison XA, Donaldson L, Correa-Cano ME et al. A brief introduction to mixed effects modelling and multi-model inference in ecology. *PeerJ* 2018; 6: e4794.
 - 13) Ishikawa M. Clinical factors affecting pupillary light reflex parameters: a single-centre, cross-sectional study. *Ophthalmic Physiol Opt* 2021; 41: 952-960.
 - 14) O'Connor PJ. Mental energy: Assessing the mood dimension. *Nutr Rev* 2006; 64: S7-9.
 - 15) Ishikawa M, Hatsukawa H. Recommendation of using both initial pupil size and constriction latency in pupillary light reflex as objective indicators reflecting subacute pain-related mental fatigue. *Int J Psychophysiol* 2023.
 - 16) Hatsukawa H, Ishikawa M. Decreased initial pupil size and shortened constriction latency due to negative mood states and mental fatigue in clinical subacute pain models. *Physiol Behav* 2022; 253: 113850.

リアルワールドパラダイムと脳機能イメージングによる 顔印象認知の神経基盤の検討

東北大学大学院教育学研究科

伊藤 文人

Previous studies have identified the neural substrates of facial impression formation using neuroimaging techniques such as functional magnetic resonance imaging (fMRI). In the present study, we combined fMRI with speed-dating, in which participants engaged in three-minute short conversations, to determine whether facial impressions of conversation partners displayed on a computer screen could predict the impressions formed during direct interactions with those partners. The results showed that ratings of trustworthiness and activity of the left amygdala obtained before the speed-dating event predicted the ratings of trustworthiness obtained during the event. In addition, ratings of dominance obtained before the speed-dating event predicted the ratings of dominance obtained during the event. These results suggest that first impression of face photograph predicts person impressions formed through direct conversation.

1. 緒言

人にとって他者の存在は不可欠なものであり、他者の顔に対する印象形成のメカニズムについて多様な検討がなされてきた。昨今のデータ解析技術の発展も相俟って、多くの知見が蓄積されている¹⁻³⁾。過去の心理学的研究は、顔がどのような認知メカニズムにより処理されているかという基礎的な知見を明らかにするだけでなく、「魅力的な顔は全般的に信頼されやすく生涯年収も高くなりやすい (Beauty Premium)」、「有能そうに見える顔の人物は選挙で当選しやすい傾向がある」といった社会生活に密接に関連する事実も明らかにしてきた¹⁾。2008年に発表された研究では、顔印象の二次元モデルが提唱されている⁴⁾。この研究では、数多くある顔印象表現の中でも信頼度(どれくらいその顔が信頼できそうか)と支配性(どれくらいその顔が支配的か)の情報が、顔の印象を包括的に規定する二次元平面をなし、魅力度や有能さといった顔から推測される他の様々な印象を、これらの2つの軸である程度説明できる(変化させることができる)ことが示唆されている。しかしながら、こうした研究は「顔」に注目しているため、例えば「信頼度が高いと判断した顔の人物と実際に会話をした際、その人物の信頼度は高いと判断するか」、つまり顔に対する印象評定が実際にその顔の人物と社会的相互作用を行った場合と(どの程度)一致するか、という点について明らかにすることが難しい。そこで本研究では、参加者同士が1) 将来会話をするようになる人物の顔写真を呈示さ

れ、その際の機能的磁気共鳴画像法(以下、fMRI)による脳活動測定および印象評定を行うセッション、2) 顔が呈示された人物と実際に会話を行う(会話課題)セッションを実施し、顔に対する印象(以下、顔印象)とその顔の人物と実際に会話をした後に抱く印象(以下、会話印象)の関連について検証することを目的とした。

2. 方法

2.1. 参加者

本研究には、精神疾患および神経疾患の既往がなく異性愛者である健常若年成人73名(女性36名、男性37名、平均年齢20.9歳、年齢範囲19-26歳)が参加した。全参加者に対し、ヘルシンキ宣言に基づいた本研究の主旨・内容・実験の安全性および被験者の権利に関する説明を行い、書面による参加の同意を得た。なお、本研究は高知工科大学倫理委員会の承認を得て、北海道大学のMRI施設を利用し実施したものである。参加者は事前に顔写真の撮影を行った。この顔写真撮影に先立ち、参加者全員に対し写真撮影の趣旨・内容・プライバシーの保護について説明を実施し、同意を取得した。顔写真の撮影は顔が正面を向いた状態で、DSC-WX300およびPIXPRO FZ43を使用し行った。また、撮影時にはフラッシュを使用し、解像度は1920×1080とした。参加者にはナチュラルなりラックスした表情で撮影に臨むように教示した。

2.2. セッション1

セッション1では、fMRI撮像中の顔呈示課題および印象評定課題(別室にてfMRI撮像後に実施)を行った。fMRI撮像は、約10分間のスキャンを2run実施した。刺激呈示および行動データの記録はPresentation (Neurobehavioral Systems, Albany, CA)を用いて行った。fMRI撮像中、被験者にはプロジェクターから後日実施する会話課題において実際に会話をする相手の顔写真が鏡を介して呈示された



Neural correlates of facial impression formation: real world paradigm and functional magnetic resonance imaging

Ayahito Ito

Graduate school of education, Tohoku University

(図1A)。刺激呈示時間は2.0秒であり、各刺激間には固視点として白い十字を呈示した。固視点の呈示時間は3.0-9.0秒間であった。被験者は、顔写真が呈示されたら、できるだけ早く人差し指でボタン押しをするよう教示された。

fMRI撮影終了後、参加者は別室に移動し、fMRI撮影中に呈示された顔写真を改めてPC画面上に呈示され、それぞれの顔の信頼度と支配性について7段階で印象評定を行った。

2.3. セッション2

後日、参加者は会話課題に参加した(図1B)。fMRI参加者は、fMRIの数日後に会話課題に参加し、セッション1

で顔が呈示された人物一人一人と3分間の会話を行った(図1B)。会話課題は計2回行われ、1回目は同性セッション(同性との会話)、2回目は異性セッション(異性との会話)を行った。セッション1からセッション2までの期間は3日~34日であった。会話課題は、200名以上が収容可能な会議施設で行われ、同性セッション、異性セッションともに約3時間を要した。参加者は会場到着後、ID番号とワークシート(質問票)を受け取り、自分のIDが貼られた椅子に座るように指示された。実際の会話課題では、参加者はそれぞれの相手と3分間の自由な会話をした。各3分間の会話の後、参加者はセッション1と同様に相手についての印象を7段階で評価した(表1)。なお、その際参

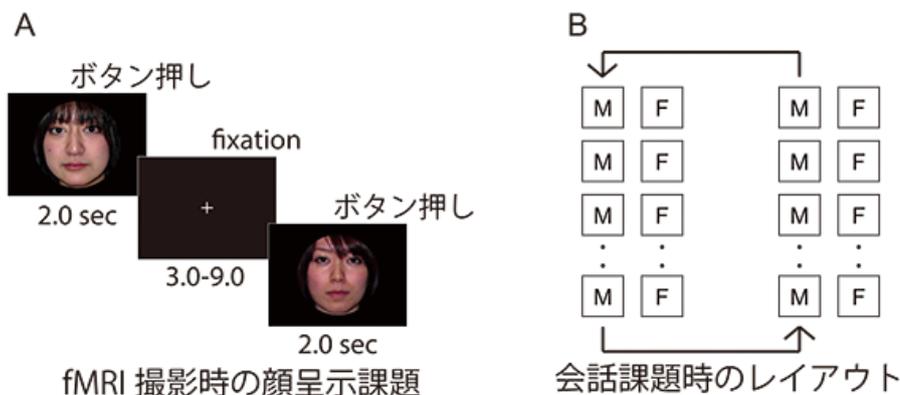


図1 (A) 被験者はfMRI撮影中に、後日会話課題において実際に会話をする相手の顔写真を呈示され、顔が呈示されたらできるだけ早く人差し指でボタン押しをするよう教示された。(B) 会話課題では会話相手と対面する形で座席が配置され、それぞれの相手と3分ずつ会話を行った。会話終了後、一方の参加者は隣の席へ移動した。感染対策として、参加者は口元が見えるクリアマスクを着用し、参加者同士の間に飛沫防止パネルを設置した。また、左右の参加者との間隔も十分に空け、空気の入替えを頻繁に実施した。なお、この図は異性セッション時様子を模式的に表したものである(M:男性、F:女性)。

表1 本研究で使用した評定項目一覧。参加者はfMRI撮影終了後に別室へ移動し、それぞれの顔写真を改めて呈示され、各項目について評定を7段階で行った。会話課題で各パートナーとの会話を終えた時点でも同様の評定項目について7段階で評定を行った。

評定番号	評定項目
1	どれくらい信頼できそうか
2	どれくらい支配的そうか
3	どれくらい近寄りやすいか
4	どれくらい魅力的か
5	どれくらい温かそうか
6	どれくらい有能そうか
7	どれくらい攻撃的そうか
8	どれくらい思いやりがありそうか
9	どれくらい知的そうか
10	どれくらい女性的か
11	どれくらい若い
12	どれくらい好きか
13	どれくらい話したいか
14	この相手は自分をどれくらい魅力的と思おうか
15	この相手は自分をどれくらい好きだと思おうか

加者は相手と面識があるかどうかとも回答した。参加者が相手を知っていると答えた場合、該当データはすべて解析から除外された。各会話の後、一部の参加者は、隣の席へ移動した(図1B)。全ての会話課題終了後、参加者は事前に作成した研究用のGmailアドレスを交換したい相手を選択した。後日、互いに連絡先を交換したいと一致が見られた参加者について、この事前に作成した研究用のGmailアドレスを交換した(研究担当者が相手のGmailアドレスを該当者に送付した)。なお、その後のトラブル等について研究者は一切関知しないことを事前に説明し、同意を得ている。

2. 4. 脳機能画像データ取得および前処理

3.0テスラMRIスキャナー(MAGNETOM Prisma, Siemens, Germany)を用いて全脳イメージングを実施した。T2*-weighted echo planar imaging (EPI) シーケンスを用い、パラメータは以下の通り設定した: 繰り返し時間(TR) = 2,500ms、エコー時間(TE) = 30ms、フリップ角 = 90°、撮影行列 = 80 × 80、FOV = 240mm、解像度 = 3 × 3mm、スライス数 = 42、スライス厚 = 3mm、スライス間ギャップ = 0.5mm。磁化率による副鼻腔の信号損失を回復するために、前交連-後交連線(AC-PC line)に対して30°傾けた撮影シーケンスを用いた⁵⁾。また、高分解能(空間分解能1 × 1 × 1mm)の構造画像は、MP-RAGE取得した。被験者の頭の動きは、頭を囲むパッドで制限された。脳画像データの前処理と統計解析は、Statistical Parametric Mapping (SPM) (Wellcome Department of Imaging Neuroscience, London, UK)を用いて実施した。各被験者のEPI画像は、スキャン間で発生した小さな動きを補正され(Realign)、次にスライス取得時間について補正された(Slice Timing Correction)。各被験者のT1強調画像は、EPI画像の平均値にコレジストレーションされ(Coregistration)、灰白質を分離するためにセグメント化された(Segmentation)。次に、EPI画像をMNIテンプレートに正規化し(Normalisation)、8mm全幅半値ガウスカ

ーネルを使用して平滑化した(Smoothing)。

2. 4. データ解析

行動データの解析では、セッション1で取得した会話相手の顔に対する1)信頼度評定、2)支配性評定とセッション2で取得した会話相手の顔に対する1)信頼度評定、2)支配性評定との関連をそれぞれ検討し、顔印象と会話印象の関連を検討した。脳機能画像の解析では、それぞれの会話相手の顔に対する扁桃体と背外側前頭前野の活動量をMarsBaR (<http://marsbar.sourceforge.net/>)にて取得し、セッション2で取得した会話相手の顔に対する1)信頼度評定、2)支配性評定との関連をそれぞれ検討した。背外側前頭前野と扁桃体のマスク画像はanatomical automatic labeling (AAL) atlas^{6,7)}を使用して作成した(図2)。統計解析にはMATLAB2018aを使用し、線形混合効果モデルによる解析を行った。

3. 結果

はじめにセッション1で取得した会話相手の顔に対する信頼度評定および扁桃体の活動量が、セッション2で取得した信頼度評定を予測するか検討を行った。従属変数はセッション2の信頼度評定とし、独立変数は1)セッション1の信頼度評定、2)左扁桃体の活動量(% signal change)、3)右扁桃体の活動量とした(Model 1)。また、ランダム効果には、参加者および刺激の情報を用いた(図3)。

その結果、セッション1の信頼度評定および右扁桃体の活動量は有意にセッション2の信頼度評定を予測することが明らかとなった(信頼度評定: $p < 0.001$, $\beta = 0.08$ [0.05, 0.10]; 右扁桃体の活動量: $p < 0.05$, $\beta = 0.11$ [0.007, 0.20])。左扁桃体に有意な予測力は認められなかった($p = 0.07$, $\beta = -0.08$ [-0.17, 0.006])。Model 1におけるAICは7080.6, BICは7127.8であった。Model 2として、セッション1の信頼度評定のみを独立変数として用い、解析を行った結果、AICは7079.2, BICは7108.7であった。Model 3として、左右の扁桃体の活動量を独立変数として

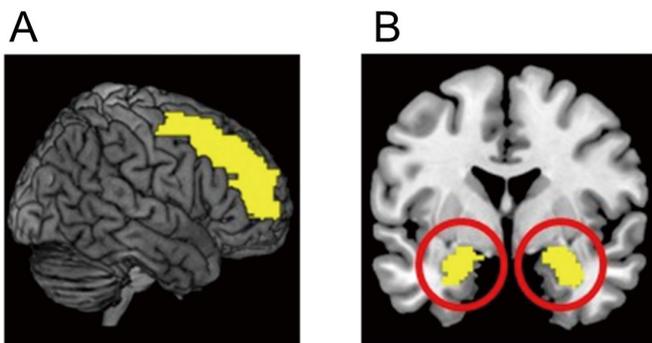


図2 (A) 背外側前頭前野のマスク画像。(B) 扁桃体のマスク画像。



図3 本研究における線形混合モデルの模式図。(A) 会話課題(セッション2)における信頼度評定をfMRI課題(セッション1)時の信頼度評定および扁桃体の活動量から予測。(B) 会話課題(セッション2)における支配度評定をfMRI課題(セッション1)時の支配度評定および背外側前頭前野(DLPFC)の活動量から予測。

用いて解析を行った結果、AICは7103.2、BICは7138.6であった。以上より、Model 2が最も適合度の高いモデルであることが示唆された。

支配性については、セッション1で取得した会話相手の顔に対する支配性評定および背外側前頭前野の活動量が、セッション2で取得した支配性評定を予測するか検討を行った。従属変数はセッション2の支配性評定とし、独立変数は1) セッション1の支配性評定、2) 左背外側前頭前野の活動量(% signal change)、3) 右背外側前頭前野の活動量とした(Model 1)。また、ランダム効果には、参加者および刺激の情報を用いた。その結果、セッション1の支配性評定は有意にセッション2の信頼度評定を予測することが明らかとなった(支配性評定： $p < 0.001$, $\beta = 0.09$ [0.06, 0.12]，左背外側前頭前野： $p < 0.05$, $\beta = -0.30$ [-0.56, -0.05])。一方、右背外側前頭前野に有意な予測力は認められなかった($p > 0.05$)。Model 1におけるAICは7886、BICは7927.3であった。Model 2として、セッション1の支配性評定のみを独立変数として用い、解析を行った結果、AICは7889.4、BICは7918.9であった。Model 3として、左右の背外側前頭前野の活動量を独立変数として用い、解析を行った結果、AICは7924.9、BICは7960.3であった。以上より、Model 1が最も適合度の高いモデルであることが示唆された。

4. 考 察

本研究では、「リアルワールドパラダイム」として、参加者同士が実際に会話を行う課題(会話課題)を用い、顔印象が会話印象を予測するか検討を行った。顔印象の二次元モデルでは、信頼度と支配性が顔印象における中心的な評価軸となると考えられてきたが、この信頼度と支配性の二軸が、他者と実際に会話を行った際の印象、すなわち会話印象においても適用可能であるかについては、十分に明らかにされていなかった。本研究結果は、顔写真に対する信頼度・支配性評定値が、会話時の信頼度・支配性評定をそれぞれ有意に予測することを明らかにした。この結果は、顔印象の二次元モデルが会話印象においても適用可能であることを示唆する直接的なエビデンスを提供するものであった。またこの結果は、人間が他者との関係を築く際に、第一印象がその後の評価に大きな関連していることを示唆するものと考えられる。

信頼度評定については、セッション1の信頼度評定と右扁桃体の活動量が、セッション2の信頼度評定を有意に予測することが明らかとなった一方、左扁桃体の活動量は予測力が認められなかった。これらの結果は、右扁桃体が信頼度の評価に関与していることを示唆している。また、モデルの適合度を比較すると、Model 2がModel 1および3よりも適合度が高いことが明らかとなった。これは、セッ

ション1の信頼度評定が、セッション2の信頼度評定を予測する上で重要であることを示唆している。なお、扁桃体の活動量に関する本研究の知見は今後の更なる追試・検討が必要と考えられる。過去の研究^{8,9)}は扁桃体が信頼度の低い顔に対して、より活動することを報告している一方、本研究では信頼度の高い顔に対して右扁桃体のより大きな活動が予測力をもつことが明らかとなった。一方、有意差は認められなかったものの、左扁桃体は反対の傾向を示した。これらの知見は、扁桃体の信頼度処理に関わる左右差を示唆するものである可能性があるが、扁桃体の機能については未だ議論の余地があり、今後のさらなる検討が重要であると考えられる。

支配性評定については、セッション1の支配性評定がセッション2の支配性評定を有意に予測することが明らかになるとともに、左背外側前頭前野の活動量に予測力を認めた。モデルの適合度を比較したところ、Model 1がModel 2および3よりも適合度が高いことが明らかとなった。これらの結果は、支配性評定の予測においては、支配性評定だけでなく背外側前頭前野も重要であることを示唆している。

本研究結果は、信頼感や支配感を向上させるための化粧方法の開発につながる可能性が考えられる。すなわち、本研究で明らかにされた「顔印象の二次元モデルが実際の会話場面でも適用可能であり、脳情報が実際の会話印象の予測に寄与する」との知見は、支配性に着目した「社会的戦略としての新たな化粧文化」の開拓に貢献できる可能性がある。「魅力」は信頼度と近い概念であるため「魅力」を操作する化粧は自ずとその人物の信頼度を高めることにつながるが、社会的責任の大きい立場の人物に特に必要となる「有能さ」は信頼度と支配性の中間に存在する概念と考えられており、支配性の操作も必要となる。これまでの化粧文化は魅力度を高め、結果として“Beauty Premium”を勝ち取ることに主眼が置かれてきた。この方策は極めて大きなインパクトをもたらしたが、支配性に着目した責任ある立場を勝ち取るための化粧技術は第二のインパクトをもたらす可能性がある。すなわち、化粧により支配性を操作して「有能さ」を演出することで、責任ある立場を勝ち取るチャンスが増加する可能性は極めて高い。信頼度と支配性を心理・脳の側面から定量的に評価する技術を応用し、「有能さ」に着目した新たな化粧文化が確立できれば、女性の社会進出・活躍推進のさらなる後押しとなることが期待できる。

(引用文献)

- 1) A. Todorov, A. N. Mandisodza, A. Goren & C. C. Hall. Inferences of competence from faces predict election outcomes. *Science*, 308, 1623-1626, 2005.
- 2) A. Ito et al. Distinct neural correlates of the

- preference-related valuation of supraliminally and subliminally presented faces. *Hum Brain Mapp*, 36, 2865-77, 2015.
- 3) S. T. Fiske, A. J. C. Cuddy & P. Glick. Universal dimensions of social cognition: warmth and competence. *Trends Cogn Sci*, 11, 77-83, 2007.
 - 4) N. N. Oosterhof & A. Todorov. The functional basis of face evaluation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 11087-92, 2008.
 - 5) R. Deichmann, J. A. Gottfried, C. Hutton & R. Turner. Optimized EPI for fMRI studies of the orbitofrontal cortex. *NeuroImage*, 19, 430-41, 2003.
 - 6) N. Tzourio-Mazoyer et al. Automated anatomical labeling of activations in SPM using a macroscopic anatomical parcellation of the MNI MRI single-subject brain. *Neuroimage*, 15, 273-89, 2002.
 - 7) L. Yoon, L. H. Somerville & H. Kim. Development of MPFC function mediates shifts in self-protective behavior provoked by social feedback. *Nat Commun*, 9, 3086, 2018.
 - 8) J. S. Winston, B. A. Strange, J. O' Doherty & R. J. Dolan. Automatic and intentional brain responses during evaluation of trustworthiness of faces. *Nat Neurosci*, 5, 277-283, 2002.
 - 9) A. D. Engell, J. V. Haxby & A. Todorov. Implicit trustworthiness decisions: automatic coding of face properties in the human amygdala. *J Cogn Neurosci*, 19, 1508-1519, 2007.

瞳孔振動と心拍変動を用いた香りが自律神経に及ぼす影響

国際医療福祉大学保健医療学部視機能療法学科

鎌田 泰彰

This study aims to evaluate the effects of fragrance on the autonomic nervous system using pupillary oscillation and heart rate variability. Participants included 22 healthy young adults (mean age 21.8±1.4 years, 11 females). The experiment was performed for 5 minutes, and pupillary oscillation and heart rate variability were measured. We analyzed 1 minute of rest (rest), 1 minute of olfactory stimulation with lavender or grapefruit essential oil (olfactory stimulation), and up to 3 minutes after stimulation for residual effects (1, 2, and 3 mins after stimulation). Pupillary oscillation was measured with an infrared pupilometer ET-200 (Newopto) and heart rate variability was measured with a Reflex Meijin system (Crosswell). Pupillary oscillation data were subjected to frequency analysis, and the power spectrum was obtained. To measure heart rate variability, high (HF) and low frequency (LF) components were determined, and cardiac parasympathetic nerve indices (HF, HFnu) and cardiac sympathetic nerve indices (LF/HF, LFnu) were calculated. Regarding pupillary oscillation, the power spectrum of 0.25 Hz increased accordingly with the increase of the cardiac parasympathetic index. Regarding heart rate variability, lavender essential oil increased HF and HFnu and grapefruit essential oil decreased HF 3 mins after stimulation. The fragrances produced changes in pupillary oscillation and heart rate variability, which may be useful as objective evaluation indices of autonomic function.

1. 緒言

香りのような感覚刺激は個人の経験や記憶、嗜好等により感受性が異なり、自覚的な評価だけでは平均化が困難である。そのため、香りによる影響を検討するためには生体反応を客観的に評価できる指標が必要である。

香りを感知する嗅上皮にはアドレナリン受容体やムスカリン受容体が存在し、香り刺激が自律神経系の亢進や抑制に関与することが考えられている。香り成分が鼻腔内に入ると、鼻腔・嗅細胞に受容され大脳辺縁系へ刺激が伝達される。刺激は大脳辺縁系で過去の経験や記憶と照合され情動・情緒が惹起される。その情報は視床下部へ伝達され、副交感神経系もしくは交感神経系が活性化される。よって、香りによる生体反応を客観的に評価するためには自律神経反応を捉えられる指標が有用となる可能性がある。

これまでに香りが自律神経系に及ぼす影響については、心拍変動を客観的な評価指標として用いた報告がされている¹⁾。心拍は自律神経によって拮抗的に支配されており、心拍変動解析をすることで副交感神経系、交感神経系のどちらが優位であるかを捉えることができる。また、自律神経反応を客観的に評価できる眼組織に瞳孔がある。瞳孔は瞳孔括約筋と瞳孔散大筋の働きによりその径が変化する。この2つの筋はそれぞれ異なる自律神経機能を有し、副交感神経

系が優位となると瞳孔は縮小、交感神経系が優位となると散大する。このことから、瞳孔は自律神経反応を評価する際にしばしば用いられる。瞳孔の観察は古くから心理学の応用にも用いられており、刺激によって惹起される感情・情緒に瞳孔の大きさが関連することが報告されている²⁾。また、瞳孔は常に一定のリズムで縮小、散大を繰り返している。このような瞳孔のゆらぎは瞳孔振動と呼ばれ、生体の覚醒状態やリラックス、疲労、ストレスの評価への応用が考えられている。既報では瞳孔のゆらぎと主観的な眠気に相関がある³⁻⁵⁾こと、眠気を感じると瞳孔は縮小しそれに伴い大きなゆらぎが起こる⁶⁾ことを報告している。これは、覚醒状態から低覚醒に移行する際に副交感神経の活性化による瞳孔の縮小と、低覚醒状態と覚醒状態を維持しようとする意識の繰り返しが副交感神経・交感神経の周期的な亢進・抑制を引き起こし、瞳孔のゆらぎが発生するためとされている。このことから、瞳孔振動と心拍変動は自律神経反応を客観的に評価でき、香りによる生体反応を検討できる指標として応用できる可能性がある。

本研究では瞳孔振動と心拍変動を客観的な評価指標に用い、香りが自律神経系へ及ぼす影響について検討した。

2. 方法

本研究は国際医療福祉大学倫理審査委員会(承認番号21-10-3)の承認を得て実施した。対象は青年健常者22名(平均年齢20.8±0.7歳、男性11名、女性11名)とした。除外基準は呼吸器疾患等の器質的な疾患、嗅覚刺激が阻害される症状(鼻汁、鼻閉等)、嗅覚刺激に対する過敏性(気分不快感、アレルギー等)、妊娠または授乳中の女性とした。被験者には実験前日からのアルコール、カフェインの摂取、激しい運動を制限し、十分な睡眠をとるように指示し



The effects of fragrance on the autonomic nervous system using pupillary oscillation and heart rate variability

Yasuaki Kamata

Department of Orthoptics and Visual Sciences, School of Health Sciences, International University of Health and Welfare

た。また、実験当日は実験2時間前からの飲食、香水やボディクリーム、整髪料等の嗅覚に影響を与えるものの使用を禁じた。

実験は光による瞳孔への影響を排除するため完全暗室で行った。また、自律神経への影響を考慮し、室温26℃、湿度60%、静音環境が保たれた部屋で行った。被験者への呼吸の指示は、呼吸制御による瞳孔、心拍への影響を考慮し自然呼吸とした。測定時間は9時から12時の間とした。

被験者は入室後、座位にて瞳孔計測用ゴーグル、心拍変動測定用電極を装着し、実験開始まで5分の安静時間を確保した。実験開始と同時に瞳孔と心拍変動の測定を開始し、実験が終了するまで連続記録した。瞳孔と心拍変動の測定は計5分間行った。実験開始から1分までは安静状態とし、この時のデータを基準値として用いた(安静)。実験1分から2分までの間に精油による嗅覚刺激を1分間負荷した(嗅覚刺激)。嗅覚刺激は精油をガーゼに約0.3ml滴下したものを袋に入れて被験者に提供し、鼻と口を十分に覆った状態で嗅ぐよう指示した。1分間の嗅覚刺激負荷後、香りの残効を調べるために実験開始2分から5分まで測定を継続した(刺激後1分、刺激後2分、刺激後3分)。残効を調べている間は、嗅覚刺激の影響がないよう袋を密閉した。最後に嗅覚刺激の自覚的な好みの度合いについてアンケートを行った。

2. 1. 嗅覚刺激

嗅覚刺激による自律神経系の変化を捉えた報告に、リナロールを主成分とした香りは副交感神経系が活性化させること、リモネンを主成分とした香りは交感神経系を活性化させることが報告されている⁷⁾。本研究ではリナロール、リモネン成分を多く含む、ラベンダー精油(リナロール含有率40.2%)、グレープフルーツ精油(リモネン含有率94.97%)(生活の木)の2種を嗅覚刺激に用いた。2種類の嗅覚刺激の順序は被験者ごとにランダムとし、異なる嗅覚刺激を与える場合は1日以上の間隔をあけた。

2. 2. 心拍変動

心拍変動の測定にはReflex名人(クロスウェル)を用いた。心電図の位置は第II誘導で導出した。心拍変動は心電図のR-R間隔から記録し、サンプリング周波数は1000Hz、周波数の解析時間は30秒とした。周波数解析により、高周波成分(High frequency: HF)は0.15-0.40Hz、低周波成分(Low frequency: LF)は0.04-0.15Hzで算出した。算出した周波数成分から心自律神経指標として、HFを心副交感神経指標、LF/HFを心交感神経指標に用いた。また、心拍変動で得られる周波数成分は個人差が大きくデータの比較に留意する必要があるため、Adachiらの報告⁸⁾を参考に周波数成分を標準化(normalized unit: nu)

した値も算出した。標準化に用いた計算式を以下に示す。求めたHFnuを心副交感神経指標、LFnuを心交感神経指標とし、HF、LF/HFとあわせて検討した。

$$\text{HFnu}(\%) = \text{HF} / (\text{LF} + \text{HF}) \times 100$$

$$\text{LFnu}(\%) = \text{LF} / (\text{LF} + \text{HF}) \times 100$$

2. 3. 瞳孔振動

測定機器には赤外線電子瞳孔径ET-200(Newopto)を用い、瞳孔の横径を連続記録した。連続記録中の瞬目による欠損データは、瞬目前後の瞳孔径のデータで補正した。瞳孔径のデータは、高速フーリエ変換を用いた周波数解析でパワースペクトルを求めた。

2. 4. アンケート

自覚的な香り好みの度合いについてはVisual Analogue Scale(VAS)を用い定量化した。VASの目盛りは0~100までとし、0を「今まで嗅いだ香りの中で最も嫌い」、100を「今まで嗅いだ香りの中で最も好き」と設定した。また、口頭でも嗅覚刺激についての好みを「とても好き」「好き」「どちらでもない」「嫌い」「とても嫌い」の5段階で回答させた。

2. 5. 解析方法

各パラメータは中央値(四分位範囲)で示す。心拍変動、瞳孔振動のデータはそれぞれ1分ごとに解析を行った。安静に対し、嗅覚刺激、刺激後1分、刺激後2分、刺激後3分の各パラメータをそれぞれ比較した。統計解析にはWilcoxonの符号順位と検定を用いた。多重比較にはBonferroni法を用いた。有意水準は危険率5%未満とした。

3. 結果

3. 1. ラベンダー精油(図1、2)

心拍変動解析において安静、嗅覚刺激、刺激後1分、刺激後2分、刺激後3分の心副交感神経指標はそれぞれ、HFで149.7(75.3-344.3)、202.9(120.0-587.7)、138.5(91.2-259.0)、137.4(100.4-274.8)、111.7(86.3-237.6)、HFnuで33.9(20.1-39.0)、41.4(33.7-50.2)、32.0(24.1-43.2)、30.4(18.0-46.6)、40.6(29.7-56.5)であった。心交感神経指標はそれぞれ、LF/HFで2.3(1.6-3.6)、1.5(0.8-2.0)、1.9(1.4-3.2)、1.7(1.1-4.1)、1.5(0.7-2.5)、LFnuで66.1(61.0-79.9)、58.6(49.8-66.3)、68.0(56.8-75.9)、69.6(53.4-82.0)、59.4(43.5-70.3)であった。心副交感神経指標において、HFは安静に比べ嗅覚刺激、HFnuは安静に比べ刺激後3分で増大した($p < 0.05$)。心交感神経指標において、LF/HF、LFnuともに安静に比べ刺激後3分で減少した($p < 0.05$)。瞳孔は心副交感神経指標の増大がみられた嗅覚刺激で縮小し、刺激後3分に振動の増大がみられた。周波数解析では副交感神経指標の増大

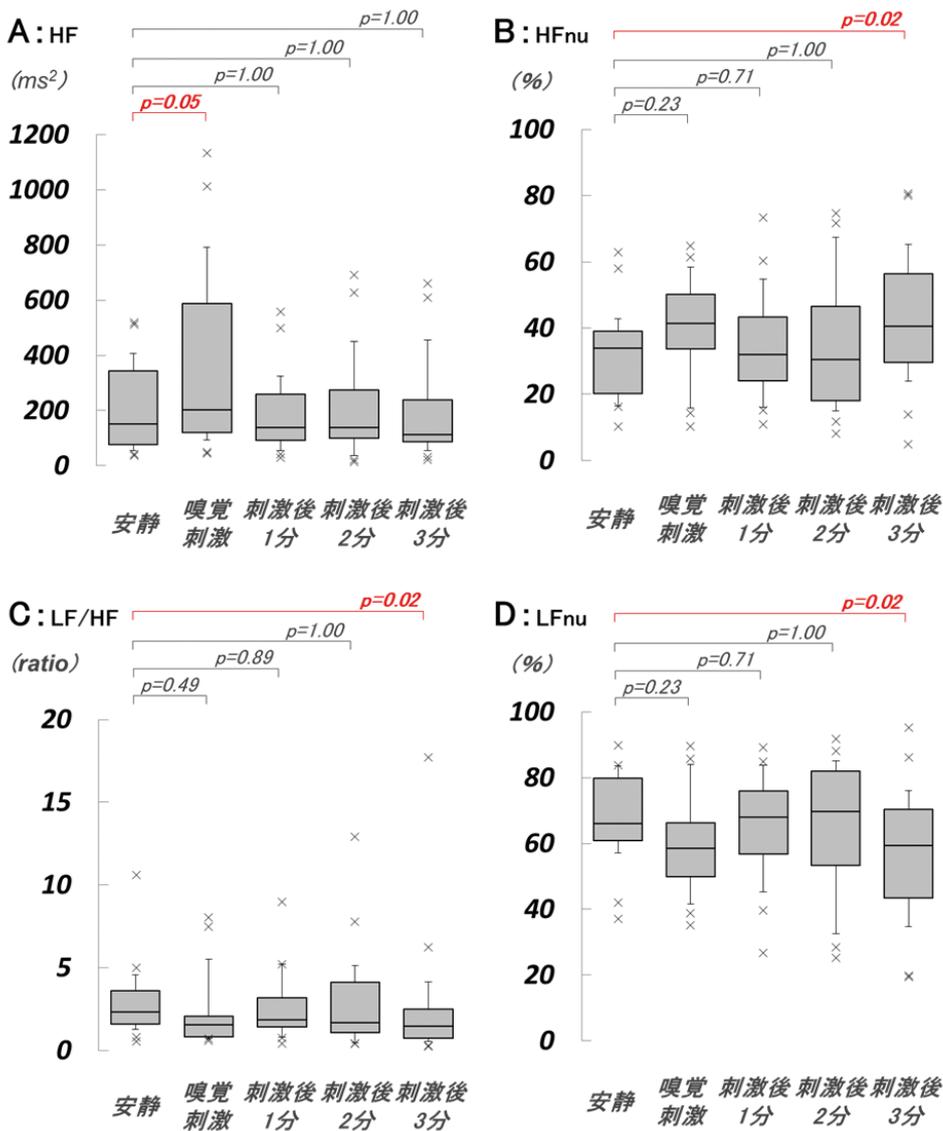


図1 ラベンダー精油による心拍変動心副交感神経指標HF (A)、HFnu (B)、心交感神経指標LF/HF (C)、LFnu (D) の結果を示す。安静に比べ嗅覚刺激で心副交感神経指標HFが増大、刺激後3分で心副交感神経指標HFnuが増大、心交感神経指標LF/HF、LFnuが減少した。

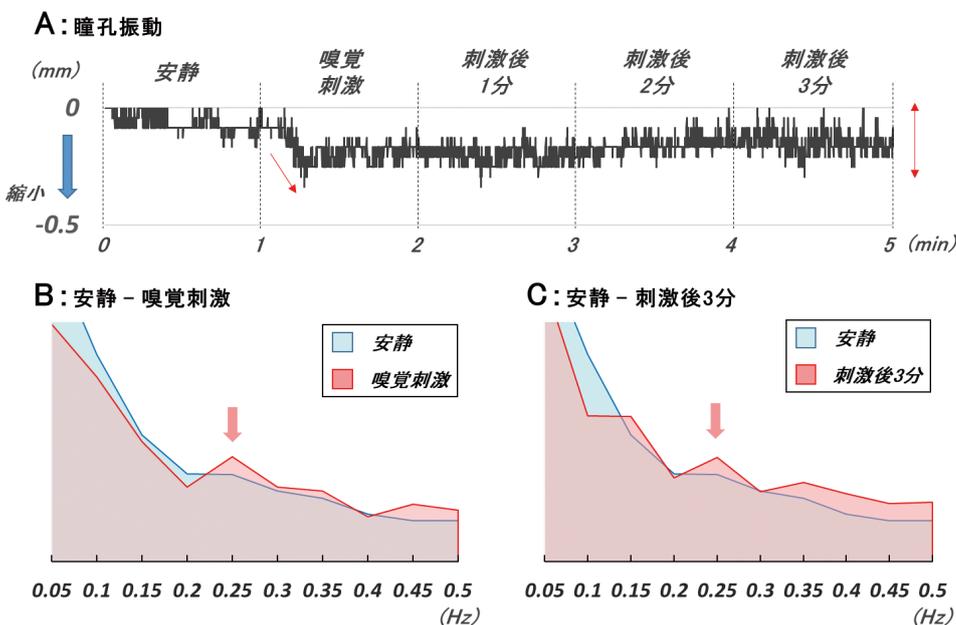


図2 ラベンダー精油による瞳孔振動瞳孔振動(A)、心副交感神経指標の増大した嗅覚刺激と刺激後3分のパワースペクトルを示す(B、C)。嗅覚刺激で瞳孔は縮小し、刺激後3分に振動の増大がみられた。嗅覚刺激、刺激後3分ともに安静に比べ0.25Hzのパワースペクトルが増大した。

した嗅覚刺激、刺激後3分で、安静に比べ0.25Hzのパワースペクトルの増大がみられた。自覚的な香りの好み合いはVASで62.0(49.3-73.5)であった。また、22名中、5名(23%)が「とても好き」、8名(36%)が「好き」、4名(18%)が「どちらでもない」、5名(23%)が「嫌い」と回答した。

3.2. グレープフルーツ精油 (図3、4)

心拍変動解析において安静、嗅覚刺激、刺激後1分、刺激後2分、刺激後3分の心副交感神経指標はそれぞれ、HFで151.7(94.5-333.7)、274.3(113.6-498.4)、151.7(100.0-276.1)、125.2(61.4-255.4)、134.4(58.6-223.9)、HFnuで38.2(25.9-46.0)、42.3(18.9-55.6)、35.5(26.7-49.2)、29.9(17.3-44.5)、32.7(19.2-49.0)であった。心交感神経指標はそれぞれ、LF/HFで1.7(1.2-3.2)、1.4(0.8-3.6)、1.5(1.0-3.5)、2.1(1.3-4.4)、2.2(1.0-3.9)、LFnuで61.8(54.0-74.1)、57.7(44.4-81.1)、64.5(50.8-73.3)、70.1(55.5-82.7)、67.3(51.0-80.8)であった。心副交感神経指標において、HFは安静に比べ嗅覚刺激で増大、刺激後3分で減少した($p < 0.05$)。心交感神経指標は、LF/HF、LFnuともに有意な差はみられなかった。瞳孔は心副交感神経指標の増大がみられた嗅覚刺激で縮小した。周波数解析では心副交感神経指標の増大した嗅覚刺激で安静に比べ0.25Hzのパワースペクトルの増大がみられたが、心副交感神経指標の減少した刺激後3分ではパワースペクトルに変化はみられなかった。自覚的な香りの好み合いはVASで69.0(63.3-81.3)であった。また、22名中、9名(41%)が「とても好き」、10名(45%)が「好き」、3名(14%)が「どちらでもない」と回答した。

3.3. 無臭刺激 (図5)

プラセボ効果を検証するため、無臭刺激で同様の実験を行った。対象は22名の被験者から無作為に選択した10名(平均年齢 21.5 ± 1.1 歳、男性5名、女性5名)とした。心拍変動において安静、無臭刺激の心副交感神経指標はそれぞれ、HFで105.0(39.2-180.5)、78.4(54.6-180.7)、HFnuで22.1(15.3-35.1)、22.0(11.4-30.9)であった。心交感神経指標はそれぞれ、LF/HFで3.5(2.0-6.5)、3.7(2.8-9.5)、LFnuで77.9(64.9-84.7)、78.0(69.1-88.6)であった。心拍変動解析において、いずれの指標も安静に比べ無臭刺激で有意な変化はみられなかった。瞳孔は安静から無臭刺激にかけて僅かに縮小傾向がみられるも、周波数解析によるパワースペクトルに変化はみられなかった。

4. 考察

嗅覚刺激が自律神経活動に与える影響として、ラベンダー精油は副交感神経系、グレープフルーツ精油は交感神経系を活性化させることが報告されている⁷⁾。これらの変化

は、ラベンダー精油に含まれるリナロール、グレープフルーツ精油に含まれるリモネンの影響であることが考えられている。嗅覚刺激を用いて指尖温度を調べた報告では、嗅覚刺激5分後にラベンダー精油で温度が低下、グレープフルーツで温度が上昇し、この結果は芳香分子の薬理作用によるものとしている⁹⁾。本研究において、嗅覚刺激後3分にラベンダー精油では心副交感神経指標の増大がみられ、グレープフルーツ精油では心副交感神経指標の減少がみられた。これは既報と同様に、ラベンダー精油に含まれるリナロールの薬理作用が心副交感神経指標を活性化させたと考えられる。また、ラベンダー精油で心交感神経指標の減少、グレープフルーツ精油で心副交感神経指標の減少がみられたことは、それぞれの成分が自律神経系を活性化させ恒常性を保つための反応と思われた。一方、ラベンダー精油とグレープフルーツ精油のどちらも安静に比べ嗅覚刺激で心副交感神経指標の増大がみられた。この異なる結果について、プラセボ効果による自律神経系への影響を無臭刺激にて検証した。その結果、心拍変動の結果では安静から無臭刺激で自律神経指標の活性はみられなかった。よって、心副交感神経指標の増加は嗅覚刺激を負荷したことによる反応であると考えられた。次に嗅覚刺激の自覚的な香りの好み合いに着目した。VASの結果ではラベンダー精油、グレープフルーツ精油ともに嗅覚刺激を好む被験者が多かった。また口頭でのアンケートでは、ラベンダー精油よりもグレープフルーツ精油の方が好みであると回答した被験者が多くみられた。グレープフルーツ精油は交感神経系の活性化が考えられているが、浅野ら⁹⁾はラベンダー精油、グレープフルーツ精油の嗅覚刺激直後、両刺激ともに一時的な体温低下がみられたことから、嗅覚刺激によってストレス緩和、リラックス効果が生じ一過性の心理作用が働く可能性を報告している。また、ラベンダー精油は降圧作用があると考えられているが、ラベンダー精油の香りに肯定的な群では血圧の低下がみられたのに対し、否定的な群では上昇したとの報告もあり¹⁰⁾、香りが自律神経に及ぼす影響には薬理作用だけではなく嗜好の影響も大きいことが考察されている。本研究においても、用いた嗅覚刺激がどちらも好まれる傾向にあったことから嗅覚刺激による一過性の心副交感神経指標の増大が心拍変動に表れた可能性がある。

瞳孔振動において、ラベンダー精油、グレープフルーツ精油ともに嗅覚刺激で瞳孔の縮小がみられた。また、ラベンダー精油刺激後3分では瞳孔の振動が増大した。周波数解析では心副交感神経の増大がみられたラベンダー精油の嗅覚刺激、刺激後3分、グレープフルーツ精油の嗅覚刺激で0.25Hzのパワースペクトルの増大がみられた。一方、心副交感神経指標が減少したグレープフルーツ精油刺激後3分では、パワースペクトルに変化はみられなかった。ク

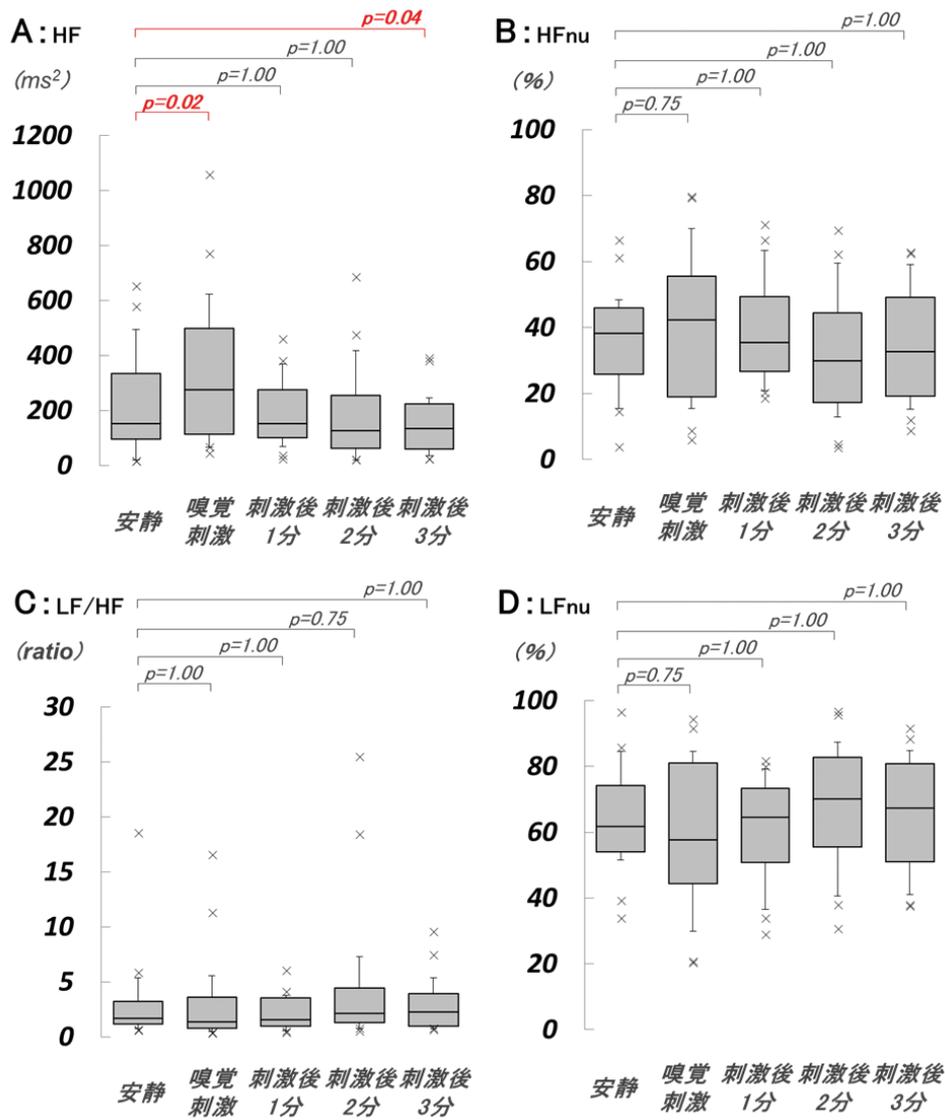


図3 グレープフルーツ精油による心拍変動
 心副交感神経指標HF (A)、HFnu (B)、心交感神経指標LF/HF (C)、LFnu (D) の結果を示す。心副交感神経指標HFは安静に比べ嗅覚刺激で増大、刺激後3分で減少した。

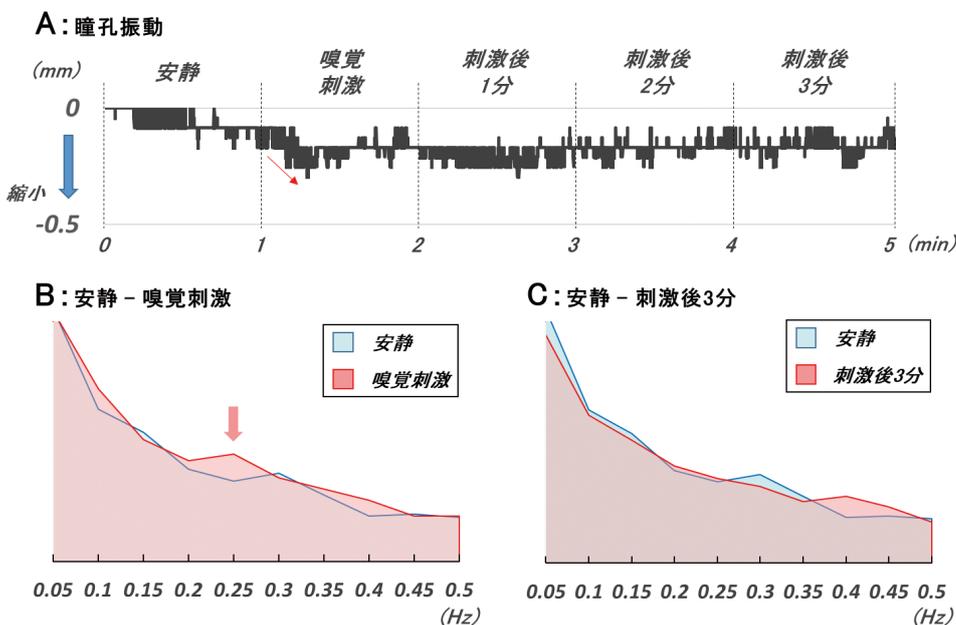


図4 グレープフルーツ精油による瞳孔振動
 瞳孔振動(A)、心副交感神経指標の増大した嗅覚刺激と減少した刺激後3分のパワースペクトルを示す(B, C)。嗅覚刺激で瞳孔は縮小し、安静に比べ0.25 Hzのパワースペクトルが増大した。一方、刺激後3分でパワースペクトルの変化はみられなかった。

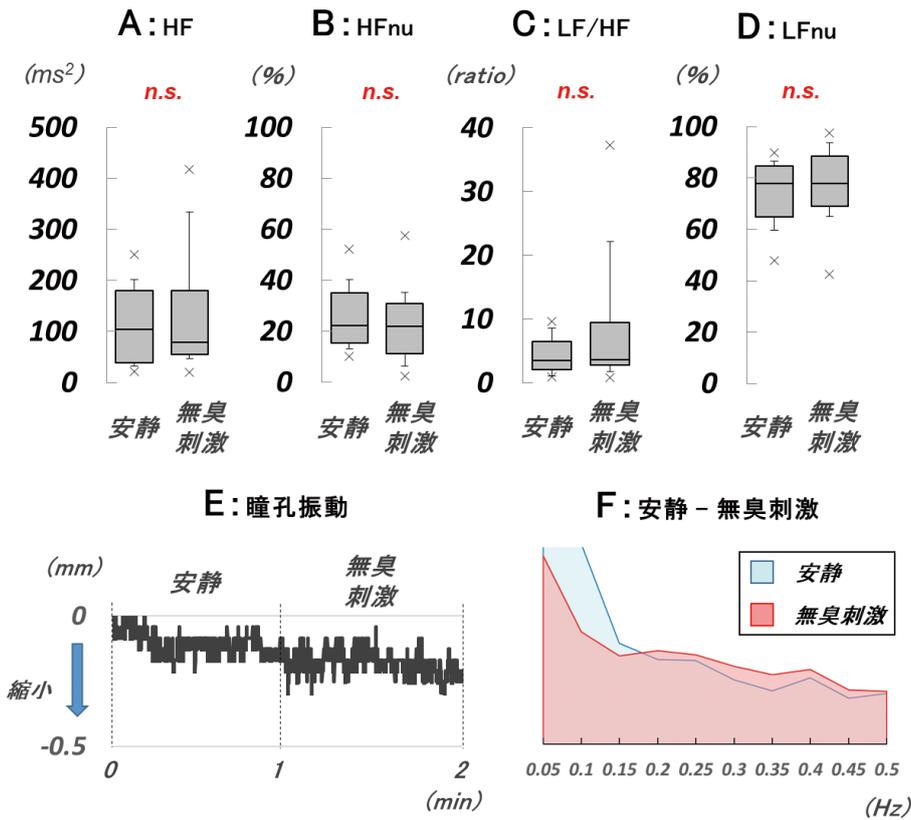


図5 無臭刺激による心拍変動と瞳孔振動、心副交感神経指標HF(A)、HFnu(B)、心交感神経指標LF/HF(C)、LFnu(D)、瞳孔振動(E)、パワースペクトル(F)を示す。心拍変動、瞳孔振動ともに変化はみられなかった。

ラシック音楽を聴覚刺激に用いた報告では、リラックス状態を反映する副交感神経系の活性化、瞳孔の縮小、0.25Hzの瞳孔振動が増大したことが報告されている¹¹⁾。本研究においても、嗅覚刺激による心副交感神経指標の増大で瞳孔の縮小、0.25Hzのパワースペクトルの増大がみられた。よって、瞳孔振動は香りによる心副交感神経系の反応を客観的に捉えられる指標となることが考えられた。

5. 総括

瞳孔振動と心拍変動は、香りが自律神経に及ぼす影響について客観的な評価指標となることが示唆された。この結果は、コスメトロジー分野において香りの好みの定量化や、香りが生体に及ぼす影響を検討するための一助となる可能性がある。

(引用文献)

- 1) Duan X, Tashiro M, et al. Autonomic nervous function and localization of cerebral activity during lavender aromatic immersion. *Technol Health Care*. 15. 69-78. 2007.
- 2) E H HESS, J M POLT. Pupil Size as Related to Interest Value of Visual Stimuli. *Science*. 5. 349-350. 1960.
- 3) B Wilhelm, H Giedke, et al. Daytime Variations in Central Nervous System Activation Measured by a Pupillographic Sleepiness Test. *J Sleep Res*. 10. 1-7. 2001.
- 4) H Wilhelm, H Lüttke, et al. Pupillographic Sleepiness Testing in Hypersomniacs and Normals. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 236. 725-729. 1998.
- 5) H Lüttke, B Wilhelm, et al. Mathematical Procedures in Data Recording and Processing of Pupillary Fatigue Waves. *Vision Res*. 38. 2889-2896. 1998.
- 6) 西山 潤平, 谷田 公二, 他. 瞳孔ゆらぎを指標とした覚醒度状態評価. *生体医工学*. 46. 212-217. 2008.
- 7) 永井 克也. 嗅覚と聴覚の刺激による自律神経変化 - 体内時計とヒスタミン神経系の関与 -. *Equilibrium Res*. 71. 207-213. 2012.
- 8) Adachi T, Sert-Kuniyoshi FH, et al. Effect of weight gain on cardiac autonomic control during wakefulness and sleep. *Hypertension*. 57. 723-730. 2011.
- 9) 浅野 智絵美, 伊藤 輝子, 他. グレープフルーツおよびラベンダーの匂い刺激による生理・心理機能への影響. *日味と匂会誌*. 16. 633-636. 2009.
- 10) 森 広子, 小林 章子, 他. 精油の香りと嗜好が健康人の血圧・脈拍に及ぼす影響. *日補完代替医療会誌*. 6. 137-142. 2009.
- 11) 原 直人. ストレス評価としての瞳孔機能. *視覚の科*. 33. 47-51. 2012.

顔魅力の知覚に服および行動の知覚が与える影響の検討

新潟大学人文学部

新美 亮輔

Although it is widely believed that facial attractiveness is determined by physical features of the face, non-physical factors also influence facial attractiveness perception. In the present study, we examined the influence of the target person's personality information and the influence of the attractiveness of the clothes worn by the target person. A verbal description of the target person's honest personality increased the rated physical attractiveness of the target face that was presented subsequently. The previously reported "honesty premium" effect was replicated with Japanese samples of wide age range. Target clothing attractiveness did not affect facial attractiveness ratings. The target person's creativity showed no effect on facial attractiveness, while high aggressiveness was found to decrease the facial attractiveness of male targets. No evidence was found that participants' mood was the cause of the "honesty premium" effect. The perception of facial attractiveness is determined not only by facial physical features, but also by the perception of target personality traits, especially those related to trustworthiness.

1. 緒言

顔魅力 (facial attractiveness) は、多くの人の関心事である。程度に個人差はあれど、人は顔を含めた自らの外見が他人にとって魅力的であることを望む。この動機づけは、社会的文脈と相互作用しながら、服飾や化粧などの豊かな文化を育んできた。その一方で、顔魅力に関する強い動機づけは時に問題も生じる。たとえば、自らの外見が理想と大きく乖離していると主観的に感じられる場合、それは強い葛藤やストレス、心理学的不適応をもたらすことがある¹⁾。また、顔の外見の魅力から人の実際の能力やパーソナリティを予測することはほとんどできない^{2,3)}にもかかわらず、顔の外見の魅力が高い人の能力やパーソナリティを好ましく判断してしまいやすい⁴⁾。この現象は魅力ステレオタイプ (physical attractiveness stereotype) と呼ばれ、人事選考や学業成績評価をゆがめるおそれがあることから、応用心理学分野や教育心理学分野で関心が持たれてきた。

なぜ私たちはある顔を魅力的だと感じるのだろうか。知覚・認知心理学分野では、顔魅力を規定する知覚的要因が検討されてきた。顔のパーツの大きさの効果などを素朴に検討する研究もあるが⁵⁾、近年はより全体的な特性、特に対称性や平均性 (averageness)⁶⁾ が議論になっている。その背景には進化心理学的な解釈がある。すなわち、対称性などの外見的特徴は身体的な健康の徴候であるからヒトの視覚系はそれらの特徴を検出し魅力的に知覚するように進

化したという解釈である。この進化心理学的解釈は1990年代に注目されたが、顔の対称性や平均性を高めれば高めるほど単純に顔魅力が高まるわけではないという報告や、顔魅力が実際に身体的な健康を反映しているかは疑わしいという報告もあり⁷⁾、明確なコンセンサスが得られるには至っていない。

これらの議論から明らかなのは、研究者を含め多くの人が顔魅力を文字通り物理的 (physical) なものだと考えていることだ。確かに、多くの人に魅力的だと判断されやすい顔がある。しかし、物理的・外見的特徴は実際に人が感じる顔魅力のすべてを決定しているわけではない。少なくとも心理学的には、魅力とは主観的経験であって、外界に存在するものではない ("beauty is in the eye of the beholder")。実際、顔魅力の知覚は顔以外のさまざまな要因によってかなり変動する。たとえば、よく見知った人の顔の魅力を高く評価しやすい^{8,9)}。表情¹⁰⁾や香り¹¹⁾も顔魅力に影響するという。なお、赤い背景は顔写真の魅力を高めると報告されたことがあるが、後のメタ分析によりこの効果はほとんどないことがわかっている¹²⁾。

本研究で注目したのは、人物のパーソナリティ情報の効果である。顔写真を提示してその顔の魅力を評価してもらう実験で、同時に "friendly" などの好ましいパーソナリティ特性の言語情報を提示すると、好ましくない特性の情報 ("unfriendly" など) を提示した場合に比べ、同じ顔写真でも外見的に魅力的 (physically attractive) と評価された¹³⁾。Paunonen¹⁴⁾はこの現象をより厳密に検討し、標的人物のパーソナリティ情報を顔写真に先立って提示した場合でも同様の効果があること、顔写真が男女どちらでも効果があることを示している。特に、誠実な (honest) パーソナリティ情報の事前提示は、続いて提示された顔写真の外見的魅力の評価を高めた。このような効果は、魅力ステレオタイプとは逆方向のステレオタイプ、すなわち「よい人は魅力



The Effects of Perceptions of Clothing and Behavior on Judgments of Facial Attractiveness

Ryosuke Niimi

Faculty of Humanities, Niigata University

的」だと判断しやすいステレオタイプの存在を示唆する。近年、この効果は注目されはじめ、複数の研究が出版されている¹⁵⁻¹⁷⁾。

このような、顔魅力に対する顔そのものの外見以外の要因の影響は、まだあまり研究されていない。しかし、顔魅力が顔の外見だけで決まるわけではないという事実を心理学的によく理解することは、外見的魅力に関わる種々の問題を考える上でも重要だと思われる。そこで本研究では、Paunonen¹⁴⁾の誠実性の効果を日本人サンプルにおいて再検討し、さらに誠実性以外のパーソナリティ特性の影響も検討した。加えて、服魅力の影響も検討した。顔魅力が服魅力の評価に影響を与えることは報告されており¹⁸⁾、その逆の効果があってもおかしくない。もし服魅力の効果があるならば、顔魅力に影響する顔以外の要因としては新しい発見となるはずである。

なお、実験1および実験3は後藤真美(新潟大学人文学部、当時)と共同で行った。本研究の詳細は、後藤との共著論文として出版済みである¹⁹⁾。

2. 方法

2.1. 実験1

大学生65名(女性38, 男性27, 平均年齢21.1)が参加した質問紙実験であった。質問紙は電子ファイルで作成し、電子メールにて配布した。実験1の目的は、Paunonen¹⁴⁾の誠実性の効果を日本の大学生で確認すること、刺激とし

て用いる顔写真の(顔写真だけで判断されるもとの)顔魅力の影響を検討することだった。

各参加者はまず質問紙に書かれた架空の大学生(標的人物)のプロフィール文を読み、続いてこの大学生の性格を評定した(この時点では顔写真は提示されない)。プロフィール文はPaunonen¹⁴⁾が用いたものの日本語訳で、誠実性高条件(財布を拾った際に中身を抜き取らず持ち主に返した、等の誠実な行動を描写)と低条件(不誠実な行動を描写)があり、参加者間で操作した。性格評定は操作チェックだった。その後、参加者は標的人物のものとして顔写真を1枚提示され、その外見的特徴を評定(9件法)するよう指示された。評定項目のうち1つが「魅力」で、この評定値が主たる従属変数であった(他の項目はフィラー)。刺激として用いた顔写真は素材写真を加工したもので、事前の予備調査により、相対的に高魅力な顔(男性2・女性2)と低魅力な顔(男性2・女性2)を選出して用いた(図1a)。各参加者は1名の刺激人物についてのみ評価した。参加者と標的人物の性別の割り当てはランダムだった(つまり、4通りのすべての組み合わせがあった)。

2.2. 実験2

従来の研究はほとんどが大学生を対象としていた。そこで実験2では、幅広い年齢層の参加者を対象としてPaunonen¹⁴⁾の誠実性の効果が再現されるか確認することを目的とした。第2の目的は、大きなサンプルサイズを用

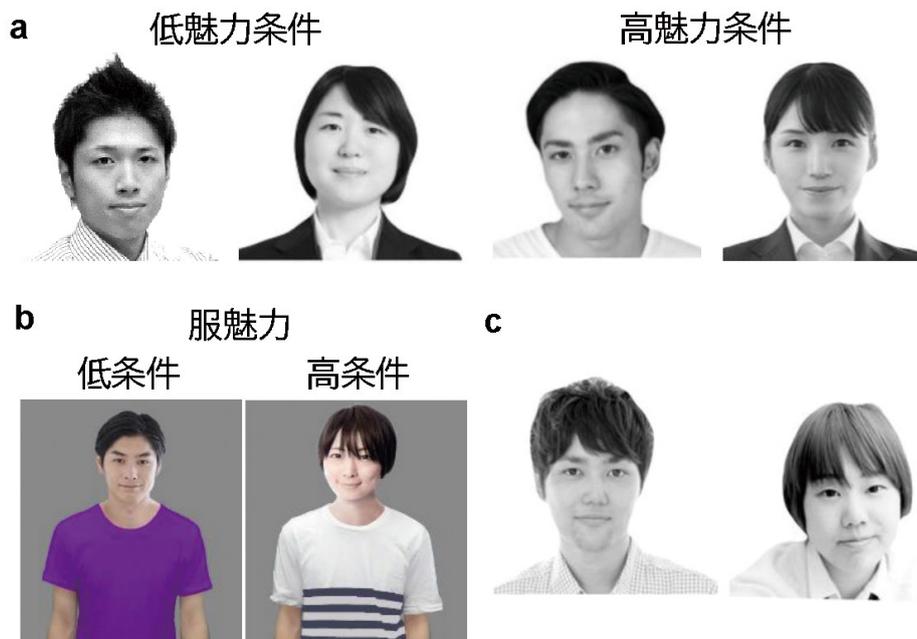


図1 実験で用いた顔写真刺激の例。実験1では、事前調査(顔写真のみを提示しパーソナリティ情報の提示はなし)により相対的に高魅力・低魅力と評価された写真を用いた(a)。実験2では、中程度の魅力の顔写真に、事前調査により高魅力・低魅力と評価されたTシャツを合成した画像を用いた(b)。実験3および4では、中程度の魅力の顔写真を用いた(c)。文献¹⁹⁾を元に著者作成。顔写真には素材写真(photoAC)を使用。

いて、参加者の性別と刺激人物の性別の効果をそれぞれ検討することだった。第3の目的は、服魅力の効果の検討だった。

クラウドワーカー 480 名が実験2に参加した。ただし、23名のデータを分析から除外した(3.2. 参照)。分析対象の457名は女性262名・男性195名で、年齢は19歳から75歳、平均40.0歳だった。

参加者はオンラインフォームにより実験2に参加した。オンラインフォームの構成は実験1の質問紙と同様で、参加者は標的人物のプロフィール文を読んだあと、性格評定を行い、続いて標的人物の顔写真を提示され、その外見的特徴(魅力を含む)を評定した。評定はvisual analogue scale(0-100)で行われた。前のページに戻ることはできなかった。プロフィール文は実験1と同じものだった。顔写真は新たに作成したもので、Tシャツを着た人物の上半身が映った画像だった(図1b)。これらは顔写真とTシャツの画像を合成して作られた。Tシャツは、事前の予備調査によって高魅力なものと低魅力なものを複数選出して用いた。顔写真は、予備調査で魅力が中程度だったもの(男女各2)を用いた。プロフィール文の誠実性(高低)、服魅力(高低)、標的人物の性別(男女)、参加者の性別(男女)からなる8条件参加者間計画だった。

2.3. 実験3

誠実性以外のパーソナリティ特性の知覚も標的人物の顔魅力知覚に影響するのだろうか。実験3では、誠実性のかわりに創造性(creativity)と攻撃性(aggressiveness)の効果を検討した。創造性(高低)×攻撃性(高低)からなる4通りのプロフィール文を作成して用いた。創造性は、誰も思いつかないようなアイデアを出す、などの描写によって操

作した。攻撃性は、よく人と言い争ったり物を蹴ったりする、などの描写によって操作した。顔写真には予備調査で魅力が中程度だったもの(男女各4)を用いた(図1c)。服魅力は操作しなかった。実験3は実験2と同様のオンラインフォームを用いて行われた。大学生117名が参加した(女性82名、男性35名、平均年齢20.5)。

2.4. 実験4

プロフィール文の内容がなぜ顔魅力評定に影響するのだろうか。Paunonen¹⁴⁾は、標的人物に対する全般的な好ましさ(likability)がパーソナリティ知覚と顔魅力知覚を媒介すると解釈している。実験4は別の可能性として気分(mood)の影響を検討した。誠実なプロフィールを読んだ参加者は、ポジティブな気分となり、これが顔魅力評定を高くする可能性が考えられたからだ。そこで、実験の最後に気分評定を行ってもらい、参加者の気分と顔魅力評定に関連があるか検討した。プロフィール文は実験1と同じ(誠実性高条件・低条件)で、顔写真は実験3と同じだった(図1c)。131名の大学生が実験4に参加した。1名はプロフィール文を以前に読んだことがあると回答したため、そのデータを除外し、130名のデータを分析対象とした(女性67、男性63、平均年齢19.7)。

3. 結果

3.1. 実験1の結果

性格評定のうち誠実性の評定は誠実性高条件で誠実性低条件より高く、誠実性の操作は成功していた。外見的特徴の評定項目のうち魅力の評定値を分析した(図2a)。誠実性(高低)と刺激顔写真のものととの魅力(高低)が標的人物の顔魅力の評定値に影響したか分散分析により検討したと

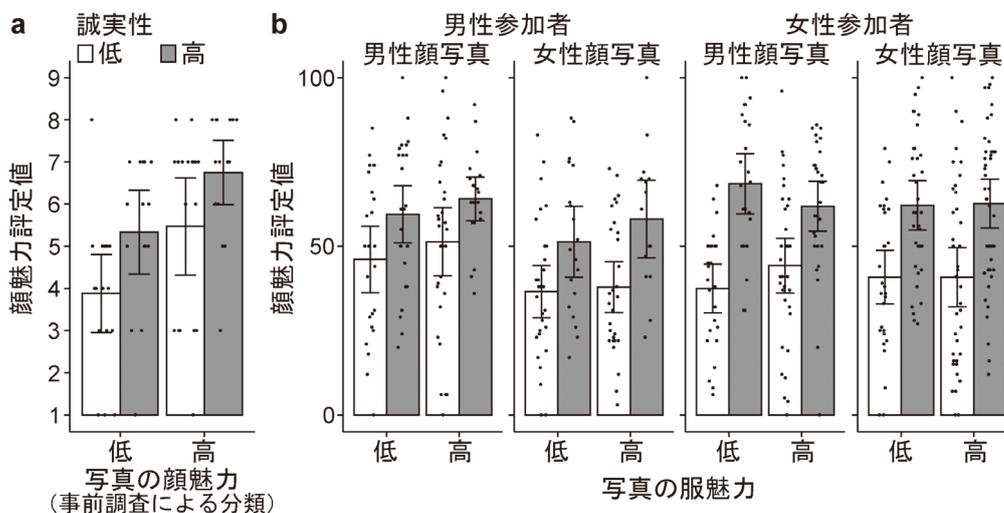


図2 実験1(a)および実験2(b)の顔の外見的魅力の平均評定値。両実験とも、標的人物の誠実性が高い条件(グレーのバー)の方が誠実性が低い条件(白いバー)よりも顔魅力が高く評定された。ドットは参加者ごとの評定値を示し、エラーバーは平均の95%信頼区間を示す。文献¹⁹⁾を元に著者作成。

ころ、どちらの効果も統計的に有意で(順に、 $F(1, 61) = 8.84, p = .004, \eta_p^2 = .127$; $F(1, 61) = 10.71, p = .002, \eta_p^2 = .149$)、かつ、交互作用はなかった($F(1, 61) = 0.03, p = .852, \eta_p^2 = .001$)。もともとの顔魅力の効果が見られたのは当然の結果であり、研究上重要なのは誠実性の効果である。誠実性の高い標的人物の顔は、誠実性の低い標的人物の顔よりも、外見的魅力が高く評価され、Paunonen¹⁴⁾の誠実性の効果が日本の大学生においても再現された。しかもその効果はもともとの顔魅力と無関係に生じていた。誠実性の効果が外見的魅力の高さと独立に生じるという結果は先行研究の報告¹⁵⁾とも一貫している。

3. 2. 実験2の結果

性格評定と外見評定の合計15項目のうち過半数(8項目以上)でvisual analogue scaleのデフォルト値(50)、左端(0)、または右端(100)を回答していた22名の参加者のデータは、信頼性が低いとみなし、分析から除外した。さらに、オンラインフォーム表紙の参加者性別の記述欄でノン・バイナリーと回答した1名のデータは、参加者の性別を要因とした分析にノン・バイナリーのカテゴリーを水準として組み込むにはサンプルサイズが小さすぎたため、やはり分析から除外した。

分析対象のデータについて、顔写真の外見的魅力の評定値を分析した(図2b)。誠実性高条件では有意に魅力評定が高く($F(1, 441) = 78.65, p < .001, \eta_p^2 = .151$)、実験1に続いてPaunonen¹⁴⁾の誠実性の効果が再現された。一方、服魅力の高条件と低条件で顔魅力評定値に有意差はなかった($F(1, 61) = 1.15, p = .285, \eta_p^2 = .003$)。評定人物が男性の場合、標的人物が女性の場合より若干顔魅力評定が高かった($F(1, 441) = 6.20, p = .013, \eta_p^2 = .014$)。これは刺激に用いた顔写真のもともとの魅力を男性写真と女性写真で厳密に等しく調整していなかったためと思われた。誠実性との交互作用はなかったことから、標的人物の性別は誠実性の効果とは関係がなかった。参加者の性別の効果はなかった($F(1, 441) = 0.64, p = .425, \eta_p^2 = .001$)。

3. 3. 実験3の結果

顔魅力評定値について、プロフィール文の創造性と攻撃性の効果を検討したところ、どちらも統計的には有意でなかった(順に、 $F(1, 113) = 0.17, p = .677, \eta_p^2 = .002$; $F(1, 113) = 3.44, p = .066, \eta_p^2 = .030$)。創造性高条件と低条件の顔魅力評定値は平均5.0と4.8だった。ベイズファクターの分析でも帰無仮説の方が確からしく($BF_{01} = 4.75$)、創造性の効果はなかったと言える。攻撃性高条件と低条件の顔魅力評定値は4.6と5.2で、統計的有意差はなかったものの、攻撃性高条件で顔魅力が低下する傾向があった。攻撃性の知覚は標的人物の性別によって異なる可能性があるこ

とから、標的人物の性別も要因として組み込んだad hocな分析を行った。その結果、標的人物の性別と攻撃性の交互作用が見られ($F(1, 109) = 4.81, p = .030, \eta_p^2 = .042$)、標的人物が男性の場合に攻撃性高条件で攻撃性低条件に比べ顔魅力評定が有意に低下した。

3. 4. 実験4の結果

Paunonen¹⁴⁾の誠実性の効果を確認するため顔魅力評定値を分析したところ、予想に反して誠実性の効果が見られなかった($F(1, 126) = 0.90, p = .344, \eta_p^2 = .007$)。平均評定値は誠実性高条件で5.0、誠実性低条件で4.7だった。

参加者の気分が顔魅力評定と関連しているか検討するため、気分評定の回答からポジティブ気分得点(PA)とネガティブ気分得点(NA)を算出してこれらを説明変数とし、顔魅力評定を被説明変数とする重回帰分析を行った。しかし、どちらの気分得点も回帰係数は有意でなく($p > .05$)、帰無モデルの方が確からしかった($BF_{01} = 3.67$)。誠実性の効果が再現されなかったためそもそも結果の解釈が難しいが、気分が顔魅力評定に影響しているという証拠はなかった。

4. 考 察

Paunonen¹⁴⁾の誠実性の効果は日本の参加者でも再現された。実験4でのみ再現に失敗したが、これは実験4のみコースクレジットを参加謝礼に用いたためかもしれない。全体的には、誠実性の効果は頑健だったと言える。誠実な人物は、男性でも女性でも、異性でも同性でも、もともとの外見的魅力が高くて低くても、着ている服の魅力が高くて低くても、不誠実な人物よりも魅力的な顔であると評価された。参加者はあくまでも顔の外見的な魅力を評価するよう求められたにもかかわらず、標的人物のパーソナリティの影響が生じたことは、顔魅力の知覚が実際には標的人物に関するさまざまな情報(外見の情報も、外見以外の情報も)を統合することで生まれる複雑な心理学的プロセスであることを示している。

なぜこのような現象が起こるのだろうか。参加者の気分が顔魅力評定を媒介しているという証拠は得られなかった。Paunonen¹⁴⁾は標的人物に対する全般的な好ましさ(likability)が媒介している可能性を指摘したが、本研究でもサンプルサイズの大きい実験2のデータを用いて媒介分析を行ったところ、誠実性の知覚が標的人物に対する好ましさを媒介して顔の外見的魅力に影響する媒介効果が有意であり、Paunonen¹⁴⁾の解釈の妥当性が確認された。顔魅力はおおむね無意識的・直感的に知覚されるものであり、そのような無意識的過程において、外見的特徴から生じる好ましさとパーソナリティ知覚によって生じる好ましさは厳密に区別されていないのだろう。

誠実性以外のパーソナリティ特性の効果はやや複雑である。顔魅力知覚への創造性の影響はないことが示唆されたが(実験3), 外見的魅力ではなく標的人物の全般的な魅力は創造性によって高まるという報告がある²⁰⁾。実験3は標的人物が男性の場合には攻撃性が顔魅力評定を下げる可能性も示したが, ad hocな分析に基づいており検出力が十分ではなく, 改めて検討する必要がある。Paunonen¹⁴⁾は知性(intelligence)が顔魅力評定にあまり影響しないことも示しており, 総じて, 能力(competence)に関わる特性はあまり顔魅力知覚を変えないようである。これに対し, 誠実性(や攻撃性)が顔魅力知覚を変えることは, 能力と信用性(trustworthiness)とが対人知覚における主要な2因子であるとする社会心理学的理論²¹⁾と整合性がある。誠実性や攻撃性は信用性を構成する特性として解釈できる。

顔魅力の心理学研究ではこれまで, 顔そのものの外見的特徴以外の要因はあまり注目されてこなかったが, 今後さらに研究されるべきだろう。顔魅力知覚の典型的な実験では, 顔の画像を提示して, その魅力の評定を参加者に求める。このような状況では顔の外見的特徴のみが利用可能な情報だから, 外見的特徴の影響が強くなるのは当然である。一方で, 日常的な対人知覚の場面では, 外見的特徴以外の情報も同時に多数利用可能なことが多い。そのような状況で実際に外見的特徴以外の情報が顔魅力知覚にどう利用されているのか, 実証的に検討することが必要であろう。

(引用文献)

- 1) ラムゼイ N, ハーコート D. アピアランス〈外見〉の心理学 可視的差異に対する社会的理解とケア 福村出版; 2017.
- 2) Dickey-Bryant L, Lautenschlager GJ, Mendoza JL, Abrahams N. Facial attractiveness and its relation to occupational success. *J Appl Psychol.* 1986; 71: 16-19.
- 3) Feingold A. Good-looking people are not what we think. *Psychol Bull.* 1992; 111: 304-341.
- 4) Eagly AH, Ashmore RD, Makhijani MG, Longo LC. What is beautiful is good, but...: A meta-analytic review of research on the physical attractiveness stereotype. *Psychol Bull.* 1991; 110: 109-128.
- 5) Cunningham MR. Measuring the physical in physical attractiveness: Quasi-experiments on the sociobiology of female facial beauty. *J Pers Soc Psychol.* 1986; 50: 925-935.
- 6) Langlois JH, Roggman LA. Attractive faces are only average. *Psychol Sci.* 1990; 1: 115-121.
- 7) Jones BC, Holzleitner IJ, Shiramizu V. Does facial attractiveness really signal immunocompetence? *Trends Cogn Sci.* 2021; 25: 1018-1020.
- 8) Kniffin KM, Wilson DS. The effect of nonphysical traits on the perception of physical attractiveness: Three naturalistic studies. *Evol Hum Behav.* 2004; 25: 88-101.
- 9) Peskin M, Newell FN. Familiarity breeds attraction: Effects of exposure on the attractiveness of typical and distinctive faces. *Perception.* 2004; 33: 147-157.
- 10) Ueda R, Kuraguchi K, Ashida H. Asymmetric effect of expression intensity on evaluations of facial attractiveness. *Sage Open.* 2016; 6: 215824401667756.
- 11) Demattè ML, Österbauer R, Spence C. Olfactory cues modulate facial attractiveness. *Chem Senses.* 2007; 32: 603-610.
- 12) Lehmann GK, Elliot AJ, Calin-Jageman RJ. Meta-analysis of the effect of red on perceived attractiveness. *Evol Psychol.* 2018; 16: 1474704918802412.
- 13) Gross AE, Crofton C. What is good is beautiful. *Sociometry.* 1977; 40: 85-90.
- 14) Paunonen SV. You are honest, therefore I like you and find you attractive. *J Res Pers.* 2006; 40: 237-249.
- 15) Lewandowski GWJr, Aron A, Gee J. Personality goes a long way: The malleability of opposite-sex physical attractiveness. *Pers Relatsh.* 2007; 14: 571-585.
- 16) Zhang Y, Kong F, Zhong Y, Kou H. Personality manipulations: Do they modulate facial attractiveness ratings? *Pers Individ Differ.* 2014; 70: 80-84.
- 17) Wang X, Liu S, Han S, Gan Y, Li W, Xu Q, et al. Roles of social knowledge and sexual dimorphism in the evaluation of facial attractiveness. *J Exp Soc Psychol.* 2020; 88: 103963.
- 18) 新美亮輔・山田真也 顔の魅力が服の魅力評価に与える影響とその性差 心理学研究, 2020; 91: 94-104.
- 19) Niimi R, Goto M. Good conduct makes your face attractive: The effect of personality perception on facial attractiveness judgments. *Plos One.* 2023; 18: e0281758.
- 20) Watkins CD. Creating beauty: Creativity compensates for low physical attractiveness when individuals assess the attractiveness of social and romantic partners. *Roy Soc Open Sci.* 2017; 4: 160955.
- 21) Walker M, Vetter T. Changing the personality of a face: Perceived Big Two and Big Five personality factors modeled in real photographs. *J Pers Soc Psychol.* 2016; 110: 609-624.

視覚障害者自らによる「化粧」が視覚障害者の Quality of Life に与える多面的な影響に関する研究

日本福祉大学社会福祉学部

横山 由香里

The objective of this study was to explore the effects on QOL of women with visual impairments the opportunity to learn to apply their own makeup. We conducted a pre-post intervention study to test the impacts of the blind makeup program. Although our study had only six participants, we did find among them that their QOL scores improved after intervention.

1. 緒言

視力を失うことは、Quality of Life (以下、QOL) の著しい低下や、うつ病のリスクにつながる。先行研究では、一般住民に比べて視覚障害者のQOLが低いこと^{1,2)}や、精神健康や心理的well-beingが低いこと³⁻⁵⁾が報告されてきた。したがって、視覚障害者のQOL向上を目指す試みは極めて重要と言える。

視覚障害があってもQOLを高め、生き活きと生きるための支援として、本研究では化粧の可能性に着眼した。WHOQOLでは‘bodily image and appearance’が構成要素の1つになっている⁶⁾。視覚に障害があったとしても自身が「こう在りたい」と考えるボディイメージは、QOLに大きな影響をもたらすと考えられる。視覚障害者以外を対象とした研究では、がん患者において、化粧等のケアがQOLの向上に資することが報告されている^{7,8)}ように、化粧がQOLの向上に寄与するとの研究が蓄積されつつあるが、視覚障害者を対象とする研究はほとんど行われていない。

視覚障害者は、自身の目で確認しながら化粧を行うことが困難である。しかしながら大石らの開発したブラインドメイクプログラム⁹⁾により、視覚に障害があっても自ら化粧をすることが可能となっている。そこで本研究では、ブラインドメイクプログラムを受講した視覚障害者において、QOLの改善がもたらされるかを検討することとした。

2. 方法

2.1. 対象

原疾患や先天性、中途障害等は問わず、「身体障害者福祉法」に基づく身体障害者手帳の障害程度等級(視覚障害)

に該当する者とした。20歳以上の女性がブラインドメイクプログラムの受講を申し込んだ際に、本研究の趣旨を説明し、6名より同意を得た。

2.2. ブラインドメイクプログラム

ブラインドメイクプログラムは鏡を見なくてもフルメイクアップができる化粧技法として大石華法氏が開発したものである⁹⁾。プログラムでは一般社団法人日本ケアメイク協会の認定を受けた化粧訓練士によって化粧工程を習得する。化粧訓練士は音声で視覚障害者を誘導し、訓練を積み重ねていくことで視覚障害者自身が自ら化粧ができる構成になっている。短時間で、自然な仕上がりにすることに配慮しながら、次のような手順で化粧をしていく。まず、自分自身の両手指をダイレクトに化粧パウダーに付け、手指に付着した化粧パウダーを左右双方の手の指先や指腹で擦り合わせ、左右同色になるように色を馴染ませる。その状態のまま顔のあらかじめ決めておいた個所に化粧を施す⁹⁾。以上の動作を、化粧訓練士と共に練習していくことで、最終的には視覚障害者が自信をもって一人で化粧をすることができるようになる。

本研究では、オンライン上で実施されたブラインドメイクプログラムの受講者を研究対象とした。

2.3. 調査方法

ブラインドプログラムの受講が決まった段階で、化粧訓練士より研究の概要を説明し、承諾が得られた場合に、研究者から改めて研究の詳細を口頭で説明し同意を得た。調査はプログラム受講前と受講後に実施した。QOLに関わる項目は構造化された質問を用いて聴取した。面接時間は約20分であった。

2.4. 指標の選定

効果測定に際して多面的な評価が必要であるが、対象者の負担を考慮すると、指標を精査することが求められる。本研究では医療分野でブラインドメイクが発展しつつある状況を鑑み、健康関連QOLの指標を採用することとし、特にどのような評価項目が優先されるかを、視覚障害者や



The effects on QOL of giving women with visual impairments the opportunity to learn to apply their own makeup

Yukari Yokoyama

Nihon Fukushi University

専門職(ロービジョン領域に精通している眼科医、視能訓練士)へのヒアリング調査を基に検討した。

視覚障害者は、精神的な苦痛を抱えやすいことが先行研究において指摘されている³⁻⁵⁾。他方、視覚障害者へのヒアリング調査では、精神的な不安はあったものの、化粧が気持ちの落ち込みを改善する契機になったことも示された。自ら化粧ができるようになることで、精神的苦痛が軽減される可能性があるか否かを検討するため精神健康度を評価することとした。

2. 5. 分析に用いた指標

QOLの指標は、SF-36v2¹⁰⁾を用いた。SF-36v2は、健康関連QOLを測定するための尺度として開発され、信頼性と妥当性が検証されている。国内外で広く使用されており、一般住民との比較も可能である。SF-36v2には、8つの下位尺度があり、国際的には身体的側面と精神的側面の2側面にまとめられる。日本では、身体的側面、精神的側面、役割/社会的側面の3側面に分けたスコアリング方法も提唱されているが、本研究ではブラインドメイクプログラムの受講によって変化が期待できる項目であることと、先行研究との比較の観点が必要であることから国際的に精神的側面として扱われている次の4つの下位尺度に着目した(①活力・②社会生活機能・③日常役割機能(精神)、④心の健康)。そのため、上位概念での合算はせず、下位尺度のまま使用した。いずれの尺度も得点が高いほど良好であることを示す。「活力」は元気いっぱい・活力にあふれていた・疲れ果てていた等の4つの質問で構成される。「社会生活機能」は付き合いの減少・付き合いをする時間の減少を尋ねる2つの質問で構成される。「日常役割機能(精神)」は普段の活動が思ったほどできなかった等の3つの質問で構成される。「心の健康」は神経質・落ち込み・穏やかな気分等を尋ねる5つの質問で構成される。

2. 6. 分析方法

SF-36v2は、スコアリングマニュアル¹⁰⁾に従い、日本人の国民標準値に基づく尺度得点(日本人の国民標準値を50、標準偏差が10)になるように得点化した。ブラインド

メイク受講前後のスコアを比較するため、対応のあるt検定を行った。有意水準は $p < 0.05$ とした。

2. 7. 倫理的配慮

研究開始前に口頭で本研究の目的や個人情報保護の方法について説明し同意を得た。本研究は日本福祉大学人を対象とする研究の倫理審査委員会の承認を得て行った。

3. 結果

3. 1. 対象者の属性

本研究では6名の女性から回答を得た。詳細を表1に示す。平均年齢は31.7歳(標準偏差6.6)であった。婚姻状況や就労状況については6名中4名が、「既婚」、「就労中」と回答した。現在の症状・障害になってからの経過年数については、6名中5名が5年以上経過していると回答した。

3. 2. 健康関連QOLの変化

健康関連QOLの精神的ドメインにある4つの指標(①活力、②社会生活機能、③日常役割機能(精神)、④心の健康)について、受講前後の変化をそれぞれ検討した。結果を図1に示す。対応のあるt検定を行った結果、受講後、①活力($p < 0.05$)と、③日常役割機能(精神)($p < 0.05$)で得点有意に上昇した。有意な差はなかったが、②社会生活機能においては平均得点が下がっていた。④心の健康はほぼ横ばいで、プログラム受講前後で有意な差は認められなかった。50点を日本人の平均値としてスコアリングしているが、介入後の「①活力」を除きすべての項目が日本人の平均値を下回った。図1には30代の日本人女性の平均値を参照値として含めたが、同年代の女性と比べても全般的に得点が低かった。

本研究はサンプル数が少ないため平均得点だけでなく参考データとして個人の得点推移を表2に示した。図1で示した平均得点と同様、①活力や③日常役割機能(精神)は、全ての協力者において得点の上昇が認められる。②社会生活機能は、6名中3名が下降、2名が維持、1名が上昇していた。④心の健康は6名中2名が下降、1名が維持、3名が上昇していた。

表1 対象者の属性

	年齢	婚姻状況	就労状況	障害の期間
No.1	33	既婚	就労中	5年以上
No.2	28	既婚	就労中	5年以上
No.3	37	未婚	就労中	5年以上
No.4	28	既婚		5年以上
No.5	23	既婚		5年以上
No.6	41	未婚	就労中	2-5年

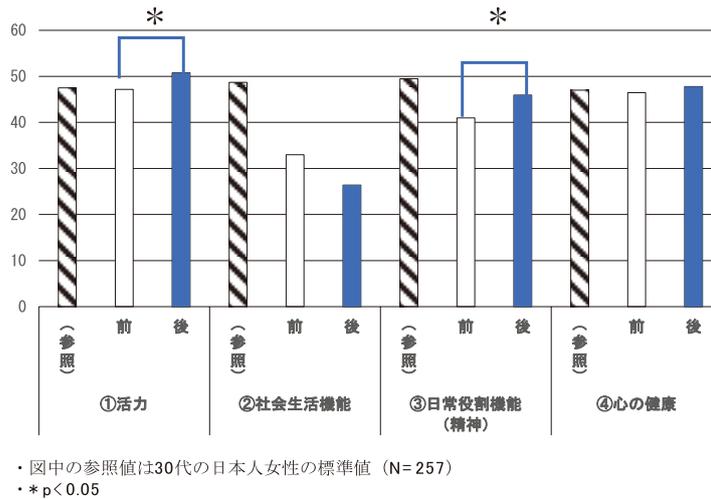


図1 健康関連QOL (精神的側面)の変化

表2 対象者個人におけるブラインドメイク受講前後の健康関連QOL (精神的側面)

	① 活力		② 社会生活機能		③ 日常役割機能 (精神)		④ 心の健康					
	受講前	受講後	受講前	受講後	受講前	受講後	受講前	受講後				
No.1	52.9	52.9	—	46.4	24.0	↘	41.9	53.1	↗	47.0	44.4	↘
No.2	52.9	62.0	↗	35.2	35.2	—	53.1	56.8	↗	57.1	57.1	—
No.3	43.8	49.8	↗	35.2	35.2	—	38.2	45.6	↗	41.9	47.0	↗
No.4	55.9	59.0	↗	40.8	29.6	↘	56.8	56.8	—	59.6	54.5	↘
No.5	34.6	34.6	—	35.2	29.6	↘	23.4	23.4	—	31.8	36.8	↗
No.6	59.0	62.0	↗	29.6	35.2	↗	45.6	49.4	↗	59.6	64.6	↗

↗ : 得点の上昇、— : 得点の維持、↘ : 得点の下降

4. 考察

4.1. 視覚障害者の化粧とQOL

本研究において、健康関連QOLの4指標中、2指標で有意な向上が認められた。サンプル数が少なく今後も検討する余地があるものの、視覚障害者女性に自ら化粧ができる技法を提供することはQOL向上につながる可能性が示唆された。

本研究は、化粧技法を習得したいと考えブラインドメイクプログラムの受講を希望した女性を対象にしているため、視覚障害者全体に一般化することは難しい。そのため化粧を強要したり、ルッキズムを助長したりすることにつながるよう十分留意する必要がある。他方で、視覚障害者における外見へのケアはこれまで重視されてこなかったという事実もある。文化人類学的な視点から行われた先行研究では、視覚に障害のある人々が「外見」に強い関心を持っていることが報告されている¹¹⁾。したがって、希望者に化粧を通じた支援を行うことでQOL向上の一助となる可能性がある。

4.2. QOL変化の要因と社会的背景

本研究では「活力」と「日常役割機能」において有意な改善が認められた。特に「活力」のスコアはプログラム受講後に一般住民の平均を上回っており、自ら化粧をすることで生き生きと過ごせるようになっていくことがうかがわれた。本研究の対象者は、面接中、ブラインドメイクの受講後に自ら化粧ができるようになったことへの喜びや自信について語っていた。自ら化粧ができたことによって、自信やエンパワーメントの向上につながった可能性がある。

他方で、受講前後で有意差が認められなかった項目については、新型コロナウイルス感染症の影響が大きい可能性が考えられた。有意差はなかったものの平均点の減少がみられた「社会生活機能」は、人づきあいの減少等がスコア化されている。調査期間中は新型コロナウイルス感染症の流行期であり、緊急事態宣言が出されていた。不要不急の外出が禁じられている社会状況において、外出機会や人との接点の増加は期待できない。さらに、視覚障害者特有の外出の難しさも考えられる。日本盲導犬協会が行った調査¹²⁾では、コロナ禍で「ソーシャルディスタンスがわかりづら

い」という困りごとが42%を占めた。その他、「商品などを触るため、周囲の目が気になる(21%)」「周囲に手引きなどのサポートを頼みづらい(19%)」とも回答されていた。視覚障害者は、視覚からの情報が限られているため、様々な情報を頼りに外出している。しかし人通りの減少や商店の休業等で音や香り、気配といった情報を得られにくくなり、気軽に外出できなくなることが考えられる。したがって、本人の意思で外出が減ったというよりも外的な環境により外出することができなかったことが得点の減少につながったとも推察される。

心の健康に関しても、有意な向上は認められなかった。コロナ禍に実施された調査では、他の障害者と比べても視覚障害者は外出自粛等の生活影響が大きかったことが示されている¹³⁾。また、先行研究ではコロナ禍に日本国内で女性の自殺が増加したことが報告される等女性におけるメンタルヘルスの問題も浮上している¹⁴⁾。視覚障害者女性においても様々な制約が重なり、精神健康の改善にまでは至らなかった可能性がある。

4. 3. オンライン受講の有用性

本研究の対象者は対面ではなくオンライン上でブラインドメイクプログラムを受講している。本研究ではオンラインであっても一定の効果が確認できた。先行研究でも、オンライン上の研修や研究会では、遠方からの参加が可能であること等の利点^{15, 16)}が報告されている。また、研究会にとどまらず、専門職が各地域に偏在しているケースで、オンライン上でのリハビリテーションが有効になるとの示唆もある¹⁷⁾。

ブラインドメイクは化粧療法士の指導や対話の中で習得するものとしてプログラム化されているが、アクセスが容易でない視覚障害者も少なくない。新型コロナウイルス感染症が流行する以前は、ブラインドメイクプログラムを受講のために遠方から視覚障害者が訪れていた。今後、受講を希望する視覚障害者のニーズに合う形で、対面とオンラインを活用したプログラム運用、発展が期待される。

4. 4. 本研究の限界と今後の課題

本研究にはいくつかの限界がある。第1に、効果を検証するために必要なサンプル数を確保することができなかったことが挙げられる。今後、新型コロナウイルス感染症の影響が小さくなることで、ブラインドメイクプログラム受講者の増加が見込まれる。介入群と対照群の数を確保し、さらに検討していくことが望まれる。第2に、ポストコロナ時代、ウィズコロナ時代を迎えた状況でブラインドメイクの効果検証をすることが必要である。先行研究において視覚障害者への生活影響が極めて大きかったことが報告されている。本研究は、社会活動等への制約が大きい最中に

行われたものであり、その影響が結果に含まれている可能性がある。感染症の終息や新しいライフスタイルへの適応がある程度完了した時点で改めて効果評価をすることも必要と考えられる。他のライフイベントといった交絡要因も含め精緻な解析が望まれる。第3に、本研究の対象者を女性のみ限定している点が挙げられる。女性以外にもブラインドメイクの受講希望者がいたものの、背景情報がある程度揃えることを目的に本研究からは除外した。しかしながら男性やその他の性を自認する方等、様々な視覚障害者にブラインドメイクのニーズがある。性の多様性を考慮し、女性に限らず広く、化粧とQOLとの関係を確認していくことが今後の課題と言える。

5. 総括

本研究では視覚障害者が自ら化粧をすることによりQOLが向上するかを検討した。前後比較の結果、QOLの一部の指標で化粧後に有意な改善が認められた。対象者の数や前後比較デザインにとどまっている点等の限界はあるものの、ブラインドメイクプログラム受講後に自ら化粧ができるようになった女性においてはQOLが向上する可能性が示唆された。

謝辞

本研究に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感謝申し上げます。調査にご回答くださった皆様、化粧療法士の皆様にも、心よりお礼申し上げます。ブラインドメイク開発者の大石華法様、植木麻理先生にはブラインドメイクの意義をご教示いただき、リクルート、研究成果の報告等でも多大なご協力を賜りました。すべての方のお名前を記載できておりませんが、ご協力いただいた皆様に感謝申し上げます。

助成いただいた研究の一部は、第3回 国際化粧療法医学会(2022年10月21日)において報告しました。FRAGRANCE JOURNAL, 50巻12号:84-84.2022にも掲載されております。今後も成果の公表に努める所存です。

(文献)

- 1) Ansuman, P. G., Nageswar, R., & Amrita, K. K. Vision-related quality of life and its sociodemographic correlates among individuals with visual impairments. *Journal of Visual Impairment and Blindness*, 115, 1-10. 2021.
- 2) Taipale, J., Mikhailova, A., Ojamo, M., Nättinen, J., Väättäinen, S., Gissler, M., Koskinen, S., Rissanen, H., Sainio, P., & Uusitalo, H. Low vision status and declining vision decrease Health-Related Quality of Life: results from a nationwide 11-year follow-up study.

- Quality of Life Research, 28, 3225-3236. 2019.
- 3) Demmin, D. L., & Silverstein, S. M. Visual impairment and mental health: unmet needs and treatment options. *Clinical Ophthalmology*, 14, 4229-4251. 2020.
 - 4) Osaba, M., Doro, J., Liberal, M., Lagunas, J., Kuo, I. C., & Reviglio, V. E. Relationship between legal blindness and depression. *Medical Hypothesis Discovery and Innovation Ophthalmology Journal*, 8, 306-311. 2019.
 - 5) Pinguet, M., & Pfeiffer, J. P. Psychological well-being in visually impaired and unimpaired individuals: a meta-analysis. *British Journal of Visual Impairment*, 29, 27-45. 2011.
 - 6) Skevington, S. M., Lotfy, M., O'Connell, K. A., & WHOQOL Group. The World Health Organization's WHOQOL-BREF quality of life assessment: psychometric properties and results of the international field trial. A report from the WHOQOL group. *Quality of Life Research*, 13, 299-310. 2004.
 - 7) Amiel, P., Dauchy, S., Bodin, J., Cerf, C., Zenasni, F., Pezant, E., Teller, A. M., André, F., & DiPalma, M. Evaluating beauty care provided by the hospital to women suffering from breast cancer: qualitative aspects. *Supportive Care in Cancer*, 17, 839-845. 2009.
 - 8) Richard, A., Harbeck, N., Wuerstein, R., & Wilhelm, F. H. Recover your smile: effects of a beauty care intervention on depressive symptoms, quality of life, and self-esteem in patients with early breast cancer. *Psycho-Oncology*, 28, 401-407. 2019.
 - 9) 大石華法, 平野隆之, 松久充子. 視覚障害者のための「ブラインドメイク・プログラム」FRAGRANCE JOURNAL, 49-44. 2017-8.
 - 10) 福原俊一, 鈴嶋よしみ. SF-36v2日本語版マニュアル, Qualitest株式会社, 京都. 2019.
 - 11) Kaplan-Myrth, N. Alice without a looking glass: blind people and body image. *Anthropology and Medicine*, 7, 277-299. 2000.
 - 12) 公益財団法人 日本盲導犬協会. コロナ禍の盲導犬ユーザー外出時や社会参加での「困りごと」聞き取り調査結果. <https://www.moudouken.net/uploads/media/2022/05/20220523142317.pdf> (アクセス日: 2023年2月20日)
 - 13) 日本財団. TCF_ コロナ禍における健常者と障害者調査レポート. https://www.nippon-foundation.or.jp/app/uploads/2020/11/new_pr_20201013_01.pdf (アクセス日: 2023年3月1日)
 - 14) Eguchi, A., Nomura, S., Gilmour, S., Harada, N., Sakamoto, H., Ueda, P., Yoneoka, D., Tanoue, Y., Kawashima, T., Hayashi, T. I., Arima, Y., Suzuki, M., & Hashizume, M. Suicide by gender and 10-year age groups during the COVID-19 pandemic vs previous five years in Japan: An analysis of national vital statistics. *Psychiatry research*, 305, 114173. 2021.
 - 15) 西井尚子, 松本珠希, 赤井由紀子, 森村美奈. コロナ禍におけるオンライン研修会の教育効果: アンケート結果からの一考察, *女性心身医学*. Vol. 26, No. 2, 129-133, 2021.
 - 16) 星紫織, 堀内寿志, 橋本賢勇, 松尾龍志, 池田光泰, 荻原真. Web システムを利用したオンライン研修会の試み, *医学検査*. Vol.70, No.1. 123-127, 2021.
 - 17) 永島圭悟, 田村文誉, 水上美樹, 町田麗子, 高橋賢晃, 古屋裕康, 菊池真依, 富岡孝成, 菊谷武. オンライン診療による小児患者への摂食嚥下リハビリテーションの試み, *日本摂食嚥下リハビリテーション学会誌*. Vol.23, No.3. 199-207, 2019.

顔面神経麻痺に対する重症度診断 AI ソフトを用いたより効果的なメイクアップ法の開発

国立病院機構東京医療センター臨床研究センター聴覚平衡覚研究部聴覚障害研究室／東海大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科

和佐野 浩一郎

We developed artificial intelligence software for facial palsy severity diagnosis using segmentation analysis and wrinkle analysis. We used facial movement movies of 20 patients and 5 normal volunteers on the Yanagihara facial nerve grading system. Then we tried to develop a make-up method for facial palsy patients using the artificial intelligence software, but due to the Covid-19 situation, we experienced only preliminary make-up for three facial palsy patients and could not develop the standardized method. As the three patients were very satisfied with the make-up, we will continue to develop the method.

1. 緒言

顔面神経麻痺とは、表情筋の運動を司る顔面神経の機能が低下することにより、発症前と比べて表情筋の動きが急激に低下する疾患であり、大部分が末梢神経由来だが、まれに脳梗塞などを原因とする中枢性由来も含まれている。末梢性麻痺の中では、特発性と呼ばれる誘因なく発症するものが最も多く、頭蓋骨骨折に伴う外傷性のものがそれに続き、それ以外にも頭頸部の腫瘍、サルコイドーシス、ギランバレー症候群など様々な疾患に引き続いて発症することがある¹⁾。

最も多くの患者が受診する特発性顔面神経麻痺は、Bell麻痺とRamsay Hunt症候群に大きく分かれ、以前感染し治癒した後に神経の中で潜伏しながら生存していた水痘帯状疱疹ウイルスや単純ヘルペスウイルスが、何らかの原因で再活性化することによって発症するとされている。初期治療としては神経の炎症を抑える目的でステロイド剤の投与を行うとともに、原因となるウイルスに対する抗ヘルペスウイルス剤を投与する。また、筋肉のこわばりや異常な動きを抑制するためにマッサージを中心としたリハビリテーションも発症早期から開始する。大多数の患者において麻痺からの回復は、3～6カ月程度と比較的長い期間が必要である。治癒率は、Bell麻痺は9割程度、Ramsay Hunt症候群は6～7割とされており、残念ながら治癒に至らなかった場合は麻痺残存や異常共同運動などの後遺症が残存する²⁾。

顔面神経麻痺の重症度評価は、柳原法・House-Brackmann法、Sunnybrook法といった方法で行われているが、いずれ

の評価法でも医師などの医療者により、安静時の左右差および運動時の左右差を評価することで点数化を行うもので、医療者による主観的な評価であるため検者により点数のばらつきがあることが知られている。なかでも日本国内で最も用いられている柳原法では40点満点の評価のなかで、検者により10点以上の差があることが報告されている³⁾。

そこで後遺症残存によりQoLの低下が継続している患者をサポートするため、メイクアップを用いたQoLの改善を指導する試みを開始した。顔面神経麻痺診療のなかにコスメトロジー(化粧品学)を取り入れることにより、一段ステップアップすることを目指す。患者さんが日常生活のなかで顔面神経麻痺メイクを実践していくためにはセルフメイクアップが必要であるが、安静時だけでなく様々な表情の際の自然さを求めるのは鏡を見て行うだけでは難しいことが予測される。そこで我々が開発中の人工知能(AI)を用いた顔面神経麻痺の重症度診断ソフトを活用することにより、安静時に加え様々な表情を作った際の左右差を客観的かつ定量的に評価し、より効果的なメイクアップ方法を探索するものである。

2. 方法

2.1. 人工知能ソフトウェアの開発

国立病院機構東京医療センター耳鼻咽喉科に受診した顔面神経麻痺の患者に対して、柳原法評価を行う際に、患者の正面からOsmo pocket (DJI JAPAN株式会社)により動画撮影を行った。柳原法は安静時、額のしわよせ、弱閉眼、強閉眼、片目つぶり、鼻根しわ寄せ、頬膨らませ、口笛、イー、への字口の際の動きを評価するものである。

この柳原法動画から各表情を抽出し、静止画へ切り出した。片目つぶりの評価には、左右対称性を評価するために麻痺側の片目つぶりに加え、非麻痺側の片目つぶりを記録し、静止画への切り出しを行った。

今回画像認識に用いた機械学習システムを構築するにあたり、プログラミング言語はPythonを使用し、Googleが開発したオープンソースソフトウェアライブラリ



Development of a make-up method for facial palsy patients using artificial intelligence software for severity diagnosis

Koichiro Wasano, MD, PhD

National Hospital Organization Tokyo Medical Center, Tokai University School of Medicine

TensorFlowを実装した。そして畳み込みニューラルネットワーク (Convolution Neural Network: CNN) 技術を応用したSemantic Segmentationの一手法であるChangqian Yuらが2018年に報告したBiSeNet⁴⁾を用い、顔面のパーツを眉、眼、鼻、口唇と領域別に抽出した(図1)。

各静止画に対し、上記画像認識により得た各顔面パーツに関して、以下の変数を算出した。

- ①安静時：眉、眼、口唇の面積の左右重ね合わせの一致率
- ②額のしわ寄せ：眉の重心点と眼の重心点の距離の左右比(図2)
- ③弱閉眼：眼の面積の左右比
- ④強閉眼：眼の面積の左右比および眉の重心点と眼の重心点の距離の左右比
- ⑤片目つぶり：麻痺側片目つぶりと非麻痺側片目つぶりそれぞれにおける眉の重心点と眼の重心点の距離の左右差の比
- ⑥鼻根しわ寄せ：鼻と口唇の面積の左右重ね合わせの一致率

率

- ⑦頬膨らませ：唇の面積の左右重ね合わせの一致率
- ⑧口笛：唇の面積の左右重ね合わせの一致率
- ⑨イー：唇の面積の左右重ね合わせの一致率(図3)
- ⑩への字口：唇の面積の左右重ね合わせの一致率

複数の耳鼻咽喉科専門医が、上記と同一の静止画を採点して得られた柳原法評価点数の平均を「教師データ」とし、上記変数を用いた回帰分析を行い、点数を目的変数とする回帰式(一次式)を算出した。

また、位置および面積だけではなく「表情しわ」を認識させるために線状の画像解析にも取り組んだ。額のしわの解析を行い、輪郭抽出フィルターを用いて表情画像のしわを含む輪郭線を抽出。セグメンテーションを用いて顔面における皮膚領域を眉毛・目・鼻・口以外の領域として抽出。重ね合わせることで、皮膚領域における表情しわを抽出した。抽出された線要素からさらに方向により絞り込みを行い、関心領域(今回は前額部に設定)のしわのみを抽出し



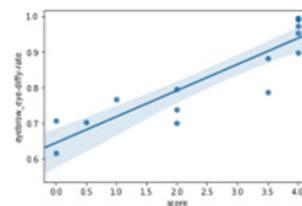
図1 顔面各パーツのセグメンテーション(筆者)

眉毛挙上の解析

眉一眼距離の左右差を評価



	点数	左右差(率)
症例1	0点	43%
症例2	2点	74%
症例3	0点	39%
症例4	2点	67%
症例5	4点	105%



回帰直線

図2 額のしわ寄せの評価のための眉毛挙上の解析

ラフ化したうえで積分し絶対値を提示、その数値の左右比を算出した(図4)。

メイクアップ指導の対象は顔面神経麻痺により顔面の静止時および運動時に左右不均等が生じた患者である。自宅でも継続できるセルフメイクアップ法の指導を行うことから女性が主たる対象となるが、希望する場合は男性も対象とする。

まず、鏡を用いて患者の主観的に左右差が減るようなメイクを助言する(用いるメイク道具に関しては、患者持参

のものを活用する)。一方、生活の様々な場面の中で出現する表情や、特に閉眼時の左右差は鏡でのセルフメイクアップでは十分にカバーできない可能性があるため、我々が開発中の人工知能(AI)を用いた顔面神経麻痺の重症度診断ソフトを活用することにより、安静時に加え様々な表情を作った際の左右差を客観的かつ定量的に評価することとする。本AI診断ソフトは顔認識技術をベースとして多くの顔面神経麻痺患者および正常者の11通りの表情(閉眼、鼻根部しわ寄せ、いー、うーなど)を対象とした顔面神経

イーの解析

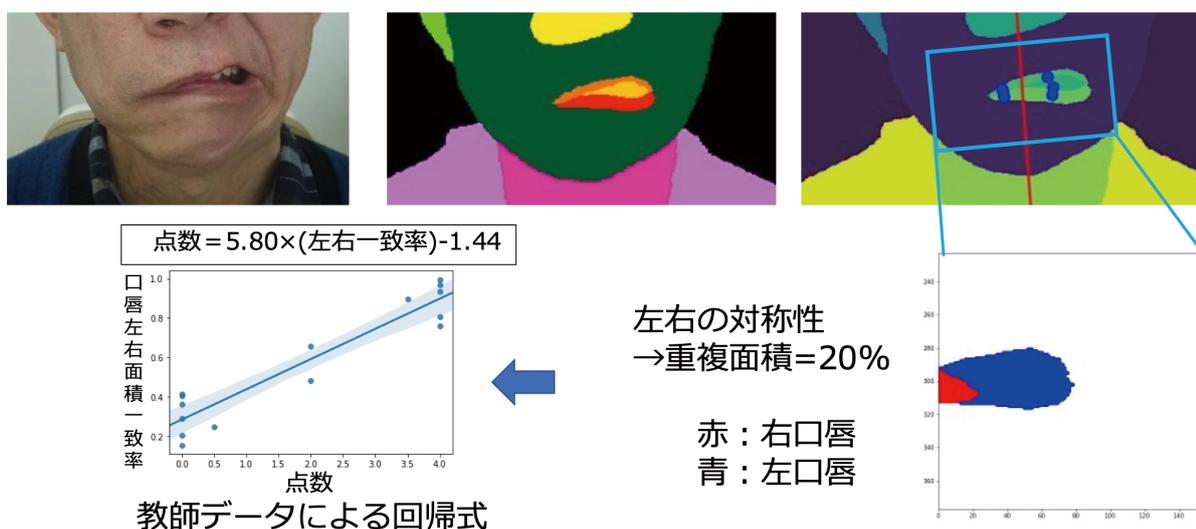


図3 イー時の口角の動きの解析

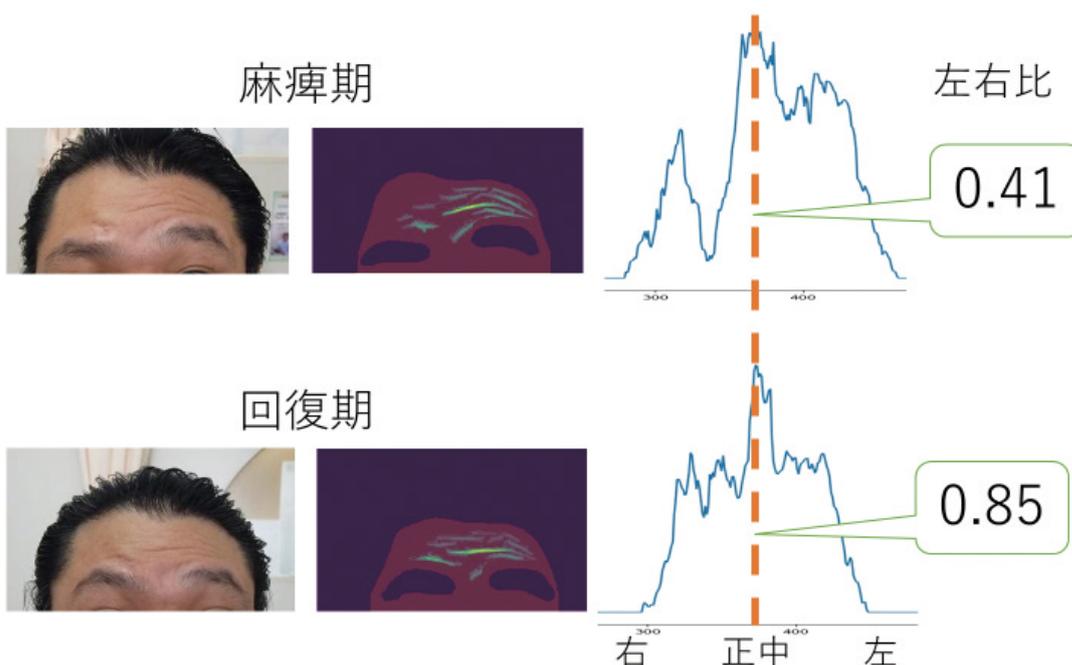


図4 額のしわ寄せの評価のための表情しわ解析

診療を専門とする耳鼻咽喉科医による重症度診断(柳原法やHouse-Brackmann 法など)の結果を機械学習によって覚えこませたものである。

アウトカムの評価法としては、QoL 調査票、自記式満足度調査票、および AI 診断ソフトによる左右差とする。メイクアップ指導の介入前と介入中、介入終了後の変化量を検討する予定であった。

本研究は国立病院機構東京医療センターの倫理委員会の承認(承認番号 R19-055)を得た上で、患者の文書による同意を得て行った。

3. 結果

人工知能ソフトウェアの開発に関しては顔面神経麻痺のない正常者 5 例と顔面神経麻痺患者 20 例のデータを用いてソフトウェアを開発した。4 名の耳鼻咽喉科専門医の採点結果を教師データとして構築し、0.0 から 4.0 点の小数にてソフトウェアから点数が算出される形となった。柳原法は 0 点、2 点、4 点の 3 段階で評価されることから、小数をどのように 3 段階に置き換えるかに関しては顔面神経学会パネルディスカッションの中で会員から投票を行うことにより、0 点(0-1.4)、2 点(1.5-3.0)、4 点(3.1-4.0)が採用された。

しわの解析に関しては、図の通り解析は可能となったが、前髪の影響による光の当たり方により大きな誤差が生まれることが示され、今後も改修が必要な結果であった(図 5)。

最後にメイクアップ法の開発に関しては、新型コロナウイルス感染症の拡大に伴い、医療機関において近接した状態での指導やマスクを外した状態での指導が禁止され、症例集積が 3 例に留まったため、効果的なメイクアップ法の開発には至らなかった。研究期間終了後、新型コロナウイルス感染症が鎮静化した後に再開の予定である。

4. 考察

顔面神経麻痺患者は耳鼻咽喉科、神経内科、総合内科、一般内科など様々な診療科を受診する。麻痺の重症度が専門診療科や診療経験の差の影響なく判定できるようになれ

ば、適切に重症度を評価することにより適切な治療法の選択が可能となる。さらに、治療による効果判定も一定の基準により行うことが可能となり、臨床試験の立案にも寄与できる。標準化された基準を作成するには点数のばらつきを軽減することが重要であり、そのためにできるだけ多くの顔面神経麻痺患者の画像データおよび、その評価に精通した医師の判定を蓄積する必要がある。本研究では顔面神経麻痺患者 20 名、正常者 5 名にとどまったが、今後さらに症例を蓄積することで精度の高い人工知能ソフトウェアの開発を継続する。また、メイクアップ法に関してはプレリミナルな 3 例にとどまったが、いずれも非常に高い満足度であり、患者ニーズが高いことから研究期間終了後も再開時期を模索する。

5. 総括

新型コロナウイルス感染症の拡大に伴いメイクアップ法の開発は果たせなかったため、感染症の鎮静化を待って再開を模索する。人工知能ソフトウェアの開発は順調に進捗したものの、さらなる精度向上が必要であるため引き続き開発を継続する。

(引用文献)

- 1) 和佐野浩一郎：本当はこわい耳疾患 顔面神経麻痺 Bell 麻痺/Ramsay Hunt 症候群/腫瘍性疾患/炎症性神経疾患/脳血管障害. 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 (0914-3491) 94 巻 9 号 Page720-723 (2022.08)
- 2) 松代直樹：麻痺スコア(40 点法)の検者による差異 顔面神経麻痺の専門家 9 人と全国の一般耳鼻咽喉科勤務医 47 人での検討. Facial N Res Jpn 2010 ; 29 : 63-65.
- 3) 日本顔面神経研究会編：顔面神経麻痺診療の手引-Bell 麻痺と Hunt 症候群-. 東京：金原出版, 2011 年.
- 4) Yu C, et al: BiSeNet: Bilateral Segmentation Network for Real-Time Semantic Segmentation. In: Ferrari V, et al., eds. Computer Vision – ECCV 2018. ECCV 2018. Lecture Notes in Computer Science, 2018 ; vol. 11217.



図 5 しわ解析において前髪の影響により左右差があるように算出された正常症例

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

池田 将

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採択頂き、誠にありがとうございました。採択のご連絡を頂いたときには、素直な喜びと安堵とともに少なからず驚きを感じました。助成頂いた研究内容は、申請当時において未だ確固たる実績のない発案初期の段階のものでした。さらに私は工学部に所属する研究者で、コスメトロジー（化粧品科学）の研究分野に馴染み深いとは言えない弱みがありました。その一方、公募要項を拝見しますと、萌芽的研究や素材に関する研究も含むことが記載されており、そこに一縷の望みをかけて発案段階の申請書を提出しました。具体的な内容は、研究報告書にも記載のとおりですが、それまでに研究室で進めていた研究内容を基盤として新たな分子を素材として設計・合成し、それを用いて環境に応答するDNA構造体を作り、ドラッグ・デリバリー・システム（DDS）のキャリアーとしての応用を

目指すというものでした。本研究期間内に、DNA構造体を創出するという素材開発面と機能評価において一定の成果を得たものの、DDS応用面では十分な検討を行うことはできませんでした。引き続き、本研究を継続し、社会とコスメトロジー研究に少しでも貢献できるよう力を尽くしていきたいと考えています。

一般に、財団助成は単年が多い中、本研究助成では2年間の助成を頂きました。このことは、規模の小さな私達の研究室にとって、また私個人にとってもありがたく、落ち着いて研究に向き合うことを可能にしてくれました。僥倖ながら是非今度とも複数年の助成を継続して頂けることを願っております。

最後に、ご支援を頂きました財団関係者の皆様に心より感謝申し上げますとともに、ますますのご発展とご多幸を心よりお祈り申し上げます。（岐阜大学工学部）

コスメトロジー研究助成を受けて

伊村 くらら

この度はコスメトロジー研究助成に採択を頂き、誠にありがとうございました。本稿を執筆しているタイミングでは、マスク着用ルールの緩和が日々の話題となっています。しかしながら、コーセーコスメトロジー研究助成による研究を進めてきた期間は一貫して、新型コロナウイルス感染症による影響が社会全体へ強く及んでいた期間と一致します。周囲を眺める限り、このコロナ禍にあって化粧品全般への考え方も少なからず変化があったように思えます。ものの本質を見極めたミニマムなスタイルへの訴求が高まっているのではないのでしょうか。また社会全体がSDGsを強く意識する中で、必要なものを適量で用いていこうとする考えも強まっているようにも感じます。本助成により進められた研究は、界面活性剤といった、ありふれたしかし重要な化学物質の機能をより効率的に自在に活用していきたいという研究方針のもとに生まれました。一般には、洗浄剤や分散剤といった用途で知られる界面活性剤ですが、

この研究ではゲル化剤としての機能に着目しました。界面活性剤による系の増粘は、ひも状ミセルや液晶の形成といった場合にも見られます。これらは水溶性の比較的高いものであらわれる現象ですが、難水溶性の両親媒性物質の場合は、いわゆる低分子ゲルを形成しうることがあります。界面活性剤のもたらす機能はこのように多彩であり、少しの工夫で大きく性質を変えるという点が実に面白いところです。少しの視点変化で埋もれていた機能を引き出すというのは簡単なようで、知見として導くには単純ではありません。昨今では界面活性剤フリーも訴求点となりつつある中、界面活性剤や両親媒性物質に新しい付加価値をもたらすこともまた重要なのではと考えています。

最後に、本研究を支えてくださった貴財団をはじめ、ご関係の皆様篤く御礼申し上げます。今後益々のご発展を祈念いたします。（お茶の水女子大学）

2020 年度 研究助成

コロナ禍でコスメトロジー研究助成を受けて

宇田 亮子

助成を頂戴したのはコロナ禍の只中でした。連日の報道はコロナ関連で埋め尽くされ、科学技術に向けられた災禍鎮静への期待を感じ、研究者の一人として出来ることは何かと改めて考えさせられることが多い時でした。自分が持っている技術で応えられることがあればと、異分野をやることも含め考えを巡らせましたが、コロナと関係あるうがなかろうが、やりたいことまたは自分しか出来ないことを正面からやるのが一番だと思いつき、温めていたアイデアを本研究助成に応募し採択を頂きました。

私が開発した材料をコスメトロジーに展開するには、皮膚科学に詳しい共同研究者を得る必要がありました。新しく共同研究者を得るには、顔を合わせて互いに人物を確認して、または信頼できる人脈筋を通してというのが従来のよくあるやり方でした。しかしコロナ禍の制限がある中では、そう簡単にはいきません。一方でそれを補うかのよう

にオンラインイベントの企画が各方面でなされ、私も慣れないオンライン交流会に参加し、オンラインツールを使いながら、顔合わせや互いの研究背景の紹介とゴール共有を経て、武庫川女子大の仁木洋子先生に本助成研究の共同研究者となって頂きました。今振り返ると、オンラインのほうがむしろ短時間でスムーズに着手出来たかもしれません。ようやく対面で仁木先生とお会いしたのは、研究期間の終わり頃になってからで「オンラインでもやろうと思えば出来るものですね」と言葉を交わしました。本研究助成には、研究のご支援を頂いたことに加え、環境変化によって変わらなければいけないこと（例えば、オンラインへの切り替え）とぶれてはいけないこと（独創性や研究への熱意）を痛感する機会を頂戴したと感じています。厚く御礼申し上げます。（奈良工業高等専門学校物質化学工学科）

2021 年度 研究助成

機能性色素のコスメトロジーへの挑戦

大山 陽介

私の専門は「機能性色素化学(Functional Dye)」です。機能性色素とは、光(太陽光も含む)、熱、電場、磁場などの何らかの操作(外部刺激)によって、色や発光性が変化する、情報を記録する、エネルギー変換(光→電気、電気→光、光→光など)を引き起こすなどの新しい機能を発現する有機化合物群であり、1970年代後半に日本人研究者によって生み出された学術用語です。機能性色素を簡単に説明すると、衣服や乗り物、標識に用いられている物を染めたり、塗ったりすることができる従来の色素(染料・顔料)の概念を超えた機能をもつ色素となります。故に、機能性色素は、発光素子や太陽電池などのオプトエレクトロニクスデバイス、医療、農業および環境分野に応用できることから、持続可能な開発目標(SDGs)に資する我が国発の重要な材料群であるといっても過言ではないでしょう。

私は、コーセーコスメトロジー研究財団の学内公募情報を得た際に、機能性色素はコスメトロジー(化粧品学)に

現時点でどのように役立っているのか、今後さらに貢献できるだろうかと考えました。サーモ(熱)クロミックあるいはフォト(光)クロミック特性を利用した機能性色素が、化粧品の着色剤として使用されていることは知っていましたが、コスメトロジーのさらなる進歩・発展に寄与する革新的な機能性色素材料を開発しようと意気込んだことが本研究助成申請に至った理由です。研究途上ではありますが、生活に彩りを添える機能性色素化粧品の開発に挑戦し続けたいと強く思っております。

末筆ながら、本研究助成申請を選考くださいました貴財団関係者様ならびに選考委員の先生方に、厚く御礼申し上げます。最後になりましたが、本研究助成を賜りましたことを荣誉に思うとともに、貴財団のより一層のご発展を心よりお祈り申し上げます。

(広島大学大学院先進理工系科学研究科)

コスメトロジー研究助成を受けて

岡村 陽介

この度は、コスメトロジー研究助成に採択して頂き、厚く御礼申し上げます。

近年、消臭剤・芳香剤が市場を賑わしている現状を目の当たりしておりました。しかし、それらを肌に適用する際は、塗布あるいは噴霧する用法のため、有効成分は汗等で流れてしまうほか、におい分子は揮発性のため消臭・芳香能の持続性が不足しているという課題があることも感じておりました。これを科学的根拠に基づいて解決したいと考え、本研究を提案した次第です。

本研究助成によって、におい分子の吸着・徐放特性を制御できる「皮膚貼付型ナノ薄膜・ナノファイバー薄膜」のプロトタイプを提案することができました。この薄膜は、透明なため肌に貼っても目立たず他者には視認できないこと、自身も貼った感覚を感じないほどの貼付材料になります。

これらの特性を活かしながら「貼ってにおいを制御する」という概念をコスメトロジーの研究領域に一石を投じることができるのでは、考えております。まだまだ研究段階であり、プロトタイプを提案したに過ぎませんが、今後も科学的根拠に基づいて研究をより発展させていく所存です。また、この機序は、におい分子に限らず薬剤の包接・徐放に应用可能であることから、新しい薬剤徐放性ナノ材料としてバイオマテリアル研究領域にも貢献できる技術として波及することも期待しています。

改めて、コスメトロジー研究助成に採択して頂き、厚く御礼申し上げます。

(東海大学工学部応用化学科／マイクロ・ナノ研究開発センター)

コスメトロジー研究助成を受けて

門田 和紀

この度、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頂き、誠にありがとうございました。私は、これまで主に医薬品や機能性食品に関する“製剤”研究を行ってきており、今回貴財団の助成に採択を受けたことで化粧品での製剤設計について初めて研究を行うきっかけとなり大変感謝申し上げます。特に、今回採択頂いた、多孔性金属錯体(シクロデキストリン-MOF)については、非常に魅力的な素材として注目しており、特に皮膚への適用といった点については未だ実施されていない例であり、挑戦的な研究でしたが、本財団の助成によって、無事立ち上げることができ、論文投稿までつなげることができたことを大変

感謝申し上げます。今後、この新たな素材を用いて、化粧品成分として使用できる多成分を含有させて製剤設計を行い、皮膚から薬物を吸収させる経皮薬物送達システム(TDDS)への適用を目指してまいりたいと思っております。

本研究を進めるにあたりご協力頂きました共同研究者や学生の皆様には大変感謝申し上げます。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、研究成果を化粧品業界の発展に貢献できるように邁進していきたいと思っております。

(大阪医科薬科大学薬学部)

2020年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

唐澤 悟

我々は長年、メタルフリー MRI 造影剤構築を目指した研究を行っております。MRI の分野では、装置開発は目覚ましい進歩を遂げている一方、造影剤開発は遅れており、臨床現場で 20 年以上用いられるガドリニウム錯体の代替造影剤が臨床現場で使用されることは果たされておられません。ガドリニウム錯体は感度の面で非常に優れているものの、臨床現場で用いる際、使用が限定的であることやレアアースの社会的需要の問題などから代替が強く望まれております。造影剤に必要な要素の一つとして、スピン源でなければなりません。即ちガドリニウムは元素で一番スピン量子数を持つため、造影剤として有利に働いているのです。我々はガドリニウムに比べて 1/7 のスピン量子数の有機ラジカルを使って、メタルフリー MRI 造影剤開発を行っております。しかしながらスピン量子数が小さい影響もあり圧倒的に感度が低いため、メタルフリーで造影剤を作るとは非常にチャレンジングな研究であります。このような背景であるためメタルフリー造影剤が臨床現場で使用され

るところに到達するまでには長い時間がかかる、若しくは使用されることはないと考えられ、感度向上のためのプレクスルーが必要であります。

今回助成金をいただき研究を進めることによって、有機ラジカルで構成された親水性コロイド(ナノ微粒子)に着眼したアプローチが、我々が報告しているナノ微粒子造影剤の中で最も高い感度を示すものを報告できたことは、コスメトロジー研究助成金のおかげであり深く感謝申し上げます。親水性コロイドの水分子が高い感度へ導いたと示唆され、研究が一步前進した感があります。

現在のところ得られた親水性コロイドは、MRI 造影剤としての機能にとどまっている段階ですが、将来的にはラジカルとしての性質を利用し、ラジカルである活性酸素と絡めて、活性酸素種を抑制できる親水性コロイドへと展開し、化粧品分野への貢献を果たしていきたいと思っております。

(昭和薬科大学)

2020年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

北山 雄己哉

この度は、コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成に採択いただき、誠に有難うございました。私は 2020 年 2 月に大阪府立大学(現在は大阪市立大学との統合により大阪公立大学に変更)に異動しましたが、異動直後に新型コロナウイルスの影響が甚大となりました。そのため、異動直後はなかなか研究のスタートもスムーズにはいかない状況でした。そのような中、貴財団の研究助成に採択いただけたことで、なんとか研究を進めていくことができました。

私は、高分子化学やコロイド界面化学を専門とし、本研究でも界面における光反応に着目した機能性高分子微粒子の開発に関する研究を実施しました。特に本研究では、私たちの独自技術として研究を進めてきた界面光架橋という方法を用いて、有害な太陽由来の紫外線から人間の皮膚を保護するサンスクリーン剤の開発を試みました。上述のよ

うに新たな大学に異動したこともあり、高分子を形成するモノマーを得るための有機合成や、ポリマー化のための高分子合成、微粒子合成のための様々な備品・消耗品をそろえる必要がありますが、貴財団の研究助成に大変助けられました。研究助成に採択いただいた成果として、研究報告書にも記載させていただいた成果を得られたことは、せめてもの恩返しができるように感じており、とても嬉しい限りです。

最後に、当研究を大きく進展させる機会を頂戴しましたコーセーコスメトロジー研究財団およびご関係の皆様にご心より感謝申し上げます。様々な分野の研究者を幅広く助成されているコーセーコスメトロジー研究財団の今後の益々のご発展を心より祈念申し上げます。

(大阪公立大学大学院工学研究科物質化学生命系専攻応用化学分野)

コスメトロジー研究助成を受けて

桑折 道済

私の専門は高分子科学で、材料設計の際に、生物の優れた機能を模倣／超越するバイオミメティクス的な観点での設計を取り入れています。これまでに、孔雀の羽毛の発色が、メラニン顆粒が形成する微細構造由来の構造色であることから発想し、人工メラニンを利用した構造色材料の作製を行ってきました。メラニンは我々の髪の毛の黒の成分ですが、メラニンベースの微細構造の作製により、鮮やかな色の構造色を発現させることができます。生体内に存在するメラニンを模倣した材料であることから生体適合性にも優れ、コスメトロジー分野への展開も常々想定していました。今回、研究助成をいただいたことから、化粧品素材としての利活用を志向した基盤的技術の開発に取り組みま

した。所属が工学部であることから、実際に肌に触れる用途での研究はできません。そこで、付け爪へのマニキュアや、貼る化粧品を想定し、ひび割れがなく、簡便、かつ耐久性に優れた構造色塗装に関する研究を実施しました。成果の一部は2報の原著論文(1報は投稿中)としてまとめることができました。実用化に向けてはまだまだ課題が山積みですが、成果を社会に還元できるよう尽力してまいります。

末筆ではございますが、本研究の遂行にあたり研究助成を賜った、公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団ならびに関係者の皆様に深く感謝すると共に、貴財団の益々のご発展を心より祈念いたします。

(千葉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

通阪 栄一

この度は、コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成に採択いただき心より感謝申し上げます。本研究課題では、水溶性高分子で形成した多孔性粒子による水中での自発的乳化作用に着目し、そのメカニズムの解明と製剤化への応用について検討しました。

私は学生時代から、両親媒性分子の集合体を用いたバイオマテリアルの開発を行っています。特に、ペプチド・タンパク質性医薬品を界面活性剤でコーティングして形成される生体膜融合性脂溶性ナノ集合体を封入したエマルションについて、生体バリアである粘膜や皮膚の透過を促進するDDS製剤としての応用を検討してきました。その中で、熱力学的に不安定なエマルションの保存定性を高めることも重要な課題と考えました。その取り組みとして、水との接触だけで確実にエマルションを形成できる自発的乳化技術の開発を検討しました。高分子粒子中へエマルションの油滴を封入したドライエマルションや多孔質シリカ粒子の

細孔に油相を封入した自発的乳化製剤を開発しました。これらは、機械的な処理を必要としない用事調製が可能なエマルション製剤として利用できます。一方で、自発的乳化に大量の界面活性剤が必要であることや、ナノサイズのエマルション形成には不向きであることが判明しました。これらの問題を克服するために、本課題では乳化作用を有する高分子で多孔性粒子を形成し、高分子の溶解とともに内封した油相を分散、安定化させるシステムを開発しました。結果として、界面活性剤添加量の低減、速やかな乳化、そしてナノエマルション調製が可能となりました。今後は、本課題での成果を発展させ、コスメトロジーへ貢献できるよう努めたいと考えております。

最後に、応用展開を模索していました基礎的研究の本課題へ研究費を助成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今後益々のご発展を祈念いたします。(山口大学大学院創成科学研究科)

2020年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

長井 紀章

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頂き、心より感謝申し上げます。採択後すぐにCOVID-19が猛威をふるったことから、研究の在り方や体制にも大きな変革が必要となりましたが、助成いただきましたおかげで、資金面におきましては苦勞することなく、継続した成果を挙げることができました。重ねて御礼申し上げます。

私は難溶性薬物の超微粒子化と他製剤へのアプリケーションについて精力的に研究を進めております。今回助成いただいたテーマは「毛根への薬物直接送達を可能とするナノ結晶ハイドロゲルの開発」であり、与えられた研究期間において、ビーズミル法を用いてミノキシジル (MXD) を5%含有するナノ粒子製剤 (MXD-NP) を設計し、MXD-NPと市販のMXD溶液 (CA-MXD) の薬物動態挙動および育毛効果について比較検討を行いました。その結果、MXD-NPの育毛効果は従来品であるCA-MXDのそれよ

りも高く、MXD-NPで処理したマウスバルジ領域部のMXD含有量はCA-MXDで処理した場合よりも7倍以上も高くなることを見出しました。このように研究を通じて得た処方は、従来品よりも効率的に毛包上部へのMXD蓄積を可能にし、発毛を活性化させるということを証明しました。本成果(技術)は、コスメトロジー分野における新たなツールとしての応用化が期待でき、国民の美容向上に繋がるものと考えます。一方で、今回助成いただいた研究テーマはまだ完結したわけではなく、今回明らかにできたことをベースとしたさらなる研究を実施し、引き続き成果を社会に還元できるよう尽力していく所存です。

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ともに、貴財団のますますのご発展を心より祈念いたします。

(近畿大学薬学部製剤学研究室)

2020年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

湊 遥香

この度は、コスメトロジー研究助成に採択していただき、心より御礼申し上げます。財団並びに関係者の皆様に心より御礼申し上げます。

本研究課題は、新規ハイドロゲル微粒子の開発を目的に進めてまいりました。ゲル微粒子は、生体適合性を有するナノ-マイクロなソフトマテリアルとして、化粧品や薬剤輸送担体として着目されています。皮膚への刺激やアレルギー反応等を誘起することが懸念される低分子界面活性剤と比較し、高分子から成るゲル微粒子は、流体界面への高い吸着エネルギーを有し、水中油滴/油中水滴エマルジョンの安定化剤としても優れる一方、実用化に向けた多くの課題が残る現状です。

そのような中、本研究課題におけるナノ構造を制御したゲル微粒子の開発を進める中、生体適合性を低下することなく、ゲル微粒子内部に疎水的なナノ材料を複合化することに成功しました。このナノ設計指針として、ゲル微粒子

内部の荷電基の空間分布が重要という知見を見出しましたので、複数から成る層の数の制御も達成することができました。

その他の一面としても、これまで様々な評価技術が必要とされてきたゲル微粒子の内部構造評価において、ポリスチレンのような硬質成分でラベル化し、電子顕微鏡法によって可視化するという新たな評価法を導入できることを見出しました。今後も、本研究を発展できるように精進してまいります。

最後になりましたが、2年間の研究サポートを賜りましたこと、重ねて感謝申し上げます。私のような若手の立場において、サポートをいただいたということ自体が励みになり、より一層研究に励もうという思いになれました。コーセーコスメトロジー研究財団の益々のご発展をお祈り申し上げます。

(信州大学)

コスメトロジー研究助成を受けて

五十里 彰

この度は、コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成課題に採択していただき、誠にありがとうございました。

私たちが日常生活で浴びている太陽光には、紫外線や可視光を含めた様々な波長の光線が含まれています。紫外線についてはこれまでに多くの研究が行われ、過度な照射によって炎症を引き起こすことや、DNA 損傷を介して皮膚がんの発症リスクを上昇させるほか、乾燥などの皮膚バリア破綻を伴う光老化と呼ばれる皮膚の早期老化が起こることが明らかになってきました。私たちの研究グループは、皮膚のタイトジャンクション構成に必須の因子であるクロロゲン-1 による細胞間バリア制御とバリア破綻メカニズムについて研究しています。これまでに、紫外線がオプシンという光受容体を介して感受され、クロロゲン-1 の局在変化によるバリア破綻が起こることを明らかにしました。本研究では、紫外線とは異なる光受容体に感受されて、組織保護的な作用を示す可能性が報告されていた赤色

可視光に着目しました。赤色光を照射した表皮細胞を用いて、どのような皮膚保護作用を示すのか、さらにその作用メカニズムに関する解析を行いました。紫外線照射によって細胞に生じる最も重要な変化として、細胞内の活性酸素種 (ROS) の産生亢進が知られていますが、赤色光照射は紫外線照射による ROS 産生亢進を抑制しました。詳細な作用メカニズムについては現在検討中ですが、一般に殆ど生理作用がないと長年考えられてきた赤色光による細胞応答を解き明かすことは、皮膚科学の発展において意義があると思っております。将来、科学的エビデンスが蓄積され、赤色光を用いて簡便に皮膚のストレス応答を高めるような技術・デバイスなどの開発に繋がることが期待されます。

最後になりますが、本研究にご支援を賜りましたこと、改めて御礼申し上げます。貴財団および関係者の皆様の今後益々のご発展を心より祈念致します。

(岐阜薬科大学薬学部)

コスメトロジー研究助成を受けて

石田 竜弘

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にご採択いただき、誠にありがとうございました。助成いただいた研究は、COVID-19 パンデミックと時を同じくしており、大学への入構制限や実験施設の使用制限の中で推進したことから、非常に記憶に残るものとなりました。お陰様で成果を “Investigation of anti-PEG antibody response to PEG-containing cosmetic products in mice. Journal of Controlled Release, 354, 260-267(2023)” という形で発表することができ、安堵しております。

COVID-19 パンデミックでは、新型コロナウイルスに対するワクチンが開発され、本邦では Pfizer 社および Moderna 社製のワクチンが使用されました。これらのワクチンの本体はウイルスの S タンパク質をコードした mRNA であり、ワクチンとしての安定性および筋肉内投与後の mRNA の発現を補助するために PEG 修飾 lipid nanoparticle (LNP) が添加されております。良好な保護効果が世界的にも見られた一方で、一部の人で重篤なアレルギー反応やショック症状があらわれており、残念ながらその原因は未だ明らかにな

っておりません。我々は PEG が微粒子やタンパク質に修飾された際、ハプテンとなり PEG に対する抗体が誘導されることを明らかにしてきました。本ワクチンは mRNA を PEG 修飾 LNP でくるんだ直径が 100 nm 程度の微粒子からなっており、このワクチンを投与することで PEG に対する抗体をもつヒトが増えたものと考えております。今回の助成により、化粧品に含まれる PEG 誘導体の皮膚への塗布によっても PEG に対する抗体が誘導されることを明らかにすることができました。PEG は医薬品だけでなく、化粧品や食品など私たちが日常で使用するものの中に添加されています。COVID-19 パンデミックの前には、PEG に対する抗体がなぜ誘導されるのかに着目して研究を行っていましたが、今後は PEG に対する抗体を既に持っているヒトに PEG を含む製品を適用した際に何が起こるのかに着眼点を移して研究を進めていきたいと考えております。

最後になりましたが、貴財団の益々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。

(徳島大学大学院医歯薬学研究部薬物動態制御学分野)

2020年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

大森 深雪

まず、コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成で私たちの研究をご支援いただき、財団ならびに関係者の方々に深謝申し上げます。『コロナ禍』にいただいた本助成は、おかげさまで研究の大きな励みとなり、実際、研究の発展にも役立てることができました。

私は博士号を修了して以降、一貫してアレルギー性皮膚炎の基礎研究に励んでまいりました。研究開始当初は、表皮由来サイトカインがT細胞の機能獲得に与える影響に着目しておりましたが、その後、T細胞由来サイトカインが表皮の性状変化に与える影響へと研究の着眼点がシフトし、ようやく、今回の研究コンセプトである『皮膚—免疫増幅サイクル』の着想に至りました。免疫細胞と表皮の両側面からアレルギー性皮膚炎の病態を捉えるこれまでの基礎研究を礎に、今回の助成では、ステロイド剤に代わる治療薬はあるのか、その治療薬は免疫細胞の機能にどのように作用するのかについて、最新の知見をもとに研究させていただきました。その結果、新たな免疫機能の制御法を見出し、学術論文として社会へ還元することができました。また、

今回の研究活動を通して、私の研究課題であるアレルギー性皮膚炎が、コスメトロジー分野といかに密接な関係にあるのかを学び、今回の研究課題の重要性について、あらためて考える機会となりました。

皮膚を体表の防御システムと捉え、皮膚が外来異物に対峙する仕組みに思いを馳せることは、私にとっての研究の大きいモチベーションになっています。大きな研究費をいただいたにもかかわらず、採択時期が新型コロナウイルスの流行と重なった影響で、貴財団開催の表彰・贈呈式への参加がかなわなかったことが、ただひとつの心残りですが、今後も引き続き、免疫細胞と表皮の両側面から皮膚を俯瞰しつつ皮膚研究に励む所存です。また機会がありましたら、今度こそは、是非ご指導を賜りたく存じます。

最後になりますが、本研究を大きく発展させてくださったコーセーコスメトロジー研究財団の関係者の方々へ、重ねて心からお礼を申し上げます。

(愛媛大学大学院医学系研究科感染防御学講座)

2020年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

櫻井 文教

このたびは、研究助成をいただき、真にありがとうございます。まず本研究助成に対し最も感謝したい点は、皮膚に対する研究のきっかけを作ってくれた点です。私は主に核酸医薬や遺伝子治療薬(ウイルスベクター)に関する研究に従事しておりますが、主な標的組織はがんや肝臓であり、皮膚に関しては興味はあったものの、研究は行う余裕がありませんでした。しかし貴財団を知り、これを機会に皮膚に関する研究に取り組みたい、と思い応募させていただきました。実際に研究の遂行に伴い、文献等を調査すると、皮膚の線維芽細胞は他組織の間葉系細胞と異なる性質を有していること、さらに生体バリアーとして重要な働きを有していることを改めて知ることとなり、大変興味深い研究

対象であることがわかりました。今後も皮膚に関する研究に従事したいと考えております。また今回の研究成果報告書には、特許等の問題から詳しく書くことができませんでしたが、大変興味深い結果を得ております。論文発表後は、ぜひとも貴財団の奨励賞に応募したいと考えております。

また貴財団にお願いしたい点としては、受賞者が研究を通じて交流できるような場を設けていただきたいと思います。私のように、新たに皮膚研究に参入した者にとっては、実験をしているうえで問題が生じても、気軽に質問できる知り合いもいないことから、受賞後も交流できるような場を設けていただけると、さらなる研究の推進につながるかと考えております。(大阪大学大学院薬学研究科)

コスメトロジー研究助成を受けて

佐々木 淳一

この度は、コスメトロジー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。本研究課題は、間葉系幹細胞の血管内皮細胞への分化能(脈管形成能)について、その生体内での制御メカニズムの一端を明らかにすることを目的としていました。生体内で新しい血管を造ることは、再生医療技術や生体材料開発の分野において非常に重要であり、この血管を自在に操作するテクノロジーはコスメトロジーの発展にも寄与すると考えられます。本研究では、グリコサミノグリカンの一つであるヘパラン硫酸に着目し、間葉系幹細胞の脈管形成能発現におけるヘパラン硫酸の役割を、血管内皮細胞への分化誘導法が確立されている歯髄幹細胞を用いて評価しました。今回のご支援のおかげで、トランスクリプトーム解析をはじめとした分子生物学的アプローチを展開することが可能となり、脈管形成へ与える影響のみならず、ヘパラン硫酸がもつ多彩な機能を明らかにすることができました。本研究の結果から、ヘパラン硫

酸を用いることで血管の形成を制御できる可能性、そして、歯髄幹細胞の再生医療や組織工学への応用可能性を示すことができました。

得られた研究成果については、助成期間中に多くの学会やセミナーで発表させていただき、本研究をともに進めた大学院生が国際歯科研究学会日本部会のJADR/GC学術奨励賞、および大阪大学歯学会の優秀研究奨励賞を受賞しました。さらに、歯学研究分野において名高い国際誌の一つであるJournal of Dental Researchに本研究の成果を掲載することができました(Li A, Sasaki JI, et al. J Dent Res 102 (2), 207-216, 2023)。

今回ご支援いただいた研究を今後も発展させ、さらなる研究成果を挙げられるよう努力したいと考えております。この度のご支援について、コーセーコスメトロジー研究財団の関係者の皆様に重ねて感謝申し上げますとともに、貴研究財団の益々のご発展を心よりお祈り申し上げます。

(大阪大学大学院歯学研究科)

コスメトロジー研究助成を受けて

志馬 寛明

この度は、コスメトロジー研究助成により2年間にわたってご支援いただき誠にありがとうございました。財団関係者の皆様に厚くお礼申し上げます。

本研究課題では、紫外線による生体機能の制御に関して新たに見出した、制御性T細胞(regulatory T cell, Treg)による創傷治癒の促進作用の機序を解明することを目指しました。太陽光に含まれる紫外線が地表に到達する量は、年々増加しています。地域差や個人差はあれども我々の身体は日常的に暴露されており、生理機能が影響を受けると考えられていますが、理解は進んでいません。紫外線は日焼けやしみ、しわ、さらには皮膚がんを誘導することから、一般的には悪いイメージしかなく、紫外線をなるべく浴びないことが健康維持に重要であるとの認識が広がっています。一方、あまり知られていませんが、紫外線には

人体に有益な作用があります。紫外線の有効利用は皮膚科の臨床で先行しており、乾癬やアトピー性皮膚炎などの治療に用いられています。近年開発されたナローバンドUVBと呼ばれる極めて狭い範囲の波長域の紫外線を照射できる装置を用いると、治療効果が高まり、副作用が軽減されることから、紫外線療法は急速に普及しています。我々は、免疫調節に関わるTreg細胞に注目して研究を行っており、網羅的な遺伝子発現解析から紫外線で誘導されたTregが創傷治癒を促進する作用を見出しました。本研究で得られた成果をさらに発展させ、創傷治癒の新たな治療法の開発やコスメトロジーの発展に貢献できれば幸いです。貴財団のご支援に重ねて感謝いたしますとともに、今後のますますのご発展を祈念いたします。(名古屋市立大学)

2020 年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

下田 将之

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頂き、多大な御支援を賜り、心より深く感謝申し上げます。

皮膚真皮の主要な細胞外マトリックス成分であるヒアルロン酸(HA)は、その優れた保水性・粘弾性・膨潤性や生体適合性の高さが注目され、化粧品だけでなく、変形性膝関節症や肩関節周囲炎の治療を目的とした関節内注射薬、内視鏡的粘膜下組織切除術時の粘膜隆起剤、白内障手術補助剤にも応用されております。また、シワの改善やリフトアップを目的としたHA注入が美容医療分野でも広く実施されていることから、近年その知名度は老若男女を問わず高まっており、細胞外マトリックス成分の中でも大きく実用化に成功した分野といえます。しかしながら、HAの生体内での代謝機構は今なお神秘のベールに包まれており、基本的なHAの分解を担う分子実体すら十分に明らかにされていないのが現状です。近年申請者らが明らかにした

HYBIDが司る新規の生体内ヒアルロン酸分解機構はこれまで立ち遅れていたHA分解研究の急展開を引き起こす可能性が十分に考えられます。従って、HYBID-HA分解機構解明はHA研究分野で注目されている重要な課題であり、阻害剤探索・開発研究はなお挑戦的研究ではありますが、成功すればコスメトロジーへのインパクトも大きいと考えております。本研究において、一部の植物抽出物が腸炎におけるHA代謝を制御する可能性を見出したことから、今後皮膚老化を予防する新規医薬となりうるかについても検証を行い、皮膚のシワ・たるみ形成を抑制しうる新たな抗皮膚老化薬・化粧品としての可能性を引き続き検討していきたいと考えております。

最後になりましたが、重ねまして、御支援を賜っております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益々のご発展を心よりお祈り申し上げます。(東京慈恵会医科大学病理学講座)

2020 年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

高杉 征樹

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ご採択頂きまして誠にありがとうございました。2019年7月より大阪公立大学(当時は大阪市立大学)の助教として採用されたばかりでまだお金のない時期に助成をして頂く事ができ、研究をスタートアップする上で本当に助けられました。

今回助成して頂いたテーマを含め、私の研究では細胞外マトリックス、特にヒアルロン酸に注目して、老化などの生理現象との関わりを調べております。アンチエイジングに関する関心が高まり、それに関わる化粧品を含む様々な製品が世に出回る中、それらが立脚すべき基礎研究を強力に後押ししてくれる組織として貴研究財団以上のものを私は知りません。化粧品に関しては基本的に一人のユーザーに過ぎなかった私は、貴財団が発行する研究報告に記載された他分野からの数々の優れた研究成果を目にし、「コスメトロジー」という学術分野の深さを思い知りました。単に研究を助成して頂いたという事だけでなく、この分野の

存在に対して目を開かせてくれたという意味でも、今回採択を頂いた事に大変感謝をしている次第です。今回助成して頂いた「ヒアルロン酸とデスモソームタンパクとの新規結合が皮膚機能に及ぼす影響の解明」に関しては、この結合自体は確かめられたもののその皮膚機能に及ぼす影響までは残念ながら未だ解明に至る事ができていません。しかしながら、ここまでの研究成果があったおかげで、現在ヒアルロン酸とその結合タンパク質が皮膚に留まらず様々な組織の老化にどのような影響を及ぼすかについて複数のトランスジェニックマウスを用いて研究を進める事ができております。今しばらくの時間を要する事になるかとは思いますが、当初の狙い通りヒアルロン酸研究を通じてコスメトロジーに寄与できるよう、今後またゆまず研究に取り組んでいきたいと思っております。最後に、本研究をご支援頂いた事に改めて深く御礼申し上げますと共に貴財団の益々のご発展を祈念申し上げます。(大阪公立大学医学研究科)

私のミッション、美と健康を守る医学研究

田中 知明

この度はコーセーコスメトロジー研究財団の研究助成に採択いただき誠にありがとうございます。

私はもともと、内分泌疾患や糖尿病・代謝性疾患を専門とする臨床医でありましたが、現在は病気のマカニズムや分子病態の解明を目指す基礎医学研究者として毎日充実した研究生活を送っています。大学病院で専門診療に従事していた中で、原因不明の脂肪萎縮症に悩む女性や、成長ホルモン分泌不全症、早老症などの難病の患者に多く出会いました。原因不明あるいは治療法のない病気を明らかにする研究の必要性を実感したことはもちろんのこと、ただ病気を治しただけでは、失った時間や健康美ゆえに、社会の中で幸せを取り戻すのが難しいことを痛感しました。人々の美と健康を守るための医学研究が私の中の大きなミッションとなっています。「コスメトロジー(化粧品学)研究は、美しく装うという領域を超えて、人々の健康を支えたり、日々の生活や心の領域まで広がって、社会的役割を担う」というコンセプトに基づいて医学研究を支援する貴財団の助成を受けたことを、とても嬉しく、共感したというのが正直な気持ちです。今回、脂肪細胞移植治療応用に資する脂肪細胞多様性の単一細胞解析をテーマに研究を推進してきました。この研究のきっかけは、脂肪萎縮症のため顔や体のふくよかさが徐々に失われていく患者さんに対して、

自家脂肪移植手術を2度も行ったにもかかわらず、ほとんど生着せずに、一緒に治療方針を悩んだことがプロジェクトの始まりです。患者さん由来のヒト脂肪組織を用いて最新のシングルセル解析を行うことで、組織の中の脂肪細胞の多様性を明らかにすることができました。この研究成果から、脂肪移植に向いている細胞(分化効率が良かったり、生着率が高い)だけを集めたり、分化誘導効率や生着率を高める細胞技術操作ができるように発展できれば、現在の再生医療の細胞医薬品技術を活用して、患者さんに届けることも実現できるのではないかと考えています。今の日本は、若手研究者人材不足や研究資金の面から、基礎医学分野の研究環境が厳しくなっています。今後、患者さんに還元できる研究成果を挙げるといふ私のミッションを達成するために、引き続き基礎医学研究に邁進する所存です。また、この場をお借りいたしまして、貴重な検体を提供してくださった患者様、本研究に携わった共同研究者の方々にも心より感謝申し上げます。

最後になりましたが、コーセーコスメトロジー研究財団の関係者皆様にも心より御礼を申し上げますとともに、貴財団の益々のご発展をお祈り申し上げます。

(千葉大学大学院医学研究院分子病態解析学)

コスメトロジー研究助成を受けて

津田 雅貴

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頂き、心より感謝申し上げます。私は、これまで、抗がん剤、放射線や紫外線が引き起こすDNA損傷とその修復機構の解明を目的とした基礎研究を行ってきました。主な研究成果としましては、紫外線が誘発する変異誘発機構を正確に評価できる実験系の構築です。本研究結果をより応用研究に結びつけたく、コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成に応募いたしました。私は、基礎研究で培った経験から、紫外線の皮膚に対する有害作用に突然変異という視点を組み入れることを考えました。一般的には、この有害作用を防ぐために、サンスクリーン剤が使わ

れます。しかし、サンスクリーン剤のみでは、完全に紫外線を防御できないことも多いようです。特に、全身性エリテマトーデスや色素性乾皮症などの患者は、紫外線に対して感受性が高いことが分かっています。このような患者へは、これまで使われているサンスクリーン剤では不十分であり、抜本的な打開策が必須であることが想定されます。そこで、本研究を通して、紫外線による突然変異が起きる機構を詳細に解明できれば、突然変異を引き起こす酵素の阻害剤をサンスクリーン剤に添加する方法を提案できると考えました。したがって、このサンスクリーン剤は、皮膚がんの発症を抑制できる可能性もあります。さらに、この

方法は日常的に使用する化粧品への応用も期待できると考えています。本研究から得られる成果は、サンスクリーン剤による紫外線防御と突然変異を抑制する医薬品を同時に用いることにより、相乗効果も期待できます。この2年間

に得られた成果では、まだ化粧品への応用には遠いですが、いつの日か実現できるようにさらにコスメトロジー研究を進めていきたいと考えています。

(広島大学大学院統合生命科学研究科)

2020年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

南雲 陽子

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頂きまして誠にありがとうございます。私はタイトジャンクションの可逆的制御を目指して研究を行っております。これまで上皮のタイトジャンクションを可逆的に開口する物質を複数見だし、そのメカニズム解析を行ってきました。また、そのメカニズムから新たなタイトジャンクション関連シグナル伝達経路や制御分子を見だし、安全な透過促進剤としての開発を試みてきました。

今回の助成対象であるMA026という化合物については現在透過促進剤としての開発を推し進めており、我々どもの通常の経験と異なり、応用研究については研究費を頂いていたものの基礎的な解析に十分な予算が割けない状況でありました。そのような背景のなか本助成に採択頂き、基礎研究に必要な類縁体の合成や学術的にも重要な標的特異性の解析を進めることができました。その結果、MA026

のクロージンファミリー特異性について知見を得ることができ、それがまた応用研究にフィードバックされ、透過促進剤としての応用を加速できております。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は心より感謝致します。

タイトジャンクションはバリア機能の他にも、皮膚をはじめとする種々組織恒常性に重要な役割を担っていることが解ってきています。そのような最先端の研究をされている憧れの先生方に助成贈呈式会場でお目にかかれたこと、とても嬉しく励みとなりました。皮膚というもっとも大きな臓器に学際的にアプローチしているコーセーコスメトロジー研究財団だからこそ可能な研究交流の場を提供してくださっていると理解しております。最後になりましたが、コーセーコスメトロジー研究財団の今後の益々のご発展を祈念致します。

(筑波大学生命環境系)

2020年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

林 良太

今回、コスメトロジー研究助成を受けて研究を行えたことに深く感謝申し上げます。私自身は遺伝性皮膚疾患という稀な疾患を主な研究テーマとしております。一方、アレルギー疾患、化粧品学は非常に身近なテーマであり、私自身の日常診療においては遺伝性皮膚疾患患者とは比べられないほどの人数を診察しております。私自身が畑違いともいえる接触皮膚炎をテーマに研究助成を申し込むきっかけとなったのは、アトピー性皮膚炎、接触皮膚炎、手湿疹として経過をみられた患者の一部に遺伝性皮膚疾患患者がいたことを経験したからです。確かにこれらの患者はcommon diseaseに類似した皮膚症状ではあったものの、やはり違和感を覚えた症例は改めて診断を考え直すべきだということを認識しました。

一方、接触皮膚炎は化粧品を含めた様々な原因により発症します。パッチテストにより原因が明らかになることで症状

が改善し、接触皮膚炎患者の満足度は得られます。しかし、本来は自身の皮膚を綺麗にしたいなどの理由で使用したもので接触皮膚炎を生じることは出来る限り避けたいことであり、化粧品使用前に接触皮膚炎のリスクを明らかに出来ることは有意義なことであると考えました。微力な私が考えられるアイデアと言えば、元々行っている遺伝子と接触皮膚炎との関連を明らかにしたいということでした。今回の研究の主なテーマである日本人における接触皮膚炎の遺伝学的背景に関してはまだまだ症例数が少ないこともあり道半ばです。しかし、今回コスメトロジー研究助成により挑戦のチャンスをいただけたこの研究テーマをこれからも継続し、コスメトロジーの将来に貢献をしたいと考えております。

(新潟大学医歯学総合病院皮膚科)

コスメトロジー研究助成を受けて

原口 省吾

このたびはコスメトロジー研究助成に採択頂きありがとうございます。私は新しい生理活性分子の探索とその機能解明に関する研究を続けていますが、これまでは神経系を対象としていたため皮膚は門外漢に近く、さらに機能未知の新規皮膚ホルモンに関して機能解明に取り組んでみたい私の研究課題を採択頂き、本当に感謝しかありません。

新規皮膚ホルモンの研究は、まだ受容体の同定や、どのような皮膚機能に関わるのか等、重要な課題は研究の途上ですが、ステロイドYの機能解明についてはまずは研究が緒に就いたように思います。一方で、ステロイドXはlncRNAや機能未知の転写産物を誘導するものの何をしているのかは行き詰まっています。何かの機会に皆さまからご助言など頂けますと幸いです。皮膚の研究を行う中で、これまで神経を対象としてきたこともあり、ルーチンで動い

ていない実験系に挑戦する必要があると多くあり本研究助成にはとても助けられました。幸いにも本研究助成で得られた成果の一端により科研費にも採択頂き、海の物とも山の物ともつかめなかった新規皮膚ホルモンの研究に手ごたえを感じはじめています。

副腎皮質ステロイド剤の例からも明らかですが、ステロイドは脂溶性低分子という物理化学的性質から皮膚に浸透しやすい性質を持ちます。新規皮膚ステロイドも皮膚における生理機能を解明することで、将来的に何らかの皮膚疾患に対する外用剤開発の道も開けるのではないかと考えています。現在は、新規皮膚ステロイドが未だ見つかっていない皮膚リボソーム病等の治療へつながることを期待して研究を継続しています。

(昭和大学医学部生化学講座)

コスメトロジー研究助成を受けて

日浅 未来

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、深く感謝申し上げます。

我々の研究室では、輸送体タンパク質の生理作用について生化学、生理化学の面から研究しています。近年では酸化型ビタミンCであるデヒドロアスコルビン酸(DHA)をオルガネラ膜上で輸送する小胞型トランスポーターの解析を進めています。ビタミンCは皆様のご承知の通り、様々な生理的作用を有しています。カテコールアミン合成やペプチドホルモンのアミド化の補酵素として、またコラーゲン合成の際のプロリン水酸化酵素の補酵素として、ビタミンCは分泌顆粒やオルガネラ内で機能します。しかし、細胞小器官内にビタミンCを輸送するメカニズムはよくわかっていません。我々は細胞小器官に発現するDHAトランスポーターを通じて、オルガネラ内へのビタミンC輸送や酸化還元機構の解明を目的としています。

これまで輸送タンパク質の精製や機能解析を行ってきたこともあり、タンパク質の扱いには長けていると思いましたが、コラーゲンの扱いに苦労しています。本助成により、コラーゲンの検出・定量ができるようになりました。今後はコラーゲンに加え、プロリンがヒドロキシ化されるエラスチンについても解析を進めていきたいと考えています。

コロナ禍で研究が思うように進まない状況や、大学の研究費も多くはない昨今、今回の助成で研究を大きく進めることができました。本研究がコスメトロジー分野の基礎研究の一助として貢献できましたら幸いに存じます。最後になりましたが、本研究にご支援いただきましたことを重ねて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お祈り申し上げます。(岡山大学学術研究院医歯薬学域)

2020年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

石川 正昭

この度は、コスメトロジー研究助成に採択頂きまして、ありがとうございます。

私は、ストレスを他覚的定量評価できるツールの開発に努めており、嗅覚とストレスには深い関連性があるであろうと常々推測していました。特にアロマセラピーのようなリラクゼーションにつながる嗅覚刺激は、生体反応に何かしらの影響を与えると考え、その影響を反映するツールの確立をと考えていました。これまでの研究から、瞳孔がストレス程度を反映させるバイオマーカー、特に精神的疲労の程度を反映させることがわかっていました。過去の臨床疼痛モデルにおける疼痛由来の精神的疲労が縮瞳と関連するという所見と今回得られた腐敗臭を用いた嗅覚刺激から生じる精神的疲労が縮瞳と関連するという所見は、類似するものでした。

今回の成果から、精神的疲労を普遍的に生じさせる条件

の更なる同定は、臨床的に応用可能な他覚的定量評価を伴った嗅覚検査の開発基盤形成に大きな役割を持っていると考えます。私としては、アロマセラピーのようなリラクゼーションを導く嗅覚刺激が成果を出すのではないかと考えていたため、まさか腐敗臭で結果が出るとは思いませんでした。やはり研究は実施しないとわからないものであり、面白いなど改めて思うこの頃です。

ストレスの研究をはじめたきっかけは、嗅覚刺激由来のストレスマーカー確立でした。それゆえ申請書を出したときに自分のアイデアがどこまで審査委員の方々に伝わるか不安でしたが、採択されたと知った時の喜び・責任感は一とおでした。本研究の成果を、次の研究に繋げたいと思います。ご援助をいただいたことに感謝申し上げます。

(兵庫県立尼崎総合医療センター)

2020年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

伊藤 文人

本研究で着目した信頼度・支配性といった対人印象は、人が社会生活を送る上で極めて重要なものとなります。この対人印象は、様々な場面でその人の人生を左右することになっていきます。例えば、上司から良い印象を持たれば昇進に結びつくかもしれませんし、異性から良い印象を持たれば、将来パートナーになってくれるかもしれません。こうして考えると、印象形成が人間社会の根幹をなすものであるといっても過言ではないかもしれません。しかしながら、実際のコミュニケーション場面を研究対象にするのは容易ではなく、あまり理解が進んでいない実情があります。本研究はこうした背景から立案・実施されたもの

になります。化粧をするという行為は相手に良い印象を与えるための重要な方略と考えられますが、魅力度を高める以外にもまだ知られていない効果や技術(例えば、有能さを高める等)があるかもしれません。心理学・脳科学の貢献による、これまでにない新たなコスメトロジーの広がりを期待してやみません。今回の研究は多くの参加者に対面で会話をさせていただく課題を取り入れており、コロナ禍の影響を大きく受けました。実施が予定よりも1年以上遅れたにも関わらず、ここまで温かくサポートして下さったコーセーコスメトロジー研究財団の皆様にご心より御礼申し上げます。(東北大学大学院教育学研究科)

コスメトロジー研究助成を受けて

鎌田 泰彰

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。

私は大学での研究活動のかたわら、視能訓練士という眼科の検査技師として臨床業務をしております。臨床業務の中で、視能訓練士が行う眼科検査の結果を眼科以外の幅広い分野に応用、発信できないかと常に考えておりました。今回、私の恩師である原直人先生から本研究助成についてのご助言をいただき、香りが生体へ及ぼす影響を眼組織から評価できないかと構想し応募に至りました。研究助成の採択をいただいたときには、自分の思い描いていたことが実現できると非常に感激したのを覚えております。改めて本研究は貴財団のご支援あってのものとして深く感謝申し上げます。

香りのような感覚刺激は個人の経験や嗜好等によって感受性が異なります。そのため、自覚的評価だけでは平均化が難しく、客観的評価指標が必要であると考えます。私はこれまでに瞳孔を客観的評価指標に用い、感覚刺激が自律神経系に及ぼす影響を検討してきました。瞳孔には自律神

経支配があり、副交感神経系が優位となることで縮小、交感神経系が優位となることで散大します。また、瞳孔は常に一定のリズムで縮小、散大を繰り返しており、このようなゆらぎは瞳孔振動と呼ばれています。瞳孔振動の機能的意味については未だ明確にはなっていませんが、近年では生体の客観的評価指標としての応用が考えられています。本研究の結果から、香りによって心副交感神経指標が増大したとき、瞳孔は縮小し、特定の周波数帯の瞳孔振動が生じることが示唆されました。このことは、香りが生体に及ぼす影響を客観的に評価できる指標として、瞳孔の有用性を示せたのではないかと考えています。今後も眼組織を用いた客観的評価指標の有用性を検討し、コスメトロジー分野をはじめ様々な分野に貢献できるよう研究活動を継続していきたいと思っております。

最後になりますが、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。

(国際医療福祉大学保健医療学部視機能療法学科)

コスメトロジー研究助成を受けて

新美 亮輔

研究期間を終えて無事に成果を報告でき、うれしく思っております。研究成果は国際誌の論文として公開されましたが、本助成のおかげでオープンアクセスとすることができました。また、研究期間はCOVID-19感染禍のただ中で、心理学実験を行うにも諸々の困難がありましたが、やはり本助成を活用することでクラウドワーカーを対象とした大規模オンライン実験を実施することができました。

私は視覚物体認識や視覚的注意などの認知心理学研究を行ってまいりました。現所属となって数年が経過し、少し研究の幅を広げたいと思い、顔魅力の問題に取り組むことを考えました。PIとして学生指導を続けるうち、学生たちが顔魅力研究に興味を持ちやすいことに気づき、その背後にある(おそらく若年層でとりわけ強い)外見というものに対するこだわりに関心を持ったこともきっかけの一つです。このように新しいテーマに手を出してみようと思った

とき、コスメトロジー研究助成の1～2年の研究期間はどうやってつけたか。科研費をはじめ多くの公的研究助成は数年以上の研究期間で、それなりの規模の体系的な研究計画が必要ですから、新しく面白そうな単発のアイデアを機動的に試してみるタイプの研究には向いていません。かつては大学のいわゆる個人研究費がそのような小規模な「芽」のような研究を支えていたはずですが、現在ではそれも難しくなっています。コスメトロジー研究助成は、研究者の自由な発想に基づいた「ちょっとやってみようかな?」という挑戦を支えてくれる、まことに貴重な機会です。このような助成は、科学と技術を豊かにし、後の重要な発見につながるかもしれない多彩な可能性を育ててくれるでしょう。今後も、可能性を秘めた多くの「芽」を助けていただければと願う次第です。(新潟大学人文学部)

2017年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

横山 由香里

この度は研究助成を賜り、誠にありがとうございました。助成期間中の妊娠・出産、新型コロナウイルス感染症の流行による研究の難航等で、当初の計画から度々の延長をお認めいただきましたことにも、心より感謝申し上げます。

助成いただいた研究は、視覚障害がある女性が自ら化粧をすることによってQuality of Lifeが向上するか否かを明らかにするものです。自ら化粧をするためのプログラム(ブラインドメイクプログラム)の受講による変化をとらえることを目的に研究を進めてまいりました。しかしながら、新型コロナウイルス感染症の流行により研究に大きな影響が生じました。緊急事態宣言等により外出機会が減少したことで、視覚障害のある方々の化粧の機会や、ブラインドメイクプログラムに参加する機会が減少しました。大変厳しい状況でしたが、貴財団に研究計画の変更をお認めいただき、オンラインで参加を募り研究を続けさせていただ

きました。おかげさまで、研究の基礎を作ることができ、ここまでの成果を国際化粧療法医学会に発表することができました。現在は国際誌に投稿中です。まだまだ課題はありますが、視覚に障害のある方々が自ら化粧をすることでQuality of Lifeが向上する可能性を実証する一助になったのではないかと考えております。

私事で恐縮ですが、妊娠・出産により研究を中断させていただく期間もありました。私の場合は、仕事や私生活で出産前後に多くの変化が生じ、様々な調整が必要でした。各方面に迷惑をかける心苦しさもありましたが、貴財団には状況をご理解いただき研究の中断をお認めいただきました。こうしたご対応は、復帰後の励みになりました。物心両面で支えていただいたことに深謝申し上げます。この度はご支援、ご配慮いただき、誠にありがとうございました。

(日本福祉大学)

2020年度 研究助成

コスメトロジー研究助成を受けて

和佐野 浩一郎

顔面神経麻痺診療のなかで、現在医療者の主観的な評価法しかない麻痺の重症度評価の客観的評価法の開発や、麻痺が残存した患者さんに対するケアの重要性を痛感していましたが、コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成を受けることが決まり、これらの問題の解決に挑むことができることとなり大変心強く思いました。

実際の研究テーマである顔面神経麻痺患者に対するメイクアップ法の開発に関しては、新型コロナウイルス感染症の拡大に伴い、近接した指導やマスクを外した状態での施術が不可能となってしまったため、3名の患者に対するプレリミナルな指導に留まってしまい、本当に歯がゆい思いをしました。一方で重症度評価に関する人工知能ソフトウェアの開発は順調に進展し、当初用いていたセグメンテーションという手法にしわの解析を追加することができ、実

用化に向けて大きな一歩を踏み出すことができました。

医療においてしばしば置き去りにされる外見上の問題は、患者さんにとって大変大きな問題であることが多いと感じております。特に私の専門診療科である耳鼻咽喉科は被服により隠れない領域であることから、コスメトロジーという分野は非常に重要であると考えております。今回の研究では最終段階まで達することができませんでしたので、研究期間終了後も引き続き医療へのコスメトロジーの応用に取り組んでいきたいと思っております。

最後に、この度は助成を頂きありがとうございました。コーセーコスメトロジー研究財団のご発展をお祈り申し上げます。

(国立病院機構東京医療センター／東海大学医学部)

國際交流助成

•

學術集會支援助成

国際交流助成を受けて

松原 弘樹

まずはこのたび、コーセーコスメトロジー研究財団の国際交流助成に採択いただきましたことを心より御礼申し上げます。私は自身の研究キャリアを界面活性剤の吸着膜および会合体形成の熱力学的な研究からスタートし、1990年代の終わり頃から発展してきた気液、液液界面の分光測定を取り入れながら、新たな吸着膜状態の発見と創出、そしてその構造解析に努めてきました。数年前よりこれらの研究によって明らかになった吸着膜の相転移現象を界面物性のスイッチとして活用し、界面化学の主要な応用領域の1つである化粧品分野で、乳化や洗浄などを中心として私なりの実学的な貢献ができないか模索してまいりました。

今回の助成では、ドイツコロイド学会の100周年を記念した大きな国際会議に参加させていただき、研究発表はもとより、実行委員として学会運営にも深く関わらせていただくことができました。その活動を通してドイツを中心に、現在すでに活発にご活躍されている著名な先生方だけ

く、中堅、更に次世代の研究者とも広く研究交流をすることができました。特に大学の先生方だけでなく、界面化学関連企業の研究者からも研究内容を高く評価していただき、これまで手探りで進めてきた「吸着膜相転移を応用した乳化安定性制御」の研究に大きな手ごたえを感じることができました。今後は、本助成で新たに構築させていただいた人的なネットワークを共同研究などで発展させていくなから、基礎研究から応用研究へ、更にコスメトロジーにも貢献できるような形で展開していきたいと考えています。

本助成に採択いただいたことが、私の研究の新たなチャレンジを拓く機会となりましたこと大変ありがたく感じております。今後も微力ながらもコスメトロジー研究の発展に貢献できれば幸いです。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。

(広島大学大学院先進理工系科学研究科化学プログラム)

国際交流とコスメトロジーとの結びつきについて

平松 隆円

COVID-19を含む感染症対策において石けんを使った手洗いは非常に重要だが、最新のユニセフによる推計によると、サハラ以南のアフリカでは都市部に住む人々の63%が手洗いを利用できないでいる。あらゆる環境において、手洗い設備、水、石けん、手指消毒剤へのアクセスを改善し、最適な手指衛生習慣のための行動変容介入を推進することが急務となっている。特に、社会的弱者や不利な立場にあるコミュニティにおいて手頃な価格の製品とサービスが利用でき、持続可能であることを目指す必要がある。

そこで、東亜大学(平松隆円)とモナスティール大学(Mohamed HACHANA)が協力し、ヘルスケアサービスを受けるうえで物理的にそれがアクセスできない状況の改善、疾病予防のための手洗い習慣といった社会習慣を改善し、ユニバーサル・ヘルス・カバレッジ(UHC)を実現すべく、アフリカにおける手洗いや手指の消毒といった衛生環境を改善する現地で製造可能なトイレタリー製品(石けん)の開発に取り組んだ。これは、チュニジア人材育成と新規産業創出も目的としており、チュニジア産原材料を用いての石けん開発だけでなく、日本およびチュニジア共和国内において製造・販売を担う企業を両大学の学生による起業による設立を目指すため、アントレプレナーシップも実施している。

今回、世界有数の産出量をほこるチュニジア産オリーブオイルを主原料に、貴重なウチワサボテンオイル、チュニジア産の天然精油を配合した肌への刺激がマイルドで子どもから大人まで使用できる石けんを開発した。国際的なパーム油問題(熱帯林の伐採、野生動物の減少)にも目を向け、パーム油に変わる原料としてチュニジア産のデーツオイルの抽出配合方法も検討した。オリーブオイルにはオレイン酸が多く含まれ、肌の刺激になりにくく保湿効果もあるため年代問わず使用できる。純度の高いオリーブオイルを使用した石けんは、万が一口に入っても脂肪酸とオイルに分解されるため、小さな子ども向けに適している。石けんで洗った排水は、下水を通して海や川に流失した際に短時間で分解され、魚やプランクトンの餌になる。国際的なパーム油やシリコンの値上がりが続く、市場のインフレ化に伴いトイレタリー製品の価格が上昇傾向にあるなかで、フェアトレード体制を実現し、適正なコストでの製造、販売をおこなう。

以上の取り組みは、美しく豊かな人間生活の実現に寄与し得るコスメトロジーの理念そのものであると考えており、今回のコーセーコスメトロジー研究財団からの助成を通じたプロジェクトの支援に感謝申し上げたい。(東亜大学)

日本ビタミン学会第74回大会を振り返って

高田 二郎

福岡市では66年ぶりとなる日本ビタミン学会第74回大会を対面開催で無事終えることができました。感染の脅威が完全に払拭できておらず、厳重な感染対策下ではありましたが、本大会を対面で開催できたことは大きな喜びであります。大会ポスターには、疫病退散を祈願した祭りである博多祇園山笠の「招き板をもつ先走りの子供」を描いた長谷川法世氏のイラストを使わせていただきました。本大会は、基調講演、特別公演6題、一般公演72題、若手シンポジウム9題、受賞公演5題、ランチョンセミナー1題で構成し、宮城から沖縄まで日本全国から274名が参加しました。本学会において「ビタミン・バイオフィクターを上手に使う」をテーマにした特別講演のうち2題が、これからのコスメトロジーを扱ったものでした。逢澤起代美氏(林原)は「化粧品業界の市場とトレンドを絡めて～化粧品の過去・現在そして未来?～」と題し、化粧品業界の市場とトレンドの推移、化粧品成分としてのビタミンC誘導体の用途展開、さらに化粧品業界の未来を志向した将来ビジョン「日

本の先端技術と文化に基づいたJapan Beautyの世界発信による人々の幸せとサステナビリティへの貢献」を紹介されました。長濱徹氏(大正製薬)は「様々な生理機能を有する含硫アミノ酸～タウリン～」と題し、皮膚におけるタウリンの新たな機能、表皮に高濃度で存在し、セラミド合成酵素やフィラグリンの遺伝子発現を増加させること、線維芽細胞においてコラーゲン分解酵素MMP-1の遺伝子発現とタンパク増加を抑制し、ヒアルロン酸合成酵素の遺伝子発現とヒアルロン酸の分泌を増加すること。すなわち、タウリンは皮膚においてバリア機能増強とシワ形成抑制効果を有する新規皮膚老化抑制剤として機能できることを紹介されました。これらの講演により、ビタミン・バイオフィクター学がコスメトロジーにおいて一定の未来を担えることが示されました。

末筆ながら、コーセーコスメトロジー研究財団からは学術集会支援助成金を援助いただき、大会開催に有効活用できました。衷心より感謝申し上げます。(福岡大学薬学部)

第15回VIP/PACAP関連ペプチド国際シンポジウムを終えて

橋本 均

この度、公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団より、2022年度学術集会支援助成をいただき、第15回VIP/PACAP関連ペプチド国際シンポジウムを大阪国際会議場とオンラインにて、2022年10月30日(日)～11月2日(水)の日程で開催することができました。

本シンポジウムは当初2021年春に開催が計画されましたが、新型コロナウイルスの影響により再三延期となりました。しかし、この研究領域のとくに将来を担う若手研究者の国際的な発表と交流の機会を確保するため、今秋にはどのような形式であっても開催することが決定されました。そのような思いも込めて「Toward Next Generation Peptide Research」のサブタイトルを付けての開催となりました。

参加者は142名(現地74名(内、日本61名、海外13名)、オンライン68名(内、日本8名、海外60名))、計19か国に及びました。海外からはオンライン参加の割合が高かったことは、新型コロナに加え、国際航空運賃の高騰などが影響しました。そのような中でも、海外から13名に参加いただけたことを嬉しく思っています。

本シンポジウムでは、特別講演5題、受賞講演3題、2つの追悼セッション、10のシンポジウム、一般口演8題とポスターセッション21題からなる大変に充実した内容

となりました。欧州や北米からの発表も多くプログラムの作成においては時差への対策が大きな問題となりました。そこで、欧州からの発表者が多いセッションは夜に、北米からの発表者が多いセッションは朝に開催することにし、最長深夜0時までの開催としました。

表彰やグラントも大変充実したものにいただき、Akira Arimura財団によるArimura賞、若手研究者グラントおよびトラベルアワード、PEPTIDES誌のご支援によるViktor Mutt賞の選考と表彰が行われました。さらに、会期中の投票により特別発表賞とポスター発表賞の表彰も行われました。卓越した学術貢献をされた研究者から将来が期待される若手研究者を、このシンポジウムにおいて表彰、祝福できたことは大変に意義深いことと感じています。

ペプチド系は、多くの生理機能の調節に関与し、皮膚においても重要な役割が知られています。本シンポジウムでは、英国のグループから皮膚炎症に関する興味深い研究成果が、また日本のグループから痒みの受容と伝達に関する多くの優れた研究成果が発表されました。

本シンポジウムの開催において必要不可欠なご支援をいただきましたコーセーコスメトロジー研究財団に、重ねて心より感謝申し上げます。(大阪大学大学院薬学研究科)

第16回次世代を担う若手のための医療薬科学シンポジウムを終えて 長野 一也

日本薬学会医療薬科学部会主催の「第16回次世代を担う若手のための医療薬科学シンポジウム」を2022年10月29-30日に、和歌山県立医科大学・薬学部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。

COVID-19禍において、世界的な感染者・死者を減らすべく、新しいタイプのワクチンや飲み薬の開発に加えて、手洗いや手指消毒、マスク着用など、予防の重要性が改めて認識されました。そこで本大会のメインテーマは、『パンデミックの経験を生かした医療薬科学研究～命のバトンに希望をのせて、近未来の予防・創薬・治療戦略につなぐ～』としました。

本大会では、上記テーマのもと、前々回、前回大会がCOVID-19禍のためにオンライン開催となり、対面議論できなかったため、「3年ぶりのオンサイト開催」を目指し、多彩な講演を企画しました。1) 特別講演では、日本薬学会の会頭を務め、薬学の研究教育に貢献されている太田 茂先生(和歌山県立医科大学薬学部)と生体の免疫/炎症応答の分子機構を遺伝子改変動物で解明されている改正恒康先生(和歌山県立医科大学先端医学研究所)に、2) 教育講演では、本シンポ

ジウムの創設初期から若手世話人を務められ、その礎を築いてこられた久米利明先生(富山大学医学薬学研究部)をお願いしました。さらに、3) 今回初めての試みとして、若手が自らのキャリア形成を考える機会を願い、過去の本シンポジウムの優秀発表賞の受賞者4名によるキャリア形成シンポジウムを企画しました。

その他にも、一般演題では、口頭発表35演題とポスター発表30演題と多数の申し込みがありました。特にこれらの演題の中には、貴財団との関連が深い領域である化粧品や皮膚疾患用医薬の開発を目指した皮膚科学に関わる基礎・応用研究も複数あり、最先端の技術や知見について熱く議論を交わすことができました。

このように、本大会をハイブリッド形式で開催でき、200名を超える先生方に参加いただき、熱い研究ディスカッションの場と人的交流の場を提供することができましたことは、偏に貴財団より賜りましたご支援のおかげだと感じております。末筆ながらこの場をお借りして、厚く御礼を申し上げます。(和歌山県立医科大学薬学部)

第33回日本微量元素学会学術集会報告

深田 俊幸

(大会・学会名称)：第33回日本微量元素学会学術集会
 (開催日時)：2022年9月8日～9月10日(3日間)
 (開催場所)：兵庫県立淡路夢舞台国際会議場
 (参加人数)：96人(うち海外からの参加者数3人、国内93名)
 (大会概要・トピックス)：「異分野融合で微量元素を深化する」

開催目的：

日本微量元素学会は、1989年に第2回国際微量元素医学会議(ISTERH)が東京で開催されたのを契機に、微量金属代謝研究会、微量元素研究会、輸液微量栄養素研究会、微量栄養素研究会が中心となり、学際的な学会として1990年4月1日に創設されました。微量元素に関する生命科学研究を振興し、健康増進と疾病の予防・治療への寄与を通じて、社会に貢献することを目的としています。第33回日本微量元素学会学術集会は、学術テーマを「異分野融合で微量元素を深化する」として、目標を以下に定めて開催しました。

- 1：異分野融合による微量元素のさらなる理解
- 2：次世代をリードする若手研究者の育成
- 3：微量元素領域の国際交流の促進

大会概要：

微量元素研究分野における日本のリーダーシップを世界に発信するとともに、世界水準の最先端科学に国内外の研究者が触れ、活発に交流することによって、国際的な共同研究を促進したいと考えました。さらに、次世代を担う日本とアジアの若手研究者を育成する教育的基盤と位置付けることを目指し、微量元素分野で顕著な業績を有するMitchell D. Knutson 先生をはじめ、微量元素に関わる様々な分野で実績のある研究者の特別講演、教育講演、日韓共同シンポジウム、若手ワークショップを計画しました。さらに、今後の発展が期待できる医療系、栄養学、農学系の分野にも魅力的な内容となるよう取り組み、基礎と臨床における



微量元素領域の発展に努めたいと考えて、多様な企画を実施しました。

日本には、亜鉛補充療法をはじめとする先駆的な微量元素研究の歴史があり、最近では、特に亜鉛をはじめとする微量元素の欠乏による皮膚の障害など、皮膚の健康維持と病気における微量元素への関心が高まっております。このタイミングでの学術集会の開催はまさに「天の時」であり、国内外からアクセスしやすく議論に集中できる兵庫県立淡路夢舞台国際会議場で開催することは、「地の利」も感じさせるものでありました。コロナ禍は、直接的な学術交流に支障をもたらしましたが、第33回学術集会は、淡路夢舞台国際会議場のご協力のもとで、感染拡大の防止に万全を期して対面で実施することができました。皮膚恒常性の最新情報や化粧品等の開発に関しても、有益な情報交換と議論がなされたものと思われまます。関係者各位のご協力に心から感謝申し上げます(写真1)。

一方、コロナ禍が本学術集会の運営に与えた影響も、決して小さなものではありませんでした。対面での学会開催が世界的に回復している中で、私達は、来日する予定であった特別講演者のMitchell Knutson教授の講演と交流を心より楽しみにしておりました。残念なことに、Mitchell Knutson教授は、コロナ禍の影響で来日することができなくなり、オンラインでの講演を余儀なくされましたが、活発な質疑応答によって、貴重な情報交換と交流をすることができました(写真2)。コロナ禍は、まだしばらくの間は学会の様々な運営面に影響を及ぼすものと思われまます。この度の経験を、今後の学術集会の運営の参考にしたいと思います。

貴財団の多大なるご支援なくして、本学術集会の運営と成功はあり得ませんでした。多大なるご援助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、心から感謝申し上げます。(徳島文理大学薬学部)



第31回日本色素細胞学会学術大会を終えて

船坂 陽子

2022年11月12日(土) 13日(日)にステーションコンファレンス東京にてハイブリッドで第31回日本色素細胞学会学術大会を開催しました。本学術大会におきましては、日本色素細胞学会奨励賞受賞講演、5つのシンポジウム、一般演題発表、ランチョンセミナー、Best presentation賞授与を行いました。

シンポジウムは“メラニン・チロシナーゼ”で3講演（講演タイトルはメラニン分析の最近の進歩、チロシナーゼの翻訳後修飾とメラニン生成の制御、膜結合型ユビキチンリガーゼRNF152によるメラニン産生調節機構）、“メラノソーム”で4講演（メラノソーム貪食作用の各種メカニズム、メラノソームの微小管逆行性輸送の新規制御因子・Rab44の機能解析、新たなエンドソーム・ライソソーム蛍光染色剤、カルボシアニン色素を用いた、メラニントランスファーにおけるエンドサイトーシス/ファゴサイトーシスの動的可視化、“光とメラノサイト”で3講演（エキシマレーザーの皮膚への作用、白斑に対する各種光線治療、可視光線、近赤外線の種類々のメラニンを含む表皮メラノサイトへの作用）、“老人性色素斑”で7講演（老人性色素斑のメラ

ノサイト活性化メカニズムと合理的な美白法、皮膚内神経によるシミの形成メカニズム、老人性色素斑部位における真皮血管の特徴、老人性色素斑におけるメラノサイトとケラチノサイトの3次元構造解析、老人性色素斑形成における皮膚幹細胞の関与、ケラチノサイトによる皮膚色制御メカニズム、老人性色素斑病変部における表皮角化細胞の増殖異常と微量金属の動態の関連）、“メラノーマ”で2講演（末端型、粘膜型、Spitz型メラノーマの遺伝子異常、メラノーマに対するがん免疫療法）、ランチョンセミナーは美白剤による治療update、一般演題は全て口演で、20演題ありました。

参加者数は約140名で、最初から最後まで多くの方にご参加いただき、活発な議論がなされ、有意義な情報交換が行われたものと思っています。顔面のシミで最も高頻度に見られる老人性色素斑の病態、その基礎的な分子制御の動態に関する新しい知見が報告され、その改善策についても熱心に議論がなされ、コスメトロジーの発展に繋がる学術大会を開催することができました。ご支援をいただきまして心より御礼申し上げます。（日本医科大学皮膚科）

付 録

●
事業報告書

2022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 2022 年 4 月 1 日 至 2023 年 3 月 31 日)

《研究助成関連》

[コスメトロジー研究助成]

2022	4	11	公募開始	全国 662 の大学、病院、研究機関等へ公募要領を送付し、学術雑誌 3 誌、9 学会 HP、および当財団 HP に公募要領を掲載
	7	8	公募締切	応募総数110件、各分科会毎に選考委員による個別審査
	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 15 課題の承認
	9	14	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	21	選考委員会	選考委員長による 2022 年度コスメトロジー研究助成採択候補 30 課題の承認
	9	30	第二回臨時理事会(書面)	選考委員会から 2022 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	30	第33回表彰・贈呈式	研究助成採択 30 課題の代表者に対し、助成金贈呈書を授与
	12	14	助成金交付	研究助成金を交付 総額 5,500 万円
2023	2	22	臨時選考委員会(書面)	2023 年度選考委員会実施計画他

[大学講座研究助成]

2022	12	10	助成金交付	2020 年度採択 3 件に 3 年目の助成金交付 総額 8,000 万円
------	----	----	-------	---------------------------------------

[国際交流助成および学術集会支援助成]

2022	9	30	第二回臨時理事会(書面)	選考委員会で内定した国際交流助成および学術集会支援助成について採択決定
------	---	----	--------------	-------------------------------------

《表彰事業》

[コーセーコスメトロジー奨励賞]

2022	4	4	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144名に趣意書を発送
	8	31	受付終了	昨年度までの提出分も含めて、研究者28名から論文延べ46報の調査
	9	21	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
	9	30	第二回臨時理事会(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	30	第33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》

2022	11	30	第33回表彰・贈呈式	新型コロナウイルス感染症予防対策をとりながらコロナ前のプログラムで実施 記念講演を取りやめ、奨励賞受賞者講演と助成受賞者代表挨拶を行った
------	----	----	------------	---

《理事会関連》

2022	5	25	第一回通常理事会（書面）	2021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 任期満了に伴う選考委員の選任に関する件 定款の一部変更に関する件 任期満了に伴う理事候補者および監事候補者の選出に関する件 理事長、副理事長および専務理事の職務執行状況の報告
	6	20	臨時理事会（書面）	代表理事（理事長）および業務執行理事（専務理事）の互選に関する件
	9	30	第二回臨時理事会（書面）	2022年度研究助成者等を承認する件
	11	30	第二回通常理事会	2022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 2022年度収支予算書の一部変更を承認する件 2023年度事業計画およ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 理事長および専務理事の職務執行状況の報告

《評議員会関連》

2022	6	10	定時評議員会（書面）	2021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 定款の一部変更に関する件 任期満了に伴う理事および監事の選任に関する件 報告事項（第一回通常理事会、財団の活動状況）
	12	9	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

2022	5	1	中間報告書発行	研究業績中間報告集 第31号
	9	1	完了報告書発行	コスメトロジー研究報告 Vol. 30 (2022)

2) 行政届出関連

2022	6	21	内閣府	令和3年度事業報告書等の提出
	6	28	内閣府	代表者変更、定款変更、理事・監事名簿、役員報酬規程変更の届出
2023	1	25	内閣府	公1事業内容の一部変更の届出
	1	31	内閣府	公2研究報告会事業の追加、変更認定申請
	3	24	内閣府	令和5年度事業計画書等の提出

3) 情報公開（当財団HP等）

2022	2	10		2022年度 事業計画等の掲載
	4	11		2022年度 コスメトロジー研究助成公募開始
	6	21		事業報告、新役員等の掲載
	7	8		2022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. 30の発行及びHPへの本文掲載
	12	1		2022年度 表彰および研究助成受賞者等の掲載
	12	6		2022年度 予算書の一部修正
2023	3	24		2023年度 事業計画等の掲載

2022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
木原 章雄	北海道大学大学院薬学研究院	教授	第29回コスメトロジー研究助成受賞(2018) アシル CoA 合成酵素 ACSVL4 による皮膚バリア形成機構

2) コスメトロジー研究助成(30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
梅野 太輔	早稲田大学理工学術院 先進理工学部	教授	進化分子工学によるデザイナー炭化水素生合成経路の開発
小田裕香子	京都大学iPS細胞研究所	主任 研究者	皮膚バリア機能を促進する新規生理活性ペプチドの開発
小林 信介	岐阜大学工学部	教授	化粧品微粒子原料表面改質のための気流層型プラズマリアクターの開発
高橋 大介	慶應義塾大学理工学部	准教授	糖脂質型バイオサーファクタントの精密化学合成と構造機能相関による新規高機能性化粧品素材の創製
高橋まさえ	東北大学大学院理学研究科	特任 研究員	テラヘルツ分光による水と水の環境の分子レベルでの解明
竹井 敏	富山県立大学工学部	教授	ガス透過性金型による1cm ² 当たり100万本以上の高溶解型無痛ナノマイクロニードルの開発
長瀬 健一	慶應義塾大学薬学部	准教授	肌温度感受性を有する細胞増殖因子送達ナノ粒子の開発
中道 友	山陽小野田市立 山口東京理科大学工学部	助教	微小血管系の多機能イメージングによる皮膚特性・機能の評価
松原 弘樹	広島大学大学院 先進理工系科学研究科	准教授	界面活性剤吸着膜の相転移を応用したピッカリングエマルジョンの自発解乳化
山本 尚	中部大学先端研究センター	教授	ペプチドの革新的合成

第2分野：生体作用、安全性に関する分野(15名)

氏名	所属	職位	研究課題
池谷 真	京都大学iPS細胞研究所	准教授	iPS細胞由来顔面部真皮幹細胞誘導法の開発
石谷 太	大阪大学微生物病研究所	教授	小型魚類を活用した皮膚老化機構の解明と抗老化因子の探索
伊藤 晃成	千葉大学大学院薬学研究院	教授	HLA多型の関わる接触性皮膚炎リスク評価系の基盤構築
岩尾 康範	和歌山県立医科大学薬学部	教授	優れた安全性・安定性を有する経皮吸収型イオン液体の創製とコスメトロジー素材への応用
上山 健彦	神戸大学バイオシグナル 総合研究センター	教授	メラニン合成関連酵素のパルミトイル化による可逆性の皮膚色制御
遠藤 裕介	公益財団法人かずさDNA研究所	室長	かゆみを引き起こすpathogenic codeの同定と治療基盤の開発

氏名	所属	職位	研究課題
神戸 大朋	京都大学大学院生命科学研究所	准教授	チロシナーゼ酵素群の活性化に不可欠な金属獲得の分子機序の解明
佐田亜衣子	熊本大学国際先端医学研究機構	特任准教授	皮膚幹細胞の糖鎖をターゲットとした老化制御に向けての基盤研究
大日 輝記	香川大学医学部	教授	表皮のペプチドによるバリア制御機構
豊島 文子	京都大学医生物学研究所	教授	妊娠期における皮膚リモデリング機構の解析
中村 由和	東京理科大学理工学部	独立准教授	表皮細胞老化において細胞膜リン脂質の果たす役割の解明
西山 功一	宮崎大学医学部	教授	加齢による微小血管網異常と皮膚老化の関係性を解く
長谷 栄治	徳島大学ポストLEDフォトンクス研究所	特任助教	全光学的手法を用いた老化皮膚における力学特性変化の解析
平林 哲也	公益財団法人 東京都医学総合研究所	主席研究員	表皮バリア脂質の代謝異常が炎症を惹起する機序の解明
和久 剛	同志社大学生命医科学部	准教授	転写因子Nrf3を標的としたシミ予防研究へのHIV-1プロテアーゼ阻害剤リポジショニング

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
泉 喜和子	福岡医療短期大学歯科衛生学科	教授	表情シワを用いた新たな顔貌定量法（顔貌解析アルゴリズム）の開発
和泉慎太郎	神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科	准教授	化粧品の機能性を最大化する塗布動作の定量評価と提示方法の研究
林 直亨	早稲田大学スポーツ科学学術院	教授	顔面の皮膚血流に及ぼす加齢と運動習慣の影響
藤本 昌代	同志社大学社会学部	教授	コスメティック産業集積地発展における社会構造、多様なアクターの協働、支援制度に関する分析
横山ちひろ	奈良女子大学研究院生活環境科学系	教授	顔形態の社会的シグナルとしての役割

3) 大学講座研究助成（2020年度採択3年目）

代表研究者	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	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	教授	上皮バリアの分子細胞生物学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 (2件)

派遣者	所属	派遣目的
松原 弘樹	広島大学大学院 先進理工系科学研究科	51st Conference of the German Colloid Society、ドイツ、ベルリン工科大学 (2022年9月27日～10月2日)
平松 隆円	東亜大学	The 8th Tokyo International Conference on African Development、チュニジア、モナスティール大学 (2022年8月24日～31日)

5) 学術集会支援助成 (5件)

実施責任者	所属	学術集会
高田 二郎	福岡大学薬学部	日本ビタミン学会第74回大会 福岡大学七隈校舎 (2022年6月25日～26日)
橋本 均	大阪大学大学院薬学研究科	第15回VIP/PACAP関連ペプチド国際シンポジウム 大阪国際会議場 (2022年10月30日～11月2日)
長野 一也	和歌山県立医科大学薬学部	第16回次世代を担う若手のための医療薬科学シンポジウム 和歌山県立医科大学薬学部 (2022年10月29日～30日)
深田 俊幸	徳島文理大学薬学部	第33回日本微量元素学会学術集会 淡路夢舞台国際会議場 (2022年9月8日～10日)
船坂 陽子	日本医科大学皮膚科	第31回日本色素細胞学会学術大会 ステーションコンファレンス東京 (2022年11月12日～13日)

役員

2023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	静岡社会健康医学大学院大学 学長、京都大学 名誉教授
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	岡崎 勲	東日本国際大学 客員教授
評議員	奥 直人	帝京大学大学院 薬学研究科長、静岡県立大学 名誉教授
評議員	齊藤 勲	元 厚生省 大臣官房審議官
評議員	齋藤 美穂	早稲田大学 副総長・名誉教授
評議員	仙名 保	慶應義塾大学 名誉教授
評議員	辻 勉	城西大学 薬学部 特任教授、星薬科大学 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

*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. 31/2023

非売品

2023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

©2023

不許複製 禁無断転載