

ごあいさつ

この度コスメトロジー研究振興財団として、第18冊目の研究報告書を刊行いたしました。当財団は平成22年度にて活動20年の節目を迎えることとなりました。化粧品科学に貢献する研究に対し助成活動を滞りなく行ってこれましたのも、多くの関係者の皆様のご理解ご協力によるものと、改めて感謝申し上げる次第でございます。

この20年間の変遷を顧みますと、時代とともに研究テーマは多岐にわたってきており、分野の枠を超えた基礎研究や、貢献性の明確な応用研究が顕著にみられるようになりました。それだけ、化粧品に関連するコスメトロジーの研究が、多くの分野の専門家から注目されてきていると考えております。また当財団の活動がその一助になっていることを幸いに思っております。

今回の報告書では平成19～20年度に助成を受けられた方の中から23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、素材、物性に関する分野と生体作用、安全性に関する分野では基礎研究の充実を感じるとともに、両分野の融合した多くの研究もみられています。例えば素材の高機能化、炎症反応の解析、角層研究、製剤研究など多くの観点から重要な示唆が得られたと考えております。精神、文化に関する分野では感覚や感性に着目したテーマが多く、化粧の本質を捉えている側面が感じられます。

全ての研究テーマに共通している点は化粧品学への高い貢献度ということですが、当財団は分野の枠や研究機関の属性にとらわれることなく、化粧品学のさらなる発展のために、優れた研究に対して今後も積極的に助成を行っていきたいと考えております。

今後とも、皆様のますますのご協力とご支援をお願い申し上げます。

平成22年7月

財団法人 コスメトロジー研究振興財団
理事長 小林 禮次郎

目次

■ごあいさつ

■研究報告

I. 素材、物性に関する分野

- ・ ビタミン E の高機能化とさらなる有効利用を目的とした新規化粧品素材の酵素・化学複合的分子創製 … 2
大分大学医学部化学講座 下 田 恵
- ・ ミルクタンパク質からなる無機有機ハイブリッドナノスフェアの創製 … 6
慶應義塾大学大学院理工学研究科 基礎理工学専攻生物化学専修 藤 本 啓 二
- ・ 化粧品の防腐剤低含有率化を目指した除菌材料の開発 … 10
九州共立大学工学部 栢 原 順 子
- ・ 化粧品素材としての生体安定性を有する発色ナノ粒子含有液の開発 … 14
東京電機大学工学部電気電子工学科 平 栗 健 二
- ・ オリーブ二次代謝産物の微生物変換によって得られる新規抗酸化物質の性状解析 … 17
岡山大学大学院自然科学研究科（農学系） 神 崎 浩
- ・ 両親媒性物質との分子複合体及びイオン交換体形成を利用する新規機能性ケミカルピーリング剤の開発 … 23
新潟薬科大学薬学部薬剤学研究室 飯村 菜穂子
- ・ 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 … 27
熊本大学医学薬学研究部 藤 原 章 雄
- ・ 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 … 33
近畿大学工学部生物化学工学科 渡 邊 義 之

II. 生体作用、安全性に関する分野

- ・ 均一径リポソームと細胞の融合のためのマイクロ流路デバイスの作成 … 40
東京大学生産技術研究所 竹 内 昌 治
- ・ 角層コルネオデスモゾーム分解過程の免疫電顕的解析 … 45
旭川医科大学医学部皮膚科 山 本 明 美
- ・ 皮膚表皮形成に関わるタンパク質架橋接着反応の分子基盤（高反応性基質配列ペプチドを用いた
皮膚型トランスグルタミナーゼの高感度で特異的な活性検出法の確立） … 49
名古屋大学大学院生命農学研究科応用分子生命科学専攻 人 見 清 隆
- ・ 皮膚の炎症反応・炎症後組織修復における血小板の役割の解明と
血小板機能制御による治療法の開発 … 54
京都府立医科大学大学院医学研究科皮膚科学 加 藤 則 人
- ・ 樹状細胞分子 SHPS-1 による皮膚免疫制御とその皮膚アレルギーへの治療的応用 … 57
群馬大学生体調節研究所バイオシグナル分野 的 崎 尚
- ・ 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 … 62
名古屋市立大学大学院医学研究科 加齢・環境皮膚科学 山 口 裕 史

・角層の若返りが皮膚の若返りに果たす役割	68
久留米大学皮膚科 大日輝記	
・ニッケルの溶出と炎症誘発作用機構の解析	71
東北大学大学院薬学研究科生活習慣病治療薬学分野 平澤典保	
・皮膚ケラチノサイトの水・グリセリンチャネル AQP3 (アクアポリン3) の脂溶性ビタミンによる発現調節 ...	78
明治薬科大学病態生理学教室 石橋賢一	
・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	81
財団法人岐阜県研究開発財団岐阜県国際バイオ研究所 大口健司	

Ⅲ. 精神、文化に関する分野

・アジア人の化粧に見られる身体観・身体表象とその変容についての研究 —身体装飾のアジア的伝統と〈化粧のグローバル化〉の狭間で—	86
東北大学大学院国際文化研究科 山下博司	
・香りが記憶や情動と結びつく際の脳内神経機構に関する研究	90
産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門 梶原利一	
・触動作の特徴抽出による化粧品の使用感評価	95
大阪大学大学院工学研究科 環境・エネルギー工学専攻 秋山庸子	
・化粧時間による耳鼻咽喉科心身症患者の抑うつ不安のレベルの評価	99
慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科 五島史行	
・香料によるメタボリックシンドローム改善効果	104
福島大学保健管理センター 渡辺英綱	

■記念講演

平成 21 年度記念講演 『コスメの国のオタク』	111
甲南女子大学人間科学部 米澤泉	

■コスメトロジー研究雑感	121
--------------------	-----

■付 録

平成 21 年度事業報告	137
役員一覧	140

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

ビタミンEの高機能化とさらなる有効利用を目的とした 新規化粧品素材の酵素・化学複合的分子創製

大分大学医学部化学講座

下 田 恵

Vitamin E functions as a chain-breaking antioxidant that prevents the propagation of free radical reactions. Recently, vitamin E has attracted much attention clinically because of its potential to be a very useful drug, and has been widely studied for its anticancer, anti-atherosclerosis, and anticarcinogenesis effects. On the other hand, vitamin E is unstable against light and heat. Chemical modifications such as esterification of unstable organic compounds are characteristic reactions, which improve their stability, bioavailability, and pharmacological properties, e.g., the esters of aromatic compounds have been used in folk medicines. To overcome the shortcomings of vitamin E, several efforts have been made to synthesize vitamin E derivatives by chemical methods. However, little attention has been paid to the biocatalytic modification of vitamin E by cultured plant cells. We attempted the functionalization of vitamin E by its modification through both biocatalytic and chemical procedures.

1. 緒 言

近年、資源の大量消費による有用機能性物質の枯渇に伴い、天然由来の生薬化合物や生理活性化合物の価値が見直されてきた。これらの機能性化合物の中で、ビタミン関連化合物は、抗菌作用、抗酸化作用やラジカル消去能などを有し、さらには免疫力の向上効果、抗ウイルス作用や制癌作用などの様々な有用生理機能を示すことから、最近では、化粧品および医薬品などとしても注目されている。ビタミン関連化合物でも特に、ビタミンEは、血管系疾患の予防効果、制癌効果、血行促進作用などの生理機能を示し、医薬品はもとより、化粧品として利用されている¹⁻³⁾。

一方、天然植物生薬成分は、ある種の植物細胞中において、その構造の一部が様々なアルキルもしくは脂肪酸によりエステル化された「アシル化合物」として、光や熱に対して安定に存在し、抗酸化性を始めとした有用な生理機能を発揮していると考えられている^{4,5)}。

また近年、生体触媒が行う反応を合成プロセスの一過程に組み込んだ有用物質生産の試みが盛んに行われ、その成果は医薬品や香料、嗜好品、などのファインケミカルズの生産へ利用されるに及んでいる⁶⁾。有機合成に生体触媒を利用するメリットのひとつとして、その選択性の高さがあげられる。生体触媒による反応では、必要とする位置に必要な立体を持ち、化学的に合成した場合には煩雑な行程を要する化合物についても、一段階の酵素的反応で得られる。このことから、生体触媒の有機合成化学への利用に期

待がかけられている。今日までに利用された主な生体触媒は、微生物、菌体、酵母、動物細胞、植物細胞、およびそれらの酵素系である。

本研究では、ビタミンEの化粧品としてのさらなる有効活用を目的として、リパーゼおよび植物培養細胞を生体触媒とする酵素的合成法と化学的合成法を活用した、ビタミンEの「アシル化」を中心とした化学修飾を行った。即ち、本研究において、ビタミンEを高機能化するため、酵素的合成法と化学的合成法を利用し、新規かつ安定な化粧品素材の複合的分子創製法を開発した。

2. 実 験

2.1. 酵素的手法によるビタミンEのプロピオニル化

リパーゼは本来エステル加水分解反応を触媒する酵素であるが、有機溶媒中で反応させると、逆加水分解反応すなわちエステル化を触媒する。このことを利用して、有機溶媒中におけるビタミンEの酵素触媒を活用した化学修飾を目的として、リパーゼによるエステル化を行った。酵素反応には、有機溶媒として1,2-ジクロロプロパンとヘキサンの混合溶液を使用した。基質ビタミンEを50mlの有機溶媒が入った酵素反応用フラスコへ入れ、全体が均一の溶液となるまで加温した。溶液を室温まで冷却後、プロピオン酸とリパーゼをフラスコへ加え、40℃、120回転/分の条件で振盪インキュベーションを行った。

24時間反応させた後、有機溶媒を減圧下において留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製を行い、反応生成物を得た。

2.2. 酵素的手法によるビタミンEのゲンチオビオシル化、ルチノシル化

タバコおよびユーカリ植物培養細胞を用いる酵素的手法により、ビタミンEのゲンチオビオシル化、ルチノシル化を行った。植物培養細胞は主に筆者らの研究室において誘



Functionalization of vitamin E to generate new cosmetics by biocatalytic and chemical methodology

Kei Shimoda

Department of Chemistry, Faculty of Medicine, Oita University

導し、継代培養したものを変換実験に用いた。植物培養細胞は培養用フラスコ内の新鮮な寒天培地に植え継いで、3週間ごとに継代培養を行った。変換実験に用いるため、培養細胞の一部を、寒天を含まない液体培地に移植し、振盪培養器内において25℃、120回転/分の条件で培養すると、2週間ほどで均一なサスペンション状態の培養細胞が得られた。この培養細胞（約50グラム）を新鮮な液体培地（100ml）に移植して、同じ培養条件で1週間前培養を行った。培養細胞への基質の投与はクリーンベンチ内において無菌状態でを行った。基質を前培養した細胞に投与し、一定期間、同じ振盪条件で反応を行った。細胞部分はメタノール浸漬し、メタノール抽出物を有機溶媒と水で分配し、培地部分は有機溶媒で抽出した。変換生成物をシリカゲルカラム、イオン交換カラム、TLC、HPLCを用いる各種クロマトグラフィーにより単離・精製した後に、スペクトル測定により構造解析を行った。変換反応の経時的追跡は、上記と同様にインキュベートさせた複数のフラスコについて、一定時間ごとにフラスコ一本から反応物を抽出することにより行った。生成物の相対量は、抽出物の高速液体クロマトグラフィー（HPLC）分析により求めた。

2. 3. 化学的手法によるビタミンEのステアリン化

ビタミンEのエステル化による高機能化を目的として、揮発性の機能性成分を創製するため、ビタミンEのステアリン化を行った。ビタミンEをピリジンに溶解した後、70℃に加熱した。これに、ピリジンに溶解したステアリン無水物を加え、3時間加熱した。さらに、3時間の還流を行った。TLCによるチェック後、蒸留水による希釈を行った。30分の静置の後、ヘキサン抽出を行った。ヘキサン抽出物を減圧下で濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製を行い、反応生成物を得た。

2. 4. 化学的手法によるビタミンEのメリビオシル化

ビタミンEのメリビオシル化による、ビタミンEの化学修飾を行った。ビタミンEをアセトニトリルに溶解した後、2, 2', 3, 3', 4, 4', 6-ヘプタアセチルアルファメリビオシルフルオライド、1, 1, 3, 3-テトラメチルゲアニジン、および3フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体の混合物へ加えた。2時間、室温において攪拌後、有機物を酢酸エチルにより抽出を行った。シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製後、ビタミンE 2, 2', 3, 3', 4, 4', 6-ヘプタアセチルメリビオシドを得た。これらを加水分解することにより、ビタミンEメリビオシドを反応生成物として得た。

3. 結 果

3. 1. 酵素的手法によるビタミンEのプロピオニル化

プロピオン酸を有機酸として用いたりパーゼによるエス

テル交換反応について、有機溶媒として1, 2-ジクロロプロパンとヘキサンを使用して、ビタミンE（図1、化合物1）とプロピオン酸、リパーゼを振盪インキュベーションすることにより、ビタミンEのプロピオニルエステル体（図1、化合物2）を得た。

以上、「化粧品素材」としてのビタミンEの安定化と高機能化を目的に、リパーゼのエステル交換反応を応用して、ビタミンEの有機アルキル酸による酵素的エステル（アシル）化を可能にした。

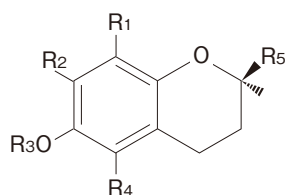
3. 2. 酵素的手法によるビタミンEのゲンチオビオシル化、ルチノシル化

生体触媒としてタバコ植物培養細胞を使用して、ビタミンEと振盪インキュベーションすることにより、ビタミンEの変換生成物を得た。HPLC分析の結果、変換生成物は、細胞部分のメタノール浸漬画分に含まれることが明らかとなった。メタノール抽出物をシリカゲルカラム、イオン交換カラム、TLC、HPLCを用いる各種クロマトグラフィーによる精製を行った。反応生成物を単離し、スペクトル測定により構造解析を行ったところ、ビタミンEのゲンチオビオシド体（図1、化合物3）が得られた。

また、ユーカリ植物培養細胞を生体触媒として用いる酵素的手法により、ビタミンEの変換を行った。上記と同様に、タバコ植物培養細胞による変換の場合にも、細胞のメタノール浸漬画分に反応生成物が含まれることが明らかとなった。メタノール抽出物をシリカゲルカラム、イオン交換カラム、TLC、HPLCを用いる各種クロマトグラフィーを利用した精製を行い、反応生成物を単離し、スペクトル測定により構造解析を行ったところ、ビタミンEはユーカリ植物培養細胞により、ルチノシド体（図1、化合物4）に変換されることが明らかとなった。

次に、タバコ培養細胞およびユーカリ培養細胞の各種植物培養細胞のビタミンEに対する変換様式を調べるため、ビタミンE変換の経時変化を調べた。その結果、図2に示したように、タバコ植物培養細胞は、ビタミンEと振盪インキュベーションを開始した後、ビタミンEのゲンチオビオシド体に変換する能力があることが分かった。これに対して、ユーカリ植物培養細胞とビタミンEを振盪インキュベーションした場合には、図3に示したように、ビタミンEのゲンチオビオシド体に加えて、ビタミンEのルチノシド体に変換されることが分かった。

以上の結果から、タバコ培養細胞とユーカリ培養細胞は、外来基質として加えられたビタミンEを、それぞれ対応するゲンチオビオシド体、ルチノシド体に変換する能力があることが明らかとなった。また、ビタミンEをルチノシド体へ変換する機能は、ユーカリ培養細胞にみられる特徴的な変換であることが明らかとなった。



- 1: $R_1, R_2, R_4 = \text{CH}_3, R_3 = \text{H}, R_5 = [(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_3)]_3\text{CH}_3$
- 2: $R_1, R_2, R_4 = \text{CH}_3, R_3 = \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CO}, R_5 = [(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_3)]_3\text{CH}_3$
- 3: $R_1, R_2, R_4 = \text{CH}_3, R_3 = \beta\text{-Glc-(1-6)-}\beta\text{-Glc}, R_5 = [(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_3)]_3\text{CH}_3$
- 4: $R_1, R_2, R_4 = \text{CH}_3, R_3 = \alpha\text{-Rham-(1-6)-}\beta\text{-Glc}, R_5 = [(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_3)]_3\text{CH}_3$
- 5: $R_1, R_2, R_4 = \text{CH}_3, R_3 = \text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}, R_5 = [(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_3)]_3\text{CH}_3$
- 6: $R_1, R_2, R_4 = \text{CH}_3, R_3 = \alpha\text{-Gal-(1-6)-}\beta\text{-Glc}, R_5 = [(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_3)]_3\text{CH}_3$

図1 化学的および酵素的手法により合成されたビタミンE誘導体

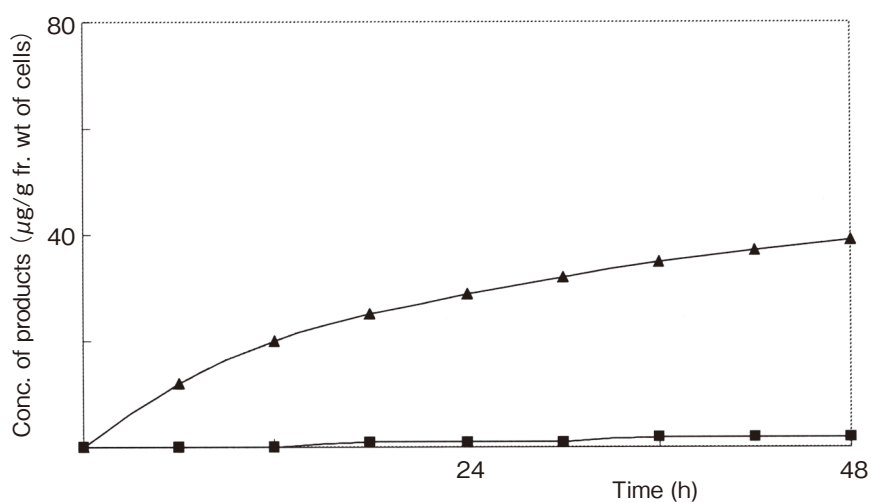


図2 タバコ植物培養細胞によるビタミンEゲンチオビオシドの合成
▲：ビタミンE グルコシド、■：ビタミンE ゲンチオビオシド

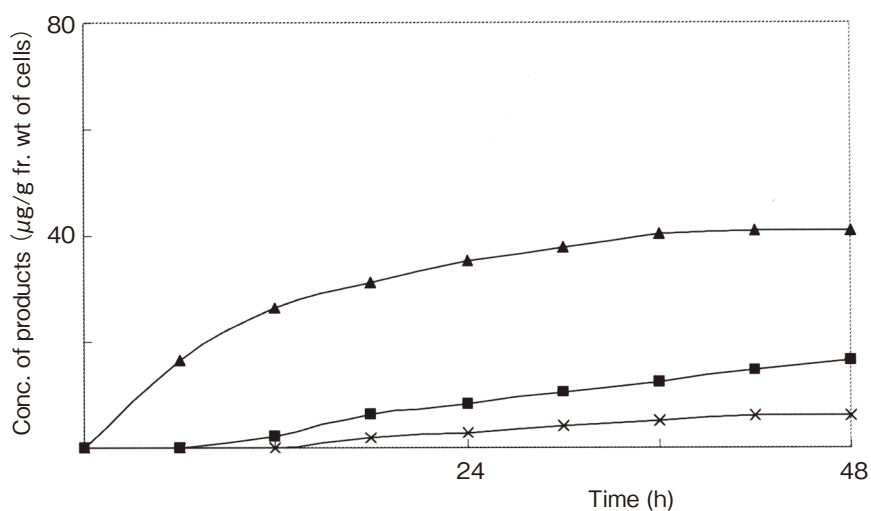


図3 ユーカリ植物培養細胞によるビタミンE ルチノシドの合成
▲：ビタミンE グルコシド、■：ビタミンE ゲンチオビオシド、X：ビタミンE ルチノシド

3.3. 化学的手法によるビタミンEのステアリン化

ビタミンEを、ステアリン無水物をエステルドナーとして使用してピリジン中で還流することにより、ビタミンEのステアリン化に成功し、ヘキサン抽出、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより、ステアシルビタミンE（図1、化合物5）を反応生成物として得た。

以上、ビタミンEのエステル化による高機能化を目的として、化学的合成手法により、ビタミンEのステアリン化を可能にした。

3.4. 化学的手法によるビタミンEのメリビオシル化

化学的合成手法により、1,1,3,3-テトラメチルグアニジン存在下、アセトニトリル中で、ビタミンEの2,2',3,3',4,4',6-ヘプタアセチルメリビオシル化することに成功した。ビタミンE 2,2',3,3',4,4',6-ヘプタアセチルメリビオシドの加水分解は定量的に進行し、対応するビタミンEメリビオシド（図1、化合物6）を得た。

以上、ビタミンEの化学的合成手法によるメリビオシル化を可能にした。

4. 考 察

ビタミンEを高機能化することを目的として、新規な化粧品素材としてビタミンE誘導体の合成を行った。各種の化学的修飾は、それぞれの反応に適した合成手法により行った。すなわち、リパーゼによる酵素的手法によるビタミンEのプロピオニルエステル化（アシル化）、植物培養細胞を生体触媒として用いる酵素的手法によるビタミンEのゲンチオビオシル化、ルチノシル化、化学的合成法を活用したビタミンEのステアリン化（アシル化）、およびメリビオシル化に成功した。

5. 総 括

以上、ビタミンEを高機能化するための植物培養細胞などの生体触媒を利用した合成法と化学的合成法による、ビタミンEの「アシル化」を中心とした化学修飾を行い、新規かつ安定な化粧品素材の複合的分子創製法を構築した。

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。

(引用文献)

- 1) Rimm ER, Stampfer MJ, Ascherio A, et al., :Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men, N. Engl. J. Med., 328, 1450-1456, 1993.
- 2) Stampfer M, Hennekens C, Manson J, et al., :Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women, N. Engl. J. Med., 328, 1444-1449, 1993.
- 3) Brigelius-Flohe R, Traber MG, :Vitamin E: function and metabolism, FASEB J., 13, 1145-1155, 1999.
- 4) Subbaiah PV, Horvath P, Achar SB, :Regulation of the activity and fatty acid specificity of lecithin-cholesterol acyltransferase by sphingomyelin and its metabolites, ceramide and ceramide phosphate, Biochemistry, 45, 5029-38, 2006.
- 5) Tosi MR, Tugnoli V, :Cholesteryl esters in malignancy, Clin. Chim. Acta, 359, 27-45, 2005.
- 6) Ishihara K, Hamada H, :Biotransformation using plant cultured cells, J. Mol. Catal. B: Enz., 23, 145-170, 2003.

ミルクタンパク質からなる無機有機ハイブリッドナノスフェアの創製

慶應義塾大学大学院理工学研究科 基礎理工学専攻生物化学専修

藤 本 啓 二

Nanoparticles composed of biopolymers have received much attention as a useful material applicable to a variety of industrial fields. We focused on casein proteins, which are associated and assembled into an organic and inorganic supra-structure. We could prepare nanoparticles of beta-casein coupled with polyethylene glycol (PEG) by changing pH, temperature, and Ca^{2+} concentration. Since the obtained nanoparticles were soluble at body temperature, we tried to produce calcium phosphate as a cross-linker in a nanoparticle. The obtained particles had a diameter of approximately 100 nm at pH 7.4 and kept stable over a wide range of temperature. Phosphorous could be detected inside the nanoparticle with XPS and EDX measurements. It was also found that nanoparticles were disrupted by lowering pH from pH 7.4 to 4.0.

1. 緒 言

バイオポリマーは生体適合性に優れたものが多く、そのいくつかは温度、pHなど生体内環境によって構造を変化させることができる。牛乳中にはバイオポリマーであるタンパク質が約3.2%含まれており、近年これらを食品以外の分野における素材として利用することが注目されている。多種類の牛乳タンパク質の中で主要なものにカゼインがある。牛乳タンパクであるカゼインは牛乳中で100nmスケールのミセルを形成しており、このミセルには主に α カゼイン、 β カゼインが含まれている。本研究では、ミセルを形成するカゼインのうち、 β カゼインに着目した。 β カゼインは生体適合性、生分解性に加え、アミノ基を数多く持つため、化学修飾が容易に行えるという利点がある。さらに β カゼインはpHや温度、 Ca^{2+} 濃度によって特徴的な会合挙動を示すバイオポリマーである。化学修飾により会合挙動を制御することで、生体適合性に優れたDDSキャリアとなるナノ粒子を作製することができる。本研究では、抗がん剤のターゲティングを目指し、正常血管では漏出しにくい化合物が腫瘍血管では漏出しやすく腫瘍部位に滞留しやすいといったEPR効果の利用を狙い、100nmスケールの粒子の作製を目指した。

図1にデザインコンセプトを示す。はじめに β カゼインを尿素を用いてランダムコイル状態に変化させて、アミノ基を介してPEG鎖を化学修飾する。次に、カルシウムイオン存在下でureaを透析によって除去することにより、100nmスケールの粒子を形成させた。その後、リン酸イ

オンを添加して、カゼイン内に含まれるカルシウムイオンと反応させることで粒子内にリン酸カルシウムを析出させた。得られたナノ粒子はリン酸カルシウムが架橋点として働き、PEG鎖が分散安定性を付与することになる(ナノスフェア)。最後に、作製した粒子にDDSキャリアに向けたモデル薬物の封入と放出の最適化を行った。

2. 実 験

まず、修飾を施していない β カゼインの基礎的性質である会合挙動を詳しく研究した。すなわち、 β カゼイン水溶液の透過率および散乱強度測定により、pH、温度応答性および Ca^{2+} 濃度による β カゼインの会合力の変化を観察した。

これらを踏まえて、分散安定性の付与とナノ粒子化の制御を目的として、ureaにより鎖状にした β カゼインの NH_2 基にpolyethylene glycol (PEG)を化学修飾させることによって試みた。PEG修飾後にureaを取り除き、温度とpHを変化させることによりPEG- β カゼイン粒子を作製した。

続いて、生体内のpH条件においても粒子形状を維持させるため、 Ca^{2+} を添加することでPEG- Ca^{2+} β カゼイン粒子を作製した。

さらに Na_2HPO_4 および KH_2PO_4 を加えることでリン酸カルシウムと β カゼインの複合化を試み、有機無機ハイブリッドナノ粒子 (Calcium phosphate-PEG- β casein nanoparticle, ナノスフェア)を作製した。複合化の際にキレート剤を用いることにより、PEG- Ca^{2+} β カゼイン水溶液に存在する Ca^{2+} を除去し、 Na_2HPO_4 および KH_2PO_4 との沈殿物を生じさせないようにした。

また、作製したナノスフェアに対し、組成分析、形態観察、二次構造の分析、表面電荷測定、および内部環境評価によるキャラクタリゼーションを行った。なお、この際リン酸カルシウムと複合化させない粒子 (PEC粒子)を作製し、ナノスフェアの挙動を比較した。その後、リン酸カルシウムの低pHにて溶解するといった性質を考慮しpH応答性を検討した。



Preparation of inorganic-organic hybrid nanoparticles by chemical modification of milk protein, casein

Keiji Fujimoto

Graduate School of Science and technology,
Keio University

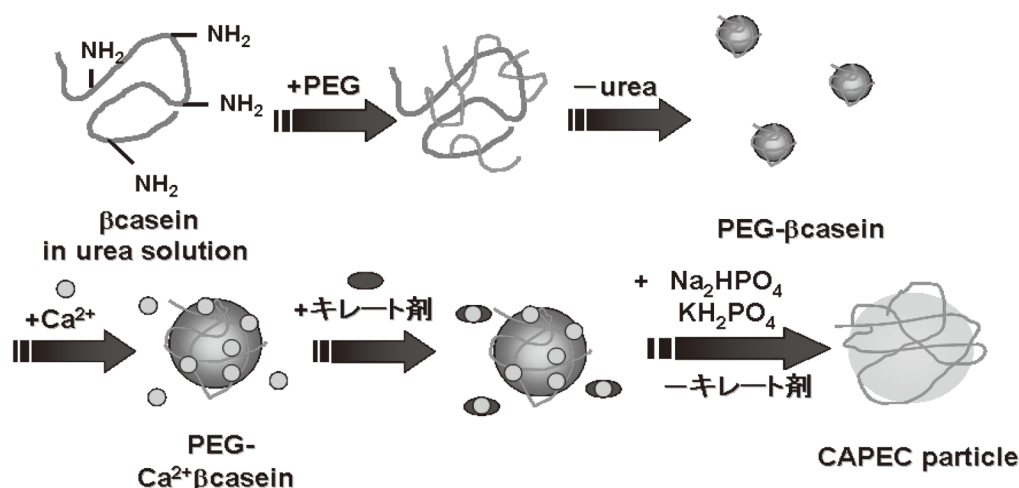
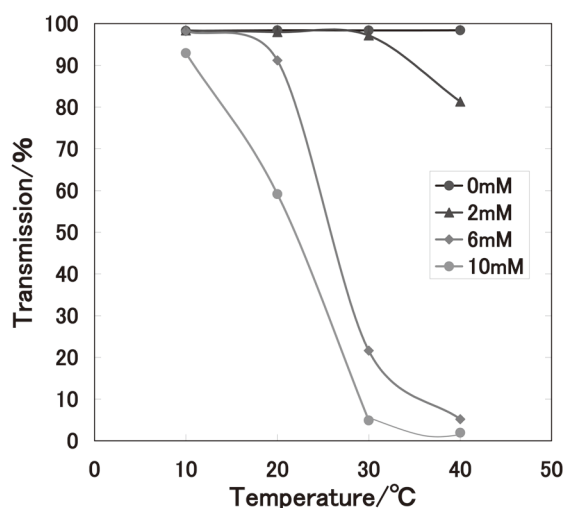


図1 カゼインから作る無機有機ハイブリッドナノスフェア


 図2 カルシウムイオンによる β カゼインの会合挙動の変化

生体内環境を考慮した外部環境の変化に対するナノスフェアの変化を観察として、この場合にはpHの変化によるナノスフェアの崩壊性について粒子サイズの変化を測定することにより検討を行った。さらに、モデル薬物として正電荷を帯びた6-methoxy-N-ethylquindinium iodide (MEQ)を用いて、透析法によりナノスフェアへの取り込み挙動をMEQの蛍光強度変化から検討した。次に、MEQの放出実験を行うために、凍結乾燥させたナノスフェアに対し、MEQ溶液を4℃にて3日間浸透させた。未封入のMEQを限外ろ過にて除去した後に、CAPAC粒子から放出されたMEQ濃度の経時変化を蛍光光度計で測定した。

3. 結果および考察

β カゼインはpHを等電点 ($\text{pI}=4.6$) へ近づけることで凝集体となって沈殿した。また、温度を上昇させることにより、 β カゼインの散乱強度が上がり、 β カゼインの会合が進んでいくことが示唆された。 β カゼインは温度の上昇に

よって二次構造が崩れ、変性したまま疎水性結合して、より巨大な凝集体を形成すると考えられる。これより、 β カゼインをナノ粒子として使用するためには、まず水中での安定性を上げるような改質を施す必要がある。

β カゼインは、4℃では400mMの Ca^{2+} が存在しても沈殿しないが、37℃では8~15mMの Ca^{2+} で沈殿する。このように Ca^{2+} を加えると凝集しやすくなることが知られている。よって本研究では、加えた Ca^{2+} の量と温度による β カゼインの会合挙動の関係を求めた。pH7.4の条件下で1000ppmの β カゼイン溶液に Ca^{2+} を添加して検討を行った。図2に示すように β カゼインのみの溶液では温度による透過率の変化は見られないが、 Ca^{2+} の存在下では温度を上げるにつれ透過率が下降した。2.0mMでは40℃、6.0mMでは30℃、10.0mMでは20℃と、 Ca^{2+} 濃度を上げていくと、より低い温度で透過率の急激な下降が見られるようになった。この結果より Ca^{2+} 濃度を上げていくことで、 β カゼインを低温で会合させることができると考えら

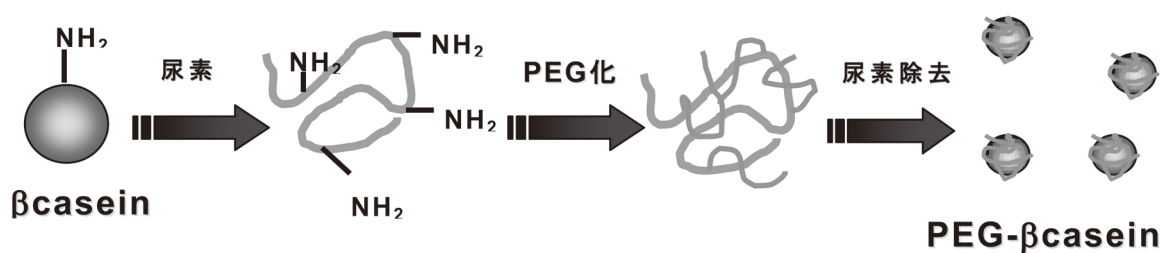


図3 粒子サイズ制御のためのカゼインのPEG修飾

れる。しかし得られたβカゼインの形態は凝集した不定形であり、サイズと形状を制御することはできなかった。

タンパク質はジスルフィド結合の還元切断と尿素の添加による水素結合の阻害によりアンフォールディングされ、三次元の立体から二次元の鎖状になる。そして一旦アンフォールディングしても還元剤と尿素を取り除くと自発的に天然構造が回復する。βカゼインにはシステイン残基が含まれていないため、ジスルフィド結合は存在しない。そのため、尿素のみによって、フォールディングの制御が可能であると考えられる。5000 ppmのβカゼインに尿素を加え、βカゼインの水素結合を切断した。尿素を加えることで沈殿が生じていたβカゼインが徐々に透明になっていき、尿素濃度2.0Mでは透過率がほぼ100%となった。尿素を添加して粒径が顕著に減少したβカゼインから尿素を抜くと、再びβカゼインの粒径である25nm付近の大きさに戻った。

そこで、βカゼインに安定性を付与するため両親媒性であるPEG修飾(図3)を行ったところ、環境応答性がPEGの導入率によって変化することを見出した。PEG導入率の高いβカゼインはpHおよび温度応答性を失い、会合が起こらなくなった。一方、低いPEG導入率では応答性は維持されており、会合が起こりやすい高温、低pH条件において直径100 nmスケールの粒子が生成することを見出した。βカゼインのみから作製した粒子はすぐに凝集してしまったが、このPEG-βカゼイン粒子は分散状態を維持していた。しかし、pHを生体内条件にすると、この粒子は溶解してしまった。

そこで、この条件(pH7.4)において Ca^{2+} を添加したところ、粒子の形成が観察された。PEG-βカゼインは高pHでは負電荷を帯びているため溶解状態であるが、 Ca^{2+} を添加することによって会合が促進されて粒子が形成されたと考えられる。このPEG- Ca^{2+} βカゼイン粒子はシャープな温度応答性を示し、高温においては会合するが、室温に戻すことにより即座に粒子の形状を維持できなくなった。

次に、室温でも粒子形状を維持する粒子の作製を目指し、リン酸カルシウムとβカゼインの複合化を行った。TEMによる乾燥状態の観察を行った結果、pH7.4において直径

100nmほどのナノスフェアが分散して存在していることがわかった(図4)。図5にEDXにより領域の構成元素を定性分析した結果を示す。粒子が存在しない部位では検出されなかったリンとカルシウムのピークがCAPEC粒子には検出された。これにより、ナノスフェア内にはリン酸カルシウムの結晶が含まれていることが示唆された。

以上のように、ナノスフェアの温度変化や乾燥した状態における安定性が示された。しかし、この粒子をDDSキャリアとして応用するためにはキャリアが形状を維持したまま薬剤を目的部位まで運ぶことに加え、目的部位で保持していた薬剤を放出することが求められる。ナノスフェアの室温におけるpH応答性を調べたところ、この粒子は生体内pHでは粒子の形状を維持しているが、低pHにすると即座に粒子が崩壊することがわかった。この現象を利用することによって、pH変化による粒子の溶解によって薬剤を放出させることができると考えられる。バイオポリマーのような大きな物質は、エンドサイトーシス経路により細胞内に取り込まれることが予想される。エンドソーム内は低pHに保たれていることから、低pHで崩壊するというナノスフェアの性質は、DDSキャリアに内包された薬剤を細胞内で放出できるという点から有利である。

そこで、モデル薬物として蛍光物質を用いて透析法によりナノスフェア内に封入することを試みたところ、正電荷を持つMEQという蛍光分子の場合に封入が観察された。おそらく、負電荷に帯電したナノスフェアとの静電相互作用により吸着および吸収されたものと考えられる。次にMEQのpH7.4およびpH4.0での放出実験を行った。外部溶液に放出されたMEQ濃度の経時変化を図6に示す。pH7.4では、徐々にMEQが放出されているのに対し、pH4.0では放出が一気に進んでいることがわかった。これは、pHを4.0まで低下させることによりナノスフェアが崩壊し、内部にMEQを保持することができなくなったためだと考えられる。実際にpH4.0において粒子が完全に崩壊するには約2日間かかったことから、50hrほどで放出が平衡に達したのは妥当な結果であると考えられる。

以上の結果から、無機有機ハイブリッドナノスフェアを用いてpHの低下による薬物放出のスイッチングを行うこ

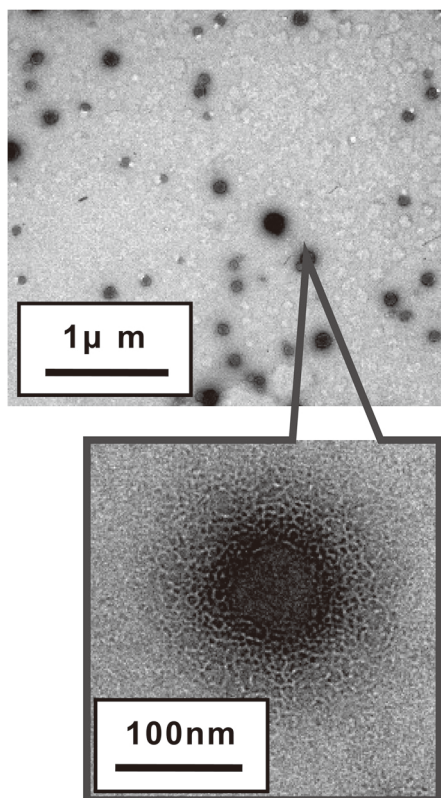


図4 ハイブリッドナノフェアの透過型電子顕微鏡

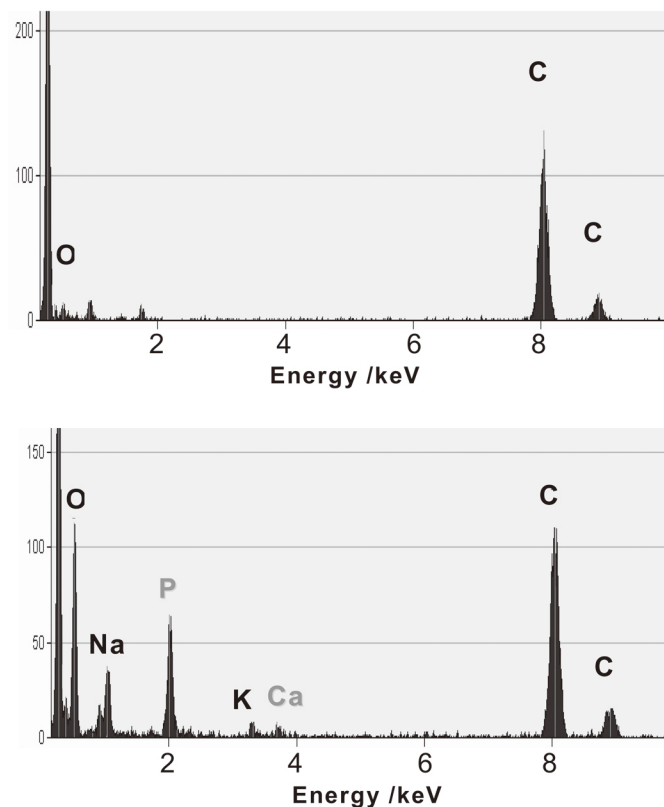


図5 EDXによるナノスフェアの元素分析

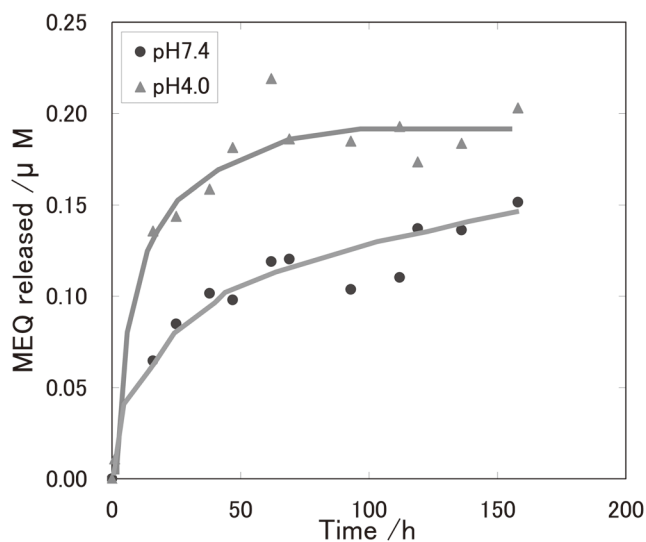


図6 pHによるナノスフェアからの薬物放出の変化

とができた。今後、粒子外部への薬物の吸着を抑制し、内部への封入効率を向上させる工夫が必要だと考えている。

4. 総括

バイオポリマーであるβカゼインを化学的に改質した後、無機物と複合化することによって、生体適合性に優れ、100nmスケールの無機有機ナノスフェアを作製すること

ができた。このナノスフェアはpH変化によって崩壊する性質を持ち、pH応答性DDSキャリアとして有望な素材であることがわかった。

謝辞

本研究は修士学生堀真帆君の貢献によるものが大きかった。ここに謝意を示す。

化粧品の防腐剤低含有率化を目指した除菌材料の開発

九州共立大学工学部¹、福岡工業大学工学部²

栢原 順子^{1,2}、甲斐原 梢¹

Parabens are alkyl ester derivatives of parahydroxybenzoic acid and are widely used as preservatives in cosmetics, foods, toiletries products. These parabens are essential for keeping quality high in the perishable products. However, parabens are known to present a very weak contact allergy to user's skin. We attempted to construct a series of sterilization agents for lowering preservative in cosmetics. These agents have dendritic lysine peptides structure as a spacer on a polystyrene bead. Peptide immobilized beads are also effective in reducing the pollution of wastewater. The surface ionic property of the beads is polycationic due to numerous α - or ϵ -ammonium groups. These polycationic beads were interacted with anionic liposomes, the liposome leakage activities were increased with surface charge density and generation number of oligo lysine dendron groups. We tested antimicrobial activity of novel surfactants containing dendritic oligo lysine groups for confirmation effectiveness of numerous ammonium groups. It was revealed that a series of surfactants were active against Gram-positive bacterium (e. g., *Staphylococcus aureus*) than Gram-negative bacterium (e.g., *Escherichia coli*). These results suggest that the peptidoglycan layer of Gram-positive bacterium cells is interacts specifically with ammonium groups.

1. 緒言

我が国における抗菌・防黴技術は20世紀半ば頃より急激な発展を遂げ、現在では天然物系、人工系のものを含めると抗菌剤の種類は百数十種類以上にのぼる。また、食品や化粧品、生活用品等の抗菌・防黴技術は私たちの衣食住を中心とした生活衛生環境の向上に大きく貢献している。

化粧品を含む一般工業製品の除菌法としては、洗浄法、濾過法、吸着法など多様な手法が知られ、数種の除菌法を組み合わせた製品が多い。また、消費者が手にする化粧品のほとんどにパラベン類の防腐剤が添加されているのが現状である。現在、国内では、防腐剤としてパラオキシ安息香酸エチルなど数種が認可されている。パラベンは、食品の防腐剤としても添加が認可されているが、人体への影響が懸念されるため使用制限値が設定されている。一方、医療用として用いられる第四級アンモニウム系の化合物は、特にグラム陽性菌に対して優れた除菌効果を示すことが知られている。しかし、除菌能力は高いが、塩化ベンザルコニウムなどのように界面活性剤系除菌剤は水で洗い流すことが前提で、化粧品のように長時間、直接肌に触れるような場合は皮膚への刺激性が認められる場合もある。抗菌活性を示す界面活性剤としてアンモニウム塩が有名であるが、これらは特に負の電荷を帯びたタイコ酸を有するグラム陽性菌に対して効果が高い。このことは、細菌の最表層と

アンモニウム基との静電相互作用による抗菌効果であり¹⁾、第一級や第四級のアンモニウム塩でも同様の効果が期待される。

本研究の目的は、防腐剤の代替物質として、安全性に優れ、かつ環境へ配慮した除菌材料を創製することである。生体親和性の高いアミノ酸、特に側鎖にアンモニウム基を有するリシンからなる除菌材料を開発した。図1で示すように分子構造の異なる3種類①球状デンドリマー型、②半球デンドリマーを親水部にもつ界面活性剤型、③半球デンドリマー固定型ビーズのそれぞれ異なるタイプの抗菌剤を合成し、その抗菌作用効果についてパラベンとの比較検討を行ったので報告する。

2. 実験

2.1 球状型リシンデンドリマーの合成

保護D-アミノ酸^tBoc-Lys (^tBoc)-OHおよび1,6-diaminohexaneを使用し、HOBt/HBTUによる活性エステル法でカップリングを行った。得られた粗生成物についてはシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製を行い、保護体を得た。さらにHClによる^tBoc基の除去を行い、第一世代を得た。また、第一世代に^tBoc-Lys (^tBoc)-OHを4等量加えてカップリングを行い、精製、脱保護を行い第二世代のデンドリマーを得た。

2.2 半球デンドリマーを親水部にもつ界面活性剤の合成

デンドリティックD-リシン導入型界面活性剤については、親水部位が第一世代型を1G DK-C12、第二世代型を2G DK-C12と略記する。原料は^tBoc-Lys (^tBoc)-OHおよび n -ドデシルアミンを使用し、球状デンドリマー同様に合成と精製を繰り返し、第一世代型、第二世代型、第三世代型を得た。



* Study on sterilization agents for lowering preservative in cosmetics

Junko Kuwahara*, Kozue Kaibara

Faculty of Engineering, Kyushu Kyoritsu University, Fukuoka Institute of Technology

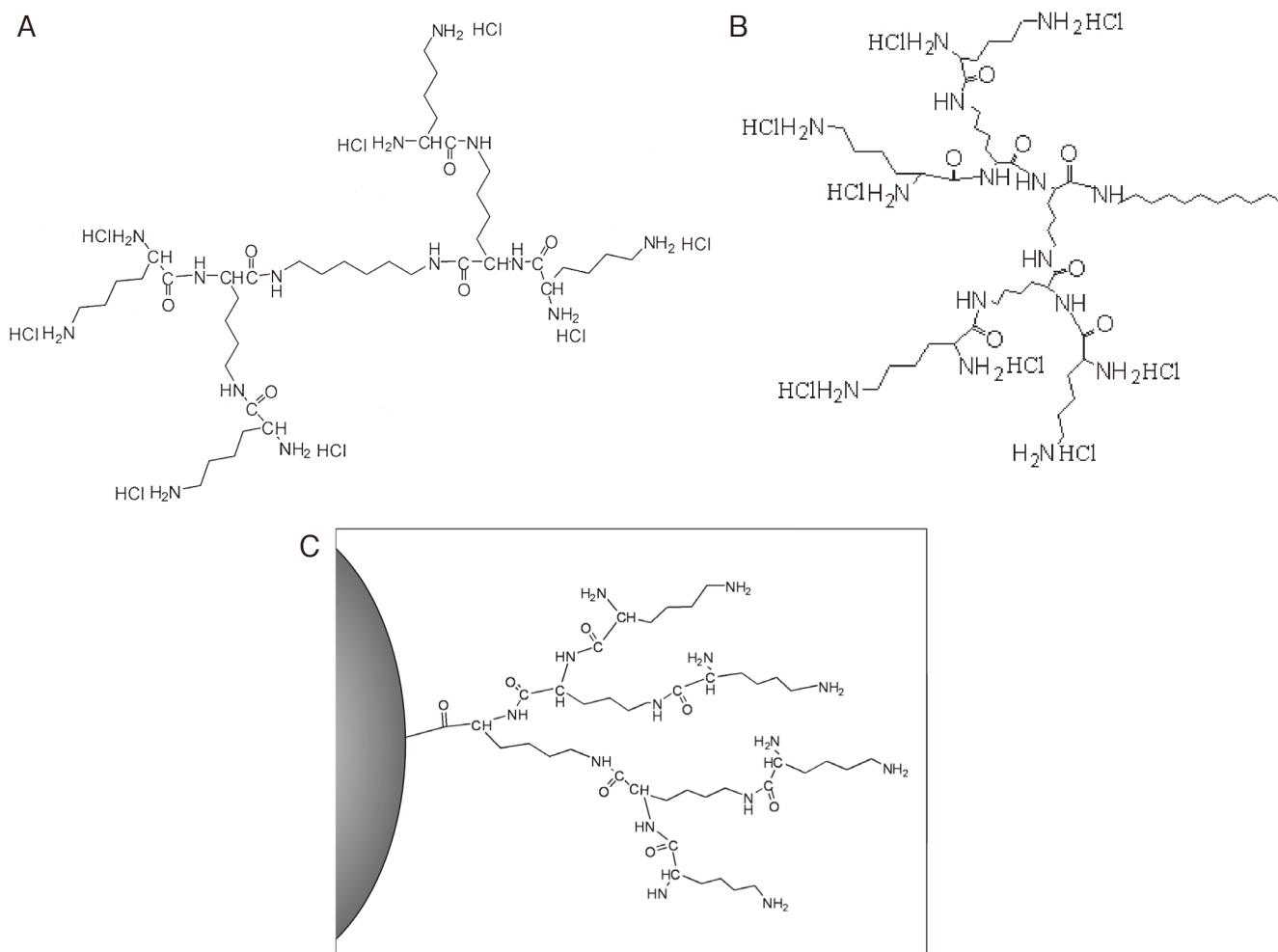


図1 分子構造の異なる3種の除菌材料

(A) 第二世代リシンデンドリマーの分子構造

(B) 親水部に第三世代型半球デンドリマーをもつ界面活性剤 3G DK-C12 の例

(C) 半球リシンデンドリマーを固定化したポリスチレン樹脂の模式図

2.3 半球デンドリマー固定型ビーズの合成

粒径75～150 μm のポリスチレン樹脂表面に第四級アンモニウム基を導入するため、樹枝状ペプチド「デンドリティックオリゴD-リシン」を結合した。リシンデンドリマー部位の世代数は1～3までとし、N-末端を第一級アンモニウム型 ($n\text{G-A}$, $n=1, 2, 3$)、あるいは第四級アンモニウム型 ($n\text{G-TMA}$, $n=1, 2, 3$) とした。第四級アンモニウム型は、リシンデンドリマーの末端部位に (3-Carboxypropyl)-trimethylammonium chloride を導入した。

2.4 人工リボソーム崩壊能評価

半球デンドリマー固定型ビーズについては、抗菌活性試験の予備実験として酸性リボソーム崩壊能評価を行った。実験に用いた人工リボソームには蛍光色素5(6)-カルボキシフルオレセイン (CF) 水溶液を内包させる薄膜法^{2,3)}で調製した。リボソーム崩壊能測定は、恒温セルホルダ付き蛍光分光光度計 (株式会社日立製作所, F-2500) を使用した。

2.5 抗菌活性試験

抗菌活性試験は液体培地希釈法で行い、試験菌株としてグラム陰性菌である大腸菌 (*E. coli*, NBRC14237)、グラム陽性菌である黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*, NBRC12732) を用いた。また、半球デンドリマー固定型ビーズの抗菌活性試験は濁度変化により評価した。

3. 結果

3.1 半球デンドリマー固定型ビーズのリボソーム崩壊能

図2は、ポリカチオンビーズ重量当たりの官能基モル数に対するリボソーム崩壊能をそれぞれ示したものである。第一級および第四級アンモニウム型はそれぞれ (A) および (B) である。第一級型 ($n\text{G-A}$) は、ビーズ重量当たりのアンモニウム基増加、即ちビーズ表面の表面電荷密度増大に伴いCF-leakage活性が指数関数的に増加した。また、その効果はスパーサー部位であるデンドリティックオリゴリシン鎖の世代数に大きく影響を受けた。一方、第四級型

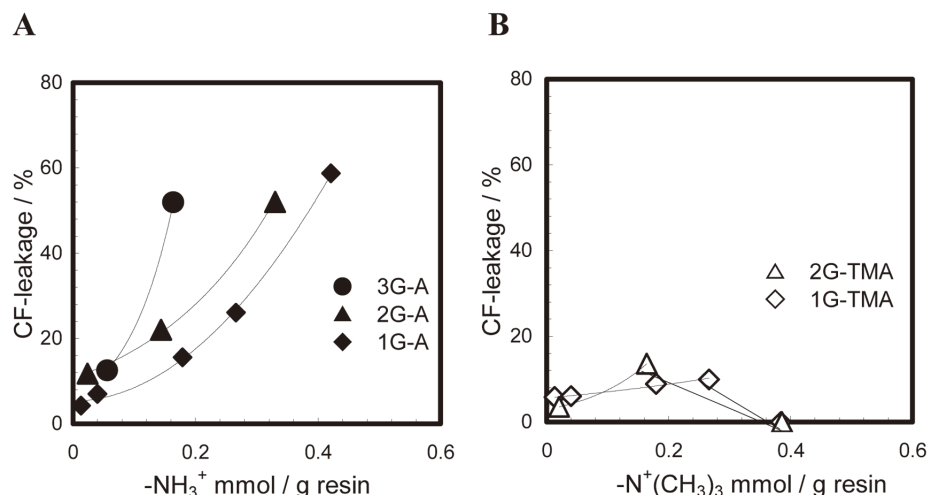


図2 ビーズ重量当たりの官能基モル数に対するリボソーム崩壊能評価
リボソーム内水相の漏出率 (CF-leakage (%)) が高いほど崩壊能が優れていることを表す。末端トリメチルアンモニウム型 (B) は 0.4 mmol/g resin 付近で光学セル表面への吸着が起こった。

(nG-TMA) は、重量当たりの官能基モル数が 0.2 mmol/g resin 付近までは官能基モル数に対して増加傾向を示したが、0.4 mmol/g resin 付近になるとビーズが石英ガラス表面へ吸着し、測定不能となった。

3. 2 抗菌活性試験結果

3. 2. 1 球状型リシンデンドリマーの抗菌活性

デンドリマーは対称性のある球状高分子であり、デンドリマー末端に種々の官能基を導入することによって多様な機能性をもたせることが可能である。しかしながら、世代数の増加とともに水への溶解度は減少するため、抗菌活性試験で使用するためにはイオン性アミノ酸からなるデンドリマーである必要がある。水に対する溶解度を考慮して第二世代型のリシンデンドリマーの抗菌活性試験を行った。

第二世代リシンデンドリマー HCl 塩の場合、大腸菌には 2 mg/mL 以上、黄色ブドウ球菌には 0.025 mg/mL 以上で抗菌活性を示し、特にグラム陽性菌である黄色ブドウ球菌に強い効果が観測された。さらに、対照物質である p-ヒドロキシ安息香酸プロピル (パラベン) より抗菌効果が高いことが明らかとなった。

3. 2. 2 半球デンドリマーを親水部にもつ界面活性剤の抗菌活性

親水部の世代数と抗菌効果の関係を明らかにするために半球デンドリマー部位を第一世代 (1G DK-C12)、第二世代 (2G DK-C12)、第三世代 (3G DK-C12) それぞれについて調べた。まず、大腸菌に対する抗菌試験の結果、1G DK-C12 は 2 mg/mL、2G DK-C12 および 3G DK-C12 は 0.25 mg/mL 以上で抗菌作用効果があった。また、黄色ブドウ

球菌に対しては 1G DK-C12 は 0.25 mg/mL、2G DK-C12 は 0.125 mg/mL 以上、3G DK-C12 は 0.063 mg/mL 以上となり世代数の増加とともに抗菌作用も高くなることが明らかとなった。球状型デンドリマー分子と同様にグラム陽性菌である黄色ブドウ球菌に対して高い抗菌活性を示した。従って球状型と半球型のような構造上の違いによるものではなく、1 分子内に含まれるアンモニウム基の総数が抗菌活性の強さに関係していると考えられる。

3. 2. 3 半球デンドリマー固定型樹脂の抗菌活性

第三世代型の末端アンモニウム型樹脂の大腸菌および黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性試験の結果を図 3 に示す。大腸菌の実験系ではほとんど顕著な差が見られなかったが、液体培地に樹脂を 50 mg/mL 投与した系では黄色ブドウ球菌の増殖を 15% 以下に抑えることに成功した。

4. 考 察

本研究では、化粧品の防腐剤として使用されているパラベンの代替物質あるいは低減化を目指した除菌材料の開発を試みた。抗菌活性試験の予備実験として行ったリボソーム崩壊能測定では、ポリスチレンビーズに結合するリシン側鎖のアンモニウム基密度が高まると酸性リボソームと強く相互作用し、崩壊能が増強されることが明らかとなった。また、同じ電荷密度でも世代数が高い方が有意であった。このことは、リシン側鎖のアンモニウム基が高密度で、かつアンモニウム基が樹脂中心から遠い、つまりアンモニウム基がある程度自由に動ける空間が必要であることを示唆している。また、半球デンドリマーを親水部にもつ界面活性剤は黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性はパラベンより優

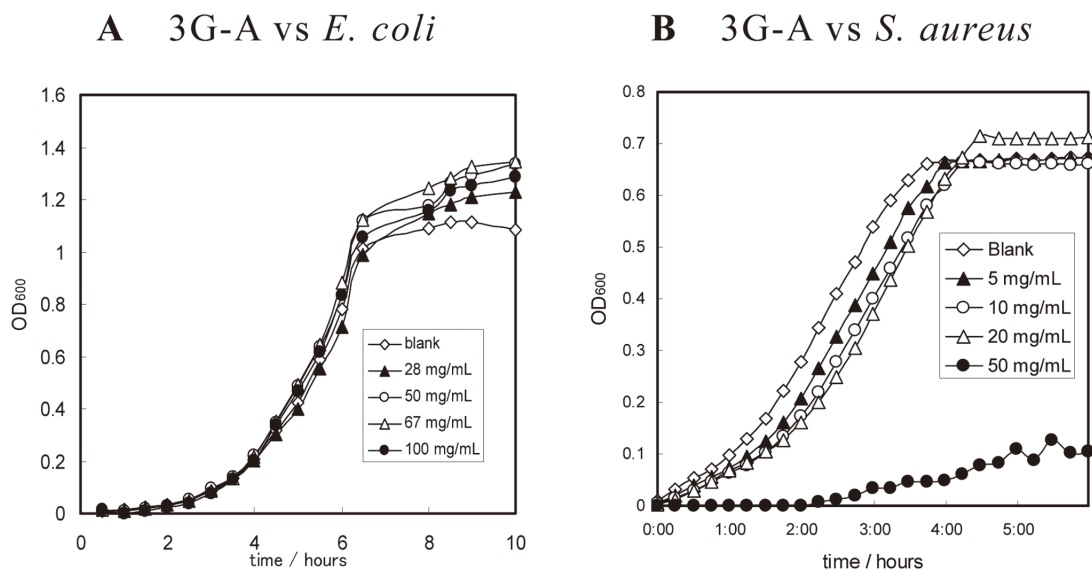


図3 液体培地中での抗菌活性樹脂各濃度における大腸菌（A）および黄色ブドウ球菌（B）の増殖曲線

れていることが明らかとなった。パラベンでは黄色ブドウ球菌に対する最小生育阻止濃度は1 mg/mLであったのに対して3G DK-C12では0.063 mg/mLであった。一方、大腸菌に対する抗菌効果は認められなかった。半球デンドリマー固定型樹脂でも同様に黄色ブドウ球菌に対して高活性が認められた。このことは、細胞膜構造の違いに由来すると考えられている。グラム陽性菌である黄色ブドウ球菌はグラム陰性菌である大腸菌と比べて細胞膜を構成するペプチドグリカン層がより厚く、頑丈である。また、多糖も多く含まれている。今回の結果は、ペプチドグリカン層、あるいはアンモニウム基同士の特異的な相互作用によるものと予想される。これまでに報告者らは、糖結合型界面活性剤MEGA-10に対して一級アンモニウム塩が強く相互作用しているという研究結果について既に報告しており⁴⁾、今回の実験からもアンモニウム基はグラム陽性菌に対してより抗菌作用効果の高い官能基であることが確認された。

5. 総括

本研究で合成した除菌材料 ①球状デンドリマー型、②半球デンドリマーを親水部にもつ界面活性剤型について抗菌活性試験の結果、どちらも大腸菌より黄色ブドウ球菌に対して高い抗菌活性を示し、高世代型のものほどパラベンより強い活性を示すことが明らかとなった。また、③半球デンドリマー固定型ビーズを50 mg/mL投与した系では黄色ブドウ球菌の増殖を15%以下に抑えることに成功した。今後は、カビ・酵母などに範囲を広げて抗菌活性を示す除菌材料の検討を行っていきたいと考えている。

謝辞

本研究を行うにあたり、ご支援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御礼申し上げます。また、本研究にご協力いただきました九州共立大学大学院秋貞英雄教授、九州工業大学大学院西野憲和教授、同大学院前田憲成助教に深謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Adair FW, Geftic SG, Gelzer J: Resistance of *Pseudomonas* to quaternary ammonium compounds: II. cross-resistance characteristics of a mutant of *Pseudomonas aeruginosa*, Appl. Microbiol., 21: 1058-1063, 1971.
- 2) Kuwahara J, Akisada H, Kato T, et al.: Effects of hydrophobic and electrostatic interactions on change in decapeptide conformation in micelle and liposome solution, J. Oleo Sci., 53, 619-626, 2004.
- 3) Kuwahara J, Akisada H, Wakayama N, et al.: Amyloid fibril formation of a simple decapeptide in a micellar environment, J. Oleo Sci., 54, 225-231, 2005.
- 4) Akisada H, Kuwahara J, Kunisaki M, et al.: A circular dichroism study of the interaction between *n*-decanoyl-*N*-methylglucamide and surface active agents in mixed micelles, Colloid Polymer Sci., 283, 169-173, 2004.

化粧品素材としての生体安定性を有する発色ナノ粒子含有液の開発

東京電機大学工学部電気電子工学科

平 栗 健 二

We have developed photoluminescent stable silicon nanocrystals (nc-Si) which have attracted great interest as quantum dots due to their nontoxic, abundant, and low-cost materials. The nc-Si particles show visible luminescent properties caused by a radiative recombination of electrons and holes in the Si-nc. The emitted colours can be tuned by changing the size of the nc-Si. In order to know the limit concentration for cytotoxicity, we investigated the response of HeLa cells. We detected a toxicity of nc-Si at 1,120 $\mu\text{g/mL}$. We suggested one of the mechanisms that nc-Si can generate oxygen radicals and the radicals were associated with membrane damages.

1. 緒 言

発光性ナノシリコン (nc-Si) は、可視領域において発光する物質であり、最近の研究により、粒子状態で固体状または溶液内へ分散することが可能になっている。そこで、生体内への取り込み、毛細血管内での流動性、さらには生体への安全性に優れた新規の半導体ナノ粒子材料として、シリコンナノ粒子が有望視されている。この材料は、今日の半導体産業を支えてきたバルクシリコン結晶のサイズ(直径)を4.3 [nm] (この値は電子と正孔が静電引力で弱く結合した粒子的状態、すなわち励起子のボーア半径に相当)以下に縮小したもので、粒子を構成する原子数も $10^2 \sim 10^4$ [個] (通常のシリコン結晶の原子数は 10^{23} [個]である)と極小にしたものである。

また、材料自体もシリコン元素のみで構成されているため、資源面、環境面以外に、特に人体に優しい無害性・無毒性の物質であり、しかも材料費や製造費が安価な物質として最大のメリットを有している。さらに、このナノシリコン粒子の物性や機能性に関しても、大変ユニークな材料である。その主な物性は、電子や励起子が3.0 [nm] 以下のナノ空間に閉じ込められることによって起こる量子閉じ込め効果である。この量子閉じ込め効果により、バルクシリコン結晶では見られない可視領域での発光現象が現れる。可視発光は、その材料のもつバンドギャップエネルギーが可視領域まで広がることで得られる。さらに、粒子径によって発光波長が制御できるため、赤色から青色までの広い

可視領域の光学マーカーとして期待されている。発光色とナノシリコンの粒子径の関係は、直径約3 [nm]で赤色、約2.3 [nm]で緑色、約2 [nm]で青色となり、目的の色を自由に制御する応用に適している^{1, 2)}。特に、溶液中での分散状発光性ナノシリコンは、多方面に添加できるので電子工学、光工学、機械工学だけでなく医学、薬学、化学など広範囲への応用が期待されている。また、この発光性ナノシリコンは、励起源として、発光波長よりエネルギーの高い短波長の光によって発光するので、赤色には青色の励起光源、青色には紫外線の励起光源など、発色の選択に光源を選ぶことも出来る³⁾。

さらに、この材料は、最近の生体への安全やリサイクル等の環境や省エネを考慮した材料である^{4, 5)}。その理由は、①ナノシリコンは、原料がSiであるので地球上に豊富に存在する元素として安定に確保できる。②このSiは、ガラスの主成分として広く利用されており、生体適合性も十分有する材料である。③加えて、Siの形成には半導体工業として培われた幅広い先端技術があり、化粧品への応用に応える十分な要素を持っている。

本研究では、この発光性ナノシリコンを含有する溶液を化粧用材料として利用する可能性について調査するために、生体に対する安定性について評価する。特に、現在、利用が期待されているが生体への影響が大きいと懸念されているCdおよびSeにより構成されている量子ドット (QD) と比較する。比較の試料としては、濃度の異なる溶液を作製し、細胞毒性を検討した。

2. 実 験

図1に作製方法の概要図を示す。スパッタ条件並びにエッチング条件は、通常のパラメータで行った⁵⁾。発光性ナノシリコン分散溶液の作製には、真空中でのスパッタ法と液相エッチング法を併用した。高周波スパッタリング法を用いて、ターゲット材料である比抵抗2-9 [Ωcm]のp形シリコンチップ(面方位(100))を純度99.99 [%]の石英デ



Luminescent nanocrystalline silicon particles with biocompatibility for cosmetic application

Kenji Hirakuri

Department of Electrical and Electronic Engineering, School of Engineering, Tokyo Denki University

イスクを同時にスパッタリングすることにより比抵抗0.01 [Ωcm]のp形シリコン基板（面方位（100））上シリコン原子が混在したアモルファスSiO_x膜を形成した。

スパッタリング後の試料は、アルゴンガス雰囲気中にて1100 [°C]で1[時間]の熱処理を行った。この熱処理において、過剰に含まれたシリコン原子とボロン原子が自在に移動し、Si原子がボロン原子を取り込みながら凝集する。この過程を経て、SiO₂層内にボロンドープされたシリコンナノ粒子を形成した。このとき形成されたボロンドープシリコンナノ粒子のサイズは、約3.0 [nm]であった。熱処理後の試料は、HF水溶液の蒸気に暴露し余分なSiO_x膜を除去した。粒子状になったnc-Siを生理食塩水内に拡散して、nc-Si分散溶液を作製した。本方法にて作製したnc-Si分散溶液の発光写真を図2に示す。

発光性ナノシリコンの細胞毒性を評価するために分散溶液中のナノシリコン濃度を変化させて培養試験を行った。ナノシリコンの含有量は、11.2～1120 [$\mu\text{g/mL}$]とした。評価に使用した細胞は、子宮癌細胞（HeLa細胞）を使用し、培養条件は通常の条件とした。細胞毒性評価試験の条件を表1に示す。

3. 結果

得られたナノシリコン粒子を電子顕微鏡により観察した。その結果、平均粒径6.5 [nm $\pm$ 1.5nm] の粒子が観察された。

この試料を生理食塩水に分散させた。細胞毒性試験には、ヒト子宮頸癌細胞株HeLa細胞を用いた。この細胞は、マルチウェルプレート内に 5×10^4 [cells/well] を播種し、10 [%] の仔牛血清と抗生物質を添加したMinimum essential medium (MEM) を培養液として、37 [°C]、5 [%]のCO₂ 湿潤環境条件下において48 [時間]培養した。その後、培養液を取り除き、ウェルに毒性試験評価用材料として2.5 [nm] のサイズをしたシリコンナノ粒子を2.8 [$\mu\text{g/mL}$]から280 [$\mu\text{g/mL}$]までの濃度で培養液とともに添加し、37 [°C]、5 [%]のCO₂湿潤環境条件下において、さらに48 [時間]培養した。48 [時間]の培養期間において、ナノシリコン粒子はHeLa細胞内に容易に貪食されていることを光学顕微鏡観察像より確認している。現在までに、細胞内に貪食される粒子濃度は、1120 [$\mu\text{g/mL}$]まで確認されている。また、毒性試験用材料を添加しないで培養した細胞は、コントロールとして使用した。

ナノシリコン粒子濃度56 [$\mu\text{g/mL}$]の溶液をHeLa細胞内に取り込み、48 [時間]培養し、その後、細胞の安定性を顕微鏡により評価した。ナノシリコン粒子含有HeLa細胞および添加していないHeLa細胞の様子を顕微鏡像ならびに紫外照射時の蛍光像を取得した（図3）。48 [時間]後の細胞は、安定して増殖していることが分かる。さらに、蛍光像からはナノシリコン粒子からの発光が観察され、この時点での細胞毒性および発光特性が良好であることが示唆

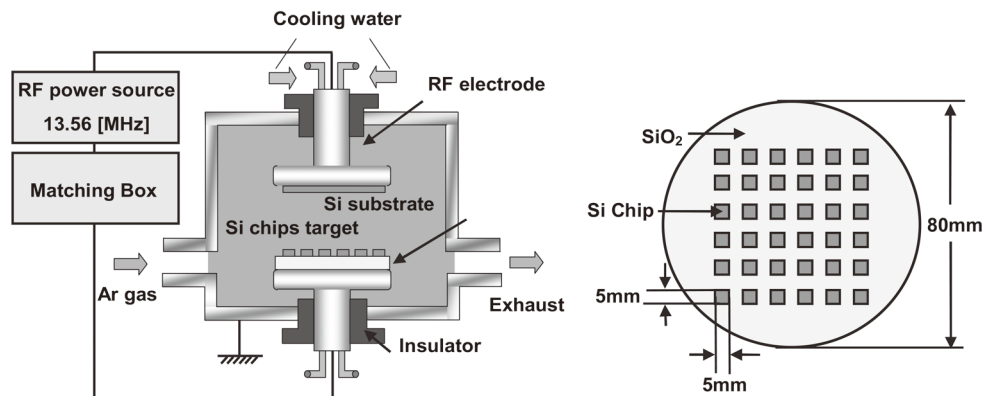


図1 スパッタ装置図ならびにターゲット条件

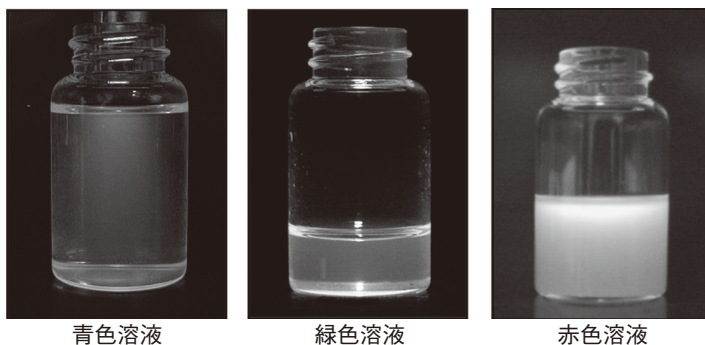


図2 各色に発光した nc-Si 分散溶液

表1 細胞培養条件

細胞	子宮癌細胞（HeLa細胞）
培養液	Minimal essential medical alpha (MEM- α)
培養条件	暗室 (37°C, CO ₂ : 5%)
細胞数	12,500 [cells/well]
培養時間	48 [h]
評価試料	CdSe (QD), nc-Si
溶液添加量	11.2, 112, 1120 [$\mu\text{g/mL}$]

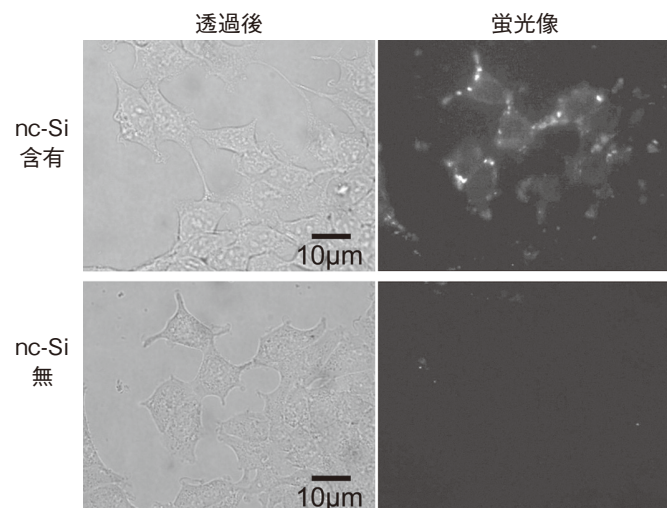


図3 nc-Si 粒子の透過および蛍光像

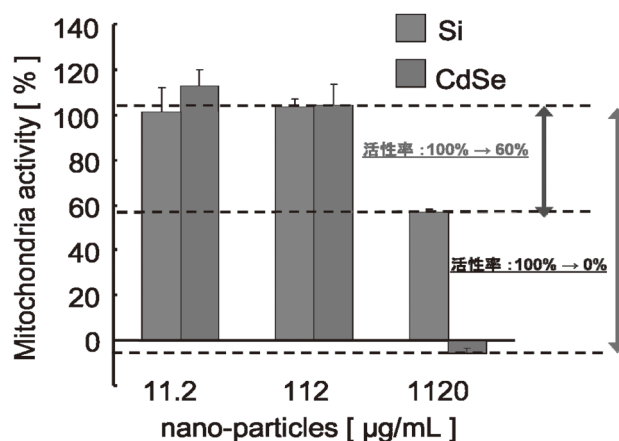


図4 細胞毒性評価試験結果

された。

ナノシリコン粒子の比較対象としてナノシリコン粒子と同条件で細胞と共培養したセレン化カドミウム (CdSe) 粒子を用い、比較・評価を行った。比較的低濃度では、nc-SiおよびCdSe試料ともに、ほぼ100 [%]の安定性を示したが、1000 [µg/mL]を超える濃度では顕著な違いが現れた。nc-Si粒子では、活性率が60 [%]程度あるのに対して、CdSeでは極端な低値を示した(図4)。この結果より、nc-Si粒子は毒性が低く、細胞に対する安定性を持つことが示唆された。

次に、毒性試験用材料を含んだ状態で培養された細胞は、MTTアッセイ試薬と培養液を1:1の比率で混合した溶液を各ウェルに20 [µL]ずつ添加し、37 [°C]、5 [%]のCO₂恒温装置で発色させた。各ウェルにおいて、プレートリーダーで450 [nm]の吸光度値から算出した細胞生存率を毒性評価の指標とした。細胞生存率は、すべての粒子濃度に対してコントロールと同様であり、比較的安定した傾向を示している。また、ナノ粒子が貪食された細胞に、UV光を照射することで、サイズ(この実験で使用した粒子サイズは2.3 [nm]である。)に依存した緑色の発光を確認することができている。この発光輝度は貪食濃度に依存しており、5.6 [µg/mL]以上の濃度において室内照明下でも肉眼で鮮明に確認できている。

4. 考 察

ここまでの研究結果からは、発光性ナノシリコンの細胞毒性は極めて低いことが判明した。これは、nc-SiがSi元素より構成されており、素材の安定性や不活性な表面で覆われていることが要因と考えられる。CdSe系の発光性ナノ粒子材料では、光励起によって粒子が活性化し、細胞に影響を与えることが報告されている。このため、励起粒子

の細胞安定性を検討する必要がある。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、経費を援助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謝いたします。細胞毒性試験評価に対する知見をいただきました国立国際医療センター研究所山本先生に感謝いたします。

(参考文献)

- 1) Sato, K., Hirakuri, K.: Influence of paramagnetic defects on multicolored luminescence from nanocrystalline silicon, J. Appl. Phys. 100, p.114303 (2006).
- 2) Sato, K., Hirakuri, K., Iwase, M., Izumi, T.: Fabrication of highly efficient full-color electroluminescent device composed of nanocrystalline silicon, J. Nanosci. Nanotechnol. 5, pp.271-276 (2005).
- 3) Barreto, J., Perálvarez, M., Rodríguez, J. A., Morales, A., Riera, M., López, M., Garrido, B., Lechuga, L., Dominguez, C.: Pulsed electroluminescence in silicon nanocrystals-based devices fabricated by PECVD, Physica E 38, pp.193-196 (2007).
- 4) Sato, K., Kishimoto, N., Hirakuri, K.: Enhancement of electroluminescent properties in ethanol dispersible nanocrystalline silicon particles, J. Nanosci. Nanotechnol. 8 pp.374-378 (2008).
- 5) Sato, K., Hirakuri, K.: Influence of oxidized layer on operating voltage and luminance of nanocrystalline silicon electroluminescent device, J. Nanosci. Nanotechnol. 6 pp.200-204 (2006).

オリーブ二次代謝産物の微生物変換によって得られる 新規抗酸化物質の性状解析

岡山大学大学院自然科学研究科（農学系）

神 崎 浩

Development of novel drugs has been achieved sometimes by microbial conversion of secondary metabolites. For example, hydroxylations of compactin and vitamin D₃ by microbial cytochrome P450s generated well-known commercial medicines, pravastatin and calcitriol, respectively. Thus, novel materials with useful functions for cosmetics or food additives will be possibly developed by bioconversion of secondary metabolites. We found that bakers' yeasts catalyzed the reduction of an aldehyde form of oleuropein aglycon (the substrate) in olive leaf extract. We isolated the substrate and its enzymatically converted product and determined their structures by instrumental analyses. Both of the substrate and the product, a novel alcohol, exhibited a pronounced antioxidative activity in a DPPH test. It was found that contents of oleuropein and its aglycon in olive leaf extract vary with variety. One pot conversion of oleuropein to compound B catalyzed by a combination of β -glucosidase and yeast cells was achieved.

1. 緒 言

二次代謝産物の利用法として、微生物による構造変換で化合物を高機能化し、医薬品に応用する例が知られている。図1に、医薬品として開発あるいは利用が期待されている微生物変換の例を示した。三共が開発したプラバスタチン (Pravastatin) は、スタチン系の高脂血症治療薬として1987年から世界中で販売されている薬剤であるが、青カビ *Penicillium citrinum* が生産するコンパクチン (Compactin) を *Streptomyces carbophilus* の酵素を用いる微生物変換によってより有効な化合物に変換させることで製品化に至った^{1,2)}。カルシトリオール (Calcitriol) は骨粗鬆症などの低カルシウム症状の患者に投与されている化合物であるが、ビタミンD₃からの化学合成には複数のステップが必要であったのに対し、大正製薬-メルシャンが1ステップでの微生物変換法を確立したことで注目されている^{3,4)}。我々のグループでも、抗ガン剤としての開発が期待される細胞分裂阻害活性物質の探索の過程で、カビが生産する新規化合物フェニラヒスチン (Phenylahistin) を放線菌 *Streptomyces albulus* 由来の新規酸化酵素で処理することにより、デヒドロフェニラヒスチン (Dehydrophenylahistin) へと変換できること、さらにその変換により細胞分裂阻害活性が飛躍的に上昇し、既存の抗ガン剤レベルに達することを明らかにした^{5,6)}。現在、本化合物の類縁体について、アメリカのベンチャー製

薬企業による臨床開発研究が行われている。

その結果を踏まえ、植物成分に含まれる二次代謝産物についても微生物の処理により、高機能化合物に変換が可能であると考え、研究を行った。植物として、岡山大学の周辺地域、すなわち香川県小豆島、岡山県牛窓地区で日本での生産のほとんどが行われているオリーブを選んで研究を実施した。その結果、オリーブ葉抽出物をパン酵母で処理することにより、新規の抗酸化化合物が生成することを明らかにした。この新規化合物はオリーブ葉に大量に含まれる配糖体オレウロペイン (Oleuropein) のアグリコン (脱グルコース体) のアルデヒド基がヒドロキシメチル基に還元変換された化合物であり、オリーブの代謝産物としては知られていない新規化合物である (図2)。また本化合物は抗酸化活性を有しており、そのユニークな構造から、化粧品素材等としての有効性を有している可能性が高い。

従って、本研究においては、この新規化合物の化粧品素材としての開発の可能性を探るべく、抗酸化活性の詳細を検討するとともに、有効な調製方法の検討を加えることを目的として実施した。

2. 実 験

(1) 抗酸化活性測定

抗酸化活性は1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 法およびBioVision社のTotal Antioxidant Capacity (TAC) Assay kitにより行った。

(1) - 1 DPPH法

水溶性抗酸化物質の代表例であるアスコルビン酸ナトリウム (Sodium ascorbate, ビタミンC) と脂溶性抗酸化物質の代表例である α -トコフェロール (α -tocopherol, ビタミンE) を比較物質として用いた。1200 μ M DPPH 25 μ L (final 100 μ M), 50% MeOH 225 μ L, 超純水25 μ L, 試料 in 50% MeOH (添加時の濃度: 10, 20, 30, 40, 50, 60 μ g/mL) を96穴



Characterization of novel antioxidative compound produced by microbial conversion of olive secondary metabolite

Hiroshi Kanzaki

Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University

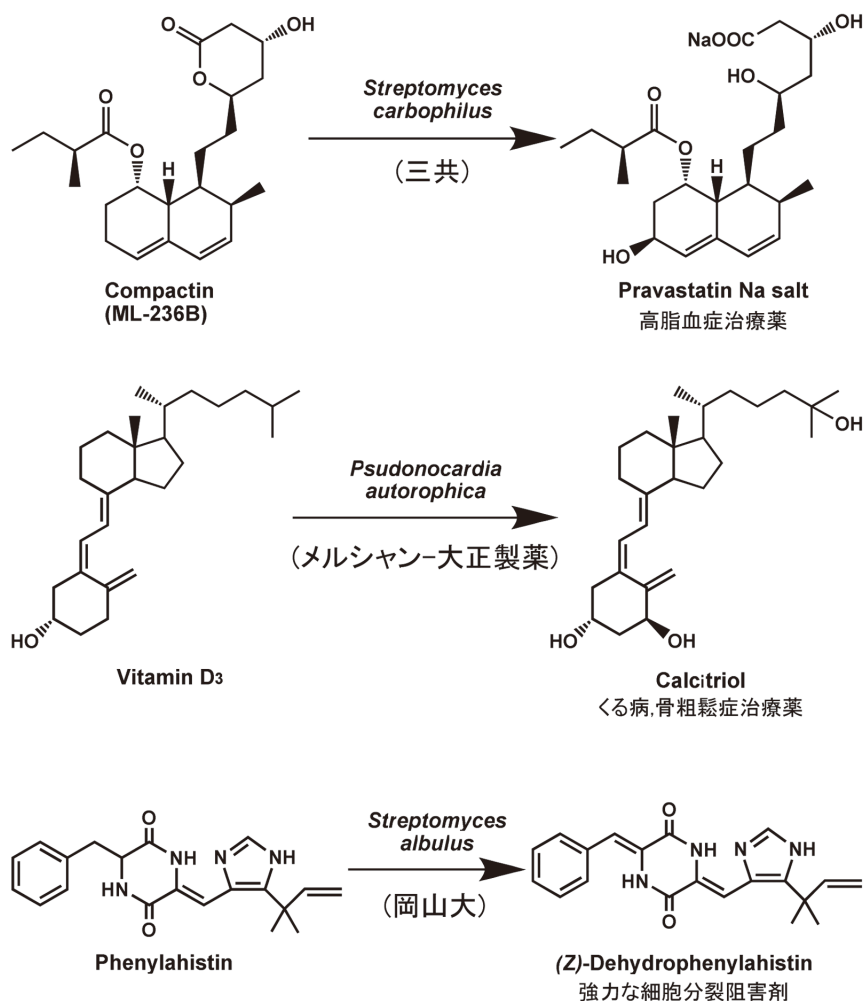


図1 天然有機化合物の生物変換による有用物質生産例

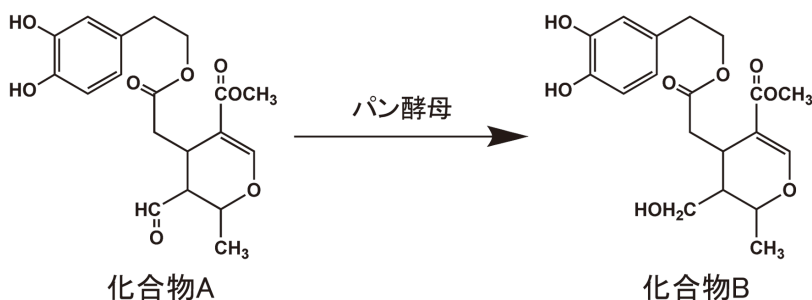


図2 パン酵母により触媒されるオリーブ葉成分の生物変換反応

アッセイプレートに添加して吸光度を測定し、吸光度の減少の割合から抗酸化力を評価した。

(1) - 2 TAC法

本方法では、抗酸化物質により Cu^{2+} が Cu^+ に還元され、その Cu^+ をキレートした試薬が示す吸光度を測定することにより活性を評価する。評価は α -トコフェロール様化合物である Trolox 相当量 (nmol) を求めることで行った。尚、1 nmol の Trolox は 2 nmol の Cu^{2+} を還元する活性を有する。

(2) 品種の異なるオリーブ葉のオレウロペイン関連化合物含有量の比較

日本で栽培されているオリーブ品種に含まれるオレウロペインおよびその関連化合物の量を測定した。当初の実験で用いていたルッカー種に加え、マンザニコ種、ミッシェン種の葉を材料として用いた。採取した生葉を細断し、エタノールに浸漬して抽出物を調製した。得られた抽出物に含まれるオレウロペインおよびそのアグリコン (化合物 A) 含有量を ODS-HPLC で測定した。HPLC 分析条件

は次に示す通りである。カラム：Inertsil ODS-3（5 mm）， $\phi 4.6 \times 250$ （nm），カラム温度：35℃，ポンプ：HITACHI Pump L-710，検出器：HITACHI Diode Array Detector L-7455（200～400 nm），溶離液：60% MeOH + 0.1% TFA，流速：1.0 mL/min

(3) オレウロペインからの化合物Bのワンポット合成法の検討

① β -グルコシダーゼ活性測定

β -グルコシダーゼ活性は\beta-D-glucopyranoside（pNPG）を基質とするpNPG分解活性で判定した。酵素活性1 unitの定義をpH 5.5の酢酸緩衝液，37℃の条件下で5 mM pNPGを基質として30分間反応させた時，1分間に1 μ molのpNPを生成する酵素量とした。

② オレウロペインから化合物Aへの脱グルコシル化反応

基質にオレウロペイン，酵素にアーモンド由来 β -グルコシダーゼを用いた。19 mM オレウロペイン（EXTRASYNTHES社製）14.5 μ L（final 11 mM）と30 mg/mL アーモンド由来 β -グルコシダーゼ（TOYOBO社製）275 μ L（final 33 mg/mL）に蒸留水を添加して全体で25 μ Lとし，37℃，160 strokes/minで24 h反応させ，ODS-HPLC分析（条件は表1に示した）によって化合物A生成の定量を行った。pHの効果を検討する際には，50 mM MES buffer（final 10 mM）5 μ Lを使用した。

③ オレウロペインから化合物Aを経た化合物Bへのワンポット酵素合成

下記の3つの反応区での変換を試みた。

- I. 初めから β -グルコシダーゼとパン酵母で24 h反応させた反応区
- II. β -グルコシダーゼで24 h反応させた後，パン酵母を添加してさらに24 h反応させた反応区
- III. パン酵母のみで24 h反応させた反応区

19 mM オレウロペイン72.5 μ L（final 11 mM）に30 mg/mL β -グルコシダーゼ13.75 μ L（final 3.3 mg/mL）と蒸留水38.75 μ Lを加えて脱グルコシル化を行った。パン酵母（日清フーズ社製）は1.875 mg（final 15 mg/mL）添加した。それぞれの反応区を37℃，160 strokes/minで24 h or 48 h インキュベートし，遠心分離によってパン酵母と上清を分離させた後，上清をHPLC分析に供した。

3. 結果

(1) 抗酸化活性

(1) - 1 DPPH法で評価した抗酸化活性

図3に示すように，化合物B，化合物A，オレウロペインは α -トコフェロール以上の抗酸化活性を示した。さらに，オレウロペインと化合物Aはアスコルビン酸ナトリウムと同程度，化合物Bはアスコルビン酸ナトリウム以上の抗酸化活性を示した。DPPHラジカルを20%消去する濃度（nM）はアスコルビン酸ナトリウムが8.88，oleuropeinが7.66，化合物Aが9.02，化合物Bが5.11であった。

(1) - 2 TAC法で評価した抗酸化活性

TAC法により求めた活性をTrolox相当量（nmol）で示すとアスコルビン酸ナトリウムは2.55，オレウロペインは2.30，化合物Bは7.10であった。

DPPH法，TAC法の両者での評価値は類似しており，アスコルビン酸ナトリウムとオレウロペインはほぼ同程度の活性を，化合物Bはそれより高い活性を示すことが判明した。

(2) 品種の異なるオリブ葉のオレウロペイン関連化合物含有量の比較

オリブには500以上の品種があるとされており，日本

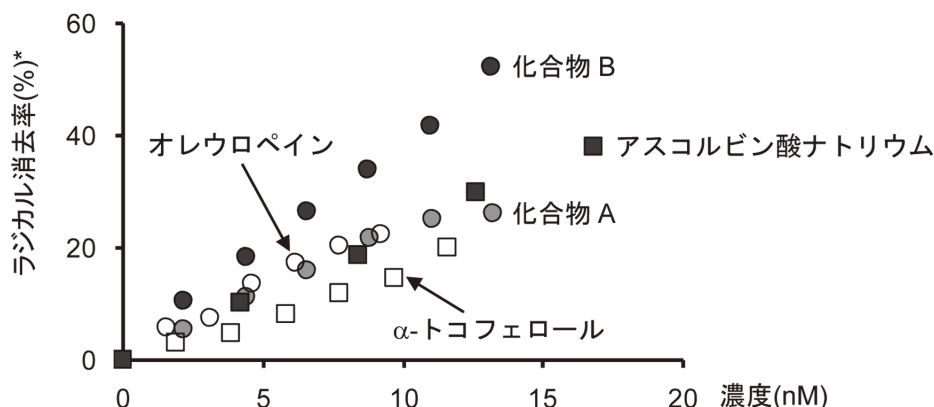


図3 DPPH法で評価した抗酸化活性
ラジカル消去率は試料無添加区と試料添加区の吸光度の差の試料無添加区の吸光度に対する比を百分率に換算した値として求めた。

でも数種類が栽培されている。論文などの報告ではオリーブにはオレウロペインが著量含まれているとされており、今回の抽出物に含まれていた化合物Aがオレウロペインのアグリコンであったことから、この基質の品種間の差を調べることにした。品種としては、前回使用していたルッカー種に加え、岡山で栽培されている、マンザニロ種、ミッション種を加えた3種を用いた。

表1から判るように、全ての品種由来の抽出物中にオレウロペインと化合物Aが含まれていた。3種のオリーブを比較すると、オレウロペインと化合物Aの両者ともにマンザニロ種由来の抽出物に最も多く含まれていることが判った。データを示していないが、抽出の際の条件を変更することにより、オレウロペインと化合物Aの比率が変化することが判っており、化合物Bの効率的調製を行うためには抽出条件も重要であることが判明した。

(3) オレウロペインからの化合物Bのワンポット合成法の検討

様々な論文の報告および(2)で示した結果から、オリーブ葉には配糖体オレウロペインが著量含まれており、化合物Bを効率よく生成するためには、オレウロペインからの変換系を確立することが望ましい。この反応は配糖体加水分解、化合物Aの化合物Bへの還元という2ステップから

表1 オリーブ葉抽出物に含まれるオレウロペインおよびそのアグリコンの量
231nmで検出した各化合物のPeak areaを生葉新鮮重1グラムあたりに換算した。

オリーブ品種	化合物A peak area ($\times 10^9$)	オレウロペイン peak area ($\times 10^9$)
ミッション	6.00	1.13
ルッカー	8.85	3.01
マンザニロ	12.6	5.25

なるが、それをワンポットで実施可能か市販のオレウロペインを基質として検討した。

この手法を用いることにより、

- ・工程を簡略化することができる
 - ・中間体の単離・精製をすることがないので収率の低下を防ぐことができる
- という利点が挙げられる。

①パン酵母の β -グルコシダーゼ活性

pNPG分解活性測定試験より、現在使用しているパン酵母の β -グルコシダーゼ活性は 5.08×10^{-4} units/酵母mgと求められた。アーモンド由来 β -グルコシダーゼ(TOYOBO社製)のpNPG分解活性は、 6.99×10^{-3} units/mgであった。次の実験で示すが、オレウロペインの脱グルコシル化には 5.77×10^{-4} units必要であり、これをパン酵母で賄おうとすると反応液25 μ Lに対してパン酵母を1.14 mg添加しなければならないので現実的ではない。そこで、オレウロペインから化合物Aへの変換にはパン酵母ではなく、市販精製 β -グルコシダーゼを用いることにした。

②オレウロペインから化合物Aへの脱グルコシル化反応

アーモンド由来 β -グルコシダーゼ(TOYOBO社製)でオレウロペインを処理したところ、オレウロペインの減少、化合物Aの生成が確認でき、オレウロペインの脱グルコシル化の進行が判明した。

そこで、その反応について β -グルコシダーゼの反応に適したpHとされる5.5と中性付近のpH 7.0で反応の経時変化実験を行った。

酸性領域において化合物Aが多く生成された。これは使用した β -グルコシダーゼの最適反応pHが5.5であったためだと考えられる。また、化合物Aの生成量は、pH 7.0では反応開始から9hをピークに急激に減少しているのに対し、pH 5.5では反応開始から72hをピークに緩やかに減少している。このことより、化合物Aは酸性条件で安定である可能性が示唆された。

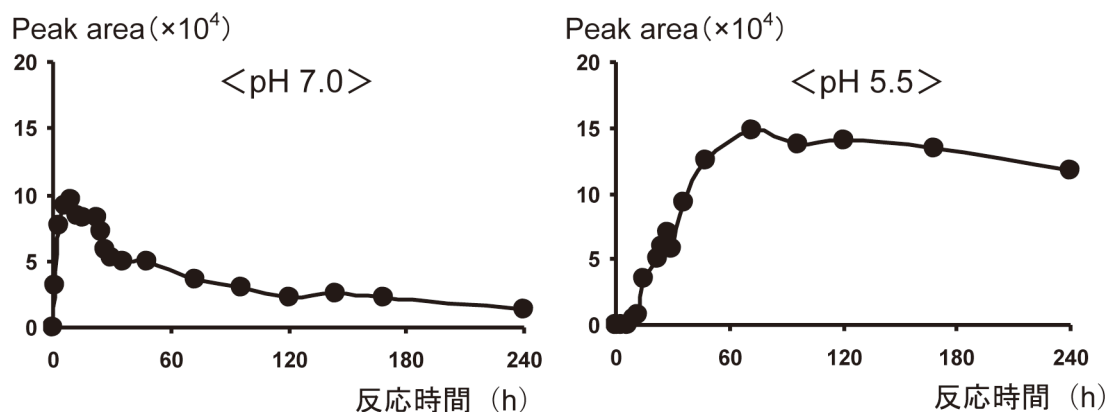


図4 β -グルコシダーゼにより触媒されるオレウロペインからアグリコンへの変換反応

③オレウロペインから化合物Aを経た化合物Bへのワンポット酵素合成

オレウロペインから化合物Bへの変換をワンポットで行うにあたり、オレウロペインから化合物Aへの変換を触媒する β -グルコシダーゼと化合物Aから化合物Bへの変換を触媒するパン酵母の2種の触媒を、同時に添加する方法（反応区Ⅰ）、触媒を継時的に連続添加する方法（反応区Ⅱ）、パン酵母のみの触媒能で反応する方法（反応区Ⅲ）の3種で検討を行った。各反応区における化合物Bの生成量を図5に示した。このことより、Ⅱのステップワイズ方式で酵素反応を行った方が化合物Bの生成に適していることが示唆された。また、反応区Ⅱにおけるクロマトグラムを図6に示した。このクロマトグラムから、オレウロペインから化合物A、化合物Bが生成されたことが明らかとなった。なお、当初の予想通り、パン酵母のみでは β グルコシ

ダーゼ活性が低く、化合物Bの生成は認められなかった。

4. 考 察

オレウロペインアグリコン（化合物A）からパン酵母処理により新たに生成した化合物Bはアスコルビン酸ナトリウムや α -トコフェロールといった抗酸化物質より強い活性を保有していることから、その作用をさらに詳細に検討することにより、化粧品素材等としての開発が期待される。

化合物Bの生成が、オレウロペインからのワンポット合成により達成できることが判明したので、この手法による変換率の向上が達成できれば、化合物Bを含むエキスの経済的な調製が可能となり、素材開発への道が開けることが期待される。

さらに、オリブ葉の抽出物中には著量のオレウロペインとそのアグリコンが含まれており、日本の栽培品種では

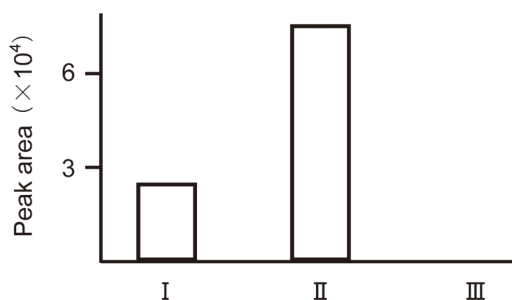


図5 ワンポット変換による化合物Bの生成量

- Ⅰ： β -グルコシダーゼとパン酵母を同時添加し、24 h 反応させた反応区
 Ⅱ： β -グルコシダーゼで24 h 反応させた後、パン酵母を添加してさらに24 h 反応させた反応区
 Ⅲ：パン酵母のみで24 h 反応させた反応区

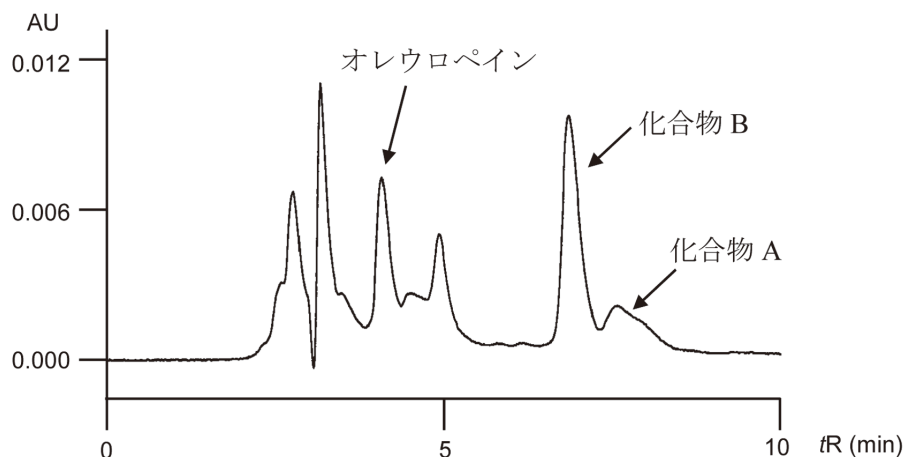


図6 ワンポット変換（反応区Ⅱ）で得られる反応溶液のHPLC分析クロマトグラム
 検出波長：231nm

マンザニロ種由来抽出物に最も含量が多いことが判明した。以上のことから、オリーブ葉抽出物を直接生物変換処理する手法を上記のワンポット合成も含めて検討することにより、より有効な化合物B含有エキスの調製法の確立が期待される。

(引用文献)

- 1) Matsuoka T, Miyakoshi S, Tanzawa K, *et al.*: Purification and characterization of cytochrome P-450sca from *Streptomyces carbophilus*. ML-236B (compactin) induces a cytochrome P-450sca in *Streptomyces carbophilus* that hydroxylates ML-236B to pravastatin sodium (CS-514), a tissue-selective inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme-A reductase, *Eur. J. Biochem.*, **184**, 707-713, 1989
- 2) 岸田有吉, 内藤敦, 岩藤誠吾, ほか2名: プラバスタ

チンの開発研究, 薬学雑誌, **111**, 469-487, 1991

- 3) Sasaki J, Miyazaki A, Saito M, *et al.*: Transformation of vitamin D₃ to 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ via 25-hydroxyvitamin D₃ using *Amycolata* sp. strains, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 152-157, 1992
- 4) Takeda K, Asou T, Matsuda A, *et al.*: Application of cyclodextrin to microbial transformation of vitamin D₃ to 25-hydroxyvitamin D₃ and 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃, *J. Ferment. Bioeng.*, **78**, 380-382, 1994
- 5) Kanzaki H, Yanagisawa S, Kanoh K, *et al.*: A novel potent cell cycle inhibitor dehydrophenylahistin--enzymatic synthesis and inhibitory activity toward sea urchin embryo, *J. Antibiot.*, **55**, 1042-1047, 2002
- 6) Kanzaki H, Kanoh K, Yanagisawa S, *et al.*: Cell division inhibitors and process for producing the same, PCT Int. Appl., 2001, WO 2001053290

両親媒性物質との分子複合体及びイオン交換体形成を利用する 新規機能性ケミカルピーリング剤の開発

新潟薬科大学薬学部薬剤学研究室

飯村 菜穂子

Recently, chemical peeling has become very popular for treatment of skin disorders in Japan. Some drugs, such as phenol, salicylic acid, and resorcinol are well known as drugs for treatment of acne vulgaris. However, the chemical structure of peeling agents changes by oxygen or heat. In addition, their drugs are worried about skin stimulus and safety. We tried to stabilize some drugs, such as phenol, salicylic acid, and resorcinol by making complexes with various amphiphilic agents. We confirmed that complexes of the drugs for chemical peeling were stable against heat, and decided their crystal structures by x-ray analysis. Moreover, we tried the ion exchange reaction counter ions of amphiphilic agents and the drug for peeling to obtain new drugs for chemical peeling. It was suggested that drugs of chemical peeling, such as salicylic acid were able to have surface activity and skin permeability by this method. Our finding of the complex between amphiphilic agents and drugs of chemical peeling and ion exchanged drugs of peeling will be expected as a new drug for acne vulgaris patients.

1. 諸 言

近年、人々の美容への関心が非常に高まっている。美容形成、皮膚科等においてしわ、シミ、ニキビを治療したいと願い、また市場に出回る化粧品開発もそのようなニーズに応えるよう進められている。これらの治療方法の一つにケミカルピーリングがある¹⁾。これまで皮膚色素性病変にレーザー治療、外用剤適用、ビタミン剤内服と種々治療法が考えられてきたが、しわ、シミ、ニキビ、いずれの疾患にも有効、効果的なケミカルピーリングが大変注目されるようになった^{2,3,4)}。皮膚科、美容形成外科等の専門医の間でも急激に関心もたれ治療効果を報告する文献も増え且つ、現在では市販品として薬店等でも容易に入手ができるようになった。しかし、ケミカルピーリングは、処方開発初期の頃に提案されたphenol、salicylic acid、resorcinol等が現在でも主流の薬剤⁵⁾であり、これらの皮膚刺激性、酸素、光による薬剤不安定性、低い皮膚浸透性は未だ改善されていない。そのため極端な高濃度での使用もしばしば見られ、患者へのストレスを無視する治療が行われており、今まさに安心して使用できる新規ピール剤開発が待たれている。

そこで筆者は、これまで行ってきた「両親媒性物質との複合体形成がもたらす新規機能性の付加」の研究^{6,7)}を基盤としてこの技術を導入し、これまで用いられてきたピール剤を薬物透過促進剤としても良く知られている両親媒性

物質との複合体を形成させること、またイオン交換体形成を試みることにより、浸透性が高まり、副作用の軽減された新規ピール剤の開発を試み、これまでに全く存在し得なかった新しいケミカルピーリング剤を作製することを主な目的に本研究を行った。

2. 実 験

分子複合体生成

現在ピール剤として使用されているsalicylic acid (SA) (和光)、resorcinol (Res) (和光)等を選択し両親媒性物質との分子複合体形成を試みた。複合体形成に使用した両親媒性物質は4級アンモニウム塩類及び2本鎖を有するdioctadecyldimethylammonium bromide (DSDAB) (東京化成)、dihexadecyldimethyl ammonium bromide (DCDAB) (東京化成)、ditetradecyl dimethylammoniumbromide (DMDAB) (東京化成)、didodecyl dimethylammonium bromide (DLDB) (東京化成)、またアルキルピリジニウム塩であるhexadecyl pyridinium Bromide (CPB) (東京化成)、hexadecylpyridinium chloride (CPC) (東京化成)、殺菌剤としてよく知られるbenzyl hexadecyl dimethylammonium chloride (BCDAC) (東京化成)、さらにhexadecyldimethylethylammonium bromide (CDEAB) (東京化成)を使用した。

イオン交換体生成

ピール剤に界面活性機能を付加することによって皮膚浸透性の高いピール剤を得ることが可能と思われることから、両親媒性物質の対イオン(例えばCl⁻、Br⁻)をsalicylic acidに交換しalkyltrimethylammoniumu salicylateにすることを試みた。

分子複合体の生成確認及びイオン交換体の生成確認

今回選択したsalicylic acid、resorcinolの分子複合体の



Development of the drug for chemical peeling using the technique of complex formation with surfactant and the ion exchange method

Nahoko Iimura

Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Niigata University of Pharmacy and
Applied Life Sciences

結晶構造が明らかになればその存在をさらに明確にすることができる。良質な結晶を得てX線を用いて構造解析を行いたいと考えていた。しかし万が一これらで良質結晶が得られない場合にその類似化合物でも複合体形成を試み分子配列を明らかにしたいと考え、phenol類であり、比較的ピール剤と類似する化合物、*p*-phenylphenol、hydroquinone等でも上記両親媒性物質との分子複合体形成を試み、X線構造解析に適当な結晶獲得に努めた。

X線結晶構造解析

分子構造決定に適当な良質結晶が得られたならば、吹きつけ低温装置 (Rigaku) により 223K の条件下、イメージングプレート単結晶自動 X 線構造解析装置 (Rapid-L, Rigaku) により、CuK α 線を用いて回折強度測定を行った。直接法プログラムは Shelxs-97、SIR2002 を用いて解き、最小二乗法プログラムの Shelxl-97 によりフルマトリックスを用いて $\Sigma w(F_o - F_c)^2$ を最小とすることにより精密化を行った。

両親媒性物質／ピール剤分子複合体の安定性試験

示差熱重量分析装置 (DTA-60, Shimadzu) を用いて、温度範囲 25 ～ 300℃、窒素気流下における昇温に伴う salicylic acid、resorcinol 等の単体揮発減量、及び分子複合体からの salicylic acid、resorcinol 等それぞれの減量測定を行い、熱に対する安定性を単体と分子複合体とで比較検討した。

分子複合体の皮膚への影響

分子複合体が皮膚に対してどのように影響するかを知ることは、新規ピール剤の効能効果を知る上で重要なことと思われる。X線結晶構造解析が成功している BCDAC/hydroquinone を選択し、test skin (東洋紡)、フランツセルを用いて単位皮膚あたりの hydroquinone の蓄積性について hydroquinone 単体との比較を行った。

3. 結 果

両親媒性物質／ピール剤分子複合体

安定に単離する事が出来た結晶性分子複合体の例を Table 1 に示した。これらの分子複合体の生成モル比の多くは、両親媒性物質：薬物 = 1：1、2：1、3：2 等の整数比で形成されていることが確認できた。

イオン交換体生成

CTAC で見られる硝酸銀反応が陰性であり、また CTAC では確認できなかった UV 吸収が見られたことから、hexadecyltrimethylammonium chloride (CTAC) から hexadecyltrimethyl ammonium salicylate にイオン交換されたと思われる。

両親媒性物質／ピール剤分子複合体の安定性試験

昇温に伴う薬物の揮発は、両親媒性物質と複合体形成させることにより良く抑えられており、その抑制は両親媒性物質のアルキル鎖長に依存し、長いアルキル鎖を有する両親媒性物質との分子複合体で安定性がより高まることがわかった。結果を Fig. 1 に示す。

両親媒性物質／phenol 類化合物の X 線結晶構造解析

BCDAC/hydroquinone、DLDAB/*p*-phenylphenol で良質結晶を得ることができた。X線構造解析は分子複合体形成の証明手段として最適な方法であり、salicylic acid、resorcinol と両親媒性物質間に生成される複合体の分子配列を知るために類似化合物の分子配列解明は有効と思われ、その X 線結晶構造解析を積極的に行った。DLDAB/*p*-phenylphenol の結晶構造について Fig. 2、3 に示す。構造解析結果から、両親媒性物質の交互に逆向きに並んだアルキル鎖間が少し開き、親水部に隣接するところに隙間ができ、そこに *p*-phenylphenol が取り込まれることが明らかとなった。取り込まれる力は、*p*-phenylphenol の -OH 基と両親媒性物質

Table 1. Crystalline molecular complexes with drugs of chemical peeling

Complexes	molar ratio (amphiphilic agent : drug)
CDEAB/Rez	2 : 1
CPC/Rez	2 : 1
CPB/Rez	2 : 1
BCDAC/Rez	1 : 1
DSDAB/Rez	1 : 1
D CDAB/Rez	1 : 1
DSDAB/SA	1 : 1
DCDAB/SA	3 : 2

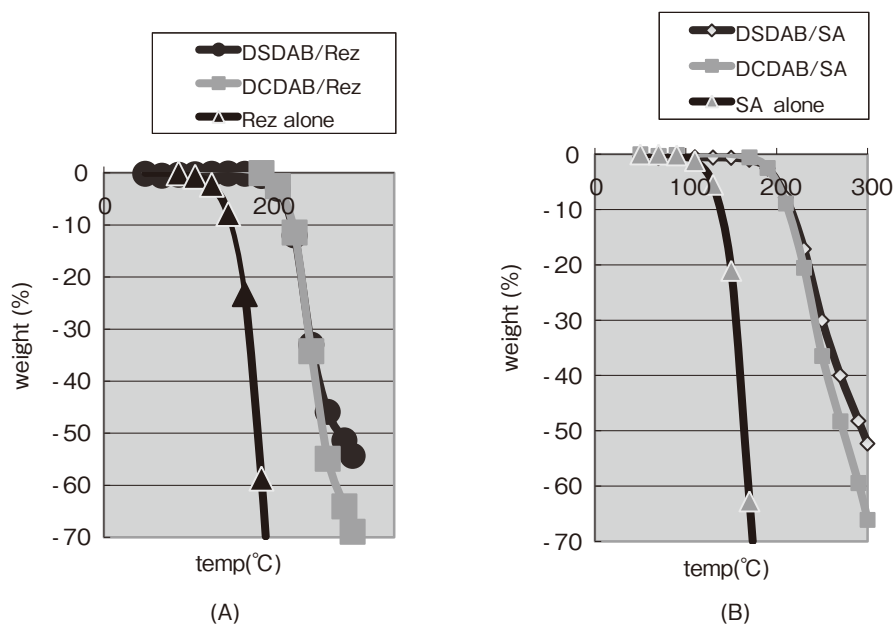


Fig.1 Thermogravimetry detected various drugs of chemical peeling (A: resorcinol(Rez) series, B: salicylic acid (SA) series) stability in the complex crystals.

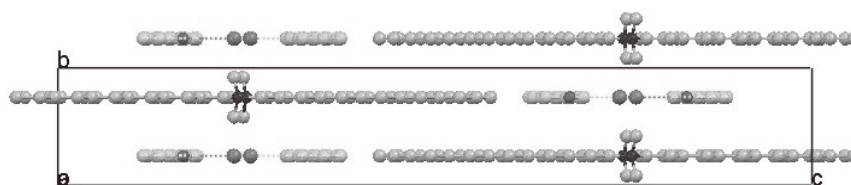


Fig. 2 Crystal structure of DLDAC/*p*-phenylphenol viewed along the *a* axis.

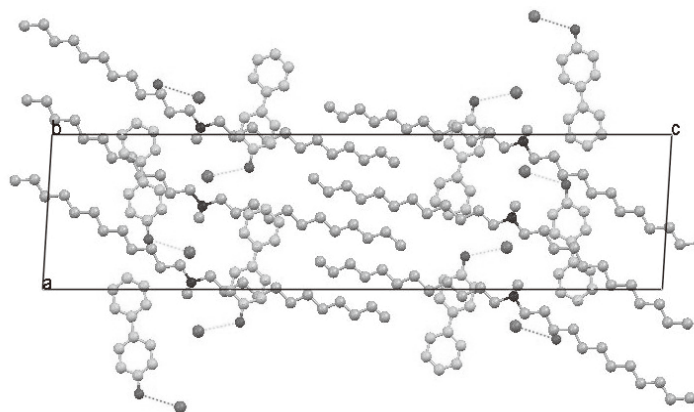


Fig.3 Crystal structure of DLDAC/*p*-phenylphenol viewed along the *b* axis.

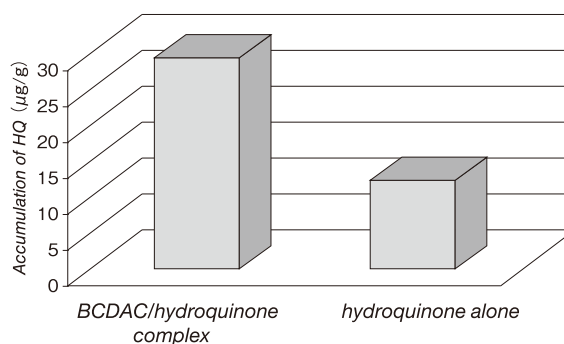


Fig.4 Accumulation profile of hydroquinone in the test skin

親水部との水素結合、*p*-phenylphenolのベンゼン環と疎水部とのC-H $\cdots\pi$ 相互作用であることがわかった。一般的にはC-H $\cdots\pi$ 相互作用は弱いとされているが、この構造ではこれらの相互作用が重要な役割を果たし構造安定化に貢献している。この構造からsalicylic acid、resorcinolとで形成された分子複合体についても、類似の分子配列をとる可能性が高いと考えられる。

分子複合体の皮膚への影響

結果をFig. 4に示す。皮膚1gあたりの薬物の蓄積は複合体を形成する方が大きいことが分かった。薬物吸収促進剤として利用される両親媒性物質との分子複合体化は皮膚親和性の乏しい薬物の経皮吸収に大きく貢献することが分かった。

4. 考 察

皮膚科、美容形成外科等々では定評のあるピール剤、salicylic acid、resorcinol等の薬剤不安定性は、両親媒性物質との分子複合体形成によって改善されることが今回の研究成果から明らかになった。複合体形成に使用する両親媒性物質の種類を選択することにより多種多様なピール剤の獲得も可能と思われる。両親媒性物質とピール剤間に生成する分子複合体は、両者の単なるmixtureと誤解されが

ちであるが、X線構造解析を用いてその類似化合物の分子配列を明らかにしたことにより、分子複合体の存在は明らかになり、またその複合体が経皮吸収促進を示したことからこれまで用いられているピール剤とは異なる性質をもつ新規化合物であることも明確にできたと思われる。

両親媒性物質との複合体化やイオン交換技術を導入して新規の機能を付加させた本化合物が、高い有用性と皮膚ストレスを軽減したケミカルピーリングの薬剤として臨床現場において貢献できるよう今後の研究を更に展開していきたいと考えている。

(参考文献)

- 1) Furukawa F and Yamamoto Y, *Journal of Dermatology*, **33**, 655-661 (2006)
- 2) Yamashita R, *MB Derma*, **48**, 25-38 (2001)
- 3) Funasaka Y, *MB Derma*, **67**, 35-42 (2002)
- 4) Miyazaki T, *MB Derma*, **67**, 71-76 (2002)
- 5) 林和弘、内沼栄樹、形成外科、**48**, 73-78 (2005)
- 6) Sawada K, Kitamura T, Ohashi Y, Iimura N, Hirata H, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **71**, 2109-2118 (1998)
- 7) Iimura N, Ohashi Y, and Hirata H, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **73**, 1097-1103 (2000)

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

熊本大学医学薬学研究部

藤原 章雄

N^ε-(carboxymethyl) lysine (CML) is an advanced glycation end-product (AGE) that was known as one of major AGEs in hydrolysate of glycated collagen. Subsequently, CML was also detected in human serum, and its level in patients with diabetes was found to be higher than in normal subjects. Furthermore, it is known that AGE-collagen induces apoptosis in fibroblasts through activation of reactive oxygen species and MAP kinases. Therefore, treatment with AGEs inhibitors may be a potential strategy for the prevention of clinical diabetic complications and skin aging. In the present study, we investigated the inhibitory effect of natural compounds on CML formation to discover the candidate agents for the new AGE inhibitors. In this screening, rutin, astragaloside, quercetin and gallic acid showed significant inhibitory effect on CML formation during incubation of collagen with ribose, thus those compounds may be candidates for the new AGE inhibitors.

1. 緒言

我々は、当研究室が保有する天然化合物ライブラリーを用いて、健康維持や疾病予防に有効な「機能性天然薬物」の探索研究を行っており、これまでに、抗動脈硬化作用を有するトマト新規配糖体や、メタボリックシンドロームを改善するリンゴ由来トリテルペン、高血圧を予防する杜仲葉由来イリド配糖体などを発見してきた¹⁾。

さらに近年、この研究の一環として、糖尿病合併症や動脈硬化症、皮膚老化などの老化性疾患の発症や進展に関与する Advanced glycation end products (AGEs) の生成を阻害する天然化合物の探索を行っている。AGEs とは、還元糖とタンパク質の非酵素的な反応であるメイラード反応によって生じる最終生成物の総称であり、このメイラード反応は、グルコースなどの還元糖とタンパク質のアミノ基が反応してアマドリ転位物を形成する前期反応と、アマドリ転位物が酸化、脱水、縮合、転位などの反応を経て、AGEs 構造体へと変化する後期反応からなる。現在、AGEs 構造体としては、約20種が知られており、その中でも主要な AGEs 構造体である N^ε-(carboxymethyl) lysine (CML) は、糖尿病合併症の病変部位や動脈硬化巣のみならず、肺線維症の肺胞マクロファージなどでも蓄積することが報告されている²⁾。さらに、コラーゲンに生成する CML と病態との関連についても、様々な報告がなされており、例えば、CML 化コラーゲンは骨を形成する骨芽細胞のアポトーシスを誘導することで骨形成を阻害し、こ

の現象は骨粗鬆症の原因の一つであると考えられている³⁾。また、コラーゲンの CML 化は、表皮に存在するケラチノサイト(角化細胞)の遊走やコラーゲンへの接着能を低下させることから、糖尿病患者における創傷治癒の遅延には、コラーゲンの CML 化が関与していることが示唆されている⁴⁾。

コラーゲンは、皮膚の真皮において線維芽細胞から産生され、真皮の70%以上を構成するタンパク質であり、このコラーゲンが線維芽細胞に引っ張られることで肌の張りが保たれている。しかし、CML がコラーゲンに蓄積すると、CML 化コラーゲンが RAGE (receptor for AGE) を介して Caspase 経路や MAP kinase 経路を活性化し、線維芽細胞をアポトーシスさせることが報告されている^{3,5)}。すなわち、AGEs は線維芽細胞のアポトーシスを誘導することによって肌の張りの低下といった皮膚老化を促進すると考えられる。

そこで、本研究では、皮膚老化予防に対する新たなターゲット分子として CML に注目し、当研究室が保有する天然化合物ライブラリーを用いて、CML 生成阻害化合物の探索を行った。

2. 実験方法

2-1. 試験化合物

本研究で用いた天然物化合物は、当研究室が保有するライブラリー化合物に含まれる代表的な植物由来二次代謝産物(アルカロイド、テルペノイド、フラボノイドなど)であり、計96種を選出して用いた。

2-2. CML 生成阻害試験

リボース (30mM) とゼラチン (2mg/mL) もしくは、I 型コラーゲン (1.5mg/mL) の混合溶液を 37℃ で 7 日間インキュベートすることで CML が生成する条件下に、DMSO に溶解した天然化合物 (100 μM) を添加し、CML 生成に



Search for natural compounds inhibiting AGE formation for preventing skin aging

Yukio Fujiwara

Department of Cell Pathology, Graduate School of Medical and Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University

対する阻害作用を、抗CML抗体を用いたELISA法にて評価した。

2- 3. ELISA

ELISAによるCML含量の評価は、Nagaiらの方法に準じて行った⁶⁾。リボース-ゼラチン(10 μ g/ml)を96穴プレートにコーティングし、0.05%Tween 20を含むPBS(washing buffer)で3回洗浄後、0.5%ゼラチンにてブロッキングを行った。各wellをwashing bufferで洗浄し、抗CML抗体(6D12)を添加後、1時間インキュベートした。各wellを洗浄後、HRP標識抗マウスIgG抗体と1時間インキュベートし、最後にOPDにて発色反応後、1Mの硫酸にて反応を停止した。各wellの492nmにおける吸光度をmicro-ELISA plate readerにより測定した。

2- 4. 繊維芽細胞の3次元培養

ヒト真皮線維芽細胞は、JCRB細胞バンクより購入した。ヒト真皮線維芽細胞(4.0 $\times 10^5$ cells/well)を培地で懸濁させた溶液に、I型コラーゲン溶液を加え、培養チャンバー内で培養することで、I型コラーゲンマトリックスに線維芽細胞を包埋した。2日後、凝固したマトリックスを培養チャンバーより剥離し、8日間培養後することで、正常に収縮するマトリックスを形成させた。

2- 5. ウェスタンブロット法

ウェスタンブロットによるMAPキナーゼの活性化の評価は、これまでの報告に準じて行った⁵⁾。37 $^{\circ}$ Cで7日間インキュベートした各種コラーゲン溶液(I型コラーゲン溶液、リボース-I型コラーゲン溶液、天然化合物を添加したリボース-I型コラーゲン溶液)にて、3時間刺激したヒト真皮線維芽細胞を回収し、lysis bufferを用いて細胞を溶解させた。電気泳動には、10%ポリアクリルアミドゲルを用いた。また、一次抗体は、Rabbit monoclonal anti-Phospho-p38 antibody, Rabbit polyclonal anti phospho-(JNK1+JNK2) antibody, Mouse monoclonal anti- β -actin antibodyを用いて行った。

2- 6. 免疫組織化学染色

37 $^{\circ}$ Cで7日間インキュベートした各種コラーゲン溶液(I型コラーゲン溶液、リボース-I型コラーゲン溶液、天然化合物を添加したリボース-I型コラーゲン溶液)にて刺激したヒト真皮線維芽細胞を4%パラホルムアルデヒドにて固定後、パラフィンにて包埋した。続いて、パラフィン切片を作製後、定法により抗CML抗体(6D12)およびRabbit polyclonal anti-cleaved caspase-3 antibodyを用いた免疫染色を行った。

3. 結 果

3- 1. CMA 生成阻害作用を有する天然化合物のスクリーニング

1次スクリーニングとして、リボースとゼラチン(可溶性コラーゲン)を用いたCML生成阻害試験系にて、96種の天然化合物のCML生成阻害作用を評価した。方法としては、リボース(30mM)とゼラチン(2mg/mL)の混合溶液を37 $^{\circ}$ Cで7日間インキュベートすることでCMLが生成する条件下に、天然化合物(100 μ M)を添加し、CML生成に対する阻害作用を、抗CML抗体を用いたELISA法にて評価した。その結果、rutin, astragalín, chlorogenic acidを含む10種の化合物が有意なCML生成阻害試験作用を示した(Fig. 1A)。次に、2次スクリーニングとして、リボースとI型コラーゲンを用いたCML生成阻害試験系にて、1次スクリーニングで阻害作用の認められた10種の化合物の効果を同様に評価した。その結果、rutin, astragalín, quercetin, gallic acidの4種類の化合物に顕著なCML生成阻害作用が認められた(Fig. 1B and C)。

3- 2. 線維芽細胞の3次元培養を用いた皮膚老化予防作用の検討

肌の張りは、真皮中に存在する線維芽細胞がコラーゲンを引っ張ることで保たれている。通常、正常なコラーゲンマトリックス中で線維芽細胞を培養すると、線維芽細胞がI型コラーゲンを引っ張り引き締めることで弾力のある真皮類似構造を形成し、マトリックスの収縮が観察されるが、CML化コラーゲンマトリックス中では、その収縮率が低下する。そこで、上記のスクリーニングで得られた4種(rutin, astragalín, quercetin, gallic acid)のCML生成阻害化合物を添加したコラーゲンを用いて、マトリックスの収縮に対する効果を検討した。方法としては、ヒト真皮線維芽細胞(4.0 $\times 10^5$ cells/well)を培地で懸濁させた溶液に、Native-collagen溶液、CML-collagen溶液(riboseとnative-collagenの混合溶液を7日間インキュベートしたもの)もしくは、CML生成阻害化合物で処理したcollagen溶液(CML-collagenを調製する条件下にCML生成阻害化合物を添加したもの)を加え、培養チャンバー内で培養することで、コラーゲンマトリックスに線維芽細胞を包埋した。2日後、凝固したマトリックスを培養チャンバーより剥離し、8日間培養後に収縮したマトリックスの直径を測定することで評価した。その結果、CML-collagenを用いたマトリックスではnative-collagenを用いた場合に比べて、その収縮率が低下し、その収縮率の低下は、CML生成阻害化合物により改善された(Fig. 2)。

前述したように、rutin, astragalín, quercetin, gallic acidは、コラーゲンのCML化により低下したマトリックスの

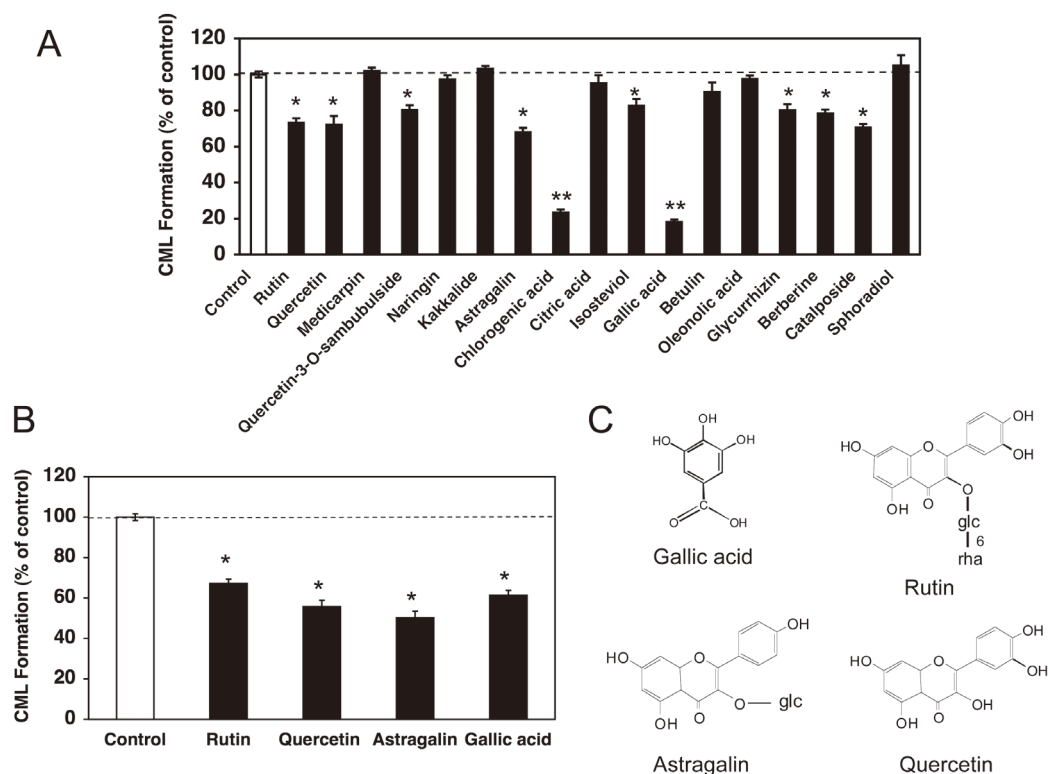


Fig. 1 Effect of Natural compounds on CML formation. (A) Gelatin (2mg/mL) and ribose (30mM) were incubated with natural compounds (100 μ M) in 100 mM sodium phosphate buffer at 37°C for 7 days. (B) Type I collagen (1.5mg/mL) and ribose (30 mM) were incubated with natural compounds (30 μ M) in 100 mM sodium phosphate buffer at 37°C for 7 days. The CMA content was determined by noncompetitive ELISA. (C) Structures of natural compounds inhibiting CML formation. Data are presented as the mean $\pm$ SD. *, $P < 0.01$, **, $P < 0.001$ vs. control.

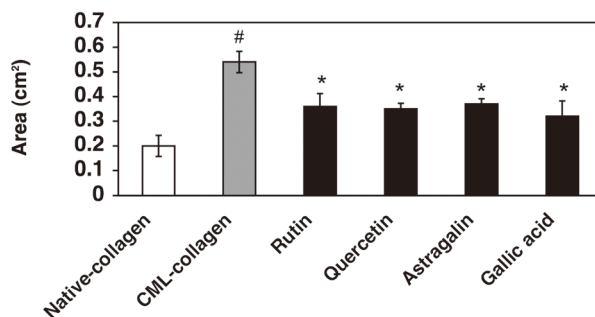


Fig. 2 Effect of Natural Compounds on Contraction of Collagen Matrix. Fibroblasts (4.0×10^4 cells/well) were cultured in type I collagen matrix for 12 days. Data are presented as the mean $\pm$ SD. #, $P < 0.005$ vs. Native-collagen, *, $P < 0.005$ vs. CML-collagen.

収縮率を改善したため、その改善作用がCML生成阻害作用によるものであるかを確認するために、マトリックス中のCML含量を、抗CML抗体を用いた免疫染色により評価した。その結果、マトリックスの収縮率が低下したコントロールではCMLの蓄積が確認され、その蓄積は、rutin, astragaloside, quercetin, gallic acidの添加により抑制されていた (Fig. 3)。ゆえに、rutin, astragaloside, quercetin, gallic acidによるマトリックス収縮改善作用は、これら化合物のCML生成阻害作用によることが示唆された。また、マトリックス中の線維芽細胞の形態を、HE染色によって確認

したところ、CML化コラーゲン中では、線維芽細胞の形態が丸くなり、Native collagenと比較して、明らかに細胞死が誘導されていた (Fig. 4)。一方、CML生成阻害化合物 (rutin, astragaloside, quercetin, gallic acid) を添加したマトリックス中の線維芽細胞は、Native collagenと比較して変化の無い正常な形態であった (Fig. 4)。さらに、カスパーゼ3の活性化を免疫染色により評価したところ、CML-collagenでは、カスパーゼ3は活性化しており、その活性化はCML生成阻害化合物により抑制された (Fig. 5) ゆえに、CML生成阻害化合物によるマトリックスの収縮率の

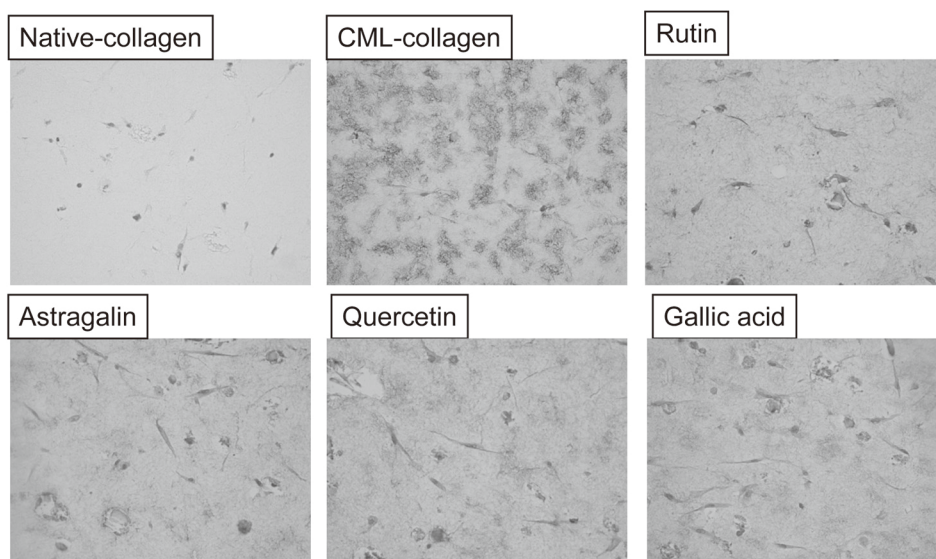


Fig. 3 CMA Accumulation in Collagen Matrix.

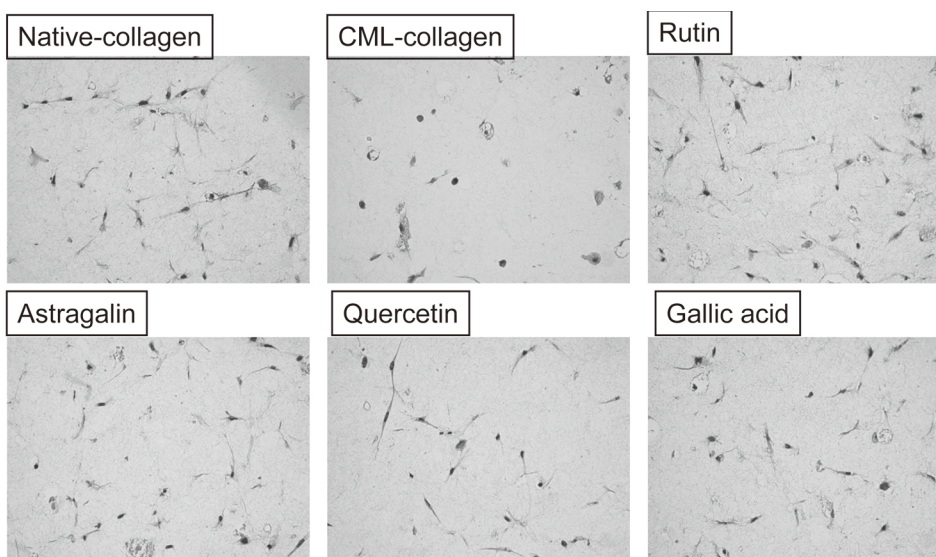


Fig. 4 HE Staining of Fibroblasts in Collagen Matrix.

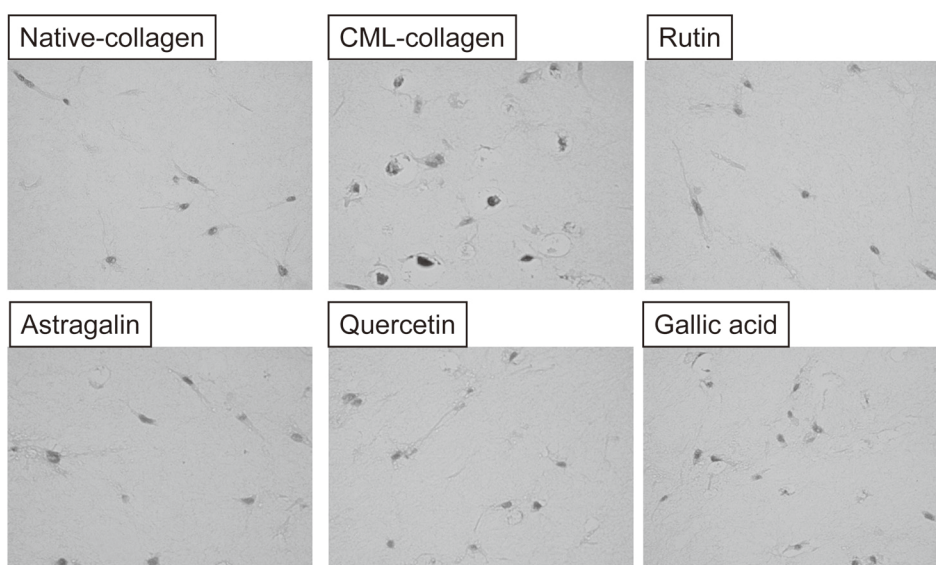


Fig. 5 Caspase-3 Activation in Collagen Matrix.

改善は、それら化合物がコラーゲンの CML 化を阻害したことで線維芽細胞のアポトーシスが抑制されたためであることが示唆された。

3-3. CML 生成阻害化合物による線維芽細胞のアポトーシス抑制メカニズム

次に、CML 生成阻害化合物が線維芽細胞のアポトーシスを抑制するメカニズムを解明することにした。CML 化タンパクは、RAGE を介して JNK や p38 などの MAP kinase を活性化することで、細胞をアポトーシスに導くことが報告されている^{3,5)}。そこで、本研究では、CML 化コラーゲンによる p38 および JNK の活性化に対する CML 生成阻害化合物の効果を検討した。方法としては、ヒト真皮線維芽細胞に CML-collagen または CML 生成阻害化合物で処理したコラーゲンを 3 時間添加後の phosphorylated-JNK および phosphorylated-p38 の発現量をウェスタンブロット法にて評価した。その結果、CML 生成阻害化合物は、コラーゲンの CML 化による p38 および JNK の活性化を顕著に抑制した (Fig. 6)。ゆえに、CML 生成阻害化合物は、コラーゲンの CML 化を抑制することで、CML-collagen により誘導される JNK, p38 の活性化を抑制し、結果的に線維芽細胞のアポトーシスを抑制することで、三次元培養におけるマトリックスの収縮率の低下を改善したものと考えられた。

4. 考 察

一次スクリーニングにより得られた 10 種の CML 生成阻害化合物について、I 型コラーゲンを用いた二次スクリーニングを行ったところ、rutin, astragal, quercetin, gallic acid の 4 種の化合物が、顕著な CML 生成阻害作用を示した (Fig. 1)。また、これら 4 種の CML 生成阻害化合物は、

線維芽細胞の三次元培養において、コラーゲンの CML 化に伴うコラーゲンマトリックスの収縮率の低下を改善した。その理由として、CML コラーゲンのマトリックスでは、線維芽細胞のアポトーシスが起るためマトリックスの収縮率の低下が引き起こされたが、CML 生成阻害化合物で処理したマトリックスでは、線維芽細胞のアポトーシスが抑制されたため、マトリックスの収縮率の改善が認められた。また、そのアポトーシス抑制メカニズムは、CML コラーゲンにより活性化される MAP kinase (JNK, p38) 経路の抑制によるものであった。つまり、CML 生成阻害化合物は、コラーゲンの CML 化を抑制することで、CML-collagen により誘導される JNK および p38 の活性化を抑制し、結果的に線維芽細胞のアポトーシスを抑制したため、三次元培養におけるマトリックスの収縮率の低下を改善したものと考えられた。本研究において、4 種の天然由来化合物 (rutin, astragal, quercetin, gallic acid) が有する皮膚老化改善作用および、その作用メカニズムを解明したことで、CML が皮膚老化改善作用における新たなターゲット分子として重要であることが示された。さらに、本研究では CML-collagen が引き起こすと考えられる病態や老化症状のうち、特に皮膚老化に注目して研究を行ったが、CML-collagen は皮膚老化のみならず骨粗鬆症や糖尿病合併症の原因物質であるとも考えられているため、今後さらに CML の生体に及ぼす影響が明らかになることで、CML 阻害剤の重要性が高まり、本研究で得られた知見や CML 阻害化合物の社会的利用価値が高まることが期待される。

謝 辞

当該研究テーマおよび関連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。

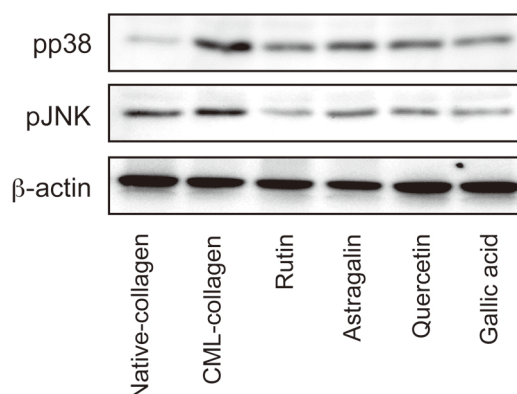


Fig. 6 Effect of Natural Compounds on MAP kinase (p38, JNK) Activation. Human dermal fibroblasts were incubated for 3 hours with 400 μ g/mL CML-collagen, unmodified collagen or natural compounds (30 μ M)-treated collagen. The phosphorylation of p38 and JNK were analyzed by western blotting analysis.

(参考文献)

- 1) Fujiwara Y, Kiyota N, Hori M et al, Esculeogenin A, a new tomato sapogenol, ameliorates hyperlipidemia and atherosclerosis in ApoE-deficient mice by inhibiting ACAT. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 ; 27 : 2400-2406.
- 2) Matsuse T, Ohga E, Teramoto S et al, Immunohistochemical localisation of advanced glycation end products in pulmonary fibrosis. *J Clin Pathol.* 1998 ; 51 : 515-519.
- 3) Alikhani Z, Alikhani M, Boyd CM et al, Advanced glycation end products enhance expression of pro-apoptotic genes and stimulate fibroblast apoptosis through cytoplasmic and mitochondrial pathways. *J Biol Chem.* 2005 ; 280 : 12087-12095.
- 4) Morita K, Urabe K, Moroi Y et al, Migration of keratinocytes is impaired on glycated collagen I. *Wound Repair Regen.* 2005;13:93-101.
- 5) Alikhani M, Maclellan CM, Raptis M et al, Advanced glycation end products induce apoptosis in fibroblasts through activation of ROS, MAP kinases, and the FOXO1 transcription factor. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 292 : C850-856.
- 6) Nagai R, Ikeda K, Higashi T et al, Hydroxyl radical mediates N epsilon-(carboxymethyl) lysine formation from Amadori product. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 234 : 167-172.

抗酸化性乳化剤の機能性化粧品としての利用に関する基礎的研究

近畿大学工学部生物化学工学科

渡 邊 義 之

Octanoyl, lauroyl and palmitoyl ascorbates as antioxidative emulsifier were synthesized by the condensation of ascorbic acid and the corresponding fatty acids in acetone using an immobilized lipase from *Candida antarctica*. The oxidation process of methyl linoleate as an oil droplet in the O/W emulsion with ascorbic acid or acyl ascorbate was measured at 40°C, and their antioxidative properties against the oxidation were examined. Hydrophilic prooxidant, AAPH, or lipophilic prooxidant, AMVN, was added to the water or oil phase to investigate the properties, and the kinetic parameters for the oxidation expressed by the Weibull equation were evaluated.

It was suggested that most of the ascorbic acid molecules in the emulsion would be present in the water phase due to its high hydrophilicity and suppress the AAPH-induced oxidation on the interface between the water and oil phases. Lauroyl and palmitoyl ascorbates would be dissolved in the oil phase and contribute to the suppression of the oxidation in the oil phase rather than on the interface. Octanoyl ascorbate, whose hydrophilic-lipophilic balance number is 11.8, would be in both phases. Regardless of the presence and type of the ascorbate, the rate constant, k , of the Weibull equation decreased as the pH of the water phase increased.

1. 緒 言

脂質は人の食生活に必要不可欠なばかりでなく、化粧品・医薬品・化成品の原料として日常生活に欠くことのできない物質である。しかし、脂質の主要な構成成分である不飽和脂肪酸は酸化安定性が低く、酸化脂質は生体に対して悪影響を及ぼし様々な疾病を引き起こすため、脂質の酸化現象は品質管理の上で大きな問題になっている。特に、近年優れた生理活性が注目されているエイコサペンタエン酸(EPA)やドコサヘキサエン酸(DHA)を構成脂肪酸とする高度不飽和脂質類に対し、効果的な酸化防止策をいかに講ずることができるかは大きな課題である。そこで、我々は酵素を用いて多価不飽和脂肪酸等の各種脂肪酸にビタミンC(L-アスコルビン酸)等の水溶性抗酸化剤を縮合させることによりアシルアスコルビン酸を合成した¹⁾。得られた生成物は、親油性基と親水性基を併せ持つ可食性界面活性剤となり得る。また、アスコルビン酸の抗酸化性の発現に寄与する分子内のエンジオール-ラクトン共鳴構造が特異的に保持されるため、機能性の高い脂質を豊富に含む化粧品に対し酸化防止剤として利用することが可能となる。さらに、酵素合成したアシルアスコルビン酸は、食しても腸管において体内のリパーゼにより基質であるアスコルビン酸と脂肪酸に分解して吸収されるため、可食性であると

考えられる。生体にも環境にも優しい機能性化粧品としての利用が期待される。

本研究は、抗酸化性乳化剤を化粧品での一般的な形態であるエマルション系にて利用した場合のその抗酸化作用および乳化特性を測定し、系内の脂質に対する作用挙動を明らかにすることを目的とする。このことにより、化粧品に代表とされる各種化学製品の化学的および物理的安定性を抗酸化性乳化剤を用いることによって改善・向上させるための一助になるものと考え、アシル鎖長の異なるアシルアスコルビン酸を合成し、それらのO/W型エマルション系での脂質酸化及ぼす影響について二種類の酸化促進剤を用いて検討した。また、アシルアスコルビン酸を使用した際のエマルション中のpHの影響についても併せて検討した。さらに、アシルアスコルビン酸を用いて調製したO/W型エマルション系の外水相に含まれる水溶性物質の安定性についても速度論的解析を行った。

2. 実 験

2.1 材 料

水溶性酸化促進剤として2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオンアミジン)二塩酸塩(AAPH)を、油溶性酸素促進剤として2,2'-アゾビス(2,4-ジメチルバレロニトリル)(AMVN)を使用した。O/W型エマルション系の内油相にはリノール酸メチルを使用し、これを酸化指標物質とした。また、外水相に含まれる水溶性物質の安定性評価には、(+)-カテキンを用いた。アシルアスコルビン酸は、*Candida antarctica*由来の固定化リパーゼChirazyme® L-2 C2の位置特異的触媒作用を利用してL-アスコルビン酸とオクタン酸、ラウリン酸またはパルミチン酸との縮合



Studies on application of antioxidative emulsifier as functional cosmetics

Yoshiyuki Watanabe

Department of Biotechnology and Chemistry, School of Engineering, Kinki University

反応により合成された。これらの精製は、既報のものに一部修正を加えて実施した²⁾。

2.2 O/W型エマルジョンの調製

1.0% (w/v) のデカグリセリンモノラウリン酸エステル ML-750水溶液 5 ml にリノール酸メチル 5 ml を加え、氷冷しながら、ロータ/ステータ式ホモジナイザを用いて予備乳化した (10,000rpm, 5 分間)。この粗エマルジョンを孔径 0.8 μm の親水性セルロースアセテート膜に供して膜乳化を実施し、O/W 型エマルジョンを得た。なお、AAPH を使用する場合は ML-750 水溶液に、AMVN を利用する際にはリノール酸メチルに、それぞれ 1.0% (w/v) となるように添加した。抗酸化剤を添加する場合、1, 10 または 100 $\mu\text{mol/l}$ のアスコルビン酸、オクタノイル、ラウロイルまたはパルミトイルアスコルビン酸を添加した。また、pH の影響について検討する場合には、塩酸-酢酸ナトリウム緩衝液を用いて pH 3, 4 または 5 に調整した水相を使用した。得られた O/W 型エマルジョンは、暗所中 40℃ にて 200 rpm で攪拌しながら保存した。

経時的に採取した O/W 型エマルジョンを蒸留水にて 100 から 500 倍に希釈後、遠心沈降式粒度分布測定装置にて油滴粒子径の測定を行った。

2.3 油滴の酸化安定性

O/W 型エマルジョン液 100 μl を採取し、これにクロロホルム/メタノール溶液 (2/1 (v/v)) を 300 μl 加え、よく混ぜた。15,000 rpm で 5 分間遠心分離した後、油相を 50 μl 取り出し、溶媒を蒸散させた。その後、ヘキサン/ミリスチン酸メチル混合液 (100/2 (v/v)) を 300 μl 添加してガスクロマトグラフィ分析用試料とした。ガスクロマトグラフィ分析には、水素炎イオン化検出器およびキャピラリーカラム (0.32 $\phi\text{mm} \times 15\text{m}$, 0.2 μm ポリエチレングリコール) を用いた。キャリアガスには窒素を用い、流量 1.8 ml/min にて測定した。カラム温度は 180℃ とし、インジェクタおよびディテクタ温度はいずれも 200℃ であった。なお、ミリスチン酸メチルは内部標準物質として利用した。

2.4 外水相カテキンの安定性

O/W 型エマルジョン調製時に所定量のカテキン (1 mmol/l) およびオクタノイルアスコルビン酸またはアスコルビン酸 (1 $\mu\text{mol/l}$ ~ 3.76 mmol/l) を添加して、暗所中 40℃ にて保存した。経時的にサンプリング後、遠心分離にて水相を取り出し、高速液体クロマトグラフィにてカテキン残量を測定した。ODS カラム (4.6 $\phi\text{mm} \times 250\text{mm}$) を用いて 280 nm にて検出した。溶離液にはメタノール/水/リン酸 = 20/80/0.5 (v/v/v) を用い、流量は 1.0 ml/min とした。

3. 結果および考察

3.1 油滴の酸化安定性に及ぼすアシルアスコルビン酸の濃度およびアシル鎖長の影響

親水性酸化促進剤 AAPH または親油性酸化促進剤 AMVN を水相または油相に添加した O/W 型エマルジョン中でのリノール酸メチルの酸化過程に及ぼす 1 $\mu\text{mol/l}$ のアシルアスコルビン酸およびアスコルビン酸の影響を図 1 に示す。同様に 10 および 100 $\mu\text{mol/l}$ の各種抗酸化剤を添加した場合の酸化過程も得た。保存期間中の油滴粒子径の測定結果から、平均粒子径は約 4.5 μm でほぼ一定であった。エマルジョン中のリノール酸メチルの酸化過程に式 1 に示す Weibull モデル³⁾を適用して速度論的解析を試みた。

$$Y = \exp [-(kt)^n] \quad \text{式 1}$$

ここで Y はリノール酸メチルの未酸化率、 k は酸化速度定数、 t は時間および n は形状定数である。図 1 中の実線は、算出した Weibull パラメータを用いて描いた計算線である。図 2 に酸化速度定数と各種抗酸化剤濃度の関係を示す。図 2 中の点線は、抗酸化剤を含まない場合の酸化速度定数を示している。抗酸化剤を添加した場合の k 値は、いずれも抗酸化剤を含まない場合よりも低かった。これは、AAPH および AMVN 添加に関係なく抗酸化剤がリノール酸メチルの酸化抑制に寄与したことを示している。AAPH 添加系では、アスコルビン酸濃度が増えるに従い k 値は大きく低下した。オクタノイルアスコルビン酸も同様な傾向が認められたが、その程度はアスコルビン酸よりも小さかった。ラウロイルおよびパルミトイルアスコルビン酸を添加した場合、 k 値はそれらの濃度に依存せず、抗酸化剤を含まないコントロールに近い値を示した。我々は、アスコルビン酸と各種飽和アシルアスコルビン酸のラジカル消去活性がほぼ同等である知見を得ている⁴⁾。したがって、親水性の高い抗酸化剤が水溶性酸化促進剤による油相の酸化を抑制し、一方親水性が低い場合には酸化抑制に寄与できなかったものと考えられる。他方、AMVN を含んだエマルジョンでは、アスコルビン酸濃度の増加により若干 k 値が低下したが、10 および 100 $\mu\text{mol/l}$ の添加では変化がなかった。アシルアスコルビン酸を添加した場合、AAPH 添加系と異なり、それらの濃度が増えると k 値が増大する傾向が求められた。AMVN 添加系では、いずれの抗酸化剤濃度においても k 値は、アスコルビン酸 > オクタノイル > ラウロイル > パルミトイルアスコルビン酸の順に高かった。すなわち、アシル鎖長が長いほど、親油性酸化促進剤により促される油相の酸化に対する抑制効果が大きかった。しかしながら、抗酸化剤濃度の増大に伴い k 値が高くなった。以上の結果から、親水性の高いアスコルビン酸分子の多くは

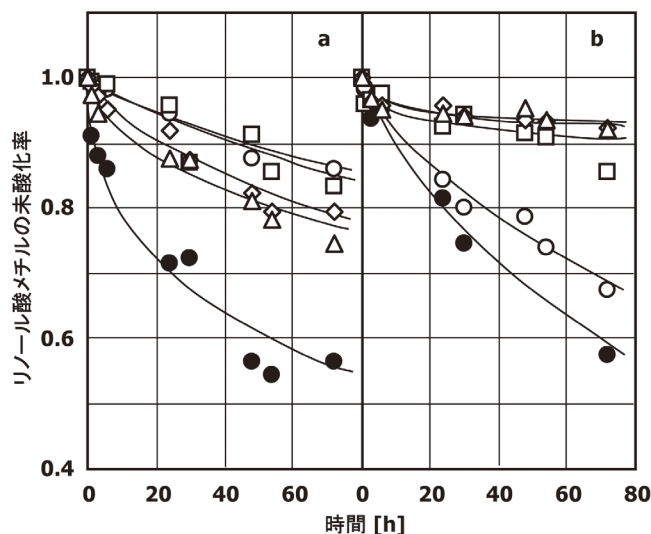


図1 (a) AAPH および (b) AMVN 添加系にて $1\mu\text{mol/l}$ の (○) アスコルビン酸, (□) オクタノイル, (◇) ラウロイルまたは (△) パルミトイルアスコルビン酸を含んだ O/W 型エマルジョン中のリノール酸メチルの 40°C での酸化過程 (●は抗酸化剤を含まないコントロール). 実線は Weibull パラメータを用いて算出された計算線を示す.

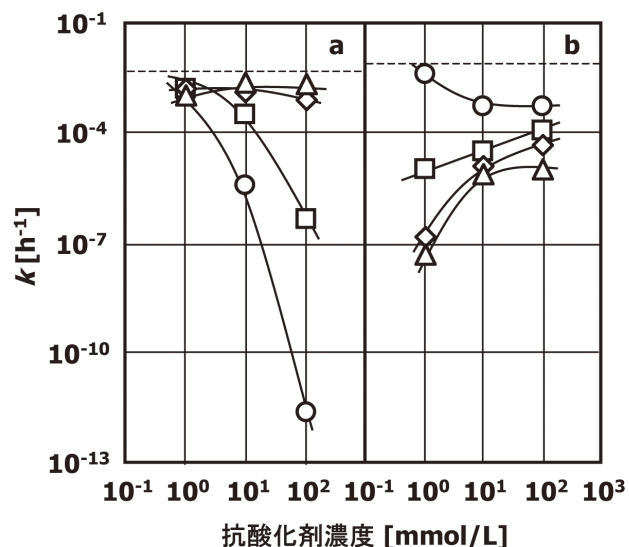


図2 (a) AAPH および (b) AMVN を添加した O/W 型エマルジョン中のリノール酸メチルの酸化速度定数, k , に及ぼす抗酸化剤濃度の影響 (シンボルは図 1 に同じ). 点線は, 抗酸化剤を含まない場合の k 値を示す.

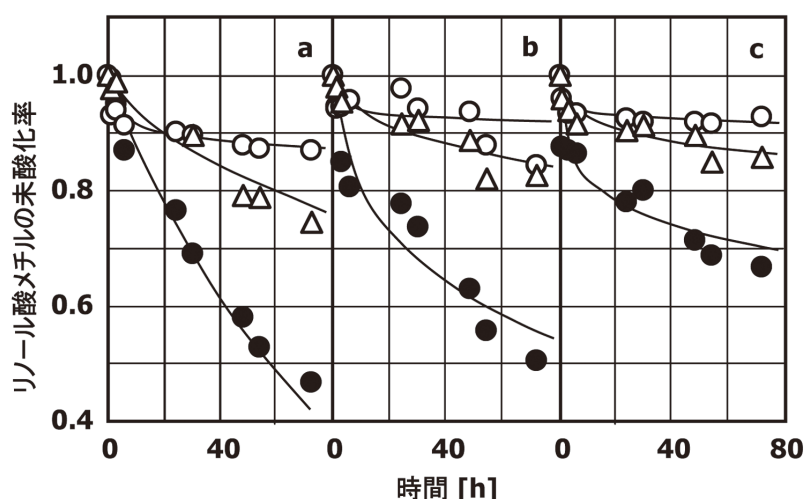


図3 (a) pH 3, (b) pH 4 および (c) pH 5 にて $100\mu\text{mol/l}$ の (○) アスコルビン酸または (△) パルミトイルアスコルビン酸を含んだ O/W 型エマルジョン中のリノール酸メチルの酸化安定性 (●は抗酸化剤を含まないコントロール).

実線は Weibull パラメータを用いて算出された計算線を示す.

エマルジョン中の水相に存在しており, AAPH に起因した油相界面からのリノール酸メチルの酸化を効果的に抑止し, 一方で AMVN による油相内部での酸化には強い抑制効果を示さなかったものと考察される. 対照的にラウロイルおよびパルミトイルアスコルビン酸分子は油相内に溶解し, 油相界面よりも油相内部で生じる酸化に対し抑制効果を示したものと考えられる. 高濃度の抗酸化剤は, 酸化促進作用を示すことが知られている⁵⁾. 油相に溶解した多くのアシルアスコルビン酸分子が部分的に油相内部での酸化を促し, その結果その酸化抑制効果が低下したものと推察

される.

形状定数については, 酸化促進剤の種類, 抗酸化剤濃度およびアシル鎖長との顕著な関係性が認められなかったが, いずれの場合も 1 より小さい値を得た. いずれの系においても誘導期間を経ずに酸化が進行したことが示唆された.

3.2 種々の pH におけるアシルアスコルビン酸とアスコルビン酸の酸化抑制作用の比較

pH 3, 4 および 5 の AAPH 添加エマルジョン系でのリノール酸メチルの酸化過程に及ぼすパルミトイルアスコ

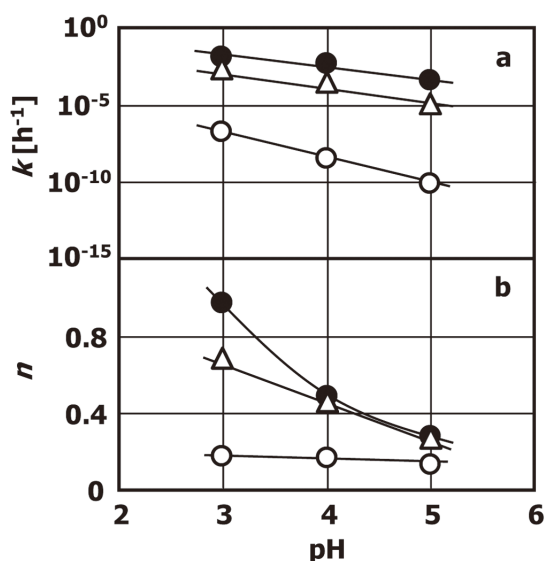


図4 O/W型エマルジョン中のリノール酸メチルの酸化に対する (a) 酸化速度定数, k , および (b) 形状定数, n , の pH 依存性 (シンボルは図3に同じ).

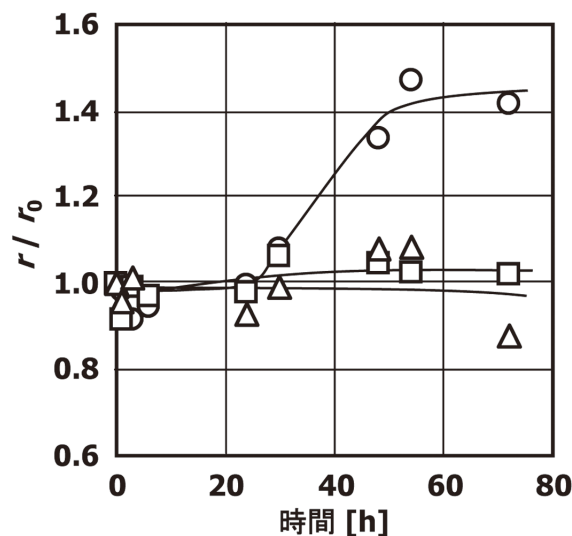


図5 (○) pH 3, (□) pH 4 および (△) pH 5 における O/W 型エマルジョンの乳化安定性. r 値は油滴粒子径, r_0 はその初期値を示す.

ルビン酸およびアスコルビン酸の影響を図3に示す. また, 得られた結果にWeibull式を適用して算出した k および n 値のpH依存性を図4に示す. いずれの場合も, pHが高くなるにつれ k 値は低下した. いずれのpHにおいてもアスコルビン酸を添加した場合に最も低い k 値が観察され, コントロールで最も高かった. 水相中のAAPHにより誘発された酸化はアスコルビン酸により強く抑制され, パルミトイルアスコルビン酸の抑制効果は小さかった. この結果は, 前述したアシルアスコルビン酸およびアスコルビン酸の作用挙動についての考察を支持するものと考えられる. 図5にpH 3, 4および5の抗酸化剤を含まないエマルジョンの乳化安定性を示す. pH 4および5の場合, エマルジョンは安定であったが, pH 3では時間とともに油滴粒子径が増大した. したがって, pH 3でのリノール酸メチルの低い酸化安定性は, 油滴粒子の合一や凝集にともなう乳化安定性の低下に起因したのと考えられる⁶⁾. 同様の傾向は抗酸化剤を添加した場合にも観察された. しかしながら, アスコルビン酸を添加した場合の k 値のpH依存性はパルミトイルアスコルビン酸のそれよりも強かった. これは, pHの増大により水相中のアスコルビン酸分子内のエンジオール基の解離を通して, その電子供与能が高まったことに由来したのと考えられる⁷⁾. 一方, 油相中のパルミトイルアスコルビン酸にはこのような現象が生じなかったと推察される.

パルミトイルアスコルビン酸を添加した場合とコントロールでの n 値はpHに強く依存した. 対照的にアスコルビン酸添加系での n 値はほぼ一定であった. これはアスコルビン酸のエマルジョン中での局在化に起因する酸化抑制効

果が強いため, pHによる直接的な影響が弱かったことによるものだろう.

3.3 外水相成分の安定性に及ぼすアシルアスコルビン酸の影響

O/W型エマルジョン中でのカテキンの安定性に及ぼすアスコルビン酸およびオクタノイルアスコルビン酸の影響について検討した. カテキンの分解過程に式1を適用してその分解速度定数 k を安定性の指標とした. いずれも10 μ mol/l以下の添加でコントロールの k 値よりも低い結果が得られ, カテキンの分解が抑制されたことが示された. 一方, 1 mmol/l以上の添加では k 値がコントロールよりも高かった. アスコルビン酸とオクタノイルアスコルビン酸の添加による顕著な差異は認められなかった. 水溶液中のカテキンの分解は, 溶存酸素によるカテキン分子内のB環の一電子酸化から始まり, その結果セミキノラジカルが生成することが知られている⁸⁾. Davies式から算出されるオクタノイルアスコルビン酸の親水性親油性バランスは11.8である⁹⁾. これらの現象についての理由は不明であるが, 今後, より親油性の高いアシルアスコルビン酸を用いて実験を進めることにより, O/W型エマルジョン系での水溶性物質に対する抗酸化性乳化剤の作用挙動が解明されるものと考えられる.

4. 総括

O/W型エマルジョン中での油滴酸化に対する抗酸化性乳化剤の作用は, その親水性親油性バランスのような特性により大きな差異を示すことが明らかとなった. また, エ

マルションのpHも乳化および酸化安定性に寄与するだけでなく、抗酸化性乳化剤の酸化抑制効果にも影響を及ぼすことが示唆された。さらに、O/W型エマルション中の水溶性成分の安定性も抗酸化性乳化剤の濃度に依存することが示された。これらのことから、抗酸化性乳化剤の利用には目的に応じた効果的な特性を有する材料とその使用量の選定が肝要であるといえよう。

謝 辞

本研究を実施するにあたりご支援頂いた財団法人コスメトロジー研究振興財団に深く感謝致します。

(参考文献)

- 1) Watanabe Y, Adachi S, Nakanishi K, *et al.*: Condensation of L-ascorbic acid and medium-chain fatty acids by immobilized lipase in acetonitrile with low water content, *Food Sci. Technol. Res.*, 5, 188-192, 1999.
- 2) Yan Y, Bornscheuer UT, Schmid RD: Lipase-catalyzed synthesis of vitamin C fatty acid esters, *Biotechnol. Lett.*, 21, 1051-1054, 1999.
- 3) Cunha LM, Oliveira FAR, Oliveira JC: Optimal experimental design for estimating the kinetic parameters of processes described by Weibull probability distribution function, *J. Food Eng.*, 37, 175-191, 1998.
- 4) Watanabe Y, Kuwabara K, Adachi S, *et al.*: Production of saturated acyl L-ascorbate by immobilized lipase using a continuous stirred tank reactor, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4628-4632, 2003.
- 5) Matsui T, Yoshida M, Ifuku T, *et al.*: Preparation of microcapsules containing α -tocopherol as an antioxidant and the application for cosmetics (in Japanese), *The research reports of the Faculty of Engineering, Kagoshima University*, 47, 71-77, 2005.
- 6) Sims R: Oxidation of fats in food products, *Inform*, 5, 1020, 1022-1028, 1994.
- 7) Muzolf M, Szymusiak H, Gliszczynska-Świąło A, *et al.*: pH-Dependent radical scavenging capacity of green tea catechins, *J. Agric. Food Chem.*, 56, 816-823, 2008.
- 8) Mochizuki, M, Yamazaki, S, Kano, K, *et al.*: Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1569, 35-44, 2002.
- 9) Davies JT: A quantitative kinetic theory of emulsion type, I. Physical chemistry of the emulsifying agent, In: *Proceedings of the Second International Congress of Surface Activity*, Butterworths Scientific Publications, London, 1957, 426-438.

Ⅱ. 生体作用、安全性に関する分野

均一径リポソームと細胞の融合のためのマイクロ流路デバイスの作成

東京大学生産技術研究所

竹内 昌治

This report describes a method for preparation of monodisperse giant liposomes from patterned lipid films using electroformation. The lipid films were patterned successfully on an indium tin oxide (ITO) electrode by a Parylene lift-off process. We found that the coefficient of variation (CV) of diameters of liposomes improved from 34 % to 7.6 % by using the patterned lipid films for liposome formation.

Giant liposomes (10 - 100 μm in diameter) are cell-sized spherical lipid membranes and can enclose bio-functional materials (e.g DNA, proteins); they can be used as an artificial cell or biological reactor. In our previous work, we have succeeded in enclosing different types of nano/micro materials in giant liposomes efficiently using microfluidic channels with electroformation method. In order to control the volume of materials enclosed in the liposomes, it is important to prepare uniform-sized liposomes. The size is also an important factor determining the success for cell-liposome fusions. Micro-contact printing of lipids using PDMS stamp to achieve size control of liposomes was reported. However, in general, PDMS tends to swell when in contact with organic solvents. Here, we have used a Parylene sheet instead of PDMS for preparing lipid patterns in order to avoid such a swelling problem. Also, the Parylene sheet has advantages that it can be patterned by standard photolithography and peeled off from the substrate easily.

Two indium tin oxide (ITO) glasses were used as electrodes and separated by a silicone spacer chamber filled with degassed water. The lipid films were patterned on the bottom ITO glass using a Parylene sheet. When AC signal (10 Hz, 0.5 - 2.5 Vpp) was applied to the top and bottom ITO electrodes, the giant liposomes were formed from the patterned lipid films. Fluorescent images of the lipids with squares of 20 μm showed clear edges of the patterned lipids on the ITO glass. Patterned lipids of 50 x 50 μm^2 square swelled and became round after applying electric field.

The size of the liposomes became larger as the size of patterned lipid films increased. When the liposomes were produced without the patterned lipid films, the size of the liposomes were widely distributed (CV = 34 %). In contrast, our preliminary experiment shows that the CV became narrow to 7.6 % when the patterned lipid films were used. These results imply that this method — electroformation of giant liposomes from lipid patterns — is useful to produce uniform-sized giant liposomes.

Finally we fabricate a device that combines microfluidic and electrical manipulation of cells or artificial vesicles in order to perform well controlled electrofusion. The actual device allows immobilizing cells or vesicles by suction onto an array of microholes and aligning different vesicles over the holes by dielectrophoresis.

1. 緒 言

近年、消費者のニーズは、高度化・複雑化し、多機能性を持った化粧品を求められるようになってきている。近い将来には、細胞に直接作用する多機能性化粧品に対する要求が今後ますます拡大すると思われる。細胞内に、物質を高効率・低侵襲な方法で導入するために、物質を含んだリポソームを細胞に融合させる方法がある。リポソームとは、リン脂質を主体に形成される二重膜の水溶液を包含した球形の小胞である。細胞膜と同様の構造を持っているため、細胞との適合性があるマイクロカプセルとして使うことができる。物質を均一な量を大量に細胞内に導入するためには、体積の揃った（直径の揃った）マイクロサイズのリポソ

ームを作成することが要求されている。本研究の目的は、直径の揃ったリポソームを効率的に作成し、リポソームと細胞と融合させることができる集約化されたマイクロ流路デバイスを実現することである。

本研究では、均一径リポソームを作成するために、筆者らの得意とするマイクロ流体デバイスを利用することに注目した。マイクロ流体デバイスを利用することによって、少量の試料で、実験に必要なさまざまな条件を変化させることができる。さらに、顕微鏡下で観察・操作を可能とするデバイスと集積化できる。具体的には以下のような機能をもつマイクロ流体デバイスを実現する。

- 1) 均一直径リポソームの作成機能：マイクロ流路内でマイクロエレクトロフォーメーション法を利用することによって、均一径のリポソームを効率よく生産する。
- 2) リポソームの操作機能（位置制御、融合）：流路内に、マイクロ電極アレイを置くことで、リポソームの位置を制御する。また細胞とリポソームに電圧をかけることにより、融合させることができるような機能を付加する。

リポソームの中でも近年、直径10から100ミクロンと大



Fabrication of microfluidic devices for the production of monodisperse liposomes and the fusion of cells

Shoji Takeuchi

Institute of Industrial Science, The University of Tokyo

さい“ジャイアント”リボソームの応用が注目されている¹⁾。その大きさから、直接顕微鏡下で観察できることが一番の利点であり²⁾、細胞と同様の大きさであることから人工細胞のモデルとして用いることができる³⁾。さらに、リボソーム内には、薬剤やDNAを包み込むことができ、マイクロサイズの容器として用いることもできる⁴⁾。

ジャイアントリボソームの生成法に、リン脂質膜で覆われた基板に電圧を印加することによって、膜を剥離させ、単層の脂質二重膜で構成させるエレクトロフォーメーション法がある¹⁾。他の方法に比べて、単一膜構造を得られやすい特徴があるが、水和法⁵⁾など他の方法と同様に、作製されたジャイアントリボソームの径には、ばらつきがある。リボソーム内に薬品やDNAを閉じ込め、人工細胞やマイクロカプセルとして用いるためには、リボソームの粒径は、知っておかなければならない重要なパラメーターであり、均一な大きさのリボソームを作製することで、リボソーム内に決まった用量の試薬を注入することが可能になる。ここでは、本プロジェクトでは、まず、均一な直径のリボソームの作製に必要な検討を開始した。続いて、リボソームや細胞の位置や固定操作が可能なデバイスを実現する。

これまでに、均一なリボソームを作製する方法として、Taylorらは、PDMS (polydimethylsiloxane) でできたスタンプを利用し、リン脂質フィルムをパターンニングする技術とエレクトロフォーメーション法を利用する方法を試みている⁶⁾。ここでは、PDMSのスタンプを使用する代わりに、マイクロ加工技術を利用して作製されたパリレン樹脂

の微細穴あきシートを用いて、リン脂質膜のパターンニングする方法を試みた。一般的にPDMSは、有機溶媒中で膨潤してしまうという問題があるが、パリレンでは、起こらない。また、パリレン樹脂は、ガラス基板に蒸着し、一般的なフォトリソグラフィの方法を用いて、簡単にマイクロサイズのパターンニング作製することができる。さらに、蒸着したパリレンは、容易に基板から剥がすことができるという利点がある⁷⁾。

以降、パリレンパターンシートを用いてリン脂質膜をパターンニングし、エレクトロフォーメーション法を用いることにより、均一径のジャイアントリボソームを基板上にアレイ状に作製する方法について検討した結果を報告する。

2. 実験

図1 (a) に実験に使用したデバイスの実験系と、図1 (b) に断面からみたプロセス図を示す。厚さ0.5mmのシリコンスペーサーの上下に電極 (ITO ガラス、大きさ: 30×40mm, 厚さ0.55mm, 10Ω/sq, 新得硝子) を配置し、内部にリン脂質の薄膜のパターンを作製する。

パリレン樹脂を用いた脂質膜のパターンニング方法とは、図1 (b) に示すように、(i) パリレン樹脂をガラスプレートに蒸着し、O₂ プラズマによりパターン化された穴あきシートを作る。その上から (ii) リン脂質と有機溶媒を混ぜた溶液を流し込み、1時間ほど乾燥させる。するとITO ガラスプレートが露出している穴の部分にリン脂質膜ができ、(iii) パリレンを剥がすとリン脂質膜のパターンが

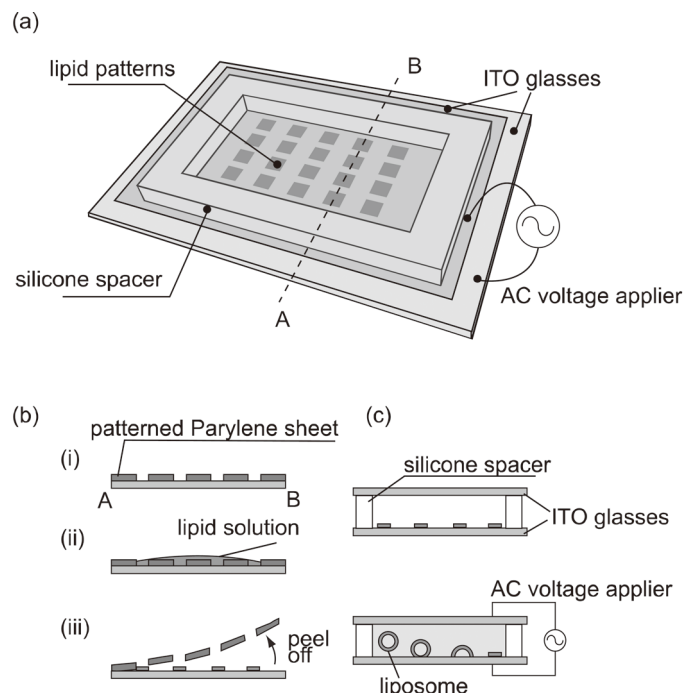


図1 (a) 均一径リボソームを作製するためのマイクロデバイスの概略図。 (b) パリレンシートによるリン脂質のパターンニング法のプロセス図。 (c) その基板を利用したマイクロチャンネル内でのエレクトロフォーメーション法。

できる。有機溶媒を完全に蒸発させるため、真空中で2時間以上乾燥させる。その後、図1(c)のように、リポソーム形成のため、シリコンチャンバー内に水溶液 (Milli-Q system; Millipore, pH=6.0) を導入し、電圧を印加することで、チャンバー内で、均一径のジャイアントリポソームの作製を試みた。

リン脂質は、ホスファチジルコリン (EPC) とホスファチジン酸 (EPA) (Sigma-Ladrich) をクロロホルムとメタノール、または、ホスファチジルコリン (EPC) をメタノールのみで溶かしたものを使用した。また、蛍光観察を行うことができるように、リン脂質を、蛍光色素 DiI (1,1'-dihexadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate, ex/em: 549/564 nm) で染色した。

パターンされたリン脂質膜やリポソームの観察は、倒立顕微鏡 (IX-70, Olympus) を用いて、蛍光観察または微分干渉観察し、CCDカメラ (ExwaveHAD, Sony, または C2741-79, Hamamatsu) を用いて撮影、ビデオで録画した。特に静止画像は、イメージプロセスソフト AquaCosmos (Hamamatsu) を用いて撮影した。ジャイアントリポソームの直径は、Image-Box software (Library Co.) を使用して計測した。

3. 結果と考察

穴あきパリレンシート上に、リン脂質溶液を流し込み乾燥させる際に、シートがITOガラス基板から剥がれてしまうことはなく、シートは、ピンセットを使い基板の端から持ち上げると簡単に剥がすことができた。図2(a)に、パリレンシートを剥がす前と後の蛍光写真をそれぞれ示す。シートを剥がす前には、基板の全体が蛍光でひかり、リン脂質が全体に付着しているのがわかる。図2(b)に示すように、シートを剥がすと、リン脂質膜パターンがITO基板上に作製されていることがわかる。正方形のパターンサイズは、 $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ で、パターン間隔は $30\mu\text{m}$ である。図2(c)にそれぞれのパターンの蛍光強度を示す。これより、パターンのエッジの境界がはっきり確認できる。以上の結果より、マイクロ加工を用いて作製された微細穴のパリレンシートを用いて、リン脂質をITOガラスの基板上にパターンすることできた。

作製されたリン脂質膜からエレクトロフォーメーション法によりジャイアントリポソームを作製することを試みた。周波数10 Hz、電圧0.5 Vの交流電場 (正弦波) を印加するとリン脂質膜が振動している様子を確認することができた。その後、電圧を1.5 Vまで次第に上げていく。それに伴い脂質膜の振動も増幅した。電場を印加してから、5 min 以内にリポソームが形成されており、図3に示すように電場による振動によりリポソーム同士が融合したり、小さなりポソームがジャイアントリポソームへと成長する様子を確認することができた。

図4に、大きさ $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ の正方形のリン脂質膜に

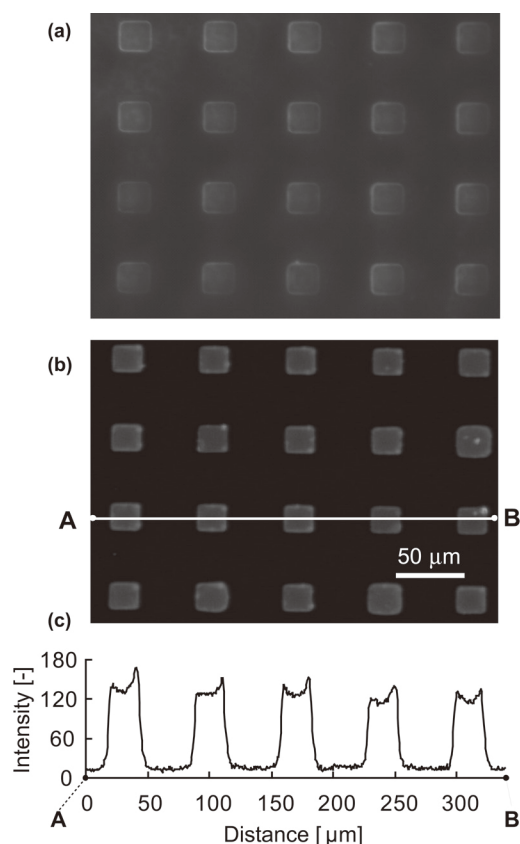


図2 (a) パリレンパターンを剥がす前の蛍光写真、(b) リン脂質膜 (正方形 $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$) をパターンした蛍光写真、(c) 断面 A-B の蛍光強度。

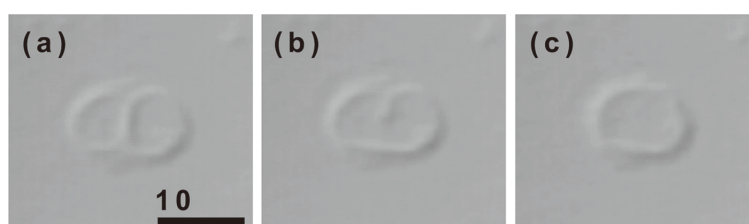


図3 リン脂質膜に電圧 AC field (1.5V, 10Hz) 印加した後のリポソームの (a) 融合前、(b) 融合中、(c) 融合後の微分干渉像。

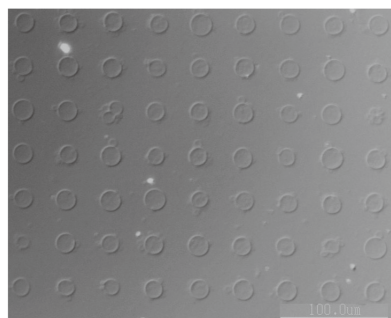


図4 脂質パターン $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ を用いて、エレクトロフォーメーション法により作製されたリポソームアレイの微分干渉像。

電圧を印加してから20min後の結果を示す。作製されたジャイアントリボソームは、その径が一番大きくなる位置で観察し、本微分干渉像は、基板の底辺から7 μm 高さに撮影されたものである。それぞれのリン脂質膜パターン上に、1つのジャイアントリボソームが形成されたが、2つ以上のジャイアントリボソームが脂質パターン上に形成されていたものもあった。ジャイアントリボソームは、アレイ状に作製され、基板上に固定されていた。ジャイアントリボソームが基板上にアレイ状に固定されていることで、例えば、ジャイアントリボソームに一種類の膜タンパク質を再構築する場合には、膜タンパク質の機構解析を効率的に行うことができるスクリーニングデバイスに応用することができる。固定されているリボソームを基板から浮遊させ、回収するには、例えば、高電圧を印加し外的な力を加えるなど、検討が必要である。

図4のジャイアントリボソームの直径を測り、直径分布を図5に示す。比較として、リン脂質パターンを使用しなかった場合の結果も図5に示す。パターンを用いた場合のリボソーム径の変動係数(CV: Coefficient of Variation)値は、脂質パターンを用いなかった場合に作製されたリボソームのCV値34%から7.6%に減少した。これより、均一径ジャイアントリボソームを作製するためには、リン脂質のパターンを使用することが有用であることが確認できた。

最後に、実際にマイクロ流体デバイス内で作成されたリボソームを操作可能な機能を実現した。具体的には、リボソームの位置制御、2種のリボソームの融合が可能なマイクロ電極アレイを組み込んだ。位置制御に関しては、誘電

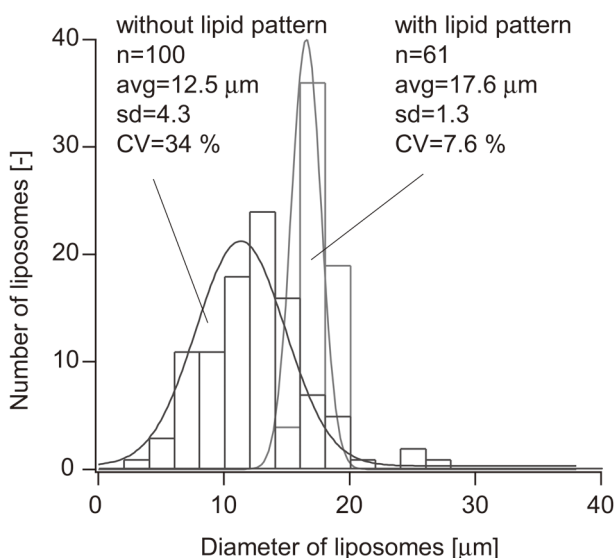


図5 エレクトロフォーメーション法により作製されたリボソームの数 vs. 直径。パターンしたリン脂質を使用しない場合と使用した場合。パターンサイズ: 10 μm ×10 μm 。変動係数 CV: 標準偏差値を平均値で割り%表示した値。

泳動などの現象を利用して、リボソームを動かした。このとき、多チャンネル信号発生装置によって、マイクロ電極間に正確に選択的な電圧を印加することにより、位置決めを効率的に実行した。図6は、パターンした電極のある流路にリボソームを導入し、写真のA-A'に電圧を印加することにより、リボソームの位置を移動させた実験の写真である。

また、移動制御させたリボソームを基板上へ整然と配置する方法として、図7のようなデバイスを開発した。このデバイスはマイクロ小孔が基板上に形成されており、その上下に流路が設置してある。上側流路にリボソームを導入し、下側流路を吸引すると、陰圧がかかり、上のリボソームが、マイクロ小孔を塞ぐようにして固定化される。このようにして、小孔の位置の設計どおりに、リボソームをアレイ化させることが可能である。写真Eは、本研究で製作したリボソーム固定用の基盤である。これを用いて、多くのリボソームや細胞を2列に配置することに成功した。

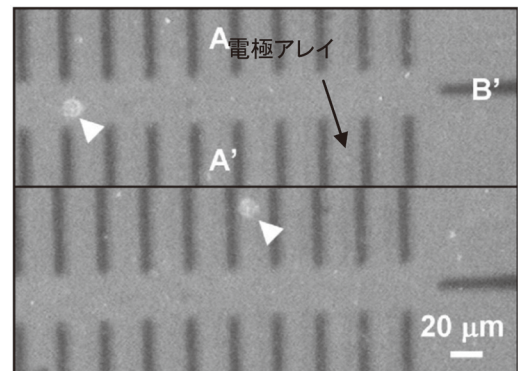


図6: 電極アレイによるリボソームの位置制御

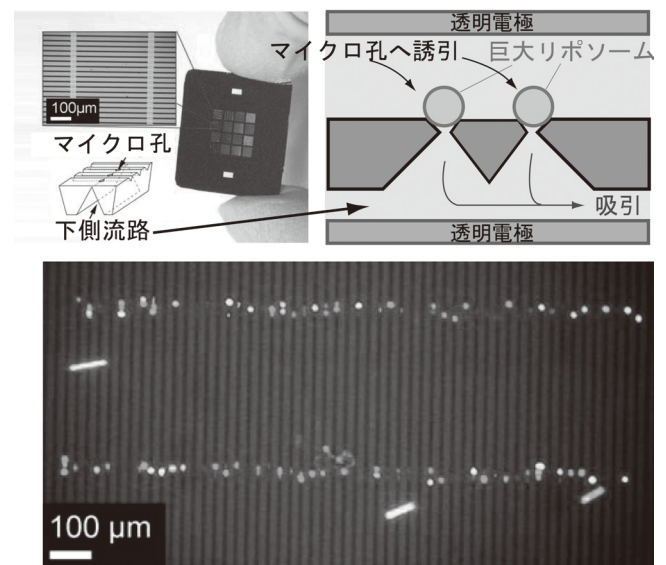


図7 リボソームや細胞の固定用基板。リボソームを固定し細胞を導入することで、リボソームと細胞の融合を試みる。この写真は細胞を固定している顕微鏡映像。

4. 総 括

本研究では、マイクロ加工技術を用いて作製されたパリレンシートにより、リン脂質膜をパターンニングすることができた。また、パターンされたリン脂質と、エレクトロフォーメーション法により、より直径分散の小さいジャイアントリポソームを基板上にアレイ状に作製することができた。さらに、マイクロ加工技術を利用してリポソームや細胞の移動や固定が可能なデバイスを実現した。これらの研究を通じて、均一直径のリポソームを得て、細胞等と融合させるためには、微細加工技術やマイクロ流体技術が有効であることが示された。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、ご支援いただきました(財)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。

(文 献)

- 1) P. L. Luisi and P. Walde: 「Why Giant Vesicles? Giant Vesicles.」, John Wiley & Sons, LTD. pp. 3-9 (2000)
- 2) M. I. Angelova and D. S. Dimitrov: 「Liposome Electroformation.」, *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, 81, pp. 303-311 and 345 (1986).
- 3) Y. Yoshikawa, T. Kanbe, and K. Yoshikawa: 「Daunomycin Triggers Membrane Blebbing and Breakage of Giant DNA Encapsulated in a Cell-Sized Liposome.」, *Chemical Physics Letters*, 366, pp. 305-310 (2002)
- 4) G. Tresset and S. Takeuchi: 「Utilization of Cell-Sized Lipid Containers for Nanostructure and Macromolecule Handling in Microfabrication Devices.」, *Analytical Chemistry*, 77, pp. 2795-2801, (2005).
- 5) J. P. Reeves and R. M. Dowben: 「Formation and Properties of Thin-Walled Phospholipid Vesicles.」, *J Cell Physiol*, 73, pp. 49-60 (1969)
- 6) P. Taylor, C. Xu, P. D. Fletcher and V. N. Paunov: 「A Novel Technique for Preparation of Monodisperse Giant Liposomes.」, *Chem Commun*, 14, pp. 1732-3 (2003)
- 7) K. Atsuta, H. Noji, and S. Takeuchi: 「Micro Patterning of Active Proteins with Perforated PDMS Sheets (PDMS Sieve) .」, *Lab on a Chip*, 4, pp. 333-336, (2004)

角層コルネオデスモゾーム分解過程の免疫電顕的解析

旭川医科大学医学部皮膚科

山本 明美

The epidermal stratum corneum provides a critical permeability barrier between the body and the environment. Our skin establishes a basket-weave like appearance in the cornified layers. The cells there are attached only at the cell periphery by corneodesmosomes which are modified desmosomes. These corneodesmosomes spare wide spaces at the central (non-peripheral) area for the lipid layers to form a continuous permeability barrier. To establish this structure while maintaining steady state thickness of the stratum corneum, degradation process of corneodesmosomes must be under strict control. Uncontrolled activation of proteases involved in this process could lead to severe skin phenotypes such as those seen in Netherton syndrome, a severe autosomal recessive disease caused by gene mutations in *SPINK5* which encodes a protease inhibitor LEKTI. Our understanding of the mechanisms which control the degradation of corneodesmosomes is limited. For example, it is unknown why corneodesmosomes persist only at the cell periphery in fully developed corneocytes. To explore this, we analyzed the precise distribution of two major components of the extracellular part of corneodesmosomes, corneodesmosin (CDSN), and desmoglein 1 (DSG1) in normal adult human epidermis. Distributions of corneodesmosomal components were analyzed using montage pictures of post-embedding immunoelectron microscopy performed on the back skin samples. The upper and lower cell surface of corneocytes from the first to the fifth layers were divided into the central half and the peripheral half, and colloidal gold particles associated with corneodesmosomes were counted and distribution densities per membrane length were calculated. Marked decrease in label densities was noted on the central areas of the upper cell surface from the second deepest layer for CDSN and DSG1. Central labeling was virtually lost by the fifth layer, whereas peripheral labeling densities were relatively high up to the fifth layer. The present study clearly demonstrated that the degradation of two major corneodesmosomal components, CDSN, and DSG1 is initiated from the central areas of corneocytes soon after the cells move into the cornified layer. This suggests that the molecular basis for the selective degradation resides in the deepest layer of the stratum corneum.

1. 緒 言

皮膚の最表層である表皮角層は生体と環境の間の物理的なバリアを形成する¹⁾。角層の構造を従来はEliasが提唱したレンガとモルタルのモデルによって説明されてきた²⁾。ここでは角層細胞はレンガに、モルタルは細胞間脂質に相当する。つまりかつては、このモルタルにたとえられた細胞間脂質が細胞間の接着をつかさどっているとされていたのである。しかし最近では細胞同士の接着は主にコルネオデスモゾームによっていることが分かってきており^{3, 4)}、細胞間接着における脂質が占める作用はあったとしてもわずかなものであらうとされている。

このコルネオデスモゾームとは角化細胞が顆粒細胞から角層細胞になるときにデスモゾームが構造変化したものである。その構成成分は顆粒細胞のデスモゾーム構成要素に加えて、細胞内の層板顆粒から提供されるコルネオデスモシン (CDSN) が新たに細胞外部分に加わっているという

特徴がある。また、微細構造的には細胞内部分ではケラチン線維が付着するアタッチメントプラークが消失し、細胞全周に形成される辺縁帯と一体化している。さらに細胞外部分はdense midline構造が失われ、全体的に電子密度の高い板状の形態を示す。分布様式では、角層下層では細胞全周に分布しているが、上層のよく分化した正常の角層細胞では辺縁部分にしか認められない。このことが顕著に現れているのが、ホルマリン固定パラフィン包埋標本で観察される角層の網状構造である。すなわちアルコール脱水、キシレン透徹処理中に細胞間に充填されていた脂質は抜けてしまうが、辺縁の接着構造であるコルネオデスモゾームは残るため、角層の全体構造が網の目状を呈するのである。逆に言うと、この辺縁の接着部位に囲まれた中央部分を水分バリアをつかさどる層状の細胞間脂質が埋めていることになる^{5, 6)}。

さて、角層の厚さを一定に保ちながらこの構造をとるためには、コルネオデスモゾームの分解過程が精密に制御されている必要がある。その制御機構の重要性は、この分解過程が遅延すると老化した皮膚や冬期の乾燥肌にみられるような角層の肥厚をきたし⁷⁾、逆に異常に亢進すると重篤な魚鱗癬を生じるNetherton症候群(常染色体劣性遺伝性疾患で、カリクレインなどの角層剥離に働く酵素を阻害するLEKTIをコードする遺伝子*SPINK5*の変異によって生じる)をきたすことから明らかである⁸⁾。しかしこの制



Immunoelectron microscopic analysis of stratum corneum corneodesmosomal degradation process

Akemi Ishida-Yamamoto

Department of Dermatology, Asahikawa Medical College

御機構の詳細はまだ不明な点が多い。例えばなぜ分化した角層細胞では辺縁にのみコルネオデスモゾームが残っているのかその理由は全く知られていない。本研究ではコルネオデスモゾーム分解過程を明らかにするために、その主たる細胞外成分であるCDSNとデスモグレイン1 (DSG1)⁹⁻¹³⁾の局在について、免疫電顕法を用いて角層の最深部5層について検討した。

2. 実験

2-1. 材料

正常ヒト背部の皮膚を2% paraformaldehyde/PBS pH 7.4にて4℃で1時間固定したのち、凍結固定、凍結置換し、Lowicryl HM20樹脂 (Chemische Werke Lowi, Waldkraiburg, Germany) に包埋したものを皮膚の垂直方向に薄切し、包埋後法の免疫電顕用の標本とした^{14, 15)}。すなわち手術材料から得られた皮膚を細切し、氷温の15% glycerol/PBSに1時間漬けた後、Reichert KF80 凍結固定装置 (Leica, Wien, Austria) を用いて-190℃の液体プロパンで固定した。その後、Reichert AFS automatic freeze-substitution system (Leica) を用いて-60℃のメタノールにより凍結置換した。Lowicryl樹脂への置換と紫外線による重合は製品説明書に従って行った。樹脂に埋め込まれた皮膚からウルトラミクロトームによって皮膚面に対して垂直方向になるように超薄切片を作成し、Formbar (LADD Research Industries, Williston, VT) の支持膜を張ったニッケルグリッドメッシュにマウントした。

2-2. 免疫染色

上記の超薄切片を1% bovine serum albumin (BSA), 5% normal goat serum (NGS), 0.1% fish gelatin/PBSで室温にて15分間、前反応させた。その後1% BSA, 1% NGS, 0.1% fish gelatin/PBS中で希釈した次の1次抗体と4℃で一晩反応させた。免疫電顕に用いた1次抗体はCDSNの中央部分に対するウサギポリクローナル抗体¹²⁾ (250倍希釈) および、DSG1の細胞外ドメインに対するマウスモノクローナル抗体 (Dsg-1-P23, Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg, Germany) (製品原液を薄めず使用) である。反応後、同希釈液で室温にて5分2回洗浄、1% BSA, 1% NGS, 0.1% fish gelatin/Tris-HCl buffered saline (pH 8.2) にて室温にて5分2回洗浄した。その後、後者にて希釈した次の2次抗体と37℃、1時間反応させた。2次抗体は5-nm gold-conjugated goat anti-rabbit IgG (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK), および5-nm gold-conjugated goat anti-mouse IgG (Amersham Bioscience) を10倍希釈で使用した。その後、希釈液で5分2回洗浄、脱イオン水で5分3回洗浄した。酢酸ウランにて電子染色を施して電子顕微鏡観察した。陰性コントロ

ールとしては1次抗体を除いて反応させたものを用いた。

2-3. 画像処理、計測

免疫電顕写真は倍率20,000倍で撮影し、取り込んだ画像をAdobe Photoshop ver. 6.0 (Adobe Systems, San Jose, CA) を用いてモンタージュ写真を合成した。角層細胞の最深部の1層目から5層目までの細胞のうち、切片上の細胞の幅をImage-Pro Plus ver. 4.0 imaging software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) によって計測し、10 μm以上の細胞を解析対象とした。それぞれの細胞の表面を上下にわけ、それぞれの外周の長さを同ソフトを用いて測定し、これを中央2分の1と辺縁2分の1にわけて、各領域におけるコルネオデスモゾーム上の免疫標識の密度を計測した (図1、2)。各層あたり、6ないし7個の細胞を解析した。

3. 結果

角層内のコルネオデスモゾーム上にはCDSN、DSG1ともにその標識が認められた (図1)。陰性コントロールでは標識は認められなかった。角層の深部第1層目から5層目までを対象とし、細胞表面を上、下に分け、それぞれを中央と辺縁に2分割し、コルネオデスモゾーム上のCDSN、DSG1の標識の細胞表面の長さあたりの密度を計測した。その結果、両者とも2層目の上面中央部分から顕著に減少しはじめ、5層目までには殆ど消失することが分かった (図2、3)。辺縁では両者とも密度の減少はゆるやかであった。

4. 考察

コルネオデスモゾームの分解過程は辺縁部分と中央部分で明らかに異なることが分かり、その複雑な制御機構が示唆された。今回解析した二つのコルネオデスモゾーム成分の分布密度は、ともに角層2層目の上面中央から急速に減少していき、辺縁では密度の減少はゆるやかであった。

角層細胞間の脂質層による水分バリア機能が適切に発揮されるためには、脂質層が広がるべき部分においてコルネオデスモゾームがタイミングよく消失している必要がある。同時に角層の構造も保たれていなくてはならない。コルネオデスモゾームの成分を分解する酵素としてはカリクレインファミリーに属するKLK5 (stratum corneum tryptic enzyme) やKLK7 (stratum corneum chymotryptic enzyme) などが知られている¹³⁾。この働きを調節する因子としては、これら剥離酵素のLEKTIをはじめとするインヒビター、相対湿度、硫酸コレステロール、遊離脂肪酸、pH、Ca²⁺濃度、酸化などがある^{9, 16-22)}。本研究では二つの主要なコルネオデスモゾーム成分であるCDSNとDSG1が角層の2層目という非常に早い段階で細胞表面の中央部分

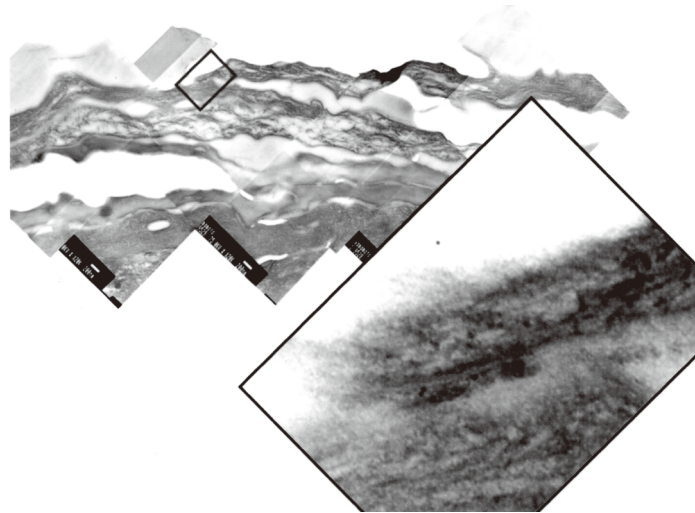


図1 CDSN 免疫電顕写真のモンタージュ画像。左上の四角で囲った部位を右下に拡大して示す。コルネオデスモゾームに一致した標識が見られる。

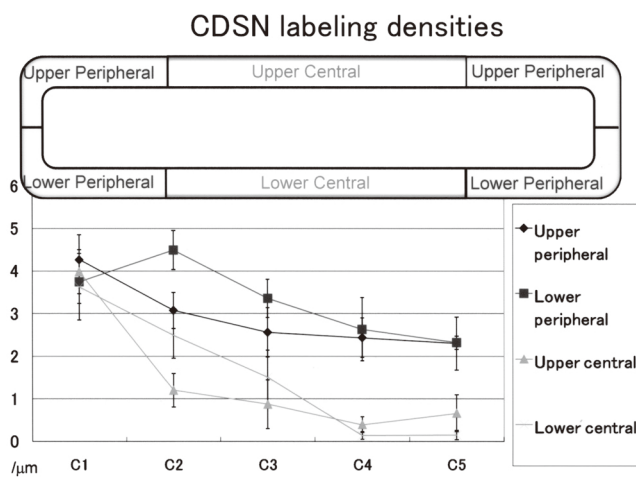


図2 CDSN 分布密度。角層の1から5層目(C1からC5)の細胞表面をそれぞれ上の図で示す4部分にわけ、CDSNの標識密度を測定した。CDSNの標識は2層目の細胞上面中央部分から減少している。(平均値 ± SEM)

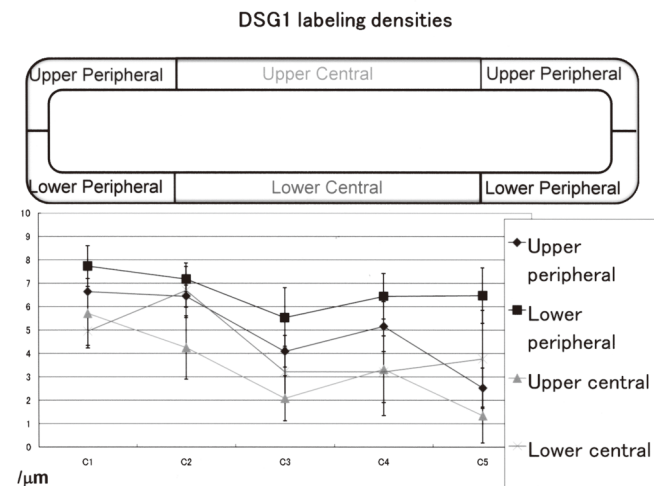


図3 DSG1 分布密度。角層の1から5層目(C1からC5)の細胞表面をそれぞれ上の図で示す4部分にわけ、DSG1の標識密度を測定した。DSG1の標識は2層目の上面中央部分から減少しはじめる。(平均値 ± SEM)

から急速に消失していくことが明らかとなった。このことは角層の深部に、異なるコルネオデスモゾーム構成成分に共通する、局在部位に依存性の分解規定因子が内在することをうかがわせるものである。

今回の解析では電顕標本上の断面が幅10μm以上の細胞を対象としたが、免疫電顕標本の角層細胞の最大径は30μm程度であったので、今後はさらに対象を切片の断面幅20μm以上の細胞にしぼって、より細胞の中央断面の状態を明らかにしていく予定である。

5. 総括

角層の細胞間同志の接着構造はコルネオデスモゾームであり、この分解により角層は剥離する。コルネオデスモゾーム分解過程を明らかにするために、その主たる細

胞外成分であるCDSNとDSG1の局在を解析した。CDSN、DSG1の標識はともに2層目の上面中央部分から減少しはじめた。辺縁では両者とも密度の減少はゆるやかであった。コルネオデスモゾーム成分の分解過程が辺縁部分と中央部分で異なることが分かり、部位特異的な分解制御機構が角層深部に内在することが示唆された。

(参考文献)

- 1) Elias PM, : Stratum corneum defensive functions: an integrated view. J. Invest. Dermatol. 125, 183-200, 2005.
- 2) Elias PM, : Epidermal lipids, barrier function, and desquamation, J. Invest. Dermatol., 80 suppl, 44s-49s, 1983.
- 3) Raknerud N, : The ultrastructure of the interfollicular epidermis of the hairless (hr/hr) mouse. III. Desmosomal

- transformation during keratinization. *J. Ultrastr. Res.* 52, 32-51, 1975.
- 4) Chapman SJ, Walsh A, : Desmosomes, corneosomes and desquamation. An ultrastructural study of adult pig epidermis. *Arch. Dermatol. Res.* 282, 304-310, 1990.
- 5) Elias PM, Goerke J, Friend DS, : Mammalian epidermal barrier layer lipids: composition and influence on structure. *J. Invest. Dermatol.* 69, 535-546, 1977.
- 6) Landmann L, : Epidermal permeability barrier: transformation of lamellar granule-disks into intercellular sheets by a membrane-fusion process, a freeze-fracture study. *J. Invest. Dermatol.* 87, 202-209, 1986.
- 7) Simon M, Bernard D, Minondo A-M, et al.; Persistence of both peripheral and non-peripheral corneodesmosomes in the upper stratum corneum of winter xerosis skin versus only peripheral in normal skin, *J. Invest. Dermatol.*, 116, 23-30, 2001.
- 8) Chavanas S, Bodemer C, Rochat A, et al, : Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. *Nat. Genet.* 25, 141-142, 2000.
- 9) Suzuki Y, Koyama J, Moro O, et al, : The role of two endogeneous proteases of the stratum corneum in degradation of desmoglein-1 and their reduced activity in the skin of ichthyotic patients. *Br. J. Dermatol.* 134, 460-464, 1996.
- 10) Simon M, Montézin M, Guerrin M, et al, : Characterization and purification of human corneodesmosin, an epidermal basic glycoprotein associated with corneocyte-specific modified desmosomes. *J. Biol. Chem.* 272, 31770-31776, 1997.
- 11) Caubet C, Jonca N, Brattsand M, et al, : Degradation of Corneodesmosome Proteins by Two Serine Proteases of the Kallikrein Family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. *J. Invest. Dermatol.* 122, 1235-1244, 2004.
- 12) Descargues P, Deraison C, Prost C, et al, : Corneodesmosomal cadherins are preferential targets of stratum corneum trypsin- and chymotrypsin-like hyperactivity in Netherton syndrome. *J. Invest. Dermatol.* 126, 1622-1632, 2006.
- 13) Borgono CA, Michael IP, Komatsu N, et al., : A Potential Role for Multiple Tissue Kallikrein Serine Proteases in Epidermal Desquamation. *J. Biol. Chem.* 282, 3640-3652, 2007.
- 14) Ishida-Yamamoto A, Simon M, Kishibe M, et al., : Epidermal lamellar granules transport different cargoes as distinct aggregates. *J. Invest. Dermatol.* 122, 1137-1144, 2004.
- 15) Ishida-Yamamoto A, : Immunoelectron microscopic analysis of cornified cell envelopes and antigen retrieval. *Methods Mol. Biol.* 289, 223-226, 2005.
- 16) Lee SH, Elias PM, Proksch E, et al, : Calcium and potassium are important regulators of barrier homeostasis in murine epidermis. *J. Clin. Invest.* 89, 530-538, 1992.
- 17) Sato J, Denda M, Nakanishi J, et al, : Cholesterol sulfate inhibits proteases that are involved in desquamation of stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* 111, 189-193, 1998.
- 18) Thiele JJ, Hsieh SN, Briviba K, et al, : Protein oxidation in human stratum corneum: susceptibility of keratins to oxidation in vitro and presence of a keratin oxidation gradient in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 113, 335-339, 1999.
- 19) Watkinson A, Harding C, Moore A, et al, : Water modulation of stratum corneum chymotryptic enzyme activity and desquamation. *Arch. Dermatol. Res.* 293, 470-476, 2001.
- 20) Hachem JP, Crumrine D, Fluhr J, et al: pH directly regulates epidermal permeability barrier homeostasis, and stratum corneum integrity/cohesion. *J. Invest. Dermatol.* 121, 345-353, 2003.
- 21) Elias PM, Crumrine D, Rassner U, et al, : Basis for abnormal desquamation and permeability barrier dysfunction in RXLI. *J. Invest. Dermatol.* 122, 314-319, 2004.
- 22) Deraison C, Bonnart C, Lopez F, et al, : LEKTI fragments specifically inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and control desquamation through a pH-dependent interaction. *Mol. Biol. Cell* 18, 3607-3619, 2007.

皮膚表皮形成に関わるタンパク質架橋接着反応の分子基盤 (高反応性基質配列ペプチドを用いた皮膚型トランスグルタミナーゼの高感度で特異的な活性検出法の確立)

名古屋大学大学院生命農学研究科応用分子生命科学専攻

人 見 清 隆

Transglutaminase 1 (TGase 1) is an essential enzyme for cornified envelope formation in stratified squamous epithelia. This enzyme catalyzes the cross-linking of glutamine- and lysine residues in structural proteins in differentiating keratinocytes. We had used a phage-displayed random peptide library for screening of primary amino acid sequences that are preferentially selected by human TGase 1. We had identified the most reactive sequence (K5) by evaluation of reactivity as GST-fused recombinant protein. In this study, we have confirmed that K5 appeared to have high and specific reactivity as substrate, even in the peptide form. Furthermore, *in situ* analysis of mouse skin sections using the fluorescence-conjugated K5 peptide resulted in the detection of TGase 1 activity with high sensitivity. Additionally, we have established a specific assay system using this peptide. In conclusion, we have established *in situ* and *in vitro* detection system using substrate peptide as sensitive and specific detection of endogenous TGase 1 activity in the skin.

1. 緒 言

タンパク質架橋化酵素トランスグルタミナーゼは、タンパク質中のグルタミン残基と異種または同種タンパク質のリジン残基に、イソペプチド結合形成を触媒する架橋化酵素である。同時にまた、グルタミン残基に一級アミンを取り込ませたり、脱アミド化することでグルタミン酸へと変換させたりする場合もある(図1A)。この酵素反応は高等動物の多くの組織で観察され、植物や下等真核生物、微生物にも類似の反応様式が見られる事が知られている。高等動物においては、これらの酵素の活性発現にはカルシウムイオンが必要であり、カルシウムシグナルに応答して多彩な生理現象に関わっている。トランスグルタミナーゼの生理的意義は、血液凝固、細胞死、形態形成、細胞外マトリクスの強化と幅広く、今なお未知の役割が発見される可能性もある。トランスグルタミナーゼはヒトにおいてはこれまで8種のアイソザイムの存在が報告されているが、表皮組織には主に3つのアイソザイム(TGase 1, TGase 3, TGase 5)が存在する。

皮膚表皮の形成は、表皮深層の未分化な前駆細胞が分化成熟して、角化した表皮細胞として表層に押し出されることによって達成される。またこの分化過程は、細胞内外のカルシウム濃度の変化によって支配されている。表皮細胞の分化に伴い、細胞内のロリクリン、インボルクリン、small proline rich protein (SPR)などの構造タンパク質群

が、トランスグルタミナーゼによる共有結合的な架橋を受ける。これらの構造物が細胞膜直下に裏打ち構造(cornified envelop)として形成される結果、表皮細胞は硬度化が生じ、外部に対し物理的にも化学的にも強力なバリアとして機能することになる(図1B)。

我々はこれまで、皮膚表皮に存在するTGaseのうち、TGase 1とTGase 3の組換えタンパク質を作製して、その生化学的解析に従事してきた^{1, 2)}。これらの酵素は不活性な前駆体として合成された後、TGase 1が*in vitro*においてカルパインで、TGase 3がカテプシンによって限定分解されて活性化されることを明らかにしてきた。

また一方で、近年我々は、トランスグルタミナーゼが架橋する基質としては、どのような一次構造(アミノ酸配列)があれば認識されやすいのか、という課題に取り組んできた(どのグルタミンやリジンでも区別なく架橋重合するのではない)。これまで、ファージ提示型ランダムペプチドライブラリを用いて、各トランスグルタミナーゼのアイソザイム(TGase 2およびFactor XIII)が好んで認識する基質配列(ペプチド)の同定に成功している^{3, 4)}。さらにこのシステムを用いて、同様に表皮のTGase 1に対する高反応性ペプチド配列を得ることをめざしていた。

今回のコスメトロジー研究振興財団における研究課題として、トランスグルタミナーゼに関わる表皮形成の分子基盤を確立するという課題で採択を頂いた。この課題の遂行を2年間に分けて行い、特に皮膚型トランスグルタミナーゼに対する高反応性基質配列ペプチドの解析と、これを用いた表皮組織での活性検出システムの構築を目的とした。昨年度(平成20年度)まででペプチドの諸性質の解析と蛍光標識ペプチドを用いた検出システムの構築に成功した⁵⁾。昨年以降はさらにこれに加えて、化学標識ペプチドを用いた、*in vitro*での特異的な皮膚表皮架橋酵素のアッセイシステムの開発にも成功したので、ここに報告としてまとめ



Molecular basis of transglutaminase reactions in the skin epidermis formation: development of efficient detection system of transglutaminase 1 activity using preferred substrate peptide

Kiyotaka Hitomi

Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University

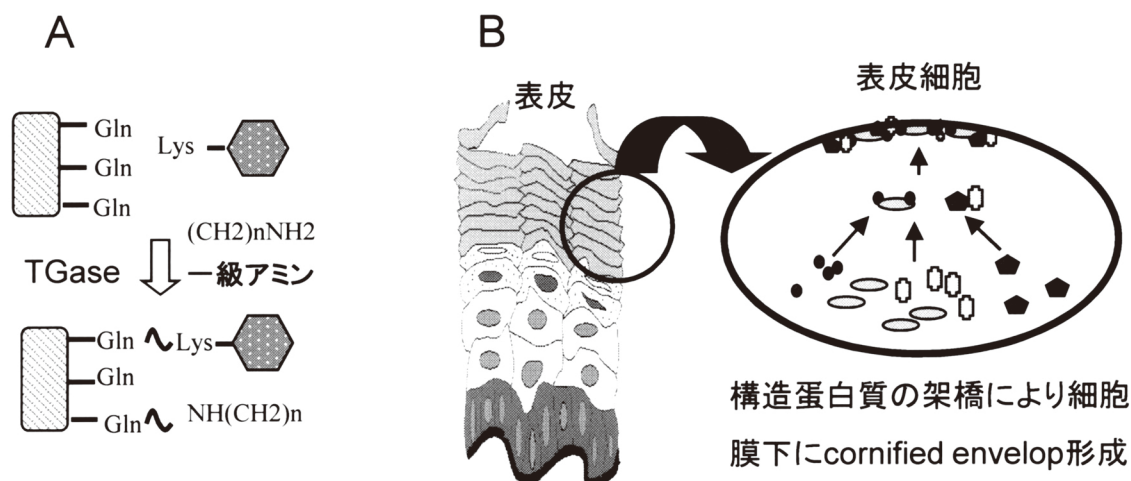


図1 トランスグルタミナーゼの作用様式と表皮における役割

たい。今後、表皮（培養）細胞中の活性検出方法の確立や関連病態との関わりを検討していきたいと考えている。

2. 実験方法

これまで我々は、TGase 1 に対する高い反応性を有する基質配列を、M13ファージディスプレイランダムペプチドライブラリからスクリーニングしている。そのうちおよそ15種類の配列を融合蛋白質として発現精製し、ダンシル修飾カダベリン（蛍光標識アミン）の存在下で、TGase 1 に対する反応性の高いものを4つ選んでおり、それぞれについて解析を進めた。さらに、TGase 1 以外のアイソザイム（TGase 2, TGase 3, Factor XIII）に対する反応性を調べて、特異性の高い配列の1つ、K5（YEQHKLPSSWPF）について、ペプチドレベルでの反応性、特異性、有用性を検討した。

2.1 ペプチドレベルの反応性評価

96穴マイクロタイタープレートを用いる発色方法で行った。この場合、カゼインをグルタミン残基受容基質として、プレートに固相化した。ここに、ビオチン標識したペプチドを含む溶液に酵素（TGase 1）を添加して反応を進行させた。尚、このとき、TGase 2 に対する高反応性ペプチド（T26:HQSYVDPWMLDH）や、変異ペプチド（K5QN:グルタミン残基をアスパラギンに置換したもの）についても並行させた。反応停止し洗浄後、アビジンパーオキシダーゼを含むバッファーを反応させた。洗浄後、パーオキシダーゼに対する発色基質溶液を添加して発色量を測定した。

2.2 蛍光標識ペプチドを用いた活性の視覚化

野生型およびTGase 1 遺伝子欠損マウスから皮膚切片を取得し、OCTコンパウンドに包埋して、3-4μm厚で

切片を作製した。スライドガラスに貼付した切片を乾燥させ、BSAにより非特異的な吸着を防止するためのブロッキングを行った後、蛍光標識したペプチドを含むバッファーを添加した。37度で1時間反応させて、生理食塩水により洗浄してから封入・検鏡した。

このとき、対照実験として、K5ペプチドのグルタミン残基をアスパラギン残基に置換した変異ペプチドで同様の実験を並行させた。また、TGase 1 遺伝子欠損マウスの皮膚表皮切片についても行った。

2.3 ビオチン標識ペプチドを用いた新規アッセイ系の開発

我々はこれまでに、フランスCovalAb社との共同研究で、組織型酵素（TGase 2）について、ELISA法（タンパク吸着プレートを用いた酵素発色による免疫反応検出系）を模した、トランスグルタミナーゼの測定系をTGase 2 について開発していた⁶⁾。これはプレートに、ポリアミン（スベルミン）を共有結合させ、一級アミンを固定したものと、ビオチン標識した高反応性基質配列を用いた検出系で、簡便に高感度で活性検出が可能である。そこで、これに応用して、TGase 1 の高反応性基質ペプチド（K5ペプチド）を用いた特異的なアッセイ系構築を実施した⁷⁾。同様にポリアミンコートしたプレートに、TGase 1 およびK5ペプチドを混合して反応させ、アビジンパーオキシダーゼを反応させ、発色基質を添加した。

3. 結果

3.1 選別した高反応性基質配列に相当するペプチドの反応性の評価

ビオチン標識ペプチド（K5）を、カゼインをグルタミン受容基質として、反応を行った。TGase 1 に対する反応を

調べた結果、K5のみが高い反応性を示し、変異ペプチド (K5QN) やT26は、まったく反応を示さなかった (図2)。なお、図では省略したが、TGase 2, TGase 3, Factor XIII に対しては、反応性が低いことを確認している。ただし、TGase 2 については、比較的高いペプチド濃度や酵素濃度のときには、cross-reactivity が生じることが観察された。これらの結果により、K5がTGase 1 に対して、ペプチドとしてのレベルでも高く、かつ特異的に基質となることが示された。

3. 2 蛍光標識高反応性ペプチドを用いた皮膚表皮における反応の視覚化

蛍光 (FITC) 標識したK5ペプチドを、皮膚表皮凍結切片に添加して、内在性のTGase 1 活性の検出を試みた (図3、図4)。その結果、カルシウム存在下では、K5ペプチドについて特異的なシグナルが観察された。キレート存在の場合、グルタミン残基を変異させた場合には観察されなかった。さらに、図では省略したがTGase 1 遺伝子欠損マウスの皮膚切片の場合では、全くシグナルは観察されな

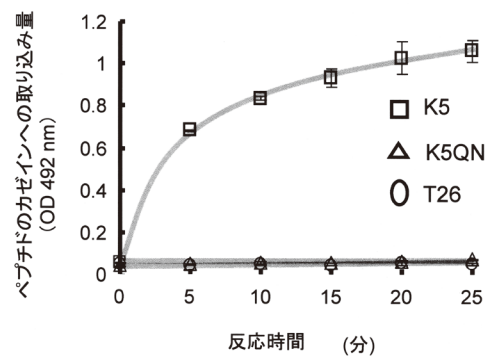


図2 選別した高い反応性配列のペプチドレベルでの評価

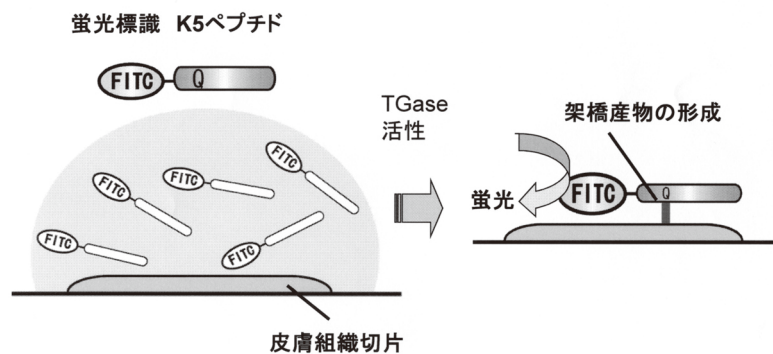


図3 蛍光標識ペプチドを用いた皮膚表皮内の活性の視覚化 (方法)

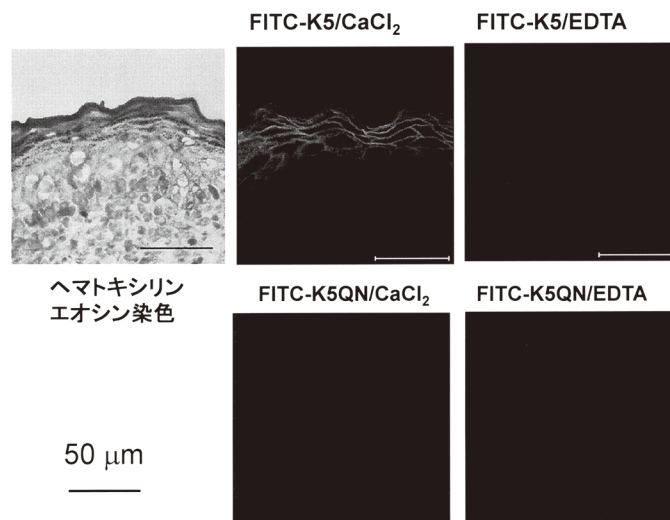


図4 蛍光標識ペプチドを用いた皮膚表皮内の活性の視覚化 (結果)

かった⁵⁾。

ヘマトキシリン&エオシン染色での結果から、角化層には活性は検出されず、顆粒層からやや下あたりまでの細胞層に見られた。また、TGase 1 は細胞膜直下に局在するが、表皮細胞の細胞膜周辺にシグナルが見られ、これまでの知見とも合致する結果となっている。

3. 3 ビオチン標識ペプチドを用いた、迅速で高感度な活性検出系の確立

図5Aに示すように、一級アミン固定化プレートに、トランスグルタミナーゼおよび、ビオチン標識した高反応性基質配列ペプチドを混合することによって、反応を進行させた。図5Bに示すように、TGase 1 に特異的なペプチドであるK5を用いた場合、TGase 1 の酵素の存在下で時間依存的にビオチン標識K5の取り込みが観察された。同じようにグルタミン残基を含む、T26やF11 (Factor XIII 高反応性ペプチド) では反応されなかった。図では省略するが、酵素量およびペプチド濃度依存的にも取り込み量が増大した。

4. 考 察

緒言でも記したように、皮膚形成、特に角化層の表皮細胞でバリア機能を果たす cornified envelopが形成されるためには、複数のトランスグルタミナーゼの活性が必須である。なかでも、本課題で対象としたTGase 1 は、(1) ノックアウトマウスで異常な皮膚形成が明らかなこと(2) 遺伝子変異によって、重篤な皮膚疾患が生じること、から最も重要なアイソザイムであると言える。

我々が近年同定してきた、トランスグルタミナーゼのアイソザイムに特異的な高反応性基質配列が、ペプチドとしても良い基質であれば、様々な用途への展開が可能であるとの認識に基づいて、今回の研究課題に臨んだ結果、いくつかの有用な成果をあげられた。

結果の3.1に示したように、ペプチドとしても、他のアイソザイムと交差することなく、特異性を有した形で

TGase 1 の基質となることが示された。K5の配列中にはリジン残基が(グルタミン受容)あり、基質としてどのTGase アイソザイムでも反応する可能性もあったが、特異的にTGase 1 の良い基質であることが、変異体(QN変異)の解析で明らかになった。

このペプチドを用いた応用的な解析として、蛍光標識したペプチドを作製し、これを用いて皮膚表皮での活性を可視化できた(結果3.2)。これは、特異的にアイソザイムの反応物を検出する方法としては、これまで抗体で行われてきた方法よりもさらに正確に酵素の働きを知ることのできる画期的な手法と言える。抗体の場合は、「存在」のみであるが、TGase 1や TGase 3 は限定的分解を受けると活性上昇が起こるので、抗体反応のみでは活性を判断できない場合に有効である。基礎的知見に加え、この手法では、TGase 1 の活性低下による疾病研究にも貢献できる。データは省略するが、この成果より発展したヒト皮膚に関する共同研究を、北海道大学医学部・清水宏教授および秋山真志准教授と行った。その中で、ヒト皮膚表皮、とりわけ魚鱗鮮患者の皮膚組織での、TGase 1 の発現解析に関しても、有用な検出系として役立つことが判明した⁸⁾。

また結果3.3に示すように、ペプチドをビオチン標識すれば、アッセイが可能なことを示した。予備的な実験結果として、マウスの皮膚抽出物から、従来のアッセイ系よりもより感度良く、短時間で活性を検出することができた。今後、蛍光ペプチドを用いた可視化の検出系と並行して、皮膚表皮トランスグルタミナーゼの異常なレベル低下の高感度検出に用いられる可能性もある。

5. 総 括

このようにタンパク質架橋酵素反応を、組織および細胞レベルで高感度に検出するシステムを開発することに成功したので、皮膚表皮における本酵素の分子基盤を確立することができたといえる。今後は、皮膚表皮培養系での活性検出と、TGase 1 以外のアイソザイムとの役割分担、および架橋重合される基質群の架橋化パターンの解明を行う

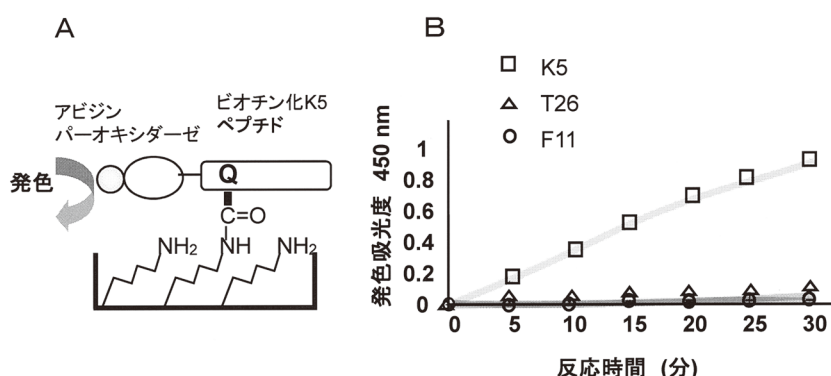


図5 ビオチン標識ペプチドを用いた新規な酵素活性測定方法

ことにより、「どのように皮膚のバリア機能と固さが形成されるのか」を明らかにしていきたい。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご支援を頂いたコスメロジー研究振興財団に厚く御礼申し上げます。本研究は名古屋大学大学院生命農学研究科分子細胞制御学研究室で行われたもので、大学院生として実験に従事されました杉村禎昭博士、細野真代氏、北村三矢子氏の多大な努力による成果であります。

また、マウスの皮膚切片標本を供与頂いた、兵庫医科大学の山西清文教授に感謝申し上げます。紹介したヒト皮膚に関する実験は北海道大学医学研究科皮膚科学教室、清水宏教授、秋山真志准教授の成果です。また、活性測定系の開発においては、フランスCovalAb 社との共同研究によるものです。

(参考文献)

- 1) Hitomi K.: Transglutaminase in skin epidermis. *Eur. J. Dermatol.* 15, 313-319, 2005
- 2) Hitomi K. et al. Analysis of epidermal-type transglutaminase (TGase 3) in human stratified epithelia and cultured keratinocytes using monoclonal antibodies. *J. Dermatol. Sci.*, 32, 95-103, 2003.
- 3) Sugimura Y. et al. Screening for the preferred substrate sequence of transglutaminase using a phage-displayed peptide library. *J. Biol. Chem.* 281, 17699-17706, 2006.
- 4) Hitomi K. et al.: Preferred substrate sequences for transglutaminase 2: screening using a phage-displayed peptide library. *Amino Acids.* 36, 619-624, 2009.
- 5) Sugimura Y. et al. Identification of preferred substrate sequences for transglutaminase 1: development of a novel peptide that can efficiently detect cross-linking enzyme activity in the skin. *FEBS J.* 275, 5667-5677, 2008.
- 6) Alea, M. P. et al.: Development of an isozyme-specific colorimetric assay for tissue transglutaminase 2 cross-linking assay. *Anal. Biochem.* 389, 150-156, 2009.
- 7) Hitomi, K. et al. A specific colorimetric assay for measuring of transglutaminase 1 and factor XIII activities. *Anal. Biochem.* 394, 281-283, 2009.
- 8) Akiyama et al.: Transglutaminase1 preferred substrate peptide K5 is an efficient tool in diagnosis of lamellar ichthyosis. *Am. J. Pathol.* 176, 1592-1599, 2010.
- 9) 人見清隆 タンパク質架橋化酵素の高反応性基質配列の探索と活用 *生化学* 81, 708-711, 2009.

皮膚の炎症反応・炎症後組織修復における血小板の役割の解明と 血小板機能制御による治療法の開発

京都府立医科大学大学院医学研究科皮膚科学

加藤 則人、峠岡 理沙

Accumulated evidences have suggested that platelets play versatile roles in variety of inflammatory reactions, but involvement of platelets in the homeostasis of dendritic cell re-distribution in cutaneous tissue after inflammation. Bone marrow-derived dendritic cells were conjugated with fluorescent and injected intravenously after 6 hours from elicitation of contact dermatitis in mice, with or without platelet depletion. The number of dendritic cells re-distributed in the cutaneous tissue was significantly reduced in platelet-depleted mice, which was recovered by intravenous restoration of platelet. However, intravenous restoration of platelet from P-selectin-deficient mice did not show this effect. These results suggest that platelets play important roles in re-distribution of dendritic cells after cutaneous inflammation and homeostasis.

1 緒言

古くから血小板は止血に必須の細胞であることが知られていたが、最近になって血小板はCD40リガンド、P-selectinなどの接着分子、ケモカイン受容体、Toll様受容体を細胞の表面に発現するほか、成長因子、サイトカイン、ケモカイン、セロトニンやマイクロパーティクルなど様々な活性物質を遊離することによって、炎症反応に関わっていることが次第に知られるようになってきた¹⁾。しかし、皮膚を反応の場とするアレルギー炎症における血小板の役割については、これまでほとんど検討されておらず、アレルギー性皮膚疾患の病態と血小板の関わりは不明であった。私たちは、これまでに活性化血小板が遊離するセロトニンがアトピー性皮膚炎患者で増加していること²⁾や、セロトニンが単球を活性化させて抗原提示能を増強させるとともにアポトーシスを抑制することで慢性炎症に関与していること²⁾、あるいはセロトニンによって免疫制御作用を有する樹状細胞への分化が誘導できること³⁾、さらには血小板減少マウスを用いた実験により、ハプテン繰り返し塗布によるアトピー性皮膚炎モデルマウスの炎症の成立に血小板が重要な役割を果たしていること^{4,5)}など、皮膚の炎症反応と制御における血小板の役割に関する研究結果を報告してきた⁶⁾。

皮膚のホメオスタシスの維持には、皮膚の抗原提示細胞である真皮樹状細胞やランゲルハンス細胞が重要な働きをしていることが知られている。皮膚炎に伴って皮膚の樹状細胞はリンパ管に遊走し、その後減少した樹状細胞を皮

膚組織に補うため末梢血から皮膚組織へ樹状細胞が供給されることが知られている。この現象にも末梢血中での樹状細胞と血小板との複合体の形成が重要な役割を果たしている可能性が推測されるが、この樹状細胞の皮膚組織への供給におよぼす血小板の役割はまだ検討されていない。そこで、蛍光で標識したマウス骨髄由来の樹状細胞を末梢血の血小板を著しく減少させたマウスに静脈注射して皮膚への樹状細胞の遊走動態を解析することにより、皮膚炎組織への樹状細胞の供給におよぼす血小板の役割を検討するとともに、血小板P-セレクトインの関与についても検討した。

2 実験

2.1 血小板減少マウスの作成

BALB/cマウスに抗血小板抗体を2日ごとに腹腔内投与することで、末梢血中の血小板を1000個/ μ l程度に減少させた。

2.2 接触過敏反応

BALB/cマウスの耳介に1% trinitrochlorobenzene (TNCB)を塗布して感作させ、7日後にマウスの耳介に1% TNCBを塗布することにより接触過敏反応を惹起させた。

2.3 マウス骨髄由来樹状細胞の調製と注射

BALB/cマウスの骨髄を採取し、骨髄細胞をGM-CSF存在下で培養し、樹状細胞を分化誘導させた³⁾。そして、培養して得られた樹状細胞(5×10^6)を5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA)で標識し、TNCB塗布24時間後のマウスに静脈注射した。

2.4 血小板補充

樹状細胞の静脈注射20分前にマウス血小板($7.5-8.0 \times 10^8$)を投与し、P-セレクトインを欠損した血小板の静脈注射は抗P-セレクトイン抗体で処理した血小板またはP-セレクトインノックアウトマウス由来の血小板を用いた。



Role of platelets in cutaneous inflammation and tissue remodeling: therapeutic approach for allergic skin diseases via blocking platelet activity

Norito Katoh, Risa Mineoka

Department of Dermatology, Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science

2.5 皮膚組織採取

樹状細胞を静脈注射して、その6時間後に耳介皮膚を採取し⁴⁾、4%パラホルムアルデヒドで固定した。そして、OCTコンパウンドで包埋した後、凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡 (Biozero, Keyence) を用いて観察した。

3 結果

3.1 樹状細胞の皮膚への分布におよぼす血小板減少の影響

CMFDAで標識した樹状細胞を静脈注射して、その6時間後に耳介皮膚を採取し、蛍光顕微鏡を用いて皮膚組織でのCMFDA陽性細胞を観察した。血小板減少マウスでは、血小板数が正常なマウスに比べて、皮膚組織でのCMFDA陽性細胞数は有意に低下していた (図1)。

3.2 樹状細胞の皮膚への分布におよぼす血小板補充の影響

CMFDAで標識した樹状細胞を静脈注射する20分前に、血小板または溶媒である生食のみを血小板減少マウスに静脈注射すると、血小板を補充したマウスでは皮膚組織へ分布する樹状細胞数の増加を認めた (図2)。

3.3 樹状細胞の皮膚への分布におよぼす血小板 P-セレクトインの影響

P-selectin ノックアウトマウスから得た血小板を投与した場合や、正常マウスから得た血小板を抗P-selectin抗体で処理してから投与した場合には、遅発相反応の回復

はみられなかった (図3) ことから、血小板上に発現したP-selectinが即時型過敏反応の遅発相において重要な役割を果たしていることが示唆された。

4 考察

血中の樹状細胞は、血管内皮細胞のP-セレクトインを介して循環血中から皮膚組織へ遊走することがこれまでに報告されていたが、今回の我々の研究結果より、血中での血小板上のP-セレクトインを介した樹状細胞との複合体の形成が、血中から皮膚組織への樹状細胞の遊走動態において重要な役割を果たしていることが示唆された。

我々は、ヒトのアトピー性皮膚炎⁷⁾やマウスを用いた抗原刺激による皮膚炎^{4,5)}において、末梢血中の血小板が活性化していることを既に明らかにしており、アレルギー性皮膚疾患において血中の活性化血小板が樹状細胞の遊走能に大きく影響している可能性が考えられる。

今後、樹状細胞の機能における血小板の役割を明らかにしていくことにより、血小板の活性制御が、接触皮膚炎やアトピー性皮膚炎などのアレルギー性皮膚疾患の有用な治療法になることが期待できる。

(引用文献)

- 1) von Hundelshausen P, Weber C: Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ. Res.*, 100, 27-40, 2007.
- 2) Soga F, Katoh N, Inoue T, et al: Serotonin activates human monocytes and prevents apoptosis. *J. Invest.*

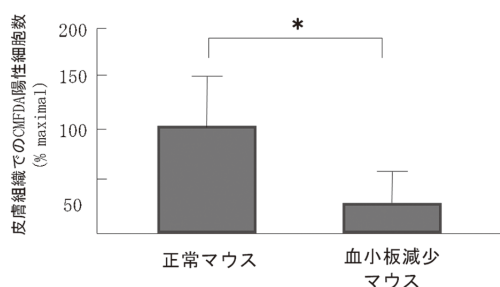


図1

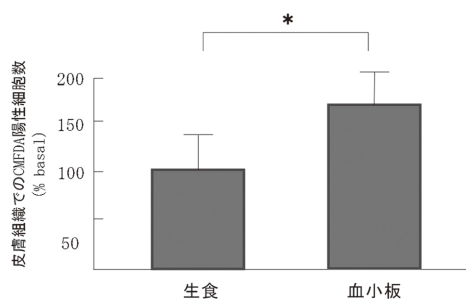


図2

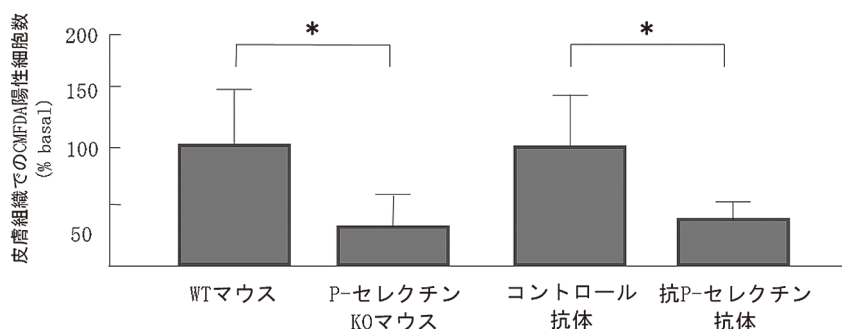


図3

- Dermatol., 127, 1947-55, 2007.
- 3) Katoh N, Soga F, Nara T, et al.: Effect of serotonin on the differentiation of human monocytes into dendritic cells. Clin. Exp. Immunol., 146, 354-361, 2006.
- 4) Tamagawa-Mineoka R, Katoh N, Ueda E, et al.: The role of platelets in leukocyte recruitment in chronic contact hypersensitivity induced by repeated elicitation. Am. J. Pathol., 170, 2019-29, 2007.
- 5) Tamagawa-Mineoka R, Katoh N, Kishimoto S.: Platelets play important roles in the late phase of the immediate hypersensitivity reaction. J. Allergy Clin. Immunol., 123:581-7,2009.
- 6) Katoh N.: Platelets as versatile regulators of cutaneous inflammation. J. Dermatol. Sci., 53: 89-95, 2009 .
- 7) Tamagawa-Mineoka R, Katoh N, Ueda E, et al.: Platelet-derived microparticles and soluble P-selectin as platelet activation markers in patients with atopic dermatitis. Clin. Immunol., 131: 495-500, 2009.

樹状細胞分子 SHPS-1 による皮膚免疫制御とその皮膚アレルギーへの治療的応用

群馬大学生体調節研究所バイオシグナル分野

崎 尚

SHPS-1 is a transmembrane protein that binds the protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 and is abundant on the surface of CD11c⁺ dendritic cells (DCs). We recently showed that SHPS-1 is essential for priming by DCs of CD4⁺ T cells and for development of Th17 cell-mediated experimental autoimmunity. We have now further evaluated the importance of SHPS-1 and that of its ligand CD47 in contact hypersensitivity (CHS) to 2,4-dinitro-1-fluorobenzene (DNFB). Whereas the DNFB-induced CHS response was impaired in mice that express a mutant form of SHPS-1 lacking most of the cytoplasmic region, it was unaffected in CD47-deficient mice. Moreover, treatment of wild-type mice with mAbs to SHPS-1 that either block or do not block the binding of SHPS-1 to CD47 inhibited the CHS response, whereas that with a mAb to CD47 had no such effect. The 2,4-dinitro-benzenesulfonic acid-induced proliferation of, and production of IFN- γ or IL-17 by, T cells from DNFB-sensitized wild-type mice were inhibited by either mAb to SHPS-1 but not by that to CD47. In contrast, the blocking mAbs to SHPS-1, but not that to CD47, inhibited an allogenic mixed leukocyte reaction. These results suggest that SHPS-1 is essential for development of CHS, likely as a result of its positive regulation of the priming by DCs of CD4⁺ T cells. However, such regulation by SHPS-1 does not appear to require its interaction with CD47.

1. 諸 言

化粧品などにより誘導される皮膚アレルギーの要因となる化学物質には様々なものが知られているが、皮膚アレルギーの実験的マウスモデルとしては、DNFBあるいはTNCB誘導性皮膚炎などがよく知られている。従来これらの化学物質誘導性の皮膚炎は、Th1誘導性であると考えられてきたが、最近になりTh1細胞とは全く異なるTh細胞亜群と考えられIL-17を特異的に産生するTh17細胞の重要性が示唆されている¹⁻³⁾。実際、IL-17の遺伝子欠損(KO)マウスでは、DNFBやTNCB誘導性の皮膚炎やこれらの化学物質誘導性の皮膚炎の発症が著しく抑制されることが報告されている⁴⁾。Th17細胞の誘導には、ナイーブCD4⁺T細胞が樹状細胞から抗原提示を受けた後、TGF β 、IL-6、IL-23などのサイトカインが協調的に作用することが重要であるとされている¹⁻³⁾。しかし、このTh17細胞誘導の分子機構は未だ十分に明らかにされておらず、また、Th17系が様々な化学物質誘導性の皮膚炎発症に関与しているか否かも明らかとはなっていない。

SHPS-1は樹状細胞に強く発現する細胞膜型分子であり、T細胞などに発現する細胞膜型分子であるCD47と相互作用することで細胞-細胞間でのシグナル伝達を担うことが

明らかとなっている⁵⁾。私共はこれまでに、このSHPS-1が樹状細胞によるT細胞活性化に関与することを明らかにしている⁵⁾。特に、SHPS-1 KOマウスでは、DNFB誘導性皮膚炎やMOG誘導性脳脊髄炎(Th17誘導性)の発症が顕著に抑制されることを見出している^{6,7)}。さらに、DNFBで感作したマウスリンパ球におけるIL-17産生が、SHPS-1 KOマウスでは減弱することを見出している。以上の実験結果は、Th17細胞の誘導には、樹状細胞に発現するSHPS-1がT細胞上のCD47と相互作用して機能することが重要であることを強く示唆している。また興味深いことに、DNFB誘導性皮膚炎の発症抑制が抗SHPS-1モノクローナル抗体投与により認められ⁶⁾、抗SHPS-1抗体が化学物質誘導性皮膚炎の治療に有効性を持つ可能性が示唆されている。

そこで本研究では、接触性皮膚炎発症にSHPS-1、またCD47-SHPS-1系がどのように関与するかについて検討を行なうとともに、化学物質誘導性皮膚炎の治療に抗SHPS-1抗体を応用するための基礎的研究を行なった⁸⁾。

2. 実 験

2.1 マウス

SHPS-1 KOマウスはSHPS-1の細胞内領域をほぼすべて欠失したSHPS-1を持つマウスであり、野生型C57BL/6と5または6世代戻し交配を行ったマウスをSHPS-1 KOマウスとして用いた。CD47 KOマウスは、10世代以上CD57BL/6と戻し交配を行ったマウスであり、Oldenborg博士(Umeå大学、スウェーデン)より供与していただいた。野生型C57BL/6マウスおよびBALB/cマウスは日本SLCより購入した。



Regulation by dendritic cell SHPS-1 of skin immunity and its therapeutic application for skin allergy

Takashi Matozaki

Laboratory of Biosignal Sciences,
Institute for Molecular and Cellular
Regulation, Gunma University

2.2 接触性皮膚炎モデルマウスの作製

8～12週の雌マウスの背部に0.5% DNFBを塗布し、5日後に0.2% DNFBを耳介に塗布した。0.2% DNFB塗布24時間後に耳介部の腫脹を計測した。また、DNFBによる耳介部の腫脹に対する抗体投与の効果は、0.5% DNFB塗布の直前に、100 μ gの抗SHPS-1抗体 (mAb 97, p84)、抗CD47抗体、または正常ラットIgG抗体をマウスの腹腔内に投与することで検討した。

2.3 リンパ球のサイトカイン産生と増殖

8～12週の雌マウスの背部に0.5% DNFBを塗布5日後に、所属リンパ節よりリンパ球を回収した。回収したリンパ球を10 μ g/mlの抗SHPS-1抗体、抗CD47抗体、または正常ラットIgG存在下で、DNBS (30 μ g/ml)、またはIL-2 (50U/ml) により72時間刺激した時点での培地中に含まれるIFN- γ およびIL-17の産生量をELISA法にて測定した。また、リンパ球の増殖の程度は、DNBSまたはIL-2刺激60時間後に培地に [3 H] チミジンを添加して、さらに12時間培養した時点でのリンパ球に取り込まれた [3 H] チミジンの量を測定することで定量化した。

2.4 リンパ球混合試験

野生型C57BL/6マウスの脾臓よりCD11c $^+$ 樹状細胞を、野生型BALB/cマウスよりCD4 $^+$ T細胞を単離し、抗SHPS-1抗体、抗CD47抗体、または正常ラットIgGをそれぞれ10 μ g/mlを含む培地で、両細胞の混合培養を行なった。培養72時間後にT細胞から分泌されたIFN- γ の産生量をELISA法にて測定した。また、培養60時間後に培地に [3 H] チミジンを添加し、さらに12時間培養した後、T

細胞に取り込まれた [3 H] チミジンの量を測定することで、T細胞の増殖の程度を定量化した。

3. 結果

3.1 接触性皮膚炎発症へのSHPS-1とCD47の関与

接触性皮膚炎の発症におけるSHPS-1とCD47の重要性を検討する目的で、SHPS-1 KOおよびCD47 KOマウスにおけるDNFB誘導性皮膚炎の誘導を試みた。その結果、以前の報告と同様にSHPS-1 KOマウスでは、DNFB塗布による耳介の腫脹が野生型マウスに比べ有意に低下した (図1A)。一方、CD47 KOマウスでは、野生型マウスと同程度の耳介の腫脹が認められた (図1B)。これらの結果から、接触性皮膚炎の発症にはCD47ではなく、SHPS-1が重要であることが示唆された。

3.2 抗SHPS-1抗体による接触性皮膚炎の抑制

SHPS-1とCD47はそれぞれ細胞外領域を介して細胞間で結合し、細胞間シグナルCD47-SHPS-1系を形成している。CD47とSHPS-1との結合が、接触性皮膚炎の発症に関与するかを検討する目的で、CD47とSHPS-1の結合を阻害する抗SHPS-1抗体であるmAb97、両者の結合を阻害しない抗体であるp84、およびCD47とSHPS-1との結合を阻害する抗CD47抗体であるmiap301をそれぞれマウス腹腔内に投与し、これら抗体のDNFB誘導性皮膚炎の発症に与える影響について検討した。抗SHPS-1抗体であるp84およびmAb97を腹腔投与したマウスでは、DNFB塗布による耳介の腫脹の程度が有意に低下した (図2A, B)。一方、抗CD47抗体miap301を投与したマウスでは、その腫脹の程度に影響は認められなかった (図2C)。これらの

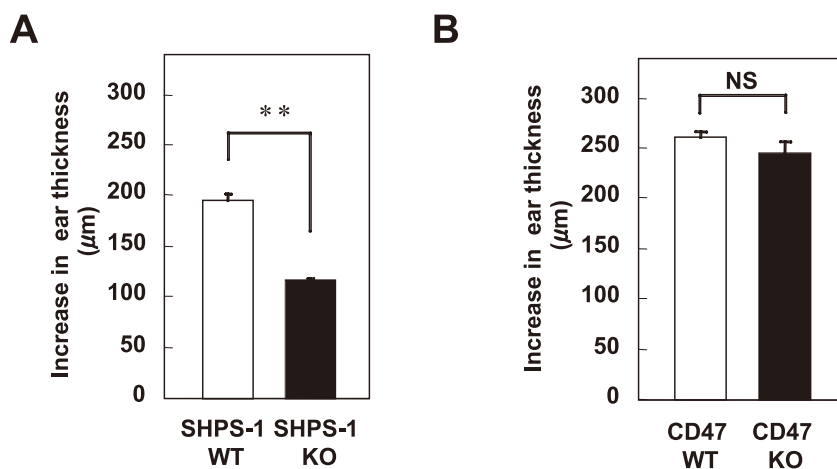


図1 SHPS-1 KO マウスおよびCD47 KO マウスにおける接触性皮膚炎の発症 SHPS-1 KO (A) またはCD47 KO (B) の雌マウスの背部にDNFBを塗布5日後に、耳介にDNFBを塗布した。耳介の腫脹の程度は、耳介へのDNFBの塗布前と塗布24時間後の耳介の厚みの差を測定することにより求めた。**, P<0.01 (野生型マウスとの比較)、NS, 有意差なし

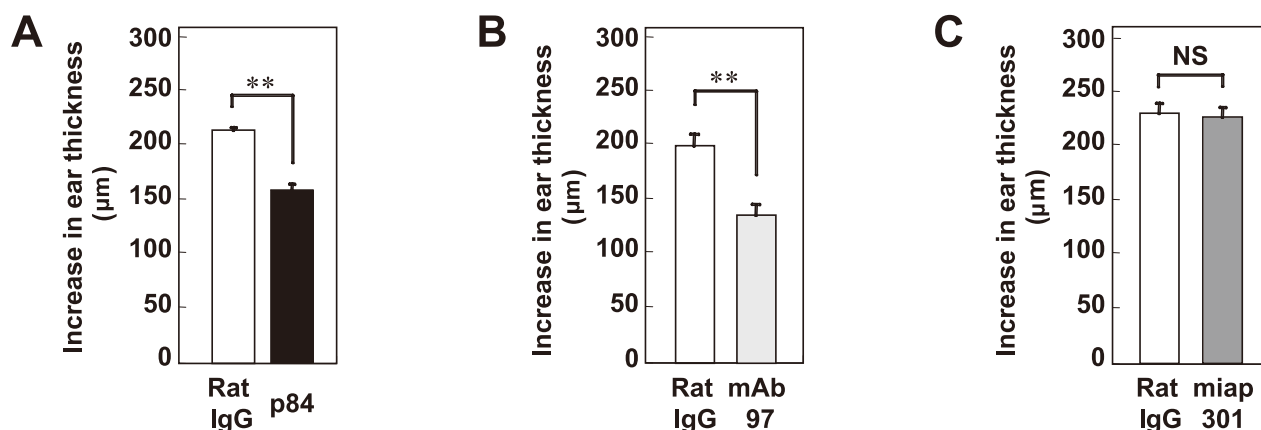


図2 接触性皮膚炎発症への抗SHPS-1抗体および抗CD47抗体の効果

野生型マウスの腹腔内に抗SHPS-1抗体 [p84 (A) またはmAb97 (B)]、抗CD47抗体 [miap301 (C)]、またはコントロールとして正常ラットIgGを投与後、マウスの背部にDNFBを塗布した。その5日後に、さらに耳介にDNFBを塗布し24時間後の耳介の腫脹の程度を測定した。耳介の腫脹の程度は、耳介へのDNFBの塗布前と塗布24時間後での耳介の厚みの差を測定することにより求めた。**, $P < 0.01$ (正常ラット抗体との比較)、NS, 有意差なし

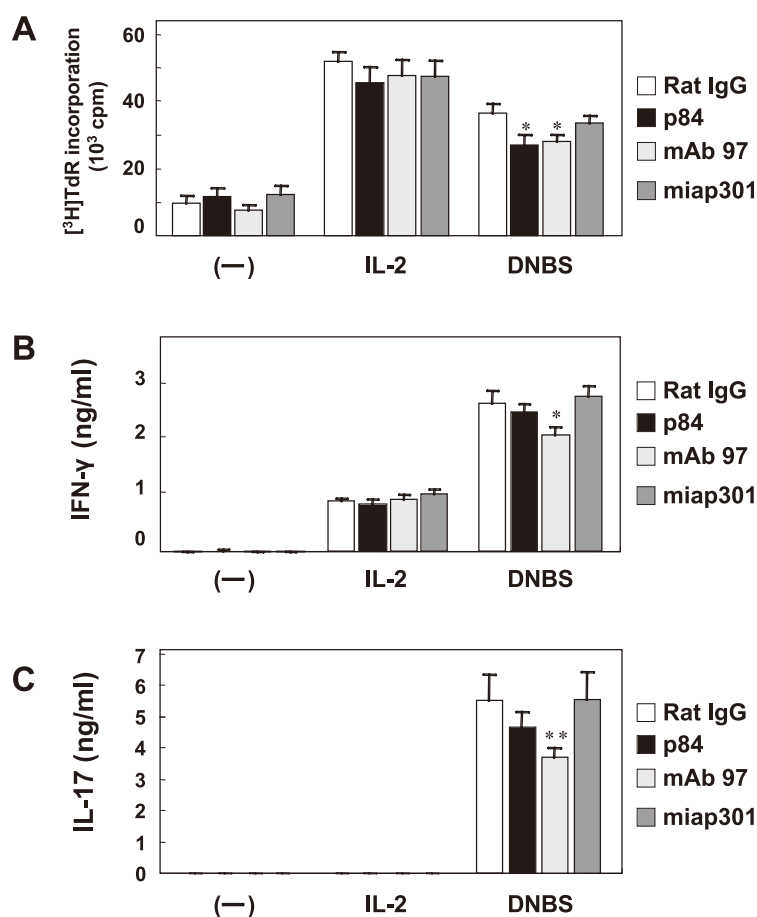


図3 DNBS刺激によるリンパ球の増殖およびIFN-γ、IL-17産生に対する抗SHPS-1抗体および抗CD47抗体の効果

DNFBをマウス背部に塗布し、5日後に所属リンパ節よりリンパ球を調製した。リンパ球を含む培地中に抗SHPS-1抗体 (p84またはmAb97)、抗CD47抗体 (miap301)、コントロールとして正常ラットIgGを添加後、DNBS (DNFBと同様の抗原性を持つ可溶性物質) またはIL-2にて72時間リンパ球を刺激した。刺激終了12時間前に培地中に [³H] チミジンを加えることでリンパ球の増殖の程度 (A) を、また培地中に分泌されたIFN-γ (B) およびIL-17 (C) の産生量をELISA法により測定した。*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$ (正常ラット抗体との比較)

結果から、抗SHPS-1抗体であるp84およびmAb97は接触性皮膚炎の発症抑制効果をもち、その抑制効果はこれら抗体が持つCD47とSHPS-1の結合阻害活性に依存しないことが示唆された。

3.3 DNFBにより感作されたリンパ球の増殖、サイトカイン産生に対する抗SHPS-1抗体の効果

DNFB誘導性皮膚炎の発症には、所属リンパ節でのDNFB特異的に反応するリンパ球の増殖やそれによるサイトカイン産生が重要である。抗SHPS-1抗体処理により認められたDNFB誘導性皮膚炎の発症抑制は、抗SHPS-1抗体が所属リンパ節でのこれらリンパ球の反応を抑制したためである可能性が高い。そこで、DNFB感作後のマウス所属リンパ節より調整したリンパ球を抗SHPS-1抗体存在下でDNBS（DNFBと同様の抗原性を持つ水溶性物質）刺激し、リンパ球の増殖およびそのサイトカイン産生について検討した。その結果、抗SHPS-1抗体（p84またはmAb97）存在下では、DNBS刺激を行ったリンパ球の増殖が抑制された（図3A）。さらにmAb97処理では、リンパ球からのIFN- γ の産生量が低下した（図3B）。接触性皮膚炎の発症にはIL-17細胞によるIL-17の産生が重要であるが、mAb97処理ではDNBS刺激によるリンパ球からのIL-17産生量の低下も認められた（図3C）。一方、IL-2による抗原刺激に依存しないリンパ球の増殖、IFN- γ 、およびIL-17の産生には、抗SHPS-1抗体処理の影響は認められなかった（図3）。また、抗CD47抗体miap301処理は、リンパ球の増殖、および両サイトカインの産生に影響を与えなかった（図3）。

3.4 抗SHPS-1抗体によるアロ抗原依存的な混合リンパ球培養反応の抑制

SHPS-1がランゲルハンス細胞などの樹状細胞に高く発現することから、抗SHPS-1抗体処理で認められたリンパ球の増殖抑制およびサイトカインの産生抑制は、所属リンパ節での樹状細胞によるT細胞の活性化の過程に抗SHPS-1抗体が抑制的に機能している可能性を示すとも考えられる。そこで、樹状細胞によるアロ反応性CD4⁺T細胞の増殖とこれらT細胞からのIFN- γ の産生に対する抗SHPS-1抗体の効果について検討した。C57BL/6マウス脾臓より調製したCD11c⁺樹状細胞とBALB/cマウスより調製したCD4⁺T細胞の混合培養を抗SHPS-1抗体存在下で行ったところ、mAb97ではCD4⁺T細胞の増殖を抑制する傾向が認められたが、p84抗体では認められなかった（図4A）。また、T細胞によるIFN- γ の産生についてはmAb97、p84のどちらにおいてもその産生量に影響は認められなかった（図4B）。一方、抗CD47抗体処理によるT細胞の増殖、IFN- γ の産生量の変化は、全く認められなかった（図4）。

4. 考 察

DNFB誘導性皮膚炎の発症におけるCD47-SHPS-1系の役割についてSHPS-1 KOマウス、CD47 KOマウスを用い解析を行なったところ、SHPS-1 KOマウスではDNFB誘導性皮膚炎の発症が抑えられたが、CD47KOマウスではその発症の抑制が認められなかった。これまで、自己免疫疾患の発症にはSHPS-1とCD47の相互作用が関与すると考えられたが⁷⁾、これらの実験結果から、SHPS-1は接触性皮膚炎の発症に重要であるが、CD47はその発症に必須ではないと考えられた。また、CD47とSHPS-1の結合を阻害する抗SHPS-1抗体であるmAb97、および両者の結合を阻害しない抗体であるp84をマウスに投与し、接触性皮膚炎の発症に対する影響を検討したところ、どちらの抗体によってもその発症が抑制された。一方、CD47とSHPS-1との結合を阻害する抗CD47抗体であるmiap301の投与では抑制されなかった。これらの結果は、SHPS-1とCD47との相互作用が接触性皮膚炎の発症に重要ではないことを支持するものである。

抗SHPS-1抗体投与により接触性皮膚炎の発症が抑制されが、これは細胞表面上に発現するSHPS-1が抗体により架橋され、SHPS-1の機能が阻害されたことによる可能性が考えられる。実際、SHPS-1を発現する培養細胞を抗SHPS-1抗体で処理した際、細胞表面上に発現するSHPS-1はエンドサイトーシスされることを認めている。したがって、抗SHPS-1抗体処理はランゲルハンス細胞および樹状細胞上のSHPS-1のエンドサイトーシスを誘導することにより、SHPS-1の機能を抑制した可能性が考えられる。一方で、抗SHPS-1抗体の処置によりSHPS-1はその細胞内領域にチロシンリン酸化を受けることを確認している。SHPS-1はチロシンリン酸化依存的に血球系細胞の種々の生理機能を負に制御するチロシンホスファターゼSHP-1と結合し、SHP-1を活性化することが知られている⁵⁾。したがって、抗SHPS-1抗体処理によりSHPS-1はSHP-1の活性化を介して、樹状細胞の生理機能を負に制御することで接触性皮膚炎の発症を抑制している可能性も考えられる。しかし、樹状細胞に対する抗SHPS-1抗体の作用機構の詳細については、今後の検討課題である。

DNFBで感作されたSHPS-1 KOマウスより単離したランゲルハンス細胞は、運動能とTNF- α の産生の障害を示す⁹⁾。また、SHPS-1 KOマウスおよび抗SHPS-1抗体処理を行った野生型マウスでは、DNFB刺激によるランゲルハンス細胞の成熟が障害を受けることも報告されている⁶⁾。これらに加えて、抗SHPS-1抗体であるmAb97、p84が、DNFBで感作を受けた野生型マウスより調製したリンパ球のDNBS刺激による細胞増殖を抑制し、さらにmAb97はリンパ球からのIFN- γ とIL-17の産生を抑制した。また、リンパ球混

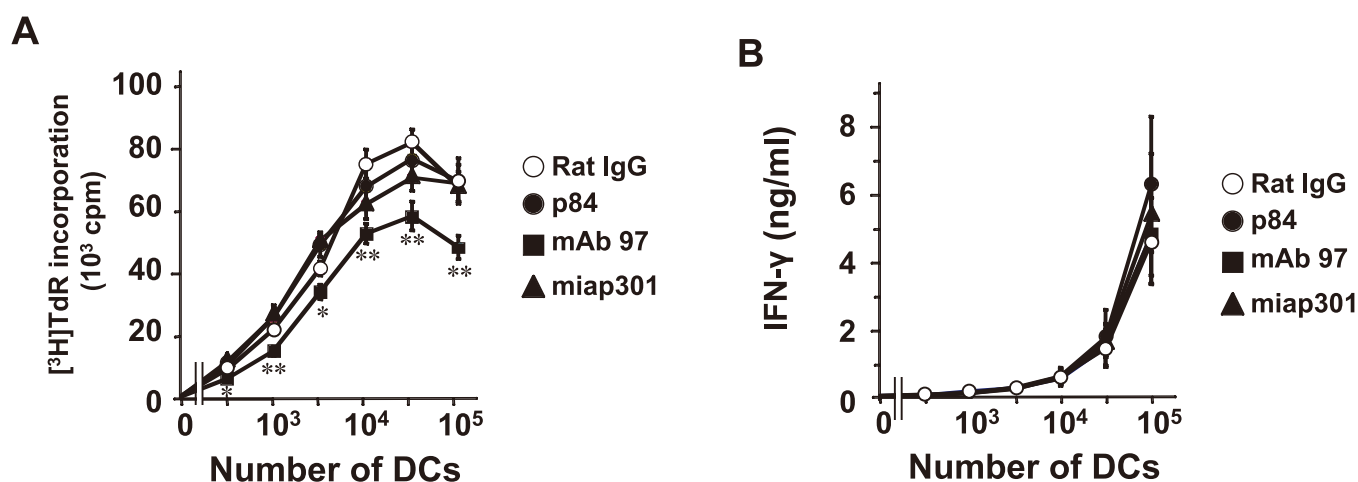


図4 樹状細胞依存的なCD4⁺T細胞の増殖、IFN-γ産生に対する抗SHPS-1抗体および抗CD47抗体の効果
抗SHPS-1抗体(p84またはmAb97)、抗CD47抗体(miap301)またはコントロールとして正常ラットIgGを培地中に添加し、図中で示した細胞数のマウス脾臓由来のCD11c⁺樹状細胞とマウス脾臓由来CD4⁺T細胞の混合培養を行い、³Hチミジンの取り込み量によりCD4⁺T細胞の増殖の程度(A)を測定し、またIFN-γの産生量(B)をELISA法にて測定した。樹状細胞はC57BL/6マウスより調製し、CD4⁺T細胞はBALB/cマウスより調製した。*, P<0.05, **, P<0.01 (正常ラット抗体との比較)

合試験からは、樹状細胞によるCD4⁺T細胞の増殖の誘導が、mAb97処理により抑制されることが明らかとなった。すなわち、抗SHPS-1抗体によるT細胞の増殖とT細胞からのサイトカイン産生の抑制が、抗SHPS-1抗体の持つ誘導性皮膚炎症抑制につながる可能性が示唆された。

本研究により、SHPS-1は接触性皮膚炎の発症に重要であり、樹状細胞の運動、成熟、T細胞の活性化などに関与することが示唆された。その一方で、SHPS-1とCD47の相互作用は、その発症には関与しないと考えられた。また、接触性皮膚炎の発症抑制に抗SHPS-1抗体が有効であることが明らかとなった。今後、SHPS-1の樹状細胞における生理機能を明らかにすると共に、接触性皮膚炎の発症をより効率よく抑制する抗SHPS-1抗体の作製が求められる。

(文 献)

- 1) Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, et al. :Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 24, 677-688, 2006.
- 2) Kikly K, Liu L, Na S, et al. :The IL-23/Th17 axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 670-675, 2006.
- 3) Iwakura Y, Ishigame H. :The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J. Clin. Invest.* 116, 1218-22, 2006.
- 4) Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, et al. :Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* 17, 375-387, 2002.
- 5) Matozaki T, Murata Y, Okazawa H, et al. :Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRPα signalling pathway. *Trends Cell Biol.* 19, 72-80, 2009.
- 6) Fukunaga A, Nagai H, Yu X, et al. :Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate 1 regulates the induction of Langerhans cell maturation. *Eur. J. Immunol.* 36, 3216-3226, 2006.
- 7) Tomizawa T, Kaneko Y, Saito Y, et al. :Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis and impaired T cell priming by dendritic cells in Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate-1 mutant mice. *J. Immunol.* 179, 869-877, 2007.
- 8) Motegi S, Okazawa H, Murata Y, et al. :Essential roles of SHPS-1 in induction of contact hypersensitivity of skin. *Immunol. Lett.* 121, 52-60, 2008.
- 9) Fukunaga A, Nagai H, Noguchi T, et al. :Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate 1 regulates the migration of Langerhans cells from the epidermis to draining lymph nodes. *J. Immunol.* 172, 4091-4099, 2004.

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

名古屋市立大学大学院医学研究科 加齢・環境皮膚科学

山口 裕 史

Palmoplantar skin, which stands for palms of the hands and soles of the feet, is generally hypo-pigmented compared with non-palmoplantar skin on the rest of the body. We have been hypothesizing that palmoplantar skin phenotype derives from the dermal fibroblasts, which influence overlying epithelium. We have proved that cultured fibroblasts derived from palmoplantar skin express higher levels of dickkopf1 (DKK1), which is an inhibitor of Wnt signalling, than those derived from non-palmoplantar skin at the RNA level measured by RT-PCR and at the protein level by Western blotting and immunocytochemistry. We also proved that DKK1 suppresses melanocyte growth and differentiation through the Wnt/ β -catenin/MITF pathway. DKK1 also suppresses melanin uptake by epidermal keratinocytes via PAR2, which explains why DKK1 causes hypo-pigmentation in three dimensional skin equivalents. Additionally, DKK1 increases the growth of keratinocytes via the induction of α KLEIP and keratin 9. Male type baldness is associated with higher DKK1 expression levels. In this study, we evaluated the expression patterns of DKK1 between palmoplantar skin and non-palmoplantar skin *in vivo*. Western blotting and immunohistochemistry indicate that the expression of DKK1 is upregulated in palmoplantar skin compared with non-palmoplantar skin *in vivo*. We conclude that the expression of DKK1 is upregulated *in vivo*, thus maintaining the homeostasis of palmoplantar skin, which is non-hair bearing, thick and hypopigmented skin. Further studies will focus on the effect of DKK1 on anti-aging.

1. 緒 言

皮膚科専門医にとって、掌蹠(手掌・足底)にできた皮膚欠損の治療には難渋し、問題となることがある。掌蹠皮膚は全体の約5%しかない特殊な皮膚であるからである。掌蹠はなぜ分厚いか・色が白いか・毛がないかを疑問に思ったことはないだろうか? 掌蹠の皮膚は分厚い、つまり外的刺激に強いという特徴があり、他の部位の皮膚を用いて再建すると多くの点で不都合が生じる。他部位の皮膚を用いて再建された場合、新たな皮膚欠損が痛みを伴い出現することも多い。高齢化社会で静脈性・動脈性の変化による皮膚欠損がおきることが近年脚光を浴びている。特に糖尿病が原因の皮膚の障害は足先や指先から始まることが多い。なぜ掌蹠は特殊な皮膚を構築しているかを我々が行ってきた研究を中心に述べ、本研究助成を得た成果を報告する。

1.1 なぜ掌蹠は分厚いのか?

皮膚を移植する植皮は以前より、分厚ければ分厚いほど機能的にも見た目にも良いとされていた。私は形成外科医を目指していた頃、大いに疑問を感じていた。皮膚には表皮といわれる最外層の上皮成分と真皮といわれるその下層の間葉成分とからなる。皮膚は場所ごとに、分厚さ、色合

い、毛の密度が違う。分厚い皮膚を移植すれば、その元の場所の皮膚の性質をそのまま移すことになる。周囲の組織との違和感を患者さん本人やそのご家族が非常に気にしている現状を目の当たりにした。しかも前述のように、掌蹠にやけどなどで皮膚欠損が生じ、掌蹠以外の皮膚で植皮された場合、活発なお子さんであれば特に、皮膚潰瘍やそれに伴う痛みの原因となることがある。一人の医者として何とか良い治療法を開発したいと考え悩んだ。

そこで立てた仮説は、「皮膚が場所により違う(頭部には毛があり、掌蹠にはない)のは、真皮線維芽細胞という間葉系由来細胞が、最外層に存在する上皮系成分(表皮細胞やメラノサイト)に影響を及ぼすから」というものであった。この仮説自体は胎生期にはある程度認められているものの、胎生期以後では一般的な概念ではなかった。

まずはこの仮説を証明するために、同一個体から掌蹠真皮線維芽細胞と大腿部などの掌蹠以外の線維芽細胞とを培養した。別個体の掌蹠以外の表皮細胞(およびコントロールとして掌蹠由来表皮細胞)を用意した。掌蹠表皮細胞にはケラチン9という特殊なケラチンが産生されることが分かっていたので、掌蹠線維芽細胞と共培養した掌蹠以外の表皮細胞にケラチン9が誘導されるか調べた。mRNAレベルでもSCIDマウスを用いた蛋白レベルでもケラチン9の誘導が確認された¹⁾。

以上の基礎データを基に、実際に患者さんに本治療概念を臨床応用した。つまり、掌蹠皮膚欠損創に掌蹠以外からの表皮成分のみを採取し移植し、分厚い皮膚が形成されるかを確認した(図1)。予想通り、従来の掌蹠以外由来の植皮は分厚い皮膚へと変化せず、移植された部位の性質を得ることなく、移植される前の状態の皮膚のままであっ



The effects of dickkopf 1 (which is an inhibitor of Wnt signaling pathway and is highly expressed in palmoplantar areas) on anti-aging (including the regulation of pigmentation, hair follicles and skin regeneration)

Yuji Yamaguchi

Department of Geriatric and Environmental Dermatology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

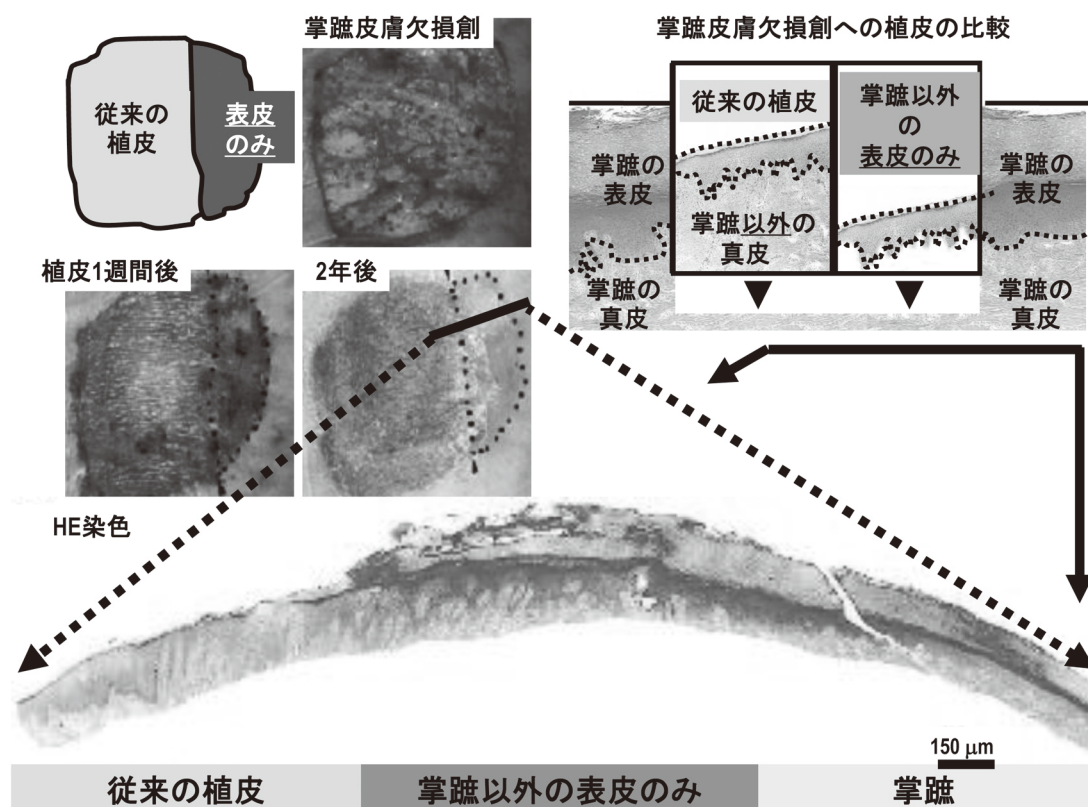


図1 掌蹠皮膚欠損創への植皮の比較. (文献2より改変)

た。ところが、厚さ0.2ミリにも満たない掌蹠以外の表皮のみを移植された場合、周辺の掌蹠の組織を反映するように、掌蹠の皮膚へと変化していた²⁾。糖尿病性足潰瘍³⁾やリウマチ性潰瘍⁴⁾やその他の疾患が原因の掌蹠や指端・足指の皮膚潰瘍⁵⁾においてもこの治療法が非常に有効であることが証明された。

つまり、掌蹠がなぜ分厚いかの一つの理由として、掌蹠真皮成分がその上の上皮成分に作用しているからと考えられる。この掌蹠真皮による掌蹠皮膚の誘導は70歳代の成人でも起こる現象であることが分かっている。

1.2 なぜ掌蹠は色が白いのか？

上記現象の科学的な根拠を解明するために、掌蹠真皮線維芽細胞と掌蹠以外の真皮線維芽細胞とを培養しcDNAマイクロアレイを施行した。多くの遺伝子で発現レベルの差があった⁶⁾。中でも Wnt シグナルの阻害因子である Dickkopf1 (DKK1; 独語で「頭でっかち」という俗語) に注目し機能解析した。DKK1はメラノサイト(掌蹠以外由来のもの)に作用し、増殖を抑制し、メラノサイト関連蛋白の発現をも抑制した(図2)。メラノサイトに DKK1 を作用させることで動く遺伝子群に関しても、マイクロアレイにより網羅的解析を施行し多くの候補遺伝子を導くことができた⁷⁾。また掌蹠真皮で多く発現している DKK1 は表皮細胞にも影響し(図3)、メラニンの取り込みを抑制す

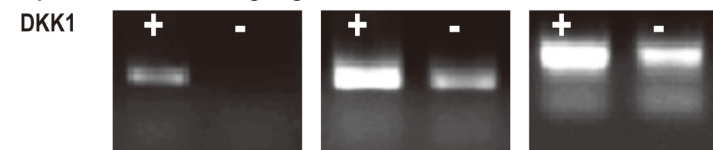
ることも明らかとなった⁸⁾。このように掌蹠の色が白いのは真皮成分の DKK1 がその上に存在するメラノサイトに影響を与えて機能面で抑制しているだけでなく、表皮細胞にも影響を与えてメラニン取り込み能をも抑制しているということが証明された。更に前項の話に戻るが、掌蹠が分厚い理由として、DKK1 がケラチン9を誘導することも証明された。これらの一連の研究成果は総説などで詳細に解説しているので参照されたい^{9,10)}。

1.3 なぜ掌蹠は毛がないのか？

同じ頃 Stanford 大学の Howard Y. Chang らが我々の掌蹠真皮線維芽細胞によるケラチン9の誘導に着目して、ご献体より50か所の様々な部位より皮膚(口腔粘膜や肺組織も含めて)を採取し、真皮線維芽細胞からRNAを抽出した。そして大規模なマイクロアレイを施行し、線維芽細胞の部位特異性を *HOX* 遺伝子(胎生期の対軸形成に関与する転写因子)の発現パターンの違いで部位特異性を説明した。この網羅的遺伝子解析でも多くの遺伝子群に差があり、Wnt シグナルは大きな注目を浴びた。Pennsylvania 大学の Sarah E. Miller らは、遺伝子改変マウス(DKK1を表皮細胞に強制発現させたマウス)を用いた系にて、DKK1を皮膚に作用させると、毛がなくなることを証明した。このように掌蹠で毛がないことも DKK1 で説明される可能性が高い。

RNA レベルでの解析

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> GSE5515 - マイクロアレイ



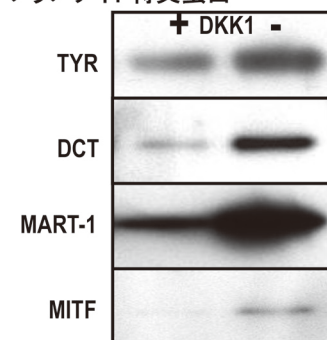
メラノサイトの増殖・分化を抑制

メラノソーム
関連蛋白

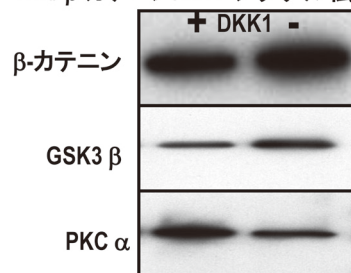
DKK1に対する他の受容体? 細胞死の経路?

蛋白レベルでの解析

メラノサイト特異蛋白



Wnt/ β -カテニン/MITF シグナル伝達



掌蹠由来線維芽細胞

メラノサイト

図2 DKK1 によるメラノサイトの増殖・分化の抑制。(文献6・7より改変)

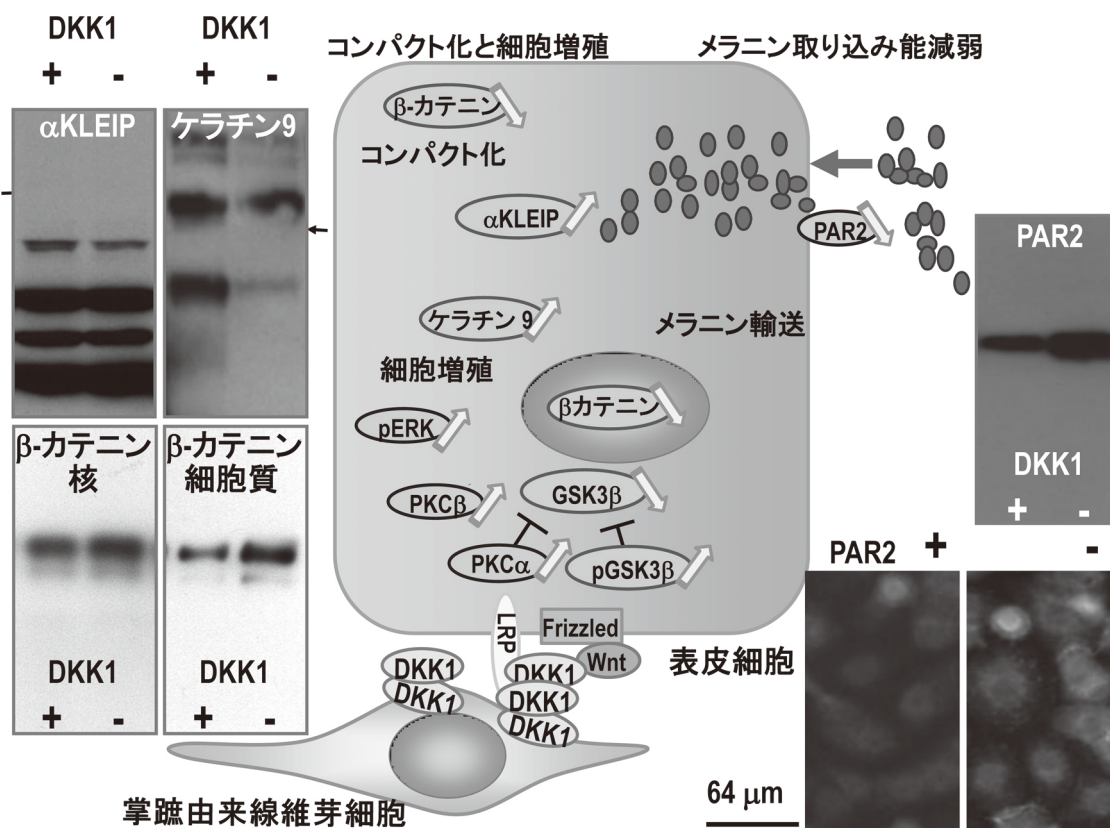


図3 DKK1 による表皮細胞の増殖促進・メラニン取り込み能の抑制。(文献8より改変)

2. 実験

緒言にて説明したように、DKK1には様々な作用があることが分かってきた。DKK1は表皮細胞に作用し、ケラチン9を誘導し表皮細胞の重層化を促進している可能性があること。また表皮細胞のメラニン取り込みのための受容体として知られているPAR2の発現を抑制することで、メラニン取り込みを抑制していること。メラノサイトに作用し、増殖能を抑制しメラノソーム関連蛋白として知られているさまざまな特殊蛋白の発現を抑制していること。などである。更にDKK1は掌蹠真皮に発現が高いことが我々の一連の研究から知られているが、証明されたのは全て培養系 (*in vitro*) であった。そこで今回、成人ヒト生体 (*in vivo*) でも同様のことが証明されるかどうかを調べた。

2.1 Western blotting

同一個体由来の成人ヒト皮膚を用いた。名古屋市立大学倫理審査委員会により承認された範囲内での研究を施行した。同一個体より掌蹠皮膚および周辺の掌蹠以外の皮膚を採取した。これら皮膚は皮膚外科手術による余剰皮膚を用いた。Dispase (Sigma) を用いて表皮成分と真皮成分とに分けた。超音波破碎装置を用いて組織を裁断した。それぞれに対してProteinase Inhibitorを添加したProtein Extraction Bufferに溶解した。8%ゲルを用いてDKK1、ケラチン9、βカテニンの発現量を調べた。

2.2 免疫組織染色

上記同様に同一個体由来の成人ヒト皮膚を用いた。また名古屋市立大学倫理審査委員会により承認された範囲内での研究を施行した。ヘルシンキ宣言も遵守した。同一個体より掌蹠皮膚から周辺の掌蹠以外の皮膚へ移行する部位を採取した。免疫組織染色の手技の詳細は別編などを参照さ

れたい¹¹⁾。DKK1の発現を調べた。既存の抗体がうまく機能しないため、さまざまなエピトープを標識する家兎由来ポリクローナル抗体を独自で作成した。

3. 結果

3.1 Western blotting (図4)

成人ヒト生体においても、掌蹠由来真皮では、掌蹠以外由来真皮と比較し、DKK1の発現量が亢進していた。またコントロールとして掌蹠由来表皮では、掌蹠以外由来表皮と比較し、ケラチン9の発現量が亢進していた。またβカテニンの発現量の違いはうまく証明することができなかった。が、掌蹠由来表皮では、掌蹠以外由来表皮と比較し、βカテニンの発現量が若干低下しているように思われた。

3.2 免疫組織染色 (図5)

上記同様に同一個体の掌蹠から掌蹠外へと移行する部位を中心にDKK1の発現を解析した。対応する明視野との比較で、色素が薄い掌蹠側皮膚の表皮直下では多くのDKK1の発現を認めたのに対して、色素が濃い掌蹠以外の皮膚の

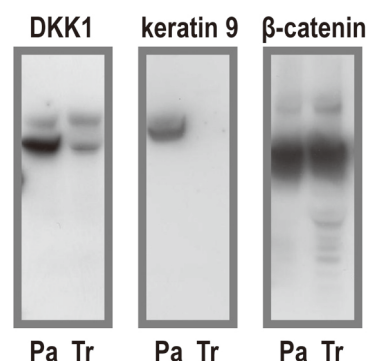


図4 成人ヒト生体での各種因子の発現量の掌蹠・掌蹠以外間比較

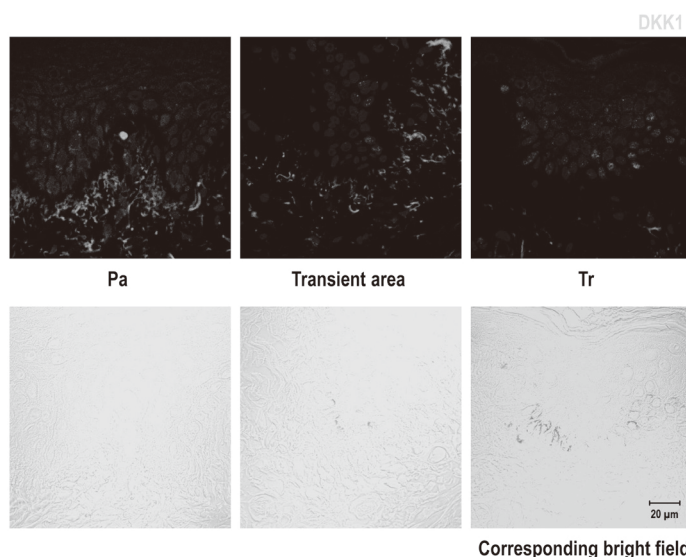


図5 成人ヒト生体での掌蹠・移行部・掌蹠外での DKK1 発現比較

表皮直下にはあまり DKK1 の発現を認めなかった。移行部では色素が薄い個所に DKK1 の発現が強い傾向を認めた。

4. 考 察

上述のように培養系だけでなく生体系でも、成人ヒトでは真皮成分の部位特異性があることが証明された。つまり掌蹠真皮では DKK1 の発現量がその他の部位由来真皮と比較して多いことが示された。今後 DKK1 のアンチエイジング（抗しわ、美白、色素再生、毛髪再生、除毛、皮膚再生）治療薬剤としての可能性を探索していきたい。

老化に伴う顔の「しわ」を気にする方は比較的多い。老化に伴い表皮が薄くなることは知られている。DKK1 を作用させて表皮を厚くすることができれば、しわ取り効果のあるクリーム開発につながると思われる。

老化に伴う顔の「しみ」（正確には肝斑・老人性色素斑）を気にする方も多い。DKK1 を作用させて皮膚色調を薄くすることができれば、全く今までと作用機序の違う美白剤の開発につながると思われる。

老化に伴う「皮膚潰瘍」は近年糖尿病などの生活習慣病の増加に伴い増えている。DKK1 を作用させて手のひら・足のうら型の強い皮膚を再生することができれば、新たな治療法開発に直結すると思われる。

老化に伴う「はげ」（男性型脱毛）を気にする方も多い。DKK1 を拮抗的に作用させて新しい毛生え薬の開発につながると思われる。現実的にもマウスの研究などから DKK1 中和抗体の研究が各種他グループ（米国や韓国）でなされている。

5. 総 括

再生医療が注目される昨今、研究の主流は iPS 細胞に向かっている。が、臨床応用を考慮すると、多くの解決すべき問題点があることが窺い知れる。コスメトロジーと皮膚再生医学は密接に関連しており、最新の技術を駆使して得られた知見は、化粧品学の進歩に直結していると思われる。

手のひら・足のうらの皮膚に張りがあり、色素が薄く、毛が存在しないことの原因解明は、アンチエイジング、美白、脱毛（あるいは毛髪再生）といった美容分野開発へとつながる可能性がある。実際、手のひら・足のうらの真皮線維芽細胞とその上皮系細胞との相互作用を解剖学的に別の個所の相互作用と比較したところ、DKK1 という物質が手のひら・足のうらの真皮でより多く存在することが培養系で証明された。更に今回の研究成果として、生体においても DKK1 を手のひら・足のうらは他部位と比較し多く分泌していることが証明された。

我々の研究グループだけでなく、他の研究者からの報告も総合すると、今後薬剤としての DKK1 の開発に期待がもたれる。様々な抗原を認識する抗体を作成したので、どの

部位がアンチエイジング、美白、脱毛に大きな効果を有するかなどの検討も将来的に可能と思われる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、一部の研究費を援助して下さい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。また本研究は「部位特異的な上皮間葉系相互作用を通じた皮膚疾患病態解明及び再生医療に関する研究」（課題番号 18689028）（H18-H21）及び「部位特異的な皮膚再生医療に関する研究」（課題番号 21591440）（H22-）の二つの課題に対する文部科学省の科学研究費補助金による援助を受けています。本研究を指導して下さいました名古屋市立大学加齢・環境皮膚科学主任教授森田明理先生に感謝します。

(引用文献)

- 1) Yamaguchi Y, Itami S, Tarutani M, 他. Regulation of keratin 9 in nonpalmoplantar keratinocytes by palmoplantar fibroblasts through epithelial-mesenchymal interactions. *J Invest Dermatol* 1999 Apr;112(4):483-488.
- 2) Yamaguchi Y, Kubo T, Tarutani M, 他 Epithelial-mesenchymal interactions in wounds: treatment of palmoplantar wounds by non-palmoplantar pure epidermal sheet grafts. *Arch Dermatol* 2001 May;137(5):621-628.
- 3) Yamaguchi Y, Yoshida S, Sumikawa Y, 他 Rapid healing of intractable diabetic foot ulcers with exposed bones following a novel therapy of exposing bone marrow cells and then grafting epidermal sheets. *Br J Dermatol* 2004 Nov;151(5):1019-1028.
- 4) Yamaguchi Y, Sumikawa Y, Yoshida S, 他 Prevention of amputation caused by rheumatic diseases following a novel therapy of exposing bone marrow, occlusive dressing and subsequent epidermal grafting. *Br J Dermatol* 2005 Apr;152(4):664-672.
- 5) Hanafusa T, Yamaguchi Y, Katayama I. Intractable wounds caused by arteriosclerosis obliterans with end-stage renal disease treated by aggressive debridement and epidermal grafting. *J Am Acad Dermatol* 2007 Aug;57(2):322-326.
- 6) Yamaguchi Y, Itami S, Watabe H, 他 Mesenchymal-epithelial interactions in the skin: high expression of dickkopf1 by palmoplantar fibroblasts results in decreased melanocyte function. *J Cell Biol* 2004 Apr;165(2):275-285.
- 7) Yamaguchi Y, Passeron T, Watabe H, 他 The

effects of dickkopf 1 (DKK1) on gene expression and Wnt signaling by melanocytes: mechanisms underlying its suppression of melanocyte function and proliferation. *J Invest Dermatol* 2007 May;127(5):1217-1225.

- 8) Yamaguchi Y, Passeron T, Hoashi T, 他. Dickkopf 1 (DKK1) regulates skin pigmentation and thickness by affecting Wnt/beta-catenin signaling in keratinocytes. *FASEB J* 2008 Apr;22(4):1009-1020.
- 9) Yamaguchi Y, Brenner M, Hearing VJ. The regulation of skin pigmentation. *J Biol Chem* 2007

Sep;282(38):27557-27561.

- 10) Yamaguchi Y, Hearing VJ. Physiological factors that regulate skin pigmentation. *Biofactors* 2009 Mar-Apr;35(2):193-199.
- 11) Yamaguchi Y, Takahashi K, Zmudzka BZ, 他. Human skin responses to UV radiation: pigment in the upper epidermis protects against DNA damage in the lower epidermis and facilitates apoptosis. *FASEB J* 2006 Jul;20(9):1486-1488.

角層の若返りが皮膚の若返りに果たす役割

久留米大学皮膚科

大 日 輝 記

Chemical peeling is used clinically to improve the cosmetic appearance of the skin that has been damaged by exposure to the sun, which is typically accompanied by pigmentation, dullness and wrinkles. A new peeling agent, 30% salicylic acid in polyethylene glycol (SA-PEG), specifically affects the cornified layer and improves the skin texture without any adverse reaction. SA-PEG treatment did not inhibit the epidermal prostaglandin E₂ production in mice. In mouse epidermal keratinocytes, the level of phosphorylated ERK, which was decreased by chronological aging, was rescued by SA-PEG treatment. These results suggest that the rejuvenation by chemical peeling of the cornified layer is not by inhibition of cyclooxygenase, but is due to unique mechanism that modulates mechanical stress in the epidermis.

1. 緒 言

老化すると肌の張りが失われ、シワが増える。表皮にかかる張力の減少は、角化細胞の増殖、分化、ひいては老化そのものに影響を与えている可能性がある。

ケミカルピーリングは、老化した肌を若返らせ、美容的に改善する臨床的手技である。角層ピーリングであるサリチル酸マクロゴールピーリングは、老化した皮膚の角層を形づくる、未熟で脆弱な cornified envelope (CE) を、成熟した硬い CE に更新する。また、角層のみのピーリングであるにもかかわらず、真皮乳頭層のコラーゲン配列まで改善する。

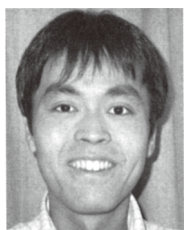
我々は、光老化、光発癌の動物モデルである紫外線照射ヘアレスマウスを用いて、サリチル酸マクロゴールピーリングが光発癌を抑制、減少させることを示した¹⁾。さらに我々は、サリチル酸マクロゴールピーリングが、ヒトおよびマウスで表皮をリモデリングすること、マウスで異常な p53 の発現を正常化させることを示した²⁾。

今回、ピーリングによる表皮のリモデリングが、角化細胞の機械的ストレス環境を修飾することで皮膚の若返りをおこすと考え、表皮に恒常的にかかる力学的ストレスと老化の関係について、ケミカルピーリングの系を用いて検討した。

2. 実 験

1) シクロオキシゲナーゼ阻害作用の否定

サリチル酸自体によるシクロオキシゲナーゼ阻害作用を



Skin rejuvenation by remodeling of the cornified layer

Teruki Dainichi

Department of Dermatology, Kurume University School of Medicine

否定する目的で以下の実験を行った。

- ①ヘアレスマウス (Skh/HR1) で、表皮プロスタグランディン E₂ の粗精製および ELISA による表皮プロスタグランディン E₂ の定量系を確立した。
- ②マウスに UVB を照射後にサリチル酸マクロゴールピーリングを施行し、表皮で誘導されるプロスタグランディン E₂ 産生を経時的に定量した。サリチル酸マクロゴールピーリングが、角化細胞でのプロスタグランディン E₂ 合成を阻害しないか検討した。

2) インテグリンおよびそのシグナル伝達物質の発現評価

角化細胞における機械的ストレス受容体としてのインテグリンのシグナル伝達物質の活性化を、加齢マウス、紫外線照射マウスおよびヒトの前癌状態 (日光角化症)、有棘細胞癌で評価した。

- ①若年マウスと加齢マウスに対してサリチル酸マクロゴールピーリングを施行し、インテグリンレセプターの下流および交叉シグナル伝達物質である ERK (extracellular signal-regulated kinase), FAK (focal adhesion kinase) の発現および活性化を、免疫組織化学で評価した。また紫外線 (UVB) を 20 週間照射したヘアレスマウスの表皮で、ERK, FAK のリン酸化を評価した。さらに、サリチル酸マクロゴールピーリングを施行した場合の影響を評価した。
- ②ヒトの日光角化症および有棘細胞癌の検体で、インテグリンレセプターの下流および交叉シグナル伝達物質である ERK, FAK の発現および活性化を、免疫組織化学で評価した。

3) ケミカルピーリングと表皮の機械的ストレスの変化

ラット足底皮膚に対してケミカルピーリングを週 1 回、計 4 回施行し、表皮梁の深さおよび間隔を組織学的に評価した。

3. 結果

1) シクロオキシゲナーゼ阻害作用の否定

マウスで、表皮プロスタグランディンE₂の定量系を確立した。次に、紫外線照射により表皮にプロスタグランディンE₂を誘導したマウスで、サリチル酸マクロゴールピーリングは角化細胞のプロスタグランディンE₂合成を阻害しないことを証明した(図1)。

2) インテグリンおよびそのシグナル伝達物質の発現評価

角化細胞における機械的ストレス受容体としてのインテグリンのシグナル伝達が、ケミカルピーリングによる表皮のリモデリングで変化するかどうかを、紫外線照射マウスで評価した。インテグリンレセプターの下流の各種シグナ

ル伝達物質、転写因子の活性化を免疫組織化学で評価した。その結果、加齢マウスでは施術6時間後に紫外線照射マウスではピーリングによりERKのリン酸化が若年マウスと同等まで増加した(図2A)。一方、紫外線照射マウスでは施術の3日後に一時低下した後、4週間後に回復することが示された(図2B)。

紫外線によって生じた前癌病変である日光角化症10例および有棘細胞癌12例の病変部におけるFAKのリン酸化を免疫組織化学的に評価したが、一定の傾向はなかった。

3) ケミカルピーリングと表皮の機械的ストレスの変化

表皮梁の深さおよび間隔を定量的に測定したが、有意な変化はなかった。

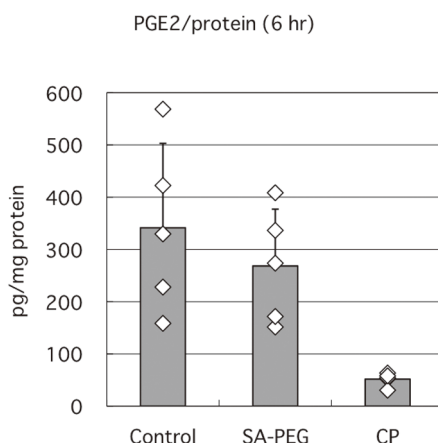


図1 表皮プロスタグランディンE₂の定量。SA-PEG：サリチル酸マクロゴールピーリング、CP：プロピオン酸クロベタゾール。

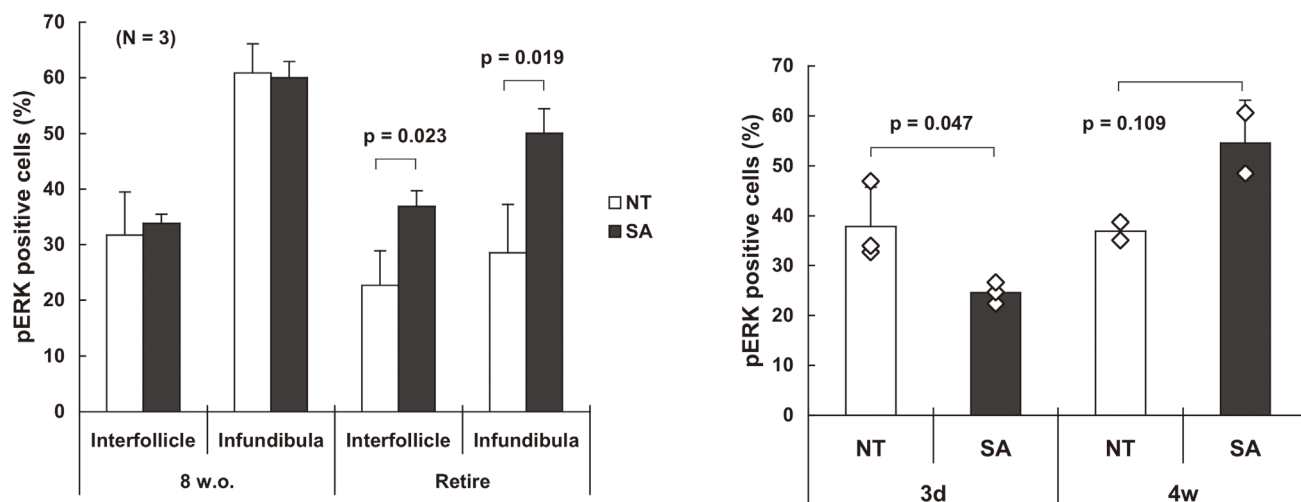


図2 サリチル酸マクロゴールピーリング施術によるマウス表皮活性化ERKの発現に対する影響。

A. 経時的加齢に伴うリン酸化ERKの発現の変化と、ピーリングによる回復。

B. 紫外線連続照射による光老化モデルにおけるリン酸化ERK発現に対するケミカルピーリングの効果。

4. 考 察

今回の実験で、サリチル酸マクロゴールピーリングによる作用が、サリチル酸のシクロオキシゲナーゼ阻害による直接作用であることを否定した。また、機械的ストレスシグナル伝達物質のひとつである活性化ERKの発現が施術により変化することを示した。

角化細胞の分化が、細胞が強いられた形によって誘導されることは、試験管内では古くから示されている³⁾。一方、ヒトの乳癌細胞で、細胞外基質の硬さ(牽引応力)が、インテグリンレセプターを介して悪性度(増殖、形態等)を高めることが示された⁴⁾。

我々は、角化細胞の力学的ストレスと老化の関係について、次のように考えた⁵⁾。「角層は、表皮の力学的環境を支配することで、正常な増殖、分化ならびに構造維持に機能している。老化によって角層の機能が損なわれ、力学的バランスが破たんすると、力学的ストレスの受容体を介したシグナル伝達を経て、シワの形成や発癌に結びつく。」ケミカルピーリングは、角層を更新し、表皮の力学的環境を回復させることで、角化細胞のみならず、間接的に真皮にまで影響を及ぼし、抗加齢にはたらく可能性がある。

(参考文献)

- 1) Dainichi T, Ueda S, Isoda M, et al Chemical peeling with salicylic acid in polyethylene glycol vehicle suppresses skin tumor development in hairless mice. *Br J Dermatol*, 148, 906-12, 2003
- 2) Dainichi T, Amano S, Matsunaga Y, Iriyama S, Hirao T, Hariya T, Hibino T, Katagiri C, Takahashi M, Ueda S, Furue M. Chemical peeling by SA-PEG remodels photo-damaged skin: suppressing p53 expression and normalizing keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol*, 126, 416-21, 2006
- 3) Cell shape controls terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. Watt FM, Jordan PW, O'Neill CH. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85: 5576-80, 1988
- 4) Tensional homeostasis and the malignant phenotype. Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, Lakins JN, Rozenberg GI, Gefen A, Reinhart-King CA, Margulies SS, Dembo M, Boettiger D, Hammer DA, Weaver VM. *Cancer Cell* 2005; 8: 241-54.
- 5) Dainichi T, Ueda S, Furue M, Hashimoto T. By the grace of peeling: the brace function of the stratum corneum in the protection from photo-induced keratinocyte carcinogenesis. *Arch Dermatol Res*, 300, s31-8, 2008

ニッケルの溶出と炎症誘発作用機構の解析

東北大学大学院薬学研究科生活習慣病治療薬学分野

平澤 典保

Nickel (Ni) is contained in various alloys, which are widely used in accessories and biomaterials, and causes inflammation and allergy. However, little is known about the regulation of Ni release from alloys *in vivo*. In this study, we established a novel *in vivo* model in which the release of Ni from metal wire could be analyzed quantitatively. A Ni wire (99.9 %; $\phi 0.8$ mm $\times$ 5 mm) was implanted subcutaneously in the dorsum of mice. Ni ions in the skin tissue (diameter : 14 mm) on the wire were extracted and quantified by the fluorometry using Newport Green. The content of Ni ion in the tissue was significantly increased from 8 h. When lipopolysaccharide (LPS, 1 μ g) was injected into the same site immediately after the implantation of Ni wire, the content of Ni ions in the tissue was significantly increased. These results suggest that the release of Ni from metal wires *in vivo* was enhanced by LPS-induced inflammation. The findings were confirmed by *in vitro* model using a macrophage-like cell line RAW264. RAW 264 cells (1×10^5 cells/mL, 0.2 mL) were seeded on a Ni plate (5 mm square) and incubated for 24 h in the medium containing LPS (0.1, 0.3 and 1.0 μ g/mL). LPS enhanced the release of Ni by RAW 264 cells in a concentration-dependent manner. Interestingly, the enhancement was observed only when the cells were attached with Ni plate. The inhibitor of lysosome chloroquine (10 μ M) and the V-ATPase inhibitor bafilomycin A₁ (1 nM) but not the Na⁺/H⁺ exchanger (NHE) inhibitor amiloride inhibited partially the elution of Ni by unstimulated RAW264 cells. In contrast, chloroquine, bafilomycin A₁ and amiloride potently inhibited that induced by the LPS-stimulated RAW264 cells. These results suggested that LPS-stimulated RAW264 cells caused the release of Ni ions via the release of lysosome and via the activation of V-ATPase and NHE. In conclusion, we established the novel models for the release of Ni from metals *in vivo* and *in vitro* and demonstrated that the activation of inflammatory cells apparently enhanced the release of Ni.

1. 緒 言

肌に直接接する装飾品に含まれるニッケルは、汗で溶出されやすくアレルギーや炎症を誘発しやすい金属である。ひとたび金属アレルギーを発症すると、ニッケル以外の金属にも過敏になることが知られており、種々の装飾品により発赤、かゆみなどが生じて、装飾品を身につけることが制限される。また金属イオンにより強い接触皮膚炎を起こし、色素沈着を誘発する場合もあり、コスメトロジーの観点からも大きな問題となっている。ニッケルが金属アレルギーを最も引き起こしやすい金属であることは周知の事実であり、そのアレルギー誘発機構については多くの報告がなされてきた^{1, 2)}。従来、ニッケルは組織蛋白に結合しハプテンとなると考えられてきたが、最近ニッケルは直接リンパ球上のMHC 複合体に結合して、細胞を活性化することが明らかにされ³⁾、組織蛋白との結合による抗原の形成は必ずしも必要ではないことも示唆された。一方、金属アレルギーの初期段階はニッケルを含む装飾品や金属医用材料からのニッケルイオンの溶出である。しかしこのニッケル

ルが溶出される分子機構や炎症が生じて金属周囲組織の環境が変化した場合のニッケル溶出の変化の定量的な解析はこれまでなされていない。その最も大きな理由は優れた実験モデルがなかった点にある。

申請者はニッケル線をマウス背部皮下に埋植させる新規モデルを開発し⁴⁾、ニッケルによる炎症反応の誘発とニッケルの溶出を定量的に解析することを可能にした。本研究は、本モデルを用いて、ニッケル線からのニッケル溶出が、その周囲で感染を模倣した炎症を誘発したときに増大することを示した。また、炎症細胞を用いた細胞培養系でのニッケルイオン溶出評価系も確立し、ニッケル溶出の分子機序について解析した。

2. 実験方法

2-1. ニッケル線誘発炎症モデルの作製⁴⁾

Diethyl ether麻酔下、マウス (22–25g) の背部皮下に移植針 (13G) を用いて、UV 照射滅菌処理したニッケル線 (99.98 % ニッケル, ニラコ) ($\phi 0.8$ mm $\times$ 5 mm) を埋植した。その直後に、lipopolysaccharide (LPS, 5 μ g/mL) 0.2mL をニッケル線近傍に皮下投与した。対照群として saline を 0.2 ml 皮下投与した。

2-2. 組織中のニッケル量の測定

一定時間後に、エーテル麻酔下マウスを脱血死させ、ニッケル線を中心に、皮打ち抜き用パンチ (内径1.4 cm) で皮膚 (表皮、真皮及び皮下組織) を打ち抜き、ニッケル



Elution of Ni ions from materials and enhancement by inflammation

Noriyasu Hirasawa

Laboratory of Pharmacotherapy of Life-style Related Diseases Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University

線を除いた後、皮膚をEppendorf tube (1.5mL) に入れた。その後、Milli Q 水500μL加えて、ミンスし、4℃で24時間ニッケルイオンを抽出した。この上清を希釈し、Newport Green DCF dipotassium saltを最終濃度 1 μM となるように加え、分光蛍光光度計F-2000 (日立ハイテック) を用いてEx 505nm/Em535nmの蛍光を測定した。

2 - 3. マウスマクロファージ様細胞株 RAW-264 細胞によるニッケル溶出の測定

ニッケル板 (99.98%, 厚さ 0.05 mm, ニラコ; 5×5 mm) を 96 well plate の 1 well につき 1 枚ずつ設置し、RAW264 細胞 ($1.0 - 5.0 \times 10^5$ cells/ml 10 % (v/v) FBS-EMEM) を 200 μL ずつ播種し、5 % CO₂ 存在下 37℃ で一定時間培養した。ニッケル板非接着群は 96-well plate にあらかじめ RAW264 細胞を播種し、2 時間後にニッケル板を細胞と接触しないように斜めに設置した。

2 - 4. 薬物処理

細胞を播種した 2 時間後、chloroquine⁵⁾ (最終濃度 10 μM)、amiloride⁶⁾ (最終濃度 100 μM)、あるいは bafilomycin A₁⁷⁾ (最終濃度 1 nM) を加え 1 時間前処理した後、LPS (最終濃度 1 μg/mL) で一定時間刺激した。

2 - 5. 統計処理

棄却検定はTompson's F-testにより行った。有意差検定はStudent-Newman-Keuls testにより行った。

3. 結 果

3 - 1. ニッケル線誘発炎症

マウス背部皮下にニッケル線を埋植し、ニッケル線により生じる炎症を観察した。8 時間後ではニッケル線周囲の組織において、弱いながらも発赤が認められ、24 時間以後においては出血を伴う強い炎症が認められた (Fig. 1A)。また、浮腫のパラメータとして皮膚重量を測定した結果、8 時間後の皮膚重量は 100 mg 前後であり有意な増加は認められなかったが、24 時間後においては 170 - 180 mg、72 時間後においては 200 - 220 mg となり、有意な増加が認められた (Fig. 1B)。

3 - 2. ニッケル線表面の観察

埋植して 72 時間後のニッケル線の表面を走査型電子顕微鏡を用いて観察した。未処置のニッケル線の表面と比較して埋植後のニッケル線の表面は腐食が確認され、ニッケルが溶出していることが示唆された (Fig. 2)。

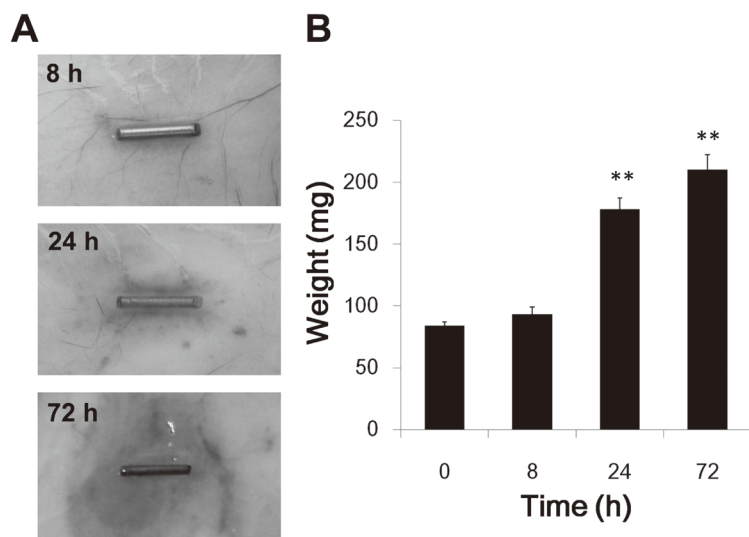


Figure 1. Ni wire-induced inflammation

(A) A Ni wire was implanted subcutaneously in the dorsum of each mouse. The mice were sacrificed 8, 24 and 72 h after the implantation, and the skin around the wire was photographed.

(B) The skin tissue (diameter: 14 mm) on the wire was excised and the weight of tissue was measured. The values are the means of four mice with S.E.M. shown by vertical bars. Statistical significance; **P<0.01 vs. the 0 h group.

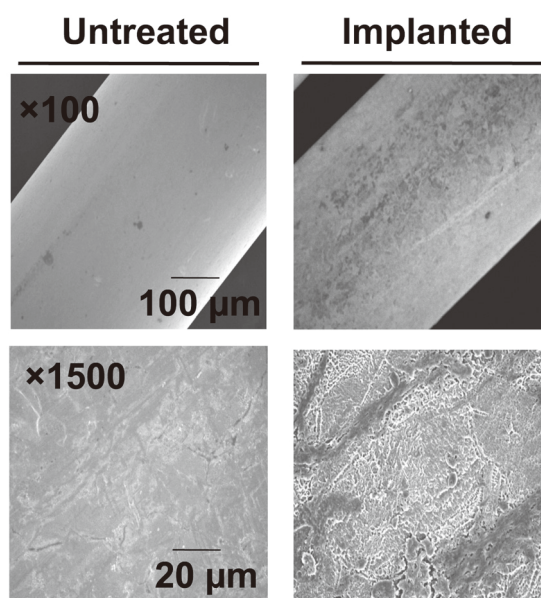


Figure 2. Erosion of the surface of Ni wire

The surfaces of untreated and implanted Ni wire (72 h) were analyzed by scanning electron microscope.

3 - 3. Lipopolysaccharide によるニッケル線周囲組織へのニッケル溶出量の増大

ニッケル線からのニッケル溶出が周囲の炎症反応により影響を受けるか明らかにするため、ニッケル線の埋植と同時に起炎剤lipopolysaccharide (LPS)を用いて炎症反応を誘発した場合の、ニッケル溶出量の変化を解析した。埋植24時間後のニッケル線周囲組織の切片を作製後、Hematoxylin-Eosin染色し組織形態を観察した。ニッケル線の埋植によりニッケル線周囲組織の皮膚の肥厚及び好中球やマクロファージなどの炎症細胞の浸潤が認められ、LPSを投与した場合はさらに炎症細胞の浸潤が増大した (Fig. 3A)。このような条件下でニッケル溶出について比較したところ、埋植8時間後及び24時間後においてLPSを注射した群 (LPS群) では、vehicle (Saline) を注射した場合 (Saline群) に比べてニッケル溶出が有意に増加した (Fig. 3B)。従ってLPSで炎症反応を誘発すると、ニッケル線からのニッケル溶出が促進することが明らかになった。

3 - 4. LPS 刺激マウスマクロファージ様細胞株 RAW264 によるニッケル板からのニッケル溶出の促進

LPSによる炎症反応によりニッケル溶出が促進する現象が*in vitro*においても認められるか明らかにするため、マ

ウス腹腔由来マクロファージ細胞株であるRAW264細胞を用い、培養細胞によるニッケル溶出を検討した。96-well plateの各wellに5 mm角のニッケル板を置き、10% FBSを含むEMEM培地を加えて24時間incubateした場合には顕著なニッケル溶出は見られなかった。しかし、ニッケル板上にRAW264細胞 (1.0 及び 3.0×10^5 cells/mL) を播種した場合には細胞数依存的にニッケル溶出が促進した。さらにRAW264細胞をLPSで刺激したところ、ニッケルの溶出量が有意に増加した (Fig. 4A)。

また細胞播種数を 1.0×10^5 cells/mL とし、RAW264細胞を各濃度のLPSで刺激したところ、LPS濃度依存的にニッケルの溶出量が増加した (Fig. 4B)。以上の結果から、RAW264細胞によりニッケル板からのニッケル溶出は促進され、この溶出作用はLPS刺激により細胞を活性化することにより著しく促進されることが明らかになった。

3 - 5. LPS 刺激 RAW264 細胞の培養上清の pH 解析

LPS刺激後のRAW264細胞の培養上清中のpHを解析した。その結果、培養上清中のpHは細胞数依存的に低下する傾向を示したものの、pH値7.2-7.5程度とその変動はごくわずかであった (Fig. 5A)。また、LPS刺激による培養上清のpH値の変化は認められず (Fig. 5B)、培養上清

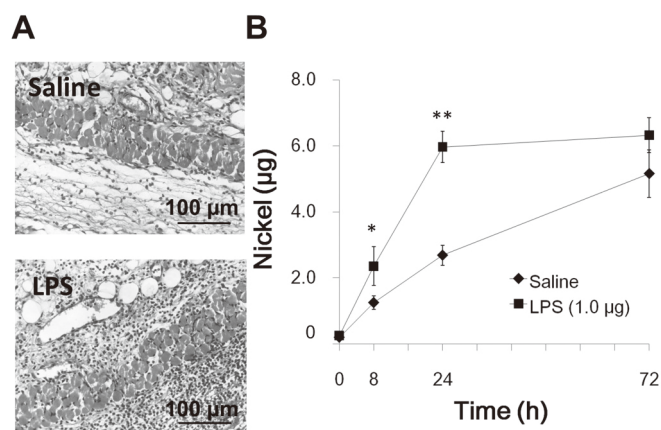


Figure 3. Increase in release of Ni by lipopolysaccharide-induced inflammation

(A) Ni wire was implanted subcutaneously in the dorsum of each mouse. Lipopolysaccharide (LPS) was injected into the same site immediately after the implantation. Twenty-four hours after the implantation, the mice were sacrificed and the skin on the wire was dissected. Paraffin section of the tissue was prepared and stained with hematoxylin-eosin.

(B) The skin tissue (diameter: 14 mm) on the wire was excised 8, 24 and 72 h after the implantation of Ni wires and Ni in the tissue was quantified by the fluorometry. The values are the means of five mice with S.E.M. shown by vertical bars. Statistical significance; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. the Saline group at the corresponding point.

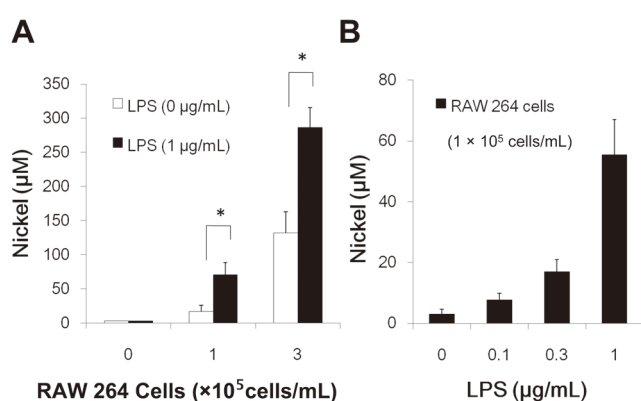


Figure 4. Enhancement of elution of Ni ions from Ni plate by lipopolysaccharide-stimulated RAW 264 cells

(A) RAW 264 cells (1 and 3×10^5 cells/mL, 0.2 mL) seeded on a Ni plate (5 mm square) and incubated for 24 h in the presence (closed columns) or absence (open columns) of LPS (1 µg/mL). The values are the means of five samples with S.E.M. shown by vertical bars. Statistical significance; * $P < 0.05$ vs. the corresponding unstimulated group.

(B) RAW 264 cells (1×10^5 cells/mL, 0.2 mL) seeded on a Ni plate (5 mm square) and incubated for 24 h in containing LPS (0.1 , 0.3 and 1.0 µg/mL). The concentration of Ni in the supernatant was determined after the 24 h incubation. The values are the means of five samples with S.E.M. shown by vertical bars. Statistical significance; * $P < 0.05$ vs. the unstimulated group.

中のpHはLPS刺激の有無に関わらず、一定に保たれていることが明らかになった。従って、LPSによるニッケル溶出の増大は、培養上清のpHが低下したためではないことが示唆された。

3 - 6. LPS 刺激 RAW264 細胞によるニッケル溶出促進の経時変化

RAW264細胞をニッケル板上に播種し、LPSで刺激した時のニッケル溶出の経時変化を解析した。Mediumのみでincubateした場合、及びニッケル板上でRAW264細胞を培養した場合では、培養上清中のニッケル濃度は、24時間経過後もわずかに増加した程度であった。しかし、LPSでRAW264細胞を刺激した場合には培養液のニッケル濃度は播種4時間後から増加し始め、8時間以後ではLPSで刺激していない群と比較して有意に増加した (Fig. 6)。

3 - 7. RAW264 細胞によるニッケル溶出促進におけるニッケル板と細胞間の接着

RAW264細胞をLPSで刺激すると、ニッケル溶出が促進するメカニズムとして細胞とニッケル板の接着部位の微小環境において酸性化が生じニッケルが溶出する可能性が考えられる。この点を明らかにするために、RAW264細胞をニッケル板上に播種しニッケル板と細胞を接着させた場合、あるいはニッケル板と細胞を接着させずに培養した場合のニッケル板からのニッケル溶出を比較した。その結果、LPSで刺激していない条件下ではRAW264細胞とニッケル板との接着及び非接着に関わらず、RAW264細胞のニッケル溶出量に差は認められなかった。しかし、RAW264細胞をニッケル板上に播種しニッケル板に接着させた場合では、RAW264細胞をLPSで刺激すると、ニッケル溶出が有意に促進したのに対し ($P < 0.01$)、ニッケル板がRAW264細胞と接着しない条件下においては、LPSで刺激を加えてもニッケル溶出の促進は認められなかった (Fig. 7)。従ってRAW細胞におけるLPS刺激によるニッケル溶出促進作用の発現には、ニッケル板と細胞との接着が必要であることが示唆された。

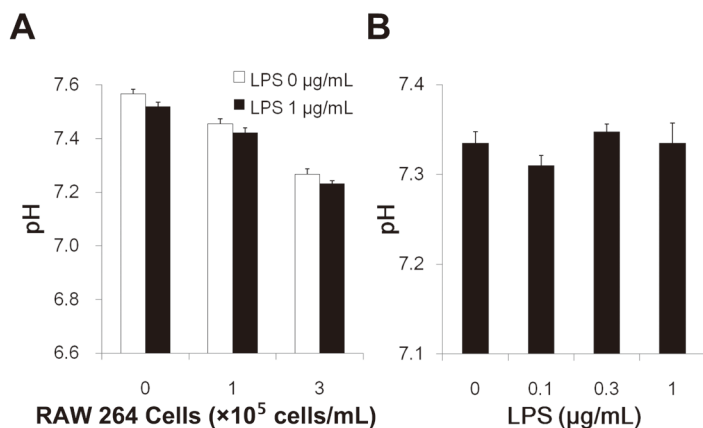


Figure 5. pH in the culture medium of lipopolysaccharide-stimulated RAW 264 cells

(A) RAW 264 cells (1 and 3×10^5 cells/mL, 0.2 mL) seeded on a Ni plate (5 mm square) and incubated for 24 h in the presence (closed columns) or absence (opened columns) of LPS (1 $\mu\text{g/mL}$). The pH of the culture medium was determined with pH meter. The values are the means of five samples with S.E.M shown by vertical bars.

(B) RAW 264 cells (1×10^5 cells/mL, 0.2 mL) seeded on a Ni plate (5 mm square) and incubated for 24 h in containing LPS (0.1 , 0.3 and 1.0 $\mu\text{g/mL}$). The pH in the culture medium was determined with pH meter. The values are the means of five samples with S.E.M. shown by vertical bars.

細胞をニッケル板上に播種しニッケル板と細胞を接着させた場合、あるいはニッケル板と細胞を接着させずに培養した場合のニッケル板からのニッケル溶出を比較した。その結果、LPSで刺激していない条件下ではRAW264細胞とニッケル板との接着及び非接着に関わらず、RAW264細胞のニッケル溶出量に差は認められなかった。しかし、RAW264細胞をニッケル板上に播種しニッケル板に接着させた場合では、RAW264細胞をLPSで刺激すると、ニッケル溶出が有意に促進したのに対し ($P < 0.01$)、ニッケル板がRAW264細胞と接着しない条件下においては、LPSで刺激を加えてもニッケル溶出の促進は認められなかった (Fig. 7)。従ってRAW細胞におけるLPS刺激によるニッケル溶出促進作用の発現には、ニッケル板と細胞との接着が必要であることが示唆された。

3 - 8. リソソーム阻害薬及びプロトン輸送阻害薬のRAW264 細胞によるニッケル溶出抑制作用

RAW264細胞によるニッケル溶出効果のメカニズムを明らかにするため、LPS非存在下リソソーム阻害薬 chloroquine ($10 \mu\text{M}$)、 Na^+/H^+ exchanger (NHE) 阻害薬 amiloride ($100 \mu\text{M}$)、vacuolar-type (H^+)-ATPase (v-ATPase) 阻害薬 bafilomycin A_1 (1 nM) の各薬物

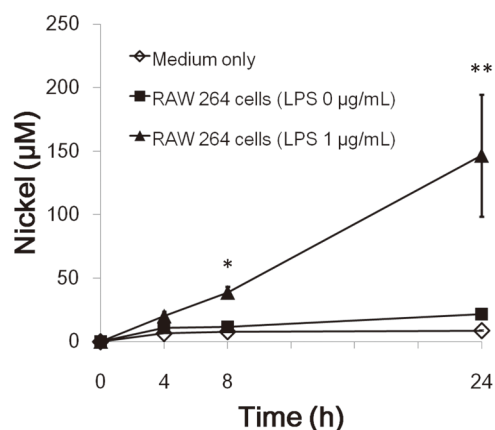


Figure 6. Requirement of cell attachment Enhancement of elution of Ni ions from Ni plate by lipopolysaccharide-stimulated RAW 264 cells

RAW 264 cells (1×10^5 cells/mL, 0.2 mL) seeded on a Ni plate (5 mm square) and incubated for 4 , 8 , and 24 h in the presence or absence of LPS (1.0 $\mu\text{g/mL}$). The concentration of Ni in the culture medium was determined. The values are the means of five samples with S.E.M. shown by vertical bars. Statistical significance; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. the corresponding unstimulated group.

を添加し、これらの薬物の影響を解析した。その結果、chloroquine添加により非刺激RAW264細胞による24時間培養でのニッケル溶出は部分的に抑制され、bafilomycin A₁も有意差はなかったもののニッケル溶出を抑制する傾向が認められた。一方、amilorideにはニッケル溶出抑制効果が認められなかった (Fig. 8)。

また、RAW264細胞をLPSで刺激した場合の8時間でのニッケル溶出促進効果に対する効果を同様に解析した。その結果、chloroquine、amiloride及びbafilomycin A₁はいずれもLPSによるNi溶出促進を有意に抑制した (Fig. 9)。

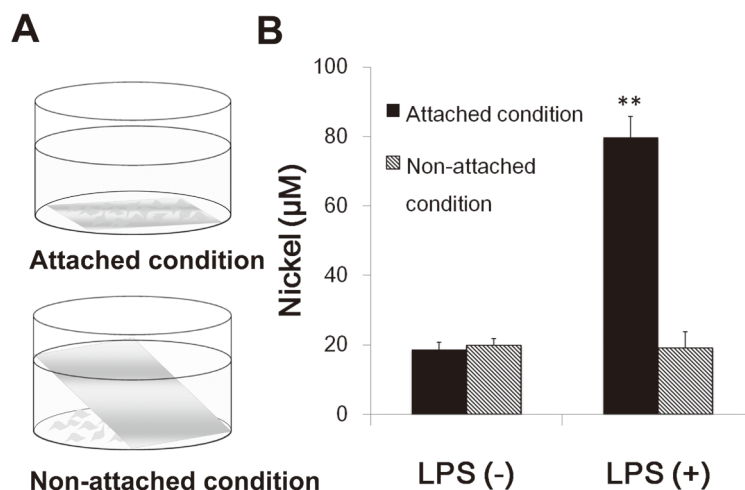


Figure 7. Enhancement of elution of Ni ions from Ni plate by lipopolysaccharide-stimulated RAW 264 cells on Ni plate

(A) Experimental scheme of culture condition of RAW 264 cells.

(B) RAW 264 cells (1×10^5 cells/mL, 0.2 mL) seeded on (attached condition) or under a Ni plate (non-attached condition) were incubated for 24 h in presence or absence of LPS (1.0 μg/mL). The concentration of Ni in the culture medium was determined. The values are the means of five samples with S.E.M. shown by vertical bars. Statistical significance; **P<0.01 vs. the corresponding LPS (-) group.

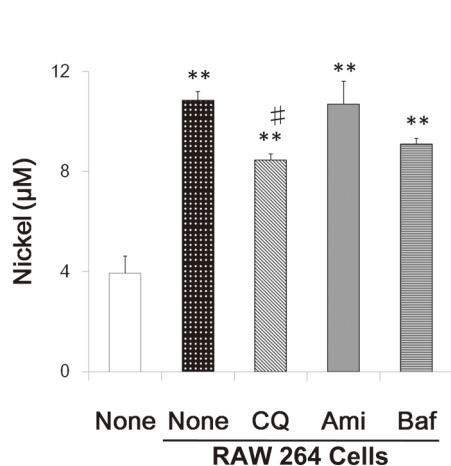


Figure 8. Effects of drugs on elution of Ni ions from Ni plate by unstimulated RAW 264 cells

RAW 264 cells (1×10^5 cells/mL, 0.2 mL) were seeded on a Ni plate (5 mm square) and incubated for 24 h in the medium containing chloroquine (CQ; 10 μM), amiloride (Ami; 100 μM) and bafilomycin A₁ (Baf; 1 nM). The concentration of Ni in the supernatant was then determined. The values are the means of five samples with S.E.M. shown by vertical bars. Statistical significance; **P<0.01 vs. medium alone (None) group, #P<0.05 vs. unstimulated RAW 264 cells group.

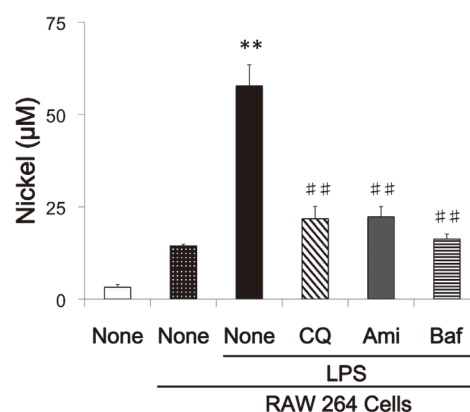


Figure 9. Inhibition of elution of Ni ions from Ni plate by lipopolysaccharide-stimulated RAW 264 cells by chloroquine, amiloride and bafilomycin A₁

RAW 264 cells (1×10^5 cells/mL, 0.2 mL) were seeded on a Ni plate (5 mm square) and incubated for 1 h in the medium in the presence of chloroquine (CQ; 10 μM), amiloride (Ami; 100 μM) and bafilomycin A₁ (Baf; 1 nM). Then the cells were stimulated with LPS (1.0 μg/mL) for 8 h. The concentration of Ni in the supernatant was then determined. The values are the means of five samples with S.E.M. shown by vertical bars. Statistical significance; **P<0.01 vs. unstimulated RAW 264 cells, ##P<0.01 vs. LPS control.

4. 考 察

種々の装飾品に対する金属アレルギーは皮膚の健康を考える上で、極めて大きな問題である。金属アレルギー誘発の初期段階として当然ながら金属イオンの溶出が必須である。したがって生体内での金属からの金属イオンの溶出を評価し、その溶出に伴う生体応答を明らかにすることは極めて重要である。しかしこれまで、生体内において金属溶出を詳細に解析できる実験系はなかった。そこで私たちは、ニッケル線をマウス背部皮下に埋植する炎症モデルを確立し、ニッケルの溶出を定量的に解析できるモデルを構築した。

ニッケル線をマウスの背部皮下に埋植し、LPSにより炎症反応を誘発するモデルは、金属製のバイオデバイスを外科的に体内に埋植した際に感染が生じた状態を模倣している。このような条件下で、金属からのニッケル溶出が増大することが明らかになったことは、医療材用の安全性評価の上で極めて重要なことである。

炎症細胞の活性化によりニッケル溶出が促進される現象は*in vitro*においても認められた。すなわち、マウスマクロファージ様細胞株RAW264細胞がニッケルを溶出する作用をもつこと、さらに同細胞が起炎物質LPSにより活性化されると、ニッケル溶出効果が増大することが明らかになった。ニッケルに限らず、金属が腐食しイオンを溶出する原因として最も一般的なものが金属表面での酸性化である。本研究ではLPSでニッケル溶出が促進した場合でも培養液中のpHは低下しなかったことと、ニッケル板上に播種したRAW264細胞をLPSで刺激するとニッケル溶出が促進したのに対し、ニッケル板と接着しない条件下においては、LPSで刺激を加えてもニッケル溶出の促進は認められなかったことから、RAW264細胞におけるLPS刺激によるニッケル溶出の促進作用はニッケル板と細胞との接着面で生じ、この局所環境においてLPS刺激により酸性化が生じていることが示唆された。

マクロファージは体内に侵入した異物を除去する機構を備えており、貪食した分解すべき異物を含むファゴソームの形成と、細胞由来の様々なタンパク分解酵素を含むリソソームを融合しファゴリソソームを形成して消化分解する。リソソーム内のタンパク分解酵素は至適pHが酸性であるため、リソソーム膜にあるV-ATPaseにより細胞質内プロトンを積極的に取り込んでいる。Chloroquineは弱塩基性の化合物で細胞内に取り込まれリソソーム内に取り込まれ中和する作用がある。無刺激のマクロファージによるニッケルの溶出はリソソームを中和するchloroquine及びリソソームを酸性化を抑制するV-ATPase阻害薬bafilomycin A₁により抑制されたことから、未活性状態のマクロファージによるニッケル溶出はリソソームの放出が関与して

いると考えられる。一方、マクロファージがLPS刺激により活性化すると、細胞膜にあるV-ATPaseやNa⁺-H⁺ Exchanger (NHE)などのイオン輸送系が活性化することが明らかになっている⁸⁻⁹⁾。Amilorideは細胞膜上に発現しているNHEの阻害薬であり、bafilomycin A₁はリソソーム膜上のV-ATPaseと同様に細胞膜上に発現しているV-ATPaseも阻害する。今回の実験ではLPSにより活性化されたマクロファージのNi溶出促進効果をbafilomycin A₁及びamilorideが強く抑制した。以上のことから、マクロファージは金属表面ではこれを異物と認識してプロトンを含むリソソームのエキソサイトーシスにより、またLPSで活性化するとリソソームの放出に加え細胞膜のV-ATPaseやNHEが活性化され、細胞外へのH⁺放出をさらに増大させて著しくニッケル溶出が促進されると考えられる。

5. 総 括

本研究において、生体内でのニッケル溶出は炎症細胞の活性化により促進されることが明らかになった。そのため装飾品や医用金属材料の安全性評価には従来の試験管内での耐汗性試験、耐唾液性試験では不十分である可能性が示唆された。特にLPS刺激したマクロファージ様細胞株を用いたニッケル溶出系は、金属性装飾品等の安全性評価に有用であると考えられる。また、コスメトロジーの観点からは、皮膚のバリア機能をはじめ、健康な皮膚を維持することが金属アレルギーの低減につながるものと考えられる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、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東北大学大学院工学研究科大津浩教授ならびに成島尚之教授に深く御礼いたします。

(引用文献)

- 1) Basketter, D.A., Briatico-Vangosa, G., Kaestner, W., Lally, C., Bontinck, W.J. (1993) Nickel, cobalt and chromium in consumer products: a role in allergic contact dermatitis? *Contact Dermatitis*, **28**:15-25.
- 2) Sato, N., Kinbara, M., Kuroishi, T., Kimura, K., Iwakura, Y., Ohtsu, H., Sugawara, S., Endo, Y. (2007) Lipopolysaccharide promotes and augments metal allergies in mice, dependent on innate immunity and histidine decarboxylase. *Clin. Exp. Allergy*, **37**: 743-751.
- 3) Thierse, H.J., Moulon, C., Allespach, Y., Zimmermann, B., Doetze, A., Kuppig, S., Wild, D., Herberg, F., Weltzien, H.U. (2004) Metal-protein complex-mediated transport and delivery of Ni²⁺ to TCR/MHC contact sites in nickel-

- specific human T cell activation. *J. Immunol.* **172** : 1926-1934.
- 4) Hirasawa, N., Goi, Y., Tanaka, R., Ishihara, K., Ohtsu, H., Ohuchi, K. (2010) Involvement of prostaglandins and histamine in Nickel wire-induced acute inflammation in mice. *J. Biomedical Materials Res. Part A*, in press.
- 5) Schneider, P., Korolenko, T.A., Busch, U. (1997) A review of drug-induced lysosomal disorders of the liver in man and laboratory animals. *Micros. Res. Tech.*, **36** : 253-75.
- 6) Kleyman, T.R., Cragoe, E.J. Jr. (1988) Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. *J. Membr. Biol.*, **105** : 1-21.
- 7) Bowman, E.J., Siebers, A. and Altendorf, K. (1988) Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** : 7972-7976.
- 8) Brisseau, G.F., Grinstein, S., Hackam, D.J., Nordström, T., Manolson, M.F., Khine, A.A., Rotstein, O.D. (1996) Interleukin-1 increases vacuolar-type H⁺-ATPase activity in murine peritoneal macrophages. *J. Biol. Chem.* **271**: 2005-2011.
- 9) Vairo, G., Royston, A.K., Hamilton, J.A. (1992) Biochemical events accompanying macrophage activation and the inhibition of colony-stimulating factor-1-induced macrophage proliferation by tumor necrosis factor- α , interferon- γ , and lipopolysaccharide. *J. Cell. Physiol.*, **151**:630-641.

皮膚ケラチノサイトの水・グリセリンチャネル AQP3 (アクアポリン3) の脂溶性ビタミンによる発現調節

明治薬科大学病態生理学教室

石橋 賢一

The skin is constantly exposed to external physical and chemical toxins to protect the interior and eventually to keep the homeostasis. This barrier mechanism will be enhanced by moisturizing the skin, which is partially conducted by glycerol, an ancient ingredient of cosmetics. The uptake of glycerol into the keratinocyte is mainly conducted by AQP3, a member of aquaglyceroporins also including AQP7, 9, and 10. Recent analyses of AQP3-null mice showed that the absence of AQP3 not only decreases the water content of the skin but also inhibits the development of skin cancer through the glycerol transport. Therefore, glycerol will be beneficial to moisten the skin and promote its regeneration while it will be harmful to stimulate the growth of skin cancers. Since the glycerol transport is regulated by the amount of AQP3 expression in the keratinocyte, the regulation of AQP3 expression should be examined to predict the clinical outcome of the application of cosmetics. Since we examined the effects of glycerol and vitamin A on AQP3 expression in keratinocarcinoma previously, here we tested the effects of vitamin E and D on the expression of AQP3 in a human normal epidermal keratinocyte cell line (PHK16-0b). Both lipophilic vitamins and lower concentration of glycerol significantly stimulated AQP3 expression examined by RT-PCR technique while higher concentration of glycerol inhibited its expression. It will be more efficient to develop a screening system to examine the effect of cosmetic ingredients on AQP3 expression in the keratinocyte in culture to predict their potential benefits and harms to the skin.

1. 緒言

われわれの体には13種類の水チャネルが発現している。水チャネルは水を選択的に通す古典的なアクアポリン (AQP0, 1, 2, 4, 5, 6, 8) と、水以外にもグリセロールや尿素も通すaquaglyceroporin (AQP3, 7, 9, 10) と、さらには水を通す細胞内オルガネラに存在するAQP11, 12の3つのサブグループに分けられている¹⁾。

皮膚の角質層には水・グリセリンチャネルであるアクアポリン3 (AQP3) が多く発現している。AQP3は角質層のグリセリンと水の量を調整しており、皮膚の保湿にとっても重要な役割をはたしていることがAQP3 ノックアウトマウスの解析からあきらかになった²⁾。

さらに2005年にAlan Verkmanらによって、血管内皮においてAQP1がないと細胞運動が遅くなって血管新生が遅延することが示されて、アクアポリンの新たな役割が注目されるようになった。皮膚や角膜にあるAQP3も、組織再生に重要な役割をしていることが示されている³⁾。現在のところ細胞運動にアクアポリンが促進的にかかわっていると考えられているが、組織の修復が促進されることから細胞増殖にもかかわっている可能性もある。アクアポリン-11 (AQP-11) のノックアウトマウスでは多発性のう胞腎

になるので、AQP-11が細胞分化、増殖にかかわっており、他のアクアポリンでも同様の役割がある可能性がある⁴⁾。

興味深いことに、最近Verkmanのグループは、AQP3 ノックアウトマウスに皮膚癌が増殖しにくいことを発見し、グリセリンの補充で増殖するようになることを報告している³⁾。これはAQP3の発現をへらすことが皮膚癌の治療になると同時に、AQP3の増加は癌の増殖を促進するという諸刃の剣になる可能性を示している。さらに、グリセリンの輸送が関与していることから、グリセリンが皮膚癌の増殖を促進する危険性も示唆している。

グリセリンは古来ひろく皮膚に直接投与する基剤として使われているので、その安全性について検証することは重要である。とくに化粧品は連日長期的に使用されるので問題となる。ただ、これまでグリセリンによる有害事象は長期的には報告されておらず、今回のノックアウトマウスの知見が、ヒトにも適用できるかどうかにはわかには判定しがたい。

われわれはこれまでAQP3をはじめヒト、マウスのアクアポリンを7つあたらにクローニングしてきた (AQP3, 7-12)¹⁾。さらに、皮膚のAQP3についてもビタミンAによって増加することをあきらかにしてきた⁵⁾。またケラチノサイトの腫瘍細胞 (keratinocarcinoma) での内因性AQP3が、ソルビトールによっても増加することもあきらかにしてきた⁵⁾。

一方、皮膚の細かい傷のすみやかな修復は、きめの細かい美的肌を保つために必須である。AQP3によってそれが促進されている可能性があり、AQP3の発現を調節する物質を発見することは、将来的に化粧品の開発のシードを提供する。これは、老化による皮膚のダメージからの修復に



The regulation of aquaglyceroporin AQP3 by lipophilic vitamins in skin keratinocytes

Kenichi Ishibashi, M.D.

Meiji Pharmaceutical University,
School of Pharmacy, Department of
Pathophysiology

も関与している可能性もある。さらに、医療の現場においても、圧迫潰瘍(床ずれ、褥瘡)など難治性の傷の治療にもつながりうる重要な知見を提供すると考えられる。

ビタミンAが紫外線から皮膚を保護する機構の一部に、AQP3の増加による皮膚再生の活性化もありうる。また皮膚圧迫潰瘍の治療において、ユーパスタのような高尿素軟膏が使われて効果をあげているが、この機構の一部にもAQP3の誘導がありうる。このような研究によって、AQP3をバイオマーカーとして新薬を開発できる可能性がある。もっとも、AQP3を高度に誘導すると皮膚癌が発生しやすい環境では、皮膚癌の増殖を促進してしまう可能性があるので注意が必要である。

そこで、癌細胞ではなく培養正常ヒト皮膚ケラチノサイトを用いて、軟膏薬としてよく用いられ、AQP3の発現を調節する可能性のある、脂溶性ビタミンである、ビタミンEとDについて検討したので報告する。

2. 実験

文献5に順じて、培養細胞を用いて実験をおこなった。簡単に述べると、正常ヒト皮膚ケラチノサイト(NHEK)(PHK16-0b細胞)⁶⁾を12ウェルプレートに40000細胞播き、翌日約60%コンフルエントに増殖したことを確認後、ビタミン類あるいはグリセロールをそれぞれ添加して培養した。PHK16-0b細胞の培養は、KGM-2 Bullet Kitを用い、培地交換は1日おきに行った。細胞の継代および使用時のプレートへの播き替えは、HEPES緩衝液(HEPES濃度30mmol/L添加した生理食塩水)で洗浄したのち、トリプシン/EDTA液(HEPES緩衝液にトリプシン濃度0.025%、EDTA濃度0.01%添加)を加え、細胞がフラスコ面から丸みをおびるのを確認後、フラスコ面を軽くたたいてフラスコから剥離させ、トリプシン中和液(HEPES緩衝液にFBS10%添加)を加えて細胞を回収した。

ビタミン類はカルシトリオール(ビタミンD; $1\times 10^{-10}\sim 1\times 10^{-8}$ M)、トコフェロール(ビタミンE; $1\times 10^{-10}\sim 1\times 10^{-4}$ M)、酢酸トコフェロール(ビタミンE酢酸塩; $2\times 10^{-10}\sim 2\times 10^{-6}$ M)、グリセロールは0.001~10%を最終濃度になるよう用いた。各ビタミンあるいはグリセロール添加12時間あるいは24時間後、細胞を回収して、トータルRNAを精製(RNeasy Mini Kit, QIAGEN)し、RT-PCRを行い、各ビタミンあるいはグリセロール添加によるヒトAQP3の発現変化を検討した。コントロールは上記添加ビタミン類なし、あるいは最終濃度0.1%エタノールを添加したケラチノサイトを用いた。

3. 結果と考察

0.01% (1.4 mM) グリセロールの添加による12時間と24時間後のAQP3の発現量は、コントロールに比較し明らか

に増加した(1.5~1.8倍)。0.001% (0.14 mM) グリセロールの添加では、コントロールと変わらない発現量であった。一方、0.1% (14 mM) グリセロールの添加では、コントロールの0.8倍に減少し、1% (137 mM) グリセロールの添加では、コントロールの1/10にさらに減少した。10% (1.37 M) グリセロールの添加では、細胞がはがれてしまったため検討できなかった。以上より、高濃度のグリセロールは、ケラチノサイトには毒性がある可能性が示唆された。ただ、少量のグリセロールでAQP3の発現が刺激されるが、中等量では抑制されるという結果は、中等濃度のグリセロールには毒性よりもネガティブフィードバックによる制御作用がある可能性がある。

以前、われわれは別の細胞で50, 100, 200mMのグリセロールでは、24時間後のAQP3蛋白の発現に影響しなかったという結果を得ている⁵⁾。これは浸透圧によると考えられるソルビトール200mMで、AQP3の発現が2倍に増加するという結果とは違っており、グリセロールに浸透圧とは異なる特異的な細胞作用が存在することを示唆している。今後、時間経過やタンパク量の発現も含めて検討する必要がある。

一方、カルシトリオール(活性型ビタミンD)の添加によるAQP3のRNA発現量の変化をみると、添加濃度に依存して増加し、 1×10^{-8} Mの濃度で1.5倍に増加した。さらに、酢酸トコフェロール(ビタミンE)添加(2×10^{-10} M)によっても、AQP3の発現量の同程度の増加が見られた。これに対して、トコフェロールのみでは、添加濃度を変えてもAQP3のRNA発現量および形態の変化は全く生じなかった。さらに、トコフェロール添加後の培養が12時間後、24時間後でも、共にAQP3の発現量に変化は認められなかった。これは、トコフェロール単体ではバイオアベイラビリティに問題がある可能性があるため、今後検討されなければならない。

以上より、正常ヒト皮膚ケラチノサイトPHK16-0b細胞において、少量グリセロール、カルシトリオール、酢酸トコフェロールの添加により、AQP3mRNAの発現量が増加することがあきらかになった。以前我々はケラチノカルチノーマ細胞において、ビタミンA添加によるAQP3の発現変化を認められなかったが⁵⁾、今回正常ヒト表皮ケラチノサイト(NHEK)を用いることで、より正常に近い反応を検討できたのではないかと考えられる。

今回もちいた脂溶性ビタミンは皮膚疾患によく用いられるものなので、AQP3発現調節にどのように関与するかに興味をもたれる。以前のわれわれの検討でも⁵⁾、脂溶性物質の溶解に用いるDMSOだけで、AQP3の発現が増加することを認めており、vehicleの影響には細心の注意を払う必要がある。今回は、エタノールをvehicleにもちいており、エタノールそのものだけでは、AQP3の発現に影響

をしないのを確認しているが、実際の化粧品などでは混合物が多いので、それらの影響も考慮する必要がある。

今後、これらの培養細胞での知見が、皮膚組織においても認められるかを検証していく必要がある。さらには、AQP3の発現を定量化するより簡便な方法を開発することで、もっと多くの化学物質を効率よくスクリーニングすることが可能になる。自動化も含めたスクリーニング系の開発は、より効果的で安全な化粧品の開発にもつなげられる可能性があるため重要である。

一方、マウスでみられたような³⁾、皮膚癌をグリセリンが促進する可能性があるため、ケラトカルチノーマ細胞におけるAQP3の発現制御が、正常皮膚ケラチノサイトと同様であるのかも検討していく必要がある。ケラトカルチノーマ細胞のAQP3を減少させるが、正常皮膚ケラチノサイトのAQP3の発現を増加させる物質を同定することが、より安全な化粧品の開発には望まれると考えられるからである。

謝 辞

本研究に対して、重ねてご支援いただいたコスメトロジー財団に感謝いたします。

(参考文献)

- 1) Ishibashi K, Hara S, and Kondo S.: Aquaporin water channels in mammals. Clin Exp Nephrol.13, 107-117, 2009.
- 2) Hara-Chikuma M, and Verkman AS. : Aquaporin-3 functions as a glycerol transporter in mammalian skin. Biol Cell. 97, 479-486, 2005.
- 3) Hara-Chikuma M, and Verkman AS. : Prevention of skin tumorigenesis and impairment of epidermal cell proliferation by targeted aquaporin-3 gene disruption. Mol Cell Biol. 28, 326-332, 2008.
- 4) Morishita Y, Matsuzaki T, Hara-Chikuma M, *et al.* : Disruption of aquaporin-11 produces polycystic kidneys following vacuolization of the proximal tubule. Mol Cell Biol. 25, 7770-7779, 2005.
- 5) Nakakoshi M, Morishita Y, Usui K, *et al.*: Identification of a keratinocarcinoma cell line expressing AQP3. Biology of the Cell. 98, 95-100, 2006.
- 6) Ishibashi Y, Sugita T, Nishikawa A.: Cytokine secretion profile of human keratinocytes exposed to Malassezia yeasts. FEMS Immunol Med Microbiol. 48, 400-409, 2006.

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

財団法人岐阜県研究開発財団岐阜県国際バイオ研究所

大口 健司

Calcium has been known to be a major factor for triggering the differentiation of keratinocytes. In the current study, the involvement of mammalian target of rapamycin (mTOR) in the regulation of calcium-induced differentiation was examined using normal human epidermal keratinocytes (NHEK). Treatment of NHEK with calcium was found to cause marked decreases in p70 ribosomal S6 kinase (p70S6K) phosphorylation level. The activity of mTOR is essential for phosphorylation of p70S6K and the treatment of NHEK with rapamycin, a potent inhibitor of mTOR effectively potentiated calcium-induced differentiation. Moreover, treatment of NHEK with rapamycin caused marked decreases in protein level of cyclin D1, a cell cycle regulator. These results indicate that mTOR would be involved in the calcium-induced differentiation by modulating the expression of cyclin D1 in NHEK.

1. 緒言

細胞は外来刺激を受けると固有の情報変換酵素が活性化され、様々なシグナル伝達系を介して細胞機能が発揮される。情報変換の引き金として、ホスホリパーゼに代表される脂質変換酵素の役割が重要であり、膜脂質の大部分を占めるホスファチジルコリンは、ホスホリパーゼD (PLD) により分解されホスファチジン酸 (PA) に変換される。PA 自身、あるいはその変換体であるリゾPAやジアシルグリセロールは、種々のシグナル伝達分子の活性制御に関わる重要なセカンドメッセンジャーとして機能する。最近、mTOR (mammalian target of rapamycin) と呼ばれるタンパク質が、PLDの産生するPAによって直接的に活性化されることが報告された¹⁾。mTORは、マクロライド系有機化合物ラパマイシン (rapamycin) の細胞内標的分子として同定されたセリン・スレオニンキナーゼであり、ターゲット分子のp70S6K (p70 S6 kinase) ならびに4E-BP1 (eIF4E-binding protein¹⁾) を介して種々の細胞機能制御、特に細胞の分裂や成長 (サイズ) における調節因子として重要な役割を果たしている²⁾。mTORは、ある種のアミノ酸やPI3K/Akt経路によって活性が調節されることが知られていたが、PAがmTORのFRBドメインに結合することによっても活性化されることが明らかにされている¹⁾。この作用はPA以外のリン脂質ではみられないことから、mTORの活性化はリン脂質の中でもPA特有の作用であり、新しいシグナル経路としてのPLD/mTORシ

グナリングの機能が注目されている。

これまでに我々は、種々の細胞機能制御におけるPLD/mTORシグナリングの関与について検証してきた。メラニン細胞がもつメラニン生合成機能 (メラノジェネシス) におけるPLDの関わりについて、マウスB16メラノーマ細胞系を用いて解析した結果、PLDアイソザイムのひとつであるPLD1の発現量および酵素活性がメラニン生成量と逆相関の関係にあることを突き止め、PLD1はメラノジェネシスのネガティブレギュレーターとして作働することを見出した³⁾。さらに、PLD1の作用メカニズムについて解析を行った結果、PLD1はmTORを介してチロシナーゼ (メラニン生合成過程の律速酵素) の発現をmRNAレベルから抑制することを明らかにした⁴⁾。

メラノジェネシスのみならず、PLD1が真皮線維芽細胞のもつコラーゲン産生機能の制御分子としても作用することを見出している⁵⁾。ヒト真皮線維芽細胞のPLD1遺伝子をノックダウンすると、mTOR活性の低下に伴い細胞外へのコラーゲン分泌が抑制されることが明らかとなった。PLD1ノックダウンによるコラーゲン産生の減弱は、細胞内のプロコラーゲン発現量の低下と相関しており、PLD1がmTORを介してコラーゲン合成を促進的に制御するという新知見を得ている⁵⁾。このように、PLD/mTORシグナリングは、各々の皮膚細胞がもつ重要機能の制御に関与することが明らかになってきた。

一方、皮膚の主要細胞であるケラチノサイト (表皮角化細胞) は、活発に増殖と分化を繰り返すユニークな特色をもつ。細胞分裂は基底層でのみ行われ、分裂によって生じた新しい細胞は上層へ移動しながら幾つかのステージを経て分化し、最終的にapoptoticな角質細胞となる。すなわちケラチノサイトの分化は、増殖→分化→終末分化 (角化) という一連のプロセスをみることができる。ケラチノサイトの分化を制御するシグナル伝達系にPLDが関与する可能性は、Bollagらにより報告されているが^{6, 7)}、その意義



Involvement of PLD/mTOR signaling in differentiation of human epidermal keratinocytes

Kenji Ohguchi

Gifu International Institute of Biotechnology

や分子機構は十分に明らかにされていない。また、ケラチノサイト分化シグナリングにおけるmTORの関与については知られていないのが現状である。そこで、ケラチノサイトの分化制御におけるPLD/mTORの関わりについて解析することを目的とし、本研究ではカルシウムによる角化誘導におけるmTORの関与について検証した。

2. 実験

細胞は、正常ヒト表皮ケラチノサイト(NHEK、クラボウ)を用いた。ケラチノサイト分化の制御機構にmTORが関わっているか否かについては、mTORの直下に位置するターゲット分子であるp70S6Kのリン酸化状態を指標に、カルシウムスイッチ(1.5mM カルシウム添加)による分化誘導系にて検証した。P70S6Kのリン酸化は、Phospho-p70S6K (Thr389) AntibodyおよびPhospho-p70S6K (Thr421/Ser424) Antibody (Cell signaling)を用いたウエスタンブロット法により検出した。

3. 結果および考察

3. 1. カルシウムによるケラチノサイト分化誘導とp70S6Kのリン酸化レベルの変化

細胞外カルシウムは、ケラチノサイトの分化調節に重要な役割を演じている。実際に、表皮では基底細胞から上層に向かって高くなるカルシウムの濃度勾配が存在し、角化調節因子の重要因子と考えられている。NHEKの細胞外カルシウム濃度を上昇させると、角化が誘導され分化マーカーとして知られているinvolucrin (エンペローブ蛋白質)

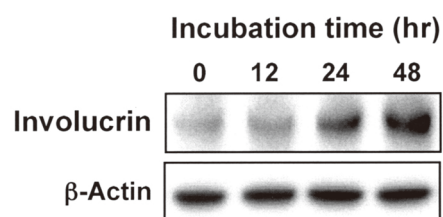


Fig.1 Induction of differentiation marker by calcium in normal human epidermal keratinocytes.

の発現増加がみられた (Fig. 1)。

次に、カルシウムによる分化誘導後のmTOR活性の変動について、mTORの代表的なターゲット分子であるp70S6Kのリン酸化レベルを指標に調べた。リン酸化タンパク質に特異的な抗体(2種類)を用いたウエスタンブロット法により、分化誘導後のリン酸化p70S6Kの経時変化を解析した。Fig. 2に示すように、2種類の抗体により検出したp70S6Kのリン酸化レベルは、分化誘導直後から低下が見られた。両者の変化には若干のタイムラグがあり、Thr389の脱リン酸化は分化誘導5分後から、Thr421/Ser424の脱リン酸化は分化誘導10分後から起こることが分かった。また、両者の脱リン酸化状態は一過性であるが、Thr389においては60分後には定常レベルに戻るのに対し、Thr421/Ser424はリン酸化レベルの低い状態が24時間後まで続いた。

Extracellular signal-regulated kinase (ERK) もカルシウムによる分化誘導に伴いリン酸化レベルが低下することが報告されている。Fig. 3に示すように、p70S6K (Thr389) とほぼ同様の挙動を示したが、脱リン酸化の回復時間や程度に相違がみられたことから、mTOR経路との連係(相互のクロストーク作動機構)解析が今後の課題である。

3. 2. カルシウムによるケラチノサイト分化誘導に対するmTOR 阻害の影響

ケラチノサイト分化の制御機構におけるmTORの関与とその意義を明確にするために、カルシウムによる分化誘導に対するラパマイシン(mTORの選択的阻害剤)の影響

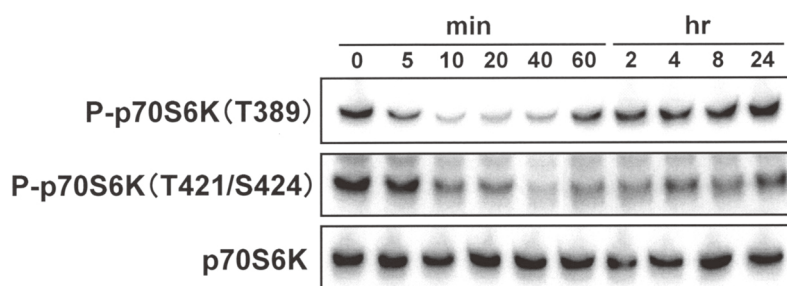


Fig.2 Changes in phosphorylation levels of p70S6K during calcium-induced differentiation in normal human epidermal keratinocytes.

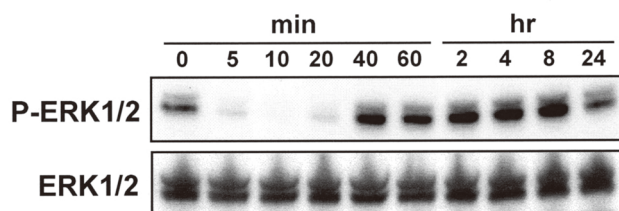


Fig.3 Changes in phosphorylation levels of ERK1/2 during calcium-induced differentiation in normal human epidermal keratinocytes.

を検証した。ラパマイシンの添加により involucrin の発現に変化はみられなかったが、ラパマイシン存在下にて高カルシウム処理した細胞では、involucrin 発現が増強しており、mTOR を阻害することで分化誘導がより促進されることが示された (Fig. 4)。すなわち、mTOR はカルシウムによる分化誘導シグナリングにおいてネガティブレギュレーターとして作動している可能性が示唆された。

3. 3. カルシウムによるケラチノサイト分化誘導に伴う cyclin D1 発現レベルの変化

Cyclin D1 は、細胞周期の G1 期から S 期への進行因子であることから、その発現量を減少させることで、増殖から分化へのスイッチ切り替えに寄与する重要な因子として知られている。NHEK におけるカルシウム分化誘導に伴う cyclin D1 発現の変化を調べたところ、p70S6K の脱リン酸化がみられた直後から、顕著なダウンレギュレーションがみられた (Fig. 5)。

3. 4. Cyclin D1 のダウンレギュレーションにおける mTOR の関与

ケラチノサイト分化誘導に伴う cyclin D1 のダウンレギュレーション機構における mTOR の関与を調べるために、cyclin D1 のタンパク質発現に対するラパマイシンの影響を検証した。その結果、ラパマイシンの添加により cyclin D1 の発現が減少した (Fig. 6)。すなわち、カルシウムによる分化誘導シグナリングにおける mTOR のネガティブレギュレーターとしての機能は、cyclin D1 発現の調節に起因する可能性が示唆された。

4. 総 括

PLD/mTOR シグナリングは、新しい細胞内シグナル伝達経路として注目されている。これまでに、サバイバル

(抗アポトーシス) や細胞成長 (サイズ) の制御などに関与することが報告されているが、細胞分化への関わりはあまり知られていない。本研究では、mTOR 経路を中心としたシグナリングの視点からケラチノサイト特有の分化プロセスである角化の制御機構について解析した。その結果、分化誘導後の cyclin D1 のダウンレギュレーションに mTOR が関わっている可能性が示唆された。分化誘導初期にみられる p70S6K の脱リン酸化機構については不明であるが、mTOR 活性の阻害 (上流シグナルの遮断) あるいは p70S6K をターゲットとする脱リン酸化酵素 (ホスファターゼ) の活性化が考えられることから、mTOR に対する siRNA を用いた検証などから明らかにしていきたい。ケラチノサイトの分化異常は、種々の角化異常症のみならず皮膚の自然老化現象としても頻繁に観察される。これらの発症に、これらのシグナリング異常が関与する可能性もあり、今後の検討課題としたい。

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心よりお礼申し上げます。

(引用文献)

- 1) Fang Y, Vilella-Bach M, Bachmann R. et al. Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science*, 294, 1942-1945 (2001)
- 2) Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene*, 23, 3151-3171 (2004)
- 3) Ohguchi K, Banno Y, Akao Y. et al. Involvement of phospholipase D1 in melanogenesis of mouse B16 melanoma cells. *J Biol Chem*, 279, 3408-3412 (2004)

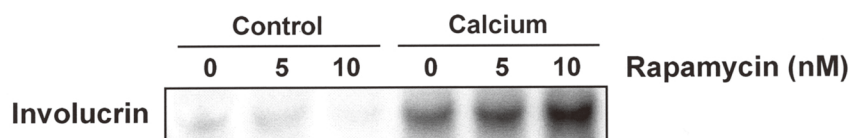


Fig. 4 Effects of rapamycin on calcium-induced differentiation in normal human epidermal keratinocytes.

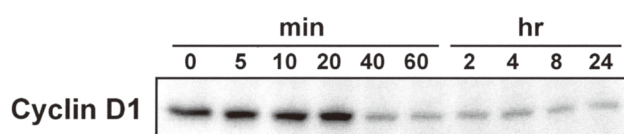


Fig. 5 Changes in expression of cyclin D1 during calcium-induced differentiation in normal human epidermal keratinocytes.

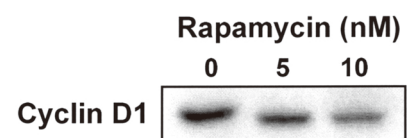


Fig. 6 Effects of rapamycin on cyclin D1 expression in normal human epidermal keratinocytes.

- 4) Ohguchi K, Banno Y, Nakagawa Y. et al. The negative regulation of melanogenesis by phospholipase D1 through mTOR/p70 S6 kinase 1 signaling in mouse B16 melanoma cells. *J Cell Physiol*, 205, 444-451 (2005)
- 5) Ohguchi K, Banno Y, Akao Y. et al. Involvement of phospholipase D1 in collagen type I production of human dermal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 348, 398-402 (2006)
- 6) Bollag WB, Zhong X, Dodd ME. et al. Phospholipase D signaling and extracellular signal-regulated kinase-1 and -2 phosphorylation (activation) are required for maximal phorbol ester-induced transglutaminase activity, a marker of keratinocyte differentiation. *J Pharmacol Exp Ther*, 312, 1223-1231 (2005)
- 7) Bollag WB, Xie D, Zheng X. et al. A potential role for the phospholipase D2-aquaporin-3 signaling module in early keratinocyte differentiation: production of a phosphatidylglycerol signaling lipid. *J Invest Dermatol*, 127, 2823-2831 (2007)

Ⅲ. 精神、文化に関する分野

アジア人の化粧に見られる身体観・身体表象とその変容についての研究 —身体装飾のアジア的伝統と〈化粧のグローバル化〉の狭間で—

東北大学大学院国際文化研究科

山下 博 司

Asia, or more specifically so-called "Monsoon-Asia" in celebrated Tetsuro Watsuji's terminology, is undergoing rapid globalization in various aspects of human life including fashion and cosmetics. However, Asia still retains the cosmetological tradition deep-rooted in its history and culture with the span of thousands of years. In this study, we take up the indigenous way of cosmetology and its cultural significance as well as the dynamics of transformation in the present era of extensive globalization.

In the present paper, the focus will be placed on the role of eyes and their accentuation employing native cosmetological techniques. We will point out the magical significance of those traditions widely observed in Asia, from the viewpoint of ritualism and native religious institutions.

Finally, we will sum up the discussion and properly locate it in the broad context of anticipated cosmetological research project with encompassing perspectives.

1. 緒 言

本研究課題は化粧の文化論、あるいは身体装飾の思想研究を指向するもので、文明史や文化史の研究においてきわめて斬新な研究分野を構成する。日本を包含するアジア地域を中心的な考察の対象とするが、アジアの諸文明における化粧の文化史的・精神史的意義の究明を基礎にして、その方法論と成果をアフリカやヨーロッパといった旧大陸の文明、さらにはアメリカやオーストラリアなど新大陸の文明にも及ぼし、体系的な「化粧の文化学」を構築することを企図している。

「コスメトロジー」が、即物的な意味内容としての狭義の「美容術」ではなく、化粧に関する総合的・体系的な学問をさす用語と捉えた場合、理系・文系といった既成の学問領域の枠組を超えた広がりや奥行きをもって然るべきである。素材や物性についての研究、生体作用や安全性についての研究と並んで、化粧を施す主体の側の文化的・社会的な研究も相俟って、体系的でホリスティック（全体論的）なコスメトロジーが成立するものと考えられる。

本研究は、アジア地域の「化粧における歴史的交流」の足跡をたどり、その背後にある思想や精神をていねいに読みとる作業を通じて、きわめて日常的な「化粧」という行為に潜む文化的・社会的意味を追究するコスメトロジー研究の一環として位置づけられる。

アジアの化粧の背景に潜む思想や文化伝統を理解するこ

とは、脱宗教化した現代の化粧のあり方やトレンドに対して多くの刺激や示唆を与えることになるであろう。

2. 考 察

2.1 「アジア」の概念と領域

本稿は、如上の立脚点に立ち、アジア地域における伝統的身体装飾、とくに「化粧」という人間生活の日常的な行為について、その特徴と意味とを比較文化論のおよび文化史学的視座から示唆しようとするものである。この場合の「アジア」とは、日本を含む東アジア、東南アジア、および南アジアを第一義的に指すものとする。

これらの地域を一括りに論じるのは、まず気候風土的に近似する条件下にあるという事実に基づく。この地域を和辻哲郎の『風土』の所論に倣い「モンスーン・アジア」とも規定し得る所以である。さらに、仏教やヒンドゥー教、儒教や道教など、この地域内に起源を有する共通の宗教的影響が浸潤していることも、同地域を一括して論じる根拠となる。言語的にはきわめて多様かつ多元的な様相を呈するものの、自然的・文化的・歴史的に緩やかな紐帯で結ばれてきた地域と認め得るのである。（さりとて、このことを以て地域内の多様性をことさら無視しようとするものではない。大局的な議論をまず踏まえたのちに、細部にも及ぼすという順序をとりたい。）

現代社会においては、情報の越境や広範なグローバリゼーションによって、世界的規模で美意識や美的観念に均質化・平準化の現象が進行していることは否定できない。無論アジアとてこの大きな流れの中で例外たり得ない。アジア地域においても、化粧法を含む固有の伝統的身体装飾の方法が今もって盤石であるとは言い難い現状にある。本稿では、グローバル化に起因する支配的トレンドを現実として踏まえつつも、なおも生きるアジア特有の傾向に光をあてることで、アジア人に特徴的な身体観や宇宙観に迫りた



The Cosmetological Tradition in Asia
and its Transformation under the Age
of Globalization

Hiroshi Yamashita
Tohoku University

いと考える。

2.2 「目の強調」が示唆するもの

アジアの化粧法の特徴をなすものの代表例として、頬紅を塗ったり、いわゆるアイライナーに相当するものを使った「目の強調」を指摘することができる。(ちなみに、アイライナー (eyeliner) は純然たる英語の単語であるが、アイライン (eyeline) のほうは和製英語である。) しかも、これは西アジアも含めた広義のアジア地域に共通する要素でもある。現代のアジア女性の間では、チーク、ファンデーション、ブルーのアイシャドウなどが一般化しているが、これらは西洋の化粧法の影響で近年になって定着したものと考えるのが妥当である。本来は地域自生の植物成分や鉱物からの天然染料を効果的に用いて、目、唇、爪などを赤その他に染色・着色していたのである。

「目の強調」は、アジア人の化粧にとって半ば本質的な意味をもっている。かなりの程度画一化された「目の強調」の技法(化粧術)によって、結果的に類似する印象を備えた顔貌を得ることになるが、そのことは化粧の目的や効果を減じたり損なったりするものではない。アジアの化粧は西洋のそれのような「個性」を標榜しない。化粧の「仕様」が同じか統一されており、化粧の結果として個性的な美しさが引き立つというより、むしろ類似した顔つきになるのである。一方現代の日本に目を転じれば、わざとらしさを排除してその人の美しさを際立たせるようなメイクが理想とされている。技術力があってのものだが、個人の肌の色や顔かたちによってその人の個性が美しく際立つような化粧が求められるのである。西洋の場合もほぼ同様と言ってよい。というより、日本をはじめとする現代社会の化粧に関わる観念が西洋の影響を濃厚に被っているのである。

ところがアジア古来の伝統に発する化粧には、「個性の発現」は必ずしも期待されない。様式化・規範化が顕著なのである。あたかも、理想とする、あるいは規範となる固定的な顔貌の心象があって、それに似せるために敢えて化粧を施しているようにすら見える。理想とする相好の概念が共有されている、と言い換えてもよい。

2.3 化粧の宗教性

それでは「固定的な顔貌の心象」とは一体いかなるものなのか、具体例を掲げて論じよう。アジア、とりわけヒンドゥー化した南アジアや東南アジアで、女性の化粧の祖型としてあるのは超自然的存在、より具体的には「女神」のイメージである。すなわち、化粧を施すことで女神と見まがう姿、あるいは少なくとも女神に似た姿になるのである。インド女性は、女神のイメージに似せた化粧によって、個性がない同じ顔になる。そこには女神が女性の美しさの理想あるいは典型になっているという事情が伏在する一方、

女神に関わる呪術性・宗教性も影を落としている。

いわば女神に自らを似せることによって自身が女神と一如となり、合体した女神のもつパワーを己のものとして神の加護を得るのである。化粧によって変身し、成り代わった他者(ここでは超自然的存在)の呪力を得るという発想である。身体装飾によって「神的なるもの」と同一化を果たすというプロセスにおいて、化粧は仮面とも軌を一にしている。さらには、超自然的存在や神秘的な印を彫った入れ墨(タトゥー)とも、その発想を同じくしている。卑近な例を挙げれば、プロレスラーがマスクをつけてリングに上がるのも、そのマスクにデザインされた存在(猛獣や悪魔など)の威力を得んがためである。これらの現象の背後にあるのは、アニミズム、シャーマニズム、トーテミズムなどの原初的かつ通文化的な宗教観念である。

この文脈で、化粧と神聖舞踊との結びつきも指摘され得る。世界各国の舞踊に詳しい芸能人類学者の宮尾慈良によれば、南アジア・東南アジアでは、バラタナート・ティヤムにせよバリの踊りにせよ、踊り子は化粧を施す前に神に祈りを捧げるという。このことは、神聖舞踊が神への奉納という意味をもつことを表しているが、同時に、化粧のプロセスを経ながら踊り手が踊られる神へと変身していく、一体化を遂げていくことも示唆している。「神の器」となった踊り子は、あたかも神が憑依してでもいるかのように、あるいは神そのもののようには踊るのである。日本の巫女がやはり踊りを踊ることも想起される。アジアにおいて化粧が単なる世俗的な行為ではないことの証である。

化粧により変身するがゆえにナチュラルメイクは必要としない。その場合の化粧に要求されるのは、むしろ個性の減却であり、規範性の優越である。「個性」はアジアの化粧にとって本質的な意味をもたない。一切を統べる、「個」を超越した存在になる以上、個性は問題にならないからである。化粧は人間が神あるいは神秘的存在になるための操作であり、その意味でまさしく「化ける」のである。そこにあるのは「没個性化」であって、ナチュラルメイク云々の余地は存在しない。

「没個性」を指向する化粧の伝統は、神が憑依したり、聖なるものと一体になったり、最高実在と一つになるという、西洋や西アジアにおける神と人との関係からは導き得ないアジアに独特な宗教観念の為せる技といえることができる。

2.4 化粧の呪術性

化粧には如上のような宗教性に加え、呪術性も指摘されなければならない。キリスト教徒やイスラーム教徒などは別として、インド女性の化粧は眉間にクンクマという赤い斑点を施すことで完成する。吉祥なる印とされるが、男性もこの斑点を付けることが見られる。特に朝の沐浴のあと、

身支度を調べてから、神に祈ってクンクマを付けるのである。クンクマの起源について定説はないが、犠牲獣の血に由来するとする見かたが有力である。犠牲になった獣の呪力、あるいは犠牲を伴う宗教儀礼を経て更新された神のパワーを我がものとするのである。ここにあるのも化粧の宗教性・呪術性である。このクンクマに似た習俗は、ヒンドゥー化したアジア（インドやバリなど）のほか、古代の日本（現代を含む）韓国やタイなどにも観察される。おそらくインドからの影響が及んだものと考えられ、本来はそのような宗教的観念を伴って採り入れられたものであろう。

「目の強調」という点からすれば、クンクマは「第三の目」でもある。シヴァ神が第三の目から発するパワーによって邪悪な存在を焼き尽くすように、人間に与えられた第三の目としてのクンクマは、邪気を祓い、吉祥をもたらすのである。

このような発想は、化粧とはある意味で矛盾する行為—身体を敢えて汚すこと—をも説明する。インドでは赤子の頬に煤を使って大きな斑点をつける。見目麗しい赤ん坊は悪魔の関心を引き、命を奪われる。悪魔の気を引かないよう、敢えて頬に煤を塗って醜くするのである。古代日本においても、子供に敢えて汚いイメージをもつ名前をつけ、鬼を遠ざけたというが、やはり魔除けの発想に基づく。このような、「化粧」とは真っ向から対立するように見える〈顔を汚す〉という行為が、「呪術性」という意味で化粧と軌を一にしているのである。

以上のことから、アジアにおける化粧ないし身体装飾の顕示的性格は明らかである。変身しなくてははいけない以上、あるいはわかってもらわなくてははいけない以上、化粧した事実が目立たなくてはならないのである。化粧を施した事実が隠匿される「ナチュラルメイク」ではなく、作為性や虚構性（虚偽性と言い換え得るかもしれない）が明らかであって構わないし、むしろ明らかである必要があるのである。アジア人にとって化粧による虚構性が露わになること、顕示的であることに抵抗を覚えない背景には、以上のようなアジアの化粧の根本にある観念が作用していると考えることができる。

2.5 「目」のもつ神秘力

「目の強調」の話題に戻ろう。上述の文脈から考えた場合、目のもつ呪術性の問題に突き当たる。目は感官であるにとどまらず、神秘的なパワーに裏打ちされた器官でもある。しかも両義的な性格（ambivalence）を具えている。その視線は、人を加護する力を有する一方で、人に不幸を招来することもできる。後者の場合が邪視（evil eye）である。多くの視線にさらされた時には、邪視を祓う儀礼が施される。筆者も、南インドの部族社会で祭りに参加した際、入念にこの邪視の祓いを受けた記憶がある。

このように目には不可思議な力が宿っているとされ、未だに人々の信じるところとなっている。南インドでは赤ん坊の両眼にマイと呼ばれる黒い縁取りを施し、目を際立たせるが、そこにも呪術的な観念が働いていることは想像に難くない。

目に関わる諸問題は、アジア人の化粧が宗教性と顕著な結びつきを示す一例として提示したに過ぎない。このような例は枚挙にいとまがない。

3. 総括

3.1 結びと展望

アジア人の「化粧」は単なる化粧ではない。そこには、美的観念だけでなく、人々の日常の営為の背後にある伝統的な神観念、身体観、世界観が色濃く反映されている。

アジアの化粧の伝統について、本報告では諸々の理由により一つのものとして扱ったが、均質性が貫徹しているわけではなく、細部に目を凝らせば歴史文化的に大きく二つの系統に分かれると言ってよい。一つは南アジア（インド文化圏）であり、一つは東アジア（中国文化圏）である。今後は、東南アジアへの伝播など、民族の違いを超えて広範な影響を与えた南アジア系の化粧の伝統を手始めに、そこに垣間見られるアジア的精神世界を、さまざまな方面（哲学思想、生命観、身体観、芸術理論など）からあぶり出し、その意義を多面的に究明していきたいと考えている。

考察の具体的対象としては、南アジアの伝統的芸術理論（ラサ論、美学理論、ナーティヤ・シャーストラなど）、芸能パフォーマンス（カタカリ、バラタナーティヤム、オリッスィー、カタックなど）、伝統医療と栄養学（アーユルヴェーダ、スィッドマルツヴァムなど）、インド古典哲学理論（シャッドルシャナや仏教・ジャイナ教など）、東南アジア（インドシナ、マレー半島、インドネシア）への伝播の様相などが考えられよう。

これらの個別的考察から、南アジアの生活文化を特徴づける基本色調（白・黒・黄・赤・青）の由来を探り、南アジアの化粧とその色調の背後にある世界観や身体観を明らかにしたい。

南アジアの化粧の伝統は、伝統的ファッションとともに移民等を通じて世界各地に拡散している。個々のディアスポラにとどまらず、イギリスなどホスト社会の服飾文化にも影響を与えつつある。

3.2 おわりに

「化粧」についての通文化的な研究は、これまでほとんど為されてこなかった。個々の国民ないし民族集団についての個別的な研究成果は散見されるものの、通文化的な視点を採り入れつつそれらを総合し、精神文化との関わりをも考慮しながら体系的に整えられた研究は事実上皆無に

等しい。その重要性和研究の潜在的可能性にもかかわらず、文化研究の中で等閑視され続けてきたのが現状である。

かたや、本報告で特に取り上げなかったが、当該課題の中心的なテーマとも関連する「色彩」ないし「彩色」についても、事情は概ね同様である。イェール大学出版部など欧米の著名な大学出版局からアジア文化における「色」を扱った写真集が刊行されているが、大学からの出版物であるにもかかわらず、適切な学問的解説や客観的分析を欠いており、折角の美しいカラー写真を盛った出版物も存在意義が半減している。

こうした現象の背景にあるのは、物質文化や大衆文化に対する学問的関心および学問的理解の相対的稀薄さである。たとえ意識はしていないにせよ、人間の「おもて」に顕れ出た様相は、その人間の内面をも表出していて然るべきであり、またそうであるに相違ない。哲学や思想を哲学書や思想書に拠って考察するのは至極当然のこととしても、化粧や服飾などの表現様式の中に内面世界の伝統を見出そうとするのも、劣らず正当な精神文化研究たり得るはずである。

本研究は、このような既成の学問的営為の限界を踏まえ、かつ虚心な反省にも立ちながら、化粧や服飾等の物質文化の形態の中にその地域・文化圏の精神の営みの反映を探る糸口を見出す試みであり、今後構築されるべき体系的研究の枢要な一部を構成するものである。

(参考文献)

- 1) 宮尾慈良『比較芸能論』彩流社、東京、2006.
- 2) 宮尾慈良『舞踊の民族誌』彩流社、東京、2007.
- 3) 山下博司「南アジア世界における〈衣〉の意味とその変容－経済開放下の変化をふまえて－」『第9期ファッション研究助成事業成果報告書』、日本ファッション協会、東京、2003.
- 4) 山下博司・橋本泰元・宮本久義『ヒンドゥー教の事典』東京堂出版、東京、2005.
- 5) 山下博司『ヒンドゥー教－インドという〈謎〉－』講談社、東京、2004.
- 6) 山下博司『ヨーガの思想』講談社、東京、2009.
- 7) 山下博司「ニールギリの邑から－バダガ族の火渡りと輪舞の祭」『コッラニ』第13号、コッラニ編集部、東京、1988.
- 8) Yamashita, Hiroshi, "The Forms and Functions of the Aiyandar Temple Complex: A Preliminary Study on the Cult of the Male Godlings in Rural Tamil Nadu", Y.Ikari & Y.Nagano (eds.), *From Vedic Altar to Village Shrine: Towards an Interface between Indology and Anthropology* (Senri Ethnological Studies 36), National Museum of Ethnology, Osaka, 1993.

香りが記憶や情動と結びつく際の脳内神経機構に関する研究

産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門

梶 原 利 一

Olfactory information from the piriform cortex (PC) is relayed to the amygdala and the hippocampus via two parallel pathways. One of which is via the amygdaloid cortex (AC) and the other is via the entorhinal cortex (EC). Since these olfactory cortices are located in ventral part of the brain, it is difficult to analyze the neural propagation pattern under *in vivo* conditions. For studying these olfactory cortices, the use of the isolated whole brain *in vitro* preparation is one of the ideal methods. By imaging voltage-sensitive dye signals in the isolated whole brain, we can monitor the spread of neural activity. In fact, physiological connections among the olfactory cortices (PC, EC, and AC) were successfully investigated in our laboratory. In the more recent study, we suggested that the AC and EC represent functionally coupled structures in the olfactory stream of information (Kajiware et al. *Eur J Neurosci* 2007). However, stimulus frequency dependency, plasticity, and other neural network properties of the olfactory system are still not well understood. In the present study, we stimulated olfactory nerves repetitively at theta frequency (10Hz), and investigated the change of the spatio-temporal pattern of evoked neural activities in the olfactory cortices. And it was found that the neural activities propagated from the EC to the AC were enhanced under the influence of the repetitive stimulation to the olfactory nerves.

1. 緒 言

ある香りを入力として受けた時、我々は無意識のうちに過去の記憶と参照し、入力された香りを認識する。多くの場合、快・不快のような気持ちさえも抱く。これはどのような神経機構によるものなのであろうか？これまでに得られている嗅覚情報処理に関する知見を総合すると、嗅球からの出力信号は、梨状皮質－嗅内皮質を介して海馬へ入力する経路（海馬システム）では「認識」に関する情報が、梨状皮質－扁桃体周囲皮質を介して扁桃核へ入力する経路（扁桃体システム）では「情動」に関する情報が、それぞれ階層的な段階を経て並列に処理されていると考えられる。本研究では、これら神経経路の動作機構を詳細に調べる事を目的とした。

視覚や聴覚などにみられる感覚皮質と異なり、嗅覚系皮質は脳の腹側部に位置している為、*in vivo*での神経活動計測が容易ではない。そこで本研究ではモルモット単離脳標本の利用により、この問題を克服した。単離脳標本では、摘出した全脳は血管系を介して実験液が常に灌流されている為、3次元的な神経回路構造とその生理活性が維持されている。更に、嗅覚系皮質が頭蓋骨無しで露出されている為、電極アクセスが容易になるだけでなく、膜電位感受性色素で標本を染色すれば、神経活動のイメージングも

行う事が可能になる¹⁻³⁾。これまでに我々は、この実験系で嗅索を電気刺激した際の神経活動伝播パターンを解析し、情動系（扁桃体）システムの入り口にあたる扁桃体皮質が、記憶系（海馬）システムの一部である嗅内皮質に先行して活性化される事を示すと同時に、並列関係にあると思われたこれら扁桃体皮質と嗅内皮質の間には、実は機能リンクを可能にする神経経路が存在し、この経路が記憶と情動の情報統合機能に関わっている可能性を示唆している³⁾。本研究では、これまで行ってきた実験を発展させ、嗅索への刺激パターンを変化させた時の神経応答パターンを検討すると同時に、イメージングでは捉えられない脳深部の現象を解析する為の多点神経応答計測装置の開発を試みた。

2. 実 験

2. 1. 単離脳標本

実験にはHartley系モルモット（150－250g）を使用し標本を作製した。まずペントバルビタール（60mg/kg）の腹腔投与後、心臓より氷冷した実験液を灌流した。そして頭部が十分に冷却された後、丁寧に脳を取り出し、実体顕微鏡下にセットした測定用チェンバーに移した。この時点でのチェンバー内の灌流液の温度は15℃に維持した。次に、椎骨動脈よりカニューレを刺入し、対側の椎骨動脈、内頸動脈、下垂体動脈をシルク糸で縛った後、椎骨動脈から毎分6 mlの速度で実験液の灌流を開始した。そして90分以上かけてゆっくりと灌流液の温度を30℃まで上昇させた後、測定を開始した。液温調節は、チェンバー下にセットしたペルチェ素子の制御により行った。尚、実験液として以下の組成の、低分子デキストラン入り人工脳脊髄液を使用した。（in mM）NaCl, 126；KCl, 3；KH₂PO₄, 1.2；MgSO₄, 1.3；CaCl₂, 2.4；NaHCO₃, 26；glucose, 15；



How does the olfactory information input to the hippocampal and amygdaloid network?

Riichi Kajiware

Biomed. Res. Inst., AIST

HEPES, 2.1; and 3 % dextran (M.W. 70 000), saturated with 95% O₂ / 5 % CO₂.

2. 2. 神経活動の電氣的及び光学的計測

単離脳標本において、嗅球の出力繊維 (LOT) への電気刺激により惹起される嗅覚ネットワークの神経応答を、電気生理学的手法と神経活動イメージング手法の二つの手法により計測した。刺激電極には、双極性タングステン電極 (直径25 μ m, 先端間隔100 μ m) を使用した。0.9% NaCl液を充填したガラス電極 (電極抵抗は 5-10M Ω) を、細胞外誘導記録用電極として使用した。神経活動のイメージングを行う際は、膜電位感受性色素Di-4-ANEPPS (Invitrogen / Molecular Probes) により標本を染色した。膜電位感受性色素の調整法は、富永らの報告に従った⁴⁾。Di-4-ANEPPS 5 mgを1 mlエタノール及び0.5 mlクレモフォアEL10%水溶液により溶解し、ストック液とした。ストック液40 μ lを0.5 ml仔ウシ血清と0.5 mlの実験液に溶かしたもの (最終濃度0.2 mM) を直接脳表に滴下して標本を染色した。尚、標本を膜電位感受性色素で25分間染色した後、30分以上灌流液を流す事により、細胞膜に取り込まれず残った不要な色素を洗い流した。光計測は、KODAK製CCDイメージセンサ (KAI-1003) を基に我々が開発した装置により行った。光計測を行うための光学系は自作のタンデム型顕

微鏡を使用した。この顕微鏡では、第一及び第二対物レンズの組み合わせを変える事によって、倍率を0.5倍、1倍、及び2倍に切り替えられる。また、安定化電源を用いたハロゲン光源からの光は光ファイバーを介して顕微鏡へ送りこまれるが、535 nm ($\pm$ 20 nm) の帯域通過フィルターを通して後、ダイクロイックミラー (580 nmで50 %透過) で反射、標本に照射される。また、標本からの蛍光はダイクロイックミラーを透過した後、長波長域通過フィルター (600 nmで50%透過) を通してCCDで受光される。

3. 結 果

3. 1. 嗅索刺激により誘発される神経応答の刺激強度依存性

モルモット単離脳標本において外側嗅索 (LOT) を刺激すると、神経興奮はまず前梨状皮質 (APC) から後梨状皮質 (PPC) へ伝播する。その後、神経興奮は内側経路を介して扁桃体皮質 (AC) へ、外側経路を介して嗅内皮質 (EC) へと伝播する。これまでこれら二つの経路の関係は、完全に並列であると思われていたが、最近の我々の研究³⁾ によって、嗅内皮質に惹起された神経興奮は、吻側方向へ戻るように伝播し、扁桃体皮質を再び活性化させることがわかった (図1A 赤矢印)。つまり、嗅内皮質と扁桃体皮質は、機能的に結び付いているのである。我々は、この嗅内

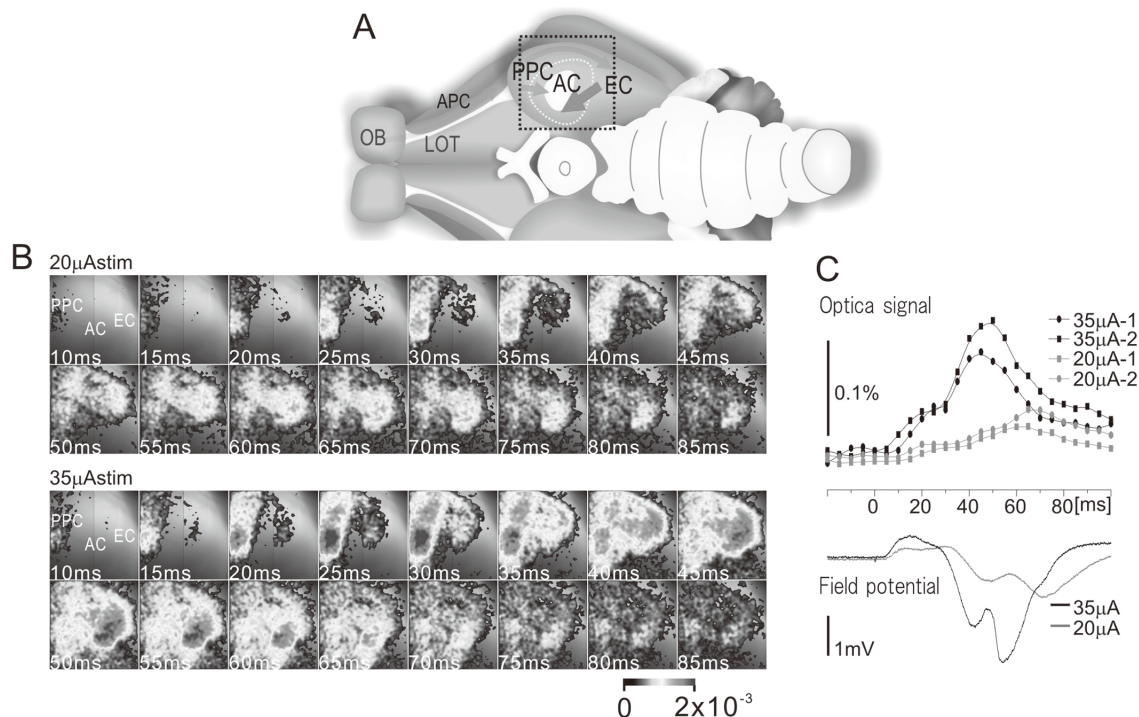


図1 外側嗅索 (LOT) 刺激により誘発される神経応答の刺激強度依存性

- A. モルモット単離脳を腹側より見た模式図。嗅索刺激により惹起された神経興奮は、二つの経路 (直接的な内側経路と嗅内皮質を介する外側経路) を経由して扁桃体皮質へ送られ統合される。OB: 嗅球, LOT: 外側嗅索, APC: 前梨状皮質, PPC: 後梨状皮質, AC: 扁桃体皮質, EC: 嗅内皮質, 破線で囲まれた領域は観測領域。
B. 20 μ A (上) および 35 μ A (下) で刺激した際の嗅覚皮質における神経興奮伝播パターン。
C. 扁桃体皮質の任意のピクセルにおける光シグナル (上) と集合電位 (下)。

皮質と扁桃体皮質を結ぶ神経経路が、刺激強度に依存してどのように活性化されるのかを検証した。図1Bは、LOT刺激時の神経興奮伝播パターンを表す。上段の結果において、刺激後20msにイメージ中央のACの領域が、45msにECが活性化され、65msには再び、ACが活性化された。下段の結果では、刺激後15msにAC、35msにEC、50msにはACが再度活性化された。つまり、LOTへの刺激強度が多少変化しても、扁桃体皮質へ入力する二つの経路（内側経路：PPC→AC、外側経路：PPC→LEC→AC）が活性化されるという現象に大きな変化は認められなかった。図1Cの波形は、二種類の刺激条件下で得られた扁桃体皮質の神経応答の時間経過を表している。上が任意の二箇所から導き出した光シグナル（膜電位変化に比例した蛍光変化）、下が細胞外記録電極により同時測定した集合電位である。光シグナルトレースは二峰性を示し（図1C上）、このピーク間隔とほぼ同一の間隔を持つ二つの集合スパイク電位が、電気生理学的な計測によっても確かめられた（図1C下）。

3. 2. 嗅索への繰り返し刺激により惹起される神経応答パターン

齧歯類がニオイの識別や探索を行う際のスニッフィン

グ周波数は約4–12Hzといわれている⁵⁾。もし外側嗅索（LOT）が繰り返し電氣的な刺激を受けると神経応答は、どのように脳内へ伝えられるのであろうか？我々はこの問題を検討する為に10Hzで外側嗅索（LOT）を繰り返し電気刺激し、これにより惹起される神経応答の活動パターンを解析した。図2Aのように、モルモット単離脳標本のLOTに刺激電極を配置し電気刺激を施した。図2Bは、刺激により誘導された細胞外記録電位波形である。10HzでLOTを6回刺激すると、後部梨状皮質（PPC）および嗅内皮質（EC）では、100ms間隔で振幅の大きい下向き集合電位が6回記録された。扁桃体皮質（AC）では、1回目の刺激に対する応答が極めて小さいものの、2回目以降において、顕著な下向き集合電位が観測された。つまり、繰り返し入力が与えられる事によって、ACの反応性が高まった事が読み取れる。

ではこのとき、ACの神経応答は、どのような神経経路の活性化により増大したのであろうか？我々は、図2の破線で囲まれた領域において、神経活動イメージングを行った。その結果が図2Cである。繰り返し刺激の一回目、二回目、三回目の刺激に対する応答を上段、中段、下段に示した。上段では、刺激後25msにPPCで神経興奮が認められ、85msに神経興奮がECまで伝播している様子がわ

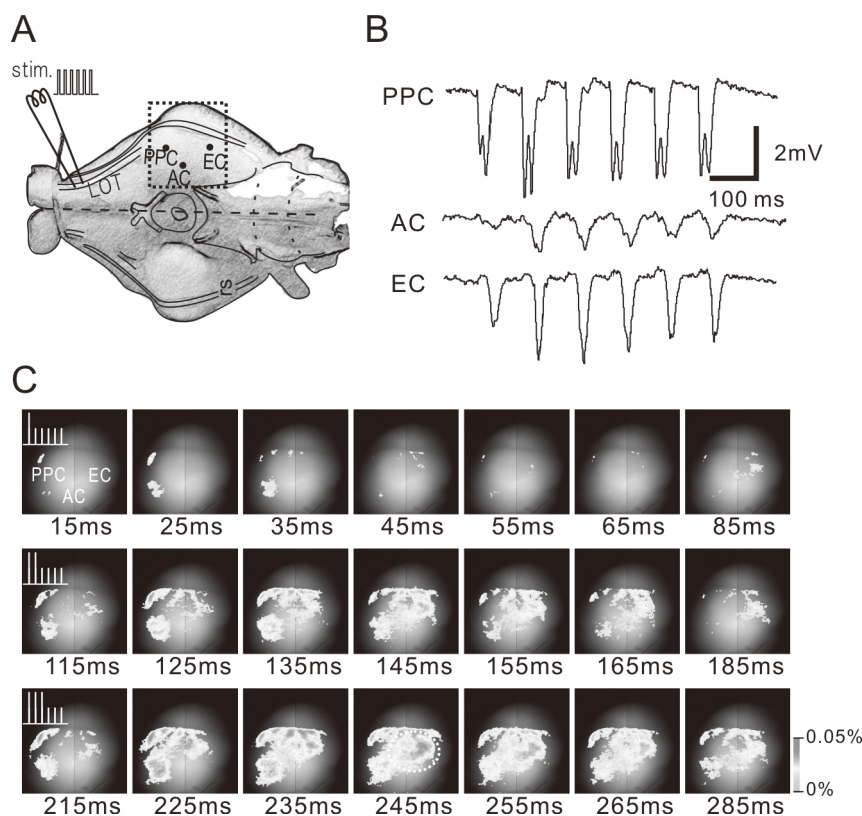


図2 外側嗅索（LOT）を繰り返し刺激した際の嗅覚ネットワークの神経応答

- モルモット単離脳標本の模式図。
- 後部梨状皮質（PPC）、扁桃体皮質（AC）、嗅内皮質（EC）における細胞外記録。
- 図Aの破線で囲まれた領域で観測した神経活動伝播パターン。

かる。更に、2回目(中段)、3回目(下段)と、繰り返し LOT に刺激が入力されると、嗅覚系皮質の全体にわたって神経応答の顕著な増大が認められた。著しい変化が生じたのは、EC と AC の領域であった。下段 245 ms のイメージの白破線内において、EC の応答の顕著な増大に引きずられて AC の領域が大きく活性化されることが判明した。

3. 3. 脳深部神経活動計測の為の機器開発

我々の所有する光計測システムで検出する光シグナルは、脳表面からおよそ 300 ミクロンまでの深さにある組織全体から発せられる蛍光シグナルを加算したものと考えられる¹⁾。本研究では、これよりも深部の脳皮質領域や、更に深部に位置している海馬や扁桃体外側核の神経活動を記録する為に、多点電極記録システムの構築を試みた。市販の 16 チャンネルシリコンプローブの使用を想定し、ヘッドアンプに電極が直接挿入できるような仕様とした。初段のヘッドアンプ部で 10 倍、後段の信号処理回路部で 10 倍、合計 100 倍のゲインを有するシステムとした。初段と後段の間にはカットオフ 0.1 Hz のハイパスフィルターを配置し、後段のアナログ信号処理回路部では、カットオフ 2 kHz を有する 4 次ローパスベッセルフィルターを構成した。

16 チャンネルから記録される集合電位は、市販の AD コンバータを介してコンピュータに取り込み、取り込んだデータは Matlab によって、CSD 解析を行えるような仕様とした。

4. 考 察

モルモット単離脳標本に膜電位イメージングを適用して、嗅覚神経経路の機能構造解析を行った。外側嗅索 (LOT) を電気刺激すると、神経興奮はまず前梨状皮質 (APC) から後梨状皮質 (PPC) へ伝播し、その後、神経興奮は内側経路を介して扁桃体皮質 (AC) へ、外側経路を介して嗅内皮質 (EC) へと伝播した後、EC に惹起された神経興奮は、

吻側方向へ戻るように伝播し、扁桃体皮質を再び活性化させた。今回の研究によって、刺激強度を変化させても、この伝播様式が大きく変化しない事がわかった。しかし、刺激強度が強いほど、AC の興奮性は劇的に増大した。特に EC を介した外側経路の影響が大きいようであった。また、刺激強度が、極めて小さく、EC → AC の伝達経路が、ほとんど活性化されない場合でも、繰り返し入力を与えられるとこの経路は活性化される事がわかった。

本実験では、標本の特性上、匂い物質を実際に与えて脳の活動を見ることが出来ないため、電気刺激を擬似的に与えた。刺激強度の強弱は、与えられた匂い物質の濃度の高低を表す可能性もあるが、匂いの種類の差を表している可能性もある。刺激強度の増大によって、弱い刺激強度では活性化されていなかった LOT の神経線維 (つまりその元にある嗅細胞) が新たに刺激されたと考える事ができるためである。つまり、ある匂い物質については、EC - AC 間の経路を活性化させるには不十分でも、他の匂い物質については、この経路を大きく活性化させる可能性を有している事が示唆される。また、繰り返し刺激の実験結果から、かすかな匂いでも間隔を置いて、繰り返し与えられる事が、EC - AC の経路の活性化には、効果的である事も示唆された。

EC は海馬と結び付いて記憶系の情報処理に関わる事が知られるが、AC は、脳深部の扁桃体重核と結び付いて、情動の情報処理に関与する。本研究で得られた結果は、入力する匂い物質の違いによって、記憶と情動の結び付きに関与する神経経路が活性化されやすかったり、されにくかったりする事を意味しているのかもしれない。

今回の研究のようにモルモット単離脳標本を用いれば、スライス標本の使用では不可能な、複雑な神経ネットワークの解析が行えるが、脳深部で生じた現象までは、解析することが出来ない。そこで本研究では、脳深部の多点電気生理計測を可能にする計測システムを新たに構築した。今

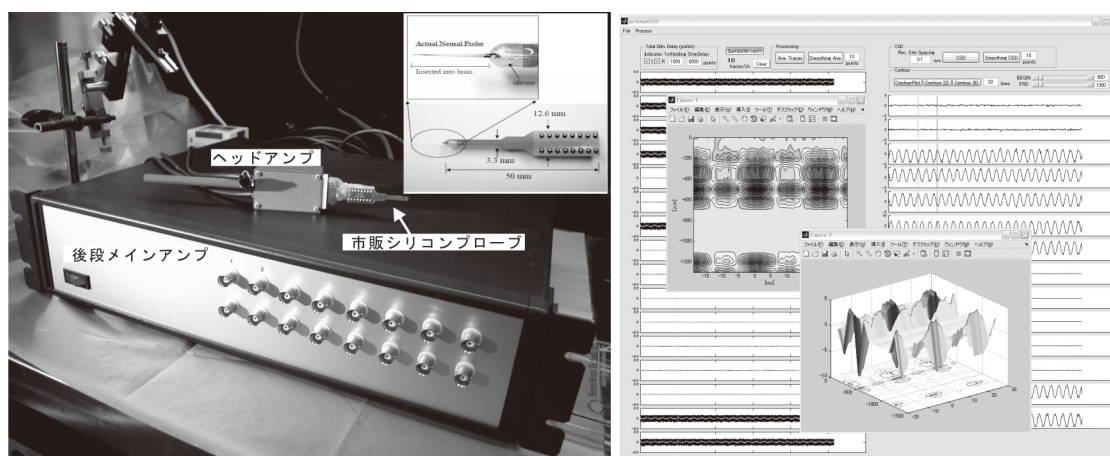


図3 開発した多チャンネルアンプ (左) と波形解析ソフトウェア (右)

後は、この装置を既存の単離脳標本実験システムと組み合わせて使用し、脳深部の複数箇所からの神経応答解析を進める事によって、嗅覚系における海馬や扁桃体ネットワークの動作様式をより詳しく明らかにしてゆきたいと考えている。

(参考文献)

- 1) de Curtis M., Takashima I., & Iijima T. (1999) Optical recording of cortical activity after in vitro perfusion of cerebral arteries with a voltage-sensitive dye. *Brain Res* **837**, 314-319.
- 2) Biella G.R., Gnatkovsky V., Takashima I., Kajiwarara R., Iijima T., & de Curtis M. (2003) Olfactory input to the parahippocampal region of the isolated guinea pig brain reveals weak entorhinal-to-perirhinal interactions. *Eur J Neurosci* **18**, 95-101.
- 3) Kajiwarara R., Tominaga T., & Takashima I. (2007) Olfactory information converges in the amygdaloid cortex via the piriform and entorhinal cortices: observations in the guinea pig isolated whole-brain preparation. *Eur J Neurosci* **25**, 3648-3658.
- 4) Tominaga T., Tominaga, Y., Yamada, H., Matsumoto, G. & Ichikawa, M. (2000) Quantification of optical signals with electrophysiological signals in neural activities of Di-4-ANEPPS stained rat hippocampal slices. *J. Neurosci. Meth* **102**, 11-23.
- 5) Kepecs A., Uchida N., & Mainen Z.F. (2007) Rapid and Precise Control of Sniffing During Olfactory Discrimination in Rats. *J Neurophysiol* **98**, 205-213.

触動作の特徴抽出による化粧品の使用感評価

大阪大学大学院工学研究科 環境・エネルギー工学専攻

秋山 庸子

The correlation between tactile sensation and tactile movement during application of cosmetics is important because tactile sensation is induced only by active handling. The aim of this study is to evaluate application feeling of skin care products objectively using motion analysis of human finger during application. The effect of the application velocity on the sensory evaluation score was investigated. It was shown that the participants tends to apply the skin care products at the velocity which they feel the most comfortable. Based on this result, change in the application velocity by changing rheological property of the skin care product was studied. From these results, it was shown that motion analysis of application is useful to evaluate tactile feelings of the skin care products. In the similar method, to establish the evaluation method of tactile sensation of human hair, coincidence measurement of motion analysis and load measurements during hair brushing and finger combing were performed. Change in load profile from root to tip of hair by application of hair care products was examined. Change in the maximum load by hair damage and treatment and its correlation with sensory evaluation were also discussed. It was shown that the load during hair brushing which is considered to reflect the frictional property of human skin surface is useful to evaluate tactile feelings of human hair. The rheological properties of hair care products mainly effects on the brushing load, whereas that of skin care products mainly effects on the velocity of application movement.

1. 緒 言

本研究は、スキンケア化粧品の塗布時の指の触動作、およびヘアケア化粧品適用前後のブラッシング・手ぐし動作を対象に3次元動作解析を行い、動作速度や変位から特徴となるパラメータを抽出することによって、化粧品の使用感の新たな評価手法を構築することを目的とする。

スキンケア・ヘアケア化粧品は、皮膚や頭髮の保湿や乾燥からの保護などの効果のみならず、人間の触感を刺激し、それによって心地良さや爽快感を与える効果が期待される。したがって、スキンケア製品塗布時の触感や、ヘアケア製品適用後のくし通り・指通りの感覚は、QOL（生活の質）向上をもたらす化粧品開発に欠かすことのできない因子である。しかし、これらの使用感は、専門パネルあるいは一般パネルによる官能検査による評価が一般的であり、化粧品の触感制御のためには、より客観的な評価手法の確立が必要である。

触感は「さわる」という能動的動作により惹起されることを考慮すると、その次の段階の研究として、触動作、官能特性、材料物性の相互の関連付けが必要である。特に化粧品のように、その変形挙動が時間依存性を持つ粘弾性材料の触感設計において、触動作は重要な情報となる。触動

作の速度や特徴を抽出することにより、官能評価よりも客観的であり、しかも化粧品の粘弾性などの物性測定と異なり、生体と化粧品との相互作用を反映した化粧品の評価手法として利用可能であると考えられる。本研究では、スキンケア化粧品塗布時の塗布動作解析、およびヘアケア化粧品適用前後のブラッシングの動作解析を行い、官能評価との相関を調べることにより、触動作解析を用いた化粧品の使用感の新たな定量的評価手法について検討した結果を報告する。

2. 実 験

2.1 スキンケア製品の塗布動作の解析¹⁾

20代の被験者6名（男性2名、女性4名）を対象としてスキンケア製品塗布時の動作解析および官能評価を行った。被験者は志願者であり、事前に十分なインフォームドコンセントを行った。実験は全て気温 $25\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60\pm 10\%$ に保たれた部屋で行った。市販のスキンケア製品2種（クリーム状のものと乳液状のもの、いずれもO/Wエマルション）0.15 mLを、左手の前腕内側、肘線から約5 cmの約7–10 cmの範囲に塗布するという条件で行った。塗布は右手人差し指の第一関節部を用いて行った。実験開始前に赤外線マーカーを人差し指の第2関節と第3関節の間に配置し、マーカーの動きを3次元運動解析システム（Move-tr/3D, ㈱ライブラリ）によって塗布時の人差し指の動作を追跡した。また触圧測定は、ELFシステム（ニッタ株式会社）を用いて、人差し指の指先にセンサーを配置し測定した。測定の概要を図1に示す。

2.2 毛髪ブラッシング速度・反力測定²⁾

全ての実験は全て気温 $25\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60\pm 10\%$ に保た



Effects of Tactile Movement Speed on Tactile Feeling

Yoko Akiyama

Graduate School of Engineering,
Division of Sustainable Energy and
Environmental Engineering, Osaka
University

れた部屋で行った。ブラッシング動作解析と毛髪にかかる反力評価を同時に行うため、毛髪サンプル（長さ30cm, 10gの中国人毛）を小型万能試験機（EZ-test, 島津製作所）の引張試験ユニットに固定した。小型万能試験機のロードセルは50Nのものを使用した。ロードセルの変位速度を0に設定した状態でブラッシングを行い、そのときの反力を測定した（測定分解能約0.0025N）。毛髪サンプルは未処理毛、ブリーチ処理毛（2.5%アンモニア、6%過酸化水素を含む2剤式ブリーチ剤にて未処理毛を25℃・30分の処理を3回行ったもの）、未処理毛に市販のヘアケア剤2種をそれぞれ使用したもの（ヘアワックス0.5gを塗布、ヘアスプレーを約3秒間全体に吹付したもの）を用いた。毛髪サンプルのブラッシングを複数の被験者に行ってもらい、3次元動作解析システム（Move-tr/3D, ㈱ライブラリ）を用いたブラッシング速度の測定と合わせ、その時の反力を同時測定した。動作解析については、くしおよびブラシの背面に赤外線マーカーを配置してその動きを追跡した。動作解析のサンプリング速度は1/30s、最大誤差は0.57mmであった。動作解析のサンプリング速度は1/30s、最大誤差は0.57mmであった。また手ぐし時の反力測定も同条件で行い、ブラッシング時と比較を行った。反力測定のサン

プリング速度は50 msecであった。測定の概要を図2に示す。

3. 結果

3.1 スキンケア製品の塗布速度の測定

スキンケア製品の触感の違いが塗布速度に与える影響について検討するため、粘性率の異なる市販のクリーム状乳液状の、いずれもO/Wエマルジョンである2種のスキンケア製品について、塗布動作の解析を行った。2種のスキンケア製品の往路・復路の塗布動作速度の代表的な結果を図3に示す。往路・復路それぞれの最大塗布速度の5回分の平均値を求め、往路・復路それぞれについて調べた。被験者によって塗布速度に大きな違いがあったため、各被験者について2種のスキンケア製品の塗布速度の比較を行った。その結果、被験者6名のうち5名において、粘性率の比較的低い乳液において往路塗布速度の有意な増加が見られたが、往路の塗布速度で有意差が見られたいずれの被験者も、復路には有意差が見られなかった。このことは、化粧品物の物性の違い、特に粘性率の減少が主に往路の塗布速度の増加として反映されていることを示している。これは、皮膚表面における塗布時の化粧品の流動特性の違いに起因すると考えられる。

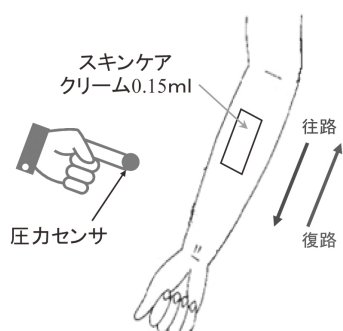
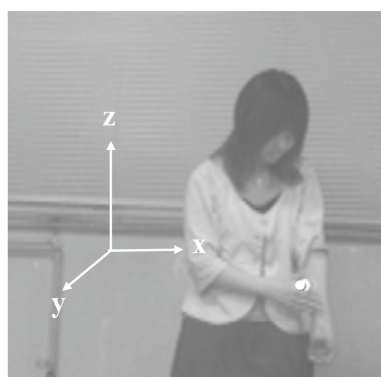


図1 触動作と触圧の同時測定

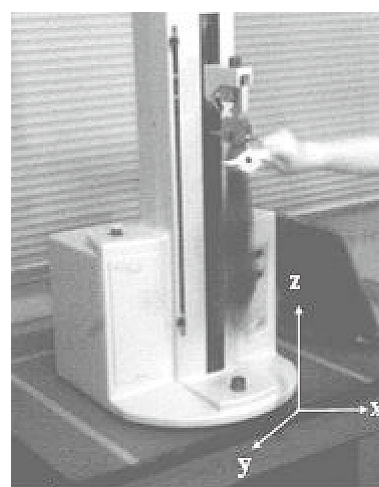


図2 毛髪のブラッシング反力・動作の同時測定

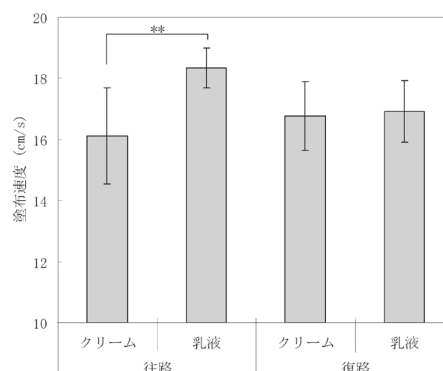


図3 スキンケア製品の塗布速度 (**p<0.01)

このようにして測定した塗布速度がどのような官能評価項目に対応しているかを調べるため、塗布速度と官能評価結果との相関を調べた。官能評価は各試料について、評価項目ごとにSD法により1-5の5段階で評価した。官能評価スコアと上記の方法で求めた往路・復路の塗布速度および塗布長さとの相関をまとめたものを表1に示す。伸びのよさ、なめらかさ、しっとり感、ぴちぴち、の各評価スコアが塗布速度と正の相関を持ち、その多くがせん断力を加えたときの抵抗が小さいことに関連する官能値であるといえる。一方、膜厚感、べたべた、ぱさぱさ、の各評価スコアが塗布速度と負の相関を示した。これらはいずれも、せん断力を加えたときの抵抗が大きいことに関連する官能値であるといえる。また、往路の速度のほうが復路の速度に比較して高い相関を示した。このことは、往路では指先の動きによってスキンケア製品を塗り伸ばしているが、復路は塗布動作というよりはむしろ、指が初期位置に戻るための戻り動作としての役割が大きいことを示唆している。

3.2 毛髪ブラッシング速度と反力の同時測定

未処理、ブリーチ毛、市販のヘアスプレーやヘアワックスで処理した毛髪について、ブラッシング時に毛髪に加わる反力とブラッシング動作の同時測定を行った。小型万能

試験機の引張試験ユニットに固定した毛髪サンプルのブラッシングを複数の被験者に行ってもらい、ブラシの背面に赤外線マーカーを配置し、3次元動作解析システムを用いてブラッシング速度を測定した。このような測定系で動作と反力の同時測定を行った。

毛髪の処理によりブラッシング速度が変化することを予想したが、いずれのサンプルでもブラッシング速度は50 cm/s前後であり、サンプル間でほとんど有意な差は見られなかった。それに対して反力には明らかな違いが見られた。横軸に反力、縦軸にブラシのZ軸方向の変位をとり、未処理の毛髪とヘアスプレー処理後の結果をプロットしたものを図4に示す。この図において、Z軸座標が45 cm付近の位置が毛髪サンプルの根元であり、10 cm付近が毛先に対応している。未処理の毛髪では根元付近と毛先付近で2つのピークが見られるが、ヘアスプレーで処理した場合、根元から中間部にかけて増加し、その後毛先にかけて減少する傾向が見られた。特に毛先でのピークが未処理のものと比較して消失していることが分かり、これはヘアケア製品による毛先の絡まりの解消を反映していると考えられる。

スキンケア製品の場合と同様に、官能評価と動作・反力パラメータの相関を調べた結果を表2に示す。ここで反力の積分値とは、1回のブラッシングごとに反力を距離につ

表1 スキンケア製品の塗布速度と官能評価の相関 (* $p<0.05$)

	往路最大速度	復路最大速度	塗布長さ
伸びのよさ	0.42	0.32	0.17
なめらかさ	0.31	0.21	0.14
油っぽさ	-0.05	0.03	0.07
みずみずしさ	0.28	0.26	-0.15
膜厚感	-0.33	-0.30	0.22
べとつき	-0.12	-0.04	0.23
しっとり感	0.64 *	0.65 *	0.00
すべすべ	0.19	0.14	0.05
ぎとぎと	-0.03	0.05	-0.26
ぴちぴち	0.45	0.42	-0.39
べたべた	-0.33	-0.26	0.23
さらさら	-0.01	-0.03	-0.09
ぱさぱさ	-0.35	-0.34	-0.06
総合評価	0.18	0.14	0.32
嗜好	-0.15	-0.21	0.23

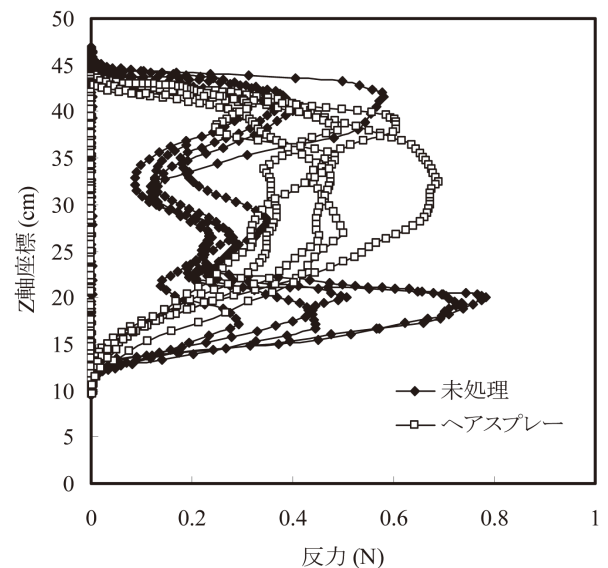


図4 未処理毛髪とヘアスプレー処理毛髪におけるブラシの変位とブラッシング反力の関係

表2 毛髪のブラッシング反力・速度と官能評価の相関

	くし通り	しなやかさ	さらさら感	きしみ	ぬるつき	ぱさつき
反力最大値(5回の平均値)	-0.34	-0.03	-0.01	-0.10	0.46	-0.30
反力最大値の標準偏差	-0.47	-0.22	0.21	0.11	-0.12	0.09
反力積分値(5回の平均値)	-0.29	0.17	-0.06	-0.25	0.49	-0.05
反力積分値の標準偏差	-0.33	-0.11	0.02	-0.10	0.05	-0.23
速度最大値(5回の平均値)	-0.14	0.33	-0.02	-0.20	0.29	-0.04
速度最大値の標準偏差	-0.29	0.00	-0.07	-0.42	-0.04	-0.04

いて積分したものであり、ブラッシングに必要な運動エネルギーに相当する。傾向としてくし通りは最大反力およびその標準偏差と負の相関、きしめは最大速度の標準偏差と正の相関、ぬるつきは最大反力と正の相関を示し、これらの傾向はおよそ妥当な結果といえる。したがって、毛髪の触感の客観化のために速度・反力の測定が有用である可能性が示された。また、相関係数は全体的に反力のパラメータのほうが大きい傾向にあった。以上のことから、毛髪のブラッシング時の反力により、毛髪のくし通りを定量的に評価できる可能性が示された。

4. 考 察

以上の結果について、大まかな傾向をまとめると、毛髪ブラッシングの場合は触感が主に反力に反映される傾向が得られ、スキンケア製品塗布の場合は触感が主に塗布速度に反映される傾向が得られた。このようにそれぞれの動作に特徴的な傾向が表れたことについて考察する。

神川³⁾は流体潤滑剤を塗布した表面の摩擦特性が固体潤滑状態と流体潤滑状態が混在した状態であると考え、摩擦力が式(1)のように表されると述べている。

$$F = \mu a W + \eta b U \quad \text{式(1)}$$

ここで、 F は摩擦力、 μ は境界潤滑部における動摩擦係数、 W は法線力、 U は物体表面間の相対速度、 η は流体の粘性率、 a 、 b は境界潤滑・流体潤滑のそれぞれの寄与に依存する係数である。

本研究の場合は皮膚および毛髪のほとんどの部分が化粧品に覆われているとすると、流体潤滑の寄与が大きいと考えられるため、式(1)の第2項の寄与が大きいと考えられる。この式から、図5に示すように、摩擦力 F は相対速度 U に比例し、その傾きは粘性率 η に依存して変化する。本実験結果から、スキンケア製品を塗布する場合、被験者はサンプルの種類に関わらず往路の指先の摩擦力が同じになるようにスキンケア製品を塗布しているため、サンプルによって塗布速度に大きな違いが現れた可能性が考えられる。

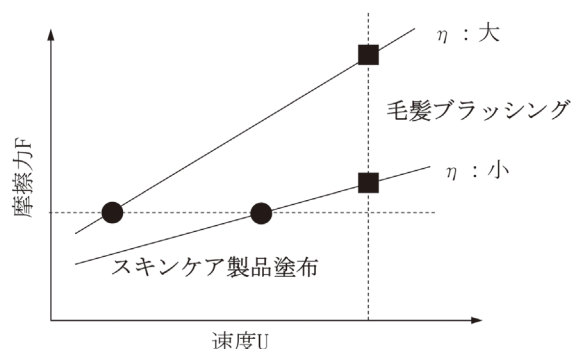


図5 皮膚へのスキンケア製品塗布と毛髪のブラッシングにおける摩擦特性

一方、毛髪ブラッシング実験においては、被験者は毛髪サンプルの状態に関わらず速度が一定になるようにブラッシングしているため、摩擦力の寄与が大きいと考えられる反力にヘアケア製品による明確な影響が見られたと考えられる。

以上のように、指先やブラシによって物体を触る動作において、毛髪ブラッシングと皮膚への塗布の場合で触動作の特徴が異なる、すなわちそれぞれが、触対象の状態に関わらず速度がほぼ同じである動作と、反力がほぼ同じである動作である可能性が示された。

5. 総 括

本研究では、皮膚へのスキンケア製品の塗布、および毛髪へのヘアケア製品の噴霧あるいは塗布が触感に及ぼす影響について、人が皮膚あるいは毛髪をさわる際の動作解析と反力測定を用いて、触動作の特徴抽出を行い、官能評価との相関を調べることによって、触感を客観的に示すための新たな指標の構築を試みた。

皮膚へのスキンケア製品塗布の場合、塗布速度が官能値に影響していることがわかった。このことはスキンケア製品のレオロジー特性、特に動的粘弾性に深く関わっていると考えられ、今後も検討を続けていく予定である。一方毛髪の場合、反力によって触感が評価できる可能性が示されたが、皮膚と異なる点として、毛髪と化粧品の相互作用のみならず、毛髪どうしの相互作用、さらには指やくしと毛髪の相互作用も検討する必要があることが挙げられる。このことに関してはトライボロジーの観点からの検討がなされ始めているが、系をどのように単純化して物理モデルを構築するか、さらには微視的特性とどのように関係付けるかが今後の課題になると考えられる。今回の結果から、スキンケア製品、ヘアケア製品の触感の評価において、触動作の特徴抽出が有用であることが示されたため、今後触感の客観化とともに、その物理的背景の検討を行っていく予定である。

(参考文献)

- 1) 秋山庸子, 泉佳伸, 西嶋茂宏, 触動作の特徴抽出による化粧品の使用感評価～スキンケア製品の塗布動作～日本化粧品技術者会誌 43 (2) 95-100 (2009).
- 2) 秋山庸子, 松江由香子, 土井佑介, 泉佳伸, 西嶋茂宏, 触動作の特徴抽出による化粧品の使用感評価-毛髪ブラッシング動作の解析-, 日本レオロジー学会誌 37 (3) 129-134 (2009).
- 3) 神川康久, 野々村美宗, 前野隆司, 皮膚上塗布物のトライボロジー特性と触感の関係, 日本機械学会論文集. C 編 Vol.73, No.730, pp.1827-1833, (2007).

化粧時間による耳鼻咽喉科心身症患者の抑うつ不安のレベルの評価

慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科

五 島 史 行

The makeup is basically unique behavior only for the female. The consuming time for makeup can be closely related to the personality. Recently we are keen to treat the psychosomatic patients in otolaryngology with clinical psychologist. The objective evaluation of the patients with these disorders are usually difficult. We realized that the makeup time is not stable in any patients but it was altered depending on the state of mental health in patients. The subjects were 25 control and 3 patients. BSRI (Bem Sex-Role Inventory) and original inquires asking their makeup time were used. The Bem Sex Role Inventory is designed to provide an assessment of degrees of masculinity, femininity, and androgyny according to Sandra Bem's gender schema theory (Bem, 1981). BSRI The results indicated that the score of BSRI in control were $M=76.4\pm16.7$, $F=92.0\pm13.3$, $S=85.6\pm8.8$, makeup time= 15.8 ± 7.2 minutes, and $M=74\pm26.9$, $F=104\pm15.6$, $S=94.3\pm6.8$, makeup time= 13.3 ± 5.8 minutes respectively. From these results the weak collation were postulated that the degrees of masculinity, femininity, and androgyny can affect their makeup time. Further studies are required to confirm the makeup time can be subjective parameters for the evaluation of mental health in psychosomatic patients.

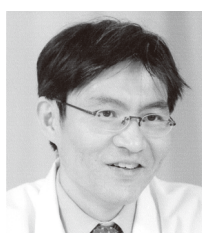
はじめに

化粧は男性が行わず女性が積極的におこなうものの一つである。化粧時間の長さは女性の持つ外面に気を遣うというメンタリティとの関係がある可能性がある。近年女性が男性化していると言われている。これまで我々は耳鼻咽喉科において耳鼻咽喉科心身症患者に対して図1に示ような体制を取り、臨床心理士と共に心身医学治療を行ってきた¹⁻¹⁰⁾。一般的に行われる心身症患者への心理治療は、カウンセリングや認知行動療法、自律訓練法である。最近抑うつ症状を含めた臨床症状が数ヶ月で改善した症例を経験した。それは、突発性難聴の後の難聴に対し、抑うつ症状に対しての行動療法としてエステサロンに月に一度行くこと、月に一度お手伝いさんを雇用して夕飯の手伝いをしてもらうことを徹底させたというものである。この期間中、患者の化粧行動は大きく変容し、化粧品の購入金額、化粧にかかる時間が増大した。他にも外来診療中に患者の心身の健康度が正常化するにつれて患者の化粧の様子が変化することをしばしば経験する。このことから患者の化粧関連行動が患者の抑うつ不安などの心理的健康度によって影響を受ける可能性がある。このことを契機に本研究を立案した。しかしながら患者の化粧時間を詳細に問診することは容易ではなく研究方法をかえ今回は男性的か女性的かという性的特徴と化粧時間との関係を調べることを目的とし

た。性役割尺度は長い間男性性、女性性と一次元の両極的概念としてきた^{11, 12)}。ところがBemは一人の人間の中に男性性、女性性、が存在するという仮説を立て男性性と女性性を二次元の概念と考えた。そして新しい性役割尺度としてBem Sex Inventory (以下BSRI¹³⁾) (表1)を考案した。この性役割尺度と化粧所要時間を臨床に応用することを考えた。

目 的

病院における医療行為は主に薬物、外科的治療が中心であり心理治療はあまり行われていない。また治療効果の判定には一般的に患者の主訴や血液検査などの医学的検査の結果が指標として用いられる。現在の医療の問題点は、人間にある“心”の部分の正確に評価していないこと、そして“心”を意識した診断的、治療的アプローチを行っていないことにある。病院を受診する心身症患者の割合は決して低くなく、我々の耳鼻咽喉科のデータでもおよそ7-9



The evaluation of the level of anxiety and depression in patients with psychosomatic disorders who visited otolaryngology by means of their required makeup time

Fumiyuki Goto M.D.

Keio University School of medicine,
Department of otolaryngology

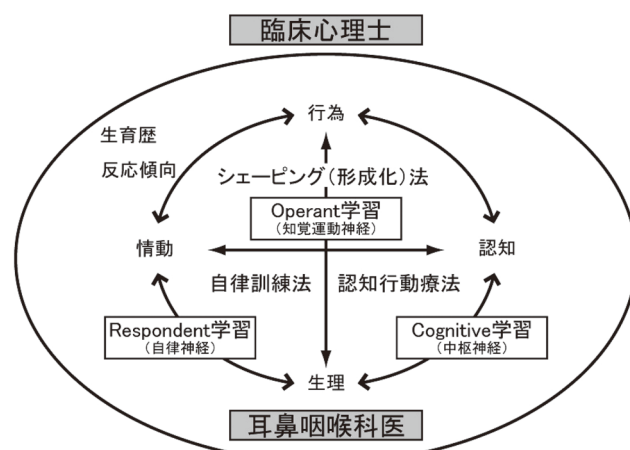


図1 耳鼻咽喉科医と臨床心理士の協同

%である。これらの心身症患者に対しては、従来、その他の患者と同様な診断、治療が行われてきた。その結果、患者の予後は良好でなく、通院を中断したり、他の病院に移ったり、通院期間が長期化する原因となっていた。このような望ましくない現状をふまえ、心身症患者に対してより適切に診断、治療する方法を開発することを目的とした。一般的に行われる心身症患者への心理治療は、カウンセリングや認知行動療法、自律訓練法である。化粧行動は、女性にとって心理的余裕が無いと取ることのできない行動である。化粧行動は化粧品の購入、外出の頻度・時間、化粧にかかる時間、そしてエステサロンなどの自分で行う以外の快適さを追求する広い意味での化粧行為のことを指す。化粧行動は個人差が大きく、相対評価が必要である。評価

に用いるものとしては、最も簡便な化粧にかかる時間とした。しかしながら患者の化粧時間を詳細に問診することは容易ではなく研究方法をかえ今回は男性的か女性的かという性的特徴と化粧時間との関係を調べることを目的とした。

対象および方法

健常被検者25人（全員女性45.5±17.2才）および耳鼻咽喉科心身症患者3人を対象とした。
 男性性、女性性を調べるために質問紙としてBSRIを施行した。合わせて各自の化粧時間について質問紙を用いて調査した。男性性、女性性と化粧時間の関係を調べた。BSRIは1974年にS. Bem¹³⁾ が開発した尺度であり被検者が女性的か男性的かを診断するためのものである。実際に使

表1 BSRI

BSRI 日本語版

この心理テストは性役割パーソナリティの尺度を測定するものです。

この尺度はあなたが自分自身をどんな人間だと思っているか、そのイメージをとらえるためのものです。

7段階評定としてお答え下さい。(あてはまる数字に○をして下さい。)

7:よくあてはまる

6:あてはまる

5:ややあてはまる

4:どちらともいえない

3:ややあてはまらない

2:あてはまらない

1:全くあてはまらない

ご自分の年代、性別に○して下さい。

(10代 20代 30代 40代 50代 60代 70代 80代)

(男 ・ 女)

1	自分の判断や能力を信じている	1 2 3 4 5 6 7	21	頼りになる	1 2 3 4 5 6 7	41	心が暖かい	1 2 3 4 5 6 7
2	従順な	1 2 3 4 5 6 7	22	分析的な	1 2 3 4 5 6 7	42	大まじめな	1 2 3 4 5 6 7
3	人の手助けになることをいとわない	1 2 3 4 5 6 7	23	同情的な	1 2 3 4 5 6 7	43	はっきりした態度がとれる	1 2 3 4 5 6 7
4	自分の信念を曲げない	1 2 3 4 5 6 7	24	しつと深い	1 2 3 4 5 6 7	44	優しい	1 2 3 4 5 6 7
5	明るい	1 2 3 4 5 6 7	25	リーダーとしての能力を備えている	1 2 3 4 5 6 7	45	好意的な	1 2 3 4 5 6 7
6	むら気がある	1 2 3 4 5 6 7	26	困っている人への思いやりがある	1 2 3 4 5 6 7	46	積極的な	1 2 3 4 5 6 7
7	独立心がある	1 2 3 4 5 6 7	27	正直な	1 2 3 4 5 6 7	47	だまされやすい	1 2 3 4 5 6 7
8	はにかみ屋の	1 2 3 4 5 6 7	28	危険を犯すことをいとわない	1 2 3 4 5 6 7	48	やることが非能率的な	1 2 3 4 5 6 7
9	良心的な	1 2 3 4 5 6 7	29	人の気持ちを返んで理解する	1 2 3 4 5 6 7	49	リーダーとして行動する	1 2 3 4 5 6 7
10	スポーツマンタイプの	1 2 3 4 5 6 7	30	隠し立てををする	1 2 3 4 5 6 7	50	子どものように純真な	1 2 3 4 5 6 7
11	情愛細やかな	1 2 3 4 5 6 7	31	意志決定がすみやかにできる	1 2 3 4 5 6 7	51	適応性がある	1 2 3 4 5 6 7
12	言動が大げさな	1 2 3 4 5 6 7	32	あわれみ深い	1 2 3 4 5 6 7	52	個人主義的な	1 2 3 4 5 6 7
13	自己主張的な	1 2 3 4 5 6 7	33	誠実な	1 2 3 4 5 6 7	53	ことば使いがていねいな	1 2 3 4 5 6 7
14	おだてにのる	1 2 3 4 5 6 7	34	人に頼らないで生きて行けると思っている	1 2 3 4 5 6 7	54	考えなどが系統的にまとまっていない	1 2 3 4 5 6 7
15	楽天的な	1 2 3 4 5 6 7	35	傷心した人をすすんで慰める	1 2 3 4 5 6 7	55	負けず嫌い	1 2 3 4 5 6 7
16	個性が強い	1 2 3 4 5 6 7	36	うぬぼれた	1 2 3 4 5 6 7	56	子供好き	1 2 3 4 5 6 7
17	忠実な	1 2 3 4 5 6 7	37	支配的な	1 2 3 4 5 6 7	57	人づき合いがうまい	1 2 3 4 5 6 7
18	言動が突拍子もない	1 2 3 4 5 6 7	38	話し方がやさしくておだやかな	1 2 3 4 5 6 7	58	野心的な	1 2 3 4 5 6 7
19	自分の意見を押し通す力がある	1 2 3 4 5 6 7	39	人に好かれる	1 2 3 4 5 6 7	59	温和な	1 2 3 4 5 6 7
20	女性的な	1 2 3 4 5 6 7	40	男性的な	1 2 3 4 5 6 7	60	因習的な	1 2 3 4 5 6 7
						61	お化粧時間	10分以内 20分 30分 40分 50分 60分 1時間以上

表2 日本人の平均値

	M	F	S
日本平均女性	82	91	88
日本平均男性	91	93	88

用した質問紙を表1に示す。健常者、耳鼻咽喉科心身症患者の男性性(M)、女性性(F)、中性性(S)についてこれまで得られている日本人の平均値(表2)との比較を行った。

結 果

健常被検者25人の結果を図2に示す。また耳鼻咽喉科心身症患者の結果を図3に示す。コントロールでは $M = 76.4 \pm 16.7$ 、 $F = 92.0 \pm 13.3$ 、 $S = 85.6 \pm 8.8$ 、化粧時間 = 15.8

± 7.2 分であり患者群では $M = 74 \pm 26.9$ 、 $F = 104 \pm 15.6$ 、 $S = 94.3 \pm 6.8$ 、化粧時間 = 13.3 ± 5.8 分であった。また日本人平均値との比較を行った(図4)。さらに男性性、女性性、中性性と化粧時間との相関関係について検討した(図5)。また耳鼻咽喉科心身症症例ごとの男性性、女性性、中性性と日本人平均¹⁴⁾との比較を行った(図6)。

コントロールと患者で化粧時間を比較した(図7)。

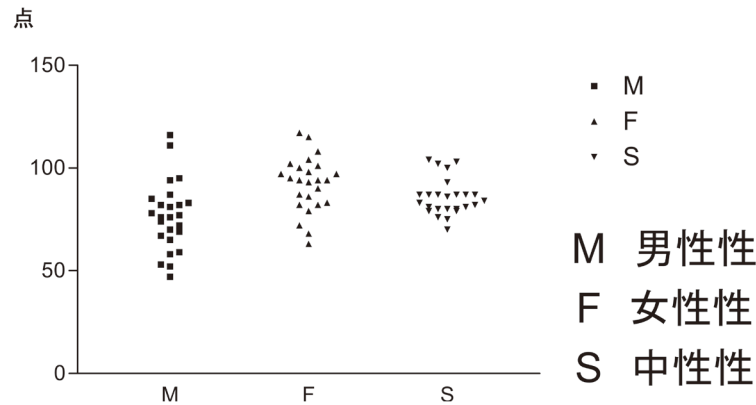


図2 男性性女性性のスコア分布 (コントロール N=25)

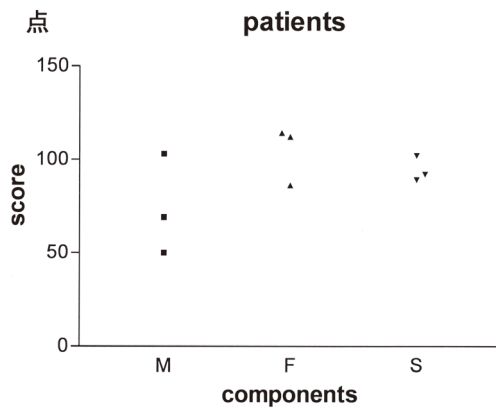


図3 男性性女性性のスコア分布 (患者 N=3)

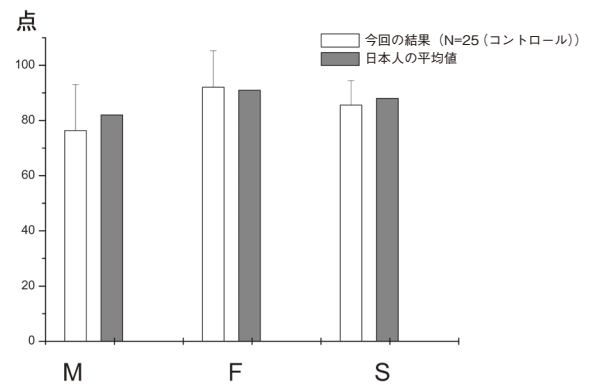


図4 日本人平均値との比較

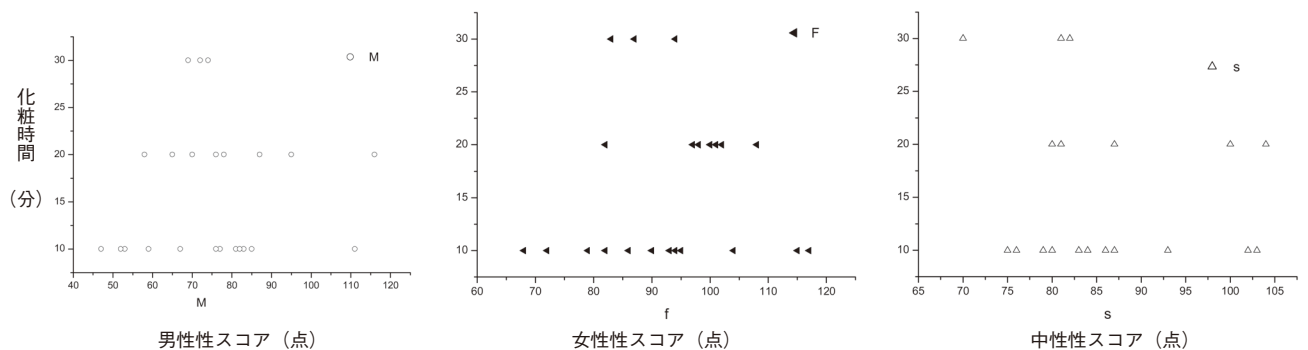


図5 MFS (男性性、女性性、中性性と化粧時間との相関関係)

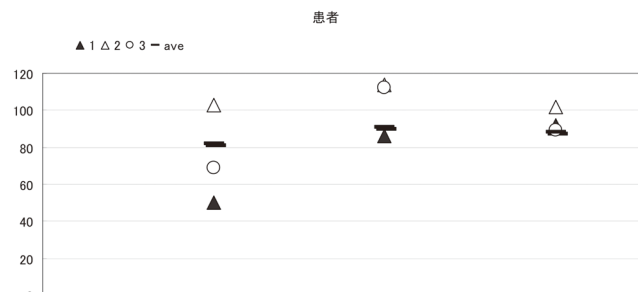


図6 症例ごとの男性性、女性性、中性性と日本人平均との比較)

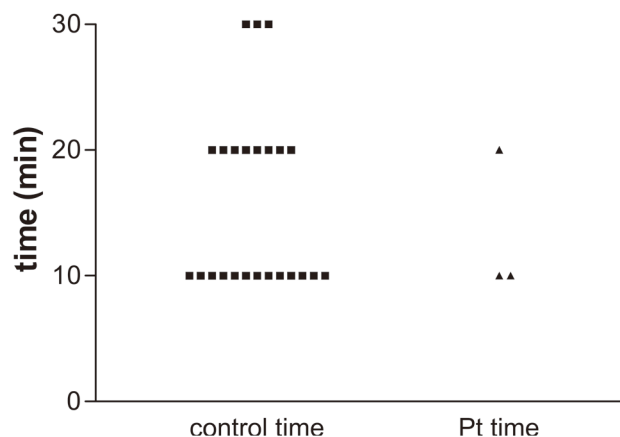


図7 化粧時間の比較

考 察

先行研究では、BSRI日本語版を用いて被験者を女性型、男性型、両性具有型、未分化型の性役割タイプに分類し生物的な性差（性別）との関係を検討していた。BSRI日本語版による男性性得点と女性性得点の中央値分割にて性役割タイプに分類を行うと、性役割タイプの出現率では性差は認められなかった。つまり、男性および女性の中性化が進んでいると推測する¹⁴⁾。Bemの先行研究では女性では女性型39.4%、男性型12.4%、両性具有型30.4%、未分化型17.9%であり女性では女性型が最も多く性別と性役割タイプが一致するタイプの出現率が高く、性別との対応関係が高いテストであった。近年の調査では女性では女性型が少なく、未分化型、両性具有型、男性型が多いと報告され、性役割タイプと性別に関係が認められなかった。

化粧時間と性役割の関係については必ずしも女性性が高い被検者が長い化粧時間をかけているという傾向は得られなかった。化粧時間は心身の健康状態以外にもその日にとる行動の予定など様々な因子によって影響を受ける。実際のデータは示していないが、病院を受診した後女性の知人と約束がある場合には化粧時間が長くなる傾向が観察された。したがって化粧時間を心身の健康の尺度として活用することを考えた場合には実際の時間以外にも被検者がその日に撮る行動予定なども加味した評価を行う必要がある。

今回の研究では健常者（女性）は男性性よりも女性性を高く持つものが多く日本人平均値と近い値を示し、性別と性役割タイプは一致していた。症例数は少ないものの耳鼻咽喉科心身症患者においては日本人平均値からはなれているものが多くこれらの要素が対人関係に葛藤を生じる原因となり心身症の発症や進展に影響を及ぼしている可能性がある。

ま と め

当初予定していた研究課題の成果がえられればコスメトロジーが患者の診断、治療の手段として十分活用できることが示され、コスメトロジーに対する医療者、患者の認識が深まることが予想された。また患者の化粧行動に着目することによってこれまで無かった視点から患者を評価、診断することが可能になり新しいアプローチが可能となる。臨床心理学はコスメトロジーと一部重複するところがある。そのため行動療法、認知療法といった心理学的手法を積極的に取り入れることにより臨床心理士の間に対する啓蒙活動となりコスメトロジーがさらに発展する。今回の研究の問題点をふまえ今後さらに耳鼻咽喉科心身症患者を増やし検討を加えていきたいと考えている。

謝 辞

本研究は平成20年度コスメトロジー研究費“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”の補助を受けた。

(文 献)

- 1) 五島史行, 中井貴美子: 唾液アミラーゼ測定を用いた自律訓練法、カウンセリングによる急性ストレス変化の客観的評価の試み. 日本心療内科学会誌 2009; 13: 79-83.
- 2) 中井貴美子, 五島史行, 内山喜久雄: 難治化したメニエール病症例への認知行動療法の適用. カウンセリング研究 2008;41:340-345.
- 3) 五島史行, 中井貴美子, 村上正人, 小川郁: 耳鼻咽喉科領域における線維筋痛症、筋痛症の診断治療. 日本心療内科学会誌 2009; 13: 16-20.
- 4) 五島史行, 中井貴美子, 小川郁: 耳鼻咽喉科における

- 明らかな器質的異常を認めない発熱患者に対する治療. 日本心療内科学会誌 2009 ; 13 : 5-9.
- 5) 中井貴美子, 五島史行: 定年退職後に発症した閉所恐怖症に有効であった認知行動療法. 未病と抗老化 2008; 17 : 159-162.
- 6) 中井貴美子, 齊藤秀行, 神崎晶, 五島史行, 田副真美, et al.: 自律訓練法により耳鳴が改善した一側聾症例. 自律訓練研究 2008 ; 28 : 56-61.
- 7) 五島史行, 矢部はる奈, 中井貴美子, 國弘幸伸, 小川郁: 本邦における Phobic postural vertigo (恐怖性姿勢めまい) 症例について. Equilibrium Research 2007 ; 66 : 123-129.
- 8) 五島史行, 矢部はる奈, 中井貴美子, 藤野紀子, 小川郁: 心因性発声障害の治療経験. 日本心療内科学会誌 2008 ; 12 : 5-9.
- 9) 五島史行, 中井貴美子: カウンセリングが有効であった咽喉頭異常感症の検討. 口腔・咽喉科 2006 ; 18 : 363-368.
- 10) 五島史行, 浅間洋二, 中井貴美子: めまいを主訴とした線維筋痛症の治療経験. 日本耳鼻咽喉科学会会報 2005 ; 108 : 1171-1174.
- 11) 柏木恵子: 青年期における性役割の認知. 教育心理学研究 1972 ; 20 : 48-58.
- 12) 柏木恵子. 現代青年の性役割の取得. In: 現代青年心理学講座4 現代青年の性意識. 東京: 金子書房; 1972. p. 48-58.
- 13) Bem SL: The measurement of psychological androgyny. J Consult Clin Psychol 1974 ; 42 : 155-62.
- 14) 加藤知可子: BSRI日本語版による性役割タイプの分類. 広島県立保健福祉短期大学紀要 1999 ; 4 : 7-11.

香料によるメタボリックシンドローム改善効果

福島大学保健管理センター

渡 辺 英 綱

There is no doubt that we live in an ever-increasingly stressful world. Stress can have a wide range of effects on mind and body, including by causing obesity. In this study, we were able to induce weight loss by controlling mental stress through exposure to fragrances.

27 subjects with metabolic syndrome or its preliminary group were divided into 3 groups in this study, 12 subjects did not want the support of public assistance and fragrances. 9 subjects wanted to help the general dietary and exercise therapy, six subjects wanted to help weight loss support by the aroma. For about three months, we compared the changes in weight loss and stress between 3 groups. Before and after the experiment, we measured body weight and preperitoneal fat thickness using abdominal ultrasonographic scanning method, and analyzed the values obtained. We assessed the subjects' mental state using questionnaires (ex. GHQ30 for evaluating neurosis, Zung's Self-Rating Depression Scale (SDS)). We also evaluated the degree of stress by measuring the concentration of cortisol in saliva.

Cypress oil reported that weight loss. I reported that the same weight loss effect in both general therapy and Cypress oil. Compared to a typical diet and exercise therapy group, in the use of cypress oil group, mental health scales (GHQ30, SDS) were improved, salivary cortisol levels are decreased. Cypress oil may improve mental health scale and abnormal HPA (hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity) by reducing the level of cortisol in saliva. Cypress might be causing a decrease in visceral fat and west circumference, could lead to weight loss.

1. 緒 言

近年、香料の心理作用は多く報告され、ラベンダーは、中枢神経を鎮静する作用があり、ジャスミンは中枢神経を覚醒する。最近は心理学的、生理学的効果の評価技術が発達し、香りによる効用が報告されている。

2005年、日本の内科学会等が中心となり日本版メタボリックシンドロームの診断基準が発表された。マルチプルリスクファクター症候群と同様に生活習慣との強い関連性が指摘されている。実際臨床の場で、一般的に軽度の脂質代謝障害、高血圧、糖尿病をあわせ持つ症例が観察され、これらの危険因子集積がそうでないものと比べ冠動脈疾患の危険因子を増加させる事が報告されている。大規模なコホート前向き研究でも生活習慣病の有病率、死亡率、およびその危険因子との因果関係が実証されつつある。メタボリックシンドロームの中心は腹囲で代表される内臓脂肪であると報告されている。

近年、ストレスは体脂肪細胞に作用し肥満を刺激する可能性が、神経ペプチドY (NPY) を介して解明されつつある。10年以上前から、慢性的なストレスと肥満には関係があることがわかっていたが、肥満とストレスの関係を直

接証明する報告は少ない。これまではマウスの実験報告のみであるが、NPY受容体の拮抗剤投与により腹部脂肪沈着が減少し、このことから現在問題とされるメタボリックシンドロームの改善にストレスコントロールが有用である可能性が示唆された。

今回、メタボリックシンドロームの中心である内臓脂肪蓄積に対する香料の作用を検討し、メタボリックシンドローム改善に対する香料によるストレスコントロールの有効性を検討した。

2. 実 験

平成20年度健康診断受診者の中でメタボリックシンドロームおよび予備群と診断された受診者を対象とした。メタボリックシンドロームは2005年4月に関連8学会で協議し診断基準が提示された。図1に示すとおり、腹囲基準を超えた上で、血糖、血圧、血中脂質のうち2項目以上が異常を呈した場合に、メタボリックシンドロームと診断し、1項目のみ満たす群を予備群とした。対象者に対し、現在までの病歴、食習慣、運動習慣等の生活習慣に関し問診した。検査結果より、糖尿病、整形外科的疾患、心疾患、腎

- 1 ; 腹囲男性 85cm、女性 90cm 以上が必須。
かつ
①血圧 130/85mmHg 以上。
②中性脂肪 150mg/dL 以上または HDLc40mg/dL 未満。
③血糖 110mg/dL 以上。
2 ; 上記①-③の3項目中2項目以上。

図1 メタボリックシンドローム基準



The Effect to Improve Metabolic Syndrome by Essential Oils

Hidetsuna Watanabe

Fukushima University Health Care Center

疾患等が存在するか疑える対象者は研究への参加を中止し、精査加療目的に近医に紹介した。次に、身長、体重、ウエストを測定し、標準体重を算出し、運動習慣に応じて食事指導を行う。さらに整形外科的な異常が運動によって悪化しないことを医師による診察で確認したのち、年齢にあった運動指導を行った。対象者に対して、従来の運動食事指導以外に、香料を用いた減量支援が有る旨を説明し、香料による減量支援を希望する群に対し、本人の同意を得た上で、抗肥満効果が報告¹⁾されているサイプレスを賦香したアロマオイルを使用させた。アロマオイルを使用前に、精神状態の評価をGHQ30（WHOにて認定されている精神状態の判定質問紙）、鬱尺度の測定はZUNG自己評価式抑うつ尺度（SDS）により自己記入式で行なった。SDSは抑うつ症状の重症度を評価するための代表的な質問紙による心理検査である。体重、体脂肪、腹部超音波による内臓脂肪厚測定を測定した。約3ヶ月の香料使用後にもう一度GHQ質問紙とSDSに自己記入式で回答していただき、体重、体脂肪、腹部超音波による内臓脂肪厚測定を行ない、香料による減量効果の有無とその背景を検討した。

2.1. 腹部超音波による内臓脂肪厚測定法

被験者をベット上に寝かせ、次に、心窩部においてプローブを正中線と平行に保持して皮膚に垂直に当てて、剣上突起の下から臍までの縦走査を行う。この際深く息を吸い込ませることで肝が下がり、肝表面が皮膚面と平行になるので、そこで呼吸を止めさせて画像を固定する。画像上で腹壁前脂肪の最大の厚さ（P）と腹壁皮下脂肪の最小の厚さ（S）を計測する。この比P/Sを計算して腹壁脂肪指数（abdominal wall fat index; AFI）とする。X線CT法の内臓型の脂肪蓄積に対応して、男性ではAFI>1.0、女性ではAFI>0.7を内臓型の脂肪蓄積とするとの報告もある²⁾。

上記の方法を用いて、内臓脂肪型肥満の指標であるP値がインスリン抵抗性や中性脂肪値と正の相関を示し、TNF（tumor necrosis factor） α とも正相関する事を明らかにした。腹部超音波法による簡易なPの測定は、動脈硬化を引き起こす危険因子の1つである内臓脂肪型肥満の測定法になりうる事を報告した³⁾。

2.2. GHQ 質問紙（The General Health Questionnaire）

WHO世界保健機構版に準拠して作られている日本版GHQ30を今回使用している。質問紙法による検査法で、主として神経症者の症状の把握、評価および発見にきわめて有効なスクリーニングテストであり、一般的疾患傾向、身体的症状、睡眠障害、社会的活動障害、不安と気分変調、希死念慮とうつ傾向が分かる。

2.3. ZUNG 自己評価式抑うつ尺度（SDS）

Zungによればアメリカ人のSDS平均値は健常者26点、神経症患者46.2点、うつ病患者で59点を示し、うつ病ないしうつ状態で高得点を示すことが明らかにされている。

本邦では福田らの判定で40点未満は「抑うつ状態はほとんどなし」、40点台で「軽度の抑うつ性あり」、50点以上で「中等度の抑うつ性あり」と判定されている。

一般臨床においてSDS 50点以上になるとうつ傾向があると判断する。

2.4. 唾液中コルチゾール測定

唾液中コルチゾールの測定はHPA（hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity）異常の判定に用いられ、唾液中コルチゾールは血中コルチゾールと強い相関関係がある⁴⁾。

2.5. 統計解析

体重、腹囲、血圧、血糖、脂質、唾液中コルチゾール変化の測定値の比較および有意差検定はone-way ANOVAで行い、多重比較はFisher's PLSDを用いた。SDSうつ尺度、GHQ得点改善度の比較および有意差検定はKruskal-Wallis testで行い、多重比較はMann-Whitney U testを用いた。

3. 結 果

健康診断受診者中、メタボリック症候群に該当する対象者は14名、予備群に該当する対象者は13名で、95名はメタボリック症候群に該当しなかった（図2）。健診受診者のメタボリック症候群該当者は非該当者と比較して、有意にBMI、血圧、血糖、インスリン抵抗性指数が高く、脂質異常を呈した（表1）。

メタボリック症候群に該当または予備群と判断された27名中、12名は一般支援および香料による支援を希望しなかった。一般的な食事指導や運動療法の支援を希望した9名と、香料による減量支援を希望した6名に分け、約3ヶ月間の減量効果、精神尺度の変化を比較した。3群間に

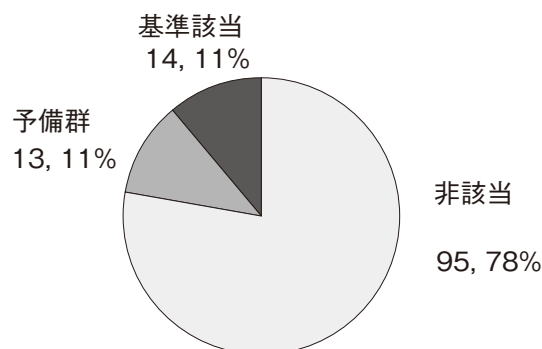


図2 健康診断受診者のメタボリック症候群を呈する割合

において減量支援開始前の年齢、BMI、腹囲、血圧に有意な差は見られなかったが、血糖値、脂質異常は香料支援群が有意に高値を呈した（表2）。

減量支援後には支援希望しなかった群と比較し、香料支援および一般支援群ともに有意な減量効果を認めた（図3）。支援後のBMIは支援希望しなかった群と比較して有

意に低く、腹囲も減少した。香料支援群において、介入前に他の群に比して有意に高値であった空腹時血糖値や脂質異常は介入により改善し他の群と有意な差を認めなかった（表3）。介入後に香料支援群では、一般支援群よりも有意に腹囲は減少した（図4）。また、腹部超音波で測定した腹壁前最大脂肪厚P値は介入により有意に減少し、ほぼ同

表1 健診受診者とメタボリック症候群の背景

	N:非該当	予備群	基準該当
Gender(m/f)	56/39	11/2	12/2
Age(years)	49±7	50±7**	54±6**
BMI(kg/m2)	22.2±2.7	27.6±2.3**	27.3±3.2**
Blood pressure (mmHg)			
Systolic	120±14	132±20**	131±14**
Diastolic	76±9	82±12**	86±8**
Fasting BS (mg/dl)	96±15	96±5	130±38**
HOMA-R	1.23±0.54	1.58±0.44*	2.39±1.17**
Triglycerides (mg/dl)	102±78	169±109**	215±87**
LDL cholesterol (mg/dl)	120±29	145±19**	149±49**
HDL cholesterol (mg/dl)	62±13	58±9	52±7

Sig. diff between N groups, *:p<0.05, **:p<0.01

表2 減量支援前のメタボリック症候群と予備群の背景

	N:支援希望せず	一般支援	香料支援
Gender(m/f)	11/1	8/1	4/2
Age(years)	52±6	53±8	52±7
BMI(kg/m2)	27.4±2.6	27.0±2.5	27.9±3.1
West circum. (cm)	92.5±4.2	92.8±3.7	94.7±6.3
Blood pressure (mmHg)			
Systolic	131±23	129±9	138±12
Diastolic	84±14	86±6	88±5
Fasting BS (mg/dl)	111±27	112±45	123±33*
Triglycerides (mg/dl)	166±102	233±107*	185±70*
LDL cholesterol (mg/dl)	143±22	127±26	168±42*
HDL cholesterol (mg/dl)	56±9	52±7	57±8

Sig. diff between N groups, *:p<0.05, **:p<0.01

表3 減量支援後メタボリック症候群と予備群の背景

	N:支援希望せず	一般支援	香料支援
Gender(m/f)	11/1	8/1	4/2
BMI(kg/m2)	28.1±2.9	26.2±2.5*	26.9±3.1*
West circum. (cm)	93.8±5.3	90.8±3.5	87.0±10.1*
Blood pressure (mmHg)			
Systolic	129±13	128±11	128±15
Diastolic	85±6	85±6	81±9
Fasting BS (mg/dl)	108±16	101±18	115±34
Triglycerides (mg/dl)	147±167	171±60	152±91
LDL cholesterol (mg/dl)	147±31	139±34	143±49
HDL cholesterol (mg/dl)	57±9	52±7	63±10

Sig. diff between N groups, *:p<0.05, **:p<0.01

等の減量効果が得られた一般支援群よりも有意な改善を認めた(図5)。

精神尺度として用いたGHQ30得点は香料支援群で有意に介入後に改善し、ほぼ同等の減量効果が得られた一般支援群よりも有意な改善を認めた(図6)。鬱尺度の測定はZUNG自己評価式抑うつ尺度(SDS)においても同様に、

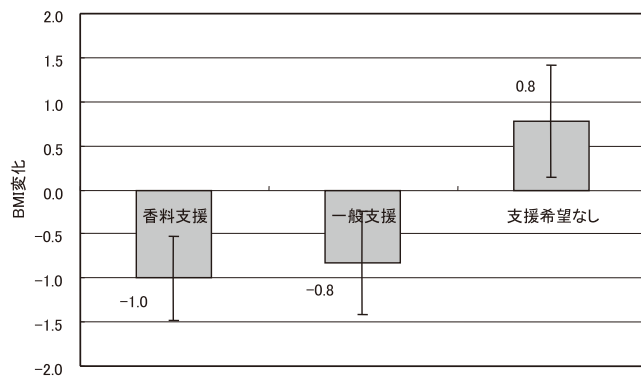


図3 支援と香料による減量効果

香料支援群で有意に介入後に改善し、ほぼ同等の減量効果が得られた一般支援群よりも有意な改善を認めた(図7)。ストレスの指標の1つとされる唾液中コルチゾール値は香料支援群において有意に改善し、ほぼ同等の減量効果が得られた一般支援群よりも優れた改善効果を認めた(図8)。

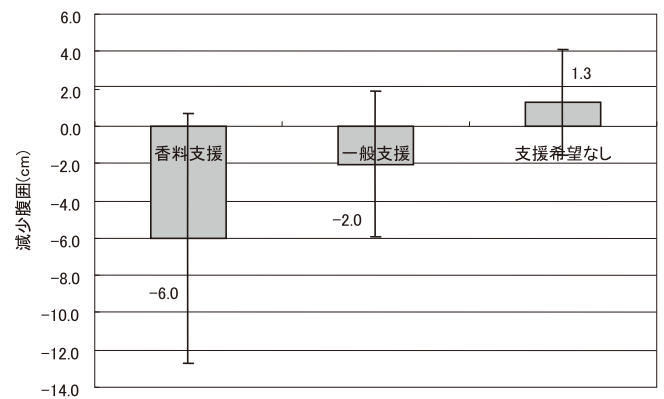


図4 支援と香料による腹囲減少効果

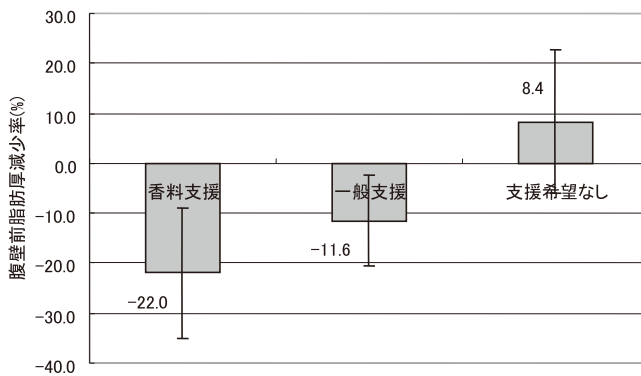


図5 支援と香料による腹壁前脂肪厚減少効果

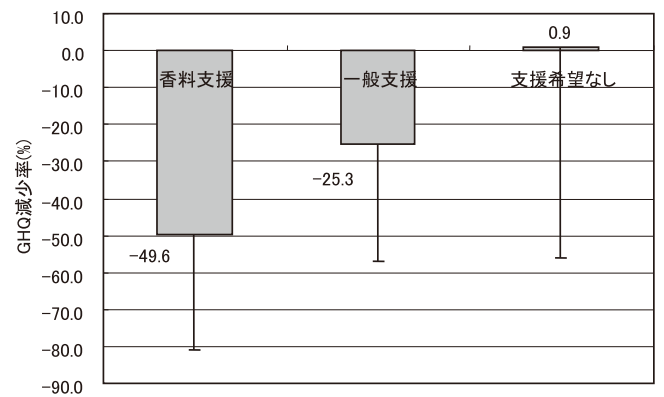


図6 支援と香料によるGHQ30改善効果

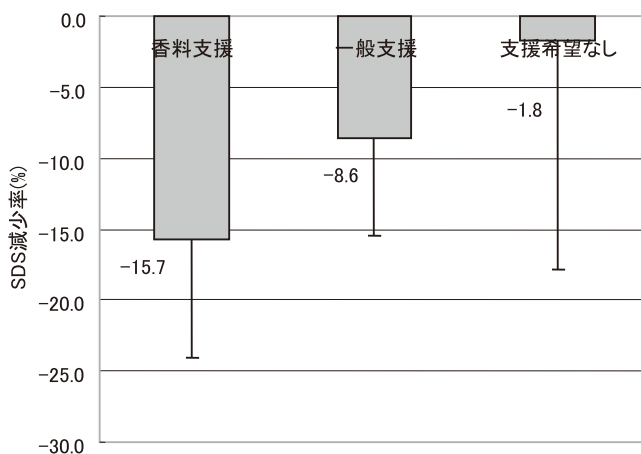


図7 支援と香料によるSDS得点改善効果

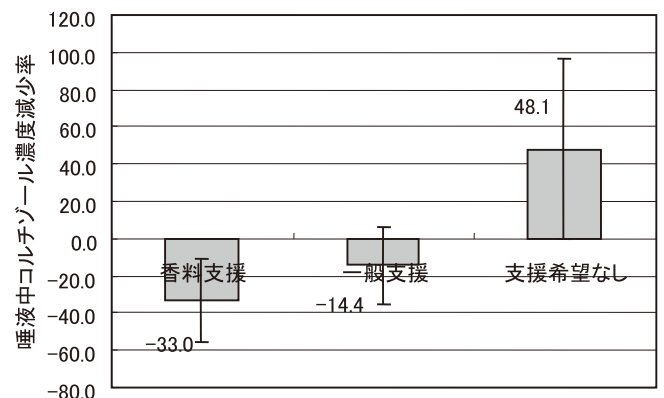


図8 支援と香料による唾液中コルチゾール減少効果

4. 考 察

医療制度改革に伴い、糖尿病等の生活習慣病予備群の25%削減目標が設定され、健診・保健指導にメタボリックシンドロームの概念を導入し、医療保険者に健診・保健指導を義務化させた。しかし、25%もの生活習慣病予備群の削減には、標準的な評価システムと健診・保健指導プログラムの作成が必要となった。リスクの重積がある者に対して発病前から早期介入して行動変容につなげる支援を行えるようにした。一方で、早期に介入するために発病前の状態をリスクの階層化により分類したことで、保健指導の対象者が増加し、保健指導の有効性を高めるため、行動変容理論の実践と6ヶ月間の経過観察と指導の継続を推奨した事で、多くの集団に対して有効な行動変容理論を活用した生活習慣介入法が必要になった。しかし、集団に対して生活習慣支援の有効な継続可能性を示した方法はいまだ報告されていない。

これまで、生活習慣病のリスクとして脂肪肝の存在および内臓脂肪蓄積の存在を報告し、大学生活が今後の生活習慣の基礎となる可能性を示した^{5,6)}。運動習慣や食事習慣と肥満、睡眠時間、就寝時間およびパソコン使用時間とは正の相関関係を認め、特に職員に関しては運動習慣、食事習慣において、ライフスタイル上の問題を抽出し、実行可能な目標を設定し、目標が達成できるよう継続した支援を行うと、脂質および動脈硬化危険因子の改善が見られると報告した⁷⁾。

今回、一般的な運動および食事療法による減量効果と香料による減量支援と同等の減量効果が得られた。同等の減量効果でも、香料支援群では、GHQ30およびSDS尺度の両方で、一般支援減量群より有意にストレス尺度は改善し、かつ唾液中コルチゾール値も改善した。これまで香料による減量効果の検討では、減量によりストレス尺度が改善したのか、香料使用によりストレス尺度が改善したのか不明であった。そのためストレス改善作用が果たして減量効果を生んでいるのか解明されていなかった。香料を減量支援に使用し、減量効果が同じでも一般支援群以上にストレス改善効果が見られたことより、香料使用は減量効果以上にストレス改善効果があり、ストレス改善効果により減量効果を生んでいる可能性が高まった。また、一般支援と同程度の減量効果であっても、腹囲の減少は香料支援群で有意

に効果があり、内臓脂肪量の目安となる腹壁前脂肪厚P値が減少していることから、香料による減量支援はメタボリック症候群の前提条件である腹囲にも改善効果があることを示した。

5. 総 括

抗肥満効果が報告されているサイプレスの使用により、一般減量支援と同等の減量効果を認めた。同程度の減量群と比較して香料支援群では精神健康尺度 (GHQ30, SDS) がより改善し、唾液中コルチゾール値も改善効果が高かったことから、サイプレスはストレスおよびうつ状態を改善し、HPA異常の改善により唾液中コルチゾール値を減少させ、腹囲の減少、つまりは内臓脂肪の減少を引き起こし、減量効果をもたらす可能性がある。

(参考文献)

- 1) 元永千穂、河野斉治、原田健、他3名:精油の抗肥満効果—肥満と心の関係に着目したアプローチ— AROMA RESEARCH No.30 (Vol.8/No.2 p164-167 2007)
- 2) 村野俊一、田所直子、森崎信尋:超音波による内臓型脂肪蓄積の診断法、日本臨床 53巻, 203-208, 1995
- 3) Watanabe Hidetsuna, Baba T, Shigetomi S. 他1名.; TNF α , its Receptores and insulin resistance in obese subjects. The comparison between the preperitoneal and subcutaneous fat deposition. The International Diabetes Federation Abstract Volume of the 18th Congress. A192. 2003
- 4) S. Francis, R. Walker, D. Riad-Fahmy, 他3名.; Assessment of adrenocortical activity in term newborn infants using salivary cortisol determinations. J. of Pediatrics, 111,129-133,1987
- 5) 渡辺英綱、渡辺厚、酒井コウ、他1名、肥満学生の内臓脂肪型肥満と脂肪肝の関係、CAMPUS HEALTH, 43 (1), p205, 2006.1
- 6) 渡辺英綱、渡辺厚、酒井コウ、他1名、大学生の朝食欠食と生活習慣の関連性について、CAMPUS HEALTH, 40 (1), p302-303, 2002.3
- 7) 渡辺英綱、渡辺厚、酒井コウ、他1名、肥満学生に対する2年間の減量支援効果 第41回全国大学保健管理研究会東北地方研究集会報告書、p32、2003

記念講演

●
平成21年度記念講演 米澤 泉
●

コスメの国のオタク

甲南女子大学人間科学部

米澤 泉

場所：(株)コーセー 王子研修センター

日時：平成21年11月13日(金)

私は現在、甲南女子大学の文化社会学科というところに所属しておりまして、学生さんには文化社会学というものを教えることになっています。私が担当しております講義題目はファッションビューティー論と申しまして、その名のとおりに、ファッションとビューティーを学生さんたちに教えております。ファッションビューティー論という名前の講義をやっている大学は多分うちの甲南女子大学だけじゃないかと思いますが、まず私自身がファッションやビューティーに並々ならぬ関心がございまして、趣味が高じたと申しますか、好きこそ物の上手なれと申しますか、気がつきますと、いつの間にか大学でファッションビューティーを教える立場になっていました。本日も、そういう化粧好き、ファッション好きの視点から見た現代女性の生き方、日本文化、そういうものを皆様にお話しできればと思っています。

3年ほど前になりますけれども、『電車の中で化粧する女たち』という本を書きました。電車の中で化粧する女たちの実態を書いた本です。90年代の初めぐらいから、電車の中で化粧する女性たちをだんだん見かけるようになってきて、それまではあまり電車の中で化粧する女性というものは見かけませんでしたけれども、それが90年代の半ばごろから非常に目につくようになってきて、なぜだろうということで私自身も非常に気になりまして、そちらのほうの研究をしようかなというふうに思ったのがこの研究に入るきっかけでした。なぜ日本人女性だけが電車の中で化粧するんだろうかというのは気になるところですが、もともと日本人女性、というか日本人は、非常に化粧に熱心な人々であるというように認識されていると思います。例えば、化粧が一番早く大衆に普及したのもやはり日本ですし、江戸時代の後期ぐらいには、もう一般大衆が普通に化粧するというのが日常化しておりました。『都風俗化粧伝』なんていう、化粧の指南の本がベストセラーになるぐらい

日本では大衆に化粧が広まっていて、それぐらい日本人というものは伝統的に化粧好きなわけなんですけれども、それだけではなくて、90年代の後半ぐらいから、日本人女性が特にお化粧に熱心になってきました。いろいろな化粧の雑誌とか、化粧や美容の本がたくさん書店に並んだり、そういうことが結構目につくようになってきたわけなんです。

例えば「顔黒（ガングロ）」という言葉や、「茶髪（チャパツ）」とか、あと「目力（メヂカラ）」とか、そういった化粧関係の流行語というものが90年代になってきますと非常に世間を賑わすようになってきました。80年代までは茶髪という言葉すらなかったと思うんですが、90年代になってみんなが髪を茶色に染めるようになってと茶髪という言葉が生まれました。同じように、女性たちが非常に熱心に目のお化粧をするようになると、今度は目力という言葉が生まれました。そんなふうには、化粧が流行を動かすとか、社会現象になるようなことが90年代に起こってまいりました。

以前よりもみんなが熱心に化粧するようになりまして、テレビをつければ、美のカリスマとか言われるような人たちが登場したり、あるいはメイクアップのアーティストたちがスターのような感じでテレビに出てきて化粧を教えたり、以前にはあり得なかったことが起こるようになってまいりました。そのような中で、化粧品は2兆円産業などと呼ばれるようになって、消費量も非常に増えてきました。化粧というものがそのころから少しずつ、従来の化粧から脱却してきたとか、変わってきた、その時代が90年代というふうに考えられます。そのような状況の中で、先ほどから申しております電車内化粧というものもだんだん目につくようになってきて、それこそ車内マナーのワースト3ぐらいにいつも挙げられ、電車の中での化粧というのがやり玉に上げられるようになってきたのも、同じように90年代の半ばぐらいからではないかと思います。

どうして女性たちが電車の中で化粧するようになったのかということですが、一般的には、やっぱりお行儀が悪くなって、例えば地べたに座ったりするような若者が増えておりますけれども、そういう若者とか、電車の中で、例えば物を食べたり、お弁当を食べたりするのと同じように、要するに、プライベートな空間とパブリックな、公の



Faculty of Human Sciences
Izumi Yonezawa
Konan Women's University

空間との区別ができていない若者たちが90年代から増えてきたので、化粧も、同じように、本来は家でやることを外でやってしまうという、そういうふうな流れで大体解釈されることが多かったと思われます。確かにそれはもちろん一理ありますが、やっぱりそれだけではないというのが私の主張です。やっている本人はお化粧を電車の中であることに対して罪悪感をそれほど持っていないのではないかと、そんなに悪いと思っていないのではないかとというのが私の考えです。

というのは、先ほどから申しておりますように、90年代以降、化粧そのものが以前の化粧とは大分変わってきていると考えられます。それまでは、お化粧というと、成人女性、大人の女性の身だしなみという、やはりその範疇におさまっていたと思いますが、90年代以降は、どんどん大人の女性の身だしなみという範囲を超えてというか、むしろそこが崩壊してきて、小学生も最近ではお化粧したりしますし、中学生、高校生はもちろんですし、男性もお化粧するような時代にだんだんできてきています。そういった中で、いつまでもお化粧というものを身だしなみ的にとらえていると、身だしなみだから家でやりなさいというふうになりますが、化粧を逆に自己表現とか教養、あるいは趣味と考えると、別に電車の中で本を読むのをとがめる人がいないように、電車の中でメールをするのと同じように、電車の中で別にお化粧してもいいんじゃないでしょうかという、そういう感じで本人たちはやっているのかなというふうには私は思います。だから、ケータイでメールするみたいに、コンパクトを出してお化粧をしているので、それほど目くじらを立てなくてもよいのではないかとというのが私の言いたいところなんです、どうでしょうか。

では、なぜ90年代に化粧が身だしなみから自己表現とか、教養とか、趣味とか、そちらの方向に移ったのかということですが、その理由の一つとしては、コギャルが登場してきたことが挙げられると思います。コギャルと言えば、顔黒（ガングロ）とか、あまりよくないイメージで語られることが多い人たちですが、90年代半ばあたりから社会現象として捉えられるようになりました。

コギャルとは何かということを一言で言うのはちょっと難しいですが、社会学者の上野千鶴子先生がコギャルを定義しておられますので、それをお借りして言いますと、「消費社会的なギャルたちの行動様式が低年齢化した現象を指す」というようにおっしゃっています。上野先生の場合は、行動様式の中でも特に性行動を含むということで、それが低年齢化した現象をコギャルというようにおっしゃっていますけれども、要するに、低年齢化ということは、何もかも大人になるまで我慢しないということです。

欲しいものがあれば今すぐ欲しいという、それがコギャルなのではないかと思っています。我慢せずに、大人になるの

を待たずに、欲望のままに生きるという、そういうのがコギャル的であると思うんですね。待つことを知らないというか。例えば、コギャルは、ブランドバッグなどをすぐに欲しがって、子供というか、まだ女子高生の分際でもそういった高級ブランドバッグを欲しがります。同じように、コギャルは、化粧に関しても、化粧したかったら今すぐするんですね。その結果こういうことになったわけなので、それまでは、女子高生という、基本的にやっぱりお化粧はしないというのが社会通念だったと思います。例えば、化粧品メーカーさんのメーク講習会というものが結構開催されていたと思うんですが、そういうものも、やっぱり高校を卒業する18歳の少女に向けて、社会人になったからお化粧しなさいという感じで行われていたと思うんですが、もうコギャルが登場してからは、女子高生は既にお化粧をしているのが当たり前で、それをいかに薄くさせるかというか、そっちの方向にエネルギーを注がないといけなくなったんじゃないかなというふうに思います。

というように、80年代は、女子高生というものはお化粧をしていないという、そういう常識が大人側にも子供側にもあったと思いますが、それが90年代になりますと、コギャルが登場したことで、制服にこのような顔黒メーク、顔を真っ黒にして、マスカラでまつ毛を過剰なまでに強調して、時々ペンで描いていたような子もいますけれども、そういうふうな過剰な化粧が、女子高生イコール化粧というように、大人側の常識をくつがえしてしまいました。そこから大人の女性の身だしなみ、イコール化粧というふうな考え方はもう過去のものになったのではないかと考えています。

それで、なぜ待てなくなったのか、コギャルは待たないのかということですが、それには90年代に普及した携帯電話などのメディアが非常に関係していると思います。私たちがそうなんですが、携帯電話が普及してからの世の中というものは、みんな待つことを知らなくなってしまうという気がします。例えば、以前ですと、待ち合わせというものでは、何時にどこどこでというのをきっちり確認して、それからその時間に行って、相手がおくれたら30分待つとか、そういう時間の約束事の中に私たちは生きていたと思うんですが、携帯電話が普及してからは、はっきり会う時間も決めずに、大体3時ごろにどこどこでねという感じで約束をして、そのあたりに行ったら、「ちょっと10分おくれます、ごめんなさい」とか言って連絡して、もう待たないわけです。すぐに「今どこにいるの?」という連絡ができるものですから、私たちは以前のように待つ時間というものを失っていったのではないかなと思います。それが、やはり我慢するとか、じっくり考えると、そういうことの低下にもおそろくつながっていったのではないかなというふうにも考えています。

90年代の半ばに待つことがなくなり、それにはメディアが関係しているというお話を今いたしましたけれども、90年代というのは、非常にメディア環境が発達した時代です。それが化粧の変化にも非常に深くかかわっていると考えられるわけです。ここでは3つのメディア、プリクラと携帯とインターネットが挙げられますが、このプリクラというのがまず95年に登場しています。それから、女子高生の間で特にブームになりまして、今はもうすっかり定着しているという感じでしょうか。

それから、携帯電話自体は90年代から普及していて、カメラ付き携帯という、今はどの機種にもついていると思いますが、カメラ機能のついた携帯電話が2000年ごろから一般に普及しています。もう一つ、インターネットですが、90年代の半ばにウィンドウズ95が発売され、その後インターネットが、女性も含めて、多くの人たちが気軽に使うメディアになって普及していきました。2000年以降は、さらにさまざまな機能が追加されて、ブログとか、自分自身を語ったり表現するための装置というものが、以前には考えられないぐらい広まってきているという、そういうメディア環境の変化がありました。

そういう状況下で、私たちの顔や体というものはいつでもどこでも被写体となる可能性が高くなってきました。以前は、写真を撮るといって、やはりカメラを持って行って写真を撮るといった感じだったんですが、今はだれでも携帯を持っていますので、いつでも、どこでも撮ろうかということになって、すぐに撮ることが当たり前になっています。また、撮った私をブログなどに載せるという、そういう機会もあるわけなので、私というものが非常に見える——ここでは「魅せる」という漢字が使っていますけれども、魅力的な私で、人に見せてもいい私でないといけないという、そういう時代に突入してまいりました。せっかくプリクラのシールになったり、友達と一緒に写真を撮ったり、あるいはブログに載ったときに、やっぱりかわいい、友達よりも際立った存在の私でいたいというのはだれでも、女子高生、若い女性、もうちょっと年のいった女性も含めて、男の方もそうかもしれませんが、だれでもよく写りたいと思うわけです。そこで、自分のイメージ、自己イメージの編集が始まってくるわけです。女性の場合は、それがもう化粧に直結するんだというふうに思います。

例えば、プリクラは特に、目が大きく写ると非常に美人というか、かわいく写るわけですね。そうなるためには、やっぱり目力が必須ということで、目を大きく見せるためのマスカラの使用量というんでしょうか、売り上げが90年代から非常に伸びてきたと思われます。とにかく写真に写ったときに目を大きく見せたいという、そういう願望、フォトジェニックな私、写真写りのよい私になりたいという、そういう思いがやはり自己を編集する、自己をプロデ

ュースする感覚を生み出し、目力のある私になるためにいろいろ努力をしないとイケないということで、その最たるツールとして化粧というものに対して世の女性の関心が高まっていったのではないかなと考えられます。

それまでは、お化粧というと、どちらかというとマイナスイメージ、負のイメージも背負っていたと思うんですね。日本語の言葉で「化粧何とか」とつくのはあまりいい言葉もございませんし、そもそも「あの人はお化粧が上手ですね」というふうに言われると、それは、今までの日本では褒められていることにはならなかったはずです。お化粧が上手ですね、ということは、「じゃ、素顔はイマイチなの？」ということになりますので、あまり言われてもうれしくない褒め言葉だったんですが、90年代の半ばぐらいから、お化粧がイコール自己プロデュース能力というふうになり、お化粧が上手であるということが評価されるようになってくるとまた話は違ってくるわけなんですね。化粧に対するマイナスイメージというものもかなり払拭されるようになりましたし、今までは、「私はすごく化粧好きなんです」ということを人に公言するのはちょっとはばかられたんですが、そういうことを堂々と口にできるような時代がやってまいりました。それはもちろん一般人もそうですし、芸能人というかタレントのような人たちが次々と「私はすごく化粧品に詳しいんです」とか「化粧好きなんです」とか、そういうことをマスコミ、テレビや雑誌などで口にするようになりました。

その中で、美容セレブとか、そういうふうには呼ばれるような有名人たちが、叶姉妹とか、君島十和子さんとか、最近ではもういろんな人たちが出てきて、美についてや、自分の美容法を堂々とテレビで語ったりするようになってきたわけなんですね。一般人も結構、私は化粧が好きですということを口にする人が増えてまいりまして、そういう人たちのことをコスメフリークというようにマスコミが呼び始めました。だんだんコスメフリークの人口が目立ってきましたので、そのような人たちに向けた雑誌なども次々と創刊されるようになりました。

コスメフリークとは何かということなのですが、まあ、コスメフリークという人たちは、とにかく化粧品が好きで、化粧が好きで、24時間化粧のことばかり考えているような人たち、というふうに言えるかと思うんですが、そんな人たちがほんとうにいるのかと、特に男性の方なんかは思われるかもしれませんが、結構いるんですね。私が考えたコスメフリークの化粧行為というのがありまして、それは、化粧を読む、書く、語る、その3つが三位一体になっているんですけれども、一つずつご説明いたしますが、普通の化粧というと、スキンケアとか、メイクとか、そういうものを含めて、一般人のだと一日の間に20～30分ぐらいで終わると思うんですけれども、このコスメフリーク

の人たちは一日中化粧のことを考えているんですね。

まず、化粧を「読む」ですけれども、美容関係の雑誌を熱心に読んで、新しい化粧品の情報を仕入れないといけないわけです。今はインターネットもありますが、そういうさまざまなメディアから化粧品の情報を手に入れて、例えばこの秋の新しいファンデーションだったら、数々の新製品がさまざまなメーカーのさまざまなブランドから発売されますから、その中で自分の肌に合ったファンデーションを一つ見つけるのでも、結構真剣にやればすごく難しい作業です。顔は一つですし、一つずつ試していくのも非常に難しいので、いろいろな口コミなどを頼りに、私の肌にはどれがいいのかということを研究しないといけないわけなんです。それだけでも結構かかりますし、実際買いにいった、そしてやっと化粧を「書く」。「書く」というのは顔に描くことですが、今度は、その買ってきた化粧品を自分の肌に乗せていく、化粧をする段階になります。普通の人だとそれで終わりなんですけれども、コスめフリークの場合は、非常に研究熱心ですので、化粧をした結果、そのファンデーションが自分の肌にとってよかったのか、イマイチだったのか、どうだったのか、ほかの人にも勧めたいのか、そのようなことを自分のブログとか、インターネット上に書き込んだりしてそれを公開するんです。それがコスめを「語る」です。コスめフリーク同士で、お互い、どここのあのファンデーションはよかったねとか、アイシャドーの新しいのは思ったほどよくなかったとか、あっちのほうがいいかったとか、化粧談義とでも申しましょうか、そういうふうに化粧品をネタに延々と語るという作業が待っています。

そういうことをやっていると、ほんとうに24時間ぐらゐすぐにたって、化粧のことばかり考えて一日が終わってしまうんですけれども、それぐらい化粧品好きな女性というものが実際に今非常に増えてきているということなんです。人気のブログのジャンルでも、そういったコスめ系のブログというのは常に結構上位のほうにランキングされていると思いますし、今は、ほんとうに化粧が趣味なんですという感じで、立派な趣味の一つとして化粧を楽しんでいる女性たちというのが増えてきていると思います。コスめフリークについて今お話したんですけれども、次は、そのコスめフリークの生まれてきた時代背景と申しますか、世の中の動きと関連づけて少しコスめフリークを見ていきたいというふうに思います。

コスめフリークが登場したところというのは、先ほども少し申しましたが、インターネット社会が到来した時代なんですね。IT化などが叫ばれたり、ウィンドウズ95が登場したりというふうに、非常にインターネットというメディアが一般の人たちに普及して、特にそれまで女性は、ネット上でも男性に比べてユーザーが少なかったんですが、

ウィンドウズ95が普及したあたりから、操作も簡単になりました、女性のパソコンユーザーも増えてまいりましたし、女性向けのホームページとか、そういうコンテンツの部分でも女性を意識したものが増えてきました。インターネット社会が到来して、自分自身を表現するメディアとしてインターネットは最適なメディアですけれども、そのような中で、コスめを語り合うようなコスめフリークというものが登場してきたのはやはりネットの普及と非常に関連があるというふうに思います。どちらも90年代の半ばぐらいから、ネット社会の到来とともにコスめフリークという存在が顕在化してきたのではないかと考えられるわけですね。

もう一つ、90年代の半ばぐらいからは、オタク社会というふうに言われています。オタク文化というものは、それまではごく一部の愛好家の人たちの間でだけで閉じられていて、一般の人たちのところにまでそういったオタク文化が広まっていなかったんですが、90年代の半ばぐらいから、さまざまなオタク文化が一般的になってきました。言葉で言いますと、例えば、「萌える」とか「萌え」とか、あと「アキバ系」とか、そういった流行語も生まれてまいりましたし、流行現象としてメイドカフェ、メイドさんの格好をしたウェイトレスがいるカフェとか、「電車男」なんていうものも数年前にヒットしたりしましたけれども、今までは一般的でなかったオタク文化とオタク、そういうものが脚光を浴びた時代でもありました。それで、オタクと呼ばれるような存在の人たちと、先ほどからお話ししております化粧が大好きなコスめフリークとは、まあ、どちらかといえば家にこもっているようなタイプのオタクの人とは一見相入れない、対極の存在であるというふうに思われるんですが、実はそうではないというのが私の持論なんですね。

コスめフリークとオタクとは、実は非常に似ているというのがここからのお話ですが、まず一つ目は、どちらも虚構の世界に生きているということです。オタクの人たちというのは、一般的にインターネットの世界ですとか、好きなアニメとか、好きな漫画とか、そういうふうな虚構の世界、バーチャルな世界に生きている、そういうところに価値を見出して、そこに自分自身のアイデンティティというものを見出しています。現実の出来事よりも、アニメの中の世界の出来事のほうが大事という、それがオタクの価値観というわけです。

よく、アニメのポスターとか、漫画とか、そういった自分の好きな世界のものを袋に入れて大量に持ち歩いているオタクの人というのがいますけれども、そういう人たちというのは、その漫画の本とかアニメの物語の虚構の世界が自分の心のよりどころになっていて、一種の精神安定剤的な要素があるので、それを常に持ち歩かないと非常に気分

が不安になってしまう。だからオタクの人というのはそういうものを持ち歩いているそうですが、それと同じように、コスプレの人たちも、化粧をした顔の世界に生きているというふうに考えられるわけです。化粧をした虚構の顔と申しますか、バーチャルな顔のほうを素顔というふうに感じているのがコスプレで、化粧をした顔に私のアイデンティティを見出しているのがコスプレなんですね。メイクを落とした素顔はもうほんとうの私の顔ではないぐらいに思っている人たちが結構多くて、だから、コンビニに行くのにでもつけまつげをつけるような人もいたりします。

というように、コスプレの頭の中では、アニメのヒロインのような顔を、私はこれというふうに思っている人が多いですね。先ほどオタクの人たちが漫画やアニメのポスターを大量に持ち歩いて、そこに精神的なよりどころを見出していると申しましたが、コスプレも、同じように、大量の化粧品を常にポーチに入れて持ち歩いて、そこに心のよりどころを見出している。まあ、ポーチを忘れたりすると非常に不安になるというところが、オタクとコスプレ、どちらも虚構の世界に生きているという点で非常に似通っているのではないかと思います。

二番目の類似点としては、アニメのキャラクターやキャラクターの一部の要素というものをオタクの人というのは非常に好んで、それを溺愛するんですが、その溺愛することを一般に「萌える」というふうな言い方で表現しているわけなんです。コスプレもそうなんです。例えば、オタクの人たちというのは、あるアニメに出てくるキャラクターの女の子を非常に溺愛して、その女の子の眼鏡がいいとか、着ているメイドさんの服がいいとか、ついている猫の耳がいいとか、しっぽがいいとか、いろいろなこだわりポイントがあって、専門じゃない人にはなかなか理解しがたいところがあると思うんですが、それらの萌えるポイントに非常に萌える、溺愛するという、それがオタクなんですけれども、コスプレの人人も結構似てまして、オタクがキャラクターのフィギュアに萌えるように、自分、「私」というフィギュアに結構萌えているんじゃないかなということなんです。萌えるポイントは、コスプレの場合もオタクと同じようにありまして、例えば、ある人にとってはそれが目であったり、白い陶器のような肌であったり、ぽってりした唇であったり、どうしても譲れない巻き髪であったりというふうに、それぞれのこだわりポイントがあって、そこに萌えているというか、自分自身の部分部分を溺愛しているというような傾向があるんじゃないかなと思っています。

オタクの人たちがフィギュアを例えば自分自身でつくって喜んでいるように、コスプレの人たちは、化粧によって自分というフィギュア、人形をつくって、自分好み

の、自分が萌えられるようなキャラクターというものを頭の中でつくり上げているのではないかなというふうに考えられるわけですね。だから、コスプレにとっての化粧というのは、自分というフィギュアづくりであると考えられるのではないかと思います。

というように、一見正反対に見えるオタクとコスプレには実は共通点があったということで、どちらも90年代以降の時代の産物ですけれども、オタクのほうは、自分の頭の中で、脳内でフィギュアの美少女と恋愛して、それで結構自己満足というか、自己完結してしまいます。逆に、コスプレのほうは、頭の中で、自分自身が少女漫画のヒロインの顔になったような気分で、もうそれで満足してしまいます。このように、お互いに脳内恋愛であったり、脳内美人であったり、自分の頭の中でだけ満足して完結してしまうので、お互いに自分しか愛せないというか、頭の中は自分しか存在しないというような、自己愛だけという点でも非常に似ているのではないかなとも思います。そうなりますと、なかなかお互いが会える機会も少ないので、オタクやコスプレが増えてきた世代においては未婚率が高かったり、それが少子化の原因になっているということまでも話が広がってしまうわけなんです。

では、最後に、なぜそんなにコスプレたちが化粧に夢中になるのか、化粧というフィギュアづくりに夢中になるかということをお話ししたいと思います。先ほどお話ししましたオタク文化などは、今非常に高い評価を得て、日本の独自の文化として、最近ではさまざまなアート関係のビエンナーレなどにもオタク文化として美少女フィギュアが出品されたりとか、そういうことがあって、海外に向けて日本の文化、オタク文化というものが発信されています。私自身は、それと同じように、日本のコスメ文化、化粧文化も、「Jカルチャー」としてこれが日本の文化ですということで発信していけばいいのと思っています。それぐらい日本のコスメというものは非常にレベルが高いと思います。

どうしてかと言いますと、日本のコスメというのはゲームとして完成されているというふうに考えられるわけです。まず、本体、自分の体がゲーム機器、何でも構わないですけれども、DSでもいいですし、プレイステーションでも何でもいいですが、自分の体がゲーム機器みたいなものです。そこに新作の化粧品、ソフトを投入します。そしていろいろ、年齢を重ねていくと出てくる敵がいるわけです。シワとかシミとかタルミとか、そういうものを次々と自分自身で退治して、クリアして、そして自分の中で自分が望むフィギュアというものを完成させていく。完成することができたらクリアという、そういうゲームをコスプレという人たちは頭の中でというか、自分の体を使ってやっているのではないかなというふうに思います。また、それ

ができるテクニックと能力を持った人たちなんですね。どんどん年齢を重ねますと、シワ、シミ、タルミ、そういうものも次々と出てまいりますし、高度にもなっていきますが、そうなるまた次の新しい化粧品が開発されて、それがどんどんレベルアップしてということで、まさに尽きることがないコスメというゲームなんです、そのおもしろさにはまっているコスメフリークたちが非常に多いんじゃないかなと思います。

フィギュアを目指して、フィギュアを完成させたら終わりというふうに申しましたけれども、では、女性たちというのは、具体的にどんなフィギュアになりたがっているのか、どんな姿になりたがっているのかということをお話したいと思います。まずはバービー人形ですね。結局どの年代の女性に聞いても、行き着くところはここなんですね。私は今、20代の学生さんを毎日相手にしておりますけれども、20歳ぐらいの女の子も、やっぱりバービーみたいな感じになりたいと。バービーみたいな、今、例えば30歳そこそこの、安室奈美恵さんとか、浜崎あゆみさんとか、ああいう人たちのような女性にどうしてもあこがれるというふうに20歳の女の子は言います。もちろん、30代の、浜崎あゆみとか安室奈美恵の同世代の女の子たちは、当然彼女たちのようになりたいんだと思います。それからもっと上の世代、40代とか50代の女性たち、その女性たちも意外とバービー人形になりたいというふうに思っているんですね。まあ、私の実感で言いますと、大体世の中の女性の9割ぐらいはバービー人形になりたいんじゃないかな——本音のところでは、ですが——と思っているんじゃないかなというふうに思います。今は時代的にも、「これが私よ」とか、「私らしさよ」というのを強調して、個性を追求する私探しの時代というよりも、バービー人形のようになって、毎日違うイメージで変身したい、自分を変えたい、メイクも服もファッションも、自分も変わりたいという、そういうふうな女性のほうが多いような気がいたします。その中でバービー人形になりたいという願望が非常に明確になってくるのもやっぱり当たり前のことなんじゃないかなと思います。

では、次に、その現状を少しお話したいと思います。『sweet』というファッション雑誌がありますが、今アラサーと呼ばれるような、20代後半から30代前半ぐらいの女の子たちの間で絶大な支持を得ている雑誌です。でも、二十歳ぐらいの大学生も結構読んでいます。その表紙になっているのが浜崎あゆみさんですね。彼女は30歳ぐらいですが、お人形さんのようなイメージをもう10年以上保ち続けていると思いますし、それがやっぱり人気の秘密というか、このルックスなしにはやっぱり浜崎あゆみのカリスマ的な人気というものはなかったと思いますし、ファッションもメイクも含めて自己プロデュースというものが完

璧にできているからこそいつまでも高い支持を得ているんじゃないかなと思います。

一方、『MAQUIA』など多くの雑誌に登場しています平子理沙さんというタレントでモデルさんなんですが、彼女も、ぱっと見た感じですよといくつかわからないんですが、今38歳なんだそうです。38歳なんですが、25歳にも見えるし、20歳にも見えるしという、そういうふうな感じですね。お人形さんのようなイメージで、雑誌の一番大きな見出しも、「一生姫で生きていく」と書いてあるんですね。まさにこれが今20代、30代の女の子たちが目指しているところなんだと思います。もう30代に突入したけれども、まだまだこのお姫様のようなルックスはキープできているので、このまま頑張って40代、50代といってみようという、そういう心意気がこの雑誌からも伺えるんじゃないかなと思います。だから浜崎あゆみさんとか安室奈美恵さんといった女性たちは30代に突入したばかりですけども、もう平子理沙さんのように、30代後半でも少女風というような女性たちが増加してきているわけなんですね。

今、「大人可愛い」という言葉が大流行していて、ファッション雑誌、化粧の雑誌、そういうところではもうキーワードとして絶対外せないのが「大人可愛い」という言葉なんですけれども、今までは、大人というのは、イコール成熟なので、「可愛い」ということとはやっぱりどこかで決別するというか、卒業するのが当たり前だったんですが、今は「大人可愛い」まま、30代はごく当たり前のように入りますし、40代でも「大人可愛い」でオッケーという、そういう感じの時代になってきています。

一生姫で生きていくというのはどういうことかということ、姫というのは、いつも主役なんですね。お姫様というのは基本的に脇役にならないということで、一生姫で生きていく宣言の裏の意味は、一生私が主役で生きていきたいという、そういうことじゃないかなと思います。今までは、30代になると、女性というのは、例えば結婚とか出産をして、妻となって、母となって、いやおうなしに人生において子供が主役になったり夫が主役で、自分は脇役というふうな生き方が一般的だったんですが、今は、30代になろうが、私は姫で、私は主役ということを女性たちが暗に言っているのではないかなというふうに思います。

今度はもうちょっと上の年代、40代、そして50代のところまでいってみようと思うんですが、50代女性も、実は同じように「大人可愛い」とバービーを目指しております、30代とほとんど変わらないんです。新しい50代というキャッチフレーズが最近目につくようになりました。萬田久子さんという女優さんも『HERS』など多くの女性誌に登場しますが、彼女は20代のときにミスユニバースの日本代表に選ばれたという見事なプロポジションの持ち主です。そのイメージを、今は彼女は50代ですが、20代、

30代、40代、50代と、同じようなイメージをキープしたまま50代になっています。そういう50代のことを多分新しい50代というふうに呼んでいるんだと思います。

今までは、やっぱり30代、40代となってきましたと、体型も崩れてきたり、ルックス的にどうしても老化ということもありますし、大人になったということで、若いころと同じようなスタイルというものはしなかったと思うんですが、今は、40代であろうが、50代であろうが、20代と同じように好きな格好をするというように、それが基本になってきています。そのためにはやはりアンチエイジングの化粧品というものが必須になってくるんだと思います。新しい50代のイメージとしては、コーセーさんの新キャラクターに選ばれた黒田知永子さんがいらっしゃいますが、彼女もやはり美しくエイジレスに年をとっていくタイプの女性の代表というふうに考えられます。このように、年齢を超越するような女性たちがどんどん登場してきています。そのためにもアンチエイジングの化粧品というか、高額化粧品ですね。他には美容医療とかがありますけれども、これらも含めて、やはり50代、60代、同じイメージをキープして若々しくいるためにはますます化粧品の力というのが非常に重要になってくると思います。

それで、なぜいつまでも彼女たちはバービー人形を目指しているのかというのが最後にお話したいことですが、やっぱりいくつになっても私自身が主役でいたいという思い、「私」で遊びたいというか、着せ替え人形になって、バービー人形のように、いくつになってもお洋服が似合う、最新のメイクや髪形が似合う、ファッショナブルな私でいたいという思いが今の50代の女性にはもう芽生

えておりますので、そういう女性たちは、急に次の60代になったからといって脇役に回るとはとても思えません。新しい60代とかいってまた同じようなイメージで頑張っていくんじゃないかなと思いますけれども、結局、主役をおりない、いつまでたっても一生主役でいたい、一生現役でいたい、一生姫でいたいという、そういう女性たちが増えてきているわけなんですね。

松田聖子さんがウェディングドレスを着ていることでちょっと話題になったCMがありました。やっぱりこれも、いくつになってもウェディングドレスの似合う私でいたいという、もう女性の願望のすべてがここに凝縮されているのではないかなというふうに思います。どうしてウェディングドレスなのかというと、やはり主役ですね。ウェディングドレスを着た花嫁さんというのは主役の象徴みたいなものだと思います。ウェディングドレスを着ている限り、女性は脇役にはならない、私が主役と彼女は言っていると思います。

そんなふうに、女性たちが一生現役主義で、主役をおりない女性たちが増えて、女性たちのバービー人形になりたい願望というものが続く限り、このコスメの国のオタクであるコスめフリークたちは、どんどん増加するんじゃないかなというふうに思います。60代のバービー人形とか70代のバービー人形がそろそろあらわれる時代がこれからやってくるのではないか、生まれるのももう時間の問題ではないでしょうか。私自身も、非常に化粧品好きでして、コスめフリークなんですけれども、自戒を込めて、今後のコスめフリークたちの行方を自分自身も実践しながら追っていきたいと思っております。

コスメトロジー研究雑感

平成 19 年度 研究助成

コスメトロジーへの植物変換の応用について

下田 恵

私は大学院時代から植物培養細胞を生体触媒とする物質変換機能について研究を行ってきました。植物は様々な二次代謝産物を生産しますから、その培養細胞は種々の優れた物質変換機能を示します。即ち、ある種の植物は生薬などの有用な生理活性物質を生産する能力があり、生産物である生薬のみならず、その培養細胞にも生体触媒としての魅力があります。しかし、植物培養細胞を生体触媒とする物質変換に関する研究はまだあまり行われておらず、その研究手法を発展・展開することをライフワークとしていま

す。このたびは、植物培養細胞を利用して、有機化合物をさらに有用な物質へ変換する手法を、化粧品の成分に応用する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、研究計画を遂行する機会を賜りました。今回開発に成功した新規な化粧品素材については今後も、その生理機能を評価し、化粧品としての可能性を検討してまいりたいと考えております。最後に、本研究にご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。（大分大学）

平成 19 年度 研究助成

秘すれば花

藤本 啓二

郷里の姫路には城がある。とても美しい姿と物語を持っている。広大な縄張りに螺旋状の堀をこしらえ、天守に至るまではいくつも門がある。その先に豪華な破風を持つ四つの天守が聳え立っている。これらは数多くの石垣と柱によってかたちを与えられている。そうして全体に均整の取れた美しさが現れている。この姫路城の西の丸には化粧櫓と呼ばれる櫓がある。大天守に登るまでの城内に漂う、冷たく優しい空気をよく思い出す。これは年を経たものだけが持つ深みである。

話は変わるが、わたしは加齢臭という言葉がどうも嫌いである。最近になってこのような臭いが気になってきた。おそらくみなさんもそうではないだろうか。帰りの車内は仕事を終えて疲れきった人たちで一杯である。ここでは臭いという言葉が独り歩きし、臭いという存在を消そうとしている。臭い、シミ、しわなどを隠すための行為も化粧である。これは、ただ化かすための、そして化けるための謀であろうか。化粧は美しいひとを目指す行為です、とひとは言う。自己を他と分かつための方法で、個性を表現する方法のひとつです、とも言う。私は化粧することに意味を

考えるのではなく、化粧することによって現れる姿を美しいと思いたい。

われわれはさまざまなことを経験してここにいる。教育とはひとが成長するために重要なものである。そして、それによって得た知識やスキルをすべて消し去った跡に残るものが教育の結実したものであると聞いたことがある。それはそのひとから立ち上る匂いと言ってもいいかもしれない。それでは齢を重ねて醸し出される匂いを加齢臭と呼ぶのはふさわしいのであろうか。名をつけられたとき、そのものは生命力を失う。少なくともその存在の一部を失う。すべてが加齢の臭いになり、ひとはその臭いの原因を探し出すことに意味を見出そうとする。しかし、そこには本来の加齢の香りはない。ひとは櫓をつくり、そこに住まう美しいひとにちなんで化粧櫓と呼ぶようになった。そこにはひとびとの気持ちがある。物数を極めて工夫を尽くして後、花の失せぬところを知るべし。齢を重ねることが楽しいことであるように、言葉に惑わされるのではなく、秘することによって花の失せぬよう努めることがコスメトロジーであると思いたい。（慶應義塾大学理工学部応用化学科）

未来へ繋げていきたいコスメトロジー

栞原 順子

今回の研究テーマは、ある女性が敏感肌のため日頃から低刺激性の化粧品を愛用していたことから着想に至った経緯があります。市販の化粧品なら何でも肌にあうわけではなく、少々割高ではあるが刺激の少ない化粧品を使いたい。できれば、使わせてあげたい。本研究申請当時は、私は産休・育休明けで「研究」と「はじめての子育て」の両立に悩まされながらも徐々に自分のペースをつかみつつある時期でした。それでも子供が急に発熱した時には実験予定を変更して保育園までお迎えに行かなくてはなりません。生活圏から私の実家は程遠く、実家の母の協力は全く得られないため苦悩の日々が続きました。そんな中、コスメトロジー研究助成に採択され、今は細々ながらも一人の研究者としてこれからも研究を続けていかねば、という強い意志と財団からの励ましを頂いたと感謝しております。

実は、敏感肌のある女性とは私の母。彼女のような多くの敏感肌の方々のためにもコスメトロジー研究を続けていければと思っています。ところで、私ごとではありますが、研究助成をいただいております2年もの間に幸いにも二人目の子どもに恵まれました。第二子の長男は第一子の長女と違ってとても肌が弱く、朝夕のスキンケアが欠かせません。成長するにつれて肌も強くなる、とは言われているものの心配です。子どもたちのそのまた子どもたち、これから先の時代も敏感肌で悩まれる方々は少なからずいらっしゃると思います。敏感肌を少しでも緩和できるより良い素材を未来へ。一研究者、そしてひとりの母としてもコスメトロジーを未来へ繋げていきたいと思っています。

(九州共立大学工学部)

材料から見たコスメトロジー

平栗 健二

私が学生の頃は、シリコン（珪素：Si）が電子デバイスの原料として半導体材料の主力に成長する時代と重なり、素材の精錬技術や大型化技術が急速に発展した。さらに、1980年代にはオイルショック後の化石燃料に代わる未来のエネルギー源としての太陽電池や高速通信を担うスイッチングデバイスに利用されるようになって行った。その当時、受講した電子デバイスや半導体物性の授業では、“Siからの発光は難しい”と学習した記憶があるが、現在のナノテクノロジーの凄まじい進歩によって、“発光デバイスとしての開発が難しいはずのSi”を数ナノメートルに微細化することで発光が可能となり、しかも医療、服飾、化粧品分野への展開を見せていることに深い感慨を持つ。

化粧品の分野で利用されている多くの材料は、金属酸化物や硫化物など意外と工業界で利用されている素材が多い。

今回、コスメトロジー財団より、研究助成を受けコスメトロジーに関しての研究を実施する機会に恵まれた。この研究に際し、医学、薬学、化学などの異分野における研究者と接する機会が得られ、視点の置き方、実験の手法、評価の検討など課題解決への道程が意外なところに潜んでいるように実感している。コスメトロジー分野においても、地球環境に配慮した材料や人類を含む生物の安全性を考慮した素材の開発が不可欠であり、その実現のためには多方面の研究者の協力が必要である。

自分自身の専門は、半導体工学であるが、境界領域や融合分野の研究者との協調と遂行が重要であることが実感できたことに大変感謝する。今後さらに研究の進展に尽力し、このSiナノ粒子（nc-Si）の製品化が実現できることを期待している。

(東京電機大学)

平成 19 年度 研究助成

コスメトロジーと農学部学生

神崎 浩

私が現在教育を行っている岡山大学農学部では、学生定員のほぼ半数を女子学生が占めている。それら学生の中には漠然と食品を取り扱う研究を行いたいという希望を抱いている者が多いようである。我々の学部は4コース制を取っているが、その中に農芸化学コースがあり、そのコースの教育を受けることにより彼女達は、食品素材ばかりでなく化粧品素材や医薬品の開発に関係する研究が農芸化学という学問分野と大いに関係があることを知る。

私は応用微生物学、天然物有機化学を研究フィールドとしているため、講義で有機化学という科目を担当しているが、その中で化粧品の素材についても紹介している。その中で、化粧品の素材開発に農芸化学研究者も関わっており、もともと化粧品を取り扱っていなかったような企業が化粧品の研究開発を行っているという情報を伝えると、彼女たちは非常に興味をもち、質問をしてくることが多い。逆にこちらから彼女たちに尋ねてみると、アトピー性皮膚炎や、乾燥肌、化粧に弱い体質など、皮膚を中心に悩みを持って

いる学生が多く、それらを解決するための研究をぜひ行いたいと思っていることが判る。もともとそのような学生諸君は、皮膚に優しい化粧品や炎症の原因究明に興味を持っており、コスメトロジーに対して人一倍嗅覚が鋭かったことになるが、農学部でもそのような研究を行う可能性があることを知ることによって、コスメトロジー業界を就職先の選択肢とするきっかけとなるようである。実際に私の研究室を卒業した学生が、日本酒メーカーで化粧品素材開発に携わったり、化粧品素材企業で毎日素材と格闘しながら活躍してくれている。さらに後輩達の中にも彼女達を手本にしてコスメトロジー分野での就職を目指す学生が増えてきている。最近では男子学生も男性化粧品の生産量の増加に伴ってコスメトロジーに興味をもちつつある。

以上の状況を考えて、我々教員としては農学部学生にコスメトロジーのおもしろさを教えるとともに、継続的にコスメトロジー研究に従事する学生を育てたいと思っている。
(岡山大学大学院自然科学研究科)

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

飯村 菜穂子

ケミカルピーリングは、皮膚科、形成外科といった専門医が皮膚疾患治療で行ってきたが、最近では癒し空間としても好評で美を追求する現代人の人気を集めるエステティックサロンでも取り入れられるようになった。またドラッグストア、コスメショップでもピーリング剤配合と謳う市販化粧品のコーナーも設けられるほど今やケミカルピーリングの一般普及、需要は目を見張るものがある。

ピール剤の代表的なものに phenol、salicylic acid、resorcinol 等があり、これらは現在も主流の薬剤と思われる。しかしこれらの皮膚刺激性や酸素、光による薬剤不安定性、低い皮膚浸透性は未だ完全には改善されているわけでない。また極端な高濃度での使用もしばしば見られ、患者へのストレス軽減に課題が残る。従って、ケミカルピーリングにおいて使用される薬剤には、①患者へのストレスを軽減し、②安心して使用できる、③安定性高い新規ピール剤の開発

が社会ニーズに応えるためにも重要と思われる。

これまで筆者が行ってきた研究成果として、salicylic acid、resorcinol 等の薬剤不安定性が、両親媒性物質との分子複合体形成、イオン交換体形成によって改善されることが明らかになった。また経皮吸収促進も見られたことからこれまで用いられているピール剤とは異なる性質をもつことがうかがわれる。従って本研究で得られた複合体等は、新規の化合物であると考えるのが適当であると思われる。

両親媒性物質との複合体化やイオン交換技術を導入したピール剤開発は、新規の機能を持つ化合物の獲得へと繋がり、臨床現場において高い有用性と皮膚ストレスを軽減したケミカルピーリングの薬剤として貢献できると思われる。本研究が新規皮膚疾患治療薬の提案へと発展できるよう更に大きく展開していきたいと考えている。

(新潟薬科大学薬学部薬理学研究室)

本研究のコスメトロジーに及ぼす影響

藤原 章雄

近年、コラーゲンの AGE 化が皮膚老化の促進に関与していることが明らかになってきた。特に、CML はコラーゲンに生成する主な AGEs 構造体であることから、CML 生成阻害剤は皮膚老化改善作用が期待できると考えられる。このように、我々が皮膚老化を引き起こす原因物質として CML に注目する中、近年、皮膚老化の予防法に対する社会的関心は、オゾン層の破壊による紫外線量の増大や平均寿命の伸長などといった理由から非常に高まっており、外科的手術やレーザー療法、化粧品、健康食品、ケミカルピーリング、コラーゲンの注入法など、様々な手法で皮膚老化を予防する試みがなされている。しかしながら、レーザー療法やケミカルピーリング、コラーゲン注入法では、瘢痕形成や色素沈着、皮膚の壊死などの副作用が現れる可能性もあり、特にケミカルピーリングにおいては施術後に徹底した遮光を行う必要があるなど、これらの治療法では要する手間や時間・費用がかかりリスクも高いことから、より安全性が高く、安価で手軽に行える化粧品や健康食品が最も一般的に普及している。一方で、近年の皮膚化学研究の発展に伴い、これまでの化粧品や健康食品でみられた保

湿やビタミン補給といった予防改善法ではなく、より高い技術や確かな科学的根拠に基づいた有用性の高い成分を配合した機能性化粧品や機能性食品の開発が求められている。このような背景から近年では、各化粧品・医薬品会社が、機能性成分を配合した商品の開発に取り組んでいるものの、それら機能性成分の作用は、紫外線など外来刺激物質からの防御作用や、活性酸素など生体に対して無差別的に有害作用を及ぼす化学種の除去作用にとどまっており、より高い有効性を発揮する商品を開発するためには、特定の新規ターゲット分子に対する有効成分の開発が必要とされる。前述したように、コラーゲンに生成した CML は皮膚老化を引き起こす原因物質であることが示唆されており、CML は皮膚老化予防に対する新たなターゲット分子として注目されるものと考えられる。ゆえに、今後、本研究で得られた CML 生成阻害化合物及び、さらなる阻害化合物の探索を行い、それらの *in vivo* での効果を検討することで、将来 CML 生成阻害剤が皮膚老化の予防・改善に応用できるよう努力していきたい。(熊本大学医学薬学研究部)

新しいものを発信すること

渡邊 義之

男性用のシェーバーは数千円から数万円の物まで様々な価格の商品が店頭に並んでおり、それらの価格差は十倍以上にもなる。簡単に調べたところ、最上位の高級シェーバーではスペックの数値が高いだけでなく、目玉となる独自の先端技術が活用されていることが多いとのこと。個人的には、最新技術を駆使した製品を是非試してみたいという願望を常に抱くが、いざ購入となると結局財布との交渉が優先されてしまう。安価で長持ちするシェーバーに出会うこともあれば、中クラスの価格のシェーバーでも度々故障してしまい焦る朝を迎えた経験もあったため、これらの経緯も商品の選定に少なからず影響しているのだろう。一般的にも男性の場合、美しさを追求するという意識より

は、専ら身だしなみと整えるというレベルで満足でき、したがって中位の機種を選択する人が多いのではないだろうか。そのようなことを考えているうちに、ふと次のような問いが思い浮かんだ。最先端の技術や製品を選択する人の割合とは幾らくらいだろうか？ 化粧品の場合はどうだろうか？ 勿論、シェーバーのような電気機械と化粧品のような化学製品とでは、大きな違いがあるだろうが、絶えず進歩を求められていることに違いはない。昨今、社会的・経済的閉塞感が報じられているが、やはり新しいものを発信することは肝要であり、コスメトロジーが担うべき役割も重要であることが再認識される。

(近畿大学工学部生物化学工学科)

平成 19 年度 研究助成

私的コスメトロジー観

山本 明美

人類の歴史の中で化粧は相当昔からあったらしく、文化のひとつとも言えるから、現代人の生活もこれを抜きにはすまされない。特に女性は化粧をするのと落とすのに毎日相当の時間とお金をかけている。私は皮膚科の診療をしているので、明らかに化粧をするために生じた、あるいは悪化した顔面の病気の患者さんをみると、化粧をやめることを一応勧めてみる。しかしほとんどのかたは無理です、と答える。職場が許さない、接客業なので、あるいはいまさらとても素顔でなんて、とおっしゃる。ほとんど化粧をしていない私（女性皮膚科医）は化粧なんかしなくても平気ですよ、むしろ楽だし、化粧品代もかからないし、いいことばかり、せめてポイントメイクだけにしたらそのニキビ（あるいは湿疹）は良くなりやすいですよ、とさらにしつつこく勧める。一応納得してくれる方もいるが、たいていは次の受診日にもバッチリ化粧をしてくる。

化粧をするとどんな良いことがあるのだろうか。欠点がかバーされる（決してなくなっているのではない）、若々しく見える（決して若くなっているのではない）、気分が引き締まる、皆と同じ化粧をすることで安心できる、あるいは他人より目立つ化粧で自己主張をできるといったことだろうか。鏡に向かって化粧するときは他人の視線を意識し、どのように映りたいかをイメージしながら表情をつくりあげていくだろうから、他者を意識した社会生活の基本姿勢の形成につながるとも言える。リハビリメイクという分野もあるくらいだから、顔面の皮膚病を気にせず明るく生活できるようになる方もいるだろう。化粧品を買うことで消費を促しているという見方すれば内需を拡大する手だてになっているのかもしれない。コスメトロジーとは化粧を通じて世の中を明るくする学問ということだろうか。

（旭川医科大学医学部皮膚科）

平成 19 年度 研究助成

酵素学研究からその先の向こうにあるものを期待して

人見 清隆

農学部という基礎と応用の両方を追い求める研究分野で、これまで皮膚形成に必要な酵素反応（トランスグルタミナーゼというタンパク質の架橋化反応）について研究してきた。酵素科学の専門であり、皮膚の専門家です、とはとても言えない立場であるが、今回のご支援によって、多少なりとも皮膚科学における知見を増やせたと考えている。

基礎研究としての研究報告書を書き終え、さてしかし、課題の「化粧品について普段思うこと」、「自分の研究と化粧品学との関わり」はすらすらと筆が進まない。自身が身だしなみを含めて化粧品のことを普段あまり考えることのない典型でもあり、またすぐに化粧品製品に繋がるような研究課題ではないのである。所属する農学部の化学系は女子学生も多い。学生や妻にヒントになるインタビューを試みたが、話は他の方向へ盛り上がってしまい、研究している酵素とすぐにつながるような答えは得られない。

私の対象としている酵素についてその先の向こうにある

ものを、あえて書かせてもらえれば、この酵素と皮膚の硬さ、老化によりこの酵素反応物の蓄積は関係しそうである。しかし、だからこの酵素の調節をすれば皮膚が柔らかくなります、とは正直言えない。表皮の性状を決める要因がそんな単純なものではない。とは言え、これら酵素反応の調節機構が皮膚の硬さや状態に関連するのでは、と期待もしている。なかなか実際の検証に進めずにいるのだが、今回こうした財団のご援助を頂く中でその先のアイデアを考えるようになった。基礎的な研究の積み重ねが突如として、いろんな利用価値を生み出すのは、どの産業分野でも明らかである。基礎と応用の垣根が低くなっている事はどの分野でもそうであろうと思う。皮膚の基礎的知見を深めることが、化粧品学を進め、思いもかけぬ新方向を見出すかもしれない。今回のご支援に感謝すると同時に、そうした基礎知見に期待を持ち続けて頂けることをお願いする次第である。

（名古屋大学大学院生命農学研究科）

平成 19 年度 研究助成

コスメトロジーの重要性

加藤 則人

3 歳になった娘が、妻の化粧に強い関心を示すのを見るたびに、美しくありたいと願うのは、人類が生まれながらに持つ欲求だと思わずにはいられない。そういえば、私も小学生の頃、母親の化粧をまねてこっそりメイクをした覚えがある。人間が元来有する欲求を安全にかなえるべく、コスメトロジーという学問は今後ますます発展していくことが期待される。

今回、コスメトロジー財団から研究助成により、血小板が皮膚の炎症において果たす役割を検討する機会を頂いた。血小板は、組織修復に必要な物質を豊富に含んでいる細胞であり、アンチエージングにも重要な役割を有していると考えられる。今後は血小板を利用した安全な化粧品の開発にもぜひ携わってみたいと思っている。

(京都府立医科大学大学院医学研究科皮膚科学)

平成 19 年度 研究助成

美の追究のジレンマ

的崎 尚

“まつ毛エクステ”なるものが最近女性の間で人気らしい。自まつ毛に人工まつ毛を付け足し、目をぱっちりさせるもので、“付けまつ毛”よりも自然に仕上がるということで流行しているようだ。1 ヶ月程度は維持できるので化粧時の手間が省けるのも人気のポイントのようである。ところが最近になって消費者庁からまつ毛エクステーションの安全性の確保について注意を促す通知が出されている。まつ毛エクステに使用する接着剤によるアレルギーへの対応の問題を含め、十分な技術をもたない業者などによる事故例が増加しているとのことである。女性は常に美を追求するが、一部で求めるものと逆の結果を導いてしまうのはなんともジレンマである。同様のことが化粧品にも言える。本来使用することで美しくなるべき化粧品、一方、その中に含まれる化学物質との接触のため皮膚に炎症がおきるといった接触性皮膚炎がそのケースにあてはまる。

私共の研究では、化学物質誘導性の接触性皮膚炎の新たな治療法の開発を試みております。皮膚での炎症反応には体に存在する多種多様な免疫細胞が主に関わっています。そこで、特に免疫細胞の活性化を調節する司令塔的な役割を果たす樹状細胞に注目し、その細胞の機能を上手く操作することで、炎症反応をコントロールする新たな方法確立しようと試みております。現在私共の研究成果から得られつつあるものが、新たな接触性皮膚炎の治療薬になり得るには、まだ多くの研究が必要となりますが、今後、接触性皮膚炎の治療法の確立に貢献できるものであると信じております。さらには、私共の研究が、接触性皮膚炎で化粧品が使用できず悩んでいる女性や男性？（最近では、化粧品を使用する男性が多くなりつつありますが）の希望となればうれしい限りです。

(群馬大学生体調節研究所)

平成 20 年度 研究助成

私のコスメトロジー観

山口 裕史

小学生の頃から(言葉を理解せずとも)「コスメトロジー」に漠然とした興味があった。女性の美容に対する熱意は何歳になっても「すごい」ことを母や祖母らやその知人が教

えてくれた。

医師として将来の診療科を選択する際に「コスメトロジー」に関連した分野(美容外科)もある形成外科を志すこ

とにした。

駆け出しの医師の頃は私の理想とする医師像と現実とのギャップに苦しみ、研究を重視するタイプの皮膚科医として再出発したが、この科にも「コスメトロジー」は関与していた。某先輩の「皮膚科は研究が臨床に直結しているやりがいのある科だ」との言葉を鮮明に覚えている。

2度の留学で「コラーゲン」・「メラノサイト」・「再生医学」を研究したので、「コスメトロジー」は身近なものであり、昨年は某化粧品メーカーのコンサルタントを務めた。妻も母も祖母もサンプルを喜んだ。仕事中心人間ができる罪滅ぼしのような気がした。

ただ長年興味があるものの「コスメトロジー」に関する研究には後ろめたさがあった。医師たるもの「命」に関わる研究を算術に囚われず志すべきであると思っていたからだ。それが私の理想の医師像であり、皮膚がん・皮膚潰瘍（自然に治癒することなく敗血症に陥り命の危険性があるものを指す）の領域で成果を上げると同時に私自身の能力の限界に直面した。

40歳も半ばを迎えた現在、私の研究成果は「自己満足」で終わることなく、社会に還元されるべきであると強く意識するようになった。ここでの「社会」とは、あらゆる病気に苦しむ患者さんだけでなく、外見を気にするばかりに社会と疎遠になり「社会的な命」を落としそうになっている方も含めた大きな意味である。命を救うばかりが医者ではなく、自分の生活・家族も大事にできる人間でありたい。自己満足の研究ばかりを追求するのではなく、産業として還元できる研究を楽しくできればいいと感じるようになった。（日本は欧米の3分の1しか医療従事者がいない。患者の側からも医師の側からもこれは大問題である。医師の多様性が日本も必要なので、医療従事者の質を保ちつつ人員が増えることを切に願っている。）

あとどれ程私自身が研究をできるかは分からない。でも楽しく、何かに囚われることなく、社会に産業として還元できる研究をするのが理想である。それを叶えてくれるのが私にとってのコスメトロジーである。

（名古屋市立大学大学院医学研究科）

平成 20 年度 研究助成

コスメトロジー展望

大日 輝記

医学は本来「人類が病気と戦うための学問」であり、美容という手法とは相容れなかった。しかし、社会の成熟に伴い、医学は美容という領域にまで立ち入るようになった。美容医学という領域がある。定義づけるとすれば「個人のあくなき美的欲求に対して、医学を中心とした集学的知見に基づき、医療行為で応える科学的手法」である。

一方、美容の手段の中心である化粧は、「外的素材を付加することで美を得る行為」である。化粧材料には、美意識にもとる部分を快適に覆い隠し、補う機能が求められてきたし、従来の化粧の最大の使命は「若返ったように見せる」ことであった。しかし、市場の拡大と科学の進歩は、化粧の定義を覆そうとしている。「機能性化粧品」という言葉が示すように、皮膚の生理機能を理解し、科学的根拠に基づき、皮膚本来が持つ美しさを引き出す。さらには本当の若返りをも目指している。

この境界領域に関わる者にとって、この急速な進歩と繁栄は華やかで見える反面、戸惑いを禁じ得ない。なぜなら、美容は今もって、享受者本人の満足という主観が第一であ

り、これをいかに取り扱うか結論を得ていないからである。美とはオカルト（目にみえないもの）であり、そこにつけ込む欺瞞を許してはならない。これを断じる手段を持たない以上、学問領域としての成熟は未だ望めない。

現時点で確実なことは、以下の3つである。

第一に、提供者の喜びである。身体に関して享受者が抱えていた不幸やストレスを取り除くことで本人や周囲の人が幸福と感じ、そこに喜びを見いだす点では変わることがない。

第二に、携わる者の責任として、「今、美容はここまでできる」という可能性と限界、そしてリスクを示せるかどうかが重要である。宇宙旅行ができる、という選択肢は、実際には行けなくても私たちに夢と希望とをもたらす。

そして最後に、コスメトロジーがもつ集学的知見とケースの蓄積は、他の学問領域にとっても可能性の宝庫である。現象に真摯に接することで、医学、生物学の進歩に還元、貢献しうる発見が、今後、コスメトロジーの最前線から生まれると信じている。（久留米大学皮膚科）

金属アレルギーを予防するコスメトロジーへ

平澤 典保

今回、金属アレルギー抑制の観点からコスメトロジーへのアプローチを試みました。金属を含む装飾品等からニッケルなどの金属が溶出することが、金属アレルギーの発症に大きく関与し、それによってかゆみ・発赤が生じ、ひどい場合には色素沈着にいたる場合もあります。汗により装飾品から金属イオンが溶出し、溶け出したニッケルイオンは組織に浸透していき、細胞膜蛋白あるいは組織間液のタンパク質と結合して抗原となり、アレルギーを誘発します。

アレルギーの治療は、様々な薬が開発されていますが、あくまで対症療法であり、特に金属アレルギーのような IV 型アレルギーを主体とするアレルギー性炎症は治療が困難です。このように金属アレルギーは薬ではコントロールしにくい疾患で、その症状を治療するよりも、むしろ金属の溶出とそれに続くイオンの組織浸透を体表面において抑制する方法がより有効性を示す可能性があります。すな

わち、制汗剤などにより体表面で金属の溶出を抑制したり、体表面で薄膜を形成して皮膚バリアを補強することによって金属イオンの皮膚組織への浸透を抑制することは金属アレルギーの予防につながると考えられます。このような機能を強めた化粧品を開発することができれば、機能性化粧品として今後大きく発展するのではないのでしょうか。そのためには、動物モデルや組織モデルで金属の浸透を解析できる新たな実験系の確立が不可欠です。今回私たちは、動物体内での金属溶出評価系、ならびに細胞系での評価系を確立しましたが、さらに、体表面での金属溶出、そして組織への浸透を評価できる系の確立も目指しています。

作用点が体表面であれば、基本的に人体に対する害は少なくなります。体表面での金属アレルギーの予防の方法論開発の研究を、コスメトロジーの新しい一領域として発展させていきたいと考えています。(東北大学大学院薬学研究科)

化粧品の安全性？

石橋 賢一

皮膚は外界に曝されており、紫外線などの物理的刺激や、細菌・汗・化粧品などの化学的刺激もうけている。従って皮膚の大きな役割はバリアーとしての機能である。一方、ヒトにおいては皮膚の色は表情とともに重要なコミュニケーション・ツールとなっている。そこで化粧品の使用は文明とも関連して非常に重要な位置をしめ、バリアーの機能にどうかかわるかが問題である。さらに、近年皮膚が光や酸素濃度を感知するセンサーとしても重要であることがわかってきたので、化粧品の無毒性についてもあらたな検証が望まれている。

今回とりくませていただいたテーマは、皮膚癌という狭い範囲に限った化粧品、とくに含有成分として古くより使われてきたグリセリンの皮膚癌への影響についての検討であったが、不十分な結果に終わったのは残念である。ただこのテーマは紫外線による発癌との関連でも考えていく必要があり、またわれわれの周辺には多くの発癌物質があるので、究極的な安全性に関しては、疫学的手法による検討が必要になると思われる。ただ、グリセリンを細胞内にと

りこませる AQP3 のないマウスの皮膚では皮膚癌の発育が抑制されるのは事実なので、グリセリンを化粧品として積極的にぬることが適切かどうか、改めて問う必要があるのではないかということであろう。

発癌ではなく癌の増殖促進なので、これは皮膚の再生にとってみればむしろ好ましいことともいえる。女性には癌ができにくいので、化粧品による皮膚癌促進がめだたない側面もあるかもしれない。この可能性をおそれて、化粧品の使用をひかえると美的に不利益をこうむり、ひいては QOL にも影響するかもしれない。もちろん、化粧品産業にとっても大問題であろう。さらに、病气や寿命との関連でいえば、日本人にはめずらしい皮膚癌よりも、同じく AQP3 が発現している大腸癌の増殖に、グリセリンのとりこみが関連しているとすれば、医学的にも重要な問題である。

一方、同じくグリセリンをとりこむ AQP7 が欠損したマウスの心臓では、心負荷でエネルギー代謝が不十分で、心肥大・心不全になるようなので、正常細胞ではむしろグ

リセリンは必要ともいえる。このほかに、グリセリンチャネルとしてはヒトに AQP9 と AQP10 があるが、これらの役割についても気になるところである。すでに、これらのノックアウトマウスは作られて、一見異常がなさそうなものではあるが、病気での役割など、解明されるべきことは多

い。これまで、グリセリンと脂肪代謝・肥満に注目されすぎたきらいがあるからである。

この生物の複雑さをうまく利用、あるいは回避するには、まだまだ解明しなければならないことは多いとつくづく考えさせられる。
(明治薬科大学病態生理学)

平成 20 年度 研究助成

機能性化粧品ターゲット探し

大口 健司

mTOR (mammalian target of rapamycin) は、細胞の分裂や成長 (サイズ) を調節する因子として知られているセリン・スレオニンキナーゼである。これまでに我々は、mTOR の新たな作用としてメラノジェネシスなど皮膚細胞がもつ重要機能の制御に関与することを見い出しており、化粧品原料メーカーと共同で mTOR をターゲットとした機能性化粧品 (ホワイトニング) の素材開発を進めている。今回コスメトロジー研究振興財団から助成金をいただき、表皮ケラチノサイトの分化過程における mTOR の関わりについて検証した。角化の新たな制御シグナル機構の解明に貢献するとともに、応用的観点からも角化をコントロールする機能性物質の探索研究に寄与する知見が得ら

れ、mTOR の機能性化粧品素材の新しいターゲット分子としての可能性が広がった。

近年、化粧品の効能・効果に対する関心が強くなっており、機能性の高さが消費者にとって化粧品を選ぶ際の“ものさし”となってきた。化粧品の機能性や有用性は、科学の進歩とともに拡大してきているが、法制度において「機能性化粧品」を直接定義したものはない。その辺りにジレンマを感じる事もあるが、化粧品の果たす大切な役割に貢献できるよう、新しいターゲット探しに日々励みたいと思う。

(財団法人岐阜県研究開発財団岐阜県国際バイオ研究所)

平成 19 年度 研究助成

コスメトロジーの意義、コスメトロジー財団の意義

山下 博司

化粧は人間が一定の環境下・条件下で行う日常的所作である。それは太古の昔から延々と続いてきた行為であり、おそらく人類の歴史と同じくらい古い。財団の名称ともなっている「コスメトロジー」という語は、即物的な意味内容として「美容術」を表すが、より抽象的な語義として、化粧に関する総合的・体系的な学問を指す用語でもある。個別的・具体的な美容術を超えたものである以上、理系・文系といった既成の学問領域の枠組を超えた広がりや奥行きをもって然るべきである。素材や物性についての研究、生体作用や安全性についての研究と並んで、化粧を施す主体の側の文化的・社会的な研究も相俟って、体系的でホーリスティック (全体論的) なコスメトロジーが成立するものと考えられる。人文科学や社会科学といった「人間学」にもじゅうぶんに出番はあるはずである。

「人間学」とは「つながりの学問」である。人間が一人で生きられないように、化粧もまた、人間生活のもろもろの営為と切り離しがたく結びついている。人が、どのような生活の局面で、どのような化粧をするのか。特定の化粧行為と結びつく行事や服飾は何か。何を以て化粧と見なし、何を以て化粧と見なさないのか。化粧はどのような文化的・社会的意義に裏打ちされているのかなどなど、複眼的・多角的に読み解いてこそはじめて、化粧のもつ深みや奥行きが見えてくるはずである。

コスメトロジー研究振興財団が、自然科学的研究プロジェクト以外に、いわゆる文系分野にも門戸を開放してくださったのは、化粧という文化現象を人類の文明史の中に位置づける上で、とても意義のあることだと思う。

(東北大学大学院国際文化研究科)

嗅覚系の研究とコスメトロジー

梶原 利一

先日、ドラッグストアへ行った時の事である。何回か年を越して使っていたリップスティックがついに無くなってしまったことを思い出し、足を運んだ私は愕然とした。それらしき商品の棚に、リップスティックが溢れんばかりにぶらさがっていたのである。その数およそ 20 種類以上。目当ての“濃い緑色をして白いキャップがちょこんと乗った”製品を探しだせないくらい種類が豊富にあった。良く見ると、ほとんどの製品が同じデザインだけれども色が微妙に違う。どうも、それぞれには、異なる香り成分が添加されているようであった。すんなり受け入れられるものにはレモンやライムがあったが、イチゴ、ピーチ、さらにはマンゴーまであった。

このように、「匂い」は、香水だけでなく様々な化粧品に、意図的に混合されている（私の見た大量のリップスティックは厳密にいうと化粧品ではないのかもしれないが、）。では、どのような意図で、様々な匂いが化粧品に混合されているのであろうか。最近では、高校生を中心にした世代に売れるから、などという経営戦略的な意図だけでなく、リラックス効果のような、我々の精神活動（脳）への影響を意識した意図もあるようである。たしかに、匂いには、快・不快といった「情動」のみならず、「記憶」にも強い影響

を及ぼす魔法のような力がある。記憶・情動の中枢である海馬や扁桃体の神経回路に、匂いが直接働きかけることを可能にするような脳内の配線が、この魔法の力を引き出す一因になっているといわれている。ところが、この配線の動作の仕掛けを、神経科学的手法で明らかにしようとした研究はあまり無い。私が今回行った研究は、この点に着目した研究であり、匂いの情報処理の仕組みの解明を目指すものである。実験手法の多くの制約から、現時点では、匂いの種別に応じた、脳の動作様式を解析するまでには至っていない。しかし、もしこれが可能になり、レモンよりも、マンゴーの香りの方が、心地よいばかりか物事の記憶にもよい、といった類のことが神経科学的に説明できるようになったとしたら、その実験系はコスメトロジーの分野で、香り成分のアッセイシステムとして利用されることになっているかもしれない。このような事を思い描きながら、今回ご支援頂いて遂行した研究を更に大きく発展させてゆきたいと思っている。

ところでリップスティックだが、結局、ピーチの香りがする唇のオジサンをイメージできず、購入には至らなかった。（産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門）

近くて遠いコスメトロジー

秋山 庸子

“工学研究科の環境・エネルギー工学専攻というところに籍を置きながら、なぜ化粧品の研究をやっているんですか。”としばしば尋ねられます。確かに地球規模の環境問題やエネルギー問題を扱っている専攻で、触動作による触感の定量化という研究テーマは一見異質な存在に思えるのも不思議ではありません。社会的な価値観が機能性の追求から快適性の追求に向かっている中で、そもそも人にとって一番身近な環境は生活環境であり、中でもきわめて身近なものは直接肌に触れる材料ではないか、という考えがこの研究の出発点となっています。

まだ浅い経験ながら、これまでコロイド・界面化学の分野を中心にさまざまな材料を相手に研究をさせて頂く機会

に恵まれました。材料というものは、一見動かない無機質なものに思えますが、暫くひとつの材料の分析や合成に携わっていると、どのような材料も、やがて生き物のように生き活きとした姿を見せ始めます。その中でも化粧品は大変表情豊かな材料で、人の肌の上でさまざまに形を変え、着手、塗布、連用時のそれぞれに違った側面を見せてくれます。このように肌と化粧品が相互作用する瞬間を捉えるのがこの研究の中心的な作業となりました。

しかし思った以上に一筋縄では捉えきれず、触感の背後にある物理的現象を捉え、さらに触感設計に辿り着くには、先の道程が長いというのが研究期間を終えての実感です。触感の迷路にまよい込むにつれて、自分自身が鏡の前でメ

イクする余裕がなくなっていくのは気のせいでしょうか…。コスメトロジーは私にとって、公私共々まだ近くて遠い存在なのかもしれません。最後に、人と材料との関わりをテ

ーマにした本研究をご採択いただき、研究の機会を与えてくださいましたコスメトロジー研究振興財団の皆様にご心から感謝いたします。（大阪大学大学院工学研究科）

平成 20 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

五島 史行

この度、コスメトロジー研究振興財団研究助成をいただきましたことを心から御礼申し上げます。私は耳鼻咽喉科において、心理治療や心身医学に力を注いでいます。この領域は非常に重要なものであると考えておりますが、その思いとは裏腹にあまり日の目を見ない領域であります。体の病気と心は密接に結びついているという考えは現代の医学教育ではあまり強調されていないのが現状です。患者さんがどのような症状で病院を受診しているかを言葉を交わす前にどのくらい感じることが出来るかというトレーニングをしばらくしてみたことがあります。その際には診察室に患者さんが入ってきたときの様子、つまり服装や行動をつぶさに観察するようになります。そのような診療を心がける中で気づいたのは心理的な健康状態が女性の化粧行動に関連することです。このことから患者さんの心の健康度

を化粧行動によって評価することを発想しました。化粧関連行動による耳鼻咽喉科心身症患者の健康評価の試みというテーマで研究を行いました。しかし実際に研究を行ってみると、化粧関連行動は女性の心の健康状態以外のいくつかの要素によって影響を受けることが分かりました。それは病院を受診した後にどのような予定を立てているかと言うことです。同姓の知人と約束があるケースが最も化粧に力を注ぐ傾向があるようです。これまで化粧行動を詳細に分析したことがなかった男性の一人としてとして本研究を行うことによって女性の行動について少し理解が深まりました。このことをさらに深め心身医学、行動医学に応用していきたいと考えています。

（慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科）

平成 20 年度 研究助成

香りが及ぼす効果

渡辺 英綱

特定健康診断により、これまでより積極的な事後指導が必要になったが、実際希望者は多いとは言えず、減量支援は困難であることが多い。今後の危険を説明しても、実際自分に降りかかるとは実感しにくいのと、支援を受けるにも時間がかかり、実行可能な支援がほとんどないと訴える受診者は多い。香りによる支援は、特に食事指導も、運動指導もなく（もちろん希望すれば受けてもいいのだが、ほとんど希望しない）、自宅にいるときにアロマオイルを使用するだけである簡易さがやってみようという気にさせるのかも知れない。それさえ面倒で受けたくない対象者がいることは、今後さらに簡易な介入法が必要ということだろうか？

香りによる介入を望む対象者は背景として、一度食事と運動療法を試みて挫折し、肥満等の危険要因と長い付き合い

いのある、むしろ一般的な支援を受け入れる対象者よりリスクの高い集団とも言える。無理に一般的な支援に組み込んでもドロップアウトしがちな集団である。正直、介入開始時は、減量にてこずるだろうと覚悟したが、一般臨床医の勧を覆す効果があらわれた。一般的支援と減量効果に有意差はないのだが、もともと減量にてこずると思われた群が、同等の効果があらわれたのには驚きさえ感じた。今回の研究では、ストレス評価と内臓脂肪肥満に着目し腹囲の減少を指標としたが、香料の効果を理論的に解明できたか自信がない。

今後は、運動量に有意差はあるのか3軸加速度計等を用いて評価し、基礎代謝に及ぼす影響の評価、レプチンなど食欲に関するホルモンへの影響も検討したいと考えている。また、介入法として更に簡易な方法はないか、支援を希望

しない対象者がいなくなるのは、研究上困るのだがエントリーしやすい介入法も考えたい。最後に、当研究をサポート

としていただいた財団法人コスメトロジー研究振興財団に感謝いたします。
(福島大学保健管理センター)

平成 21 年度 国際交流援助

第4回日本分子イメージング学会を開催して

長野 哲雄

2009年5月14日、15日の2日間、千代田区一ツ橋の学術総合センターにおいて、第4回日本分子イメージング学会学術集会が開催された。企業関係者80名を含め437名の参加者が一堂に集い、分子イメージングに関する最近の成果について活発な討議が行われた。

昨年(2008年)のノーベル化学賞が下村先生、Prof. Tsien, Dr. Chalfi等の「緑色蛍光タンパク質GFPの発見とその応用」研究に与えられたことに代表されるように、生細胞、生体組織、*in vivo*あるいは人体の中で起こっている現象を時と場所を特定して「見る」ことができれば、真の生命現象を解析する上において極めて有用であることは明らかである。我が国でも大学、研究期間、企業を含めた分子イメージング研究の連携が生まれ、多くの先生方のご尽力により2006年5月に日本分子イメージング学会(JSMI)が設立された。諸外国の組織に比べても、JSMIはMRI、PET、光などのイメージング手法が異なる専門家が大同団結し、極めて強固に組織された。日本イメージング学会(JSMI)

主催の学術集会としては今年は第4回目を迎え、学会の揺籃期から大きく発展する成長期に入っている。本大会における先生方の活発な討議を通して、日本のイメージング研究が世界のトップになることを祈願して本学術集会が開催された。本大会には、特別講演者としてSamuel Achilefu博士をお招きして、最新の成果を報告していただいた。Achilefu博士は光分子プローブについてlifetimeイメージングなど新たな視点からの講演を行った。マルチモダリティなど、現在最も興味ある先進的な話題もあり、他研究分野の聴衆も興味深く講演に聞き入っていた。このように本公演は、新たな光イメージング技術の展開を示唆する内容であったため参加者からも多くの質問があり、ポスター会場においてもAchilefu博士との熱の入った議論が行われていた。

終わりにあたり、本学術集会の開催にあたり、ご支援を頂きましたことを厚く御礼申し上げます。

(東京大学大学院薬学系研究科)

平成 21 年度 国際交流援助

コスメトロジーと医学国際交流

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の治癒に重要であるが、過剰な発現は皮膚の線維化やケロイド形成を引き起こす。この度、コスメトロジー研究振興財団から海外交流助成を受け、フィンランド・テュルク大学皮膚科のVeli-Matti Kähäri教授を日本にお招きして、皮膚の線維化と発癌機序に関する研究の交流を行う機会を得た。同教授の講演会には多くの結合組織領域の研究者と皮膚科をはじめとする臨床医師が参加し、得るところ誠に大なるものがあった。コスメトロジー研究振興財団のご支援に、あらためて厚く御礼申し上げる次第である。

さて、今年度より所属大学の国際交流委員を拝命し、医学部学生の海外交換留学に携わることとなった。グローバル化の功罪が論じられるようになって久しいが、四方を海に囲まれたわが国では、表面的な短期の海外旅行を別にすれば、海外と交流する機会は実際のところはまだまだ少ない。交換留学生には、医学の研鑽や英語力の向上にとどまらず、多面的なものごとの考え方・多様な価値観を学んで欲しいと願いつつ、欧米の提携校を訪問している。

ひるがえって、化粧の評価はひとえに個人の美的感覚や精神文化に影響される面が大きく、いわゆる「標準化」や「グローバル化」とは縁遠いように感じられる。そのような中であって、医学の国際交流がコスメトロジーの進

歩に寄与しうるとすれば、そのひとつは冒頭に述べたように皮膚の病態生理を理解して、健康な皮膚を維持するメカニズムを解明することであろう。また、皮膚科疾患や手術後の跡をいかに最小化するかは、単に見かけ上の改善のみならず、コンプレックスの解消や自信の回復といった患者の精神面に大きな影響を及ぼすことも見逃せない。Kähäri

教授の来日を契機として、皮膚科学・結合組織学をはじめとする医学の進歩が、コスメトロジーの発展にも寄与しうることを再認識した次第である。今後も、皮膚の創傷治癒や線維化の研究を通じて、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。

(東海大学医学部基盤診療学系・総合医学研究所)

付 録

●
事業報告書（平成21年度）

役 員
●

事業報告書

(自平成 21 年 4 月 1 日 至平成 22 年 3 月 31 日)

《研究助成等の選考関連》

2009	5	7	公募開始	全国 273 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 83 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	8	選考委員会（分科会 2）	生体作用、安全性に関する分野の選考
	9	11	選考委員会（分科会 3）	精神、文化に関する分野の選考
	9	28	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 30 課題、国際交流援助 2 課題を選考
	11	13	表彰贈呈式	記念講演：「コスメの国のオタク」 甲南女子大学人間科学部 専任講師 米澤泉 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
2010	2 中旬		持ち回り企画委員会	平成 22 年度の研究助成課題選考に関して

《理事会関連》

2009	6	12	通常理事会	平成 20 年度事業報告ならびに収支決算報告、研究助成引当資産の積立承認、株主としての議決権行使、報告事項
	11	13	通常理事会	平成 21 年度（第 20 回）研究助成者等の承認、平成 22 年度事業計画及び予算案の承認、公益財団法人移行認可申請方針、公益財団法人移行時の最初の評議員の選任方法、報告事項
2010	3	16	臨時理事会	事務所所在地の移転等の承認 最初の評議員の選定委員会の委員会運営細則の決定、最初の評議員の選定委員会の外部委員 3 名及びその他の選任、報告事項

《評議員会関連》

2009	6	12	通常評議員会	平成 20 年度事業報告及び収支決算報告、報告事項
	11	13	通常評議員会	平成 21 年度（第 20 回）研究助成者等の承認、平成 22 年度事業計画及び予算案の承認、公益財団法人移行認可申請方針等、公益財団法人移行時の最初の評議員の選任方法、報告事項
2010	3	16	臨時評議員会	事務所所在地の移転等の承認、報告事項

《その他》

2009	3	末	財団活動の情報更新	当財団 HP へ平成 21 年度事業計画等を記載
	6	末		当財団 HP へ平成 20 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」17 号の概要を当財団 HP に掲載

第 20 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-09-01	核内受容体PPARを介して皮膚の美容効果を発揮する化粧品素材の探索	細胞生物学、分子生物学、生化学、核内受容体リガンドスクリーニング	大阪大学大学院薬学研究科蛋白情報解析学分野 助教 橘 敬 祐
J-09-02	界面活性粒子を利用した多重エマルジョンおよびマイクロカプセルの開発	界面化学 物理化学	山形大学大学院理工学研究科 准教授 野々村 美 宗
J-09-03	酵素合成トレハロース脂質の生理機能を活用した付加価値の高いリポソーム化粧品の開発	生物化学工学 酵素工学 界面コロイド化学	東京都市大学工学部エネルギー化学科 准教授 黒 岩 崇
J-09-04	アロエの美白成分クロモン類の生合成研究	生薬学 天然物化学	東京大学大学院薬学系研究科 教授 阿 部 郁 朗
J-09-05	多様な皮膚酸化障害を制御するガロイル化フラボノイド素材の探索	生物資源科学 天然物有機化学	徳島大学大学院ソシオ・アーツ・アンド・サイエンス研究部 教授 増 田 俊 哉
J-09-06	化粧品用色材としての天然色素／無機ホスト複合材料の開発	有機・無機ハイブリッド材料、天然色素物理化学、光化学	静岡大学工学部 助教 河 野 芳 海
J-09-07	エレクトロスプレーを利用した高機能性粉体調製技術の開発	粉体工学 界面化学	独立行政法人物質・材料研究機構 主幹研究員 川 上 亘 作
J-09-08	アロエ含有物によるUVケアの研究 ー紫外線防御と一重項酸素消去作用ー	物理化学 ボディケア化粧品学 (UVケア化粧品学)	愛媛大学 教授 長 岡 伸 一
J-09-09	加齢に伴う皮膚脂質の変化に対するリピドーム解析	生化学 分析化学	京都府立医科大学 博士研究員 守 田 麻由子
J-09-10	自生ハマナス (<i>Rosa rugosa</i>) の精油成分と抗菌活性 〜コスメトロジーへの有効利用を目的とした基礎的研究〜	天然物化学 および 微生物学	弘前大学大学院理工学研究科 准教授 長 岐 正 彦
J-09-11	能動的標的化技術を搭載した新規ドラッグデリバリーシステムキャリア「バイオナノカプセル」の次世代化粧品分野での応用可否の検討	分子細胞生物学 DDS学	名古屋大学大学院生命農学研究科 産業生物工学研究分野 教授 黒 田 俊 一
J-09-12	新規角質保護素材応用へ向けた抗炎症性スフィンゴ糖脂質の精製と性質解明に関する研究	糖鎖生物学 脂質生化学 免疫生化学	独立行政法人産業技術総合研究所 四国センター 研究員 奥 田 徹 哉
J-09-13	ヒトはいかにして化粧品にかぶれるのか ー一次刺激性皮膚炎を伴わない接触皮膚炎モデルの作成ー	皮膚科学	東北大学大学院医学系研究科 教授 相 場 節 也
J-09-14	小皺形成に関わる皮膚特異的プロテアーゼSASPase活性と加齢の関係	皮膚科学 表皮分化、生化学	東京医科歯科大学難治疾患研究所 メディカル・トップ・トラック (MTT) プログラム 特任講師 松 井 毅
J-09-15	栄養障害型表皮水疱症の原因遺伝子であるVII型コラーゲンの分泌メカニズムの解析	細胞生物学 分泌、小胞輸送	東京大学大学院薬学系研究科 生理化学教室 助教 齋 藤 康 太
J-09-16	タイトジャンクション動的平衡を制御する低分子化合物の探索	複合領域 (細胞生物学・構造生物学・ケミカルバイオロジー・計算機科学)	神戸大学大学院医学研究科 特命教授 廣 明 秀 一

(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-09-17	皮膚の健康・老化状態の非侵襲的解析法：質量分析法を基盤としたケラチン上の化学修飾スクリーニング法の開発	臨床分析化学	東北大学大学院薬学研究科教授 大江 知行
J-09-18	皮膚細胞を用いた化粧品中のナノマテリアルの安全性評価	薬学 毒性学 皮膚科学	大阪大学大学院薬学研究科教授 堤 康 央
J-09-19	細胞外マトリックス糖タンパク質による皮膚の再生・修復のグリコバイオロジー	糖鎖生物学、細胞外マトリックス生化学、分子生物学	お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科 教授 小 川 温 子
J-09-20	物質の輸送・代謝リズムの分子時計機構の解明と操作要因の開発：テラーメード化粧品適正使用を目指して	時間生物学 時間薬理学 時間化粧品学 テラーメード化粧品学	九州大学大学院薬学研究科教授 大 戸 茂 弘
J-09-21	遺伝子改変動物を用いた脂肪酸受容体の皮膚における作用の検討	薬理学 細胞生物学	京都大学大学院薬学研究科薬理ゲノミクス分野 准教授 平 澤 明
J-09-22	MEMS触覚センサを用いた髪の手触り感計測に関する研究	MEMS触覚センサ	東京大学 特任助教 野 田 堅太郎
J-09-23	皮膚表皮でのナノマテリアルの動態と免疫応答の可視化－ナノマテリアルに対する新たな安全性評価法の確立に向けて－	ナノテクノロジー 生体イメージング 免疫学	大阪大学免疫学フロンティア研究センター 特任助教 藤 井 文 彦
J-09-24	皮膚老化・がん化を誘発するストレス性刺激を蛍光タンパク質断片の相互作用により検出するシステムの開発	細胞生物学	金沢大学医薬保健研究域薬学系 准教授 山 下 克 美
J-09-25	毛包の色素幹細胞形質維持におけるエピジェネティクス機構の関与と白髪形成予防法の研究	エピジェネティクス 幹細胞学 色素細胞学 毛髪科学	国立成育医療センター研究所周産期病態研究部 部長 秦 健 一 郎
J-09-26	「少女」の化粧 －近代および現代の美容教育からの一考察－	化粧文化研究	立命館大学大学院先端総合学術研究科 修士相当 小 出 治都子
J-09-27	高齢者の終末期および死後における整容・美容ケアの標準化	高齢者終末期ケア 医学教育 高齢者のQOL	名古屋大学医学部附属病院卒後臨床研究・キャリア形成支援センター 特任助教 平 川 仁 尚
J-09-28	「化粧品と現代化粧品観」、「身体加工と化粧」「化粧の消費と身体規範の転換－現代カイロの化粧をめぐる世代間の衝突」	中東研究 人類学 ジェンダー論	お茶の水女子大学大学院人間文化研究科 大学院博士後期課程学生 鳥 山 純 子
J-09-29	「台湾と日本の化粧文化の比較研究－日常生活の実践を中心に」	文化人類学 化粧文化学	都留文科大学 准教授 山 本 芳 美
J-09-30	化粧がもつ自尊心昂揚効果に関する発達脳科学的研究	認知神経科学 実験心理学 社会心理学 大脳生理学	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 助教 土 居 裕 和
H-09-01	新規近赤外蛍光プローブの開発による光イメージング技術研究	Washington University School of Medicine 受入責任者 東京大学大学院 薬学系研究科 教授	Samuel Achilefu 長 野 哲 雄
H-09-02	皮膚の創傷治癒と線維化進展機序に関する研究	University of Turku Department of Dermatology 受入責任者 東海大学医学部基盤診療学系 教授	Veli-Matti Kähäri 稲 垣 豊

役 員

平成 22 年 3 月 31 日現在

理事長	小林禮次郎	(株)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	(株)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	(株)コーセー代表取締役会長
	新村 嘉也	高砂香料工業(株)取締役相談役
	高橋 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	(株)コーセー常務取締役
	上野 芳夫	元東京理科大学薬学部教授
	緒方 宏泰	明治薬科大学教授
	北原 文雄	東京理科大学名誉教授
	近藤 保	東京理科大学名誉教授
	齊藤 勲	(財)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
	宮崎 榮三	東京工業大学名誉教授
	山崎 幹夫	新潟薬科大学学長

(専務理事以外は全員非常勤)

*本財団についてのお問い合わせは下記に
お願いいたします。

財団法人 コスメトロジー研究振興財団

〒104-0032 東京都中央区八丁堀三丁目11番8号
ニチト八丁堀ビル五階
電話 03 (3206) 7721

コスメトロジー研究報告 Vol.18/2010

非売品

2010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三丁目11番8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