

## ごあいさつ

消費財の典型ともいえる化粧品は、消費者の潜在的ニーズにいかに応え新たな機能・効能を実現させるかが重要であると共に、“癒し”、“心の満足”の側面が益々重要になりつつあります。これらのニーズに応えうる化粧品を社会に送り出していく為には、総合的な学術探求を欠かすことはできません。

研究報告第5号のごあいさつで人間科学の重要性に触れましたが、マスコミ等でもこの潮流を取り上げ、コンピュータ技術の発展には電子技術と共に人間の思考、行動感覚の研究を一緒に研究する必要性があり、従来型の個別専門研究の寄せ集め方式では限界があると論評しています。つまり理工学、人文学といった分類の中から思考するのではなく両者一体となった“文理融合”の視点からの研究が必要になってくるということだと思えます。勿論、遺伝子科学のようにその専門分野がより深化される流れも重要であり、この両者に分化していきたくらうと思えますが、化粧品学の確立には前者がより重要ではないかと考えている次第です。

この研究報告第6号に掲載されている報告を含めると設立当初からの累計で研究報告数が105題となりますが、研究分野別に見てみると、素材・物性に関する分野が37題、生体作用・安全性に関する分野が56題、精神・文化に関する分野が12題となっており、これからの時代を想定すると精神・文化の分野の研究が更に充実していった貰いたいと願う次第であります。

いずれに致しましても、化粧品学の確立に向けて、今後とも地道な一歩一歩を積み重ねていく努力を続けたいと考えておりますので、関係各位の皆様方の暖かいご理解とご協力をお願い申し上げます。

平成10年8月

財団法人 コスメトロジー研究振興財団

理事長 小林 禮次郎



## 目次

ごあいさつ

### ■ 研究報告

#### I. 素材、物性に関する分野

- ・ 材料表面—生体分子相互作用の直接解析に基づく生体適合性の発現機構の解明 …………… 2  
九州大学大学院工学研究科 高原 淳
- ・ オリゴ糖による皮膚の耐乾燥保護の分子メカニズムに関する基礎的研究 …………… 11  
東京工業大学生命理工学部 井上 義夫
- ・ 新発見の糊代を持ったタンパク質の基礎と応用  
(タンパク質接着能を有する化粧品素材の開発) …………… 18  
東京工業大学生命理工学部 広瀬 茂久
- ・ 食用乳酸菌による化粧品素材としての機能性多糖の生産とその改質 …………… 27  
新潟大学工学部 谷口 正之
- ・ メラニン生合成阻害作用を示す海洋天然物の探索 …………… 35  
北海道大学大学院薬学研究科 小林 淳一

#### II. 生体作用、安全性に関する分野

- ・ 表皮ケラチノサイトにおけるヒト細胞老化因子の研究 …………… 44  
愛媛大学医学部 橋本 公二
- ・ 脂質皮膚モデルを利用した化粧品及び水の浸透と安全性に関する基礎的研究 …………… 49  
東京工業大学工学部 谷岡 明彦
- ・ 小分子化学物質によるアトピー性皮膚炎の発症と予防についての基礎研究 …………… 60  
岐阜薬科大学 永井 博式
- ・ 酸化ストレスにより生体膜に生成する酸化型リン脂質の代謝機構の解明 …………… 67  
北里大学薬学部 中川 靖一
- ・ アレルギー性接触皮膚炎成立の必要条件となるハプテンによる成熟分化機構の解析 …………… 72  
東北大学医学部 相場 節也
- ・ 免疫不全マウス再構成皮膚における培養毛乳頭細胞による  
毛包形成誘導と関連因子の検討 …………… 79  
聖マリアンナ医科大学 窪田 泰夫
- ・ 細胞増殖因子および接着分子による皮膚硬化制御に関する分子生物学的研究 …………… 86  
獨協医科大学 山蔭 明生

#### III. 精神、文化に関する分野

- ・ シルクロードの十字路口に誕生した化粧皿とその文化の研究  
—古代ガンダーラにおける化粧皿の誕生から終わりまで— …………… 94  
神戸芸術工科大学芸術工学部 服部 等作

・ 化粧品の表示に関する研究 ―ことに警告表現について― .....107  
慶應義塾大学商学部 吉川 肇子

■ 記念講演

平成9年度記念講演 『化粧品技術の変遷』～育毛剤・整髪料を事例に～ .....117  
コスメトロジー研究振興財団 小林 禮次郎

■ コスメトロジー研究雑感 .....123

■ 付 録

平成9年度事業報告 .....135  
役員一覧 .....141  
研究助成課題一覧 .....142



# 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

# 材料表面－生体分子相互作用の直接解析に基づく 生体適合性の発現機構の解明

九州大学大学院工学研究科

高 原 淳

The n-octadecyltrichlorosilane (OTS,  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{SiCl}_3$ ), the [2-(perfluorooctyl)ethyl]trichlorosilane (FOETS,  $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_7\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiCl}_3$ ) and their mixed monolayers were used as the model surfaces for the study of protein adsorption mechanism. The ATR-FT IR flow cell study on protein adsorption behavior revealed that the adsorption amount of bovine serum albumin (BSA) onto each OTS and FOETS monolayer increased remarkably in an initial stage of adsorption experiment and attained an equilibrium within a few minutes at pH=7.5. In the case of the (OTS/FOETS) mixed monolayer, the amount of protein adsorption was apparently suppressed in comparison with the case for the OTS and the FOETS monolayers. The atomic force microscopic (AFM) observation of BSA adsorption behavior onto monolayer surface in a BSA solution at pH=7.5 showed that BSA was preferentially adsorbed onto the FOETS phase of the (OTS/FOETS) mixed monolayer. In contrast, the selective adsorption of BSA onto the FOETS phase was not observed at the isoelectric point of BSA (pH=4.7). The interaction between BSA and the surface of (OTS/FOETS) mixed monolayer was evaluated on the basis of the adhesion force measurement by AFM. When the gold-coated tip was used as a control experiment, the adhesion force between tip and surface was less than 1 nN. In the case of the BSA immobilized tip, the adhesion force was ca. 5 nN and showed multiple minima in retract curve because of the multi-point contacts of BSA with the monolayer surface or the chain unfolding of BSA.

## 1 緒 言

人工材料が体液と接触した場合、材料表面にはまず体液中のタンパク質が吸着し、その後、細胞との相互作用が起こる。このため、材料表面の化学構造すなわち親水性、疎水性、荷電、結晶性及びマイクロ相分離構造などがどのようにタンパク質吸着挙動に影響するかを解明することは抗血栓性材料をはじめとする生医学材料を設計するための基礎的な知見となる。高分子表面への生体成分の吸着に関する研究が活発に行われているが、医用材料として最も実用化が進んでいるセグメント化ポリウレタンなどの多相系高分子では表面構造が環境に依存して再編成を示すため、表面構造の制御は極めて困難である<sup>1)</sup>。高分子材料の生体適合性の発現機構を解明するためには、表面組成が明確で、表面構造の経時変化のない安定なモデル表

面が必要となる。

一般に、両親媒性化合物からなる単分子膜は、膜調製を水面上で行うため、分子レベルでの配向制御が可能である。しかしながら、環境の変化に伴い表面構造が不安定になるため、特に水中での応用には耐えることが出来ない。著者らは、水面上で有機シラン化合物を重合し、基板上に固定化するという新規な高分子化単分子膜調製法で水中でも安定な疎水性表面が形成できることを見いだした<sup>2-8)</sup>。有機シラン単分子膜は分子間で二次元的に重合し、さらに単分子膜と基板の間に共有結合及び多重の水素結合を形成するため、環境変化に対して安定で表面構造再編成を示さない単分子膜を形成する<sup>2)</sup>。したがって、ラングミュアー法により調製された有機シラン単分子膜は、タンパク質吸着挙動の研究における高分子モデル表面として非常に有用である。

本研究では、表面構造を制御した安定な固定化有機トリクロロシラン単分子膜をラングミュアー法により調製し、その表面へのタンパク質の吸着挙動を多重全反射赤外吸収分光 (ATR-FT-IR) フローセル測定及び原子間力顕微鏡 (AFM) 観察に基づき評価した。さらにタンパク質修飾カンチ



Elucidation of Mechanism of Biocompatibility on the basis of the Direct Analysis of Interaction between Materials Surface and Biological Components

Atsushi Takahara

Graduate School of Engineering,  
Kyushu University, Higashi-ku,  
Fukuoka 812-8581, Japan

レバーを用いて探針と有機トリクロロシラン単分子膜表面間に働く力を評価した。

## 2 実験

有機シラン化合物としてアルキル基を疎水基に有する *n*-octadecyltrichlorosilane (OTS)、及び表面自由エネルギーの低いフルオロアルキル基を疎水基に有する [2-(perfluorooctyl) ethyl] trichlorosilane (FOETS) を用いた。Fig. 1 はラングミュア－法による有機シラン単分子膜の調製過程の模式図である。水面上で重合した OTS、FOETS 単分子膜及び (OTS/FOETS) 混合単分子膜を垂直引き上げ法により水酸化処理を施したシリコンウェハー上に移し取り、固定化した<sup>2-8)</sup>。フローセルを組み込んだ赤外吸収装置を使用し、ATR-FT-IR 法<sup>9, 10)</sup>により単分子膜の表面と牛血清アルブミン (BSA) の相互作用を検討した。表面に単分子膜を固定化したシリコンプリズムをフローセルに設置し、BSA リン酸緩衝溶液 ( $10\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) を流動させ、赤外吸収差スペクトルの経時変化を追跡した<sup>4)</sup>。また、AFM 観察によりタンパク質吸着挙動を評価した。単分子膜を固定したシリコンウェハーを  $20\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  の BSA 溶液に浸漬し、BSA 溶液浸漬後の試料を空气中で乾燥後、タッピングモードで AFM 観察を行った。BSA と (OTS/FOETS) 混合単分子膜との相互作用はリン酸緩衝液中での BSA 固定化探針と単分子膜表面間に働くフォースカーブ測定に基づき評価した。金蒸着した AFM のカンチレバーチップの表面に 3,3-ジチオビス (プロピオン酸スクシンイミジル) (DSP) を吸着させ、さらに BSA を DSP と反応させ固定化した<sup>11)</sup>。

## 3 結果と考察

### 3.1 混合単分子膜の表面構造

電子線回折 (ED) 像観察により、OTS 及び FOETS 単分子膜は室温においてそれぞれ結晶性及び非晶性であることが明らかとなった<sup>2-8)</sup>。また、AFM 観察よりこれらの単分子膜は nm レベ

ルで平滑な表面構造を有することが明らかである。Fig. 2 は (OTS/FOETS)(a)(25/75)、(b)(50/50) 及び (c) (75/25) 混合単分子膜の AFM 像である。基板上に単分子膜が固定化されていることを X 線光電子分光測定及び多重全反射赤外分光測定により確認した<sup>2)</sup>。(OTS/FOETS) 混合単分子膜は海島状のドメイン構造を示した。AFM 像の高さプロファイルより評価した島状ドメインとマトリクスの高さの差は約 1.3nm であり、これは OTS と FOETS の分子長の差に対応している。また、島状ドメインの数及び寸法は OTS の分率とともに増加した。島状ドメインの占める面積比は  $\pi$ -A 曲線からの分子極限占有面積より計算される OTS 成分の面積比と一致した。これらの事実から円柱状ドメインは OTS 成分であり、マトリクスは FOETS 成分であると結論できる。また、Fig. 2 (c) の (OTS/FOETS) (75/25) 混合単分子膜の場合、OTS の分率が 75 モル%でも OTS 成分はマトリクスを形成せず、依然として円形のドメインを形成した。さらに、(OTS/FOETS) (75/25) 混合単分子膜の OTS 成分の結晶化が ED 像観察により確認された。結晶 (10) 面間隔は約 0.42nm であり、OTS 単独単分子膜のそれとよく一致した。また、アルキル基を有するシラン化合物同士の混合単分子膜である (OTS/*n*-dodecyltrichlorosilane (DDTS) (非晶性)) 混合単分子膜においても、相分離構造が確認された<sup>4)</sup>。これらの結果より、OTS 成分の結晶化が (OTS/FOETS) 混合単分子膜の相分離の駆動力であると結論できる。

### 3.2 ATR-FT-IR フローセル法による単分子膜表面への BSA 吸着挙動の評価

ラングミュア－法により調製した有機トリクロロシラン単分子膜は、分子配向が制御されており、環境変化に対して安定な表面構造を有するため、タンパク質の吸着実験に適している。有機トリクロロシラン単分子膜と BSA の相互作用を ATR-FT-IR フローセル法に基づき検討した。OTS 及び FOETS 単分子膜及び (OTS/FOETS) 混合単分

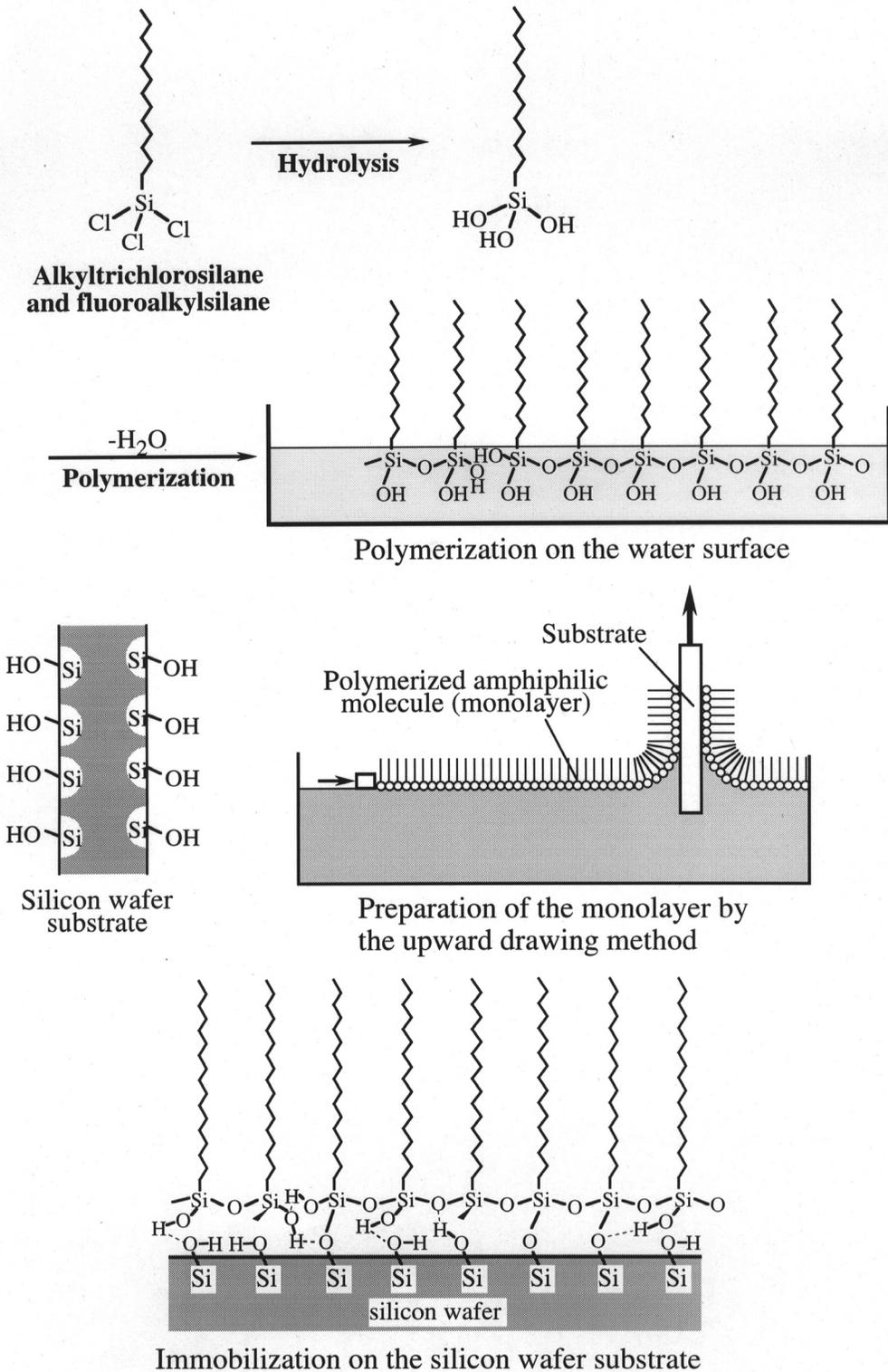


Fig. 1 Schematic representaion of preparation process of organotrichlorosilane monolayer.

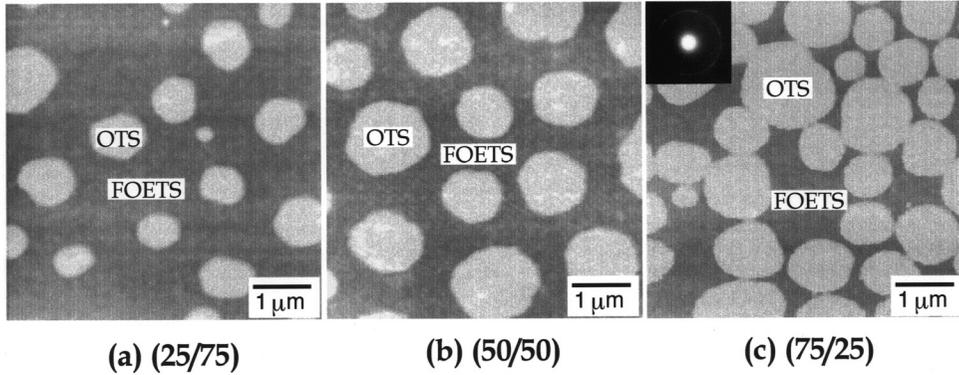


Fig. 2 AFM images of the (OTS/FOETS) (a) (25/75), (b) (50/50), (c) (75/25) mixed monolayers.

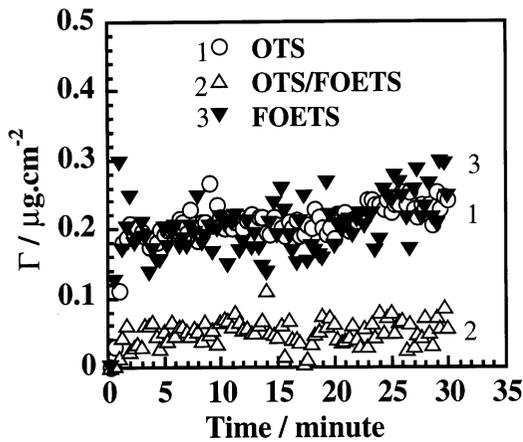


Fig. 3 Variation of amount of adsorbed BSA on the surfaces of the OTS, FOETS monolayers and (OTS/FOETS) mixed monolayer immobilized onto the Si IRE with time.

子膜をシリコン単結晶の内部反射エレメント上に垂直引き上げ法により固定化した。Fig. 3はATR-FT-IRフローセル法により評価した種々の有機トリクロロシラン単分子膜表面へのBSAの吸着量の経時変化である<sup>5, 6)</sup>。流動させたBSAの溶液濃度は、 $10\text{mg mL}^{-1}$ である。BSAの吸着量は、 $1550\text{cm}^{-1}$ に観測されるamide IIの吸収強度から計算した。有機トリクロロシラン単分子膜表面へのBSA吸着量は吸着初期から高い値を示し、10分以内で吸着平衡に到達した。OTS及びFOETS単分子膜表面へのBSAの平衡吸着量は $0.18 \sim 0.20\mu\text{g cm}^{-2}$ であったのに対し、(OTS/FOETS)混合単分子膜では $0.05\mu\text{g cm}^{-2}$ 程度であり、相分離単分子膜表面へのBSAの吸着は抑制されるこ

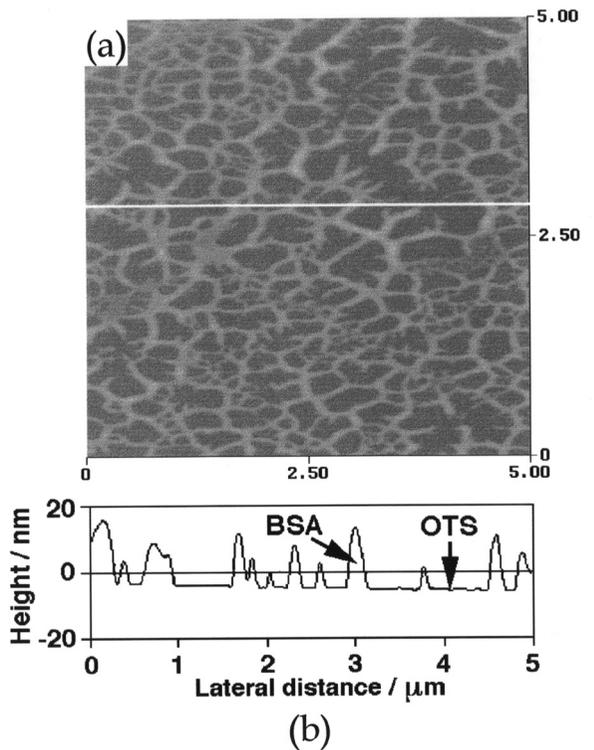


Fig. 4 (a) Tapping mode AFM image of the OTS monolayer surface after exposure to a BSA  $0.1\text{mg mL}^{-1}$  solution in PBS (pH=7.5) at 293 K for 10 min and (b) the height profile along the line shown in (a).

とが明らかとなった。これは、(OTS/FOETS)混合単分子膜表面が表面自由エネルギーの異なる相から構成される相分離構造を有していることと相関があると考えられる。この吸着機構に関しては、AFM観察の結果に基づき次節で詳細に議論する。

### 3.3 AFM 観察による有機トリクロロシラン単分子膜表面への BSA 吸着挙動の評価

OTS 及び FOETS 単分子膜及び (OTS/FOETS) 混合単分子膜表面への BSA の吸着状態 (分布及び配向状態) の AFM 観察を行った。Fig. 4(a)は、 $0.1\text{ mg mL}^{-1}$  BSA の PBS 溶液へ室温で 10 分間浸漬した後の OTS 単分子膜表面のタッピングモードでの AFM 像及び (b) 白線部分の高さプロファイルである。像中明るい部分は OTS 単分子膜表面に吸着した BSA に相当する。Fig. 4(a)より、BSA は OTS 単分子膜表面に二次元網目状に吸着することが明らかとなった。また、Fig. 4(b)より、BSA 吸着層の厚みは約  $14\text{ nm}$  であった。X 線構造解析に基づき BSA は  $4.1 \times 14.1\text{ nm}^2$  の回転楕円体であることが明らかにされている<sup>12, 13)</sup>。本吸着実験では BSA を有機トリクロロシラン単分子膜表面へ吸着した後、PBS によりリンスを行っているため、弱い相互作用で吸着している BSA はリン

スにより除去され则认为られる。以上の結果は、BSA は OTS 単分子膜表面へ end-on の状態で吸着していることを示唆している。

Fig. 5(a)は、 $0.1\text{ mg mL}^{-1}$  BSA の PBS 溶液へ室温で 10 分間浸漬した後の FOETS 単分子膜表面のタッピングモードでの AFM 像及び (b) 白線部分の高さプロファイルである。AFM 像より BSA は FOETS 単分子膜表面に均一に吸着することが明らかである。吸着層の厚みを評価するため、コンタクトモードでカンチレバーに斥力をかけた状態で走査を行うことにより吸着した BSA を除去し穴を形成させた (Fig. 5(c))。像中暗い部分は FOETS 単分子膜表面に対応する。Fig. 5(d)はそのラインプロファイルである。BSA 吸着層の厚さは約  $4\text{ nm}$  であったことから、BSA は FOETS 単分子膜表面に side-on の状態で吸着していることを示唆している。

OTS 及び FOETS 単分子膜の単独系での吸着

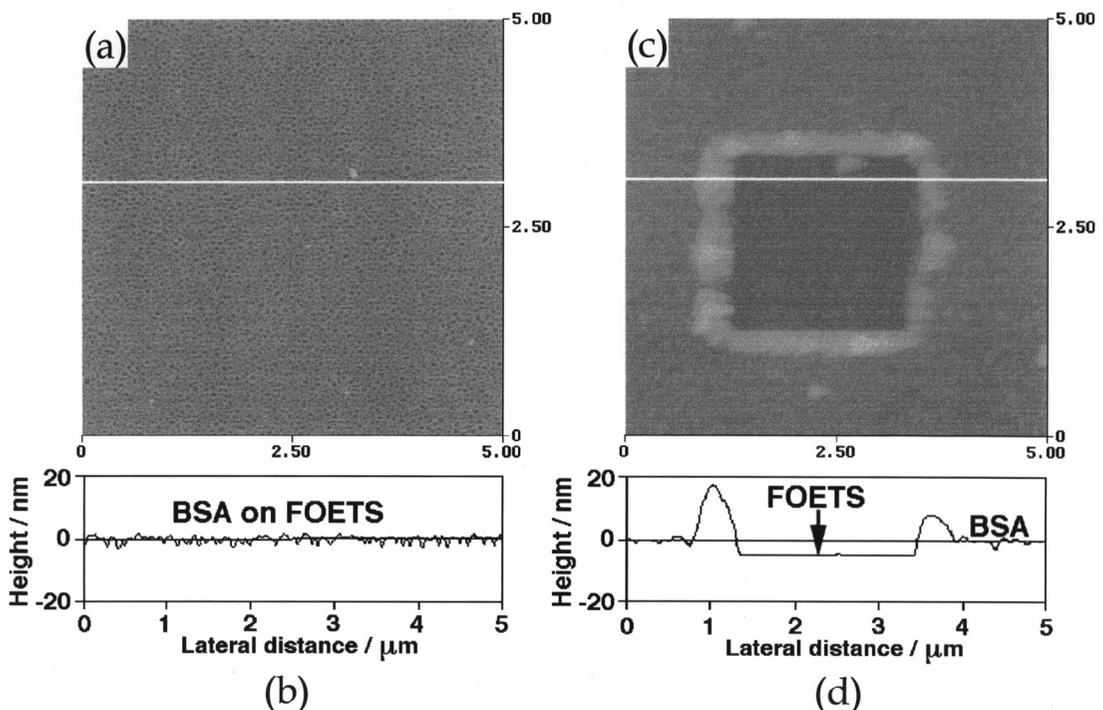


Fig. 5 Tapping mode AFM image of the FOETS monolayer surface after exposure to a BSA  $0.1\text{ mg mL}^{-1}$  solution in PBS (pH=7.5) at 293 K for 10 min and (b) the height profile along the line shown in (a). The square hole at center of the image shown in (c) was formed by operating AFM in the constant mode at repulsive imaging force. (d) The height profile along the line shown in (c).

挙動について以下議論する。FOETS 単分子膜は OTS 単分子膜より表面自由エネルギーが低いいため、FOETS 単分子膜の水との界面自由エネルギーは OTS に比べて大きい値となる。FOETS 単分子膜表面に BSA は side-on の状態で吸着するため、BSA 分子と FOETS 単分子膜表面との接触面積は end-on の状態で吸着する OTS 単分子膜の場合のそれと比較して大きい。また、CD スペクトル測定より、BSA は界面自由エネルギーが大きい FOETS 単分子膜への吸着の場合の方がより大きなコンホメーション変化が生じていることが明らかになっている<sup>6)</sup>。したがって、BSA 分子は OTS 単分子膜表面と比較して、FOETS 単分子膜表面へより強固に吸着していると結論できる。

Fig. 6 (a)は、 $0.1\text{mg mL}^{-1}$  BSA の PBS 溶液 (pH=7.5) へ室温で 10 分間浸漬した後の (OTS/FOETS) 混合単分子膜表面のタッピングモードでの AFM 像及び (b) 白線部分の高さプロファイルである。BSA は side-on の状態で FOETS 相のみに選択的に吸着した。ATR-FT-IR フローセル法から得られた結果と対応させるため、BSA の濃度を  $10\text{mg mL}^{-1}$  として同様な観察を行った結果、 $0.1\text{mg mL}^{-1}$  の場合と同様、BSA の FOETS 相への選択吸着が観測された<sup>6)</sup>。このように、(OTS/FOETS) 混合単分子膜における FOETS 相への BSA の選択吸着は BSA の溶液濃度に強く依存しない。また、in situ AFM 観察より、FOETS マトリクス上の BSA の吸着面は時間とともに増加するが、OTS ドメイン上には BSA の吸着はほとんど起こらないことが明らかとなった。これらの結果より、(OTS/FOETS) 混合単分子膜表面における BSA の吸着の抑制は BSA の FOETS マトリクスへの選択吸着に起因すると結論できる。

タンパク質分子と単分子膜表面間における相互作用の強さは疎水基を水界面に配向した有機トリクロロシラン単分子膜の場合、疎水性相互作用に強く依存する。また、BSA の等電点は pH=4.7 付近であり、pH=7.5 では BSA は負に荷電しているため、BSA 分子間のイオン反発は BSA の吸着状

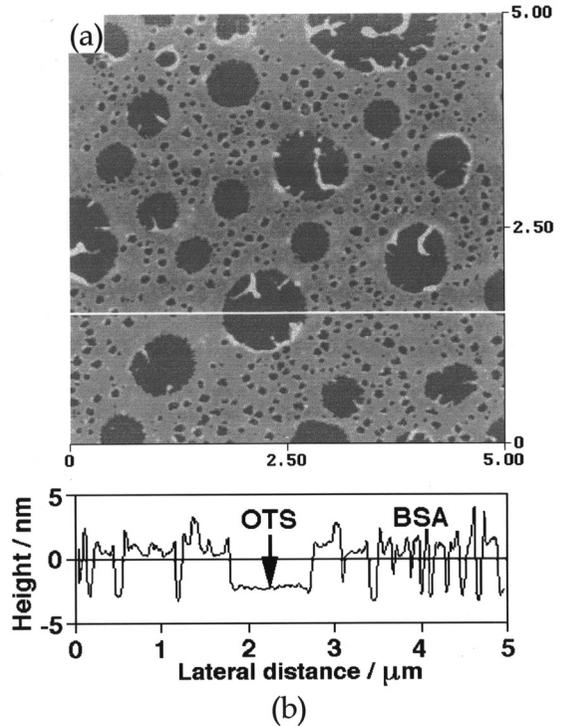


Fig. 6 (a) Tapping mode AFM image of the OTS monolayer surface after exposure to a BSA  $0.1\text{mg mL}^{-1}$  solution in PBS (pH=7.5) at 293 K for 10 min and (b) the height profile along the line shown in (a).

態に大きな影響を与えられ。さらに、疎水性の単分子膜表面と水との間の界面自由エネルギーを極小にするために、BSA が単分子膜表面に吸着する際、大きなコンホメーション変化が生じる必要がある。Fig. 7 は (OTS/FOETS) 混合単分子膜における BSA の FOETS 相への選択吸着過程の模式図である。(OTS/FOETS) 混合単分子膜の場合、OTS 相あるいは FOETS 相への BSA の吸着挙動は、BSA と単分子膜表面との相互作用と吸着された BSA と溶液中に存在する BSA との静電的反発に依存すると予想される。吸着の初期過程において、BSA が FOETS 相に吸着されると、OTS 相に吸着した場合と比較してより大きな界面自由エネルギーの低下が生じるため、FOETS 相への優先的な吸着が生じる。吸着の進行に伴い、FOETS 相に吸着した BSA はコンホメーション変化することで定常状態に到達する。一方、OTS

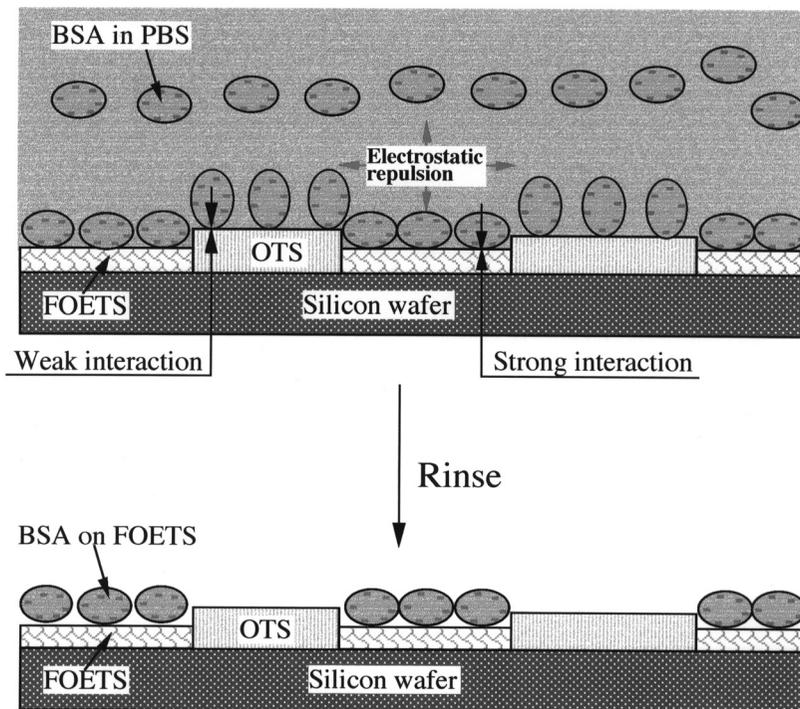


Fig. 7 Schematic representation of preferential adsorption of BSA onto the FOETS phase in the (OTS/FOETS) mixed monolayer.

相においては BSA と OTS 単分子膜表面間の弱い疎水性相互作用及び FOETS 相に吸着された BSA と溶液中にある BSA との間の静電的反発のため、BSA は end-on で吸着し接触面積と吸着相互作用はより小さい。このため、OTS 相に吸着した BSA はリンスにより容易に除去され、OTS 相への BSA の吸着はほとんど観測されなかったと考えられる。

この選択吸着機構を確認するため、BSA の等電点である  $\text{pH}=4.7$  の条件で (OTS/FOETS) 混合単分子膜表面への BSA の吸着挙動を評価した。Fig. 8(a)は、 $0.1\text{mg mL}^{-1}$  BSA の PBS 溶液 ( $\text{pH}=4.7$ ) へ室温で 10 分間浸漬した後の (OTS/FOETS) 混合単分子膜表面のタッピングモードでの AFM 像及び (b) 白線部分のラインプロファイルである。等電点  $\text{pH}=4.7$  の場合、 $\text{pH}=7.5$  と同じ吸着時間では、BSA はより速い速度で単分子膜表面に吸着した。また、Fig. 8 より明らかなように、静電

的反発がない状態では、BSA 分子は OTS 相及び FOETS 相に均一に吸着することが明らかとなった。この結果は、混合単分子膜表面の BSA 吸着において、BSA 分子間の静電的反発は、選択吸着の発現の重要な要因であることを示している。したがって、(OTS/FOETS) 混合単分子膜における  $\text{pH}=7.5$  での BSA の FOETS 相への選択吸着は、単分子膜表面と水溶液間の界面自由エネルギーの極小化と負に荷電した BSA 分子間の静電的反発により発現していると結論できる。

### 3.4 タンパク質と相分離表面間に働く力

AFM はチップと表面に働く力を高精度で検出することが出来る。AFM を用いて BSA 固定化チップと単分子膜表面間に働く力を測定した。Fig. 9 はリン酸緩衝液中で AFM により測定した金蒸着チップ及び BSA 固定化チップと混合単分子膜の OTS 相と FOETS 相との間働く典型的なフォ

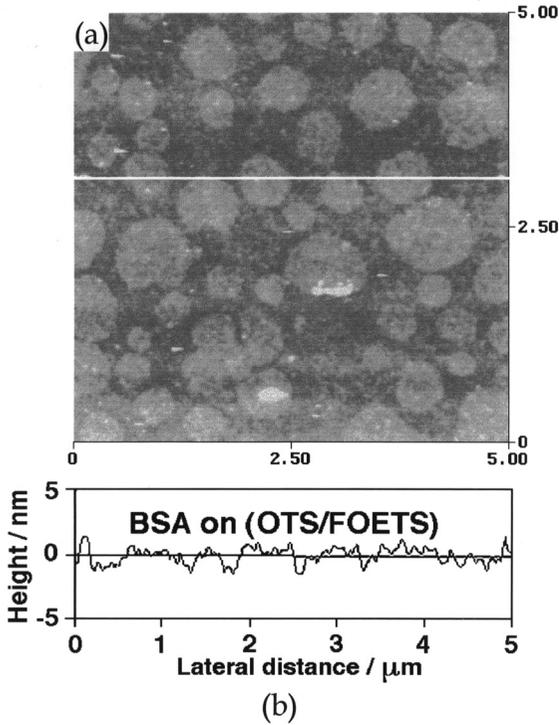


Fig. 8 (a) Tapping mode AFM image of the (OTS/FOETS) mixed monolayer surface after exposure to a BSA  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$  solution in PBS (pH=4.7) at 293 K for 10 min and (b) the height profile along the line shown in (a).

ースカーブである。チップと単分子膜との相互作用はチップが単分子膜表面から離れていく際の凝着力から評価できる。BSAを固定化していない金蒸着チップの場合、凝着力が1 nN以下であったが、BSA固定化チップを用いた場合は5 nN程度であった。また、金蒸着チップでは凝着力が単一ピークを示すが、BSA固定化チップでは多数の極小値を示した。これはBSA分子の単分子膜表面との多点接触あるいはBSAの分子鎖のunfoldingと関連するものと考えられる。これらの結果は、BSAとOTS相あるいはFOETS相の間に働く凝着力の値には大きな差はなく、むしろpH = 7.5でのBSAの負の帯電によるFOETSマトリクスに吸着したBSAと溶液中のBSAの静電的反発がBSAのFOETS相への選択吸着と関連していることを示唆している。

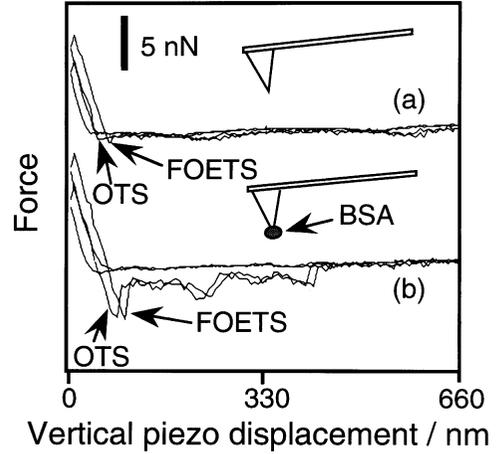


Fig. 9 Force-distance curves between AFM tip and OTS or FOETS phase in PBS. (a) unmodified tip (b) BSA immobilized tip.

#### 4 結論

ラングミュアー法により (OTS/FOETS) 混合単分子膜を調製すると相分離構造が形成されることを見いだした。この海島状相分離構造形成には構成成分の結晶化挙動が非常に重要な因子であることを明らかにした。ATR-FT-IR フローセル法及びAFM観察により、混合単分子膜へのBSA吸着挙動において、単分子膜表面と水溶液間の界面自由エネルギーの極小化と負に荷電したBSA分子間の静電的反発により、選択吸着が発現されることを明らかにした。

#### 参考文献

- 1) A. Takahara, N. J. Jo, and T. Kajiyama, Surface Molecular Mobility and Platelet Reactivity of Segmented Poly(etherurethaneureas) with Hydrophilic and Hydrophobic Soft Segment Components, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **1**, 19, 1989.
- 2) S. R. Ge, A. Takahara and T. Kajiyama, Aggregation Structure and Surface Properties of

- Immobilized Organosilane Monolayers Prepared by the Upward Drawing Method, *J. Vac. Sci. Technol.*, **A 12**, 2530, 1994.
- 3) S. R. Ge, A. Takahara and T. Kajiyama, Phase Separated Morphology of Immobilized Organosilane Monolayer Studied by Scanning Force Microscope, *Langmuir*, **11**, 1341, 1995.
  - 4) T. Kajiyama, S. R. Ge, K. Kojio and A. Takahara, Scanning Force Microscopic Study of Surface Structure and Properties of (Alkylsilane/Fluoroalkylsilane) Mixed Monolayers, *Supramolecular Science*, **3**, 123, 1996.
  - 5) A. Takahara, K. Kojio, S. R. Ge and T. Kajiyama, Scanning Force Microscopic Studies of Surface Structure and Protein Adsorption Behavior Organosilane Monolayers, *J. Vac. Sci. Technol.*, **A 14**, 1747, 1996.
  - 6) S. R. Ge, K. Kojio, A. Takahara, and T. Kajiyama, Bovine Serum Albumin Adsorption onto Immobilized Organotrichlorosilane Surface: Influence of Phase Separation on Protein Adsorption Behavior, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **9**, 131, 1997.
  - 7) K. Kojio, S.-R. Ge, A. Takahara, T. Kajiyama, Molecular Aggregation State of n-Octadecyltrichlorosilane Monolayer Prepared at an Air/Water Interface, *Langmuir*, **14**, 971, 1998.
  - 8) A. Takahara, S.-R. Ge, K. Kojio, T. Kajiyama, Scanning Force Microscopy of Surface Structure and Surface Mechanical Properties of Organotrichlorosilane Monolayers Prepared by Langmuir Method, *ACS Symposium Series Vol.694*, American Chemical Society, chapt 12, 1998.
  - 9) D. J. Fink, R. M. Gendreau, Quantitative Surface Studies of Protein Adsorption by Infrared Spectroscopy I. Correction for Bulk Concentrations, *Anal. Biochem.*, **139**, 140, 1984.
  - 10) W. G. Pitt, S. L. Cooper, FTIR-ATR Studies of the Effect of Shear Rate Upon Albumin Adsorption onto Polyurethaneurea, *Biomaterials*, **7**, 340, 1986.
  - 11) U. Dammer, M. Hegner, D. Anselmet, P. Wagner, M. Dreler, W. Huber, H.-J. Guntherodt, Specific Antigen/Antibody Interactions Measured by Force Microscopy, *Biophys. J.*, **70**, 2437, 1996.
  - 12) T. A. Horbett and J. L. Brach (Eds), *Protein at Interfaces*, ACS Symposium Series Vol. 602. American Chemical Society, Washington DC, 1995.
  - 13) T. Peters, Jr., Serum Albumin, *Adv. Protein Chem.*, **37**, 161, 1985.

# オリゴ糖による皮膚の耐乾燥保護の分子メカニズムに関する基礎的研究

東京工業大学 生命理工学部

井上 義夫

The molecular mechanisms of protective effects of oligosaccharides, such as trehalose, maltose, and sucrose, on the cells under highly dehydrated conditions, have been studied by using model phospholipid membrane as well as yeast cells. From the thermal and NMR analysis, and molecular dynamics simulation, anomalously high hydration ability of trehalose was elucidated.

## 1 緒言

生体内で糖質は、グリコーゲン／ブドウ糖などとして糖質のみで存在するものから、核酸や糖蛋白質などでの糖単位の場合のように分子の構成成分として存在するものまで様々な形態で存在し、エネルギー源、構造構築要素、分子認識相互作用要素などとして幅広い機能を担っている。

一般に、生物が生命活動を維持するためには水は不可欠と考えられるが、一方で高度脱水の状態でも長期間経過後、加水すると生命活動を再開する微生物が存在する。また凍結しても細胞が破壊されず生命を保持する微生物が存在する。このような極度乾燥あるいは凍結という物理化学的ストレスの存在する環境下で生命活動を維持するためには何らかの防御機構が必要である。パン酵母、原始的甲殻類 *Artemia* をはじめとする種々の微生物は、乾燥あるいは凍結という極限環境下に置かれると2分子のぶどう糖 (D-グルコース) が結合したオリゴ糖トレハロース (Glu  $\alpha$  1-  $\alpha$  1Glu ; 図1 参照) を多量に産出することが最近わかった。細胞に耐乾燥性・耐凍結性を付与するトレハロースの機能を

を解明することは、皮膚の乾燥保護・保湿剤などの化粧品素材、生体材料を長期安定保存する際の保存剤などとしてオリゴ糖を今後幅広く応用して

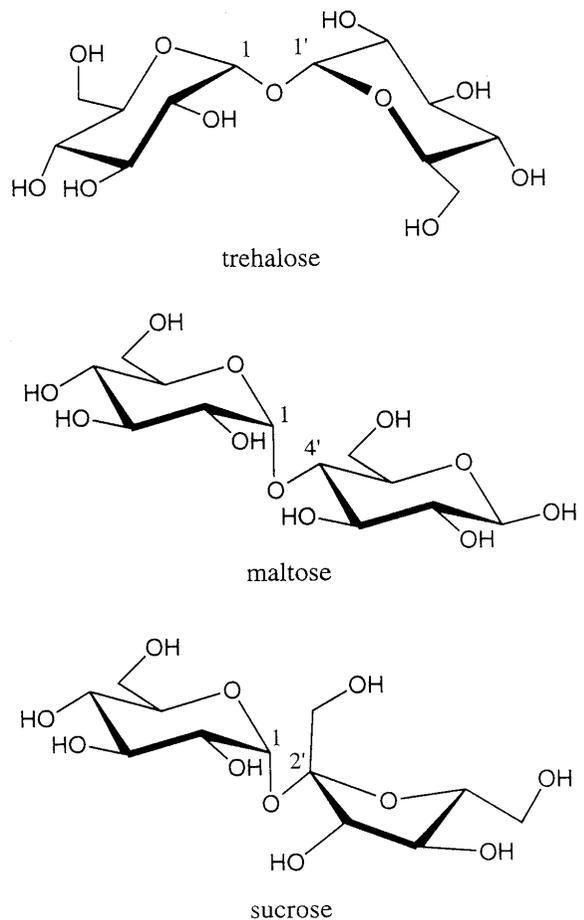


図1 トレハロース、マルトース、スクロース (上から)



Studies on Molecular Mechanisms of Protective Effects of Oligosaccharides on Skins and Cells in the Dry State

Yoshio INOUE

Faculty of Bioscience and Biotechnology  
Tokyo Institute of Technology

いくため、さらにはより優れた乾燥保護機能を持つ新規オリゴ糖誘導体を開発するために極めて重要なことと考えられる。しかし、トレハロースが細胞を保護する分子機構はまだほとんどわかっていない。

本研究の目的は、トレハロースおよび関連する種々のオリゴ糖と生体膜との相互作用を調べ、オリゴ糖、特にトレハロースが乾燥および凍結の際の細胞の破壊を防止する機構を分子レベルで解明するとともに、皮膚や細胞の耐乾燥保護能力がより優れた新たな糖誘導体を開発するための基礎的研究を行うことである。トレハロースの特異な耐乾燥細胞保護活性の機構を解明するためにはトレハロース、細胞および水の3者間の分子レベルでの相互作用を検討し、さらに結果を他のオリゴ糖について得られる結果と比較する必要がある。そこで本研究では、「オリゴ糖と水の相互作用の研究」と「モデル生体膜の耐乾燥安定性に対するオリゴ糖の効果の研究」の二つを重要研究項目とし、おもに示差走査熱量計と超伝導核磁気共鳴法(NMR)を使用した実験および分子動力学計算による理論的方法により研究を行った。

## 2 実験

市販のトレハロースとジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)を水分散状態で混合後、凍結乾燥することにより種々の含水率のトレハロース含有リボソームを調製した。

トレハロースを菌体内に含有する、および含有しない酵母菌体は旭化成工業(株)より提供された。示差走査熱計(DSC)測定はSEIKO/DSC20高感度装置を使用し、昇温速度5℃/分、温度範囲0~100℃にて行った。

核磁気共鳴(NMR)スペクトルと磁気緩和時間は日本電子製JEOL/GSX270装置を使用して測定した。

トレハロースとマルトースの水溶液の分子動力学シミュレーションはAmder4.0プログラムを使用し、分子科学研究所(岡崎)のTITAN3000V計

算機上で行った。トレハロースとマルトースの初期構造として結晶構造を使用した。糖水溶液として1糖分子と414~419水分子とから成る系を使用した。

## 3 結果と考察

### 3.1 オリゴ糖の水和特性

トレハロースが、細胞の乾燥による破壊を防ぎ、保護剤として働く作用機構については、モデル生体膜を使用した実験に基づいて現在二つの仮説が提案されている<sup>1, 2)</sup>。一つは水置換仮説であり、完全脱水状態においてトレハロースが細胞膜に直接結合し、含水状態での結合水の代役を果たすという説である。もう一つはガラス状態仮説である。これは、糖-水混合系が脱水、濃縮、乾燥に進む過程でガラス化し、その結果細胞膜はマイクロカプセルともいべき状況の中に閉じ込められ、その時点での状態が固定・凍結されてしまうという説である。

乾燥状態でトレハロースが細胞膜モデルであるリン脂質二分子膜の表面に直接結合することを示す多くの実験事実がすでにあるが、すべての結果が水置換仮説を必ずしも支持しているわけではない。例えば、リン脂質二分子膜のゲル-液晶転移温度 $T_m$ の乾燥に伴う上昇を抑える添加糖の効果を糖-膜間相互作用の強さの一つの指標として使用し、凍結乾燥後のDPPCリボソームの $T_m$ を比べてみると、DPPC単独時の112℃は単糖グルコース、ガラクトースを添加するとそれぞれ44.9、44.1℃に、二糖トレハロース、マルトース、スクロース(図1参照)を添加するとそれぞれ25.4、26.0、28.7℃になる<sup>3)</sup>。すなわち、二糖は単糖に比べると優れた $T_m$ 抑制効果を持つが、トレハロースが二糖の中で際立った抑制効果を示しているとは言えない。

二糖の水溶液系のガラス転移温度 $T_g$ はスクロース<マルトース<トレハロースの順に高くなり、濃縮が進むとトレハロースの場合 $T_g$ 値は室温付近まで上昇する<sup>4)</sup>。 $T_g$ が高いことはガラス化がよ

り容易に起こることを示し、乾燥保護剤として有利であることを示す。

水置換仮説とガラス状態仮説のいずれが正しいにせよ、糖の生体膜保護作用は糖と膜、糖と水および膜と水との間の相互作用が密接に関与する現象である。生体膜の乾燥保護でのトレハロースの特異性に注目するならば、これら3相互作用の中でも特に糖-水間相互作用を重視することは妥当であろう。本研究では水和という観点からトレハロースを含む数種のオリゴ糖の性質を調べた。

DSCにより決定した1分子当たりの不凍水量はトレハロース、マルトース、スクロースでそれぞれ7.95、6.50、6.33であり3糖のなかでトレハロースが一番大きかった<sup>5)</sup>。不凍水は、糖と相互作用するためにバルク水が作る水素結合網に参加できない水分子のことを示す。

さらに、糖水溶液中の水分子の<sup>17</sup>O核スピン-格子NMR緩和時間を測定し、糖水和殻の水の動的水和数を評価した<sup>5)</sup>。動的水和数は糖分子のまわりで運動を制限されている水分子の数を示す。動的水和数はトレハロース、マルトース、スクロースでそれぞれ48.3、27.2、36.8となり、トレハロ

ースが最も大きな値を示している。すなわち、3種の二糖の中でトレハロースは水和殻の水分子の動的状態を安定化する能力が最も高い。熱分析と磁気緩和の実験から、トレハロースは静的にも動的にも水を強く束縛し、構造形成させる能力の高い糖であると言える。

トレハロースの特異的な水和特性を分子レベルで理解するために、マルトースとトレハロースの水溶液について分子動力学シミュレーションを行った<sup>6)</sup>。モデル水溶液を平衡化後40psにわたり分子動力学シミュレーションを行い、この間10fs間隔でトラジェクトリイを追跡し、糖分子の構造揺らぎと糖極性基周辺の水の動径分布関数を調べた。結果の一例として、グルコース単位の各O原子と近接水分子の酸素原子の間の動径分布関数において2.8オングストローム付近に現れる第一水和ピークの強度を表1に示した。O<sup>6</sup>の第一水和ピークの強度はマルトースよりもトレハロースの方が明らかに大きい。糖分子の全酸素原子の動径分布関数の第一ピーク強度の平均を計算した結果、トレハロースでは4.22であり、これはマルトースの4.17よりも大きい。図2はシミュレーション開始

表1 グルコース単位の各酸素原子の周りの水の動径分布関数における第一水和ピークの強度

Atom	Trehalose <sup>a)</sup>	Maltose A	
		Nonreducing	Reducing
O <sup>1</sup>	—	—	4.54
O <sup>2</sup>	4.26	3.99	4.17
O <sup>3</sup>	4.77	4.77	4.40
O <sup>4</sup>	3.59	4.39	—
O <sup>6</sup>	4.24	3.93	3.18
Average	4.22	4.17	
Observed $n_f$ <sup>b)</sup>	3.98	3.25	
$n_h$ <sup>c)</sup>	15.3	14.5	

a) Average values for the two glucose rings. b) Number of unfrozen water per residue. c) Number of hydration water.

20ps 経過後について、糖グリコシド結合酸素原子から5オングストローム以内の距離に存在する水分子をスケッチしたスナップショットである。トレハロースではグリコシド結合領域にはマルトースに比べてより多くの水分子が存在することが分かる。

分子動力学シミュレーションから糖 OH 基酸素原子の第一水和殻に存在する水分子の自己拡散係数  $D$  を計算した。温度 298 K での  $D$  値 ( $10^9 \times \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ ) の平均はトレハロースで 1.85、マルトースで 1.90 であり、いずれも純水の  $D$  値よりも小さい。

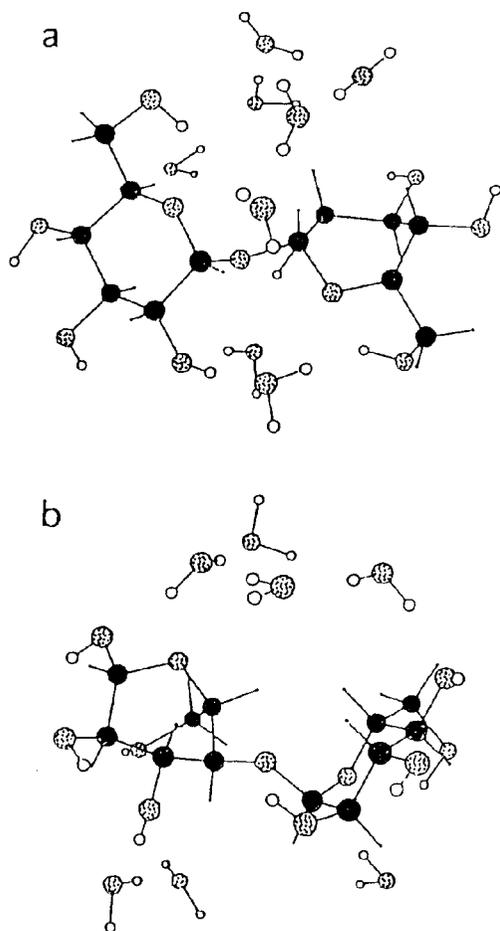


図2 MDシミュレーション開始20ps経過後における、糖グリコシド結合酸素原子から5オングストローム以内の距離に存在する水分子をスケッチしたスナップショット。a. トレハロース、b. マルトース

この結果は第一水和殻に存在する水分子の運動が純水中に比べて束縛されていることを示す。水和水分子の束縛は存在位置に大きく依存するが、平均するとマルトースよりもトレハロースの方が強いことも分かった。

分子動力学シミュレーションから、マルトースよりもトレハロースの方が周囲の水構造に及ぼす摂動が少し大きく、また水和能力が高いことが分かった。マルトースに比べてトレハロースでは分子内水素結合を作る確率が低く、トレハロースの水酸基は水との間の分子間水素結合を作ることにより安定化しようとする傾向が強くと、そのため周囲の水構造により大きな影響を与える。

### 3.2 オリゴ糖と生体膜の相互作用

前節で示した様に、幾つかの関連オリゴ糖の中でトレハロースの水和特性は特異的である。そこで、この特異的水和を示すトレハロースが水和系での生体膜の構造安定性に及ぼす効果を調べた。種々の濃度のトレハロースを含む水溶液中の卵黄レシチン単一層ベシクルでの二分子膜の状態を、 $^{31}\text{P}$ -NMRでの燐脂質 $^{31}\text{P}$ -コリンメチル $^1\text{H}$ 間核 Overhauser 効果 (NOE) を測定した<sup>7)</sup>。NOEは観測核の運動性と核間距離に依存する。NOEのトレハロース濃度依存性から、トレハロース濃度の増加に伴いベシクル内隣接燐脂質分子間の距離が接近すること、言い換えれば脂質膜のパッキング密度が大きくなることが示唆された。この結果は、トレハロースの添加により脂質膜のゲル-液晶転移温度が上昇するという実験結果<sup>8)</sup>と矛盾しない。ここで観測された脂質膜の構造安定性に対する効果が膜近傍に存在するトレハロースの特異的水和挙動により膜の水和が摂動を受けた結果であるとするならば、十分な量の水が存在する系でのトレハロース-生体膜間相互作用は水を介した間接的相互作用であると考えられる。

トレハロースの高い水構造形成能力が実際の細胞の中で発現されているかどうかを検証するために、トレハロース高産生性酵母について、細胞内

の水の  $^1\text{H}$ -NMR スピン-スピン緩和時間  $T_2$  を測定した<sup>9)</sup>。緩和時間の長さから、細胞内の水を運動性の極めて高い自由水 (成分C)、運動が高度に抑制された結合水 (成分A)、およびこれらの中間の状態にある水 (中間水: 成分B) の3種類に分けることが可能であった。培養条件を調整することによりトレハロースを全く含まぬ菌体と、乾燥菌体重量の8.1%のトレハロースを含む菌体が得られる。これらを凍結乾燥後、調湿し、乾燥菌体重量の1.91%~3.53%の水を含む細胞試料とした。NMR 緩和時間の解析から、成分A、B、Cの存在割合 (population) を決定した。トレハロース欠乏および含有酵母細胞について得られた結果をそれぞれ表2と3に示した。また、成分Bの存在割合の含水率依存性を調べた結果を図3に示した。検討した範囲の含水量では、自由水 (成分C) は全く存在しないこと、結合水 (成分A) の割合はトレハロースを含まぬ菌体では約50%であるがトレハロースを含む菌体では約80%にもなることがわかった。

菌体は種々の物質を含むので、ここで観測され

た水の存在状態がトレハロースのみの効果であるとは断言できない。そこで、DPPC モデル生体膜についても同様のNMR 緩和実験を行った結果、結合水の割合はトレハロース無しでは僅か20%であったがトレハロースの添加により80%まで増加することがわかった。

#### 4 総括

本研究ではオリゴ糖、特にトレハロースについて水和特性および生体膜との相互作用を調べた。トレハロースは、関連するオリゴ糖に比べて、静的ばかりでなく動的にも水と強く結合する能力の高い糖質であり、このトレハロースの特性は、水溶液中のみならず生体膜あるいは生体細胞系においても発現されていることが分かった。

蛋白質や生体膜などに強く結合した結合水は生体系の高次構造/複合構造を保つために必須な水である。トレハロースはこの必須の水分子を生体から逃さないということにより乾燥保護剤、あるいは保湿剤としての働きを示すのかもしれない。トレハロースを含有する生体中の結合水の存在部

表2 トレハロース欠乏酵母細胞のプロトンNMR 横緩和時間  $T_2$  と細胞水構造の含水率依存性

Water content <sup>a)</sup>	Component <sup>b)</sup>	Population <sup>c)</sup>	$T_2$ <sup>d)</sup>
%			ms
3.89	A	0.49	5.5
	B	0.51	54.
	C	0.0	
6.16	A	0.46	5.0
	B	0.54	56.
	C	0.0	
6.25	A	0.51	5.5
	B	0.49	55.
	C	0.0	

a) Weight fraction of the residual water to the dry cells.

b) Components A and B correspond to the bound and intermediate waters, respectively. c) Maximal errors, accompanied by the curve fitting analysis, are  $\pm 0.01$ .

d) Relative experimental errors are  $\pm 10\%$ .

表3 トレハロース含有酵母細胞のプロトンNMR横緩和時間 $T_2$ と細胞水構造の含水率依存性

Water content <sup>a)</sup>	Component <sup>b)</sup>	Population <sup>c)</sup>	$T_2$ <sup>d)</sup>
%			ms
1.91	A	0.77	3.3
	B	0.24	38.
	C	0.0	
2.15	A	0.76	3.3
	B	0.24	33.
	C	0.0	
2.67	A	0.77	3.3
	B	0.23	33.
	C	0.0	
3.53	A	0.77	3.5
	B	0.23	37.
	C	0.0	

- a) Weight fraction of the residual water to the dry cells.  
 b) Components A and B correspond to the bound and intermediate waters, respectively. c) Maximal errors, accompanied by the curve fitting analysis, are  $\pm 0.02$ .  
 d) Relative experiental errors are  $\pm 10\%$ .

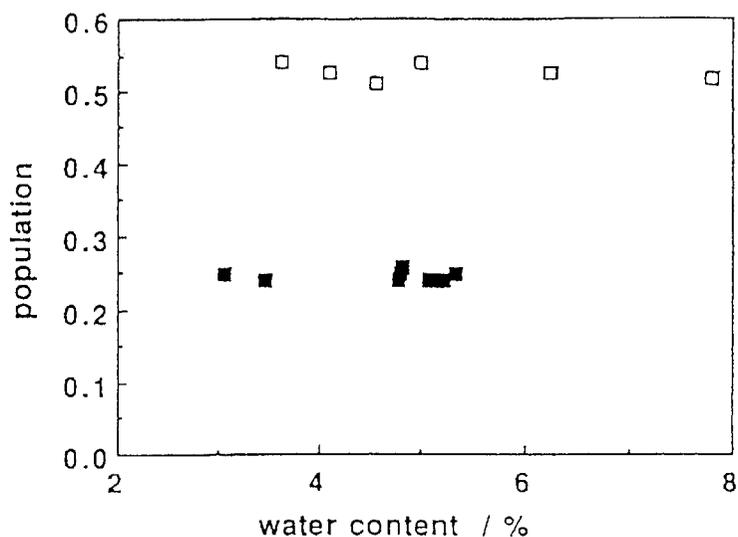


図3 酵母細胞中の中間水(表2、3の成分B)の組成の含水率依存性

位、あるいはこの結合水が乾燥あるいは凍結条件下の生体の生理に及ぼす効果などの解明は今後の研究課題である。

#### 引用文献

- 1) 櫻井実、井上義夫：細胞のストレス耐性と糖の役割、表面、34(4),213-219(1996)
- 2) 櫻井実、井上義夫：糖の水和とトレハロースの生理機能、生物物理、37(1), 326-330(1997)
- 3) Tanaka K.,Takeda T.,Fujii K.,Miyajima K.: Cryoprotective Mechanism of Saccharides on Freeze-drying of Liposome:Chem. Pharm. Bull.,40, 1-5(1992)
- 4) Green J. L. and Angell C. A.: Phase Relations and Vitrification in Saccharides-Water Solutions and the Trehalose Anomaly: J. Phys. Chem., 93, 2880-2882(1989)
- 5) Kawai H., Sakurai M., Inoue, Y., Chujo R.,and Kobayashi S.: Hydration of Oligosaccharides. Anomalous Hydration Ability of Trehalose: Cryobiology, 29, 599-606(1992)
- 6) Sakurai M., Murata M., Inoue Y., Hino A., and Kobayashi S.: Molecular Dynamics Study of Aqueous Solution of Trehalose and Maltose. Implication for the Biological Function of Trehalose: Bull. Chem. Soc. Jpn., 70, 847-858(1997)
- 7) Nishiwaki T., Sakurai M., Inoue Y.,and Chujo R.:Increasing Packing Density of Hydrated Dipalmitoylphosphatidylcholine Unilamellar Vesicles Induced by Trehalose: Chem. Lett., 1841-1844(1990)
- 8) Crowe L. M. and Crowe J. H.: Solution Effects on the Thermotropic Phase Transition of Unilamellar Liposomes: Biochim. Biophys. Acta, 1064,267-274(1991)
- 9) Sakurai M., Kawai H., Inoue Y., Hino A.,and Kobayashi S.: Effects of Trehalose on the Water Structure in Yeast Cells as Studied by in vivo  $^1\text{H}$  NMR Spectroscopy: Bull. Chem. Soc. Jpn., 68, 3621-3627(1995)

# 新発見の糊代を持ったタンパク質の基礎と応用 (タンパク質接着能を有する化粧品素材の開発)

東京工業大学 生命理工学部

広瀬 茂久

Trappins are a family of unique proteins that have recently been identified and shown to have an anchoring sequence at their N-termini through which they become covalently trapped at the site of action. A typical example of the trappin family members is the elastase inhibitor elafin which is composed of two domains: the N-terminal transglutaminase substrate domain or "cementoin" domain that serves as an anchoring sequence and the C-terminal inhibitor domain having a compact structure stabilized by four disulfide bonds and therefore called "four disulfide core" or "WAP motif". In this study, as summarized below, we characterized the cementoin moiety which has an important potential application in developing intelligent cosmetic materials and further carried out a series of basic research on trappins such as molecular evolution of trappins.

Two types of derivatives of the cementoin-like anchoring sequence of trappin-1 were produced and characterized. The cementoin-like sequence (cem) was first elongated by tandemly linking its cDNA and expressing it in *E. coli*. Using the genetically engineered cem-cem, the anchoring sequence rich in Gln, Lys, and Pro was shown to have a random coil structure and to serve as a good substrate for transglutaminase, a characteristic very useful for developing the biotechnology of protein cross-linking or protein gluing. As a second construct, we prepared a fusion protein of cem and green fluorescent protein (GFP). The useful properties of the component proteins are maintained in the fusion protein, namely we succeeded to prepare a fluorescent cementoin moiety that will be of special interest and importance in protein engineering.

Previous studies showed that trappin genes, especially of the pig, have undergone rapid evolution, producing trappins with a broad spectrum of action. To understand the evolution of such a rapidly evolving multigene family, we characterized the trappin genes and found that the intron sequences are homogenized by gene conversion. Similar mechanisms may also operate in the other genes whose intron sequences are conserved much higher than the exon sequences.

In summary, 1) using the newly discovered adhesive protein "cementoin" and its family members, we developed a powerful method for protein cross-linking. 2) The secondary structure of cementoin was determined using recombinant cementoin. 3) Fluorescent cementoin was prepared by fusing it with green fluorescent protein. 4) Evolution of cementoin family genes was clarified.

## 1 緒言

私たちは最近働き場所に共有結合でとどまるという風変わりなタンパク質を見つけトラップイン (Trappin) と命名した<sup>1-9)</sup>。働き場所にトラップされるという意味と次に述べるようにトランスグルタミナーゼ (Transglutaminase) の基質になるという意味からそう名付けた。cDNA 及び遺伝子をクローニングして構造を決定したところ、このタンパク質のN末端に糊代に相当する部分があるこ

とが分かった (図1)。すなわちN末端側にLysとGlnに富む繰り返し配列があり、この部分を介してトランスグルタミナーゼによって他のタンパク質に架橋されることが明らかになった。糊代に相当する部分に私たちはその働きにちなんで、セメントインと命名した<sup>4)</sup>。セメントインないしはその誘導体を利用すると、タンパク質の接着技術が開発できるのみならず、皮膚の保護剤や枝毛防止剤として化粧品の分野でも有用な素材になると考えられるので、本研究ではセメントインを遺伝子工学的に生産し、その性質を明らかにするとともに、応用の可能性を探った。また基礎の観点から特に興味を持たれるセメントイン部分の由来を明らかにするべく、遺伝子レベルで、詳細な分子進化学的な解析を行った。



Properties, evolution, and cosmetological aspects of trappins that have recently been discovered as a new protein family and shown to have anchoring sequences

Shigehisa Hirose

Department of Biological Sciences,  
Tokyo Institute of Technology

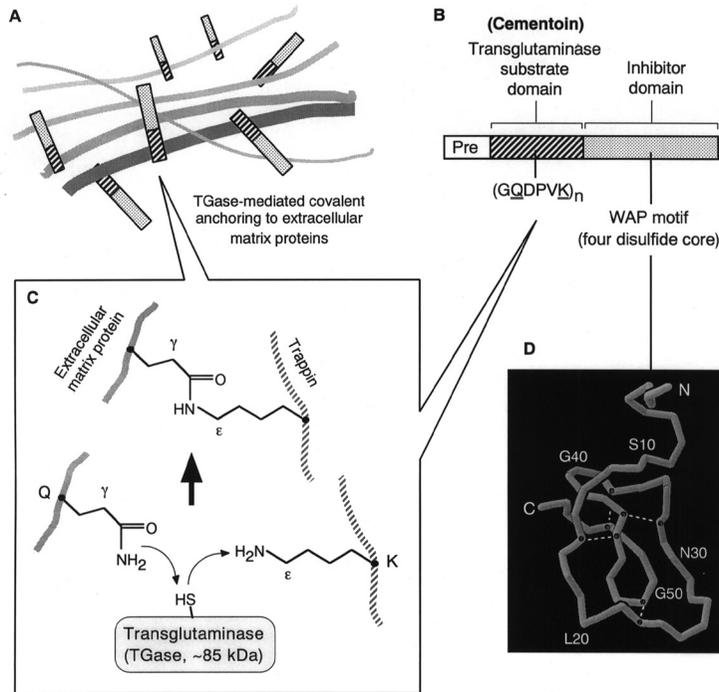


図1 Structural features of trappins. A) Covalent cross-linking of trappins to other proteins through the transglutaminase substrate domain. B) Domain structure of the trappin precursor. C) Mechanism of action of transglutaminase that catalyzes the formation of the isopeptide bond. Glutamine residue (Q) acts as an acyl donor and lysine (K) residue serves as an acceptor. The catalytic sulfhydryl group involved in the formation of an acyl-enzyme intermediate is also shown (for review, see Refs. 1 and 2). D) Three dimensional structure of the WAP motif of human trappin 2 (SKALP/elafin) determined by x-ray crystallography and NMR spectroscopy. Four disulfide bonds are indicated by broken lines.

## 2 実験

### 2.1 遺伝子工学的生産法と精製法

実験手順の概要を図2に示す。まず、Trappin ないしは Trappin のセメントイン部分をコードする cDNA を発現ベクター pMAL-p (New England Biolabs 社) に組み込み、大腸菌に導入し、マルトース結合タンパク質との融合タンパク質の形でペリプラズムに分泌されるようにした。このようにして作製した形質転換大腸菌を 4L の規模で 4~5 時間 振とう培養したのちに、IPTG で誘導をかけて、目的タンパク質を多量に作らせた。集菌後、Cold osmotic shock をかけて、ペリプラズム中のタンパク質を回収し、これをアミロース・レジン

を担体とするアフィニティーカラムにかけ精製した。約 20mg の目的産物がマルトース結合タンパク質との融合タンパク質の形で得られた。この精製標品にファクター Xa (プロテアーゼ) を作用させて、不要なマルトース結合タンパク質部分を切断除去し、ヒドロキシアパタイト・カラムに通すことにより簡便かつ効率よく目的物を得る方法を開発した。最終的な収量は約 5mg であった。

### 2.2 接着能の評価

上記のようにして得た Trappin ないしはセメントインに触媒量のトランスグルタミナーゼを作用させ、それらが架橋接着されて重合体になる様子を光散乱法及び SDS ポリアクリルアミドゲル電

電気泳動法によりモニターした。架橋接着反応の進行は、散乱光の増加ないしは電気泳動ゲル上の単体に相当するバンドが消失し多量体に相当する高分子量のところに新しくバンドが現れることにより検出できる。

### 2.3 その他

遺伝子工学的手法（プラスミドの調製, PCR, 塩基配列の決定), 抗体の作製, 免疫化学的組織染色, インサイチュハイブリダイゼーション等は通常の方法に従った。

## 3 結果と考察

### 3.1 セメントイン及びその同族分子の生産と性質

タンパク質の接着技術を確立する上で要となるセメントインを遺伝子工学的に大腸菌に作らせる系を構築し, セメントインの性質を明らかにした。同様に, 本研究を通して新たに発見した同族分子についても, 大腸菌を利用した発現系とアフィニティークロマトグラフィーによる精製系を確立した。このようにして得た産物は, 予想通り触媒量のトランスグルタミナーゼによって非常に効率よく架橋され, 優れたタンパク質接着能力を有することが確かめられた(図3)。

### 3.2 セメントインの2次構造

糊代として働くセメントイン領域は, 一次構造上は, LysとGlnに富む繰り返しの構造をとっていることが明らかになっているが, より高次の構造については不明である。そこで, 大腸菌で生産したセメントインを用いて二次構造の決定をおこなった。立体構造に関する情報は, セメントインの接着能を理解し, 応用に役立てるためには極めて重要である。

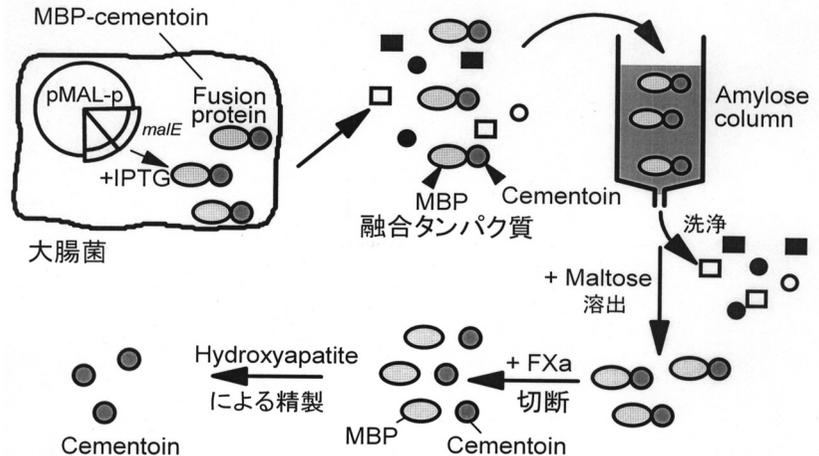


図2 糊代の役割をたすセメントインの遺伝子工学的生産と精製法の概要。

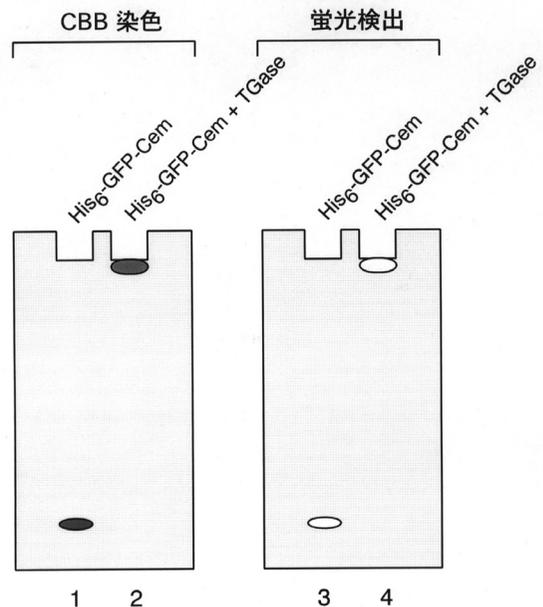


図3 蛍光性セメントイン (His6-GFP-Cem) の調製と評価。大腸菌用の発現ベクターにクラゲの蛍光タンパク質 (GFP) とセメントイン (Cem) の cDNA を組み込み, 産物をインクルージョン・ボディとして回収し, 尿素で可溶化後, Niキレートカラムにかけて精製した。精製標品を大の中性緩衝液で希釈後4°Cに5日間放置し, 蛍光性とした。低温で徐々に酸化させることにより蛍光を発するクロモフォアが形成されたものと推定される。トランスグルタミナーゼ (TGase) の添加により His6-GFP-Cem は速やかに架橋接着され, SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってはっきりと識できるほど高分子化した (レーン2と4)。GFPは, 一旦蛍光性になるとクロモフォアは極めて安定で SDS のような界面活性剤の存在下でも蛍光を失わないという利点を有する。

セメントインを大腸菌でマルトース結合タンパク質との融合タンパク質として発現させ、セメントイン部分のみを切り離し精製した後に、円偏光二色性(CD スペクトル)を測定することによって、二次構造である  $\alpha$  ヘリックス、 $\beta$  構造の含量を求めたところ、予想外に、特徴的な二次構造は持たず、ランダムコイル構造をとっていることが判明した。最初は  $\alpha$  ヘリックス構造が主ではないかと予想していたが、よく考えてみると、ランダムコイルの方がより効率よくタンパク質を架橋するのに適した構造といえそうである。

### 3.3 局在部位の同定

精製標品に対する抗体も作製し、ウエスタン分析や免疫組織化学やラジオイムノアッセイの開発に応用した。その結果、セメントイン及びセメントイン様接着分子は生体中では細胞外マトリックスタンパク質に架橋されて存在すること、気管や腸の上皮細胞に多く発現しており、血中にも存在することが明らかになった<sup>4, 6)</sup>。組織分布に関しては、RNase プロテクションアッセイによっても気管や腸に多いことを確かめた。さらにヒトのある種の病態 (Psoriasis, 乾癬) では、セメントインが異常に発現し、皮膚等の結合組織の病気になることが判明した<sup>5)</sup>。以上の結果は、本研究対象である接着因子が基礎及び応用の両面において、極めて重要な因子であることをよく物語っている。

私たちが最初に見つけた Trappin (Trappin-1) は、上述のように血中にも多量に存在するが、それがどこから来るのか不明であった。そこで、この問題を解く手がかりを得るために、インサイチュ ハイブリダイゼーションにより Trappin-1 の局在部位を決定した。ブタの小腸切片を用いて、Trappin-1 mRNA の局在を調べたところ、陰窩底部の内分泌細胞 (enteroendocrine cells) がきれいに染色された<sup>7)</sup>。エンテロエンドクリン細胞は、種々の腸管ペプチドを合成・分泌しており、ここで Trappin-1 が合成されている事実は、腸の陰窩が血中の Trappin-1 源であることを強く示唆す

る。

### 3.4 蛍光性セメントイン分子の作製

セメントインは期待どおり非常に優れたタンパク質の接着剤になることがわかったが、さらにセメントイン分子を標識することが出来れば利用価値は格段に上がる。そこで、最近よく利用されているクラゲ由来の蛍光性タンパク質 GFP (Green Fluorescent Protein) との融合タンパク質として発現させることを試みた。GFP の N 末端と C 末端にセメントインを結合させた融合タンパク質をデザインし、それぞれの N 末端に精製のためのヒスチジン・タグを付けて大腸菌で発現させた。いずれも不溶性のインクルージョンボディとして回収されたが、N 末端にセメントインを結合させたものでは、Renaturation 後も GFP の蛍光は戻らなかったため、C 末端にくっつけた His6-GFP-セメントインについて詳細に検討することにした。

His6-GFP-セメントインをインクルージョンボディとして回収し、6M 尿素で可溶化後、金属キレートカラムで精製した。精製標品を希釈法によって Renaturation し、低温に放置することにより蛍光を発するようにした。希釈時に、0.1%のポリエチレングリコール (MW6000) を共存させると Renaturation の効率が良くなることも見出した。

蛍光性とすることに成功した His6-GFP-セメントインにトランスグルタミナーゼを作用させると、His6-GFP-セメントインは容易に重合し高分子化した。すなわち His6-GFP-セメントインは、当初のもくろみどおり、蛍光性のタンパク質接着剤として機能することが確かめられた (図3)。最近では改良型 GFP として色調の異なるものも開発されており、私たちのセメントインと組み合わせれば魅力的な化粧品素材の一つになるものと期待されよう。

### 3.5 セメントイン遺伝子ファミリーの由来方と進化

セメントイン領域すなわち糊代を持った興味深

い一群のタンパク質が存在することを見つけ、それらの性質と応用の可能性について検討してきた。これらのタンパク質は皮膚等の上皮組織を守るという極めて重要な役割を担っていることから皮膚科学との関連においてもより詳細な生化学的・分子生物学的な研究を進めなければならないが、もう一つ明らかにしなければならない根本的問題がある。すなわち進化の過程でどのようにしてこのように風変わりな構造を持つタンパク質が登場したかという根源的問題にも答えなければならない。この問題解決の糸口を見つけるために、DNA データベースの検索をおこない、遺伝子構造の類似性等を比較検討したところ、セメントイン領域は REST 遺伝子の一部から派生し (図 4)、その後繰り返しの複雑な重複や除去等を経て、今日の姿になったことが明らかになった (図 4)<sup>11)</sup>。上述の Trappin 分子の遺伝子は、従って、

REST 遺伝子と Trappin の活性部位をコードしている WAP モチーフの先祖遺伝子がエクソン・シャッフリングすることによって出来たものと推定される。

トラッピン・ファミリーの進化系統樹を図 5 に示す。トラッピン・ファミリーのメンバーの数が動物種によって大きく異なるのも特徴であるが、ブタにおいてその傾向が特に強いので、ブタの近縁種 (イボイノシシ、ベッカリー、カバ) で詳細な解析を試みつつある (図 6)<sup>11)</sup>。この過程で、イボイノシシのトラッピン遺伝子を解析した際に、以下に述べるように、予想外の大発見をした。

Trappin 遺伝子は 3 個のエクソンと 2 個のイントロンから成る (図 6 A)。エクソン 1 は 5' 非翻訳領域と分泌シグナル (pre-sequence) をコードし、エクソン 2 はセメントイン領域とそれに続く WAP モチーフをコードし、エクソン 3 は 5' 非

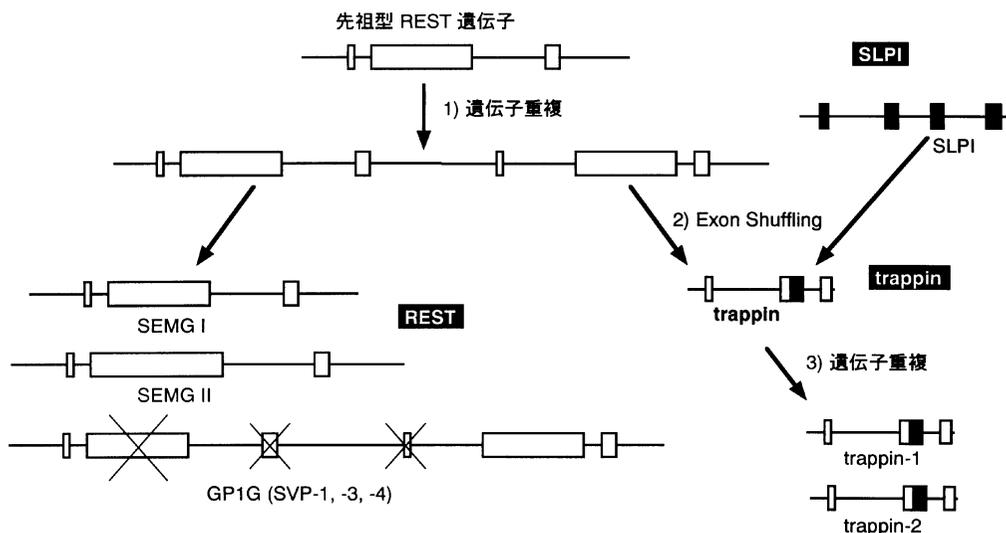


図 4 トラッピン (Trappin) 遺伝子の由来。トラッピン遺伝子は、REST 遺伝子と SLPI 遺伝子を起源とすることが明らかになった。REST は Rapidly Evolving Seminal vesicle Transcribed の略で、精囊で多くに作られている一群のタンパク質の総称であるが、セメントインのようにトランスグルタミナーゼの良い基質となり、架橋接着される。REST 遺伝子産物は、Seminal Vesicle secretory Protein ないしは Seminal Vesicle clotting Protein (SVP) あるいは Semenogelin (SEMG) と呼ばれる。SLPI は、Secretory Leukocyte Proteinase Inhibitor の略で、Antileukoproteinase (ALP) とも呼ばれる。SLPI に特徴的なことは、プロテアーゼインヒビター・ドメイン (WAP モチーフ) を 2 個持つことである。第 2 の WAP モチーフをコードするエクソン (exon 3) が REST 遺伝子の後半と一緒に、トラッピン遺伝子が出来たと考えられる。

翻訳領域をコードする。すべてのトラップイン遺伝子において、エクソン2の変異率が周りのイントロンに比べて極めて高く、これまでの分子生物学の常識では説明できない事実として注目を浴びている。一般的には機能的制約のないイントロンの方が変異しやすいと考えられ、実際にほとんどの遺伝子ではそうなっているので、トラップイン遺伝

子の場合イントロンの保存率が98%と異常に高い（エクソンは70%程度）のはなぜかがここ数年大問題となっていたわけである<sup>9)</sup>。私たちはイボイノシシのトラップイン遺伝子を解析中に、この問いに対する解答を得た。すなわち、ジーン・コンバージョンによってイントロンの配列が一定になるように置換されていることをジーン・コンバー

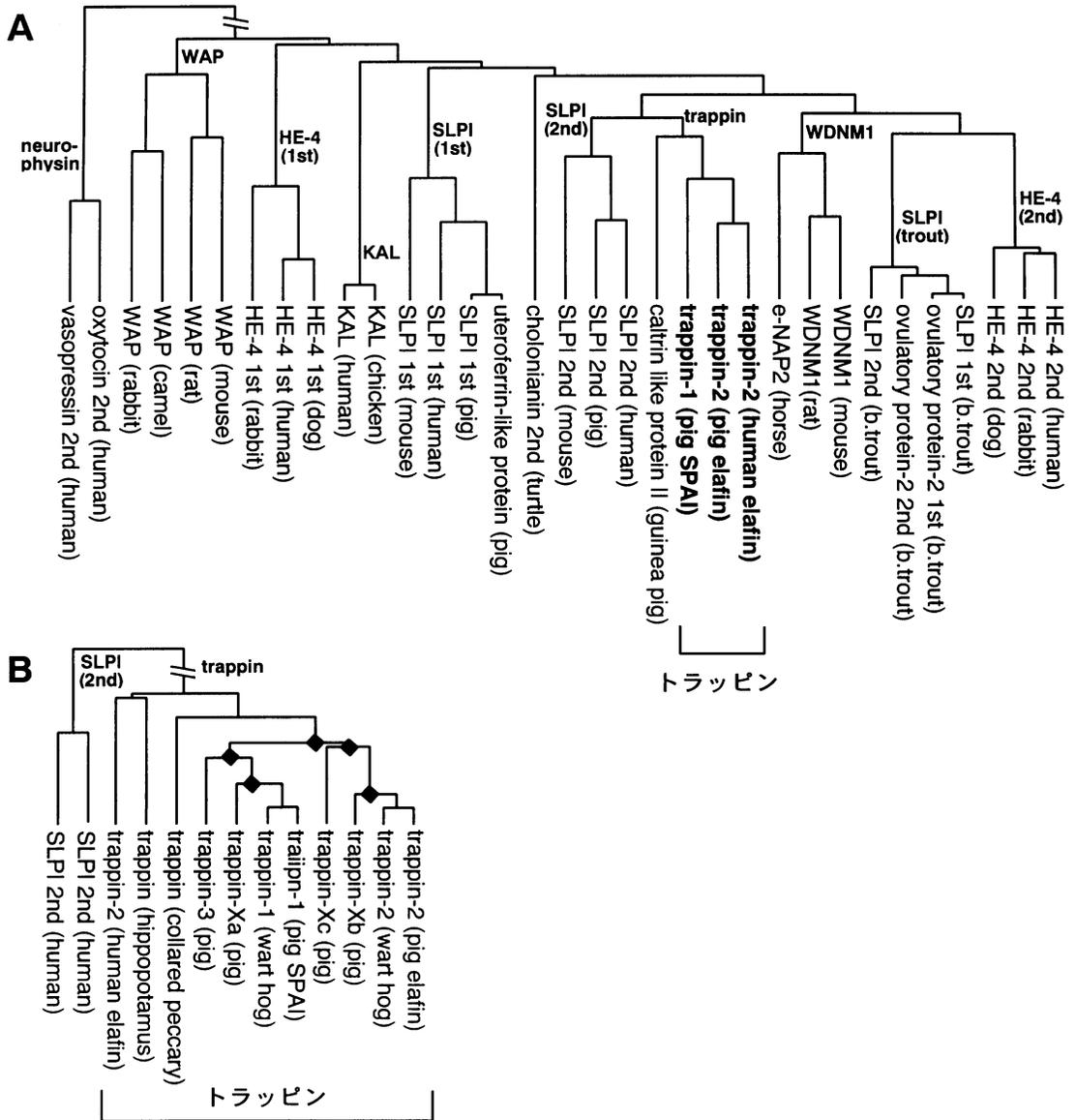


図5 トラップイン・ファミリーとその関連遺伝子の分子進化系統樹。

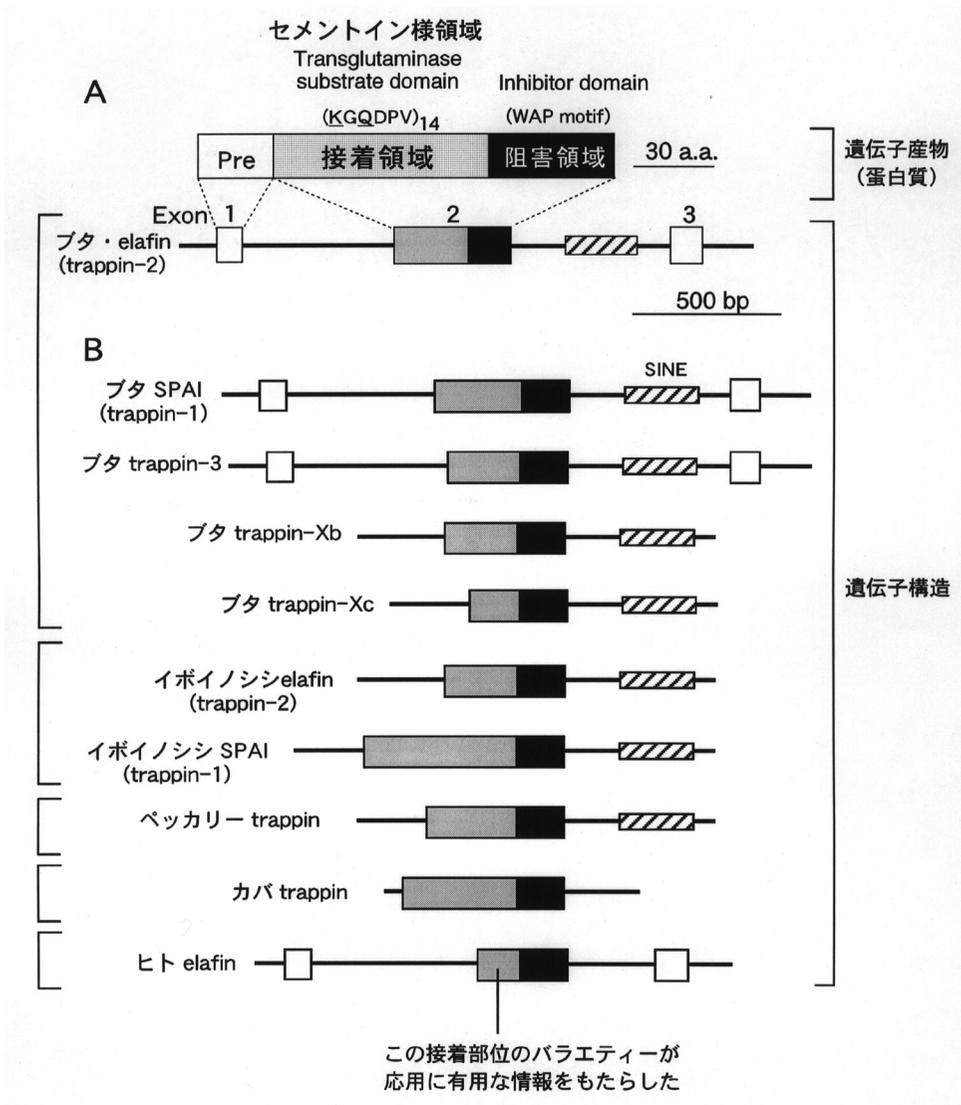


図6 偶蹄目におけるトラップイン遺伝子の種類と構造。これまでの解析で、ブタで5種類、イボイノシシで2種類、ベッカリー、カバ、ヒトでそれぞれ1種類、合計10種類のトラップイン分子の構造が明らかになった。接着部分のバラエティーの豊富さは応用の観点から注目される。A、トラップインの代表ブタ・エラフィン (Trappin-2) とその遺伝子構造。B、その他のトラップイン遺伝子ファミリーの構造

ジョンの中間体を捕まえることにより明らかにした(図7)<sup>12)</sup>。このジーン・コンバージョンの生物学的意義は現在のところ不明であるが、イントロンが保存されるメカニズムが明らかになったことで、今後この分野の大きな進展が期待できよう。基礎的には画期的な成果である。

#### 4 総括

糊代に相当するセメントイン領域を有する一群の内在性のタンパク質を発見し、トラップイン (Trappin) と総称することを提唱した。働き場所にトラップされて機能を発揮しているからであ

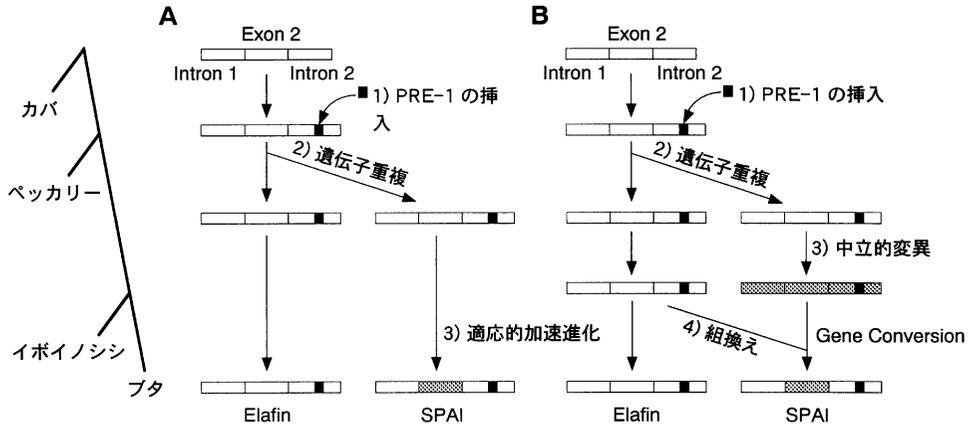


図7 トラップイン遺伝子のイントロンの保存機構。左の系統樹は、偶蹄目においてトラップイン遺伝子がどのように分子進化をし、出来てきたかを示す；トラップイン遺伝子の数、塩基配列の類似性、及びPRE-1の有無に基づいて推定したものである。PRE-1はPig Repetitive Elementの略で、散在性反復配列（Short Interspersed Repetitive Element, SINE）の一種である。SINEの有無は分子進化の時標として重宝されている。カバのトラップイン遺伝子にはPRE-1（SINE）は無く、PRE-1の挿入はカバとイノシシ上科の分岐後に起こったと推定される。AとBには、見かけ上エクソン2の配列のみが変化し、イントロンの配列が保存されるメカニズムが2つ示されている。Aは何らかの機構でエクソン2に変異が集中的に起こるとするもので、現在信じられている進化の中立説では説明しにくい。Bは、変異はイントロンにもエクソンにもまんべんなく起こるが、途中で相同組換えによるジーン・コンバージョン（Gene Conversion）によってイントロンの配列が置換されるために見かけ上イントロンが変化しないように見える。Bの可能性を強く示唆する結果がイボイノシシの解析から得られた。

る。さらにプロテアーゼ等をトラップして不活性化するという意味も込められている。この興味深いタンパク質トラップインは皮膚を守ることに也大いに貢献しており、化粧品学の観点からも興味深い研究対象である。本研究では、基礎及び応用の両面から解析を進め、以下の成果を得た。

- 1) 内在性の架橋接着因子であるセメントインとその同族分子を利用して効率の良いタンパク質の接着法を開発した。
- 2) セメントインを遺伝子工学的に量産し、その2次構造を推定した。
- 3) 蛍光性のセメントインを調製し、セメントインの付加価値を高めた。
- 4) セメントイン遺伝子の由来方と進化を分子レベルで明らかにした。私たちが世に送り出したトラップインが皮膚科学・化粧品学の分野で有名になり、愛用されることを願ってやまない。

## 謝辞

本研究は以下の方々の献身的な努力に負うところ大である：Magdy A. Ghoneim (NEDO 研究員；現、カイロ大学助教授)、古川 真 (博士課程大学院生；現、有人宇宙システム株式会社)、古谷 裕 (修士課程大学院生；現、総合研究大学院生)、加藤 明 (博士課程大学院生；現、理化学研究所特 研究員)、鈴木陽子 (東京工業大学生命理工学部教務職員)。

## 文献

- 1) 広瀬茂久, Ghoneim MA: 糊代をもったタンパク質：タンパク質の局在化機構に新たな視点：タンパク質の接着技術への応用にも期待。化学と生物 34, 632-633, 1996.
- 2) Schalkwijk J, Wiedow O, Hirose S: The trappin gene family: proteins defined by an N-terminal transglutaminase substrate domain and a C-terminal four-disulfide core motif. J Invest

- Dermatol, in press (1998).
- 3) Saheki T, Ito F, Hagiwara H, Saito Y, et al: Primary structure of the human elafin precursor preproelafin deduced from the nucleotide sequence of its gene and the presence of unique repetitive sequences in the prosegment. *Biochem Biophys Res Commun* 185, 240-245, 1992.
  - 4) Nara K, Ito S, Ito T, et al: Elastase inhibitor elafin is a new type of proteinase inhibitor which has a transglutaminase-mediated anchoring sequence termed "cementoin". *J Biochem*, 115, 563-567, 1994.
  - 5) Nonomura K, Yamanishi K, Yasuno H, et al: Up-regulation of elafin/SKALP gene expression in psoriatic epidermis. *J Invest Dermatol*, 103, 88-91, 1994.
  - 6) Kuroki J, Hosoya T, Itakura M, et al: Cloning, characterization, and tissue distribution of porcine SPAI, a protein with a transglutaminase substrate domain and the WAP motif. *J Biol Chem*, 270, 22428-22433, 1995.
  - 7) Furukawa M, Suzuki Y, Ghoneim MA, et al: Cryptic origin of SPAI, a plasma protein with a transglutaminase substrate domain and the WAP motif, revealed by in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Biol Chem*, 271, 29517-29520, 1996.
  - 8) Hirose S, Furukawa M, Tamechika I, et al: Discovery of a new type of proteinase inhibitor family whose members have an anchoring sequence. In: Bond J, Suzuki K (eds): *Intracellular Protein Catabolism*. Plenum, New York, 1996, 43-49.
  - 9) Tamechika I, Itakura M, Saruta Y, et al: Accelerated evolution in the inhibitor domains of porcine elafin family members. *J Biol Chem*, 271, 7012-7018, 1996.
  - 10) Ghoneim MA, Hirose S: Fluorescent protein glues: preparation, properties, and application for protein cross-linking of cementoin moieties of trappins fused to green fluorescent protein. (in preparation)
  - 11) Furutani Y, Kato A, Yasue H, Hirose S: Evolution in Suidae of the trappin multigene family with unusually conserved intron sequences. (in preparation)
  - 12) Kato A, Furutani Y, Yasue H, Hirose S: Mechanisms of evolution of the trappin gene family and unusual conservation of their intron sequences. (in preparation)

# 食用乳酸菌による化粧品素材としての機能性多糖の生産とその改質

新潟大学 工学部

谷口正之

Effect of co-existence of yeast cells on production of extracellular polysaccharide, (Kefiran) by *Lactobacillus kefiranofaciens* was investigated on the basis of the assumption of interaction between the yeast cells and the lactic acid bacterium in kefir grains. In the single culture of *L. kefiranofaciens*, not only the addition of yeast extract to the medium but also controlling the pH of the culture at 5.5 resulted in significant increase in amount of Kefiran produced. Since the yeast cells are considered to produce carbon dioxide and ethanol in kefir grains, the influences of aeration of gas containing carbon dioxide and addition of ethanol to the medium on Kefiran production by *L. kefiranofaciens* alone were also studied. The optimal gas composition for producing Kefiran was found to be  $N_2 : CO_2 = 9:1$ . By supplying ethanol at a concentration of 10 g/L, the amount of Kefiran produced was enhanced. Partially purified Kefiran was prepared from culture supernatant by ethanol precipitation, followed by anion-exchange chromatography. Gel filtration analysis indicated that the average molecular weight of partially purified Kefiran was several millions Da.

## 1 緒言

ケフィール粒は、図1に示すような、ケフィラン生産菌であるホモ型乳酸桿菌 *Lactobacillus kefiranofaciens* とヘテロ型乳酸短桿菌 *Lactobacillus kefir* などの乳酸菌と、乳糖発酵性および乳糖非発酵性の酵母などの複数の微生物から形成されている<sup>1)</sup>。その中で多糖ケフィランを主に生産しているのは、乳酸桿菌 *L. kefiranofaciens* であることが既に報告されている<sup>2)</sup>。これらの乳酸菌と酵母の間には、栄養源のやり取りや生育環境に関して相互作用や共生関係が存在すると推定されている。すなわち、乳酸菌は乳糖を分解し、ガラクトースを乳糖非発酵性酵母に提供し、酵母は乳糖発酵性酵母も含めてエタノールや二酸化炭素を生成して、乳酸菌の生育に適した環境を整えていると考えられている。

多糖ケフィランは、ケフィロヘキサオースを3

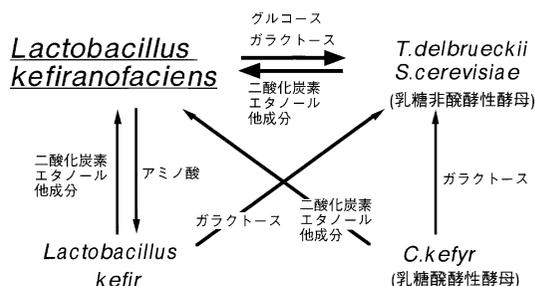


図1 ケフィール粒における微生物間の相互作用

～4単位連結した部分にケフィロヘプタオースが1単位組込まれた基本構造の繰り返しからできており、その分子量は約100万台であることが報告されている<sup>3)</sup>。ケフィールから得られるケフィール粒あるいは多糖ケフィランは抗腫瘍活性、抗血栓作用などの生理活性を示すことから、医療分野において利用すること、またケフィランの水溶液が強い粘性を有することから、食品用の増粘剤、安定化剤などとして利用することが考えられている。

筆者らは、これまでにセラミックフィルターや合成高分子膜を濾材として用いて代謝産物の除去と新鮮培地の供給が連続的にできる濾過培養システムを完成し、この膜濾過培養方式が種々の乳酸菌の高濃度培養および有用代謝産物の効



Production of Functional Polysaccharide as a Cosmetic Material by a Lactic Acid Bacterium for Food Processing and Modification of the Polysaccharide.

Masayuki Taniguti  
Niigata University

率的生産に適用できる実用的な生産法であることを報告してきた<sup>4-8)</sup>。すなわち、A) 発酵乳製品のスターターとしてのホモ乳酸菌およびビフィズス菌の生産、B) 耐塩性乳酸菌の高濃度かつ高速生産、C) *Lactococcus lactis* によるペプチド性抗生物質ナイシンの連続生産、D) *Lactococcus lactis* による抗菌性を有する発酵フレーバーの生産、E) ビフィズス菌を用いた安全な食品保存用抗菌剤の生産などについて報告してきた。そこで、本研究では、多くの分野において利用可能な機能性多糖であるケフィランを、化粧品用の保水剤、潤滑剤などとして利用することを目的として、食用乳酸菌による機能性多糖ケフィランの生産を中心に検討した。

## 2 実験

### 2.1 ケフィラン生産菌とその培養培地

本研究では、予備的な検討の結果、*Lactobacillus kefiranofaciens* JCM6985 をケフィラン生産菌として用いた。本菌はラクトースを炭素源とした MRS 培地を用いて、培養温度を 30℃ として培養した。

### 2.2 培養方法

本研究では、乳酸桿菌 *L. kefiranofaciens* によるケフィラン生産に対する酵母の存在の影響を 3つの因子に分けて検討した。すなわち、1) 酵母エキスの添加の効果、2) 酵母の生育によって発生する二酸化炭素の通気の効果、および 3) 酵母によって生成するエタノールの添加の効果について検討した。

### 2.3 ケフィランの回収

培養液を回収した後、遠心分離によって菌体を除去した。得られた上澄液中の粗ケフィランは、上澄液と等量のエタノールを添加することによって沈殿させた。沈殿した粗ケフィランは遠心分離によって回収した。回収した粗ケフィランは、培養液の 1/10 容量の蒸留水に溶解した。この粗

ケフィラン溶液に再び等量のエタノールを添加して、再沈殿させ、再び遠心分離によって回収した。この操作を合計 3 回繰り返して、粗ケフィランを部分精製しながら回収した。

粗ケフィラン溶液中の全糖をフィノール・硫酸法によって測定し、培養液中の粗ケフィラン濃度を算出した。

### 2.4 ケフィランの精製

回収した多糖溶液を精製するために陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。陰イオン交換クロマトグラフィーには、DEAE-Toyopearl 650 M (東ソー(株)) を担体として用いた。その担体は、0.02M Tris-HCl 緩衝液 (pH8.8) で平衡化した後に使用した。溶出液をフラクションコレクターにより 10.0mL ずつ採取し、タンパク量を 280nm における吸光度によって、全糖量をフェノール・硫酸法によってそれぞれ測定した。

### 2.5 ケフィランの分子量測定

エタノール沈殿によって回収した多糖溶液および陰イオン交換クロマトグラフィーより得られた成分について分子量を測定した。分子量は、カラム (Asahipak GS-710) を用いた高速液体クロマトグラフィーによって測定した。検出器は示差屈折計を使用した。分子量マーカーとしてプルラン標準品を用いた。

### 2.6 培地成分の分析

培養液中のラクトース濃度は、示差屈折計を検出器とした高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。また、培養液中の乳酸濃度は、電気伝導度検出器を備えた有機酸分析システムを用いて測定した。

## 3 結果と考察

### 3.1 酵母エキスの影響

図 2 は、*L. kefiranofaciens* によるケフィラン生産に対する酵母エキスの添加濃度の影響を示

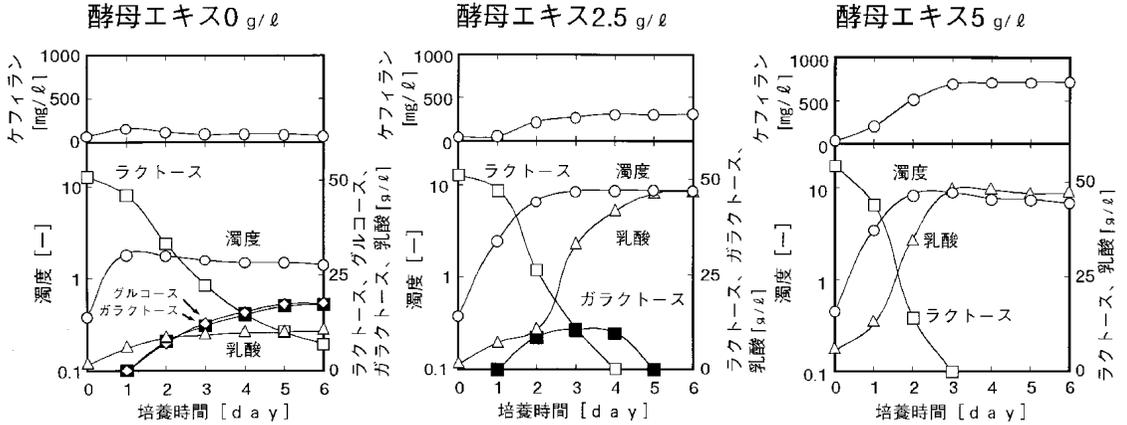


図2 酵母エキスの影響

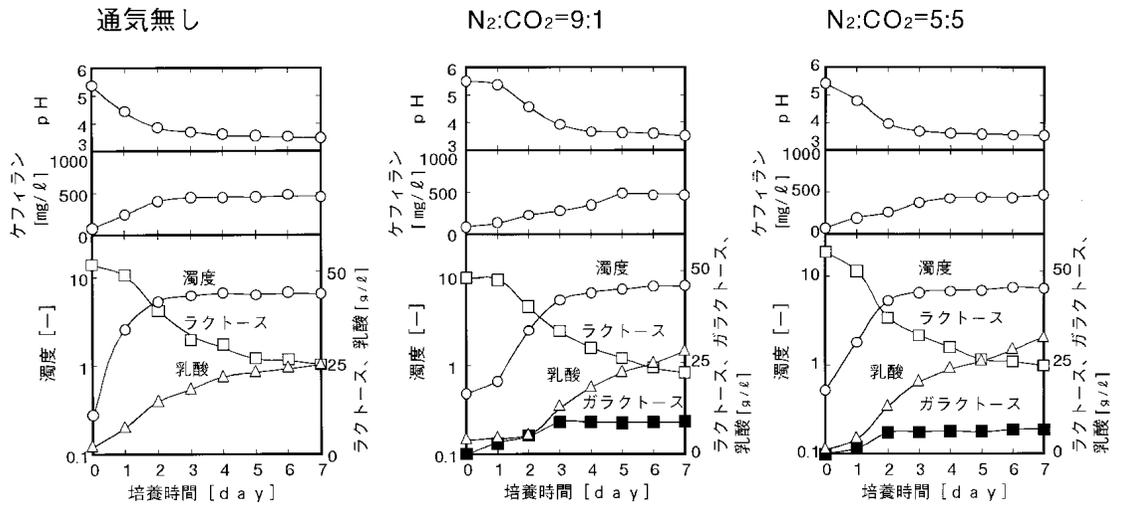


図3 気ガス組成の影響

す。これらの培養において、初期ラクトース濃度は50g/L、通気するガスの組成はN<sub>2</sub>対CO<sub>2</sub>を9対1とし、その混合ガスを0.3vvmになるように気した。またpHは予備的に検討した結果をもとに、ケフィラン生産にとって最適な5.5に設定した。

酵母エキスを添加しない場合には、菌体の増殖が非常に悪く、ケフィランもほとんど生産しなかったが、酵母エキスの添加濃度を増加するにつれて、濁度の値が高くなり、また、ケフィランの生産量も増加した。特に、ケフィラン生産量は酵母

エキスを5g/L添加した場合に、2.5g/Lとした場合に比べて増加した。したがって、5g/L程度の酵母エキスは*L. kefiranofaciens*の増殖とケフィラン生産にとって必要であることが判明した。以下の実験では、酵母エキスを5g/Lとなるように添加してケフィランを生産した。

### 3.2 気ガス組成とpH制御の影響

図3は、*L. kefiranofaciens*によるケフィラン生産に対する気ガス組成の影響を示す。これらの培養において、pHは制御せず、初期ラクトー

ス濃度は 50g/L とした。結果は左から通気をしない場合、 $N_2$  と  $CO_2$  の割合を 9 対 1、および 5 対 5 になるように調節した結果を示す。この図の一番上に示す pH の変化からわかるように、いずれの培養においても pH は培養 3 日目以降 4 以下となり、濁度からわかるように、生育はほとんど停止した。

通気ガス中の  $CO_2$  の割合を増加することによって、ラクトースの分解物であるガラクトースが蓄積し、消費されなかった。一方、最終的なケフィランの生産量は、通気ガス中の  $N_2$  対  $CO_2$  の割合を変えてもほとんど影響を受けなかった。これは、 $CO_2$  はラクトースの代謝に何らかの影響を与えるものの、pH が低下するために生育が停止し、ケフィランの生産量には差がでなかったためと考えられる。

そこで、次に全く同じ培養条件で pH を 5.5 に制御して、ケフィラン生産に対する通気ガス組成の影響を検討した。図 4 は、pH 制御をした培養の結果を示す。いずれの培養においても、pH を制御することによって 50g/L のラクトースは 4 日間で全て消費され、いったん生成したガラクトースもすべて消費された。また、菌体の生育量も増加し、乳酸の生産量も、pH を制御しない場合に比べて約 2 倍に増加した。一方、ケフィラン生産量は、pH を制御しない培養に比べて、 $N_2$  と  $CO_2$

の割合を 9 対 1 とした場合には約 1.4 倍多くなり、ケフィラン生産にとって pH 制御が有効であることがわかった。しかし、ケフィランの生産量はラクトースの消費量に応じて増加せず、消費したラクトース量当たりのケフィラン収率は増加しなかった。

### 3.3 ラクトース濃度の影響

ケフィラン生産に対する炭素源の初期濃度の影響を検討した。図 5 は通気ガスの組成を 9 対 1、pH を 5.5 に制御して、ラクトース濃度を 50、75、および 100g/L として培養した結果を示す。いずれの培養においても、乳酸濃度が 30g/L 以上になると生育はほとんど停止したが、ラクトースは消費され続けた。初期のラクトース濃度が高くなるにつれて、ラクトースをすべて消費するまでに必要な時間は徐々に長くなり、分解産物であるガラクトースとグルコースが培養液中に残存するようになった。一方、ケフィランの生産量は、初期のラクトース濃度が高くなるにつれて増加した。ただし、ラクトースの消費量に応じてケフィランの生産量は増加せず、消費したラクトース量当たりのケフィラン収率は低下した。

たとえば、初期ラクトース濃度を 100g/L とした培養において、ラクトースは 6 日目にすべて消費されたが、ガラクトースとグルコースはそれぞれ

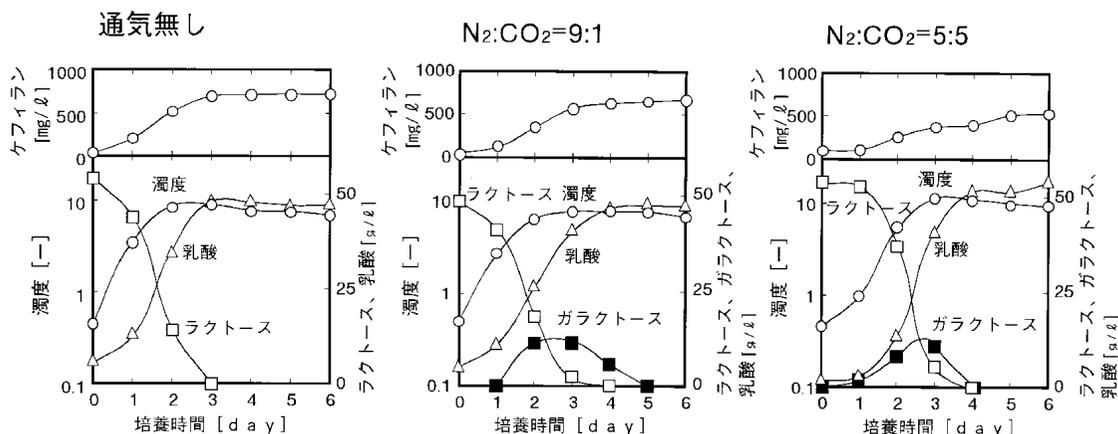


図 4 pH 制御培養における 気ガス組成の影響

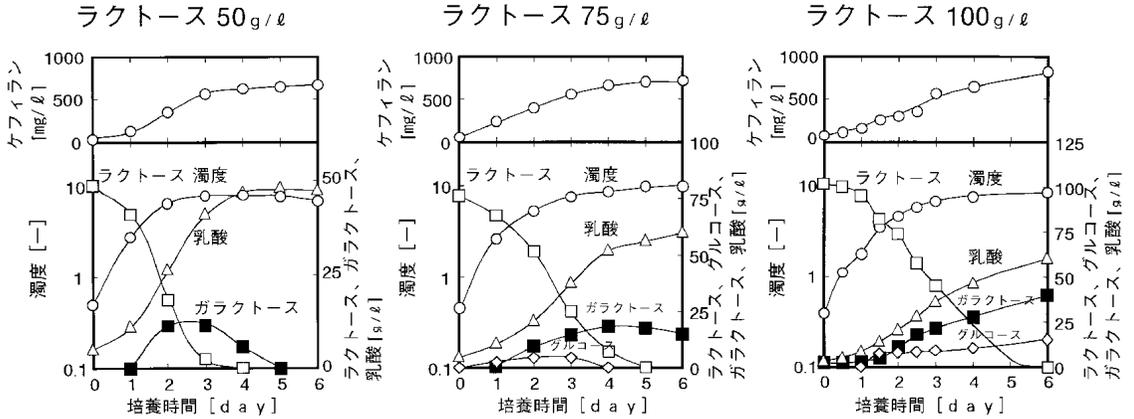


図5 ラクトース濃度の影響

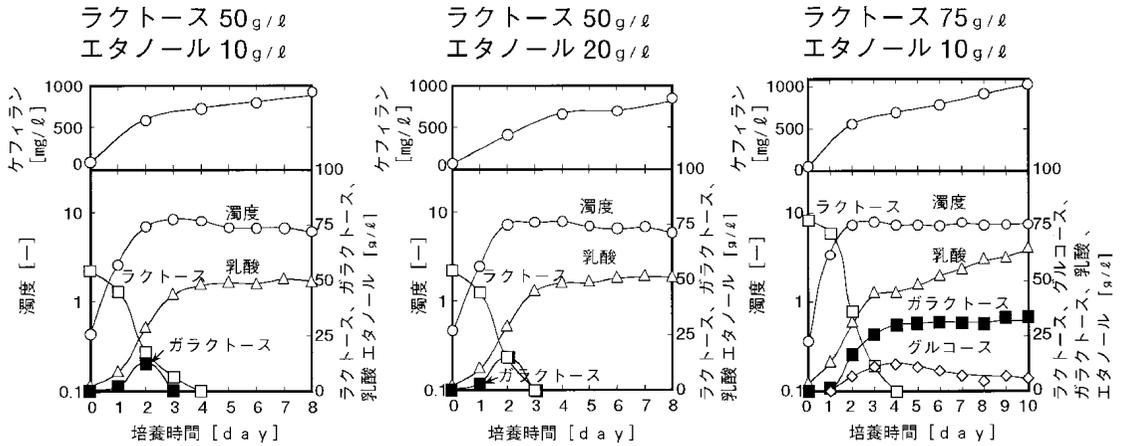


図6 エタノール添加の影響

れ約40と約11g/L残存しており、乳酸の蓄積が糖代謝、およびその結果としてケフィラン生産に影響を及ぼしたと考えられた。

### 3.4 エタノール添加の影響

酵母の存在に関係する第三の因子であるエタノールのケフィラン生産に対する効果について検討した。図6は、N<sub>2</sub>とCO<sub>2</sub>の割合を9対1、pHを5.5に制御した培養における、エタノール添加の影響を示す。初期ラクトース濃度を50g/Lとし、エタノールを10g/Lと20g/Lとなるように添加した。また、初期ラクトース濃度を75g/Lとし、エタノールを10g/Lとなるように添加した。

エタノールを添加して培養した場合と添加しない場合を比較して、ラクトース消費速度、乳酸生成量、生育量に大きな変化はなかったが、ケフィランの生産量は増加した。しかし、添加するエタノール濃度を20g/Lに増加しても、ケフィラン生産は、エタノール濃度を10g/Lにした場合に比べて、増加しなかった。

### 3.5 ケフィラン生産量の比較

図7は、これまで述べてきた各培養における粗ケフィラン生産量を比較した結果を示す。すなわち、ケフィラン生産に対する通気ガス組成、pH制御、初期ラクトース濃度およびエタノール添加

量の影響についてまとめた結果を示す。

pHを制御しない培養において、 $N_2$ と $CO_2$ の割合を変えても粗ケフィランの生産量に影響しなかったが、同一の通気ガス条件では、pHを5.5に制御した場合に粗ケフィラン生産量は増加した。しかし、二酸化炭素の割合を増加した場合には、pHを制御しても粗ケフィラン生産量はわずかしこ増加しなかった。なお、窒素のみを通気した場合、*L.kefiranofaciens*は増殖できなかった。これらの結果より、 $N_2$ と $CO_2$ の割合を9対1として通気し、pHを制御することによって、*L.kefiranofaciens*の増殖速度および粗ケフィランの生産量を増加できることがわかった。また、初期ラクトース濃度を50、75、100g/Lと順次増加するにつれて、ケフィランの生産量は、徐々に増加した。また、エタノールを添加すると、初期ラクトース濃度を50g/Lと75g/Lにした培養において、ケフィランの生産量はともに増加した。

以上の結果より、初期ラクトース濃度を増加することによって、およびエタノールを10g/L程度添加することによって、ケフィランの生産を増大できることがわかった。

最終的に、pHを5.5に制御し、 $N_2$ と $CO_2$ の割合を9対1とした混合ガスを通気し、10g/Lのエタノールを添加することによって、最も多くのケフィランを生産できることがわかった。

### 3.6 ケフィランの部分精製

これまでの、ケフィランを培養液からエタノール

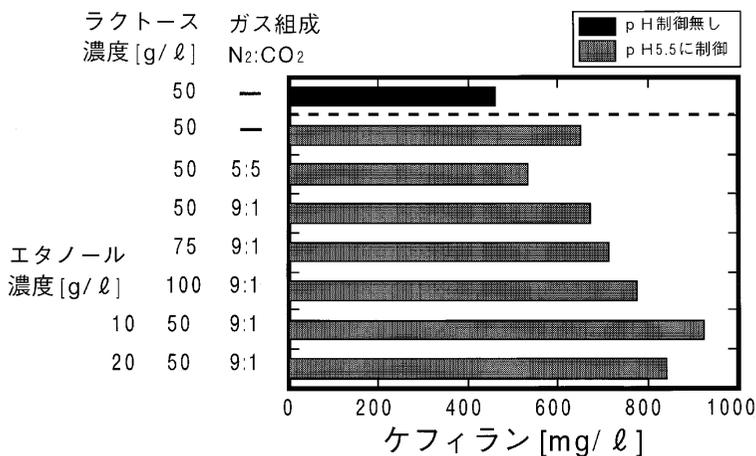


図7 ケフィラン生産の比較

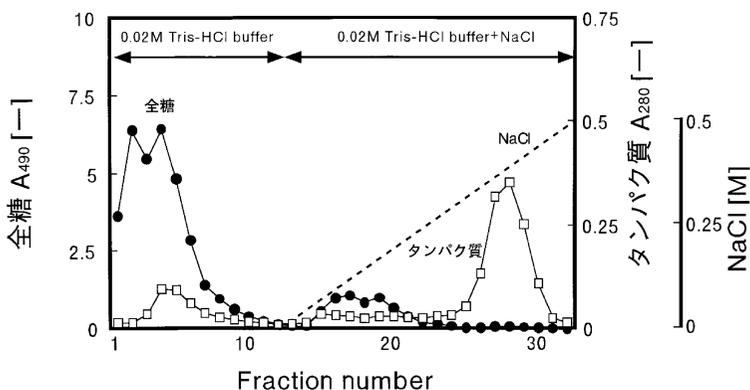


図8 陰イオン交換クロマトグラフィーによるケフィランの精製

ル沈殿によって回収し、フェノール・硫酸法によって求めた全糖量として、ケフィラン生産量を表してきた。しかし、エタノール沈殿によって回収した粗ケフィランには、不純物を含んでいる可能性がある。そこで、つぎにエタノール沈殿によって回収したケフィランの水溶液を陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて、さらに部分精製した。図8は、培養して得られた粗ケフィランをDEAE-Toyopearlを用いて、精製した結果を示す。おおよそ8割の全糖は未吸着画分に溶出されたが、低い濃度のNaClを含むフラクションにもわずかに検出された。また、大部分のタンパク質はNaClの濃度が0.4M付近のフラクションに溶出された。ケフィランはグルコースとガラクトー

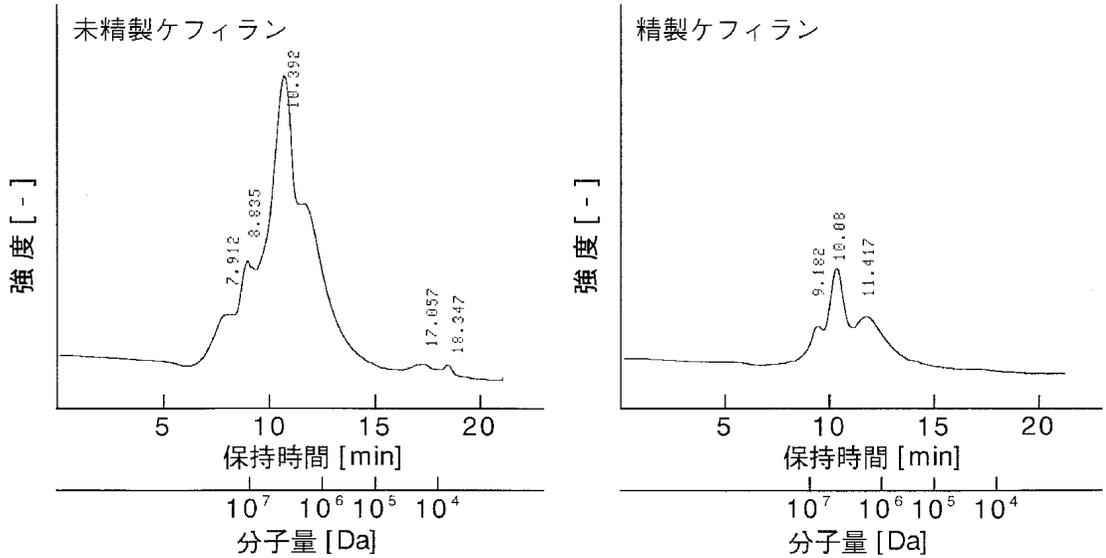


図9 ゲル濾過クロマトグラフィーによる分子の測定

スからなる中性糖であることから、未吸着画分をエタノール沈殿によって再回収し、部分精製ケフィランとした。また、培養条件を変えても得られる粗ケフィランの成分はほとんど同じであり、このクロマトグラフィーの結果と同じようなプロファイルを示した。

### 3.7 ケフィランの分子量

ゲル濾過クロマトグラフィーによってケフィランの分子量分布を検討した。図9は、エタノール沈殿によって得られたケフィラン水溶液、および陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製し、再回収されたケフィラン水溶液の分子量分布を示す。

保持時間が約8分の高分子量ピークと17分、18分の低分子量ピークは未精製ケフィランにおいて検出されたが、それらのピークは精製ケフィランでは消失しており、先ほど示したイオン交換クロマトグラフィーによってケフィランがさらに精製されたことを確認できた。また、3つのピークが存在するが、精製ケフィランの分子量はおおよそ数百万であることがわかった。

### 3.8 精製ケフィラン生産量の比較

図10は、陰イオン交換クロマトグラフィーによって部分精製したケフィランの濃度を比較した結果を示す。部分精製ケフィランは代表的な培養において得られた粗ケフィランから調製した。各培養条件とも、陰イオン交換クロマトグラフィー後、エタノールで再沈殿して得られた部分精製ケフィランの回収率は、55%程度であった。

部分精製ケフィランの量も、粗ケフィランの場合と同じように、pHを5.5に制御し、N<sub>2</sub>とCO<sub>2</sub>の割合を9対1とした混合ガスを気し、10g/Lのエタノールを添加することによって、気もpH制御もしない培養に比べて約1.8倍増加できることがわかった。

## 4 総括

本研究では、ケフィール中の乳酸菌と酵母の相互関係を推定して、乳酸桿菌 *L. kefirifaciens* によるケフィラン生産に対する酵母の存在の影響を検討した。また、得られたケフィランを部分精製し、その分子量を推定した。本研究の結果は、以下のようにまとめられる。

1. 酵母エキスを添加した培地を用いて、混合ガ

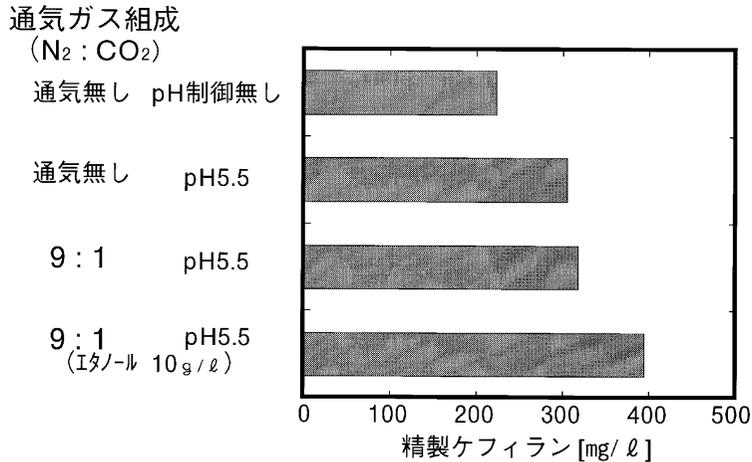


図 10 精製ケフィラン生産の比較

ス (N<sub>2</sub> : CO<sub>2</sub> = 9 : 1) を通気し、pH を 5.5 に制御することによって、*L. kefirifaciens* による粗ケフィランの生産量を増加できた。

- 初期ラクトース濃度を増加することによって、および 10g/L のエタノールを添加することによって、粗ケフィランの生産量を増大できた。
- 陰イオン交換クロマトグラフィーによってケフィランを精製した結果、その分子量は数百万であった。また、精製ケフィランは、粗ケフィランと同じように培養条件を工夫することによって増加できた。

## 謝 辞

本研究をご支援いただきましたコスメトロジー研究振興財団に対しまして、厚くお礼申し上げます。

## 引用文献

- 戸羽隆宏：中温性乳酸菌を使った発酵乳、*Japanese Journal of Dairy and Food Science*, 36, 235-244, 1987.
- 戸羽隆宏、足立 達：ケフィール粒の微生物学、*バイオサイエンスとバイオインダストリー*, 47, 383-388, 1989.
- 足立 達、伊藤敏敏、戸羽隆宏、ほか 2 名：乳酸菌の生態、*微生物*, 6, 15-26, 1990.
- 小林 猛、谷口正之：膜型バイオリアクターによる醗酵生産、*化学工学会編*、：バイオリアクター、アイピーシー、東京、1988、139-161 頁。
- Taniguchi M., Nakagawa I., Hoshino K., et al.: Production of Superoxide Dismutase from *Streptococcus lactis* by Using a Bioreactor with a Microfiltration Module. *Agric. Biol. Chem.*, 53, 2447-2453, 1989.
- Hoshino K., Taniguchi M., Marumoto H., et al.: Continuous Lactic Acid Production from Raw Starch in a Fermentation System Using a Reversibly Soluble-Autoprecipitating Amylase and Immobilized cells of *Lactobacillus casei*. *Agric. Biol. Chem.*, 55, 479-485, 1991.
- Taniguchi M., Hoshino K., Ito T., et al.: Production of Superoxide Dismutase in *Streptococcus lactis* by a Combination of Use of Hyperbaric Oxygen and Fermentation with Cross-Flow Filtration. *Biotechnol. Bioeng.*, 39, 886-890, 1992.
- Taniguchi M., Hoshino K., Urasaki H., et al.: Continuous Production of an Antibiotic Polypeptide (Nisin) Using a Bioreactor Coupled to a Microfiltration Module. *J. Ferment. Bioeng.*, 77, 704-708, 1994.

# メラニン生合成阻害作用を示す海洋天然物の探索

北海道大学大学院薬学研究科

小林 淳 一

Tyrosinase inhibitors may control over production of the dermal melanin pigment since tyrosinase, which is a bifunctional copper protein widely distributed in animals and plants, plays an important role in the process of melanin biosynthesis. In our going investigation of bioactive substances from marine organisms, we have isolated novel cyclic peptides, showing tyrosinase inhibitory activity, from a marine sponge *Hymeniacidon* sp. and novel alkaloids possessing inhibitory activity of melanin synthesis from a marine sponge *Amphimedon* sp.

## 1 緒言

近年、紫外線の増加といった原因からシミ・ソバカスや日焼けといった肌の色素沈着に関する関心が、確実に増加している。こういった皮膚の色素沈着の主な要因は、紫外線による日焼け、ホルモン分泌異常によるメラニンの生産と排泄のバランスが崩れることによると考えられており、スキンケアにおける重要な問題となっている。皮膚色素のメラニン是非溶解性の巨大分子で、チロシンを出発物質として生合成される。その初期段階を触媒する酵素チロシナーゼが皮膚色素の形成に重要な役割を担っていることが明らかになっており、チロシナーゼによるメラニンの過剰生産を効率的に抑制することができれば、こういった色素沈着異常の予防や治療が可能になるものと期待される。

これまでにメラニンの合成阻害物質としては、こうじ酸やメルカプトプロピオニルグリシンが知られている。これらの化合物は、チロシナーゼから銅イオンを除去することにより作用発現することから、重篤な副作用を持つ点で注意が必要とな

る。また合成ヒドロキノン類（ヒドロキノン、ヒドロキシモノベンジルエーテル）にもチロシナーゼ阻害作用が認められるが、皮膚の脱色による白斑を生じるなどの副作用が報告されている。天然物由来のチロシナーゼ阻害作用としては、コケモモから得られたヒドロキノン化合物アルブチンがあり、現在化粧品添加物として広く用いられている。これらのことからチロシナーゼ阻害作用は、チロシン類似の構造を持つ化合物に特異的であると考えられてきたが、最近、構造的に類似性のない環状ペプチド化合物にチロシナーゼ阻害作用あるいはメラニン合成阻害作用が見い出されている。乳酸菌から単離された環状テトラペプチドや、ナデシコ科植物から得られた環状オクタペプチド・シュードステラリン類は、アルブチンと同等、あるいはそれ以上に強い阻害活性を示すことが知られている。しかしながら、海洋生物由来のメラニン合成阻害物質は、これまでに報告されてこなかった。

本研究では、これまでこの分野において未開拓の状況にある海洋生物を素材として、チロシナーゼ阻害活性を主な指標としたメラニン合成阻害物質を探索することを目的とする。

## 2 実験・結果

沖縄で採取した海綿動物、原索動物、腔腸動物などをメタノールを用いて抽出し、有機溶媒で分配した。得られた抽出物に対してチロシナーゼ阻



Search for new marine natural products inhibiting melanin biosynthesis

Jun'ichi Kobayashi

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University

害作用を指標としたスクリーニングを行い、顕著な活性を示す抽出物を選別した。

沖縄産海綿 *Hymeniacidon* sp. の抽出について、上記の活性を指標にしてシリカゲルカラム、ゲルろ過、ならびに逆相HPLCなどの種々のクロマトグラフィーにより精製し、新規環状ペプチド Hymenamide A～E, G～HおよびJ～Kを、既知環状ペプチドとともに単離した (Fig. 1, 2)<sup>1-3)</sup>。

これらの環状ペプチドの1次構造は、各種2次元NMRデータの解析、部分加水分解反応で生成したペプチドのエドマン分解、あるいはFAB MS/MSのデータに基づいて帰属した。たとえば、Hymenamide Bの構造解析については、本化合物の<sup>1</sup>H NMRデータならびに酸加水分解物のアミノ酸分析により、2モルのProおよびPhe、1モルのGlu、Val、およびAsnの存在が示唆された。各アミノ酸残基のつながりについては、HMBCならびにFAB MS/MS (Fig. 3)に基づいて帰属した。各アミノ酸残基の絶対立体配置は、Marfey法によりいずれもL体であることがわかった。さらにNOEデータおよび分子力場計算に基づいて、Hymenamide Bの溶液中でのコンホメーションを推定した (Fig. 4)。同様の手法により、他の環

状ペプチドの構造を解析した。Hymenamide A～Eは蛋白性アミノ酸から構成される環状ヘプタペプチドであり、Hymenamide G, H, JおよびKは環状オクタペプチドである。これらの環状ペプチドは、いずれも芳香族アミノ酸を含む点、ならびにHymenamide J, Kを除いて複数のプロリン残基を有している点の特徴である。

一方、別種の沖縄産海綿 *Theonella* sp. からは、新規環状ペプチド Keramamide BおよびFを単離した (Fig. 2)<sup>4, 5)</sup>。Keramamide Bは、酸加水分解物のアミノ酸分析により、Pro, Orn, Ile, n-Val,  $\alpha$ -aminobutyric acid (Aba) が各1残基ずつ存在することが明らかとなった。2次元NMRを詳細に解析することにより、異常アミノ酸として2-bromo-5-hydroxytryptophan (BhTrp)の存在が判明し、他に $\alpha$ -ケト- $\beta$ -アミノ酸、オキサゾール環に共役したアクリル酸の存在も示唆された。各アミノ酸残基のつながりについてはHMBCおよびNOESY等の2次元NMRならびにFAB MS/MSにより帰属した。各アミノ酸残基の絶対立体配置は、分解生成物のキラルGC分析により決定した。Keramamide FもKeramamide Bとほぼ同様の手法で構造解析を行った。酸加

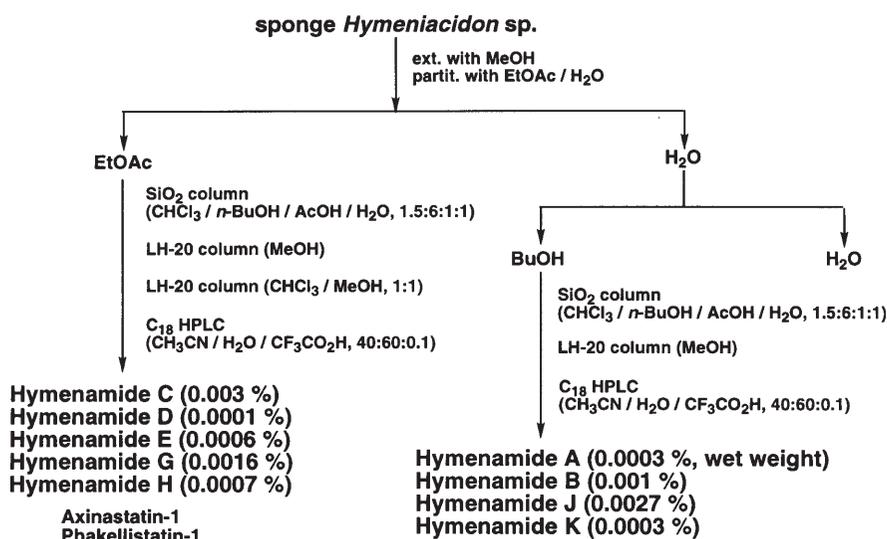


Fig.1

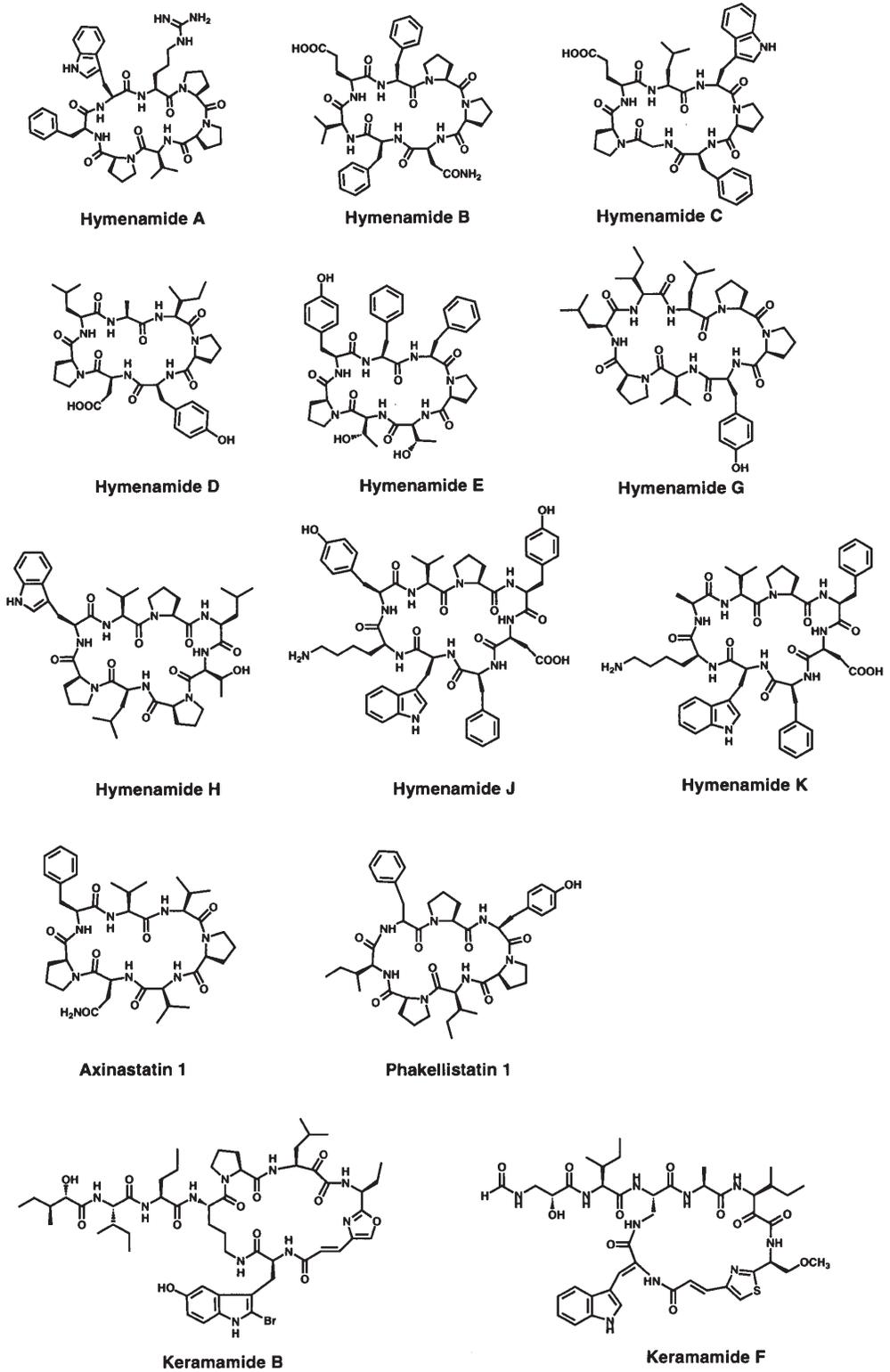


Fig.2

水分解物のアミノ酸分析により、Ala、Ile、Ise、diaminopropionic acid (Dpr) が各1残基ずつ存在することが明らかとなった。2次元NMRを詳細に解析することにより、異常アミノ酸として  $\alpha, \beta$

-dehydrotryptophan ( $\Delta$ -Trp) の存在が判明し、他に  $\alpha$ -ケト- $\beta$ -アミノ酸、チアゾール環に共役したアクリル酸の存在も示唆された。各アミノ酸残基のつながりについては2次元NMRならびに

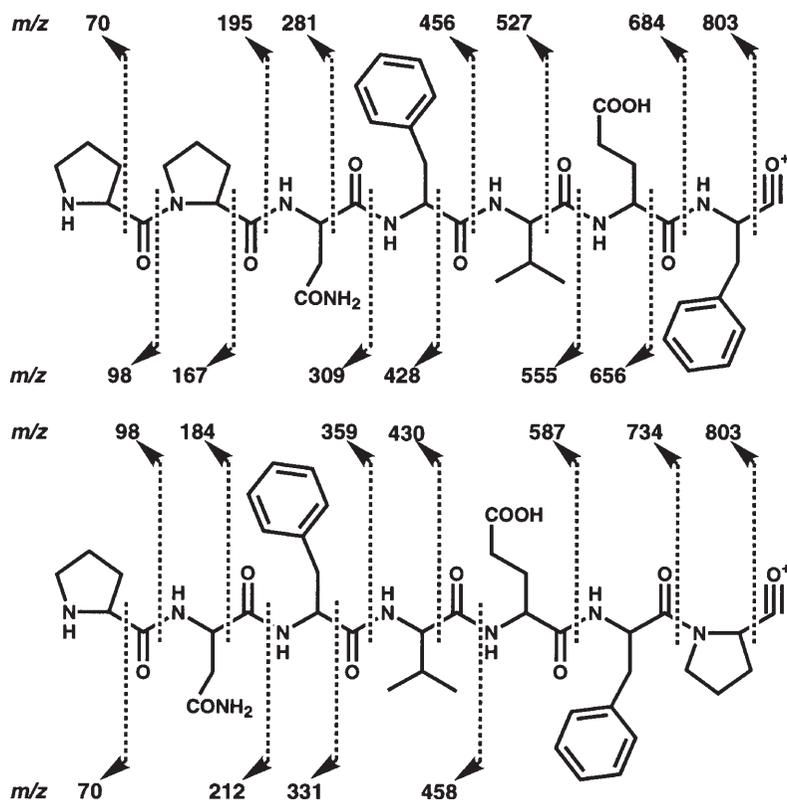


Fig.3 FAB MS/MS Fragmentations of Hymenamide B

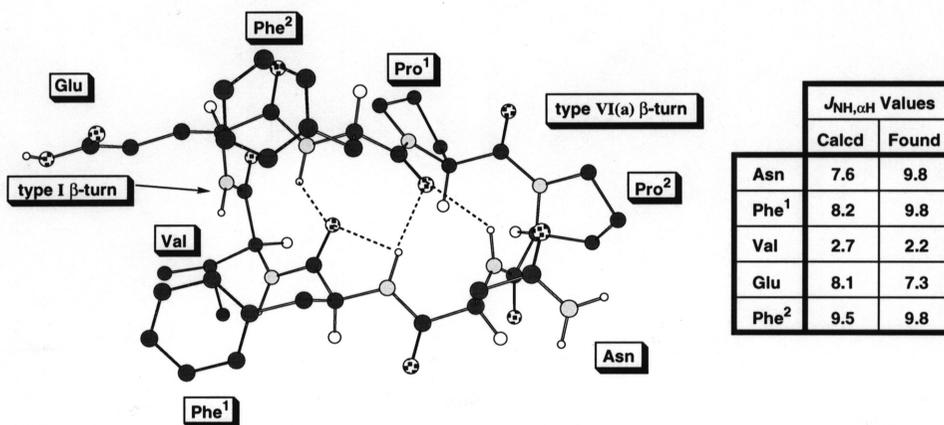


Fig.4 Three-Dimensional Structure of the Lowest-Energy Conformer of Hymenamide B Evaluated by Molecular Mechanics Calculation

FAB MS/MSにより帰属し、各アミノ酸残基の絶対立体配置は、分解生成物のキラル GC 分析により決定した。

上記の環状ペプチドについてチロシナーゼ阻害活性を調べたところ、Hymenamamide E および K ならびに Keramamide F に活性が認められた(表 1)。これらの結果から、活性発現には、環状部分の大きさにはあまり関係なく、芳香族アミノ酸部分が活性に影響を及ぼしているのではないかと考えられる。

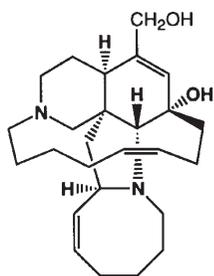
沖縄産海綿 *Amphimedon* sp. より新規アルカロイド Ircinol A、Keramaphidin B、および Keramamine C を、既知インドールアルカロイド Manzamine A とともに単離した<sup>6~8)</sup>。Keramaphidin B は、高分解能 EIMS より得られた分子式から 5 環性化合物と推定された。HMQC-HOHAHA ならびに HMBC 等の 2 次元 NMR データに基づいて Keramaphidin B の構造を帰属した。相対立体配置については、NOESY スペクトルと X 線結晶解析により明らかにした。Keramaphidin B は全体として光学活性体であるにもかかわらず、X 線結晶解析に用いられた結晶はラセミ体であった

ことから、Keramaphidin B はエナンチオ混合物であることが推定された。キラルカラムを用いた HPLC 分析の結果、(+)-体および(-)-体の比率は約 20 : 1 であることがわかった。Ircinol A は、高分解能 EIMS より、既知の Ircinal A よりも水素原子が 2 個多いことが明らかとなり、Ircinal A のアルデヒド部分がアルコールに還元された化合物と推定された。このことは Ircinal A の DIBAL による還元生成物のスペクトルデータが、Ircinol A のそれらと一致したことからも確認された。Keramamine C の NMR データは既知の Manzamine C と類似しており、高分解能 EIMS より、Manzamine C よりも 4 Dalton 大きいことがわかった。NMR データの比較により、Keramamine C は Manzamine C の  $\beta$ -carboline 環が tetrahydro- $\beta$ -carboline 環に置き換わった構造であると帰属した (Fig. 5)。

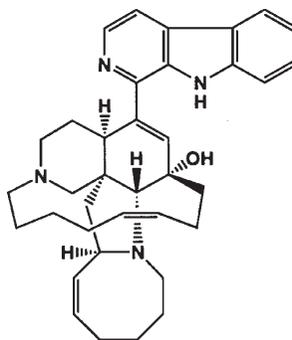
上記のマンザミン関連アルカロイドの他に、海綿 *Theonella* sp. より単離したマクロライド Theonezolid A<sup>9)</sup>、Spongidae 科の海綿より分離したセスキテルペノイドキノン Nakijiquinone A<sup>10)</sup>、ならびにホヤ *Aplidium multiplicatum* より単離

表 1 海綿由来の環状ペプチドのチロシナーゼ阻害活性

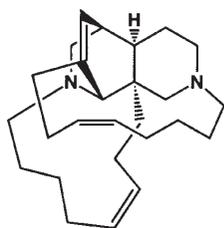
化合物	阻害% (mean $\pm$ S.D., n = 2~4)			
	濃度( $\mu$ g/mL)	40	100	200
Hymenamamide A		0.65 $\pm$ 3.71	9.80 $\pm$ 6.72	1.37 $\pm$ 4.30
Hymenamamide B		5.35 $\pm$ 10.95	11.43 $\pm$ 6.78	9.38 $\pm$ 4.30
Hymenamamide C		-1.07 $\pm$ 5.29	1.96 $\pm$ 3.61	9.08 $\pm$ 5.80
Hymenamamide D		2.90 $\pm$ 1.27	11.11 $\pm$ 3.28	12.77 $\pm$ 5.43
Hymenamamide E		0.67 $\pm$ 3.52	12.86 $\pm$ 2.51	18.16 $\pm$ 4.89
Hymenamamide G		-3.73 $\pm$ 5.05	3.93 $\pm$ 2.47	14.31 $\pm$ 3.06
Hymenamamide H			1.20 $\pm$ 6.03	-4.83 $\pm$ 0.13
Hymenamamide J		0.31 $\pm$ 7.69	13.36 $\pm$ 6.79	15.20 $\pm$ 9.39
Hymenamamide K		5.87 $\pm$ 2.43	9.72 $\pm$ 10.64	18.00 $\pm$ 0.22
Axinastatin-1		-1.45 $\pm$ 0.38	7.36 $\pm$ 5.89	11.98 $\pm$ 2.69
Phakelistatin-1		1.18 $\pm$ 1.32	13.77 $\pm$ 4.50	16.58 $\pm$ 0.17
Keramamide B		-5.68 $\pm$ 1.21	1.33 $\pm$ 5.64	8.34 $\pm$ 1.18
Keramamide F		2.06 $\pm$ 0.86	14.88 $\pm$ 5.33	20.19 $\pm$ 1.23



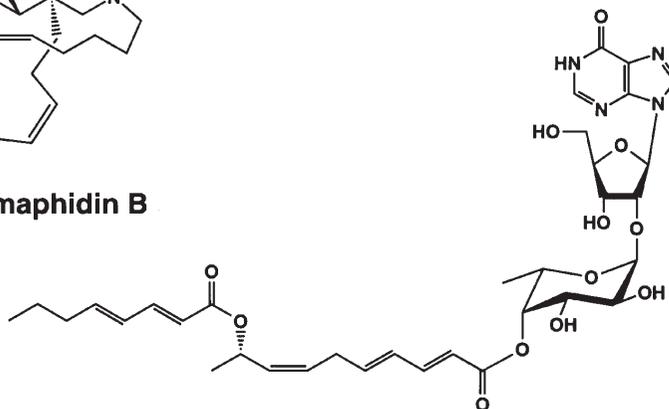
**Ircinol A**



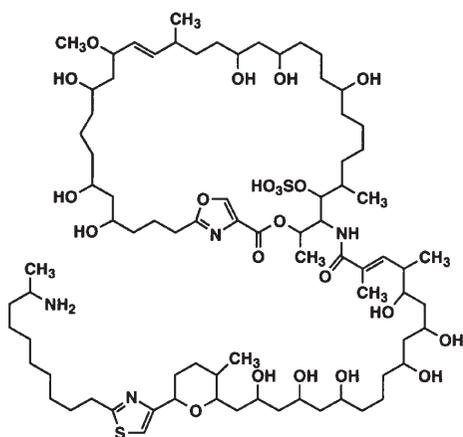
**Manzamine A**



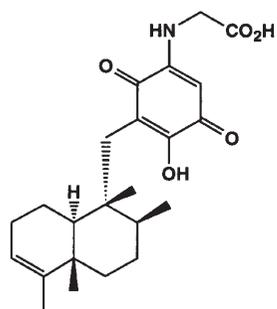
**Keramaphidin B**



**Shimofuridin A**



**Theonezolid A**



**Nakijiquinone A**

Fig.5

表2 海洋天然物質のメラニン合成阻害活性

化合物	濃度 (μg/mL)					
	17	8	4	2	1	0.5
Keramamide B	-	-				
Keramamide F		+	+			
Shimofuridin A			-	-		
Nakijiquinone A	-	-				
Keramamine C	T	T				
Theonezolid A				T	+	
Keramaphidin B		+	+			
Hymenamide C	+					
Manzamine A					+	+
Ircinol A				+	+	

+: positive, -:negative, T:toxic

したヌクレオシド関連化合物 Shimofuridin A<sup>11)</sup> (Fig. 5) について、B 16 メラノーマ細胞のメラニン合成阻害作用を調べた(表2)。その結果、Manzamine A および Ircinol A に顕著な活性が認められた。これらの化合物は共通の5環性構造を有しており、これらの部分構造が活性発現に重要であると推測される。

### 3 考察

海洋生物から単離した環状ペプチドについて、チロシナーゼ阻害活性を調べた結果、3種のペプチドに活性が認められた。これらのペプチドに含まれる芳香族アミノ酸が活性発現に寄与しているものと推測される。一方、B-16メラノーマ細胞のメラニン合成阻害活性については、5環性構造を有するアルカロイドに顕著な活性が認められたことから、これらの環構造が活性発現に重要ではないかと考えられる。以上の結果をもとに、構造活性相関を検討することにより、より優れたチロシナーゼ阻害物質ならびにメラニン合成阻害物質の開発を検討する予定である。一方、海洋生物を素材としたメラニン合成阻害剤の研究は緒につい

たばかりであり、今後、さらにスクリーニングを進めることにより、これまでにない新しいタイプのメラニン合成阻害剤の発見が大いに期待される。

### 引用文献

- 1) Kobayashi J., Tsuda M., Nakamura T. et al. : Hymenamides A and B, new proline-rich cyclic heptapeptides from the Okinawan marine sponge Hymeniacidon sp., *Tetrahedron*, 49, 2391-2402, 1993.
- 2) Tsuda M., Shigemori H., Mikami Y., et al. : Hymenamides C - E, new cyclic heptapeptides with two proline residues from the Okinawan marine sponge Hymeniacidon sp., *Tetrahedron*, 49, 6785-6796, 1993.
- 3) Tsuda M., Sasaki T., and Kobayashi J. : Hymenamides G, H, J, and K, four cyclic octapeptides from the Okinawan marine sponge Hymeniacidon sp., *Tetrahedron*, 50, 4667-4680, 1994.
- 4) Kobayashi J., Itagaki F., Shigemori H., et al.,

- : Keramamides B-D, novel peptides from the Okinawan marine sponge *Theonella* sp., *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 7812-7813, 1991.
- 5) Itagaki F., Shigemori H., Ishibashi M. et al. : Keramamide F, a new thiazole-containing peptide from the Okinawan marine sponge *Theonella* sp., *J. Org. Chem.*, 57, 5540-5542, 1992.
- 6) Tsuda M., Kawasaki N., and Kobayashi J. : Ircinols A and B, first antipodes of manzamine-related alkaloids from an Okinawan marine sponge., *Tetrahedron*, 50, 7957-7960, 1994.
- 7) Kobayashi J., Tsuda M., Kawasaki N. et al. : Keramaphidin B, a novel pentacyclic alkaloid from a marine sponge *Amphimedon* sp.: a plausible biogenetic precursor of manzamine alkaloids, *Tetrahedron Lett.*, 35, 4383-4386, 1994.
- 8) Tsuda M., Kawasaki N., and Kobayashi J. : Keramaphidin C and keramamine C, plausible biogenetic precursors of manzamine C from an Okinawan marine sponge, *Tetrahedron Lett.*, 35, 4387-4388, 1994.
- 9) Kobayashi J., Kondo K., Ishibashi M. et al. : Theonezolid A, a novel polyketide natural product from the Okinawan marine sponge *Theonella* sp., *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 6661-6665, 1993.
- 10) Shigemori H., Madono T., Sasaki T. et al. : Nakijiquinones A and B, new antifungal sesquiterpenoid quinones with an amino acid residue from an Okinawan marine sponge, *Tetrahedron*, 50, 8347-8354, 1994.
- 11) Kobayashi J., Doi Y., and Ishibashi M. : Shimofuridin A, a nucleoside derivative isolated from the Okinawan marine tunicate *Aplidium multiplicatum*, *J. Org. Chem.*, 59, 255-257, 1994.

## Ⅱ. 生体作用、安全性に関する分野

# 表皮ケラチノサイトにおけるヒト細胞老化因子の研究

愛媛大学 医学部皮膚科

橋 本 公 二

Senescent cells are blocked in the G1 phase of the cell cycle. The proteins p21 and p16 are inhibitors of cyclin-dependent kinase and affect cell cycle progression and senescence. We have studied whether p21, p53 and p16 was associated with cultured keratinocytes senescence. Keratinocytes were isolated from normal human skin obtained from individuals aged from 1 to 70 years, and cultured under serum free condition. The cultures have been continued until the cell growth arrest. The expression of p21, p16 and p53 in the growing cells and the senescent cells was analyzed by Western blot. The keratinocytes obtained from the individuals aged 1 and over 40 years tend to survive longer periods than the cells from the other ages. The p21 expression has not been changed compared to the early passage while the cells were growing, but increased just before the growth arrest. The p16 expression on the 8th passage has been increased compared to the third passage in both growing cells and senescent cells. These data suggest that increased p21 followed by p53 play an important role in the growth arrest of senescent keratinocytes. Increased p16 is a co-factor for the growth arrest.

## 1 緒 言

表皮ケラチノサイトは皮膚における重要な構成細胞であり、その老化機構の解明はコスメトロジーにおける生物学的基礎研究の根幹をなすと言っても過言でない。1961年に、ヒト胎児繊維芽細胞を *in vitro* で継代培養すると常に決まった分裂回数後に、増殖を停止してしまうことが見出された<sup>1)</sup>。このことより *in vitro* における培養細胞の有限増殖能は、細胞レベルでの老化であると考えられるようになった<sup>2)</sup>。正常ヒトケラチノサイトでも同様に、20 - 50代で増殖が停止し<sup>3)</sup>、また他の多くのヒトの細胞でも、同様に老化することが知られている。細胞の老化は、細胞死の一種であるアポトーシスへと向かう過程とは全く異なっており、細胞は老化するにつれて細胞周期をまわる時間が長くなり、完全に老化した細胞は G 1

期で停止する<sup>4)</sup>。

細胞周期を制御し、老化細胞の細胞増殖を抑えると考えられている p21 が、1993年に、いくつかの独立した研究グループから報告された<sup>5-8)</sup>。sdi 1 (senescent cell derived inhibitor 1) は Noda ら<sup>5)</sup> が老化細胞由来の分裂抑制因子として、遺伝子を単離した。そのタンパク質の分子量は 21 kd で 164 個のアミノ酸からなる。線維芽細胞を用いた実験により、継代数の増加に伴い、sdi 1 mRNA が増加すること、あるいは、sdi 1 を細胞に過剰に発現させると細胞増殖の抑制がおこることが報告されている。一方、Harper ら<sup>8)</sup> はサイクリン依存性キナーゼ (cdk 2) の阻害物として働く制御物質を見だし cip 1 (cdk-interacting protein) と名付け、その塩基配列を決定したところ、sdi 1 と同一であった。また、El-Deiry ら<sup>7)</sup> は、野生型 p53 で発現が誘導され、変異型 p53 では発現が誘導されない遺伝子を単離し waf 1 (wild type p53-activated fragment) と名付け、その塩基配列を決定したところ、sdi 1 と同一であった。彼らはさらに waf 1 上流に p53 結合部位を見つけた。

細胞が G1 期から S 期へ移行する際に癌抑制遺伝子産物である RB タンパク質のリン酸化が必要



Senescence of cultured keratinocytes and the expression of p21, p53 and p16

Koji Hashimoto, M.D.

Department of Dermatology  
Ehime University School of Medicine

であるが、p21 はリン酸化を行う種々の cdk と cyclin の複合体に結合することによりその活性を阻害し、さらに癌抑制遺伝子産物 p53 により誘導される。また、p16 は cdk と免疫沈殿で共沈するタンパク質として、見出された<sup>9)</sup>。cdk と結合することにより cyclin との複合体形成を競合的に阻害し、その活性を抑え、細胞周期制御・細胞老化に関与していると考えられている。

そこでこの研究では、正常ヒトケラチノサイトを無血清培地で可能なかぎり継代し、細胞の老化と p21、p53、p16 が関連しているかどうか調べた。

## 2 実験

### 2.1 表皮ケラチノサイト培養

形成外科手術で、15 人の 1 才～70 才の人より得られた正常皮膚由来ケラチノサイトを下記のごとく無血清培地で培養し、増殖が停止するまで培養を続けた。細胞継代時には、細胞抽出物を -80℃ で保存した。

正常皮膚片を 250PU/mL Dispase-ダルベッコ変法イーグル培養液に浸し、4℃で一晩静置。翌日、表皮を真皮から剥離した。表皮片を、0.25% トリプシン液液中にひたし、37℃、5 分間静置した。表皮片を、プラスチックシャーレに移し、ほぐした。ほぐし終えたら表皮・溶液ともに遠心管に移し入れ細胞浮遊液をつくり、細胞数を数えた。遠心した後、細胞を無血清培地である MCDB153 に以下のアミノ酸を添加した培地（最終濃度：isoleucine  $7.5 \times 10^{-4}$ M、histidine  $2.4 \times 10^{-4}$ M、methionine  $9.0 \times 10^{-5}$ M、phenylalanine  $9.0 \times 10^{-5}$ M、tryptophan  $4.5 \times 10^{-5}$ M、tyrosine  $7.5 \times 10^{-5}$ M）で懸濁し、100mm プラスチックシャーレ（コラーゲンコート）のシャーレ）当たり  $2 \sim 3 \times 10^6$  細胞 / 10 mL medium の割合で播種した。翌日培地交換を行い、以後、培地交換は 2～3 日に一度おこなった。細胞密度が 70～80% 程度あるいは 1 週間毎に継代培養を行った。継代するときは、0.25% トリプシン、0.05% EDTA 混合用液を用い、37℃、5 分間処理を行い血清で、トリプシン・EDTA のはたらきを中和した後、細胞の回

収・分散を行った。播種密度は 100mm シャーレにつき  $0.5 \sim 1.0 \times 10^6$  細胞 / 10mL medium。なお、アミノ酸添加 MCDB153 培地にはインスリン 5.0μg/mL、モノエタノールアミン 0.1mM、ホスホリルエタノールアミン 0.1mM ハイドロコチゾン 0.5μM、牛脳視床下部抽出液 50～150μg 蛋白/mL を加えた。CaCl<sub>2</sub> の最終濃度は 0.1mM に調整。

### 2.2 Western blot 法

抽出したタンパク質 70μg を 15% SDS-PAGE にて分離後、nitrocellulose 膜に転した。以下の、膜の洗浄・抗体の希釈には 20mM tris-HCl pH 7.4、150mM NaCl、0.05% Tween-20 を用いた。膜を 5% BSA にて 1 時間ブロックした後、洗浄し、10μg/mL のモノクロナル抗 p21 (6B6; Pharmingen Co., San Diego, CA)、p53 (Pab1801; Oncogene Science Co., Cambridge, MA)、p16 (G175-405; Pharmingen Co.) 中で 2 時間インキュベートした。洗浄後、1 : 600 fluorescein 標識抗マウス IgG (Amersham, Buckinghamshire, England) 中にて、1 時間インキュベートした。洗浄後、さらに 1 : 2500 AP 標識抗 fluorescein 抗体 (Amersham) 中で 1 時間インキュベートした。洗浄後、AttoPhos (Amersham) と約 20 分間反応させ、蛍光は FluoroImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) にて検出し、それぞれのバンドの強度を測定し、定化を試みた。3 代目の細胞での発現を 1 としたときの 8 代目の値を示した。

## 3 結果

### 3.1 細胞増殖

図 1 は 7 種類のケラチノサイトの 100 日目までの細胞増殖を示した。50 日目頃、継代数で 10 代前後で増殖を停止するものが多かった。

さらに、増殖を続けるものがあつたので、培養を続けた。15 種のケラチノサイトのうち、2 種は約半年間増殖を続け、継代数で 27 代まで、培養することができた (図 2)。それぞれ、1 才、45 才

の人より得た、ケラチノサイトであった。

図3に、増殖停止時の計算上の総細胞数と年齢の関係を示した。1才および中年以降のヒトから

得られたケラチノサイトの方が、それ以外の年齢のヒトより得た細胞より長期間増殖を続けることができる傾向があった。

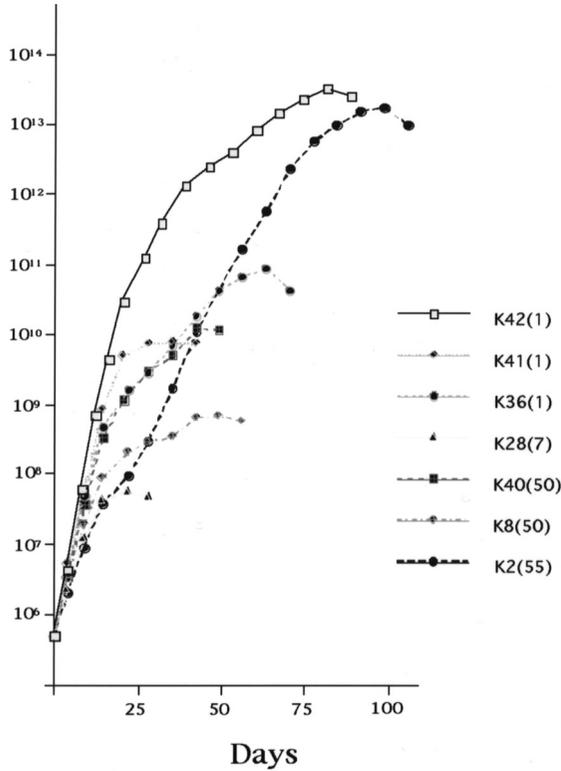


図1 100日目までの細胞増殖。15種のケラチノサイトのうち7種を示す。縦軸には計算上での総細胞数を示す。

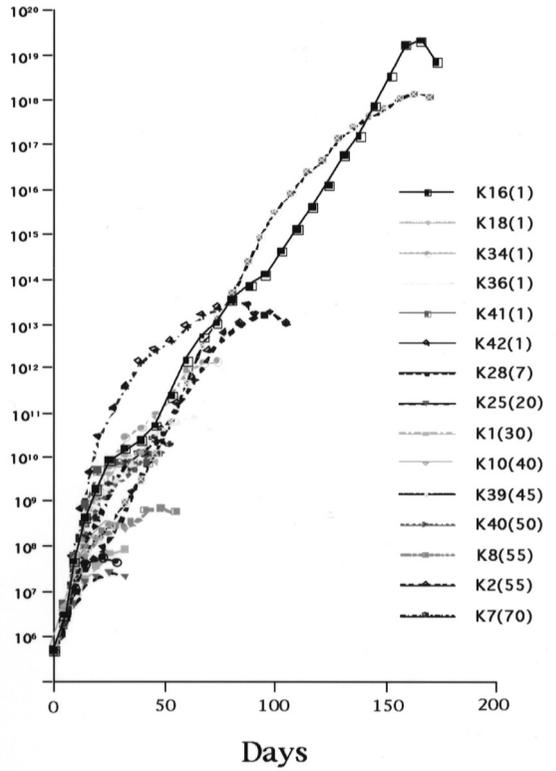


図2 200日目までの細胞増殖。15種のケラチノサイトを増殖停止時まで示す。縦軸には計算上での総細胞数を示す。

### Cell number at the growth arrest

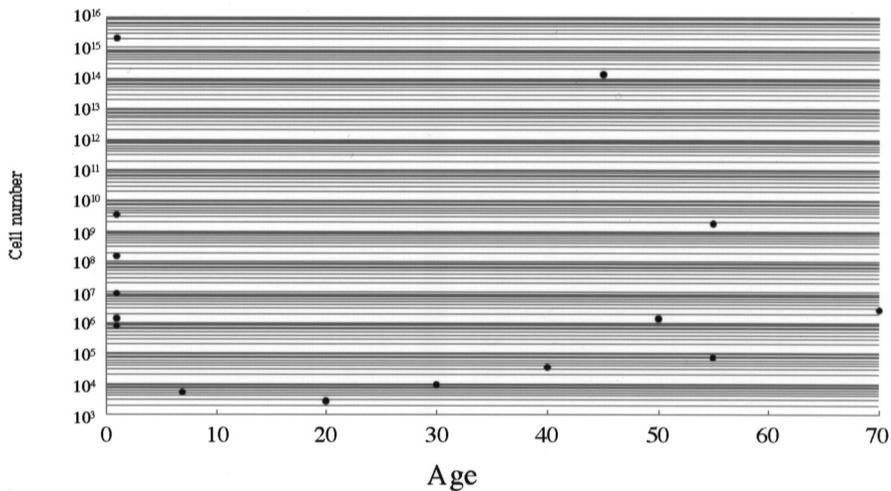


図3 増殖停止時の総細胞数と年齢との関係。

### 3.2 p21、p53、p16の発現

p21の発現をwestern blot法にて調べた。3代目と8代目のケラチノサイトを調べた(図4)。#16、#34、#39は8代以降も増殖を続けている細胞、#18、#1、#7は8代目直後に増殖停止した細胞。増殖を続けている細胞ではp21の変化はみられないが、増殖停止直前の細胞では、それぞれ、3.5、2.0、1.9と増加していた。

次にp21を誘導するとされているp53の発現をWestern blot法にて調べた。増殖停止した細胞を図5に示す。8代目の細胞ではp53は増加しており、p21の発現増加と平行していた。増殖中の細胞ではp53の発現は一定しなかった(結果は示さない)。

次に、p21と同様にcdk inhibitorであるp16の発現を調べた(図6)。増殖停止した細胞では8代目でp16は増加していたが、増殖を続けている細胞でも、8代目では同様にp16は増加した。

## 4 考察

p21、p53、p16の変化のまとめを表1に示す。p21は増殖中の細胞では変化はなく、老化した細胞で増加していた。このことより、ケラチノサイトの老化に伴う細胞増殖停止にはp21が関与していると考えられる。p53は老化した細胞で増加しており、p21の増加と平行していた。p21はp53により誘導されるとされており、老化ケラチノサイトでも増加したp53によりp21が誘導されたものと考えられる。p21はcyclin dependent kinaseに結合してキナーゼ活性を阻害し細胞周期をG1期に停止させるものと考えられており、ケラチノサイトの老化による細胞増殖の停止は、増加したp21による細胞周期のG1期への停止が原因と考えられる。

p16は、増殖中あるいは老化した細胞、いづれでも継代を経るにしたがって増加しており、老化に伴う細胞増殖停止には直接は関与していないものと考えられる。

### Western blot of p21

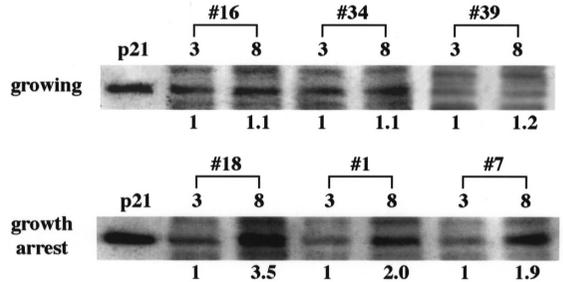


図4 Western blot法による3代目と8代目の細胞でのp21の発現。上段(#16、#34、#39)が8代目以降も増殖を続けている細胞、下段(#18、#1、#7)が8代目直後に増殖停止した細胞を示す。蛍光はFluorolmagerにて検出し、それぞれのバンドの強度を測定し、定化した。3代目の細胞での発現を1としたときの8代目の値を下端に示した。

### Western blot of p53

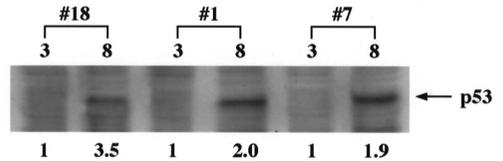


図5 Western blot法による増殖停止細胞(#18、#1、#7)でのp53の発現。それぞれのバンドの強度は図4と同様に定化した。

### Western blot of p16

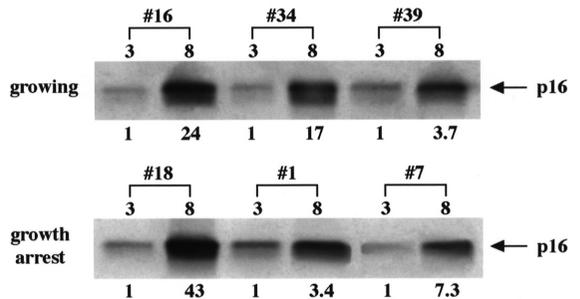


図6 Western blot法による3代目と8代目の細胞でのp16の発現。上段(#16、#34、#39)が8代目以降も増殖を続けている細胞、下段(#18、#1、#7)が8代目直後に増殖停止した細胞を示す。それぞれのバンドの強度は図4と同様に定化した。

表1 p21、p53、p16の発現のまとめ

	増殖中	増殖停止
p21	→	↑
p53	不定	↑
p16	↑	↑

図 4、5、6 の結 をまとめた。8代目の細胞での発現を3代目の細胞と比較した。

1才、および中年以降の個体より得た、ケラチノサイトは、より長期間細胞増殖を続けることができる傾向があった。若い個体より得たケラチノサイトの方が長期間培養が可能であるという報告<sup>3)</sup>はあるが、今回の実験のように中年以降の個体から得た細胞で再び長期間培養が可能になるという報告はない。その原因はよくわからないが、サンプル数を増やす必要がある。

## 5 結 論

in vitro における、老化ケラチノサイトでは p53 により誘導された p21 が細胞周期を G1 期に停止させて細胞増殖を停止させているものと考えられる。p16 は増殖中の細胞でも増加しており、細胞増殖停止の co-factor としては働く可能性があるが、直接は関与していないと考えられる。

## 文 献

- 1) Hayflick L, Moorhead PS: The serial cultivation of human diploid cell strains, *Exp Cell Res*, 25, 585-621, 1961.
- 2) Hayflick L: The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains, *Exp Cell Res*, 37, 614-636, 1965.
- 3) Rheinwald JG, Green H: Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells, *Cell*, 6, 331-344, 1975.
- 4) Yanishevsky R, Mendelsohn ML, Mayall BH: Proliferative capacity and DNA content of aging human diploid cells in culture: a cytophotometric and autoradiographic analysis, *J Cell Physiol*, 84, 165-170, 1974.
- 5) Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM, Smith JR: Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen, *Exp Cell Res*, 211, 90-98, 1994.
- 6) Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D: p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases, *Nature*, 366, 701-704, 1993.
- 7) El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B: WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression, *Cell*, 75, 817-825, 1993
- 8) Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ: The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases, *Cell*, 75, 805-816, 1993
- 9) Serrano M, Hannon GJ, Beach D: A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4, *Nature*, 366, 704-707, 1993.

# 脂質皮膚モデルを利用した化粧品 及び水の浸透と安全性に関する基礎的研究

東京工業大学 工学部有機材料工学科

谷 岡 明 彦

The transport phenomena of weak electrolytes through a charged membrane as a model of skin has been studied in order to understand the basic behavior of cosmetics in the skin. The membrane potential across positively charged and negatively charged membranes was measured for acetic acid and glycine methyl ester hydrochloride aqueous solutions as model materials of cosmetics. The anion-to-cation mobility ratios in the membrane were determined. In the case of acetic acid solutions in a positively charged membrane, the ratios were about 0.0001-0.001 times larger than those in water. On the other hand, they were about 10000 times larger than in water if a negatively charged membrane was employed. It is suggested that the transport phenomena of weak electrolyte ions in a charged membrane can be explained by the above-described transport theory.

The dissociation constant of acetic acid as a weak electrolyte in an ion-exchange membrane was estimated using the Donnan equilibrium theory. The total concentration,  $C_0$ , which represents the sum of the dissociated proton concentration and carboxyl concentration of undissociated electrolyte in the membrane, was determined by neutral titration in order to use it for the calculation. The apparent dissociation constants of acetic acid,  $K$ , in the negatively charged membrane were on the order of  $10^4$  and were larger than that in water ( $=1.73 \times 10^5$ ).  $K$  increased with an increase in the concentration in external solution and decreased with the fixed charge density increase. The larger dissociation constant in the membrane compared with that in water suggests the existence of an interaction between the solute and the membrane other than that with the electric field.

The glycine and leucine permeability coefficients,  $P$ , through a negatively charged membrane were measured as a function of HCl concentration,  $C_{HCl}$ , from 0 to  $10^1$  mol/l for three different interfacial conditions. Amino acid transport phenomena remarkably depended on the interfacial condition between the membrane and the external solution. The lowest  $P$  was obtained at  $C_{HCl}=0$  for both sides of the membrane, and generally  $P$  increases with an increase in  $C_{HCl}$ . In case of the glycine, the lowest  $P$  had been obtained if  $C_{HCl}$  on the glycine source side was  $10^1$  mol/l and that on the opposite side was 0. The highest  $P$  was obtained if  $C_{HCl}$  on the amino acid source side was 0 and that on the opposite side was  $10^1$  mol/l. The  $P$  values of glycine had been explained by the transport mechanism based on the interfacial chemical reaction (protonation, deprotonation or ion-exchange) and the ionic transport across a charged membrane. They, however, are remarkably affected by the physicochemical properties of the membrane such as hydrophobicity, molecular size, etc..

## 1 緒 言

皮膚は脂質、コラーゲン、その他タンパク質を主体とし、多量の水分を含有する複雑な構造を有した皮膜状の物質である。化粧品はこの中を障害物を回避し、特定の官能基を有する物質と相互作用くり返ししながら内部に浸透していく。その浸透能は皮膚を構成する化合物の化学構造や高次構造に著しく依存する。化粧品の浸透性能を明らかに

するにあたり、皮膚のすべての構造と化学組成を明らかにし化粧品の各成分の運動を逐次追うことは不可能である。そこでこのように複雑な系を解析するには、皮膚をブラックボックスとして取り扱う方法と皮膚をモデル化して取り扱う方法が考えられる。本研究では後者の方法を用いて化粧品の安全性を解析する上で重要と考えられる基礎的知見を得ることを目的とする。

化粧品の多くは弱電解質であることが知られており、また皮膚を構成する脂質やタンパク質は正や負の荷電基を有していることが知られている。このことは水溶液中の弱電解質が正または負の固定荷電基が分布する水のチャンネル内を移動すると考えることができる。しかしながらこのような系ではチャンネル内における弱電解質の性質を決定す



Fundamental study on penetration of cosmetics and water through lipid-skin model for safety

Akihiko Tanioka

Department of Organic and Polymeric Materials, Faculty of Engineering, Tokyo Institute of Technology

することは非常に困難であるから、皮膚外で生じる現象を観察することによって内部の状態を推定することになる。本研究では電荷を有した膜を皮膚モデルの基本単位と考え、このような膜における弱電解質やアミノ酸の挙動を理論的及び実験的に解析した<sup>(1-5)</sup>。

## 2 実験

### 2.1 試料

負に荷電した試料としてスチレンジビニルベンゼン共重合体にスルホン酸基を付与したもの(負荷電膜: K101, TK11, 12, 13 & 15)及び正に荷電した試料としてスチレン-ブタジエン共重合体にアルキルアミンを付与したもの(正荷電膜: A201, TA13)を使用した。これらの有効荷電密度  $QC_x$ 、荷電密度  $C_x$ 、含水、膜厚を Table 1 に示す。弱電解質として酢酸を、アミノ酸としてグリシン及びロイシンを使用した。また膜電位の測定には KCl, HCl, KOH、グリシンメチルエステルを使用した<sup>(6)</sup>。

### 2.2 測定

#### 2.2.1 膜電位

Fig. 1 に示す装置を用いて膜電位を測定する。

測定セルの中央に膜をセットし、右側セル濃度を 0.01 mol/L に固定し、左側セル濃度を 0.001 - 2.0 mol/L の濃度範囲で変化させ 23°C にてイオンメータを使用して測定した。電極には銀/塩化銀電極を使用し、飽和 KCl 水溶液中に浸し、セルと塩橋により連絡した。

まず膜の有効荷電密度  $QC_x$  を求めるために KCl 水溶液中で膜電位を測定した。次に  $QC_x$  の pH 依存性を調べるために HCl 水溶液及び KOH 水溶液中において膜電位を測定した。さらに HCl

Table 1 Physicochemical properties of charged membrane

	Negatively charged membrane					Positively charged membrane	
	TK11	TK12	TK13	TK15	K101	TA13	A201
$QC_x$ (mol/l)	1.09	1.08	1.14	1.03	0.684	0.981	0.570
$C_x$ (mol/l)	4.02	5.41	5.67	6.34	5.53	6.17	3.14
Q	0.271	0.200	0.201	0.162	0.124	0.159	0.181
Water Content (%)	18.3	19.8	26.6	31.6	24.4	32.2	27.8
Thickness ( $\mu\text{m}$ )	100	105	110	122	220	109	230

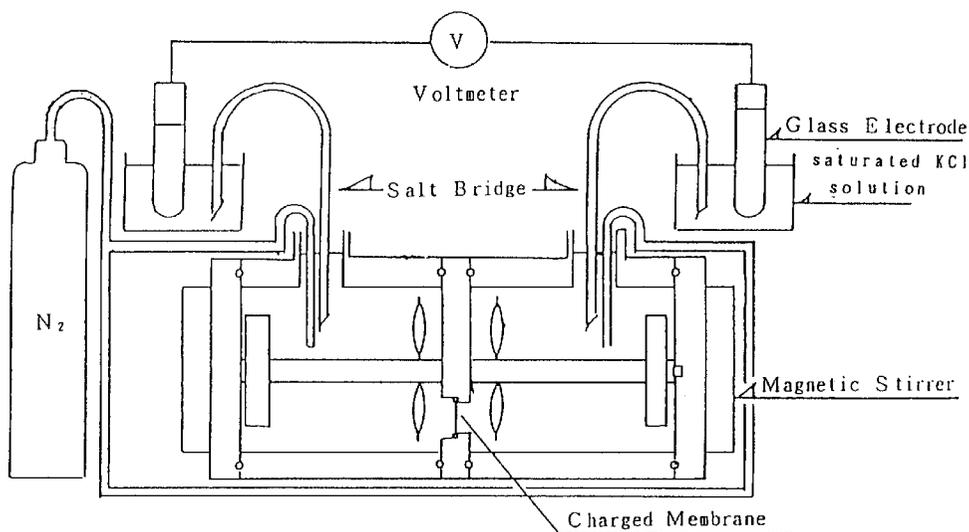


Fig. 1 Apparatus for membrane potential measurements.

+ KCl 及び KOH + KCl 水溶液中においても同様の測定を行った。弱電解質による膜電位の測定には酢酸水溶液を使用した。酢酸の解離状態を変えるために HCl または KOH を膜の両側に加えたこの時の濃度は 0.001 mol/L であった。弱電解質の結果とを比較するために、有機酸塩であるグリシンメチルエステル塩酸塩水溶液についても膜電を測定した<sup>(6, 7-16)</sup>。

### 2.2.2 透過係数

Fig. 2 に測定装置を示す。右側のセルに 0.87 mol/L の酢酸水溶液、左側のセルにイオン交換水を注入し、10 分おきに 2 時間、左側セルの比伝導度を測定した。この比伝導度を別に作製した校正曲線から左側セル濃度に換算した。さらに、左セル濃度の変化量から、膜におけるイオンの流束が求められ、この値から透過係数を計算した<sup>(6)</sup>。

アミノ酸の透過実験にはグリシン、L-ロイシンを使用した。左右同体積のガラス製の 2 室セルを用い各室の水溶液にそれぞれ電極を浸せきして pH をモニターした。左側セルに 0.05 M アミノ混合水溶液を右側セルにはイオン交換水を入れ、両側のセルから一定時間毎に一定量を採取しこれを測定試料とした。また pH の調整には HCl を用い次の 3 種類の境界条件を設定した。

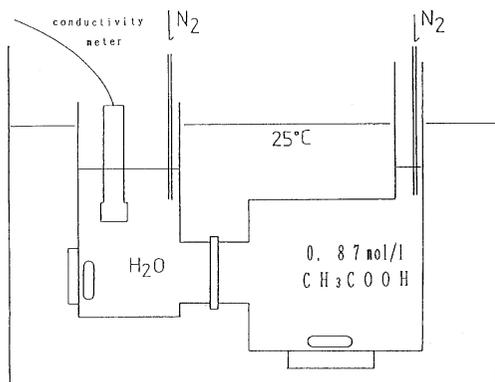


Fig. 2 Apparatus for permeability coefficient measurements

実験(a): セルの両側の pH を変化させる (両側に加える HCl 濃度は同一)。

実験(b): セルの左側はアミノ酸水溶液のみとし、右側の pH を変化させる。

実験(c): セルの右側はイオン交換水のみとし、左側 (アミノ酸側) の pH を変化させる。

使用した pH は 1.0、2.0、4.0、5.9 (イオン交換水) であった。

アミノ酸透過量の測定は液体クロマトグラフ (Inertsil Ph 5.0) を使用し、ラベル化せずアミノ酸溶液を直接測定した<sup>(17, 18)</sup>。

### 2.2.3 中和滴定

#### (1) 3成分イオン系

3成分イオン系では、膜を 1 mol/L の KCl に 24 時間以上浸せきし、対イオンを負荷電膜は  $K^+$ 、正荷電膜は  $Cl^-$  に置き換えた。次にイオン交換水中で攪拌し、伝導度が十分小さくなるまでイオン交換水を取り換えて洗浄した。このような膜を濃度  $C_0$  の酢酸水溶液 400 mL に 24 時間以上浸せきし平衡になるまで十分な時間放置した。有効荷電密度は膜電から決定されるために、 $C_0$  は膜電と同じ濃度範囲ではなくてはならない。そこで膜電の測定と同じ 0.001 mol/L ~ 2.0 mol/L の濃度範囲の 10 種類の  $C_0$  で測定を行った。

上記の平衡状態にある膜を取り出して表面の酢酸を拭い、4 枚全てを 2 mol/L の KCl 溶液 100 mL に浸し、膜ごとの溶液を KOH 溶液で中和滴定した。この測定により、膜中の濃度  $C_0$  が求められる。KOH 溶液は酢酸の濃度に応じて、0.01 mol/L ~ 0.2 mol/L の濃度のものを使用した。この時、濃度の小さいものは、2 mol/L の KCl 溶液 100 mL に対するブランク滴定を行い、滴定値を補正した<sup>(19)</sup>。

#### (2) 2成分イオン系

2成分イオン系では、負荷電膜は 1 N の HCl、アニオン交換膜は 1 mol/L の  $CH_3COOK$  に 24 時間以上浸せきし、対イオンを  $H^+$ 、または  $CH_3COO^-$

に置き換えた。次に、膜をイオン交換水中に浸せきして攪拌を行い、pHが中性付近になるまでイオン交換水を取り換えながら洗浄した。このような膜を、3成分イオン系と同様に濃度  $C_0$  mol/L の酢酸水溶液と平衡状態におき、0.1 または 0.2 mol/L の KOH で中和滴定し、 $\bar{C}_0$  を決定した。

更に荷電密度と膜中の解離定数を比較検討するため、荷電密度（イオン交換容量）の異なる膜についても同様の実験を行った<sup>(19)</sup>。

### (3) 膜中の解離定数の決定

中和滴定により決定した  $\bar{C}_0$ 、 $Q$ 、 $C_X$  を用いて解離定数の計算を行った。3成分イオン系では次式を用いて  $C_1$  を計算した。

この値から、膜中のイオン濃度を求め次式から膜中の解離定数を定めた。ここで求めた解離定数は活量係数を1として取り扱っているため、真の解離定数とは異なり、見かけの解離定数となっている。

$$C_1^5 (V_m^2 - V_e^2 Q^2) + C_1^4 \{V_e Q^2 V_m C_X + 2K (V_m^2 - V_e^2 Q^2)\} + C_1^3 K (K - 2C_0) (V_m^2 - V_e^2 Q^2) + C_1^2 K Q^2 V_m C_X (V_m C_X - K V_e) - 2K C_0 (V_m^2 - V_e^2 Q^2) + C_1 K \{C_0 Q^2 V_m C_X (2V_e K - V_m C_X) + K C_0^2 (V_m^2 - V_e^2 Q^2)\} - V_e Q^2 V_m C_X K^2 C_0^2 = 0 \quad (1)$$

## 3 結果と考察

### 3.1 膜電

膜に発生する電位  $\Delta\phi$  はドナン電位  $\Delta\phi_{Don}$  と拡散電位  $\Delta\phi_{diff}$  の和として次式で表すことができる。

$$\Delta\phi = \Delta\phi_{Don} + \Delta\phi_{diff} = -\frac{RT}{Z_3 F} \ln \frac{C_3^1 \left( \sqrt{\frac{Z_X C_X}{2Z_3}} + \left( \frac{C_3^1}{Q} \right)^2 \frac{Z_X C_X}{2Z_3} \right)}{C_3^1 \left( \sqrt{\frac{Z_X C_X}{2Z_3}} + \left( \frac{C_3^1}{Q} \right)^2 \frac{Z_X C_X}{2Z_3} \right)} - \frac{RT \sum Z_i^2 \omega_i (\bar{C}_i - \bar{C}_i)}{F \sum Z_i^2 \omega_i (\bar{C}_i - \bar{C}_i)} \ln \frac{\sum Z_i^2 \omega_i \bar{C}_i}{\sum Z_i^2 \omega_i C_i} \quad (2)$$

ここで  $Z_i$  は外部溶液中のイオンの価数、 $C_X$  は膜固定荷電密度、 $Z_X$  は固定荷電基の価数、 $C^l$  及び  $C^r$  はそれぞれ左水槽及び右水槽のイオン濃度、 $\bar{C}^l$  及び  $\bar{C}^r$  は膜のそれぞれ膜の左側及び右側界面のイオン濃度、 $\omega_i$  はイオン移動度、 $F$  はファラデー定数、 $R$  は気体定数、 $T$  は絶対温度である。膜透

過係数は次式で表すことができる。

$$P = \frac{\omega_- \omega_+ R T C_X}{d (\omega_- + \omega_+) (\bar{C}_i - \bar{C}_i)} \left\{ \sqrt{1 + \left( \frac{2C^l}{Q C_X} \right)^2} \sqrt{1 + \left( \frac{2C^r}{Q C_X} \right)^2} \operatorname{Wln} \left( \frac{\sqrt{1 + \left( \frac{2C^l}{Q C_X} \right)^2} + W}{\sqrt{1 + \left( \frac{2C^r}{Q C_X} \right)^2} + W} \right) \right\} \quad (3)$$

ここで  $d$  は膜の厚みである。また  $W$  及び  $Q$  は次式となる。

$$W = (1 - \omega_- / \omega_+) / (1 + \omega_- / \omega_+) \quad (4)$$

$$Q = \sqrt{(\gamma_- + \gamma_+) / (k_- + k_+)} \quad (5)$$

ここで  $\omega_-$ 、 $\omega_+$  はそれぞれアニオンとカチオンの移動度、 $\gamma_-$ 、 $\gamma_+$  はそれぞれアニオンとカチオンの活 係数、 $k_-$ 、 $k_+$  はそれぞれアニオンとカチオンの分配係数である。

Fig. 3 に KCl 水溶液を使用して求めた正荷電膜及び負荷電膜における膜電 を示す。実線及び点線は得られた実験データに (2) 式を適用した結 であり、非常に良い一致を示している。これらから膜中のアニオンとカチオンの移動度の比 ( $\omega_- / \omega_+$ ) を計算したところいずれの膜においても水溶液中の値と変わらなかった。さらに有効荷電密度  $Q C_X$  を求めたところ正荷電膜に対しては 0.570 mol/L、負荷電膜に対しては 0.684 mol/L となった。これらの値は HCl や KOH、さらには KCl-HCl や KCl-KOH 系においても大きな変化は見られなかった。これらのことから膜の物理化学的性質は pH による変化を受けないと考えられる。

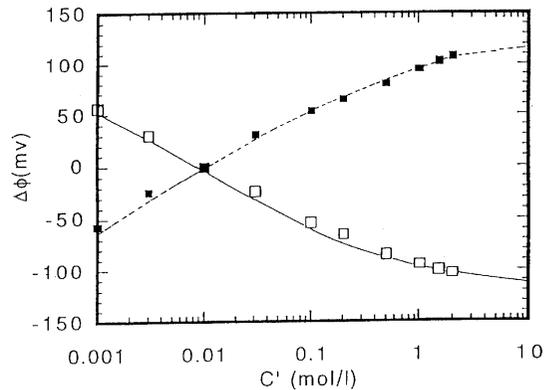


Fig. 3 Membrane potential  $\Delta\phi$  as a function of logarithmic KCl concentration  $C^l$ . □ for positively charged membrane, and ■ for negatively charged membrane.

Figs. 4と5に正荷電膜及び負荷電膜における、酢酸、酢酸/塩酸、酢酸/苛性カリ系における膜電と酢酸濃度との関係を示す。これらの系では膜の片側の酢酸濃度は $10^{-3}$  mol/Lに保たれ、もう一

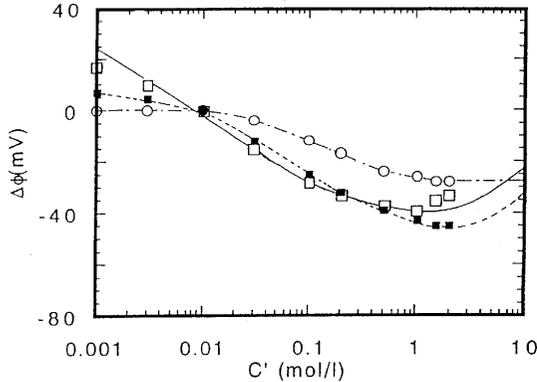


Fig. 4 Membrane potential  $\Delta\phi$  as a function of logarithmic acetic acid concentration  $C'$  in the system of positively charged membrane.  $\square$  shows acetic acid, and  $\blacksquare$  shows acetic acid mixed with HCl. HCl concentration in both sides of the membrane  $10^{-3}$  mol/L.  $\circ$  shows acetic acid mixed with KOH. KOH concentration in both sides of the membrane is  $10^{-3}$  mol/L. Acetic acid concentration  $C'$  is varied from  $10^{-3}$  to 2 mol/L, and  $C''$  is kept constant at  $10^{-2}$  mol/L. Lines are calculated results.

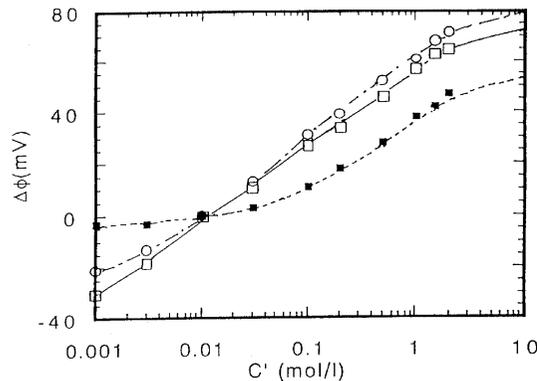


Fig. 5 Membrane potential  $\Delta\phi$  as a function of logarithmic acetic acid concentration  $C'$  in the system of negatively charged membrane.  $\square$  for acetic acid,  $\blacksquare$  acetic acid mixed with HCl. HCl concentration in both sides of the membrane is  $10^{-3}$  mol/L.  $\circ$  shows acetic acid mixed with KOH. KOH concentration in both sides of the membrane is  $10^{-3}$  mol/L. Acetic acid concentration  $C'$  is varied from  $10^{-3}$  to 2 mol/L, and  $C''$  is kept constant at  $10^{-2}$  mol/L. Lines are calculated results.

方の濃度は $10^{-3}$  mol/Lから2 mol/Lまで変えられた。また酸及びアルカリの濃度は膜の両側で一定 $10^{-3}$  mol/Lに保たれた。図中における実線、点線、一点鎖線は式(1)に基づく理論曲線である。この時カチオン及びアニオンの濃度は解離平衡を考慮して求めた。理論値と実験曲線は非常に良い一致を示しており、これらからそれぞれの膜におけるカチオン( $H^+$ )とアニオン( $CH_3COO^-$ )の移動度の比を求めることができ Table 2に示す。水中での比は $\omega_{CH_3COO^-}/\omega_{H^+} = 0.12$ であり、正荷電膜、負荷電膜共に著しく異なった値を示す。正に荷電した膜内ではアニオンの移動度が著しく減少し(1000~10000分の1)、負に荷電した膜内ではカチオンの移動度が著しく減少すること(1000~10000分の1)を示唆している。膜中の固定荷電基に対する対イオン $\overline{\omega}_{counter}$ 及び副イオン $\overline{\omega}_{co}$ の移動度は次式で近似される。

$$\overline{\omega}_{counter} = \omega_{counter} \frac{C_{co} + \phi C_x}{C_{co} + C_x} \quad (6)$$

$$\overline{\omega}_{co} = \omega_{co} \quad (7)$$

ここで $\omega_{counter}$ は対イオンの、 $\omega_{co}$ は副イオンの水中における移動度、 $C_{co}$ は副イオンの膜中における濃度である。この式によると膜中のイオンはそれと逆符号の固定荷電基の影響を著しく受けるものと考えられる。

Figs. 6と7に正荷電膜及び負荷電膜における、グリシンメチルエステル塩酸塩、グリシンメチルエステル塩酸塩/塩酸、グリシンメチルエステル塩酸塩/苛性カリ系における膜電とグリシンメチ

Table 2 Mobility Ratio of  $H^+$  to  $CH_3COO^-$  ( $\frac{\omega_{CH_3COO^-}}{\omega_{H^+}}$ )

Solution	Membrane	In Positively Charged Membrane	In Negatively Charged Membrane
$CH_3COOH$		$5.5 \times 10^{-5}$	$1.4 \times 10^4$
$CH_3COOH + HCl$		$3.0 \times 10^{-4}$	$1.0 \times 10^3$
$CH_3COOH + KOH$		$2.2 \times 10^{-4}$	$1.3 \times 10^3$

In Water :  $\frac{\omega_{CH_3COO^-}}{\omega_{H^+}} = 0.12$

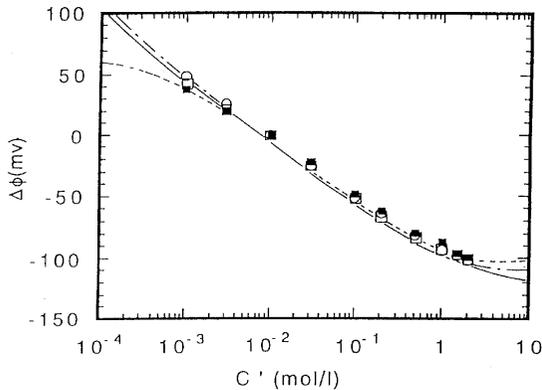


Fig. 6 Membrane potential  $\Delta\phi$  as a function of logarithmic glycine methyl ester hydrochloride concentration  $C'$  in the system of positively charged membrane.  $\square$  for glycine methyl ester hydrochloride, and  $\circ$  for glycine methyl ester hydrochloride mixed with HCl. HCl concentration in both sides of the membrane is  $10^{-3}$  mol/L.  $\blacksquare$  for glycine methyl ester hydrochloride mixed with KOH. KOH concentration in both sides of the membrane is  $10^{-3}$  mol/L. Glycine methyl ester hydrochloride concentration  $C'$  is varied from  $10^{-3}$  to 2 mol/L, and  $C''$  is kept constant. Lines are calculated results.

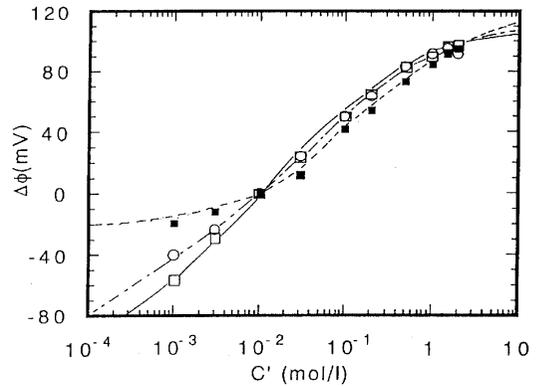


Fig. 7 Membrane potential  $\Delta\phi$  as a function of logarithmic glycine methyl ester hydrochloride concentration  $C'$  in the system of negatively charged membrane.  $\square$  shows glycine methyl ester hydrochloride, and  $\circ$  shows glycine methyl ester hydrochloride mixed with HCl. HCl concentration in both sides of the membrane are  $10^{-3}$  mol/L.  $\blacksquare$  shows glycine methyl ester hydrochloride mixed with KOH. KOH concentration in both sides of the membrane is  $10^{-3}$  mol/L. Glycine methyl ester hydrochloride concentration  $C'$  is varied from  $10^{-3}$  to 2 mol/L, and  $C''$  is kept constant. Lines are calculated results.

ルエステル塩酸塩濃度との関係を示す。酢酸をグリシメチルエステル塩酸塩に置き換えた以外実験条件は同じである。図中における実線、点線、一点鎖線は式(1)に基づく理論曲線である。理論値と実験曲線は非常に良い一致を示しており、これらからそれぞれの膜におけるカチオン ( $H_3^+ NCH_2COOCH_3$ ) とアニオン ( $Cl^-$ ) の移動度の比を求めることができ Table 3 に示す。水中におけるこれらのデータがないことから比較のためにトリメチルアンモニウムクロライド及び塩化アンモニウムにおける水中での値  $\omega_{Cl^-}/\omega_{N(CH_3)_4^+}=1.7$  及び  $\omega_{Cl^-}/\omega_{NH_4^+}=1.0$  を同時に示す。これらの結果、移動度の比に大きな違いは見られなかった。このことはグリシメチルエステル塩酸塩が強電解質としてふるまっていることを示している。

Table 4 に正荷電膜及び負荷電膜における酢酸の透過係数を示す。この値を式(5)に適用し、 $\omega_+ \omega_- / (\omega_+ + \omega_-)$  を求め、Table 2 における移動度の比  $\omega_- / \omega_+$  とからカチオンとアニオンの移動度  $\omega_+$ 、 $\omega_-$  を求め Table 5 に示す。こ

Table 3 Mobility Ratio of  $H_3^+ NCH_2COOH_3$  to  $Cl^-$

Solution	$\left( \frac{\omega_{Cl^-}}{\omega_{H_3^+ NCH_2COOH_3}} \right)$	
	Membrane	In Positively Charged Membrane / In Negatively Charged Membrane
Glycine methyl ester hydrochloride	0.99	1.6
Glycine methyl ester hydrochloride + HCl	0.98	1.3
Glycine methyl ester hydrochloride + KOH	1.03	1.5

In Water :  $\frac{\omega_{Cl^-}}{\omega_{N(CH_3)_4^+}} = 1.7$ ,  $\frac{\omega_{Cl^-}}{\omega_{NH_4^+}} = 1.0$

Table 4 Permeability Coefficients of Acetic Acid ( $P_{CH_3COOH}$ ) at 0.87mol/L

	In Positively Charged Membrane	In Negatively Charged Membrane
$P_{CH_3COOH} (cm^2/s)$	$0.51 \times 10^{-5}$	$1.69 \times 10^{-5}$

れらの結 によるとうずれの膜においても膜の固定荷電基に対する対イオンの移動度よりもプロトンの移動度が著しい影響を受けることが明らかとなった。荷電膜における弱電解質の輸送に関しては飽和現象モデルや界 動力学モデル等が考えられて

いるが、プロトンの輸送現象も含めてさらに考察しなければならない。また浸透圧による水の輸送がプロトンに与える影響も考慮しなければならない<sup>(6, 20-24)</sup>。

### 3.2 荷電膜中のイオン濃度と弱電解質の見かけの解離定数

外部溶液濃度に対して、中和滴定により決定した膜中の水素イオン濃度と未解離の酢酸のカルボキシル基の濃度の和  $\bar{C}_0$  をプロットしたものを Fig. 8 に示す。□、■がそれぞれ3成分系の負荷電膜と正荷電膜における結、○、×がそれぞれ2成分系の負荷電膜と正荷電膜における結果である。これらの濃度から計算した膜内の各成分

Table 5 Ion Mobility  $\omega_+$  and  $\omega_-$  ( $\text{mol cm}^2 \text{ J}^{-1} \text{ S}^{-1}$ ) Determined by Permeability Equation due to the Permeability Coefficient Measurements

	$\omega(\text{H}^+)$	$\omega(\text{CH}_3\text{COO}^-)$
In Negatively Charged Membrane	$6.76 \times 10^{-14}$	$9.44 \times 10^{-10}$
In Positively Charged Membrane	$8.77 \times 10^{-5}$	$4.82 \times 10^{-9}$
In Water	$3.76 \times 10^{-8}$	$4.39 \times 10^{-9}$

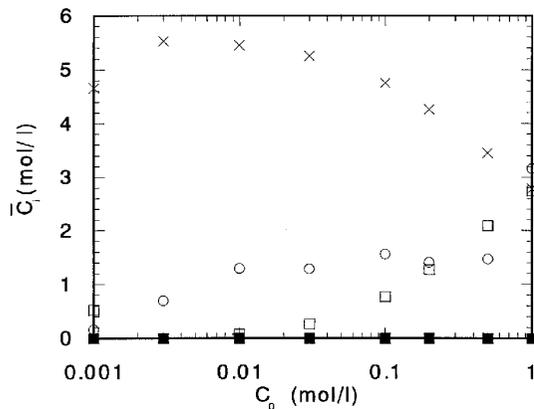


Fig.9 Concentrations of  $\text{H}^+$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{K}^+$  and  $\text{CH}_3\text{COOH}$  in negatively charged membrane are plotted as a function of the total concentration in the external solution ( $C_0$ ) for K101-ternary ionic system, where □ corresponds to  $\text{H}^+$ , ■  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ , ○  $\text{CH}_3\text{COOH}$  and X  $\text{K}^+$ .

の濃度を、Fig. 9～Fig.12に示す。荷電密度を考慮するといずれの系においても、電気的中性条件の成立していることが確認できた。また外部溶液濃度が1.0mol/Lまで大きくなっても、副イオン濃度は極めて小さい濃度となり、副イオンに対するDonnan排除が強電解質系よりも顕著に現れた。

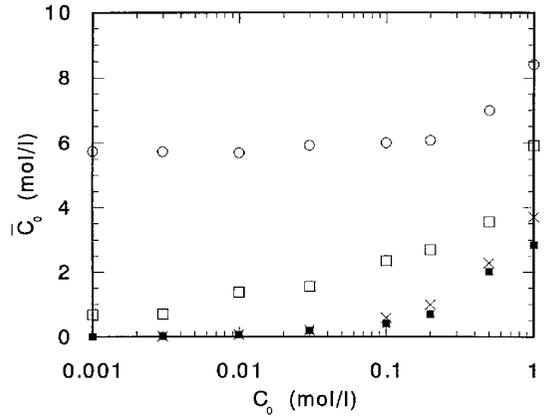


Fig.8 The total concentrations of dissociated and undissociated acetic acid ( $C_0 = C_1 + C_2$ ) in the charged exchange membrane determined by titration are plotted as a function of the total concentration in the external solution ( $C_0$ ), where □ corresponds to K101 in ternary ionic system, ■ A201 in ternary ionic system, ○ K101 in binary ionic system and X A201 in binary ionic system.

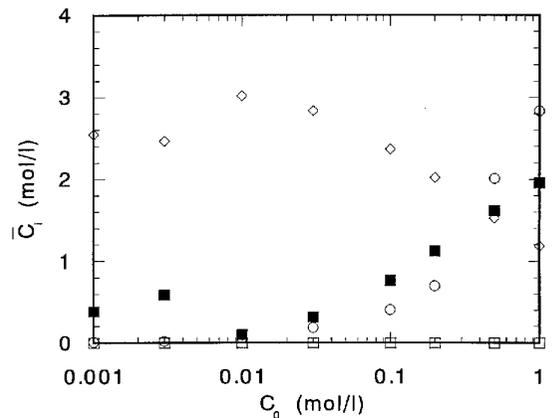


Fig.10 Concentrations of  $\text{H}^+$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{Cl}^-$  and  $\text{CH}_3\text{COOH}$  in positively charged membrane are plotted as a function of the total concentration in the external solution ( $C_0$ ) for A201-ternary ionic system, where □ corresponds to  $\text{H}^+$ , ■  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ , ○  $\text{CH}_3\text{COOH}$  and ◇  $\text{Cl}^-$ .

これは、外部溶液中の解離したイオン濃度が小さいためである。3成分系では、膜内の対イオンが外部溶液の  $H^+$  または  $CH_3COO^-$  と置き換わるを見積もることができる。強電解質溶液では  $1.0\text{mol/L}$  の時、ほとんど全ての対イオンが置き換わるが、弱電解質の場合、 $1.0\text{mol/L}$  でも、約半分の対イオンが置き換わるにとどまっている。このことも、弱電解質の解離したイオンが少ないことに起因している。Fig. 9、Fig.10をもとに解

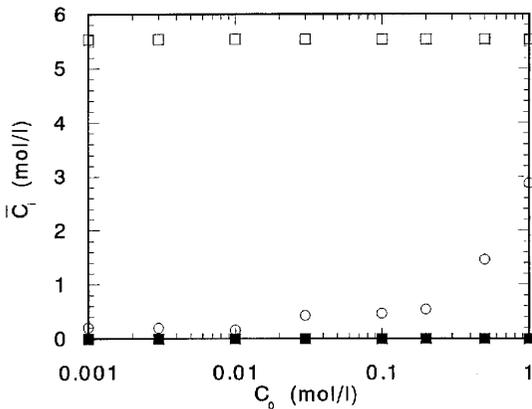


Fig.11 Concentrations of  $H^+$ ,  $CH_3COO^-$  and  $CH_3COOH$  in negatively charged membrane are plotted as a function of the total concentration in the external solution ( $C_0$ ) for K101-binary ionic system.  $\square$  corresponds to  $H^+$ ,  $\blacksquare$   $CH_3COO^-$  and  $\circ$   $CH_3COOH$ .

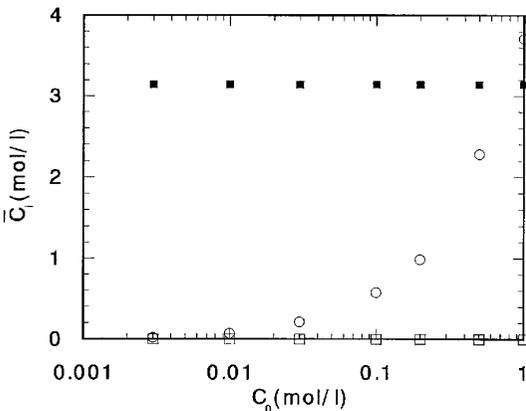


Fig.12 Concentrations of  $H^+$ ,  $CH_3COO^-$  and  $CH_3COOH$  in positively charged membrane are plotted as a function of the total concentration in the external solution ( $C_0$ ) for A201-binary ionic system.  $\square$  corresponds to  $H^+$ ,  $\blacksquare$   $CH_3COO^-$  and  $\circ$   $CH_3COOH$ .

離定数を求め Fig.13 に示す。いずれの系においても、図中に実線で示した水中  $25.5^\circ\text{C}$  における酢酸の解離定数 ( $1.73 \times 10^{-5}$ ) より大きい。このような解離定数の上昇の原因としては、膜の、物理的構造、化学的構造、固定荷電基の影響等が考えられる<sup>(19)</sup>。

### 3.3 荷電膜中の弱電解質の真の解離定数

膜中の真の解離定数  $\overline{K_{th}}$  は膜中の活  $a_i$  とおくと次式で与えられる。

$$\overline{K_{th}} = \frac{\overline{a_a}}{\overline{a_s}} = \frac{\overline{\gamma_i \cdot C_i \cdot \gamma_j \cdot C_j}}{\overline{\gamma_s \cdot C_s}} \quad (8)$$

ここで  $\overline{\gamma_i}$  及び  $\overline{C_i}$  はそれぞれ膜中の活 係数及び濃度である。また外部水溶液中の解離定数  $K_{th}$  との間に次の関係が成立する。

$$\overline{K_{th}} = \frac{k_i k_j C_i \gamma_i \gamma_j C_j}{k_s \gamma_s C_s} = \frac{k_i k_j a_i a_j}{k_s a_s} = \frac{k_i k_j}{k_s} K_{th} \quad (9)$$

ここで  $\gamma_i$  及び  $C_i$  はそれぞれ外部溶液中の活 係数及び濃度、 $k_i$  は分配係数である。このことから、膜中の解離定数はカチオン、アニオン、未解離の中性分子の分配係数に対応して変化する。分配係数は膜相が固定電荷を持たない時に、各イオンまたは中性分子が水相、膜相に分配される割合を示し、溶液の濃度や電位には依存しない量である。

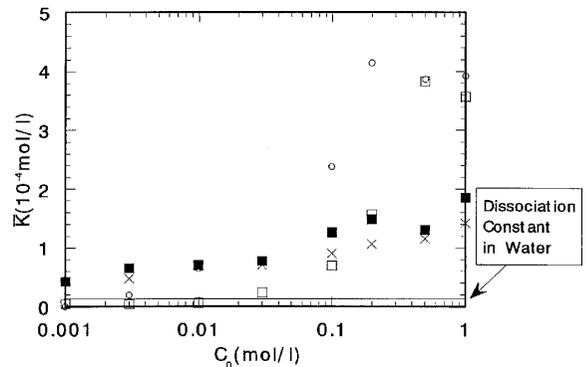


Fig.13 Apparent dissociation constants in charged membrane are plotted as a function of the total concentration in the external solution ( $C_0$ ), where  $\square$  corresponds to K101 in the ternary ionic system,  $\blacksquare$  A201 in ternary ionic system,  $\circ$  K101 in binary ionic system and  $\times$  A201 in binary ionic system.

従って膜中の解離定数は外部溶液の溶質濃度に依存せず、一定となることが確認された。

### 3.4 荷電基の異なる膜における解離定数

負荷電膜における2成分系で、荷電密度の異なる膜を使用し、外部溶液濃度を0.1mol/Lとして、見かけの解離定数をもとに見かけの解離定数を計算した。この時の膜内のイオン及び、未解離の中性分子の濃度はFig.14に、見かけの解離定数はFig.15に示す。また見かけの解離定数は、正荷電膜の結も合わせてTable 6に示す。Fig.14によ

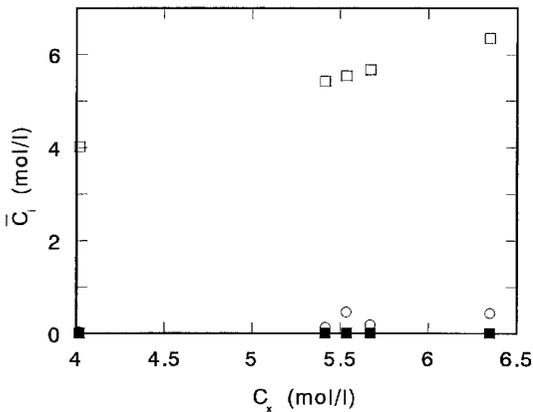


Fig. 14 Concentrations of  $H^+$ ,  $CH_3COO^-$  and  $CH_3COOH$  in negatively charged membrane equilibrated with 0.1 mol/L acetic acid solution are plotted as a function of the fixed charge density ( $C_x$ ), where  $\square$  corresponds to  $H^+$ ,  $\blacksquare$   $CH_3COO^-$  and  $\circ$   $CH_3COOH$ .

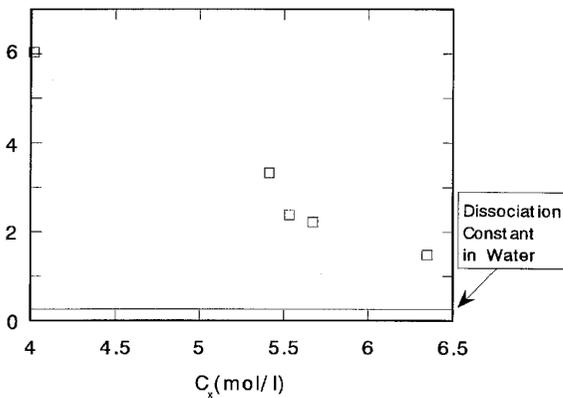


Fig. 15 The dissociation constants in charged membrane equilibrated with 0.1 mol/L acetic acid solution are plotted as a function of the fixed charge density ( $C_x$ ).

ると膜中の対イオンの量は、固定荷電基の量に応じて増加しており、副イオンの量はほとんど変化しない。また中性分子の量は0.03mol/L (TK11) から0.43mol/L (TK15) までかなり大きく変化した。しかしFig.13において、負荷電膜の場合、中性分子の活 係数が解離定数に大きく影響した濃度は0.47mol/L ( $C_0=0.1mol/L$ ) 以上である。故にここで取り扱う系では中性分子の活量係数もほぼ一定であると考えられる。Fig.15、Table 5をみると、全ての荷電膜において、解離定数は水中に比べて大きくなっており、荷電膜中で解離定数は増加することが荷電密度の異なる膜についても確認された。また荷電基の量に注目すと、Fig.15の結は荷電密度の増加に伴い、解離定数が減少している。従って、固定荷電基は解離を押さえる効果があると考えられる<sup>(19)</sup>。

### 3.5 アミノ酸の透過

Fig.16、Fig.17に負荷電膜におけるグリシン及びロイシンの透過係数をpHの関数として示す。pHの変化と共に透過係数は変化するが、膜の両界面におけるpHの境界条件に著しく依存する。グリシン及びロイシン共に実験(a)でpH=5.9の時透過係数が最も小さくpHが減少すると透過係数が増加する。最大の透過係数は実験(b)でpH=1の時得られた。またグリシンの場合実験(c)でpH=1場合透過係数が著しく減少し実験(a)でpH=5.9の時と同様の値になった。pHが減少すると実験(a)、(b)、(c)間で透過係数の違いが著しくなる。pH=

Table 6 Apparent dissociation constant  $\bar{K}$  in negatively charged membrane equilibrated with 0.1 mol/L  $CH_3COOH$

	Negatively charged membrane					Positively charged membrane	
	TK11	TK12	TK13	TK15	K101	TA13	A201
$\bar{K}$ (mol/l)	$6.0 \times 10^{-4}$	$3.3 \times 10^{-4}$	$2.2 \times 10^{-4}$	$1.5 \times 10^{-4}$	$2.4 \times 10^{-4}$	$5.6 \times 10^{-5}$	$9.1 \times 10^{-5}$

1の時、透過係数は実験(b)>実験(a)>実験(c)の順番であった。

アミノ酸は等電点付近の水溶液中でR-C(NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)HCOO<sup>-</sup>、酸性溶液中でR-C(NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)HCOOHとなる。HCl水溶液中ではプロトン、アミノ酸カチオン、塩素イオン、中性アミノ酸が存在しこれらがお互いに影響しあいながら荷電膜の中を移動する。これらの輸送はドナン平衡、ネルンストープランクのイオン輸送の式、膜界でのプロトン化及び脱プロトン化を支配する反応速度論により説明

される。従ってNaCl存在下ではアミノ酸はほとんど透過せず実験(a)のHCl濃度0の時とほぼ同一になった<sup>(17, 18)</sup>。

#### 4 結論

以上の結果から皮膚のように電荷を持った媒体中を化粧品のような弱電解質が移動する時は、強電解質の移動とは著しく異なることが明らかとなった。特に媒体内のプロトンが他の分子の移動に大きく影響を与えている。このことに対して本研究

では媒体中の固定荷電基とプロトンとの電気的相互作用が原因であると考えた。一方媒体と外部相界におけるプロトンと弱電解質との反応が支配しているとの考えもある。また式(1)には考慮しなかったが浸透圧による水の移動も無視することができない。これらのメカニズムを明らかにすることは皮膚における化粧品の安全性を考慮する上で非常に重要であると考えられる。

#### 5 本研究に関する投稿論文

- 1) MKawaguchi, TMurata and A.Tanioka, "Membrane potentials in charged membranes separating solutions of weak electrolytes", J.Chem.Soc.,Faraday Trans., 93, 1351-1356, 1997
- 2) A.Tanioka, MKawaguchi, MHamada and K. Yoshie, "Dissociation constant of weak electrolyte in charged membrane", J. Phys. Chem.,102, 1730-1735, 1998
- 3) M. Minagawa and A. Tanioka, "Leucine transport through cation exchange membranes: effect of HCl concentration on interfacial transport", J. Colloid & Interface Sci., 1998, in press

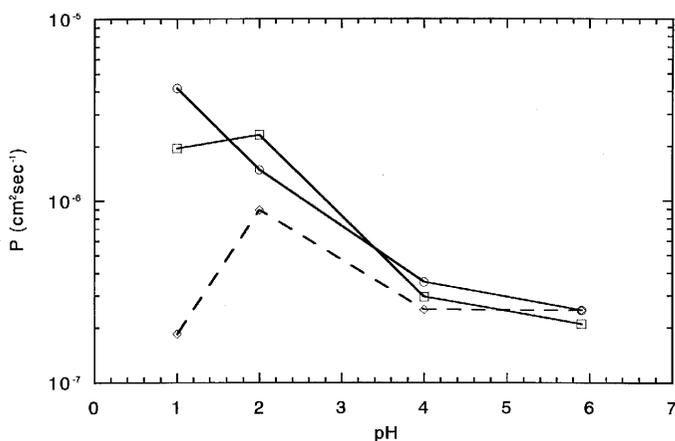


Fig. 16 Permeability coefficients of glycine obtained for  $c_A = 5 \times 10^{-2}$  mol/L in the experiments (a), (b) and (c) as a function of pH. Experiment (a) indicated by square (□), experiment (b) circle (○) and experiment (c) rhombus (◇).

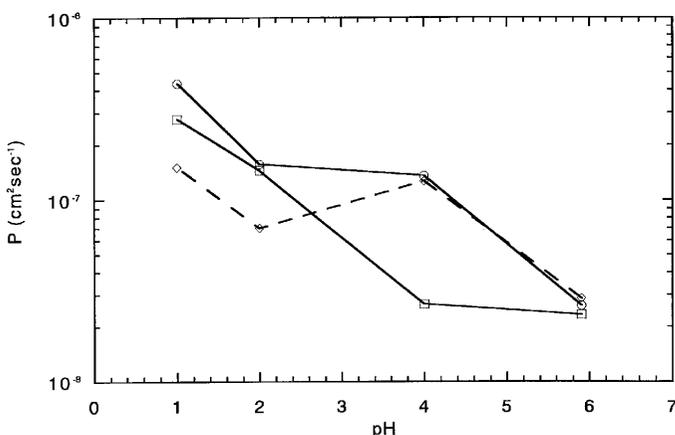


Fig. 17 Permeability coefficients of leucine obtained for  $c_A = 5 \times 10^{-2}$  mol/l in the experiments (a), (b) and (c) as a function of pH. Experiment (a) indicated by square (□), experiment (b) circle (○) and experiment (c) rhombus (◇).

参考文献

- (1) F.Helfferich, Ion Exchange, McGraw-Hill, New York, 1962
- (2) N.Lakshminarayanan, Transport Phenomena in Membranes, Academic Press, New York, 1969
- (3) R.Schloegl, Stofftransport durch Membranen, Steinkopff, Darmstadt, 1964
- (4) A.Katchalsky and P.F.Curran, Non-equilibrium Thermodynamics in Biophysics, Harvard Univ. Press, Cambridge, 1967
- (5) R. B.Gennis, Biomembrane, Molecular Structure and Function, Springer, New York, 1989
- (6) M.Kawaguchi, T.Murata and A.Tanioka, J.Chem.Soc.,Faraday Trans., 93, 1351, 1997
- (7) T.Teorell, Proc.Soc.Exptl.Biol., 33, 282, 1935
- (8) T.Teorell, Progress Biophysics Biophysical Chem., 3, 305, 1953
- (9) K.H.Meyer and J.F.Sievers, Helv.Chim.Acta., 19, 649, 665, 987, 1936
- (10) F.G.Donnan, Z.Electrochem, 17, 572, 1911
- (11) F.G.Donnan, Z.Physik.Chem., A 168, 369, 1934
- (12) W.Nernst, Z.Phys.Chem., 2, 613, 1888
- (13) W.Nernst, Z.Phys.Chem., 4, 129, 1889
- (14) M.Planck, Ann. Physik. Chem., 39, 161, 1890
- (15) M.Planck, Ann. Physik. Chem., 40, 561, 1890
- (16) N.Lakshminarayanan, Equations of Membrane Biophysics, Academic Press, Orlando, 1984
- (17) M. Minagawa, A. Tanioka, P. Ramirez and S. Mafe, J. Colloid and Interface Sci., 188, 176, 1997
- (18) M. Minagawa and A. Tanioka, J. Colloid & Interface Sci., 1998, in press
- (19) A.Tanioka, M. Kawaguchi, M. Hamada and K. Yoshie, J. Phys. Chem., 102, 1730-1735, 1998
- (20) M.Higa, A.Tanioka and K.Miyasaka, J. Membrane Sci., 37, 251, 1988
- (21) M.Higa, A.Tanioka and K.Miyasaka, J. Membrane Sci., 49, 145, 1990
- (22) W.Pusch, Desalination, 59, 105, 1986
- (23) Y.Toyoshima, Y.Kobatake and H.Fujita, Trans. Faraday soc. Faraday Soc., 63, 2814, 1967
- (24) N.Kamo, Y.Toyoshima, H.Nozaki and Y.Kobatake, Kolloid-Z. U. Z Polymere, 248, 914, 1971

# 小分子化学物質によるアトピー性皮膚炎の発症と 予防についての基礎研究

岐阜薬科大学 薬理学

永井博弐

The purpose of the present study is to investigate whether or not simple chemicals are able to introduce atopic dermatitis like symptoms in mice. An another purpose of the present study is to investigate the pharmacological and immunological prevention of such symptoms. For the first purpose, we tried to make a good model for atopic dermatitis in mice by using dinitrophenylbenzene (DNFB) on the ear skin. Consequently, we have established two different kinds of models for atopic dermatitis in mice.

In the first model, mice were passively sensitized by an intravenous injection of monoclonal anti-dinitrophenol (DNP) IgE, and their ears challenged epicutaneously with dinitrofluorobenzene (DNFB) 24 h later. The cutaneous reaction estimated by ear thickness reached a peak 1 and 24 h after the antigen challenge. Histopathological studies indicate that eczematous skin lesion (24 h) in mice is similar to that in human atopic dermatitis. Prednisolone at doses of 3 to 10 mg/kg clearly inhibited the IgE-mediated cutaneous reaction.

In the second model, DNFB was painted on the mice ear five times. The thickness due to dermatitis reached a maximum 24 hr after the second, third and fourth paintings. The strong expressions of INF- $\gamma$  and IL-2 but not IL-4 and IL-5 mRNAs in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in the skin lesions indicated the participation of Th1 cells in the ear delayed type hypersensitivity reaction. Simultaneously, hapten specific IgE (sIgE) was detected in serum from the immunized mice. These results indicate that five topical applications of DNFB to the mouse ear produces eczematous dermatitis in the ear and hapten sIgE in the serum. This model shows typical atopic dermatitis symptoms in the skin and IgE production. Regarding second project, the effect of anti-IL-4 monoclonal antibody on this hapten-induced contact dermatitis and IgE antibody production are studying now. The results will be reported in near future.

## 1 目的

近年の化学工業の発展に伴いアレルギー疾患の患者が増加している。この主な原因は生活環境の変化と同時に精神衛生面の環境変化が挙げられている。アレルギー疾患発症の大きな要因は遺伝的要素と環境因子であることは多くの研究者によって指摘されている。本研究の目的は化粧品などに含まれる小分子化学物質によるアトピー様皮膚炎の発症機序と予防法について動物モデルを用いて検討することである。近年、アトピー性皮膚炎の患者数は増加の一途を辿っている。特に、成人の患者数が増加し、社会問題にもなっている。これまで、教室では種々のアレルギー疾患の発症機序

とそれらの予防法について検討を行ってきた。アトピー性皮膚炎はその中でも最も重要な課題の一つである。これまで、アレルゲンとしてはダニ抗原に代表される室内アレルゲン、食物および化粧品に含まれる小分子化合物などが知られているが、近年、我々は小分子化合物によるアトピー性皮膚炎様症状を発症するマウスモデルの作成に成功したのでそれらを用い、小分子化合物による皮膚炎の発症機序の解明を行ない、さらに予防法についての検討を行った。

## 2 実験

### 2.1 実験材料

実験動物は体重 16 ~ 21 g の 9 ~ 10 週令雌性 BALB/c 系マウスを、日本 SLC より購入して使用した。マウスは温度  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $60 \pm 5\%$  の恒温恒湿飼育室にて、自由給水下に固形飼料（ラボ MR ストック、日本農産）を用いて飼育した。抗原として 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB, Nacalai Tesque) を用いた。DNFB は、acetone



Basic studies on the onset and prevention of atopic dermatitis with simple chemicals

Hiroichi Nagai

Department of Pharmacology, Gifu Pharmaceutical University

(Nacalai Tesque) : olive oil (東海製薬) = 3 : 1 (v/v) 溶液に 0.15% となるように溶解した。抗体は Monoclonal mouse anti-DNP IgE 抗体 (MMCE) を用いた。MMCE は、DNP 化ブタ回虫抽出物で免疫した Balb/c 系マウス脾細胞から樹立したマウス IgE 抗体産生細胞株 (EC1) を培養して作製し上清を回収して MMCE とした。MMCE は -80℃ で凍結保存し、実験には培養上清をそのまま使用した。MMCE 中の力価は、ラット 48hr heterologous passive cutaneous anaphylaxis を用い 1 : 512-1024 であった。また、enzyme linked immunosorbent assay によって測定した IgE の濃度は、2914.52ng/mL であった。

## 2.2 実験方法

IgE 依存性二相性皮膚反応は Sakurai ら<sup>1)</sup>の方法に従い惹起した。すなわち、雌性 Balb/c 系マウスに MMCE 1 mL を静脈内注射して受動的に感作し、24 時間後に 25mL の DNFB をマウス両耳殻の表裏に塗布して反応を惹起した。反応惹起後、種々の時間にダイヤルシクネスゲージ (Peacock ; 尾崎製作所、東京) を用いて両耳殻の厚さを測定した。成績は、反応惹起直前と反応惹起後の耳殻の厚さの差で示した。

抗原反復塗布の実験はマウスの両耳介の表裏に 0.15% DNFB を 25mL 宛、1 週間に 1 回の割合で 5 回塗布して反応を惹起した。

## 2.3 統計学的解析

成績は平均値 ± 標準誤差で示した。有意差検定は、Dunnet multiple range test あるいは Student's t-test および Aspin-Welch によって行った。

## 3 成績および考察

これまでにマウスを用いた二種類の in vivo モデルの作成にほぼ成功した。in vivo モデルでは dinitrofluorobenzene (DNFB) を抗原としてそれに対応するモノクローナル IgE 抗体を用いて生じる遅発型皮膚炎、および前述の DNFB を抗原として皮膚に反復塗布すると当初、遅延型接触性皮膚炎

の症状を示したのち、やがて血清 IgE 値の上昇を伴う皮膚炎が発症し、その組織像、サイトカイン発現パターンおよび治療薬の薬効から両モデルともアトピー性皮膚炎の類似モデルであると考えられた。

これらのモデルを用いて発症に関与する炎症細胞および組織細胞の役割をサイトカイン、リピッドメディエーターを中心に検討し、それぞれの発症における役割を明らかにした。

### 1) DNFB による二相性皮膚反応

図 1 に各系統のマウスにおける二相性皮膚反応の成績を示す。ddY、ICR および Balb/c 系マウスでは反応後 1 及び 24 時間にピークを示す二相性の反応がみられる。肥満細胞欠損マウスである WBB6F1-W/Wv マウスでは即時相の反応はみられないが、遅発相の反応がみられた。また、T cell 欠損マウスの Balb/c-nu/nu マウスでは Balb/c+/+ 正常マウスと変わらない二相性皮膚反応がみられた。更に、本二相性皮膚反応は IL-1 および TNF に対するモノクローナル抗体により抑制されるが、IL-5 に対する抗体によっては影響されなかった (図 2)。しかし、抗炎症薬のプレドニゾロンは用量依存的に本反応を抑制した (図 3)。図 4 にその際の組織写真を示す (図 4)。すなわち、抗原である DNFB の塗布により正常部位 (A) に比べ、好中球を中心とする多くの炎症性細胞の浸潤がみられ、表皮の肥厚が観察される (B)。さらに、血管の著明な拡張がみられた。これに対し、プレドニゾロン投与群では炎症性細胞の浸潤や表皮の肥厚は少なく、組織学的にも明らかに炎症反応は抑制された。これらのことから、本モデルは低分子化合物とそれに対応する抗体により生じるアレルギー性皮膚炎であり、低分子化合物による皮膚炎症の発症と予防の研究に有用であるものと思われた。

### 2) DNFB 反復塗布によるアレルギー性皮膚炎

DNFB を一週に一回、マウスの耳殻に塗布すると接触性皮膚炎による炎症反応が観察される (図 5)。またこの時血清中には DNP に対する特異的

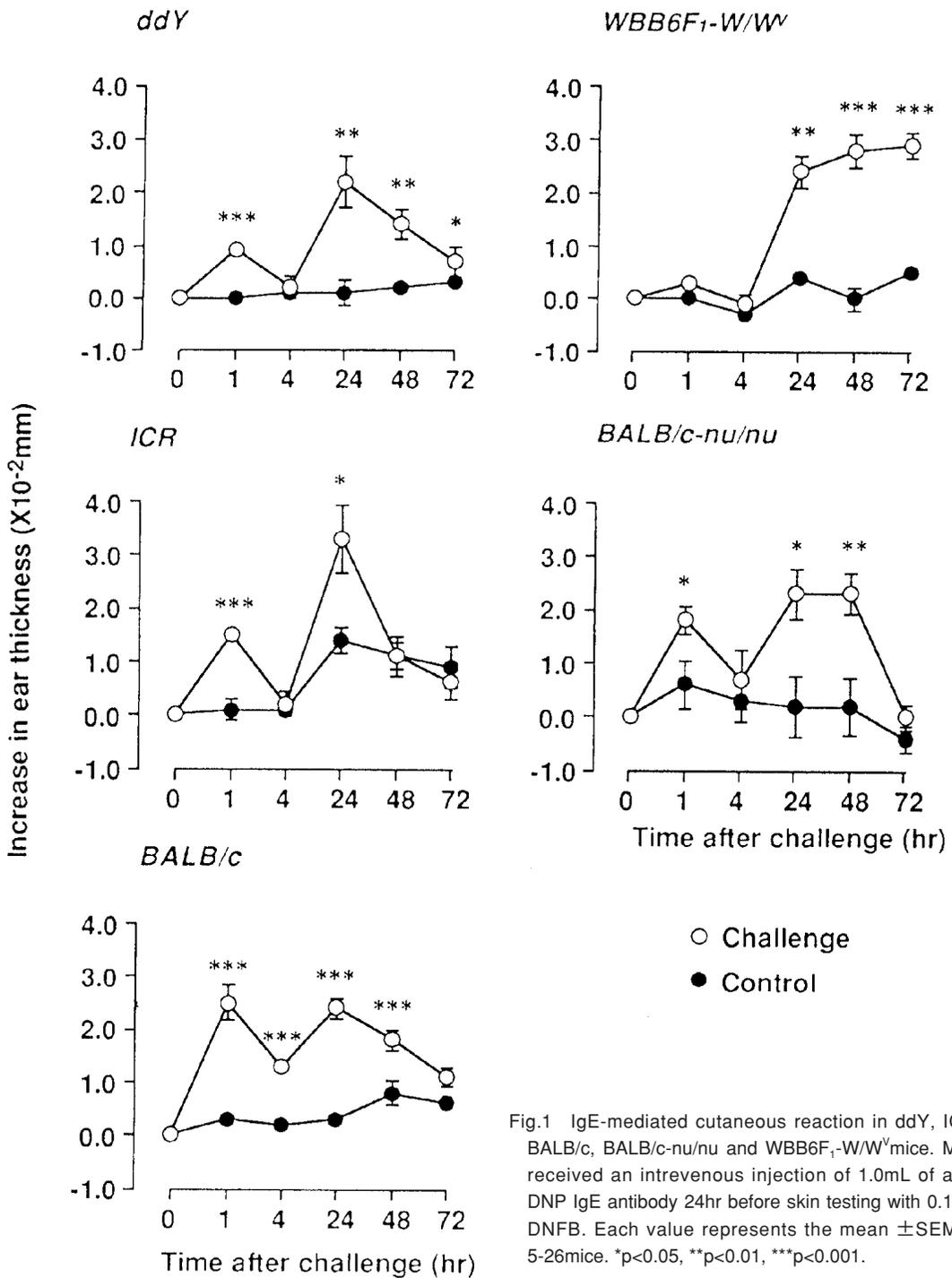


Fig.1 IgE-mediated cutaneous reaction in ddY, ICR, BALB/c, BALB/c-nu/nu and WBB6F<sub>1</sub>-W/W<sup>V</sup> mice. Mice received an intravenous injection of 1.0mL of anti-DNP IgE antibody 24hr before skin testing with 0.15% DNFB. Each value represents the mean  $\pm$  SEM of 5-26mice. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

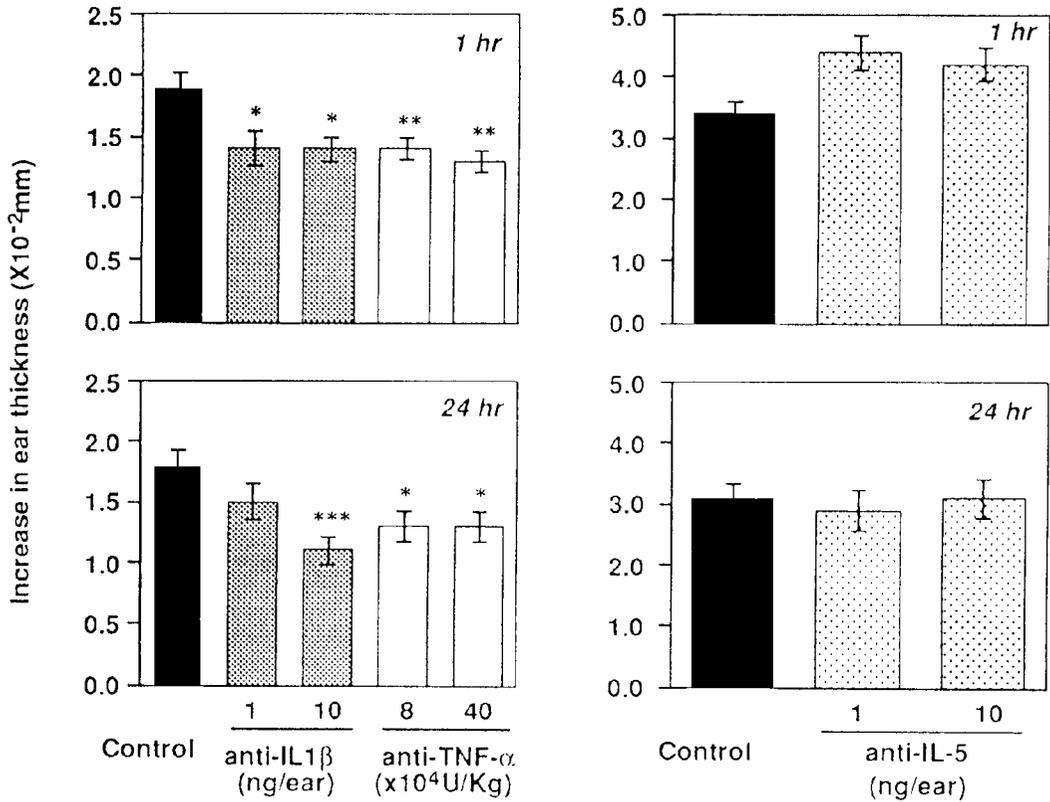


Fig.2 Effects of anti-IL-1 $\beta$ , anti-TNF- $\alpha$  and anti-IL-5 on IgE-mediated cutaneous reaction in BALB/c mice. Anti-IL-1 $\beta$  and anti-IL-5 were given intradermally and anti-TNF- $\alpha$  was intravenously 10min before antigen challenge. Each value represents the mean  $\pm$  SEM of 5-8 mice. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001

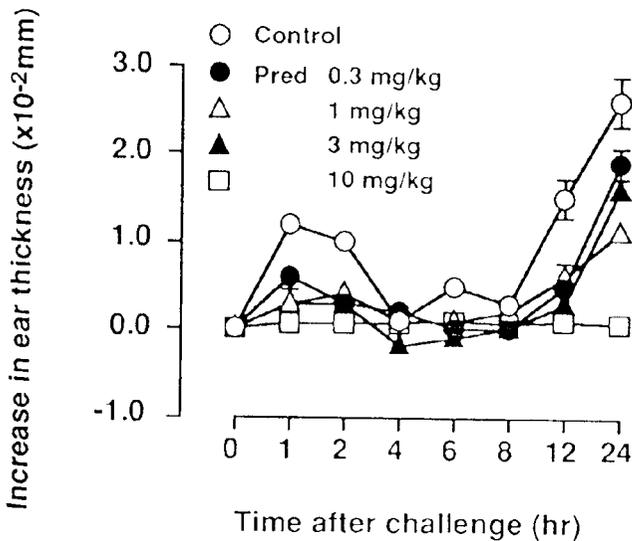


Fig.3 Effect of prednisolone on IgE-mediated cutaneous reaction in BALB/c mice. prednisolone was administered intraperitoneally 2hr before antigen challenge. Each value represents the mean  $\pm$  SEM of 8mice.

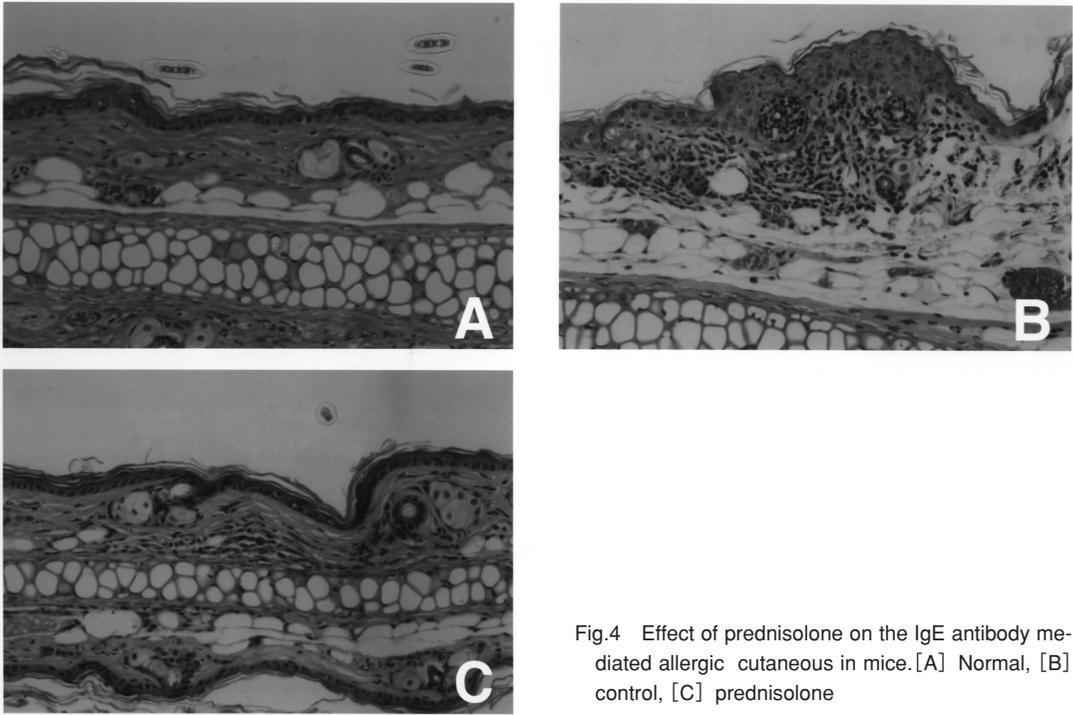


Fig.4 Effect of prednisolone on the IgE antibody mediated allergic cutaneous in mice. [A] Normal, [B] control, [C] prednisolone

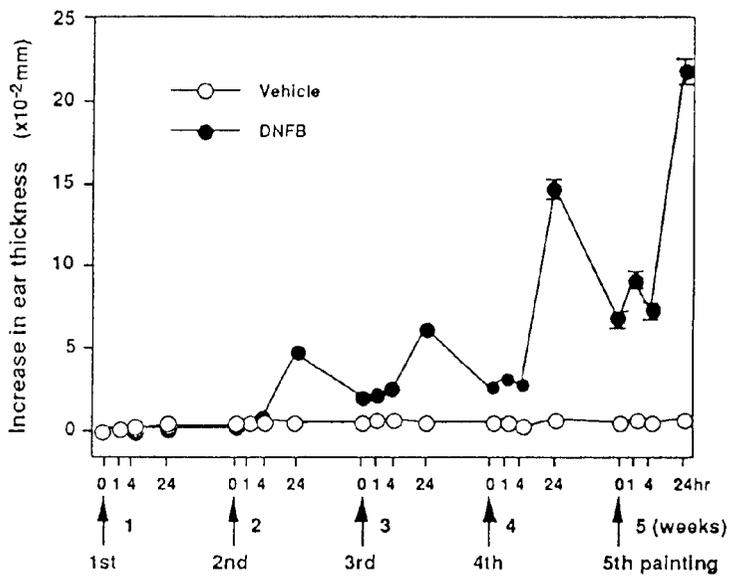


Fig.5 Ear swelling caused repeated painting of DNFB in mice. Ears of mice received atypical application of 0.15% DNFB in acetone and olive oil or vehicle once a week for 5 times. Each point indicated the mean  $\pm$  SEM of 8mice. hr: Time after each painting(hours)

IgE抗体が証明された (Table 1)。このことはこれまで、単純なハプテンでは接触によっては接触性皮膚炎のみの発症であると考えられたことが、明らかに、免疫グロブリンの産生を伴う反応が発症できることを示しており、ヒトのアトピー性皮膚炎を考える上で重要な発見であった。また、こ

の時の耳介局所およびリンパ節でのサイトカインの mRNA 発現を RT-PCR 法で測定すると耳介局所では IFN- $\gamma$  および IL-2 の mRNA の発現がみられ、Th 1 細胞の関与が示唆された (図 6)。この時、Th 2 サイトカインである IL-4 および IL-5 は耳介では証明されず、頸部リンパ節において

Table 3 Effect of repeated of DNFB on the serum immunogloblin levels

Antibody titer	sIgE(EU/ml)	tIgE(EU/ml)	tIgG( $\mu$ g/ml)	tIgM( $\mu$ g/ml)
0 week (n=7)	0	365 $\pm$ 76	117 $\pm$ 25	563 $\pm$ 78
5th painting of Vehicle (n=18)	0	173 $\pm$ 43	1456 $\pm$ 61	745 $\pm$ 70
5th painting of DNFB (n=19)	163 $\pm$ 25	4909 $\pm$ 433	1235 $\pm$ 48	571 $\pm$ 42

Mice ears were painted with the vehicle or 0.15% of DNFB once a week for 5 weeks. The titer of hapten specific IgE(sIgE), total IgE(tIgE), total IgG(tIgG) and total IgM(tIgM) in mouse serum was measured at 0 week and 4hr after the fifth painting of the vehicle or DNFB on the ear. sIgE and tIgE readings are given in ELISA units(EU)/ml compared with laboratory generated DNP-sIgE and tIgE standards. tIgG and tIgM readings given in  $\mu$ g per ml compared with respective commercial standards. The values represent the arithmetic mean  $\pm$ SEM of indicated number of mice.

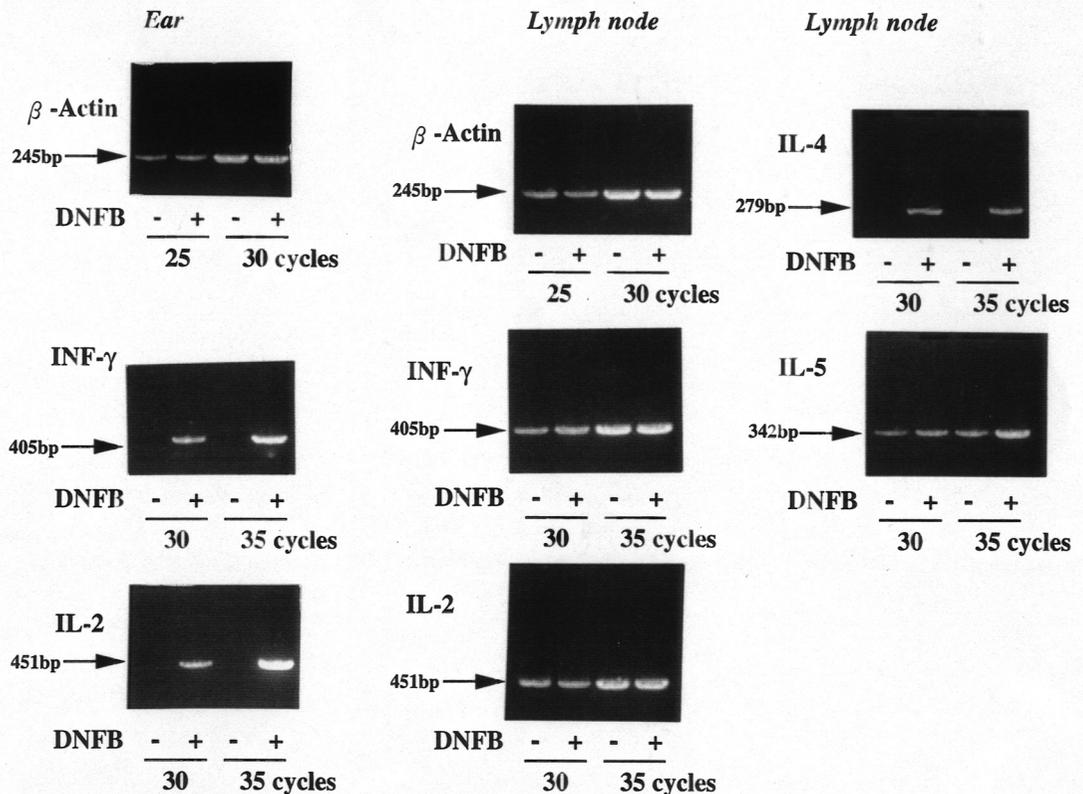


Fig.6 Expression of cytokine mRNA in the ears and cervical lymph nodes of mice treated with DNFB. Ears of mice received a topical application of 0.15% DNFB in acetone and olive oil or vehicle once a week for 5 times. The expression of IFN-  $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5 and  $\beta$ -actin mRNAs were examined using RT-PCR.

その発現あるいは発現増強がみられた。更にこのことはリンパ節でのIgE産生を示唆する germline C $\epsilon$  および productive C $\epsilon$  の mRNA が証明されたことから確かめられた。以上のような多くの基

礎検討から本反応の発症は図7に示すような機序が想定された。

すなわち、小分子化合物によるアレルギー性皮膚炎の報告は大半が接触性皮膚炎についてであ

# Characteristics of the model

## Repeated antigen application-induced ear swelling and IgE production

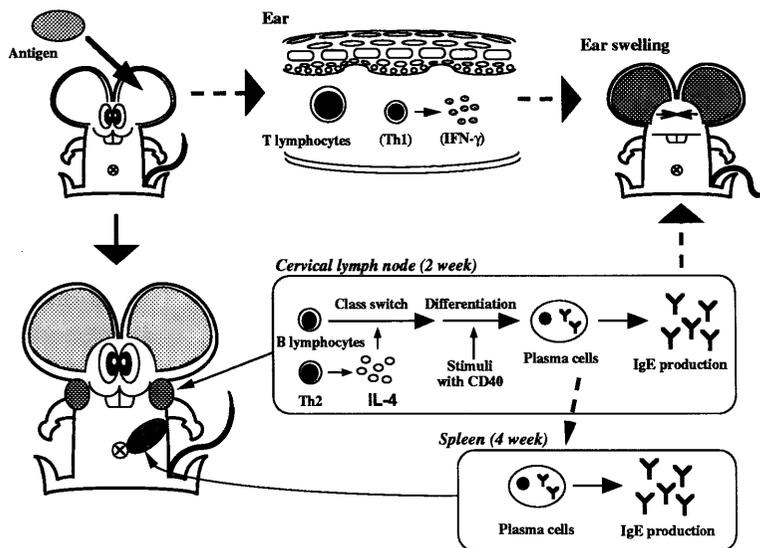


Fig.7 DNFB 塗布によるアレルギー性皮膚炎モデルの発症機序

る。抗原を経皮的に塗布することによる感作では、これまでほとんど皮膚での単核球の浸潤を主体にした組織学的判定により検討してきた。また、最近免疫学の進歩により、T細胞のうち helper T細胞は、その機能の違いから Th 1細胞と Th 2細胞に分類されることが明らかになった。接触性皮膚炎の発症は Th 1細胞が反応性細胞であることも次第に明らかにされてきた。さらに、Th 2細胞は液性抗体産生に必要な細胞としてとらえられている。しかし、小分子化合物による免疫反応についての解析はほとんど行なわれていない。今回の我々のモデルは小分子化合物を皮膚に反復塗布すると皮膚では接触性皮膚炎に類似の症状を呈しながら Th 1細胞活性化が起き、次第に全身のリンパ系組織で Th 2細胞が活性化されて免疫グロブリン、特に IgE 抗体の産生が始まることを明らかにしたものである。従って、多くの点でヒトのアトピー性皮膚炎と類似しており、小分子化合物によるアトピー性皮膚炎モデルとして有用であるものと思われる。

以上、本研究ではこれまであまり解析されな

った小分子化合物によるアトピー性皮膚炎様症状の発症についての研究に有用なモデル系を確立でき、今後、系統的にその発症機序と予防についての免疫薬理学的な検討を行う予定である。

### 参考文献

- 1) Sakurai T, Inagaki N and Nagai H; The effect of anti-tumor necrosis factor (TNF)-a monoclonal antibody on allergic cutaneous late phase reaction in mice. *Life Science*, 54, PL291-295, 1994
- 2) Nagai H, Sakurai T, Inagaki N et al.; An immunopharmacological study of biphasic allergic skin reaction in mice, *Biol Pharm Bull* 18, 239-245, 1995
- 3) Nagai H, Sakurai T, Abe T et al.; TNF-a participates in an IgE-mediated cutaneous reaction in mast cell deficient, WBB6F1-W/Wv mice. *Inflamm Res* 45, 136-140, 1996
- 4) Inagaki N, Tsunematu M, Sakurai T et al.; Effect of prednisolone on IgE dependent biphasic cutaneous reaction in Balb/c mice. *Gen. Pharmac.* 28, 93-97, 1997
- 5) Nagai H, Matsuo A, Hiyama H et al.; Immunoglobulin E production in mice by means of contact sensitization with a simple chemical hapten, *J. Allergy Clin. Immunol.*, in press, 1997
- 6) Nagai H, Hiyama H, Matsuo A et al.; FK-506 and cyclosporin A potentiate the IgE antibody production by contact sensitization with hapten in mice *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 283, 321-327 (1997)

# 酸化ストレスにより生体膜に生成する 酸化型リン脂質の代謝機構の解明

北里大学 薬学部

中 川 靖 一

Phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) is the unique antioxidant which is able to reduce the phospholipid hydroperoxides produced in biomembrane. PHGPx is preferentially localized in mitochondria as compared with another type of glutathione peroxidase such as classical GPx (cGPx). The cDNA for PHGPx included two site for initiation of translation. One deduced product was 20 kDa PHGPx (non-mitochondrial type) and another was 23 kDa PHGPx (mitochondria type) which possessed a signal peptide for the targeting to mitochondria. Cells that overexpressed the 23 kDa PHGPx were more resistance than control cells to the oxidative damage of mitochondria caused by the treatment with KCN, while the protective effect for the mitochondria damage were not observed in the 20 kDa PHGPx-overexpressed cells. The 23 kDa PHGPx could prevent cell death due to the damage of mitochondria with oxidative stress and would be a key antioxidant enzyme to protect a damage of the skin which is exposed to oxidative damage.

## 1 緒 言

皮膚は生体の最外層にあり、さまざまな物質による化学的、物理的な障害の最前線にある。特に紫外線などによる最大の標的となるのは高度不飽和脂肪酸をもつリン脂質であり、過酸化反応の結果生ずる過酸化脂質は皮膚の炎症、老化を引き起こす原因物質として注目を集めている。過酸化脂質研究の歴史は古いが、生体膜中に生ずる脂質の過酸化物の除去に係わる防御機構を検討した報告は少ない。リン脂質が過酸化されることより生ずる一次生成物はリン脂質ヒドロペルオキシドであり、この生成を抑制することは生体膜の酸化的な障害の防御につながる。特に、細胞内の活性酸素の主要な産生場であるミトコンドリアでの過酸化脂質の蓄積は細胞の老化、さらには細胞の死に至ることから、ミトコンドリア内の防御因子の役割を明らかにすることは重要と考えられている<sup>1)</sup>。

リン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ (PHGPx) はリン脂質やコレステロールヒドロペルオキシドなど生体膜中に生ずる脂質ヒドロペルオキシドを消去できる細胞内の唯一の抗酸化酵素であり、広く組織、細胞に存在している<sup>2, 3)</sup>。我々は生体膜に生ずる酸化型リン脂質であるリン脂質ヒドロペルオキシドの代謝機構を考える上で、PHGPxはカギとなる酵素であると考え、本研究では細胞の老化と深く係わるミトコンドリアにおける本酵素の生理的な役割について検討を行った。

## 2 実 験

### 2.1 PHGPxの細胞内分布の測定

ヒト血管内皮系ガン細胞株 ECV304 細胞、ラット好塩基球系細胞 RBL2H3 細胞の PHGPx を放射性セレンで標識した後、オルガネラに分画した。遠心分離により、核、ミトコンドリア、ミクロソーム、細胞質に分画した。可溶化したミクロソーム、ミトコンドリア画分および細胞質画分を抗PHGPxモノクローナル抗体で免疫沈降を行い、得られた試料について SDS-PAGE を行った。ゲルを乾燥後、イメージングアナライザーにより放射活性のあるスポットを検出した。



The enzymatic regulation of production of oxidative phospholipids in biomembrane suffered with oxidative stress

Yasuhito Nakagawa

Faculty of pharmaceutical Sciences Kitasato University

## 2.2 in vitro 翻訳系によるリコンビナント PHGPx の作成

PHGPxcDNA を用いて、T7 RNA polymerase により調製した mRNA に [<sup>35</sup>S] メチオニン、ウサギ網状赤血球ライゼートを加え、リコンビナント蛋白質の作成を行った。

## 2.3 PHGPx のミトコンドリアへの輸送

### 2.3.1 in vitro でのミトコンドリアへの輸送

ラット肝臓ミトコンドリアにリコンビナント PHGPx を添加し、反応を開始させた。一定時間に 2,4-ジニトロフェノールを添加して反応を停止させた後、遠心し、ミトコンドリアと上清に分離した。ミトコンドリアは Proteinase K によりミトコンドリア表面に結合したリコンビナント PHGPx を消化した。遠心により得られたミトコンドリアを可溶化して SDS-PAGE を行った。泳動後、イメージアナライザーにより放射活性を測定し、定量した。

### 2.3.2 Green Fluorescent Protein (GFP)

#### 融合タンパク質の細胞内分布の測定

PHGPx の第 1 開始コドンから第 2 開始コドンを含むアミノ酸配列の 1 番から 32 番までをコードする遺伝子、および第 2 開始コドンからのアミノ酸 28 番から 70 番までをコードする遺伝子を GFP 遺伝子にライゲーションしたキメラ cDNA (L-GFP、S-GFP) を構築した。第 1 開始コドンを含まない S-GFP、第 1 開始コドンを含む L-GFP をエレクトロポレーションを用いて、RBL-2H3 細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入した細胞をカバーガラスに細胞を付着させ、ホルムアルデヒドに 20 分間浸し、細胞を固定した。カバーガラスを洗浄後、GFP の蛍光を蛍光顕微鏡で観察した。

## 2.4 ミトコンドリア型、細胞質型 PHGPx 高発現細胞株の樹立

第 1 開始コドンを含むミトコンドリア型 PHGPx をコードしている pRPHGPx4 と、第 2

開始コドンを含む細胞質型 PHGPx をコードしている pRPHGPx2 を哺乳動物の発現ベクターをベクターに組み込み、エレクトロポレーション法により RBL-2H3 細胞へ遺伝子導入した。またコントロール細胞として、PHGPx インサートを含まない発現ベクター SR- $\alpha$  と pSV2-neo を導入した細胞も同時に作成した。遺伝子導入した細胞をゲネチシンにより耐性株を選択し、高発現細胞のスクリーニングを行った。

## 3 結果

### 3.1 PHGPx の細胞内分布

ヒト血管内皮細胞株である ECV304 細胞について細胞を放射性セレンで 4 日間標識し、PHGPx の放射活性の細胞内分布について調べた。対象として、GPx として一般的によく知られている cytosolic GPx (cGPx) についても、同様に調べ、比較検討した。Fig. 1 に示すように ECV304

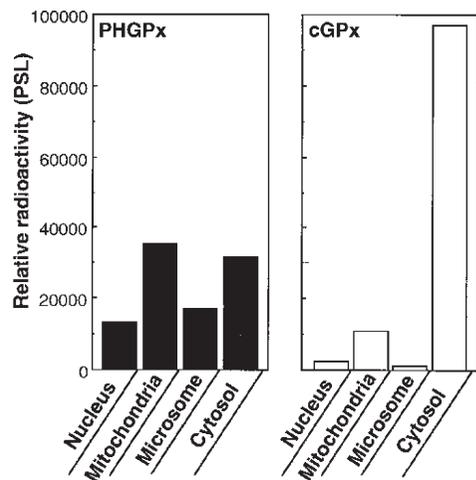


Fig. 1 Subcellular localizations of PHGPx and cGPx in the ECV304 cells.

ECV304 cells were metabolically labeled with <sup>75</sup>Se (0.14 mCi/mL) for 4 days. The <sup>75</sup>Se-labeled cells were fractionated by differential centrifugation into nuclear fraction, mitochondrial fraction, microsomal fraction and cytosolic fraction. Distribution of PHGPx and cGPx was determined by immunoprecipitation analysis with anti-PHGPx and anti-cGPx. Relative radioactivities of PHGPx and cGPx were calculated from scanning densitometry by a Bio-Imaging Analyzer.

細胞では、cGPx の総発現量の 86% が細胞質画分に存在していた。PHGPx は核画分に 13%、ミトコンドリア画分に 34%、ミクロソーム画分に 18%、細胞質画分に 33% の割合で存在しており、いずれのオルガネラにおいても発現が見られたが、ミトコンドリア画分と細胞質画分に多く分布していた。ラット好塩基球系細胞である RBL-2H3 細胞においても ECV304 細胞と同様に cGPx は主に細胞質に存在しており、PHGPx はミトコンドリア画分に多く存在していた。

ミトコンドリア画分および細胞質画分における PHGPx と cGPx の存在量比について見ると、細胞質画分では cGPx 量は PHGPx の約 3.5 倍であるのに対して、ミトコンドリア画分では cGPx は PHGPx の約 1/3 であり、ミトコンドリアにおいて PHGPx の存在比が高いことが明らかになった。このことは細胞質に存在する主な GPx のアイソザイムは cGPx であり、ミトコンドリアでは PHGPx であることを示している。

### 3.2 分子量の異なる 2 種の PHGPx の発現

ラット脳 cDNA ライブラリーより PHGPx の cDNA をクローニングを行った結果、PHGPx には翻訳開始点が 2 つ存在していた (Fig. 2)<sup>3)</sup>。それぞれの開始コドンを含む cDNA を鋳型として *in vitro* の蛋白質合成系を用いて、リコンビナント PHGPx の合成を行った。第 1 開始コド

ンを有する cDNA からは 197 アミノ酸からなる分子量約 23kDa の PHGPx (L-form) が、第 2 開始コドンからは 170 アミノ酸からなる分子量約 20kDa の PHGPx (S-form) が翻訳された<sup>4)</sup>。第 1 開始コドンと第 2 開始コドンの間のリーダー配列がオルガネラへの輸送シグナルとなっている蛋白質が存在することから、PHGPx のこのリーダー配列がミトコンドリアへの輸送シグナルであるか否かについて検討した。

### 3.3 PHGPx のミトコンドリアへの輸送機構

放射性メチオニンで標識されたリコンビナント PHGPx をミトコンドリアとともに反応させ、ミトコンドリア内へ輸送された PHGPx 量を SDS-PAGE で調べた (Fig. 3)。反応 30 分後においても、リーダー配列を持たない 20kDa の S-form の PHGPx は輸送されず、ミトコンドリア内に放射性 PHGPx は検出されなかった。一方、リーダー配列を持つ 23kDa の L-form と反応したミトコンドリア内では輸送された PHGPx が検出された。ミトコンドリア内に輸送された L-form の分子量は 20kDa に変化していることが明らかとなった。ミトコンドリア内に輸送された 20kDa PHGPx はリーダー配列を認識するポリクローナル抗体 (抗 P-1 抗体) で沈降されないことから、ミトコンドリア内に輸送された 23kDa L-form のリーダー配列はプロセッシングにより切断され、20kDa の

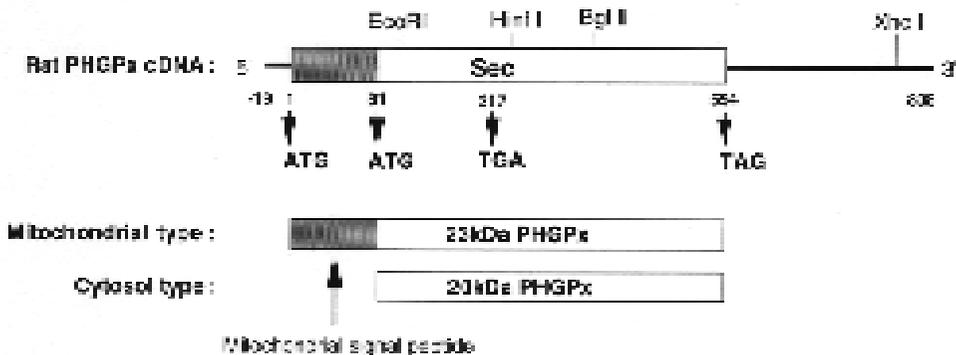


Fig. 2 The structure of cDNA for rat PHGPx.

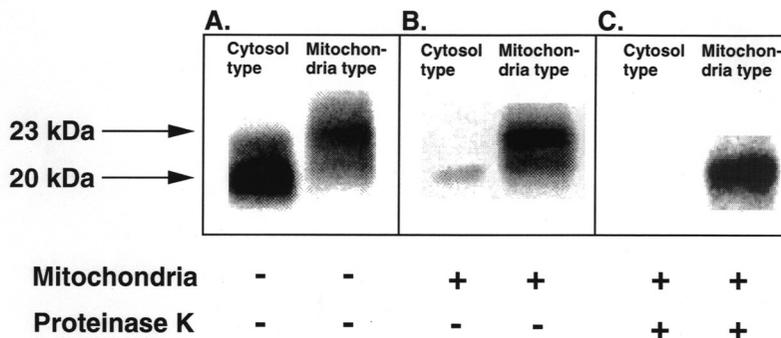


Fig. 3 Import of mitochondria type PHGPx into mitochondria

The cytosol type and the mitochondria type of [<sup>35</sup>S] PHGPx, synthesized in the in vitro translation system (A), was incubated with rat liver mitochondria at 25°C for 30 min (B). After import, the mitochondria were treated with proteinase K for 30 min at 0 °C (C). After the incubation, the mitochondria were further incubated with proteinase K, reisolated and analyzed by 12.5% SDS-PAGE, with subsequent autoradiography and quantitative analysis with the Bio-imaging analyzer.

PHGPxに変化したものと考えられた。これらの結果より、リーダー配列を有する 23kDa L-form の PHGPx がミトコンドリア内へ輸送されることが明かとなった。

L-form のリーダー配列が細胞内でミトコンドリアへの標的化シグナル（ターゲティングシグナル）として機能するのかについて細胞レベルで明らかにするため、シグナルペプチド-GFP の融合タンパク質を細胞内に発現させることにより検討した。リーダー配列を含む 32 アミノ酸をコードする配列をクラゲ蛍光蛋白質である GFP の N 末側に融合させた L-GFP、第 2 開始コドン以降の 42 アミノ酸をコードする配列を同様に融合させた S-GFP の 2 種類の発現ベクターを RBL-2H3 細胞に導入し、発現した GFP 融合タンパク質の細胞内分布を蛍光顕微鏡で調べた。その結果、S-GFP を発現させた細胞は細胞全体に蛍光が見られ、S-GFP は主に細胞質に分布していることが示された。L-GFP は S-GFP の細胞内分布とは明かに異なり、蛍光の分布はミトコンドリア特異的蛍光色素であるローダミン 123 (Rh123) の蛍光パターンと良く一致した。このことはリーダー配列を融合させた GFP タンパク質 (L-GFP) は

ミトコンドリアへ選択的に輸送されることを示している。以上のことから、第 1 開始コドンから翻訳される 23kDa PHGPx がミトコンドリアに輸送されるミトコンドリア型 PHGPx であり、第 2 開始コドンから翻訳されている 20kDaPHGPx がミトコンドリア以外に存在する細胞質型 PHGPx であることが明かになった。

### 3.4 ミトコンドリアの選択的な酸化的障害に対する PHGPx の役割

PHGPx のミトコンドリアにおける役割を明らかにするために、ミトコンドリア型 PHGPx を高発現した M15 細胞、細胞質型 PHGPx を高発現した L 9 細胞を作成し、ミトコンドリアの酸化的障害に対する応答を調べた (Fig. 4)。電子伝達系複合体 IV の阻害剤であるシアン化カリウム (KCN) で各細胞を処理し、生存率を調べた。コントロール細胞株の S 1、細胞質型 PHGPx 高発現細胞株の L 9 細胞では KCN 処理後、2 時間後に強い細胞障害が見られ、処理後 4 時間での生存率は 35%であった。しかし、ミトコンドリア型 PHGPx を高発現した細胞株である M15 細胞では同時間の処理においても 69%の生存率を示し、

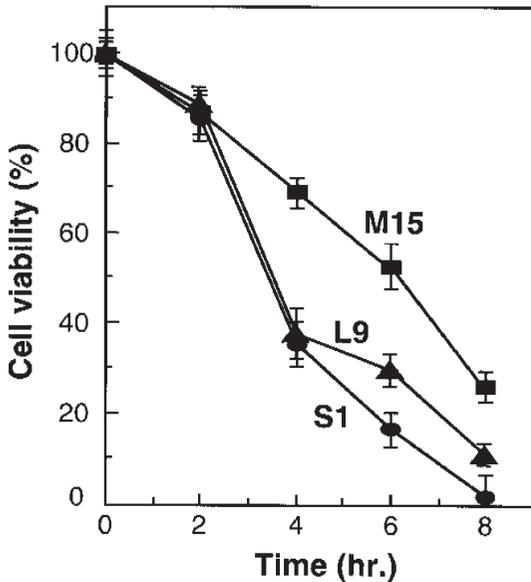


Fig. 4 Effects of KCN on the cell viability of the PHGPx overexpressed cells.

Mitochondrial type PHGPx overexpressed cells (closed squares, M15), cytosolic type PHGPx overexpressed cells (closed triangles, L9) and control cells transfected with the empty vector (closed circles, S1) were plated in  $0.5 \times 10^5$  cells/well in 5%FCS/DMEM. After 24h, these clones were exposed for the indicated time with 25mM KCN. After the treatment of KCN, cell viability was examined with the release of lactate dehydrogenase (LDH). Viability is expressed as a percentage, relative to the total LDH in the cells that were lysed with 0.2% Tween20. Data are expressed as the means of triplicate results.

処理後6時間においても56%の生存率を保っており、S1、L9細胞と比較して約2倍の耐性を獲得していた。これらの結果より、ミトコンドリアの酸化障害に対し、細胞質型PHGPxは関与することはないが、ミトコンドリア型PHGPxは防御因子として機能していることが明らかとなった。

#### 4 考察

活性酸素の主要な産生場であるミトコンドリアに存在する抗酸化酵素はミトコンドリアの酸化障害に起因する老化、アポトーシスの細胞死を抑制する上で極めて重要な役割を果

たしていると考えられている。絶えず酸化的ストレスの環境下にある表皮細胞のミトコンドリア機能を維持するために、PHGPxは主要な役割を果たしているものと推測される。ミトコンドリア抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)の発現はストレスに応じて変動することから、SODに連動して活性酸素を消去するPHGPxの発現も変動するものと考えられるが、PHGPxの発現制御に関しては細胞質型、ミトコンドリア型の転写調節を含めほとんど明らかにされていない。生体膜の酸化型リン脂質の産生調節機構を明らかにするためにはPHGPxの発現調節機構の解明はこれからの検討されるべき課題である。こうした問題を明らかにすることにより、ミトコンドリアの酸化障害が介在するさまざまな疾病の発症、老化、アポトーシスの細胞死の機構の解明につながるものと期待される。

#### 引用文献

- 1) Quillet MA, Jaffrezou JP, Mansat V, et al. : Implication of mitochondrial hydrogen peroxide generation in ceramide-induced apoptosis, *J. Biol. Chem.*, 272, 21388-21395, 1997.
- 2) Roveri A, Maiorino M, Ursini F. : Enzymatic and immunological measurements of soluble and membrane-bound phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, *Method in Enzymology*, 233, 202-212, 1994.
- 3) Imai H, Sumi D, Hanamoto A, et al. : Molecular cloning and functional expression of a cDNA for rat phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase : 3'-untranslated region of the gene is necessary for functional expression, *J. Biochem.*, 118, 1061-1067, 1995.
- 4) Arai M, Imai H, Sumi D, et al. : Import into mitochondria of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase requires a leader sequence, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 227, 433-439, 1996.

# アレルギー性接触皮膚炎成立の必要条件となる ハプテンによる成熟分化機構の解析

東北大学 医学部皮膚科

相 場 節 也

After application of haptens to the skin, Langerhans cells (LCs), i.e., immature dendritic cells (DCs) in the skin, move to secondary lymphoid organs to sensitize naive T cells. During this process, LCs become mature DCs with augmented expression of various co-stimulatory molecules and class II MHC antigens. In this scenario, however, critical questions remain as to what kind of chemicals can induce this maturation process through what kind of mechanisms. To clarify these questions, we used monocyte-derived CD1a<sup>+</sup> DCs instead of LCs since LCs matured in *in vitro* culture, spontaneously. After we confirmed that monocyte-derived DCs showed at least phenotypic characteristics and a response to TNF $\alpha$  similar to LCs, we added various chemicals, i.e., dinitrochlorobenzene (DNCB), trinitrochlorobenzene (TNCB), NiCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, sodium lauryl sulfate (SLS), or benzalkonium chloride (BC), to a culture of purified monocyte-derived CD1a<sup>+</sup> DCs. Among them, only NiCl<sub>2</sub> and DNCB significantly increased the surface expression of CD54, CD86, HLA-DR antigen, and IL-1 $\beta$  production, while SLS, BC, or ZnCl<sub>2</sub> could not augment them, except for weak augmentation of CD86 expression by SLS. Among these three molecules, the increase in the expression of CD86 induced by NiCl<sub>2</sub> or DNCB was most remarkable, being observed in DCs from almost all the subjects we examined. TNCB could also induce responses similar to those with DNCB, but the number of the subjects whose DCs responded to it was far less than that of the subjects whose DCs responded to NiCl<sub>2</sub> or DNCB. In spite of the augmented CD86 expression on DCs treated with DNCB or NiCl<sub>2</sub>, they induced different responses of DCs in their expression of CD54 and HLA-DR and the production of IL-6 and TNF $\alpha$ . In addition, the up-regulation of CD86 expression on DCs treated with DNCB was significantly suppressed by either anti-IL-1 $\beta$  or anti-TNF $\alpha$  antibody, while that by NiCl<sub>2</sub> was relatively insensitive to these antibody treatments. Finally, the protein kinase C inhibitor, H7, but not staurosporin, could suppress the augmentation of CD86 expression on DCs induced either by NiCl<sub>2</sub> or by DNCB. These data suggest that DCs respond to some haptens by changing their expression of several co-stimulatory molecules and their production of cytokines with a resultant change in potency of antigen presenting function. They also suggest that these chemicals stimulate DCs by different mechanisms. By these responses, DCs may modulate the final immune response to chemicals.

## 1 緒 言

骨髄の幹細胞に由来する樹状細胞は、分化成熟に伴い、種々の co-stimulatory molecules, class II MHC 抗原の発現を増強させることが知られている<sup>1-6)</sup>。この樹状細胞の分化成熟ともなう変化は、はじめ、試験管内での培養後に観察され<sup>7-8)</sup>、その後、同様の現象が、皮膚にハプテンというある種の化学物質が塗布された際にも起こることが我々の研究により明らかにされた<sup>9)</sup>。一方、Macatoni ら<sup>10)</sup>や、Kripke ら<sup>11)</sup>は、その際、ランゲルハ

ス細胞が表皮から所属リンパ節に遊走する事を報告した。これらの報告により、生体内の非リンパ組織のいたるところに分布している樹状細胞が、そこに侵入してくる抗原を取り込み、その後所属リンパ節に遊走しT細胞を感作するというシエーマが完成した。

しかし、このシエーマの中には、非リンパ組織に分布するランゲルハンス細胞がどのような刺激を、どの様な機序で認識し、また、どの様な機序で分化成熟するのかという未解決の問題が存在する。当然、この問題を明らかにするためには、樹状細胞を試験管内で培養する必要があるが、上述したように、ランゲルハンス細胞は試験管内で培養したのみでは、未刺激で分化成熟してしまうため、我々の明らかにしたい問題の解決には利用できない。しかし、最近、Sallustro ら<sup>12)</sup>、および、Romani ら<sup>13)</sup>により、末梢血 CD14 陽性細



Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules.

Setsuya Aiba

Department of Dermatology, Tohoku University School of Medicine

胞を、IL-4、GM-CSF の存在下に培養すると未熟な樹状細胞が誘導できることが報告され、我々は、この培養系を利用してハプテンの樹状細胞への影響を試験管内で検討した。

## 2 実験方法

### 2.1 樹状細胞、ランゲルハンス細胞の培養

樹状細胞の純粋培養は、末梢血バフィーコートから比重遠心にて分離した白血球分画を、抗 CD14 標識ビーズと magnetic activated cell sorter (MACS) にて処理し CD14 陽性細胞を単離した後に、IL-4 と GM-CSF の存在下に培養することにより得た。また、ランゲルハンス細胞は、手術などに際し余った皮膚を dispase、トリプシンなどで処理した後比重遠心を行い、ランゲルハンス細胞の含有率の高い表皮細胞浮遊液を作成し、それを用いた。

### 2.2 化学物質の添加と樹状細胞に対する生物学的効果の検討

可能な限り多くの化学物質の影響を検討したいと考えたが、主に、本研究では、ニッケル、コバルト、dinitrochlorobenzen、trinitrochlorobenzen などのハプテンと分類される化学物質、sodium lauryl sulfate、benzalkonium chloride、phenol など皮膚一次性刺激物質、ハプテンとはなりにくい亜鉛、銅などを中心に検討した。これらの物質を種々の濃度で培養系に加えて以下のアッセイ方法にてその影響を調べた。

### 2.3 flow cytometry を用いた class II MHC 抗原、CD54、CD80、CD86 などの co-stimulatory molecules の発現量の定量

培養樹状細胞に、種々の濃度の化学物質を添加後、経時的に樹状細胞を回収し、抗 class II MHC 抗原、CD54、CD80、CD86 抗体にて免疫染色を施行後、flow cytometry (FACScan) にて解析した。

### 2.4 産生された IL-1a、IL-1b、TNF $\alpha$ 、IL-10、IL-12 などのサイトカインの市販の Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) キットによる定量

樹状細胞培養上清を回収し、市販の ELISA キットにて IL-1a、IL-1b、TNF $\alpha$ 、IL-10、IL-12 の産生量を定量した。

### 2.5 reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

以上の細胞表面マーカー、サイトカインの産生が mRNA の発現増加を伴っているか reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) により半定量した。

### 2.6 抗原提示

樹状細胞の機能的変化に関しては、アロ T 細胞刺激能力を指標にして検討した。

## 3 結果と考察

### 3.1 ランゲルハンス細胞と単球由来樹状細胞の比較 (図 1)

ランゲルハンス細胞と CD14 陽性単球由来の樹状細胞を、いかなるサイトカインも加えていない状態、あるいは、TNF $\alpha$  を添加した状態で培養し、その細胞表面マーカーの変化を比較検討した。ランゲルハンス細胞は、TNF $\alpha$  を加えない培養でも活性化し、CD86 分子の発現を増強してしまい、樹状細胞を分化成熟させることが明らかな TNF $\alpha$ <sup>12, 14)</sup> を添加してもその影響が観察られなかった。

一方、単球由来の樹状細胞では、TNF $\alpha$  無添加では、分化が抑制され CD86 の発現が弱く抑えられており、それに、TNF $\alpha$  添加することにより CD86 の発現が著明に増強され、その影響が明らかに観察された。

### 3.2 化学物質による樹状細胞表面の class II MHC 抗原、CD54、CD80、CD86 などの co-stimulatory molecules の発現増強 (図2、3、4)

そこで、この細胞を用い、7種類の化学物質 (DNFB、TNCB、NiCl<sub>2</sub>、ZnCl<sub>2</sub>、SLS、Benzalkonium、DMSO) が樹状細胞の分化成熟に与える影響を検討した。

まず、培養系にそれぞれを種々の濃度で添加したところ、採取した白血球により個体差がみられたが、今回の検討した試薬のなかでは DNFB、TNCB、NiCl<sub>2</sub> が明らかに樹状細胞の活性化を促した。また、この3種の化学物質の間でも相違が認められ、NiCl<sub>2</sub> は CD86 のみならず HLA-DR 抗原と CD54 の発現を、DNFB は CD86 のみの明らかな発現を増強させた。TNCB

は DNFB に類似した影響を及ぼしたが、実験に用いた白血球による個体差が非常に大きかった。また、RT-PCR を用いた、mRNA の解析によっても、NiCl<sub>2</sub>、DNFB 処理樹状細胞では、CD86 mRNA の発現が増強していた。

### 3.3 樹状細胞によるサイトカインの産生 (図5)

次に、NiCl<sub>2</sub>、DNFB、TNCB、SLS で刺激された樹状細胞がいかなるサイトカインを産生するかを ELISA にて検討したところ、NiCl<sub>2</sub> で刺激された樹状細胞は、IL-1b、TNFα、IL-6 の産生を、DNFB に関しては、IL-1b の産生のみを未処理のコントロールに比べて有意に増加させた。

### 3.4 ハプテン刺激により誘導される樹状細胞の成熟過程におよぼす抗 IL-1b、TNFα 抗体の影響

NiCl<sub>2</sub>、DNFB 刺激により樹状細胞のサイトカイン産生が増強する事が明らかとなったので、次に、樹状細胞の成熟がこれらの産生されるサイトカインにより二次的に誘導されているのか否かを、NiCl<sub>2</sub>、DNFB で刺激された樹状細胞の培養系に抗 IL-1b、TNFα 抗体を添加することにより検討した。

その結果、NiCl<sub>2</sub> により誘導される樹状細胞の CD86 分子の発現増強には、それらの抗体はほとんど影響を及ぼさな

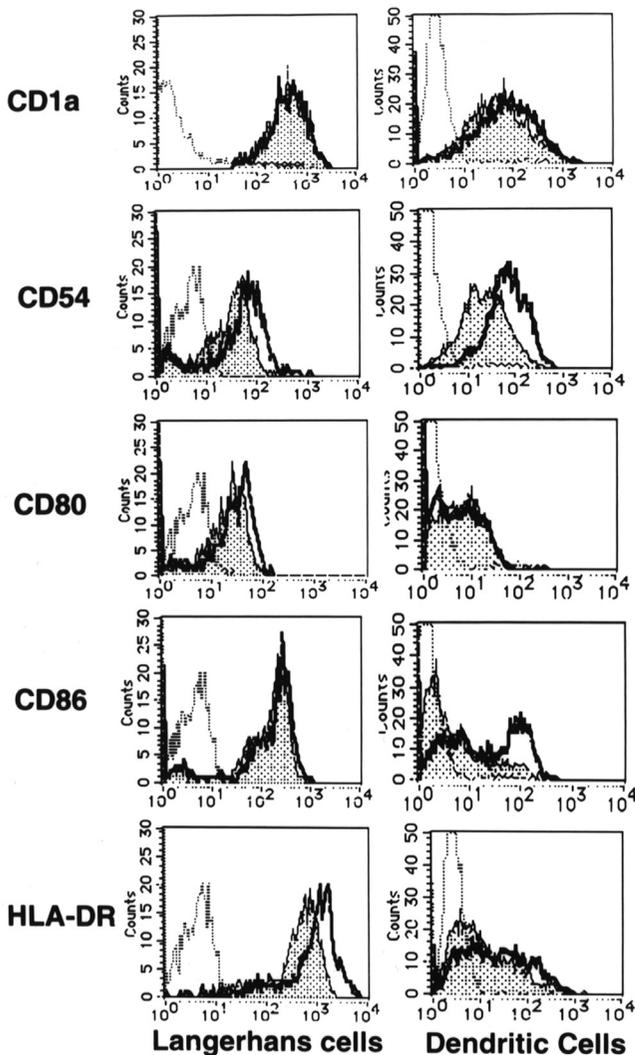


図1 ランゲルハンス細胞と単球由来樹状細胞の細胞表 マーカーの比較  
点線: negative control 抗体, shaded curve: サイトカイン無添加の培養、実線: TNFα 添加培養。ランゲルハンス細胞の培養系では、TNFα の影響がほとんど認められないが、樹状細胞の培養系では、CD86 の発現増強が明瞭に認められる。(文献 17 より)

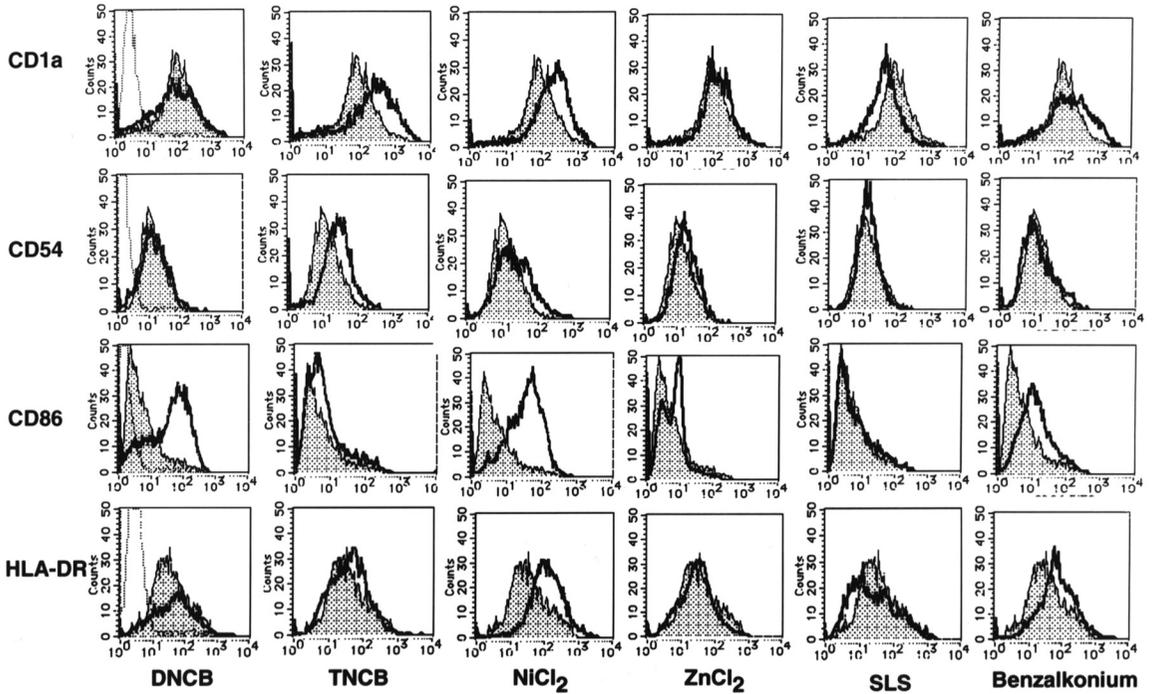


図2 種々の化学物質添加による樹状細胞表 抗原 (flow cytometry profile)

種々の化学物質添加による樹状細胞表 抗原の変化を flow cytometry にて解析した。その代表的なプロフィール。shaded curve: 化学物質を添加しないコントロール、実線; 化学物質添加 48 時間後の発現パターン。(文献 17 より)

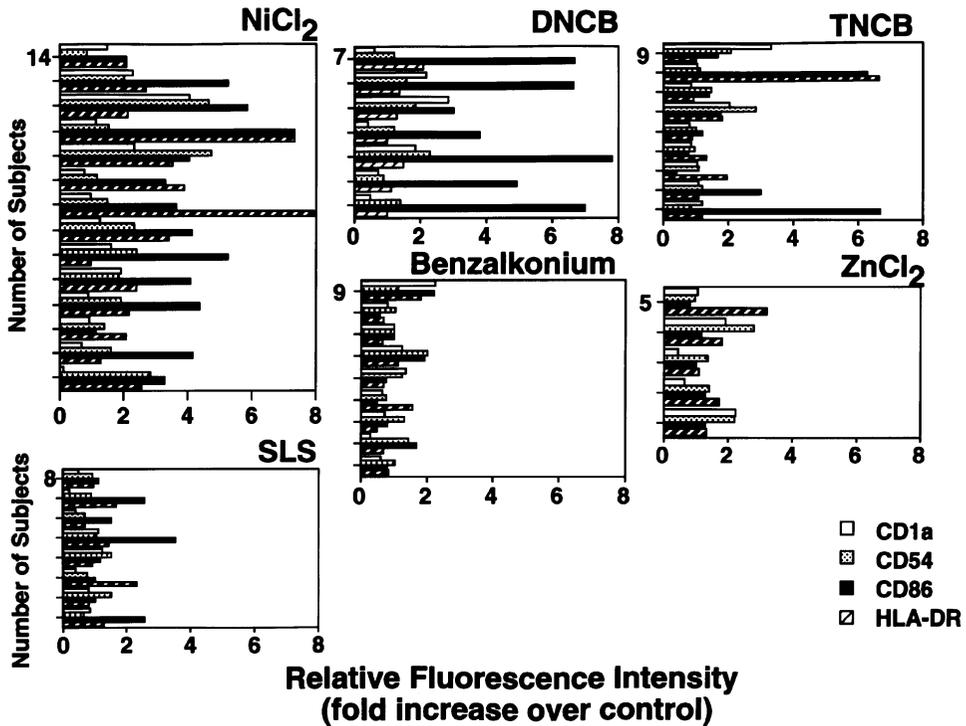


図3 種々の化学物質添加による樹状細胞表 抗原 (前解析例のまとめ)

種々の化学物質添加による樹状細胞表 抗原の relative fluorescence intensity を棒グラフに表した。(文献 17 より)

ったが、DNCBの作用は、抗 TNF $\alpha$  抗体により著明に抑制されることが明らかとなった。以上から、樹状細胞が、ハプテンの種類により、異なった機構により表面マーカーの発現、サイトカインの産生を変化させることが明らかとなった。すなわち、例えば DNCB の場合は IL-1 $\beta$ 、TNF $\alpha$  を産生し、その autocrine 機構により樹状細胞を活性化させ、NiCl $_2$  の場合はサイトカインの分泌を介さず、むしろ、直接、CD86 の発現を増強させる。

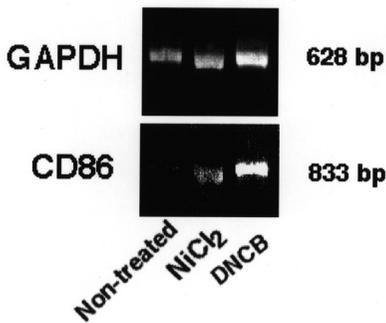


図4 化学物質処理樹状細胞の CD80、CD86mRNA の発現

化学物質処理樹状細胞から mRNA を取り出し、RT-PCR にて CD80、CD86mRNA の発現を比較した。

### 3.5 化学物質の刺激を受けた樹状細胞の抗原提示 (図6)

NiCl $_2$ 、DNCB で刺激された樹状細胞は、アロ T 細胞刺激する抗原提示活性を増強した。また、その活性は抗 CD54、CD86 抗体により抑制された。

### 総括

アレルギー性接触皮膚炎は、一見、T 細胞が成立過程のすべてを支配しているように受けとられがちである。しかし、今回の我々の研究により、実際は、ランゲルハンス細胞あるいは樹状細胞が抗原の侵入を察知し、それを引き金として成熟、分化し、自らの形質を変化させるという過程がきわめて重要なカギを握っていることがあきらかとなった。

化粧品の開発において、添加する化学物質が接触皮膚炎を惹起する物質であるか否かの判定はきわめて重要な過程である。これまでは、その試験を Kligaman、Magnusson ら<sup>15, 16)</sup> により開発された実験動物を用いた maximization test により行ってきた。しかし、この方法には、化粧品というヒトの生命とは関わりのない物の開発に、実験動物の貴重な命を犠牲にしてよいのかと

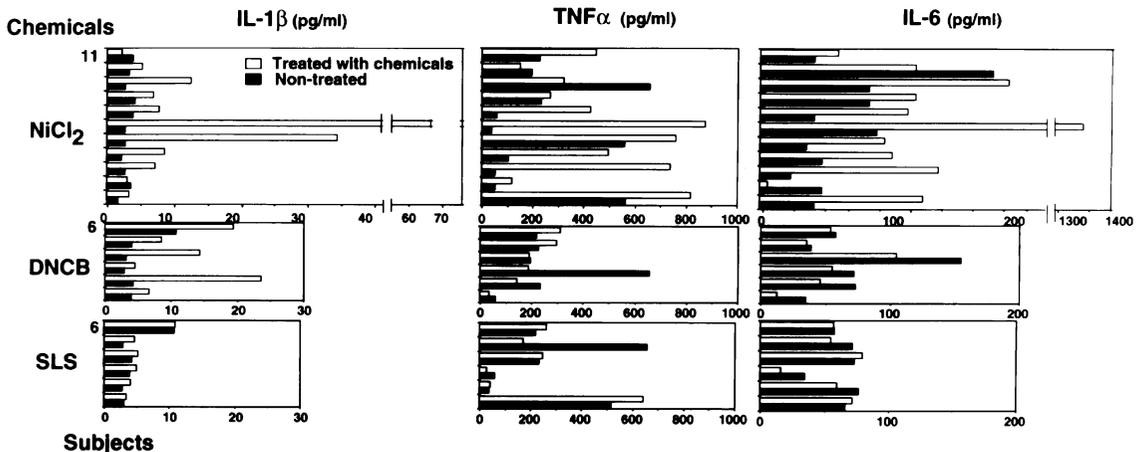


図5 化学物質処理樹状細胞のサイトカイン産生

樹状細胞を NiCl $_2$ 、DNCB、SLS にて処理し 48 時間後の培養上清中に含まれるサイトカインを ELISA に定した。(文献 17 より)

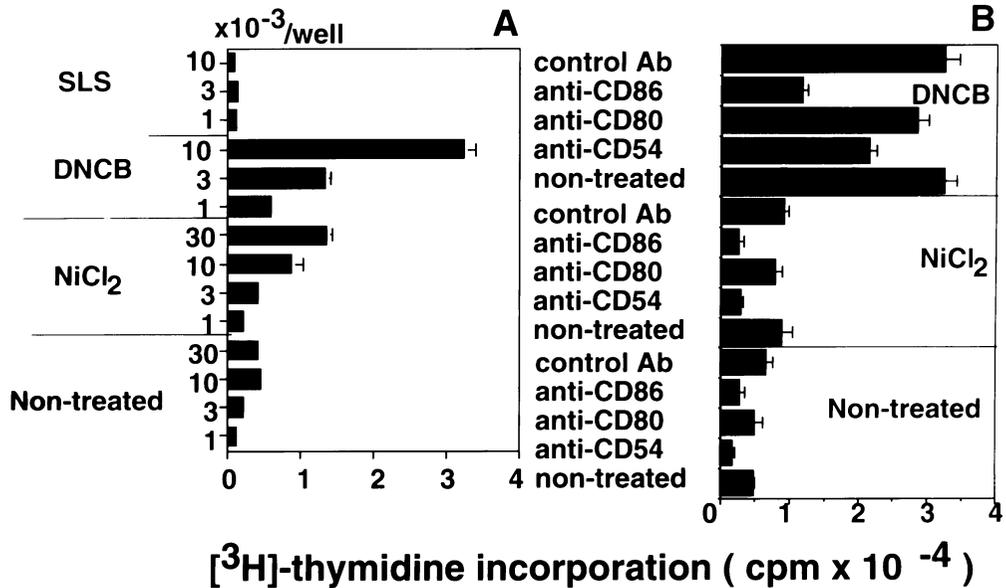


図6 化学物質処理樹状細胞のアロT細胞刺激

化学物質処理した樹状細胞の抗原提示能を、アロT細胞刺激活性を指標に比較した。また、その系に抗体を添加し、その抗原提示活性にどの co-stimulatory molecules が重要な役割を たしているか検討した。

いう倫理的問題と、また、実験動物のデータが果たしてヒトに当てはまるのかという未解決の問題が存在する。今回我々が詳細に検討した樹状細胞培養系は、化学物質に接触皮膚炎を惹起する必要条件が存在するかを明らかにでき、maximization test の代替法としての可能性が示唆される。

なお、以上の結果は、Eur J Immunol vol 27, 2031-2038 に報告した。

文 献

- Steinman, R. M., *Annu Rev Immunol* 1991. 9 : 271.
- Romani, N., Lenz, A., Glassel, H., Stossel, H., Stanzl, U., Majdie, O., Fritsch, P. and Schuler, G., *J Invest Dermatol* 1989. 93 : 600.
- Symington, F. W., Brady, W. and Linsley, P. S., *J Immunol* 1993. 150 : 1286.
- Giolomoni, G., Zambruno, G., Manfredini, R., Zacchi, V., Ferrari, S., Cossarizza, A. and

- Giannetti, A., *J Invest Dermatol* 1994. 103 : 54.
- Ozawa, H., Nakagawa, S., Tagami, H. and Aiba, S., *J Invest Dermatol* 1996. 106 : 441.
- Yokozeki, H., Katayama, I., Ohki, O., Matsunaga, T., Watanabe, K., Satoh, T., Azuma, M., Okumura, K. and Nishioka, K., *J Invest Dermatol* 1996. 106 : 147.
- Schuler, G. and Steinman, R. M., *J Exp Med* 1985. 161 : 526.
- Inaba, K., Schuler, G., Witmer, M. D., Valinsky, J., Atassi, B. and Steinman, R. M., *J Exp Med* 1986. 164 : 605.
- Aiba, S. and Katz, S. I., *J Immunol* 1990. 145 : 2791.
- Macatonia, S. E., Knight, S. C., Edwards, A. J., Griffiths, S. and Fryer, P., *J Exp Med* 1987. 166 : 1654.
- Kripke, M. L., Munn, C. G., Jeevan, A., Tang, J. M. and Bucana, C., *J Immunol* 1990. 145 : 2833.

- 12 Sallustro, F. and Lanzavechia, A., *JEM* 1994. 179 : 1109.
- 13 Romani, N., Bruner, S., Brang, D., Kampgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P. O., Steinman, R. M. and Schuler, G., *J Exp Med* 1994. 180 : 83.
- 14 Ludewig, B., Graf, D., Golderblom, H. R., Becker, Y., Kroczeck, R. A. and Pauli, G., *Eur J Immunol* 1995. 25 : 1943.
- 15 Kligman, A. M., *J Invest Dermatol* 1965. 47 : 393.
- 16 Magnusson, B. and Kligman, A. M., *Identification of contact allergens.*, Springfield, Illinois 1970.
- 17 Aiba, S., Terunuma, A., Manome, H., and Tagami, H., *Eur J Immunol* 1997. 27:3031.

# 免疫不全マウス再構成皮膚における 培養毛乳頭細胞による毛包形成誘導と関連因子の検討

聖マリアンナ医科大学

窪田 泰夫

Living human skin equivalents, in which human keratinocytes are cultured on collagen matrix containing human dermal fibroblasts, have been successfully transplanted and maintained for a long time on deep connective tissue of immunodeficient mice. Here, we cultured human dermal papilla cells in the type I collagen gels and overlaid by primary culture of human epidermal cells concomitant with a few melanocytes as a composite graft.

We examined effects of human dermal papilla cells derived from human hair follicle on the induction of hair follicle after xenotransplantation of the composite grafts into immunodeficient mice. At three weeks after transplantation, the epidermal cells generated human epidermis-like tissue. Histological examinations revealed that no epidermal elongation or newly formed follicular-like structure were observed. Interestingly, a significant number of DOPA positive melanocytes, which were initially concomitant in a primary epidermal cell culture, was found not only in the epidermal basal layer but also in the entire mid-dermis, while the transplantation of a composite grafts in immunodeficient mice by using human fibroblasts instead of dermal papilla cells showed the presence of a small number of melanocytes in the basal layer only.

These results indicates that human dermal papilla cells facilitate the maintenance or migration of the melanocytes in the xenotransplantation of composite grafts, a living human skin equivalents.

The present system by using the xenotransplantation of composite grafts in immunodeficient mice also seems to be the good models for studying the cell-cell (epithelial-mesenchymal) interaction.

## 1 緒言

免疫不全マウスに培養細胞を移植して作製するヒト皮膚再構成システムは表皮細胞と真皮線維芽細胞との相互作用の検討に有用である。さらに表皮細胞と線維芽細胞以外にもさまざまな細胞種を組み合わせて移植することで任意の細胞の in vivo に近い状況下での機能や各種細胞間の相互作用を解析することが可能な実験系と考えられている。

毛乳頭細胞は毛母の構成細胞の一つで毛幹形成の上で重要な役割を果たしていることが指摘されている<sup>1)</sup>。近年、細胞培養技術の進歩や細胞成長因子の発見により毛乳頭細胞はヒト毛包からも単離可能となり、長期の純培養も行なわれている<sup>2)</sup>。

今回われわれはヒト皮膚の in vivo 実験系として利用できる免疫不全マウスを用いた再構成皮膚の線維芽細胞に代って培養ヒト毛乳頭細胞を用いて同様の再構成皮膚を作製して毛包形成の誘導を検討した。また表皮細胞と線維芽細胞による再構成皮膚の中に直接的に毛乳頭組織を注入して、三者の共存のもとでの毛包形成の誘導についても検討した。

## 2 実験 (材料と方法)

### 2.1 SCID マウスの改良と供給

本研究で使用した SCID マウスの多くは BALB/cA を遺伝的背景にもつ系統である。この BALB/cA-SCID マウスは高い繁殖性を有し、ビニールアイソレーターを用いて生産と供給を行なった。また定期的に微生物的汚染事故の発生を検討した。

### 2.2 細胞培養

#### a) ヒト表皮細胞

皮膚科手術材料よりフリーハンドデルマトー

The effects of human dermal papilla cells on the induction of hair follicle after xenotransplantation of the composite graft into immunodeficient mice.

Yasuo Kubota

St. Marianna University, School of Medicine, Department of Dermatology



ムにて皮膚を薄く採取し、トリプシンないしデイスパーゼ処理により分散させた表皮細胞を低カルシウム無血清培地 (KGM; Clonetic 社、カルシウム濃度 0.15 mM) にて培養を行なった。

#### b) ヒト線維芽細胞

皮膚科手術材料より得られた健常皮膚を型の如く explant culture を行ない、皮膚切片から遊走する紡錘状細胞を 10% FCS 添加 Eagle MEM 培地 (MEM; IBL, 免疫生物研究所) にて継代して使用した。

#### c) ヒト血管内皮細胞

臍帯静脈から 0.1% コラゲナーゼによる酵素灌流法により単離した。培養液は M-199 培地に 20% FCS、血管内皮増殖因子、ヘパリンを添加し、ファイブロネクチンをコートした培養皿で培養を行なった。形態学的にいわゆる敷石状を呈し、免疫染色により第 8 因子関連抗原陽性を確認した。

#### d) ヒト毛包毛乳頭細胞

毛根の下方は膨大し、毛球を形成し、その中には毛乳頭をいれている (図 1)。この毛乳頭の毛器官における生物学的意義は少ない。すなわち毛乳頭は毛包の発育や増殖を誘導し、毛組織の形成や維持において重要な役割が指摘されており、男性ホルモン作用にも深い関係があることが判明している<sup>3)</sup>。この毛乳頭を構成するヒト毛乳頭細胞は未分化の間葉系細胞で互いに密着して塊状をなして存在する。

ヒト毛包毛乳頭の単離と培養は Messenger ら<sup>4)</sup>の方法に準じて行なった。まず正常人被髪頭部皮膚より毛包を採取し、実体顕微鏡下に 23G の注射針を用いて採取した毛包をその周囲を被う結合組織性被膜から切開、反転し、毛乳頭を露出させ、その基部から切断して毛乳頭を単離した。この過程で毛乳頭に決して暴力的に物理的刺激を加えて破損せしめないことが重要である。単離した毛乳頭は予め 1 mg/mL のヒトファイブロネクチンで

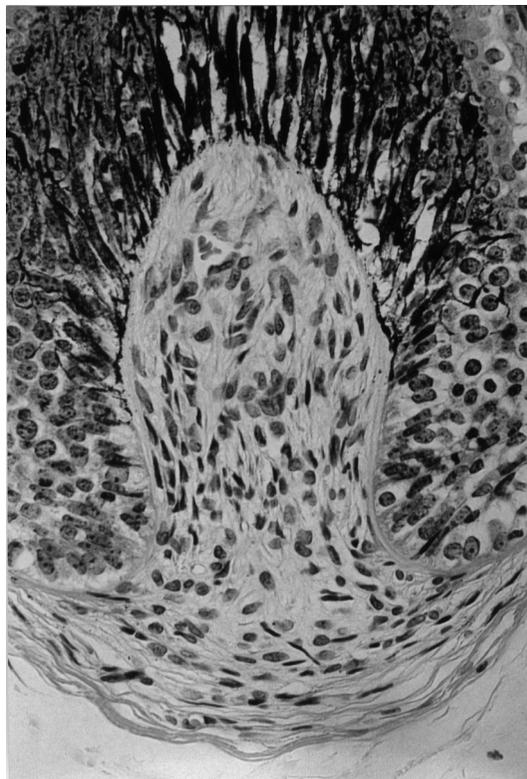


図 1 ヒト毛包の構造 (HE 染色)

コーティングした 35mm 培養皿に数個移して組織培養した。基本培養液としては 20% FCS 添加の Medium 199 を使用した。通常、48 時間程度のあいだに単離した毛乳頭から辺縁に向かって紡錘状の毛乳頭細胞が増殖、伸展していく所見が観察された (図 2)。培養液は三日に一度新しいものに替えた。この際に培養皿に付着の完全でない毛乳頭を誤って除去しないようにする。数日後毛乳頭細胞が confluent な状態になると型のごとく 0.25% トリプシン-EDTA 溶液にて継代培養し、通常 7~8 継代の培養が可能となっている。培養が 7~8 代を越えると毛乳頭細胞の形態は大型化し、細胞は 2 極の紡錘状から多極化を呈してきた。毛乳頭細胞の生存期間はやや短く、線維芽細胞の継代培養可能数の  $1/2 \sim 1/3$  程度に短い。

なお上述のいずれのヒト細胞も 0.25% トリプシン-EDTA 溶液により継代した。なおヒト表皮細胞は初代培養を用い、その他の細胞種では 3~7

継代を実験に供与した。

### 2.3 Composite graft 法によるヒト再構成皮膚の作製

培養線維芽細胞  $1 \times 10^6$  個を I 型コラーゲン液 (新田ゼラチン社) の中に懸濁させて 12 皿培養シャーレでゲル化させる。続いてそのコラーゲンゲルの上に別途培養調整しておいたヒト表皮細胞 (初代)  $1 \times 10^6$  個を重層させ Composite graft を作製した。数日後ゲルは収縮して培養皿辺縁から剥がれてくるので、BALB/cA-nu, SCID マウスの皮下に移植し、生体接着剤を用いてマウス皮膚により保護した。3 週間後にマウス皮膚を除去して開窓し、再構成皮膚の状態を観察した (図 3)。

### 2.4 ヒト血管内皮細胞およびヒト毛乳頭細胞を用いた SCID マウスでのヒト再構成皮膚の作製

血管内皮細胞および毛乳頭細胞をそれぞれ線維芽細胞の代わりにコラーゲンゲル中に懸濁させ、同様にその上に表皮細胞を重層して Composite graft を作製し、BALB/cA-nu, SCID マウスの皮下に移植した。

### 2.5 SCID マウスでのヒト再構成皮膚へのヒト毛乳頭組織の注入実験

線維芽細胞と表皮細胞による Composite graft を作製したのち、実体顕微鏡下にヒト毛包から単離した毛乳頭組織を直接的に Composite

graft のコラーゲンゲル中に注入した。その後に BALB/cA-nu, SCID マウスの皮下に移植して、3 週間ののち再構成皮膚の形成を観察して組織学的観察を行なった。

### 2.6 組織学的検討

コラーゲンゲルの移植 3 週間後の開窓時に移植片の状態を確認して、肉眼的ならびに組織学的所見を検討した。組織学的検討のために通常ホルマリン固定・HE 染色のほか、フォンタナ・マッ

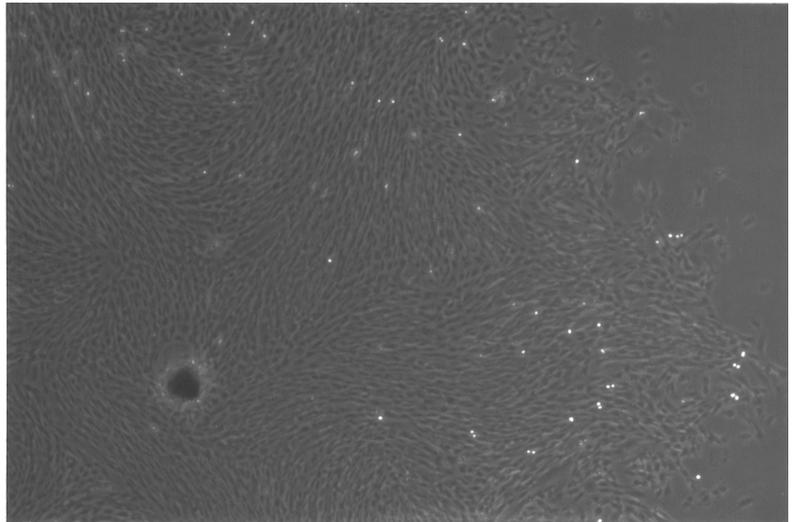


図2 培養ヒト毛乳頭細胞 (相差像)

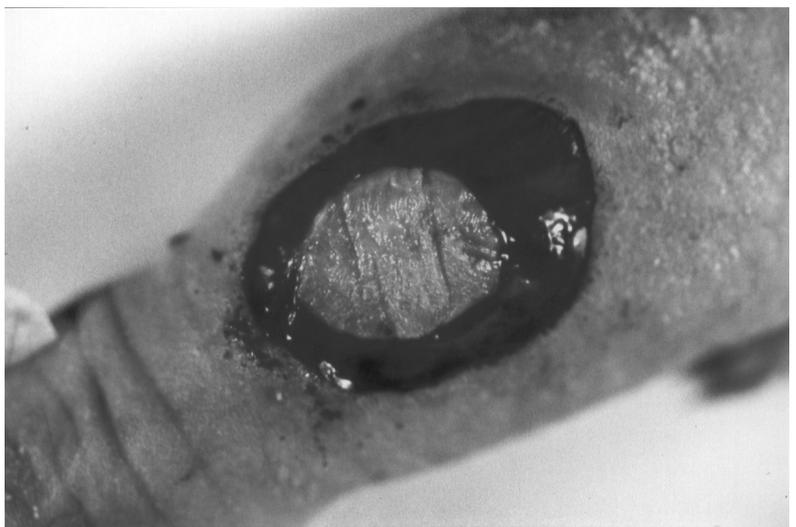


図3 線維芽細胞により作製した composite graft の nu/SCID マウスへの移植後に形成された再構成皮膚。マウス背部皮膚の開窓時の所見。

ソン染色および凍結切片標本を作製して DOPA 反応を行なった。

## 2.7 単離ヒト毛包の凍結保存と男性ステロイドの作用

これまではヒト毛包の移植は頭皮皮膚の入手時に限られてしまう欠点があったので、その実用性を高めるため単離したヒト毛包を凍結保存して BALB/cA-nu, SCID マウスの皮下に移植した。

すなはち、同一ドナーから採取した単離毛包をそのまま直ちに SCID マウスに移植する群と凍結保存してから移植する群の 2 群に分けた。凍結保存方法は単離した毛包を DMSO 添加細胞凍結用保護培地 (cell stock media, 免疫生物研究所) に浸漬して凍結用チューブにいれてドライアイスにて凍結させて、液体窒素中に 1 週間以上おいて移植実験を行なった。実験に際しては移植の直前に 37℃ の温湯にて急速に融解し麻酔下の BALB/cA-nu, SCID マウスの背部皮膚に移植した。生体用接着剤および皮膚被覆剤にて固定保護して、経時的に毛幹の伸長を観察した。そして、毛包採取後直ちに移植する群と凍結保存してから移植する群との間で毛包生着率を比較した。

この系によりヒト毛包を生体環境下に長期間維持可能となるためヒトでは行ないにくかった実験に利用できると考えられた。例えばヒトへの男性ステロイドの投与は危険性があり容易ではない。そこでこの移植毛包において男性ステロイドの作用を検討した。すなはち毛包が生着して毛幹の伸長が確認された例に関してエナント酸テストステロン (Enarmon depot) 5 mg を週一回皮下注射にて投与した。対照としては胡麻油を投与し、経時的に移植毛包の変化を観察した。

## 3 結果

### 3.1 SCID マウスの改良

BALB/cA-SCID マウスは加齢に伴い、Leaky 現象が出現することと、胸腺腫が発生することが欠点とされていた。しかしわれわれはこの

SCID マウスに改良を加えて nu 遺伝子を導入して BALB/cA-nu, SCID マウスを育成した。このマウスにはこれらの欠点はみられずレシピエント動物として高い評価が得られるものと考えられた。しかしながらこの BALB/cA-nu, SCID マウスは生産効率が他種と比較してやや低く、生産規模拡大の点で若干の問題を残している。

### 3.2 SCID マウスでのヒト再構成皮膚の作製

線維芽細胞と表皮細胞からなる Composite graft は移植後 3 週目に開窓した時点では、組織上、数層の表皮細胞の層とコラーゲングル中に紡錘状の線維芽細胞が散在する真皮が形成されており、いわゆるヒト皮膚の構造を呈していた。また使用した表皮細胞は初代培養であるため混入したメラノサイトが表皮基底層に分布しており、肉眼的にも再構成された皮膚面にはわずかに黒褐色色素沈着の所見が確認された。

### 3.3 ヒト血管内皮細胞およびヒト毛乳頭細胞を用いた SCID マウスでのヒト再構成皮膚の作製

血管内皮細胞を用いた移植片は移植後 3 週目には開窓時に皮膚様の構造が形成されていなかった。すなはち少量の細胞残骸物とコラーゲン基質のみがマウス皮下に残存しているにすぎなかった。これは血管内皮細胞はコラーゲングル中において拘縮せず、ゲル組織を十分に支持することができなかったものと思われた (data not shown)。

一方、毛乳頭細胞により作製した Composite graft のマウス移植片では、開窓時に肉眼的には線維芽細胞による場合とほぼ同様の再構成皮膚の形成が確認された。しかし組織学的には毛乳頭細胞を使用した場合と線維芽細胞の場合ではメラノサイトの分布やメラニン顆粒の沈着の点で大きな差異が認められた。すなはちフォンタナ・マッソン染色や DOPA 反応を施行したところ、コラーゲン中に線維芽細胞を混じた場合ではメラニン顆粒や DOPA 陽性メラノサイトは表皮細胞層の最

下端のみに少数存在するのに対して、毛乳頭細胞による再構成皮膚では表皮層のみならず真皮(コラーゲン層)へもメラニン顆粒やメラノサイトが

著明に認められた(図4a、b、c、d)。

### 3.4 SCID マウスでのヒト再構成皮膚へのヒト毛乳頭組織の注入実験

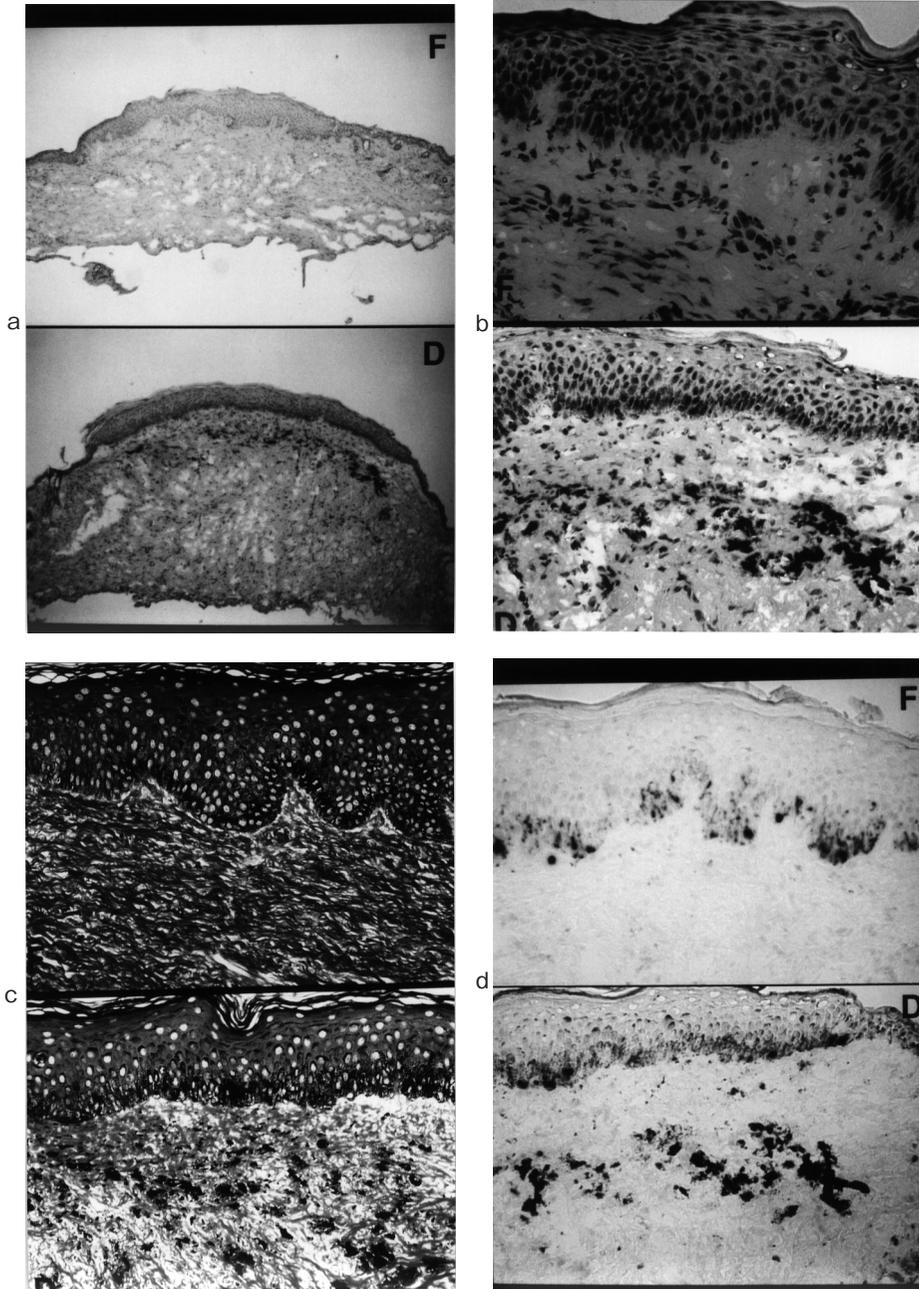


図4 F=線維芽細胞により作製した再構成皮膚組織.D=毛乳頭細胞により作製した再構成皮膚組織.a; HE染色(弱拡、×10)、b; HE染色(強拡、×50)、c; フォンタナ・マッソン染色、d; DOPA反応。毛乳頭細胞による再構成皮膚では真皮層にもメラノサイトやメラニン顆粒を多数認めた。また表皮層肥厚の程度も両者の間に差が見られた。

実体顕微鏡下にヒト毛包から単離した毛乳頭組織を直接的に線維芽細胞と表皮細胞を用いて作製した Composite graft のコラーゲンゲル中に注入した。開窓後に組織学的に検討した結果、コラーゲンゲルの中に毛乳頭組織は残存していたが、その被覆表皮や周辺の線維芽細胞にはとくに変化を認めることはなかった (data not shown)。

### 3.5 単離ヒト毛包の凍結保存法の確立と男性ステロイドの移植凍結ヒト毛包への影響

5例の健常頭皮から得られた毛包についてその BALB/cA-nu, SCID マウス皮膚への生着率は凍結保存の有無によりなんらの影響も受けなかった (表1)。さらにその生着した毛包の組織学的変化も未凍結のものと比較して差異はなかった (図5)。このことは毛包のマウスへの移植実験が頭部皮膚入手時にのみ制限されることがなく実用性の向上が図られた。

毛包が生着して毛幹の伸長が確認された例に関してエンアント酸テストステロン (Enarmon depot) 5mg を週に一回の割合で合計6回投与した。対照群と比較して投与群5本の内2本において毛幹が脱落して移植した毛包にも退行変性を生じた (data not shown)。変化の認められなかった毛包

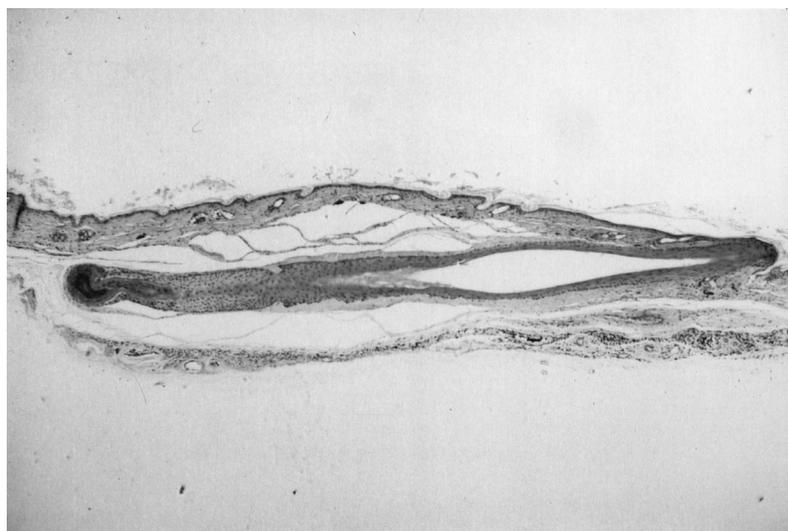


図5 凍結単離毛包の組織像。移植3カ月目 (HE染色)。未凍結毛包のそれとほぼ同様であった。

表1: ヒト単離毛包の nu/SCID マウスへの移植における凍結保存の影響。

実験番号	凍結		未凍結	
	正着本数	移植本数	正着本数	移植本数
#1	0	20	4	13
#2	3	6	1	6
#3	11	19	3	13
#4	10	24	3	13
#5	1	23	5	13
計	25	92	16	58
	(27.2%)		(27.6%)	

も認められた点は毛包採取部位の差 (頭頂部、側頭部) あるいは検体間の差を反映している可能性もある。

## 4 考察

ある特定の異常を有する実験動物の作製はこれまでの研究材料や方法ではアプローチが困難であった諸問題の解明に重要な糸口を与えてくれることがある。近年、T細胞およびB細胞を欠如した SCID マウスを用いて正常のヒト皮膚由来細胞の増殖や分化過程の解析が進んできている<sup>5, 6, 7)</sup>。

in vitro で培養された各種のヒト皮膚由来の細胞を動物に移植することにより in vivo で増殖分化させることができれば、個々のヒト皮膚由来の

細胞レベルでの研究が in vivo に一層近い状態で行なうことができる。SCID マウスへの培養細胞移植によるヒト皮膚再構成システムは各種の細胞の in vivo での働きを解析するのに有用な手段と考えられ、皮膚の悪性腫瘍や感染症などのヒト疾患の病態解明、あるいは上皮系と間葉系の相互作用の解明など多くの研究分野に利用できるものと考えられる。

残念ながら、当初に目指していたヒト再構成皮膚内

での培養毛乳頭細胞による毛包形成の誘導は成功し得なかった。今後、このヒト皮膚再構成システムに毛乳頭細胞のほかに毛母の上皮細胞(外毛根鞘細胞)の混合培養を行ったり、線維芽細胞増殖因子(FGF)や肝細胞増殖因子(HGF)などの毛髪成長に働くと考えられている各種成長因子の添加などを試みる予定である。しかし毛乳頭細胞による再構成皮膚では表皮基底層ならびに真皮にまで及ぶメラノサイトの浸潤が認められた。生体においては毛乳頭細胞はメラノサイトの豊富な毛母の基部に存在している。前述の所見は毛母における両細胞の相互作用、とりわけ毛母における毛乳頭細胞の毛母上皮内のメラノサイトの遊走や生存、維持に対する重要な関与を示唆する興味深いものと考えられた。さらにこの毛乳頭細胞からのメラノサイトに対する因子(サイトカイン?、細胞成長因子?)の同定を進める必要がある。最近、Randallら<sup>8)</sup>のグループは培養毛乳頭細胞からSCF(stem cell factor、幹細胞増殖因子)の産生・分泌を報告している。今回の実験においても毛乳頭細胞を用いた再構成皮膚に認められたメラノサイトの動態に関与する因子の一つとしてこのSCFが考えられる。

BALB/cA-nu, SCIDマウス皮膚への凍結ヒト毛包の移植生着は凍結保存によりなんらの影響も受けなかった。さらに生着した毛包の組織学的変化も未凍結のものと比較して差異はなかった。このことは毛包のマウスへの移植実験が頭部皮膚入手時にのみ制限されることがなく遠隔地への輸送も確実にこなえるなど、実験システムとしての実用性を高めたものと思われる。さらに今回、SCIDマウスに移植された毛包が生着して毛幹の伸長が確認されたヒト凍結毛包に対して男性ホルモンの投与実験を行なったが、本実験系はヒトへの実験的投与が必ずしも容易ではないその他の薬剤のヒト毛包に対する直接的な効果をみるのが可能なシステムでありその有用性が期待される。

## 謝 辞

本研究を行なうにあたりご援助をいただいた財団法人コスメトロジー研究振興財団に深謝いたします。

なお、本研究の一部は平成9年10月松本市で開催された日本皮膚科学会東部支部総会学術大会、ワークショップにおいて発表した。

## 引用文献

- 1) Jahoda CAB, Reynolds AJ: Dermal-epidermal interactions-Follicle-derived cell populations in the study of hair-growth mechanisms. *J Invest Dermatol*, 101:33S-38S,1993.
- 2) 久志本常人、窪田泰夫、河陽子、ほか3名: 酵素処理、細胞外マトリックスおよび細胞成長因子が培養毛乳頭細胞に与える影響、*日皮会誌*、106:249-259、1996.
- 3) 板見 智: ヒト毛乳頭細胞と外毛根鞘細胞の相互作用。組織培養工学、23: 52-56、1997.
- 4) Messenger AG. The culture of dermal papilla cells from human hair follicles. *Br J Dermatol*, 114:425-430,1986.
- 5) McCune JM, Namikawa R, Kaneshima H., et al. The SCID-hu mouse; murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science*241:1632-1639,1988.
- 6) 野村大成: がん研究における SCID マウスの重要性。 *Oncologia*,26:321-328,1993.
- 7) Christofidou-Solomidou M, Longley BJ, Whitaker-Menezes D, et al. Human skin/SCID mouse chimeras as an in vivo model for human cutaneous mast cell hyperplasia. *J Invest Dermatol*, 109:102-107,1997.
- 8) Hibberts NA, Messenger AG, Randall VA, Dermal papilla cells derived from beard hair follicles secrete more stem cell factor (SCF) in culture than scalp cells or dermal fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212:988-994, 1995.

# 細胞増殖因子および接着分子による 皮膚硬化制御に関する分子生物学的研究

獨協医科大学 皮膚科

山 蔭 明 生

Purposes: We investigated how to control skin sclerosis and softness. Systemic scleroderma is a model for sclerotic or aging skin. We indicated that TGF- $\beta$ , PDGF-AA and PDGF  $\alpha$  receptor interaction might play an important role in skin sclerosis. Recently, it has been clear that many of the proteoglycans behave as modulators of growth factors binding in scleroderma and normal fibroblasts. We examine the role of proteoglycans for binding to growth factors on scleroderma fibroblasts in this paper. The hyaluronate receptor (CD44) molecule is a multifunctional cell surface protein involved in T cell activation, monocyte cytokine release, fibroblast locomotion, and lymphocyte binding to high endothelial venules. There is protein kinase C-like kinase domain in intracellular portion of CD44, and intra-molecular serine/threonine residue may be phosphorylated to mediate signal transduction. Materials and methods: Effects of heparitinase digestion on TGF- $\beta$  and bFGF binding to their receptors were studied in vitro using ligand binding assay,  $^3\text{H}$ -thymidine uptake and affinity level in scleroderma and control fibroblasts. To study the roles of CD44 molecules play in systemic sclerosis (SSc), we measured expression and phosphorylation of CD44 in lymphocytes and fibroblasts from SSc patients and healthy controls, using immunoprecipitation method with  $^{32}\text{P}$  and anti-CD44 antibody. Results: TGF- $\beta$  binds to 200-300kD betaglycan (type III receptor of TGF- $\beta$ , type I and II receptor in scleroderma fibroblasts more than in control fibroblasts. After heparitinase digestion betaglycan is degraded to 110kD core protein of betaglycan and TGF- $\beta$  does not bind to type I nor II receptor. bFGF binds to 130kD receptor in scleroderma fibroblasts more than in control fibroblasts. After digestion bFGF bind to no receptor. CD44 was expressed and phosphorylated on many lymphocytes and fibroblasts. Furthermore, lymphocytes from SSc patients contained more CD44 or more phosphorylated than cells from healthy control. Immunohistochemically, CD44 was expressed on the cells. Conclusions: Obtained data suggest that heparan sulfate proteoglycans are growth factor receptors and affect storage, release and protection against degradation of growth factors. It was suggested that multifunctionality of TGF- $\beta$  express through heparan sulfate proteoglycans. In the pathogenesis of SSc, CD44 may play an important role in control of cell locomotion, cell adhesion, cell proliferation, and synthesis of extracellular matrix component.

## 1 緒言

皮膚の柔らかさ・硬さは主に真皮結合組織、すなわち膠原繊維・弾力繊維・ムコ多糖等の量的および質の状態を反映していると考えられる<sup>1), 2)</sup>。臨床的に皮膚硬化を来す強皮症や軟化を示すエーラス=ダンロス症候群などの疾患で皮膚結合組織代謝異常が認められ、これらの病態は種々の増殖因子や接着分子の作用によって制御されている<sup>3) - 8)</sup>。そこで我々は、汎発性強皮症患者と健康人の皮膚を比較対照して検討することで、増殖因子や接着分子の産生およびそれらのレセプター

発現さらにはシグナル伝達機構などの働きを解明し、線維化を様々な段階で抑制することを目指した。すなわち transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) や basic fibroblast growth factor (bFGF) のレセプターであるヘパラン硫酸プロテオグリカンの役割や CD44 の作用を検討して、*in vitro* で皮膚線維芽細胞の作用をコントロールすることにより、皮膚の柔軟性保持ひいては皮膚老化抑制の方法を探った。

## 2 実験

### 2.1 材料

汎発性強皮症患者前腕伸側硬化部皮膚および健康人対照の同部非硬化皮膚より生検により採取し培養した真皮線維芽細胞、患者および健康人から分離したリンパ球浮遊液及び培養線維芽細胞培養上清を用いて以下の実験を行なった。



Molecular biological study on the control of skin sclerosis by growth factors and adhesion molecule

Akio Yamakage

Department of Dermatology,  
Dokkyo University School of Medicine

## 2.2 $^3\text{H}$ -TdR uptake

1 ng/mL TGF- $\beta$  および 1 ng/mL basic FGF を加え、heparitinase 添加群と無添加群で培養線維芽細胞の増殖活性を  $^3\text{H}$ -TdR の uptake を測定することにより、検討した<sup>4), 9)</sup>。

## 2.3 receptor binding assay

リガンドとレセプターの結合を receptor binding assay により測定し、レセプター数と親和性を算定した<sup>10)</sup>。

## 2.4 immunoprecipitation 法

すでにコラーゲン・ムコ多糖産生を促進することが知られている TGF- $\beta$ 、basic FGF のレセプター発現と、リガンドとレセプターの結合様式に与えるヘパラン硫酸プロテオグリカンの影響をヘパリチナーゼによりレセプターとしてのヘパラン硫酸プロテオグリカンを切断することで検討した。

さらに、TGF- $\beta$ 、FGF などの成長因子が細胞表面上のプロテオグリカンを含むレセプターにどれだけ結合するかを receptor binding assay およびアフィニティラベルにより測定した。

細胞膜表面に存在する接着分子 CD44 はヒアルロン酸・コラーゲン・ヘパラン硫酸・ヘパリンをリガンドとして、リン酸化シグナルを発信しリンパ球の増殖、活性化を促進するので、汎発性鞏皮症患者より分離したリンパ球浮遊液中にヒアルロン酸を加え、 $^{32}\text{P}$  ラベル後抗 CD44 モノクローナル抗体を用いた Immunoprecipitation 法により CD44 を分離し、SDS-PAGE 後 autoradiography を施行し、tyrosine kinase のリン酸化を指標としてリン酸化シグナルを測定した<sup>11)</sup>。

# 3 結果

## 3.1 培養線維芽細胞の増殖活性

健常人由来線維芽細胞では TGF- $\beta$  添加群では無添加群に比して増殖活性は低下する傾向があり、heparitinase 消化によりさらに低下する傾向

を認めた。一方、PSS では TGF- $\beta$  添加群と無添加群とで増殖活性は不変で、heparitinase 消化により上昇する傾向を認めた (図 1)。

健常人由来線維芽細胞では basic FGF 添加群では無添加群に比して増殖活性は 2 倍以上上昇する傾向があり、heparitinase 消化では不変。一方、PSS では basic FGF 添加群では無添加群に比して増殖活性は 2 倍に上昇する傾向があり、heparitinase 消化により低下する傾向を認めた (図 2)。

## 3.2 heparitinase 消化による receptor binding

heparitinase 消化前後の TGF- $\beta$  receptor 数は健常人でも PSS でもやや減少し、親和性はやや増加した (図 3)。

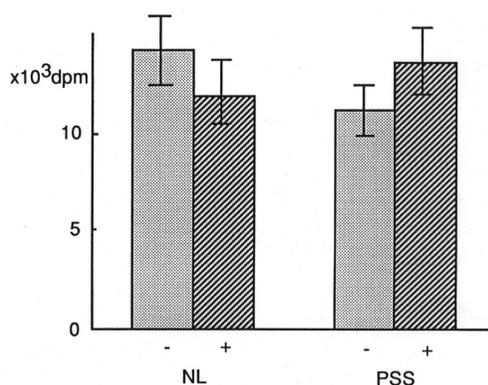


図 1 健常人由来および PSS 由来培養線維芽細胞における heparitinase 消化 (+) および未消化 (-) 条件下での TGF- $\beta$  添加による増殖活性

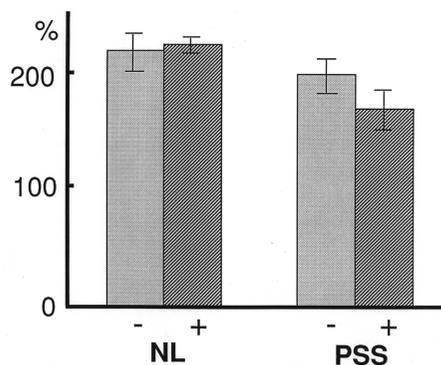


図 2 heparitinase 消化 (+) および未消化 (-) 条件下での bFGF 添加による増殖活性

heparitinase 消化前後の basic FGF receptor 数は健常人でも PSS でもやや増加し、親和性もやや増加した (図4)。

### 3.3 heparitinase 消化による TGF-β および bFGF binding site の変動

heparitinase 消化により、heparan sulfate proteoglycan (betaglycan、TGF-β receptor type III、MW 300Kd 前後) に結合していた <sup>125</sup>I-TGF-β は、GAG 鎖が消化されて残った、TGF-β 結合部位を有する core protein (MW 100 ~ 130Kd) に結合して存在するようになった。また type I (MW <sup>125</sup>I-TGF-β monomer との結合体として

65Kd) および type II (MW 同 95Kd) の TGF-β receptor に結合していた <sup>125</sup>I-TGF-β は、そのまま残った (図5)。

heparitinase 消化により、heparan sulfate proteoglycan の proteoglycan 部分に結合していた <sup>125</sup>-basic FGF は、結合部位を失ったため、結合し得なくなった (図6)。

### 3.4 ヒアルロン酸添加培養による CD 44 のリン酸化

汎発性鞏皮症より分離した末梢血リンパ球では、健常人に比してヒアルロン酸添加培養群で CD44 のリン酸化をより強く認めた (図7)。

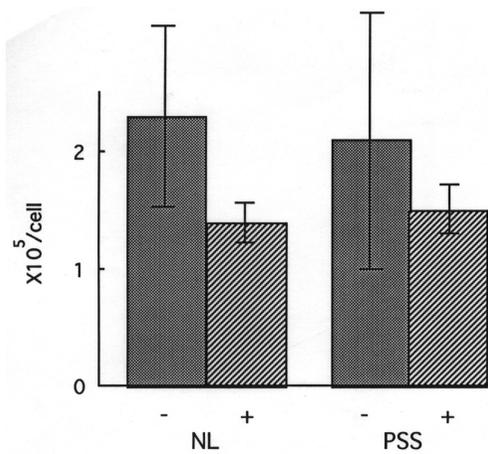


図3 heparitinase 消化前後の TGF-β receptor 数

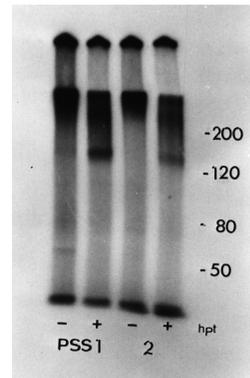


図5 heparitinase 消化による TGF-β binding site の変動

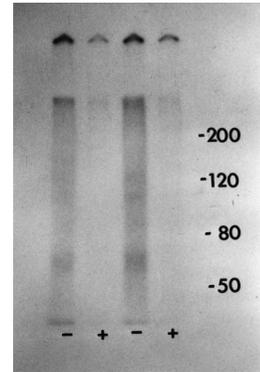


図6 heparitinase 消化による bFGF binding site の変動

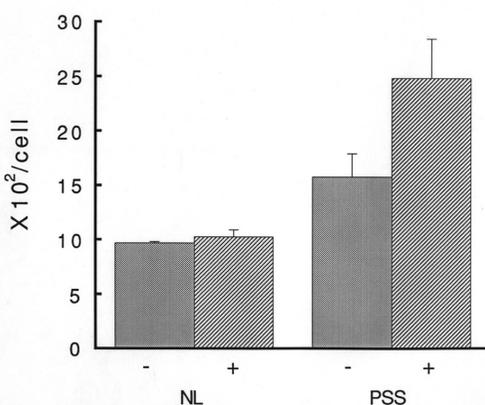


図4 heparitinase 消化前後の basic FGF receptor 数



図7 汎発性鞏皮症より分離した末梢血リンパ球では、健常人に比してヒアルロン酸添加培養群で CD44 のリン酸化をより強く認めた

#### 4 考察

近年、種々のコア蛋白とグリコサミノグリカン (GAG) 側鎖からなるプロテオグリカンの構造と機能が明かになりつつある。例えば、コア蛋白と GAG 鎖の種類によって軟骨のアグリカン、線維芽細胞のバーシカン、結合組織のデコリン、基底膜のパールカンなどが知られている。アグリカンやバーシカンはヒアルロン酸と結合してマトリ

ックスを構築し、デコリンは I 型コラーゲンや TGF- $\beta$  に結合する。

ベータグリカンはヘパラン硫酸およびコンドロイチン硫酸に富む GAG 鎖をもち、分子量 300Kd (非還元下 $\sim$ 600Kd) 前後のプロテオグリカンで、TGF- $\beta$  タイプ III レセプターとも呼ばれ、100 $\sim$ 130Kd のコア蛋白部分に TGF- $\beta$  結合部位を有する (図 8)。ベータグリカンそのものにはシグナル伝達機能は認められていないが、TGF- $\beta$  を貯

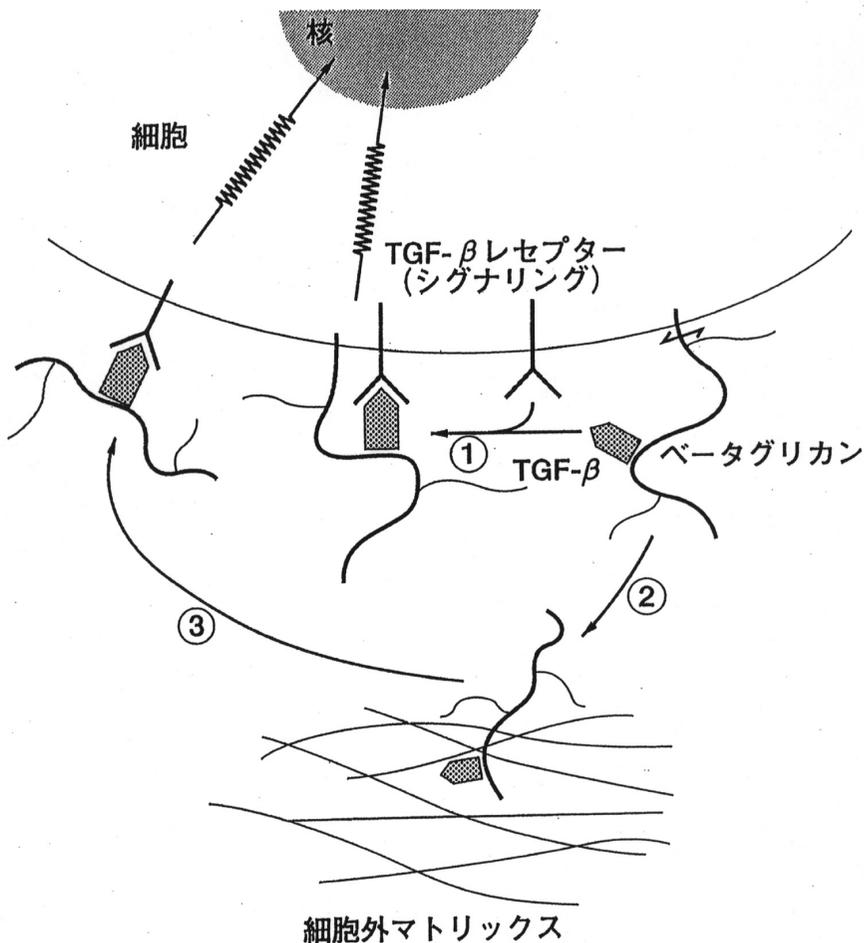


図8 ベータグリカンの仮想的機能 (山口佑: 実験医学 10: 1859, 1992 より)

①ベータグリカンは TGF- $\beta$  をシグナリングレセプター (タイプ I あるいはタイプ II レセプター) に提示する。ベータグリカンの存在により、シグナリングレセプターへの TGF- $\beta$  の結合が促進される。②ベータグリカンの一部は遊離型となり、TGF- $\beta$  を細胞外マトリックスに貯蔵する。③遊離のベータグリカンがレセプターに TGF- $\beta$  を提示する可能性。

蔵ないし保存する働きやタイプ I およびタイプ II レセプターへの TGF- $\beta$  の提示ないし結合促進作用などが知られている<sup>12) - 16)</sup>。

今回の実験で、PSS 患者前腕伸側硬化部皮膚由来および健常人対照の同部非硬化皮膚由来真皮培養線維芽細胞に対する TGF- $\beta$  の作用およびプロテオグリカンの役割がより明かになった。

basic FGF は細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンあるいはフリーの可溶性ヘパリンないしヘパリン様分子に結合し、ある種の構造変化を遂げた状態でのみ高親和性レセプターに結合し得る(図 9)<sup>17) - 26)</sup>。PSS 線維芽細胞においても健常人対照線維芽細胞においてもヘパリチナーゼ無添加

では bFGF と結合し得、ヘパリチナーゼ消化により結合できなくなる点で、線維芽細胞の性状に相違はなかった。

リンパ球及び線維芽細胞表面 CD44 は、ヒアルロン酸と結合し、protein kinase C 類似の kinase のリン酸化および CD44 分子内 serine/threonine 残基のリン酸化を来たすことによりシグナルを発信し、細胞の接着機能・増殖能・結合織成分合成などを制御している可能性がある(図 10)<sup>27) - 29)</sup>。特に汎発性鞏皮症では CD44 を介してリンパ球及び線維芽細胞の誘導、増殖、ムコ多糖・コラーゲン合成の亢進などが行なわれていることが示唆された。

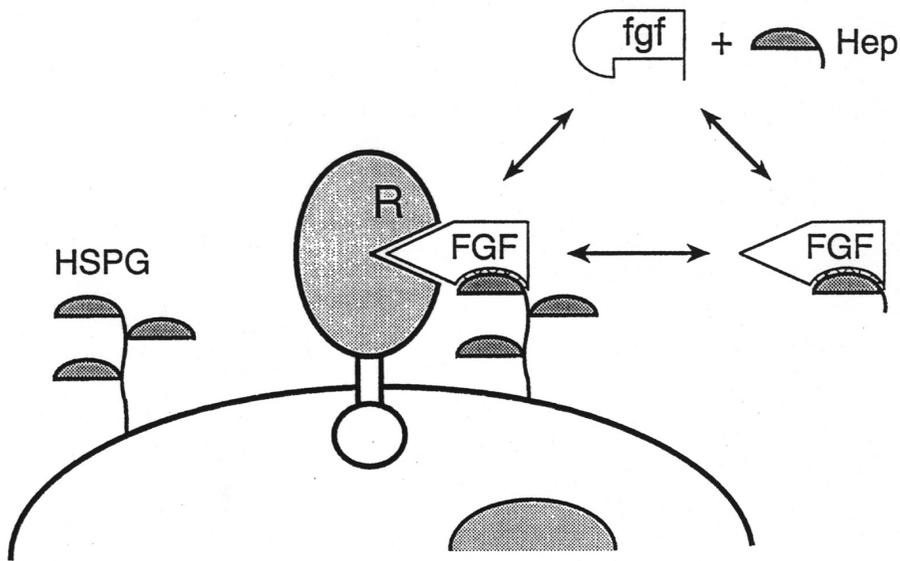


図 9 An Induced-Fit Model for Heparin-Dependent High Affinity Receptor Binding of bFGF (Yayon A et al:Cell 64:841,1991 より)

bFGF can bind to its high affinity receptor only when bound to either cell surface HSPGs or to free, soluble heparin or heparin-like molecules. Both free and cell surface immobilized heparin-like molecules can interchangeably confer a stable, receptor-compatible conformational change upon bFGF. Hep, heparin; R, receptor.

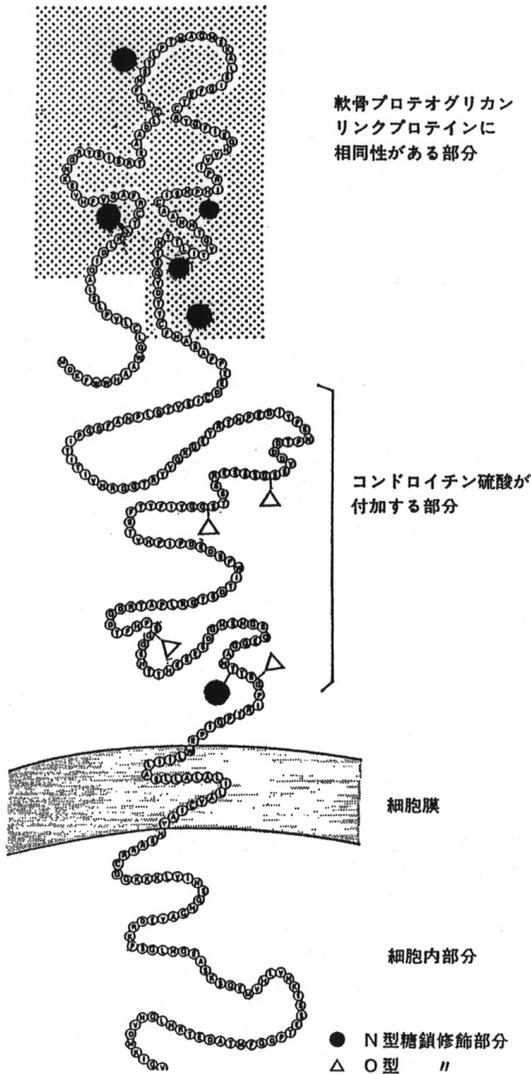


図10 CD44分子の構造(反町典子ら: 実験医学 12:2190,1994より)

N末端側に軟骨プロテオグリカンのコアプテインあるいはリンクプロテインに相同性のあるドメインが存在し、この部分でヒアルロン酸に結合すると考えられている。細胞膜直上部にコンドロイチン硫酸が付加する部分がある。

文献

1) Ishikawa H, Saito Y, Yamakage A, Kitabatake M: Scleroderma-inducing glycosaminoglycan in the urine of patients with systemic scleroderma.

Dermatologica 156: 193-204, 1978

2) Kitabatake M, Ishikawa H, Uchiyama Y: Significant increase of urinary low-sulfated heparan-sulfate-related protein in patients with severe systemic scleroderma. *Dermatologica* 174: 166-172, 1987

3) LeRoy EC, Smith EA, Kahaleh MB, Trojanowska M, Silver RM: A strategy for scleroderma (systemic sclerosis): is transforming growth factor beta the answer? *Arthritis Rheum* 32:817-825, 1989

4) Yamakage A, Kikuchi K, Smith EA, LeRoy EC, Trojanowska M: Selective upregulation of PDGF  $\alpha$  receptors by TGF- $\beta$  in scleroderma fibroblasts. *J Exp Med* 175:1227-1234, 1992

5) Ishikawa O, Yamakage A, LeRoy EC, Trojanowska M: Persistent effect of TGF- $\beta_1$  on extracellular matrix gene expression in human dermal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 169: 232-238, 1990

6) Trojanowska M, Wu L, LeRoy EC: Elevated expression of c-myc protooncogene in scleroderma fibroblasts. *Oncogene* 3: 477-481, 1988

7) Kikuchi K, Yamakage A, Smith EA, LeRoy EC, Trojanowska M: Differential modulation of bFGF receptors by TGF- $\beta$  in adult skin, scleroderma skin, and newborn foreskin fibroblasts. *J Invest Dermatol* 99: 201-205, 1992

8) Bowen-Pope DF, Ross R: Platelet derived growth factor. *J Biol Chem* 257: 5161-5171, 1982

9) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970

10) Scatchard G: The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 51: 660-672, 1949

11) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular cloning. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory

- Press, New York, 18:26-46, 1989
- 12) Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Crombrugge B: Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. *J Cell Biol* 105: 1039-1045, 1987
  - 13) Obberghen-Schilling EV, Roshe NS, Flanders KC, Sporn MB, Roberts AB: Transforming growth factor  $\beta$  1 positively regulates its own expression in normal and transformed cells. *J Biol Chem* 263: 7741-7746, 1988
  - 14) Ruoslahti E, Yamaguchi Y: Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 64: 867-869, 1991
  - 15) Massague J: Subunit structure of a high-affinity receptor for type  $\beta$ -transforming growth factor. Evidence for a disulfide-linked glycosylated receptor complex. *J Biol Chem* 260: 7059-7066, 1985
  - 16) 山口祐 : TGF- $\beta$  の作用と細胞外マトリックス. *実験医学* 10:1859,1992
  - 17) Burgess WH, Maciag T: The heparin-binding (fibroblast growth factor) family of proteins. *Ann Rev Biochem* 58: 575-606, 1989
  - 18) Dionne CA, Crumley G, Bellot F, Kaplow JM, Searfoss G, Ruta M, Burgess WH, Jaye M, Schlessinger J: Cloning and expression of two distinct high-affinity receptors cross-linking with acidic and basic fibroblast growth factors. *EMBO J* 9: 2685-2692, 1990
  - 19) Rafkin DB, Moscatelli D: Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol* 109: 1-6, 1989
  - 20) Moscatelli D: High and low affinity binding sites for basic fibroblast growth factor on cultured cells: absence of a role for low affinity binding in the stimulation of plasminogen activator production by bovine capillary endothelial cells. *J Cell Physiol* 131: 123-130, 1987
  - 21) Vlodavsky I, Folkman J, Sullivan R, Fridman R, Ishai-Michaeli R, Sasse J, Klagsbrun M: Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor: synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 2292-2296, 1987
  - 22) Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweigerer L: Fibroblast growth factor: structural and biological properties. *J Cell Physiol* 5: 15-26, 1987
  - 23) Moscatelli D: Metabolism of receptor bound and matrix-bound basic fibroblast growth factor by bovine capillary endothelial cells. *J Cell Biol* 107: 753-759, 1988
  - 24) Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM: Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 64: 841-848, 1991
  - 25) Rapraeger AC, Krufka A, Olwin BB: Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science* 252: 1705-1708, 1991
  - 26) Kan M, Wang F, Xu J, Crabb JW, Hou J, McKeenan WL: An essential heparin-binding domain in the fibroblast growth factor receptor kinase. *Science* 259: 1918-1921, 1993
  - 27) Pasquale EB, Singer SJ: Identification of a developmentally regulated proteintyrosine kinase by using anti-phosphotyrosine antibodies to screen a cDNA expression library. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5449-5453, 1989
  - 28) 反町典子、宮坂昌之 : リガンド結合による CD44 分子の機能的調節とその生理的意義. *実験医学* 12: 2190,1994
  - 29) Hynes BF, Talen MJ, Hale LP & Denning SM: CD44--a molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation. *Immunology Today* 10:423-428, 1989

### Ⅲ. 精神、文化に関する分野

---

# シルクロードの十字路に誕生した化粧皿とその文化の研究 —古代ガンダーラにおける化粧皿の誕生から終わりまで—

神戸芸術工科大学 芸術工学部

## 服 部 等 作

Large numbers of the Cosmetic Trays were found in Sirkap, Taxila, in the Greek/ Shaka/ Parthian/ Kushan city of the Crossroad of ancient Gandhara, now the boaderland of north-west borderlands between Pakistan and Afganistan, famous as crossroad of the Silk Road. They were excavated from various levels ranging from the second century B.C. to the first century A.D. The compositions of the figure scene on trays generally depict Hellenistic myths, drinking scenes, amorous couples, sea monsters or animals, and they may be used in home use, ritual practices or ceremonies.

The micaceous schist at Gañdhara have no doubt products for import outside. This study refer to the trays under the influences from the hellenising and the nomad's similar products.

### 1 緒 言

化粧皿と呼ぶ石製の小さな皿がパキスタン西北部のアフガニスタン国境地帯にかかる紀元前後代に栄えた古代ガンダーラ地方の遺跡から出土する。皿の用途は、顔料に香油を加え皿上ですりつぶして室内の卓上に置き使用するとされてきた<sup>1)</sup>。

一般的な化粧皿の直径は10数cm程、底面から上縁表面まで高さ数cm前後の浅い碗状の皿で削り易い現地産片岩や凍石<sup>注1)</sup>で製作されるが、少数の板状やテラコッタ製<sup>2)</sup>化粧皿もある(図1)。

化粧皿の様式は、表面上縁から内側には複数の区画をもうけ、その区画中心、または重要な区画に主題となるテーマ、神話上の人物や怪獣などを浮彫で表現し、その残り1/4程の凹面に幾何学文(貝文)や花文で装飾して香料置きや顔料とバルサム油を混ぜる区画を持つ。

その区画された凹面を表面観察すると、刃物による線状痕がある反面、摩耗した状態まで様々であり色々な応用があったと考えられる<sup>注2)</sup>。

化粧皿の底面は、ロクロで円弧状に成形した後、大部分が無文であるが、時に花文や幾何学文を線刻する例がある。

皿の表面には初期において西方のギリシャ神話テーマを浮彫りに採用しているにもかかわらず、ガンダーラ以西のヘレニズムから西アジアの文化圏にかけて化粧皿と直結するものがないため化粧皿の誕生から終わりまでには不明な点が多い。

本稿では、古代ガンダーラ地方に花開いた化粧皿について類似形態と技法を有する資料と共に化粧皿の誕生と終焉及びその文化を考察する。

### 2 化粧皿の特徴

#### 2.1 化粧皿研究のはじまり

化粧皿の発掘調査は、ガンダーラの中核であったギリシャ人都市タキシラ・シルカップ遺跡でMarshallが行なった体系的な調査<sup>1)</sup>での概説以外は少なく、化粧皿の多くが来歴不明のものに加え盗掘品が横行し化粧皿の解明を一層困難にしている。

シルカップ遺跡調査は、主にタキシラ平地部の中心地区の第Ⅱ-Ⅲ層について行なわれた。この層位に関する限り大規模かつ組織的に発掘され、各層から出土した中の化粧皿約40点(34点はタキシラ出土)の年代と図像を特定し、ギリシア人時代からクシャン時代にわたる文化変遷の様相：



Studies of Cosmetic Trays and Their Culture in the Crossroad of Silk Road -There Origins of Helenism influence into the Gandhāra-

Tousaku Hattori

Department of Arts and Design,  
Kobe Design University



カラチ博蔵 NMK8502、片岩製、径 11.2cm  
アポロンとダフネ<sup>1B)</sup> - 表 1・35  
A. ギリシャ人時代期



タキシラ博蔵 TM9500、凍石製、径 9.2cm  
B. サカ前期・有翼海馬<sup>1C)</sup> - 表 1・33



タキシラ博蔵 TM8480、片岩製、径 11.9cm  
C1. パルティア朝・魚尾の海馬にのる男<sup>1D)</sup> - 表 1・13



カラチ博蔵 NMK8473、片岩製、径 11.5cm  
C2. パルティア風・葡萄酒をもつ男女像<sup>1D)</sup> - 表 1・6

図1 化粧皿の図像と形態

少なくともパルティアの支配下で化粧皿がその最盛期を迎え、またヘレニズムの美術がタキシラで普及していた事を明かにした<sup>1A)</sup>。

すなわち紀元前 337 年、マケドニアのアレクサンドロス大王がインドへ進出し、王の死後に部下達がガンダーラ地方で興したギリシャ人時代（紀元前 2 世紀～ 20 年頃）のタキシラ VI - V 層出土の化粧皿 2 点は、ヘレニズム風の表現をもつ<sup>1B)</sup>（図 1 - A）。

一方でギリシャ人が接触した遊牧民族：南ロシアのスキタイ<sup>註3)</sup>に加え、ユーラシア全体ではカザフ草原のサルマタイ、天山・アラタウ山脈の烏孫などが活躍していた。

現アフガニスタン北部の古代バクトリア<sup>註4)</sup>（漢書で言う大夏）の遊牧民サカ族と西アジアからパルティア（安息国）の侵入によりギリシャ人王朝は滅亡し、インド・サカ（紀元前 80～紀元 25 年）、インド・パルティア王朝（紀元 25～60 年頃）のもとで化粧皿が最盛期を迎えた。

タキシラ IV 層サカ時代初期から III 層の後期の化粧皿 8 点は、遊牧民の動物・怪獣の特徴的図像が用られる<sup>1C)</sup>（図 1 - B）。

次のインド・パルティア朝の II 層に化粧皿が最も多く出土する。西方ヘレニズムの文物を愛好した王朝がその美術を化粧皿などの石製彫刻にとり入れヘレニズムのテーマを復活している。

そのうち 18 点はアフロディーテーとディオニューソス<sup>注5)</sup>等のヘレニズムの主題が復活し、内 5 点が饗宴図<sup>1D)</sup>、3 点が騎獣図<sup>1E)</sup>、7 点が動物・怪獣図<sup>1F)</sup>、3 点が素文<sup>1G)</sup>とサカ時代の純粋な動物図像を漸次圧倒する。タキシラ出土の化粧皿以外の美術にも本点は共通する(図 1-C)。

一方で中央アジアにいた遊牧民月氏族が蒙古の匈奴族の圧迫をうけて移住し小国に分裂(五翕侯)、その一部族がインド亜大陸中央部から西北部にまたがるクシャン朝(貴霜国)を興した。

この王朝初期に該当するタキシラ第 I 層は、最も広範囲に発掘されたが、化粧皿は 5 点<sup>1H)</sup>が出土しただけで 1、2 世紀以降に確定できる化粧皿がない。この事からパルティア朝滅亡後に少なくともタキシラで化粧皿が衰退した事がわかる。

以上の点から少なくともタキシラ出土の化粧皿は、前 2 世紀ギリシア人時代に始まりサカ・パルティア朝時代を経てクシャン朝時代前半の 1 世紀まで約 300 年間程続いたと言えるが、ガンダーラ全体として、スワート地方のウデグラムやチャールサダ出土の化粧皿が浮彫りのテーマを変えつつ 4 世紀まで存続していた<sup>3A)</sup>。

現在知られている化粧皿 162 例とそのテーマ内容を表にした(表 1)。そのうち化粧皿 98 例は、ほぼ正確に出土地を特定でき、また都市遺跡(タキシラ・シルカップ、ビール丘、スワート・ウデグラム、バリコト等)は、85 例である。テーマではディオニソスの祭祀の場面が 60 例で最も多く<sup>注5)</sup>、神話動物の 39 例が次ぐ。タキシラの 33 例では、怪獣図が 20 例と圧倒的に多い(表 2)。

## 2.2 化粧皿の研究と問題点

Marshall の化粧皿の概説に Dar<sup>4)</sup>は、33 点に図像比較を加えを詳しく考証し次の点を明らかにした。まずギリシア人時代の VI-V 層に出土する化粧皿がタキシラで前 2 世紀中頃から初めて現われ、クシャン朝初期の 1 世紀頃の I 層に終焉をむかえるまで化粧皿の浮彫りがヘレニズム様にはじまり、土着の仏教にギリシャ・ローマの様式をも

つガンダーラ美術の先駆的な役割を果たした事、さらに化粧皿が現地産出の石材製によることから輸入品でない事を指摘した。

また Francfort<sup>5)</sup>は、化粧皿の材質を片岩、凍石、その他に分類し、さらに様式をヘレニズム、パルティア、中間型に体系化し、存続期間を紀元前 150~紀元 50 年頃までとした。

以上の各研究では、古代ガンダーラの化粧皿を歴史・図像検討の面で前進したが、浮彫りのテーマとなった肝心のヘレニズム世界とガンダーラを結びつける化粧皿の類似品の十分な比較がされず、化粧皿が交易品や所持品として西方からの流入品か、あるいはギリシャ風のテーマを装いガンダーラから西方に輸出されたものかは、依然未解明である。

さらにヘレニズム起源に固執するあまり、ギリシャ人に接触し東方ギリシャ様式を獲得した遊牧民の影響についてほとんど考慮されていない。

このため、ギリシャ周辺地域の様式も含めた化粧皿の技法：形態面、及び技術面について新資料を加えて検討する必要が残されている。

## 3 化粧皿の比較

### 3.1 形態面からの類似性

比較的加工が容易な陶器、石製品について化粧皿の形態面から類似のものを求め検討を進める。

まずギリシャ古典期からヘレニズム期に皿・碗状の内側を区画し、その主要部分に神話のテーマや装飾文様の描画、浮彫り表現は一般的である。

ギリシャでは、テラコッタ、陶器、石膏、石、青銅、ならびに貴金属などの多様な材料と広い応用分野がみられ、アレクサンダ大王の遠征後ギリシャの植民地となったガンダーラのタキシラ、サカ朝からクシャン朝にかけてのバクトリアのベグラム<sup>6)</sup>遺跡にも同様の分布例がある。

しかし、形態面からガンダーラの化粧皿に直結する物は、ギリシア本土から小アジアで例がなく、周辺地であるエジプト・ローマ統治時代のディスク<sup>7)</sup>、およびイラクのパルティア帝国ハトラの神

表1 化粧皿の一覧表<sup>1、4、5</sup>より適用

番号	出土地	所収・登録番号	テーマ	材質直径 (cm)
1	タキシラ	TM69.SK26.2367	獅子にのるキュービッド	片巻、径11.2cm
2	〃	TM170.SK29.2292	有翼のマカラ	片巻、径14.7cm
3	〃	TM171.SK28.2400	獅子	片巻、径11cm
4	〃	TM172.SK29.2223	断片	〃
5	〃	TM173.SK27.13	対向する獅子	片巻、径15.3cm
6	〃	NM8470.SK28.2159	有翼の馬をもつ男女上半身	片巻、径11.5cm
7	〃	TM8474.SK19.695	有翼の馬をもつ男女	片巻、径10.2cm
8	〃	TM8475.SK24.316	2778 (No.22)	片巻、径11.25cm
9	〃	TM8476.SK15.841	十字形分割、人物なし	片巻、径12.2cm
10	〃	TM8477.SK12.1336	有翼魚尾の怪物	片巻、径12.1cm
11	〃	TM8478.SK22.384	変化した有翼のマカラ	片巻、径11.1cm
12	〃	TM8479.SK13 (06A-60)	有翼のグリフィン	片巻、径12.9cm
13	〃	TM8480.SK15.277	魚尾の海馬にのる男	片巻、径11.9cm
14	〃	TM8481.SK27.607	有翼のグリフィン	片巻、径14.7cm
15	〃	TM8482.SK29.306	海馬にししかける女	片巻、径13.8cm
16	〃	TM8483.SK29.1138	有翼のマカラ	片巻、径15.2cm
17	〃	TM8484.SK29.394	有翼双頭のマカラ	片巻、径12.5cm
18	〃	TM8485.SK27.501	九分割、人物なし	片巻、径14.6cm
19	〃	TM8486.SK27.1649	有翼海馬、船尾	片巻、径15cm
20	〃	TM8487.SK22.401	有翼のマカラ	片巻、径15.2cm
21	〃	TM8488.SK20.230	獅子	〃
22	〃	TM8489.SK29.2285	断片	片巻、径18cm
23	〃	NM8490.SK20.763	有翼の馬をもつ男女上半身	片巻、径17.4cm
24	〃	NM8491.SK28.1776	アリアドネーの結婚	直径15.5cm
25	〃	TM8492.SK12.814	二人の女と踊る男	片巻、径13.4cm
26	〃	TM8493.SK2 (06A-60)	有翼の4人組	片巻、径14.2cm
27	〃	TM8494.SK29.2572	死者の宴	片巻、径13.5cm
28	〃	TM8495.SK28.2530	〃	片巻、径12.5cm
29	〃	TM8496.SK27.501	有翼の獣と有翼の人物	片巻、径15.3cm
30	〃	TM8497.SK12.642	兎耳有翼魚尾の怪物	〃
31	〃	TM8498.SK28.635	有翼の馬をもつ男女	片巻、径10.2cm
32	〃	TM8499.Dit15.613	マカラと蛇頭のアリモン	〃
33	〃	TM8500.SK29.2455	有翼海馬	凍石、径9.2cm
34	〃	TM8501.SK28.763	海馬にのる半裸の女と龍尾	凍石、径8cm
35	〃	NM8502.SK29.1849	Zボロンとタブネー	片巻、径11.2cm
36	〃	TM8503.SK28.1486	女に抱擁する懐たる男	凍石、径10.7cm
37	〃	TM85128.SK19.299	有翼海馬	〃
38	〃	TM15158.SK16.871	対向する獅子	〃
39	〃	TM15199.SK26.1825	〃	〃
40	〃	TM15211.SK27.937	十字分割、人物なし	〃
41	〃	TM171.SK.186	有翼の馬をもつ立像	〃
42	〃	TM197.Sr.No.58	4立像	〃
43	〃	MIBD	海馬上で裸をもつ半裸女	凍石、径12cm
44	〃	NMNo.1918.7.62	死者宴	片巻、径12.7cm
45	〃	TM.S5100.SK13.2135	断片 (船舶不明)	〃
46	〃	TM.S5111.SK15.571	〃 (有翼馬)	〃
47	〃	TM.S5120.SK17.686	断片 (船舶不明)	〃
48	〃	TM.S5128.SK19.299	〃 (有翼マカラ)	〃
49	〃	TM.S5203.SK26.2230	〃 (獅子)	〃
50	〃	TM.S5205.SK26.2367	〃 (獅子)	〃
51	〃	TM.S5209.SK26.3132	〃 (人物上半身)	〃
52	〃	TM.S5220.SK20.355/353	〃 (仔をもつ男女半身)	〃
53	〃	TM.S5241.SK26.3545	〃 (船舶不明)	〃
54	〃	TM.S5242.SK26.3857	〃 (馬)	〃
55	〃	TM.S5292.SK29.171.3	〃 (蛇尾のマカラ)	〃
56	〃	TM.S5313.SK28.1679	〃 (立像)	〃
57	〃	TM.S5315.SK28.2860	〃 (船舶不明)	〃
58	〃	TM.S5382.SK37.4444	〃 (海馬)	〃
59	〃	TM.S.SK13.1087	人物のある断片	〃
60	〃	India 邦道 12.4.49	断片 (獅子) (Sirkap)	〃
61	〃	〃	〃 (馬)	〃
62	〃	NMA.No.49.8	雄・裸の男女・男人の上半身	凍石、径12cm
63	〃	V.A.M.	人物、船舶不明	〃
64	〃	V.A.M.No. No.SI220	2人の女に支えられた裸の男	Serpentine、径不明
65	〃	SM UD 372	2頭立馬車の上の2人	不明、不明
66	〃	SM UD 251	ディオニューシス構図	不明、不明
67	〃	IsMIO (Rome)	ミサラ構図	不明、不明
68	〃	SM Dukara.5466	マカラ様の有翼海馬	200 Z/A/T SM022556/79.11.20.5)
69	〃	SM	女2人・男・キュービッド	201 Z/A/T SM022566/76.11.30.18)
70	〃	DM 1930.12.9.1	有翼海馬 (647)	202 Z/A/T SM03135/78.11.9.23)
71	〃	BM106 (1994年購入)	有翼の馬にわたす男 (立像)	203 Z/A/T SM03511/81.6.14.72)
72	〃	PM1117M	有翼グリフィンA	204 Z/A/T SM03512/68.11.2.446)
73	〃	PM989M	ディオニューシス構図	205 Z/A/T SM03513/47.6.28.8)
74	〃	Lahore 巻巻庫?	ヴィーナスを捧ぐ少女	206 Z/A/T SM03514/76.11.30.182)
75	〃	V.A.M.1S.695.1950	Zボロンとタブネー	207 Z/A/T SM03515/82.11.27.87)
76	〃	V.A.M.1S.490.1950	海馬にのる男	208 Z/A/T SM03516/80.11.16.1)
77	〃	V.A.M.1S.71.1950	聖上の龍 (坐像)	209 Z/A/T SM03517 (75.5.15.152)
78	〃	PM984 (715M)	死者宴	210 Z/A/T SM049182 (A.13.1917)
79	〃	NMKS988M	双子座アキオス・クローイ	凍石、径13cm
80	〃	DM 1973.6.18.1	10-Aを模した77 Z/A/T	凍石、径11.05cm
81	〃	BM 1906.12.231	77 Z/A/Tと77 Z/A/T	Y.aoposone凍石、径12.06cm
82	〃	PM1188M (PM72)	男に近寄る女	凍石、径12.3cm
83	〃	BM 1937.3.19.2	獅子の頭、海馬にのる男	Stesite、径13cm
84	〃	BM 1913.10.22	対向する獅子と牛	Stesite、凍石、径10.3cm
85	〃	Harm博.No.NK	神々のついで	〃
86	〃	PM1103M	バクシとオンパレー	片巻、径12.6cm
87	〃	PM1107M	獅子闘争	不明、径11.8cm
88	〃	PM113M	Zキレスの死	〃
89	〃	PM1100M	女の立像	〃
90	〃	〃	酒杯をもつ男女	〃
91	〃	BM No.1939.1.19.12	獅子と牛の闘争	不明、径15cm
92	〃	BM No.1939.1.19.13	男2人の上半身	灰色片巻、径10.4cm
93	〃	BM No.1898.10.271	裸のバクシ	片巻、径13.3cm
94	〃	BM No.1927.3.19.3	獅子の頭、海馬にのる男	凍石、径4.5inch

番号	出土地	所在・登録番号	テーマ	材質直径 (cm)
95	〃	BM No.1939.1.19.14	有翼の馬をもつ男女の上半身	片巻、径18.8cm
96	〃	BM No.?	猪	〃
97	〃	V.A.M.1.S.3.1958	皿をもって海馬にのる	片巻、径12cm
98	〃	V.A.M.1.S.64.1948.V.235	男女5人の立像	〃
99	〃	アゾノ長崎空博物館	人物一對、太陽の馬車	不明、径10cm
100	〃	アゾノ長崎空博物館	猪、有翼の海馬と2立像	凍石、径19.3cm
101	〃	V.A.M.No.?	帆立貝	〃
102	〃	D.H.Laughton 取巻	男女上半身 (抱き合う)	〃
103	〃	〃	マカラ彫刻にのる裸の女	〃
104	〃	PUM.99-1氏蔵	海馬にのる女	〃
105	〃	〃	対向する2頭の獅子	〃
106	〃	〃	有翼の馬をもつ男女の上半身	〃
107	〃	LM.No.G.339	断片 (セゾを打倒する?)	〃
108	〃	LM.No.G.814	有翼馬	〃
109	〃	LM.No.815	飾飾を向かい合う男女	〃
110	〃	LM.No.816	断片 (有翼の馬をもつ男)	凍石、径不明
111	〃	アゾノ長崎空博物館	仔をもつ男女	〃
112	〃	AMUM.69.132	獅子	〃
113	〃	AMUM.69.133	断片 (テーマ不明)	〃
114	〃	SLM	蛇尾足のない男	〃
115	〃	NMT	女	〃
116	〃	DMNo.1880.91	有翼海馬の断片	凍石、幅11cm(CXLIII-40 5×4)
117	〃	DMNo.1939.1.19.11	獅子	凍石、径9.7cm(PS230679)
118	〃	DMNo.1945.4.17.10	〃	凍石、径4.5cm
119	〃	DMNo.1963.7.11.2	男女の供養者	片巻、径10.5cm(PS230681)
120	〃	DMNo.1967.20.21.1	94と同じ	片巻、径12cm(PS295785)
121	〃	DMNo.1967.2.21.2	エロス	片巻、径11.5cm(K73097)
122	〃	DMNo.1967.2.21.3	〃	片巻、径5cm
123	〃	DMNo.1971.5.17.1	〃 (獅子、猪と戦士)	片巻、径13.7cm、径15.2
131	〃	LCM.M85.224.4	有翼の馬もつ立像、有翼海馬	凍石、径10.5cm
132	〃	LCM.M85.224.2	象と獅子	凍石、径13.3cm
133	〃	LCM.M85.281	有翼の馬をもつ男女像	Copper、径9.9cm
134	〃	NWFP	幼虎を抱く2婦人の座像	片巻、径17cm
135	〃	NWFP	皿をもって海馬にのる男	女片巻、不明
136	〃	MNAOR.8714	皿をもって海馬にのる女	片巻、径不明
137	〃	A.I.C	女に抱擁する懐たる男	片巻、径14.7cm
138	〃	A.I.C	王子文胸像と2供養者	片巻、径12cm
139	〃	V.A.M.1S.326.1960	2つと77 Z/A/T	凍石、径7cm
140	〃	V.A.M.1S.322.1960	77 Z/A/T	〃
141	〃	J.W.Alsford蔵	海馬にのる仔をもつ女神	片巻、径13.3cm
142	〃	MG.No.21.202	海馬 (ドラゴン) にのる女	不明、径10.5cm
143	〃	MG.No.18575	太陽神スーリア	不明、径7.6cm
144	〃	PM113M	男に近寄る女	凍石、径10.9cm
145	〃	Samuel Eilenberg蔵	戴不明	凍石、径不明
146	〃	Samuel Eilenberg蔵	アピロコンとダブネー	凍石、径12.06cm
147	〃	Samuel Eilenberg蔵	獅子狩り	片巻、径14.5cm
148	〃	米岡朝人蔵	バクシとオンパレー	凍石、径不明
149	〃	不明	4柱する貴族人と侍女	片巻、径12cm
150	〃	不明	ディオニューシスと従者	片巻、径13.5cm
151	〃	不明	四神戦車と77 Z/A/T女神(バク)	片巻、径13.5cm
152	〃	不明	地玉顔人蔵	片巻、径12cm
153	〃	不明	Zボロンと有翼海馬	片巻、径12.2cm
154	〃	不明	四人の女性像	片巻、径15.7cm
155	〃	不明	千葉顔人蔵	片巻、径15.5cm
156	〃	不明	皿に乗る男子	不明、径不明
157	〃	V.A.M.1.S.60.1948	皿をもって海馬にのる女	片巻、径12cm
158	〃	MIBD IC 34550	尊像像と供養者	不明、径不明
159	〃	不明	ディオニューシスと従者	不明、径不明
160	〃	O.A.M.No.0260 AM	聖徳と人間 (Hantle,1987)	77 Z/A/T、径不明
161	〃	BM 1918.7.6-2	杖象・従者と177 Z/A/T	凍石、径12.7cm
162	〃	BM 1918.7.6-2	杖象・従者と177 Z/A/T	凍石、径12.7cm

略称:  
A.I.C: 古代イラン博物館; AMUM: エリツ大寺古博物館(米国); AOMT: 東京古代博物館(日);  
BM: 大英博物館(英国); L.M.: ロサンゼルス博物館(1937); LCM: ロサンゼルス美術館(米国);  
MG: キエフ美術館(仏); MIBK: ヴェルビエ博物館; MNAOR: ローマ東洋美術館(977);  
NMA: W.R.Nelson美術館(米国); NMT: カラキ国立博物館(1937);  
NMD: ニューゼaland国立博物館(日); NMT: 東京国立博物館(東京); O.A.M.: 2021大学、77 Z/A/T美術館(米国);  
PM: シェンヤン博物館(1937); PUM: ベトナム大博物館; SM: スウェーデン博物館(1937); SLM: 東京美術館(米国);  
TM: 東京少博物館(1937); V.A.M.: ビクトリア・アルバート博物館(英国);  
NWFP: 北西インド西境州

表2 化粧皿のテーマ<sup>1、4、5</sup>より適用

A. ディオニューソスの祭祀	60例	22.0%
B. アフロディーネ	31例	12.0%
C. 神話動物	39例	15.0%
D. 動物界	23例	8.5%
E. 太陽信仰	10例	4.0%
F. 幾何学・花文	26例	9.7%
G. そのほか	58例	21.6%
H. 不明	21例	7.8%

重複計あり 計 268例 100.0%

殿円板浮き彫り<sup>8)</sup>以外に見あたらない。

まず古王朝代の古くから儀式用化粧板(パレット)の伝統をもつエジプトにディスクと呼ぶ化粧皿<sup>7)</sup>があり、出土したアレクサンドリアは、アレキサンダー大王の首都となって以来、プトレマイオス朝では、インドまで知られる貿易経済の中心となり、紀元前30年以降のローマ統治下でも相互間の経済交流が増した交易の中心地である。

当時の経済関係のなかエジプトのディスクとガンダーラの化粧皿が同じ起源、あるいはガンダーラの皿をアレクサンドリア将来とする関係が取りざたされてきた<sup>9)</sup>。共通点を求めればディスクの材質が黒色片岩や凍石を使い、寸法形状もガンダーラより小型か同程度、テーマも人物肖像で共通性が見られ、二つ共に最盛期の後に消滅し、再び現れない点である。

一方で不一致点は、エジプトのには注ぎ口と浅碗キュリックスの影響によるのか二つ小さな把手を持つがガンダーラの化粧皿には共にない。また、エジプトのディスクの仕上げは研磨に緻密さをもつが、ガンダーラのは初期のヘレニズム風以降の化粧皿は、仕上りが荒々しい(図2)。

またタキシラやバグラム遺跡の宝物庫<sup>6)</sup>から出土した青銅ハポクラテス像<sup>6A)</sup>、ヘラクレス-セラピス像<sup>6B)</sup>、エジプト製のガラス<sup>6C)</sup>、タキシラには、エジプト固有の神像ハポクラテス像やロータス文をローマのものと共に受容したにもかかわらず、エジプトではガンダーラのテーマはない。むしろエジプトのディスクのテーマは、エジプト風で鷲鳥に乗るハポクラテス、野犬に座す豊穡神とエロスなどエジプトのテーマの組み合わせ



大英博物館蔵 EA-38517、暗緑砂岩、径7.7cm  
A. 集合場・婦人達とキューベツト<sup>5)</sup>



大英博物館蔵 EA-38516、暗灰色砂岩、径9.6cm  
B. 鷲鳥に乗るハポクラテス<sup>5)</sup>

図2 エジプトの化粧皿風ディスク

せである。いずれにしても西方からガンダーラへの通過地で化粧皿への図像的影響は、イラン風のグリフィンがごく少数化粧皿に現れる程度であったことからエジプトのディスクをガンダーラの源流とするには矛盾がある。

エジプトのディスクの年代と用途を、Petrieが1~2世紀の鏡台の装飾具、Evansが4世紀頃の神酒の容器とし、共にローマ統治時代とする<sup>7)</sup>ことから、ガンダーラで化粧皿がサカ・パルティア時代以降の衰退期に、エジプトのディスクが誕生する点で同じく矛盾がある。

次にガンダーラ以西で化粧皿に酷似するのはパルティア朝(前1世紀~240年頃)ハトラ・パンテオン神殿出土の装飾浮彫り円板(イラク国立博物館蔵 IM-59033)がある<sup>8)</sup>。

「神々のつどい」をテーマに、上に向かって左端からヘラクレス立像、脇にヘラ女神を配したゼウス王座座像、向かって右端には右手を上にした裸体男子の集合場面を浮き彫りする。

皿内側に水平線で区画をもうけテーマを表現する点はガンダーラの化粧皿の寸法・形態・浮彫りが酷似する。登場人物像の筋肉や着衣の表現がヘレニズムの影響が濃厚で、象牙を精密に製作し調和のとれた構図と仕上がりは、ガンダーラやハトラよりも西方の製作、および祖先崇拜、宗教儀式との関係が想定でき献上目的か輸入品と考えられる(図3)。

同様にガンダーラの北辺にあたるバクトリアで紀元前2世紀のギリシャ人都市アイハヌームから化粧皿風の形態を有し凹面内側を区画した片岩製の碗と皿<sup>10)</sup>がある。しかしテーマとなる浮彫りがなく、直径は化粧皿のおおよそ倍にあたる20cm近くから化粧皿の半分以下の5cmまで、厚さもおおよそ数倍のものが多く一定せず、かぶせ蓋になるように上縁外側に段差を設けるなどの相違点から化粧皿以外の容器を想定させる。

以上前述したガンダーラの化粧皿との類似例以外の物は、ロードス式皿、および把手つき浅碗状のキュリックスの二形式、皿内側に水平線で区画し神話等の主題のテーマを描画表現する点が化粧皿と共通するのがヘレニズム圏に見当る程度である(図4)。

ロードス式皿は、大きい方の区画に絵を描き、下部は素文か花文や数本の川状線の装飾が化粧皿と共通する。相違点は、ロードス式皿の主テーマがホメロスの英雄場面や動物の絵画表現である。この伝統は前7世紀の方形構成に始まり円形メダイオン(飾り板)にも同一テーマを用いた後、円形に部分装飾し前5～6世紀頃まで継承される。

またキュリックスと共通するエトルスクの皿絵(ローマ・ピラジュリア美術館蔵 inv.23949)<sup>12)</sup>には、円形の枠内を水平に区画し上の区画側に戦象の上に騎乗する兵士達、をテーマに描く例がある。その手法は後述するバクトリアの古式のフィアレ



高さ 11.5cm、幅 12cm  
ハトラの出土・イラク国立博物館蔵 IM-59033<sup>8)</sup>

図3 象牙型装飾浮彫り円板「神々のつどい」



ロードス式皿：大英博物館蔵 GR1860.4-4.1、

図4 化粧皿との類似性<sup>11)</sup>

(円盤)<sup>3B、3C、13A)</sup>と、化粧皿と同一表現を持ち、西方の表現方法、テーマが共にバクトリアに伝播した実例である。

上記のロードス式皿と浅碗状のキュリックスの内側の描画表現は、紀元前3～1世紀中に次第に浮彫りを採用し、ギリシャのメガロス式碗、およびエトルリアのカレニア式浅い銀製円形フィアレ<sup>14、15A)</sup>の浮彫りに多様化し発展する。

カレニア式皿は、型製円板(前4～前2世紀頃)

とテラコッタ製の灯油ランプ(前4～前2世紀頃)にも影響を与えた。カレニア式皿は、ロードス式皿と同じく扱うテーマがパーン、エロース、アフロディーテ等ほぼ同じく登場する。

ランプは、神話の登場人物が多様で、両型式共に3世紀のローマ時代までつづき、東のベグラム<sup>6D)</sup>に至る。さらにテラコッタ製円板は、円板内側に主要な浮彫し、前4～3世紀頃まで続く。

浮彫装飾の後期には、1世紀後半～2世紀初期頃に大理石円板(オスシラ)がギリシャにある。大理石円板の中心に化粧皿と同じ浮彫の方法で彫像した後の残部が凹状となる様に両面を浮彫、一端を穿孔しディオニューソス祭には神殿門戸にかけ利用したとされる。

タキシラで同時期の化粧皿は、ガンダーラ美術における最も古い時期の彫刻に属するディオニューソスのテーマが多く、その銅像と共に美しいストッコのサテュロス頭部<sup>1L)</sup>が、シルカップの寺院跡で出土し、ベグラムでもディオニューソス頭部<sup>6E)</sup>が出土している。後にガンダーラ美術の盛時にあってもディオニューソスは仏教の諸テーマと並び多数現れ、その信仰が根強く継続していた。

この大理石円板を石膏製の複製品にしたヘレニズム風のがベグラム<sup>6F)</sup>で多数出土するが、ガンダーラ化粧皿と反対に大きく、また化粧皿には採用されない単独像の表現でオスシラの代用と考えられる。

この他に2世紀前半頃の白大理石製の浅碗(パテラ・大英博物館蔵GR1805. 7-3.435)がローマ近郊ハドリアヌス帝別荘から出ている。鳶の葉と胸飾りの円形枠の中で踊る女性を表現し、化粧皿風である。この表現は、後述する銀製のキュリックスの浮彫り表現にも通じる。

最後に化粧皿が発展したインド土着の伝統を見ると、クシャン朝以前の釈迦の象徴表現として仏塔(パールフト<sup>16)</sup>・紀元前185～72年頃、サンチー<sup>17)</sup>・前72～25年頃など)の塔門、欄楯の円枠内側メダイオンにテーマが表現される。表現には、アケメネス朝ペルシャやギリシャの影響

を受けたテーマ内容もあるが、化粧皿がもつ携帯可能な寸法と異り独立分離できない構築物の外部装飾品であり、その比較は無理がある。

### 3.2 技術面からの類似性

化粧皿のように皿内側を水平線で区画し、鋳物の浅浮彫り、あるいは鍛金で打出しによりテーマを表現する技術も化粧皿と類似性がある。

鋳物では、紀元前4世紀頃のギリシャやエトルスクの銀貨がある。貨幣周縁には細かい列点文をめぐらし、またテーマは、化粧皿の盛期のサカ朝に最も多い有翼怪獣と同じ獣頭蛇尾<sup>18A)</sup>や有翼海馬<sup>18B)</sup>を用いる。金属の貨幣は型で製作される点で違うが、その型材料は、化粧皿と同じく石材でその仕上げ技術は共通する(図5-A、B)。

次に鋳物製銅柄鏡の蓋も化粧皿の装飾様式との類似性と化粧道具としての組み合わせからも関連性がある。

前5世紀からギリシャにおいて製作された鏡は、ヘレニズム世界を通じギリシャの東方の植民地であったベグラム、タキシラ<sup>1M)</sup>まで広く分布する。鏡の図は、化粧皿と同様にディオニューソス、エロスやアフロディーテが登場する。

紀元前3世紀前半に製作されたエトルリアの鏡蓋(ローマ・ビラジュリア美術館蔵inv. 51391)<sup>19, 15A)</sup>は、上面に像を表現し、裏面は同心円の刻文とする化粧皿の製法と似るが、化粧皿との相違は材質が金属と開閉の蝶番が付く点である(図5-C)。

次に、鍛金で裏側から打出した後に表面から毛彫りした後鍍金により表現する打出し加工技術は、陶製キュリックスの描画表現を源流にするメガロス式碗、およびエトルリアのカレニア式銀製フィアレ<sup>15B)</sup>にもつながる(図6-A)。

その典型例は、碗の内側にギリシャ神話にあるオンフォロス(臍)を中心に打出し、その周囲に草葉文を浮彫りし幾重もの同心円状の輪の中に線彫<sup>15C)</sup>、または打出しでテーマを表現する<sup>15D)</sup>。

一方で紀元前7世紀頃のエトルスクのフェニキ



A. 獣頭蛇尾銀貨<sup>18 A)</sup>

B. 有翼海馬銀貨<sup>18 B)</sup>

ローマ・ビラジュリア美術館蔵  
inv.51391  
C. 鏡の蓋<sup>19)</sup>

図5 化粧皿との類似性—エトルスクの金属工芸から—

アン式銀鍍金碗や4世紀頃のカレニア式フィアレはオンフォロスが無い場合<sup>15B)</sup>は特に化粧皿に近似し、碗の内側に幾重にも円形の枠を設け、その中心に化粧皿と同じ区画をもちテーマを浅く打出し、周囲に様々な図像を表現する<sup>15E)</sup>。

前3世紀頃以降はオスシラのように単独肖像を高浮彫り表現する皿<sup>15F)</sup>も現れる。後には円形の枠内に区画を設け、主要なテーマの表現<sup>15G)</sup>をするが、特にヘレニズム期の銀製フィアレには、アケメネス朝ペルシャの影響を持つ様式も現れ<sup>15H)</sup>、儀式用で1世紀前半頃とされるヘラクレスの毛皮の上に寝るオンファレーを表現するフィアレは、後述するサルマタイ王墓のものと同類で、これら銀碗のギリシア神話テーマは化粧皿同様にほぼ全体に及ぶ。

メガロス式碗のテーマはガンダーラの化粧皿と同じディオニューロスやアフロデティーが登場し、カレニア式フィアレは器の中心にギリシア神話のほぼ全体に及ぶ1ないし複数人物、または神獣を、全体には複数の円形枠の中に配置する。

1世紀頃のサルマタイ王墓(ロストフ博物館蔵 KP2544 / 13 - 17)出土の銀製フィアレ<sup>20)</sup>は、遊牧民の墓にも関わらずヘレニズムの東方様式を完備した埋葬品で化粧皿と同じ寸法、形態、特徴を持ち中心部に主題となるモチーフを打ち出し、周縁の装飾を毛彫する(図6-B)。



A. カレニア式フィアレ<sup>15 A)</sup>  
ローマ・ビラジュリア美術館蔵



B. サルマタイ王墓出土フィアレ・エロスとプシュケ<sup>20 A)</sup>

図6 化粧皿との類似性—古式フィアレから—

出土した8枚の内6枚の銀製大杯は、縁取りにガンダーラの化粧皿、ギリシャの銀製フィアレに頻繁に用いられる草葉文様をもち、中央部に打出されたギリシャ神話テーマはエロスとプシケ<sup>20A)</sup>、海馬やトリトンにのるネレイデス<sup>20B)</sup>、ならびに葡萄収穫<sup>20C)</sup>の神話テーマで円形メダイオンに精巧に表現し、追悼供養容器とされる<sup>20D)</sup>。

同時に出土した金製ファレラ(円形の飾り板、胸飾、馬の額飾)と銀鍍金の沐浴用容器(ルテリオン)は、すべてヘレニズム様式に属し、紀元1世紀の末頃と考えられるこの古墳の埋葬時期から、これらの銀製大杯が埋葬時より様式上は古く、化粧皿と同時代のものである事、及び前述した銀製ファレラ<sup>20、15A B)</sup>との類似性がわかる。

古代バクトリアのアムダリア流域でオクサスの遺宝と呼ぶ金属盤も化粧皿との関連を考慮する必要がある。盤内側の大きい方の区画に以下に述べる多様なテーマを表現、他の区画は素文、その外周は草葉文で装飾し化粧皿と共通する。

まずガンダーラの化粧皿にはない騎象をテーマに表現した一連の古式ファレラ、エルミターージュ美術館蔵 S565<sup>13A)</sup>、大英博物館蔵<sup>3B)、3C)</sup>がある。

紀元前3~2世紀頃の古式ファレラからエルミターージュのは、兵士の兜がセレウコス朝風、鞍の鞍覆はタキシラを始めガンダーラ化粧皿に度々見る蛇尾の海獣と同類でエトルスクの貨幣やヘレニ

ズム世界からの明らかな影響がある(図7-A)。

また突き棒を持つインド人象使いの表現は、西方(古典)的と東方的な要素が共存するいわゆるグレコ・バクトリア風美術に属し、前述した騎象兵士を描くエトルリアの壺絵と材質以外の表現で共通する。

同じ騎象のテーマで二つある大英博物館蔵 OA 1937.3-19.5.のは化粧皿の特徴、皿内側を区画しテーマを表現、周縁には蓮華文様を配する。これはインド仏塔欄楯の様式を小型で金属仕様にしたもので、前述ファレラ<sup>20B)</sup>を典型的なインド風に表現したキシラの化粧皿<sup>1N)</sup>と共通する(図7-BC)。

他に龍文のファレラ(エルミターージュ美術館蔵 S550)<sup>13B)</sup>は、周囲を列点文と渦文帯で縁どりし、中央には、猛禽の嘴、尖った耳、猛獣の脚をもつ有翼龍が、輪形に表わされている。裏面には、皮紐を通す鉦や鋌留め痕がある。このファレラは、技術、寸法、裏面に付けた鐙の位置、ならびに文様からも、前述の戦象文のファレラ、さらにはエトルスクのカレニア式フィアレ<sup>15B)</sup>の外周に縁どられた蛇文への関連性がある。

以上あげたバクトリアと化粧皿との類似例は、アレキサンダ大王の死後、ギリシャ人の子孫が興したセレウコス朝代に西方のシリアやギリシャ人と接触した遊牧のスキタイを含めたヘレニズム世



エルミターージュ美術館蔵 S565  
A. 騎象図・1<sup>13A)</sup>



大英博物館蔵 OA 1937.3-19.5  
B. 騎象図・2<sup>3B)</sup>



エルミターージュ美術館蔵 S550  
C. 龍文図・3<sup>13B)</sup>

図7 化粧皿との類似性—ファレラから—

界からの流入品、または現地製としても、前3世紀頃バクトリアからガンダーラにかけてに住んでいたギリシャ人の子孫が精密に加工表現できる金属を基盤にガンダーラの化粧皿の製作するための移行期間があったことを示している。

## 4 化粧皿とその文化

### 4.1 化粧皿の終焉

ここで化粧皿のまとめと終りについて述べる。製作にたずさわったギリシャ人を含めた西方からの職人達は、地理的にギリシャの東の果てバクトリアのアムダリア河畔アイハヌームやガンダーラのタキシラといったギリシャ人都市に生活し、グレコ・バクトリア美術を担う伝統の製作法、テーマの表現様式などの知識を持って製作活動をした。

そこでは化粧皿と同じ様式として皿の内側を区画し主テーマを表現する様式と浮彫り技法の伝統が存在していた。内側を装飾する手本は、ロードス式皿の描画があった。円枠内に区画を設け、そのテーマを浮彫し周縁を装飾する技法は、フィアレ、キュリックスから応用ができた。

しかし化粧皿の盛期であったインド・サカ、インド・パルティア朝のもと、少なくともタキシラの初期のギリシャ人時代においても、結果的にはロードス式皿、フィアレを流用する化粧皿も作らず、精密で高級な表現が可能な貴金属、金属による打ち出しや象牙材料にも手をださなかった。何より扱いやすく加工が比較的簡単なうえ量産や急造に応じることが出来る現地の片岩を積極的に用い、簡単に携帯、運搬可能な重量寸法を、さらに浮彫りのテーマにも支配王朝毎の文化をためらわずに採用したのである。

即ち初期のヘレニズムの面影が強く残る化粧皿は、少なくとも緻密な加工・仕上がりを求め黄色がかった凍石などを使い緻密に製作した。当時の石彫技術に化粧皿と同じく石を使った貨幣の型製作、例えばインド・ギリク朝最後のヘルマエオス王貨幣、の仕上がりにおいてすら、初期の化粧皿の緻密な仕上がりに共通性がある。

ギリシャ人時代が衰える一方、遊牧民族のインド・サカ朝、インド・パルティア朝のもと遊牧民が持つ伝統にもかかわらず領地における古くからの習慣を容認し、化粧皿が最盛期を迎えた。

その証拠は、遊牧民の神器<sup>註6)</sup>の一つである杯においてもギリシャ神話の図像と共にヘレニズム風のフィアレ<sup>13)</sup>を用い、またガンダーラの化粧皿では、海洋の象徴の有翼海馬や蛇尾怪獣の図像、さらにディオニューソス、饗宴図などを加え、そのなかで遊牧民族の化粧皿の仕上げは、荒々しい動物・怪獣文のテーマと共に荒けずりな彫刻法に変化する。

ローマに対抗し覇権を競った西アジアのパルティアの美術では、ヘレニズム文物への傾倒から化粧皿のテーマは怪獣とともにディオニューソスが多く、この時代がもつバッカス的な風潮とも一致し、少なくともギリシャの東の領界にあるタキシラの化粧皿は、数量的にも最盛期をむかえた。

化粧皿の西方の領界が不明であるが、化粧皿の仕上がりの点から、エジプトのディスク及びハトラの化粧皿風の緻密な仕上がりに、明らかにガンダーラの質と異りそれらは輸入によるものではなく、現地製である事は明確である。

最後に少なくとも都市部のタキシラでは、化粧皿が急に衰退した。イラン系遊牧民族によるクシヤン朝の支配で、インド土着の節度ある仏教が当時の文化・意識を高揚し国際化しはじめた時期である。新たな勢力である仏教徒達は、仏伝図、あるいは単独の仏像表現に関心をむけガンダーラの仏教美術が本格化する。この新たな宗教美術活動の盛り上がりに対抗するため、伝統的な化粧皿を担ってきた主人公とテーマの関心が変化していたのである。

### 4.2 化粧皿の文化について

最後に化粧皿を利用した背景の文化を見たい。

バグラム遺跡から出土したインド様家具の象牙製装飾板に、ギリシャの鏡や化粧皿や道具をもち裸体で化粧する女性<sup>6G)</sup>像がある(図8-A)。

図から古代インドでは、裸体の装いとして全身美容と衛生のため沐浴と共に化粧が意義をもち、女性が化粧皿、鏡、香料などを使って化粧していた事がわかる。

さらに化粧は宗教儀礼の一部に土着のシバ神信者らの想像を越す空隙嫌忌観から神聖で清浄と考える白檀の泥灰を塗付し邪眼を塗りつぶす魔除けの化粧が取り込まれていた<sup>21)</sup>。

それは、インド・グreek朝でギリシャ系のメナンドロス王(紀元前155～130年頃)と、仏教の高僧ナーガセーナとの問答が経典<sup>22)</sup>のなかで



ベグラム遺跡出土象牙製裝飾板<sup>6G)</sup>  
A. 化粧する女性像



ブトカラ寺院遺跡出土<sup>23)</sup>  
B. 化粧皿と女性像

図8 化粧する女性像

額飾や眉間飾により邪悪を除く化粧観が示されていることからわかる<sup>注7)</sup>。

タキシラでは少なくとも化粧皿が多く出土したのは寺院の密集地区であり、寺院から非仏教的な巨人を浮彫りした化粧皿が出ているためガンダーラの化粧皿が信仰との関連を無視できない。

この点に関してガンダーラのスワート・ブトカラ寺院(紀元前1～後3世紀頃)跡出土の化粧皿を使う女性のレリーフ<sup>23)</sup>は、インド式アーチの下でターバンをつけた貴族風男性に寄りそうイラン風衣装の女性が化粧皿を使う光景が見いだせる。また化粧皿に酷似する裝飾板がハトラの神殿跡から発見されたことも、世俗から離れた装いと信仰との関係をによわせている(図8-A)。

#### あとがき

本研究では、関係各位から資料調査の協力と支援をいただいた。まず、財団法人コスメトロジー研究振興財団の研究助成のもとで大英博物館・貨幣メダル部、エジプト部、東洋部、ヴィクトリア&アルバート美術館東南アジア・インド部門、オクスフォード大学・アシュモレアン博物館、ならびに(株)欧亜美術から調査で御協力をいただいた。

以上本稿を借り厚く御礼申し上げます。

#### 引用文献

- 1) Marshall, J. H.: Taxila, A) Vol. 2., pp. 493, 503, B) Vol. 2. Pl. 144, no. 62, 65, 97, C) Pl. 145, no. 75, 78, 79, 82 - 85, D) Pl. 144, no. 64 - 5, 68 - 9, 71, E) Pl. 144, no. 74, Pl. 145, no. 76 - 7, F) Pl. 145, no. 73, 80 - 1, 86, 88 - 9, G) Pl. 145, no. 92 - 94, H) Pl. 144, no. 66, 70, 72, Pl. 146, no. 106, I) pp. 494, J) Pl. 186, no. 417, K) Pl. 209, no. 21, L) Pl. 148, no. 1, M) Pl. 181, no. 209, Pl. 182, no. 208, 211, N) Pl. 145, no. 73, pl. 186 - no. 417, D) pl. 181 - no. 209, pl. 182 - no. 208, 211, F) vol. 1. Plates., Cambridge, 1975
- 2) Haarle, J. C.: Artefacts of the Historical Period from Bannu, 9th Intern. Conf. of the Assoc. of

- South Asian Archaeologists in Western Europe, 1987
- 3) Cribb, J., and Errington, E.: The Crossroad of Asia, Transformation in Image and Symbol in The Art of Ancient Afghanistan and Pakistan, A) pp. 152, B) Pl. 161, C) Pl. 162, Cambridge, 1992
- 4) Dar, S. R.: Toilet Trays from Gandhara and Beginning of Hellenism in Pakistan, Jarn. of Central Asia, Vol. 2 (2), Islamabad, 1979
- 5) Francfort H. P.: Les Palettes Du Gandhara recherches, Meoires de la D. A. F. A., Tome XXIII, Paris 1979
- 6) Hackin, J. R.: Nouvelles recherches Archelologiques a Begram (Ancienne Kapici) 1939-1940, Meoires de la D. A. F. A., Tome XI, A) Fig. 322, 324, B) Fig. 323, 325, C) Fig. 257 - 265, D) Fig. 419 - 430, E) Fig. 329, F) Fig. 274 - 320, G) Fig. 233, 660-68, Rencontre de Trois Civilisations Inde-Grèce-Chine, Paris, 1954
- 7) K.Parlasca: Greichish-romische Steinchalschen aus Agypten', 1983
- 8) 深井普二：ペルシャ古美術研究 2、p.153、吉川弘文館、1980
- 9) Mervat Seif-el-Din: Interactions in Art-India and Egypt-Influence and Interactions, Marg Pub. and Indian council for cultural Relations, pp.85-89, 1993
- 10) Bernard, P.: Fouilles d'Ai Khanoum IV. Le Monnaies Hors Tresors Questions d'Histoire Greco-Bactrienne., Mémoires de la D.A.F.A. Tome XXIV, pp.9-20, Paris, 1984.
- 11) 日本放送出版協会：大英博物館 - 3, Pl.39, 日本放送出版協会, 1990
- 12) Beazley, J.D.: Etruscan Vase-Painting, pp.211-215, Oxford, 1947
- 13) Wilfried S.: Weihrauch und Seide, Alte Kulturen an der Seidenstrase, A) Pl.126, B) Pl.127, 1996
- 14) Salvatore S.: The land of the Etruscans, from Prehistory to the Middle ages, Pl.146, Rome, 1985
- 15) Strong D.E.: Greek and Roman Gold and Silver Pl. A) Pl. 29B, B) Pl. 13 A, C) Pl. 14 A, 15 A, 15 B, 24 A, 24 B, D) Pl. 14 B, Pl. 19 A, E) Pl. 13 A, F) Pl. 36 A, 36 B G) Pl. 30 A, H) Pl. 43 A, 1966
- 16) Coomaraswamy, A. K.: La Sculpture de Bharhut, Fig.89, Fig.94, VANOEST, Paris, 1956
- 17) Marshal, J., and Foucher, A.: The Monuments of Sanchi, Vol.3, Pl.75-90, 1983
- 18) Fiorenzo C.: Monete Etrusche, A) Pl.8, B) Pl.18, Instituto Poligrafico e Zecca Dello Stato, Libreria Dello Stato, 1990
- 19) Paola Pelagatti et al.: La Civiltà degli Etruschi-Scavie Studi Recenti, エトルリア文明展、最新の発掘と研究による全体像、Pl.131、朝日新聞社、1990-1991
- 20) Ausden Schatzkammern Eurasiens Meisterwerke Antiker Kunst, held at Kunsthause Museum Zurich, A) Pl.91, B) Pl.93, C) Pl.95, D) Pl.52, 1993,
- 21) 松山俊太郎：古代インド人の装い、A) pp.34 - 35(1)、化粧と文化、昭和 56
- 22) 中村元、早島鏡正訳：ミリンダ王の問い、3.8.5 章、東京、平凡社、1964
- 23) Facenna, D., Taddei, M.: Sculptures from the sacred area of Butkara II- Swat, W. Pakistan, Reports and memoirs CLXVIII, Roma Istituto Poligrafico dello Stato, 1962-1964.

#### 注 釈

注 1 材質は片岩・Schist が代表的で、凍石・Steatite、Soapstone がつく。

注 2 仏語は、Palette、英語は Toilet Tray、Cosmetic Tray とも呼ぶ。

注 3 現在のアフガニスタンが古代バクトリアに相当する。その南部をインド・ギリク朝、北部はグレコ・バクトリア朝が支配し「漢書」の大夏を示す。

注4 ギリシャのヘロドトス(紀元前484～425年頃)が「歴史」に記したスキタイは、ペルシャ人がサカ(塞)と称した。

注5 デイオニソース(英語読み・バックス)は、葡萄と酒の神、女性からは野生的な狂乱の神として熱狂的な崇拜を受けた。デイオニソース、アプロディーテーが持つ性格は、ヘレニズム美術が持つ武勇・暴力・強奪に代わり、清純で牧歌的な愛と情熱をかき立てる内容がある。

ガンダーラの化粧皿は、このヘレニズム時代

の新しい気風を反映し、デイオニソースの場を表すのが多い(表1の66,89,98,100,150,153)。このデイオニソース信仰がガンダーラではほぼ確実に存在した。

注6 ヘロドトス著の「歴史」のなかでスキタイの起源神話に出てくる、黄金製の鋤・軛、戦斧、盃の三つの神器がある。

注7 サンスクリット語 Tilaka、ヒンディー語 tika、および lalatika と呼ぶ。

# 化粧品の表示に関する研究 — ことに警告表現について —

慶應義塾大学 商学部

吉川 肇 子

The purpose of the present study was to examine the effect of directions of cosmetics on people's understanding of risk. In communicating risks to people, even if they are provided with accurate probabilistic information, there may be great difficulties dealing with the uncertainty associated with evaluating probabilities. The first experiment was conducted to examine the effect of graphical representation on understanding probabilities. As the result the experiment, though, the graphical representation of probabilistic information did not improve subjects' understanding of risk. Then the survey was conducted to examine the attitudes towards cosmetics and warnings of cosmetics among women. The result revealed that instructions and warnings of cosmetics did not attract attention among the subjects. No relationship was found between the subjects' attitudes towards technology or cosmetics and attention towards warnings. The implications of the results were discussed.

## 1 緒言

本研究では、化粧品のパッケージや取扱説明書、広告などにおける表示が、消費者にどのように受け取られているのか、また、表示の内容がどの程度理解されているのかについて、実験的に検討することを目的とする。ことに、本研究では、化粧品の表示のなかでも警告表現に焦点を当て、その表現に含まれているリスクがどの程度認知されているのか、またそうしたリスク認知が、消費者の化粧品の購買や使用などの行動面にいかなる影響を及ぼすことになるのかについて、主として検討を進める。

近年の科学技術の発展は、新たにさまざまなリスクを生み出している。以前から知られているリスクも含め、ある程度のリスクを受け入れることは、もはやさけることのできない状況といえる。

また、人々には知る権利があるということが社会的な合意となり、その権利の確立が目指されているという社会的変化もある。こうした状

況の中で、リスクをどのように伝えるのかという、いわゆるリスク・コミュニケーション (risk communication) の研究が盛んに行われるようになってきた。

リスク・コミュニケーションとは、「個人、機関、集団間での情報や意見のやりとりの相互作用的過程」(National Research Council, 1989<sup>1)</sup>)と定義されている。こうした定義の背景には、リスクにさらされる(ないしはさらされる可能性のある)人々に対しては、十分に情報を提供し、その問題に対する理解を深めてもらうことが重要である、という考え方がある。

さて、このようなリスク・コミュニケーション研究の基本的立場は、対象が化粧品であっても同様に尊重されるべきであると考えられる。化粧品の使用にリスクがあるならば、それがたとえ小さなものであるにしても、正しく伝えられなければならないということである。

警告や注意書き、また、広くは取扱説明書も、リスク・コミュニケーションの一つの形態としてとらえることができる。こうしたリスク・コミュニケーションは、人々にリスクがあることを伝えて、それを理解してもらうことと、安全でない行動をしないようにさせるという、行動を変容させることとの二つの目的を持つ。

しかしながら、現実には、これらの警告や注意



An empirical study on directions of cosmetics

Toshiko Kikkawa

Faculty of Business and Commerce  
Keiou University

書きによって、化粧品にリスクがあることは、必ずしも正しく消費者に伝えられているとはいえない。リスクを正しく伝えていないことが、化粧品に対する過剰な不信を招くこともある。また、表示のあり方によっては、たとえ正しくリスクが伝えられていても、消費者がそのリスクを十分に理解し得ないということもあり得る。

1995年7月に施行されたPL法により、化粧品に限らずさまざまな製造物の表示にわかりやすさ、理解しやすさが求められることになった。しかしながら、どのような表示が適切であるのか、社会心理学的な見地から十分に検討されているとはいえない。警告表示に限っても、従来のJIS規格との不斉合や、業種間での不斉合がみられるばかりでなく、はたしてそれらの表示が消費者に意図したとおりに受け取られているかどうかの保証がない。

こうした制度的な変化にともなって、アメリカ合衆国におけるANSI(1991)<sup>2)</sup>のように、わが国でもまた、警告や表示の標準化が、さまざまな分野で試みられている(林田、1995<sup>3)</sup>、渡邊、1995<sup>4)</sup>、など)。

しかし、本稿で取り上げるのは、制度や基準ではなく、そのようにして作られた表示や警告などが、人々にどのように受け取られているのか、その効果の問題である。したがって、心理学的研究によって、現在使われている警告よりも、より効的な警告のあり方が指摘されることもある(これらの問題の詳細については、吉川(1997)<sup>5)</sup>を参照)。

このような研究の代表的なものとして、Wogalter(1994)<sup>6)</sup>は、有効な警告のあり方を検討している。そして、警告の要素として、次の四つをあげている。

①警告があることがわかるような単語。しかもその被害(hazard)の程度の違いがわかるものであること。英語でいえば、DangerとCautionであり、前者の方が、被害の程度が大きい。日本語では、この用語の差は「警告」と「注意」と

して使い分けられている。

②被害がなにであるかについての記述。

③警告にしたがわないときに起こる結果についての記述。

④被害を避けるために、すべきこと。または、してはいけないこと。

これらの四つの要素は、一般的にはすべて必要だが、必ずしもすべてなくてもよいと、彼は指摘している。たとえば、場合によっては、「止まれ」(先のWogalter(1994)の④の要素にあたる)という文字だけでもよいということである。つまり、警告に必要な要素は、その製品がどのような性質のものであるか、どの程度警告メッセージを載せるスペースがあるか、などさまざまな要因によって影響されると考えられる。

化粧品については、わが国では、渡邊(1995)が、望ましい注意・警告事項について、①警告・禁止事項の明示、②禁止を破ったときの結果の明示、③その結果に対する(応急)措置、の三つをあげている。

しかし、先にも述べたように、これらの表示や警告が正確に記載されているとしても、消費者がそれらを正しく理解するとは限らない。たとえば、杉森ら(1996)<sup>7)</sup>は、女子学生を対象とした調査によって、化学品の表示については、「警告」と「危険」という語句が危険度を逆転して理解している者が少なくないこと(「警告」の方が「危険」よりもリスクが高い)、シンボルマーク(絵表示)が必ずしも正確に理解されていないこと、を明らかにしている。

Wogalter et al.(1991)<sup>8)</sup>は、警告が消費者に届かない理由を、①消費者が警告を見ない、②消費者が警告を理解できない、③消費者が警告を無視する、という三つの理由に大別し、そのうちの、なぜ警告を見ないのかについて検討を行っている。彼らは、大学生を対象とした三つの研究によって、警告を読もうという気持ちは、被害(hazard)の知覚によって決定されるということを明らかにした。すなわち、その製品が安全であると感じられ

れば警告は読まれないのであり、逆に危険であると感じられれば警告を読もうという気持ちになるということである。また、その製品にどれくらい慣れ親しんでいるか (familiarity) も、警告を読もうという気持ちに関連があり、よく使ってなれている製品ほど、警告が読まれないということである。しかし、こうした製品への慣れは、被害の知覚と比較すると、あまり重要ではないという。さらに、被害が起こる確率よりも、その被害の重大さが、被害の知覚に影響することを明らかにしている。つまり、被害が重大であると確信されればされるほど、その起こりやすさがどうであれ、警告はより読まれるようになるということである。

警告の内容については、Laughery & Stanush (1989)<sup>9)</sup> が、内容の明確さ (explicitness) が、人々の理解にどのような影響を及ぼすかについて検討している。その結果、明確な警告によって、被験者のリスク認知が高まることと、被害の程度の理解が深まることが明らかになった。

また、Lovvoll et al. (1994)<sup>10)</sup> も、大学生と一般人を対象とした調査によって、シートベルトの着用について、さまざまな警告文の効果を検討している。その結果、現在の (アメリカ合衆国で使われている) 警告よりも、被害の内容をより明確に伝える方が有効であることを明らかにしている。

ただ、商品を守る側から見れば、「はっきりと警告することで、消費者は購買を控えるのではないか？」という懸念が生じるであろう。この問題について、Laughery & Stanush (1989) は、明確な警告は、その商品の製造者の消費者に対する関心の高さの反映とみなされることを明らかにしている。この結果から Laughery らは、研究で対象とした9つの製品のうち、一つの製品 (排水管クリーナー) を除いて、明確な警告が買い控えにつながるとはいえないと結論づけている。

同様に、購買意図と警告との関係を検討した Silver et al. (1991)<sup>11)</sup> も、警告を読むことと、商品の購買意図とは関連がないことを指摘している。

以上のような先行研究をもとに、本研究では、

化粧品においてリスクを正しく伝えることを阻む技術的問題を、社会心理学的立場から解明していくことをねらった。

まず、きわめて小さい確率のリスクを、人々がどのように認知しているのかについての実験的研究 (第1実験) については、すでに中間報告で報告した。この結果を要約すると、きわめて小さい確率のリスクはたとえ図による説明があつたとしても、理解されにくいことが明らかになった。また、客観的には冗漫な (意味のない) 説明であっても、文章による説明があつことが、被験者のわかりやすさの評価を高めることが明らかになった。

さて、本報告では、化粧品およびその警告に対する女性の態度についての調査結果 (第1調査) の結果を報告する。

## 2 第1調査

### 1. 目的

本研究の目的は、以下の2点にまとめられる。

- ①化粧品の説明と警告 (注意書き) が、実際にどの程度読まれているのかを明らかにする。
- ②上記の行動が、被験者の化粧品や科学技術に対する態度によって影響されているかどうかについて、検討する。

### 2. 方法

被験者：成人女子 41 名 (18 歳～41 歳)。

質問紙の構成：主たる質問項目は以下の通りであった。

- 1) 化粧品を買ったときに説明を読むかどうか、注意書き (警告) を読むかどうか、読まない場合はその理由についてあらかじめ用意した選択肢の中から選択させた。
- 2) 科学技術に対する態度、化粧品の安全性に対する信念、化粧品会社に対する信頼、などの態度をリッカートタイプの7点尺度上に回答させた。
- 3) 被験者自身の化粧に対しての日常的な行動や信念をリッカートタイプの7点尺度上に回答さ

せた。

4) 被験者自身の化粧品の保有数、化粧に使う時間、金額(月額)。

### 3. 結果

化粧品を買ったときに使い方の説明を読むかどうかについて尋ねたところ、「新製品を買ったときだけ必ず読む」、「時々読む」、「ほとんど読まない」という回答が多かった(表1)。「新製品も使い慣れている製品も買うたびに必ず読む」という回答や、「全然読まない」という回答は少なかった。「ほとんど読まない」または「全然読まない」と回答した被験者に、その理由を尋ねたところ、「読むのが面倒くさいから」という理由がもっとも多く、ついで「読んでも意味がわからないから」という理由が挙げられた。

化粧品を買ったときに、注意書き(警告)を読むかどうかについて尋ねたところ、「時々読む」という回答がもっとも多く、ついで「新製品を買ったときだけ必ず読む」という回答が多かった。「新製品も使い慣れている製品も買うたびに必ず読む」という回答は少なかった(表2)。「ほとんど読まない」または「全然読まない」と回答した被験者に、その理由を尋ねたところ、「読むのが面倒くさいから」、「読んでも意味がわからないから」、「よく知っている製品だから」という順に回答が多かった。

科学技術や化粧品に対する信念を測定する質問項目についての回答を因子分析し、固有値1以上の4因子をバリマックス回転したところ、回転後の因子負荷行列として表3のような結果を得た。第1因子は、「ほとんどの企業は、裏では不正な取引を行っている」、「化粧品の安全性について、化粧品会社は本当のことを公表していない」、「化粧品会社は消費者のことをあまり考えていない」、「化粧品会社は不当に大きな利益を得ている」

表1 使い方の説明を読むかどうかについての回答

回 答	度数 (%)
新製品も使い慣れている製品も買うたびに必ず読む	3 (7.9)
新製品を買ったときだけ必ず読む	11 (28.9)
時々読む	10 (26.3)
ほとんど読まない	11 (28.9)
全然読まない	2 (5.3)
その他	1 (2.6)

表2 注意書き(警告)を読むかどうかについての回答

回 答	度数 (%)
新製品も使い慣れている製品も買うたびに必ず読む	5 (13.2)
新製品を買ったときだけ必ず読む	11 (28.9)
時々読む	14 (36.8)
ほとんど読まない	6 (15.8)
全然読まない	1 (2.6)
その他	1 (2.6)

表3 バリマックス回転後の因子負荷量

項 目	第1因子	第2因子	第3因子	第4因子
ほとんどの企業は、裏では不正な取引を行っている	.585			
化粧品の安全性について、化粧品会社は本当のことを公表していない	.897			
化粧品会社は消費者のことをあまり考えていない	.503			
化粧品会社は不当に大きな利益を得ている	.792			
科学技術の発達はわれわれの生活を豊かなものにしてくれる		-.732		
空き缶や牛乳パックのリサイクルを進めるべきだ		.840		
食料品はできるだけ添加物(合成着色料、保存料など)の少ないものがよい			.902	
野菜はできるだけ農薬を使わない方がいい			.543	
ほとんどの企業は消費者のことをあまり考えていない				.882

という項目に負荷が高く、「化粧品会社に対する信頼のなさ」の因子と命名した。第2因子は、「科学技術の発達はわれわれの生活を豊かなものにしてくれる」に負の負荷量が高く、「空き缶や牛乳パックのリサイクルを進めるべきだ」という項目に正の負荷量が高いので、「科学技術に対する否定的な態度」の因子と命名した。第3因子は、「食品はできるだけ添加物（合成着色料、保存料など）の少ないものがよい」と「野菜はできるだけ農薬を使わない方がいい」という2項目に因子負荷量が高いので、「化学品に対する否定的態度」の因子と命名した。第4因子は、「ほとんどの企業は消費者のことをあまり考えていない」という項目にのみ、因子負荷が高かった。

これらの因子得点と、化粧品の説明書や注意書きを読むかどうかという行動との関係をみたところ、説明書を読むかどうかによって、科学技術に対する否定的な態度の因子の得点に有意な差がみられた ( $F=3.13$ ,  $df=3/37$ ,  $p<.05$ , 表4)。LSD法によって、グループ間の差を多重比較したところ、「新製品も使い慣れている製品も買うたびに使い方の説明を必ず読む」と回答した被験者が、他の被験者に比べて、この因子の得点が有意に低かった。すなわち、このように回答した被験者は、他の被験者に比べて、科学技術に対する態度がより肯定的であるといえる。

また、第4因子に負荷している項目は1項目だけであったが、注意書きを読むかどうかという行動によって、この因子の得点に有意な差がみられた ( $F=3.37$ ,  $df=1/37$ ,  $p<.05$ , 表5)。LSD法によって、グループ間の差を多重比較したところ、「新製品を買ったときだけ注意書きを必ず読む」と回答した被験者が、他の被験者に比べて、この因子の得点が有意に高かった。すなわち、新製品を買ったときだけ注意書きを必ず読む被

験者は、他の被験者に比べて、ほとんどの企業は消費者のことをあまり考えていないと考えていることになる。

被験者自身の化粧品に対しての日常的な行動や信念についての回答を、因子分析し、固有値1以上の2因子をバリマックス回転したところ、表6のような結果を得た。第1因子に正の負荷が高い項目は、「化粧品は私の生活になくってはならないものである」と「化粧品の新製品がでたら試してみたい方である」であり、負の負荷が高い項目は「化粧品はできることならば使いたくない」であった。これらの項目の意味内容から、第1因子を「化粧品に対する好意的態度」の因子と命名した。ついで、第2因子に負荷が高い項目をみると、「私はできるだけ自然に近い成分の化粧品を使うようにしている」、「使う化粧品のメーカーを決めている」、「肌は弱い方である」の3項目であり、いずれも正の負荷であった。そこで、第2因子は、「化粧品に対する慎重な態度」の因子と命名した。

これらの因子得点と説明書や注意書きを読むかどうかという行動との関連をみたところ、有意な関連は見いだせなかった。

#### 4. 考 察

化粧品の使い方の説明については、新製品も使

表4 科学技術に対する否定的な態度の因子得点

説明書を読むかどうかについての回答	因子得点の平均
新製品も使い慣れている製品も買うたびに必ず読む	-1.55
新製品を買ったときだけ必ず読む	.05
時々読む	-.12
ほとんど読まない・全然読まない1)	.22

1) 度数が少なかったため、グループを併合して分析した。

表5 「ほとんどの企業は消費者のことを考えていない」(第4因子)の因子得点

注意書き(警告)を読むかどうかについての回答	因子得点の平均
新製品も使い慣れている製品も買うたびに必ず読む	-.19
新製品を買ったときだけ必ず読む	.68
時々読む	-.35
ほとんど読まない・全然読まない1)	-.33

1) 度数が少なかったため、グループを併合して分析した。

表6 バリマックス回転後の因子負荷量

項 目	第1因子	第2因子
化粧品は私の生活になくなくてはならないものである	.851	
化粧品はできることならば使いたくない	-.723	
化粧品の新製品がでたら試してみたい方である	.645	
私はできるだけ自然に近い成分の化粧品を使うようにしている		.826
使う化粧品のメーカーを決めている		.644
肌は弱いほうである		.610

い慣れている製品も買うたびに必ず読むという被験者は少なく、ほとんど読まない被験者も少なくなかった。注意書き（警告）については、使い方の説明よりも、読まれる割合が相対的に高かったが、それでも、十分に多くの被験者が注意書きを読んでいるとはいえない。また、新製品を買ったときさえ、特に警告を読む人の割合が増えるとはいえない。これらの結果は、Wogalter et al. (1991) の製品に対する慣れよりも、むしろ被害の知覚が警告を読もうとする気持ちに影響するという指摘に合致すると考えられる。すなわち、本研究の被験者については、直接に化粧品についてのリスク認知を調査していないが、それほど化粧品に対するリスク認知が高いとはいえず、そのことが説明書や警告に対する認識の低さに影響していると推察される。

また、科学技術に対する態度や化粧品会社に対する信頼などの態度は、説明書や警告を読むかどうかという行動にそれほど意味のある関係を持たなかった。化粧品を使うか使わないか、また使うとしてどのような化粧品を使うかというような行動選択は、リスク・コミュニケーションでいうところの個人的選択の事態 (personal choice settings, National Research Council, 1989) である。科学技術に対する態度や企業への信頼が、原子力発電所や化学プラント、環境問題などのような社会的選択の事態 (public debate settings) のリスク・コミュニケーションでは、影響が大きいことが多くの研究から知られているが (吉川、印刷中<sup>12)</sup>)、本調査の結果からは、こうした化粧品の使用という個人的選択事態においては、態度の行動への影響

はみられなかったといえる。

さらに、本調査では被験者の日常の化粧行動 (化粧品の保有数、化粧時間) と警告への関心について十分な分析が行えなかったが、これは、被験者間で化粧行動に非常に大きなばらつきがあり、信頼できるほど十分なデータが得られなかったためである。先に、リスク認知と警告を読むことについての関連を述べたが、化粧行動とリスク認知との関連も含め、今後さらにデータを蓄積して、この点について明らかにする必要があるといえる。

#### 引用文献

- 1) National Research Council *Improving risk communication*. National Academy Press, 1989
- 2) ANSI *American national standard for product safety signs and labels: Z535*. American National Standards Institute. 1991
- 3) 林田学 PL 対応表示のノウハウ 中央経済社 1995
- 4) 渡邊健二 化粧品の警告・表示等における PL 対策 *Fragrance Journal*, 23, 32-35. 1995
- 5) 吉川肇子 消費生活製品のリスク・コミュニケーションー特に警告表示の効 についてー 日本リスク研究学会誌、第9巻1号、75 - 80. 1997
- 6) Wogalter, M.S. Factors influencing the effectiveness of warnings. *Proceedings of Public Graphics*, 5.1-5.21. 1994
- 7) 杉森伸吉・安部明美・鬼武一夫・島井 哲志・武井玲子・関沢純 化学品リスクの認知と行動 についての アンケート調査の解析 日本リス

- ク研究学会第10回大会発表論文集、137-142. 1996
- 8) Wogalter, M.S., Brelsford, J.M., Desaulniers, D.R., & Laughery, K.R. Consumer product warnings: The role of hazard perception. *Journal of Safety Research*, 22, 71-82. 1991
- 9) Laughery, K.R. & Stanush, J.A. Effects of warning explicitness on product perceptions. *Proceedings of the Human Factors and Ergonomics Society 33rd Annual Meeting*, 431-435. 1989
- 10) Lovvoll, D.R., Laughery, K.R., Wogalter, M.S., & Terry, S. A. Risk Perception issues in the use of motorized shoulder belt/manual lap belt systems. *Proceedings of the Human Factors and Ergonomics Society 38th Annual Meeting*, 456-460. 1994
- 11) Silver, N. C., Leonard, D.C., Ponsi, K.A., & Wogalter, M.S. Warnings and purchase intentions for pest-control products. *Forensic Reports*, 4, 17-33. 1991
- 12) 吉川肇子 リスク・コミュニケーションにおける信頼 産業・組織心理学研究 印刷中

# 記念講演

●  
平成9年度記念講演 小林 禮次郎  
●

## 『化粧品技術の変遷』～育毛剤・整髪料を事例に～

コスメトロジー研究振興財団 理事長

### 小林 禮次郎

場所 日本薬学会会長井記念ホール  
日時 平成9年11月13日(休)

#### はじめに

頭髪製品(育毛剤・整髪料)が日本でどのくらい売れているかといえば、昨年の出荷金額実績でヘアトニックが415億円、整髪料が1,090億円である。フランスでは香水、オーデコロンが化粧品中の約3割の売り上げを占めるが、日本では国産の香水の売り上げは1%にも満たず、輸入品を考慮したとしても大変少ない売り上げ比率である。逆に育毛剤(ヘアトニック)の売り上げが意外に大きいという印象がある。このような頭髪製品の私なりの見方について述べてみたい。

#### 育毛剤

まず髪の毛の一般的特性について触れてみると次のような特性がある。人間の体全体には約130万本の毛が生えているが、その中で頭髪は約10万本である。また、その密度は150本/cm<sup>2</sup>、成長速度は1ヶ月に1cm、毛髪1本を抜く力は60～80g、切るのに要する力は約120gである。そして1日に約100本の毛が自然に抜けるといわれ、その太さは日本人で0.7～0.9mm、欧米人で0.5～0.7mmと日本人の方がやや太く、禿げの多い人種は白人、黒人、黄色人の順といわれている。髪の毛の長さについては2m15cm(1981年、35歳の

女性)やギネスブックにインドのスワミ・バンダラサナジという人は7m93cmであった等の記録があるが、上記自然脱毛数と頭髪の本数から計算すると約3～4年ですべての頭髪が生え変わることになる。月当たり1cmの成長速度とすれば66年生え変わらずに伸びたという信じられない数字である。また、文学の世界での毛の長さの記述を見てみると、源氏物語絵巻などでは宮廷の女性の髪は背中より長く描かれており、大鏡の中の記述に『御車に奉り給ひければ、わが御身は乗り給ひけれど御ぐしのすそは、母屋の柱のもとにぞおわしける』との表現がある。つまりある高貴な女性が牛車に乗ったが、その髪のははまだ門のところにあったとの描写である。更に『一筋をみちのく紙におきたるに、いかにもすきま見え給はずとぞ申しつたへためる』との記述があるが、これは今でいえば半紙に前述の長い髪の毛を1本巻きながら重ならないように置いたら隙間なく黒くなってしまったとのことであり、相当髪が長かったことを窺わせるものである。

さて豊かな髪とは逆に、禿げの要因の諸説について見てみると、1) 皮脂過多説、2) ホルモン説、3) 帽子説、4) 遺伝説、5) 頭皮緊張説などがあげられるが、これらの要因説は40年前からいわれているものであり、新しい切り口への展開があまり進んでいないとの印象が強く、脱毛のメカニズムの新たな研究進展に期待したいところであるが、これはさておき、上記要因説について私見も交えていまして少し触れてみたい。

1) 皮脂過多説は1945年に Agnes Savill が The



Changing Cosmetic Technology  
-Hair Growth and Grooming Products-  
Reijirou Kobayashi  
The Cosmetology Research Foundation

Hair and the Scalp で唱えた説である。皮脂が多くなると毛穴が詰まって脱毛に結びつくというものであるが、眉の部分のように皮脂が多い部分でも脱毛しない事例への説明力が弱い。

2) ホルモン説は 1940 年に Macanthy が Diagnosis and Disease of the Hair で唱えた説であり、女性は禿げないが、男性は禿げる。また、女性でも月経閉止後は髭が生えるなどの男性的特徴が進行する場合があること、逆に思春期以前に去勢した男性は成人しても禿げにならず、皮脂分泌・ふけも少ないなどホルモンの影響を示唆したものである。

3) 帽子説は軍人に禿げが多いことがきっかけで唱えられた説であり、固くてキチツとした帽子をかぶっていたこととの因果関係に着目したものであるが、軍人に関しては男性的な性格の人が多く、前述のホルモン説も関連しているのではと感じている。しかし、戦前は学生帽、中折れ帽、鳥打帽など男性のほとんどが帽子を着用しており、禿げも多かったと記憶している。この説はこの後述べる頭皮緊張説と連動していると考えている。

4) 遺伝説は禿げやすい形質が遺伝するということで当事者にとっては悲劇的なものであるが、これも頭皮緊張説と関連があるように思われる。つまり頭の形が親子でよく似ている人を見かけるが、骨格形状が近ければ、頭皮緊張度も近いこととなる。

5) 頭皮緊張説は今でも一番適合している説であると考えているが、皮膚や結合組織が圧迫を受けて、血液やリンパ液の循環が悪くなり、栄養が行き渡らなくなるという説である。男子の頭の形状は鉢が張っていて側頭部はよいが頭頂部に対し緊張して栄養が行きにくいいため、この部分から禿げてきやすいということで妥当性が高いと思われる。

以上の諸説をまとめてみると、遺伝説、帽子説、またホルモン説も、ホルモンの関係で皮膚の弾力性に影響が出ると考えればすべて頭皮緊張説と結びついてくる。したがって頭皮緊張説が上記諸説

の中で根幹のものではないかと考えている訳である。しかし、一步踏み込んで頭皮の緊張とは何かと問われると、皮膚の組織が固くなったり、毛細血管の機能が鈍ったりする老化現象が、頭皮の緊張につながっているのではと考えているだけであり、医学的な説明はできないものの、経験的な見方として頭部の骨格と頭髪の形状の関係を映像的に提示してみたい。立派な骨格で外人のような骨格の人は禿げやすく、肉付きがよく額をつまめそうな人は禿げにくいと感じている。私はこれを骨顔、肉顔と名づけて分類しているが、政治家で思い浮かべるのは、前者では西洋人的な骨格の桜内氏や中曽根氏であり、東洋的な骨格では宮沢氏である。後者の事例としては安倍氏や河野洋平氏があげられるのではないだろうか。

さて、少し話題の角度を変えてみると、外国では禿げをあまり気にしないが、日本では大変気にするだけではなく、恐怖心すら感ずる人が多過ぎるのではないだろうか。この原因は外国人は 50 歳を過ぎるとほとんどの人が禿げてくるのでマイノリティの悲哀を感じなくてすむ。これに対して日本人が気にするのは 50 歳を過ぎても髪の毛の豊かな人が多いことと、カツラメーカーが髪の毛が薄いことのマイナス面を毎日宣伝することが影響しているのではないかと考えている。しかし、最新号の『アエラ』には「禿げはセクシー」との記事が出ており、おやじの代名詞であり、女性にもてないと思われてきた禿げに対する認識が変わってきている。竹中直人などの影響で年齢を重ねても恋愛を楽しみたいという女性が増えてきた。イタリアでは禿げの男性が好きだという女性が、嫌いという人の 2 倍もいるという内容である。日本もやっと禿げを気にしなくなる時代、禿げに関するグローバルスタンダードの時代になりつつあるのかとも思われる。

さて、話題がそれてしまったが、本題に戻って育毛剤の話が続けてみたい。育毛剤に含まれる成分としては血管拡張剤、頭皮刺激剤、ホルモン剤、抗炎症剤、殺菌剤、角質溶解剤、栄養補給と

してのビタミン類、アミノ酸類、保湿剤などが各種配合されている。昔は血行促進を意図したトウガラシチンキなどを配合していたものだが最近の話題としては毛細胞へのエネルギー活性をねらったペンタデカン酸グリセリドや毛髪の育毛、成長をねらったミノキシジルなどがあげられ、数多くの製品が市場に送り出されている。日本が海外に比べて育毛剤の売り上げが大きい要因を歴史的に見ると、戦後ヨウモトニク、加美乃素という会社がマーケット展開をうまく行って市場を作り出し、その後各社が種々の切り口で追随展開してきたことが今日の市場形成に結びついていると思われる。このような種々の育毛剤は、細胞を使った *in vitro* 評価法、動物による評価法、ヒト実用試験（臨床評価法）を経て市場に出されている。ヒトの評価法としては毛髪数を直接カウントする方法、洗髪時の抜け毛を測定する方法、実際の毛髪を抜き取り、成長毛と休止期毛の比率を調べる方法や、頭皮の血流量や毛髪の太さなどの外観観察をする方法などを組み合わせて効果測定がされている。今後の育毛剤の方向としては毛乳頭、毛包上皮細胞機構の解明であり。これにまつわる細胞成長因子、神経伝達物質、ホルモンの影響、遺伝子の解明が進むものと考えている。

当財団の助成研究にも第2回の広島大学・吉里勝利先生や今回の大阪大学・板見 智先生の研究がありますが、今後ともこの関連の研究がより進展することを期待している次第です。

## 整髪料

整髪料にはポマード、チック、ヘアリキッド、ヘアムース、ウォータージェル等々の製剤があるが、戦前の整髪料にはサネカヅラ、椿油、丁子油、伽羅油などの歴史があり、一言でいえば油を髪に塗った歴史である。日本では緑の黒髪という表現があるが、これは瑞々しさを表したもので艶を大事にしたことを示している。そしてこの艶を演出するために油が使用されたといえる。また、相撲取りの丁髷に見られるように日本のヘアスタイル

は髪を結うことであり、これに併せて整髪力の調整が油の中で工夫された。これが明治になって西洋の文化の導入とともにポマードの出現を見た。

そして第二次大戦後の男性整髪料の流れはポマード、ヘアリキッド、ヘアソリッド、泡状整髪料（ムース）、ウォータージェルに代表される変遷をしてくるが、この流れは自然志向と高分子化学の発展に伴う機能性追求の流れといえるだろう。

若干、整髪料の各論を述べるならば、戦後坊主頭から髪を一斉に伸ばしヘアスタイルを整えたのがポマードである。今日では売り上げも大変少なくなっているが、柳屋ポマードは今でも売られている。このポマードは鉱物性と植物性があり、日本では整髪力の強い後者が売れ筋の主体であった。これはひまし油とモクロウを溶融混合し、冷やして固めればできあがる簡単な成分組成であるが、今から見ればとても快適な整髪料とはいえないものであった。まず匂いが悪く、これをカバーするのに5%程度の香料を配合する必要があった。また、べとつくため枕を汚し、洗い落としも困難なものであった。外国人が日本の国電に乗って感じる匂いがこのポマードの匂いであり、日本人が外国で日本を思い出す匂いもポマードの匂いであった、などの話が残るほど当時の主流整髪料であった。そして油が100%で水が入らない製剤であり、儲けが薄いと悩みの聞かれた整髪料である。

このポマードの次の製剤として登場したのがヘアリキッドであるが、これはポリオキシプロピレングリコールブチルエーテル系の高分子素材の発展による製剤化の典型事例であり、高分子素材をアルコール水溶液に溶かした液状整髪料である。(株)ライオンがプリストルマイヤーズ社から技術導入して発売した「バイタリス」がこの系の先導商品として有名であり、この整髪料はポマード、チックの欠点を解消し、サッパリした仕上がりで洗髪も容易であることで整髪料の流れを固形から液状に変えた画期的な製剤であった。

これと前後した時期にもう一つヘアソリッドと

いう製剤がある。これは界面活性剤で油を可溶化してゲル剤型としたもので、使用感はよかったが、これに使用されたポリオキシエチレンオレイルアルコールリン酸エステル系の素材が当時の眼鏡のつるや櫛を変形させたり、溶かすといったクレームが発生したと記憶している。

この次に話題を提供した整髪料がムースであるが、これは各種樹脂をアルコール水溶液に溶解し、少量の噴射剤と混ぜてボンベから泡状の形態で出して使用する整髪料であり、ロレアル社が先鞭をつけ樹脂組成の特許を押さえたため、各社はこれを避けながら製品化する工夫を行った製剤である。この商品は髪をまとめる機能とこれを固定する機能を併せ持ち、形状の目新しさもあって、1985年に登場しヒット商品となった。

そして、これから主流になっていくのではないかと考えている製剤がウォータージェル系の整髪料で、樹脂をアルコール水溶液に溶かし、高分子ゲル化剤でジェル状にした製剤である。仕上がりのドライ感に特徴があるが、保湿成分を加えて水に濡れたツヤ感を出すバリエーションも可能である。

現在市場には整髪料として戦後開発されたほとんどの製剤があり、ヘアスタイル・好みに合わせて整髪力・感触のバリエーションも多いが、戦後の整髪料の売り上げの変遷を見てみるとポマード・チックの時代から香油・ヘアクリームを経て、液状整髪料の時代へと着実に変化してきたことがわかる。この変化の背景には川上～川下産業の見方、つまり素材産業（鉄鋼、石油産業など）からファインケミカルズ（香料、界面活性剤、染料・顔料工業）そして化粧品、医薬品、食品のような消費財産業と消費者に近い産業への流れとして見ると、川下の産業は川上の産業の技術発展に影響を受けて新しい製品が開発される側面があるが、整髪料はこの典型的事例ではないかと考えている。

育毛剤と整髪料の概略的で現象的な視点での話になりましたが、効能効果とメカニズムの解明・新たな新規素材の開発基盤の基礎研究が化粧品技術の発展に有意義であり、皆様方の研究のますますの発展を期待して止まない次第です。

A rectangular area with a marbled paper texture, featuring various shades of grey, white, and light brown. The marbling pattern consists of irregular, vein-like shapes and spots.

# コスメトロジー研究雑感

(平成7年度)

## ● コスメトロジーと生体材料 ●

高原 淳

化粧という言葉電子百科事典(マイペディア98・株式会社日立デジタル・平凡社)で引くと次のような記述があった。

化粧とは顔や身体を整え飾るために人為的に行うものであるが、本来の動機は複雑であった。化粧によって心霊が乗り移り、災難を避けるという考えは古くから世界各地にあり、宗教、儀礼、呪術などと関連している。広義には入墨、抜歯、身体切断、纏足(てんそく)などの文化人類学などでいう身体変工も含む。現在の化粧の概念は、身体全体を美しく調和させるという美容の考え方になりつつある。

これらのような意味を考えるとバイオマテリアルの学問はまさにコスメトロジーの一分野と言うことになる。バイオマテリアルの分野では1970年代後半から合成高分子をはじめとする人工材料の生体への応用に即した研究が世界的にブームとなったが、現在では組織工学に代表される生体組織を材料としてどのように活用していくかという研究にシフトしている。合成材料から生体組織へ

とシフトしていった理由としては、生体は免疫反応の起こらないような系では生体との親和性は極めて良く、一方では生体と人工材料の相互作用に関する基礎的な研究が十分に確立されていなかったためだと筆者は考えた。今回、助成をいただいた研究テーマは、もう一度基礎的現象を精密に解析して、人工材料のバイオマテリアルとしての可能性を追求するためである。幸運にも、1990年代に入って、新しい研究手法が大きく発展し、それを利用する機会に恵まれた。実空間でのタンパク分子の形態が観察可能な分解能を有する走査プローブ顕微鏡、分子間に働くナニュートンオーダーの力を測定する表面力測定装置、単分子層レベルでの吸着のその場評価が高い時間分解能で測定可能な表面プラズモン共鳴(SPR)などがその例である。筆者らもこれらの手法を相補的に用いて単分子膜表面と生体成分の相互作用に関わる基礎的な知見を得ることが出来た。今後はこれらの情報を集積して、人工材料を活用した人工臓器が開発されることを夢見ている。(九州大学)

(平成7年度)

## ● 水とコスメトロジー ●

井上 義夫

水が生命活動の維持に不可欠であることは誰でもよく知っている。しかし、生化学関係の教科書には水の性質に関する記述は皆無に等しい。生体高分子系の高次構造や分子間相互作用における水素結合、疎水性相互作用の役割に関連して数行程度の水の性質の記述があれば良いほうである。物理化学の教科書では電解質の項にかなりのページ

数が割かれている。電解質の性質は溶媒である水との相互作用を抜きにしては理解できない。しかし、1000ページを越える分厚い物理化学の教科書でも、水の性質の説明は少ない。これは、水が身近なところに普遍的に存在し、良く知られた物質であり、あらためて取り上げるまでもないからであるという理由によるのではなく、水の理解が未

だに不十分であるためであると思われる。

分子集合体としての水はそれを構成する分子が小さいにもかかわらず融点、沸点、蒸発熱、比誘電率などは大きく、固体である氷は液体である水よりも軽い。あらためて見直すと水の示す性質は異常に感じられる。水の本質はもとより水が直接的・間接的に関係する多くの自然現象の理解は今後の大きな研究課題として残されている。

水は生体内のあらゆる場所に存在し、生命活動の維持に必要な様々な特異的、あるいは選択的かつ効率的な反応に媒体として、さらには反応物質として関与している。生体系でのほとんどの相互作用や反応は水の存在を考慮せずには説明できないことが分かってきており、生体系での水の関わりを積極的に取り上げた研究報告が年々増加している。私どもの研究室では生体反応・相互作用の場としての水が反応・相互作用に及ぼす効果を実験と理論の双方から調べており、トレハロースを含むオリゴ糖の水和と機能の関係の究明は現在一つの重要な研究課題となっている。

トレハロースを保護剤として極度の乾燥あるいは凍結状態に耐える生物が存在する。最近の研究によれば、トレハロースは乾燥、凍結以外のストレスに対しても生物を保護する機能を持つ。なぜ

これらの生物は保護剤として多くの類似オリゴ糖のなかからトレハロースを選択したか、なぜトレハロースが生体系のストレス耐性獲得に寄与するかなどは未だに明確に説明できないが、水との関わりが重要であるように思われる。水分子の化学構造は星の数ほどある地球上の分子の中では最も単純な部類に属する。また生体系の分子のなかではトレハロースの化学構造は単純明解である。このような単純な分子が未解明な多くの現象を示すことは不思議であり、魅力的でもある。

皮膚は多数の分子から構築される精緻な複合系であり、このような生体系と化粧品成分との相互作用を調べることは Cosmetology 研究の困難ではあるが重要な学際的課題であろう。最近、トレハロースを保湿成分として含む化粧品が販売され、テレビによりトレハロースという物質名がお茶の間でも耳に入るようになった。生体系におけるトレハロースの機能を調べている私どもには、トレハロースは保湿剤としての役割以上の効果を皮膚に与えているように思われてならない。この魅力的ともいえる水とトレハロースに関する研究は今後の Cosmetology 発展に寄与できるものと確信して研究を進めている。 (東京工業大学)

(平成8年度)

## ● コスメトロジー雑感 ●

広瀬 茂久

私は富山県の黒部川下流の農村で育った。昭和22年(1947)の生まれゆえ、生活にゆとりのなかった頃である。冬になると寒風が吹き荒れ、雪の舞う日が多かった。手はあかぎれで水仕事をするとしみたし、放課後にバレーボールをするとボールをトスするごとにあかぎれから血がにじんだ。皆がそうであったから、これが当たり前で苦にならなかった。冬が厳しければ厳しいほど、春にな

って辺り一面が急に緑になっていく様は感動的であった。あの時に感じた地球の息吹は今も忘れられない。日陰に残っていた雪がなくなりかける頃になると、待っていたように草木が芽吹き、2~3日のうちに野原を緑に染め上げるのである。そして農作業が始まると鋤を持つ手にタコができた。れんげ草を絨毯代わりに寝そべったのも懐かしい思い出である。燃えるような恋もした。夏休

みの午後は近所の友達を誘って毎日のように炎天下の川原で過ごしたから肌は黒光りするほど真っ黒になった。秋の稲刈りの時には、汗が噴き出すように流れ、それが乾くと皮膚が塩を噴いたようになった。自慢できる話ではないが、昔の私の肌には自然と同じように四季（あかぎれ・タコ・黒光り・塩噴き）があったことになる。そのせいか今でもよく手を見て過ごす。今もワープロに向かいながら、四季が消え華奢になった我が手をじっ

と見つめて、来し方行く末に思いをはせている。偶然出会った研究テーマを追っかけているうちに、トラップインという新型分子にたどり着き、コスメトロジーの領域にも足を踏み入れることになったが、考えてみればコスメトロジーは健康な皮膚の上になり立つゆえ、手を見て育った私にとっては、故郷に帰ったようで、ぴったりのテーマなのかもしれない。  
(東京工業大学)

(平成8年度)

## ● コスメトロジーと食品成分 ●

谷口 正之

私は、これまでに各種ホモ乳酸菌、ビフィズス菌、プロピオン酸菌などの食品関連の微生物の培養について研究を継続してきた。特に、ホローファイバーモジュールを組み込んだ膜濾過型バイオリクターを構築し、ホモ乳酸菌およびビフィズス菌の高濃度培養について検討し、ヨーグルトやチーズをはじめとする多くの発酵乳製品用の乳酸菌スターターを効率的に生産できることを報告した。また、各種乳酸菌は食中毒原因菌や腐敗細菌に対する抗菌物質（ジアセチル、有機酸、バクテリオシンなど）を生産することが知られていることから、膜濾過型バイオリクターを用いて高菌体濃度を維持しながらこれらの抗菌物質を効率的に生産できることを報告してきている。これらの研究は、食品微生物を用いた有用生化学物質の製造技術および方法に関する内容であり、新規に化合物を発見したり、合成するような0から1の研究ではない。すなわち、既に有用であることがわかっている物質の効率的な大量生産に関する研究であり、いわゆる1から10の研究に属する。

今後も、食品微生物に関する研究を継続するつ

もりであるが、食品成分・素材として利用できるものは、当然化粧品原料になると考えられる。このような考えから研究助成に応募した。乳酸菌がつくるヒアルロン酸が化粧品素材として利用可能であることは知っていたが、多糖も利用できることは、これに関する発表を学会で聞いて知った次第である。残念ながら安い化粧品は比較的売れないそうであるから、同じ物質でも食品成分・素材としてよりも化粧品素材として利用した方が、付加価値が高いと考えられる。既にビタミンや抗酸化剤など多くの物質が化粧品の成分として利用されていると思われるが、食品成分を化粧品の素材として今後もっと積極的に利用できるのではないだろうか。化粧は外観を美しくするためだけではなく、細胞を生き活きさせるために補給する栄養と考えると、食品成分はおもに腸管を経由して細胞に与えられる栄養であるが、化粧品成分は細胞に対する外からの栄養と考えられる。私は、毎日、お肌の活性化のために化粧品を愛用している。  
(新潟大学)

## ● コスメトロジーと海洋生物 ●

小林 淳一

ここ数年来、地球温暖化やオゾン層破壊などの問題が世界中で論議されている。オゾン層の破壊は紫外線の増加に直接結びつき、われわれの生活に影響を及ぼしつつある。これまで、美容の点からシミ・ソバカスや日焼けといった肌の色素沈着に対する関心もたれていたが、最近では、むしろ皮膚癌などの皮膚疾患の予防という点に目が向けられている。夏になるとUVケアと称する商品が数多く目につくようになるが、単なる美容のためだけではなく、皮膚疾患に対する予防薬としても考える必要がある。そういった点で、コスメトロジーは、化粧品だけではなく医薬とも密接にかかわっている。したがって、より有効な紫外線吸収物質や、チロシナーゼ阻害剤、メラニン合成阻害

剤の開発が望まれる。

興味深いことに一般に海洋生物は、その生体内に紫外線吸収物質を保持していることが知られている。おそらく、海洋生物は紫外線に対してかなり鋭敏ではないかと考えられる。われわれ人間にはそのような物質を産生する能力はなく、衣服で保護するか化粧品に頼るしか術はない。実際に海洋生物から単離された化合物で、スキンケアクリームに加えられているものがある。今回の研究は、海洋生物からのメラニン合成阻害物質の探索であるが、海には未知の部分が多く、それだけに新たな化合物が得られることが大いに期待される。今後も生物から有用な物質の探索を行う予定である。(北海道大学)

## ● コスメトロジー雑感 ●

橋本 公二

私が化粧のことを真剣に考えるようになったきっかけは、あるうら若い女性の患者である。彼女は結婚式を一ヶ月後に控え、首筋にある小さな赤あざをとりたいと来院されたのである。レーザー治療が普及する以前の時代でもあり、日数を考えて、結婚式には化粧で隠すことを勧めたのである。患者は半信半疑の持ちで小生の紹介状を持ち診察室を出ていったのだが、何となく、重い足取りであった。ところが、数日後彼女が現れたときには人かと思間違うほど明るく美しくなったのである。事情を聞くと、化粧品会社の指導員から懇切丁寧に指導を受け、化粧をするとあざが完全に隠すことができるようになった。あざのこ

とを考えると結婚式が近づくのが憂うつであったが、今はあざのことが気にならなくなり、結婚式が待ち遠しくて仕方がないとのことであった。皮膚疾患の治療でこれほど短期間で変わった患者は経験したことがなかったので、啞然としてしまった。

それ以来化粧を如何に考えるか迷っていたが、この疑問に明快な答えを与えてくれたのは、Kligman博士である。Kligman博士は高名な皮膚科医であると同時に化粧に関する研究においても世界最高の権威の一人であり、化粧品に関する分野で彼の名を知ら 人はいないであろう。私は10数年前にペンシルバニア大学に留学した時に初め

て接する機会を得たが、既に70歳を超えていたにもかかわらず、衰えを知ら彼のパワーに圧倒されたものである。そのKligman博士が「CosmeticsとはHope sellingである。」と、ある講演会で述べたのである。この言葉を聞いたとき、永年抱いていた化粧品に対する疑問が氷解する思いがした。

世の女性にお願いしたい。化粧品は崇高な作業である。決して、軽々しい気持ちで化粧品をしないでいただきたい。心を込めて化粧品をし、自信を持ち、輝くばかりに美しくなっていたいただきたい。

(愛媛大学)

(平成7年度)

## ● 本研究成 のコスメトロジーに及ぼす影響 ●

谷岡 明彦

いったい皮膚はどのような化合物から出来ており、どのような構造をしているのだろうか。その中を多数の化合物を含んだ化粧品がどのように浸透していくのであろうか。化粧品と皮膚との関係をモデル実験と計算機シミュレーションで行うことができたなら、化粧品の安全性を正確に把握する上でも、新しい化粧品を開発する上でも非常に意味のあることに違いない。このようなことに対して二つのアプローチの仕方がある。一つは皮膚を全くのブラックボックスとして扱い、あらゆる種類の化合物について実験を手あたり次第に行いその中から一つの傾向を見だし今後の予測に役立つ方法である。もう一つは皮膚を構成する要素を把握し、化粧品の各成分がそれぞれの要素とどのような関係にあるかを見いだす方法である。前者は物事を総合的に捉えることが出来、一方後者は個々の機能を明らかにすることが出来る。どちらのアプローチも欠かすことは出来ないが、本研究では後者の立場をとった。

化粧品や皮膚の複雑な構成要素を極めて単純化しその中から自分の研究と密接に関係する要素を取り出すと、皮膚は電荷を有した化合物から出来ており化粧品には弱電解質が含まれているということである。ところが電荷を有した媒体中を強電解質が移動する問題は理論的にも実験的にも過去に多数の研究がみられるが、弱電解質が移動する

ことに対してほとんど体系的な研究がなされていない。この問題を明らかにしない限りコスメトロジーの進展は見られないと考えた。しかしこの問題は以外にやっかいであることが研究を進めて行くうちに明らかになってきた。まず一番最初に悩まされるのは空気中の炭酸ガスである。これは過去から言われ続けて来たことであるが、実際に弱電解質の問題を取り扱うと大きく立ちはだかる。単にpHを変えるだけなら問題がないが、電荷を有した媒体中を移動するとき他の電解質の移動にも影響を与える。このために出来るだけ炭酸ガスの影響を取り除いて実験を行うが、実際上は完全に取り除くことが出来ない。

本研究の最大の成果はアミノ酸の透過の所で明らかにしたように、弱電解質の輸送において膜界面でプロトン化と脱プロトン化が関与しており、それ以外は従来のドナン平衡とネルンストープランクの式を用いて説明することができる点であろう。これらを要約すると、

- (1) 皮膚の中へ化粧品が入る時は化粧品と皮膚との親和性、両方が持つ電荷の程度、媒体中のプロトンの濃度により影響される。
  - (2) 皮膚中の化粧品成分が移動する方向や程度は皮膚の電荷の程度、皮膚中や化粧品中の電解質濃度や移動する方向によって影響を受ける。
- となる。以上の結果は他の研究分野にも大きな影

響を与えるものと考えられ、コスメトロジーが更に発展する基盤をなすものと期待される。

このような研究は大変地味で実際の問題との関

連をつけるのが難しいが、欧米の非常にレベルの高い論文誌が評価をしてくれたことを記しておきたい。  
(東京工業大学)

(平成7年度)

## ● コスメトロジーと免疫薬理 ●

永井 博弐

私の専門分野は免疫薬理学という免疫学と薬理学のハイブリッドの学問です。特に私はアレルギーや自己免疫疾患等の免疫機構が行き過ぎて、生じる生体にとって不利な反応の発症機序とその予防および治療薬について研究しています。今回は化粧品にもちいられるような小分子の物質によるアレルギー性皮膚炎について、その予防法と発症機序についての研究に研究補助金をいただきました。皮膚は生体の中で最も面積の広い免疫臓器であると考えられます。皮膚に異物が接触しますと、皮膚はただちに異物排除の機構を働かせ、非特異的機構と同時に特異的な免疫機構を活性化させます。この、免疫機構が行き過ぎるとアレルギー反応として現れます。すなわちアレルギー反応によってその部分が赤く腫れたり、痒くなって掻いたりします。このような赤く腫れたり、痒くなってその部分を掻くことはいずれも、生体防御反応です。赤く腫れることによって、その部分に血漿浸出液を出し、ある一定以上外部からの異物の侵入を防ぐ役目を致します。また、痒みは皮膚を掻くことによって、その部分をかきとり、新しい組織に置き換えようとする反応であると考えられます。では、なぜ同じ条件で外部から異物が入ってもアレルギーが起きるヒトと起きないヒトがいるのでしょうか。この点は大変興味のある所です。この点についても、現在、色々な研究が進み、ア

レルギー遺伝子の研究が世界各国で行われています。まだ完全に同定されたわけではありませんが、少しずつ解ってきています。いずれにしても、アレルギーは免疫という生体防御の機構が行き過ぎて起きる反応であり、まさに「過ぎたるは猶およばざるがごとし」と言った格言が当てはまる現象です。先日のコスメトロジーの会でこれによく似たお話をお聞きました。化粧の程度は段階によってノーメイク、ナチュラルメイク、ヘビーメイクの3段階に分けられ、これが行き過ぎると、お面になるとお聞きしました。アレルギーも自分を守らなければいけないという自己意識が強すぎるとかえって、逆の効果になってしまいます。化粧品も自己を主張するためにどんどんエスカレートしていき、ついには自分のもの以外に理想を求めるといった異常な事態になるようです。若干違うのは、化粧の場合はいま行くならば、自己主張が効果的に発揮されるといった点です。アレルギーの場合も何に気をつければ免疫反応を効果的に発揮させ、アレルギーにならないで済むかと言ったことが解れば、予防につながるのでは無いかと考えています。いずれにしても心の持ち方のコントロールは難しいけれど、コスメトロジーでも免疫薬理でも重要な課題であると思っています。

(岐阜薬科大学)

(平成8年度)

## ● 酸化ストレスとコスメトロジー ●

中川 靖一

皮膚は絶えず酸素に接し、紫外線に曝露されているところから、活性酸素による脂質過酸化物の生成など光酸化反応が惹起されやすい組織といえる。特に、日焼けなどの中波長紫外線による光線皮膚障害を防ぐことはコスメトロジーにおいて重要な課題である。また、皮膚の衰えは脂質過酸化物の蓄積とともに促進されることから、活性酸素による組織障害から皮膚を守ることは、皮膚を健康に美しく保つことであり、コスメトロジーの大きな使命となると考えられる。

コスメトロジーを生化学、分子生物学的にアプローチする場合、過酸化脂質、抗酸化物質、抗酸化酵素など酸化ストレスに係わる項目はいずれも重要な研究課題である。すなわち、過酸化脂質の生成機構や抗酸化酵素の発現調節機構を明らかにすることは活性酸素産生調節作用を有する薬剤の開発に有用であり、また、皮膚組織における抗酸化物質の役割を知ることは皮膚に適合した抗

酸化物質の開発に役立つなど、極端な言い方をすれば、酸化ストレスの研究はコスメトロジーの研究でもあることになる。

本研究は抗酸化酵素の性状解析について検討を行ったが、抗酸化酵素としてスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) が医薬品として使用されており、一定の評価を得ている。グルタチオンペルオキシダーゼはSODの活性酸素除去には不可欠の細胞内抗酸化酵素であることから、SODとグルタチオンペルオキシダーゼが共存した医薬品が開発されれば、より高い効果が望める。グルタチオンペルオキシダーゼと同様な活性を持つ化学合成品であるエブセレンも開発された。現在まで、活性酸素調節剤の開発では天然よりの活性酸素のスカベンジャーの探索、また抗酸化化合物の化学合成が主流であるが、近い将来、抗酸化酵素を医薬品として適用される時代が来るとされる。

(北里大学)

(平成8年度)

## ● スメトロジーと皮膚科学 ●

相場 節也

この度は、コスメトロジー財団奨学金を授与いただき有難うございました。これを機会にコスメトロジーと私が専攻する皮膚科学との関係を考えてみました。両者は、丁度、コインの表と裏の関係にあるように思われます。コスメトロジーは皮膚をいかに美しく見せるかを様々な角度、手法を用いて研究する分野であり、一方、皮膚科学は異常をきたした皮膚をどのようにしてもとの正常な状態にもどすかを研究する分野です。しかし、いずれにしても、皮膚の形態、機能についての正し

い理解無くしては発展の期待できない分野である点は相違ありません。実際、皮膚科学会では、基礎的研究面での化粧品会社の研究員の方たちの目覚ましい活躍が目立ちます。また、私たちの研究室も同様ですが、皮膚科の研究室と化粧品会社の研究室との共同研究も盛んです。最近、社会的にも産学一体の研究体制の必要性が唱えられており、今後ますます、こう言った傾向には拍車がかかると思われます。さて、私の現在の研究テーマは、化学物質が樹状細胞を含む皮膚構成細胞に対

しどの様な影響をおよぼすのかと言う問題です。皮膚は、言うまでもなく生体と外界との境界を形成する臓器で、常に種々の化学物質に曝されています。また、人は、化粧品として、必ずしも生命活動に必要な無い多くの化学物質を皮膚に塗布します。今回、私は、樹状細胞が、ある種の化学

物質に対し特異的に反応すること、いわば、センサーとしての機能を有することを明らかにしました。今後も、化学物質の生体組織、細胞への影響は、コスメトロジー、皮膚科学を問わず発展させていかなければいけない分野と考えています。

(東北大学)

---

## ● 本研究成 のコスメトロジーに及ぼす影響 ないしコスメトロジーの観点から見た本研究の展開 ●

窪田 泰夫

(平成8年度)

皮膚科臨床に携わる者の一人として感ずることは近年、皮膚科において毛髪関連および色素関連の領域での研究が注目される割合が増してきたことである。本研究の当初の計画ではヒト毛包由来の培養毛乳頭細胞を用いて免疫不全マウスに作製した再構成皮膚に新たな毛包を誘導し、その関連因子を解析する予定であった。その結果、残念ながら現在のわれわれの実験系では毛包の誘導はできなかった。しかし興味深いことにヒト毛包由来の培養毛乳頭細胞を用いて免疫不全マウスに作製した再構成皮膚には色素細胞の著明な浸潤像が認められた。これは生体での毛包における毛乳頭細胞と色素細胞の相互作用を示唆する所見であり、両細胞間のネットワークを司る諸因子(サイトカイン、細胞成長因子?)の解明につながるものと思われた。成人皮膚では毛包上皮内に色素細胞が密に局在しているが、その機能や動態は不明な点

が多い。また皮膚科臨床上也成人皮膚における色素再生は毛包を中心にみられる。よってこの毛乳頭細胞由来の因子を同定し、制御することでヒト皮膚の色素沈着や脱失を主体とする各種疾患の病態解明や移植皮膚における色調の調整などの治療面にも役立つものと思われる。本研究内容は毛髪研究から色素研究へ少しスライドされた形とはなってしまったものの、両研究領域はもっと密な関連をもってよいのではないかと考えられた。脱毛と色素沈着(すなわち「育毛、養毛」と「美白」)は皮膚科領域あるいはコスメトロジーの分野でまだまだ解決すべき大きなテーマと言えよう。

また *in vivo* と *in vitro* の実験の橋渡的な役目のみならず全く新しい実験モデルの可能性を有するこの免疫不全マウスのシステムはコスメトロジー研究の場においても今後もっと幅広く応用されるものと期待される。(聖マリアンナ医科大学)

(平成8年度)

## ● コスメトロジー雑感 ●

山蔭 明生

東京の下町で育った私は、幼い頃、近所の銭湯へ行くのが楽しみだった。母や姉は大きな洗面器に石鹸、シャンプー、リンス、タオル、バスタオル、着替えなどを入れ、それを風呂敷に包んでもって行くのが常であったが、父と私は石鹸箱を手し、タオルを肩にブラブラ歩いて行った。その後成人して内風呂のあるアパート暮らしをするようになってからも、三つ子の魂百までとか、固形石鹸で全身を洗っている。たまにもらい物のボディソープと称する液状の石鹸を風呂場で使うと、ヌルヌルして気持ちが悪い。“ツバキ油に5本櫛”などとパンカラを気取るわけではないが、シャンプーやリンス、整髪料の類も床屋以外ではほとんど使わない(床屋では気持ちよく眠っているうちにアレコレ付けてくれる)。男性化粧品を買う若者の気が知れない。大学の職員や病院の看護婦さん達についても、若いのに厚化粧している人はどうも苦手だ。

若い女性の患者さんにもこれまで、UVカットの目的のものを除いて、できるだけお化粧をしな

いよう勧めてきた。しかし、先日皮脂に関する講演を聞いていて、皮脂の分泌は男性では30～50歳にピークがあるのに対し、女性では10～20歳であるというデータを示され、女性は20歳以降皮脂含量が下り坂となり、水分保持機能も低下するのだから、しっかり化粧する必要があるのだと了解した。

話は変わって、10年ほど前のことになるが、割烹料理屋で私も大ファンの女優とたまたま同席する機会があった。40歳前後であった彼女の大きな瞳・鼻筋の通った高い鼻・すっきりした頬から顎の線・均整のとれた肢体……どれをとっても大女優の名に恥じない美しさであったが、どういう訳か“すっぴん”で、長い間ドーランを塗って映画やテレビの強い照明に照らされ続けた跡をさらして、夏季合宿明けのテニス部の学生のように顔の肌は黒光りしていた。銀幕やブラウン管での彼女はどれほど化粧をしているのだろうか。

(獨協医科大学)

(平成7年度)

## ● コスメトロジー雑感 ●

吉川 肇子

私は近年、リスクをどのように伝えるかといういわゆるリスク・コミュニケーションの分野を研究しております。リスク・コミュニケーションには、原子力発電所や化学プラントの設置のように社会的論争のあるような問題と、喫煙やシートベルトの着用のように、リスク回避行動をとるかどうかは個人の判断にゆだねられているような個人

的選択の問題とに分けられています。化粧品を使うかどうか、使うとしてどのような化粧品を選ぶかというのは、後者の場合の問題に含まれますが、その場合に、どのような形でリスクがあることを伝えるのかという技術的な問題については、心理学が取り組むべき重要な問題と考え、研究助成をいただいたのをきっかけに実験と調査を実施

しました。

実際に研究を進めてみますと、技術的にクリアしなければならない問題が予想以上に多く、データとして明確な結果を得ることができませんでした。また、時間内に分析しきれないデータが残っておりますので、これをさらに分析していきたいと考えております。

この助成をいただいたことで、新たにさまざま

な問題を発見することもでき、この研究を端緒として、今後一層この分野の研究を進めることができると思います。助成をいただいただけの十分な成果をあげられたか心許なく思っておりますが、むしろこれから、よりよい研究成果をあげるべく努力を続けていく契機としたいと考えます。助成に深く感謝いたします。 (慶應義塾大学)



●  
事業報告書（平成 9 年度）  
役 員  
研究助成課題一覧  
●

# 事業報告書

(自平成9年4月1日 至平成10年3月31日)

## I. 平成9年度(第8回)事業

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、100万円、又は50万円)
- 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50万円まで)

## 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9年5月6日より募集を開始し同9年7月10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206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、関係学術雑誌8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9年9月24日<sup>^</sup>パールビーホールにおいて本選考委員会を開催して受賞候補者を決定し、11月13日の理事会及び評議員会の議決を経て、受賞者を最終決定しました。

## III. 第8回功労賞・研究助成等の結果

以下のとおり合計22件が決定され研究助成金2,600万円、国際交流援助金150万円が交付されました。

功労表彰(小林 孝三郎賞)	0件
研究助成	19件
国際交流援助	※ 3件

※国際交流援助については11月以降2件の追加がなされて合計3件になった。

## IV. 会議等

### 理事会

#### 第1回通常理事会

開催日時 平成9年6月18日(土) 午後5時

開催場所 東京都千代田区大手町1-5-1 大手町ファーストスクエア23階 宴「銀河」

理事総数 13名 本人出席 9名 委任状出席 4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

配付された資料に基づき、平成8年度の事業内容が事務局より詳細に説明され、続いて収支計算、財産内容などが詳しく報告された。次いで小田倉監事より、上記内容が適正適法である旨の監査報告がなされた。

慎重審議の結果、本議案は書面表決者を含め全員一致で可決承認された。

#### 報告事項

平成9年度の研究助成課題の公募について

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、理事会全員でその趣旨を認めた。

#### その他

本年8月中にコスメトロジー研究報告第5号(収載論文13編)が発刊される予定であること、また助成金贈呈式を平成9年11月13日に開催予定であること及び記念講演の演者候補の報告がされ、いずれも了承された。

### 評議員会

#### 第1回通常評議員会

開催日時・場所は理事会に同じ。

評議員総数 14名 本人出席 8名 委任状出席 6名(賛成)

上記理事会の決議を全員一致で確認した。

## 第2回通常理事会

開催日時 平成9年11月13日 午後2時30分

開催場所 東京都渋谷区渋谷2-12-15 日本薬学会長井記念館会議室

理事総数 13名 本人出席 11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 平成9年度(第8回)研究助成者等を承認する件

配付された資料に基づき、事務局より平成9年度の研究助成者及び海外交流援助の候補者の提案及び選定の経緯に関する説明がなされた。

慎重審議の結果、本議案は書面表決者を含め全員一致で可決承認された。

第二号議案 平成10年度事業計画及び予算案を承認する件

配付された資料に基づき、平成10年度の実業計画及び予算案について事務局より詳細な説明がなされた。

慎重審議の結果、本議案は書面表決者を含め全員一致で原案通り可決承認された。

第三号議案 選考委員を選任する件

事務局より前任者中村選考委員の後任として、植村展生氏を選考委員に推薦する提案がされた。

本議案は書面表決者を含め全員一致で承認された。

### 報告事項

平成8年度助成研究の中止申請の件

平成8年度の助成研究テーマ「光老化におけるフリーラジカルの関与」-長期紫外線反復照射による皮膚抗酸化能の変化-に関して主研究者である金沢大学医学部の安井裕子氏より研究中止及び助成金返却の申請がなされ、理事長承認の上でこれを受理した旨、申請事由の説明と併せて報告がされた。

本報告は全員一致で了解された。

## 第2回通常評議員会

開催日時・場所は理事会に同じ。

評議員総数 14名 本人出席 7名 委任状出席 6名(賛成) 欠席 1名

上記理事会の決議を全員一致で確認した。

## 選考委員会

### 分科会Ⅰ

開催日時 平成9年9月3日(水) 午後6時30分  
開催場所 東京都千代田区大手町1-5-1 トップオブザスクエア会議室

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9年9月4日(木) 午後6時  
開催場所 東京都千代田区大手町1-5-1 トップオブザスクエア会議室

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9年9月19日(金) 午後7時30分  
開催場所 東京都千代田区大手町1-5-1 トップオブザスクエア会議室

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9年9月24日(水) 午後5時30分  
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9年11月13日(木) 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8回 研究助成等を受けられたかたがた

(JA, JB：一般研究助成 H：国際交流援助)

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
JA-97-01	微粒子酸化チタン上に形成された多鎖型界面活性剤吸着層への紫外線吸収剤の吸着可溶化	コロイド 界面化学	東京理科大学理学部教授 江 角 邦 男
JA-97-02	新規な機能を有するコラーゲンの創製	生物化学 分子生物学 バイオテクノロジー	東京工業大学生命理工学部助教授 斉 藤 佑 尚
JA-97-03	脂質エマルジョン表面単分子膜とリポソーム表面2分子膜の示す顕著なバイオ機能の差異	界面化学 製剤物理化学	京都大学大学院薬学研究科教授 半 田 哲 郎
JA-97-04	男性ホルモンによる毛の発育制御機序の解析	皮膚科学 内分泌学	大阪大学医学部助教授 板 見 智
JA-97-05	新規蛍光プローブを用いた一酸化窒素 (NO) の皮膚における作用解析	有機化学 分析化学 細胞生物学	東京大学大学院薬学系研究科助手 菊 地 和 也
JA-97-06	生体計測工学に基づいた非侵襲的な皮膚の性状の測定法の開発	皮膚科学 化粧品材料 生体工学 医用工学	東北大学医学部教授 田 上 八 朗
JA-97-07	老化による皮膚色素沈着の画像定量自動解析システム確立のための基礎研究	皮膚科学	慶應義塾大学医学部専任講師 田 中 勝
JB-97-01	接触過敏症の皮膚浸潤細胞に特異的に発現している遺伝子の解析	免疫学 分子生物学	東邦大学理学部教授 小 林 芳 郎
JB-97-02	ノックアウトマウスをもちいたcell envelopeのバリアー機能解析	分子生物学 発生工学 遺伝子工学 皮膚科学	京都府立医科大学医学部講師 山 西 清 文
JB-97-03	植物由来環状ペプチド類のチロシナーゼ阻害活性に関する研究	生薬 天然物化学	東京薬科大学薬学部助教授 竹 谷 孝 一
JB-97-04	紫外線吸収効果をもつ酸化チタンの光触媒作用と生体適合性	生体材料	東京理科大学基礎工学部助教授 鈴 木 高 広

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
JB-97-05	日光老化についてとくに日光弾性線維症の発症機構ならびにUVs症候群の病態に関する研究一	皮膚科学 生化学 分子生物学	熊本大学医学部教授 小野友道
JB-97-06	眼粘膜への障害を指標とした化粧品素材の安全性評価のための基礎的検討ー眼内動態の定量的評価法の確立	薬剤学	長崎大学薬学部教授 中村純三
JB-97-07	逆ミセルを用いた水の構造化とその機能性に関する研究	コロイド界面化学	静岡県立大学経営情報学部助教授 五島綾子
JB-97-08	紫外線誘発DNA損傷および修復酵素の細胞内分布状態の三次元的表示	放射線生物学	奈良県立医科大学助教授 森俊雄
JB-97-09	高齢者の被服行動の変容が、高齢者の自尊感情及び日常生活行動に与える影響	行動学 老年心理学 臨床心理学	京都大学教育学部助教授 吉川左紀子
JB-97-10	皮膚器官培養系を用いた化学物質の刺激性、抗原性の検討	免疫学 アレルギー 分子生物学	東京医科歯科大学医学部助教授 横関博雄
JB-97-11	皮膚の老化に伴うテロメア短縮化とフリーラジカル障害に対する、細胞内アスコルビン酸のエンリッチング化による防御効果	皮膚生化学 細胞薬理学	広島県立大学大学院 生物生産システム研究科教授 三羽信比古
JB-97-12	健康な笑いづくりの方法について	感情心理学 健康心理学	福岡大学人文学部教授 高下保幸
H-97-01	活性酸素及びセラミドに制御される免疫及び炎症反応の解析とそれを標的とした薬剤化合物の開発	分子生物学 腫瘍学	米国ソーク研究所ポスドク研究員 Daniel J Van Antwerp 受入責任者 東京大学医科学研究所 井上純一郎
H-97-02	分子生物学的手法を用いた皮膚角化細胞の分化・増殖に関する分子の解析及び遺伝子治療の標的細胞としての表皮幹細胞の同定	皮膚科学	筑波大学臨床医学系講師 川内康弘
H-97-03	カナダ・ケベック州におけるフランス文化の現状と将来	現代思想・美学	早稲田大学政治経済学部教授 原章二

(敬称略 受付順)

平成10年3月31日現在

## 役員

理事長	小林禮次郎	(株)コーセー 代表取締役会長
専務理事	宮澤 香	
理事	有本 亨	日本化粧品工業連合会 専務理事
理事	磯邊 律男	(株)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	内山 充	(財)日本薬剤師研修センター 理事長
理事	小林 保清	(株)コーセー 代表取締役社長
理事	菅原 正文	高砂香料工業(株) 代表取締役会長
理事	高橋 久	帝京大学医学部 教授
理事	高山富士雄	安田信託銀行(株) 前相談役
理事	西川 武二	慶應義塾大学医学部 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	廣部 雅昭	東京大学 名誉教授
監事	小田倉正典	公認会計士
監事	黒田 節哉	弁護士
評議員	秋吉 信夫	(株)コーセー 常務取締役
評議員	上野 芳夫	東京理科大学薬学部 教授
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 名誉教授
評議員	近藤 保	東京理科大学 名誉教授
評議員	長野 哲雄	東京大学薬学部 教授
評議員	西岡 清	東京医科歯科大学医学部 教授
評議員	野呂 影勇	早稲田大学人間科学部 教授
評議員	福内 靖男	慶應義塾大学医学部 教授
評議員	溝口 昌子	聖マリアンナ医科大学 教授
評議員	宮崎 榮三	東京工業大学 名誉教授
評議員	山崎 幹夫	千葉大学名誉教授
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
J 90-03	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 古澤邦夫
J 90-06	ヒアルロン酸で表面を修飾したり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
J 90-07	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
J 90-15	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 中川昌子
J 90-16	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
J 91-02	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 国枝博信
J 91-05	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 片岡一則
J 91-06	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
J 91-08	化粧品素材としての竹節人參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 神田博史
J 91-10	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 荒殿誠
J 91-11	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
J 91-20	各種界面活性物質によるマクロ及びマイクロエマルジ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

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
J 92-01	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
J 92-03	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 界面化学	明星大学理工学部教授 日高 久夫
J 92-04	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	薬剤学	昭和薬科大学薬学部講師 藤井 まき子
JA-93-05	細胞膜の脂質の物性と機能の基礎的な研究 ーリン脂質物性のコスメトロジーへの応用ー	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-93-08	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の抗酸化能の向上ー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ー	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Crocinn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 $\gamma$ -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
JA-95-01	材料表面-生体分子間相互作用の直接解析に基づく生体適合性の発現機構の解明	高分子化学	九州大学工学部助教授 高 原 淳
JA-95-06	生体膜構造をもつ高分子中の水の構造解析と生体反応の解明に関する研究	高分子化学 生体材料学	東京医科歯科大学 医用器材研究所助教授 石 原 一 彦
JA-95-07	オリゴ糖による皮膚の耐乾燥保護の分子メカニズムに関する基礎的研究	生体分子工学	東京工業大学生命理工学部教授 井 上 義 夫
JA-95-10	両親媒性分子が構築する超分子の構造と機能性に関する研究	超分子物性化学 高分子物性	名古屋大学理学部助教授 今 栄 東 洋 子
JB-95-02	光学活性化化合物合成を目的とする新規不斉触媒及び新規不斉触媒サイクルの開発研究	有機合成化学	早稲田大学理工学部助教授 中 田 雅 久
JA-96-02	単分散無機顔料粒子のモルフォロジー制御とそのキャラクターゼイション	コロイド化学 界面化学	大阪教育大学教育学部助教授 神 鳥 和 彦
JA-96-05	合成糖脂質の超分子集合体に関する研究	高分子化学 高分子物性	早稲田大学理工学部助教授 武 岡 真 司
JA-96-07	高分子経皮吸収促進剤の開発と応用研究	高分子化学 製剤学	相模中央化学研究所主任研究員 長 瀬 裕
JA-96-08	新発見の糊代を持ったタンパク質の基礎と応用 (タンパク質接着能を有する化粧品素材の開発)	生物化学	東京工業大学生命理工学部教授 広 瀬 茂 久

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
JB-96-02	食用乳酸菌による化粧品素材としての機能性多糖の生産とその改質	生物材料化学 応用生物化学	新潟大学工学部教授 谷口正之
JB-96-03	メラニン生合成阻害作用を示す海洋天然物の探索	生薬学 天然物化学	北海道大学薬学部教授 小林淳一
JA-97-01	微粒子酸化チタン上に形成された多鎖型界面活性剤吸着層への紫外線吸収剤の吸着可溶化	コロイド 界面化学	東京理科大学理学部教授 江角邦男
JA-97-02	新規な機能を有するコラーゲンの創製	生物化学 分子生物学 バイオテクノロジー	東京工業大学生命理工学部助教授 斉藤佑尚
JA-97-03	脂質エマルション表面単分子膜とリポソーム表面2分子膜の示す顕著なバイオ機能の差異	界面化学 製剤物理化学	京都大学大学院薬学研究科教授 半田哲郎
JB-97-03	植物由来環状ペプチド類のチロシナーゼ阻害活性に関する研究	生薬 天然物化学	東京薬科大学薬学部助教授 竹谷孝一
JB-97-07	逆ミセルを用いた水の構造化とその機能性に関する研究	コロイド界面化学	静岡県立大学経営情報学部助教授 五島綾子

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
J 90-01	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
J 90-02	ドレイズ試験代替法の開発ーヒト細胞、昆虫細胞を用いた高感度迅速試験法の開発研究ー	組織培養学	理化学研究所副主任研究員 大野 忠 夫
J 90-05	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
J 90-08	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
J 90-09	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
J 90-10	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 金ヶ崎 士朗
J 90-11	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
J 90-12	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
J 90-13	生体の酸化的障害に対する防御機構の生化学的研究ービタミンEの活性発現機構の解析ー	生化学	東京大学薬学部助手 新井 洋 由
J 90-14	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
J 91-01	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
J 91-03	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

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
J 91-04	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
J 91-07	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
J 91-09	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
J 91-12	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
J 91-14	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
J 91-16	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
J 91-17	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
J 91-18	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
J 91-19	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
J 91-22	フリーラジカルとボ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
J 92-02	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	分析化学	東京大学工学部教授 澤田嗣郎
J 92-05	アスパラギン酸プロテアーゼ類の蛋白工学的機能変化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

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
J 92-06	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
J 92-07	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
J 92-08	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
J 92-09	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
J 92-10	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
J 92-11	アスコルビン酸2-グル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-93-07	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-93-09	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

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
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
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	化粧品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	浜松医科大学医学部講師 戸倉 新樹
JA-95-02	脂質皮膚モデルを利用した化粧品及び水の浸透と安全性に関する基礎的研究	生物物理化学 高分子物性	東京工業大学工学部助教授 谷岡 明彦
JA-95-03	小分子化学物質によるアトピー性皮膚炎の発症と予防についての基礎研究	免疫薬理学	岐阜薬科大学教授 永井 博 式

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
JA-95-04	ヒト皮膚移植SCIDマウスを用いた新しいコスメトロジー研究	実験病理学	大阪大学医学部教授 野村大成
JA-95-08	接触皮膚炎におけるマスト細胞活性化反応の解析	生化学	昭和大学薬学部教授 工藤一郎
JA-95-09	放射線照射あるいは制癌剤投与による脱毛の抑制	生化学 放射線生物学	星薬科大学講師 太田節子
JB-95-01	皮膚表皮細胞におけるリピドバイオフィクターの機能発現機構	生化学 分子生物学	新潟大学医学部助教授 藤井博
JB-95-03	炎症後色素沈着におけるエイコサノイドによるメラノサイト活性化機構の解明	皮膚科学 生化学	京都大学医学部助教授 井階幸一
JB-95-04	細胞内小器官ペルオキシソーム：エーテルリン脂質の生合成と酸素ラジカスカベンジャー機能及び欠損症	細胞生化学 分子生物学	九州大学理学部教授 藤木幸夫
JB-95-06	多成分油性皮膚浸透促進システムの有効性及び作用機構に関する研究	製剤学	城西大学薬学部助教授 杉林堅次
JA-96-01	化粧品用生理活性物質の皮膚透過と皮内貯留性及びヒト皮膚と動物並びに培養皮膚との比較	生物薬剤学 皮膚科学	近畿大学薬学部教授 小木曾太郎
JA-96-03	酸化ストレスにより生体膜に生成する酸化型リン脂質の代謝機構の解明	生化学 薬学	北里大学薬学部教授 中川靖一
JA-96-06	HGFによる皮膚の再生促進と老化防止の基礎的研究	生化学 細胞生物学	大阪大学医学部助教授 松本邦夫
JA-96-09	in vitroヒト樹状細胞培養系を用いた化学物質の感作性試験の可能性についての基礎的検討	皮膚科学 皮膚免疫	東北大学医学部講師 相場節也
JA-96-10	ケラチノサイトの発現するエラスチンと皮膚老化の関連について	皮膚科学 生化学 分子生物学	防衛医科大学校助教授 多島新吾

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
JB-96-05	免疫不全マウス再構成皮膚における培養毛乳頭細胞による毛包形成の誘導と関連因子の検討	皮膚科学	聖マリアンナ医科大学助教授 窪田 泰夫
JB-96-06	細胞増殖因子および接着分子による皮膚硬化制御に関する分子生物学的研究	皮膚科学 膠原病学	獨協医科大学助教授 山蔭 明生
JA-97-04	男性ホルモンによる毛の発育制御機序の解析	皮膚科学 内分泌学	大阪大学医学部助教授 板見 智
JA-97-05	新規蛍光プローブを用いた一酸化窒素 (NO) の皮膚における作用解析	有機化学 分析化学 細胞生物学	東京大学大学院薬学系研究科助手 菊地 和也
JA-97-06	生体計測工学に基づいた非侵襲的な皮膚の性状の測定法の開発	皮膚科学 化粧品科学 生体工学 医用工学	東北大学医学部教授 田上 八朗
JA-97-07	老化による皮膚色素沈着の画像定量自動解析システム確立のための基礎研究	皮膚科学	慶應義塾大学医学部専任講師 田中 勝
JB-97-01	接触過敏症の皮膚浸潤細胞に特異的に発現している遺伝子の解析	免疫学 分子生物学	東邦大学理学部教授 小林 芳郎
JB-97-02	ノックアウトマウスをもちいたcell envelopeのバリアー機能解析	分子生物学 発生工学 遺伝子工学 皮膚科学	京都府立医科大学医学部講師 山西 清文
JB-97-04	紫外線吸収効果をもつ酸化チタンの光触媒作用と生体適合性	生体材料	東京理科大学基礎工学部助教授 鈴木 高広
JB-97-05	日光老化について一とくに日光弾性線維症の発症機構ならびにUV <sup>B</sup> 症候群の病態に関する研究一	皮膚科学 生化学 分子生物学	熊本大学医学部教授 小野 友道
JB-97-06	眼粘膜への障害を指標とした化粧品素材の安全性評価のための基礎的検討一眼内動態の定量的評価法の確立	薬剤学	長崎大学薬学部教授 中村 純三
JB-97-08	紫外線誘発DNA損傷および修復酵素の細胞内分布状態の三次元的表示	放射線生物学	奈良県立医科大学助教授 森 俊雄

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
JB-97-10	皮膚器官培養系を用いた化学物質の刺激性、抗原性の検討	免疫学 アレルギー 分子生物学	東京医科歯科大学医学部助教授 横関博雄
JB-97-11	皮膚の老化に伴うテロメア短縮化とフリーラジカル障害に対する、細胞内アスコルビン酸のエンリッチング化による防御効果	皮膚生化学 細胞薬理学	広島県立大学大学院 生物生産システム研究科教授 三羽信比古

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
J 90-04	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
J 91-13	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
J 91-15	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
J 91-21	「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
JA-95-05	化粧皿を通じた古代ヘレニズム世界における化粧文化の研究	装飾文化 デザイン	神戸芸術工科大学助教授 服部 等作
JB-95-05	化粧品の表示に関する研究—ことに警告表現について—	社会心理学	筑波大学社会工学系講師 吉川 肇子

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
JA-96-04	化粧品の香り表現に関する研究	心理学 官能評価	東京学芸大学教育学部助教授 神宮英夫
JB-96-04	高齢女性における情動活性化の試み：リハビリテーション・プログラムへの適用可能性の検討	情動心理学 発達心理学	同志社大学 文学部学生（博士課程） 伊波和恵
JB-97-09	高齢者の被服行動の変容が、高齢者の自尊感情及び日常生活行動に与える影響	行動学 老年心理学 臨床心理学	京都大学教育学部助教授 吉川左紀子
JB-97-12	健康な笑いづくりの方法について	感情心理学 健康心理学	福岡大学人文学部教授 高下保幸

\*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

〒104-0061 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. 6 / '98

非売品

1998年9月1日発行

編集責任者 宮澤 香

発行 財団法人 コスメトロジー研究振興財団  
〒104-0061 東京都中央区銀座三丁目5番12号  
電話 東京 03 (3564) 6731

製作 エイエム企画  
〒170-0013 東京都豊島区東池袋一丁目33番7号  
電話 東京 03 (3590) 5375

印刷 宮崎印刷