ごあいさつ

典型的な消費財である香粧品にあっては、使用者が求めている新しい機能を実現させるための技術的要請が研究開発の原動力となっています。

求められる機能は時代と共に変遷していますが、高齢化社会の到来と消費者ニーズの多様化を背景とする昨今は、香粧品にとっての変革期とも言える時期であり、より高度な内容になっています。例えば、従来の安全性、品質安定性、使用性を確保した上で、老化制御、美白、育毛などに代表される、皮膚科学上明確な機能を備えた製品の開発が強く望まれています。ご承知の通り、この種の分野の研究はきわめて先端的であり、学問的な進展は新しい研究手段の導入に待つところが大きいわけですが、幸い現在では、生化学的な手法等が成功を納め、既に多くの点で具体的な成果を挙げていて、つぎつぎとその研究対象を拡げつつあります。

一方で、今日は「こころ」の時代であると言われています。化粧文化を通して、 香粧品が 果している、あるいは今後求められる社会的役割が改めて大きな研究課題となっています。

この面に関しても、既にいくつかの社会科学的な、あるいは人間工学的なアプローチが試行され、その結果、感情心理学、コミュニケーション理論などの分野で新たな知見が蓄積されつつあります。

これらの自然科学的、社会科学的側面に於ける研究進展は化粧品学の振興を目的とする当財団にとって、まことに喜ばしい傾向であります。

今後とも時代の行く末を見つめ、より有効な研究課題を発掘し、知見を深めることで、化粧品学発展のための一翼を担って行ければと念じている次第です。今までにも増して、当財団の活動を温かく見守ってくださいますよう、お願い申し上げます。

平成７年７月

財団法人 コスメトロジー研究振興財団

理事長 **小林　孝三郎**

目　次

ごあいさつ

■ 研究報告

Ⅰ．素材，物性に関する分野

・高分泌酵母突然変異体を用いた蛋白質素材生産効率化システムについての研究 …… 2
広島大学理学部　鈴木　克周

・紫外線照射による化粧品素材の光分解メカニズムの研究 …… 7
明星大学理工学部　日高　久夫

・水素添加大豆リン脂質を用いた油性ゲル及び水性ゲルの保湿作用に関する研究 …… 16
昭和薬科大学　藤井　まき子

・アスパラギン酸プロテアーゼ類の蛋白工学的改変によるケラチナーゼの開発 …… 24
東京大学理学部　井上　英史

・細胞膜の脂質の物性と機能の基礎的な研究 -リン脂質物性のコスメトロジーへの応用- …… 29
東北大学理学部　大木　和夫

・化粧品基本素材金属酸化物の酸性大気汚染物質との相互作用 …… 39
千葉大学理学部　金子　克美

・新規な構造を有するヒアルロン酸類似多糖の開発 …… 46
東京工業大学生命理工学部　畑中　研一

Ⅱ．生体作用，安全性に関する分野

・紫外線誘発DNA損傷の定量とメラニン色素のサンスクリーン効果 …… 54
奈良県立医科大学　小林　信彦

・安定型アスコルビン酸誘導体の免疫賦活活性とそのメカニズム …… 62
岡山大学薬学部　山本　格

・化粧品による光老化の抗酸化的制御に関する細胞生物学的及び生化学的研究 …… 67
群馬大学医学部　宮地　良樹

・太陽光紫外線誘発DNA損傷とヒト細胞における修復 …… 74
金沢大学薬学部　二階堂　修

・いわゆる“しみ”(肝斑など)の発症機構とその憎悪因子に関する研究 …… 79
秋田大学医学部　富田　靖

・尋常性痤瘡の発症機序の解明のための皮膚の保湿機能と脂質代謝に関する研究 …… 86
新潟大学医学部　山本　綾子

・不飽和脂肪酸とその過酸化生成物の皮膚角質層への作用に関する研究 …… 91
大阪薬科大学　森本　一洋

Ⅲ．精神，文化に関する分野
・『色白』の嗜好構造に関する一考察 …… 100
早稲田大学人間総合研究センター　齋藤　美穂
・病院看護における化粧に関する研究 …… 114
杏林大学保健学部　大河原千鶴子
・高齢者のおしゃれ行動とその評価に関する研究 …… 129
横浜国立大学経営学部　藤森　立男

■ 記念講演
平成６年度記念講演　顔を科学する …… 141
東京大学工学部　原島　博

■ コスメトロジー研究雑感 …… 153

■ 付　録
平成６年度事業報告 …… 163
役員一覧 …… 170
研究助成課題一覧 …… 171

研究報告

♦

I　素材、物性に関する分野

II　生体作用、安全性に関する分野

III　精神、文化に関する分野

♦

Ⅰ．素材，物性に関する分野

高分泌酵母突然変異体を用いた蛋白質素材生産効率化システムについての研究

広島大学理学部　千葉県工業試験所　生命工学工業技術研究所
鈴木　克周・岡　千寿・地神　芳文

Yeast supersecreting mutant strains were examined for their ability to produce lysozyme protein. The *ssl1* mutant strains secreted 10-fold more lysozyme than the wild type parent strain. The efficiency was improved 10-folds by introduction of the lysozyme gene by multi-copy plasmids. About 10-fold improvement was also achieved by supplying casamino acids in culture media. New *ssl1* host strains, which secreted 3-4 fold more lysozyme than the original *ssl1* mutant strain, were obtained by crossing the original *ssl1* mutant strain and a wild type strain. The new *ssl1* transformant secreted 500-fold more lysozyme in synthetic media supplemented with casamino acids than the original *ssl1* muant did in synthetic media. These data indicate that the above factors help multiplicatively one another and yeast mutants can contribute to build up highly efficient system to produce protein resources.

1　緒　言

生体の機能素子として多種多様な酵素蛋白質が報告されている。これらの中にはコスメトロジー素材として有効と考えられるものもあるが、適用例は少ない。この原因として蛋白質の固有の特徴である安定性や活性発現条件による制約もあるが、純度の良い酵素蛋白質を多量に得る上での問題点があげられる。天然の含有量が微量な有用蛋白質を微生物で遺伝子発現させて生産しようとする試みは組み換え遺伝子技術が確立された早い段階から行われている。組み換え遺伝子の発現のために遺伝子発現能力の高い大腸菌を宿主に用いることが多いが、バクテリアを溶解する活性を持つリゾチームの場合のように大腸菌を組み換え遺伝子の発現のための宿主とすることができない例や、大腸菌を用いて蛋白質を多量に作ることはできるが酵素としての高次構造を構築できず活性を発現できない例も多い。真核微生物であるパン酵母は、組み換え遺伝子宿主として大腸菌に近い扱い易さを持ち、バクテリア固有の障害を被らずに生産することができる特質を持っている。またパン酵母は、真核生物として蛋白質への糖鎖付加などのプロセシング機能を持つだけでなく、突然変異を用いてこれらの機能を人為的に制御[1]することができるという他の真核生物宿主では容易に行えない操作が可能である。このパン酵母での蛋白質分泌の高効率システムの構築原理を確立できれば、様々な有用蛋白質素材を生産する場合の指針となり

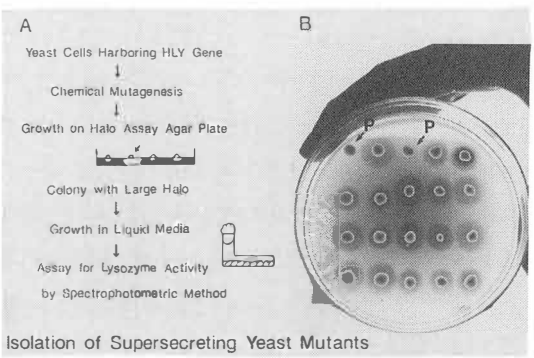
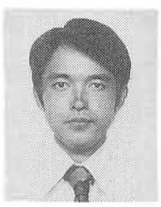


図 1　リゾチーム高分泌突然変異体のスクリーニング
突然変異処理及びスクリーニング法の概要（A）、ならびに細菌含有寒天培地平板を用いた酵母菌コロニーのリゾチーム分泌能力検定（B）。
コロニー周縁の透明環はコロニーから分泌されるリゾチームにより寒天中のバクテリアが溶解されたため形成される。矢印（P）の先のコロニーは野生型親株なのでコロニー周縁に透明環は見えない。



Development of efficient system for production of protein resources by yeast supersecreting mutants

Katsunori Suzuki,
Facutly of Science
Hiroshima University

うると期待される。筆者等は先にリゾチーム遺伝子を染色体DNA に組み込んだパン酵母に突然変異を誘起して、分泌量が10倍以上高まった変異体を分離した[2]（図 1）。酵母宿主に限らず培養条件の改変や細胞・個体選抜による優良株の育成はこれまでに多数行われているが、どのような機構で効率が変化したのか明らかにされている例は少ない。この高分泌変異体中の一つ*ssl1*変異体では蛋白質のソーテイング機構が変化しており（図 2）、膜透過後輸送の過程が効率化されたものと考えられた。

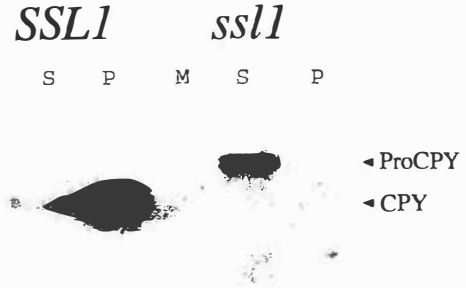


図 2　蛋白質輸送過程に変化のある高分泌変異体
培養液上清（M）、細胞壁画分（S）、及びプロトプラスト画分（P)の蛋白質をアクリルアミドゲル電気泳動した後、抗CPY抗体を用いてCPY蛋白質を検出した。CPYは野生型細胞（*SSL1*）ではプロトプラスト分に検出されるが、変異体（*ssl1*）では細胞壁画分に前駆体として検出される。

ヒトリゾチームはフレミングにより当初鼻水から発見され、涙液に含有量が高いもののわずかしか得られない[3]。この酵素は細菌細胞壁を溶解して細菌を殺菌するという人体防御作用を持つ一方で炎症を低下防止するという安定化作用を合わせ持つ蛋白質である。リゾチームは蛋白質としては低分子量のものであり、立体構造も明らかにされている。酵母組み換え体のリゾチーム分泌の量をコロニーの段階で検出する手法も開発できたので（図 1B）、制限要因を順次明らかにしてゆくのに好適な素材と考えられる。

本研究は宿主の設計上重要な点であり、また高分泌変異体*ssl1*においてさらに制限要因を明らかにしてゆく上の基礎知見、即ち、交配・遺伝子量効果・培地の改変などの基本操作で分泌効率を相乗的に操作できるかどうかを知ることを第一の目的としている。

2 実　験

2・1 培　養

主にイーストニトロゲンベース0.67%とグルコース2%（SD培地）、およびイーストニトロゲンベース0.67%とガラクトース2%（SG培地)を基本培地として30℃で振とう培養した。YPD寒天培地(1%イーストエキス、2%ポリペプトン、2%グルコース）は主に交配や単細胞分離後の培養に用いた。

2・2 宿主とプラスミド

高分泌株I69(*ssl1*)野生型株KS45-3DとKS51-3C、脱抑制変異体株KK4、ならびに、これらを交配後に減数分裂させ顕微操作[4]により四分子解離して菌株を作成して使用した。プラスミドとして、リゾチーム遺伝子（*HLY*）を持つマルチコピー型ベクターYEpHLYSIG[5]およびpESH[6]を用いた。YEpHLYSIGは*HLY*のプロモーターとして*GAP10p*を持ち、pESHでは*ENO1p*を保持している。

2・3 活性測定

細胞から培養液中へ分泌されるリゾチームの活性測定は細菌を基質とする濁度減少法を用いて行った。 *Micrococcus* 乾燥菌体懸濁液｛50mMリン酸緩衝液(pH6,4)中0.1mg／ml｝ 0.8mlに試料液0.2mlを加えて経時的に吸光度をフォトメーターを用いて測定した。450nmの吸光度が1分間に0.001減少するとき、1ユニット活性とした。培養液の遠心上清を上記緩衝液で希釈して試料液とした。四分子解離して得た菌株での高分泌変異は細菌含有平板で細菌溶解環を大きく形成するものとして判定した他に、カルボキシペプチターゼY活性が欠損しているかどうかを検出して判定[2]した。その他の変異は酵母遺伝学の一般的判定法[4]に従って確認した。

2・4 蛋白質の検出

培養液中へ分泌されたリゾチームはHPLC及び電気泳動分析した。電気泳動には培養液遠心上清に、

SDSとメルカプトエタノールを含むサンプル緩衝液を加えて、煮沸したものを試料とした。アクリルアミドゲルで泳動の後、銀染色で全蛋白質を染色して確認した他、PVD膜へ転写した蛋白質を抗リゾチーム抗体を用いるWestern Blot法で検出した。

3 結 果

3・1 遺伝子量効果

先に筆者らが分離した*ssl1*変異体は、野生型親株に比べて10倍高い効率を示すものの純粋に遺伝生化学的見地から解析するために分離したもので、遺伝子発現も低い形態で設計されていたため、分泌量は低いレベルにとどまっていた。そこで、リゾチームのmRNA量を増すために、多コピー数プラスミドベクターでリゾチーム遺伝子を*ssl1*変異体と親株に導入したところ、*ssl1*変異体と親株の形質転換体は、共に10倍多いリゾチームを培養液中へ分泌した。性質の異なる2種のプロモーターを用いた場合で同様な結果が得られた（図 3）。

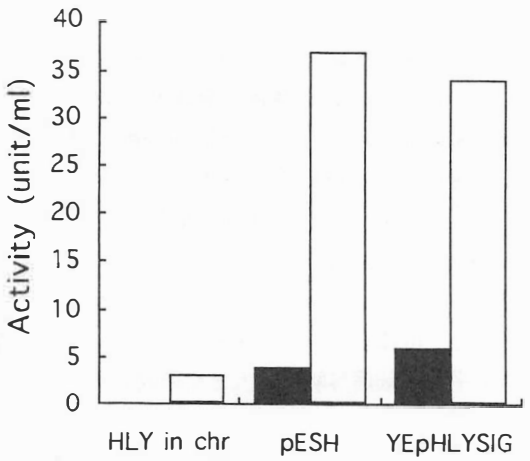


図 3 遺伝子量のリゾチーム分泌に及ぼす効果
染色体DNA上に1コピー挿入したリゾチーム遺伝子(*HLY* in chr)及び多コピー数プラスミドベクターに導入されたリゾチーム遺伝子(YEpHLYSIG, pESH)を持つ細胞を比較した。SDC培地(HLY in chr, pESH)及びSGC培地（YEpHLYSIG）を用いて培養した。宿主として野生型親株KS45-3D(■)及び突然変異体I69(□)を用いた。培養液上清中のリゾチーム活性を示す。

このことは、*ssl1*変異の効果と遺伝子量効果が相乗的に作用していることを示している。

3・2 栄養の効果

培養液の成分を変更することによって分泌量が変動した。合成培地へ添加するアミノ酸をカザミノ酸に置き換えると、10倍高い活性がみられた。野生型親株と*ssl1*変異体で同様に変動しているので、*ssl1*変異の効果とカザミノ酸の効果は相乗的に作用していると考えられた（表 1、図 4）。

表 1 YPDによる抑圧作用

菌株	培地	リゾチーム活性（unit）	
		2日後	5日後
KS45-3D	YPD	-	0
KS45-3D	SD+CAS	0	1
I69	YPD	2	0
I69	SD+CAS	18	27
I85	YPD	2	0
I85	SD+CAS	46	56

2日及び5日間培養後の培養上清液中の活性を測定した。
(-; 測定せず)

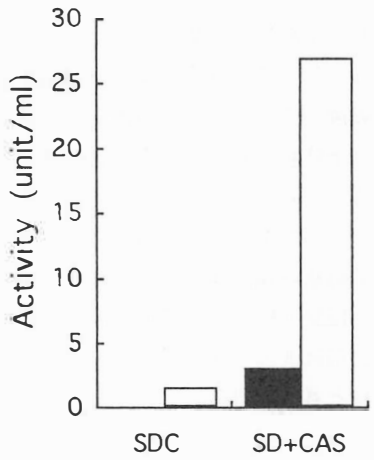


図 4 培地のリゾチーム分泌に及ぼす効果
SDC培地及びSD＋CAS培地を用いて染色体DNA 上に1コピー挿入したリゾチーム遺伝子を持つ野生型親株KS45-3D（■）及び突然変異体I69（□）を培養した。培養液上清中のリゾチーム活性を示す。

一方。パン酵母を栄養増殖する目的で使用される培地YPDを用いた場合は、一過的に低い活性が*ssl1*変異体で観察されその後消滅した（表 1)。培養液中へ分泌されたリゾチームが分解を受けている可能性を示す興味深い基礎的知見である。

3・3 交配の効果

パン酵母は菌株ごとに性質が少しずつ異なるので、*ssl1*変異体を他の菌株と交配して子孫を調べれば、分泌量が増大したものが得られる可能性がある。そこで生育の良い野生型細胞と交配して2倍体を作成した。この2倍体は表現型として高分泌ではなかった。*ssl1*変異が野生型対立遺伝子に対して劣性の性質を持っていると解釈される。2倍体細胞を減数分裂させ1倍体細胞を顕微操作により選別してから培養すると、表2に示すようにリゾチームを多く分泌する子孫（*ssl1*）と、少ししか分泌しない子孫（*SSL1*）が2対2の割合で得られる。これらの中には元の変異体よりも3〜4倍多い分泌量を示すものがあった。高効率な2株の培養液上清をイオン交換HPLCで分析したところ、表2に活性の値でみられたのと同様に天然のリゾチーム蛋白質と同じ性質の蛋白質が著量存在していることがわかった。

表 2 交配体から得られた1倍体菌株の分泌量

菌株	活性	菌株	活性
	(unit)		(unit)
KS58-1A	1	KS58-2A	1
-1B	43	-2B	108
-1C	99	-2C	0
-1D	1	-2D	127
KS58-3A	64	KS58-4A	47
-3B	3	-4B	1
-3C	14	-4C	0
-3D	7	-4D	54
Wild type & *ssl1* strains used for the diploid construction			
KS51-3C	1		
I69	30		

3・4 *ssl1*変異、カザミノ酸、遺伝子量の相乗作用

前項までの3つの改善効果は互いに組み合わせると相乗的に効果が現れて分泌量を増やせるのか、それとも、組み合わせによってはそれほど付加的な効果が現れてこなくなるかということは、リゾチーム生産の課題にとどまらずに宿主の設計上重要な課題である。そこで前節で得られた*ssl1*株にプラスミドを導入し合成培地及びカザミノ酸添加培地で培養して分泌量を測定した。図3と表3を比べるとプラスミドの導入とカザミノ酸添加培地により新規*ssl1*宿主での分泌量は、元の*ssl1*宿主を合成培地で培養した場合に比べて500倍に高まっており、相乗的に作用したと判断される。この培養液上清中の蛋白質をSDSゲル電気泳動で分離分析すると全構成蛋白質中で最も主要なバンドとしてリゾチーム蛋白質を検出できた(図 5)。

表 3 新規宿主、遺伝子量効果、カザミノ酸間の相乗効果

Strain	YEpHLYSIG		pESH	
	SGC	SG+CAS	SDC	SD+CAS
	リゾチーム活性 (unit)			
KS58-2B	300	1920	100	860
KS58-2D	280	2180	40_0	1180

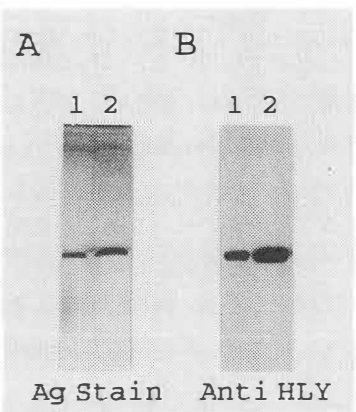


図 5 分泌されたリゾチーム蛋白質の分析
KS58-2D(YEpHLYSIG)をカザミノ酸添加培地を用いて培養した。培養液上清（1；10ul、2；20ul）中の全蛋白質をアクリルアミドゲル電気泳動した後、銀染色（A）及び抗ヒトリゾチーム抗体（B）を用いて全蛋白質ならびにリゾチームをそれぞれ検出した。

4 考 察

微生物を宿主にして蛋白質を作成すると、製品に混入する宿主由来の物質が副作用となることが問題となると指摘されている。効率の高い生産システムを作ることは、単に経済的な効果をもたらすだけでなく、副作用を低下する点でも役立つと期待されている。本研究では*ssl1*変異、交配、カザミノ酸添加、遺伝子量効果の各作用で分泌量を増加させられることと、これらの要素の組み合わせが相乗的な改善効果があることを示すことができた。蛋白質の分泌は遺伝子発現、蛋白質合成、膜透過、輸送、分解など細胞内の多数の要素が組み合って行われる過程であるので、様々な制限要因を想定できる。筆者等は先に*ssl1*変異が転写には影響せず蛋白質分配機構に変化をもたらしていることを明らかにした。この変異体において本研究で試みた操作がすべて分泌量を増加させ得たことは制限要因がまだ多いことを示唆している。言い換えれば、パン酵母での分泌効率は遺伝的改変あるいは遺伝子工学的操作を用いてさらに高められよう。例えば、YPD培地を用いた場合のようにいったん培養液中に検出された酵素活性が消失してゆく現象が見られた（表1)。この現象に関与する因子の遺伝子を破壊すればさらに効率の高い安定した宿主を構築できるものと考えられる。

酵母を分泌宿主に用いると活性を持った蛋白質を分泌生産できるという報告例が多いものの、生産効率は高くないのが一般的である[7]。一見、回り道のようにも見えるが、パン酵母でリゾチームを分泌するシステムを用いて遺伝子発現から酵素の集積までの素過程を総合的にかつ遺伝生化学的に解明してゆくことと、関与している遺伝因子を改変してゆくことは、真に望ましい高効率なシステム作りに寄与できると考えている。

総 括

コスメトロジー有用素材と考えられる蛋白質リゾチームの生産を突然変異を有するパン酵母宿主を用いて効率化する方法を検討した。遺伝子量効果によるmRNAの加重、栄養成分の添加による生育条件の効果を分析した。リゾチーム高分泌*ssl1*変異体は、野生型親株に比べて10倍高い分泌効率を示す。mRNAを増すために、多コピー数で複製するプラスミドベクターとしてリゾチーム遺伝子を*ssl1*変異体に導入することによって10倍効率が上昇した。合成培地の成分について検討しカザミノ酸の添加によって10倍近く効率上昇した。*ssl1*変異体と生育の良好な菌株との交配により3〜4倍効率の高い新規*ssl1*宿主を得た。新規*ssl1*宿主は、これまでの宿主と同様に天然型と同じ性質のリゾチーム蛋白質を多量に分泌していることを生化学的に確認した。新規*ssl1*宿主の利用・プラスミドの導入・カザミノ酸添加培地での培養は相乗的に作用し得た。新規*ssl1*宿主が天然型と同じ性質のリゾチーム蛋白質を培養液中に著量分泌していることを生化学的に確認した。以上の知見は本変異体を基にさらに効率の高い変異体の分離や他の変異との組み合わせによる柔軟なシステム作りにも役立つと考えられる。

引用文献

1) T. Nagasu, Y. Shimma, Y. Nakanishi, J. Kuromitsu, K. Iwama, K. Suzuki, Y. Jigami *Yeast.*, 8 535-547 (1992)

2) K. Suzuki, K. Ichikawa, Y. Jigami *Mol. Gen. Genet.*, 219 58-64 (1989)

3) A Fleming *Proc. soc. Lond.*, [B] 93 306-317 (1922)

4) K. Suzuki, N. Yanagishima *Cut. Genet.*, 10 353-357 (1986)

5) Y. Jigami, M. Muraki, N. Harada, H. Tanaka *Gene.*, 43 273-279 (1986)

6) K. Ichikawa, K. Komiya, K. Suzuki, T. Nakahara, Y. Jigami, *Agric. Biol. Chem.*, 53 2687-2694 (1989)

7) D. T. Moir, L. S. Davidow *Meth. Enzymol.*, 194 491-5075 (1991)

紫外線照射による化粧品素材の光分解メカニズムの研究

明星大学理工学部
日　高　久　夫

Studies on the photocatalytic mechanism for cosmetics containing TiO_2 powder is useful for the protection of human skin. The photodegradations of such cosmetic materials as surfactants, amino acids, polymers, et. al. in heterogeneous aqueous TiO_2 suspensions under UV or solar exposure were examined in the present work. The anionic surfactant of DBS can be easily photooxidized in the presence of TiO_2 powder under solar exposure to mineralize into CO_2 gas.

The photodegradation of amino acids and nitrogen-containing surfactants gives NH_4^+ and NO_3^- ions concomitantly. The decomposition of DNA and RNA produces NH_4^+ and NO_3^- ions (4:1) after 5-h irradiation with a maximal formation of $H_2PO_4^-$ ion at 2 h of irradiation. Water-soluble polymers of polyethylene glycols (PEG) and polyvinylalcohol (PVA) were easily photooxidized to evolve CO_2 gas. The CO_2 mineralization yield decreased with increasing the molecular weight of PEG and PVA. The photooxidation process involves the photogeneration of ・OH and/or ・OOH radicals at TiO_2/H_2O interfaces. These activated radicals attack the organic molecules adsorbed on or near to the TiO_2 surface to form hydroxylated intermediates or peroxides. Subsequently, they were photo- or auto-oxidized to mineralize ultimately into CO_2 via several oxidation steps such as formaldehyde and formic acid.

1　緒　言

酸化チタン(TiO_2)は生体に対して毒性がなく、さらに隠蔽性や着色性に優れているなどの特徴を有しているので、化粧品素材として多量に使用されている。フロンによるオゾン層破壊に伴い、太陽光中の紫外線領域（290～320nmのUV-B）の光が増加し、地表へ到達し、動植物へ影響を与えている。免疫低下や角膜炎、白内障など人体への健康障害、特に皮膚ガン発生の増加が憂慮されている。このため、化粧品によるスキンケアー（皮膚の保護）は大切な課題である。クリーム、乳液、ファンデーションなどの化粧品中に白色顔料として含まれるTiO_2粒子は紫外線吸収や光散乱によつて紫外線の表皮細胞への浸入を遮断（UVカット）する役割をしている。

Photocatalytic Degradation Mechanism of Cosmetic Materials under UV exposure

Hisao Hidaka

Faculty of Science and Technology, Meisei University

一見相反することであるが、TiO_2は紫外線（378nm以下の短波長）により皮膚の光劣化や化粧品の光酸化反応も起こつている。すなはちTiO_2はn-型半導体の特性があり、紫外線照射により電荷分離がおこり、化粧品素材の有機化合物の光酸化反応が起こる[1-9]。このような光触媒作用を抑制するために、触媒活性の低いTiO_2（例えばルチル型を使用）や表面修飾されたTiO_2（アルコキシ基されたもの）が用いられている。化粧品中には種々の有機物質、例えば界面活性剤、高分子、油脂、炭化水素類、高級脂肪酸、高級アルコール、エステル、香料、保湿剤などの成分が含有しているが、TiO_2触媒は予想よりはるかに強い光酸化力を示すため、化粧品中の有機化合物を容易に酸化する。太陽光線照射下TiO_2の触媒作用で化粧品中の水分や汗などの水分子から・OH や・OOHラジカルが生成する。このような活性酸素種は皮膚角質を攻撃して、過酸化物をつくる。触媒活性の高いアナターゼ型TiO_2粒子により炭化水素はCO_2とH_2Oへ、窒素化合物はNH_4^+イオンとNO_3^-イオンへ、リン化合物は$H_2PO_4^-$イオンへ、硫黄化合物はSO_4^{2-}イオンまで無機化される。

本研究では紫外線照射下で化粧品の構成物質で

ある有機化合物がどの程度酸化されるか、どのような分解生成中間物ができるかなどの基礎的研究を行つた。実際の化粧品は多種多様の物質の混合物から構成され、複雑であるので、単品の界面活性剤や構造の決つた窒素を有するモデル物質（アミノ酸やDNA, RNA）に関して光酸化反応の分解メカニズムを検討した。

2 実 験

2. 1 試薬、試料

アナターゼ型TiO_2粒子（a-TiO_2）はDegussaAG（ドイツ）製P-25（表面積55m²／g）を、ナノサイズの超微粒子はSachtleben Chemie GmbH(ドイツ)製UV-100(表面積250m²／g)を、ルチル型TiO_2粒子(r-TiO_2)は和光純薬製(表面積16m²／g）を、表面修飾型T-805は日本エアロジル株製（octyltrimethoxyl silaneで表面改質したもので、37m²／gの表面積)を、ZnOは和光純薬製(純度9 9.9%で表面積3.8m²／g,平均粒径約5μm)をそれぞれ使用した。sodium dodecylbenzene sulfonate{DBS;$C_{12}H_{25}C_6H_4SO_4Na$}は東京化成㈱を使用した。

各種アミノ酸

α-Alanine { L-α-Ala, CH_3CHNH_2COOH}

β-Alanine {β-Ala, $NH_2CH_2CH_2COOH$}

L-Cystine { L-Cys, $HSCH_2CHNH_2COOH$}

L-Methionine { L-Met, $CH_3SCH_2CHNH_2COOH$}

は東京化成㈱または味の素㈱のものを使用した。DNA(Herring sperm から得られた試料、分子量約1千万、東京化成)およびRNA（Yeastから得られた試料、分子量約2.5万、東京化成）を用いた。

窒素を有する界面活性剤であるN-dodecanoyl-N-(2-hydroxyethyl)amide {N-DHA;$C_{11}H_{23}CONHCH_2CH_2OH$}は東邦化学工業㈱のものをそのまま使用した。Sodium N-dodecyl-N,N-dimethyl ammonium acetate {C_{12}-betaine;$C_{12}H_{25}N^+(CH_3)_2CH_2COONa$}およびSodium N-dodecylamidopropyl-N, N-dimethylammonium acetate{C_{12}-amidobetaine;$C_{11}H_{23}CO\text{-}NHCH_2CH_2CH_2N^+(CH_3)_2CH_2COONa$} はミヨシ油脂㈱のものをエタノール／アセトンで再結晶して使用した。

polyethylene glycol（PEG）はミヨシ油脂㈱のものを使用した。

PEG200（n=4.1), PEG300（n=6.4),

PEG400（n=8:7), PEG600（n=13.2),

PEG1000（n=22.3), PEG2000（n=45.0）

ここで、番号は分子量を意味する。nは平均オキシエチレン付加モル数である。

polyvinyl alcohol（PVA）はクラレ製で、酢酸ビニル基を完全にケン化した次の分子量のものを使用した。

PVA110 分子量 45000（n=1000),

PVA117 分子量 78000（n=1700),

PVA120 分子量 89900（n=2000),

PVA124 分子量 105700（n=2400）

スクワレン(squalane, $C_{30}H_{62}$）は東京化成の試薬をそのまま使い、乳液はUVwhite（whitening emulsion)でS社のものを使用した。

2. 2 光分解および分析方法

TiO_2粒子を固定化させたガラス繊維は次のようにして作成した。蒸留水（10ml）にTiO_2粒子(1g)を溶解し、ガラス繊維（10×10cm²）に塗布した。その後、200℃、3時間電気炉中で焼結した。

TiO_2（65mg）固定化ガラス繊維を反応装置（17×10×1cm²）に入れ、DBS(0.1mM, 150mL）の水溶液を導入した。ローラーポンプを使い172mL/分の流量で循環しながら、屋外で日中(11AM～3PM)4～6h太陽光照射を行つた。紫外線強度はTOPCON製UVR-1紫外線強度計(測定波長域220～390nm、極大感度波長260nm)を用いて測定した。

太陽光の紫外線強度は1994年12月6、7、10日晴天(11時～16時）3.07～2.47mW／cm²、12月13日曇り0.43mW／cm²で、および12月15日晴天（9時～11時)3.28～1.96mW／cm²ある。

320nm以下の波長は反応装置のガラスに吸収され、TiO_2のバンドギャップである387nm以下の狭い波長領域の光エネルギーを使用している。室内では、反応装置（75mLバイアル瓶）中に各測定試料(0.1mM, 50mL）とTiO_2粒子(100mg）を入れ、酸

素ガス(または空気中)を導入し、撹拌しながら水銀ランプ(75W、東芝SHL-1002A)で光照射を行つた。TiO_2粒子をミリポアフィルターまたは遠心分離で除去した。NH_4^+イオンはHPLC（JASCO製、検出CD-5)で、ShodexY-521陽イオンカラム、溶離液(硝酸4mM)用いて測定し、NO_3^- およびSO_4^{2-}、$H_2PO_4^-$イオンはShodexI-524陰イオンカラム、溶離液｛フタル酸2.5mMとトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン2.3mMの混合溶液｝で測定した。密閉したバイアル瓶の気相中のCO_2はPorapackQカラムを用い、ガスクロマトグラフィー（大倉理研製GC-802、TCD検出）で定量した。過酸化物生成量（POV）はヨウ化カリ法（Wheeler法）により、イソオクタン／酢酸（1：4）中で、最大吸収波長

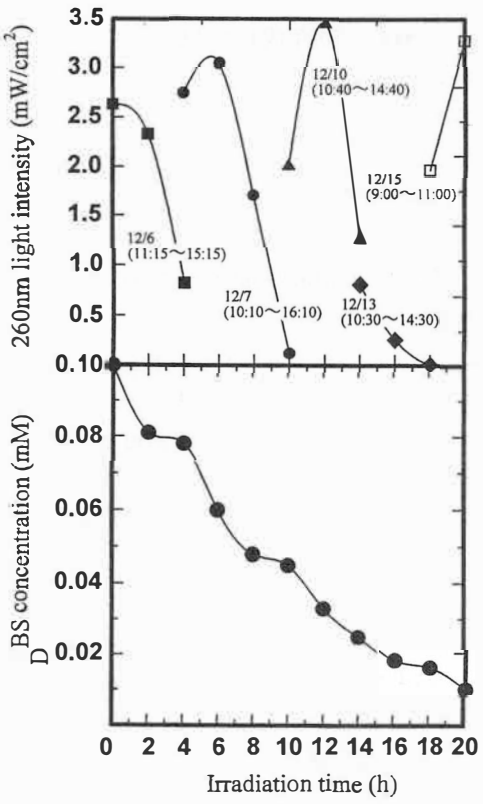


Fig.1 (a) The solar light intensity of 260nm on day times of Dec., 6, 7, 10, 13 and 15, 1994.
(b) The photocleavage of a benzene ring in DBS (0.1mM) against accumulated time of solar exposure.

360nmの吸光度から定量した。全有機炭素計(TOC)は島津製TOC-500を用いて測定した。

3 結果および考察

3．1 太陽光下での光反応とTiO_2の触媒効果

TiO_2を固定化したガラス繊維を使用した DBSの太陽光照射による分解をFig.1に示す。日昼４hから６h太陽光を照射した時の紫外線強度とDBSの濃度(ベンゼン環の開環速度)を示した。一日の実験が終了後、反応装置を室内に持ち込みアルミフォイルで光を遮断した。次の日屋外実験を続けた。

晴天の時は10～11時から紫外線は強く(2～3mW／cm^2)、午後（14～15時）は徐々に弱く(0.5mW／cm^2)となった。11時頃から15～16時になるにつれ、紫外線強度はFig.1（a）に示すように徐々に低下した。DBSの光分解は累積光照射時間と共に分解が進行する。曇りの時は分解速度が遅くなる傾向が認められた。累積照射時間20h後、DBS(0.1mM、150mL)で90%が分解した。

種々の半導体の触媒効果をFig.2に示す。ZnOがDBS のベンゼン環の開環速度が最も早い。表面修飾されたTiO_2(T-805）は化粧品の白色顔料に良く使われているが、光酸化の能力を持つている。ルチル型TiO_2（600℃以上で焼結）はDBSをほとんど分解しない。一方、アナターゼ型TiO_2(600℃以

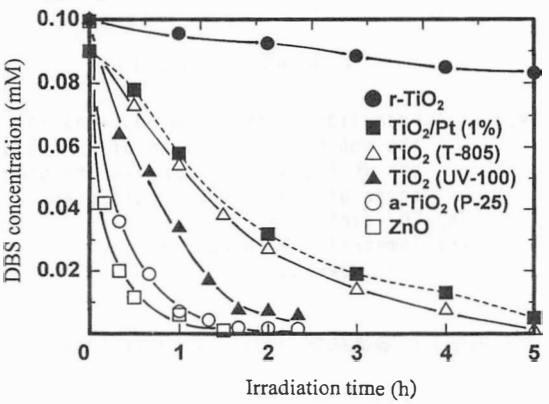


Fig.2 Photocatalytic effects of various semiconductors on the ring opening of benzene in DBS surfactant (0.1mM) under UV illumination (75W Hg-lamp).

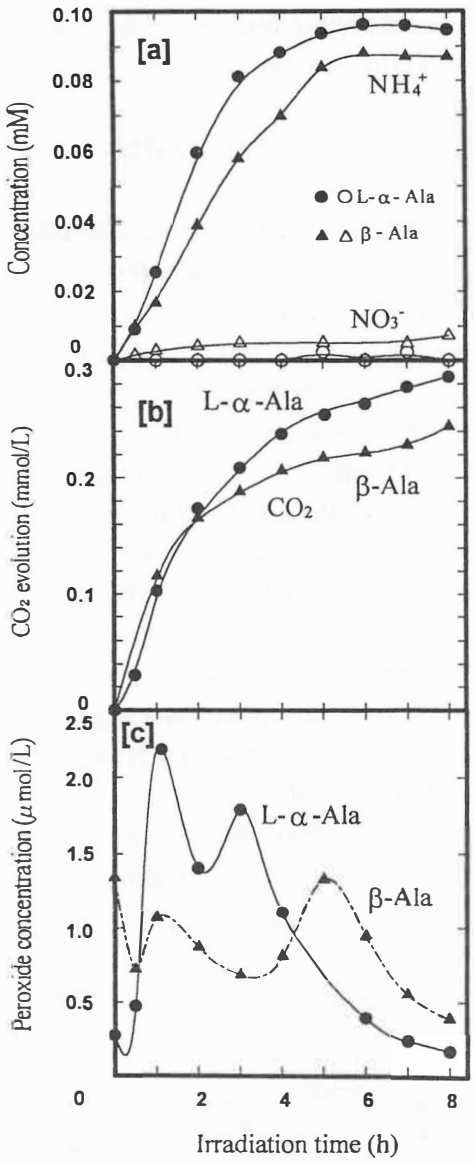


Fig.3 (a) Formation of NH_4^+ and NO_3^- ions for the photomineralization of L-α-Ala and β-Ala(0 1mM, 50mL) in the presence of TiO_2 (100mg) particles.
(b) CO_2 evolution
(c) Temporal POV changes during photodegradation.

下で焼結）は触媒活性が高い。この活性の違いの理由はまだ明らかでないが、•OHや•OOHラジカルの生成がルチル触媒表面で抑制されていると推察される。Pt坦持TiO_2触媒は光酸化は低下する。これは伝導帯（CV）の電子がO_2分子への移動（光還元）が抑制され、Pt金属の方に移動するため光酸化が抑えられる。

アナターゼ型の粒径に対する触媒効果を比較した。P-25（55m²／g）に比較して、UV-100（250m²／g)表面積は大きくなるが、ナノサイズの粒子はバンドギャップが小さくなり、電荷分離された電子とホールの再結合が起こり易くなる。酸素分子により伝導帯にある電子が捕獲(光還元)が起こりにくくなる。従つてホールと基質(有機化合物)の光酸化が抑制される。

3-2 アミノ酸およびDNA，RNAの光分解

Fig.3(ａ）にL-α-Alaとβ-Alaの光分解によるNH_4^+とNO_3^-イオンを示す。共に、NH_4^+イオンがNO_3^-イオンより圧倒的に生成しやすい。NO_3^-イオンはβ-Alaの方が生成しやすい。しかしNH_4^+イオンはL-α-Alaの方が生成しやすい。8ｈ照射後L-α-Alaとβ-Alaの窒素はほとんどNH_4^+とNO_3^-イオンに無機化されることが分つた。

Fig.3(ｂ）にCO_2の生成を表わす。CO_2の発生はL-α-Alaの方が早い。これはNの位置がカルボニル基に近いので、Nの分解が早いためである。
8ｈ照射後L-α-Alaは約96%、β-Alaは約81%CO_2へ無機化された。
Fig.3(ｃ）にパーオキサイドの生成を示す。L-α-Alaは初期生成から約3hで減少が始まる。β-Alaの初期生成時間は、α-Alaと変わらないがその後の生成量があまり伸びず約5hまで持続する。またL-α-Ala、β-Ala共に二段階で反応が進行し、初期ではα位がOOH化され、続いてβ位などがOOH化されていると思われる。

硫黄を含むアミノ酸である L-CysとL-Met の光分解の結果をFig.4 に示す。NH_4^+イオンとNO_3^-イオンは他のアミノ酸と同様な傾向が認められたが、SO_4^{2-}イオンは末端にあるL-Cysの方が分解が早いことがわかった。一方、L-MetのSO_4^{2-}イオンが初期で少ないのはα炭素からラジカルの攻撃が始まるためであると思われる。
Fig.5（a）と（b）にDNAとRNA の光分解の結果を示す。初期過程でリン酸イオン($H_2PO_4^-$)が生成し、

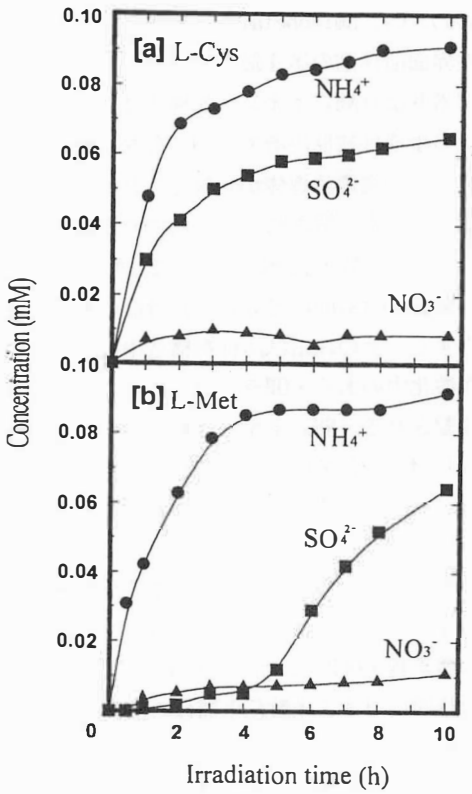


Fig.4 (a) Formation of NH_4^+, NO_3^- and SO_4^{2-} ions for the photodecomposition of L-Cys (0.1mM, 50mL) catalyzed by TiO_2 particles (100mg).
(b) Formation of NH_4^+, NO_3^- and SO_4^{2-} ions for photodecomposition of L-Met (0.1mM, 50mL).

2時間の照射後最大値を与える。リン酸基が二重らせんの外側に存在するので、・OHラジカルの活性酸素の攻撃を受けやすいためである。その後のリン酸イオンの減少はTiO_2粒子表面に吸着によるものである。光酸化が進むと分解溶液は酸性($H_2O+h^+ \rightarrow \cdot OH+H^+$)になり、吸着のためバルク溶液に存在するリン酸イオン濃度が低下する。次にNH_4^+イオンが生成し、徐々に増加した。一方、タイムラグがあり3hの光照射後からNO_3^-イオンが生成し始めた。NH_4^+/NO_2^-イオンの生成比は8時間の光照射後では約4.6であり、15h後は約3.7であつた。このことから、OHラジカルが表面にあるリン酸基を攻撃し、続いてDリボースの塩基部を攻撃するためである。またリン酸イオンが減少する理由は、光化学反応が進むにつれて、酸性になりプロトンH^+が生成し、TiO_2の表面電荷プラスにチャージするためアニオンであるリン酸イ

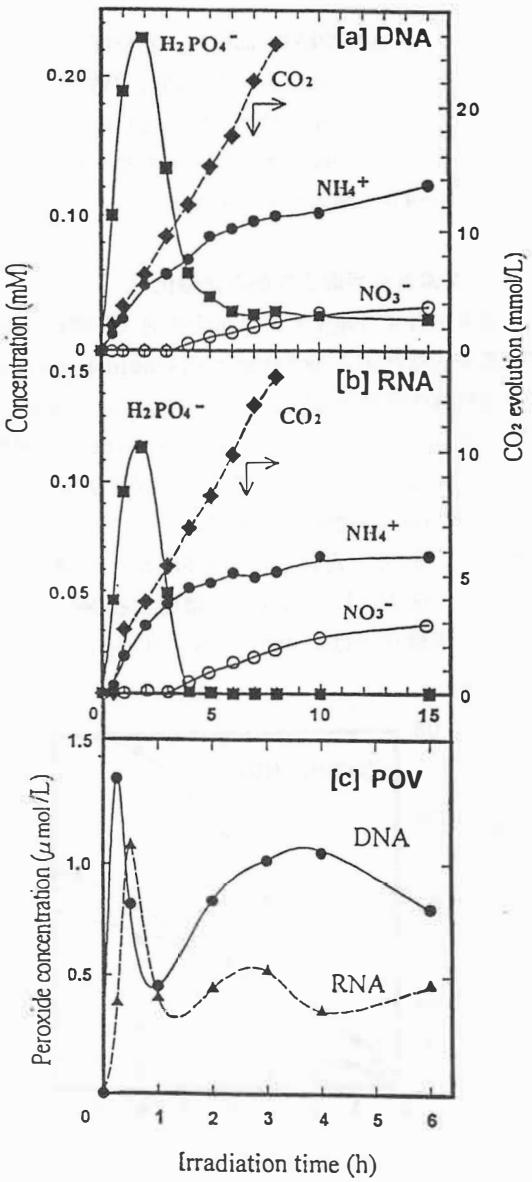


Fig.5 (a) Formation of NH_4^+, NO_3^- and $H_2PO_4^-$ ions for the photodegradation of DNA (0.05%) catalyzed by TiO_2 particles (100mg) in aerated aqueous solutions.
(b) Photomineralization of RNA (0.05%) under the same ondition as shown in Fig. 5(a).
(c) Temporal POV changes for the photo-oxidation of DNA and RNA (0.05%).

オン吸着しコンプレックスを形成し、ろ過されるため減少する。NH_4^+イオンはNO_3^-イオンよりも多いが、NO_3^-イオンは約3hの光照射から生成を始める。

Fig.5(c)は、DNAやRNA（25mg）の光分解によるパーオキサイドの生成量を示す。DNA、RNA共に初期過程で急速にパーオキサイドが生成しその後減少する。さらにその後徐々にパーオキサイドが増加し、約3～4hで極大値を与えた。

3-3 窒素含有界面活性剤の光酸化

窒素を有する非イオン界面活性剤（N-DHA)と両性界面活性剤(C_{12}-betaineと C_{12}-amidobetaine)の光無機化におけるNH_4^+とNO_3^-イオンの生成量をFig.6(a)に示す。C_{12}-amidobetaineはN-DHAとC_{12}-betaineよりNH_4^+イオンの生成量は少ない。C_{12}-betaineは照射時間の増加とともに 4hまでは増加し、8hで一定になる。N-DHAからのNH_4^+イオンの生成は8hまで1次反応で増加する。NH_4^+イオンへの無機化率はN-DHA(76%)＞C_{12}-betaine(57%)＞C_{12}-amidobetaine（30%）の順である。両性界面活性剤の第4級の窒素基はペプチド結合の窒素基よりNH_4^+イオンへ無機化は遅い。NH_4^+イオンの生成は初期段階で C-N結合が切断され、続いて、この窒素誘導体が光酸化され、さらにNH_4^+イオンへ加水分解される。1個の窒素基を含有している活性剤と比較して、2個以上を持つC_{12}-amidobetaineの光分解は長時間の光照射を必要とする。その理由は活性剤構造中の2つの窒素基が酸化力のある・OHラジカルによつて、競争的に攻撃される。NH_4^+イオンはNO_3^-イオンと同時に生成し、4～12倍多い。アミド結合や第4級窒素はNO_3^-イオンよりNH_4^+イオンへ優先的に光無機化される。

光励起TiO_2の伝導帯(cv)中の電子がO_2分子により捕獲され、O_2^-を与え、H^+ プロトンと結合して活性酸素種・OOHラジカルを与える。Fig.6(b)に照射時間に対する光酸化中間体のPOVの値を示す。C_{12}-amidobetaineとC_{12}-betaineは2h照射で最大のPOV値を与えた。この結果は2h照射のCO_2発生の増加と一致している。

非イオン系活性剤(N-DHA）の過酸化物の量は比較的少ない。この過酸化物誘導体はさらに光酸化され、アルデヒドやカルボン酸へ酸化が進行する。

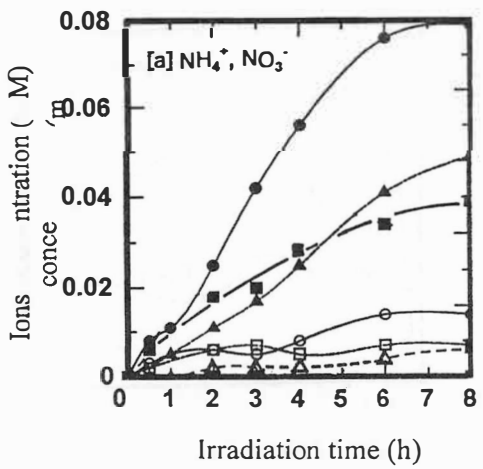
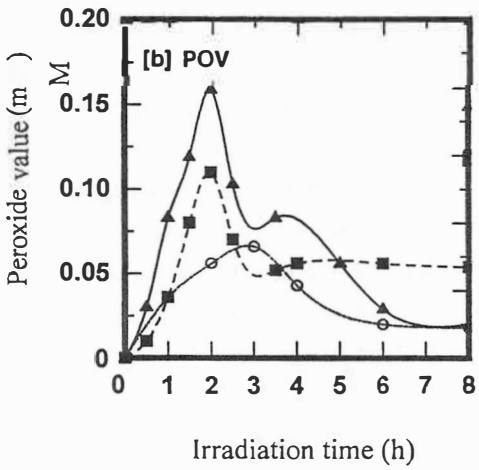
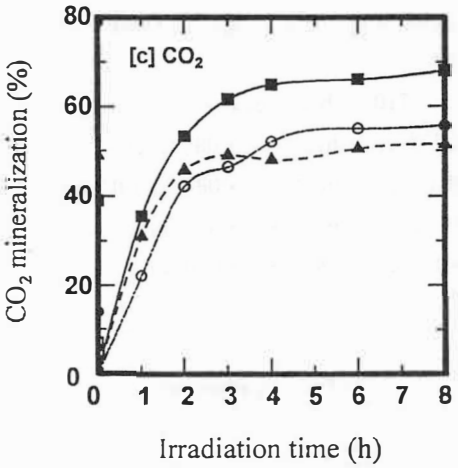


Fig.6 (a) Formation of NH_4^+ and NO_3^- ions as a function of irradiation time at a concentration of 0.1mM in the photo mineralization of nonionic N-DHA and amphoteric C_{12}-betaine and C_{12}-amidobetaine.
NH_4^+ion: ●N-DHA, ■C_{12}-betaine, ▲C_{12}-amidobetaine,
NO_3^-ion: ○N-DHA, □C_{12}-betaine, △C_{12}-amidobetaine



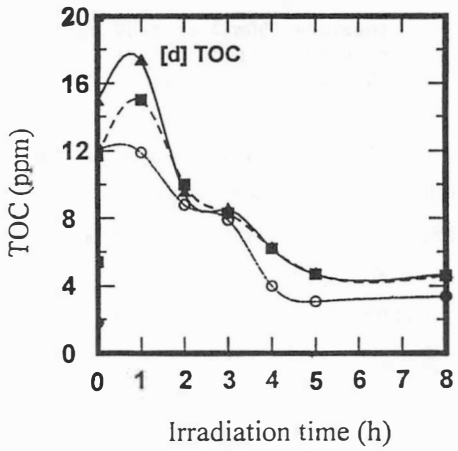
(b) Temporal formation of peroxide (POV) at a starting concentration of 1mM.
●N-DHA, ■C_{12}-betaine, ▲C_{12}-amidobetaine

N-DHAの過酸化誘導体はC_{12}-amidobetaineとC_{12}-betaineより分解されやすいことがわかった。CO_2発生量をFig.6（c）に示す。CO_2は照射時間とともに増加し、3～4hで最大の一定値を与えた。



(c) Relationships between CO_2 mineralization chemical yield and illumination time at a concentration of 0.1mM.
●N-DHA, ■C_{12}-betaine, ▲C_{12}-amidobetaine

8h後のCO_2への無機化率はC_{12}-betaine(68%)>N-DHA(53%)>C_{12}-amidobetaine(51.5%)である。界面活性剤の炭化水素部分からのCO_2生成は窒素部分からのNO_3^-イオンおよびNH_4^+イオンの生成より早い。



(d) Total organic carbon (TOC) in the residual solutions in the photomineralization at a concentration of 0.1mM.
●N-DHA, ■C_{12}-betaine, ▲C_{12}-amidobetaine

光照射時間に対するTOC変化量をFig.6（d）に示す。TOC測定により界面活性剤の光酸化を評価できる。TOC測定結果から光分解溶液中の残留有機中間生成物の全炭素量がわかる。両性のC_{12}-amidobetaineとC_{12}-betaineのTOC値は1h照射までは増加する。その後、TiO_2表面に吸着された活性剤は光酸化され、バルク溶液中へ移動する。非イオン系N-DHAにはこの様な現象は認められなかつた。このことはTiO_2への活性剤の静電気的吸着の違いによるものと思われる。光照射時間が長くなるにつれて、CO_2ガスが発生するため、TOC値は減少し、5hで一定値になつた。光照射をしない暗反応での、TOC値より予測されたTiO_2表面への活性剤の吸着はC_{12}-betaine(36.2%)>C_{12}-amidobetaine(15.4%)>N-DHA(8.3%)の順である。

3-4 その他の化粧品原料(高分子PVA, PEG, スクアレン)

Fig.7(a)(b)化粧品の素材によく使用されている水溶性高分子PEGおよびPVAの光酸化について調べた。Fig.7（a）は、オキシエチレン付加モル数の異なるPEGの光酸化のCO_2への無機化率を示した。0～4hの初期照射ではCO_2の発生が遅いが、4h以後CO_2の発生が急速に増加した。分子量が増加するにつれ無機化率は低下した。10hの光照射後の結果は、PEG200(46%)>PEG300(25%)>PEG400(23%)>PEG600(16%)である。

Fig.7（b）はPVAのCO_2への無機化率を示した。PVAの酸化プロセスも同様に•OHラジカル攻撃から光酸化が始まり、多くの酸化過程を経てCO_2になる。PVA(1μM、50mL)の無機化率はPVA-110(37%)>PVA-117(31%)>PVA-120(28%)>PVA-124(27%)で分子量が大きくなるにつれ無機化率は低下した。

過酸化物(POV)は紫外線照射1～5時間で化粧品(100mg)に対して2μgの過酸化物が生成した。化粧品原料としてよく使われているスクワレンのモデル化合物としてのスクアラン炭化水素は20～30分後、POVが最大になつた。引き続き酸化が

進行し、別の中間生成物に変わるためはPOVは減少する。

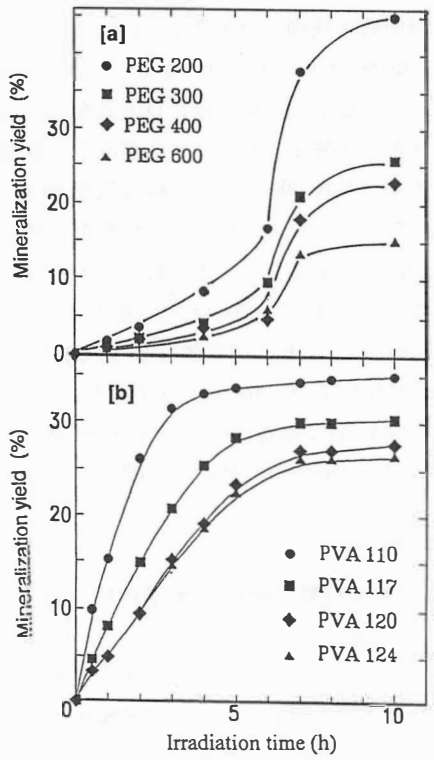


Fig.7 (a) CO_2 evolution for the photomineralization of PEG homologues (0.1mM, 50mL) in the presence of TiO_2 particles (100mg) in aerated aqueous solutions.
(b) CO_2 evolution for the photodegradation of PVA solutions (0.1mM, 50mL) in the presence of TiO_2 particles (100mg).

4 半導体光触媒による光酸化メカニズム[4, 8-12]

光分解速度の観点から見ると、①TiO_2の粒子表面への界面活性剤の吸着、②紫外線照射によるTiO_2中の正孔と電子への電荷分離、および・OHや・OOHラジカルの生成とこれら活性酸素種の有機分子への攻撃、③ベンゼン環開環、パーオキサイド（過酸化物）生成、アルデヒドおよびカルボン酸を経て最終的にCO_2まで無機化する二次的酸化過程が考えられる。TiO_2半導体は 3.2eVのバンドキャップを有し、すなわち387nm以下のエネルギーの紫外線を照射することにより電荷分離が起こり、価電子帯(VB) に正孔が、伝導帯 (CB) に電子がそれぞれ生成する。正孔は、TiO_2表面に吸着したH_2OまたはOH^-イオンから電子を捕獲し、・OHラジカルを生成する。同時に溶存酸素は伝導帯より電子を受けとり・O_2^-ラジカルとなり、溶液中のプロトンと反応し・OOHラジカルを生成する。

$$TiO_2 + h\nu \rightarrow e_{CB}^- + h_{VB}^+$$

$$[OH^-]_{ads} + h_{VB}^+ \rightarrow [\cdot OH]_{ads} \text{（アルカリ溶液中）}$$

$$[H_2O]_{ads} + h_{VB}^+ \rightarrow [\cdot OH]_{ads} + H^+ \text{（酸化溶液中）}$$

$$[O_2]_{ads} + e_{CB}^- \rightarrow [\cdot O_2^-]_{ads}$$

$$[\cdot O_2^-]_{ads} + H^+ \rightarrow [\cdot OOH]_{ads}$$

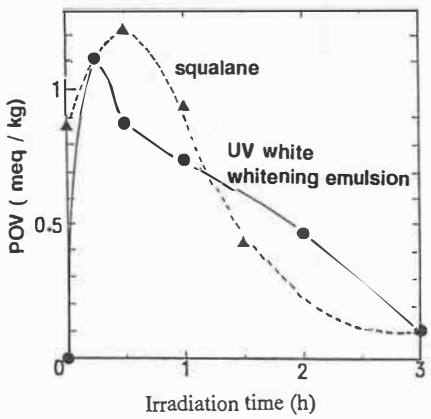


Fig. 8 Peroxide formation (POV) during the photodecomposition of squalane in a TiO_2 suspension (50mL) containing squalane (50mg) or a UV white whitening emulsion cosmetics (50mg) and T-805 catalyst (100mg).

TiO_2粒子と溶液の界面で生成する・OHまたは・OOHラジカルは、光酸化過程における主要な活性酸化種である。・OOHラジカルは特に酸性溶液において多く生成する。反応性の強いこれらのラジカルはDMPOスピントラッピング剤によるESR法で確認した。・OHや・OOHラジカルは、TiO_2表面に吸着した界面活性剤を攻撃し、ヒドロキシル化合物、パーオキサイドの誘導体をそれぞれ生成し、その後、さらに光酸化および自動酸化によってアルデヒド(HCHO)、カルボン酸 (HCOOH) を経てCO_2を発生する。ヘテロ分子はNH_4^+ やNO_3^-, $H_2PO_4^-$,

SO_4^{2-}などのイオンへ無機化される。光酸化反応には、TiO_2触媒、紫外線、酸素（空気）および水分の４つの因子が光分解の必須条件である。実際に化粧品に使用されている粒子は光触媒活性が抑制されているが、光酸化反応、特に角質表面での電子移動についてさらに詳細に検討する必要がある。

謝　辞

本財団より研究援助を賜わり、研究成果（引用文献1〜9）を国内外の専門雑誌に発表できたことに厚く御礼申し上げます。

引用文献

1) H. Hidaka, K. Takashima, K. Nohara, J. Zhao, E. Pelizzetti and N. Serpone, *New J. Chem.*, **18** 541 (1994)

2) K. Waki, L. Wang, K. Nohara and H. Hidaka, *J. Mol. Catal.*, **95** 53 (1994)

3) H. Hidaka, J. Zhao, Y. Satoh, K. Nohara, E. Pelizzetti and N. Serpone, *J. Mol. Catal.*, **88** 239 (1994)

4) H. Hidaka, Y. Asai, J. Zhao, K. Nohara, N. Serpone and E. Pelizzetti, *J. Phys. Soc.*, **99** 8244 (1995)

5) H. Hidaka, K. Nohara, K. Ooishi, J. Zhao, N. Serpone and E. Pelizzetti, *Chemosphere.*, **29** 2619 (1994)

6) H. Hidaka, J. Zhao, S. Horikoshi, N. Serpone and E. Pelizzetti, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **44** 121 (1995)

7) H. Hidaka, K. Nohara, J. Zhao, E. Pelizzetti and N. Serpone, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, in press. (1995)

8) H. Hidaka, J. Zhao, E. Pelizzetti and N. Serpone, *J. Phys. Chem.*, **96** 2226 (1992)

9) J. Zhao, H. Hidaka, A. Takamura, E. Pelizzetti and N. Serpone, *Langmuir.*, **9** 1646 (1993)

10) H. Gerischer and A. Heller, *J. Phys. Chem.*, **95** 5261 (1991)

11) H. Gerischer and A. Heller, *J. Electrochem. Soc.*, **139** 113 (1992)

12) H. Gerischer, *Electrochem. Acta.*, **38** 3 (1993)

水素添加大豆リン脂質を用いた油性ゲル及び水性ゲルの保湿作用に関する研究[1)]

昭和薬科大学
藤井まき子

Moisturizing effect of oily gel and aqueous gel formed by hydrogenated phospholipids (HSL) were examined by application to healthy female volunteers. Water concentration of stratum corneum was expressed as conductance measuring by high-frequency current. Moisturizing effect was evaluated with water concentration of stratum corneum, water sorption ability and water-holding capacity calculated from water sorption-desorption test. Inside of forearm was chosen for application site, because individual variation was small.

Application of oily gel of liquid paraffin (LP) with HSL 15% improve the water concentration about 100μS over 2h. Water sorption ability and water-holding capacity also increased significantly. Moreover, addition of soybean phosphatidylcholine (PC) to the gel was effective on prolongation of moisturizing effect. In contrast, oily gel of octyl isononanoate showed no increase of water concentration and water sorption ability. Only water-holding capacity increased. Addition of PC to the gel improve the moisturizing effect, but it was not as high as that of oily gel of LP. It indicated that character of oil using for gel affected greatly on moisturizing effect of oily gel.

Aqueous gel was formed by addition of 3% hydrogenated PC to water,water-ethanol (6:4) or water-ethanol-propylene glycol (PG) (6:2:2) mixture. Water concentration extremely increased immediately after application, but decreased to control level withn 10min except water-ethanol-PG gel. Water sorption ability and water-holding capacity increased when water-ethanol or water-ethanol-PG gel was applied. These results suggest that moisturizing effect was depend on the state of hydrogenated PC in vehicle.

1 緒 言

皮膚角質層における水分は刺激からの防御機能のための重要な因子である。皮膚の乾燥は皮膚疾患を招き、また美容上も好ましくない。近年老齢人口が増加し、老年性乾皮症が問題となっており、特に湿度が低くなる秋冬は患者が増大する。一方、若年者においても空調施設の発達により年中乾燥にさらされる傾向にあり、保湿剤の必要性は年々高まってきている。

リン脂質は生体膜成分であり、親水性、疎水性の両方の性質を示し、界面活性作用を有する。安全性は高いと考えられ、近年注目を集めている素材の1つであり、粧原基にも大豆リン脂質が収載されている。この天然リン脂質に水素添加し、酸化安定性が非常に良好となった水素添加大豆リン脂質の応用を多岐にわたり検討した結果、水素添加大豆リン脂質が流動パラフィンなどの液状油をゲル化する現象を見出した[2)]（油性ゲル）。

リン脂質は皮膚に対して保湿効果があることが知られている。保湿効果には皮膚水分の蒸散抑制と外界からの水分吸着促進の2種の機序が考えられるが、この油性ゲルは基剤の主体が油であるため水分蒸散を抑えるとともにリン脂質の吸湿作用により2重の保湿効果があると考えられる。しかも処方が単純で、他種の界面活性剤などの添加が不要であるため、角質水分が低く皮膚の防御機能が低下しアトピー様の症状を起こしやすくなっている人に対して余分なものを負荷する必要がない。そこでこの油性ゲルの保湿効果を検討した。

また、高純度のphosphatidylcholine(PC)が水、

The study of moisturizing effect of oily gel and aqueous gel formed by hydrogenated soybean phospholipids

Makiko Fujii

Showa College of Pharmaceutical Sciences

エタノール、プロピレングリコール（PG）等の混合溶媒をゲル化することも見出しているので[3]、この水性ゲルの保湿効果についても併せて検討した。

2 実験の部

2-1. 試料

油として流動パラフィン(LP)、イソノナン酸オクチル(OIN)、ミリスチン酸イソプロピル(IPM)を用いた。リン脂質として、水素添加大豆リン脂質(HSL;レシノールS-10、日光ケミカルズ)、大豆リン脂質より抽出した高純度PC（Epicron200：PC純度95%以上)及び、これに水素添加したHPC（レシノールS-10EX、日光ケミカルズ）を用いた。その他溶媒、試薬は特級品を用いた。

2-2. ゲルの調製

2-2-1 油性ゲルの調製

フラスコに適当に乾燥したHSL 1.5gをとりLPを加え、10gとした。フラスコを密封し、沸騰水浴中で加熱し、HSLをLPに溶解させた。熱時に軟膏チューブに充填し、20℃水中で30分冷却し、その後ゲルの性質を一定とするため、40℃に3日間放置した後室温で保存した[2]。PCを加えるときはHSLと同時に加え、40℃放置を30℃放置に変えた。

2-2-2 水性ゲルの調製

フラスコにHPC0.3gをとり、エタノール等の溶媒を加え、加温溶解した後、80℃の水を徐々に加えた。40℃水浴に30分おいた後、室温に放置した。

2-3. 測定法

角質水分の測定は、高周波伝導度測定装置(SKICON-200, IBS製)を用いて行った。各部位で3回測定し、その伝導度の平均値を角質水分とした。

2-3-1 健常人の角質水分の測定

健常女子ボランティア(年齢18～23才）の手甲及び前腕屈側の角質水分を測定した。測定は、室温22±1℃の部屋で30分以上座位で安静にした後に行った。

2-3-2 油及び油性ゲルの角質水分に与える影響

健常女子ボランティア(年齢21～23才)を対象とした。室温22±1℃、相対湿度40～60%の部屋で30分以上座位で安静にした後、まず前腕屈部の3点（手首から3～4cm 、屈部から3～4cmの点及びその中間）の角質水分を測定した。その後、右手はそのまま、左手に油または油性ゲルを約5mg／cm²塗布した。30分～2時間後油または油性ゲルをティシュペーパーで拭き取り、直ちに角質水分を測定した。その後さらに田上らの方法[4]に準じて水負荷試験を行った。すなわち、精製水を十分含ませた脱脂綿を10秒間被験部位に置いた後キムワイプで水を拭き取り直ちに角質水分を測定した。さらに、30、 60、90、120 秒後の値も測定した。

2-3-3 水性ゲルの角質水分に与える影響

油性ゲルと同様の方法で測定した。ただし測定は拭き取らずにそのまま行い、塗布1時間後の測定終了後、水負荷試験を行った。

3 結果と考察

3-1. 健常人の角質水分

保湿効果の実験に先立ち、健常人31名の角質水分を測定した。測定部位は被験者の抵抗感のない部位として当初、顔面、手甲、前腕部について行ったが、顔面は化粧や発汗の影響を大きく受けるため、以後は手甲と前腕部について検討した。

Fig.1に相対湿度と角質水分の関係を示した。いずれの部位でも相対湿度の上昇にともなって角質水分の増加がみられた。部位による差をみると、前腕屈側より手甲の方が角質水分が高いことが明らかとなった。また、個人差は手甲の方が大きか

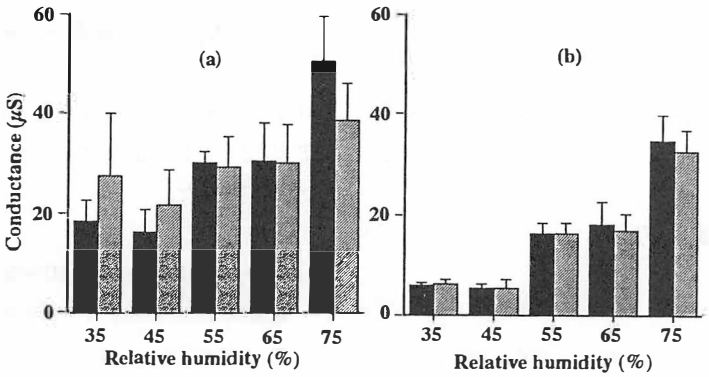


Fig. 1 Effect of Relative Humidity on Water Concentration of the Stratum Corneum

(a) hand, (b) forearm ■ right hand ▨ left hand

Room temperature was controlled at 22℃. Each value represents mean ± S.E. of 3-7 experiments

った。約半数の被験者がハンドクリームを使用していたが、これとの関係は明確ではなく、そのほかの生活条件なども大きく影響するものと考えられる。前腕屈側では中央付近がいずれの相対湿度においても角質水分が低い傾向がみられた。肘の内側に近い部分では、湿度の影響を受けやすく、特に湿度が70%以上では他の部位に比べ角質水分が高い傾向を示した。これは発汗の影響がでたものと考えられる。また、いずれの部位でも左右では差がみられなかった。

以上より実験時の相対湿度はばらつきが比較的小さい50%以下が望ましいと考えられるが、実験室における環境条件の設定が困難であるため、相対湿度は60%以下で行うこととした。被験部位は手甲ではハンドクリームの影響、その他手を使用する作業は多いためその影響がでる可能性があることから、比較的そのような影響を受けにくい前腕屈側部の手首及び肘から5㎝以上離れた部位を選び、さらに個人差、実験時の条件差を考慮にいれ、右手を常にコントロールとし、左手のみに処置を行うこととした。

3-2. 油及び油性ゲルの角質水分に与える影響

油類はその閉塞性のため保湿剤として有用であると考えられるが[5]、実際上使用されるのはワセリンや液状の油である。ワセリンは閉塞性が非常に高いが、べたつくため使用感が悪く、コンプライアンスが望めない。ベビーオイル等の液状油はべたつき感はワセリンに比べ低いが取り扱いにくい。液状油を水素添加リン脂質でゲル化した油性ゲルはワセリン程度の稠度を持つが、塗布時に構造が壊れ、展延しやすくなるため、べたつき感はもとの油と同程度である。そこで、この油性ゲルの保湿剤としての有用性を検討した。

3-2-1 油の角質水分に与える影響

まず、ゲルの基剤として用いる油の保湿効果に与える影響を検討した。油としては医薬品添加物として油相やベビーオイルに用いられるLP及びIPM、IPMと分子量は同じで、化粧品にエモリエント剤などとして使われるOINを塗布した後の角質水分を測定した。

Fig. 2に油を塗布した後の角質水分を示した。値は塗布した左手の伝導度からコントロールとした右手の伝導度を差し引いて示した。コントロールに比較してLPでは角質水分は30分で有意に増大し、塗布時間2時間でも角質水分が高い状態が続いた。これはLPが皮膜形成能が高い油であるためと考えられる。IPMやOINではLPに比較し効果は低かったが、IPMでは1、2時間塗布、OINでは30分、

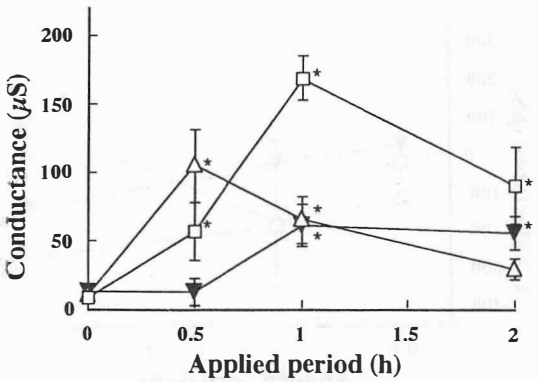


Fig. 2 Change of Water Concentration of the Stratume Corneum after Application of Oil

—□— LP —△— OIN —▼— IPM

Each value represents Mean ± S.E. of 6 experiments.
*Significantly different from control site.($p<0.05$)

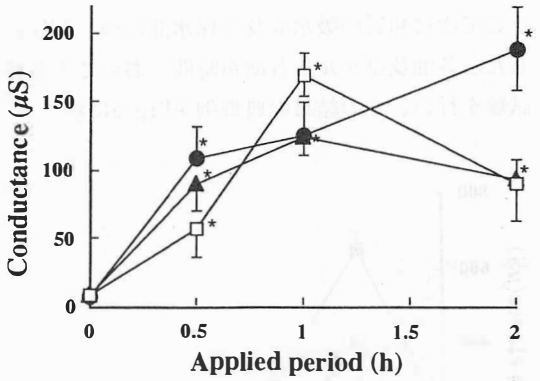


Fig. 3 Change of Water Concentration of the Stratume Corneum after Application of Oily Gel with Liquid Paraffin

—□— LP —▲— Gel —●— Gel with PC

Each value represents Mean ± S.E. of 6 experiments.
*Significantly different from control site.($p<0.05$)

1時間塗布でコントロールに比べ有意に角質水分が上昇することが明らかとなった。

3-2-2 油性ゲルの角質水分に与える影響

このように油を塗布することにより閉塞性によると考えられる角質水分の上昇がみられたが、油自身の性状によりその効果に差があることが明らかとなった。そこで、閉塞性の高いLPと、使用感は油っぽくなくさっぱりしているが角質水分上昇の小さいOINを選び、油性ゲルを調製した。

LPを用いた油性ゲルではLPと角質水分には差がなかった。しかし、LPを用いた油性ゲルにさらにPCを5%添加したものでは効果の持続がみられ、2時間塗布で有意にLPより高い角質水分を示した(Fig. 3)。

使用感のよいOINの場合、HSLを15%添加しゲルとしたときは、OIN単独の場合に比べ、保湿効果が低くなり、コントロールに対し有意差がなかった。LPゲル同様、未水添のPC5%加えたゲルを塗布したところOIN単独とほぼ同じ効果が現れ、しかも作用は2時間後でも持続していた(Fig. 4)。

PCは先のLPを用いたゲルにおいても効果の持続に寄与していたが、OINの場合はこの効果に加え、ゲル稠度を低下させることにより皮膚との親和性を改善する効果もあるものと思われる。

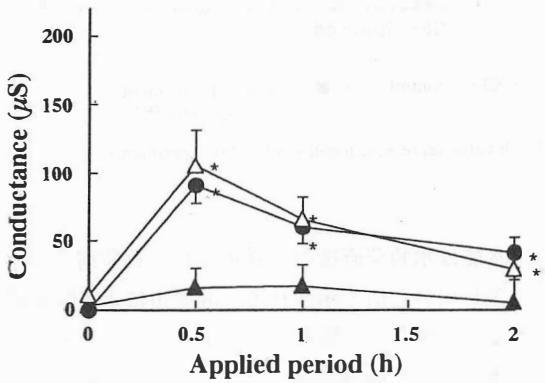


Fig. 4 Change of Water Concentration of the Stratume Corneum after Application of Oily Gel with Octyl Isononanoate

—△— OIN —▲— Gel —●— Gel with PC

Each value represents Mean ± S.E. of 6 experiments.
*Significantly different from control site.($p<0.05$)

このように角質水分の上昇の程度は、用いる油によって異なるが、PCを併用したゲルでは効果の持続が示唆された。

3-2-3 油及び油性ゲルの皮膚吸水能及び保水能に与える影響

保湿剤の効果は塗布後の角質水分だけでなく、皮膚の吸水能や保水能に与える影響も重要である。

そこで次に角質の吸水能及び保水能について検討した。各油及びゲル、各塗布時間において水負荷試験を行い、その結果の典型例をFig. 5に示した。

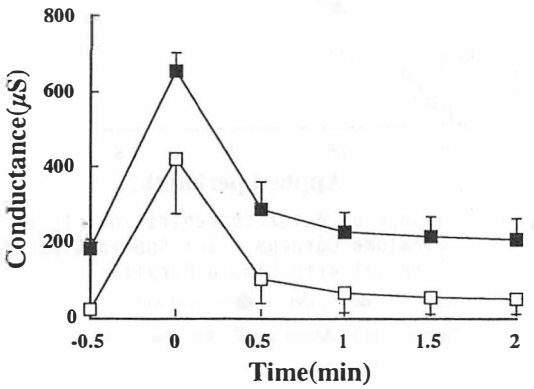


Fig. 5 Typical Profiles of Water Sorption-Desorption Test of Control Site and Gel Applied Site

control　after 1 h treatment with gel with PC

Each value represents mean ± S.E. of 6 experiments.

吸水能は水負荷直後の角質水分から負荷前の水分を差し引いた値で示される。油塗布による吸水能の変化（塗布した場合の吸水能－コントロールの吸水能）をFig. 6に示した。いずれの油でもやや吸水能は下がる傾向がみられたが、コントロールとの有意差はなかった。これは拭き取った後油が残存しているためやや水を吸いにくくなっているのではないかと考えれる。ゲルを塗布した場合、LPのゲルで有意に吸水能が上昇しており、特にPCを含む場合は適用時間が長いほど吸水能が上昇する傾向がみられた（Fig. 7）。

OINを用いたゲルではPCを添加した場合のみコントロールより高い吸水能を示したが、わずかであった（Fig. 8）。

保水能は先に示した水負荷試験の時間－伝導度曲線下面積(AUC）として求め[6]、処置部からコントロール部のAUCを差し引いてFig. 9-11に示した。油、ゲルともコントロールに比べ有意な上昇が認められた。この場合もLPを用い、PCを併用したゲルが最も効果が大きくかった。

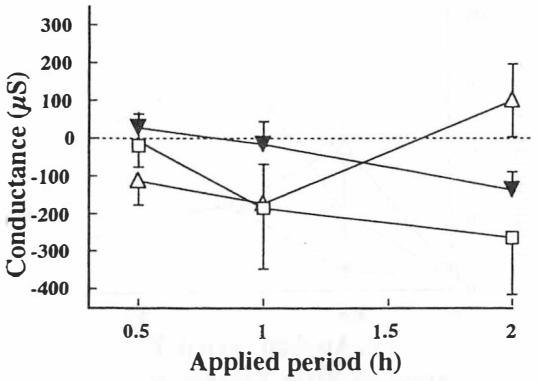


Fig. 6 Change of Water Sorption Ability of the Stratume Corneum after Application of Oil

LP　OIN　IPM

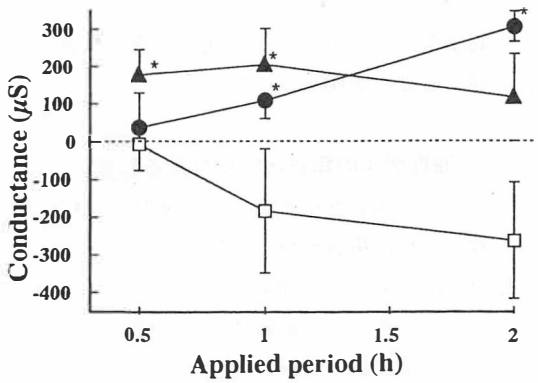


Fig. 7 Change of Water Sorption Ability of the Stratume Corneum after Application of Oily Gel with Liquid Paraffin

LP　Gel　Gel with PC

Each value represents mean ± S.E. of 6 experiments.

*Significantly different from control site.($p<0.05$)

以上の結果より油性ゲルは油単独に比べ皮膚に対する作用時間が長くなる傾向がみられた。特に、未水添のPCを含む方が効果が良好であると思われる。また、使用する油の性質によりゲルの保湿効果にも大きな差があることが明らかとなった。

3-3 水性ゲルの角質水分に与える影響

HPCが水やエタノール、PG等の溶媒系でゲル化することを見いだした。この水性ゲルを用いた場

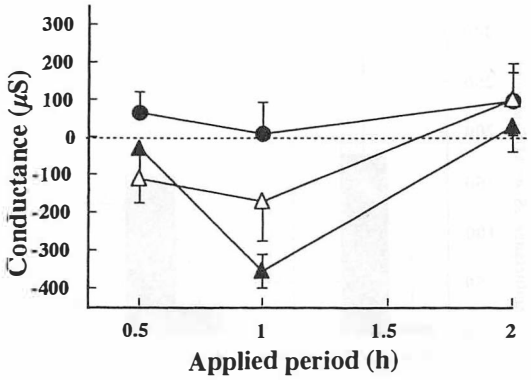


Fig. 8 Change of Water Sorption Ability of the Stratume Corneum after Application of Oily Gel with Octyl Isononanoate

—△— OIN —▲— Gel —●— Gel with PC

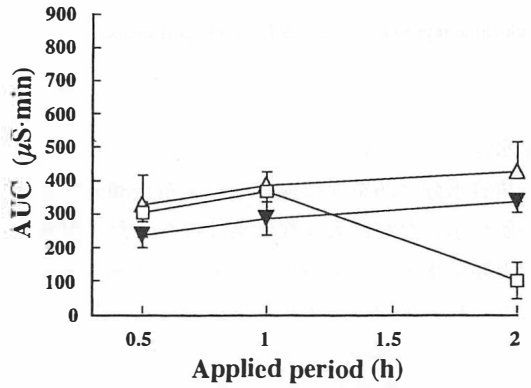


Fig. 9 Change of Water-Holding Capacity of the Stratume Corneum after Application of Oil

—□— LP --△-- OIN —▼— IPM

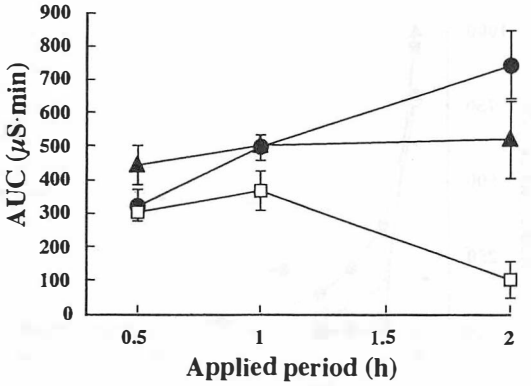


Fig. 10 Change of Water-Holding Capacity of the Stratume Corneum after Application of Oily Gel with Liquid Paraffin

—□— LP —▲— Gel —●— Gel with PC

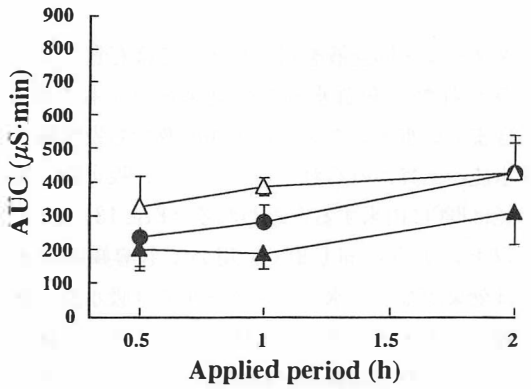


Fig. 11 Change of Water-Holding Capacity of the Stratume Corneum after Application of Oily Gel with Octyl Isononanoate

—△— OIN —▲— Gel —●— Gel with PC

合の保湿効果について油性ゲルと同様に検討した。

水性ゲルの溶媒として、水のみ、水・エタノール(6:4)混液及び水・エタノール・PG(6:2:2)混液を用いてHPC3%を含むゲルを調製し、塗布後の角質水分変化を測定した。結果をFig. 12に示した。

いずれの場合も多量に水を含むため、塗布直後は非常に高い水分を示したが、水のみ及び水・エタノール混液を用いたゲルでは5-10分後にはコントロールとの差がみられなくなった。水塗布の場合は5分以内に元に戻ることから考えると多少の効果はあるのかも知れないが、有効とは考えられない。これに対し、水・エタノール・PG混液を用いたゲルでは30分程度の効果の持続がみられた。HPCを添加しない溶媒だけでも効果の持続がみられたことから、これはPGの効果も大きいものと考えられる[7]。

次に吸水能と保水能を水負荷試験により評価した。吸水能、保水能共に水を用いたゲルではまったく効果がないのに対し、水・エタノール及び水・

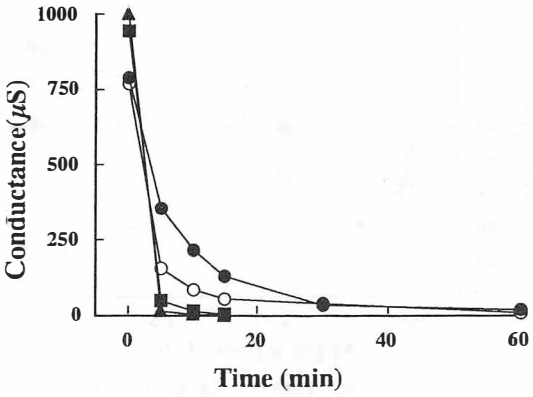


Fig. 12 Change of Water Concentration of the Stratume Corneum after Application of Aqueous Gel

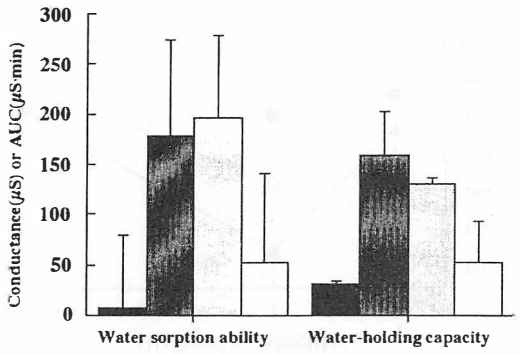


Fig. 13 Change of Water Sorption Ability and Water-Holding Capacity of the Stratume Corneum after Application of Aqueous Gel

Each value represents mean ± S.E. of 3 experiments.

エタノール・PG混液を用いたゲルでは有意な上昇がみられた。角質水分では効果がみられたHPCを含まない水・エタノール・PG混液でも吸水能、保水能の上昇はみられないことから、吸水能、保水能はHPCに由来すると思われる（Fig. 13）。

以上のように同じHPCを用いても溶媒系が水では効果がなく、水・エタノールでは吸水能、保水能に、水・エタノール・PGでは全ての点で保湿効果がみられ、溶媒系が異なると保湿効果に差が出ることが明らかとなった。これはHPCの存在状態に差があるためではないかと思われる。

4 総 括

健常女子ボランティアにより水素添加大豆リン脂質を用いた油性及び水性ゲルの保湿効果について検討したところ、次のことが明らかとなった。

＊油性ゲルについて

閉塞性の高いLPを用いた場合の方が、角質水分、吸水能、保水能とも効果が大きかった。未水添のPCを併用すると効果が持続する傾向がみられた。OINは使用感はさっぱりしているが、効果はLPを用いた場合より低く、油の性質が保湿効果に大きな影響を与えることが明らかとなった。

＊水性ゲルについて

角質水分はPGを含む場合のみ塗布後30分程度高い値を示したが、大きな効果はなかった。保水能の上昇が水・エタノール、水・エタノール・PG系でみられ、水のみのゲルでは認められなかった。このことからHPCの存在状態が保湿効果に影響することが示唆された。

引用文献及び注

1） 本報告の一部は第19回日本香粧品科学会学術大会、1994年6月、東京にて発表

2） M. Fujii, H. Terai, J. Togasaki, I. Kawamata, Y. Takashima, H. Yamaguchi, M. Matsumoto, "Oily gel formed by hydrogenated soybean phospholipids and its properties", *Yakuzaigaku.*, 46 45-49 (1986)
;M. Fujii, H. Terai, J. Togasaki, M. Matsumoto, "Effect of storage temperature and phosphatidylcholine content on the properties of oily gel formed by hydrogenated phospholipids", *Yakuzaigaku.*, 46 266-270 (1986)

3) 藤井、吉田、有馬、松本、“水素添加大豆リン脂質を用いた2成分系（水・エタノール）におけるゲルの調製方法”、日本香粧品科学会誌 14 213-216 (1990)
；藤井、吉田、有馬、松本“水素添加大豆リン脂質・水・エタノールゲルに対するプロピレングリコール及び他の添加物の影響”、日本香粧品科学会誌 16 90-93 (1992)

4) H. Tagami, Y. Kanamaru, K. Inoue, S. Suehisa, F. Inoue, K. Iwatsuki, K. Yoshikuni, M. Yamada, “Water sorption-desorption test of the skin in vivo for functional assessment of the stratum corneum.” *J. Invest. Dermatol.*, 78 425-428 (1982)

5) 熊坂、“皮膚保湿効果測定法”、フレグランスジャーナル臨時増刊 23 2-8 (1994)

6) H. Tagami, “Quantitative mesurements of water concentration of the stratum Corneum in vivo by high-frequency current” *Acta. Derm. Venereol.*, (Stockh) Suppl. 185 29-33 (1994)

7) 日本薬学会訳編 “医薬品添加物ハンドブック” 丸善 pp. 310-311 (1989)

アスパラギン酸プロテアーゼ類の蛋白工学的改変によるケラチナーゼの開発

東京大学大学院理学系研究科
井　上　英　史

An aspartic proteinases, proctase B from *Aspergillus niger var. macrosporus,* was prepared by two types of heterologous systems, *i.e.,* an expression- *in vitro* refolding system using *Escherichia coli* and an expression-secretion system using *Bacillus brevis*. Both of the systems gave potentially active proproctase B, which was converted into the mature form under acidic conditions (pH ≦ 5) by autoprocessing. The completely processed form had almost the same properties with native proctase B although their N-termini were different from each other. The *B. brevis* expression system yielded proproctase B corresponding to 50 mg of active proctase B per one liter of culture. The replacement of Arg6 or Lys7 in the prosequence with glutamine increased the yield up to 120 mg. These expression systems, especially the *B. brevis* system, enable us to alter the properties of proctase B by site-directed mutagenesis and to study the relationships between the structure and substrate specificity of proctase B to increase the activities toward keratin and collagen.

1　緒　言

皮膚は身体を被覆することにより、体内の諸器官が外部から種々の刺激や傷害を受けることを防御する。表皮の最も外側にあって、この重要な役割を担っている角質層は化粧品学においても非常に重要な身体組織である、角質層を構成する成分として主要なものはケラチンと呼ばれる蛋白質である。ケラチンは不溶性であり、かつ種々の要因に対して抵抗性が強く、このことにより身体の最外層の構成成分としての重要な役割を果たすと考えられる。しかし一方では、このような性質のためにケラチンは生化学的には非常に扱いにくい蛋白質であり、研究は進んでいない。蛋白質を分解する酵素プロテアーゼは、これまでに多くの生物種から非常に多数の分子種が単離され研究されてきているが、そのほとんどは、身体の強靭な組織を構成するケラチンやコラーゲンなどの"固い"蛋白質を消化する機能を持たない、ケラチンを分解するプロテアーゼはケラチナーゼと総称されるが、ケラチナーゼに関する研究は少ない。

皮膚感染を起こす菌として*Candida* 属が知られるが、これらは菌体外にアスパラギン酸プロテアーゼを分泌する。このアスパラギン酸プロテアーゼはケラチンやコラーゲンを分解する活性を持つことが報告されている。アスパラギン酸プロテアーゼは、真核生物に広く存在しており、哺乳類においてもペプシン、レニン、カテプシンD・E等、生理機能の異なる他数の分子種が存在している。これらは構造や触媒機構において共通性を持っており、同一の起源から進化したと考えられる。我々が本研究で用いる糸状菌*Aspergillus niger var. macrosporus* が分泌するアスパラギン酸プロテアーゼ（プロクターゼB）[1,2]は消化薬として用いられているが，コラーゲンを分解するコラゲナーゼ活性を持つことが知られている[1]。

プロテアーゼがケラチンやコラーゲン等を分解するための必要条件は何であるのか、あるプロテアーゼを改変してこのような蛋白質に対する活性を高めるためにはどうすれば良いのか。このような点を明らかにし、ケラチン分解活性を持った新規な酵素を蛋白工学的に創生することは皮膚科学や化粧品学の基礎研究・応用に役立つと思われる。

Study on the relationship between structure and karatinase activity of aspartic proteinases.

Hideshi Inoue

The University of Tokyo

また、ケラチン含有組織を蛋白質資源として有効利用することにも応用されることが期待される。そこで本研究では、種々のアスパラギン酸プロテアーゼを改変することにより、ケラチナーゼ活性を付与または増強することを目的とし、アスパラギン酸プロテアーゼの大量発現系を構築し、部位特異的変異を行うことにより発現量の向上を行った。

2 実 験

2・1 大腸菌による発現系の構築

ヒト・ペプシノーゲンA、ヒト・カテプシンE、及び、*A. niger var. macrosporus* 由来プロクターゼBのcDNAのプロ体部分をコードする領域をpolymerase chain reaction法により増幅し、それぞれT7プロモーターを持つ発現ベクターpAR2113[4]に組み込み、大腸菌BL21(DE3)に導入した。発現に用いたプラスミドが各プロテアーゼ前駆体を正しくコードしていることを、DNAシークエンシングにより確認した。クローン化した形質導入株をM9ZB培地で培養し、イソプロピルチオガラクトピラノシドを加えることにより発現を誘導した。培養後、集菌した菌体をリゾチーム処理、超音波破砕処理により溶菌した。以下にプロプロクターゼBにおける実験手順を記す。溶菌後遠心して封入体を沈殿させ、8M 尿素、100mM 2-メルカプトエタノールを含むトリス－塩酸バッファー(pH8)で変性プロプロクターゼBを抽出した。透析して変性剤と還元剤を取り除くことによりリフォールディングを行った。遠心して上清をとり、DE52カラムに吸着させた。

0～0.5M NaClの直線濃度勾配によりプロプロクターゼBを溶出し、潜在活性をもつフラクションを集めた。

次にPhar-macia LKBの Superose6HRカラムを用いてゲル濾過を行い、さらに20mMトリエタノールアミン緩衝液（pH7.3）に対し透析した後MonoQカラムに吸着させ、0-1M NaCl濃度勾配により溶出した。潜在活性を持つフラクションを集め、10mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.0）に対し透析した。

2・2 アッセイ

蛋白質分解活性は、pH2（リン酸ナトリウム）で酸変性したヘモグロビンを基質として用いて行った[5]。

2・3 *Bacillus brevis*による発現系の構築

ヒト・ペプシノーゲンA、ヒト・カテプシンE、及び *A. niger var. macrosporus* 由来プロクターゼBのcDNAのプロ体部分をコードする領域をpolymerase chain reaction 法により増幅し、発現ベクターpNU211R2L5[6]に組み込んだ。これを *B. brevis* HPD31株に導入し、PY-1培地中で培養した[7]。以下に、プロクターゼBについて行った手順を述べる。培養上清を集め、60～80%硫安で沈殿する画分を集め、プロプロクターゼBの部分精製試料とした。また、培養上清に塩酸を加えてpH2.2とし、37℃で10分処理した後、遠心して沈殿物を除き、60%飽和硫安で沈殿させた画分をプロクターゼBの部分精製試料とした。

2・4 部位特異的変異

変異をデザインした合成オリゴDNAを用いて、Kunkelの方法[8]によりプロクターゼBcDNAに変異を導入した。発現に使ったプラスミドは変異が正しく導入されていることをDNAシークエンシングにより確認した。

3 結 果

3・1. 大腸菌による発現

ヒト・ペプシノーゲンA、ヒト・カテプシンE、及び*A.niger var.macrosporus*由来プロクターゼBのcDNAのプロ体部分をコードする領域をそれぞれT7プロモーターを持つ発現ベクターに組み込み、大腸菌BL21(DE3）による発現を行った。その結果、プロクターゼBにおいて、完全長のプロ体蛋白質が大量に（1リットル培養液中200mg以上）発現した。ただし、発現したプロプロクターゼBの

大部分は、不溶性の封入体を形成しており、活性を持たなかった。そこで、大腸菌を溶菌後、遠心分離により封入体を分離し、8M 尿素と100mM2-メルカプトエタノールにより可溶化する画分を集め、透析して尿素と2-メルカプトエタノールを取り除くことによりリフォールディングを行った。その結果、酸性条件下において変性ヘモグロビンを基質に用いたアッセイにより酸性プロテアーゼの活性が認められた。このプロプロクターゼBは、DE52、Superose HR、MonoQによるカラムクロマトグラフィーにより精製され、SDS-PAGE上で単一のバンドになった。この完全精製物の収量は1リットルの培養液から1mgであった。一方、ヒト・ペプシノーゲンAは完全長の蛋白質を発現させることが出来なかった。

3・2 *B. brevis* による分泌発現系の構築

B. brevis は菌体外に大量の蛋白質を分泌することが知られている。そこで、*B. brevis* の菌体外主要蛋白質のシグナルペプチドと種々アスパラギン酸プロテアーゼのプロ体との融合蛋白質の分泌発現を行った。その結果、ペプシノーゲンAの発現量はたいへん少なく、またプロカテプシンEの発現は全く検出できなかったが、プロプロクターゼBについては潜在活性の発現が見られた。

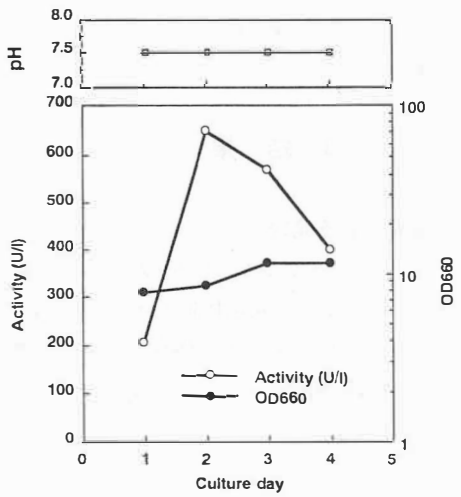


Fig. 1 *B. brevis*によるプロプロクターゼB分泌発現の経時変化

発現したプロプロクターゼBは、ヘモグロビンを用いたアッセイにより、1リットル培養液あたり約50mgのプロクターゼB活性に相当すると見積もられた。(Fig. 1)

3・3 組み換え発現により得たプロクターゼBと天然プロクターゼBとの比較

大腸菌で発現して精製したプロプロクターゼB、*B. brevis*から得られたプロプロクターゼB、いずれも酸性条件下で、SDS-PAGE上で天然のプロクターゼBと等しい移動度を示す活性型成熟体に変換し、他のプロテアーゼ活性を必要とせずに、自己触媒的にプロセッシングすることが明らかになった。得られる成熟型プロクターゼBは天然のものと等しい比活性や性質(pH依存性等、Fig. 2) を持ち、

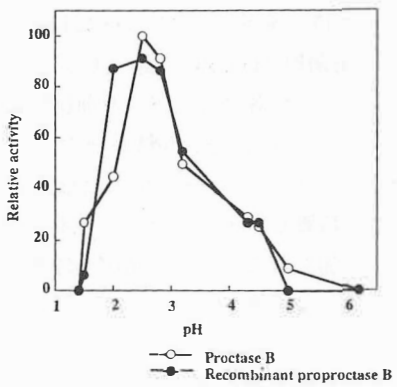


Fig. 2 プロクターゼBと組み換えプロプロクターゼBの活性のpH依存性

正しい高次構造を持ったプロクターゼBが得られたと考えられた。しかしながら、N端の配列、すなわちプロ体から成熟体を精製するときのプロセッシング部位は異なっており、組み換え体のN端はいずれの発現系を用いた場合も天然のものより2残基長かった。

このことは*A. niger var. macrosporus*にはプロプロクターゼBが自己触媒的に活性化した後にさらにN端の2残基を切断するプロテアーゼが存在することを意味する。ただし、このことは組み換え発現系を用いてプロクターゼBの機能改変を行うことにおいては全く影響がない。

```
                10          20          30          40
ANB   APAPTRKGFTINQIARPANKTRTINLPGMYARSLAKFGGTVPQSVKEAA
PGA   IMYKVPLIRKKSLRRTLSERGLLKDFLKKHNLNPARKYFPQWEAPTL
PCE   QGSLHRVPLRRHPSLKKKLRARSQLSEFWKSHNLDMIQFTES
```

Fig. 3 プロ配列の比較
ANB : *A. niger var. macrosporus* proctase B　PGA : Human pepsinogen A
PCE : Human procathepsin E　二重下線 : 塩基性アミノ酸残基

3・4 プロ配列の改変による発現量の向上

ペプシノーゲンAとプロカテプシンEはプロ配列のN端近傍に塩基性アミノ酸残基が多数存在しているのに対し、プロクターゼBでは塩基性残基が比較的少ない（Fig. 3）ことから、N端近傍の塩基性残基の存在が分泌発現において不利な要因となる可能性が考えられた。そこで、プロクターゼBプロ配列の6位のアルギニン残基と7位のリジン残基をそれぞれグルタミンに変換した変異体（R6Q及びK7Q変異体）を部位特異的変異法により作製した。その結果、いずれの変異体においても発現量が上昇し、R6Q変異体では1リットル培養液あたり120mgの潜在活性型プロプロクターゼBの発現が見られた（Table 1）。これらのプロ体は野生型プロ体と同様に酸性条件下で自己触媒的に速やかに活性型成熟体に変換した。一方、16、22、32位のアルギニン、20、36、46位のリジンは、いずれをグルタミンあるいはアスパラギンに変換しても発現量の増大が見られなかった。

Table 1 *B. brevis*によるプロプロクターゼBの発現部位特異的変異による発現量の増大

Proproctase B	Medium	Amounts of ANB
Wild type	5'PY	50 mg
R6Q	5'PY	90 mg
K7Q	5'PY	80 mg
R6Q	5'PY + 0.3% glycine	120 mg

4 考　察

プロクターゼBの発現系を大腸菌及び*B. brevis*を用いて構築した。特に*B. brevis*による分泌発現系の方がいくつかの点で大腸菌による系に比べてすぐれていると考えられる。すなわち、第一に、*B. brevis*による発現系ではリフォールディングの処理をすることなく潜在活性型のプロ体を大量に発現できる。第二に、*B. brevis*の系では菌体外にプロプロクターゼBを分泌するので*B. brevis*由来の蛋白質の混入が少ない。第三に、活性型プロクターゼBの収量が*B. brevis*の系の方が多い。発現量はプロ配列N端近傍の塩基性残基を減らすことにより増加したが、このことは他のアスパラギン酸プロテアーゼにも応用できるものと考えられる。すなわち、プロプロクターゼBよりもヒト・ペプシノーゲンAやヒト・カテプシンEの方がプロ配列N端近傍が塩基性残基に富んでおり、このことが*B. brevis*による分泌発現に不利である可能性が考えられる。今後検討の余地がある課題である。第四に、*B. brevis*が活性型アスパラギン酸プロテアーゼを菌体外に生成することは、種々の変異体の活性の測定を簡便にし、目的とする基質（ケラチン）を含んだ寒天培地を用いることにより、一度に大量の変異体のスクリーニングを行うことが可能であると考えられる。また、栄養源をケラチンに制限することによってケラチナーゼ活性発現菌の選択も可能かもしれない。また、プロクターゼBのコラーゲン分解活性を増強する研究も同様に行うことが可能である。

5 総 括

A. niger var. macrosporus 由来プロクターゼBを大腸菌及び *B. brevis* を用いて発現し、活性型酵素を得た。特に *B. brevis* の系ではプロ配列を改変することにより、1リットルの培養により120mgの活性型酵素を分泌発現させることに成功した。このことは他のアスパラギン酸プロテアーゼ類を発現させる上でも重要な指針を提供すると思われる。また、この活性型酵素の菌体外高発現系を利用することにより、改変酵素の作製と検索を容易に行うことが可能となった。

引用文献

1) Koaze Y., Goi H., Ezawa K., Yamada Y., and Hara T. *Agric. Biol. Chem.*, 28 216-223 (1964)

2) Horiuchi S., Yamasaki M., and Yamada Y. *Sci. Pap. Coll. Gen. Educ. Univ. Tokyo (Biol. Part)* 19 127-139 (1969)

3) Chomarat N., Robert L., Seris J. L., and Kern P. *Enzyme Microb. Technol.*, 16 756-760 (1994)

4) Studier F. W., Rosenberg A. M., Dunn J. J., and Dubendorff J. W. *Methods in Enzymol.*, 185 60-89 (1990)

5) Anson, M. L. *J. Gen. Physiol.* 22 77-89 (1939)

6) Sagiya Y., Yamagata H., and Udaka S. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, in press. (1994)

7) Udaka S., and Yamagata H. *Methods Enzymol.*, 217 23-33 (1993)

8) Kunkel T. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 488-492 (1985)

細胞膜の脂質の物性と機能の基礎的な研究
－リン脂質物性のコスメトロジーへの応用－

東北大学大学院理学研究科
大　木　和　夫

Cosmetology includes physiological approach to skincells of human body. And all cells are constructed with biomembranes which are assemblies of lipids, proteins and various minor constituents held together by non covalent interactions. Membrane lipids are amphipathic molecules, and they spontaneously form bilayers in aqueous environments. Hydration of lipids plays an important role in this process. So the hydration was investigated in various phospholipid species by an optical microscope with image processing devices. Interaction of membrane proteins with lipids is hydrophobic with the lipid hydrocarbon chains in contact with hydrophobic regions on the protein surface or penetrating into the protein interior and electrostatic interaction between charged groups on the protein surface and the lipid head groups. Although a lot of studies are focused on the structure of biomembranes, the organization of lipid molecules in biomembranes has not been fully determined. In order to resolve more extensively the interaction between lipids and proteins, it was investigated by differential scanning calorimetry (DSC) in model membrane systems.

The effect of electrostatic interaction between basic polypeptides (polylysine and polyarginine) and acidic phospholipids (phosphatidylserine and phosphatidic acid) was examined by DSC. Polylysine raised the phase transition temperature of dipalmitoylphosphatidylserine (DPPS) by 5 degrees. On the other hand, polyarginine lowered the phase transition temperature of DPPS by 6 degrees. The same effects was observed in dimyristoyl phosphatidic acid (DMPA) and dipalmitoyl phosphatidic acid (DPPA).

Melittin is a major component of bee venom and consists of 26 amino acids starting with predominantly hydrophobic amino acids in the N-terminal part and finishing with charged and hydrophilic residues in the C-terminal part. DSC studies revealed that melittin was able to induce membrane fusion between neutral phospholipids and acidic phospholipids.

1　緒　言

コスメトロジーは生物・医学・生理学の観点からは多細胞生物の表皮細胞上での作用を扱っており、背景として生命の基本単位である細胞についての理解が必要となる。実際に、構造から機能まで生物の基本要素のすべては細胞に存在しており、さらに、その環境として水の重要性が指摘できる。細胞を構築している膜構造は「生体膜」と呼ばれ、重要な生物機能が行われる場である。生体膜の主要な成分は蛋白質と脂質であり、水中で自発的に集合して膜構造を形成する脂質分子にその基本構造は依存している。生体分子の中で、蛋白質、核酸、糖質はユニットとなる分子が重合した生体高分子であるのに対して、脂質は低分子（リン脂質で分子量が1000程度）であるが、その分子構造に由来する両親媒性から水中で分子集合体を形成して膜構造となる特徴をもっている。これは多様な構造と物性を生じさせ、蛋白質との相互作用を通して、細胞膜の機能を制御するだけでなく、生物の環境適応にも重要な役割を果たしている[1)]。

また、生物は進化の過程で、生命の誕生した水中から陸上に移行したのであり、そのとき以来、表皮細胞により、体細胞を本来の水環境と同様な環境に維持してきた。つまり、脂質は気液界面での物性および水和現象を介して、コスメトロジーに深く関連している。そこで、細胞膜の脂質について、その物性を詳細に研究し、コスメトロジーの発展と新たな展開を可能とする基礎的な知見を得

Basic Study on Physical Property and Function of Cellular Membrane Lipids
- Application of Physical Property of Phospholipids to Cosmetology -

Kazuo Ohki
Tohoku University
Graduate School of Science

ることを目的とした研究を実施した。

具体的には、可能な限り多くの脂質分子種について、脂質2分子膜の相転移、相分離、流動性などの諸物性を測定するとともに、その水和過程についても検索し、各種のイオン、薬物、ペプチドなどが物性に及ぼす影響を調べ、コスメトロジーに有用な物性を明らかにすることを試みた。

2 リン脂質2分子膜の構造と相転移

リン脂質は主要な膜脂質であり、生体膜の形成に重要な役割を担っている両親媒性の分子である。多様な分子種が存在するが、共通な構造として親水性の極性頭部と疎水性の脂肪側鎖をもっている(Fig. 1)。

この性質により、水中では熱力学的な平衡状態として自発的に分子集合体であるリン脂質2分子膜を形成する。これが生体膜の基本構造となる脂質二重層膜であり、領域を区画するだけでなく、相転移・相分離・流動性・選択透過性など種々の物性を示す。これにDNAの遺伝情報に従って合成された蛋白質が結合したものが生体膜であり、細胞を構築するとともに重要な生物機能の場でもある。

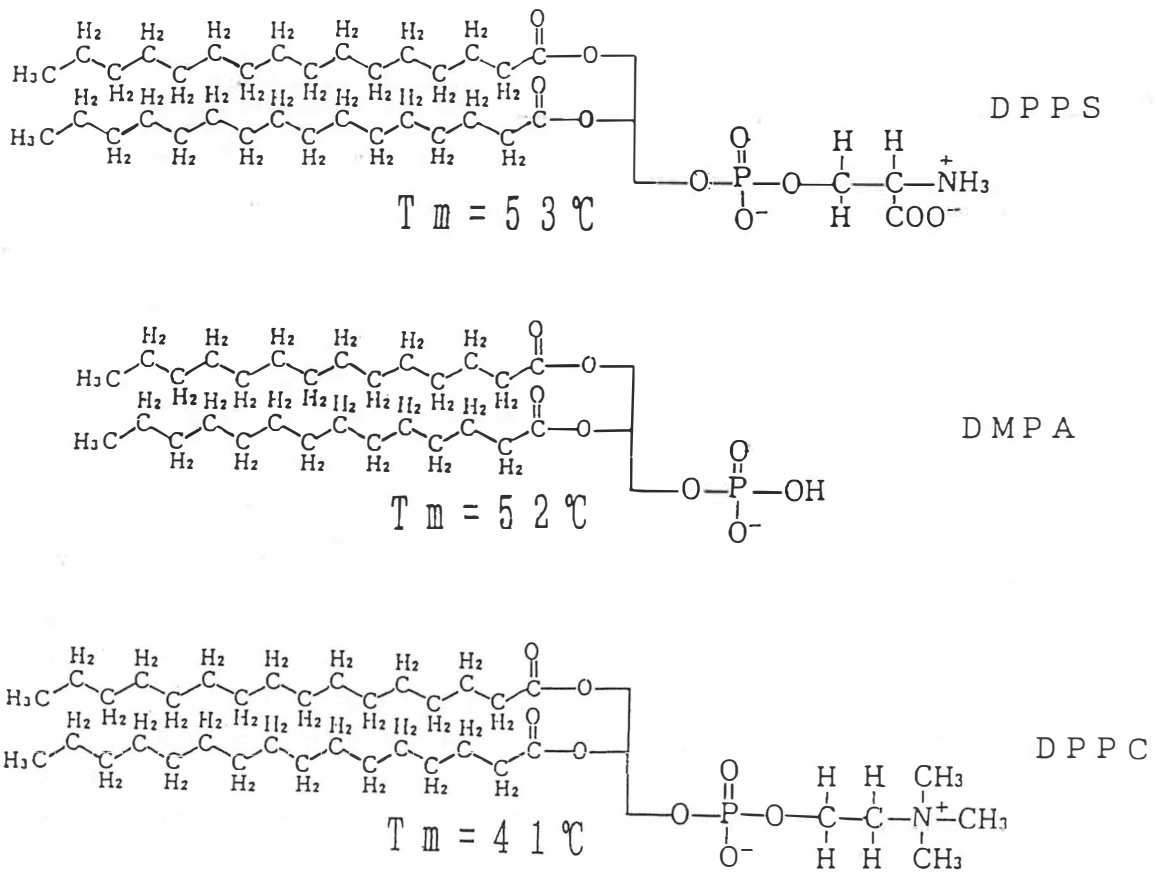


Fig. 1 Chemical structures of phospholipids
DPPS: dipalmitoylphosphatidylserine. DMPA: dimyristoyl phosphatidic acid. DPPC: dipalmitoylphosphatidylcholine.
DPPS and DMPA are acidic phospholipids, and DPPC is a neutral phospholipid.
Tm indicates main phase transition temperature of each phospholipid.

種々の物理的または化学的な因子は生体膜の構造と物性を介して生体膜の機能に反映している。脂質膜の熱物性を示差走査熱量計（DSC＝Differential Scanning Calorimeter）で測定すると、構成する分子種およびその組成、また、膜内での分布状態に依存した相転移が観察される。これは膜に作用する物質の影響を受けるので、脂質膜の相転移挙動を解明することは、生体膜の基本的な物性の知見を得ることになる。

脂質二重層膜は液晶のスメクティック相に類似の構造であり、熱誘起型の相転移（thermotropic phase transition）を示す。リン脂質分子の脂肪酸部分は炭化水素鎖であり、相転移の主転移はこのall-trans構造にC-C結合間の異性化回転運動が始まり、gauche結合が現われるchain-meltingである。さらに、リン脂質分子の極性頭部に依存して、主転移の他にもいくつかの熱誘起型相転移を示す。代表的な合成リン脂質であるジパルミトイルホスファジルコリン（DPPC）では低温側から、結晶相（Lc）、ゲル相（Lβ'）、リップル相（Pβ'）、流動相（Lα）の相構造を取る（Fig. 2）。

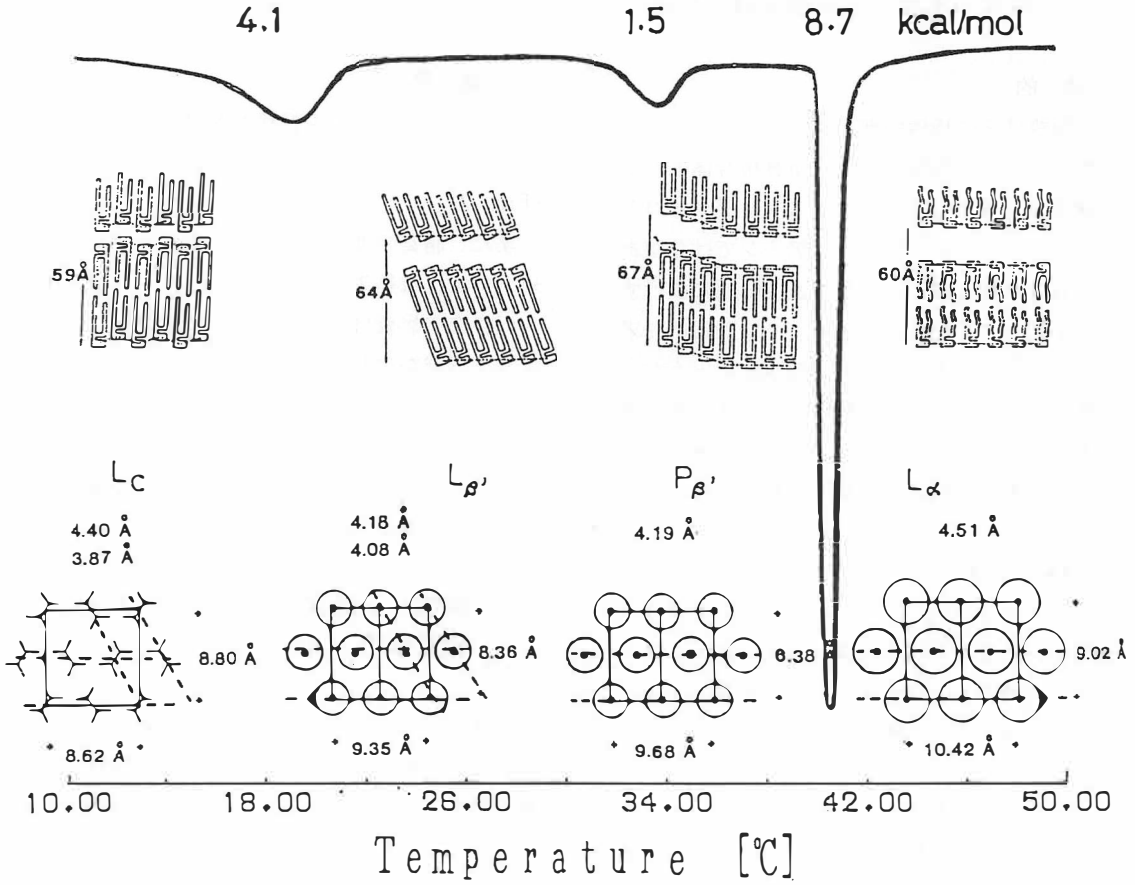


Fig. 2 Thermogram and unit structure of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) membrane
Top: thermogram measured by DSC.
Middle: arrangement of phospholipid molecules (side view)
Bottom: Unit structures obtained by X-ray diffraction (top view)
Lc, Lβ', Pβ', Lα indicate crystal phase, gel phase, ripple phase and fluid phase, respectively.

ここで、ゲル相と流動相の間の主転移が脂肪側鎖の融解に相当しており、この相転移に伴う物性の変化がもっとも顕著である。

リン脂質二重層膜の相転移温度はその分子種で決定し、極性基部分が共通であれば、その脂肪側鎖の種類によっている。脂肪側鎖に不飽和結合として、二重結合を導入すると脂質分子の充填構造を崩すために、分子間のファンデルワールス引力を低下させ、相転移温度が低下する。二重結合は折れ曲がるcis型の方が直線のtrans型よりも大きく転移温度を降下させる。

3 リン脂質の水和による脂質膜の形成

3.1 目 的

リン脂質はその極性頭部が水和することで水中に分散し、その両親媒性により脂質集合体としての膜構造を形成する。水和はホスファチジルコリンとホスファチジルエタノールアミンでは差があり、後者は水和し難く、主転移と協同的に進行することが知られている。そこで、リン脂質の粉末に水を添加し、種々の条件下での水和にともなう膜形成（ミエリン形成）と相転移の関係を光学顕微鏡下に観察し、これより分子レベルの条件とマクロな分子集合体構造との相関を検索する。

3.2 材料と方法

[材料]ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC)、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン（DMPE）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（DPPE）、ジパルミトイルホスファチジルセリン（DPPS）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（DPPG）、ジパルミトイルホスファチジン酸（DPPA）はシグマ社から購入した。

[方法]ニコンBiophotoノマルスキー微分干渉顕微鏡に浜松ホトニクスCCDカメラセット C3077CCDカメラを接続し、画像処理システム｛ビデオテープレコーダーSONY SLV-SR7、RGB カラーモニター SONY PVM-1444Q、カラービデオプリンター SONY UP-1800、Apple マッキントッシュ Quadra840AV、カラーモニターICMLS-2617FN、Appleマッキントッシュ Quadra610、光磁気ディスク コバルCS-M120W、カラープリンター YHPデスクライター550C、レーザープリンター 沖 MICROLINE800PSIILT、カラーイメージスキャナ エプソン GT-6500、8ミリビデオカメラ ソニーCCD-TR3｝で解析した。温度制御は顕微鏡用ウォームプレートを用い、温度測定はマルチ温度計 アドバンテストTR2114で行った。

窪みをもつスライドガラスに脂質の粉末を取るか、脂質の薄膜を形成し、水または緩衝液の数滴を滴下し、温度変化による脂質の変化の様子を顕微鏡で観察し、ビデオに録画して解析した。

3.3 結 果

DPPCの粉末はその主転移温度以上になると水和過程が進行し、ミエリン形成が観察された(Fig. 3)。

また、脂質の薄膜を形成して水和させたときは、以下のような結果を得た。DPPCはカルシウムイオンの存在の影響は受けずに、主転移温度以上でミエリン形成が生じ多重層ヴェシクルが生じた。DPPE、DMPEではミエリン形成の直後に集合して凝集塊となった。DPPA、DPPGなどの酸性リン脂質ではコントラストが低く積層数の少ない多重層ヴェシクルが形成された。

4 酸性リン脂質と塩基性ペプチドの相互作用

生体膜では、内在性膜蛋白質は疎水性相互作用で、表在性膜蛋白質は静電相互作用で脂質二重層膜に結合している。そこで、この相互作用の基本的な様式を脂質の相転移を利用して塩基性ペプチドとホスファチジルセリンの系で調べた。ポリリジンはジパルミトイルホスファチジルセリン（DPPS）の相転移温度を上昇させたのに対して、ポリアルギニンは低下させた。これらの相転移挙動の変化はそれぞれのペプチドに特徴的であり、その解析により相互作用の様式を推測した。

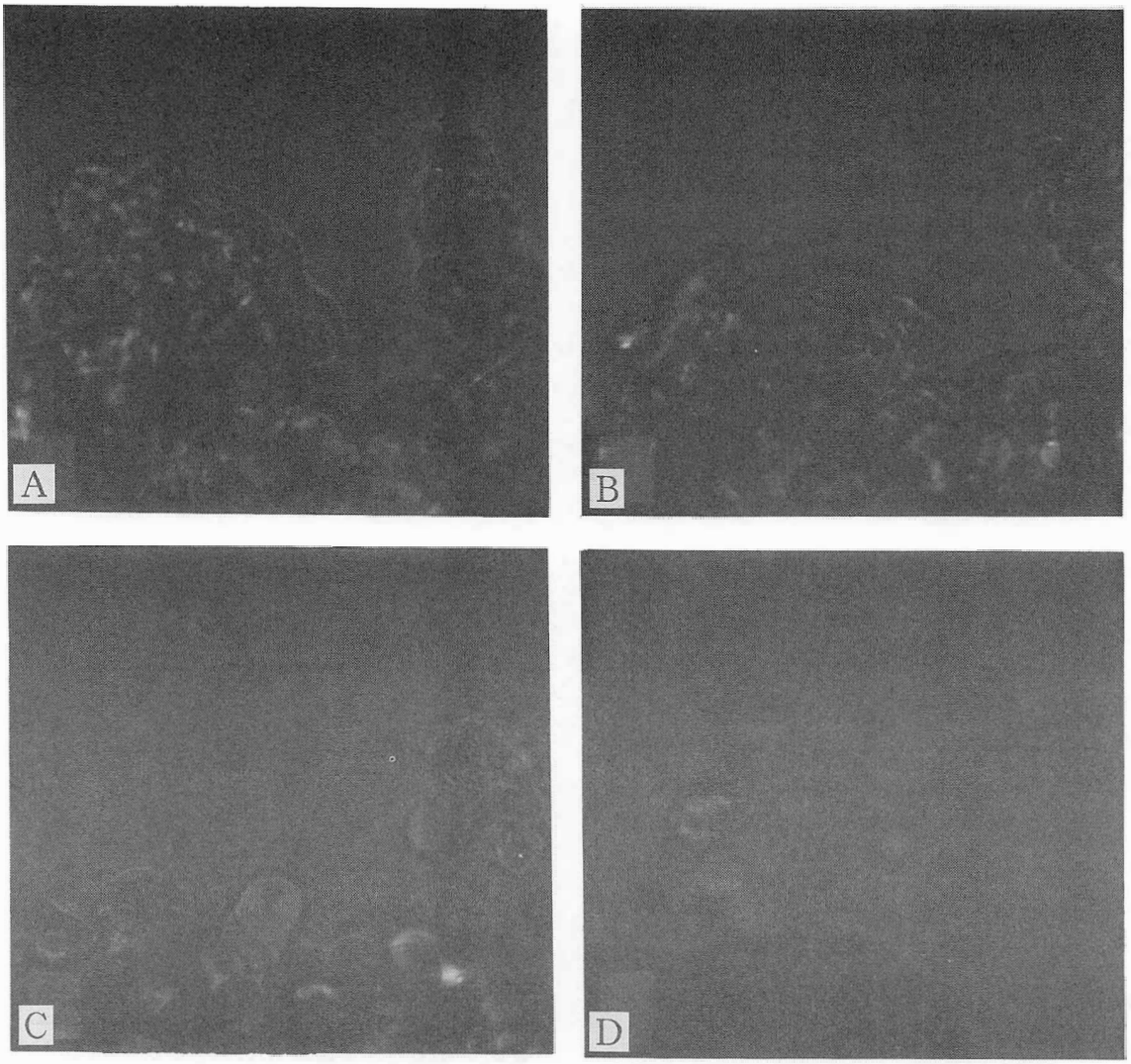


Fig. 3 Hydration of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)
The hydration process is accompanied with phase transition.
A: Below the phase transition temperature.
C: Avove the main transition temperature, hydration was proceeding.
B:Above the main transition temperature, hydration process just started.
D:Above the main transition temperature, the hydration was completed. The hydration process was observed by an optical microscope, and the process was recorded on a video tape.

4.1 目 的

生体膜には正味に中性なリン脂質に加えて負電荷が残る酸性リン脂質が存在し、膜蛋白質との静電的な相互作用を介して、その機能に重要な役割を担っていると考えられる。そこで、このような蛋白質に含まれ正電荷をもつ塩基性アミノ酸のリジンとアルギニンのポリマーを用いて、ホスファチジルセリンとの静電的な相互作用について、DPPSの相転移挙動の変化を示差走査熱量計(DSC)で測定することで検索した。

4.2 材料と方法

［材料］DPPS(DL-dipalmitoylphosphatidyl-L-srine)、ポリリジン(poly-L-lysine；平均重合度=120)、ポリアルギニン（poly-L-arginine；平均重合度=215)はいずれもSigma社より購入した。これらの化学構造をFig. 4に示す。

［リポソームの調製］脂質のクロロホルム溶液をガラス容器に取り、窒素気流下、さらに減圧下に溶媒を留去し、内壁に脂質の被膜を作る。これに緩衝液（HEPES 50mM；pH7.4）を加えて、浴槽式超音波発振機で80℃、２分間の処理によりリポソームを調製した。

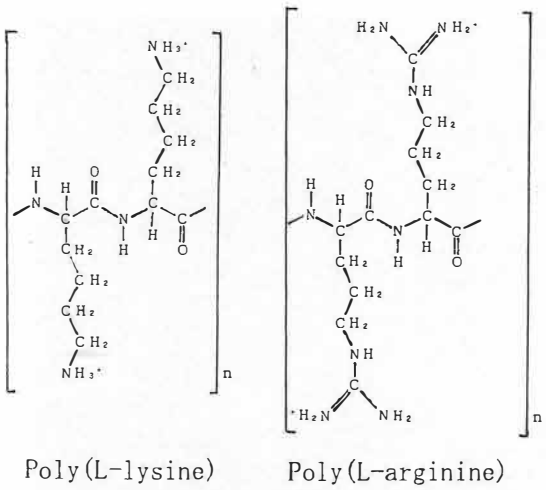


Fig. 4 Chemical structure of poly (L-lysine) and poly (L-arginine) Average numbers of polymerization are 120 and 215 for poly (L-lysine) and poly(L-arginine), respectively.

［DSC測定］0.5mlの試料を用い、プリバロフ断熱型高感度微小示差走査熱量計DASM-4により、昇温速度0.5K／minで測定し、サーモグラムを得た。試料液内の発泡を防ぐためには窒素で２気圧に加圧した。

4.3 結　果

酸性リン脂質のDPPSのリポソームはEDTAの存在下では52.6℃と53.9℃に明瞭に分離した相転移ピークをもつサーモグラムを示した。DPPSリポソームにポリリジンを添加すると、54℃付近に転移ピークが現われ、ポリリジンのDPPSに対する電荷比が 0.15、0.25、0.5、0.75と増加すると、このピークが成長し、本来のピークは減少した(Fig. 5)。

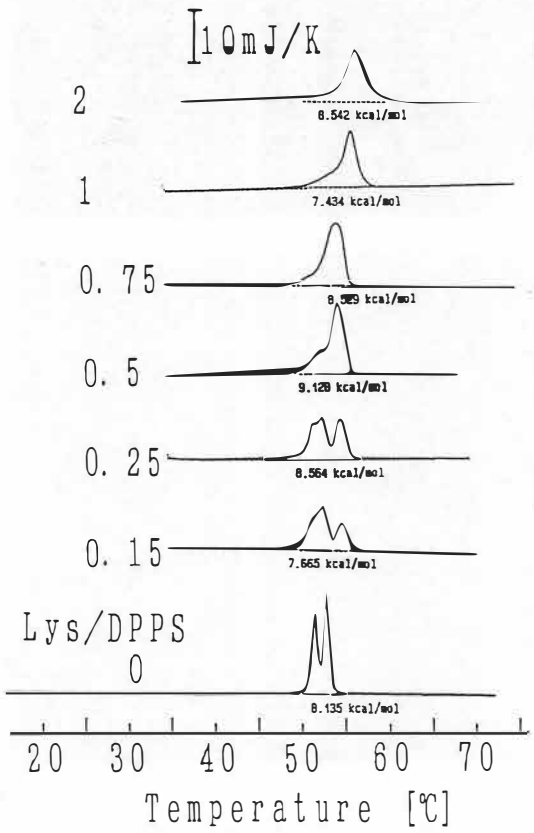


Fig. 5 Effect of poly(L-lysine) on thermograms of dipalmitoylphosphatidylserine DPPS liposomes were prepared by dispersing 2μmol phospholipid in HEPES buffer (50mM HEPES, 5mM EDTA；pH7.3) containing desiredamount of poly (L-lysine) at 80℃.
The numbers indicate molar ratio of L-lysine residue to DPPS.
Thermograms were obtained after the incubations at a heating rate of 0.5K/min.

これはDPPSにポリリジンと結合した領域と結合していない領域があり後者の領域が拡大していく

と理解できる。電荷比が1になるとそのピークは57℃に移行し、電荷比2ではさらに58℃へと上昇した。一方、ポリアルギニンの添加ではまず電荷比0.15でわずかな転移の上昇があり、0.60まで降下して52℃付近のピークとなった。さらに、ポリアルギニンを増し、0.65を越えると49℃付近のピークが成長して52℃のピークと置き換わり、0.90からは、さらに転移温度が降下し48℃となった(Fig. 6)。

4.4 考 察

DPPSは酸性リン脂質であり生理的な条件下で負電荷をもつ。そのためカチオンの影響を受け易く、緩衝液に含まれる微量の2価金属イオンのために幅の広い相転移を示す。EDTAを加えて金属イオンを除去すると先鋭な転移ピークとなるだけでなく、近接した2本の相転移ピークとなる。これらはpHに依存して転移温度を変えたことからDPPSの極性頭部の異なる解離状態による分裂と推測される。

酸性リン脂質であるホスファチジン酸およびホスファチジルグリセロールに及ぼすポリリジンの影響と比較して、今回のDPPSに対する効果を考察する。ポリリジンをジパルミトイルホスファチジン酸（DPPA）にアミノ酸残基と脂質の電荷比1で添加したときは、その相転移温度を20度上昇させていた。DPPSではその上昇はおよそ5度に過ぎず、これはホスファチジルグリセロール（DPPG）に添加した場合の相転移温度の上昇に等しい。ポリリジンを添加すると高温側に転移ピークが現われ、添加量に比例して本来のピークが減少し、高温側のピークが成長するのはDPPAの場合と一致している。X線回折による研究ではDPPAの多重層膜の膜間にポリリジンがβ構造を取って入り込んだ構造が得られており[2]、DPPSではαヘリックスを取っているために、脂質とペプチドの相互作用が弱いと推測できる(Fig. 7)。

また、ポリリジンの脂質膜上の構造はDPPGではαヘリックスとβシートの共存であると報告されており、αヘリックスは二重層膜内の脂質分子の配列および分子運動に対する束縛が小さいと想像される。

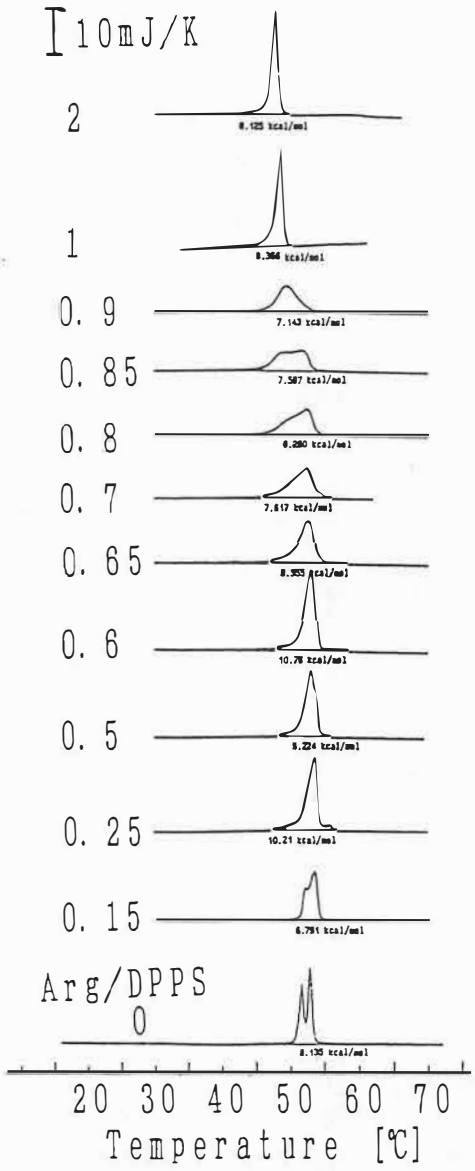


Fig. 6 Effect of poly(L-arginine) on thermograms of dipalmitoylphosphatidylserine (DPPS)
DPPS liposomes were prepared by dispersing 2μmol phospholipid in HEPES buffer (50mM HEPES, 5mM EDTA; pH7.3) containing desired amounts of poly (L-arginine) at 80℃.
The numbers indicate molar ratio of L-arginine residue to DPPS. Thermograms were obtained after the incubations at a heating rate of 0.5K/min.

ポリアルギニンの酸性リン脂質膜上の構造は不

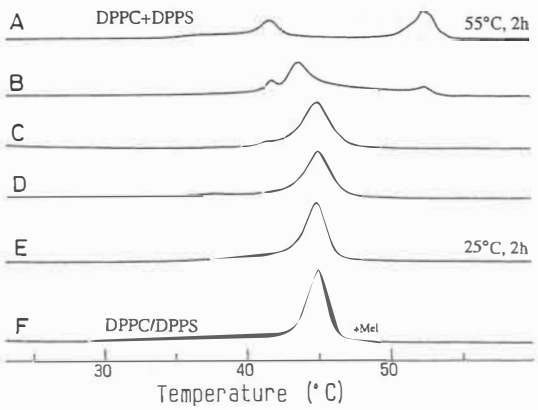


Fig. 7 Membrane fusion detected by change in DSC thermograms
DPPC liposomes were prepared by (50mM HEPES, 5mM EDTA ; pH7.3) containing (A)0mM, (B)0.02mM, (C)0.04mM, (D)0.06mM and (E)0.06mM melittin.
In the absence of melittin, DPPS liposomes were prepared in the same method. DPPC and DPPS liposomes were mixed and incubated for 2h at (a)-(d) 55℃ or (e) 25℃. (F) Liposomes of equi molar mixture of DPPC and DPPS were prepared in 0.06mM melittin at 80℃.
Thermograms were obtained after the incubations at a heating rate of 0.5K/min.

明であるが、相転移温度を低下させることから、膜内脂質分子のパッキングを緩和させるような構造と相互作用を考える必要がある。

これらの結果は、脂質と蛋白質の相互作用にアミノ酸構成による特異性が存在することを示唆するとともに、生体膜における蛋白質の機能発現の機構に静電的な相互作用を介した脂質の関与があることを示している。

5 蜂毒メリチンによる酸性リン脂質膜と中性リン脂質膜の膜融合

塩基性アミノ酸残基と疎水性領域をもつペプチドである蜂毒メリチンは、酸性リン脂質と中性リン脂質の間の膜融合を惹起することを示差走査熱量計（DSC）を用いた実験で示した。これは、細胞の分泌顆粒の膜にホスファチジルセリンが含まれることや、細胞が刺激を受容したときホスファチジン酸を生成することから、細胞内に塩基性アミノ酸と疎水性領域をもつ蛋白質を介した膜融合が誘起される可能性を検討したものである。

5.1 目 的

膜融合は細胞の共通かつ基本的な機構として、細胞分裂、分泌、エンドサイトシス、ウィルス感染など生体膜の再配列が関与した種々の生物機能に存在している。また、細胞がレセプターを介して外部の刺激を受容すると、脂質代謝が促進され、ジアシルグリセロールキナーゼおよびホスホリパーゼDの活性化によりホスファチジン酸が生成する。一方、細胞外からホスファチジン酸を添加すると、繊維芽細胞の増殖を誘導することが示されており[3]、さらに、好中球、血小板、肝細胞、内皮細胞など多くの細胞でもアゴニスト刺激によりホスホリパーゼDが活性化されることが明らかになっている。しかし、刺激に応答した細胞で、脂質代謝の促進により生成するホスファチジン酸の役割については、まだ未知であり、その解明が重要な研究課題となっている。ホスファチジン酸の役割についてはCa_2^+イオノフォア活性を示すことを人工膜系において報告している[4]が、細胞内での生理的な条件下での活性は確認できていない。酸性リン脂質を含む脂質膜がCa_2^+で融合することは、ホスファチジン酸やホスファチジルセリンなどについてリポソーム系の実験ではよく研究されているが、実際に細胞内でこの機構が作用していることの証明はまだ充分ではない。これに対して、蛋白質による膜融合の機構は解明が進展している。そこで、ホスファチジン酸の役割として、細胞内に塩基性アミノ酸残基と疎水性領域をもつ蛋白質またはペプチドが存在したときに膜融合を誘起するとの仮定のもとに、中性リン脂質のホスファチジルコリン(DPPC)と酸性リン脂質のホスファチジルセリン(DPPS)およびホスファチジン酸(DMPA)でリポソームを調製し、蜂毒メリチンを塩基性アミノ酸と疎水性部位をもつペプチドとして用い、断熱型高感度示差走査熱量計(DSC)で測定した相転移挙動の変化により膜融合を検索した。

5.2 材料と方法

ジパルミトイルホスファチジルセリン（DPPS）、ジミリストイルホスファチジン酸（DMPA）、メリチン(純度85%）はSigma社より、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）は日油リポソームより購入した。リポソームは、脂質で被膜した試験管に脂質濃度が2mMになるように緩衝液（HEPES 50mM, pH7.4；EDTA 5mM)を加え、浴槽型発振器により70℃で2分間、超音波処理して調製した。EDTAはメリチンに含まれるホスホリパーゼ活性を抑制するために加えてある。

示差走査熱量測定は、プリバロフ断熱型高感度微小熱量計（DASM-4）を用いて、昇温速度0.5K／minで行った。試料液の発泡を抑えるために2気圧に加圧した。

5.3 結果と考察

一般にリン脂質は水に分散させると自発的に膜構造を取り、極性頭部と脂肪酸側鎖の組合せで決定する分子種に依存した温度で相転移を示す。

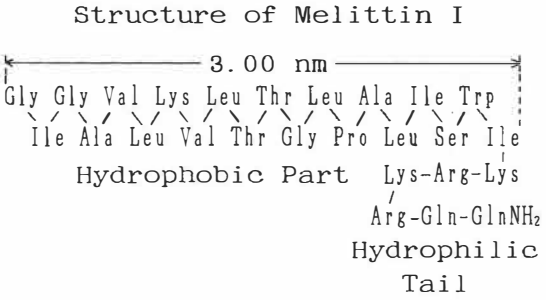


Fig. 8 Chemical structure of bee venom melittin

一方、蜂毒のメリチンはFig. 8に示すように、26残基で構成されるペプチドであり、アミノ末端から20残基でαヘリックスを形成させると疎水的なアミノ酸が片側に集中している。また、カルボキシル末端には塩基性アミノ酸のリジン(Lys)とアルギニン（Arg）が2残基ずつあり、正電荷を帯びている。したがって、メリチンの疎水性領域がDPPCと疎水的な相互作用を、塩基性アミノ酸残基が酸性リン脂質の負電荷と静電的な相互作用し、両リポソームの膜融合を誘導するものと予測して実験を実施した。この予測を支持する報告もあり、酸性リン脂質のカルジオリピンを30mol%含むリン脂質のリポソームは、Ca_2^+で融合させるには10mM以上の濃度が必要であるのに対して、メリチンではμMのオーダーでよいことが示されている[5]。

DPPCは42℃、DPPSは53℃付近で脂肪酸側鎖の融解による相転移、つまり、主転移を示す。

また、DPPCとDMPAを混合した状態で水に分散させると、そのリポソームは DPPCとDPPS のmiscibiltyに依存した脂質2成分系（binary mixture）の相図（相転移と相分離）を示すことになる。

DPPCとDPPSの組合せはmiscibilityが高いので、一つの相転移を与える。そこで、DPPCとDPPSの各脂質成分でリポソームを別々に調製して混合した系では、膜融合のないとき各成分の相転移が維持され、膜融合が生じたとき一つの相転移となる。

したがって、示差走査熱量計（DSC）でこれらの系の相転移挙動を測定すれば膜融合の進行を検索できる。

それぞれ、独立に調製したDPPCとDPPSのリポソームを混合して、55℃で2時間インキュベートしたとき、42℃付近と52℃付近に相転移のピークが観察される（Fig. 7A; DPPC＋DPPS)。この相転移のプロファイルはDPPCとDPPSの単純な重ね合わせに近いものであり、それぞれの転移は分離して観察されている。このことはDPPCとDPPSの間に膜融合が生じていないことを示している。また、全てのリポソームが膜融合したときに得られるサーモグラムとして、DPPCとDPPSの混合脂質から3モル%のメリチン存在下で調製したリポソームの相転移挙動を示してある（Fig. 7F; DPPC／DPPS)。

メリチンによるDPPCとDPPSの膜融合は、先にDPPCのリポソームにメリチンを添加し、これにDPPSリポソームを混合してインキュベートしたとき効率的に進行した。このような系での実験結果がFig. 7B-Eに示してある。添加したメリチンの濃

度に依存して膜融合により生じるDPPC／DPPSの２成分混合系の相転移ピークが45℃付近に現われた。３モル%になると、その転移ピークは完全な膜融合が生じたときのサーモグラムであるFig. 7Fの相転移ピークとほぼ一致しており、DPPCとDPPSの膜融合が完了していることを示した。一方、インキュベーションの温度をDPPCおよびDPPSがともにゲル相にある25℃に低下させても（Fig. 7E)、55℃のサーモグラムと差のない結果が得られており、この膜融合は脂質膜の相構造には依存しないことも示された。

酸性リン脂質をDMPAに置き換えた系で同様な実験を実施したが、その結果は、DPPCとDPPSの場合とほとんど一致していた。

これらの結果は、PSを含む細胞の分泌顆粒の形質膜との膜融合にカルシウムイオンだけでなく蛋白質またはペプチドが関与している可能性だけでなく、刺激を受容した細胞内に生成するホスファチジン酸がペプチドまたは蛋白質の介在のもとに、細胞内での膜融合現象を惹起している可能性も示唆している。

6 総 括

コスメトロジーがヒト表皮の細胞を対象としている限り、細胞を構築する生体膜への作用を考慮せざるをえない。ここでは、生体膜の主要な構成成分である脂質と蛋白質に注目して、その基本的な物性についての研究を行った。とくに、生物に必須な水との関係を重視し、脂質の水和についての研究も実施した。生体膜は生物機能が行われる場であり、この機能が物性の影響で変化することは一つの機能制御の機構と考えられる。そこで、この観点からリン脂質の物性の解明がコスメトロジーへの応用の端緒を開くものと期待したい。

文 献

1. 野澤義則、大木和夫「生体膜のバイオダイナミクス」羊土社、1993
2. Takahashi H., Matuoka S., Kato S.,Ohki K., and Hatta I., *Biochem. Biophys. Acta.*, 1069 229-234 (1991)
3. Moolenaar W.H., Kruijer W., Tilly B.C., Verlaan I., Bierman A.J. and de Laat S.W. *Nature.*, 223 171-173 (1986)
4. Ohki K., Nagaoka S., Sogami M. and Nozawa Y. *Biochem. Biophys. Acta.*, 39 237-249 (1986)
5. Eytan G.D. and Almary T. *FEBS Lett.*, 156 29-32 (1983)

化粧品基本素材金属酸化物の酸性大気汚染物質との相互作用

千葉大学理学部
金　子　克　美

The transition metal oxide powders such as ZnO and TiO_2 which have been widely used as cosmetic materials, were prepared. Also a new preparation method of uniform Ti-doped α-Fe_2O_3 films was developed in order to get accurate informations on the excited states upon photoirradiation. Their surface and crystalline states were examined by X-ray diffration, X-ray photoelectron spectroscopy, UV spectrocopy, electrical conductivity measurement, and Ar or N_2 adsorption at 77K. The adsorption of NO on ZnO and TiO_2 was measured at 303K and the effect of photoirradiation on the NO adsorption was examined by a volumetric method and in situ FT-IR spectroscopy. The photoirradiation gave rise to a marked chemisorption, which produced new IR bands due to the oxidized species of NO adsorped. A perfect deactivation of the surface of ZnO and TiO_2 should be preferable to avoid the formation of acidic species of atmospheric pollutants of NO under the photoirradiation condition. The doping of Ti in α-Fe_2O_3 changed the UV absorption according to the valence controll was clearly shown.

1　緒　言

α-FeOOH、α-Fe_2O_3、ZnOおよびTiO_2などの遷移金属酸化物はファウンデーションあるいはUVケアとして広く化粧品に用いられている。同時に、これらの酸化物は著しい表面活性を示し、光触媒作用も知られている。

化粧品として利用されるときには、不活性膜によりコートされているが、分子次元での完全被覆は困難である。従って、これらの酸化物の表面活性が化粧品の品質に深い関連を持つであろう。

一方、SO_2やNO_xによる大気汚染は一向に改善されないので、皮膚環境の重要因子として考慮すべきである。特に、自動車排ガスによるNO汚染が深刻である[1-3]。申請者の研究によれば[4-9]、α-FeOOHとα-Fe_2O_3はSO_2および NOに対して著しい化学吸着性を持ち、酸化物表面酸素と反応して、SO_3^{2-}-SO_4^{2-}、NO_3^-あるいはNO_2^-となる。これらは水分子と容易に反応して強酸になる。このような酸化物上での大気汚染物質からの強酸生成は化粧品の機能に深く関わってこよう。本研究では、上述のような観点から、化粧品素材酸化物のNOに対する化学吸着性と光照射効果を検討し、化粧品の一層の改善に資するものとする。

特にNO_xによる汚染の進行により、都市部の大気汚染環境は十分快適とは言えなくなりつつある。NO_x汚染の大きな問題は、自動事道路や駐車場に限らず、家庭の中でも考慮しなければならない点である。住宅事情が変わって、閉鎖的住環境になり、台所のNO_x濃度がしばしば基準値を越えている。強い日光の下では、いつそう著しい大気汚染の影響を受けるであろう。従って、本研究では化粧品と大気汚染物質との相互作用を検討する。先に述べたように、ZnOあるいはTiO_2等の酸化物上でのNOの化学吸着状態だけでなく、化粧品素材酸化物の光学特性が重要であるので、α-Fe_2O_3等については膜状試料合成法を開発してTiドープによる原子価制御からのUV吸収の変化を調べた。更に大気中ではミクロ孔とメソ孔が水蒸気を多量に吸着して、大気汚染酸性物質と作用して強酸を生ずる可能性もあるので、細孔性にも留意した。

Interaction between cosmetic metal oxides and acidic pollutants

Katsumi Kaneko

Chiba University, Faculty of Sciencs, Department of Chemistry

2 実 験

2.1 試 料

ZnO微結晶は$Zn(COO)_2 \cdot 2H_2O$を450℃、10h、空気中の条件で分解して冷却後、改めて600℃、4.5hr、加熱分解して得た試料を用いた。

TiO_2微結晶は$Ti(O\text{-}iPr)_4$エタノール溶液に水・HCl・エタノール溶液を滴下した水酸化物ゾルを500℃、1h、焼成して得た。

Tiドープα-Fe_2O_3薄膜の試料は、$Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$、$Ti(O\text{-}iPr)_4$、 2メトキシエタノールの混合溶液をスピンコート法で薄膜化し、500℃、1h、空気中で加熱して得た。NO(99.7%)を白色固体のNOが得られるまで、liq-N_2及びドライアイスーエタノールトラップによる蒸留操作を繰り返してから用いた。

2.2 試料のキャラクタリゼーション

CuKα線を用いるX線回折(理学電機自記X線回折装置ガイガーフレックス2028) により試料の結晶構造並びに結晶子径を求めた。TG・DTA(理学電機示差熱天秤TG-DTA)にて、5℃／min.の昇温速度で試料の構造安定性を調べた。試料の比表面積あるいは細孔性は、77KにおけるN_2あるいはAr吸着等温線から決定した。

2.3 紫外可視光吸収特性

微結晶試料の紫外可視光吸収スペクトルの測定は、日立ダブルビーム分光光度計200-10を用いた。試料5%をKBrに混合して、200kgw／cm^2可圧成型して得た100mgディスクを用いた。薄膜試料は加圧成型することなくそのまま測定した。

2.4 光電気伝導度測定

微結晶試料の電気伝導度測定は、微結晶試料を200～250kg／cm^2にて加圧し、13φディスクに成型後、ディスク両面にAlを真空蒸着した。両Al電極には、Ni線を取り付け、110℃、2hr、の真空前処理後、dc電気伝導度を微小電流計（アドバンテスト社微小電流計R8340）にて測定した[10]。光電気伝導性については、赤外除去用にガラスフィルター（東芝IRA-255）を用いてXeランプ（450w）によって、光照射し、その時の電気伝導度を測定した。

2.5 表面キャラクタリゼーション

77KでのArもしくは N_2吸着等温線を容量法あるいは重量法により測定をした。試料の吸着前の真空前処理は110℃、2hであった[11, 12]。Tiドープα-Fe_2O_3薄膜の表面電子状態についてはMgKαを用いるX線光電子分光装量(島津ESCA-80) によってXPSスペクトルを決定した[13, 14]。

3 実験結果と考察

3.1 合成酸化物の結晶状態

3.1.1 ZnOとTiO_2

ZnOのX線回折図には全て、ZnOによるシャープなピークが見られた。ミラー指数によると六方晶形に属する通常の ZnO結晶であった。各ピークの半値幅からScherrer式を用いて求めた平均結晶子径は120nmであった。X線回折によれば合成したTiO_2はアナターゼ型構造を有している。一般にアナターゼ型がルチル型より光触媒活性が高いので、アナターゼ型を得ることを目的とした。ゾルゲル法で調製したが、500℃焼成によれば残留炭素はほとんど見られなかった。半値幅から求めた平均結晶子径は210nmであった。TG・DTAによればZnOおよびTiO_2ともに500℃までは安定である。

3.1.2 Tiドープα-Fe_2O_3

α-Fe_2O_3格子にTi^{4+}イオンをドープすると、欠陥化学反応によってFe^{2+}が生成するといわれ、Fe^{3+}とFe^{2+}が混合し、その異なる原子価のFeイオン間をd電子がホッピングする混合原子価が実現する。これは可視吸収特性の制御につながる重要なものである。従来は微細結晶でのTiドープα-Fe_2O_3の研究が主であったが、本研究では光散乱効果の少ない薄膜状態のTiドープα-Fe_2O_3を調製した。ただし、この系でのNO吸着性の検討は今後の課題である。

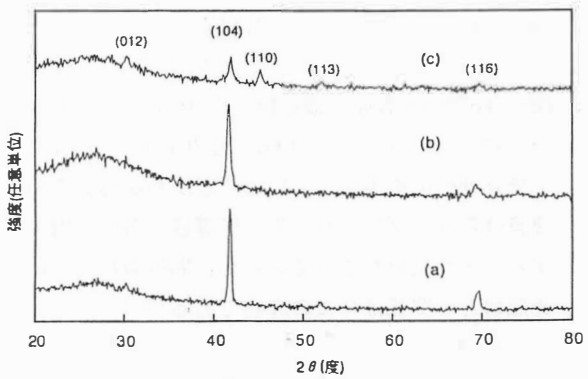


図1　Tiドープα-Fe_2O_3薄膜のX線回折図
(a) α-Fe_2O_3
(b) 5%Tiドープα-Fe_2O_3(Ti/Fe=0.05)
(c) 10%Tiドープα-Fe_2O_3(Ti/Fe=0.1)

図1はTiドープα-Fe_2O_3薄膜のX線回折図である。薄膜の厚さは1μmである。α-Fe_2O_3とTi5%ドープ試料は配向性のよい膜であるために、104と116反射しか観察されない。Tiドープでは配向性はなくなる。10%ドープまではα-Fe_2O_3格子以外のピークはみられない。

3．2　比表面積と細孔性

ZnOとTiO_2のArあるいはN_2吸着等温線は(Ⅱ)型に近く、近似的には平坦表面と見なしてよい。

そこでBET解析により吸着等温線を解析したところZnOとTiO_2の比表面積は各々、9.0m^2/gと34.1m^2/gであった。ただし、低圧部の立ち上がりが著しく、ミクロ孔の存在も考えられるが詳細な研究はまだ行われていない。Tiドープα-Fe_2O_3薄膜については絶対表面積が小さいために信頼できる実測値が得られていないが、ミクロ孔が存在している可能性もある。

3．3　紫外可視吸収特性

ZnOでは380nmにピークがみられ、それより短波長側で吸収がみられた。380nm(＝3.27eV)はZnOの伝導帯と価電子帯のバンドギャップ間の電子励起に関係していると見られる。TiO_2は400nmより短波長側で吸収が始まり、250nmまでは明瞭なピークはみられなかった。図2はTiドープの光吸収スペクトルである。420nmと500nmにブロードなピークがみられる。420nmのピークはO^{2-}からFe^{3+}への電荷移動、500nmのピークはd-d遷移($^6A_{1g}\rightarrow{}^4T_{1g}$)によると考えられる。このd-d遷移はTiドープにより変わらないが、電荷移動バンドはTiドープにつれて減少する。Fe格子点をTiが置換してゆくためドープ量に比べて鋭敏に紫外光吸収を制御し得る。

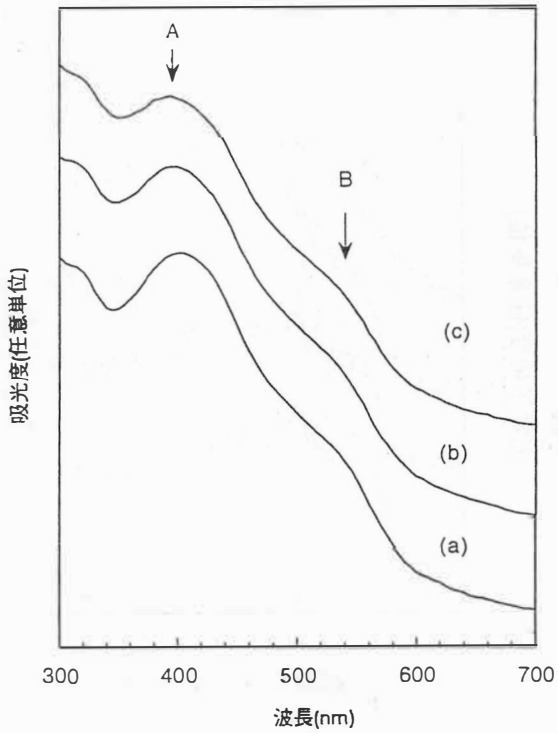


図2　Tiドープα-Fe_2O_3薄膜の光吸収スペクトル
(a) α-Fe_2O_3
(b) 5%Tiドープα-Fe_2O_3
(c) 10%Tiドープα-Fe_2O_3

3．4　Tiドープ酸化鉄薄膜の電子状態

上記の光吸収スペクトルからZnOとTiO_2は文献値とほぼ同じ吸収特性を与えることが解った。Tiドープα-Fe_2O_3はTiドープにつれて光吸収特性が変わるので、X線光電子分光法により電子状態を検討した。図3はTiドープα-Fe_2O_3フィルムのXPS原子価スペクトルである。 5eVのピークは局在3d電子に帰属され、Tiドープ量によって変化する。このピークは配位子場分裂によって

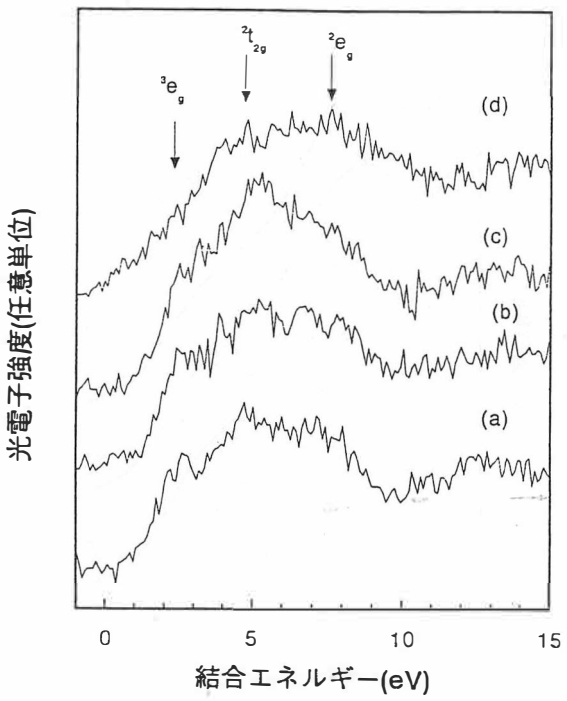


図3　Tiドープα-Fe_2O_3薄膜のXPS原子価バンドスペクトル
(a) α-Fe_2O_3
(b) 5%Tiドープα-Fe_2O_3
(c) 10%Tiドープα-Fe_2O_3

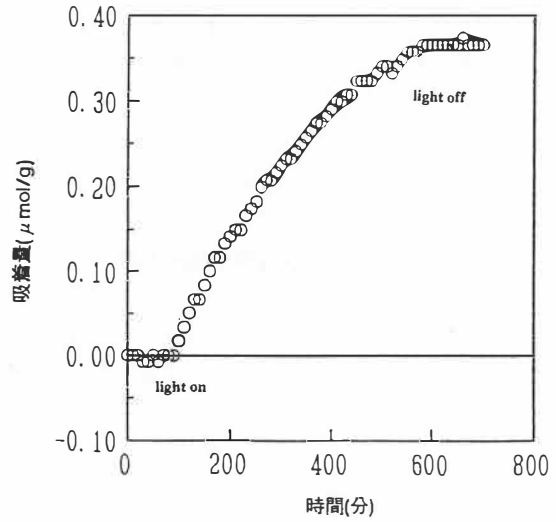


図4　10TorrNO雰囲気下のZnOの吸着に対する光照射効果

^3e_g、$^2t_{2g}$、^2e_gのピークに分離している。Tiドープにより2eVの^3e_gピークが生ずる。これはFe^{2+}-Fe^{3+}の混合原子価を持つFe_3O_4ではみられない。従って、TiドープはFe^{2+}を生成し、混合原子価α-Fe_2O_3を実現していることがわかる。この薄膜はTiドープにつれて電気伝導度が著しく増大することが見いだされているが、NO吸着ならびに光照射との関係は今後の課題である[14, 15]。

3．5　光NO吸着性と光電気伝導度

ZnOとTiO_2については電気伝導度とNO吸着を測定し、それらに対する光吸着効果を調べた[16, 17]。図4は30℃でのZnOのNO光吸着性を示す。10TorrNOを暗時120分放置後に、光を照射、更に600分後に光照射を止めた時の吸着量の変化を示している。

暗時には吸着測定感度（0.01μmol/g)内で吸着を認められないが、光照射につれて著しいNO吸着が生ずる。そして光吸着後に光照射を止めてもNOは脱離せず完全な不可逆吸着である。従ってZnOでは顕著な光化学吸着が起こるとも言える。

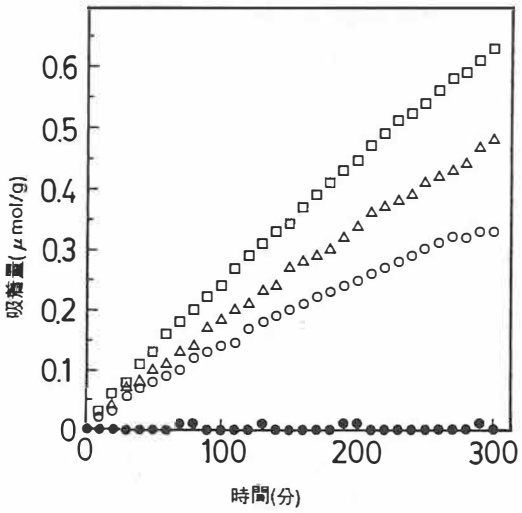


図5　ZnOへのNO吸着と光照射量との関係(30℃)
●：光照射なし　○：280W　△：380W　□：450W

図5はNO吸着が光照射量に依存することを示す。Xeランプの照射量を増やすにつれて、NO吸着量が

著しく増大し、この減少が光誘起NO化学吸着であることを端的に示している。他の光照射は全て450Wで行った。この光誘起NO化学吸着はNO圧とともに増大する。 Elovich速度式による解析を行うと初期光誘起NO吸着速度はNO圧の1／2乗に比例した。従って吸着初期にはNOが解離している可能性がある。

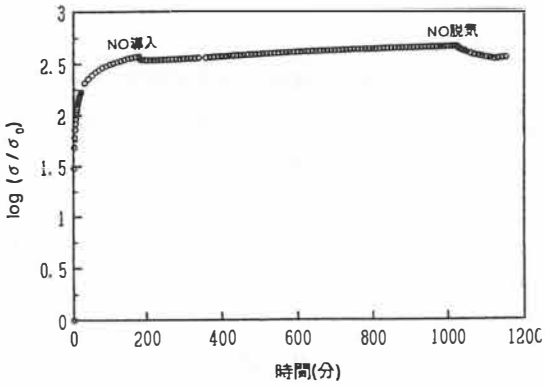


図6　ZnOの光電気伝導度のNO吸脱着時の変化

図６には光照射120分後に10TorrNOを導入したときの電気伝導度変化である。光照射によって電気伝導度が著しく増大し、NO導入時にはわずかながら減少する。さらにNOを脱気すると、電気伝導度が減少する。NOは光照射で生じた(e-, h+)ペアの電子をトラップして電気伝導度を低下させるが、NOの表面酸化物化による電気伝導度増加も見られる。図7にはNO吸着ZnOの光伝導度が光照射

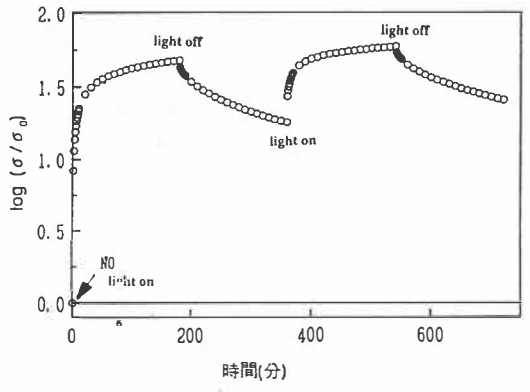


図7　NO吸着ZnOの光電気伝導度の光照射とその停止の効果

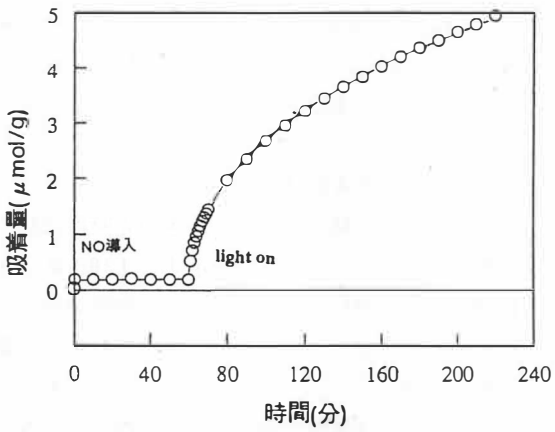


図8　光照射下10TorrNO導入時のNO吸着変化量

停止と再照射によっていかに変化するかを示す。ここではNO吸着による電気伝導度減少が全く隠されている。

図８にはTiO_2の30℃における光照射による10TorrNO導入時のNO吸着が示されている。暗時にも微量(0.2μmol／g) のNOが吸着されるが、光照射によって著しい吸着が生ずる。この吸着NOはZnOの場合と全く同様に不可逆であった。

図９にはTiO_2の光電流の10TorrNO導入に伴う変化を示す。ZnOはTiO_2の約100倍の光電流を示した

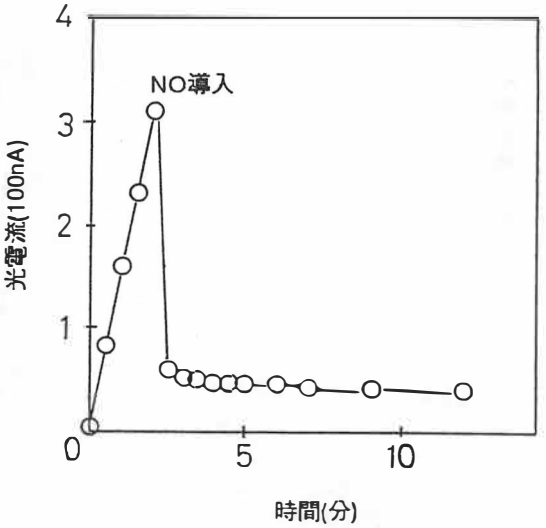


図9　10TorrNO導入に伴うTiO_2の光電流変化

が、TiO_2は0.1μAの光電流である。このため、NO吸着による(e^-,h^+)の電子トラップ効果が著しく、NO導入につれて光電流が激減し、回復しない。

3. 6 NO光化学吸着状態

■10に20TorrNOを導入したときの光照射状態でのFT-IRの差スペクトルを示す。1300cm^{-1}と1530cm^{-1}に明瞭なピークがみられ、時間が経つにつれて成長する。これらのピークはNOが化学吸着されることを示している。従来の研究によれば[6, 8, 18, 19]、金属酸化物上のNOは1500cm^{-1}付近ではM-O-NOあるいはM-O-NO_2が考えられ、1300cm^{-1}付近では、M$<^{O}_{O}>$$NO_2^-$、M-$NO_2$、あるいはM-O-$NO_2$と考えられる。従って、光照射によって、ZnOの表面酸素が活性化され、NOを酸化して不可逆に化学吸着していると見られる。同様な光誘起化学吸着によるNOの酸化物種は TiO_2でも認められた。TiO_2系では1170cm^{-1}と900cm^{-1}にピークが現れた。これらはNO_2^-様の化学吸着種と考えられるが、更に検討を加える必要がある。

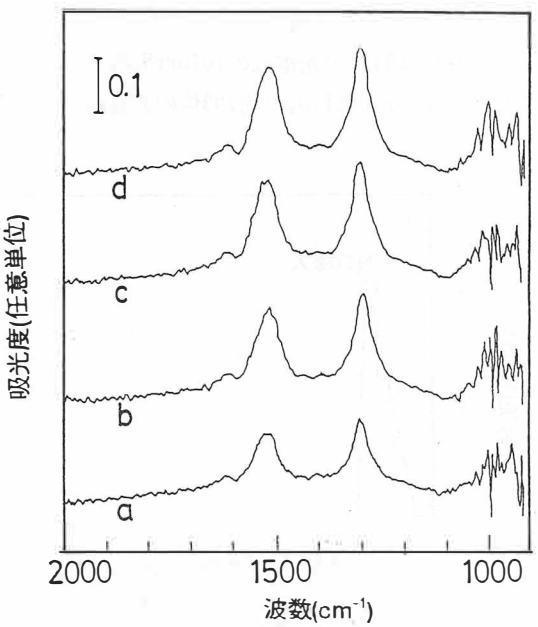


図10 ZnO上の光誘起NO化学吸着種のFT-IR差スペクトル
(a)光照射30分後-NO導入直後
(b)同60分後-NO導入直後
(c)同90分後-NO導入直後
(d)同120分後-NO導入直後

4 結 論

ZnOとTiO_2系においてもα-FeOOHで認められたように、NOの吸着時に酸化物表面の酸素と強く結合して、NO_2あるいはNO_3というNOの酸化物状態になっていることが示唆された。特にこのNO表面酸化物生成は光照射によって著しく促進されることは注目すべきである。この酸化物は吸着水と反応して硝酸等へと変化していくことが予想されるために、光活性遷移金属酸化物表面酸素の不活性化がコスメトロジーの分野で重要なことが酸性大気汚染物質との相互作用面からも示された。

本研究は完全には完結しておらず、Tiドープα-Fe_2O_3系でのNO光吸着あるいは吸着H_2OとNO化学吸着種との反応性等の研究が望まれる。

謝 辞

本研究はコスメトロジー研究振興財団よりの御援助で行われたことをここに記し、厚くお礼を申し上げる。

参考文献

1) 金子克美、新しいNO吸着剤の開発 現代化学、18 (1987)
2) 金子克美、王正明、今井潤、鉄酸化物高分散活性炭素繊維によるNO還元技術、PPM(日本工業新聞)、4 49 (1949)
3) 金子克美、酸化鉄修飾カーボンナノスペースに吸着したNOからN_2生成、触媒、36 336 (1994)
4) 金子克美, 実在固体表面の階層構造性と分子吸着機能性, 金属表面技術, 39 244 (1988)
5) N. Inoue, A. Matsumoto, T. Suzuki, S. Ozeki, K. Kaneko, "Photoadsorption of SO_2 on Synthetic Goethite α-FeOOH", *Langmuir.*, 4 774 (1988)
6) K. Kaneko, N. Inoue, T. Ishikawa "Electrical and photoadsorptive properties of valence-controlled α-FeOOH", *J. Phys. chem.*,

93 1988 (1989)

7) K. Kaneko, A. Matsumoto "Role of surface defects in the chemisorption of NO and SO_2 on variable-sized crystalline α-FeOOH", *J. Phys. Chem.*, 93 8090 (1989)

8) A. Matsumoto, K. Kaneko, "Infrared study on SO_2 chemisorption activity of crystallite-size controlled γ-FeOOH", *Colloid Surface.*, 37 81 (1989)

9) A. Matsumoto, K. Kaneko, "Gradual change in the chemisorbed NO species on α-FeOOH", *Langmuir.*, 6 1202 (1990)

10) K. Kaneko, S. Kugawa, S. Ishida, Y. Kadowaki, N. Uekawa, T. Suzuki, "Electronic and molecular dynamics of chemisorption with time-delayed injection of doner-acceptor gases", *J. Chem. Soc., Faraday Trans*, 88 1327 (1992)

11) 金子克美、気体の吸着、色材、67 115 (1994)

12) K. Kaneko, "Determination of Pore size and pore size distribution", *J. Membrane Sci.*, 96 59 (1994)

13) Z. M. Wang, T. Suzuki, N. Uekawa, K. Asakura, K. Kaneko, *J. Phys. Chem.*, 96 10917 (1992)

14) N. Uekawa, F. Mizukami, K. Kaneko, "Mixed valence formation in highly oriented Ti-doped iron oxide film", *J. Chem. Soc., Faraday Trans*, 印刷中

15) N. Uekawa, K. Kaneko, "Transition metal oxide films", *Adu. Maler.*, 7 1014 (1995)

16) K. Kase, M. Yamaguchi, T. Suzuki, K. Kaneko, "Photo-assisted chemisorption of NO on ZnO", *J. Phys. Chem.*, 印刷中

17) M. Yamaguchi, K. Kase, M. Kaneeda, N. Uekawa, K. Kaneko, "Photo-induced chemisorption of NO on Photoconductive transition meta loxides", *Chem. Phys. Lett.*, 投稿中

18) J. Laane, J. R. Uhlsen, "Characterization of nitorogen oxides by vibrational spectros copy", *Prog. Inog. Chem.*, 25 465 (1980)

19) M. A. Hitchman, G. L. Rowbottom, "Transition metal nitric complexes", *Coordination Chem. Rev.*, 42 55 (1982)

新規な構造を有するヒアルロン酸類似多糖の開発

東京工業大学生命理工学部
畑 中 研 一

Syntheses of analogous polysaccharides to hyaluronic acid were attempted in order to better understand the relationship between physical and biological properties and the chemical structure.

The polymerizable 1,6-anhydro-2,4-di-*O*-benzyl-3-*O*-1- (methoxycarbonyl) ethyl-β-D-glucopyranose (1) was synthesized by selective benzylation at C-2 and C-4 of 1,6-anhydro-β-D-glucopyranose, followed by 1- (methoxycarbonyl) ethylation with methyl 2-chloropropionate. Polymerization of 1 with phosphorus pentafluoride as initiator in methylene chloride at low temperature under high vacuum gave a stereoregular (1→6)- α -D-glucopyranan derivative. Copolymerization of 1 and tri-*O*-benzylated monomer gave copolysaccharides having various amounts of carboxylates. The calculated values of monomer reactivity ratios were 0.88 and 0.99 showing the distribution of each monomeric unit in the obtained copolymer was random. Hydrolysis of carboxylate groups was achieved by the reaction with potassium *tert*-butoxide, giving the stereoregular polysaccharide containing the carboxylic acid. However, debenzylation of the polysaccharide was unsuccessful.

1 緒 言

生理活性を有する機能性多糖の開発は最近の重要な課題であり、生体の応答性と密着した解析が必要である。しかしながら現在、機能性多糖の合成法も未熟であり、生体との相互作用のメカニズムも未開発である。本研究では、機能性多糖設計による生体応答制御のモデル系として、ヒアルロン酸類似多糖を化学合成し、皮膚との相互作用について調べる。

ヒアルロン酸は、N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸との交互共重合体構造を有するヘテロ多糖であるが、細胞間隙に水を保持するのに役立ち、皮膚の潤滑性や柔軟性を保っていると考えられている。皮下組織のヒアルロン酸が少なくなってくると、皮膚にみずみずしさがなくなり、しわがよってくる。

本研究では、ヒアルロン酸のどの様な化学構造が保水性や細胞との相互作用に関わっているのか（ヒアルロン酸様の生理活性を発現するためにはどのような化学構造が最低限必要なのか）を詳細に調べるため、アミノ基を有する糖とカルボキシル基を有する糖の共重合体を化学合成する。化学合成であるが故に、多糖ポリマー鎖上における官能基の位置や分布を自由に変化させることができるため、構造と機能の相関が（天然物と比べて）より明確にわかると思われる。

ヒアルロン酸ナトリウムとして販売されている粉末の市販品は、その水溶液の粘度や保湿性が分子量によって異なることがわかっている。また、ヒアルロン酸ナトリウムの保湿性は、周囲の環境（相対湿度）の影響を受けにくいのが特徴であることが赤坂日出道氏らにより報告された[1,2]。しかしながら、ヒアルロン酸の化学構造や高次構造が保湿性に対してどのように影響するのかを調べた報告はない。また、ヒアルロン酸類似の糖鎖化合物を化学合成しようとする試みもなされていない。

糖質工学において、天然多糖の化学修飾は古くから行われてきたが、精密構造を制御するまでには至っていない。一方、無水糖誘導体の開環重合

Syntheses of New Analogous Polysaccharides to Hyaluronic Acid

Kenichi Hatanaka

Faculty of Bioscience and Biotechnology
Tokyo Institute of Technology

やオルトエステルグリコシル化法といった優秀な多糖合成法が開発されて以来、官能基を有する多糖合成は比較的容易に行われるようになった。無水糖誘導体のうちでは、1,6-無水糖の重合が最もよく研究されていて、精密構造を有する機能性多糖合成の土台となっている。

本研究では、開環重合反応に及ぼす影響の小さいC-3位に乳酸エステル基を導入し、多糖鎖を構築することによって、ヒアルロン酸類似多糖を開発することを目的としている。

2 実 験

2. 1 モノマー合成

現在までに開環重合法によって合成された多糖の種類はかなりの数に上る。様々な糖残基の種類や結合様式のものはもちろん、水酸基を選択的に保護することで種々の置換基を位置特異的に導入することも多く行われてきた[3]。本研究の目的は、モノマーユニットにあらかじめカルボキシル基を保護した状態で導入し重合および共重合することで、位置特異的にカルボキシル基を持つ立体規則性多糖を合成することであるため、ここではD-グルコースを出発原料として、モノマーの合成を行った。1,6-β-無水環構造を持たせたのは、重合反応における立体規則性の制御が容易であるとともに、他の結合様式に較べて高い分子量のポリマーが得られることが予想されるからである。すなわち1,6-無水糖の重合は完全に1,6-開裂であり、反応を低温で行うとオキソニウムイオン機構で進行し、立体反転を伴ってα-結合のポリマーを与える。つまり、(1→6)-α-結合の立体規則性多糖誘導体が得られるのである[4]。また、無水グルコースの3位に置換基を導入した背景には、重合において3位の保護基の影響が最も小さいことが知られているとともに、1,6-無水グルコースの2位と4位を簡単に選択的保護することができるという事実がある[1]。無水糖の重合における保護基にはエーテル系保護基であるベンジル基が良好なものとして知られているため、ここでも同じ保護基を用いた。ベンジル基は液体アンモニア中ナトリウムによる還元（Birch還元）で、短時間で

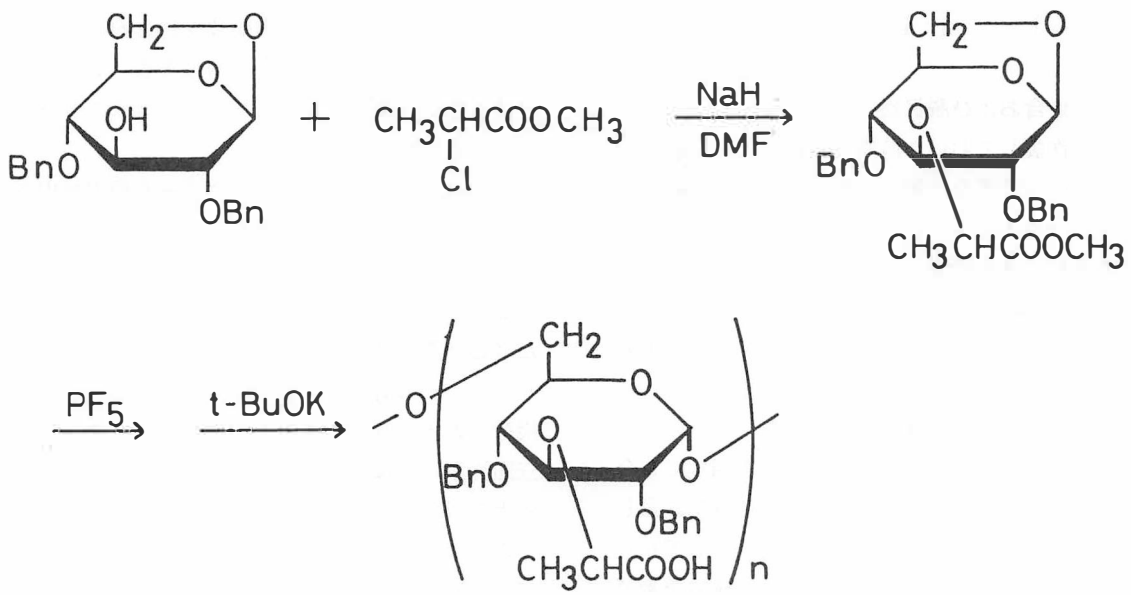


Fig. 1. Synthesis and polymerization of 1,6-anhydro-2,4-di-O-benzyl-3-O-1-(methoxycarbonyl) ethyl-β-D-glucopyranose and hydrolysis of the obtained polymer.

定量的に脱保護することができる[5,6]。

1,6-無水グルコースの合成は、かつてはデンプンや微結晶セルロースの真空熱分解によって行われていた[7]が、1984年にFraser-Reidが、6位トシル化後アルカリによって閉環させる方法[8]を開発し、1989年に大量合成法が確立されたので、ここでもそれに従うこととした。この方法の利点としては、遊離のD-グルコースを原料として極めて安価な試薬で合成できること、また容易にスケールアップできることなどが挙げられる。カルボキシル基（メチルエステルで保護）の導入は、オーソドックスなエーテル合成法により行った。天然のムラミン酸にヒントを得た1-（メトキシカルボニル）エチル基[10]を導入した（Fig. 1)。水酸化ナトリウム6.0gをn-ヘキサンで洗浄して、窒素気流下、ジメチルホルムアミド（乾燥、蒸留したもの）100mlに加え、しばらく懸濁させた後、2,4-ジベンジル化1,6-無水グルコース12.0gを加え、2時間激しく撹拌した。その後、2-クロロプロピオン酸メチル6.0mlを滴下し、3時間反応させた。反応停止はメタノール添加によって行い、常法に従って後処理した後、シリカゲルカラム（酢酸エチル：n-ヘキサン＝1：4）により精製を行った。

2. 2　重合および脱保護

予め作製しておいた溶媒管を用いて、Fig. 2のような重合装置を作製し、真空ラインに接続した。ピンホールチェック、二回の加熱乾燥の後、窒素気流下にてAを切断してモノマー化合物を導入、同じくBを切断して開始剤前駆体（ρ-クロロベンゼンジアゾニウムヘキサフルオロホスファート）を導入し、それぞれ融封した。

一晩高真空下で乾燥してから真空ラインのコックを閉じ、Cのブレーカブルシールを割って重合管を液体窒素で冷却、塩化メチレンを真空蒸留してモノマーを溶解させた。溶液を均一にしてから1時間室温のまま放置、Cのアンプルを液体窒素で冷却して塩化メチレンをもとのアンプルに戻し、凍結させた状態で真空につなぎ、Dのしぼり部を融封した。（この操作はモノマー中に微量に含まれる水などの不純物を除去するために行った。）

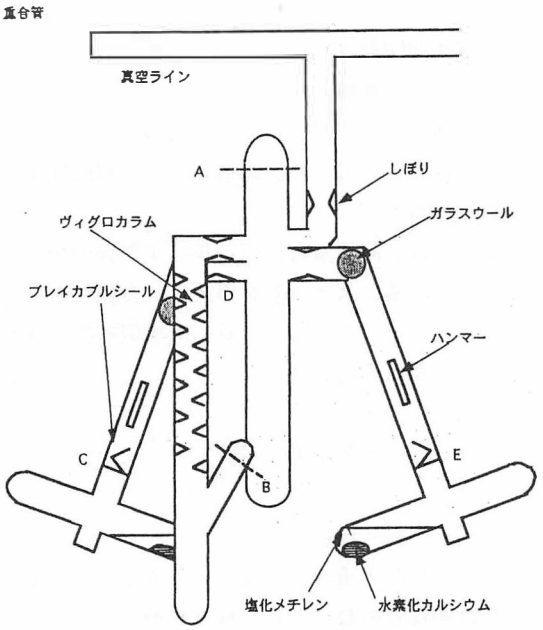


Fig. 2. Polymerization apparatus.

次にEのブレーカブルシールを割って重合管を冷却し、重合溶媒となる塩化メチレンを導入してEを切り離した。溶液を均一にしてから液体窒素で凍らせ、弱火で開始剤前駆体を熱分解させて、生じた五フッ化リンを重合管内に蒸着させた後、触媒管を切り離して脱気しながら重合管を真空ラインから切り離した。

所定重合温度に設定したエタノール恒温槽内で重合管を10分間激しく振とうし、重合反応を開始した。一定時間後、重合反応の停止は、重合管の一部を切断してメタノールを添加することで行った（この際ポリマーが生成していれば、白沈を生じる）。この溶液をクロロホルムに溶かし、10%炭酸水素ナトリウム水溶液で中和、脱イオン水で三回洗浄した後、無水硫酸ナトリウムによる乾燥、ろ過を行い、減圧濃縮した。ポリマーをクロロホルム／メタノール系で再沈精製し、ベンゼン溶液にして凍結乾燥を行った。

多糖ポリマー鎖におけるカルボキシル基の脱保護は、水を含むTHF中のカリウムt-ブトキシドにより行った。また、液体アンモニア中のナトリウ

ム金属により脱ベンジル化を試みた。

3 結果と考察

3. 1 モノマー合成

D-グルコースを出発物質とする2,4-ジベンジル体の合成は、酸化バリウムを作用させて得る既知の方法[11]に従って行った。この化合物の3位に種々の置換基を導入してカチオン開環重合性を検討した例は多く、様々な応用目的のもとに合成されている。本研究ではまず、カルボキシル基を持たせることを目的に、メトキシカルボニルメチル基の導入を、オーソドックスなエーテル合成法により試みた。反応溶媒にはジメチルホルムアミドおよびジオキサン、反応試薬にはクロロ酢酸メチルおよびブロモ酢酸メチルを検討するとともに、反応条件として温度、濃度などを検討した。しかし20回にも及ぶ予備試験を行ったもののなかなか収率の向上がみられず、むしろ全く反応しなかったり精製困難な多くの生成物を与えたりということの方が多かった。最終的にジメチルホルムアミド溶媒中でブロモ酢酸メチルを60℃で長時間反応させるという手段をとり、なんとか収率を30%以上にすることができたが、これも再現性は低かった。

そこで、30%という低収率を改善すべく、次に反応試薬を2-クロロプロピオン酸メチルに変え、ジメチルホルムアミド溶媒中室温にて同様の反応を行った。これはすなわち一級ハロゲン化試薬から二級ハロゲン化試薬に変えたことになるのであるが、結果として反応速度が著しく増大し、室温にて二時間後にはほとんど反応が終了した。この反応に関して、以前、我々は光学活性な2-クロロプロピオン酸を反応させた場合にラセミ化を伴って反応が進行することを観察し、化合物5の生成反応がSN1機構で進んでいることを証明した[10]。一般の有機化学の教科書で述べられている通り、ハロゲン化アルキルのSN1反応における反応性は第三級＞第二級＞第一級の順である。これはカルボカチオンの陽電荷を非局在化させる程度によっている。これを考慮すると、上記の反応はいずれもSN1機構をとる傾向にあり、カルボカチオンの安定性の差が実際の反応速度および収率に反映したと考えることができる。過去にメチル2-アセトアミド-4,6-*O*-ベンジリデン-2-デオキシ-α-D-グルコピラノシドの3位にクロロ酢酸[12]およびDL-2-クロロプロピオン酸[13]を反応させた例が報告されているが、単純に比較はできないもののこの場合も二級試薬のほうがはるかに収率が高くなっている。今回ラセミ体の二級試薬を用いた合成でも収率は高く、^{1}H-NMRスペクトルのアノメリックプロトンから判断すると、生成物はジアステレオマー1：1の混合物であった。

3. 2 重合、共重合および脱保護

1,6-アンヒドロ-2,4-ジ-*O*-ベンジル-3-*O*-1-(メトキシカルボニル)エチル-β-D-グルコピラノ

Table 1. Polymerization of 1,6-anhydro-2,4-di-O-benzyl-3-O-1-(methoxycarbonyl) ethyl-β-D-glucopyranose (1)[a]

No.	Initiator (mol%)	Temp. (°C)	Time (h)	Yield (%)	M_n[b] (x10^4)
1	5	-60	12	70	28.7
2	15	-60	24	46	9.8
3	10	0	24	53	-

a. Monomer concentration in dichloromethane: 0.26-0.50 g/mL; initiator: PF_5.
b. Determined by GPC.

ースの単独重合性については既に調べられているので、まず既報[10]の結果を示す。五フッ化リンを開始剤として重合を行うことにより、高収率(61.9～63.7%)で高重合度(最高で平均重合度400程度)の多糖誘導体が得られている。得られた多糖誘導体の立体規則性は、^{13}C-NMRおよび比旋光度からα-コンフィギュレーションの単一構造であると結論されている。本研究でもこのカルボキシルモノマーの単独重合を行い、Table 1に示すような結果を得た。前例よりも重合時間を短くすると、数平均分子量28.7万という高分子量ポリマーを得ることができた。これは、重合時間が長くなると残存触媒によりポリマー主鎖が切断されるということを示していると思われる。大量にモノマーを仕込んだ重合の収率および得られたポリマーの分子量低下は、モノマー仕込み濃度が低かったこと、および開始剤の量が多かったことが原因であると考えられる。ここで、低温における重合で得られたポリマーの^{13}C-NMRスペクトルにおいてアノメリック炭素(C-1)が97.4ppmのみに単一のピークを与えていること、またIRスペクトルにおいて844cm^{-1}にα-コンフィギュレーションに相当(エクアトリアルC1-Hの変角振動に由来)するピークが認められることから、得られた多糖誘導体は、α-グリコシド結合から成る立体規則性多糖誘導体、2,4-ジ-*O*-ベンジル-3-*O*-1-(メトキシカルボニル)エチル-(1→6)-α-D-グルコピラナンであると結論した。

次に、多糖鎖中のカルボキシル基含量が物性に及ぼす影響を調べることを目的として、カルボキシル基含量の異なる種々のポリマーを共重合によって合成した。カルボキシル基を有するモノマーとトリベンジル化1,6-無水グルコースとの共重合結果をTable 2に示す。重合時間を短く、収率を低く抑さえてあるのは、モノマーの反応性を調べるためである。仕込みモノマー比を変化させることによって、カルボキシル基含量が14～100%の共重合体を得た。Kelen-Tüdös法により求めたモノマー反応性比は、0.88と0.99であり、共重合体中の各モノマーユニットは、ほぼランダムに分布していると言える。

さらに、カルボキシル基を有する多糖誘導体の脱保護を試みた。カリウムt-ブトキシドで処理したポリマーの^{1}H-NMRスペクトル中には、メチ

Table 2. Copolymerization of 1,6-anhydro-2,4-di-O-benzyl-3-O-1-(methoxycarbonyl) ethyl-β-D-glucopyranose (1) with 1,6-anhydro-2,3,4-tri-O-benzyl-β-D-glucopyranose (2)[a]

No.	Mole fraction of **1** in feed (%)	Yield (%)	Mole fraction of **1** in copolymer[b] (%)
1	0	68.0	0.0
2	10	3.2	14.5
3	20	3.8	23.2
4	30	7.0	33.3
5	40	18.5	37.8
6	50	13.9	48.8
7	60	12.0	59.0
8	70	6.6	70.4
9	80	9.0	75.3
10	90	8.2	89.7
11	100	11.4	100.0

a. Total monomers, 1.17 mmol; initiator: PF_5, 5 mol%; solvent:dichloromethane, 1 mL: temperature, -60 °C; time: 1-9 min.
b. Determined by ^{1}H NMR spectroscopy.

ルエステルに帰属されるメチルプロトンの吸収が消失し、エステルの加水分解が完全に起こっていることを示した。カリウム塩とした多糖は、モノマーユニット当たり2個のベンジル基を有しているにもかかわらず水溶性で、有機溶媒には不溶であった。

バーチ還元による脱ベンジル化は、現在までのところ成功していない。前記のようにエステル加水分解生成物が水にしか溶解しないため、適当な反応溶媒がなく、不均一系となってしまうためである。また、エステル加水分解前のポリマーは有機溶媒可溶であるが、還元反応中にエステル基がアルコールにまで還元されてしまったのである。現在、接触水添による脱ベンジル化について検討中である。

3. 3 アミノ基前駆体を有するモノマーとの共重合

前述のように、ヒアルロン酸にはグルコサミン残基が含まれている。ウロン酸ユニットとアミノ糖ユニットとの交互共重合体であることから、事実上50%のアミノ糖含有率ということになる。今までに行われたグリコサミノグリカンの構造活性相関に関する研究はすべて交互共重合体であることを前提として話を進めているので、アミノ基およびアセトアミド基の活性に対する存在的必然性は、これまでほとんど議論されたことがなかった。そこで各官能基の存在量比が活性にどれだけ影響するかを調べる場合、カルボキシル基のユニットとアミノ基のユニットとの相対含量を変化させたサンプルが必要となる。そのような多糖サンプルは、現在のところ開環重合法でしか得ることができないと考えてよい。

本研究では2位にアミノ基前駆体を導入した重合性モノマーと前述のカルボキシルモノマーとの共重合によって、合成多糖鎖中にアミノ基を有するユニットとカルボキシル基を有するユニットを同時に持たせることに挑戦した。

2位にアミノ基前駆体であるフタルイミド基が導入されたモノマーは、単独重合において置換基のかさ高さ(立体障害)によってβ-グリコシド結合からなるオリゴ糖誘導体(平均重合度5〜7)を与えることがわかっている。このフタルイミド基はヒドラジン一水和物を用いて容易にアミノ基に変換することができる[14]。

予備的な実験では、アミノ基を有するユニットとカルボキシル基を有するユニットがほぼ1:1の割合でランダムに存在するコポリマーを得ることができた。詳しい構造については現在検討中である。

4 総 括

1,6-無水糖誘導体の開環重合および共重合によって、カルボキシル基を種々の割合で持つ多糖を、かなり自在に設計して合成できるようになった。しかしながら、脱保護がうまくいってないため、当初の予定であった保湿性と化学構造の相関を調べるまでには至っていない。今後、脱ベンジル化の方法を確立しなければならない。あるいは、ベンジル基以外の保護基を検討する必要があるのかもしれない。一方で、アミノ糖前駆体モノマーとの共重合が成功したことにより、ヒアルロン酸類似多糖の合成は期待できると考えられる。

参考文献

1) 赤坂日出道、瀬戸進、柳光男、福島正二、光井武夫、日本化粧品技術者会誌、22 35(1988)
2) 赤坂日出道、山口敏二郎、フレグナンスジャーナル、14 42(1986)
3) 瓜生敏之、畑中研一、有機合成化学協会誌、42 557 (1984)
4) N. K. Kochetkov, *Tetrahedron.*, 43 2389 (1987)
5) T. Uryu, *Prog. Polym. Sci.*, 18 717 (1993)
6) E. R. Ruckel and C. Schuerch, *Biopolymers.*, 5 515 (1967)
7) 瓜生敏之、畑中研一、阪本吉弘、針間一成、萩野新、伊藤克博、船本明士、松崎啓、日本化学会誌、10 1638 (1982)

8) M. Georges and B. Fraser-Reid, *Carbohydr. Res.*, 127 162 (1984)
9) M. A. Zottola, R. Alonso, G. D. Vite, and B. Fraser-Reid, *J. Org. Chem.*, 54 6123 (1989)
10) K. Hatanaka, T. Uryu, S. Miyahara, and H. Kuzuhara, *J. Med. Chem.*, 30 810 (1987)
11) T. Iversen and D. R. Bundle, *Can. J. Chem.*, 60 299 (1982)
12) T. Miyazaki and Y. Matsushima, *Bull. Chem., Soc. Jpn.*, , 41 2723 (1968)
13) R. W. Jeanloz, E. Walker, and P. Sinay, *Carbohydr. Res.*, 6 184 (1968)
14) K.-I. Kanno, Y. Kobayashi, S.-I. Nishimura, H. Kuzuhara, and K. Hatanaka, *J. Carbohydr. Chem.*, in press.

II．生体作用，安全性に関する分野

紫外線誘発DNA損傷の定量と メラニン色素のサンスクリーン効果

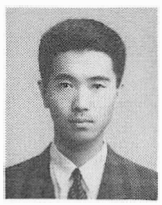
奈良県立医科大学
小 林 信 彦

Melanin is believed to protect cells against ultraviolet (UV)-induced damage formation. It, however, has not been experimentally proved, because published results have been inconclusive. The present study was carried out to determine whether intracellular melanin protected cells against UV-induced photoproduct type DNA damage formation and killing. Three human melanoma cell lines containing different amounts of melanin were used. Absorption spectrum, subcellular localization of melanin, and melanin concentration were examined in the three cell lines. Two types of DNA damage, cyclobutane pyrimidine dimers and (6-4)photoproducts, were detected by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with monoclonal antibodies specific for these photolesions. We found that melanin reduced the induction rates of both types of DNA damage in pigmented cells irradiated with UVC in a melanin concentration-dependent manner. Almost no differences in repair capacity for the two types of photolesions were observed among the three cell lines. We also found that the more highly melanotic cell lines were more resistant to UVC than the less melanotic cell lines. These results suggest that intracellular melanin plays an important role in preventing UV-induced cell killing by reducing the formation of two types of DNA damage. The three cell lines, however, might have different induction rates of UV-damage and different UV sensitivities, under identical conditions with equal amounts of melanin, since they stemmed from melanomas of three different patients. Besides, we have not ascertained whether melanin protects cells against sunlight, since we used UVC only. Thus, we treated highly melanotic HM3KO cells with docosahexaenoic acid (DHA) to reduce the amount of melanin to about half, and prepared two types of cells with the same genetic background, with different melanin levels. We carried out similar experiments using UVC and UVB, and ascetained that melanin protected melanoma cells from the two types of DNA damage formation and killing both after UVC and after UVB irradiation. Data obtained from the two studies in series suggest that the protective effect of intracellular melanin increases in a melanin concentration-dependent manner and reaches a plateau.

1 緒 言

小麦色に日焼けした肌は健康的かつ魅力的である。また、太陽の下で遊んだり休息することは実に気持ちのいいものである。しかしながら、太陽光中の紫外線によって、日焼け（紅斑・水疱・色素沈着）、光老化（しわ・しみ・そばかす）、皮膚良性・悪性腫瘍、免疫能の低下、白内障などのさまざまな障害が生ずることも事実である。とりわけ、近年、皮膚癌の患者数が増加傾向にある。オゾン層の破壊に伴って地表に到達する紫外線量が増加し、患者数は今後さらに増加すると警告されている。生活習慣の変化や屋外でのレジャーの多様化も皮膚癌の増加の重要な原因のひとつであると推測されている。それゆえ、紫外線をよく知り、太陽光と上手に付き合うことが必要となる。紫外線により表皮細胞の核にDNA損傷が生じ[1]、発癌の引き金となる[2]。また、DNA損傷が紫外線による紅斑・sunburn cell生成・免疫抑制などのさまざまな障害の直接の原因となるという報告もある[3-5]。紫外線による主なDNA損傷として、シクロブタン型ダイマー・(6-4) 型ダイマーおよび後者のDewar型異性体が知られている。これらの損傷の生成量を定量することは、紫外線による障害とその防御を考える上で重要である。しかし、従来これらの損傷を直接定量する方法がなかった。

Determination of UV-induced DNA damage and photoprotection by melanin



Nobuhiko Kobayashi

Nara Medical University

共同研究者の森らは、これら3種類のDNA損傷に対するモノクローナル抗体を世界に先駆けて樹立することに成功した[6-11]。そこで、本研究では、これらのモノクローナル抗体を用いたELISA 法および免疫組織化学的染色法によって DNA損傷の定量を試みた。

さて、紫外線から身体を守る方法として、日傘・帽子・サングラス・長袖のシャツ・長ズボンなどの着用やサンスクリーン剤の外用などが考えられる。現在、サンスクリーン剤などの紫外線防御効果の判定には、紅斑抑制効果を指標としたSun Protection Factor (SPF) が用いられている。この評価に、DNA 損傷生成に対する抑制効果を用いれば、紅斑のみならず、皮膚癌などさまざまな紫外線障害に対する防御効果を反映することができると考えられる。さらに、我々はメラニン色素を用いて紫外線防御することを提唱している。しかし、メラニン色素のDNA 損傷生成抑制効果は実験的には未だ証明されておらず[12-18]、さらに逆にメラニン色素が光増感作用を持つという報告もあり[19]、メラニン色素の光防御への応用の可否についても決着がついていないのが現状である。紫外線とメラニン色素の関係については、総説を参照されたい[20]。本研究では、実験材料と実験方法を厳選することによって、メラニン色素の生物学的な差異を際立たせる工夫を行い、メラニン色素が紫外線誘発 DNA損傷の生成を抑制することを証明した。

2 実 験

2.1 3種類の培養ヒトメラノーマ細胞を用いた実験[21]

実験材料として、細胞内のメラニン色素と核との位置関係が明確である培養細胞が優れていると考えられた。そこで、ペレットの色調の黒いHM3KO(神戸大・市橋教授より供与された)、茶色いG-361および白いMewo (ともにJCRB細胞バンクより供与された) の3種類の細胞株を選んだ。メラノーマ細胞を1N NaOHにて可溶化し、400nmにおける吸光度から細胞内のメラニン色素量を定量した。また、顕微鏡写真から各細胞の直径を測定し、細胞内のメラニン色素の濃度を算出した。その結果、細胞内のメラニン色素量は、ペレットの色調から予想されるように、HM3KO・G-361・Mewoの順に多かった (Table 1)。

Table 1 Melanin concentration in three melanin cell lines

Cells	HM3KO	G-361	Mewo
Melanin content (pg/cell)	26.0 ± 1.1	5.5 ± 0.5	0.8 ± 0.2
Cell diameter (μm)	21.2 ± 3.4	20.0 ± 3.8	13.9 ± 2.7
Melanin concentration ($\mu g/mm^3$)	5.2 ± 0.2	1.3 ± 0.1	0.6 ± 0.2

Each value shows the mean ± SD.

次に、これらのメラノーマ細胞をホモジナイズし、遠心分離によってメラノソームを含む分画を抽出し、紫外線領域における吸光曲線を比較した。3種類のメラノーマ細胞株に含まれるメラノソーム分画の吸光曲線は同じパターンを示し、波長が短くなるほど吸光度が増加し、200nm付近に吸収極大を持つというメラニン色素に典型的なものであった (Fig. 1；データは真の吸収に加え、散乱による効果も含む)。

また、これらのメラノーマ細胞をプラスチック・プレート上で培養し、その垂直切片をFontana-Masson染色してメラニン色素の細胞内局在を調べた。すべての細胞株でメラニン色素の局在には差がなく、メラノソームは細胞質全体に分布していた。以上の結果より、これら3種類のメラノーマ

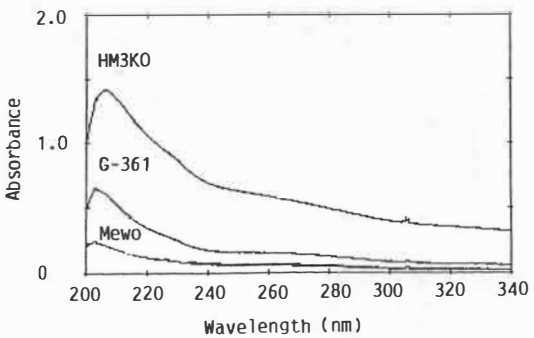


Fig. 1 Absorption spectra of melanosomal fractions from human melanoma cells.

細胞株を用いて、細胞内のメラニン色素量と紫外線によって誘発されるDNA損傷量とを比較することによって、メラニン色素の紫外線防御効果を定量できることが推測された。さて、従来の報告では、メラニン色素の紫外線誘発DNA損傷生成に対する防御効果はシクロブタン型ダイマーについてのみ論じられてきた[12-19]。しかし、最近では（6-4）型ダイマーも紫外線によって誘発され、シクロブタン型ダイマーと同様に細胞死や突然変異の原因となっていることが知られており、(6-4）型ダイマー生成量の定量も必須となっている。そこで本研究では両 DNA損傷の生成量を定量するために、シクロブタン型ダイマーあるいは(6-4)型ダイマーに特異的なモノクローナル抗体を用いたELISA法を採用した[10]。この定量法は、現在のところ最も感度の高い方法のひとつであり、さらに、両ダイマー量を同時に定量できる唯一の方法である。本実験では5-20J/m² (254nm)という低線量の紫外線照射によって生成する両ダイマー量を定量することができた。また、この線量は生物学的に充分に低い線量であったため、メラノーマ細胞株の紫外線感受性の比較にも用いることができた。メラノーマ細胞に紫外線を照射した後、細胞からDNAを抽出し、1%硫酸プロタミンで前処理した96穴プレートを用いて DNA上の両ダイマー量を測定した。２%牛胎児血清にて抗体の非特異的な吸着を阻害した上で、シクロブタン型あるいは(6-4）型ダイマーに対するモノクローナル抗体を反応させた。つづいて、ビオチン標識抗マウスIgG抗体、さらに、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを反応させた。o-フェニレンジアミンを基質として、その発色度を492nmにおける吸光度として測定し、両ダイマーの生成量とした。シクロブタン型ダイマーおよび(6-4)型ダイマーともに、その生成量は紫外線照射線量に依存して増加していた。また、メラニン色素量の多い細胞株ほど両ダイマーの生成量が少なかった。この結果より、細胞内のメラニン色素は、その量に依存して紫外線によるDNA損傷の生成を抑制していることがわかった(Fig. 2 a, b)。さらに、各々の細胞株の両ダイマー修復能を比較したところ、ほとんど差が見られなかった(Fig. 3 a, b)。

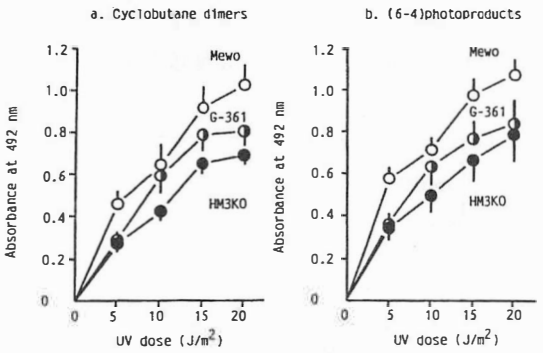


Fig.2 Induction of cyclobutane pyrimidine dimers(a) and (6-4)photoproducts(b) in DNA from UV-irradiated human melanoma cells. DNA damage was measured by the ELISA with monoclonal antibodies against photolesions.

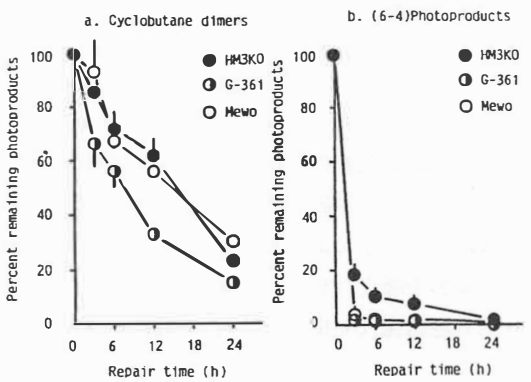


Fig.3 Repair capacity for cyclobutane pyrimidine dimers(a) and (6-4)photoproducts(b) in melanoma cells. HM3KO, G-361, and Mewo cells were UV irradiated at 20,15,and 10J/m², respectively,to induce similar numbers of photolesions. The percentage of the initial number of photolesions was determined at various times after UV irradiation.

また、３種類のメラノーマ細胞株の紫外線感受性をコロニー形成法によって比較したところ、メラニン色素量の多い細胞株ほど紫外線に抵抗性であった。この結果より、細胞内のメラニン色素は、

その量に依存して紫外線による細胞死を抑制していることがわかった（Fig. 4）。

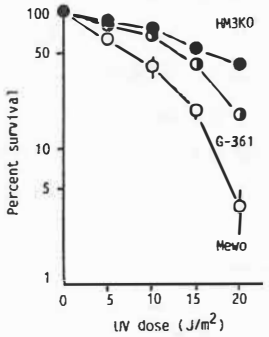


Fig. 4 UV-survival curves of cultured human melanoma cells. Survival after UV irradiation was determined by the colony-formation method.

次に、メラニン色素による両ダイマー生成抑制効果と細胞死抑制効果の関連を検討するために、UV-protection factor（UPF；紫外線防御能を比で表したもの）を算出した（Table 2）。

Table 2 UV-protection factors (UPF_s) in three melanoma cell lines

Cells	HM3KO	G-361	Mewo
UPFs for cyclobutane dimers*	2.4 ± 0.6	1.6 ± 0.5	1.0
for (6-4)photoproducts*	2.3 ± 0.5	1.7 ± 0.1	1.0
for cell killing§	2.2 ± 0.3	1.7 ± 0.3	1.0
Relative melanin concentration¶	8.7 ± 0.4	2.2 ± 0.2	1.0

* Calculated from UV doses showing 0.5 of absorbance at 492 nm in Figs. 2a, b (the mean ± SD). The value of Mewo was expressed as 1.0.
§ Calculated from UV doses showing 50 of percent survival in Fig. 4 (the mean ± SD). The value of Mewo was expressed as 1.0.
¶ Calculated from melanin concentration in Table 1 (the mean ± SD). The value of Mewo was expressed as 1.0.

各細胞株においてシクロブタン型ダイマーおよび(6-4)型ダイマーの生成抑制に対するUPF値がほぼ等しかったことより、メラニン色素は紫外線を遮蔽することにより両ダイマーの生成を同様に抑制していると考えられた。さらに、これら両ダイマー生成抑制に対するUPF値と細胞死抑制に対するUPF値もほぼ等しいことがわかった。各々の細胞株の間で両ダイマー修復能に差が見られなかったことも勘案すると、細胞内のメラニン色素は、両ダイマーの生成を抑制し、その結果として細胞死をも抑制していると考えられた。以上の実験結果より、細胞内のメラニン色素が紫外線によるDNA損傷の生成および細胞死を抑制することが証明された。

2.2. ドコサヘキサエン酸(DHA)によってメラニン色素量を減少させた細胞を用いた実験[22]

前実験では、3人の異なる患者さんから樹立されたメラノーマ細胞株を用いた。このため、細胞内のメラニン色素量が同じであっても細胞株ごとにDNA損傷生成量や紫外線感受性に差があった可能性を否定できない。また、紫外線として UVCを照射したが、UVCは大気中でほぼ吸収されるため、メラニン色素が実際に地表に到達する太陽光に対しても防御作用を持つかどうかを確かめる必要がある。これらの疑問点を解決するために、遺伝的背景が等しく、メラニン色素量のみ異なるようなメラノーマ細胞株を作り、メラニン色素自体のUVCおよびUVBに対する防御効果の証明を行った。

我々は、多価不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸(DHA)にメラニン色素合成阻害作用のあることを発見している[23]。そこで、メラニン色素を多量に含むヒトメラノーマ細胞株HM3KOにDHAを処理して、細胞内のメラニン色素量をコントロールすることにした。まず、DHAの細胞毒性をコロニー形成法で調べた。DHA50 μM 6日間処理では細胞毒性はほとんど認められなかった(Fig. 5)。

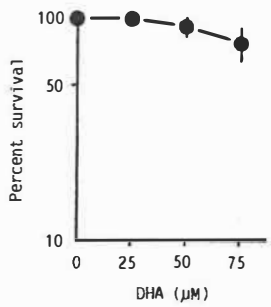


Fig. 5 Cytotoxicity of DHA. Cytotoxicity was determined by the colony-formation method.

また、この処理条件では、細胞内のメラニン色素量は、溶媒のDMSOのみで処理したコントロール細胞株の約半分に減少した（Fig. 6)。

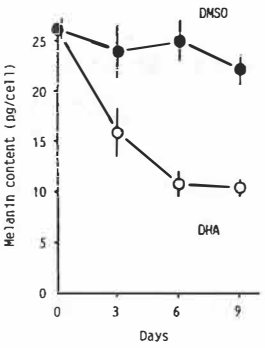


Fig.6 Inhibitory effect of DHA on melanogenesis. Melanin content in DHA- and DMSO-treated cells was determined.

DHAを処理したメラニン色素量の少ない細胞株とコントロールのメラニン色素量の多い細胞株を用いて前回と同様の実験を行なった。２種類の細胞株は、細胞形態・メラニン色素の吸光曲線・細胞内局在がほぼ等しく、メラニン色素量が異なる以外には紫外線防御に関してほぼ等しい性質を持っていた（Fig. 7)。

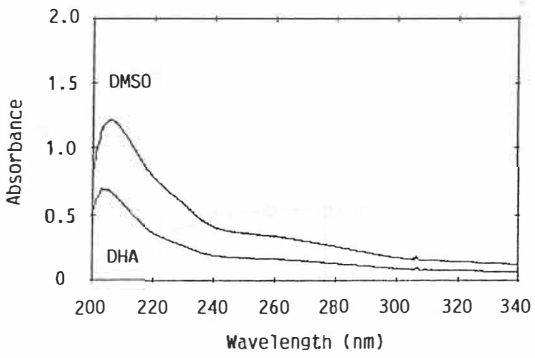


Fig.7 Absorption spectra of melanosomal fractions from DHA- and DMSO treated cells.

この結果より、この２種類のメラノーマ細胞株を用いることによって、メラニン色素自体の紫外線防御効果を判定できると考えられた。次に、メラノーマ細胞に紫外線(UVCおよびUVB)を照射し、生成するDNA損傷量をELISA法にて測定した。その結果、シクロブタン型ダイマーおよび（6-4)型ダイマーの生成量は、UVC照射後およびUVB照射後ともに、メラニン色素量の多いコントロール細胞株の方が、 DHA処理したメラニン色素量の少ない細胞株よりも若干少なかった（Fig. 8, 9)。

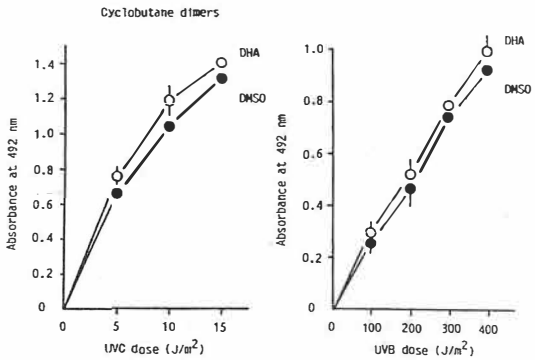


Fig.8 Induction of cyclobutane pyrimidine dimers in DHA- and DMSO-treated cells irradiated with UVC (left) and UVB (right). Cyclobutane dimers were measured by the ELISA method.

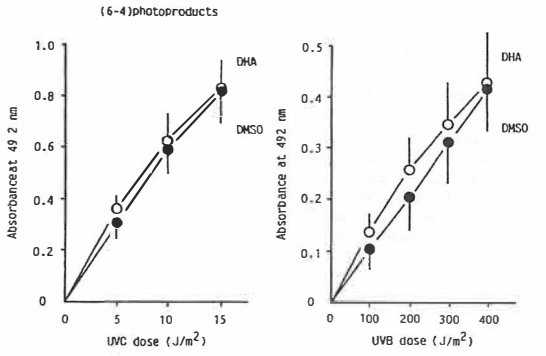


Fig.9 Induction of (6-4)photoproducts in DHA- and DMSO-treated cells irradiated with UVC (left) and UVB (right). (6-4)photoproducts were measured by the ELISA method.

また、UVCおよびUVBに対する感受性も、メラニン色素量の多いコントロール細胞株の方が若干抵抗性であった（Fig. 10)。

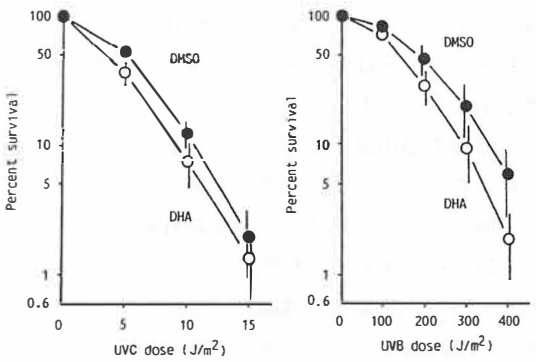


Fig. 10 UV-survival curves of DHA- and DMSO-treated cells. Survival after UVC (left) and UVB (right) irradiation was determined by the colony-formation method.

UV-protection factor(UPF;紫外線防御能の比)を算出したところ、UVCおよびUVB照射後ともに、メラニン色素による両ダイマー生成抑制および細胞死抑制に対するUPF値がほぼ等しい値をとった。この結果より、メラニン色素はUVCおよびUVBの両方に対して防御効果を持つこと、メラニン色素は紫外線を遮蔽することによって両ダイマーの生成を同様に抑制すること、そして、その結果として紫外線による細胞死をも抑制することが示唆された(Table 3)。

Table 3 UV-protection factors between DNA- and DMSO-treated cells

HM3KO cells treated by	DMSO	DHA
UVC-induced cyclobutane dimers[a]	1.18 ± 0.11	1.0
(6-4)photoproducts[b]	1.14 ± 0.10	1.0
cell killing[c]	1.19 ± 0.08	1.0
UVB-induced cyclobutane dimers[d]	1.12 ± 0.07	1.0
(6-4)photoproducts[e]	1.24 ± 0.15	1.0
cell killing[c]	1.21 ± 0.02	1.0
Relative melanin concentration	2.33 ± 0.37	1.0

[abde] Calculated from UV doses showing 0.7[a], 0.4[b], 0.5[d], or 0.2[e] of absorbance at 492 nm (the mean ± SD). The values of DHA-treated cells were expressed as 1.0.
[c] Calculated from UV doses showing 10 of percent survival (the mean ± SD). The values of DHA-treated cells were expressed as 1.0.

しかし、2つの細胞株間の相対的なメラニン色素量の差が2.33倍あったにも関わらず、その紫外線防御効果(UPF値)は非常に小さな値(1.12-1.24)にとどまった。この理由を検討するために、先の実験から得られたデータも加えて、細胞内のメラニン色素量と紫外線防御効果(UPF値)との関係を検討した(Fig. 11)。

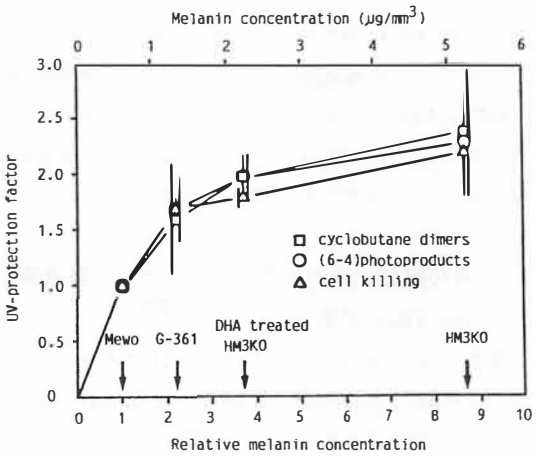


Fig. 11 Photoprotective effect of melanin in melanoma cells with different pigment levels. The relationship between relative melanin concentration (or melanin concentration) and UV-protection factor among four types of melanoma cells was shown using the present and previous results. Only results of UVC were plotted. Each point shows the mean (±SD).

そして以下のことが明らかとなった。

1) 細胞内のメラニン色素量が増加するほど、シクロブタン型ダイマー生成抑制・(6-4)型ダイマー生成抑制および細胞死抑制に対する UPF値が増加すること。

2) 3種類のUPFについて、各細胞株のUPF値を結ぶと、ほぼスムーズな3本の曲線が描けること。

3) 3種類のUPFの曲線がほぼ重なること。

これらの結果より、メラニン色素が紫外線を遮蔽することによって両DNA損傷の生成を抑制し、その結果として紫外線による細胞死をも抑制することが推測された。さらに、メラニン色素の紫外線防御作用が強力であるため、メラニン色素量が比較的少ない状態でもある程度の防御効果が認められるが、その効果はメラニン色素量が中等度(2μg/mm³)の状態で飽和してしまう事が推測され

た。２つの実験で細胞内のメラニン色素量の比とUPF値が並行していなかったこと、および2番目の実験でメラニン色素の紫外線防御効果が非常に小さかったことは、このメラニン色素の紫外線防御効果の飽和のためであったと考えられた。この結果より、培養細胞を用いてメラニン色素の紫外線防御効果を証明する場合には、細胞内のメラニン色素量の差と同時に、メラニン色素の絶対的な量も非常に重要であることがわかった。

2.3 免疫組織化学的染色法を用いた紫外線誘発DNA損傷の定量

現在、培養細胞レベルで認められたメラニン色素の紫外線防御作用が、皮膚でも実際に見られることの証明を試みている。多層構造をとる表皮では、メラニン色素と核との位置関係が培養細胞に比べてより複雑である。そこで、シクロブタン型および(6-4)型ダイマーに対するモノクローナル抗体を用いた蛍光抗体間接法を用いて、紫外線照射した表皮細胞内の両ダイマー生成量を定量する系を作製している。この方法を用いると、メラニン色素の分布などの組織学的な検討とDNA損傷の定量を同時に行うことが可能となる。また、表皮各層ごと、あるいは細胞１個ごとについての両ダイマー生成量を定量することができるようになる。皮膚癌の発生には、幹細胞の性質を持つ基底細胞におけるDNA損傷が引き金となると考えられている。この方法を用いれば、基底細胞に生じた両ダイマーの生成量も定量できる。それゆえ、メラニン色素やサンスクリーン剤などの皮膚癌予防効果についての予測も可能となる。現在のところ、蛍光抗体間接法の基礎実験はほぼ終了し、まもなく本学に導入されるレーザー顕微鏡を用いて定量化する予定である。

3 総 括

太陽光にあたることは、人類にとっての基本的な欲求のひとつである。また、海水浴・スキー・ゴルフ・テニス・釣りなどの屋外でのレジャーも盛んである。一方、太陽光中の紫外線によって、しわ・しみ・そばかす・皮膚癌などさまざまな障害が生ずることも事実である。しかし、紫外線による障害を最小限に予防しながら、太陽光と上手に付き合ってゆくことは可能であろう。

一般に、一生に被ばくする総紫外線量のうち、半分以上を青年期までに被ばくすると言われている。このことから、紫外線対策をなるべく早い年齢(幼少時)から、特に戸外での運動の際に行うことが大切である。紫外線から皮膚を守る方法として、帽子・長袖のシャツ・長ズボンなどの着用やサンスクリーン剤の外用などが考えられる。日本人の皮膚には、メラニン色素が比較的多量に含まれている。そこで、我々はメラニン色素も利用して紫外線防御することを提唱している。具体的には、 1) 急に強い紫外線にあたらないこと。あたる場合にはサンスクリーン剤などを使用して強力にブロックすること。 2) 慢性的に紫外線にあたる場合、日光にあたった後に皮膚が色素沈着しやすい人は、紫外線量の少ない季節あるいは時間から少しずつ日光にあたる時間を延ばしていったり、あるいはサンスクリーン剤を併用して徐々に日焼け(色素沈着)し、内因性サンスクリーン剤であるメラニン色素の量を徐々に増加させて紫外線防御を行なう。 3) 日光にあたってもほとんど色素沈着しない人は、常にサンスクリーン剤などを用いて紫外線防御を行う。この方法ならば、サンスクリーン剤の副作用・経済的負担・わずらわしさなどの問題を最小限にとどめ、子供にも応用できると思われる。さらに、我々はサンスクリーン剤などの紫外線防御効果の判定を、表皮細胞に生ずるDNA損傷に対する防御効果(SPF)で表すことを提唱している。現在は、紅斑反応の抑制効果を指標として評価されているが、紅斑反応は生物学的な反応であるため、被検者間の個人差が大きく、最適とは言えない。一方、DNA損傷は光化学的反応の結果として、紫外線照射線量に依存して生成するため、検査のばらつきが少ない。また、紅斑のみならず、皮膚癌やその他さまざまな紫外線障害に対する防御効果を反映することができる。我々

のモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的染色法が確立されれば、紅斑をおこさない程度の低線量の紫外線によって誘発されるDNA損傷の定量が、組織レベルで可能となるであろう。さらに、人工的に再構成した皮膚を用いて統一した規格を作製すれば、被検者も不要になる。このことから、被検者によるばらつきも無くなり、さらに精度・再現性に優れた方法となることが期待される。本研究は、現実的な紫外線予防方法の確立およびその効果の評価に大きく貢献するものと確信している。

文　献

1) Muramatsu T., Kobayashi N., Tada H., Yamaji M., Shirai T., Mori T., Ohnishi T. *Arch. Dermatol. Res.*, **284** : 232-237 (1992)

2) Yarosh D., Alas L. G., Yee V., Oberyszyn A., Kibitel J.T., Mitchell D., Rosenstein R., Spinowitz A., Citron M. *Cancer Res.*, **52** :4227-4231 (1992)

3) Ley R.D. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* **82** :2409-2411 (1985)

4) Ley R.D., Applegate L.A. *J. Invest. Dermatol.*, **85** : 365-367 (1985)

5) Kripke M.L., Cox P.A., Alas L.G., Yarosh D.B. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* **89** :7516-7520 (1992)

6) Mori T., Matsunaga T., Hirose T., Nikaido O. *Mutation Res.*, **194** :263-270(1988)

7) Matsunaga T., Mori T., Nikaido O. *Mutation Res.*, **235** : 187-194 (1990)

8) Mizuno T., Matsunaga T., Ihara M., Nikaido O. *Mutation Res.*, **254** :175-184(1991)

9) Mori T., Matsunaga T., Chang C.-C., Trosko J.E., Nikaido O. *Mutation Res.*, **236** :99-105 (1990)

10) Mori T., Nakane M., Hattori T., Matsunaga T., Ihara M., Nikaido O. *Photochem. Photobiol.*, **54** : 225-232 (1991)

11) Matsunaga T., Hatakeyama Y., Ohta M., Mori T., Nikaido O. *Photochem. Photobiol.*, **57** : 934-940 (1993)

12) London D.A., Carter D.M., Condit E.S. *J. Invest. Dermatol.*, **67** : 261-264 (1976)

13) Chalmers A.H., Lavin M., Atisoontornkul S., Mansbridge J., Kidson C. *Cancer Res.*, **36** : 1930-1934 (1976)

14) Hill H.Z., Setlow R.B. *Cancer Res.*, **40** :1867-1872 (1980)

15) Hill H.Z., Setlow R.B. *Photochem. Photobiol.*, **35** : 681-684 (1982)

16) Niggli H.J. *Photochem. Photobiol.*, **52**:519-524 (1990)

17) Schothorst A.A., Evers L.M., Noz K.C., Filon R., van Zeeland A.A. *J. Invest. Dermatol.*, **96** : 916-920 (1991)

18) Yohn J.J., Lyons M.B., Norris D.A. *J. Invest. Dermatol.*, **99** : 454-459 (1992)

19) Huselton C.A., Hill H.Z. *Environmental Mol. Mutag.*, **16** 37-43(1990)

20) 小林信彦、村松　勉、山科幸夫、白井利彦、大西武雄、森　俊雄　放射線生物研究　**28** (4) : 20-37 (1993)

21) Kobayashi N., Muramatsu T., Yamashina Y., Shirai T., Ohnishi T., Mori T. *J. Invest. Dermatol.*, **101** : 685-689 (1993)

22) Kobayashi N., Muramatsu T., Yamashina Y., Shirai T., Hashizume R., Ohnishi T., Mori T. "Photoprotection by melanin against photoproduct type DNA damage formation and cell killing." In:Zeise L., Chedekel M.R., Fitzpatrick T.B.(eds.) *Melanin ; Its role in human photoprotectio.*, Valdenmar Publishing Company, *pp* 141-150 (1995)

23) Hashizume R., Doi H., Hirano J., Fukushima S., Kobayashi N., Mori T. *J. Dermatol. Sci.*, **4** : 115 (1992)(abstr.)

安定型アスコルビン酸誘導体の免疫賦活活性とそのメカニズム

岡山大学薬学部
山　本　格

A stable form of ascorbate, AA-2P significantly enhanced anti-SRBC antibody productions by cultured splenocytes at a concentration of 0.5mM, as had been previously described with AA-2G, whereas AA-2S was without effect. In this culture system, it was confirmed that AA-2G and AA-2P were cleaved by lymphocyte's α-glucosidase and phosphatase, respectively, to release intact ascorbic acid. We also demonstrated that AA-2P synergistically enhanced the antibody responeses with nerve growth factor (NGF) by T-cell depleted splenocytes, as had been previously reported with AA-2G, whereas AA-2S did not. SRBC-induced expression of NGF receptor on B cell surface was stimulated by AA-2P as well as AA-2G. These results indicate that AA-2G or AA-2P, as an ascorbate source, may be a useful tool for finding new biological actions and for elucidation of their mechanisms.

緒　言

ビタミンCはビタミンの中でもその働きや機能について最もよく知られており、それ故に研究し尽くされたかに見えるビタミンである。しかし、近年細胞レベル、分子レベル並びに遺伝子レベルの研究が進むにつれ、今なお新しい機能の発掘と生体内での意義について知見が蓄積されつつある。

最近、我々は新規安定型アスコルビン酸誘導体、2-*O*-α-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid (AA-2G)を見い出し、その酵素的大量合成にも成功した[1-3]。

AA-2Gは熱や酸化に対し極めて安定であるが、経口投与された場合には、消化管組織のα-グルコシダーゼによりグルコースとアスコルビン酸が生じ、それが吸収され抗壊血病作用(モルモット)などのビタミンC活性を発揮する[4,5]。AA-2Gは培養細胞に対しても作用を発揮する。例えば、AA-2Gはヒト線維芽細胞におけるコラーゲン合成を促進する[6]。この場合、培地中に含まれる血清または細胞膜面上のα-グルコシダーゼによりAA-2Gから遊離したアスコルビン酸が本作用を発揮するしていることも明らかにされている。

我々は AA-2Gをアスコルビン酸供給源として用い、脾細胞培養系において、アスコルビン酸の抗体産生増強作用を初めて実証した[7]。ビタミンCの免疫増強作用については、古くより多くの研究者により報告されているが、in vitroにおける細胞レベルで作用が認められないことから、例えば抗体産生増強作用のメカニズムに関してはこれまで全く不明であった。この原因がアスコルビン酸の不安定さにあることを証明した。その後、我々はアスコルビン酸の抗体産生促進作用が神経成長因子（NGF）により相乗効果を受けることを見いだした（投稿中）。そのメカニズムを解析したところ、Bリンパ球上のNGF受容体発現がアスコルビン酸により増強されるという興味ある知見を見いだしている（投稿中）。

本研究では、主に安定型アスコルビン酸誘導体であるAA-2PとAA-2Sについて、AA-2Gと同様の作用があるか否かにつき検討した。

Immnostimulatory activity of stable ascorbates and it's mechanism.

Itaru Yamamoto

Okayama University

実験方法と材料

動物：雌性BALB／cマウスは7週齢で(株)日本クレアより購入し、一定の環境下で馴化後10週齢で使用した。

抗SRBC抗体産生応答：マウスT細胞除去脾細胞$4X10^6$をSRBC抗原及びNGFなどの薬物と共に、10% FCS含有RPMI1640培地を24穴カルチャープレート(NUNC)を用いて5日間培養した。培養終了後細胞を回収・洗浄後、補体並びにSRBC存在下、プラーク形成細胞をcunninghamの方法[8]に準じて計数した。

NGF受容体発現細胞の測定：培養細胞$1X10^6$をMEM培地50μlに懸濁し、ビオチン化NGF溶液6μlを加え、氷冷下30分放置し、洗浄後0.5% BSA含有PBSに懸濁しフローサイトメトリーにて解析した。

結　果

AA-2G は全脾細胞系においては、0.25mM以上の濃度で抗体産生を著明に増強することをすでに報告している[7]。この増強作用はAA-2Gによる単なる非特異的な脾細胞の生存維持作用ではなく、特異的抗体産生細胞数の増加によること、すなわち、分化促進作用に基づくことを明らかにしている。一方、T細胞除去脾細胞系では0.25mMのAA-2Gは単独ではほとんど増強作用を示さず、また、NGFも同様に単独では抗体産生に対し無作用である。しかし両者を併用すると相乗効果が出現し、抗体産生は著明に促進される。

ここではAA-2Gと同様、既知の安定型アスコルビン酸誘導体であるAA-2P並びにAA-2Sにも抗SRBC抗体産生におけるNGFとの相乗作用が認められるか否かを検討した。その結果、図1Aに示すように0.5mMのAA-2Pは単独では何等作用は認められないにもかかわらず、30ng／ml のNGFを同時に培地に添加すると、AA-2GとNGFの場合に認められたとほぼ同程度の相乗効果が認められた。

ところで、先に我々が報告したように、AA-2GとNGFの相乗効果の原因の一つはAA-2GによるBリンパ球膜面上の NGF受容体の発現促進であることが明らかにされている。そこで、AA-2Pの場合にも同様の現象が観察されるか否かにつき検討した。その結果、図1Bに示したように、抗原SRBCの刺激下、0.5mMの AA-2PによりNGF受容体の発現増加が認められた。

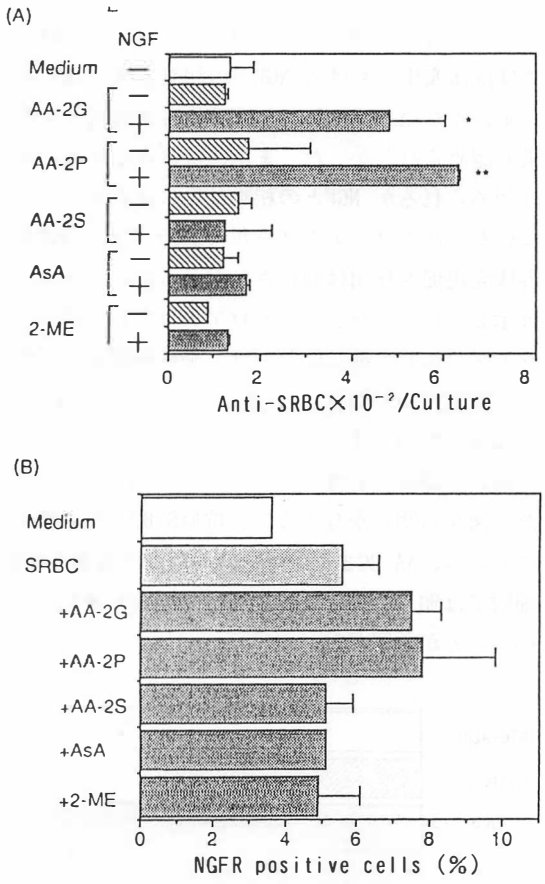


Fig.1 (A) Combind effect of NGF and several AsA derivatives on anti-SRBC PFC response in T cell depleted splenocytes.
(B) Flow cytometric analysis of T cell depleted splenocytes stimulated with SRBC in the presence of several AsA derivatives, Splenocytes were cultured with NGF (30ng/ml)and AA-2G (0.5mM), AA-2P (0.5mM), AA-2S (0.5mM). ASA (0.5 mM) or 2-ME (0.5μM) for 5days (A) or 4days (B). NGF was added to the cultured medium at day 4. Significant differences from each control was expressed as *:p<0.05, **:<0.01.

それに対し、AA-2S（0.5mM）及びAsA（0.5mM）では抗体産生における NGFとの相乗効果は認められず、また AA-2SやAsAではNGF受容体発現促進効果も認められなかった。また、抗体産生促進効果は認められるが NGFとの相乗効果の認められていない2-メルカプトエタノール（2ME）でも、NGF受容体発現促進作用は観察されなかった。データには示していないが、デヒドロアスコルビン酸やイソアスコルビン酸に関しては、全脾細胞系で抗体産生促進作用やNGFとの相乗作用、さらにはNGF受容体発現作用もすべて認められていない。

図2にはNGF受容体を発現している細胞数を示した。図から明らかなように、抗原SRBCのみの場合にくらべ、AA-2Gまたは AA-2Pの存在下培養したB細胞では顕著に NGF受容体発現細胞数が増加していることが判明した。

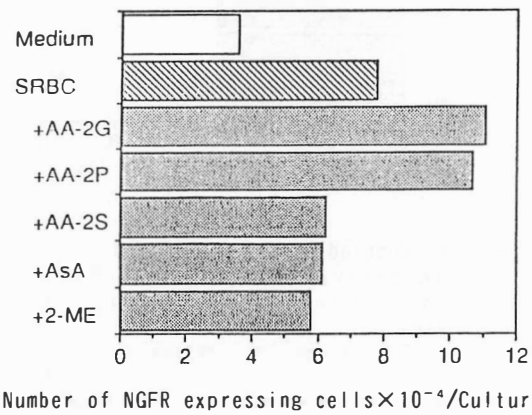


Fig.2 Flow cytometric analysis of T celldepleted splenocytes stimulated with SRBC in the presence of several AsA derivatives. splenocytes were cultured with or without SRBC in the presence of AA-2G(0.5mM), AA-2P(0.5mM), AA-2S (0.5mM), ASA(0.5mM) or 2-ME (0.5μM) for 4days. Cultured cells (1×10⁶) were incubated with biotinylated-NGF and then stored with PE-conjugated streptavidin.

次に、安定型AA-2GとAA-2Pのみでこのような作用が認められ、AsAを遊離しないAA-2Sや不安定なAsAでは認められなかったことと、細胞内アスコルビン酸含量の間に相関性があるか否かを知るために、培養Bリンパ球内のアスコルビン酸含量を経時的に測定した。その結果、NGFとの相乗効果の認められたAA-2GまたはAA-2Pを添加したときに、培養期間中、細胞内アスコルビン酸含量が培養開始時のレベルに維持されていることが判明した。それに対して、相乗効果の認められなかったAA-2S及びAsAではコントロールと同様に培養後期にはアスコルビン酸含量がほとんど消失していた(図3)。

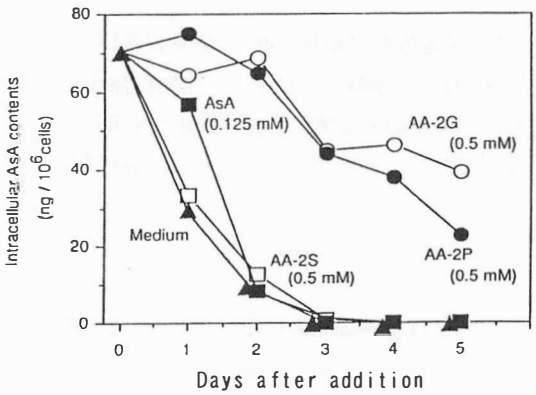


Fig.3 Time course of Intracellular AsA contents in T cell-depleted splenocytes. Splenocytes were cultured with SRBC in the presence of AA-2G(0.5mM:○) AA-2P (0.5mM:●), AA-2S(0.5mM:□), ASA (0,125mM:■) for 5days, Then the cells were washed and lysed with TCA at the indicated days. Those supernatants were analyzed by HPLC equipped with ECD.

このことから、AA-2GやAA-2PのNGFとの抗体産生の相乗効果やNGF受容体発現促進には一定の細胞内アスコルビン酸含量の維持が重要であること、すなわち、アスコルビン酸がその作用の本体であることが示唆された。

考　察

これまでのビタミンCに関する研究には三つの方向性がある。第一はビタミンCの新しい生理活性並びにその作用メカニズムに関する研究である。

第二は新規アスコルビン酸誘導体の合成並びに天然からの抽出・構造決定に関する研究であり、第三はビタミンC及びその誘導体の医療的応用である。中でも新規アスコルビン酸誘導体の発見や開発は、それをきっかけにビタミンCの研究を広範囲に活性化する傾向がある。

先に我々は哺乳動物α-グルコシダーゼや*Bacillus stearothermophylus*由来CGTaseを用いてアスコルビン酸と二糖または多糖から新規安定型アスコルビン酸誘導体、AA-2Gが合成出来ことを発見した[1-3, 9]。AA-2Gは酸化的条件下で安定であり、生体に投与された場合または細胞培養系に添加された時には、α-グルコシダーゼによりアスコルビン酸を遊離しビタミンC活性を発揮する[2]。

ビタミンCにはIFN誘導能や抗ウイルス作用、さらには免疫増強作用があると言われている。しかしながら、実験的にそれを証明することは極めて困難である。その理由として、アスコルビン酸は他のビタミンと異なり化学的に極めて不安定であること、また実験動物であるマウスやラットではアスコルビン酸を生合成していること、ヒトの場合にも常時食事からアスコルビン酸を得ていることから、ビタミンC投与により誘導される一定の効果を観察出来ないためと考えられている。そこで、例えば細胞培養系でアスコルビン酸の免疫賦活作用などが観察されるならば、そのメカニズムの解析や基礎的・応用的研究が可能となる。しかしながら、これまでそのような報告はない。我々もマウス脾細胞を用いたin vitro一次抗体産生系において、アスコルビン酸の作用を検討したが、既知の免疫賦括物質に見られるような抗体産生増強作用は観察出来なかった[7]。

ところで、著者らはAA-2Gの生理活性、薬理活性に関する研究過程で、AA-2Gがアスコルビン酸と異なり、培養マウス脾細胞を用いた抗体産生系において、顕著な抗SRBC PFC応答促進作用を示すこと、そして本作用はα-グルコシダーゼ阻害剤（キャスタロスペルミン）の存在下では消失することを観察した[7]。これらの知見は、AA-2Gの免疫賦活作用発現が酵素により切断され徐々に生じたアスコルビン酸そのものに基づくことを示唆するものである。そこで、アスコルビン酸を12時間毎に5日間の培養期間中総計10回に渡り分割添加したところ、アスコルビン酸に抗体産生促進作用のあることが認められた。

その後の研究により、抗体産生におけるAA-2GとNGFとの相乗作用とAA-2GによるB細胞上のNGF受容体発現促進作用を見いだしたが、この作用もその本体はアスコルビン酸であることを証明した。

そこで本研究では、AA-2Gと同様、安定型アスコルビン酸として知られるAA-2PやAA-2SにおいてもAA-2Gで認められている抗体産生促進作用など一連の作用が認められるか否かを検討した。

その結果、AsA、AA-2SとAA-2Pとの間で明確な差異が観察された。すなわちAA-2PのみにAA-2Gと同様の免疫活性作用が観察された。これは、AA-2GとAA-2Pの場合には、α-グルコシダーゼやホスファターゼにより水解を受け、遊離したアスコルビン酸が培養期間を通じてリンパ球に対し作用を発揮出来た結果であり、一方、AsAは不安定であり、AA-2Sはアスコルビン酸を遊離できなかったため、それぞれ作用を示すに至らなかったものと考えられる。

AA-2GやAA-2Pのような安定型アスコルビン酸誘導体を用いることにより、細胞培養系でアスコルビン酸の作用解明が可能となった意義は大きいものと思われる。すなわち、培養ヒト線維芽細胞におけるコラーゲン生合成のように、アスコルビン酸によっても促進効果が観察できる作用はむしろ稀であり、それ故にアスコルビン酸の生理作用・薬理作用のメカニズム解明が遅れていたからである。

一般に哺乳動物はアスコルビン酸を生合成し、その1日合成量は体重60kg当たり少なくとも4g、多いものでは12gを越えることが知られている。

一方、生合成能を欠くヒトの場合、ビタミンCの1日の所要量は50mgと定められており、この量で壊血病は予防できる。それではこの開きは一体何を意味するのか。ビタミンCのコラーゲン合成

促進作用を介しての抗壊血病作用以外に、ビタミンCは生体の恒常性と言う基本的機構に対し、様々な形で関与している可能性があるのではないか。筆者らが見い出した抗体産生増強におけるビタミンCと神経蛋白質（NGF）の相互作用に関する知見は、ビタミンCの生体防御作用を考える上で重要な意義を持つものと考える。それと共に、これらの知見はビタミンCと神経系との直接の関わり合いを示しており、従来から示唆されているビタミンCの精神・神経機能への役割を研究する手がかりを与えたものと思われる[10]。

参考文献

1) Yamamoto I., Muto N., Nagata E., Nakamura T., and Suzuki Y., "Formation of a stable L-ascorbic acid α-glucosidases catalyzed transglucosylation", *Biochim. Biophys. Acta.*, 1035 44-50 (1990)

2) Muto N., Nakamura T., Yamamoto I., "Enzymatic formation of a nonreducing L-ascorbic acid α-glucosidases catalyzing site-specific transglucosylation from rat small intestine", *J. Biochem.*, 107 222-227 (1990)

3) Aga H., Yoneyama M., Sakai S., Yamamoto I. "Synthesis of 2-*O*-α-D-glucopyranosyl L-ascorbic acid by cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*," *Agric. Biol. Chem.*, 55 1751-1756 (1991)

4) Yamamoto I., Muto N., Murakami K., Suga S., Yamaochi H. "L-ascorbic acid α-glucoside formed by regioselective transglu cosylation with rat intestial and rice seed α-glucosidases : It's improved stability and structure determination", *Chem. Pharm., Bull.*, 38 3020-3023 (1990)

5) Wakamiya H., Suzuki E., Yamamoto I., Akiba M., Otsuka M., Arakawa N, "Vitamin C activity of 2-*O*-α-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid in guinea pigs" *J. Nutr. Sci. vitoin.*, 38 ,235-245 (1992)

6) Yamamoto I., Muto N., Murakami K., Akiyama J. "Collagen synthesis in human skin fibroblasts is stimulated by a stable form of ascorbate, 2-*O*-α-D-glucopyranosyl-L-aseorbic acid", *J. Nutr.*, 122 871-877 (1992)

7) Yamamoto I., Tanaka M., Muto N., "Enhancement of in vitro antibody production of murine splenocytes by ascorbic acid 2-*O*-α-glucoside", *Int. J. Immunopharmacol.*, 15 319-325 (1993)

8) Cunningham A.J., Szenberg A. "Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody forming cells", *Immunology.*, 14 599-600 (1968)

9) Tanaka M., Muto N., Yamamoto I. "Characterization of *Bacillus stearothermophilus*, cyclodextrin glucanotransferase in ascorbic acid 2-*O*-α-glucoside formation", *Bioehim. Biophys. Acta*, 1078 127-132 (1991)

10) ポーリング L.「ビタミンCとカゼ、インフルエンザ（村田 晃訳）」 共立出版（1977）

化粧品による光老化の抗酸化的制御に関する細胞生物学的及び生化学的研究

群馬大学医学部
宮　地　良　樹

Photoaging is a term that denotes the gross and microscopic cutaneous changes induced by chronic sun exposure, which is quite different from intrinsic chronological aging both qualitatively and quantatively. Among the various insults brought by ultraviolet (UV) irradiation, reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxides are one of the most reasonable candidates for explaining actinic injuries in photoaging.

In the present study, using an experimental animal model of photoaging, we investigated the time dependent antioxidant enzyme changes as well as dermal glycosaminoglycan levels by disaccharide analysis. We have found that SOD activity was increased by repeated UVB irradiation, but catalase was not, indicating that the skin SOD and catalase activities are not coordinately regulated by a long-term UV irradiation and that the SOD activity, which has been reported to decrease after acute actinic injury, is induced by chronic photo-oxidative stress.

We have also demonstrated that the total amount of main disaccharide units increased by UV irradiation confirming the previous histochemical findings.

Another important progress made during the present investigation was the development of the three-dimensional culture system supplemented with L-ascorbic acid 2-phosphate using dermal fibroblasts from photoaged murine skin. This method should provide a promising technique to evaluate the capacity for regulating the photoaging process by cosmetics in the near future.

I　緒　言

高齢化社会を迎えて、加齢による皮膚老徴に対する関心も高まり、また皮膚悪性腫瘍患者、とりわけ日光角化症、基底細胞上皮腫、有棘細胞癌などの患者数が明らかに増加している。これらの疾患に共通していることは、長期にわたる紫外線曝露による蓄積性の光線皮膚傷害が、高齢期に露光部皮膚病変としてあらわれる点である。すなわち、紫外線生物学の研究対象として克服されるべき課題と考えられる。日光露出部にみられる皮膚老徴は光老化として通常の非露光部皮膚の老化とは、質的にも量的にも明確に区別される加齢現象で、整容的な観点からも、光発癌とともに莫大な医療費が使われてる疾患である[1-3]。しかし、光老化は予防あるいは制御可能な老化現象であり、一般の人々の啓蒙が重要であるが、現在のところ被服やサンスクリーンなどによる物理化学的な光防御のみ可能である。この光老化の本質的な制御手段が開発されれば医療経済の面からみても福音と考えられる。

そこで、今回の研究では、ヘアレスマウスを用いた光老化モデルを作成し、得た試料を皮膚抗酸化能、皮膚ムコ多糖の側面から検討するとともに、次のステップとして光老化モデルマウス由来線維芽細胞の三次元培養系を確立・検証することで、将来、培養下での紫外線照射および各種酸素ストレスによる抗酸化能、過酸化脂質レベルの変動[4]真皮ムコ多糖の組成および量的変化の二糖分析、コラーゲン架橋結合の解明をめざすことにした。さらにこれらの変化が化粧品として投与可能な抗酸化剤の外用というドラッグデリバリーによりどのように修飾され、それが究極的に光老化制御に貢献しうるか否かを明らかにしたいと考えている[5-7]。

Cell biological and biochemical studies on anti-oxidative regulation of photoaging by cosmetics

Yoshiki Miyachi

Gunma University

2 実　験

1）光老化モデルマウスの作成[8)]

6週齢の雌性ヘアレスマウス（HOS：Hr-1）を購入し、週3回、マウス背面剃毛皮膚に、1回あたりUVB(290～320nm）を40mJ／cm²、UVA(320～400nm）を30J／cm²ずつそれぞれ照射した。1群を12匹とし、最高36週間照射した。

2）皮膚試料の準備

UVA、UVB照射群、非照射コントロール群の三群それぞれより12、24、36週後に4匹ずつのマウスから皮膚片を採取し、実験まで-80℃にて保存した。凍結試料は、フリーザーミルにて粉砕し所定の実験に供した。

3）ムコ多糖二糖分析[9)]

まず、粗ムコ多糖を精製のうえ、コンドロイチナーゼーABC消化したのち、PMPラベルし、HPLCにて、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸を構成するΔDi-HA（HA）、ΔDi-6S（CS）ΔDi-4S（CS）、ΔDi-4S（DS）を測定した。

4）皮膚抗酸化能測定[10)]

SOD活性は、チトクローム法にて、カタラーゼ活性は、紫外部吸収法によりそれぞれ測定した。

5）線維芽細胞の三次元培養[11)]

マウス線維芽細胞に先立ち、ヒト線維芽細胞を10%FCS添加DMEMに0.1mMのリン酸化アスコルビン酸（Asc・2-p）を加えて、CO_2インキュベーターで培養した。細胞を収穫したのちムコ多糖分析に供した。

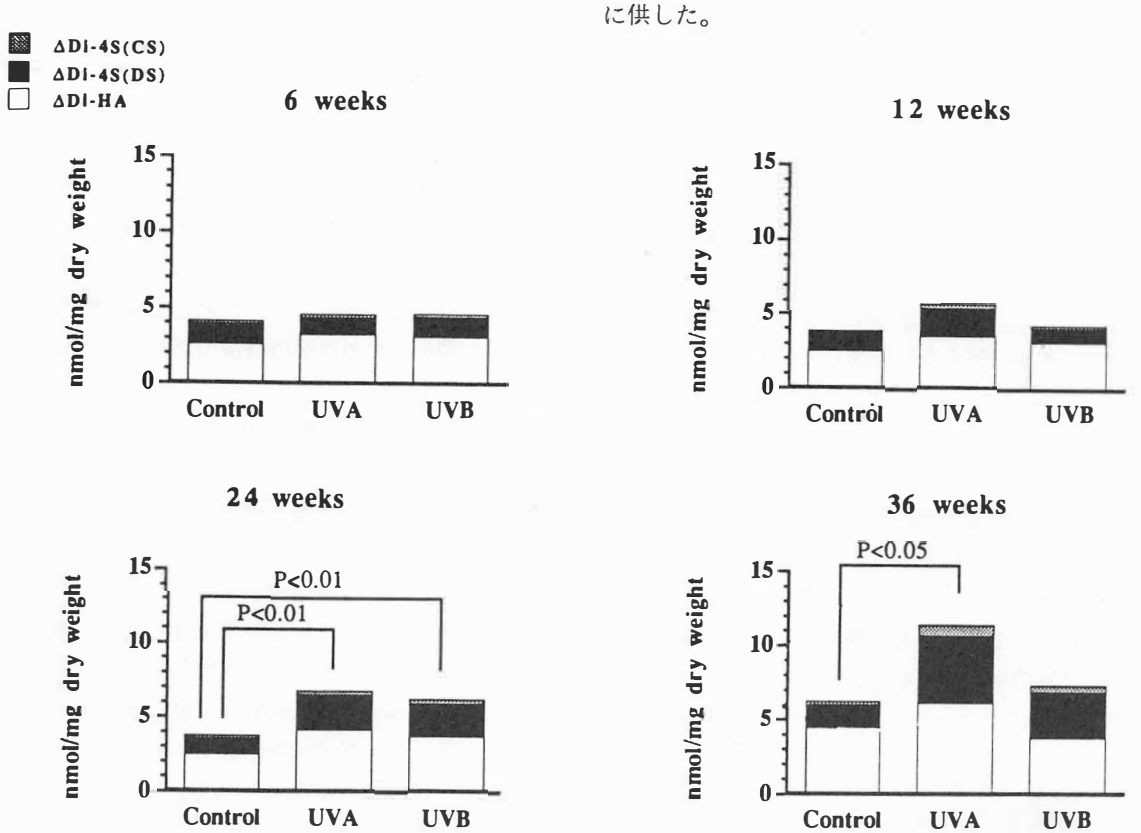


Fig. 1 The total amount of skin main disaccharide units in UVA-, UVB-irradiated and unirradiated control mice at 6th, 12th, 24th and 36th week.

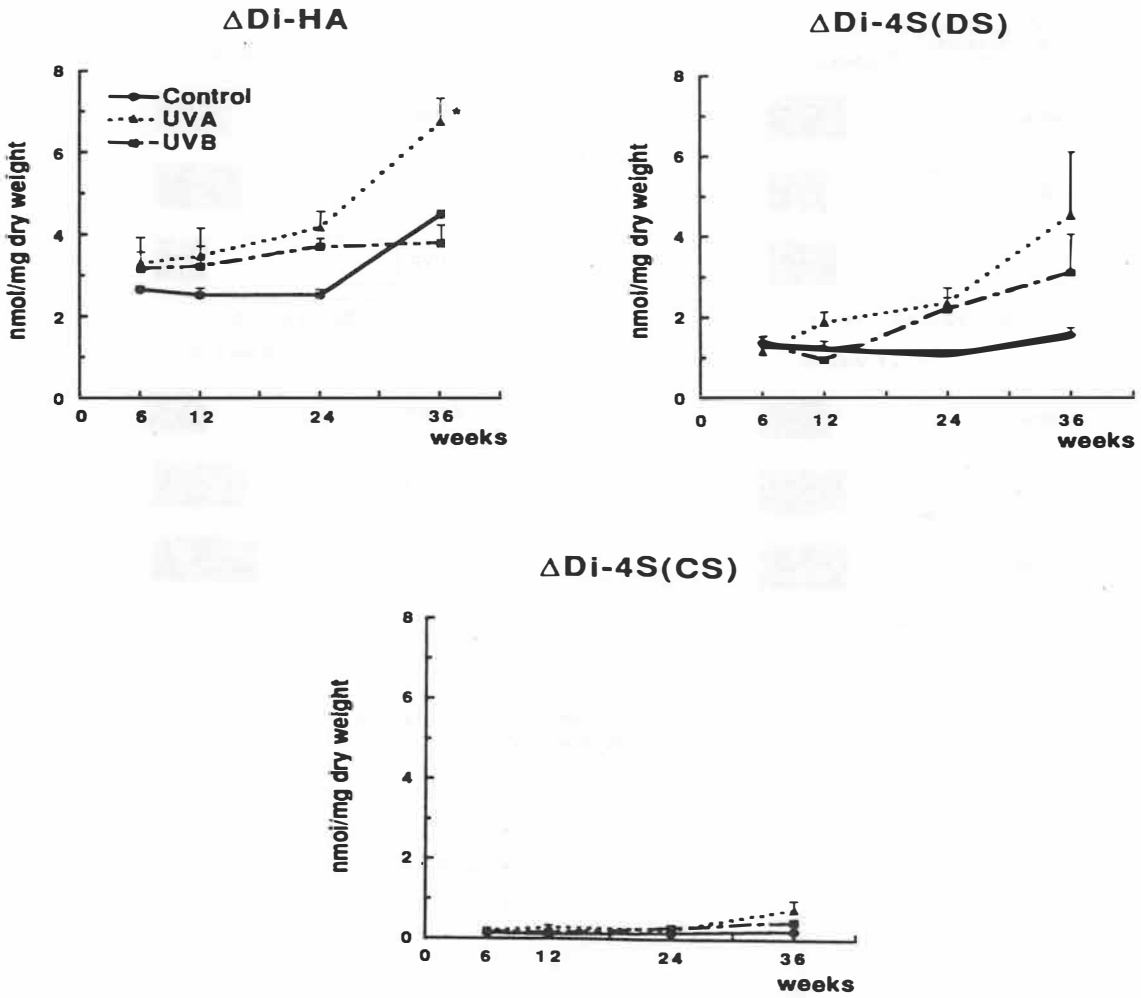


Fig. 2 The sequential changes of skin main disaccharide units, hyaluronic acid-derived ΔDi-HA (HA) ,dermatan sulfate derived ΔDi-4S (DS) and chondroitin-sulfate derived ΔDi-4S (CS) , in UVA-,UVB-irradiated and unirradiated control mice.

3 結 果

1) 光老化モデルマウスの皮膚ムコ多糖分析

コントロールヘアレスマウスでは、ΔDi-HA (HA)とΔDi-4S (DS) がほぼ全ムコ多糖の95%を占め、その全体量はFig. 1に示すように、照射12週からUVA照射群で増加しはじめ、24週では、UVA、UVB照射群とも有意な増加を示した (P< 0.01)。二糖レベルの分析では、すべて増加傾向を示すものの、UVA照射36週のΔDi-HA (HA) を除いて統計的な有意差はみられなかった(Fig. 2)。二糖組成をみると、照射36週でUVB、UVA、コントロール群の順に、ΔDi-HA (HA) の減少、ΔDi-4S (DS) の増加傾向が認められた (Fig. 3) 。

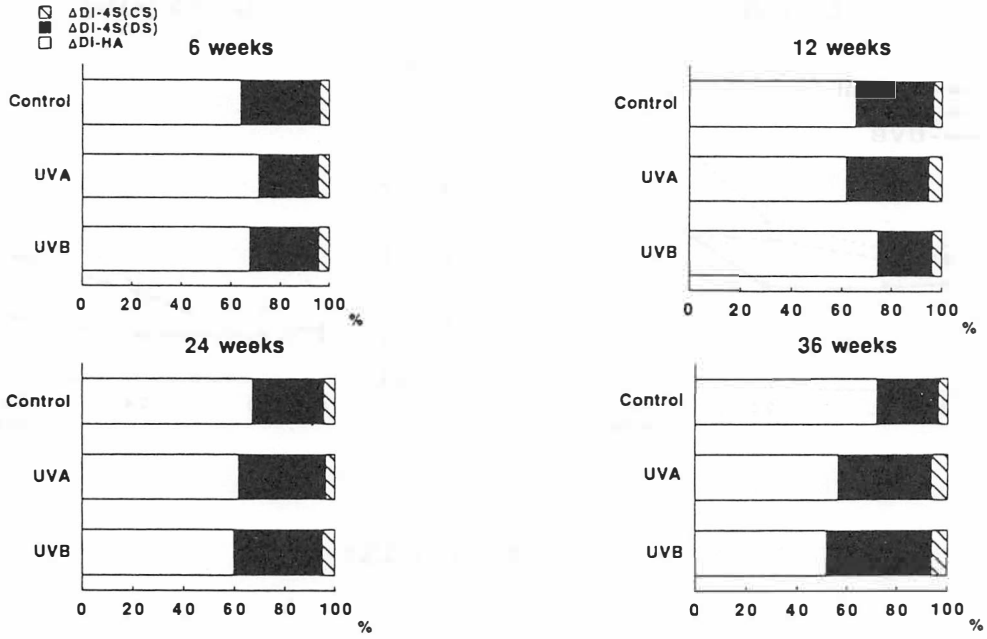


Fig. 3 The compositional change of skin main disaccharide units in UVA-, UVB-irradiated and unirradiated control mice at 6th, 12th, 24th and 36th week.

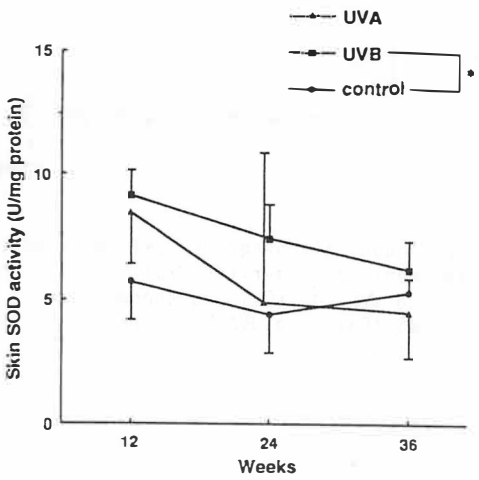


Fig. 4 The effect of UVA or UVB irradiation on SOD activity in hairless mice skin. Results are expressed as mean±SEM (n=4). *p<0.05;analyzed by two factor ANOVA followed by Fisher's protected LSD test.

2) 皮膚抗酸化能の変化

UVB照射群では一様に有意な（P<0.05）SOD活性の上昇がみられたが、UVA照射群では、12週後に上昇したSOD活性は、24週までにほぼコントロールレベルに復した（Fig. 4）。カタラーゼ活性は、全経過を統計処理するとコントロール

群およびUVB照射群に比して、有意な低下がみられた（Fig. 5）。

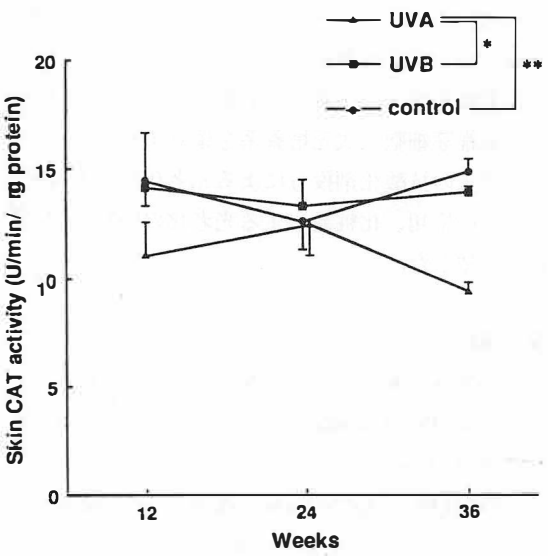


Fig. 5 The effect of UVA or UVB irradiation on Catalase activity in hairless mice skin. Results are expressed as mean±SEM (n=4) .*p<0.05,**n<0.01; analyzed by two factor ANOVA followed by Fisher's protected LSD test.

3) 線維芽細胞の三次元培養

Asp・2-pを添加することにより、20日間の培養で、Fig. 6に示すように、線維芽細胞は重層し、

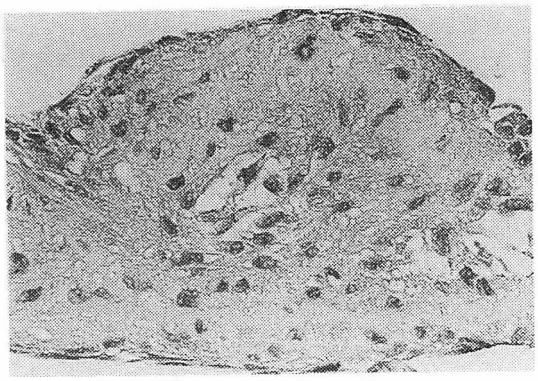


Fig. 6 Microscopic finding of the cell layer supplemented with L-ascorbic acid 2-phosphate. Multilayered fibroblasts supplemented with L-ascorbic acid 2-phosphate are surrounded by a dense extracellular matrix.

細胞外マトリックスも産生し、あたかも真皮の様相を呈するようになった。単層培養に比し、DNA量にして約5倍となり、ムコ多糖の二糖分析でもFig. 7に示すように、Asc・2-p添加群の方がより正常ヒト真皮のムコ多糖に類似するようになった。

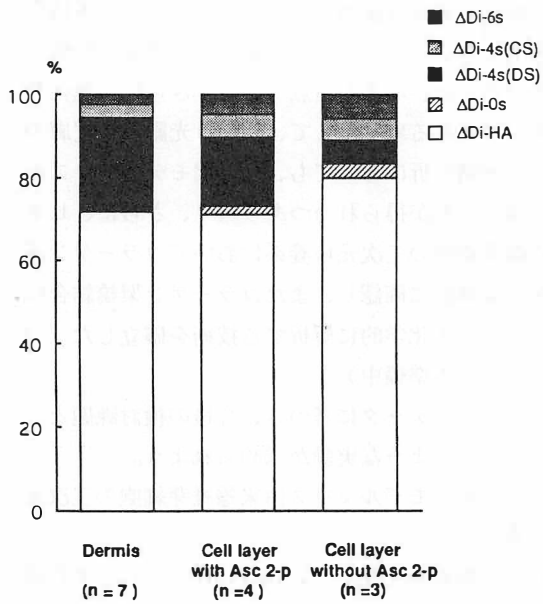


Fig. 7 The compositional change of main disaccharide units in the medium and the cell layer supplemented with or without L-ascorbic acid 2-phosphate. The cell layer supplemented with Asc 2-p became closer to that of the dermis mainly due to the increase of ΔDi-4S (DS)

4 考 案

今回の研究から判明したことを列挙すると以下のようになる。

1） 光老化モデルマウスの皮膚変化は、ヒト光老化を反映したものであり、光老化研究に供することが可能であること。

2） 長期紫外線反復照射による皮膚抗酸化能の変化は、SODとカタラーゼとでは挙動が異なること、急性紫外線照射では減少するSOD活性も、慢性反復照射ではむしろ誘導されること、UVAとUVBと

では、異なる変化を示すこと。

3） 真皮ムコ多糖の二糖分析では、従来の組織化学的変化をほぼ反映した変化を量的に把握できたこと、これらの変化はUVA、UVBにより差異があり、しかも照射回数に依存して変化していくこと[12]。

4） Asc・2-pを添加したヒト線維芽細胞培養系では線維芽細胞は重層し、コラーゲンやムコ多糖を産生すること、ムコ多糖の組成は、真皮に類似していること、などの諸点である。さらに、現在判明しつつある事実として、ヒト日光露出部皮膚のムコ多糖分析においても、光老化モデルマウスと同様の所見が得られつつあり[13]、さらに、ヒト線維芽細胞の三次元培養系においてコラーゲン産生を電顕的に確認し、またコラーゲン架橋結合についても生化学的に解析する技術を確立した（いずれも発表準備中）。

これらのデータに基づき、今後の検討課題としては以下のような実験が求められよう。

1） 光老化モデルマウス由来線維芽細胞の三次元培養の確立。

2） 同培養系を用いて、in vitroにおける紫外線照射を含む新たな酸素ストレスに対し、線維芽細胞の抗酸化能、過酸化脂質量がどのように変動するかの検証。

3） 同じく、コラーゲン架橋結合やムコ多糖組成がどのような挙動を示し、それが光老徴をどのように説明しうるかの検討。

4） 最終的に、cosmeticsとして外用可能な抗酸化物質(現在実用化しているβ-カロテンやビタミンEなどとの比較も含めて）をin vitro投与し、上記の変化をいかに制御しうるかの検索などである。

これらの検討により、長期紫外線照射による変化の一部でも抗酸化物質投与により制御可能であることが判明すれば化粧品に配合することにより、光防御よりもさらに積極的な抗光老化戦略手段としての有用性が明らかになり、臨床応用が可能となるものと期待される。

5 総 括

光老化モデルマウス皮膚を用いて、長期反復紫外線による皮膚抗酸化能、ムコ多糖組成、コラーゲン架橋形成などに対する影響を検討した。同時に、線維芽細胞三次元培養系を確立することにより、将来の抗酸化剤投与による光老化制御実験系としての応用、化粧品による光老化の抗酸化的制御を展望した。

文 献

1. Yoshiki Miyachi, “Photoaging from an oxidative standpoint”, *J. Dermatol. Sci.*, **9** 79-86 (1995)
2. 宮地良樹、“老化の臨床－皮膚”、活性酸素・フリーラジカル、**5** 181-186 (1994)
3. 宮地良樹、“紫外線防御、NMシンポジウム　光と皮膚” 日経メディカル **311** 155-158 (1994)
4. 宮地良樹、“皮膚老化と過酸化脂質”、*Geriatric Medicine.*, **32** 1069-1072 (1994)
5. 宮地良樹、“活性酸素病態学(３)－皮膚科領域における抗酸化剤の臨床応用” 西日本皮膚科 **56** 503-513 (1994)
6. 宮地良樹、“皮膚抗酸化療法とフリーラジカル” *Mebio.*,**11** (4) 72-77 (1994)
7. 宮地良樹、“抗酸化剤による皮膚疾患の治療” 日皮会誌、**104** 1608-1609 (1994)
8. 宮地良樹、“紫外線傷害モデル”、細胞工学別冊 活性酸素実験プロトコール、谷口直之監修 秀潤社 283-287 (1994)
9. Tadayoshi Higuchi, Kazunori Ohnishi, Hiroaki Hayashi, Osamu Ishikawa, Yoshiki Miyachi “Changes in skin disaccharide components correlate with the severity of sclerotic skin in systemic sclerosis”, *Acta. Dermatol. Venereol.*, **74** 179-182 (1994)
10. Katsuyuki Okada, Yumiko Nonaka, Kazunori Ohnishi, Osamu Ishikawa, Yoshiki

Miyachi, "Time-dependent effect of chronic UV irradiation on superoxide dismutase and cata lase activity in hairless mice skin" , *J. Dermatol. Sci.*, 8 183-186 (1994)

11 Osamu Ishikawa, Yoko Kojima, Yoshiki Miyachi, "Disaccharide analysis of dermal fibroblast derived glycosaminoglycans in the three dimensional culture", *J. Dermatol. Sci.*, 8 203-207 (1994)

12 Yumiko Takahashi, Katsuyuki Okada, Kazunori Ohnishi, Osamu Ishikawa, Yoshiki Miyachi, "Disaccharide analysis of the skin glycosaminoglycans in chronically ultraviolet-irradiated hairless mouse," *J. Dermatol Sci.*, in press

13 Yumiko Takahashi, Katsuyuki Okada, Kazunori Ohnishi, Osamu Ishikawa, Yasushi Igarashi, Yoshiki Miuachi, "Disaccharide analysis of human skin glycosaminoglycans in sun-exposed and sun-protected skin of the aged people" *J. Dermatol. Sci.*, in press

太陽光紫外線誘発DNA損傷と ヒト細胞における修復

金沢大学薬学部
二 階 堂 修

We analyzed the induction and repair of various kinds of DNA damage in human cells exposed to a solar UV-simulator, by means of an enzyme-linked immunosorbent assay or an immunoslot blot conjugated with enhanced chemiluminescence (ISB-ECL) system. When we irradiated normal human cells with up to 10J/m² of UVC (germicidal lamps, predominantly 254nm), we could detect the induction of both cyclobutane thymine dimers (TT-dimers) and (6-4) photoproducts (64Ps) in their cellular DNA in dose-dependent manners. Normal human cells completely excised 64ps by 8hr after the exposure, whereas the cells excised only 50% of initial amount of TT-dimers by 24hr. On the other hand, the xeroderma pigmentosum cells beloging to complementation group A (XPA) could not excise both TT-dimers and 64ps.

We succeeded to detect the induction of the Dewar isomers of (6-4) photoproducts in human cells exposed to a solar UV-simulator (Oriel) by using a monoclonal antibody DEM-1 specific for Dewer photoproducts (Dewer-P) in DNA. Normal human cells excised Dewer-P from their DNA faster than TT-dimers, but slower than (6-4) photoproducts. However XPA cells defective in DNA repair could not excise any kinds of DNA damage at all.

1 序 論

太陽光紫外線は295nm～400nmの波長の長波長紫外線を含むが、そこに含まれるUVB（295～320nm）とUVA(320～400nm）は、様々な人体影響、例えば免疫能の低下や皮膚がんの発生をもたらすことが知られている。太陽光紫外線は前述の様に極めて広範囲なスペクトルを有する長波長紫外線であるため、そこに含まれるUVBがDNAに様々な損傷を誘起すること、および UVAが誘起された損傷の一つである(6-4) photoproductを光異性化する[1,2]という特徴がある。即ち、太陽光紫外線の生物学的影響を調べる場合には、そこにふくまれる各種波長の紫外線のDNAへの効果とともに、混在する他の波長の紫外線による複合効果をも併せ考慮する必要があることになる。これまでヒト細胞への紫外線の効果を調べるのに、専ら254nmの単一波長に近い紫外線を特異的に放射する殺菌燈が用いられてきたが、得られた効果は太陽光紫外線の効果を近似するものですら無いことが明らかである。従って、太陽光紫外線の生物・人体影響を解析する場合には、太陽光紫外線に特徴的な損傷を指標として研究をおこなうべきと思われる。

紫外線の照射によって種々の損傷が DNAに誘発されるが、前述の様に損傷の種類とその生成量は波長依存的である。図-1に代表的な損傷の構造式を示した。254nmの紫外線照射（UVC）によって、DNA中の隣合ったthymineが cyclobutane thymine dimer（TT-dimer）と（6-4）photoproduct（64P）に変換されるが、Dewar photoproduct（Dewar-P）は生成されない。一方、320nm 付近の紫外線が照射されると、64PがDewar-Pに光異性化されるので、太陽光紫外線などの長波長紫外線によって生成さ

DNA damege and its repair in human cells exposed to solar light

Osamu Nikaido

Division of Radiation Biology, Faculty of Pharmaceutical Sciences Kanazawa University

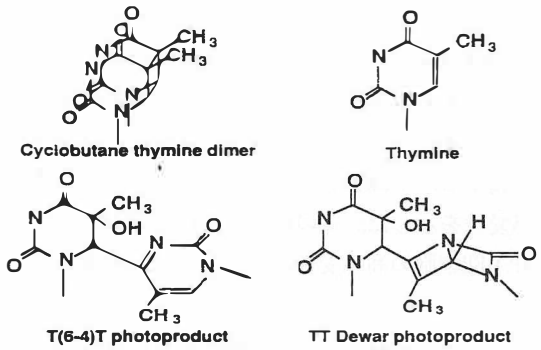


図-1. 紫外線で誘発されるthymineを含む各種の損傷

れるのは主としてTT-dimerとDewar-Pとなる。

これまで我々は、紫外線によって誘発されるDNA損傷を特異的に分別検出するモノクローナル抗体の樹立を行って、ヒト細胞の損傷修復動態や修復の機構について解析してきた。本研究では、太陽光紫外線で特異的に誘発されるDewar-Pのヒト細胞での生成と修復の動態を解析することを目的とした。

2 実 験

2.1 細 胞

ヒト細胞としてGUN-2M(ヒト皮膚由来正常2倍体細胞)、WI38VA13(ヒト胎児肺由来SV40形質転換細胞)とHeLaS3(ヒト子宮頚がん由来細胞)を用いた。また A相補性群に属する色素性乾皮症患者由来細胞(XP1EH, XP20SSV)を用いた。全ての細胞はダルベッコ変法 MEM培地に10%の濃度に仔牛胎児血清を加えた培養液によって、37℃の CO_2 インキュベータ内で培養された。

2.2 紫外線照射

各種の細胞10^6個を直径10cmのプラスチックシャーレに培養して2日後、細胞を10mlの氷冷PBS(-)で2回洗浄し、細胞の乾燥を防ぐため厚さ1mmの石英ガラスをシャーレ上面にかぶせ、氷冷下で種々の紫外線を照射した、主として254nmの紫外線(UVC)を照射する殺菌燈(東芝GL-15)、太陽光中の紫外線をシミュレートする照射装置(Oriel社81192型)、並びに太陽光紫外線そのものを紫外線源として実験に用いた。シミュレート照射装置の照射する紫外・可視域のスペクトル分布を図-2に示した。

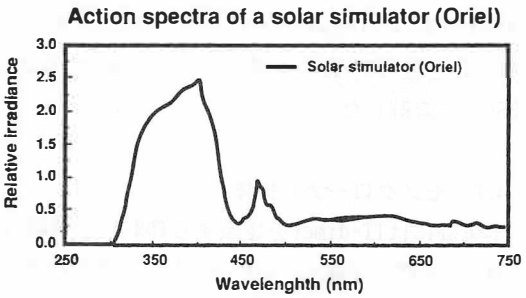


図-2. 太陽光紫外線シュミレート照射装置から照射される紫外・可視域のスペクトル分布

紫外線の線量率は、UVCの場合東京工学のトプコンUV-radiometerで、太陽光紫外線シミュレート照射装置による照射の際には、Mecam社(Scotland)のultraviolet digital radiometer(360nm)で測定した。紫外線照射直後、あるいは一定時間37℃でインキュベート後、細胞を取り出しDNAを抽出した。

2.3 各種細胞の太陽光紫外線感受性の検討

100～200個の各種の細胞を直径10cmのシャーレに播種した後、6時間インキュベートした。ついで氷冷PBS(-)で細胞を洗浄し、氷冷浴下太陽光紫外線シミュレート照射装置で照射を行った。照射後加温した培養液を再び加え、37℃で2週間インキュベートした。シャーレ上に形成されたコロニー数から生存率曲線を求めた。

2.4 損傷の検出

紫外線を照射後、一定時間インキュベートされた細胞からDNAを抽出し、DNA中に残存する各種損傷をモノクローナル抗体を用いて免疫化学的に定量検出した。

2.4.1 DNA抽出

水野等の方法によった[3]。細胞をPBS(-)で洗浄後、EDTAとSDSを含む細胞溶解液で処理し、proteinase Kで一晩37℃でインキニベートした。ついでphenol／chloroform:isoamylalcohol(P/CIA)でDNAを抽出した。抽出されたDNA標品をRNaseで37℃、1時間インキュベートした後、再びP/CIA処理によりDNAを抽出し、ethanol沈殿後、PBS(-)に溶解した。

2.4.2 モノクローナル抗体

本実験にはTT-dimerを認識するTDM-1[3]。TDM-2抗体[4]、64Pを認識する64M-2抗体[4] とDewar-Pを認識するDEM-1抗体[2] を用いた（各種抗体の認識するエピトープについては図-1を参照のこと）。

2.4.3 紫外線損傷検出法

各種のモノクローナル抗体を用いた酵素標識免疫抗体法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay：ELISA）[5]とimmunoslot blotにenhanced chemiluminescence(ISB-ECL)を適用した方法で損傷を検出した。

3 結 果

3.1 太陽光紫外線を照射されたヒト細胞の感受性の検討

太陽光紫外線シミュレート照射装置を用いて細胞の感受性を検討した結果を図-3に示した。

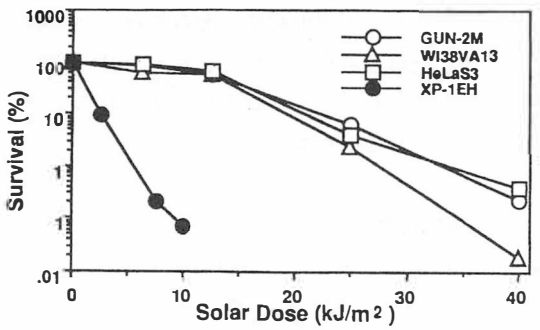


図-3. シュミレーター照射装貴で照射された各種ヒト細胞の生存率曲線

正常ヒト由来GUM-2M、ヒト由来の無限増殖するWI38VA13細胞、子宮頚がん由来HeLaS3細胞では、共に太陽光紫外線に対する感受性に大きな違いは無い結果が得られたが、色素性乾皮症A相補性群に属するXP1EH細胞は、太陽光紫外線に対し高い感受性を示した。この結果は UVCを照射した際のXP1EH細胞の高感受性と矛盾しない（未発表）。

3.2 UVCを照射されたヒト細胞におけるDNA損傷の修復

図-4にUVCを照射された正常ヒト、XPA群細胞におけるTT-dimerと64Pの修復動態を調べた結果を示した。XPA（XP2OSSV）細胞は両損傷の除去修復能力を示さない。正常ヒト細胞は64Pを6～12時間以内に完全に除去するが、TT-dimerは24時間を経過しても約40～50%が除去されるに過ぎないことが明らかである。なおつけ加えるならば、10J／m²のUVC照射ではDewar-Pは全く生成されない。

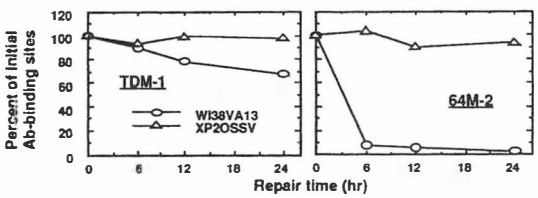


図-4. UVC10J／m²を照射された各種のヒト細胞における損傷の修復動態（左図はTDM－1抗体で検出されたTT-dimer，右図は64Pを示す）

3.3 太陽光紫外線を照射されたヒト細胞におけるDNA損傷の誘発

太陽光紫外線シミュレート照射装置で各種のヒト細胞を照射し、その直後にDNA を抽出して各種の損傷を測定した結果を図-5に示した。左右両図の縦軸は異なっていることに注意されたい。なお、損傷の生成量をUVC(殺菌燈紫外線)等量で示した。TDM-2抗体で測定されたTT-dimerに比較し、64M-2抗体で検出された64Pは生成量が低いことが明らかである。その理由はシミュレート照射装置によって生成された64Pが光異性化されてDewar-Pに変化したことによる。事実、生成量は低いながら

も右に掲げた図からも明らかなようにDewar-Pの生成が認められる。

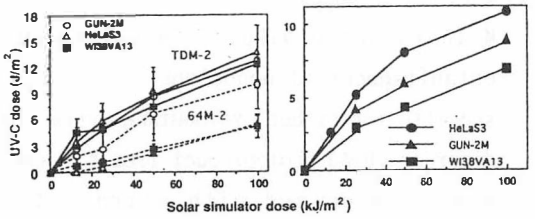


図-5. 太陽光紫外線シミュレート照射装置で照射されたヒト細胞における種々の損傷の誘発（左図はTT-dimerと64Pを、右図はDewar-Pの誘発動態を示す）

3.4 太陽光紫外線シミュレート照射装置で照射されたヒト細胞におけるDNA損傷の修復

照射後、横軸に示した時間インキュベートした細胞よりDNAを抽出し、残存する損傷量を測定したところ、UVCで得られた結果と同様に64Pの除去はTT-dimerのそれより早いことが分かった(図-6)。一方、Dewar-Pの除去動態を見ると、正常ヒト細胞では24時間の間に約70%を除去する能力があることが分かった。

以上の結果から、正常ヒト細胞におけるDewar-Pの除去はTT-dimerより早く、64Pより遅いという結果が得られた。

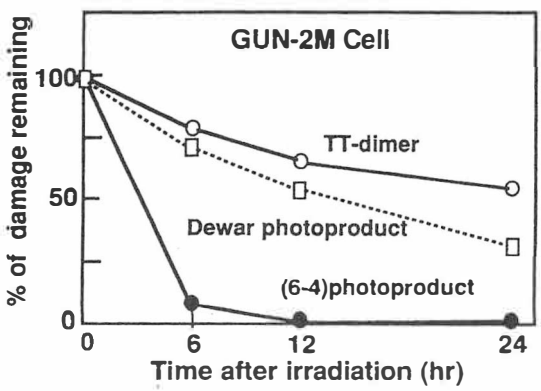


図-6. 正常ヒト細胞における各種損傷の修復

4 考 察

これまでの細胞を用いた多くの研究がUVC(殺菌燈)を紫外線線源として用いたものであり、太陽光紫外線、もしくはシミュレート照射装置による長波長紫外線照射の効果を調べた実験は数える程しか無いのが現実である。我々がこれまで報告し、また本報告で明らかになったように、太陽光紫外線は、広範囲にわたる各種の波長の紫外線を含み、その複合効果が現われることから、太陽光紫外線の生物・人体影響をUVCを用いた実験から推定することは出来ないという結論が導かれる。
本報告では、Dewar-Pの正常ヒト細胞における修復動態を解析した。一方、修復能の欠損を示すXPA 群細胞は何れの損傷をも除去できない結果が得られた（未発表）。

Dewar-Pは太陽光紫外線の照射によった生成される64Pが、同時に太陽光紫外線に含まれる320nmの波長によって効率よく光異性化されることによって生じる。今後は太陽光紫外線に照射されたヒト皮膚組織で、TT-dimerやDewar-Pがどの様に生成・除去されるかを明らかにする予定である[6]。

5 総 括

近年のオゾン層の減少に伴い、これまで我々が経験したことの無い短波長紫外線が地表上に到達し、皮膚がんの多発する可能性が示唆されている。皮膚がんの原因の一つは、太陽光紫外線によって細胞遺伝子に誘発される様々な DNA損傷であることは疑いを容れない。短波長紫外線の増加はTT-dimerと64Pを生成し、64PはさらにDewar-Pに効率よく変換されることから、その修復動態を解析することが重要である。本研究の結果からDewar-Pの除去はTT-dimerと同様に遅滞することが明らかになったが、その変異原性についての詳細な研究が今後必要となると考える。また、コスメトロジーの観点から見ると、UVBのみならずUVAをも効率的に防護する製剤を開発することが急務となるであろう。

6 謝 辞

我々は長年にわたって太陽光紫外線生物学研究の樹立を訴えてきたが、今回コスメトロジー財団から研究助成を受けたことにより、その基礎を築く研究を完成させることが出来た。深く感謝すると共に貴財団の今後の発展を祈るものである。

引用文献

1) Taylor J.-S. and M. P. Cohrs, "DNA, light and Dewar pyrimidone : the structure and biological significance of TpT3", *J. Am. Chem. Soc.*, 109 2834-2835 (1987)

2) Matsunaga T., Y. Hatakeyama. M. Ohta. T. Mori. and O. Nikaido, "Establishment and characterization of a monoclonal antibody recognizing the Dewar isomers of (6-4) photoproducts", *Photochem. Photobiol.*, 57 934-940 (1993)

3) Mizuno T., T. Matsunaga, M. Ihara and O. Nikaido, "Establishment of a monoclonal antibody recognizing cyclobutane-type thymine dimers in DNA : a comparative study with 64M-1 antibody specific for (6-4) photoproducts", *Mutation Res. DNA Repair.*, 254 175-184 (1991)

4) Mori T., M. Nakane, T. Hattori, T. Matsunaga. M. Ihara and O. Nikaido, "simultaneous establishment of monoclonal antibodies specific for either cyclobutane pyrimidine dimer or (6-4) photoproduct from the same mouse immunized with ultraviolet irradiated-DNA", *Photochem. Photobiol.*, 54 225-232 (1991)

5) Matsunaga, T., T. Mori and O. Nikaido. "Base sequence specificity of a monoclona antibody binding to (6-4) photo-products", *Mutation Res.*, 235 187-194 (1990)

6) Chadwick C. A., C. S. Potten, O. Nikaido, T. Matsunaga, A. R. Young, "The detection of cyclobutane thymine dimers, 6-4 photolesions and the Dewar photoisomer in sections of UV-irradiated human skin using specific antibodies, and the demonstration of depth penetration effects", *Photochem. Photobiol.*, in press.

いわゆる"しみ"(肝斑など)の発症機構とその増悪因子に関する研究

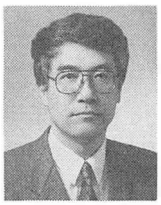
秋田大学医学部　秋田大学医学部　秋田大学医学部
富田　靖・前田　憲寿・松永　純

Normal human epidermal melanocytes became swollen and more dendritic with an increase in the amount of tyrosinase activity and immunoreactive tyrosinase-related protein 1 (TRP-1) when they were cultured for 2days with each one of [Nle^4, D-Phe^7] α melanocyte-stimulating hormone(αMSH), follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH). Estradiol, estriol, progesterone and ACTH affected the melanocyte morphology and the amount of TRP-1, but did not increase the tyrosinase activity. These data suggest that all of those hormones, especially αMSH, FSH and LH, may be responsible for the induction of facial hyperpigmentation such as chloasma.

1　緒　言

多くの日本人女性は、中年になると顔面の色素沈着、いわゆる"しみ"に悩まされる。この顔面の色素沈着の大部分は、肝斑と呼ばれる、眼周囲や頬部の褐色の色素増加で、早い女性で30歳前後より出現する。この肝斑の発症機序は不明であるが、妊娠時には増悪すること[1]、女性により月経時にも濃くなること[2]、閉経後の女性に肝斑が見られないこと、避妊用のピルにより肝斑が誘発されること[3]、そして男性には極めてまれであることなどから、黄体形成ホルモン、卵胞刺激ホルモン、卵胞ホルモン、黄体ホルモンなどの女性ホルモンが肝斑の発症および増悪に関与していることが推察される。

さてこれらの女性ホルモンが直接に色素細胞に働いて、メラニン色素の増加をもたらすのか否かは、肝斑の発症機序を知る上で重要であるにも関わらず、ヒト色素細胞を用いてこれらのホルモン種々の女性ホルモンの効果を、細胞形態の変化、メラニン生成に関与する酵素の増加を指標にして調べた。



Effect of pituitary and ovarian hormons on normal human melanocytes in vitro.

Yasushi Tomita
School of Medicine
Akita University

2　実　験

2・1　材料

実験に使用した主な試薬は以下のとおりである。phorbol-12-myristate-13-acetate(PMA), insulin, hydrocortisone, N^6,O^2-dibutryl cyclic adenosine3',5'-monophosphate（dbcAMP）, [Nle^4, D-Phe^7]α melanocyte-stimulating hormone（以下単にαMSHと略す）, follicle-stimulating hormone（FSH）以上はSigma製。βmelanocyte-stimulating hormone（βMSH）(Bachem Co.), luteinizing hormone（LH）(UCB bioproducts), MCDB153(極東製薬), epidermal growth factor（EGF）(湧永製薬), bovine pituitary extract (Clonetics Co.), human basic fibroblast growth factor（bFGF）(Amersham社)。

2・2　色素細胞の培養

色素細胞の培養は、以前に我々が開発した吸引水疱を用いた方法によって行った[4]。簡単にその

方法を述べる。健常人男性（年齢20～24才）の前の直接作用を調べた報告はいまだにない。そこで本研究において、培養ヒト正常色素細胞に対する腕をヒビテンで消毒後、抗真菌剤ビフォナゾール含有クリームを滅菌ヘラで塗布する。20mlのディスポザブル注射筒の外筒を4ヶ所または8ヶ所皮膚に密着し、陰圧（300-350mmHg）で、1時間～2時間吸引すると表皮と真皮が遊離し、吸引水疱が形成される。表皮全層よりなる水疱蓋を無菌的に切除し、それを0.25%トリプシンEDTA/PBS液で37℃、30分処理して、表皮細胞をバラバラに分離する。これら表皮細胞の大部分は角化細胞で、色素細胞は数%しか含まれていないが、後述の培地にて培養を続けると、角化細胞は増殖せず分化をとげ死滅し、いずれ色素細胞のみとなる。

2・3 色素細胞の形態とチロシナーゼ活性およびチロシナーゼ関連蛋白量の測定

単離した色素細胞を20ng/mlPMA、ウシ脳下垂体抽出液含、EGF、インシュリンとハイドロコルチゾンを含む10%FCS／MCDB153培地で4日間培養後、10%FCS／MCDB153のみの培地に交換し、さらに3日間培養した。この初代培養ヒト色素細胞に種々のホルモンを添加し、二日間培養した後にメタノール／アセトンで固定した。これを抗チロシナーゼ関連蛋白1抗体（TMH-1）[5] とFITC抗ラットIgG抗体で染色し、個々の細胞の一個あたりの相対蛍光強度を測定して、チロシナーゼ関連蛋白1（tyrosinase-related protein 1、TRP-1）量の相対変化を調べた。また蛍光顕微鏡で写真を撮り、色素細胞の形態変化（樹状突起の数、細胞周囲長、細胞面積）をイメージスキャナーを用い、すでに報告した方法[6]で測定した。またチロシナーゼ活性を前田らの方法[7]で定量した。

2・4 統計的処理

個々の色素細胞30個について蛍光強度、樹枝状突起の数、周囲長、面積のそれぞれの平均値と標準偏差を算出した。有意差検定にはStudent's t-testを用いた。

3 結 果

3・1 下垂体ホルモンのTRP-1への影響

まず下垂体前葉から分泌される性ホルモンである黄体形成ホルモン(LH)、卵胞刺激ホルモン(FSH)について、同じ下垂体から分泌されるACTHと、β色素細胞刺激ホルモン(βMSH)とともに比較検討した。またすでに色素細胞にたいする刺激効果が報告されているα色素細胞刺激ホルモン（αMSH）[8,9]を、陽性コントロールとして加えて検討した。βMSH、αMSH、ACTH、FSH、LH について、それぞれ終濃度が1ng／ml、10ng／ml、100ng／ml、1μg／mlになるように培地へ加えて培養した後、色素細胞中のTRP-1の相対量を測定し、それぞれの平均値±SDを図1に示した。

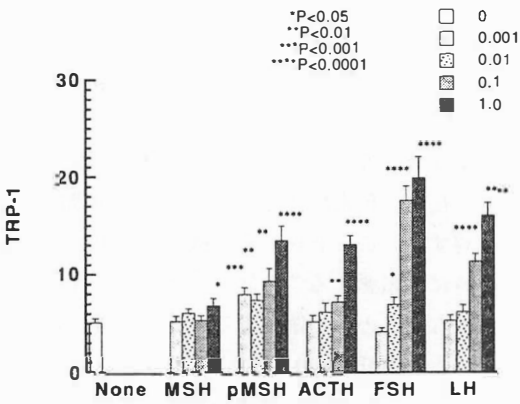


図1. 下垂体ホルモンによる色素細胞内チロシナーゼ関連蛋白1への影響

0.001μg／mlから1.0μg／mlまでの濃度の種々のホルモンを培地に添加して、色素細胞を2日間培養した後、細胞を固定し、チロシナーゼ関連蛋白1(TRP-1)の相対量(細胞1個当たりの平均値＋／－標準偏差)を測定した。

MSHはβmelanocyte-stimulating hormone色素細胞刺激ホルモンを、pMSHは[Nle^4, D-Phe^7]αmelanocyte-stimulating hormoneを、ACTHは副腎皮質刺激ホルモンを、FSHはfollicle-stimulating hormone卵胞刺激ホルモンを、LHはluteinizing hormone黄体形成ホルモンを示す。

TRP-1は、メラニン生成の場であるメラノソームに局在し、チロシナーゼとともにメラニン生成に関与している[10]。したがって、TRP-1の増加は、メラニン生成機能の亢進を意味している。

αMSH、ACTH、FSH、LHにおいて、1ng／mlから1μg／mlで濃度依存的にTRP-1の増加が認められた。特に、100ng／mlと1μg／mlのFSHでは著しい増加を認めた。一方、βMSHは1μg／mlを除き、図1中の無添加のNoneとほぼ同じ値を示し、TRP-1量の増加を認めなかった。

3・2　下垂体ホルモンの細胞形態への影響

生体表皮基底層に散在する色素細胞は、紫外線などの刺激により、メラニン生成が亢進し、かつまた周囲の角化細胞へメラニン顆粒を盛んに転送することは周知の事である。その際、色素細胞は樹枝状突起を増加させ、かつそれらを延長させたり、細胞自体が大きくなったりする[11]。従って細胞形態の変化も色素細胞の活動性の指標になると考え測定した。細胞形態の測定として、細胞1個あたりの樹枝状突起の数、細胞周囲長（複数の樹枝状突起の長さの和を反映するものとして）、細胞面積のそれぞれについて定量した。

LHのみが、細胞周囲長に有意の増加を示さなかったことを除けば、全てのホルモンが多少の違いがあっても、いずれも細胞形態を変化させた（図2-4）。特にβMSHとαMSHは、0.01-1.0μg／mlにおいて樹枝状突起数、細胞周囲長、細胞面積の全てについて著しい増加を示した。

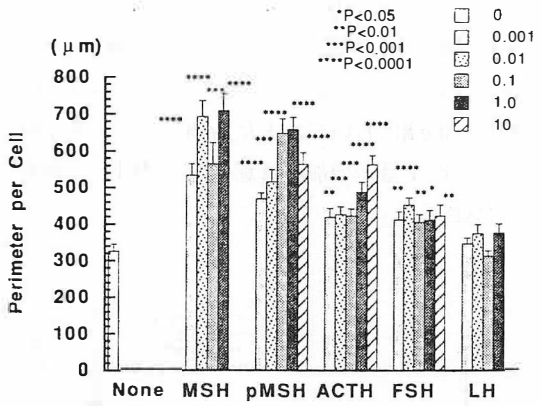


図3．下垂体ホルモンによる色素細胞の周囲長への影響

実験条件は図1と同様。グラフは細胞1個あたりの平均周囲長＋／－標準偏差を示す。
図中のMSHはβmelanocyte-stimulating hormone色素細胞刺激ホルモンを、pMSHは[Nle⁴, D-Phe⁷]αmelanocyte-stimulating hormoneを、ACTHは副腎皮質刺激ホルモンを、FSHはfollicle-stimulating hormone卵胞刺激ホルモンを、LHはluteinizing hormone黄体形成ホルモンを示す。

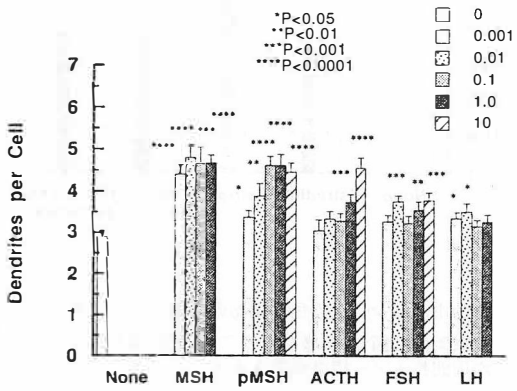


図2．下垂体ホルモンによる色素細胞の樹枝状突起数への影響

実験条件は図1と同様。グラフは細胞1個あたりの平均突起数＋／－標準偏差を示す。図中のMSHはβmelanocyte-stimulating hormone色素細胞刺激ホルモンを、pMSHは[Nle⁴, D-Phe⁷]αmelanocyte-stimulating hormoneを、ACTHは副腎皮質刺激ホルモンを、FSHはfollicle-stimulating hormone卵胞刺激ホルモンを、LHはluteinizing hormone黄体形成ホルモンを示す。

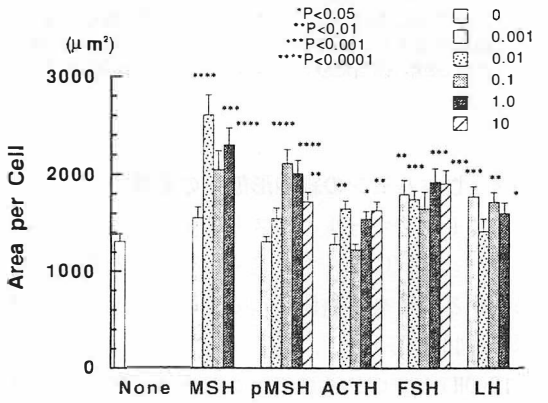


図4．下垂体ホルモンによる色素細胞の胞体の大きさ（面積）への影響

実験条件は図1と同様。グラフは細胞1個あたりの平均面積＋／－標準偏差を示す。図中のMSHはβmelanocyte-stimulating hormone色素細胞刺激ホルモンを、pMSHは[Nle⁴, D-Phe⁷]αmelanocyte-stimulating hormoneを、ACTHは副腎皮質刺激ホルモンを、FSHはfollicle-stimulating hormone卵胞刺激ホルモンを、LHはluteinizing hormone黄体形成ホルモンを示す。

3・3　性ホルモンのTRP-1への影響

卵巣から分泌される女性ホルモンとして、エストラジオール、エストリオール、プロジェステロン、17(OH)-プロジェステロンについて検討した。

エストラジオールとエストリオールでは、0.001-1.0μMにおいて、また1μMプロジェステロンに、TRP-1量の増加が有意（$p<0.001$）に認められた(図5)。

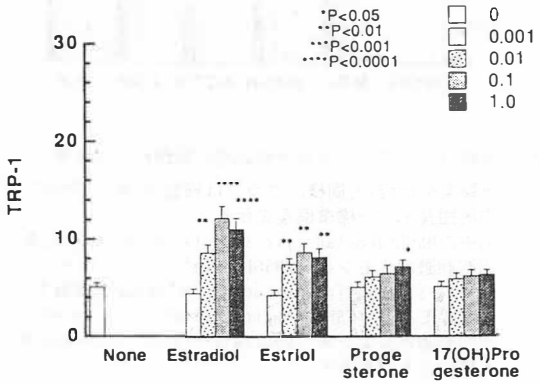


図5. 女性ホルモンによる色素細胞中チロシナーゼ関連蛋白1への影響

0.001μMから1.0μMまでの濃度の図中に示すホルモンを培地に添加して、色素細胞を2日間培養した後、細胞を固定し、チロシナーゼ関連蛋白1(TRP-1)の相対量(細胞1個当たりの平均値＋／－標準偏差)を測定した。

3・4　性ホルモンの細胞形態への影響

エストラジオール、エストリオール、プロジェステロン、17(OH)-プロジェステロンの細胞形態に対する影響を下垂体ホルモンの場合と同様に調べた(図6-8)。

17(OH)-プロジェステロンの樹枝状突起数と細胞周囲長に対して有意の影響を示さなかった事を除けば、いずれの性ホルモンも細胞形態へ強い影響を与えていた。エストリオールにおいては、1nMから10μMまで濃度依存性に効果が強まったが、エストラジオールでは0.01と0.1μMで強い効果を示し、それより高濃度の1と10μMでは逆に効果が減少を示している(図6-8)。

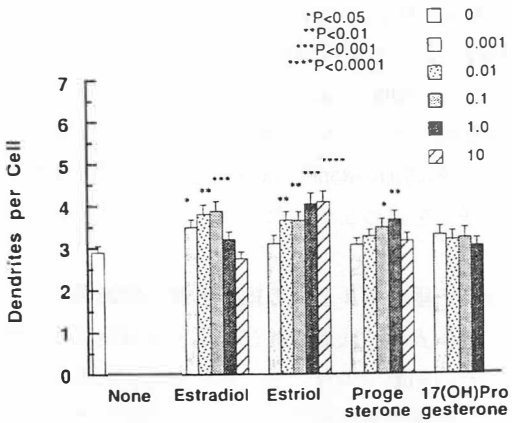


図6. 女性ホルモンによる色素細胞の樹枝状突起数への影響

実験条件は図5と同様．グラフは細胞1個あたりの平均突起数＋／－標準偏差を示す。

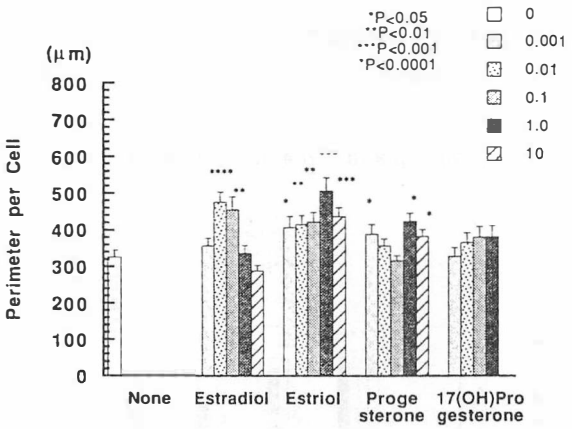


図7. 女性ホルモンによる色素細胞の周囲長への影響

実験条件は図5と同様．グラフは細胞1個あたりの平均周囲長＋／－標準偏差を示す。

3・5　ホルモンのチロシナーゼ活性に対する影響

本研究で用いたホルモン全てについて、色素細胞中のチロシナーゼ活性に対する影響を検討した。

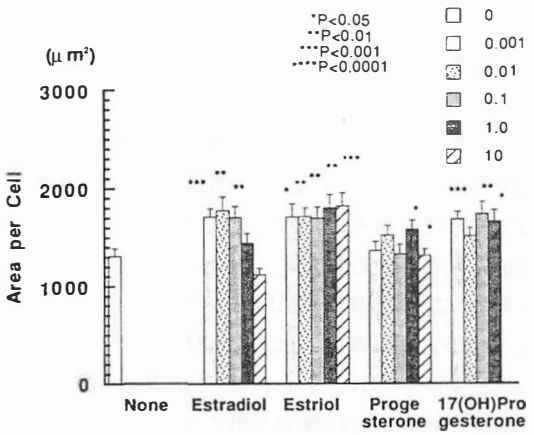


図8. 女性ホルモンによる色素細胞の胞体の大きさ（面積）への影響

実験条件は図5と同様。グラフは細胞1個あたりの平均面積＋／－標準偏差を示す。

図9に示すように、高濃度のβMSH、αMSH、FSH、LH、において、チロシナーゼ活性の増加が認められた。エストラジオール、エストリオール、プロジェステロン、17(OH)－プロジェステロンにおいては、有意の増加が認められなかった。

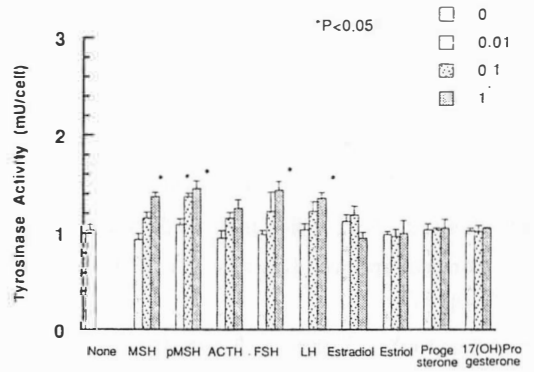


図9. 種々ホルモンによる色素細胞内チロシナーゼ活性量への影響

0.001μg／mlから1.0μg／mlまでの濃度のMSH(色素細胞刺激ホルモン)、pMSHA([Nle⁴, D-Phe⁷]αmelanocyte-stimulating hormone)、ACTH(副腎皮質刺激ホルモン)、FSH(卵胞刺激ホルモン)、LH(黄体形成ホルモン)を、また0.001Mから1.0Mまでの濃度の図中の女性ホルモンを培地に添加して、色素細胞を2日間培養した後、細胞を固定し、チロシナーゼ活性を測定した。グラフは細胞1個当たりの活性平均値＋／－標準偏差を示す。

4 考 察

日本人をはじめ黄色人種の中年女性に多い肝斑の発症機序は、現在不明である。妊娠時の婦人の皮膚の色素が増加すること[1]、月経周期の終り頃に眼周囲の色素が増加すること[2]が知られている。また皮膚科の日常診療で気付くことであるが、閉経後の女性には肝斑が減少していくことからも女性ホルモンと肝斑との関係をうかがわせる。月経時あるいは妊娠時にはMSHのほかにLH(黄体形成ホルモン)、FSH(卵胞刺激ホルモン)、エストロジェン(卵胞ホルモン)、プロジェステロン（黄体ホルモン）などの女性ホルモンの血中濃度が増加することから、これらのホルモンが色素沈着に関与していると考えられる。またアメリカでは避妊用のピルを内服している女性の約29%に肝斑が発症すると報告されていること[3]などから、ピルに含まれるエストロジェンやプロジェステロンが肝斑の発症に関わっていると推測される。

Snellら[12]の動物実験の結果でも、卵巣を摘除したモルモットにエストロジェンを投与すると、皮膚のメラニンを増加させることが観察されている。その場合、少量のプロジェステロンはややメラニンを増加させるものの、大量のプロジェステロンは逆にメラニンを減少させるという。Snellらの動物実験以来、女性ホルモンの色素生成に対する影響をみた研究の報告は見当らない。

ところで、魚類、両生類においては、MSHが色素細胞に直接作用して、皮膚色の調節に関与している事は、あまりにも有名である。このMSHが、ヒトの肝斑の発症に関与するのではないのかと考え、肝斑患者の血中MSH量の測定が行われたようであるが、positive dataが得られていない。例えば、ピルにより発症した肝斑患者の血中MSHは決して高くはなかった[3]。そんな訳で現在ではMSHが肝斑の発症に関係しているとは考えられていない。しかし培養ヒト色素細胞では、MSHによって細胞内のcAMPが増加することが知られており、またチロシナーゼ活性の増加も報告されている[13]。そこで本研究では、このMSHを女

性ホルモンの効果を比較する上での、positive controlとして加えた。

本研究において、検討した3つのパラメーター、すなわちは細胞形態の変化とTRP-1そしてチロシナーゼは、いずれも表皮での色素増加に関係するパラメーターである。つまり紫外線照射により皮膚のメラニンが増加するが、このとき表皮基底層に散在する色素細胞が大きくなり、そして樹枝状突起が著しく延長し、周囲の角化細胞にメラニン顆粒を盛んに配送することが観察されている[11]。またチロシナーゼはメラニン生成の律速酵素、つまりメラニン生成で一番重要な酵素であることはあまりにも有名である。TRP-1は褐色のメラニン生成に関与する蛋白として知られていたが、メラニン生成経路の下流で働くdihydroxyindole carboxylic acid oxidase（DHICA oxidase）であることが最近判明した[10]。従ってチロシナーゼとTRP-1の増加は、色素細胞内でのメラニン生成の亢進を意味しており、また色素細胞の樹枝状突起の延長は、増加したメラニン顆粒の配達の増加を意味していると考えて良い。

結果に示したように、LHの細胞周囲長とプロジェステロンの細胞面積に対して有意の効果を示さなかった事を除き、今回調べた全てのホルモンが色素細胞に刺激を与え細胞形態の変化を誘導した。TRP-1もβ-MSHとプロジェステロンを除き、他のホルモンで大なり小なりの反応を示した。特にFSH、LH、エストラジオールにおいては、著しい増加を示した。しかしチロシナーゼ活性はαおよびβ-MSH、FSH、LHで有意の増加を示したのみであった。細胞形態の変化とTRP-1そしてチロシナーゼの増加の3つのパラメーターは、今回調べたホルモンの刺激にいつも平行して反応する訳ではないので、これらはそれぞれ異なった、レセプターとシグナル伝達系を持っているようである。それでもα-MSH、FSHそしてLHの3者は、細胞形態変化、チロシナーゼ活性、TRP-1量の3つのパラメーターを増加させた事から、生体内の色素細胞に対しても直接に作用する可能性を強く示している。

ところで、前にも述べたように閉経後の女性には肝斑が見られなくなる。閉経後のホルモン動態を見ると、エストロージェンが著しく減少するのに対して、そのnegative feedbackとしてFSH、LHが著しく増加する[14]。もしFSHとLHが肝斑野出現に関与しているとすると、閉経後のFSHとLHの増加と肝斑の消失は矛盾してくる。ホルモンの動態からみると、むしろエストロジェンやプロジェステロンが肝斑の形成に関与しているように見える。しかし今回のin-vitroの実験結果では、エストロジェンやプロジェステロンは、色素細胞の形態変化に対して直接刺激効果をそれなりに示してはいるが、TRP-1やチロシナーゼに対しては有意な作用を示さず、強力な肝斑を引き起こす犯人とするには、もの足らない。だがエストロジェンあるいはプロジェステロンがある細胞に作用して、その細胞が色素生成促進因子を産生して、その結果肝斑が生ずる可能性がある。今後この点に関しての検討を進める必要がある。

文　献

1) Snell RS., Bischitz PG., "The melanocytes and melanin in human abdominal wall skin a survey made at different ages in both sexes and during pregnancy", *J. Anat.*, 97 361 (1963)

2) Snell RS., Turner R., "Skin pigmentation in relation to the menstrual cycle", *J. Invest Dermatol.*, 47 147 (1966)

3) Resnick CS., "Melasma induced by oral contraceptive drugs", *J.A.M.A.*, 199 601 (1967)

4) Tomita Y., Yamamoto H., Sato C., et al., "Efficient culturing of human melanocytes from suction blisters", *Tohoku J.Exp Med.*, 147 219 (1985)

5) Tomita Y., Shibahara S., Takeda A., et al. "The monoclonal antibodies TMH-1 and TMH-2 specifically bind to a protein encoded at the murine b-locus, not to the authentic tyrosinase encoded at

c-locus", *J. Invest Dermatol.*, **96** 500(1991)

6) Tomita Y., Iwamoto M., Masuda T.,et al "Stimulatory effect of prostaglandin E2 on configuration of normal human melanocytes in vitro", *J. Invest. Dermatol.*, **89** 299 (1987)

7) Maeda K., Tomita Y., Fukuda M., et al. "Effects of staurosporine, PMA and A23187 on human melanocyte cultures with dibutyryl cyclic AMP", *Br, J, Dermatol.*, **126** 118 (1992)

8) Lerner AB., McGuire JS., "Effect of αMSH and βMSH on the skin color of man", *Nature.*, **189** 176 (1961)

9) Lee TH., Lee MS., "Studies on MSH induced melanogenesis:effect of longterm administration of MSH on the melanin content and tyrosinase activity", *Endocrinology.*, **88** 155 (1971)

10) Kobayashi T., Urabe K., Winder ., A et al. "DHICA oxidase activity of TRP1 and interactions with other melanogenic enzymes", *Pig Cell Res.*, **7** 227 (1994)

11) Quevedo WC. Jr, Szabo G., Virks J., et al. "Melanocyte populations in UV-irradiated human skin", *J. Invest. Dermatol.*, **45** 295 (1965)

12) Snell RS. "Hormonal control of pigmentation in man and other mammals", In : Advan ces in biology of skin, vol. VIII, The pigmentary system. Pergamon Press, Oxford, p447,(1996)

13) Pawelek JM., "Factors regulating growth and pigmentation of melanoma cells", *J. Invest. Dermatol.*, **60** 201 (1976)

14) 倉智敬一,“女性内分泌機能の異常と皮膚病変” 現代皮膚科学大系2B. 中山書店 p96, (1981)

尋常性痤瘡の発症機序の解明のための皮膚の保湿機能と脂質代謝に関する研究

新潟大学医学部
山　本　綾　子

In acne vulgaris, abnormal follicular keratinization is important for comedo formation, yet no precise mechanisms of comedogenesis is known. The present study examined the inter-relationship between sebum secretion rate (SSR), and lipid content and water-barrier function (WBF) of stratum corneum (SC) in 36 acne patients and 29 control subjects. All major SC lipid classes were separated and quantitated by thin-layer chromatogrphy/photodensitometry. WBF was evaluated by measuring transepidermal water loss (TEWL), and hygroscopic property and water-holding capacity of SC. SSR for 3h was significantly larger in patients with moderate acne than in control subjects, but no significant difference was noticed between patients with mild acne and control subjects. Significant differences between acne patients both moderate and mild and control subjects were noted in the amount of sphingolipids (ceramides and free sphingosine), but not for any other lipid classes. Furthermore in acne patients, lower amount of sphingolipids were observed corresponding to diminished WBF. These results suggest that impaired WBF caused by decreased ceramides may be responsible for comedo formation, since barrier dysfunction is accompanied by hyperkeratosis of follicular epithelium.

1　緒　言

尋常性痤瘡(痤瘡)は、思春期に一般的な皮膚疾患である。しかしその発症機序についてはいまだ不明の点が多く、治療についてもその効果は充分とは言えない。

痤瘡の最も初期の病理組織学的変化は、脂腺性毛包の毛包漏斗下部の過角化によって引き起こされる面皰形成である。これまで、面皰形成に及ぼす脂質の役割に関して種々の研究がなされている。なかでもKligman[1]の遊離脂肪酸説が古くから知られている。これを要約すると皮脂分泌の亢進によって増加した遊離脂肪酸が刺激性を有するために、毛包上皮の過角化を来すというものである。さらに80年代後半にあいついで2つの仮説が提言された。

Water-barrir function and lipid composition of stratum corneum in acne vulgaris

Ayako Yamamoto

Department of Dermatology, Niigata University School of Medicine

Downingら[2]は、痤瘡患者の皮脂分泌の亢進によって角層のセラミド1に結合している脂肪酸に皮脂由来の脂肪酸が多く含まれ、リノール酸含有量が相対的に減少していることを指摘した。すなわち、毛包上皮における必須脂肪酸欠乏状態が、バリアー機能を低下させ、*propinibacterium acnes* (*P. acnes*)の増殖をもたらし、炎症を惹起すると推察した。また、Melnikら[3]は角層の剥離の調節因子として、コレステロールサルフェイトの役割に注目した。彼らによれば、皮脂分泌の亢進による遊離脂肪酸の増加の結果、コレステロールがエステル化される割合が増えるために、遊離コレステロールが減少し、コレステロール／コレステロールサルフェイト比を低下させ、毛包上皮の過角化が誘導される。この2つの説は、増加した皮脂が角質細胞間脂質を希釈すると推測している点で共通している。しかしこれらの説では痤瘡が皮脂分泌量の最も高い20歳代～30歳代ではなく、思春期に多く発症し、20歳代ではむしろ軽快する理由が示されていないために疑問が残っている。

一方、最近Prokschら[4]は、マウスを用いた実験で、表皮のDNAと脂質の合成が角層の水分バリアー機能の変化によって制御されることを示した。

この説に従えば、ヒトにおいても水分バリアーの障害は上皮の増殖を亢進させる可能性がある。なかでも脂腺性毛包の漏斗下部は、一旦過角化を来すと容易に閉塞する機序が予想される。

そこで本研究では、痤瘡患者において水分バリアー機能を初めて検討し、面皰形成機序について考察したので報告する。

2 実 験

1. 実験の対象

未治療の痤瘡患者を、PlewigとKligmanの痤瘡重症度分類[5]によって面皰型と丘疹膿疱型のgradeIからgradeIVに分類し、面皰型のgradeI(軽症群：顔面半側の面皰数が9個以下で丘疹や膿疱を伴わない）の患者25例（平均年齢21.1±3.4歳)、およびgradeII(中等症群：顔面半側の面皰数が10個以上20個未満で、小数の丘疹や膿疱を伴う）の患者11例（20.5歳±3.2歳)を対象に実験を行った。対照として16歳から24歳の顔面に皮膚炎や痤瘡のない健常人29名(21.8±2.9歳）を被験者とした。

2. 実験の方法

(1) 保水機能

角層の水分バリアー機能は、transepidermal water loss（TEWL）および角層の水分含有量（角層水分量）により評価した。

TEWLは、evaporimeter（EP1,Servo, Med., Stockholm, Sweden）を用い[6]、角層水分量は高周波伝導測定装置（SKICON-100、IBS社、浜松）を用いて[7]、いずれも頬部を被験部位として測定を行った。測定は、室温20℃、湿度50%の条件に設定した皮膚機能検査室で行い、前夜洗顔後12時間以上経過した被験者に、安静を保たせて測定した。

(2) 角質細胞間脂質と皮脂分泌量の測定

保水機能を測定した後、頬部から、カップ法により角質細胞間脂質を採取した[8]。さらに前額を軽くエーテルで拭き取った後、吸着法にて3時間の皮脂分泌量を測定した[9]。

(3) 角質細胞間脂質の分画と定量

脂質組成の分析は、高性能薄層クロマトグラフィー（HPTLC）を用いた[8]。HPTLCプレート上に採取した脂質を塗布し、展開、発色後にphotodensitometerを用いて各脂質分画を定量した[8]。

(4) スフィンゴ脂質の抽出と分画[10]

カップ法で採取した脂質を、シリカゲルカラムを用いて、極性および非極性脂質に分画した。極性脂質画分より、TLCにて展開の後ninhydrin反応にて発色させて定量した。

3 結 果

1) 角層の水分バリアー機能の評価

水分バリアー機能の成績を痤瘡群と対照群で比較すると、痤瘡群ではTEWLが高く、角層水分量が低い値を示した（表1）。すなわち痤瘡患者では、健常人に比較して保水機能の低下が明らかであった。また、痤瘡の重症度の比較では、中等症群が軽症群よりも保水機能の低下が見られた。（表 1）

尋常性痤瘡患者と健常対照者の角層水分バリアー機能の比較（平均値±標準偏差）[10]

	尋常性痤瘡患者		健常対象者 (n=29)
	中等症群 (n=11)	軽症群 (n=25)	
TEWL (g/m²h)	16.8±3.8**	14.4±2.5**	10.3±2.4**
conductance(μ℧)	52.1±6.7**	92.8±8.0**	188.9±12.7**

**3群間でp<0.01

2) 皮脂分泌量

吸着法で得られた前額の皮脂分泌量は、中等症群で対照群よりあきらかに高値を示したが、軽症群では有意の差がなかった。（表 2）。

3) 角質細胞間脂質の組成

頬部からカップ法により採取された角質細胞間脂質における各脂質画分の重量を比較すると、セラミドは、痤瘡群が対照群に比較して明らかに低

い値を示したが、他の脂質成分には、統計的に有意の差はなかった（表 2）。単位面積当たりの総脂質量の比較では、中等症群で多い傾向にあったが、3群間で統計的に有意の差はなかった(表 2)。

表 2 尋常性痤瘡患者と健常対照者の皮脂分泌量（$\mu g/cm^2/3h$)と角質細胞間脂質量($\mu g/cm^2$)の比較(平均値±標準偏差)[10]

	尋常性痤瘡患者		健常対象者 (n=29)
	中等症群 (n=11)	軽症群 (n=25)	
皮脂分泌量	472.5±101.7*	351.0±91.0	377.8 ±153.5
スクアレン	27.42±4.46	16.37±3.80	16.66±2.58
ワックスエステル	51.03±7.10	36.60±5.50	39.21±3.39
トリグリセライド	40.88±6.00	35.33±3.50	35.81±3.18
遊離脂肪酸	27.81±1.32	31.24±3.57	31.54±3.16
コレステロール	5.79±0.71	6.53±0.80	5.72±0.65
コレステロールエステル	7.65±0.30	6.85±0.94	5.77±0.87
コレステロールサルフェイト	0.54±0.18	0.74±0.20	0.87±0.18
セラミド	3.40±0.45*	4.07±0.87*	6.49±0.98
リン脂質	0.77±0.15	0.75±0.21	0.79±0.09
総脂質量	165.29±20.1	138.48±10.22	142.86±15.75

*健常対照者に比較してp<0.01

表 3に、極性脂質画分に占めるスフィンゴ脂質の割合を示す。スフィンゴシンとセラミドのいずれも、対照群に比べ痤瘡群は減少が見られ、中等症群が最も低値を示した。

表 3 尋常性痤瘡患者と健常対照者の角層の極性脂質におけるスフィンゴ脂質の割合(%)（平均値±標準偏差)[10]

	尋常性痤瘡患者		健常対象者 (n=29)
	中等症群 (n=11)	軽症群 (n=25)	
スフィンゴシン	0.18±0.05**	0.30±0.07**	0.74±0.09**
セラミド	29.08±2.07**	35.46±3.94**	44.96±5.83**

**3群間でp<0.01

4 考 按

今回の実験では、痤瘡患者の頬部において水分バリアー機能の低下（表 1）とスフィンゴ脂質の減少(表 2、3) を認めた。軽症群と対照群において皮脂分泌量の差はなかったが、水分バリアー機能は軽症群で低下していた（表 1と2を比較)。したがって痤瘡患者では、同年代の健常人比較して特に皮脂分泌量が高くなくても、毛包漏斗部の閉塞すなわち面皰形成が起こり得ると考えられる。

Knutson[11]は、正常毛包と面皰の漏斗部を観察している。それによれば、初期面皰では、毛包漏斗の過角化が層板顆粒の減少に伴って認められる。

角質細胞間のスフィンゴ脂質は、層板顆粒より由来し、水分バリアー機能を担っている。最近セラミドの合成は、年齢によって変化する可能性が示唆されており、痤瘡患者において、思春期では成人に比してセラミドが少ないことも予想される。

水分バリアー機能の低下と過角化を伴う病態は、魚鱗癬[12]、乾癬[13]、アトピー性皮膚炎[14] 等で報告されている。本研究は、直接毛包上皮について検討していないが、表皮角層において、アトピー性皮膚炎患者より強い水分バリアー機能の低下とセラミドの減少が認められる（山本ら、未発表成績）。そこで、Prokschら[4] の前述の説に従えば、毛包上皮の水分バリアー機能の低下が、上皮の増殖性変化を生じ、面皰を形成する機序が考えられる。はじめに紹介したDowningら[2]とMelnickら[3]の仮説は、今回検証を試みたが、合致する成績は得られなかった[10]。痤瘡は本邦では、思春期に好発するが、欧米の白人に比較して軽度で、20歳前後に軽快してくる場合が多いことと考えあわせると、表皮の脂質代謝に人種差が存在するのかも知れない。

痤瘡においては、面皰形成に加えて、炎症が惹起される。今回の被験者の中等症群では、軽度の炎症所見すなわち丘疹や膿疱が混在し、軽症群より低い水分バリアー機能(表1)と高い皮脂分泌量(表2)が認められている。これまで*P. acnes*が面皰形成に働いていると推測する報告が多い。しかし、Lavkerら[15]は、*P. acnes*が存在しない状態で面皰の角化異常が起こることを示した。一方最近の報告では、*P. acnes*が表皮の炎症のmodulatorとして、あるいはサイトカイン遊離に促進的に作用する成績が示されている[16] 。おそらく、バリアー機能の損なわれた毛包において、 *P. acnes*が豊富な皮脂を栄養として炎症惹起に関与する可能性は大きいと考えられる。また今回の痤瘡群では、スフィンゴシンの低下が見られた（表3)。角層のスフインゴシンは、セラミドの水解によって生じ

ると考えられる。最近スフィンゴシンは種々の生物活性を有することが明らかになりつつあり、なかでも *P. acnes* などの細菌の増殖を抑制する成績が示されている[17]。そこで痤瘡患者は水分バリアー機能だけでなく、感染防御能の低下も併せ持つことも推測される。しかしスフィンゴシンと *P. acnes* の関係についてはさらに詳細な検討が必要と考えられる。

文　献

1) Kligman AM, Katz AG "Pathogenesis of acne vulgaris", *Arch. Dermatol.*, 98 53-57 (1968)

2) Downing DT, Stewart ME, Wertz PW et al. "Essential fatty acids and acne", *J. Am. Acad Dermatol.*, 14 221-225 (1986)

3) Melnik B, Kinner T, Plewig G "Influence of oral isotretinoin treatment on the composition of comedonal lipids. Implications for comedogenesis in acne vulgaris", *Arch. Dermatol. Res.*, 280 97-102 (1988)

4) Proksch E, Holleran WM, Menon GK et al. "Barrier function regulates epidermal lipid and DNA synthesis", *Br. J. Dermatol.*, 128 473-482 (1993)

5) Plewig G, Kligman AM, " Classification of acne vulgaris; in Acne", (Plewig G, Kligman AM ed), Springer, Berlin Heidelberg New York, 1975 162-165.

6) Nilsson GE "Measurent of water exchange through skin", *Med. Biol.*, 15 209-218 (1977)

7) Tagami H, Kanamaru Y, Inoue K et al. "Water sorptiondesorption test of the skin in vivo for functional assessment of the stratum corneum", *J. Invest. Dermatol.*, 78 425-428 (1982)

8) Serizawa S, Osawa K, Togashi K et al. "Relationship between cholesterol sulfate and intercellular cohesion of the stratum corneum demonstration using a pushpull meter and an improved high-performance thin-layer chromatographic separation system of all major stratum corneum lipids", *J. Invest. Dermatol.*, 99 232-236 (1992)

9) Yamamoto A, Serizawa S, Ito M et al. "Effect of aging on sebaceous gland activity and on the fatty acid composition of wax esters", *J. Invest. Dermatol.*, 89 507-512 (1987)

10) Yamamoto A, Takenouchi K, Ito M, "Impaired waterbarrier function in acne vulgaris", *Arch. Dermatol. Res.*, 287 214-218 (1995)

11) Knutson DD "Ultrastructural observations in acne vulgaris : The normal sebaceous follicle and acne lesions", *J. Invest. Dermatol.*, 62 288-307 (1974)

12) Williams ML, Elias PM "Stratum corneum lipids in disorders of cornification: I. Increased cholesterol sulfate content of stratum corneum in recessive X-linked ichthyosis", *J. Clin. Invest.*, 68 1404-1410 (1981)

13) Tagami H, Yoshikuni K "Interrelationship between water-barrier and reservoir functions of pathologic stratum corneum", *Arch. Dermatol.*, 121 642-645 (1985)

14) Werner Y, Lindberg M "Transepidermal water loss in dry and clinically normal skin in patients with atopic dermatitis", *Acta. Dermatol. Venereol.*, 65 102-105(1985)

15) Lavker RM, Leyden JJ, McGinley KJ "T relationship between bacteria and the abnormal follicular keratinization in acne vulgaris", *J. Invest. Dermatol.*, 77 325-330 (1981)

16) Ingham E, Eady EA, Goodwin CE et al. "pro-inflammatory levels of interleukin-1α-like bioactivity are present in the

majority of open comedones in acne vulgaris", *J. Invest. Dermatol.*, **98** 895-901 (1992)

17) Bibel DJ, Aly R, Shinfield HR "Antimicrobial activity of sphingosine", *J. Invest. Dermatol.*, **98** 269-273 (1992)

不飽和脂肪酸とその過酸化生成物の皮膚角質層への作用に関する研究

大阪薬科大学
森本一洋

Effects of unsaturated straight-chain fatty acid and its oxidized products on skin stratum corneum were examined using rat skin permeation of drugs in *in vitro* and FT-IR method. We investigated that the effects of pretreatments of high purity oleic acid and its oxidation products on the permeations of indomethacin, as relatively lipophilic compound and 6-carboxyfluorescein (6-CF),as hydrophilic compound through rat skins. The skin permeations of indomethacin and 6-CF were very low (duffusivity;2.3×10^{-6} and 0.19×10^{-6}cm²/h, respectively). Permeations of indomethacin and 6-CF were significantly increased by prepreatment with oleic acid or its first and second oxidation products.

The frequency of the asymmetric CH bond stretching absorbance (2919cm^{-1}) on FT-IR spectra of stratum corneum was shifted to higher wavenumber (7.5cm^{-1}) by the treatment of high purity oleic acid. Therefore, the perturbation increase of lipid domain in stratum corneum by oleic. acid The degree of shift was decreased by first and second oxidized products of oleic acid. On the other hand, the frequency of the α-helix NH deformation of amidell (1548cm^{-1}) on FT-IR spectra of stratum corneum was shifted to higher wavenumber (2cm^{-1}) by the treatment of high purity oleic acid. The shift significantly increased by first oxidized product with highest peroxide value (85.7meq/kg). Therefore, keratin cell in stratum corneum should be affected by first oxidized product with high peroxide value.

緒　言

経皮吸収型製剤は薬物の全身治療を目的とした新しい投与剤形として期待されている。しかし、皮膚の最表面に存在する角質層はケラチン、繊維状たん白、さらにはセラミドや中性脂質より成り(Fig. 1)、体内からの水の蒸発や外部からの物質の侵入に対し強いバリアーとして機能している。したがって、この角質層は皮膚表面からの薬物の吸収バリアーとなる[1]。現在、薬物の皮膚吸収促進に関する様々な研究が進められており、数種類の吸収促進剤が見出されているが、それらの吸収促進剤の実用化には皮膚刺激性、安全性などが問題となる[2]。オレイン酸などの不飽和脂肪酸類は高い薬物の皮膚透過促進効果を示すことが知られているが、これらは生体由来物質であることより実用化が期待されている[3]。最近、高純度（99%以上）のオレイン酸が開発されているが、一般的に市販オレイン酸は酸化物を含み、また酸化されやすい欠点を有している。したがって、これらの酸化生成物の皮膚への影響を調べることは重要である。本研究では、高純度オレイン酸、酸化生成段階の異なる酸化物を含むオレイン酸による薬物の皮膚透過促進効果および皮膚角質層（ケラチノサイトおよび脂質層）への影響について検討した。

皮膚透過の検討には脂溶性モデル薬物として非ステロイド系消炎剤であるインドメタシンおよび水溶性モデル薬物として6-カルボキシフルオレセイン（6-CF）を用いた。皮膚角質層への影響はフーリエ変換赤外分光法(FT-IR)により解析した。

Effects of Unsaturated Fatty Acid and its Oxidized Products to Skin Stratum Corneum

Kazuhiro Morimoto

Osaka University
of Pharmaceutical Sciences

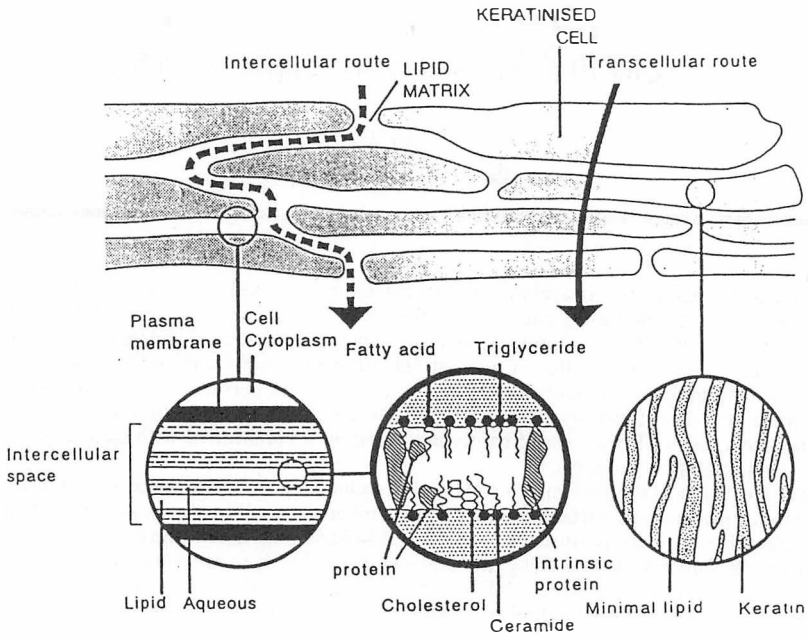


Fig.1 Route of Drug Permeation through Human Stratum Corneum[1)]

2 方 法

2-1 材料および試料の調整

吸収促進剤としては、高純度オレイン酸(EO-99;99.9%)、酸化生成物を含むオレイン酸(Table 1)は日本油脂(株)のものを、Azone (1-dodecylazacycloheptan-2-one)はNelson社のものを使用した。モデル薬物としては、インドメタシンと6-CFはSigma社のものを使用した。吸収促進剤溶液はプロピレングリコール (PG) またはプロピレングリコール(PG)／エタノール(EtOH) (1/2)混液に溶解させ調製した。製剤は水に溶解させた

Table 1 Peroxide values and carbonyl values of oleic acids of various grades

	peroxide value (meq/kg)	carbonyl value (meq/kg) saturated	unsaturated	total
High Purified Oleic Acid				
EO-99 (99.9%) a)	0	0.3	0	0.3
EO-90 (90%) a)	0.1	0.8	0.1	0.9
Low Grade Oleic Acid				
LL (60%) a)	1.7	6.9	0.9	7.8
Oxidized Oleic Acid				
First Oxidized b)				
SO-L	48.7	20.0	5.4	25.4
SO-H	5.4	27.4	12.1	39.5
PO-L	47.5	30.5	1.8	32.3
PO-H	85.7	64.7	3.7	68.4
Second Oxidized c)				
SO-LR	0.6	23.5	0	23.5
SO-HR	0.4	46.9	1.5	48.3

a) Purity of oleic acid(mol%)
b) O_2 bubbling(100°C) treated high purity oleic acid(EO-99)
c) Heat(200°C) treated first oxidized oleic acid

Carbopol 1342（1%w/w）にPG（12%w/w）およびEtOH(24%w/w）を加えて製したゲル基剤中に薬物（0.5mg/g)を溶解させ、アンモニア水を加えpH7.0とすることにより調製した。

2-2 In Vitro 皮膚透過実験

除毛したWistar系雄性ラット(体重200-250g）の腹部摘出皮膚表面を吸収促進剤溶液で前処理（1時間)し、その前処理液を皮膚表面から取り除いた後、薬物の皮膚透過実験に用いた。透過実験にはFranz型拡散セル(37℃)を用いた[4]。インドメタシンはHPLC法、6-CFは蛍光光度法により定量した。

2-3 FT-IR による皮膚角質層の解析

白色ウサギ（体重約2kg）の耳から剥離した皮膚角質層を用いた。吸収促進剤溶液で表面を処理（2時間）した皮膚角質層をFT-IR（Parkin Elmer,1720X）を用い測定しFT-IRスペクトルを得た。光源にはHe：Neレーザー（0.633μm）を使用し、出力は400mWとし、分解能2cm^{-1}、積算回数100回、室温で測定した。

3 結果および考察

3-1 皮膚透過性

高純度オレイン酸(EO-99）と強制酸化物を含むオレイン酸のインドメタシンと6-CFの皮膚透過に及ぼす影響について検討した。

Fig.2には高純度オレイン酸（EO-99）と強制1次酸化したオレイン酸(SO-L, SO-H, PO-L, PO-H)によるインドメタシンと6-CFの皮膚透過促進効果を示した。インドメタシンの皮膚透過におけるこれらの促進効果は、EO-99＜SO-H＜PO-L＜SO-L＜PO-Hの順に高いことが認められたが、EO-99と強制1次酸化したオレイン酸の透過促進効果の間には有意差は認められなかった。6-CFの皮膚透過におけるこれらの促進効果は、PO-L＜EO-99＜PO-H＜SO-H＜SO-Lの順に高いことが認められた。EO-99と強制1次酸化したオレイン酸の透過促進効果の間には有意差は認められなかったが、酸化過程の中間体であるSO-Lの6-CFへの吸収促進効果の高いことが示された。

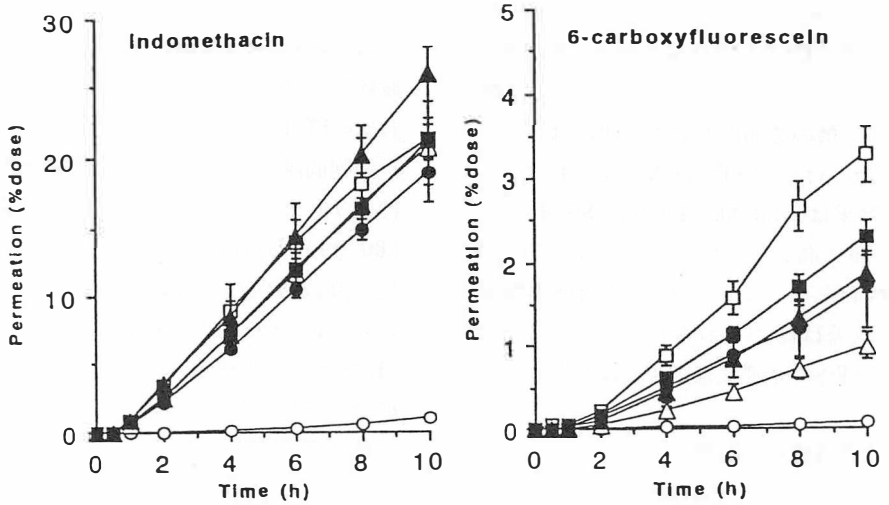


Fig.2 Effects of pretreatments of oleic acids (0.2%) containing first oxidation products on the permeations of indomethacin and 6-carboxyfluorescein through rat skins.
○ Control, High Purity Oleic Acid (● EO-99)
First Oxidized Oleic Acid (□ SO-L, ■ SO-H, △ PO-L, ▲ PO-H)
Each point represents the mean ± S.E. of 4 experiments.

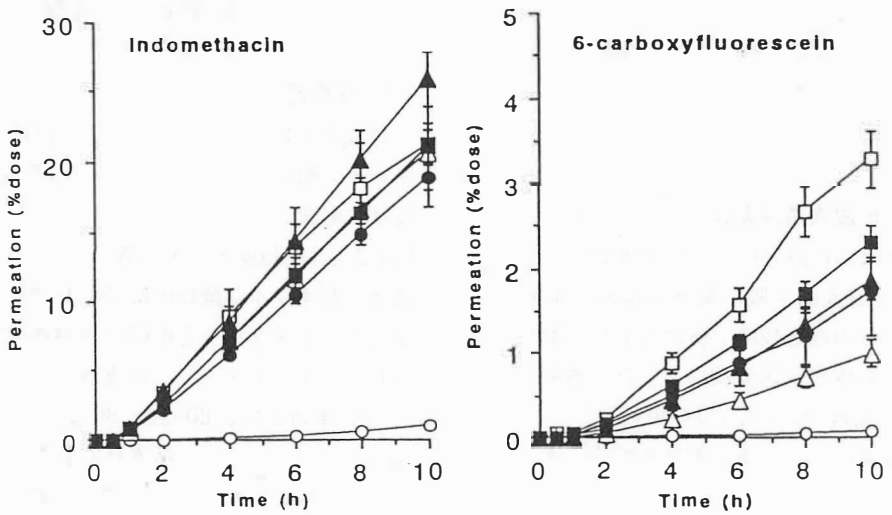


Fig.3 Effects of pretreatments of oleic acids (0.2%) containing first oxidation products on the permeations of indomethacin and 6-carboxyfluorescein through rat skins.
○ Control, High Purity Oleic Acid (● EO-99)
First Oxidized Oleic Acid (□ SO-L, ■ SO-H, △ PO-L, ▲ PO-H)
Each point represents the mean ± S.E. of 4 experiments.

Fig.3には高純度オレイン酸（EO-99）と強制2次酸化したオレイン酸（SO-LRはSO-Lを2次酸化したもの、SO-HRはSO-Hを2次酸化したもの）によるインドメタシンと6-CFの皮膚透過促進効果を示した。インドメタシンの皮膚透過におけるこれらの促進効果は、SO-HR＜EO-99＜SO-H＜SO-L＜SO-LRの順に高いことが認められたが、EO-99と強制2次酸化したオレイン酸の透過促進効果の間には有意差は認められなかった。6-CFの皮膚透過におけるこれらの促進効果は、SO-HR＜EO-99＜SO-H＜SO-LR＜SO-Lの順に高いことが認められた。EO-99と強制2次酸化したオレイン酸の透過促進効果の間には有意差は認められなかったが、強制2次酸化物の6-CFへの透過促進効果は減少した。

3-2 FT-IRによる皮膚角質層の解析

皮膚角質層の細胞間隙脂質流動性と細胞実質のたん白の立体構造に及ぼす高純度オレイン酸(EO-99)、強制酸化したオレイン酸、Azoneの影響を検討した。皮膚角質層の細胞間隙脂質流動性は、角質層のFT-IRスペクトルからGoldenらの方法を用い、細胞間隙脂質CH2逆対称伸縮振動(2919cm^{-1}付近)由来の波数のシフトにより評価した[5]。赤外吸収の波数は脂質流動性の上昇に伴い高波数側にシフトすることが報告されている。また、皮膚角質層のたん白変成はα-helixのペプチド結合のN-H deformation (1548cm^{-1}付近)由来の波数のシフトから評価した。ウサギの耳の皮膚角質層のFT-IRスペクトルをFig.4に示した。

細胞間隙隙脂質CH_2逆対称伸縮振動(2919cm^{-1}付近)由来の赤外吸収は、高純度オレイン酸(EO-99)の処理によりコントロール(PG処理)に比べ高波数側に約7.5cm^{-1}シフトした。たん白のα-helixのペプチド結合のN-H deformation (1548cm^{-1}付近)由来の赤外吸収も高純度オレイン酸(EO-99)の処理によりコントロール(PG処理)に比べ高波数側に約2cm^{-1}シフトした。オレイン酸並びにAzoneで処理した皮膚角質層の脂質CH_2逆対称伸縮振動、並びにたん白のα-helixのペプチド結合のN-H deformation(1548cm^{-1}付近)由来の赤外吸収の波数をTable2に示した。

C-C二重結合を有するオレイン酸の2次酸化物で

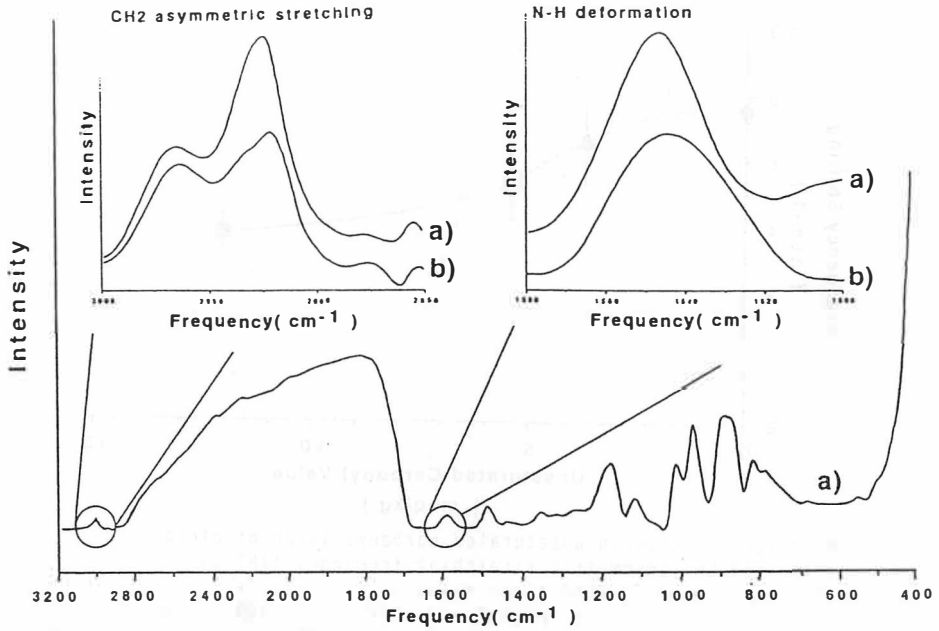


Fig. 4 FT-IR spectra of stratum corneum of rabbit ear skins over the range 400-3200cm^{-1}
a) treatment with 0.2% high purity oleic acid (EO-99)
b) treatment with solvent (PG)

ある不飽和カルボニルに着目しその角質層細胞間隙脂質流動性に与える影響を評価した。Fig. 5に示すように高純度オレイン酸の処理により細胞間隙隙脂質CH_2逆対称伸縮振動(2919cm^{-1}付近)由来の赤外吸収はコントロール(PG処理)に比べ高波数側にシフト(約7.5cm^{-1})した。この効果は、オレイン酸の不飽和カルボニル価の増大に伴い低下し、その値が12meq/kgと2次酸化の進んだSO-H

Table 2 Effects of treatments with oleic acids and Azone on FT-IR frequency(cm^{-1}) of N-H deformation of amidell from proteins and CH_2 asymmetric stretching from lipids of stratum corneum of rabbit ear skins

	N-H deformation(Proteins) Frequency(Shifting)	CH_2 asymmetric(Lipids) Frequency(Shifting)
Control(PG)	1546.00±0.12 (0.00±0.12)[b]	2918.00±0.40 (0.00±0.40)[b]
High Purity Oleic Acid		
EO-99(0.2%)	1548.10±0.10 (2.10±0.10)[a]	2925.50±0.33 (7.50±0.33)[a]
First Oxidized Oleic Acid		
SO-L(0.2%)	1547.40±0.27 (1.40±0.27)[a]	2923.33±1.20 (5.33±1.20)[a]
SO-H(0.2%)	1547.95±0.03 (1.95±0.03)[a]	2921.68±0.61 (3.68±0.61)[a][b]
PO-L(0.2%)	1547.55±0.71 (1.55±0.71)[a]	2925.45±0.92 (7.45±0.92)[a]
PO-H(0.2%)	1550.04±0.89 (4.04±0.59)[a][b]	2924.54±1.30 (6.54±1.30)[a]
Second Oxidized Oleic Acid		
SO-LR(0.2%)	1548.35±0.22 (2.35±0.22)[a]	2926.95±0.15 (8.95±0.15)[a][b]
SO-HR(0.2%)	1547.85±0.12 (1.85±0.12)[a]	2924.45±0.66 (6.45±0.66)[a]
AZONE(0.2%)	1553.83±0.23 (7.83±0.23)[a][b]	2923.83±0.69 (5.83±0.69)[a]

Shifting=frequency shifting from control(treatment with PG)
a)Significant in comparison with control ($p<0.05$)
b)Significant in comparison with high purity oleic acid (EO-99 ;0.2%) ($p<0.05$)
Each point represents the mean ± S.E. of 4 experiments.

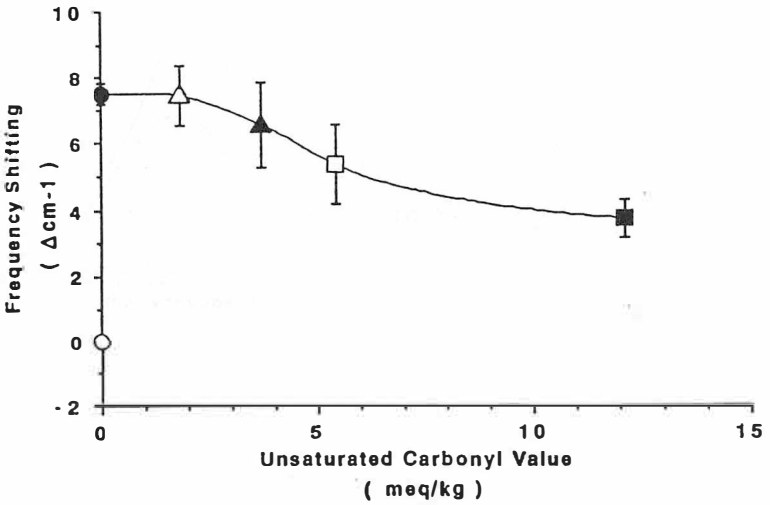


Fig.5 Relationship between unsaturated carbonyl value of oleic acids and CH_2 asymmetric stretching frequency (IR) of stratum corneum of rabbit ear skins
○ Control (PG), High Purity Oleic Acid (● EO-99)
First Oxidized Oleic Acid (□ SO-L, ■ SO-H, △ PO-L, ▲ PO-H)
Each point represents the mean ± S.E. of 4 experiments.

では高純度オレイン酸に比べ有意に低波数側にシフ(約4cm^{-1})した。

一方、Fig. 6にたん白のα-helixのペプチド結合のN-H deformation (1548cm^{-1}付近)由来の赤外吸収の波数のシフトとオレイン酸の過酸化物価の関係を示した。たん白のα-helixのペプチド結合のN-H deformation (1548cm^{-1}付近)由来の赤外吸収も高純度オレイン酸(EO-99)の処理によりコ

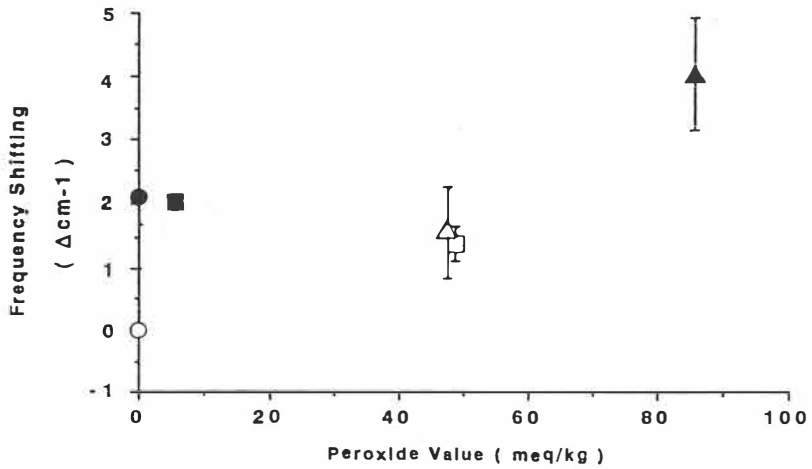


Fig.6 Relationship between peroxide value of oleic acids and shifting of N-H deformation frequency (IR) of stratum corneum of rabbit ear skins
○ Control (PG), High Purity Oleic Acid (● EO-99)
First Oxidized Oleic Acid (□ SO-L, ■ SO-H, △ PO-L, ▲ PO-H)
Each point represents the mean ± S.E. of 4 experiments.

ントロール(PG処理)に比べ高波数側に約2cm^{-1}シフトした。高純度オレイン酸と過酸化物価が約50meq／kgまでのものとたん白のα-helixのペプチド結合のN-H deformation(1548cm^{-1}付近)由来の赤外吸収のシフトの間には有意な差は認められなかったが、過酸化物価が80meq／kgと酸化が進んだオレイン酸（PO-H）では有意に高波数側へシフト(約4cm^{-1})した。

以上、FT-IRスペクトルの解析から高純度オレイン酸で処理をした場合、インドメタシンの主な透過経路と考えられる細胞間隙脂質の流動性が上昇することが認められ、その流動性の上昇効果はオレイン酸の２次酸化物である不飽和カルボニルの増加に伴い減少させることが示唆された。オレイン酸と比較して、鎖長の短い不飽和カルボニルが細胞間隙脂質構造を乱すと考えられる。一方、高純度オレイン酸の処理によりCFの主な透過経路と考えられる角質層実質細胞のたん白の構造変化がFT-IRスペクトルの解析から認められ、1次酸化したオレイン酸はさらにその変化を増加することが認められた。高純度オレイン酸と強制酸化したオレイン酸（1次、2次）によるインドメタシン並びにCFに対する経皮吸収促進効果には有意な差は認められなかった。これは強制酸化物は酸化過程でオレイン酸とその酸化物を共存するために、薬物の経皮吸収促進効果には直接的に影響しなかったと考えられる。

参考文献

1) B.W.Barry, *J. Controlled. Release.*, 6 85-97 (1987)

2) 橋田充、岡本浩一、経皮吸収の改善、瀬崎仁編 “医薬品の開発” 第13巻、87-133頁、広川書店 (1987)

3) M.L.Francoeur, G.M.Golden, R.O.Potts, *Pham. Res.*, 7 621-627 (1990)

4) K.Morimoto, A.Nagayasu, S.Fukanoki, K.Morisaka, S.H.Hyon, Y.Ikada, *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 16 13-29 (1990)

5) G.M.Golden, J.E.Mckie, R.O.Potts, *J. Pham. Sci.*, 76 25-28 (1987)

III. 精神，文化に関する分野

『色白』の嗜好構造に関する一考察

早稲田大学
齋　藤　美　穂

The main purpose of this study is to determine the psychological structure of aesthetic preference for white by surveying the preference for a fair complexion. A series of studies on color preference conducted by the author have shown a strong preference for white among Japanese and other Asian subjects (Japanese Psychological Research , Vol.36, No.4, 1994). This suggests that "whiteness" and positive feelings like "pleasantness" may be interrelated for Japanese and Asian people, as shown, for an instance, by the ancient Japanese saying "A fair complexion can hide seven blemishes." Not only to determine whether or not a fair complexion is preferred psychologically but also to study the cultural aspects of the preference for complexions, 176 Japanese and 132 Indonesian male and female university students were presented four stimuli, i. e., four pieces of paper, each colored with one of four stages of flesh color from fair to dark. Covering each color sample was a transparent plastic sheet with a drawing of the contour of a female face. The subjects were then asked to answer a questionnaire designed to discriminate personal images. The results, examined by both Factor Analysis and Quantification Method III by Hayashi, showed that the images associated with a fair complexion were positive in Japan, but were rather negative in Indonesia. This suggested that the cultural criteria in feelings of pleasantness and beauty may have been a factor in the study results.

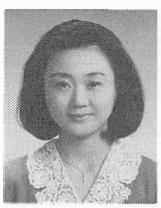
1　緒　言

白に対する嗜好順位が我が国における色見本を使用した選択評価による色彩嗜好調査結果の中で比較的上位に出現しはじめるのは Tsukada & Funatsu & Sato (1964)[14]の研究以降であり、その後の中小企業振興事業団と千々岩(1972)[2]の研究結果や日本色彩研究所による嗜好調査結果の継年変化 (1992)[7]および齋藤ら (1991)[10,11]による東京・大阪・福岡・富山の4都市で実施した調査結果からも日本での白嗜好は高く安定していることが確認されている。

また齋藤 (1981)[9]は日本人の色彩嗜好傾向を9つの文化的グループ（アメリカ・ドイツ・デンマーク・オーストラリア・パプアニューギニア・南アフリカ共和国・日系米国人・在日外国人）の間で比較し、日本での白嗜好の高さは他のグループには観察されない傾向であることを報告した。さらに1988年にはソウルと東京との色彩嗜好傾向の比較（齋藤1992）[12]、また1992年には天津、台北、東京での比較研究を行った（齋藤1994）[13]。その結果から白嗜好は他の周辺アジア地域でも観察され、むしろその傾向は日本を上回っていることが分かった。白に対する嗜好理由を調査の自由回答から探ると、東京やソウルでは清潔感や純粋が主な理由となっているが天津や台北では純潔が最も多く、時には白に対する神聖視も見られた。

ところで日本文化の中で白いものが良いとされる具体的なある種の概念に「色白は七難隠す」という古くからの言い伝えがあるが、特に女性において色白の肌の方が好ましいという概念は光との関係から生まれている。昔の家屋の構造も原因して低照度下で営まれた生活場面では高明度の色白の顔色は顔の明るさとして映え、この明るさが好まれ美しいとされ化粧文化の中ではおしろいの使用へと関連してくる。特に最近の化粧文化の中では紫外線の有害性やホワイトニングに対する意識の高まりが注目されている。

本研究はこの色白に対する嗜好構造を探ること



A study on the structure of preference for a fair complexion

Miho Saito

School of Human Sciences,
Waseda University

を目的とするが、具体的には、肌の色における白さは果して本当に好ましいとされているのか、また色白肌はどのような心理的イメージを持って構成されているのかという点を、他の肌色との相対的なかかわりの中で検討することにある。またその評価に対する文化的な差異という点に関しても興味がある。本研究では日本の嗜好構造をインドネシアと比較したがその主たる理由は、同じアジアに位置するインドネシアにも色白の肌を好ましいとする概念があることと、日本に比べ多民族文化である為、色白への嗜好構造が日本とは若干異なるものと仮定したからである。

研究は調査1と調査2により構成されている。調査1は調査2のプリテストとして日本の女子大学生に実施したものであるが、調査2は文化的側面を検討するため日本およびインドネシアの男子大学生と女子大学生に実施した。調査1は刺激の選択パターンより因子分析を用い嗜好構造を探ってみたが、調査2では被験者が各評価語に対して選択した刺激の第一選択に着目し、数量化Ⅲ類により分析したものである。

2 方 法

2・1 被験者

調査1；日本の女子大学生（18才から20才）59名。

調査2；日本（東 京)の大学生176名（男性90名・女性86名）、およびインドネシア(ジャカルタ）の大学生132名（男性68名・女性64名）。被験者総数308名（男性158名・女性150名）。年齢はいずれも18才から25才。

2・2 調査刺激

既存の研究より日本人の肌色を調査し分類した肌色調査結果[6]を参考にしながら、ナチュラル肌の肌色色票である以下の4種の刺激を抽出した。

( ) 内はJIS記号。

刺激1：ナチュラル肌/色白肌(5.0YR 7.5/4.0),

刺激2：ナチュラル肌/普通肌の色白寄り
(5.0YR 7.0/5.0),

刺激3：ナチュラル肌/普通肌の色黒寄り
(5.0YR 6.5/5.0),

刺激4：ナチュラル肌/色黒肌(5.0YR 6.0/5.0)

2・3 手続き

上記4種の刺激に従って4種の肌色色票をB5版の大きさで作成し、それらの上に女性の顔の輪郭が描かれた透明シートを重ね、これをもって4枚1組とした。なお肌の色が白いか黒いかというイメージは多分に相対的な関係も考えられるので、被験者にはこの1組中の4つの刺激を同時に1より左から順に並べてもらい、容貌を手がかりとしたパーソナリティーイメージの因子分析結果[5]を基に選び出した52個の評価語(次 項)に対して、最も適切だと思う順番に刺激の順位づけをしてもらった。

使用照明は蛍光灯。なお質問紙はインドネシア語・英語・日本語のものを用意した。

2・4 評価語

01）美しい、02）明るい感じ、03）女性的な感じ、04）りこうそうな感じ、05）親しみやすい感じ、06）ふけた感じ、07）のんびりした感じ、08）貧相な感じ、09）派手な感じ、10）柔らかい感じ、11）はきはきとした感じ、12）近づきやすい感じ、13）古くさい感じ、14）いやらしい感じ、15）陽気な感じ、16）丸みのある感じ、17）きりっとした感じ、18）好き、19）落ち着いた感じ、20）弱々しい感じ、21）知性的な感じ、22）モダンな感じ、23）育ちがよい感じ、24）うわべだけの感じ、25）可愛らしい感じ、26）静かな感じ、27）軽い感じ、28）意志が強そうな感じ、29）貴族的な感じ、30）保守的な感じ、31）善人のような感じ、32）デリケートな感じ、33）特色のある感じ、34）清潔な感じ、35)ていねいな感じ、36)うちとけた感じ、37）幼い感じ、38)上品な感じ、39)愉快な感じ、40）ねちねちした感じ、41）消極的な感じ、42）やさしい感じ、43)おとなしい感じ、44)甘い感じ、45）うすっぺらな感じ、46）あたたかい感じ、47）あじわいがある感じ、48）しゃれた感じ、

Table 1　因子マトリックス

質　問　項　目	第1因子	第2因子	第3因子	第4因子	第5因子	第6因子
育ちが良い	-.8932	-.1387	.0043	.3045	-.0918	.1846
デリケートな	-.8363	.1059	-.0406	-.1211	.1990	-.0665
上品な	-.7847	.2969	.2709	-.0119	-.0618	.0082
ていねいな	-.7648	.0162	00238	-.1259	.2548	-.0049
特色のある	.5763	-.2318	-.1682	.2256	.0851	-.0031
丸みのある	-.4899	.3944	.1103	-.0626	-.0414	.0091
ねちねちした	.4047	.1102	.3366	-.3993	.0093	.0575
美しい	-.3534	.0117	-.1334	.2870	.2277	.0939
優しい	-.0040	.7050	.0216	.2522	.2748	-.0280
柔らかい	-.3733	.6553	.1495	.1602	-.2053	-.0455
のんびりした	.0305	.6377	-.0699	-.0398	.0489	.0083
うちとけた	.0314	.5641	-.3149	.1559	-.1285	.0680
善人のような	.1091	.5127	-.2380	.0544	.2435	.0561
甘い	-.3679	.4568	-.2061	-.0150	.3249	-.1010
好き	.1774	.3789	-.1596	-.3682	.2440	-.1301
可愛らしい	-.0485	.3707	-.0232	.0124	.0557	-.2633
清潔な	.0197	.1532	.0137	.0417	-.0999	-.0393
幼い	.0262	.1373	-.1058	-.0580	-.1285	.0968
陽気な	.1752	-.0221	-.7834	.0781	-.0635	-.0206
弱々しい	-.2596	.0300	.6732	.0353	.1331	.1398
はきはきした	-.1606	-.0567	-.5547	.3244	-.2653	.1104
愉快な	.3937	.1278	-.4909	.3332	-.0659	-.0263
親しみやすい	-.1737	.4691	-.4909	-.0088	.1589	.2588
ふけた	.0937	.3455	.4643	-.1496	.1916	.0131
きりっとした	.2202	-.4400	-.4569	.2643	.1373	-.0518
派手な	.3280	.1069	-.4336	.0095	-.1646	.0749
貧相な	.0522	-.0762	.3594	.0280	.1398	.1247
あたたかい	-.1550	.2120	-.3530	-.0082	.2745	.1184
古くさい	-.0311	.0409	.3012	-.1752	.1373	.2886
女性的な	-.1323	.0223	.2534	.0814	-.0987	-.1010
魅力的	.1154	.2177	-.1501	.6953	.1451	.0552
しゃれた	-.0413	.1932	-.1083	.6624	-.1577	.0756
貴族的な	-.0659	-.3661	.0209	.5197	-.1120	.3575
モダンな	.2682	.0749	-.1964	.5178	.0382	-.0925
知性的な	-.3568	.0502	.1785	.4592	-.0476	.3350
明るい	-.3313	.1875	-.0825	.4558	.0428	-.2370
いやらしい	-.0647	-.2338	.3283	-.4425	-.3101	.0719
消極的な	.1075	.0143	.1357	-.3292	.2486	.2608
女らしくない	.1034	-.0912	-.0515	-.2025	-.1619	.0428
いばった	.0480	.2039	.0490	-.1811	.6785	.0696
おとなしい	-.0507	.0668	.2468	-.0896	.6580	.0077
静かな	-.4168	-.2296	.0196	-.2385	.6203	.0869
落ち着いた	-.0080	.0542	.1273	.1281	.5927	.1632
おだやかな	-.1014	.3535	.1838	.0113	.5235	.1699
うわべだけの	.3181	.1285	-.1085	-.3635	-.3891	-.1295
軽い	-.1756	.1457	-.0918	-.1056	-.2393	-.6562
保守的な	-.2644	-.0355	.0404	-.0367	.0582	.6560
りこうそうな	.0112	.0422	.0467	.0605	.0698	.5604
意志が強そうな	.5133	.0110	-.0247	-.1079	-.0593	.5500
近づきやすい	-.3114	.2657	-.4301	.2299	.0217	.5281
あじわいがある	-.3249	.2663	-.1900	.0705	.0936	.4844
うすっぺらな	-.0647	.1915	.1413	.0709	-.3013	-.3763

49）女らしくない感じ、50）おだやかな感じ、51）いばった感じ、52）魅力的

2・5　分析

調査1；上記4つの刺激の選択反応パターンに対して因子分析を行った。

調査2；上記の手続きにより得られた結果に対し、色白肌（5.0YR 7.5／4.0）の刺激を最初に選んでいる評価語に対し1を与え、それ以外の刺激を選んでいる評価語に対しては0を与えたパターンをケース1、同様に普通肌の色白寄り（5.0YR 7.0／5.0）の刺激を最初に選んだパターンをケース2、普通肌の色黒寄り（5.0YR 6.5／5.0）の刺激を選んだパターンをケース3、色黒肌（5.0YR 6.0／5.0）の刺激を選んだパターンをケース4とし、各ケースについて数量化Ⅲ類により分析した。

2・6　実施期間

調査1；1992年10月

調査2；1993年4月～1994年1月

3. 結　果

3・1　調査1の結果

4刺激の順位づけに対する被験者の選択反応パターンとしては全部で24パターンあるが、選択反応パターンの各評価語に対する度数を調べた結果、色白肌－普通肌の色白寄り－普通肌の色黒寄り－色黒肌の順番で選択された評価語として反応数の多かったものは、「女性的な」、「弱々しい」、「貴族的な」、「おとなしい」、「デリケートな」、「消極的」、「育ちがよい」、「静かな」、「ていねいな」、「上品な」、「清潔な」、「保守的な」、「優しい」、「可愛らしい」、「丸みある」、「おだやかな」、「美しい」、「甘い」などであり、逆の反応パターンである色黒肌－普通肌の色黒寄り－普通肌の色白寄り－色白肌の順番で選択された評価語として反応数の多かったものは、「女らしくない」、「派手な」、「いばった」、「陽気な」、「はきはきした」、「いやらしい」、「軽い」、「きりっとした」等が主なものであることが分かった

Table 1は、選択反応パターンと評価語との関係に対して行った因子分析による因子マトリックスである。6因子が抽出されたが、第1因子には「育ちが良い」、「デリケートな」、「上品な」、「ていねいな」等、品格と関連したものに対する因子負荷量が高くなっている。第2因子は「優しい」、「やわらかい」、「のんびりした」、「うちとけた」、「善人のような」等、好ましいパーソナリティーと関連した因子であることが分かる。第3因子には「陽気な」、「弱々しい」、「はきはきした」、「愉快な」等、強さとの関わりの他に、「ふけた」等年齢との関わりが見られる。第4因子には「魅力的な」が最も高く、その次に「しゃれた」、「モダンな」等、魅力と現代性（モダンさ）を含んでいる。第5因子には「いばった」が最も高いが、その次からは「おとなしい」、「静かな」、「落ち着いた」等が続き、静の因子と考えられる。第6因子には「軽い」、「保守的な」の他に、「りこうそうな」、「意志が強そうな」等があり、怜悧性との関連が見られた。

なお選択反応パターン頻度との関わりを見ると、第1因子（品格の因子）と第5因子（静の因子）には色白肌－普通肌の色白寄り－普通肌の色黒寄り－色黒肌の順に選ぶ反応パターンが多く、第2、第4因子には普通肌の色白寄り－色白肌－普通肌の色黒寄り－色黒肌の反応パターンが多く、第3因子（強さの因子）には色黒肌－普通肌の色黒寄り－普通肌の色白寄り－色白肌の反応パターンが多かった。また第6因子（怜悧性の因子）は普通肌を最初に選択していく反応パターンが多く見られた。

3・2　調査2の結果

調査2の結果の処理は4種のケース全てについて数量化Ⅲ類によって分析を行ったが、ここでは特に色白肌（5.0YR 7.5／4.0）の刺激に関する分析結果を中心に述べる。

Table 2　ケース1(色白肌を最初に選択したケース)に対する評価語の上位一覧表

	日本		インドネシア	
順位	評価語	選択率(%)	評価語	選択率(%)
1位	弱々しい	92.0	弱々しい	85.6
2位	貴族的な ++	86.4	清潔な ++	85.6
3位	デリケートな ++	85.8	いばった ++	78.0
4位	静かな ++	83.5	貴族的な --	71.2
5位	おとなしい ++	83.0	幼い ++	70.5
6位	上品な ++	81.3	しゃれた ++	70.5
7位	育ちが良い ++	79.5	明るい ++	65.2
8位	消極的な ++	77.3	派手な ++	59.8
9位	女性的な ++	75.8	きりっとした ++	59.1
10位	保守的な ++	71.0	特色のある ++	59.1
11位	清潔な --	69.9	保守的な --	56.8
12位	ていねいな ++	68.2	デリケートな --	56.8
13位	柔らかい ++	64.8	静かな --	55.3
14位	美しい ++	60.8	育ちが良い --	54.5
15位	可愛らしい ++	55.1	軽い ++	53.0

注) 全てのTableおよびFiq.において、殆どの評価語における「・・・感じ」という表現は省いた。
++および--はパーセントの差の検定において1%水準での有意差、+および-は5%水準での有意差をそれぞれ示す。なおプラス記号はその評価語における選択率をカテゴリー間で比較した時に相対的に有意に高いもの、マイナス記号は有意に低いものを示している。

Table 3　ケース1(色白肌を最初に選択したケース)に対する評価語の上位一覧表
-性別での比較-

	日本男性		日本女性		インドネシア男性		インドネシア女性	
順位	評価語	選択率(%)	評価語	選択率(%)	評価語	選択率(%)	評価語	選択率(%)
1位	弱々しい	92.2	弱々しい	91.9	清潔な +	86.8	弱々しい	85.9
2位	貴族的な +	88.9	おとなしい ++	90.7	弱々しい	85.3	清潔な	84.4
3位	デリケートな++	84.4	デリケートな++	87.2	いばった++	77.9	しゃれた ++	81.3
4位	静かな +	81.1	静かな ++	86.0	貴族的な	73.5	いばった++	78.1
5位	上品な ++	81.1	貴族的な	83.7	幼い +	72.1	保守的な	71.9
6位	育ちが良い +	77.8	上品な ++	81.4	明るい ++	67.6	貴族的な -	68.8
7位	消極的な ++	76.7	育ちが良い ++	81.4	きりっとした++	66.2	幼い	68.8
8位	おとなしい +	75.6	消極的な ++	77.9	派手な ++	66.2	特色のある ++	67.2
9位	清潔な	74.4	女性的な ++	77.9	しゃれた	60.3	デリケートな	64.1
10位	女性的な++	73.3	柔らかい ++	72.1	育ちが良い --	52.9	明るい +	62.5
11位	保守的な	71.1	可愛らしい ++	72.1	静かな --	51.5	静かな -	59.4
12位	ていねいな +	66.7	保守的な	70.9	軽い +	51.5	育ちが良い -	56.3
13位	知性的な ++	66.7	清潔な --	65.1	特色のある ++	51.5	軽い ++	54.7
14位	美しい	60.0	甘い ++	62.8	デリケートな--	50.0	うわべだけの ++	54.7
15位	柔らかい	57.8	美しい +	61.6	やさしい	48.5	派手な ++	53.1

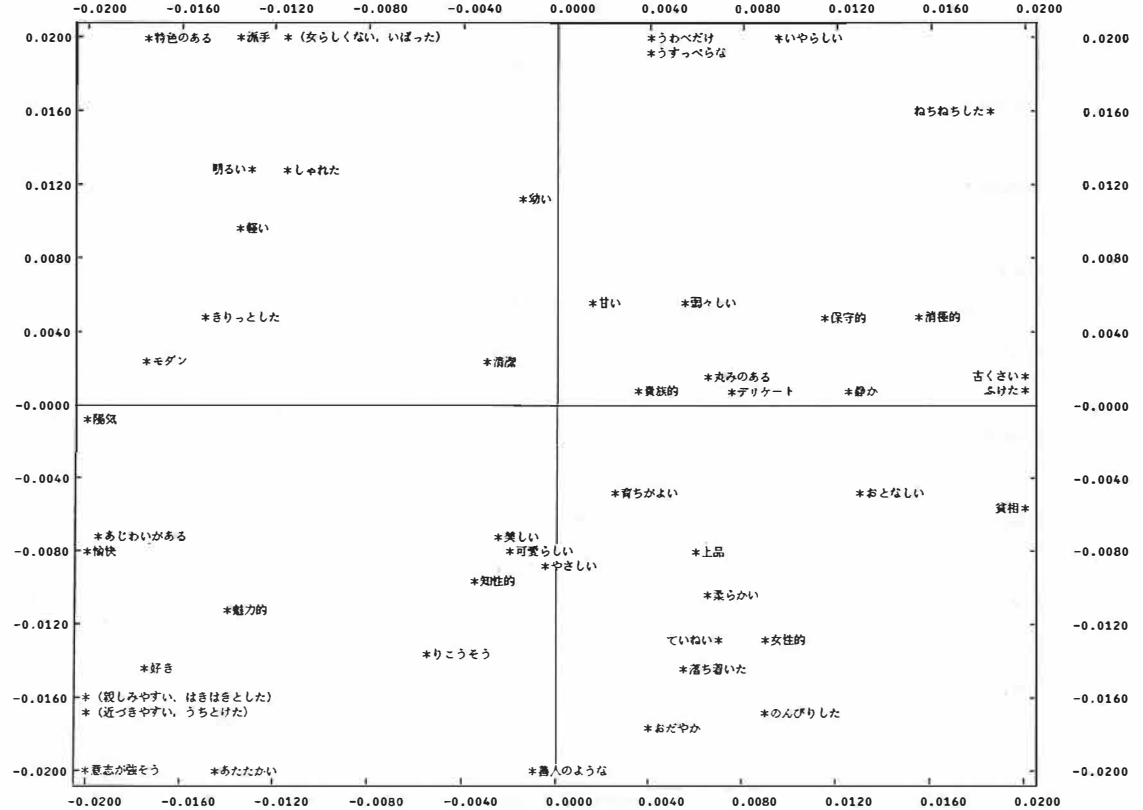
3・2・1　色白肌(5.0YR 7.5／4.0）の刺激に関する分析結果

Table 2およびTable 3は、ケース1、即ち4つの刺激中、最も色白肌の刺激である1番の刺激を最初に選んだ評価語を、その多い順に上位15位まで示した一覧表である。Table 2は日本とインドネシアとの総合的な比較であり、Table 3は両地域の性別における比較である。表中に$^{++}$および$^{--}$とあるのはパーセントにおける有意差検定において1％水準で有意差の見られたものであり、$^{+}$および$^{-}$とあるのは、5%水準で有意差のある場合を示す。

いずれの場合もプラスの記号はその評価語に対してカテゴリー間(例えばTable 2では日本とインドネシアの間、Table 3では日本男性・日本女性・インドネシア男性・インドネシア女性の間）で総合的な選択率による期待値と比較したとき有意に高かったもの、マイナスはカテゴリー間で相対的に有意に低かったものである。

色白肌（5.0YR 7.5／4.0）の刺激が最初に選択された評価語として総合的に最も多かったものは「弱々しい」の275反応であった。Table 2から両地域とも色白肌は「弱々しい」イメージと最も結びついている点は共通しており、その他、共通して持たれているイメージの上位には、「貴族的な」、「デリケートな」、「静かな」、「育ちが良い」、「保守的な」、「清潔な」があがっている。しかし日本では色白肌に対して、「おとなしい」、「上品」、「消極的」、「女性的」、「ていねいな」、「柔らかい」、「美しい」、「可愛らしい」といったイメージがインドネシアよりも高く、インドネシアでは、むしろ「いばった」、「派手な」イメージや「特色のある」「しゃれた」イメージ、また「幼い」、「軽い」、「明るい」、「きりっとした」というイメージが日本より高く選択されているのが分かる。その他、15位以下の評価語で、日本の方が1％水準で有意に高く選択している評

Fig. 1　数量化III類による色白肌に対する評価語のカテゴリープロット(1軸×2軸)

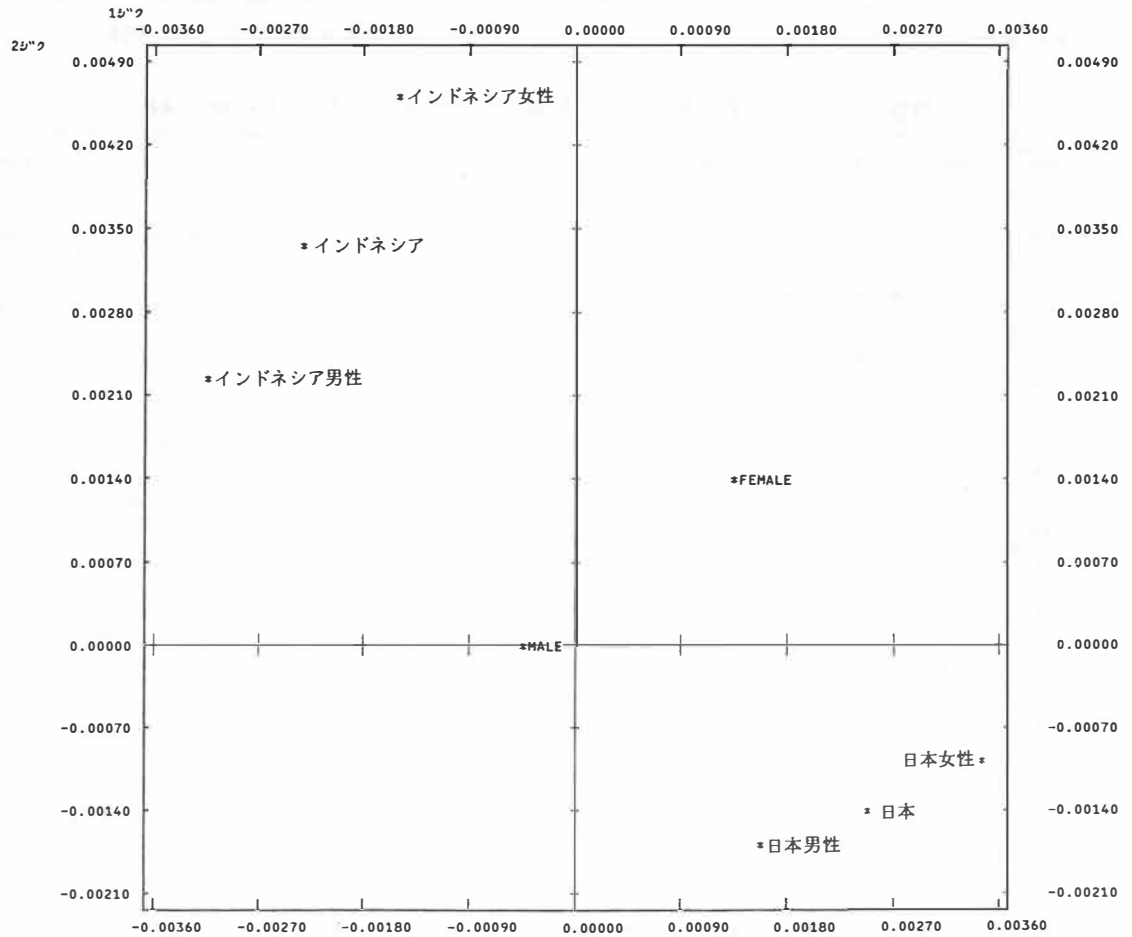


価語としては、「知性的な」、「おだやかな」、「古くさい」、「のんびりした」、「落ち着いた」、「りこうそうな」、「善人のような」、「ふけた」、「貧相な」であり、逆にインドネシアの方に有意に高く選択された評価語としては、「うわべだけの」、「あじわいがある」、「愉快な」、「陽気な」であった。

両地域のこれらの評価語のうち日本の男性に特に高く見られる評価語は、「ていねいな」と「知性的な」であり、女性では、「可愛らしい」と「甘い」であることがTable 3より分かる。「おとなしい」と「柔らかい」というイメージも女性が影響を与えている評価語と考えられる。インドネシアの男性の方に高く見られる評価語としては、「きりっとした」と「やさしい」であり、女性では、「うわべだけの」と「保守的な」であるが、「しゃれた」というイメージも女性の方に高く選択されている。

このように順位一覧表を見ても両地域における色白肌への評価がかなり異なっているようである。そこでこれらの結果を数量化Ⅲ類により分析した。Fig.1 は、ケース1における評価語のカテゴリースコアを1軸と2軸によりプロットしたものである。各軸の味を分析すると1軸は、陰気で消極的な感じか、陽気で活発な感じかを分けている軸であり、積極性・消極性の軸と言えよう。それに対し2軸はうわべだけの表層的な感じか、あたたかい善人そうな感じかを分けている軸のようである。

Fig. 2　数量化Ⅲ類による色白肌に対する国および性別のカテゴリープロット(1軸×2軸)



これにFig. 2 の日本とインドネシアの性別および国別のプロットを考え合わせると、インドネシアでは日本に比べ色白肌に対して「特色のある」イメージ(インドネシア;59.1%$^{++}$, 日本;10.2%$^{--}$)や「しゃれた」イメージ(インドネシア;70.5%$^{++}$, 日本;37.5%$^{--}$)、「明るい」イメージ(インドネシア;65.2%$^{++}$, 日本;36.4%$^{--}$)は持っているようであるが、同時に、「いばった」(インドネシア;78.0%$^{++}$, 日本;26.1%$^{--}$)「女らしくない」イメージも持っており、日本人が持っているような「女性的」(日本;75.6%$^{++}$, インドネシア;25.8%$^{--}$)で「おだやかな」(日本;50.0%$^{++}$, インドネシア;29.5%$^{--}$)「のんびりした」(日本;49.4%$^{++}$, インドネシア;20.5%$^{--}$)イメージはあまり持たれていないことが分かる。特に「うわべだけ」の表層的なイメージの方向にベクトルが向いているのは、インドネシア女性の方であることがこの図からもわかる(日本男性;21.1%$^{--}$, 日本女性;37.2%, インドネシア男性;32.4%, インドネシア女性;54.7%$^{++}$)。インドネシア男性の方は、女性に比べると「きりっとした」、「陽気な」(日本男性;7.8%$^{-}$, 日本女性;4.7%$^{--}$, インドネシア男性;32.4%, インドネシア女性;23.4%)イメージの方向にベクトルが向いている。日本男性は、「善人のような」(日本男性;44.4%$^{++}$, 日本女性;29.1%, インドネシア男性;22.1%, インドネシア女性;14.1%$^{--}$)、「りこうそうな」(日本男性;45.6%$^{++}$, 日本女性;29.1%, インドネシア男性;27.9%, インドネシア女性;14.1%$^{--}$)、「好き」(日本男性;44.4%$^{++}$, 日本女性;31.4%, インドネシア男性;29.4%, インドネシア女性;25.0%)、「意志の強そうな」(日本男性;22.2%$^{++}$, 日本女性;4.7%$^{--}$, インドネシア男性;14.7%, インドネシア女性;7.8%)等の方向にベクトルが向いているが、日本女性の特徴は、「貧相な」の方向にベクトルが向いていることである。これは色白肌に対して日本人全体としてはポジティブなイメージを抱いているものの、日本女性の中では貧相なというイメージを持っている被験者が男性より若干多かったことに起因する(日本男性;30.0%$^{+}$, 日本女性;34.9%$^{++}$, インドネシア男性;5.9%$^{--}$, インドネシア女性;4.7%$^{--}$)。

Table 4　ケース2(普通肌の色白寄りを最初に選択したケース)に対する評価語の上位一覧表

	日　本		インドネシア	
順位	評価語	選択率(%)	評価語	選択率(%)
1位	うすっぺらな ++	55.7	女性的な ++	56.8
2位	近づきやすい	52.3	好き	53.0
3位	親しみやすい	46.6	柔らかい	53.0
4位	魅力的	43.2	あじわいがある	53.0
5位	好き	42.0	落ち着いた ++	52.3
6位	あたたかい	40.9	おだやかな ++	50.8
7位	うちとけた	40.3	陽気な ++	50.8
8位	りこうそうな	39.2	魅力的	50.0
9位	善人のような	36.9	知性的な ++	49.2
10位	おだやかな --	35.2	りこうそうな	48.5
11位	明るい	35.2	モダンな ++	47.0
12位	落ち着いた --	34.1	美しい +	45.5
13位	知性的な --	32.4	上品な ++	45.5
14位	モダンな --	31.3	ていねいな ++	44.7
15位	美しい - 可愛らしい	31.3 31.3	善人のような	43.9

3・2・2　普通肌の色白寄り(5.0YR 7.0/5.0)の刺激に関する結果

Table 4およびTable 5は、同様にケース2（普通肌の色白寄りの刺激である2番の刺激を最初に選んだもの）の評価語を、その多い順に上位15位まで示した一覧表である。普通肌の色白寄り(5.0YR7.0／5.0）の刺激が最初に選択された評価語として総合的に最も多かったものは「近づきやすい」の149反応であった。Table 4から両地域に共通して多く選ばれた評価語を探ると、「好き」、「おだやかな」、「魅力的」、「知性的な」、「りこうそうな」、「モダンな」、「美しい」、「善人のような」があがる。日本の上位評価語の中でインドネシアの上位評価語に登場しないものをあげるならば、「うすっぺらな」、「近づきやすい」、「親しみやすい」、「あたたかい」、「うちとけた」、「明るい」、「可愛らしい」であり、インドネシアの場合は、「女性的な」、「柔らかい」、「あじわいがある」、「陽気な」、「上品な」、「ていねいな」等、日本人が色白肌に対して主に選択していた評価語が含まれていることが興味深い。

日本の男性が特に多く選択していた評価語は、「可愛らしい」であり、「やさしい」、「美しい」、「柔らかい」という評価語も女性より上位に位置している評価語である。日本女性の場合は「明るい」、「落ち着いた」、「知性的な」、「あじわいがある」、「モダンな」が男性の上位評価語には見られない特徴的なものとなっている。インドネシアの男性の場合は、「モダンな」、「うちとけた」、「愉快な」、「あたたかい」が、インドネシア女性の場合は、「美しい」、「善人のような」、「知性的な」、「親しみやすい」、「のんびりした」が特徴的なものであった。インドネシアの場合、「女性的な」イメージを普通肌の色白寄りの刺激に抱いているが(インドネシア;56.8%，日本;17.6%)、その傾向は特にインドネシア女性の方に多く見られるようである(男性;44.1%，女性;70.3%）。

Table 5　ケース2(普通肌の色白寄りを最初に選択したケース)に対する評価語の上位一覧表
-性別での比較-

	日本男性		日本女性		インドネシア男性		インドネシア女性	
順位	評価語	選択率(%)	評価語	選択率(%)	評価語	選択率(%)	評価語	選択率(%)
1位	うすっぺらな ++	56.7	近づきやすい+	58.1	落ち着いた +	54.4	女性的な ++	70.3
2位	近づきやすい	46.7	うすっぺらな++	54.7	好き	52.9	柔らかい ++	59.4
3位	親しみやすい	42.2	親しみやすい	51.2	あじわいがある +	52.9	おだやかな ++	56.3
4位	あたたかい	42.2	好き	46.5	魅力的	50.5	陽気な ++	54.7
5位	可愛らしい ++	42.2	魅力的	46.5	モダンな +	50.5	好き	53.1
6位	魅力的	40.0	善人のような	44.2	柔らかい	47.1	りこうそうな	53.1
7位	うちとけた	38.9	明るい +	43.0	陽気な +	47.1	あじわいがある +	53.1
8位	やさしい	38.9	りこうそうな	41.9	おだやかな	45.6	魅力的	50.0
9位	好き-	37.8	落ち着いた	41.9	上品な ++	45.6	落ち着いた	50.0
10位	りこうそうな	36.7	うちとけた	41.9	りこうそうな	44.1	美しい +	50.0
11位	甘い ++	35.6	知性的な	40.7	うちとけた	44.1	善人のような	48.4
12位	美しい	33.3	おだやかな	40.7	女性的な	44.1	知性的な	48.4
13位	柔らかい	32.2	あたたかい	39.5	愉快な ++	44.1	親しみやすい	48.4
14位	おだやかな --	30.0	あじわいがある	34.9	あたたかい	42.6	ていねいな ++	46.9
15位	善人のような-	30.0	モダンな	34.9	ていねいな +	42.6	のんびりした ++	45.3
							上品な ++	45.3

Table 6　ケース3(普通肌の色黒寄りを最初に選択したケース)に対する評価語の上位一覧表

	日本		インドネシア	
順位	評価語	選択率(%)	評価語	選択率(%)
1位	親しみやすい 意志が強そうな	24.4 24.4	はきはきとした++	31.8
2位			近づきやすい+	30.3
3位	うちとけた ふけた++	23.9 23.9	親しみやすい のんびりした	28.8 28.8
4位				
5位	あじわいがある++	22.7	愉快な 善人のような	21.2 21.2
6位	貧相な++ あたたかい	22.2 22.2		
7位			意志が強そうな	19.7
8位	ねちねちした++	21.6	あたたかい 可愛らしい++	18.9 18.9
9位	陽気な	21.0		
10位	愉快な	19.3	うちとけた	18.2
11位	モダンな++ 近づきやすい-	18.8 18.8	落ち着いた りこうそうな	17.4 17.4
12位				
13位	古くさい	18.2	好き	15.9
14位	落ち着いた	17.6	陽気な うすっぺらな	15.2 15.2
15位	はきはきとした--	17.0		

Table 7　ケース3(普通肌の色黒寄りを最初に選択したケース)に対する評価語の上位一覧表
-性別での比較-

	日本男性		日本女性		インドネシア男性		インドネシア女性	
順位	評価語	選択率(%)	評価語	選択率(%)	評価語	選択率(%)	評価語	選択率(%)
1位	貧相な++	27.8	親しみやすい うちとけた++	32.6 32.6	はきはきとした+	33.8	近づきやすい はきはきとした 愉快な	29.7 29.7 29.7
2位	ねちねちした++	26.7			近づきやすい のんびりした+	30.9 30.9		
3位	ふけた+	25.6	意志が強そうな あたたかい	26.7 26.7				
4位	のんびりした	23.3			親しみやすい	29.4	親しみやすい	28.1
5位	意志が強そうな	22.2	あじわいがある++	25.6	善人のような うすっぺらな+ 女性的な++	19.1 19.1 19.1	のんびりした	26.6
6位	落ち着いた あじわいがある	20.0 20.0	陽気な	24.4			可愛らしい++ うちとけた	25.0 25.0
7位			愉快な	23.3				
8位	あたたかい 陽気な	17.8 17.8	ふけた モダンな++ きりっとした++	22.1 22.1 22.1	意志が強そうな 古くさい	17.6 17.6	善人のような	23.4
9位							意志が強そうな あたたかい 落ち着いた	21.9 21.9 21.9
10位	親しみやすい- 近づきやすい 丸みのある	16.7 16.7 16.7			あたたかい 好き	16.2 16.2		
11位			近づきやすい 古くさい	20.9 20.9				
12位					陽気な りこうそうな うわべだけの	14.7 14.7 14.7	りこうそうな	20.3
13位	うちとけた 愉快な 古くさい モダンな	15.6 15.6 15.6 15.6	りこうそうな はきはきとした	19.8 19.8			陽気な 好き 美しい+ おとなしい+	15.6 15.6 15.6 15.6
14位								
15位			明るい++	18.6	愉快な 落ち着いた 可愛らしい 甘い おとなしい 保守的な	13.2 13.2 13.2 13.2 13.2 13.2		

3・2・3　普通肌の色黒寄り(5.0YR 6.5／5.0)の刺激に関する結果

Table 6およびTable 7は,同様にケース3（普通肌の色黒寄りの刺激である 3番の刺激を最初に選んだもの）の評価語の上位一覧表である。普通肌の色黒寄り（5.0YR 6.5／5.0）の刺激が最初に選択された評価語として総合的に最も多かったものは「親しみやすい」の81反応であり、これは４つの刺激の中で最も第一選択になりにくかった刺激と言える。両地域に共通して多く選ばれた評価語としては、「親しみやすい」、「意志が強そうな」、「うちとけた」、「愉快な」、「近づきやすい」、「あたたかい」、「落ち着いた」、「陽気」、「はきはきとした」であるが、このうち、「はきはきとした」という評価語はインドネシアでは第１位となっているのに対し、日本では15位である。また日本で多く選ばれた評価語はインドネシアで上位に選ばれた評価語と異なっているのがこれらの表から分かる。すなわち日本の上位評価語は、「ふけた」、「あじわいがある」、「貧相な」、「ねちねちした」、「モダンな」、「古くさい」のようにネガティブなイメージのものが多いが、インドネシア 場合は 「のんびりした」、「善人のような」、「可愛らしい」、「りこうそうな」、「好き」というようにポジティブなイメージも含まれている。

日本で多く選択された「貧相な」というイメージは特に日本男性が多く抱いているイメージであることがTable 7より分かる。日本男性の場合はその他に、「ねちねちした」、「のんびりした」、「落ち着いた」、「丸みのある」が多いが、女性の場合は、「きりっとした」、「りこうそうな」、「はきはきとした」、「明るい」が多く、ポジティブな評価語が男性よりは若干多く見られる。インドネシア女性の場合も、「うちとけた」、「美しい」というポジティブなイメージが多く持たれているが、インドネシア男性の場合になると「うすっぺらな」、「女性的な」、「古くさい」、「うわべだけの」、「甘い」、「保守的な」というようにネガティブなものが多くなり、この刺激に関しては両地域に共通して性差を感じさせる。

3・2・4　色黒肌（5.0YR 6.0／5.0）の刺激に関する結果

Table 8およびTable 9は、同様にケース4(最も色黒肌の刺激である４番の刺激を最初に選んだもの）の評価語の上位一覧表である。色黒肌(5.0YR 6.0／5.0）の刺激が最初に選択された評価語として総合的に最も多かったものは「女らしくない」の237反応であった。両地域に共通して多く選ばれた評価語としては、「女らしくない」、「派手な」、「いやらしい」、「うわべだけの」、「はきはきとした」、「意志が強そうな」、「貧相な」、「ふけた」、「うすっぺらな」、「ねちねちした」である。日本で多く選ばれた評価語として特徴的なものは、「特色のある」、「いばった」であり、これらはインドネシアで色白肌の刺激への評価であったのが興味深い。その他、「軽い」、「陽気な」、「愉快な」も日本での上位評価語である。インドネシアの上位評価語は、「古くさい」、「消極的な」、「甘い」、「静かな」、「丸みのある」で、これらは逆に日本の色白肌の刺激へのイメージと多く一致する。

日本男性の場合、「あじわいがある」、「うすっぺらな」が日本女性には観察されない上位評価語であるのに対して、日本女性の場合は、「きりっとした」、「ねちねちした」が上位評価語として特徴のあるものである。このうち「きりっとした」は普通肌の色黒寄りの刺激における日本女性でも上位に見られた特徴的な評価語であり、日本の女性の場合、肌の色が濃くなると「きりっとした」印象を持ち始めることが分かる。インドネシア男性の場合は「保守的な」というイメージが特徴的であり、インドネシア女性の場合は、「派手な」、「うちとけた」、「デリケートな」が上位評価語として特徴的であった。

4　考　察

調査１の因子分析による結果でも調査２の数量

Table 8　ケース4(色黒肌を最初に選択したケース)に対する評価語の上位一覧表

	日　本		インドネシア	
順位	評価語	選択率(%)	評価語	選択率(%)
1位	女らしくない	75.0	貧相な ++	87.1
2位	特色のある ++	69.9	女らしくない	79.5
3位	派手な ++	64.2	いやらしい ++	76.5
4位	いやらしい--	61.4	ふけた ++	74.2
5位	いばった ++	58.5	古くさい ++	52.3
6位	うわべだけの ++	54.5	意志が強そうな	51.5
7位	軽い ++	51.1	消極的な ++	48.5
8位	陽気な ++	48.9	ねちねちした	44.7
9位	はきはきとした	46.0	はきはきとした	43.2
10位	愉快な ++	44.9	うすっぺらな	40.2
11位	意志が強そうな	44.9	うわべだけの --	37.9
12位	貧相な --	38.6	甘い ++	37.1
13位	ふけた --	36.9	静かな ++	35.6
14位	うすっぺらな	35.2	丸みのある ++	34.1
15位	ねちねちした	34.1	派手な --	31.8

Table 9　ケース4(色黒肌を最初に選択したケース)に対する評価語の上位一覧表
-性別での比較-

	日本男性		日本女性		インドネシア男性		インドネシア女性	
順位	評価語	選択率(%)	評価語	選択率(%)	評価語	選択率(%)	評価語	選択率(%)
1位	女らしくない	75.6	女らしくない	74.4	貧相な ++	83.8	貧相な ++	90.6
2位	特色のある ++	71.1	特色のある ++	68.6	女らしくない	83.8	女らしくない	75.0
3位	派手な ++	65.6	派手な ++	62.8	いやらしい ++	82.4	ふけた ++	73.4
4位	いやらしい	64.4	いばった ++	60.5	ふけた ++	75.0	いやらしい	70.3
5位	うわべだけの ++	61.1	いやらしい -	58.1	古くさい ++	58.8	意志が強そうな	56.3
6位	いばった ++	56.7	意志が強そうな	50.0	ねちねちした +	51.5	はきはきとした	50.0
7位	軽い ++	56.7	はきはきとした	48.8	消極的な ++	51.5	古くさい	45.3
8位	陽気な ++	51.1	うわべだけの	47.7	うすっぺらな +	50.0	消極的な ++	45.3
9位	愉快な ++	46.7	陽気な ++	46.5	意志が強そうな	47.1	甘い ++	42.2
10位	はきはきとした	43.3	軽い ++	45.3	うわべだけの	44.1	派手な	40.6
11位	意志が強そうな	40.0	愉快な --	43.0	丸みのある ++	38.2	ねちねちした	37.5
12位	あじわいがある ++	37.8	貧相な ++	43.0	静かな ++	38.2	うちとけた	45.9
13位	ふけた --	36.7	きりっとした ++	41.9	保守的な ++	38.2	静かな ++	32.8
14位	貧相な --	34.4	ふけた --	37.2	はきはきとした	36.8	うわべだけの --	31.3
15位	うすっぺらな	34.4	ねちねちした	37.2	甘い +	32.4	うすっぺらな 丸みのある デリケートな ++	29.7 29.7 29.7

化Ⅲ類による分析でも日本における各刺激に対するイメージはほとんど一致していており、またそのイメージにはそれぞれ特徴があったが、調査2の日本とインドネシアの比較から、肌の白さに対する評価は両地域でかなり異なっていることが分かった。色白の肌は日本では「弱々しい」イメージが強いものの、その弱々しさは、おとなしくデリケートで保守的な印象や、やわらかく女性的で可愛らしいイメージとの結び付きであることが分かり、日本における女らしさのステレオタイプに一致するイメージを持たれていると判断できよう。それに対してインドネシアでは、同様に「弱々しく」「清潔な」印象は強いものの、「いばった」イメージや「派手な」イメージ、また「幼い」イメージなど、どちらかというとネガティブな傾向を持つ。ポジティブな場合でも「特色のある」「しゃれた」イメージなど、ある種の特殊性が感じられる。ただし選択率としては多くないが、日本もインドネシアも男性は色白肌に対して「弱々しい」イメージだけではなく「意志の強そうな」(日本男性;22.2%$^{++}$,日本女性;4.7%$^{--}$, インドネシア男性;14.7%,インドネシア女性;7.8%)、「はきはきした」(日本男性;17.8%$^{+}$, 日本女性;5.8%, インドネシア男性;13.2%,インドネシア女性;7.8%)イメージも持っていることは興味深い。

しかし結果でも述べた様にこの相反する関係は色黒肌の刺激を第1選択としたケース4において逆転する。すなわち日本人が色黒肌の刺激に抱いたイメージはインドネシア人が色白肌の刺激に抱いたイメージと一致し、逆に日本人が色白肌の刺激に抱いたイメージはインドネシア人が色黒肌の刺激に抱いたイメージと多く一致する点である。その理由に関しては何らかの文化的背景とその影響を感じさせるが、本研究結果からは明かではなくこの点に関してはより深い研究が必要と考えられる。

インドネシアの場合、肌の色の濃さは加齢を意味するようであることが、「幼い」「ふけた」という評価語とのかかわりで分かった。即ち「幼い」と色白肌の刺激、「ふけた」と色黒肌の刺激との結び付きがインドネシアでは強かったわけだ。このように、年配者には褐色の肌、若者にはたとえ男性であっても色白の肌のように、老若の対比を肌の色で表現するようなことは、特に西洋絵画の中では一種の約束事のように使用されていた。

また日本では、色白肌の刺激に対し、インドネシアでは普通肌の色白寄りの刺激に対してそれぞれ「女性らしい感じ」を抱き、逆に色黒肌の刺激に両地域とも「女らしくない感じ」を抱いていたが、絵画の世界ではエジプトやローマの壁画でも男女の肌の色分けを慣習的に行っており、男は褐色、女は白、と明確な性別の区分を示す記号としていたようである。1400年頃に書かれたと思われるイタリア初期ルネッサンスの画家である Cenniniの書("Il libro dell'arte")[1]にも既にその約束事は書かれている。このように色白肌は女性らしさと結び付き、褐色の肌は女性らしくない、即ち男性的なイメージと結びつく背景は絵画にも見出せるようだ。

有意な性差も多く観察された。特に普通肌の色黒寄りの刺激では日本もインドネシアもネガティブな評価をしているのが男性であり(日本男性:貧相な、ねちねちした等。インドネシア男性:うすっぺらな、古くさい、うわべだけの等)、女性はむしろポジティブな受け止め方をしていた(日本女性:きりっとした、りこうそうな、はきはきとした、明るい等。インドネシア女性:うちとけた、美しい等)。 美しさの判断において色白肌を「美しい」と評価しているのは日本の方であり、インドネシアの場合はむしろ普通肌の色白寄りを「美しい」と選択していた(「美しい」という評価語に対する選択率:色白肌の場合:日本;60.8%,インドネシア;39.4%、普通肌の色白寄りの場合:日本;31.3%, インドネシア;53.0%)。また嗜好性という点から「好き」という評価語に着目するならば、「好き」と思われていたのは、日本もインドネシアも最も色白の印象を持つ刺激よりも普通肌の色白寄りの刺激であったことが明かとなった。具体的な形態を伴った場合、色の嗜好性は変化することが既存の研究結果からも明かであるが、

本研究結果からも同様の結論が導かれたと言えよう。

自己のアイデンティティーが形成されるに従い、自分の肌の色に肯定的な評価を与えるという主旨の事を述べる研究は幾つかあるが（Clark 1963[3]、Ogletree 1960[8]）、本研究のこのような結果は、それぞれの地域におけるナチュラルな普通肌の色を自己のある種の基準として、それよりも若干、色白寄りのものへと好みや美しさの評価が偏向したものとも考えられる。また肌色における記憶色の調査結果からも、自分が理想とする肌の色や、記憶している自分の肌の色が、実際の肌の色の測定値よりやや明度が高く色白寄りであるという事実にも関連していると言えよう。即ち基準からの若干の不適合が見られる訳だが、これらのことは好ましさや快さの感情が、心理的水準との適度の不適合と関わりを持つ（Haber 1958）[4] ということをも示唆するものと考えられる。そうであるとするならば、その心理的水準が形成される過程で、文化という環境要因が影響を与えることになるのかも知れない。

しかし，「おだやか」で「魅力的」で「知性的」というパーソナリティーと関連しているのは、日本もインドネシアも普通肌の色白寄りであり「陽気」で「親しみやすく」「あたたかい」パーソナリティーとして捉えられているのは、両国とも普通肌の色黒寄りであるということを考えあわせると、パーソナリティーの側面からは中庸であることが最も好ましいようである。

近年、ホワイトニングへの意識が高まる中、色白の嗜好構造に着目して調査および検討を行ってきたが、肌の色における白さが重んじられるのは、その貴族的なイメージとデリケートで弱々しいもろさという特殊性が関連しているようである。このことはまた日本をはじめとする周辺アジア地域で観察される白嗜好が、その特殊性や稀少性から変容していったことを示唆するのかも知れない。

引用文献

1) Cennini C. circa 1400 "Il libro dell'arte".
2) 中小企業事業団報告書 "消費者の色彩嗜好に関する研究" 中小企業事業団 (1972)
3) Clark K., "Prejudice and your child". Beacon Press, Boston, (1963)
4) Haber R.N. "Discrepancy from adaptation level as a source of affect". *Journal of Experimental Psychology.*, **56** 370-375 (1958)
5) 岩下豊彦、"SD法によるイメージの測定" 川島書店 (1983)
6) 小林嗣幸、"おしゃれの色彩" 日本色研事業株式会社 (1967)
7) "日本色彩研究所色彩情報研究会 第12回消費者の色彩嗜好調査報告書データ集" (財) 日本色彩研究所 (1992)
8) Ogletree E. "Skin color preference of the Negro child". *Journal of Social Psychology.*, **79** 143-44 (1969)
9) 齋藤美穂、"色彩嗜好における Cross-Cultural Research" 早稲田大学文学研究科紀要, 27 211-216 (1981)
10) 齋藤美穂、冨田正利、向後千春、"日本の四都市における色彩嗜好(1) -因子分析的研究-" 日本色彩学会誌 **15** No.1, 1-12 (1991)
11) 齋藤美穂、冨田正利、山下和幸、"日本の四都市における色彩嗜好(2) -クラスター分析によるライフスタイル特性の類型化-" 日本色彩学会誌、**15** No.2, 99-108 (1991)
12) 齋藤美穂、"アジアにおける色彩嗜好の国際比較研究(1) -日韓比較・白嗜好に着目して-" 日本色彩学会誌、**16** No.1, 1-10 (1992)
13) Saito M. "A cross-cultural study on color preference in three Asian cities :Comparison between Tokyo, Taipei and Tianjin". *Japanese Psychological Research.*, **36** No.4, 219-232 (1994)
14) Tsukada I., Funatsu K., & Sato M. "A study on color preference". *Acta Chromatica.*, 1 131-146 (1964)

病院看護における化粧に関する研究

杏林大学保健学部　　千葉大学看護学部
大河原　千鶴子・金井　和子

The purpose of this study is to make clear the effectiveness to self-consciousness of hospital nurses concerning the use of cosmetics on themselves. The study consists of 5 parts as follows; In part 1, 269 hospital nurses were asked about their habit to make-up and self-consciousness to it by questionaire. In part 2, 234 hospital nurses who are employed in three hospitals in different area were asked same questions as part 1. In part 3, 67 nursing school teachers and bedside nurse leaders were asked same questions as part 1 and effectiveness to patients about make-up of nurse moreover. In part 4, 60 patients belong in a hospital were asked their impressions about make-up of nurses by interview and questionaire. In part 5, 99 nursing school teachers and bedside nurse leaders were asked how the make-up on them affect to their feelings by qestionaire. The results are as follows:

1. There are 85% nurses who use cosmetics on their working hours, but it makes a some differences about both area of hospital and their age. Some nurses of a hospital in thirties and forties have no time of their make-up for they are compatible with an employment and a home life.
2. Many nurses answer in the affirmative about their make-up in working hours. They say that to make-up themselves increase tensible force and make positive attitude them in working hours.
3. Many patients also answer in the affirmative about make-up of nurse. As desirable image for make-up of nurse many patients point out such as "clean and fresh" "healthy and cheerful" "mild and grace" as the feelings of nurse.

1　緒　言

我々は魅力ある職業イメージへの脱皮・転換に必要な要因の一つとして「看護婦の化粧」をとりあげ、化粧の効果に対する看護婦の意識を把握し、現代看護婦の好ましい化粧のあり方について提言することを目的として、5回にわたる質問紙調査および看護の管理職を対象に聞き取り調査を行ってきた。

その結果、浦和市内の2総合病院に勤務する看護婦296名を対象とした調査Ⅰでは、勤務時に「化粧をする」ものは85.1%で日常より高く、年齢と共に上昇傾向を示していた。「香り」への配慮、化粧する理由の「身だしなみ」の内容に年代差がみられ、年齢的要因が高いことがわかった。また化粧により気持ちが多少なりと「変化する」のは約60%を占めていた。

調査Ⅱ[4]として、看護婦の化粧は年齢的要因が主であるのか更に意識を探る意味で、地域の異なる2病院の看護婦234名を対象として、調査Ⅰの内容に化粧品の種類を加え調査を行った。年齢要因に多少の地域差は認められたが、概して同じような傾向であった。しかし中堅の30および40代に職業と家庭の両立、育児のために忙しく「化粧したくても出来ない」ものがおり、したがって化粧したときの気持ちの変化が大きいことが一施設の特徴として見い出された。

調査Ⅰおよび調査Ⅱを基礎調査として、調査Ⅲの概要を加え中間報告を行った。本稿では調査Ⅲの分析・検討結果と調査ⅣおよびⅤに加え、看護の管理職に対する聞きとり調査の結果を検討し、最終報告としたい。

A Study on the Actual Situation of Make-up, Cosmetics and Personal Apperance of Hospital Nurse

Chizuko Ohkawara

School of Health Sciences, Kyorin University

2 調 査 Ⅲ

2-1 目 的

調査Ⅱで3地域・施設における看護婦の化粧に関して比較検討を行ったところ、谷津の30および40代に結婚、育児のためにゆとりがなく、化粧をしたくても出来ないという特徴があったことを前述した。看護婦の中でこの年代は、勤務を継続していれば看護のキャリアを積みいわば中堅リーダーおよび管理職である。

そこで調査Ⅲとしては、30および40代が多い現任教育講習会受講中の看護教員および臨床指導者を対象に、化粧や身だしなみに加えて、看護婦の化粧の患者への影響、化粧や身だしなみに関する教育についての考え方などの把握を目的とした。

2-2 対象及び方法

平成5年度埼玉県主催の看護教員研修会受講者51名、文部省主催看護教員講習会の受講者16名の計67名を対象に、平成5年8月に質問紙調査を実施した。調査内容は勤務時の化粧の有無、化粧する理由と配慮、使用化粧品の種類、化粧による気持ちの変化、化粧以外などこれまでの調査項目に、看護婦の化粧に対する意見と好ましいイメージ、患者に与える影響についての意識、教育指導の必要性を加えた。

対象の構成は図2-1に示すように、30および40代が86.6%を占め、平均年齢は37.0±6.3歳である。勤務場所は病院55.2%、看護学校44.8%で、埼玉県内の在職者が70%である。

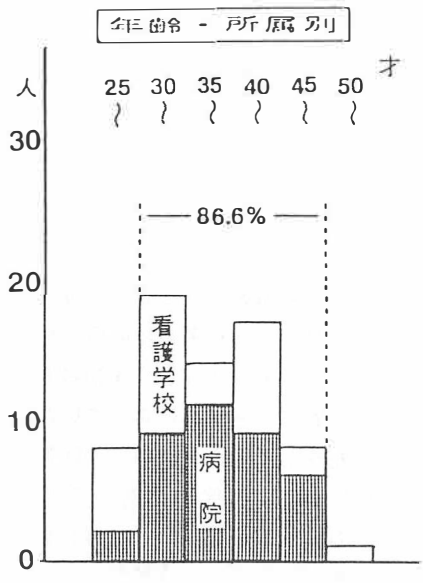


図2.1 対象の構成

2-3 結 果

年齢別および所属別にみた化粧する割合について（図2-2）日常と勤務時を比較すると、日常は40代が他の年代より低く、勤務時は年代を増す毎に上昇している。所属別では看護学校勤務の方が高い。

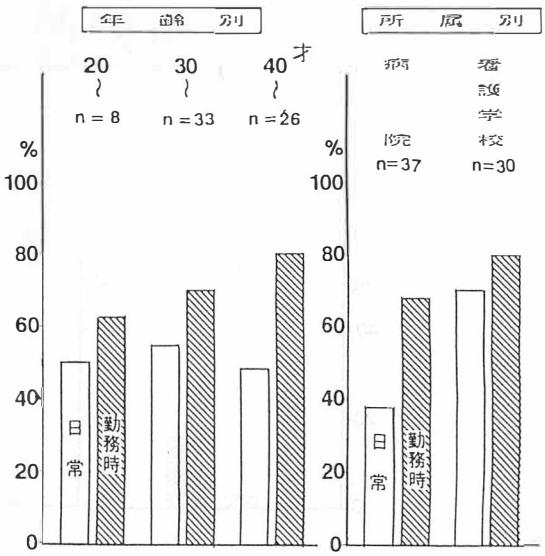


図2.2 化粧する割合

化粧の理由（図2-3）はこれまでと同様「身だしなみ」が一番多く、特に40代は80%以上を占めていた。次は「他人への印象」でやはり年代が増すに従い高い傾向を示した。化粧品の種類（図2-4）をみると、ファウンデーション、口紅、ほほ紅といった一般的な化粧品は、年代に比例して高くなっているが、眉ずみは逆に若い年代に多く、アイ

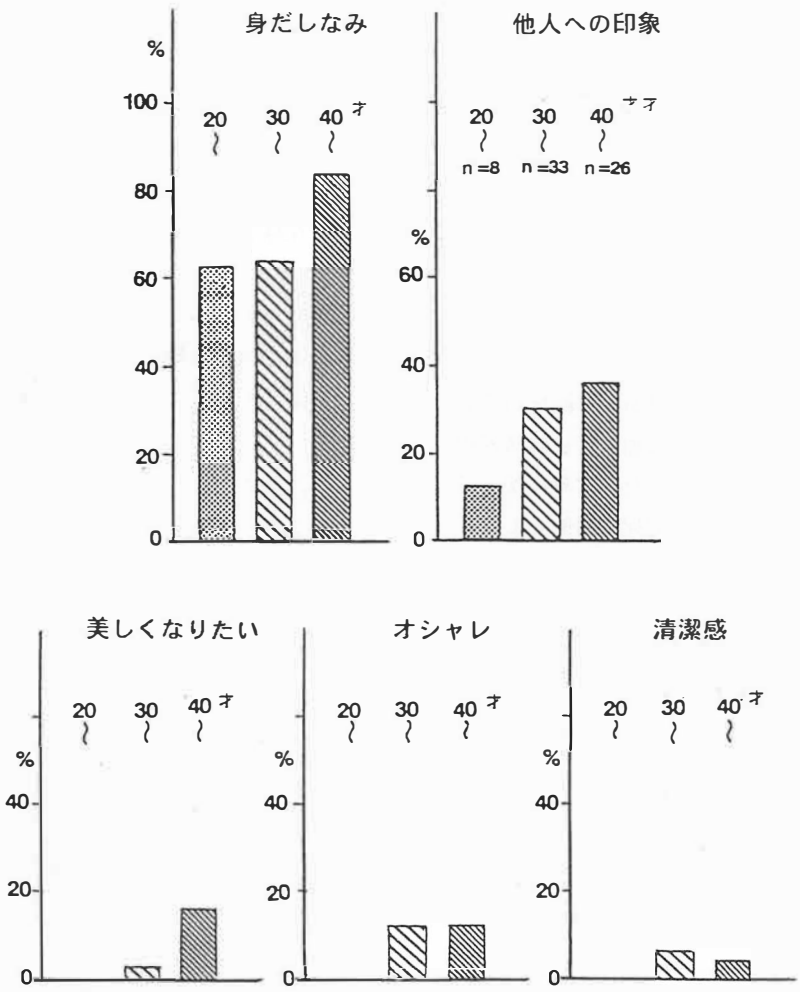


図2.3 化粧の理由

シャドー、アイライナーも年代に比例しておらず、これらは個性によるちがいと思われる。化粧に当たっての配慮（図2-5）は、「薄化粧」と「香り淡泊」であり40代にやや高い傾向を示し、これまでの調査を裏付けるものであった。

また患者への影響を「意識する」の回答は、年代に比例して高率となり、40代は100%を占め、「意識しない」の回答がみられるのは34歳以下であった。

患者への影響を意識した自由記述内容として①患者に不快感や刺激を与えない　②香水などの強いにおいをさける　③夜勤あけの疲れた顔や顔色の悪さは患者に心配をかける　④初対面は外観からイメージされるなどがあげられていた。

看護婦は化粧をした方が「よい」の回答と「気になる」化粧は共に年代に比例して高くなり（図2-6）気になる内容の記述は　①厚化粧　②きつい香りの化粧品　③派手な化粧などであり、化粧への配慮と逆の内容であった。化粧による気持ちの変化は「非常に」と「少し変わる」をあわせ

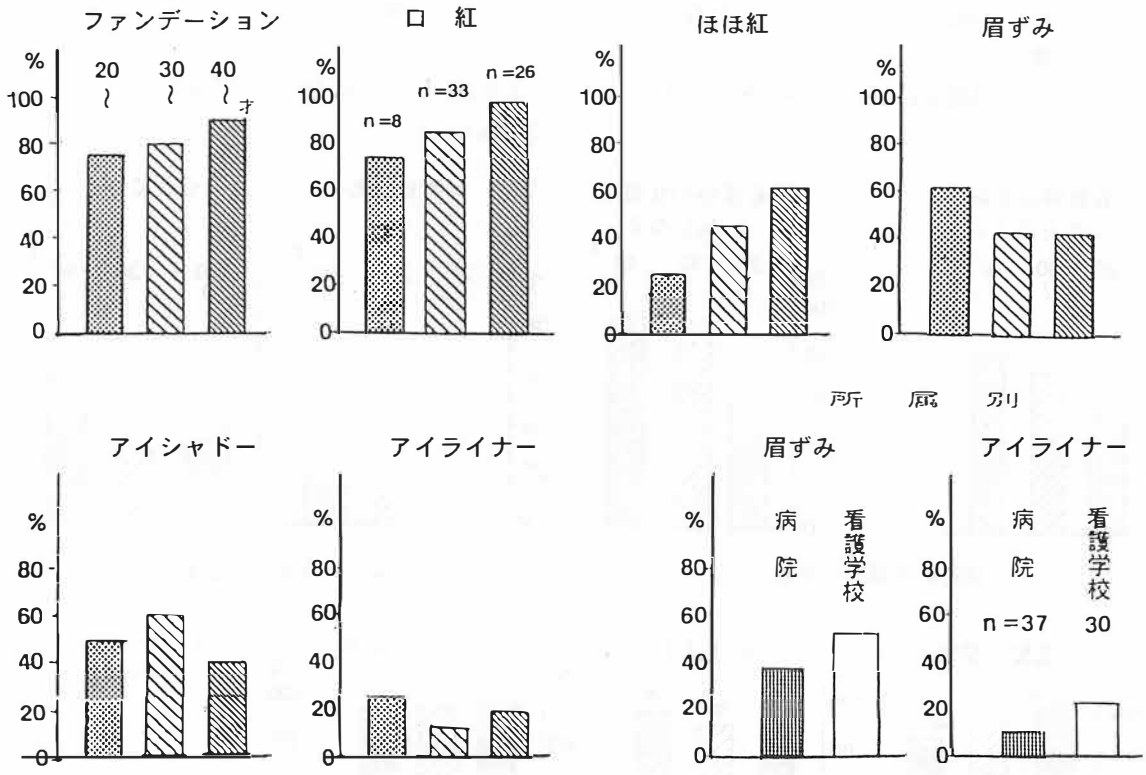


図2.4 化粧品の種類

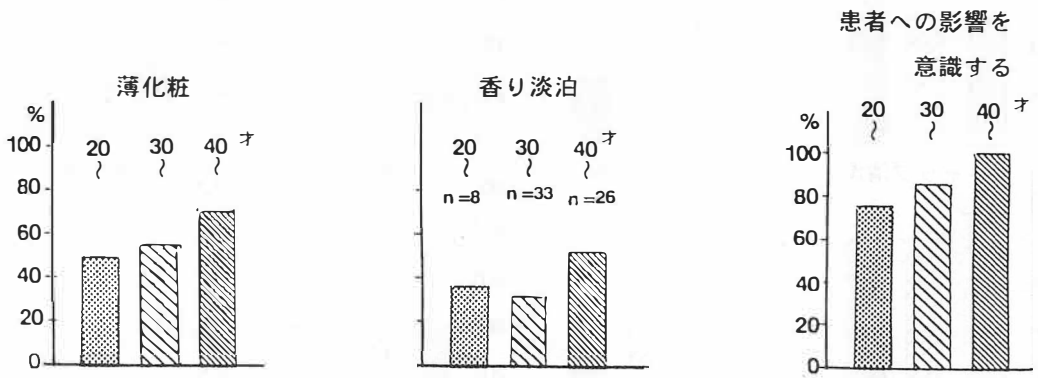


図2.5 配　慮

ると、20および30代で約60%、40代では約80%の高率であった。(図2-7) 変化の内容は「気持ちをひきたて明るくなる」「気持ちがシャキツとひきしまる」など緊張感と気持ちの高揚を示すものであった。

化粧以外の身だしなみは清潔感が重視され、ユニフォームや靴のデザイン、ピアス、ハンカチーフ（ポケットチーフ）などおしやれ感覚をとり入れる意識が、若い年代に多い傾向であった。(図2-8)

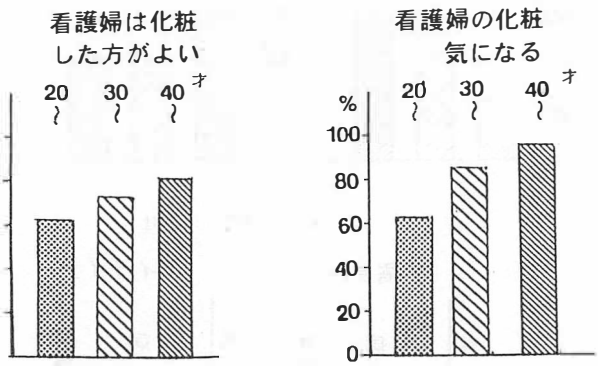


図2.6 看護婦の化粧

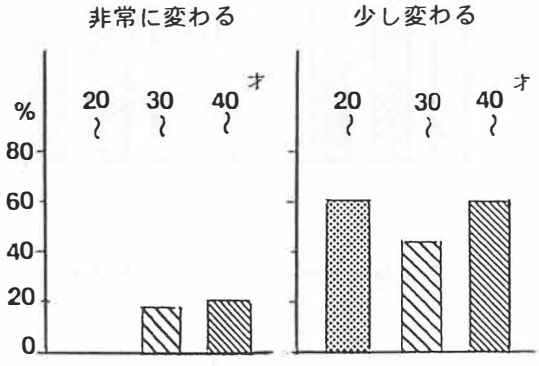


図2.7 きもちの変化

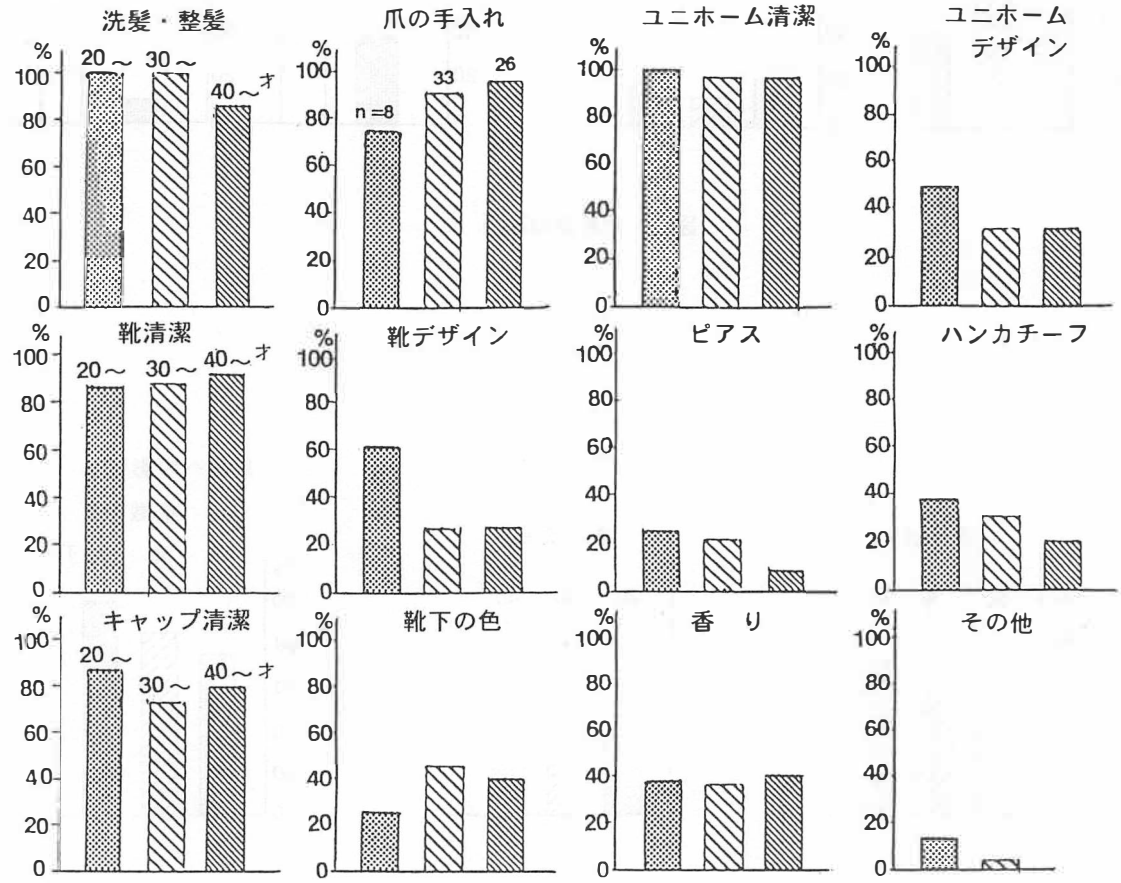


図2.8 化粧以外の身だしなみ

看護婦の化粧に関する好ましいイメージとして6つの選択肢のうち、どの年代も1位に「清潔でさわやか」を選び、2位に「健康で明るい」、3位は「おだやかで優しい」であり、「エレガントで上品」「知的でクール」は低率を示し、「はつきり個性的」は皆無であった。（図2-9)看護婦の化粧や身だしなみに関する教育・指導については「必要である」と75%が回答し、年代別では20代と40代が30代に比べやや高い傾向であった。どこで希望するかは基礎教育においてが20代に高く、30および40代は就職時のオリエンテーションで希望するものがやや高い傾向であった。（図2-10）

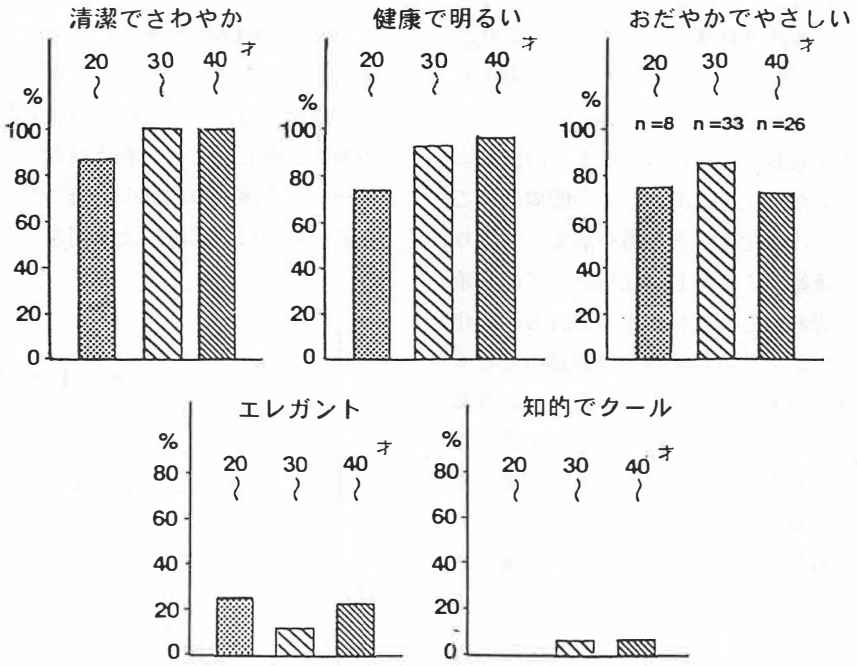


図2.9 看護婦の化粧はどうあればよいか

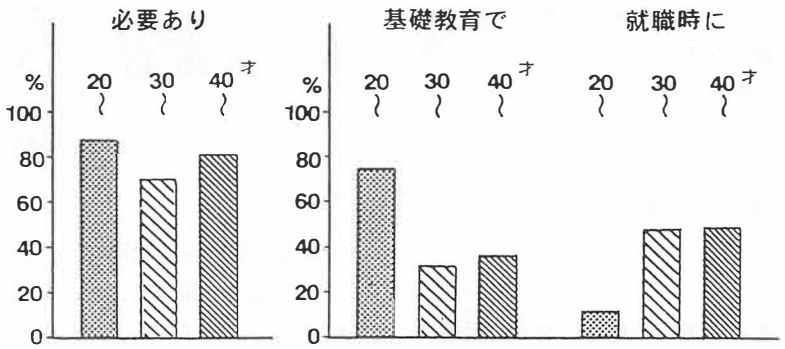


図2.10 化粧についての教育･指導

2-4 考　察

調査Ⅰ・Ⅱの対象は20代が過半数を占め、30および40代は35～37%であったが、調査Ⅲではこの年代が87%を占めていた。職位別てもこれまでの調査対象はスタッフが70～80%であったが、今回は約10%であり前述の中堅リーダーが大部分であった。

結果にみられるように勤務時に「化粧をする」ものは高率で、谷津は特殊であることがわかり、これまで以上に化粧に関し肯定的であると考えられる。化粧をする理由としては「身だしなみ」が高率で、他人を意識した回答はこれまでの調査より上まわっていた。化粧にあたっての配慮は、これまでと同じく「薄化粧」と「香り淡泊」であり、この2点は看護婦にふさわしい化粧としての必須条件であると思われる。化粧による気持ちの変化も高率であったが、その記述内容は前述のごとく積極的な行動、仕事への動機づけ、気持ちの高揚を示すものが大部分であり、内にもてる魅力をひき出す原動力ともなっていることがうかがえ、これまでの調査を裏付けるものであった。

化粧以外の身だしなみとしては清潔感が重視され、化粧についての意見、好ましいイメージとも一致している。ここでは化粧や身だしなみについて、患者に与える影響を意識したことが「ある」と90%が回答し、「ない」のは10%以下で年代的には34歳以下であったことに注目しておきたい。つまり看護のキャリアを積むに従い患者との教育的・治療的関係において、看護婦が患者をどうみるかと同時に患者が看護婦をどうみるかという治療的環境としての自己の存在に気づいていくことが重要と考えるからである。

3 調　査

3-1 目　的

調査Ⅲまでにより看護婦の化粧に対する配慮は、「薄化粧」と「香り淡泊」であり、患者に不快な刺激を与えぬよう患者への影響を意識している看護婦が多く、年代に比例して高率となっていることが明らかとなった。では看護を受ける側の患者は、看護婦の化粧についてどうみているのであろうか。その意識を探ることを目的として入院患者を対象に調査を行った。

3-2 対象および方法

調査Ⅰで対象とした浦和市内の1総合病院に、平成5年3月9日の時点に入院中で調査に応じてくれた患者60名を対象とした。調査内容は、看護婦は化粧をしていた方がよいか、「感じよい」化粧の程度、看護婦の化粧について気になったこと、不愉快と感じたこと、看護婦の化粧の好ましいイメージ、看護婦の化粧の有無で受ける感じなどである。方法は質問紙による聞きとり調査とした。

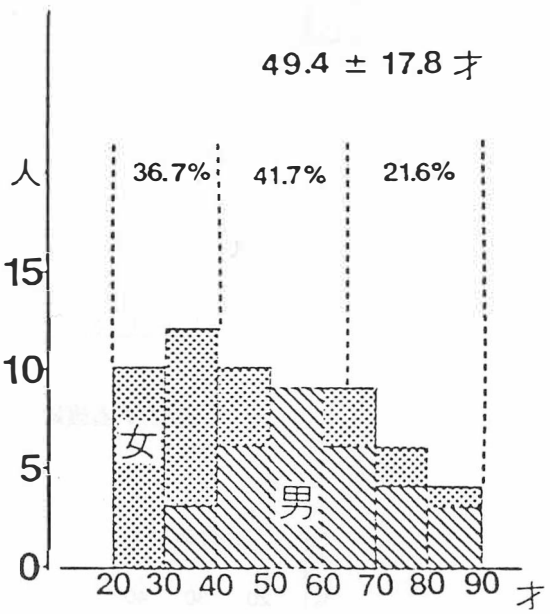


図3.1 対象の構成

対象の構成を年齢別にみると図3-1のように20および30代が36.7%、40から64歳までが41.7%、65歳以上が21.6%を占め、男性31名、女性29名で年齢平均は49.4±17.8歳である。入院病棟は男性の場合内科21名、泌尿器科10名、女性は産科18名、内科・外科11名である。

3-3 結　果

看護婦は化粧をしていた方が「よい」の回答は、男性80.6%、女性96.6%で女性の方が多く、「いいえ」は男性1名のみであり化粧に対し看護婦以上に肯定的であった。(図3-2)「感じがよい」化粧の程度は薄化粧が一番多く71.7%であり、男性67.7%、女性75.8%でやはり女性の方が多い傾向を示し、厚化粧は皆無であった。(図3-3)その他についての内容をみると、男性は「その人の自由」「普通でよい」「化粧をしていた方が明るくなってよいが強烈なにおいは困る」などであり、女性の場合は「その人の肌にあわせ似合った化粧」「顔がよくみえる化粧」「自分にあった節度ある化粧」などがみられ、化粧に対しより具体的になっていた。

看護婦の化粧が気になったことが「ある」のは、男性12.9%、女性20.7%で女性がやや多い傾向であった。その理由は、男性では「厚化粧」「起床時に濃い口紅をみるとギョッとする」であった。女性の場合全員産科入院患者であり、派手な化粧と濃い口紅に加え「香水のきついにおい」があげられ、逆に化粧をしていない人も気になるとしていた。看護婦の化粧で不愉快な思いをしたことが「ある」のは、やはり産科入院中の女性患者であり、その理由としては、特に妊娠悪阻の時に香水および化粧品のにおい、口紅の光りをあげていた。男性患者の場合は不愉快な思いをしたことは「ない」と回答し、化粧をしていない方が不愉快だと

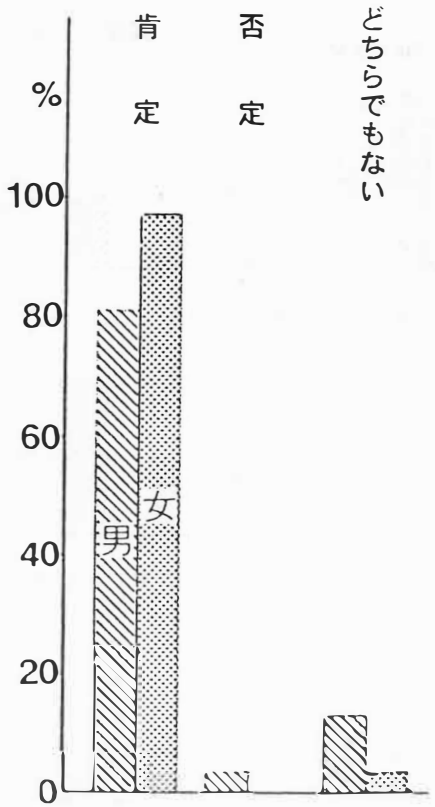


図3.2 看護婦は化粧をしていた方がよいか

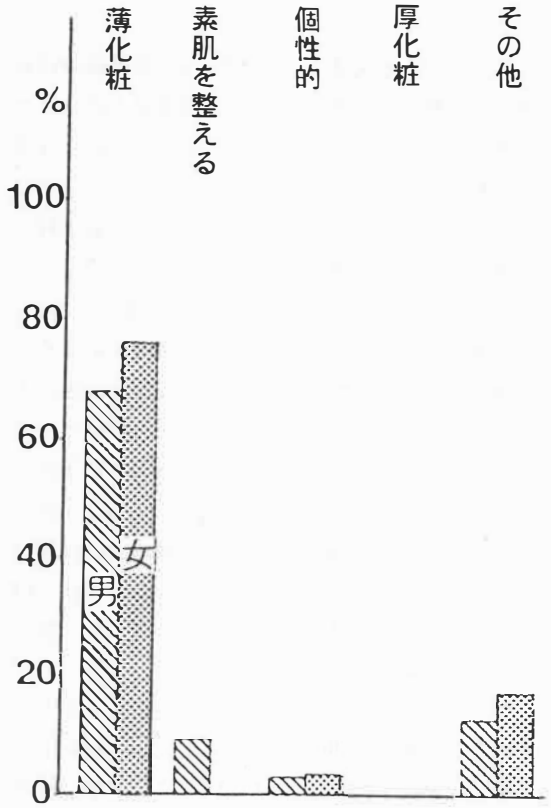


図3.3「感じよい」化粧の程度

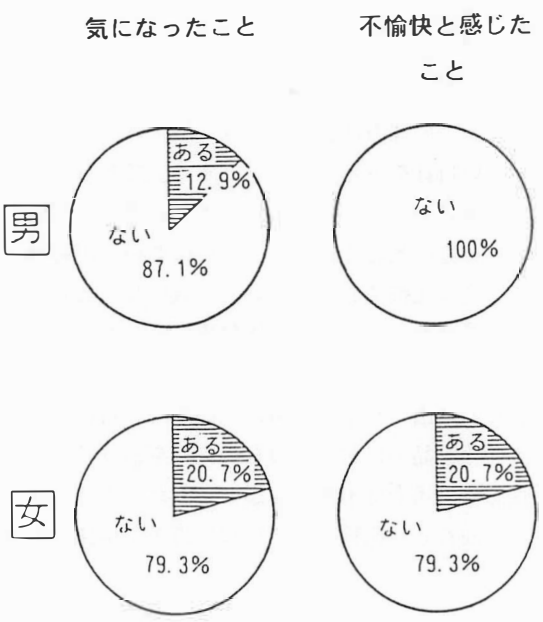


図3.4 看護婦の化粧について

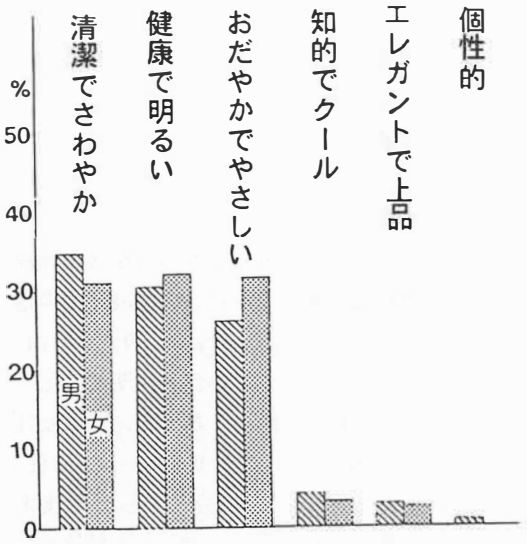


図3.5 看護婦の化粧の好ましいイメージ

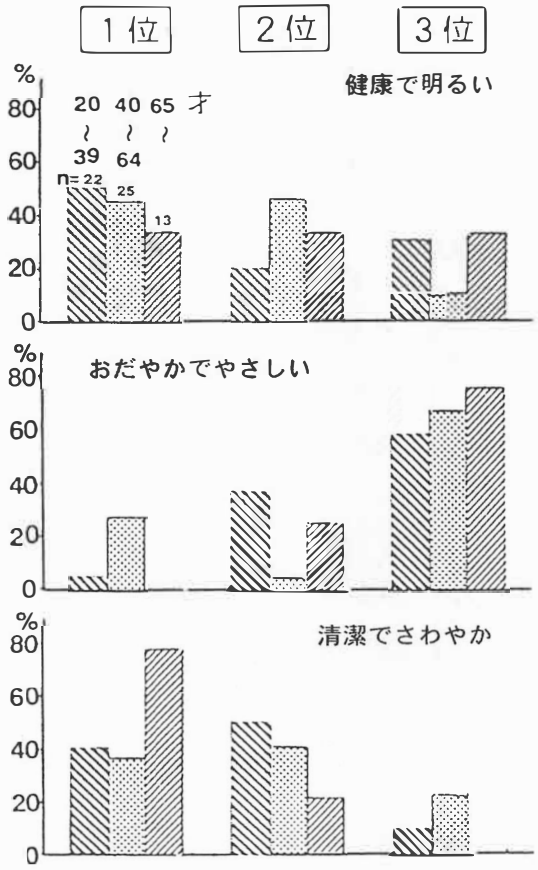


図3.6 看護婦の化粧の好ましいイメージ
世代別順位づけ

述べているものもあった。(図3-4) 看護婦の化粧はどうあればよいかについて、調査Ⅲと同様６つの選択肢により選んでもらったところ、1位「清潔でさわやか」、2位「健康で明るい」、3位「おだやかで優しい」であり、選び方の順位は看護婦と一致していた。性別では、男性は上位３位までの順位がはつきりしており、女性は「健康で明るい」31.2%を1位に、「清潔でさわやか」と「おだやかで優しい」は31.0%の同率2位で、1位とは僅少差であった。(図3-5)その傾向を年代別順位づけでみたのが図3-6である。「健康で明るい」を１位にしたのは、多い順に20および30代が50%と半数を占め、40から64歳までは45%、65歳以上では33.3%になっていた。２位への順位づけは、40から64歳までが45%で一番多く、20および30代が一番少なく20%、65歳以上は中間であった。３位への順位づけは一番少ないのが40から64歳までであった。すなわち20および30代において１位への順位づけが多く、40から64歳までは1位、2位が同率、65歳以上ではいずれも同率であった。

「清潔でさわやか」の1位順位づけは、65歳以上が際立って高率(77.8%)で、20および30代が40%、

40から64歳までは36.4%であった。2位順位づけは、20および30代、40から64歳まで、65歳以上の順となっていた。

「おだやかで優しい」は、3位への順位づけがどの年代も多く、20および30代では57.9%、40から64歳までは66.7%、65歳以上では75%で年代が増すにつれ高率となっていた。

化粧を「している」看護婦と「していない」看護婦から受ける感じについて、これまでの調査結果を基に看護婦の化粧と関係がある形容詞対を7対選び、5段階評定をしてもらった結果が図3-7である。

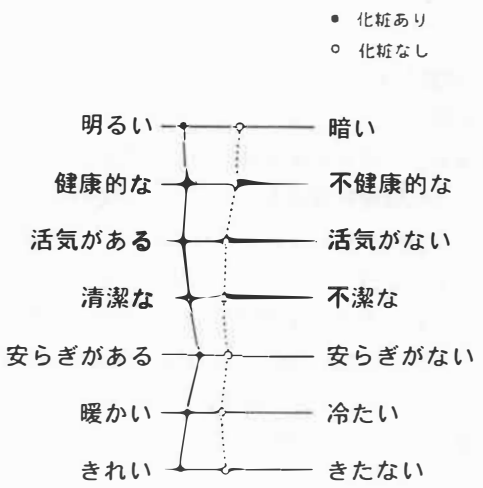


図3.7 看護婦の化粧の有無で受ける感じ

化粧の有無で受ける感じの差が大きい順に列挙すると次のようであった。

全体では

明るい	暗い
健康的な	不健康的な
きれい	きたない
活気がある	活気がない
清潔な	不潔な
あたたかい	つめたい
安らぎがある	安らぎがない

それを年代別にみると次のようであった。

20および30代

健康的な	不健康的な
明るい	暗い
活気がある	活気がない
きれい	きたない
清潔な	不潔な
安らぎがある	安らぎがない
あたたかい	つめたい

40から64歳まで

明るい	暗い
健康的な	不健康的な
きれい	きたない
活気がある	活気がない
あたたかい	つめたい
清潔な	不潔な
安らぎがある	安らぎがない

65歳以上

明るい	暗い
健康的な	不健康的な
清潔な	不潔な
あたたかい	つめたい
きれい	きたない
安らぎがある	安らぎがない
活気がある	活気がない

3-4 考 察

対象が入院中の患者であり、看護婦から直接的なケアを受けていることもあって、看護婦に好意的な回答が寄せられたと考える。しかし不快や気になる内容について率直に答えていることから、結果をそのまま受けとめてよいと思われる。化粧に関しては、していた方が「よい」と看護婦以上に肯定的であり、「感じがよい」程度は薄化粧と香り淡泊であって、看護婦を対象としたこれまでの調査と全く一致していた。したがってこの2点は看護婦に望まれる化粧の程度といえる。強い香りは患者にとって刺激的かつ不愉快であり、特に妊娠悪阻など匂いに敏感で気分が左右される患者

への配慮は、これまでと同様重要であることが証明された。

看護婦の化粧に対する好ましいイメージとして選択された「清潔でさわやか」「健康で明るい」「おだやかで優しい」の上位3つは、看護婦のイメージとして患者が希求している現れであり、看護婦のイメージは患者に反映するといえよう。つまり健康回復を願う患者は、気分的にさっぱりした清潔でさわやかなイメージ、明るく元気づけられる健康で明るいイメージ、親しみやすく安らぎが感じられるおだやかで優しいイメージを求めていると考えられる。

これを年代別の順位づけでみると、若い年代の患者は「健康で明るい」を1位に、「清潔でさわやか」を2位に「おだやかで優しい」を3位にしており、何れも半数を占めていて順位づけが明確である。40～60歳までの中年層の患者は「健康で明るい」が1位および2位同率であり、「清潔でさわやか」は2位、「おだやかで優しい」は順位づけでは3位であるが66.7%と他に比べ高率であり、ここに特徴があるといえる。65歳以上では「清潔でさわやか」の1位順位づけが他に比べ高率で、「健康で明るい」は2位と3位が同率で、3位の「おだやかで優しい」は75%を占め、他に比べ極めて高率であり特徴的である。つまり「おだやかで優しい」は順位づけでは3位であるが、年代を増すに従い高率を示す傾向と言える。

4 調 査V

4-1 目 的

これまでに看護婦の年齢的な要因も考慮に入れた対象を選択し調査を進めた結果、化粧による気持ちの変化が行動に及ぼす影響について示唆された。そこで調査の最終として気持ちの変化に焦点をしぼり、行動の動機づけとなる要因を詳細に調べることを目的として検討を行った。

4-2 対象および方法

調査Ⅲと同様埼玉県、および文部省主催の看護教員講習会平成6年度受講生99名を対象に、平成6年11月に質問紙調査を実施した。調査内容は勤務時の化粧の有無、化粧する理由ならびに配慮、化粧による気持ちの変化に、気持ちの変化を表現した23項目に対する4段階評定を加えた。対象の構成の年代別では、20代は10.3%、30代は69.0%、40代は20.7%で平均年齢は35.0±5.0歳であり、調査Ⅲの対象に比べ30代が多い。

表 1 : 気持ちの変化 23項目の相関

項目	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1 自分に自信がもてる	0.669	0.445	0.525	0.601	0.517	0.582			0.426					0.441		0.400						
2 気持ちが前向きになる	1.000		0.471	0.560	0.610	0.437								0.462	0.539	0.511		0.417				
3 気になる部分を隠せる		1.000	0.614			0.448										0.460					0.438	
4 対人意識が高まる			1.000	0.472	0.487	0.447			0.503	0.451				0.578	0.509	0.509		0.408			0.416	
5 気持ちが明るくなる				1.000	0.607	0.534			0.566	0.523	0.417	0.447	0.481	0.594	0.657	0.501						
6 人と会うのが楽しくなる					1.000	0.434	0.405	0.448	0.465	0.554		0.446		0.503	0.537	0.430						
7 きれいになったような気がする						1.000			0.428				0.462			0.485						
8 女らしいしぐさを心がけるようになる							1.000	0.457		0.441					0.405							
9 身だしなみにまで注意がはらえる								1.000	0.427	0.434				0.457	0.492							
10 気持ちにハリがでる									1.000	0.555	0.455	0.531	0.698	0.628	0.644	0.701		0.475		0.454	0.464	
11 外向的になる										1.000	0.426	0.435	0.436	0.706	0.707	0.487	0.430					0.402
12 人の明るい印象を与える											1.000	0.427	0.452	0.500	0.489	0.431						
13 すっきりした気持ちになる												1.000	0.418	0.498	0.586	0.521	0.446					0.436
14 気分転換ができる													1.000	0.521	0.517	0.675				0.447		
15 積極的になる														1.000	0.722	0.500	0.429					0.477
16 生き生きしてくる															1.000	0.633	0.495				0.401	0.543
17 気持ちがひきしまる																1.000	0.567	0.530		0.475	0.542	
18 背筋がしっかり伸びる気持ちになる																	1.000	0.499		0.484		0.459
19 仕事をするぞという気持ちになる																		1.000			0.688	
20 顔色が悪いのをおぎなうことができる																			1.000			
21 私生活と仕事のきりかえができる																				1.000	0.662	
22 仕事に行くという緊張感がでる																					1.000	
23 やさしい気分になる																						1.000

☆提示したものはすべてP<0.05以上の有意差を有する

表 2 ： 気持ちの変化 23項目の因子分析

	項　　目	因子1	因子2	因子3	因子4	因子5
活気・気持ちのゆとり	生き生きしてくる	-0.746				
	外向的になる	-0.714				
	積極的になる	-0.684				
	すっきりした気持ちになる	-0.630				
	やさしい気分になる	-0.611				
	身だしなみにまで注意がはらえる	-0.513				
	背筋がしっかり伸びる気持ちになる	-0.478				
	人に明るい印象を与える	-0.441				
	女らしいしぐさを心がけるようになる	-0.438				
対人意識の高まり	自分に自信がもてる		-0.823			
	気持ちが前向きになる		-0.686			
	きれいになったような気がする		-0.655			
	対人意識が高まる		-0.561			
	気持ちが明るくなる		-0.546			
	気になる部分を隠せる		-0.542			
	人と会うのが楽しくなる		-0.537			
仕事への意欲	仕事に行くという緊張感が出る			-0.826		
	仕事をするぞという気持ちになる			-0.748		
	私生活と仕事のきりかえができる			-0.617		
気持ちのハリ	気分転換ができる				-0.718	
	気持ちにハリがでる				-0.560	
	気持ちがひきしまる				-0.450	
顔色のおぎない	顔色が悪いのをおぎなう ことができる					-0.622
	累積寄与率	19.39	34.22	46.12	54.41	58.97

4-3 結　果

(1) 勤務時に「化粧する」ものは78.8%で、理由は身だしなみ53.9%、他との組み合わせ28.1%で両者で82%を占めていた。

(2) 配慮は、薄化粧44.3%、香り淡泊13.6%、両者の組み合わせ11.3%で調査Ⅲに比べ低率であり、なしが25.0%を占めていた。

(3) 化粧による気持ちの変化は「非常に変わる」16.9%、「少し変わる」73.0%で計89.9%は調査Ⅲよりわずかに高率であった。

(4) これまでの調査の自由記述から選んだ気持ちの変化の表現23項目については、表1のようにかなりの項目間に相関がみられた。

(5) 気持ちの変化の表現23項目に対する回答から、因子分析により5因子を抽出した（表2）。

因子1は活気・気持ちのゆとり、因子2は対人意識の高まり、因子3は仕事への意欲、因子4は気持ちのハリ、因子5は顔色のおぎないにそれぞれ分類された。

4-4 考　察

明治41年わが国最初の看護婦による著書といわれる実地看護法[1]に、“看護婦心得として患者の精神の慰めや衛生を保つ心配りとして何時も麗しき顔で接するように”とある。また「身だしなみ」として“束ね髪、身体の清潔、爪切り、手の荒れを防ぎ、衣服は清潔にして飾らず”と記述されている。

戦後の新制度と言われた看護教育では、看護倫理[2]に看護婦の容姿として清楚な美しさが求められ、“看護婦の清らかな心の表現は患者の慰めであり、人の目に清らかな感じを与える化粧・身だしなみが望ましく煽情的であってはならない”とある。

一方、日本の化粧品の歴史[3]によると、明治の初めは洗顔入浴には石鹸は高級品であり、化粧水時代であり、白粉による鉛中毒が問題となっていた。大正時代に入って色白は七難隠すの諺から、自分の肌色を生かす意識を与える色白粉の開発により、化粧の方法が個人表現へとすすむことになったという。さらに戦後アメリカの影響を受けファンデーションが入ってきて、個人の肌の状態に応じた化粧品、無香化粧品、肌色価値観多角化、バイオ口紅およびシャンプーやリンスなどの開発めざましい時代を迎えることになる。1980年代に入ると女性の社会進出が定着し、行動する女性時代となり、自然なメーキャップ、自分らしさの表現へと変遷し、化粧品は幅広い領域に関連した総合人間科学の観点から研究開発が行われるようになってきた。

この化粧品の進歩発展は、看護婦の化粧にも大きく影響を及ぼしていると考えられる。かって化粧は派手でけばけばしく刺激的であるため、病人を看とる看護婦の身だしなみとしては、ふさわしくないとされていた。しかし今回の一連の調査では、看護婦も患者はそれ以上に看護婦の化粧に対し肯定しており、むしろ化粧をしていない方が不愉快だとしていること、看護婦の患者への配慮が患者の意識と一致していること、最終調査結果で示された気持ちの変化の内容は、顔色のおぎない、気持ちのハリ、対人意識の高まり、活気などでこれらが仕事への意欲に連なって、生き生きと働く原動力になっていることが明らかになった。つまり看護婦の化粧は単に外観だけでなく、看護の姿勢の反映であり、気持ちの変化に関与し、内にある魅力を引き出し、明るく生き生きと意欲的に働く行動への動機づけとなっていることが分かったことは大きな意義があると考える。

5　結論にかえて

看護婦の教育・指導的立場にある看護部長や婦長は、看護婦の化粧に関しどのような意見を持っているかを把握する目的で、平成6年10月末にこれまでの調査結果の概要を話した上で聞き取り調査を行った。その内容を整理したのが表3である。

対象は看護部長であった70代および60代各1名、現職にある50代2名、40代3名の看護部長および婦長計7名であり、内容は看護婦の好ましい化粧、化粧に関する教育・指導等である。

表 3 : 管理職を対象とした看護婦の化粧に関する意見

質問項目	回答結果・内容
I ～1.看護婦の化粧や身だしなみについて看護教育で教えられたか	・７名全員が教えられたと回答した。 1)学科目としては看護倫理、職業的調整、看護管理など 2)教えられた内容としては化粧についてというより「実習時の身だしなみ」として教えられた（日赤） 3)白衣にふさわしい化粧をし、髪を整える 4)白衣、ナース靴の清潔、ナース靴としてサンダル型はいけない 5)毎日朝礼時にユニフォーム、髪をチェックされた（日赤） 6)ネックレス、指輪はいけない
2.白衣にふさわしい化粧と髪の整え方について教えられたことは	・薄化粧がよい 1)刺激的でないどぎつい化粧はよくない 2)口紅はうすく、アイシャドーはしない方がよい 3)マスカラ、アイラインはいけない 4)顔色が悪いときは頬紅でカバーする 5)特に深夜勤時起きっぱなしの顔、髪ボサボサはいけない ・髪の整え方 1)髪が襟足にかからぬようにショートカットにするかあげてとめる 2)前髪をたらさぬように下を向いた時にダラッとならぬように 3)髪が襟元につかぬようネットをかぶる（日赤）
3.就職時にオリエンテーションされたか	・「はい」が６名、「特になかった」は１名～ただし日常勤務中度が過ぎている時は注意された。例えば患者から麻酔が覚めてみたら口紅コッテリ、アイシャドーが濃い看護婦は嫌と言われ、注意
4.化粧したいと思ってもできないことがあったか	・特にない、薄化粧、口紅位でそれ以上したいと思ったことはない ・マニキュアが好きだったがいけないと禁止されできなかったので爪を磨いた（日赤）
II ～1.現代看護婦の化粧に関する意識をどうみているか	・最近のクリニックや近代的な病院では看護婦のオシャレに積極的 例えば 1)ポケットチーフ－白にうつる柔らかい色は患者さんに安らぎを与える 2)ナースリング　－手がきれいに見える 3)小さなピアス
2.化粧をする事についての意識が変わったと思うか	・変わってきた。昔は化粧をしない看護婦が多かったが女性の社会進出、化粧品の進歩、一般社会の化粧に影響されていると思う ・見かけだけでなく看護の姿勢の反映である。化粧により自分に自信をもって笑顔で接することができる
3.勤務場所、世代による違いがあるか	・若い人は化粧をしなくても肌がきれい－口紅はつけた方がよい ・中年すぎてもきれいにしたいと思う人が多くなった－いくつになってもその人にあった薄化粧 ・勤務場所の外来、病棟別は特に意識しないがクリーンルームは化粧しない、手術室はしている ・卒業生をみていると１年目は化粧しない人が多いが外出する機会が多くなると化粧する人が多くなる ・病院の外では一般社会の女性と違いがなくなった
4.化粧をするのは自分のためか、他者を意識してのことか	・自分と他者（特に患者さん）の両方である ・誰と接するかによって違う
III ～教育・指導上の留意	・化粧の程度と化粧以外の身だしなみ 1)化粧はその人にあった薄化粧、口紅を奨励 2)香りは患者さんに刺激を与えぬよう、ほんのりと 3)結婚指輪はよいが石の入った物はだめ 4)白衣とのつりあい、清潔感、清楚な感じがよい 5)化粧は身だしなみであり、全くしないのはよくない 6)アイシャドーは注意してどぎつくつけるのはどうかと思う 紫系はよくない、特に夜勤の時は患者にとってアイシャドーは刺激的 7)看護の職場と外出先によって使い分ける

表3にはこれまでの調査結果が集約されており、さらに化粧に関する教育・指導上の配慮として、現代看護婦の化粧に関する意識、特に若い世代は勤務する場所に応じて身だしなみの内容におしゃれ感覚をとり入れ、自己表現がなされるように変わって来ていることを受けとめた上で、個々人にあった薄化粧を奨励したいと考えていることに注目したい。

引用文献

1. 大関　和、“実地看護法(復刻版)”、医学書院（1908）
2. 橋本寛敏、“看護倫理”、医学書院（1964）
3. 光井武夫、“新化粧品学”、南山堂（1993）
4. 大河原千鶴子、コスメトロジー財団、研究業績 中間報告集 3 51（1993）

高齢者のおしゃれ行動とその評価に関する研究

横浜国立大学経営学部　聖マリアンナ医学研究所
藤森　立男・藤森　和美

The purpose of this study was to examine the images held by elderly people about what "an elegant elderly lady" is like, and to clarify the qualities of such a lady. The subjects of this study were seven hundred and thirty five elderly people who were taking educational courses for the aged held at local community centers.They were asked to imagine two kinds of elderly ladies; One who was elegant, and another who was not elegant. Then they filled out questionnaires consisting of items dealing with their images and cognitions of their qualities. The main results were as follows:

1) The image ratings of an elegant elderly lady were analyzed by factor analysis. Two factors were extracted : leadership and maturity. The elderly people had images that an elegant elderly lady was superior to an inelegant elderly lady in such inner qualities as leadership and maturity.
2) The cognitive ratings of properties which she had were analyzed by factor analysis. Three factors were extracted : sophisticated appearance, economic capacity and make-up skills. The elderly people had cognitions that an elegant elderly lady was superior to an inelegant elderly lady in outer qualities as sophisticated-appearance, economic capacity and make-up skills.
3) Elegant elderly ladies were grouped into three clusters by cluster analysis : gold cluster, sophisticated cluster and executive cluster.

1　緒　言

従来、社会心理学の分野では、特定の非言語的コミュニケーション(Non-Verbal Communication; NVC) のキュー(Cue)が対人認知と密接に関連しているとの研究がなされている[1-4]。その代表的な研究は、Dionらによるものである[5]。彼らは大学生を対象にして、「外見的に魅力的な人物が社会的に望ましい性格特性を持っており、将来において社会的地位の高い職業につくだろうと認知される」ことを報告している。わが国では、山本らの社会的地位のイメージに関する研究があり、社会的地位の高さに関する判断と服装・容姿などの特徴、言葉使いや立ち振舞いなど、さらに保有財産や経済行動などの特性がどのように関連しているかを検討している[6]。その結果、他者の社会的地位が高いかどうかを判断する手がかりとして、大学生および社会人（25歳から49歳）ともに「話し方・言葉使い」「身だしなみ」「仕事の内容」「職業・勤め先」「身分・肩書」などの特性を重視していることを明らかにしている。

しかしながら、これまでの研究は対象が大学生や成人中期までに限定されていることが多く、成人後期に属する高齢者が同年代の他者をどのように認知しているかについてはほとんど検討されていない[7, 8]。

そこで本研究では、従来の研究では触れられることの少ないこの問題を検討した。すなわち、高齢者が認知する「おしゃれの上手な人と上手でない人」のイメージとはどのようなものであり、高齢者のおしゃれのイメージの構造はどのような要素から構成されているかを検討した。また、高齢

A Study on Elderly People's Cognitions of "an Elegant Elderly Lady"

Tatsuo Fujimori
Faculty of business administration
Yokohama National University

者が認知する「おしゃれの上手な人と上手でない人」の服装・容姿、言葉使いや立ち振舞いなどの外見的特性にどのような違いがあるかを調べ、同時に高おしゃれ者の外見的特性に関する構造を検討した。さらに、高齢者が認知するおしゃれの上手な人はどのようなグループに分かれるかをクラスター分析を用いて検討した。

2 方 法

2．1 対象者

本研究の対象者は、東京都世田谷区内および杉並区内のコミュニティセンターなどを利用する高齢者、北海道函館市・江差町・恵山町・木古内町のシニアカレッジや高齢者大学などの参加者であり、最終的な分析対象者は合計735名(男性249名、女性486名)であった。年齢は60歳代から80歳代までに分布し、平均年齢は男性が70.5歳、女性が68.9歳であった。

2．2 実施時期

平成5年6月から9月までの期間に調査票を配布し、施設内に設置した回収箱、または郵送によって回収した。

2．3 調査票の内容

調査票は初めに、「あなたの知っている女性の中で、おしゃれの上手な人（Aさん）とおしゃれの上手でない人（Bさん）の条件にあてはまる女性を1人ずつ思い浮かべて下さい」と教示し、それぞれの人物を想起させ、その印象や外見的属性などについて記入することを求めた。

Aさんの条件は、①60歳以上の女性　②あなたが会ったことのある人　③おしゃれが上手な人という3条件であった。次に、Bさんの条件は、①Aさんとほぼ同じ年輩の女性　②あなたが会ったことのある人　③おしゃれが上手でない人という3条件となっていた。

質問項目は、Ⅰ．Aさんについて、Ⅱ．Bさんについて、Ⅲ．あなた自身についての3部門から構成されていた。

2．4 調査内容

質問項目の主要な内容は、以下の通りであった。

(1)高おしゃれ者と低おしゃれ者

①印象・イメージ
②容姿・服装などのおしゃれ特性
③所属・趣味・購買行動などの行動特性
④身長・体型などの身体的特徴
⑤職業・年齢などのデモグラフィック特性

(2)回答者の特性

①おしゃれの評価基準
②おしゃれに対する態度
③自尊感情
④職業・年齢などのデモグラフィック特性

3 結果と考察

3．1 評定対象者として選択された人物の妥当性

高おしゃれ者と低おしゃれ者の差異を具体的に検討する前に、各回答者が想起しているそれぞれの人物のおしゃれの程度が実施条件どおりであるか否かを検討する必要性がある。そこで、実施条件のチェックを行った。おしゃれの程度の認知に関する測定は、おしゃれが「じょうず」「ふつう」「じょうずでない」の3件法を使用し、高おしゃれ者または低おしゃれ者として想起された人物のおしゃれの程度について対応のあるt検定を行った。その結果、男女ともに高おしゃれ者と低おしゃれ者としてあげている人物の平均値に有意差が認められ、高おしゃれ者の方が高い評価であった（男性:$t=37.021$, $df=248$, $p<.001$; 女性:$t=52.501$, $df=485$, $p<.001$)。したがって、本研究におけるおしゃれの高低に関する条件操作は、有効であることを示している。

3．2 高おしゃれ者・低おしゃれ者の基本属性

回答者は実際にどのような人物を高おしゃれ者や低おしゃれ者として選択しているのだろうか。ここでは、高おしゃれ者と低おしゃれ者の基本的な属性を明らかにする。

(1) 評定対象者と回答者との間柄

まず評定対象者と回答者の間柄、好意度、年齢、職業の側面を検討することにより、回答者と評定対象者との関係、および評定対象者のことを回答者がどのように認知しているかについて検討した。

①評定対象者と回答者との関係

高おしゃれ者として選ばれているのは、男性では多い順に「趣味やクラブ活動の仲間(38.2%)」「家族・親戚(18.5%)」「近所の人(17.3%)」「職場や仕事上の友人・知人(10.8%)」であった。女性では、「趣味やクラブ活動の仲間(45.3%)」「近所の人(19.5%)」「学生時代の友人・知人(11.7%)」であった。

低おしゃれ者では、男性は「近所の人(29.3%)」「趣味やクラブ活動の仲間(27.7%)」「家族・親戚(18.5%)」「職場や仕事上の友人・知人(12.0%)」が多く、女性では「近所の人(35.0%)」「趣味やクラブ活動の仲間(34.8%)」「学生時代の友人・知人(10.1%)」が多く選ばれていた。

評定対象者と回答者との関係は、全体的傾向として性差は認められない。男女とも高おしゃれ者の上位に「趣味やクラブ活動の仲間」「近所の人」を選択していた。また、低おしゃれ者では上位に男女とも「近所の人」「趣味やクラブ活動の仲間」をあげており、高おしゃれ者の選択と類似していた。このことは、男性の回答者が退職によって現在の対人関係の範囲が女性の回答者のそれに近づき、男女とも同様の結果が得られたものと推察される。

評定者対象者に対する好意度

高おしゃれ者、低おしゃれ者のそれぞれの評定対象者に対する回答者の好意度を「非常に好き」「ふつう」「非常に嫌い」の3件法で評定することを求め、性別ごとに高おしゃれ者と低おしゃれ者との間で好意度に差があるかを調べるために対応のあるt検定を実施した。その結果、男女ともに高おしゃれ者は低おしゃれ者に比べて好意度が有意に高かった(男性: $t=11.939$, $df=248$, $p<.001$; 女性: $t=15.674$, $df=485$, $p<.001$)。このことから、高おしゃれ者は低おしゃれ者よりも好意を持たれていることを示している。

3. 3 高おしゃれ者と低おしゃれ者との差異

高おしゃれ者と低おしゃれ者として認知される人物がどのような点で異なるかを調べるために、「身体的特徴」「おしゃれのイメージ」「生活・行動の外見的属性」などの諸特性について検討した。

(1)身体的特徴

高おしゃれ者と低おしゃれ者の身体的特徴がどのように異なっているかについて調べた。身体的特徴の指標には、体型と身長をとりあげ、それぞれについて3件法を使用し、対応のあるt検定を行った。その結果、高おしゃれ者は低おしゃれ者に比べて、体型が細く(男性: $t=3.970$, $df=248$, $p<.001$; 女性: $t=3.272$, $df=485$, $p<.01$)、身長は高いことが明らかとなった(男性: $t=6.226$, $df=248$, $p<.001$; 女性: $t=5.767$, $df=485$, $p<.001$)。こうしたことから、高おしゃれ者は低おしゃれ者に比べて、体型が細く、背が高いと認知されており、総じてスタイルが良いとみなされていることを示している。

(2) 社会的地位の程度

高おしゃれ者と低おしゃれ者の社会的地位がどのように異なっているかについて調べた。社会的地位に関する測定は、「高い方」「ふつう」「低い方」の3件法を使用し、高おしゃれ者と低おしゃれ者について対応のあるt検定を実施した。その結果をみると、男女ともに高おしゃれ者は低おしゃれ者に比べて、社会的地位が高いと判断されていた(男性: $t=6.518$, $df=248$, $p<.001$; 女性: $t=3.272$, $df=485$, $p<.001$)。

(3) おしゃれのイメージ

高齢者のおしゃれのイメージに関する測定には、予備調査の自由記述によって得られた12項目を使用した。各項目は「あてはまる」「ややあてはまる」「あてはまらない」の3件法であった。そして、その回答結果に基づいて高齢者のおしゃれに関するイメージがどのような要素から構成されているのかを調べるために、因子分析を実施した。因子数の決定には、固有値(1.0以上)と解釈可能性を基

準とした。また、当該因子には .40以上の負荷量をもち、他の因子には .40未満の負荷量をもつ項目だけが残るように、主因子解による因子の抽出と直交Varimax回転を繰り返した。その最終的な結果は、表1に示されており、高齢者のおしゃれのイメージとして2因子が特定された。

因子の特徴を具体的にみていくと、第1因子には、「1.リーダシップのある」「2.外向的な」「3.決断が速い」「4.意見をはっきり言う」「5.人目を引く」などの負荷量が高く寄与していた。このことから、第1因子は社交的で、しっかりとした主張を持っていることに関する因子と考えられ、『積極性』の因子と解釈された。第2因子には、「6.思いやりのある」「7.上品な」「8.親しみやすい」「9.センスのよい」などの負荷量が高く寄与していた。このことから、第2因子は上品で、人間的な親しみや温かさに関する因子と考えられ、『成熟性』の因子と解釈された。これらの結果から、高地位者のおしゃれのイメージは『積極性』や『成熟性』から構成されていることが確認された。

次に、『積極性』にかかわる項目と『成熟性』にかかわる項目について、それぞれ合成得点を作成し、高おしゃれ者と低おしゃれ者に対するイメージに違いがあるかどうかを対応のあるt検定によって検討した。その結果、男女ともに高おしゃれ者は低おしゃれ者に比べて、『積極性』『成熟性』などの各側面で優れているというイメージを強く持たれていることが明らかとなった（積極性：男性 $t=10.242$, $df=248$, $p<.001$、女性 $t=16.266$, $df=479$, $p<.001$；成熟性：男性 $t=19.360$, $df=248$, $p<.001$、女性 $t=25.220$, $df=482$, $p<.001$）。

表 1　おしゃれな女性のイメージに関する因子分析の結果

項　　目	因子1	因子2	共通性
1．リーダーシップのある	0.6643	-0.1230	0.4564
2．外向的な	0.6385	0.0557	0.4108
3．決断の速い	0.6115	-0.1269	0.3900
4．意見をはっきり言う	0.5213	-0.0766	0.2776
5．人目を引く	0.4118	-0.0388	0.1711
6．思いやりのある	0.0171	-0.6398	0.4097
7．上品な	0.0079	-0.5895	0.3476
8．親しみやすい	0.0496	-0.5136	0.2663
9．センスのよい	0.3237	-0.5010	0.3558
因子負荷量の2乗和	1.7718	1.3135	
因子の寄与率（%）	19.6866	14.5940	
累積寄与率（%）	19.6866	34.2806	

3．4 生活・行動の外見的属性

高おしゃれ者と低おしゃれ者に関する生活・行動の外見的属性を測定するために、予備調査の自由記述から生活・行動特性に関する30項目を作成した。各項目は「あてはまる」「ややあてはまる」「あてはまらない」の3件法であった。その回答結果に基づいて、高齢者の外見的属性がどのような要素から構成されているかを明らかにするために、

表 2　おしゃれな女性の外見的特性に関する因子分析の結果

項　　目	因子 1	因子 2	因子 3	共通性
1．清潔である	-0.7018	-0.0121	0.0500	0.4951
2．話をしていて楽しい	-0.5850	0.0375	0.0949	0.3526
3．話し方が上品である	-0.5815	0.2437	-0.1048	0.4085
4．顔立ちが美しい	-0.4891	0.1060	0.0845	0.2575
5．食事のマナーがよい	-0.4840	0.2853	0.0258	0.3163
6．服装の趣味がよい	-0.4681	0.2096	0.1841	0.2969
7．健康への関心が高い	-0.4446	0.0462	0.0940	0.2087
8．スタイルがよい	-0.4168	0.1871	0.0115	0.2089
9．高級な時計・メガネなどをつけている	-0.1727	0.6320	0.2306	0.4824
10．高価な美術品をもっている	-0.1571	0.6221	0.0501	0.4142
11．高級住宅地に住んでいる	-0.1724	0.5584	-0.0068	0.3416
12．高級な香水・コロンなどを使っている	-0.1009	0.4955	0.3627	0.3873
13．服装にお金をかけている	-0.1683	0.4911	0.3806	0.4143
14．自由に使えるお金が多い	-0.0854	0.4692	0.1764	0.2586
15．明るい色の服装が多い	-0.0531	0.0601	0.6200	0.3908
16．地味な服装が多い	-0.0983	0.0209	-0.5130	0.2733
17．化粧品にお金をかけている	-0.0320	0.3772	0.5091	0.4025
18．口紅の色がよい	-0.3093	0.2397	0.4807	0.3842
19．おしゃれの流行に敏感である	-0.2856	0.3550	0.4530	0.4128
20．ほほ紅をさしている	-0.1522	0.2149	0.4060	0.2341
因子負荷量の2乗和	2.5806	2.4156	1.9443	
因子の寄与率（%）	12.9030	12.0781	9.7216	
累積寄与率（%）	12.9030	24.9811	34.7027	

因子分析を実施した。因子数の決定は固有値(1.0以上)と解釈可能性を基準とし、当該因子に .40以上の負荷量をもち、他の因子には .40未満の負荷量をもつ項目だけが残るように、主因子解による因子の抽出と直交Varimax回転を繰り返した。表2は、その最終的な結果を示したものであり、外見.的属性の心理的構造として以下の3つの因子が特定された。

各因子の特徴を具体的にみていくと、第1因子には、「1.清潔である」「2.話をしていて楽しい」「3.話し方が上品である」「4.顔立ちが美しい」「5.食事のマナーがよい」「6.服装の趣味がよい」「7.健康への関心が高い」「8.スタイルがよい」などの負荷量が高く寄与しているので、 第1因子は『洗練性』の因子と解釈された。第2因子には、「9.高級な時計・メガネなどをつけている」「10.高価な美術品をもっている」「11.高級住宅地に住んでいる」「12.高級な香水・コロンなどを使っている」「13.服装にお金をかけている」「14.自由に使えるお金が多い」などの負荷量が高く寄与していた。このことから、第2因子は『経済力』の因子と解釈された。第3因子には、「15. 明るい色の服装が多い」「18.口紅の色がよい」「19.おしゃれの流行に敏感である」「20. ほほ紅をさしている」などの負荷量が高く寄与しているので、第3因子は『装飾性』の因子と解釈された。これらの結果から、高齢者が認知するおしゃれの外見的特性は『洗練性』『経済力』『装飾性』などの因子で構成されていることが確認された。

次に、各因子を構成する項目の得点を合算して合成得点を作成し、高おしゃれ者と低おしゃれ者の外見的特性の得点に差があるかどうかを対応のあるt検定によって検討した。その結果、男女ともに高おしゃれ者は低おしゃれ者に比べて、『洗練性』『経済力』『装飾性』などの多くの側面で優れているとみなされており、高おしゃれ者の外見的特性の評価は一様に高いものであった（洗練性：男性 $t=22.481$, $df=248$, $p<.001$、女性 $t=30.361$, $df=468$, $p<.001$；経済力：男性 $t=12.824$, $df=248$, $p<.001$、女性 $t=23.665$, $df=470$, $p<.001$： 装飾性：男性 $t=16.663$, $df=248$, $p<.001$、女性 $t=29.350$, $df=471$, $p<.001$)。

3.5 高地位者のクラスター特性

本研究の結果から、高おしゃれ者は『洗練性』『経済力』『装飾性』などの多くの側面で優れていると認知されており、この傾向は男女とも共通していた。

しかし、ひとりの高おしゃれ者が全ての属性に関して一様に優れているのではなく、高おしゃれ者はいくつかのタイプに分かれていることも予想された[3)]。そこで、高齢者の認知する高おしゃれ者はどのようなグループ（クラスター）に分類されるのか、またそれらクラスターにはどのような特徴がみられるのかを検討するために、高おしゃれ者の属性についてクラスター分析を実施した。その手順は、以下の通りである。

まず、高おしゃれ者のおしゃれを特徴づけていると考えられる変数を年齢・職業・体型・社会的地位・外見的特性などにしぼった。ここでは、社会的地位の変数は回答者が対象者を認知している程度を表す指標と考え、職業の変数は実際の社会的地位を表す指標と位置づけている。ところで、これらの変数には質的変数（例えば、職業）と量的変数（例えば、年齢・外見的特性など）が混在しているため、クラスター分析に変数を投入する前に、各変数の標準化が必要となった。このため、変数の標準化を目的として、数量化理論Ⅲ類による分析を行った。その結果、解釈が可能な軸は第1軸と第2軸であり、それぞれ「洗練性に関する軸」「ソーシャル・リソースに関する軸」と解釈された。

次に、数量化理論Ⅲ類の第1軸と第2軸のサンプルスコアを投入し、高おしゃれ者を分類するためのクラスター分析を実施した。クラスター分析の手法としては、WARD法を使用した。その結果、各クラスターの特徴が最も明瞭であったのは3クラスターに分類した場合であったので、これを採用することとした。

表 3　属性別にみた各クラスターの比率（対数-線型モデル分析）

		第1クラスター	第2クラスター	第3クラスター	人数
６０－６４歳		40.9	17.1	42.0	264
６５－６９歳		44.0	14.2	41.8	218
７０－７４歳		35.2* (-)	16.7	48.1	162
７５歳以上		50.6* (+)	7.9+ (-)	41.5	89
経営者・管理職		41.5	2.4* (-)	56.1* (+)	41
専門職		51.6	15.6	32.8* (-)	64
自営業・商店		28.6	14.3	57.1	35
事務系		43.5	19.6	36.9	46
現場系		38.7	16.1	45.2	31
専業主婦		41.2	16.1	42.8	491
社会的地位	低	43.5	8.7	47.8	23
	中	40.4	17.3+ (+)	42.3	520
	高	45.3	9.5	45.2	190
体型	やせ型	46.9	13.1	40.0	145
	標準	38.8* (-)	16.2	44.9	476
	太り型	47.8	12.6	39.6	111
身長	低	45.0	10.0	45.0	80
	中	41.2	16.8* (+)	42.0	500
	高	41.8	11.8	46.4	153
洗練性	低	40.3	15.4	44.3	325
	高	42.8	14.9	42.3	402
経済力	低	38.6+ (-)	18.1* (+)	43.3	332
	高	44.1+ (+)	12.8* (-)	44.1	392
装飾性	低	40.9	13.4	45.7	374
	高	42.5	16.7	40.8	353

+p<.10, *p<.05, **p<.01

表３は、これらクラスターがどのような特徴を持っているかについて検討するために、クラスター×属性の２要因対数－線型モデル分析を実施した結果である[9]。各クラスターの特徴を整理すると、以下のようになる。第１クラスターは、75歳以上の高齢者が多く、経済力では高い人が多い。このことから、このクラスターは充実した裕福な人々が多いと考えられるので、『ゴールド・クラスター』と命名した。第２クラスターは、75歳以上の高齢者が少なく、60歳前半の相対的に若い層が多い傾向にある。また、身長は平均的な高さの人が多く、社会的地位は中程度の人が多い。こうしたことから、このクラスターは年齢的に若く、ほどほどの女性らしさを有する人々から構成されると考えられるので、『ソフィスティケイト・クラスター』と命名した。第３クラスターは、経営者や管理職を経験した人が多く、年齢では60歳前半の若い層は少ないのが特徴となっている。これにより、このクラスターは優れた業績を持つキャリア・ウーマンから構成されると考えられるので、『エグゼクティブ・クラスター』と命名した。

また、高齢者の性別によって、高おしゃれ者のクラスターの特徴が異なるかどうかを調べるために、クラスター×性別の２要因対数―線型モデル分析を実施した。

表４は、その結果である。この表から明らかなように、『ゴールド・クラスター』の選択に関しては男女に差異はみられなかった。しかし、『ソフィスティケイト・クラスター』と『エグゼクティブ・クラスター』の選択に関しては男女に違いが認められた。すなわち、男性は女性に比べて『ソフィスティケイト・クラスター』に属する人々が有意に多いのに対して、女性では『エグゼクティブ・クラスター』に属する人々が有意に多かったのである。これらのことは、男性と女性では高齢者のおしゃれを判断するための手がかりが異なる部分があることを示唆している。すなわち、男性の場合には60歳前半の若い層の中からおしゃれな女性を選択する傾向にあり、年齢的な若さがおしゃれ判断の重要なポイントになっている。これに対して、女性の場合にはそうした若さは必ずしも重要ではなく、キャリア・ウーマンとしての実績が重要であり、豊かな社会的資源を有する側面がおしゃれ判断の基準となっていることを示しているのである。

以上、高齢者のおしゃれについて議論してきたが、おしゃれな女性として認知されている人物は『ゴールド・クラスター』『ソフィスティケイト・クラスター』『エグゼクティブ・クラスター』などのグループに分類することができ、さまざまな様相を呈していることが明らかとなった。これらの結果から、おしゃれが単に化粧という表層的な現象だけにとどまらず、積極性や成熟性などの心理的なイメージや洗練性や経済力といった外見的属性など、さまざまな意味あいを持って他者に認知されているという興味深い知見が得られた。

表 4　性別にみた各クラスターの比率（対数-線型モデル分析）

	第１ｸﾗｽﾀｰ	第２ｸﾗｽﾀｰ	第３ｸﾗｽﾀｰ	人数
男　性	40.0	20.5**(+)	38.5* (-)	249
女　性	42.2	12.2**(-)	45.6* (+)	484

*p＜.05, **p＜.01

引用文献

1) Argyle, G. W. Psychology of Sosial Class. Routiledge. (1994)

2) 大坊郁夫、顔 -コミュニケーション手段として-、資生堂ビューティーサイエンス研究所編 化粧心理学、フレグランスジャーナル社、108-117 (1993)

3) Feldman S. D. "The Presentation of Shortness in everyday life". Paper presented at the meeting of the American Sociologi cal Association.

4) 山本真理子、社会的地位のイメージ -その判断基準と上昇方略-、東京都立大学人文学報、233 197-215 (1991)

5) Dion K., Bersheid E. & Walster E. "What is beautiful is good." *Journal of Personality and Social Psychology,* 24 285-290 (1972)

6) 山本真理子編、 ソーシャルステイタスの社会心理学 -日米にみる地位イメージ- サイエンス社、(1994)

7) 藤森和美・藤森立男、 高齢者の社会的地位の認知に関する研究、人文論究、 54 167-180 (1992)

8) 藤森和美・藤森立男、 高齢者のおしゃれの認知に関する研究、日本心理学会第58回大会発表論文集、690 (1994)

9) 弓野憲一、 対数一線型モデルによる質的データの解析とそのためのBASICプログラム、静岡大学教育学部研究報告 (自然科学篇) 32 189-215 (1981)

記念講演

♦

平成6年度記念講演　原島　博

♦

コスメトロジー研究振興財団
第5回表彰・贈呈式記念講演

顔を科学する

原島　博
東京大学工学部 電子工学科　教授

場所　日本薬学会長井記念ホール
日時　平成6年11月21日(月)

はじめに

ご紹介頂きました東京大学の原島でございます。本日は「顔を科学する」ということで1時間弱の時間を頂戴致します。コスメトロジー関係の集まりということですので、ここにいらっしゃる方々は何らかの意味で「顔」に関係していると思いますが、私も最近コンピューターや、情報学の立場から、「顔」にいろいろと関心を持つようになりました。ただ「顔を科学する」というと非常に広い意味になるのですが、その中で特に、「顔の情報学を目指して」ということでお話ししてみたいと思います。

顔と情報

ご承知のように、私たちはいろいろな情報を顔から受け取っています。

まず、ある人の顔を見ることによって、その人の大体の「証明」が得られます。例えば「何才ぐらいか？」「男か女か？」あるいは「この子はあの人の子供だ」などをある程度判断できます。本当かどうかはわかりませんが「男の顔は履歴書だ」と言われることもあります。

心理学関係の方は、顔から心の動きを探ります。「感情」「精神状態」だけでなく、「精神的な疾患」も対象となるかも知れません。「仏像」、私は仏像を見ることが好きですが、仏像の顔はまさに当時の文化の反映です。総じて、人間は顔を通して、さまざまなコミュニケーションをしています。

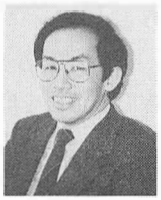
顔と私のかかわり

さて、私自身の専門は「コミュニケーション工学」、もう少し厳密に言えば「電気通信工学」です。今とは少し変わった方式の画像通信、例えば「テレビ電話」を考えてみたいという立場から、顔に関心を持つようになりました。

テレビ電話では、声だけでなく顔も見えるようにします。ところが、実際の通話場面を想定しますと、単に「本当の顔」を送るだけで良いのだろうかとの疑問が生じます。たとえば朝早く電話がかかってきたとき、まだ顔を見せたくないと思うこともあります。このような時に、「申し訳ありませんが朝早いので、あらかじめ化粧した顔で話させて頂きます」と断った上で、自分が気にいっている顔写真をまず相手に送り、この写真を動かしながら相手とコミュニケーションできれば便利でしょう。

このような方式を「顔画像の分析合成符号化」とか「知的画像符号化」と名づけて研究を始めま

Face and It's Science



Hiroshi Harashima
Faculty of Engineering
The University of Tokyo

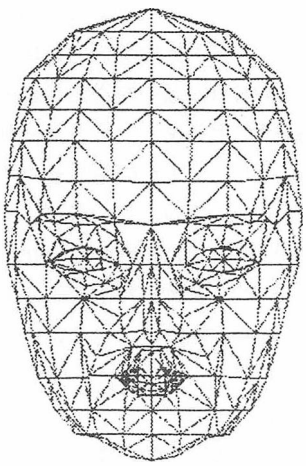
した。約10年前のことです。

1枚の顔写真を動かすためには、「右向いた」「左向いた」という顔の動きに関する情報だけでなく、「あっ！笑った」という顔の表情に関する情報を抽出して送らなければなりません。そこで必要となる顔の表情の情報とは何でしょうか？そもそも顔とは何でしょうか？　こうして顔の研究に関わるようになりました。

正直言って、こういう研究はなかなか実用には結びつきません。工学部の研究としてはかなり異色かも知れません。しかし、大学の研究には、このような遊びがあってもよいのではないか、たとえ世の中に注目されなくとも、夢のある研究をやりたい。それが当時の私の気持ちでした。

ところがこの研究は、最初予想もしなかった形で注目されるようになりました。コンピューターを使って、表情などの顔の情報を引き出し、それによって顔写真を動かす技術は、心理学や人類学などで顔を研究するときの、基本的な研究道具になるかも知れないというわけです。「顔」が縁で、いろいろな分野の研究者との交流が生まれ、共同研究が始まりました。それが本日お話しする内容でございます。

写真 1　顔の骨組み（ワイヤーフレーム）



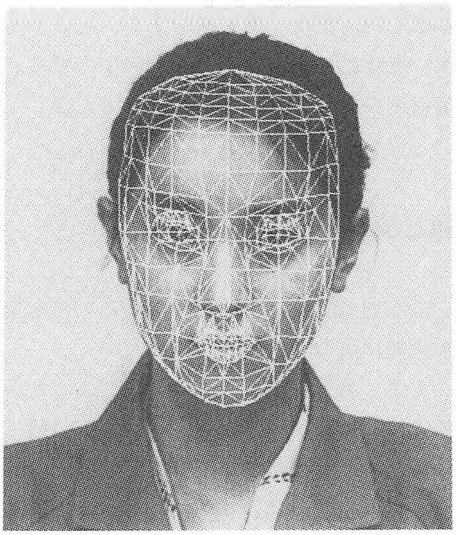
まずは研究ツールの整備から

共同研究は、研究ツールの整備、すなわちコンピューターを使った「顔の容貌と表情分析合成システム」の構築から始めました。

そこではまず、コンピューターのなかに「顔の張り子」を作ります。顔の張り子の骨組みは、この写真のようなものを用意します（写真 1）。これは3次元的に作られています。

当然ながらあらかじめ用意してある骨組みは個々の人のそれとは異なります。顔写真とはずれています。そこでまずその人の特徴点、例えば口元、鼻、目尻等が一致するように骨組みを変形させて、少なくとも正面から見る限りその人特有の骨組みになるようにします（写真 2）。そして、その上に皮膚として、顔写真を張りつけます。

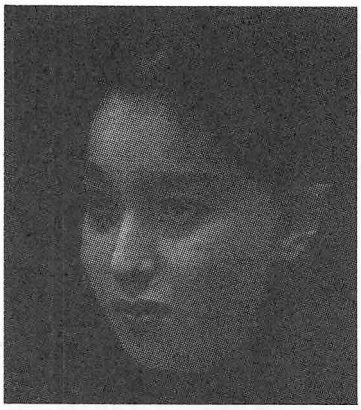
写真 2　骨組みの変形



1枚の顔写真ですから中心部分はぴったり一致しますが、耳の付近は怪しくなります。その部分は最初は適当にぼかしておいて、テレビ電話の場合であれば、横を向いたときに側面の情報を取り込んでそれを送り、張りつけていくことにします。

とりあえずは1枚の写真だけを張りつけてみましょう。このときこの顔は横から見るとどうなるでしょうか。骨組みが3次元的にできているので、正面の顔写真だけから作っても、それなりに立体的な横顔ができます（写真 3）。最初はもっと不自然になるのではないかと心配していたのですが、目も顔の正面方向を向いており、まあまあ自然な顔になりました。

写真 3　正面顔写真からの横顔の合成



こうなると欲が出て来ます。例えば、単に合成するだけではなく、実際の顔の動きを自動的に解析して、これと同じように張り子の顔を動かすことができないか？　これに表情をつけるにはどうしたら良いか？　などです。

顔の表情学へ

人の表情の取扱いには非常に難しいところがあります。最初は単純なシステムを組んでみました。人の表情はほとんど目と口の周りに集中しています。私どもでは「テレビ電話」への応用を考えておりましたので、表情が集中している目や口の周辺部分だけは元の画像をそのまま送り、残りを合成にする方式をまず試しました。いわゆる「はめ込み合成」です。

しかしこれではおもしろくありません。はめ込み合成では技術的な発展性がありません。本格的にやるには、骨組みをきちんと動かしながら表情付けをする必要があります。

例えば「笑い顔」、口を三日月にすればそうなるだろうと思ってやってみましたが、失敗でした。異様な顔になってしまいした。自然な表情を作るには何かルールがあるはずです。

例えば、皆様の中にご専門の方がいらっしゃると思いますが、表情は、顔の筋肉（表情筋）の動きによって変わります。したがって、筋肉が走っている方向に沿って、顔を動かせば自然な表情になるでしょう。逆に、筋肉の動きがない方向に動かせば不自然に見えるわけです。

実際にコンピュータグラフィックス等で表情を合成する時は、こういうやり方を使います。ただし、私たちはこの方法は採用しませんでした。私たちの目標である通信（テレビ電話）では、送信側で顔の動きから表情がどうなっているかを分析します。ところが顔の筋肉の動きそのものは外からは見えません。見えないものの動きを外から分析することは非常に難しい問題です。

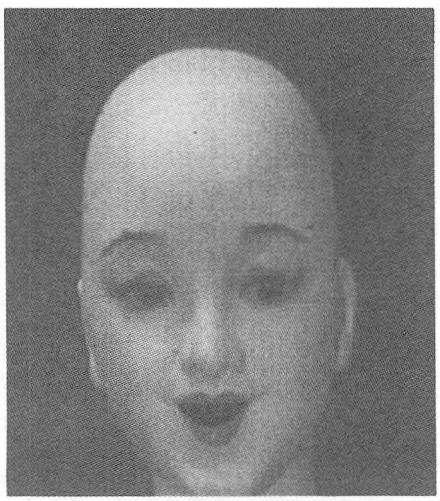
できれば、目尻とか口とかのように外から見える部位の動きを基にして、表情を分析したいところです。この立場から文献をいろいろ調べているうちに、アメリカのある心理学者のグループがおもしろい研究をしていることを見つけました。

このグループは、人間の表情の記述法として、「フェイシャル・アクション・コーディング・システム」なるものを提唱していました。彼らは表情を客観的に記述することを目的として、表情を要素に分解することを検討しました。そして、44通りの基本的な動きを考えれば、ほとんどすべての表情を記述できるとの結論を出しました。それぞれの基本的な動きは「アクション・ユニット」と名づけられて、例えばAU1、AU2と番号が付されています。簡単に紹介しますと、AU1は眉の内側を上に上げる、AU2は眉の外側を上に上げる、AU3は欠番になっています。AU4は眉全体を下に下げる動きであり、強くすると眉間に皺が寄ります。AU12は口元を引き上げる動きです。いわゆる「紀

子さんスマイル」になります。これにAU26、口を開ける動作を加えますと口が三日月型になります。ところがこれではまだ笑っているようには見えません。笑わせるにはもうひとつAU6、頬を緊張させて上に上げる動きが必要です。これにより、結果的に目が細くなり、目が笑います。つまり、AU12、26、6を組み合わせることにより笑い顔ができるのです。他にもいろいろな表情がAUの組合せで記述できます。

私たちは、この考え方を使って、コンピューターの上で実際に表情を合成することを試みてみました。「生の顔」を用いますと時々不気味な表情を呈しますので、最初は「マネキン」でやりました。マネキンに先程の紀子さんスマイルAU12、それにAU26をつけ加え、更にAU6を少しつけ加えるとたしかに笑い顔になりました（写真 4）。

写真 4　マネキンの笑い顔



一方、AU12にAU1、眉の内側を上げる動きを加えると、マネキンでありながら生き生きした表情が合成できます。

次に「生の顔」でやってみました。良く見て頂けるとわかると思いますが1枚1枚表情が違います。これはすべて1枚の顔写真を動かして作った合成像です。これは後ほどビデオでお見せします。

単に表情を合成するだけではなくて、同時に分析もしてみようと考えました。表情のある顔画像が与えられたら、その表情にアクション・ユニットの何番がどのくらい含まれているかを自動的に分析しようというわけです。分析したアクション・ユニットのパラメーターを使って、もう1度表情を合成します。無表情の顔をパラメーターで動かしてみるわけです。その結果、元の表情と再合成された表情が印象的に一致していれば分析が成功したと考えます。テレビ電話に当てはめて考えると、元の表情のある顔が送信側、そこからアクション・ユニットのパラメーターだけを相手に送り、受信側であらかじめ用意してある顔写真を動かす。そういうシステムになります。

研究ビデオの紹介

それではビデオをお願い致します。学会発表用に作ったビデオですので見にくい部分があるかとも思いますがご容赦いただきたく思います。

まず、いままで申し上げたことを簡単に復習します。このような張り子の骨組みをあらかじめ作っておきます。3次元的に作られていますので、横から見ると鼻がとび出ています。

具体的にこの女の人の顔に適用してみましょう。まず、少なくとも正面から見る限り、その人と一致する様に骨組みを変形します。これに顔写真を張りつけると、このような横顔が合成できます。1枚の顔写真だけから作った横顔ですが、それなりに自然な感じになっています。修正は施していません。

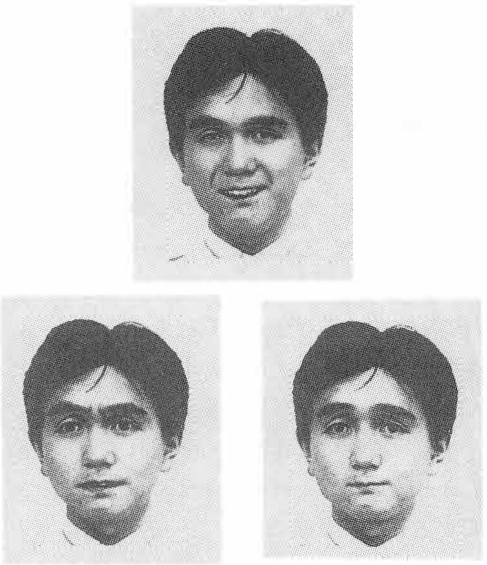
次に、顔の動きを自動的に追うことをやってみました。実はこれが非常に難しい技術で、当時は余りうまく行かず、この女性の顔に点を打ってそれを追う工夫などをしています。顔の動きをきちんと追える様になれば、例えば、目の部分、口の部分が画面のどこに相当しているかがわかりますから、これらの部分は原画をしっかり送って、ほかの部分は適当に合成すれば、はめ込み合成で表情付けができます。

次に、「フェーシャル・アクション・コーディング・システム」に基づいて表情を合成した例を示します。これがアクション・ユニットの12番、つまりAU12、例の紀子さんスマイルです。これにAU26をつけ加え、最後にちょっとAU6をつけると目も笑って笑い顔になります。3次元的に作っていますから、ちゃんと横顔も笑っています。横顔で見るとわかりますが、笑いというものは口も重要ですが、それ以上に目の下の部分が重要です。目玉だけを動かすこともできます。これは相手の視線を受けながらコミュニケーションをするという意味で非常に重要な動作です。

次に、生の実在の顔でやってみました。これがアクション・ユニットの1番、AU1です。これがAU2。すべて1枚の顔写真を動かしています。本人はこんなに顔の筋肉が発達しておりません。これはAU4。これがAU9。これがAU12。自然に顔の皺も出るようになっています。これがAU26。

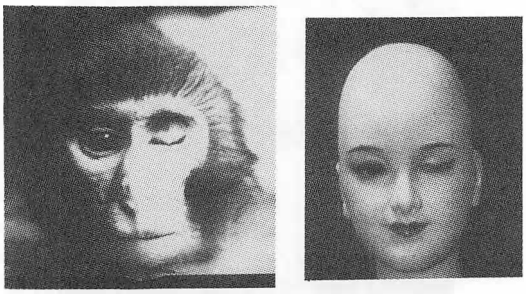
これはAU1と2の組み合わせです。眉の内側と外側を同時に動かすと全体が動きます。これはAU4と9の組み合わせ。だんだん複雑な表情になってきます。もちろん目玉だけ動かすこともできます。このような基本的な動きを組み合わせて、人間の感情を表現してみました（写真 5）。これは驚き。驚いているように見えたらお慰みです。これが恐怖。ホラー映画を見ている時の目になっているかどうか？　これが嫌悪。「いやー」「臭ーい」とかの感情を表現しようとしています。これは怒り。歯を剥き出して怒っています。これは「笑い」のつもりなのですが、余り笑っていませんね。どう見ても作り笑いに見えます。これは悲しみ。これらは心理学で基本感情といわれるものです。

写真 5　表情の合成



このように基本的な表情が合成できましたのでちょっとしたシーケンスを作ってみました。このシーケンスでは最後にウインクします（写真 6）。

写真 6　ウィンクの合成(サルとマネキン)



1枚の顔写真を与えられれば、異なる顔がすべて同じ動きをする例をいくつかお見せします。これがマネキン。結構自然な動きなのでびっくりしました。動くはずがないものが動くので自然な動きに見えるのでしょう。動くはずのものが動いても、全然おもしろくないというのが次の実在の顔の例です。やはり生の人間を動かすことは難しく、どこか不自然になります。

国際会議にはこのモナリザ像を持っていきました。これでこの研究が国際的に有名になってしまいました。これも動かないはずのものが動くので自然に見えるのです。その次の国際会議にはこの猿の顔を持っていきました。この顔でも大丈夫なのだから、貴方の顔でも大丈夫ですよと強調したかったのです。マネキン、生の顔、モナリザ、猿、それぞれ顔写真は違いますが、表情のコマンドは同じです。

モナリザの表情付けは、外国の人に持て囃されまして、早速イタリアの友人から百面相を作ってくれと依頼されました。これがそうです。この時気がついたのですが、AUの1番と2番、眉の内と外ですが、これを動かしても顔に変化がありませんでした。良く良く見たらモナリザには眉毛がないことに気づきました。

1枚の顔写真から横顔が作れるのだから、ダ・ヴィンチも知らなかったモナリザの横顔ができるのではないかということで試してみました。顔を上から見ると結構厳しい顔をしています

写真 7　モナリザの横顔

(写真 7)。下から見上げると結構笑っていて、正面に戻るとなぞの微笑となります。このように向きによって表情が変わります。考えてみれば日本の能面もそうなっているんですね。見る向きによって面の表情が変わるように作られています。それと同じことがモナリザでも起きてしまいました。

ここまで合成ができましたので、分析すなわちアクションユニットのパラメータを自動的に求めることもやってみました。そして、そのパラメータで無表情の顔を動かして表情を再合成してみました。

左側が実際の画像です。当時、私の部屋にいた留学生が自分で表情を作った顔です。右側が合成の顔です。通信で言えば、左が送信側、右が受信側です。顔そのもの、例えば明るさは異なっていますが、表情については結構似ています。通信がそれなりにしっかり成立しているわけです。中には難しい表情があります。笑いは非常に難しい。笑いが非常に高級な表情であることがこれでわかります。もちろん、技術的には唇の形を放物線で近似して処理するなどをしますので、それらの近似の限界があるわけですが‥‥。

たまたま受信側に他の人の顔が登録してあれば、その顔でテレビ電話をするという、誘拐犯人が喜びそうなこともできます。

次に、ちょっと毛色の違った話題になりますが、かなり前に、NHKの依頼で次のような映像を作ってみました。「トライ・アンド・トライ」という番組です。徳田アナウンサーの顔がはっと気づくと眼鏡をかけていない山川アナウンサーの顔になって、それがまた女性の遠藤アナウンサーの顔になっています。彼女の顔がまた徳田アナウンサーに戻りました。逆まわしをしてみます。徳田アナウンサーが少し若くなったかなあと思うと遠藤アナウンサーになって、その顔が年とると山川アナウンサーになって、最後に元の徳田アナウンサーになります。ついでに徳田アナウンサーを猿にしてしまいました。「これを逆にすると人間の進化の過程が解るではないか？」「進化の途中の方が美男じゃないか？」など感想がずいぶん寄せられました。

長くなりますのでビデオはこの辺にします。

顔の印象学へ

最後にお見せした顔が少しづつ変わる映像について説明します。ここで用いた方法は最近よく使われる技術になりました。「モーフィング」と呼ばれています。御存知かもしれませんが、テレビのコマーシャル・フィルムの中で子供の顔がだんだんとラモスの顔になる映像があります。その技術です。原理的には古くから知られている技術で、それほど難しいことはありません。

要するに2つの顔の間で、一方の顔にたとえ

ば0.8の重みを付け、他方に0.2の重みをつけるとその比率で合成された顔になります。この比率を少しづつ変化させると顔を少しづつ変えられます。単なる写真の濃淡値ではなく骨組みの方もしっかり中間の比率にすることにより、ぼけない顔が合成できます。

この手法を使うといろいろな実験ができます。例えば、外人の顔と日本人の顔の中間を採ると、もしかしたら、ハーフができるかもしれないということでやってみましたら、何となくハーフっぽい顔ができました。人間の顔の印象とは一体何なのでしょうか。日本人らしさ、西洋人らしさはいったいどこから来るのでしょうか。すこしづつ動かすと、あるところで日本人の顔が急に外人的になったりします。目だけ動かす口だけ動かすこともできます。日本人と外国人の違いに顔のどの部分が関係しているかを調べられるというわけです。

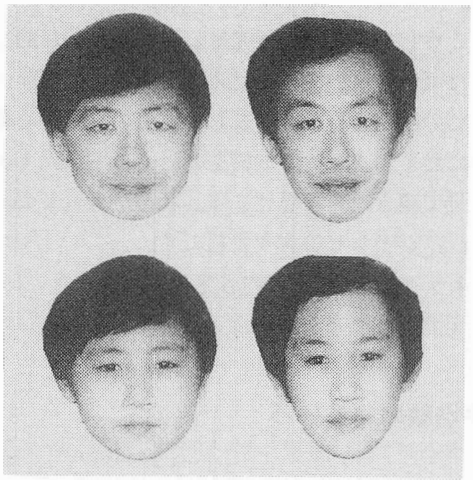
この手法を使うと、もしかしたら「顔の印象学」なるものを作ることができるかも知れません。先程のはいわば「顔の表情学」ですがこちらは「印象学」です。男性的な印象、女性的な印象、人種の違いによる印象、あるいはこの顔は何才ぐらいなのかという印象はどこから来るのかというわけです。断っておきますが「顔の印象学」は別に「人相学」ではありません。本人の属性を言い当てることはまったく考えていません。その顔を見た時に私たちがどういう印象を持つかだけが関心の対象です。本人が実際にどうであるかは問題ではありません。

年齢の印象に関して、ちょっと実験をしてみました。顔の研究というのは非常に難しくて、勝手なことをやるとその人の人格を傷つけることになります。身近な顔でやってみました。この顔は、実は私の息子です。その父親の顔がここにあります。これが中間の顔です。時間の関係で、本日はお見せできませんがビデオにも収録してあります。子の顔をすこしづつ変えるとだんだん成長して親の顔になります。モーフィング技術です。

ところが、ここで疑問が沸いてきました。10才の子供から当時45才の親に徐々に変えたわけですが、この実験ではワイヤーフレームの骨組み、いわば骨格を少しづつ動かし、それと同じ様に肌も、別の方式で制御している髪の毛も同じように直線的に動かしたわけです。ところで本当にこのように変化するのだろうか、骨格の変化と肌の変化とは様子が異なるのではないか、必ずしも直線的には変化しないのではないか、との疑問です。

そこでこういう顔を作ってみました（写真 8）。

写真 8　年齢の印象



左下が息子で、右上が親つまり私です。眼鏡をかけていない時の顔です。残りの右下と左上は実在しない顔です。右下は顔の形や、目鼻の配置などはまったく私、張り子で言えば骨組みは私のを使って、皮膚だけを子供の皮膚にしたものです。左上は逆に骨組みは子供で皮膚が私です。

この右下と左上の顔は、いずれも子どもとその親の顔の要素が半分ずつ入っています。ところが、この両者の年齢印象はまったく違います。右下は中学生ぐらいの印象です。それに対して左上は何とも異様な感じです。私自身より年上の感じすらします。

そこでもう少し細かく実験してみました。骨格と肌の様子を独立に変化させて組み合わせた5×5、つまり25通りの顔を作って、その年齢判定をさせたのです。川村短大の山田寛先生との共同研究の

形で、川村短大の学生と東大生のグループに独立に年齢を推定してもらいその平均を取りました。

その結果を大まかに言いますと、ある年齢以上になると、肌の状態だけが年齢を判定する要素となることが示されました。それに対して、10才から10数才までは、つまりティーン・エージ年齢までは顔の形が年齢評価に関係している、という結論が得られました。まだ検証にまでは至っておりませんが、ひとつの仮説として、20才ぐらいまでは骨格が年齢印象に影響し、それ以上では、肌が効いてくるといえます。

こうして私たちの研究は、もともとの目的であった画像通信の領域を越えて、「顔の情報学」としての展開をみせてきました。この立場から数年前にたまたまテレビ取材を受けて作られたビデオを見て頂きたいと思います。音声が入っております。フジテレビの深夜番組です。

（ビデオ放映5分‥‥内容割愛）

ビデオどうもありがとうございました。

平均顔のいろいろ

このビデオにも出てきましたが、最近「平均顔」というものに興味を持って、いろいろやっています。平均顔についてちょっと説明します。2つの顔のモーフィングでは、その中間に2つの平均の顔ができます。別の2つの顔の平均顔も作り、次に平均顔どうしで平均をとると、結果として4つの顔の平均顔ができます。その平均の顔は、もとの4つの顔に対して1／4ずつの重みをつけて加えた形になっています。一般にN個の顔があれば、このすべてに1／Nの重みをつけて加えれば、N個の顔の平均が得られます。

東大生22人の平均の顔を示します(写真 9)。いずれも修士2年生で、研究室の修士が自分の同級生を集めたものです。それぞれの顔には個性がありますが、平均を取るとその集団に共通の要素が浮かび上がってきます。

別の職業でやってみました。たとえばこの写真はどういう職業の平均の顔でしょうか？

写真 9　東大生の平均顔

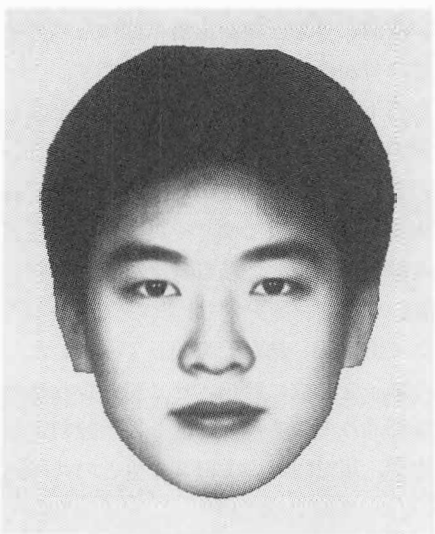
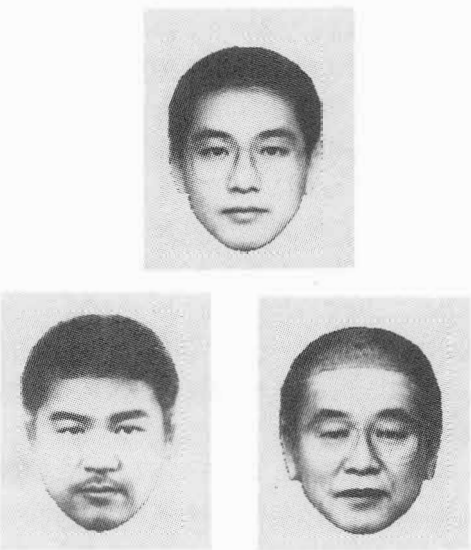


写真 10　職業別平均顔

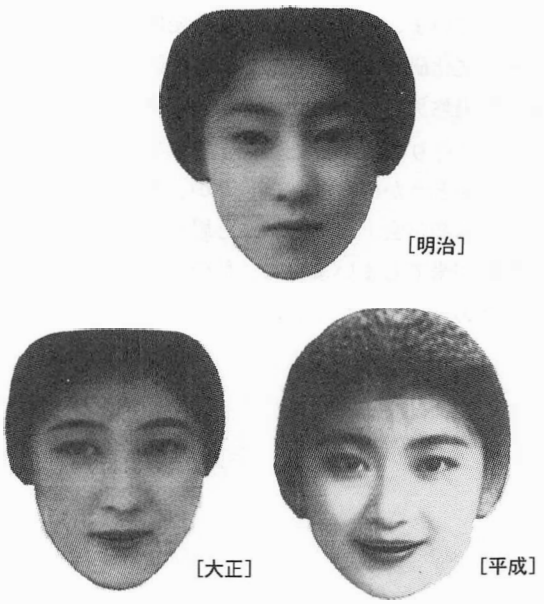


（写真 10）答えは銀行員です。いかにもそういう顔、居そうな顔になっています。プロレスラー約10名の平均の顔も作って見ました。比べてみれば一目瞭然です。これは政治家の顔。自民党の派閥の親分クラス約10人です。何となくそういうイメージがあります。この席にはそれなりの年配の方がいらっしゃいますのでおなじみでしょうが、日活アクションスターの平均の顔もあります。若き

日の裕次郎とか、渡哲也とか、小林旭です。何となく納得できる顔です。

男性ばかりではおもしろくないので女性で試みたのがこれです（写真 11）。明治時代の芸妓

写真 11　時代別 日本女性の顔



さんの平均の顔は、どことなく浮世絵のイメージに似ています。凌雲閣百美人と言う絵はがきの写真を使いました。大正の平均の顔は、「丸の内のビル1美人特集」なるものをある雑誌が組んでいましたので、そこに掲載された顔を使いました。丸ビルとか新丸ビルに勤める、当時で言えば、いわば職業婦人です。何となく大正的な雰囲気がでています。平成は、92年ミス日本候補者10人の平均顔で、顔が小さくなっているのが特徴です。王冠を被っていますので髪の形は多少変になっています。

そうこうしていると、ある雑誌社から「未来の日本人の顔」を人類学の方と共同でシミュレーションするように依頼されました。人類学の馬場悠男先生、大変偉い方ですが、この方が未来の日本人の骨がどう変化するかを検討されました。この言わば骨格に皮膚をつけてみたわけです。結果として得られた未来の日本人の顔は、顎が極端に小さくなっています。ちょうど先がとがったアイスクリームコーンにアイスクリームをたっぷりのせた形をしています。顎が小さくなるのは、固いものを食べなくなるという食生活の変化によります。現在でも中学生や高校生の顔は、かなりこれに近くなっています。

顔の印象学は、顔の魅力学とも関係します。ここにいらっしゃる大坊先生のご専門です。

例えば、ある有名な写真家が「昔は美人が多かったが最近少なくなった」と言っています。それではと言うことで女優さんの顔で検討しました。これは戦後すぐの女優さんの平均顔です。懐かしい方がいらっしゃることと思いますが、久我美子、岸恵子、そして山本富士子です。一方の写真は、現代の女優の平均顔です。ダブル浅野、つまり浅野ゆう子と浅野温子、それに鈴木保奈美です。

この両者を比較すると、確かに昔の顔の方がはっきりしています。少なくとも静止画、止まっているかぎり昔の顔のほうが美人です。これに対して、表情が豊かなのは現代の女優で、むしろ動くと魅力的になります。カメラマンは静止画で見ますから、その立場からは、昔のほうが美人となるかも知れません。しかし、顔がアップとなって表情が強調されるテレビの立場からは、逆になるのではないかという気もします。

このような分析をある新聞社が嗅ぎつけて、「明治から平成まで美人の変遷を分析、東大工学部原島教授」と見出しをつけ、記事にしてしまいました。「東大教授がどうしてこんなことをするのか」と物議を醸し出しそうですが、幸いきちんとした科学欄でした。言っておきますが科学欄です。

むすび　顔学へ向けて

さて、そろそろ結びに入らせて頂きます。顔の研究をやっていまして、私にとって一番嬉しかったことは、今までの工学畑だけではつき合えない、いろいろな方とつき合えるようになったことです。今日もまさに、そのような良いチャンスであるわけです。

人類学の先生、心理学の先生もあります。化粧や伝統芸能が専門の先生もあります。そうして気づいたのですが、こういう先生方同士は必ずしも知り合いではありません。そこで互いに一堂に会する場があれば面白いのではないかということで、92年春から毎年1回、有志主催という形で「シンポジウム－顔－」を開いています。

第1回目の表題は「ヒューマンコミュニケーションの原点を探る」です。文化人類学の立場、顔と犯罪などの立場での発表もあります。第2回が「その魅力を探る」、第3回が「その演出のしくみ」です。この第3回では、顔の美学というテーマで芸大の美術解剖の先生にも話して頂いています。

そして、今年（1994年）の夏にこのシンポジウムを基にして、「顔学宣言」という特集を「科学朝日」に組んで頂きました。内容的には顔の哲学、進化学、美学、認知学、情報学、心理学、魅力学などです。まさに「顔学」は、典型的な学際分野であります。

そしていま、「顔学」の更なる発展を願って、ポーラ文化研究所の村澤博人さんや国立科学博物館の馬場悠男さんたちと共に、顔の研究者のネットワーク作りを進めています。そして、準備が間に合うかどうかはわかりませんが、来年春頃に仮称「日本顔学会」ができればと思っております。

時間が来てしまいました。私の「顔学」への夢につきあっていただき、ありがとうございました。

コスメトロジー研究雑感

研究雑感

コスメトロジーと本研究

藤井　まき子

（平成4年度）

化粧をするとは、メークアップをするというのが子供の頃のイメージであった。最近はシミやシワを改善する基礎化粧品により皮膚そのものを美しくしようという研究が盛んである。いずれもより美しくなりたいという文化的社会的な意味合いが大きいと思う。化粧にはこの他にもう1つ大きな役割がある。これも最終的には美しさにつながるのかも知れないが、皮膚の健康を保つということである。紫外線吸収剤や保湿剤はこの目的のために開発されたものである。そしてこれは化粧品と医薬品の接点である。

皮膚はなにもしない状態でも健康であればそれに越したことはないが、実際には様々なストレスにさらされている。健康な状態を保つために使用されるものは化粧品、何らかの傷害を起こしてしまったときに用いるのが医薬品である。

今回保湿剤に関する研究を行ったが、乾燥により多少傷害を起こしても医薬品のお世話になる前に何とか健康な状態に戻れるものはないか、あるいは一度具合が悪くなった後ほとんど快復したときに使えるものはないか、つまり化粧品と医薬品の間に位置するものをと考えた。結果は使用感がよいと保湿性は低く、保湿性を高くするには多少使用感は犠牲にしなくてはならないということであった。化粧品と医薬品の境界領域ということでどちらに比重をおくかはケースバイケースであろう。

本研究によりコスメトロジー研究の難しさを感じさせられたが、コスメトロジー研究振興財団からの御助成により研究を始めることができ、深く感謝する次第である。　（昭和薬科大学）

コスメトロジー雑感

井上　英史

（平成4年度）

私が現在所属している研究室には、酵素学講座という名前がついており、その名のとおり酵素が主な研究対象となっている。酵素学というと古めかしい印象を持つ人もいるようだが、遺伝子工学等の発展により、酵素（あるいは機能性蛋白質）の周辺には新たな研究分野が誕生している。クローン化した遺伝子やcDNAを大腸菌等に発現させて高純度の蛋白質を大量に得ることが可能になったことから、近年、蛋白質の高次構造が次々に解明されている。その結果、蛋白質の機能がしばしば原子レベルで議論され、高次構造に基づいた議論が不可欠になりつつあるとも言える。また、様々な変異蛋白質を作製することが容易であり、天然には全く見出されていない一次構造を待った蛋白質や非天然型アミノ酸を含む蛋白質も人工的に作ることが可能である。このような高次構造に基づいた蛋白質機能の解明と人工的に蛋白質を作る技術を柱として、蛋白質工学という領域が発展してきている。蛋白質工学は自在に蛋白質をデザインし創生することを大きな目標としているが、このことが実現すれば非常に広範囲の基礎研究や産業・医療に大きなインパクトを与えることはまちがいない。化粧品の世界においても、蛋白質工学は新しい材料や方法を提供することが期待される。例えば、人工的に蛋白質をデザイン・創生することにより、保湿性が高く、紫外線を遮断する機能を持ち、かつ微生物が繁殖しにくいような新しい素

材を開発することも可能であろう。しかし蛋白質工学はまだ若い学問であり、高次構造の構築原理や機能発現のメカニズムの解明、機能性蛋白質を大量生産する技術の開発（現在は量的発現を実現できない蛋白質も多い）等、解決すべき課題が多い。私は、地道な基礎研究の中から、いつか有用な物質を生み出したいと思っている。その物質が仮に化粧品に応用できないとしても、蛋白質工学における一つの成功は化粧品学の将来にとっても価値のあることと信じている。　（東京大学）

コスメトロジーと生体膜

大木　和夫

（平成5年度）

私の専門は一応、生物物理学です。一応と云うのは、生物物理学は定義しにくい学問領域であり、生化学と重複している部分が多いのですが、優れた教科書が数多く出版されている生化学と比較すると、これはと言う教科書を挙げることが難しいからです。ところで、生命の基本的な単位は細胞であり、その構造は生体膜により構成されています。生物機能の場として、生物科学の進展とともに生体膜の重要性はさらに増しているのが現状です。また、生体膜の動的な構造の解明には生物物理学的な手法が貢献したこともあり、生体膜の研究は生物物理学の主要な研究テーマの一つとなっています。私自身は、膜脂質の構造・物性および蛋白質との相互作用に興味をもって研究を進めてきました。とくに、膜脂質の研究を広範囲に行っていたことが、コスメトロジーとの大きな接点になりました。つまり、私の研究の視点を変えて、コスメトロジーから眺めることで、基本的で重要な問題をその観点から整理することができました。さらに、幸いしたことは、この助成金で研究を進めているときに、私の所属している日本膜学会年会の特別講演で本財団理事の小林禮次郎氏のお話を伺う機会を得ました。これにより、コスメトロジーの理解を深め、以後の研究に反映させることができました。水と油、つまり、親水性と疎水性の問題、および、生体分子の水和の問題は、生物の機能を考えるときに必須であり、それが生体膜の機能では本質的な問題を与えています。コスメトロジーはこの点に生理学的に関わっていますので、生体膜の研究とともに進展するものとの思いを強くしました。研究には、視点を変えたり、多角的に考察することで、問題が解けたり、新しいアイデアを得ることがよくありますが、コスメトロジーの視点を導入したことは、私の研究でまさにそのような例になりそうです。研究は基本的な部分の知見を得ただけですが、今回の研究助成に心より感謝しております。　（東北大学）

異邦人から見たコスメトロジー

金子　克美

（平成5年度）

この度の「化粧品基本素材金属酸化物の酸性大気汚染物質との相互作用」の研究を考えるまでは、私の意識のなかにコスメトロジーは存在しなかった。もちろん、生活のなかにはコスメトロジーは厳然として存在し、多くの恩恵をうけていた。にもかかわらず、意識のなかにはコスメトロジーとの強い関係を想像することは出来なかった。どうみても私はコスメトロジーにとって異邦人である。

意識の上だけでなく、専門研究歴からも。ただ、良く考えて見ると、私の研究しているテーマはコスメトロジーだけでなく実に多くの分野に関係している。コスメトロジーにかぎって見ても、鉄酸化物、酸化チタン、酸化亜鉛などは文字どおり化粧品基本素材であり、自分の意図とは離れて金属酸化物関連の研究はコスメトロジーの一環に組み入れることが出来る。私の別の研究テーマである、微細孔性固体全般の研究、表面フラクタルの研究、ナノスペースの分子科学研究もまた、私の研究理解が進むと、コスメトロジーに関係してくるのではあるまいか。皮膚にも微細孔があるであろう。皮膚微細孔中の分子が、人間の感覚にも関連しよ

う。私が一方的にコスメトロジーにとって「異邦人」と考えていても、どうもそうではないらしい。

いかなる科学も実は深いところでは技術あるいは他の科学分野に繋がっている。特に近代の技術分野は極めて総合的であり、多くの「異邦人」の目が役にたつと信じたい。　（千葉大学）

本研究のコスメトロジーに及ぼす影響

畑中　研一

（平成5年度）

ヒアルロン酸は哺乳動物の結合組織に分布し、皮膚の潤滑性と柔軟性を保っている。皮膚にみずみずしさがなくなり、しわがよってくるのは、ヒアルロン酸の量が減ってくるためである。したがって、しわを防ぐためには、不足分のヒアルロン酸を外部から供給してやる必要が生じる。ヒアルロン酸は鶏のトサカに多く含まれることがわかっているので、初めの頃は盛んに抽出が行われた。しかしながら、この方法では製品が高価になってしまう。最近になってバイオテクノロジーを用いた微生物生産が開発され、より安価なヒアルロン酸が得られるようになってきた。

本研究では、クルコースやマンノースなどの単糖を出発原料とするため、さらに安価なヒアルロン酸類似体を大量に合成するのに適していると言える。しかも、色々な化学構造の多糖を設計し、合成することができるため、品質向上も容易に行われるものと考えられる。さらに、本研究では、ヒアルロン酸様の物性および生理活性を示すためにはどのような化学構造が本質的なのか、すなわち、機能表現のための必要条件の決定、さらには、より高い機能を引き出すための細工について分子レベルで探索していくために、使用目的に合致した非常に緻密な分子設計を行うことを可能とするであろう。タンパク質工学では遺伝子を制御することににによって種々の性質のタンパク質を得ることができる。しかしながら、糖鎖構築を行う際には、遺伝子の制御は酵素（糖転移酵素および加水分解酵素）を支配するだけであり、糖鎖の精密構造を自由自在に操るまでには至らないのである。これに対して、化学合成に基盤をおいた糖鎖工学では、上記のような糖鎖機能の本質を探ることもできるし、超高機能を発現する糖鎖を設計、構築していくことも可能となる。生体適合性もよく、化粧品の原料として期待の大きい糖質化合物を分子のレベルまで掘り下げて研究していくことは、今後のコスメトロジーを支えていくのにおおいに役立つものと信じている。　（東京工業大学）

紫外線と皮膚とコスメトロジー

小林　信彦

（平成4年度）

太陽光中の紫外線によって、しわ・しみ・そばかすといった美容の敵が生じる。さらには恐ろしい皮膚がんも生ずる。とはいえ、スキーやゴルフや海水俗にも行きたい。そして、太陽の光を浴びたいという欲求は抑え切れるものではない。このジレンマを解決するのが、コスメトロジーであろう。

紫外線による害を防ぐためには、まず、自分の皮膚についてよく知ることが大切である。皮膚のタイプによって、紫外線を浴びたときのリスクが違ってくる。色白で、日光にあたった後に赤くなる人ほど、紫外線による害を受けやすい。皮膚のメラニン色素が少ないためである。こういう人は、外出する際には、必ず、日傘・帽子・長袖シャツ・サンスクリーン剤などで紫外線を強力にカットすること。そして、白い肌を守ってください。皮膚の色がやや黒くて、太陽光にあたった後に黒くなりやすい人は、紫外線による害を比較的に受けにくい。天然のサンスクリーン剤であるメラニン色素を持っているためである。それでも、急に強い紫外線にはあたらないこと。あたる場合にはサンスクリーン剤などを使用して紫外線をカットすること。慢性的に紫外線にあたる場合には、紫外線量の少ない季節あるいは時間から少しずつ日光に

あたる時間をのばしていったり、あるいはサンスクリーン剤を併用して徐々にメラニン色素の量を増加させると良い。ただし、日焼けサロンで紫外線を浴びて日焼けをするなどもってのほかである。後でしみやしわができる恐れがあります。また、白い肌を守りたい人は、色白の人と同様にして紫外線をカットして下さい。

白い肌も小麦色の肌もどちらも魅力的である。自分の皮膚のタイプをよく考えて、紫外線による害を少しでも予防しながら、紫外線対策は、小さい頃から始めるとそれだけ効果も大きくなる。身の周りのお子さんたちにもできるだけ早く始めてあげてください。　　（奈良県立医科大学）

ボーダーレス時代のコスメトロジー研究

宮地　良樹

（平成5年度）

本来、化粧品は薬事法により、医薬品とは異なり、健康な人を対象として、美しく装うことが目的とされ、身体の構造や機能に影響を及ぼさない生理作用の緩和なものと定義されている。しかし、最近のサンスクリーン製剤や保湿剤の進歩をみるまでもなく、抗光老化の戦略の一つとして明らかに薬理作用を有するものが志向され、機能性化粧品とも呼ぶべきジャンルが拓かれつつある。私の研究対象である光老化の抗酸化的制御においては、外用というドラッグデリバリーによる抗酸化剤の開発が急務であるが、この領域などはまさにコスメトロジーの最大の研究ターゲットとなっており、医薬品との境界分野である。医薬品研究でも、主として虚血一再灌流傷害の制御を求めて抗酸化剤開発が盛んであるが、この動向は直ちにコスメトロジー研究にも反映され、むしろ外用剤の技術では一歩進んだ感のある化粧品として先に結実する可能性さえある。熱傷初期治療に対する抗酸化外用剤などは、コスメトロジー研究から生まれるかもしれない。このように、コスメトロジー研究は、医薬品とのボーダーレス時代を迎えつつある。コスメトロジー研究者は、薬事法の「化粧品」の範囲を越えて医薬品研究に参入することを躊躇せず、もっと積極的に、このボーダーレス時代のコスメトロジー研究に参画すべきであろう。その成果の蓄積がコスメトロジーをサイエンスとして成熟させることになるものと信じたい。
（群馬大学）

一基礎研究者の立場から

二階堂　修

（平成5年度）

紫外線のヒト細胞に与える影響について、殺菌燈紫外線（UVC）を用いた研究は数限りなく報告されてはいるが、太陽光紫外線の人体影響に関する基礎的研究は余りにも少ない。容易に入手できて安価であること、単一波長の紫外線であるため研究が進めやすいことなどがUVC生物学が今日まで繁栄した理由と考えられる。しかし、オゾンホールの拡大に伴うUVB領域の紫外線線量の増加、及びそれに基づく皮膚がんの増加が懸念される現在、地表上に到達する太陽光紫外線には全く含まれないUVCを利用した研究は、我々の科学的知識の増加に貢献こそすれ、太陽光紫外線の人体影響研究や、そのリスク推定には何の寄与もしないことになる。確かに、広範囲の波長の紫外線を含む太陽光紫外線の人体影響研究を行うことは困難である。そこに含まれる各種波長の紫外線の効果に加えて、他の波長の紫外線による複合効果が加わるからである。

各種の紫外線によってヒト細胞に誘発されるDNA損傷の修復機構を解明するため、我々は過去8年間にわたって紫外線損傷を特異的に認識するモノクローナル抗体の樹立研究に携わってきた。その結果、これまでにシクロブタン型チミン二量体、（6・4）光産物、デワー型光産物を認識する複数の抗体を樹立し、その性格付けを完成させることが出来た。これら抗体を利用して、各種の単一波長紫外線のDNA損傷誘発動態を調べた

ところ、当然のことながら照射紫外線の波長が異なれば、生成されるDNA損傷の種類と量が大きく異なることが明らかになったのである。一方、ヒト細胞に誘発された各種のDNA損傷は、その種類によって、細胞から除去修復される速度が異なる結果がえられた。これについては、個々の損傷の生成量と、それら損傷のヒト細胞での修復され易さに関して、分子レベルでの検討が今後必要と思われる。

太陽光紫外線による皮膚がんの原因は、それによってDNA中に誘発される損傷であることは明白である。事実、太陽光紫外線に高感受性の遺伝疾患・色素性乾皮症では損傷の除去能が全く欠損しており、患者の日光曝露部位に皮膚がんが多発する。ヒト皮膚における紫外線損傷の蓄積は、皮膚の色調の決定に関与するメラニン含量と存在形態、スキンタイフ、ならびにその個人の細胞のDNA除去修復能力に依存すると考えられる。これらの諸点に関する実証的な基礎研究が今後必要と考えられ、オーストラリア、イギリス、及び日本の研究者とともに共同研究を企画しているところである。この国際共同研究が成果を挙げることにより、太陽光紫外線の人体影響を制御する道が拓け、健康な生活を楽しむのに必要なコスメトロジーに関する種々の情報が得られるものと期待している。

（金沢大学）

私のコスメトロジー

富田　靖

（平成5年度）

顔に色素沈着、つまりメラニン増加を引き起こす皮膚疾患はかなり多く、それらはいずれも患者さんに、美容的、心理的に大きな悩みをもたらします。私は、このメラニン色素に関する研究を、20年間続けてきています。そんな訳で、皮膚科医あるいは皮膚に関する研究者の中でも、私は、コスメトロジーに比較的近い分野の研究者と思います。

私が皮膚科の分野に入った20年前頃は、皮膚科医が化粧品を扱った研究を行うのは、邪道という意識がありました。名古屋大の早川律子先生が、その辺の偏見に苦苦しめられた事を書いた文章をどこかで、読んだ記憶があります。

時代は明らかに変わったと思います。昨年私の教室に入った2名の新卒の女医さんは、化粧や化粧品に興味があるので、ぜひそちらの方面の事をやりたいと、申し出ました。昨年美容皮膚科学会もでき、私とその2名の女医さんは早速入会しました。現在の私には、女性患者を前にして、化粧品については一般的な話しかできません。出来ない理由のひとつには、化粧品について細い知識がない事、女性がどのような種類の化粧品を、どのように使い分けているかも女性なみには知らないからです。もし知っていても、女性患者を相手に化粧や化粧品について、あれこれと細かく質問したり、指導する事にはまだ照れくささを感じて、抵抗があります。

時代は今後も急速に変わると思います。今でも男性のタレントやロック歌手が、女性のように厚化粧したり、町を歩いている若者の中には、頭髪を黄色に染めたり、ピアスを付けている人もいます。10年後には、男性も女性と同じように化粧をしても、なんら違和感のない状況となるでしょう。その時には、私も抵抗感もなく、女性も驚くほど詳しい化粧の知識を振りまいて、化粧や化粧品についての患者指導をしている事でしょう。

（秋田大学）

私のコスメトロジー感

山本　綾子

（平成5年度）

このたび研究助成に応募するまで、正直のところコストロジー研究振興財団について何も知識がありませんでした。ところが思いがけなく助成をいただき、はじめてコストロジー（化粧品学）の意義について考えております。近年皮膚科学と化

粧品学は非常に接近している部分が多いと思われます。たとえばいまやスキンケア化粧品は、しみ、しわ、肌あれを防ぐのみならず治療する（？）使命を持ちつつあるようです。私は表皮の脂質代謝と皮膚の病態の関係についてこれまで勉強してきましたが、最近では、表皮の水分バリアー機能について興味を持っております。肌あれは、まさにこの水分バリアー機能の損なわれた表皮であり、この発症機序の解明と治療はいまや私の重要な研究課題のひとつであります。すなわち私にとって皮膚科学と化粧品学は一致する目的を持っているといえます。私達皮膚科学の業界（？）では、「お肌の話」を「皮膚の研究」より格下にみなす立場もありますが、私個人としては、きれいなお肌（＝正常な皮膚）をめざして実験を重ねてゆきたいと思う次第です。

（新潟大学）

私の研究とコスメトロジー

森本　一洋

（平成5年度）

私の研究分野は薬剤学（製剤学）であり、現在主に生体表面（皮膚および粘膜組織）に薬物を投与するための剤形設計を行っている。皮膚は最表面に角質層を有し、外界から身を守るために異物の侵入に対しバリアーになっていると同時に体内からの水分の蒸発を防ぐ働きをしている。したがって、皮膚表面に投与した薬物の全身的な薬理効果を発揮させるためには何らかの方法を講じ、皮膚に障害を与えずに薬物を皮膚透過させなければならない。私はこの様な皮膚を扱う研究をしていることから、数年前よりコスメトロジーの研究にも関わるようになった。

化粧品の場合、医薬品とは異なり皮膚表面に塗られた化粧品の成分が体内に入らず皮膚表面に留まり皮膚におだやかに働く必要がある。医薬品の評価は薬物の血中濃度や薬効により行われるが、化粧品の評価はその作用がおだやかであり、またそれ以外の様々な観点からの評価も必要となり難しい点が多い。また、欧米ではヒト皮膚（死体から採取したもの）を用い研究することは容易であるが、動物実験は動物愛護の観点からかなりの制限を受けている。一方、わが国ではヒトの皮膚を研究に用いることは特別な場合を除くと不可能であるが、動物実験は一定のルールを守れば行える。その場合、どの動物の皮膚を用いるかが重要となる。最近では、動物実験の代替に培養細胞を用いることも多くなってきているが、ヒトの皮膚角質層の培養細胞に関しては開発が遅れているようである。

最後に、コスメトロジーは科学のみならず、美学や心理学など様々な学問を背景に成り立っている学問であり、社会構造、高齢化が進む21世紀にはますます魅力のある学問となるであろう。

（大阪薬科大学）

看護とコスメトロジー

大河原　千鶴子

（平成4年度）

21世紀に向けて変革の時代といわれるが、女性の代表的な職業として長い歴史をもつ看護職も急速に変化しつつある。その第1は、専門職にふさわしい教育としてようやく大学化が進んでいることである。教育による質的な向上は今年の大学受験にも影響し、折からの不景気と就職難という現実を見越して職業や資格に直結した学部を好む傾向にあるという。

特に薬学・看護系などに代表される実学志向が女子の進出とともに目立つと新聞に出ていた。私たちがコスメトロジー研究に着手した3年余り前は「白衣の天使」とあこがれの的だった職業も、きつい、汚い、危険の3K職種というイメージが強く、看護婦不足が社会的な問題になっている時であった。

看護をめざした人たちが、看護に魅力を感じ溌剌と働くためには看護の質的向上、社会的な位置づけ、待遇の改善など基本的な問題はもとより様

々な要因がある。

そこで魅力ある職業イメージへの脱皮・転換に影響を与える要因のひとつとして、病院における「看護婦の化粧」を取り上げてみたいと考えた。

しかしこのようなテーマの研究はみられなかったし、一般社会の女性に比べ看護婦と化粧はあまり結びつかず、かなり突飛な発想と見られていた。

だが日本看護研究学会に報告を重ねているうち次第に関心が寄せられて次の報告を促されるようになってきた。昔から看護婦の容姿に求められてきたのは患者の心の慰め、清らかな心の表現であり煽状的であってはならないとされ、素肌を整える程度であった。つまり当時化粧は派手でけばけばしく、刺激的なイメージとしてとらえられていたのであろう。今回の一連の調査結果では看護婦が化粧をする事に対し、看護婦自身及び患者はそれ以上に肯定的であった。患者が描く化粧による看護婦の好ましいイメージは「清潔でさわやか」「健康で明るい」「穏やかで優しい」であり、看護婦の描くイメージとも一致していた。また化粧が外観だけでなく看護婦の気持ちの変化に多大な影響を及ぼし、魅力的で明るく生き生きと意欲的に働く行動への動機づけとなっていることが分かった。これらの点は注目してよい成果といえよう。

看護婦の化粧は患者に不快感や刺激を与えないよう「薄化粧」「香り淡白」であること、そして若い人達に見られた化粧による自己表現に対し、無香料化粧品、自分の肌にあった多種類のファンデーション、口紅の選択など自然なメーキャップが可能となった化粧品の進歩・発展が大きく関与している。さらに私たちの調査研究もまた総合人間科学をめざすコスメトロジーに影響を与えるものと思われる。

（杏林大学）

高齢者のおしゃれ

藤森　立男

（平成4年度）

劇的な平均寿命の上昇にともなって、老後の人生をいかに豊かに過ごすかということは、大きな社会問題となっている。この高齢化の進行は多様な生き方や価値観を生じさせ、さらに「老い」との共存も同時に問い直させている。

われわれは東京都や北海道の高齢者大学や高齢者のサークルを訪問し、そこに参加している高齢者のおしやれに関する意識を調査した。当初、各機関に対して「高齢者のおしやれの研究をしたい」と申し出たところ、担当職員に実際のおしやれの専門家であると間違えられて「高齢者が大変興味を持っているテーマなので、おしやれの指導をして欲しい」と反対に依頼されてしまい、戸惑ったことが数多くあった。もちろん、自分自身はおしやれとは縁遠い存在なので、丁寧に辞退させていただいた。このことから、調査に入る以前に、いかにおしやれに対する高齢者の関心が高いかを知らされる思いがした。

実際に調査に入ってみると、生涯学習の場面に積極的に参加している高齢者たちは、男女とも教養や知識の習得だけでなく、対人関係の交流をはかり、新たな生活の目標を意識的に選択し、社会とのつながりを模索しているようであった。また、男女ともに服装や髪型を整え、女性はおしろいに口紅と化粧をしてやってきていた。このことは、「おしゃれ」という外見的な特性が与える印象形成の意味を、高齢者自身が熟知していることを窺わせている。老化については、どうしてもネガティブなイメージが先行するものであるが、高齢者が能動的に加齢を謳歌している姿がそこに存在していたのである。

今後は、青年期や成人期の人々が高齢者のおしゃれをどのように認知しているかを明らかにすることにより、高齢者とどのような点で類似し、どのような点で異なっているのかを検討していくことが新たな課題であると考えている。

（横浜国立大学）

付　　録

♦

事業報告書(平成 6 年度)

役　員

研究助成課題一覧

♦

事 業 報 告 書

（自　平成６年４月１日　至　平成７年３月31日）

Ⅰ．５年度事業（平成６年度）

昨年に引き続き以下のような事業を計画し，実行しました。

自然科学や社会科学の各分野にわたり，ひろくかかわりをもつ化粧品を総合的に体系化することを目的として

①化粧品学の調査・研究に関して顕著な成績をあげた研究者や機関に対して功労金をもってこれを表彰する。（１件あたり100万円）

②皮膚の生理機能や老化機構の解明，美容に役立つ素材の研究等化粧品学に関連した生命科学，その他の分野の調査・研究に対する助成を行う。（１件あたり200万円及び100万円）

③化粧品学の調査・研究にたずさわる研究者の海外派遣や招聘に対して資金援助を行う。（１件あたり50万円）

Ⅱ．募集及び選考の経過

本年度の各事業につきましては平成６年５月９日より募集を開始し同６年７月20日をもって締切りました。研究助成事業は本年度も一般公募を原則とし全国160ヶ所の大学・病院・研究機関等にダイレクトメールで推薦書を送付するほか８誌の関係学術雑誌にも広告し，その結果多数の応募をいただきました。応募者の研究分野が多岐にわたった為，選考委員会の中に３分科会を設けそれぞれにおいて予備選考を行い平成６年９月20日(火)ルビーホールにおいて本選考委員会を開催し受賞候補者を決定し11月21日に理事長・理事・評議員の諒承を得て受賞者を最終決定しました。

Ⅲ．第５回功労賞・研究助成等の結果

以下のとおり合計19件が決定され，功労金100万円，研究助成金2,800万円，国際交流援助金50万円が交付されました。

功労表彰（小林孝三郎賞）	１　件
研　究　助　成	17 件
国 際 交 流 援 助	１　件

Ⅳ. 会 議 等

理事会

第１回通常理事会

開 催 日 時　　平成６年６月14日（火）午後５時

開 催 場 所　　東京都千代田区丸の内1-1-1 パレスホテル会議室

理事総数　12名　　本人出席　10名　　委任状出席　２名（賛成）

監　　事　２名　　出席　２名

審議事項

第一号議案　事業報告ならびに収支決算報告について

平成６年度の事業内容が事務局より詳細に説明された。続いて収支計算，財産内容などが詳しく説明された。次に小田倉監事より上記内容が適正適法である旨の監査結果が表明された。質疑応答，審議の後，本議案は書面表決者を含め全員一致で賛同を得，可決承認された。

報告事項

平成６年度の助成表彰の公募方法について

研究助成事業の方式について，昨年との相違点を主とした詳細な説明がなされた。理事会及び評議員会は全員でその趣旨を認めた。

その他

研究業績中間報告集第３号が披露され，近く研究報告集第２号（収載論文20編）が発刊される予定であることが報告された。

評議員会

第１回通常評議員会

開催日時・場所・議案ともに理事会に同じ。

評議員総数　14名　　本人出席　10名　　委任状出席　１名（賛成）

欠席　３名

各議案とも全員一致で承認された。

第２回通常理事会

開 催 日 時　　平成６年11月21日（月）午後２時30分

開 催 場 所　　東京都渋谷区渋谷２－１２－１５　日本薬学会館会議室

理事総数　　12名　　本人出席　11名　　欠席　　１名

審議事項

第一号議案　第５回表彰・贈呈者の決定について

表彰・贈呈の候補者について，選考枠，選考経過などに及ぶ詳細な説明の後，分野別の応募状況の確認などを含めた活発な意見が交換された。なお今回は功労表彰対象者として，本年８月急逝された細田文一郎氏が提案された。しかるのち本議案は書面表決者を含め全員一致で原案通り可決された。

第二号議案　平成７年度事業計画案及び予算案について

配布された資料に基づき，事業計画，予算案について新規事業，金利動向などにもふれた詳細な説明があり，前年の事業規模を維持，継承した提案がなされた。原案は書面表決者を含め，全員一致で賛同を得た。

第三号議案　寄附行為の一部改正について

配布された別紙に基づき変更理由が説明され、財団が保有する株式会社コーセーの株の運用について、一定の制約を設けるために複数の条項の改正提案がなされた。国税局の指摘事項である旨の説明があった後、原案は書面表決者を含め全員一致の賛同を得た。

報告事項

研究報告について

第一巻に続き，第二巻を平成６年に発行配布した点と，今後も年報を継続発行する旨の報告がなされ了解された。

第２回通常評議員会

開催日時・場所・議案ともに理事会に同じ。

評議員総数　14名　　本人出席　８名　　委任状出席　６名（賛成）

各議案とも全員一致で承認された。

選考委員会

分科会Ⅰ

開催日時　平成６年９月７日（水）午後５時30分

開催場所　東京都港区虎の門1-8-7 富田屋会議室

審議事項　素材、物性に関する分野の選考

分科会Ⅱ

開催日時　平成６年９月16日（金）午後５時

開催場所　東京都千代田区丸の内1-9-1 ルビーホール会議室

審議事項　生体作用、安全性に関する分野の選考

分科会Ⅲ

開催日時　平成６年９月７日（水）午後６時

開催場所　東京都新宿区西新宿2-2-1 京王プラザホテル会議室

審議事項　精神、文化に関する分野の選考

本選考委員会

開催日時　平成６年９月20日（火）午後５時

開催場所　東京都千代田区丸の内1-9-1 ルビーホール会議室

審議事項　各分科会の結果を総合的に判断して助成候補者が決定された。

表彰贈呈式

開催日時　平成６年11月21日（月）午後４時

開催場所　東京都渋谷区渋谷2-12-15 日本薬学会長井記念ホール

以　上

第５回　研究助成を受けられたかたがた

（K－功労表彰　JA－一般研究助成A　JB－一般研究助成B　H－国際交流援助）

管理番号	研　究　題　目	分　野	代表研究者
K-94-01	香粧品の有効性PR、香粧品科学教育を通しての産業育成	香粧品科学 美容評論	コスメチック コンサルタント 細田文一郎
JA-94-01	ハーダー腺の分泌するアルキルジアシルグリセロールの物性解明とその素材としての応用開発	生化学 脂質生化学	東京大学医学部教授 脊山洋右
JA-94-02	植物組織培養法を用いたクチナシ植物からの橙黄色色素Crocin及び青色色素イリドイド配糖体の生成に関する研究	植物細胞工学	東京理科大学総合研究所助教授 生田安喜良
JA-94-03	表皮ケラチノサイトにおけるヒト細胞老化因子の研究	皮膚科学	大阪大学医学部助教授 橋本公二
JA-94-04	植物培養細胞・組織による化粧品素材としての活性成分の生産と育種に関する研究	生薬学 植物細胞・組織培養	九州大学薬学部教授 正山征洋
JA-94-05	化粧と痴呆老人に関する基礎的研究	脳神経外科学 心理学 人間工学	産業医科大学名誉教授 松岡成明
JA-94-06	皮膚生理機能賦活物質の合理的吸収促進法の開発	薬剤学	京都大学薬学部教授 橋田充
JA-94-07	遺伝子工学的手法を用いた必須脂肪酸γ-リノレン酸の高等植物における多量生産	植物生理学 植物細胞工学 栄養化学	九州大学理学部助教授 射場厚
JA-94-08	リポソーム封入薬剤の皮膚吸収過程の解析と皮膚内ラジカル消去への応用	生体物理化学 生体医用化学	九州大学薬学部教授 内海英雄

管理番号	研究題目	分野	代表研究者
JA-94-09	表皮細胞の細胞接着と角化制御に関するシグナル伝達	皮膚科学 細胞生物学	岐阜大学医学部教授 北島康雄
JA-94-10	遠赤外線の水の構造と物性に及ぼす影響及び遠赤水の保湿効果に関する研究	物理化学 (薬学・医学・理学系)	静岡県立大学薬学部助教授 片山誠二
JA-94-11	微生物に由来する多糖分解酵素のコスメトロジーへの応用	遺伝子工学 生化学	東京工業大学生命理工学部助教授 中村聡
JB-94-01	皮膚発現型レチノイン酸受容体のドミナントネガティブ・トランスジェニックマウスを用いた皮膚の成熟過程の検討	皮膚科学 遺伝子工学	京都大学医学部助手 田中俊宏
JB-94-02	化粧が高温環境下の発汗反応及び選択的脳冷却機構に及ぼす影響	環境生理学 温熱生理学	金沢大学医学部助手 田辺実
JB-94-03	サンスクリーン剤の光ハプテンとしての性格	皮膚科学	浜松医科大学講師 戸倉新樹
JB-94-04	対人魅力の形成にかかわる顔の構造的特徴と化粧行動の影響の研究	社会心理学 対人コミュニケーション・対人魅力	北星学園大学文学部教授 大坊郁夫
JB-94-05	弾性繊維蛋白質エラスチンの自己組織化集合体の構造、物性、機能に関する研究	物理化学 生物物理学 生体物性学	九州大学理学部助手 甲斐原梢
JB-94-06	バイオシグナル分子を固定化した細胞成長促進タンパク質ハイブリッド材料の合成	生体材料化学 高分子化学	京都大学工学部助手 伊藤嘉浩
H-94-01	毛周期の皮膚遅延型過敏症成立に与える影響	皮膚科学 毛髪学	Freie Universitat Berlin医学部 Udo Hofmann 受入責任者 浜松医科大学 滝川雅浩

(敬称略 受付順)

平成７年４月１日現在

役　員

理事長	小林　孝三郎	㈱コーセー取締役名誉会長
専務理事	佐藤　大正	
理　事	磯邊　律男	㈱博報堂代表取締役会長
理　事	宇佐美　昭次	早稲田大学理工学部教授
理　事	大澤　利昭	東京大学名誉教授
理　事	小林　禮次郎	㈱コーセー代表取締役社長
理　事	菅原　正文	高砂香料工業㈱代表取締役社長
理　事	高山　冨士雄	安田信託銀行㈱代表取締役会長
理　事	中村　芳郎	慶応義塾大学医学部教授
理　事	西川　武二	慶応義塾大学医学部教授
理　事	花輪　隆昭	社会福祉法人 福利厚生センター理事長
理　事	宮澤　香	東京化粧品工業会顧問
監　事	小田倉　正典	公認会計士
監　事	黒田　節哉	弁護士
評議員	上野　芳夫	東京理科大学薬学部教授
評議員	大隈　孝一	学校法人 名城大学理事
評議員	緒方　宏泰	明治薬科大学教授
評議員	北原　文雄	東京理科大学工学部教授
評議員	近藤　保	東京理科大学薬学部教授
評議員	佐々　隆之	内科医師
評議員	高橋　久	帝京大学医学部教授
評議員	中村　桂子	早稲田大学人間科学部教授
評議員	野呂　影勇	早稲田大学人間科学部教授
評議員	廣部　雅昭	東京大学薬学部教授
評議員	宮崎　榮三	東京工業大学理学部教授
評議員	山崎　幹夫	千葉大学薬学部教授
評議員	山本　晴彦	神奈川大学理学部教授
評議員	渡辺　徹	日本薬剤師会専務理事

素材、物性に関する分野

管理番号	研　究　課　題	分　野	代表研究者
J90-03	リン脂質膜の表面修飾と分子集合体としての機能発現に関する研究	界面物理化学	筑波大学化学系助教授 古　澤　邦　夫
J90-06	ヒアルロン酸で表面を修飾したリポソームからの内容物の温度による放出制御	薬品物理化学	東京理科大学薬学部助手 牧　野　公　子
J90-07	皮膚ＤＤＳとしての高分子脂質リポソームの基礎研究	高分子合成	早稲田大学理工学部教授 西　出　宏　之
J90-15	皮膚への作用性を有する各種糖脂質の合成	有機合成化学	千葉大学薬学部助教授 中　川　昌　子
J90-16	新製剤法及び新素材を用いた化粧品の品質確保に関する研究	衛生化学	国立衛生試験所環境衛生化学部長 武　田　明　治
J91-02	生体適合性逆型ベシクルの生成、安定化と応用に関する研究	溶液論 界面化学	横浜国立大学工学部助教授 国　枝　博　信
J91-05	新しいＤＤＳ剤型としての高分子ミセルの設計と機能開発	高分子合成 ＤＤＳ	東京理科大学生命科学研究所助教授 片　岡　一　則
J91-06	化粧品素材としての利用が可能な乳酸菌の新規育種技術の開発	応用生物化学	早稲田大学理工学部専任講師 桐　村　光太郎
J91-08	化粧品素材としての竹節人参並びに甘草の組織培養による物質生産並びに大量増殖に関する研究	生　薬 薬用生物学	広島大学医学部助教授 神　田　博　史
J91-10	界面活性剤を含む溶液混合系の相挙動と濡れの挙動に関する研究	界面化学 物理化学	九州大学理学部助教授 荒　殿　　誠
J91-11	超微粒子分散系の構造と物性及び自己制御コロイド系の開発	高分子物性 コロイド物性	京都大学工学部助手 松　本　孝　芳
J91-20	各種界面活性物質によるマクロ及びマイクロエマルションの調製並びに物性に関する物理化学的研究	応用界面化学	東京理科大学理工学部講師 阿　部　正　彦
J92-01	ヒトリゾチームタンパク質を高分泌する酵母突然変異体を用いた素材生産の効率化研究	分子生物学 遺伝学	広島大学理学部助手 鈴　木　克　周

管理番号	研　究　課　題	分　野	代表研究者
J92-03	化粧品の紫外線照射による光酸化メカニズムの研究	物理化学 界面科学	明星大学理工学部教授 日　高　久　夫
J92-04	水素添加大豆リン脂質を用いた油性ゲル及び水性ゲルの保湿作用に関する研究	薬　学	昭和薬科大学講師 藤　井　まき子
J92-05	アスパラギン酸プロテアーゼ類の蛋白工学的機能改変によるケラチナーゼの開発	蛋白工学 生化学	東京大学理学部助手 井　上　英　史
JA-93-05	細胞膜の脂質の物性と機能の基礎的な研究 －リン脂質物性のコスメトロジーへの応用－	生体物性学 細胞生物 物理学	東北大学理学部教授 大　木　和　夫
JA-93-06	化粧品基本素材金属酸化物の酸性大気汚染物質との相互作用	物理化学 固体界面化学	千葉大学理学部教授 金　子　克　美
JA-93-07	色素化合物の光照射下での反応の解析	生物物理化学 光化学治療 光増感化学	東京工業大学生命理工学部教授 大　倉　一　郎
JA-93-08	新規な構造を有するヒアルロン酸類似多糖の開発	糖鎖工学 高分子化学	東京工業大学生命理工学部助教授 畑　中　研　一
JB-93-01	ペプチドシナージストによるビタミンEの抗酸化能の向上－ヒト血清アルブミン由来のペプチドシナージストの開発－	脂質生化学 食品化学	水産大学校講師 幡　手　英　雄
JB-93-02	層状鉱物を用いたホストーゲスト反応による有機色素のカプセル化	無機材料化学 粘土科学	早稲田大学理工学部助教授 菅　原　義　之
JA-94-01	ハーダー腺の分泌するアルキルジアシルグリセロールの物性解明とその素材としての応用開発	生化学 脂質生化学	東京大学医学部教授 脊　山　洋　右
JA-94-02	植物組織培養法を用いたクチナシ植物からの橙黄色色素Crocin及び青色色素イリドイド配糖体の生成に関する研究	植物細胞工学	東京理科大学総合研究所助教授 生田　安喜良
JA-94-04	植物培養細胞・組織による化粧品素材としての活性成分の生産と育種に関する研究	生薬学・植物細胞・組織培養	九州大学薬学部教授 正　山　征　洋
JA-94-07	遺伝子工学的手法を用いた必須脂肪酸γ－リノレン酸の高等植物における多量生産	植物生理学 植物細胞工学	九州大学理学部助教授 射　場　　厚

管理番号	研　究　課　題	分　野	代表研究者
JA-94-10	遠赤外線の水の構造と物性に及ぼす影響及び遠赤水の保湿効果に関する研究	物理化学 (薬学・医学系)	静岡県立大学薬学部助教授 片　山　誠　二
JB-94-05	弾性線維蛋白質エラスチンの自己組織化集合体の構造、物性、機能に関する研究	物理化学 生体物性学	九州大学理学部助手 甲　斐　原　梢
JB-94-06	バイオシグナル分子を固定化した細胞成長促進タンパク質ハイブリッド材料の合成	生体材料化学 高分子化学	京都大学工学部助手 伊　藤　嘉　浩

生体作用、安全性に関する分野

管理番号	研　究　課　題	分　野	代表研究者
J90-01	染毛剤成分の代謝に関する研究	薬物代謝	食品薬品安全センター秦野研究所 中尾美津男
J90-02	ドレイズ試験代替法の開発－ヒト細胞、昆虫細胞を用いた高感度迅速試験法の開発研究－	組織培養学	理化学研究所副主任研究員 大野忠夫
J90-05	胆汁酸生合成のメカニズムに関する研究	生物有機化学	東京工業大学理学部助教授 藤本善徳
J90-08	皮膚の老化に伴うエラスチン遺伝子発現の動態	皮膚科学	慶應義塾大学医学部講師 多島新吾
J90-09	Werner症候群患者皮膚由来培養線維芽細胞のサイトカイン細胞成長因子に対する応答性	皮膚科学	横浜市立大学医学部助手 佐々木哲雄
J90-10	光化学反応によるフリーラジカルの産生と表皮培養細胞に対する影響	医科学 生化学	東京大学医科学研究所教授 金ケ崎士朗
J90-11	色素性皮膚病変に対するレーザー療法の研究	皮膚科学	帝京大学医学部助教授 渡辺晋一
J90-12	表皮糖脂質の生化学的、形態学的並びに臨床的研究（エピデルモシド）	皮膚科学 生化学	山口労災病院皮膚科部長 浜中すみ子
J90-13	生体の酸化的障害に対する防御機構の生化学的研究－ビタミンEの活性発現機構の解析－	生化学	東京大学薬学部助手 新井洋由
J90-14	皮膚生理機能賦活物質の経皮吸収に対する評価解析理論の確立	薬剤学	京都大学薬学部教授 瀬崎仁
J91-01	培養表皮細胞及び線維芽細胞におけるグリコサミノグリカン及びコラーゲンの代謝	生化学	東京薬科大学教授 森陽
J91-03	活性酸素、フリーラジカルによる生体膜障害の防止に関する研究	有機生化学	東京大学先端科学技術研究センター教授 二木鋭雄
J91-04	パッチテスト結果のコンピューター処理システムの開発	皮膚科学 接触皮膚炎	名古屋大学医学部附属病院分院　皮膚科長 早川律子

管理番号	研　究　課　題	分　野	代表研究者
J91-07	皮膚過敏症に対するマスト細胞の役割 －マスト細胞欠損動物を用いた検定法の開発－	実験病理学	大阪大学医学部教授 北　村　幸　彦
J91-09	マウス悪性黒色腫を用いたチロシナーゼ抑制因子の精製と応用	皮膚科学 メラニン色素	北里大学医学部講師 亀　山　孝一郎
J91-12	接触光過敏症のマウスモデルを用いた化粧品による光アレルギーのスクリーニング及びサンスクリーンの効果の評価	光生物学 皮膚免疫	浜松医科大学教授 滝　川　雅　浩
J91-14	メラニン生合成の調節	分子生物学	東北大学医学部教授 柴　原　茂　樹
J91-16	ビタミンCと上皮成長因子によるヒト皮膚線維芽細胞の増殖とコラーゲン代謝調節機構の分子細胞生物学的研究	分子細胞生物学 医化学	東京医科歯科大学助手 畑　　隆一郎
J91-17	人工皮膚を用いた皮膚の形成機構及び皮膚の反応性試験に関する研究	細胞生物学	広島大学理学部教授 吉　里　勝　利
J91-18	サンスクリーンの紫外線性表皮障害に対する防御作用の免疫生物学的研究	皮膚科学	京都大学医学部講師 古　川　福　実
J91-19	ダイレクトスキンセンサーを用いて測定した皮溝と加齢の関係	老年病学 動脈硬化	慶應義塾大学医学部助手 本　間　聡　起
J91-22	フリーラジカルとポルフィリン代謝に関連する皮膚の老化機構解明に関する研究	環境科学 毒性学	国立公衆衛生院　労働衛生学部室長 市　川　　勇
J92-02	光熱変換分光法による薬物の組織及び細胞への非侵襲吸収計測法の開発	分析科学	東京大学工学部教授 澤　田　嗣　郎
J92-06	神経ペプチドによる皮膚炎症反応の成立機序とその特異的制御	内科学 アレルギー学	千葉大学医学部助手 岩　本　逸　夫
J92-07	皮膚の機能と脂質代謝に関する基礎的研究	生化学	新潟大学医学部教授 小　野　輝　夫
J92-08	転移因子を用いたアントシアニン色素生合成遺伝子とその発現調節因子遺伝子の解析	分子遺伝学 分子生物学	東京理科大学基礎工学部教授 飯　田　　滋

管理番号	研　究　課　題	分　野	代表研究者
J92-09	モノクローナル抗体を用いた紫外線誘発ＤＮＡ損傷の定量とメラニン色素のサンスクリーン効果の実験的証明	皮膚科学	奈良県立医科大学大学院生 小　林　信　彦
J92-10	皮膚の老化における染色体構造の変化と遺伝子修復機構に関する研究	細胞生理学	理化学研究所主任研究員 花　岡　文　雄
J92-11	アスコルビン酸２－グリコシドの生物学的有用性研究－経皮吸収によるビタミンＣ活性発現の評価－	免疫薬理学	岡山大学薬学部教授 山　本　　格
JA-93-01	還元型ネオプテリン（ＮＰＨ－４）の紫外線照射皮膚障害に対する効果	放射化学 薬理学 生化学	東京理科大学生命科学研究所講師 小　島　周　二
JA-93-02	化粧品による光老化の抗酸化的制御に関する細胞生物学的及び生化学的研究	皮膚科学 紫外線生物学	群馬大学医学部教授 宮　地　良　樹
JA-93-03	太陽光紫外線でヒトＤＮＡ中に誘発される損傷とその修復に関する研究	放射線生物学 細胞生物学	金沢大学薬学部教授 二階堂　　修
JA-93-09	いわゆる”しみ”（肝斑など）の発症機構とその増悪因子に関する研究	皮膚科学	東北大学医学部講師 富　田　　靖
JB-93-04	尋常性痤瘡の発症機序の解明のための皮膚の保湿機能と脂質代謝に関する研究	皮膚科学	新潟大学医学部助教授 山　本　綾　子
JB-93-05	哺乳類皮膚細胞のアポトーシスと細胞接着をつかさどるセラミドの研究	糖生物学 発生生物学 生化学	九州大学理学部助教授 野　村　一　也
JB-93-06	不飽和脂肪酸とその過酸化生成物の皮膚角質層への作用に関する研究	製剤学	大阪薬科大学薬学部助教授 森　本　一　洋
JA-94-03	表皮ケラチノサイトにおけるヒト細胞老化因子の研究	皮膚科学	大阪大学医学部助教授 橋　本　公　二
JA-94-06	皮膚生理機能賦活物質の合理的吸収促進法の開発	薬剤学	京都大学薬学部教授 橋　田　　充
JA-94-08	リポソーム封入薬剤の皮膚吸収過程の解析と皮膚内ラジカル消去への応用	生体物理化学 生体医用化学	九州大学薬学部教授 内　海　英　雄

管理番号	研　究　課　題	分　野	代表研究者
JA-94-09	表皮細胞の細胞接着と角化制御に関するシグナル伝達	皮膚科学 細胞生物学	岐阜大学医学部教授 北　島　康　雄
JA-94-11	微生物に由来する多糖分解酵素のコスメトロジーへの応用	遺伝子工学 生化学	東京工業大学生命理工学部助教授 中　村　　聡
JB-94-01	皮膚発現型レチノイン酸受容体のドミナントネガティブ・トランスジェニックマウスを用いた皮膚の成熟過程の検討	皮膚科学 遺伝子工学	京都大学医学部助手 田　中　俊　宏
JB-94-02	化粧が高温環境下の発汗反応及び選択的脳冷却機構に及ぼす影響	環境生理学 温熱生理学	金沢大学医学部助手 田　辺　　実
JB-94-03	サンスクリーン剤の光ハプテンとしての性格	皮膚科学	浜松医科大学講師 戸　倉　新　樹

精神、文化に関する分野

管理番号	研　究　課　題	分　野	代表研究者
J90-04	化粧が意識性に及ぼす効果の研究	心理学	早稲田大学人間科学部教授 春　木　　豊
J91-13	香料に関する定量的解析	感覚生理学	北海道大学薬学部教授 栗　原　堅　三
J91-15	アルツハイマー型老年痴呆症者と、いわゆる”ぼけ”症状を呈する人々への化粧による情動活性化の研究	感情心理学 臨床心理学	同志社大学文学部教授 浜　　治世子
J91-21	「色白」の嗜好構造に関する一考察	心理学 色彩心理学 造形心理学	早稲田大学人間総合研究センター 齋　藤　美　穂
Js-92-01	病院看護における化粧に関する研究	基礎看護学	埼玉県立衛生短期大学教授 大河原　千鶴子
Js-92-02	高齢者のおしゃれ行動とその評価に関する研究	人間行動科学	北海道教育大学教育学部助教授 藤　森　立　男
JA-93-04	色彩の心理学的意味空間の研究	計量心理学 認知心理学 行動計量学	金沢大学文学部助教授 岡　本　安　晴
JB-93-03	化粧の個人的効果と対人的効果に関する実証的研究	社会心理学	福島大学教育学部助教授 飛　田　　操
JA-94-05	化粧と痴呆老人に関する基礎的研究	脳神経外科学 心理学	産業医科大学名誉教授 松　岡　成　明
JB-94-04	対人魅力の形成にかかわる顔の構造的特徴と化粧行動の影響の研究	社会心理学 対人魅力	北星学園大学文学部教授 大　坊　郁　夫

＊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。

財団法人　コスメトロジー研究振興財団
〒104　東京都中央区銀座三丁目5番12号

電 話　東京03(3564)6731

コスメトロジー研究報告 Vol.3/'95　非売品

1995年9月15日発行

編者　佐藤大正，宮川安正

発行　財団法人　コスメトロジー研究振興財団
〒104 東京都中央区銀座三丁目5番12号
電話　東京 03（3564）6731

製作　データ 八十二
〒104 東京都中央区新富一丁目17番8号
電話　東京 03（3551）3726（代表）

印刷　宮崎印刷

©1995　不許複製　禁無断転載