ごあいさつ

このたび、当財団として第17巻の研究報告書を刊行いたしました。小林孝三郎が1990年にコスメトロジー財団を設立して以来、化粧品科学に貢献する多くの研究に対する助成活動等を行ってまいりました。私たちの財団の活動がきっかけとなって、人の美しさや、健康の面でも、また精神的な面でも人間の豊かさが実現されていくこととなれば、これほど嬉しいことはありません。多くの関係者の皆様のご理解とご協力に改めて感謝申し上げる次第でございます。

今回の報告書では平成18～19年度に助成を受けられた方の中から26名の方の研究成果を掲載いたしました。

ご一読いただければわかりますように、先端素材開発、老化メカニズムの解明、素材分野と生体作用分野の連携テーマ、ヒトのこころと化粧の関係などの優れた研究が数多くみられ、コスメトロジーの進化が明らかにみえるようです。特に有用性に関わるテーマにおきましては、皮膚科学、工学、心理学、社会学の観点から多くのアプローチがなされ、化粧に関わる現象の解明に向け独創性のある知見が得られております。

今後も老化防止やQOLなどをキーワードとして複数分野の融合研究が盛んになってくるかと予測されます。ひとつひとつの研究が科学技術の潮流においてもライフサイエンスの進化や生活向上、健康増進に寄与する可能性があるのではないかと考えております。当財団は分野の枠にとらわれることなく、化粧品学のさらなる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。

皆様方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21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

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

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

大阪大学大学院工学研究科
水 上　進

Controlled release systems induced by external stimulation have attracted great attention, because these systems enable spatiotemporal regulation of active drugs in target organs. Furthermore, the drug efficacy could be enhanced, and thus the dosage could be reduced. Until now, several strategies for controlled release have been proposed. As the external stimulation, temperature, pH, light, etc. have been used. Especially, controlled release by light is very promising, because light irradiation does not need complex instruments and can be concentrated on the small area. Additionally, laser devices are clinically used in photodynamic therapy. However, there are almost no practical photo-controlled drug release systems. Therefore, we started to develop a novel drug release system triggered by light irradiation. We focused on the membrane-damaging properties of antimicrobial peptides (AMPs) such as magainin. AMPs are attracting increased attention as novel types of antibiotics. Their target is the lipid bilayer of bacterial membrane, and they kill bacteria by disrupting their membranes. We synthesized an AMP mimic foldamer modified with (6-Bromo-7-hydroxycoumarin-4-yl)methoxycarbonyl (Bhc) groups, which are photocleavable protective groups. The caged group is deprotected by irradiation UV light around 365 nm. When the caged molecule was treated, the AMP mimic foldamer was reproduced. Then, we applied the caged compound to the controlled drug release system. After several kinds of liposomes containing fluorescence dyes were treated with the caged compound. Only when the samples were treated with UV light, fluorescence dyes were released.

1．緒　言

ドラッグデリバリーシステム（Drug Delivery System: DDS）は、薬物の投与を量的・時間的・空間的に制御する手法であり、副作用の低減や薬効の増強などを可能とするため、近年盛んに研究されており、実用化されているものも存在する。近年、外部刺激によってキャリアに内包された薬物の放出を制御する研究は大きな注目を集めている。これまでに行われた研究例において、用いられた外部刺激としては、温度変化、pH 変化、酵素活性、あるいは金属イオンなどが挙げられる[1)]が、近年では非侵襲的な刺激として光[2)]が大きな注目されている。消化管や血管内における内視鏡技術の発達により、体内の局所で光を照射することも不可能ではない。それゆえ、光によって薬物放出をコントロールすることができれば、多くの疾患において幅広い応用が期待できる。しかしながら、光照射によって薬物放出を引き起こす手法の中で、臨床で用いられているものはまだ無い。そこで、本研究において、新規メカニズムに基づく光誘導薬物放出システムの開発に取り組んだ。

2．実　験

2．1　光応答薬物放出システムの開発コンセプト

本研究では、薬物キャリアとしてはリポソームを選択した。リポソームは、脂質二分子膜が殻のようになった構造を持つ小胞である。内部に水を含み水中で安定に分散する。作成方法を変えることで大きさを制御でき、直径が 100 nm ～ 1 μm のものを Large Unilamellar Vesicles（LUVs）と呼び、10μm 以上のものを Giant Unilamellar Vesicles（GUVs）と呼ぶ。近年では、化学修飾などによって安定性が向上したため、様々な分野への応用が期待されている[3)]。

一方、薬物を放出させるスイッチについては、これまでの研究ではリポソームを構成するリン脂質に光応答性官能基を修飾するものがほとんどであった。今回我々は、リポソームを破壊して内包薬物を放出させる機能性分子を光応答性官能基で修飾し、その薬物放出活性を光によって制御するシステムを考案した。

まず、リポソームを破壊する機能性分子として、抗菌ペプチド[4)]（Antimicrobial Peptides: AMPs）に注目した。抗菌ペプチドは、1920 年代からグラム陰性菌などのバクテリアに対して原核生物が分泌するものとして研究されてきたが、1979 年に蛾のさなぎ由来の抗微生物作用たんぱく質セクロピンが、1987 年にはアフリカツメガエル *Xenopus laevis* の皮膚からマガイニン（図 1 (a)）が単離され、抗菌ペプチドの研究は一気に進展した。

抗菌ペプチドの性質は、1．ウイルスや微生物にのみ作用し、ホスト生物には無害である（選択毒性）、2．即効性がある、3．広い抗菌スペクトルを持つ、の 3 つが挙げられる。特に 1．の選択毒性は抗菌ペプチドの医療への応用にとって重要である。選択毒性の理由として考えられているのが、原核生物と真核生物の細胞膜表面の構成リン脂質の違いである。微生物の細胞膜表面にはフォスファチジルグリセロール、フォスファチジルセリン、カルジオピリン等の酸性リン脂質が存在するのに対し、健康な動物細

Structural conversion and functionalization of self-assembled structures induced by photoirradiation

Shin Mizukami

Graduate School of Engineering, Osaka University

胞膜表面には酸性リン脂質は露出していない。また、微生物膜には存在しないコレステロールが豊富に存在し、その他の構成脂質もフォスファチジルコリンなどの中性脂質である。抗菌ペプチドは正電荷を多く持つので、負電荷を帯びた膜には静電相互作用によって吸着するが、電気的に中性の膜には作用しない。そこで、薬物キャリアとなるリポソームを微生物の細胞表面を構成する酸性の脂質成分で作製することにより、抗菌ペプチドが真核細胞に影響を与えることなくリポソームのみを選択的に破壊できると考えられる。本研究では、マガイニン２の構造および機能アナログとして、Tew らによって報告された PT[5]（Pyrimidine Trimer; 図１(b)）を用いることにした。このとき、PT の殺菌作用に重要なカチオン性官能基を光応答性保護基でブロックすることで、抗菌ペプチドのリポソーム破壊能を光制御できると考えた（図２）。

光応答性保護基は、生理学の分野ではケージド（Caged）基と呼ばれ、これまでに多くの種類の保護基が報告されている。本研究においては、1999 年に古田らによって開発され、その後の生理学研究において多くの応用例が見られる Bhc（(6-bromo-7-hydroxycoumarin-4-yl) methyl）基[6]を選択した。Bhc 基は光反応の量子収率、水溶性などの面で優れた性質を有しており、特にヌクレオチドや mRNA のケージに応用されており、ニューロン等の情報伝達分子の挙動を光制御するツールとしても幅広く利用されている[7]。

２・２　光感受性膜傷害性分子 BBhcPT の合成

抗菌ペプチドアナログ PT および光感受性保護基 MOM-Bhc-ONp をそれぞれ合成し、それらを縮合させた後、脱保護を行い、光応答性膜傷害性分子 BBhcPT を合成した（図３）。合成した化合物は NMR スペクトルおよび質量分析により同定を行った。

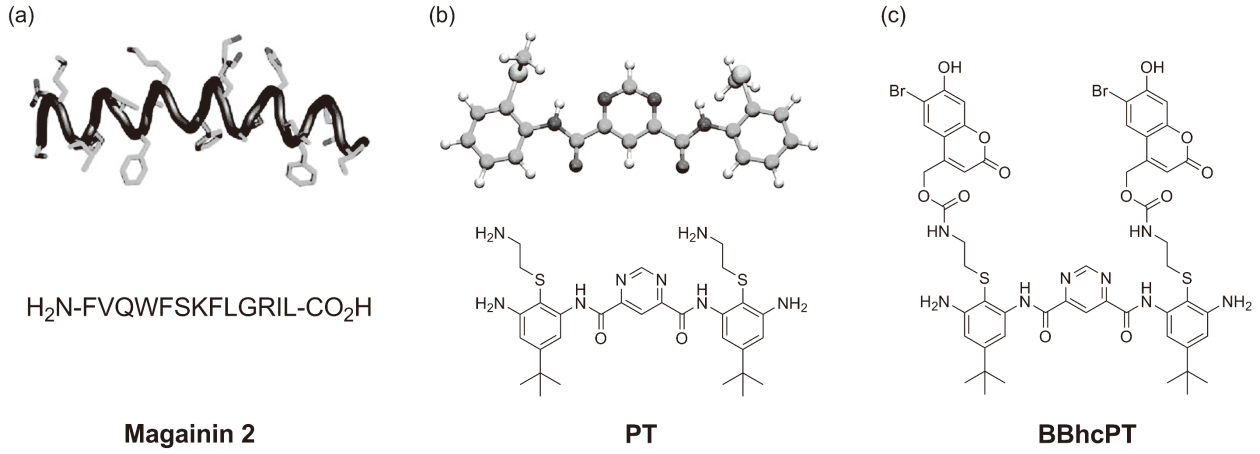


図１　(a) マガイニン２、(b) 膜傷害性分子 PT、および (c) 光応答性膜傷害性分子 BBhcPT の構造

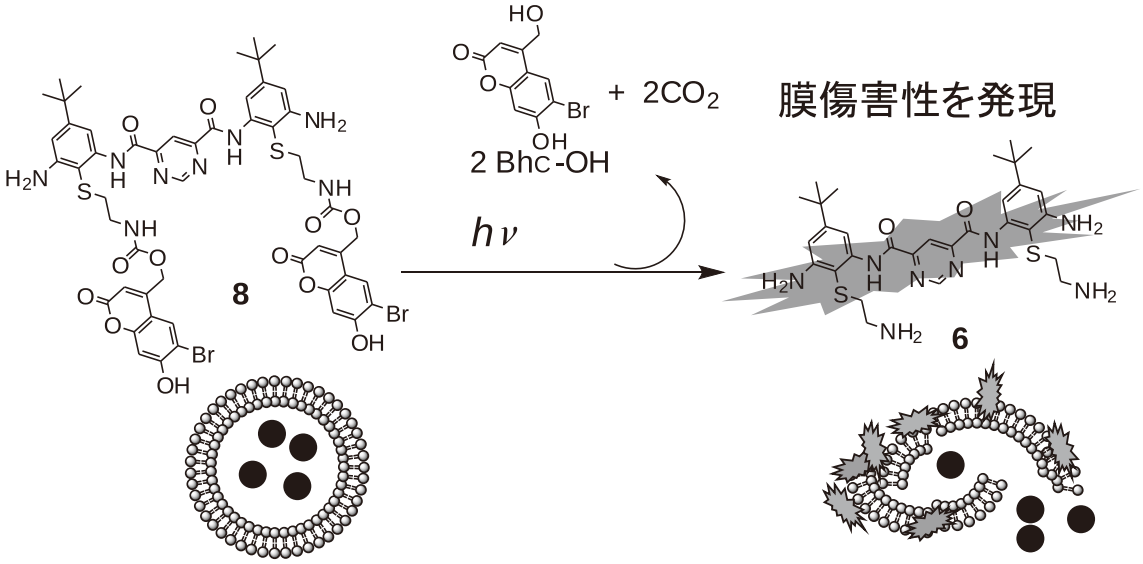


図２　光応答性薬物放出システムの概要

２・３　紫外光照射による BBhc-PT における Bhc 基脱離の確認

紫外光（360 nm）を照射することで、化合物BBhcPTからBhc基が脱離してPTが生成する過程を以下のプロトコルで確認した。まず、1 mM BBhcPT の DMSO 溶液を、10 mM MOPS 緩衝液（pH 7.1）により 100 倍希釈し、10 μM とした。続いて、この溶液 100 μl を石英セルに入れ、レオネット社製の光照射装置を用いて紫外光（360 nm）を当てた。その後、各サンプルを逆相HPLCにより測定した。

２・４　リポソームの調製および光照射によるリポソーム破壊実験

水溶性蛍光物質カルセインを含むリポソーム（Giant Unilamellar Vesicles; GUVs）を作成した。調製したリポソームをポリリジンコートガラスボトムディッシュに移し、静電相互作用によりカバーグラスに沈着させた。蛍光顕微鏡下、カルセインの蛍光を観測することで、リポソームの形態変化を追跡した。ここに、BBhcPT を添加し、360 nm の UV 光を照射しながら、リポソームの形態変化を蛍光顕微鏡により観察した。

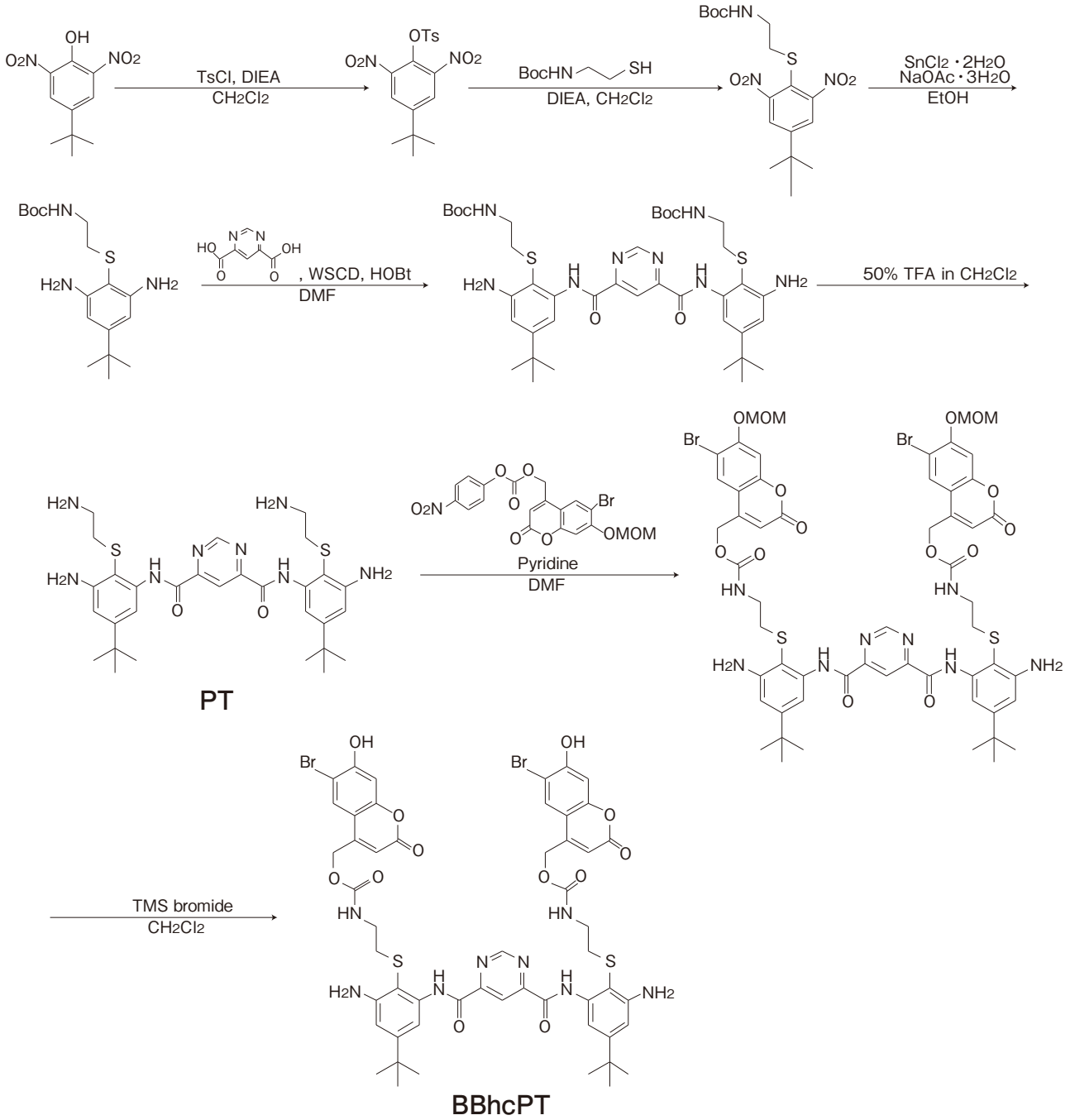


図３　BBhcPT の合成スキーム

3．結　果

図４に示すように、BBhcPT は 360 nm の紫外光を照射したところ、経時的に HPLC ピークが減少し、1800 秒後には完全に消失した。この結果より、BBhcPT は紫外光照射によって、脱保護を受け、膜傷害活性を回復することが示唆された。

次に、蛍光物質カルセインを内包させた LUVs を用いて、BBhcPT を添加した後、紫外光を照射することで、カルセインの放出を定量的に測定した（図５）。照射時間に対するカルセインの流出と BBhcPT の残存率を比較することで、BBhcPT は光照射によってケージ解除されることで膜傷害能を発現し、リポソームを破壊することが示された。

最後に、光照射によるリポソームに内包された化合物の放出を蛍光顕微鏡によって観察した。蛍光物質カルセインを封入した GUVs を作製し、ポリリジンコートガラスボトムディッシュに沈着させた。その後、BBhcPT を添加して静置した後、蛍光顕微鏡を用いて紫外光を照射しながら、GUVs の挙動を観察した。

まずコントロールとして、GUVs が紫外光及びケージ解除前の BBhcPT によって影響を受けないことを確認した。GUVs に DMSO を添加した後 360nm の紫外光を照射した。また、BBhcPT を 10mM の最終濃度で添加し、490 nm の励起光で挙動の観察を行った。

最終濃度 5 μM の光感受性抗菌ペプチドアナログ２をガラスボトムディッシュ上のリポソームに添加し、６分間静置した。蛍光顕微鏡システムによる 488 nm の励起光照射ではリポソームの形態にほとんど影響を与えないことを確認した。次に、励起光の波長を 350 nm に変更し、リポソームの観察を行った。紫外光による励起開始の数十秒後からリポソーム膜の形態変化が観察され始め、２分半後には内部のカルセインが完全に流出するのが確認された（図６）。また、BBhcPT の濃度を増やすことによって、素早いカルセインの放出が起こることも明らかとなった。低濃度の BBhcPT の添加では、図６のようなダイナミックなリポソーム破壊は観測されず、リポソーム内の蛍光強度が徐々に消光していく傾向が見られた。この場合は、リポソーム上に細孔を形成し、カルセインが徐々に漏出した為と思われる。

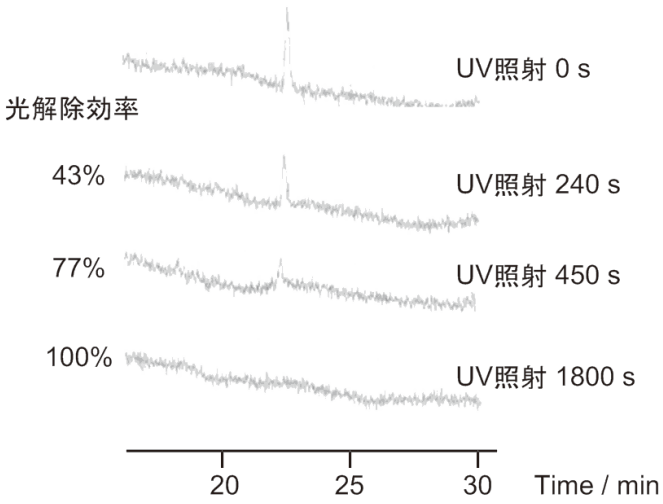


図４．紫外光照射による BBhcPT の HPLC チャートの時間変化

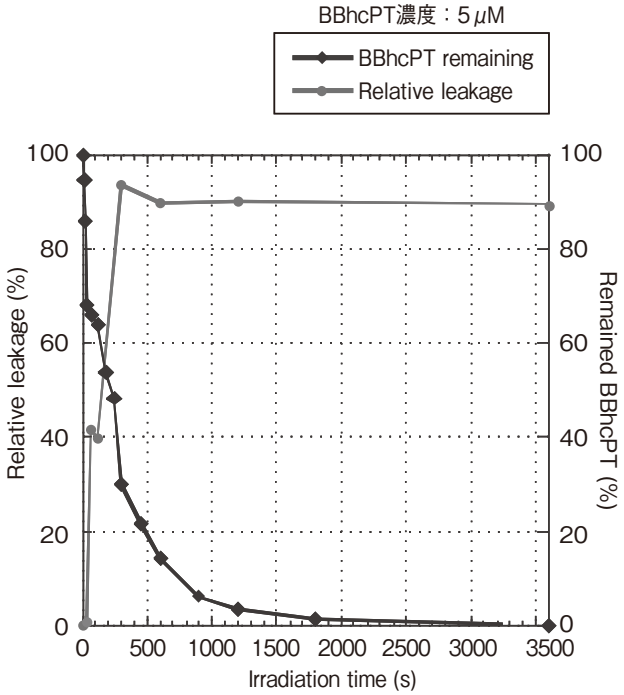


図５．BBhcPT の光解除効率（◆）、および流出したカルセインの割合（●）の経時変化

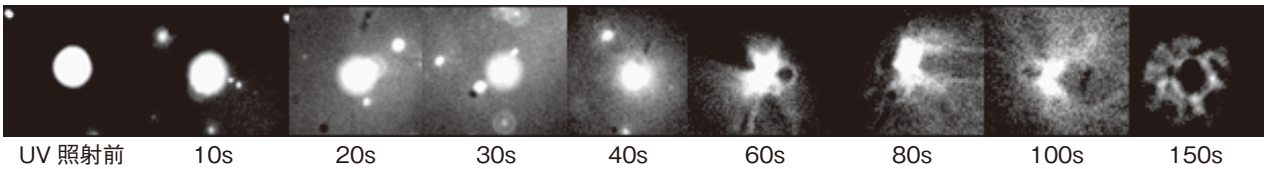


図６．紫外光照射によって引き起こされた、リポソームに内包されたカルセインの放出

4．考　察

本研究において、抗菌ペプチドの細菌膜傷害活性に着目し、脂質集合体ドラッグキャリアであるリポソーム内に内包された薬物を光刺激によって放出させるシステムの構築に成功した。抗菌ペプチドアナログの膜傷害活性に重要な官能基を光感受性保護基で保護することで、紫外光照射のときのみ膜傷害活性を発現させることができた。また、リポソームの組成は最近の細胞膜に近い組成を選択することで、選択性を出すようにデザインされている。現段階は、まだシステムの基本原理を開発したところであるが、今後ドラッグキャリア内に光感受性分子を組み込み、より汎用性が高い光感受性ドラッグキャリアへと発展させる予定である。本研究で用いる薬物キャリアはリポソームであり、このような脂質からなる自己集合体は化粧品にも馴染みの深い成分である。すなわち本研究の応用例としては、医療応用のみならず、紫外線に暴露された場合の皮膚の保護能を有する機能性化粧品の開発などコスメトロジーへと発展する可能性を持つ。

（参考文献）

1）(a) A. Chilkoti, M. R. Dreher, D. E. Meyer, D. Raucher, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 613–630. (b) D. Schmaljohann, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *58*, 1655–1670. (c) N. Rapoport, *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 962–990.

2）P. Shum, J. -M. Kim, D. H. Thompson, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *53*, 273–284.

3）V. P. Torchilin, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 145–160.

4）M. Zasloff, *Nature* **2002**, *415*, 389–395.

5）G. N. Tew, D. Liu, B. Chen, R. J. Doerksen, J. Kaplan, P. J. Carrol, M. L. Klein, W. F. DeGrado, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 5110-5114.

6）T. Furuta, S. S. Wang, J. L. Dantzker, T. M. Dore, W. J. Bybee, E. M. Callaway, W. Denk, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 1193–1200.

7）H. Ando, T. Furuta, R. Y. Tsien, H. Okamoto, *Nat. Genet.* **2001**, *28*, 317–325.

ツバキ油に含まれるトリテルペンの生合成研究

東京大学大学院薬学系研究科
渋 谷　雅 明

Camellia oil is used as a base material in oil-based cosmetics, and rates high quality oil due to high composition of oleate glycerides. In addition to fatty acid glycerides, camellia oil contains triterpenes as minor constituents. Although effectiveness of triterpenes in camellia oil is uncovered yet, triterpenes specific for camellia oil likely characterize camellia oil as a good material in cosmetics, which are *seco*-triterpenes, camelliol A, B, sasanquol, *etc*. Biosynthesis of these *seco*-triterpenes was unknown. Recent study on *Arabidopsis thaliana* oxidosqualene cyclase (OSC), however, revealed that *seco*-triterpenes are directly biosynthesized by OSC. In order to clarify the biosynthesis of triterpenes in *Camellia japonica*, cDNA cloning of OSC from seeds of C. *japonica* was carried out by homology-based PCR in this study. Presence of eleven OSC homologues (named as cj-01, -02, ---- and -11) was revealed by analysis of the sequence of core DNA fragments. Sequences of three full-length OSCs (cj-01, 08, 11) were obtained by RACE, although none of the other eight OSCs was unfortunately obtained. Three full-length OSCs (cj-01, 08, 11) were obtained by PCR, and ligated into yeast expression vector pYES2. Resulting expression vectors were transferred into *ERG7* (lanosterol synthase gene) deficient yeast strain GIL77. After cell lysis and extraction with hexane, extracts were subjected to GC-MS analysis, which revealed that extract from cj-01 transformant contained β-amyrin as a sole product, that of cj-08 α-amyrin and β-amyrin, and that of cj-11 also α-amyrin and β-amyrin. Minor products by these three transformants were extensively surveyed, but no trace of camelliol A, B and sasanquol was detected. From these result, it is concluded that none of the obtained OSCs (cj-01, 08, 11) in this study was involved in the biosynthesis of camelliol A, B and sasanquol.

1．緒　言

1-1　ツバキ油

ツバキ（*Camellia japonica*）は日本原産の樹木である。古事記や万葉集にツバキの記載があり、観賞用として古くから日本人に親しまれてきた。また、ツバキの種子を圧搾して得られるツバキ油は、毛髪への吸収が優れていることや毛髪へ弾力性を与える長所のゆえ、奈良時代の頃から宮中の女性たちの黒い垂髪を整える髪油として使用され始め、その後、大衆にも普及した。化粧品の油性基剤として用いられている植物性不乾性油の中でも、植物性油脂としての安定性や品質の高さを示す指標に用いられるオレイン酸含量は 85 − 90% であり、オリーブ油（オレイン酸の含有量は 54 − 83%）を大きく引き離している。明治時代の西洋文明の導入、さらに、戦後の石油化学技術を基盤とした工業製品の汎用は、化粧品にも及び、一時期、ツバキ油への関心は薄らいでいたが、近年の国民の自然志向、環境問題への配慮からツバキ油への関心が高まり始めている。

1-2　ツバキ油の成分

ツバキ油、オリーブ油などの植物油は、主成分として脂肪酸のグリセライドを含むが、数パーセントの含量でトリテルペンを含んでいる。オレイン酸が高含量であることが髪油としての有用性の高さと考えられてきたが、それ以外に微量に含まれるトリテルペンが、ツバキ油の髪油としての有用性（安定性、吸収性、弾力性の向上など）を高めている可能性も十分考えられる。実際、近年の研究から、ツバキ油やサザンカ油には、β −アミリン(**1**)、α −アミリン(**2**)、ルペオール(**3**) などの植物界に広く分布するトリテルペンに加えて、カメリオール A(**4**)、カメリオール B(**5**)、カメリオール C(**6**)、サザンクオール(**7**) などのツバキ油特有のトリテルペンが含まれていることが判明した(引用文献 1)。

1-3　トリテルペンの生合成、オキシドスクアレン閉環酵素

トリテルペンは植物ステロール生合成の中間体であるオキシドスクアレン(**8**) から分岐して生合成される。トリテルペンの骨格はこの分岐反応を触媒する酵素（オキシドスクアレン閉環酵素（oxidosqualene cyclase, OSC)、あるいは、トリテルペン合成酵素と呼ぶ）によってつくり出される。これまで β −アミリン合成酵素をはじめとして、複数の高等植物から 20 種を超える OSC がクローニングされている。近年、我々によってシロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）からセコアミリン合成酵素が同定された（引用文献 2)。この酵素は、「OSC は直線状の基質から環構造をつくり出す酵素である。」というこれまでの概念に反し、開裂反応により一旦構築した環構造を破壊し、新骨格を創出する酵素であった。もし、このような OSC が普遍的に

Studies on the Biosynthesis of Triterpenes in Camellia Oil
Masaaki Shibuya
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

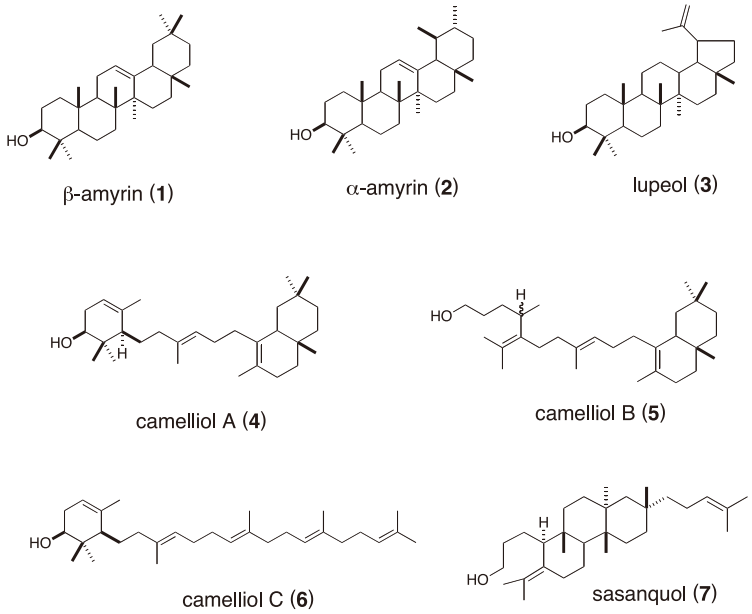


図１　ツバキ油に含まれるトリテルペン

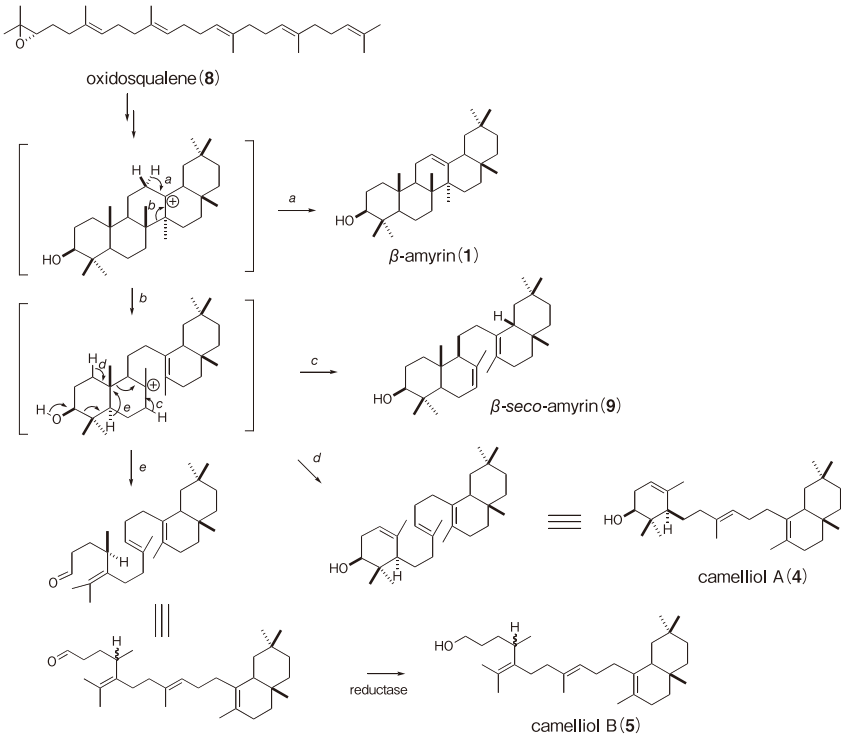


図２　セコトリテルペンの生合成機構

分布するならば、ツバキ油に含まれる開裂型トリテルペンであるカメリオール A、B などは、OSC により直接生合成されるものと考えられる（図 2）。すなわち、ツバキ種子には、シロイヌナズナ由来のセコアミリン合成酵素と類似した反応を触媒する OSC が存在していると考えられる。しかし、これまでツバキの OSC に関する研究はなされていないため、ツバキにおけるトリテルペン生合成機構は全く不明である。

1-4　本研究の目的

ツバキのトリテルペンの生合成機構を明らかにできれば、生合成酵素遺伝子の高発現、あるいは抑制により、従来のものとはトリテルペンの種類と含量が異なったツバキ油を調製することが可能となる。本研究においては、ツバキの形質転換による品種改良を視野にいれ、ツバキ種子からトリテルペン合成酵素のクローニングを行う。

2. 実験、結果

2-1 ツバキ種子の収穫

平成18年7月に、東京大学本郷キャンパスに植樹されているツバキから種子を収穫した。種皮を剥皮後、直ちに液体窒素で凍結し、－80℃にて保存した。

2-2 ツバキ種子から RNA の調製、及び、逆転写反応による cDNA の調製

凍結保存されていたツバキ種子を、液体窒素を加えながら乳鉢・乳棒を用いて粉砕した。破砕物からフェノールクロロフォルム法で Total RNA を調製した。さらに、GE社の RNA purification kit を使用して精製し、mRNA を調製した。

この mRNA を鋳型とし、dT primer と superscript Ⅱを用いて逆転写反応を行った。得られた産物を以下のPCR の鋳型として用いた。

2-3 Nested PCR による中央部の増幅

既知OSC に保存されているアミノ酸配列に基づいて10種のオリゴ DNA を合成した。

これらプライマーを組み合わせて上記cDNA を鋳型にPCR を行なった。PCR 生成物をプラスミドベクターにサブクローニングし、総数72個のクローンの塩基配列を決定した。その結果、11種にグループ分けすることができ、各クローンを CJ-01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11 と命名した。

2-4 RACE 法による塩基配列の決定

各クローンについて RACE 法（引用文献3）による塩基配列の決定を試みた。11種のうち、8種については何らかの理由により PCR の産物が全く得られなかった。PCR産物が得られた cj-01, 08, 11 の3種のクローンについてRACE 法よる塩基配列の決定を進めた。その結果、全ORF の塩基配列を決定することができた。

2-4 全長クローンの取得、及び酵母での発現

cj-01, 08, 11 の3種のクローンのN 末、及びC 末に対応するオリゴ DNA を合成し、それらを用いて PCR を行い、3種の OSC の全長クローンの DNA 断片を得た。それらを酵母発現ベクター pYES2（Invitrogen）に組み込んだ。得られたプラスミドをラノステロール合成酵素欠損酵母株GIL77 に導入した。

各プラスミドで形質転換した GIL77 を培養し、ガラクトース添加で導入遺伝子の発現を誘導した。

2-5 生成物の同定

GIL77 は、ラノステロール合成酵素が欠損しているために、ラノステロール合成酵素の基質となるオキシドスクアレンを酵母内に蓄積させる。GIL77 内で発現した OSC は、この蓄積したオキシドスクアレンと反応し生成物を与えるので、酵母に蓄積する生成物の構造を決定することにより、導入OSC の機能を同定することができる。

ガラクトース添加で導入遺伝子の発現を誘導した酵母（20 mℓの培養）を遠心により集菌し、アルカリ添加後加熱により容菌した。ヘキサンで抽出し、抽出物を GCMS で解析した。

cj-01 は単一生成物を与え、GC の保持時間と MS の開裂様式が標品の β －アミリンと完全に一致したことから､生成物を β －アミリンと同定した。一方、cj-08 は、複数の生成物を与えた。GCMS で最も強度の大きかった生成物は、GC の保持時間と MS の開裂様式が標品の α －アミリンと完全に一致した。また次に強度が強かったものは、同様に標品との比較から β －アミリンと同定した。cj-11 の生成物は、cj-08 の生成物と同一であった。cj-08、及びcj-11 の生成物の組成は、これまで報告のある混合アミリン合成酵素のものと一致していた。

以上の結果から、cj-01 を β－アミリン合成酵素、cj-08、及び cj-11 を混合アミリン合成酵素と同定した。

2-5 cj-01, -08, -11 の Minor 成分の検索

本研究においてツバキには少なくても 11 種の OSC クローンが存在することが明らかになった。これまでのところ、3種の OSC（cj-01：β －アミリン合成酵素、cj-08、及びcj-11：混合アミリン合成酵素）を同定したが、残りの8種の OSC は得られていない。これら得られていない8種のOSC のいずれかがカメリオール A、及び B などのセコトリテルペンを生産する可能性が高いが、ツバキ油に含まれるセコトリテルペンの含量はごく微量（引用文献1）であるので、cj-01、cj-08、及び cj-11 が、微量ながらカメリオール A、及び B を生産する可能性も否定できない。そこで、酵母で発現した cj-01、cj-08、及び cj-11 の生成物の微量成分中にカメリオール A、及び B が含まれているかどうかを調べることにした。

各形質転換酵母を 1L 培養し、同様にアルカリ添加後加熱により容菌した。ヘキサンで抽出し、生成物を抽出した。抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラムで分離し、β －アミリンを major に含むフラクションの前後のフラクションを GCMS で解析した。カメリオール A、及び B の標品を入手することが困難であったため、MS の開裂様式の文献値と比較して、カメリオール A、及び B が存在するかどうかを調べた。しかしながら、カメリオール A、及び B に相当するトリテルペンは検出できなかった。以上の結

果から、cj-01、cj-08、及び cj-11 はカメリオール A、及び B の生合成に関与していないことが強く示唆された。

3. まとめと考察

ツバキ油に含まれるトリテルペン、特にセコ型トリテルペンの骨格生成に関与する OSC のクローニングをめざして、ツバキ種子から OSC のクローニングを行なった。既知OSC に保存されているアミノ酸配列を利用して合成したプライマーを用いて PCR を行なったところ、11 種の OSC クローンの存在が明らかとなった。これらのうち、cj-01, cj-08, cj-11 の 3 種のクローンについて、RACE 法により全長配列の決定に成功した。これら 3 種の全長クローンを PCR により得、酵母酵母発現ベクターに組み込み、ラノステロール合成酵素欠損酵母株GIL77 で異種発現させた。生成物を GCMS で解析し、cj-01 を β －アミリン合成酵素、cj-08 と cj-11 を混合アミリン合成酵素と同定した。cj-01、cj-08、及び cj-11 の酵母における微量生成物を調べたが、カメリオール A、及び B に相当するトリテルペンは検出できず、cj-01、cj-08、及び cj-11 はカメリオール A、及び B の生合成に関与していないと思われる。

クローニングが成功しなかった 8 種の OSC の中にカメリオール A、及び B の生合成に関与する OSC が含まれる可能性が高い。ツバキ油のカメリオール A、及び B の含量は少なく、もしこれら 8 種の中に目的の OSC が含まれているとしたならば、そのツバキでの発現量は含量に比例して極めて少ないと予想される。発現量の少なさが RACE 法による DNA 断片の増幅を困難にしている可能性が高いと思われる。本研究期間の後半では、そのような視点に立ち、微量RNA を効率的に増幅可能な改良RACE 法（Clontech 社の SMART RACE cDNA 増幅キットなど）を用いて未クローニングの 8 種の OSC のクローニングを試みたが、成功することができなかった。

考えられるクローニング未成功のもう一つの理由として、種子の収穫時期とカメリオール A、及び B の生合成時期の相違、あるいは RNA 調製に用いた部位と生合成の場所との相違が考えられる。種子の収穫時期の変更、葉など種子以外からの RNA の調製などの試行が必要と思われる。

カメリオール A、及び B を生成物として与える OSC のクローニングの未成功は、「OSC はセコトリテルペンに関与しないのでは？」という疑念を生じさせる。すなわち、β －アミリンなどの閉環産物を基質として、その二重結合にプロトネーションしカルボカチオンを生じさせて反応を進行させる異性化酵素が存在し、その異性化酵素がカメリオール A、及び B の生合成に寄与している可能性を考慮する必要性が生じる。

本研究と独立して、セコトリテルペンであるヘリアノ

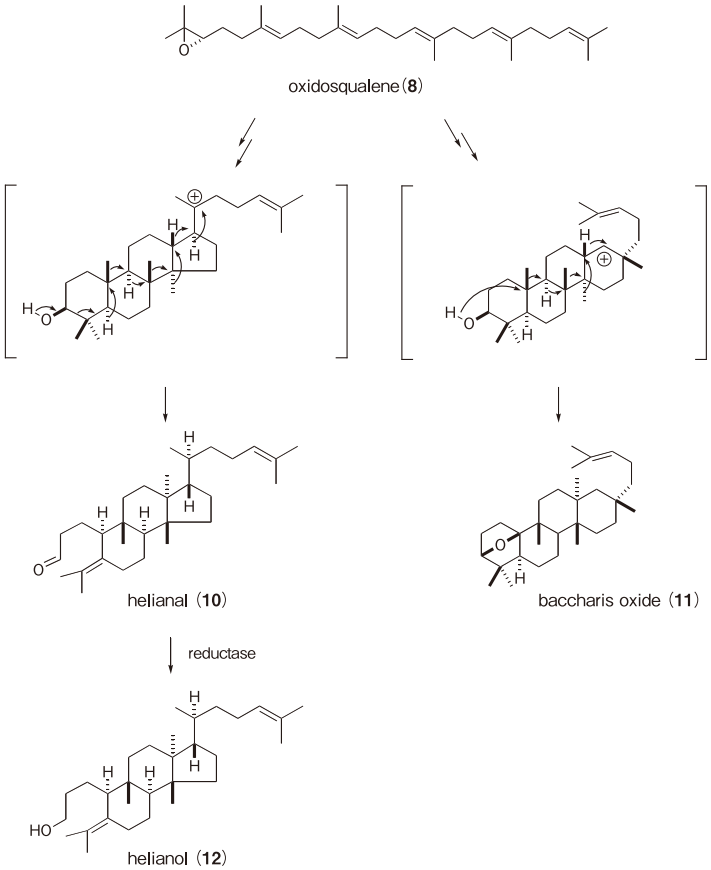


図３　ヘリアノールおよびバッカリスオキサイドの生合成

ール（**12**）の単離が報告されているヒマワリ（*Helianthus annuus*）の管状花、及びB環開裂型オレアナン骨格のトリテルペンが報告されている *Stevia viscida* 及び *Stevia eupatoria*（引用文献4）の同族植物 *Stevia rebaudiana* の根から、本研究と同様の手法によりセコテルペン合成酵素のクローングを試みた。

その結果、*S. rebaudiana* からはバッカリスオキシド合成酵素（引用文献5)、ヒマワリからはヘリアナール合成酵素のクローニングに成功した。バッカリスオキシド（**11**）はセコトリテルペンではないが、ヘリアナールは標的としたセコトリテルペンである。ヒマワリ由来ヘリアナール合成酵素は、セコトリテルペンを生成物として与えるシロイヌナズナ由来以外OSCの初めての例である。このことから、セコトリテルペンを生成物として与えるOSCは、セコトリテルペン生産植物に存在することが強く示唆される。ツバキにおいても、セコトリテルペンの生産に関与するOSCが存在しているものと思われる。早期にクローニングを成功させ、ツバキの形質転換の足場を築きたいと考えている。

（引用文献）

1）T. Akihisa, K. Koike, Y. Kimura, et. al., Lipids, 34, 1151-1157（1999）.

2）M. Shibuya, T. Xiang, Y. Katsube, et.al., J. Am. Chem. Soc, 129, 1450-1455（2007）.

3）M.A. Frohman, M.K. Dush, et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8998-9002（1988）.

4）L.U.Roman, D.Guerra-Ramirez, et. al. Org. Lett. 6, 173-176（2004）.

5）M. Shibuya, A. Sagara, et. al., Org. Lett., 10, 5071-5074（2008）.

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

大阪教育大学教育学部
織 田　博 則

While the contribution of singlet oxygen quenchers to synthetic colors has been studied previously by several workers, there have been few studies pertaining to the use of singlet oxygen quenchers as a means of improving the light fastness of cosmetic colors (e.g. hair colors). Nickel complexes of arylsulfonic acids were preliminary prepared, and the protecting effect of these compounds towards the photochemical stability of natural and synthetic colors was examined in polymer substrate. It was proposed that nickel salts of benzenesulfonic acid and its derivatives can be applied as effective stabilizers against the photofading of synthetic or natural colors.

In this paper, the photofading behaviors of some colors were investigated in polymer substrate. The contribution of singlet oxygen to those fading was suggested. Various phenyl ester type UV absorbers were prepared, and the protecting effect of these compounds towards the photofading of colors was in cellulose acetate film. The application of simple UV absorbing compounds is not necessarily useful for improving the light fastness of colors. However, phenyl ester UV absorbers bearing a singlet oxygen quencher, nickel sulfonate group, almost perfectly suppress the photofading rate of these colors. It was proposed that nickel complexes of 4-benzoyloxybenzenesulfonic acid and its derivatives can be applied as effective stabilizers against the fading of colors.

Antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Eschrichia coli* of six phenyl ester type UV absorbers containing nickel sulfonate group was investigated a mean of JIS test method (JIS L 1992). The antibacterial activity was not observed about six compounds. It was suggested that these nickel compounds were environmental safety chemical compounds.

1．緒　言

フロンによる成層圏オゾン濃度の減少は地表に到達する太陽紫外線の増大を招き、地球上の生物に多大な悪影響を及ぼすことが予測される。そのため近年、紫外線による皮膚障害を防御する意識が高まってきた。ＵＶカット剤は日焼けを防止することから、化粧品分野では古くから取り上げられている。

又、化粧品分野の中では、昨今パーマやヘヤーカラーの需要が高くなっているが、染毛剤は単に髪が傷むというだけでなく、強い毒性を持つ物質が多数含まれており、健康に重大な影響を与えている。染毛剤使用によるアナフィラキシーの症状は、激しい呼吸困難症状、顔、唇、喉粘膜・喉の激しい痛み、咳、舌・喉・首のむくみによる呼吸困難、目に入ったり、眉毛やまつげに使用した時に、目が焼け付くような感じ、結膜の充血や白内障の報告もある。その原因は、酸化染料の原料である *p*-フェニレンジアミン誘導体に対するアレルギー反応や毒性に起因する。この現状下、最近天然素材に含有されている色素への関心が高まって来た。植物に由来する色素としてはクチナシ、紅花、うこん、動物に由来する色素はコチニール、ラック色素などが知られているが、天然素材含有色素を染毛用色素として用いる場合には、色素の光不安定性が問題になり、その利用を阻んでいる。

本研究は優れた紫外線カット機能と日光堅ろう度改善効果を併せ持つ機能性材料の開発に関する基礎研究として、可視光照射による退色を効率よく抑制するニッケルスルホン酸基[1]をフェニルエステル系紫外線吸収剤の分子内に導入し、紫外・可視両域での色素の日光堅ろう度改善機能を有する化合物の合成を行い、その効果について検討した。天然色素を用いて安定化剤の効果を検討する場合、現在未だ化学構造がハッキリしていない天然色素が多く、異性体や不純物の混在による純度の低さが問題となるため、ここでは合成色素をモデル化合物に選び、機能性紫外線カット剤の安定化効果を検討した。

さらに、これらの添加物が化粧品関連材料に適用された場合の環境毒性についても検討した。

Developments of UV Cutting Materials and the Utilization for Cosmetics (Hair Colors or UV Cutting Articles)

Hironori Oda

Faculty of Education, Osaka Kyoiku University

2．実　験

2．1　材　料

この実験で使用した染料クリスタルバイオレット（C. I. Basic Violet 3）（dye 1; λ_{max} 560, 595nm）とローズベンガル（C. I. Acid Red 94）（dye 2; λ_{max} 521, 562 nm）は和光純薬kkから購入した。化学構造式を図１に示す。ベンゾフェノン系紫外線収剤 2- ヒドロキシベンゾフェノン（HBP）（λ_{max} 260, 335nm）は東京化成kkから購入したものを精製して用いた。各種タイプの異なる新規なフェニルエステル系紫外線吸収剤は文献[2]に従い合成した。ニッケルスルホン酸類の合成も文献[1]に従い、合成し精製

した。本研究で新たに合成された紫外線吸収機能を有する安定化剤の化学構造式を図２に示す。

２．２　フィルム中での光退色

ローズベンガル（5×10^{-4} mol dm^{-3}）をアセトンと DMF（1:1v/v）の混合溶液 40 ㎤に溶解し、各種スルホン酸の金属塩や HBP などの添加物（1×10^{-2} mol dm^{-3}）を含んだ溶液と含まない溶液を調整し、酢酸セルロース（4g）を加え、ガラス板にキャスティングし 150℃で１時間乾燥した後、減圧下１週間室温で乾燥して、着色フィルムを作成した。

得られたフィルム（厚さ：30 ㎛）に 38℃、湿度 30％で 6kW カーボンフェードメータ（須賀試験機kk、FAL-5）を用い光照射した。その吸収スペクトルを分光光度計により測定し、光退色挙動を追求した。

２．３　添加物の抗菌活性評価

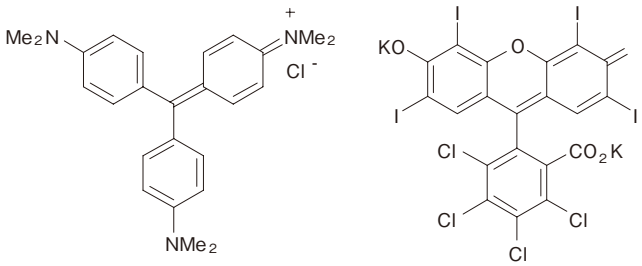
黄色ブドウ球菌と大腸菌に対する新規添加物の抗菌活性を検討した。試験した添加物は図２に示した新規合成添加物のうちエステルのニッケル塩類６種であった。さらに比較のため、抗菌活性についてすでに検討されている染料４種（メチレンブルー、フクシン、クリスタルバイオレッドおよびアシッドフクシン）について同時に検討した。

抗菌活性試験は、日本工業規格（JIS）の「繊維製品の抗菌性試験法（L 1992）に準じた定性試験を行った。検査用細菌は黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus*（グラム陽性球菌）保存菌：NBRC12732　および大腸菌 *Escherichia coli*（グラム陰性桿菌）保存菌：ATCC25922 であった。試験培地は菌ごとに、菌濃度が１㎖あたり 10^6 個のオーダーになるように調整した普通寒天培地を準備し、内径 90 ㎜の滅菌済みシャーレに約 15 ㎖ずつ分注し凝固させた。抗菌活性試験に使用した検体は、羊毛モスリン（10× 5 ㎝）を用い、３％ owf、浴比（１：30）、90℃、30 分の条件で染料あるいはエステルのニッケル塩を染着または吸着させたものを、一辺 28 ㎜の正方形に切った布片である。これを高圧蒸気滅菌（２気圧、121℃、15 分）後、前述の培地の中央に貼付した。24 時間後に観察し、布の周りの菌が繁殖していないハローと呼ばれる部分の有無で抗菌活性を判定した。

3.　結果および考察

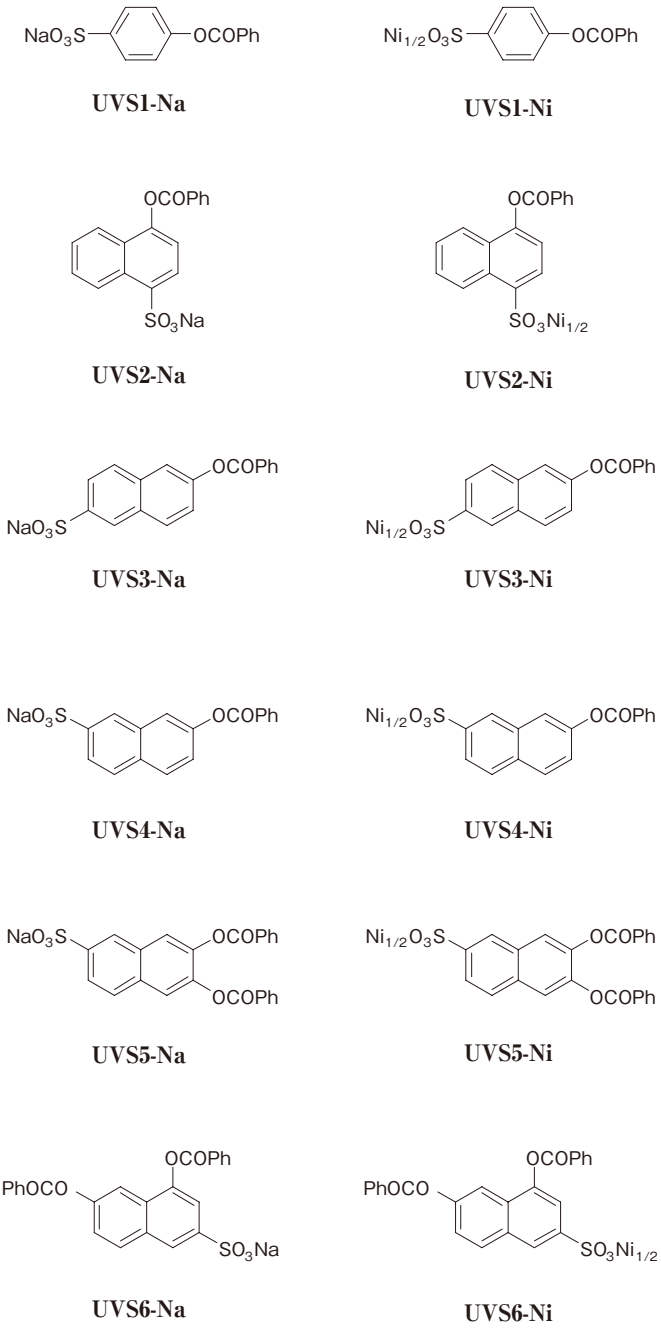
３．１　フェニルエステル系紫外線吸収剤の耐光性改善効果

染料の光退色過程は、染料の化学構造のみならず、染料の染着状態、基質の性質、外的条件、共存物の性質など多くの因子によって決定される非常に複雑な系であるとされている。それは多くの光反応が競争的に起こるからであり、



dye 1　　**dye 2**

Figure 1　Dyes used in the present study



UVS1-Na　**UVS1-Ni**
UVS2-Na　**UVS2-Ni**
UVS3-Na　**UVS3-Ni**
UVS4-Na　**UVS4-Ni**
UVS5-Na　**UVS5-Ni**
UVS6-Na　**UVS6-Ni**

Figure 2　Stabilizers used in the present study

それぞれの反応が退色に寄与する程度、つまりいずれの反応因子が特に優先するかは、その状態によって異なり、優先する因子が光退色過程を決定するものと思われる。

染料の化学構造と日光堅ろう度との関係は、以前から数多くの経験的事実が集積されており、光退色は一般に酸化反応に起因して起こり、基質が染料より酸化されやすい場合には還元反応が起こり、一部の染料によっては異性化や二量化の寄与を受けるものもある[3)]。

染料の光退色における酸化反応については、自動酸化、一重項酸素酸化およびスーパーオキシドイオン酸化の寄与が見出されている。自動酸化は基底状態の酸素が酸化剤となり、ラジカル生成により退色が開始され、ラジカル連鎖機構で進行する。それゆえ、紫外線照射などで退色が促進され、自動酸化防止剤や紫外線吸収剤がそれを抑制する[4)]。

このコンセプトに基づき、まずフェニルエステル系紫外線吸収剤の効果をクリスタルバイオレット（dye 1）を用い、酢酸セルロースフィルム中、カーボンアーク灯照射により検討した。その結果を表1に示す。フィルム中での dye 1は、5時間の光照射で46％、15時間の照射で75％退色するのに対し、UVS1-Na 存在下では18％および38％の退色が見られ、市販紫外線吸収剤である2-ヒドロキシベンゾフェノン（HBP）とその効果はよく似ている。同様な抑制効果は、他のナフタレン誘導体（UVS2-Na ～UVS6-Na）についても見られる。

次にローズベンガル（dye 2）についても同様、酢酸セルロースフィルム中カーボンアーク灯照射により検討した。その結果を表2に示す。大半のフェニルエステル系化合物は、先と同様、dye 2の光退色をほとんど抑制せず、その効果は HBP と同様であった。

３．２　機能性フェニルエステル系紫外線吸収剤の耐光性改善効果

一重項酸素酸化は染料の励起三重項エネルギーを、基底状態の酸素分子に移行することにより生成した、一重項状態の酸素活性種が酸化剤となる。この反応の特徴は可視光照射によっても退色が進むことであり、自動酸化防止剤では効果がないが、一重項酸素脱活性化剤が退色を抑制する[5)]。

ところが、現在知られている一重項酸素脱活性化剤を、

Table1　Effect of various uv absorbers on the photofading of dye 1

UV Absorber	Photofading % after light exposure, hours						
	1	2	3	5	7	10	15
None	12	25	30	46	55	65	75
UVS1-Na	1	8	13	18	26	31	38
UVS2-Na	2	8	13	21	27	40	53
UVS3-Na	1	5	7	13	17	26	38
UVS4-Na	2	6	11	20	28	38	57
UVS5-Na	1	5	10	18	24	31	44
UVS6-Na	2	6	10	18	25	33	47
HBP	2	7	12	17	23	35	47

Table 2　Effect of various uv absorbers on the photofading of dye 2

UV Absorber	Photofading % after light exposure, hours						
	1	2	3	4	5	6	7
None	70	90	95	100			
UVS1-Na	35	56	65	70	73	75	77
UVS2-Na	40	61	70	74	77	79	80
UVS3-Na	45	62	68	73	75	79	80
UVS4-Na	50	62	70	74	78	81	83
UVS5-Na	44	58	65	68	73	77	80
UVS6-Na	47	63	70	74	78	81	84
HBP	44	61	69	73	78	81	84

そのまま染料の日光堅ろう度改善剤として使用するには、やや問題が残されている。例えば、β-カロチンは光に弱く[5]、ニッケル錯体は有色性[5]であるため、染色布の色を変えてしまう。第三級アミン類は強塩基性でラジカル酸化を誘発する[4]などの問題を抱えている。ところが、我々が見出したニッケル *p*-トルエンスルホン酸塩は無色性（λ_{max} 233 nm）で、有効な一重項酸素脱活性化効果を有していた[1]。そのため、一重項酸素脱活性化効果を発現していると考えられるニッケルスルホン酸基を、フェニルエステル系紫外線吸収剤の分子内に導入し、紫外・可視領域での日光堅ろう度改善が期待される化合物を合成した。新規に合成された一重項酸素脱活性化機能を有するフェニルエステル系紫外線吸収剤の光退色抑制効果を、dye 1 を用いて酢酸セルロースフィルム中、カーボンアーク灯照射下検討した。その結果を表 3 に示す。

カーボンアーク灯照射により dye 1 は著しく退色するが、その系に UVS1-Ni を添加した場合には殆ど dye 1 の退色は抑制され、15 時間の光照射後も、dye 1 の退色は 2 %であった。また、同様な安定化効果は、ナフタレン誘導体（UVS2-Ni ～UVS6-Ni）についても見られ、先に検討したフェニルエステル系紫外線吸収剤のナトリウム塩（UVS1-Na ～UVS6-Na）や市販紫外線吸収剤（HBP）より、遥かに優れた効果を有していた。事実、UVS1-Ni や UVS3-Ni 添加の系では、dye 1 の退色をほぼ完全に抑制した。このことは、一重項酸素脱活性基を分子内に有する紫外線吸収剤はトリフェニルメタン系染料の光退色抑制には重要な役割を演じていることが明らかになった。一方、UVS5-Ni や UVS6-Ni による抑制効果は他のモノベンゾエート誘導体と同様な抑制効果を示していることから、紫外線吸収剤への更なるバルキーな置換基（例えば、ベンゾエート基）の導入は、染料の日光堅ろう度改善には、必ずしも有効な構造改変でないことを示唆している。

同様な添加剤の効果を dye 2 を用いて、同様な条件下行った。その結果を表 4 に示す。dye 2 はカーボンアーク灯を 1 および 4 時間照射することにより、70 および 100 %退色する。しかし、UVS1-Ni 添加の系では、その退色は 7 および 28%に抑制される。この効果は HBP 添加の系より遥かに優れており、ナフタレン誘導体（UVS2-Ni ～

Table 3　Effect of various uv absorbers on the photofading of dye 1

UV Absorber	Photofading % after light exposure, hours						
	1	2	3	5	7	10	15
None	12	25	30	46	55	65	75
UVS1-Ni	0	0	0	0	0	1	2
UVS2-Ni	0	0	0	0	1	3	7
UVS3-Ni	0	0	0	0	0	1	2
UVS4-Ni	0	0	0	0	1	3	7
UVS5-Ni	0	0	0	1	2	3	7
UVS6-Ni	0	0	0	0	1	2	7
HBP	2	7	12	17	23	35	47

Table 4　Effect of various uv absorbers on the photofading of dye 2

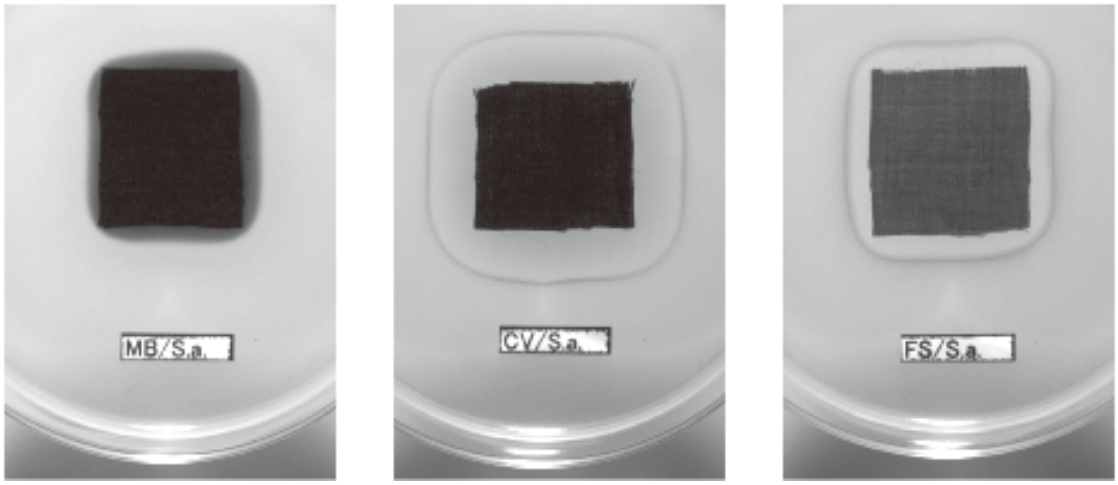
UV Absorber	Photofading % after light exposure, hours						
	1	2	3	4	5	6	7
None	70	90	95	100			
UVS1-Ni	7	15	22	28	31	34	37
UVS2-Ni	10	21	28	36	41	45	47
UVS3-Ni	8	14	19	23	27	30	32
UVS4-Ni	12	19	24	27	30	32	34
UVS5-Ni	12	19	24	29	33	36	40
UVS6-Ni	14	20	23	27	30	32	34
HBP	44	61	69	73	78	81	84

UVS6-Ni）添加の系においても、同様な優れた抑制効果が見られた。

以上の結果より、本研究で新規に開発された、ニッケルスルホン酸基を分子内に有するフェニルエステル系紫外線吸収剤は、従来の安定化剤（紫外線吸収剤など）に比べ、遥かに優れた色素の日光堅ろう度改善効果を有していることが明らかになった。

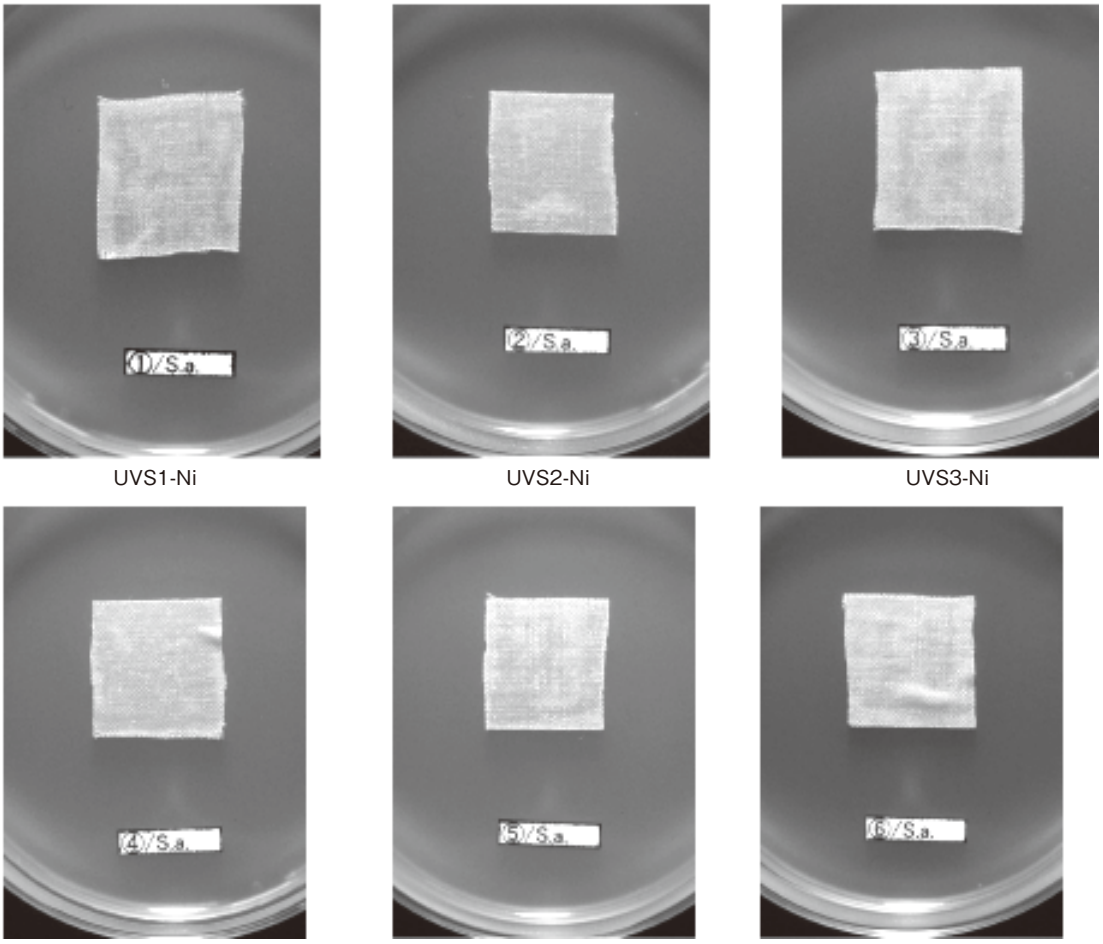
3．3　新規合成紫外線カット材料の抗菌活性評価

黄色ブドウ球菌と大腸菌に対する染料と添加物の抗菌活性試験写真の一部を図３と４に示し、全結果を表５に示した。試用菌数は黄色ブドウ球菌：5.2×10^{6}/ mℓ、大腸菌：



Methylene Blue　　Crystal Violet　　Fuchsine

Figure 3　Elution test by JIS testing method with Basic Dyes against *Sutaphylococcus aureus*



UVS1-Ni　　UVS2-Ni　　UVS3-Ni

UVS4-Ni　　UVS5-Ni　　UVS6-Ni

Fig. 4　Elution test by JIS testing method with Phenyl ester nickel salts against *Sutaphylococcus aureus*

Table 5　Elution test by JIS testing method（JIS L 1902）for phenyl ester uv absorbers and dyes

sample	check of halo	
	S.aureus	*E.coli*
Free[a)]	-[b)]	-
UVS1-Ni	-	-
UVS2-Ni	-	-
UVS3-Ni	-	-
UVS4-Ni	-	-
UVS5-Ni	-	-
UVS6-Ni	-	-
Methylene Blue	+[c)]	-
Fuchsine	+	-
Crystal Vioret	+	-
Acid Fuchsine	-	-

a) with out uv absorbs and dyes, b) no halo, c) halo

7.2×10^{6}/ mℓであった。すぐれた光退色効果がみられたニッケルスルホン酸塩基を有するフェニルエステル系紫外線吸収剤６種では、大腸菌と黄色ブドウ球菌のいずれに対してもハローは見られず、抗菌作用は認められなかった。したがって、これらの添加物は化粧品などの生活関連製品に使用されても、人体や環境にほとんど影響がないものと考えられる。このように環境毒性が低いことはスルホン酸塩基の効果と考えられる[6)]。比較のため同時に試験した染料のうちメチレンブルー、フクシンおよびクリスタルバイオレットの３種では黄色ブドウ球菌に対しハローが見られ抗菌性が認められた。アシッドフクシンには抗菌性は認められなかった。これらの染料の抗菌性については既に検討された結果と同様であり、試験に使用した培地が正常に機能したことが検証された[6)]。したがって、新規開発されたニッケルスルホン酸塩基を有するフェニルエステル系紫外線吸収剤は、環境保全の面からも実用性が高いと思われる。

４．総　括

フロンによる成層圏オゾン濃度の減少は地表に到達する太陽紫外線の増大を招き、地球上の生物に多大な悪影響を及ぼすことが予測される。そのため近年、紫外線による皮膚障害を防御する意識が高まってきた。ＵＶカット剤は日焼けを防止することから、化粧品分野では古くから取り上げられている。しかし、一重項酸素脱活性基を有する紫外線カット剤の合成は全く見られていない。ここでは、可視光照射による化粧品用色素の自己増感性一重項酸素の脱活性化と、有害紫外線Ａ波、Ｂ波からの肌の保護、ならびに化粧品用色素の光安定化を目的として、一重項酸素脱活性基を有するフェニルエステル系紫外線カット剤を新規に合成し、その効果を高分子基質中で検討した。

その結果、紫外線カット剤のみの添加は、さほど安定化効果を発現しなかったが、一重項酸素脱活性基を有する紫外線カット剤はいずれも顕著な安定化効果を具備していた。また、それら化合物は地球環境に優しい化合物である事も明らかとなった。

謝　辞

本研究にご助成頂きました財団法人コスメトロジー研究振興財団に深謝申し上げます。

（参考文献）

１）Oda, H., and Kitao, T., Intramolecular Quenching of Photofading of Some Dyes, *J. Soc. Dyers Colour.*,**101**, 177-179 (1985).

２）Finnegan, R.A. and Mattice, J.J., Photochemical Studies II: The Photo-rearrangement of Aryl Esters, *Tetrahedron*, **21**, 1015-1026（1965）.

３）Allen, A., and Mckellar, J., *Photochemistry of Dyed and Pigmented Polymers*, Applied Science Publishers, London, 1980.

４）Griffiths, J., *Developments in the Chemistry and Technology of Organic Dyes*, Society of Chemical Industry, London, 1984.

５）Wasserman, H.H., and Murry, R.W., *Singlet Oxygen*, Academic Press, London, 1979.

６）杉山章、浅野梨紗、織田博則．大阪教育大学紀要．55（1）33 － 41（2006）

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探索

筑波大学大学院生命環境科学研究科

礒田　博子

Recently, people are experiencing more stress and some have problems regarding hair growth as a part of the aging process. Resolving this hair growth problem is important for the aging society in the future. This is because not only bodily health but also mental health is important for a healthy life. Thus, we attempted to find plants having hair growth regulation activity. We collected plant extracts from Tunisia for bioprospecting purposes. Among them, we investigated the Erica multiflora extract to evaluate the hair growth promotion activity. MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thyazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) assay and cell cycle assay on human dermal papilla cells in vitro and administration assay on mouse dorsal skin in vivo were performed. As a result, the Erica multiflora extract promote the dermal papilla cell growth and cell cycle, and induced hair growth in vivo. We show that the Erica multiflora extract has a high activity for promotion of hair growth cycle, or induction of anagen phase from telogen phase.

1．緒　言

毛の成長周期の制御に関する研究は、現在世界中で盛んに行われており、年々分子生物学的手法を取り入れたものが数多く見られるようになってきた。しかしながら、ごく最近までは医学系の研究者が主に研究を行っていた背景もあり、分子生物学的コントロール下のデータは少ない。また逆に分子生物学者が行っているデータを眺めると、皮膚科学としてのコントロールが正確になされていないものも少なくない。したがって、現在までに報告されているもののうち、分子生物学的・皮膚科学的信頼性の高いものはごく限られた研究室から出た報告に限定されると言わざるを得ない。

また、白髪の改善にも注目した毛成長周期制御に関する研究についてはほとんど進んでおらず、本研究課題が皮膚科学分野へ与える影響は大きいと言える。これまでは、実際に皮膚に発現している分子をターゲットとして研究が行われてきており、毛成長に関与するもの、白髪の抑制に関与するものを分けて考えざるを得ず、白髪を抑制し尚且つ発毛も促進するようなものへの期待が高いことが明らかであったにも関わらず、その実験系の構築までは至っていない[1)]。

本研究では、北アフリカ乾燥地域原産生物資源をターゲットし毛成長促進・メラニン合成促進を探索する。その後、正常皮膚の色素沈着へ貢献しないものをさらにスクリーニング、毛成長促進作用とメラニン合成促進作用とのシナジー効果を評価するという三段階に分かれた評価系の構築を目指した。

Hair growth regulation by the extract of aromatic plant Erica *multiflora*

Hiroko Isoda

Alliance for Research on North Africa (ARENA), Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba,

2．実　験

2．1　地中海アロマ植物

本研究において実験に使用したサンプルとして、環地中海半乾燥地域に生育するアロマ植物である、*Erica multiflora*、*Thymelaea hirsuta*、*Pistacia lentiscus*、*Lycium europeum*、*Thapsia garganica* の５種を用いた[2)-4)]。チュニジアにおいて、これらの植物の乾燥重量 10g を 100 ㎖の 70％エタノールに７－10 日間浸して抽出したもの、また植物の乾燥体は生物多様性条約に基づいて、北アフリカ研究センターを通じて入手した。その抽出液を 0.22 ㎛フィルター（Millipore, USA）で濾過したものをサンプルとした。

2．2　*E. multiflora* の分配・分離

葉の乾燥体（100g）を 100％メタノール（500 ㎖及び 800 ㎖）に浸して暗所で１週間静置した。この抽出液を吸引濾過後、濾液をロータリーエバポレーターにて減圧下 30℃で濃縮・乾固し、メタノール抽出物（22.68 g）を得た。

得られたメタノール抽出物を､酢酸エチル（400 ㎖× ３）と水（400 ㎖× ３）で２層分配し、酢酸エチル層・水層を得た。酢酸エチル層をロータリーエバポレーターで濃縮・乾固し酢酸エチル層（EMEA）を得た。その後水層を *n*-ブタノール（500 ㎖× ３）で２層分配し、ブタノール層・水層を得た｡それぞれをロータリーエバポレーターで濃縮･乾固させ､ブタノール層（EMBU）･水層（EMWA）を得た。

酢酸エチル層をシリカゲルクロマトグラフィー（ϕ 2.2×30 ㎝、*n*-hexane：EtOAc ＝５：１→３：１→１：２→$CHCl_3$：MeOH ＝８：２→５：５→２：８→０：10）で分離を行い、酢酸エチル層を 15 画分（EMEA1 ～ 15）に分離した（図１）。

２．３　毛乳頭細胞増殖率測定実験

ヒト毛乳頭細胞（human dermal papilla cell）を播種し、37℃、５％ CO_2 インキュベーターで一晩培養した後、サンプルを含む培地と交換し、96 時間培養した。そのあと、細胞生存率を調べるため、MTT 手法を用いて測定した。

２．４　細胞周期測定

Erica multiflora で処理した細胞に Cell Cycle Reagent（Millipore, USA）を加える。フローサイトメトリー（Guava PCA; Millipore, USA）を用いて、細胞周期測定用ソフトウエア Guava CellCycle により、細胞周期を測定した。

２．５　メラニン産生量測定実験

B16 メラノーマ細胞を播種し、37℃、５％ CO_2 インキュベーターで一晩培養した後、サンプルを含む培地と交換し、72 時間培養し、メラニン産生量を測定した。培地を除去した後、トリプシン処理により細胞を採取した。0.1％ Triton X-100 を用いて細胞の膜タンパク質を可溶化し、10％トリクロロ酢酸を用いて産生されたメラニンを沈殿させ精製を行った。その後 8N 水酸化ナトリウムを添加し、80℃設定のヒートブロック中で２時間処理することでメラニンを溶解させ、410nm の波長で吸光度を測定した。産生されたメラニンの量は濃度既知のメラニンで作製した検量線を用いて算出し、さらに細胞数で除法することで１細胞あたりのメラニン産生量とした[5)]。

２．６　動物実験

C3H ／ He マウス（16 週齢、雄）の背部を剃毛し、１日に１回、500 μg／mℓの *Erica multiflora* 抽出物を含む PBS 溶液、PBS をそれぞれ 0.1 mℓずつ、21 日間皮下注射した。

３．結果と考察

３．１　毛乳頭細胞増殖率測定実験

毛乳頭細胞を用いて、アロマ植物 *Erica multiflora*、*Thymelaea hirsuta*、*Pistacia lentiscus*、*Lycium europeum*、*Thapsia garganica* の毛乳頭細胞増殖率に及ぼす影響を調べた。その結果、*Erica multiflora* に最も毛乳頭細胞増殖活性が見られた（表１）。

３．２　毛乳頭細胞周期測定実験

Erica multiflora で 12、24、36、48 時間処理した毛乳頭細胞の細胞周期を調べた。その結果、24、36、48 時間処理において弱いが細胞周期進行の停止が見られたが、12 時間処理においては細胞周期促進が見られた（表２）。以上のことは *Erica multiflora* の成分が毛乳頭細胞の細胞周期を制御することを示唆する。

３．３　マウスの毛髪成長促進効果

C3H ／ He マウスにおける *Erica multiflora* の毛髪成長促進効果を調べた。*Erica multiflora* を毎日皮下注射して３週間後マウスの毛を剃った皮膚から毛の成長が確認でき、血管拡張も確認した（図２）。*Erica multiflora* によるマウス毛髪成長促進効果は血管拡張効果による毛根までの血流が増加したことによると思われる。

３．４　*E. multiflora* メタノール抽出物分配成分が B16 メラノーマ細胞のメラニン産生量に与える影響

B16 メラノーマ細胞に、*E. multiflora* メタノール抽出物、またメタノール抽出物を分配して得られた酢酸エチル層、ブタノール層、水層を１μg／mℓの濃度で添加し 72 時間後のメラニン産生量を測定した結果、酢酸エチル層においてメ

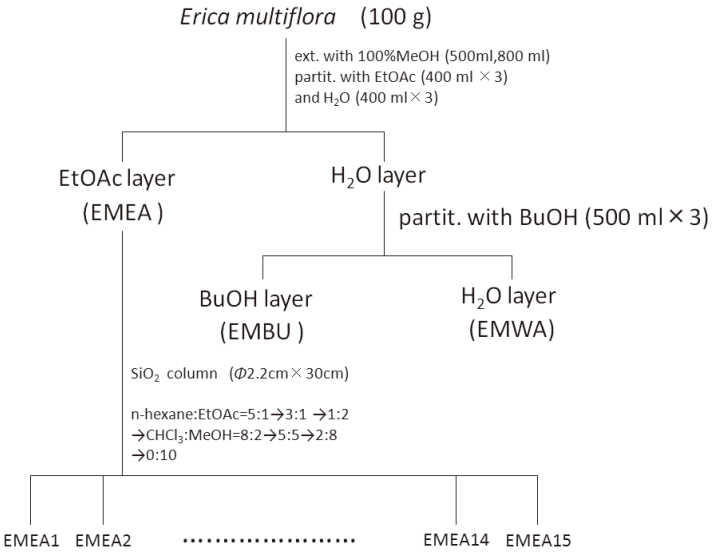


Figure 1.　*E. multiflora* の分離スキーム

ラニン産生を促進する活性が示された（図３）。酢酸エチル層にて処理した細胞ではコントロールと比較して138.5％とメラニン産生が促進された。

３．５　*E. multiflora* メタノール抽出物酢酸エチル層の分離成分が B16 メラノーマ細胞に与える影響

E. multiflora のメタノール抽出物分配画分である酢酸エチル層にメラニン産生促進活性があることが明らかとなったので、この画分をさらに15の画分に分離し、同様の方法で、メラニン産生に与える影響を評価した。その結果、画分２において最も強いメラニン産生促進活性を示した（図４A）。図３より *E. multiflora* 酢酸エチル層画分２はメラニン産生促進活性を示したので、同様の実験を３回行い、結果を平均値 ±SD にて表した（図５A）。その結果 *E. multiflora* 酢酸エチル層画分２にて処理した細胞ではコントロールと比較して172.7% と有意にメラニン産生が促進された。またメラニン産生量測定時と同条件で *E. multiflora* の分離・分配成分による細胞生存率を評価した（図４B、５B）。その結果、*E. multiflora* の分離・分配成分による処理はB16メラノーマ細胞の生存率に影響を与えないことが明らかとなった。

４．総　括

北アフリカのチュニジアのアロマ植物から、発毛制御活性がある植物の探索を試みた。その植物抽出物の中から、発毛促進活動を評価するためにアロマ植物を選び、*in vitro* 系ではヒト毛乳頭細胞（human dermal papilla cell）を用いてMTTアッセイ及び細胞周期分析を、*in vivo* 系ではマウスの背側の皮膚における発毛促進実験を行った。その結果、*Erica multiflora* 抽出物はヒト毛乳頭細胞において細胞増殖促進効果と細胞周期促進効果が、マウスにおいては発毛促進効果が見られた。このような結果から、

Table 1.　Growth promotion activity of the *Erica multiflora* extract on human follicular dermal papilla cells (HFDPCs). Symbols represent means±SD of n=4 samples. Asterisks (* and **) indicate statistically significant difference (p<0.05 and p<0.01, respectively) between the extract-treated and control cells.

Plant name	Growth promotion activity（% of control）			
	Concentration（μg / mℓ）			
	5	50	500	5000
Erica multiflora	103 ± 18	106 ± 11	109 ± 8*	144 ± 9**
Thymelaea hirsta	81 ± 16	90 ± 17	88 ± 13	105 ± 9
Pistacia lentiscus	92 ± 22	98 ± 7	97 ± 15	112 ± 6*
Lycium europeum	97 ± 11	102 ± 9	101 ± 13	93 ± 18
Thapsia garganica	78 ± 3	81 ± 9	78 ± 10	83 ± 5
Gloria alypum	96 ± 17	93 ± 15	85 ± 11	91 ± 13

Table 2.　Human dermal papilla cell cycle promotion activity of the *Erica multiflora* extract. Human follicular dermal papilla cells (HFDPCs) were subcultured at density of 4 x 10^5 cells in collagen type I-coated 100 mm dish. After overnight culture, HFDPCs were starved for 48 h, and then the cells were treated with the *Erica multiflora* (500 μg / mℓ) for 12, 24, 36 and 48 h. The treated cells were harvested and washed with PBS, and then fixed in 75% Ethanol. The fixed cells were evaluated about cell cycle status using Guava cell cycle system according to the manufacture's instructions. Cont. means control.

		G_0/G_1	S	G_2/M
12h	Cont.	72.6%	4.9%	8.2%
	Extract	68.5%	4.8%	10.0%
24h	Cont.	69.2%	6.8%	7.8%
	Extract	77.7%	3.1%	7.2%
36h	Cont.	74.4%	6.0%	6.0%
	Extract	76.2%	4.7%	7.3%
48h	Cont.	75.6%	4.4%	8.9%
	Extract	79.7%	4.3%	5.4%

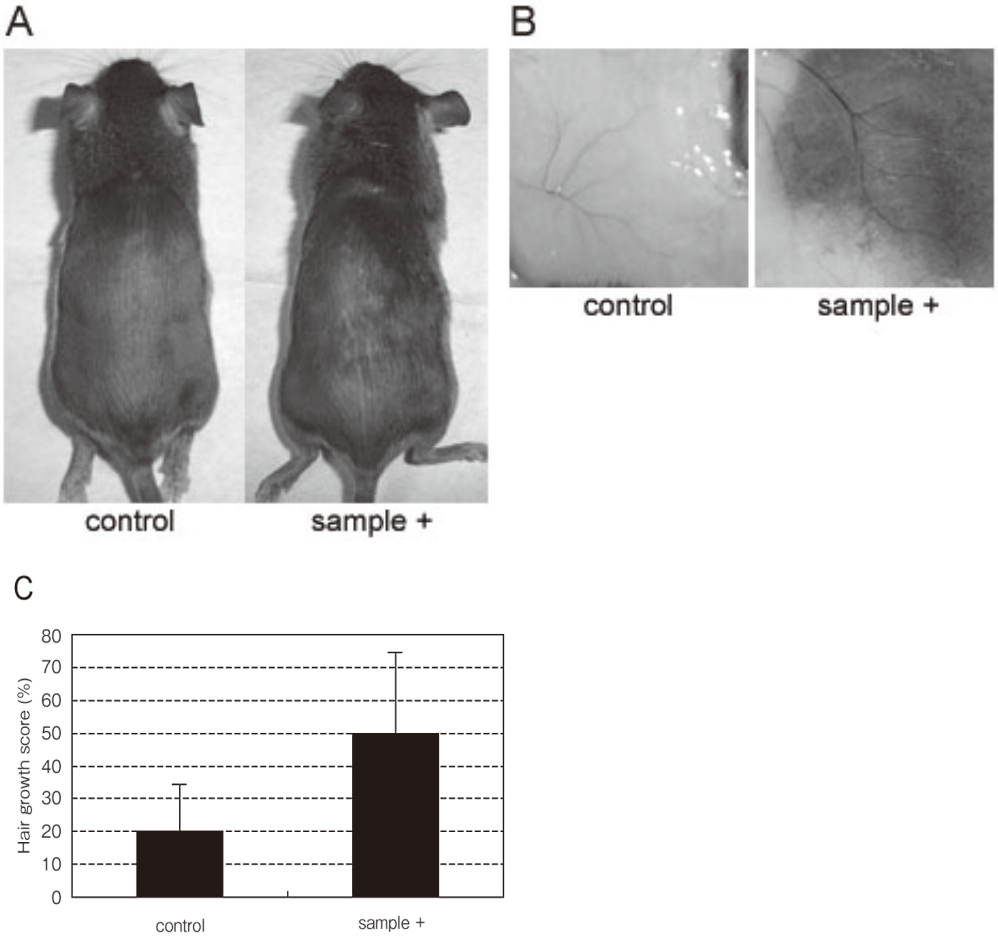


Figure 2. Hair growth effect of the *Erica multiflora* extract. A, Skin surface hair growth was detected on the dorsal skin of mice injected with the *Erica multiflora* extract. Seven-seek-old male C3H/He mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital and dorsal hair shafts were trimmed to maintain the telogen phase. *Erica multiflora* extract (+sample) or PBS (control) was injected subcutaneously into the trimmed telogen phase skin (n=5 in each group). B, On the reverse side of the skin. After gray color skin was detected, their skin was isolated and the reverse side was photographed to evaluate anagen induction. C, Hair growth score. The hair growth was evaluated by the skin reverse side gray or black colored area (%).

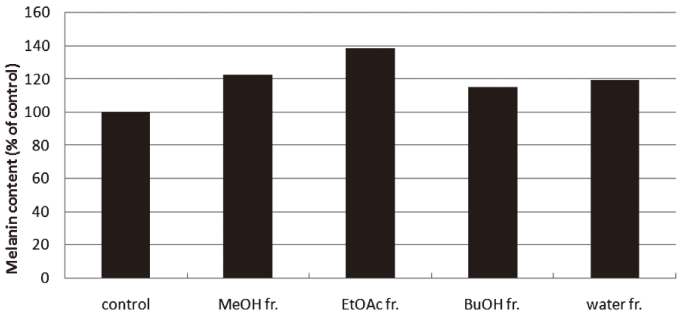


Figure 3. *E. multiflora* の画分成分が B16 メラノーマ細胞のメラニン産生量に与える影響
B16 メラノーマ細胞を 100-mm ディッシュに 5.0×10^5 cells/dish の濃度で播種し、一晩培養後、*E. multiflora* メタノール抽出物を酢酸エチル層、ブタノール層また水層に分配したサンプルを 1 μg / mℓの濃度で添加し、72 時間後のメラニン産生量を測定した。

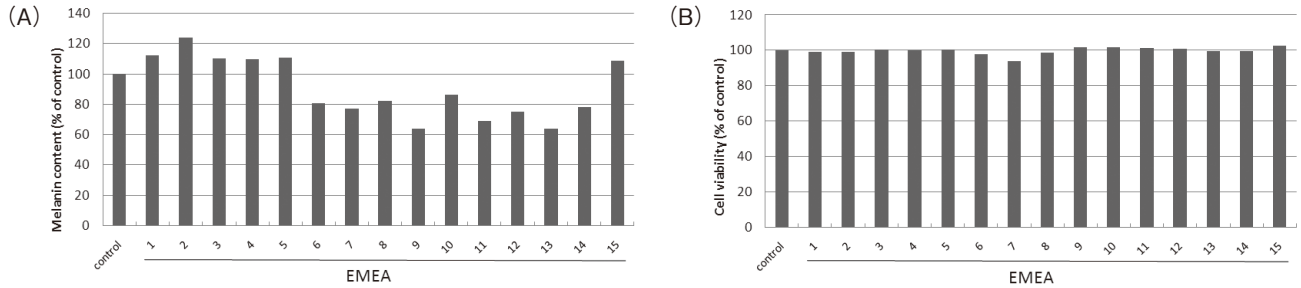


Figure 4.　*E. multiflora* の分離成分が B16 メラノーマ細胞のメラニン産生量に与える影響
（A）メラニン産生量（B）細胞生存率
B16 メラノーマ細胞を 100-mm ディッシュに 5.0×10^5 cells/dish の濃度で播種し、一晩培養後、*E. multiflora* メタノール抽出物の酢酸エチル層を分離した 15 画分をそれぞれ 1 μg / mℓの濃度で添加し、72 時間後のメラニン産生量及び細胞生存率を測定した。

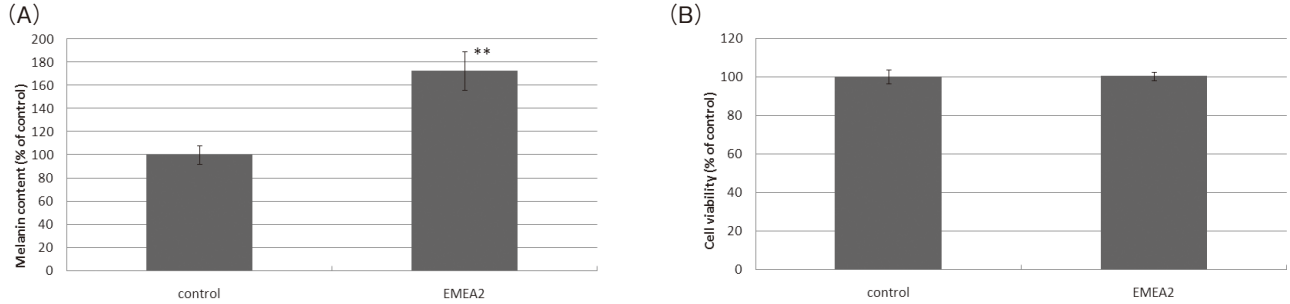


Figure 5.　*E. multiflora* メタノール抽出物の酢酸エチル層分離画分 2 が B16 メラノーマ細胞のメラニン産生量に与える影響
（A）メラニン産生量（B）細胞生存率
B16 メラノーマ細胞を 100-mm ディッシュに 5.0×10^5 cells/dish の濃度で播種し、一晩培養後、*E. multiflora* メタノール抽出物を酢酸エチル層、ブタノール層また水層に分配したサンプルを 1 μg / mℓの濃度で添加し、72 時間後のメラニン産生量を測定した。n=3、**P ＜ 0.01 vs control

Erica multiflora 抽出物による発毛促進効果は発毛周期の促進、或いは発毛周期の休止期（telogen phase）から成長期（anagen phase）への誘導によるものだと思われる。

E. multiflora はメラニン産生促進物質を含むと示唆されたことから、その活性物質を同定するために *E. multiflora* をメタノールにて抽出、さらに分配・分離して得られた画分についてメラニン産生促進活性を評価した。その結果、活性物質は *E. multiflora* メタノール抽出物の酢酸エチル層から分離された画分にあることが明らかとなった。この画分による細胞生存率への影響は見られなかった。従って、この画分にメラニン産生を顕著に促進する活性物質が含まれると示唆された。

（参考文献）

1）Kawano M, Imamura T, Isoda H: Methods for searching and evaluating effective hair growth regulation factors from Tunisian samples. Journal of Arid Land Studies 15: 443-446, 2006

2）Sassi AB, Harzallah-Skhiri F, Bourgougnon N, et al.: Antiviral activity of some Tunisian medicinal plants against Herpes simplex virus type 1. Nat Prod Res., 22 (1): 53-65, 2008

3）Harnafi H, Bouanani Nel H AM, Serghini CH, et al.: The hypolipidaemic activity of aqueous Erica multiflora flowers extract in Triton WR-1339 induced hyperlipidaemic rats: a comparison with fenofibrate. J. Ethanopharmacol., 109 (1): 150-160, 2007

4）Bnouham M, Merhfour FZ, Legssyer A, et al.: Antihyperglycemic activity of Arbutus unedo, Ammoides pusilla and Thymelaea hirsute, Pharmazie., 62 (8): 630-632, 2007

5）Ohguchi K, Akao Y, Nozawa Y: Stimulation of melanogenesis by the citrus flavonoid naringenin in mouse B16 melanoma cells. Biosci. Biotechnol. Biochem., 70 (6): 1499-1501, 2006

肌の質感を容易に評価するシステムの開発

木更津工業高等専門学校機械工学科
小 田　　功

Youthfulness of a human appearance is considerably affected by youthfulness of skin. Now, youthfulness of skin is mainly evaluated by measurement of the skin age. Skin age is measured by a water quantity of skin, a smoothness of skin, an elasticity of skin, and so on. However, an appearance of skin may be able to be evaluated by the index that is different from the skin age. We paid attention to a transparency of skin as the element which affected the appearance of skin. It seems that beauty of skin have some relation to transparency of skin, because there is expression of "transparent white skin" from old days. However, a measurement method and an evaluation method of transparency of human skin are not established yet. In this report, we suggest one method for evaluation of skin transparency. In this method, we project a grating pattern onto an object and measure its contrast. We measured the contrast of projected pattern onto some samples, such as diffusers and human skin. As a result of the experiment, it was shown that the evaluation of transparency of an object was possible by our method.

1．緒　言

人間の見た目を左右する重要な要素として，肌の若々しさが挙げられる．現在，肌の若々しさは，主に肌年齢を測定することで評価されている．肌年齢は，肌の水分量，きめの細かさ，弾力などから算出されている．ところが，肌年齢以外の指標を用いて，肌の見た目を評価することができる可能性もある．我々は，肌の見た目を左右する要素として，肌の透明度に着目した．肌の透明度と肌の美しさとの関係は，昔から“透き通るような白い肌”という表現があることからも，何らかの関係があると考えたからである．

ところでこれまで我々は，樹脂面に着目し，ある格子パターンの影を樹脂表面に投影したときのコントラストを測定することで，樹脂面の透明感が測定できる可能性があることを報告してきた[1)]．今回，これと同様な手法を用いて，肌の透明度を測定することが可能であったので報告する．

2．測定の方法

人間の肌は，血管が透けて見えることから分かるように半透明である．これと同様に，一般的な樹脂やいわゆる曇りガラスも半透明である．このことは，樹脂や曇りガラスに光を照射したとき，裏面から観察すると光が透けて見えることからも想像できる．このような半透明物体の透明度を測定するために，格子パターンの像を表面に投影し，そのコントラストにより透明度を測定することにした．

Development of an evaluation system for an appearance of human skin

Isao Oda

Dept. of Mechanical Engineering, Kisarazu National College of Technology

測定の概要を図１に示す．大きさ25×25［㎜］，空間周波数50［本ペア／インチ］の振幅型の格子に，光源であるハロゲンライトからの光を照射し，焦点距離50［㎜］の投影レンズを用いて格子パターンの像を測定サンプルに投影する．測定サンプル表面に現れた格子像を正面からCCDカメラで撮影し，画像入力ボードを介してパソコンに取り込み，そのコントラストを解析する．ここで，格子が横向きに設置されているのは，光を斜め方向から照射しているために生じる光強度分布の不均一さが，コントラストに与える影響を小さくするためである．

この手法の大きな特徴は，光を用いているので軟質な測定サンプルでも非接触での測定が可能なことである．さらに，格子パターンの影を可視光で測定サンプルに投影し，その影を正面から撮影するだけなので，非侵襲であり測定の危険性もない．これらの点から，本手法は人間の肌の測定に好都合である．

図２(a)は半透明のアクリル板に格子パターンを投影したときの画像である．図２(b)は(a)の画像の中心付近における，x方向の光強度変化の一部を表した図である．コントラストを定量的に測定するために，光強度変調の大きさを次のように定義する．図２(b)に示すように，投影された格子パターンの明るい部分（I_{1max}, I_{2max}, I_{3max}, …）と，暗い部分（I_{1min}, I_{2min}, I_{3min}, …）の光強度の値を数個取り出し，隣り合うもの同士の差を求める．さらにそれぞれの差の平均を求め，その値をコントラスト値Cとする．光強度を取り出す測定点は，格子パターンの明るい部分と暗い部分，それぞれ５点ずつ設けることにした．

3．透明度とコントラストとの関係

表面状態が異なった数種類の透明な測定サンプルに格子パターンの影を投影し，そのコントラストを測定してみた．本実験で使用した測定サンプルは，透明ガラスの片面が砂

面となった，厚さ２［㎜］のフロスト型拡散板である．砂面の砂番は，#240，#400，#600，#800，#1000，#1500の６種類であり，数値が小さいほど面が粗くなっている．

拡散板の砂面の砂番と見た目の透明度との関係を調べるため，印刷面の上に拡散板を置き，拡散板を通して見る印刷面の見え方を観察した．拡散板の砂面と印刷面が接触していると，砂面による光の拡散の影響が現れにくいので，印刷面と砂面を適度に離す必要がある．そこで格子を印刷した紙面の上に厚さ５［㎜］のガラス板を置き，その上に砂面を下向きにした拡散板を置いて観察した．代表的な拡散板として#240，#600，#1500の３種類の拡散板を選び比較した結果を，図３に示す．図３から，砂番が大きいほど透過して見える印刷面がはっきり見えることが分かる．

図３の状態で，拡散板を透過した格子模様を正面からCCDカメラで撮影した．#240，#400，#600，#800，#1000，#1500の６種類の拡散板において，格子模様の光強度変調の大きさを比較した結果を，図４に示す．砂番が大きくなるにしたがい，光強度変調，すなわち明暗が大きくなっていることが分かる．このことより，砂番と見た目の透明度は関係しており，砂番が大きいほど見た目の透明度は高いと言える．

図５は，６種類の拡散板の砂面に格子パターンを投影し，そのとき現れる格子の影の光強度変化を比較したものである．図５から砂番の違いにより，光強度変化の大きさ，すなわちコントラストが異なっていることが分かる．さらに砂番が小さいほどノイズ成分が大きく現れている．これは表面粗さが粗いほど，光の散乱の影響を受けるためであると考えられる．

拡散板の砂番と光強度変調の大きさＣとの関係を表したものを，図６に示す．砂番が大きくなるにしたがい，光強度変調の大きさが小さくなっていく，すなわちコントラストが低くなっていくことが分かる．図４と図６を比較すると明らかなように，透明度が高いほど，格子パターンを投影したときのコントラストが低くなっている．以上のことより，拡散板の見た目の透明度が，本手法により測定できることが確認できた．

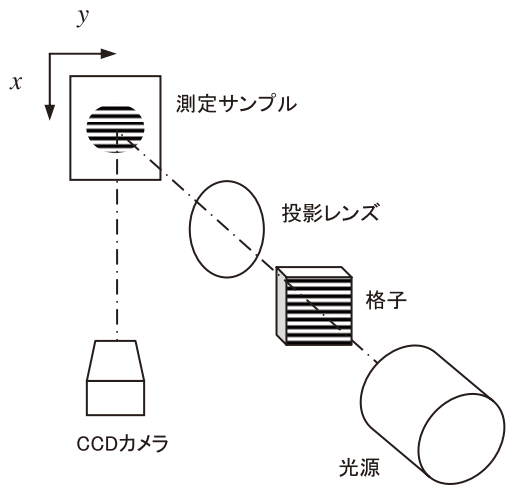
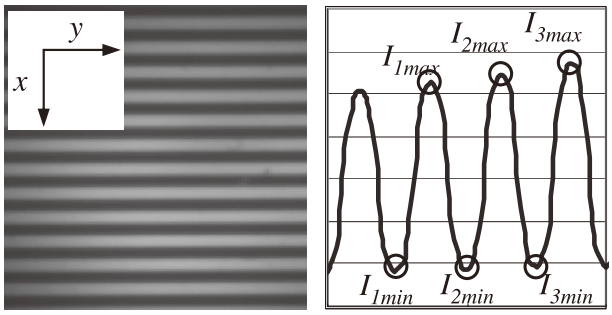


図１　測定の概要



(a) 格子パターンの投影像　　(b) 光強度変化

図２　半透明アクリル板への格子パターンの投影

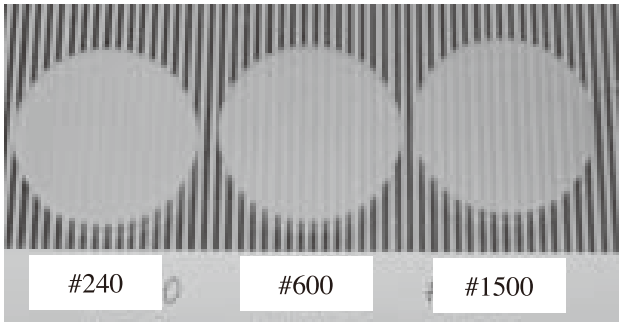


図３　拡散板の見た目の透明度の比較

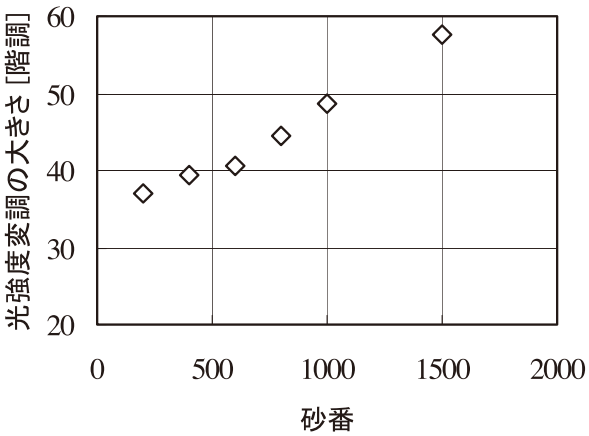


図４　拡散板の砂番と透明度との関係

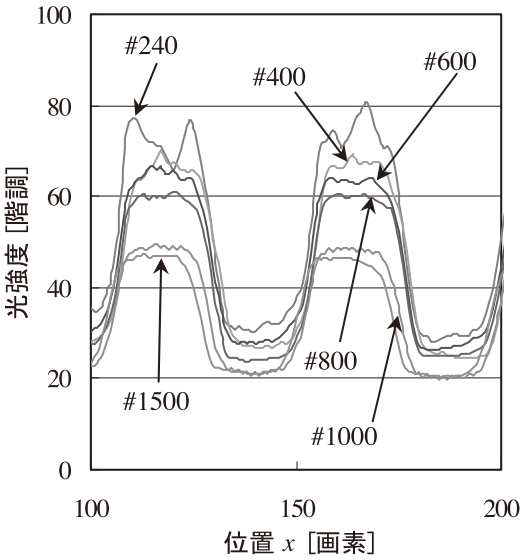


図５　拡散板の砂糖と光強度変化

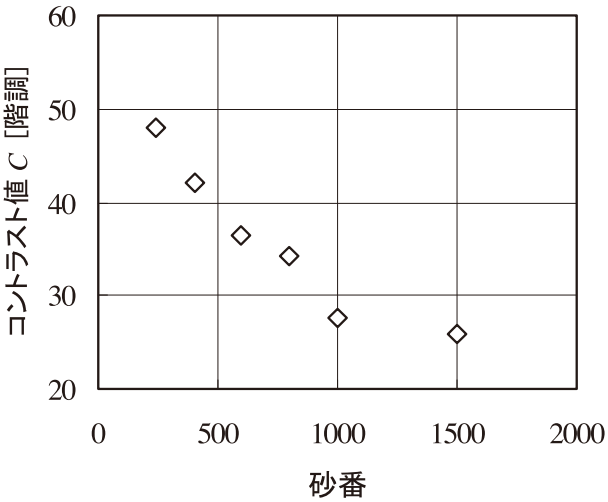


図６　拡散板の砂番とコントラストとの関係

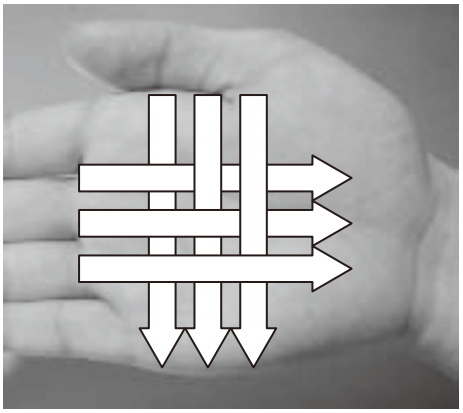
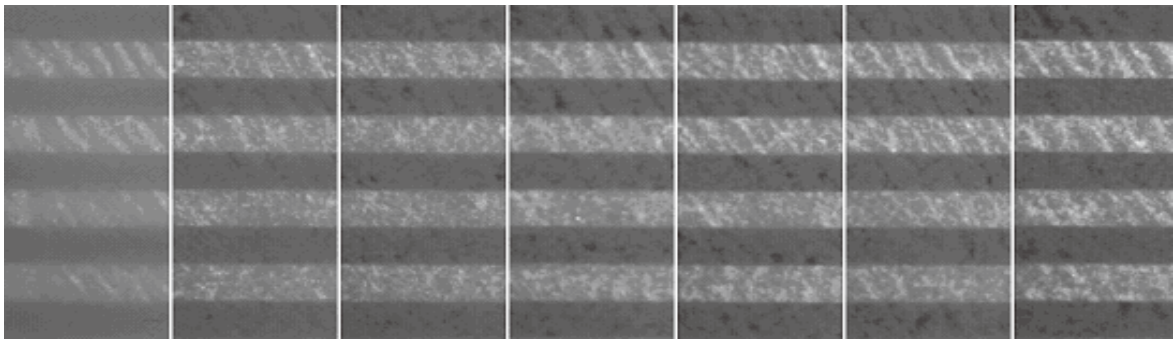


図７　ファウンデーションの塗布方向



(a) 0セット　(b) 1セット　(c) 2セット　(d) 3セット　(e) 4セット　(f) 5セット　(g) 6セット

図８　手のひらへの格子パターンの投影像

4．肌の透明度の測定

これまでの実験結果から，透明物体の場合は表面状態と見た目の透明度との間に関係があることと，格子パターンの影を透明物体に投影し，そのコントラストを測定することで，透明物体の透明度が測定可能であることが確認できた．そこで本手法を用いて，実際に人間の肌の透明度を測定してみた．

測定サンプルは人間の手のひらである．肌の透明度を変化させるために，パウダーファウンデーションを塗布し，その濃さを変化させることにした．ファウンデーションを濃く塗布するほど，肌の表面にファウンデーションが厚く付着し，透明度が低くなると考えたからである．パフに付けたファウンデーションを，図７に示すように，縦方向と横方向に交互に塗布する．これを３回繰り返すことを１セットとした．

肌に何も塗布していない０セットから，ファウンデーションが厚く付着していると考えられる６セットまで，格子パターンを投影したときの画像の比較を図８に示す．ファウンデーションを塗布していない (a) と，最も濃い (g) を比較すると，(g) のコントラストが高いことが分かる．しかし (b) ～ (g) の画像の比較からは，各々のコントラストの差異を判断することは困難である．

そこで図８の各画像からコントラスト値Ｃを算出した．この結果を図９に示す．図９から，ファウンデーションの塗布回数が増す，すなわち肌の透明度が低くなるにしたがって，投影された格子パターンのコントラストが向上していることが分かる．この実験結果から，本手法を用いて見た目では判断が難しい肌の透明度の差異が，測定できることが示された．

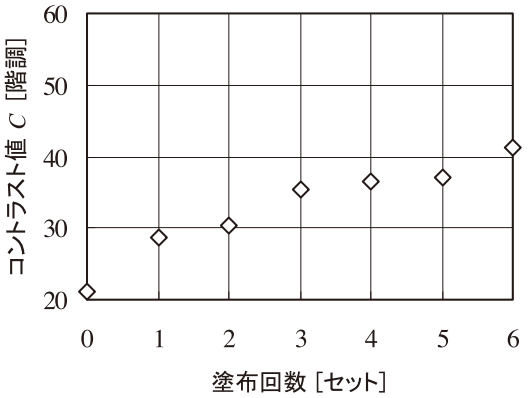


図９　肌の透明度とコントラストとの関係

5．結　言

本報告では，人間の肌の透明度を評価する手法として，肌に格子パターンを投影し，そのコントラストを測定することを提案した．表面状態の異なる拡散板および人間の肌を測定サンプルとして用い，格子パターンを投影したときのコントラストを測定する実験をおこなった結果，以下の点が明らかとなった．

(1) 拡散板の砂番が大きくなると，見た目の透明度が高くなること．

(2) 本手法を用いると，透明物体の透明度の測定が可能であること．

(3) 見た目では判断が難しい肌の透明度の差異も，判定できること．

今後の課題は，人間の肌の透明度と肌の見た目の質感との関係を，定量的に評価する方法を模索し，新たな評価方法の確立を目指すことである．その上で，肌の質感を人間の見た目に基づいて容易に測定することが可能な，新規的な測定システムを装置化したいと考えている．

（参考文献）

１）有松大志，小田　功：「パターンを投影した際のコントラストを用いた樹脂面の質感評価」，2003 年度精密工学会春季大会学術講演会講演論文集，(2003) 421.

アニオン性の多糖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

慶應義塾大学理工学部
佐藤　智典

In this study, chitosan particles were employed as a protein carrier. Glucose oxidase (GOD) was encapsulated in chitosan particle coated with anionic polysaccharides such as hyaluronic acid and pectin. Encapsulation efficiency of GOD, size of the particles, and controlled release of GOD from the particles were investigated. Water-soluble chitosan was employed to encapsulate proteins (BSA and GOD) at neutral pH condition. Protein-encapsulated chitosan particles were prepared by using cross-linker such as citric acid triacetate. Compared to other cross-linkers, citric acid was showed the higher encapsulation efficiency for BSA (30-40%). However, the stability of ionic cross-linked chitosan particle was significantly decreased by the addition of salt. Therefore, the chitosan particle was covalently cross-linked. Encapsulation efficiency was significantly increased (>80%), and the release of GOD from the covalently cross-linked chitosan particles was significantly suppressed at neutral pH. Next, coating of the chitosan particles with anionic polysaccharides were carried out. Hyaluronic acid-coated chitosan particles showed the aggregation. Pectin-coated chitosan particles showed high encapsulation efficiency for GOD (60-90%), the particle size was submicron order. The aggregation of the particle coated with pectin was also suppressed. The release of GOD from the pectin-coated chitosan particles was significantly suppressed in the absence of NaCl, and increased depending on the concentration of NaCl. The controlled release of proteins from chitosan particle was achieved by using cross-linker and coating with anionic polysaccharide.

1　緒　言

近年遺伝子組み換えタンパク質に代表されるバイオ医薬品の開発が進み、有効な治療法が存在しなかった各種疾病の治療薬として大きな期待が寄せられている。しかし、臨床応用にはまだまだ多くの課題が残されている。タンパク質の医薬品化に際しての主な問題点は、熱や酸、有機溶媒などに不安定で、容易に変性・失活する、消化管や粘膜組織中のプロテアーゼによる分解・失活する、分子量が大きく生体への吸収効率が低い等である。例えば、タンパク質をカプセル化した粒子でも、塩存在下や酵素により速やかに放出や分解が起きる。体内への吸収効率が低く、期待通りの治療効果が得られない。従来の低分子化合物ならば誘導体化によって、化合物の安定性・吸収性などを解決できる事も多いが、タンパク質の誘導体化は容易ではない。そのため、タンパク質の臨床応用にはDDSによる吸収や体内動態の制御が不可欠であり、「プロテインデリバリーシステム」の重要性が高まっている。

本研究では、キトサン微粒子をタンパク質のキャリアーとして用いることにした。キトサンは、甲殻類や昆虫、微生物などの細胞壁など天然に豊富に存在するキチン（β-1,4- ポリ -N- アセチル -D- グルコサミン）を脱アセチル化することによって得られるカチオン性の多糖である。キトサンは生体毒性が低く（マウスの経口LD_{50} = 16 g/kg）、生体適合性および生分解性に優れており、タンパク質キャリアーの開発に適した長所を有している[1]。また、粘膜吸着性、抗菌・制菌性、免疫賦活作用など多様な生物活性を有する事から、タブレットやビーズ、マイクロスフェア、ナノパーティクルなど様々な剤形で、工業、農業、医薬など様々な分野に応用されている。本研究者らはキトサンを遺伝子のデリバリーとして利用してきた[2-7]。キトサンは遺伝子と安定な複合体を形成し、遺伝子の分解酵素からの保護能力、細胞内において遺伝子発現活性に優れていることを見出している。

本研究の目的は、タンパク質製剤の設計・開発を行い、タンパク質の安定性や特異性を改善し、その治療効果を高める事である。キトサンを用いてプロテインキャリアーを設計するに当たって、以下の点に留意した。

①生体適合性・生分解性のあるマテリアルのみで微粒子を調製する。
②タンパク質が変性・失活しない緩和な条件でタンパク質をカプセル化する。
③タンパク質の保持能の高い微粒子を作製する。

本研究ではキトサンとタンパク質の複合体を作製し、さらにキトサン微粒子の安定性を向上させるために、ヒアルロン酸やペクチンのようなアニオン性多糖での被覆を行った。

2　実験方法

水溶性キトサンは焼津水産化学㈱より入手した。ヒアルロン酸ナトリウムとペクチンはWakoから購入した。カ

Encapsulation of proteins in chitosan particles coated with anionic polysaccharides and analyses of their functions

Toshinori Sato

Department of Biosciences and Informatics, Keio University

プセル化するタンパク質であるグルコースオキシダーゼ（GOD、Aspergillus niger）はICNから購入した。

タンパク質をカプセル化したキトサン粒子の作製プロセスは図1に示した。まず、BSAやGODをカプセル化したキトサン粒子を作製した。キトサン溶液は20 mM MES buffer（pH6.0）に溶解した。架橋化剤として用いたトリポリリン酸（TTP）やデキストラン硫酸（DS）およびクエン酸三ナトリウム（TC）はMilli-Q水に溶解した。BSA、グルコースオキシダーゼ（GOD）はMilli-Q水に溶解した。共有結合架橋を形成するには、縮合剤であるEDCを20 mM MES Buffer（pH 5.8）に溶解して用いた。

カプセル化効率は次のようして求めた。GODをカプセル化した被覆化キトサン微粒子懸濁液を、遠心分離機を用いて10000 rpm, 20 min, 4 ℃の条件で遠心処理を行い、微粒子を沈殿させた。遠心後上清を回収し、上清中のタンパク質濃度をプロテインアッセイにより決定した。

カプセル化効率（%）＝（タンパク質仕込み濃度
－上清のタンパク質濃度）/（タンパク質仕込み濃度）×100

この微粒子懸濁液のNaCl溶液、異なるpH中での安定性を評価した。被覆化キトサン粒子を塩溶液と混合した。一定時間後、微粒子懸濁液を上記と同様の条件で遠心処理を行い、微粒子を沈殿させた。遠心後上清を回収し、上清をプロテインアッセイした。

3　実験結果

キトサン微粒子の作製における、架橋化剤の違いによる影響を検討した。トリポリリン酸を用いた場合、カプセル化効率が高いナノサイズの粒子を調製できる条件は見つからなかった。カプセル化効率は、10%前後であったが、粒子径とゼータ電位はキトサン／トリポリリン酸比に依存した変化が見られた。キトサンを増やすと粒子径は小さくなり、ゼータ電位は増加した。

デキストラン硫酸をクロスリンカーとした場合にはキトサン／デキストラン硫酸比が大きくなるにつれて粒子径およびカプセル化効率ともに大きくなり、ナノサイズの粒子径と高いカプセル化効率を持つ微粒子が調製される条件は見つからなかった。

クエン酸を用いて調製したキトサン微粒子では、キトサン／クエン酸の組成により、ナノサイズの粒径を有し、30－40%程度のカプセル化効率を持つ微粒子が調製された。フマル酸やマレイン酸を架橋剤として用いた場合には、微粒子の形成は確認できなかった。よってクエン酸がキトサン粒子の作製には有効であることが示された。またカプセル化効率は、本研究ではBSAやGODを用いているが、タンパク質の種類により影響されることが示された。

次に、調製したキトサン微粒子懸濁液の塩強度を変化させた際の、懸濁液の濁度の変化を測定した。低分子であるクエン酸は高分子であるデキストラン硫酸ナトリウムと比較して、塩強度の変化に非常に脆弱であった。塩強度に依存して濁度が経時的に減少し、30mM NaClでもわずか1分程で粒子が崩壊してしまう事が示された。一方、デキストラン硫酸の場合では、塩強度を変化させても濁度に大きな変化は見られず、NaClの濃度が150mMでも微粒子が崩壊しなかった。高分子－高分子間のコンプレックスは、ある位置で高分子同士の官能基が結合すると、近傍に存在する官能基間で次々と結合が進行するため、安定性が高いと考えられる。

次に、溶液のpHにおけるキトサン微粒子懸濁液の濁度を測定した。酸性のpHではクエン酸の荷電率の低下、pH6.5以上ではキトサンの荷電率の低下に対応して濁度が低下し、粒子が崩壊していた。つまり、官能基の荷電率の低下に対応して濁度が減少し、荷電率が濁度の変化（粒子の膨張や崩壊）に密接に関わっている事が示唆された。この結果は、官能基の荷電率の低下に伴い、微粒子形成の駆動力である粒子内のイオン架橋点が減少するため微粒子が徐々に膨張し、イオン架橋点がある一定以下の数になると微粒子は完全に崩壊すると考察される。

そこで、より安定なキトサン粒子を得るためにEDCによる共有結合架橋の形成を行ったところ、塩存在下での微粒子の安定性が改善された。またタンパク質のカプセル化効率は80%かそれ以上となり、大幅に改善されることがわかった。キトサンの架橋化によりタンパク質の放出が抑制されていることが示された。粒子サイズとしては、動的光散乱法および走査型電子顕微鏡での観察により4－5 μm程度であることが示された。

共有結合されたキトサン粒子からの内包されたGODの放出挙動を測定した。イオン架橋化キトサン微粒子では、pH 7.4の緩衝液中においてGODが10分で80%以上放出

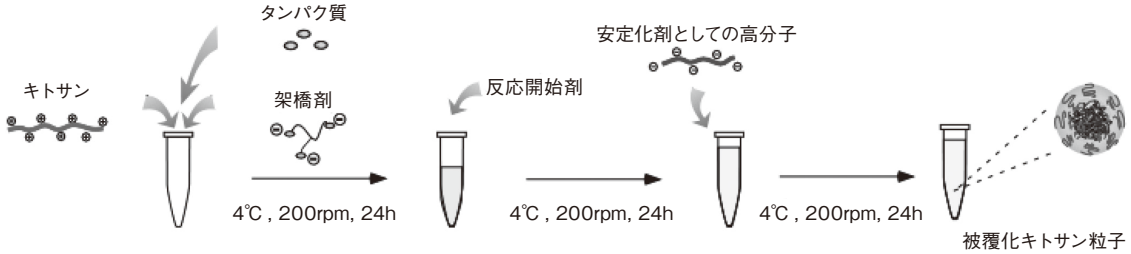


図1　タンパク質をカプセル化した微粒子の作製方法の概略図

されてしまった。一方、共有結合架橋化キトサン微粒子では、GOD の放出が大幅に抑制され、数時間後でも 10％程度であった（図２）。共有結合架橋により微粒子が膨張・崩壊しなくなった事でタンパク質を粒子内に安定に保持できるようになり、放出が抑制されたと考えられる。

次に、キトサン粒子をアニオン性の高分子により被覆を行った。このような３元複合体の作製では、キトサンのアミノ基とアニオン性高分子のカルボキシル基の比率(N/C 比) によって調製される粒子の粒子径やカプセル化効率などの物性が変化すると考えられる。そこで複数の N/C 比でキトサン粒子を被覆し、そのキャラクタリゼーションを行なった。ヒアルロン酸で被覆した粒子では凝集の度合いが高く正確な測定が出来なかったので、ペクチンでの測定を行なった。

ペクチン被覆化キトサン粒子のカプセル化効率と粒子径の測定を行なった。カプセル化効率に関しては全体的に 60 ～ 90％の高い値を示していた。粒子径に関しては、N/C 比の増加によりミクロンオーダーからナノオーダーへの粒子サイズの減少が観察された。N/C 比が増加するにつれて粒子の凝集が抑制された。次に、ペクチン被覆キトサン粒子からの GOD の放出挙動における塩濃度の影響について検討した。その結果、塩濃度が高くなると GOD の放出がみられた（図３）。

３　結言

キトサン粒子中にタンパク質GOD をカプセル化することができた。水溶性のキトサンを用いることで、タンパク質の変性のない中性の pH でのカプセル化が可能であった。しかしながら、タンパク質とキトサンを混合するだけでは、溶液中でタンパク質を保持する事はできなかった。そこで、クエン酸を用いてキトサンをイオン架橋さらには共有結合架橋する事でタンパク質の保持効率を向上することができた。さらに、その表面をアニオン性の多糖で被覆することも可能であった。アニオン性の多糖としてヒアルロン酸は粘性が高く安定な粒子を得ることができなかったが、ペクチンを用いることで安定な粒子を得ることができた。このようなタンパク質をカプセル化した微粒子の作製を達成したが、用途によっては、溶液中での凝集の抑制や、塩溶液中での安定性を高める工夫を更に行なう必要性が示された。キトサン微粒子の安定性を向上と、タンパク質の徐放性が示されたことで、今後は細胞特異性を高めるための工夫、および細胞を活性化するタンパク質などをカプセル化して、その機能を解析する予定である。

（引用文献）

1）M. Morimoto et al, *Trends. Glycosci. Glycotechnol.*, 14, 205-222,（2002）

2）T. Sato, T. Ishii, and Y. Okahata, Biomaterials, 22, 2075-2080（2001）

3）T. Ishii, Y. Okahata, T. Sato, Biochim. Biophys. Acta,1514, 51-64（2001）

4）M. Hashimoto, Z. Yang, Y. Koya, Non-viral Gene Therapy: Gene Design and Delivery, Springer, 63-74（2005）

5）M. Hashimoto, M. Morimoto, H. Saimoto, Y. Shigemasa, T. Sato, Bioconjugate Chemistry, 17, 309-316（2006）

6）M. Hashimoto, M. Morimoto, H. Saimoto, Y. Shigemasa, H. Yanagie, M. Eriguchi and T. Sato, Biotechnology Letters, 28,815-821（2006）

7）M. Hashimoto, Y. Koyama, and T. Sato, Chem Lett. 37266-267（2008）

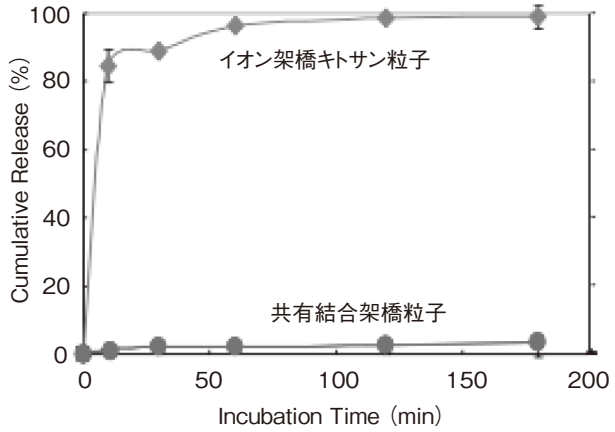


図２　イオン架橋および共有結合架橋したキトサン粒子からの GOD の放出

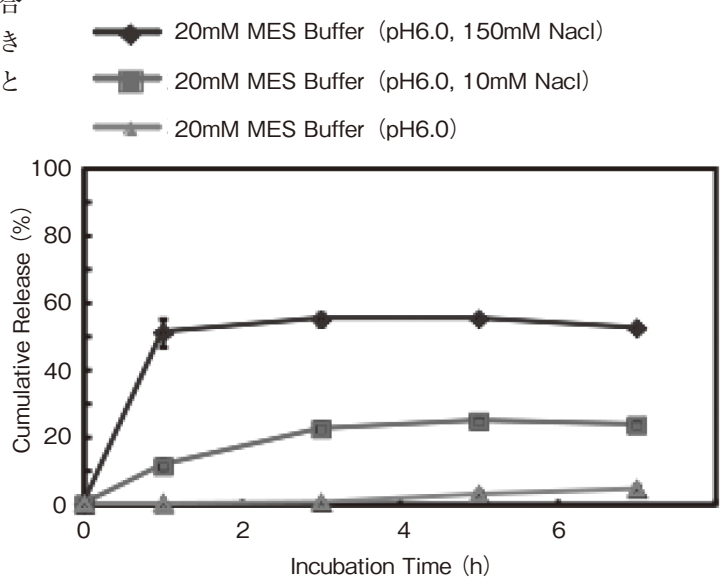


図３　ペクチン被覆化キトサン微粒子からの GOD の放出の塩濃度依存性

新しい生体親和性材料としてのペプチド性人工コラーゲンゲル

早稲田大学理工学術院
小 出　隆 規

We have developed a peptide-based collagen-like gel utilizing the self-assembling property of collagen-like peptides, *i.e.* (Pro-Hyp-Gly)$_n$. In order to functionalize the hydrogel, we incorporated Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg sequence, which is recognized by integrin, to the peptide building blocks. When human fibroblasts are cultured on the material, integrin-dependent cell attachment and spreading are observed.

1．緒　言

これまでの多くの研究から、数十種におよぶタンパク質が、長さ 300 nm におよぶコラーゲン３重らせん領域に多数結合していることが知られている。その中には、直接コラーゲン３重らせんを認識して細胞内に直接シグナルを入力するインテグリン、Discoidin domain reseptor（DDR）のような膜レセプターや、コラーゲンに結合して機能が制御されるコラーゲン結合タンパク質（例えば、Pigment epithelium-derived factor（PEDF）など）が含まれる。それぞれのコラーゲン結合タンパク質は、３重らせん上に提示された特異な配列（コラーゲンの機能エピトープ）に結合し、その機能を発揮する。したがって、天然のコラーゲンは、多数の機能エピトープと多数のコラーゲン結合タンパク質との結合によって惹起される多様なシグナルを、様々なターゲット細胞に入力している。また、個々のターゲット細胞は、コラーゲンより直接的・間接的に複数のシグナル入力を受け、それらシグナルの総和としてのレスポンスを示す。

しかし現状において、コラーゲンは常に「バルク材料」として利用されており、コラーゲンが分離可能な多数の機能的アミノ酸配列を内包した多機能タンパク質であるという認識は、生命科学に携わる研究者においても低い。また、天然のコラーゲンをソースとしている限り、コラーゲンの個々の機能を分離して利用することは原理的に困難である。

そこで本研究では、細胞膜上のレセプターを活性化する特定のアミノ酸配列を組み込んだ人工コラーゲンを作成し、これを新規な機能性生体材料として応用するための技術基盤を築くことを目的として研究を行った。

A peptide-based collagen-like gel as a novel biomaterial

Takaki Koide

Faculty of Science and Engineering, Waseda University

用いた人工コラーゲンは、デザイン・合成したヘテロ３量体コラーゲンペプチドの自発的な分子間フォールディングを利用して作製した。採用したペプチドは、コラーゲン様 Gly-Pro-Hyp（Hyp, 4-Hydroxyproline）繰り返し配列を持つ３本のペプチド鎖を、ジスルフィド結合によって相互にずらせて架橋した３量体ペプチドである。このペプチドは、自発的な分子間フォールディングにより、３重らせん構造が長軸方向に伸長し、コラーゲン様超分子となる（Yamazaki CM, Asada S, Kitagawa K, **Koide T.** *Biopolymers*. 2008;9(6):816-23）。

2．実　験

2-1　３量体ペプチドのデザイン

細胞表面に存在するコラーゲンレセプターのひとつである α2β1 インテグリンは、コラーゲン３重らせん構造上の Gly-Phe-Hyp-Gly-Glu-Arg（GFOGER）配列を認識して結合することがすでに知られている。この GFOGER 配列を含む３量体ペプチドをデザインした。しかし、この GFOGER 配列を３量体ペプチドのコラーゲン様Gly-Pro-Hyp 繰り返し配列中に組み込むことで、そのペプチドが形成する３重らせん構造の熱安定性の低下が懸念される。そこでまず、経験的パラメータをもちいたコンピュータプログラムを利用して、コラーゲン様配列中の一部を GFOGER 配列に置換することで３重らせん構造の熱安定性をどれくらい変化させるかについて解析した。この結果を基に、３量体ペプチド中のどの位置に GFOGER 配列を組込むか、また、３量体ペプチドを構成する３本のペプチド鎖の長さを決定し、機能化人工コラーゲンの原料となる３量体ペプチドを考案した。

2-2　α2β1 インテグリンの結合配列を組込んだ３量体ペプチドの合成

３量体ペプチドを構成する３本の各ペプチド鎖は、Fmoc 固相法により合成した。次いで、分子中に導入したシステインのチオール基を利用した段階的かつ位置選択的なジスルフィド結合形成反応を用いることで、各ペプチド

鎖を３量体化した（Figure 1）。合成したペプチドは、逆相HPLC分析およびMALDI-TOF MS測定により同定した。合成した３量体ペプチドの３重らせん構造の形成およびその熱安定性を、円二色性（CD）測定により確認した。

2-3　機能性人工コラーゲンへの細胞接着の顕微鏡観察

３量体ペプチドをコーティングした96 well dish-plate 上でヒト皮膚繊維芽細胞（HDF）を培養し、細胞接着の有無を顕微鏡で観察した。ペプチド水溶液（10 μg/ mℓ）を各 well に入れ４℃で12時間静置し、ペプチドをプレートにコーティングした。BSAで各well をブロッキングした後、ヒト皮膚繊維芽細胞（HDF）を播種し、37℃でインキュベートした。２時間後、細胞を４％ *p*-formaldehyde で固定、２％ crystalviolet で染色し、細胞接着の有無を顕微鏡にて観察した。

３．結果と考察

3-1　デザインと合成

デザインした３量体ペプチドを純度良く得た。CD スペクトル測定の結果、合成した３量体ペプチドがコラーゲン様３重らせん構造を形成することを確認した。また、３重らせん構造の変性温度を測定したところ、細胞培養温度である37℃においてその３重らせん構造を安定に維持できることを確認した。

3-2　人工コラーゲンの機能化

３量体ペプチドでコーティングしたプレート上でのHDF の接着を、コラーゲン、またはBSA をコーティングしたプレート上での接着と比較した。

GFOGER 配列を組み込んだ３量体ペプチドをコーティングしてあるプレート上では、コラーゲンの場合と同様に HDF は接着した。一方、

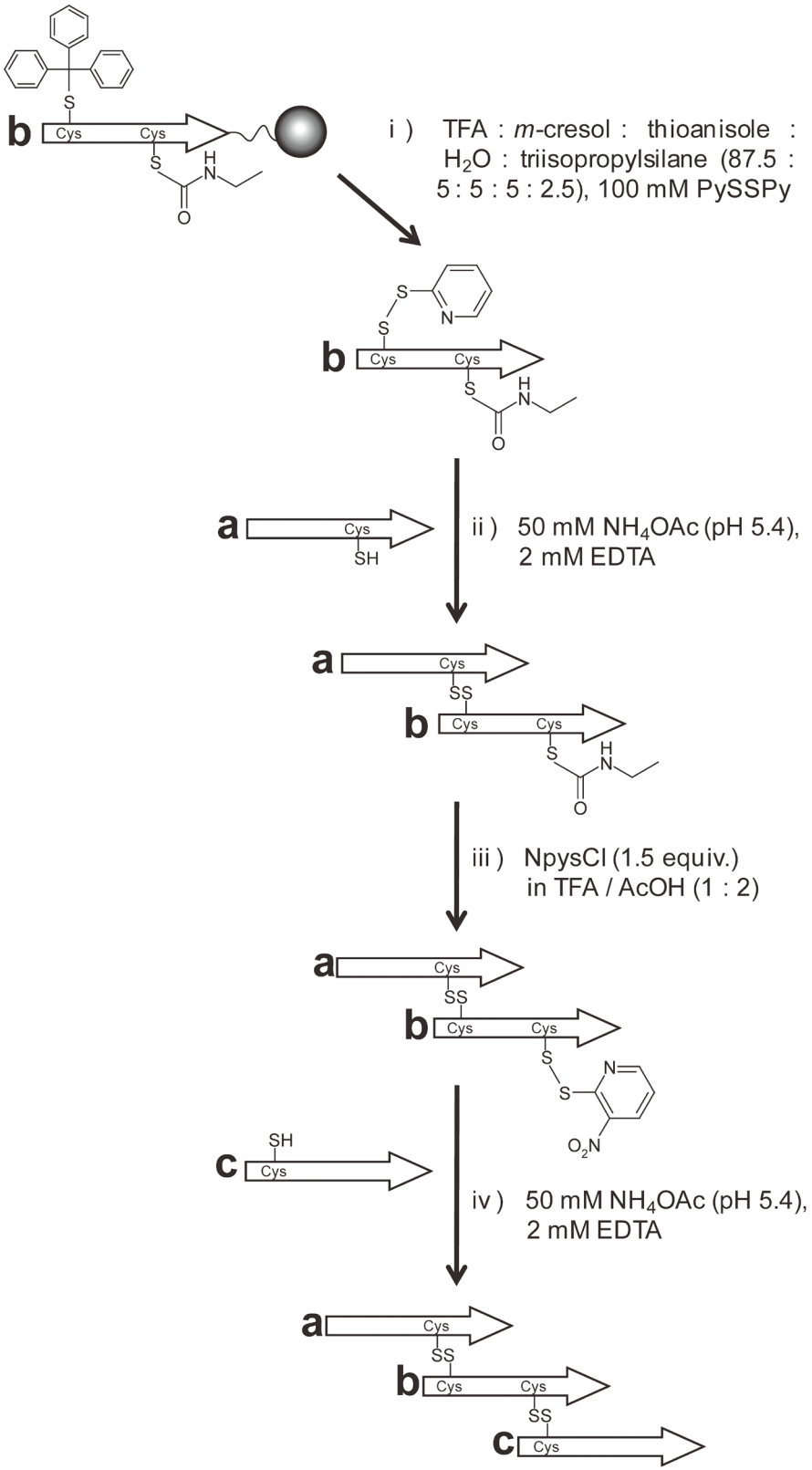


Figure 1　位置選択的なジスルフィド結合形成反応を利用したペプチドの３量体化
矢印は、コラーゲン様 Gly-Pro-Hyp の単純繰り返し配列を示す。
ⅰ）固相合成用ビーズからの切り出し、脱保護、およびチオール基のピリジルスルフェニル化（活性化）反応。
ⅱ）ジスルフィド結合形成反応（２量体化）。
ⅲ）アセトアミドメチル基（保護基）からニトロピリジルスルフェニル基（活性化基）への変換反応。
ⅳ）ジスルフィド結合形成反応（３量体化）

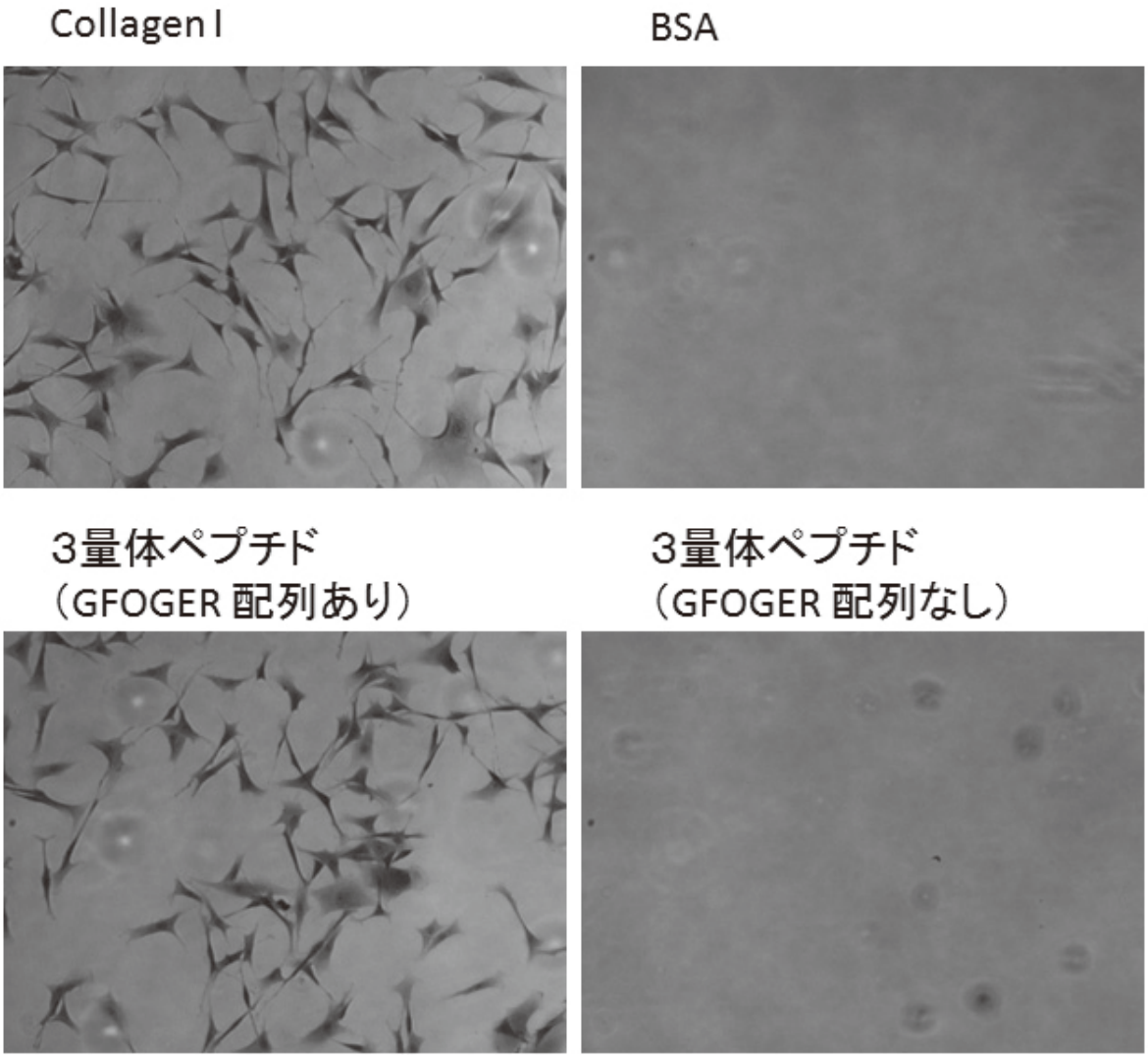


Figure 2　プレートにコーティングした基質依存的な HDF の接着
プレートのコーティングに要した Collagen I, BSA, ３量体ペプチド、各水溶液の濃度は、いずれも 10μg/mℓ。

GFOGER 配列をもたない３量体ペプチドでは接着が見られなかった。本実験で示した細胞接着が、GFOGER 配列依存的に起こるものであることを明らかにした。

コラーゲンの３重らせん上における GFOGER 配列は、α2β1 インテグリンの認識配列であるが、今回確認した HDF の接着がα2β1 インテグリンによるものかどうかを示すには至っていない。今後解析していく必要がある。

Wnt シグナルを標的とした育毛促進作用をもつ天然成分の探索

千葉大学大学院薬学研究院
大 槻 崇

Wnt signaling maintains hair inducing activity including regeneration of hair follicle. On the basis of our screening program targeting activation of TCF/β-catenin transcriptional activity, a plant extract of *Excoecaria indica* was selected as a positive sample. Activity-guided fractionations led to the isolation of α-sapinine (**1**) as active compound. Also, two flavonoid glycosides, myricetin 3-*O*-β-D-galactopyranoside (**2**) and myricetin 3-*O*-α-L-rhamnopyranoside (**3**) were isolated from *Erythrophleum succirubrum* as active compounds. Compound **1** led to more than 20-fold increase in TCF/β-catenin transcriptional activity at 1.4 or 2.9 μM.

1．緒　言

古来より加齢に伴う男性型脱毛が多くの男性を悩ませてきたが，最近では脱毛の発症メカニズムについても分子レベルで解明されてきている．退縮に向かう分子機構についてはアポトーシスによるものであることが明確になってきたが，休止していた毛包の発毛段階へのスイッチングに関しては，以前から指摘されていた男性ホルモン (アンドロゲン) の関与に加え，最近では，毛包上皮幹細胞の存在，この幹細胞にシグナルを送る毛乳頭細胞の重要性，及びこれら2種の細胞間に作用する分泌性のシグナル因子の関与することがトランスジェニックマウスやコンディショナルノックアウトの研究で明らかになりつつある[1, 2]．また，動物の発生過程で，体軸形成や陥入運動など形づくりの基盤となる初期の重要なプロセスから，その後の種々の組織・器官の形成に関与する Wnt シグナル伝達経路の活性化（β-catenin/LEF/Tcf タンパクの複合体形成→複合体の TCF 結合領域への結合それに伴う転写活性化）が，毛包形成，毛髪生成に重要な役割を果たしていることが明らかにされている．当研究室では，最近，Wnt シグナル伝達経路における最下流の TCF/LEF 転写因子の転写活性を評価するレポーターアッセイを確立した．本研究では，Wnt シグナルを活性化する天然物（小分子化合物）を探索し，見出した活性成分の中から，有効な育毛促進作用を有する化合物を発見し，育毛剤原材料としての利用に貢献することを目的とする．

Search for natural product for promoting hair growth based on Wnt signaling

Takashi Ohtsuki

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

2．実　験

2・1　TCF/β-catenin 転写誘導活性試験

対数増殖期にある 293T/STF 細胞[3] を 96 穴白色平底マイクロプレートに各ウェル中 200μL あたり 3×10^4 cells の密度で細胞を播種し，10%FBS 含有 D-MEM 培地中で 24 時間培養した．培地の除去後，種々の濃度の試料（植物エキス，分画後の画分，単離した化合物）を含有する 200μL の培地を添加し 24 時間培養した．その後培地を取り除き，PBS で細胞を 1 回洗浄後，細胞溶解剤 Cell Culture Lysis Reagent（プロメガ社製）を 20μL 加え 30 分間振とうした．その後プレートと発光基質液（発光基質 Luciferase Assay Substrate ＋緩衝液 Luciferase Assay Buffer, ともにプロメガ社製）をマイクロプレートルミノメーター（サーモ社製ルミノスキャンアセント）へセットしルシフェラーゼ活性を測定した．なお，試料添加時のルシフェラーゼ遺伝子の発現量（化学発光量）を指標として，TCF/β-catenin 転写誘導活性を評価した． 293T/STF 細胞は，John hopkins 大学の Jeremy Nathans 教授よりご恵与頂いた．

2・2　スクリーニング検体

スクリーニングは，当研究室で独自に採集，構築したタイ，インドネシア，バングラデシュ産の植物エキス群を対象とし，良好な活性を示す検体を選別する．

2・3　*Excoecaria indica* からの活性成分の探索

Excoecaria indica の葉部（42 g）をメタノールで室温にて 24 時間抽出した．その後，ホモジナイズし，遠心分離及び濾過により抽出液を濾別した．残渣にメタノールを加えて再抽出し，これらの抽出液を併せて減圧濃縮し，抽出物（16 g）を得た．次に，この抽出物についてヘキサン，酢酸エチル，ブタノールを用い溶媒分配を行い，ヘキサン可溶部（0.7 g），酢酸エチル可溶部（3.9 g），ブタノール可溶部（3.3 g），水可溶部（3.9 g）をそれぞれ得た．ヘキサ

ン可溶部をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（分離用担体：Silica gel PSQ100（28 ㎜×260 ㎜）；移動相：クロロホルム / メタノール）に付し Fr. 1A ～ 1R を得た．次に，Fr. 1E（53.6 ㎎）についてゲルろ過カラムクロマトグラフィー（分離用担体：Sephadex LH-20（20 ㎜×550 ㎜）；移動相：メタノール）に付し Fr. 2A ～ 2O を得た．次に Fr. 2D について，逆相HPLC（カラム：CAPCELL PAK ACR C18（4.6 ㎜×250 ㎜）；移動相：75% メタノール；流速，1.0 mL/min；検出UV（254 nm））による精製を行い化合物 **1**（1.4 ㎎）を単離した．

2・4 *Erythrophleum succirubrum* からの活性成分の探索

Erythrophleum succirubrum の葉部 330 g をメタノールで室温にて 24 時間静置した．その後，ホモジナイズし，遠心分離及び濾過により抽出液を濾別した．残渣にメタノールを加えて再抽出し，これらの抽出液を併せて減圧濃縮し，抽出物 56 g を得た．この抽出物のうち 37 g をヘキサン，酢酸エチル及びブタノールで溶媒分配を行い，ヘキサン可溶部（10.9 g），酢酸エチル可溶部（4.3 g），ブタノール可溶部（9.3 g），水可溶部（13.4 g）をそれぞれ得た．ブタノール可溶部をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（分離用担体：Silica gel PSQ100B（44 ㎜×600 ㎜）；移動相：クロロホルム / メタノール）に付し Fr.1A ～ 1I を得た．このうち Fr. 1E について逆相HPLC（カラム：Mightysil RP-18（10 ㎜×250 ㎜）；移動相：35% メタノール；流速：2.0 mL/min；検出：UV（254 nm）and RI）による分画を行い，Fr.2A-2F を得た．得られた画分のうち Fr.2C 及び 2E について，C30 カラムを用いた逆相HPLC（カラム：Develosil C30 UG5（8 ㎜×250 ㎜）；移動相：45％メタノ

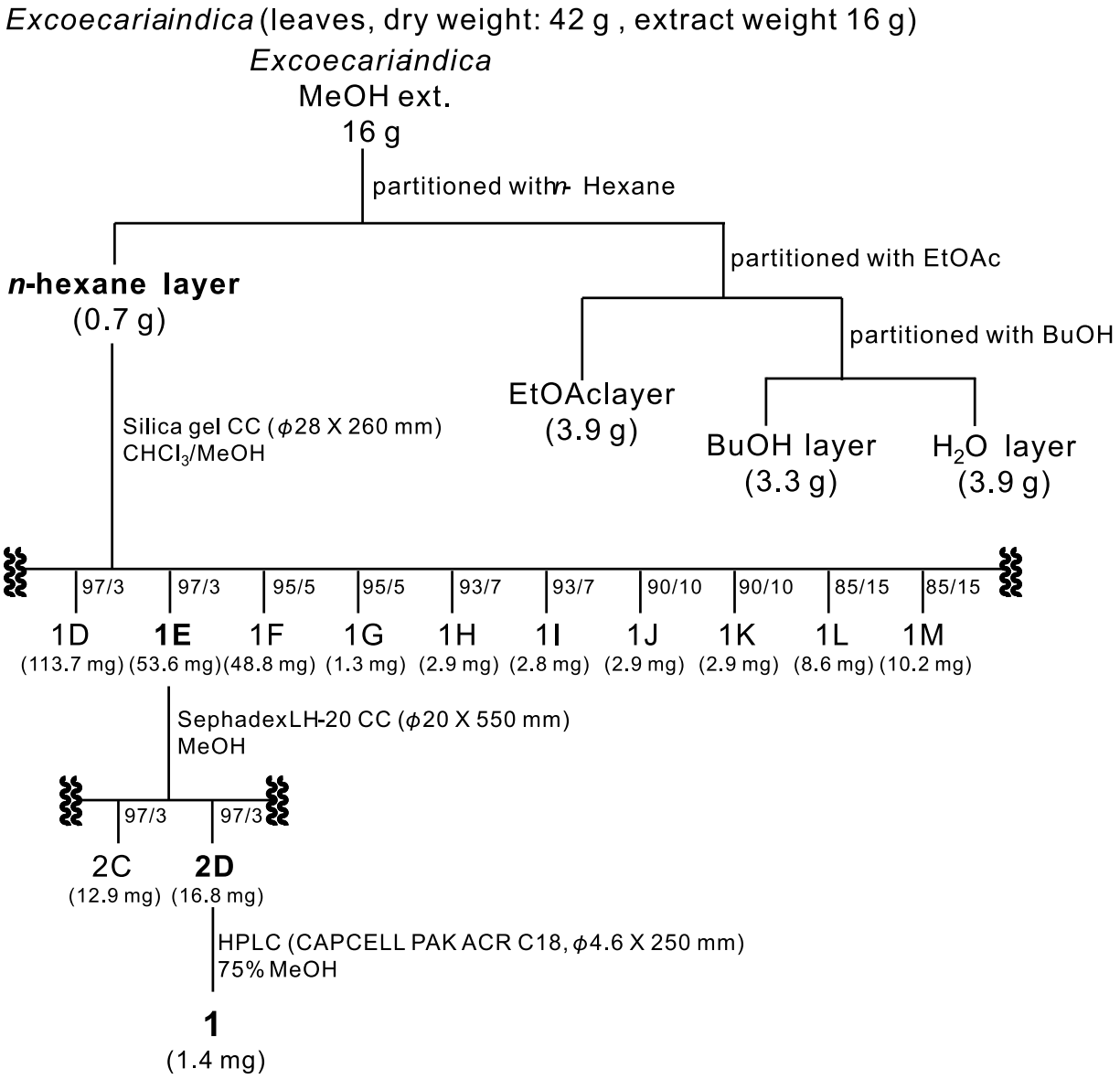


Fig.1 Isolation chart of *Excoecaria indica*

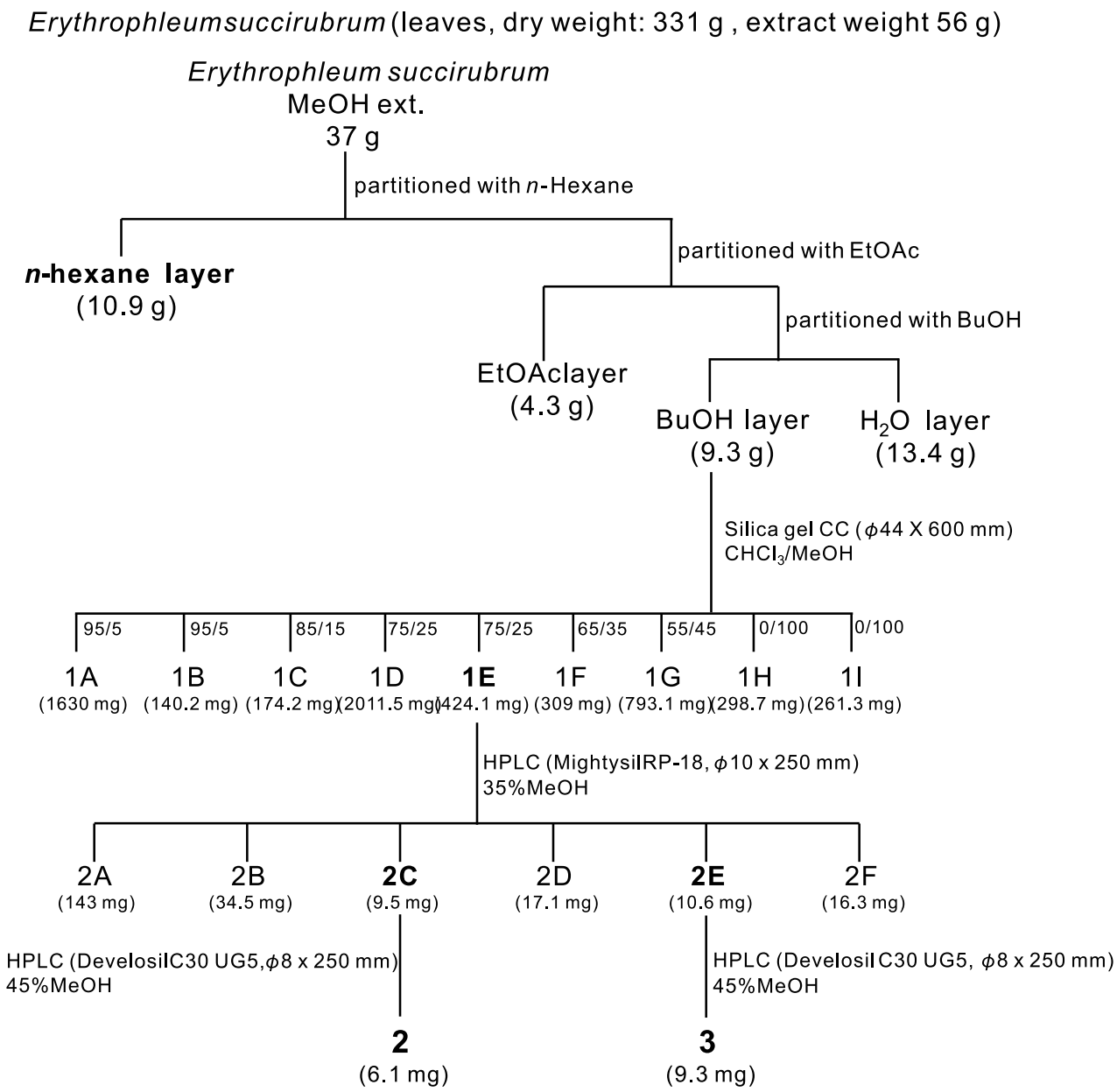


Fig.2 Isolation chart of *Erythrophleum succirubrum*

ール；流速：1.5 mL/min；検出：UV（254 nm）and RI）を行い，Fr.2C からは化合物 **2**（6.1 ㎎）を，Fr.2E からは化合物 **3**（9.3 ㎎）をそれぞれ単離した．

3．結果及び考察

3・1　スクリーニング

当研究室の天然物資源ライブラリー（天然抽出物）のうち，植物エキス 250 種についてスクリーニングを行ったところ，2 種に TCF/β-catenin 転写活性を上昇させることが判明した．このうち，強い活性が認められた *Excoecaria indica*（トウダイグサ科）を試料として選択し活性成分の探索を行った．また，本スクリーニングにて TCF/β-catenin 転写阻害作用を示した植物 *Erythrophleum succirubrum*（マメ科）より転写活性を上昇させる化合物を単離したので併せて報告する．

3・2　*Excoecaria indica* からの活性成分の探索

Excoecaria indica の葉部より得られたメタノール抽出物の TCF/β-catenin 転写活性について検討を行ったところ，25μg/mL で未処理群と比較して 9.5 倍 TCF/β-catenin 転写活性を上昇させることが判明した．次に，本抽出物についてヘキサン，酢酸エチル，ブタノールを用い溶媒分配を行い，各可溶部をそれぞれ得た．得られた各可溶部の TCF/β-catenin 転写活性について検討を行ったところ，ヘキサン可溶部，酢酸エチル可溶部，ブタノール可溶部に活性が認められた．そこで，ヘキサン可溶部について分画を

行った．ヘキサン可溶部をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し Fr.1A ～ 1R を得た．得られた画分のうち Fr. 1E, 1F, 1H, 1K, 1L, 及び 1M に TCF/β-catenin 転写活性の上昇が認められた．単離量並びに TLC 分析の結果を考えあわせ，Fr.1E を次の分画の対象とした．そこでまず，Fr.1E（53.6 mg）について，Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーを行い Fr. 2A ～ 2O を得た．主成分が Fr. 2C 及び 2D に移行したことが TLC 分析より明らかになったため，この 2 つの画分について，逆相HPLC による精製を行い化合物 **1**（1.4 mg）を単離した．

化合物 **1** は，各種スペクトル分析及び文献値[4)] との比較より，α-sapinine と同定した．

化 合 物 **1**: α-sapinine. White solid; $C_{30}H_{37}NO_7$, MW: 523. $[\alpha]_D^{26}$ = -63.6 (*c* 0.4, $CHCl_3$); EIMS *m/z* 523 [M^+], ^{1}H NMR [measured at 600 MHz, $CDCl_3$)]: δ 7.08 (*s*, H-1), 2.80 (*m*, H-4), 3.45 (*brd*, *J*=15.6, H-5), 5.14 (*brs*, H-7), 2.02 (*m*, H-8), 3.52 (*m*, H-10), 1.87 (*m*, H-11), 5.72 (*d*, *J*=10.2, H-12), 0.83 (*d*, *J*=4.8, H-14), 1.17 (*s*, H-16), 1.33 (*s*, H-17), 1.12 (*d*, *J*=6.0, H-18), 1.80 (*s*, H-19), 3.91 (*d*, *J*=12.0, H-20), 4.01 (*d*, *J*=12.0, H-20), 6.70 (*d*, *J*=9.0, H-3'), 7.42 (*t*, *J*=7.2, H-4'), 6.61 (*t*, *J*=7.2, H-5'), 7.88 (*d*, *J*=7.8, H-6'), 2.92 (*d*, *J*=4.8, NH-CH_3), 2.08 (*s*, CO-CH_3), ^{13}C NMR [measured at 150 MHz, $CDCl_3$]: δ 156.1 (C-1), 137.1 (C-2), 214.3 (C-3), 49.6 (C-4), 25.1 (C-5), 143.4 (C-6), 126.4 (C-7), 40.7 (C-8), 78.1 (C-9), 47.4 (C-10), 43.5 (C-11), 74.9 (C-12), 65.3 (C-13), 37.1 (C-14), 25.2 (C-15), 24.1 (C-16), 16.5 (C-17), 11.8 (C-18), 10.4 (C-19), 69.3 (C-20), 173.5 (C-21), 169.1 (C-22), 152.3 (C-1'), 110.8 (C-2'), 110.8 (C-3'), 134.9 (C-4'), 114.3 (C-5'), 134.9 (C-6'), 29.5 (NH-CH_3), 21.2 (CO-CH_3).

3・3 *Erythrophleum succirubrum* からの活性成分の探索

Erythrophleum 属の植物は西アフリカ，アーストライアやフィリピンなどに広く分布しており，葉部，種子に強い毒性を示し，子供や家畜を致死させた報告が多数ある．マメ科植物 *Erythrophleum succirubrum* はタイでは「**Saat**」との慣用名で知られ，その葉部，種子の急性毒性作用，心臓停止及び神経筋遮断作用が報告されている[5)]．これまでに *Erythrophleum* 属の成分研究に関しては，アルカロイド類化合物の cassaine, cassaidine, acetyl cassaidine の単離報告例がある[6)]．なお，*Erythrophleum succirubrum* のメタノールエキスは，上記のスクリーニングにおいて TCF/β-catenin 転写阻害活性を示したものの，本植物について詳細な成分解析を行ったところ，驚くことに TCF/β-catenin の転写を活性化する成分の単離に至ったので報告する．

Erythrophleum succirubrum の葉部 330g をメタノールで抽出し抽出物 56g を得た．このうち 37g をヘキサン，酢酸エチル及びブタノールで溶媒分配を行い，各可溶部をそれぞれ得た．得られた各可溶部のうちブタノール可溶部を選択し以下の分画を行った．まず，本可溶部についてシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い Fr.1A ～ 1I を得た．このうち，Fr.1E について逆相HPLC による分画を行い，Fr.2A-2F を得た．得られた画分のうち Fr.2C 及び 2E について，C30 カラムを用いた逆相HPLC を行い，Fr.2C からは化合物 **2** を（6.1 mg），Fr.2E からは化合物 **3**（9.3 mg）をそれぞれ単離した． 単離した化合物 **2** 及び **3** は，^{1}H NMR スペクトルにおいて特徴的なシグナルとして，6-8 ppm 付近でフラボノイド骨格由来するシグナル並

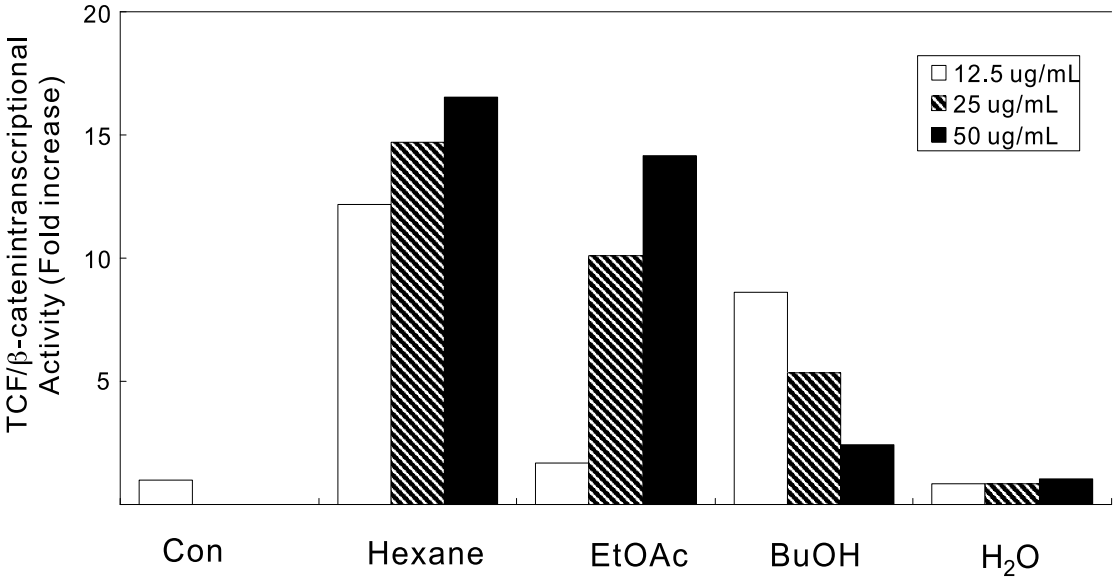


Fig.3 TCF/β-catenin transcriptional activity of each soluble fractions of *Excoecaria indica*

びに 3-5 ppm 付近に一分子の糖に由来するシグナルが観測されたことより，**2** 及び **3** はフラボノイド配糖体と推定された．各種スペクトル分析及び文献値との比較より，**2** は myricetin 3-*O*-β-D-galactopyranoside[7]，**3** は myricetin 3-*O*-α-L-rhamnopyranoside[8] と同定した．

化 合 物 **2**: Myricetin 3-*O*-β-D-galactopyranoside. Yellow powder; $C_{21}H_{20}O_3$, MW: 480.; FABMS *m/z* 481 $[M+H]^+$, ^1H NMR [measured at 500 MHz, CD_3OD)]: δ 6.19 (*d, J*=2.0, H-6), 6.39 (*d, J*=2.0, H-8), 7.37 (*s*, H-2' and H-6'), 5.18 (*d, J*=8.0, H-1''), 3.82 (*dd, J*=8.0 and 9.0, H-2''), 3.56-3.59 (overlapped, H-3''), 3.86 (*brd, J*=3.0, H-4''), 3.49 (*brt, J*=6.5, H-5''), 3.65 (*dd, J*=6.5 and 11.5, H-6''), and 3.56-3.59 (overlapped, H-6''), ^{13}C NMR [measured at 125 MHz, CD_3OD]: δ 158.7 (C-2), 136.0 (C-3), 179.4 (C-4), 163.0 (C-5), 99.9 (C-6), 166.1 (C-7), 94.7 (C-8), 158.4 (C-9), 105.6 (C-10), 121.7 (C-1'), 110.0 (C-2'), 146.3 (C-3'), 138.1 (C-4'), 146.3 (C-5'), 110.0 (C-6'), 105.6 (C-1''), 73.3 (C-2''), 75.1 (C-3''), 70.1 (C-4''), 77.2 (C-5''), 62.0 (C-6'').

化 合 物 **3**: Myricetin 3-*O*-α-L-rhamnopyranoside. Yellow powder; $C_{21}H_{20}O_3$, MW: 464.; FABMS *m/z* 465 $[M+H]^+$, ^1H NMR [measured at 500 MHz, CD_3OD)]: δ 6.19 (*d, J*=2.1, H-6), 6.35 (*d, J*=2.1, H-8), 6.94 (*s*, H-2' and H-6'), 5.31 (*d, J*=1.5, H-1''), 4.21 (*dd, J*=1.5 and 3.2, H-2''), 3.78 (*dd, J*=3.2 and 9.5, H-3''), 3.33 (*t, J*=9.5, H-4''), 3.51 (*dq, J*=6.1 and 9.5, H-5''), 0.95 (*d, J*=6.1, H-6''), ^{13}C NMR [measured at 125 MHz, CD_3OD]: δ 159.4 (C-2), 136.3 (C-3), 179.7 (C-4), 163.2 (C-5), 99.8 (C-6), 165.9 (C-7), 94.7 (C-8), 158.5 (C-9), 105.9 (C-10), 122.0 (C-1'), 109.6 (C-2'), 146.9 (C-3'), 137.9 (C-4'), 146.9 (C-5'), 109.6 (C-6'), 103.6 (C-1''), 71.9 (C-2''), 72.1 (C-3''), 73.4 (C-4''), 72.0 (C-5''), 17.7 (C-6'').

3・4　単離した化合物の TCF/β-catenin 転写活性

単離した 3 種の化合物について TCF/β-catenin 転写活性について検討を行った．その結果，α-sapinine（**1**）は，293T/STF 細胞の生存率を維持しながら 1.4 μM で 22.5 倍（Viability: 86%），2.9 μM で 46.6 倍（Viability: 88%）と比較的低濃度で顕著に TCF/β-catenin の転写を活性化することが判明した．また，フラボノイド配糖体である myricetin 3-*O*-β-D-galactopyranoside（**2**）及び myricetin 3-*O*-α-L-rhamnopyranoside（**3**）は，293T/STF 細胞の生存率を維持しながら 50 μM 及び 100 μM で TCF/β-catenin の転写を活性化することが判明した．

4．結　語

Wnt シグナルと毛髪生成に関しては 2007 年 5 月に成体における毛包形成と Wnt シグナル経路の関与について Nature 誌[9] で報告されるなど，その新知見が多く報告されている[10]．一方，小分子を用いたアプローチでは，Wnt シグナルを活性化させる化合物として，QS11[11] や SB-216763[12]，SB-415286[12] などが報告されているが，Wnt シグナルに作用する小分子を育毛作用に結びつけた研究はあまり知られていない[13]．本研究では，上記の知見を基に，有効な育毛促進作用を有する化合物を発見を目指し，当研究室保有の植物エキス 250 種について TCF/β-catenin 転写活性を指標としたスクリーニングを行った．その結果，活性が認められた *Excoecaria indica* より α-sapinine を，*Erythrophleum succirubrum* より myricetin 3-*O*-β-D-galactopyranoside 及び myricetin 3-*O*-α-L-rhamnopyranoside の単離に成功した．今後，特に *Excoecaria indica* の活性画分について，更に成分探索を行い，得られた活性成分の化

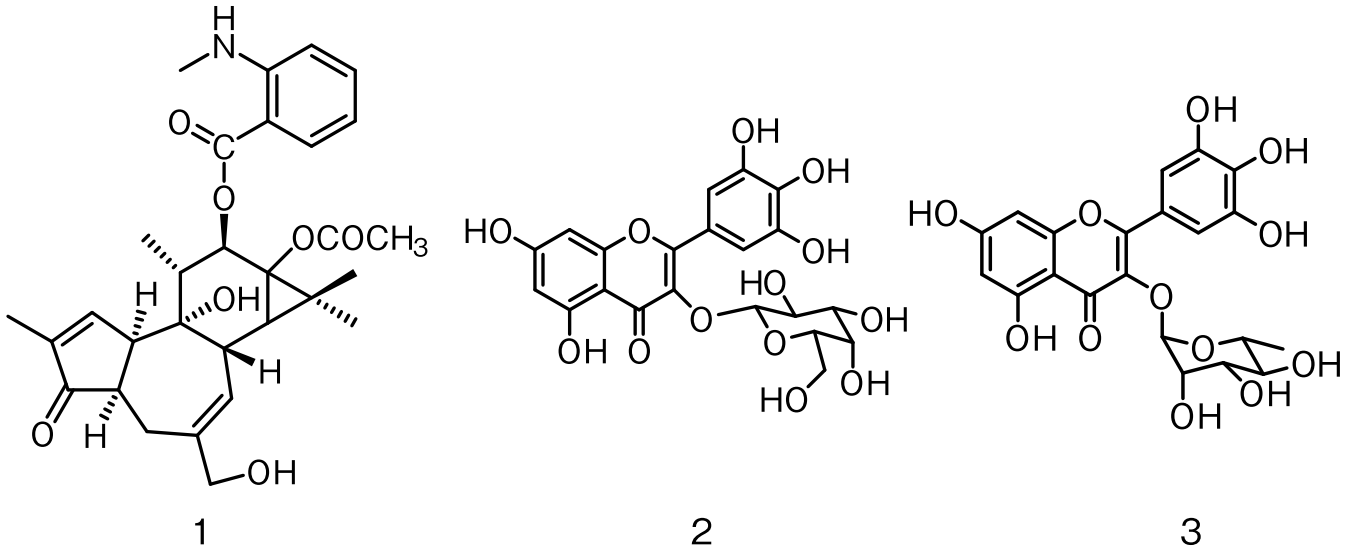


Fig.4 Chemical structure of compounds **1**-**3**

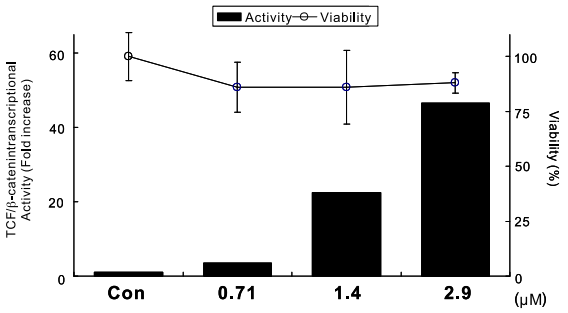


Fig.5 TCF/β-catenin transcriptional activity of compound **1**
Values are mean±S.D. (*n*=3)

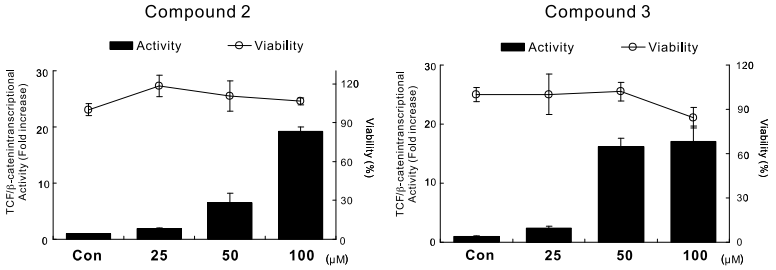


Fig.6 TCF/β-catenin transcriptional activity of compound **2** and **3**
Values are mean±S.D. (*n*=3)

学構造を明らかにする予定である．また，得られた活性成分について，種々の生化学的手法（Western blotting 法など）を用いてその作用機構の詳細な解析を行い，有望な作用を示した成分について，*in vivo* 実験等により育毛作用に関する有用性を評価し，育毛剤原材料としての利用を検討していきたい．

（引用文献）

1）岸本治郎，日本農芸化学会誌 **2003**, *77*, 566-569.

2）岸本治郎，実験医学 **2000,** *18*, 1817-1820.

3）Xu, Q.; Wang, Y.; Dabdoub, A. et al., **2004**, *116*, 883-895.

4）Chumkaew, P.; Karalai, C.; Ponglimanont, C. et al, *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 540-543.

5）Sattayasai, J.; Sattayasai, N.; Laupattarakasem, P. et al., *J. Sci. Coc. Thailand* **1983**, 9, 47-52.

6）Griffin, W.J.; Phippard, J.H.; Culvenor, C. C. J.et al., *Phytochemistry* **1971**, *10*, 2793-2797.

7）Foo, L.Y.; Lu, Y; Molan, A.L. et al., *Phytochemistry* **2000**, *54*, 539-548.

8）Chung, S.; Kim, Y.; Takaya, Y. et al., *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4664-4668.

9）Ito, M.; Yang, Z.; Andl, T. et al., *Nature* **2007**, *447*, 316-320.

10）Gerard M. J. Beaudoin III, G. M. J.; Sisk, J. M.; Coulombe, P. A. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **2005**, *102*, 14653-14658.

11）Zhang, Q.; Major, M.B.; Takanashi, S. et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **2007**, *102*, 7444-7448.

12）Coghlan, M.P.; Culbert, A.A.; Cross, D.AE. et al., *Chem. boil.*, **2000**, *7*, 794-803.

13）河﨑綾，鳥居宏右，西沢幸二　他，*日本薬学会第 127 年会講演要旨集*　**2007**, *2*, 117.

Ⅱ．　生体作用、安全性に関する分野

表皮細胞接着因子のバイオイメージング法の開発

慶應義塾大学医学部皮膚科学教室
天 谷　雅 行

In this study we attempted to develop a bioimaging analysis for epidermal cell-cell adhesion molecules, desmoglein (Dsg), as well as intermediate keratin cyteskeleton network. We used Dsg3, which is an autoimmune target antigen of pemphigus vulgaris, and keratin 14 and fused them with green fluorescence protein (GFP) or red fluorescence protein (RFP). When these chimeric molecules were introduced into cultured keratinocytes, we could observe time-lapse changes of Dsg3 and keratin as live images without killing or fixing cells. This approach has allowed us to overcome the limitations inherent in establishing a temporal sequence of events from fixed specimens, and to study the assembly and fate of desmosome precursors in living cells during junction assembly. We demonstrated the fate of Dsg3 and keratin after binding of AK23 pathogenic monolconal IgG antibody. After binding of AK23 IgG, Dsg3 diminished on the cell surface and tended to be internalized into cytoplasma. The insertion of keratin filaments was also obscured and its retraction into cytoplasma was also observed. We are under way to generate transgenic mice with Dsg3-GFP to perform in vivo bioimaging analyses. These new technique for live image of epidermal cell adhesion molecules will provide a valuable tool to understand molecular mechanisms of normal skin, that will in turn contribute to cosmetic science.

1．緒　言

本研究では、組換え蛍光蛋白質を用いて、表皮細胞間接着において重要な役割をするデスモゾーム関連蛋白のリアルタイムイメージング法を開発することである。細胞間接着に関与する蛋白の空間的情報（細胞内局在）及び時間的情報（経時変化）を解析し、全く新しい観点からデスモゾーム関連蛋白の機能解析を行うことである。正常な細胞間接着を保つことは、皮膚を健康に保つ基礎となっており、その分子基盤を解析するリアルタイムイメージング法は、化粧品学の進歩に大きく貢献するものと考えられる。

2. 実　験

デスモソームは、全身の上皮組織、心筋、肝臓などに分布する主要な細胞間接着装置の一つであり、隣接する細胞同士を強固に接着させるとともに、ケラチンなどの中間径線維と結合することで各組織の形態を安定化させる役割をもつ。デスモソームの構成蛋白には、膜貫通蛋白であるデスモグレイン（Dsg）およびデスモコリン（Dsc）、ならびに細胞内の裏打ち蛋白であるプラコグロビン（PG）、デスモプラキン（DP）、プラコフィリン（PKP）などの蛋白がある。これらの蛋白のうち、Dsg には Dsg1-Dsg4 の４種のアイソフォームが存在するが、その中でも Dsg1 および Dsg3 は重層扁平上皮における角化細胞間の接着に重要な役割を示すと考えられている。

Development of bioimaging analysis for epidermal cell adhesion molecules
Amagai Masayuki
Department of Dermatology, Keio University School of Medicine

天疱瘡は、Dsg1 および Dsg3 に対する自己抗体が体内で産生された結果、重層扁平上皮のデスモソーム同士の接着が障害されて表皮や口腔粘膜などに水疱やびらんを生じる自己免疫疾患である。自己抗体の標的となる Dsg の組織内分布と天疱瘡の表現形との関連についてはこれまでに詳細に解析されてきた。これに対し、自己抗体結合後にどのような機序で表皮細胞間の接着が障害され水疱が形成されるのかは未だ不明である。天疱瘡の病態を詳細に解明する上で、表皮細胞に自己抗体が結合する際、抗原蛋白を含め周囲のデスモゾーム関連蛋白がどのような挙動を示すかを、空間的情報（細胞内局在）ならびに時間的情報（経時的変動）の両面から解析することが現在求められている。

従来まで細胞内の蛋白質の局在を解析する方法としては、特異的な抗体を用いた免疫染色が主体であった。しかし、免疫染色は、ホルマリン、アセトンなどの種々の固定剤により組織、細胞を固定した後に蛋白の局在を検討するため、細胞が生きている状態での蛋白の局在を反映しているかは不明である。また、細胞を固定してしまうため同じ細胞内での蛋白の経時的変化を観察することは不可能であった。近年、蛍光蛋白質（Green Fluorescence Protein、GFP など）を目的の蛋白と融合させた融合蛋白を作製し、それを機能プローブとして用いることで、生きた状態での細胞内局在を可視化する技術が可能となり、従来とは全く異なる視点で分子の細胞内動態を観察することができるようになった。

本研究では、デスモソーム関連蛋白のリアルタイムイメージング法を開発し、細胞間接着におけるそれぞれの蛋白の挙動をリアルタイムで解析すると共に、天疱瘡の自己抗

体が結合してから水疱形成に至るまでの分子メカニズムに関する基礎的知見を得ることにある。デスモソーム関連蛋白ならびに表皮角化細胞の中間径線維であるケラチンに蛍光蛋白質を融合した発現ベクターを作製し、それぞれを培養角化細胞に導入して融合蛋白の発現を試みた。続いて細胞接着における発現蛋白の細胞内動態を経時的固定後の観察ならびにリアルタイムイメージング法により解析した。さらに培養角化細胞に抗Dsg3 IgG抗体を反応させ、抗体とDsg3とが結合した後の発現蛋白の細胞内動態を経時的固定後の観察ならびにリアルタイムイメージング法により試みた。

3．結　果

1）蛍光蛋白質融合ケラチン14（K14）およびケラチン5（K5）の発現

ヒトK14およびK5翻訳領域全長のcDNAをPCR法により増幅し、これをClontech社の蛍光蛋白質発現ベクターpEGFP-C1 (緑) に挿入して2種類の発現ベクター（pEGFP-K14, pEGFP-K5）を作製した。またヒトK14のcDNAについては、同じくClontech社のGFP変異蛋白質発現ベクターであるpEYFP-C1（黄）、pECFP-C1（シアン）にも挿入して2種類の発現ベクター（pEYFP-K14, pECFP-K14）を作製した。

作製した4種類の発現ベクターについて、デスモソームを発現しない細胞株であるCHO細胞にそれぞれFuGENE（Roche Applied Science）を用いて遺伝子導入したところ、発現した蛋白は細胞内で核周囲に凝集して認められ、正常なケラチンと同様の網状の構築を形成することはなかった。そこで4種類のベクターを培養ヒト表皮細胞株であるKU8細胞に遺伝子導入したところ、発現した蛋白は細胞内で網状の構築を形成するとともに、一部では隣接する細胞にむかってネットワーク状に伸張する像が認められ、この部位におけるデスモソームの裏打ち蛋白との結合が示唆された。これらの発現蛋白のうちEGFP-K14については、安定形質導入KU8細胞株をネオマイシンで選択し、細胞間接着におけるケラチンの細胞内動態の解析に用いた。

2）蛍光蛋白質融合Dsg3の発現

ヒトDsg3翻訳領域全長のcDNAをpEGFP-N1に挿入して発現ベクターpEGFP-hDsg3を作製した。作製した発現ベクターをKU8細胞ならびに培養マウスケラチノサイト細胞株Pam212細胞に遺伝子導入したが、2種類の細胞において融合蛋白の発現は全く認められなかった。

続いてマウスDsg3翻訳領域全長のcDNAをpEGFP-N1、pEYFP-N1、pECFP-N1、ならびに赤色変異蛋白質発現ベクターであるpDsRed（Clontech社）に挿入し、これらをKU8細胞ならびにPam212細胞に遺伝子導入した。その結果それぞれの融合蛋白が導入細胞の細胞質に発現して認められたものの、Dsg3が本来発現する場所となる細胞膜表面での発現は認められなかった。

3）リアルタイムイメージング法による動態解析

過去に我々は、単独でマウス表皮に水疱を誘導する抗Dsg3マウスモノクローナル抗体（AK23 mAb）を単離した。EGFP-K14導入KU8細胞株を、ガラスベースディッシュでコンフルエントになるまで培養した後、100 μg/mℓのAK23 mAbを反応させ、その後AxioVision社のDelta Vision撮影装置を用いてEGFP-K14の細胞内動態を12時間まで観察した。その結果、AK23 mAb反応後0.5時間よりEGFP-K14のごく一部で接着面の細胞膜へのinsertionが消失し、ケラチン線維が細胞の中心へとretractしている像が見られたが、ほとんどのケラチン線維は反応後12時間においてもそのまま膜にinsertionした状態で認められ、keratin retractionは認められなかった。その理由として、株化された角化細胞が単層培養下でDsg2を発現するため、Dsg2を裏打ちする部分でEGFP-K14のretractionが認められなかった可能性が示唆された。そこで細胞培養下でDsg2を発現しない正常ヒト表皮角化細胞（NHEK）を今後の実験に用いた。

4）NHEK細胞における抗Dsg3 IgG抗体結合後のK14、Dsg3の動態解析

pEGFP-K14をFuGENE（Roche）を用いてNHEK細胞に遺伝子導入し、GFP融合K14の発現を試みたが、融合蛋白の発現は遺伝子導入後72時間まで認められなかった。そこでNHEK細胞をガラスベースディッシュでコンフルエントになるまで培養し、その後培養液を高Ca培地（1.2mM Ca含培地）に変更してさらに12時間培養した。培養後のNHEK細胞に対し、100 μg/mℓのAK23 mAbを0.5～24時間反応した。固定後、ケラチン線維をウサギ抗ケラチン抗体ならびに緑色蛍光色素（Alexor Fluor 488）で標識した抗ウサギIgG抗血清（Molecular Probes社）を用いて染色すると共に、膜状に結合したAK23 mAbをAlexor Fluor 546標識抗マウスIgG抗血清（Molecular Probes社）を用いて染色した。その結果ケラチン線維のretraction像は、EGFP-K14発現KU8細胞を使用したときよりも明瞭に観察された。しかしこの方法では、ケラチン線維が点状の蛍光として認められたこと、ならびに一部のケラチン線維ではAK23 mAb反応後24時間が経過しても細胞膜からのretractionが認められなかったことなどの問題を伴っていた。

後者についてはCaシフトにより重層化したNHEK細胞がDsg1を発現するため、Dsg1を裏打ちする部分でケラチン線維のretractionが認められなかった可能性が考え

られた。そこでNHEK細胞をAK23 mAbと反応する直前に、Dsg1の細胞外を切断することでその接着機能を障害する黄色ブドウ球菌産生表皮剥脱毒素（ETA）1 μg/mℓを反応させ、その後AK23 mAb反応後のケラチン線維およびAK23 mAbの細胞内動態を経時的に観察した。その結果、AK23 mAb反応後6時間より、角化細胞同士の接着面においてケラチン線維の細胞膜からのretractionならびにAK23 mAbのinternalizationが明瞭に観察された（図1）。

以上の結果より、AK23 mAbとの反応によってケラチンのretractionおよびDsg3のinternalizationが生じることが示唆された。しかしケラチン線維が点状の蛍光として認められる問題については解決が得られないため、アデノウイルス発現系を用いたEGFP-K14 cDNAのNHEK細胞への遺伝子導入、ならびにその融合蛋白の発現を試みた。

5）アデノウイルス発現系によるEGFP-K14のNHEK細胞での発現

EGFP-K14のcDNAを挿入した組換えアデノウイルスを、TAKARA社のAdenovirus Expression Vector Kitを用いて作製した。すなわちpEGFP-K14よりEGFP-K14のcDNAを制限酵素を用いて切断し、末端を平滑末端処理した後にコスミドベクターpAxcwに挿入した。作製したcDNA挿入コスミドベクターをSTRATAGENE社のGIGAPACK III XLを用いてLambda Phageにパッケージングし、コスミドベクターを増幅した。増幅したコスミドベクターを制限酵素処理済みDNA-TPCとともに293細胞にco-transfectし、出現した組換えアデノウイルスを回収した。ウイルス液を4回以上継代して高力価ウイルス液を作製し、これをNHEK細胞に感染させてEGFP-K14の発現の有無を観察した。その結果、感染後24時間よりEGFP-K14がNHEK細胞質内で高率に発現し、かつ線維状の蛍光パターンとして観察された（図2）。

低濃度のカルシウムの培養液中で角化細胞を培養すると、デスモゾーム蛋白は産生されるものの、デスモゾームは形成されない。しかし、培養液中のカルシウムの濃度を上昇させると、比較的短時間で、細胞と細胞が接着し、デスモゾームが形成されることが知られている。そこで培養液中のCa濃度を高濃度へシフトし、角化細胞表面にデスモゾームが形成されたときにEGFP-K14の接着面に向かってのinsertionに変化が見られるか解析した。まずNHEK細胞を無Ca培地で培養したときには、EGFP-K14が細胞質内に網状の構造を形成して認められたが、接着面に向かってネットワーク状に伸張する像は認められず、細胞膜へのinsertionは認められなかった。これに対し培養液を高Ca培地（1.2mM Ca含培地）に変更したときには、EGFP-K14が接着面に向かってinsertionする像が観察された（図7）。さらに培養液を再び無Ca培地に変更したところ、EGFP-K14が接着面に向かってinsertionする像が再び認められなくなった。

以上の結果より、アデノウイルス発現系を用いて発現させたEGFP-K14は、NHEK細胞において高率に発現する

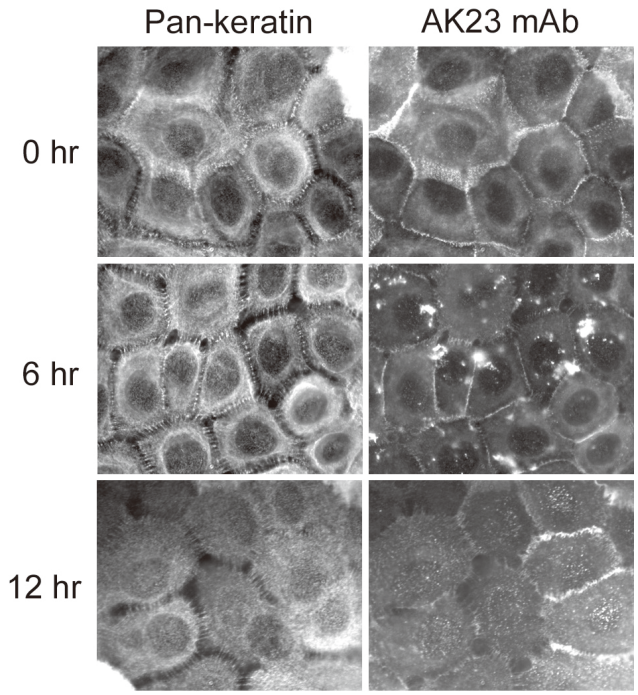


図1　AK23 mAb反応前後のNHEK細胞におけるケラチン線維およびAK23 mAbの細胞内動態。
AK23 mAb反応前のNHEK細胞では、ケラチン線維の染色が細胞質全体および接着面の細胞膜表面において点状に認められ（A）、またAK23 mAbの染色も接着面の細胞膜上に点状に配列して認められた（B）。AK23 mAb反応6時間後より、ケラチン線維の膜表面からのretraction（C）、ならびにAK23 mAbの細胞質内へのinternalization（D）が認められ、これらの反応はAK23 mAbの反応後12時間後でより顕著となった。（E, F）。

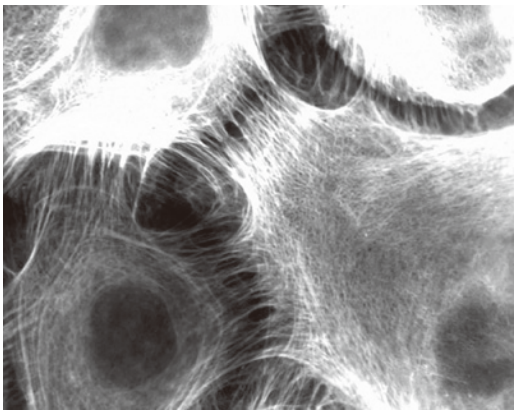


図2　Adenovirus発現系でNHEK細胞に発現したEGFP-K14。
EGFP-K14がNHEK細胞の細胞質内で明瞭な線維状の蛍光パターンとして観察された。

とともに、正常なケラチンと同様、高Ca条件下ではデスモソームの形成に伴いデスモソームの裏打ち蛋白と結合する可能性が示唆された。

6）水疱形成能の異なる抗Dsg3 IgG抗体結合後のK14、Dsg3の動態解析

過去に天疱瘡モデルマウスより単離した複数のAK mAbの中で、マウスへの投与により明らかな水疱形成を誘導するAK23 mAbと、水疱形成を誘導しないAK7 mAb、AK18 mAb、AK20 mAbについて、それぞれのNHEK細胞に対する接着障害活性の違いをDissociation assayを用いて解析した。さらにEGFP-K14を発現させたNHEK細胞にそれぞれのmAbを反応した後の、EGFP-K14およびDsg3の挙動について解析を行った。NHEK細胞をコンフルエントになるまで培養した後、培養液を高Ca培地へシフトして重層化し、そこにAK7 mAb、AK20 mAb、AK23 mAbを37℃、24時間反応した。その後0.5 mg/mℓのETAを37℃、2時間反応し、さらにDispase（Roche Diagnostics）を15分間反応してNHEK細胞をディッシュから剥離した。剥離後、角化細胞のシートに対しピペッティングで物理的刺激を加え、固定後断片化した角化細胞のシート数を計数した。その結果断片化したシート数は、AK23 mAb反応後に最も多く認められたのに対し、AK7 mAb、AK20 mAbを反応したときには断片化は顕著ではなかった。さらにNHEK細胞を異なる濃度のAK23 mAbと反応してDissociation assayを行ったところ、断片化したシート数はAK23 mAbが増加するにつれ用量依存性に増加した（図3）。

続いてアデノウイルス発現系によりEGFP-K14を発現させたNHEK細胞を、あらかじめ1 mg/mℓのETAで処理した後、100 mg/mℓのAlexor Fluor 546で標識したAK23 mAb、ならびに新生仔マウスへの投与で明らかな水疱形成を認めないAK18 mAbと反応させ、その後Axio社のDelta Visionを用いてEGFP-K14ならびにAK

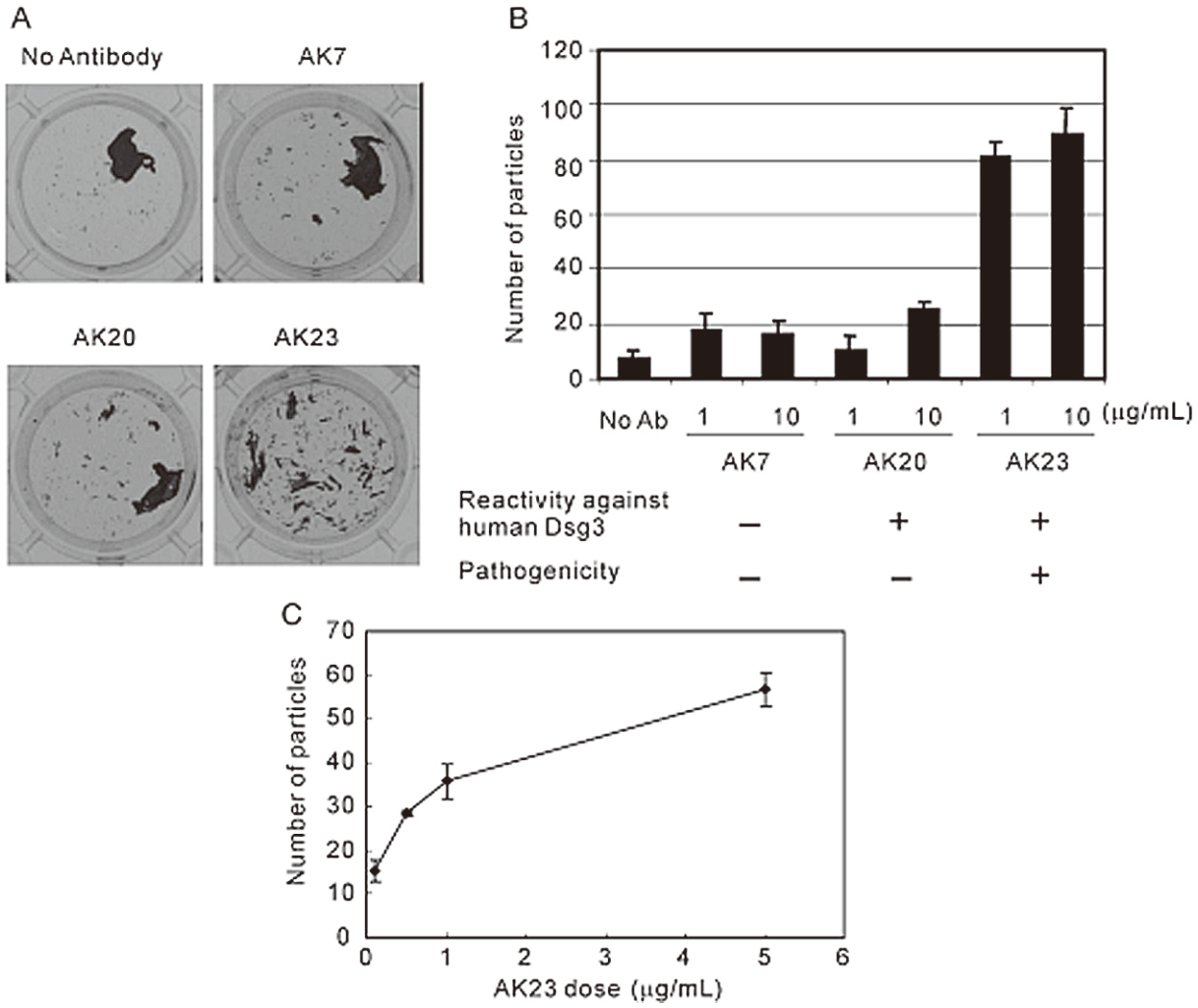


図3　Dissociation assayによるAK mAbの接着障害活性の比較。
断片化したシート数はNHEK細胞をAK23 mAbと反応したとき最も多く認められた（A, B）。またAK23 mAb反応後の断片化したシート数は、反応に用いたAK23 mAbの濃度を増加することで用量依存性に増加した。

mAb の細胞内動態の違いを 8 時間まで観察した。その結果 AK23 mAb を反応させた NHEK 細胞では、反応後 0.5 時間より EGFP-K14 の細胞内への retraction ならびに AK23 mAb の細胞内への internalization が認められたのに対し、AK18 mAb を反応させた細胞では、EGFP-K14 の retraction および AK18 mAb の internalization ともに反応後 8 時間まで明瞭ではなかった（図 4）。

7）EGFP-K14 トランスジェニックマウスの作製

アデノウイルス発現系にて導入に成功した EGFP-K14 の cDNA を、K5 プロモーター（13 kb）の下流に挿入した cDNA コンストラクト pGEM-K5pro-EGFP-K14 を作製した。この cDNA コンストラクトを、マウス角化細胞株 Pam212 細胞に前述の FuGENE（Roche Applied Science）を用いて遺伝子導入したところ、発現した蛋白は細胞内で網状の構築を形成するとともに、一部では隣接する細胞にむかってネットワーク状に伸張する像が認められた。

4．考　察

本研究は、従来不可能であったデスモゾーム関連蛋白の生細胞における分子動態を、リアルタイム解析という新しい観点から解析するものである。その成果は in vivo における細胞間接着機構を理解する上で新しい視点を導入するものであり、皮膚科学のみならず、細胞生物学を含めた基礎医学に対する多大な貢献が期待される。また本研究における解析の結果、天疱瘡の水疱形成のメカニズムが分子動態の観点から明らかにされることで、ステロイド、免疫抑制剤などの副作用の多い現行の治療法とは全く異なる新しい治療法の開発が可能となるかもしれない。

正常な細胞間接着を保つことは、皮膚を健康に保つ基礎となっており、その分子基盤を解析するリアルタイムイメージング法は、化粧品学の進歩に大きく貢献するものと考えられる。

5．総　括

本研究では、表皮細胞間接着において重要な役割をするデスモゾーム関連蛋白のリアルタイムイメージング法を開発するとともに、抗Dsg3 IgG 抗体反応後の細胞間接着におけるそれぞれの蛋白の空間的情報（細胞内局在）及び時間的情報（経時変化）を解析し、デスモゾーム関連蛋白の機能解析を行った。その結果抗Dsg3 IgG 抗体の反応後に、角化細胞同士の接着障害が見られると共に、Dsg3 の細胞内への internalization およびケラチン線維の細胞膜からの retraction が生じることが明らかとなった。またマウス表皮での水疱形成能の異なる AK mAb を角化細胞に反応させた際、Dsg3 とケラチンの挙動に違いが見られることを細胞レベルで明らかにした。本研究の成果は、天疱瘡における水疱形成機序を分子レベルで解明する上での新しい所見を得ただけでなく、表皮細胞間接着の分子機構についても新しい視点を導入するものと考えられた。また本研究では達成できなかったものの、Dsg3、PG、DP 等のデスモソーム関連蛋白を蛍光色素により可視化することで、デスモソームにおけるこれらの蛋白の動態をリアルタイムで解析することが可能となると考えられた。さらに本研究においてその開発に着手した EGFP-K14 トランスジェニックマウスは、in vivo における天疱瘡の分子病態メカニズムならびに細胞間接着の分子機構を理解する上で重要なツールとなると考えられた。

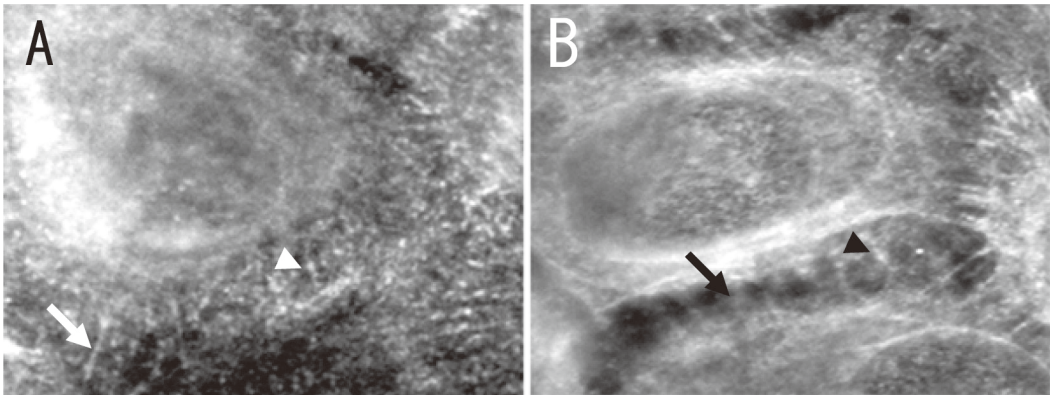


図 4　AK18 mAb(A) ならびに AK23 mAb(B) を反応させた NHEK 細胞における EGFP-K14 および Dsg3 の細胞内動態。
AK18 mAb を反応させた細胞では、AK23 mAb を反応させた細胞と比べ、EGFP-K14（矢印）および AK mAb（矢頭）の細胞内への移動は明瞭ではなかった。

毛形成におけるホスフォリパーゼ Cδ1 の機能解析

東京薬科大学生命科学部
深 見　希代子

Nude mice exhibit athymia and hairlessness by a loss-of-function mutation in the transcription factor *Foxn1* gene. Although the immunologic functions of Foxn1 have been studied intensively, there have been relatively few studies of its functions in skin. Foxn1 regulates expression of hair keratins, which is essential for normal hair structure; however, it was largely unknown how Foxn1 regulates hair keratin expression and hair formation. In the present study, we found that mice lacking phospholipase C (PLC)-δ1, a key molecule in the phosphoinositide signaling pathway, and nude mice show similar hair abnormalities, such as lack of cuticle and bending. We also found that expression of hair keratins was remarkably decreased in skin of PLCδ1 knockout mice. Furthermore, expression of PLCδ1 was induced in Foxn1-transfected U2OS cells. In addition, we showed that PLCδ1 expression was remarkably decreased in skin of nude mice. In skin and keratinocytes of nude mice, activation of PLC downstream effectors, such as PKC and NFAT, was impaired as well as those of PLCδ1 KO mice. These results indicate that PLCδ1 is an essential molecule downstream of Foxn1 in normal hair formation, and strongly suggest that hairlessness in nude mice is caused by insufficient expression of PLCδ1.

1. 緒　言

毛は美容の対象として、非常に多くの人々に関心を持たれている器官でありながら、毛の形成についての詳細なメカニズムは未解明な部分が多い。申請者らは、イノシトールリン脂質代謝系の要となる酵素、ホスフォリパーゼ C（PLC）の一つである PLCδ1 のノックアウト（KO）マウスを作製し、このマウスが顕著な体毛減少を示すことを報告している。最近、PLCδ1KO マウスの体毛減少のメカニズムを詳細に検討したところ、ヌードマウスと外見のみならず、毛の詳細な形状等がよく似ていることが判明してきている。ヌードマウスは転写因子 Foxn1 が先天的に変異し、その結果、毛の形成に必要なヘアケラチンである mHa3 が減少することが無毛の原因と考えられている。

そこで本研究では、ヌードマウスと PLCδ1KO マウスの類似性と相違点を種々の解析法により検討し、ヌードマウスと PLCδ1KO マウス間のシグナル伝達の共通性を明らかにすることにした。

2. 実　験

２－１．PLCδ1KO マウスの作製および抗体等

PLCδ1KO マウス作製についてはすでに報告している（EMBO J.2003）。PLCδ1 抗　体（BD Pharmingen, USA）, Foxn1 抗体（Santa Cruz Biotechnology, USA）, β-actin 抗体（Chemicon, USA）は市販品を使用した。

The roles of phospholipase Cδ1 in the formation of hair follicles

Kiyoko Fukami

Laboratory of Genome and Biosignal, Tokyo University of Pharmacy and Life Science

２－２．*in situ* ハイブリダイゼーション

皮膚を 4％パラホルムアルデヒドで固定後、8-mm の厚さの切片を作製した。PLCδ1、Foxn1、mHa3 の検出はジゴキシゲンラベルのリボプローブを用いて行なった。

２－３．ノザンブロット解析

RNA は RNeasy Mini Kit（QIAGEN）を用いて皮膚から調整した。mHa3 および GAPDH は DIG Northern Starter kit（Roche, Germany）によるジゴキシゲンラベルのリボプローブを用いて行なった。

3. 結　果

３－１．PLCδ1KO マウスはヌードマウスと非常に類似した表現型を示す

PLCδ1KO マウスはヌードマウスと同様に無毛となる（図 1 B, C）が、電子顕微鏡で皮膚構造を観察した場合にも、コントロールマウスでは毛が存在しているのに対し、両マウスではほとんど毛が見られないこと（図 1 D, E, F）、また存在している毛も折れ曲がっている（図 1 H, I）など、非常に類似していることが判明した。更にコントロールマウスの毛で観察されるキューティクルが両マウスでは見られないなどの事実が判明した（図 1 G, H, I）。

３－２．ヌードマウス同様、PLCδ1KO マウスは皮膚でのヘアケラチンが減少している

ヌードマウスでは転写因子 Foxn1 が先天的に変異し、毛の形成に必要なヘアケラチンである mHa3 が減少している。そこで PLCδ11KO マウスの皮膚における mHa3 の mRNA 量をノザンブロットで検討した所、ヌードマウス

と同様に mHa3 の mRNA 量が顕著に減少していた（図２）。

３－３．PLCδ1、Foxn1、mHa3 は毛包において同局在する

PLCδ1KO マウスとヌードマウスの類似性が観察されたことから、ヌードマウスの原因遺伝子である Foxn1 と PLCδ1 の関連性を検討することにした。

Foxn1 は毛包に発現が多いことが報告されている。そこで、*in situ* hybridization により、Foxn1、PLCδ1、及び mHa3 の発現を検討した。図３に示す様に、Foxn1、PLCδ1、及び mHa3 の mRNA はいずれも、毛包において、毛の形成や毛を保持するために重要な部位である precortex 部分に発現していることが判明した（図３）。

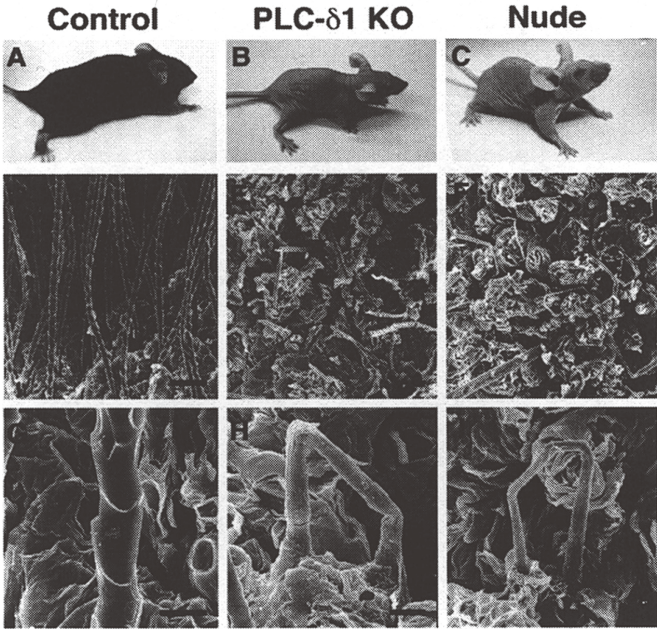


図１．A-C: PLCδ1KO マウスとヌードマウスの外観、D－I：マウス皮膚の走査香型電子顕微鏡像。コントロールマウスでは多くの毛が存在するのに対し、PLCδ1KO マウスとヌードでは毛がほとんど観察されず (D-F)、折れ曲がっている (G-I)。

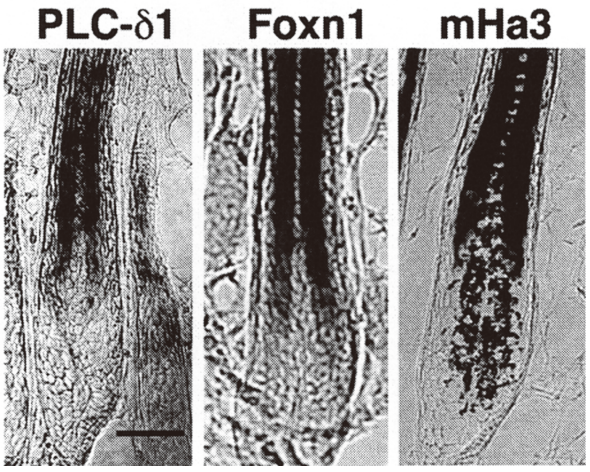


図３．*in situ* hybridization による毛包における Foxn1、PLCδ1、及び mHa3 の mRNA の発現。毛の形成に重要な precortex 部位に、これらの mRNA がいずれも発現している。

３－４　Foxn1 の過剰発現は PLCδ1 の発現を誘導する

PLCδ1 及び mHa3 の mRNA が毛包において同じ部位に発現していることが明らかになり、これらのタンパク質が機能的に関連している可能性が強く示唆された。またヌードマウスおよび PLCδ1KO マウスの両マウスで mHa3 の mRNA の発現量が減少していることから、シグナル伝達において、Foxn1 と PLCδ1 は mHa3 の上流にあると考えられた。そこで Foxn1 と PLCδ1 のシグナルの伝達経路での関連性を次に検討することにした。

骨肉腫細胞である USOS 細胞に Foxn1 を強制発現した場合には、PLCδ1 の発現が mRNA およびタンパク質の両方で誘導されることが判明した（図４）。逆に PLCδ1 を USOS 細胞に強制発現した場合には、Foxn1 の発現は誘導されなかった。このことから、Foxn1 は PLCδ1 の上流に

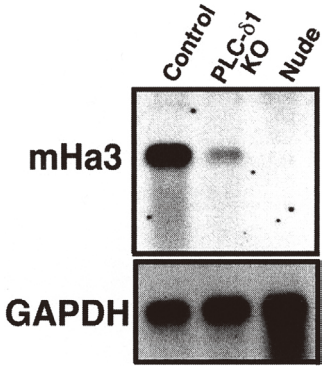


図２．ノザンブロットによる PLCδ1KO マウス皮膚での mHa3 の mRNA の発現。PLCδ1KO マウス皮膚ではヘアケラチンの mHa3 の mRNA 量がヌードマウスと同様に減少している。

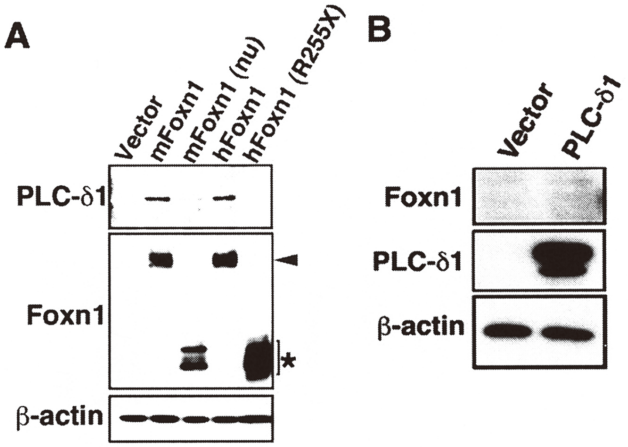


図４．Foxn1 の強制発現は PLCδ1 の発現を誘導する。USOS 細胞に Foxn1 を強制発現した場合、PLCδ1 タンパク質の発現が誘導される（A）。一方、PLCδ1 を USOS 細胞に強制発現した場合には、Foxn1 の発現は誘導されなかった（B）。

位置し、PLCδ1 の発現を調節していると考えられた。

３－５．ヌードマウス毛包では PLCδ1 の発現が低下している

毛包の形成においては、Foxn1 →PLCδ1 →mHa3 というシグナルの流れが存在することが示唆されたので、ヌードマウスにおいて PLCδ1 の発現が低下しているかを調べてみることにした。

第一に毛包での PLCδ1 の発現を *in situ* hybridization により検討した。図５A、B に示す様に、野生型のコントロールマウスの毛包では PLCδ1 の発現が強く観察されるのに対し、ヌードマウスの毛包では、PLCδ1 の発現がほとんど見られなかった。またウエスタンブロット法により、皮膚における PLCδ1 タンパク質の発現を比較した所、ヌードマウス皮膚において PLCδ1 タンパク質の発現量が著しく減少していることが判明した（図５C）。同様に PLCδ1mRNA の減少も RT-PCR により明らかになった（データ示さず）。これらの事実は、Foxn1 →PLCδ1 →mHa3 というシグナルの流れが毛包において存在していることを示している。

３－６.「ヌードマウスの体毛減少は PLCδ1 欠損が原因である」ことの検証

ヌードマウスの体毛減少が PLCδ1 の発現低下のみで説明できるのであれば、ヌードマウスに PLCδ1 を発現させることにより、体毛が正常に形成されるようになることが期待される。そこで、ヌードマウスの原因遺伝子である Foxn1 プロモーター制御下で PLCδ1cDNA を発現する TG マウスを作製した。第一に、Foxn1 の発現部位での PLCδ1 発現の影響を検討するため、PLCδ1KO マウスで TG マウスを作製した（Foxn1:: PLCδ1TG/PLCδ1KO マウス）。PLCδ1KO マウスでは、表皮の肥厚、皮膚の炎症、cyst の形成、毛包形成異常、ヘアケラチンの減少が観察されるが、これらの異常は Foxn1:: PLCδ1TG/PLCδ1 マウスではすべて回復した。このことから PLCδ1 がこうした組織では Foxn1 下流分子として生体内で機能していることが強く示唆された。一方脂腺では、このトランスジーンで脂腺拡大が回復しないことから、脂腺では PLCδ1 は Foxn1 と独立したシグナルを経由していると考えられる（図６）。

次に、ヌードマウスで TG マウスを作製（Foxn1:: PLCδ1TG/nude マウス）した所、外見上は毛の形成が回復しなかった。またヌードマウスの無胸腺、表皮の肥厚は全く回復しなかったので、これらの組織では Foxn1 と PLCδ1 の関連性は薄いと考えられる。しかしながら、毛包形成やヘアケラチンの発現は部分的ではあるものの回復し、cyst の形成も激減した。こうした事実は、PLCδ1 が毛の形成においては Foxn1 の下流分子として重要な役割を担っていることを示している（図７）。

4. 考　察

今回我々は、PLCδ1KO マウスが、転写因子 Foxn1 の変異が原因であるヌードマウスと形態的に酷似していること、ヌードマウスで PLCδ1 の発現が低下し、Foxn1 →PLCδ1 →mHa3 というシグナルの流れが存在することを明らかにした。また Foxn1 の欠損による無毛というヌードマウスの表現型を PLCδ1 の強制発現で補完することができるのかを明らかにするために、TG マウスを作製した。現在、回復する異常と回復しにくい異常が判明しつつあり、Foxn1 と PLCδ1 の関連性がわかってきている。

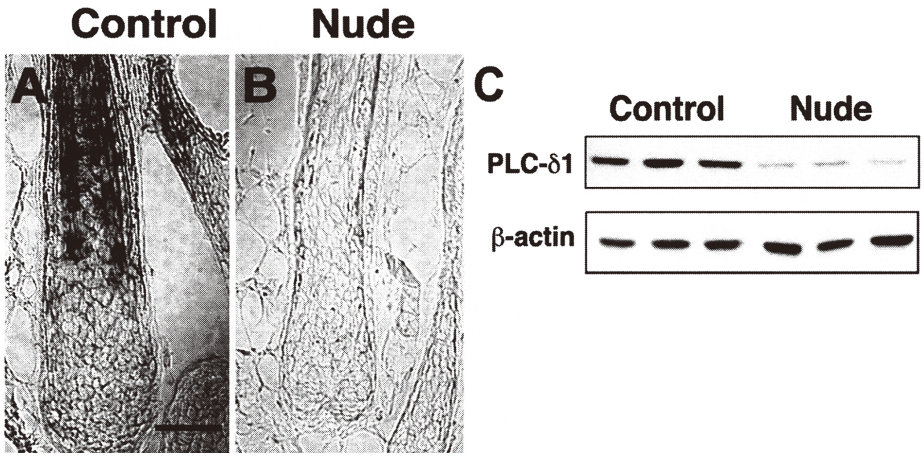


図５．ヌードマウスでは PLCδ1 の発現が低下している。A、B；*in situ* hybridization による毛包における PLCδ1 mRNA の発現。コントロールマウスでは強い PLCδ1 mRNA のシグナルが見られるのに対し（A）、ヌードマウス毛包では、PLCδ1 の発現がほとんど見られない（B）。C；ウエスタンブロット法による皮膚における PLCδ1 タンパク質の発現比較。ヌードマウス皮膚で PLCδ1 の発現が激減している。

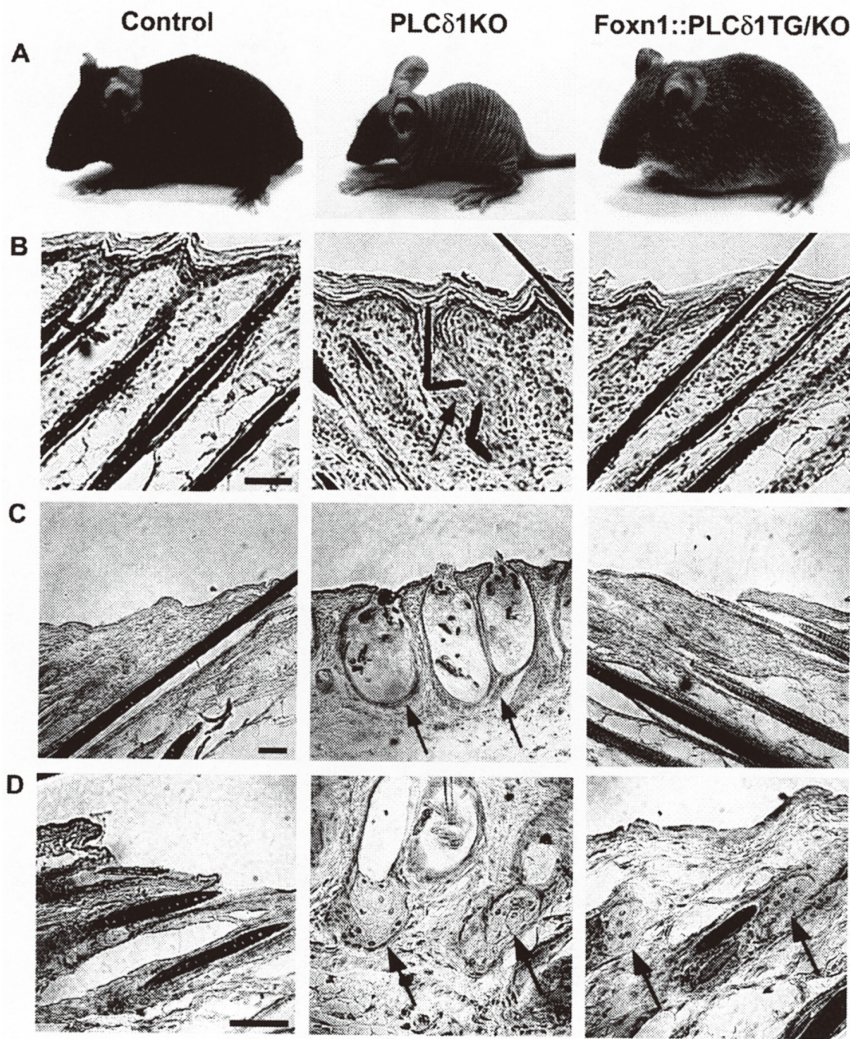


図６． Foxn1::PLCδ1TG/PLCδ1KO マウスでの皮膚構造。Foxn1::PLCδ1TG/PLCδ1KO マウスでは、PLCδ1KO マウスで観察される無毛の回復（A）、毛包形成の回復（B）、Cyst の形成（矢印）の正常化（C）が確認できる。一方、脂腺の拡大は回復しない（D、矢印）。

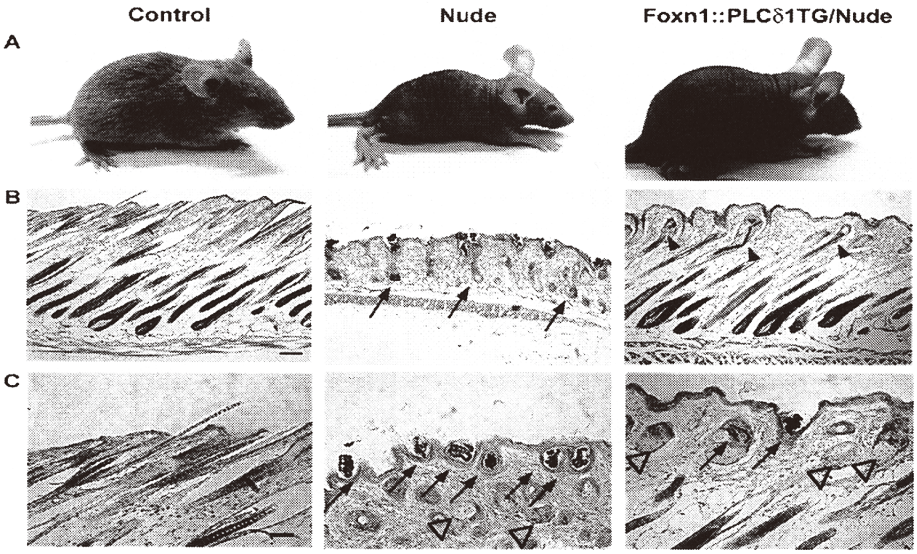


図７． Foxn1::PLCδ1TG/ ヌードマウスでの皮膚構造。Foxn1::PLCδ1TG/ ヌードマウスでは、PLCδ1KO マウスで観察される無毛は回復しない（A）。一方、毛包形成（B）や Cyst の異常形成（C）は部分的であるが回復した。

今後、より詳細にマウスの表現型を解析し、毛包形成のメカニズムを明らかにしていきたい。毛の形成メカニズムは不明な点が多く PLCδ1 が関与するという事実は興味深い。育毛、脱毛など毛の形成に関わる研究は一般社会の関心も高いので今後は応用的な点からも解析する必要があると思われる。

また最近、Foxn1 がメラニン色素の表皮細胞への輸送にも関与していることが明らかになってきている。今後皮膚において PLCδ1 が Foxn1 と同様に美白などに応用できる可能性についても検討していきたい。

謝　辞

以上の研究は、東京薬科大学生命科学部ゲノム情報学研究室の中村由和助教をはじめとして、大学院生の一戸学、平田真之、松浦宏和らとの共同研究によるものです。また電子顕微鏡像の解析は愛媛大学の藤原隆先生との共同研究によるものです。コスメトロジー研究振興財団からは多大な研究資金の御支援をいただきました。心よりお礼申し上げます。

（文　献）

1）Ichinohe M., Nakamura Y., Sai K., Nakahara M., Yamaguchi H., and Fukami K.: Lack of phospholipase C-δ1 induces skin inflammation. Biochem. Biophys. Res. Comm., 356: 912-8, 2007.

2）Nakamura Y., Ichinohe M., Hirata M., Matsuura H., Fujiwara T., Igarashi T., Nakahara M., Yamaguchi H., Yasugi S., Takenawa T. and Fukami K.：Phospholipase C-δ1 is an essential molecule downstream of *Foxn1*, the gene responsible for the nude mutation, in normal hair development. FASEB J. 22, 841-849,2008.

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

東海大学医学部臓器線維症研究ユニット

稲垣　豊

Skin fibrosis is characterized by an excessive deposition of type I collagen and other components of extracellular matrix. Several recent studies have shown that bone marrow (BM)-derived cells migrating into wounded skin produce type I collagen and may contribute to accelerating wound healing. It is unknown, however, whether BM-derived cells also participate in the progression of pathological skin fibrosis. In the present study, we utilized a transgenic mouse strain that harbors a tissue-specific strong enhancer sequence of α2(I) collagen gene (COL1A2) linked to its proximal promoter and an enhanced green fluorescence protein (EGFP) reporter gene (COL/EGFP). Following a subcutaneous bleomycin injection, there were a large number of EGFP-expressing mesenchymal cells observed in the thickened dermis. BM cells obtained from COL/EGFP transgenic mice were transplanted into lethally irradiated syngeneic animals to replace their BM with COL/EGFP-positive cells. In those recipient mice, only a limited number of EGFP-positive BM-derived collagen-producing cells were observed in the fibrotic skin tissue following a bleomycin injection. These results therefore indicate that skin resident cells, but not BM-derived cells, are the major players producing collagen during skin fibrogenesis.

1．緒　言

コラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスの発現は、組織や臓器形態の保持に必須であるのみならず、創傷治癒や組織の修復過程などの生理的条件下において重要な役割を演じている。しかしながら、慢性炎症の結果この産生調節機構が破綻をきたすと、コラーゲンが組織に過剰沈着し、皮膚・肝・肺・腎など諸臓器の線維化を引き起こす。これら臓器線維症のうち、強皮症は皮膚をはじめとする全身諸臓器へのコラーゲンの過剰沈着を特徴とする、原因も未だに不明の難治性疾患である。また、手術後瘢痕や熱傷後の皮膚のケロイド形成もコラーゲンの過剰産生によってもたらされ、美容上また精神面で患者に与える影響は深刻である。したがって、これら皮膚のコラーゲン産生過剰をきたす病態を系統的に研究して、その予防と治療法を確立することは、医学的にまたコスメトロジー上も重要な研究課題と言える。

近年、骨髄から皮膚の創傷部位に動員されて生着した細胞が、I型コラーゲンを産生することで創傷治癒の促進に関与する可能性が報告された[1, 2]。しかしながら、これらの研究における骨髄由来細胞の同定方法やコラーゲン産生の評価方法は報告によりまちまちで、感度および特異性に乏しいため、骨髄由来細胞がどの程度創傷治癒に寄与しているかは充分に解明されていない。また、病的な皮膚線維化進展に骨髄由来細胞がどの程度に関わっているかは全く解明されておらず、そのメカニズムも不明であった。

そこで今回、I型コラーゲンα2鎖遺伝子（COL1A2）の組織特異的エンハンサー・プロモーターとEGFP（緑色蛍光タンパク）を連結した融合遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス（COL/EGFP Tg）を用いて、皮膚線維化過程における骨髄由来細胞の線維化組織への動員とコラーゲン産生能を検討した。

Migration of Bone Marrow-Derived Cells and their Contribution to Collagen Production during Skin Fibrogenesis

Yutaka Inagaki

Research Unit for Tissue Remodeling and Regeneration, Tokai University School of Medicine

2．実　験

線維化組織において増加する細胞外マトリックスの主要成分であるI型コラーゲンのα2鎖をコードするCOL1A2遺伝子の転写開始部位の上流−17.0から−15.5 kb間には、胎児の発生過程を含めてI型コラーゲンの産生細胞においてのみ活性が見られ、強い組織特異性を示すエンハンサー配列が存在する[3]。このエンハンサーを近位部プロモーター、さらにEGFPに連結した融合遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス（COL/EGFP Tg）が、本研究者らにより樹立・継代されている（図1）。

このCOL/EGFP Tgの背部皮下に、ブレオマイシン含有ポリ乳酸マイクロスフェアを単回注射して皮膚の線維化を誘導した。注射21日目に皮膚組織を採取して、COL1A2プロモーターの活性化をEGFP蛍光の共焦点レーザー顕微鏡観察により検出した。次に、COL/EGFP Tgの骨髄細胞5×10^6個を、致死的照射を行った同系マウスの静脈内に投与して、骨髄を置換した。骨髄置換後8週を経過したこれらレシピエントマウスの背部に、同様にブレオマイシン含有ポリ乳酸マイクロスフェアの単回注射を行い、COL1A2プロモーターの活性化をCOL/EGFP Tgの場合と比較することで、骨髄由来細胞のコラーゲン産生への関与の程度を評価した。さらに、コラーゲン産生細

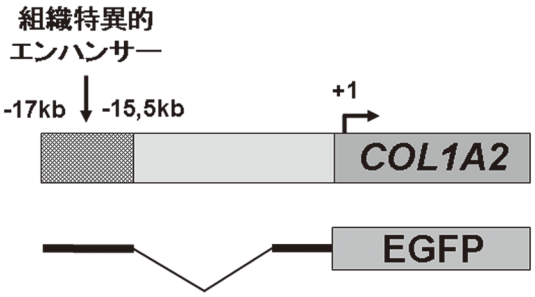


図1　COL1A2エンハンサー・プロモーター／EGFP融合遺伝子
COL1A2遺伝子の転写開始部位の上流-17.0 kbから-15.5 kb間に存在する組織特異的エンハンサーを近位部プロモーター、さらにEGFPに連結した融合遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス(COL/EGFP Tg)を用いることで、共焦点レーザー顕微鏡下にコラーゲン産生細胞を高感度かつ特異的に検出することが可能である。+1：転写開始部位。

胞の筋線維芽細胞への分化の有無を、抗α-smooth muscle actin（αSMA）抗体ならびにAlexa660結合ストレプトアビジンを用いた免疫蛍光染色により検討した。この際に共焦点レーザー顕微鏡観察の妨げとなる線維化組織内の自家蛍光は、EGFPとAlexa660の蛍光波長を特異的に検出するEmission Fingerprinting法[4]を用いて除外した。

3．結　果

3．1　ブレオマイシン投与による皮膚線維化の誘導とCOL1A2プロモーターの活性化

ブレオマイシン含有ポリ乳酸マイクロスフェアを皮下注射したCOL/EGFP Tgでは、投与21日目において局所の真皮に線維性の肥厚が認められた（図２Ａ）。この真皮内にEGFP陽性、すなわちCOL1A2プロモーターが活性化した間葉系細胞が多数認められ（図２Ｂ）、その約半数がαSMA陽性のmyofibroblastsであった。

3．2　COL/EGFPレシピエントマウスにおけるCOL1A2プロモーターの活性化

次に、COL/EGFPレシピエントマウスの背部皮下にブレオマイシン注射を行うと、COL/EGFP Tgの場合と同程度の皮膚線維化が誘導された。この際に、線維性に肥厚した真皮内にごく少数のEGFP陽性細胞、すなわち骨髄由来のコラーゲン産生細胞が検出され間葉系細胞の形態を示していたが、αSMAとの共発現は認められなかった。また、骨髄由来のコラーゲン産生細胞数はCOL/EGFP Tgで認められた皮膚組織に存在する全コラーゲン産生細胞数の１％以下と、きわめて少数であった。

4．考　察

骨髄には、高い自己複製能とともに全血球細胞への多分化能を有する幹細胞が存在する。加えて近年では、血球以外の細胞への分化能も証明され、再生医学の分野で注目されるに至った。実際、移植された骨髄細胞が様々な皮膚の構成細胞に分化することで、欠損した皮膚組織が再生することが実験的に証明されている[5,6]。加えて最近では、骨髄由来細胞が皮膚の創傷部位に生着し、Ｉ型コラーゲンを産生することで創傷治癒の促進にも関与する可能性が報告された[1,2]。しかしながら、これらの研究における骨髄由来細胞の同定はFACS・Y-FISH・骨髄細胞の遺伝的ラベリングなど、研究者により様々な方法が用いられており、コラーゲン産生の評価にも感度および特異性に優れた方法がないのが大きな欠点となっていた。また、病的な皮膚の

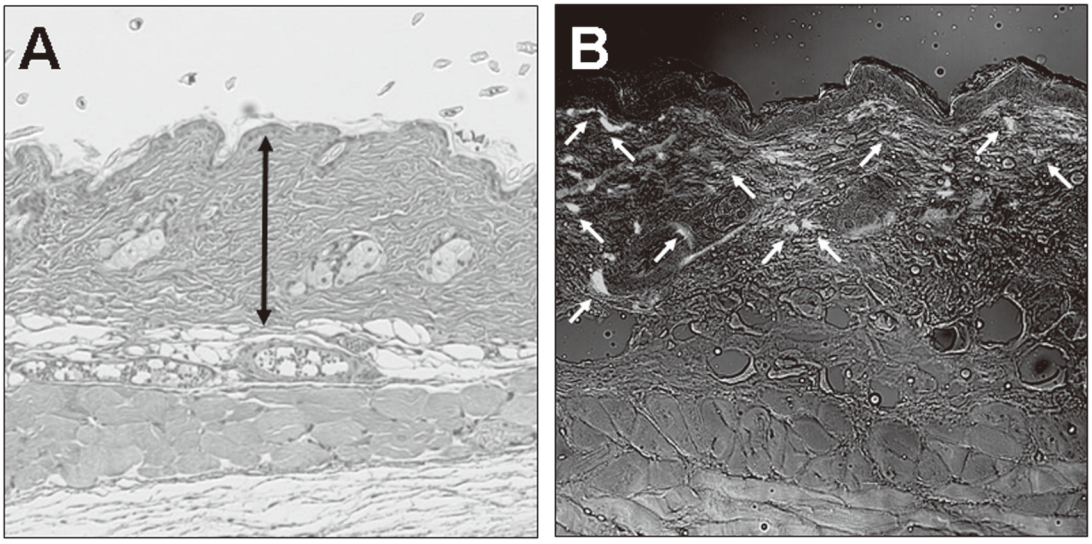


図２：ブレオマイシン皮下投与による皮膚線維症の誘導とＩ型コラーゲンプロモーターの活性化
COL/EGFP Tgの背部にブレオマイシンを含有したポリ乳酸マイクロスフェアを単回皮下注射すると真皮が線維性に肥厚し（Ａ、両矢印）、同部にEGFP陽性、すなわちCOL1A2プロモーターが活性化した間葉系細胞が多数認められた（Ｂ、矢印）。

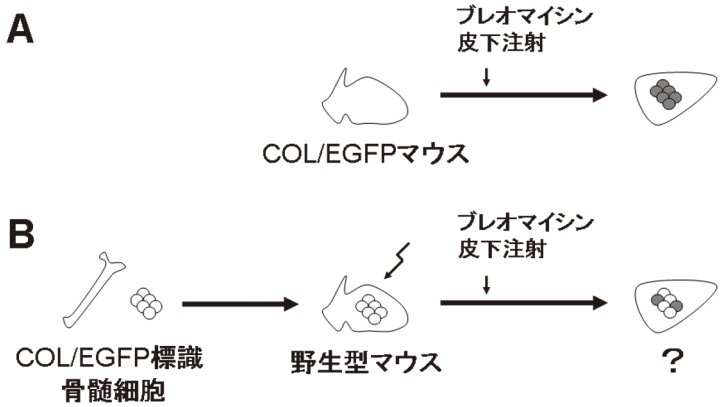


図３　皮膚線維化過程におけるコラーゲン産生細胞の解析
COL/EGFP Tg に実験的皮膚線維症を誘導すると、線維化組織における全てのコラーゲン産生細胞が、その起源とは無関係に、EGFP 発現細胞として検出される（A）。これに対して、COL/EGFP Tg の細胞により骨髄置換されたレシピエントマウスでは、コラーゲンを産生する骨髄由来細胞のみが肝組織内で EGFP を発現する（B）ため、両者を比較することで皮膚組織固有細胞と骨髄由来細胞のコラーゲン産生への関与を比較することが可能になった。

線維化過程に骨髄由来細胞がどの程度に関わっているかは全く不明で、骨髄由来細胞が果たす生理的あるいは病因的役割は充分に解明されていなかった。

今回、I 型コラーゲン遺伝子の組織特異的エンハンサー・プロモーターと EGFP を連結した融合遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス（COL/EGFP Tg）を樹立し、個々の細胞におけるコラーゲン産生を高感度かつ特異的に検出することが可能となった。この COL/EGFP Tg ならびにその骨髄細胞を移植されたレシピエントマウスの背部皮下にブレオマイシン注射による皮膚線維症を誘導して、両者における EGFP 発現細胞を比較したところ、皮膚線維化の進展には皮膚組織固有の（myo）fibroblasts が重要な役割を果たし、骨髄由来細胞の関与はあってもきわめて限定的であることが初めて明らかにされた（図３）。

皮膚は全身諸臓器の中でも、コラーゲン含量が最も多い組織のひとつである。その適切な発現制御は皮膚の生理機能の維持や創傷治癒過程において重要であるが、過剰な発現はケロイド形成や皮膚の線維化・硬化を引き起こす。コラーゲン発現の調節機序を解明する上で、骨髄由来細胞の創傷治癒や線維化進展への関与を詳細に研究することは、生理的・病的条件下における皮膚の病態を明らかにし、創傷治癒の促進や皮膚線維症の新たな治療戦略の構築に直接的に結びつくものである。健康な皮膚を維持する上でも多くの情報を与え、コスメトロジーの進歩にも寄与するところが大きいと考えられる。

５．総　括

I 型コラーゲン α2 鎖遺伝子上の組織特異的エンハンサー・プロモーターと EGFP とを連結した融合遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスを樹立した。このトランスジェニックマウス、もしくはその骨髄細胞を移植したレシピエントマウスを用いることで、皮膚組織固有あるいは骨髄由来コラーゲン産生細胞を特異的に検出することが可能となり、皮膚線維化の進展や骨髄由来細胞によるコラーゲン産生の機序を解明する上で有用な手段になりうると考えられた。

（引用文献）

１）Direkze NC, Forbes SJ, Brittan M, et al: Multiple organ engraftment by bone marrow-derived myofibroblasts and fibroblasts in bone marrow transplanted mice. Stem Cells 21: 514-520, 2003
２）Ishii G, Sangai T, Sugiyama K, et al: In vivo characterization of bone marrow-derived fibroblasts recruited into fibrous lesions. Stem Cells 23: 699-706, 2005
３）Bou-Gharios G, Garrett LA, Rossert J, et al: A potent far-upstream enhancer in the mouse proα2(I) collagen gene regulates expression of reporter genes in transgenic mice. J Cell Biol 134: 1333-1344, 1996
４）Higashiyama R, Inagaki Y, Hong YY, et al: Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice. Hepatology 45: 213-222, 2007
５）Kataoka K, Medina RJ, Kageyama T, et al: Participation of adult mouse bone marrow cells in reconstitution of skin. Am J Pathol 163: 1227-1231, 2003
６）Badiavas EV, Abedi M, Butmarc J, et al: Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing. J Cell Physiol 196: 245-250, 2003

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

京都大学医学研究科皮膚科学
椛島　健治

Allergic contact dermatitis, one of the most common occupational and environmental diseases, is caused by foreign antigen exposed to the skin. The contactant diverges into wide range of materials, such as meta1, chemica1, and resin. Photo contact dermatitis is caused by ultraviolet exposure in addition to exogenous materials, such as NSAIDs.

For evaluating the safety of each materia1, it has been requested to use in vitro systems instead of using animal models these days. Since contact dermatitis and photo contact dermatitis are based on the chain reaction of immune cells, it is not satisfactory to assess these issues only using single cell line. Therefore, we sought use several cell lines in combination and estimate the safety and effect on each immunological step in contact and photo-contact dermatitis.

1. 緒　言

接触皮膚炎(いわゆるかぶれ)は皮膚に外因性抗原物質が塗布されて起こる職業性・環境性疾患全体の中でも最も頻度の多い疾患であり、化粧品を原因とすることもまれではない。接触皮膚炎は一次刺激性あるいは単に刺激性と呼ばれる接触皮膚炎と、アレルギー性接触皮膚炎とに分けられる。一方、アレルギー性接触皮膚炎は免疫学的機序を介する反応であり、感作・惹起の複雑な各ステップの解明は免疫学の大きなテーマである[1,2]。

光接触皮膚炎は外因性物質塗布に紫外線(UVとくにUVA)照射が加わって生じる反応で、光毒性と光アレルギー性がある。現在頻度が高いものは、非ステロイド系消炎外用薬、サンスクリーン製剤などであり、ほとんどが光アレルギー性である。化粧品などを原因とする光接触皮膚炎もまれではなく、化粧品に含まれる物質の光アレルギー誘導能の評価は重要な課題であると思われる。

ところがこれらのスクリーニング方法としては、皮膚炎反応がそもそも生体反応であるため、ある物質が毒性、アレルギー性があるかを評価するのは歴史的には動物モデルが用いられることが多かった。しかし近年、動物を用いないin vitro実験を用いた代替法による評価が望まれている。これまで毒性・光毒性のin vitro評価は、細胞毒性評価など多くの方法があり、ある程度満足を与えるものとなっている。それに比較し、アレルギー性・光アレルギー性の反応は、免疫担当細胞の連鎖反応を基礎としているために、in vitroの評価を困難なものとしている。また、光アレルギーにはプロハプテン（prohapten）と光ハプテン（photohapten）の２種類のメカニズムが存在する（図１）[2]。各物質の光アレルギーにおける両者の関与を検討することも重要な課題である。

一方、免疫学の進歩に伴い、接触過敏症あるいは光接触過敏症のメカニズムが明らかになり、その各ステップをin vitroで検証することが可能となりつつある。そこで、アレルギー反応という多くの細胞・液性因子の関わる反応においては、in vitro試験で評価しうるステップをいくつか駆使し、統括的に行うことが理想的と考えられ、その実現を図ることが当研究の目的である。

2. 実　験

接触過敏症のメカニズムは、外因性物質に対する抗原異的なＴ細胞を生み出す相（感作相）と、再び侵入した当該外因性物質にＴ細胞が反応し皮膚炎を形成する相(惹起相)とに分かれる。特に感作相は、外因性物質が過敏症を起こしうるかを決定する最も重要な段階であると考えられる。

そこで 化学物質の抗原提示細胞に対する成熟化誘導をヒト単球細胞株である THP-1 細胞を用いて検討する。THP-1 細胞はヒト単球性白血病由来の細胞株であり、単球としての性格を有する。そこで被検物質とのインキュベーションの後、フローサイトメーターによりCD54, CD86 などの発現を測定することにより評価する。この際、prohaptenの検討の際にはUVA（1 J/㎠）を披険物質に直接照射し、その後THP-1と混合する。一方、photohaptenの検討の際には被検物質をTHP-1と混合培養した後にUVAを照 射する(図2)。

3. 結　果

光接触皮膚炎を誘発させる代表的な物質であるketoprefen[3,4], 3, 3, 4, 5-tetrachlorosalicylanilide（TCSA）[5,6], sparfloxacin[7,8]を各濃度で混合培養し、細胞表面上のCD54, CD86, HLA-DRの発現をflowcytometryにて解析した。すると

The development of screening method for evaluating safety on materials used for cosmetics

Kenji Kabashima
Kyoto University Graduate School of Medicine, Department of Dermatology

図3から図5のようにketoprofenではphotohapten刺激によるCD54の上昇（図3）、TCSAではphotohapten刺激によるCD86, HLA-DRの上昇（図4）、sparfloxacinではphotohapten刺激によるHLA-DRの上昇（図5）が認められた。

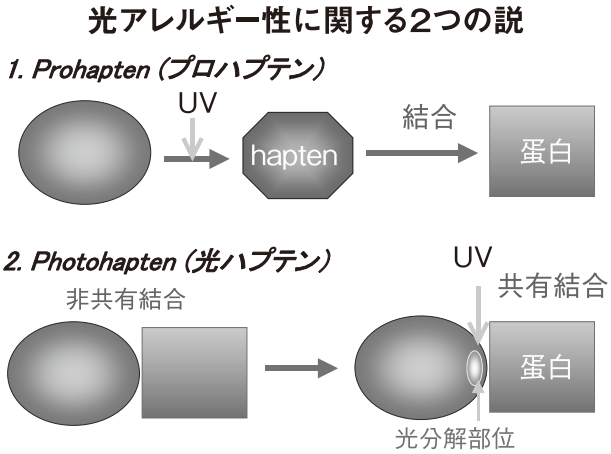


図1　prohaptetn と photohapten の違い

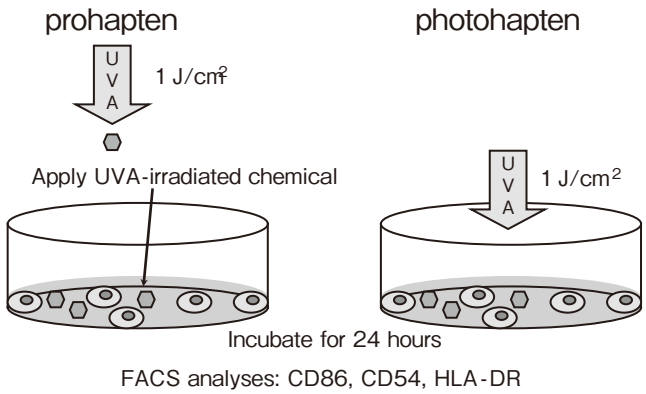


図2　THP-1 と UVA 照射による prohaptetn と photohapten 誘導方法

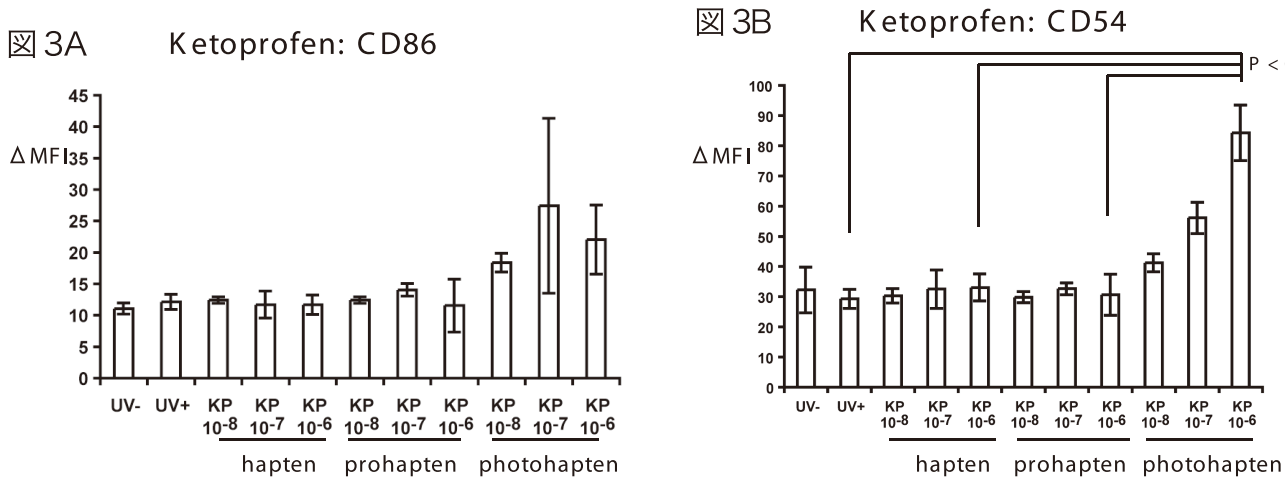


図4　Ketoprofen による prohaptetn と photohapten 誘導に対する CD86、CD54 発現

図4A

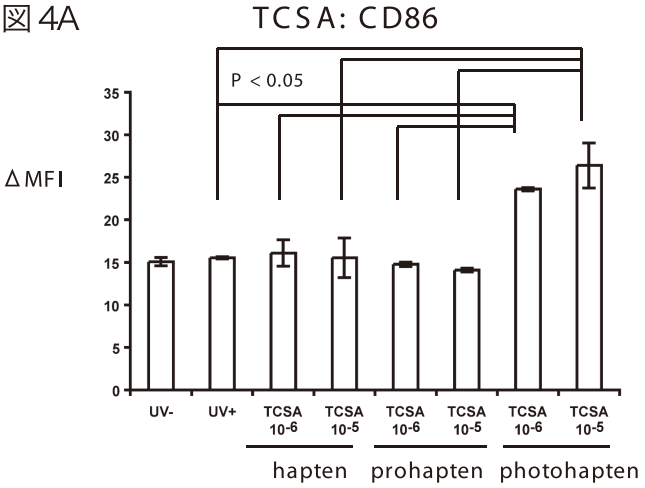


図5A

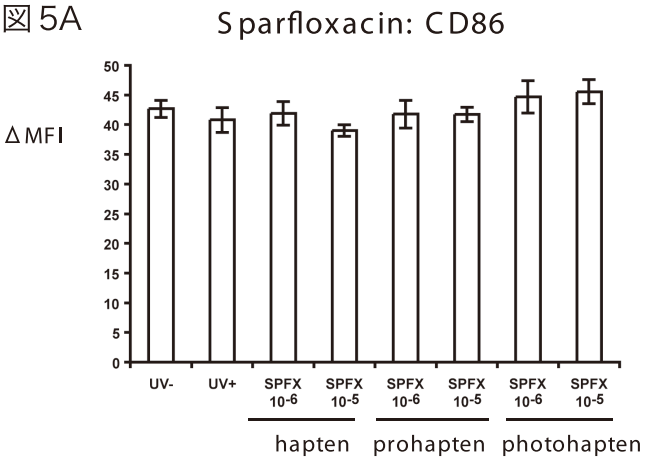


図4B

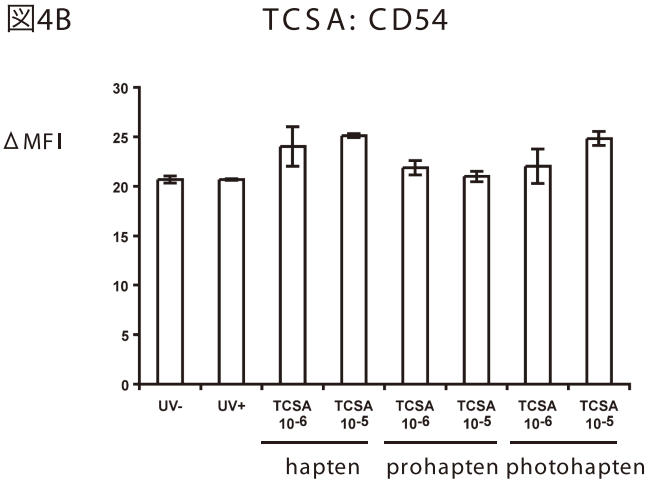


図5B

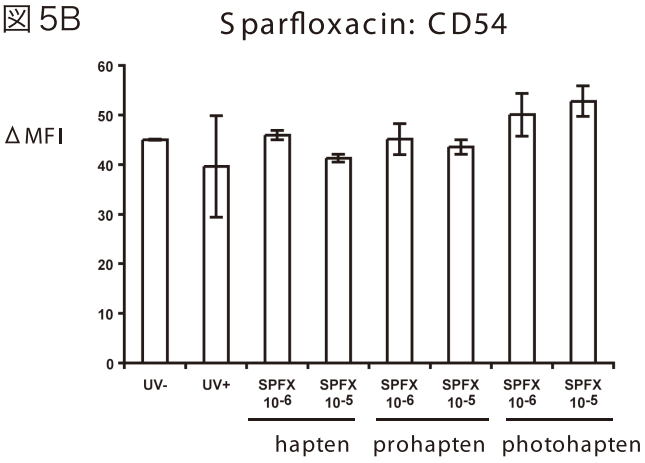


図4C

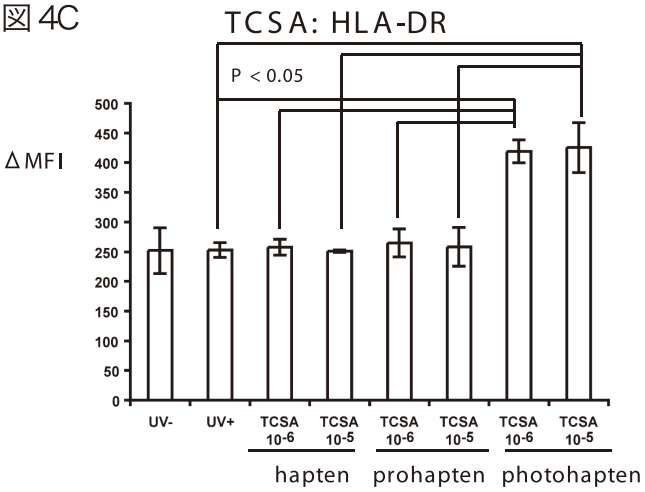


図5C

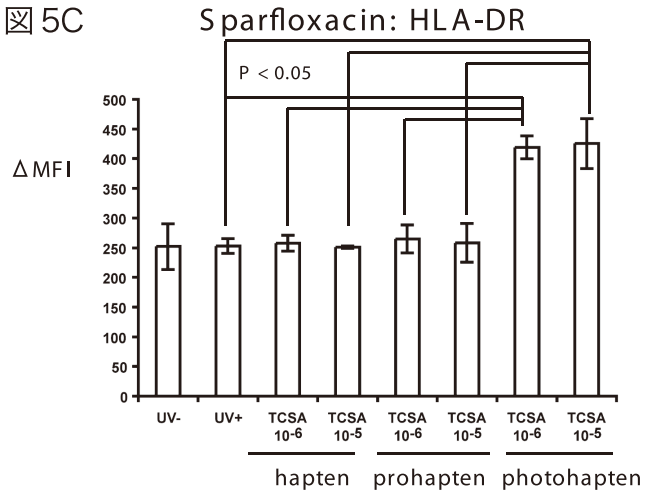


図4　TCSA による prohapten と photohapten 誘導に対する CD86, CD54, HLA-DR 発現

図5　Sparfloxacin による prohapten と photohapten 誘導に対する CD86, CD54, HLA-DR 発現

4. 考　察

光アレルギーがあることの知られているketoprofen, TCSA, sparfloxacinによる光アレルギー誘導能をprohapten, photohapten刺激により検証した。すると3剤全てにおいてTHP-lのco-stimulatory moleculeであるCD86、接着因子であるCD54、あるいはHLA-DRの上昇が認められた。ところが、これらの上昇を示すパターンは各物質によって異なることが判明した。ここには記さなかったが、photohapten刺激によるこれらの因子の誘導は他のphotoallergyを起こさない物質では認められなかった。以上より、THP-lを川いたin vitroの検査により、物質の光アレルギー誘導能を評価できる可能性が示唆された。

今後はさらに被検物質を増やし、光アレルギー誘導能の定量 化を図ること、各光接触アレルギーの臨床型とCD86, CD54, HLA-DRの発現パターンにおける相関の有無の検討を行いたいと考えている。

（文　献）

1）Lankerani L, Baron ED. 2004. Photosensitivity to exogenous agents. *J Cutan Med Surg* 8: 424-31

2）Tokura Y. 2000. Immune responses to photohaptens: implications for the mechanisms of photosensitivity to exogenous agents. *J Dermatol Sci* 23 Suppi 1: S6-9

3）Atarashi K. Kabashima K, Akiyama K, Tokura Y. 2007. Stimulation of Langerhans cells with ketoprofen plus UVA in murine photocontact dermatitis to ketoprofen. *J Dermatol Sci* 47: 151-9

4）Imai S, Atarashi K, Ikesue K, Akiyama K. Tokura Y. 2006. Establishment of murine model of allergic photocontact dermatitis to ketoprofen and characterization of pathogenic T cells. *J Dermatol Sci* 41: 127-36

5）Nishijima T. Tokura Y, Imokawa G, Takigawa M. 1999. Photohapten TCSA painting plus UVA irradiation of murine skin augments the expression of MHC class II molecules and CD86 on Langerhans cells. *J Dermatol Sci* 19: 202-7

6）Tokura Y, Yagi H, Ihda H, Takigawa M. 1994. Evaluation of ultraviolet-A protection by sunscreen agents using a mouse model of contact photoallergy. *J Dermatol Sci* 7: 39-44

7）Neumann NJ, Blotz A, Wasinska-Kempka G, Rosenbruch M, Lehmann P, Ahr HJ, Vohr HW. 2005. Evaluation of phototoxic and photoallergic potentials of 13 compounds by different in vitro and in vivo methods. *J Photochem Pholohiol B* 79: 25-34

8）Tokura Y, Seo N, Ohshima A, Yagi H. Furukawa F, Takigawa M. 1999. Lymphocyte stimulation test with drug-photomodified cells in patients with quinolone photosensitivity. *J Dermatol Sci* 21: 34-41

再構築培養表皮モデルを用いた遺伝毒性の評価

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　薬理部新規試験法評価室

小島　肇夫、新井　晶子、北條　麻紀

【Objective】 To evaluate a risk assessment of genotoxicity when human skin is affected by chemicals, we tried to perform a Comet assay using a 3-dimensional human epidermal model (LabCyte EPI-MODEL, Japan).

【Materials & Methods】 Mitomycin C, methylmethanesulfonate (MMS) and 4-NQO (4-Nitroquinoline 1-Oxide) were utilized as test chemicals. Each test chemical solution was applied directly to the surface of the models and treated for 4 hours, then washed off and incubated for 20 hours after the treatment and maximal dosage was calculated according to the cytotoxicity. As to the Comet assay, each test chemical solution refer to the cytotoxicity was applied to them and treated for 4hr. Cells were detached by Liberase solution (Roche) or Trypsin solution (GIBCO), and an adequate cell suspension was obtained.

【Results】 More single cells could be efficiently retrieved using Trypsin solution, especially with treatment for 25min, than using Liberase solution. Comet signals mediated by Mitomycin C (150μM<) and 4-NQO were shown by our protocol. However, those by MMS were not clear response.

【Discussion】 We established a practical, rapid and easy Comet assay protocol using a 3-dimensional human epidermal model. To define the difference in genotoxical action between the epidermal model and *in vivo*, it is necessary to perform additional researches for minimal dosage of unknown chemicals that show genotoxicity to the human epidermis.

1．緒　言

安全性試験の中でも大きな比重を占める遺伝毒性試験には、遺伝子突然変異を評価する微生物を用いるエイムス試験や哺乳類の培養細胞を用いるマウスリンフォーマアッセイがある。また、染色体突然変異の評価には、分裂中期の染色体構造を観察する哺乳類の培養細胞や実験動物を用いる染色体異常試験や小核試験がある。これらの試験の中から、医薬品の安全性評価には、微生物を用いる復帰突然変異試験、哺乳類の培養細胞を用いる染色体異常試験やマウスリンフォーマ試験ならびにげっ歯類を用いる小核試験の三試験が必須と定められている[1)]。

一方、医薬部外品の有効成分又は添加剤については、遺伝子突然変異および染色体異常の有無の確認を目的とした微生物および哺乳類の培養細胞を用いる *in vitro* 試験が求められる。ただし、これらの試験で遺伝毒性が疑われた場合には、各々の目的に応じ動物の個体を用いる *in vivo* 試験の提出が求められるとされている[2, 3)]。しかし、*in vitro* 試験の中で特に、哺乳類の培養細胞を用いるマウスリンフォーマ試験および染色体異常試験は発がん性試験と比較して疑陽性が検出されやすい[4)]。今後、 EU における化粧品規制第７次改正により[5)]、動物実験代替法が開発された試験法は 2009 年以降、化粧品原料の開発に実験動物を持いた小核試験が利用できなくなる。その場合、多数検出される *in vitro* 試験の結果を受け入れ、新成分の開発を断念するならともかく、その検証を行うには、より実験動物に近いモデルを用いてリスクを評価する必要がある。

そこで、より実験動物に近いモデルとして化粧品の安全性を考慮した場合、成分が皮膚に直接暴露した際の遺伝毒性の検出を、３次元培養表皮モデルを用いて調べられれば、リスクを評価できると考えた。評価系としては、作用機構が明確なコメットアッセイを用いることとした。コメットアッセイとは、培養細胞や動物組織をシングルセルに分散し、アガロースゲルに包埋してアルカリ電気泳動にかけることにより、個々の細胞が受けた DNA 初期傷害を検出する手法である。図１に示すように、障害を受けた DNA の電気泳動像によりすい星が流れるように見えることから、コメットアッセイと名づけられた。この試験法では、非分裂細胞に対する遺伝毒性が評価できることや、感受性の異なる細胞が混在する細胞集団でも細胞レベルで評価可能なこと、また、近年では、Honma ら[6)] により培養細胞を用いた簡便な *in vitro* コメットアッセイが考案されるなど、

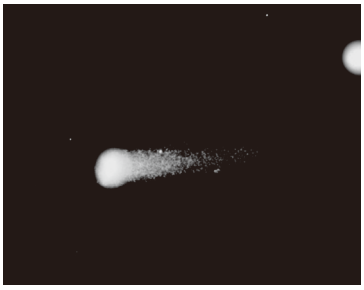


図１　細胞に生じたコメット

Evaluation of genotoxicity using 3-dimensional human epidermal model

Hajime Kojima, Ph.D.

Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM), National Center for Biological Safety and Research National Institute of Health Sciences (NIHS)

有用な遺伝毒性試験として注目を集めている。

本研究では、3次元培養ヒト表皮モデルを用いたコメットアッセイの試験法開発を目的として、実験を行った。

2．材料および方法

2・1　材料

2・1・1　3次元培養表皮モデル

ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング（J-TEC）株式会社が製造販売している3次元培養ヒト表皮モデルLabCyte　EPI-MODEL12または24を実験に用いた。図2に示すように、本モデルは表皮構造を呈しており、培養液と合わせキットとなっている。

本キット到着日あるいはその翌日から実験を開始した。

2・1・2　被験物質

マイトマイシンC（和光純薬株式会社）、メチルメタンスルフォネート（MMS: 和光純薬株式会社）および4ニトロキノリンNオキシド（4-NQO：和光純薬株式会社）を溶媒に溶解してモデルに供した。

MMCおよびMMSの溶媒としては蒸留水、4-NQOの溶媒としてはエタノール溶液を用いた。

2・2　試験法

2・2・1　コメットアッセイ基本操作

6ウェルプレート（Falcon）の各ウェルの中に、キットに付いている培養液を加え、LabCyte　EPI-MODEL12を置いた後、37℃のCO_2インキュベーター中で1時間培養した。培養後、すぐに酵素処理してセルストレイナー（Falcon）を通して単一細胞を得た。1×10^6細胞/mLにPBSで調整した細胞懸濁液10μLを寒天0.5％液80μLとともに、スライドグラス（マツナミ）にのせ、Lysis緩衝液中で1時間処理後に電気泳動を行った。電気泳動条件は、pH13の泳動液（4℃）で15分放置した後、300mA/90Vで15分間とした。得られた細胞を70％エタノール溶液で洗浄し、乾燥後、SYBR gold（1：10000）で染色し、スライド当り100個観察した。コメットシグナルの検出には、『COMET ASSAY Ⅳ（PERCEPTIVE, UK)』という解析ソフトを使用し、% Tail Intensity（コメット部分の蛍光強度／1細胞あたりのDNA蛍光強度）を求めた。つまり、% Tail Intensityの値が高いほど遺伝毒性が強いことになる。

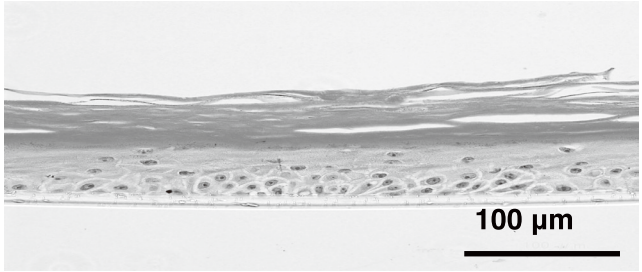


図2　Labcyte　EPI-MODEL24のHE染色

2・2・2　条件検討

2・2・2・1　細胞解離条件の検討

培養皮膚モデルにリベラーゼ（Roche）で30分間処理すればコメットを検出できるとの報告がある[7]。

一方、培養皮膚モデルからの小核誘発の検出にはトリプシンが使われている[8]。どちらの条件がラボサイトに適しているのか、リベラーゼ（0.28 Wunch Unit/HBSS）およびトリプシン（0.25%/0.02%EDTAリン酸緩衝液：PBS）溶液で30～50分処理後の①得られる細胞数,②解離溶液が細胞に及ぼす遺伝毒性の有無を調べた。

次に、それぞれの解離条件から得られた細胞を用いてコメットアッセイを行い、解離溶液がモデルに及ぼすコメット出現頻度を調べた。

2・2・2・2　溶媒濃度の検討

非水溶性物質の溶媒として用いるエタノールの細胞毒性およびコメットアッセイに及ぼす影響を検討した。細胞毒性試験の条件を2・3・3に示す。エタノール溶液の濃度3、6、12.5および25%で4時間処理した場合の条件を検討した。

2・2・3　被験物質を用いた細胞毒性の検出

LabCyte　EPI-MODEL24を37℃のCO_2インキュベーター中で1時間培養した後、溶媒および被験物質溶液100μLを加え、4時間処理後さらに20時間培養した。

マイトマイシンCにおいては、限界溶解度である1500μMを最高濃度として、10倍希釈系列を調整して細胞毒性を検出した。MMSにおいては、1800μMを最高濃度として、10倍希釈系列を調整した。4-NQOにおいては、100％エタノールに溶解した10mM溶液をエタノールの最終濃度が2％になるように加え（最高処理濃度200μM)、10倍希釈系列を調整した。

PBSでLabCyte　EPI-MODEL24を4回洗浄し、MTT（sigma）0.5mg/mLを含む培養液で3時間処理した後、モデルをイソプロパノールで抽出した。溶媒および被験物質の抽出液0.2mLを96ウェルに移し、OD570およびOD650における吸光度を測定し、以下の式から細胞生存率を求めた。

$$OD = [570nm\ OD_{被験物質} - 570nm\ OD_{ブランク}] - [650nm\ OD_{被験物質} - 650nm\ OD_{ブランク}]$$

$$細胞生存率（\%）= \frac{OD_{被験物質}}{OD_{溶媒}} \times 100$$

2・2・4　被験物質を用いたコメットの検出

図3に試験法の概略を示す。LabCyte EPI-MODEL12に溶媒および被験物質溶液200μLウェルを加え、4時間処理した後、PBSで3回洗浄した。細胞毒性で得られた

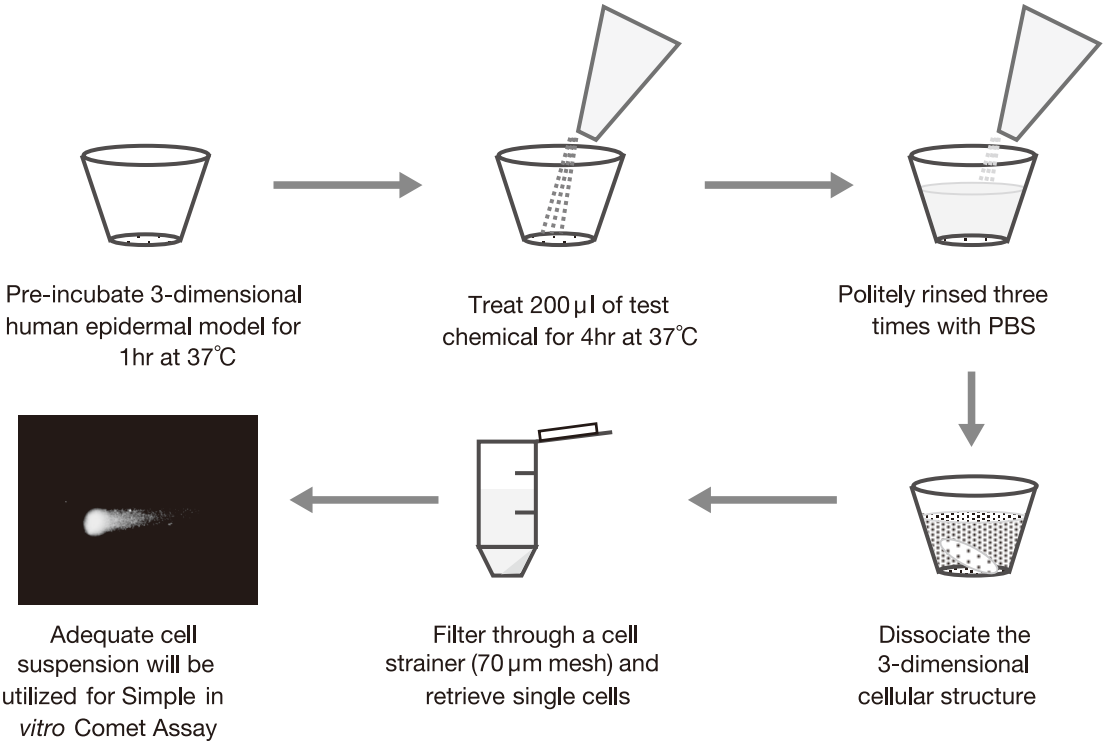


図３　試験方法概略

結果から最高適用濃度を決定し、それぞれ 10 倍希釈系列を調整してコメットアッセイを実施した。

３．結　果

３・１　解離条件の検討

それぞれの解離条件でラボサイトを処理し、１ウェルから回収することのできた細胞数をカウントした。その結果、図４に示すように、トリプシン処理によりリベラーゼよりも 20 倍以上多くの単一細胞を得ることができた。また、トリプシンの処理時間を 35 分、50 分と延長しても得られる細胞数に差はなかった。また、リベラーゼ , トリプシン共に細胞毒性を誘導することはなかった。しかし、図５に示すように、トリプシンの処理時間を 50 分に延長するとコメットシグナルが検出されるようになった。

以上の結果から、ラボサイトの細胞解離には、トリプシンの短時間（25 分）処理が適していることが明らかとなった。

３・２　溶媒濃度の検討

エタノールの細胞毒性は 25％まで検出されなかった（データは示していない）。しかし、図６に示すように、12.5％以上の濃度で中央値に変化はないものの、コメットを引き起こす細胞を認めた。以上の結果から、溶媒の最適濃度は６％以下、可能な限り薄くすることを目指し、２％と設定した。

ちなみに、箱ひげ図は、最小値、第１四分位点、中央値、第３四分位点と最大値を示している。母集団は実際には様々なタイプの確率分布に従うわけだが、箱ひげ図はそのような仮定に関係なく、データの分布を表現している。箱の各部分の間隔から分散や歪度の程度、また外れ値を示している。

３・３　被験物質を用いた細胞毒性の検出

図７～９に３物質の細胞生存率の結果を示した。

図７に示すように、マイトマイシン C の限界溶解度は 1500μM であり、４時間暴露後、20 時間培養しても細胞毒性は全く検出されなかった。よって、コメットアッセイでは 1500μM を最高濃度として、10 倍希釈系列を調整して検出することにした。

MMS は 180μM 以上の濃度において、図８に示すように強い細胞毒性を認めた。よって、18μM を最高濃度として、10 倍希釈系列を調整してコメットアッセイを行うことにした。

４-NQO は最高濃度 200μM のみにおいて、図９に示すように細胞毒性を認めた。よって、20μM を最高濃度として、10 倍希釈系列を調整してコメットアッセイを行うことにした。

３・４　被験物質を用いたコメットの検出試験

コメットアッセイを実施する被験物質の最高処理濃度は、４時間処理後、さらに 20 時間培養した場合、細胞が 50％以上生存している濃度でなければいけないと設定した。その最高濃度から公比 10 で希釈して得られた３被験物質に

おけるコメットアッセイの結果を求めた。その結果、図10に示すようにマイトマイシンCでは150μM以上の濃度で濃度依存的なコメット出現頻度の増加が明らかとなった。一方、図11に示すように、MMSのコメット出現頻度の増加は検出されなかった。また、図12に示すように、4-NQOのコメット出現頻度は20μMでわずかに増加した。

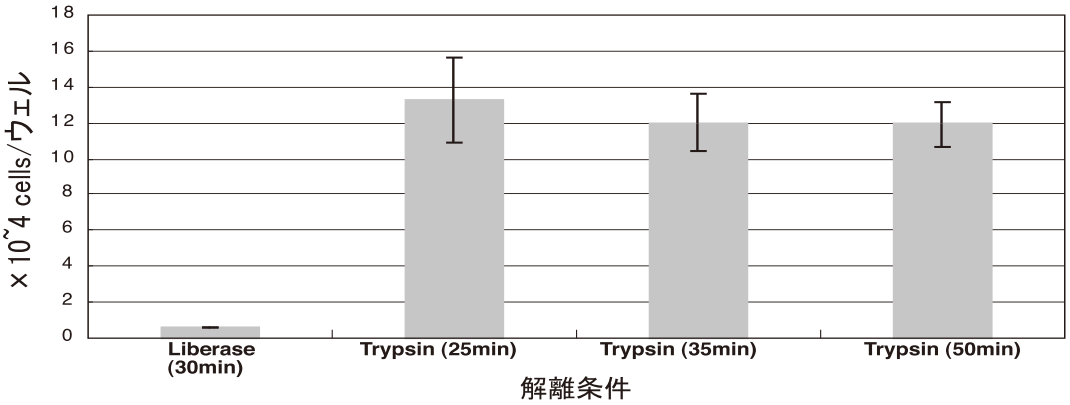


図４　解離条件の検討　酵素処理による単一細胞出現頻度

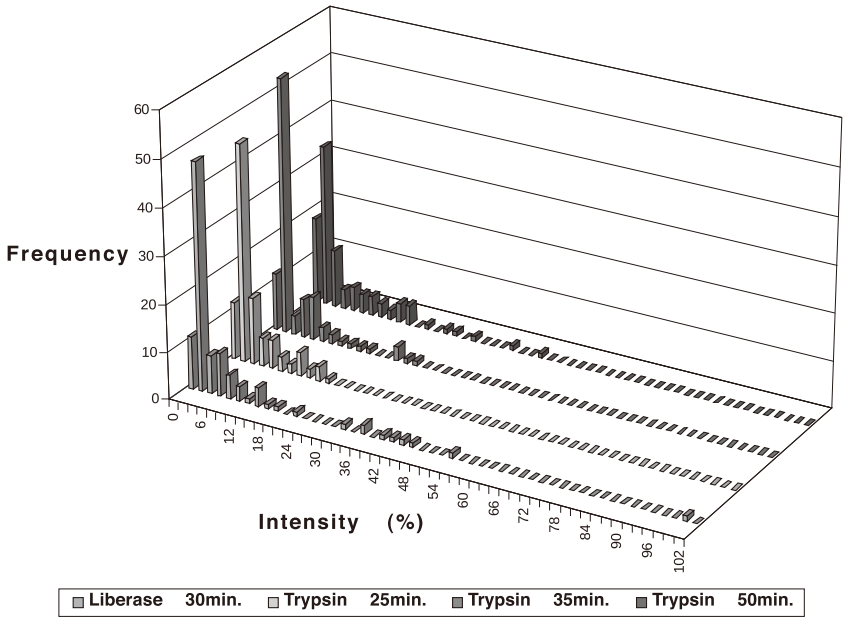


図５　解離条件の検討　酵素処理によるコメット出現頻度

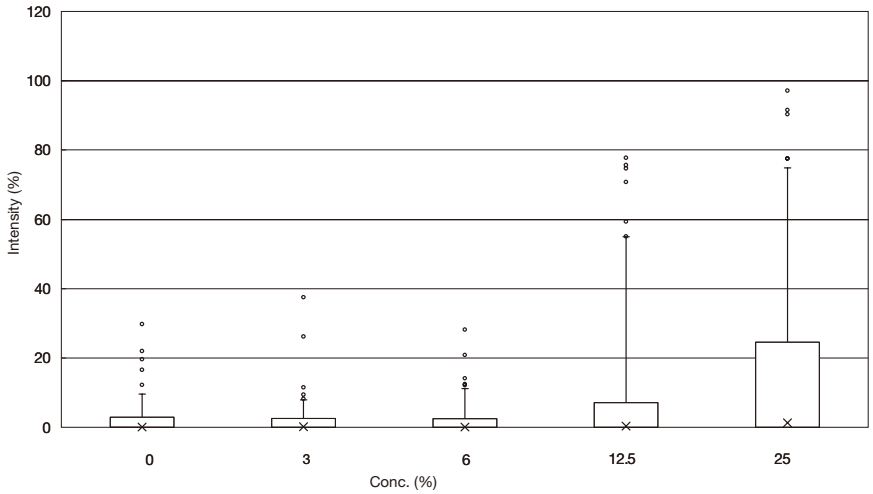


図６　エタノールのコメット出現頻度

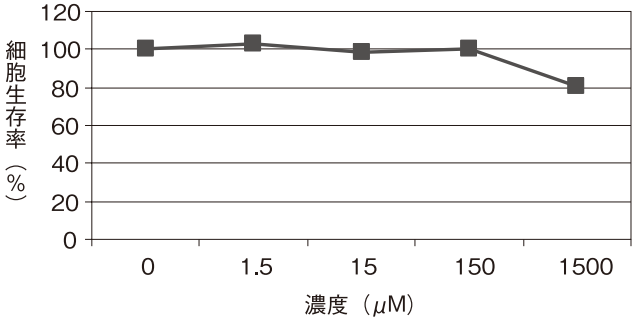


図7　マイトマイシン C の細胞毒性試験結果

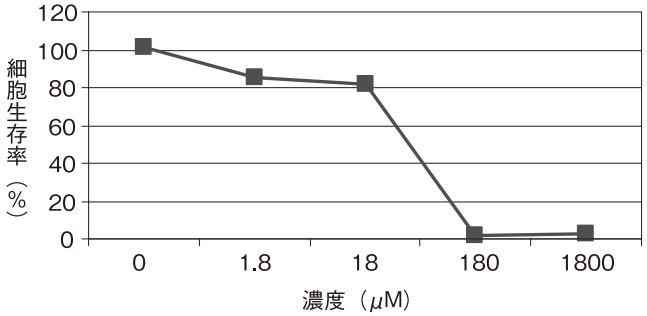


図8　MMS の細胞毒性試験結果

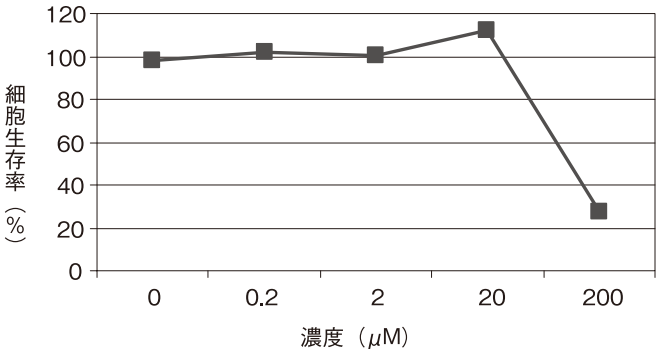


図9　4-NQO の細胞毒性試験結果

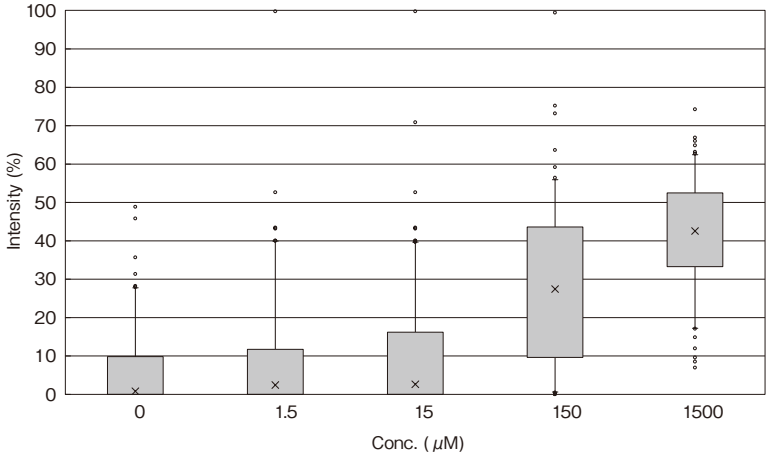


図 10　マイトマイシンCによるコメット出現頻度

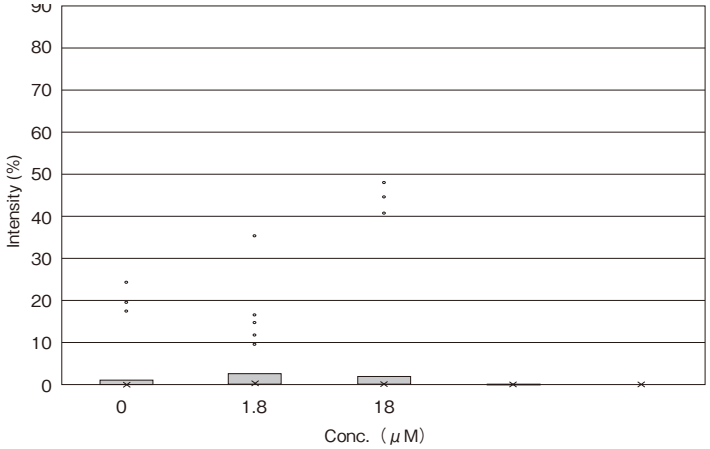


図 11　MMS によるコメット出現頻度

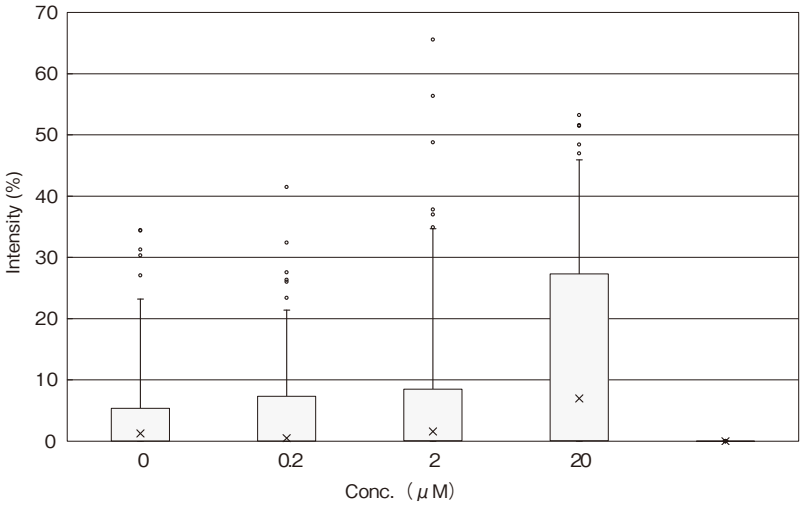


図 12　4-NQO によるコメット出現頻度

4．考　察

酵素処理条件、最適な溶媒濃度を決定でき、3 次元培養表皮モデルを用いたコメットアッセイの試験法開発という目的を達成できた。マイトマイシン C は DNA のクロスリンカーとして遺伝毒性を起こし、MMS や 4-NQO は DNA をアルキル化して遺伝毒性を引き起こす著名な遺伝毒性物質である。しかし、得られた結果からマイトマイシン C および 4-NQO はコメット出現頻度を増加させるが、MMS はその強い細胞毒性からコメットを明確に引き起こさないと判断した。

以上の結果から、遺伝毒性物質の検出感度における課題も明らかになった。今後は、マイトマイシン C、MMS、4-NQO 以外の遺伝毒性物質についても、同様の検討を行うとともに、小核の検出を行う予定である。得られたデータベースからを他の *in vitro* および *in vivo* データと比較して、遺伝毒性に対する感受性にどの程度違いがあるのかを明らかにする予定である。

なお、これらの成果の一部は日本環境変異原学会第 36 回年次大会（2007 年 11 月、北九州）にて発表した[9)]。

（参考文献）

1）医薬品非臨床試験研究会監修（2002）医薬品非臨床試験ガイドライン解説、薬事日報社

2）化粧品・医薬部外品製造販売ガイドブック 2008、薬事日報社

3）厚生労働省医薬食品局審査管理課（2006）医薬部外品の製造販売承認申請及び化粧品基準改正要請に添付する資料に関する質疑応答集（Q＆A）について

4）Kirkland D, Pfuhler S, Tweats D, Aardema M, Corvi R, Darroudi F, Elhajouji A, Glatt H, Hastwell P, Hayashi M, Kasper P, Kirchner S, Lynch A, Marzin D, Maurici D, Meunier JR, Müller L, Nohynek G, Parry J, Parry E, Thybaud V, Tice R, van Benthem J, Vanparys P, White P.(2007) How to reduce false positive results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ECVAM Workshop. Mutat Res. 628（1）: 31-55

5）Commission Staff Working Documents（2004）; Time Tables for the phasing-out of animal testing in the framework of the 7th Amendment to the Cosmetics Directive（Council Directive 76/768/EEC）; EN, SEC（2004）1210

6）Honma M.（2007）A Multi-endpoints in vitro Genotoxicity Test SAYstem Consisting of Comet, Micronuclei and Gene Mutation Test, 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, abstract pp.88.

7）Flamand N, Marrot L, Belaidi JP, Bourouf L, Dourille E, Feltes M, Meunier JR.（2006）Development of genotoxicity test procedures with Episkin, a reconstructed human skin model: towards new tools for in vitro risk assessment of dermally applied compounds? Mutat Res. 606（1-2）: 39-51.

8）Curren RD, Mun GC, Gibson DP, Aardema MJ.（2006）Development of a method for assessing micronucleus induction in a 3D human skin model（EpiDerm）. Mutat Res. 607（2）: 192-204.

9）Arai S, Saitoh M, Tajashima Y, Honma M, Kojima H（2007）A new trial for in vitro Comet assay using 3-dimensional human epidermal model, 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society, Abstracts, p111.

老人性色素斑ダーモスコ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

東京女子医科大学東医療センター皮膚科

田 中　勝

A computer assisted area of involvement measurement of skin pigmentations would be useful for the assessment of senile lentigo. It is, however, sometimes difficult when lesions cannot simply be separated using the photographs taken under normal condition. Because of the skin curvature and the glare due to sebum, brightness of the pictures would not be equal.

We used a novel cross-polarized flash system, which enables to take a wide range of dermoscopy picture. An image from a patient with senile lentigo was taken by a single-lens reflex digital camera equipped with the flash system. The area of the lesions were semi-automatically extracted and sum of the darkness score "z" compared with normal skin, was calculated and defined as QPI (quantified pigment index) after color correction using Casmatch system and size correction. The darkness of the senile lentigo was also assessed by two dermatologists. The QOL index was evaluated by patients before and after treatment or makeup. Skindex 16 and Dermatological Life Quality Index, Japanese version, were used for the assessment of the QOL of the patients.

Images were collected from 40 patients for at least 3 months every 4 weeks. Total of 160 images were assessed. Some difficulty of image analysis were pointed out, including a variation of image brightness which could not be corrected even with the Casmatch system, different camera settings, lighting condition affected by natural light or room light. There were some patients who experienced a worsening of skin lesion due to seasonal and accidental ultraviolet irradiations.

The method of image analysis of pigmentation might be of use if the photographing conditions were appropriately standardized and assessed carefully comparing with subjective evaluation by dermatologists and with QOL index by patients. The establishment of these objective methods would be desirable to measure the area of pigmentations for an assessment of treatment efficacy.

1．緒　言

女性の顔面に生じる色素斑は，わずかな病変であっても QOL を大きく損なうものであり，治療や化粧によって，その QOL の回復を図ることは社会的なニーズの高い重要な課題である．本研究では，主として老人性色素斑をできるだけ正確に定量するため，無反射の画像を得るための新しいデジタル偏光フラッシュシステムを用いて広範囲の色素斑の弱拡大ダーモスコピー画像を撮影し，コンピュータで自動定量を行うことにより，客観的な評価を可能とし治療効果の治療方法による違いを判定する．また，皮膚疾患特異的QOL の指標として日本語版Skindex16[1]）および DLQI（dermatological life quality index）[2]を用いて，患者サイドの主観的病変評価を併せて行い，両者を比較検討する．QOL 評価値については治療による改善を定量評価するのみならず，一部の患者では，化粧による効果も同時に判定し，治療補助としての化粧が重要な位置づけにあることを再確認することも目的とする．つまり，治療の前後および化粧の前後で QOL 評価を行って比較することで，治療と化粧の効果を同時に判定する．

Image analysis on senile lentigo by dermoscopy and improvement of quality of life index after treatment and makeup.

Masaru Tanaka

Department of Dermatology, Tokyo Women's Medical University Medical Center East

2．実　験

2．1　症例集積

東京女子医科大学東医療センター皮膚科を受診し，臨床およびダーモスコピーにより老人性色素斑と診断した患者に文書で同意を得たのち，治療前・中・後で広範囲弱拡大ダーモスコピー撮影（新しい無反射デジタルフラッシュシステムを使用）を行い，デジタル画像としてコンピュータに保存，データベースとする．患者は初診時と治療終了時に，アンケート形式の皮膚科学的QOL 評価指標である，Skindex16 日本語版および DLQI 日本語版を用いて，色素斑が患者の症状，感情，機能などに与える影響を評価される．さらに化粧を日常的に行う一部の患者においては，化粧の前後でもこれらの評価が変わる可能性があるため，可能な限り，並行して評価する．色素斑は臨床症状に応じて皮膚科学的に診断され，治療方針が決定される．治療は患者の希望も考慮し，ケミカルピーリング，液体窒素，ハイドロキノン，レーザーなどから選択することとする．治療期間は，３ヵ月程度とし，効果の判定は治療による炎症反応などが消退した時点で行うものとする．ダーモスコピー画像のデータベースは色素斑切り出しプログラムを用いて自動的に（または手動で）抽出し，面積と色素斑の濃度を自動処理で定量評価する．治療効果はコンピュータにより自動評価すると同時に QOL 評価指標により，患者自身によって主観的にも評価してもらう．比較指標として，２名

の皮膚科医により，印刷した色素斑の画像を色見本と比較して，肉眼的に効果判定を行う．

2．2　色見本の作成

線型近似と主成分分析により，3種類の色見本を作成した．色見本1と2では線型近似を行い，スコアZで肌の明るさを表した．色見本3では主成分分析を行い，スコアZでシミの濃さを表した．さらに，シミの大きさと濃さを表す指標として，QPI（quantified pigment index）を絶対値および周囲の健常皮膚との差分によって定義した．

3．結　果

3．1　色見本1と2の作成

17枚の老人性色素斑の無反射ダーモスコピー画像から線型近似を行うことにより，2種類の色見本を作成した（図1および図2）．これらの色素斑の色相（Hue）はおよそ143±4°であった．色素斑の色はRGB色空間の値を用いて，

$$Z=(R-120)*0.523+(G-73.8)*0.578+(B-60.5)*0.626$$

で定義される．スコアZは肌の明るさを表すと考えられる．

撮影した色素斑の画像と，上記の色見本は同じプリンタ（キャノン，Selphy CP-710）を用いて印刷し，2名の皮膚科専門医が両者の画像を比べることにより，色素斑の色の濃さをZ値で示した．図1の色見本1ではちょうど間にある色合いをどちらに選ぶかで迷いが生じたが，図2の色見本2では，逆に，色の近いものが並ぶため，複数の色がいずれも当てはまるように見えてしまい，両者の差よりも色合いの違いを強く感じてしまうという欠点が見られた．色合いのバリエーションをどの程度までの間隔で使用するのが適切か，より多くの画像を用いた検討を要すると判断された．色素斑の色合いは不均一なところもあるため，面積と色の濃さを反映する色素インデックス（PI）を考慮する必要がある．PIは$\Sigma(Zr-Zi)$（Zrは色素斑と健常皮膚のちょうど境目となるように設定，iは注目する色素斑内の画素）で計算される．

3．2　色見本3の作成

シミの濃さをZ値で表したほうが，直感的に理解しやすいため，新たな指標として，シミの濃さを，主成分分析（PCA，principal component analysis）を用いて計算し，新たな色見本を作成した（図3）．すなわち，数式

$$Z = 150-\{(R-120)\times0.523+(G-73.8)\times0.578+(B-60.5)\times0.626\}$$

で定義した．スコアZはシミの濃さを表し，健常皮膚は$8 \leqq Z \leqq 60$程度に分布した．

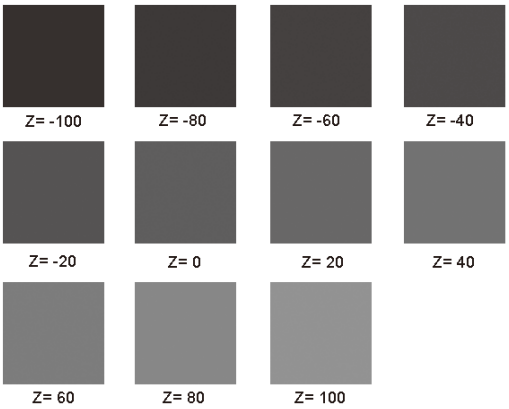


図1　色見本1
Z値を-100から+100まで20刻みで作成したもの．
Z値は肌の色の明るさを表す．

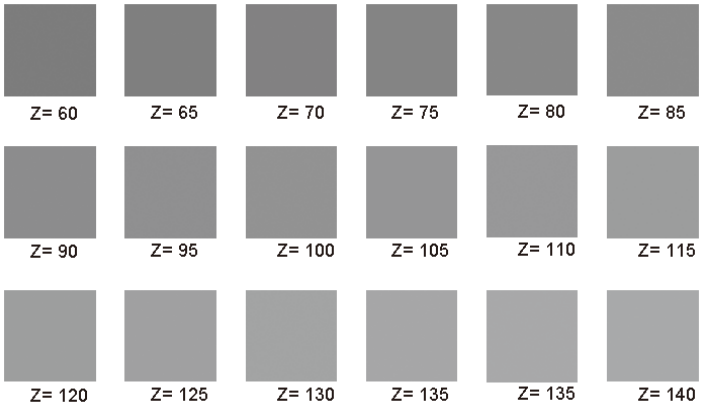


図2　色見本2
Z値を細かく分け，60から140まで5刻みで作成したもの．Z値は肌の色の明るさを表す．

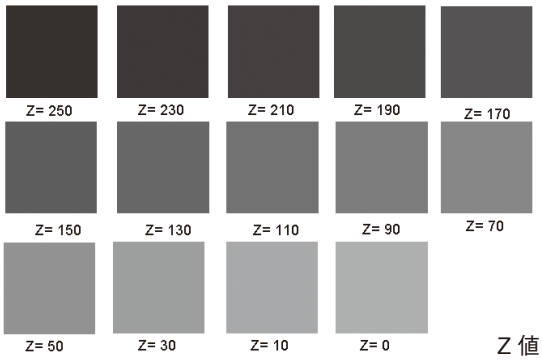


図3　色見本3
Z値がシミの濃さを表すように改訂した．
8から60ぐらいが健常部の色合い．

3. 3　シミの濃さと大きさの定義

さらに，シミの濃さと大きさを定量するため，絶対値および健常部との差分により QPI を定義した．すなわち，微小領域 ds における Z 値を Z（s）とするとき，QPI の絶対値は，

QPI ＝ ΣZ（s）≒シミの面積 × シミ領域内の平均Z 値

で計算することができる．また，QPI の健常皮膚との差分定義は，健常部の平均Z 値を Zn とすると，

QPI ＝ ΣZ（s）－ Zn・ds

≒シミの面積 ×（シミ領域の平均Z －健常部の平均Z）

で計算できる．

3. 4　ケミカルピーリング治療例の結果まとめ

色素斑をケミカルピーリングで治療し，定期的に観察した症例を示す（図４）．色素斑が改善していることが PI 値の減少として客観的に示されている．DLQI では，治療前にはアンケートの項目があてはまらないという評価をしていたものが，治療後は化粧により DLQI 値の改善が示されるようになった（表１）．

全症例，治療により改善したことは担当医判定により確認されたが，症例２では，写真に影が入ったため，客観判定では悪化している．しかし，DLQI と Skindex16 ではいずれも改善しており，患者サイドのアウトカムが満足する結果であることを示した．症例１の Skindex16 でのわずかなスコア悪化は乾燥敏感肌による灼熱感が原因と思われた．症例３は改善により，化粧をしなくても満足しているが，症例２は化粧をすることで満足しており，両者間でシミに対する感じ方が異なるという結果が示されており興味深い．また，化粧に対する考え方にも差があるようである．

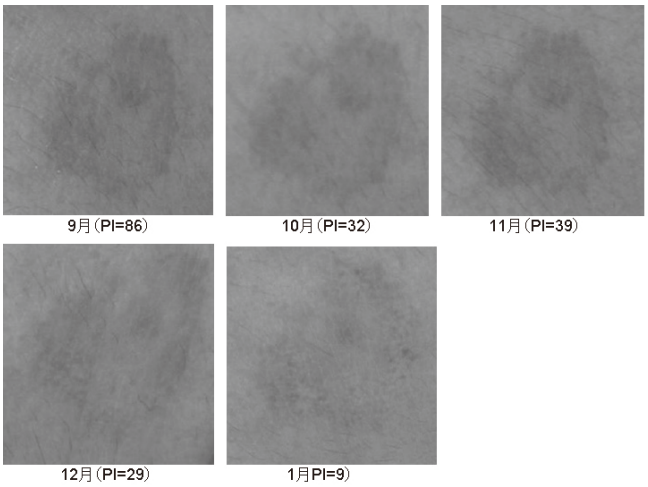


図４　ケミカルピーリングによる色素斑の経過
PI 値の改善とともに色素斑は明るく改善している．

表１　ケミカルピーリング３症例のまとめ

	症例 1N	症例 2S	症例 3U
診断名	老人性色素斑	老人性色素斑	老人性色素斑
治療内容	50% グリコール酸でケミカルピーリング	30% グリコール酸でケミカルピーリング	50% グリコール酸でケミカルピーリング
治療前DR 判定Z	100	70	60
治療後　〃	185（改善）	100（改善）	100（改善）
治療前PI	157	62	97
治療後　〃	40（改善）	148（悪化，影）	57（改善）
治療前化粧前DLQI	8（N/A）	36	8
〃　化粧後　〃	8（N/A）	36	8
治療後化粧前　〃	8（N/A）	38	24
〃　化粧後　〃	32（改善）	38（改善）	24（改善）
治療前化粧前SD16	3	32	9
〃　化粧後　〃	4	32	7
治療後化粧前　〃	4	15	0
〃　化粧後　〃	4（悪化？）	0（改善）	0（改善）
総合的判定	改善	やや改善	改善
総合的満足度	やや満足	やや満足	満足
コメント	当初，DLQI の項目自体に当てはまらないという拒否がみられた．しかし，治療に満足した結果，拒否傾向も改善した．	わずかな改善でも化粧により気にならなくなる可能性が示された．	本人の改善したという自覚が強いと化粧をしなくても気にならなくなる．

したがって，化粧にかかわらずきれいになることを求める人と，化粧によって改善できればかなりの満足を得られる化粧好きの人で，判定が大きく変わるということも示された．

3．5　ハイドロキノン治療例の結果まとめ

40 例中 17 例で QPI の２割以上の改善を認め，これらは有効例と判断された．５例では２割以上の悪化を認め，18 例は ± ２割の範囲内であり，これらは無効例と判断された．Skindex16 では，感情面の QOL 低下が見られていたが，治療後に有意に改善した（図５）．しかし，DLQI では，症状・感情面でわずかな改善はあったが，有意の変化はなかった（図６）．QPI の改善と QOL の改善の間に明らかな相関はなかった．すなわち，客観的な改善がない症例においても QOL の改善が見られている．

４．考　察

色素斑の撮影方法により，客観的定量性が弱くなる傾向がみられた．すなわち，治療によって改善したと思われる症例がある一方で，悪化しているようにみられる症例も存在する．これにはいくつかのあきらかな理由が考えられたため，特に（1）撮影条件，（2）カメラの設定，には注意を払った．また，実際の患者の色素斑の経過と比較すると，シミの主要な色調が改善した時点で，周囲の目立たなかったシミとの境界が不明瞭になり，改善後に面積が広くなってしまう現象がみられた．（1）撮影条件としては，①室内光の影響，②窓からの自然光の影響，③皮膚との距離，④皮膚とカメラの角度，などが一定となるよう考慮した．室内光の影響を減らすため，電灯の真下での撮影を避け，自然光の影響を最小限にするため，少なくとも横から光が当たらないよう窓側を向いてもらい撮影を行った．撮影時刻は午後３時から４時頃になるべく揃えた．また，可能な限り，天候の影響をなくすため，自然光の影響が少ない位置での撮影を心がけた．距離を一定にするため，撮影位置（患者の位置と撮影者の位置）を決め，撮影範囲をどこからどこまでにするか決めた．角度については垂直に構えるように注意深く撮影した．（2）カメラの設定は，マニュアルモードで，シャッタースピード 1/125，F 値８という決まりで撮ることにした．

季節変動の影響をできるだけ避けるため，紫外線の影響が少なくなる 10 月から１月にかけて症例を集積した．

色素斑などの皮膚病変を正確に客観的に評価することは難しいが，我々はすでにさまざまな皮膚病変を自動的に定量するコンピュータプログラムを開発し，多数の成果を国内外の学会および論文にて発表を重ねている[3),4),5),6)]．今回の研究の目的はなかでも，女性の顔面の色素斑を定量評価の対象としており，女性の QOL に与える顔面色素斑の影響を客観的および主観的に判定するものである．したがって，コスメトロジーの発展に大きく寄与する可能性がある．

本研究は治療効果の QOL に与える影響を評価すると同時に，化粧による同等の治療補助効果をも併せて判定することを目的に含んでおり，化粧が女性の行動や精神的な安定に及ぼす効果やストレスの改善に多大な効果を上げることを証明するというねらいもある．客観的な改善と QOL の改善には人によって異なる微妙なギャップがあることがわかったが，まだ症例数が少ないため，今後の蓄積と統計的解析が期待される．ある患者では，治療後には化粧をしなくても QOL が改善されているが，別の患者では治療だけでは QOL に変化はなくとも，化粧により QOL が改善するという微妙な意識の違いを治療がもたらした可能性が示唆され興味深い．

今回の研究で，色素斑の治療による客観的な改善と QOL の改善は必ずしも関係しないという可能性が示唆された．すなわち，たとえ客観的には改善がわずかであっても，治療するということが気分的に QOL を改善するとい

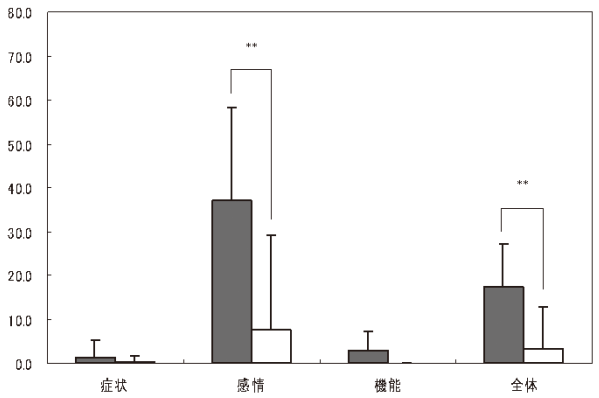


図５　ハイドロキノン治療前後の Skindex16 の変化
特に感情面の有意な改善が見られる．

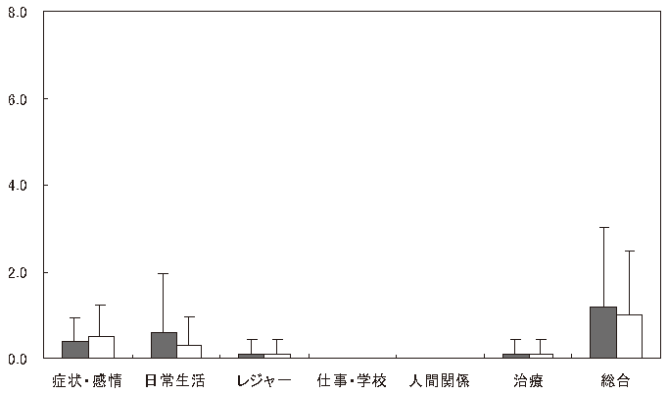


図６　ハイドロキノン治療前後の DLQI の変化
初めから低値であるため，治療前後の変化が少ない．治療による有意な改善は見られない．

う可能性が考えられた．これはあらゆる疾患の治療にも共通する概念である可能性もある．すなわち，治療効果がわずかでも治療に対して満足するということである．したがって，治療のプロセスが不快なものでなければ，患者サイドのアウトカムはよい結果となるわけである．

5．総　括

人間の目では変化をとらえにくい色素斑の画像定量方法を開発した．治療効果のわかりにくい変化も客観的にとらえることが可能となり，他のさまざまのデータとの比較が可能となった．しかし，色素斑の客観的な改善と QOL の改善には明らかな相関は見られなかった．その理由としては，治りにくく変化の少ない治療であっても，何かをしてもらったこと（施術）に対する満足感の表れである可能性が示唆された．

今後はコンピュータの画像切り出しが皮膚科医の判断と差がないことを証明することも必要と考えている．医師判定とコンピュータ判定の違いを定量し、統計学的に解析する。その結果を元に，色素沈着性皮膚病変を自動的により効率よく切り出すためのプログラムを作成することが重要と考えられる．

当研究を継続することが，今後のコスメトロジーにおける客観的定量手段の１つになるよう，方法の精度を向上させ，さらに症例を集積してデータ解析をおこなっていきたいと思う．

（文　献）

1）檜垣祐子: 臨床皮膚科, **58**: 164-166, 2004

2）福原俊一，鈴鴨よしみ: アレルギーの臨床, **27**: 267-271, 2007

3）小林誠一郎: 日本皮膚科学会雑誌, **114**: 1769-1776, 2004

4）Tanaka M, Gaskell S, Edwards C et al: Clin Exp Dermatol, **25**: 323-6, 2000

5）Iyatomi H, Oka H, Saito M et al: Melanoma Res, **16**: 183-190, 2006

6）Iyatomi H, Oka H, Celebi ME et al: J Invest Dermatol, **128**: 2049-2054, 2008

各種有効成分の効率的な皮膚内送達方法の開発

大阪大学大学院薬学研究科
近 藤　昌 夫

Claudin, a 24-kDa integral membrane protein with four transmembrane domains, plays a pivotal role in barrier-function of epithelial cell sheets. There are more than 20 members of the claudin family with different tissue-specific expression and barrier-function. The epidermis consists of several cell layers of strata corneum, granulosum and spinosum. Recently, Tsukita's group found that claudin-1 is expressed in the strata granulosum and is responsible for epidermal barrier. This finding indicates that a claudin-1 modulator may be a promising candidate for trans-epidermal delivery of cosmetics, such as anti-aging compounds and radical scavengers. However, a method to modulate claudin-1-barrier has never been developed.

A C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin (C-CPE) is the only claudin modulator, and C-CPE disrupts barrier-function of claudin-4 in epithelial cells. We previously showed that modulation of claudin-4 is a novel strategy for intestinal absorption of drugs using C-CPE as a claudin modulator, and we also found that deletion of the C-terminal 16 amino acids of C-CPE lost its ability to modulate claudin-4. Taken together, we started to develop a claudin-1 modulator using C-CPE as a prototype. Previously, substitution of Tyr310 with Cys reduced binding of *Clostridium perfringens* enterotoxin to its receptor. Until now, we investigated roles of the tyrosines (Tyr306, Tyr310, and Tyr312) of the C-terminal 16 amino acids of C-CPE in claudin-4 binding and modulation of epithelial barrier by site-directed mutagenesis. Single mutations of Tyr306, Tyr310 and Tyr312 to alanine resulted in partial reduction of claudin-4-binding. Double mutants Tyr306Ala/Tyr310Ala and Tyr306Ala/Tyr312Ala lost the ability to bind to claudin-4 and to modulate epithelial barrier. These data provide us useful information in the development of claudin-1 modulator based on C-CPE.

1．はじめに

最近、皮膚の生理学が進展し、しみやそばかすの要因や老化に伴うしわなどの生成メカニズムが明らかになりつつあり、色素沈着を阻害する物質、抗酸化活性物質、コラーゲン合成促進物質などが美白成分やアンチエージング成分として注目されている。

これらの美白成分やアンチエージング成分の作用部位は、皮下に存在するメラノサイト細胞や真皮領域などであり、単に皮膚表面にこれら成分を塗布しただけではメラノサイト細胞や真皮に到達する成分は極めて少なく各種有効成分の効果を期待することができない。皮膚内への物質透過は、角層ばかりでなく表皮下部に位置する重層上皮細胞層により制御されており通常外部からの物質の侵入は抑制されている。この重層上皮細胞層の物質透過抑制機構は長年不明であったが、2002年に京都大月田グループにより細胞と細胞の間隙に存在するclaudin-1蛋白質によって細胞間隙がシールされ重層上皮細胞層の物質の漏れ（移動）が阻害されていることが明らかにされた[1)]。この報告は、claudin-1を制御することにより美白成分の重層上皮細胞層透過を亢進できる可能性を示唆しているものの、未だclaudinを利用した皮膚内物質透過方法の開発研究は皆無である。

Development of a novel method for trans-epidermal delivery of cosmetics

Masuo Kondoh

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

Claudinのバリア機能を阻害する分子としては、ウェルシュ菌が産生する*Clostridium perfringens* enterotoxin（CPE）のC末ペプチド断片（C-CPE）がclaudin-4阻害分子として唯一知られていた[2)]。そこで当グループでは、claudin-4阻害分子であるC-CPEを用いて、claudinの薬物送達における標的分子としての有用性について解析を試み、C-CPEがラット腸管においてカプリン酸の400倍もの吸収促進作用を示すこと、この吸収促進作用にはC-CPEとclaudin-4との相互作用が関与していることを見出し、claudinが薬物送達の標的分子として有用であることを見出した[3)]。さらに、C-CPEのC末端側16アミノ酸領域を欠損させることにより、claudin-4結合性および吸収促進作用が完全に消失していたことから、これらC末16アミノ酸中に機能ドメインが存在するものと推察された[3, 4)]。また、過去のCPE研究において、Tyr310をCysに置換することによりCPEの受容体結合活性が著しく低下するとの報告がなされていた[5)]。

これらのCPE研究および当研究グループの研究成果を踏まえ、本研究では、C-CPEの機能解析を試み（Fig. 1）、ファージライブラリを作製し、claudin-1 binderのスクリーニングを試みた。

2．材料と方法

2－1．変異型C-CPEの作成

C-CPE遺伝子（大阪大学微生物病研究所　堀口安彦博

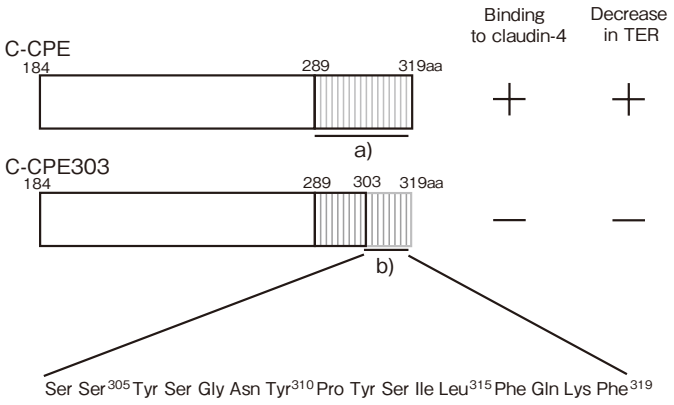


Figure 1 Diagram of C-CPE structure.
C-CPE is the C-terminal fragment of CPE. C-CPE binds to claudin-4 and decreases TJ barrier function as indicated by a decrease in TER (2). The C-terminal 30 amino acids of CPE and C-CPE mediate interaction with the CPE receptor and claudin, respectively [a)](6). Further analysis shows that the C-terminal 16 amino acids are responsible for the interaction of C-CPE with claudin and for its ability to decrease the TJ barrier function [b)](4).

Table 1 Primers used for site-directed mutagenesis.
The underline in forward primer and in reverse primer is NdeI site and BamHIsite, respectively. The italic letters in the reverse primer indicated the site of mutation.

Primers	Sequences (5' to 3')
Common forward primer	ggaattc cat atg gaa aga tgt gtt tta aca gtt cca tct aca
Reverse primer for Y306A	cgggatcc tta aaa ttt ttg aaa taa tat tga ata agg gta att tcc act *agc* tga tga att agc ttt cat tac
Reverse primer for Y310A	cgggatcc tta aaa ttt ttg aaa taa tat tga ata agg *ggc* att tcc act ata tga tga att agc ttt c
Reverse primer for Y312A	cgggatcc tta aaa ttt ttg aaa taa tat tga *agc* agg gta att tcc act ata tga
Reverse primer for Y306A/Y310A	cgggatcc tta aaa ttt ttg aaa taa tat tga ata agg *ggc* att tcc act *agc* tga tga att agc ttt cat tac
Reverse primer for Y306A/Y312A	cgggatcc tta aaa ttt ttg aaa taa tat tga *agc* agg gta att tcc act *agc* tga tga att agc ttt cat tac aag
Reverse primer for Y310A/Y312A	cgggatcc tta aaa ttt ttg aaa taa tat tga *agc* agg *ggc* att tcc act ata tga tga att agc ttt cat tac
Reverse primer for Y306A/Y310A/Y312A	cgggatcc tta aaa ttt ttg aaa taa tat tga *agc* agg *ggc* att tcc act *agc* tga tga att agc ttt cat tac

士より供与）を鋳型とし、Table 1に示した各種primerを用いてPCR法により目的のアミノ酸をアラニンに置換した変異型C-CPEをクローニングした。変異型C-CPE DNA断片をHisタグ融合タンパク質発現プラスミドpET-16bに挿入することにより変異型C-CPE発現プラスミドを作製した。大腸菌BL21（DE3）（Novagen）を用いて各種タンパク質を発現・産生させた後、HisTrap™ Kit（GE Healthcare）を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより各種変異型C-CPEを精製した。

２－２．変異型C-CPEによるC-CPE-PSIF拮抗阻害作用

Claudin-4を強制発現させたマウス線維芽細胞（claudin-4発現細胞）を播種し、一昼夜培養した。変異型C-CPE添加1時間後にclaudin-4指向性のタンパク質合成阻害タンパク質C-CPE-PSIF（7）（0.2 μg/mℓ）を加え、C-CPE-PSIF添加36時間後にCytoTox96®（Promega）を用いて培地中に放出された乳酸脱水素酵素（LDH）量を測定した。各種変異体の細胞傷害性抑制作用は、C-CPEによるLDH放出抑制率を100%とした各種変異体の阻害率（%）として算出した。

２－３．変異型C-CPEとclaudin-4との結合性評価（pull down assay）

Caco-2細胞を回収し、lysis buffer（1% Triton X-100, 1% protease inhibitor cocktail含有PBS）を用いて細胞

を溶解させ、予めNi-NTA Agarose（Invitrogen™）に作用させることで非特異的な吸着物質を除去した。Caco-2細胞溶解液と各種変異型C-CPEを37℃で30 分間反応させた後、Ni-NTA Agaroseを加え4℃、3時間反応させた。遠心分離した沈澱画分をlysis bufferで洗浄した後、ウェスタンブロッティングによりclaudin-4および変異型C-CPEを検出し、変異型C-CPEのclaudin-4結合性を評価した。

2－4．変異型C-CPEの膜電気抵抗値に及ぼす影響

ヒト結腸癌由来Caco-2細胞をTranswell®（Corning）に播種し、Transwell上に単層膜を形成させた。一定期間培養後、各種変異型C-CPEを作用させ、TJのバリア機能の指標である膜電気抵抗値（TER）を測定した。添加18時間後のC-CPEのTER低下作用を100%として、各種変異体のTER低下率（%）を算出した。

2－5．変異型C-CPEの吸収促進作用

モデル薬物としてFITC-dextran（FD-4, Mw:4000, Sigma）を用いて、吸収促進剤の評価法として汎用されているラット *in situ* loop assayにより変異型C-CPEの吸収促進作用を評価した。

変異型C-CPE（0.2 mg/mℓ）およびFD-4（10 mg/mℓ）を空腸（5 cm）に投与し、頸静脈より経時的に採血した。その後、血漿中FD-4濃度を蛍光光度計（励起波長；485 nm, 蛍光波長；538 nm）を用いて測定し、投与後4時間目までの濃度－時間曲線下面積（$AUC_{0\to4}$）を算出した。

2－6．C-CPE誘導体ファージライブラリの作成およびclaudin-1 binderのスクリーニング

過去の報告に準じてpCantab5Eを用いてC-CPEのclaudin-4結合残基をランダムなアミノ酸に置換したC-CPE誘導体ファージライブラリを作成し[7, 8]、claudin-1発現L細胞を用いてclaudin-1 binderのスクリーニングを試みた。

3．結果および考察

3－1．C-CPE-PSIFの細胞傷害性に及ぼす変異型C-CPEの阻害作用

当研究室では、C-CPEにタンパク質合成阻害因子PSIFを融合させたC-CPE-PSIFを作製し、C-CPE-PSIFがC-CPEを介してclaudin-4発現細胞に特異的に結合することにより細胞傷害作用を示すことを見出している[7]。そこで、C-CPE-PSIFを用いた拮抗阻害実験により各種アラニン置換体とclaudin-4との結合性を評価したところ、Y306A, Y310A、Y312Aいずれの変異体でもC-CPEと比較してclaudin-4結合性が顕著に低下していた（Fig. 2A）。

3－2．変異型C-CPEとclaudin-4との相互作用

C-CPE-PSIF拮抗阻害実験においてclaudin-4結合性の低下が観察された変異体について、Caco-2細胞溶解液を用いたpull down assayによりclaudin-4結合性を評価したところ、Y306A, Y310Aのclaudin-4結合性は低下していたものの、Y312AではC-CPEと同程度の結合性が認められた（Fig. 2B）。

3－3．変異型C-CPEの膜電気抵抗値に及ぼす影響

次に、Caco-2細胞の単層膜培養系を用いて各種アラニン置換体のTER低下作用（バリア機能低下作用）を検討した結果、Y306AでのみTER低下作用の有意な減弱が観察された（Fig. 3A）。

3－4．変異型C-CPEの吸収促進作用

ラット腸管 *in situ* loop assayにより吸収促進活性を評価したところ、Fig. 3BCに示すようにY306A、Y312AではC-CPEと比較して吸収促進作用は著しく低下していた。C-CPE-PSIFおよびpull down assayの結果を考え合わせると、Y306Aではclaudin-4結合性の低下に伴い吸収促進作用が減弱したと考えられる。Y312AではC-CPEと同程度のclaudin-4結合性が認められているにも関わらず、吸収促進作用の低下が観察されていた。ラット小腸の上皮細胞層溶解液を用いたpull down assayを行ったところ、claudin-4との結合が観察されたことから（data not shown）、Tyr312はclaudin-4との結合には必須ではなく吸収促進活性に関与しているものと考えられる。

3－5．2、3アミノ酸変異型C-CPEの吸収促進作用

Alanine scanによってC-CPEの各種活性にTyr306, Tyr310, Tyr312が関与している可能性が示された。そこで次に、これらアミノ酸残基の2アミノ酸アラニン置換体を作成し各種活性を評価した。Pull down assayおよびC-CPE-PSIF拮抗阻害実験ではいずれの変異体においても相加的な結合性の低下が観察された（Fig. 4AB）。さらに *in situ* loop assayにより吸収促進効果を評価したところ、Fig. 3BCに示してあるようにいずれの変異体においても著しい吸収促進作用の低下が観察された。さらに、Tyr306, Tyr310, Tyr312をいずれもアラニンに置換した3置換体では、claudin-4結合性、TER低下作用、吸収促進作用が消失していた（Fig. 5A-E）。

3－6．Claudin-1 binderのスクリーニング

C-CPEのclaudin-4結合領域をランダムなアミノ酸に置換したC-CPE誘導体ライブラリを作製し、claudin-1発現L細胞を用いてclaudin-1 binderのスクリーニングを試みたところ、得られたクローンはいずれも天然型C-CPE

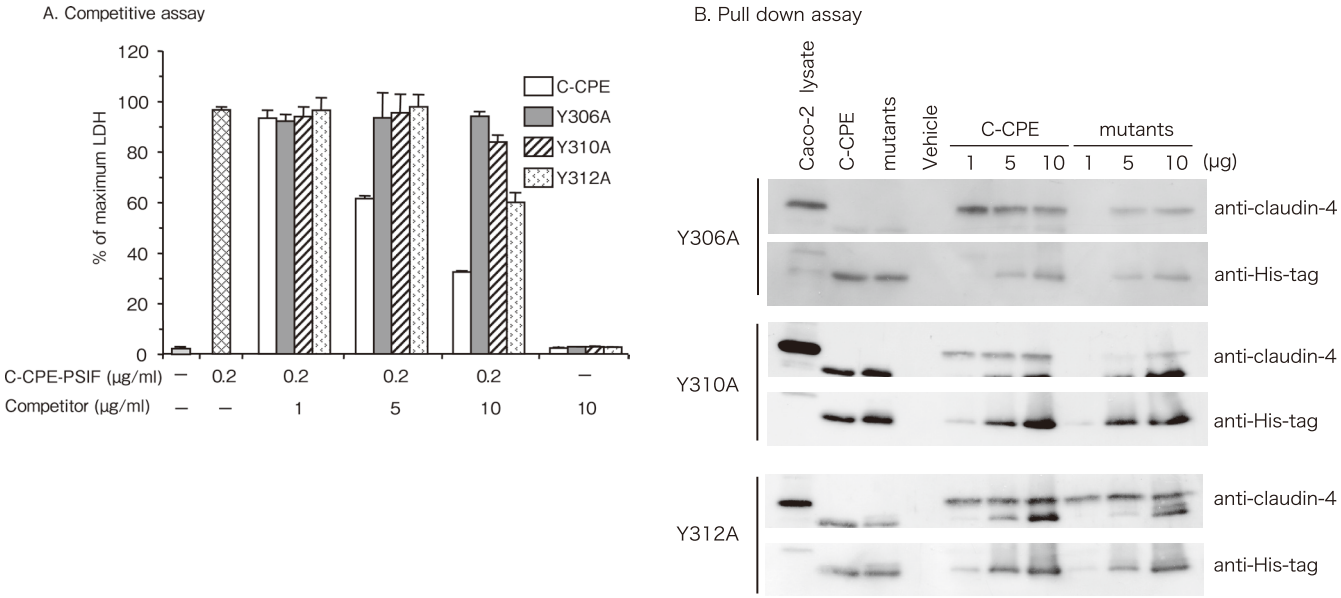


Figure 2 Effects of Tyr306, Tyr310 and Tyr312 on the interaction of C-CPE with claudin-4.

A) Competitive inhibition of C-CPE-PSIF-induced cytotoxicity by mutants of C-CPE. Claudin-4-expressing L (CL4/L) cells were pretreated with the indicated concentrations of C-CPE or C-CPE mutants for 1 h. The cells were then incubated with 0.2 μg/mℓ of C-CPE-PSIF. After 36 h, LDH release was assessed using a commercially available kit. The results are representative of three independent experiments, and the values are means ± SD (n=3).

B) Pull-down assay. Confluent Caco-2 cells were harvested and lysed in lysis buffer. The lysate (10 μg) was incubated with vehicle, C-CPE, or mutants of C-CPE for 30 min at 37℃. After addition of Ni-resin, the lysate was incubated for 3 h at 4℃. The resin was then precipitated, and the bound proteins were analyzed by SDS-PAGE followed by Western blotting using anti-claudin-4 or anti-His-tag antibodies. The lanes containing Caco-2 lysates (10 μg), C-CPE (1 μg), and mutants of C-CPE (1 μg) were positive controls for claudin-4, C-CPE, and mutants of C-CPE, respectively. The results are representative of three independent experiments.

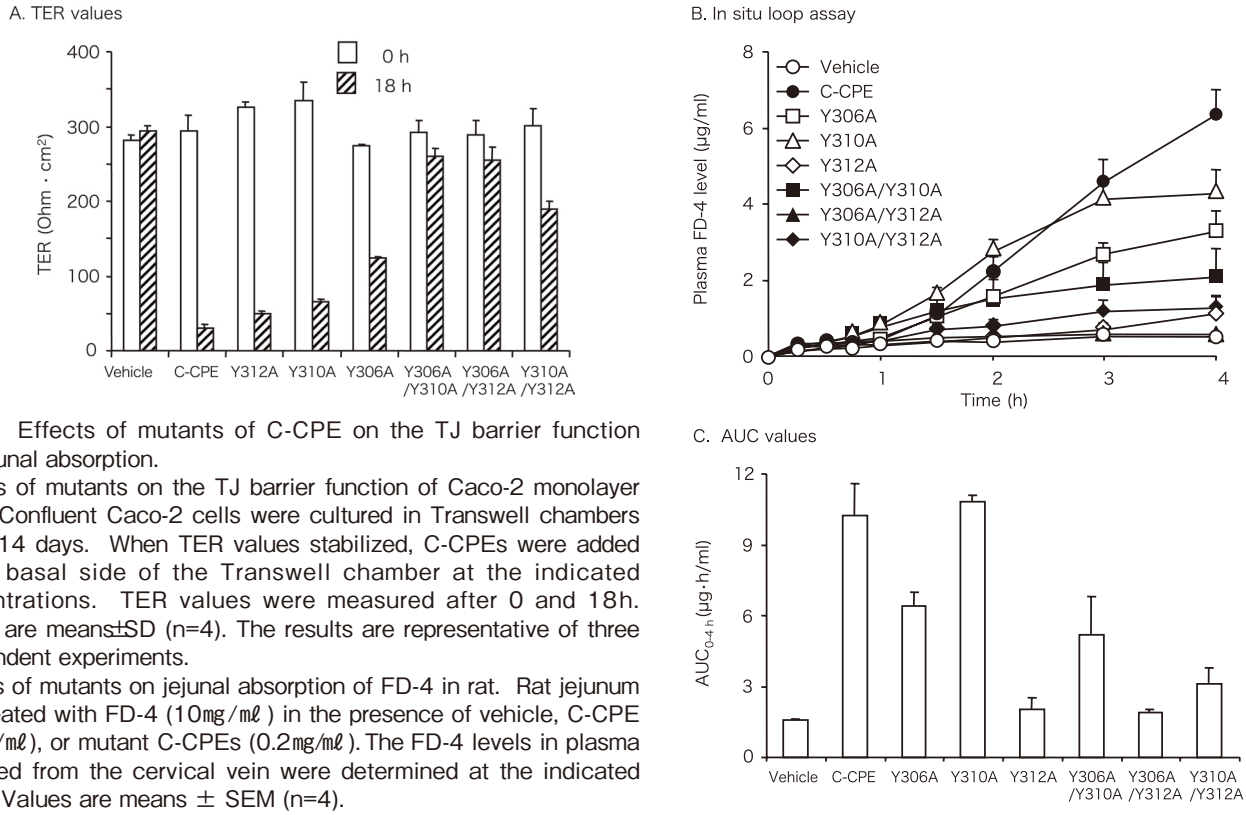


Figure 3 Effects of mutants of C-CPE on the TJ barrier function and jejunal absorption.

A) Effects of mutants on the TJ barrier function of Caco-2 monolayer cells. Confluent Caco-2 cells were cultured in Transwell chambers for 10-14 days. When TER values stabilized, C-CPEs were added to the basal side of the Transwell chamber at the indicated concentrations. TER values were measured after 0 and 18h. Values are means±SD (n=4). The results are representative of three independent experiments.

B) Effects of mutants on jejunal absorption of FD-4 in rat. Rat jejunum was treated with FD-4 (10mg/mℓ) in the presence of vehicle, C-CPE (0.2 mg/mℓ), or mutant C-CPEs (0.2mg/mℓ). The FD-4 levels in plasma collected from the cervical vein were determined at the indicated times. Values are means ± SEM (n=4).

C) The $AUC_{0\text{-}4h}$ values were calculated from (B) and are means± SEM (n=4). The results shown in (B) and (C) are representative of three independent experiments.

であった（data not shown）。C-CPE は claudin-1 結合性を有していないことから、claudin-1 発現細胞は claudin-1 binder スクリーニング系として不適であると推察された。

4．考　察

以上、本研究により、C-CPE と claudin-4 との結合には Tyr306, Tyr310, 吸収促進作用には Tyr312 が関与していることが明らかにされ、機能ドメインをランダムなアミノ酸に置換した C-CPE 誘導体ライブラリを作製し、claudin-1 binder のスクリーニングを試みたものの、claudin-1 binder の取得には至らなかった。現在のところ、claudin のバリア機能を制御する分子は C-CPE 以外には報告されておらず、C-CPE を prototype として用いた claudin modulator 創製には新たな claudin binder スクリーニング系構築の必要性が示唆された。現在までに当グループでは、claudin 発現細胞に代わる新規 claudin binder スクリーニング系を作製し、本系が claudin binder 探索系として機能することを確認している。今後は、本検討で構築した C-CPE 誘導体ライブラリ、および新たに構築した claudin binder スクリーニングシステムを用いて、claudin-1 modulator 創製を図る予定である。

尚、当該研究成果は以下の論文に掲載された。

1）Ebihara, C., Kondoh, M., Harada, M., Fujii, M., Mizuguchi, H., Tsunoda, S., Horiguchi, Y., Yagi, K., and Watanabe, Y. Role of Tyr306 in the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin for modulation of tight junction. Biochem Pharmacol, *73*: 824-830, 2007.

2）Harada, M., Kondoh, M., Ebihara, C., Takahashi, A., Komiya, E., Fujii, M., Mizuguchi, H., Tsunoda, S., Horiguchi, Y., Yagi, K., and Watanabe, Y. Role of tyrosine residues in modulation of claudin-4 by the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. Biochem Pharmacol, *73*: 206-214, 2007.

3）Takahashi, A., Komiya, E., Kakutani, H., Yoshida, T., Fujii, M., Horiguchi, Y., Mizuguchi, H., Tsutsumi, Y., Tsunoda, S., Koizumi, N., Isoda, K., Yagi, K., Watanabe, Y. Domain mapping of a claudin-4 modulator, the C-terminal region of C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin, by site-directed mutagenesis. Biochem Pharmacol, *75*: 1639-1648, 2008.

謝　辞

当該研究テーマの実施に際して、グラントサポートを賜りました財団法人コスメトロジー研究振興財団に深謝致します。

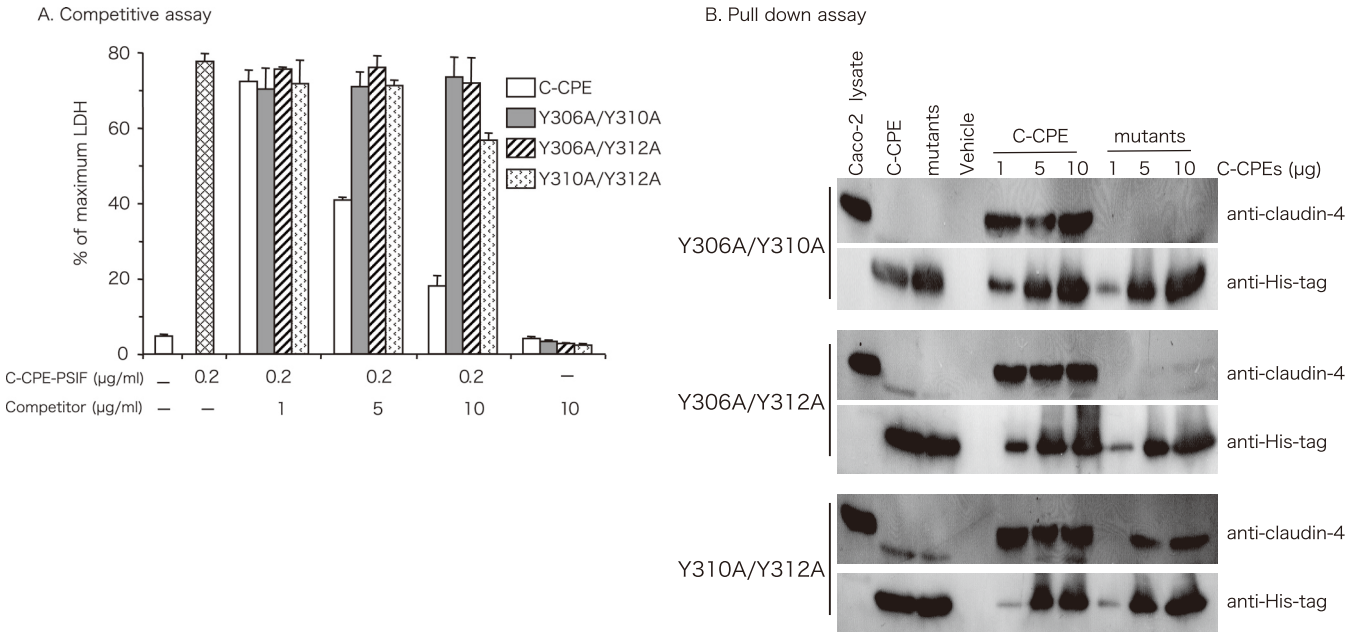


Figure 4 Interaction of double mutants at residues 306, 310, and 312 of C-CPE with claudin-4

A) Competition assay. CL4/L cells were incubated with double mutants at the indicated concentration for 1h and then mixed with C-CPE-PSIF (0.2 μg/mℓ). After 36h, LDH release was assessed using a commercially available kit. The results are representative of three independent experiments. Values are means±SD (n=3).

B) Pull-down assay. Caco-2 lysates (10 μg) were incubated with double mutants (Y306A/Y310A, Y306A/Y312A, or Y310A/Y312A) for 30 min at 37℃. Ni-resin was then added, and the lysate was incubated for 3h at 4℃. Next, the resin was precipitated, and the bound proteins were analyzed by SDS-PAGE followed by Western blotting.

（参考文献）

1）Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. J Cell Biol, *156*: 1099-1111, 2002.

2）Sonoda, N., Furuse, M., Sasaki, H., et al. *Clostridium perfringens* enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. J Cell Biol, *147*: 195-204, 1999.

3）Kondoh, M., Masuyama, A., Takahashi, A., et al. A novel strategy for the enhancement of drug absorption using a claudin modulator. Mol Pharmacol, *67*: 749-756, 2005.

4）Takahashi, A., Kondoh, M., Masuyama, A., et al. Role of C-terminal regions of the C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin in its interaction with claudin-4. J Control Release, *108*: 56-62, 2005.

5）Kokai-Kun, J. F., Benton, K., Wieckowski, E. U., and McClane, B. A. Identification of a *Clostridium perfringens* enterotoxin region required for large complex formation and cytotoxicity by random mutagenesis. Infect Immun, *67*: 5634-5641, 1999.

6）McClane, B. A., Chakrabarti, G. New insights into the cytotoxic mechanisms of *Clostridium perfringens* enterotoxin. Anaerobe, *10*:107-114, 2004.

7）Ebihara, C., Kondoh, M., Hasuike, N., et al. Preparation of a claudin-targeting molecule using a C-terminal fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin. J Pharmacol Exp Ther, *316*: 255-260, 2006.

8）Yamamoto, Y., Tsutsumi, Y., Yoshioka, Y., et al. Site-specific PEGylation of a lysine-deficient TNF-alpha with full bioactivity. Nat Biotechnol, *21*: 546-552, 2003.

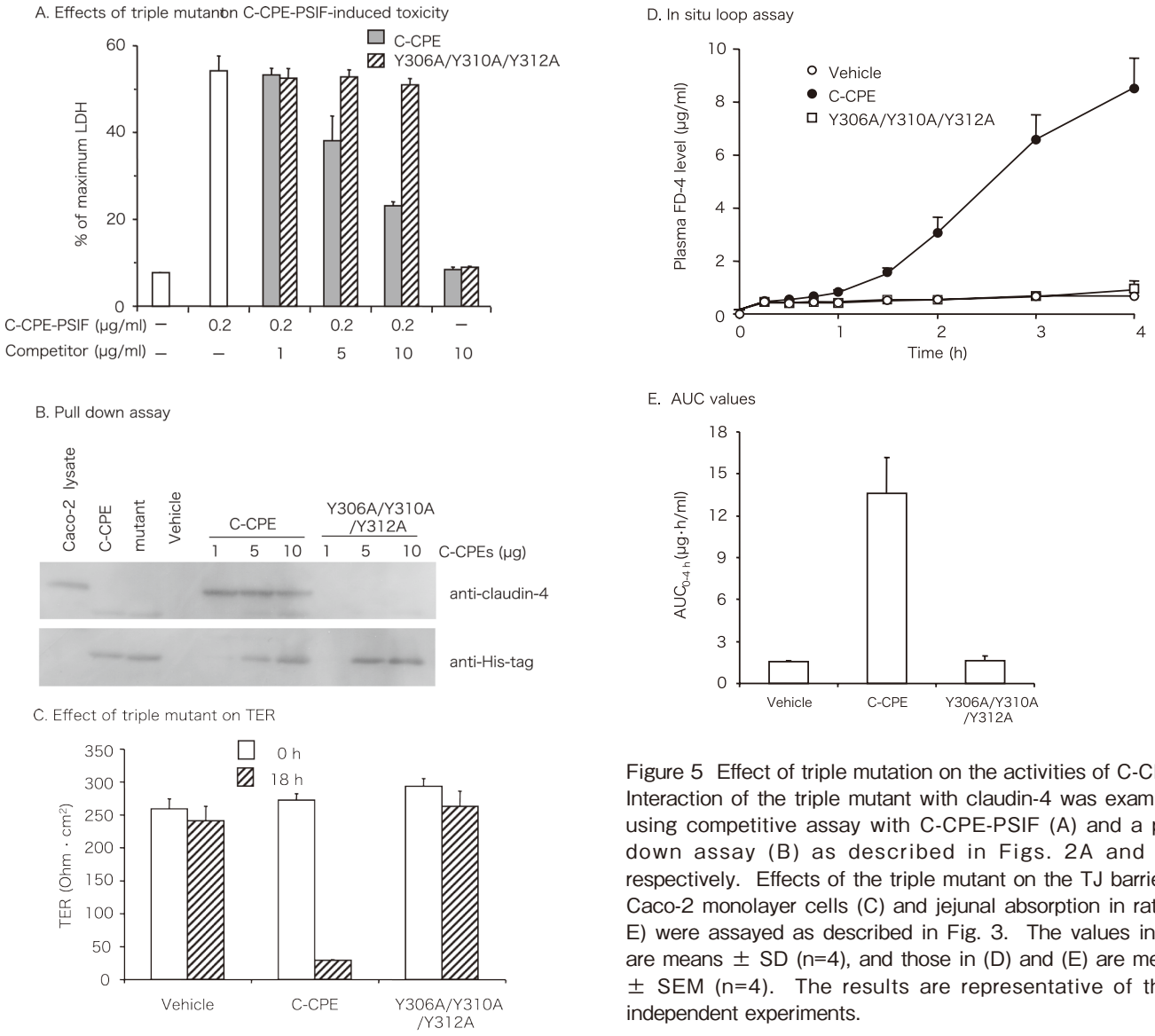


Figure 5 Effect of triple mutation on the activities of C-CPE. Interaction of the triple mutant with claudin-4 was examined using competitive assay with C-CPE-PSIF (A) and a pull-down assay (B) as described in Figs. 2A and 2B, respectively. Effects of the triple mutant on the TJ barrier in Caco-2 monolayer cells (C) and jejunal absorption in rat (D, E) were assayed as described in Fig. 3. The values in (C) are means ± SD (n=4), and those in (D) and (E) are means ± SEM (n=4). The results are representative of three independent experiments.

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

富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学

安東　嗣修

In addition to epidermal hyperplasia, chronic pruritic skin diseases (e.g., atopic dermatitis, dry skin) show the increased number of nerve fibers in epidermis. However, the characteristics and the mechanisms of sprout of nerve fibers are still unknown. In the present study, we investigated the characteristics of the nerve fibers in epidermis by using the immunohistochemical analysis and proteomics analysis of epidermal protein for identification of the factor for sprouting in the dry skin mouse model with itch. For preparing the mouse model, the rostral back was treated daily with cutaneous application of acetone/ether (1:1) mixture (AE), water following AE (AEW). The stratum corneum hydration decreased in AE- and AEW-treated mouse skin, but not non-treated skin. The treatment with AEW induced the spontaneous scratching as an itch-associated response, and increased the number of protein gene product 9.5-positive nerve fibers, which were calcitonin gene-related peptide-positive C-fiber neurons. However, these alterations were not shown in non- and AE-treated mice. The proteomics analysis showed a lot of epidermal proteins that the expression altered by treatment with AE and AEW, compared with non-treatment. We are doing the identification of these proteins by using MALDI-TOF/MS.

1．緒　言

「痒み」は，皮膚と一部の粘膜において認められ，掻きたいという衝動を引き起こす不快な感覚である。痒みの発生は，皮膚内における痒みのメディエーターの産生に起因するものだけでなく，特に乾皮症やアトピー性皮膚炎患者では，皮膚が痒覚過敏（痒み刺激に対する反応の増大）あるいはアロネーシス（通常は痒みを生じない刺激で痒みが起こる状態）の状態になっていることが報告されている[1, 2]。この様な病態では，痒みのシグナルを伝える一次感覚神経の表皮内への伸展が報告されている[3－6]。しがしながら，この様な病理学的変化は観察されるものの，その伸展神経の特徴や痒み発生との関連に関して明らかになっていない。そこで，本研究では，乾燥性皮膚掻痒症マウスモデル[7]を用いて，表皮内伸展神経の特徴を免疫組織学的に解析し，表皮における変化タンパクのプロテオミクス解析を行ない，末梢神経伸展因子の同定を試みた。

2．実　験

2．1　実験動物

実験には，雄性ICR系マウス（7～8週齢，日本SLC，静岡）を用いた。

Identification of sprouting factor for peripheral nerve fibers in the epidermis with chronic pruritic skin disease

Tsugunobu Andoh

Department of Applied Pharmacology, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama

2．2　乾燥性皮膚掻痒症モデルマウスの作製

乾燥性皮膚掻痒症モデルマウスは，Miyamoto ら[7]の方法により作製した。実験開始5日前に，ジエチルエーテル麻酔下，マウス吻側背部を2㎝四方にバリカンで除毛後，さらにシェーバーで剃毛した。角質細胞間脂質を抽出する目的でアセトンとジエチルエーテルの1：1混液を2㎝四方の脱脂綿に染み込ませ，これをジエチルエーテル麻酔下，剃毛部位に15秒間適用した（AE処置），直後に蒸留水を2㎝四方の脱脂綿に染み込ませ，30秒間適用した（AEW処置）。この操作を1日2回8時間以上の間隔をあけ，5日間行った。

2．3　角質水分量の測定

毎朝の皮膚バリア破壊処置前，および行動実験開始前に，Moisture Checker® MY707S（SCALAR Corporation，東京）を用いて測定した。電気伝導率を指標として測定された角質水分量は，測定値として表示される単位（%）で示した。

2．4　行動実験

5日間のAEW処置の翌日にKuraishi ら[8]の方法でマウスの自発的掻き動作数を計測した。すなわち，動物の行動を無人環境下で8㎜ビデオカメラにて撮影した。行動観察はビデオの再生により行い，後肢による皮膚バリア破壊処置部位（剃毛部位）に対する自発的な掻き動作回数を数えた。マウスは，1秒間に数回掻くので後肢を挙げてから降ろすまでの一連の動作を1回として数えた。

2．5　免疫組織化学染色

5日間のAEW処置の翌日に，マウスを4％パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定後，バリア破壊した吻側背

部皮膚を採取した。続いて厚さ30 μmの凍結切片を作製後，定法により抗protein gene product 9.5（PGP9.5）および抗カルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）抗体を用いて免疫染色を行なった。染色した皮膚切片は共焦点レーザー顕微鏡（Bio-Rad，Radiance 2100）を用いて観察した。一部の実験では，マウス1匹当り5ヶ所の表皮内伸展末梢神経終末数を数え，幅1 mm当りの本数の平均値を個体値とした。

2．6　二次元電気泳動

無処置，AE処置及びAEW処置マウス皮膚を摘出後，表皮を剥離し，タンパク質を抽出した。IPGストリップ（pH 3－10）を用た等電点電気泳動に続いて，SDS-PAGEによる電気泳動を行なった。ゲルをクマシーブリリアントブルー染色後，画像解析を行なった。変化したスポットに対してMALDI-TOF/MSによるタンパクの同定を試みた。

3．結　果

3．1　AEW処置マウスにおける皮膚症状

剃毛した無処置マウスの皮膚は鱗屑等の乾皮症に類似する症状は認められなかた（Fig. 1A）。一方，1日2回5日間AE処置（data not shown）あるいはAEW処置（Fig. 1B）を行ったマウスでは，顕著な鱗屑を認める典型的な角化亢進を伴う乾皮症に類似する皮膚症状が観察された。本モデル皮膚の病理組織学的変化として，無処置マウス皮膚と比較して，AEW処置マウス皮膚では明らかな表皮の肥厚，顕著な角化亢進の像が観察され，炎症性細胞の顕著な浸潤は認められなかった（data not shown）。

3．2　AE処置およびAEW処置による角質水分量と自発的掻き動作数の変化

角質水分量は，無処置群では変化しなかったが，AE処置群において処置開始後2日目から，AEW処置群においては処置開始後1日目から有意に減少した（Fig. 2A）。また，AEW処置群はどの時点においてもAE処置群よりも有意に低い値を示した（Fig. 2A）。

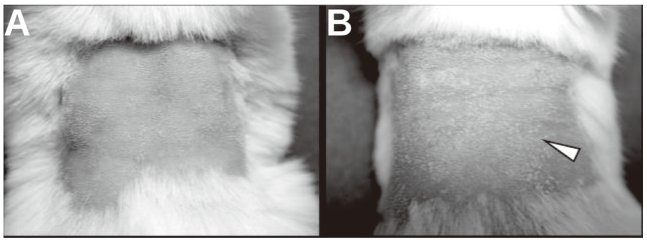


Fig. 1 Skin condition of AEW-treated mouse skin. The skin conditions in non-treated mouse skin (A) and in AEW-treated mouse skin (B).

一方，自発的掻き動作数は，AE処置群では無処置群と比較して有意な差は認められなかったが，AEW処置群は無処置群およびAE処置群のいずれに対しても有意に自発的掻き動作回数が増加した（Fig. 2B）。

3．3　AE処置及びAEW処置による表皮内伸展末梢神経の変化

PGP9.5は，神経のマーカーである。AE処置およびAEW処置を5日間行った部位の表皮における，PGP9.5陽性神経線維の分布をFig. 3A-Cに示した。無処置マウス（Fig. 3A）およびAE処置（Fig. 3B）マウスの皮膚では末梢神経終末のほとんどが表皮－真皮接合部までしか達しておらず，表皮内への伸展は少なかった。一方，AEW処置マウスの皮膚では無処置マウスの皮膚に比べ，多くの末梢神経終末が表皮内へ伸展しているのが観察された（Fig. 3C）。

また，無髄C線維が痒みの伝達に関与していることが知られている。また，そのC線維のほとんどがカルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）含有神経である[9]。そこで，AEW処置を行った皮膚部位におけるCGRP含有神経線維の分布をFig. 4に示した。AEW処置マウスの皮膚では，数多くのCGRP含有神経終末が表皮内へと伸展していた。

3．4　AE処置及びAEW処置による表皮内タンパク質のプロテオミクス解析

無処置，AE処置及びAEW処置マウス皮膚より表皮を剥離し，抽出したタンパクを用いて二次元電気泳動を行っ

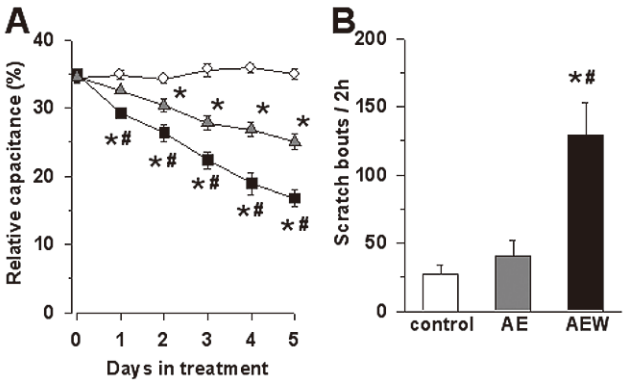


Fig. 2 Time-dependent changes in stratum corneum (SC) hydration and scratching behavior in mice treated with AE or AEW. (A) SC hydration was measured daily before AE or AEW treatment. (B) The number of scratching for 2h was measured the day after 5-days AE or AEW treatment. Values represent the mean±SEM for 8 animals. *$p < 0.05$ and #$p < 0.05$ compared with control and AE-treatment, respectively (Dunnett's multiple comparisons).

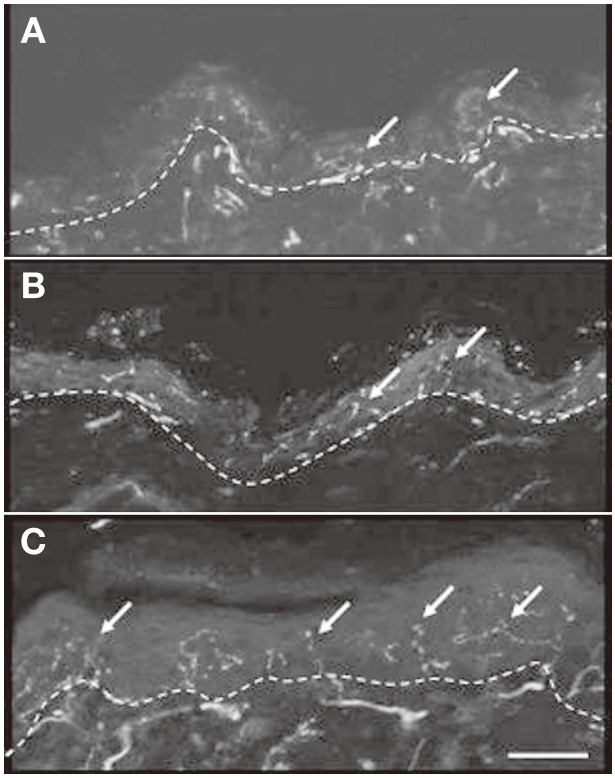


Fig. 3 PGP9.5-immunoreactive nerve fibers in the mouse skin. The skin sections obtained from non-treated (A), AE-treated (B) and AEW-treated (C) mice were immunostained with anti-PGP9.5 antibody. The dashed line in each panel indicates the border between the epidermis and the dermis. Arrows indicate nerve fibers in epidermis. Scale bar=50 μm.

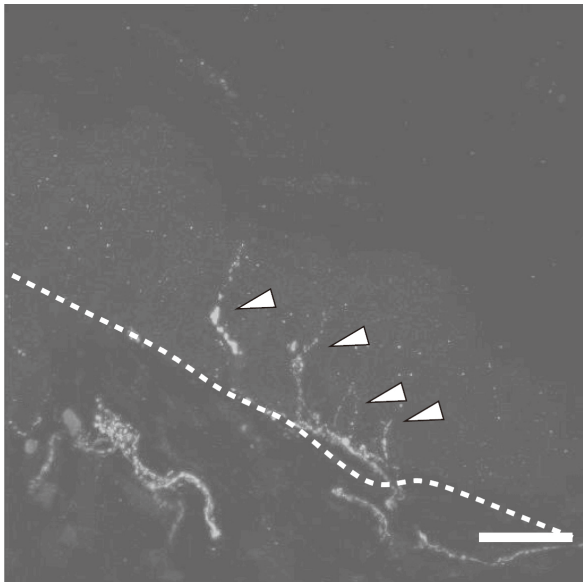


Fig. 4 CGRP-immunoreactive nerve fibers in AEW-treated mouse skin. The skin sections obtained from AEW-treated mouse mice was immunostained with anti-CGRP antibody. The dashed line in each panel indicates the border between the epidermis and the dermis. Arrow heads indicate CGRP-immunoreactive nerve fibers in epidermis. Scale bar = 25 μm.

た。それぞれの処置により発現が増加，減少したタンパクが多く見つかった。現在，それぞれスポットを抽出して解析している。現在までに同定できたタンパクで，機能がわかっているものの一つで filaggrin あり，無処置，AE 処置及び AEW 処置と発現が減少していった。

4. 考　察

本研究において，AE 処置では皮膚は乾燥するものの自発的掻き動作や末梢神経の表皮内伸展は観察されず，AEW 処置マウスにおいてのみ自発的掻き動作の有意な増加や表皮内伸展神経線維数の増加が認められた。これらのことから，AEW 処置マウスにおける痒みが表皮内伸展末梢神経の増加に付随して誘導されていることが示唆される。皮膚の乾燥を伴うようなアトピー性皮膚炎などの掻痒性皮膚疾患の皮膚でも，表皮内に一次感覚神経が伸展している[3－6]。この様な皮膚疾患の皮膚は，痒覚過敏あるいはアロネーシスの状態になっていることが報告されている[1, 2]。したがって，表皮内に伸展した末梢神経は，痒みの伝達に重要な役割を担っていると考えられる。

ところで，AEW 処置マウス皮膚の表皮内伸展神経が，主に CGRP を含有する無髄神経であった。CGRP[9]は，無髄の C 線維に加え，有髄の A 線維にも発現している。しかしながら，有髄の A 線維のマーカーである neurofilament 200 陽性神経の伸展は観察されなかった（data not shown）。このことから，伸展神経線維は，主に C 線維であることが示唆される。

表皮内への末梢神経伸展には，表皮の大部分を占めるケラチノサイトからの遊離因子が関与している可能性がある。そこで，表皮を剥離してプロテオミクス解析を試みている。その中で，AEW 処置により filaggrin の減少が認められた。

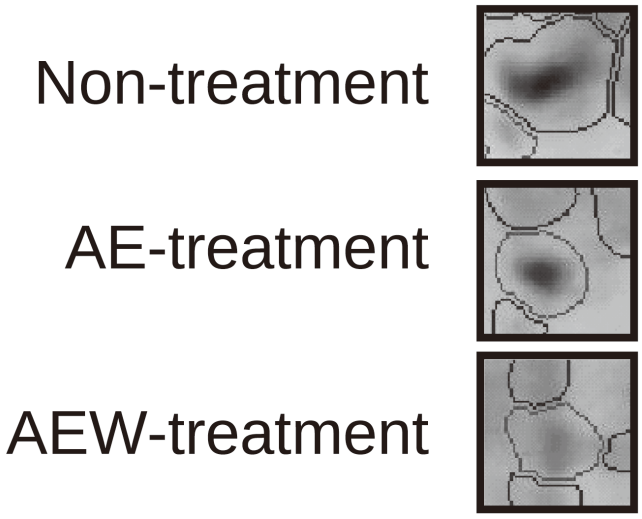


Fig. 5. Comparative analysis of differentially expressed protein spots in control and AE- or AEW-treatment epidermis. Zoom of the 2-DE gel on the spot of filaggrin.

Filaggrin は，脂質成分のセラミドと伴に皮膚の保湿やバリア機能に関与している因子である。Filaggrin の遺伝子変異が魚鱗癬の発症の原因に関係していることが示唆されており，その患者の多くがアトピー性皮膚炎を伴っていることが報告されている[11, 12]。このように皮膚バリア機能が破壊されることにより外部からの刺激を受けやすくなっており，しかもこのことがケラチノサイト活性化に重要であるかもしれない。現在，AEW 処置によって変化するタンパク質の同定を行っており，直接神経伸展に関与する因子と細胞間接着因子など神経伸展に当り細胞間の隙間形成と表皮環境に関与するもの，更には，神経因子だけでなく痒みに関与する因子も見出されることが期待される。

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。また、本研究にご協力くださいました当研究室 倉石泰教授、並びに浅川優太、桑園 崇両氏に感謝いたします。

（引用文献）

1）Heyer G, Ulmer FJ, Schmitz J, et al,: Histamine-induced itch and alloknesis (itchy skin) in atopic eczema patients and controls, Acta Derm. Venereol., 75, 348-352, 1995.

2）Simone DA, Alreja M, LaMotte RH,: Psychophysical studies of the itch sensation and itchy skin ("alloknesis") produced by intracutaneous injection of histamine, Somatosens Mot. Res., 8, 271-279, 1991.

3）Tobin D, Nabarro G, Willem A, et al,: Increased number of immunoreactive nerve fibers in atopic dermatitis, J. Allergy Clin. Immunol., 90, 613-622, 1992.

4）Sugiura H, Omoto M, Hirata Y, et al,: Density and fine structure of peripheral nerves in various skin lesions of atopic dermatitis, Arch. Dermatol. Res., 289, 125-131, 1997.

5）Urashima R, Mihara M,: Cutaneous nerves in atopic dermatitis. A histological, immunohistochemical and electron microscopic study, Virchows Arch., 432, 363-370, 1998.

6）Kinkelin I, Motzing S, Koltzenburg M,: Increase in NGF content and nerve fiber sprouting in human allergic contact eczema, Cell Tissue Res,. 302, 31–37, 2000.

7）Miyamoto T, Nojima H, Shinkado T, et al,: Itch-associated response induced by experimental dry skin in mice, Jpn. J. Phamacol., 88, 285–292, 2002.

8）Kuraishi Y, Nagasawa T, Hayashi K, et al,: Scratching behavior induced by pruritogenic but not algesiogenic agents in mice, Eur. J. Phrmacol., 275, 229-233, 1995.

9）Lawson SN, McCarthy PW, Prabhakar E,: Electrophysiological properties of neurons with CGRP-like immunoreactivity in rat dorsal root ganglia, J. Comp. Neurol., 365, 355-366, 1996.

10）Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, et al,: Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. Nat. Genet., 38, 441-446, 2006.

11）Smith FJ, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, et al,: Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. Nat. Genet., 38, 337-342, 2006.

リン脂質代謝酵素ホスホリパーゼ A_2 群の皮膚における発現・機能と脂質メタボロミクス

東京都臨床医学総合研究所

村 上　誠

Phospholipase A_2 (PLA_2) enzymes catalyze the hydrolysis of glycerophospholipids to fatty acids and lysophospholipids and have been implicated in a wide variety of biological events. Of more than 30 PLA_2 enzymes identified in mammals, the secreted PLA_2 ($sPLA_2$) family contains 10 catalytically active enzymes (IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, and XIIA). Although $sPLA_2$s have been implicated in various biological events such as gastrointestinal phospholipid digestion, inflammation, host defense and atherosclerosis, precise functions of individual $sPLA_2$s remain largely unknown. In an effort to elucidate the possible *in vivo* functions of $sPLA_2$s, we generated transgenic mice that overexpressed individual $sPLA_2$ isozymes. We found that transgenic mice overexpressing group X $sPLA_2$ under the control of the β-actin promoter displayed notable skin abnormalities characterized by alopecia, epidermal hyperplasia, hyperkeratosis and sebaceous gland hyperplasia during a period corresponding to the late stage of the initial hair cycle. However, endogenous expression of group X $sPLA_2$ was rather low and confined only to hair follicles entering the anagen phase in wild-type mouse skin. Moreover, K14 promoter-directed, skin-specific transgenic overexpression of group X $sPLA_2$ did not cause skin defects, suggesting that the epidermal abnormality resulting from overexpression of group X transgenic mice in the whole body might result from a secondary effect and not reflect the intrinsic function of this enzyme. We found that another $sPLA_2$ with unknown function, group IIF $sPLA_2$, was highly expressed in the epidermis of wild-type mice and that its expression was markedly elevated in the thickened epidermis of group X $sPLA_2$ transgenic mice, of TPA-treated wild-type mice, and of patients with skin disorders harboring epidermal hyperplasia. Notably, transgenic overexpression of group IIF $sPLA_2$ under either the β-actin or the K14 promoter led to marked skin abnormalities. The alopecic skins of group IIF and X $sPLA_2$ transgenic mice displayed an identical gene expression profile, with increased expression of genes related to terminal differentiation of epidermis and sebaceous glands as well as reduced expression of genes related to hair development. Lipid mass spectrometry revealed that group IIF $sPLA_2$ hydrolyzed particular phosphatidylethanolamine molecular species containing docosahexaenoic acid, which was further converted to the docosanoid protectin D1, in the transgenic skin. These results underscore an unexplored aspect of group IIF $sPLA_2$ as an epidermal $sPLA_2$ participating in skin biology and also suggest that protectin D1, a major group IIF $sPLA_2$ product, is a novel regulator of epidermal homeostasis and pathogenesis.

1．緒　言

分泌性ホスホリパーゼ A_2 ($sPLA_2$)は細胞外に分泌されるグリセロリン脂質脱アシル化酵素の一群であり、哺乳動物では10種類の活性型アイソザイムが同定されている[1)]。しかしながら、各アイソザイムの生体内における機能とその標的基質については、古典的なアイソザイムである $sPLA_2$-IB（膵液の消化酵素）と $sPLA_2$-IIA（炎症刺激により誘導される抗細菌酵素）以外は十分に理解されていない。我々は、$sPLA_2$ の生体内機能を解明する方策のひとつとして、$sPLA_2$ 群の各アイソザイムを過剰発現したトランスジェニックマウスを作出し、その表現型の解析を進めている[2, 3)]。本稿では、脱毛・表皮肥厚の表現型を示す $sPLA_2$-X 全身性トランスジェニックマウスの解析、ならびにこれを通じて新たに浮上してきた新規皮膚特異的 $sPLA_2$ アイソザイム、$sPLA_2$-IIF の皮膚における機能について報告する。

Expression, functions, and lipid metabolomics of phospholipase A_2 enzymes in the skin.

Makoto Murakami

The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science

2．実　験

2－1．全身性および皮膚特異的 $sPLA_2$ トランスジェニックマウスの作出

各 $sPLA_2$ アイソザイムの全長cDNA をトランスジェニックマウス作出用のベクター pCLANL5 に導入した。これを常法にしたがってマウス受精卵に注入し、不活性型 $sPLA_2$ (LNL-$sPLA_2$)を全身に発現するトランスジェニックマウスを作出した[2, 3)]。このマウスを CAG（chiken β-actin promoter）プロモーターまたは K14 プロモーターの制御下に Cre recombinase を発現するトランスジェニックマウスと交配し、活性型 $sPLA_2$ を全身性（以下 CAG-Tg）または皮膚特異的（以下 K14-Tg）に発現するトランスジェニックマウスをそれぞれ得た。

2－2．皮膚の表現型の解析

2－2－1．組織学的所見

トランスジェニックマウスならびにその対照マウスの皮膚を採取し、パラフィン包埋切片を作成した。脱パラフィン後、切片をヘマトキシリン・エオジンで染色し、組織学的所見を観察した。

2－2－2. 免疫染色

上記皮膚切片をパラホルムアルデヒドで固定した後、各種抗体と反応させた。更に Alexa Fluor 645 標識二次抗体とインキュベートした後、DAPI で核染色を行い、LSM510 META 共焦点レーザー顕微鏡（Zeiss）にて蛍光画像を観察した。また、別の切片については、HRP 標識二次抗体と反応させた後、DAB 染色（Dako）を行った。

2－2－3. 遺伝子発現解析

皮膚より RNA を抽出・精製し、電気泳動を行った後、ニトロセルロース膜に転写した。この膜を各種 ^{32}P 標識プローブと反応させ、X 線フィルムに感光させて特異的バンドを検出した。また別の RNA プールについては、High Capacity cDNA Reverse Transcription kit（Applied Biosystems）を用いて逆転写反応を行った後、7300 Real Time PCR System（Applied Biosystems）を用いて定量的RT-PCR 反応を行った。更に、上記RNA を用いて Whole Mouse Genome Oligo Microarray（Agilent）による遺伝子プロファイリング解析を行った。

2－2－4. 脂質質量分析

皮膚より総脂質を抽出し、4000Q-TRAP quadrupole-linear ion trap hybrid mass spectrometer（Applied Biosystems）により脂質成分の網羅的な質量分析を行った[3)]。

3．結　果

3－1. sPLA2-X 全身性トランスジェニックマウスは皮膚異常を発症する

sPLA2-X を全身に過剰発現するトランスジェニックマウスは正常に生まれたが、生後２週目から脱毛が始まり、生後３－４週にかけて無毛状態となった（図１）。この時期はマウスの第一毛周期に相当し、これに先立って sPLA2-X は何らかのプロテアーゼの作用により N 末端のプロペプチドが解裂して活性型に変換していた。sPLA2-X トランスジェニックマウスの出生直後から無毛期にかけての皮膚切片を組織学的に解析した結果、本マウスでは初期毛周期（embryonic hair cycle）における体毛の増殖期（anagen）が短く、それに続く退行期（catagen）と休止期（telogen）が長くなっていることがわかった。また sPLA2-X トランスジェニックマウスでは脱毛に加えて表皮肥厚、皮脂腺肥大、嚢胞形成（Cyst）が顕著であり、表皮分化のホメオスタシスに著しい異常が生じるものと考えられた（図２）。生後 25 日の皮膚におけるリン脂質の変化について脂質質量分析の手法により調べた結果、sPLA2-X トランスジェニックマウスでは高度不飽和脂肪酸（アラキ

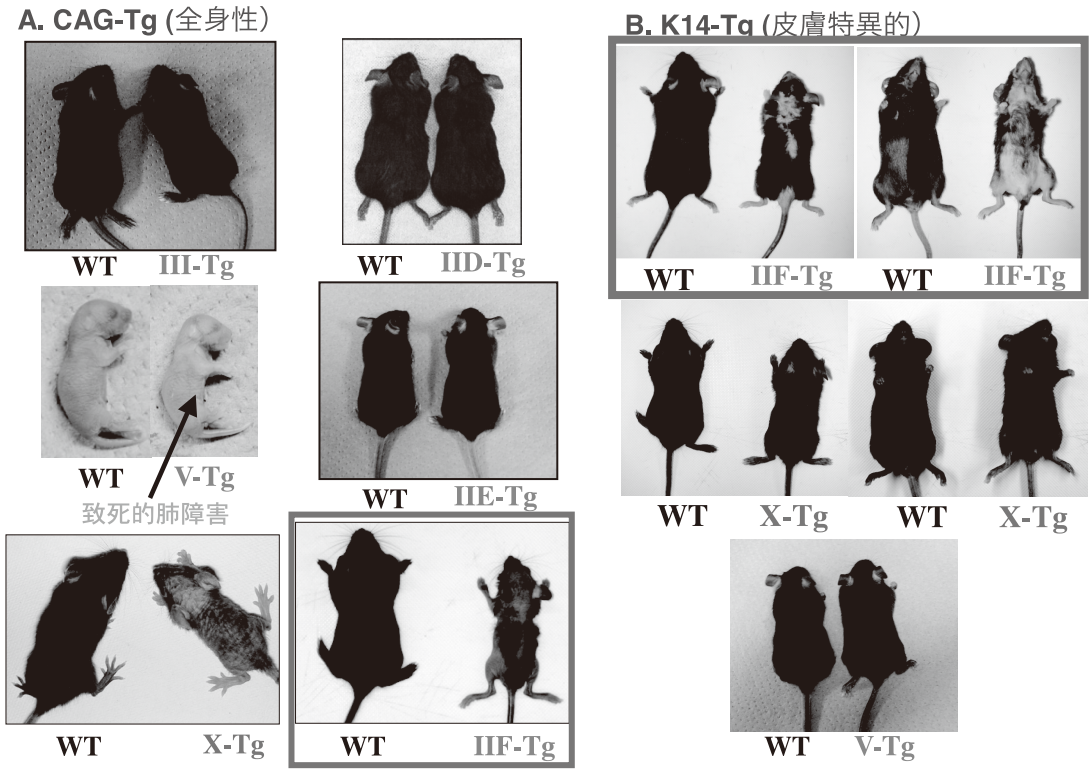


図1　各 sPLA$_2$ アイソザイムの全身性 (A) および皮膚特異的 (B) トランスジェニックマウスの外観
(A) 全身性の過剰発現では、sPLA$_2$-X (X-Tg) と sPLA$_2$-IIF (IIF-Tg) のトランスジェニックマウスが皮膚異常の表現型を示す。sPLA$_2$-V の過剰発現は肺障害による呼吸困難により新生児期に死亡する。(B) 皮膚特異的な過剰発現では、sPLA$_2$-IIF (K14-IIF-Tg) のみが皮膚異常を発症する。

ドン酸、ドコサヘキサエン酸）を含むホスファチジルエタノールアミン（PE）が WT マウスと比べて有意に減少し、これに対応してリゾホスファチジルエタノールアミン（LPE）が増加していた（図３）。また、皮膚の主要アラキドン酸代謝産物である PGE_2 ならびにドコサヘキサエン酸代謝物である Protectin D1 が $sPLA_2$-X トランスジェニッ

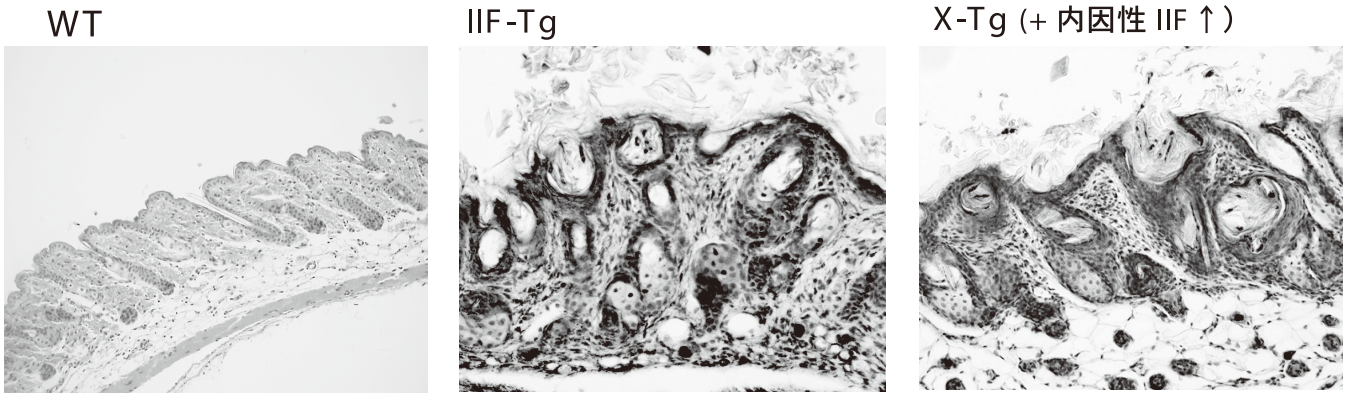


図２　$sPLA_2$-IIF（IIF-Tg）および $sPLA_2$-X（X-Tg）トランスジェニックマウスの皮膚組織所見
野生型マウスと比べて、両トランスジェニックマウスでは表皮肥厚、角質化、毛胞形成異常、皮脂腺肥大が顕著である。

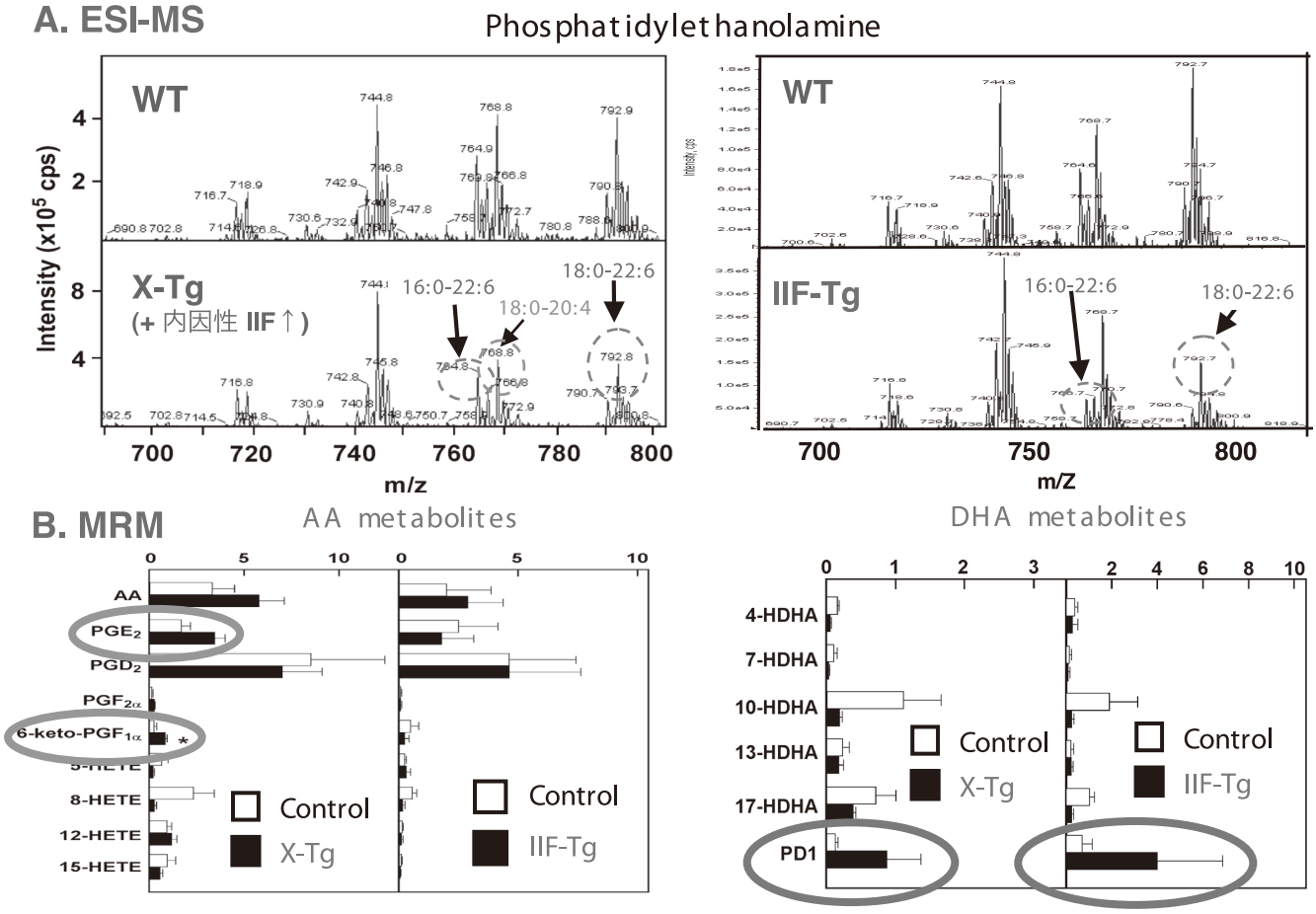


図３　$sPLA_2$-IIF (IIF-Tg) および $sPLA_2$-X (X-Tg) トランスジェニックマウスの皮膚より抽出した脂質の質量分析
(A) ESI-MS 法によるリン脂質の分析。両トランスジェニックマウスにおいてホスファチジルエタノールアミンの組成に変化が見られ、ドコサヘキサエン酸（C22:6）を含む分子種が共通して減少している。$sPLA_2$-X トランスジェニックマウスでは加えてアラキドン酸（C20:4）を含む分子種の減少も見られる。(B) 脂肪酸酸化代謝産物の網羅的解析。$sPLA_2$-X トランスジェニックマウスではアラキドン酸代謝物（AA metabolites）として PGE_2 と 6-keto-$PGF_{1\alpha}$（PGI_2）の増加が見られるが、この変化は $sPLA_2$-IIF トランスジェニックマウスでは観察されない。両トランスジェニックマウスにおいて、ドコサペンタエン酸代謝産物（DHA metabolites）である Protectin D1（PD1）が顕著に増加している。

クマウスで増加していた（図３）。この時の皮膚についてマイクロアレイによる遺伝子プロファイリング解析を行った結果、sPLA$_2$-X トランスジェニックマウスでは表皮上層部の顆粒層および角質層に特有の遺伝子群の発現が顕著に増加しており、表皮基底層から有棘層に分布する遺伝子群の発現に大きな変化は認められなかった。また皮脂腺の肥大に対応して、脂肪酸の生合成や代謝に関わる遺伝子群の発現が sPLA$_2$-X トランスジェニックマウスでは増加していた。一方、毛鞘を構成するケラチン群やケラチン結合タンパク群、およびその発現を制御する転写因子群の発現は sPLA$_2$-X Tg マウスで著しく減少していた（図４）。以上の結果から、sPLA$_2$-X トランスジェニックマウスの皮膚ではリン脂質代謝の過度の進行により皮膚幹細胞の分化バランスが崩れ、分化の方向性が毛胞ではなく表皮・皮脂腺に偏っているものと推察された。

3－2. 内因性 sPLA$_2$-X の発現は体毛増殖期の毛胞に限局している

しかしながら、野生型マウスの皮膚における内在性 sPLA$_2$-X の発現を皮膚全体で評価すると、sPLA$_2$ 群の中で最も発現が低いアイソザイムであることが判明した。免疫組織染色により sPLA$_2$-X の発現を検討した結果、本酵素は体毛増殖期に相関して毛胞外根鞘に限局して発現しており、表皮や皮脂腺などのトランスジェニックマウスで顕著な異常が見られた部位には全く検出されなかった。したがって、内在性 sPLA$_2$-X が体毛の増殖分化の制御に関わっている可能性は現段階で否定はできないが、本質的に表皮や皮脂腺で何らかの機能を担っている可能性は低いものと考えられた。それでは、上述の sPLA$_2$-X トランスジェニックマウスに発症する皮膚異常は何を意味しているのであろうか？

3－3. sPLA$_2$-IIF は皮膚特異的に発現している sPLA$_2$ である

対照マウスと sPLA$_2$-X トランスジェニックマウスの皮膚の間でマイクロアレイ解析を行った結果、トランスジェニックマウスの皮膚において別の sPLA$_2$ アイソザイムである sPLA$_2$-IIF の内因性発現が顕著に上昇していることを発見した（図５）。Northern blotting, 免疫組織化学染色および *in situ* hybridization の結果、sPLA$_2$-IIF は他の sPLA$_2$ アイソザイムよりも圧倒的に皮膚での発現が高く、表皮の上層（顆粒層から角質層）に分布している主要なアイソザイムであることが判明した。また、本酵素の発現は皮膚以外の組織では非常に弱いことから、皮膚特異的な sPLA$_2$ であると考えられた。更に、表皮肥厚を伴う TPA 誘導マウス皮膚炎モデル、更には様々なヒト皮膚疾患において sPLA$_2$-IIF の発現が顕著に増加することがわかった。

3－4. sPLA$_2$-IIF の全身性および皮膚特異的トランスジェニックマウスは皮膚異常を発症する

全種類の sPLA$_2$ の全身性トランスジェニックマウスを樹立したところ、先述の sPLA$_2$-X に加えて、sPLA$_2$-IIF

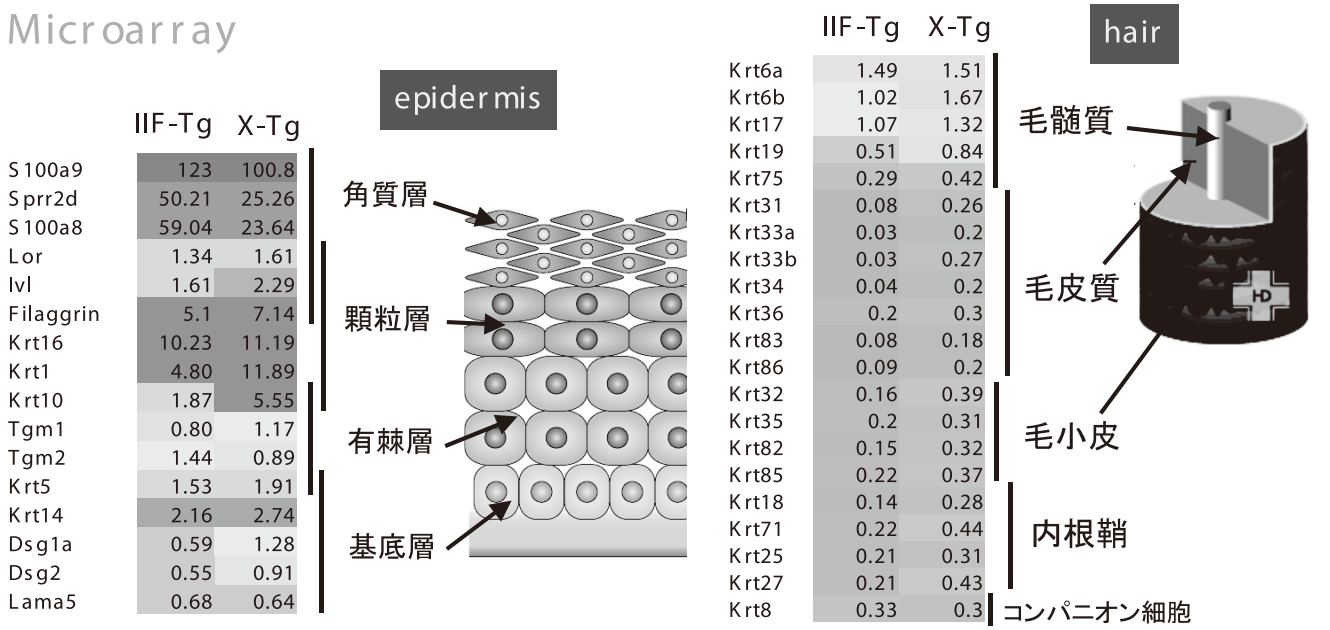


図４　sPLA$_2$-IIF（IIF-Tg）および sPLA$_2$-X（X-Tg）トランスジェニックマウスの皮膚における遺伝子発現のマイクロアレイ解析
数字は野生型マウス皮膚における各遺伝子の発現と比較した値（fold increase）を示す。両トランスジェニックマウスは同じ傾向の遺伝子発現変化を示しており、表皮では顆粒層、角質層の遺伝子発現が相対的に増加し、基底層の遺伝子が減少している。また、毛を構成する遺伝子群のうち、髄質を除く毛皮質、毛小皮、内毛鞘、コンパニオン層の遺伝子発現の減少は顕著である。これらの遺伝子発現変化は、表皮肥厚、角質化、脱毛などの組織学的な所見とほぼ合致している。

のトランスジェニックマウスが皮膚異常を発症することが判明した（図１）。sPLA2-V の全身性トランスジェニックマウスは肺障害により新生児期に死亡するため、皮膚に対する影響を評価できない[2)]。そこで、sPLA2-IIF, -V, -X の３種類のアイソザイムについて、K14 プロモーター制御下に皮膚特異的なトランスジェニックマウスを樹立したところ、K14-sPLA2-IIF トランスジェニックマウスのみが皮膚異常を発症した（図１）。これらの結果と、先述したように全身性 sPLA2-X トランスジェニックマウスの皮膚では内因性 sPLA2-IIF の発現が大きく増加していることを考え合わせると、皮膚の表現型を直接引き起こしているアイソザイムは sPLA2-IIF であると考えられた。なぜ全身性 sPLA2-X トランスジェニックマウスの皮膚において内因性 sPLA2-IIF の発現が上昇するのかについての原因は定かではないが、過剰発現した sPLA2-X が全身性に誘発した何らかのリン脂質代謝異常がトリガーとなって、皮膚における sPLA2-IIF の発現が二次的に増幅されたのではないかと推測している。

sPLA2-X および sPLA2-IIF それぞれの全身性 Tg マウスの皮膚についてマイクロアレイ遺伝子プロファイリングの結果を比較すると、両者はほぼ同一の遺伝子発現パターンを示し、表皮顆粒層から角質層の遺伝子発現の増加と体毛関連遺伝子の発現低下が顕著であった（図４）。また、sPLA2-IIF トランスジェニックマウスの皮膚ではドコサヘキサエン酸を含む PE が選択的に減少し、Protectin D1 の産生が亢進していた（図３）。一方、PGE2 などのアラキドン酸代謝物の増加は sPLA2-IIF トランスジェニックマウスでは認められなかった。したがって、sPLA2-IIF は皮膚の PE からドコサヘキサエン酸を選択的に遊離しているものと考えられた。また sPLA2-X トランスジェニックマウス（＋内因性 sPLA2-IIF の発現増加）ならびに sPLA2-IIF トランスジェニックマウスの共通の所見から、両者で顕

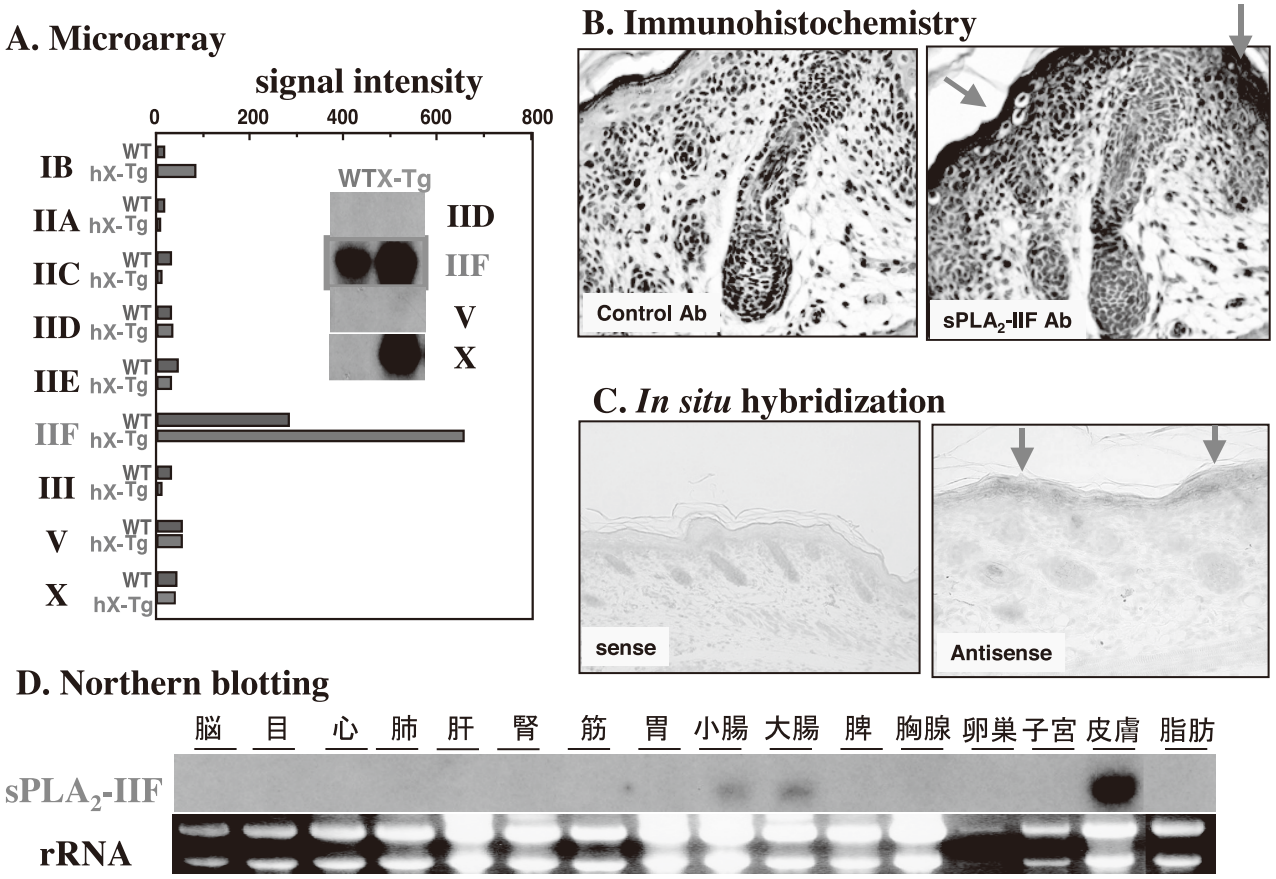


図５　sPLA$_2$-IIF は皮膚の主要な sPLA$_2$ アイソザイムである

(A))sPLA$_2$-X トランスジェニックマウス（X-Tg）とその対照マウス（WT）における sPLA$_2$ 群の発現のマイクロアレイ解析。各酵素のうち sPLA$_2$-IIF が突出して発現が高く、さらに X-Tg マウスにおいて発現が更に増加していることがわかる。（なお、ここで用いている X-Tg マウスはヒト sPLA$_2$-X を発現させており、マイクロアレイではマウスの内因性 sPLA$_2$-X を検出している。）（B & C）野生型マウスの皮膚（P0）における sPLA$_2$-IIF の免疫組織化学染色(B)と *in situ* hybridization(C)。表皮における陽性シグナルが顕著である。(D)野生型マウスの全身臓器（５週齢、雌）における sPLA$_2$-IIF mRNA の発現を Northern blotting により調べた結果、皮膚に非常に強いシグナルが検出され、他の臓器では腸に弱い発現が検出されるのみである。

著に増加していたドコサヘキサエン酸代謝物Protectin D1は皮膚ホメオスタシスを制御する新しい脂質メディエーターである可能性がある。

4．考　察

本研究では、機能未知の $sPLA_2$ アイソザイム全種のトランスジェニックマウスを作出し、皮膚の表現型を中心に解析を行った。$sPLA_2$-X の全身性トランスジェニックマウスは脱毛、表皮肥厚、皮脂腺肥大を伴う激しい皮膚症状を発症した。このことは、$sPLA_2$ によるリン脂質代謝反応の過度の進行が皮膚異常を誘発することを示しているが、内在性 $sPLA_2$-X の皮膚における発現は極めて低く、かつ毛胞に限られていたことから、本酵素が生体内で皮膚の病態に本質的に関わっている可能性は低いものと考えられる。この点については、本来マウスの皮膚に発現していない $sPLA_2$-IIA のトランスジェニックマウスも類似の皮膚異常を発症することが報告されている[4)]。興味深いことに、皮膚特異的な $sPLA_2$-X トランスジェニックマウスでは目立った皮膚の異常所見は観察されなかったことから、$sPLA_2$-X の全身性トランスジェニックマウスで見られる皮膚異常は $sPLA_2$-X が皮膚のリン脂質を分解することに直接起因しているのではなく、皮膚以外の組織で起こっているリン脂質代謝異常（例えばリポタンパク質の過剰分解）の二次的結果を見ている可能性が高い。

$sPLA_2$-X 全身性トランスジェニックマウスの皮膚を解析している過程で、$sPLA_2$-IIF が本来皮膚に発現している主要アイソザイムであることを見出した。これまでに $sPLA_2$-IIF に関する情報は極めて限られており[5, 6)]、皮膚における発現は見過ごされていた。その意味で、「$sPLA_2$-IIF = epidermal $sPLA_2$」の発見は重要であるといえる。$sPLA_2$-IIF の発現は全身性 $sPLA_2$-X トランスジェニックマウスの皮膚で顕著に増加しており、また TPA 誘導マウス皮膚炎モデル、更には表皮肥厚を伴うヒト皮膚疾患でも発現が増加していることが分かった。全身性 $sPLA_2$-IIF トランスジェニックマウスは全身性 $sPLA_2$-X トランスジェニックマウスと類似の皮膚異常を発症した。全身性 $sPLA_2$-X トランスジェニックマウスの皮膚で上昇した内因性 $sPLA_2$-IIF の発現レベルは、全身性 $sPLA_2$-IIF トランスジェニックマウスの皮膚における本酵素の発現レベルに匹敵していた。皮膚のマイクロアレイ解析の結果、両トランスジェニックマウスで生じる遺伝子発現変化はほぼ同一であり、組織学的所見（表皮角質化・皮脂腺異常・脱毛）を説明するものであった。更に、皮膚特異的な $sPLA_2$-IIF トランスジェニックマウスを作出したところ、これも皮膚異常を発症した。これらの結果から、$sPLA_2$-IIF は皮膚のホメオスタシスや病態生理に関わる新しい分子であると考えている。$sPLA_2$-IIF の発現は表皮の上層部（顆粒層と角質層）で特に際立っており、表皮肥厚・角質化との関わりに興味が持たれる。

全身性の $sPLA_2$-X トランスジェニックマウス（内因性 $sPLA_2$-IIF の発現上昇を伴う）ならびに $sPLA_2$-IIF トランスジェニックマウスの双方の皮膚において、ドコサヘキサエン酸を有する PE 分子種が選択的に減少していた。一方、前者のマウスではこれに加えてアラキドン酸含有PE も減少していたが、後者ではこの変化は観察されなかった。したがって、$sPLA_2$-IIF は皮膚においてドコサヘキサエン酸含有PE 分子種に選択的に作用しており、全身性 $sPLA_2$-X トランスジェニックマウスのみに認められたアラキドン酸含有PE の減少とそれに付随する PGE_2 の増加は、人為的に過剰発現した $sPLA_2$-X の付加的作用を反映しているものと思われる。$sPLA_2$ ファミリーは本質的に細胞外に存在するリン脂質に作用すると思われるので、$sPLA_2$-IIF が分布する表皮の顆粒層から角質層に細胞外PE のプールが存在する可能性がある。皮膚におけるドコサヘキサエン酸代謝物の一斉解析を試みた結果、検出された複数の代謝物の中で Protectin D1 の量が全身性の $sPLA_2$-X、$sPLA_2$-IIF 双方のトランスジェニックマウスで顕著に増加していた。このことから、$sPLA_2$-IIF は皮膚において PE →ドコサヘキサエン酸→Protectin D1 の代謝経路を制御している可能性を想定している。Protectin D1 は最近注目を集めている抗炎症性脂質メディエーターのひとつであり、皮膚における機能に関する知見はないが、網膜上皮細胞の細胞死を抑制して生存を延長する活性が報告されていることから[7)]、表皮ケラチノサイトにも類似の効果を及ぼしている可能性がある。この点については今後の検討課題である。

表皮角質は細胞間に脂質フィルムが存在し、これが水分透過性バリアを形成している。このバリア脂質の主成分はセラミドであるが、遊離脂肪酸も 20% 程度存在しており、この存在比の乱れは水分透過性バリアに障害を起こすことが知られている。実際、バリア脂質の合成、輸送、代謝に関わる分子の遺伝子変異（ノックアウトを含む）は表皮に著しい表現型を生じる[8, 9)]。$sPLA_2$ の古典的阻害剤をマウス皮膚に塗布すると皮膚のバリア機能が損なわれ、脂肪酸塗布により回復することが報告されている[10)]。このことから、$sPLA_2$-IIF の作用機序のひとつとして、バリア脂質を形成する脂肪酸の供給に関わっている可能性を考慮する必要がある。今後、$sPLA_2$-IIF ノックアウトマウスの解析を通じて本酵素の皮膚における役割を更に検証する必要があるが、予備的結果として、$sPLA_2$-IIF KO マウスの皮膚はパサパサした触感があり、その超微細構造を電子顕微鏡で観察した結果、表皮角質層の表面が鱗状になる異常を認めている。この所見は角質を満たす脂質バリアに異常があることを示唆しており、$sPLA_2$-IIF が皮膚の病態生理に関わることを更に支持するものである。

謝　辞

本研究を遂行するにあたり、ご支援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致します。

（引用文献）

1）Kudo, I., and Murakami, M. (2002) Phospholipase A_2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69, 3-58

2）Ohtsuki, M., Taketomi, Y., Arata, S., Masuda, S., Ishikawa, Y., Ishii, T., Takanezawa, Y., Aoki, J., Arai, H., Yamamoto, K., Kudo, I., and Murakami. M. (2006) Transgenic expression of group V, but not group X, secreted phospholipase A_2 in mice leads to neonatal lethality because of lung dysfunction. *J. Biol. Chem.* 281, 36420-36433

3）Sato, H., Kato, R., Isogai, Y., Saka, G., Ohtsuki, M., Taketomi, Y., Yamamoto, K., Tsutsumi, K., Yamada, J., Masuda, S., Ishikawa, Y., Ishii, T., Kobayashi, T., Ikeda, K., Taguchi, R., Hatakeyama, S., Hara, S., Kudo, I., Itabe, H., and Murakami, M. (2008) Analyses of group III secreted phospholipase A_2 transgenic mice reveals potential participation of this enzyme in plasma lipoprotein modification, macrophage foam cell formation, and atherosclerosis. *J. Biol. Chem.* 283, 33483-33497

4）Grass, D. S., Felkner, R. H., Chiang, M.-Y., Wallace, R. E., Nevalainen, T. J., Bennett, C. F., and Swanson, M. E. (1996) Expression of human group II PLA_2 in transgenic mice results in epidermal hyperplasia in the absence of inflammatory infiltrate. *J. Clin. Invest.* 97, 2233-2241

5）Valentin, E., Ghomashchi, F., Gelb, M. H., Lazdunski, M., and Lambeau, G. (1999) On the diversity of secreted phospholipases A_2. Cloning, tissue distribution, and functional expression of two novel mouse group II enzymes. *J. Biol. Chem.* 274, 31195-31202

6）Murakami, M., Yoshihara, K., Shimbara, S., Lambeau, G., Gelb, M. H., Singer, A. G., Sawada, M., Inagaki, N., Nagai, H., Ishihara, M., Ishikawa, Y., Ishii, T. and Kudo, I. (2002) Cellular arachidonate-releasing function and inflammation-associated expression of group IIF secretory phospholipase A_2. *J. Biol. Chem.* 277, 19145-19155

7）Schwab, J. M., Chiang, N., Arita, M., and Serhan, C. N. (2007) Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature* 447, 869-874

8）Weserberg, R., Tvrdik, P., Undén, A.-B., Månsson, J.-E., Norlén, L., Jakobsson, A., Holleran, W. H., Elias, P. M., Asadi, A., Flodby, P., Toftgård, R., Capecchi, M. R., and Jacobsson, A. (2004) Role for ELOVL3 and fatty acid chain length in development of hair and skin function. *J. Biol. Chem.* 279, 5621-5629

9）Zheng, Y., Eilertsen, K. J., Ge, L., Zhang, L., Sundberg, J. P., Prouty, S. M., Stenn, K. S., and Parimoo, S. (1999) *Scd1* is expressed in sebaceous glands and is disrupted in the asebia mouse. *Nat. Genet.* 23, 268-270

10）Elias, P. M., Menon, G. K., Grayson, S., and Brown, B. E. (1988) Membrane structural alterations in murine stratum corneum: Relationship to the localization of polar lipids and phospholipases. *J. Invest. Dermatol.* 91, 3-10

紫外線の皮膚慢性毒性に対するサンスクリーン剤の防御効果を高速・高感度に評価する方法の開発

東北大学大学院医学系研究科ゲノム生物学分野

池畑　広伸

Sunscreens are widely used to protect our skin from harmful chronic effects of the sunlight such as photoaging and cancer induction, which are known to result from oxidative and genotoxic effects of the ultraviolet light (UV) included in the sunlight. The ability of sunscreens to prevent those chronic UV toxicities has been assessed using their capacities to suppress sunburn (erythema) after sunlight or UV irradiation, and is evaluated by indices such as sun protection factor (SPF). However, any direct correlation has not been established between the skin inflammation (erythema) and those chronic UV skin toxicities. We developed a rapid and sensitive method to evaluate the protecting ability of sunscreens for those chronic UV effects by assaying mutation and/or DNA damage induction in the skin after UV irradiation, using a transgenic mouse line, Muta Mouse, developed specifically for mutation analysis. Here, we show that the newly developed method is highly useful to evaluate the protection ability of sunscreens against the skin genotoxicity of UV by assaying mutation induction, and can assess their capacity to prevent the photoaging by quantifying oxidative DNA damage. Moreover, we found an inconsistency between the SPF and the mutation-suppressing ability for some of the sunscreens we tested, and those sunscreens had formulations that UV scatterers, instead of absorbers, were main components of their UV protectors. These findings indicate that SPF is not the index appropriate to evaluate the ability of sunscreens to prevent the genotoxicity of UV. We introduced a new index of mutation protection factor (MPF), which can be determined by the method developed here, for the appropriate evaluation of sunscreen's protecting ability against the UV skin genotoxicity.

1．緒　言

日光紫外線の有害作用を防ぐためにサンスクリーン剤は日常的に一般に広く使用されているが、その性能は主に皮膚の日焼け（紅斑反応burningと黒化反応tanning）に基づくSPFやPAといった指数によって評価されている。SPFやPAが高いほど日焼けを防ぐ効果が高いわけだが、紫外線の有害作用には日焼けのような急性のものの他に、皮膚癌（ゲノム毒性）やシミ・しわ（光老化）のような慢性のものもあり、こちらの方が不可逆的で美容・医学的により深刻な影響を皮膚に与える。紅斑・黒化反応と皮膚の癌化・光老化の間には直接的因果関係は認められておらず、SPFやPAが高いからといって、そのサンスクリーン剤が皮膚癌や光老化の予防にも有効と判断できる科学的根拠は乏しい。本研究では個々のサンスクリーン剤についてこのような紫外線の皮膚への慢性毒性に対する抑止性能を直接評価できる指数の開発を試みた。

皮膚癌や光老化は紫外線の皮膚のゲノムや構造に対する直接的（生体高分子の光化学反応）・間接的（活性酸素生成を介した反応）な毒性によることが多くの研究から示されている。紫外線のこうした直接・間接作用はゲノムDNAを傷つけ突然変異を高頻度で誘発することが多くの生物で証明されている。そこでこの突然変異を指標として紫外線の皮膚慢性毒性を高感度で検出できるアッセイ系をマウスで開発し、その有効性を実際のサンスクリーン剤を用いて検証した。通常、慢性毒性の検証には長い試験期間を必要とするが、突然変異を指標とすることにより短期間に検出することが可能となる。また評価用の検体に突然変異検出用トランスジェニックマウスを用いることにより検出法そのものも効率化・迅速化を図った。

Development of a rapid and sensitive method to evaluate the ability of sunscreens for protection of the chronic skin genotoxicity by ultraviolet lights.

Hironobu Ikehata

Department of Cell Biology, Graduate School of Medicine, Tohoku University

2．実　験

2・1　紫外線源

紫外線源としてナローバンドUVB（NB-UVB; Philips TL/01, 308-313 nm, 312 nm peak）とUVA1レーザ（364 nm）を利用した。それぞれ約25-28 W/㎡, 300 W/㎡の線量率で照射した。UVA1レーザは自然科学研究機構基礎生物学研究所に設置されている装置を利用した。線量計としてNB-UVBにはUVP社（米国）のUVX RadiometerとUVX-31 Sensorを、UVA1レーザにはシリコンフォトダイオード（浜松ホトニクス）を使用した。

2・2　トランスジェニックマウスによる紫外線誘発突然変異頻度の解析

突然変異検出用トランスジェニックマウスとしてMutaマウスを用いた[1)]。このマウスはトランスジーンとして大腸菌*lacZ*遺伝子を有し、この遺伝子を突然変異検出マーカとして利用する。*lacZ*トランスジーンはλファージベクタに組み込まれているので、容易にゲノムDNAからファ

ージ粒子として回収できる。

Muta マウスを用いた皮膚における紫外線誘発突然変異の解析法は既に発表済みである[2, 3]。簡単に紹介すると、Muta マウスの背中をバリカンと脱毛クリームを用いて麻酔下で除毛する（除毛範囲：約 3 × 6 ㎠）。3 日後、麻酔下で除毛部皮膚に紫外線照射する。皮膚の突然変異を十分発現させるため照射マウスの飼育を 4 週間続けた後、照射部皮膚を採取する。酵素処理により表皮と真皮に分離後、各組織からゲノム DNA を抽出する。ゲノム DNA から *lacZ* トランスジーンをファージ粒子として回収し、大腸菌に感染させて、*lacZ* 遺伝子の突然変異を検出する。総ファージ数と変異ファージ数より突然変異頻度を計算する。

2・3　サンスクリーン剤

3 社（甲・乙・丙）から発売されている 5 種のサンスクリーン剤（A ～E）を使用した。甲社からは SPF 値の異なる 3 種類のサンスクリーン剤（A, D, E）を選んだ。各サンスクリーン剤の性能及び成分表示を表 1 に示す。

サンスクリーン剤は照射 15 分前に、皮膚脱毛部にマウス 1 頭あたり約 0.2 ㎖を均一に塗布した。

2・4　DNA 損傷の検出・定量

紫外線により誘発される DNA 損傷の検出・定量法は既に発表済み[4]。簡単に説明すると、マウスに紫外線を照射後、直ちに照射部皮膚を採取する。組織内の酵素反応を

表 1　使用サンスクリーン剤

サンスクリーン	A	B	C	D	E
メーカー	甲	乙	丙	甲	甲
SPF	23	24	32	35	50+
PA	++	++	++	++	+++
剤型	クリーム	乳液	乳液（2 層型）	乳液	乳液（2 層型）
表示配合成分 （下線は紫外線吸収剤、太字は紫外線散乱剤を示す。）	水，エタノール，メトキシケイヒ酸エチルヘキシル，DPG，イソノナン酸イソトリデシル，BG，オクチルトリアゾン，セテアリルアルコール，シクロペンタシロキサン，トリメチルシロキシケイ酸，セイヨウハッカ葉エキス，ハトムギエキス，ブドウ葉エキス，BHT，（アクリル酸／アクリル酸アルキル（C10-30））コポリマー，カルボマー，ジエチルアミノヒドロキシベンゾイル安息香酸ヘキシル，ジメチコン，ステアロイルメチルタウリン Na，セテアリルグルコシド，ヒドロキシプロピルメチルセルロース，ポリイソプレン，ポリソルベート 80，メタクリル酸メチルクロスポリマー，水酸化 Na，メチルパラベン，香料	水，メトキシケイヒ酸エチルヘキシル，BG，エチルヘキシルトリアゾン，シクロメチコン，PEG-60 水添ひまし油，ヒアルロン酸 Na，加水分解コラーゲン，アルギニン，スクワラン，ポリクオタニウム -51，トリエチルヘキサノイン，1,2- ヘキサンジオール，セタノール，（アクリレーツ／アクリル酸アルキル（C10-30））クロスポリマー，キサンタンガム，ジエチルアミノヒドロキシベンゾイル安息香酸ヘキシル，フェノキシエタノール，TEA，EDTA-2Na，プロピルパラベン，メチルパラベン	水，エチルヘキサン酸セチル，イソノナン酸エチルヘキシル，**酸化亜鉛**，DPG，シクロペンタシロキサン，ミリスチン酸オクチルドデシル，メトキシケイヒ酸エチルヘキシル，セテスリン酸 Na，ベヘニルアルコール，テトラヘキシルデカン酸アスコルビル，カンゾウ根エキス，ペンタステアリン酸ポリグリセリル -10，ジメチコン，PPG-8 セテス -20，ステアロイル乳酸 Na，ポリシリコーン -14，酢酸トコフェロール，キサンタンガム，セテアリルアルコール，ミリスチン酸，BG，エチドロン酸，BHT，メチルパラベン，プロピルパラベン，フェノキシエタノール，香料	水，シクロメチコン，**酸化亜鉛**，ジメチコン，**酸化チタン**，エタノール，DPG，PEG-9 ポリジメチルシロキシエチルジメチコン，セイヨウハッカ葉エキス，ハトムギエキス，BG，PEG/PPG-19/19 ジメチコン，（ジメチコン／メチコン）コポリマー，シリカ，ステアリン酸，塩化 Na，メチルパラベン，香料，**酸化（Ca/ セリウム）**，水酸化 Al	シクロメチコン，**酸化亜鉛**，水，メトキシケイヒ酸エチルヘキシル，セチルジメチコン，ジメチコン，エタノール，ミネラルオイル，セスキイソステアリン酸ソルビタン，ポリメチルシルセスキオキサン，エチルヘキサン酸セチル，フェニルベンズイミダゾールスルホン酸，イソノナン酸イソトリデシル，TEA，オウゴンエキス，トコフェロール，白金，BG，BHT，グリセリン，ポリアクリル酸 Na，メチコン，ラウリルポリグリセリル -3 ポリジメチルシロキシエチルジメチコン，メチルパラベン，香料，**酸化（Ca/ セリウム）**

止めるため55℃で５分間熱処理した後、表皮・真皮に分離してそれぞれからゲノムDNAを抽出する。このDNAについて、シクロブタン型ピリミジンダイマー（CPD）と6-4型光産物（64PP）はモノクローナル抗体を利用したELISA法により、８ヒドロキシグアニン（8OHdG）はHPLC/ECD法により検出・定量する。

３．結　果

３・１　NB-UVBによる突然変異の誘発動態

サンスクリーン剤の紫外線慢性毒性に対する防御効果の評価を突然変異検出用トランスジェニックマウス実験系（Muta マウス）で試みる前に、紫外線誘発突然変異に対するこの実験系の感度を確認した。サンスクリーン剤の評価に使用する紫外線としてはUVBを利用したが、自然の日光には含まれない短波長UVB成分を出さないNB-UVBランプを光源として用いることにし、NB-UVBランプによってマウス皮膚に誘発される突然変異頻度の線量依存性を解析した。結果は図１に示すとおりになり、真皮では調べた範囲の紫外線量に対しほぼ直線的に突然変異頻度が上昇した。表皮では低線量域（3 kJ/㎡まで）では線量依存的に直線的な変異頻度増加が見られ、その傾きは真皮の４倍程度を示したが、それより大きい線量域では変異頻度の上昇が止まり一定値を示した。こうした表皮・真皮各々に特有の変異誘発動態はブロードバンドUVBランプでも既に報告している[2)]。また3 kJ/㎡以上では皮膚に炎症の誘発が見られ、3 kJ/㎡がNB-UVBに対するマウス皮膚の最小紅斑線量（minimal erythema dose, MED）と見積もられた。

誘発変異頻度を見ると、3 kJ/㎡で表皮では非照射群（約1.2×10^{-4}）の30倍以上、真皮で７倍以上の変異誘発が見られた。10 kJ/㎡では真皮でも20倍以上の誘発が見られた。以上の結果より、我々の使用する実験系はサンスクリーンの性能評価に十分な感度を有すると判断し、最小紅斑線量よりも大きく真皮でも十分な変異誘発の見られる10 kJ/㎡（約３MED）でサンスクリーン剤の評価を行うことにした。

３・２　サンスクリーン剤の紫外線誘発突然変異の抑制効果

SPF表示の異なる３社（甲、乙、丙）５種（A, B, C, D, E）のサンスクリーン剤（詳細は表１参照）について、紫外線による皮膚突然変異誘発に対する防御効果を、Mutaマウスを用いて評価した。結果を図２に示す。サンスクリーン剤はSPFの低いもの２種（A, SPF23; B, 同24）、中程度のもの２種（C, 同32; D, 同35）、高いもの１種（E, 同50+）を選んだ。まずサンスクリーン単独の影響について調べたところ、いずれのサンスクリーン剤も皮膚に対する変異誘発の影響は認められなかった（図２、黒棒）。

次にNB-UVB 10 kJ/㎡照射に対する効果（照射時間は約６分）を調べた。まず皮膚の急性反応であるが、サンスクリーン未塗布のものでは照射２日後より皮膚全体の発赤が出現し、３日目には炎症・むくみが強く現れ、痒みによる掻き傷と思われるものが局所的に認められた。傷の一部は後に潰瘍化し、完治するのに３週間程度を要した。一方、サンスクリーン塗布群ではEを除き、炎症などの変化は照射後４週目まで全く認められなかった。Eでは照射後３日目に皮膚の一部分で軽い炎症が認められたが、照射４日後には消えた。

突然変異誘発に対するサンスクリーンの抑制効果を図２（白棒）に示す。サンスクリーン未塗布のものでは非照射群と比較して表皮で34倍、真皮で20倍の変異誘発が認められた。塗布群ではいずれのサンスクリーン剤でもUVBによる変異誘発の抑制効果が表皮・真皮ともに認められた。しかしその結果は必ずしも表示SPF値とは対応しなかった。最もSPF値の高いサンスクリーンE（SPF50+）では表皮・真皮ともにほぼバックグラウンドレベルまで変異誘発が抑制された。SPF値の低いサンスクリーンA, B（SPF23～24）でも表皮で80～90%の抑制効果を示し、真皮ではほぼバックグラウンドレベルまで抑制された。ところが中程度のSPF値を持つサンスクリーンC, D（SPF32～35）ではA, Bよりも成績が悪く、表皮で70～80%、真皮で80～90%程度の抑制効果であった。特にサンスクリーンCの成績の悪さが目立った。また同じメーカの製品であるAとDの間でもSPFが低い方の変異抑制効果が高いという逆転現象が認められた。

サンスクリーン剤の突然変異誘発に対する抑制効果を

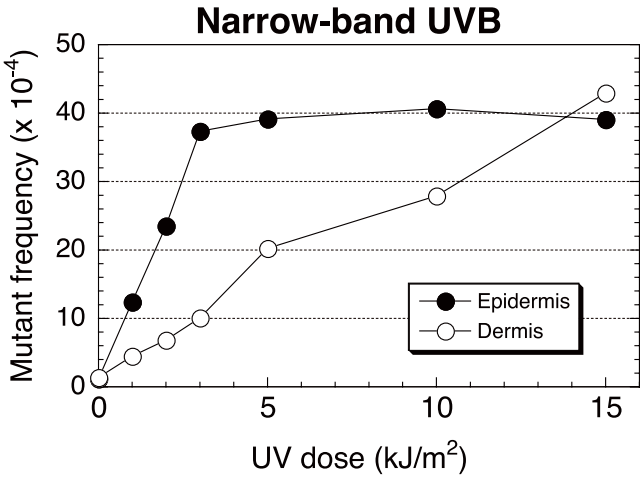


図１　ナローバンドUVBによるマウス皮膚における突然変異誘発動態：
NB-UVBによってマウス皮膚表皮（●）及び真皮（○）で誘発される突然変異頻度の紫外線量依存性を示す。各データポイントはマウス２～３個体の平均。但し15 kJ/㎡のポイントは１個体からのデータ。

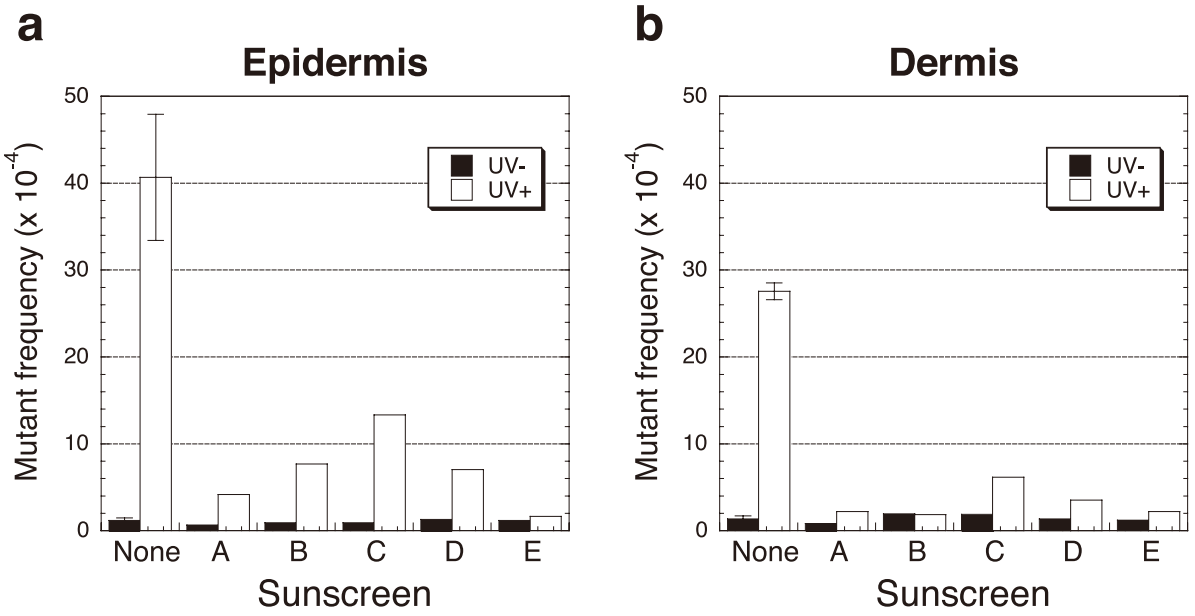


図２　NB-UVB による皮膚突然変異誘発に対するサンスクリーンの抑制効果：
サンスクリーンを塗布したマウス皮膚に NB-UVB 10 kJ/ ㎡を照射し、誘発される突然変異の頻度を表皮(**a**)と真皮(**b**)で調べた。各サンスクリーンの紫外線非照射（黒棒）・照射（白棒）のデータはそれぞれマウス１個体に由来する。サンスクリーンを塗布しない対照群は３個体のデータの平均。

表２　使用サンスクリーン剤の MPF（突然変異防御係数）の見積もり

Sunscreen	SPF	Epidermis			Dermis		
		Repressed MF[a] (×10^{-4})	Effective UV dose (kJ/ ㎡)	MPF[b]	Repressed MF[a] (×10^{-4})	Effective UV dose (kJ/ ㎡)	MPF[b]
A	23	4.18	0.26	39	2.22	0.29	34
B	24	7.68	0.55	18	1.85	0.16	61
C	32	13.33	1.04	10	6.17	1.66	6
D	35	7.03	0.50	20	3.52	0.74	13
E	50+	1.65	0.04	250	2.22	0.29	34

a) MF, mutant frequency.
b) MPF, mutation protection factor; MPF = (Irradiated UV dose) / (Effective UV dose).
The irradiated UV dose in the present study is 10 kJ/㎡.

数値化するため、突然変異防御係数（mutation protection factor, MPF）という新たな指数を導入した。MPF の定義は以下のとおり。

MPF =（照射紫外線量）/（実効紫外線量）

定義により計算した MPF 値を表２に示す。ここで「照射紫外線量」は本実験では 10 kJ/㎡になる。「実効紫外線量」（effective UV dose, 表２）は紫外線照射したサンスクリーン剤塗布群で観測された突然変異頻度を未塗布群で誘発するのに必要な紫外線量のことで、図２の白棒で示される塗布群の変異頻度（repressed MF, 表２）と同じ変異頻度を誘発するのに必要な紫外線量を図１の線量効果曲線を用いて求める。MPF 値が大きいほどサンスクリーン剤の突然変異防御能が高いことになるが、今回の実験は各観測値がマウス１個体からのデータであるので、統計的ばらつきの影響に注意する必要がある。図２の結果から考えて紫外線非照射群とあまり差のない表皮のサンスクリーン E、真皮のサンスクリーン A, B, E の MPF 値は「極めて大きい」という程度に解釈し、計算値を使用しての相互比較はあまり意味がないと思われる。この点に注意して表２の MPF 値を比較しても、やはりサンスクリーン C, D の変異抑制に関する成績がその表示SPF 値の割に低いことが、表皮・真皮ともに明らかに看て取れる。

3・3　酸化ストレスによる影響の検出法の検討

我々が今回使用したトランスジェニックマウスの検出系で紫外線による酸化ストレスの影響を検出できるか確認するため、主に酸化ストレスを誘発すると思われる UVA1 を Muta マウス皮膚に照射し、誘発される突然変異を解析した。UVA1 光源として 364 nm レーザを用い、最大 2.56 MJ/㎡まで照射した。図３c に示すように、表皮・真皮ともにバックグランドレベルの最大３～４倍程度の変異誘発

が認められた。回収された変異トランスジーンのDNA塩基配列変化を解析したところ、誘発された突然変異はほとんどが紫外線型の突然変異で、ピリミジン塩基が連続して並ぶ配列中でのシトシンからチミンへの塩基置換が主であった。酸化ストレスで誘発されるといわれるグアニンからチミンへの塩基置換の誘発は認められず、Mutaマウスによる突然変異アッセイ法では紫外線による酸化ストレスの影響を評価するのは困難であることが明らかとなった。

そこで代替法としてUVA1照射により皮膚ゲノムDNAに生成する酸化型DNA損傷の検出・定量を試みた。その結果、図3aに示すとおり代表的酸化型DNA損傷である8OHdGの照射線量に応じた直線的な生成量増加が表皮・真皮の両方で認められた。生成量に表皮と真皮で差は認められなかった。比較としてCPD, 64PPの生成も解析したところ、CPDのみ照射線量に依存した生成の誘発が表皮・真皮で認められた。この結果より、DNA損傷誘発量を指標とすることにより、紫外線による酸化ストレスに対するサンスクリーン剤の防護効果を評価することが可能であることが示唆された。

4．考　察

4・1　皮膚癌防止効果の評価法の開発

突然変異を指標として、紫外線の慢性毒性のひとつである皮膚癌誘発に対するサンスクリーン剤の防護効果を評価するアッセイ法の開発を、トランスジェニックマウスを利用して行った。その結果、図2のとおり高い感度でサンスクリーンの効果を検出・評価できるアッセイ系であることが確認できた。しかもここで開発した方法で得られた各サンスクリーンの紫外線突然変異誘発の防御能（MPF値で示される）は、表示SPF値とは必ずしも対応しない場合があることが明らかとなった（サンスクリーンC, D）。この結果はサンスクリーンの皮膚癌防御能を正しく評価するには、従来の紅斑反応に基づく方法では不十分であり、今回開発したような方法で直接ゲノム毒性をアッセイする必要があることを示唆している。紫外線の皮膚慢性毒性、特にそのゲノム毒性に対するサンスクリーン剤の防御能を示す新たな評価指数として、突然変異アッセイ法に基づくMPFの導入を提案したい。

4・2　光老化防止効果の評価法の開発

紫外線のもうひとつの慢性毒性である光老化は酸化ストレスの誘発にあるとされているが、今回の研究で突然変異を指標にしてこの酸化ストレスを直接皮膚で検出する試みは成功しなかった。これには、紫外線による突然変異誘発ではCPDなどの紫外線特異的DNA損傷によるものの影響が大き過ぎて酸化ストレスによるものはマスクされ検出されにくいこと、酸化ストレスによるDNA損傷はすぐに修復されて突然変異になりにくいことなどが影響していると推測される。しかしながら本研究により紫外線で酸化型DNA損傷が生成することは確認された（図3a参照）。このことは突然変異ではなく、DNA損傷を指標とすることにより、紫外線の酸化ストレスを評価することが可能であることを示している。紫外線照射直後の皮膚DNA中の酸

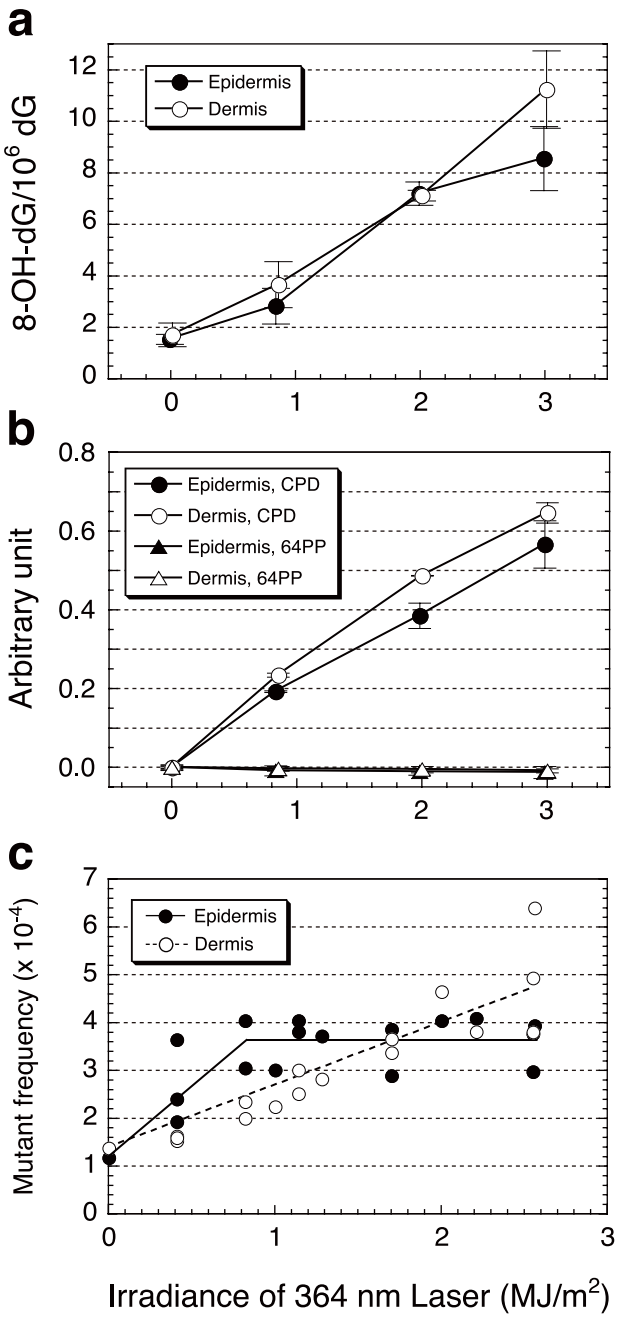


図3　UVA1レーザによるDNA損傷及び突然変異の誘発動態：364 nmレーザ光によりマウス皮膚表皮（●▲）及び真皮（○△）に生成するDNA損傷の誘発動態（**a**, **b**）と突然変異誘発動態（**c**）の線量依存性を示す。**a**: 8ヒドロキシグアニンの誘発動態。**b**: シクロブタン型ピリミジンダイマー（●○）と6-4型光産物（▲△）の誘発動態。DNA損傷誘発動態の各データポイントはマウス2個体の平均値、突然変異誘発動態の各データポイントはマウス1個体からの実測値を示す。

化型DNA 損傷を検出・定量することにより、サンスクリーンの酸化ストレス防御能、即ち光老化防御能をマウス皮膚で評価することが可能と考えられる。

4・3　紫外線の皮膚慢性毒性防御能指数としてのSPF 表示の限界

今回使用したサンスクリーン剤の表示SPF 値から、突然変異誘発抑制能は、（数値的には必ずしも一致しないとしても）少なくとも A, B, C, D, E の順番で高くなると予想していた。しかし実際には SPF 値の低いものの方（サンスクリーン A, B）が、それより高い SPF 値を有するもの（サンスクリーン C）より高い変異誘発防御能を示した。こうした逆転は同じメーカの製品間でも認められた（甲社 A, D）。成績の悪かった中程度の SPF 値を持つサンスクリーン C, D は、紫外線防御剤として散乱剤を主とした組成となっており、他のサンスクリーン剤に比べ紫外線吸収剤の配合が少ない（表１参照）。散乱剤は凝集を起こしやすく、サンスクリーン皮膜内で紫外線防御効果のムラができやすいと言われており、これらのサンスクリーン剤が期待どおりの成績を示さなかったことに影響しているかもしれない。またサンスクリーン C は散乱剤として酸化亜鉛の１種類しか配合されておらず、吸収剤はメトキシケイヒ酸エチルヘキシルの１種類だけでしかもカプセルコーティングされて配合されており、こうした点が特に悪かった実験成績に影響している可能性がある。

その一方で、これら C, D を含む今回テストしたサンスクリーン剤のいずれも、UVB による皮膚炎症の誘発はほぼ完全に抑え込んでおり、突然変異抑制効果の評価結果とは必ずしも一致しなかった。照射した UVB 量はほぼ３MED に相当するので、炎症抑制効果の結果は使用したサンスクリーン剤の表示SPF 値（23 ～ 50+）とよく一致している。しかし突然変異について完全に抑えることができたのはサンスクリーン E だけであり、A ～D のサンスクリーンは表皮で多少の変異誘発が認められた。紅斑反応を誘発する紫外線量には閾値があり、それが一般には MED として知られている訳だが、突然変異や癌などの誘発に必要な紫外線量には閾値はないと考えられている。こうした違いが今回の評価結果の不一致の背後にあると考えられる。皮膚炎症と突然変異に対する防御効果が必ずしも一致しないという結果は、ひとつの重要な事実を明らかにしている。即ち皮膚に炎症（紅斑）は認められなくても、突然変異の誘発は起きていること、即ち将来の皮膚癌発生への変化が蓄積されているということである。

5．総　括

紫外線の皮膚慢性毒性に対するサンスクリーン剤の防御効果を評価するため、突然変異を指標にし、マウス皮膚で直接評価できるアッセイ系の開発を試みた。紫外線の慢性毒性のうち、将来の皮膚癌発生につながる突然変異の抑制効果については、本研究で検討した方法で鋭敏に評価できることを明らかにした。一方もうひとつの慢性毒性である光老化については、酸化ストレスの検出を意図して突然変異の解析を行ったが、酸化ストレスによると思われる変異はほとんど誘発されず、うまく行かなかった。しかしながら照射直後の皮膚ゲノム DNA を利用することにより酸化型DNA 損傷を検出・定量できることが明らかとなり、これを指標にすれば光老化抑制効果の評価が可能であることを示した。

サンスクリーン剤の有する SPF 値と本研究で開発したアッセイ法で得られる突然変異誘発防御係数（MPF）は必ずしも対応しないことを明らかにした。実際に各サンスクリーンは表示どおりに紫外線誘発炎症（紅斑）に対する抑制効果を示したが、完全な炎症防御を示していても SPF50+ のもの以外は突然変異を完全に抑え込むことはできなかった。このように紫外線の皮膚慢性毒性に対する防御能を評価するには、少なくとも皮膚癌防御能に関しては、従来の紅斑反応を指標とした方法では不十分であり、本研究で開発したような皮膚ゲノム毒性（突然変異、DNA 損傷など）を直接指標とする評価法が必要であることが示された。またサンスクリーン剤の配合成分によっては、SPF 値と MPF 値のあいだで紫外線毒性防御能の評価に逆転が起こる可能性があり、特に散乱剤中心の配合の場合は注意する必要があることも示唆された。紫外線の皮膚慢性毒性、特にそのゲノム毒性に対するサンスクリーン剤の防御能を示す新たな評価指数として、突然変異アッセイ法に基づく MPF の導入を提案したい。

（参考文献）

１）Gossen JA, De Leeuw WJF, Tan CHT, *et al*. Efficient rescue of integrated shuttle vectors from transgenic mice: a model for studying mutations *in vivo*. Proc Natl Acad Sci USA 86: 7971-7975, 1989.

２）Ikehata H, Ono T. Mutation induction with UVB in mouse skin epidermis is suppressed in acute high-dose exposure. Mutat Res 508: 41-47, 2002.

３）Ikehata H, Saito Y, Yanase F, *et al*. Frequent recovery of triplet mutations in UVB-exposed skin epidermis of X*pc*-knockout mice. DNA Repair 6: 82-93, 2007.

４）Ikehata H, Kawai K, Komura J, *et al*. UVA1 genotoxicity is mediated not by oxidative damage but by cyclobutane pyrimidine dimers in normal mouse skin. J Invest Dermatol 128: 2289-2296, 2008.

細胞内シグナル PTEN/PI3 キナーゼ経路による白髪化やメラノーマの制御

九州大学生体防御医学研究所 / 秋田大学医学部

鈴 木　聡

PTEN is a tumor suppressor gene inactivated in numerous sporadic cancers, including melanomas. To analyze *Pten* functions in melanocytes, we used the *Cre-loxP* system to delete Pten specifically in murine pigment-producing cells and generated *DctCrePten*$^{flox/flox}$ mice. Half of *DctCrePten*$^{flox/flox}$ mice died shortly after birth with enlargements of the cerebral cortex and hippocampus. Melanocytes were increased in the dermis of perinatal *DctCrePten*$^{flox/flox}$ mice. When the mutants were subjected to repeated depilations, melanocyte stem cells in the bulge of the hair follicle resisted exhaustion and the mice were protected against hair graying. Although spontaneous melanomas did not form in *DctCrePten*$^{flox/flox}$ mice, melanomas developed after carcinogen exposure. *DctCrePten*$^{flox/flox}$ melanocytes were increased in size and exhibited heightened activation of Akt and Erks, increased expression of Bcl-2, and decreased expression of p27^{Kip1}. Our results show that *Pten* is important for the maintenance of melanocyte stem cells and the suppression of melanomagenesis.

1．緒　言

白髪化は老化現象の１つであり、コスメトロジーの分野においては、大きな関心事の１つであることは疑いない。白髪形成は遺伝的要素が強いとされるものの、その分子機序の多くはいまだ不明で、Bcl-2、Mitf、Pax3、Notch、c-Kit、Rab27A が欠損したマウスが白髪になることから、メラノサイト幹細胞の細胞死やメラノサイト分化、メラニン色素の産生・輸送機構が白髪形成に関与する可能性があると考えられている。

PI3 キナーゼ（PI3K）は、EGF、FGF、SCF をはじめとする種々の成長因子やサイトカインによって活性化される。活性化された PI3K は、ホスホイノシチド -4,5- 二燐酸（PIP2）をホスホイノシチド -3,4,5- 三燐酸（PIP3）に変換し、さらに PIP3 は主に下流の PKB/Akt を活性化することによって、アポトーシス抵抗性・細胞増殖亢進・細胞遊走亢進に働く。PTEN は、PIP3 を主な基質とするホスファターゼで、PI3K 経路を負に制御する。

我々は、PTEN 欠損マウスが胎生早期に致死であることを示し､次に PTEN の組織特異的な欠損マウス（PTENflox マウス）を作成することによって、種々の臓器における PTEN/PI3K 経路の機能を解析してきた[1), 2)]。

本研究で我々は PTENflox マウス[3)] と DCT-Cre トランスジェニックマウス[4)] とを交配することにより、メラノサイト特異的PTEN 欠損マウスを作成し、このマウスがメラノサイト幹細胞の枯渇抵抗性から白髪抵抗性に働くこと、また化学発がんによるメラノーマ形成を加速することを見出した[5)]。

Pten/PI3-kinase pathway in melanocytes governs hair graying and melanomagenesis

Akira Suzuki

Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University / Akita University School of Medicine

2．実　験

2－1　メラノサイト特異的PTEN 欠損マウスの作製とメラノサイトの培養：

我々の作製した PTENflox マウスと DCT-Cre Tg マウスとを交配し、メラノサイト特異的PTEN 欠損マウスを作製した。メラノサイト培養細胞はディスパーゼによって採取した皮膚上皮細胞をタイプ I コラーゲン上で、0.5mM DB-cAMP や 10nM endothelin-1 を含有する melanocyte-defined medium（MDM）を用いて 14 日間培養した。

2－2　マウスの頻回脱毛とメラノサイト幹細胞の可視化：

毛髪周期が第二休止期にあるマウスを麻酔して背中の毛を刈り、さらにその後テープを用いて脱毛した。その後約４週後に背中の毛が休止期に入っていることを確かめ、さらに脱毛を５回繰り返した。マウスの皮膚は最後の脱毛後８日目で観察した。

メラノサイト幹細胞の可視化には、c-kit 抗体をマウスの腹腔に投与後[6)]、Dct 抗体で染色する方法を用いた。

2－3　発がん剤投与によるメラノーマの発症：

3 週齢のマウスの背中の毛を剃り、0.5 mg の 7,12-dimethylbenz[a]anthrcene（DMBA）塗布 2 週後、5 μg phorbol-12-myristate 13-acetate（TPA）を週２回、合計 24 週間塗布した。

3．結　果

3－1　メラノサイト特異的PTEN 欠損マウスの作製：

我々は PTEN$^{flox/+}$ マウスと Dct-Cre Tg マウスを用いてメラノサイト特異的PTEN 欠損マウスを作製した。この

マウスでは約70%のメラノサイトでPTENが欠損していた。しかしながら、Dctは胎生期においてメラノサイトのみならず終脳などの神経組織にも発現するために、50%のマウスは脳細胞の膨化による巨脳を呈し、生後2か月以内に死亡した。また生後2か月を超えた残りのマウスも種々の神経症状を呈し、短命であった。

3-2　PTEN欠損による周産期皮膚真皮メラノサイト数の増加と白髪抵抗性：

メラノサイト特異的PTEN欠損マウスでは、周産期における真皮メラノサイトの数が野生型マウスに比し約2倍増えていたが、毛髪色・皮膚色素量・網膜上皮や虹彩の色素量には変化がなく、成体における真皮メラノサイト数にも変化がみられなかった。

ヒトにおいては約10回の毛髪周期のあと(約40歳相当)、白髪が生じることが知られている。しかしながら一般にマウスはヒトと異なり毛髪周期が終了後も毛髪が毛嚢に残り続けることから、マウスの毛嚢には常時複数の毛髪が存在して白髪が明瞭とはならず、これがマウスを用いた白髪研究を困難にしてきた。

我々はメラノサイト特異的PTEN欠損マウスを用いて、頻回脱毛による毛髪色変化を検討したところ、野生型マウスでは頻回脱毛とともに、白髪になるのに対し、PTEN欠損マウスでは頻回脱毛後の白髪形成に抵抗性であった(図1)。

3-3　PTEN欠損による頻回脱毛による皮膚メラノサイト幹細胞の枯渇抵抗性：

メラノサイト幹細胞が維持されないと白髪となることが知られている[7]。またc-kit抗体（ACK2）を投与すると分化したメラノサイトやメラノブラストは個体から消失し、メラノサイト幹細胞だけとなってDCT抗体で可視化できる[6]。またPTENはこれまでに前立腺細胞、神経細胞、肺胞細気管支細胞、始原生殖細胞などにおいて幹細胞数を制御することが報告されている[8]。そこで我々はc-kit抗体を投与して可視化したメラノサイト幹細胞が、頻回脱毛によってどのように変化するかを、野生型マウスとPTEN欠損マウスで検討した。

まずメラノサイト幹細胞数は野生型マウスとPTEN欠損マウスで有意な差は認めない。しかしながら野生型マウスでは頻回脱毛によって皮膚メラノサイト幹細胞数が枯渇してくるのに対して、PTEN欠損マウスでは頻回に脱毛しても、いつまでもメラノサイト幹細胞数が保たれることを見出した（図2）。

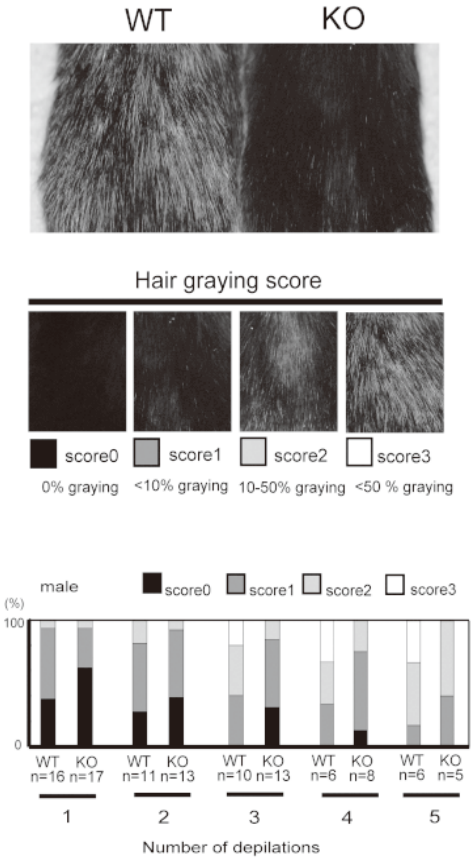


図1　メラノサイト特異的PTEN欠損マウスにみられた白髪抵抗性

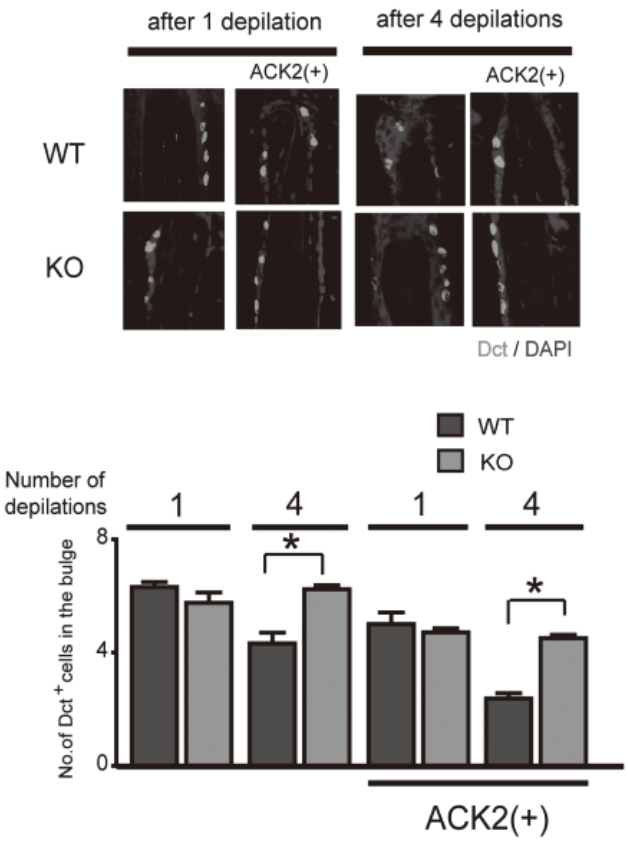


図2　PTEN欠損マウスにみられる、頻回脱毛によるメラノサイト幹細胞の枯渇抵抗性

3－4　PTEN 欠損による発がん剤感受性の亢進：

多くの組織において、PTEN 欠損によってがんが自然発症することから、このマウスを経過観察して自然発症メラノーマがみられるかどうかを検討したが、発症は認められなかった。そこで DMBA+TPA による化学発がんを検討することにした。メラノサイト特異的PTEN 欠損マウスでは発がん剤投与後、野生型マウスと同様の頻度でケラチノサイト由来の乳頭腫が認められ、その頻度に差はなかった。しかしながら PTEN 欠損マウスでは発がん剤投与後 15 週間の観察期間中約 26％に Spindle cell melanoma が認められたのに対し、野生型では２％にメラノーマを認めるのみであった（図３）。

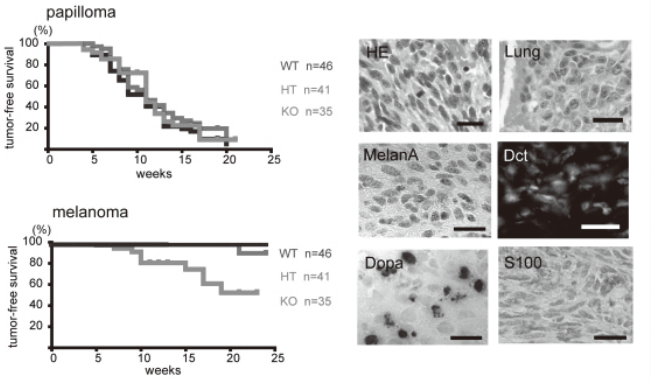


図３　PTEN 欠損マウスにみられる、発がん剤投与によるメラノーマ発症の加速

3－5　PTEN 欠損による細胞学的・生化学的変化：

我々は次にこれらマウスの皮膚から作製した培養メラノサイトを用いて PTEN 欠損によっておこる細胞学的・生化学的変化を検討した。PTEN 欠損培養メラノサイトは細胞の個々のサイズが、野生型に比し、有意に増加していた。

また、これまでメラノサイトの分化やメラニン合成に重要であることが報告されている９分子の発現を比較検討したところ、PTEN 欠損メラノサイトでは Bcl-2 の発現が著しく高値であった。

さらにこの他にも PTEN 欠損メラノサイトでは Akt や ERK の活性亢進、p27 の発現低下が認められた。さらに PTEN 欠損マウスに DMBA+TPA を投与して引き起こされたメラノーマにおいては、ERK の活性化がさらに増加していたが、Akt の活性化は癌化していない PTEN 欠損メラノサイトと同様であった。

４．考　察

PTEN 欠損マウスでは、PTEN の下流の Akt や Erk の活性化、またその下流の p27 の発現低下、Bcl-2 の発現亢進をひきおこすことによってメラノサイト幹細胞は枯渇抵抗性となり、白髪抵抗性になったものと考えられる。実際これらの分子の内Bcl-2 の欠損マウスはメラノサイト幹細胞が維持されず、マウスは第二毛髪周期から白髪を呈し、PTEN 欠損マウスとちょうど反対の発現形を示している[7)]。

PTEN 欠損マウスでは自然発症メラノーマは認められなかったが、発がん物質に対して感受性が亢進していた。これまでにメラノーマ形成に関わるシグナル経路としては Ras-ERK 経路、p16-Rb 経路、p19-p53 経路、PI3K-Akt 経路などがある。しかしながらこれらのどの経路も１つのシグナル経路ではメラノーマ形成はおきず、２つあるいは３つの経路の変異によってはじめてメラノーマ形成がおきると考えられている。PTEN 欠損マウスでは Akt と ERK の活性化が認められ、これら２つの経路は皮膚発がんにおいて相乗的に働くことが示されている。しかしながら PTEN 欠損マウスにメラノーマが発症するには DMBA による Ras 変異によってさらに ERK を活性化する必要があるのであろう。実際PTEN 欠損マウスにおこった化学発がんメラノーマではさらなる ERK の活性化を認めるが、Akt の活性化は化学発がんが見られない PTEN 欠損マウスと同様であった。

我々の研究はメラノサイトにおける PTEN の機能をはじめて解析したものである。また、これまで白髪になる遺伝子改変動物は数多く存在するが、メラノサイト特異的 PTEN 欠損マウスは、はじめての白髪抵抗性モデルマウスであると思われる。

ヒトにおいて白髪は最も容易にわかる加齢現象であり、メラノーマもまた加齢に伴う紫外線や化学物質への暴露によっておこる腫瘍である。本研究は、PTEN やその下流分子は白髪や腫瘍を研究するコスメトロジーやオンコロジー研究者にとって魅力的な分子標的であることを示した。またメラノサイト特異的PTEN 欠損マウスはヒトの白髪やメラノーマへの新規治療を考えるにあたって優れた動物モデルとなろう。

（引用文献）

１）Suzuki A, Nakano T, Mak TW ほか：Portrait of PTEN :Messages from Mutant Mice. Cancer Science, 9, 209-213, 2008

２）Knobbe CB, Lapin V, Suzuki A ほか：The role of PTEN in development, physiology and tumorigenesis in mouse models: a tissue-by-tissue survey. Oncogene, 27, 5398-5415, 2008

3）Suzuki A, Yamaguchi MT, Ohteki T ほか：T Cell-Specific Loss of Pten Leads to Defects in Central and Peripheral Tolerance. Immunity, 14, 523-534, 2001

４）Guyonneau L, Rossier A, Richard C ほか：Expression of Cre recombinase in pigment cells. Pigment Cell Research, 15, 305-309, 2002

5）Inoue-Narita T, Hamada K, Sasaki T ほか：Pten deficiency in melanocytes results in resistance to hair graying and susceptibility to carcinogen-induced melanomagenesis. Cancer Research 68, 5760-5768, 2008
6）Botchkareva NV, Khlgatian M, Longley BJ ほか：SCF/c-kit signaling is required for cyclic regeneration of the hair pigmentation unit. Faseb Journal, 15, 645-658, 2001
7）Nishimura EK, Granter SR, Fisher DE ほか：Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. Science 307, 720-724, 2005
8）Yanagi S, Kishimoto H, Kawahara K ほか：Pten controls lung morphogenesis, bronchioalveolar stem cells, and onset of lung adenocarcinomas. Journal of Clinical Investigation, 117, 2929, 2007

非線形光学現象を利用した
真皮コラーゲン分布 in vivo 可視化法の開発

大阪大学大学院基礎工学研究科
荒 木　勉

Second-harmonic-generation (SHG) microscopy has been applied to observe collagen fiber structure in porcine dermis. Collagen fiber structure in the samples is clearly visualized as high contrast SHG images using a sample-scanning SHG microscope based on a transmission configuration equipped with a mode-locked Ti:sapphire laser. From comparison of the SHG images between the transmission detection mode and reflection one, we have confirmed that the reflection-mode SHG imaging is also applicable to observation of the collagen fiber structure in the porcine dermis. In order to apply the SHG measurement to human skin, we have used a mode-locked Cr:forsterite laser with a long wavelength and compared its imaging characteristics with that of the Ti: sapphire laser-based microscope for the measurement of dermal collagen fiber. The results indicate that the applicability of the Cr:forsterite laser-based SHG microscope for in vivo imaging of human skin.

1．緒　言

真皮は皮膚の張り・弾性・水分保有の機能に深く関与しており、その主成分はコラーゲンである。したがって、皮膚の形態的及び機能的特性を決定する上でコラーゲンが重要な役割を果たしているといえる。日常生活においても化粧過や過度の日照によって光老化が引きおこされるなど皮膚は様々な刺激にさらされており、これら刺激によって真皮性状は変化すると思われる。このような真皮コラーゲンの構造異常や構造的変化を観察することは、皮膚性状を探るだけでなく皮膚疾患に関する情報を得る上でもきわめて重要と考えられることから、真皮コラーゲンの変化を迅速にモニターするための診断技術が皮膚科学の分野で強く望まれている。そこで我々はこれまで生体計測ではほとんど用いられることの無かった非線形光学現象と超高速光技術を積極的に導入することで、真皮コラーゲン分布の in vivo 可視化を試みる。

フェムト秒（10^{-15} 秒）オーダーの超短パルスレーザー光を生体組織に照射すると、光電場とコラーゲン分子の非線形相互作用によって、入射レーザー光の半波長（あるいは２倍の周波数）の光が第２高調波発生光（生体SHG 光）として発生する[1)]。皮膚組織の場合、コラーゲンは真皮のみに豊富に含まれ（含有量 70%）、表皮および皮下組織にはほとんど含まれないことに注目すると、真皮コラーゲンの分布情報を特異的に抽出する手段として、生体SHG 光が有効であると考えられる[2)]。これまでにも、生体SHG 光を用いた皮膚疾病診断[3)] や真皮コラーゲン配向計測[4)] が提案されているが、真皮コラーゲンの詳細な構造分布測定ついてはほとんど報告されていない。またレーザー光のヒト皮膚への影響についての検討も皆無である。そこで本研究では、はじめにブタ真皮コラーゲンの詳細な構造分布測定を行い、その結果をもとにヒト皮膚測定への応用の可能性について考察する。

Visualization of in vivo dermal collagen fiber distribution by non-linear optical effect

Tsutomu Araki

Graduate School of Engineering Science, Osaka University, Machikaneyama, Toyonaka, Osaka 560-8531

2．実　験

コラーゲンの基本構造はトロポコラーゲン（コラーゲン分子）であり、これが規則的に順次集合して階層的に太くなっていく。トロポコラーゲンは光波長オーダーで非中心対称性構造をとり、２次の非線形光学特性を有している。そのため、非常に高い瞬時ピークパワーを有するフェムト秒パルスレーザー光をコラーゲンに照射すると、非位相整合型SHG 発生過程を介して[5)]、SHG 光が特異的に発生する。特にコラーゲンは真皮のみに局在しているので SHG 光を用いることにより真皮コラーゲン構造の選択的計測が可能になる。また、その後方散乱光を検出することで表皮越しに生体SHG 光を取得し、in situ 観察が可能となる。

図１に実験装置を示す。光源にはモード同期チタン・サファイアレーザー（Ti:S レーザー、中心波長 800nm、パルス幅 100fs、繰り返し周波数 80MHz）を用いた。レーザービームは、ガルバノミラー（GM）とリレーレンズ光学系（RL1, RL2）を経た後、対物レンズ（OL）でサンプル照射することにより生体SHG 光（中心波長 400nm）を発生させる。反射配置計測とするため、生体SHG 光の後方散乱成分を同じ対物レンズで集光し、ハーモニックセパレータ（HS, 反射波長 400nm）と青色透過フィルター（F, 透過波長=300-500nm）で抽出した後、光電子増倍管（PMT）で検出を行う。なお、基本は反射光学配置であるが、透過型の光学配置へも随時転換できるようにしている。さらに自動ステージによるサンプル走査あるいはガルバノミラーによるビーム走査を用いて、SHG イメージング計測を行った。本システムの面内分解能と深さ分解能はそれぞれ

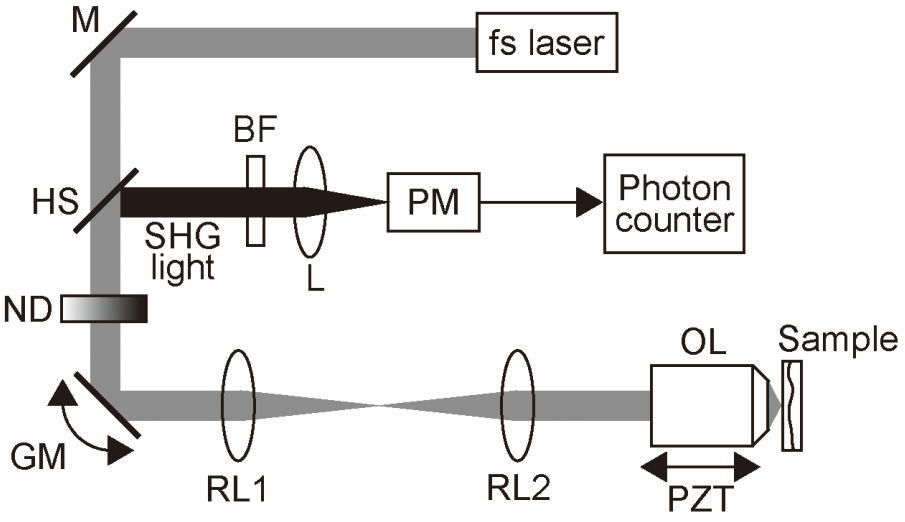


図１　実験装
M：ミラー、ND：減光フィルター、BF：ブルーパスフィルター、HS：ハーモニックセパレーター、GM：ガルバノミラー、L：レンズ、RL：リレーレンズ、OL：対物レンズ、PM：光電子増倍管

1.5μm と 14μm である。

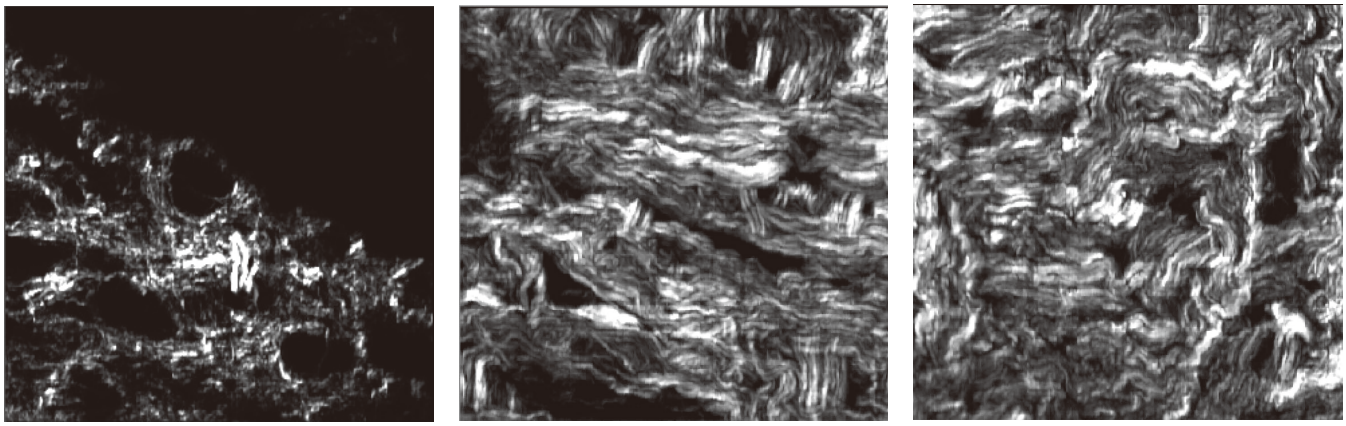
サンプルには、様々な動物の中で比較的ヒト皮膚に類似した構造を有する市販ブタ皮膚（Yucatan Micropig、米国チャールズ・リバー社）の背中部分を用いた。採取された皮膚組織は表皮剥離後OCT コンパウンド（サクラファインテックジャパン社）で包埋された後、液体窒素で凍結され保存される。このような凍結豚真皮組織ブロック（厚さ３㎜）を解凍しサンプルとして用いた。透過型光学系で測定する場合、凍結皮膚組織ブロックをミクロトームによって皮膚表面と平行方向に連続スライスすることにより、各皮膚深さでの切片サンプル（厚さ 16μm）を作成した。

３．結果と考察

3. 1　組織切片の SHG イメージング

組織の詳細を知るため、はじめに空間的、時間的に焦点の変化しないステージスキャンにより切片サンプルの透過SHG イメージングを行った。ここでは、真皮上層（乳頭層付近）、真皮中層（網状層上部）及び真皮下層（網状層下部）をそれぞれ測定した。得られた SHG イメージ（400μm×400μm）を図２に示す。この結果を見るとコラーゲン線維分布が高コントラストな SHG イメージとして可視化できていることが分かる。特に真皮上層部では、非常にキメの細かいコラーゲン線維が密に分布している様子が分かる。これらの像を HE 染色光顕像と比較し考察した。図２(a)で表皮が真皮に落ち込んだ表皮突起部分は、表皮がコラーゲンを含有していないため、SHG 光の全く検出されない丸い領域として現われている。真皮中層部では、比較的太いコラーゲン線維が直交方向にゆるやかに交叉した網状分布が部分的に確認できた。しかし真皮下層部では、網状のコラーゲン線維分布は確認できなかった。また、真皮各層で SHG イメージを比較すると、乳頭層と網状層ではコラーゲン線維分布の相違が確認できたが、網状層上部と下部では明確な相違は確認できなかった。

in vivo 計測への拡張を考慮した場合、反射配置が現実的であるが、信号強度が小さくなり SN 比の劣化が懸念される。そこで実用性を検討するため、反射配置に光学系をアレンジし、豚真皮組織ブロックの深さ分解SHG イメージング計測を行った。ここでは皮膚の非接触リモート計測という観点からドライの対物レンズを用い、入射レーザーパワーを 30mW に固定して測定を行った。さらに in vivo 計測を目指す点から、測定時間の短縮は必須であり、今回



(a)　(b)　(c)

図２　ブタ皮膚切片試料の SHG 画像（画像サイズ：400μm× 400μm）
(a)真皮上層、(b)真皮中層、(c)真皮下層

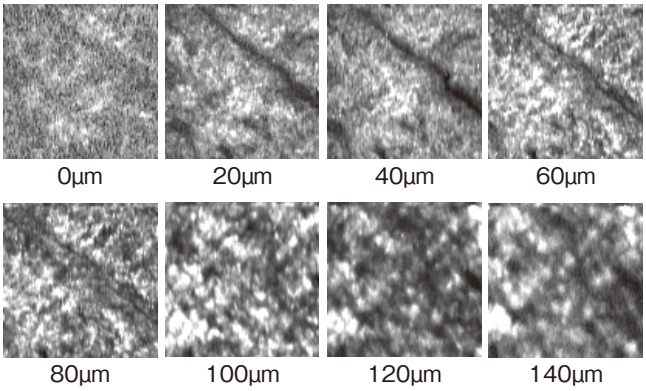


図３　豚真皮ブロック試料の反射 SHG 画像（画像サイズ：100μm×100μm）

の測定はビームスキャンモードで計測を行った。図３は各測定深度（20μm 毎）で得られた SHG イメージ（100μm ×100μm）を示している。反射配置における測定SN 比の低下によりイメージが若干ぼけているが、オプティカル・セクショニングされた SHG イメージが連続的に変化している様子が確認できる。しかしながら、実際の応用計測を考慮した場合、現在の測定可能深度ではまだ十分とは言えない。

3. 2　長波長レーザーによる測定深度の向上

以上実施した測定においては 800nm のレーザーを用い、400nm の青色 SHG 光を得ていた。このような青色光は生体内多重散乱を受けやすい波長帯に位置しており、散乱による信号減衰が測定可能深度を制限している。したがって 150μm より深部の画像は極めて不明瞭であった。一般に多重散乱効果は波長の 4 乗に反比例するため、レーザー波長を長波長化することで得られる赤色SHG 光が測定可能深度の向上に有効である。このような点を踏まえて波長 800nm の Ti:S レーザーの代わりに、フェムト秒モード同期クロム・フォルステライトレーザー（Cr:F レーザー、中心波長 1250nm）と油浸対物レンズを用いたシステムを使用し、両レーザーの測定能を比較した。ここでは豚皮を測定資料として、表面から 50μm ごとに深さ 350μm までの SHG 画像を取得した。レーザーパワーは試料面上でいずれも 40mW に設定した。1 画面にあたりの試料の大きさは 400×400μm であり、1 画面あたりの取得時間を 10 秒にした。図４に測定結果を示す。この図からも明らかなように Cr:F レーザーを使用することで 300μm まで鮮明な画像が得られており、レーザーの長波長化の有効性が確認できた。

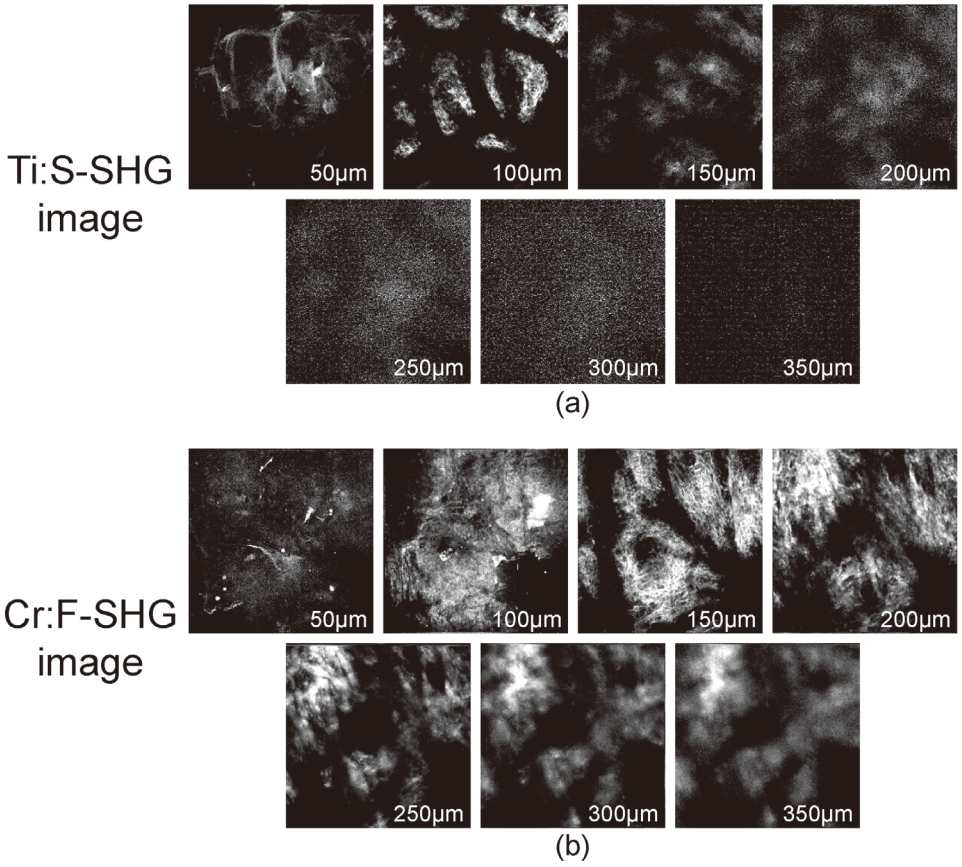


図４　深さ方向に 20μm ステップで分解した豚真皮ブロックの反射 SHG 画像（画像サイズ：100μm×100μm）.

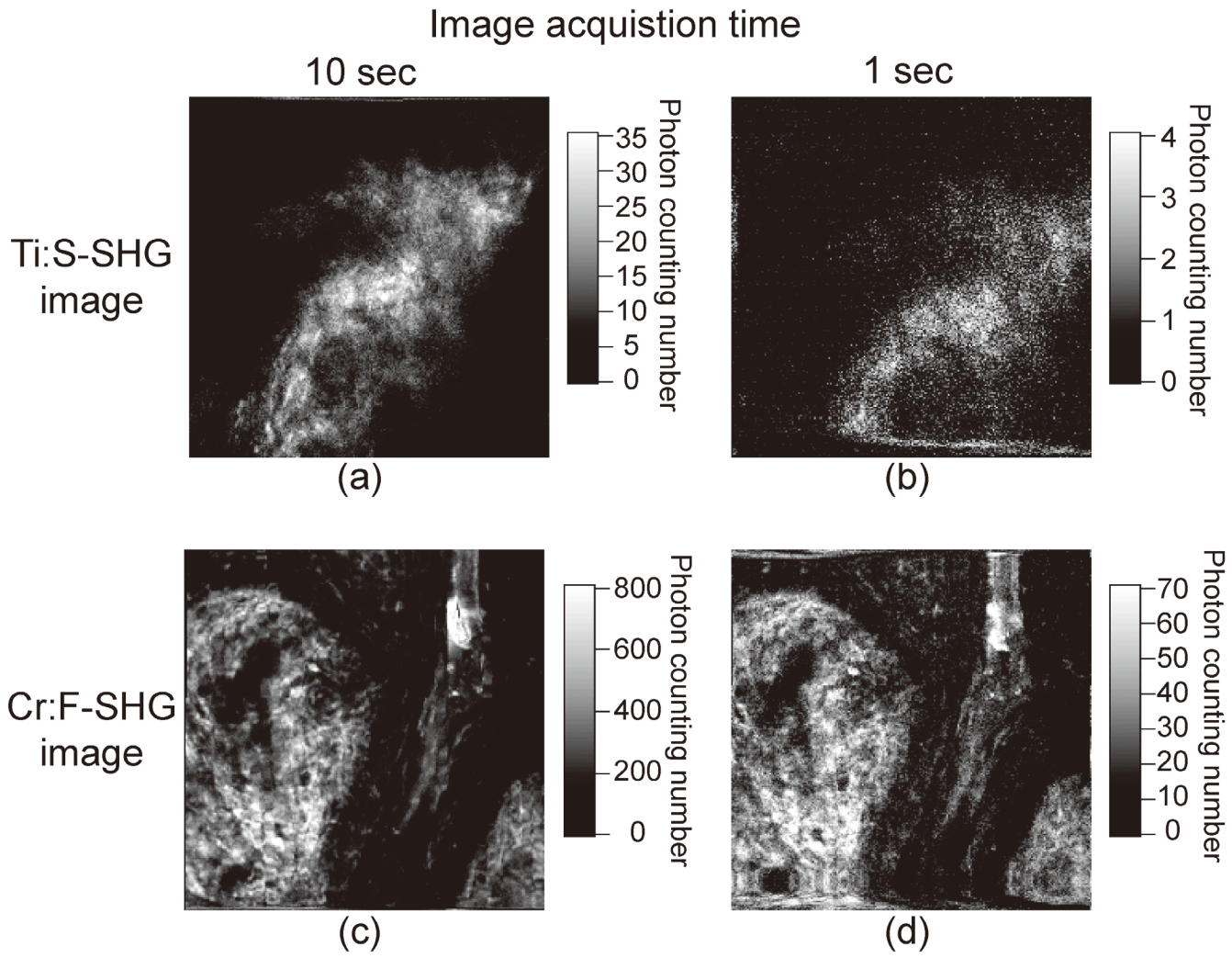


図６　Ti:S レーザーと Cr:F レーザーによる SHG 画像の比較(2)
深さ 140μm における豚真皮ブロックの反射 SHG 画像（画像サイズ：200μm×200μm）.Ti:S レーザーによる画像（a：10 秒で取得、b：1 秒で取得）、Cr:F レーザーによる画像（c：10 秒で取得、d：1 秒で取得）

3. 3　ヒトを対象とする in vivo 測定への可能性

ヒトに対する測定で必要なことは安全性の確保と迅速性である。Cr:F レーザーを用いた計測では 1 画面あたり 10 秒を要しており、数画面の取得には 1 分程度必要となる。体動の影響をなくするにはさらなる時間短縮が望まれるが、それに伴う SN 比の劣化が懸念される。そこで実用性を検討するため、200μm×200μm の画面を 1 秒で取得し、10 秒で取得したものと比較した。この結果を図 5 に示すが、1 秒の取得時間でも SN 比の大きな劣化はなく、実用性に問題はないことを確認した。

次に、Cr:F レーザー光が皮膚へ及ぼすダメージについて検討する。Cr:F レーザー光に関してこれまでに、120mW の光をタマネギ切片の細胞壁に 10 分間照射しても細胞壁の破壊は認められなかったとする報告[6]、100mW の光をゼブラフィッシュの胚へ 12 時間照射しても正常な幼魚に成長したとする報告[7]、150mW の光をハムスターの口腔部へ 3 時間照射しても細胞の壊死は観測されないとした報告[8] などがある。我々が提唱する装置では Cr:F レーザー照射光を 40mW に設定し、照射時間も 10 秒程度であるため、測定時における被験者への光照射エネルギーは上記報告例における場合に比べて格段に小さい。したがって皮膚へのダメージは無視できると思われる。

4．総　括

本報告では、生体SHG イメージングが真皮コラーゲン分布を抽出する手段として有効であることを示した。高コントラスト・高空間分解な透過型SHG イメージをもとに、真皮各層の切片サンプルにおけるコラーゲン線維の詳細な 2 次元分布が調査できた。また、反射型深さ分解SHG イメージングによってコラーゲン線維分布のオプティカル・セクショニング像が得られ、本法が 3 次元的コラーゲン構

造の in vivo 計測に有効な手法であることを確認した。このような計測手法を利用することにより基礎研究だけでなく、臨床応用にも耐えうる真皮コラーゲン診断法が可能となり、様々な皮膚科学分野への応用が期待できる。

謝　辞

本研究に対して助成を賜った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）S. Roth and I. Freund: Optical second-harmonic scattering in rat-tail tendon, Biopolymers **20**,1271-1290, 1981.

2）伊藤誠啓，安井武史，荒木勉，山下豊信，國澤直美，高橋元次：SHG（第２高調波発生光）顕微鏡を用いた真皮コラーゲン線維分布の観察、光学、 **1** 35-40, 2007.

3）K. König and I. Riemann: High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution, J. Biomed. Opt., **8**, 432-439, 2003.

4）T. Yasui, Y. Tohno, and T. Araki: Characterization of collagen orientation in human dermis by two-dimensional second-harmonic-generation polarimetry, J. Biomed. Opt., **9**, 259-264, 2004.

5）B. M. Kim, J. Eichler, and L. B. Da Silva: Frequency doubling of ultrashort laser pulses in biological tissues, Appl. Opt., **38**, 7145-7150, 1999.

6）I.-H. Chen, S.-W. Chu, C.-K. Sun, P.-C. Cheng, and B.-L. Lin: Wavelength dependent damage in biological multi-photon confocal microscopy: a micro-spectroscopic comparison between femtosecond Ti:sapphire and Cr:forsterite laser sources, Opt. Quantum. Electron, **34**, 1251-1266, 2002.

7）S.-W. Chu, S.-Y. Chen, T.-H. Tsai, T.-M. Liu, C.-Y. Lin, H.-J. Tsai, and C.-K. Sun, In vivo developmental biology study using noninvasive multi-harmonic generation microscopy, Opt. Express, **11**, 3093-3099, 2003.

8）S.-P. Tai, W.-J. Lee, D.-B. Shieh, P.-C. Wu, H.-Y. Huang, C.-H. Yu, and C.-K. Sun: In vivo optical biopsy of hamster oral cavity with epi-third-harmonic-generation microscopy, Opt. Express, **14**, 6178-6187, 2006.

低分子量 G 蛋白質 Rab27A による メラノソーム輸送制御メカニズムの解明

東北大学大学院生命科学研究科
伊 藤　敬

Rab27A is responsible for melanosome transport in melanocytes tethering melanosome to myosin Va, an actin-dependent motor protein, through Slac2-a/Melanophilin. For understanding the precise mechanism of melanosome transport, it is important to clarify how Rab27A is activated/inactivated. Furthermore, the regulatory mechanism of Rab27A is also important based on the clinical standpoint, since mutation in Rab27A causes an inherited disease of human "Griscelli syndrome". Exhaustive screening among TBC domain containing proteins revealed that EPI64 is the GAP (GTPase activating protein; inactivator) of Rab27A. EPI64 inactivates Rab27A in vivo and in vitro and overexpression of EPI64 results in melanosome aggregation in melan-a cells probably through intactivation of Rab27A. Interestingly, there are two close homologues of EPI64, FLJ13130 and mFLJ00332, in mammalian genome including human. Therefore, I investigated functional difference among these three TBC proteins.

As a consequence, I found that FLJ13130 and mFLJ00332 have other functions than EPI64. FLJ13130 inactivated and mislocalized Rab3A in PC12 cells. mFLJ00332 was involved in formation of immunological synapse in T cells. Furthermore, in vitro GAP assay revealed that FLJ13130 exhibited somewhat broad specificity and that mFLJ00332 showed specific GAP activity toward Rab35. These data indicate that there are significant differences even in the closest members among TBC proteins. These basic data will be useful for application to medical care like a drug discovery against EPI64.

1．緒　言

日本人の女性に対する美意識の中では、黒い髪、白い肌というものが古来より重要であった。現代女性にとってもシミのない白い肌を保つことが美容の中でもっとも重要なことであると言っても過言ではないだろう。また男女問わず、白髪は老化を感じさせるために敬遠される傾向が強い。このように日本人の美的感覚の中で重要な役割を担っている「黒」という色はメラニンと呼ばれる色素がもとになっている（実際にはメラニン色素は黒色一種類ではないが）。このメラニン色素の合成や、いかに肌や髪を黒くするかのメカニズムの解明はコスメトロジーの観点から非常に重要なテーマであると考えられる。

肌であれ、髪の毛であれ、メラニン色素は色素細胞という特殊化された細胞によって産生されている。例えば皮膚では、肌を構成している角質化細胞へ色素細胞からメラニン色素が受け渡されることで皮膚全体が黒色化する。実は、皮膚における色素細胞は、数としては少なく表皮全体の２～３%のみであるため、角質化細胞へのメラニン色素の受け渡しという過程は肌の色を決めるのに重要な役割を果たしている。

色素細胞中でメラニン色素は、メラノソームと呼ばれるオルガネラの中で合成され、貯蔵される。メラノソームは核周辺で作られ、その成熟とともにメラニン色素を蓄え黒色化し、細胞周辺部に輸送される。輸送されたメラノソームはそのまま角質化細胞へ受け渡されると考えられている。逆にこの輸送が行なわれないと、メラニン色素は角質化細胞に受け渡されない[1)]。現在、この輸送の過程には低分子量Ｇタンパク質である Rab27A が関与することが明らかになっており、実際、Rab27A 変異マウスや、Rab27A に変異を持つヒト遺伝病Griscelli 症候群の患者から単離した色素細胞では、メラノソームが核周辺に凝集するという表現型が観察され、その結果、毛髪の白色化が起こると考えられている[2, 3)]。以上のような背景から、筆者は Rab27A によるメラノソーム輸送制御メカニズムを明らかにすることで、コスメトロジーに貢献できると考えた。

一般的に、低分子量Ｇ蛋白質の不活性化は GAP（GTPase-activating　potein）が GTP の加水分解を促進することで、活性化は GEF（guanine nucleotide exchang factor）が結合している GDP を GTP に変換することで行うと考えられているが、Rab27A に関してはそのどちらもこれまで同定されていなかった（図１）。筆者は、色素細胞内での Rab27A の不活性化がメラノソーム輸送を阻害することに着目し、メラノソーム輸送阻害を指標にヒトゲノム上に存在する Rab-GAP/TBC タンパク質の網羅的スクリーニングを行った。そして、このスクリーニングで同定された TBC タンパク質の一つ（TBC1D10A/EPI64、以下 EPI64 と表記）が、実際に Rab27A を不活性化していることを明らかにし、Rab27A の GAP を世界で初めて同定することに成功した[4)]。

ヒトを含むほ乳類では EPI64 と極めて相同性の高いタ

Analysis of melanosome transport mechanism by small GTPase Rab27A

Takashi Itoh

Department of Developmental Biology and Neurosciences, Graduated School of Life Sciences, Tohoku University

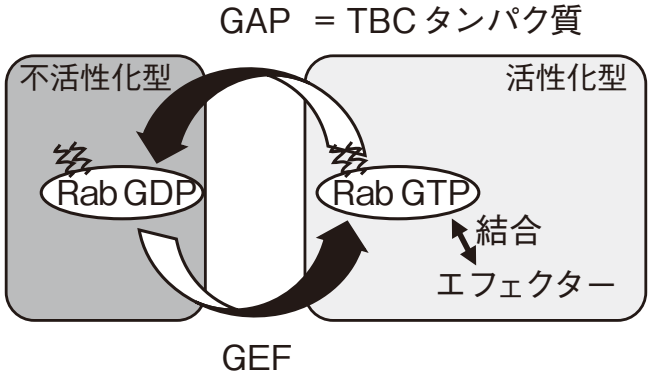


図１　Rab の機能メカニズムと活性サイクル
Rab の活性化サイクルをその制御因子を含めて示した。多くの低分子量 G 蛋白質に共通するメカニズムであるが、Rab は GTP 型と GDP 型をサイクルする事で膜輸送を制御している。GEF によって活性化した Rab はエフェクターと結合する事により機能を果たす。機能を果たした Rab は適切なタイミングで GAP により不活性化を受ける。現在、Rab-GAP は TBC タンパク質によって担われていると考えられている。

ンパク質 TBC1D10B/FLJ13130（以下 FLJ13130 と表記）、TBC1D10C/mFLJ00332（以下 mFLJ00332 と表記）が存在し、TBC1D10 ファミリーを形成している（図２）。この３者は TBC ドメインにおいて非常に高い相同性を持ち、全体の構造も良く似ているため、機能的な相関の可能性が示唆された。実際、筆者は FLJ13130 が Rab27A を不活性化し、メラノソーム輸送を負に制御していることを示している[4)]。しかしながら、最近他のグループから、複数の Rab に対して活性を持つ TBC タンパク質が報告されており[5)]、EPI64, FLJ13130、mFLJ00332 が Rab27A の不活性化という共通の機能のみならず、それぞれが更に個別の機能を持つという可能性が考えられた。そこで、TBC1D10 ファミリーのそれぞれのタンパク質に関して機能解析を行なった。それぞれ独立した仕事なっているが、興味深いデータが得られたので報告したい。

２．実　験

２．１　免疫沈降

T7 タグや FLAG タグを融合した目的タンパク質を発現するベクターを構築、アカゲザル由来の COS-7 細胞に導入することでタンパク質を発現させた。細胞抽出液から、T7 タグを認識する抗体が付加されたアガロースビーズにより T7 タグ付きタンパク質を沈降させ、同時に FLAG タグ付きタンパク質が沈降してくるかどうかでタンパク質同士の結合の有無を評価した。

２．２　細胞観察

EGFP や mRFP を融合した目的タンパク質を発現するベクターを構築、melan-a、PC12、Jurkat 細胞に導入した。細胞をパラフォルムアルデヒドで固定後、Rab3、Rab27 への特異的抗体で染色を行ない、共焦点顕微鏡にて観察を行なった。

２．３　in vitro GAP assay

大腸菌用発現ベクターに Rab 遺伝子を導入したベクターを構築。Rab タンパク質を大腸菌から精製して用いた。TBC タンパク質は COS-7 細胞に発現させたものを精製して用いた。Rab タンパク質に放射性ラベルされた GTP（[α-32P] GTP）を結合させ、その後 TBC タンパク質と反応させた。反応後の GTP/GDP の量比を TLC 展開を行なうことで定量し、GAP 活性の有無を評価した。

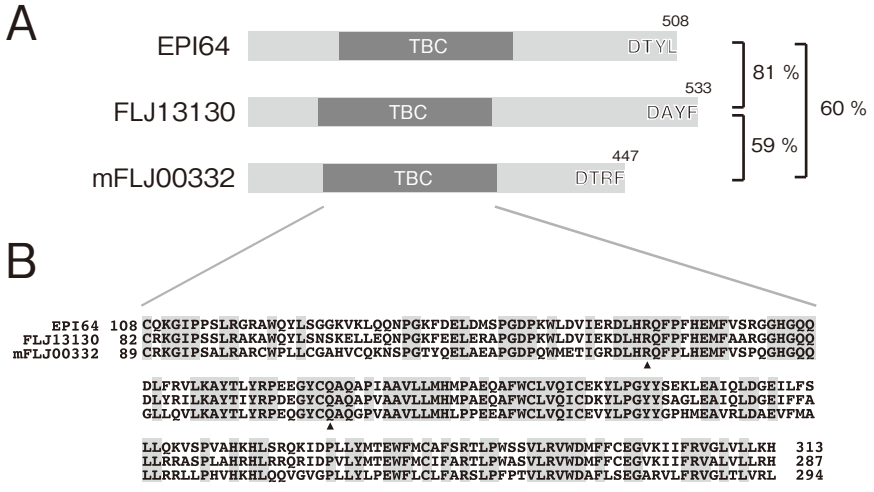


図２　TBC1D10 ファミリーの構造と配列の比較
A. それぞれのタンパク質の構造と同一のアミノ酸の割合を示している。
B. TBC ドメインの配列のアライメント。活性中心であることが明らかになっているアルギニンとグルタミンを矢印で示してある。

3．結　果

3．1　TBC1D10A/EPI64

メラノソームの核周辺への凝集というRab27Aの機能不全による表現型を指標に、TBCタンパク質の中でRab27Aを不活性化するものを探索した結果、EPI64、FLJ13130を含む5種類のTBCタンパク質の過剰発現によってメラノソームの凝集が引き起こされた（図３Ａ）。この中から実際にRab27Aに活性を示すものを明らかにするために、共発現させた時に活性化型のRab27Aの量を減少させるものを調べてみると、EPI64とFLJ13130を共発現している時のみ活性型Rab27Aの量が顕著に減少していることが明らかになった。実際、EPI64とFLJ13130を用いてin vitro GAP assayを行なうとin vitroにおいてもEPI64とFLJ13130はRab27AにGAP活性を示した（図３Ｂ）。これらのデータは、過剰発現されたEPI64とFLJ13130はRab27Aを不活性化する事によってメラノソーム凝集を引き起こしていると考えられる。EPI64は実際にmelan-a細胞に発現していることが確認されたため、実際の細胞内での輸送にもEPI64が機能している可能性は高いと考えている[4)]。

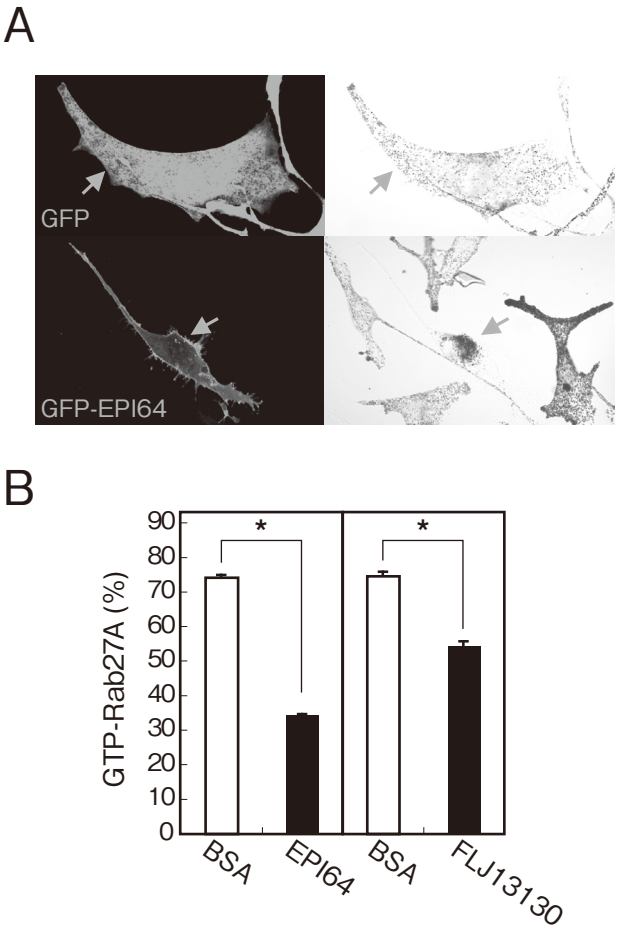


図３　TBC1D10A/EPI64

A. GFP（上）もしくはGFP-EPI64（下）を発現させたmelan-a細胞を示している。GFPを発現させた細胞では何も発現させていない細胞と同様に、メラノソームは細胞辺縁部に輸送されているが、GFP-EPI64を発現した細胞では核周辺に凝集しているメラノソームが観察される。

B. In vitro GAP assayの結果。コントロール（白）に対し、TBCタンパク質を加えることで（黒）GTP型のRabの量がどのように変化するかを調べている。EPI64とFLJ13130はRab27AにGAP活性を示した。

3．2　TBC1D10B/FLJ13130

Rab3AはRab27Aと近縁のRabであり、一次構造や局在などが他のRabと比べて非常に似ている。しかしながら、Rab3Aに関してはTBCタンパク質に属するGAPが同定されていなかった。そこで、EPI64を同定したものと同様の手法を用いて、Rab3Aに対するGAPの同定を試みた。副腎髄質クロマフィン細胞由来のPC12細胞では、Rab3Aは細胞突起先端の小胞上に局在し（図４Ａ）、ホルモン分泌を制御している。Rab3Aに活性を持つTBCタンパク質を過剰発現させることで、このRab3Aの局在が失われるものがあれば、そのTBCタンパク質はRab3AのGAPであると考えられる。実際にスクリーニングを行なった結果、FLJ13130の発現によりRab3Aの局在が失われることが明らかになった（図４Ａ）。興味深いことにmFLJ00332は若干の活性を持つものの、EPI64の発現ではRab3Aの局在は全く影響を受けなかった（図４Ａ）。In vitro GAP assayの結果、FLJ13130は弱いもののRab3AへのGAP活性を示した（図４Ｂ）。しかしながら他のRab（Rab22A、Rab27A、Rab35）にも活性を示し、上記したようにRab27Aへの活性がもっとも強かった。FLJ13130はEPI64やmFLJ00332（後述）と異なり、かなり緩い特異性を持った酵素であると考えられ、更に色素細胞とは異なる細胞でも機能していることが示唆された[6)]。

3．3　TBC1D10C/mFLJ00332

ヒトを病気から守る免疫システムのなかで、Ｔ細胞と抗原提示細胞とが形成する免疫シナプスはＴ細胞が抗原を認識する過程で重要な役割を果たしている。この免疫シナプスを形成するためには極性に従った膜輸送が必要となるが、それに関わるRabやRab-GAPはまだ同定されていなかった。mFLJ00332は末梢血Ｔ細胞に豊富に発現しており、その候補と考えられた。また、mFLJ00332の標的を同定するため、mFLJ00332と共局在を示すRabを探索したところ、Rab35がもっとも強く共局在するRabだと同定され、実際、mFLJ00332がRab35にGAP活性を持つことを明らかにすることが出来た。またこの時、mFLJ00332はRab3AやRab27AにはGAP活性を示さなかった（図５）。更に、mFLJ00332やドミナントネガティブ型のRab35の発現やmFLJ00332のノックダウンによって、免疫シナプスの形成が著しく阻害され、同時に、リサ

イクリング経路の機能障害、極性を持った TCR（T Cell Receptor）の輸送に異常を示したことなどから、Rab35 と mFLJ00332 は T 細胞においてリサイクリング経路を制御することで免疫シナプスの形成に寄与していると考えられた[7]。

4．考　察

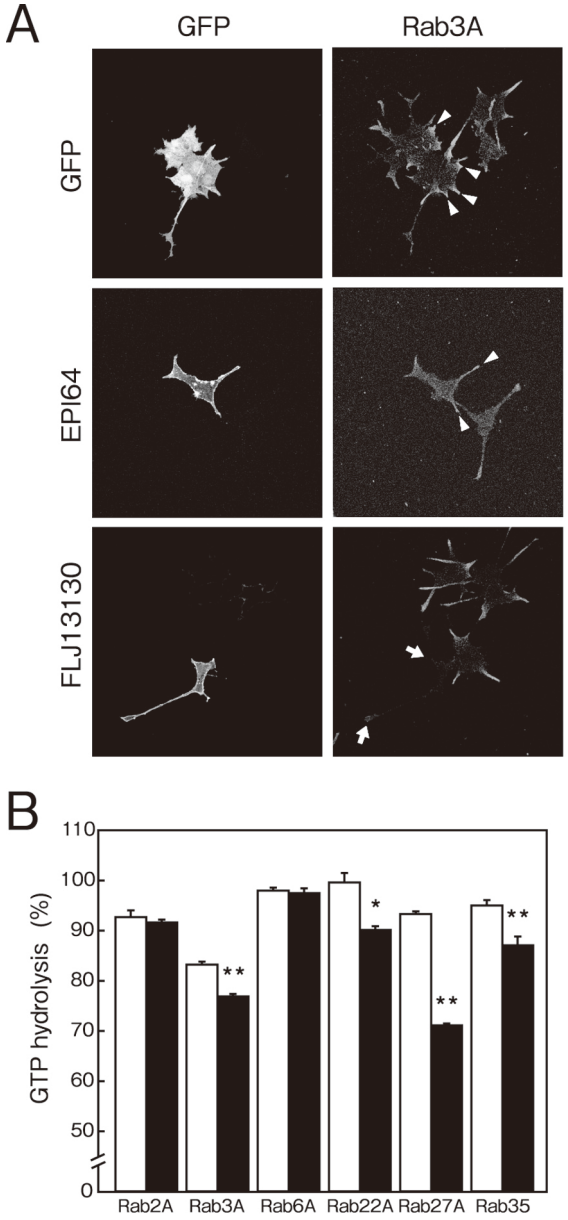


図４　TBC1D10B/FLJ13130

A. GFP（上）、GFP-EPI64（中）、GFP-FLJ13130（下）を発現させた PC12 細胞を示している。細胞は固定後、抗 Rab3A 抗体を用いて染色している。GFP もしくは GFP-EPI64 が発現している細胞では、Rab3A の突起先端における局在は影響を受けていないが（矢頭）、GFP-FLJ13130 が発現している細胞では、突起先端の Rab3A のシグナルが有為に減少していることが観察される（矢印）。

B. In vitro GAP assay の結果。コントロール（白）に対し、TBC タンパク質を加えることで（黒）GTP 型の Rab の量がどのように変化するかを調べている。FLJ13130 は複数の Rab に対し GAP 活性を示した。

以上のデータから TBC1D10 ファミリーのメンバーがそれぞれに固有の機能を持つということが示された。

T 細胞で機能することが明らかになった mFLJ00332 は、Rab27A に GAP 活性を持たなかったが、実際、mFLJ00332 を Melan-a 細胞に発現させてもメラノソームの凝集は起こらず、EPI64 と機能的に離れていることが示唆された。一方、FLJ13130 は EPI64 と同様メラノソーム輸送にも関与するが、ホルモン分泌を制御する Rab3A の局在の制御という EPI64 には無い機能も持つことが明らかになった（図６ A）。構造の極めて良く似た TBC タンパク質間でこのような機能のバリエーションが存在することは想像しておらず、非常に驚く結果となった。

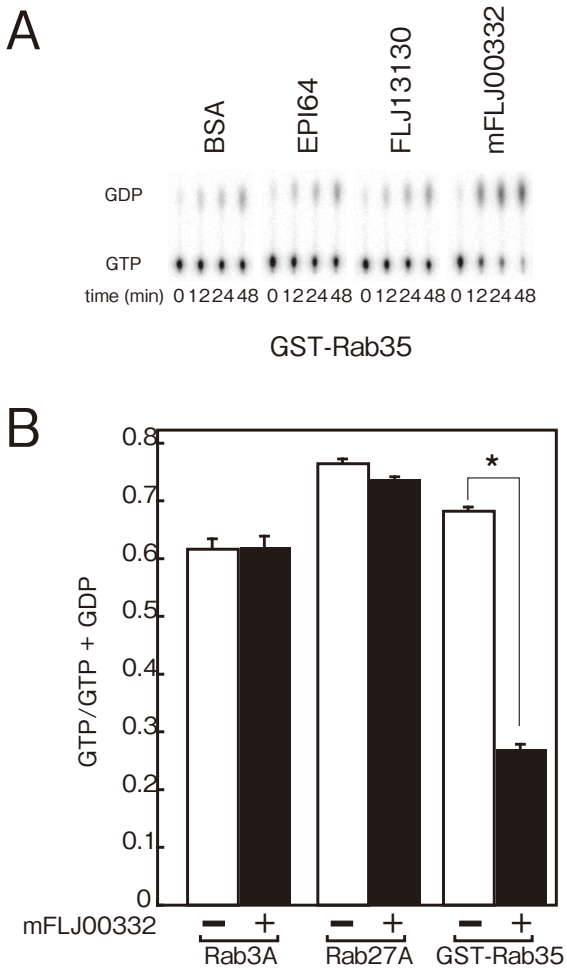


図５　TBC1D10C/mFLJ00332

A. Rab35 に結合していたグアニンヌクレオチドを TLC 展開したもの。下のドットが GTP、上のドットが GDP の量を示している。時間経過とともに GDP の量が増えて行くが、mFLJ00332 が存在している場合の方がその速度が速い。つまり、mFLJ00332 は Rab35 に対して GAP 活性を示している。

B. In vitro GAP assay の結果。コントロール (白) に対し、TBC タンパク質を加えることで (黒) GTP 型の Rab の量がどのように変化するかを調べている。mFLJ13130 は Rab3A, Rab27A には GAP 活性を示さなかった。

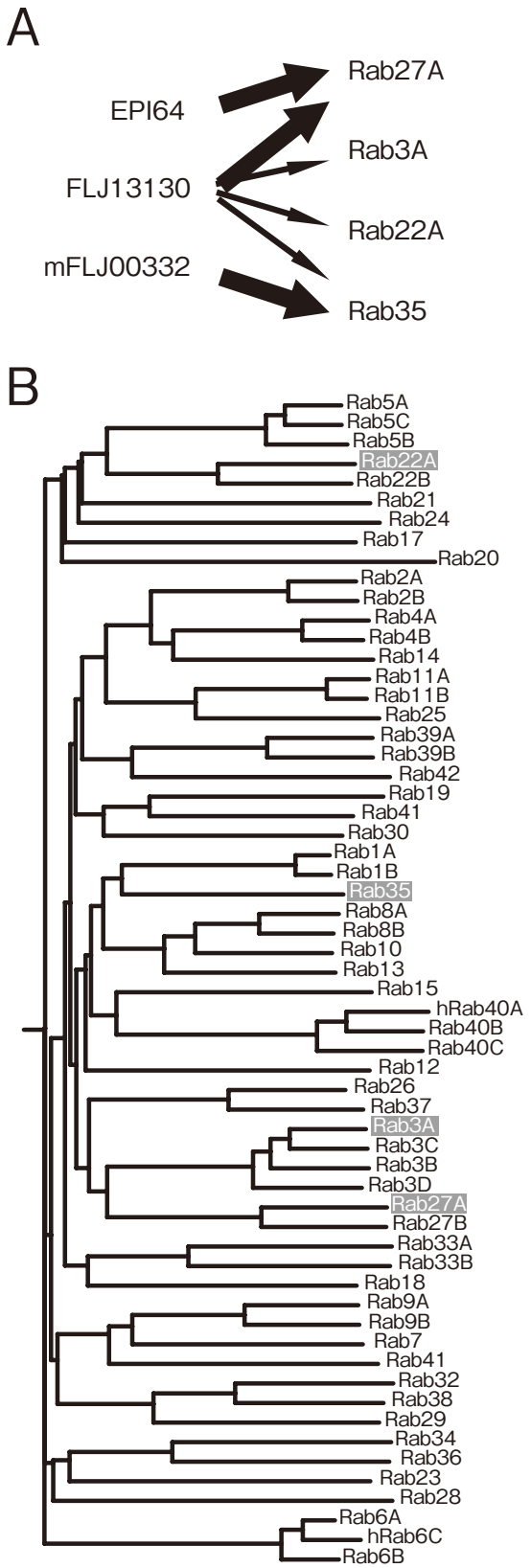


図6　まとめ

A. TBC1D10 ファミリーと Rab の関係図。EPI64 と mFLJ00332 は強い特異性を持つが、FLJ13130 は緩い特異性を示した。

B. Rab の系統樹。Rab3A、Rab22A、Rab27A、Rab35 を反転して示してある。Rab3A と Rab27A は近縁だが、Rab22A、Rab35 はかなり離れたところに位置する。

この結果はどのようなことを意味しているのであろうか。上記した T 細胞や PC12 細胞、色素細胞での機能はかなりかけ離れているため、TBC1D10 ファミリーがどのように機能分化してきたのかは現在のところ全く明らかでない。しかし、想像の域を出ないが、以下のようなモデルも考えられるのでないだろうか。Rab3A、Rab27A は色素細胞では細胞膜付近のメラノソームに局在するが、神経細胞ではシナプス小胞、特に細胞膜直下で放出を待つ小胞に局在している。Rab22A は細胞膜からエンドサイトーシスにより形成されるリサイクリングエンドソームに局在することが明らかになっている。Rab35 は数多く存在する Rab の中で唯一細胞膜に局在するという特徴を持つ。アミノ酸配列上はかなり異なる Rab 達であるが、細胞膜付近で機能すると言う共通項が存在する。TBC1D10 ファミリーは細胞膜付近の Rab を不活性化するように進化してきており、その後それぞれの Rab への特異性を獲得したのかもしれない。

Rab3A、Rab27A は Rab の中でも非常に配列も似ているが、Rab22A や Rab35 に関しては離れたサブファミリーに属している（図 6 B）。TBC ドメインの配列によって分類された TBC1D10 ファミリーのメンバーがこれほど広い範囲の Rab に対して活性を示すのは生化学的観点から非常に興味深く、TBC ドメインにおけるわずかな塩基の違いが、その基質特異性に大きな違いをもたらしている可能性がある。TBC ドメイン -Rab 複合体の立体構造を解き明かすことでその基質認識への普遍的なメカニズムが明らかになるかもしれない。

5．総　括

本研究成果のコスメトロジーへの応用の一つは、EPI64 を標的とした創薬であろう。EPI64 を活性化することで、メラノソームの輸送を阻害し、美白へとつなげることが出来る。EPI64 を標的にするような薬剤の作成を行なう場合、極めて相同性の高い分子である FLJ13130 や mFLJ00332 の機能を同様に活性化、または不活性化する可能性が十分に考えられる。今回示したデータの通り、FLJ13130 や mFLJ00332 は EPI64 にはない Rab3A、Rab35 を標的とするような機能を持つ。そのため、FLJ13130 や mFLJ00332 の活性に影響を与えないと言うセカンドスクリーニングを行なう事によって、事前に副作用の危険性を回避することが出来るようになるのではないだろうか。本研究がコスメトロジーに応用されることを期待したい。

（参考文献）

1）Raposo, G. and Marks, M. S. : Melanosomes — dark organelles enlighten endosomal membrane transport, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 8, 786-797, 2007

2）Ménasché, G., Pastural, E., Feldmann, J., et al. : Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome, Nat. Genet., 25, 173-176, 2000
3）Wilson, S. M., Yip, R., Swing, D. A., et al. : A mutation in Rab27a causes the vesicle transport defects observed in ashen mice, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 7933-7938, 2000
4）Itoh, T., and Fukuda, M. : Identification of EPI64 as a GTPase-activating Protein Specific for Rab27A, J. Biol. Chem., 281, 31823-31831, 2006
5）Mîinea, C. P., Sano, H., Kane, S., et al. : AS160, the Akt substrate regulating GLUT4 translocation, has a functional Rab GTPase-activating protein domain, Biochem. J., 391, 87-93, 2005
6）Ishibashi, K., Kanno, E., Itoh, T., et al. : Identification and characterization of a novel Tre-2/Bub2/Cdc16 (TBC) protein that possesses Rab3A-GAP activity, Genes Cells, 14, 41-52, 2008
7）Genaro Patino-Lopez, Xiaoyun Dong, Khadija Ben-Aissa, et al. : Rab35 and Its GAP EPI64C in T Cells Regulate Receptor Recycling and Immunological Synapse Formation, J. Biol. Chem., 283, 18323-18330, 2008

遺伝子改変マウスを用いた ヒスタミンの接触性皮膚炎に与える影響の研究

東北大学大学院工学研究科応用量子医工学

大 津　浩

Since its discovery in 1910, histamine has been regarded as one of the most important biogenic amines in medical and biological field. Histamine regulate smooth muscle contraction, immune response, vascular permeability, neurotransmission, and stimulation of gastric acid secrestion. Histamine is synthesized from histidine through oxidative decarboxylation by histidine decarboxylase (HDC; EC 4.1.1.22), a pyridoxal 5'-phosphate (PLP)-dependent enzyme. We generated histidne decarboxylase gene-knockout (HDC-/-) mice and previously revealed that scratching behavior was exclusively induced in HDC+/+ mice whereas it was barely observed in HDC-/- mice. Histological examination revealed that both HDC+/+ and HDC-/- mice displayed similar extent of inflammatory cell infiltration, hyperplastic epidermis and newly spreading of neuronal processes in the skin tissue. Since several metal are ingredient of cosmetic material we started to consider that metal allergy is important for the cosmetics. The first step for the metal allergy is elution of metal ion into the skin. Therefore it is important to establish the measuring system of trace ionized metal in the skin. In this study we assessed metal allergy in mice using nickel wire implantation in their back skin and revealed that the amount of nickel ion in the tissue seems to be paralleled with the extent of inflammation. The amount of ionized metal in the skin tissue was measured using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) and the surface of the metal wire was analyzed with X-ray diffraction (XRD) and scanning electron microscopy/energy dispersed X-ray analysis (SEM-EDX) method. To assess the extent of allergic reaction we generated HDC-promoter (1.1Kb) plus ZsGreen gene transgenic mice. It was shown that peritoneal macrophages in these mice were positively glittered under the fluorescent microscopy but we found that other cells which do not express HDC gene also glittered non-specifically. In this regards, we started to generate BAC based reporter mice to attain the accurate reflection of HDC expression in mice.

1．緒　言

化粧品学において，皮膚の炎症は重要な問題点である．私たちは，先にヒスタミンを欠くヒスチジン脱炭酸酵素遺伝子ノックアウトマウスを作製し（Ohtsu, Tanaka et al. 2001），皮膚の炎症反応におけるヒスタミンの役割について研究を続けている．例えば，皮下に木綿糸を植え込んだ慢性炎症モデルでは，ヒスタミンによって肉芽種が形成され，血管新生にヒスタミンが必須であり，マクロファージ由来のヒスタミンによって VEGF が誘導され，それによって血管新生が誘導されることを明らかにした（Ghosh, Hirasawa et al. 2002）．また，皮膚に創傷を作製し，ヒスタミンの影響を見る実験系において，ヒスタミンの存在は創傷治癒過程に重要であり，ヒスタミンが存在しないと創傷の治癒過程に遅れることが判明している．この過程でも血管新生が重要であるものの，この血管新生においては bFGF の作用がヒスタミンによってコントロールされ，創傷の治癒を促していることを明らかにしている（Numata, Terui et al. 2006）．また，ハプテンを繰り返して背部皮膚に塗布して誘導した接触性皮膚炎のモデルにおいて，2 週目から 4 週目に表皮肥厚を起こすがノックアウトマウスや H1 拮抗剤によってその程度が抑制され，ヒスタミンは痒みの発症に不可欠であり，痒みのシグナルは脊髄後角を伝達していくことを明らかにしている（Seike, Ikeda et al. 2005; Seike, Takata et al. 2005）．また H1 受容体拮抗剤を使った実験から，少なくとも H1 受容体を介する経路はこの接触性皮膚炎の発病に重要であることを報告している（Hamada, Seike et al. 2006）．このようにヒスタミンはマウス皮膚において，慢性炎症，皮膚創傷治癒，接触性皮膚炎など多岐に渡り重要な影響を与え化粧品学的に重要であると考えられる．

そこで，本研究においてヒスタミンの合成を触媒するヒスチジン脱炭酸酵素遺伝子のプロモーター領域に蛍光色素のレポーター遺伝子を繋いだトランスジェニックマウスを作製し，上述した皮膚疾患モデルのどの細胞にどういう時期にヒスタミン産生の遺伝子の発現が起きるのかについての検討を進めようと考えた．

また，装飾品などの含まれているニッケル，コバルトなどを考えてみると美容と金属アレルギーの関連は非常に重要な課題である．実際に金属によって起きるアレルギー性接触性皮膚炎（ACD）は多くの皮膚反応が起き，この病態は皮膚や全身性に化粧品や，タトゥー，洗剤，装飾品，ピアス，皮のなめし，人工関節，歯科インプラントなどに暴露されることによって引き起こされる．ニッケルによって ACD が起きることはよく知られているが，その他にア

The effect of histamine on contact dermatitis using gene manipulated mice

Hiroshi Ohtsu

Applied Quantum Medical Engineering, Tohoku University School of Engineering

ルミニウム，ベリリウム，クロミウム，コバルト，銅，金，イリジウム，水銀，パラジウム，白金，ロジウム，チタンが皮膚過敏を起こすことが知られている．このことにアプローチするため，生体内に溶け出す金属イオンの測定できるシステムがあると診断や重症度および治療効果，予後の判定などに大いに役立つ．そこで工学的な機器開発の現状と問題点に関して検討した．

2．実　験

2．1　マウスの金属ワイアーの植え込み実験

4 種類のマウス C57Bl/6, BALB/c, C3H/He, DBA/2 マウスの背部皮下に 13G の implant needle を用いて麻酔下で金属ワイアーを打ち込む．金属ワイアーは Ni, Co, Fe, Al で直径 0.8 ㎜であり，長さは 5 ㎜とする．植え込み後 8 時間，24 時間，3 日後にマウスを処理して，組織学的な観察や血管透過性について検討する．また，RT-PCR 法にて HDC や COX-2 の発現を検討する．

2．2　ICP-AES 法による組織内金属イオンの測定

ICP-AES 法（誘導結合プラズマ発光分光法）は，三重管の石英トーチを用い，その中にアルゴンガスを通して，最外周管にはアルゴンガスをプラズマを形成するべく通す．またこのガスはトーチの冷却も兼ねる．また中間の管のアルゴンガスは補助ガスと呼ばれ，プラズマを上方に浮かせてトーチの中央と中間の管が溶けるのを防ぐ役割をする．トーチの外側上部に巻いた誘導コイルに高周波電流を流すと，高周波がトーチ内のガス中に誘導されてプラズマを発生するようになっている．中心管からアルゴンキャリアーガスとともに試料溶液を霧状にして送ると，プラズマ中を通る間に試料は原子化，一部はイオン化されて，さらに励起される．励起状態となった原子から放電によって発光スペクトルが得られて，スペクトルを分析することによって，各元素のスペクトル線の波長が各元素固有のものであることを利用して元素の存在を確認するとともに，スペクトル線の強度を測定することによって，試料中の定量成分元素の濃度を計算する．

2．3　XRD（X-ray diffraction）法による Ni プレートの表面の性状分析

Ni ワイアーを埋め込み，その表面を観察すると，植え込み後数日経過すると黒ずんでくることが観察され，実験当初表面が酸化するものと考えた．そこで，X 線回折法を用いて，表面性状について検討した．Ni ワイアーでは X 線回折法によっての観察が困難であるため，Ni のプレートを代わりに植え込み，黒ずんだ部分と光っている部分を解析した．X 線回折分析法は，X 線が物質に当たって散乱されたとき，その波長は入射 X 線と同じ場合と長波長に変化する場合とがある．入射 X 線と同じ場合を Rayleigh 散乱と呼び，互いに干渉しあって回折（diffraction）現象を生じる．結晶面の格子間隔を d，X 線の入射角を θ とすると，X 線が回折を起こす条件は，$n\lambda=2d\ \sin\theta$ で表わされる．ここで n は任意の整数で回折の次数を表す．この式は Bragg の式と呼ばれる．この解析によって，元素の化合状態の分析が可能となる．従って，この分析法を用いてプレートの表面の酸化状態の解析を行った．

2．4　走査型電子顕微鏡 Scanning electron microscopy/energy dispersed X-ray analysis（SEM-EDX）による金属プレート表面の解析

金属を植え込んだ実験系ではマウスの生体反応を起こした Ni wire のみが黒く変色していた。走査型電子顕微鏡とエネルギー分散型 X 線分光法を用いて Ni wire および Ni plate の表面の組成について分析した。走査型電子顕微鏡は電子を標本の表面に当て，散乱および放出してくる電子を検出器でとらえて，微細な表面の変化を観測できるため，生体内で影響を受けた後の金属プレートの変化を観察できる．

2．5　レポーターマウスの作製

ヒスチジン脱炭酸酵素（Histidine decarboxylase: HDC）はヒスチジンからヒスタミンを合成する生体内で唯一の酵素である．私たちはこの遺伝子をクローン化後，この遺伝子における転写調節機構について研究してきた．その後，遺伝子ノックアウトマウスを作製し，ヒスタミン関与の種々の病態を明らかにしている（Ohtsu, Tanaka et al. 2001）．その中で接触性皮膚炎についての実験ではヒスタミンの有無に関わらず，病理像は大きな変化はないものの，痒みの対してはヒスタミンの役割が大きいことを明らかにしている（Seike, Ikeda et al. 2005）．その後，ヒスタミンの産生細胞を判断できるように，HDC 遺伝子プロモーターに蛍光色素遺伝子をプラスミッド上で繋ぎ，トランスジェニックマウスを作製した．当初 HDC 遺伝子のプロモーター 1.0kb に市販されているうちで最強の蛍光色素遺伝子と言われている pZsGreen1.1 を繋いだプラスミッドよりトランスジェニックマウスを作製したが，思ったほど蛍光発光が強くないこと，非特異的な発光がみえることから現在は bacterial artificial chromosome（BAC）を用いたトランスジェニックマウスを作製中である．

2．6　レポーターフィッシュの作製

緑色の蛍光はゼブラフィッシュの場合，色素細胞の自家発光と重なってしまい，特異的な発光と非常に区別しにくいことがわかった．そのため，赤色の蛍光である mCherry という遺伝子を HDC promoter に繋いだプラス

ミッドをトランスジェニックしたフィッシュを作製した．このフィッシュでは脳の深部まで見えるものの，躯間部の筋組織も発光し特異性に乏しかった．現在は，フィッシュにおいては考えられる negative enhancer 部位を除いたレポーターフィッシュの作製を目指しており，それで期待される結果が得られない場合はマウス同様に BAC を用いたトランスジェニックフィッシュを用意する予定である．

3．結　果

3．1　溶出金属イオンの測定法の開発

マウスの背部皮下に種々の金属を植え込み炎症反応を惹起させると、ニッケルに特異的に血漿成分の漏出や組織の壊死などがおきる。植え込んだニッケルの周辺組織中におけるニッケル濃度を Newport Green を用いた蛍光法および ICP-AES 法で測定した（図１）。両方法の結果を比較するために，横軸に蛍光法縦軸に ICP-AES 法の測定値をとり，Ni 濃度の測定結果を比較した。その結果両方法は良く相関し、ともに正確な測定法であると考えられた。また、Newport Green による測定では特異性がなかったニッケルと亜鉛を ICP-AES 法では分離して測定できることがわかった。測定の感度はほぼ同程度であった。また、Ni ion の周囲組織内への溶出経過の結果と、周囲組織における血漿成分の溶出反応をエバンスブルーという色素を用いて測定した結果を比較してみた（図２）。Ni イオンは Ni wire を植え込んでから８時間で溶出を開始し、その時間経過はエバンスブルーによる血漿漏出反応の時間経過とよく一致していた。この結果、Ni ion が組織に溶け出すことが、血漿成分の血管外漏出にとって必要なことであろうと推察される。

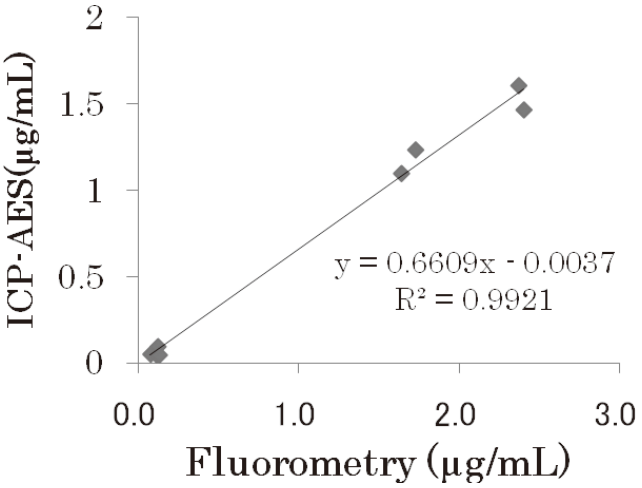


図１　Ni wire を植え込んだマウスの植え込み周囲の皮膚からのサンプル中における Ni ion の濃度
ICP-AES 法と New Port Green を使った蛍光法を用いた時の検出値の比較

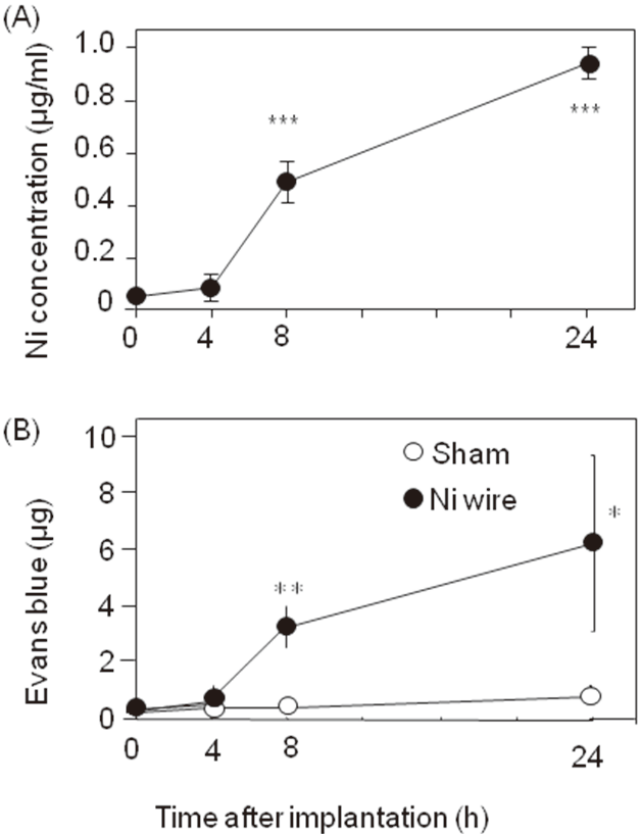


図２　Ni wire を植え込んだマウスの植え込み周囲の Ni イオンの濃度とエバンスブルーの組織内濃度
植え込み後の周囲組織内における Ni の濃度の経時変化(A) と組織内への血漿成分の漏出反応をエバンスブルーを静脈内注射して測定した結果(B)

3．2　金属表面の分析

SEM-EDX（Scanning electron microscopy /energy dispersed X-ray analysis）による解析

走査型電子顕微鏡で、マウスの背部に植え込んだあとの Ni プレートを観察すると、黒く変色している部分(a)と金属本来の部分(b)が同時に存在していた（図３）。変色のあった部分(a)を EDX 法にて分析すると、Ni のピークを検出した他に C、N、O、Cl、Na、P、S、K などの元素のピークも検出し、Ni プレートに生体内成分が付着あるいは浸潤していることがわかった。その中ではとくに C 元素のピークが高く、炭素元素が多量にプレートに付着あるいは浸潤していることがわかった。プレートは測定前に念入りに洗浄しているため、これらの生体内成分は恐らく金属表面よりやや内側に浸潤していっているものと考えられるが、今後はさらに別の実験系を組みその点を明らかにする必要があるのかも知れない。

XRD（X-ray diffraction）法による解析

マウスに Ni ワイアーやプレートを植え込み、X 線回折法にて Ni の化合状態の分析をおこなった（図４）。その結

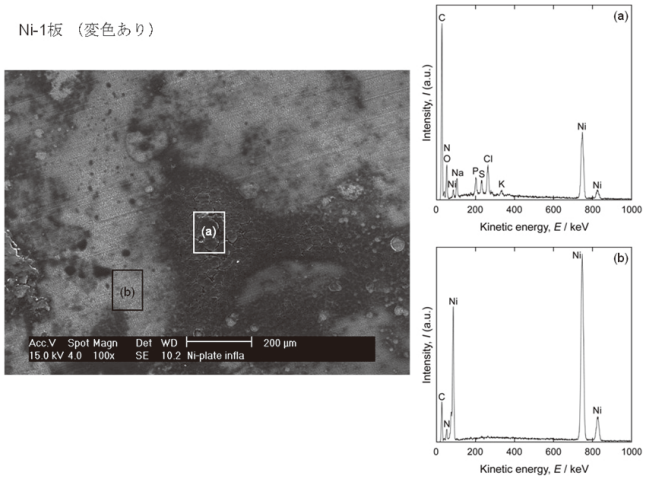


図３　Ni 板の SEM-EDX による解析
Ni プレートについて、黒くなった部分(a)と金属光沢を残している部分(b)の表面性状を SEM-EDX 法にて解析した。

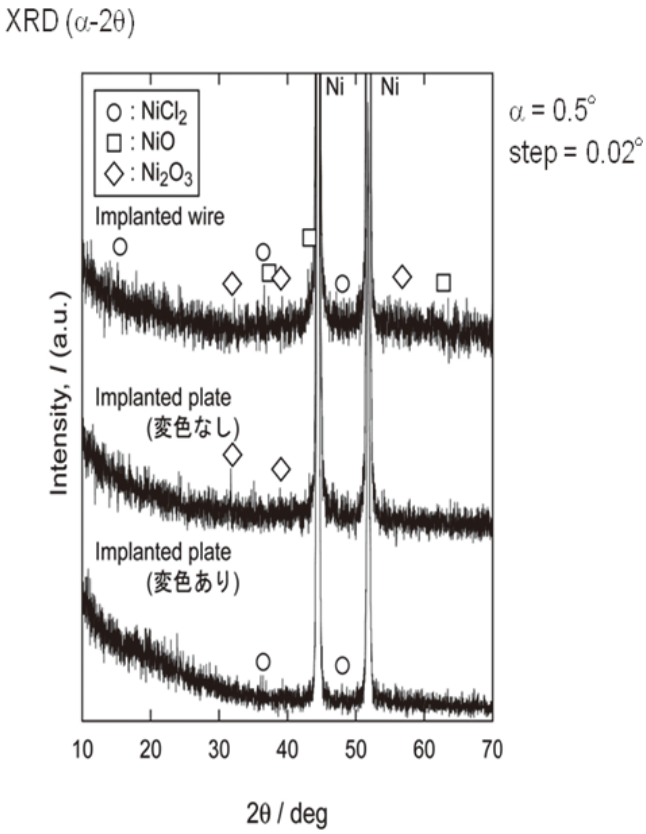


図４　Ni 板の XRD による解析
上段から、植え込み前の Ni プレートの一部分、植え込んだものの Ni プレートに変色を認めなかった部分、変色を認めた部分、それぞれの XRD 解析を示している。

果、Ni ワイアーにおいて Ni のピーク以外に高いピークが認められない（上段）ことから、Ni の酸化物などの化合物は少ないことがわかった。また Ni プレートを植え込んだ後で、黒く変色していた部分（下段）も、金属の光沢のあった部分（中断）と同様に Ni の酸化物などの化合物の量は少なく、植え込み前のプレートとしての性状と変化がなかった。従って黒く変色した金属プレートは酸化による変化ではないことが判明した。

3．3　レポーター動物の作製について

トランスジェニックマウス

HDC promoter+ZsGreen1.1 マウスは肥満細胞が発光するものの、その発光強度は弱く、非特異的な部位における発光も見られるため、金属アレルギー反応において使用に耐えうるものであるかどうかには疑問がある．おそらく、使用した promoter 部分が 1kb と短いため発現の特異性を担うのに充分な領域を持たず、発現特異性に問題のあるトランスジェニックマウスができた可能性が高い。そこで、実験のアプローチの方法を変えて、現在は HDC 遺伝子を含む BAC を入手して、プロモーター直後に GFP 遺伝子を挿入して HDC 遺伝子近傍 100kb の DNA を丸ごとつかったトランスジェニックマウスを作製するべく実験を開始した。これによって、本来HDC 遺伝子がもつ近傍の情報を充分に含んだ DNA を導入できるため、本来の遺伝子の発現パターンを表すレポーターマウスが作製できると考えている。

トランスジェニックフィッシュ

緑色の蛍光はゼブラフィッシュの場合、色素細胞の自家発光と重なってしまい、特異的な発光と非常に区別しにくいことがわかった。このため、赤色の蛍光である mCherry 遺伝子を HDC promoter に繋いだプラスミッドをトランスジェニックしたフィッシュを作製した。このフィッシュでは脳の深部まで見えるものの、躯間部の筋組織も発光し特異性に乏しかった。現在は、コンストラクト内に Negative Enhancer がある可能性を考えて、全長 300bp 程度の短いプロモーターによってコントロールされるレポーター遺伝子をもつトランスジェニックフィッシュを作製中である。

4．考　察

4．1　溶出金属イオンの測定法の開発

Ni wire を使った系では、今まで行われている Newport Green を用いた蛍光色素を用いた解析でも Ni の量を定量可能であると思われる。今回、生体内のしばしば用いられるステンレス鋼である SUS316 を植え込んだ周囲に Ni の溶出が測定され、臨床的には問題がないと考えられているステンレス鋼からも Ni の溶出があることが明らかになった。このことは、臨床的に問題となってくる Ni の溶出には閾値があるか、あるいは、臨床的には問題にならない程度でも組織において反応している可能性があると考えられる。したがって、動物体内でのニッケルの溶出を正確に評

価する必要性が確認された。

今後、生体にしばしば用いられる金属を対象に、感度のより高い測定法を見つけ、どのような金属がイオン化しにくいかについて検討を進めていきたいと考えている。

4. 2　HDC promoter-reporter 動物の作製

作成したマウスにおいては、ZsGreen1.1 の発光の特異性に問題があり、プロモーター内にすべての制御領域がはいっているかどうか問題がある。

今後、マウスではBAC を用いたレポーターマウスの作成を、フィッシュにおいては考えられる negative enhancer 部位を除いたレポーターフィッシュの作製を目指す。

5．総　括

Ni の金属アレルギーに対して、組織内で Ni イオンの量を測定することが可能になっている。また、金属表面の性状変化についても、２種類の方法で解析できる。
HDC promoter によるレポーター動物の作製は非特異的な発光を示していたため、方法を変えて再度作製を開始している。

謝　辞

本研究を遂行するに当たり，ご支援を頂きました㈶コスメトロジー研究振興財団および共同研究者に深く感謝いたします。また、本研究をすい行するにあたり東北大学大学院薬学研究科平澤典保教授、東北大学工学研究科成島尚之教授およびヘルシンキ大学ペルティ・パヌラ教授にじん大なる支えんをいただいた事を報告し、深く御礼申し上げます。

（文　献）

1）Ghosh, A. K., N. Hirasawa, H. Ohtsu, T Watanabe and K Ohuchi. (2002). "Defective angiogenesis in the inflammatory granulation tissue in histidine decarboxylase-deficient mice but not in mast cell-deficient mice." J Exp Med **195**(8): 973-82.

2）Hamada, R., M. Seike, R. Kamijima, M. Ikeda, H. Kodama, H. Ohtsu (2006). "Neuronal conditions of spinal cord in dermatitis are improved by olopatadine." Eur J Pharmacol **547**(1-3): 45-51.

3）Numata, Y., T. Terui, R. Okuyama, N. Hirasawa, Y. Sugiura, I. Miyoshi, T. Watanabe, A. Kuramasu, H. Tagami, and H. Ohtsu (2006). "The accelerating effect of histamine on the cutaneous wound-healing process through the action of basic fibroblast growth factor." J Invest Dermatol **126**(6): 1403-9.

4）Ohtsu, H., S. Tanaka, T. Terui, Y. Hori, Y. Makabe-Kobayashi G. Pejler, E. Tchougounova, L. Hellman, M. Gertsenstein, N. Hirasawa, E. Sakurai, E. Buzás, P. Kovács, G. Csaba, Á. Kittel, M. Okada, M. Hara, L. Mar , K. Numayama-Tsuruta, S. Ishigaki-Suzuki, K. Ohuchi, A. Ichikawa, A. Falus, T. Watanabe and A. Nagy (2001). "Mice lacking histidine decarboxylase exhibit abnormal mast cells." FEBS Lett **502**(1-2): 53-6.

5）Seike, M., M. Ikeda, H. Kodama, T. Terui, and H. Ohtsu. (2005). "Inhibition of scratching behaviour caused by contact dermatitis in histidine decarboxylase gene knockout mice." Exp Dermatol **14**(3): 169-75.

6）Seike, M., T. Takata, M. Ikeda, H. Kodama, T. Terui and H. Ohtsu. (2005). "Histamine helps development of eczematous lesions in experimental contact dermatitis in mice." Arch Dermatol Res **297**(2): 68-74.

Ⅲ.　精神、文化に関する分野

生きるための呼吸、感じる呼吸　－香りと慣れ現象－

昭和大学医学部第二生理学教室
政岡　ゆり

Previously we tested simultaneous recordings of electroencephalograms and respiration in normal subjects during threshold and recognition levels of olfaction. The study identified changes of respiratory pattern during odor stimuli and found that inspiratory phase-locked alpha oscillation (I-α) from the averaged potentials were triggered by inspiration onset. We performed dipole analysis of I-α and found the dipoles were located in the olfactory-related areas: the entorhinal cortex, hippocampus, amygdala, and the orbitofrontal cortex. As we often experienced that olfaction is habituated with constant exposure of odor presentation, we compared the respiratory patterns, I-α, and dipole localizations of I-α during recognition of odor with those of adaptation in odor. We found that changes in tidal volume and respiratory rate returned to the normal breathing level during the adaptation period. From averaging EEGs triggered as the inspiration onset, I-α was observed in all electrodes positions during perception of odor; on the other hand, power spectra of frontal areas decreased during the adaptation period. During the adaptation period, dipoles were not estimated in the orbitofrontal cortex, but sustained activations in the entorhinal cortex and hippocampus were observed.

1．目　的

呼吸の役割は酸素を取り入れ二酸化炭素を排出することであり、またエネルギー代謝に伴い算出される二酸化炭素量を一定にする為に呼吸の深さと速さで調節することである。呼吸のリズム産出とそれらの調節はすべて無意識になされ延髄がその役割を担っている。この生命の維持に不可欠である呼吸にもうひとつの重要な役割がある。それは息を吸うという行為が嗅覚と深く密接しているということである。息を吸いこんで香りを感じることができ、息を止めれば香ることはできない。

これまでに香りによる呼吸変化と、香り刺激時の吸息に一致した脳内の活動を観察してきた。心地よい香りでは呼吸はゆっくりと深くなり、不快な香りでは浅く、早い呼吸のパターンとなることを報告してきた[1)]。また香り刺激時に脳波を同時に記録し、吸息に一致させて脳波を加算するとアルファ帯域の律動波（I-α）が観察され、脳波から脳内の電源を探る方法である双極子追跡法により律動波の電源が嗅内野皮質、海馬、扁桃体を中心とした辺縁系であることを示した[1)]。嗅覚は他の感覚と異なり、嗅球から直接情動の中心である辺縁系に投射をする唯一の感覚であり、香り分子を含んだ１呼吸１呼吸が脳内のリズムを変化させ、情動の中枢である辺縁系を刺激することが示唆された。

しかし香りには慣れ現象（adaptation）があり、そのレベルは香りに対する個人の嗜好、記憶などの要素が大きいと予測される。香りの慣れ現象は末梢レベルのみではなく中枢においても起こるという報告があり[2)]、中枢の賦活を低減させることがわかってきた。本研究では香りの慣れ現象時の呼吸と脳活動を記録し、香りの慣れにより呼吸がどのように変化するのか、または前研究で観察されたI-αは観察されるか、また慣れにおける脳内の活動部位はどのように変化するのかを検討した。ヒトにとって香りの慣れとはどのような意味をもつのかを考察する。

Adaptation toward odor stimuli in humans : investigating into respiratory rhythm and the limbic activations.

Yuri Masaoka
Department of Physiology, Showa University School of Medicine

2．実験方法

健常成人７例（平均年齢：29.5　利き手：右）は実験前、Spielberger の State Trait Anxiety Inventory（STAI）[3)] を施行し、オルファクトメーター（高砂香料）を用い嗅覚テストを行った。香り５種ＡからＥまで（odor A, β-phenyl ethyl alcohol; odor B, methyl cyclopentenolone; odor C, iso-valeric acid; odor D, γ-undecalactone; odor E, skatole）を濃度が薄い順－2から＋4までを順に嗅がせ、匂いがすると分かった時点（だが何の香りが特定できない）を検知（threshold）とし、匂いの種類を特定できた時点を認知（recognition）レベルとし、両者とも正常範囲であることを確認した。今回の実験では前研究で用いたもっとも心地よいとされた香りＡ（バラの香り）の各被験者の認知レベルを用いた。脳波 19 チャンネルを国際 10－20 法に従い電極を装着し、不関電極を右耳朶に設置した。記録は脳波計（EEG-1100, 日本光電社）を用いた。

香り刺激はパソコンから駆動させる吸息同期香り刺激装置（Odor stimulator, 特許出願番号：特願 2005-151437）を用いた。呼吸は呼気ガス分析計（CPX, アルコシステム）により分時換気量（V_E）、一回換気量（V_T）、呼吸数（RR)、酸素消費量（VO_2）、呼気炭酸ガス濃度（$ETCO_2$）を測定した。

脳波加算の為、呼吸の流量をアナログにて出力し脳波計に同時記録した。

匂い刺激開始時からの呼吸の吸息に一致させて脳波を加算した。加算作業はNihon Koden社のFocusを用い、香り刺激時（odor stimulation）と慣れ現象（adaptation）とに分けて加算作業を行った（図１）。各加算回数は50－60回とした。香り刺激装置に装着したバルブの吸息側に香りを浸したリトマス紙を貼付し、パソコン制御によりバルブを開閉させた。香りは被験者の吸息時に香り、呼息は呼息バルブへ流れる仕組みである。香りに対する認知の度合いは感情測定ソフト（こころのものさし，ブレインリサーチアンドデベロップメント）を使用した。タッチパネルPCの画面上に提示されるvisual analogue scale（VAS）（右側を最大限とし左側をまったく匂わないとする）に15秒ごとに右示指で触れ、adaptaionしているか否かを確認した。スケールが０（まったく分からない）になった時間をadaptationとし、さらに香りを投与した。加算脳波は双極子追跡法（BS-navi, ブレインリサーチアンドデベロップメント）により電源の推定を行った。

双極子追跡法

脳波から脳内の電源を推定する方法として双極子追跡法がある[4]。脳波の特徴として、電位測定を各サンプリングあたりでの双極子の位置を推定できるため、時間分解能が高く、また簡便で非拘束的であることがあげられる。また電源推定にあたり最大の問題である脳・骨・皮膚の導電率の違いを加味し、より正確な位置推定が可能となってきた。双極子追跡法の利点として時間分解能に優れていることがあげられる。

双極子追跡法の妥当性は、術前検査のために硬膜外電極を留置したてんかん患者において間欠発作波の起源を推定している。またHommaらは（2001）[5]やはり術前のてんかん患者において、深部電極による間欠発作波の出現部位が表面電極によるEEGからの３層実形状頭蓋モデルによる推定位置と一致していることが示されている。これまでに嗅覚[1]、視覚[6]、運動準備電位[7]の電源推定に応用されている。

３．結　果

表１に安静時（rest）、香り刺激時（odor stimulation）、慣れ（adaptation）時の呼吸測定結果を示した。odor stimulationではV_T（$P<0.01$）、RR（$P<0.05$）の変化が認められた。VO_2に変化が認められないことから、V_TとRRの変化は代謝によるものではないことが示された。$ETCO_2$はどのタスクにおいても変化は認められなかった。adaptationにおいてodor stimulation時にみられた呼吸の変化は持続せず、安静時（baseline）と同呼吸パターンとなった。

図２にodor stimulation時の吸息に一致させて脳波を加算したもの（左）、adaptation時の吸息に一致させて

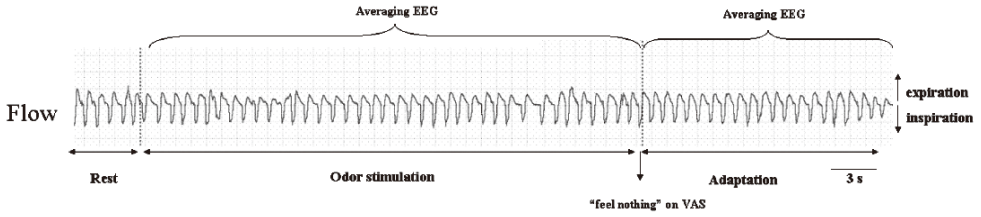


図１　香り刺激時（odor stimulation）と香りの慣れ（adaptation）の際の呼吸流量（下向き：吸息、上向き：呼息）。Visual analogue scale (VAS) により香りを感じるか否かを確認し、その後をadaptationとした。

表１　安静時（Baseline），香り刺激時（Odor stimulation），香りの慣れ（adaptation）における分時換気量（Minutes ventilation），一回換気量（Tidal volume），呼吸数（RR），呼気終末炭酸ガス濃度（$ETCO_2$），酸素消費量（VO_2）.

	Baseline	Odor stimulation	Adaptation
$\dot{V}_E$ (l)	7.5±0.9	7.5±0.2	7.9±0.5
V_T (ml)	563±24	71.5±112 **	573±25
RR (breath/min)	13.3±1.5	10.7±1.9 *	13.6±0.5
$ETCO_2$ (%)	5.63±0.3	5.75±0.49	5.5±0.2
$\dot{V}O_2$ (ml)	228±13	230±10	235±9.8

*P<0.05

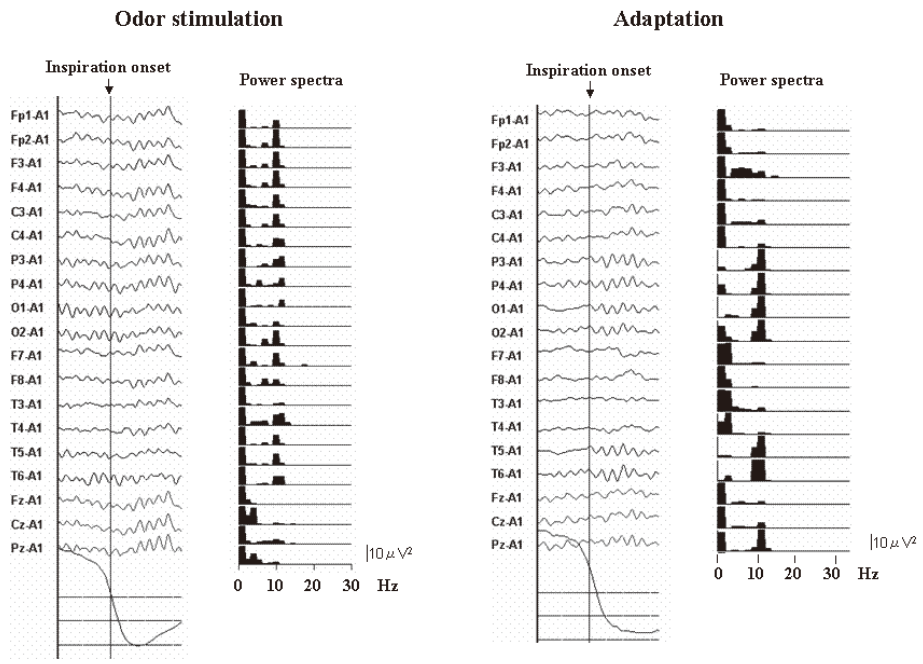


図２　Odor stimulation 時の吸息に一致させて脳波を加算したもの（左）、adaptation 時の吸息に一致させて脳波を加算したもの（右）を示した。それぞれの電極のパワースペクトル解析を行ったものを示した。

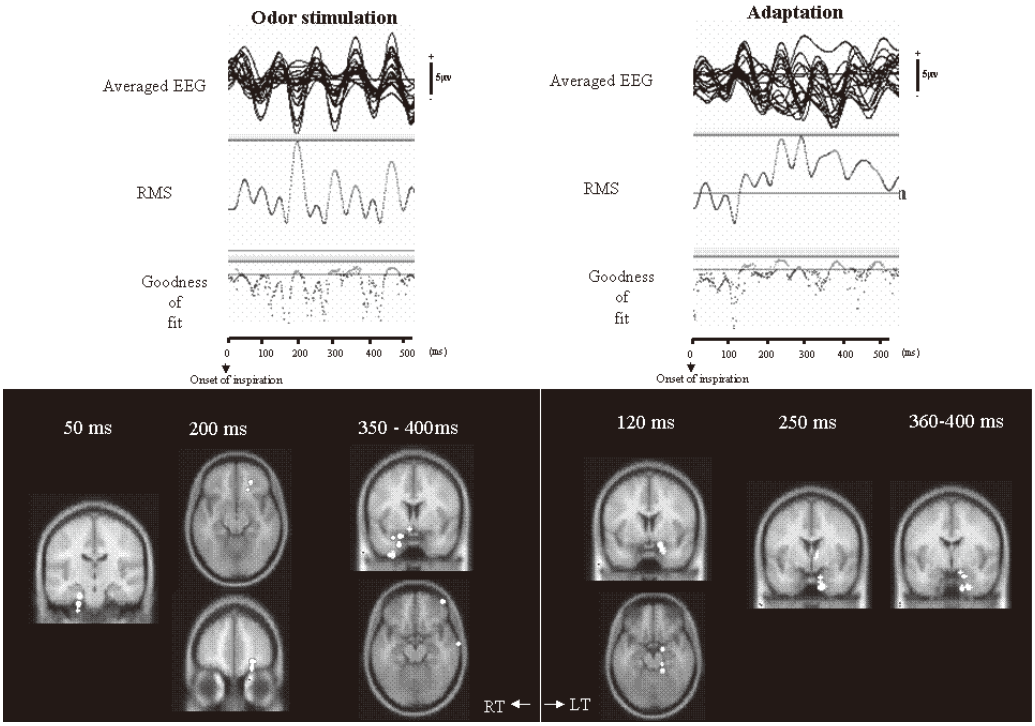


図３　（上）健常者における吸息に同期した加算脳波。左：香り刺激時（慣れ：adaptation 前）。右：adaptation 時　RMS: 平均二乗誤差
（下）双極子推定を時間を追って追跡したもの。双極子の位置を白丸で示す。吸息開始からの活動部位の変動を示す

脳波を加算したもの（右）を示した。またそれぞれの電極のパワースペクトル解析を行ったものを示した。odor stimulation では香り刺激時の吸息に同期して I-α が認められた。adaptation においては脳波電極すべてのチャンネルでの α 帯域の律動波は認めず、後頭葉（P3, P4, O1, O2）、側頭葉領域（T5, T6）のみ律動波を認めた。

odor stimulation では I -α の電源は吸息開始後から嗅内野皮質、扁桃体、海馬、眼窩前頭葉に認められ（図３左）、200ms から 300ms で眼窩前頭葉に最も双極子が収束した。odor adaptation（図３右）においては吸息開始後、嗅内野皮質、扁桃体、海馬に活動を認めるが眼窩前頭葉賦活が認められないことがわかった。

４．考　察

本研究では香りの慣れ現象を呼吸のパターンと脳内の活動部位から検討した。香りの情報は他の感覚と異なり、視床を介さず直接扁桃体、嗅内野皮質海馬など情動の中枢へ投射する。香りを含む一呼吸一呼吸がこの嗅覚に関連した辺縁系を賦活させることとなる。これまでにこれらの部位を刺激することにより呼吸の変化が認められることが明らかにされてきた[8, 9]。香り分子を含んだ空気が吸息とともに嗅覚に関連する部位を刺激し、香りを感じることと呼吸の変化はほぼ同時であると考えられる。

本結果から、香りに慣れることにより香りによって変化した呼吸のパターンが安静時レベルに戻ることが認められた。香りの慣れは本人の主観によるものであるが、呼吸のパターンからこれらの変化を客観的に捉えることができ、またＩ－ α の有無、脳内の電源推定からも観察されることがわかった。

香りの慣れによる脳内推定部位は側頭極内部にとどまり、眼窩前頭葉では認められない。これまでヒトにおいて眼窩前頭葉は香りの認知・識別に関わっていることが示されてきた[10, 11]。またパーキンソン病患者において香りの認知障害が眼窩前頭葉賦活の減衰によるという報告から[12]、香りの認知は嗅内野皮質、扁桃体、海馬から前頭葉への投射によりなされることが確認されてきた。本研究結果からは香りの慣れでは眼窩前頭葉の活動が減衰することがわかった。

しかし香りに慣れ、自分の意識として認知されていないのにも関わらず嗅内野皮質、扁桃体、海馬の活動は持続する。この部位が活動を持続するなら香りによる呼吸の変化は持続すると考えられるが、呼吸のパターンは安静時と同レベルにもどる結果となった。

この点について考察したい。これまでの動物、ヒトにおいて不快な刺激における脳反応は顕著であり、特に扁桃体の賦活は強く、生理的反応も大きいことが示されてきた。それと比較し快の刺激は生理反応（発汗、心拍増加など）が顕著に表れず、また脳活動部位もさまざまな部位が賦活する。しかし言い換えれば様々な脳部位が賦活するということは快の感情がより高度な脳機能であることを意味する。他の生理反応と比べ呼吸では心地よい香りによって大きく変化することが特徴である。

本研究では慣れ現象を心地よい香りのみで検討した。その香りが心地よいと判断されれば、その香りを吸いたい、何かを知りたいという意思が働く。それらは不快な香りに対する反応よりもより高次なものである。よって扁桃体、海馬の辺縁系の活動とともに前頭葉の賦活、つまり皮質から辺縁系への抑制が働くこととなる。良い香りでみられる深く、ゆっくりとした呼吸は無意識の変化であるが辺縁系及び眼窩前頭葉の両部位の賦活の統合と調整によって出力される結果であろう。慣れによる眼窩前頭葉の賦活が認められないのは、この抑制の過程が消え、辺縁系のみの賦活が持続すると考えられる。

それではなぜ海馬や扁桃体のみの賦活が持続するのだろうか。恐らくこれらの部位の活動レベル上昇、維持は新しい匂いに対して敏感に反応するものなのではないだろうか。動物においては敵の識別、食物のありか、性行動など嗅覚は重要な情報入力であり、情動を起こさせる主情報である。新たな情報にすばやく反応するためのひとつの防御反応とも考えられるであろう。

謝　辞

本研究の遂行にあたり、ご支援いただきましたコスメトロジー研究振興財団に厚く御礼申し上げます。

（参考文献）

1）Masaoka Y, Koiwa N, Homma I, : Inspiratory phase-locked alpha oscillation in human olfaction: source generators estimated by a dipole tracing method, J Physiol., 566 (3), 979-97, 2005.

2）Poellinger A, Thomas R, Lio P, et al., : Activation and habituation in olfaction –An fMRI study, Neuroimage, 13, 547-560, 2001.

3）Spielberger CD, : Manual for the State-Trait Anxiety Inventory (STAI), Consulting Psychologists Press, Polo Alto, 1983.

4）本間生夫，政岡ゆり，: EEG からの双極子追跡法，臨床脳波 12, 46,761-769,2004.

5）Homma I, Masaoka Y, Hirasawa K, et al., : Comparison of source localization of interictal epileptic spike potentials in patients estimated by the dipole tracing method with the focus directly recorded by the depth electrodes, Neurosci Lett., 304, 1-4, 2001.

6）Yoshimura N, Kawamura M, Masaoka Y, et al., : The

amygdala of patients with Parkinson's disease is silent in response to fearful facial expressions, Neuroscience, 131, 523-534, 2005.

7) Inoue M, Masaoka Y, Kawamura M, et al., :Differences in areas of human frontal medial wall activated by left and right motor execution: Dipole-tracing analysis of grand-averaged potentials incorporated with MNI three-layer head model. Neurosci Lett., 437, 82-87, 2008.

8) Harper RM, Frysinger RC, Trelease RB et al., : State-dependent alteration of respiratory cycle timing by stimulation of the central nucleus of the amygdala. Brain Res., 306, 1-8, 1984.

9) Masaoka Y, Homma I, : Amygdala and emotional breathing, In: Champagnat J (eds): Post-genomic perspectives in modeling and control of breathing. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2004, vol.551, 9-14.

10) Gottfried JA, Deichmann R, Winston JS, et al., : Functional heterogeneity in human olfactory cortex: an event-related functional magnetic resonance imaging study. J Neurosci., 22, 10819-10828, 2002.

11) Rolls ET, Kringelbach ML, de Araujo IE, : Different representations of pleasant and unpleasant odours in the human brain. Eur J Neurosci., 18, 695-703, 2003.

12) Masaoka Y, Yoshimura N, Kawamura M, et al., : Impairment of odor recognition in Parkinson's disease caused by weak activations of the orbitofrotal cortex. Neurosci Lett., 412, 45-50, 2006.

化粧品のリスク認知に関する心理学的研究
－安全とリスクのバランス－

名古屋大学大学院教育発達科学研究科
元 吉　忠 寛

The aim of the present study was to examine consumers' risk perception on cosmetics, and the effects of perceived risk on their selection of cosmetics. A questionnaire survey was conducted on a total of 178 female undergraduates. Findings of the present study clarified that 65.1% of the participants have experienced skin troubles caused by cosmetics. Skin care products were the most common cause of skin troubles. Risk information on base and lips makeup products were examined more precisely by consumers prior to purchase compared to eye and lips makeup products. Consumers tend to actually try new cosmetics to check if a product causes skin troubles without looking at the risk information. Consumers showed the same levels of interest in risk information as the effects information and trusts towards manufacturers. Although consumers show high levels of interest in risk information, they do not study the information well on their own. Further researches on communication techniques are needed to enhance the risk communication between manufacturers and consumers.

1．緒　言

化粧をすることには多くの効用があり、自分らしさを他者に伝え、自信を持って日々の生活を過ごしたいというコミュニケーションとしての役割を持っている。これまで、社会心理学の分野では、化粧と対人魅力の関連や化粧がもたらすさまざまな効用に関する多くの研究が行われてきた（大坊,2000 [1)]）。その一方で、化粧品は直接皮膚につけるため、その作用は緩和ではあるものの、選択を誤れば、自らの皮膚を痛めてしまうという危険性を持つ。近年、BSE問題やさまざまな食料品の偽装事件などを受け、食料品に対するリスクの問題が一般消費者の関心を集めている。また、薬事法の改正により、全成分表示や製造販売後安全管理基準の作成など、化粧品に対する安全性にも社会的な関心が高まってきた。化粧品は、多くの女性が日常的に使用しているため、その安全性やリスクに対する認識は、今後ますます重要になっていくことが予想される。

本研究の目的は、化粧品のように、日々の生活で使用し、選択を誤れば自らの皮膚を傷めてしまうという危険性を併せ持つ商品、日々の生活で使用するものに付随する危険性認知について、消費者がどのような認識を抱いているのか、また、抱かれた危険性の印象が、商品選択にどのように影響しているのかを検証することである。

Risk perception of cosmetics among undergraduates:
Balancing risk and safety

Tadahiro Motoyoshi

Graduate School of Education and Human Development , Nagoya University

2．調　査

2.1　調査対象

東海地方の私立大学に在籍する女子学生178名が質問紙調査に参加した。回答者の平均年齢は19.8歳（*SD*=0.75）であった。

2.2　調査内容

調査用紙では、まず、⑴スキンケア製品（化粧水、乳液、洗顔料）、⑵ベースメイク製品（化粧下地、ファンデーション、コンシーラー）、⑶アイメイク製品（眉墨、マスカラ、アイシャドウ）、⑷リップ製品（口紅、リップグロス）、の計11種類の化粧品の使用実態（「1. 全く使わない」から「5. よく使う」）およびそれぞれの化粧品による肌トラブルの過去経験（「あり」、「なし」）についてたずねた。その後、⑴から⑷までの各化粧品を選ぶときに、どのようなことを重視しているかについて、約20項目の観点から回答を求めた（具体的な項目については、表3参照）。さらに、公的自己意識尺度（菅原, 1984 [2)]）と化粧に対する一般的な意識についての質問への回答を求めた。

3．結　果

表1に各化粧品の使用実態と肌トラブルの過去経験について示した。コンシーラー、口紅をのぞくとほとんどの化粧品は平均で4点を超えており、比較的よく使用されていた。肌トラブルについては、65.1％の者が、何らかのトラブルを経験していた。製品別に見ると、化粧水、乳液、洗顔料などスキンケア製品において、経験率がもっとも高く30％程度となっている。化粧下地やファンデーションなどベースメイク製品における経験率も20％程度と高くなっている。また、口紅やグロスなどリップ製品のトラブル経験率も20％程度と高く、アイメイク製品のトラブル経験

表１　普段使っている化粧とトラブル経験率

	M	*SD*	トラブル経験率
スキンケア製品			
化粧水	4.81	0.64	35.7%
乳　液	4.24	1.28	22.9%
洗顔料	4.92	0.42	33.7%
ベースメイク製品			
化粧下地	4.39	1.22	20.0%
ファンデーション	4.42	1.19	27.3%
コンシーラー	2.72	1.63	9.3%
アイメイク製品			
眉　墨	4.41	1.21	0.6%
マスカラ	4.60	0.97	5.5%
アイシャドウ	4.43	1.16	9.1%
リップ製品			
口　紅	2.81	1.57	21.6%
リップグロス	3.69	1.27	21.0%

率は10%以下と低かった。

スキンケア、ベースメイク、リップ、アイメイクの４種類の化粧品を選ぶときに、肌トラブルなど化粧品リスクと関連する側面を、どの程度重視しているかについてたずねた項目の平均を表２に示した。スキンケア製品やベースメイク製品において、使われている成分の中身や肌への刺激、自分の肌に合っているかどうかなどリスクの観点を重視するが、リップメイクではそれほど重視せず、アイメイクではもっともリスクについて重視していなかった。また、スキンケアでも、「自分の肌に合っているかどうか（*M*=4.63）」や「肌への刺激が低いかどうか（*M*=3.83）」は強く重視しているが、「使われている成分の中身（*M*=2.96）」や「肌トラブルの原因となる成分が使用されているかどうか（*M*=3.08）」を重視している程度は中程度であった。つまり、使用前に成分などを確認するというよりも、実際に使用してみて、問題があれば、使用を中止するというように、体験的にリスクを判断するというリスク対処行動を取っていることが明らかになった。

次に、化粧品を選択する際に、リスク以外の側面も含めて、それぞれどのような点を重視しているかを検討するために、もっともリスク認知の高かったスキンケア製品を対象として、重視すること20項目について、主成分分析・バリマックス回転を行い６主成分を解釈した（表３）。第１主成分は「リスク認知」、第２主成分は「ベネフィット認知」、第３主成分は「評判」、第４主成分は「ブランド」、第５因子は「高価格」、第６因子は「製品」と解釈した。各成分に負荷の高かった項目の得点の平均を図１に示した。もっとも高かったのは「ブランド」であり、信頼できる、有名メーカーの製品を重視していることが示された。また、「評判」、「ベネフィット認知」とならび、「リスク認知」の重視は高く、化粧品の選択において、リスクに対する関心が高いことが示された。

さらに、スキンケア製品、ベースメイク製品、アイメイク製品、リップ製品それぞれについて、トラブル経験数別に、リスクの重視度を比較した（図２）。その結果、スキンケア製品（$F(3,162)=5.18, p<.01$）とリップ製品（$F(2,154)=6.47, p<.001$）において、リスクの重視度に有意差が確認された。すなわち、トラブル経験者は未経験者に比べてリスク要因を重視していた。トラブルを経験しない人はリスク要因にあまり目を向けず、予防的にはリスク要因を重視しないことが示唆された。

最後に、公的自己意識と、選好重視成分との関連について検討したが、ほとんど関連は確認されなかった。

４．考　察

本研究の結果から、女子大生の６割以上が過去に肌トラブルを経験していることが明らかになった。そして、化粧品に関するリスクについては、特にスキンケア製品に対して高い関心を持っていることが示された。しかし、その判断は、事前に成分表示などを確認したり、自分にあわない成分について使う前に判断したりするというよりは、使ってみて合わなければ使用を止めるという消極的な対応であることが推察された。化粧品の人体への影響は緩和であるため、このようなリスク認識の実態が明らかになったと思われる。しかし、リスク・コミュニケーションでは、十分

表２　製品別に見た化粧品に対するリスク認知の重視度

	スキンケア	ベースメイク	リップ	アイメイク	*F*
使われている成分の中身	2.96 a	2.79 a	2.52 b	2.07 c	31.83 ***
肌トラブルの原因となる成分が使用されているか	3.08 ab	3.09 a	2.84 b	2.26 c	35.03 ***
肌への刺激が低いかどうか	3.83 a	3.70 a	3.21 b	2.51 c	63.74 ***
肌に負担をかける成分が使用されているかどうか	3.23 a	3.21 a	2.92 b	2.41 c	30.97 ***
自分の肌にあっているかどうか	4.63 a	4.51 a	4.00 b	3.35 c	59.4 ***

*** $p<.001$、得点が高いほど、重視していることを示し、異なるアルファベット間には下位検定の結果有意差があったことを示す。

表３　スキンケア製品の選択重視内容の因子分析結果

	I	II	III	IV	V	VI	h^2
肌に負担をかける成分が使用されているかどうか	**.89**	.01	.00	.06	.00	.08	.80
肌トラブルの原因となる成分が使用されているか	**.88**	.01	.03	-.04	.07	.06	.79
使われている成分の中身	**.84**	.01	.05	-.01	.06	.07	.71
肌への刺激が低いかどうか	.77	.02	-.12	.19	.14	-.11	.67
無添加の化粧品であること	**.66**	.03	.21	.30	.10	.24	.64
自分の肌にあっているかどうか	**.52**	.17	.08	.16	.21	-.46	.59
保湿効果があること	.18	**.69**	-.03	.09	.07	-.14	.54
美白（ホワイトニング）効果があること	-.07	**.68**	.10	.03	-.04	.00	.49
手に入りやすい販売形態であること	-.01	**.57**	.19	.14	-.25	.16	.46
雑誌で評判がよいこと	.00	.12	**.80**	.18	.10	-.02	.71
WEB サイトで評判がよいこと	.07	.20	**.74**	.05	.02	.08	.60
国内の製品であること	.21	.05	-.04	**.76**	-.09	.19	.66
信頼できるメーカーの製品であること	.23	.00	.20	**.66**	.28	-.15	.62
有名なメーカーの製品であること	-.14	.37	.29	.63	.13	-.01	.65
高級な製品であること	.09	-.01	.22	-.03	**.72**	.19	.61
価格が安いこと	.09	.24	.24	-.22	**-.68**	.13	.66
店員の説明に納得できること	.24	.38	.22	.10	**.49**	.05	.51
海外の製品であること	.08	.13	-.29	.33	.18	**.68**	.72
家族や友人など身近な人が使っていること	.20	-.11	.31	-.01	-.02	**.53**	.43
新しく発売された製品であること	.00	.52	.23	-.14	.17	**.53**	.64
二 乗 和	3.85	1.98	1.83	1.81	1.55	1.48	12.51

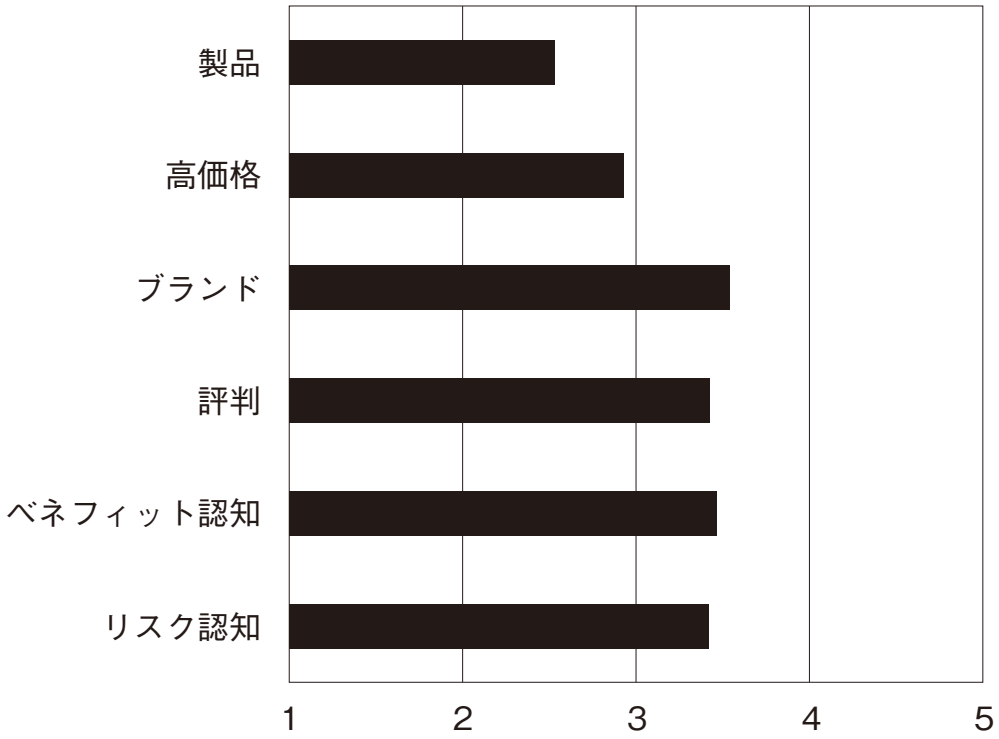


図１　スキンケア製品の選択重視度

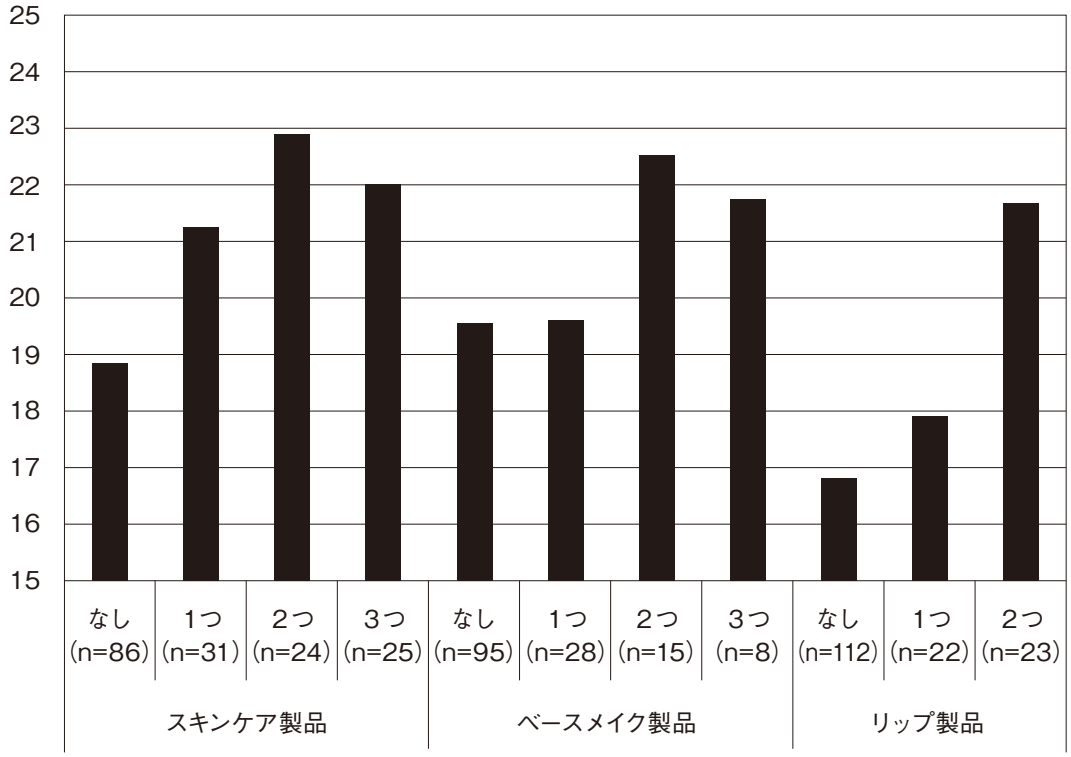


図２　トラブル経験とリスクの重視度

なリスク情報の提供と、一般の人々のリスクに対する関心・意見の表明が重要な要素として位置づけられており、化粧品に関するリスク・コミュニケーションは、このような側面が十分に機能していないことが示唆された。化粧品の製造販売業者は、単なる情報の提供で終わるのではなく、消費者が理解しやすく関心を持つようなリスク情報、安全情報の提示や提供を行い、利害関係者間に信頼を構築していくことが必要である。

謝　辞

本研究を実施するにあたりご支援をいただいた㈶コスメトロジー研究振興財団に感謝いたします。

（引用文献）

１）大坊郁夫，：顔の魅力と認知－社会心理学的展望，日本化粧品技術者会誌，34, 241-248, 2000.

２）菅原健介，：自意識尺度（self-consciousness）日本語版作成の試み，心理学研究，55, 184-188, 1984.

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り男性配偶者の quality of life の向上は図れるか?

大分大学医学部神経生理学講座

徳 丸　治

Introduction: Aging significantly affects the quality of life (QOL) of the elderly partly because of the affected perception of their body image. It is reported that makeup improves the QOL of the elderly females (wives), but little is known about its impact on their husbands. The author hypothesized that makeup of elderly wives improve not only their own QOL but also that of their husbands. Impact of makeup on QOL in senior couples was investigated.

Methods: Twelve senior couples over 60 years participated in the present study as volunteer subjects. Wives received a 1-hour session of individual cosmetic counseling, and performed the instructed makeup for the following study period of one month at home. A validated QOL questionnaire, WHOQOL-BREF, was administered to the wives and their husbands before and after the one-month study period.

Results: The mean scores of psychological QOL (p = 0.003), social relationship QOL (p = 0.02), environmental QOL (p = 0.03) and general QOL (p = 0.008) of the WHOQOL-BREF were significantly improved in the wives, while no change in QOL was observed in the husbands. QOL scores were positively correlated between physical and environmental domains, psychological and social relationship domains, and social relationship and environmental domains ($p < 0.05$). No correlation was observed between the QOL scores of the wives and those of husbands in either domain.

Conclusion: Cosmetic counseling and the following practice of makeup significantly improved QOL of the elderly females. But no impact of makeup was observed on that of their husbands.

1　緒　言

加齢に伴うさまざまな身体の変化は，高齢者の生活の質（quality of life，以下QOL）に影響を与える。高齢者は，加齢に伴う皮膚のシワや色素沈着，色素脱失，あるいは疾病による変形等の皮膚の問題を抱えている。このことから，自信を喪失したり，自己のボディイメージが悪化したり，あるいは社会から隔絶されたりすることにより，QOL が低下する[1)]。

一方，皮膚疾患の患者が化粧によるカムフラージュを行うことによって，自己のボディイメージの改善や自信の回復が図られ，社会との結びつきが回復し，QOL が改善されることが報告されている[2-5)]。化粧により化学療法および放射線療法中の乳癌患者の QOL が改善した[6)]。美容外科手術後の患者の不安状態が，カモフラージュメイクアップにより改善した[7)]。また，皮膚疾患をもつ患者本人の QOL とその家族の QOL との間の強い相関が示唆されている[8, 9)]。

近年，高齢者に対する訪問美容室などの活動が行われ，化粧による高齢者の QOL 向上が試みられている[1)]。しかし，健康な高齢女性の化粧が QOL に与える影響に関する研究は，筆者の知る限り報告されていない。従来の研究では，何らかの皮膚疾患をもつ女性が化粧をする（あるいは施される）ことによる女性本人の QOL の改善に着目されているのみである[10)]。また，女性配偶者が化粧をすることによって，男性配偶者（男性パートナー）の QOL にどのような影響を与えるか検討した報告は見当たらない。皮膚疾患患者と家族の QOL に相関がある[8, 9)]ならば，健康な高齢女性の化粧が健康な男性配偶者の QOL にも影響を与える可能性が考えられる。

本研究は，以下の仮説を検証することを目的として実施した。

(1) 化粧は，健康な高齢女性の QOL を改善する。

(2) 健康な高齢女性配偶者の化粧は，健康な男性配偶者の QOL を改善する。

2　実　験

2. 1　被験者

妻･夫のいずれも 60 歳以上の健康な高齢者夫婦 12 組（いずれもボランティアでの参加）を対象とした（以下，それぞれ女性配偶者，男性配偶者という）。これらのうち，4 組の夫婦は大分市内在住，残り 8 組は郡部在住であった。また，化粧実施期間中およびその前後に人生上の大きな出来事（身近な人の死など）が起こっていないことを確認した。

本研究計画は実験に先立って大分大学医学部倫理委員会の審査を受け，承認を受けた。被験者には本研究の目的、手順、予想される危険などを文書により説明し、書面で参加の同意を得た。

Behavioral changes in the elderly by makeup: Does makeup improve the quality of life of a husband as well as that of his wife?

Osamu Tokumaru

Department of Neurophysiology, Oita University Faculty of Medicine

2. 2　実験手順（図１）

2. 2. 1　化粧習慣の調査

化粧開始に先立ち，女性配偶者に対して現在の化粧行為および理想とする化粧について質問紙による調査を行った。その結果に基づいて，個々の被験者に対して理想的な化粧像（化粧品の種類，方法）を作成した。

2. 2. 2　化粧指導

その化粧像に基いて，女性配偶者に対し，化粧品の選び方やその使い方について約１時間にわたって個別に化粧指導を行った（図２）。指導は化粧品メーカーにて開発研究に従事した実務経験をもつ共同研究者（M. A.）を中心に行った。

2. 2. 3　化粧実施期間

必要な化粧品・道具一式（表１）を被験者に無償で提供し，指導された化粧を自宅にて１ヶ月間にわたって実施するよう要請した（化粧実施期間）。その間，研究者が被験者の自宅を不定期に訪問し，化粧が適切に行われているかどうかをチェックした。

2. 2. 4　化粧指導前後の気分の変化

１時間の化粧指導の直前直後に，女性配偶者と男性配偶者それぞれについて，質問紙により気分を評価した。

2. 2. 5　化粧指導期間の前後での QOL の変化

１ヶ月間の化粧実施期間の前後で，女性配偶者と男性配偶者それぞれについて，World Health Organization Quality of Life（WHOQOL）-BREF（WHOQOL-BREF）[11] を用いて主観的な QOL の評価を行った。WHOQOL-BREF は 26 項目の質問から構成され，physical QOL（Domain 1），psychological QOL（Domain 2），social relationship QOL（Domain 3），environmental QOL（Domain 4），General QOL，及び Overall health を測定することができる。個々の質問は１点から５点の得点で評価され，得点が高いほど QOL が高いとされる。

2. 2. 6　統計的検討は統計ソフト R ver.2.7.0 にて解析した。有意水準は５％とした。得られたデータは平均 ± 標準偏差で示す。

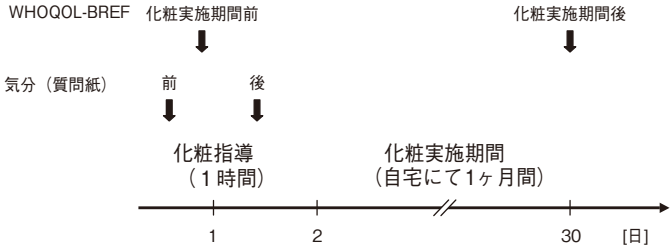


図１　実験プロトコール

表１　自宅での化粧のために提供した化粧品

洗顔料	化粧水	乳液
化粧下地	ファンデーション	
口紅	チーク	
アイカラー	アイブロウ	
その他（ブラシ類，　容器等一式		

3　結　果

3. 1　化粧実施期間中に１回以上，研究者または共同研究者が不定期に（抜き打ちで）被験者宅を訪問したが，全ての女性被験者は指導を受けた化粧を行っていた。

3. 2　大分市内在住者と郡部在住者との間で，現在の年齢，初めて化粧をした年齢や化粧品にかける費用等，現在の化粧行為に有意な差は認められなかった（表 2）。そこで以降の解析は両者を合併して行った。

3. 3　化粧指導前後の気分の変化

化粧指導の前後で，女性配偶者は調査した９項目中６項目で有意な改善が認められた:「元気さ」，「うれしさ」，「自信」「（自分は）きれい」「（自分は）若くみえる」，「（自分は）化粧をすべきだ」（表 3，$p < 0.05$）。

男性配偶者では改善は２項目に止まった:「緊張感」，「妻

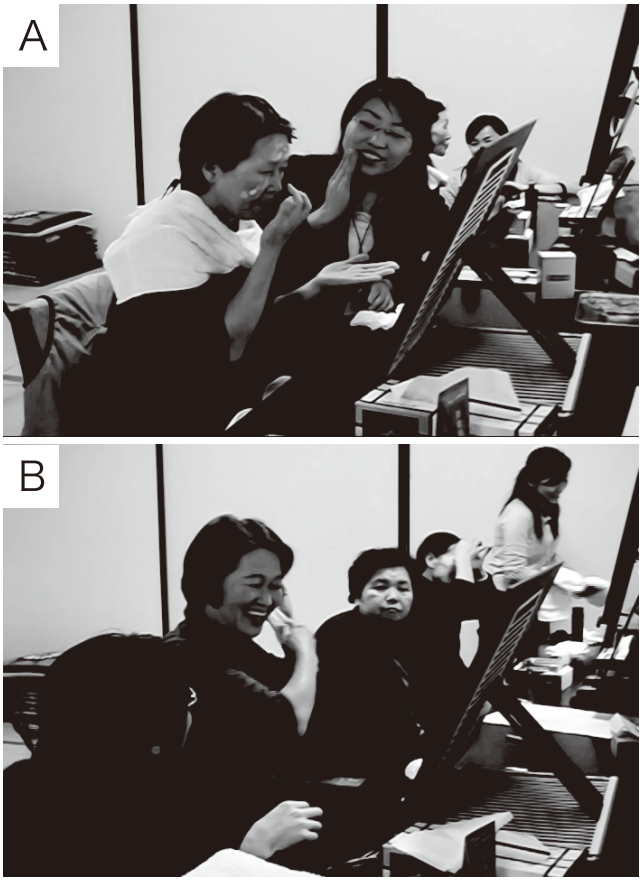


図２　化粧指導の様子。A:女性配偶者に個別の化粧指導を行った。B：化粧指導を終えて，微笑がこぼれた。

はきれい」（$p < 0.05$）。

3. 4　化粧実施期間の前後での QOL の変化

女性配偶者では，1 ヶ月間にわたる化粧実施期間の前後で WHOQOL-BREF の点数を比較すると，全ての Domain で改善を認めた（Fig. 3）。WHOQOL-BREF の点数を two-way mixed design ANOVA（主効果：1 ヶ月間の化粧実施期間と化粧習慣）により解析した（表３）。化粧実施期間の主効果は，Domain 2, Domain 3, Domain 4, General QOL において有意であった。しかし，化粧習慣の主効果はどの領域においても有意ではなかった。General QOL では化粧実施期間と化粧習慣との交互作用効果が有意であ

表２　被験者の特性

	女性配偶者		男性配偶者	
居住地	市内	郡部	市内	郡部
被験者数	4	8	4	8
年齢				
平均 ± SD	66.8 ± 5.1	70.4 ± 5.0	70.3 ± 4.8	73.0 ± 5.8
中央値	65.5	71.5	69	74
最大値-最小値	62-74	63-78	66-77	66-80
初めて化粧をした年齢				
平均 ± SD	20.0 ±0.0	21.9 ± 5.4	N/A	N/A
中央値	20	20	N/A	N/A
最大値-最小値	20-20	18-35	N/A	N/A
1 ヶ月間に化粧にかける費用	¥1,000 ~ ¥3,000	¥1,000 ~ ¥3,000	N/A	N/A

表３　化粧指導前後における気分の変化

気分	女性配偶者				男性配偶者			
	改善	悪化	不変	p-value*	改善	悪化	不変	p-value*
元気さ	5	0	7	0.013	4	2	6	0.068
やる気**	5	2	4	0.132	3	4	5	0.141
うれしさ	6	1	5	0.041	5	2	5	0.092
自信	5	1	6	0.037	5	4	3	0.361
緊張感	5	3	4	0.197	8	1	3	0.028
外出したい§	3	3	6	0.083	6	2	4	0.102
きれい**,¶	10	0	1	0.002	9	1	2	0.017
若くみえる†	11	1	0	0.004	8	3	1	0.141
化粧すべきだ‡	3	2	7	0.041	4	3	5	0.141

*：符号検定（有意な項目に下線を付した。）
**:データ欠損のため女性配偶者は n = 11 である。

§：男性配偶者の場合は「妻と外出したい」
†：男性配偶者の場合は「妻は若くみえる」
¶：男性配偶者の場合は「妻はきれい」
‡：男性配偶者の場合は「妻は化粧をするべきだ」

った。即ち，毎日化粧をする習慣のある女性は，化粧習慣のない女性よりも化粧指導により有意に大きな General QOL の点数の改善が認められた（$p < 0.022$, 図４）。

一方，男性配偶者の QOL に対しては，化粧実施期間も化粧習慣も有意な主効果は認められなかった（表４下段）。

3. 5　化粧実施期間の前後における QOL の変化の domain 間の相関

女性および男性被験者それぞれにおいて，QOL の点数の変化の各 domain 間の相関を調べた（図５）。女性では，Domain 1 と Domain 4（$r = 0.84$），Domain 2 と Domain 3（$r = 0.65$），Domain3 と Domain4（$r = 0.57$）の３組の間に有意な正の相関が認められた（図５左）。一方男性被験者では，図５右に示すように８つの Domain の組に有意な相関が認められた。

3. 6　夫婦間の QOL スコアの相関

QOL の点数の変化の夫婦間の相関を検討したところ，全ての Domain において，夫婦の QOL には相関が認められなかった（図 6）。

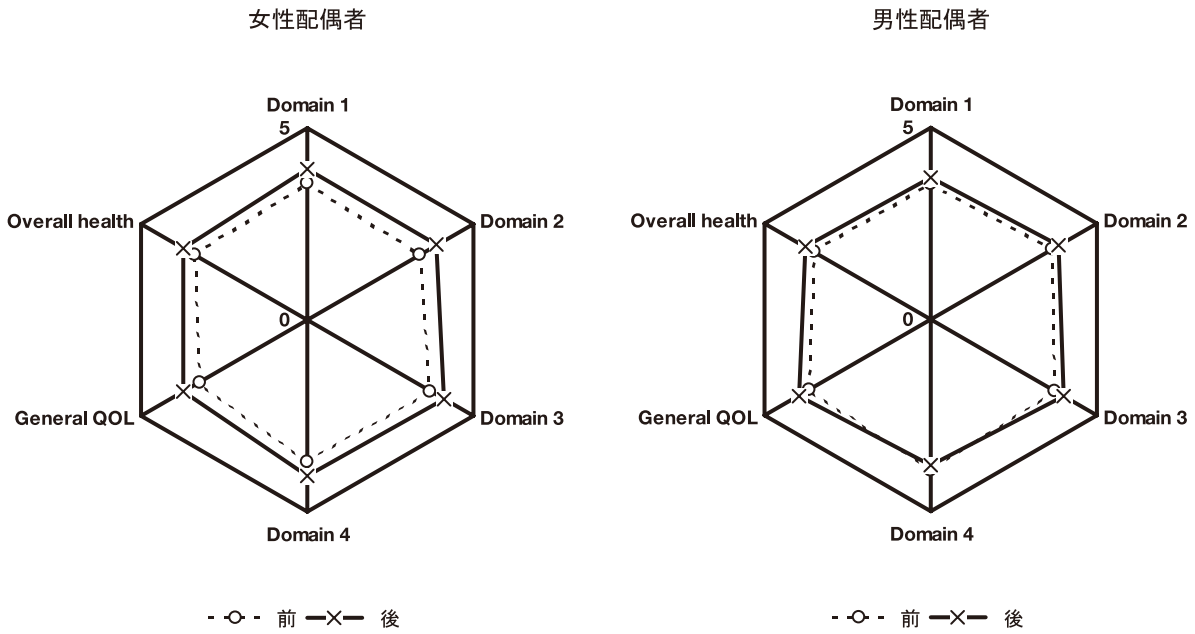


図３　１ヶ月の化粧実施期間の前後における QOL スコア（WHOQOL-BREF）

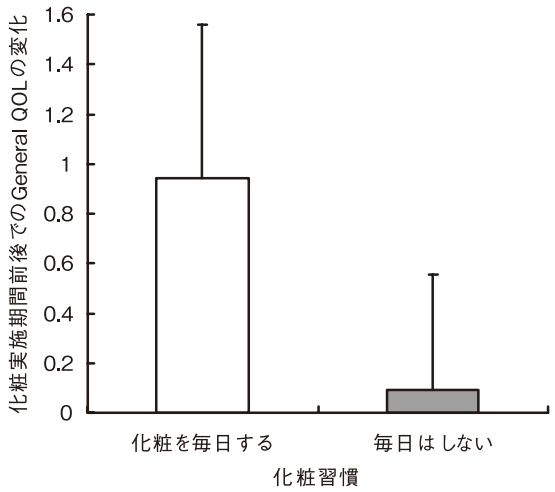


図４　WHOQOL-BREF の General QOL の化粧実施期間の前後での変化は，化粧習慣によって異なる。化粧を毎日する女性配偶者（左）の方が，毎日しない女性配偶者（右）よりも QOL が有意に改善した（$p = 0.022$）。

表４　WHOQOL-BREF による化粧実施期間前後での QOL の評価：分散分析表（Two-way mixed design ANOVA）

	領域	QOL スコア		化粧実施期間		化粧習慣		実施 × 習慣	
		前	後	$F_{1,10}$	p	$F_{1,10}$	p	$F_{1,10}$	p
女性配偶者	Domain 1	3.6 ± 0.6	3.9 ± 0.6	4.74	0.055	0.20	0.663	1.24	0.291
	Domain 2	3.4 ± 0.6	3.9 ± 0.5	15.06	0.003	1.46	0.255	0.27	0.615
	Domain 3	3.7 ± 0.5	4.1 ± 0.5	7.67	0.020	1.04	0.331	1.52	0.246
	Domain 4	3.7 ± 0.4	4.1 ± 0.4	6.04	0.034	0.36	0.562	2.84	0.123
	General QOL	3.2 ± 1.1	3.7 ± 1.3	10.71	0.008	0.78	0.398	7.29	0.022
	Overall Health	3.4 ± 0.8	3.7 ± 1.0	1.39	0.266	0.00	0.990	0.05	0.834
男性配偶者	Domain 1	3.5 ± 0.8	3.7 ± 0.6	1.14	0.312	0.39	0.546	0.05	0.827
	Domain 2	3.7 ± 0.6	3.8 ± 0.4	1.86	0.202	3.51	0.091	0.312	0.589
	Domain 3	3.7 ± 1.1	4.0 ± 0.5	0.97	0.349	0.21	0.657	0.03	0.873
	Domain 4	3.9 ± 0.6	3.8 ± 0.4	1.45	0.256	0.30	0.593	0.64	0.442
	General QOL	3.7 ± 0.7	4.0 ± 0.6	2.97	0.116	0.96	0.351	1.80	0.210
	Overall Health	3.5 ± 1.2	3.8 ± 1.0	1.94	0.194	0.88	0.370	2.33	0.158

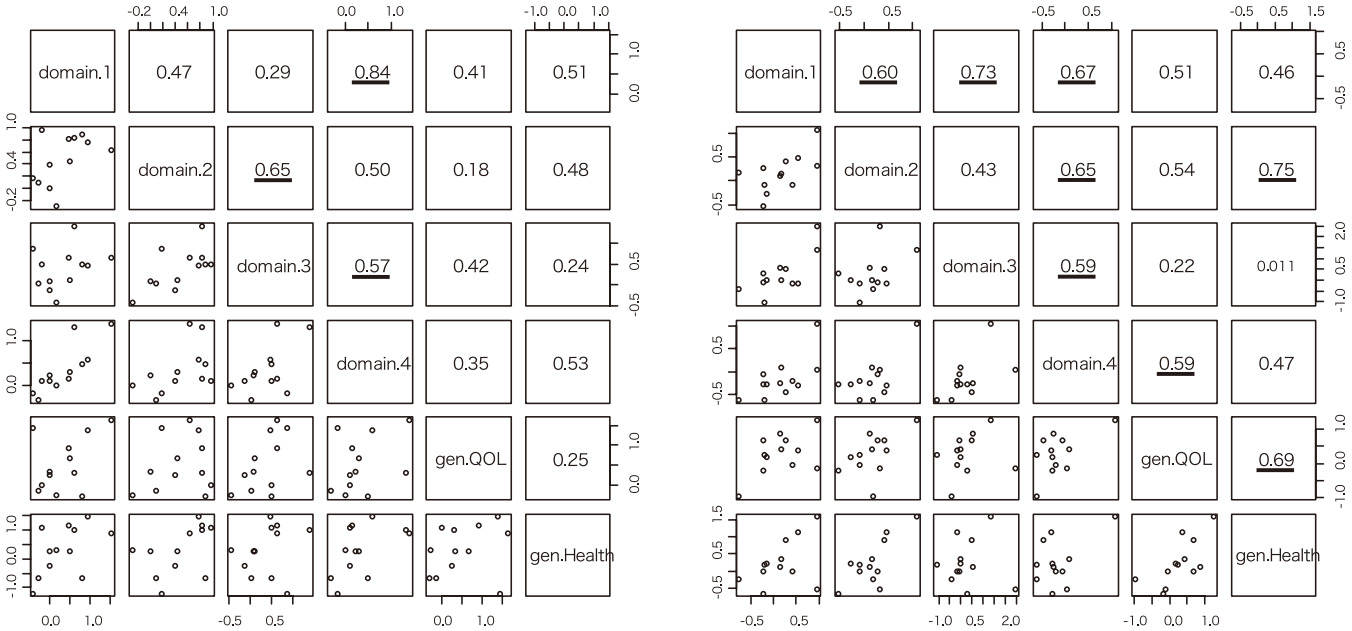


図５　WHOQOL-BREF スコアの領域間の散布図（左は女性配偶者，右は男性配偶者）。各々，右上の数字はピアソンの相関係数である（下線は有意な相関を示す）。
domain.1：Domain 1 のスコアの変化；domain.2：Domain 2 のスコアの変化；domain.3：Domain 3 のスコアの変化；domain.4：Domain 4 のスコアの変化；gen.QOL：General QOL のスコアの変化；gen.Health：General health のスコアの変化；

4 考 察

4. 1 化粧指導前後の気分の変化

女性配偶者が化粧指導を受けると，その直後の気分は9項目中6項目で有意な改善が認められた（表3）。しかし，男性配偶者ではその改善は2項目に止まった。化粧指導を直接受けたのは女性配偶者であり、その間、男性配偶者は隣室で待機していた。このため、化粧指導を受けた女性の気分が多くの面で短期的に改善したのに対し、男性配偶者ではそれが限定的にしか認められなかったのではないかと考えられる。

4. 2 女性配偶者の化粧実施期間の前後でのQOLの変化

化粧実施期間の主効果は，Domain 2, Domain 3, Domain 4, General QOL に対して有意であった（表4）。1ヶ月間にわたって化粧を実施することにより高齢女性の QOL が改善したことを示している。皮膚疾患患者が皮膚科医の指導下で化粧を実施することにより QOL の改善が認められたが，それは Domain 2（心理的QOL）に限られていたと報告されている[5)]。今回の実験では，Domain 2のみでなく、Domain 3（社会的関係）、Domain 4（環境）、および General QOL でも改善が認められた。これまでの研究は皮膚疾患などの異常をもった女性が対象に行われてきたのに対し、本研究は健常な女性を対象としたことが従来の報告よりも多くの領域において QOL の改善を示した理由である可能性が考えられる。

女性被験者において、化粧習慣の主効果はどの領域においても有意ではなかった。しかし、General QOL のスコアに対して、化粧実施期間と化粧習慣との交互作用効果が有意であった。我々は当初、普段化粧する習慣のない高齢女性ほど化粧をすることによって、彼女のボディイメージの改善や自信の回復が図られ、また社会との結びつきが回復し，その結果QOL が改善するであろう[2−5)]との仮説をもっていた。しかし、実験の結果はその逆で、化粧習慣のある人ほど General QOL のスコアは有意に大きな上昇を示した。一つの解釈として、普段から化粧をする習慣のある女性とない女性では，化粧に対する興味の度合いに元々差がある可能性を挙げることができる。普段から化粧をする習慣のある女性は、正しい化粧品の使い方を教示され、普段とは違った化粧品を使用することを楽しんでいたのに対し、普段化粧する習慣のない女性は元来化粧に対する興味が薄く化粧実施期間を楽しめなかったのかもしれない。

4. 3 男性配偶者の化粧実施期間の前後でのQOLの変化

男性配偶者の QOL に対しては，化粧実施期間も化粧習慣も有意な主効果は認められなかった（表4）。皮膚疾患をもつ患者本人の QOL とその家族の QOL との間に相関がある[8, 9)]ことから推論して、化粧による女性の QOL の

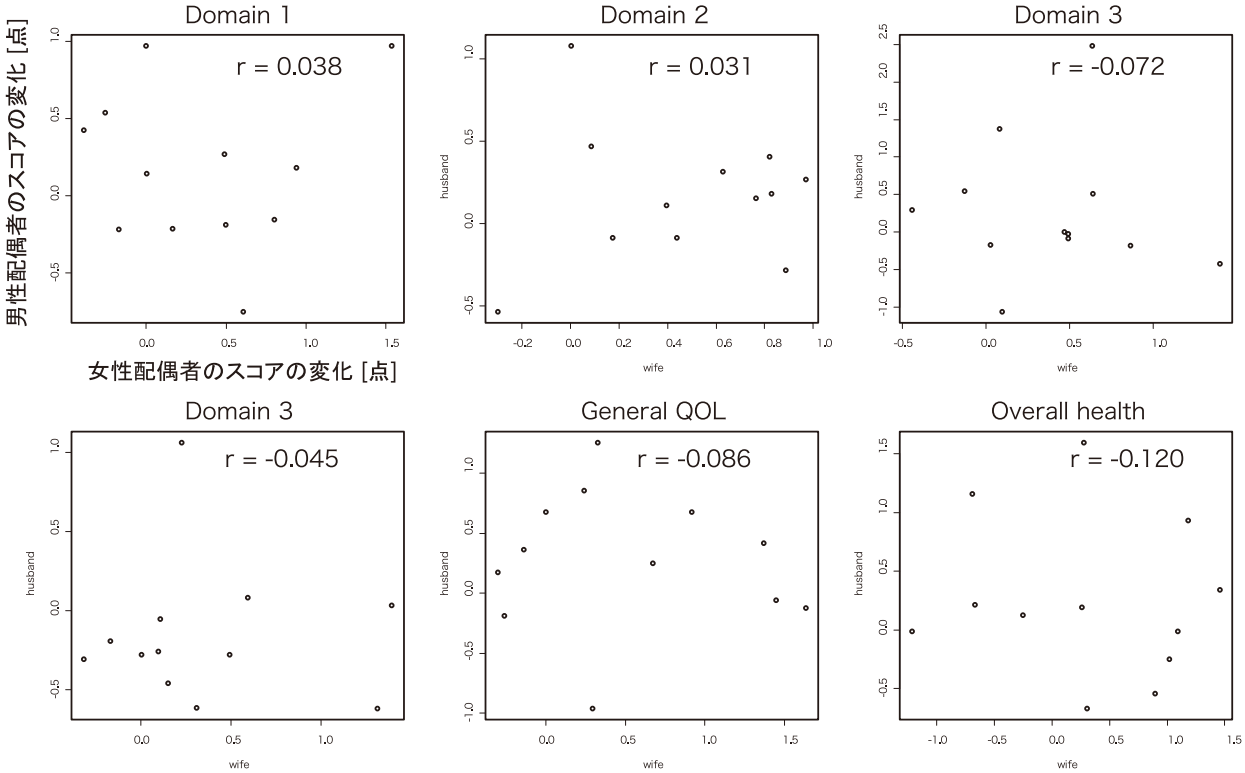


図6 WHOQOL-BREF スコアの夫婦間の散布図を示す。横軸は女性配偶者のスコアの変化［点］，縦軸は男性配偶者のスコアの変化［点］である。

改善に伴いその男性配偶者の QOL も改善するであろうとの仮説を立てた。しかし、本研究では１ヶ月間にわたる化粧実施期間の前後で男性配偶者の QOL に差は認められず、その仮説は否定的であった。

4. 4　女性配偶者における QOL の変化の domain 間の相関

女性配偶者の化粧実施期間の前後の QOL スコアの変化について，Domain 1 と Domain 4，Domain 2 と Domain 3，Domain3 と Domain4 の３組の間に有意な正の相関が認められた（図５左）。Domain 2 と Domain 3 の間の相関は、例えば「あなたは自分の身体的見た目を受け入れることができますか？」といった心理的因子の改善が、対人関係の改善につながっていることを示唆していると考えられる。Domain 1 は Domain 4 と相関していた。現実的に考えると、化粧を行うことのみによって身体的な状態が変化するとは考えにくい。同様に、化粧をすることによって環境要因を変化させることも物理的に不可能である。女性被験者は、化粧を行うことによって心理的および社会的関係性が改善する（表４，図５）。それらの改善によって，本来化粧によって変化するとは考えられない身体的QOL の因子や環境的QOL の因子がよりよい方向に変化したと感じるようになるために、QOL のスコアが改善した可能性が推察される。

4. 5　男性配偶者における QOL の変化の domain 間の相関

一方，男性被験者では，８つもの Domain の組に有意な相関が認められた（図５右）。化粧実施期間の前後で QOL のスコアが変化しなかったにもかかわらず、多数の領域のスコアどうしが相関したのは不可解である。この多数の領域間の相関の理由は不明である。

4. 6　夫婦間の QOL スコアの相関

QOL の点数の変化の夫婦間での相関を検討したところ，全ての Domain において，夫婦の QOL には相関が認められなかった（図 6）。皮膚疾患をもつ患者本人の QOL とその家族の QOL との間に相関がある[8, 9]ことから、夫婦間でその QOL には何らかの相関があると予想したのであるが、この仮説も誤っていた。

4. 7　今後の課題

本研究では，化粧実施期間の後に男性配偶者の QOL の改善が認められなかった。また，その QOL スコアの変化は，女性配偶者のそれとは相関がみられなかった。その理由として，以下の仮説を考えることができよう。

(1) 男性配偶者の QOL は、女性配偶者の化粧によって影響を受けない。

(2) 男性配偶者の QOL は女性配偶者の化粧によって影響を受けている。しかし、今回使用した QOL 評価バッテリーではその変化を捉えることができなかった。

化粧指導の間，隣室で待機していた男性配偶者は、指導終了後にきれいに化粧した妻と対面した。非定量的な観察所見であるが、普段とは違った化粧をした妻と対面して，多くの男性配偶者は笑顔をみせていた。この観察と化粧指導後の男性配偶者の気分に少数項目ではあるものの改善がみられた（表２）ことから考えて、男性配偶者が妻の化粧に全く関心がない訳ではないと考えられる。また，皮膚疾患の患者の QOL とその家族の QOL との間に相関がみられたように、化粧実施期間後における高齢女性の QOL の改善に伴い、その男性配偶者の QOL も改善する可能性が推察され，今回の実験ではその変化をよく評価できなかったとする仮説（2）の可能性が示唆される。

しかし、WHOQOL-BREF は国際的に広く使われている汎用の QOL バッテリーであり、本実験において高齢女性の QOL の変化はよく検出されている。そのバッテリーが同時に評価した男性配偶者の QOL の変化を全く検出できないできないと仮定することは，極めて不合理である。化粧指導の直後の男性配偶者の気分の変化が女性と比較すると限定的であったことも、男性の QOL が変化しなかった可能性と矛盾しないと考えられ、これは仮説（1）を支持する。

従って，現時点では化粧の男性配偶者の QOL に与える影響については否定的であると推察する。しかし，化粧が男性配偶者の QOL に影響を与えるか否か、さらに研究を進めて検証していく必要がある。また，本研究では女性配偶者と男性配偶者それぞれの QOL を評価したが，夫婦としての QOL の評価は行っていない。化粧が，夫婦としての QOL を高めることができるかどうか，今後の研究の中で検討していく必要がある。

5　総　括

5. 1　高齢女性配偶者の化粧は、女性本人に対して気分の改善をもたらしたが，男性配偶者の気分に対する影響は限定的であった。

5. 2　高齢女性配偶者の１ヶ月間にわたる化粧実施は、本人の QOL の改善をもたらした。

5. 3　しかし、その男性配偶者には化粧実施期間後の QOL の変化は認められなかった。

5. 4　化粧実施期間前後の高齢女性の QOL の変化は男性配偶者の QOL の変化とは全く相関がなかった。

5. 5　化粧が男性配偶者のQOLに影響を与えるか否か、また夫婦としてのQOLにどのような影響を与えているか，さらに研究を進めて検証していく必要がある。

謝　辞

本研究を行うに当たり助成を頂いたコスメトロジー研究推進財団に深く感謝申し上げます。

共同研究者の横井功，黒木千尋，尾方和枝（大分大学医学部神経生理学講座），山田和廣（大分医科大学名誉教授），丸野綾子，路昭暉，江原千尋（大分大学医学部医学科学生）各氏に深謝申し上げます。

また，被験者を募集するに当たりご協力いただいた鶴山恒教（池中山安祥院蓮華寺住職・大分県国東市），首藤孝宏（大分大学医学部附属病院）両氏に篤く御礼申し上げます。

本研究の一部は10th International Congress of Behavioral Medicine（2008年8月，東京）および第14回日本行動医学会学術総会（2008年3月，津市）にて発表した。

共同研究者である丸野綾子氏は上記学会での発表により，日本学生支援機構の平成20年度優秀学生顕彰事業優秀賞を受賞した。

（引用文献）

1）Kligman AM: Psychological aspects of skin disorders in the elderly, Cutis, 43, 498-501, 1989.

2）Boehncke WH, Ochsendorf F, Paeslack I, et al.: Decorative cosmetics improve the quality of life in patients with disfiguring skin diseases, Eur J Dermatol, 12, 577–80, 2002.

3）Holme SA, Beattie PE, Fleming CJ: Cosmetic camouflage advice improves quality of life, Br J Dermatol, 147, 946–9, 2002.

4）Hayashi N, Imori M, Yanagisawa M, et al.: Make-up improves the quality of life of acne patients without aggravating acne eruptions during treatments, Eur J Dermatol, 15, 284-7, 2005.

5）Matsuoka Y, Yoneda K, Sadahira C, et al.: Effects of skin care and makeup under instructions from dermatologists on the quality of life of female patients with acne vulgaris, J Dermatol, 33, 745–52, 2006.

6）Titeca G, Poot F, Cassart D, et al.: Impact of cosmetic care on quality of life in breast cancer patients during chemotherapy and radiotherapy: an initial randomized controlled study, J Eur Acad Dermatol Venereol, 21, 771–6, 2007.

7）Aydogdu E, Misirlioglu A, Eker G, et al. : Postoperative camouflage therapy in facial aesthetic surgery. Aesth Plast Surg, 29, 190–4, 2005.

8）Basra MKA, Sue-Ho R, Finlay AY: The Family Dermatology Life Quality Index: measuring the secondary impact of skin disease, Br J Dermatol, 156, 528–38, 2007.

9）Basra MKA, Edmunds O, Salek MS, et al.: Measurement of family impact of skin disease: further validation of the Family Dermatology Life Quality Index (FDLQI), J Eur Acad Dermatol Venereol, 22, 813–21, 2008.

10）Finlay AY, Khan GK: Dermatology Life Quality Index (DLQI) – a simple practical measure for routine clinical use, Clin Exp Dermatol, 19, 210-6, 1994.

11）WHOQOL Group: Development of the World Health Organization WHOQOL-BREF quality of life assessment. Psychol Med, 28, 551-8, 1998.

経済開放政策以降のインドにおける中間層の増加と化粧品の消費動向の変化に関する研究

東北大学大学院文学研究科
岡 光　信 子

This study focuses on the Indian economic growth and the variation of commodities, especially cosmetics. After Gulf war, the remittance abroad reduced, so India suffered from a shortage of foreign currencies. Indian government set up the open policy economy and welcomed foreign investments in 1991.

After that, the worldwide companies regard India as the giant market. Both inter and international cosmetic companies target Indian market. The consumers have many choices in cosmetics, as a result they prefer industrial cosmetics to natural cosmetics. On the other hand, the natural ingredients cosmetics are revalued and more popular in advanced countries. Indian consumers have experienced both industrial cosmetics and natural cosmetics. Their next choice would be the unique example to know the future of cosmetic culture.

1．緒　言

本研究は、経済政策の転換による中間層の増大という社会変化とそれによりもたらされた消費財の多様化に着目し、インドの消費動向の変化に関する研究として立案されたものである。90年代の開放経済以降、インドは巨大な市場として世界的に注目されている。本研究の目的は、購買力のある中間層が種類と価格帯が豊富になった化粧品を取捨選択していることに注目し、消費者の化粧品に対する意識の変容、消耗品としての化粧品の行方について考察を行うものである。

インドの製造業は、閉鎖的な経済体制のもと、長期間にわたる中央政府の国内産業保護政策によって、粗雑な製品でも国内市場で販路を確保することができた。インド製品は、外国企業との競争にさらされずにいたため国際競争力を欠き、国外市場ではほとんど見向きもされなかった。産業不振にあえぎ国際収支が悪化し、湾岸戦争が起こり（1990～91年）、外国からの送金が途絶え、インドは未曾有の外貨不足に陥った。1991年、インド政府は、経済を立て直すために国内産業保護政策から経済開放政策に大きく転換した。

経済開放以降、インド経済はIT産業や医薬品の分野で高い業績を上げ、年率8％の経済成長を続けるまでになった。現在、年収9万ルピー以上の中間層が全人口（約11億人）の約20～30％にまで膨らみ、世界中の企業がインドを巨大なマーケットして注目するようになった。

The Growth of the Middle Class and the Change in Cosmetic Comsumption in India after the Intrudoction of Open Policy Economy

Nobuko Okamitsu

Graduate School of Arts and Letters, Tohoku University

経済開放以前、インドで入手できる化粧品の種類は非常に限定されており、粗雑な国産化粧品または高品質だが高額な外国製品という極端な品揃えであった。そのため、ほとんどの女性は、髪や素肌に栄養を与えるココナッツ油、水に溶かしたターメリックを日焼け止めとして使用する程度に過ぎなかった。これら伝統的な化粧品は、香りや見た目は悪くとも、安価で優れた効用があることから所得の上下に関わらず多くの人が愛用していた。

経済開放以降、有名外国ブランドだけでなく大小の国内製薬会社が化粧品市場に参入する状況になった。国産化粧品会社は、ブランドイメージの高い外国化粧品および新規参入社への対抗措置として、従来のメーキャップ用品中心の方針を切り替え、基礎化粧品からヘヤケア製品に至るまでラインナップを増やし、ミニサイズや多様な価格帯のシリーズを導入するなど、消費者が自社製品を選択する対策と努力を惜しまなかった。このような状況の下、インド国内で購入できる化粧品は、基礎化粧品からメーキャップ用品に至るまで多様な種類と価格帯が揃ってきた。現在、消費者は、自分のニーズに応じた化粧品を購入することが可能になっている。

2．考　察

2．1　インドの伝統的コスメティック

美しくありたいというのは、洋の東西を問わず、女性の永遠の願望である。女性のファッションと化粧とは、切っても切り離せない。工業製品が出回る以前、インドでは化粧品を生活の身近なところから調達し使用していた。古来インドの女性たちは、オイルやハーブなどの自然素材を使って、肌や髪の美しさを引き出していた。例えば、ココナッツ油は髪と地肌を健康にするために老若男女を問わずに用いられていた。また、ハーブエキスを加えた油は、肌をなめらかにするのと皮膚を保護する作用があるために、沐浴する前のマッサージに用いられていた。

伝統的な化粧品は、日常生活の中で自然に使われていたものである。特に、ココナッツ油は、安価であることも手伝って多目的に使われている。例えば、髪や素肌に栄養を与える作用に加え、男女を問わず整髪料にも、強い日差しによる皮膚の乾燥を保護するためにも用いられている。ココナッツ油は、単独で用いられるだけでなくハーブと併用される場合もある。ニーム(インドセンダン)という植物は、アザディラクチンという抗菌作用の強い成分が含まれており、その葉や実は、アーユル・ヴェーダという古代インド医学でも内服薬・外服薬として用いられていた。それゆえ、ニームの葉を漬けてそのエキスを抽出したココナッツ油は、髪と地肌にたっぷりと刷り込んで２～３時間置いてからシャンプーすると、地肌を清潔にするだけでなく、オイルの栄養が髪と地肌にいきわり髪を艶やかにすると言われている。2000 年代に入り、インドが豊かな様相を見せてきても、リンスやヘヤー・コンディショナーは、シャンプーに比べまだ高嶺の花の感が強く、シャンプーだけを使っての洗髪となることも多い。したがって、ココナッツ油は、今も女性たちの洗髪の際の必需品となっている。

インディアン・グースベリーの実を乾燥させて粉状にしたものは、アムラーと呼ばれ、古来からシャンプーの代わりに使われていた。シャンプーは、髪に付着した汚れだけでなく油分も奪うため、髪はどうしてもぱさぱさになる。アムラーは、シャンプーに比べると洗浄力が落ちるが、髪と地肌の汚れを吸収するだけでなく適当に油分を補ってくれるため髪が傷まないという。しかし、シャンプーが普及するにつれて徐々に使われなくなってきた。2006 年の現地調査では、アムラーは化粧品と衛生用品を扱う薬局の目立たない片隅で細々と売られていた。

ターメリック（うこん）・パウダーを水で溶かしてペースト状にしたものは、顔に塗ると気化熱で涼しく、日焼け止めにも利用されてきた。現在でも田舎に行くと、ターメリックのペーストで顔を黄色にした女性たちを目にすることができる。ターメリックは、もともと殺菌作用が強く、肌に塗ると吹き出物や湿疹等の肌のトラブルを未然に防ぎ、肌荒れなどの症状を鎮める作用があるとされている。

インド人は概して多毛な民族である。うら若い女性といえども、その鼻の下に、口ヒゲと見まがうような立派な産毛が見られることがある。ターメリックには発毛を抑える効果があると考えられている。親は、産毛が濃くならないよう、幼い娘の鼻の下にたっぷりとターメリック・ペーストを塗ってやったものである。いま日本で流行のインドエステでも、色素沈着を防いだり脱毛・除毛に効果があるものとして、ターメリックを粉にした「アンバハルディ」が注目されている。

スパイスでもあるクローヴ（丁字）は、口に含むと口臭を消す作用がある。口臭対策として、奥歯にクローヴを挟むこともあるという。歯磨き粉にクローヴのエキス入りを売り物にしているものも存在する。ココナッツ油、ターメリック、クローヴは、料理の味を調えるために不可欠な食用油やスパイスであり、どの家庭にも切らさずに置いてある。また、インディアン・グースベリーは、ビタミンＣが多く含まれるため生食にもピクルス加工にも用いられ、成長すれば大木となり木陰を提供する。

ヘナ（和名では指甲花またはツマクレナイノキ）・パウダーを水で溶かしたペーストは、昔から爪を染めたり、手に文様を書くのに使われ、また髪につやと栄養を与えるものとしても重宝されてきた。ヘナは、古代から、殺菌効果や体温を下げる効果があることも知られており、薬剤、防腐剤としても用いられていた。

これら天然素材の化粧品は「かぶれ」などの副作用も少なく、人々の経験によって安全性と効用とが証明されてきた、いわば「生活の知恵」の結晶である。現代科学は、伝統的に用いられてきたこれら天然素材の化粧品の薬効を立証している。たとえば、ターメリックの主成分クルクミン（クルミン）の効用として、メラニン色素の生成抑制作用のような美容に関わるもののほかに、肝臓の働きの活性化(胆汁分泌やアルコール分解の促進)、抗酸化による老化防止、動脈硬化の防止、利尿作用、ガン抑制効果、殺菌・抗菌作用などが指摘されている。日本でも、同様の効用を掲げてターメリックを宣伝している会社もあるほどである。

ほんの一昔前まで、農村だけでなく都会でも、女性たちはせいぜい伝統的な化粧品を用いる程度であった。都市部に住む中産階級の主婦であっても、髪にココナッツ油をつけるくらいが関の山で、特別なスキンケアなどはせずに日々の暮らしを送ってきたものである。当時国内で売られていた「商品」としての化粧品は、種類が少なく価格も低廉かつ品質にも問題あるものが主流を占めていた。それだけ需要が伴わっていなかったのである。そもそも汗のにじむインドの気候風土で、成人女性が日常的にメーキャップを施すこと自体、あまり現実的なことではない。大きな需要がなかったのも当然といえば当然である。それでも、富裕で美的好奇心の旺盛な女性たちは、自ら渡航先で購入したり外国在住の友人に頼むなど、涙ぐましい努力を傾けて舶来の化粧品を調達していたものである。

2. 2　経済開放政策以降の化粧品をめぐる動き

経済開放政策が功を奏し始める 1990 年代の後半になると、世界的な化粧品会社であるレブロン（Revlon）やエイボン（Avon)、スウェーデンの化粧品会社であるオリフレーム（Oriflame）などがインドに進出してきた。特に 2000 年から 2001 年にかけ、海外の有名な化粧品会社が続々とインドに参入するなど、インドの化粧品業界はにわかに活況を呈するようになった。この時期、ロクシタ

ン（L'Occitance）、クリスチャン・ディオール（Chiristian Dior）などの高級化粧品会社が高所得者層に的を絞って販売を開始し、日本の資生堂もムンバイーに進出を果たしている。資生堂は、富裕層をターゲットに、1,000 ルピー以上の価格帯の高級品を投入して市場の開拓を試みている。子会社を動員するなどしながら販売戦略の強化をはかっている。

これは 2006 年の調査時点での話だが、インドに進出したある欧米の化粧品会社（ロレアル）は、カラーリングした髪専用に特化したシャンプーとコンディショナーを販売していた。それらは 200 cc入りのボトルでインド製であるが、ショッピング・モールに出店している某チェーン店で 219 ルピーで売られていた。同じ容量のタイ製輸入シャンプーが、同じ店で 79 ルピーで売られていることからすれば、こうした特化した商品は富裕層をターゲットにしていることは明白である。2000 年ころには、チェンナイのような都会でも化粧水とヘヤー・コンディショナーを探すのに一苦労したのに、ここ数年の商品の多様化には目を見張るものがある。

国内外の化粧品会社は、テレビや雑誌などで新しい商品のコマーシャルを積極的に行い、化粧品市場の開拓に余念がない。購買力のある層は、多様な商品ラインナップの中から自分の好みにあった高品質のものを国内で購入することができるようになっている。さらに、インターネットの普及により、日本の中小の化粧品会社の商品すら知られるようになっている。商品の多様化は、高価格化に傾斜しているのでなく、ミニサイズなどの導入により手頃な価格の化粧品も販売されるようになり、これまで化粧品の購入を控えていた層にも販売路を見いだしている。

こうして国内外の化粧品ブランドが市場拡大をねらって鎬を削った結果、現在のインドの化粧品市場は、口紅やファンデーションをはじめとするメーキャップ用品、スキンケア用品からヘヤケア用品に至るまで、さまざまな価格帯の商品が見られるようになっている。このことは化粧品を日常的に使う女性がそれだけ増えたことを意味する。老舗の国産化粧品メーカーであるラクミー（LAKMÉ）は、豊富な製品ラインナップと価格帯の多様さを武器に業界トップの地位にある。しかし、大小さまざまな国産製薬・化粧品会社も積極的に展開を図っており、自然素材やインドの伝統医術であるアーユル・ヴェーダを売り物にした化粧品なども生産・販売されている。このように化粧品の品揃えが豊富になったおかげで、消費者は自分の好みや予算に応じた商品を自由に選べるようになっている。安価な美白クリームやシャンプーが田舎でも手に入るようになり、都会に比べて保守的な村落部でも愛用する女性が珍しくなくなった。

2008 年の現地調査時、最近できたばかりの、チェンナイでもっともトレンディーなショッピング・コンプレックスとされるシティー・センターを訪れた。そこの化粧品売り場では、資生堂、クラランス、レブロン、イブサンローラン、ブルジョアなどの外国の化粧品会社だけでなく国産の化粧品会社ラクミーが出店しており、日本のデパートの化粧品売り場と見間違うようなしゃれたディスプレーをして販売していた。資生堂の売り場では、1,000 ルピー以上の買い物をした人には、無料でお肌のカウンセリングを行うというサービスを売りにしていた。販売を担当する美容部員は、自らモダンに化粧を施し、英語で顧客に接してくる。化粧水が 1 本 1,000 ルピー以上する商品を買いに来る層は、日常的に英語を用いるような富裕層に限られており、そうした階層の女性たちが販売のターゲットになっていることは一目瞭然である。

2003 年に筆者が南インドの村に長期滞在していた折には、1,000 ルピーというお金があれば、田舎で四人家族が 1 ヶ月の食費を十分にまかなえたものである。輸入化粧品は、おおかたの庶民にとっては手の届かない代物であり、かなりの贅沢品である。1,000 ルピー以上する輸入化粧品を買えるような富裕層は、仕事や休暇で海外渡航する機会も十分にあるが、化粧品を買うために海外渡航する訳にもいかない。かといって慣れない国産化粧品を使うことにも気が引けるので、価格が高くとも輸入化粧品をインド国内で買うことにならざるを得ないのだという。

2. 3　伝統的な化粧品離れ

ほんの数年前まで、インドでは、長期間の保護経済政策ゆえに、粗雑な国産品もしくは高額な輸入化粧品しか流通しておらず、一部の富裕層を例外として伝統的な化粧品以外に選択の余地がなかった。さらに、熱い気候にも関わらず冷房設備の普及率が低く、汗で直ぐに流されるメーキャアップも普及しなかった。化粧をするという行為だけでなく、スキンケアすら一般的ではなかったのである。

現在、多種多様な消耗品としての化粧品を選択できる状況になったことで、伝統的な化粧品離れの現象も見られるようになっている。以前ならスキンケアやヘヤケアは、工業製品ではなく、オイルやスパイスなど身近にあるもので済まされていた。しかし、安価な製品が市場に供給されるようになると、手軽さなども手伝って、伝統的なものから規格化した化粧品に切り替える女性が増えているのである。

例えば、ヘナの代わりに欧米のメーカーのカラーリング剤を使う女性が着実に増えている。ヘナの粉を水で溶いたペーストは、髪に塗って色を定着させ、洗い落とすまで時間と手間がかかる。しかし、その割に退色が早い。インドで売られている天然素材のヘナは、白髪だけが赤く染まるため、白髪染めをしていることが一目瞭然となる。それを嫌がる女性も少なくないという。

それに比べカラーリング剤の方は、色も豊富な上に染め上がりも自然で、簡単に染められ色も長持ちするというのである。インドの人は、カラーリング剤による髪の痛みや染める際の刺激臭をあまり気にせず、染め上がりの良さと退色の少なさのほうを重視する傾向が強い。日本でヘナが髪にも地肌にも優しい天然素材のカラーリング剤として人気を集めているのときわめて対照的である。

かつて、化粧品といえば、いわゆる髪や素肌を健やかに保つ自然素材の基礎化粧品が一般的であった。ココナッツ油、ヘナ、インディアン・グースベリー、ターメリックやクローヴなどのオイルやハーブが用いられていた。これら伝統的な化粧品は、日常的な食品であることから安全性は長い間の使用で証明されており、入手も簡単で安価であるという特徴がある。

自然素材の化粧品は、工業製品と比較してアレルギーや副作用が少ないため、欧米を中心に人気が高まり、世界的な基準で考えれば消費人口が減少しているわけではない。欧米における自然派化粧品への再評価がある一方、インドでは工業製品化した化粧品の消費が伸びているのである。特に、経済政策の転換以降、国内外の化粧品メーカーがしのぎを削り、購買力のある層が増加したことも重なり、自然派の化粧品離れがすすみ、工業製品化した化粧品の消費が急増している。伝統的な化粧品から規格化した化粧品に乗り換える傾向は、都市部だけでなく村落部でも目立っている。

工業製品化した化粧品が一般化するにつれ、天然素材の伝統的な化粧品離れが進み、以前では考えられなかった化粧品による湿疹などのトラブルを耳にするようになった。伝統的な化粧品では起こらなかった化粧品が原因となるアレルギーが報告されるようになっているのである。例えば、美白クリームを使って湿疹が出たという話も珍しくない。「化粧する」という行為が一般化するにつれて、伝統的なものにはあまりなかった「副作用」という予期せぬ出来事に遭遇する事態となっているのである。しかし、現時点では消費者が自然派化粧品に回帰する動きは見られない。

3．総　括

人文科学における化粧に関する研究は、化粧の変遷に関する歴史的な研究、化粧を文化的表象として位置づける文化史的な研究が主流となっている。本研究は、経済開放政策以降、インド社会が巨大な化粧品市場として注目される状況を鑑み、消費者の嗜好が伝統的な化粧品から工業製品化した化粧品に移行する現象を捉えた。さらに、経済・社会環境の変化における消耗品としての化粧品の位置づけを分析し、インドにおける商品としての化粧品の可能性について考察を行った。

現地調査を通じて、インド国内で入手できる化粧が多様化していること、ハーブや香油を用いた天然素材のものから国内外の製薬・化粧品メーカーによる工業製品に消費動向がシフトしていることが確認された。このこと自体、中間層が急増するインド社会における化粧品の消費動向の顕れのひとつとして捉えることが可能である。また、近年の化粧品の消費傾向は、インドにおいて化粧品が髪や素肌を健康に保つ補助品であるのか、または美を追究する手段となるのか、ステータスシンボルのような別の意義を有していくのかについて一定の予見を提示できる可能性も秘めている。

一方、欧米を中心に、化学物質に対するアレルギー反応の増加や代替医療としてのアロマセラピーなどへの関心の高まりから、ハーブ、泥や植物の香油などの天然素材を原料にした化粧品に対するニーズが増加している。日本においても、こうした自然派化粧品への再評価は、安全な原料を使って添加物を含まない化粧品を自分で作る指南書が複数刊行されていることからも理解できる。

一般的に、化粧品市場は、世界的に消費者マインドの変化が激しく、間をおかずに新しいものへとトレンドは移っていく。商品のサイクルも速い。このような業種が、何かにつけてテンポの緩慢なインドという土地柄で、どのような展開を見せていくのか注目されるところである。伝統的化粧品と工業製品化した化粧品の双方を経験した消費者が、今後何を選択するのかインドの化粧品の消費動向は化粧品文化の行方を考察する上で貴重な事例といえる。

（主要参考文献）

1）Cunningham Scott, : *The Magical Power of Herbs*, New Age Books, New Delhi, 2007.

2）Farrer-Halls Gill, : *The Aromatherapy Bible: The Definitive Guide to Using Essential Oils*, Godsfield Press, London, 2005.

3）Mathew A.G., : *Indian Spices*, DEE BEE Publications, Kottayam, n.d.

4）宮野博司，宮野ちひろ，:『心と体に効く　ハーブ栽培78種』，成美堂出版，東京，2001.

5）Mukherjee Pippa, : *Nature Guides Common Trees of India*, Oxford University Press, Bombay, 1990.

6）Pengelly Andrew, : *The Constituents of Medical Plants: An Introduction to the Chemistry and Therapeutic Herbal Medicine*, Allen & Unwin, Crows Nest, 2006.

7）鮫島浩二，:『女性によく効くアロマセラピー』，株式会社主婦の友社，東京，2003.

8）Sharma Rajeev, : *Herbal Home Remedies*, Lotus Press, New Delhi, 2006.

9）山下博司，岡光信子，:『インドを知る事典』，東京堂出版，東京，2007.

記念講演

平成20年度記念講演　竹内 一郎

見た目を磨く、内面を磨く

比較社会文化博士　劇作家・演出家
竹内　一郎

場所：コーセー王子研修センター
日時：平成20年11月12日（水）

私は演劇をやったり漫画の原作をやったりしております。そうすると、私が書いた言語、言葉はすばらしい役者さんがしゃべれば伝達力は上がるんです。下手な演出家が演出をすると伝達力は下がる。あるいは漫画もすばらしい漫画家が漫画にしてくれると、伝達力は上がる。で、そういうことを考えると、私が書いた言語というものは、実は非言語的なメディアに大きく左右されて伝達力が変わるんだというふうに思うようになりました。

そこで、非言語コミュニケーションの重要性というのを考えるようになりました。日本で長いことコミュニケーションといえば、話し方の本と書き方の本しかございませんでした。しかし、考えてみますと、話し方や書き方以外にも、表情とかしゃべり方、衣服、今日身近なところで言うならばメイク、ヘアースタイル、いろんなメディアが我々のパーソナリティーを伝達しております。つまりそれもひっくるめて非言語的なコミュニケーションは非常に大きいんだというふうに考えるようになりました。

私が「人は見た目が9割」を書いたのは3年前ですけど、そこから少しずつ日本でも選挙の場合にはアクションが大事、しゃべり方が大事であるとか、裁判の中でもその被告はどう言ったかだけではなくて、どのように言ったのか、あるいは学校の教育の現場でも、先生がこう言ったのではなくて、どのくらい魂を込めて相手の胸を揺さぶったのか、それが大事だというふうな世論が少しずつ広がってきたかと思います。

非言語コミュニケーションにはどのようなものがあるんでしょうか。

これは伊藤進さんという方が分類されたんですが、このくらいたくさんメディアがあるんですね。パラランゲージ、たとえば声の高さですね。これも十分にコミュニケーションのツールです。一般的にアナウンサーの試験に受かりますと、低い声を出すようにトレーニングをします。低い声のほうが相手を落ち着かせる傾向があるということなんです。

逆に高いからだめということはありません。八代目の桂文楽のように声の高いはなし家もいらっしゃいますから、自分のパーソナリティーに合っていればいいと思うんです。

声の大きさもそうですね。自信がある時は大きい声でしゃべる傾向がありますが、自信がなくなりますと声が小さくなります。これも十分にコミュニケーションですね。声の質、語調、抑揚なんかもコミュニケーションですね。ため息、このあたりも「ため息は命を削るかんなかな」と言いまして、余りため息をつく人を見ると、こっちも元気がなくなるということがございます。

身体的特徴、動きですね。この身ぶりとか姿勢、表情、目の動き、このあたりもやはり十分にコミュニケーションなんですね。

アイコンタクト、日本人は目を見てしゃべるのが苦手です。とりわけ今の若い方たちはモニターばっかり見て育っていますから、相手の目を見ることがなかなかできません。日本人の平均的なアイコンタクトの時間ですけど、目を見て話しなさいと言っても、ジーッと目を見て話すとちょっと具合が悪いんですね。やはりどのぐらい見ればいいのかというと、二者間の対話で一般的には0.3から0.6ぐらいです。たくさん見る方で0.6ぐらいです、黒目と黒目が合っている時間が。したがって、0.6掛ける0.6ですから、両方の黒目が合っている時間は0.36ぐらい、つまり3割ぐらいしか黒目は合っていないんですね。このようにアイコンタクトの時間も十分にその人に自信があるか、ないか。そういうようなことを伝達するコミュニケーションのメディアになっております。

身体接触、これも日本人は握手は少ないんですが、アメリカ人だと握手すると、おまえのこの本を絶対翻訳させてくれみたいな、アメリカ人のエージェントと話すと、「ナイス・トゥー・ミート・ユー」と言いながら、ぎゅっとこう握ってきますね。「ノー」とは言わせないぞと。これも十分にコミュニケーションだと思うんです。

身体的特徴、最近は人権問題もありますから余り強くは言いませんが、ただ余りにも不摂生で飲み過ぎて、体型がどうかなと思う方の場合は、意志が少し弱いのかなというメッセージを伝えたりします。

Ichiro Takeuchi, Ph. D.
playwright, Director

これが今日のメーンテーマですけど、衣服、化粧、めがね、このあたりもその方のどういう服を着ているかによって十分伝達をいたします。メイクもそうなんですね。私は昭和31年生まれなんですが、私たちのころはナチュラルメイクだったんですね。だから、私が若いころは、同級生たちのしゃれた女子たちはみんなナチュラルメイクをしておりました。いつしか大学を出て30年もたちますと、みんなおばさんになっている。ナチュラルメイクをしていると、おばさんだということがわかる。今の若い人はそのナチュラルメイクの人はいませんので。それも十分に、ああ、この人は結構年取っているんだなということがわかったりします。

空間行動、これも相手との距離とか着席行動とか、これも一つの十分に情報を伝達いたします。宴会の席で入り口のほうにいますと、何となく控えめな方なのかなという情報を伝達したりもします。

このように一言も言葉を発さなくても、やはり情報は随分伝達する傾向があろうかと思います。こういうことを我々は演劇であったり、漫画であったりする時に考えながら一生懸命作っているんですね。相手との距離、どこに座るか、どの角度で相手を見ているか、どういう目で相手を見るか、そういうようなことを一生懸命考えるんです。科学ではありませんが、経験則の中で舞台を見たり、漫画を読んだりする人が納得する形で、この人とこの人のコミュニケーション、関係を作っているんですね。こういうときは私は非常に科学的な考え方ではなくて、経験則になっていきます。

しかし、いくら経験則と言っても、観客ないしは読者がそれを納得しないのでは、おおよそ受け手が納得するような演出を考えるんですね。こういうことをずっと考えながら生きております。そうすると、人間は言葉を発しなくても随分多くのことを伝達しているなということがよくわかります。

我々、人を外見で判断してはならないというふうによく教えられましたが、倫理観の階層ではやはり外見で判断してはならないだろうと思います。幾らいい身なりの方でも、心の中にはやましいことを考えていらっしゃる方もあるし、ぼろは着てても心は錦、すばらしい方もいらっしゃるだろうと思います。

ただ、フロリダ州立大学のジョン・マナー、心理学の先生ですけど、この人は実験で友達になれそうだとか、魅力的かなというようなことをパッと判断する時に必要な所要時間は0.5秒ぐらいだと言っているんですね。これを0.5秒写真で見せたのと、あるいはゆっくりたっぷり見せたのと比較すると、そう違わない。0.5秒で、私たちの目というのは非常に多くの情報を脳が処理しますために、言語で本1冊分、この人は信頼できる人間だと書くよりも、パッと見て、ああ、仲よくなれそうだな。我々の脳の処理能力というのは非常に高いんだということがわかります。もちろん当たっていないこともあるんですよ。

アメリカの16代大統領リンカーンは、40歳にもなれば、自分の顔に責任を持たなければなりません。これも日本人もいろんな手を変え品を変え、いろんな言葉で言っておりますが、やはり若いころは少し美人であったり、少しイケメンであったりすれば得をする傾向があります。

しかし、社会に出て20年か30年たちますと、もう化けの皮がはがれていきます。ちょっとぐらい知的なふりをしていても、ああ、普段からやっぱり切磋琢磨しておられない方と接しても、何となく見当がつきます。これは人生が50年のころの40歳ですから、今でいうと50歳ぐらいと考えてもいいのではないでしょうか。おおよそこの方は信頼できる方だ、信頼できない方だというのは見当がついていくのではないでしょうか。

私、非言語コミュニケーションというのを提案いたしました。なぜこんなに非言語コミュニケーションが大切なんだろう。本がたまたま売れたんでしょうけど、これは恐らく15世紀に活版印刷機が生まれました。活字というのが18世紀の産業革命以降情報伝達の非常に主要な手段として、私は非常に偏った形で世界に広がったと思っております。

その後、1960年ごろからテレビが広がっていきました。今はインターネットで世界の画像情報を摂取することができます。そうすると、画像情報は意外にも信用できるということがわかってきました。

そうすると、画像情報が、言語情報よりも非言語情報に非常に中心が移ってきたということが言えると思います。それからもう一つは、メールが社会的に浸透しました。大企業の方、メールが浸透してきた時に、東京本社と大阪支社でわざわざ会議をやらなくてもいいではないか、新幹線を利用しなくてもメールで情報を共有すればいいではないかという時期がしばらくありました。

今はそれでは難しい。なぜかというと、その情報はどれだけ信頼できるのか。その情報の緊急度はどのくらい高いのかというのは、その情報の発信人の表情とかアクションとか、言い方によって弁別できるのではないかということなんです。メールではその情報の信頼性が非常に薄い。したがって、非言語的な情報でバックアップされていない情報はうまく伝わりにくいということに気がつきました。

あるいは少子化、ここでは表情を学ぶ機会が減ってきました。昔は兄弟が何人もおりましたから、表情をミラーリング、姿勢反響と申しまして、表情を兄弟から学んでおりましたが、今は表情を学ぶ相手がモニターです。モニターは表情がありませんから、表情を学ぶ相手が余りいないんですね。母親から学んだ表情がかつてはたっぷり時間があ

りましたが、今は母親が働きますから、その時間が減ってまいりました。

あと、東京におりますと、日本人以外の方がたくさんおります。アメリカやヨーロッパほどまではいきませんが、日本もかなり多民族化しつつあります。したがって、言語だけでは通用しない方が実はたくさんいらっしゃるんですね。したがって、非言語コミュニケーションは、だんだん重要になりつつあるのではないでしょうか。

私が、これは私がやった調査ですが、一部上場企業で調査をやりました。初対面の相手について何を判断しますかというと、もう人柄、年齢、個性、かなり多くの方が実は外見で判断していらっしゃる。これはもう社会人としてきちんとやっておられる方も実際はそうなんですね。そこから何を判断することが多いかというと、表情、服装、身ぶり・しぐさ、体型、目つき、こういうもので相手の方をいろいろ察しながら生きております。

見た目が原因で他人に誤解された経験がありますか？これは３人に１人の方がやっぱりあるんです。それを実感しておられる。その誤解の程度は人によってまちまちなんですが、それでもこの人は大酒飲みかなと思ったり、あるいは女性には申しわけないんですけど、この女性だとこのくらいの言葉は傷つかないのかなと思いきや、やはり人によってデリケートなポイントが違いますから、失礼だなというようなポイントが随分違います。

そういうことで、外見で判断してはならないと言いながらも、外見で判断しないと、やはりコミュニケーションの潤滑油というのは、崩れてくる傾向がございます。

自分の見た目について日ごろ気をつけていることはありますかと、やはり８割の方がある。つまり誤解を招かないようにしないとだめだということですね。二者間の会話で、日本人というのは非常にプラットフォームが安定しております。何しろ日本語をしゃべればいいし、民族が１種類、恐らく飛鳥時代のころには大陸の連中と混ざったんでしょうけれども、しかし非常にプラットフォームが安定しておりますから、認知しやすいんですね。アメリカに行きますと、この人が信用できるか、信用できないかというのに、時間がかかりますからね。日本の場合はそこまで時間がかかりません。そういう意味では非常にプラットフォームがいいということは、文化が発展しやすい土壌があります。したがって、化粧品もこれほど化粧品が発展するというのは、化粧品とか衣服が発展するというのは、文化がそれだけ高いということなんだと思うんです。

そこに気をつけるというのが当たり前になっているんですね。清潔であるとか、笑顔とか愛きょう、このあたり、我々は非常に重要だと思いますが、実は今の若い人たちはモニターを見る時間のために減っておりますので、少しずつ退行しつつあるのではないでしょうか。コミュニケーションをやはり大事にしないと、どうなのでしょう。私は少し危機を感じているんです。

大学の演劇科で教えておりますと、やはり体を使って表現する、あるいは非言語的なことが、自分の体全体で表現したり伝えたり、伝え合ったりすることが大事だなということを、今の若い人たちも気がついていきます。そうじゃないと、どうしても頭でっかちになる傾向がございます。やはり頭だけで考えるんじゃなくて、体を使っていろいろ考える。こういうことが大事なんじゃないかなと思うんです。

フィリップ・ジンバルドというアメリカの心理学者によりますと、外見と内面の問題なんですが、新聞で公募した人を無作為に囚人役と看守役に分けました。それは囚人と看守になりなさいとサジェスチョンする必要はなく、衣服だけを着せたんです。そうすると、やがて看守役は看守っぽい口調でしゃべるようになり、囚人役は囚人っぽい口調でしゃべるようになった。つまり私たちの心は、意外にも外側に左右されながら生きているということです。私たちは役者に、実際に医者の役を当てて、ジャージで稽古をしている時と、白衣を着せて稽古する時では、全然気持ちが違うんです。やはり白衣を着せる瞬間に医者になる。あるいは軍人の役を当てます。軍服を着せるとやはり手荒なことがしやすくなります。

ということは、私たちの内面というのはそんなに堅牢なものではなくて、外の刺激に非常にナイーブに反応しながら生きているのではないかということを、我々演劇をやりながら思います。ということは、ここにいらっしゃる方々の例でいくならば、メイク一つでも随分心の持ちようが変わる。ヘアースタイル一つでも心の持ちようが変わるということなんです。

恐らくこの中にも免疫系の方がいらっしゃって、免疫が単純に免疫系だけで動くだけではない。つまりいろんなものが多岐にわたって協調し合いながら、我々の免疫が左右されながら私たちは生きているということがあるから、多分今日の専門の方は皮膚科学であったり、化学であったり、サイコロジーであったりするのだろうと思うのです。恐らくそういうふうにまだまだ解明され得ない部分があろうかと思いますが、我々は経験則的にこういうのは何となく見当がついているんです。

これは「人は見た目が９割」のタイトルの根拠になった研究ですけど、アメリカの心理学者にアルバート・マレービアンさんという方がいらっしゃいます。この人は心理学者の割にはMITの出身で、割に数字にするのが好きな方なんです。私自身は演劇とか漫画なんで、すべて数字にするのはどうかなと思うんですけど、この方はこういう数字を作ったんです。実験室の中に、仮に例えば言いますと、好きという情報をここに置きます。言い方を嫌そうな感じ

で「好き」と言います。言葉の意味は好きです。言い方は嫌そうに好き。ここに止まった写真で怒った写真を仮に置くとします。言葉は好き、言い方は嫌そう、表情は怒っている、この矛盾する情報が３つ与えられた時に、人間はどの情報を享受するのかという実験なんです。

そうすると、言葉の意味を取った人が７％、言い方を取った人が38％、表情を取った人が55％だったということなんですね。人は見た目が９割というのは、話す言葉の意味は矛盾した情報に邪魔されてしまうと、人は10％以下しか取ってくれませんよということなんです。

これは私たちわかりやすいと思うんです。代議士の方が金銭をもらって、証人喚問がテレビで映ります。秘書がやった、私は知らなかったというようなことを言います。活字で言うならば､「秘書がやった､私は知らない」ですから、その方は潔白なんです。

ところが、我々は非言語情報をテレビを通じて見て知っております。その人は自信なくしゃべる、うつむく、そわそわしている、手遊びをしている。ああ、この人の言語情報はどうも当てにならないなというふうに我々は考える。

すると、矛盾した情報が与えられた時には、話す言葉の内容は相手に伝達しないということなんです。したがって、私たちは戯曲、舞台の脚本を書く時に、いい役者さんが演じれば､「あなたなんか大嫌い」という言葉で愛しているという表現をやってくれます。つまりせりふは「あなたなんか大嫌い」でもいいんです。伝達できる情報は愛しているという情報だったりします。これが下手っぴな役者だと、「愛している」と書かないとだめなんです。なぜならば「愛している」と言わないと愛しているということが通じなくて、下手っぴな人が「あなたなんか大嫌い」と言うと、本当に嫌いに見えちゃうんですね。そうすると、私たちの演出意図と違った芝居になってしまう。伝わり方が違っちゃうんです。

こうやって非言語情報というのは、これだけすごく我々に重要なファクターであるということが、演劇をやっているとわかります。

なぜこんなに言語情報は信頼できないのでしょうか。これはサイエンスじゃありません。デズモンド・モリスという動物行動学者が観察によってつけた順位です。したがって、まだユニバーサルなものではないんですが、観察者の立場からいきますと、自律神経信号が一番信頼できる。これは手汗をかいたりとか、心臓のどきどき。これはうそ発見器ですね。日本はうそ発見器が警察の証拠になるんですが、アメリカは証拠に使えないんです。うそ発見器は。日本は心理学の専門家がうそ発見器を触りますけど、アメリカは心理学の専門家じゃないので、うそ発見器の情報は余り信用できない。ところが、デズモンド・モリス流に言うならば、まだ自律神経信号が一番信頼できる。

下肢信号、脳から遠いところですね。一番手の先とか足の先、脳の支配を受けにくいところは、むしろ本心があらわれやすい。体幹信号、大きな部分ですね。あとはちっちゃなしぐさ、この辺もだんだん信用できなくなってくる。見分けられる手のジェスチャー、これはもう明らかに計算して嘘のアクションができますから、だんだん信頼できなくなっていきます。

表情、これは我々が飛行機に乗りますと、スチュワーデスの方が笑顔で我々を迎えてくれます。あのスチュワーデスの方は、我々に好意を持っているということはないんですね。実は営業用のスマイル。本心かどうかはわかりませんで、表情というのはもう随分作りやすい嘘の情報が混じってしまいます。

そして、一番信頼できないのが言語なんです。言語というのは脳の指示どおりに嘘をついてくれます。したがって、脳の指示どおりに嘘をつくということは、私たちは自分が嘘をつくように人も嘘をつくと思っているから、言語情報は信頼しにくいということなんです。逆に言うならば、非言語情報でバックアップすることによって、その言語はいかようにも伝達力が上がることもあるということです。

私たち、舞台をやっておりまして、いい役者がしゃべればものすごく伝わる。だめな役者がやると伝わらない。そう言いながら、私はこうやって人前でお話しするという非常につらい立場におります。私の言葉がどのぐらい伝わるかというのは非常に難しい、厳しい問題ですが、それでも伝達力を高めるためには、信頼していただくためには、表情とか言い方もひっくるめて情報だというように考えております。

「人は見た目が９割」という本が出た直後に、朝日新聞がアンケートを実施しました。それによりますと初対面で好印象を与える自信がありますかと言うと、やっぱり「はい」は43％で、「いいえ」は57％おりました。自信があるのは話し方、表情、笑顔でした。自信がないのも話し方、表情、顔立ち、笑顔、このあたりでした。

したがって、「はい」でも「いいえ」でもおおよそ同じものなんです。同じものが「はい」なんです。ただ、自信というのはその人の心の持ちようが自信ですから、具体的にスキルがあるかどうかではないと思うんです。第一印象を重視しますかというのは、私の調査と同じで、80％ぐらいがやはり第一印象は当たると思っているんですね。

なぜ第一印象は当たるのかというと、私たちの脳はいろんな方と出会って裏切られたり、信じ合ったり、友人を作ったりしました。生まれてこの方、数千人、数万人の方の情報がデータベース化されております。そのデータベースと照らし合わせて見て、この人は信頼できる、友達になれそうだ、話が合いそうだという情報を処理しているんだと思うんです。

もう一つは山びこ効果という心理学でいうところの働きがあります。ある方と会います。ああ、この人いい人だなと思います。そうすると、次会う時にあの人、いい人だからといって気持ちが和みます。表情が柔らかくなりますから、表情が柔らかくなると、ああ、この人、いい人だなと相手が思ってくれる。ああ、この人いい人なんだ、好意を寄せているんだと思うから、その人の表情が柔らかくなります。お互いの表情が柔らかくなって、第一印象は当たる。

最初苦手だなと思うと、表情がパッとこわばります。逆にこちらのこわばった表情を見て、相手の表情がこわばっていきます。そうなってくると、これも山びこ効果で、第一印象は当たったということになります。

第一印象というのは、その１つは、脳のセンサーがすばらしいということもありますけれども、もう一つは我々の関係性ですね。感情がその第一印象に呼応する傾向があるということも言えると思います。

外見の重みは何割ぐらいでしょうか。これはいろんな方がいらっしゃるでしょうけど、やはりその七、八割であるとか半分ぐらい、やっぱり随分外見の重みを取っておられます。第一印象なんですが、これは母集団が少ない調査ですけど、アメリカの電話インタビューですけど、1500 人にした一目ぼれの調査をしたデータがあります。一目ぼれで、その人と出会って１時間以内に好きになった、恋をした状態を一目ぼれと定義したんだそうです。一目ぼれというのは、約 30％の人が経験したことがあって、そのうちの 55％は一目ぼれの人と結婚をしていると言うんですね。

だから、一目ぼれというのは割に人間の行動を動かすんです。我々、結婚する時には理性的にしたほうがいいのかなと思いきや、実は一目ぼれという非常に非論理的なものに左右されて動いている傾向があります。

その後追い調査なんですが、母集団が少ないためにどのくらい信頼度があるかどうかわかりませんが、アメリカというのは離婚率が 50％の国なんですね。その中で一目ぼれと結婚した男性の離婚率は 20％しかないんですよ。女性に至っては一目ぼれと結婚した方の離婚率はわずか 10％なんですね。つまりフォール・イン・ラブした激しい勢いが余りにも強いために、性格の不一致や価値観の違いを乗り越えてしまうんです。そのくらい一目ぼれの力というのは強いようなんです。人間というのは確かに理性的動物であり、社会的動物でありますが、一方では非常にもっと動物的な、ないしは本能的な働きが非常に大きな力を持っていると、まだまだ解明されていない力もあるんだなというように思います。

この調査で私はおもしろいなと思ったのは、コミュニケーション上手の中に、相手の話をよく聞くというのがあるんです。ここは「朝日新聞」の読者の方というか、「朝日新聞」の目のつけどころだと思ったので、これをわざわざ挙げたんですけど、実は本屋に行って、コミュニケーション上手の本を読みますと、ほとんど話し方、書き方ですよ。

ところが、実際には相手の話をよく聞いてくれる人が大事だというふうにみんな知っているんです。なぜかというと、我々は私の話を聞いてよ、おれの話を聞いてくれないかと思っているんです。

ということは、聞いてくれる人を欲しているんですよ。話し上手ではなくて聞き上手の人がいてくれると非常にうれしい。こうやって先生たちもいろんなところで講義をなさっていらっしゃると思いますけど、このくらいの教室に３人ぐらいうなずき上手の学生がいてくれると、ものすごい講義をやりやすいですよね。みんながじっとしていると、講義がものすごくしにくいんです。恐らくこうやって意味もなくうなずいてくれると、ああ、その人の顔に合わせてリズムを取って話せば、いいリズムができていくんですけど、こうやってパソコンばっかりやっている学生の大学で授業をやりますと、顔が止まっていますよね、ぴたっと。そこで１時間半しゃべると、ものすごく疲れますよね。

つまりうまく聞いてくれると、我々の授業は非常によくなるんです。ところが、そうじゃないと、また我々授業がどんどん固くなって、かなりベテランの先生でも、ああ、今日の授業失敗したのかなと思ったりするんだそうです。

聞き方もコミュニケーション、大学を私、作家業が忙しくて大学を辞めてしまったために、自分の実験が最近ないんですね。人の実験ばかり使ってお話を申し上げております。会話に自信のある男性を被験者として赤、青のチーム、２チームに分けて、初対面の女性と１対１で会話をしてもらいました。女性の足元には会話がおもしろくないと感じた時に点灯する赤ランプをつけました。Ａチームはランプがつくのに、Ｂチームはランプがつかない。つまり女性にあえて表情をなく聞いてくれと言うと、男はだんだん自信がなくなっちゃうんですね、動揺するんですよ。私の、おれのトークはうまいはずなのに、相手はこうやって表情を変えない。だんだん自信がなくなってきて、しゃべりがだめになっていくんですね。

ということは、ユニバーサルな話し上手はいないということなんです。相手がこうやって聞いていたら、どんなにトークが上手な人でも、自信がなくなっていくんですよ、動揺していくんですよ。つまりコミュニケーションというのは、相手の聞き方があって初めて話し上手が生まれるのであって、最初から話し上手がいるわけではない。キャッチボールだということですね。

青の女性に、片方の女性にあえて表情を作らずに聞いてもらうように指示を出すと、聞き手の表情が変化しないと、話し手が動揺して、話し手の表情も硬くなるから、お互いの表情が硬くなってしまうんだ。したがって、表情の変化をつけてあげないと、どんなにイケメンであっても、どん

なに美人であっても、楽しいコミュニケーションができないということですね。

それから、オーディションという名目で集まってもらった人に面接をしました。スタッフが無表情の時には、相手も無表情になります。笑顔を作ると相手も笑顔になります。感情と表情は伝染するということですね。したがって、私も勤務する大学では、「おはよう」とか、もう大きい声で言うようにしているんです。すると、事務員の方も頑張って明るくなってくれます。でも事務員の方がみんなシラーッとしていると、多分大学の体質が悪いんでしょうね。そういうところに行きますと、もうだめですね。学生もまた暗い。余裕がないんでしょうね、やっぱり学生募集とかいろんなことがありまして。表情がだめですね。

ただ、なるたけ研究室を明るくするためには、自らが進んで率先して、朝、「おはよう」と言ったり、表情をパッと明るくすることによって、その研究室、活気が出ていきますので、研究成果も上がるのではないかと思うんです。やっぱり締め切りに追われているとか、やらなければいけないことが多い。多分疲れることが多いと思うんです。

しかし、やはり表情を減らしてしまうと職場が暗くなります。無駄なことでも、無駄なおしゃべりでも、挨拶とか表情をつけてコミュニケーションをするということで、よい潤滑、よい循環をするのではないでしょうか。

これ、実際に人間の顔でやるとうまくいきませんので漫画家に描いてもらったんですね。どっちの女性が話しかけやすいですかというと、こっちのほうが話しかけやすいことになります。これは目と目を離して描いてもらったんです。こっちのほうが話しかけやすいのはなぜかというと、顔の輪郭によって話しかけやすいのではなくて、私たちは余りにもきちきちっとした人とはつき合いにくいんですね。言葉とか生き方とかにも遊びのある方のほうがつき合いやすい。

僕は役者さんによくこう言います。人気が必要なんだ。人気というのは人の気持ちと書きます。人の気持ちはどこに入るのかというと、完璧な人のところには入りにくいですね。やはり最高裁判所裁判官みたいな方とはなかなか友達になりたくないと恵うんです。やはりちょっと遊びがある方のほうがいい。すき間に入りやすいんですね。そのすき間をちょっと作ってあげることによって、人の気持ちが入ってきやすくなるということですね。

これは同じ顔を、ヘアースタイルを変えて描いてもらいました。そうすると、前髪をおろすと３歳若く見えると言われております。逆に前髪を上げてくると、スチュワーデスみたいな方は、プロフェッショナルというイメージですね。つまり必ず額を上げてきますから、私はプロなんだ、つまり若く見えるのではなくて、社会的にもスキルの高い人間だというメッセージになっていきます。このあたりだと若干ニュースを読み間違えても、アナウンサーでも、この方がニュースを読み間違えてもしょうがないかなと思うんですけど、このあたりがニュースを読み違えるとちょっとおかしいなという気がしますね。そのようにメッセージであります。

これもコミュニケーション、髪の毛が余り長いと、日本の場合は縄張りを大きくしたいというメッセージがあります。これ、傾向としては３代前の総理でしょうか、非常に縄張りを広げられたですね。やっぱり縄張り、戦国の大名というのは自分のパーソナルスペース、縄張りを大きくされる方がよろい、かぶとをこうやって、おれは大きいぞという縄張りを広げますが、総じて前の前の総理は縄張りを狭める傾向があったような感じがある。

これは髭ですね。戦国大名の場合は髭を生やしておりました。これもパーソナルスペース、縄張りを広げるというメッセージでありました。日本はビジネス社会では髭を生やしません。これは３代将軍、江戸時代に３代将軍徳川家光が髭を禁止にしちやったんですね。つまりもう天下太平の御代であるから、レジスタンスは許さんということで、それ以降、日本のビジネス社会では髭は御法度になっていきます。髭を生やすのは自由業の方が多い。逆に言うと、会社でも営業マンたちは髭を生やしませんが、工場とか総務とか、人に会わない職域の人は髭を生やす傾向があります。つまりこれも十分にメッセージなんですね。このように印象が変わっていきます。

非言語情報を強化しましょうということなんですが、私、こうやって演劇をやっておりますと、作家の方が本を読んだり、文章を書いたりすることで人間も磨かれていく、人格の陶冶があります。先生たちは大学の研究室ですばらしい研究をなさることで、人格が陶冶されていくんだと思うんです。農民が田んぼや畑を耕すことで自分を耕すように、自分の心を耕すように、我々役者を見ていると、表情、言い方、アクションのプロなんですね。決して彼らはインテリジェンスが低くない。作家に比べて低いわけではない。研究者に比べてインテリジェンスが低いとは言えないと思うんです。役者さんは確かに専門的知識を、本にするような知識はないかもしれないけれども、膨大な知識を集積して、彼らの一生を生きております。

アフリカにこういう諺があります。「１人の老人が死ぬことは、１個の図書館がなくなることと同じだ」という諺があります。これはなぜかというと、その老人は一生涯に１冊の本も読んでおらなくても、目で見て、鼻でかいで、皮膚で触って、耳で聞いて、舌で味わった、五感で感じた情報が膨大に体の中に集積されている、蓄積されているのだ。その知識の総和は図書館１個、１館分の本に、書物に匹敵するのだという、そういう諺なんですね。

例えばリンゴという果物があります。これを言語で表現

するならば、リンゴを見たことのない人に言葉だけでリンゴを伝えようとするならば、本１冊分描写してもリンゴの味とかリンゴの形状は言葉では伝わらないと思うんです。ところが、リンゴというのは目で見て、手で触って、鼻でにおいをかいでがぶりとかじってみた時に、ああ、リンゴというものはこういうものだなということがわかります。膨大な情報を我々は五感で一瞬にして処理しているんだと思うんです。

ということは、私たちの脳というのは、書物による知識も大事ですが、書物以外による情報が膨大に詰まっているのだというふうに考える。そうすると、感受性の豊かな役者は、仮に書物をそう読んでいなくても、研究室が本だらけになっている研究者より知識量が劣っているというふうにはならないのではないかと、私は思うんですね。

我々は役者に比べると、はるかに書物は読んでおります。しかし、役者さんが直感的にここはこう演じたらいいんじゃないのと言った時に、ああ、そうだなと感じることはたくさんあります。つまり知識量で劣っているとは感じられない瞬間がたくさんあります。言語になりにくい情報も実は世の中には沢山ありますので。我々は経験則で、歌舞伎役者はもう３つのころから舞台を踏んでいますから、すばらしい方は本当にすばらしいですよ。

そのように、人間というのは書物以外の情報を摂取することによっても、我々の脳というのはフル回転されていきますから、人間的にも磨かれ、人格が陶冶されるケースはたくさんあるというふうに実感しております。非言語情報を強化するだけでも、我々は非常に理性的な生き方をすることができるのではないかなと思ったりします。

心を開く、これは相手にオープンな印象を与えるということですね。肩をちょっと開いてあげて立ちます。それから、足、よく女性の方、足をお見合い写真なんかこうやって閉じていますが、スーパーのチラシなんかを見ていただけるとわかるんですが、女性のモデルさんは必ず開いて立っています。閉じると相手の心が入っていきにくいので、実際は開いてもおかしくない立ち方をすると、相手の気持ちが入ってきやすいんですね。腰に力感がないとどうしても不安定に見えますので、立ち方として、多分先生たち、講義をなさる方、腰に力感のある立ち方をすることによって、ああ、地に足が着いているなというイメージを相手に誘うことができます。

時々手のひらを見せます。ブッシュなんか、アメリカ大統領になった直後はおどおどしていましたけど、やっぱりこうやって時々手を見せていきます。私に嘘はありませんよという感じですね。こうバッとさらしても、もう自信のある人というのは、バッとさらしてきますね。あのオバマは最初のころはさらしていませんでしたけど、最後のほうはもう堂々としたもので、全部見ろという感じだったですね。あのくらいの自信があると、ああ、この人ならみんなついていこうと、こう思うんでしょうね。

何でしょうか、やっぱりバッとこう、非言語的なものも非常に大きいんじゃないでしょうか。しかもあの短いフレーズで言うというのは、大変自信がないと言えないんですね。自信がない人というのは、もたもたもたもたした形容詞が山ほどついて、いろんな例外のことをごちゃごちゃごちゃごちゃ言うんですけど、自信がある人というのは誤解を恐れずにガッとこう言うんですね。オバマを見ながら、ヒラリーとやっている時から、ガガガガッとこう変わってきましたね。非言語的なものがものすごい勢いで変わっていきました。あれに耐え得る人じゃないと国のトップになれないという、非常にいいシステムだなと思います。我が国もああいうシステムになってくれるといいなと思っていました。

役者感覚、人が見ていても恥ずかしくない感覚でいると、やはり役者さんたちまで変わっていくんです。世阿弥という能の創始者が「花鏡」という本の中で、「目前心後」という言葉を書いております。目前というのは目で前を見ます。心を背中に置いて見ます。ちょっとやってみましょうか。心、背中の後ろにある心で自分を見て、美しい背中を作りなさいというのを世阿弥は言ったんですね。目で前を見ながら、背中の後ろにある心で自分をちょっと見てみてください。そうすると、背中の線がよくなります。

こうやって世阿弥は、すごいですね、12世紀の段階でこれに気づいた日本人がいる。それ、まだ日本は生かされていないんですね。世界で最初の演劇論の本が世阿弥なんですけど「離見の見」。これは我見の見と離見の見と言いまして、我見、自分の目で見ている社会がある。その自分を離れて見ているもう一人の自分がいる、これが離見の見なんですが、離見の見で自分を見なさいと言っているんです。誰から見ても恥ずかしくない自分でいなさいということなんでしょう。これ、すばらしい考え方だと思うんです。

声を豊かにモノトーンでしゃべらないと書いてありますが、私自身も演出家ですから、役者にはだめを出すんですけど、自分はなかなかできません。声ののどの奥のところを広げてあくびをした時の感覚でしゃべると、低くていい声になります。あくびを、「あー、あー、あー」としますと、のどの奥のところに空洞ができます。その空洞のできた感覚でしゃべってあげると、柔らかく相手を和ませる声になるんです。このトレーニングをしなさいと私は役者に言うのですが、自分はなかなかできずにおります。難しいですね。

声帯を満遍なく使う。声帯というのは使わないと退化します。声帯というのは小さな筋肉ですから、使うことによって少しずつ強化されます。ということは、声帯は余りしゃべらないと声帯が退化していきますので、やはりしゃべってあげないとだめなんです、筋肉ですから。したがって、

「おはよう」と言うこととか「さよなら」とか「お疲れさま」、これも大きな声で言ってあげないと、声帯は退化していきます。私たちは土・日にスポーツジムに行って体は鍛えてあげますが、声帯という筋肉は鍛えてあげません。

我々、子供のころはあぜ道の向こうとこっちで、「おーい」と、「５時になったらあそこで会おうな」と言っておりました。今、東京でそんな大きい声でしゃべっている人は困ります。したがって声帯が退化しております。これ、使ってあげないと伝わりにくくなります。伝達力が下がります。

言葉もイメージを持ちましょうということですね。言葉の意味だけではなくて、イメージを持ってしゃべりましょうということです。つまり青空という言葉を吐く時も、私は役者によくこう指導します。青空という言葉の意味も伝えなければいけませんが、心の中にまずブルースカイをイメージしなさい。ブルースカイがあると、青空を心の中でイメージしながら「青空」と吐きなさい。そうすると、言葉の意味だけではなくてイメージも伝わりますよということなんですね。

そのことによって伝達力は高くなる。１つはしゃべり過ぎなくて済むんですね。イメージのことまで意識すると、ゆっくりしゃべることになります。東京におりますと、どうしてもカリカリしておりまして、早く物事を済まそうとするんですね。私、郷里が福岡県なんです。福岡の大学で教えて、福岡と東京と二重生活がずっと続いておりました。東京に来るとみんな早口なんですよ。福岡に帰りますと、みんなのんびりなんですね。久留米大学の先生がおられましたが、私、久留米の出身なんです。久留米に帰りますとのんびりになるんです。

やらなければいけないことが、東京にいると多いんですね。しかも生産性が高いかというと高くないんですね。東京に来ても、余り生産性が上がらないんですよ。コンプライアンスみたいにやらなきゃいけないことが、何にも生まないことが膨大にどんどんどんどん増えていきましたでしょう。あとはコンピューターのトラブルとか、あれを処理しているだけで１日つぶれると、今日は何も生まなかったなという１日がどんどんある。

それに比べると、我々が田舎で暮らしておりましたシンプルな１日のほうが、よっぽど物を生産しておりました。あるいは、友達と会っても、よっぽど豊かな時間を過ごしたなと思うことができます。言葉も意味だけではなくて、イメージもひっくるめて伝えることによって、言葉というのはもっと豊かになっていくのではないかなと思うんです。

これはさっきの見方のところをまとめましたが、これも芝居で使うので、出典が明らかではありません。ただ、二者間の会話で、自信のない方というのは、相手の顔から目線が外れていく傾向があります。これはあるテレビ番組で実験をやったんですけど、お見合いに何度も何度も失敗している人を実験に使ったんですよ。それで、その人の前に若い女性を置いてみたんですよ。そしたら、その人、自信がなくてきょろきょろきょろきょろ相手の顔のところに目線を置いておけないんですね。要するに、自信がないんです。したがって外れていきます。

二者間の会話で初対面の方と目を合わせる時には、このあたりをこうやってグッと動かしてあげるといい。これを社交ゾーンと言ったりします。ここをじっと見ていると、３秒以上見ていると変な人と思われますから、それはだめですね。したがって、グーッと頑張りながら、粘りながらトレーニングする。実際にはうちの息子、長男坊は理科系のオタクで、相手を見ることができません。モニターばっかり見ていると、どうしても人の目という生々しいものを見ることができなくなってしまうんですね。やはりそれもトレーニングが必要なんですね。

仲よくなりますと親密ゾーンと言いまして、股間ぐらいのところまでグッと目線が下がります。ここぐらいまで見ていると、女性も男性のこの辺まで見ます。こうやって見るようになると、だんだん打ち解けてきたなというシグナルです。つまりこの辺まで見ると失礼かなというのは、初対面の時には失礼なんですが、やがて親しくなってくると、無意識に見るようになると、ああ、お互い警戒心を解いたなというメッセージになってきます。

権力ゾーン、我々教師として教えたりしますと、上から学生の額を見てあげることで、権力ゾーンという言葉が余りよくないんですけど、自信を持って人に何かを伝達する時には、このあたりを見てあげたほうが、自信があるように見える。目線を落とすと、自信がなく見えますので、このあたりを見てあげたはうが、この人には自信があるなという印象を与えることができます。

もちろんこれはテクニックの問題だけではありませんで、自信がないのに権力ゾーンだけ見ても仕方がないですね。話す内容に自信があって初めて、そこを見て初めて、形だけというわけにはいきませんで、やはりオバマのようにアメリカ全体をよくするぞという自信があって初めて権力ゾーンを見ることができると思うんですね。ある日突然、おれ、総理を辞めたとか、そういう人によってここを見ていただいても、もういいかげんにしてくれというふうに我々は言いたくなります。

このように内容と外側というのは密接につながっておりますが、テクニックだけの問題ではございませんで、やはりその方の生き方が背景にあって初めてその内容を伴ってくると思います。ただ、一般的な技術としてはそういう傾向があると言ってもいいと思います。

これは日々の生活の磨き方ですけど、１つか２つで結構ですから、ちょっといい物を身につけるといいんです。文章もちょっと格好つけると、余り格好をつけるとだめです

よ。ちょっと格好つけるといいんですよ。万年筆も普段の生活水準から余りにも高いのはだめですね。万年筆にダイヤモンドを埋め込んでいる人がいまして、この人はだめだなと思いましたけど、そういうのではなくて、ちょっと生活水準より上の物を持とう。大事にするんです。

役者さんたちが、本番が近づきますと小道具屋さんから小道具を借ります。小道具屋さんの小道具は壊してはいけませんから、必然的に物を丁寧に扱います。丁寧に扱いますと、立ち居振る舞いがよくなるんです。物を大事にするということは、立ち居振る舞いがよくなる。したがって、ちょっといい物を持ってあげると、立ち居振る舞いがよくなります。これはコーセーの方もいらっしゃるでしょうから、やはり普段の収入よりもちょっと高めのメイクを使うとやはり違うんですよ。やっぱり自分の気持ちが変わってくるんですね。それが生活水準から離れ過ぎますと、やはり地に着きませんから、ちよっといい物をつけることで、日々と違う、変われるんですね。

役者さんたちもメイクすると変われるんですよ。メイク、やっぱり化粧というのは化けると書きますけど、メイクをつけると違う自分になれるんですでね。自信がぐんとつくんですよ。普段役者さんたちはこんな多くの前でしゃべれませんよ、怖くて。だけど、メイクをつけて、衣装をつけることによって、赤の他人になることによって、こんだけバッと、自分じゃない人間になることによって人前へ出ることができるんですね。役者さんってすごいシャイな人が多くて、メイクなしで素っぴんで人前へ出ると、もう全然だめな方がいらっしゃいます。やはりメイクというのは自信をつけるためにも非常に重要なんです。したがって、それをオーデイナリーなものでなくて、いつもよりちょっと高価なものをつけてあげると随分変わります。

信頼感は回数勝負と書いてありますけど、ザイアンスという心理学者が調査研究したんですけど、接触の回数に比例して好意も増すんですね。したがって、会う回数、目の処理能力というのは非常に高いので、１回0.5秒で相手をジャッジします。ということは、0.5秒の回数を増やしてあげることで、信頼感も増していくということなんです。

今、メール社会ですから、確かにメールは便利です。しかし、メールの処理能力、メールを目で見て処理する能力に比べるならば、私が今こうやってしゃべっておりますが、私という人間をどういう人間か弁別する処理能力ははるかに高い。私が書いた本を１冊読んでいただくよりも、この男の言っていることは信頼に値するかどうかは、はるかに処理されているのではないかと思うんです。

あと、数分後に、ああ、あいつはやっぱりだめだったなというふうに思われるかもしれませんが、回数と比例するということになりますので、いろんな条件で機嫌のいい時、悪い時もひっくるめて、その方の条件、いろんな条件で回数を増やしてあげることで、信頼感も増しますので、やはり人間の脳の処理能力というのは高いということを信じてもいいのではないのかなと思います。

ミラーリング、私たち、ミラーリング、好むと好まざるとにかかわらず、姿勢反響、姿勢はポスチャー、反響は反射の反に響くと書き、姿勢反響、日本語では姿勢反響と言いますが、似るんですね。私、結婚22年なんですが、うちの両親が私は子供のころ、両親を見ながら、何でこの人たちはこんなに似ている者同士結婚したのかなと思っていたんですね。あの人たちは似ている者同士結婚したのではなくて、一緒に生活するためにいや応なく似ていったんですね。そこが結婚して22年たってわかったんです。どうせ似るとわかったら、もっと違う人と結婚しておけばよかったなと思ったりもするんですが、やっぱりうなずき方とか、感じ方とか生活がリズムを似させていかないと、一緒に暮らすことができません。

同じ職場の上司にある程度似ていかないと、そこの会社に適応することができませんので、実はその研究室のボスにみんな似るんですよ。若い人、笑っていますけど、あなたの上司に似ますよ、何十年もいると。必ず似るんです。したがって、研究室の主任の方は、みんなその方に似ますから、表情とかしゃべり方とかきちんと気をつけて、もう主任の先生がこうやっていつもこうしていると、その研究室みんなこうなりますからね。したがって、出世する方はお手本となって、表情、挨拶、お願いいたします。そうしないと、若い連中、みんな迷惑しますから。できることならば、好きな人の真似をしましょう。そうすると似ます。

私自身、このしゃべり方、そんなにすばらしいと思いませんが、大学時代に尊敬できた先生がいらっしゃって、その方に近づきたいなというしゃべり方ではあります。まだまだ近づき方が足りませんが、その先生に近づきたいと思ったから、学位論文も書いたりすることができました。やはり少しずつ尊敬できる方に近づいていけば、姿勢とか表情とかアクション、そういうのも変わっていくんだと思います。

これは役者さんが成長するからそう思うんですが、これは観世清和さんという能の本家といいましょうか、能の家元の言葉なんですけど、能というのはもう観阿弥、世阿弥の時代、1200年代に一つのスタイルが完成されて、同じ台本を８世紀も９世紀もやり続けているんですね。そうすると、同じことだから飽きるのではないかと思うんですけど、そうじゃなくて、型どおりのことをやればそれでよいのだと惰性に流れてしまうと、そうなると型どおりの空虚な形式だけが残るということですね。単なる形式は心に訴えかけてこない。同じ言葉でも魂を揺さぶる言い方と揺さぶらない言い方がある。

役者さんたちは同じせりふを東京公演だけだと30ステ

ージ、全国ツアーなんかをやりますと100ステージぐらい同じせりふをしゃべります。しかし、胸を打つしゃべり方をするならば、新鮮な心を持ったしゃべり方をするならば、初めてしゃべるように、初めて聞く人に伝わるようにしゃべれば、その言葉は伝達力が上がるということなんですね。

そして、その感覚は気持ちとか心がけといった皮相なもの、この皮相というところが大事だと思うんですけど、最近ちょっと私、オバマがマイブームなんでオバマの例えが多いんですが、あの人は動かしますよね、ガッ、ガッ、ガッとこう。もちろん敵も作ると思います、あれでは。しかし、同じ言葉をどうしゃべったら相手に伝わるかということを真剣に考え、恐らくヒラリーとやっているころから、側近が教えたんだと思うんですね。

日本も私も随分あちこちに呼ばれて、政治家の方たちとかにレクチャーしたりしに行くんですよ。だけど、それでも効かないんですよね、日本って密室で総理が決まるから。だめなんですよ。結局テレビというか、大衆に支持されなければリーダーになれないのだという社会を作らない限り頑張らない。アメリカ、皮相ということではなくて、ものすごいパッションですね。もう鳥肌が立つそうですよ、オバマが演説をバーツとする時には。もう全くもって、このぐらいの人数だったらみんな感動してしまうんだそうですね。だから、私はとてもじゃないけど大統領になれないんですね。そのくらい停滞と惰性をぶち壊すぐらいしゃべるんですね。

日本の歌舞伎社会だと市川猿之助さん、もうかなり体の具合が悪いですけど、ものすごいエネルギーでしゃべります。そうしないと人の胸を揺さぶらない、人の魂に火をつけないんですね。恐らくすべてのコミュニケーションというのはそうではないかなと思うんです。そのくらい力強い生命力にほかならない。これがコミュニケーションなんだと思うんです。

私は演劇をやりながらこのようなことを考えております。先生たちは研究ないしはいろんなことで新しい停滞とか惰性を打ち破られて、新しい研究をなさって、社会の役に立つ研究をなさっていただきたいと思います。

コスメトロジー研究雑感

平成 18 年度　研究助成

コスメトロジーからケミカルバイオロジー・次世代医薬品開発へ

水上　進

私は現在工学部に所属しているが、もともとは薬学部の出身なので薬や化粧品について考えることが多い。「薬学」と「コスメトロジー」は一見近い学問分野に見えるが、「薬」と「化粧品」の製造において基礎となる学問は、薬が主に「生理活性を持つ低分子の化学」なのに対して、化粧品では主に「生理活性を持たない高分子の化学」という点で、その出発点から大きく異なっているように感じる。現代のコスメトロジーにおいては、「お肌に栄養」や「アンチエイジング」などの何らかの生理作用を持たせるような薬学的視点も大事だが、同時に本来の化粧品の特徴であった「生理活性を持たない」点を、薬学をはじめとする周辺分野へ利用する視点も重要であろう。

その周辺学問分野の例を挙げるなら、「ケミカルバイオロジー」がある。この言葉は、化学を用いて生命現象を解き明かす学問分野と定義されている。ここ数年にわかに注目されているが、その起源は古く、黎明期の有機化学も今で言うところのケミカルバイオロジーにあたるだろう。ケミカルバイオロジーの中にも色々あるが、「生体の機能を化学的ツールを用いて非侵襲的に（周りに影響を与えずに）解析する」研究がある。これは生体分子のネットワークを保った状態で、生体分子の機能を明らかにすることを目的としている。生体を酵素反応など個々の生化学反応が組み合わさったシステムとして考えることで、生命をより本質的に理解できると考えられている。このような研究では、細胞や生体の応答を可視化するセンサー分子が多用されるが、それら自身の生理活性や毒性がしばしば問題となる。そこで、化粧品開発の歴史で積み重ねられてきた「生理活性を持たない」材料をこれらのセンサー分子と組み合わせることで、より生体に影響を与えない測定手法開発が今後ますます注目されると予想する。不必要な生理活性を抑えるという点は、そのまま医薬品開発の副作用低減にも繋がり、コスメトロジーは次世代医薬品開発のキーテクノロジーになるだろう。　（大阪大学大学院工学研究科）

平成 18 年度　研究助成

鏡よ鏡、かべの鏡。この国でいちばん美しいのはだれ?

渋谷　雅明

いつの世も女性は美しくなりたいと思う。それを助けようとするのがコスメトロジー研究であり、非常に応用に志向した研究であると思っている。今回申請した私の研究は、整髪料に用いるツバキ油に含まれる微量成分のトリテルペンの生合成研究という極めて基礎的な研究である。コスメトロジー研究分野に含まれると判断していただけたのは、非常に光栄である。研究助成をしてくださったコスメトロジー研究振興財団に、ここであらためて深謝する次第である。

さて、多くの女性はコスメトロジー研究に何を求めるのであろうか？

グリム童話の一節にある、

「鏡よ鏡、かべの鏡。この国でいちばん美しいのはだれ？」

と、たずねると、鏡が、

「女王さま、この国でいちばん美しいのはあなたです。」

と答え、女王さまが自己陶酔に陥るシーンを思い出した。女性がお化粧をするときに向かうのは鏡である。何を考えながら、お化粧しているのだろうか。ひょっとして鏡に向かって、

「鏡よ鏡、かべの鏡。今日の私のお化粧の出来具合はどうかしら？」

と聞いていたりして。

その時、鏡が、

「今日の出来具合は 80 点。アイラインの引きかたがイマイチです。アイシャドウの色のチョイスがなっていません。」

としゃべりだしたらどうだろうか。あるいは、カーナビのように、

「まず、ファンデーションを盛って、……、目的地付近です。ガイドを終了します。」

と鏡がお化粧をガイドしたら女性は喜ぶだろうか？そばを通りがかった女子学生に聞いてみた。答えは、

「そんなのあったらいいんじゃないですか。アイラインを引く位置が、鏡に映った私の顔の上で点滅したら、とって

も便利かも。ドラえもんの道具みたい。」
であった。

お化粧ナビの開発も幅広いコスメトロジーの研究の一分野になるのかもしれない。あるいは私が知らないだけで、極秘裏にもう開発が進行しているのかもしれない。

（東京大学大学院薬学系研究科）

平成 18 年度　研究助成

本研究成果のコスメトロジーに及ぼす影響

織田　博則

フロンによる成層圏オゾン濃度の減少は地表に到達する太陽紫外線の増大を招き、地球上の生物に多大な悪影響を及ぼすことが予測される。そのため近年、紫外線による皮膚障害を防御する意識が高まってきた。ＵＶカット剤は日焼けを防止することから、化粧品分野では古くから取り上げられている。しかし、一重項酸素脱活性基を有する紫外線カット剤の合成は全く見られていない。ここでは、可視光照射による化粧品用色素の自己増感性一重項酸素の脱活性化と、有害紫外線Ａ波、Ｂ波からの肌の保護、ならびに化粧品用色素の光安定化を目的として、一重項酸素脱活性基を有するフェニルエステル系紫外線カット剤を新規に合成した。

新規化合物はフェニルエステル系であるため生体内分解が可能で、人体に対して非常に優しい化合物である事が予期される。これら化合物を化粧品に使用した場合、肌や人体に対する影響は小さく、フェニルエステル系紫外線吸収剤の紫外線カット機構は、当初紫外線Ｃ波を吸収し、光フリース転移を起こし、ベンゾフェノン系紫外線吸収剤を生成し、その紫外線カット剤がＡ波、Ｂ波を効率よく吸収する。

また、化粧品に使用されている色素は可視光を吸収し、活性酸素種である一重項酸素を生成し肌の劣化を促進している事は以前から良く知られている。この活性酸素種（一重項酸素）を効率よく不活性化するのが一重項酸素脱活性化剤であり、ここに合成した一重項酸素脱活性基を有する紫外線吸収剤は、肌の日焼けを防止するだけでなく、化粧品用色素による色素増感性一重項酸素から肌を保護する機能も兼ね備えている夢の化粧品添加剤になるかも知れない。

（大阪教育大学教育学部）

平成 18 年度　研究助成

毛の成長周期の制御に関する研究について

礒田　博子

毛の成長周期の制御に関する研究は、現在世界中で盛んに行われており、年々分子生物学的手法を取り入れたものが数多く見られるようになってきた。しかしながら、ごく最近までは医学系の研究者が主に研究を行っていた背景もあり、分子生物学的コントロール下のデータは少ない。また逆に分子生物学者が行っているデータを眺めると、皮膚科学としてのコントロールがきちんとなされていないものも少なくない。したがって、現在までに報告されているもののうち、分子生物学的・皮膚科学的信頼性の高いものはごく限られた研究室から出た報告に限定されると言わざるを得ない。

また、現在主に用いられている研究方法としては、①各毛成長段階における網羅的遺伝子発現定量・比較、②各成長段階で特徴的な発現を示す因子の特定、③正常皮膚および脱毛部分の皮膚での発現量比較、④以上でピックアップした因子の培養細胞への添加による増殖活性評価、⑤マウス個体皮膚への投与による毛周期への影響評価、等が挙げられ、これらを組み合わせることにより毛周期制御機構解明への研究が行われている。この研究方法の結果明らかとされることは、もともと皮膚において発現の認められている因子の作用機序等であり、未知の遺伝子産物による発毛促進因子はターゲットに入っていない。すなわち生体内でのよりマイルドな作用物質のみに絞られるため、画期的な発毛因子の特定は、現時点では未だなされていないのが現状である。

様々な皮膚機能科学研究が体系化され、コスメトロジーが学問として深化していくことを期待している。

（筑波大学大学院生命環境科学研究科）

平成 18 年度　研究助成

使用感は個人により差があります

小田　功

化粧品の値段にはピンからキリまでありそうなことは，化粧品に興味のない私でも気づいていた．そこで妻に確認したところ，化粧水の例では数百円の物から高い物では数万円もするという．同種の製品で 100 倍以上も価格差があるというのは，驚きである．高価な化粧品も安価な化粧品も，原料にそれほど差はあるまい．おそらく，原価自体は大差ないのではなかろうか．もっとも，高価な化粧品は，それなりに研究開発費がかかっているとは思うが．

工業製品の中で価格差の大きい代表格は，オーディオ機器であろう．さすがに，安価な一体型ラジカセと５万円くらいのミニ・コンポの音質の差は歴然としている．しかしそれ以上の価格になると，私には正直，あまり音質の違いが分からない．もはや好みの問題である．ただ“音楽を聴く”ということが目的の実用品であれば，高価なオーディオ機器は売れるはずもない．しかしながら，高価格少量生産で商売が成り立っているのは，オーディオ機器がいわば嗜好品だからである．音作りが感性に合えば，たとえ高価であっても購入する人がいるのだろう．

こうして見ると，化粧品はオーディオ機器と同様，実用品というよりも嗜好品の要素が強いように思う．ひいきのブランドがある点も，オーディオ機器に似ている．確かに物を購入する際，男性は競合機種の諸元を比較してから購入するが，女性は感性で購入することが多そうだ．そんな中，某フィルム会社が化粧品に進出したが，男性から見ると技術を前面に押し出した説得力のある広告を展開しているように思う．果たして，このような広告が世の女性に受け入れられるか，大変興味深い．

計測を生業にしている身としては，化粧品の性能の定量的な評価をしてみたい．そのような装置を開発して，価格の差がどの程度，性能に反映されているのかを，調べてみたいものである．たとえ“使用感は個人により差”があったとしても，客観的な評価ができれば，化粧品を売る側としても説得力があろう．なお，妻の話では，高価な化粧品は，やはり効果があるということである．

（木更津工業高等専門学校機械工学科）

平成 18 年度　研究助成

糖鎖の研究とコスメトロジー

佐藤　智典

若い時には感じなかったのに、年を重ねる毎に感じるのは体力の低下と皮膚の老化である。体力はウオーキングやジョギングを行なうことで維持できているが、皮膚の老化を防ぐ手だては正直なところ何の努力もしていない。皮膚の老化を隠すために、化粧をすることも顔のエステをすることもない。しかしながら、男女問わず、元気な肌を保ちたいと言う意識は高まっているようである。従来の化粧ということでなく、若々しい肌を保つために細胞の機能解析に基づいたコスメトロジーの考え方が今後は飛躍的に進歩して行くと思われる。

私が糖鎖の研究を始めてから約２５年になる。多糖を用いたドラッグデリバリーシステム (DDS) の研究は２５年間も続いておりライフワークになりつつある。最近、細胞に発現している糖鎖の構造や機能に関する研究が飛躍的に進んできており、細胞に発現している糖脂質や糖タンパク質中のオリゴ糖鎖の研究が面白くなってきている。メラニンの様な糖タンパク質の糖鎖も機能発現に大きな役割を果たしている。細胞が分化すると細胞に発現している糖鎖構造が変わってくることも知られている。細胞の表面を覆っている糖鎖は、まさしく細胞の顔であり、細胞の性質を反映している。ヒアルロン酸以外にも、元気な肌を保つための秘密が細胞に発現する糖鎖が関与していても不思議ではない。細胞に異常があった時に改善してくれるタンパク質や遺伝子などのバイオ医薬品を細胞内に送り込む DDS にも糖鎖は非常に有用である。特にヒアルロン酸やキトサンといった多糖は、DDS において面白い素材であることが判ってきている。糖鎖の機能を理解し、さらにその生合成を制御する研究は、コスメトロジーの分野でも発展すると考えられる。

（慶應義塾大学理工学部）

平成 19 年度　研究助成

コラーゲン…化粧品？ 健康食品？ はて、何？

小出　隆規

私はプロの研究者になってからずっとコラーゲンを中心にすえた研究をおこなってきました。

（以前どこかに書きましたが）コラーゲンの研究をしている、というとほとんどの場合「化粧品のご研究ですか？」とか「食べたら健康にいいんですか？」云々という話の展開になってしまいます。つい先日もある会合で「てっちり」が出てきたとき、鍋をつくってくれているお店の女性が「ふぐのコラーゲンがしみ出して、お肌しっとりぷりぷりになるんですよ…」としきりに説明をしてくれました。周りの連中は私がコラーゲンの研究をしているのをよく知っていましたので、吹き出しそうになるのを皆こらえているようでしたが、私もムキになって反論しそうになるのをやっとこらえて、その夜はにこにこ和やかにてっちり→ふぐ雑炊を堪能しました。しかし、翌日になっても私の肌はしっとりにもぷりぷりにもなっていないのです（当たり前だ！）。

正直、昨今のコラーゲンブームにはちょいとやり過ぎの感があります。

曰く「天然だからからだに優しいコラーゲン」
人工コラーゲンがないだけでしょうが…

曰く「体の中からコラーゲンを補いましょう…コラーゲンペプチド」

類似のパターンとして、筋肉増強ミオシンペプチド、とか、受験勉強に海馬スライスとかいくらでもできるなあ…

曰く「植物性コラーゲン配合の化粧品…」

きわめて独創的で声もでない。

まあ、いまのところ健康被害は出ていないようなのでべつにかまわなければいいのですが、まじめに研究しているものとしてはなんとなく寂しい気持ちもするのです。今回初めて化粧品に関連する財団から助成をいただきました。こちらはかなりうれしいことでした。

（早稲田大学理工学術院）

平成 19 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

大槻　崇

私は，大学院修士課程までは農学分野で，大学院博士課程から現在までは薬学分野で研究を行っています．特に，薬学分野に移ってからは，主な研究テーマの一つとして「がん疾患関連シグナルを制御する天然物の探索とその作用機序の解析」を行っております．その研究の一環として，大腸がんにおいて異常亢進している Wnt/β-catenin シグナル伝達経路を標的として，本シグナル経路の転写因子である TCF/β-catenin の転写活性化を阻害する活性天然物の探索を行い，目的とする転写活性を阻害する植物エキスを発見しています．一方，逆に転写を活性化するエキスも見いだされました．このような転写を活性化するものを何とか利用できないものかと考え文献調査を行ったところ，Wnt シグナルが毛包形成（毛髪形成）に関連することに気付きました．近年，高齢人口の増加や環境的ストレスなどにより，薄毛，抜け毛に悩まれている方々が多くなっています．ヒトの頭髪は単なる生理的機能を持った器官としてだけではなく，整容的な意味合いを持っていると言われています．また男女共に脱毛症に罹患した人の喪失感，QOL の低下は著しいものがあります．このような背景から，私は，育毛促進に有効な天然素材，天然化合物の探索に興味を持ち，育毛，発毛への関与が明らかにされてきている Wnt シグナル伝達機構に注目した研究を計画いたしました．幸運にも，貴財団の研究助成に採択され，計画した研究を遂行する機会を賜りました．本研究では，2 種の植物より計 3 種の活性化合物の単離に成功いたしました．助成期間は終了いたしますが，今後も本研究を継続し，得られた活性成分の育毛作用に関する有用性を評価し，育毛剤原材料としての利用を検討していきたいと考えています．最後に，本研究に対し研究助成を賜り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申し上げます．

（千葉大学大学院薬学研究院）

平成 18 年度　研究助成

コスメトロジー研究振興財団研究助成金をいただいて

天谷　雅行

この度、コスメトロジー研究振興財団研究助成金をいただきましたことを心から御礼申し上げます。日本の公的な研究費は様々な制約があり、すべての研究、学術活動をサポートするのは困難であるのが現状です。例えば年度問題です。４，５月に海外で学会がある際に、少しでも安い航空券を購入するために、数ヶ月前に予約をします。ところが、安い航空券は、例えば３日以内に発券し、購入しなければいけません。すると、前年度の 11 月、12 月に購入し、受領書は前年度のものになります。領収書と実際に使用する時期が年度をまたいで異なるという理由のため、この場合公的資金では購入が困難になります。マウスの飼育費もそうです。マウスは、あたりまえですが、通年で飼育が必要です。３月 31 日まで、マウス飼育費はかかります。ところが、大学事務局に提出する伝票の締切は３月上旬です。すると、３月中のマウスの飼育費は公的資金から出すことはできません。研究は継続されているにも関わらずです。これらの矛盾な点を、本研究助成金は埋めてくれます。

本研究課題は、GFP（Green Fluorescence Protein）を用いて､細胞接着分子を可視化するものです。その GFP が､昨年、ノーベル化学賞の受賞対象となり、日本人である下村脩博士が見事受賞しました。日本人としては、本当に嬉しいことです。しかし、手放しで喜べないのは、日本で行った研究でないからです。もちろんすべての研究がノーベル賞級な訳ではありませんが、独自性の高い、世界をあっと驚かすようなわくわくする研究成果が日本人により、日本からでることを心から祈念しています。そして、できるだけ多様性に富む研究成果をだせる集団が、強い集団と言えると思います。コスメトロジー研究振興財団が、そのような研究活動を今後も支えていただけることを願っています。

（慶應義塾大学医学部皮膚科学教室）

平成 18 年度　研究助成

治療と美容のターゲット：皮膚を考える ～コスメトロジーの重要さ～

深見　希代子

アンチエイジング、美白、シワ・シミが消える、などをキャッチコピーにした化粧品が多々売り出されている。それらの効果が如何程かはわからないものの、日々鏡に向かいため息をついている者としては、つい手が出て購入してしまう。であるので、化粧品に対する興味は非常に強い。

我々が皮膚研究を始めたのは、細胞膜直下の情報伝達系の１つであるリン脂質代謝に関する酵素の遺伝子欠損マウスが毛のないマウスとして生まれたことに端を発する。約８年前である。ヌードマウスと同様な外見はインパクトが大きく、遺伝子解析をしなくとも遺伝子欠損マウスと判断できることもあり、当初は非常にわかりやすいと喜んだが、解析はどうしてどうして、手放しで喜べる程簡単ではなかった。特にリン脂質代謝の異常が何故、無毛になるのかの関連性がわからないことから、成果を一流雑誌に投稿しては蹴られ、と気落ちすることも多かった。それでもこの遺伝子欠損マウスの表現型はとても面白く、毛がないこと以外に、体が小さくて痩せであったり、皮膚の炎症の亢進を伴う免疫応答の異常が見られたりと今でも解析には事欠かない。特にコスメトロジー研究振興財団からの御支援で、我々の遺伝子欠損マウスとヌードマウスの毛形成におけるシグナル伝達の共通性を明らかにできたことは、大きな成果であると考えている。また免疫系についても、白血球数が顕著に増加し、貪食能の低下が見られるなどの新たな知見を最近見出してきており、機会があれば是非その成果も報告したい。

毛のない方々の悩みを解決できるかという質問をよく受けるが、ヒトとマウスとは大分毛の形成機構が異なることもあり、すぐには難しい。しかし、現在市販されている育毛剤のターゲットタンパク質との関連性もあることから期待は大きい。また最近、メラニン色素の表皮細胞への輸送にも関与することが示唆されており、美白をターゲットにできる可能性も出てきている。仕事と興味が一致できる有り難さを感じている。

（東京薬科大学生命科学部）

平成 18 年度　研究助成

医学研究からコスメトロジーへの橋渡し

稲垣　豊

皮膚は全身諸臓器の中でも、コラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスの含量が最も多い組織のひとつである。その適切な発現は、皮膚の生理機能の維持や創傷治癒において重要であるが、何事も過ぎたるは及ばざるがごとしであって、コラーゲンの過剰な発現はケロイド形成や皮膚の線維化を引き起こす。若い瑞々しい肌を手に入れたいと望むのは、人類が誕生して以来の永遠の願いであり、新聞や雑誌の広告欄には「コラーゲン」や「ヒアルロン酸」といったマトリックス成分名が踊っている。筆者が専門とする結合組織学あるいはマトリックス生物学の立場から見ると、にわかには信じがたいものや、時には眉をひそめたくなるようなものが存在するのもまた事実である。

今回、コスメトロジー研究振興財団からの研究助成を受けて、これまで縁がなかったコスメトロジーという学問に接して、新たな発見とともにいくつかの点について考えさせられた。

１点目は、表彰贈呈式での記念講演を拝聴し、化粧が皮膚科疾患や手術後の傷を隠すことで、単なる見かけ上の改善に留まらず、コンプレックスの解消や自信の回復といった精神面に大きな影響を及ぼすことを再認識した。この点は、毎年の研究助成において「精神、文化に関する分野」として重要視されている。

２点目は、冒頭に記載した点にも関連して、これからのコスメトロジーでは効果と安全性の両面において医学的裏付けが一層必要とされることを痛感した。医学において、EBM（Evidence-based medicine）という言葉が重用されて久しい。自然科学の１分野である医学には evidence があって当然だが、EBM という言葉が強調されたこと自体、人間を相手にする医学の不確実性や、「医学」と「医療」の違いを物語っている。コスメトロジーの分野においても、化粧品を用いた人の主観が占める割合も大きいと思われるが、それと同時に客観的裏付けとなる科学的根拠が今後ますます重要視されると思われた。今回の助成を契機として、皮膚の創傷治癒や線維化研究を通じて、医学からコスメトロジーへの橋渡しに少しでも貢献できることを願っている。

（東海大学医学部臓器線維症研究ユニット）

平成 18 年度　研究助成

私のコスメトロジー観

椛島　健治

私個人は化粧品を用いるわけではないので、あくまで研究者側の立場でコスメトロジーを考えてきました。ところが、最近になって、自分の頬にできたシミが徐々に拡大しているのが気になり始め、ついに、ハイドロキノンクリームを入手。早速試してみることにしました。確かに、徐々にシミが薄くなり、ある意味初めて「美しくありたい」と願う乙女心を共感することができた訳です。しかしながら、話はこれで終わりません。徐々に、ハイドロキノンを塗った部分が痒くなり始めました。ついにうわさに聞いていた接触皮膚炎を併発してしまったのです。ぽりぽり掻いていたら炎症が強く起こり、あわててステロイドを塗りましたが、その部分が色素沈着を起こしてまたシミが復活しつつあります。

サイエンスに基づき化粧品を捉えていくコスメトロジー（化粧品学）は今後益々発展していかなければならない、ということを、身をもって体験した次第です。

（京都大学医学研究科皮膚科学）

平成 18 年度　研究助成

今研究成果のコスメトロジーに及ぼす影響

小島　肇夫

本研究は予想以上に培養表皮モデルに対する最適な酵素処理条件および溶媒濃度の決定に手間取り、度重なる検討により予算が底を突き、申請の際に提出した計画の１／４程しか成果をあげることはできなかった。実験の見積もりの甘さを陳謝してお詫びしたい。

現在、化粧品業界は 2009 年の欧州における動物実験禁止問題に直面しているが、安全性試験についてはまだ動物実験を回避できる段階にない。今後、徐々に影響が出てくることになろう。国際市場の中で欧州の問題に対応しながら、どのように日本の化粧品の安全性を担保し、業界のスタンスを守っていくのか難しい時代となった。

安全性試験の一分野である遺伝毒性試験において、本研究を参考に化粧品の安全性確保に取り組む研究者の奮起を期待したい。

(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　薬理部新規試験法評価室)

平成 18 年度　研究助成

コスメトロジーに影響を及ぼす本研究の展開

田中　勝

この研究は治療の QOL への影響を評価し，同時に，化粧による補助効果も併せて検討するという，今までにない研究の方向性を探った．その結果，データは少ないが，化粧が女性の行動や精神に及ぼす効果やストレス改善に何らかの効果を上げるという可能性が示唆された．しかし，これは個人差が大きいということも事実である．また，客観的シミ改善と QOL 改善には，人によって異なる微妙なギャップがあった．まだ症例が少ないため，この結論には，今後のデータ蓄積と統計解析が期待される．ある患者では，治療後には化粧をしなくても QOL が改善されているが，別の患者では治療では QOL に変化はなくとも，化粧により QOL が改善するという微妙な意識の違いを，治療がもたらした可能性が示唆され，たいへんに興味深い．

今回の研究では，色素斑の治療による客観的な改善と QOL の改善は必ずしも関係しなかった．すなわち，シミ改善がわずかでも，治療自体が気分的に QOL を改善したのかもしれない．これは皮膚疾患の治療にも共通する概念である．つまり，治療結果が不変でも治療に対して満足することがある．ゆえに，治療がつらいものでなければ，患者サイドとしては，結果以上によく感じることがある．

色調の淡い老人性色素斑の画像定量を目指したが，客観的変化をとらえるということは重要な課題である．人間の記憶はあいまいであり，患者も医師も，主観的に惑わされている可能性が高い．また，他のさまざまのデータとの比較もしやすいので，データには誤差があるものの，今後の実用性はかなり高いものではないかと考えている．今後，自動的画像切り出しと皮膚科医の手動切り出しに差がないことも検討しなければならない．皮膚科医の判定とコンピュータの判定を定量的に比較し、統計学的に解析することが必要である．色素沈着性病変に最も合った自動抽出プログラムを完成する必要がある．当研究が発展し，今後のコスメトロジーにおいて，客観的定量手段の１つとして広く実用的に用いられるようになることを願い，さまざまな分野との共同研究を展開していきたい．

（東京女子医科大学東医療センター皮膚科）

平成 18 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

近藤　昌夫

昨今のコスメトロジー研究の進展に伴いしみ・そばかす・しわなどの生成メカニズムの分子レベルでの理解が進み、ハイスループットスクリーニング技術およびコンビナトリアルケミストリー等との融合と相俟って、多種多様な美白成分やアンチエージング成分が開発されつつある。これら各種成分の実用化に際しては皮膚内への侵入が不可欠であるものの、元来皮膚は生体内外を隔てるバリアとして機能しており、ここにコスメトロジー基礎研究の実用化に向けた難しさがある。

長年に渡り角層が皮膚バリア機能の本体であると考えられており、化学的手法のみならず物理的手法を含めて多方面から角層バリア制御法の開発が進められてきた。2002年、京大月田グループにより皮膚の重層上皮細胞層もバリア機能を担っていること、このバリア機能の本体がclaudin-1であることが示され、「皮膚バリア＝角層バリア」という旧概念から「皮膚バリア＝角層バリア＋重層上皮細胞層バリア」という新概念が提唱された。しかしながら、claudinバリア制御技術開発に向けた試みは緒についたばかりであり、未だほとんど進展していない。

本研究では、独自の生体バリア制御研究を有効活用し、初めての重層上皮細胞層バリア制御法の確立を試みたものの、現時点で制御技術の創出には至っていない。本研究終盤に現状の課題が顕在化し、直ちに課題解決に向けた予備検討を進め幸いにも改善策を構築することができた。今後は、本研究成果を有効活用し、コスメトロジー基礎研究の実用化に資する基盤技術の創出を図る予定です。

最後になりましたが、当該課題の推進に際して、グラントサポートを賜りました財団法人コスメトロジー研究振興財団に衷心よりお礼申し上げます。

（大阪大学大学院薬学研究科）

平成 18 年度　研究助成

コスメトロジーと掻痒性皮膚疾患

安東　嗣修

近年，アトピー性皮膚炎などの皮膚疾患を抱える患者が増加している。また，特に女性ではこの様な皮膚疾患に加え，化粧品によるIV型アレルギーを発症する場合も増えてきており，化粧品が使用できないあるいは，使用できる化粧品に限りがあるといったような状態となっている。当研究室配属女子学生の多くが，アトピー性皮膚炎を含むなんらかしらのアレルギー性皮膚疾患を伴っており，化粧品の使用に抵抗感をもっている。その為，アレルギーのこと，皮膚のことを研究したいとうことで，当研究室を希望するようである。

当研究室の研究テーマの一つに痒みの発生機序の解明がある。痒みは，上記皮膚疾患の主要な症状のひとつであり，痒みの抑制がこれら皮膚症状の改善につながることが臨床で明らかとなっている。痒みは，皮膚に付いた異物を感知し，掻き動作により除去するための警告信号のようなものである。一方で，皮膚疾患の症状としての痒みによる掻破は，皮膚の損傷ならびに皮膚炎の悪化を招く。したがって，痒みの抑制は非常に重要である。痒みは，非常に耐えがたく多大なストレスを導きだす。特に，顔面における掻破は，寝ている合間にも気付かないうちに起こっており，外見上問題となるような状態（炎症等）を誘発する。この様な状態では，化粧品の使用は難しい。更に，皮膚疾患のみならず，化粧品自体によっても同様な事態を生じることがある。そのため，国内はもちろん，海外の化粧品関連企業からの共同研究依頼や痒みの評価法の技術指導依頼がある。最近では，機能性化粧品ということで，従来の美を追求したものだけでなく，皮膚の保湿や健康も意識したものが多く開発されてきている。このことは，掻痒性皮膚疾患患者の使用する化粧品の選択範囲の拡大につながる。

今回，コスメトロジー研究振興財団の助成を受ける機会に恵まれ，コスメトロジーを当研究分野に生かす糸口をつかめたことに感謝する。今後更に，コスメトロジーという学問分野は，皮膚という共通のターゲットを介して，医薬学分野と密接に関わっていくことを期待する。

（富山大学大学院医学薬学研究部応用薬理学）

平成 19 年度　研究助成

バリア？ シグナル？ それとも…？

村上　誠

ホスホリパーゼ A_2（PLA_2）という単語を聞くと、生化学を少しかじっている者であればすぐに「炎症」とか「脂質メディエーター」が頭に浮かぶであろう。しかしながら実際のところ、細胞外に分泌される $sPLA_2$ と呼ばれるファミリーが体の中で何をやっているのか、全然わかっていないのである。何か新しい機能を見つけるにはどうしたらいいのか…。単純な発想で $sPLA_2$ 群の各アイソザイムを片端からマウスに過剰発現させてみたら、思いも寄らないことに、ある特定のアイソザイムを発現すると脱毛マウスが誕生した。それまで皮膚のバイオロジーなど真剣に考えたことなどはなかったから、それ以来皮膚の病態生理学の勉強を始めたが、その複雑かつ巧妙さを理解するのに頭を抱える毎日である。

本研究を進めているうちに、$sPLA_2$ − IIF という従来誰も注目していなかった分子が皮膚に重要なアイソザイム本命らしいということがわかってきた。私が専門とする狭い基礎研究領域からの視点からすれば、大きな発見といえる。もしかしたら、この酵素の活性を調節する薬物が見つかれば皮膚の健康や美容にも役立つかもしれない、と夢が膨らむ。しかし発想が先走りする前に、まずは面前の疑問に答えなければならない。$sPLA_2$ であるからにはリン脂質が分解されることが引き金となって皮膚異常が発症するのであろうし、実際に脱毛マウスの皮膚では特定のリン脂質の代謝に変化があることはわかったが、リン脂質分解のあとで皮膚に何が起こっているのであろうか？

皮膚の脂質というと、表皮角質のバリア脂質を思い浮かべる。このバリアのおかげで、皮膚は水分の蒸発や外敵の侵入から守られている。この酵素はバリア脂質の成分のひとつである脂肪酸の供給に関わっているのだろうか？それとも、「PLA_2 = 脂質メディエーター」という既存概念に沿って、皮膚ホメオスタシスを制御する新しい脂質メディエーターのシグナルを調節しているのであろうか？はたまた、環境から侵入してくる微生物の膜リン脂質を分解として感染防御に関わっているのであろうか？どの可能性が破綻しても、皮膚には相応の異常が生じるであろう。より視野を広げてみると、実は脂質代謝酵素の変異が皮膚異常を生じる例は非常に多いのである。皮膚における脂質代謝の重要性を改めて認識するとともに、皮膚学の奥の深さを実感している次第である。　（東京都臨床医学総合研究所）

平成 19 年度　研究助成

コスメトロジーと動物実験

池畑　広伸

今回助成頂いた研究では、紫外線の発癌性や光老化という皮膚慢性毒性に対するサンスクリーンの防御性能を評価するために、多数のマウスが犠牲となった。EU 域内では今年（2009 年）から化粧品のための動物実験は禁止されると聞く。またある米国の化粧品会社では製品開発に動物実験を利用しないことをセールスポイントにしている。化粧品業界では動物実験代替法への移行が世界の潮流となっているようである。私が今回実施した研究も代替法で置き換えることが可能であろうか。突然変異アッセイ法にはバクテリアや培養細胞を利用したものがいくつも開発されている。これらの方法で紫外線の突然変異を検出できることも実際に多くの研究で実証されている。しかし、である。こうした代替法の実験系に紫外線防御剤を投与し、何らかの防護能を示す結果・数値が得られたとしても、問題はその防御剤が皮膚でもそのとおりの性能を発揮するとは限らない点にある。実際に皮膚に投与するとなると、防御剤を溶解・懸濁する溶媒の選択が重要であり、それが防御剤の安定性や皮膚塗布時の分散性に影響し、サンスクリーンの性能を左右する。他の化粧品との相性の問題もあるかもしれない。また皮膚という特殊な構造を持つ組織の表面をコートして保護するというサンスクリーンの投与形態に基づく問題も考慮しなければならない。したがってサンスクリーン個々の性能を評価するには実際に皮膚に塗って試すことがどうしても必要になる。

それでも近年では培養皮膚シートが販売されており、遺伝子工学で操作することにより突然変異研究用の培養皮膚

も開発されるかもしれない。そうなれば今回開発したマウスを用いたアッセイ法もいらなくなるであろうか。しかし現時点ではまだそれは早計に過ぎると思われる。理由は紫外線に対する生体反応が単に皮膚という限られた薄い組織の皮一枚に留まらないからである。皮膚は重要な免疫器官のひとつであり、その機能は紫外線の影響を受けることが知られている。また絶えず新陳代謝を繰り返す組織で、特に紫外線でダメージを受けた後はそれが顕著になり角層が一斉に落屑して新しい皮膚が再生する。紫外線量が多い場合は炎症を起こし火傷のようになる場合もある。炎症や免疫に関わる細胞は身体の内奥から皮膚へ移動してくる訳だし、皮膚再生には真皮の奥深くにある毛胞内の幹細胞が重要な役割を果たしている。こうした紫外線に対する生体反応は現在の培養皮膚では再現できない。むしろ紫外線の生体反応は動物個体まるごとが関わる反応ととらえた方がよい。

代替法の利用は化粧品配合成分の特定の効能の評価には有効かもしれない。しかしその化粧品が生体に適用された場合に起こるかもしれない副作用を見落としてしまう危険性が付きまとう。動物実験の優れたところは、こうしたこちらが予測していない生体側の反応まで、たとえそれがこれまで未知の現象であったとしても、検出し評価の対象とし得る点にある。紫外線による皮膚での突然変異誘発ひとつにしても、細胞レベルの研究では知られていなかった組織・個体レベルの反応により修飾を受けることを私たちは見出しつつある。炎症やかぶれのような急性反応については実験動物をとばして、直接人体皮膚でテストすればいいのかもしれない。しかし発癌性や酸化ストレス（光老化など）による慢性的皮膚毒性については人体を使う訳にはいかない。この場合はどうしても動物を使った安全性評価が避けられないと考えられる。化粧品メーカーには、企業イメージのために「動物実験撲滅」というイデオロジックで感性的な現在の潮流に迎合することなく、合理的・科学的なコスメトロジーに基づく製品開発を目指して頂きたい。

（東北大学大学院医学系研究科ゲノム生物学分野）

平成 19 年度　研究助成

本研究成果のコスメトロジーに及ぼす影響

鈴木　聡

今回メラノサイトにおける PTEN の欠損によって（たぶん PI3 キナーゼ経路が活性化され）、白髪抵抗性となることを見出した。ロマンスグレイという言葉もあるものの、白髪は外見から容易にわかる加齢現象であるために、コスメトロジーの分野では重大なテーマである。さらに以前我々はケラチノサイトにおける PTEN 欠損が、角質層増生、皮膚上皮過形成、毛髪の湾曲を認めることを報告しており、これらもまたコスメトロジーの分野において非常に興味ある現象であろう。

いつまでも黒髪を保つには PTEN の発現を抑制してメラノサイトの細胞死ができるだけ回避されることが望ましい。しかしながら、PTEN の発現を抑制すると発がん剤に対する感受性が加速されてメラノーマ形成がおこりやすくなる。さらに現在メラノサイトだけで PTEN を抑制することは困難であり、外用剤で PTEN を抑制するとケラチノサイトにおける PTEN も抑制されて、角質層の増生や皮膚上皮の過形成から皮膚は、がさがさ・ごわごわ感が出てしまうであろう。さらに有棘細胞がんの危険性も高まる。

コスメトロジーは、人の生活を豊かなものにし、生活の質を高めることに大きく貢献することは間違いない。しかしながらコスメトロジーに基づいて市販される化粧品は危険性をもってはならない。

上述のように、我々の研究からすぐに白髪予防化粧品が生まれるというわけにはいかないが、今後 PTEN の下流分子を１つ１つ検索することにより、白髪形成のみに関与し、腫瘍形成には全く関与しない標的分子を同定することができれば、いつまでも黒髪であるという夢も可能となる日がくるかもしれない。

（九州大学生体防御医学研究所／秋田大学医学部）

平成 19 年度　研究助成

光計測とコスメトロジー

荒木　勉

私の専門は光計測である。大学院の時代には、紫外線を対象にした吸光測定に関する研究を進め、大学に職を得てからは可視光を取り扱った蛍光測定を行ってきた。最近は赤外からテラヘルツ域の光を扱っている。光は紫外―青―緑―黄―赤―赤外―遠赤外…という順にエネルギーが小さくなっていくが、この色順と人生とは同期しているように思える。青春時代はエネルギーレベルが高く、気持ちも青あおしている。大人からは尻が青いなどと言われるし、反発（散乱）も大きい。壮年になってエネルギーは少し衰えるが、成果の蓄積が実りのある緑の季節をもたらす。しかし 60 歳を迎えるともはや老境の入り口であり、赤い衣を着る儀式も待っている。そしていつかは終焉を迎える。そんなことを考えると、赤外レーザーを使って皮膚を測りだしたのは自然の成り行きのようにも思える。それにしてもコラーゲンからの発光は面白い。800nm の赤外パルス光を照射して 400nm という青色光が得られる。これが非線形現象である。中高年パワーを結集すれば若者同様のエネルギーが生まれるということか。我々団塊の世代はまだまだ頑張らねばと思うこのごろである。

光計測はかならずしも専用機器を用いるとは限らない。目による観察も光計測のひとつであるといえる。しかも大変高機能である。医師は患者の皮膚を肉眼観察することで形態情報と分光情報を瞬時に取得し、的確な診断を行う。現存の光計測機器を駆使してもそれにはかなわない。しかし、肉眼観察の弱点は皮膚の内部まで見通せないことである。光計測のよいところは非接触・非侵襲である。この利点を活かして皮膚内部の構造情報を得たいと思い、今回の研究を行った。幸い各種レーザーが手に入ったので、報告したように経皮で深さ 300 ㎛までのコラーゲン分布画像を取得することができた。安全性も十分に確保できた。次はぜひ人の皮膚に関する in vivo 計測へと発展させたい。この一連の研究が皮膚科学に寄与することを願う。さまざまな世代の研究者が自身の色に基づく研究を創意工夫することで、新しい彩（いろどり）が生まれる。これこそ「コスメトロジー研究」が目指すところであろう。

（大阪大学大学院基礎工学研究科）

平成 19 年度　研究助成

コスメトロジーとは？

伊藤　敬

今回コスメトロジー研究振興財団から助成金をいただいて、改めてコスメトロジーとは何かということを考えてみた。普段、基礎研究に盲進している身としては、毎日メラノサイトを培養し、ディッシュが黒々としていくのを目の当たりにしていたとはいえなかなか難しい。Cosmetology の語源としては装飾技術の学問ということになるようだが、実際の化粧品、美容技術は 2 つの方向性があるように思われる。一つは加工、つまり新しく何かを付け加えるもので、マスカラ、マニキュアなどがこれに相当するだろう。こちらの方が語源には合っているように思える。もう一つは、若さの維持とでもいうのだろうか、主に肌を若く、健康な状態に留める努力である。面白いのは、前者は地域、時代、文化によって大きく異なるのに対し、後者は（おそらく）有史以来、常に変わらず人間の中にある願望であるということだ。これは言葉を変えて言えば、不老不死の願望に近いのではないだろうか。科学、特にバイオロジーが寄与することが出来るのはどちらかと言えば前者ではなく後者であろう。実際、科学技術が発達した現代では、美のために様々な処方が主に外科の技術を用いて行なわれている。今後さらに科学技術が進んでいくことで、コスメトロジーはどのようになるのだろうか？例えば最近巷でも話題になる iPS 細胞は自身の細胞一片からあらゆる細胞を作り出す可能性を持っている。もちろん主たる目的は医療と言うことになるが、コスメトロジーにも十分応用できるだろう。火傷の跡、取れないシミ、たるんだシワなど、、、あらゆるものと言ってしまうと一気に非科学的な雰囲気になってしまうが、数多くの応用例が考えられる。ヒトが見た目だけとは言え念願の不老不死を手に入れることができる日も近いのではないだろうか。

（東北大学大学院生命科学研究科）

平成 19 年度　研究助成

ひとの幸不幸

大津　浩

わたしは、今回「遺伝子改変マウスを用いたヒスタミンの接触性皮膚炎に与える影響」についての研究で財団からご支援をいただきました。考えてみますと、何事をやるにあたっても、ひとの幸不幸を考えずに行動することが必要であり、今回の支援を受けて実際に実験に移す際もそのことを念頭に実験したいと思いました。機会があって今回皮膚のアレルギーについて仕事をすすめましたが、これはコスメトロジーに積極的に寄与するというよりはむしろ有害な副作用を事前に防ぐという性質の仕事で、不幸をおこさないように予防するという意味合いでひとを幸福にしていくことに繋がると思っています。近年の社会を鑑みるに幸福になることが宣伝され、実際に踏み込んでみると不幸になることが数多くあります。それなら、むしろ何もしない方がよかったとなるのですが、この何もしないことを選択させるような選択肢を選ぶに充分な情報が与えられる事も実は社会にとってかけがえも無いほど重要なことであると思えます。新しい事物は、ひとにとって幸福をもたらすものと、不幸をもたらすものとがあります。幸福面のみにとらわれると、とんでもない不幸に見舞われることがあり、十分な注意が必要です。こういう観点で仕事を進めるときは、明るい面を強調してすすめるときに比べて財政的な支援を受けにくいのが一般的です。こういう意味から今回貴財団からの支援をいただいたことは大きな意義があり、不幸を防ぐことによって幸福を得ることに加担していただいていると思い、鼻息荒く持論を展開いたしました。また、「コスメトロジー雑感」のような企画も持論を展開できる場であり、報告書には書けないようなことを読んでいただけて、ちょっと「幸福」になりました。ひとの幸不幸は複雑ですね。

（東北大学大学院工学研究科応用量子医工学）

平成 18 年度　研究助成

コスメトロジーと心の美しさ

政岡　ゆり

どんな著名な画家でも目に映るものや写実的な絵画を描くことに飽き、抽象的なものや概念を表出した絵を描く。それは恐らく既存の物質を表現することに限界を感じ、自分の内面を描くこと、さらに自分というフィルターを介して表出することに価値をみいだすとも考えられる。

それを人の美しさに置き換えるなら、このようなことがいえるのではないか。誰もが美しさには限界があるということを知る。それは年齢を重ねて鏡の前で初めて気づかされる老いという悲しみである。しかし、鏡に映るその顔に刻まれた皺や、日に照らされて作り出された生理現象の跡にはその人の歴史が刻まれ、また表情には感じてきた情動が表現される。物質的な美しさに限界を感じたとき、人間の美しさは内面にあり、表情の豊かさが年齢や性別を超えた真の美しさということに気づくのである。

これまでのヒトにおける表情認知の研究では恐怖の表情を提示すると、見ている側の恐怖の情動の中枢である扁桃体が賦活するという報告がある。また逆に楽しい表情を提示すると楽しい気分になるという報告がある。人の表情に我々の脳がいかに敏感に反応し、自らの感情に働きかけるかがよく理解できる。表情の豊かさは内面の輝きそのものであり人に与える影響力も大きい。

それではコスメと内面の美しさをいかに結びつけるかという疑問が起こる。

我々の研究では香りによる情動の変化を明らかにしてきた。香りの情報は直接、情動の中心である辺縁系に投射をする唯一の感覚である。またその香りは呼吸の吸息とともに感じる感覚である。呼吸することは生きるためであり、また香り、感じることである。良い香りに伴う呼吸の変化が脳に与える影響は大きい。記憶に働きかけ、気分がすぐに変化するのが嗅覚の特徴である。さらに香りによるイメージや記憶の想起は視覚や聴覚よりも容易であり、言葉以前の概念に働きかける。

コスメによる皮膚への効果、美しく見せる様々な物質的効果には限界がある。その先にあるものは、人の情動に働きかけるもの、自分さえも意識できない脳内の部位に影響力を与える要素を作り出すことではないだろうか。香りの

持つ神秘性、香りが作り出すイメージそのものが一呼吸一呼吸によって脳の中で膨らんでいくような、そんなコスメが望ましいのではないだろうか。

（昭和大学医学部第二生理学教室）

平成 18 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

元吉　忠寛

もともと、社会生活の中に存在する人々のリスク認知について研究していたことから、化粧品のリスクについて女性がどのような認識をしているのかに興味を持ち、女子大学生の化粧品に対するリスク認知についての意識調査を実施して、検討を行った。食に関する安全については、マスコミで繰り返し大きく取り上げられ、消費者の意識も高まっているため、直接的な健康被害のない商品や製品に対しても厳しい規制や不買運動が起こることもある。しかし、どうやら化粧品に対しては、被害にあってはじめて、製品を使うのをやめればよいという行動パターンが示唆された。すなわち、少なくとも今回の調査対象者においては、化粧品に関して、多少の肌トラブルのリスクは受容されているということである。食の安全には、非常に敏感でも、肌トラブルにあわないための予防的な行動を取っている者はほとんどいなかったようである。これは、調査対象者が大学生だったことによるかもしれないが、化粧品に使用される数多くの成分のうち、自分の肌に合わないものを事前に把握しておくことが困難であることも影響していると考えられる。調査対象者をもう少し上の年齢層に広げて、改めて調査をすることも必要であろう。個人的には、化粧品リスクに関しては、「天然」とか「無添加」など、一見すると、肌に対するリスクがないというイメージを消費者に与える不正確なメッセージ戦略が多い気がして、多少の不安を感じる。リスク・コミュニケーションの観点からすると、消費者の立場に立ったリスク情報の発信や商品の提供を行うことも、必要なのではないかと感じている。

（名古屋大学大学院教育発達科学研究科）

平成 18 年度　研究助成

高齢者を対象としたコスメトロジー研究に取り組んで

徳丸　治

今回の助成によりコスメトロジー研究を行うに当たり，2つの困難にぶつかった。1つは自分が化粧について無知であったことであり，もうひとつは高齢の男性を研究対象としたことである。

研究を開始するに当たり，まず自分が化粧について全く無知であるということに気付いた。このままでは何も始められないと頭を抱えていたところ，医学生の中に大手化粧品メーカーで商品開発に従事した経験のある学生がいるといううわさを聞いた。藁にもすがる思いで研究への参加を懇願したところ，二つ返事で承諾してくれたのみならず，同級生2人を引き入れて，本研究の強力な推進力となってくれた。彼女の本研究への取り組みが，日本学生支援機構から評価され表彰につながったことは望外の喜びである。

医学生3名の参加でようやく研究体制が整ったものの，被験者をいかに集めるかが次の難題であった。大学病院のボランティア団体等にお願いしたものの，なかなか引き受けてくださる方がみつからなかった。奥様は興味をもってくださるのだが，ご主人が首を縦に振らないケースが続出したのである。研究期間が残り半年になった時点でまだ被験者が4組しか集まらないというありさまであった。最後の頼みの綱とばかりに，我が家の菩提寺に頼んで檀家に片っ端から被験者をお願いしてもらった。そこでも，奥様が参加したいと希望してもご主人がうんと言わないケースが数多くあったそうである。幸いご住職の熱心な勧誘のおかげで，研究期間残り1ヶ月で8組を追加することができた。

被験者集めに難渋したことから，高齢のご夫婦においては奥様とご主人との間に化粧に対する興味の乖離が少なからず存在すると推察する。今回研究に参加してくださった男性被験者は，お断りになった方よりも化粧に対する興味が元々あった可能性がある。今後は，このバイアスを考慮し

た研究を工夫していく必要があるが，そこがクリアできれば高齢者に対する化粧の影響に関して一歩進んだ知見が得られる可能性があると考える。

本助成により，いままで全く知らなかったコスメトロジーの世界に興味を広げることができました。どうもありがとうございました。　（大分大学医学部神経生理学講座）

平成 19 年度　研究助成

インドの化粧品の昨今

岡光　信子

私がインド調査を始めた時期は、インドの経済政策が保護主義から開放政策に転換する 1990 年代の初頭に遡ります。それ以降、短・長期の滞在を通して、インドの様々な変化を目の当たりにすることができました。この長くもあり短くもある年月の中、貴重な友人・知人と出会いました。彼らの小さかった子供たちが成長し、進学・就職や結婚をする姿を見るだけでも、インド社会が着実に変化していることを実感します。

開放政策以降、インドは外資投資や外国企業の進出もめざましく、IT と医薬品の分野における躍進により高い経済成長を達成しました。その結果、優秀な人材がインドでも高い給与を得られる状況が生まれ、頭脳流出組が母国で働くという現象も珍しくなくなりました。こうした帰国組は、高い給与を得ているため、高額でも高品質な消耗品を好む傾向があり、実際にこうした高所得をターゲットに開発された商品も多数見られます。安価なものから高額なものまで、商品のバリエーションが以前とは比べられないほど増えました。

商品の多様化は、化粧品も例外ではありません。かつて、インドで入手できる化粧品の種類は非常に限定されていました。私の調査地は南インドの村落部にあり、日本では当たり前の化粧水やリンスですら、調査地の人々はその存在すら知りませんでした。当然、こうした商品は現地では手に入らない貴重品でした。

現在、都市部で入手できる化粧品は、国内外の化粧品メーカーのものだけでなく、インドの伝統医学を売りにしたものまで多数あります。消費者が商品を取捨選択できる状況になりました。それどころか、日本で流布していない、ヨーロッパの製薬会社の敏感肌用の商品がインドで製産・販売されています。多種多様な化粧品が広範囲に流通する環境が整い、村落部でも安価な化粧品が売られています。古代から女性は美を追究してきました。インド女性が今後どのような化粧品を選択するのか、学術的にも個人的にも非常に興味がそそられます。

（東北大学大学院文学研究科）

平成 19 年度　研究助成

スリランカ —光り輝く島— との交流

井上　英史

私が交流しているスリランカは，かつてはセイロンと呼ばれた島国である．スリランカとは，シンハラ語で“光り輝く島”という意味であり，その名の通りとても美しく豊かな国と聞く．しかし，現在は長年の内戦によって疲弊し苦しんでいる．国は，予算を戦費に回さなければならず，人々の生活を支える部分では経済的な困難を抱えている．国内で高度な科学研究を行うことは極めて困難であり，多くの優秀な人材が海外に流出している．それでも国内に踏みとどまり，頑張っている人達がいる．

今回招聘した研究者と私は 20 年に渡り研究交流を続けている．彼は時折来日して，本国では困難な研究を私のところで熱心に行う．今回は，スリランカで身近な材料から彼らの健康に役立つ物質を探すことがテーマであった．モデル生物として線虫を用いて，その寿命を延ばすものを探索した訳だが，長寿命化活性を見つけることは毒性を見つけることに比べてはるかに難しい．今回の探索では，本来の目的とは逆の殺線虫作用がいくつかの植物性食材から見出された．そのような植物が彼らの国で日常的によく食されていることは，寄生線虫に感染する危機に常に脅かされている彼らの生活において必要なことなのかもしれない．

スリランカの研究者と研究交流を続けるためには，“本国でしかできないことを本国でできるようにする”ことが重要と考えている．今回，構築したアッセイ系は，スリランカに帰国しても遂行が可能であることを考慮した．本国に戻った彼が，彼の学生達と一緒にそのアッセイ系を用いて，元気に健康に寿命を全うできるような活性をスリランカ特有の素材の中から見出すことを願っている．そして次に来日するときは，その有効成分の分離と同定を主題としたい．“光り輝く島”から人々を元気に美しくする物質を見つけること．そのことが彼らを支え，彼らの美しく豊かな国を取り戻すことにつながることを願っている．

（東京薬科大学生命科学部）

付　　録

事業報告書（平成20年度）

役　　員

事 業 報 告 書

（自平成 20 年 4 月 1 日　　至平成 21 年 3 月 31 日）

《研究助成等の選考関連》

2008	5	7	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	2	公募締切り	応募数 120 件
	9	4	選考委員会（分科会 1）	素材、物性に関する分野の選考
	9	11	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	9	選考委員会（分科会 3）	精神、文化に関する分野の選考
	9	25	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 28 課題、国際交流援助 1 課題を選考
	11	12	表彰贈呈式	記念講演：「 見た目を磨く、内面を磨く 」 比較社会文化博士、劇作家、演出家　竹内 一郎 先生
	11	12～	助成課題の公表	当財団 HP 他関係学術雑誌に掲載
2009	2	中旬	持ち回り企画委員会	平成 21 年度の研究助成課題選考に関して

《理事会関連》

2008	6	12	通常理事会	平成 19 年度事業報告ならびに収支決算報告、第 10 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、事務所所在地の変更等承認、株主としての議決権行使、助成金の返還、報告事項
	11	12	通常理事会	平成 20 年度（第 19 回）研究助成者等の承認、 平成 21 年度事業計画及び予算案の承認、報告事項

《評議員会関連》

2008	6	12	通常評議員会	平成 19 年度事業報告及び収支決算報告、第 10 期理事及び監事の選任、報告事項
	11	12	通常評議員会	平成 20 年度（第 19 回）研究助成者等の承認、 平成 21 年度事業計画及び予算案の承認、理事の補欠選任、報告事項

《その他》

2008	3	末	財団活動の情報更新	当財団 HP へ平成 20 年度事業計画等を記載
	6	末		当財団 HP へ平成 19 年度事業報告等を掲載
	12		コスメトロジー研究報告	「コスメトロジー研究報告」16 号の概要を当財団 HP に記載

第19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-08-01	マイクロエマルションを利用したポリフェノールの皮膚へのデリバリーと光老化防御	製剤学 香粧品科学	神戸薬科大学 教授 北河修治
J-08-02	皮膚組織再生を目的とした生体組織類似コラーゲン組織体の作製	新素材開発と再生医療	東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 特任助教 南広祐
J-08-03	紫外線遮蔽剤用単分散板状酸化セリウムマイクロ粒子の合成及びその形態に由来する付加機能性の実現	無機機能材料	東北大学多元物質科学研究所 准教授 殷澍
J-08-04	細胞外マトリックス分解性微生物酵素を用いた動物原料からコスメトロジー素材への実用的アプローチ	タンパク質化学 ペプチド化学 酵素化学 応用微生物学	京都府立大学大学院 生命環境科学研究科 教授 渡部邦彦
J-08-05	物質保持能を制御できるコラーゲン擬似分子の作製	高分子材料化学 生化学	大阪府立大学大学院工学研究科 助教 児島千恵
J-08-06	酵母由来の機能性糖脂質（バイオサーファクタント）の構造及び機能の拡充に関する研究	微生物工学 酵素化学 有機化学 界面化学	独立行政法人産業技術総合研究所 研究員 福岡徳馬
J-08-07	皮膚の老化予防を目的としたコラーゲンのAGE化阻害物質の探索	医学薬学基礎研究領域	熊本大学医学薬学研究部 助教 藤原章雄
J-08-08	アスコルビン酸誘導体を用いた新規薬物含有ナノ微粒子製剤の開発	製剤学 物理薬剤学 薬物送達学	千葉大学大学院薬学研究院 准教授 森部久仁一
J-08-09	抗酸化性乳化剤の機能性化粧料としての利用に関する基礎的研究	生物化学工学 食品工学	近畿大学工学部 講師 渡邉義之
J-08-10	コエンザイムQ10（CoQ10）の美肌、抗老化作用におけるミトコンドリア移行の意義	生化学、細胞生物学 分子生物学 抗酸化物質 酸化ストレス	同志社大学生命医科学部 講師 斎藤芳郎
J-08-11	形成外科領域におけるヒト間葉系幹細胞移植を用いた瘢痕形成抑制の実現ならびに問題点の抽出と改善	再生医療 分子発生学 病理学 形成外科学	国立成育医療センター研究所 生殖医療研究部部長 梅澤明弘
J-08-12	手のひら･足のうらで発現が高いWnt阻害剤･Dickkopf 1がアンチエイジング（抗しわ、美白、色素再生、毛髪再生、除毛、皮膚再生）に及ぼす影響	色素産生細胞（メラノサイト） 表皮細胞 真皮線維芽細胞 アンチエイジング 老人性白斑　他	名古屋市立大学大学院医学研究科 加齢・環境皮膚科学 准教授 山口裕史
J-08-13	ビタミンCを合成できない毛のないSMP30/GNL遺伝子破壊ヘアレスマウスを用いた皮膚におけるビタミンCの美白、抗しわ効果の科学的実証	皮膚老年学 皮膚科学 香粧品学	東邦大学薬学部生化学 准教授 石神昭人
J-08-14	角層の若返りが皮膚の若返りに果たす役割	皮膚科学	久留米大学医学部皮膚科学教室 講師 大日輝記
J-08-15	ニッケルの溶出と炎症誘発作用機構の解析	アレルギー・炎症	東北大学大学院薬学研究科 准教授 平澤典保

管理番号	研　究　課　題	分　　野	代　表　研　究　者
J-08-16	cAMPシグナルを標的にしたヒアルロン酸産生制御メカニズムの研究	細胞生理学	横浜市立大学大学院医学研究科 教授 石　川　義　弘
J-08-17	放射線・紫外線適応応答マーカーを指標とした老化制御因子スクリーニング法の開発	放射線生物学 基礎老化学	東京都老人総合研究所 主任研究員 三　浦　ゆ　り
J-08-18	神経ペプチドおよびストレスによる皮膚バリア機能障害のメカニズム解析	皮膚科学 (皮膚免疫と皮膚バリア機能の複合領域)	大分大学医学部皮膚科 准教授 片　桐　一　元
J-08-19	タンパク質分解酵素を応用した新しい皮膚代謝促進治療薬の開発	生化学 細胞生物学 薬理学	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 医療科学専攻生命医科学講座 口腔病態薬理学分野 教授 筑　波　隆　幸
J-08-20	グリセリンによる皮膚湿潤、皮膚再生促進、癌促進の関連：アクアポリン3（AQP3）は諸刃の剣か？	医学 薬学	明治薬科大学 教授 石　橋　賢　一
J-08-21	表皮ケラチノサイトの角化プロセスにおけるPLD/mTORシグナリングの関与	生化学 細胞生物学 皮膚科学	財団法人岐阜県研究開発財団 岐阜県国際バイオ研究所 主任研究員 大　口　健　司
J-08-22	妊娠期における肌の乾燥メカニズムの究明 エストロゲン過剰分泌状態にも関わらず皮膚が乾燥する原因はなにか	助産学 美容学 皮膚学	京都大学大学院医学研究科 人間健康科学系専攻 助教 山　口　琴　美
J-08-23	化粧が更年期女性に及ぼすストレス軽減効果についての検討	性差医学 内分泌代謝学 加齢医学 美容医学	東京女子医科大学東医療センター 美容・性差医療部 准教授 片　井　みゆき
J-08-24	顔の魅力と人物の印象の相互作用メカニズムに関する認知神経科学的研究	認知神経科学	東北大学加齢医学研究所 准教授 月　浦　　崇
J-08-25	耳鼻咽喉科を受診する心身症患者に対する心理治療の化粧関連行動による評価の試み	心身医学 耳鼻咽喉科 臨床心理学	慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科 非常勤講師 五　島　史　行
J-08-26	身体加工と化粧に関する日本及び英語圏における文化表象の分析	ジェンダー論 比較文化研究 文化理論研究	お茶の水女子大学人間文化研究科 大学院生 英　　美由紀
J-08-27	皮膚科メイクアップケア外来が色素異常症患者および外来化学療法中がん患者のquality of life（QOL）に与える影響	化粧による QOLの変化	京都大学大学院 医学研究科皮膚科学 助教 谷　岡　未　樹
J-08-28	香料によるメタボリックシンドローム改善効果（内臓型肥満とストレスの関係に着目したアプローチ）	内分泌代謝学	福島大学保健管理センター 准教授 渡　辺　英　綱
H-08-01	C .elegansを指標とした長寿命化作用をもつ化合物の検索と作用機構の解析	ペラデニア大学医学部講師 Senarath B. P. Athauda 受入責任者　東京薬科大学大学院生命科学研究科 教授 井　上　英　史	

（敬称略・分野順）

※第1回～18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 21 年 3 月 31 日現在

理事長	小林禮次郎	㈱コーセー取締役相談役
専務理事（常勤）	有本　　亨	
理　事	磯邊　律男	㈱博報堂相談役
	宇佐美昭次	早稲田大学名誉教授
	内山　　充	一般社団法人薬剤師認定制度認証機構理事長
	小林　保清	㈱コーセー代表取締役会長
	新村　嘉也	高砂香料工業㈱取締役相談役
	髙橋　　久	帝京大学名誉教授
	西川　武二	慶應義塾大学名誉教授
	花輪　隆昭	昭和館館長
	廣部　雅昭	静岡県学術教育政策顧問
	内田　康策	日本化粧品工業連合会専務理事
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	㈱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	㈶日本食品化学研究振興財団専務理事
	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	早稲田大学名誉教授
	溝口　昌子	聖マリアンナ医科大学名誉教授
	宮﨑　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

〒104-0032　東京都中央区八丁堀一丁目９番９号
電話 03 (3206) 7721

コスメトロジー研究報告　Vol.17／2009　　**非売品**

2009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
〒104－0032　東京都中央区八丁堀一丁目９番９号
電話　03 (3206) 7721
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：㈱コーセー　商品デザイン部デザイン室

Ⓒ2009　　不許複製　禁無断転載