

ごあいさつ

このたび、当財団として15冊目の研究報告書をお届けできることになりました。小林孝三郎が1990年にコスメトロジー研究振興財団を設立して以来、多くの優れた研究に対する助成活動等を行ってまいりましたが、人々の豊かで美しい生活を実現するための一助となれば、これ以上嬉しいことはないと考え次第でございます。

今回の研究報告書では平成16～17年度に研究助成を受けられた方の中から22名の方の研究成果を掲載させていただきました。

コスメトロジーと一番関わりの深い表皮細胞に関する研究を中心に、活性酸素や抗酸化作用など人類の究極の願いでもあるアンチエイジング関係の研究が多いことが今回の特長だといえます。また、化粧と心理学分野の融合した研究は従来からも多かったのですが、QOL（クオリティ オブ ライフ）や緩和ケアなど医療分野における化粧品の効用など今注目の分野に関わる研究も増えてきています。

安倍首相は所信表明演説の中で、医療や工学、情報技術など社会の成長に貢献する分野のイノベーション創造のために、2025年までの長期的戦略指針「イノベーション25」を発表しましたが、医療や薬学の分野とコスメトロジー分野の研究融合はますます進むものと考えられます。

化粧品分野からアプローチした老化研究の成果が医療分野へ応用されるケースも多くなっていますし、再生医療の美容分野への応用、人間の免疫能と化粧療法の関わりなど、コスメトロジーにまつわる研究は人間生活にとってますます重要な役割を持つものになってまいります。

当財団といたしましても、このようなコスメトロジーの進化と発展に今後とも深く関わってまいりたいと考えております。

皆様のますますのご協力とご支援をお願い申し上げます。

平成19年7月

財団法人 コスメトロジー研究振興財団
理事長 小林 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

- ・シルクプロテイン-ポリフェノールコンジュゲートの合成と機能評価 2
大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻 宇山 浩
- ・酵母を利用した組み換えヒト型セラミド生産系の開発 7
広島大学大学院生物圏科学研究科 船戸 耕一
- ・アミロース工学による分子認識性ナノゲル微粒子の設計と応用 13
東京医科歯科大学生体材料工学研究所 秋吉 一成
- ・脂質分子集合体の活性酸素種分解機能の解明による新規な抗酸化系の構築 18
山口大学工学部応用化学工学科 吉本 誠
- ・ショウガ成分誘導体の抗酸化作用と遺伝子発現誘導作用 23
同志社大学工学部 野口 範子
- ・リン脂質ベシクル上にリポアミノ酸が形成するナノチャンネルとその薬物放出能の検討 29
金沢大学大学院自然科学研究科 太田 明雄
- ・二酸化チタン上に形成した脂質二重膜への表面特性の影響およびUV照射効果 36
分子科学研究所 手老 龍吾
- ・コラーゲンに正しい構造を取らせる、HSP47誘導剤の発見 42
熊本大学大学院医学薬学研究部 水島 徹
- ・皮膚再生を促す non-drug 細胞間脂質類似構造体 (リオトロピック液晶) の開発 44
聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター DDS 研究室 五十嵐 理慧

II. 生体作用、安全性に関する分野

- ・ラミニン-5 α 3LG4由来シンデカン結合ペプチドによる表皮細胞遊走活性化 50
京都大学大学院医学研究科皮膚生命科学講座 宇谷 厚志
- ・表皮細胞におけるエピブラキンの機能 57
大分大学医学部皮膚科 藤原 作平
- ・皮膚の光音響学的診断法の開発 64
防衛医科大学校防衛医学研究センター情報システム研究部門 佐藤 俊一
- ・インターロイキン12による紫外線防護に関する研究 73
長崎大学先端生命科学研究支援センター 松田 尚樹
- ・薬用人参の皮膚老化防止作用と育毛作用の分子メカニズム 78
東京医科歯科大学難治疾患研究所 古川 哲史

目次

・ 高齢者顔面における常在真菌マラセチアのフローラ —— 脂漏性角化症との関連について	85	
筑波大学人間総合科学研究科 六町皮フ科クリニック 伴野 朋裕		
・ 皮膚における弾性繊維形成とトロポエラスチンの細胞機能解析	94	
星薬科大学薬学部臨床化学教室 輪 千 浩 史		
・ 表皮細胞の増殖・分化・細胞死に影響を与える遺伝子群の機能解析システムの構築	99	
大阪大学医学系研究科社会環境医学 竹田 潤 二		
・ 色素細胞幹細胞の制御による白斑症治療モデルの開発	101	
岐阜大学大学院医学系研究科 國 貞 隆 弘		
Ⅲ. 精神、文化に関する分野		
・ 化粧療法による被介護者と介護ボランティアの精神的活性化	106	
仙台大学体育学部健康福祉学科 吉 田 寿 美 子		
・ 口唇裂患者の化粧による外観変化と内面変化について	115	
大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病因病態制御学講座口腔外科学第一教室 古 郷 幹 彦		
・ 化粧品の香料がヒト自律神経系に及ぼす生理学的効用の研究	120	
藤田保健衛生大学医学部生理学 河 合 房 夫		
・ 皮膚ボディイメージ評価尺度 Cutaneous Body Image Scale (CBIS) 日本語版の作成	125	
東京女子医科大学附属女性生涯健康センター 檜 垣 祐 子		
■記念講演		
平成 18 年度記念講演 『顔と心と体について』	131	
フェイシャルセラピスト、歯学博士、REIKO KAZKI 主宰 かづきれいこ		
■コスメトロジー研究雑感		135
■付 録		
平成 18 年度事業報告	149	
役員一覧	152	

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

シルクプロテイン-ポリフェノールコンジュゲートの合成と機能評価

大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻

宇山 浩

The biological and pharmacological effects of polyphenols have been demonstrated in numerous human, animal and in vitro studies. The present report describes synthesis and bio-related properties of polyphenol conjugates on poly(amino acid)s such as silk protein and poly(ϵ -lysine). In this study, chlorogenic acid, caffeic acid, and green tea catechin were used as polyphenol for the conjugation. At first, silk protein was chemically modified with the polyphenols by using dehydrating coupling agent, but the introduced ratio of the polyphenols was very low. Next, an enzymatic conjugation of the polyphenols on poly(ϵ -lysine) has been examined. The conjugates were successfully synthesized by the oxidation of the polyphenols using *Myceliophthora* laccase as catalyst in the presence of poly(ϵ -lysine). The antioxidant activity of the resulting conjugates was evaluated in terms of superoxide anion scavenging activity. The conjugates greatly scavenged superoxide anions in a concentration dependent manner on the polyphenol unit level, compared to the monomeric polyphenol. These data imply that the enzymatic conjugation enormously improved the antioxidant property of the polyphenols. Additionally, the conjugates showed good inhibitory effects toward disease-related enzymes, xanthine oxidase, collagenase, and hyaluronidase.

1. 緒言

緑茶をはじめとする食品に含まれるポリフェノール類は、優れた抗酸化性、抗ガン活性、抗菌性、抗炎症性、抗ウィルス性などの種々の生理活性を有することが知られており、動脈硬化などの成人病やガン発生を予防する機能性食品基材として注目されている。一方、天然にはプロアントシアニジンに代表されるポリフェノールオリゴマーが知られており、低分子ポリフェノール類とは異なる特異的な生理活性を示す。動脈硬化抑制作用、胃潰瘍抑制作用、大腸ガン抑制作用、糖尿病合併症抑制作用などが見出されている。

一方、我々は低分子量ポリフェノール類を人工的に高分子量化することで、ポリフェノールの機能向上・新機能発現を検討してきた¹⁻⁸⁾。本研究ではシルクプロテインを始めとするタンパク質(ポリアミノ酸)へポリフェノールを導入し、その機能の増幅を調べた。

2. 実験

ポリフェノール類としてはクロロゲン酸(ChA)、カフェ酸(CA)といったカルボン酸含有のポリフェノールと緑茶抽出カテキン(GTC)を用いた。幹ポリマーへのコンジュゲート化は幹ポリマー側鎖のアミノ基を利用し、①ポリフェノールのカルボン酸間の脱水縮合、②ポリフェノール類の酵素的酸化を伴うカップリング、の二種類の方法を検討した。



Synthesis of Silk Protein-Polyphenol Conjugates and Evaluation of Their Properties

Hiroshi Uyama

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

②に関し、ポリ(ϵ -リジン)-クロロゲン酸コンジュゲートの合成を詳しく述べる。大気中、ポリ(ϵ -リジン)(0.64 g, 5 mmol monomer unit)を蒸留水 20 mlに溶解させ、pHを7に調整した。ここに2 mlのメタノールに溶解させたクロロゲン酸(0.089g, 0.25mmol)を混合した。ラッカーゼ溶液(5 μ l, 5units)を添加することで反応を開始し、24時間後、6 N HCl数滴を加え、10%メタノールを含む蒸留水中で透析することにより精製した(cut-off MW=500)。得られた溶液を凍結乾燥し、0.38gのコンジュゲートを得た。

¹H-NMR (DMSO-d₆) : δ /ppm = 1.0-2.0 (br. CH₂CH₂CH₂ of PL), 2.4-2.9 (CH₂), 3.0-3.2 (br ϵ -CH₂), 3.2-3.6 (br. CHOH), 3.6-3.9 (α -CH₂), 7.5-8.6 (br. CH=CH, Ar-H), 8.7-9.1 (br. Ar-OH)。ポリ(ϵ -リジン)-カフェ酸コンジュゲート、ポリ(ϵ -リジン)-緑茶カテキンコンジュゲートは同様に合成した。

3. 結果

本研究の前半ではポリフェノールとしてクロロゲン酸とカフェ酸を用いた。これらはコーヒーの独特の褐色、香り、味のもとになるものであり、抗酸化性、抗炎症性、抗アレルギー性などの様々な生理活性が知られている。コーヒーは13世紀半ば頃からアラビアを中心とするイスラム教の国々で愛飲され薬としても用いられたと言われており、後に欧州に伝わり現在では緑茶と並び世界中で広く飲用されている。近年ではコーヒーに肝臓がん予防効果があることなども報告されている。

最初にモデル反応として、合成ポリアミンの一種である分岐状ポリエチレンイミン(分子量2万)とカフェ酸の反

応を検討した。水中でのペプチド結合形成に一般的に用いられる縮合剤 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩と縮合助剤 N-ヒドロキシスクシンイミドを用いることで、カフェ酸が効率的に導入された(ポリエチレンイミンのアミノ基当たり数%の導入)。

スーパーオキシドアニオンは通常の好気性代謝などによって、生体内で常に生成している。そのひとつにキサンチンがキサンチンオキシダーゼによって尿酸に変わる反応がある。この過程で酸素が電子受容体として働くことで同時にスーパーオキシドアニオン (SOD) が発生する。そこで、このキサンチン/キサンチンオキシダーゼ系を用いてスーパーオキシドアニオンを発生させ、化学発光法で検出することにより生成物のスーパーオキシドアニオン消去能、すなわち SOD 様活性を調べた。その結果、カフェ酸に比較してコンジュゲート化による機能の向上が見られなかった。次にシルクプロテインを用いて同様の反応を行ったが、カフェ酸の導入率が1%以下であったため、酵素法によるポリフェノール類のコンジュゲート化に切り替えて、狙いとするコンジュゲートの合成を試みた。

クロロゲン酸とカフェ酸といったカルボン酸基含有ポリフェノールを用いる酵素的コンジュゲート化を検討した。幹ポリマーとしては、抗菌・静菌作用を有する食品基材であるポリ(εリジン)を用いた。*Myceliophthora* 由来のラッカーゼを触媒に用い、ポリフェノールをポリ(εリジン) (PL) にコンジュゲートさせた。ポリ(εリジン) -

クロロゲン酸コンジュゲート (PL-ChA) の UV-vis スペクトルを測定したところ、250 ~ 450nm にポリリジンがほとんど吸収を示さないのに対し、コンジュゲート化によりクロロゲン酸に由来する吸収が見られた。カフェ酸においても同様の結果が得られた。ポリ(εリジン)へのクロロゲン酸とカフェ酸の導入率を元素分析により求めたところ、7.4% (PL-ChA) と 8.1% (ポリ(εリジン)-カフェ酸コンジュゲート (PL-CA)) であった。

得られたコンジュゲートの SOD 様活性を調べた (Fig. 1)。クロロゲン酸、カフェ酸のいずれにおいてもポリペプチドへのコンジュゲート化により SOD 様活性が大きく向上した。また、コンジュゲート化ポリフェノールの DPPH (1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl) ラジカルに対する消去能を測定した。DPPH は天然には存在しないが、比較的安定なラジカルであり評価が簡便なことから、抗酸化性の指標としてよく用いられる。Table 1 に IC₅₀ 値として抗酸化性機能を示す。これより、DPPH 消去能がコンジュゲート化により低下することが明らかとなった。

キサンチンオキシダーゼによりキサンチンから尿酸が生じる反応は、プリン体と呼ばれる共通構造を持つ物質が分解される最後の過程である。プリン体は体内の代謝によって生成したり、またビールや動物性食品に含まれることでも知られており、最終産物である尿酸が関節に蓄積することにより痛風などの症状を引き起こす。よってキサンチンオキシダーゼの阻害物質はスーパーオキシドアニオンの生

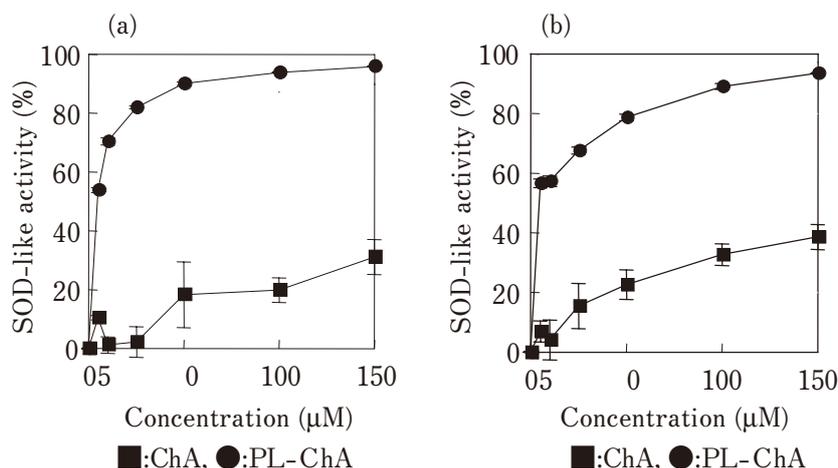


Fig.1 SOD-like activity of PL-polyphenol conjugates: (a) chlorogenic acid; (b) caffeic acid.

Table 1 Antioxidant property and enzyme inhibition activity of PL-polyphenol conjugates

Product	IC ₅₀ (μM)		
	DPPH scavenging	Collagenase inhibition	Hyaluronidase inhibition
Chlorogenic acid	18.4	145	145
PL-ChA	>30	>150	157
Caffeic acid	17.3	145	145
PL-CA	>30	150	230

成を抑制するとともに、尿酸の生成を阻害することによる痛風治療薬としても有用であると考えられる。Fig. 2に本コンジュゲートのキサンチンオキシダーゼ阻害能を示した。クロロゲン酸、カフェ酸のコンジュゲートは濃度に応じたキサンチンオキシダーゼ阻害を示し、モノマーと同程度であるの阻害活性を示した。

マトリックスメタロプロテイナーゼはZnを活性中心に持つ酵素群であり、コラゲナーゼ、ゼラチナーゼ、ストロメリシンなどからなる。これらは細胞外マトリックスのタンパク質を分解、再構築する酵素で、その恒常性を保つのに重要な役割を果たしているが、その発現や活性のバランスが崩れると様々な病態が発症する。そのため近年、がんや炎症、関節炎などに対し、マトリックスメタロプロテイナーゼをターゲットとした薬剤の開発に注目が集まっている。同様に、微生物 (*Clostridium histolyticum*) 由来のコラゲナーゼについても多くの研究が行われている。この微生物コラゲナーゼは基底膜の主成分であるIV型コラーゲンを分解する酵素である。コラーゲンは骨、軟骨、皮膚、血管などに多く含まれ、体内の全タンパク質の30%を占める。コラーゲンの衰えにより動脈硬化、関節痛、肌あれ、シミ・しわなどの症状が現れる。よって、これらの症状を予防するためのコラゲナーゼ阻害剤の研究が盛んに行われており、ポリフェノール類もそのひとつである。そこで本研究で得られたコンジュゲートのコラゲナーゼ阻害能について評価を行った (Table 1)。その結果、コンジュゲート

に阻害活性が見られたが、その活性はモノマーと同程度あるいはそれ以下に留まった。

ヒアルロニダーゼは人間の肌や眼球、鶏のとさかに含まれる保湿成分であるヒアルロン酸を分解する酵素である。真皮中に存在する酵素ヒアルロニダーゼは活性化して、かゆみ・ひりつき・毛細血管の拡張による赤み、むくみなどの炎症を引き起こす。またヒアルロニダーゼは炎症時の血管透過性を増加させることにより、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎やじんましんなどのI型アレルギー症状にも深く関わっており、抗炎症剤、抗アレルギー剤としてヒアルロニダーゼ阻害剤の開発が求められている。本研究で得られたコンジュゲートのヒアルロニダーゼ阻害能について評価を行った (Table 1)。その結果、コラゲナーゼ阻害と同様に顕著な活性の増幅は見出されなかった。

次に緑茶抽出ポリフェノール (緑茶カテキン) のポリ (ϵ -リジン) へのコンジュゲートを試みた。緑茶に含まれるカテキン類は最も豊富に存在しよく研究されている植物ポリフェノールの1つである。茶の木は *Camellia sinensis* というツバキ科に属する植物で、その乾燥葉重量中に10~15%のカテキン類が含まれる。中国や日本では古くから健康によいとされ、嗜好品としてだけでなく様々な疾患に対する民間療法として緑茶が飲用されてきたが、その薬効の多くがこのカテキン類によるものであると考えられる。緑茶カテキンの主成分の構造を Fig. 3 に示す。本研究では緑茶カテキンとして三井農林製ポリフェノール70Sを用いた。

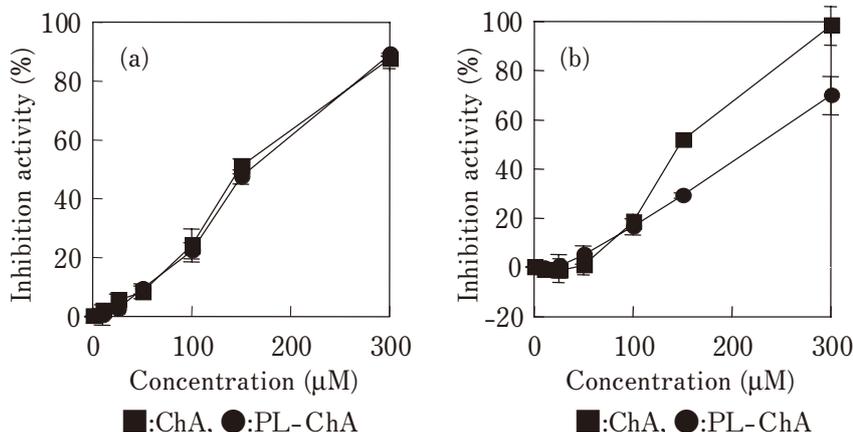


Fig. 2 XO inhibition activity of PL-polyphenol conjugates: (a) chlorogenic acid; (b) caffeic acid.

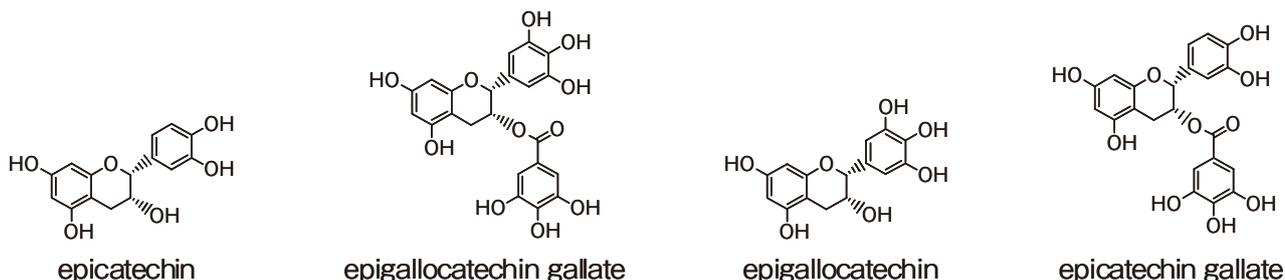


Fig. 3 Structure of typical catechin derivatives in green tea

コンジュゲートの合成はカフェ酸、クロロゲン酸の場合と同様にラッカーゼ触媒を用いて行った。得られたポリ(ϵ -リジン)-緑茶カテキンコンジュゲート (PL-GTC) における緑茶カテキンの導入率は 3.4mol% であった。

抗酸化性評価の尺度として、上述の DPPH 消去能と SOD 様活性以外に、安定カチオンラジカル (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, ABTS) に対する消去能を測定した。評価結果を Table2 に示す。比較として工業的に用いられている抗酸化剤である BHT や Trolox の抗酸化性を示した。DPPH ラジカル、ABTS ラジカル

については、緑茶カテキン、ポリ(ϵ -リジン)-緑茶カテキンコンジュゲートともに低濃度で効果的に消去された。DPPH についてはコンジュゲート化により緑茶カテキンより抗酸化性が低下したが、ABTS に対しては抗酸化性が向上した。SOD 様活性については、コンジュゲート化による著しい向上が見られた。

ポリ(ϵ -リジン)-緑茶カテキンコンジュゲートの酵素阻害活性について調べたところ、キサンチンオキシダーゼ、コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼのいずれに対しても、コンジュゲート化により阻害活性が大幅に向上した (Fig.4)。

Table 2 Antioxidant activity of PL-GTC conjugate

Product	Radical scavenging activity (IC_{50} (μM))		
	DPPH	ABTS	Superoxide anion
Green tea catechin	7.2	5.2	55.8
PL-GTC conjugate	16.9	4.4	4.6
BHT	—	—	>>200
Trolox	24.8	—	155

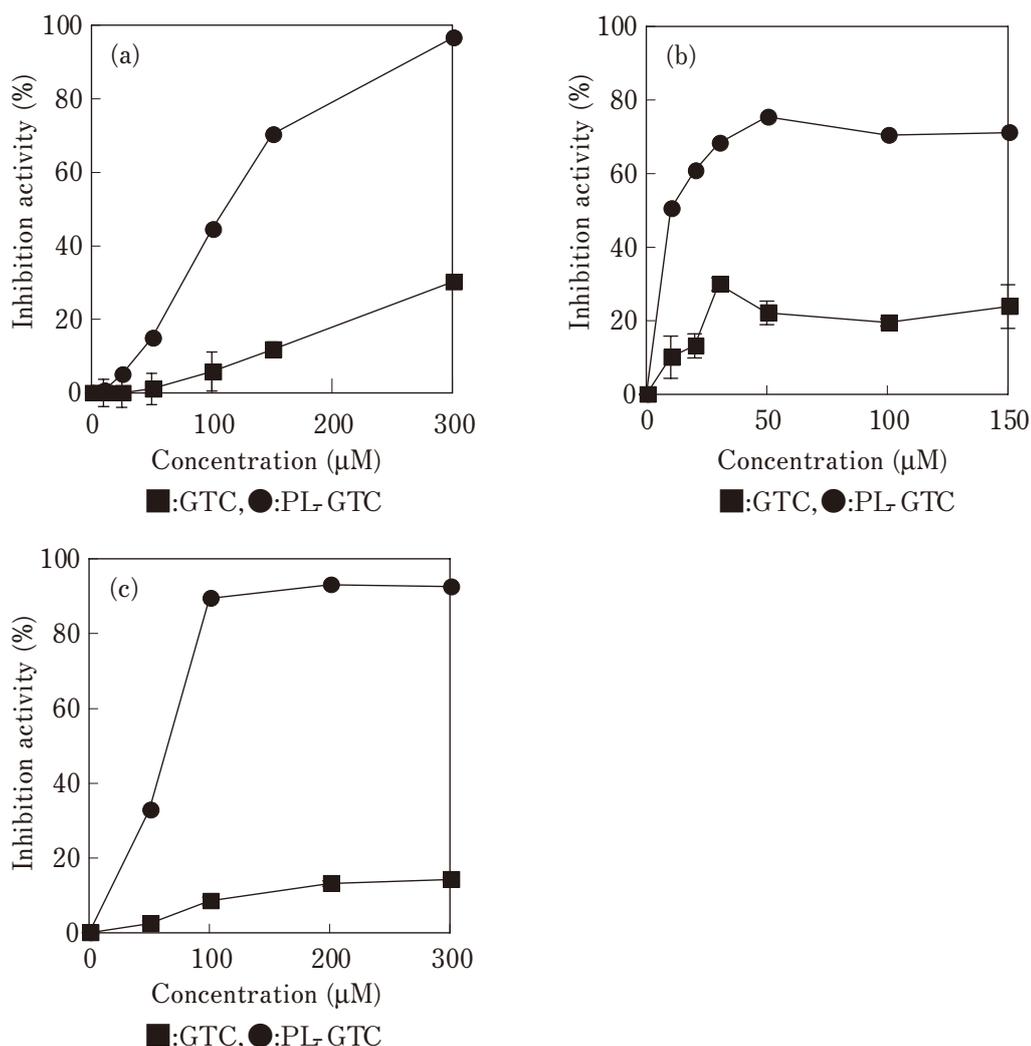


Fig. 4 Enzyme inhibition activity of GTC and PL-GTC conjugate for: (a) xanthine oxidase; (b) collagenase; and (c) hyaluronidase

これらの結果から、緑茶カテキンの機能向上にポリペプチドへのコンジュゲート化が有効であることがわかった。この結果はカフェ酸、クロロゲン酸のコンジュゲート化と異なり、緑茶カテキンに特有の現象である。

4. 考 察

本研究ではカフェ酸、クロロゲン酸、緑茶カテキンといったポリフェノール類のタンパク質へのコンジュゲート化を試みた。ポリフェノールのカルボン酸基を利用したコンジュゲートではモデル系で反応の進行を確認できたが、アミノ基（リジン残基）の少ないシルクプロテインでは、十分な反応の進行を達成できなかった。また、シルクプロテインは可溶性サンプルの分子量が高くなく（数千程度）、そのことが収率と導入率の低下につながっていると思われる。

一方、酵素法については、モデルポリマーであるポリ(ϵ -リジン)に対するポリフェノールの導入法が確立できた。ラッカーゼの添加により空気酸素を用いた酸化が利用できるように、コンジュゲート体合成の操作は極めて簡便である。また、抗酸化性や酵素阻害活性が見出されたことから、実用的化粧品基材としての可能性が示された。

活性酸素やフリーラジカルによる酸化傷害は種々の疾病や発がん、老化と密接に関わっている。酸化ストレスは、細胞のDNA、細胞膜上のリン酸脂質、蛋白、糖質を傷害し、老化や血管傷害、脳障害、がんなどを進行させる。こうした酸化ストレスから体を防御して体を錆びつづのを防止するために、優れた抗酸化作用を有する食品や医薬品が必要とされる。現在、緑茶カテキンをはじめとするポリフェノール類は飲料やサプリメントなどの健康食品として用いられているが、さらに機能を高めることにより疾患を治療する製剤などへの積極的な利用が期待される。その観点から本研究で開発したポリ(ϵ -リジン)には機能性食品、予防薬への用途が想定される。

5. まとめ

本研究では、主に酵素を触媒に用いたクロロゲン酸、カフェ酸、緑茶カテキンのポリ(ϵ -リジン)へのコンジュゲート体の合成と機能評価を行った。コンジュゲート化によりスーパーオキシドアニオン除去能が著しく向上し、キサンチンオキシダーゼ、コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼといった疾患関連酵素に対する阻害能が見出された。これらの結果から、我々が先に見出したポリフェノール類の高分子量化による生理活性の増幅という手法をクロロゲン酸、

カフェ酸、緑茶といったポリフェノール類に拡張できることが明らかとなり、得られたポリフェノール含有コンジュゲートには機能材料としての応用が期待される。

(参考文献)

- 1) M. Kurisawa, J. E. Chung, Y. J. Kim, H. Uyama, and S. Kobayashi, Amplification of Antioxidant Activity and Xanthine Oxidase Inhibition of Catechin by Enzymatic Polymerization, *Biomacromolecules*, **4**, 469-471 (2003).
- 2) M. Kurisawa, J. E. Chung, H. Uyama, and S. Kobayashi, Enzymatic Synthesis and Antioxidant Properties of Poly(rutin), *Biomacromolecules*, **4**, 1394-1399 (2003).
- 3) M. Kurisawa, J. E. Chung, H. Uyama, and S. Kobayashi, Oxidative Coupling of Epigallocatechin Gallate Amplifies Antioxidant Activity and Inhibits Xanthine Oxidase Activity, *Chem. Commun.*, 294-295 (2004).
- 4) Y. J. Kim, J. E. Chung, M. Kurisawa, H. Uyama, and S. Kobayashi, New Tyrosinase Inhibitors, (+)-Catechin-Aldehyde Polycondensates, *Biomacromolecules*, **5**, 474-479 (2004).
- 5) Y. J. Kim, J. E. Chung, M. Kurisawa, H. Uyama, and S. Kobayashi, Superoxide Anion Scavenging and Xanthine Oxidase Inhibition of (+)-Catechin-Aldehyde Polycondensates. Amplification of Antioxidant Property of (+)-Catechin by Polycondensation with Aldehydes, *Biomacromolecules*, **5**, 547-552 (2004).
- 6) Y. J. Kim, H. Uyama, and S. Kobayashi, Inhibition Effects of (+)-Catechin-Aldehyde Polycondensates on Proteinases Causing Proteolytic Degradation of Extracellular Matrix, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **320**, 256-261 (2004).
- 7) N. Ihara, S. Schmitz, M. Kurisawa, J. E. Chung, H. Uyama, and S. Kobayashi, Amplification of Inhibitory Activity of Catechin against Disease-Related Enzymes by Conjugation on Poly(ϵ -lysine), *Biomacromolecules*, **5**, 1633-1636 (2004).
- 8) N. Ihara, M. Kurisawa, J. E. Chung, H. Uyama, and S. Kobayashi, Enzymatic Synthesis of a Catechin Conjugate of Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane and Evaluation of Antioxidant Property, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **66**, 430-433 (2005).

酵母を利用した組み換えヒト型セラミド生産系の開発

広島大学大学院生物圏科学研究科

船戸 耕一

Yeast has been widely and successfully used to produce polypeptides, enzymes, vitamins, and lipid components of high commercial interest. Here we describe progress using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as an industrial organism for production of human-type ceramides. The yeast cells do not synthesize sphingolipids desaturated at the $\Delta 4$ -position of the dihydrosphingosine, which are found in many eukaryotic organisms including humans. Instead, they produce sphingolipids hydroxylated at the C-4 position. Therefore in order to 'humanize' ceramide biosynthesis in the yeast, it is necessary to eliminate endogenous yeast ceramide biosynthetic pathway and introduce a heterologous DES1 gene encoding a sphingolipid $\Delta 4$ -desaturase. Indeed, the resultant yeast strain was capable of synthesizing $\Delta 4$ -desaturated sphingolipids. Furthermore, we observed that the engineered yeast can produce a human-type ceramide, ceramide NS. Since ceramides play a critical role in maintaining the permeability barrier function of the skin, the yeast-derived human-type ceramide could be used for clinical applications to improve the impaired barrier function seen in several skin diseases including atopic dermatitis.

1. 緒言

皮膚の最外層には、水分を保持する保湿機能と外部刺激から肌を保護するバリア機能を司る角質層という組織が存在する。角質層は角質細胞と天然保湿因子、そして細胞間脂質から構成されているが、その中でも特に細胞間脂質の約半分を占めるセラミドが、それらの機能に極めて重要な役割を担っている。例えば、アトピー性皮膚炎や老人性乾皮症に共通する特徴は保湿能の著しい低下であるが、その主因は脂質代謝酵素異常によるセラミド量の減少であることが知られている。またセラミドはバリア機能の増強・美白作用やメラニンの生成を抑制する作用があることも示唆されている。セラミドは外部から補給することが可能な物質である。そのため近年では、乾燥敏感肌を伴う皮膚疾患に対する治療薬あるいは化粧品・美容健康食品の素材として大変注目されている。実際、化粧品に関しては、セラミドを配合した多くの製品がすでに市販されている。セラミドの原料としては、これまで牛などの動物由来のものが使われていたが、感染症の問題が指摘され、現在では米、小麦、大豆や芋などの植物性セラミドが主流である。しかし、植物性セラミドはヒトのセラミドと構造が異なる上に生産性が低いことから、それらを克服することが可能な新しい生産技術の開発が強く望まれている。本研究では、酵母のセラミドの合成および代謝システムを巧く制御することに

より、ヒトの皮膚に対して最も安全で高い効果が期待されるヒト型セラミドを効率的に生産するシステムを開発することを目的とした。

2. 実験

2.1 *hDES1* (ヒト由来の *DES1*) 遺伝子発現ベクターと破壊株の作製

ヒト cDNA ライブラリーを鋳型として PCR を行い、得られた PCR 産物の制限酵素サイトを利用して酵母用遺伝子発現ベクターにクローニングした。またタンパク質の発現チェック用として、N 末端に HA および GFP が融合した *hDES1* 遺伝子発現ベクターも作製した。酵母破壊株の作製は PCR を用いた遺伝子置換法を用いた。YDp プラスミドを鋳型として PCR を行い、標的遺伝子の上流 - 選択マーカー遺伝子 - 下流が連結した PCR 産物を得た。形質転換を行い、栄養要求性培地で形質転換体を選抜し標的遺伝子の破壊株を得た。

2.2 放射能標識 [^3H] myo-inositol および [^3H] sphingosine を用いたイノシトール含有スフィンゴ脂質の解析

野生株、各遺伝子破壊株を SD 培地で 25°C、一晚振盪培養した後、イノシトールを含まない SD あるいは含有 SD 懸濁液 0.5 ml (菌体重量 50 mg) を調製した。ラベル時の温度で 10min 間プレインキュベーションした後、[^3H] myo-inositol (15 μl , 15 μCi) (図 2A) または [^3H] sphingosine (8 μl , 4 μCi) (図 2B) 加え、30°C で 2 時間 ([^3H] myo-inositol) あるいは 37°C で 3 時間 ([^3H] sphingosine) インキュベーションした。10mM の非標識 PHS は、最終濃度が 100 μM になるように、プレインキュベーションの前に加えた (図 2A)。250mM の NaF と 250mM の NaN₃



Genetic engineering for synthesis of human ceramides in yeast

Kouichi Funato

Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University

を 20 μ l 加え、反応を停止させた後、氷冷した滅菌水で 3 度洗浄し、菌体を 66 μ l の滅菌水に懸濁させた。懸濁液にグラスビーズを加え、激しく攪拌することにより菌体を破碎した。これにクロロホルム、メタノール、懸濁液の比が 10:10:3 になるようにクロロホルム、メタノールを加え、脂質を抽出した。抽出液の遠心分離を行い、得られた上清を回収した後、窒素ガスを吹き付けて濃縮乾燥させた。試料を 100 μ l のクロロホルム-メタノール-水 (10:10:3) に溶解し、0.6N NaOH メタノール溶液を 20 μ l 加え、30

℃で 90min 間反応させた後、0.6N 酢酸溶液で中和させた。ブタノール抽出により塩を除去し、得られたブタノール層を窒素ガスにより濃縮乾燥させた。脂質を 20 μ l のクロロホルム-メタノール-水 (10:10:3) に溶解させ、薄層クロマトグラフィー (TLC) プレートに全量をスポットし、クロロホルム-メタノール-4.2N NH₄OH (9:7:2) で展開した¹⁾。展開後、放射能標識スフィンゴ脂質をバイオイメージアナライザー (BAS) で解析した。

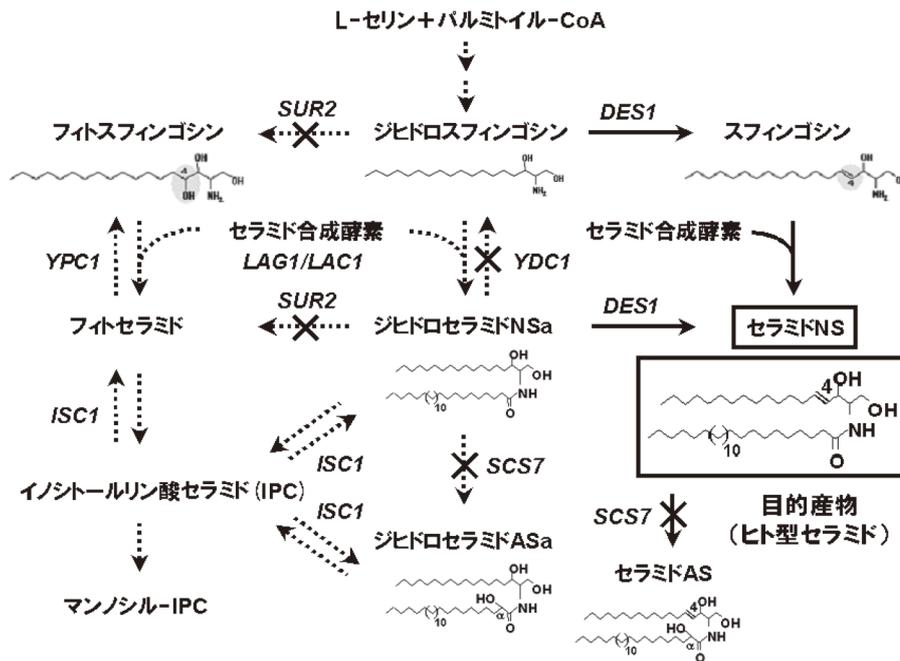


図1 酵母のスフィンゴ脂質合成経路 (.....) とヒト型セラミドの産生経路 (——)

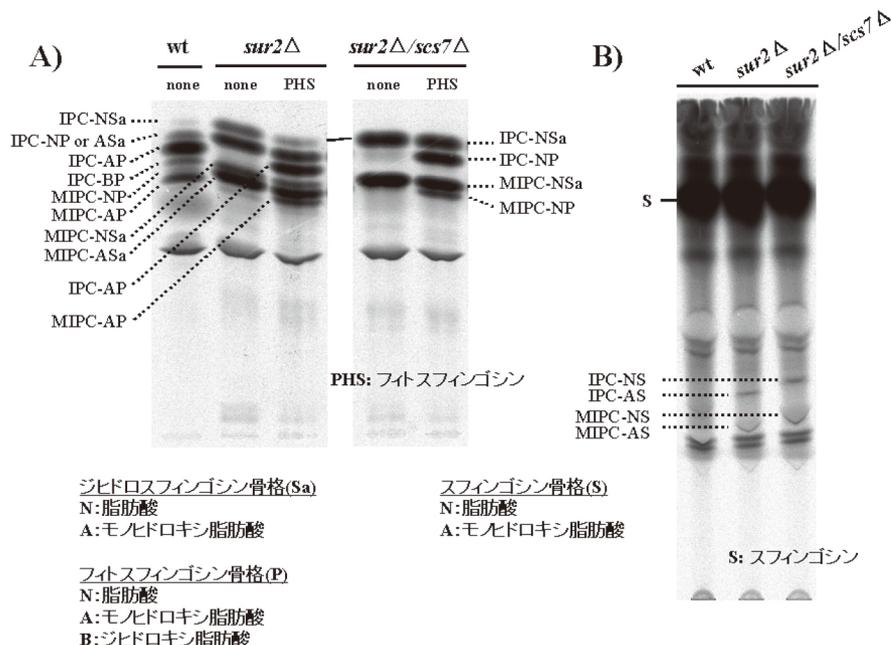


図2 出芽酵母におけるヒト型スフィンゴ脂質の合成活性能力

2.3 hDES1 タンパク質の発現解析

野生株、N末端にHAが融合した *hDES1* (*HA-hDES1*) 遺伝子発現ベクターを形質転換した *sur2* 破壊株をSD培地で25℃、一晚振盪培養した後、マイクロソーム画分を調製した²⁾。マイクロソーム画分を遠心(100,000g×60min)し、可溶性画分(S)と膜画分(P)を分離した。SDS-PAGE後、ニトロセルロース膜に転写し、マウス抗HAモノクローナル抗体を用いてウエスタン解析した(図3)。

2.4 ニンヒドリン試薬を用いたスフィンゴイド塩基の解析

sur2 遺伝子破壊株および *hDES1* 遺伝子発現ベクターを形質転換した株をSD培地で25℃、一晚振盪培養した後、SD懸濁液0.5ml(菌体重量50mg)を調製した。30℃で2時間インキュベーションした後、氷冷した滅菌水で3度洗浄し、菌体を66μlの滅菌水に懸濁させた。上述したように、菌体を破碎、脂質を抽出・濃縮乾燥した後、200μlのメタノール-5N HCl(9:2)混合液を加え、80℃で1時間インキュベーションした。再度、濃縮乾燥させた後、ブタノール抽出、脂質の濃縮乾燥を行った。脂質を20μlのクロロホルム-メタノール-水(10:10:3)に溶解させ、TLCプレートに全量をスポットし、クロロホルム-メタノール-2.5N NH₄OH(40:10:1)で展開した³⁾。TLCプレートにニンヒドリン試薬(0.2%ニンヒドリンエタノール溶液)を噴霧、100℃で数分間加熱し、スフィンゴイド塩基を解析した(図4)。スタンダードとして、50nmol(10mMの5μl)の精製品(S, DHS, PHS)を用いた。

2.5 放射能標識 [³H] DHS を用いたセラミドの解析

sur2 遺伝子破壊株および *hDES1* 遺伝子発現ベクターを形質転換した株をSD培地で25℃、一晚振盪培養した後、SD懸濁液5ml(0.5OD₆₀₀units, 0.1 OD₆₀₀/ml)を調製した。³H DHSを10μl(10μCi)加え、25℃で24時間培養した。250mMのNaFと250mMのNaN₃を200μl加え、反応を停止させた後、氷冷した滅菌水で3度洗浄し、菌体を66μlの滅菌水に懸濁させた。上述したように、菌体を破碎、脂質を抽出・濃縮乾燥した後、NaOH処理、ブタノール抽出、脂質の濃縮乾燥を行った。脂質を20μlのクロロホルム-メタノール-水(10:10:3)またはクロロホルム-メタノール(10:10)に溶解させ、あらかじめborate(70mM Na₂B₄O₇·10H₂Oメタノール溶液)で30min間処理し乾燥させたTLCプレートに全量をスポットし、クロロホルム-メタノール(9:1)で展開した⁴⁾。展開後、放射能標識セラミドをBASで解析した(図5A, 5B)。

3. 結果と考察

ジヒドロスフィンゴシン(DHS)生合成以降の反応は高等動物細胞と酵母の間で大きく異なる。宿主として用いる出芽酵母にはスフィンゴイドΔ4-デサチュラーゼ遺伝子 *DES1* が存在しないことから、スフィンゴシンを骨格にもつヒト型セラミドは合成されない(図1)^{3,5-6)}。その代わり *sur2* 遺伝子がコードする酵素によってDHSのC-4位が水酸化されフィトスフィンゴシン(PHS)が合成される。次いでそれらのスフィンゴイド塩基DHSとPHSは、それぞれジヒドロセラミドとフィトセラミドに変換さ

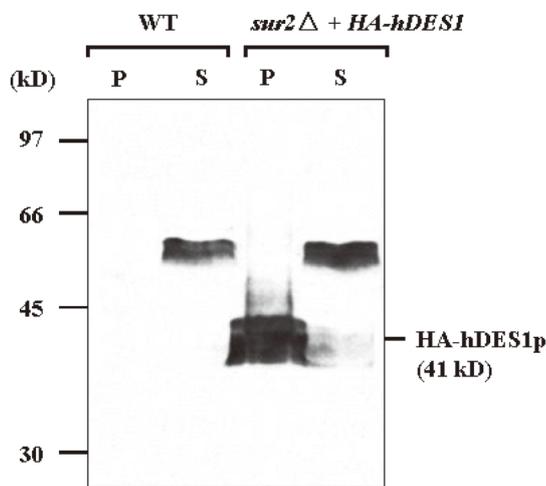


図3 出芽酵母におけるhDES1タンパク質の発現

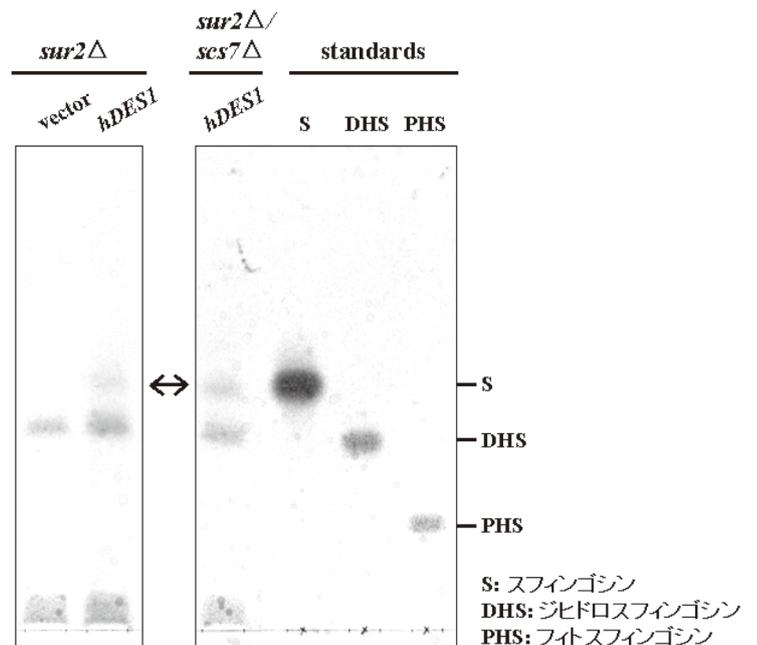


図4 *hDES1* 遺伝子導入によるスフィンゴシン骨格をもつスフィンゴ脂質の産生

れる。そのためヒト型セラミドを酵母で合成させるためには、酵母特有の PHS とフィトセラミドの両方が合成されないように細工をし、*DES1* 遺伝子を酵母に導入する必要があると考えられる。もし酵母のセラミド合成酵素がスフィンゴシンあるいは *DES1* タンパク質がジヒドロセラミドを基質として認識することができるならば、スフィンゴシンを骨格にもつヒト型セラミドが酵母で合成されるはずである。本研究では、酵母の *SUR2* 遺伝子を破壊した株をベースにし、ヒト由来の *DES1* (*hDES1*) 遺伝子を導入することによってヒト型セラミドが産生されるかどうかについて解析を行った。

3.1 外因性基質によるヒト型スフィンゴ脂質の合成活性

SUR2 遺伝子がコードする酵素 C4-ヒドロキシラーゼは、DHS またはジヒドロセラミドの C4 位に水酸基を導入する触媒活性をもつ。従って、その遺伝子破壊株は、C4 位が水酸化された PHS 骨格をもつイノシトール含有スフィンゴ脂質、イノシトールリン酸セラミド (IPC-NP, IPC-AP, IPC-BP; N: 脂肪酸鎖, A: モノヒドロキシ脂肪酸鎖, B: ジヒドロキシ脂肪酸鎖, P: フィトスフィンゴシン骨格) とマンノシル-IPC (MIPC-NP, MIPC-AP) を合成することができない (図 2A)。この *sur2* 破壊株に細胞外から PHS を供給させると、PHS 骨格をもつ IPC-AP と MIPC-AP が合成される。このことは、内因性のスフィンゴイド塩基と同様に、細胞内に取り込まれた外因性スフィンゴイド塩基もセラミドの合成を経てイノシトール含有スフィンゴ脂質へ変換されることを示している。

ヒト型スフィンゴイド塩基 (スフィンゴシン) をセラミドに変換させる能力が酵母にあるかどうかは不明である。

そこで、放射能標識 [³H] スフィンゴシンを用いて、外因性スフィンゴシンがイノシトール含有スフィンゴ脂質に変換されるかどうか解析を行った。*sur2* 破壊株に [³H] スフィンゴシンを加えると、スフィンゴシン由来の 2 つの特異的な脂質が検出された (図 2B)。比較的穏やかな NaOH 処理後に検出されることから、この 2 つの脂質はアミド結合を有するスフィンゴ脂質であり、それらの移動度からそれぞれ IPC-AS と MIPC-AS (A: モノヒドロキシ脂肪酸鎖, S: スフィンゴシン骨格) であると推定された。一方、野生株ではそれらの脂質はほとんど検出されない。これは、おそらく野生株で作られる PHS あるいはフィトセラミドとの競合が原因であると考えられる。これらの結果は、細胞内でスフィンゴシンが合成されれば、スフィンゴシン骨格をもつヒト型セラミドが *sur2* 破壊株で合成される可能性を示している。また *SUR2* 遺伝子の破壊がヒト型セラミドの合成のための必須な条件であることも示唆している。

酵母には、C4-ヒドロキシラーゼ *SUR2* タンパク質以外に、スフィンゴ脂質の脂肪酸の α 位に特異的に作用する α -ヒドロキシラーゼの存在が知られている。この酵素をコードする遺伝子は *SCS7* であり、この遺伝子の破壊株はスフィンゴ脂質の脂肪酸の α 位に水酸基を導入することができない (図 1)。上述したように、*sur2* 破壊株では PHS を骨格にもつスフィンゴ脂質は合成されないが、*SCS7* タンパク質の作用により 2 種類の異なった脂肪酸鎖 (N: 脂肪酸鎖, A: モノヒドロキシ脂肪酸鎖) を有するセラミド (Cer-NSa, Cer-ASa) とイノシトール含有スフィンゴ脂質 (IPC-NSa, IPC-ASa, MIPC-NSa, MIPC-ASa) が合成される (図 2A)。酵母でヒト型セラミドを効率的に生産させるためには、またその後の抽出と精製を容易にさせる

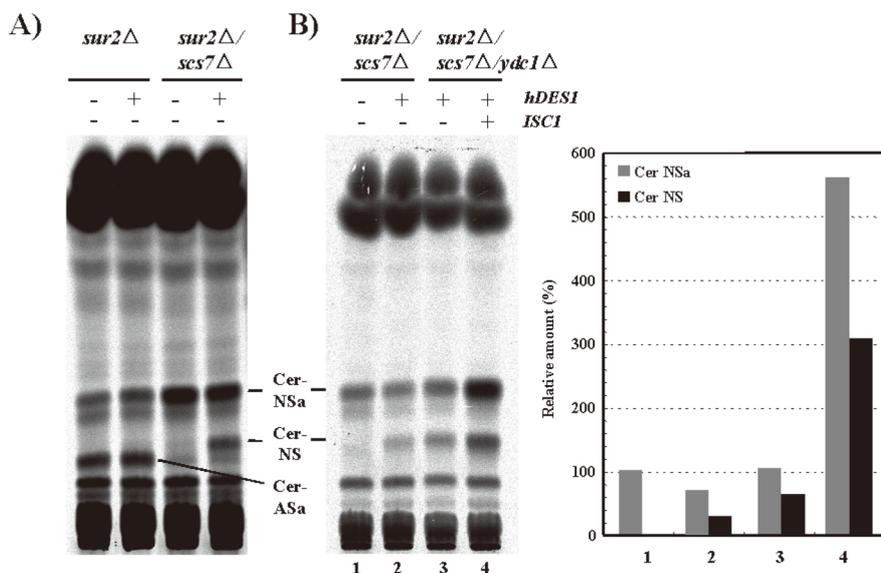


図5 *hDES1* 遺伝子導入によるセラミド NS の産生と *YDC1* 破壊及び *ISC1* 過剰発現の影響

には、基質となるセラミドの種類が少ないほうがより効果的であると考えられる。そこで、モノヒドロキシ脂肪酸鎖からなるスフィンゴ脂質 (Cer-ASa, IPC-ASa, MIPC-ASa) が合成されない *sur2 scs2* 二重破壊株 (図 2A) においても、上記と同様の実験を行った。その結果、*sur2* 単独破壊株でみられたスフィンゴ脂質と移動度の異なる 2 つのスフィンゴ脂質が観察された (図 2B)。SCS7 タンパク質の機能とその移動度から推察するに、この 2 つの脂質はそれぞれ IPC-NS と MIPC-NS であると考えられる。以上の結果は、*sur2* 破壊株と同様に、細胞内でスフィンゴシンが合成されれば、スフィンゴシン骨格をもつヒト型セラミドが *sur2 scs2* 破壊株で合成される可能性を示している。

3.2 hDES1 タンパク質の発現解析

hDES1 タンパク質が酵母の細胞内で発現されるかどうかについて調べるため、N 末端に HA が融合した *hDES1* 遺伝子発現ベクターを *sur2* 破壊株に形質転換し、可溶性画分と膜画分を調製した後、それらの画分をウエスタン解析した。その結果、HA 融合 hDES1 タンパク質の殆どは膜画分に存在し、酵母内で hDES1 タンパク質が膜タンパク質として発現していることが確認できた (図 3)。また蛍光顕微鏡により GFP 融合 hDES1 タンパク質の発現も確認できた (data not shown)。

3.3 hDES1 遺伝子導入によるヒト型スフィンゴ脂質の産生

sur2 破壊株と *sur2 scs7* 破壊株に *hDES1* 遺伝子を導入することによって、スフィンゴシン骨格をもつスフィンゴ脂質が合成されるかどうかについて解析を行った。形質転換した株から脂質を抽出、塩酸で処理 (スフィンゴ脂質のアミド結合を分解) した後、得られた全スフィンゴイド塩基をニンヒドリン試薬で分析した。その結果、*hDES1* 遺伝子を形質転換した両方の株からスフィンゴシンが検出された (図 4)。コントロールベクターを形質転換した *sur2* 破壊株では、スフィンゴシンは検出されない。これらの結果は、*hDES1* を導入した *sur2* 破壊株および *sur2 scs7* 破壊株において、スフィンゴシン骨格をもつスフィンゴ脂質が合成されていることを示しており、ヒト型セラミドが産生されている可能性を強く示唆している。

次に実際に、ヒト型セラミドが産生されているかどうかについて解析を行った。TLC を用いたセラミド分子種の分離の方法についてはこれまでいくつか報告がある。そのなかで Cer-NSa と Cer-NS を分離することが可能な方法を用いて、ヒト型セラミドの産生評価を行った。その結果、*hDES1* 遺伝子を形質転換した *sur2 scs7* 破壊株において、Cer-NSa とはあきらかに移動度の異なる脂質が検出された (図 5A)。この脂質は、ベクターのみを形質転換

したコントロール株では検出されない。また *sur2* と *scs7* の両方の遺伝子を破壊させた株に *hDES1* 遺伝子を導入したときのみ観察され、*sur2* 単独破壊株においては認められなかった。更に放射能標識 [³H] sphingosine でラベルした *sur2 scs7* 二重破壊株において検出されたセラミド分子と同じ移動度を示すこと、この脂質の合成がセラミド合成阻害剤である australifungin により阻害されたことから (data not shown)、Cer-NS であると考えられる。これは、*hDES1* 遺伝子を形質転換した *sur2 scs7* 二重破壊株で産生されたセラミドの主なものが Cer-NSa と Cer-NS であるという LC-MS/MS の解析結果とも一致している (data not shown)。

そこで、この評価系を用いて、アルカリジヒドロセラミダーゼをコードする *YDC1* 遺伝子 (図 1 参照) の破壊およびイノシトールホスホスフィンゴ脂質ホスホリパーゼ C をコードする *ISCI* 遺伝子 (図 1 参照) の過剰発現の影響について解析を行った。その結果、*sur2 scs7* 二重破壊株の Cer-NSa を 100% とした場合、二重破壊の Cer-NS は 30%、*sur2 scs7 ydc1* 三重破壊株で 64%、*ISCI* を高発現させた *sur2 scs7 ydc1* 三重破壊株で 309% と順次増加した (図 5B)。以上の結果は、*hDES1* 遺伝子を *sur2 scs7* 二重破壊株に導入することによって、ヒト型セラミドである Cer-NS が産生されること、および Cer-NS を酵母で効率的に産生させるには *YDC1* との三重破壊と *ISCI* の高発現が有効であることを示唆している。

4. 総括

本研究では、まず *hDES1* 遺伝子を *sur2* 破壊株および *sur2 scs7* 二重破壊株に形質転換させるとスフィンゴシン骨格を有するスフィンゴ脂質が合成されることが示された。また *hDES1* 遺伝子を *sur2 scs7* 二重破壊株に形質転換させることによりヒト型セラミドである Cer-NS が産生されること、Cer-NS をより効率的に産生させるには *YDC1* との三重破壊と *ISCI* の高発現が有効であることが示唆された。以上の結果より、出芽酵母を用いてヒト型セラミドを産生する基盤的システムが構築できたといえる⁷⁾。今後、この Cer-NS 合成システムをより効果的なシステムに最適化することにより、実用化可能なシステムの開発が期待される。

謝辞

本研究に対してご支援を頂いた財団法人コスメトロジー研究振興財団に深く感謝致します。また本研究の遂行にご尽力頂いた広島大学大学院生物圏科学研究科とサントリー株式会社先進コア技術研究所の共同研究者の皆様へ厚く御礼申し上げます。

(参考文献)

- 1) Zanolari B, Friant S, Funato K, et al. : Sphingoid base synthesis requirement for endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*, EMBO J., 19, 2824-2833, 2000.
- 2) Funato K, Lombardi R, Vallee B, et al.: Lcb4p is a key regulator of ceramide synthesis from exogenous long chain sphingoid base in *Saccharomyces cerevisiae*, J. Biol. Chem., 278, 7325-7334, 2003.
- 3) Haak D, Gabel K, Beeler T, et al.: Hydroxylation of *Saccharomyces cerevisiae* ceramides requires Sur2p and Scs7p, J. Biol. Chem., 272, 29704-29710, 1997.
- 4) Triola G, Fabrias G, Dragusin M, et al: Specificity of the dihydroceramide desaturase inhibitor N-[(1R, 2S)-2-hydroxy-1-hydroxymethyl-2- (2-tridecyl-1-cyclopropenyl) ethyl]octanamide (GT11) in primary cultured cerebellar neurons, Molecular Pharmacology, 66, 1671-1678, 2004.
- 5) Funato K, Vallee B, Riezman H: Biosynthesis and Trafficking of sphingolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Biochemistry, 41, 15105-15114, 2002.
- 6) Ternes P, Franke S, Zahringer U, et al: Identification and characterization of a sphingolipid $\Delta 4$ -desaturase family, J. Biol. Chem., 277, 25512-25518, 2002.
- 7) 児玉由紀子、永野秀昭、船戸耕一、形質転換酵母を用いるセラミドの製造方法、特願 2005-351366

アミロース工学による分子認識性ナノゲル微粒子の設計と応用

東京医科歯科大学生体材料工学研究所

秋吉 一成

Synopsis: Stimuli-responsive molecular assembly systems have attracted considerable attention in the fields of biotechnology and drug delivery systems. Typically, the external stimulus is heat, pH, light or the addition of molecules, such as glucose or cyclodextrin. Enzymes are also used to trigger the response of a system. We report here new enzyme-responsive micellar systems in which an enzymatic reaction controls the amphiphilicity of the surfactants. The surfactants in our study consist of a short alkyl chain and a maltooligomer as a primer which can be synthesized enzymatically. In the presence of phosphorylase and α -D-glucose-1-phosphate (G1P), the elongation reaction of the saccharide chain proceeds from the non-reducing 4-OH terminus of the (α 1 \rightarrow 4)-glucan chain. Thus, we first prepared amylose-primer surfactants (C8MP, C12MP, C16MP) where an alkyl group (C8, C12, C16) is linked to the reduced terminus of maltopentaose (MP, number of glucose units (GU) = 5). The surfactants form micelles in water, which are dissociated upon the enzymatic elongation reaction of the sugar moiety. The association of amylose primer surfactants was controlled by changing the amphiphilicity with a chain-elongation reaction triggered by the addition of phosphorylase. We demonstrate here that by using this property the micelle-to-vesicle transition of mixed lipid/ primer systems can be controlled, and this presents a new method for the reconstitution of transmembrane protein to liposome.

1. 緒言

生分解性を有するアミロースは水溶液中において螺旋構造を形成し、その中に疎水性の低分子を包接しうる興味ある高分子ホストである。アミロースはまた、グルコース残基5つからなるマルトペンタオースをプライマーとして、ホスホリラーゼを用いた酵素触媒重合により合成できる^[1, 2]。この反応は非還元末端から進行することから還元末端の修飾により、様々なアミロース誘導体の合成が可能である^[3-6]。

我々はこれまでにポリエチレンオキシド (PEO) 修飾プライマーを合成し、酵素重合法により両親媒性の PEO-アミロースブロックコポリマーを合成した。この PEO-アミロースがククロホルム中にてアミロース部位を内核とした会合体を形成し、特異な包接挙動を示すことを明らかにした^[6]。食品やドラッグデリバリー分野ではすでに利用され安全性も高いアミロースの自己組織化制御による機能発現、ナノバイオマテリアル創製はより広範な利用の途が開かれるものと期待される。

本研究ではマルトペンタオースにアルキル鎖 (アルキル鎖長 = 8, 12, 16) を化学置換した両親媒性アルキル置換プライマー (C8-MP, C12-MP, C16-MP) を合成し、その水中での会合挙動、ホスホリラーゼを用いた酵素重合に

よる会合構造の制御、およびそのバイオテクノロジー応用について検討した。

2. 実験

2.1 アルキル置換アミロースプライマーの合成とキャラクタリゼーション

マルトペンタオースの還元末端を既存の方法によりラクトン化し、マルトペンタオースラクトンを得た (図1)。

その後、マルトペンタオースラクトン / エチレングリコール溶液にアルキルアミン / エチレングリコール溶液を滴下し、窒素雰囲気化にて70℃で6時間攪拌することで、アルキル鎖長が8, 12, 16のC8-MP, C12-MP, C16-MPを得た。

構造解析は¹H-NMR, FT-IR, MSより行った。次に表面張力測定により各アルキル置換プライマーの臨界ミセル濃度 (CMC) を決定した。またC12-MP, C16-MPの水溶液中における会合挙動を多角度光散乱測定 (MALS) 測定により評価した。

2.2 アルキル置換プライマーを用いた筋肉ホスホリラーゼによる酵素重合

合成した各プライマーを用いて筋肉ホスホリラーゼによる酵素重合を行った (図2)。

各プライマーまたはマルトペンタオース (1.0mM)、G-1-P (100mM)、AMP (10mM)、筋肉ホスホリラーゼ (0.26 μ M) となるように pH6.2 の 100mM Bis-Tris buffer に溶解し、40℃にて重合を開始した。所定の時間における反応液を用いて遊離リン酸の定量を行い、重合度を求めた。



Amylose engineering: Design of nanogel particles with molecular recognition

Kazunari Akiyoshi

Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

2.3 アルキル置換プライマーの酵素重合による動的構造変化

酵素重合による C12-MP ミセルの崩壊挙動を重合条件下における表面張力変化および重合度より評価した。

2.4 アルキル置換プライマーの酵素重合によるリポソームの再構成

DPPC (1mM) および C12-MP (1mM) を G-1-P (100mM)、AMP (10mM)、筋肉ホスホリラーゼ (1.3 μ M) を含む pH6.2 の 100mM Bis-Tris buffer (1mL) に溶解し、40 $^{\circ}$ C にて重合を開始した。各時間における溶液を採取し、0.80

μ m のフィルターを通した後、動的光散乱 (DLS) 測定を行い粒径を評価した。TEM 観察は 0.5% の酢酸ウランにより染色後、100kV で行った。

3. 結果および考察

3.1 プライマーの合成とキャラクタリゼーション

1 H-NMR、MS スペクトルより、アルキルプライマーの合成をそれぞれ確認した。

合成の結果、それぞれ収率 50%、39%、20% で C8-MP、C12-MP、C16-MP を得た (表 1)。

両親媒性プライマーは表面張力測定からミセルを形

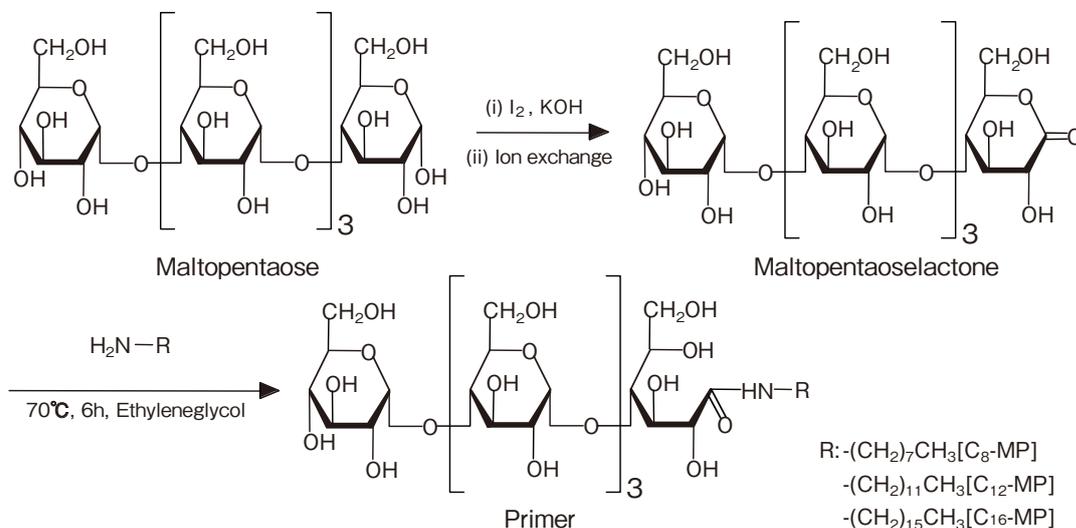


図1 アルキル化アミロースプライマーの合成

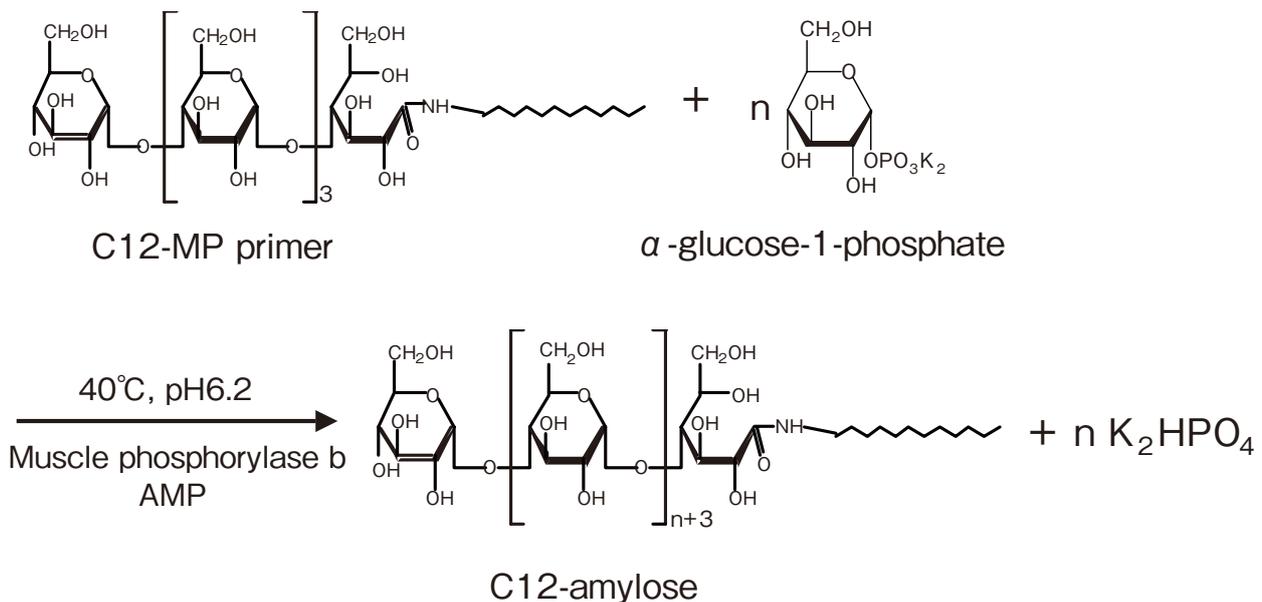


図2 C12-MP プライマーの酵素重合

成していることが示唆され、CMCは、それぞれC8-MP=10mM、C12-MP=0.5mM、C16-MP=0.05mMであることが明らかとなった。静的光散乱測定による求められた会合体の分子量から、C12-MPでは会合数が約68分子のミセルをC16-MPでは138分子からなるミセルをそれぞれ形成していることが示された。

3.2 プライマーの酵素重合

図3より1mMの各プライマー存在下にて筋肉ホスホリラーゼを用いた酵素重合ではC12-MPにおいて酵素重合がマルトペンタオースに比べ、約4倍早く進行した。リン定量により求められた重合度の値は¹H-NMRより計算された重合度とほぼ一致することが確かめられた。また、糖鎖の伸長はマススペクトル(MS)より確認され、分子量分布も狭いことが分かった。

いずれの系でもCMCより低い濃度、すなわちモノマーとして存在する濃度では、重合速度は、アルキル鎖を導入していない未修飾のマルトペンタオース(MP)とほぼ等しかった。一方、C8-MPとC12-MPをCMCよりも高い濃度で重合させた場合には、未修飾MPよりも反応が加

速された。これは、ミセル表面で基質の濃縮効果によるものと思われる。一方、C16-MPではCMCよりも高い濃度では重合反応はむしろ抑制された。本酵素反応の律速は、ミセルから基質プライマーが引き抜かれ、酵素活性点へ取り込まれる段階であると考えられる。疎水性が高く最も安定なミセルを形成するC16-MP系では、ミセルへの引き抜きが抑制され結果的に反応が抑制されたものと考えられた。プライマーの会合状態により、酵素反応が制御しえることが明らかになった。

また、ホスホリラーゼbはAMPが存在することで活性型となり重合を開始することから、AMP分子応答性のミセルともいえる。

3.3 酵素重合によるミセル構造の動的変化

C12-MPミセル(1mM)系での酵素重合反応の時間変化を詳細に観測したところ、重合および表面張力は時間とともに、初期の早い反応過程とその後ある時間経過後の遅い反応の二段階で進行することが明らかになった(図4)。

これは糖鎖の伸長により親水性が増大し、ミセル臨界濃度が増加し、最終的にはC12-MPミセルが崩壊したものと

表1 アルキル置換アミロースプライマーの合成およびキャラクタリゼーション

Abb.	アルキルアミン ¹⁾ (mmol)	エチレングリコール (mL)	収率 (%)	CMC ²⁾ (mM)
C8-MP	6.0	18	50	10
C12-MP	6.0	18	39	0.5
C16-MP	6.0	21	20	0.05

1) マルトペンタオースの仕込量：1.2mmol

2) 表面張力測定による

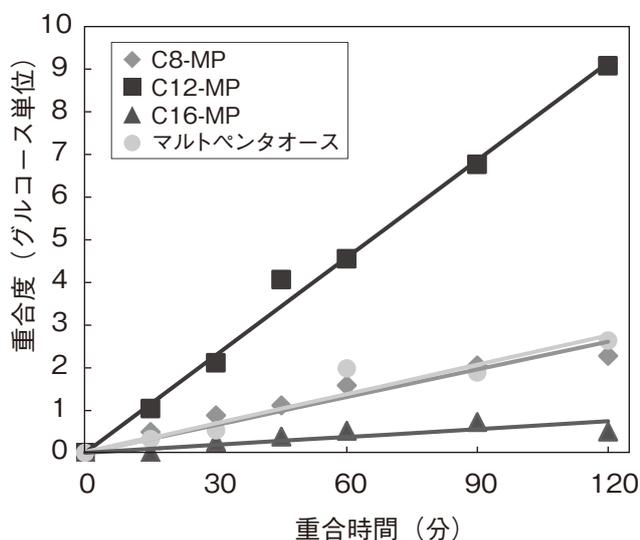


図3 各プライマーの酵素重合

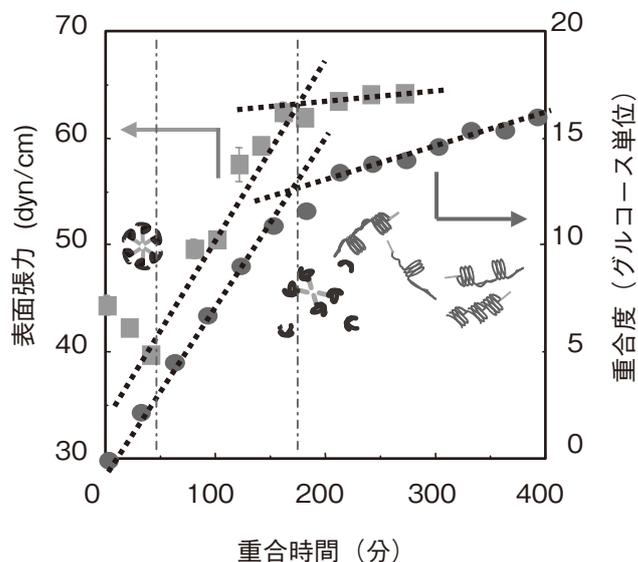


図4 C12-MPの酵素重合による表面張力変化

いえる。今回行った表面張力測定では40分後から160分後に急激な変化が見られたことから、その中間点である100分後の重合度(DP = 9)あたりからミセルの崩壊が始まり、180分後の重合度(DP = 17)でミセルは完全に崩壊していると考えられた。

3.4 ミセルベシクル転移の酵素反応制御：新規リポソーム合成法

リン脂質-界面活性剤系における酵素応答性ミセルベシクル転移についても検討した。リン脂質とC12-MPを混合すると動的光散乱測定より粒径21.1nmの混合ミセルが形成することがわかった。この溶液に酵素処理を行うと、時間とともに会合体の粒径が増加し、重合時間が2時間を経過すると(重合度14)比較的サイズの揃った約100nmのリポソームが形成した。C12-MPの糖鎖の伸長に伴って、その親水性が増加して界面活性剤としての性質が失われ、会合体から除去され結果的にリン脂質のみからなるリポソームへと転移したものと考えられる。

この重合条件における混合ミセルの重合速度はMPの1.5倍であった。電子顕微鏡観察からもサイズの揃ったリポソーム形成が確認された。これは、リポソーム形成法として従来にない新しい手法である。

C12-MPミセルは、バクテリオロドプシン(BR)を可溶化した。このBRを含むミセル溶液にC12-MP-リン脂質(DPPC)混合ミセルを加えた。この溶液に対して、グルコース-1-リン酸および筋肉ホスホリラーゼ存在下酵素重合を2時間行ったところ、約150nmのロドプシン再構成リポソームが調製しえた。この再構成されたロドプシンは、プロトンポンプ活性を有しており、本システムが、新規な膜タンパク質再構成リポソーム調製法として有効であることが明らかになった。

4. 総括

以上のように、糖鎖界面活性剤は、水中、中性pHという穏和な条件下でホスホリラーゼ酵素による糖鎖伸長反応により分子の親水性-疎水性を変化させ、その集合特性、界面特性を制御しえることが明らかになった。これら界面活性の制御は、材料表面へのコーティング、物質可溶化、エマルジョン作成はもとより近年のマイクロ計測における流れやぬれの制御などにおいて重要であろう。この新規酵素応答性界面活性剤を持ちうることで、コロイド化学のみならず、タンパク質再生や膜タンパク質再構成などのバイオテクノロジー分野での幅広い応用が期待できる。

(参考文献)

- 1) Whelan WJ, Bailey JM, : The action pattern of potato phosphorylase, Biochem. J. 58, 560-9, 1954.
- 2) Ziegast G, Pfannemueller B.; Linear and star-shaped hybrid polymers.4. Phosphorolyric synthesis with di-functional, oligo-functional and multifunctional primers, Carbohydr. Res., 160, 185-204, 1987.
- 3) Kobayashi K, Kamiya S.;Amylose-carrying styrene Macromonomer and its homo- and copolymers: Synthesis via enzyme-catalyzed polymerization and complex formation with iodine, Macromolecules 29, 8670-8676,1996.
- 4) Loos K, Stadler R.; Synthesis of Amylose-block-polystyrene rod-coil block copolymers, Macromolecules 30, 7641-7643, 1997.
- 5) Enomoto N, Furukawa S, Ogasawara Y, Akano H, Kawamura Y, Yashima E, Okamoto Y.; Preparation of silica gel-bonded amylose through enzyme-catalyzed

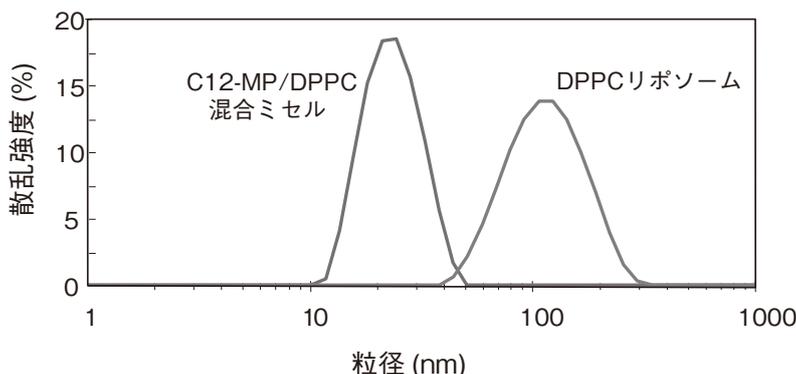


図5 C12-MP/DPPC 混合ミセルの酵素重合によるベシクル転移

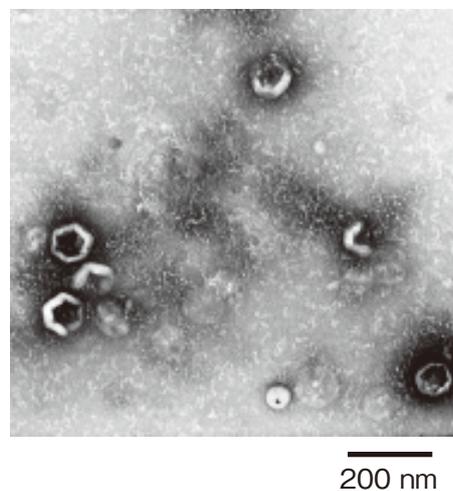


図6 C12-MP/DPPC 混合ミセルの酵素重合により得られたDPPCリポソームの電子顕微鏡像

polymerization and chiral recognition ability of its phenylcarbamate derivative in HPLC, *Anal. Chem.*, 68, 2798-2804, 1996.

6) Akiyoshi K, Maruichi N, Kohara M, Kitamura S.: Amphiphilic block copolymer with a molecular

recognition site: Induction of a novel binding characteristic of amylose by self-assembly of poly(ethylene oxide)-block-amylose in chloroform, *Biomacromolecules*, 3, 280-3, 2002.

脂質分子集合体の活性酸素種分解機能の解明による 新規な抗酸化系の構築

山口大学工学部応用化学工学科

吉本 誠

The structure and function of phospholipids are modified in the presence of reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide. An excess amount of the ROS is known to be decomposed enzymatically with catalase. To our knowledge, little is known on the role of phospholipid molecules in decomposing the ROS in the absence of the enzyme. In the present work, the decomposition of hydrogen peroxide at the initial concentration of 1.0 mM was examined at pH 7.4 in the presence of the various molecular assemblies of phospholipids. Phospholipids used were various phosphatidylcholines (PC) which were different in the number of carbon atoms in the acyl chains n as well as the degree of unsaturation. The saturated PCs ($n < 10$) forming monomers and micelles slightly enhanced the decomposition of hydrogen peroxide. In marked contrast, the PCs forming liposomes ($10 \leq n$) significantly enhanced the decomposition reaction with neither lipid peroxidation nor change in the size of liposomes. Therefore, the liposomes were suggested to undergo negligible physicochemical modifications in the presence of hydrogen peroxide. The steady-state fluorescence polarization of the probes incorporated in the liposome membranes was measured to clarify an effect of hydrogen peroxide on the fluidity of liposome membranes. The fluidity of the lipid-water interface in the liposomes was decreased by the presence of hydrogen peroxide. On the other hand, practically no effect of hydrogen peroxide was seen on the fluidity of the hydrophobic region in the membrane. These results obtained indicated that the liposome-mediated decomposition of hydrogen peroxide proceeded at the lipid-water interface of liposomes. In conclusion, it was revealed that the phospholipid bilayer membranes forming liposomes functioned as a novel antioxidant system which effectively decomposed hydrogen peroxide.

1. 緒言

過酸化水素をはじめとする活性酸素種は、生体内において種々の機能を制御する因子として重要である¹⁾。一方、過剰に生成蓄積した活性酸素は、脂質膜の過酸化を引き起こして疾病の原因となる²⁾。生体内では過酸化水素は通常カタラーゼ等の酵素により効率よく分解除去されている。一方、脂質膜自体が活性酸素に対して発現すると考えられる自己防御的な機能は殆ど知られていない。

著者らは、リポソーム内に封入されたグルコースオキシダーゼによるグルコース酸化反応を、酸素を連続的に供給する気泡塔バイオリクターの条件下で行い、共存するリポソーム内封入カタラーゼにより生成過酸化水素が効率よく分解されることを報告した³⁻⁵⁾。この酸化反応過程において、カタラーゼ分子のみならず、リポソームを構成する脂質二分子膜自体が過酸化水素の分解を促進していることが示唆された。脂質二分子膜は、タンパク質や水をはじめとする種々の生体分子と静電・疎水性相互作用や水素結合などにより複合体を形成して、脂質膜に結合した分子の構造に影響を及ぼすことが報告されている^{6,7)}。これまでに、

活性酸素による不飽和脂質分子の過酸化反応については豊富な知見が蓄積されている。一方、脂質分子が活性酸素の安定性にどのように影響するのかについては不明な点が多い。脂質の共存下における活性酸素の安定性を明らかにすることは、活性酸素に対する脂質膜の自己防御機能を解明して脂質膜を利用した新規な抗酸化系を構築する観点から重要であると考えられる。

本研究では、種々の疎水鎖長、不飽和度を有するホスファチジルコリンを用いてリン脂質モノマー、ミセル溶液及びリポソーム懸濁液を調製し、それらの脂質分子集合体がモデル活性酸素である過酸化水素の分解反応に及ぼす影響を検討した。また、脂質分子集合体の化学的安定性、粒子径及び膜流動性に及ぼす共存過酸化水素の影響を検討して、脂質分子集合体と過酸化水素の相互作用機構を推定した。

2. 実験

2.1 リン脂質

飽和リン脂質として、脂質親水部位 (Choline) が同一であるが、疎水鎖を構成する炭素数が異なる種々の diC_nPC (diacyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, $n=4, 6, 7, 8, 10, 12, 14$) を用いた。また、不飽和リン脂質として、1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) を用いた。

2.2 脂質分子集合体の調製

ナス型フラスコ内で脂質を有機溶媒に溶解した後、有機溶媒を留去してフラスコ壁面に脂質薄膜を形成させた。凍



A novel antioxidant system based on lipid assemblies-mediated decomposition of reactive oxygen species

Makoto Yoshimoto

Department of Applied Chemistry and Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Yamaguchi University

結乾燥機を用いて 8 Pa 以下の減圧下 (2 h) で有機溶媒をほぼ完全に留去した後、50 mM Tris-HCl/100 mM NaCl 緩衝液 (pH 7.4) で乾燥脂質膜を水和した。この操作により炭素鎖長の短い脂質 ($n \leq 8$) は、脂質濃度 10 mM において脂質モノマー溶液あるいは脂質ミセル溶液を形成した。リポソームを形成した脂質懸濁液について、大きな多重層リポソームを形成させるために、 -80°C で凍結及び 35°C で融解する操作を 7 回繰り返した。さらに、エクストルーダーを用いて平均細孔径が 400 nm、200 nm、100 nm、80 nm、50 nm、30 nm のポリカーボネート膜を 11 回通過させて種々の粒子径を有する一枚膜リポソームを調製した。脂質濃度は酵素法で測定し、調製した脂質分子集合体は -4°C で遮光保存した。

2.3 リン脂質共存下における過酸化水素の分解

脂質分子を溶解あるいは懸濁した Tris 緩衝液と過酸化水素水溶液を混合して、脂質と過酸化水素の濃度がそれぞれ 1.0 – 40 mM と 1.0 mM の溶液 1.0 – 1.5 mL を調製した。これをガラス製試験管に入れ、綿栓をして種々の温度に設定した恒温槽中に静置した。過酸化水素濃度の経時変化を後述の酵素法により 120 h 追跡した。

2.4 過酸化水素濃度の測定

過酸化水素濃度は、西洋ワサビ由来の Peroxidase (HRP) 触媒下の過酸化水素による *o*-dianisidine の酸化反応に基づき定量した³⁾。反応溶液中の HRP、*o*-dianisidine 及びコール酸ナトリウムの濃度は、それぞれ 5 μM 、3.3 mM 及び 10 mM とした。ここで、コール酸ナトリウムは、リポソームを溶解させ、リポソーム内水相の過酸化水素溶液を放出させるために添加した。 25°C において、460 nm の吸光度を測定して過酸化水素濃度を決定した。共存する脂質は、本定量に影響を及ぼさなかった。

2.5 脂質懸濁液の濁度測定

リポソーム粒子径及び粒子径分布の指標として、リポソームを懸濁した Tris 緩衝液の濁度を 600 nm、 25°C における吸光度 (OD_{600}) から評価した。初濃度 1.0 mM の過酸化水素と 120 h 共存させる前後のリポソーム懸濁液 ([lipid] = 10 mM) の濁度を測定した。

2.6 生成過酸化脂質量の評価

生成過酸化脂質量の指標として、過酸化脂質の二次反応生成物を定量することができるチオバルビツール酸 (4,6-dihydroxy-2-mercaptopyrimidine; TBA) 法⁸⁾を用いた。本測定は、脂質過酸化を受ける可能性がある不飽和脂質 POPC について行った。POPC リポソーム懸濁液 0.5 mL と 3.75 g/L TBA、150 g/L trichloroacetic acid, 0.25 M HCl

and 0.1 g/L 2,6-di-*t*-butyl-4-methylphenol (BHT) からなる TBA 試薬 2 mL とを混合した。POPC-TBA 試薬混合液を密閉したガラス製容器に入れ、15 分間沸騰後、水冷した。遠心分離 (1000 g, 15 分) した後、532 nm の吸光度を測定して過酸化脂質量の指標とした。

2.7 脂質膜流動性の評価

脂質二分子膜の親水部位と疎水部位に配向する蛍光プローブとして、Trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene iodide (TMA-DPH) と Diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) をそれぞれ用いた。脂質濃度 0.5 mM のリポソームと 0.4 μM の DPH あるいは 2.0 μM の TMA-DPH を混合して 24 h 静置後、過酸化水素 (10 mM) を添加して 5 h 後の分極率 P を蛍光分光光度計で測定した。 $1/P$ 値をリポソーム膜流動性の指標とした。

3. 結果

3.1 リポソームの過酸化水素分解機能

Fig. 1 に 25°C において脂質を含有しない Tris 緩衝液 (pH 7.4) 及び平均直径 100 nm の POPC リポソームを種々の濃度で懸濁した Tris 緩衝液中の過酸化水素濃度の経時変化を示す。初期過酸化水素濃度は 1.0 mM である。脂質非共存系では、過酸化水素は 120 h の間 90% 以上が分解せずに安定に存在している。これより、過酸化水素分解の要因となり得る緩衝液中の不純物金属イオン及び試験管壁の影響は無視できることがわかる。一方、POPC リポソーム懸濁系では、過酸化水素の分解反応が促進されている。リポソームの過酸化水素分解促進効果は、高脂質濃度条件下ほど顕著である。100 μM Fe^{2+} イオン共存下において過酸化水素は 25 h で 90% 以上が分解した (データ省略)。これは、

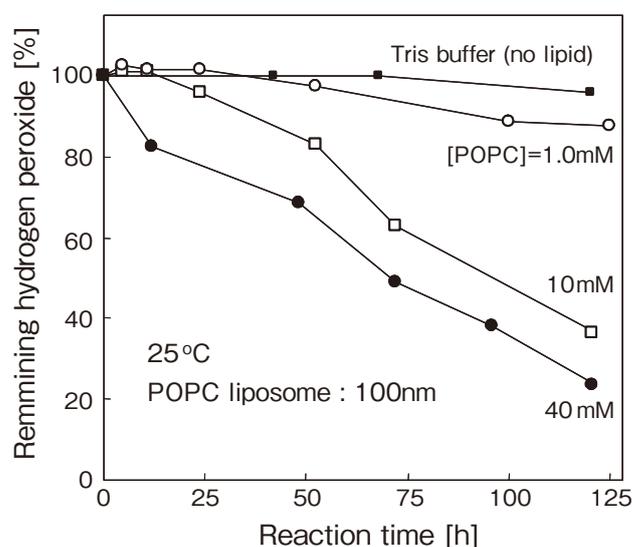


Fig. 1 初濃度 1.0 mM 過酸化水素の分解に及ぼす共存 POPC リポソームの影響 (25°C , pH 7.4)

Fe²⁺ イオンによりラジカル種が生成して過酸化水素の分解反応が著しく促進されたためである。リポソーム共存による過酸化水素分解反応速度はFe²⁺ 共存下の分解反応の場合に比べて小さいことがわかった。

3.2 過酸化水素共存下におけるリポソームの物理化学的特性の変化

30-400nm の平均粒子径を有するPOPC リポソームと過酸化水素を120h 共存させた後にリポソーム懸濁液の濁度を測定して、過酸化水素共存前のそれぞれの濁度と比較した。結果をTable 1 に示す。リポソーム懸濁液の濁度は過酸化水素の共存により僅かに増加しているものの、120 h 静置中に一部のリポソーム間において凝集体が形成することを考慮すると、過酸化水素はリポソーム懸濁液の濁度に殆ど影響しないとみなすことができる。すなわち、リポソーム粒子径が共存過酸化水素の分解反応中に殆ど変化しないことがわかる。また、POPC リポソームと過酸化水素を120h 共存させた後に過酸化脂質生成量をTBA法で評価したところ、POPCは過酸化されていないことがわかった。以上の結果より、リポソームは過酸化水素共存下において物理化学的な修飾を受けることなく過酸化水素の分解反応を促進していると考えられる。

3.3 種々の脂質分子集合体の過酸化水素分解機能

脂質分子の会合状態と脂質の炭素鎖の特性が共存する過酸化水素の分解反応に及ぼす影響を検討した。脂質濃度を10mMの一定として、脂質と初濃度1.0mMの過酸化水素を120h 共存させたときの残存過酸化水素濃度をFig. 2 に示す。分解反応はpH7.4、25°Cの条件下で行った。脂質は、炭素鎖長*n*により、モノマー溶液 (*n*=4, 6)、ミセル溶液 (*n*=7, 8)⁹⁾ 及びリポソーム懸濁液 (*n*=10, 12, 14, POPC) を形成した。リポソームの平均粒子径は100nmとした。脂質によるリポソームの形成は濁度から判定した。Fig. 2において、脂質モノマーおよび脂質ミセル溶液中では、脂質を添加していないTris緩衝液系よりも過酸化水素の分解がやや促進されている。一方、リポソーム懸濁液中では、脂質モノマー、ミセル溶液中に比べて過酸化水素の分解が著しく促進されている。これより、脂質が発現する過酸化水素分解活性は脂質分子の集合状態に依存し、リポソームが最も高い活性をもつことがわかった。また、リポソームを形成する脂質の種類により、リポソームの過酸化水素分解促進効果が異なることがわかる。diC₁₄PCから形成されるリポソームは最も高い過酸化水素分解促進効果を示している。

Table 1 リポソーム懸濁液濁度に及ぼす共存過酸化水素の影響

リポソーム平均直径 [nm]	OD ₆₀₀ (過酸化水素非共存下)	OD ₆₀₀ (過酸化水素と120h 共存後)
50	0.22 ± 0.06	0.24 ± 0.07
100	0.39 ± 0.05	0.54 ± 0.23
200	0.79 ± 0.08	1.05 ± 0.25
400	2.13 ± 0.21	2.13 ± 0.09

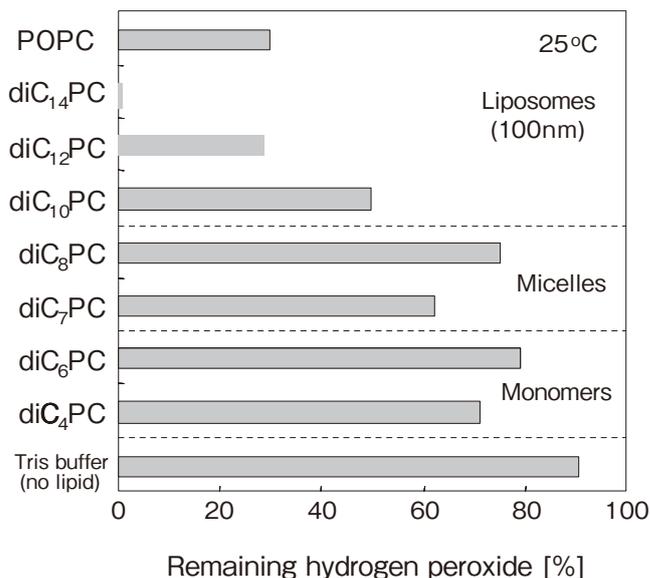


Fig. 2 1.0 mM 過酸化水素の分解に及ぼす種々の脂質分子の会合状態の影響 ([lipid] =10 mM, 25°C, pH 7.4)

3.4 リポソームの過酸化水素分解活性に及ぼす脂質膜相状態の影響

Fig. 3 に diC₁₄PC から形成される平均粒子径 100 nm のリポソームを 15–35 °C で初濃度 1.0 mM 過酸化水素と 120 h 共存させたときの残存過酸化水素量を示す。diC₁₄PC 膜がゲル相から液晶相へ転移する温度 T_m は 23 °C 付近である。リポソーム非共存系では、各温度において過酸化水素は安定である。リポソーム共存系では、全ての温度において過酸化水素の分解が促進されているが、15 °C ではリポソームの共存効果がやや小さくなる傾向が認められる。これより、液晶相の状態にあるリポソーム膜は共存過酸化水素の分解促進に有利であることが示唆される。

3.5 リポソームによる過酸化水素分解機構

リポソームと過酸化水素間の相互作用を効率よく検出するために、種々のリポソーム ([lipid] = 0.5 mM) を初濃度 10 mM の過酸化水素と 5 h 接触させ、H₂O₂/lipid モル比が高い条件下で膜流動性を測定した。Fig. 4 に異なる粒子径の POPC リポソームを用いたときに得られた結果を示す。いずれのリポソームでも疎水部位の流動性は親水部位に比べて高く、過酸化水素に殆ど影響を受けていない。一方、親水部位の流動性は、いずれの場合も過酸化水素の添加により僅かに減少している。この結果は、過酸化水素分子が脂質膜の親水部位（リポソーム膜表層）に結合して分解作用を受けることを示唆している。

4. 考察

POPC リポソームを過酸化水素と共存させた後に過酸化脂質の生成およびリポソーム径の変化が認められなかった (Table 1)。したがって、リポソームによる過酸化水素分解反応では、リポソーム自体が物理化学的に変化すること

なく、リポソームが触媒的に作用していることが示唆される。Fig. 1 で用いた 1.0 mM の過酸化水素は酵素カタラーゼを触媒とすると速やかに分解されることから、リポソームが発現する過酸化水素分解活性は微弱であり、低濃度の過酸化水素に対する脂質膜の自己防御的な機能として捉えることができる。脂質分子が過酸化水素の分解反応を効率よく促進するのは、脂質分子がリポソームを形成するときである (Fig. 2)。リポソームの脂質二分子膜は、数万から数十万の脂質分子が高密度かつ秩序的に集合して形成する安定な会合体であるのに対し、脂質ミセルはミセル間の脂質分子の組み換えが容易な不安定な会合体である。すなわち、脂質分子集合体内において分子の配向性と密度が高いことが過酸化水素分解活性の発現に寄与すると考えられる。また、Fig. 3 の結果は、diC₁₄PC から形成されるリポソームがゲル状態に比べて液晶状態にある場合に高い過酸化水素分解促進機能を示すことを示している。相転移温度が室温付近である diC₁₄PC リポソームの過酸化水素分解機能についてはさらに詳細な検討が必要である。

過酸化水素の共存による脂質膜親水部位の流動性の低下 (Fig. 4) より、過酸化水素分子がリン脂質親水部位と複合体を形成して、脂質分子の回転運動を阻害しているものと推測される。すなわち、過酸化水素の分解はリポソーム外膜-液本体及びリポソーム内膜-リポソーム内水相の各界面で行うと推定される。

リポソーム膜が発現する過酸化水素分解活性を最大限に高めることができれば、リポソームを安定な抗酸化素子として活用できると考えられる。例えば、リポソームとカタラーゼを複合化した過酸化水素分解素子は、気泡塔バイオリアクターの条件下において、酸化酵素反応で副生する過酸化水素を効率よく安定に分解除去する機能を発現することを明らかにしている⁵⁾。

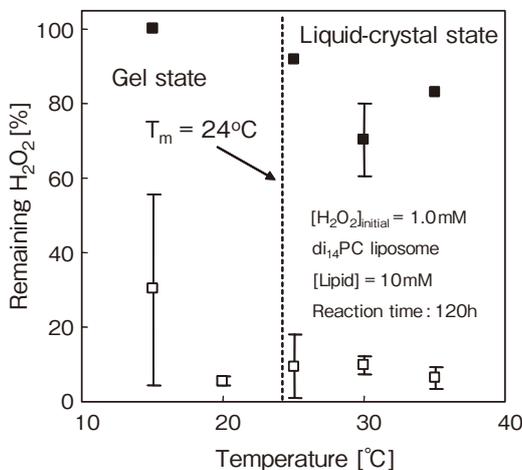


Fig. 3 DMPC リポソームの過酸化水素分解機能に及ぼす温度の影響 (■: 脂質非共存下、□: 脂質共存下、[lipid] = 10 mM, pH 7.4)

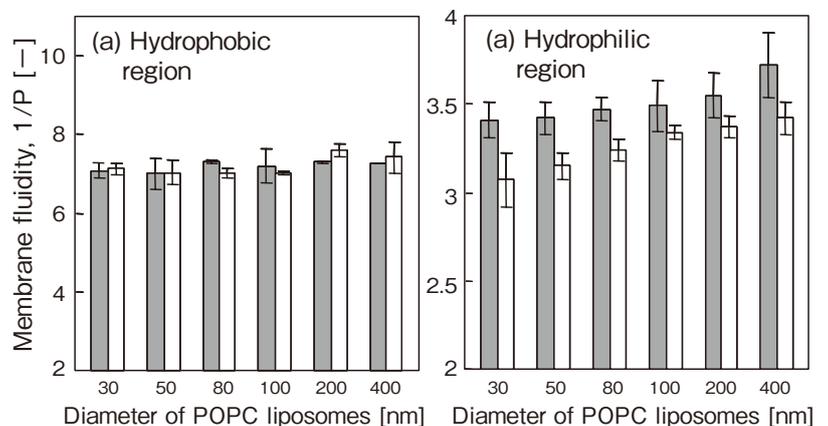


Fig. 4 POPC リポソームの (a) 疎水部と (b) 親水部の膜流動性の変化 (過酸化水素添加前 (■), 添加後 (□))

(参考文献)

- 1) Schallreuter, K. U., Elwary, S. M., Gibbons, N. C., Rokos, H. and Wood, J. M., Activation/deactivation of acetylcholinesterase by H₂O₂: more evidence for oxidative stress in vitiligo. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **315**, 502-508 (2004)
- 2) Emerit, J., Edeas, M. and Bricaire, F., Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed. Pharmacotherapy*, **58**, 39-46 (2004)
- 3) Yoshimoto, M., Miyazaki, Y., Sato, M., Fukunaga, K., Kuboi, R. and Nakao, K., Mechanism for high stability of liposomal glucose oxidase to inhibitor hydrogen peroxide produced in prolonged glucose oxidation. *Bioconjugate Chem.*, **15**, 1055-1061 (2004)
- 4) Yoshimoto, M., Wang, S., Fukunaga, K., Fournier, D., Walde, P., Kuboi, R. and Nakao, K. Novel immobilized liposomal glucose oxidase system using the channel protein OmpF and catalase. *Biotechnol. Bioeng.*, **90**, 231-238 (2005)
- 5) Yoshimoto, M., Miyazaki, Y., Kudo, Y., Fukunaga, K., Nakao, K. Glucose oxidation catalyzed by liposomal glucose oxidase in the presence of catalase-containing liposomes. *Biotechnol. Prog.*, **22**, (2006)
- 6) Paleos, C. M. and Tsiourvas, D., Molecular recognition and hydrogen-bonded amphiphiles. *Top. Curr. Chem.*, **227**, 1-29 (2003)
- 7) Kuboi, R., Yoshimoto, M., Walde, P. and Luisi, P. L., Refolding of carbonic anhydrase assisted by 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine liposomes. *Biotechnol. Prog.*, **13**, 828 (1997)
- 8) Genot, C., Metro, B., Viau, M. and Bouchet, B., Characterisation and stability during storage of liposomes made of muscle phospholipids. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, **32**, 167-174 (1999)
- 9) Hauser, H., Short-chain phospholipids as detergents. *Biochim. Biophys. Acta*, **1508**, 164-181 (2000)

ショウガ成分誘導体の抗酸化作用と遺伝子発現誘導作用

同志社大学工学部（前・東京大学先端科学技術研究センター）

野口 範子

Ginger is the rhizome of *Zingiber officinale* Roscoe, a plant cultivated in tropical and subtropical countries. Ginger extract contains many kinds of constituents, such as gingerol, shogaol, and gingediol, responsible for the pungent taste of ginger and has been known to possess a variety of pharmaceutical effects. The present study was conducted to evaluate antioxidant activities of some of ginger constituents and their synthetic derivatives (thirteen compounds) and to find out novel functions of these compounds in cell. All phenolic compounds inhibited lipid peroxidation of methyl linoleate and low density lipoprotein (LDL). A hydrophilic group at the end of side chain decreased antioxidant activity in LDL. The compounds with longer side chain showed stronger antioxidant activity. A global study of gene expression using DNA microarray in endothelial cell exposed to ginger-related compounds revealed that compounds having α,β -unsaturated carbonyl, eg. shogaol, strongly induced expression of genes which were regulated by Keap-1/Nrf2/ARE pathway. The side chain effects on gene expression was not as large as observed in antioxidant activity. Nrf2-regulated genes encode cytoprotective proteins against oxidative stress, which may explain a part of pharmaceutical effects of ginger extract.

1. 緒言

ショウガはインドや東南アジア原産の宿根草で、古来より漢方の多くの処方に配合されている。ショウガには「生姜」と「乾姜」があり、それぞれ薬効に違いがあるとされ、使い分けられている。日本では古くから、調味や薬味として親しまれているが、日本で用いられている「生姜」は厳密には「乾生姜」に相当する。本稿ではこれらすべてを含めショウガと総称することとする。

ショウガには解毒や解熱作用があり、頭痛や咳、痰、鼻づまりなど風邪の諸症状を緩和したり、胃痛、腹痛、嘔気を鎮めるなど多岐にわたる効能が知られ、薬理作用について詳細な研究がされている¹⁾。さらに、肌の美白作用もあるとされコスメトロジーの分野においても非常に興味深い食材料である。ショウガの成分としては、精油や辛味成分が知られている。精油は食品や化粧品の香料としてよく用いられている。辛味成分としては gingerol 類、shogaol 類がある。本研究は後者の成分である gingerol 類、shogaol 類とその誘導体の抗酸化作用と血管内皮細胞に対する作用を明らかにすることを目的としておこなった。

2. 実験

2.1 試薬

本研究に用いたショウガ成分の誘導体の化学構造式を



Activity of Shogaol Derivatives as Antioxidant and Gene Expression Regulator

Noriko Noguchi

RCAST, University of Tokyo
(Faculty of Engineering, Doshisha University)

Fig. 1 に示した。これらの化合物は東亜合成株式会社より供与された。ヒト臍帯静脈内皮細胞 human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) と培養液は Clonetics 社から購入した。DNA マイクロアレイ用の GeneChip, Human Genome Focus Array は Affymetrics 社から購入した。その他の試薬は和光純薬から購入した。

2.2 抗酸化作用の評価

ショウガ成分の誘導体の脂質酸化に対する抗酸化作用について、リノール酸メチルのアセトニトリル均一溶液中、リン脂質のリボソーム膜、そしてリポタンパク質の酸化に対して評価をおこなった。低比重リポタンパク質 (LDL) の精製、分析および解析は研究室の常法に従った²⁾。

2.3 内皮細胞における遺伝子発現の解析

HUVEC (1×10^5 cells) に対して、エタノールに溶解したカルボン酸型ショウガオール ([8]-Shogaol-COOH)、[6]-OCH₃-Gingediol そして [6]-OCH₃-Gingerol を終濃度 5 μ M になるように添加し、6 時間後に細胞から RNA を回収して DNA マイクロアレイに供した³⁾。

2.4 Real-time PCR

ショウガ誘導体によって大きく誘導された遺伝子について、Real-Time PCR を用いて再現性の確認を行った。また、DNA マイクロアレイで検討した化合物以外のショウガ誘導体について、遺伝子誘導能を調べるために用いた⁴⁾。

2.5 Western blot

ショウガ誘導体を添加 6 時間後の細胞を溶解し、電気泳動をおこなった後、転写因子 Nrf2 に対する抗体 (Sant Cruz 社) を用いて Western blot を行った⁴⁾。

2.6 LDL 受容体欠損マウスへのショウガ成分投与

[8]-Shogaol-COOH、[6]-OCH₃-Gingediol、そして天然の [8]-Shogaol を 2% コレステロール負荷した基本食餌に 5% 重量で添加し、自発的摂取で 4 週間与えた。大動脈弁から腹部大動脈までを取り出し、ホルマリン固定後、オイルレッド染色を行った。

3. 結果

3.1 リノール酸メチルの酸化に対する抑制作用

生姜には [6]-gingerol や [8]-gingerol が多く含まれるが、乾燥度の増加や精製の過程で脱水がおこるとそれぞれに対応する [6]-shogaol や [8]-shogaol が 10 : 1 で回収されるようになる (Fig. 1)。本研究ではこれらの天然ショウガ成分の誘導体 3 種、[8]-Shogaol-COOH、[6]-OCH₃-Gingediol そして [6]-OCH₃-Gingerol を合成し、これらのリノール酸メチルのアセトニトリル均一溶液中におけるラジカル酸化に対する抗酸化作用の評価を行なった。ラジカル捕捉型抗

酸化物質の代表のひとつである α -トコフェロールを対照とした。リノール酸メチルはラジカル開始剤から放出されるラジカルにより酸化し、234nm に吸収をもつ酸化生成物を与える (Fig. 2, none)。 α -トコフェロールはその高いラジカル捕捉能によって酸化を効率よく抑制し、 α -トコフェロールが消費されると抗酸化物がないときと同じ酸化速度にもどる。これに対して、3 種類のショウガ成分誘導体は酸化を抑制するがその抑制能は小さかった。また、3 種間に酸化抑制作用に大きな差は認められなかった。

3.2 LDL の酸化に対する抑制作用

酸化 LDL は動脈硬化の主要な危険因子である。LDL の脂溶性ラジカル開始剤による酸化に対する 3 種ショウガ成分誘導体の抗酸化作用を調べた。均一溶液中での脂質酸化とは異なり、[6]-OCH₃-Gingediol と [6]-OCH₃-Gingerol は強い抗酸化作用を示した (Fig. 3)。これに対して、[8]-Shogaol-COOH も酸化を抑制したが、その作用は他の

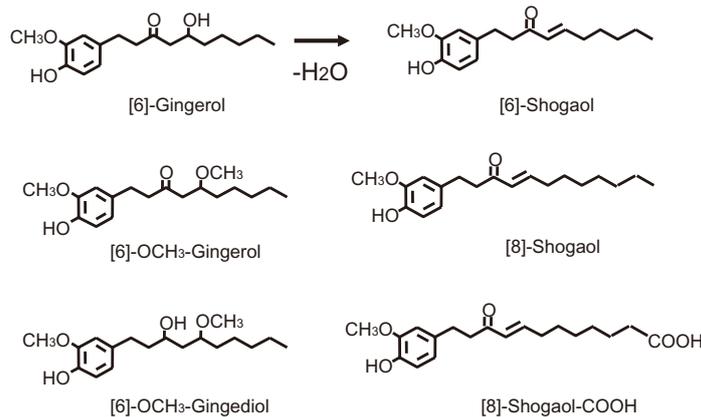


Fig.1 Chemical structure of constituents in ginger extract and their synthetic derivatives

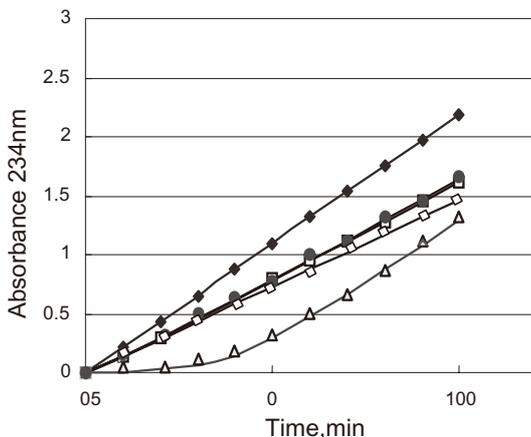


Fig.2 Antioxidant effect of [8]-Shogaol-COOH, [6]-OCH₃-Gingerol, and [6]-OCH₃-Gingediol on oxidation of methyl linoleate. Increase in absorption at 234 nm in the oxidation of methyl linoleate (15mM) induced by 0.5mM AMVN in acetonitrile at 37 °C .
 ◆ : control; △ : 1 μ M α tocopherol; ◇ : 5 μ M [8]-Shogaol-COOH;
 ● : 5 μ M [6]-OCH₃-Gingerol; □ : 5 μ M [6]-OCH₃-Gingediol

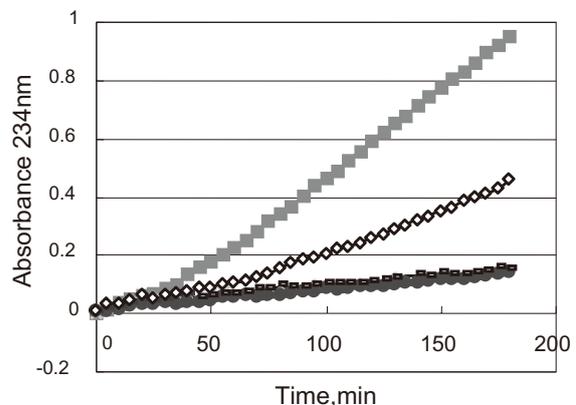


Fig.3 Antioxidant effect of [8]-Shogaol-COOH, [6]-OCH₃-Gingerol, and [6]-OCH₃-Gingediol on LDL oxidation. Increase in absorption at 234nm in the oxidation of LDL (0.1 mg/ml) induced by 0.4mM AMVN in PBS (pH7.4) at 37 °C .
 ■ : control; ◇ : 5 μ M [8]-Shogaol-COOH; ● : 5 μ M [6]-OCH₃-Gingerol; □ : 5 μ M [6]-OCH₃-Gingediol

2種よりも劣っていた。[8]-Shogaol-COOHと[6]-OCH₃-Gingediolおよび[6]-OCH₃-Gingerolとの化学構造の違いは側鎖にある。そこで、Fig. 4Aに示すようにGingediolの側鎖に修飾を加えた化合物を合成し、側鎖の化学構造のちがいがLDLの酸化に対する抑制効果に及ぼす影響を検討した。その結果、[6]-OCH₃-Gingerolの側鎖末端に-OH基をつけると([6]-OCH₃-Gingerol-OH)、抗酸化効果が大きく低下することがわかった(Fig. 4B)。しかし、同じく末端に-OH基をもつが炭素鎖の長さをのばすと([8]-OCH₃-Gingerol-OH)、抗酸化効果は[6]-OCH₃-Gingerol-OHよりも優れ、[6]-OCH₃-Gingerolに近づいた。

フェノール性の抗酸化物の抗酸化活性部位は、通常フェノール基(ベンゼン冠の-OH基)にあるが、ショウガ成分誘導体についてこの点を確認するためにPhenyl-[8]-Shogaol-COOHを合成し、LDLの酸化に対する抑制作用を調べた(Fig. 5A)。Phenyl-[8]-Shogaol-COOHはLDLの酸化をほとんどまったく抑制しなかった(Fig. 5B)。

3.3 血管内皮細胞の遺伝子発現誘導に及ぼす化学構造

ショウガ成分の誘導体の血管内皮細胞の遺伝子発現に及ぼす影響を網羅的に解析するために、ヒト遺伝子約一万個に対するプローブを搭載したGeneChipを用いて[8]-Shogaol-COOH、[6]-OCH₃-Gingediolそして[6]-OCH₃-Gingerolによる遺伝子発現誘導を調べた(Table 1)。その結果、非常に興味深いことに、[8]-Shogaol-COOHのみが遺伝子発現を大きく誘導することがわかった。[8]-Shogaol-COOHによって誘導される遺伝子の上位は、

転写因子Nrf2によって制御されることが知られている遺伝子によって占められていた。これらの遺伝子発現に[6]-OCH₃-Gingediolや[6]-OCH₃-Gingerolは全く影響を及ぼさなかった。

GeneChipで得られた結果についてその再現性をreal time PCRによって確認するとともに、Fig. 6Aに示した他の誘導体を用いて比較することにより、遺伝子発現を決定する化学構造を求めた。もっとも強く誘導されたhemeoxygenase-1(HO-1)は、[8]-Shogaol-COOHによって誘導されるが[6]-OCH₃-Gingerolでは誘導されないことがreal time PCRによる解析においても確認された(Fig. 6B)。
[8]-Shogaol-COOHと[6]-OCH₃-Gingediolまたは[6]-OCH₃-Gingerolの化学構造上の違いは、[8]-Shogaol-COOHの側鎖にあるα,β-不飽和カルボニルであることに着目し、この部分がKeto型、そしてEnol型の化合物を用いてHO-1の誘導能を調べた(Fig. 6B)。Keto型およびEnol型shogaolはいずれもHO-1の誘導をおこなさなかった。抗酸化能に影響を与えた側鎖末端の修飾基やフェノール基のHO-1誘導能に及ぼす影響について検討をおこなったところ(Fig. 6C)、[8]-Shogaol-COOHの末端のカルボキシル基に換わって、ヒドロキシル基(-OH)をもつ[8]-Shogaol-OHのHO-1誘導能は[8]-Shogaol-COOHと差はなかったが、エステル基をもつ[8]-Shogaol-CooEtはHO-1を誘導するもののその誘導能は[8]-Shogaol-COOHに比べて小さかった。抗酸化能がまったくないPhenyl-[8]-Shogaol-COOHはHO-1誘導能をもつがその作用は[8]-Shogaol-COOHに比較して小さかった。また、比較のために天然のショウガ成分

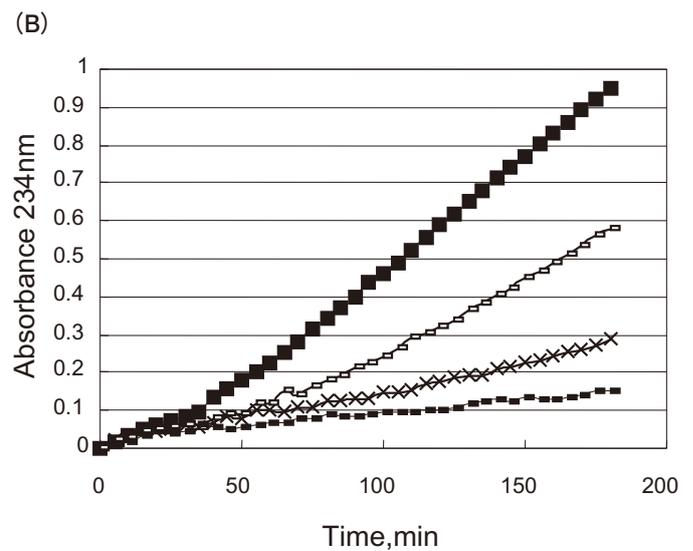
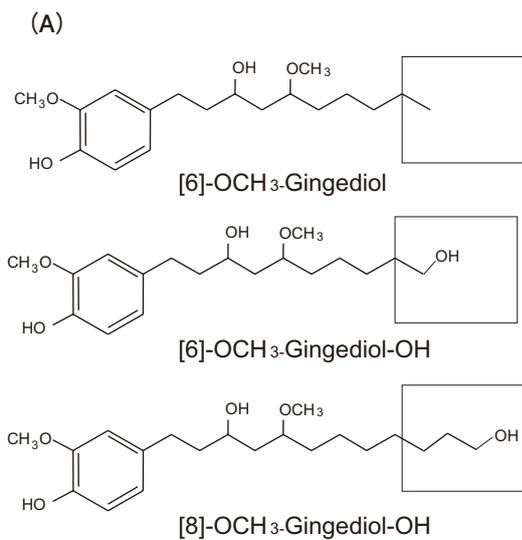


Fig.4 Effects of side chain on LDL oxidation
(A) Chemical structure of compounds studied.

(B) Increase in absorbance at 234 nm in the oxidation of LDL (0.1 mg/ml) induced by 0.4 mM AMVN in PBS (pH7.4) at 37 °C .

■ :control; ● :5 μM [6]-OCH₃-Gingediol; □ : 5μM: [6]-OCH₃-Gingediol-OH; X: 5μM [8]-OCH₃-Gingediol-OH

である [6]-Shogaol や [8]-Shogaol の HO-1 誘導作用を分析したところ、[8]-Shogaol は [8]-Shogaol-COOH とほぼ同等の誘導を示したが、[6]-Shogaol の誘導能は小さかった。

3.4 LDL 受容体欠損マウスの動脈硬化巣形成に対するショウガ成分の影響

今回の投与期間（4週間）ではいずれの化合物も顕著な動脈硬化抑制作用を示さなかった。投与期間を延長するなど、実験方法を再検討する必要があると考えられた。

4. 考察

ショウガには古くから様々な効果をもつ成分が含まれていることが知られていたが、その作用メカニズムに関しては明らかでない部分も多かった。本研究では、ショウガの成分のなかで shogaol や gingerol がフェノール基をもつこ

とに注目し、これらのラジカル捕捉型抗酸化物質としての作用について研究を行なった。天然の化合物に加え、化学構造の一部がわずかに異なる種々の誘導体を合成し、その作用を比較検討することにより、抗酸化作用に影響を与える分子内構造を特定することができた。

[8]-Shogaol-COOH、[6]-OCH₃-Gingediol そして [6]-OCH₃-Gingerol の3種のショウガ成分誘導体は均一溶液中における脂質酸化に対してはほとんど同じ抗酸化作用を示した。これは均一溶液中では側鎖のちがいによる化合物の動きに差がないためと考えられる。

これに対し、LDLの酸化においては側鎖の影響が強く現れた。側鎖の末端に親水性の高いカルボキシル基をもつ [8]-Shogaol-COOH は [6]-OCH₃-Gingediol や [6]-OCH₃-Gingerol よりも抗酸化作用は劣ることが明らかとなったが、これは脂質と蛋白質の球状複合体である LDL 内へ

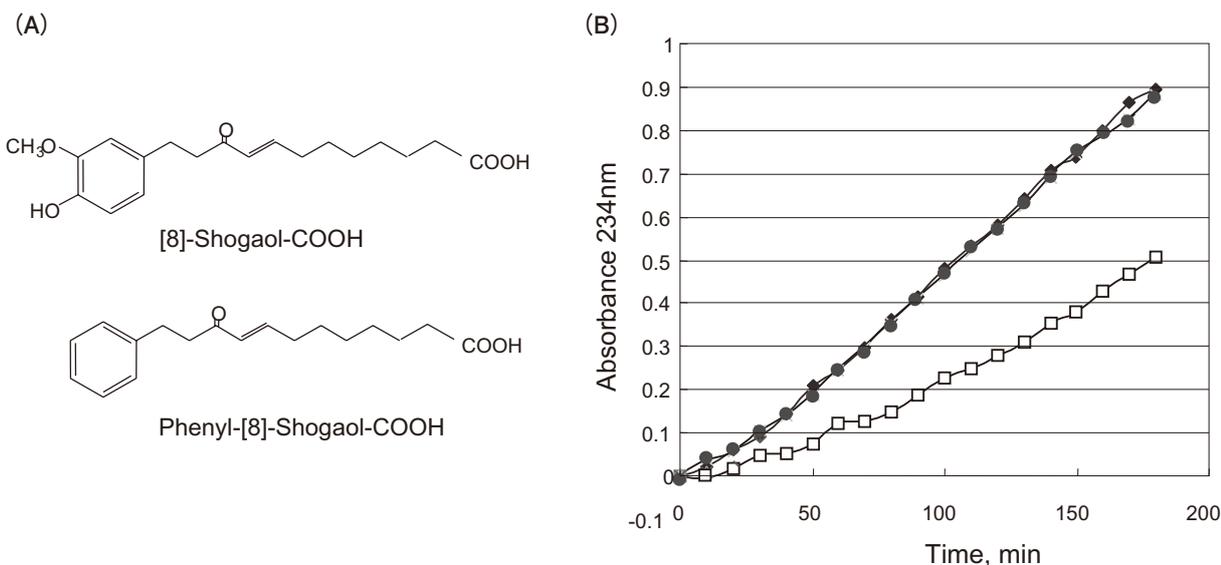


Fig.5 Effects of phenol group on LDL oxidation

(A) Chemical structure of compounds studied.

(B) Increase in absorption at 234nm in the oxidation of LDL (0.1 mg/ml) induced by 0.4mM AMVN in PBS (pH7.4) at 37°C.

◆ :control; □ : 5 μM [8]-Shogaol-COOH; ● : 5 μM Phenyl-[8]-Shogaol-COOH

Table1 Gene expression in endothelial cell induced by shogaol derivatives

Gene Name		none	Shogaol-COOH	OCH ₃ -Gingediol	OCH ₃ -Gingerol
hemeoxygenase 1	HO-1	161	1959	188	178
tripartite motif-containing 16	TRIM16	123	681	152	120
sequestosome 1	SQSTM1	61	219	73	75
glutamate-cysteinylase, modifier subunit	GCLM	223	753	283	213
solute carrier family7, member 11	SLC7A11	608	1635	726	642
solute carrier family 3, member 2	SLC3A2	229	466	256	254

の侵入、分布が親水性の高いカルボキシルによって妨げられたためと考えられる⁵⁾。この効果は側鎖中央部がまったく同じで末端のヒドロキシル基の有無のみが異なる [6]-OCH₃-Gingediol と [6]-OCH₃-Gingediol-OH の比較により明確に示されたといえる (Fig. 4)。LDL の抗酸化作用に影響を与えるのは側鎖末端だけではなく、側鎖の炭素鎖の

長さも重要であることがわかった。炭素数を2つ増やして炭素鎖を長くした [8]-OCH₃-Gingediol-OH は末端に -OH 基があるにもかかわらず抗酸化効果は [6]-OCH₃-Gingediol にかなり近づいたことから明らかである。

フェノール系抗酸化物質の抗酸化活性はラジカルへのフェノール基からの電子、水素の供与であると考えられ

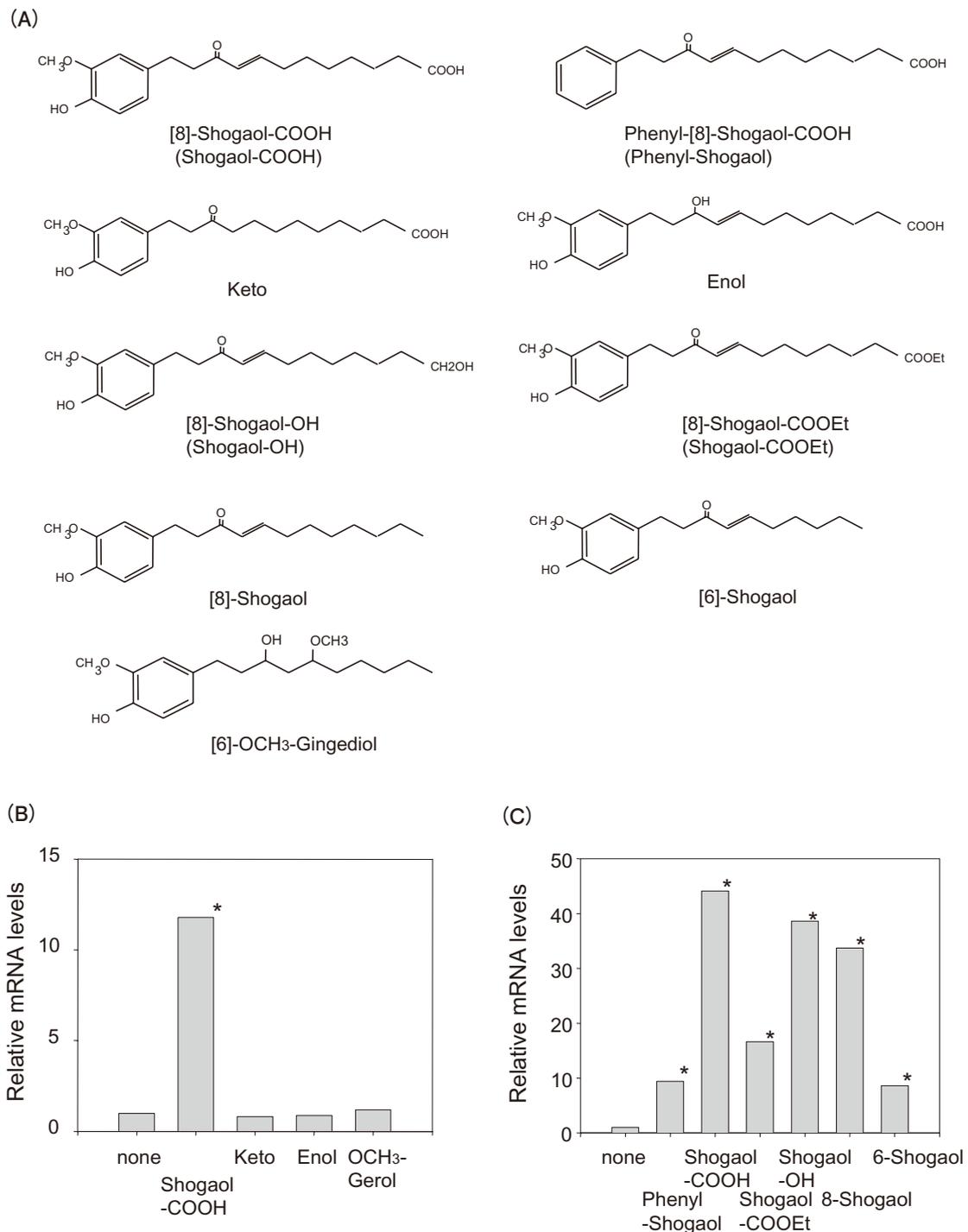


Fig.6 Induction of hemeoxygenase-1 (HO-1) by shogaol derivatives in endothelial cell.

(A) Chemical structure of compounds studied.

(B), (C) Relative mRNA levels of HO-1 were measured by real-time PCR. *p<0.01

るため²⁾、[8]-Shogaol-COOHのベンゼン環の置換基がすべてメチル基である Phenyl-[8]-Shogaol-COOHは予想どおり LDLの酸化を全く抑制しなかった。また、[8]-Shogaol-COOHの置換基を2つの -OCH₃に変えた化合物も同様に抗酸化作用をもたなかった (data not shown)。

ショウガ成分とその誘導体による内皮細胞の遺伝子発現誘導能の網羅的解析によって、転写因子の一つである Nrf2 が制御する遺伝子群が数多く誘導されることが示された^{4,6,7)}。さらにある特定の化学構造がこの遺伝子発現を厳密に規定していることが、種々の誘導体の遺伝子発現能を比較することにより明らかとなった。その構造はショウガ成分類の側鎖にある α -、 β -不飽和カルボニルであった。

Nrf2は合成されると、細胞質に存在する蛋白質 Keap-1と結合し、Keap-1のユビキチン化酵素作用によりユビキチン化されプロテアソームによって速やかに分解される^{8,9)}。ところが、親電子性の化合物やラジカル性の活性酸素が細胞内に増加すると Keap-1分子内の2つの -SHが酸化され、-S-S-結合が生じたり、あるいは化合物(X)自体が結合して架橋構造をとり (-S-X-S-)、Keap-1の構造変化がおこるため Nrf2は Keap-1から解離する¹⁰⁾。解離した Nrf2は核内に移行して遺伝子のプロモーター領域の antioxidant response element (ARE) 配列に結合し転写活性を促す。Table 1に示したショウガ成分類によって発現誘導された遺伝子はすべてそのプロモーター領域に ARE 配列があることが知られている。これらの遺伝子にコードされる蛋白質は細胞内を還元状態に保ち、酸化ストレスから細胞を防御する機能をもつ。また、解毒機構の第二相の酵素も同じく Nrf2/ARE 制御下にあることがわかっている。ショウガの効能のいくつかは α -、 β -不飽和カルボニル構造によるこれらの遺伝子誘導にその作用機序を求めると考えられる。

本研究により、ショウガ成分およびその誘導体の脂質や LDLの酸化に対する抗酸化作用に影響する化学構造と、遺伝子発現に影響する化学構造がそれぞれ明確になった。また、ショウガ成分の細胞防御に関わる新規機能が明らかになった。

(引用文献)

- 1) 油田正樹：現代東洋医学，8, 45-50, 1987.
- 2) Noguch N, Iwaki Y, Takahashi M, et al.: 2,3-Dihydro-

5-hydroxy-2,2-dipentyl-4,6-di-tert-butylbenzofuran: Design and evaluation as a novel radical-scavenging antioxidant against lipid peroxidation, *Arch. Biochem. Biophys.*, 342, 236-243, 1997.

- 3) Takabe W, Kanai Y, Chairoungdua A, et al.: Lysophosphatidylcholine enhances cytokine production of endothelial cells via induction of L-type amino acid transporter 1 and cell surface antigen 4F2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24,1640-1645, 2004.
- 4) Warabi E, Wada Y, Kajiwara H, et al.: Effect on endothelial cell gene expression of shear stress, oxygen concentration, and low-density lipoprotein as studied by a novel flow cell culture system. *Free Radic. Biol. Med.* 37,682-694, 2004.
- 5) Gotoh N, Noguchi N, Tsuchiya J, et al.: Inhibition of oxidation of low density lipoprotein by vitamin E and related compounds. *Free Rad. Res.*, 24, 123-134, 1996.
- 6) Hosoya T, Maruyama A, Kang M-I, et al.: Differential responses of the Nrf2-Keap1 System to laminar and oscillatory shear stress in endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 280, 27244-27250, 2005.
- 7) Chen X L, Varner S E, Rao A S, et al.: Laminar flow induction of antioxidant response element-mediated genes in endothelial cells. A novel anti-inflammatory mechanism. *J. Biol. Chem.* 278, 703-711, 2003.
- 8) McMahon M, Itoh K, Yamamoto M, et al.: Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *J. Biol. Chem.* 278, 21592-21600, 2003.
- 9) Itoh K, Tong K I, Yamamoto M.: Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic. Biol. Med.* 36,1208-1213, 2004
- 10) Wakabayashi N, Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw W D, et al.: Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101,2040-2045, 2004.

リン脂質ベシクル上にリポアミノ酸が形成するナノチャンネルとその薬物放出能の検討

金沢大学大学院自然科学研究科

太田 明雄

Incorporation behavior of N-amino acid-type surfactant into phospholipid vesicle membrane has been studied. It was known that leakage of the vesicle-entrapped probe took place slowly at a very low concentration in the sulfate- or sulfonate-type surfactant systems, on the other hand it occurred rapidly at the concentration just below the CMC in the amino acid-type surfactant systems. These results suggest that the amino acid-type surfactants adsorb cooperatively on the vesicle surface, and as a result, the surfactant molecules organize to make a kind of channel which is large enough for the entrapped molecules to pass through easily. In this study, the effect of amino acid residue on the incorporation into the vesicle membrane was investigated from the both view points of morphology and interaction. Furthermore the control of the release of entrapped-molecules from vesicles by temperature or pH was examined.

1. 緒言

これまでアシル化アミノ酸に代表されるアミノ酸系界面活性剤は肌に優しくマイルドな界面活性剤として認知され、またその特性を生かした商品も数多く開発されている。またアミノ酸の種類を選ぶことにより、官能基を系統的に変化させることができるため、親水部位のサイズや極性、電荷といったものが界面活性剤の物理化学的性質に及ぼす影響を検討する上でも、都合の良い対象である。更にグリシンを除くアミノ酸は光学活性体であり、分子不斉といった観点からも非常に興味深い対象である。実際アシルアミノ酸塩を扱った研究について、総説として既に多くが紹介されている^{1) - 7)}。しかしながら、生体に対して“マイルドである”とは物理化学的にどのようなことなのか、そのメカニズムは詳細には明らかにされていない。そこで我々はこれまで蓄積してきたアミノ酸系界面活性剤の研究手法や成果を生かし、上記のメカニズムを脂質膜（リン脂質ベシクル）とアシルアミノ酸界面活性剤（リポアミノ酸）との相互作用という観点から明らかにすることを目的として実験を進めているが、その中で硫酸エステル系やスルホン酸系界面活性剤と、アミノ酸系界面活性剤ではベシクルに対する作用が全く異なる事が明らかとなった⁸⁾。前者の界面活性剤と比較してアミノ酸系界面活性剤のベシクルへの作用としての主な特徴は、1) ベシクルへの作用に対し協同性を有し、ある臨界濃度が存在する（臨界ミセル濃

度 CMC よりも低濃度）；2)（その臨界濃度以上で）ベシクル二分子膜構造を破壊することなしに内包物を放出させる；3) 内包物の放出速度が大きい；ということである。これらの事実より、アシルアミノ酸界面活性剤（リポアミノ酸）はベシクル二分子膜上に協同的に吸着し、内包物の通り道（チャンネル）を形成しているのではないかと推測した。そこで本申請研究では、a) リポアミノ酸のリン脂質ベシクルへの作用様式とその形態観察、b) そのアミノ酸側鎖の影響を系統的に検討した。さらにこの作用を利用して、温度や pH による内包薬物の放出制御を試みた。

2. 実験

リン脂質として L- α -ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) を選んだ。ベシクルは Bangham 法にて作成した後、ポリカーボネートメンブランを用いたエクストルージョン法にて、約 100nm 径を有する均一のユニラメラベシクルとして調製した。内包薬物のモデルとして 5(6)-カルボキシフルオレセイン (CF) を利用し、濃度消光するような濃度 (0.1M) にて封入した。CF を封入したベシクル分散液は 100nm にサイジングした後、封入できなかった CF をゲルろ過にて除去した。薬物放出実験の場合では、DPPC 濃度は 0.05mM に調製し、界面活性剤を添加した後の CF 蛍光強度の回復度より漏出率を見積もった。アシルアミノ酸界面活性剤として N-ドデカノイル-グリシン (C12-Gly)、L-アラニン (C12-Ala)、L-ロイシン (C12-Leu)、L-フェニルアラニン (C12-Phe) およびドデカノイル-L-セリン (C12-Ser)、L-アスパラギン (C12-Asn)、L-グルタミン酸 (C12-Glu) の各ナトリウム塩を使用した。これらの界面活性剤の構造式を Schem1 に、また Tris-HCl 0.1M (pH = 7.4) 緩衝液中における CMC を Table 1 にそれぞれ示した。アシルアミノ酸のベシクルへの作用様式は恒温滴定型カロリメトリー (ITC) と 300kV Cryo-



Investigation on nano-channels made from lipo-amino acid surfactants on phospholipids vesicles

Akio Ohta

Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University

TEMによる形態観察を位相差法により非染色の条件下で行った。Cryo-TEMによる形態観察ではDPPC濃度は2mMで固定し、アシルアミノ酸濃度を変化させて実験を行った。また各サンプル調製には、Tris-HCl 0.1M (pH = 7.4) 緩衝液を溶媒として使用した。内包薬物の放出制御の実験では、他にpH = 6.0と8.2の緩衝液も溶媒として使用した。これらはTris-HCl 0.1M (pH = 7.4) 緩衝液に、それぞれHCl、NaOH水溶液を適量加えることで調製した。

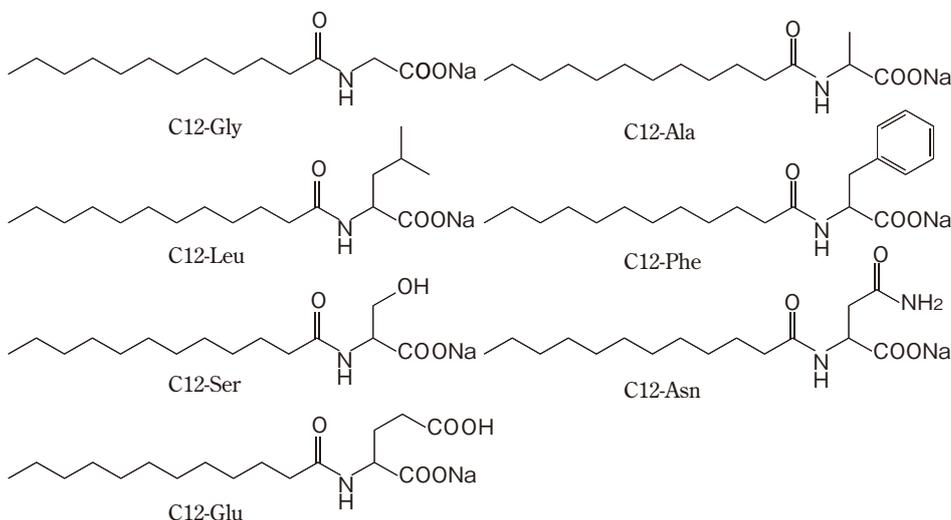
3. 結果と考察

Fig. 1に界面活性剤の添加直後と2時間後のCF漏出率を、各CMCで換算した界面活性剤濃度 ($C^* = C/CMC$) に対してプロットしたものである。なお漏出率 L は各点における蛍光強度 I 、界面活性剤添加以前の蛍光強度 I_{bg} 、ならびにTritonX-100を添加することで完全にベシクルを崩壊させた後の蛍光強度 I_{triton} から以下の式により計算している。

$$L(\%) = \frac{I - I_{bg}}{I_{triton} \times r - I_{bg}} \times 100$$

なお r は TritonX-100 を添加することによる希釈率を表しており、今回のケースでは1.1とした。いずれのアシルアミノ酸界面活性剤の場合でも、かなり低い濃度ではベシクルの漏れを殆ど引き起こさないものの、CMCよりも低いある濃度に達すると急激に漏出率が上昇しているこ

とがわかる。比較としてドデシル硫酸ナトリウム (SDS) の系を示した。SDS系では低濃度からすでに漏れが生じ、CMCに近づくにつれ徐々に漏れ率が上昇するものの、2時間後でもそれほど大きな漏れを引き起こしていないことがわかる。両者を比較するとそのアシルアミノ酸界面活性剤の作用における協同性が顕著であることがよくわかる。次にアミノ酸の違いについて検討することにする。まず疎水性アミノ酸で比較すると側鎖が嵩高いLeu, Pheではその漏れ速度が非常に高く、側鎖の小さなGlyとAla系ではその速度が低いことがわかる。特にPhe系ではCMCの20%程度の低濃度の溶液においてさえ、ベシクル添加後2時間以内に内包物を完全に放出させている。一方親水性アミノ酸であるSer, Asn, Glu系はそれぞれ異なる挙動を示した。側鎖に水酸基を有するSer系は添加直後の漏れ率は低いもののLeu, Phe系に似たような挙動を示した。これに対しアミド基を有するAsn系はGly, Ala系の挙動に似ているが、漏れ率は他の系と比べて小さかった。なお後者の系では、CMC以降の高い濃度領域で漏出率が再度減少している。この原因については未解明であるが、現時点では界面活性剤ミセルとDPPCベシクルとの複合体が形成されたためではないかと考えている。側鎖にカルボキシル基を有するGlu系も同様に、CMC後に漏れ率の低下を示したが、この系に関してはCFはC12-Gluミセルに可溶化されると顕著に消光されることがわかっており、この蛍



Scheme 1 使用したアシルアミノ酸界面活性剤の分子構造

Table 1 各界面活性剤の臨界ミセル濃度 (25°C in 0.1M tris-HCl pH = 7.4)

	SDS	C12-Gly	C12-Ala	C12-Leu
CMC / mM	1.1	3.0	3.0	0.60
	C12-Phe	C12-Ser	C12-Asn	C12-Glu
	0.35	4.1	4.8	14.0

光の消光により見かけの漏れ率が減少したものと思われる。

次に DPPC ベシクル懸濁液と界面活性剤水溶液との微分希釈熱測定を行った。なお DPPC 濃度は蛍光実験の際に使用した量と同じ濃度になるように適量をセルに添加し、各界面活性剤の CMC の 20 倍の濃厚水溶液を滴下した。DPPC ベシクル存在下、非存在下での各系における界面

活性剤の微分エンタルピーの結果を Fig. 2 に、それぞれ Fig. 1 と同様に CMC で換算された濃度に対して示した。DPPC ベシクルが存在しない場合の微分エンタルピーは CMC 近傍で急激に変化し、CMC 前後のエンタルピーの差を取ることで、ミセル形成エンタルピーを得ることができる⁹⁾。その結果より SDS 系、C12-Phe 系ではミセル形

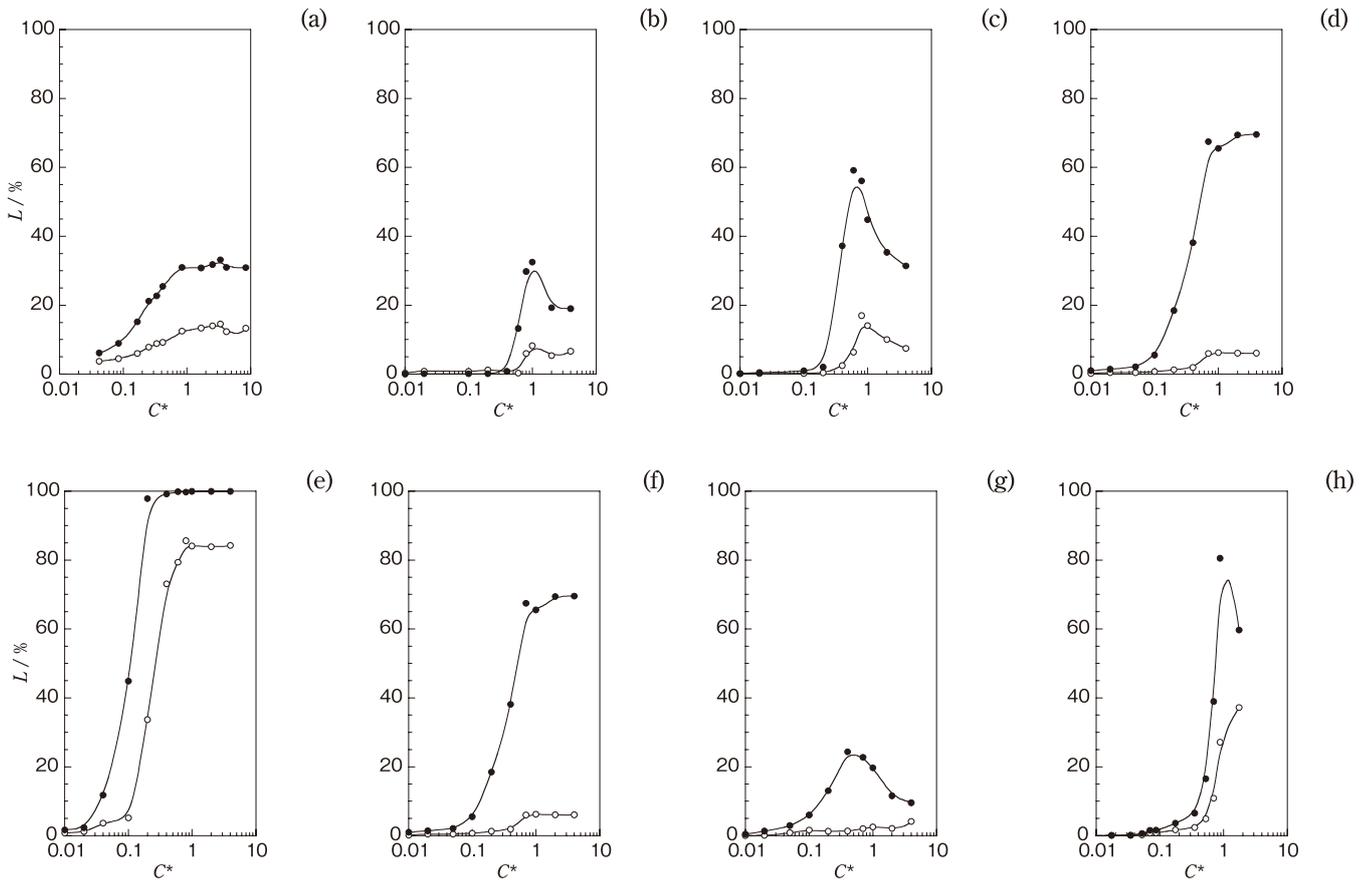


Fig.1 SDS および各アシルアミノ酸界面活性剤系におけるベシクル内包物の放出挙動。(○) 添加直後、(●) 添加 2 時間後 (a) SDS, (b) C12-Gly, (c) C12-Ala, (d) C12-Leu, (e) C12-Phe, (f) C12-Ser, (g) C12-Asn, (h) C12-Glu

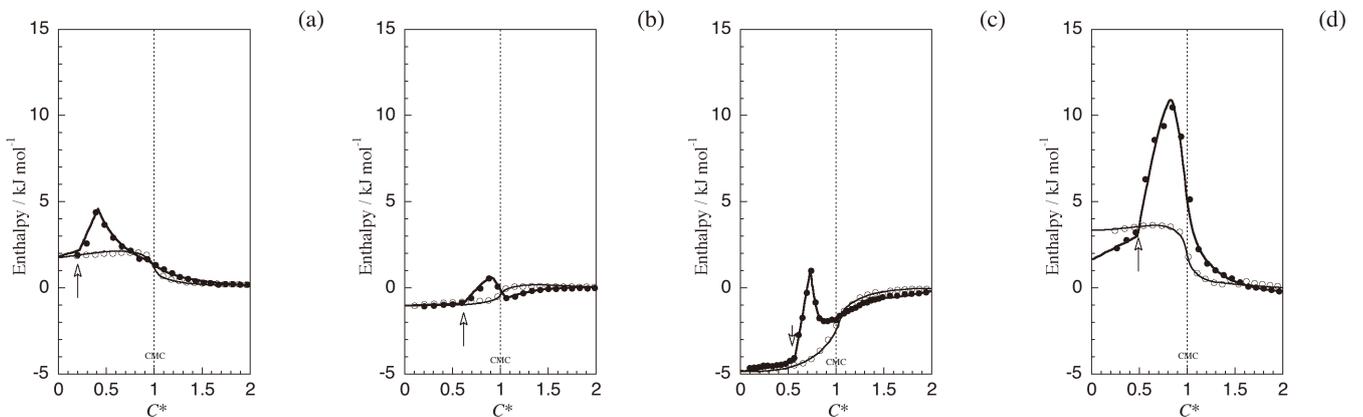


Fig.2 SDS および各アシルアミノ酸界面活性剤系における界面活性剤の微分エンタルピー (○) 界面活性剤のみ、(●) DPPC ベシクル共存下 (a) SDS, (b) C12-Gly, (c) C12-Leu, (d) C12-Phe.

成は発熱的であり、C12-Gly と C12-Leu 系では逆に吸熱的であることがわかる。一方 DPPC ベシクルが存在した場合、このミセル崩壊のプロセスに伴う熱の出入りに加え、ベシクルへの界面活性剤の作用に伴うエンタルピー変化が加わることになる。SDS 系では比較的低濃度から DPPC が存在しない場合の希釈熱のカーブからずれ始め、CMC の 50% 程度の濃度において最大値に達し、その後単調に減少した。C12-Gly と C12-Leu 系では CMC の 50% 程度の濃度まではほぼ一定の値であったが、最初の矢印の点で急激に上昇し、CMC の 80% 程度の濃度において極大値をとりその後 CMC に達した後 DPPC が存在しない場合の希釈熱のカーブと同様の挙動を示した。これらの結果は上述した各界面活性剤におけるベシクル膜への作用様式を強く支持している。つまり SDS 系では低濃度領域から単調に作用しているのに対し、C12-Gly と C12-Leu 系では最初の矢印の点まではベシクル膜に対してエンタルピー的には殆ど影響を与えていないものの、ある濃度に達すると協同的に作用することになる。また界面活性剤が作用した際の大きな吸熱は、主に DPPC ベシクル膜のパッキング状態の緩和を反映したものと思われる。その後は添加された分子は膜上のドメイン形成に消費され、界面活性剤モノマー濃度が CMC に到達するとミセルが形成され、DPPC 分子はミセル内に可溶化されていくものと思われる。一方 C12-Phe 系では、非常に希薄な濃度においては DPPC が存在しない場合の希釈熱のカーブから負の方向にずれており、低濃度における吸着が発熱的であることを示している。その後他のアシルアミノ酸型界面活性剤と同様に CMC の 50% 程度の濃度付近から急激に上昇し、CMC 付近で極値をとった後減少した。C12-Phe 系での極大のエンタルピーは他の界面活性剤に比べ非常に大きな値を示した。この結果は先の内包物の漏れ挙動の結果と対応しているように思われる。すなわち C12-Phe はベシクルに対して非常に強く作用する結果、内包物の素早い漏れを引き起こしたのではないかと考えられる。

次に各界面活性剤ミセルの DPPC 分子の可溶化能を検討するために、先の実験とは逆の滴定測定を行った。具体的にはセル内の各 CMC の 4 倍濃度のミセル溶液中に DPPC ベシクル懸濁液を滴定し、その際に発生する熱を測定した。結果を DPPC の微分エンタルピーを DPPC の濃度に対して Fig. 3 に示した。各界面活性剤系ともに比較的大きな正の値を示し、DPPC 濃度の上昇とともに減少するような挙動を示した。なおグラフ内に示した実線は、回帰曲線に分数関数 ($f(C_{DPPC}) = P1 + P2/(P3 + C_{DPPC})$: P1, P2, P3 は可変パラメータ) を用いてフィッティングしたものであるが、実験結果をうまく再現できている。また DPPC 濃度が無限希釈に近づくにつれ、各系の値は同じような値に収束していくように見える。この無限希釈で

の値は DPPC 分子がベシクル状態からミセル内に移行する際のエンタルピー変化に相当するが、このことは DPPC の可溶化に伴うエンタルピー変化は界面活性剤の種類にあまり依存しないことを示している。実際に得られた回帰曲線から DPPC 濃度がゼロの極限値を算出したところ、それぞれ 36 ~ 42 kJ mol⁻¹ 付近の値を示した。なお DPPC ベシクルは 42℃ 付近でゲル状態から流動性の大きな液晶状態への転移を示すことが知られているが¹⁰⁾、その相転移の潜熱が約 36 kJ mol⁻¹ である¹¹⁾。可溶化に伴うエンタルピー変化とほぼ同等であることから、界面活性剤ミセル中での DPPC の状態は液晶状態に似通っているといえる。しかしながら DPPC 濃度が上昇するにつれ、各界面活性剤系における微分エンタルピーの差が拡大している。詳しく見てみると、SDS 系では比較的那の減少度が小さいのに対し、アシルアミノ酸界面活性剤系ではそのエンタルピー値がより急激に減少した。これはミセル中での混和性の違いを反映しているものと思われる。つまり DPPC はアシルアミノ酸界面活性剤ミセル中よりも、SDS ミセル中でより界面活性剤と混和しているものと思われる。この結果はこれまで考察してきた DPPC ベシクル内での界面活性剤の混和性の違いと共通している。

これらの結果をもとに、C12-Gly、C12-Leu と C12-Phe 系に対して、幾つかの濃度において、cryo-TEM によるベシクルの形態観察を行った。結果はそれぞれ Fig. 4 に示した。Fig. 4a は C12-Gly (C* = 0.6) における像であるが、漏れ挙動や熱測定の結果からは既にベシクルに対して作用し、内包物を漏れさせているにもかかわらず、ほぼその粒径を保ったユニラメラベシクル像を得ることができた。一方同じ濃度 (C* = 0.6) における C12-Leu 系 (Fig. 4d)、C12-Phe 系 (Fig. 4f) では、C12-Gly 系と同様に急激な漏れの発生や大きな正のエンタルピー変化を起すという点では似通った挙動であるにも関わらず、その形態が異なっていた。C12-Leu 系ではほとんどのベシクルはカプセル形を保っていたが、その輪郭は円形ではなく多角形であった。更に写真にあるような一部にはシートに転移したものが観察できた。なおそのシートへ転移したものの存在比は 1% 以下であった。C12-Phe 系ではその違いが著しく、球状ベシクルは全く観察されず、全てのベシクルがシートへと転移していた。C12-Leu、C12-Phe 系で見られた内包物の急激な漏れは、ベシクルの形態をカプセル状からシートへと転移させることに起因しているものと思われる。またベシクルの輪郭が多角形に近いような形が得られたことは、界面活性剤がベシクルに均一に作用しているのではなく局所的に作用していることを裏付けているように思われる¹²⁾。つまり部分的に吸着した結果、DPPC リッチドメインと界面活性剤が吸着した部分との間に、ある種の界面が形成されたためではないかと考えている。次に、C12-Leu、C12-

Phe系において漏れが起こり始める濃度 ($C^* = 0.1$) における画像を検討してみる (Figs. 4c, 4e)。この濃度においてはどちらの系ともにシート構造は殆ど確認できなかったが、やはりベシクルの輪郭は多角形であった。これらのことから C12-Leu、C12-Phe 系の場合では、ベシクルへの局所的な作用は低濃度から既に起こっており、濃度が上昇するにつれ過度なドメイン形成が、カプセルを崩壊させシートへと転移させていることが予想される。最後に Fig. 4b の C12-Gly ($C^* = 4$) における像について触れてみる。画像にあるように一部には疎水性アミノ酸系で見られた多角形状の輪郭が得られたものの、観察できたベシクルは全てカプセル状であった。漏れ挙動の結果において C12-Gly 系を含む幾つかの系では、CMC 後に漏れ率が減少するという特異な挙動を示しているが、TEM 画像からは形態の変化など特に変わった様子は見られなかった。

以上の結果より、界面活性剤の作用によりベシクルの形

態転移を引き起こすことで、漏出効率が高くなる C12-Leu と C12-Phe 系に対して、温度と pH の変化による内包物の放出挙動を検討した。またこれらの界面活性剤は CMC が低く、他の系に比べ添加量を抑えることができることも利点として挙げられる。なお内包物には同様に CF を用いた。まず両系ともに CMC の 4%、ならびに 40% の濃度での結果を Fig. 5 に示した。この結果より、温度を上げることで内包物が放出されやすくなることがわかった。これは界面活性剤の作用によるベシクル形態の転移が温度の上昇により促進されたためだと思われる。特に CMC の 4% では、25℃以下の温度においては全く漏れを生じさせていないが、35℃まで温度を上昇させることで内包物を速やかに漏出させることができることがわかった。なお C12-Leu、C12-Phe 両系とも CMC の 40% 濃度においても、DPPC の二分子膜の相転移温度は 35℃以上であることを確認している。同様に Fig. 6 に示したように、pH については低下

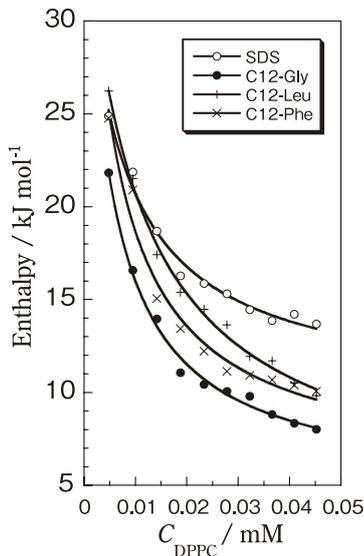


Fig.3 各界面活性剤ミセル水溶液中における DPPC の微分エンタルピー

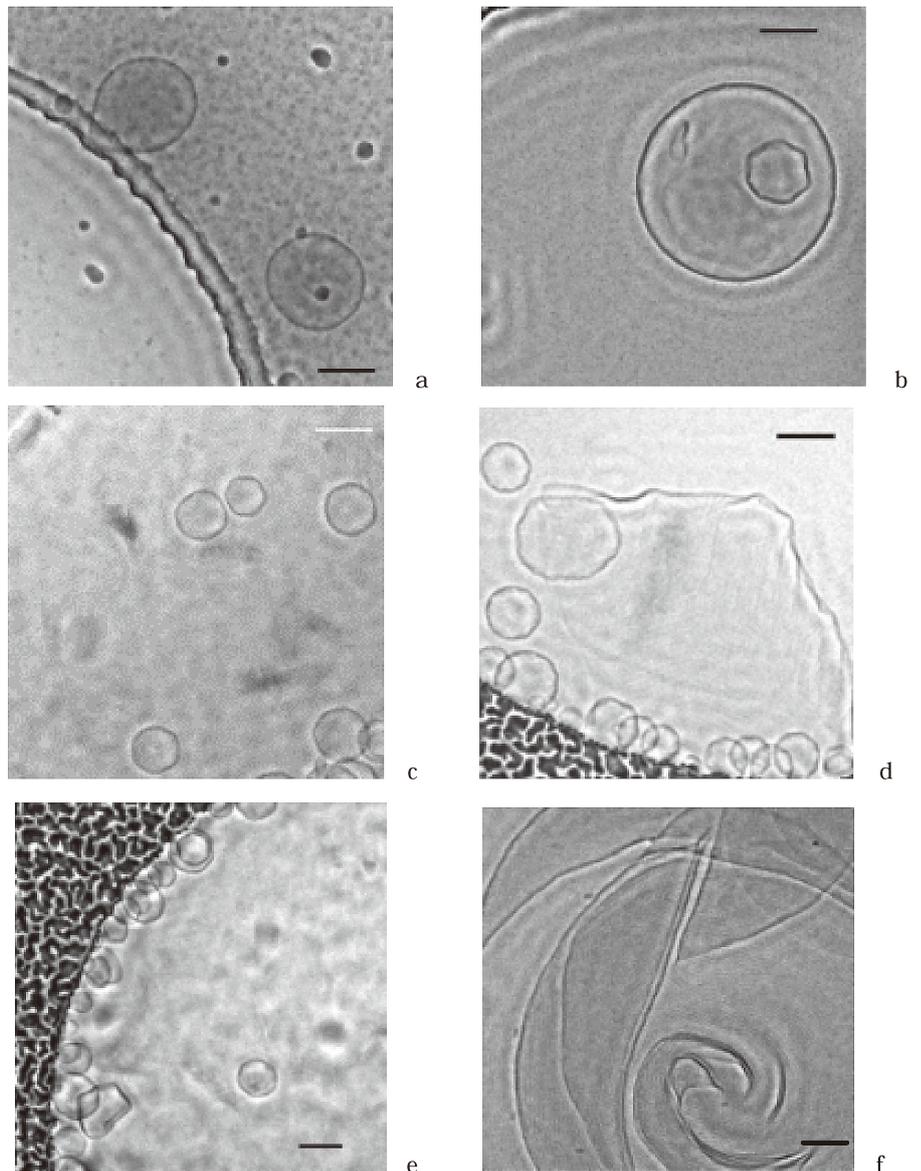


Fig.4 各界面活性剤系におけるベシクルの形態
 (a) C12-Gly, $C^* = 0.6$, (b) C12-Gly, $C^* = 4$, (c) C12-Leu, $C^* = 0.2$, (d) C12-Leu, $C^* = 0.6$, (e) C12-Phe, $C^* = 0.1$, (f) C12-Phe, $C^* = 0.6$ (各 bar = 100nm)

させることで内包物が放出されやすくなることが分かった。特に pH を 7 から 6 へと僅かに下げることで劇的な変化をしており、両系とも CMC の 10% 程度の濃度においては、内包物の放出のオン・オフをほぼ完全に制御することが可能である。これらの界面活性剤の見かけの pKa は 7 前後であることから、界面活性剤のカルボキシル基の解離を抑えることで、ベシクルへの吸着量が飛躍的に向上し、その結果内包物の放出を招いたのではないかと考えられる。

4. 結 言

アシルアミノ酸界面活性剤を用いたベシクル膜内包物の放出作用を系統的に検討した。これらの界面活性剤は SDS と比較すると、その作用が協同的であることが特徴としてあげられる。特に側鎖に嵩高い疎水基を有する

C12-Leu、C12-Phe 系では、速やかな放出能を有することがわかった。TEM 観察により、これらの系におけるベシクル膜への作用が局所的であり、かつその性質のため CMC 以下においてベシクル形態の転移を引き起こすことがわかった。このベシクル形態の転移が内包物の速やかな放出をもたらすことが予想される。更に添加する界面活性剤にこの C12-Leu や C12-Phe を用いることで、僅かな pH や温度の調節により、鋭敏にベシクル内包物の放出を制御できることがわかった。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり(財)コスメトロジー研究振興財団の支援をいただきました。ベシクルの熱測定は、北陸先端科学技術大学院大学教授 由井伸彦氏の協力により行

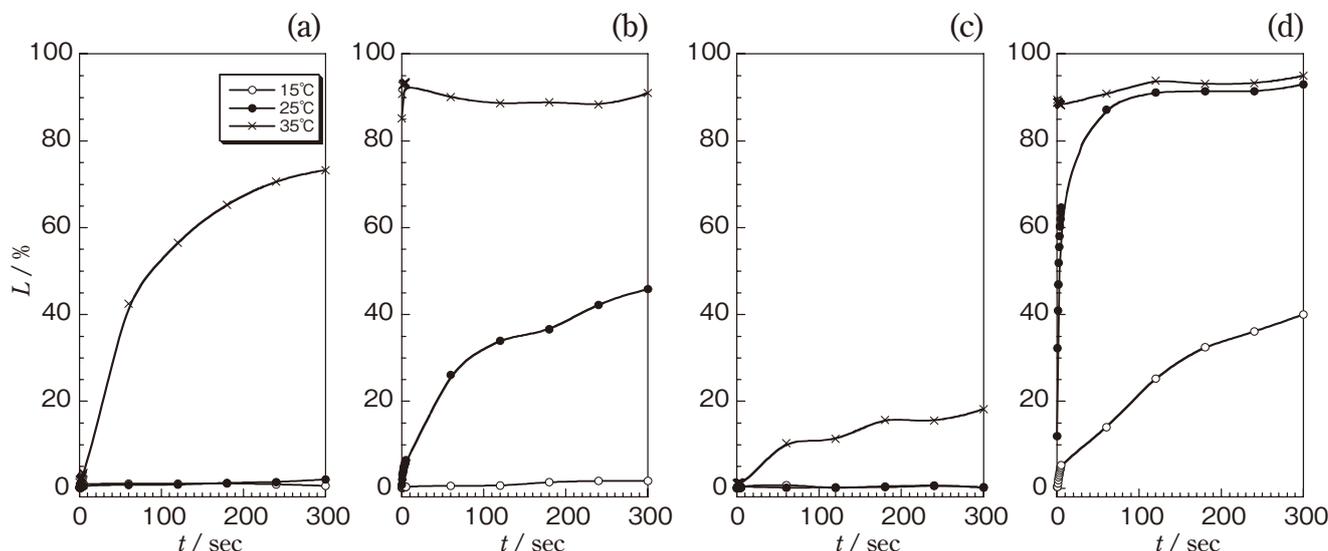


Fig.5 C12-Phe および C12-Leu 希薄溶液系におけるベシクル内包物放出挙動の温度依存性
(a) C12-Phe, $C^* = 0.04$, (b) C12-Phe, $C^* = 0.4$, (c) C12-Leu, $C^* = 0.04$, (d) C12-Leu, $C^* = 0.4$.

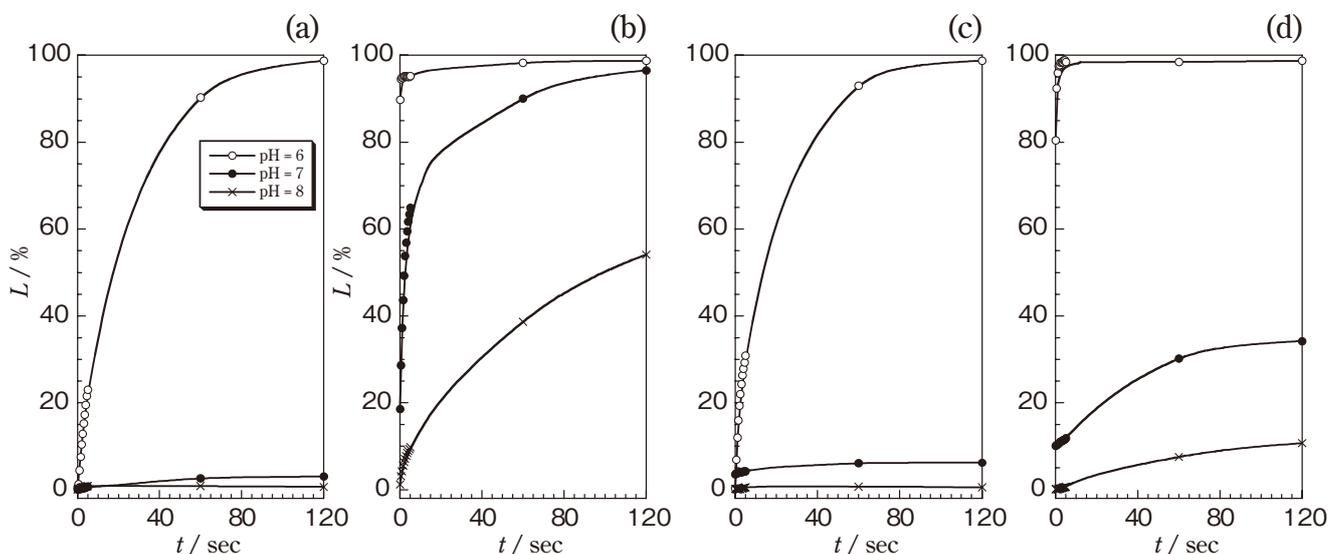


Fig.6 C12-Phe および C12-Leu 希薄溶液系におけるベシクル内包物放出挙動の pH 依存性
(a) C12-Phe, $C^* = 0.1$, (b) C12-Phe, $C^* = 0.4$, (c) C12-Leu, $C^* = 0.2$, (d) C12-Leu, $C^* = 0.4$.

いました。また TEM 観察は、分子科学研究所「ナノ支援」プログラムの援助を受け、生理学研究所教授 永山國昭氏ならびに R.Danev 博士に多大なご協力をいただきました。この場を借りて深謝いたします。

(関連文献)

- 1) 吉田良之助, 竹原将博, 有機合成化学協会誌, 33, 671 (1975).
- 2) 吉田良之助, 竹原将博, 洪江昭夫, 薄羽恭謙, 油化学, 26, 747 (1977).
- 3) 竹原将博, 表面, 22, 459 (1984).
- 4) 竹原将博, 表面, 22, 512 (1984).
- 5) 竹原将博, 油化学, 34, 964 (1985).
- 6) 坂本一民, 油化学, 44, 256 (1995).
- 7) 宮岸重好, 表面, 35, 85 (1997).
- 8) Yasuhara K. Ohta A. Asakura Y. Kodama T. Asakawa T. Miyagishi S., *Colloid Polymer Science* 283, 8, p.987-993 (2005).
- 9) Ohta A., Murakami R., Takiue T., Ikeda N., Aratono M., *J. Phys Chem. B* 104(35), p8592-8597 (2000).
- 10) 八田一郎, 村田昌之: シリーズ・ニューバイオフィジックス II (4) 生体膜のダイナミクス, 共立出版 (2000).
- 11) Fa N., Ronkart S., Schank A., Deleu M., Gaigneaux A., Goormaghtigh E., Mingeot-Leclercq M. -P., *Chem. Phys. Lipids* 144, p108-116 (2006).
- 12) Ickenstein L.M., Arfvidsson M.C., Needham D., Mayer L.D., Edward K., *Biochim. Biophys. Acta* 1614, p1335-138 (2003).

二酸化チタン上に形成した脂質二重膜への 表面特性の影響および UV 照射効果

分子科学研究所

手老 龍吾

Lipid bilayer membranes on TiO₂ substrates were investigated by means of atomic force microscopy (AFM) and fluorescence microscopy. Lipid bilayer membranes deposited on flat solid surfaces are called "supported planar bilayers" (SPBs), and expected to be an effective cell-membrane-mimicking model system *in vitro*. TiO₂ is widely used in cosmetic products such as sunscreens, face-powders, foundations, etc. I propose that the SPB on TiO₂ surfaces can be a good model-system of the cell/cosmetics interface on skins.

Single-stepped rutile-TiO₂ low index surfaces were used in order to clarify the effects of surface atomic structures and chemical properties of each TiO₂ surface. Single-stepped TiO₂(100), (001) and (110) surfaces were prepared by HF aq. immersion and thermal treatment at 700-850°C at O₂ flow. The SPBs were formed by vesicle fusion methods using extruded vesicles through 50-100 nm and sonicated vesicles. Two kinds of saturated phospholipids, dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), an unsaturated phospholipid, dipalmitoleoylphosphatidylcholine (DPOPC), or their mixture were used for the SPBs on purpose.

After the single-stepped TiO₂(100) surface was incubated in the 100-nm-filtered and sonicated DPOPC vesicle suspension, a defect-less and full-coverage SPB formed. Fluorescence recovery after photobleaching experiment showed that the SPB retains the fluidity. In the AFM images, the trace of the single steps was recognized on the DPOPC-SPB on the TiO₂(100). This step-trace was also observed on both gel-phase and liquid-crystal-phase domains in a phase-separated binary SPB of DPPC and DPOPC. The gel-domains edges along the substrate steps preferentially appeared. It was also found that the nucleation of the gel-domains occurred on the terrace regions. These results indicated the atomic structure on the substrates actually affects to the assembly of lipid molecules in the SPBs.

The DMPC 50-nm-filtered vesicles transformed to planar bilayer on the O₂-annealed TiO₂(100), but adsorbed as vesicles on the UV-irradiated TiO₂(100). Stable hydrogen-bonded water layer formed due to the UV-induced hydrophobicity on the TiO₂ surface. The water layer worked as the barrier for the interaction between the DMPC head group and the substrate.

1. 緒言

化粧品には金属酸化物や粘土鉱物などの様々な無機材料の微粒子が使われており、生体物質(細胞)と無機物質の界面系として捉えることができる。細胞膜の主成分である脂質分子を固体表面上に平面二重膜として堆積した“supported planar bilayer (SPB)”(図1)は細胞膜のモデルシステムとして生化学や医療分野で有力視されている。本来は流動的で壊れやすい脂質二重膜が固体表面に支持されることにより安定化され、また、走査プローブ顕微鏡や各種分光法などの高空間分解能・高感度の表面科学的実験手法を用いて解析を行うことができる点が長所として挙げられる。本研究では、白色顔料やUVカット素材として化粧品に広く用いられているTiO₂の表面に堆積したSPBを用いて、無機固体の物理的・化学的特性が脂質膜にどのよ

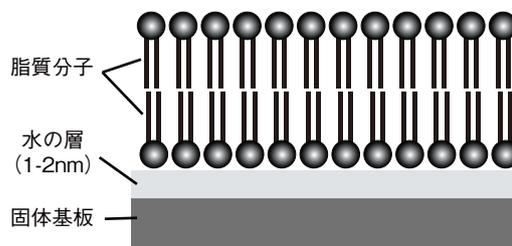


図1 Supported planar bilayer (SPB) の模式図

うな影響を与えるかを明らかにする事を目的とする。

近年では化粧品に用いられるTiO₂は透明度を上げるために超微粒子化が進んでいる。ナノメートルサイズの微粒子は、粒径や調整方法によって低指数面の組み合わせで形成される特徴的な構造を取ることが知られている^{1, 2)}。図2がルチル型TiO₂の代表的な低指数表面の構造である。ルチル型TiO₂表面は酸化物表面の中ではこれまでに最も多くの研究がなされており、表面原子構造、電子状態、化学反応特性について多くの情報が既に得られている^{3, 4)}。それぞれの低指数面のSPBに対する特性をTiO₂単結晶表面を試料として用いることでモデル化すれば、基板表面物性の「何が」「どのように」脂質膜に影響するのかを要素化することができると期待される。また、TiO₂はUV照射による超親水性の発現など、多様な表面機能を示す。本



Effect of Surface Properties and UV irradiation on the Supported Lipid Bilayer Membranes on Titanium Dioxide Surfaces

Ryugo Tero

Institute for Molecular Science

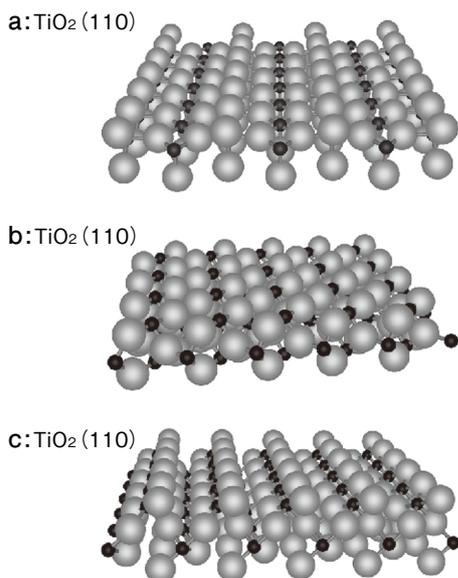


図2 ルチル型 TiO₂ 低指数面のバルク終端構造モデル (a) TiO₂(110) ; (b) TiO₂(001) ; (c) TiO₂(100) 。ルチル型 TiO₂ の単位格子は正方晶なので、(001) 面と (100) 面は等しくない。

レポートでは、TiO₂ の表面構造および表面状態が SPB の形状や性質、ドメイン構造に及ぼす影響を原子間力顕微鏡 (AFM) と蛍光顕微鏡を用いて調べた結果について報告する。

2. 実験

2.1 リン脂質ベシクル懸濁液の調製

目的に応じて、ゲル-液晶相転移温度 (T_c) の異なる 3 種類のリン脂質を使用した; dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC, $T_c = 41^\circ\text{C}$) dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC, $T_c = 24^\circ\text{C}$), dipalmitoleoylphosphatidylcholine (DPOPC, -36°C)。ガラスバイアル壁面に広げて真空乾燥させた後、リン脂質フィルムを緩衝溶液 (KCl 150 mM, MgCl₂ 40 mM, HEPES 5 mM /pH 7.2 KOH) 中で攪拌して 0.1 mg/ml のベシクル懸濁液とした。この懸濁液を凍結・解凍 5 回、超音波破碎、ポリカーボネート膜 (50 nm または 100 nm メッシュ) を通すフィルタリング⁵⁾、のプロセスによって SPB 形成に適した small unilamellar vesicle を調製した^{6, 7)}。これらのプロセス (凍結時は除く) は懸濁液をそれぞれのリン脂質の T_c 以上に保って行った。

2.2 シングルステップ TiO₂ 表面の調製

TiO₂ 表面の処理は、文献⁸⁾ のウェット法を一部変更して用いた。アセトン、メタノール、純水中で超音波洗浄した TiO₂ 単結晶基板を H₂SO₄+H₂O₂ (4:1) 溶液中で 5 s 煮沸して有機物を完全に除去、10% HF 水溶液中に 10 min 浸漬した後、酸素流通下 (1.0 L/min) で 700-850°C、1 h 焼成した。

2.3 基板表面上への SPB 形成

TiO₂ 表面への SPB 形成はベシクル展開法^{6, 7)} によって行った。洗浄・焼成した TiO₂ 表面上にベシクル懸濁液を滴下し、40°C に 30 分間保った後、液相を緩衝溶液で置換して未反応のベシクルを取り除いた。

2.4 AFM および蛍光顕微鏡観察

AFM 観察は、TiO₂ 表面形状は大気中、SPB 形成後の試料は緩衝溶液中でそれぞれ行った。前者は通常のタッピングモード、後者は磁気励振モードで行った。

蛍光顕微鏡観察のために、あらかじめ色素ラベルしたリン脂質 (lissamine rhodamine B sulfonyl-dioleoylphosphatidylethanolamine (Rb-DOPE), Ex/Em: 550/590 nm) を 1% 混ぜてベシクル懸濁液を調製した。脂質膜の蛍光顕微鏡観察は水銀ランプを備えた落射型顕微鏡を用いて行った。

3. 結果

3.1 TiO₂ 低指数面の表面構造

酸素雰囲気下で焼成した後の TiO₂ 低指数表面の AFM 像を図 3 に示す。TiO₂(110) (図 3a), (001) (図 3b), (100) (図 3c) の 3 種類の低指数面を用いて、平坦なテラスとステップで形成される表面を再現性よく調製することができた。図 3d には TiO₂(100) 面 (図 3c) のラインプロファイルのみを示したが、それぞれのステップの高さは単位格子 1 つ分の高さに等しく、シングルステップが形成されていることがわかる。

TiO₂(100) 面上では、焼成温度を変えることでモフォロジーの異なるステップ & テラス構造が現れることを見出した。焼成温度 700°C ではシングルステップが形成される (図 3c, d) が、焼成温度 800°C ではステップ高さが 2 倍になったダブルステップ構造が現れた (図 3e)。テラス幅もおよそ 2 倍に広がっているため、面全体での平均の傾きは変わっていない。焼成温度 850°C の表面では、ステップ高さはシングルステップ相当ながら、いびつなステップ形状を持ち、テラス上に [001] 方向に走るストリーク構造が観察された (図 3f)。

図 3 に示した TiO₂ 表面は、いずれの表面も室温の大気中、緩衝溶液中で安定に存在することを確認した。次に、これらの TiO₂ 表面のうち、TiO₂(100) 表面上への SPB 形成にの結果について述べる。

3.2 TiO₂(100) 表面上の SPB

図 3c に示したシングルステップ TiO₂(100) 表面上にベシクル展開法によって SPB 形成を行った。100 nm フィルターを通してから超音波破碎した DPOPC ベシクル懸濁液下で TiO₂(100) を 40°C でインキュベーションすることに

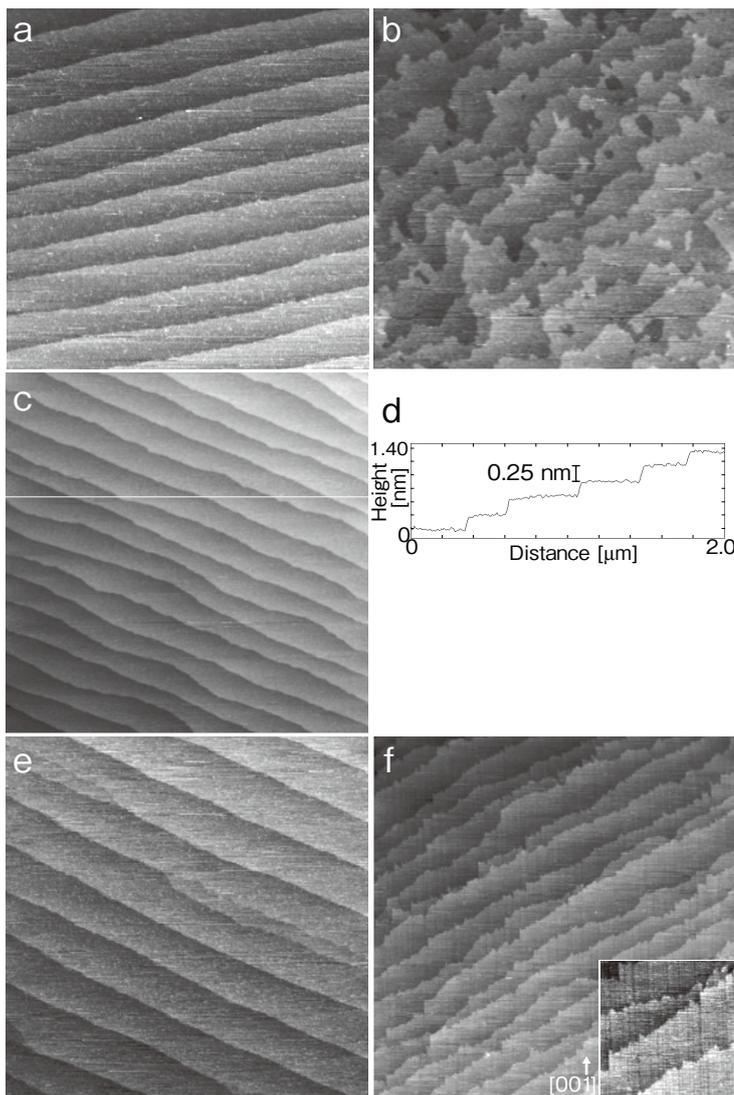


図3 HF処理後に酸素雰囲気下で1h焼成したTiO₂単結晶低指数表面のAFM像
 (a)TiO₂(110), 焼成温度800°C ((1.0×1.0 μm²); (b)TiO₂(001), 850°C ((1.0×1.0 μm²); (c)TiO₂(100), 700°C (2.0×2.0 μm²); (d)図3cのラインプロファイル; (e)TiO₂(100), 800°C (2.0×2.0 μm²); (f)TiO₂(100), 850°C (2.0×2.0 μm²), 挿入図は400×400nm². 全て大気中、室温で観察。

よって、ディフェクトの無いSPBがTiO₂表面全体を覆うことを蛍光顕微鏡観察によって確認した(図4a)。蛍光消光回復法(FRAP)によって、形成されたSPBが連続的で流動性を保っていることが示された。吸着ベシクルと2層目のSPBが存在するため、定量的な拡散係数の算出はできなかった。図4aの試料をそのままAFMで観察したものが図4bである。表面全体を覆っている脂質膜が、基板のステップ&テラス構造を反映した階段状の構造をとっていることがわかる。

一般的に液晶相のSPBは流動性が高く膜に欠陥が出来にくいいため、AFM像からは被覆率100%のSPBと何も無い表面の見分けが付きにくい⁹⁾。図4bにおいても、蛍

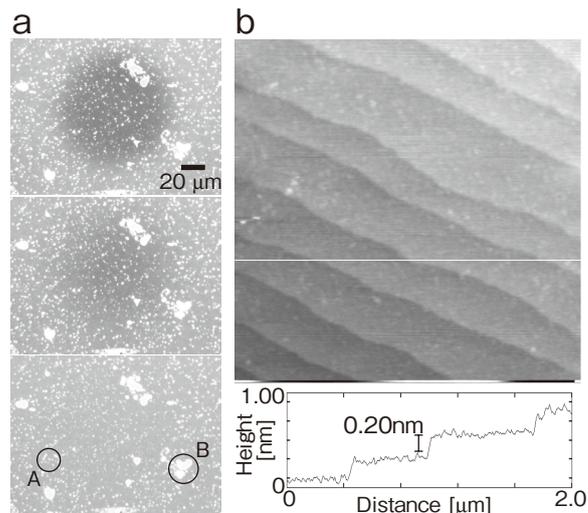


図4 シングルステップTiO₂(100)表面上に形成したDPoPC-SPBの(a)蛍光顕微鏡像と(b)AFM像(2.0×2.0 μm²)
 (a)は同じ領域でFRAPを行い、蛍光が回復していく過程を撮影したもの。A, Bで示した輝点と明るい領域はそれぞれ吸着ベシクルと2層目の二重膜。

光顕微鏡像とステップ高さがシングルステップよりも低く観察されることなどから観察領域全体が脂質膜に覆われていると考えられるが、直接的なデータであるとは言いがたい。そこで、室温で液晶相のDPoPC (T_c= -36°C)に室温でゲル相をとるDPPC (T_c=41°C)を1:1で混ぜた2相系SPBを形成し、AFM観察を行った(図5a)。2種類の脂質を混ぜることでDPPCのT_cが低下するため、インキュベーション(40°C)時には全体が液晶のSPBが形成されるが、室温付近では相分離が起こり、DPPCリッチなゲル相ドメインが析出する。液晶からゲルへの相転移に伴いランダムな配向をとっていたリン脂質の炭化水素鎖がオールトランス配向に変化してパッキングするため、膜厚が増加して、1分子当たりの占有面積は減少する。そのため、

AFM像の高さの差から、ゲル相と液晶相のドメインを区別することができる。また、面積の減少にともないSPBに欠陥が形成されて基板表面が露出するため、SPBの厚さを評価することができる。ゲル相ドメイン、液晶相ドメインの膜厚はそれぞれ5.8 nm, 4.3 nmであった(図5a)。AFM像のZ方向のコントラストを強調すると、いずれのドメイン上でもTiO₂基板のステップ構造を認識することができたことから(図5b)、相状態にかかわらずSPBが基板表面の原子レベル構造を反映した形状をとっていることが確認された。また、ゲル相ドメインの2次元的な形状に着目すると、図5cのように基板ステップ方向に伸びたエッジ多く観察された。

DPPCとDPoPCの混合比と観察温度を制御すること

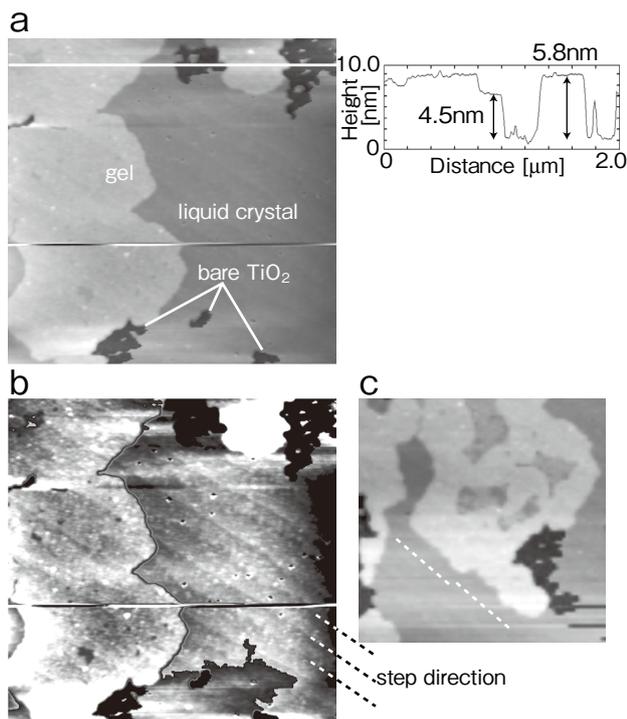


図5 (a)シングルステップ TiO₂(100) 表面上に形成した DPoPC+DPPC (1 : 1) の 2 相混合 SPB の AFM 像 (2.0 × 2.0 μm²)。 (b) 図5bの Z 方向のコントラストを強調した像。 (c) ステップ方向に沿ったエッジを持つゲル相ドメインの AFM 像 (1.5 × 1.5 μm²)。

で、ゲル / 液晶ドメインの割合を変化させることができる。図6はダブルステップの TiO₂(100) 表面 (図3e) 上に形成した DPPC : DPoPC = 1 : 3 の混合 SPB を 30 K/s で 25℃ から 5℃ に冷却し、5℃ で観察した AFM 像である。この冷却条件では DPoPC リッチな液晶相の SPB の中に、小さなゲル相ドメインが点在しているのが観察された (図6a)。ゲル相ドメインの大きさがテラス幅と同程度まで小さくなっており、液晶ドメイン上から基板のステップ構造が認識できるため、ゲル相析出の核生成サイトを調べることができる。図6b から、ゲル相の析出は平坦なテラス上で優先的に起きていることが確認された。

3.3 TiO₂ 表面への UV 照射効果

TiO₂ の重要な表面特性として、紫外光照射による超親水性の発現が上げられる¹⁰⁾。基材表面の親水性は微粒子の分散度などにも関係する要因であり、また、紫外光誘起の表面改質は屋外に長時間滞在した際の基材の材質変化としても影響すると考えられる。そこで、ベシクル展開法によって脂質を堆積する前の TiO₂ 表面上に紫外光照射を行った場合の SPB 形成への影響について調べた。

まず、シングルステップ TiO₂(100) 面 (図7c) に低圧水銀灯 (25W) を用いて大気中で紫外光照射を行い、表面構造に変化が現れないことを確認した。次に、フィルタ

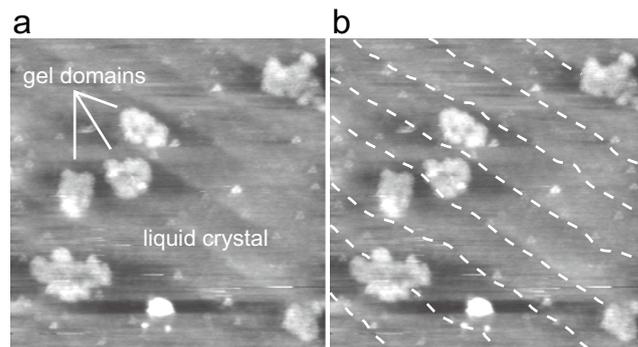


図6 (a)ダブルステップ TiO₂(100) 表面上に形成した DPoPC+DPPC (3 : 1) の 2 相混合 SPB の AFM 像 (2.0 × 2.0 μm²)。 (b) 図6aの液晶相上に観察されるステップ構造を破線で示した。

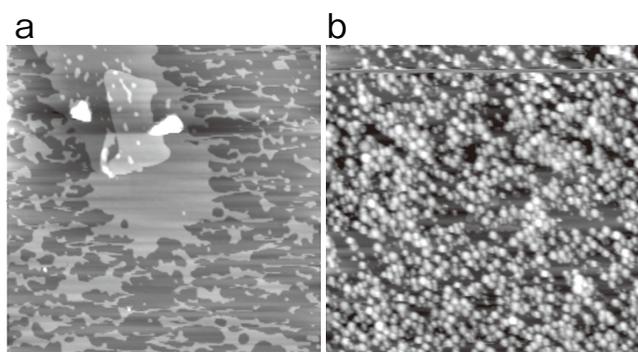


図7 シングルステップ TiO₂(100) 表面上へのベシクル展開法による SPB 形成における、基板表面への紫外光照射の効果。 (a) 紫外光照射なし。平面膜が形成されている。 (b) 紫外光照射を行った TiO₂(100)。表面にベシクルが吸着したままで、平面膜形成が進んでいない。

ーを通して粒径を約 50nm にそろえた DMPC-ベシクル懸濁液を用いて、紫外光照射の有無により SPB 形成に差が現れるかどうかを確かめた。紫外光照射を行わない TiO₂(100) 表面上では図4-6同様 SPB が形成された (図7a) のに対し、あらかじめ紫外光照射した TiO₂(100) 面上ではベシクルが吸着したままで平面膜の形成が進まなかった (図7b)。

4. 考 察

焼成後の TiO₂ 表面でシングルステップ現れるという結果は文献⁸⁾ に倣ったものであるが、加熱を酸素下で行ったことによってステップ形状などに違いが現れている。また、TiO₂(100) 表面が焼成温度によってステップ & テラス構造を保ちながらも、異なるモフォロジーを持つことは非常に興味深い (図3c-e)。これらの表面上での SPB の挙動を詳細に調べることによって、無機材料の表面処理方法と生体膜の相互作用について新しい知見が得られると期待できる。

本研究においては TiO₂(100) 表面にベシクル展開法に

よって比較的容易に SPB 形成をすることができたが、過去の報告では TiO₂ 表面上では SPB の形成が進みにくいとされてきた^{11,12)}。SPB は固液界面に存在する有機分子の自己組織化構造であり、基板表面の形状と化学状態、溶液のイオン濃度や pH、脂質の組成と相状態など、非常に多くのパラメーターを含む複雑な系である。TiO₂(001), TiO₂(110) 表面上での平面二重膜形成にも着手しており、いずれも質の良い SPB を作製できそうな感触を得ている。これらの実験によって、「表面」の持つパラメーターを要素化することに近づくと期待している。

Supported bilayer においては、脂質分子は基板表面に直接吸着しているのではなく、図 1 に示したように 1-2 nm の水の層を介して基板上に支持されている¹³⁾。この水の層を挟んだ上で、図 4, 5 で観察されたように、厚さ約 5 nm ある SPB はたった 0.25 nm の表面原子ステップ構造を反映した形状をとっており、基板表面と脂質膜間の距離が広範囲にわたってオンゲストロームオーダーで精密に決まっていることがわかる。また、図 5, 6 の結果は、この脂質膜の厚さのわずか 5% 程度の小さなひずみが、脂質膜内のドメイン形状やゲル相の核生成などの相分離過程に大きく影響を及ぼしていることを示している。ゲル相ドメインの形状が表面ステップ構造を反映したことから、脂質膜中での 2 次元分子拡散がステップに垂直 / 平行な方向で異方性を持っている可能性がある。表面微細構造を利用した指向性分子輸送や、拡散速度の違いを利用した分子選別などにつながると期待できる。ゲル相の核生成がテラス上で選択的に起きた (図 6) のは、ステップ構造によってできた歪によって分子の分配係数が変化したためであろう。脂質膜が歪んだ状態のステップ上にはよりフレキシビリティの高い液晶相の DPoPC が優先的に存在するため、結果として平坦なテラス上の SPB 内での DPPC 濃度が上昇し、過飽和度を越えた時点でゲル相の析出が始まると考えている。しかし、このような立体的効果だけでなく、ステップとテラスでの原子の化学状態の違いが影響している可能性も残されており、今後 TiO₂(110), (001) 面など表面原子配列や化学特性の異なる低指数表面を用いての実験で詳細を明らかにしたい。

紫外光照射による超親水性発現のメカニズムについては今でも盛んに研究が行われているが、TiO₂ 表面においては水分子が光誘起の解離吸着を起こして準安定的に表面水酸基密度が増加した状態になると報告されている¹⁰⁾。ベシクルあるいは SPB のリン脂質分子は親水性頭部によって水を介して親水基板表面に支持されているため、直観的には基板表面親水性の上昇にともないベシクル吸着が強まり SPB 形成速度は上昇しそうに思えるが、図 7 の結果は全くの反対である。筆者は以前、表面親水性を制御した SiO₂ 表面上への SPB 形成において、ある程度まで親水

性を低下させた方が SPB 形成速度が上昇することを報告した⁷⁾。これは、表面水酸基密度が高く最も親水度が高い SiO₂ 表面近傍には、水素結合で表面水酸基と結ばれた安定な水の層が存在するためである。この水素結合ネットワークがベシクルの基板表面への安定吸着を妨げ、平面膜形成のための障壁として働いている。光照射によって表面水酸基密度が増加した TiO₂ 表面上で SPB 形成が進まなかったことも、同様のメカニズムで説明することができると考えている。

5. 総括

TiO₂ 単結晶基板上にステップ & テラス構造を調整して SPB 形成を行い、その構造を AFM と蛍光顕微鏡によって観察した。SPB は原子ステップ高さの表面構造を反映した形状をとっており、その微細なひずみによって SPB 内での相分離の際にドメイン構造や核生成サイトの形状・位置が影響されることを明らかにした。また、TiO₂ 表面の光誘起親水性の発現によって脂質膜の吸着構造が大きく変化することを見出した。

謝辞

本研究は、分子科学研究所・宇理須恒雄教授、名古屋大学・宇治原徹助教授との共同研究である。本研究に対して助成をいただきました財団法人コスメトロジー研究振興財団に深く感謝いたします。

(参考文献)

- 1) P. M. Oliver, G. W. Watson, E. T. Kelsey, et al., Atomistic simulation of the surface structure of the TiO₂ polymorphs rutile and anatase, *J. Mater. Chem.*, 7, 563-568, 1997.
- 2) T. Ohno, K. Sarukawa, and M. Matsumura, Crystal faces of rutile and anatase TiO₂ particles and their roles in photocatalytic reactions, *New J. Chem.*, 26, 1167-1170, 2002.
- 3) Y. Iwasawa, Dynamic oxide interfaces by microscopic techniques at high resolutions, *Surf. Sci.*, 404-404, 8-19, 1998.
- 4) U. Diebold, The surface science of titanium dioxide, *Surf. Sci. Rep.*, 48, 53-229, 2003.
- 5) R. C. MacDonald, R. I. MacDonald, B. P. M. Menco, et al., Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles, *Biochim. Biophys. Acta*, 1061, 297-303, 1991.
- 6) R. Tero, M. Takizawa, Y. J. Li, et al., Lipid membrane formation by vesicle fusion on silicon dioxide surfaces modified with alkyl self-assembled monolayer islands,

- Langmuir, 20, 7526-7531, 2004.
- 7) R. Tero, H. Watanabe, and T. Urisu, Supported phospholipid bilayer formation on hydrophilicity-controlled silicon dioxide surfaces., Phys. Chem. Chem. Phys., 8, 3885-3894, 2006.
- 8) Y. Yamamoto, K. Nakajima, T. Ohsawa, et al., Preparation of atomically smooth TiO₂ single crystal surfaces and their photochemical property, Jpn. J. Appl. Phys., 44, L511-L514, 2005.
- 9) S. Furuieka, J. Hirokawa, S. Yamada, et al., Atomic force microscopy studies of interaction of the 20S proteasome with supported lipid bilayers, Biochim. Biophys. Acta, 1615, 1-6, 2003.
- 10) K. Hashimoto and H. Irie, Photo-induced Hydrophilic Conversion on TiO₂ Surface, Hyomenkagaku, 25, 252-259, 2004.
- 11) C. A. Keller and B. Kasemo, Surface Specific Kinetics of Lipid Vesicle Adsorption Measured with a Quartz Crystal Microbalance, Biophys. J., 75, 1397-1402, 1998.
- 12) I. Reviakine, F. F. Rossetti, A. N. Morozov, et al., Investigating the properties of supported vesicular layers on titanium dioxide by quartz crystal microbalance with dissipation measurements, J. Chem. Phys., 122, 204711-204711-204718, 2005.
- 13) C. M. Ajo-Franklin, C. Yoshina-Ishii, and S. G. Boxer, Probing the Structure of Supported Membranes and Tethered Oligonucleotides by Fluorescence Interference Contrast Microscopy, Langmuir, 21, 4976-4983, 2005.

コラーゲンに正しい構造を取らせる、HSP47 誘導剤の発見

熊本大学大学院医学薬学研究部

水島 徹

Since HSP make cells resistant to various stressors, HSP-inducers are effective against various diseases, such as gastric ulcer. Therefore, we here try to establish the screening system for HSP-inducers. We construct plasmid in which the luciferase gene is located downstream of the promoter of HSP gene. Cells transfected with this plasmid showed phenotype of stimulation of luciferase activity upon heat shock, suggesting that this system is useful for screening of HSP-inducers. We are now starting such screening from natural products.

1 緒言

細胞、特に人体を外界から隔てている上皮細胞の傷害(細胞死)は疾患の直接の原因となる。例えば胃を様々なストレスから守っている胃粘膜細胞の傷害は胃潰瘍を導く。また、気道を保護している気道上皮細胞の傷害は、神経終末の露出により気道過敏症、即ち喘息を起こす。従って、細胞を様々なストレスから守る物質は、疾患治療薬として有望である。本研究提案は、細胞を保護する蛋白質を誘導する物質を天然物から選択し、疾患治療薬(抗潰瘍薬、抗喘息薬)として開発することを目的としている。このような医薬品は現在なく、本研究は独創的である。

我々が注目しているのはストレス蛋白質である。細胞はストレスに対し、適切な蛋白質(ストレス蛋白質)を発現することによって、自らの生存を保っている。そこでストレス蛋白質を人工的に発現させることによって、細胞をストレスから守ることが出来る。実際我々は胃粘膜細胞において、代表的なストレス蛋白質である熱ショック蛋白質(HSP)を人工的に誘導することによって、胃粘膜細胞を様々なストレス(アルコール、酸、ピロリ菌など)に耐性化出来ること、及びそれによりストレス性胃潰瘍を防御できることを初めて見出した。また最近、気道上皮細胞にHSPを人工的に誘導することによって、気道上皮細胞を様々なストレス(アレルギー、活性酸素、炎症性細胞傷害因子)に耐性化出来ること、及びそれにより喘息症状を和らげることが出来ることを初めて見出した。

一方最近、蛋白質の高次構造(これをフォールディング(折り畳み)と呼ぶ)の異常が多く疾患の原因になって

いることが明らかにされ、それらの疾患は“蛋白質フォールディング異常病”と総称されるようになった。代表的な蛋白質フォールディング異常病は、神経変性疾患、プリオン病(いわゆる狂牛病)、嚢胞性繊維症などである。ほとんど全ての蛋白質フォールディング異常病の根本的な治療法は確立していない。これは蛋白質フォールディング異常病の根本的な原因である、蛋白質のフォールディング異常の観点からその治療法を開発しようとする研究がほとんどなされてこなかったためである。HSPは蛋白質が正しいフォールディングをとるのを積極的に助けている。そこで、安全なHSP誘導薬は、抗潰瘍薬、及び抗喘息薬としてだけでなく、蛋白質フォールディング異常病の根本的な治療法を確立にもつながると期待されている。

2 実験

2.1 プラスミドの構築

プラスミド、LSNWTを入手し、それをHaeIIIとBamHIで切断し、human HSP47プロモーター部分を切り出し、それをpGL3-basic Neo Vector plasmidのBglII-SmaI部位に導入した。作成されたプラスミドを、pGL3-pHSP47と命名した。

2.2 細胞への導入

CHO-K1細胞に、pGL3-basic Neo Vector plasmid、pGL3-pHSP47、及びpGL3-pHSP47をリポフェクトアミン(プロメガ社)を用いて導入した。モノセル化後、G418(400 µg/ml)で選択した。熱ショックによるルシフェラーゼ活性上昇を指標に候補細胞を選択し、さらに同様の条件でモノセル化を2回行った(モノセル化後、同様の方法で候補細胞を選択した)。最も誘導効率の高い細胞をストックし、それを起こして、次の項で述べる実験を行った。

2.3 ルシフェラーゼアッセイ

24wellプレート上でconfluentになるまで培養した(Ham F12, 10%FCS, 400 µg/ml G418)。42度で1.5 h熱ショック



Identification of HSP47-inducers

Toru Mizushima

Graduate School of Medical and Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University

クをかけ、その後 37 度で 12 時間培養した。ルシフェラーゼアッセイは、プロメガ社のルシフェラーゼアッセイキットを用いた。

3 結果

熱ショック依存にルシフェラーゼ活性の上昇が顕著に見られた。この結果は、継代培養を続けても、また一端ストックし、それをまた起こして使用しても、ほぼ同じ結果が得られている。

4 考察

以上の結果から、ルシフェラーゼを用いた、HSP 誘導薬のスクリーニングシステムを確立することが出来たと考えている。そこで現在このシステムを用いて、様々な生薬成分から、HSP 誘導薬の検索を行っている。

(参考文献) (本研究成果は投稿準備中)

- 1) Tsutsumi, S., Gotoh, T., Mima, S., Tomisato, W., Hoshino, T., Hwang, H-J., Mori, M., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. *Cell Death Differ.* 11, 1009-1016. (2004)
- 2) Mima, S., Tsutsumi, S., Ushijima, H., Takeda, M., Fukuda, I., Yokomizo, K., Suzuki, K., Sano, T., Nakanishi, T., Tomisato, W., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. *Cancer Res.* 65, 1868-1876. (2005)
- 3) Tanaka, K., Tomisato, W., Hoshino, T., Ishihara, T., Nanba, T., Aburaya, M., Katsu, T., Suzuki, K., Tsutsumi, S. and Mizushima, T. *J. Biol. Chem.* 280, 31059-31067. (2005)
- 4) Ushijima, H., Tanaka, K., Takeda, M., Katsu, T., Mima, S. and Mizushima, T. *Mol. Pharmacol.* 68, 1156-1161. (2005)
- 5) Tsutsumi, S., Namba, T., Tanaka, K., Ishihara, T., Arai, Y., Aburaya, M., Suzuki, K., Hoshino, T. and Mizushima, T. *Oncogene* 25, 1028-1029. (2006)
- 6) Aburaya, M., Tanaka, K., Hoshino, T., Tsutsumi, S., Suzuki, K., Makise M., Akagi, R. and Mizushima, T. Heme oxygenase-1 protects gastric mucosal cells against non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Biol. Chem.* in press. (2006)

皮膚再生を促す non-drug 細胞間脂質類似構造体 (リオトロピック液晶) の開発

聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター DDS 研究室

五十嵐 理慧

Tissue in body must quickly recognize injury to respond to the rapid pace of epidermal growth. In skin, the epidermal cells must also react to danger signals from the surrounding extracellular lipid of the stratum corneum spaces and immediately participate by initiating the wound repair process. The topical administration of lyotropic liquid crystal on stratum corneum rapidly broke down the lipid lamella structure which would be recognized as a wound without organ-change. This can activate a variety of biological processes. This study set out to determine if the occur of the phase transition of lipid to neighbour different physicochemical structure can stimulate keratinocyte cells and what mechanism is responsible for this response. Using small angle x-ray scattering (SAXS) analysis, the response to the transient structural change of lipid was detected because it might result the diffusion of oil and/or water from liquid crystal towards lipid lamella phase. Simultaneously, significant increase of the growth factors and inflammatory cytokines were detected after the administration of liquid crystal. Not only the excess expression of cytokines but also the extent of TEWL as the barrier marker of skin increased. These observations suggest that the structural change of lipid can stimulate to trigger recognition of a slight injury in the wound defence and repair response as homeostasis. This method actually succeeded the improvement of photo-induced hyperpigmentation on human face.

1. 緒言

加齢や光老化による顔面の日光性（老人性）色素斑、いわゆるシミやしわ（顔面の陥凹、変形を含む）の改善は、Quality of Life (QOL) を重要視するこれからの高齢化社会において非常に重要な問題のひとつになると予想される。従来から、シミやしわの改善については化粧品業界が中心的に商品開発を行い、美白効果がある様々な薬物を発見・開発している。近年では、長期使用しなければ効果が得られにくい化粧品や医薬部外品では消費者の満足が得られにくくなってきたため、確実に効果が上がる形成外科や皮膚科におけるレーザー治療、医師主導で開発された化粧品（ドクターズコスメ）に人気が集まっている。我々の研究室では、皮膚再生に効果の高い薬物であるビタミン A 活性体（all-trans Retinoic Acid, atRA）^{1, 2)} を新規ナノテクノロジー技術によって Drug Delivery System (DDS) 化した外用剤（nanoegg®）を開発した。表皮ターンオーバーを加速することでシミの排出を促し、同時に表皮細胞にヒアルロン酸産生を誘導したことからしわの改善も達成することが可能となった^{3, 4)}。

このように、皮膚再生研究は表皮もしくは真皮における細胞の分化・増殖を促す薬物を用い、種々の方法（角質軟

化剤やイオントフォレシス、マイクロニードル法など）によってより効率良く角質層の透過性を向上させる技術開発が主流である。しかしながら、一方生体は本来自然治癒を促す能力、ホメオスタシスを備えている。例えば皮膚が創傷した際、器質的に変化が生じる、すなわち機械的損傷を伴う場合と、器質的に変化が生じない場合の2通りに大きく分類される。一般に創傷時は炎症性サイトカインが産生し、炎症状態を引き起こす。器質的な変化が生じた場合は、生体は自然治癒するため様々なサイトカインやケモカインを細胞に産生させ、細胞の修復や遊走が起こり治癒する方向に向かう。一方、器質的な変化が生じない場合の詳細な検討は今のところなされていない。これは、外観上の変化がないために研究として重要視されていないものと予想される。しかしながら、物理的概観変化なしに皮膚再生を引き起こすことが出来れば、新たな治療法として有効であると考えられる。そこで我々は、ホメオスタシス誘導による皮膚再生を目指し、バリア機能を有する皮膚角質層に着目した。角質層の細胞間脂質の一過性の物理的変化が器質的な変化なしの創傷に相当すると仮定し、新たな皮膚再生誘導法として研究を行っている⁵⁾。

細胞間脂質はリオトロピックラメラ液晶構造を形成し、外界からの細菌の侵入や水分の蒸散をコントロールしバリアーとしての機能を果たしている。我々は、リオトロピック液晶を作製した。本稿では、リオトロピック液晶を皮膚に塗布した際の皮膚再生効果とその機序について報告する。

2. 実験

2.1 リオトロピック液晶の作製

水、極性油、界面活性剤を様々な配合で混合し、相平衡



Development of intercellular lipids (lyotropic liquid crystal) which can induce skin regeneration

Rie Igarashi

Institute of Medical Science, St. Marianna University, School of Medicine

図を作成した。リオトロピック液晶領域内で、小角 x 線散乱を用い、領域内液晶の構造を同定した。

2.2 in vivo 皮膚塗布実験

2.1 で作製した非イオン界面活性剤、油、水からなるリオトロピック液晶を、ddY mice (5-week, male) 背部 $2 \times 2 \text{ cm}^2$ に 30 mg を塗布し、2 日後に皮膚を採取、コロイド鉄染色（ヒアルロン酸を検出するための染色方法で併せて表皮部位の認知も出来る染色方法）を行った。

2.3 皮膚組織染色及び解析

ddY mice (5-week, male) 背部に塗布し 2 日後に採取した皮膚を、ホルマリン固定後、コロイド鉄染色（ヒアルロン酸を検出するための染色方法で併せて表皮部位の認知も出来る染色方法）を行った。

3. 結果と考察

3.1 リオトロピック液晶塗布による皮膚再生効果

ddY マウスに塗布した結果を Fig. 1 に示す。

皮膚再生効果がある場合、表皮細胞のターンオーバーが促進されるため表皮の肥厚化（keratinocyte の増殖・分化の結果）として検出される。Fig. 1 の赤色で染色されている上層部分が表皮層に相当する。液晶を形成している各成分にはほとんど表皮肥厚効果はないが、液晶塗布では明らかに表皮は肥厚していることがわかる。そこで、次に液晶の表皮肥厚に対する濃度依存性について検討した結果を Fig. 2 に示す。同様にエマルジョンローション溶液に配合されている液晶濃度に応じて表皮は肥厚し、30% 配合では

表皮基底及び有棘細胞間隙にヒアルロン酸（青く染色されている部分）が産生されていた。液晶を皮膚に塗布すると、単回塗布にもかかわらず表皮は肥厚し、その肥厚度の程度から最適液晶濃度が存在することが Fig. 1 と Fig. 2 の結果から明らかとなった。この肥厚は、基底細胞の増殖（増殖時に発現する Ki-67 の免疫染色が陽性）と、有棘細胞及び顆粒細胞の分化（cytokeratin 1 の蛍光染色が強く陽性で、loricrin の発現は wild-type と大きく変わらない）の増強のために、顕著な効果が得られたと考えられる⁵⁾。

3.2 リオトロピック液晶による皮膚再生メカニズム

創傷治癒時に細胞はヒアルロン酸を産生すると言われている⁶⁾。液晶塗布が創傷治癒と同じ状態を促しているならば、ヒアルロン酸の産生だけでなく、炎症性サイトカイン（tumor necrosis factor (TNF)- α や interleukin (IL) 1β など）量も増加しているはずである。Fig. 3 は keratinocyte の増殖・分化に大きく関わっているサイトカインである heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF)⁷⁾ mRNA や Transforming growth factor (TGF)- $\beta 1$ ⁸⁾ mRNA の産生量も測定している。無処置に比べ、HB-EGF や TGF- $\beta 1$ の産生は 4 倍以上であり、炎症性サイトカインである TNF- α ⁹⁾ や IL- 1β の産生も高いことがわかる。この結果は、液晶塗布による皮膚再生は増殖・分化に関わるサイトカインの産生に大きく依存していることが理解されるが、同時に炎症性サイトカイン産生も増加していたことから、ホメオスタシスに基づく創傷治癒状態に近いことも予想された。

液晶塗布により皮膚に何が起きているのかを理解する

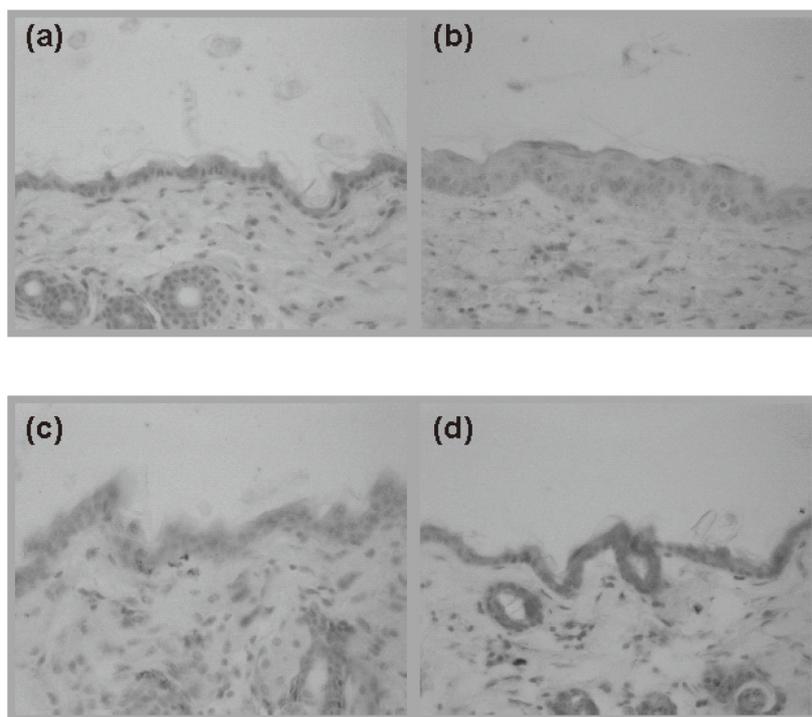


Fig.1 Histological researches of topical administration of liquid crystal. The dorsal areas of ddY mice (male, 5-week) were used as in vivo. (a) non-treatment (b) liquid crystal treatment (c) oil (d) surfactant

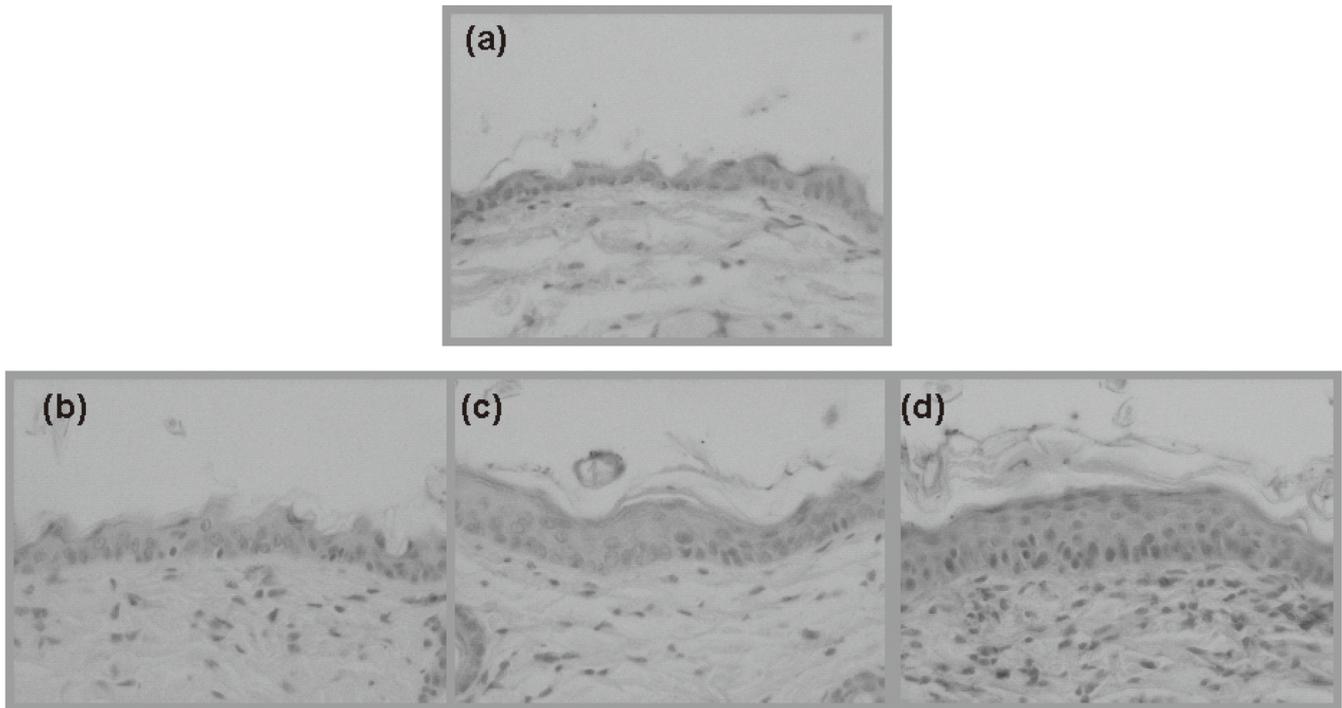


Fig.2 Dose dependence of liquid crystal. The dorsal areas of ddY mice (male, 5-week) were used as in vivo. (a) liquid crystal 0% (b) liquid crystal 10% (c) liquid crystal 20% (d) liquid crystal 30%

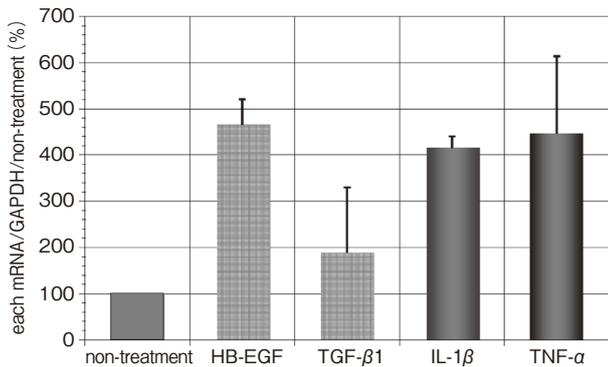


Fig. 3 Expression of mRNAs of several cytokines HB-EGF, TGF-β1 for the proliferation and differentiation of keratinocytes, and IL-1β, TNF-α for the inflammation. The expression of each cytokines was estimated the level of non-treatment sample as 100%, respectively. The liquid crystal 30mg was administered on mice dorsal areas, and the tissue was taken at 2-day after one time treatment with liquid crystal.

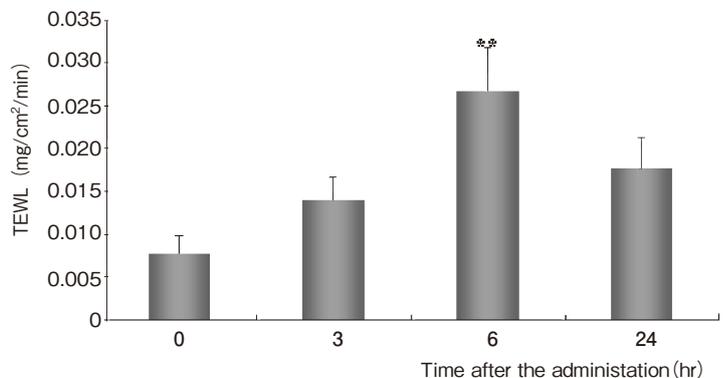


Fig. 4 Change of TEWL degree after the topical administration of liquid crystal on the mouse dorsal area 2 × 2cm². 50mg of liquid crystal was administered one time (n=5).

ために、マウスへの液晶塗布後の transdermal water loss (TEWL) 値を測定した (Fig. 4)。塗布後6時間まで徐々にバリアー機能は崩壊し、1日後にはほぼ戻っていることがわかった。崩壊の程度は正常が0.02mg/cm²/minであることからそれほど大きくはない。バリアー機能崩壊は、バリアー機能を中心的に担う角質層の細胞間脂質変化に基づくものと考えられる。

4. 総括

液晶に使用されている各成分は塗布と同時に細胞間脂質への受動拡散、もしくは細胞間脂質成分の塗布液晶内への拡散が起こり、その結果細胞間脂質構造相転移が引き起こされたと想定できる。塗布後短時間で細胞間脂質の秩序構造崩壊が誘導されスピノーダル分解による chaotic structure に変化する。時間経過とともに本来の細胞間脂

質構造であるラメラ構造は bicontinuous cubic phase への転移が誘導される。しかしながら、この相転移は一過性で、塗布後 24 時間ではほぼ元の状態に戻ると考えられる。この仮説は TEWL 値変化 (Fig. 4) から理解できる。液晶構造が皮膚再生能にどのように影響するかを検討するため、preliminary experiment として液晶の面間隔変化と表皮肥厚現象の関係を検証する予定である。液晶の面間隔を示す SAXS 散乱カーブと、マウス切片の HE (hematoxylin Eogin) 染色の関係を検証することで、新たな皮膚再生のメカニズムを明らかにし、薬物を使用せずに生体の本来持つ自然治癒力を促して皮膚再生を実現するといった従来にないまったく新しい概念を構築していきたいと考えている。

謝 辞

本研究は、聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター先端医薬開発部門 DDS 研究室の山口葉子氏、長澤輝明氏、中村なつみ氏、松本香代氏、平田圭一氏らの研究に基づくものである。ここに記して感謝する。

(参考文献)

- 1) Klingman, L.H., Duo, C.H., Klingman, A.M., *Connect. Tissue Res.*, 12 (1984) 139.
- 2) Klingman, A.M., Grove, G.L., Hirose, R., Leyden, J.J. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 15 (1986) 836.
- 3) Y.Yamaguchi, T.Nagasawa, N.Nakamura, M.Takenaga, M.Mizoguchi, S.Kawai, Y.Mizushima, R.Igarashi, *J.Controlled Release*, 104 (2005) 29
- 4) Y.Yamaguchi, N.Nakamura, T.Nagasawa, A.Kitagawa, K.Matsumoto, M.Mizoguchi, R.Igarashi, *Die Pharmasie*, (2006) 6,117-121
- 5) Y.Yamaguchi, T.Nagasawa, A.Kitagawa, N.Nakamura, K.Matsumoto, H.Uchiwa, K.Hirata, R.Igarashi, *Die Pharmasie*,(2006) 6,112-116
- 6) Kristen R.Taylor, Janet M. Trowbridge, Jennifer A. Rudisill, Christian C.Termeer, Jan C.Simon, Richard L.Gallo, *J.Bio. Chem.* 279 (2004) 17079
- 7) Stoll S.W., Elder J.T., *Exp. Dermatol.*, 7 (1998) 391.
- 8) Jennings MT, Pietenpol JA. *J Neurooncol* 36(1998) 123
- 9) Hatano Y. Terashi H, Arakawa S, Katagiri K. *J Invest Dermatol* 124 (2005) 786

Ⅱ. 生体作用、安全性に関する分野

ラミニン-5 α 3LG4 由来シンデカン結合ペプチドによる表皮細胞遊走活性化

京都大学大学院医学研究科皮膚生命科学講座

宇谷 厚志

Laminin α 3 chain, a functional key subunit of laminin-5, contains a large globular module (G module) at its C-terminus, which consists of a tandem repeat of five homologous LG modules (LG1-5). Here, we show that a recombinant α 3LG4 and synthetic peptides containing syndecan binding motif within LG4 (A3G756) induced keratinocytes motility and a MMP-9 expression in keratinocytes. The A3G756-induced cell motility was inhibited by an MMP-9 inhibitor and a neutralizing antibody of MMP-9, indicating the cell motility was dependent on an MMP-9 activity. In addition, the A3G756-induced cell migration was also abolished by the presence of p38MAPK inhibitor, but not by Erk MAPK inhibitor. Neutralizing antibody to integrin α 5 as well as β 1 could inhibit A3G756-induced cell migration. These data showed that syndecan binding with laminin-5 α 3LG4 module induced keratinocyte migration, which was mediated by a set of molecules such as MMP-9, p38MAPK, and integrin α 5 β 1. These results suggest that the interaction between laminin and syndecan may have a significant role in reepithelialization at wound healing.

1 緒言

表皮真皮基底膜に接して存在する表皮細胞の「皮膚基底細胞層」には、表皮細胞、メラノサイトなどが属する。これらの細胞は、基底膜の細胞外マトリックスに直接結合しており、マトリックスからシグナルを受け、分化、増殖、アポトーシス等生物学的活動を調節している。基底膜は表皮幹細胞のいわゆる「ニッチェ」を提供していると考えられる。一般に接着細胞は、その足場を「受容体」で認識し、本来の機能を発揮する。皮膚基底膜には、4型コラーゲン、パーレカンをはじめとするプロテオグリカン、ラミニンなどが存在する。これらが、複雑に相互結合し、細胞へのシグナルを調節していると考えられる。その中で、ラミニン-5は、特に皮膚科で精力的に研究されている分子の1つである。角化細胞に対して、ラミニン-5は、細胞接着、遊走、分化、アポトーシス等の機能を有し、また癌細胞の転移を制御する機能もあるなど皮膚科医にとって興味深い分子である。

私は、ラミニン-5の生物学的活性を研究してきており、近年、ヘパリン依存性細胞接着活性中心を同定した^{1,2)}。本研究では、ラミニン-5由来細胞接着活性中心を含む合成ペプチドの表皮細胞遊走活性化をマトリックスメタロプロテイナーゼ産生、MAPK、インテグリンに焦点を当てて解析する。皮膚基底膜は、単なる「構成成分」としての機

能があまりに明確であるために、かえってマトリックス成分が細胞を活性化するという面に、関心が低かったと言える。それだけに、「基底膜分子が表皮を活性化する」というコンセプトは、これから注目を集める分野に成りうると考える。

2 実験

Materials and methods

1 Cell culture

Human primary keratinocytes were purchased from Clonetics and maintained in keratinocyte-SFM supplemented with EGF and bovine pituitary extracts (Invitrogen Life Technologies). Keratinocytes were used at the 2nd ~ 5th passage in the experiments.

2 Recombinant Proteins and Synthetic Peptide

Recombinant α 3 LG4-5, LG4 and LG5 modules were expressed as a chimera with human IgG Fc portion at the C-terminus and purified as previously described with a minor modification^{1,2)}. Briefly, recombinant proteins were expressed in 293 T cells by Ca-P transfection kit (Invitrogen Life Technologies). After 24h, cells were incubated with CHO medium (Invitrogen Life Technologies) for another 2 days, followed by purification with protein A-Sepharose (Amersham-Pharmacia Biotech).

3 Reagents

An anti-human MMP-9 monoclonal antibody (6-6B) and a MMPs inhibitor (MMP-9/MMP-13 Inhibitor I, 444252) were purchased from Calbiochem.



Keratinocyte migration activated by synthetic peptide containing syndecan binding site within laminin-5 α 3LG4 domain

Atsushi Utani

Associate professor, Department of dermatology, Kyoto University Graduate School of Medicine

FITC-conjugated anti fibronectin antibody (#4470-2504) was from Biogenesis. MAPKs inhibitors, SB203580 and PD98059, were from Calbiochem. The MMPs and MAPKs inhibitor were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). Heparin was from SEIKAGAKU KOGYO and cycloheximide from Sigma Chemical Co. The protein concentration is calculated by the BCA Protein Assay Kit (Pierce). Purity of proteins was determined by reducing 10% SDS-PAGE and Coomassie Blue staining.

The following function-blocking monoclonal antibodies (mAbs) against integrin subunits were used: PIE6 against integrin α 2; P1B5 against integrin α 3; P1D6 against integrin α 5; GoH3 against integrin α 6. All of them were obtained from chemicon, Temecula, CA. Rat mAb13 against integrin β 1 was a kind gift from Dr. K. M. Yamada (National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health, Bethesda, USA).

4 Colloidal Gold Phagokinetic Assay³⁾

Cell migration induced by synthetic peptides was examined by a phagokinetic track assay, as previously described by Albrecht-Buehler. Briefly, cover slips (10 mm in diameter) were dipped in 1 % freshly prepared bovine serum albumin (BSA) in distilled water and then in 100% ethanol and were quickly dried with a hair dryer. They were placed into 24-well tissue culture plates. The BSA-coated cover slip was covered with 0.3 ml of Gold salt solution (0.01% of formaldehyde was mixed in the solution (10% of 14.5mM HAuCl₄, 58% of H₂O and 32% of 36.5mM Na₂CO₃) with boiling.) and left undisturbed for 1-2 h to let the gold salt particles settle. Following PBS wash, the cover slips were kept at 4 °C in dMEM. Plates were rinsed once with PBS before use. Approximately 3,000 cells were plated onto the wells and allowed to adhere the cover slips for 30-60 minutes, the peptide was added to medium to induce migration. The cells were incubated for 12-24 h, washed and fixed in 10% formaldehyde in PBS for 10 min. Three randomly selected and non-overlapping fields (x40) analyzed under dark field optics and photographed with a CCD camera (Model VB7010, KEYENCE) and by a NIH Image 1.60 program. The migration was detected as an area without gold particle. The migration index (MI) represented the ratio of the area consumed by cell migration tracks to a whole area of the field.

5 RT-PCR Analysis of MMP-9

After 24 h stimulation of recombinant proteins or synthetic peptides, total RNA was prepared from cells by RNAeasy kit (Qiagen GmbH). cDNA was synthesized from RNA (2.0 μ g) with an oligo (dT) primer in a total volume of 21 μ l by SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies). cDNA (1 μ l for MMP-9 or 0.1 μ l for GAPDH) was subjected to PCR for amplification. In preliminary experiments, we determined the optimal number of cycles within the linearity of reactions for each PCR product. The cycle number for MMP-9 was 30 cycles and GAPDH was 25 cycles. The primers for PCR are: The primers for PCR are: human MMP-9 (1715-2129nt, Genbank™ J05070), forward 5'-AAGCTGGACTCGGTCTTTGAG and backward 5'-ACTGCAGGATGTCATAGGTC; human GAPDH (292-885 nt, Genbank™ J04038), forward 5'-CCCATCACCATCTTCCAG and backward 5'-CCTGCTTCACCACCTTCT. Using these primers, PCR was performed by the Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics) at 94°C for 4 min followed by individual cycles at 94°C for 30s, 58°C for 30s, 72°C for 1 min with an extension step of 7 min at 72°C at the end of the last cycle. The products were separated on 1.5% agarose gel. The bands were visualized with ethidium bromide staining.

6 Gelatin Zymography

Keratinocytes (1.2 \times 10⁴ cells in 96-well dishes) were seeded and incubated for 24h. Cells were starved for 24h and treated in 50 μ l of fresh medium with reagents. Conditioned media were recovered, and lyophilized. The lyophilized samples were dissolved in nonreducing sample buffer (6% glycerol, 1% SDS, and 0.004 % bromophenol blue) , and incubated in 37°C water bath for 10 min. Samples were loaded on a 10% SDS-polyacrylamide gel containing 1 mg/ml gelatin (BioRad Co.Ltd.) . The gel was run in Tris/glycine buffer for 2h and then incubated in 2.5% Triton X-100 solution for 15 min twice to remove SDS. To detect gelatinase activity, the gel was incubated in reaction buffer containing 50 M Tris-HCl (pH 7.4) , 0.2M NaCl, 5 mM CaCl₂ and 1 mM ZnCl₂ overnight at 37 °C . The gelatinolytic activity was visualized by staining with 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 10% (v/v) glacial acetic acid, and 30% (v/v) methanol and destaining with 10% (v/v) acetic acid and 30% (v/v) methanol. Protease activity

was detected as translucent area in a Coomassie blue-stained gel. The scanned results of gels were calculated by NIH image 1.60. The values except time course analysis were depicted as the ratio of the conditioned media only as a control.

7 Immunostaining

HaCat cells (immortalized keratinocytes) seeded on poly-D-lysine coated cover glass were fixed with 4% paraformaldehyde/PBS and followed by incubation with FITC-conjugated anti fibronectin antibody (Biogenesis) at 1 : 200 for 1 h at room temperature. Photograph was

taken by Carl Zeiss LSM510 Confocal microscopy.

3 結果・考察

3・1 ラミニン-5 α 3鎖のLG4ドメインは、角化細胞遊走を刺激する。

以前、ラミニン α 3鎖LG4に細胞接着活性があること¹⁾、また同部位がMMP-1分泌を促すこと²⁾を証明した。本研究において、その活性部位が細胞遊走を刺激するかどうかを判定した。はじめにレコンビナント蛋白でLG45ドメインをつくり、培養角化細胞に投与し、その遊走刺激活性を金コロイド法で判定した (Fig. 1A, B)。細胞が動いた部分の金コロイドを貪食するという性質を利用した方法であ

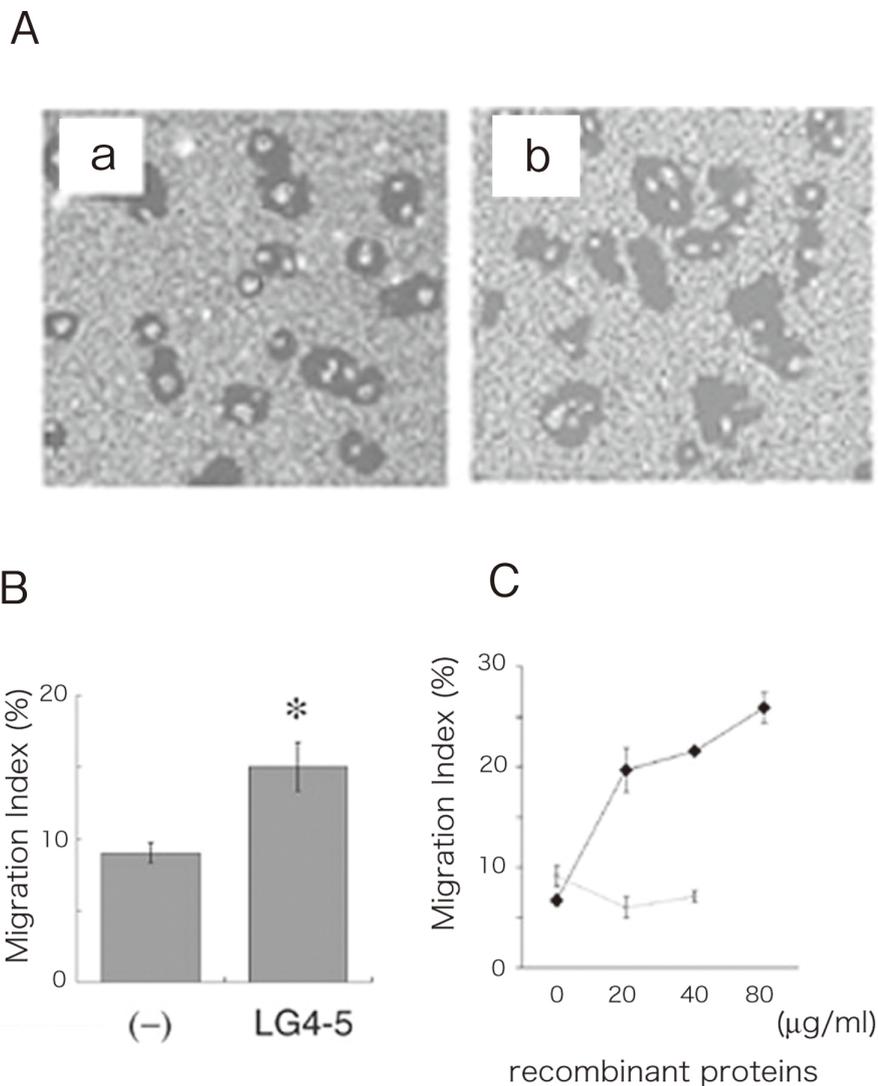


Figure1 ラミニン α 3LG4 はケラチノサイトの遊走を刺激する

A: Keratinocyte migration stimulated by recombinant laminin α 3LG4-5 module. Keratinocytes were incubated on gold particle coated cover slips without (a) or with (b) 10 μ g/ml of the rec-LG4-5 module. After 24 hour stimulation, cells were fixed and representative fields were photographed at x 40 under dark field optics.

B: Quantitation of the Phagokinetic track was calculated by measuring the MIs, using NIH Image 1.60. The data presented are mean \pm S. D. of three independent experiments. *, $p < 0.05$.

C: Dose-dependent manner of cell migration activity stimulated by recombinant LG4 modules. Keratinocytes were stimulated for 24 h. Quantitation of the Phagokinetic track was calculated as above.

る。この結果 LG4 は、濃度依存性に遊走刺激活性を持つことが明らかになった (Fig. 1C)。

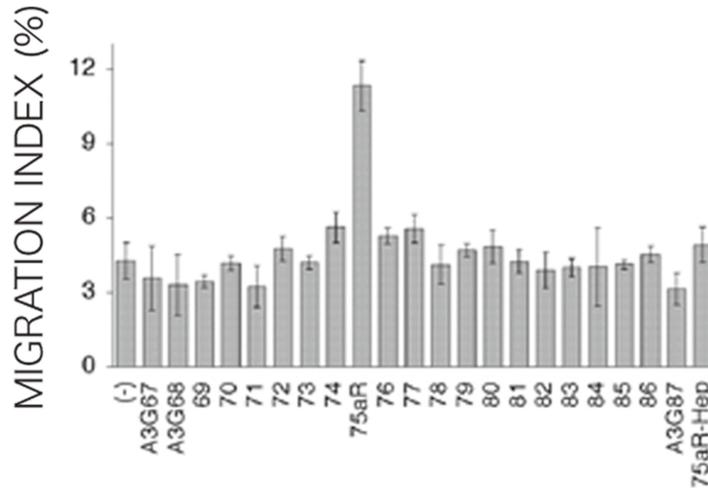
3・2 活性部位マッピング

LG4 ドメイン (約 200 アミノ酸残基) のうちの活性部位のマッピングをおこなった (Fig. 2A)。LG4 ドメインをカバーする 21 個の合成ペプチド 1) を用いて、遊走刺激活性を金コロイド法で計測した。シンデカン結合部位として同定した部分 (75aR) のみに活性が同定できた。この活性はヘパリン共存により阻害されるので、この活性はシンデカン依存性であると考えた。水溶性を増すために、

5 アミノ酸残基ほど C 末にのばした 19mer の合成ペプチド A3G756 を新たに作成し、活性を証明した (Fig. 2B)。これらの実験は α 3 鎖 LG4 ドメインのシンデカン結合部位は、遊走刺激活性を有するというを示している。

一般に細胞遊走を引き起こす機構は実に数多くの分子が関与している。そのなかでも、細胞外マトリックスと直接関係している分子として、受容体のインテグリンと細胞周辺成分を分解することで遊走を引き起こす MMP (マトリックスメタロプロテイナーゼ) に注目した。まず MMP から解析を始めた。以前 A3G756 が角化細胞の MMP-1 の産生増加を引き起こすことを報告していたため²⁾、遊走刺激

A



B

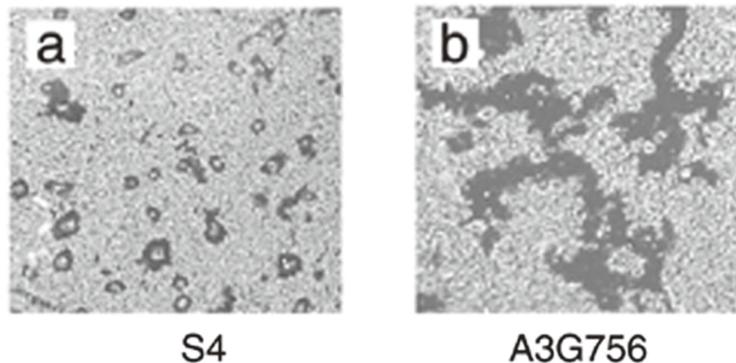


Figure 2 合成ペプチドを用いた活性部位マッピング

A: Cell migration was stimulated by the synthetic peptides (192 μ g/ml) for 12 hour. The active peptide, A3G75aR- promoting migration was inhibited by heparin (30 μ g/ml) (column 75aR-Hep).

B: Keratinocytes were treated with 30 μ g/ml of the scrambled peptide (S4) (a) or the A3G756 (b) for 12 hours on colloidal gold coated cover slips, and photographed at x40.

と代表的 MMP の1つである MMP-9 に注目した。

3・3 A3G756 による MMP-9 産生刺激

まず MMP-2, -9 のタンパク量を、ゼラチンザイモグラフィを行った (Fig. 3A)。レコンビナント蛋白 (rec-LG4)、および合成ペプチド (A3G756) で、明らかに濃度依存性に MMP-9 のみの増加を引き起こした。その増加は、mRNA の増加によるものであり、ヘパリン依存性であると共に *denovo* な蛋白合成を必要とすることが、RT-PCR にて判明した (Fig. 3B)。

3・4 A3G756 ペプチドによる細胞遊走刺激およびその MMP-9 依存性

A3G756 ペプチドによる細胞遊走刺激をペプチドによる遊走刺激活性を金コロイド法で計測した。濃度依存性に遊走を刺激した。ただし 30 μ g/ml をこえて濃度をこくして

も逆に活性は減弱した。時間の検討では、ペプチド添加後 12 時間でプラトーに達した (Fig. 4AB)。この A3G756 は実験 (Fig. 2) より MMP-9 の産生増加を引き起こすので、化学阻害剤 (MMP-9/MMP-13 chemical inhibitor 444252) ならびに MMP-9 中和抗体を共存させ、金コロイド法実験を行った。A3G756 ペプチドによる遊走刺激は中和抗体、MMP-9/-13 に対する阻害剤の共存で完全に阻害できた (Fig. 4C)。この事実は、A3G756 ペプチドは、シンデカンに結合後、遊走を引き起こす機構には、MMP-9 の活性が必須であることを示している。

3・5 p38MAPK の関与

この A3G756 は、シンデカンに結合後 p38MAPK をリン酸化することにより細胞内へシグナルを伝達することを報告した²⁾。そこで、この細胞遊走への MAPK の関与を検討した (Fig. 4D)。P38MAPK と MEK の阻害剤共存下

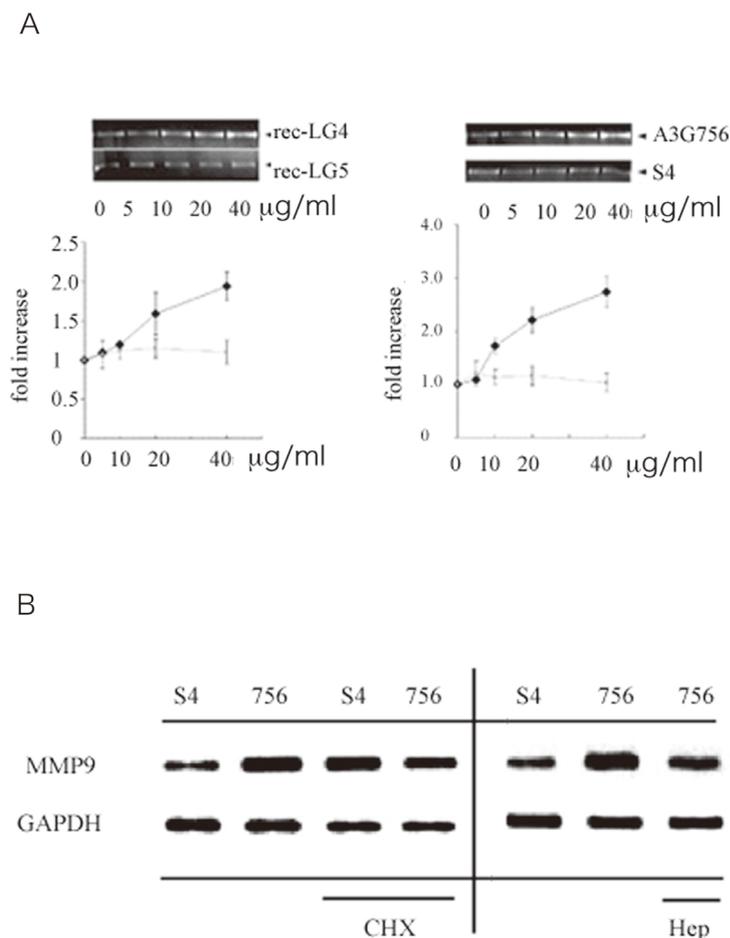


Figure 3 ラミニン α LG4 and A3G756 による MMP-9 の発現増加。

A: MMP-9 activity induced by the recombinant LG4 modules (left) or the A3G756 (right). Keratinocytes were incubated for 24 h. MMP-9 in the conditioned medium was analyzed by zymography (Upper). Lower, pooled results of zymography analysis. S4, scrambled peptide.

B: The A3G756-mediated MMP-9 induction through an increase of mRNA. Keratinocytes were incubated with 30 μ g/ml of the A3G756 or the S4 peptide in the presence of cycloheximide (CHX) or heparin (Hep). RT-PCR was performed as described in M&M.

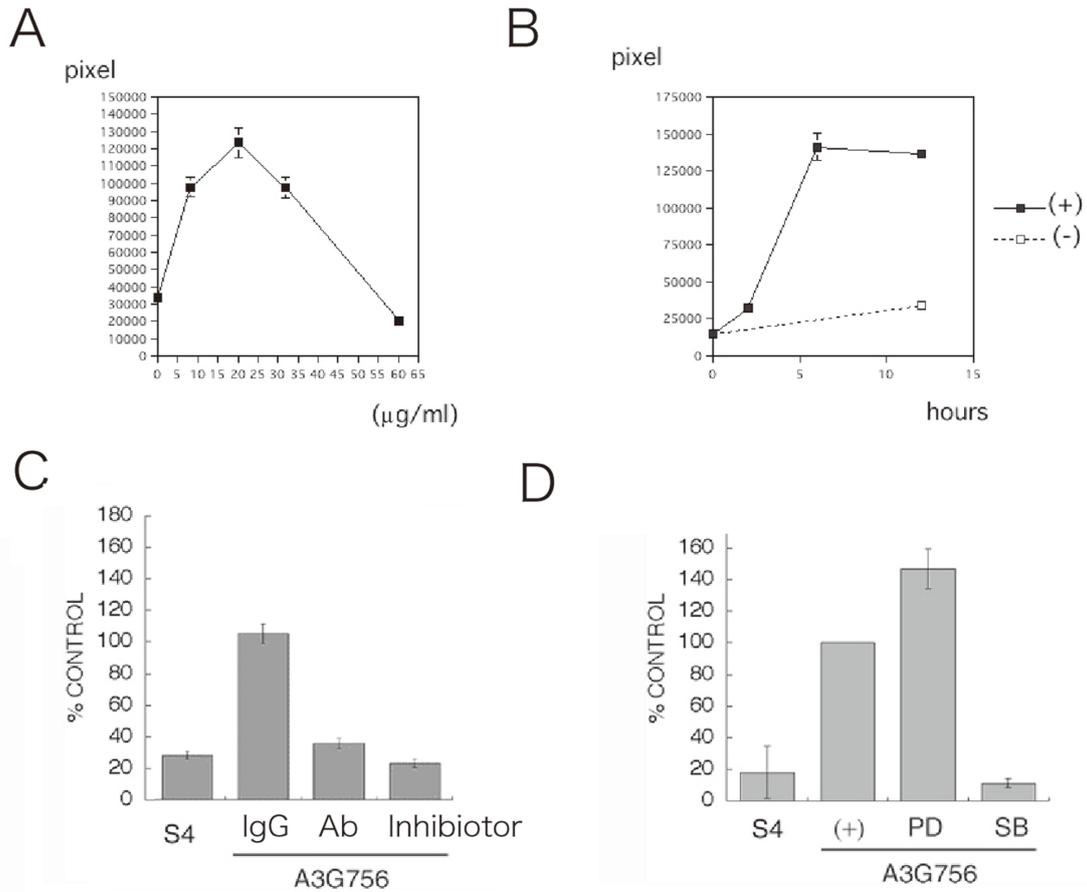


Figure 4 A3G756による遊走刺激はMMP-9とp38MAPKに依存している。

- A: Dose-dependent cell migration. Keratinocytes were incubated with various amounts of A3G756 for 12 h.
- B: Time course of cell migration. Keratinocytes were incubated with 30µg/ml A3G756 (+) or S4 (-) for indicated periods. Data presented are mean +/- S.D. of three non-overlapped fields from each cover slip.
- C: Keratinocytes on gold particle-coated cover slips were incubated with the S4 or the A3G756 peptide (30µg/ml) for 12 h in the presence of an MMP-9 neutralizing antibody (Ab) (20µg/ml), an MMP-9/-13 chemical inhibitor 444252 (inhibitor), 2mM, or a mouse IgG as a control antibody (IgG) (20µg/ml).
- D: Keratinocytes were incubated with 30µg/ml A3G756 in the presence of PD98053 (20µM) or SB203580 (30µM) for 12 h. The value of the sample incubated with A3G756 was taken as 100%. Data are mean +/- S. D. of three independent experiments.

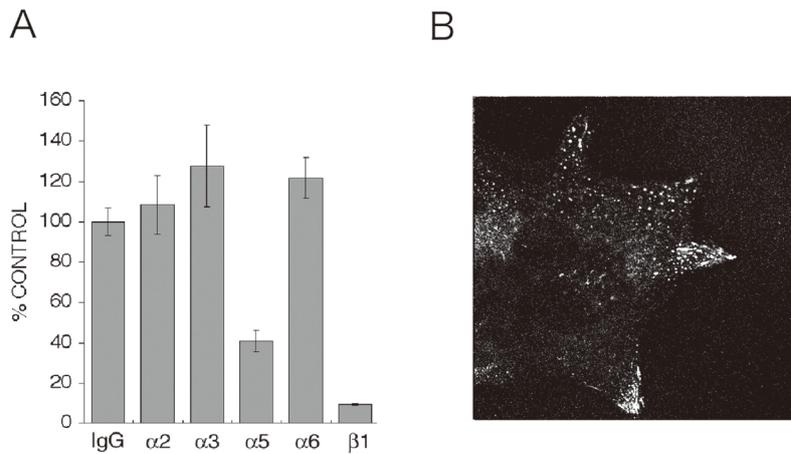


Figure 5 A3G756による遊走はインテグリン α 5 β 1を介している。

- A: Keratinocytes were incubated with A3G756 in the presence of functional blocking antibodies. Mouse IgG for control (IgG), integrin α 2 (P1E6), integrin α 3 (P1B5), integrin α 5 (P1D6), and integrin α 6 (GoH3), and integrin β 1 (rat IgG2 antibody mAb13). Data presented are mean +/- S.D. of three non-overlapped fields from each cover slip.
- B: Fibronectin staining using HaCat cell with Carl Zeiss LSM510 Confocal microscopy. Original magnification, X100.

で遊走刺激活性測定を金コロイド法で試みた。P38MAPK 阻害剤を添加した場合に遊走は著しく低下した。このことより、A3G756 の遊走刺激活性には P38MAPK が関与していると示された。RT-PCR の結果から、P38MAPK は MMP-9 の mRNA の増加を阻害することが判明した⁴⁾。この結果から p38MAPK は、MMP-9 転写レベルの抑制により遊走活性を阻害する可能性を示している。

3・6 integrin $\alpha 5 \beta 1$ の関与

これらの実験よりラミニン-5 $\alpha 3$ 鎖 LG4 は、シンデカンに結合することにより細胞遊走を刺激しその際に増加する MMP-9 が細胞遊走に必須であることが判明した。そこで、細胞遊走の際に必須といわれているインテグリンについてその関与を検討した (Fig. 5A)。インテグリン中和抗体を共存下で遊走刺激活性測定を金コロイド法で試みた。結果は、インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ の関与が最も考えられた。抗 $\alpha 5$ 中和抗体単独で 100% 阻害できないので、他の α 鎖の関与も少ないながら存在すると考えられる。抗 $\beta 1$ 抗体では完全に抑制できたので、 β 鎖に関しては $\beta 1$ のみであると考えられる。

培養セラチノサイトはファイブロネクチンを培養細胞のまわりに分泌沈着させている (Fig. 5B)。インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ のリガンドは、ファイブロネクチンである事実より、A3G756 による遊走活性には細胞自身が分泌しガラス面に沈着させるファイブロネクチンの存在が必要であり、インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ を介してのシグナルが必須であると考えら

れる。そこに MMP-9 が何らかのマトリックス蛋白もしくは細胞表面分子などをプロセスする経路も加わって、遊走が可能になると考えられる。

以上により A3G756 は、19 アミノ酸と短く合成が容易であり、皮膚へ直接作用させる際にも、工夫しやすいと考えられる。In vitro の実験である程度分子機構が明らかにされたと考え、in vivo の動物実験による潰瘍治癒促進効果の検討を計画している。

(文献)

- 1) Utani A, Nomizu M, Matsuura H, et al. A unique sequence of the laminin alpha3 G domain binds to heparin and promotes cell adhesion through syndecan-2 and -4. *J Biol Chem* 276: 28779-28788, 2001
- 2) Utani A, Momota Y, Endo H, et al. Laminin alpha3 LG4 module induces matrix metalloproteinase1 (MMP1) through MAPK signaling. *J Biol Chem* 278: 34483-34490, 2003
- 3) Albrecht-Buehler G. The Phagokinetic Tracks of 3T3 Cells. *Cell* 1977, 11 (2), 395-404
- 4) Momota Y, Suzuki N, Kasuya Y, Kobayashi T, Mizoguchi M, Yokoyama F, Nomizu M, Shinkai H, Iwasaki T, Utani A. Laminin ?3 LG4 module induces keratinocyte migration: involvement of matrix metalloproteinase-9. *J Recept Signal Transduct Res.* 25:1-17, 2005

表皮細胞におけるエピプラキンの機能

大分大学医学部皮膚科

藤原 作平

Epiplakin (EPPK), a cytoskeletal linker protein, was originally identified as an autoantigen in serum from a patient with subepidermal blistering disease. To clarify the function of EPPK, we performed slot-blot assays using fusion proteins that included various wild-type and mutated EPPK domains. At least two of the 4.6 repeats in the B domains of epiplakin were necessary for the binding of fusion proteins to keratin. The repeated structures of linker domains were also important for the binding of EPPK to keratin in these assays. Similar but weaker binding to vimentin and desmin was also detected. To confirm these interactions between EPPK and intermediate filaments (IFs), we performed cell-overlay assays with fusion proteins. In HeLa cells, the distribution of fusion proteins in the cytoplasm and their partial colocalization with keratin filaments suggested that the B domains are mainly important for interactions with IFs, while linker domains might include multifunctional regions that are involved in binding to IFs and to molecule(s) other than IFs.

1. 緒言

エピプラキンは、自己免疫性表皮下水疱症の自己抗原として同定された分子量 552kDa (ヒト) ないし 725kDa (マウス) の分子であるが、表皮細胞内に局在する。構造上の特徴として、他のプラキン分子、例えばデスモプラキン、BPAG1、プレクチンのカルボキシ末端に見られる B ドメイン構造が、ポリペプチド全体にわたりヒトでは 13 個、マウスでは 16 個見出し、特にカルボキシ末端にはほぼ完全に保存された 5 (ヒト) - 8 (マウス) 回の繰り返し構造が存在している (Fig. 1a)¹⁾。プラキン分子は細胞骨格結合蛋白に分類され、その中のデスモプラキンやプレクチンなどは中間径フィラメントと相互作用することは、すでに明らかになっていたが、新たな分子であるエピプラキンと中間径フィラメントとの相互作用は不明であった。今回この相互作用を検討するために、いくつかの融合蛋白質を使った Slot-blot Assays と Cell-Overlay Assays による実験を行った。一般にプラキン分子の B ドメイン構造には、38 アミノ酸モチーフ (plakin repeat domain=PRD) からなる 4.6 回の繰り返し構造が存在するが、これはエピプラキンにも存在し、これが機能の単位になっている可能性がある (Fig. 1b)。さらにエピプラキンでは、B ドメイン構造を連結するリンカードメインにも 3 回の繰り返し構造が存在するが、これはエピプラキンに特異的で、他のプラキン分子には見られない構造である (Fig. 1c)。今回我々は、

これらの繰り返し構造に着目し、中間径フィラメントとの相互作用を検討した。

2. 実験

2-1 Slot-blot Assays

まず B ドメイン、Linker ドメインと B+Linker ドメインのそれぞれに対するプライマーを用いて、ヒト白血球由来の遺伝子断片を鋳型として、PCR 法により各ドメインを支配する cDNA を得た (Fig. 1a)。配列を確認した上で、PGEX 発現ベクターに組み込み、GST 融合蛋白質を得た。B ドメイン内のリピート数とケラチンとの相互作用を調べるために、B ドメイン中の 4.6 回のリピートのうちの 1 リピート (1R)、2 リピート (2R)、3 リピート (3R) を含むコンストラクトを作成し、GST 融合蛋白質として発現させた (Fig. 1b)。次に Linker ドメイン内の 1 リピート (L1R)、2 リピート (L2R)、3 リピート (L3R) を含むコンストラクトを作成し、GST 融合蛋白質として発現させた (Fig. 1c)。これらの GST 融合蛋白質を用いて、Slot-blot Assays を行った。メタノール処理後の PVDF 膜上に中間径フィラメントをしみこませた後、ブロッキングをおこない、それぞれの GST 融合蛋白質を加え、一晚インキュベートした。翌日抗 GST 抗体を加え、2 時間インキュベートした後、二次抗体を加え、さらに 1 時間インキュベート後、化学発光法で抗原を検出した。中間径フィラメントの高次構造が各ドメインとの相互作用にどのような影響を及ぼすかを調べるために、PVDF 膜上に中間径フィラメントをプロットした後 6 M のグアニジン塩酸で変性し、GST 融合蛋白質との反応性を上記と同様の方法で検討した。

2-2 Cell-Overlay Assays

さらに、これらの GST 融合蛋白質と細胞全体との反応性を検討するために、培養 HeLa 細胞、HaCaT 細胞をメ



The function of epiplakin in keratinocytes
Sakuhei Fujiwara, M.D.Ph.D

Department of Anatomy, Biology and
Medicine (Dermatology) Faculty of
Medicine, Oita University

タノール固定後、GST 融合蛋白質を加えインキュベート後に洗浄し、抗 GST 抗体を加え、さらに二次抗体を加えて Cell-Overlay Assays を行った。

3. 結果

3-1 Slot-blot Assays

B ドメイン、Linker ドメイン、B+Linker ドメインの GST 融合蛋白質が、正しく作成されているか否かを確認するため、作成した融合蛋白質を SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行ない、クーマシーブルー蛋白染色、抗 B ドメイン抗体、抗 Linker ドメイン抗体、抗 GST 抗体との反応性を検討した (Fig. 2a-d)。その結果、融合蛋白質はそれぞれの抗体と反応することが示され、また B ドメイン、Linker ドメインはアミノ酸配列上も正しい融合蛋白質であることが明らかになった。Slot-blot Assays の結果、B ドメイン、Linker ドメインと B+Linker ドメインの GST 融合蛋白質の中、B+Linker ドメインとケラチンとの相互

作用が一番強く、次いで GST-B、GST-Linker の順であった (Fig. 3)。中間径フィラメントについては、ケラチン、ビメンチン、デスミン順で弱くなった (Fig. 3)。ケラチンを 6 M のゲアニジン塩酸で変性させた後には、B ドメインとの相互作用がほぼ消失した (Fig. 4)。B ドメイン内のリピート数を変化させた融合蛋白質を用いて Slot-blot Assays を行なった結果、少なくとも、2 ないし 3 リピートで GST-B ドメインとケラチンとの相互作用にほぼ匹敵したため、GST-B ドメインとケラチンとの相互作用には少なくとも 2 ないし 3 つのリピートが必要であることが明らかになった (Fig. 5)。HeLa 細胞と HaCaT 細胞から抽出されたケラチンを使って、同様の Slot-blot Assays を行なった結果、同様の結果が得られた (Fig. 5)。次に Linker ドメイン内のリピート数を変化させた融合蛋白質を用いて Slot-blot Assays を行なった結果、リピートの数が増すとともに相互作用が強くなった (Fig. 6²⁾)。

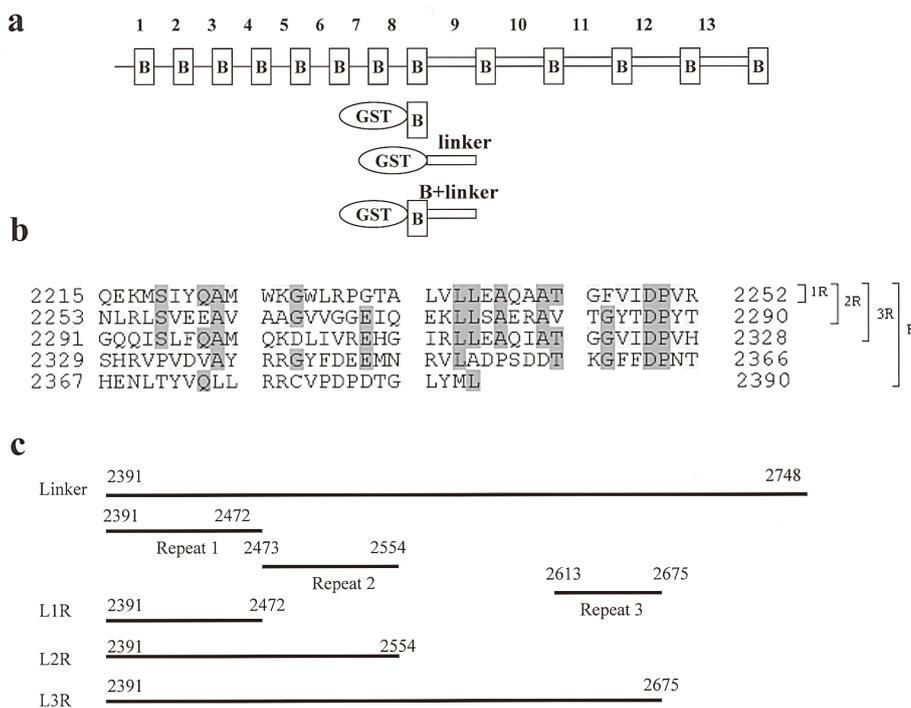


Figure1 Schematic representation of epiplakin (a) and the repeat structures of the B domain (b) and the linker domain (c). (a) Numbered boxes indicate B domains that are 46-70% homologous to the B domain in desmoplakin. The double-lined linker regions and the five corresponding B domains (9-13) are almost identical (1). We performed PCR to generate GST-B domain (8B), GST-linker domain (L8-9), and GST-B+linker domain (B8+L8-9). (b) The structure of each B domain includes 4.6 copies of a motif of 38 amino acids, which is referred to as the plakin repeat domain (PRD). The sequence shown is that of B8. When at least three amino acid residues are identical in the 4.6 copies, they are shown in green, while identical amino acid residues in the first and third or second and fourth copies are shown in yellow. 1R denotes a GST-fusion protein that contains one copy unit, and 2R and 3R denote fusion proteins with two and three copies units, respectively. (c) The structure of the linker domain between B8 and B9, with 2.7 repeats of a sequence of 82 amino acids (1). These repeats are lined up along the entire linker domain. L1R denotes the GST-fusion protein that included the first one repeat of the linker domain (repeat 1). L2R and L3R denote GST-fusion proteins that included two linker repeats (repeat1+repeat2) and three linker repeats (repeat1-3), respectively. L3R also included a non-repeated structure (residue 2555-2612).

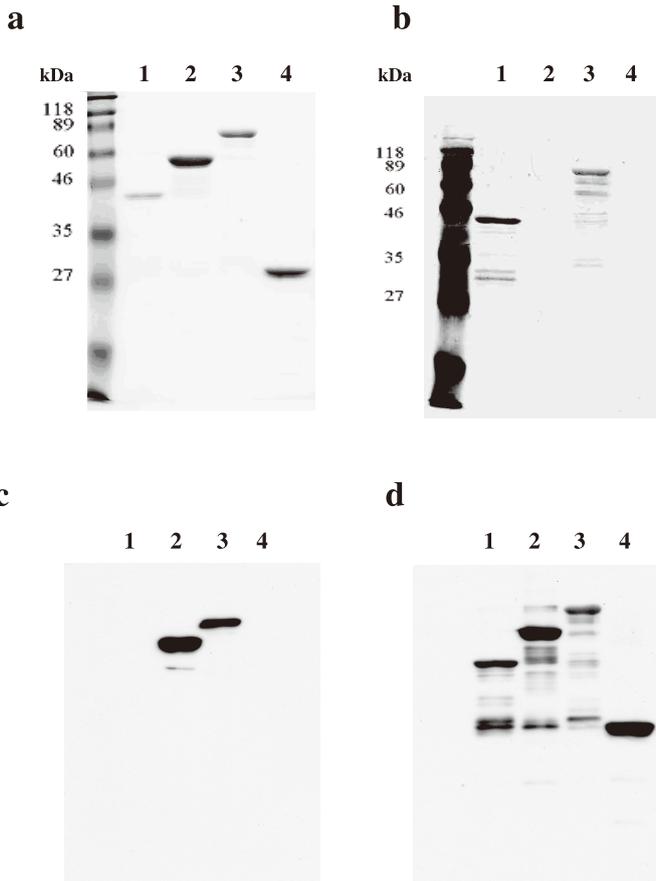


Figure 2 The purity of GST-fusion proteins was examined by SDS-PAGE.

GST-B domain (lane 1), GST-linker domain (lane 2), GST-B+linker domain (lane 3), and GST (lane 4) were separated on an SDS-polyacrylamide gel (12.5% polyacrylamide) and then stained with Coomassie Brilliant Blue (a). Proteins were immunostained with polyclonal antibodies specific for the B domain (b) or with monoclonal antibodies specific for the linker domain (c) or with polyclonal antibodies specific for GST (d). Molecular markers were included on the left side of a and b.

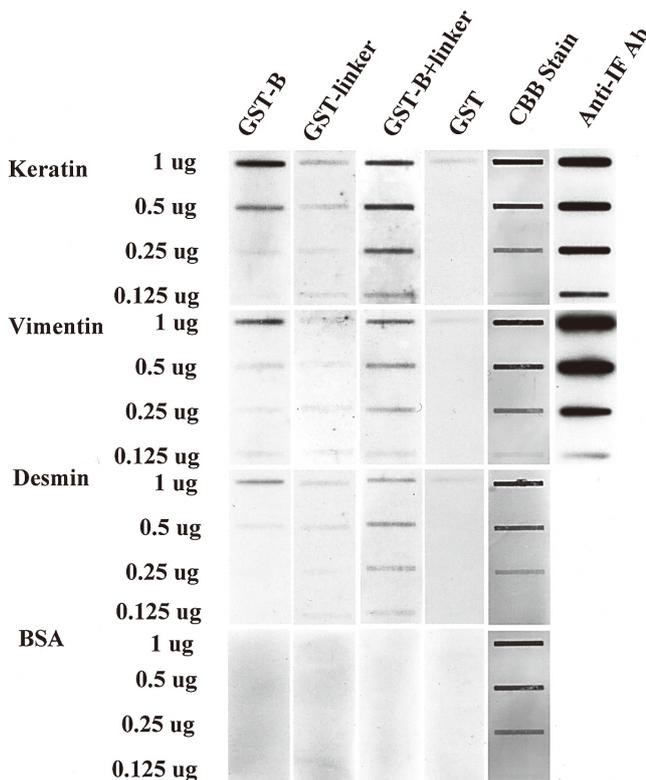


Figure 3 Keratin interacted most strongly with GST-B+linker domain, less strongly with GST-B and least strongly with GST-linker domain.

In slot-blot assays, the indicated protein or BSA (as a control) was immobilized on membranes and then the membranes were incubated with the indicated fusion protein (GST-B, 1.0 $\mu\text{g/ml}$; GST-linker, 1.3 $\mu\text{g/ml}$; GST-B+linker, 1.6 $\mu\text{g/ml}$; these concentrations are equal on a molar basis.) or with GST (as a control) and probed with GST-specific rabbit polyclonal antibodies and HRP-conjugated goat antibodies against rabbit IgG. The immunoreactive proteins on membranes were visualized by chemiluminescence and exposure to x-ray film. The protein loading was monitored with Coomassie Brilliant Blue staining (CBB) or reaction using anti-keratin (right upper panel) or anti-vimentin (right lower panel) antibodies and HRP-conjugated goat antibodies against mouse IgG. The immunoreactive proteins on membranes were visualized described above.

Keratin interacted most strongly with GST-B+linker domain and it reacted less strongly with GST-B and GST-linker domain, in that order. Although vimentin and desmin also bound to GST-B+linker, GST-B, and GST-linker domain, in a descending order of avidity, the binding was weaker than that to keratin.

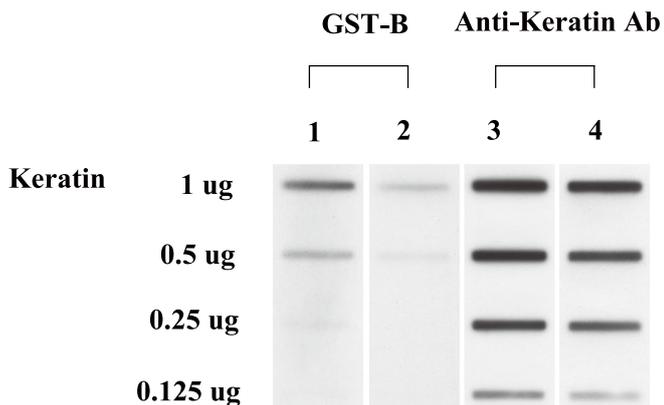


Figure 4 Denatured keratin decreased binding with GST-B domain.

In slot-blot assays, keratin was immobilized on a PVDF-membranes and the membranes were denatured with (lane 2 and 4) or without (lane 1 and 3) 6M guanidinium chloride and two pieces of membranes (lane 1 and 2) were incubated with GST-B, 1.0 μ g/ml and probed with GST-specific rabbit polyclonal antibodies. The proteins were visualized as described in the legend to Fig. 3. The protein loading was monitored by reaction using anti-keratin antibodies, HRP-conjugated goat antibodies against mouse IgG and a chemiluminescent reagent (lane 3 and 4). After denaturing keratin, the binding ability of the GST-B fusion protein decreased.

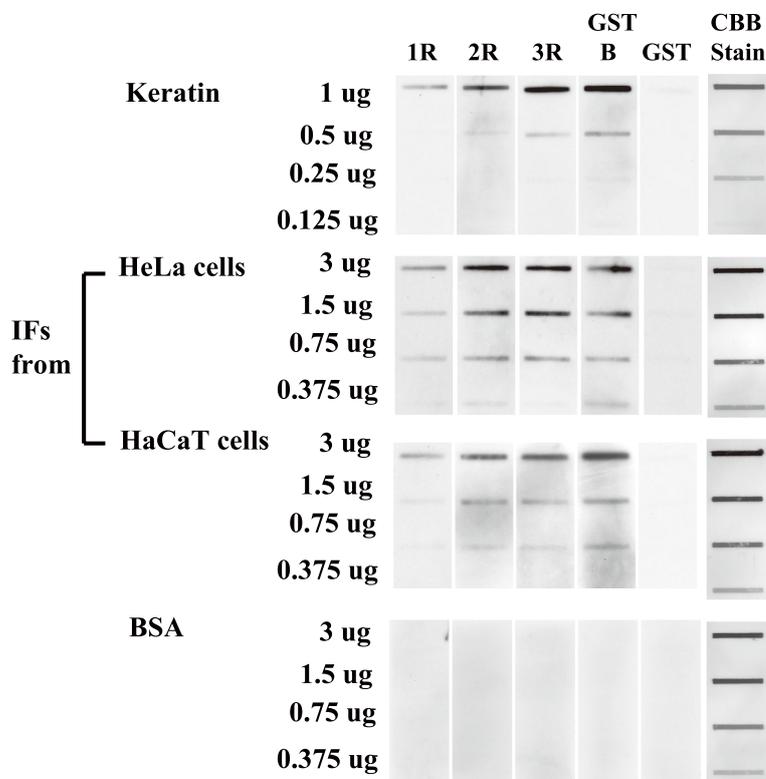


Figure 5 Repeated structures of B domain are important for binding to keratin.

For slot-blot assays, keratin, IF fractions extracted from HeLa cells and HaCaT cells, and BSA (as a control), were immobilized on a PVDF membrane. Each membrane was incubated with 1.0 μ g/ml of GST-fusion proteins that included one, two and three copies of PRD (1R-3R as shown in Fig.1), GST-B domain and GST (as a control). The proteins were visualized as described in the legend to Fig. 3. The protein loading was monitored by with Coomassie Brilliant Blue staining (CBB)

2R and almost 3R in the B domain were necessary for binding to keratin, or to IFs extracted from HeLa or HaCaT cells.

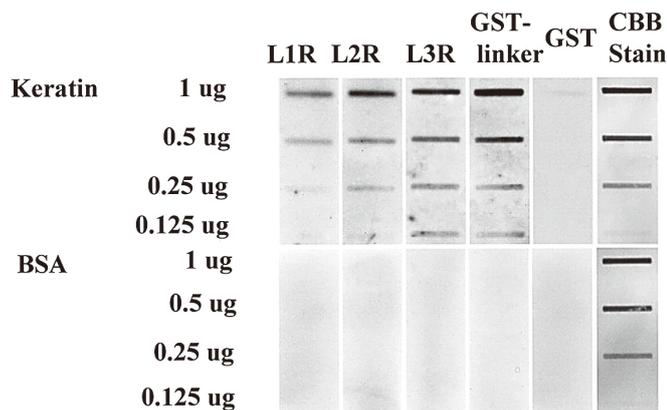


Figure 6 Repeated structures of the linker domain are also important for the binding to keratin.

Immobilized keratin or BSA (as a control) on a PVDF membrane was incubated with 3.0 μ g/ml of fusion proteins (L1R, L2R, L3R and GST-linker) and GST (as a control), as shown schematically in Fig. 1. The proteins were visualized as described in the legend to Fig. 3. The protein loading was monitored by with Coomassie Brilliant Blue staining (CBB). L3R that included three linker repeats bound to keratin almost as strongly as the entire linker domain, while L2R and L1R to keratin bound less strongly in that order.

3-2 Cell-Overlay Assays

HeLa細胞を用いたCell-Overlay Assaysの結果、GST-Bドメインは、核周囲に顆粒状に分布し、一部にケラチンとの局在が認められた (Fig. 7, B-C)。GST-Linkerドメインは、細胞内に点状に分布し、ケラチンとの局在は見られず (Fig. 7, E-F)、GST-B + Linkerドメインは、GST-BとGST-Linkerドメインの中間的分布すなわち一部顆粒状、一部点状の分布がみられた (Fig. 7, H-I)。このことから、GST-Linkerドメインは、ケラチン以外の他の分子とも相互作用することが示唆された。HaCaT細胞における結果もHeLa細胞と同様の結果が得られた。

4. 考察

Slot-blot AssaysおよびCell-Overlay Assaysの結果、エピブラキンのBドメインは、ビメンチンよりもケラチンと強く結合することが明らかになった。加えてLinkerドメインもケラチンと結合することが明らかになった。後者は、B+Linkerドメインとケラチンとの相互作用がBドメインとケラチンとの相互作用よりも強かったことを、よく説明しうる。しかしこれらの結果は、Bドメインがケラチン5/14よりビメンチンと強く結合し、Linkerドメインが、ケラチン5/14やビメンチンと反応しないとしたJangらの結果と異なっている3)。この違いは、我々がヒト表皮のケラチン（おそらくケラチン5/14以外にケラチン1/10も含む）を使用したことや、Linkerドメイン融合蛋白質の結合能の不安定性によると考えられる。新規に調整したLinkerドメイン融合蛋白質は、ケラチンと再現性良く結合した。Linkerドメインが、繰り返し配列をとることは、エピブラキンの特徴であり、繰り返し構造が増すごとに、ケラチンへの結合能が増したことは大変興味深い。デスマブラキン、BPAG1、プレクチン、エンボブラキンやペリブラキンなどの他のブラキン分子のLサブドメインと呼ばれるLinkerドメイン（ペリブラキン以外はCドメインのアミノ末端側、ペリブラキンにはCドメインがなく、棒状ドメインのカルボキシ末端側）が、ケラチンやビメンチンと結合することが知られているが4)、その部分と共通の配列は、エピブラキンのLinkerドメインには見られなかった。またFontaoらが、デスマブラキンのLinkerドメインが、単層上皮のケラチン8/18やビメンチンと反応するが、ケラチン5/14と結合しないことを報告している5)。エピブラキンでは、今後ケラチン8/18やケラチン6/16または6/17と結合するか否か、そしてそれがBドメイン、Linkerドメインのいずれと結合するかを検討する必要がある。最近のデスマブラキンのBドメインの結晶解析から、4.6回の繰り返し構造のうち1-2回と3-4回の繰り返し構造の間に溝が形成され、それがおそらく、中間

径線維の棒状ドメインと結合するモデルが提唱されているが6)、ケラチンとの相互作用をする上で、Bドメイン内の少なくとも3リピートが、GST-Bにほぼ匹敵した我々のデータは、このモデルを支持している。しかし、彼らはデスマブラキンのLinkerドメインは、ビメンチンとの結合に大きく寄与しないとしており、今後おそらく球状であるエピブラキンのLinkerドメインの結晶解析を進める必要がある。B+Linkerドメインはケラチンと最も強く相互作用し、ビメンチン、デスミンの順に弱くなる現象は、デスマブラキンと中間径フィラメントとの相互作用に類似している。プレクチンのBと一部のLinkerドメインは、ケラチン(5/14)よりむしろビメンチンとの相互作用が強い。エピブラキン、デスマブラキン、プレクチンのBドメイン間のホモロジーは互いに70%でほぼ等しいが、エピブラキンとデスマブラキン、あるいはエピブラキンとプレクチンのLinkerドメイン間のホモロジーは、デスマブラキンとプレクチンのLinkerドメイン間のホモロジーよりも低い。したがってエピブラキンのB+Linkerドメインが中間径フィラメントと相互作用するにあたっては、高次構造が重要と考えられる。B+LinkerドメインあるいはBドメインがケラチンと相互作用する形式については、エピブラキンが、数本のケラチンを束ねると我々は想定しており、今後この仮説を検証していきたい。

一方エピブラキンのノックアウトマウスを使った実験では、野生型マウスに比し創傷治癒が速くなる傾向が認められた7)。現時点では、エピブラキンノックアウトマウスでは、ケラチン6の発現が低下し、それに伴ってデスマゾームの構造が変化し、表皮細胞の移動が速くなるのではないかと考えているが、今後エピブラキンノックアウトマウスでは、野生型マウスと比較してデスマゾームやケラチンの配行などにどのような違いを生じているのか、電子顕微鏡レベルで詳しく検討する余地がある。また創傷治癒過程で発現するケラチン6、17、18とエピブラキンとの相互作用についても検討する必要があると考えられる。

5. 総括

エピブラキンは、自己免疫性表皮下水疱症の自己抗原として同定された表皮内蛋白質であるが、そのBドメイン、Linkerドメイン共に中間径フィラメントと相互作用し、GST融合蛋白質の中では、B+Linkerドメイン、次いでGST-B、GST-Linkerの順で相互作用が弱くなった。中間径フィラメントに関しては、ケラチン、ビメンチン、デスミンの順に弱くなった。Bドメイン、Linkerドメイン共に、その繰り返しのリピート数が増すに連れて中間径フィラメントとの相互作用が強くなった。

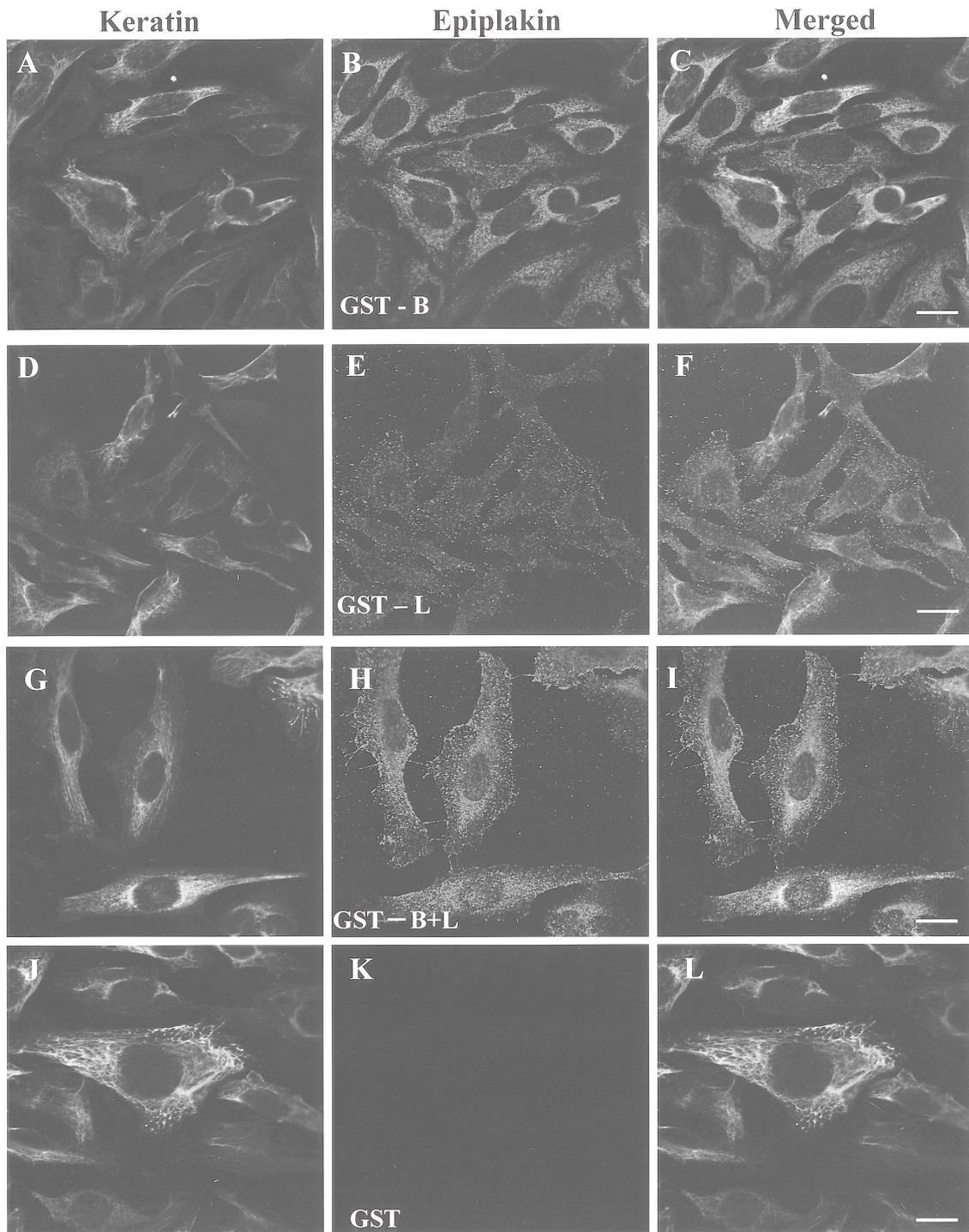


Figure 7 GST-B bound to the cytoplasm partially along keratin filaments, although GST-linker and GST-B+linker distributed mainly in dots in the cytoplasm in HeLa cells.

HeLa cells were fixed with 100% methanol and then were incubated with fusion proteins in 1% BSA/PBS. After washing with PBS, cells were incubated with a mixture of anti-pan-keratin monoclonal antibody C11 and anti-GST rabbit polyclonal antibodies, and then washed with PBS. Cells were subsequently incubated with FITC- and Rodamine-conjugated secondary antibodies directed against mouse or rabbit IgG.

GST-B(red) localized around the nucleus in the cytoplasm partially along keratin filaments (green) in HeLa cells(B). Both GST-linker and GST-B+linker distributed mainly in dots in the cytoplasm(E,H) and did not colocalize with keratin filaments, which indicated that linker domains interact with other component(s) other than IFs. Bars=20 μ m

(References)

- 1) Fujiwara S, Takeo N, Otani Y, et al: Epiplakin, a novel member of the plakin family originally identified as a 450-kDa human epidermal autoantigen: Structure and tissue localization, *J Biol Chem*, 276: 13340-13347, 2001.
- 2) Wang W, Sumiyoshi H, Yoshioka H, et al: Interactions between epiplakin and intermediate filaments. *J Dermatol*, 33, 518-527, 2006.
- 3) Jang SI, Kalinin A, Takahashi K, et al: Characterization of human epiplakin: RNAi-mediated epiplakin depletion leads to the disruption of keratin and vimentin IF networks, *J Cell Sci*, 118: 781-793, 2005.
- 4) Karashima T, Watt FW: Interaction of periplakin and envoplakin with intermediate filaments, *J Cell Sci*, 115: 5027-5037, 2002.
- 5) Fontao L, Favre B, Riou S, et al: Interaction of the bullous pemphigoid antigen 1 (BP230) and desmoplakin with intermediate filaments is mediated by distinct sequences within their COOH terminus, *Mol Biol Cell*, 14: 1978-1992, 2003.
- 6) Choi HJ, Park-Snyder S, Pascoe LT et al: Structures of two intermediate filament-binding fragments of desmoplakin reveal a unique repeat motif structure, *Nat Struct Biol*, 9: 612-620, 2002.
- 7) Goto M, Sumiyoshi H, Sakai T, et al: Elimination of epiplakin by gene targeting results in acceleration of keratinocyte migration in mice. *Mol Cell Biol*, 26 (2) , 548-558, 2006.

皮膚の光音響学的診断法の開発

防衛医科大学校防衛医学研究センター情報システム研究部門

佐藤 俊一

Chromophores in skin tissue, such as melanin and hemoglobin, can be excited by irradiation with short pulsed light, by which adiabatic expansion occurs in the chromophores and as a result, photoacoustic waves are emitted in the tissue. By detecting the photoacoustic waves on the skin surface, we can obtain information on the distributions of chromophores in the skin, which is an important factor for determining cosmetic characteristics of the skin. The objective of this study was to develop a new modality for skin diagnosis, based on the photoacoustic technique. To investigate the validity of this technique, we performed multiwavelength measurements of photoacoustic signals induced in rat skins and human skins under the various experimental conditions. We used a transducer which consisted of an annular P(VdF/TrFE) (vinylidene fluoride trifluoroethylene copolymer) film and a quartz fiber; the film and fiber were coaxially arranged. Output pulses from an OPO (optical parametric oscillator) were coupled to the fiber and transmitted pulses irradiated skins. Photoacoustic signals induced were recorded in a high-speed digital oscilloscope. For human forearm skins, photoacoustic signal peaks appeared in the depth range of 0.1 - 0.2 mm, which were thought to be originated from melanin in the epidermis. The signal amplitude for the forearm outside skin was higher than that for the inside skin, indicating the higher melanin content in the outside skin due to exposure to larger amount of sunlight. For human palm skin, no clear signal originating from melanin was observed, while signal peaks which were thought to be originated from hemoglobin were observed in the three depth ranges: 0.3 - 0.4 mm, 0.75 - 0.8 mm, and 1.1 - 1.2 mm. These results suggest the validity of this method for depth-resolved skin diagnosis.

1. 緒言

コスメトロジー分野において、皮膚の色調や組織の吸収・散乱係数などの光学特性を評価する技術は非常に重要である。皮膚の色については、近年、マルチスペクトルイメージング技術の進歩により客観的評価技術が確立しつつあるが、これにより色を決定する各種色素（メラニン、ヘモグロビンなど）の深さ方向分布に関する定量的情報を得ることはできない。そこで本研究は、光音響学的アプローチにより、皮膚組織中（一部皮下組織を含む）の色素の深さ方向分布をリアルタイムで計測する新しい診断技術を確認することを目的とした。

光音響学的診断法（以下、単に光音響法と呼ぶ）の原理については次項で述べるが、簡単には、組織に光を照射し、吸収体（chromophore）が発生する音響波を検出する診断法である。光診断と超音波診断の両方の特徴を併せ持ち、検出対象が音波であるために、光診断の最大の問題である散乱による信号の減衰の影響を直接的には受けない。このため、比較的深い組織を高い空間分解能で観測することができ、ヒトの皮膚や皮下組織の診断に十分な能力を有する。



Development of photoacoustic skin diagnostics

Shunichi Sato

Division of Biomedical Information Sciences, National Defense Medical College Research Institute

歴史的にみると、光音響効果は1880年 Bellにより報告され¹⁾、その後一般科学技術分野、産業分野において様々な応用技術が創出されてきた。しかし、生体・医学分野において研究が盛んになってきたのは2000年代に入ることである。ここ1～2年の技術的進展は著しく、診断の対象は全身のほぼ全ての組織と言ってよいが、皮膚科学分野の応用は特に重要な位置づけにある。

2. 原理

簡単のため、図1に示すような深さ $z = z_0$ に吸収係数 μ_a の層が存在する半無限透明媒質（散乱係数 $\mu_s = 0$ ）の表面に、時刻 $t = 0$ でパルス幅 τ_p 、フルエンス F_0 のビーム径の大きいレーザー光を照射することを考える。レーザー光は吸収層で吸収されて熱に変換されるが、応力の閉じ込め条件（ $\tau_p \ll 1/\mu_a v_s$ 、 v_s は音速）が満たされると、熱弾性過程により次式で示される圧力波が効率的に放出され、これを光音響波と呼ぶ。

$$p(z) = (\beta v_s^2 / c_p) \mu_a F_0 \exp(-\mu_a z) \quad (1)$$

ここで β は体積膨張率、 c_p は定圧比熱、 $\beta v_s^2 / c_p = \Gamma$ は Grüneisen 係数と呼ばれる無次元数で、光から熱弾性波への変換効率を表す。上記の応力閉じ込め条件は、多くの生体応用において、ナノ秒オーダー（ $10^{-9} - 10^{-8}$ s）のパルス光を使用することで満たされる。

(1) 式で示される圧力波（光音響波）は二分され、それぞれ媒質の表面方向と裏面方向に伝搬する。前者を媒質表面（ $z = 0$ ）に配置した検出器（図の transducer #1）で検出すると、その振幅ないし指数関数的スロープより μ_a

に関する情報を、また伝搬時間と音速 v_s の積より吸収層の深さ z_0 を知ることができる（後方または反射型検出方式）。検出器を媒質裏面に配置する形式（図の transducer #2）でも同様の計測が可能であるが（前方または透過型検出方式）、皮膚を対象とする場合は反射型検出方式が用いられる。複数の吸収層がある場合も、観測した光音響波を各層で発生する光音響波の合成と考えればよく、この方法により、吸収体の深さ方向分布計測（depth profiling）が可能となる。検出器を走査すれば吸収体の二次元断層情報を得ることができ、これを光音響トモグラフィ（PAT: photoacoustic tomography）などと呼ぶ。

本研究では、皮膚の光音響診断を行うための実験系を構築し、まず動物（ラット）の皮膚を対象とした実験により

基礎データの収集を行った。次に、これに基づいてヒト皮膚の光音響信号の取得を試み、本診断法の有用性について検討を行った。

3. 実験

光音響波計測においては、照射光の波長とパルスエネルギーが重要なパラメータとなる。光音響波は光が組織中の chromophore に吸収され、断熱的に膨張することにより発生するため（熱弾性過程）、観測したい吸収体の吸収スペクトルに合った波長の光を照射する必要がある。皮膚の代表的な吸収体であるメラニン^{2, 3)}とヘモグロビン^{4- 6)}の吸収スペクトルを図2にまとめた。メラニンの吸収係数は波長が短くなるに従い単調に増大するのに対し、ヘモグ

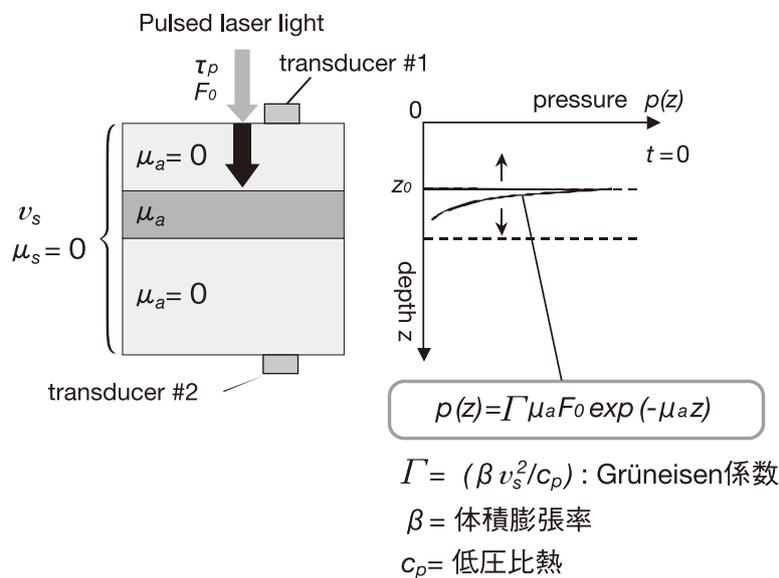


図1 光音響法の原理図

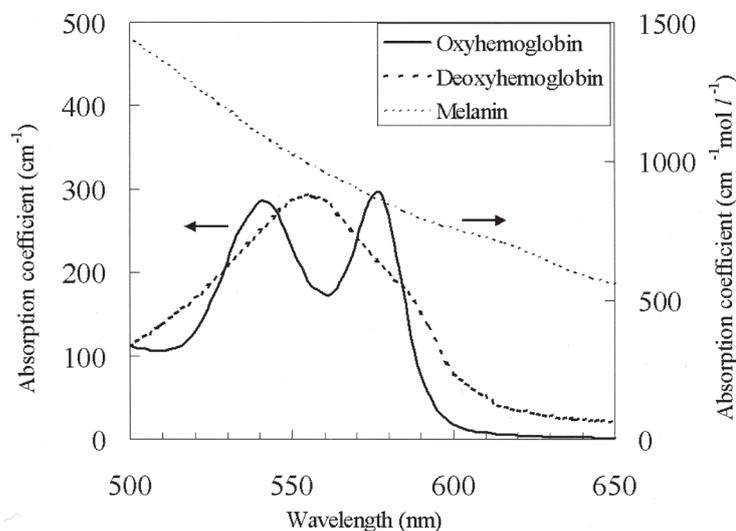


図2 メラニン、ヘモグロビンの吸収スペクトル（文献2-6のデータより作成）

ロビン、特に酸素化ヘモグロビンは複雑な吸収スペクトルを示し、わずか数 nm 程度の波長の違いが光音響波の発生に大きな影響を与えうる。逆にこの点を利用して、皮膚組織中のヘモダイナミクスを評価することも可能である。また適切な波長を選定しても、光エネルギーが不十分であると検出に十分な信号を得られない。一般に光は、生体組織中で吸収と散乱を受けて大きく減衰するため、特に深部の吸収体を観測するためには高いエネルギーが必要となる。ただし、エネルギーを高くしすぎると皮膚損傷を招くおそれがあるため、一定の制限を受ける。以上の観点より、本研究ではまずラット皮膚を対象に、照射光パラメータが光音響信号にどのような影響を与えるかについて調べた。

実験に用いた検出器と装置の構成を図3に示す。光音響波の検出に用いた圧電素子は外径 5.5 mm、内径 1.5 mm、厚さ 30 μ m のリング形 P(VdF/TrFE) (フッ化ビニリデン/三フッ化エチレン共重合体) フィルム (東レ製) で、周波数帯域 (-6 dB 帯域) は 13.6 - 39.2MHz である。この素子の中心部に光音響波の励起光を伝送するための石英光ファイバー (コア径 600 μ m) を配置した。これら素子とファイバー出射端の下面には、皮膚からの反射光を減弱させるため、厚さ 6 mm の PMMA (ポリメチルメタクリレート) のスペーサを設けた。ファイバー出射光はこのスペーサを透過して皮膚に照射され、発生した光音響波もこのスペーサを伝搬して素子に到達する。光音響波励起用の

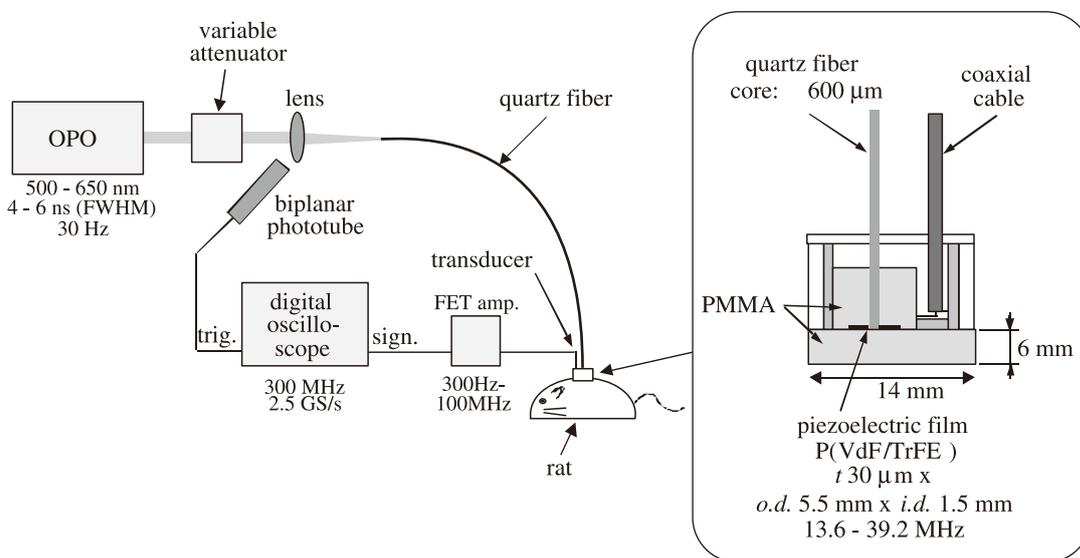


図3 実験装置の構成 (左) と検出器の構造 (右)

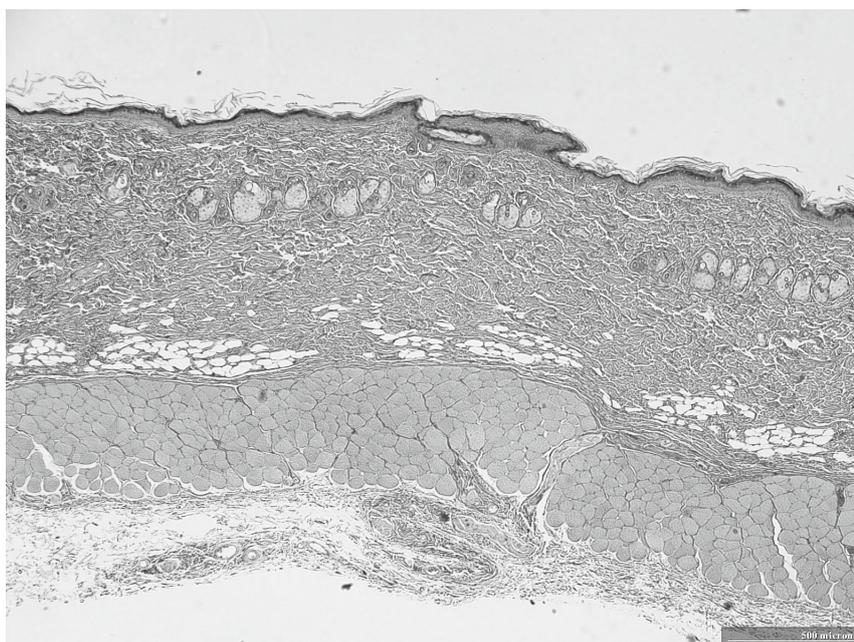


図4 ラット背部皮膚の組織画像 (HE 染色)。スケールバー 500 μ m

光源には出力波長可変の光パラメトリック発振器 (OPO : optical parametric oscillator) を用いた。OPO の出力光は可変アッテネータを介して前記ファイバーに導入した。圧電素子の出力信号 (電圧信号) は同軸ケーブルを介して FET (電界効果トランジスタ) 増幅器で増幅後、デジタルオシロスコープで記録した。

ラットを用いた実験は、Wistar 系ラットオス、体重約 400 g の背部および腹部の皮膚を計測対象とした。図 4 に背部皮膚の組織画像を示す。表皮および真皮の厚さはそれぞれ 70 - 80 μm 、約 1 mm であった。全身麻酔下 (ペントバルビタール 50 mg/kg) で皮膚を剃毛、除毛し、約 1 時間経過後に計測を行った。計測の状況を図 5 に示す。ヒト皮膚の計測は、著者 (47 歳、男性) の前腕皮膚 (内側、外側) と手掌部を対象に行った。計測部位の写真を図 6 に示す。全ての計測において、検出器は超音波ゼリーを塗布して皮膚に接触させた。

4. 結果および考察

4.1 ラット皮膚の光音響波計測

ラット背部皮膚を対象に、波長 532, 560, 600 nm の 3

条件において、照射パルス光エネルギーを最大 500 μJ まで変化させて光音響信号を取得した。図 7 に波長 532 nm の場合 (酸素化ヘモグロビンと脱酸素化ヘモグロビンのほぼ等吸収点) の信号波形を示す。ここで、時間波形を音速 1500 m/s を用いて深度分布に変換した。信号は照射エネルギーが大きくなるに従い増大し、深さ約 0.1 mm 付近、0.7 mm 付近、1.3 mm 付近の三箇所に顕著なピークが認められる。組織画像 (図 4) より、これらの深度はそれぞれ、表皮深部ないし真皮最上部、真皮深部、皮下組織 (筋層) に相当することがわかる。

図 8 に各波長における最大ピーク信号 (振幅) の照射パルスエネルギー依存性を示す。(1) 式より、発生する光音響波の圧力は吸収エネルギーすなわち照射光エネルギーに比例するが、同図は 450 μJ 付近までその関係が成立していることを示している。また信号の大きさは、波長 600 nm < 560 nm < 532 nm の順に大きくなっており、これは酸素化ヘモグロビンの吸収係数の順に対応している (図 2)。これより、これらの波長における計測においては、上記各深度領域における酸素化ヘモグロビンが主な吸収体として働いていることが推察される。ただし 600 nm においては、



図5 ラット皮膚の光音響波計測状況

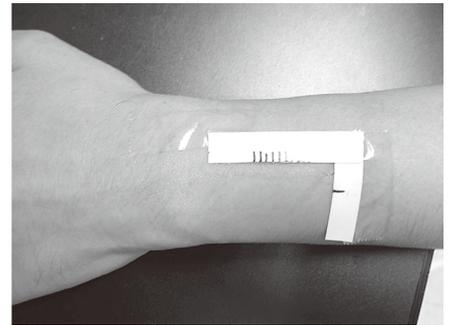
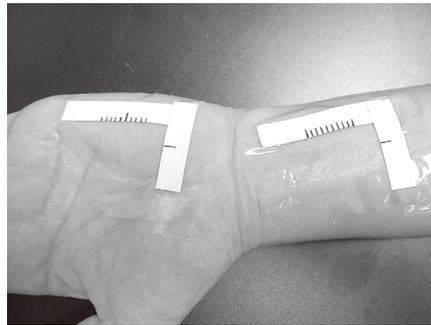


図6 ヒト皮膚の光音響波計測部位。手掌部および前腕内側 (左), 前腕外側 (右)

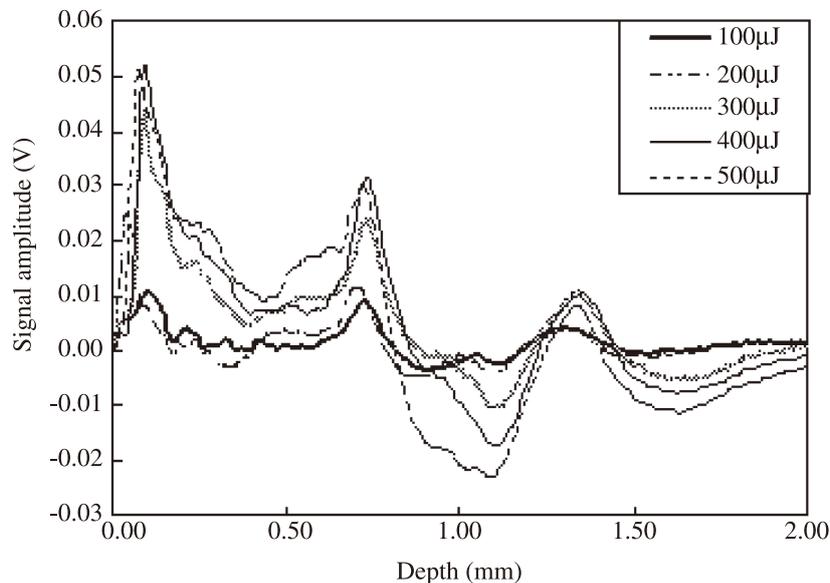


図7 照射光パルスエネルギーを変化させた場合のラット背部皮膚の光音響信号波形。波長 532nm

脱酸素化ヘモグロビンの吸収係数が酸素化ヘモグロビンの吸収係数より4倍以上高いことから、他の波長と比較して、脱酸素化ヘモグロビンの寄与が大きくなっていると考えられる。

図9に波長500 - 665nmの帯域における、上記の三つのピーク信号の波長依存性(光音響スペクトル)を示す。第二の(真皮深部の)信号ピークのスペクトルは明確な双峰性を示し、酸素化ヘモグロビンの吸収スペクトルと同様の傾向を示している。これに対し、第一の(表皮から真皮最上部の)信号ピークのスペクトルは500nmにおいて最大となっており、ヘモグロビンの吸収スペクトルと大きく異なっている。これは表皮中のメラニン等が主要な吸収体

となっていることを示唆するデータである。一方、第三の(皮下組織の)信号ピークのスペクトルは、長波長側で低下がみられないことが特徴的である。これは、長波長の光の組織内減衰が小さく、比較的大きな光エネルギーが皮下組織に到達していることによると考えられる。

以上は全て同一ラットの同一部位(背部)のデータであるが、図10に二匹のラットのそれぞれ背部と腹部を対象に計測した光音響信号の比較を示す。これより、背部および腹部同士の信号の個体差は大きくないが、背部と腹部の信号には大きな違いがあることがわかる。すなわち腹部皮膚の信号には、背部皮膚の表層付近に観測された顕著なピークがみられない。用いたラットにおいては、背部皮膚表

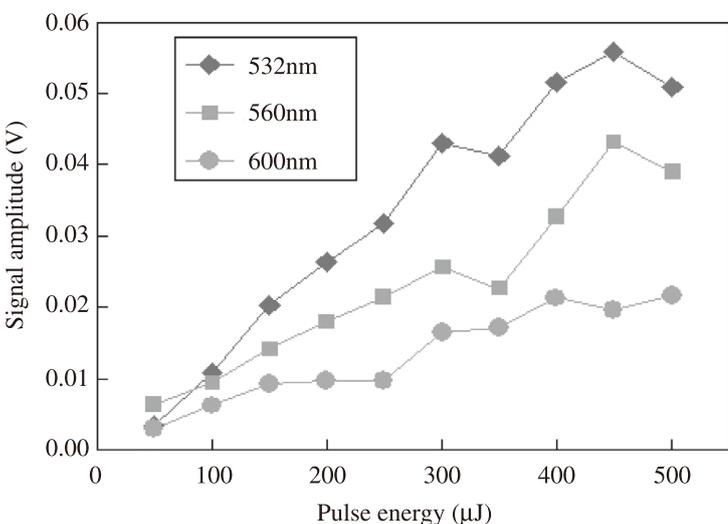


図8 波長532nm, 560nm, 600nmにおけるラット背部皮膚の最大光音響信号の照射光エネルギー依存性

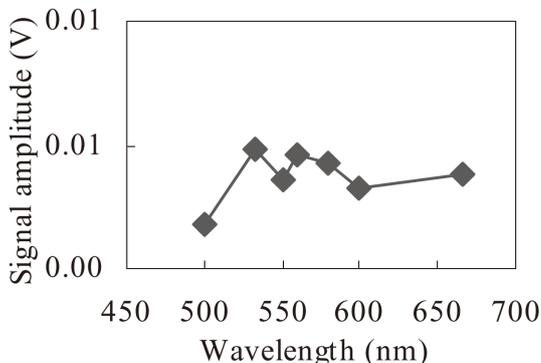
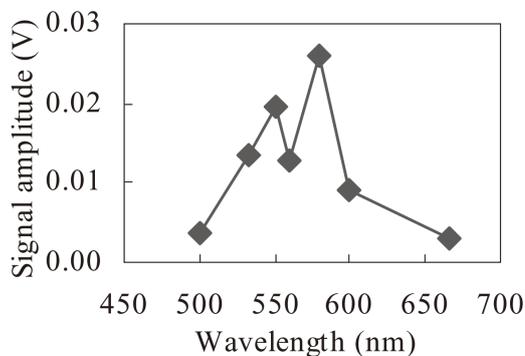
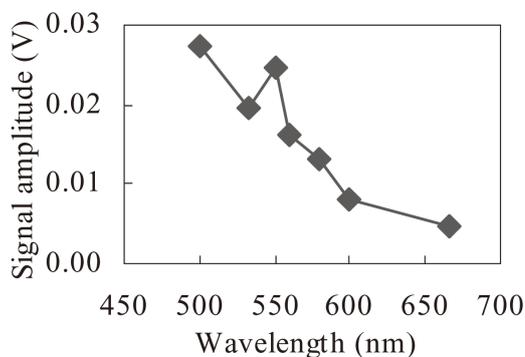


図9 ラット2匹のそれぞれの背部皮膚、腹部皮膚の光音響信号波形。照射光波長532nm, パルスエネルギー300μJ

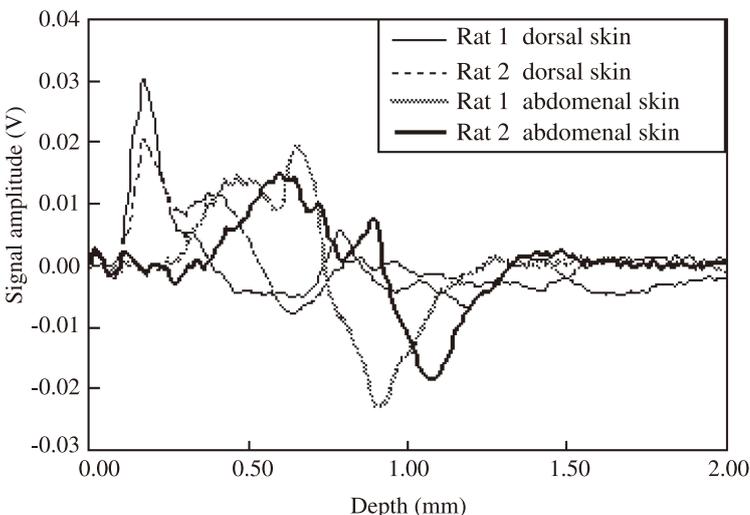


図10 ラット背部皮膚の光音響信号の波長依存性(光音響スペクトル)。第1ピーク(上段), 第2ピーク(中段), 第3ピーク(下段)

面に淡褐色の色素沈着が認められたのに対し、腹部ではこれがなかった。この色素沈着は、剃毛、除毛の過程で目視上は消失したが、背部皮膚においては残留色素成分に起因する光音響信号がピークとして表れたものと考えられる。この結果は、本光音響診断法の感度の高さを示すものである。

4.2 ヒト皮膚の光音響波計測

著者（47歳、男性）の前腕皮膚（内側、外側）と手掌部の直線2cm区間において、検出器を2mm間隔で走査して光音響波の計測を行った（図6）。パルスエネルギーは200 μ Jで一定、測定波長は532nm（酸素化・脱酸素化ヘモグロビン等吸収点）、556nm（脱酸素化ヘモグロビンによる吸収が優勢）、576nm（酸素化ヘモグロビンによる吸収が優勢）、600nm（脱酸素化ヘモグロビンによる吸収が支配的）の4波長とした。前述したようにメラニンの吸収係数は波長が短くなるに従って大きくなることから、上記4波長の中では532nmにおいて最大になると考えられる。

図11, 12, 13にそれぞれ前腕皮膚内側、同外側および手掌部の各波長における10計測点の光音響波形を示す。各波形において、深さ0.1 - 0.2mm付近にある信号ピークは、表皮中のメラニンに由来すると考えられる。いま同深度領域にある波長532nmの信号ピークに着目すると、前腕内側で0.04 - 0.1Vであるのに対し、前腕外側で0.06 - 0.15Vと高くなっている。これは紫外線暴露量が多い後

者の部位において、メラニン濃度が高くなっていることを示している。また手掌部はメラニン濃度が低いことが知られているが、同部位の信号ピーク（深度0.1 - 0.2mm、波長532nm）は0.02V以下と低い値を示している。このように、光音響信号ピークとメラニン量の間には明確な相関が認められた。

前腕内側および外側の深度0.2 - 0.4mm付近の信号ピークは、メラニンと真皮上部のヘモグロビンの両方に由来していると考えられる。今回取得したデータから両因子の寄与率を見積もることは困難であるが、同一点、同一深度の信号の振幅の波長依存性を詳しく調べることにより、ある程度の定量化は可能であると考えられる。一方、手掌部の0.2mmより深い領域の信号は、酸素化・脱酸素化何れかのヘモグロビンに由来すると考えられる。532nm（等吸収点）、556nm（脱酸素化ヘモグロビン優勢）、576nm（酸素化ヘモグロビン優勢）の各波長の波形によると、深さ0.3 - 0.4mm付近、0.75 - 0.8mm付近、1.1 - 1.2mm付近に信号ピークが認められ、これら深度領域に血液層が存在していることを示している。脱酸素化ヘモグロビンによる吸収が支配的な600nmの信号において顕著な信号ピークが認められないことから、上記の各信号ピークは酸素化ヘモグロビンによる吸収の寄与率が高いと考えられる。600nmの信号においては、深さ1.3 - 1.4mm付近に小さな信号ピークが認められ、この深度領域において脱酸素化ヘモグロビンの濃度が高くなっている可能性を示唆してい

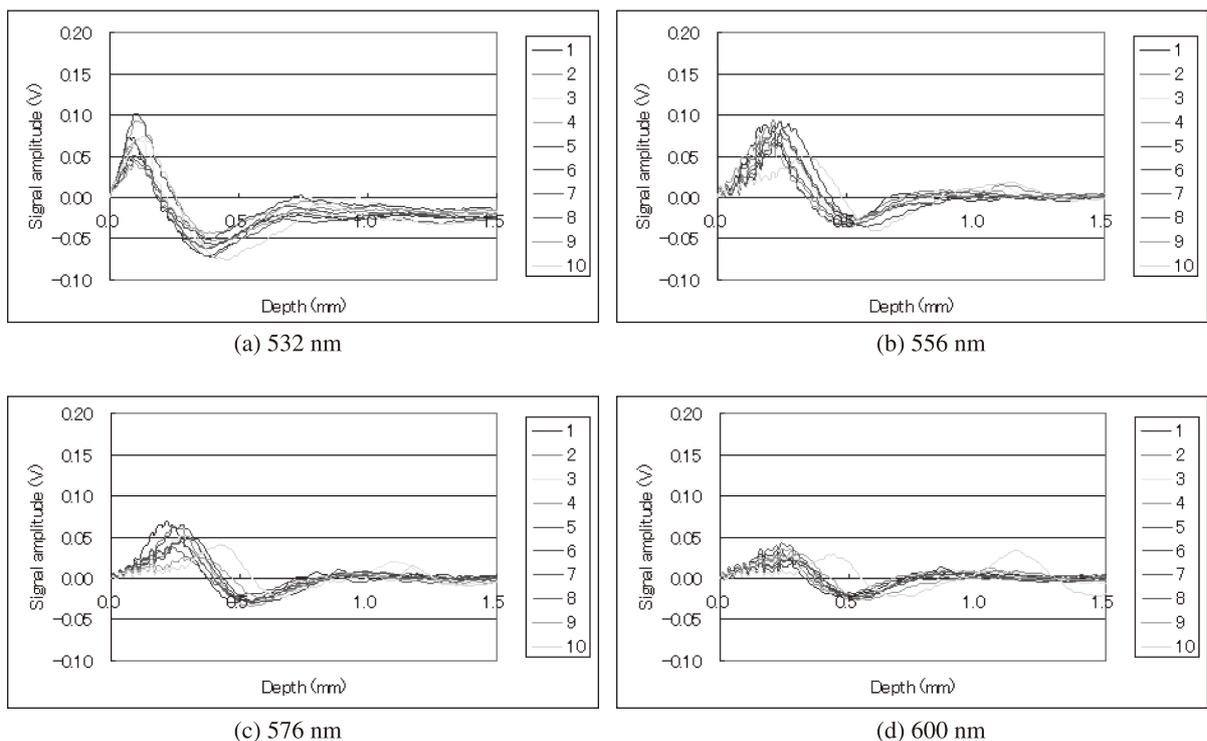


図11 各波長におけるヒト前腕内側皮膚10点の光音響信号波形。パルスエネルギー 200 μ J

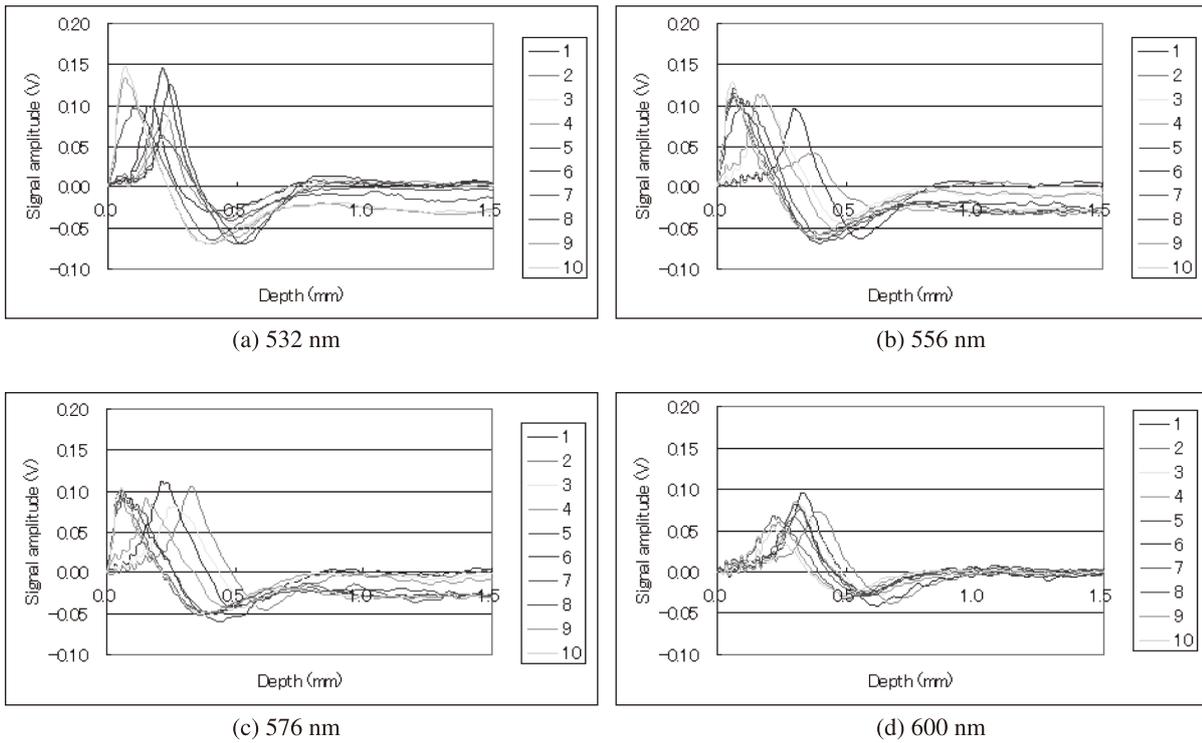


図 12 各波長におけるヒト前腕外側皮膚 10 点の光音響信号波形。パルスエネルギー 200 μ J

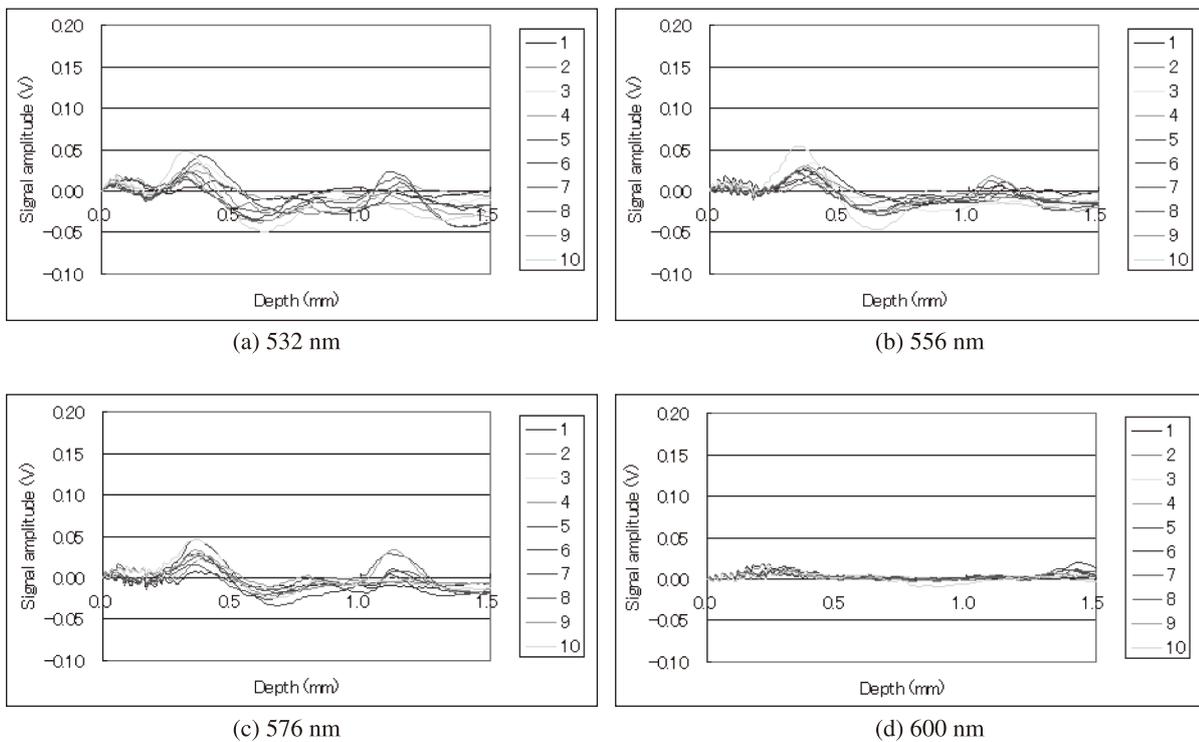


図 13 各波長におけるヒト手掌部皮膚 10 点の光音響信号波形。パルスエネルギー 200 μ J

る。

図 11, 12, 13 の各点のデータより信号の二次元分布を求めた結果（光音響トモグラム）を図 14 に示す。上述した傾向を視覚的に捉えることができる。

今回の実験は、波長毎に三部位の計測を行ったことから、同一部位の各波長のデータ取得時間には数 10 分の時間差がある。この間の信号の時間変動が無視できれば、各波長の信号の比を取り、例えば、556nm/532nm, 576nm/532nm が一定値以上の領域を、それぞれ静脈と動脈として表示することも可能であろう。また波長を高速で走査してメラニンの光音響信号スペクトルを得ることによ

り、黒色メラニンと黄色メラニンの分布を診断できる可能性もある。

5. 総括

光音響法が皮膚組織中のメラニン、ヘモグロビンなどの深さ分布を診断するのに有効であることがわかった。本方法は無侵襲かつリアルタイムの皮膚診断が可能であり、皮膚診断用ツールとして有望である。今後、装置の小型・軽量化および上述した高機能化に取り組み、コスメトロジー分野での実用化を目指したい。

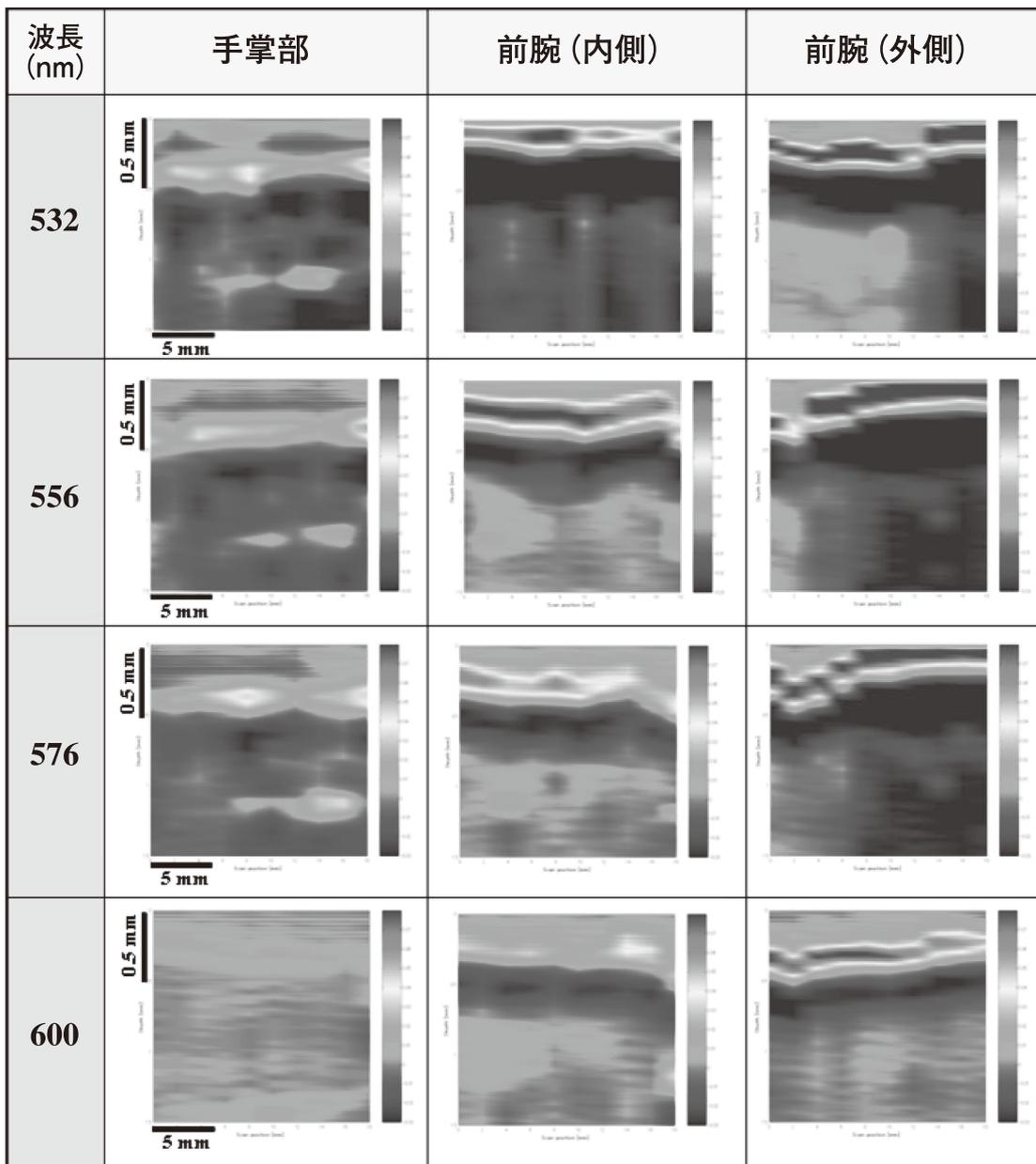


図 14 各波長における手掌部, 前腕内側, 前腕外側の光音響トモグラム。カラーバーにおいて、青色から赤色に行くに従い光音響信号（振幅）が大きくなる。パルスエネルギー 200μJ

(参考文献)

- 1) Bell AG, :The production and reproduction of sound by light, Am. J. Sci., 20, 305, 1880.
- 2) Sarna T and Sealy RC, :Photoinduced oxygen consumption in melanin systems. Action spectra and quantum yields foreumelanin and synthetic melanin, Photochem. Photobiol., 39, 69-74, 1984.
- 3) Crippa RP, Cristofolletti V, and Romeo N, :A band model for melanin deduced from optical absorption and photoconductivity experiments, Biochim. Biophys. Acta., 538, 164-170, 1987. 4) Schmitt JM, :Optical measurement of blood oxygenation by implantable telemetry, Technical Report G558-15, Stanford.
- 5) Moaveni MK, :A multiple scattering field theory applied to whole blood, Ph.D. dissertation, Dept. of Electrical Engineering, University of Washington, 1970.
- 6) Takatani S and Graham MD, :Theoretical analysis of diffuse reflectance from a two-layer tissue model, IEEE Trans. Biomed. Eng., BME-26, 656-664, 1987.

インターロイキン 12 による紫外線防護に関する研究

長崎大学先端生命科学研究支援センター

松田 尚樹

Interleukin-12(IL-12), one of the cytokines produced in UV-irradiated human skin, has been reported to prevent UV-induced immunosuppression through the mechanisms involving enhancement of DNA repair. This fact let us to speculate on the potential use of IL-12 for biological protection against harmful solar UV radiation. We examined effects of exogenously-added IL-12 on UV-irradiated human epidermal keratinocytes, the expression of IL-12 in those cells, and UV-induced intracellular signaling molecules responsible for IL-12 production. The removal of cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) from the genomic DNA in cells irradiated with 100J/m² of UV-B (80μ W/cm²) was accelerated by the presence of human recombinant IL-12 at doses of 50 or 100ng/ml. Treatment of the irradiated cells with IL-12 also resulted in elevated survival level following UV-B irradiation. When cells were irradiated with 200J/m² of UV-B, IL-12 concentration in conditioned medium for 24h post-irradiation was approximately 12pg/ml, which was 10 fold higher than that in unirradiated control. Expression for IL-12A(p35) mRNA was also increased to 2.4 fold over the control level in 16h following exposure. Both the IL-12 secretion and IL-12 mRNA expression were inhibited by a JNK inhibitor and by an antioxidant. These results suggested that UV-induced oxidative stress in the cells triggers activation of intracellular signaling, including a JNK pathway. Although the downstream signaling is to be determined, activated JNK would lead to secretion of IL-12 through upregulation of IL-12 mRNA expression. IL-12 then enhances elimination of CPD from damaged DNA. Thus, UV-induced signaling pathways toward production of IL-12 are possibly a positive autocrine regulation of DNA repair system. To potentate this mechanism may lead to a new approach toward biological protection against solar UV light.

1. 緒言

オゾン層破壊による太陽紫外線（以下 UV）被ばく量増加に伴う人体影響が危惧されている。UV の悪影響を低減するための UV 防護として、衣服、帽子、眼鏡等の着用や、サンスクリーン剤の塗布による物理的あるいは化学的な方法が用いられ、これらの方法はいずれも有効であるが、生体の UV 防御反応を促進するものではない。そのため、UV を浴びた後に適用しても有効な生物学的 UV 防護法が望まれている。

UV 被ばく後の表皮には DNA 損傷が生じており、その大部分は修復されるが、修復されない損傷や誤った修復を受けた損傷が、細胞死または突然変異を引き起こし、ひいては、短期的には重篤な日光皮膚炎、長期的には発がんを誘導する。したがって、生物学的 UV 防護のアプローチの一つとして、DNA 損傷の修復を促進する因子を適用することが考えられる。事実、DNA 損傷の修復に必要な遺伝子の機能を欠損した XP（色素性乾皮症）患者の臨床においては、DNA 損傷の除去修復の際に必須の UV-endonuclease V や、損傷の光回復を可能とする

photolyase の適用が既に試みられているが、健常者が日常生活で使用し得る生物学的防護法は未だ確立していない。

サイトカインの一種であるインターロイキン 12 (IL-12) は、免疫担当細胞により産生され、免疫ネットワークを制御する液性因子としてクローニングされたものである。その後、皮膚構成細胞も IL-12 を産生し、UV がこれを誘導すること^{1, 2)}、また IL-12 が UV による皮膚免疫抑制に対して拮抗的に働くこと³⁾ が報告されてきたが、この機構の一つとして、IL-12 による DNA 損傷の除去修復促進の可能性が示されている⁴⁾。このことは、IL-12 が免疫系に対して働くのみならず、UV を浴びた後の組織防護に働く可能性を示す。一方、UV 照射された細胞内では、DNA 損傷に起因する、あるいは起因しないシグナル分子群が活性化し、細胞の増殖、アポトーシス、また分化機能といった多様な細胞機能の発現に関わっているが⁵⁻⁷⁾、その IL-12 誘導との関連性については知られていない。

本研究では、UV による組織の損傷を低減し、組織の再生を促す新たな UV 防護因子としての IL-12 の可能性を探ることを目的とし、培養ヒト表皮角化細胞を用いて、中波長 UV (UV-B) 照射後の DNA 損傷修復と細胞死に対する exogenous に与えられた IL-12 の作用、および UV-B 照射による endogenous な IL-12 産生誘導と、それに関する UV-B 誘導細胞内シグナル分子群について検討した。

2. 材料と方法

細胞には初代培養正常ヒト表皮角化細胞 (normal human epidermal keratinocytes: NHEK)、またはヒト表



Biological protection from ultraviolet radiation by interleukin-12

Naoki Matsuda

Center for Frontier Life Sciences,
Nagasaki University

皮角化細胞由来樹立株 (HaCaT) を用い、培養液にはそれぞれ EpiLife-KG2 (Kurabo) または DMEM/10% FBS を用いた。なお NHEK は継代数 1 - 3 の細胞を実験に供した。UV-B 照射には、CO₂ インキュベータ内に設置した UVB ランプ (UVP F8T5 8W、波長ピーク 302nm、線量率 80μW/cm²) を用いた。

照射後の細胞より DNA を単離し、UVB による主要な DNA 損傷であるシクロブタン型ピリミジンダイマー (CPD) 及び 6-4 光産物 (6-4PP) を、抗 CPD 抗体 (TDM-2) または抗 6-4PP 抗体 (64 M-2) を用いて ELISA 法により測定した。また UVB 照射後の細胞生存率をコロニー形成法により求めた。一方、照射後の細胞による IL-12A (p35) mRNA の発現は等長プライマー伸長法 (IPE 法、TrimGen) により、また培養液中に分泌された IL-12 (p70) 量は ELISA (Endogen) により定量した。細胞内シグナル分子としてはすでに UV-B に応答することを報告している MAP kinase 群である ERK1/2、JNK1/2、および p38 に着目し、それぞれのシグナル伝達系の阻害剤である PD98059 (MEK inhibitor, 100μM)、SP600125 (JNK1/2 inhibitor, 20μM)、および SB203580 (p38 inhibitor, 25μM、以上 Calbiochem) による IL-12 発現量の変化を調べた。シグナル分子のリン酸化は western blot により検出した。

3. 結果

100J/m² の UV-B を照射された HaCaT における CPD 及び 6-4PP 量の経時変化を Fig. 1 に示す。CPD 量は照射後 8 時間で半減し、24 時間後にも約 20% が残存したのに対して、6-4PP は照射後 2 時間で急激に減少し、16 時間後にはほぼ未照射のレベル (OD=0) に達した。すなわち、CPD はゆっくりと、6-4PP は早く修復されることが示された。

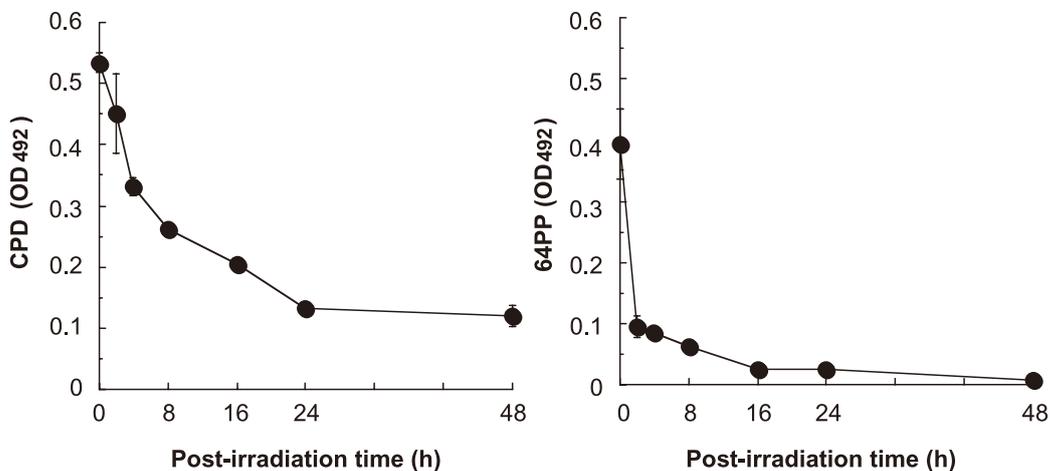
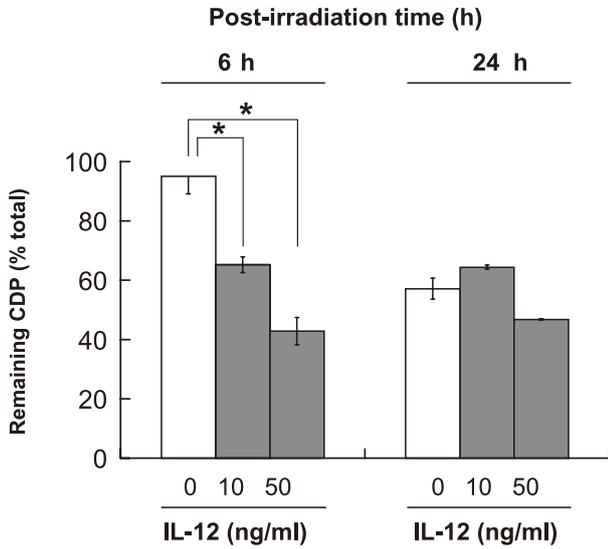


Fig.1 Repair kinetics of CPD (left) and 6-4PP (right) of HaCaT cells following exposure to UV-B (100J/m²).

そこで、あらかじめ細胞を IL-12 (ヒト・リコンビナント体, Sigma) で 1 時間培養した後に UV-B を照射し、さらに IL-12 存在下で培養を続け、CPD 及び 6-4PP 量を測定したところ、10ng/ml および 50ng/ml の IL-12 によって照射 6 時間後における CPD 量が有意に減少していた (Fig. 2)。しかし照射 24 時間後では IL-12 の作用は見られなかった。また、データには示さないが、IL-12 は 6-4PP の量には影響を与えなかった。さらに、UV-B 照射後の細胞の生存率は、IL-12 の存在により上昇した (Fig. 3)。以上を合わせると、exogenous に加えられた IL-12 は、CPD の修復のうち特に初期過程を促進し、その結果、UV-B による細胞死を防ぐことが考えられる。

次に、UV-B による IL-12 の産生誘導について検討したところ、NHEK 細胞では、200J/m² の UV-B 照射 16 時間後における IL-12 mRNA の顕著な発現 (非照射に対して約 2.4 倍、Fig. 4) と、24 時間後における培養液への IL-12 の分泌の線量依存的な増加 (200J/m² では約 12pg/ml、Fig. 5) が認められた。興味深いことに、HaCaT ではこのような UV-B による IL-12 の誘導は見られなかった (data not shown)。

この UV-B 誘導 IL-12 産生に関わる細胞内シグナル伝達経路を推定するために、UV-B で活性化することが確かめられている MAP kinase 群の阻害剤の存在下で UV-B を照射し培養を続けたところ、IL-12 分泌 (照射 24 時間後、Fig. 6) および IL-12 mRNA 発現 (照射 16 時間後、Fig. 7) のいずれもが、JNK1/2 の特異的阻害剤である SP600125 により非照射のレベルまで抑制された。また、抗酸化剤である N-acetyl-cysteine (NAC) は SP600125 と同様に IL-12 産生を抑制するとともに、UV-B による JNK1/2 のリン酸化を阻害していた (Fig. 8)。



* statistically significant difference ($p < 0.05$) by student t-test

Fig.2 Effect of exogenously-added IL-12 on removal of CPD in HaCaT cells in 6h or 24h following exposure to UV-B ($100\text{J}/\text{m}^2$).

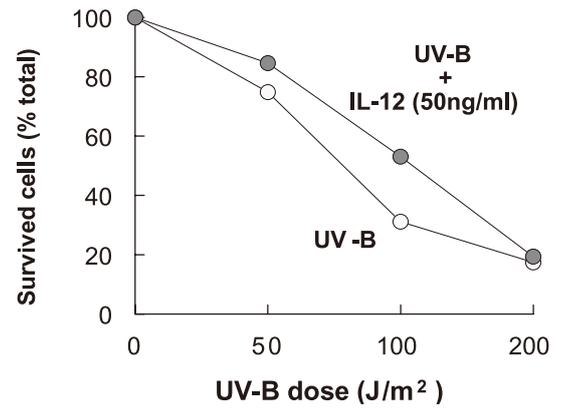
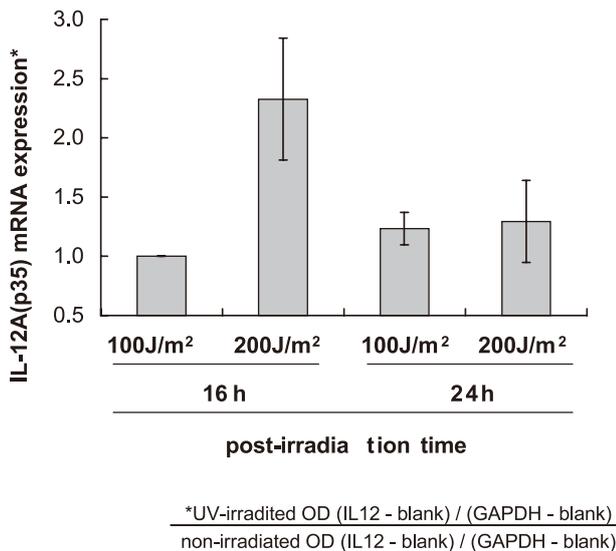


Fig.3 Clonogenic cell survival of HaCaT cells in the presence or absence of IL-12 following irradiation with UV-B at various doses.



*UV-irradiated OD (IL12 - blank) / (GAPDH - blank) / non-irradiated OD (IL12 - blank) / (GAPDH - blank)

Fig.4 mRNA expression for IL-12 (p35) in normal human epidermal keratinocytes in 16h or 24h following exposure to UV-B ($100\text{J}/\text{m}^2$ or $200\text{J}/\text{m}^2$).

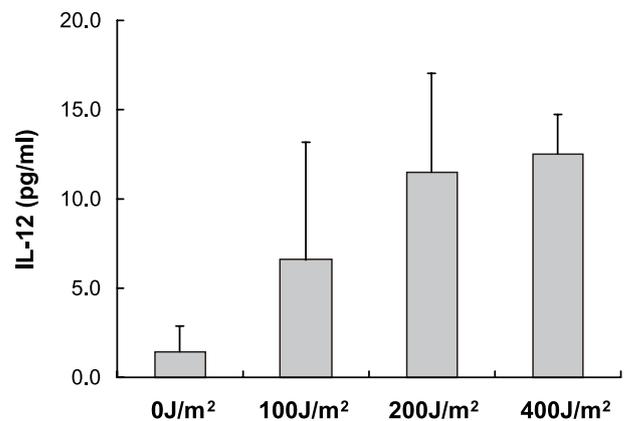


Fig.5 Secretion of IL-12(p70) by normal human epidermal keratinocytes in 24h following exposure to increasing doses of UV-B.

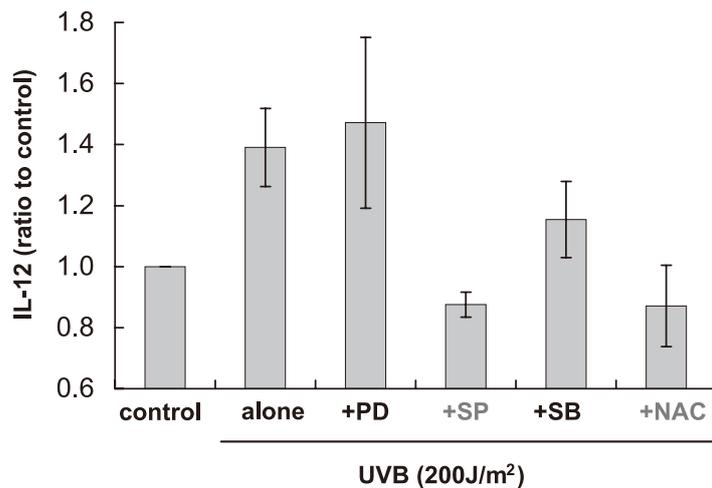


Fig.6 Inhibition of IL-12 secretion by various MAPK inhibitors and an antioxidant in 24h following irradiation with 200J/m² of UV-B. PD:PD98059 (MEK inhibitor, 100μM) , SP:SP600125 (JNK1/2 inhibitor, 20μM) ,SB:SB203580 (25μM) , NAC:N-acetyl cysteine (antioxidant, 1mM).

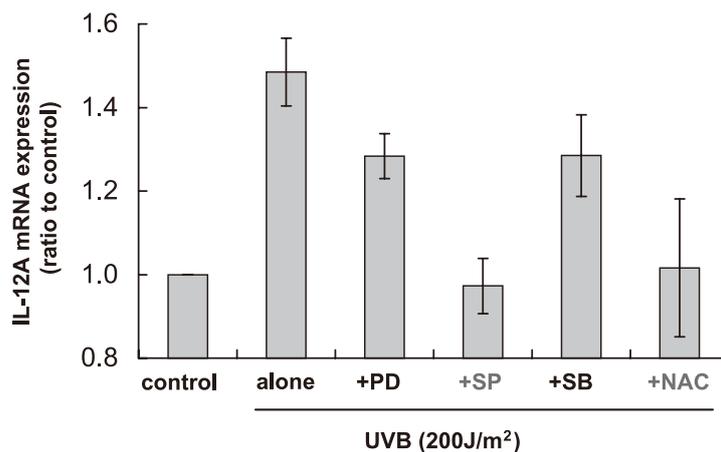


Fig.7 Inhibition of IL-12A mRNA expression by various MAPK inhibitors and by an antioxidant in 16h following irradiation with 200J/m² of UV-B.

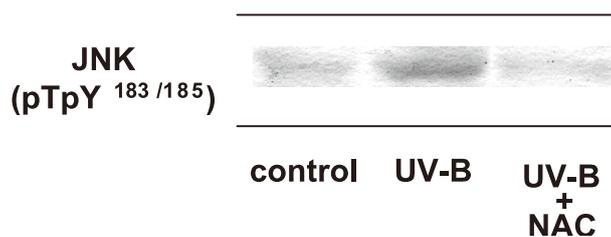


Fig.8 Phosphorylation of JNK and its inhibition by NAC in 24h following irradiation with 400J/m² of UV-B.

4. 考 察

UV-B はヒト表皮角化細胞による IL-12 の産生を誘導したことが、一方、exogenous に加えた IL-12 が CPD の修復を促進し UV-B による細胞死を抑制したことは、UV-B により放出誘導された IL-12 が DNA 損傷の修復を促進するという、一種の autocrine な upregulation 機構の存在を示唆する。しかし、exogenous に加えられた IL-12 の有効濃度域 (ng) は、培養液中に検出された IL-12 濃度 (pg) よりも高く、また IL-12 は CPD の修復のうち特に照射 6 時間以内の初期過程を促進したが、培養液中への IL-12 の分泌が確認されたのは照射 24 時間を経過後であった。そのため、この autocrine な regulation が生理的に生じているかという点について、IL-12 をノックダウン、もしくは強制発現させた細胞系での確認が必要である。

UV による IL-12 の誘導には細胞種波長依存性があり、HaCaT では UV-B による IL-12 の誘導は見られなかった (data not shown)。HaCaT には樹立化に伴い p53 等の遺伝子に変異が生じていることが知られており⁸⁾、正常な細胞とは異なる UV-B 応答性が関与しているのかもしれない。また波長依存性も存在し、IL-12 誘導能は UV-A が UV-B よりも高い。さらに UV-B 照射による immunosuppression は UV-A の共照射により抑制されることも報告されている⁹⁾。以上を合わせ考えると、太陽光紫外線の大部分を占める UV-A が、日常生活における UV-B 防衛的な働きをしている可能性もあろう。

UV を受けた表皮細胞の IL-12 の産生機構については明らかではなかったが、今回の結果は、UV-B により産生された活性酸素種が JNK1/2 経路を活性化し、その下流で IL-12 遺伝子発現が制御されていることを示唆する。JNK による IL-12 産生制御に関する同様の報告は、マクロファージにおける LPS 誘導 IL-12 産生系においても見られる¹⁰⁾。UV を照射され細胞内で活性化するシグナル伝達経路のうち、JNK1/2 経路は一般にアポトーシスに関連すると考えられてきた⁵⁾。今回の結果と合わせ考えると、JNK1/2 経路はアポトーシスによる損傷細胞の排除のみならず、IL-12 産生を介した DNA 損傷修復によっても UV 防衛的に働いているのかもしれない。

本研究では、ヒト表皮角化細胞における UV-B 照射→活性酸素種→JNK1/2→IL-12→CPD 修復→細胞生存の一連の autocrine regulation の機構の存在を示した。今後、生物学的な紫外線防護法開発へのアプローチの一つとして、この機構に変化を及ぼす薬物、因子、素材等の投与による IL-12 産生の間接的活性化が考えられよう。

(参考文献)

- 1) Kondo S, Jimbow K: Dose-dependent induction of IL-12 but not IL-10 from human keratinocytes after exposure to ultraviolet light A. *J Cell Physiol* 177, 493-498, 1998.
- 2) Werth VP, Bashir MM, Zhang W: IL-12 completely blocks ultraviolet-induced secretion of tumor necrosis factor from cultured skin fibroblasts and keratinocytes. *J Invest Dermatol* 120, 116-122, 2003.
- 3) Schwarz A, Grabbe S, Aragane Y et al.: Interleukin-12 prevents UVB-induced local immunosuppression and overcomes UVB-induced tolerance. *J Invest Dermatol* 106, 1187-1191, 1996.
- 4) Schwarz A, Staender S, Berneburg M et al.: Interleukin-12 suppresses ultraviolet radiation-induced apoptosis by inducing DNA repair. *Nat Cell Biol* 4, 26-31, 2001.
- 5) Matsuda N, Horikawa M, Wang LH et al.: Differential activation of ERK 1/2 and JNK in normal human fibroblast-like cells in response to UVC under different oxygen tensions. *Photochem Photobiol* 72, 334-339, 2000.
- 6) Yanase H, Ando H, Horikawa M et al.: Possible involvement of ERK 1/2 in UVA-induced melanogenesis in cultured human epidermal melanocytes. *Pigment Cell Res*, 14, 103-109, 2001.
- 7) Horikawa-Miura M, Matsuda N, Yoshida M et al.: The higher lethality of UVB radiation to cultured human cells is associated with the specific activation of a DNA damage-independent signaling pathway. *Radiat Res*, in press.
- 8) Lehman TA, Modali R, Boukamp P et al.: p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis* 4, 833-839, 1993.
- 9) Reeve VE, Domanski D, Slater M: Radiation sources providing increased UVA/UVB ratios induce photoprotection dependent on the UVA dose in hairless mice. *Photochem Photobiol* 82, 406-411, 2006.
- 10) Utsugi M, Dobashi K, Ishizuka T et al.: c-Jun N-terminal kinase negatively regulates lipopolysaccharide-induced IL-12 production in human macrophages: Role of mitogen-activated protein kinase in glutathione redox regulation of IL-12 production. *J Immunol* 171, 628-635, 2003.

薬用人参の皮膚老化防止作用と育毛作用の分子メカニズム

東京医科歯科大学難治疾患研究所

古川 哲史

The earliest evidence of humans' use of herb for healing dates back to the Neanderthal period. In the late 20th century, with concerns over the iatrogenic effects of conventional medicine and desire for more self-reliance, interest in natural health increased and use of herbal medicines again became popular. Among >20,000 herbal products that are currently on the market, ginseng root is one of the most popular herbs. The name "ginseng" originates in the "panacea (cure-all)", and it exhibits varieties of actions, including modulation of immune responses, antineoplastic effects, and cardio-protection. In addition, recent data show that ginseng has beneficial effects on skin-care and hair growth, and ginseng is widely used as a cosmetology medicine in Eastern Asia.

Steroid saponin "ginsenoside" is the major constituent of ginseng; more than 30 ginsenosides are included in ginseng. In this study, we examined effects of ginsenoside Re which exerts the strongest bioactivities. Ginsenoside Re exhibits estrogenic actions in a dose-dependent manner. Estrogen exhibits its actions by transactivation of various genes, referred as a classical genomic pathway and by membrane-delimited signaling referred as a non-genomic pathway. Ginsenoside Re produces nitric oxide via the non-genomic pathway of estrogen receptor without activation of genomic pathway. This is because ginsenoside Re has a bulky side-chain which interferes with the co-activator recruitment. Thus, ginsenoside Re is considered as non-genomic pathway specific ligand of estrogen receptor. Since estrogen is known to increase collagen content in the skin and proliferate hair follicle cells, the role of estrogenic actions of ginsenoside Re in skin-care and hair growth should be examined in the future study.

1. 緒言

ハーブの医療に対する使用の歴史はネアンデルタール人までさかのぼる^{1,2)}。20世紀に入ってから近代医薬品の副作用に対する危惧や個人の健康に対する意識の高まりから、ハーブ薬品の使用頻度が再び増加傾向を示している。市販されているハーブ医薬品・ハーブサプリメントは2万種類以上あるが、その中で薬用人参 *Panax ginseng* は最も人気のあるハーブ医薬品の一つである³⁾。*Panax* はラテン語の *panacea* (=cure-all) に由来し万能薬として使用されており、免疫活性化作用・抗腫瘍作用・強心作用など様々な作用を有する。最近スキンケア・育毛に効果があることが注目されており、東アジアを中心として広く使用されているが、そのメカニズムは充分解明されていない。

薬用人参の主成分は steroid saponin の ginsenoside であり、現在では30種類以上の ginsenoside が含まれると考えられている^{4,5)}。薬用人参は閉経期に伴う様々な症状に有効であることが知られており、中国では更年期障害の治療薬として処方されている⁶⁾。乳がん由来細胞株 MCF-7 を用いた転写アッセイ実験では、人参にエストロゲン様作用

があることも報告されている^{7,8)}。そこで、本申請では薬用人参成分の性ホルモン作用の分子メカニズムを検討した⁹⁾。

2. 実験と考察

2・1 薬用人参の主成分 ginsenoside のエストロゲン様作用

申請者は性ホルモンであるテストステロン・エストロゲンが性ホルモン受容体を介する作用で、心筋のカリウムチャンネルを活性化することを報告している¹⁰⁻¹²⁾。そこで薬用人参の主成分 steroid saponin (=ginsenoside) の性ホルモン様作用の強さを、本アッセイ系を用いて検討した。薬用人参には30種類以上の ginsenoside の存在が知られている。現在市販されている ginsenoside は Rb1, Rc, Rd, Re, Rg1 の5種類であり、これらに関して検討した。Ginsenoside は3位と21位に糖鎖のついた panaxadiol と6位と21位に糖鎖のついた panaxatriol に分類されるが、ginsenoside Rb1, Rc, Rd は panaxadiol に、ginsenoside Re, Rg1 は panaxatriol に分類される(図1A)^{4,5)}。

これらの ginsenoside の心筋カリウムチャンネル活性化の濃度—反応曲線を取ってみると図1Bのようになり、ginsenoside Re が最も作用が強く、ginsenoside Rd はほとんど活性化作用を示さず、ginsenoside Rb1, Rc, Rg1 はこれらの中間の作用を示した。そこで以下の検討は ginsenoside Re のみを用いて行った。



Molecular mechanism for protection against skin aging and hair growth by *Panax ginseng*

Tetsushi Furukawa

Tokyo Medical and Dental University, Medical research Institute

2・2 Ginsenoside Re の性ホルモン受容体への結合アッセイ

Ginsenoside Re の性ホルモン受容体であるアンドロゲン受容体 (AR)・エストロゲン受容体 (ER)・プロゲステロン受容体 (PR) への結合アッセイを competitive binding assay を用いて行った。ジヒドロテストステロン (DHT) の AR への結合の IC₅₀、エストラジオール (E2) の ER への結合の IC₅₀、プロゲステロン (P4) の PR への結合の IC₅₀ は、それぞれ 2.8nM、33.8nM、50.0nM であった (図2)。Ginsenoside Re も AR, ER, PR に対して濃度依存的に結合し、その IC₅₀ はそれぞれ 59.0μM、80.6μM、80.6μM と比較的高濃度であった (図2)。

2・3 Ginsenoside Re のゲノム作用

性ホルモンの古典的作用は、脂溶性の性ステロイドホルモンが脂質2重層からなる細胞膜を透過し、細胞質内にあ

る性ホルモン受容体に結合し、ホルモン-受容体複合体が核内へ移行し、性ホルモン応答領域を有する遺伝子に結合し転写調節を行うゲノム作用であり、これは転写-翻訳の過程を経ることから数時間~数日の時間経過で起こる反応である (図3)¹³⁾。ところが近年、数秒~数分のゲノム作用では説明できない早い経過で起こる反応が性ホルモンにはあることが判明し、非ゲノム作用と呼ばれ特に末梢組織における重要性が注目を集めている^{14,15)}。非ゲノム作用は細胞膜に局在した反応であり、チロシキナーゼ c-Src、脂質キナーゼである PI3-kinase、Ser/Thr キナーゼである Akt、内皮型一酸化窒素合成酵素 eNOS を介して一酸化窒素 NO を産生する経路が良く知られている (図3)^{14,16)}。

まず最初に、ginsenoside Re の性ホルモンゲノム作用の有無を検討した。アンドロゲンのゲノム作用は前立腺ガン由来の細胞株 LNCaP の増殖で¹⁷⁾、エストロゲンのゲノム作用は MCF7 細胞の増殖で検討されている¹⁸⁾。

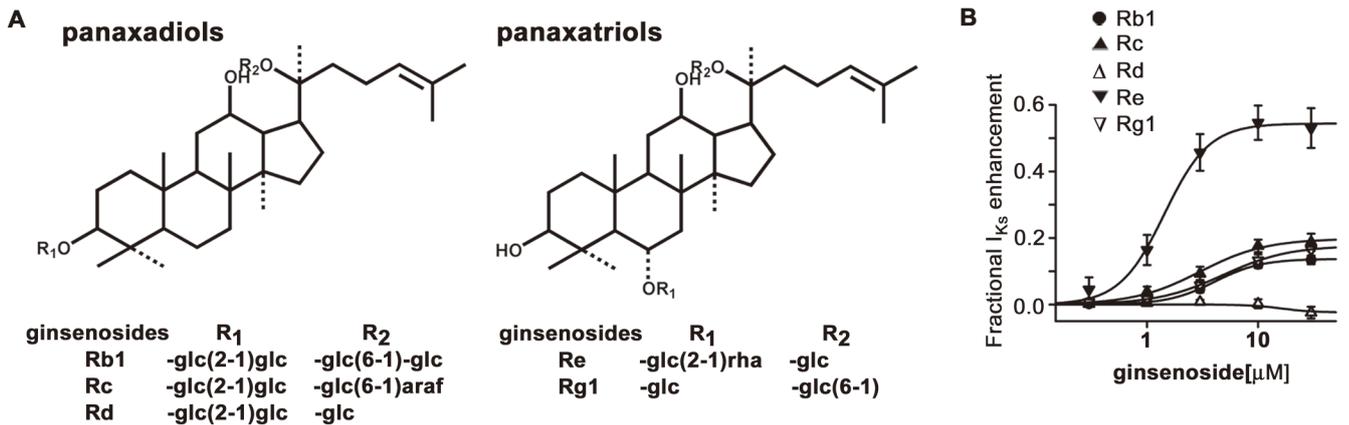


図1 種々の ginsenoside とエストロゲン様作用の強さ。

- A. Panaxadiol と panaxatriol の化学構造。Panaxadiol は 3 位と 21 位にインセットにある糖鎖が付き、panaxatriol は 6 位と 21 位に糖鎖が付く。
 B. 心筋カリウムチャネル活性化を用いてアッセイした ginsenoside のエストロゲン様作用。Re が最も作用が強く、Rd は作用が無く、Rb1, Rc, Rg1 はこれらの中間の強さを示す。

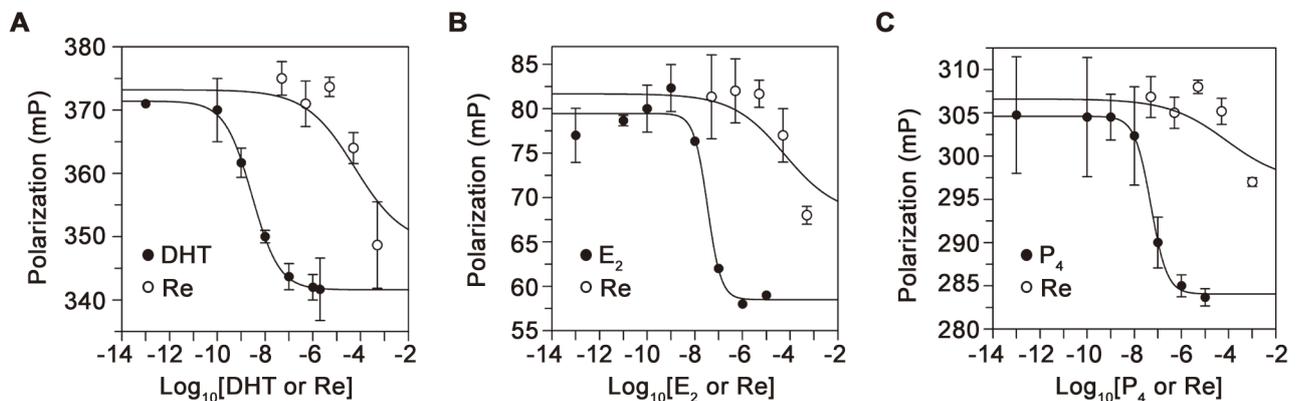


図2 Ginsenoside Re の性ホルモン受容体への結合。

AR (パネルA)・ER (パネルB)・PR (パネルC) に対するそれぞれのリガンドと ginsenoside Re の結合。

そこでこれらの細胞の増殖に対する作用を検討すると、ginsenoside Re はいずれも増殖作用を示さず、逆に DHT および E2 による増殖作用に対して抑制的に働いた (図 4)。

2・4 Ginsenoside Re の非ゲノム作用

次に ginsenoside Re の性ホルモン非ゲノム作用の有無を検討した。非ゲノム作用は Akt のリン酸化抗体を用いた Western blot 解析により Akt のリン酸化により検討した¹⁹⁾。図 5A に示すように、ginsenoside Re は濃度依存性に Akt をリン酸化した。Ginsenoside のリン酸化は AR の阻害薬 nilutamide、ER の阻害薬 ICI182,780、PR の阻害薬 mifepristone により部分的に阻害され、nilutamide、ICI182,780、mifepristone の同時投与によりほぼ完全に阻害され (図 5B)、ginsenoside Re は AR、ER、PR それぞれの非ゲノム経路を活性化することが示唆される。また c-Src の阻害薬 PP2、PI3-kinase の阻害薬 wortmanin、Akt の阻害薬 SH-6 により阻害されたことから (図 5B)、心筋カリウムチャネル活性化で明らかにした、性ホルモン受容体 - c-Src - PI3-kinase - Akt - eNOS の経路で NO を産生することが ginsenoside Re の主な作用経路であることが示唆された¹²⁾。

2・5 コアクチベーターのリクルートに対する作用

以上から、ginsenoside Re は性ホルモンのゲノム経路は活性化せず、非ゲノム経路のみを特異的に活性化することが判明した。性ホルモン受容体はアミノ末端から

activation factor-1 (AF-1), DNA-binding domain (DBD), ligand-binding domain (LBD), activation factor-2 (AF-2) の4つのドメイン構造を有している²⁰⁾。ゲノム経路では性ホルモンが LBD に結合するとヘリックス 12 が構造変化を起こすことによりコアクチベーターの結合ポケットが生じ、コアクチベーターをリクルートする^{21, 22)}。一方非ゲノム経路では LBD に性ホルモンが結合すると、AR・PR ではプロリンリッチ領域の構造変化が起こり c-Src の SH-3 ドメインに結合し、ER ではリン酸化チロシン周辺の構造変化が起こり c-Src の SH-2 ドメインに結合し、c-Src の活性化をもたらす¹⁶⁾。そこで、ginsenoside Re によるコアクチベーターのリクルートの検討を、fluorescent resonance energy transfer (FRET) を用いた検討により行った。コアクチベーターは L-X-X-L-L (L はロイシン、X はあらゆるアミノ酸) からなるモチーフが性ホルモン受容体コアクチベーター結合ポケットに結合する。そこで、東京大学大学院理学系研究科化学専攻梅澤研究室で開発された CFP-LBD- (L-X-X-L-L) モチーフ-YFP からなる蛍光プローブ、AR-SCCoR、ER-SCCoR、PR-SCCoR、を活用した²³⁻²⁵⁾。CFP は 440nm の光で励起され、480nm の蛍光を発生し、YFP は 480nm の光で励起され 535nm の光を発生する。そこで、この蛍光プローブに 440nm の光を当てると、通常は CFP だけが励起され 480nm の光を発生するが、リガンドが結合しコアクチベーターが LBD に結合すると、CFP から発生した 480nm の光で YFP が励起され 535nm の光を発生する。これによりコアクチベーターのリクルー

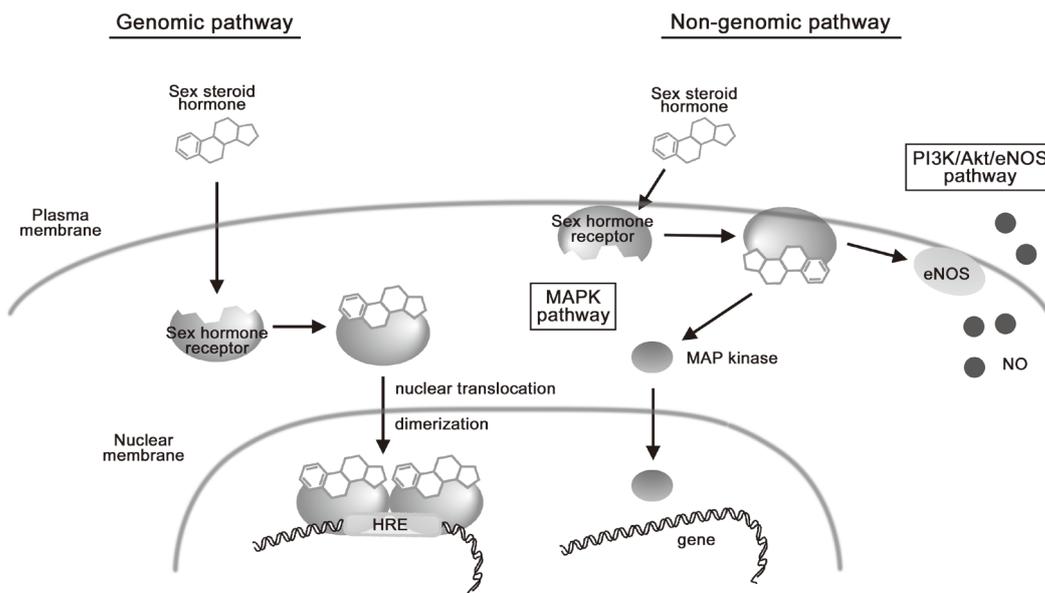


図3 性ホルモンのゲノム作用と非ゲノム作用。

ゲノム作用では、性ホルモンが受容体に結合し、ホルモン受容体複合体が、コアクチベーターをリクルートし、ホルモン応答領域を有する遺伝子に結合し転写を制御する。一方、非ゲノム作用は膜局在の受容体に結合し、c-Src を介して MAP-kinase 経路あるいは NO 合成酵素 (eNOS) を活性化する。

トの有無を検討できる。図6にあるように、ginsenoside ReはAR-SCCoR, ER-SCCoR, PR-SCCoRともFRETシグナルを発せず、性ホルモン受容体には結合するがコアクチベーターのリクルートが出来ないためにゲノム作用は示さなかったものと考えられる。DHT, E2, P4でもたらされるFRETシグナルに対してはginsenoside Reは逆に抑制することから、これらの阻害薬として作用することが判明した。

3. 考察

薬用人参あるいはその主成分ginsenosideは、多くのスキンケア製品・育毛製品として市販されているが、その作用メカニズムは充分解明されていない。文献的には、薬用人参が1型コラーゲンの合成を誘導すること²⁶⁾、

ginsenosideがケラチノサイトにおいて紫外線によるアポトーシスから保護すること²⁷⁾、皮膚損傷の修復を促進すること²⁸⁾などが知られている。また、薬用人参がマウスの毛根細胞の増殖を誘導すること²⁹⁾、放射線による毛根細胞のアポトーシスを抑制すること⁸⁾などが報告されている。エストロゲンも皮膚や毛髪に対して重要な働きをすることは古くから知られている。エストロゲンは皮膚のコラーゲン含量を増加させること、紫外線傷害に対して保護的に働く³⁰⁾。また、産後脱毛症が知られており、妊娠中は成長期にある毛根細胞の割合が増え、出産後は休止期にある毛根細胞の割合が増えることが知られている³¹⁾。以上のような薬用人参とエストロゲン作用の類似性は、ginsenoside Reに見られるエストロゲン様作用で説明される可能性がある。今回の検討では、ginsenoside Reは性ホルモン受容体の

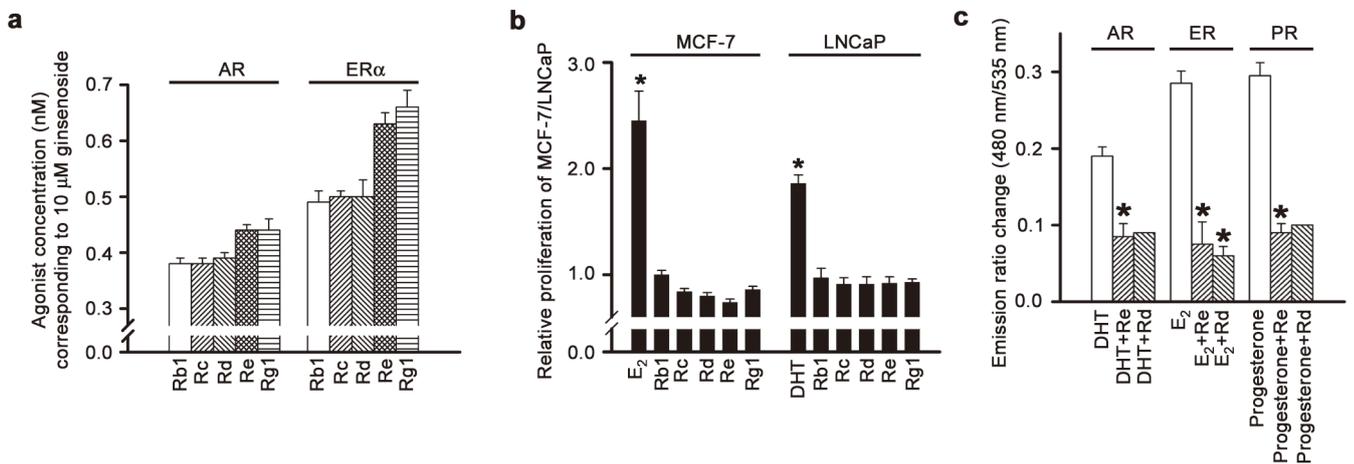


図4 Ginsenoside Reのゲノム作用。

性ホルモン受容体 (AR・ER) のゲノム作用を、アンドロゲン感受性細胞 LNCaP とエストロゲン感受性細胞 MCF-7 の増殖に対する作用で検討。Ginsenoside Reはこれらの細胞の増殖促進せず、DHT・E2による増殖に対して阻害した。

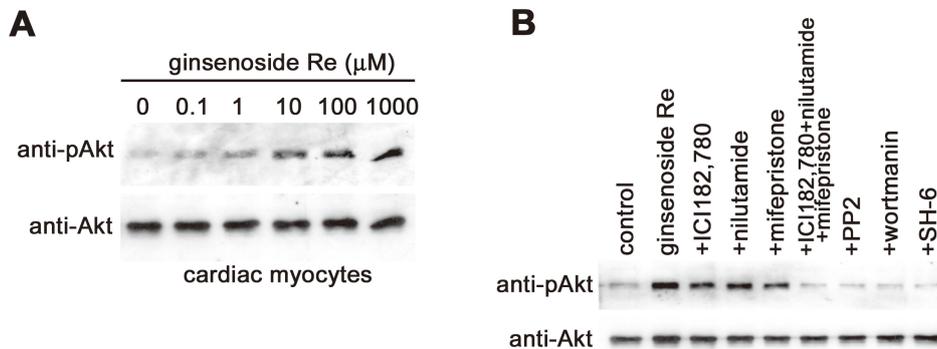


図5 Ginsenoside Reの非ゲノム作用。

性ホルモンの非ゲノム作用を、Aktのリン酸化で検討した。

A. GinsenosideはAktのリン酸化を濃度依存性に増強した。

B. IC182,780・nilutamide・mifepristoneはAktのリン酸化を部分的に抑制し、これら3阻害薬の同時投与はほぼ完全に抑制した。また、PP2・wortmanin・SH-6もAktのリン酸化をほぼ完全に抑制した。

ゲノム経路は活性化せず、非ゲノム経路を選択的に活性化した⁹⁾。これは ginsenoside Re は性ホルモン受容体に結合することはできるが、コアクチベーターをリクルートできないためと考えられた。エストロゲン受容体のアンタゴニストは長い側鎖を有しており、LBD に結合しても側鎖がヘリックス 12 の移動を妨げるため、コアクチベーター結合ポケットを形成できないためリガンドの作用を阻害すると考えられる。Ginsenoside Re も長い側鎖を有しており、ドッキング実験でも ER の LBD に対する ginsenoside Re の結合はヘリックス 12 の移動を妨げることが示唆されており、ginsenoside Re が E2 による MCF-7 細胞の増殖を抑制し、ER-SCCoR において E2 による FRET シグナルを抑制し、アンタゴニストとして作用することと良く一致する。今回の検討では ginsenoside Re の性ホルモン非ゲノム作用が、スキンケア・育毛の作用することを示す直接の証拠は得られておらず今後の課題と考えられる。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、ご支援を頂きました(財)コスメトロジー研究振興財団及び共同研究者に深く感謝いたします。

(文 献)

- 1) Winslow LC, Kroll DJ. Herbs as medicines. *Arch Internal Med.* 1998;158:2192-2199.
- 2) Goldman P. Herbal medicines today and the roots of modern pharmacology. *Ann Internal Med.* 2001;135:594-600.
- 3) Attele AS, Wu JA, Yuan CS. Ginseng pharmacology: multiple constituents and multiple actions. *Biochem Pharmacol.* 1999;58:1685-1693.
- 4) Kaku T, Miyata T, Uruno T, Sako I, Kinoshita A. Chemico-pharmacological studies on saponins of

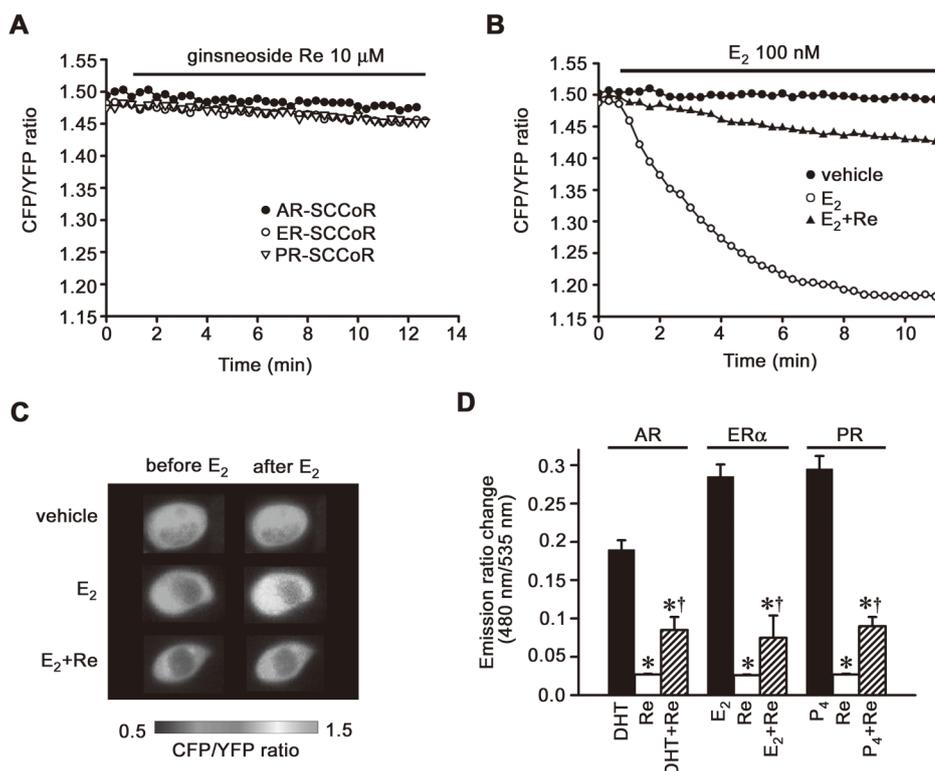


図6 コアクチベーターリクルートアッセイ。

性ホルモン受容体のコアクチベーターリクルートを、FRET プローブ (AR-SCCoR・ER-SCCoR・PR-SCCoR) を用いて行った。

- A. Ginsenoside Re は AR・ER・PR いずれにおいてもコアクチベーターのリクルートを誘導しなかった。
- B. E2 は ER のコアクチベーターリクルートを誘導し、ginsenoside Re はこの作用を抑制した。
- C. 実際の実験例。E2 により FRET シグナルが誘導されており、E2 と ginsenoside Re の同時投与では E2 による FRET シグナル誘導が抑制されている。
- D. 複数例での統計的解析。Ginsenoside Re は AR・ER・PR のコアクチベーターリクルートを誘導せず、DHT・E2・P4 によるコアクチベーター誘導を抑制した。

- Panax ginseng C. A. Meyer. II. Pharmacological part. *Arzneim-Forsch.* 1975;25:539-547.
- 5) Kaku T, Miyata T, Uruno T, Sako I, Kinoshita A. Chemico-pharmacological studies on saponins of Panax ginseng C. A. Meyer. I. Chemical part. *Arzneim-Forsch.* 1975;25:343-347.
- 6) Low Dog T. Menopause: a review of botanical dietary supplements. *Am J Med.* 2005;118 (Suppl 12B):98-108.
- 7) Lee Y, Jin Y, Lim W, Ji S, Choi S, Jang S, Lee S. A ginsenoside-Rh1, a component of ginseng saponin, activates estrogen receptor in human breast carcinoma MCF-7 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003;84:463-468.
- 8) Kim SH, Jeong KS, Ryu SY, Kim TH. Panax ginseng prevents apoptosis in hair follicles and accelerates recovery of hair medullary cells in irradiated mice. *In vivo (Athens, Greece)* . 1998;12:219-222.
9. Furukawa T, Bai CX, Kaihara A, Ozaki E, Kawano T, Nakaya Y, Awais M, Sato M, Umezawa Y, Kurokawa J. Ginsenoside Re, a main phytosterol of Panax ginseng, activates cardiac potassium channels via a nongenomic pathway of sex hormones. *Mol Pharmacol.* 2006;70:1916-1924.
- 10) Bai CX, Sunami A, Namiki T, Sawanobori T, Furukawa T. Electrophysiological effects of ginseng and ginsenoside Re in guinea pig ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol.* 2003;476:35-44.
- 11) Bai CX, Takahashi K, Masumiya H, Sawanobori T, Furukawa T. Nitric oxide-dependent modulation of the delayed rectifier K⁺ current and the L-type Ca²⁺ current by ginsenoside Re, an ingredient of Panax ginseng, in guinea-pig cardiomyocytes. *Br J Pharmacol.* 2004;142:567-575.
- 12) Bai CX, Kurokawa J, Tamagawa M, Nakaya H, Furukawa T. Nontranscriptional regulation of cardiac repolarization currents by testosterone. *Circulation.* 2005;112:1701-1710.
- 13) Beato M, Klug J. Steroid hormone receptors: an update. *Human Reprod Update.* 2000;6:225-236.
- 14) Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Reviews.* 2000;52:513-556.
- 15) Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Reviews.* 2001;81:1269-1304.
- 16) Migliaccio A, Castoria G, Di Domenico M, de Falco A, Bilancio A, Lombardi M, Barone MV, Ametrano D, Zannini MS, Abbondanza C, Auricchio F. Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-Src complex triggers prostate cancer cell proliferation. *EMBO J.* 2000;19:5406-5417.
- 17) Lippman M, Bolan G, Huff K. The effects of androgens and antiandrogens on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture. *Cancer Res.* 1976;36:4610-4618.
- 18) Lippman M, Bolan G, Huff K. The effects of estrogens and antiestrogens on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture. *Cancer Res.* 1976;36:4595-4601.
- 19) Baron S, Manin M, Beaudoin C, Leotoing L, Communal Y, Veysièrè G, Morel L. Androgen receptor mediates non-genomic activation of phosphatidylinositol 3-OH kinase in androgen-sensitive epithelial cells. *J Biol Chem.* 2004;279:14579-14586.
- 20) Bain DL, Heneghan AF, Connaghan-Jones KD, Miura MT. Nuclear Receptor Structure: Implications for Function. *Annu Rev Physiol.* 2006;69:9.1-9.20.
- 21) McKenna NJ, O'Malley BW. Nuclear receptors, coregulators, ligands, and selective receptor modulators: making sense of the patchwork quilt. *Ann NY Acad Sci.* 2001;949:3-5.
- 22) McKenna NJ, O'Malley BW. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell.* 2002;108:465-474.
- 23) Awais M, Sato M, Sasaki K, Umezawa Y. A genetically encoded fluorescent indicator capable of discriminating estrogen agonists from antagonists in living cells. *Anal Chem.* 2004;76:2181-2186.
- 24) Awais M, Sato M, Umezawa Y. A fluorescent indicator to visualize ligand-induced receptor/coactivator interactions for screening of peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands in living cells. *Biosens Bioelectron.* 2006.
- 25) Awais M, Sato M, Lee X, Umezawa Y. A fluorescent indicator to visualize activities of the androgen receptor ligands in single living cells. *Angewandte Chemie* 2006;45:2707-2712.
- 26) Lee J, Jung E, Lee J, Huh S, Kim J, Park M, So J, Ham Y, Jung K, Hyun CG, Kim YS, Park D. Panax ginseng induces human Type I collagen synthesis through activation of Smad signaling. *J Athnopharmacol.* 2007;109:29-34.
- 27) Lee EH, Cho SY, Kim SJ, Shin ES, Chang HK, Kim DH, Yeom MH, Woe KS, Lee J, Sim YC, Lee TR. Ginsenoside

- F1 protects human HaCaT keratinocytes from ultraviolet-B-induced apoptosis by maintaining constant levels of Bcl-2. *J Invest Dermatol.* 2003;121:607-613.
- 28) Chang LK, Whitaker DC. The impact of herbal medicines on dermatologic surgery. *Dermatol Surg.* 2001;27:759-763.
- 29) Matsuda H, Yamazaki M, Asanuma Y, Kubo M. Promotion of hair growth by ginseng radix on cultured mouse vibrissal hair follicles. *Phytother Res.* 2003;17:797-800.
- 30) Thornton MJ. The biological actions of estrogens on skin. *Exper Dermatol.* 2002;11:487-502.
- 31) Conrad F, Paus R. Estrogens and the hair follicle. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2004;2:412-423.

高齢者顔面における常在真菌マラセチアのフローラ ——脂漏性角化症との関連について

筑波大学人間総合科学研究科 六町皮フ科クリニック

伴野 朋裕

Seborrheic keratoses (SK) are verrucous dark-brown nodules or elevated macules, which develop on the face and the body mainly in elderly patients. They are often multiple in seborrheic areas and show epidermal proliferation with hyperkeratosis. Lipophilic yeasts of the genus *Malassezia* are members of the normal human cutaneous microflora and are also associated with several skin diseases including atopic dermatitis and seborrheic dermatitis. We investigated the roles of genus *Malassezia* in SK by microflora analysis using nested PCR. *Malassezia obtusa* and *Malassezia slooffiae* were preferentially detected in SK group. Aging and a lack of face cleansing are important factors in the detection rate for both species. DNA microarray analysis in normal human keratinocytes incubated with *Malassezia slooffiae* for 24 hours revealed transcriptional changes toward epidermal proliferation, keratinization, and up-regulation of lipid metabolism, which provide beneficial environments for the growth of *Malassezia* spp.

1. 緒言

高齢化社会となり高齢者の美容に対する関心が高まっているなか、中年以降に顔面に多発する脂漏性角化症（老人性いぼ）は多くの人々を悩ませている。脂漏性角化症の発生には古くから紫外線の影響が言われているが、脂漏性角化症は非露光部にも多発することから紫外線以外の因子もその発生に関与していると思われる。脂漏性角化症は黒褐色のいぼ状外観のため老人様顔貌の象徴ともなっているが、脂漏性角化症を予防ないし治療したいと希望する高齢者は少なくない。したがって、脂漏性角化症の発生機序を明らかにすることは高齢化社会において無視できない課題である。

最近、マラセチア (*Malassezia*) 族がアトピー性皮膚炎や脂漏性皮膚炎の増悪因子であることが明らかとなってきた¹⁾。脂漏部位に好んで常在するマラセチア族が表皮ケラチノサイトに対して様々なサイトカインの分泌を誘導し皮膚炎を惹起する病態が推測されている^{2,3)}。本研究では、高齢者の顔面におけるマラセチア族のフローラをタイピング（菌相解析）するとともに、特に脂漏部位において老人性色素斑が隆起しやすく脂漏性角化症が多発することに着目し、老人の顔面にみられる脂漏性角化症とマラセチア族の関連を調べた。マラセチア族の菌相解析は培養法が主流であったが、マラセチア族は培養が困難でありフローラの解析にあたっては培地など発育条件の違いのために培養法

では検出率にかなりのばらつきがみられる。一方、最近、杉田らによって開発されたマラセチアの rRNA 遺伝子解析による菌種同定は発育条件によらず菌相解析が可能な有意義な方法であり¹⁾、本研究では主にこの方法を用いた。

次に、マラセチアによってヒトの表皮細胞がどのように遺伝子発現を変化させるのか調べる目的で、DNA マイクロアレイを用いてマラセチアと共培養したケラチノサイトの転写プロファイリングを行った。

2. 実験方法

2-1 対象と観察

顔面片側に径 5 mm 以上の脂漏性角化症が 6 個以上多発する 60 歳以上の男女のうち同意を得た方を対象とした。対照として 60 歳以上であるが顔面に脂漏性角化症が少ない方に協力いただいた。被験者には日光暴露の有無、入浴や洗顔の頻度と方法、石鹸使用の有無などについて問診するとともに、写真撮影とダーマスコープによる観察を行い、顔面以外の脂漏部位（頭皮、腋窩、臍周囲など）についても観察した。

2-2 マラセチアの菌相解析

被験者の顔面頬部生え際付近からオプサイト®（医療用滅菌シール）貼付により皮膚表層の常在真菌を採取して DNA を抽出した。現在まで知られている 11 種のマラセチアのうち動物のみに検出される *M. pachydermatitis* と *M. nana* を除く 9 種のマラセチアについて、rRNA 遺伝子の IGS (intergenic spacer) あるいは ITS (internal transcribed spacer) 領域に設計した各種マラセチアに特異的なプライマー（表 1）を用いて nested PCR を行った。菌株分離のためにはクロモアガーマラセチア / カンジダ生培地®（関東化学）による培養と PCR による菌種同定を併用した。



Malassezia microflora on the senile face associated with seborrheic keratoses

Tomohiro Banno

Tsukuba University Graduate School of Comprehensive Human Sciences, Rokucho Skin Clinic

2-3 培養ヒト正常ケラチノサイトにおける転写プロファイリング

ヒト正常ケラチノサイトを Keratinocyte growth medium (KGM) で第3パッセージまで培養し keratinocyte basal medium (KBM) に培地を交換した。マラセチアの菌相解析により脂漏性角化症と関連がありそうな特定のマラセチア族を同定し、ケラチノサイトと共培養したものを実験群としてDNAマイクロアレイを用いて解析した。本研究の中間報告で示したように培養ケラチノサイトは細胞密度依存性に遺伝子発現を大きく変化させる。このような培養にともなう遺伝子発現変化を除外するため実験群と同時進行でケラチノサイトを単独培養したものを対照群とした。マラセチア感染から24時間後にRNAを抽出し、mRNA選択、cDNA変換、cRNA合成を経て等量の標識RNAをAffymetrix社GeneChipにハイブリダイゼーションした。マラセチア感染の他は実験群と対照群ですべての条件を統一した。シグナルは標準化し、Data Mining Toolを用い

てデータを抽出、比較した。統計学的に有意な発現変化を示す遺伝子を選択し、分子機能により分類してプロファイリングした。

3. 結果

3-1 脂漏性角化症の観察

症例群17名(平均年齢76.6±8.5)、健常群17名(平均年齢70.1±7.4)について調査した。長期日光暴露を受けていた例では老人性色素斑が多発する傾向があった。このような症例ではしばしば老人性色素斑から脂漏性角化症への移行像を見ることがあり、脂漏性角化症は扁平隆起性のものが多い(図1a)。老人性色素斑は顔面のどこにでも生じるようであるが、脂漏性角化症は毛髪生え際付近の頬部、眉毛付近、鼻のわき、外耳道など脂漏部位優位に分布する傾向がある(図1b)。老人性色素斑と脂漏性角化症の区別が必ずしも容易でないものもあるが、拡大写真やダーモスコープで確認すると脂漏性角化症は顆粒状ないし乳頭

表1 nested PCRに用いた各種 *Malassezia* 特異的プライマー

Species and		Sequence (5' → 3')	Annealing temp. (°C)
1st PCR for six <i>Malassezia</i> species (a)	Forward	ATCCTTTGCAGACGACTTGA	55
	Reverse	TGCTTAACTTCGGAGATCGG	
1st PCR for three <i>Malassezia</i> species (b)	Forward	ACCTGCAGAAGGATCATTAGTGA	56
	Reverse	TCCTCCGCTTATTGATATG	
2nd PCR for each <i>Malassezia</i> species			
<i>M. dermatis</i>	Forward	CGCACCTTGCCTCCATGGT	58
	Reverse	AGCCTGGTTTCCCAGGCAGCGG	
<i>M. furfur</i>	Forward	TGTGTACCATAGGCACCCAC	58
	Reverse	CACGGTGATAAAGGGATGCA	
<i>M. globosa</i>	Forward	TCGAGTGCATACCACACTCGAG	57
	Reverse	TACGGTGCTTTCACGGTTCT	
<i>M. japonica</i>	Forward	CGTATGTGGATCTTATCCTAT	44
	Reverse	TGACTAGTGTCGTAGGCACGGTA	
<i>M. obtusa</i>	Forward	CATGGTCCATCTCCCACACA	60
	Reverse	AGAGAGTGCGTGGCGCATGGT	
<i>M. restricta</i>	Forward	CGACCTAGTCGACTACATCCTACT	55
	Reverse	TTCGGAGATACAAGCCTCCAT	
<i>M. slooffiae</i>	Forward	ACGCACGCTAACACAACGTG	60
	Reverse	TGTGCGATTCTGAAGCGCACA	
<i>M. sympodialis</i>	Forward	CGCACCTTGCCTCCATGGT	58
	Reverse	GGTACAATCCCCAGGCAGCAA	
<i>M. yamatoensis</i>	Forward	CGATCAAACCTTCTCTGTGTCCAG	59
	Reverse	TGTGTGGGAGGTAGAAGAGGCA	

(a) *M. furfur*, *M. globosa*, *M. japonica*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. yamatoensis*

(b) *M. dermatis*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*

腫状に隆起しており、表面に鱗屑が付着して角化性であることがわかる(図1c, d)。顔面以外について観察すると、非露光部である腹部の溝に脂漏性角化症が多発する例(図2a)や代表的な脂漏部位である頭皮に脂漏性角化症が多発する症例(図2b)があった。腋窩付近の側胸部に脂漏性角化症と癩風様の紅褐色斑が共存する場合もあり(図2c)、この紅褐色斑を擦過すると多量の鱗屑が得られ、KOH 検鏡で菌糸(後にマラセチアと同定)を確認できた(図2d)。図2a～cの症例はいずれも多汗ないしあぶら症と自覚しており、脂漏性角化症の発生と汗や脂質を好むマラセチア

族との関連を想起させる。図2eの症例は入浴の際にほとんど石鹸を用いないという方であるが、臍と臍周囲に脂漏性角化症が多発していた。特に臍の脂漏性角化症は油粕のような厚い鱗屑があかつき状に付着しており、ここからも多種のマラセチアが検出された。

3-2 マラセチア族の菌相解析

マラセチアのrRNA 遺伝子について nested PCR により菌種同定し(図3a)、クロモアガーマラセチア/カンジダ生培地[®]を用いた培養で各マラセチアを分離した(図3b)。

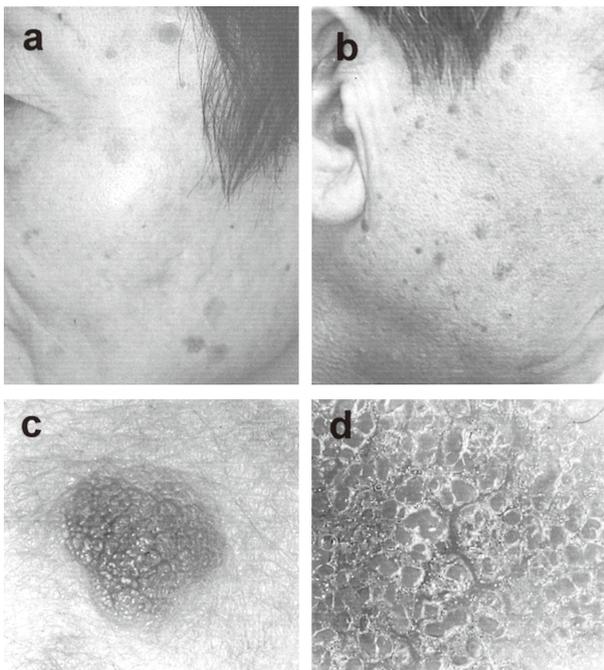


図1 顔面に生じた脂漏性角化症の観察

- a: 長期日光暴露者に生じた脂漏性角化症 b: 脂漏部位である生え際と外耳道に脂漏性角化症が多発する例 c: 脂漏性角化症の拡大像 d: ダーモスコープによる脂漏性角化症の観察

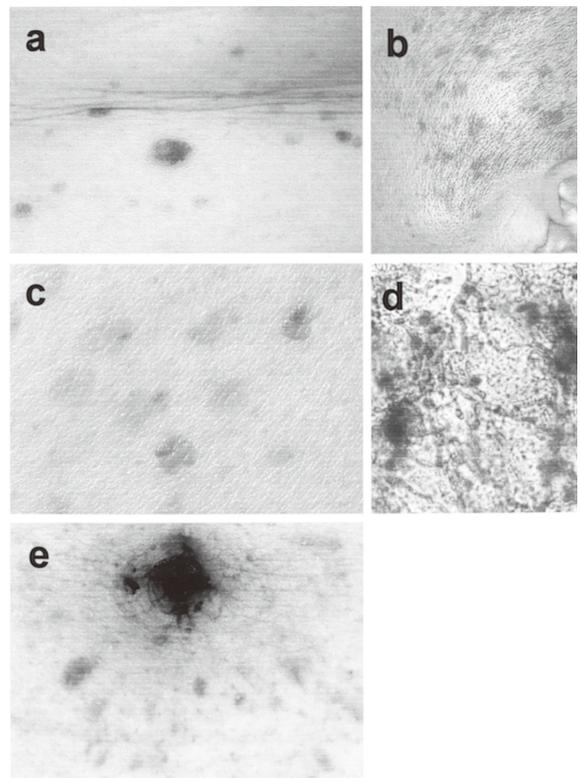


図2 顔面以外に生じた脂漏性角化症の観察

- a: 腹部の皺溝に多発する脂漏性角化症 b: 被髪頭部に多発する脂漏性角化症 c: 腋窩付近に多発する脂漏性角化症と癩風様紅褐色斑 d: KOH 検鏡で菌糸を確認 e: 臍と臍周囲に多発する脂漏性角化症(入浴の際にほとんど石鹸を用いない例)

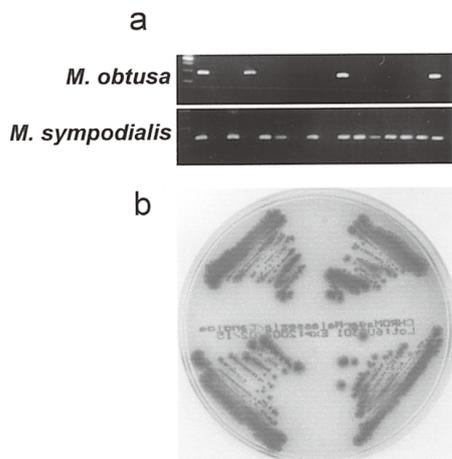


図3 マラセチアフローラの菌相解析

- a: PCR によるマラセチアの菌相解析 b: クロモアガーマラセチア/カンジダ生培地[®]を用いたマラセチアの分離培養

被験者のプロフィールと菌相解析の結果を表2に示す。顔面に脂漏性角化症が少ない健常群の高齢者でも複数のマラセチア族がフローラを形成していた。特に *M. globosa*, *M. sympodialis*, *M. dermatis* は両群を通じて検出率が高かった(表3)。一方、*M. obtusa* と *M. slooffiae* は症例群と健常群における検出率の差が顕著であった(*M. obtusa*, *M. slooffiae* とも症例群における検出率が65%で健常群の3.6倍)。年齢が高齢であるほど多種のマラセチアが検出される傾向があり、女性よりも男性に、外来患者より入院患者に多種のマラセチアが検出された。また、洗顔頻度の少ない者、石鹸を使用しない者にマラセチアが多く検出される傾向があった。

3-3 DNAマイクロアレイを用いた転写プロファイリング

M. slooffiae とヒト正常ケラチノサイトを24時間共培

養し、DNAマイクロアレイを用いて遺伝子発現をプロファイリングした。*M. slooffiae* 感染ケラチノサイトは細胞周期関連遺伝子やDNA合成に関わる遺伝子の発現を一斉に増加させた。一方、細胞周期抑制性分子の発現は低下した(表4)。どちらの変化もケラチノサイトを増殖性にするものと思われる。ケラチノサイトの分化関連遺伝子群は発現増強した(表5)。角化に関する代表的な分化マーカーである transglutaminase 1, involucrin, loricrin, filaggrin は2倍以上の増加であったが、small proline-rich protein, S100A protein, 分化関連蛋白分解酵素である各種 kallikrein は比較的軽度の上昇を示した。分化型ケラチンである keratin 1,10 の増加と、角化開始前の表皮基底層で主に発現する keratin 15 の減少もマラセチアと共培養したケラチノサイトが分化傾向を示すことを意味する。また、主に基底層のケラチノサイトが産生するコラー

表2 被験者のプロフィールとマラセチア菌相解析結果

No.	年齢	性	区分	洗顔	石鹸	SL	SK	G	Sy	D	R	Y	F	J	O	SI	備考
1	70	M	外来	毎日	不使用	多	多	●	●	●	●				●		
2	73	M	外来	稀	不使用	多	多	●		●					●		日光
3	65	M	外来	毎日	使用	多	多	●	●	●	●						SD
4	75	M	外来	毎日	不使用	多	多	●	●	●	●				●	●	
5	81	F	外来	毎日	不使用	多	多	●	●	●	●			●		●	
6	76	M	外来	毎日	使用	多	多	●	●			●		●			
7	72	M	外来	毎日	使用	多	多	●	●	●		●	●		●		
8	71	M	外来	稀	不使用	多	多	●	●	●	●					●	日光
9	84	M	外来	毎日	使用	多	多	●	●		●						
10	79	F	外来	毎日	不使用	多	多	●	●						●	●	
11	69	M	外来	毎日	不使用	少	多	●	●	●	●					●	
12	75	F	入院	2/週	不使用	少	多	●	●	●					●	●	
13	93	M	入院	2/週	不使用	多	多	●	●	●			●		●	●	
14	86	F	入院	2/週	不使用	多	多	●	●	●			●		●	●	
15	91	M	入院	2/週	不使用	多	多	●	●	●	●	●			●	●	
16	63	F	入院	2/週	不使用	多	多	●	●	●			●		●	●	
17	79	M	入院	2/週	不使用	多	多	●	●	●			●		●	●	
18	66	F	外来	毎日	使用	少	少	●									
19	65	M	外来	毎日	使用	少	少	●	●	●	●						SD
20	65	M	外来	毎日	使用	少	少	●		●							
21	62	M	外来	毎日	使用	少	少	●		●							
22	63	F	外来	毎日	使用	少	少	●		●							
23	73	F	外来	毎日	不使用	少	少	●	●	●		●	●	●			
24	74	F	外来	毎日	使用	多	少	●	●	●							日光
25	68	F	外来	毎日	使用	多	少	●		●	●						
26	66	F	外来	毎日	使用	少	少	●	●		●						
27	72	M	外来	毎日	不使用	少	少	●	●	●					●		
28	62	M	外来	毎日	使用	少	少	●	●		●						
29	64	F	外来	毎日	使用	少	少	●	●	●	●						
30	76	M	外来	毎日	不使用	少	少	●	●	●	●		●		●		SD
31	68	M	外来	毎日	使用	少	少	●	●		●	●					
32	83	M	入院	2/週	不使用	少	少	●	●	●		●			●	●	
33	77	F	入院	2/週	不使用	少	少	●	●	●				●		●	
34	87	F	入院	2/週	不使用	少	少	●	●	●						●	

SL : Senile Lentigo (老人性色素斑), SK : Seborrheic Keratosis (脂漏性角化症),

SD : Seborrheic dermatitis (脂漏性皮膚炎)

日光 : 長期日光暴露歴あり

G : *M. globosa*, Sy : *M. sympodialis*, D : *M. dermatis*, R : *M. restricta*, Y : *M. yamatoensis*, F : *M. furfur*, J : *M. Japonica*, O : *M. obtusa*, SI : *M. slooffiae*

● : 検出

表3 脂漏性角化症群と健常群における各種*Malassezia*族の検出率

Species	Detection (%)	
	SK	HS
<i>M. dermatis</i>	82	71
<i>M. furfur</i>	35	18
<i>M. globosa</i>	100	100
<i>M. japonica</i>	12	12
<i>M. obtusa</i>	65	18
<i>M. restricta</i>	47	41
<i>M. slooffiae</i>	65	18
<i>M. sympodialis</i>	94	71
<i>M. yamatoensis</i>	18	12

SK：脂漏性角化症群（症例群）

HS：健常群

表4 細胞周期関連分子の遺伝子発現変化

Symbol	Gene	Signal	S.L.R.	Change	Function
CCNA1	cyclin A1	136	0.8	Up	Cell cycle
CCNA2	cyclin A2	202	0.6	Up	Cell cycle
CCNB1	cyclin B1	1305	0.7	Up	Cell cycle
CCNB2	cyclin B2	697	0.6	Up	Cell cycle
CDC2	cell division cycle 2	788	0.5	Up	Cell cycle
CDC20	CDC20 541		0.5	Up	Cell cycle
CDC25B	cell division cycle 25B	412	0.7	Up	Cell cycle
CDC2L1	cell division cycle 2-like 1	461	0.5	Up	Cell cycle
CDKN3	cyclin-dependent kinase inhibitor 3	393	0.5	Up	Cell cycle
CENPA	centromere protein A	349	0.5	Up	Cell cycle
DEEPEST	mitotic spindle coiled-coil related protein	176	0.6	Up	Cell cycle
G0S2	putative lymphocyte G0/G1 switch gene	365	1.2	Up	Cell cycle
GTSE1	G-2 and S-phase expressed 1	62	0.5	Up	Cell cycle
KIAA0165	extra spindle poles	136	0.6	Up	Cell cycle
KIF13B	kinesin family member 13B	58	1	Up	Cell cycle
MAD2L1	MAD2 like 1	604	0.5	Up	Cell cycle
MPHOSPH6	M-phase phosphoprotein 6	1218	0.5	Up	Cell cycle
KATNB1	katanin p80 subunit B 1	663	0.5	Up	Cell cycle
PLK	polo (Drosophila)-like kinase	177	0.5	Up	Cell cycle
BUB1	BUB1	257	0.5	Up	Cell cycle
BUB1B	BUB1B	275	0.5	Up	Cell cycle
AMPD3	adenosine monophosphate deaminase 3	392	0.7	Up	DNA synthesis
DNASE1L3	deoxyribonuclease I-like 3	115	0.8	Up	DNA synthesis
RRM2	ribonucleotide reductase M2 polypeptide	911	0.6	Up	DNA synthesis
UP	uridine phosphorylase	226	0.8	Up	DNA synthesis
H1F0	H1 histone family, member 0	811	0.5	Up	Histone
H2AFL	H2A histone family, member L	138	0.7	Up	Histone
H2AFO	H2A histone family, member O	2580	0.6	Up	Histone
H2BFQ	H2B histone family, member Q	343	0.5	Up	Histone
CDKN2B	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B	253	-0.5	Dn	Cell cycle inhibitor
GAS1	growth arrest-specific 1	228	-0.5	Dn	Cell cycle inhibitor
GAS6	growth arrest-specific 6	796	-0.5	Dn	Cell cycle inhibitor
GADD45B	growth arrest and DNA-damage-inducible	317	-0.6	Dn	Cell cycle inhibitor
RAB27B	RAB27B, member RAS oncogene family	72	1.1	Up	Ras pathway
RAB9	RAB9, member RAS oncogene family	867	0.6	Up	Ras pathway
SSPN	sarcospan (Kras oncogene-associated)	80	0.7	Up	Ras pathway
NDRG1	N-myc downstream regulated	3093	0.7	Up	Myc pathway
NDRG2	N-myc downstream-regulated gene 2	233	0.9	Up	Myc pathway
NOTCH2	Notch (Drosophila) homolog 2	332	0.5	Up	Notch pathway
NOTCH3	Notch (Drosophila) homolog 3	319	0.7	Up	Notch pathway

S. L. R : Signal Log Ratio, Log (Log2) 比

表5 ケラチノサイト分化関連分子の遺伝子発現変化

Symbol	Gene	Signal	S.L.R.	Change	Function
TGM1	transglutaminase 1	214	1.2	Up	Cornification
IVL	involucrin	622	1.3	Up	Cornification
LOR	loricrin	153	2.2	Up	Cornification
FLG	filaggrin	497	2.9	Up	Cornification
KLK7	kallikrein 7	732	0.9	Up	Cornification
KLK8	kallikrein 8	664	0.6	Up	Cornification
KLK10	kallikrein 10	3174	1	Up	Cornification
KLK11	kallikrein 11	488	1	Up	Cornification
CDSN	corneodesmosin	355	2	Up	Cornification
ANXA9	annexin A9	56	1.9	Up	Cornification
ARS	ARS component B	161	1.7	Up	Cornification
SPRK	Small proline-rich protein SPRK	10986	0.5	Up	Cornification
S100A4	S100 calcium-binding protein A4	278	0.6	Up	Cornification
S100A7	S100 calcium-binding protein A7	564	4.6	Up	Cornification
S100A8	S100 calcium-binding protein A8	12728	0.7	Up	Cornification
S100A9	S100 calcium-binding protein A9	6634	1.8	Up	Cornification
SCEL	sciellin	186	0.7	Up	Cornification
KRT1	keratin 1	3338	1.2	Up	keratin
KRT10	keratin 10	4898	0.6	Up	keratin
KRT15	keratin 15	823	-0.5	Dn	keratin
COL4A1	collagen, type IV, alpha 1	862	-0.8	Dn	ECM
COL4A2	collagen, type IV, alpha 2	1517	-0.5	Dn	ECM
COL5A1	collagen, type V, alpha 1	305	-0.6	Dn	ECM
COL5A2	collagen, type V, alpha 2	418	-0.5	Dn	ECM
P4HA2	procollagen-proline	1925	-0.5	Dn	ECM
PLOD2	procollagen-lysine	391	-0.5	Dn	ECM
CSPG4	chondroitin sulfate proteoglycan 4	62	-0.5	Dn	ECM
EFEMP1	EFEMP1	819	-0.5	Dn	ECM
MATN2	matrilin 2	312	-0.7	Dn	ECM
SDC2	syndecan 2	52	-0.5	Dn	ECM
DSC1	desmocollin 1	2101	0.8	Up	Desmosomal
DSG1	desmoglein 1	2185	0.6	Up	Desmosomal
ALOX12B	arachidonate 12-lipoxygenase	170	1.7	Up	Prostaglandin pathway
ALOX15B	arachidonate 15-lipoxygenase	178	1.7	Up	Prostaglandin pathway
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	474	0.5	Up	Prostaglandin pathway
PLA2G4A	phospholipase A2, group IVA	520	0.5	Up	Prostaglandin pathway
UGCG	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	872	0.7	Up	Lipid metabolism
AKR1C1	aldo-keto reductase family 1C1	3144	0.6	Up	Lipid metabolism
AKR1C3	aldo-keto reductase family 1C3	758	1.3	Up	Lipid metabolism
HSD17B2	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2	105	2	Up	Lipid metabolism
SULT2B1	sulfotransferase family	361	1.1	Up	Lipid metabolism
GCH1	GTP cyclohydrolase 1	354	0.5	Up	Lipid metabolism
PPT2	palmitoyl-protein thioesterase 2	129	0.7	Up	Lipid metabolism

ゲンなどの細胞外マトリックスの遺伝子発現はいっせいに低下した。このこともケラチノサイトが basalt type から supurabasal type にシフトしていることを示唆する。脂質代謝に関する遺伝子群は発現増強した（表5）。特に角化にともなう細胞間脂質の産生に関連した分子の発現増加が特徴的である。各種ケモカインや炎症性サイトカインである interleukin1 や TNF α 、および interferon 関連遺伝子の発現は増加した（表6）。一方、ケラチノサイトの増殖抑制作用を有する TGF β の発現は低下した。

4. 考 察

脂漏性角化症が多発している高齢者からは *M. slooffiae* と *M. obtusa* が検出されることが多く、疾患との関連が示唆された。しかし、対照群にあっても入院患者の場合は

M. slooffiae ないし *M. obtusa* が検出される率が高く、その要因を検討していくうちにこのふたつの菌種については、年齢、洗顔の頻度、石鹸使用の有無が特に重要な因子であることも示唆された。つまり顔面に両菌種が検出されるのはほとんどが70歳以上であり、洗顔の頻度が低く、洗顔の際に石鹸を用いない場合が多い。すでに報告されているマラセチアの菌相解析では主に若年から中年を対象にしており、実験系が異なるので本研究結果と一概に比較できないが、高齢者の方がより多種類のマラセチアが検出される印象がある。本研究の被験者においても年齢が高いほど多量のマラセチアがフローラを形成する傾向があった。特に91歳の男性入院患者では、検索した全9種のマラセチアのうち8種が検出された。高齢になるにつれ顔面の脂腺の活動が活発になることも一因かもしれない。このように年齢は顔面におけるマラセチアのフローラにおいて重要な

表6 サイトカイン関連分子の遺伝子発現変化

Symbol	Gene	Signal	S.L.R.	Change	Function
CCL27	CTACK/ILC	79	1.6	Up	Secreted, Chemokine
CXCL1	GRO α oncogene	739	0.9	Up	Secreted, Chemokine
CXCL2	GRO β oncogene	90	1.1	Up	Secreted, Chemokine
CXCL10	IP-10	485	1.2	Up	Secreted, Chemokine
CXCL11	I-TAC	86	1.3	Up	Secreted, Chemokine
IL8	interleukin 8, CXCL8	287	1	Up	Secreted, Chemokine
IL1A	interleukin 1, alpha	2603	1.3	Up	Secreted
IL1B	interleukin 1, beta	1250	2.7	Up	Secreted
TNF	tumor necrosis factor	95	1.2	Up	Secreted
CSF2	colony stimulating factor 2	138	0.5	Up	Secreted
DEFB1	defensin beta 1	536	1.5	Up	Secreted
EFNA3	ephrin-A3	120	0.6	Up	Secreted
EREG	epiregulin	134	1.6	Up	Secreted
ST16	suppression of tumorigenicity 16	218	1.2	Up	Secreted
IL1R2	interleukin 1 receptor, type II	318	1.6	Up	Receptor
IL1RN	interleukin 1 receptor antagonist	2390	1.3	Up	Receptor
IFNGR1	interferon gamma receptor 1	1925	0.5	Up	Receptor
CTGF	connective tissue growth factor	770	-1.2	Dn	Secreted
NRG1	neuregulin 1	170	-0.6	Dn	Secreted
EGF	epidermal growth factor	65	-1.1	Dn	Secreted
IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3	245	-0.6	Dn	Secreted
IGFBP4	insulin-like growth factor-binding protein 4	206	-0.5	Dn	Secreted
TGFB2	transforming growth factor, beta 2	92	-0.6	Dn	Secreted
LGALS9	lectin, galactoside-binding, soluble 9	58	-0.6	Dn	Secreted
NESP55	neuroendocrine secretory protein 55	97	-0.8	Dn	Secreted
SPARC	secreted protein, acidic, cysteine-rich	776	-0.5	Dn	Secreted
IL7R	interleukin 7 receptor	123	-1	Dn	Receptor
OAS1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1	368	0.6	Up	Interferon regulated
OASL	2'-5' oligoadenylate synthetase-like	73	0.5	Up	Interferon regulated
IFI30	interferon, gamma-inducible protein 30	559	0.6	Up	Interferon-regulated
IFIT4	interferon-induced protein	233	0.9	Up	Interferon-regulated

S. L. R : Signal Log Ratio, Log (Log2) 比

因子と思われるが、高齢であるほど洗顔の頻度が減って石鹸を用いなくなる傾向があり、顔面がより脂漏性となりやすいだろう。このような年齢に伴う生活様式の変化も大きな要因と考えられる。今回調査対象にした入院施設は慢性疾患や認知症を有する高齢者をケアする施設であり、清潔維持のために入浴ではなく週に2回の清拭が行われていた。顔面の清拭には石鹸を使用しないとのことである。高齢者が顔面清潔保持に無頓着になる傾向は女性よりも男性に顕著であるが、認知症を有する場合は男女を問わず清潔保持は介護者に大きく依存するようになる。今回、入院患者から多種のマラセチアが検出されたのはそのような背景があるのかもしれない。本研究で脂漏性角化症との関連が疑われた *M. slooffiae* と *M. obtusa* についても高齢化にともなう脂腺の活動亢進や石鹸を用いた洗浄の欠如により増加してくるものと考えられる。これら2菌種はおそらく脂質要求性が他のマラセチア菌種より高いのであろう。本研究ではまだ十分に検討していないが、中年ないし若年者においても何らかの理由で長期間入浴ができない場合や、入浴しても石鹸を全く使用しない場合は、これら2菌種が通常より高頻度で検出されるようである。また、脂漏部位のうち石鹸洗浄する機会の少ない外耳道からはしばしば *M. slooffiae* が検出される。

本研究で採用した nested PCR を用いた菌相解析はあくまでも定性的なものであり、菌量を反映するものではない。そこで *M. slooffiae* と *M. obtusa* が検出された症例のうち2例についてクロモアガーマラセチア培地上のコロニーをそれぞれ任意に10個選択してPCR法にて菌種の同定したところ、約8割が *M. slooffiae* であり、計20個のコロニーのなかには *M. obtusa* はひとつもなかった。このことは *M. obtusa* より *M. slooffiae* が定量的に圧倒的に多いことを意味する。以上の結果から、DNAマイクロアレイによる解析には *M. slooffiae* を選択した。DNAマイクロアレイによる転写プロファイリングの結果は、*M. slooffiae* と共培養したケラチノサイトが増殖と分化の両方に向かうことを示唆している。正常の表皮においては基底層のケラチノサイトは増殖性であるが、有棘層から顆粒層へかけてケラチノサイトが増殖を停止し分化を開始するとともに遺伝子発現も大きく変化する^{4,5)}。したがって、増殖と分化は表皮内の各層に特異的な個別の現象であるが、乾癬に代表される炎症性角化症の表皮や今回調査対象にした脂漏性角化症では増殖と分化がともに亢進していることが知られている。ただし、今回得られた発現変化は *M. slooffiae* とケラチノサイトを共培養してから24時間後のものであり、実際に *M. slooffiae* に感染した表皮が長期的にどのような変化を示すのかは不明である。また、増殖関連や角化関連分子の発現変化は比較的軽度であった。しかし、軽微な変化であってもそれが長期にわたって持続した場合はケラ

チノサイトが角化を伴う腫瘍性増殖を示していくことがあるかもしれない。つまり洗浄不足により *M. slooffiae* がフローラの優位菌種となり、その状態が数ヶ月から数年にわたって持続すれば脂漏性角化症の発生に結びつく可能性がある。実際、長期間入浴しないことで生じるあかつき病では表皮が肥厚し脂漏性の厚い痂皮が付着するが、あかつき病の肥厚した角層からは *M. slooffiae* が検出される⁶⁾。ケモカインや炎症性サイトカインの発現誘導は比較的軽度であったが、このことはマラセチアが皮膚に恒常的にフローラを形成していく上で都合がよいただろう。あまりに強い炎症が起これば、棲家である組織が壊死してしまうか炎症によって微生物が短期間のうちに排除されてしまう可能性が高くなるからである。炎症性サイトカインである IL-1, TNF α , IFN γ は免疫応答の惹起のみならずケラチノサイトにおいて多様な遺伝子変化を生じさせる^{7,8)}。IL-1 は増殖性のサイトカインであり、ケラチノサイトの増殖にも関与するだろう。一方、TNF α は炎症惹起とともにケラチノサイトの置かれた状況に応じて分化ないし細胞死のための遺伝子発現を準備する^{8,9)}。 *M. slooffiae* に感染したケラチノサイトは細胞間脂質に関連する脂質代謝分子の発現を亢進させた。ケラチノサイトは角化に伴いオドラント小体由来の細胞間脂質を分泌して結果的に角層間に高密度の脂質を含ませる。したがって、脂質要求性の高いマラセチア族にとっては、脂質を豊富に含む角層は格好の棲家となろう。 *M. slooffiae* はケラチノサイトの遺伝子発現変化を介して表皮増殖、角化、脂質代謝のすべてを亢進させることで自らの成育環境を有利に導いているのかもしれない。

本研究では脂漏性角化症と *M. slooffiae* および *M. obtusa* の関連が示唆されたが、これら2菌種の出現には年齢、性別、洗顔頻度と方法、入院外来の区分など多数の因子が関係しており、マラセチアが存在が必ずしも脂漏性角化症の発生に直接結びつくものではないのかもしれない。脂漏性角化症のように脂漏性の厚い角質を有する状態では *M. slooffiae* および *M. obtusa* が生育しやすいということもあるだろう。つまり二次的に両菌が脂漏性角化症に生着した可能性もある。微生物が病原菌であることを証明するには「コッホの原則」を満たさなければならない。もっと症例数を増やして多変量解析を行うとともに、人工表皮や実験動物などへの接種実験も行って菌と脂漏性角化症の因果関係を確かめる必要がある。また、菌種の同定だけでなくリアルタイム PCR などによる定量的解析も必要である。最近、杉田らはアトピー性皮膚炎におけるマラセチア菌相の詳細な遺伝子解析を行い、同一菌種でも遺伝子形の違いにより病原性を示す場合があるという機序を提唱している¹⁰⁾。本研究においても同様の遺伝子形に関する解析が必要かもしれない。今回は主に露光部である顔面についてマラセチア族の菌相解析を行ったが、紫外線の影響を除外する

ためには非露光部における解析も必要と思われる。腋窩などの非露光部に脂漏性角化症が多発する症例をしばしば経験するのでそのような症例にも同様の解析を行っていきたい。

謝 辞

PCR法によるマラセチア菌相解析について技術的な指導をしていただいた明治薬科大学微生物学教室の杉田隆博士に深謝いたします。共同研究者である筑波大学人間総合科学研究科の佐藤寛子氏と本研究に対して終始ご支援いただいたコスメトロジー研究振興財団に感謝いたします。

(参考文献)

- 1) Sugita T, Suto H, Unno T, et al. Molecular analysis of *Malassezia* microflora on the skin of atopic dermatitis patients and healthy subjects. *J Clin Microbiol.* 39 (10) : 3486-90, 2001
- 2) Watanabe S, Kano R, Sato H, et al. The effects of *Malassezia* yeasts on cytokine production by human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 116 (5) : 769-73, 2001
- 3) Ishibashi Y, Sugita T, Nishikawa A. Cytokine secretion profile of human keratinocytes exposed to *Malassezia* yeasts. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 48 (3) : 400-9, 2006
- 4) Radoja N, Gazel A, Banno T, et al. Transcriptional profiling of epidermal differentiation. *Physiol Genomics.* 27 (1) : 65-78, 2006
- 5) Gazel A, Banno T, Walsh R, et al. Inhibition of JNK promotes differentiation of epidermal keratinocytes. *J Biol Chem.* 281 (29) : 20530-41, 2006
- 6) Tajima M, Amaya M, Sugita T, et al. Molecular analysis of *Malassezia* species isolated from three cases of Akatsuki disease (pomade crust). *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 46 (3) : 193-6, 2005
- 7) Banno T, Adachi M, Mukkamala L, et al. Unique keratinocyte-specific effects of interferon-gamma that protect skin from viruses, identified using transcriptional profiling. *Antivir Ther.* 8 : 541-54, 2003
- 8) Banno T, Gazel A, Blumenberg M. Effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling. *J Biol Chem.* 279 (31) : 32633-42, 2004
- 9) Banno T, Gazel A, Blumenberg M. Pathway-specific profiling identifies the NF-kappa B-dependent tumor necrosis factor alpha-regulated genes in epidermal keratinocytes. *J Biol Chem.* 280 (19) : 18973-80, 2005
- 10) Sugita T, Tajima M, Amaya M, et al. Genotype analysis of *Malassezia restricta* as the major cutaneous flora in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *Microbiol Immunol.* 48 (10) : 755-9, 2004

皮膚における弾性繊維形成とトロポエラスチンの細胞機能解析

星薬科大学薬学部臨床化学教室

輪千 浩史

Elastin (ELN) is an insoluble extracellular matrix protein and the core protein of the elastic fibers that provide elasticity to elastic tissues such as arterial, lungs, skin and ligaments. It is secreted from cells as a soluble protein of approximately 70-kDa referred to the extracellular space as tropoelastin.

The purpose of this study was to investigate the elastic fiber assembly in human skin fibroblast cells on two- or three-dimensional culture. We demonstrated elastic fiber assembly on the neonatal normal human dermal fibroblast cells (NHDF-Neo) or the adult normal human dermal fibroblast cells (NHDF-Ad) Immunofluorescence staining showed that NHDF-Ad is difficult to make elastic fiber in contrast to NHDF-Neo in two-dimensional culture resulting from the activity of tropoelastin degradation is high. Furthermore, the formation of cross-linking amino acid in NHDF-neo significantly increased by the addition of recombinant human tropoelastin (HTE). On the other hand, it was not able to observe the elastic fiber assembly on NHDF-Neo in three-dimensional culture. In addition, it revealed the gel greater contraction in the presence of HTE.

Taken together, these observations contributed to the clarification of mechanisms of elastic fiber assembly on the dermal fibroblast cells in two- or three-dimensional culture.

1. 緒言

皮膚は表皮・真皮・皮下組織から構成されている。真皮は、厚い層で毛細血管、皮脂腺、汗腺など大切な付属器官があるが、組織の大部分は膠原繊維（コラーゲン）や弾性繊維、その他の細胞外マトリックスで構成されている。膠原繊維や弾性繊維は真皮の中に分散している繊維芽細胞から作られ、肌の張りや弾力のもとであるばかりでなく、皮膚の運動にも大きく関わっている。特に、エラスチンは皮膚、血管、肺などの組織や臓器に存在し、弾性力の源として重要な機能を果たしている。皮膚は身体の表面を被っており、常に外的刺激にさらされている。したがって、老化に伴い皮膚にたるみやしわが増加する。このような加齢による皮膚の変化が見られる時は弾性繊維の変化が著しいと考えられている。

エラスチンは、前駆体である可溶性トロポエラスチンとして細胞外に分泌された後、トロポエラスチン分子の自己集合、フィブリリン-1やフィブリリン-5と呼ばれる糖タンパク質との分子間相互作用、銅を補酵素とする Lysyl oxidase による分子内または分子間架橋形成の過程を経て不溶性のエラスチン繊維になると考えられている。トロポエラスチン遺伝子発現については様々な研究が報告されているが、エラスチン繊維形成における加齢の影響について

は、ほとんど報告されていない。近年、網膜上皮色素細胞 (Pigmented Epithelial cells: PE 細胞) がエラスチンを産生せずマイクロフィブリルやリジロキシダーゼを産生している細胞にエラスチン遺伝子を導入の導入や組換えトロポエラスチンの添加により、エラスチン線維を免疫蛍光染色で確認すると共に、エラスチン線維固有の架橋アミノ酸であるデスモシンの形成もアミノ酸分析により明らかとなった¹⁻³⁾。そこで、本研究では、組換えトロポエラスチンを皮膚繊維芽細胞に処理し、2次元培養におけるエラスチン繊維形成に対する加齢の影響と3次元培養におけるトロポエラスチンの役割について検討した。

2. 実験

2・1 抗体と試薬

抗体に関しては anti fibrillin-1 polyclonal antibody, anti His-G monoclonal antibody は Invitrogen (Carlsbad, USA) から, anti tropoelastin monoclonal antibody (MAB2503) は Chemicon International, Inc. (Temecula, USA) から, Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG は Molecular Probes (Eugene, USA) から HRP conjugated anti mouse IgG antibody は Amersham (Buckinghamshire, UK) から購入した。試薬に関しては、コラーゲン培養キットは新田ゼラチンより、Human TGF- β 1 は和光純薬より、Protease inhibitor cocktail tablets は Roche Diagnostics K. K. (Japan) より購入した。

2・2 細胞培養

正常ヒト新生児皮膚細胞 (NHDF-Neo) および正常ヒト成人皮膚細胞 (NHDF-Ad) はタカラバイオより購入した。2次元培養は、NHDF-Neo および NHDF-Ad を FBS



Analysis of elastic fiber formation and the cell functions of tropoelastin on the skin.

Hiroshi Wachi

Department of Clinical Chemistry, Hoshi University School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.

(Biowest)、L-glutamine、Penicillin-Streptomycin、MEM Non-Essential Amino Acids、Sodium pyruvate (Gibco) を含む 10% FBS-DMEM 培地で培養した。3 次元培養は、NHDF-Neo をコラーゲンゲルに包埋し、10% dialyzed-FBS DMEM で培養した。また、N 末端に 6×His が付加した大腸菌組換えヒトトロポエラスチン (HTE) は前報にしたがって作製したものをを用いた¹⁾。

2・3 蛍光免疫染色

4% Paraformaldehyde で固定した後、Block Ace (Roche) でブロッキングした細胞に、エラスチンに対する MAB2503 抗体 (モノクローナル抗体)、または抗エラスチン抗体 (ポリクローナル抗体)、V5-tag に対する V5 抗体 (モノクローナル抗体)、および Fibrillin-1 に対する抗 Fibrillin-1 抗体 (ポリクローナル) で処理し、Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit IgG と Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG で処理し、蛍光位相差顕微鏡にて観察した。

2・4 RNA 抽出と reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

全 RNA は AGPC 法で抽出した⁴⁾。RT-PCR は、1 μ g/10 μ l の全 RNA に 10 mM dNTP、Oligo dT をそれぞれ 1 μ l ずつ加えたものを 65°C で 5 分間 熱変性後、氷上で 5 分間冷却した。その後、これに 5×1st Strand buffer 4 μ l、100 mM DTT 2 μ l、RNase Inhibitor 1 μ l を加えた。2 分間 37°C でプレインキュベートし、Reverse Transcriptase (M-MLV) を 1 μ l 加えて cDNA を合成し、各遺伝子に特異的なプライマーを用いて遺伝子を増幅した。

2・5 ウェスタンブロッティング

培養上清を 30% 硫酸アンモニウムで塩析した後、Laemmli sample buffer (1% SDS、5% glycerol、0.01% BPB、0.1 M DTT 含有 0.01M Tris-HCl pH7.4) を加えて溶解したものをサンプルとした。サンプルを 7.5% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。ニトロセルロース膜に転写した後、5% スキムミルク含有の T-TBS (50mM Tris-HCl、pH 8.0、0.9% NaCl、0.05% Tween 20) で処理した。次に、抗 His-G 抗体で処理し、ECLTM キット (Amersham, Buckinghamshire, UK) で検出した。

2・6 架橋アミノ酸定量

培養細胞を剥離した後、6N 塩酸で 110°C、18 時間加水分解した。加水分解物を乾燥後、精製水に溶解し架橋アミノ酸測定試料とした。この資料中の架橋アミノ酸量は、テキサス大学 Starcher 博士に依頼し、前方に従ってラジオイムノアッセイ⁵⁾によって測定した。

2・7 エラスチカ・ワンギーソン染色

3 次元培養したゲルをマイルドホルムで固定後、パラフィン置換し切片を作製した。

脱パラフィン後、ヘマトキシリン液と塩化鉄液、ヨウ化カリウム液、滅菌精製水を 20:3:8:5 で混合した溶液を切片に添加した。滅菌精製水で洗い塩化鉄液と滅菌精製水を 3:37 の割合で混合した溶液を切片に添加し分別し、ワンギーソン液を添加後、脱水し乾燥して封入した。

3. 結果

3・1 NHDF-Neo および NHDF-Ad の 2 次元培養におけるエラスチン繊維形成

NEDF-Neo および NHDF-Ad の HTE の未添加、添加によるエラスチン繊維形成を、抗 Elastin 抗体と抗 Fibrillin-1 抗体を用いて蛍光免疫染色で確認した。HTE 未添加の場合、NHDF-Neo ではエラスチン繊維を確認することができたが、NHDF-Ad ではエラスチン繊維をほとんど確認することができなかった。しかし、NHDF-Ad に HTE を添加することでエラスチン繊維の確認できた (図 1)。また、NHDF-Neo において HTE を添加することで、

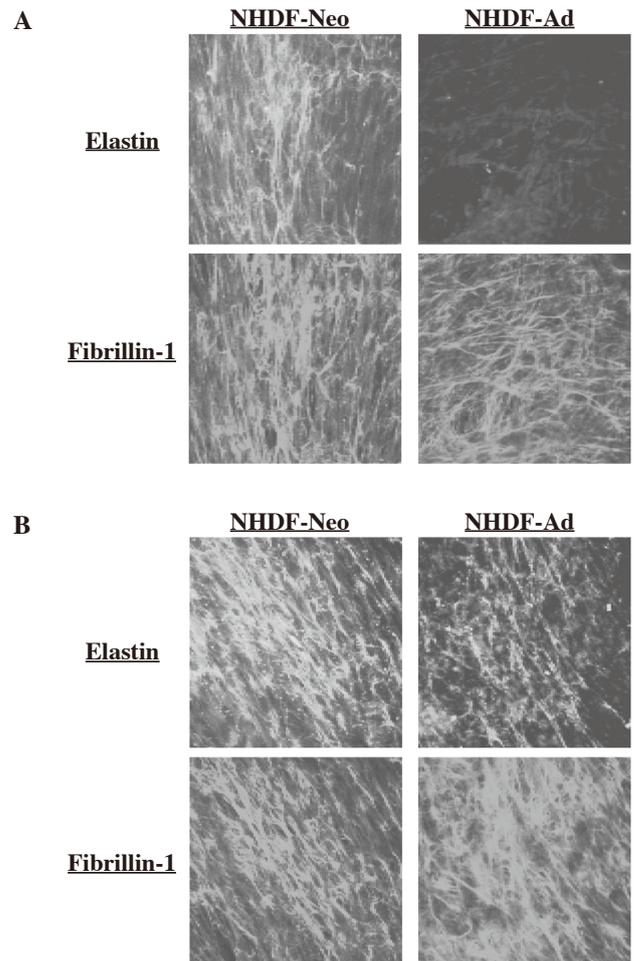


図1 NHDF-NeoとNHDF-AdにおけるHTE未添加(A)、添加(B)によるエラスチンおよびフィブリリン1の蛍光免疫染色

内因性と外因性のエラスチン繊維が確認でき、エラスチン繊維の指標である架橋アミノ酸の有意な増加も認められた。尚、エラスチンの足場タンパク質の一つであるフィブリリン-1繊維に大きな変化は認められなかった。(図2)。

3・2 NHDF-Neo および NHDF-Ad の 2 次元培養におけるエラスチン繊維形成関連タンパク質の遺伝子発現

加齢によるエラスチン繊維形成能が低下する原因を検討するため、NHDF-Neo および NHDF-Ad の 2 次元培養におけるエラスチン関連タンパク質の遺伝子発現を RT-PCR 法にて確認した。エラスチン繊維の足場タンパク質として重要なフィブリリン-1 やフィブリリン-5、架橋形成に重要なリジロキシダーゼと各遺伝子発現に大きな変化は見られなかった (図3)。

3・3 NHDF-Neo および NHDF-Ad の 2 次元培養における添加 HTE の分解活性

次に、NHDF-Neo および NHDF-Ad の 2 次元培養添加

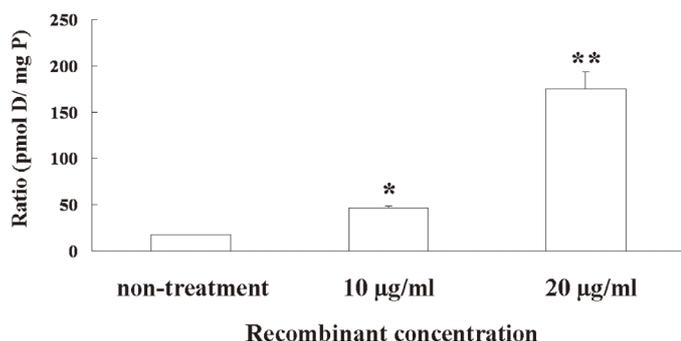


図2 NHDF-NeoのHTE添加における架橋アミノ酸、Mean±S.E. (n=3)、* P<0.05、** P<0.01 (vs. non-treatment, Student's t-test)

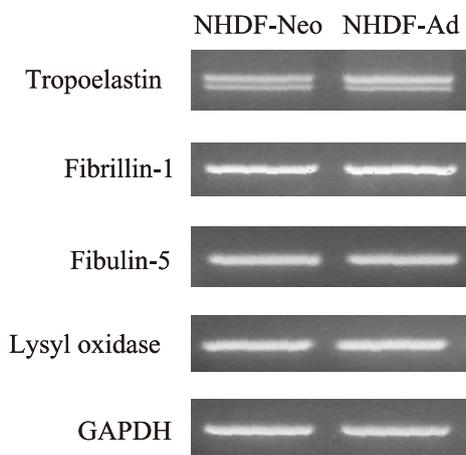


図3 NHDF-Neo と NHDF-Ad におけるエラスチン関連遺伝子発現

した HTE が、培養上背中でどの程度分解されるかを検討するため、HTE 添加後、経時的に培養上清を回収し、添加した HTE のみを検出するため、抗 His-G 抗体を用いてウェスタンブロット法にて解析した。NHDF-Neo では培養時間による分解はみられませんでした、NHDF-Ad では HTE 添加後 48 時間で☆トロポエラスチンの顕著な低下が認められた。そして、この低下はプロテアーゼ阻害剤の存在下で認められなかった (図4)。

3・4 NHDF-Neo の 3 次元培養におけるエラスチン繊維形成

3 次元培養における皮膚繊維芽細胞のエラスチン繊維形成について、2 次元培養でエラスチン繊維形成できる NHDF-Neo を用いて検討した。2 次元培養と同様に 3 次元培養の NHDF-Neo に HTE を添加後、切片をエラスチカ・ワンギーソン染色した。その結果、HTE (20µg/ml) および TGF-β (10ng/ml) の添加に関わらず、エラスチン繊維は確認できなかった (図5)。

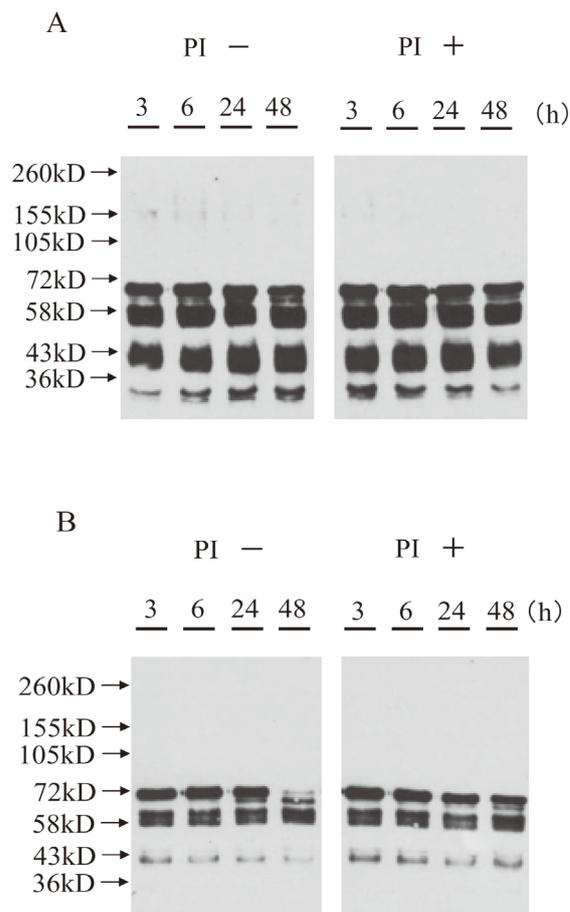


図4 NHDF-Neo (A) と NHDF-Ad (B) におけるトロポエラスチンの分解
PI: プロテアーゼインヒビター

3・5 NHDF-Neo の3次元培養におけるエラスチン関連タンパク質の遺伝子発現

3次元培養でのエラスチン繊維形成が確認できない原因を検討するため、2次元培養と3次元培養におけるエラスチン関連タンパク質の mRNA 発現について比較した。その結果、3次元培養は、2次元培養と比較して各 mRNA 発現の低下が認められた (図6)。

3・6 NHDF-Neo の3次元培養におけるトロポエラスチンの細胞活性作用

さらに、3次元培養の NHDF-Neo に対するトロポエラスチンの役割を検討するため、コラーゲンゲル収縮を指標とした細胞活性を測定した。コラーゲンゲルの中に HTE が存在することでゲルの収縮が増強することが認められた (図7)。

4. 考察

弾性繊維は、皮膚や肺、動脈、靭帯などの軟部組織において、弾性の保持に大きく寄与しており、この組織の破綻は、様々な障害や病変を引き起こすことが知られている。弾性繊維は、複数の成分が集合、結合している“機能複合体”であり、その“コア”となる成分のエラスチンとエラスチンとのネットワークを形成する微細繊維 (マイクロフィブリル繊維; フィブリリンや microfibril-associated glycoprotein、フィブリンなどから成る) から構成されている。近年、エラスチンノックアウトマウスにおいて大動脈では内皮傷害が引き起こされることなく内膜肥厚が起これ、生まれて間もなく死亡することが報告された⁶⁾。このことより、エラスチンが生命の維持にとって必須のタンパク質であることが証明された。また先天性のエラスチン遺

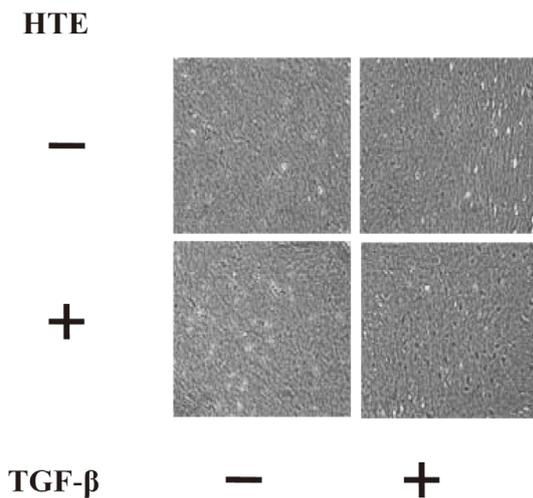


図5 3次元培養のエラスチン・ワンギーソン染色

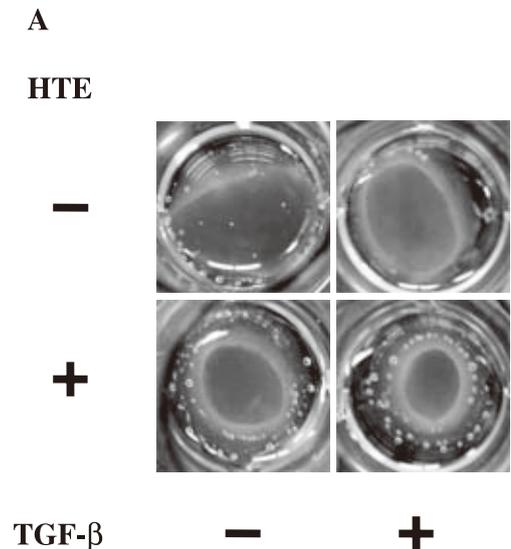


図7 コラーゲンゲル収縮における HTE の影響。

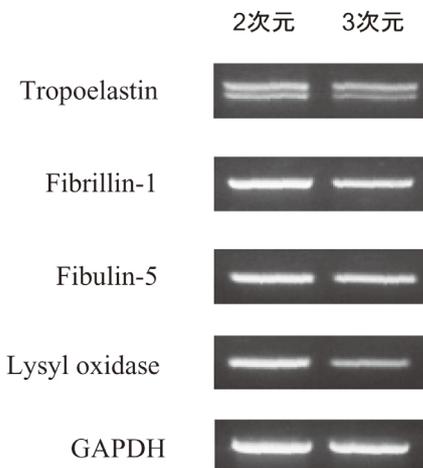


図6 NHDF-Neo の2次元培養と3次元培養におけるエラスチン関連遺伝子発現

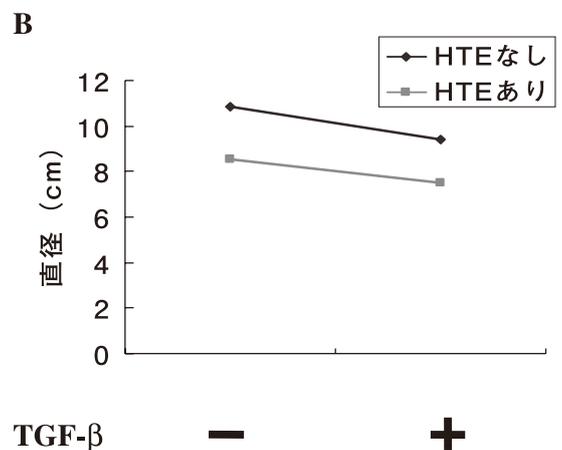


図7 コラーゲンゲル収縮における HTE の影響。
A: 写真観察 B: 収縮したゲルの直径

伝子異常疾患として大動脈弁上狭窄症 (SVAS)⁷⁾ や皮膚弛緩症 (Cutis laxa)⁸⁾ が知られており、SVASではエラスチン繊維の断片化を伴う動脈平滑筋細胞の異常増殖により冠動脈の狭窄が起こり、さらにCutis laxaでもエラスチン繊維の断片化が原因となり皮膚の過伸展が引き起こされることが報告されている。これらの報告からエラスチン繊維形成不全が血管や皮膚における疾患の重要な病因を担っていると思われる。

筆者らは、2次元培養において、内因性のトロポエラスチンを発現していないヒト網膜色素上皮由来細胞に、外因性のトロポエラスチンを添加しエラスチン繊維を再構築する新たなエラスチン繊維構築モデルを確立した。本研究においても、HTEをNHDF-NeoおよびNHDF-Adに添加することで、成熟エラスチンの指標である架橋アミノ酸の増加からもエラスチン繊維の再構築が確認できた。しかしながら、NHDF-Adにおけるエラスチン繊維構築量は著しく、この要因として、加齢に伴いトロポエラスチン分解酵素の関与が示唆された。皮膚繊維芽細胞をコラーゲンゲル内培養したものは真皮モデルとして用いられているが、そこにエラスチン繊維は存在していないため、より生体に近い状態でのエラスチンに関する検討が困難となっている。そこで、2次元培養でエラスチン繊維形成することができたNHDF-neoを用いて3次元培養でのエラスチン繊維形成を検討した。しかしながら、HTEの添加および未添加に関わらず、エラスチン繊維を確認することが出来なかった。この要因として、3次元培養ではElastin関連タンパク質のmRNA発現の低下によりタンパク質量が減少し、足場タンパク質の成熟が不十分であった可能性が示唆された。一方、NHDF-neoの細胞活性に対するHTEの影響を、3次元培養ゲル収縮を指標として検討した結果、ゲル内にHTEを加えることによりゲル収縮は増強された。このことから、HTEは細胞活性作用を有し、コラーゲンゲル内に存在することで、より生体に近い状態となる可能性が示唆された。

以上のことから、足場タンパク質の改良とHTEの分解を抑制することで、ヒト皮膚へのHTEの処理が、機能的なエラスチン繊維の再構築を導く可能性が示唆された。本研究は、加齢に伴う皮膚のエラスチン繊維形成の解明だけ

でなく、HTEの生体応用とより生体に近いエラスチン繊維を含む3次元皮膚モデルの確立に大きく寄与するものと考えられる。

(引用文献)

- 1) Wachi, H., Sato, F., Murata, H., Nakazawa, J., Starcher, B. C. and Seyama, Y. (2005) Development of a new in vitro model of elastic fiber assembly in human pigmented epithelial cells, *Clin Biochem*, **38**, 643-653.
- 2) Kozel, B. A., Wachi, H., Davis, E. C. and Mecham, R. P. (2003) Domains in tropoelastin that mediate elastin deposition in vitro and in vivo, *J Biol Chem*, **278**, 18491-18498.
- 3) Robb, B. W., Wachi, H., Schaub, T., Mecham, R. P. and Davis, E. C. (1999) Characterization of an in vitro model of elastic fiber assembly, *Mol Biol Cell*, **10**, 3595-3605.
- 4) Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal Biochem*, **162**, 156-159.
- 5) Starcher, B. C. and Mecham, R. P. (1981) Desmosine radioimmunoassay as a means of studying elastogenesis in cell culture, *Connect Tissue Res*, **8**, 255-258.
- 6) Li, D. Y., Brooke, B., Davis, E. C., Mecham, R. P., Sorensen, L. K., Boak, B. B., Eichwald, E. and Keating, M. T. (1998) Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis, *Nature*, **393**, 276-280.
- 7) Urban, Z., Zhang, J., Davis, E. C., Maeda, G. K., Kumar, A., Stalker, H., Belmont, J. W., Boyd, C. D. and Wallace, M. R. (2001) Supravalvular aortic stenosis: genetic and molecular dissection of a complex mutation in the elastin gene, *Hum Genet*, **109**, 512-520.
- 8) de Schepper, S., Loeys, B., de Paepe, A., Lambert, J. and Naeyaert, J. M. (2003) Cutis laxa of the autosomal recessive type in a consanguineous family, *Eur J Dermatol*, **13**, 529-533.

表皮細胞の増殖・分化・細胞死に影響を与える遺伝子群の機能解析システムの構築

大阪大学医学系研究科社会環境医学

竹田 潤二

Somatic cells from patients with Bloom (Blm) syndrome show an increased rate of homologous recombination and therefore, results in generation of bi-allelic mutation from mono-allelic mutation. We have used a tetracycline-regulated Blm allele (Blm^{tet}) to introduce bi-allelic mutations in ES cells (5). Phenotype-based genetics is now achievable and raises new possibilities for identifying novel gene functions.

Although we would like to apply this system in mice or their somatic cells, addition of doxycycline (dox), an analogue of tetracycline, to Blm^{tet} mice did not result in sufficient reduction of Blm expression because of leaky Blm expression in vivo. This leaky expression has been markedly reduced in vitro by using a tetracycline-controlled trans-silencer. A new tetracycline cassette containing the trans-silencer gene was constructed and inserted into the Blm gene to generate a new Blm allele ($Blm^{tet-new}$) in ES cells. We tested the dox-dependent regulation of Blm expression and possible introduction of bi-allelic mutations in mice or their somatic cells derived from the ES cell line bearing $Blm^{tet-new}$ and found that sister chromatid exchange (SCE), a hallmark of Bloom gene deficiency, was markedly increased in lymphocytes derived from mice bearing $Blm^{tet-new}$ alleles, suggesting that efficient bi-allelic mutations have been introduced in mice.

We reported that Sleeping Beauty transposon (SB) jumps efficiently in mouse genome (1) and SB-mediated mutagenesis is possible (3). Moreover, we have been recently reported potential of SB for comprehensive mutagenesis (6). Since the SB transposon system has a unique feature that can introduce various mutations in somatic tissues, this allows us to search for many novel gene functions in a single mouse.

Combination of the two systems described above opens a new research field for “somatic cell genetic biology”. In this system, SB-mediated transpositions cause many mono-allelic gene disruptions in somatic cells followed by the introduction of bi-allelic mutations from them.

1. 緒言

表皮は直接外界に接している組織であり、外界からの刺激から生体を防御している²⁾。表皮細胞一つ一つを解析できれば皮膚疾患の病態解明に多大な効果を及ぼすことが期待される。

そのために我々は、二つの手法を組合わせて個体の表皮細胞などの体細胞での遺伝子機能を効率良く解析するための手法を開発しようとしている。

一つ目はランダムに変異を効率良く導入する手法であり、二つ目は、導入された変異をもう片方のアレルにも導入し(両アレル変異導入)、遺伝子機能解析に供するというものである。

ランダム変異導入は、我々が世界に先駆けてマウス個体で効率良く動き回ることを報告したSBトランスポゾンシステムを用いる¹⁾。トランスポゾンシステムは生殖細胞だけでなく、体細胞でも効率良く動き回ることが知られている。

一方、両アレル変異に関しては、ブルーム遺伝子を利用する。

ブルーム遺伝子が欠損したブルーム症候群と呼ばれる患者では高頻度に癌が発症する。患者由来の細胞を観察すると、高頻度に相同組み換えが起こり片アレル変異から両アレル変異に移行しやすく、このことが癌発症に密接に関連していると考えられる。

遺伝子の機能を個体で解析するときには、遺伝子が欠損しているアレルをホモにする必要がある。通常それは、ヘテロマウス同士を交配することにより達成される。我々は、ブルーム遺伝子を欠損させることにより交配をしなくても遺伝子の機能を解析できる手法を開発しようとしている。ES細胞を利用してその原理が正しいことを証明できた⁵⁾。上記で述べた二つの手法を組み合わせ、マウス個体の体細胞で遺伝子の機能を効率良く解析しようとするものである。

2. 実験

2-1 マウストランスポゾンが表皮細胞でも効率良く動き回るかどうかの検討

我々はこれまでに生殖細胞系列でSBトランスポゾンが効率良く動き回り、内在性遺伝子を破壊できることを報告してきた。そこで体細胞である表皮細胞でも効率良く遺伝子移動を可能にするためにKeratin-5トランスポゼーストランスジェニックマウスを作製した。このマウスとトランスポゾン保有マウスを交配したダブルトランスジェニックマウスを作製し、表皮細胞でその移動効率を測定した。



Generation of a novel system for functional analysis of genes involved in growth, differentiation, and cell death in epidermal cells

Junji Takeda

Department of Social and Environmental Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine

2005年、アメリカの二つのグループがSBトランスポゾンで体細胞で移動させ癌遺伝子の同定に成功したことがNature誌に報告された。その際、体細胞（表皮だけでなく体細胞全体）での移動効率を高めるために、トランスポーゼース遺伝子をRosa-26遺伝子座にノックインしたマウスが作製されていた。我々も同様のマウスを独自に作製したのでそのマウスを用いて表皮細胞で移動効率が高まっているかテストした。

2-2 ブルーム遺伝子欠損による表皮細胞における両アレル変異導入効率の検討

我々は、これまでES細胞においてブルーム遺伝子を条件付き（テトラサイクリン類似体を添加した時だけで遺伝子がオフになるいわゆるtetシステム）で破壊することにより両アレル変異導入が可能であることを示してきた。そこでそのES細胞からマウスを樹立し、体細胞を取り出しES細胞と同様両アレル変異導入が可能か検討した。

3. 結果および考察

3-1 マウストランスポゾンの表皮細胞での移動効率

実際の移動効率は、遺伝子の挿入で検討しなければならないが、マウストランスポゾンはランダムに移動するので挿入効率を測定するのは困難である。そこで挿入する前のトランスポゾン切断効率で移動効率を類推した。他の実験でトランスポゾンが切断されたもののうち、半分は実際に遺伝子挿入が起きていることが証明されている。Keratin-5トランスポーゼーストランスジェニックマウスとトランスポゾン保有マウスを交配したダブルトランスジェニックの表皮細胞での移動は10～100個の細胞に一個ぐらゐの頻度で起こっていることが想像された。この頻度は、表皮での遺伝子機能解析が可能であることが考えられる。

3-2 表皮細胞における両アレル変異導入効率

表皮細胞を培養することが簡単ではないためモデル系として初期線維芽細胞での両アレル変異導入効率を検討した。ブルーム遺伝子欠損は、両アレル変異導入だけではなくて姉妹染色体間の組み換え頻度も同時に上昇するので我々は実際には初期線維芽細胞での姉妹染色体間の組み換え頻度で両アレル変異導入効率を検討した。しかし、ES細胞でみられた組み換え頻度の上昇は見られなかった。その原因がブルーム遺伝子のLeakyな発現によるものだと考えられたので、それを押さえるためにtetシステムのサプレッサーを新たにシステムに加えてテストしたところ姉妹染色体間の組み換え頻度の上昇がみられた。

そこで、サプレッサーを組み込んだコンストラクトを新たに作製し、ES細胞にノックインし、それ由来のマウス

を作製し、その後ホモマウスを作製した。そのホモマウスからリンパ球を取り出し、組み換え頻度が上昇しているかどうかを姉妹染色体間の組み換えで測定したところ、顕著に頻度が上昇していることが観察された⁷⁾。

4. 結語および今後の展開

二つのシステムを融合して表皮細胞で遺伝子の機能を解析するものであるが、それぞれのシステムは完成に近づきつつあると考えられる^{4) 8)}。それらが融合できた時にこれまでにない新しいシステムが誕生し、今後新規遺伝子群が多数同定されることが期待される。

(参考文献)

- 1) Horie, K., A. Kuroiwa, M. Ikawa, **ほか4名**: Efficient chromosomal transposition of a Tc1/mariner-like transposon Sleeping Beauty in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 9191-9196, 2001
- 2) Takagi, S., H. Tojo, S. Tomita, **ほか9名**: Alteration of the 4-sphingenine scaffolds of ceramides in keratinocyte-specific Arnt deficient mice affects skin barrier function. *J. Clin. Invest.* 112 (9) : 1372-1382, 2003
- 3) Horie, K., K.Yusa, K.Yae, **ほか10名**: Characterization of Sleeping Beauty transposition and its application to genetic screening in mice. *Mol.Cell.Biol.*23(24): 9189-9207, 2003
- 4) Yusa, K., **J. Takeda**, and K. Horie; Enhancement of Sleeping Beauty Transposition by CpG Methylation: Possible Role of Heterochromatin Formation, *Mol. Cell. Biol.*, 24; 4004-4018, 2004
- 5) Yusa, K., K. Horie, G. Kondoh, **ほか4名**: Genome-wide phenotype analysis in ES cells by regulated disruption of the Bloom's syndrome gene. *Nature* 429, 896-899, 2004
- 6) Keng, V.W., K. Yae, T. Hayakawa, **ほか10名**: Region-specific saturated germ-line mutagenesis in mice using the Sleeping Beauty transposon system. *Nat. Methods.* 2; 763-769, 2005
- 7) Hayakawa T, Yusa K, Kouno M, **ほか2名**: Bloom's syndrome gene-deficient phenotype in mouse primary cells induced by a modified tetracycline-controlled trans-silencer. *Gene.*, 369; 80-89, 2006
- 8) Ikeda R., C Kokubu, K Yusa, **ほか3名**: Sleeping Beauty transposase has an affinity for heterochromatin conformation, *Mol. Cell. Biol.*, 27 : 1665-1676, 2007

色素細胞幹細胞の制御による白斑症治療モデルの開発

岐阜大学大学院医学系研究科

國貞 隆弘

Piebaldism is an autosomal dominant genetic pigmentary disorder, characterized by congenital white hair and patches located on the forehead, anterior trunk, and extremities. Most piebald patients have a mutation of the *Kit* gene, which encodes a tyrosine kinase receptor involved in pigment cell development. The white hair and patches of such patients are already completely formed at birth and do not usually expand thereafter. This stability of pigmented spots also applies to *Kit^{fl}* and *Kit^{sl}* mutant mice. However, 2 novel cases of piebaldism were reported in 2001, in which both mother and daughter having a novel Val620Ala mutation in their *Kit* gene showed progressive depigmentation. To prepare an animal model of this mutation to explore undefined functions of KIT signaling for maintaining pigmented melanocytes in the skin or more specifically the integrity of the melanocyte stem cell system in the postnatal skin, we produced transgenic mice expressing Val620Ala *Kit*. These mice well mimicked the white spotting pattern of patients; however, no change in this pattern was observed after birth, even after increasing the transgene expression by various means. Here, we report the unexpectedly extremely stable maintenance of the melanocyte stem cell system under stringent conditions for KIT signaling.

1. 緒言

色素細胞は発生初期に神経管から離脱した多分化能をもつ幹細胞である神経堤細胞に由来する。神経堤細胞はマウスでは9.5日胚で移動を開始し、13.5日までは体の様々な部分へ移動し、その場所で色素細胞を含め、神経、内分泌、結合組織、骨組織など様々な細胞・組織へと分化する。色素細胞へと運命決定された細胞は色素細胞幹細胞（色素芽細胞）として表皮の近傍の真皮中を移動し、表皮に一斉に移動後毛包の形成と共に一部は其中に進入する。毛包で（ヒトでは毛包以外の表皮中にも）生涯色素細胞は維持され、UVなどの外部刺激に反応してその密度が増減すること、毛周期に同調して増殖・分化を繰り返すことから、幹細胞システムとして皮膚（ケラチノサイト）の再生と関連しながら再生し続けると考えられる¹⁻³⁾。

例えば、White Spotting (*W*) マウスでは受容体型チロシンキナーゼ遺伝子 *Kit* の突然変異により、それを発現する色素細胞幹細胞は体内環境から十分なシグナル（ここではリガンドとして *Kit* に結合する SLF）を得られなくなり、移動能力が低下する。その結果、神経管から遠位にある腹部、額、臀部、四肢の先端を中心に色素細胞幹細胞が到達せず、その部分は色素細胞の存在しない白斑になる。同様

のメカニズムで白斑を生じる分子として、先述の SLF や ET3 EDNR3 MITF PAX3、などが知られている^{4,5)}。

皮膚の色素異常は多彩な臨床症状を示し、The Pigmentary System⁶⁾ によると実に141種の病名が報告されている。分類の大まかな基準は、先天的か後天的か、色素過剰か色素過小か、表皮性か真皮性か、あるいは発生段階で生じるか成長してから生じるかであり、臨床例として最も多い白斑症 (vitiligo) は自己抗体の形成などによる後天的な原因で色素細胞が失われ白斑が形成されると考えられている。例えば、*mi^{vit}* というマウスの突然変異は、先天的な白斑（後天的なものとは区別して piebaldism あるいは Waardenburg 症候群として記載される）を持つ。*mi^{vit}* では加齢と共に色素が減少することからヒトの vitiligo のモデルと考えられてきたが、原因遺伝子が Waardenburg 症候群の原因遺伝子と同じ転写調節因子 MITF であること、ヒト vitiligo に MITF 遺伝子の変異が見つかっていないこと、などから典型的な白斑症のモデルとは考えられていない。いずれにしても、動物モデルを通して色素異常症の研究を進めることは、病態の分子的本質を明らかにする上で必要不可欠である。

我々は、Richard, 深井らにより2001年に報告されたヒト piebaldism (まだら症) の臨床報告⁷⁾ に注目した。その患者母娘は *c-kit* に変異を持ちまだら症と診断されたが、娘には生後白斑の拡大が観察された。白斑形成は、表皮の色素細胞幹細胞の発生・維持ができず色素細胞が消失する、いわば幹細胞システムの破綻として統一的に扱うことができる。白斑形成という表現型を持つ毛色の突然変異体の解析により幹細胞の増殖・分化・自己複製を制御する因子（遺伝子）のほとんどが明らかにされている。そのような遺伝



Establishment of animal models for piebaldism by the regulation of melanocyte stem cells

Takahiro Kunisada

Department of Tissue and Organ Development, Gifu University Graduate School of Medicine

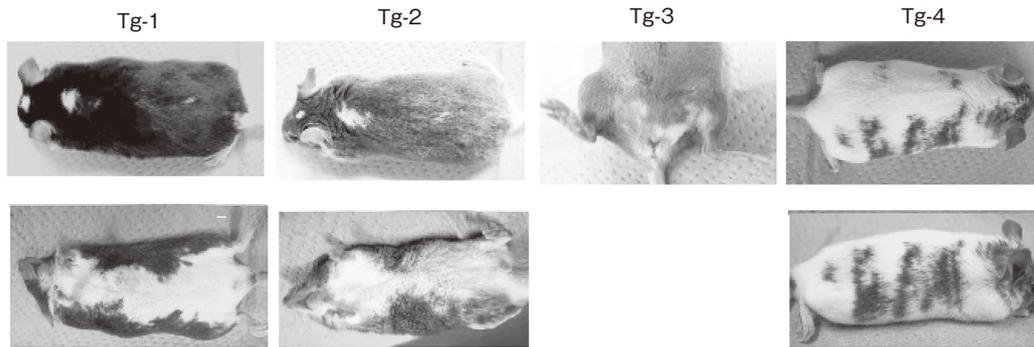


図 1

子のひとつとしてマウスやヒトを含むいくつかの哺乳動物で受容体型チロシンキナーゼ c-kit の様々な変異が知られている。c-kit 変異マウスを含む白斑を持つマウス変異体では白斑パターンが生後に変化する現象は報告されていない。体表の一部に色素細胞が存在しない領域は、分子的原因が何であれ発生中の色素細胞の異常によって生じたものであり、いずれも生後には白斑のパターンは決まっておらず、成長に比例してそのサイズは拡大するがパターンは変化しないとされている。

ところが、この論文で報告された c-kit 変異 (Val620Ala) では、一旦形成された娘の白斑領域が加齢に伴って拡大したことが報告されている。生後表皮の成長とは無関係に色素細胞が減少するということは一端毛包に定着した色素細胞幹細胞が失われることを意味し、発生時に形成された白斑部が安定して維持され、一端発生過程で形成された色素細胞の分布のパターンは生涯変わらないという従来のみだら症に対する認識を覆すものである。この表現型が再現できれば、受容体型チロシンキナーゼのシグナル異常によって生後に進行する白斑症 (vitiligo) が生じることを証明できるだけでなく、表皮における色素細胞幹細胞の維持機構の解明に直接つながると考えた。

本申請では報告されたみだら症と同一の点突然変異を導入した c-Kit 遺伝子をメタロチオネイン遺伝子の転写調節領域の下流に接続して色素細胞で強制発現させたトランスジェニックマウス (Tg マウス) を作成し、この大変希なみだら症の表現型の再現を試みた⁸⁾。

2. 実験

ヒトみだら症の c-kit Val620 Ala 変異はこの受容体の細胞内チロシンキナーゼ部位の数百アミノ酸にわたってヒトとマウスではほぼ完全に保存されている領域で起こっており、マウス c-kit 遺伝子に同様の変異を導入することで再現可能と考えられた。ミスマッチ PCR プライマーを用いて Val620Ala 変異を導入したマウス c-kitcDNA を作成し、これをメタロチオネイン I 遺伝子の転写プロモーター領域と接続した DNA コンストラクト作成し、これを用いてト

ランスジェニックマウスを作成した (mt-kit^{V620A}Tg マウス)。メタロチオネインプロモーターは色素細胞を含む様々な組織や細胞で発現を誘導するが、全く c-Kit を発現しない W マウスですら必ずしも致死的でないことから、ドミナントネガティブに機能すると予想される Val620Ala 変異を広範囲の細胞に発現させても個体の生存に影響することはないと考えた。これらの操作を含む実験の詳細は文献 8) に詳述した。

3. 結果

3.1 Tg マウスの表現型

7 個の独立した mt-kit^{V620A}Tg マウスが得られ、4 個体の白斑が遺伝することが確かめられ、下図 1 のように Tg-1,2,3,4 とした。この中から、比較的白斑の面積が少ない Tg-1 と、白斑が最も大きい Tg-4 を株として維持した。白斑のサイズやパターンに個体差はあるものの、Tg-1 と Tg-4 が外見で区別できないほどではなく、世代を重ねても安定に維持された。トランスジーンが発現量を皮膚で比較すると Tg-4 の方が圧倒的に多く、ドミナントネガティブ c-kit 遺伝子の発現量と白斑の面積が比例していることになり、白斑形成がトランスジーンに起因することが示された。つまり、この変異はヒトと同じくマウスにもみだら症を誘発することが確認された。

3.2 mt-kit^{V620A}Tg マウスでの加齢に伴う白斑の変化

これらの Tg マウスにおいて白斑の拡大が認められるか、長期にわたって観察した。最も大きな白斑を持つ Tg-4 でも、生後の白斑の大きさや形状は、成長による表皮の拡大以外は認められなかった (図 2)。Tg-1 の小さな白斑も、拡大も縮小もしなかった。多数の mt-kit^{V620A}Tg マウスについて観察を行ったが、いずれも同様であった。従って、通常の飼育状態においては、c-kit の V 6 2 0 A 変異は、発生を反映した白斑形成はヒトの症例と同じく生じるものの、生後の白斑の拡大は起こらないと考えられる。

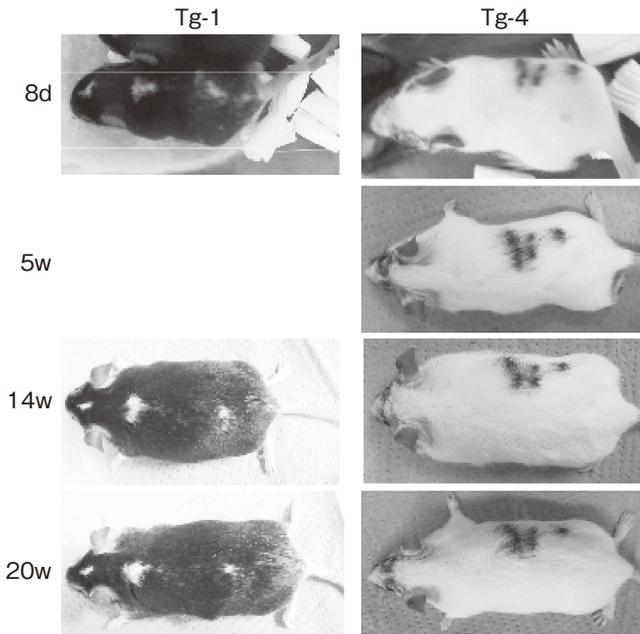


図2

3.3 トランスジーンが発現量の増加による白斑の変化

mt-kit^{V620A} の発現を担うメタロチオネインプロモーターは重金属の添加により活性が増大する。実際に、Tg-1 や Tg-4 においても ZnSO₄ を飲用させることで数倍の転写亢進が認められた。このようにして mt-kit^{V620A} の発現を高めた Tg マウスも、たとえ生後直ちに ZnSO₄ の飲用を開始し長期観察しても、生後の白斑の拡大は観察されなかった。Tg-1 のホモ個体では、mt-kit V620A の発現量が2倍になると考えられ、実際その白斑は Tg-4 よりも大きくほとんど白色の固体も見られたが、そこにわずかに残った黒毛も生涯消失することはなかった。

3.4 ヒトに類似した色素細胞分布を示す SLF-Tg マウスにおける mt-kit^{V620A} トランスジーンの効果

マウスでは、生後速やかに毛包以外の色素細胞が失われるので、ヒトの色素細胞の動態を調べるモデルとしては限界がある。ヒトでいう白斑の拡大とは、主に毛包以外の表皮に存在する色素細胞が消失を指すからである。この点を克服するため、我々が以前開発した毛包以外の表皮にも生涯色素細胞が維持されるヒト型の表皮を持つモデルマウス (hk14-SCFTg マウス⁹⁾) と mt-kit^{V620A} Tg マウスとを交配し、白斑の状態を調べた。図3に示したように、例えば SLFTg/+;Tg-4/+ ダブルトランスジェニックマウスは

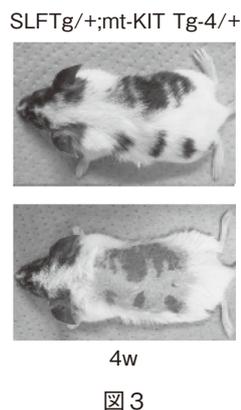


図3

やや白斑が小さい (黒毛のストライプが太い) こと以外毛色のパターンは Tg-4 と変わらないが、実際に毛を剃ってみると表皮にメラノサイトが存在し、色素が沈着しているのがわかる。このマウスを剃毛後も飼育を続け再び剃毛したところ、表皮の白斑のパターンは変化していなかった。このようなダブルトランスジェニックマウスを Tg-1 でも作製したが同様の結果であった。さらに、これらのダブルトランスジェニックマウスに ZnSO₄ を飲ませても、パターンが変化することはなかった。従って、ヒトと同様に毛包以外の表皮に色素細胞が常在する状態でも、mt-kit^{V620A} によって生後に白斑が拡大することは無いことがわかった。

4. 考察

以上、ヒト kit^{V620A} 変異の生後の白斑の拡大を再現すべく行った様々な試みは現在のところ全て失敗した。マウスの多くの piebaldism 変異体で一旦発生過程で生じた白斑の生後の拡大は報告されておらず、我々がそれらのマウスを飼育した経験でもそのようなことは観察されなかった。もちろん、ヒトでもこのような報告は一例のみである。従って、ヒトでの症例報告では、mt-kit^{V620A} に加えて何らかの別の遺伝的な要因、あるいは環境因子が付加することによって白斑の拡大が生じたと考えるのが妥当と思われる。

このように、ヒトの症例を再現する試みは成功しなかったが、本研究の過程で色素細胞の増殖・分化・維持に関していくつかの点が明らかになった。まず、色素細胞の発生異常により生じた piebaldism の白斑の安定性である。発生過程での白斑のサイズあるいは形態には c-Kit シグナルが影響を及ぼすことは、今回作製した mt-kit^{V620A} Tg マウスを見ても明らかであり、実際 SLFTg/+; mt-kitTg-1/+ ダブルトランスジェニックには図4のように Tg-1 では決して観察されない腹部の白斑が極端に小さなものがしばしば生じたが、c-Kit のリガンドである SLF の強制発現により、mt-kit^{V620A} の活性が上昇したため、色素細胞がより野生型に近い分布を示すようになったと考えられる。ただし、この場合ですら生後の白斑の変化は見られなかった。マウスの場合、SLF の発現は生後においては毛包に限局されるが、SLFTg では表皮全体に発現し続けるので、我々は白斑の周囲の色素細胞が活性化され、幹細胞を含めた色素細胞が存在しない白斑に進入することは大変考えやすいと予想したが、実際には半年後でも白斑のサイズや形状は変化しなかった。もともと、c-Kit や ET3 などのシグナルの不足により生じた piebaldism の白斑が生後も

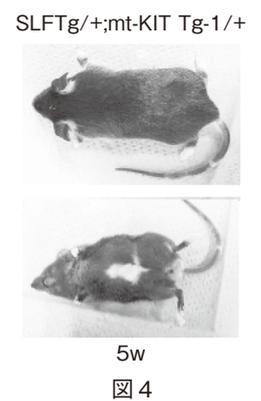


図4

変化しないのは十分予想されることであるが、いくらそれを強制発現させたりガンで活性化し、シグナルの不足分を補っても（実際に発生過程ではほとんど腹部の白斑が消失するという著しい効果として現れているのだが）、生後の白斑のパターンは一切変化しない。シグナルの不足に対しても、過剰に対しても、一旦形成された胎児期の白斑のパターンは強固に維持される。

神経堤由来の色素細胞は発生中皮膚の広範囲を移動し、それには c-Kit が必要であることが実験的に確実に示されている。生後も、毛包のバルジに存在する色素細胞幹細胞が毛周期に対応して毛球部へ移動することは確認されており³⁾、今回確認されたことを言い換えると、生後の色素細胞は個々の生存シグナルの増大や減少には反応せず、毛包から毛包へ移動することはない、ということになる。生後の色素細胞は、毛包でも表皮でもこれほど移動に対して抵抗することは、多くの脊椎動物が体表の配色を種や個体の識別に使っていることを考えると進化的な合理性があるとも考えられる。発生中の色素細胞と、生後のメラノサイトのどのような違いによってこのような移動性の差異がもたらされるかを明らかにすることは、piebaldism 以外の白斑症の発症機構にも参考になるとと思われる。色素細胞でなく、表皮の側に原因があることも考えられる。我々は十分な検討をしていないが、UV 照射や発癌剤の投与で表皮が一気に黒化する現象の動態を詳しく調べることも必要かもしれない。色素細胞の幹細胞が刺激に対して柔軟に反応しないことが、白斑が自然治癒しない大きな原因と考えられるからである。

白斑症あるいは白髪などを含め、色素細胞の発生異常という観点から症状の分子機構を調べ、治療あるいは予防を行おうという試みは最近国内外で盛んである。ただ、実用化という観点では、海外メーカーによるチロシナーゼ遺伝子に対するアンチセンス DNA を用いた美容液等新しいメラニンコントロール法の実用化は国内外で活発であるが、色素細胞幹細胞の動態を制御する効果の高い製品は存在しない。その原因は、モデル動物を通した白斑あるいは白髪

の発生機構の研究が不十分で色素細胞の消失に関する分子機構の解明が不十分であることにある。本研究では、最終的に当初目指していた vitiligo タイプの白斑症のモデルの

作製には至らなかったが、たとえば ET3 など他のシグナルも同時に操作することで、様々な白斑症のマウスを作出したい。

(引用文献)

- 1) Hall, B.K. (1999) *The Neural Crest In Development and Evolution*. New York: Springer.
- 2) Le Douarin, N. M., and Kalcheim, C. (1999) *The Neural Crest*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- 3) Nishimura E K, Jordan S A, Oshima H, Yoshida H, Osawa M, Moriyama M, Jackson I J, Barrandon Y, Miyachi Y, Nishikawa S, : Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature* 416, 854-860, 2002.
- 4) Bennett DC, Lamoreux ML, : The color loci of mice - a genetic century, *Pigment Cell Res.*, 16, 333-344, 2003.
- 5) Steingrimsson E, Copeland NG, Jenkins NA, : Mouse Coat Color Mutations: From Fancy Mice to Functional Genomics, *Dev. Dyn.* 235, 2401-2411, 2006
- 6) *The Pigmentary System*, J.J. Nordlund, R.E. Boissy, V.J. Hearing, R.A.King, and J-P Ortonne, eds (New York, NY: Oxford University Press) , pp. 475-487.
- 7) Richards KA, Fukai K, Oiso N, Paller AS, : A novel KIT mutation results in piebaldism with progressive depigmentation. *J Am Acad Dermatol* 44: 288-292, 2001
- 8) Tosaki H, Kunisada T, Motohashi T, Aoki H, Yoshida H, Kitajima H, : Mice transgenic for KitV620A: recapitulation of piebaldism, but not progressive depigmentation, seen in humans with this mutation. *J. Invest. Dermatol.* 126, 1111-1118, 2006.
- 9) Kunisada T, Yoshida H, Yamazaki H, Miyamoto, A, Hemmi H, Nishimura E, Shultz LD, Nishikawa S-I, Hayashi S-I, : Transgene expression of steel factor in the basal layer of epidermis promotes survival, proliferation, differentiation and migration of melanocyte precursors. *Development* 125, 2915-2923, 1988.

Ⅲ. 精神、文化に関する分野

化粧療法による被介護者と介護ボランティアの精神的活性化

仙台大学体育学部健康福祉学科*, 東北大学大学院教育学研究科臨床心理学分野**

吉田 寿美子*, 荒川 冴子*, 中幡美絵*, 土屋 慶子*, 作山 美智子*,
石津 憲一郎**, 安保 英勇**, 上埜 高志**

Cosmetic therapy was believed to improve the quality of life (QOL) in women including senile dementia patients. However, the mechanisms of cosmetic therapy are not clear. In this study, we examined the psychosomatic effects induced by the cosmetic therapy in senile dementia or healthy elderly women. Thirteen senile dementia women (mean MMSE: 20.3, mean age: 84.2) received cosmetic therapies conducted by 2 college student volunteers every week for 3 months (total 12 sessions). Twenty-six healthy elderly women (mean MMSE: 26.6, mean age: 70.1) took cosmetic learning class to master self-cosmetic behavior, every week for 1.5 months (total 5 sessions). On every week, senile dementia or healthy elderly women were evaluated on their physical and psychological status for the short-term effects (STE) of cosmetic therapy. We also evaluated the status of senile dementia women and the volunteers (mean age: 22, women) or healthy elderly women before and after the series of cosmetic therapy to examine its long-term effects (LTE).

For the senile dementia women, 1) the moods assessed by face scale were significantly improved; diastolic blood pressures, pulse rates, double products and the temperatures of cheeks significantly decreased; the temperature of palm significantly increased as STE, 2) depressive moods and anxiety significantly decreased; feeling of well-being showed tendency in increased only in high public self-consciousness persons. On the contrary, cosmetic therapy showed no clear effects in volunteer women.

For the healthy elderly women, 1) the moods assessed by face scale or NRS were significantly improved; blood pressures (both of diastolic and systolic), pulse rates significantly decreased; the temperature of palm, forehead and cheeks significantly increased as STE, 2) the moods significantly improved; feeling of well-being showed significantly increased; increasing of feeling of well-being was not influenced by character, employment or commencing time of skin-care behavior.

Our study showed cosmetic therapy activated parasympathetic system and improve the mood in both senile dementia and healthy elderly women. The effects in healthy elderly women (self-cosmetic behavior) exceeded that in senile dementia women because LTE were not influenced by character.

Cosmetic therapy seems to activate bodies and spirits of both senile dementia and healthy elderly women as STE, although LTE is limited in senile dementia women.

1. 緒言

「化粧」に関する心理学的研究は20世紀の半ばにその兆しが現れ、後半に目覚ましい発展を遂げた。化粧に種々の心理作用があることを示し、化粧に注目を集めたのは1985年にGrahamらが化粧の臨床的効用についての書籍を発行したことから始まり、「化粧療法」という新たな領域を生むに至った(阿部, 2001)。日本では近年、「化粧療法」は代替療法の一つとして老人保健施設やデイサービス等の福祉の現場や病院などの医療の現場で取り入れられ始めた。

宇山, 阿部によると「化粧療法」とは「化粧を用いた治療法であり、化粧が心理学的な過程を介して心理・生理的な治療効果をもたらすことを期待して行われるものである」という定義を提案している。

海外ではアメリカ合衆国において“Look Good...Feel Better”という化粧の無料支援プログラムが展開されている。この活動はがん患者などの容貌、容姿に配慮することによって症状を改善することを目的として全米化粧品工業界、アメリカ癌学会、全米コスメトロジー協会の3者が共催して行っており、医療の現場において癌患者のリハビリテーションの一環として定着し、高い評価を得ている(高橋, 2003)。

以上のように福祉、医療及び社会心理学的に「化粧療法」に関する関心は高まっている。

そこで、我々はこれまでの先行研究を踏まえ、化粧療法は高齢者の不安や抑うつを減少させて、生きる意欲といった精神的活性化をもたらす、高齢者の生理的状況を改善すると仮定した。さらに、高齢者への化粧療法を施す介護ボランティアにも達成感を与え、介護ボランティアの心理にも良い影響を与えると想定した。本研究では、認知症高齢



Spiritual activation induced by cosmetic therapy in senile dementia women and nursing volunteers

Sumiko Yoshida*, Saeko Arakawa, Mie Nakahata, Keiko Tuchiya, Michiko Sakuyama, Kenichiro Ishizu, Hideo Anbo, Takashi Ueno

Department of Health and Welfare science, Faculty of Physical Education, Sendai College
Division of Clinical Psychology, Graduate School of Education, Tohoku University

女性に対しては介護ボランティアが化粧療法を行い、健康高齢女性に対しては「化粧教室」を開催して化粧を自ら行えるように指導した。これらの結果から、化粧は高齢者の精神的活性化をもたらすか、介護ボランティアが高齢者に化粧を施すことで達成感を得られるかの2点を心身への影響を検討することで明らかにすることを目的としている。

2. 実験

2.1 認知症高齢者を対象とした研究

・対象

仙台大学近郊の老健施設入居者のうち本研究に同意でき、同意能力がある判断されるMMSE (Mini-Mental State Examination) が15点以上の高齢女性(計13名)に研究協力を依頼した。MMSEの平均得点は 20.3 ± 3.6 点、平均年齢は 84.2 ± 5.9 歳であった。仙台大学に通学するボランティア学生(計2名、平均年齢22歳)が上記認知症高齢者に化粧を実施した。

・研究方法

同意の得られた協力者に化粧療法全プログラム開始前にTable 1-1に示した尺度と検査を実施した。

本研究では「化粧療法」として下記のメイクプログラムを実施した(1セッション約30分)。

- ①顔のマッサージ
- ②ファンデーション→白粉
- ③眉墨→アイメイク
- ④口紅
- ⑤チーク
- ⑥全体のバランス
- ⑦「きれいになりましたね」と評価する。

希望に応じて化粧のアドバイスをを行う。

協力者に対して「化粧療法」を週1回、約3ヶ月間(平成16年11月8日～平成17年2月28日、全12セッション)実施した。毎回のセッションの前後にTable 1-2に示した尺度と検査を実施した。化粧療法全プログラム終了後、再びTable 1-1に示した尺度と検査を実施した。

化粧をする介護ボランティアに対しては化粧療法全プログラム開始前及び終了後にTable 1-3に示した尺度を実施した。また、化粧療法プログラム終了後にはインタビューにより高齢者に化粧療法を施術した感想を聴取した。

2.2 健康高齢者を対象とした研究

・対象

本学近郊のA町の広報誌で公募し、65歳～75歳の高齢女性を募った。研究説明会を実施し、本研究に同意する者を協力者とした。協力者はMMSEの得点がいずれも22点以上であり、認知症の症状はなく自ら化粧ができる者であった。なお、平均年齢は 70.1 ± 2.9 歳(計26名)であ

った。

・研究方法

同意の得られた協力者に化粧教室全プログラム開始前にTable 2-1に示した各尺度と検査を実施した。本研究では「化粧教室」として週1回1セッション1.5時間、下記の内容のプログラムを実施した。

- 第1回 スキンケア・洗顔・顔のマッサージ・下地
- 第2回 ファンデーション・影・フェイスパウダー
- 第3回 眉・アイシャドー・アイライン
- 第4回 マスカラ・チーク・リップ
- 第5回 復習

「化粧教室」ではセッションごとにデモンストレーションを行い、協力者にはそのセッションごとの資料を配布し、個別指導を行った。化粧教室は5回のセッションを一つのプログラムとし、最終的には一人で化粧できることを目標に指導を行った。協力者が多かったため、26名を前半と後半の2グループに分け、平成17年11月30日～平成18年3月8日までの約3ヶ月間実施した。協力者に対して毎回のセッション前後に以下のTable 2-2に示した尺度と検査を実施し、化粧教室プログラム終了後、Table 2-3に示した尺度と検査を実施した。最後に、化粧教室の感想と普段の生活の変化の2点を共通の質問項目とし、その他はフリートークを重視した半構造的インタビューを実施した。

2.2 統計

統計は統計ソフトSPSS (Windows, version 11.5J)を用い、Wilcoxonの符号付順位和検定で比較し、 $p < .05$ を有意とした。

2.4 倫理的配慮

この研究は仙台大学倫理委員会の了承の下、研究協力者に研究の趣旨を口頭と文書にて十分説明し、文書による同意を得て行った。データは全て数値化し、個人を特定できないように配慮した。

3. 結果

3.1 認知症高齢女性を対象とした研究

・毎回のセッション前後の比較

Face Scaleは低下($p < .01$, Fig. 1), 拡張期血圧, 脈拍数は低下する人が有意に多かった($p < .01$, $p < .01$; Fig. 2, Fig. 3). 表面温度は頬部が低下, 手掌部は上昇する人が有意に多かった(各 $p < .05$, Fig. 4). 収縮期血圧×脈拍数で計算されるダブルプロダクトは低下する人が有意に多かった($p < .01$, Fig. 5). 収縮期血圧, 前額部の表面温度に有意な変化はなかった。

・化粧プログラム前後の比較

3ヶ月間のプログラム前後に心理的・生理的尺度に有意な変化は認められなかった。公的自意識尺度の平均得点を基準として、協力者を高群と低群に分類したところ（高群5人・低群6人）、高群では、GDI（抑うつ）、STAI（特性不安）が減少する人が有意に多く（それぞれ $p<.05$, Fig. 6）、PGC モラル尺度（幸福感）が高まる人が増加傾向であった（ $p<.10$, Fig. 6）。血液検査では随意血糖値が上昇する人が増加傾向（ $p<.10$ ）にあり、白血球数が増加する人が有意に多かった（ $p<.01$ ）が、いずれの値も正

常範囲内であった。その他の血液検査項目には変化がなかった。

・介護ボランティアへの影響

3ヶ月の化粧療法プログラム前後の心理的尺度に有意な変化はなかったが、以下のような感想が得られた。

- ・「自分が化粧をしてあげることで、高齢者が明るくなって自分たちが元気をもらったような気がする。」
- ・「化粧をする前は、あまり会話がなかったのに、化粧が終わるとよく話をしてくれるようになって、うれしかった。」

Table 1 認知症高齢者を対象とした研究で実施した尺度・検査項目

1	GDS 短縮版（高齢者の抑うつ）、新版 STAI（不安）、PGC モラル尺度（主観的幸福感）、Face Scale（気分）、自意識尺度（公的自意識） 血圧（収縮期・拡張期）、脈拍数 血液検査（血液一般、生化学検査、免疫機能検査）
2	Face Scale（気分）、表面温度（前額部、左右頬部、左右手掌部） 血圧（収縮期・拡張期）、脈拍数、ダブルプロダクト（心付加係数）
3	孫・祖父母関係評価尺度（孫版）、自尊感情尺度、生き甲斐感スケール、新版 STAI（不安特性）、SDS（成人の抑うつ）

（注釈）

- ・ GDS 短縮版（Geriatric Depression Scale shorted version; Sheikh and Yesavage, 1986）：老年者のうつ病のための尺度
- ・ 新版 STAI（State-Trait Anxiety Inventory-Form JYZ; 肥田野ほか, 2000）：不安に関する尺度
- ・ PGC モラル尺度 改訂版（The Philadelphia Geriatric Center Morale Scale; Lawton, 1975）：主観的幸福感を測定する尺度
- ・ Face Scale（Lorish and Maisiak, 1986）：1 から 20 までの一連の表情変化のイラストから自分の気分に近いものを選択する気分に関する尺度
- ・ 公的自意識尺度：自意識尺度 日本語版（菅原, 1984）の公的自意識に関する 11 項目を用いた。
- ・ 孫・祖父母関係評価尺度（孫版）（田畑ほか, 1996）：敬老精神の尺度
- ・ 自尊感情尺度（山本ほか, 1982）：自分をポジティブに捉えることができる感情の尺度
- ・ 生き甲斐感スケール（近藤・鎌田, 1998）
- ・ 日本語版 SDS：抑うつ性を評価する自己評定尺度（福田・小林, 1983）

Table 2 健康高齢者を対象とした研究で実施した尺度・検査項目

1	Face Scale, NRS, 新版 STAI（特性不安）、PGC モラル尺度（主観的幸福感）、自意識尺度（公的自意識）、WHO- 5（こころの健康度）、SF- 8（QOL, スタンダード版）、NEO-FFI（性格特性, 成人用）、ピッツバーグ睡眠調査, 生活歴, 化粧に関するアンケート, 血圧（収縮期・拡張期）、脈拍数
2	Face Scale（気分）、NRS（気分）、血圧（収縮期・拡張期）、脈拍数、表面温度（前額部、両頬部、両掌部）
3	Face Scale（気分）、NRS（気分）、新版 STAI（特性不安）、PGC モラル尺度（主観的幸福感）、自意識尺度（公的自意識）、WHO- 5（こころの健康度）、SF- 8（QOL, スタンダード版）、NEO-FFI（性格特性, 成人用）、ピッツバーグ睡眠調査, 化粧教室に対する総合評価表、インタビュー, 化粧に関するアンケート, 血圧（収縮期・拡張期）、脈拍数

（注釈）

- ・ NRS（Numerical Rating scale：数値的評価スケール）：100 点を最大とした場合、自分の現在の気分は何点かを回答させる。数値が高いほど気分が良いことを表す。
- ・ WHO-5 精神的健康状態表（1998 年度版）（WHO-Five Well-Being Index; Awata, S, et al, 2006）：5 つの回答の数字を合計して計算する。粗点の範囲は 0 ~ 25 点で、0 点は QOL（Quality of Life）が最も不良であることを示しており、25 点は QOL が最も良好であることを示している。
- ・ SF-8 日本語版（The MOS 8-Item Short-Form Health Survey Japanese Version; Fukuhara S and Suzukamo Y, 2004）：PF（身体機能）、RP（日常役割機能-身体-）、BP（体の痛み）、GH（全体的健康感）、VT（活力）、SF（社会生活機能）、RE（日常役割機能-精神-）、MH（心の健康）の 8 つの健康状態を示す得点を数値化する調査票。一定の測定基準によってスコアリングし、得点を決定する。各項目の得点を重み付けして加算し、定数を加え、公式に当てはめると PCS（身体的サマリースコア）、MCS（精神的サマリースコア）を求めることができる。
- ・ 日本版 NEO-FFI（NEO Five Factor Inventory Japanese Version; 中下ら, 2002）：合計 60 項目から成っている。大学生用と、成人用の 2 種類がある。神経症傾向、外向性、開放性、調和性、誠実性の人格の 5 つの次元における個人の特性を明らかにする。
- ・ ピッツバーグ睡眠調査（Pittsburgh sleep quality index ; PSQI）：睡眠とその質を評価する自記式質問票。18 の質問項目から成り、睡眠の質、睡眠時間、入眠時間、睡眠効率、睡眠困難、眠剤使用、日中の眠気などによる日常生活への支障といった 7 つの要素から構成されている。得点が高いほど睡眠が障害されていると判定する。

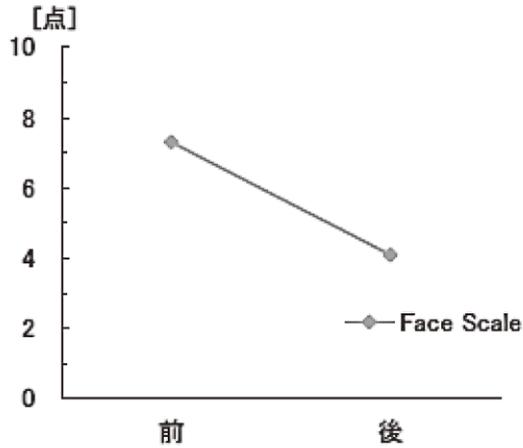


Fig.1 セッション前後のFace Scaleの変化

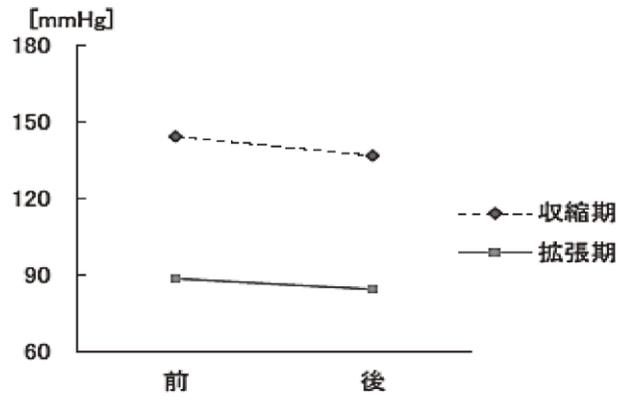


Fig.2 セッション前後の血圧の変化

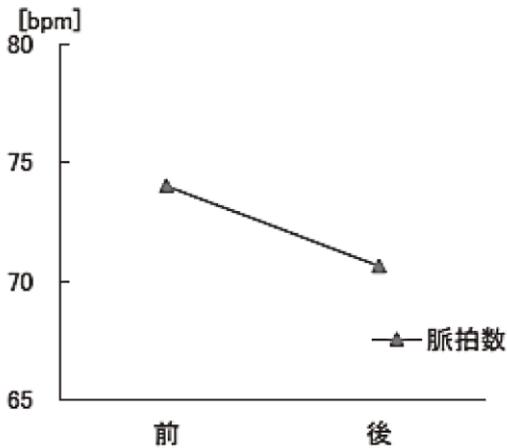


Fig.3 セッション前後の脈拍数の変化

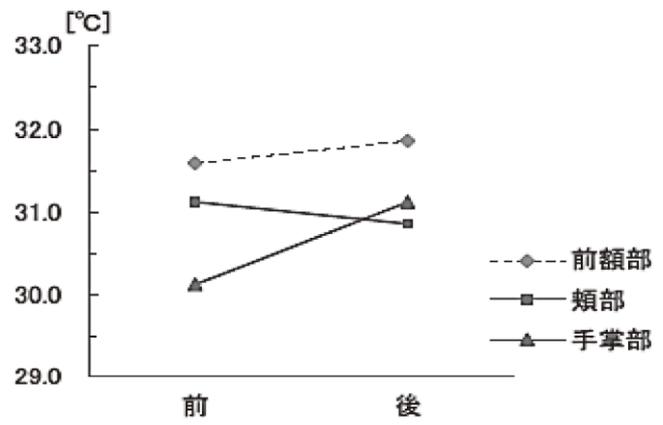


Fig.4 セッション前後の表面温度の変化

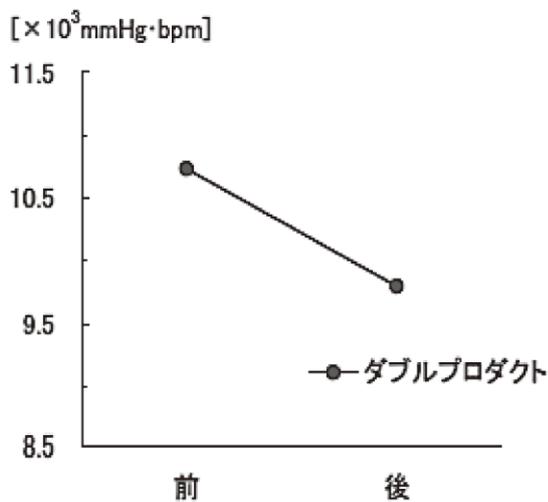


Fig.5 セッション前後のダブルプロダクトの変化

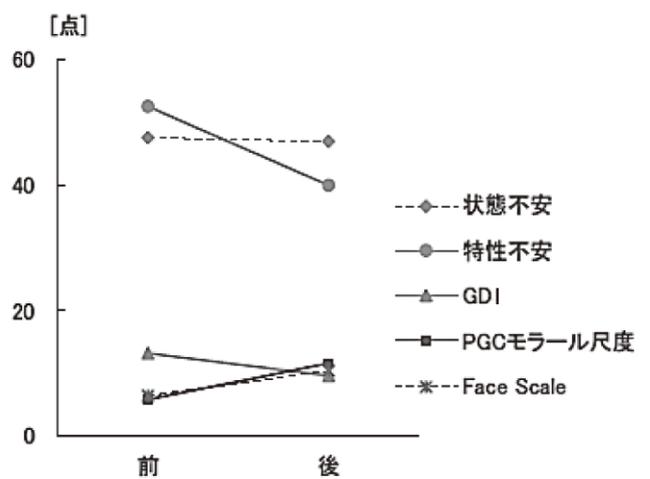


Fig.6 化粧療法プログラム前後の心理特性変化
公的自意識高群 (n=5)

*実線は $p < .01$, $p < .05$ または $p < .10$, 破線は有意差がないことを示す。

3.2 健康高齢女性を対象とした研究

・毎回のセッション前後の比較

Face Scale は低下する人が有意に多く ($p<.00$), NRS は上昇する人が有意に多かった ($p<.00$). 血圧 (収縮期・拡張期) が低下する人が有意に多く ($p<.01, p<.00$), 表面温度 (前額部・頬部・手掌部) は上昇する人が有意に多かった ($p<.00, p<.00, p<.00$).

・「化粧教室」プログラム前後の比較

一般的な変化: Face Scale の得点が低下する人が有意に多く ($p<.00$), モラル尺度の得点が上昇する人が有意に多かった ($p<.00$). NRS, WHO-5 の得点が上昇する人が増加傾向であった ($p<.06, p<.07$). その他の項目については変化が見られなかった. 生理的尺度の全ての変数に有意な結果は認められなかった. 化粧に関する調査における各質問項目 (スキンケア, ファンデーション, 口紅, アイシャドー) についてはスキンケアのみ得点が上昇する人が増加傾向であり ($p<.07, Fig. 7$). その他の項目については変化が見られなかった.

性格特性の影響: NEO-FFI を用いて, 日本人の平均値を基準として神経症傾向, 外向性, 開放性, 調和性, 誠実性の高群と低群に分類して比較したところ, 性格傾向に関係なくモラル尺度の得点が高まる人が増加傾向または有意に多かった ($p<.04, p<.07$). 公的自意識についてはグループ平均点 (36.7) が一般の平均点 (56.4) よりも低かった為, 解析しなかった.

就労経験の有無や化粧習慣の開始時期の影響: 就労経験の有無で2つのグループに分け (仕事をしていた10人・していなかった人12人) 比較したところ, 就労経験者

は, Face Scale の得点が低下する人 ($p<.01$), NRS, モラル尺度の得点, 化粧品目が増加する人が有意に多かった ($p<.04, p<.03, p<.05$). 就労経験の無い者もモラル尺度, ピッツバーグの睡眠調査, VT, MCS の得点, 化粧品目数が増加する人は増加傾向であった ($p<.06, p<.07, p<.08, p<.05, p<.06$). 化粧 (スキンケア) の開始時期を2つのグループに分け (25歳以降の群9人・25歳以前の群13人), 比較検討した. 25歳以降の者は Face Scale が低下する人, WHO-5, モラル尺度, VT, MCS の得点, 化粧品目が増加する人が有意に多く, ピッツバーグ睡眠調査の得点が上昇する人が増加傾向であった ($p<.02, p<.01, p<.04, p<.03, p<.04, p<.04, p<.06; Fig. 8$). 25歳以前の者はモラル尺度の得点が増加する人が有意に多く ($p<.04$), Face Scale, STAI の得点が低下する人が増加傾向であった ($p<.07, p<.06$). 化粧品目が増加する人が増加傾向であった ($p<.09$).

・総合評価アンケートやインタビューの結果

アンケート結果: 化粧教室に参加しての評価を4段階の選択式アンケートで回答を得た (21名). 21人中21人が良かったと回答した (100%). その理由について7項目から選択式の複数回答可で回答を得た. 結果は Table 3 に示した. 21人中20人が化粧を教えた良かった理由であると回答した (95.2%). 次いでスタッフと話ができた事と回答した人が11人 (52.4%) であった. 再度化粧教室が行われた際の参加意思について4段階の選択式アンケートで回答を得た. ぜひ参加したいと回答した人が15人 (71.0%), どちらかといえば参加したいと回答した人が5人 (24.0%) であった. 再度

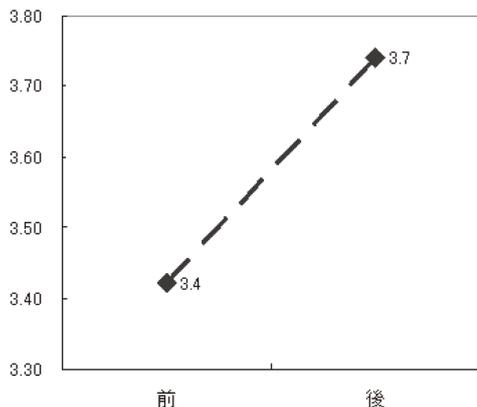


Fig. 7 「化粧教室」プログラム前後のスキンケア (頻度) の変化 (n =23)

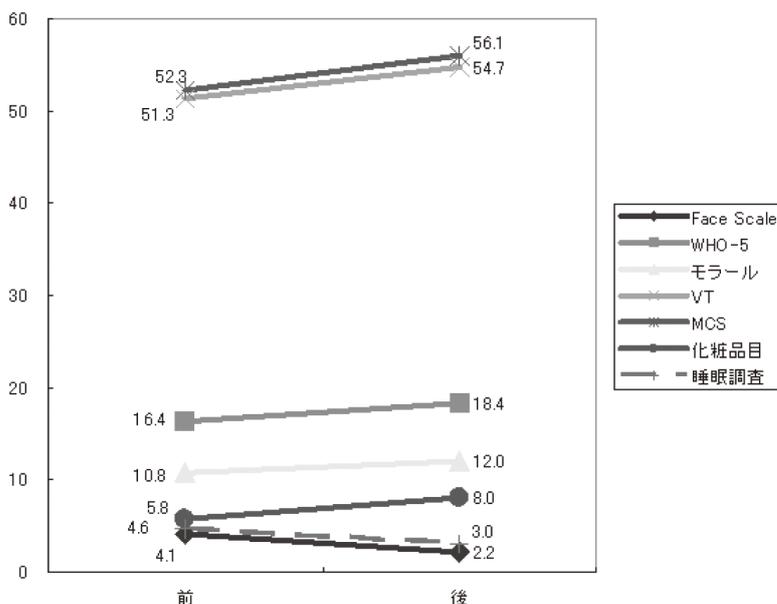


Fig. 8 化粧習慣が25歳以降の人の「化粧教室プログラム」前後の変化 (各々; n=12, 13, 13, 9, 9, 13, 9)

*実線は $p<.01, p<.05$ または $p<.10$, 破線は有意差がないことを示す.

化粧教室が開催された際に参加したいと考えている人が95%であることが分かった。どちらかといえば参加したくないと回答した人は1人(5.0%)であった。

インタビュー結果：主な内容を6つのカテゴリーに分けてTable 4に示す。「化粧の仕方を覚えて良かった、楽しかった」、「化粧をする機会が増えた、化粧の話をするようになった」、「嬉しい、やっぱり女」、「肌にはハリ・ツヤがでた」、「褒められた、友達に教えた」という感想や多かった。「頭の働きが良くなった」「食事にも気を配るようになった」など化粧とは直接関連しない感想も認められた。

4. 考察

4.1 認知症高齢女性を対象とした研究

・化粧療法の短期的効果

心理的効果：高齢者の化粧療法における短期的効果として、Face Scale でみられる気分の改善が認められた。これは、化粧を施すことにより被験者の感情表出が豊かになるという報告(岩男・松井, 1984)、化粧のマッサージによる皮膚接触行為が快感情を生起するという報告(畑山ほか, 1987; 浄土ほか, 1987; 山田ほか, 1987)を支持するものである。1回の化粧療法でも十分に「気分の改善」効果を発揮すると考えられる。

生理的効果：高齢者の化粧療法における生理的効果として、拡張期血圧の低下、脈拍数の低下、手掌部の表面温度の上昇やダブルプロダクトの低下が認められた。これは化粧療法には、短期的効果として副交感神経を優位にする効果があることを示すものである。この効果の一部はマッサージ固有の効果(阿部, 1990, 1993)に由来するものと考えられる。尚、頬部の表面温度が有意に低下したが、この要因は不明である。

以上から、化粧療法は、心身両面のリラクゼーション効果を示すと考えられる。これらの効果は足部の押圧刺激による自立神経系の変化についての調査(許ほか, 2004)や音楽療法によるリラクセス効果の報告(田川ほか, 2003)と同様の結果であることから、化粧療法は指圧や音楽療法と同様な代替医療となる可能性もあると考えられる。

Table 3 化粧教室の評価の理由

	人数(人)	割合(%)
化粧を覚えてもらった事	20	95.2
スタッフと話ができた事	11	52.4
化粧をした事	6	28.6
他の化粧教室参加者と話ができた事	4	19.0
温泉に入れた事	4	19.0
外出するきっかけになった事	3	14.3
その他	0	0.0

・化粧療法の長期的効果

心理的効果：高齢者の化粧療法における長期的効果として、幸福感の高まり、抑うつや不安傾向の改善がみられた。これは、化粧には自信と満足感・幸福感を高める効果があり、感情状態を適度の緊張感を帯びた快適な方向へ向かわせるという報告(余語ら, 1990)を支持するも

Table 4 インタビュー結果

カテゴリー	内 容	人数
化粧教室の感想	化粧の仕方を覚えて良かった	11
	楽しかった	10
	マッサージの指導が良かった	9
	教えてもらえて良かった	7
	生活の楽しみだった	6
	会話が楽しかった	4
	その他	11
生活の変化	化粧する機会が増えた	10
	化粧の話をするようになった	9
	外出するのが面倒でなくなった	8
	化粧品を買いに行った	6
	家族が協力的になり、自分の時間を作るようになった	5
	鏡を見るのが楽しみ	5
	化粧をしている人を見るようになった	4
	生活のリズムができた	4
	洋服もコーディネートしたくなった	4
	テキストで(化粧の)勉強をしている	3
	頭の働きが良くなった(考えるようになった)	3
	友達ができる	3
	その他	7
心理的变化	うれしい	9
	やっぱり女	5
	気持ちが明るくなった	4
	幸せ	4
	(化粧すると)気分が良い	3
	自信がついた	3
	その他	18
顔・肌の変化	肌にはりがでた・つやがでた	10
	きれいになった	4
	顔の表情がにこやかになった	1
周囲とのコミュニケーションの変化	褒められた	7
	友達に教えた	6
今後の期待	今後も継続したい	15
	また化粧教室に参加したい・開催して欲しい	9
	きれいになりたい	4
	今後が楽しみ	2

のである。これらの報告ではどのような高齢者に心理的効果があるのか不明であったが、今回我々は認知症高齢者では他人の目を気にする傾向の強い高齢者（公的自意識高群）にのみ認められることを初めて明らかにした。これは、公的自意識の低い女性より公的自意識の高い女性の方が、化粧をつけた場面の魅力度が高いという報告（Miller and Cox, 1982）を支持するものである。

生理的効果：生化学的検査の結果として、随意血糖値の上昇、白血球数の増加がみられたが、いずれの値も正常範囲であり特別な意味は無いと考えられる。また、長期的効果には短期効果で認められたような副交感神経系を優位にする効果は無かった。

介護ボランティアへの影響：データ数が少なく、統計的な処理は出来なかった。インタビューからは認知症高齢者に化粧を施すことで介護ボランティアに「嬉しい」、「やりがいがある」といった満足感や達成感が生じていることが分かる。認知症を介護する現場では介護者の燃えつきが問題となってきた（谷口・吉田, 2000）。この燃え尽きに対しては適切な対処法が医療現場では重要であるとされている（片桐ほか, 1999）。以上をふまえると、化粧療法は介護職に就く人の燃え尽き防止の対処法として寄与できる可能性があると考えられた。

4.2 健康高齢女性を対象とした研究

・「化粧教室」の短期的効果

Face Scale, NRS の有意な変化に認められるように気分の改善、収縮期・拡張期血圧の有意な低下・表面温度の有意な上昇で認められるように副交感神経を優位にする事が分かった。これらの変化は認知症高齢女性を対象とした研究より明らかであった。これは対象となった人数の相違及び年齢差に基づくものと考えられた。

・「化粧教室」の長期的効果

心理的効果：Face Scale, NRS, WHO-5, モラール尺度の得点が改善され、気分の改善と心の健康度や幸福感が上昇することが認められた。気分が改善して、幸福感が高まったことから心の健康度も高まったものと考えられる。これらの変化は認知症高齢女性を対象とした研究よりも明らかであった。認知症高齢女性との相違は、対象となった人数の相違・年齢差・対象の特性（認知症と健康高齢者）の違いに基づくものと考えられた。

生理的効果：有意な変化が認められなかった。これは認知症高齢女性を対象とした研究の結果と同様であった。しかし、就労経験の無い群及び化粧習慣の開始時期が25歳以上の群ではピッツバーグ睡眠調査の得点の上昇する人が増加傾向であったが、調査を完成できた人が少ないため考察は困難と考えられた。

化粧習慣への効果：スキンケアの頻度が高くなったことが

認められた。スキンケア以外の「飾る」ことを目的とする化粧項目には有意な変化は認められなかった。大別すると化粧には「飾る」化粧と「慈しむ」化粧がある（阿部, 2002）が、「慈しむ」化粧は自分で実行しやすく、インタビュー結果のように「肌にハリがでた・つやがでた」と自覚することができて満足感を得られる事からスキンケアの頻度が高くなったものと考えられる。インタビューから「化粧をする機会が増えた」「化粧をしている人を見る機会が増えた」との感想も聞かれ、化粧行為全般に関して関心が高くなったことが伺える。

性格特性の影響：ほぼ性格の特性に関係することなく主観的幸福感の上昇効果があると考えられた。結果では述べなかったが、外向性低群、開放性低群、誠実性低群には更に気分の改善効果や精神的 QOL の改善や化粧品目の増加などより多くの変化が認められた。化粧に関してこれらの性格傾向を持つ女性には共通した特性がある可能性が伺えた。いずれにせよ、認知症高齢女性を対象とした研究では公的自意識の高い人のみに効果があったことを考えると、能動的化粧は高齢女性誰にでも効果を及ぼす点で優れていると考えられる。

就労経験の有無や化粧習慣の開始時期の影響：就労経験の無い者も、心の健康度が有意に上昇し、有意な差は見られなかったものの、主観的幸福感の上昇する人が増加傾向であったことから就労経験に関係なく主観的な幸福感が上昇する事が示唆される。化粧習慣の獲得が25歳以前の者も主観的幸福感の上昇する人が有意に多く、気分が改善する人が増加傾向であった。以上から、化粧習慣の獲得の時期に関係なく主観的な幸福感が高まる事が分かった。しかし、化粧習慣の獲得が遅い人の方が多くの心理的項目が改善された原因は不明であり更なる検討が必要である。

総合評価アンケート及びインタビュー：化粧教室に参加して全員が良かったと回答し、再度化粧教室が開催された際に参加したいと考えている人が95%であることが分かった。あるプログラムを開催しこれ程の好評を得ることは殆どないことから、その要因が注目されたが、化粧行為を通じた他者とのコミュニケーションが化粧行為そのものを上回っていたことが分かった。化粧療法の効果は報告者によって差異がある（浜ら, 1990；宇野ら, 1997；伊波ら, 2002；柳ら）が、その要因の1つに対象者とのコミュニケーションの差違いが考えられた。インタビューでは化粧、化粧教室に対して肯定的な感想が多く聞かれ、これらの内容は化粧教室の心理的効果を補完するものが殆どであった。「孫に化粧を教えた」「夫や娘や嫁にほめられた」「頭の働きが良くなった」「食事にも気を配るようになった」等の感想も聞かれ、化粧教室が単に「化粧」だけではなく生活全体にも影響を及ぼして

いることが伺えた。自宅での夫娘、嫁、孫との化粧を介した会話の増加は化粧を通じて多世代との交流のきっかけとなる可能性がある。

以上のように化粧教室の長期効果として、気分の改善、主観的幸福感など精神的状態を良好にする可能性を示した。インタビューからは「化粧教室」が生活全体にも影響を及ぼしている可能性が伺えた。

5. 総括

化粧は短期的には心身のリラックス効果を、長期的には精神的な健康状態を良好にする効果があることを示した。これらの結果は化粧が高齢者の精神的活性化に寄与できる可能性を示している。これらの効果は自ら化粧をする能動的な化粧の方が優れていた。一方、化粧療法を行う介護ボランティアも満足感や達成感を示したが、統計的な検討はできなかった。

(参考文献)

- 1) 阿部恒之：エステティックの心理学的効果および東洋医学の関連について。Fragrance Journal Special Issue 10: 19-26, 1990.
- 2) 阿部恒之：リラクゼーション法としての化粧。現代エスプリ 311: 123-132, 1993.
- 3) 阿部恒之：スキンケアへの期待の返還と心理学的効果—容貌の演出・肌の健康・リラクゼーション 大坊郁夫(編) シリーズ：21世紀の社会心理学9 化粧行動の社会心理学。北大路書房：148-157, 2001.
- 4) 阿部恒之：ストレスと化粧の社会生理心理学。フレグランスジャーナル社：東京, 2002.
- 5) Awata S, Bech P, Yoshida S, Hirai M, Suzuki S, Yamashita M, Ohara A, Hinokio Y, Matsuoka H and Oka Y: Reliability and validity of the World Health Organization-Five Well-Being Index in the context of detecting depression in diabetic patients. Psychiatry and Clinical Neurosciences 61: 111-118, 2007.
- 6) Fukuhara S and Suzukamo Y: Manual of the SF-8 Japanese version : Institute for Health Outcomes & Process Evaluation Research, Kyoto, 2004.
- 7) 浜治世・日比野英子・藤田祐子：化粧による情動活性化の試み。日本心理学会第54回大会論文集：p714, 1990.
- 8) 畑山俊喜・丸山欣哉・平田 忠：美粧行為の心理的効果に関する研究Ⅱ：(1)問題・方法および行動観察。日本心理学会第51回大会発表論文集：398, 1987.
- 9) 肥田野直・福原真知子・岩脇三良 他：新版 STAI マニュアル。実務教育出版：東京, 2000.
- 10) 福田一彦・小林重雄：SDS 使用手引。三京房：京都, 1983.
- 11) 岩男寿美子・松井豊：化粧の心理的効用(Ⅲ)—化粧後の心理的变化。日本社会心理学会第2回大会発表論文集：128-129, 1984.
- 12) 伊波和恵：高齢者と「化粧療法」研究に関する考察および展望。Fragrance journal 27(9)：52-58, 1999.
- 13) 片桐敦子・斉藤功・真島一郎 他：【医療現場における医療従事者のストレス】医療従事者のストレスとその関連事項。ストレス科学 14: 39-43, 1999.
- 14) 近藤 勉・鎌田次郎：現代大学生の生きがい感とスケール作成。健康心理学研究 11: 73-82, 1998.
- 15) 許鳳浩・上馬場和夫・田川美貴 他：足部の押圧刺激による循環・呼吸・自律神経系の変化。東方医学 19(420): 1-12, 2004.
- 16) Lawton MP: The Philadelphia Geriatric Center Morale Scale: A revisions, J. of Gerontology 30 (1): 85-89, 1975.
- 17) Lorish CD and Maisiak R: The face Scale: brief, no verbal method for assessing patient mood. Arthritis Rheum 29: 906-909, 1986.
- 18) Miller LC and Cox CI: For appearances' sake. Public self-consciousness and makeup use. Personality and Social Psychology Bulletin 8: 748-751, 1982.
- 19) Sheikh JI and Yesavage JA: GDS: Resent evidence and development of a shorter version. Clinical Gerontology 56: 509-513, 1986.
- 20) 菅原健介：自意識尺度 (self-consciousness scale) 日本語版作成の試み。心理学研究 55: 84 - 188, 1984.
- 21) 浄土英一・山田嘉明・阿部恒之：美粧行為の心理的効果に関する研究Ⅱ：(2)EEGの結果。日本心理学会第51回大会論文集：399, 1987.
- 22) 下中順子・中里克治・権藤郷之・高山緑：日本版 NEO-PI-R, NEO-FFI 使用マニュアル。東京心理株式会社：東京, 2002.
- 23) 田畑 治・星野和美・佐藤朗子 他：青年期における孫・祖父母関係評価尺度の作成。心理学研究 67(5): 375-381, 1996.
- 24) 田川 泰・井口 茂・中野裕之 他：音楽療法とメラトニンの併用による循環動態と皮膚温度の解析 有効かつ十分なリラックス効果と求めて。長崎大学医学部保健学科紀要 16(2): 55-58, 2003.
- 25) 高橋 都：がん患者への「化粧」支援プログラムの日本への適用可能性に関する研究。コスメトロジー研究報告, 2003.
- 26) 谷口幸一・吉田靖基：【チーム医療におけるストレスとそのコントロール】老人福祉施設職員の介護ストレスに関する研究。ストレス科学 15: 82-88, 2000.

- 27) 山田嘉明・浄土英一・畑山俊喜：化粧行為の心理的効果に関する研究Ⅱ：(3)質問紙と作業検査の結果とまとめ. 日本心理学会第51回大会発表論文集：400, 1987.
- 28) 宇野賀津子・河合すみれ・大西尚之・谷都美子・西幹栄美・吉本美和・沢田学・青地脩・岸田綱太郎：老年者に対する化粧療法の効果. メンタルヘルス岡本記念財団研究助成報告集：9：21-24, 1997.
- 29) 山本真理子・松井豊・山成由紀子：認知された自己の諸側面の構造. 教育心理学研究, 30: 64-68, 1982.
- 30) 柳美紀・谷口加代・浜野亜由美・大久保まさ子：老人保健施設での化粧療法の試み. 日本リハビリテーション看護学会大会収録, 14：73-75, 2002.
- 31) 余語真夫・津田兼六・浜 治世 他：女性の精神的健康に与える化粧の効用. 健康心理学研究 3: 28-32, 1990.

口唇裂患者の化粧による外観変化と内面変化について

大阪大学大学院歯学研究科顎口腔病態制御学講座口腔外科学第一教室

古郷 幹彦

As a final treatment, we used a make-up for cleft lip patients. In this study, we analyze the effect on the mental stress of cleft lip patients. Professional make-up treatment was performed on the patients face. The five types of stress (recognition, body, life, social, total) were evaluated before make-up and after. The surgical lines on the upper lip were almost diminished with the professional make-up. Higher stress was recognized before make-up treatment. Each type of stress was reduced with make-up treatment.

1. 緒言

大阪大学歯学部附属病院第一口腔外科で初診した1977年から2002年までの25年間の口唇裂患者は1681人である。いわゆる口唇口蓋裂患者の75%であった。うち口蓋裂を合併するものは約70%であった。口唇口蓋裂は我が国においては約600人に1人の割合で発生する疾患であり¹⁾、先天異常の中でもその発生数は多いとされる。古くは口唇裂患者は手術痕跡が癍痕として目立ち、さらに口蓋裂を合併していれば著しい上顎の発育不全も審美性に障害を与えた。そこで口唇裂初回手術においてはミラード法・テニソン法をベースにしながら様々な改良が加えられてきた。さらに顎裂部への二次的骨移植術、顎変形の著しい症例には顎骨骨きり術、その他、口蓋裂の手術法の改良など顎の形態の著しい改善も行われてきた。ことに顎骨への手術的アプローチ法も仮骨延長術などで画期的に進歩したことなどから、顔面形態という点ではかなり改善した。このような近年の医歯学の発達により口唇口蓋裂患者の治療に関しては形態的にはかなり審美的改善ができるようになった。また縫合法についても新たな吸収性縫合糸の開発などによって癍痕が著しく目立つこともなくなってきた。しかしながら手術癍痕を完全に消失させるところまでは至っておらず、微細にしる残存することはやむをえない。患者はこの点について精神的苦痛を大小の違いはあるが感じていることは事実である。先天異常を顔面に持つことは社会生活上、本人に精神的ストレスをかけることはしばしばと思われる。このような事態をいかに把握するかは医療を行う上で重要なポイントともいえる。一方近年の化粧の技術の発達は目覚し

いものがあり、皮膚表面の癍痕を肉眼的に不明瞭にすることを可能にした。少なくとも化粧をすれば口唇の癍痕は見えなくすることができる。このことが患者の精神的ストレスを改善できる可能性は十分にあると考える。そこで本研究は化粧を用いることにより患者の口唇裂癍痕を消失させることが患者の内面に与える効果について検討した。

2. 方法

大阪大学歯学部附属病院第一口腔外科で総合治療を受けた口唇口蓋裂患者のうち口唇裂を有する22名に対し、化粧の指導を行った。患者の内訳は10歳代6人、20歳代12人、30歳代3人であった。

大阪大学歯学部附属病院の約20年前の口唇口蓋裂治療のスケジュールは

初回口唇形成術 3ヶ月

初回口蓋形成術 1歳2ヶ月から1歳6ヶ月

(言語治療:顎口腔機能治療部にて良好と判断されるまで)

(歯列矯正治療:永久歯萌出以後)

顎裂部二次骨移植術 10歳から13歳

口唇外鼻二次修正術 16歳から18歳

であった。

全員が口唇外鼻二次修正術まで修了していた。

内面審査

内面審査は大阪大学歯学部附属病院で患者に直接承諾を得たものである。熊本大学式ストレス尺度を用い、別紙アンケート調査を指導直前と指導直後に行った。患者個人が直接質問シートに記入する方式で行った。

患者ストレスを認知的ストレス、身体的ストレス、社会的ストレス、生活的ストレス、総合的自己評定的ストレスに分け、それぞれの項目を無秩序に並ぶように質問項目を以下のごとく設定した。

それぞれのストレスについて化粧指導前と指導後で比較し内面における化粧の効果について検討した。

評価は勝俣瑛史氏・篠原弘章氏による熊本大学式ストレ



The effect of makeup on psychological status of cleft lip patients.

Mikihiko Kogo

First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Osaka University Graduate School of Dentistry

質問シート

	あ て は ま る	非 常 に ま る	あ て は ま る	あ て は ま る	あ ま っ た く ま る
01. 美しい花をみても、美しいと感じられない	4	3	2	1	
02. 自分のスタイル（体型）や容貌のことがとても気になる	4	3	2	1	
03. 人に自分の心（気持ち）を開くことができない	4	3	2	1	
04. 何かに挑戦したり、何かをやろうとする意欲がわかず、「何もしたくない」と思う	4	3	2	1	
05. 自分は「人から愛されていない」と思う	4	3	2	1	
06. 自分の考えや気持ちを十分に言葉で言う（表現する）ことができない	4	3	2	1	
07. 胃や心臓などの内臓器官の調子が悪いと感じる	4	3	2	1	
08. 人前で、もっとうまくしゃべれたらなあと思う	4	3	2	1	
09. 何かしようとしても、いざとなると実行することができない	4	3	2	1	
10. 自分は誰からも愛されていない気がする	4	3	2	1	
11. 物事を判断したり、自分の考えを決めることができない	4	3	2	1	
12. 性的問題（月経、マスターベーション、性器の問題など）とても気になる	4	3	2	1	
13. 人に親しみを感じられない	4	3	2	1	
14. 何かをしようとしても、すぐいやになり続けられない気がする	4	3	2	1	
15. 自分は「人から必要とされていない」と思う	4	3	2	1	
16. 何かしようとしても気が散って、集中することができない気がする	4	3	2	1	
17. 歩いて買い物に出かけたり、散歩したり、スポーツをしたりなど、体を動かす気持ちになれない	4	3	2	1	
18. 人を信じられないと思う	4	3	2	1	
19. やるべき事があるのに、なまけてしまう気になる	4	3	2	1	
20. 自分のことを「人にわかってもらえない」と思う	4	3	2	1	
21. 何か考えると、いろいろな考えが浮かばない	4	3	2	1	
22. 頭痛、腹痛、発熱、吐き気、体のだるさ、肩こりがあり、つらい	4	3	2	1	
23. 人と一緒に何かするのは苦痛（いや）だと思う	4	3	2	1	
24. 朝、起きなければならない時間になっても起きられない気がする	4	3	2	1	
25. 「自分はだめな人間だ」と思う	4	3	2	1	
26. 何か覚えようとしても、なかなか覚えられないと思う	4	3	2	1	
27. 心配事があって、よく眠れない気がする	4	3	2	1	
28. 何かするとしても、人と一緒にしたくないと思う	4	3	2	1	
29. いろいろなことがまんでできない	4	3	2	1	
30. 自分に自信が持てない	4	3	2	1	
31. 今のままの成績や評価ではだめだと思う	4	3	2	1	
32. 表情や動作が固いと人から言われる	4	3	2	1	
33. 人と話したくないと思う	4	3	2	1	
34. 病気以外の理由で、学校（会社・習い事など）休みたい	4	3	2	1	
35. 楽しい事がほとんどないと思う	4	3	2	1	

ス尺度（インターネット公開）に沿って行った²⁾（表1）。それぞれのストレスについて化粧指導前と指導後で比較し内面における化粧の効果について検討した。認知的ストレス、身体的ストレス、社会的ストレス、生活的ストレス、総合的ストレスについて各々メイク前後での変化を統計学的に検定した。検定は paired-t test（パラメトリック検定で対応のある t 検定）を用い危険率は5%に設定した（両側検定）。

表 1

問題番号		スコア		認知的 ストレス		身体的 ストレス		社会的 ストレス		生活的 ストレス		総合的・自己知的 ストレス												
01	4	3	2	1	02	4	3	2	1	03	4	3	2	1	04	4	3	2	1	05	4	3	2	1
06	4	3	2	1	07	4	3	2	1	08	4	3	2	1	09	4	3	2	1	10	4	3	2	1
11	4	3	2	1	12	4	3	2	1	13	4	3	2	1	14	4	3	2	1	15	4	3	2	1
16	4	3	2	1	17	4	3	2	1	18	4	3	2	1	19	4	3	2	1	20	4	3	2	1
21	4	3	2	1	22	4	3	2	1	23	4	3	2	1	24	4	3	2	1	25	4	3	2	1
26	4	3	2	1	27	4	3	2	1	28	4	3	2	1	29	4	3	2	1	30	4	3	2	1
31	4	3	2	1	32	4	3	2	1	33	4	3	2	1	34	4	3	2	1	35	4	3	2	1
合計 得点					合計 得点					合計 得点					合計 得点					合計 得点				

3. 結果

認知的ストレスについて、メイク前には対象者の平均が12.36であったのに対してメイク後には11.27と減少し、統計学的検定の結果 $p=0.009$ (<0.05) で統計学的有意に認知的ストレスはメイク後減少した。

次に身体的ストレスについて、メイク前には12.22、メイク後には10.32と減少し、統計学的検定の結果 $p=0.001$ (<0.05) で、統計学的有意差を認めた。

社会的ストレスについて、メイク前には11.82、メイク後には10.27と減少し、統計学的検定の結果 $p=0.01$ (<0.05) で、統計学的有意差を認めた。

生活的ストレスについて、メイク前には12.05、メイク後には10.27と減少し、統計学的検定の結果 $p=0.005$ (<0.05) で、統計学的有意差を認めた。

総合的ストレスについて、メイク前には11.81、メイク後には10.09と減少し、統計学的検定の結果 $p=0.001$ (<0.05) で、統計学的有意差を認めた。

すなわち統計学的検定の結果全ての項目で統計学的有意にメイク後ストレス値が減少した。平均値の差を見ると、リハビリメイクによって、認知的ストレスで1.09、身体的ストレスでは1.90、社会的ストレスでは1.55、生活的ストレスでは1.78、総合的には1.72ポイントのストレス軽減を認めた。これを化粧前のそれぞれのストレスを1.0としてその変化率で示すと図1のようになる。変化率では身体ストレスが84.3%と最も縮小し、生活ストレス、総合的ストレス、社会的ストレス、認知的ストレスの順に縮小した。最も変化の少なかった認知的ストレスで91.5%であった。化粧後の年代別ストレスの平均値を図2に示す。化粧後のストレス残留は20歳代が最も高く11前後で、10歳代、30歳代の順に少なくなった。30歳代で9前後であった。

ストレス変化率

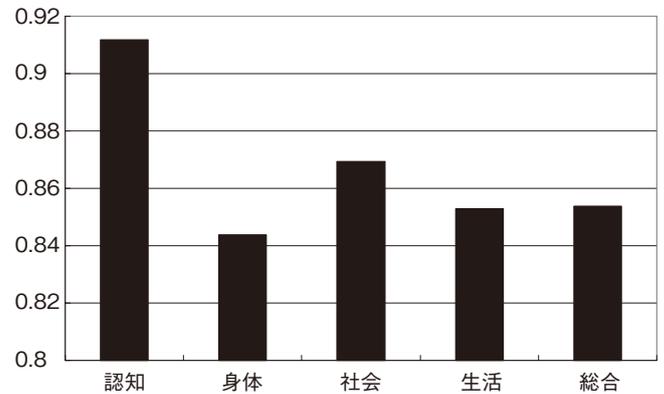


図1：化粧による各ストレスの変化率

化粧後、身体的ストレスが最も減少し、生活的ストレス、総合的ストレス、社会的ストレス、認知的ストレスの順に減少した（化粧前の各ストレスを1.0とする）。

年代別ストレス平均値

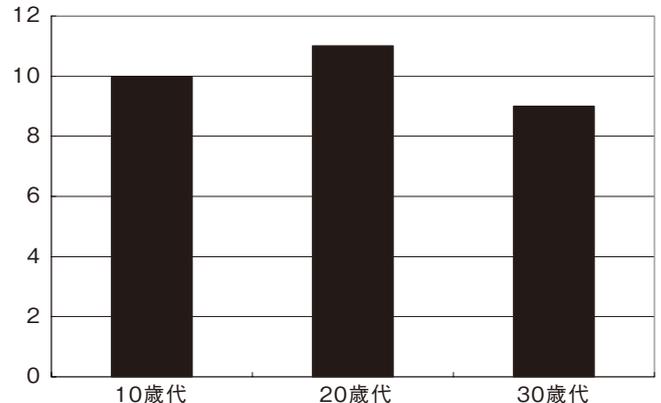


図2：化粧後の年代別ストレス平均値

化粧後、20歳代がストレスが他と比べてわずかではあるが最も高く、10歳代、30歳代の順であった。

4. 考 察

口唇口蓋裂の中でも口唇裂を有する患者は顔面にわずかも治療の痕跡を残すことから自分自身の口唇の状態に神経質になっていることが少なくない。このことが患者をストレスという形で精神的に圧迫していることは十分に考えられる。この点は口唇裂を有しない口蓋裂単独患者とは大きく違うものと推定される。

顎発育をコントロールでき、咬合の確立が成功した患者は口唇の癒痕を除けば数メートルはなれば形態は殆ど正常に近い。今回の研究でそこに専門のメイクを施すと口唇裂の痕跡が全くと言ってよいくらい素人的な目では正常と判別がつかなくなった。少なくとも化粧をしている間は口唇裂をもたない健常人と同じ外見と言ってよい。化粧によって我々医療側も口唇裂の術後癒痕がいかにか人として意味のないものであるか本人に見せることができることに気づいた。しかしそれでもなお患者本人のストレスは全項目でいまだ平均約10であったことは特筆に値する。

ストレスを研究する際に、人のストレスの程度を計測することは非常に難しい。客観的に評価を行うことは今後の患者の検討を行ううえで非常に重要である。日常のストレスを熊本大学方式は認知的ストレス、身体的ストレス、社会的ストレス、生活的ストレス、総合的自己評的ストレスに分類している。本研究結果では認知的ストレス、身体的ストレス、社会的ストレス、生活的ストレス、総合的自己評的ストレスのすべての項目で化粧前は平均が12前後であり、化粧後では全ての項目で平均が10前後であった。また全ての項目で有意差をもってストレスが軽減された。このことは化粧が単に口唇の傷を見えにくくするというだけでなく、患者の持つストレスの減少に役立つことを示している。数値的には1以上2以下の差であった。変化率で言うと身体ストレスが最も影響を受け84%、認知ストレスが最も変化が少なく92%であった。これを僅差と考えるか否かは様々な意見があると思う。しかし、2つのアンケートの時間差がおよそ1時間以内である。すなわち変化のしにくい短時間内の差であることから化粧はある一定の効果を患者の内面にもたらすと結論付けることができる。また認知的ストレス、身体的ストレス、社会的ストレス、生活的ストレス、総合的自己評的ストレス全てで有意差があったことは見方を変えれば口唇裂という事実は認知的ストレス、身体的ストレス、社会的ストレス、生活的ストレス、総合的自己評的ストレスという全てのストレスに影響していることを示すものである。今後の治療においてはこれら患者のストレスに対する配慮が重要となる。

短時間内に同じ質問をすることは質問と答えの記憶もあり通常結果は変化しにくい。月あるいは週を隔てればゆっくりとした心の変化から明確な差となって現れることも考

えられる。この場合、その間に別の因子が介在しやすくなることも考えねばならない。したがって研究を複雑なものにしてしまう可能性が考えられる。本研究では間に介在する他の因子を可及的に排除することが研究の端緒としては必要であった。

口唇裂という疾患は先天異常であることから癌などとは違い、形態的には問題なくなっても患者は疾患の治療ということ認識できないことが多い。口唇裂という疾患を一生身に持っていると考えることが多い。そのことが日常の多くの面にストレスとなって現れる。しかし化粧という手技で少しでも確実にストレスが軽減することが本研究によって明らかになった。すなわち傷が見えることのストレスが化粧で軽減したと考えるのが適当であろう。

化粧後の年代別ストレスは20歳代が最も高く、10歳代、30歳代の順であった。これは30歳代が最も化粧への理解があるためかもしれないが今後の検討課題となった。10歳代の女性は化粧を始めたばかりか、これから始めるところであり純粋さをもって協力してくれたのに対し、20歳代の女性は自己の方法との葛藤があったかもしれないが、それぞれの年代の女性による対応の違いは特筆すべきであろう。

現在までの治療技術の進歩により機能的にも形態的にも著しく改善できるようになった。しかしながら患者の心に踏み込むことはまだできていないように感じている。患者が口唇にあまり気を使うあまり、眉や頬などの所への日頃の配慮が健常人と比べて少なくなっている症例も多く認められた。また外観においても今まで眼周辺に視点を置くことがいかに顔貌に変化を及ぼすかを認識できなかった患者もいた。現在化粧も進歩し10代後半から20代の女性ならば今は常識となりつつある眉や頬の化粧に視点が行っていなかった。このことから患者の口唇への執着がいかに強いのかも伺える。すなわち、心の顔の視点を口唇から離すこと、さらに外観のポイントを口唇から離すことを化粧は可能にした。このことがストレスの解消へとつながったことも考えられる。本研究により化粧は口唇だけでなく眼瞼周辺や眉、頬など患者自身の美しさを認識させる有効な手段であることに患者だけでなく医療を行う我々に気づかせる有効な手段であることを認識できた。また今後男性の化粧についても検討を行うことが必要と考えた。

5. 総 括

口唇口蓋裂治療の最終段階で化粧を行うことによる精神面の効果について検討し以下の結果を得た。

1. 口唇口蓋裂の医療的治療後でも全体的にストレスが高いことが示された。
2. 化粧により認知・身体・社会・生活・総合の各ストレスが84%から91%程度に有意に減少することが明らか

かとなった。

3. 口唇口蓋裂患者に対する化粧は患者の精神面で非常に有効であることが示された。

謝 辞

本件を遂行するに当たり、REIKO KAZUKI 事務所のかづききれいこ氏、大阪大学歯学部附属病院第一口腔外科口唇口蓋裂専門外来担当の先生方、同看護部長西尾善子氏、同副看護部長 池 美穂氏に多大なるご協力を頂いたことに御礼申し上げますとともに、REIKO KAZUKI 事務所のスタッ

フの皆様、大阪大学歯学部附属病院第一口腔外科の教室員の皆様のご協力に深く感謝いたします。

(参考文献)

- 1) 足立忠文、古郷幹彦、岡田 元、ほか6名：大阪近郊における唇裂口蓋裂の発生について。大阪大学歯学雑誌、41：240 - 247, 1996.
- 2) 篠原弘章・勝俣暎史：熊大式コンピタンス尺度の開発と妥当性 (1): 小学生の「感情・態度」および「希望」との関係。熊本大学教育学部紀要, 49, 93-108, 2000.

化粧品の香料がヒト自律神経系に及ぼす生理学的効用の研究

藤田保健衛生大学医学部生理学

河合 房夫

In the present experiment, effects of smelling cineole, an odorant, on the human autonomic nervous system were investigated by using a physiological engineering method such as the power spectrum analysis of human heart rate variability (HRV). When subjects smelled cineole, subject's heart rate subsequently decreased, and slightly tended to be larger than the heart rate of the control condition. However, this difference was not statistically significant. In addition, the smell of cineole changed neither the sympathetic nerve index nor the parasympathetic nerve index clearly. Therefore, those results may suggest that only smelling cineole does not markedly affect human autonomic nerve system.

1. 緒言

化粧品には、様々な香料が利用されている。近年、香りが人に及ぼす影響が注目され始め、急速にその研究が進んでいる。特に、アロマセラピーはマスコミなどの影響もあり、多くの人を知る治療法となりつつある。このアロマセラピーには、香りによって気分をリラックスさせ、ホルモンの分泌を調整する効果などがあると考えられている。ハーブ系精油の主成分である 1,8-cineole (シネオール) には、気管平滑筋弛緩作用、呼吸器系・消化器系分泌腺刺激作用¹⁾、血糖低下作用^{1,2)} など様々な効果があると言われている。しかし、その効果が、実験的に裏付けられているのは交感神経活動の変化によると考えられる気管平滑筋弛緩作用³⁾ だけである。

cineole などの匂い物質は、嗅上皮に存在する嗅細胞と呼ばれる神経細胞により受容される⁴⁻¹⁵⁾。嗅細胞には繊毛があり、この部位に匂い分子と結合する受容体が存在する。匂い分子は、受容体に結合することにより受容器電位を発生させる。匂い分子により発生した脱分極性受容器電位は、嗅細胞の樹状突起を介して細胞体へと伝わり、細胞体あるいは軸索において活動電位が発生する。嗅細胞細胞体の原形質膜には、膜電位依存性の Na⁺ チャンネル、Ca²⁺ チャンネル、及び K⁺ チャンネルなどが存在し、活動電位の発生に寄与する¹⁶⁻¹⁸⁾。発生した活動電位が軸索を介して嗅球へと伝達されることにより、匂いの情報が脳へと伝わり処理される(図1)。

生理的な心拍周期(心周期)のゆらぎは、自律神経に



A research on physiological effects of odorants in cosmetics on human autonomic nervous system

Fusao Kawai

Department of Physiology, School of Medicine, Fujita Health University

よって媒介されると考えられている¹⁹⁾。心臓に自律神経遮断薬を投与すると心拍のゆらぎが消失し、メトロノームのような規則正しいリズムを刻むことが知られている¹⁹⁾。このような心周期のゆらぎは、洞結節(心拍リズムを決める場所)を支配する自律神経活動のゆらぎに由来しており、心拍変動と呼ばれる。心拍数は、交感神経と副交感神経(迷走神経)によって拮抗的に支配されている。これら両神経活動のバランスは心拍数に反映され、そのゆらぎである心拍変動はそのバランスの揺らぎを反映する¹⁹⁾。したがって、心拍変動には心拍数からは得られない純粋な心臓副交感神経(迷走神経)性心拍数機能調節機構に関する情報が存在する¹⁹⁾。

cineole の作用の中には自律神経活動に着目すると相反するものがあるため、本研究では、cineole が実際にヒトにどのような効果を与えるかを、心電図から解析した。具

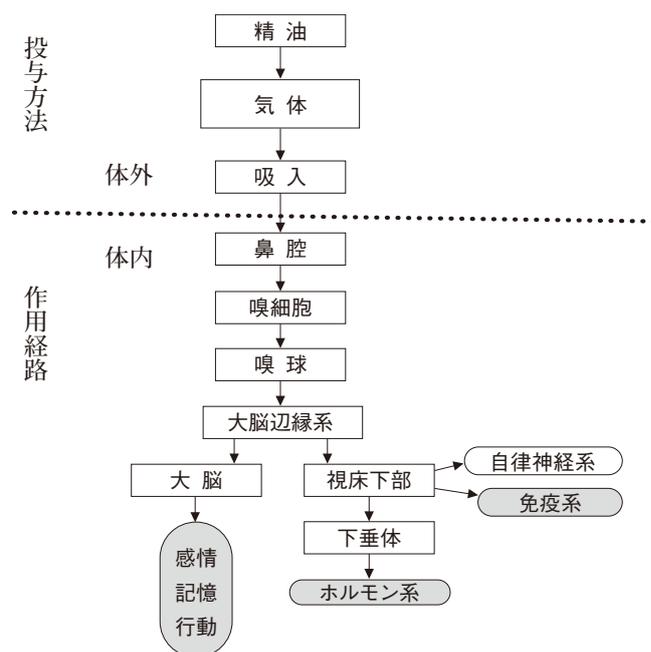


図1 精油(匂い物質)を吸入した時の生理学的作用

体的には、心拍変動パワースペクトル解析法等の生理学的手法を用い、cineoleの香りによる交感神経系及び副交感神経（迷走神経）系への影響を解析した。また、香りの種類によっては、覚醒感やリラックス感などを起こさせるようなものもあり、空調を利用して香りを職場に取り入れることにより、疲労感が減少し、会議の効率の上昇やVDT（video display-terminal）作業での作業能率を高めたという報告もある²⁰⁻²²。そこで、本研究では、心電図測定中に暗算課題を課し、その結果からcineoleの香りによる作業能率の変化についても解析した。

2. 実験

匂い物質として1,8-cineoleを用いた。cineoleは、オキサイドという化学物質に分類される。オキサイドは酸素基が2つの炭素基にはさまれた形になっており、特徴的なリングを形成している¹。cineoleは、ハーブ系精油の主成分でユーカリ・グロブルス（75%）、ニアウリ・シネオール（50%）、ローズマリー・ベルベノン（50%）などに多く含まれる²³。また、構造異性体が存在し、今回用いた1,8-cineole（図2A）はハーブ類に、1,4-cineole（図2B）は柑橘類に含まれる²⁴。

1,8-cineoleをシャーレに100 μ l（不快に感じない量）滴

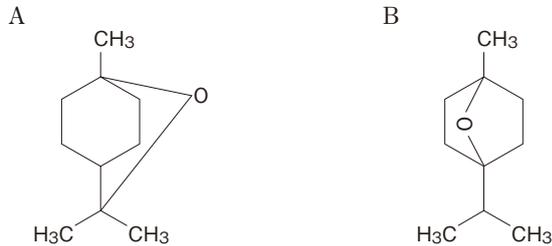


図2 1,8-cineole及び1,4-cineoleの構造式
A：1,8-cineole
B：1,4-cineole
本研究では1,8-cineole（A）を用いた。



図3 暗算課題に用いたソフトウェア（ソフト名：100ますたー，vectorフリーソフト）

下し、被験者から約50cmの位置に呈示した。本実験では、心電図測定260秒と休憩60秒を1セットとして、cineole呈示前に2セット、呈示中に2セット、呈示後に3セットの計7セットの測定を行った。また、コントロールとして無臭状態で7セット測定した。なお測定中、被験者にはパソコンを用いて簡単な暗算（ソフトウェア名：100ますたー，Vectorフリーソフト）を行ってもらった（図3）。それぞれの状態において、健康な21～23歳の女性延べ15人分の心電図（単極胸部誘導V5）を測定した。

自律神経活動の測定には、胸部誘導法により測定した心電図のR波（図4A）ピーク毎の間隔（R-R間隔、図4B）の解析により自律神経活動を測定できる心拍変動パワースペクトル解析法を用いた^{19,25}。心電図の測定、及びR-R間隔抽出には、パラマテック（株）製の心電計EP-202（改良品）、及びソフトウェアR-R間隔収集システム（特注品）を用いた。

R-R間隔収集システムでR-R間隔を検出した後、高速フーリエ変換（FFT）し、心拍変動パワースペクトルを解析した。パワースペクトルの低周波数成分（Lo：0.04～0.15 Hz）、高周波数成分（Hi：0.15～0.4 Hz）、Total（Lo成分とHi成分の和：自律神経全体の活動の目安となる）の各スペクトル積分値と心拍数の時間変化を解析した。

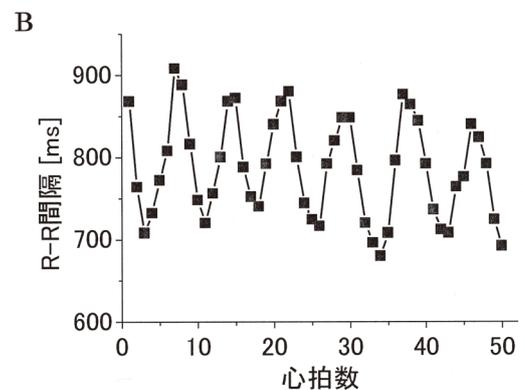
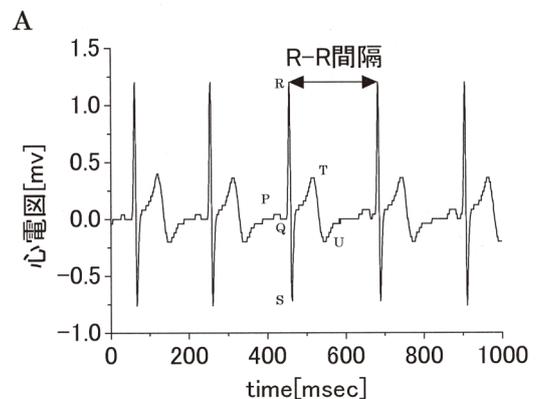


図4 コントロール（無臭状態）の心電図及びR-R感覚の変化
A：コントロールの心電図
B：R-R間隔の時間変化

本実験では、Lo/Hi を交感神経活動指標、Hi/Total を副交感神経活動指標として用い、これらの指標の変化から cineole が自律神経に与える影響を解析した。

なお、FFT 及び t 検定の解析には、ソフトウェア Origin7 (OriginLab Co.) を、FFT 時の窓関数には、Hanning 窓を用いた²⁶⁾。

3. 結果

まず、コントロール実験として無臭状態で心電図を測定した(図4A)。心電図には、P波、Q波、R波、S波、T波、及びU波と呼ばれる成分が存在する²⁵⁾。これらの波形成分のうち、R波同士の間隔はR-R間隔と呼ばれ、図4Aの矢印の間が1回の拍動のR-R間隔に相当する²⁵⁾。図4Bは、無臭状態のR-R間隔の時間的変化を示す。“緒

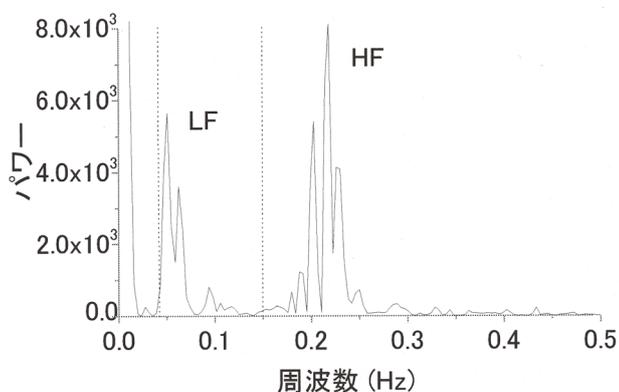


図5 交感神経と副交感神経(迷走神経)の心拍数調節機能におけるパワースペクトルの差異
LF (0.04 ~ 0.15Hz), HF (0.15Hz以上)は、それぞれ低周波成分、高周波成分を表す。

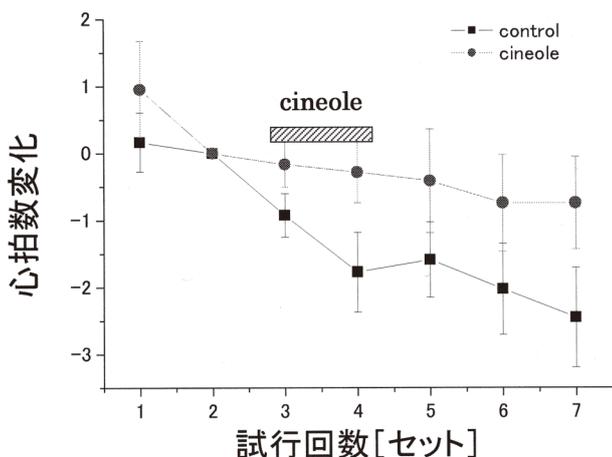


図6 cineoleの香りが心拍数に及ぼす影響
四角印はコントロール状態、丸印はcineole呈示状態の平均値。各縦棒は標準誤差を示す。cineoleの香りによる心拍数変化を調べるため、cineole呈示直前(第2セット目)の心拍数の平均値を0にシフトした。すなわち、縦軸は2セット目を基準とした各セットにおける心拍数の変化を表す。

言”で記述したように、心周期にはこのような心拍変動と呼ばれるゆらぎが見られ、これは洞結節(心拍リズムを決める場所)を支配する自律神経活動のゆらぎに由来している¹⁹⁾。

図5は、無臭状態(コントロール状態すなわち標準状態)における交感神経と副交感神経(迷走神経)の心拍数調節機能におけるパワースペクトルである。心拍変動パワースペクトルには、低周波数成分(LF, 0.04 ~ 0.15 Hz)と、高周波数成分(HF, 0.15 Hz以上)の2つの成分が存在する¹⁹⁾。

次に、cineoleの香りが心拍数に及ぼす影響を測定した(図6)。図6中の3、4セット目においてcineoleの香りを呈示した。四角印(コントロール状態)及び丸印(cineole呈示状態)は、健康な21 ~ 23歳の女性延べ15人の平均値である。図6では、cineoleの香りによる心拍数変化を解析するため、cineole呈示直前(第2セット目)の心拍数の平均値を0にシフトした。すなわち、図6の縦軸は2セット目を基準とした各セットにおける心拍数の変化を表す。cineole呈示状態の方が全体的に心拍数が高い結果と

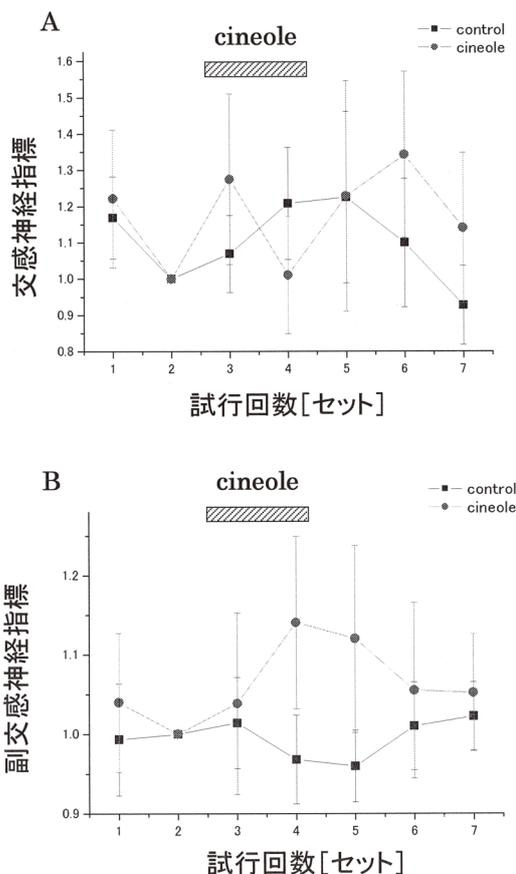


図7 cineoleの香りが交感神経指標及び副交感神経指標に及ぼす影響
A: 交感神経指標, B: 副交感神経指標。四角印はコントロール状態、丸印はcineole呈示状態の平均値。各縦棒は標準誤差を示す。

なった。また、両状態とも経時的に低下したが、cineole 呈示状態の方が、その低下率は小さくなる傾向にあった。この変化が有意であるかを調べるため、0.05 レベルにおいて t 検定を行った。その結果、4 セット目では $p = 0.07$ で有意差に近い値を示した (1 セット目より、 $p = 0.33, 0.46, 0.12, 0.07, 0.22, 0.21, 0.11$)。

次に、cineole の香りが交感神経指標 (図 7A) 及び副交感神経指標 (図 8B) に及ぼす影響を解析した。図 7 では、図 6 の心拍数解析時と同様に、cineole の香りの効果を調べるため、香りを呈示する直前 (2 セット目) の各指標の平均値を 1.0 にシフトした。交感神経指標 (図 7A) においては、1, 3, 6, 7 セット目では、cineole 呈示状態の方が平均値は高かった。しかし、t 検定の結果、0.05 レベルにおいて有意差は見られなかった (1 セット目より、 $p = 0.80, -, 0.39, 0.39, 0.99, 0.40, 0.33$)。副交感神経指標 (図 7B) においては、4 セット目と 5 セット目で、コントロール状態に比べて cineole 呈示状態の方が平均値は高く、大きな差が見られた。しかしながら t 検定の結果、0.05 レベルにおいて有意差は見られなかった (1 セット目より、 $p = 0.68, -, 0.84, 0.15, 0.18, 0.70, 0.72$)。

さらに、暗算課題の正答率の変化から cineole の香りが作業能率に及ぼす影響について検討した (図 8)。なお、暗算課題の問題数は、被験者それぞれにおいて 1 セットの問題数を測定前に予め設定した (平均: 1 セット 172 問)。したがって、セット毎で問題数が異なるということはない。第 1 ~ 6 セット目では cineole 呈示状態の方が正答率は高い結果となった。この差が有意であるかを調べるため、0.05 レベルにおいて t 検定を行った。その結果、6 セット目では、 $p = 0.05$ で有意差が見られた (1 セット目より、 $p = 0.46, 0.37, 0.84, 0.93, 0.66, 0.05, 0.79$)。

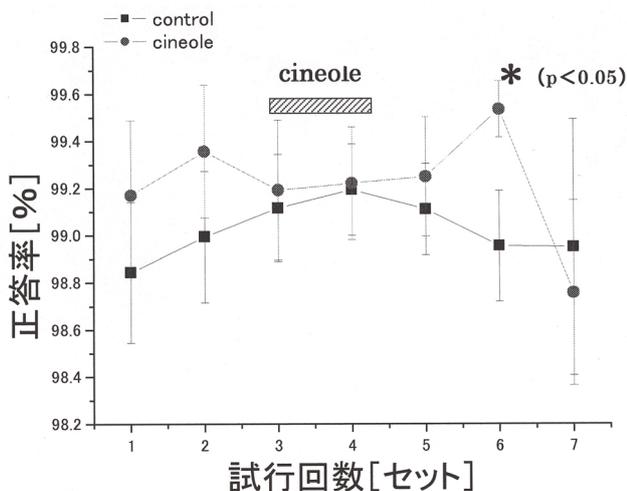


図 8 cineole の香りが作業能率 (暗算課題) に及ぼす影響
四角印はコントロール状態、丸印は cineole 呈示状態の平均値。各縦棒は標準誤差を示す。

4. 考察

cineole の香りは自律神経 (交感神経指標・副交感神経指標) にはほとんど著明な変化を引き起こさなかった。しかしながら、cineole 呈示中は心拍数の低下率が小さくなっており、また、心拍数増加では交感神経活動亢進が、心拍数減少では副交感神経活動亢進が関与することから、cineole 呈示で交感神経が活性化する傾向にある事が推測される。さらに、パソコン上での暗算課題において第 6 セット目に有意差が見られた事から、cineole の香りにより、作業能率が向上したものと考えられる。

心拍数変化において、第 3 セット目に比べ 4 セット目の方がより強く効果が現れていた事から、cineole の呈示時間を長くすることや、その濃度を高くすることにより、自律神経 (交感神経指標・副交感神経指標) にも明確な変化が現れる可能性があると考えられる。

謝 辞

本研究に対して研究助成を賜った財団法人 コスメトロジー研究振興財団に厚く感謝致します。心電計の改良および R-R 間隔の検出ソフトウェアを快くご提供頂いたパラマテック(株)開発部 佐伯俊英氏に謝意を表します。また、実験に協力して頂いた藤田保健衛生大学 衛生学部 大日方千恵さん、岡田絵美さんに感謝します。

(引用文献)

- 1) 川端一永, 鮫島浩二, 小野村健太郎, “医療従事者のためのアロマセラピーハンドブック”, メディカ出版, 大阪, 1999. 32-33
- 2) Holmes P : The Energetic of Western Herbs. Vol.1. Artemis, Boulder, USA, 1989.
- 3) Coelho-de-Souza LN, Leal-Cardoso JH, de Abreu Matos FJ, Lahlou S, Magalhaes PJ, “Relaxant effects of the essential oil of Eucalyptus tereticornis and its main constituent 1,8-cineole on guinea-pig tracheal smooth muscle.”, *Planta Med*, 71(12):1173-1175, 2005.
- 4) Kawai, F., Kurahashi, T. and Kaneko, A., “T-type Ca^{2+} channel lowers the threshold of spike generation in the newt olfactory receptor cell”, *Journal of General Physiology*, 108: 525-535, 1996.
- 5) Kawai, F., Kurahashi, T. and Kaneko, A., “Nonselective suppression of voltage-gated currents by odorants in the newt olfactory receptor cells”, *Journal of General Physiology*, 109: 265-272, 1997.
- 6) Kawai, F., Kurahashi, T. and Kaneko, A., “Adrenaline enhances odorant contrast by modulating signal encoding in olfactory receptor cells”, *Nature*

- Neuroscience*, 2: 133-138, 1999.
- 7) Kawai, F., "Simulation analysis of effects of adrenaline on spike generation in olfactory receptor cells", *Chemical Senses*, 24: 701-704, 1999.
 - 8) Kawai, F., "Odorants suppress T- and L-type Ca^{2+} currents in olfactory receptor cells by shifting their inactivation curves to a negative voltage", *Neuroscience Research*, 35: 253-263, 1999.
 - 9) Kawai, F. and Miyachi, E., "Odorants suppress voltage-gated currents in retinal horizontal cells in goldfish", *Neuroscience Letters*, 281: 151-154, 2000.
 - 10) Kawai, F. and Miyachi, E., "Direct suppression by odorants of cyclic nucleotide-gated currents in the newt photoreceptors", *Brain Research*, 876: 180-184, 2000.
 - 11) Kawai, F. and Miyachi, E., "Modulation by cGMP of the voltage-gated currents in newt olfactory receptor cells", *Neuroscience Research*, 39: 327-337, 2001.
 - 12) Kawai, F. and Miyachi, E., "Enhancement by T-type Ca^{2+} currents of odor sensitivity in olfactory receptor cells", *Journal of Neuroscience*, 21: RC144 (1-5), 2001.
 - 13) Kawai, F. "Ca²⁺-activated K⁺ currents regulate odor adaptation by modulating spike encoding of olfactory receptor cells", *Biophysical Journal*, 82: 2005-2015, 2002.
 - 14) Ohkuma, M., Kawai, F., and Miyachi, E.-I. "Direct suppression by odorants of ionotropic glutamate receptors in newt retinal neurons", *Journal of Neural Transmission*, 109: 1365-1371, 2002.
 - 15) Narusuye, K., Kawai, F., Matsuzaki, K., and Miyachi, E.-I. "Linalool suppresses voltage-gated currents in sensory neurons and cerebellar Purkinje cells", *Journal of Neural Transmission*, 112: 193-203, 2005.
 - 16) 河合房夫, 倉橋隆, "嗅覚器", *生体の科学*, 47(5), 482-485, 1996.
 - 17) Narusuye, K., Kawai, F., and Miyachi, E., "Spike encoding of olfactory receptor cells". *Neuroscience Research*, 406: 407-413, 2003.
 - 18) 河合房夫, "ハーブの香りを用いた臨床治療の神経生理学的研究", *Aroma Research*, 22, 122-129, 2005
 - 19) 早野潤一郎, "心拍変動による自律神経機能解析", 循環器疾患と自律神経機能, 71-109, 2001.
 - 20) 関根幸恵, 寺門正顕, 山岡淳, ケミリー園子, "女性の月経周期と香り—音の長短の弁別課題作業に及ぼす影響—", *アロマサイエンス シリーズ 21 ⑦ 香りの機能性と効用*, 13-14, 2001.
 - 21) 岩橋基行: *労働の科学*, 47 (7), 364 (1992)
 - 22) 岩橋基行: *aromatopia*, 15, 35 (1996)
 - 23) 川端一永, 鮫島浩二, 小野村健太郎, "医療従事者のためのアロマセラピーハンドブック", 173,150,196, 1999.
 - 24) 川井悟, "カンキツ類精油成分のがん抑制効果", *アロマサイエンス シリーズ 21 ⑦ 香りの機能性と効用*, 286, 2003.
 - 25) 熊田衛, 瀬山一正 "心電図", *標準生理学* 499-509, 2000.
 - 26) 白井支朗 "生体信号のスペクトル推定", *生体信号処理の基礎* 107-126, 1985.

皮膚ボディイメージ評価尺度 Cutaneous Body Image Scale(CBIS) 日本語版の作成

東京女子医科大学附属女性生涯健康センター

檜垣 祐子

Cutaneous body image is defined as the individuals' mental perception of the appearance of their skin, hair, and nails. The concept of cutaneous body image is an important psychodermatological element both in skin diseases that can affect the patients' appearance and in body dysmorphic disorders. To measure individuals' cutaneous body image, practical and accurate instrument is necessary. In this study, we translated into Japanese, Cutaneous Body Image scale, 7-item instrument originally created by Gupta et al. using forward- and back-translation method. Six bilingual persons whose primary language was Japanese translated the instrument into Japanese and produced a unique translation by consensus. Two bilingual persons whose primary language was English carried out back-translations of the first Japanese version. The original Canadian author of the instrument reviewed both of the first back-translations. Four doubtful items required a second back-translation to reach satisfactory agreement with the original instrument. The Japanese version was pre-tested in a pilot group composed of Japanese adults with and without skin diseases and revealed to be comprehensive and have no problematic item for adaptation to Japanese culture. In conclusion, we have developed a semantically equivalent translation of Cutaneous Body Image scale into Japanese. The instrument seemed to be practical and useful to measure cutaneous body image of Japanese dermatological patients, though further evaluation of the measurement property is necessary.

1 緒言

皮膚は心理状態の影響を受けて変化し、羞恥で顔が赤くなる、恐怖のために蒼白になるなど、情動を表現する器官である。また同時に他人の眼に触れることから、コミュニケーションに影響を与え、反対に何らかのアピールの心理が皮膚を場として表現されることがある。すなわち皮膚は、対人的、社会的コミュニケーションの媒体として重要な役割を果たし、皮膚の外見に関わる問題は周囲との人間関係にさまざまな影響を及ぼしている。

自分自身の体や外見についての内部からの見方をボディイメージという。ボディイメージは誰にでもある身近な自己の感覚で、一定のものではなく、個人個人で、また個人の中でも様々な要因によって変動する。誰でも自分の顔を直接見ることが出来ないように、自分自身の体は他の人の体のように見ることが出来ないため、ボディイメージの形成には自分自身の知覚に加えて、感情や思考が影響する。さらにボディイメージは対人関係や社会生活と関連し、相互に影響しあう。従ってボディイメージはかなり多面的な要素からなる複雑な概念といえる¹⁾。

このボディイメージの形成に皮膚は重要な役割を果たす。

ボディイメージの評価には、妥当性が評価された自記式尺度を用いて、その回答を解析するのが一般的であり、欧米ではいくつかの評価尺度が考案されている。皮膚に関係する尺度としては、Multidimensional Body-Self Relations Questionnaire²⁾などが、主として形成外科手術患者を対象として考案されてはいるが、皮膚疾患患者や一般人には適合しにくい上、煩雑で回答者の負担が大きい。このような背景から、Guptaらが2004年に皮膚のボディイメージの評価尺度 Cutaneous body Image Scale (CBIS) を考案し、一般人を対象に計量心理学的検討を行い、その妥当性を確認した³⁾。CBIS (図1) は皮膚全体、顔の皮膚、毛髪、爪の外見についての7項目の質問からなり、回答者は項目ごとに0:全くあてはまらない、から、9:非常に良くあてはまる、までの10段階の数字を選択する。項目数が少なく比較的簡便な尺度で、回答者の負担が軽い。

我が国では対象者のボディイメージを適確に評価する、実用的かつ国際的に通用する尺度はこれまで全く開発されていない。そこで今回はこのCBISについて、原作者の許可を得て、言葉の同義性が保たれた日本語版を作成し、皮膚疾患患者や一般人のボディイメージについて検討した。



The Japanese version of Cutaneous Body Image Scale

Yuko Higaki

Institute of Women's Health, Tokyo Women's Medical University

1. I like the overall appearance of my skin
2. I like my complexion or overall color of my skin
3. I like the appearance of the skin of my face
4. I like the complexion or the overall color of the skin of my face
5. I am very satisfied with my hair
6. I am satisfied with the appearance of my fingernails
7. I am satisfied with the appearance of my toenails

図1 Cutaneous Body Image Scale (Gupta)³⁾ の各項目

このような英語版の尺度を翻訳するには、文化的背景の違いなどが問題になる可能性があるものの、新たに日本語版ボディイメージ評価尺度を作成する場合に比べて、時間、労力、費用が軽減できる利点がある。しかも国際的に通用しうる標準化された尺度が作成できるため、海外のデータともそのまま比較検討することが可能となる。

2 方法

2・1 CBIS 日本語版への翻訳

CBIS 日本語版への翻訳は forward-back translation 法により行う (図 2)。なお日本語版作成に関し、すでに 2005 年 2 月に原作者である Gupta 氏の許可を得ている。

順翻訳は日本語を母国語とする医療関係者、非医療関係者計 6 名が、各々英語版から日本語版への翻訳を行う。6 つの日本語版を作成したのち、討議のうえ 1 つの順翻訳版にまとめる。次に英語を母国語とする逆翻訳者 2 名により、それぞれ逆翻訳を作成し、2 つの逆翻訳について、英語版との言葉の同義性を原作者に照合する。問題のある箇所については、順翻訳、逆翻訳を繰り返し、言葉の同義性が保たれた CBIS 日本語版 (暫定版) を作成する。

2・2 Feasibility study

作成した日本語版 (暫定版) について、一般人、皮膚疾患患者各々 5 名に回答してもらい、不明確な表現や文化的に問題のある項目があれば、再度順翻訳、逆翻訳を繰り返し、問題点を修正する。

2・3 計量心理学的検討

得られた日本語版 (暫定版) について、一般人および皮膚疾患患者を対象として、計量心理学的検討を行い、尺度の妥当性を確認する。

2・3・1 対象

東京女子医科大学附属女性生涯健康センターまたは東京女子医科大学皮膚科外来を受診した皮膚疾患患者を対象とする。調査にあたっては、回答者にプライバシーが侵害されたり、患者が受ける今後の治療に不利益が生じたりすることは一切ないことを説明の上、承諾を得ることとする。

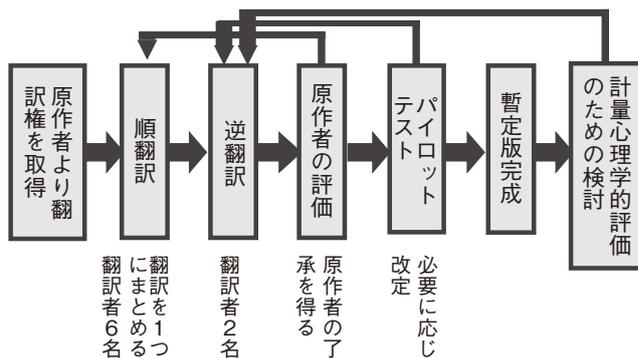


図 2 Cutaneous Body Image Scale (CBIS) 日本語版作成手順

なお本研究は東京女子医科大学倫理委員会承認を受けたものである (受付番号: 964)。

患者の付添い人など皮膚疾患のない、一般人についても調査する。

2・3・2 方法

Gupta の原作についての計量心理学的検討³⁾ により行う。

信頼性 (reliability) については、対象者に Cutaneous Body Image Scale (CBIS) を施行し、Cronbach α (internal consistency) を計算する。

構造妥当性 (construct validity) については得られた CBIS スコア (7 項目の平均得点、低いほどボディイメージはネガティブ) につき、以下の仮説を検証する。

①年齢と逆相関 ②男性 > 女性 ③結婚、教育の違いによる差がない。

統計解析には SPSS11.5J を用いる。

3 結果

3・1 CBIS 日本語版への翻訳

言葉の同義性に関して問題になった部分は表 1 に示した。項目 1 は順翻訳の外見「全体」という言葉が、逆翻訳者 A の 1 回目の逆翻訳で反映されなかったため、その点を修正し、2 回目の逆翻訳では general という語を加えて、原作者の了承を得た。項目 2、4 も同様であった。

項目 5 は大変満足の大変という言葉が逆翻訳者 A の 1 回目の逆翻訳で反映されず、2 回目に very を加えて、こ

表 1 CBIS の原作および言葉の同義性が問題となった逆翻訳

原作	逆翻訳(第 1 回)	同義性の評価*
1 I like the overall appearance of my skin.	I like the appearance of my skin.	b
	I like the overall appearance of my skin.	a
2 I like my complexion or overall color of my skin.	I like the color or complexion of my skin.	b
	I like the overall color, or complexion, of my skin.	a
4 I like the complexion or the overall color of the skin of my face.	I like the color or complexion of my facial skin.	b
	I like the overall color, or complexion, of the skin on my face.	a
5 I am very satisfied with my hair.	I am satisfied with my hair.	b
	I am very satisfied with my hair.	a

*同義性の評価:a,問題なし; b,問題あり

1. 皮膚の外見全体が気に入っている
2. 皮膚の色全体または色つやが気に入っている
3. 顔の皮膚の外見が気に入っている
4. 顔の皮膚の色全体または色つやが気に入っている
5. 自分の髪に大変満足している
6. 手の爪の外見に満足している
7. 足の爪の外見に満足している

図3 CBIS日本語版（暫定版）の各項目

©Yuko Higaki 2007 禁無断転載

れも原作者の了承を得た。

これらの作業を経て、CBIS 日本語版（暫定版）（図3）を作成した。

3・2 Feasibility study

作成した日本語版（暫定版）について、一般人、皮膚疾患患者各々5名の回答から回答の指示文中の「外見」がわかりにくいとのことで、「外見（見た目）」と修正した。質問項目自体の表現には問題はなかった。

3・3 CBIS 日本語版の計量心理学的検討

現在まで、皮膚疾患患者および一般人各々150人以上から回答を得ており、解析作業中である。このうちすでに解析した患者群50人に限定した結果を以下に述べる。

50人の年齢は16歳から75歳、平均40歳で、性別は女性37人、男性13人であった。婚姻状況は、未婚24人、既婚21人、その他5人であった。最終学歴については、便宜的に30歳以上（31人）に限定し、大学18人、それ以外（中学、高校、専門学校）13人で比較した。

Chronbach α 係数は0.84と高い信頼性が示唆された。CBISスコアは全体で3.33、女性は3.03、男性は4.16と、女性の方が低かった（ $p < 0.05$ ）。CBISスコアと年齢との間には統計学的に有意な相関は見られなかった。婚姻状況とCBISスコアとの関連は、未婚者が3.23、既婚者が3.41で両者間に統計学的な有意差はなかった。最終学歴については大学卒3.63、それ以外3.98で、両者間に統計学的な有意差はなかった。

4 考察

皮膚に関するボディイメージは「自分自身の皮膚、毛髪、爪の外見についての内部からの見方」である。実際にボディイメージが問題になるのは、大きく分けて、2つの場合が考えられる。第一には多くの皮膚疾患や外傷、熱傷など実際に外見の変化を伴う場合、患者は否定的なボディイメージを持ちやすく、その改善は治療のアウトカムの一つとして重要である。第二には自分の外見に嫌悪感や不満を持っているが、他者から見ればそれに相当する問題が無い場合がある。これはボディイメージのゆがみが特

徴となる病態で身体醜形障害がこれに相当する。身体醜形障害は、米国では軽度のもも含めれば形成外科、美容外科、皮膚科受診者の6 - 15%に達するともいわれており、これらの患者のボディイメージを評価し、そのゆがみを把握しておくことは日常診療上、また治療上有益と思われる。

しかしながら、これまで外見の変化を伴う皮膚疾患におけるボディイメージの検討はほとんどなく、わずかに乾癬について、患者が否定的なボディイメージを抱えていることが、QOLの評価尺度を用いた研究として報告されているに過ぎない⁴⁾。この理由のひとつには、ボディイメージの概念そのものが複雑であるために、皮膚のボディイメージを簡便かつ適切に評価する尺度がなかったことが上げられる。

今回著者らは、言葉の同義性を保たれた日本語版CBISを作成した。英語版の尺度を文化的背景の異なる日本語に翻訳する場合、いろいろな困難が付きまとう。翻訳に関するガイドラインは主に英語から他のヨーロッパの言語への翻訳を対象にしているため、尺度の中に仮に日本の文化になじまない項目があれば変更や削除を余儀なくされる可能性があるからである。幸いにして今回の翻訳作業では大きな困難はなく、言葉の同義性を保った日本語版CBISを作成することができた。作成した日本語版CBISはfeasibility study、現在も進行中の計量心理学的検討を通し、文化への適合性について特に問題は生じていない。

CBIS日本語版の妥当性が十分確認された場合、その活用法としては、まず外見の変化を伴う皮膚疾患について、患者のボディイメージへの影響を把握し、その改善をめざした治療を選択するための手段のひとつとなると思われる。また治療アウトカムの指標の1つとしてボディイメージの評価を行う際に用いることができる。さらにボディイメージの障害が中心的な問題となる身体醜形障害では、その症状の評価、治療の指標としてCBISを用いると思われる。またCBISは広く一般人も対象となるため、化粧などの心理的効果の評価にも利用できるのではないかと予想される。

このようにCBISは皮膚のボディイメージをめぐるさまざまな課題に広く用いることができ、その有用性が高いことが予想され、皮膚のボディイメージ研究に大きく役立つものと考えている。

(引用文献)

- 1) 加茂登志子、醜形恐怖とリハビリメイク、かづきれいこ、田上順次編：デンタル・メディカルスタッフのためのリハビリメイク入門、第1版、医歯薬出版、東京、2004、93-98頁
- 2) Cash TF.:MBSRQ Users' Manual. 3rd rev. Available

at:www.body-image.com

3) Gupta MA, Gupta AK, Johnson AM: Cutaneous body image: Empirical validation of a dermatology construct, J Invest Dermatol., 2004; 123: 405-406

4) De Korte J, Sprangers MAG, Mommers FMC, et al.:Quality of life in patients with psoriasis: A systematic literature review, J Invest Dermatol Sympo Proc 2004; 9: 140-147

記念講演

●
平成18年度記念講演 かつきれいこ
●

顔と心と体について

フェイシャルセラピスト、歯学博士

REIKO KAZKI 主宰

かづき れいこ

場所：日本薬学会 長井記念館ホール

日時：平成 18 年 11 月 16 日

リハビリメイク®とは自身の外観を受容できないため社会生活に支障をきたしている人が、現状を受け入れ、元気に社会復帰するのを支援するためのメイクアップである¹⁾。講演は以下の構成でリハビリメイクの社会的役割とその有用性について、示唆的な講演をいただいた。デモンストレーションでは会場から希望者を募り、リハビリメイクの効果を非常にわかりやすく実演していただいた。

【講演概要】

1. リハビリメイクについて
2. 症例紹介
3. 聴講者をモデルにしたデモンストレーション
4. 結語

[財 cosmetology 研究振興財団事務局記]

参考文献

- 1) 日本化粧品学会誌, Vol.29, No.4, pp.335-339 (2005)



Kazki Reiko
Facial Therapist
Doctor of Medical Dentistry
Superintendence of REIKO KAZKI

コスメトロジー研究雑感

平成 16 年度 研究助成

高分子新素材開発とコスメトロジー

宇山 浩

私はこれまで高分子新素材の合成と応用を中心に研究してきた。学生時代に研究した高分子界面活性剤の技術が応用されて、化粧品材料が実用化されるなど、コスメトロジーに関連する材料を一貫して開発してきた。世間から見たコスメトロジーという学問分野に対する偏見は持っていなかったが、学問分野としての重要性、すなわち、材料設計・開発、皮膚医学などの融合的な異分野研究という認識は無かった。当初は材料合成に留まり、機能評価まで自分で踏み込んで考えることをしなかったことが一因である。しかし、産学連携研究を積極的に行うようになり、企業の研究者と直に交流することが多くなり、更に、昨年には化粧品メーカーの研究所を見学させて頂く機会を得て、コスメトロジーに対する考えが一変した。皮膚における諸現象の科学的解明とそれに基づく化粧品素材の分子設計を知り、自分でも化粧品素材の開発を行ってみたいと考えられるようになった。

私の研究室では天然素材を基盤とする高分子新材料の開発が主たる研究内容である。その中で、ヒアルロン酸、 γ -ポリグルタミン酸といったバイオポリマーの修飾や加工、カテキン、ビタミンCといった低分子機能物質の誘導体化を検討している。抗酸化力を増幅したポリフェノール誘導体や多機能バイオポリマーゲル、バイオナノファイバーなどを開発している。今までは、何となく、抗酸化性が強いと化粧品に使えるのでは？ という浅はかな考えで化粧品素材を見ていたが、コスメトロジーや皮膚医学をわずかながらでも知ることで、どのようにすれば、皮膚でその機能を発現させることができるのか？ と自分で開発した素材の用途を生医学の観点から考えるようになった。コスメトロジーの入り口に足ったにすぎないが、自分の専門とする天然素材を基盤とする高分子材料開発の技術を化粧品素材に積極的に結び付けていければ、と考えている。
(大阪大学大学院工学研究科)

平成 16 年度 研究助成

セラミド入りボディーローション

船戸 耕一

化粧品には全く縁がないと思っていた私だが、ここ数年乾燥によるアトピー性皮膚炎に悩まされ、ボディーローションのお世話になっている。暑い風呂を好み、くせで身体をごしごし洗ってしまい、肌のお手入れなしとくれば、皮膚の乾燥もひどくなる一方でとにかくかゆくなる。かけば皮膚は赤くはれ、湿疹がさらに広がるという悪循環を繰り返し、見かねた妻からセラミド入りボディーローションを手渡された。ひどくなってから強い薬に頼るより、日ごろから予防をせよということらしい。今や薬局には乾燥過敏肌のためのローションが多く並び、そのなかから選んできたらしい。妻はこういうものを買うのが好きで、自分でもあれこれ試しているようだ。

アトピー性皮膚炎や老人性乾皮症に共通する特徴は保

湿能の著しい低下であり、その主因は脂質代謝酵素異常によるセラミド量の減少であることわかっている。セラミドは外部から補給することが可能な物質であり、乾燥敏感肌を伴う皮膚疾患に対する治療薬あるいは化粧品の素材として大変注目されている。確かに私の身体にもセラミド入りボディーローションは効いているようだ。毎日のお手入れが大切という妻の言葉である。

さて、私の研究は、ヒトの皮膚に対して最も安全で高い効果が期待されるヒト型セラミドを効率的に生産するシステムを開発することを目標としている。まさに自分のために始めたような研究であるが、まったくの偶然である。本研究の成果が私のみならず多くの人々のお役に立てれば幸いである。
(広島大学大学院生物圏科学研究科)

コスメトロジーと多糖ナノゲル

秋吉 一成

ドラッグデリバリーシステム (DDS) 研究に関わるようになって、20 年近く経った。その中で、多糖からなるナノサイズのゲルを開発し、ナノキャリアとしての有用性を明らかにしてきた。特に、一昨年、ナノゲルを抗原タンパク質のキャリアとして用いた癌免疫療法に関する臨床応用が始まった。たとえひとりの患者さんでも、我々の開発した DDS によって病気の苦しみから解放できるならば望外の幸せである。しかし、認可も含めて幅広い実用化に向けては、まだまだ時間がかかるのが実情である。

一方、そのナノゲルは、化粧品の素材としても優れており、4~5 年前から化粧液やヘアトリートメントの中に添加されて市販品として売られている。DDS 応用に先駆けて実用化したことになる。コスメトロジーの分野では、多糖は比較的良好によく使われる素材であろう。ナノゲル化技術により多糖の機能をさらに引き出すことに成功した。現在、様々な機能を持ったナノゲルを開発している。素材としては、特に天然由来多糖に注目している。多糖を扱い始めたのは DDS 研究をはじめた時と同時期で 20 年前になる。それ以前、私は両親媒性分子の自己組織化研究や有機金属

化学などの、比較的低分子の化学を研究していた。それまでに扱っていた分子に比べて、天然由来多糖は、分子量も揃っておらず、分岐構造などもあり非常に複雑な高分子である。化学修飾するとどんな溶媒にも溶けなくなる等、非常に扱いにくい物質であった。特に、水溶性の多糖に疎水性基を導入した疎水化多糖の合成には苦労した。

あきらめずにこつこつ研究をやっていると神様も微笑んでくれるようで、研究をはじめて 3 年くらい経ったころ、疎水化多糖が水中で集合してサイズの揃ったナノサイズのゲル微粒子を形成することを見いだした。タンパク質を取り込んで安定化し、タンパク質のフォールディングを補助するシャペロン機能が明らかになるなど、興味ある現象が見つかった。多糖は手なずけるまで苦労するが、その過程で種々の興味ある特性を示してくれる。コスメトロジー分野での多糖ナノゲルの様々な応用を期待したい。最後になりましたが、本研究助成を頂いたコスメトロジー研究振興財団に心から感謝致します。

(東京医科歯科大学学生体材料工学研究所)

コスメトロジーとリポソーム

吉本 誠

リン脂質二分子膜ベシクル (リポソーム) は生体膜と同様の基本構造を有する。リポソームは種々の物質を内水相あるいは二分子膜中に保持することができる。したがって、リポソームは薬物担体や化粧品の開発において生体分子や効能のある化合物を保護しながら目的の部位に送達するための“小さな入れ物”として有用と考えられている。リポソームの主要な機能は上述の物質保持機能と脂質膜の選択的物質透過性に起因している。両親媒性の脂質分子が自己集合することにより生まれるこれらの機能は、生命体が誕生する極初期過程において重要な役割を担ったと考えられている。活性酸素は生命の進化の過程で重要な役割を担ったと考えられるが、脂質膜自体が活性酸素に対してどのように振舞うかについてはあまり知られていない。このたび財団法人コスメトロジー研究振興財団より助成を頂いた研

究課題では、酵素が存在しない条件下においてリポソームが活性酸素である過酸化水素の分解反応を促進することを示した。リポソームの過酸化水素分解促進機能は微弱ではあるが、リポソームが生体機能の維持に必要な種々の機能を潜在的に有する可能性を示すものと考えている。このような観点から、リポソームは化粧品材料の開発において単なる入れ物の役割のみならず多様な機能を発現している可能性がある。リポソームの活性酸素分解機能は現時点では酵素に比べると非常に微弱であるが、リポソーム膜中における脂質分子密度や脂質組成を改変することにより、実用的に価値のあるレベルまでリポソーム活性が向上すると考えられる。今後は、リポソーム自体が発現する酵素類似機能を活用した高い抗酸化機能を有する化粧品などの開発が期待される。

(山口大学工学部応用化学工学科)

平成 16 年度 研究助成

血管からコスメトロジーを考える

野口 範子

シヨウガ成分の抗酸化作用に関する研究を始めるにあたり、あらためて従来より知られているシヨウガの効能について文献をあたってみた。解毒、解熱、その他風邪の諸症状の緩和など、私の知識内におさまるものに加えて美白、美肌とあった。やはり私も女性である。こういう言葉には弱い。それならばと、コスメトロジーの観点からシヨウガ成分について研究をすすめることとした。当初はシヨウガ成分の抗酸化作用の評価だけを予定していたのだが、“美白、美肌”でシヨウガへの期待感を大きく膨らませてしまったので、それだけでは飽き足らず、シヨウガの遺伝子発現作用を調べることにした。コスメトロジーの研究であれば、用いる細胞は皮膚を構成する細胞かとも考えたが、「美しさは内面から」という言葉を思い出し、血管の細胞を使

うことに決めた（実は血管細胞の遺伝子発現データベースをもっていたから）。「健康な血管がつくる美しいお肌」を自分あてのキャッチフレーズにして熱心にシヨウガのコスメトロジー研究を遂行することができた。そしてシヨウガ成分は、そんな私の期待を上回る優れた作用を、血管内皮細胞の遺伝子発現誘導を介して示すことが、研究を通してわかってきた。それ以来、香り付けや臭みとりに入れたシヨウガも食べるようになり、お寿司のガリは残した人の分も食べるという執心ぶりをみせている。その効果ですか？私は科学者でもあるので、被験者数が1で結論を出すなどということはしないのである。

（東京大学先端科学技術研究センター）

平成 16 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

太田 明雄

私は主に界面活性剤を含む両親媒性物質の溶液物性や会合挙動について研究しておりますが、研究対象を対外的に、特に研究室に配属が予定されている学部の3年生などに説明する場合に、化粧品やコスメトロジーといった用語を多用しております。実際にはコスメトロジーの観点から研究していることは（少なくとも今回の助成を頂くまでは）あまりなかったのですが、このようなキーワードを交えることで、学生の興味をぐっと惹きつけることができるのです。ここで改めて界面活性物質や界面化学をコスメトロジーの観点から考えてみますと、両者は切っても切れない関係であることが思い知らされます。コスメトロジーは主に皮膚を対象にしておりますが、その皮膚自身そのもの外界と生体とを仕切る境界（界面）であります。また皮膚の構成物質はまぎれもなく界面活性物質です。またコスメトロジー製品の作用として必要な、保湿・洗浄といった作用機構、

更には乳化・分散といった製品製造に必要な技術にも界面化学が深く関わっております。

ところで素人の意見ですが、コスメトロジー製品自体は既に完成の域に達しているように思われる一方で、連日のように新しい商品や参入メーカーが現れ、新聞雑誌をはじめ最近ではテレビショッピング、インターネットのバナー広告など多くのメディアから発信されております。このことから人の美に対する欲求に上限がないことを実感させられます。そこにニーズが存在する限り、コスメトロジー分野に対して少しでも新技術や新製品の種になるような研究成果を発信していけるよう努力していきたいと思っております。最後になりますが、この度コスメトロジー研究振興財団より助成をいただくことができ、大変光栄に思いますと同時に深く御礼申し上げます。

（金沢大学大学院自然科学研究科）

コスメトロジー研究によせて

手老 龍吾

本助成金に応募するとき、私は「コスメティック」という言葉から「化粧品」という製品そのものだけを連想して、含まれる成分と機能のことばかりを考えていました。採用された方々の研究が、医薬・生物学はもちろん、心理学や文化論にまで広大な範囲におよんでいるのを見て新鮮な驚きを感じるとともに、自分の視野の狭さを恥じ入るばかりでした。これでは自動車を作るのにエンジンとタイヤを組み立てることばかり考えて、乗る人を無視しているのと同じ。それでも採用していただいたのは、財団の選考委員の先生方の懐の広さと、「乗る人」として妻からのアドバイスのおかげだと思っています。

私の研究では、固体基板上に形成した脂質二重膜に表面科学的にアプローチしようと試みています。人工脂質二重膜を細胞膜のモデルとして使うことは昔から行われていますが、多くの場合、無機物は変性を引き起こすマイナス要因として捉えられてきました。この課題を克服して、固体

基板上でいかにして細胞膜内で起きる複雑な反応を再現するか、というのは研究分野内での重要なテーマの1つになっています。ところが、「コスメトロジー」という立場から考えると、無機固体表面が系を構築する重要な要因の1つに様変わりします。無機微粒子/細胞膜界面のモデルとして、微粒子を高分散させるための界面活性剤として、脂質膜と固体表面の相互作用を知ることで貢献できることがいろいろありそうです。また、脂質膜をのせる固体基板としてはマイカ、シリカ、チタニアなど、化粧品基材としても使われている素材が用いられている点も共通しています。これは「生化学的に不活性な材料」という必要条件を考えれば当然のことなのかもしれませんが、この新しい視点を得ることができたことは、今後の私の研究にとっていただいた予算以上に貴重な財産になると確信しています。本研究案を採択していただいたコスメトロジー研究振興財団に心から感謝申し上げます。(分子科学研究所)

胃粘膜と皮膚との類似性

水島 徹

胃私はこれまで消化管粘膜、特に胃粘膜の研究をして参りました。ご存知の様に胃粘膜は様々なストレスに曝されています。アルコール(お酒)、熱、細菌(ピロリ菌)、経口投与された毒性のある薬物(非ステロイド系抗炎症薬など)に胃粘膜は曝され、これら胃粘膜ストレスによる細胞死、及びそれに伴う炎症誘発が胃潰瘍などの様々な疾患の原因となっています。一方、胃粘膜細胞は大変代謝回転の早い細胞で、一週間でほぼ入れ替わると考えられています。この代謝回転の変化も、胃癌や胃潰瘍の原因になると言われています。この様な胃粘膜、及び胃粘膜関連疾患の性質は皮膚細胞のそれとよく似ています。皮膚も外界と接しているため熱、乾燥、毒物など様々なストレスに曝されています。また、皮膚細胞も代謝回転している事が知られています。そしてストレスによる皮膚細胞傷害や代謝回転

の変化が、肌荒れやしみなどの原因になっていると考えられています。そこで私は、胃粘膜の研究で明らかになった事を皮膚の研究に応用する事によって全く新しい皮膚の研究、すなわちコスメトロジー研究が出来るのではないかと考えています。本研究も、胃粘膜を様々なストレスから守る熱ショックタンパク質(HSP)の誘導剤が様々なストレスから皮膚を守り化粧品としても有用ではないかという考え方から行われています。今後も、これまで胃粘膜研究で得た経験を生かしながら、新しいコスメトロジーに対する研究を行っていきたいと考えておりますので、よろしくお願ひ申し上げます。最後に、本助成金を賜りましたことを深く感謝申し上げます。

(熊本大学大学院医学薬学研究部)

平成 17 年度 研究助成

本研究のコスメトロジーに及ぼす影響

五十嵐 理慧

従来の化粧品や医薬部外品は、皮膚に効果効能のある薬物を配合して製造している。年齢を重ねるとともに皮膚の細胞の活性化は低下し、顔面にはメラニン色素の沈着やコラーゲンの減少・破壊によるしわの形成が顕著となってくる。幼少期もしくは若年期には、たとえ怪我をしても自然に直す力すなわち自然治癒能が高いため、紫外線暴露下でも沈着もしわの形成もほとんど見られない。薬物による強制的細胞活性や、予防ではなく、本来備わっている自然治癒のメカニズムを呼び覚ますような化粧品の開発が、我々の研究テーマである。今回の研究で皮膚に液晶を塗布すると、皮膚のホメオスタシスが誘発され、皮膚再生作用が惹起されることを実証することができた。薬物を使用することなく、皮膚再生が促される現象を発見し、今後は本研究成果を元に新しい化粧品開発を進めたいと考えている。

化粧品は薬理効果を明示してはいけないが、消費者は当

然効果を期待している。また、最近では IT 革命によって情報を簡単・迅速に入手することができるために、消費者も化粧品に関する科学的知識を豊富に持っている。このような背景から、今後は効果を伴わないイメージだけの化粧品の開発には限界があるだろう。本来化粧品とは、どのようなものであるべきなのだろうか。薬物を使って特異的に作用を期待するよりも、むしろ本来装備されている生きるための機能である自然治癒能を高め、細胞を活性化し、自ら皮膚を再生させる力を付けさせる化粧品が必要ではないだろうか。加齢とともに細胞は元気を失っていき、外的刺激などによりまだまだ機能を発揮できるはずである。今後は、キャッチコピーだけではなく、本当に本質を伴った化粧品、いや医薬と化粧品が融合したような cosmedics な分野の構築が必要になると考えている。

(聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター DDS 研究室)

平成 16 年度 研究助成

コスメトロジーの観点から見た本研究

宇谷 厚志

マトリックスと美容といえば最近では、ヒアルロン酸、グリコサミノグリカン、数年前は、コラーゲンという具合に2つの関連づけが、なにやら一大ブームといった感さもある。皮膚の「肌理、皺、張り」といった老化事象がまさしく「皮膚細胞外マトリックス」の老化、変性による現象であることからこのような流行を生んだのではないかと推測する。私個人の考えでは外用、または食物として摂取することがどれほどの効果を皮膚に与えてくれるかは、まだ確実ではないと考えている。しかし足りなくなったら外から補うというシンプルな発想に基づいて細胞外マトリックスを真皮に注入したり、レチノール酸外用で膠原線維をふやしたりして、肌を若返らせる手法は美容皮膚科ではルーティンで施行されている。現在、マトリックスはその量を増やす方向でコスメティックに深く取り込まれている。

私も、大学院のころよりマトリックス研究をはじめ、年月の経つのは早いものですでに20年を超え、この間に私の真皮マトリックスも老化し、たるんできた。私のもっぱら真皮コラーゲン、基底膜のラミニンの研究をおこなってきたが、また皮膚科医として創傷治癒との関連でマトリックスに関心を持ってきた。幸いなことにとうとう本研究にあるように角化細胞へ作用し、様々な生理活性を引き起こすアミノ酸配列をラミニン5の中に見出した。これを合成ペプチドで作成し研究を行っている。合成ペプチドを使えば老化した皮膚でも表皮基底細胞活性化を起こし、皮膚を生き生きと若返りさせ得るのではと考え、いよいよ「若返りのクリーム発売」の実現かと2007年の初夢をみているところである。

(京都大学大学院医学研究科皮膚生命科学講座)

コスメトロジーの観点から見た本研究

藤原 作平

現時点ではコスメトロジーとは関連性の大変薄い私の基礎研究（表皮細胞におけるエピプラキンの機能）に対して助成をいただき、コスメトロジー研究振興財団の皆様、厚く御礼申し上げます。エピプラキンは表皮下水疱症患者の血清が認識する自己抗原として同定された分子ですが、表皮細胞内に局在しており、その病的意義はまだ解明されておられません。またそのノックアウトマウスも、現時点で明らかな表現型の異常は見つかっておらず、創傷時の表皮細胞移動が野生型より速いという現象しか捉えられておられません。しかし何らかの疾患あるいは病態に必ず関与していると信じ、現在研究を進めています。真皮の体の部位による違いについては、いくつかの論文で報告されていますが（たとえば Yamaguchi ら, Arch Dermatol, 621-628, 2001）、表皮の体の部位による違い、例

えば表皮や角層の厚さなどは何によって規定されているのか？といった問題についてはまだ研究されておられません。第一シグナルは真皮側に存在し（Yamaguchi ら, J Cell Biol, 275-2004）、それが表皮に伝わるのかもしれませんが、さらにそれがケラチンの種類を規定したり、ひいてはエピプラキンを含む中間径フィラメント結合蛋白質を規定したりしている可能性があります。エピプラキンのカルボキシ末端の5回の規則的繰り返し構造が順に切断されている証拠があり、それが表皮細胞の空間的、時間的差異を表現しているのではないかと考えています。もしこれが事実であるならば、エピプラキンは表皮細胞の分裂・老化や部位特異的なマーカーとなりうると考えられます。これはまだ仮説の段階ですが、いつか近い将来この仮説を検証してみたいと思っています。（大分大学医学部皮膚科）

コスメトロジーとフォトニクス

佐藤 俊一

毎年1月下旬、米国のシリコンバレー（San Jose, CA）においてフォトニクス（光学）の生体応用に関する世界最大の国際シンポジウム、BiOS（Biomedical Optics Symposium）が開催される。とにかく巨大なシンポジウムで、基礎から臨床、診断と治療、先端技術を網羅し、今年論文数が1,300を越えた。常時10～20のセッション（Conference）が進行しているため、聞きたい発表をフォローするために広い会場を駆け回ることになる。この中で皮膚科、皮膚科学関係の発表は大変多い。そもそも皮膚は最も「光」を受けやすく、また人目につきやすい組織。人目は「光」を介しているのであるから、フォトニクスの会議で皮膚の話が多いのも当然である。皮膚科・形成外科専門のConferenceも勿論あるが、各種診断・イメージング技術のConferenceにおいても、皮膚を対象とした研究発表は多い。ここ数年目立つのはマルチスペクトルイメージ

ングや多光子マイクロコピーであるが、さまざまな新技術も注目されている。その一つである光音響診断法は、高コントラストで深さ分解計測ができることから、皮膚中のメラニン、ヘモグロビン等の診断にピッタリである。しかし研究の方向（少なくともこのシンポジウムにおける）は、微細なイメージングや病気の診断を向いており、コスメトロジーの観点より取り組んでいる例はほとんど見ない。特許検索をすると関係企業からの出願も見られることから、その観点での研究も行われているのであろうが…。いずれにしても、今回貴重な助成をいただき、本技術の有用性を確認できたのは大変有意義であった。コスメトロジー界における新ツールとして表舞台に立つ資質十分であると確信した。

（防衛医科大学校

防衛医学研究センター情報システム研究部門）

平成 16 年度 研究助成

紫外線教育とコスメトロジー

松田 尚樹

大学の地域貢献が必要とされる昨今、放射線施設で放射線安全管理を行なう傍ら紫外線の研究を進めている立場上、出前授業など学外での放射線教育と紫外線教育に関わることが多い。正しい知識に基づいて健康影響とその防御を理解していただきたいという目的は、課題が何であれ同じであるが、ともすれば安全神話確立のための恣意的な教育になりやすい放射線教育と異なり、健康影響の日常性と実感を伴う紫外線教育は聞く側との一体感が生まれやすい。これは、対象が小学校の生徒、保護者から、大学生、大学院生にいたるまで同様である。そこで、いくつかの根本的な質問に出会うことがある。「紫外線の防御法はわかりました、でも浴びてしまったら、もう、どうしようもないのですか？ 浴びてしまったあとにも効くような、何かいい薬や化粧品はないのですか？」

紫外線を受けた細胞では DNA 損傷が生じ、活性酸素種が発生し、あるものは修復し、あるものは除去され、そしてシグナル分子が伝達され遺伝子発現が変化し、最終的に細胞の運命が決定する。彼らの素朴な疑問は、この一連

の細胞応答の流れの中で、紫外線を浴びてしまった後の健康影響を低減するには、どこをどう変化させれば良いのか、を問うていることにもなる。今回、助成していただいた研究では、一つの突破口としてサイトカインを介した autocrine な DNA 損傷修復促進系に着目してみた。質問をしてくれた彼らに、胸を張って答えられるだけのまで結果には至っていないが、サイトカインなど液性因子の産生の調節は生薬や天然物素材のお得意とするところであり、コスメトロジーとの相性は良いといっている。

さて、いくつかの教育では、受講者のリスク認知度の調査を行なうようにしている。受講後の「紫外線ケアせずに真夏に屋外運動をする」のリスク認知度は、「原子力発電所の近隣で生活する」とほぼ同程度で、「アメリカ産牛肉を食べる」、「シンドララー社製エレベーターに乗る」などよりはるかに高くなる。紫外線教育と、紫外線から健康を守るコスメトロジーの社会的重要性は、これほどまでも高いと感じている。

(長崎大学先導生命科学研究支援センター)

平成 16 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

古川 哲史

本研究助成では薬用人参の美容・育毛に対する影響の検討を行った。薬用人参を研究対象としたのは全くの偶然であり、教授として着任した研究室に留学していた中国人大学院生が研究しており、残り2年間指導をしなくてはならなかったためである。中国からの大学院生がその有効性を熱く説明してくれるのであるが、最初は疑心暗鬼で指導に取り掛かった。結果として、薬用人参の主成分である ginsenoside が植物エストロゲン作用を有することを明らかにすることが出来た。生薬のことを勉強していくうちに、極めて奥の深いものであることが分かってきた。生薬はネアンデルタール人の頃から使われており、主に麻酔・喘息・狭心症に有効な生薬が多く知られている。これは、昔狩に出て怪我をした時、これを治療する時に麻酔作用を有するものが必要であったこと、病気の中でも喘息・狭心症が人々に特にひどい苦痛を与えていたことを意味しており、必然性からこれらに有効な植物を古代の人々

が捜し求めた様子が伺える。これらとともに、生薬の中には長寿の薬・若返りの薬と言われるものも多く知られており、今回研究対象とした薬用人参はその代表選手のようなものである。昔から若くありたいというのは万人の強い願望であったことが推測されるが、“アンチエイジング”というしゃれた呼び方で最近とみに注目が高まっている。最近医学の世界でも evidence based medicine が注目されており、以前は薬の作用メカニズムから有効であろうと予想して治療が行われてきたが、きちんと大規模試験を行って有効性が確認されたものを選択しようという至極あたりまえのアプローチが再認識されている。その点、生薬は有効であるというエビデンスが長年多くの人々により証明されてもののみが生き延びてきているので、そのメカニズムを追求することから“アンチエイジング”に対するヒントが得られることが期待される。

(東京医科歯科大学難治疾患研究所)

皮膚常在酵母とコスメトロジー

伴野 朋裕

ある種の酵母からは優秀な美白成分や保湿成分が得られるが、皮膚常在酵母のひとつであるマラセチアは今まで悪役と見なされてきた。古くは癩風の病原微生物として、最近ではアトピー性皮膚炎や脂漏性皮膚炎の増悪因子としての認識が定着しつつある。本研究においても、あまり洗顔をしない高齢者の顔面から多種多様なマラセチアが検出され、一部のマラセチアにおいては老人性いぼ（脂漏性角化症）との関連も示唆された。しかし、マラセチアは本当に人肌にとって悪なのだろうか。私にはマラセチアとケラチノサイトが共存しているように思えてならない。確かに増え過ぎれば問題であろうが、本来マラセチアは、大好きな脂質たっぷりの毛穴の中でひっそりと棲息し強い炎症を惹起することはない。実際、マラセチアと共培養したケラチノサイトのサイトカイン発現誘導は比較的弱かった。彼らは、激しい争いを好まず、安全で暖かい洞窟のなかで三食昼寝つきでのんびり暮らしているような生き物なのかもしれない。今回の転写プロファイリングの結果が示すように、マラセチアによってケラチノサイトが増殖

とともに角化と脂質代謝も亢進させれば細胞間脂質に富んだ厚い角層ができるので好脂性であるマラセチアの生存には有利となるであろう。同時に、その変化が過剰でなければ適度に潤いがある丈夫な表皮となり、皮膚にとってもメリットかもしれない。腸内の微生物フローラはビタミンの代謝吸収や病原菌の増殖阻止に重要な働きをしている。皮膚のフローラにも何か重要な役割があるはずである。頻回かつ強力で洗顔をする現代人は、人類の歴史のなかには特殊な存在だろう。長年、適度に汚れた人肌に慣れ親しんできたマラセチア族にとっては、宿主の急激な生活習慣の変化が巨大な天変地異であるに違いない。年齢、性別、生活習慣の違いなどでダイナミックに変化するマラセチア族のフローラが人類の皮膚にとってどのような意味をもつのか、コスメトロジーにとっても興味深いテーマだと思う。

(筑波大学人間総合科学研究科皮膚病態制御分野、

六町皮膚科クリニック)

コスメトロジーの観点から見た本研究の展開

輪千 浩史

皮膚は加齢にともない、伸びて縮まない状態、つまり“しわ”となる。これは、コラーゲン、ヒアルロン酸、エラスチンなどの結合組織が、加齢・紫外線・活性酸素・ストレスなどで質的・量的変化に起因すると考えられている。一般に、肌の張りや弾力を保つ弾性線維の主成分はエラスチンであり、エラスチンの減少が肌の老化と密接に関連している。スキンケアの多くは、不足した結合組織を補うことを目的としているが、エラスチン線維を標的としたものは少ない。エラスチンの前駆体（トロポエラスチン）を肌処理することでエラスチン線維を補充することができれば、より機能的な肌を維持することが可能であると思われる。しかし、エラスチン線維を生体内で再構築した報告は少なく、本研究結果からも、培養系でのエラスチン再構築は可能であったが、3次元培養でのエラスチン再構築は失敗に

終わった。この要因として、エラスチン線維の足場タンパク質の低下とトロポエラスチンの分解によると考えられた。今後、足場タンパク質として注目されているフィブリリンやフィブリン5の線維構機序を明らかにすることは、エラスチン線維形成の機序解明とともに最重要課題であると考えられる。さらに、トロポエラスチンの分解に関与するエラスターゼや MMP の阻害剤や分解酵素に対して抵抗性のある組換えトロポエラスチンを用いることで、効率よくエラスチン線維を構築できると思われる。今後このような視点から研究を進めることで、ヒトの皮膚に対する機能的な弾性線維の再構築に大きく寄与し、いつまでも若々しい肌の維持につながる魅力的なスキンケア製品の開発につながることを期待する。

(星薬科大学臨床化学教室)

平成 16 年度 研究助成

元皮膚科医? のざれごと

竹田 潤二

私は医学部を卒業し、いったん皮膚科医を選択しましたが、その後、基礎医学研究者に転身しました。本格的に基礎医学に移るとき、ずいぶん悩んだ記憶があります。皮膚科医? だった頃は、主に生化学的手法で研究を行っていました。しかし、もっとも興味があったのは、何故あんなに見事に秩序だって基底細胞は分化して行き、最後は垢になって脱落して行くんだろうということでした。その現象をなんとか、実験医学的手法で明らかにしたいという欲望は大変大きいものでした。しかし、当時の私の実力では何か

ら手をつけていいのか皆目見当がつきませんでした。

その欲望は基礎医学に移っても変わる事なく持ち続けているつもりです。今回の研究テーマもそのラインに沿ったものであることはいうまでもありません。ただ、皮膚の分化のメカニズムの秘密を明らかにするには、まだ少々時間がかかるような気がしております。それを明らかにした暁には、皮膚を内面からきれいにするという概念に少しでもお手伝いができるかもしれません。

(大阪大学 医学系研究科)

平成 17 年度 研究助成

身勝手な提案

國貞 隆弘

少し前にある中堅化粧品企業の研究責任者の方と話をする機会があり、育毛薬もさることながら、数でいえば白髪を気にしている人の方がずっと多く、化粧品のターゲットとしては実に魅力的ということでした。毛染めで十分でしょうという問いには、毛染めの手間と効果の短さを考えると、風呂上がりの頭皮にすり込むだけで色を取り戻せる薬は大変魅力的であるとの返答でした。

事の真偽はともかく、ではうちのマウスや実験系(その話の前にES細胞から無尽蔵に色素細胞幹細胞を取り出す話などで盛り上げておいたのですが)を使って色素細胞幹細胞の研究をしませんかという段になると急に話がしほみ、おきまりの企業経営者の研究に対する無理解、昨今のデフレに伴う企業収益の低下、はては製品化までにかかるコストの上昇など、全ての社会状況が基礎的な研究をしない理由になるのだと感心したものです。我々も同じで、講座運営費の一律カット、研究の重点化、教育への一層の傾注、納税者への説明責任を果たすための様々な自己評価、学生の学力の低下などをすべて研究をしないこと、してもうまく行かないことへの正当化に利用してしまいます。昨今の研究費の不正利用を受け、研究費の執行は厳密を極め、未使用研究費の納入業者への預け金などもってのほか(法的にはもちろん当然のことですが)、私のように臨床との関わりが少ない者にとっては、もし科学研究費が取れなければ、その年はマウスが維持できないことになり、研究対象

を魚などにかく維持費の安いものに変えようという話さえ出てきます。

いろいろな方の言ういろいろな状況は少なくともある面では事実であり、研究といえども世の中を支えている様々なシステムの一部に過ぎず、ことさらに擁護すべきものでもないのですが、これまでいろいろな方と共同研究などをしてきて、多くの知的な人には面白い研究に対して他の何ものにも変えがたい魅力を感じる性質があるように思います。研究するという伝統を後世に残すためにも、大学と企業が今はやりの新製品の開発のみを指向した産学協同ではなく、たとえば「色素細胞の毛包への移動を制御している分子の探索」のような基礎的なテーマで共同研究を行う状況が生まれないかと考えます。修士で就職が基本の日本の学生には継続的で蓄積的な高度な基礎研究は困難で、医学部では基礎研究を選ぶ医師も激減しています。企業にとっては、アメリカなどの大学や研究機関との共同研究が、こと生物科学の基礎研究に関しては合理的な選択とも思いますが、20年先日本の大学生は留学する以外医学生物学の基礎研究(ひょっとしたらかなりの応用研究も)をするという選択肢はないという状況になったら、寂しいことです。面白い研究をするのにそうお金がかからないことは、実際多くの企業の研究者の方もご存じだと思います。たとえば、企業の研究者が本来の研究のほかに一つ基礎的な研究テーマを持ちそれに関して3割程度の時間を割く自由があれば、

継続的で深みのある基礎研究が行えると思います。そういう時間で我々との共同研究をしませんかという誌面を借りた誠に勝手な提案なのですが、企業の多くの研究職があ

まり役に立ちそうもないけれど語りだしたら止まらない研究テーマを持っているというのは楽しいでしょうね。

(岐阜大学大学院医学系研究科)

平成 16 年度 研究助成

私の化粧歴

吉田 寿美子

私と化粧の歴史は大学に入ってから始まった。化粧水と乳液を使用してスキンケアを行うようになった。20歳の記念には母からメイクアップの道具を貰った。早速化粧を試してみた。その頃は化粧の仕方も分からず、自己流で行ったところ、却ってブスになったように感じた。しかも、翌日肌がボロボロになってしまった。顔中に赤い湿疹ができて、皮膚科を受診して治療を受けなければならなくなった。これをきっかけに「化粧」は怖い、化粧は塗ったり落としたりと面倒なことと思うようになった。自分の結婚式や披露宴に招待されたときは肌が荒れるのを覚悟でプロに化粧を依頼していた。

転機が訪れたのは、平成 15 年に現在所属する大学の健康福祉学科に異動した時である。「これからは健康や福祉に関する研究も行わなければ」と考えていたところ、同僚から高齢者の化粧療法を聞いた。また、担当する学生にその話をしたところ大変興味を示し、一緒に研究しようということになった。学生に引きずられるようにして、化粧教

室に通って勉強もした。その後化粧療法に関する研究を通して、高齢者への化粧や化粧教室での指導も行った。今まで色々な研究を行ってきたが、これ程喜ばれた研究はなかった。研究を通して化粧を行う自分も幸せな気分になった。指導した高齢者はどんどんきれいになっていく。何より表情が明るくなる。「化粧はすごい。」と感じた。しかし、私の化粧は高齢者程の成長はなく、ある程度の化粧技術を身につけてからは、スキンケアが主な化粧に戻ってしまった。但し、スキンケアは丁寧になり、肌に負担にならない程度の日焼け止めをほぼ毎日つけるようにはなった。きれいに化粧をしている人をみると「すてきだな。」と思えるようにもなった。

今は仕事が忙しく自分に化粧をする余裕がない。私は本格的な化粧は 60 歳を過ぎてからと考えている。研究から化粧は良好な老い（の受容）に貢献する可能性があると感じたからである。（仙台大学体育学部健康福祉学科）

平成 16 年度 研究助成

心とコスメトロジー

古郷 幹彦

美しいということはどういうことだろうと考えることがある。オーストラリア ブリスベンに最近行くことがあり、非常に美しい町であった。この美しいは私にとって心地よいという意味である。では人が美しいとはどういうことか。外見が美しいというのは、他人が見てか、本人が見てか。やはり美しい人というのは周囲の人が見てであろう。ヒト全体からの雰囲気があるとなく心地よさを人に与える時、人は美しいというのではないだろうか。今回の研究テーマである口唇口蓋裂治療でもやはり美しいというのは患者様本人の雰囲気が大きく影響しているように思われる。顎の発育においてもいわゆるイーセティックラインと呼ばれる

横顔のラインが美しいとされる。鼻の頂点と上唇の先端、下唇の先端、オトガイの突端を結ぶ直線のことである。これらの点が一直線並ぶことである。そのかみ合わせにあわせることが非常に重要となる。その上で化粧をすると客観的に非常に美しくなる。ただの唇と鼻を結ぶラインであるが、これにたどり着くには非常に苦労する。しかし非常にいい雰囲気の患者様がこのラインを獲得した時、治療する側としては“してやったり”の感がある。今回口唇裂の患者様に化粧を指導することにより口唇裂の手術瘢痕を見えなくして患者様は非常に喜びました。しかし、化粧をする前からあなたはイーセティックラインを既に獲得し、美し

いですよと言いたかった。確かに化粧を指導したあと患者様の雰囲気が変わるのを肌で感じることができました。化粧が患者様の心まで変化させたのです。同じ人でも化粧後輝いて見えることすらありました。あらためて美と心の関

係に直視することができました。本研究を助成いただいたコスメトロジー研究財団に心から感謝いたします。

(大阪大学大学院歯学研究科

顎口腔病因病態制御学講座口腔外科学第一教室)

平成 17 年度 研究助成

香りとコスメトロジー

河合 房夫

化粧品には、様々な香料が利用されている。ハーブなどの香り成分である精油（エッセンシャルオイル）は、アロマセラピーとしても広く用いられている。これらのエッセンシャルオイルの匂い分子を吸入することにより、鼻腔内の嗅上皮存在する嗅細胞に活動電位が発生し、その電気的信号が嗅球、大脳辺縁系などに伝達される。その結果、自律神経系、免疫系、および内分泌系などに作用することにより、様々な生理的効果が現れる。一方、精油の匂い分子は肺経由で血液中に溶解することにより、直接的に大脳辺縁系および視床下部などの脳神経系に作用する経路も考え

られる。すなわち、匂い物質は嗅細胞だけでなく、中枢神経系の神経細胞にも何らかの影響を及ぼす可能性が考えられる。しかしながら、そうした仮説を裏付ける科学的証拠は、ほとんどない状況である。

我々の研究グループでは、化粧品などに含まれる匂い物質が、個体レベルで自律神経系に及ぼす影響の解明を目指し、研究している。こうした基礎研究成果は、将来的には、香りという観点から生理学的に有効な化粧品の開発の足がかりになるものと考えます。（藤田保健衛生大学医学部）

平成 17 年度 研究助成

皮膚ボディイメージとコスメトロジー

檜垣 祐子

「本当に頭がいいと思う。ボディイメージみたいな複雑な概念を、たった7つの項目でまとめてしまうなんて」と、共同研究者（精神科医）は言いました。Guptaの考案した皮膚ボディイメージ評価尺度 Cutaneous Body Image Scale (CBIS) をはじめて見たときのことです。

ボディイメージの形成には、自分で見て、知覚できる自分自身の外見だけでなく、個人のそれまでの経験や社会的背景も影響を及ぼします。小麦色の肌が美しいとされたり、あくまでも白い肌がもてはやされたり、その時々で変化する社会の価値観に左右されて個人のボディイメージは変動するわけです。ボディイメージはこのように多面的で、非常に複雑な概念であるため、その評価には困難がつきま

います。

CBISは皮膚のボディイメージを評価するために考案され、皮膚の外見、色つや、髪、爪に関する必須の7項目で構成され、皮膚に関するボディイメージを大まかに把握するのに適しています。皮膚疾患があって外見の変化を伴う場合のみならず、一般人のボディイメージの評価にも使用できるものと考えています。

CBISが皮膚ボディイメージ評価のためのツールとして今後広く用いられ、皮膚に関するボディイメージに対する関心が高まり、この分野の研究の発展につながれば、ボディイメージの問題に悩む人たちに役立つのではないかと考えます。（東京女子医科大学女性生涯健康センター）

付 録

●
事業報告書（平成18年度）

役 員
●

事業報告書

(自平成 18 年 4 月 1 日 至平成 19 年 3 月 31 日)

《研究助成等の選考関連》

2006	5	8	公募開始	全国 265 ヶ所の大学・病院・研究機関等、関係学術雑誌 8 誌、当財団 HP 他 2 HP に掲載
	7	3	公募締切り	応募数 88 件
	9	8	選考委員会（分科会 1）	素材、物性に関する分野の選考
	9	7	選考委員会（分科会 2）	生体作用、安全性に関する分野の選考
	9	11	選考委員会（分科会 3）	精神、文化に関する分野の選考
	9	21	本選考委員会	各分科会の結果を総合的に判断して研究助成 23 課題、国際交流援助 1 課題を選考
	11	16	表彰贈呈式	記念講演：「顔と心と体について」 フェイシャルセラピスト・歯学博士・REIKO KAZKI 主宰 かつきれいこ先生
	11	16～	助成課題の公表	関係学術雑誌 7 誌、当財団 HP に掲載
2007	2	中旬	持ち回り企画委員会	平成 19 年度の研究助成課題選考に関して

《理事会関連》

2006	6	14	通常理事会	平成 17 年度事業報告ならびに収支決算報告、第 9 期評議員の選任、理事長及び専務理事の互選、選考委員の選任、株主としての議決権行使について、報告事項
	11	16	通常理事会	平成 18 年度（第 17 回）研究助成者等の承認、平成 19 年度事業計画及び予算案の承認

《評議員会関連》

2006	6	14	通常評議員会	平成 17 年度事業報告及び収支決算報告、第 9 期理事及び監事の選任、報告事項
	11	17	通常評議員会	平成 18 年度（第 17 回）研究助成者等の承認、平成 19 年度事業計画及び予算案の承認

《その他》

2006	3	末	財団活動の情報更新	当財団 HP へ平成 18 年度事業計画を記載
	6	末		当財団 HP へ平成 17 年度事業報告を掲載
	12		コスメトロジー研究報告	「コスメトロジー研究報告」14 号の概要を当財団 HP に記載
2006	5	19	基本財産	保有株式が無償分割により 1,163,323 株から 1,279,655 株へ

第 17 回 研究助成を受けられたかたがた

(J：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
J-06-01	紫外線カット機能材料の開発と化粧品関連素材（ヘアカラーおよびUVカット用品）への利用に向けての基礎研究	染料 染色学 色彩学	大阪教育大学教授 織田博則
J-06-02	好熱菌由来カロテノイド化合物の生体膜安定効果の研究	界面化学 生体材料学 生物工程学	大阪府立大学大学院 理学系研究科生物科学専攻教授 原正之
J-06-03	圧電材料基板上のマイクロ流路を用いた単分散多相エマルジョン生成法の開発	ナノ・マイクロ科学 コロイド化学 表面化学	東京工業大学 精密工学研究所助手 西迫貴志
J-06-04	ツバキ油に含まれるトリテルペンの生合成研究	天然物化学	東京大学大学院 薬学系研究科助教授 渋谷雅明
J-06-05	肌の質感を容易に評価するシステムの開発	光学 計測工学	国立木更津工業高等専門学校 機械工学科助教授 小田功
J-06-06	化粧品素材の皮膚アレルギーにおける新規スクリーニング法の開発	接触アレルギー 光接触アレルギー 安全性試験	産業医科大学 皮膚科学助教授 椛島健治
J-06-07	中高年者の化粧行動の変動様態と前頭葉認知機能との関連に関する神経心理学的研究	神経心理学 認知心理学	名古屋大学大学院 環境学研究科教授 八田武志
J-06-08	毛形成におけるホスホオリパーゼC δ 1の機能解析	皮膚科学 分子生物学	東京薬科大学 生命科学部教授 深見希代子
J-05-09	再構築培養皮膚および角膜を用いた遺伝毒性の評価	皮膚科学 遺伝毒性	国立医薬品食品衛生研究所安全性 生物試験研究センター薬理部長 小島肇
J-06-10	地中海アロマ植物からの白髪予防生理活性物質の探索およびその機能解析	生物資源利用学 皮膚科学 分子細胞生物学	筑波大学大学院生命環境科学研究科 北アフリカ研究センター助教授 磯田博子
J-06-11	ヒアルロン酸で被覆したキトサン微粒子へのタンパク質のカプセル化と機能評価	生体高分子 糖鎖工学	慶応義塾大学 理工学部生命情報学科教授 佐藤智典
J-06-12	各種有効成分の効率的な皮膚内送達方法の開発	細胞生物学 薬物送達学	大阪大学大学院 薬学研究科助教授 近藤昌夫
J-06-13	心地良い香り、及び不快な香りの慣れ（adaptation）現象 —呼吸パターンと脳内活動部位推定の検討—	呼吸生理学 神経生理学	昭和大学 医学部第二生理学教室兼任講師 政岡ゆり
J-06-14	老人性色素斑ダーモスコーピー画像の自動定量ならびに治療と化粧によるQOL評価改善	皮膚科学	東京女子医科大学 東医療センター皮膚科助教授 田中勝
J-06-15	光照射による分子集合体の構造変換及びその機能化に関する研究	光化学 ナノテクノロジー	大阪大学大学院 工学研究科生命先端工学専攻助手 水卜准

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
J-06-16	慢性掻痒性皮膚疾患における表皮内末梢神経伸展因子の探索	皮膚科学 神経科学	富山大学大学院 医学薬学研究部講師 安東 嗣 修
J-06-17	表皮細胞接着因子のバイオイメージング法の開発	皮膚科学 細胞生物学	慶應義塾大学 医学部皮膚科学教授 天谷 雅 行
J-06-18	皮膚を覆う「毒素のデパート」ブドウ球菌は、なぜ多様な毒素を作れるのか：ゲノムからのアプローチ	分子医科学 細菌学 ゲノム科学	東京大学大学院新領域創成科学研究科および東京大学医科学研究所教授 小林 一 三
J-06-19	人前化粧品における意識	社会心理学	岡山大学大学院 社会文化科学研究科 塩田 真友子
J-06-20	皮膚線維化過程における骨髄由来細胞の動員とそのコラーゲン産生能に関する研究	皮膚線維症治療	東海大学 医学部基盤診療学系助教授 稲垣 豊
J-06-21	メラノサイト由来リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素が関与する皮膚組織の恒常性維持機構	分子生物学	東北大学大学院 医学系研究科教授 柴原 茂 樹
J-06-22	化粧品のリスク認知に関する心理学的研究 ー安全とリスクのバランスー	社会心理学	名古屋大学大学院 教育発達科学研究科助手 元吉 忠 寛
J-06-23	化粧による高齢者の行動変容：高齢夫婦の女性配偶者の化粧による男性配偶者のquality of lifeの向上と生理学的反応の変化	神経生理学 自律神経学 脳波解析学	大分大学 医学部脳・神経機能統御講座助教授 徳丸 治
H-06-01	細胞情報伝達における脂質・タンパク質相互作用の研究		イリノイ大学シカゴ校教授 Wonhwa Cho 受入責任者 昭和大学薬学部教授 工藤 一 郎

(敬称略・受付順)

※第1回～16回の研究助成課題はホームページ (<http://www.cosmetology.or.jp/>) でご覧ください。

役員

平成 19 年 3 月 31 日現在

理事長	小林禮次郎	(株)コーセー代表取締役会長
専務理事(常勤)	有本 亨	(元厚生省薬務局安全課長)
理 事	磯邊 律男	(株)博報堂 相談役 (元国税庁長官)
	宇佐美昭次	早稲田大学名誉教授
	内山 充	有限責任中間法人薬剤師認定制度認証機構理事長
	小林 保清	(株)コーセー代表取締役社長
	高橋 久	帝京大学名誉教授
	新村 嘉也	高砂香料工業(株)代表取締役会長
	西川 武二	慶応義塾大学医学部名誉教授
	花輪 隆昭	昭和館 館長 (元厚生省援護局長)
	廣部 雅昭	静岡県学術教育政策顧問
	牧野 利孝	日本化粧品工業連合会専務理事 (元厚生省生活衛生局食品化学課長)
監 事	小田倉正典	公認会計士
	黒田 節哉	弁護士
評議員	石倉 伸治	(株)コーセー常務取締役
	上野 芳夫	元東京理科大学薬学部教授
	緒方 宏泰	明治薬科大学教授
	北原 文雄	東京理科大学名誉教授
	近藤 保	東京理科大学名誉教授
	齊藤 勲	日本製薬団体連合会理事長 (元厚生省大臣官房審議官)
	多島 新吾	防衛医科大学校教授
	長野 哲雄	東京大学大学院薬学系研究科教授
	西岡 清	横浜赤十字病院院長
	野呂 影勇	早稲田大学大学院人間科学研究科教授
	溝口 昌子	聖マリアンナ医科大学名誉教授
	宮崎 榮三	東京工業大学名誉教授
	山崎 幹夫	新潟薬科大学学長

(専務理事以外は全員非常勤)

*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

〒103-0027 東京都中央区日本橋三丁目7番20号
電話 03 (3278) 5561

コスメトロジー研究報告 Vol.15/2007

非売品

2007年9月1日発行

編集責任者	有本 亨
発行	財団法人 コスメトロジー研究振興財団 〒103-0027 東京都中央区日本橋三丁目7番20号 電話 03 (3278) 5561
制作	エイエム企画 〒170-0013 東京都豊島区東池袋三丁目15番2号 電話 03 (3590) 5375
印刷	太陽印刷工業

表紙デザイン監修：(株)コーサー 商品デザイン部デザイン室