ごあいさつ

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

この度コスメトロジー研究振興財団として、19 冊目の研究報告書を刊行いたしました。当財団は昨年度にて活動 20 年の節目を迎えました。化粧品を取り巻く環境の変化の中で、コスメトロジーへの貢献を継続し、助成活動を滞りなく行ってこられましたことは、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す。

20 年間の研究助成は 422 件を数えることとなりますが、医学、化学、薬学、生理学、心理学、文学、社会学など多くの領域にわたる研究者の方々のお力添えにより、コスメトロジーという分野が発展してきたといっても過言ではありません。助成させていただいた研究テーマは、先端技術研究から健康医学への応用、化粧品の有用性や本質へのアプローチなど多岐にわたり、多様なかたちで社会への貢献ができたと考えております。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 20 ～ 21 年度に助成を受けられた方の中から 24 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、物性に関する分野では製剤設計や生体へのデリバリーに注目した研究が多く、有用性を捉える上で重要な研究であったと考えております。生体作用、安全性に関する分野のそれぞれの研究テーマは角層研究、抗老化研究、再生医療など多岐な領域にわたっており、皮膚を中心とした生体へのアプローチとして非常に水準の高い内容であったと思われます。精神、文化に関する分野の研究につきましては社会生活や QOL の観点から、化粧品の役割を考えてゆくのに示唆的な内容であったと感じております。

全ての研究テーマに共通している点は、化粧品に関わるあらゆる人々につながるテーマであることであり、当財団は分野の枠や研究機関の属性など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行きたいと考えております。

また、海外研究者の招聘並び研究者の海外派遣を主とする国際交流についても 38 件に助成することが出来、この分野でも財団が些かなりとも貢献できたことは喜ばしいことと存じます。

今後とも、皆さまのますますのご協力とご支援をお願い申し上げます。

設立20周年に際して

厚生労働省医薬食品局
審査管理課長
成 田　晶 稔

財団法人コスメトロジー研究振興財団が設立20周年を迎えられ、心よりお祝い申し上げます。

健康で長生きしたいという願いは万人に共通するものであり、その中で、より美しくありたいという願いも、また共通のもので、人が生涯に渡り潤いのある充実した生活を送るために、化粧品の果たす役割は大変大きいものです。

その一方で、その安全性や品質に関しても国民の関心は非常に高いものです。国民の皆さまの安全・安心の確保に当たっては、化粧品、医薬部外品、そして配合される成分の品質・安全性の確保し、適切に使用いただくことが重要であると考えております。

また、最近では先端科学技術を用いた化粧品の研究が急速に進んでいるなど、化粧品の分野におきましても新しい技術の開発・応用がますます進められております。医薬行政を取り巻く環境についても、科学技術の進歩、規制の国際調和の進展などに代表されるように大きく変化しております。厚生労働省といたしましては、こうした変化に迅速に、かつ、科学技術の根拠に基づいて適切に対応をしつつ、化粧品等の施策の推進に取り組んでいるところです。

このような中、貴財団におかれましては、コスメトロジーに関する調査研究及びその助成を行うことにより、広く国民の保健衛生の向上を図り、美しく豊かな人間生活の実現に寄与することを目的に1990年に設立されて以来、20年が経過し、この間、400題以上の研究課題に助成が行われてきたとうかがっております。

昨今の厳しい経済状況下にも拘わらず、毎年着実に研究助成を続けてこられた財団関係者のたゆまぬご努力に対し、深く敬意を表するところでございます。

これまで、助成されてきました研究課題は、素材・物性に関する分野、生体作用・安全性に関する分野、精神・文化に関する分野、それぞれの分野においてコスメトロジーの進歩・発展に寄与する独創的な研究が行われており、このような科学的な研究が化粧品分野で推進されていることに、厚生労働省といたしましても、他に例を見ない研究助成制度であると高く評価しているところです。

今後とも、貴財団が益々発展され、化粧品分野の研究が進み、美しく、豊かな生活の実現に寄与していただくことを祈念いたしまして祝辞とさせていただきます。

財団の 20 年に想う

財団理事
早稲田大学名誉教授
宇 佐 美　昭 次

当財団は平成 2 年（1990 年）小林孝三郎氏が私財を拠出して設立、昨年 20 周年を迎えている。同氏は戦後間もない昭和 21 年（1946 年）今日の株式会社コーセーの前身を創業、社業の順調な発展に伴い、社会還元の一つとして当財団を設立されたのである。経営者としての強い信念と共に謙虚なお心も常に示された。設立時は既に 90 歳半ばに近い高齢であられたが、理事長として自ら研究助成金贈呈式に出席されていた。挨拶での財団の主旨を“感謝のしるし”とし、受領者一人ひとりにやさしい温かなまなざしを向けられていたお姿が今でも眼底深く焼き付いている。

平成 7 年（1995 年）現理事長小林禮次郎氏に引き継がれ、財務基盤の強化と財団活動の更なる拡大に努められた。同氏は誠実な経営者であり、応用化学を専攻された技術者でもある。多くの財団が助成対象機関を限定する中で完全な公募制をとり、この分野の研究領域の複雑化に対応するため分野別にその課題を明示して広く厳正な審査を可能にする現在の要領を完成させている。10 年ほど前のことであったが、助成金贈呈式での挨拶でご自身の国際的会合での講演として、コスメトロジー研究の方向性はただ美しさだけでなく、これからは薬理学的内容を付与した商品の開発が求められると述べている。今日その予測は現実のものとなっている。

ところでこの 20 年ほど国の教育指針がめまぐるしく変わったことはない。いわゆる“ゆとり教育”の結果として大学をはじめとする研究機関はその世代の学生の対応に腐心されているのではないだろうか。私事ではあるが前職を離れて 10 年近くなっている。会合の折に現職の先生方から今の院生世代から研究に対する意識が大きく変化していると悲鳴にも聞こえる話を耳にすることが多い。現実には当財団の研究助成を受けられている先生方が研究室で直面している課題ともなっているのではないだろか、研究社会で許されるのは、失敗を恐れない、綿密な計画のもとに行われる研究に対する大胆な挑戦であると思う。厚かましいお願いであるが、先生方の研究指導姿勢を通じて“脱ゆとり”教育へと正して欲しいと願っている。

新公益法人制度改革に伴って当財団も現在内閣府に対し公益財団法人への移行認定を申請中です。この 20 年という節目をコスメトロジー振興財団の更なる飛躍の年ととらえたいと願っている。

二十周年を迎えて思うこと

財団元評議員・選考委員長
東京理科大学名誉教授
北 原　文 雄

コスメトロジー研究振興財団が設立二十周年を迎えたことは誠に喜ばしいことで、心から祝福申し上げたい。

さて、コスメトロジーの意味する分野は科学、文化の多方面にわたっており、日本語の「化粧品学」ではカバーしきれない意義をもっているとわたくしは思う。以下述べることはそのようなことに関連している。

当財団の主要な業務は学術研究への助成である。広い学術範囲からの多くの申請に対して、専門家の厳正な審査を経て受賞者が決められている。対象としている分野は化粧について、(一)、素材・物性に関する分野、(二)、生体作用・安全性に関する分野、(三)、精神・文化に関する分野の三つである。第三の分野は大変ユニークであるが、化粧品にとって大事なソフト面である。こういう面に着目していることは当財団の特徴の一つである。

第一、第二の分野は、化学、薬学、医学に関する分野であるが、最近第一、第二の境界に関する研究、両者にまたがる研究が増していると聞く。本来学問に境界はない。研究が多岐にわたるのは当然である。それを捉えようとしているところにコスメトロジーの意義があり、そこに学問の発展の芽があるといえるであろう。

コスメトロジーが多岐にわたっており、当財団がそれを捉えようとしている点を具体的にみてみよう。申請者、受賞者の研究分野には、第一分野の例をとってみると次のようなものがある。界面・コロイド化学、高分子化学、有機合成化学、天然物化学など化学分野の他に、分子生物学、タンパク質化学、生物化学工学、材料工学、食品工学など生物、工学分野にも及んでいる。広い学問分野の研究者がコスメトロジーに注目しているということがわかる。

もう少し具体的な例について述べさせていただく。界面・コロイド化学は多くの化粧品の製造・品質保持に不可欠の分野であり、この分野で何人かの人たちが受賞されてきた。これらの方はこの分野でその研究が評価されている人達である。

しかし、最近では界面・コロイド化学関係のしかるべき研究者が応募しても、なかなか受賞に至らないという話である。これはコスメトロジー乃至は当財団が広く多分野に知れわたり、多方面の研究者が応募してくるようになったのも一因と思われる。

コスメトロジー研究振興財団の存在が多方面の学問分野に広く知れわたってきて、多くの研究者の活動に刺激を与えていることは喜ばしい。

当財団が次の三十周年に向かって着実にその歩みを進めていくことを願って止まない次第である。

設立 20 周年記念特別講演

筑波大学名誉教授、日本学士院会員、2000 年ノーベル化学賞受賞

白 川　英 樹　先生

導電性高分子の発見とセレンディピティー

～ポリアセチレン研究の 34 年を振り返って～

（講演概要）

コスメトロジー研究振興財団 20 周年記念講演特別講演として講師に白川先生をお迎えし、御講演いただきました。

白川先生は「電気を通すプラスチックの発見は、『有機物は電気を通さない絶縁体』という常識を覆す画期的で独創的な研究成果である。」として 2000 年にノーベル化学賞を受賞されました。先生は「ノーベル化学賞をいただけたことは、個人的にはもちろんのこと、導電性高分子という物質を広く世間に知らせたという点で大変幸いであった。」と当時の様子を述べられております。

本講演では、「導電性高分子に関する研究を以下に展開したかという研究論よりは、むしろ、大学院を終えて助手として大学に奉職して以来、退職するまでの 34 年に及ぶ研究生活を通して体験した学際交流の大切さとセレンディピティーなどの研究の背景」を主題としていただきました。

以上の主題に基づき、導電性高分子の研究、ノーベルシンポジウムでの受賞講演、ノーベル賞授賞式での出来事、「セレンディピティーと三人の王子」のエピソードを通じた海外研究者との連携についてお考えを述べていただきました。また研究テーマであるポリアセチレン合成研究を通じ、研究開発に大切なこととして、童心や好奇心を持つこと、心構えとしての、よく考え、記録し、調べ、考えることなど、研究に取り組むのに基本的な姿勢を示唆したいただきました。

最後に学際領域の融合、知の創造と活用、国際化と産学連携など、化粧品産業に携わる者への将来へ向けた課題を挙げていただきました。

（主な略歴）

1994 年 4 月	
～ 1997 年 3 月	筑波大学第三学群長
2000 年 4 月	筑波大学名誉教授
2000 年 5 月	高分子科学功績賞受賞
2000 年11月	文化勲章受章、文化功労者顕彰
2000 年12月	ノーベル化学賞受賞
2001 年	日本化学会特別顕彰
2001 年12月	日本学士院会員（第２部第５文科）

（主な著書）

『合成金属―ポリアセチレンからグラファイトまで』（化学増刊 87 1980）
『現代の錬金術―電気を通すプラスチック』（イリューム第２巻２号 1990）
『化学に魅せられて』（岩波新書 2001）
『私の歩んだ道』（朝日選書 2001）
『何を学ぶか　作家の信条、科学者の思い』（読売新聞社 2004）

目　次

ごあいさつ　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
設立 20 周年に際して　厚生労働省医薬食品局審査管理課長　成 田　晶 稔
財団の 20 年に想う　財団理事　早稲田大学名誉教授　宇佐美　昭次
二十周年を迎えて思うこと　厚生労働省医薬食品局審査管理課長　北 原　文 雄
設立 20 周年記念特別講演　『導電性高分子の発見とセレンディピティー　～ポリアセチレン研究の 34 年を振り返って』
筑波大学名誉教授、日本学士院会員、2000 年ノーベル賞受賞　白 川　英 樹

■研究助成のあゆみ

コスメトロジー研究助成の概要 …… 3
研究助成を受けられた研究機関 …… 4
研究助成・20 年のあゆみ …… 7

■研究報告

Ⅰ．素材、物性に関する分野

・マイクロエマルションを利用したポリフェノールの皮膚へのデリバリーと光老化防御 …… 26
神戸薬科大学　北 河　修 治

・皮膚組織再生を目的とした生体組織類似コラーゲン組織体の作製 …… 31
東京医科歯科大学生体材料工学研究所　南　　広　祐

・紫外線遮蔽剤用単分散板状酸化セリウムマイクロ粒子の合成及びその形態に由来する付加機能性の実現 … 39
東北大学多元物質科学研究所　殷　　澍

・化細胞外マトリックス分解性微生物酵素を用いた動物原料から
コスメトロジー素材への実用的アプローチ …… 46
京都府立大学大学院生命環境科学研究科　渡 部　邦 彦

・物質保持能を制御できるコラーゲン擬似分子の作製 …… 52
大阪府立大学 21 世紀科学研究機構ナノ科学・材料研究センター　児 島　千 恵

・酵母由来の機能性糖脂質（バイオサーファクタント）の構造及び機能の拡充に関する研究 …… 58
独立行政法人産業技術総合研究所環境化学技術研究部門　福 岡　徳 馬

・アスコルビン酸誘導体を用いた新規薬物含有ナノ微粒子製剤の開発 …… 63
千葉大学大学院薬学研究院製剤工学研究室　森 部 久仁一

・コエンザイム Q10（Co10）の美肌、抗老化作用におけるミトコンドリア移行の意義 …… 66
同志社大学生命科学部　斎 藤　芳 郎

・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 …… 70
東京都市大学工学部エネルギー化学科　黒　岩　　崇

・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 …… 74
徳島大学大学院ソシオ・アーツ・アンド・サイエンス研究部　増 田　俊 哉

・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 …… 79
静岡大学工学部　河 野　芳 海

Ⅱ．生体作用、安全性に関する分野

・形成外科領域における間葉系幹細胞移植を用いた瘢痕形成抑制の実現ならびに問題点の抽出と改善 … 86
独立行政法人国立成育医療研究センター　生殖・細胞医療研究部　梅 澤　明 弘

・ビタミンＣを合成できない毛のないSMP30/GNL遺伝子破壊ヘアレスマウスを用いた
皮膚におけるビタミンＣの美白、抗しわ高価の科学的実証 …… 89
東邦大学薬学部生化学　石 神　昭 人

・cAMPシグナルを標的にしたヒアルロン酸産生制御メカニズムの研究 …… 91
横浜市立大学医学部　石 川　義 弘

・放射線・紫外線適応マーカーを指標とした老化制御因子スクリーニング法の開発 …… 96
東京都健康長寿医療センター研究所医療分子機構研究チーム　三 浦　ゆ り

・神経ペプチドおよびストレスによる皮膚バリア機能障害のメカニズム解析 …… 100
大分大学医学部皮膚科学　片 桐　一 元

・タンパク質分解酵素を応用した新しい皮膚代謝促進治療薬の開発 …… 103
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻　生命医科学講座　筑 波　隆 幸

・ヒトはいかにして化粧品にかぶれるのか
一次刺激性皮膚炎を伴わない接触皮膚炎モデルの作成 …… 108
東北大学大学院医学系研究科皮膚科学講座　相 場　節 也

・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 …… 117
金沢大学医薬保健研究域薬学系遺伝情報制御学研究室　山 下　克 美

・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 …… 122
国立成育医療研究センター研究所　周産期病態研究部　秦　　健一郎

Ⅲ．精神、文化に関する分野

・顔の魅力と人物の印象の相互作用メカニズムに関する認知神経科学的研究 …… 126
東北大学加齢医学研究所脳機能開発研究分野　月 浦　　崇

・身体加工と化粧に関する、日本及び英語圏における文化表象の分析 …… 131
お茶の水女子大学大学院博士後期課程　英　　美由紀

・白斑に対するメイクアップケア外来は白斑患者のQOLを改善する …… 134
京都大学大学院医学研究科皮膚科学　谷 岡　未 樹

・高齢者のエンゼルケアの標準化と教育コンテンツの開発 …… 137
名古屋大学医学部附属病院卒後臨床研修・キャリア形成支援センター　平 川　仁 尚

■コスメトロジー研究雑感 …… 149

■付　録

平成22年度事業報告 …… 163

役員一覧 …… 165

研究助成のあゆみ

コスメトロジー研究助成の概要
研究助成を受けられた研究機関
研究助成・20年のあゆみ

コスメトロジー研究助成の概要

《設立》

1990 年 7 月 5 日付厚生省認可に基づき設立

《基本財産》

信託銀行信託金等　10 億円
コーセー株式　　1,279,655 株

《事業》

⑴ 美しく豊かな人間生活を実現するためのコスメトロジーの理論的体系化に関する調査研究及びその助成
⑵ 皮膚の生理機能や老化機構の解明、美容に役立つ素材の研究等コスメトロジーに関連した生命科学その他の調査研究に対する助成
⑶ ⑴ 及び ⑵ に掲げる調査研究に関する国際交流の助成及びシンポジウムの開催
⑷ コスメトロジーに関する各種資料の収集及び普及
⑸ その他財団の目的を達成するために必要な事業

《事業実績》

		研究助成実績							功労表象		海外交流助成		交付金
		応募数	分野1	分野2	分野3	合計	採択率	助成総額	件数	金額	件数	金額	総額
第１回	平成２年３月	18	5	10	1	16	88.9%	32,000,000	3	3,000,000	2	1,000,000	36,000,000
第２回	平成３年11月	38	7	12	3	22	57.9%	44,000,000	3	3,000,000	4	2,000,000	49,000,000
第３回	平成４年11月	36	3	8	2	13	36.1%	24,000,000	2	2,000,000	5	2,497,446	28,497,446
第４回	平成５年11月	49	5	8	2	15	30.6%	24,000,000			3	1,300,000	25,300,000
第５回	平成６年11月	66	7	8	2	17	25.8%	28,000,000	1	1,000,000	1	500,000	29,500,000
第６回	平成７年11月	84	5	9	2	16	19.0%	26,000,000	1	1,000,000	1	500,000	27,500,000
第７回	平成８年11月	95	6	7	2	15	15.8%	25,000,000			3	1,350,000	26,350,000
第８回	平成９年11月	83	5	12	2	19	22.9%	26,000,000			3	1,500,000	27,500,000
第９回	平成10年11月	84	7	11	2	20	23.8%	25,000,000			2	1,000,000	26,000,000
第10回	平成11年11月	69	5	11	1	17	24.6%	20,000,000			2	1,000,000	21,000,000
第11回	平成12年11月	70	7	8	2	17	24.3%	17,500,000					17,500,000
第12回	平成13年11月	72	6	9	6	21	29.2%	18,000,000			3	1,000,000	19,000,000
第13回	平成14年11月	87	8	8	3	19	21.8%	18,000,000			1	400,000	18,400,000
第14回	平成15年11月	84	6	10	4	20	23.8%	18,000,000			1	300,000	18,300,000
第15回	平成16年11月	107	8	11	3	22	20.6%	19,000,000			1	500,000	19,500,000
第16回	平成17年11月	103	6	10	4	20	19.4%	19,000,000			1	500,000	19,500,000
第17回	平成18年11月	88	8	10	5	23	26.1%	20,000,000			1	500,000	20,500,000
第18回	平成19年11月	86	8	10	5	23	26.7%	22,000,000			1	500,000	22,500,000
第19回	平成20年11月	120	10	12	6	28	23.3%	25,000,000			1	500,000	25,500,000
第20回	平成21年11月	83	12	13	5	30	36.1%	27,000,000			2	1,000,000	28,000,000
第21回	平成22年11月	101	9	15	5	29	28.7%	27,000,000					27,000,000
	小　計	1,623	143	212	67	422	26.0%	504,500,000	10	10,000,000	38	17,847,446	532,347,446

研究助成を受けられた研究機関

●国立大学

研究機関	計
秋田大学大学院医学系研究科（医学部）	3
旭川医科大学	1
愛媛大学大学院理工学研究科	1
愛媛大学上級研究員センター	1
大分大学医学部	4
大阪大学大学院医学研究科（医学部）	10
大阪大学免疫学フロンティア研究センター	1
大阪大学大学院薬学研究科	4
大阪大学大学院工学研究科	5
大阪大学大学院基礎工学研究科	2
大阪大学大学院言語文化研究科	1
大阪大学大学院歯学研究科（歯学部）	3
大阪大学歯学部附属病院	1
大阪大学保健センター	1
大阪教育大学教育学部	2
お茶の水女子大学大学院人間文化研究科	3
お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科	1
岡山大学薬学部	2
岡山大学大学院医歯学総合研究所	1
岡山大学大学院社会文化科学研究科	1
岡山大学大学院自然科学科学研究科	1
金沢大学大学院医学系研究科（医学部）	4
金沢大学医薬保健研究域薬学系（薬学部）	2
金沢大学文学部	1
金沢大学大学院自然科学研究科	1
京都大学大学院薬学研究科（薬学部）	6
京都大学工学部	2
京都大学大学院農学研究科	1
京都大学大学院医学研究科（医学部）	8
京都大学ウイルス研究所	1
京都大学教育学部	1
京都大学化学研究所	1
京都大学原子炉実験所	1
京都工芸繊維大学繊維学部	1
京都工芸繊維大学工芸学部	1
九州大学理学部	5
九州大学大学院薬学研究院（薬学部）	4
九州大学農学部	1
九州大学有機化学基礎研究センター	1
九州大学大学院システム情報科学研究科	1
九州大学大学院工学研究院 (工学部）	2
九州大学大学院理学研究院	1
九州大学大学院農学研究院	2
岐阜大学大学院医学研究科（医学部）	2
熊本大学大学院医学薬学研究部（医学部）	3
熊本大学大学院生命科学研究部	1
熊本大学医学部附属遺伝発生医学研究施設	1
群馬大学医学部	3
群馬大学生体調節研究所	2
群馬大学大学院工学研究科	1
神戸大学医学部附属病院	1
神戸大学大学院医学系研究科	3

研究機関	計
高知大学農学部	1
静岡大学工学部	1
島根大学医学部	1
信州大学繊維学部	1
千葉大学大学院薬学研究院（薬学部）	6
千葉大学大学院医学研究科（医学部）	2
千葉大学理学部	1
千葉大学工学部	1
筑波大学化学系	1
筑波大学社会工学系	1
筑波大学応用生物化学系	2
筑波大学大学院人間総合科学研究科	1
筑波大学大学院数理物質科学研究科	1
筑波大学大学院生命環境科学研究科	1
東京大学大学院情報理工学系研究科	1
東京大学医科学研究所	3
東京大学先端科学技術研究センター	2
東京大学大学院医学系研究科（医学部）	2
東京大学医学部附属病院	1
東京大学大学院薬学系研究科（薬学部）	8
東京大学大学院新領域創成科学研究科	1
東京大学工学部	1
東京大学理学部	1
東京大学生産技術研究所	1
東京大学分子細胞生物学研究所	1
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科（医学部）	4
東京医科歯科大学医用器材研究所	1
東京医科歯科大学難治疾患研究所	3
東京医科歯科大学生体材料工学研究所	3
東京学芸大学教育学部	1
東京工業大学生命理工学部	6
東京工業大学大学院理工学研究科（理学部・工学部）	6
東京工業大学精密工学研究所	1
東北大学大学院医学研究科（医学部）	9
東北大学加齢医学研究所	1
東北大学理学部	1
東北大学大学院薬学研究科（薬学部）	7
東北大学大学院文学研究科	2
東北大学大学院生命科学研究科	1
東北大学大学院工学研究科	1
東北大学大学院国際文化研究科	1
東北大学反応化学研究所	1
東北大学多元物質科学研究所	2
徳島大学大学院Ｓ・Ａ＆Ｓ研究部	1
富山大学大学院医学薬学研究部	1
長崎大学大学院医歯薬学総合研　究科（薬学部）	4
長崎大学医学部附属病院	1
長崎大学先導生命科学研究支援センター	1
名古屋大学医学部附属病院分院	1
名古屋大学医学部	1
名古屋大学医学部附属病院	1
名古屋大学大学院医学系研究科	1

研究機関	計
名古屋大学理学部	1
名古屋大学大学院環境学研究科	1
名古屋大学大学院教育発達科学研究科	1
名古屋大学大学院生命農学研究科	3
新潟大学医学部	4
新潟大学工学部	2
浜松医科大学医学部	4
弘前大学医学部附属病院	1
弘前大学大学院理工学研究科	1
広島大学医学部	2
広島大学大学院理学研究科（理学部）	3
広島大学大学院生物圏科学研究科	1

研究機関	計
広島大学原爆放射能医学研究所	1
福島大学教育学部	1
福島大学保健管理センター	2
北海道大学大学院医学研究科（医学部）	2
北海道大学医学部附属病院	2
北海道大学大学院薬学研究科（薬学部）	3
北海道教育大学教育学部	1
宮崎大学教育文化学部	1
山形大学医学部	1
山形大学大学院理工学研究所	1
山口大学工学部	2
横浜国立大学工学部	1

●公立大学校、工業高等専門学校

研究機関	計
水産大学校	1
防衛医科大学校	3
国立木更津工業高等専門学校	2

●都道府県立大学

研究機関	計
大阪府立大学先端科学研究所	1
大阪府立大学大学院理学系研究科	1
大阪府立大学大学院工学系研究科	1
岡山県立大学保健福祉学部	1
岐阜薬科大学	1
京都府立医科大学大学院医学研究科（医学部）	4
京都府立医科大学大学院生命環境科学研究科	1
埼玉県立衛生短期大学	1
静岡県立大学薬学部	2

研究機関	計
静岡県立大学経営情報学部	1
首都大学東京大学院理工学研究科	1
都留文科大学比較文化学科	1
名古屋市立大学大学院医学研究科	1
名古屋市立大学大学院薬学研究科	1
奈良県立医科大学	3
広島県立大学大学院生物生産システム研究科	1
横浜市立大学大学院医学研究科（医学部）	2
和歌山県立医科大学	1

●私立大学

研究機関	計
愛知学院大学薬学部	1
岡山理科大学理学部	1
大阪薬科大学薬学部	1
神奈川歯科大学歯学部	1
関西学院大学理学部	3
慶応義塾大学医学部	7
慶応義塾大学理工学部	2
北里大学医学部	1
北里大学薬学部	1
北里大学看護学部	1
九州共立大学工学部	1
近畿大学薬学部	1
近畿大学工学部	2
久留米大学医学部	1
神戸芸術工科大学	1
神戸薬科大学	1
神戸松蔭女子学院大学文学部	1
自治医科大学	1
昭和大学薬学部	2

研究機関	計
昭和大学医学部	1
昭和薬科大学薬学部	1
城西大学薬学部	2
聖マリアンナ医科大学	3
摂南大学薬学部	1
仙台大学体育学部	1
千歳科学技術大学	2
千葉科学大学薬学部	1
帝京大学医学部	1
帝京大学医学部市原病院	1
東海大学医学部	1
東京都市大学工学部	1
東京女子医科大学附属女性生涯健康センター	1
東京女子医科大学東医療センター	2
東京電機大学工学部	1
東京理科大学理工学部	2
東京理科大学理学部	2
東京理科大学薬学部	1
東京理科大学生命科学研究所	2

研究機関	計
東京理科大学基礎工学部	2
東京理科大学総合研究所	1
東京薬科大学薬学部	4
東京薬科大学生命科学部	1
東邦大学理学部	1
東邦大学薬学部	1
独協医科大学	1
同志社大学文学部	2
同志社大学生命医科学部	1
奈良女子大学生活環境学部	2
奈良女子大学大学院人間文化研究科	1
奈良先端科学技術大学院大学	1
新潟薬科大学薬学部	1
日本大学芸術学部	1
福岡大学人文学部	1

研究機関	計
藤田保健衛生大学医学部	1
北海道医療大学薬学部	1
北星学園大学文学部	1
星薬科大学	3
武庫川女子大学大学院家政学研究科	1
明治大学理工学部	1
明治薬科大学	1
明星大学理工学部	2
立教大学文学部	1
立命館大学大学院先端総合学術研究科	1
早稲田大学人間科学部	3
早稲田大学理工学術院（理工学部）	7
早稲田大学人間総合研究センター	1
産業医科大学	2

●専門研究機関

研究機関	計
放射線医学総合研究所	2
国立医薬品食品研究所	2
国立公衆衛生院労働衛生学部	1
国立成育医療センター研究所	2
産業技術総合研究所	3
産業技術総合研究所四国センター	1
岐阜県国際バイオ研究所	1
物質・材料研究機構	1

研究機関	計
東京都老人総合研究所	2
東京都臨床医学総合研究所	1
食品薬品安全センター秦野研究所	1
理化学研究所	5
相模中央化学研究所	1
山口労災病院	1
分子科学研究所	1

●件数の合計：422 件

研究助成・20年のあゆみ

●第1回（平成3年3月）

No	研究課題	代表研究者	
1	染毛剤成分の代謝に関する研究	食品薬品安全センター秦野研究所	中尾美津男
2	ドレイズ試験代替法の開発 －ヒト細胞、昆虫細胞を用いた高感度迅速試験法の開発研究－	理化学研究所	副主任研究員 大野　忠夫
3	リン脂質膜の表面修飾と分子集合体としての機能発現に関する研究	筑波大学化学系	助教授 古澤　邦夫
4	化粧が意識性に及ぼす効果の研究	早稲田大学人間科学部	教授 春木　　豊
5	胆汁酸生合成のメカニズムに関する研究	東京工業大学理学部	助教授 藤本　善徳
6	ヒアルロン酸で表面を修飾したリポソームからの内容物の温度による放出制御	東京理科大学薬学部	助手 牧野　公子
7	皮膚DDSとしての高分子脂質リポソームの基礎研究	早稲田大学理工学部	教授 西出　宏之
8	皮膚の老化に伴うエラスチン遺伝子発現の動態	慶應義塾大学医学部	講師 多島　新吾
9	Werner症候群患者皮膚由来培養線維芽細胞のサイトカイン細胞成長因子に対する応答性	横浜市立大学医学部	助手 佐々木哲雄
10	光化学反応によるフリーラジカルの産生と表皮培養細胞に対する影響	東京大学医科学研究所	教授 金ケ崎士朗
11	色素性皮膚病変に対するレーザー療法の研究	帝京大学医学部	助教授 渡辺　晋一
12	表皮糖脂質の生化学的、形態学的並びに臨床的研究（エピデルモシド）	山口労災病院	皮膚科部長 浜中すみ子
13	生体の酸化的障害に対する防御機構の生化学的研究 －ビタミンEの活性発現機構の解析－	東京大学薬学部	助手 新井　洋由
14	皮膚生理機能賦活物質の経皮吸収に対する評価解析理論の確立	京都大学薬学部	教授 瀬崎　　仁
15	皮膚への作用性を有する各種糖脂質の合成	千葉大学薬学部	助教授 中川　昌子
16	新製剤法及び新素材を用いた化粧品の品質確保に関する研究	国立衛生試験所環境衛生化学部	部長 武田　明治

●第2回（平成3年11月）

No	研究課題	代表研究者	
17	培養表皮細胞及び線維芽細胞におけるグリコサミノグリカン及びコラーゲンの代謝	東京薬科大学	教授 森　　陽
18	生体適合性逆型ベシクルの生成、安定化と応用に関する研究	横浜国立大学工学部	助教授 国枝　博信
19	活性酸素、フリーラジカルによる生体膜障害の防止に関する研究	東京大学先端科学技術研究センター	教授 二木　鋭雄
20	パッチテスト結果のコンピューター処理システムの開発	名古屋大学医学部附属病院分院	皮膚科長 早川　律子
21	新しいＤＤＳ剤型としての高分子ミセルの設計と機能開発	東京理科大学生命科学研究所	助教授 片岡　一則
22	化粧品素材としての利用が可能な乳酸菌の新規育種技術の開発	早稲田大学理工学部	専任講師 桐村光太郎
23	皮膚過敏症に対するマスト細胞の役割－マスト細胞欠損動物を用いた検定法の開発－	大阪大学医学部	教授 北村　幸彦
24	化粧品素材としての竹節人参並びに甘草の組織培養による物質生産並びに大量増殖に関する研究	広島大学医学部	助教授 神田　博史
25	マウス悪性黒色腫を用いたチロシナーゼ抑制因子の精製と応用	北里大学医学部	講師 亀山孝一郎
26	界面活性剤を含む溶液混合系の相挙動と濡れの挙動に関する研究	九州大学理学部	助教授 荒殿　　誠

27	超微粒子分散系の構造と物性及び自己制御コロイド系の開発	京都大学工学部	助手 松本　孝芳
28	接触光過敏症のマウスモデルを用いた化粧品による光アレルギーのスクリーニング及びサンスクリーンの効果の評価	浜松医科大学	教授 滝川　雅浩
29	香料に関する定量的解析	北海道大学薬学部	教授 栗原　堅三
30	メラニン生合成の調節	東北大学医学部	教授 柴原　茂樹
31	アルツハイマー型老年痴呆症者と、いわゆる”ぼけ”症状を呈する人々への化粧による情動活性化の研究	同志社大学文学部	教授 浜治　世子
32	ビタミンＣと上皮成長因子によるヒト皮膚線維芽細胞の増殖とコラーゲン代謝調節機構の分子細胞生物学的研究	東京医科歯科大学	助手 畑　隆一郎
33	人工皮膚を用いた皮膚の形成機構及び皮膚の反応性試験に関する研究	広島大学理学部	教授 吉里　勝利
34	サンスクリーンの紫外線性表皮障害に対する防御作用の免疫生物学的研究	京都大学医学部	講師 古川　福実
35	ダイレクトスキンセンサーを用いて測定した皮溝と加齢の関係	慶應義塾大学医学部	助手 本間　聡起
36	各種界面活性物質によるマクロ及びマイクロエマルションの調製並びに物性に関する物理化学的研究	東京理科大学理工学部	講師 阿部　正彦
37	「色白」の嗜好構造に関する一考察	早稲田大学 人間総合研究センター	斎藤　美穂
38	フリーラジカルとポルフィリン代謝に関連する皮膚の老化機構解明に関する研究	国立公衆衛生院 労働衛生学部	室長 市川　　勇

●第３回（平成４年11月）

No	研　究　課　題	代　表　研　究　者	
39	ヒトリゾチームタンパク質を高分泌する酵母突然変異体を用いた素材生産の効率化研究	広島大学理学部	助手 鈴木　克周
40	光熱変換分光法による薬物の組織及び細胞への非侵襲吸収計測法の開発	東京大学工学部	教授 澤田　嗣郎
41	化粧品の紫外線照射による光酸化メカニズムの研究	明星大学理工学部	教授 日高　久夫
42	水素添加大豆リン脂質を用いた油性ゲル及び水性ゲルの保湿作用に関する研究	昭和薬科大学薬学部	講師 藤井まき子
43	アスパラギン酸プロテアーゼ類の蛋白工学的機能改変によるケラチナーゼの開発	東京大学理学部	助手 井上　英史
44	神経ペプチドによる皮膚炎症反応の成立機序とその特異的制御	千葉大学医学部	助手 岩本　逸夫
45	皮膚の機能と脂質代謝に関する基礎的研究	新潟大学医学部	教授 小野　輝夫
46	転移因子を用いたアントシアニン色素生合成遺伝子とその発現調節因子遺伝子の解析	東京理科大学基礎工学部	教授 飯田　　滋
47	モノクローナル抗体を用いた紫外線誘発ＤＮＡ損傷の定量とメラニン色素のサンスクリーン効果の実験的証明	奈良県立医科大学	大学院生 小林　信彦
48	皮膚の老化における染色体構造の変化と遺伝子修復機構に関する研究	理化学研究所	主任研究員 花岡　文雄
49	アスコルビン酸２－グリコシドの生物学的有用性研究 －経皮吸収によるビタミンＣ活性発現の評価－	岡山大学薬学部	教授 山本　　格
50	病院看護における化粧に関する研究	埼玉県立衛生短期大学	教授 大河原千鶴子
51	高齢者のおしゃれ行動とその評価に関する研究	北海道教育大学教育学部	助教授 藤森　立男

●第4回(平成5年11月)

No	研究課題	代表研究者	
52	還元型ネオプテリン（NPH-4）の紫外線照射皮膚障害に対する効果	東京理科大学 生命科学研究所	講師 小島　周二
53	化粧品による光老化の抗酸化的制御に関する細胞生物学的及び生化学的研究	群馬大学医学部	教授 宮地　良樹
54	太陽光紫外線でヒトDNA中に誘発される損傷とその修復に関する研究	金沢大学薬学部	教授 二階堂　修
55	色彩の心理学的意味空間の研究	金沢大学文学部	助教授 岡本　安晴
56	細胞膜の脂質の物性と機能の基礎的な研究 －リン脂質物性のコスメトロジーへの応用－	東北大学理学部	教授 大木　和夫
57	化粧品基本素材金属酸化物の酸性大気汚染物質との相互作用	千葉大学理学部	教授 金子　克美
58	色素化合物の光照射下での反応の解析	東京工業大学 生命理工学部	教授 大倉　一郎
59	新規な構造を有するヒアルロン酸類似多糖の開発	東京工業大学 生命理工学部	助教授 畑中　研一
60	いわゆる“しみ”（肝斑など）の発症機構とその増悪因子に関する研究	東北大学医学部	講師 富田　靖
61	ペプチドシナージストによるビタミンEの抗酸化能の向上 －ヒト血清アルブミン由来のペプチドシナージストの開発－	水産大学校	講師 幡手　英雄
62	層状鉱物を用いたホスト－ゲスト反応による有機色素のカプセル化	早稲田大学理工学部	助教授 菅原　義之
63	化粧の個人的効果と対人的効果に関する実証的研究	福島大学教育学部	助教授 飛田　操
64	尋常性疱瘡の発症機序の解明のための皮膚の保湿機能と脂質代謝に関する研究	新潟大学医学部	助教授 山本　綾子
65	哺乳類皮膚細胞のアポトーシスと細胞接着をつかさどるセラミドの研究	九州大学理学部	助教授 野村　一也
66	不飽和脂肪酸とその過酸化生成物の皮膚角質層への作用に関する研究	大阪薬科大学薬学部	助教授 森本　一洋

●第5回(平成6年11月)

No	研究課題	代表研究者	
67	ハーダー腺の分泌するアルキルジアシルグリセロールの物性解明とその素材としての応用開発	東京大学医学部	教授 脊山　洋右
68	植物組織培養法を用いたクチナシ植物からの橙黄色色素Crocin及び青色色素イリドイド配糖体の生成に関する研究	東京理科大学総合研究所	助教授 生田安喜良
69	表皮ケラチノサイトにおけるヒト細胞老化因子の研究	大阪大学医学部	助教授 橋本　公二
70	植物培養細胞・組織による化粧品素材としての活性成分の生産と育種に関する研究	九州大学薬学部	教授 正山　征洋
71	化粧と痴呆老人に関する基礎的研究	産業医科大学	名誉教授 松岡　成明
72	皮膚生理機能賦活物質の合理的吸収促進法の開発	京都大学薬学部	教授 橋田　充
73	遺伝子工学的手法を用いた必須脂肪酸γ－リノレン酸の高等植物における多量生産	九州大学理学部	助教授 射場　厚
74	リポソーム封入薬剤の皮膚吸収過程の解析と皮膚内ラジカル消去への応用	九州大学薬学部	教授 内海　英雄
75	表皮細胞の細胞接着と角化制御に関するシグナル伝達	岐阜大学医学部	教授 北島　康雄
76	遠赤外線の水の構造と物性に及ぼす影響及び遠赤水の保湿効果に関する研究	静岡県立大学薬学部	助教授 片山　誠二
77	微生物に由来する多糖分解酵素のコスメトロジーへの応用	東京工業大学 生命理工学部	助教授 中村　聡
78	皮膚発現型レチノイン酸受容体のドミナントネガティブ・トランスジェニックマウスを用いた皮膚の成熟過程の検討	京都大学医学部	助手 田中　俊宏

79	化粧が高温環境下の発汗反応及び選択的脳冷却機構に及ぼす影響	金沢大学医学部	助手 田辺　実
80	サンスクリーン剤の光ハプテンとしての性格	浜松医科大学医学部	講師 戸倉　新樹
81	対人魅力の形成にかかわる顔の構造的特徴と化粧行動の影響の研究	北星学園大学文学部	教授 大坊　郁夫
82	弾性線維蛋白質エラスチンの自己組織化集合体の、構造物性、機能に関する研究	九州大学理学部	助手 甲斐　原梢
83	バイオシグナル分子を固定化した細胞成長促進タンパク質ハイブリッド材料の合成	京都大学工学部	助手 伊藤　嘉浩

●第6回(平成7年11月)

No	研究課題	代表研究者	
84	材料表面－生体分子間相互作用の直接解析に基づく生体適合性の発現機構の解明	九州大学工学部	助教授 高原　淳
85	脂質皮膚モデルを利用した化粧品及び水の浸透と安全性に関する基礎的研究	東京工業大学工学部	助教授 谷岡　明彦
86	小分子化学物質によるアトピー性皮膚炎の発症と予防についての基礎研究	岐阜薬科大学	教授 永井　博弌
87	ヒト皮膚移植SCIDマウスを用いた新しいコスメトロジー研究	大阪大学医学部	教授 野村　大成
88	化粧皿を通じた古代ヘレニズム世界における化粧文化の研究	神戸芸術工科大学	助教授 服部　等作
89	生体膜構造をもつ高分子中の水の構造解析と生体反応の解明に関する研究	東京医科歯科大学 医用器材研究所	助教授 石原　一彦
90	オリゴ糖による皮膚の耐乾燥保護の分子メカニズムに関する基礎的研究	東京工業大学 生命理工学部	教授 井上　義夫
91	接触皮膚炎におけるマスト細胞活性化反応の解析	昭和大学薬学部	教授 工藤　一郎
92	放射線照射あるいは制癌剤投与による脱毛の抑制	星薬科大学	講師 太田　節子
93	両親媒性分子が構築する超分子の構造と機能性に関する研究	名古屋大学理学部	助教授 今栄東洋子
94	皮膚表皮細胞におけるリピドバイオファクターの機能発現機構	新潟大学医学部	助教授 藤井　博
95	光学活性化合物合成を目的とする新規不斉触媒及び新規不斉触媒サイクルの開発研究	早稲田大学理工学部	助教授 中田　雅久
96	炎症後色素沈着におけるエイコサノイドによるメラノサイト活性化機構の解明	京都大学医学部	助教授 井階　幸一
97	細胞内小器官ペルオキシソーム：エーテルリン脂質の生合成と酸素ラジカルスカベンジャー機能及び欠損症	九州大学理学部	教授 藤木　幸夫
98	化粧品の表示に関する研究 －ことに警告表現について－	筑波大学社会工学系	講師 吉川　肇子
99	多成分油性皮膚浸透促進システムの有効性及び作用機構に関する研究	城西大学薬学部	助教授 杉林　堅次

●第7回(平成8年11月)

No	研究課題	代表研究者	
100	化粧用生理活性物質の皮膚透過と皮内貯留性及びヒト皮膚と動物並びに培養皮膚との比較	近畿大学薬学部	教授 小木曽太郎
101	単分散無機顔料粒子のモルフォロジー制御とそのキャラクタリゼイション	大阪教育大学教育学部	助教授 神鳥　和彦
102	酸化ストレスにより生体膜に生成する酸化型リン脂質の代謝機構の解明	北里大学薬学部	教授 中川　靖一
103	化粧品の香り表現に関する研究	東京学芸大学教育学部	助教授 神宮　英夫
104	合成糖脂質の超分子集合体に関する研究	早稲田大学理工学部	助教授 武岡　真司

105	HGF による皮膚の再生促進と老化防止の基礎的研究	大阪大学医学部	助教授 松本　邦夫
106	高分子経皮吸収促進剤の開発と応用研究	相模中央化学研究所	主任研究員 長瀬　　裕
107	新発見の糊代を持ったタンパク質の基礎と応用（タンパク質接着能を有する化粧品素材の開発）	東京工業大学 生命理工学部	教授 広瀬　茂久
108	*in vitro* ヒト樹状細胞培養系を用いた化学物質の感作性試験の可能性についての基礎的検討	東北大学医学部	講師 相場　節也
109	ケラチノサイトの発現するエラスチンと皮膚老化の関連について	防衛医科大学校	助教授 多島　新吾
110	食用乳酸菌による化粧品素材としての機能性多糖の生産とその改質	新潟大学工学部	教授 谷口　正之
111	メラニン生合成阻害作用を示す海洋天然物の探索	北海道大学薬学部	教授 小林　淳一
112	高齢女性における情動活性化の試み：リハビリテーション・プログラムへの適用可能性の検討	同志社大学文学部	博士課程 伊波　和恵
113	免疫不全マウス再構成皮膚における培養毛乳頭細胞による毛包形成の誘導と関連因子の検討	聖マリアンナ医科大学	助教授 窪田　泰夫
114	細胞増殖因子および接着分子による皮膚硬化制御に関する分子生物学的研究	獨協医科大学	助教授 山蔭　明生

●第８回（平成９年 11 月）

No	研　究　課　題	代　表　研　究　者	
115	微粒子酸化チタン上に形成された多鎖型界面活性剤吸着層への紫外線吸収剤の吸着可溶化	東京理科大学理学部	教授 江角　邦男
116	新規な機能を有するコラーゲンの創製	東京工業大学 生命理工学部	助教授 斎藤　佑尚
117	脂質エマルション表面単分子膜とリポソーム表面２分子膜の示す顕著なバイオ機能の差異	京都大学大学院 薬学研究科	教授 半田　哲郎
118	男性ホルモンによる毛の発育制御機序の解析	大阪大学医学部	助教授 板見　　智
119	新規蛍光プローブを用いた一酸化窒素 (NO) の皮膚における作用解析	東京大学薬学部	助手 菊地　和也
120	生体計測工学に基づいた非侵襲的な皮膚の性状の測定法の開発	東北大学医学部	教授 田上　八朗
121	老化による皮膚色素沈着の画像定量自動解析システム確立のための基礎研究	慶応義塾大学医学部	専任講師 田中　　勝
122	接触過敏症の皮膚浸潤細胞に特異的に発現している遺伝子の解析	東邦大学理学部	教授 小林　芳郎
123	ノックアウトマウスをもちいた cell envelope のバリアー機能解析	京都府立医科大学医学部	講師 山西　清文
124	植物由来環状ペプチド類のチロシナーゼ阻害活性に関する研究	東京薬科大学薬学部	助教授 竹谷　孝一
125	紫外線吸収効果をもつ酸化チタンの光触媒作用と生体適合性	東京理科大学基礎工学部	助教授 鈴木　高広
126	日光老化について－とくに日光弾性線維症の発症機構ならびに UV^S 症候群の病態に関する研究－	熊本大学医学部	教授 小野　友道
127	眼粘膜への障害を指標とした化粧品素材の安全性評価のための基礎的検討ー眼内動態の定量的評価法の確立	長崎大学薬学部	教授 中村　純三
128	逆ミセルを用いた水の構造化とその機能性に関する研究	静岡県立大学 経営情報学部	助教授 五島　綾子
129	紫外線誘発 DNA 損傷および修復酵素の細胞内分布状態の三次元的表示	奈良県立医科大学	助教授 森　　俊雄
130	高齢者の被服行動の変容が、高齢者の自尊感情及び日常生活行動に与える影響	京都大学教育学部	助教授 吉川左紀子
131	皮膚器官培養系を用いた化学物質の刺激性、抗原性の検討	東京医科歯科大学医学部	助教授 横関　博雄
132	皮膚の老化に伴うテロメア短縮化とフリーラジカル障害に対する、細胞内アスコルビン酸のエンリッチング化による防御効果	広島県立大学大学院 生物生産システム研究科	教授 三羽信比古
133	健康な笑いづくりの方法について	福岡大学人文学部	教授 髙下　保幸

●第 9 回（平成 10 年 11 月）

No	研究課題	代表研究者	
134	紫外線ならびに放射線により皮膚で惹起されるラジカル反応の無侵襲測定と皮膚障害予防を目的とした抗酸化剤評価への応用	放射線医学総合研究所	総合研究官 小澤　俊彦
135	ヒト角層細胞の cell envelope の発生とその機能障害を来す病態の解析	慶応義塾大学医学部	助手 秋山　真志
136	古細菌由来のエーテル型リン脂質の物性と機能に関する基礎的な研究	東京工業大学大学院理工学研究科	助教授 江口　　正
137	微小透析法を用いた皮膚内の化粧品素材動態および生体成分動態の系統的解析法の確立	長崎大学医学部附属病院	助教授 佐々木　均
138	森林生物資源からの育毛活性化成分の探索	九州大学農学部	助教授 近藤隆一郎
139	動的光散乱法を用いた合成および天然高分子のゲル化機構の多面的解析	京都工芸繊維大学繊維学部	教授 柴山　充弘
140	接触性皮膚炎の研究：皮膚刺激とマクロファージ「細胞交通」の関与	静岡県立大学薬学部	教授 今井　康之
141	老化抑制遺伝子 klotho の結合織細胞老化における病態生理学的意義の解明と治療法開発への応用	群馬大学医学部	教授 永井　良三
142	サンスクリーンの皮膚悪性黒色腫発症予防効果の解析	名古屋大学医学部	助手 加藤　昌志
143	アスコルビン酸膜透過促進キャリアーの開発と機構探求	東北大学薬学部	講師 鈴木　　巌
144	表皮有棘細胞に特異的な遺伝子組み替えを用いた、ダメージスキンの修復機序の研究	京都大学大学院医学研究科	助手 高橋　健造
145	化粧品による皮膚かぶれを防ぐ菌類成分の探索	千葉大学薬学部	助教授 藤本　治宏
146	太陽光紫外線変異原性の作用スペクトラムとサンスクリーンの効果	岡山大学薬学部	助教授 根岸　友惠
147	ヒト毛細胞特異的ペプチジルアルギニンデイミナーゼの cDNA クローニングと毛髪新生における生理機能の解析	帝京大学医学部市原病院	助教授 川田　　暁
148	化粧とよそおいにおける非対称性 －アシンメトリー流行の可能性－	神戸松蔭女子学院大学文学部	教授 藤本　浩一
149	遺伝子の増殖を制御する人工の脂質膜の開発	九州大学有機化学基礎研究センター	助教授 石川　雄一
150	美白剤の紫外線色素沈着抑制機構とその安全性に関する研究	神戸大学医学部附属病院	講師 船坂　陽子
151	発光、電子分光スペクトルによる酸化亜鉛中の表面・欠陥の状態解析と発光特性制御	東京工業大学工学部	助手 大橋　直樹
152	含フッ素非対称置換トレハロース誘導体の合成と皮膚に対する保湿性と親和性の検討	北里大学看護学部	助教授 森島　直彦
153	空間演出における環境芳香の与える心理的影響に関する研究	早稲田大学人間科学部	助手 河合　隆史

●第 10 回（平成 11 年 11 月）

No	研究課題	代表研究者	
154	匂いの感性計測を行うセンサーシステムの開発	九州大学大学院システム情報科学研究科	教授 都甲　　潔
155	ヒト皮膚線維芽細胞における脂肪酸、コレステロール代謝調節機構	大阪大学大学院薬学研究科	助教授 佐藤隆一郎
156	高発現型メラニン色素産生遺伝子のコスメトロジーへの応用	広島大学医学部	教授 杉山　政則
157	新規化粧品素材としての植物由来クロロゲン酸代謝産物の配糖体合成と美白効果ならびに感作性の検討	近畿大学工学部	教授 野村　正人
158	ヒト脂腺細胞に代るハムスター脂腺細胞を用いた皮脂代謝に関する基盤的研究	東京薬科大学薬学部	講師 佐藤　　隆
159	分散安定性に優れたサーファクタントフリーエマルションの調製法の確立とその凝集・合一過程の解明	東京理科大学理工学部	教授 阿部　正彦
160	紫外線照射で生じる DNA 損傷部位に特異的に結合するタン白 DDBp48 の発現調節	熊本大学医学部附属遺伝発生医学研究施設	教授 山泉　　克
161	サイトカインノックアウトマウスにおける免疫反応とストレス応答を指標とする皮膚機能の解析	昭和大学薬学部	教授 吉田　武美

162	糖転移酵素の関与するメラニン産生制御の解析	大阪大学医学部	教授 谷口　直之
163	白血球分画が皮膚の健康状態と関連するメカニズム	新潟大学医学部	教授 安保　　徹
164	UVA による酸化的遺伝子損傷の細胞内修復機構	広島大学大学院理学研究科	教授 井出　　博
165	化粧品素材としての含硫化合物の生産に関する研究	早稲田大学理工学部	教授 木野　邦器
166	太陽紫外線による細胞のアポトーシスとサンスクリーンの効果	放射線医学総合研究所	主任研究官 古澤　佳也
167	ゼラチンによるアレルギー反応のエピトープ解析と安全なゼラチンの開発	東京医科歯科大学難治疾患研究所	助手 堀　　久枝
168	口唇口蓋裂患者の顔面の非対称感の改善に対する化粧の効果	大阪大学歯学部	助手 飯田　征二
169	皮膚色素性病変の新しい診断法の開発～デジタルマイクロスコープと病理組織三次元再構築法を用いた早期メラノーマ診断～	北海道大学医学部	助手 松村　哲理
170	分子量および官能基を制御した新規キトサン系界面活性剤の機能化に関する研究	東京工業大学大学院理工学研究科	教授 梶内　俊夫

●第 11 回（平成 12 年 11 月）

No	研　究　課　題	代　表　研　究　者	
171	A、B 領域紫外線の直接照射により SCID マウス移植ヒト皮膚に誘発される遺伝子変異とその予防	大阪大学大学院 医学系研究科	助教授 本行　忠志
172	微生物代謝工学に基づく必須および新規脂肪酸の大量生産	筑波大学応用生物化学系	教授 小林　達彦
173	皮膚老化の分子メカニズムの解明：老化マウス klotho における解析	群馬大学医学部	教授 倉林　正彦
174	水分子の移動とその速度制御のための分子膜の開発	九州大学大学院 理学研究院	教授 師井　義清
175	ヒト皮膚線維芽細胞における Ⅰ 型コラーゲン遺伝子の個人依存性発現制御機構	神奈川歯科大学歯学部	教授 畑　隆一郎
176	ヒト皮膚における遊離脂肪酸の動態に及ぼす皮膚常在細菌ならびに化粧品の影響に関する研究	東京薬科大学薬学部	助手 小谷　　明
177	４位置換レゾルシノール誘導体のメラニン生成抑制効果	九州大学大学院 農学研究院	講師 清水　邦義
178	酸化セリウム系紫外線遮断剤の開発	大阪大学大学院 工学研究科	助手 増井　敏行
179	逆ミセルの微細構造を利用した生理活性物質内包型ナノカプセルの創製	九州大学大学院 工学研究院	助手 小野　　努
180	皮膚保護作用を有するセラミドの生理作用発現機構に関する研究	東北大学大学院 薬学研究科	教授 中畑　則道
181	爪の形状に対するⅦ型コラーゲンの変異がかかわる影響について	北海道大学医学部 附属病院	助手 松村　和子
182	表皮角層細胞間脂質形成に対する上皮型脂肪酸結合蛋白（E-FABP）の機能解析－ E-FABP ノックアウトマウスを用いた検討－	東北大学大学院 医学系研究科	講師 大和田祐二
183	癌患者への「 化粧 」技術指導プログラムの日本への適用可能性に関する研究	東京大学大学院 医学系研究科	助手 高橋　　都
184	$^{1}C_{4}$ 配座のグルコース環状六量体、反転シクロデキストリンの創製	関西学院大学理学部	助教授 山田　英俊
185	紫外線及び化学合成化合物のヘアレスラット皮膚に対する障害作用及びその防御	城西大学薬学部	教授 谷　　覺
186	化粧品素材としての合成スメクタイトの高機能化	東北大学反応化学研究所	助手 白井　誠之
187	化粧文化史の変遷と流行した化粧の受け入れ方の考察	武庫川女子大学大学院 家政学研究科	院生 玉置　育子

●第 12 回（平成 13 年 11 月）

No	研　究　課　題	代　表　研　究　者	
188	日本における「× メーク 」*の伝統性に関する研究 －起源と大衆文化への波及－　　*（極端な化粧、Extreme make up の意）	千歳科学技術大学 光科学部	助教授 Jonathon John
189	脂質－高分子界面活性剤混合系による新規分散系“液晶エマルション”の形成	京都大学大学院 薬学研究科	助手 中野　　実
190	接着分子シグナルを利用した皮膚老化防止の新戦略	群馬大学生体調節研究所 附属生理活性物質センター	教授 的崎　　尚
191	発生再生の分子メカニズムを応用した人工皮膚作製	秋田大学医学部	教授 杉山　俊博
192	紫外線防御因子メタロチオネインのヒノキチオールによる合成誘導とその意義	東北大学大学院 薬学研究科	教授 永沼　　章
193	日本の化粧意識の近代化をめぐる比較史的考察	奈良女子大学 生活環境学部	専任講師 鈴木　則子
194	ナノ構造配列制御を基盤とする光学活性材料の開発	山口大学工学部	助手 鬼村謙二郎
195	接触皮膚炎への p38mitogen-activated protein kinase の関与機構の解明	千葉大学大学院 医学研究院	助教授 粕谷　善俊
196	再構築機能を有する新規の粘土材料の作製とその吸着特性	東京工業大学大学院 理工学研究科	助手 亀島　欣一
197	光で透過制御可能な人工ベシクルを形成する新規多鎖型両親媒性化合物の開発	大阪大学大学院 工学研究科	助教授 中辻　洋司
198	顔の魅力を規定する要因の実験計量心理学的分析	東北大学大学院 文学研究科	助教授 行場　次朗
199	Wnt シグナルによるメラニン産生の制御機構の解析	東北大学大学院 医学系研究科	助手 武田　和久
200	カンキツ精油の有する生体作用の生化学的解析	高知大学農学部	助教授 受田　浩之
201	皮膚の老化によるⅦ型コラーゲンの代謝及び遺伝子発現調節機構について	弘前大学医学部附属病院	講師 今　　淳
202	皮膚の水チャネルの保水性への役割の解明	自治医科大学	講師 石橋　賢一
203	皮膚表皮細胞への生理活性タンパク遺伝子のデリバリーと分泌方向性の制御	京都大学大学院 薬学研究科	教授 高倉　喜信
204	かみ合わせのずれが大きく笑った顔貌の非対称性に及ぼす影響	大阪大学歯学部附属病院	講師 中村　隆志
205	アトピー女性の自尊感情の向上を目指したスキンケアと集団認知行動療法の開発	宮崎大学教育文化学部	専任講師 富家　直明
206	早老性疾患遺伝子による皮膚線維芽細胞の老化とテロメア制御	広島大学 原爆放射能医学研究所	教授 小松　賢志
207	痴呆高齢者の表情分析と主観的 Quality of Life の評価手法に関する研究	浜松医科大学医学部	助教授 鈴木みずえ
208	独自のチタン反応を利用する、ムスク・ジャスミン系高級香料の実用的化学合成	関西学院大学理学部	教授 田辺　　陽

●第 13 回（平成 14 年 11 月）

No	研　究　課　題	代　表　研　究　者	
209	エストロゲンの皮膚老化防御における分子機構の解明	金沢大学大学院 医学系研究科	教授 井上　正樹
210	正常皮膚角化における蛋白質脱イミノ化の役割解明 －瑞々しい肌をいつまでも保つために－	東京都老人総合研究所	研究員 石神　昭人
211	環境に適した新規な糖型界面活性剤の開発と応用	東京理科大学理学部	助手 吉村　倫一
212	生体内環境を再現するポリホスフェートヒドロゲルの調製と機能	東京医科歯科大学 生体材料工学研究所	助教授 岩崎　泰彦
213	コラゲナーゼ抑制作用をもつ天然物の探索	千葉大学大学院 薬学研究院	教授 石橋　正己
214	フレグランスの減量および生活習慣改善効果 －特に内臓脂肪、酸化ストレスに対する影響－	福島大学 保健管理センター	助教授 渡辺　英綱
215	生体適合性超薄膜の吸水および保湿特性の評価	東北大学大学院 薬学研究科	教授 安斉　順一

216	毛包、汗腺、皮脂腺など皮膚附属器官の形成に関わる細胞内シグナル伝達経路の解明	東京大学医科学研究所	教授 井上純一郎
217	皮膚における生体リズムの分子機構	神戸大学大学院 医学系研究科	教授 岡村　　均
218	トリクロロ酢酸とフェノールの生体におよぼす安全性に関する研究	和歌山県立医科大学	教授 古川　福実
219	紫外線遮断剤用単分散球状酸化セリウムナノ粒子の低環境負荷な製造法の開発	千葉大学工学部	助手 上川　直文
220	新規な化粧品素材としての、コウジ酸、βツーヤプリシン、p-アミノ安息香酸、及び、アルブチンのさらなる高機能化を目的とした酵素的分子設計	岡山県立大学 保健福祉学部	専任講師 中島　伸佳
221	集合して生体に作用する有機分子の設計と合成および機能評価	東京大学大学院 薬学系研究科	教授 大和田智彦
222	日本人と韓国人の化粧観の国際比較研究	日本大学藝術学部	非常勤講師 村澤　博人
223	ヒアルロン酸水溶液のナノコットン効果の研究	理化学研究所	先任研究員 丑田　公規
224	リボザイムを用いた皮膚細胞新規老化遺伝子の単離と解析 筑波大学応用生物化学系 教授　柳澤純	京都大学大学院 薬学研究科	教授 高倉　喜信
225	モーションキャプチャーシステムを用いた、スマイルトレーニング前後の笑顔の動的変化に関する研究	大阪大学大学院 歯学研究科	助教授 荘村　泰治
226	コラーゲン経口摂取が結合組織（骨、皮膚）におよぼす作用	東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科	教授 春日井昇平
227	表皮細胞に対する機械的刺激の作用についての検討	東京大学医学部附属病院	講師 小宮根真弓

●第 14 回（平成 15 年 11 月）

No	研　究　課　題	代　表　研　究　者	
228	化粧品としてのヒアルロン酸およびその誘導体の物性と生理的安全性に関する研究	千葉大学大学院 薬学研究部	教授 戸井田敏彦
229	半導体ナノ粒子の紫外光吸収による活性酸素生成とその制御に関する研究	東北大学 多元物質科学研究所	教授 佐藤　次雄
230	ダイエット効果を有する脂質が皮膚の状態に及ぼす影響	九州大学大学院 農学研究院	教授 古瀬　充宏
231	性ホルモンと性ホルモン結合蛋白による皮膚メラニン産生の検討	大阪大学医学部 皮膚科学教室	講師 田所　丈嗣
232	統合失調症における化粧顔の認知に関する研究	大阪大学大学院医学系研究科精神医学教室	助手 岩瀬　真生
233	ヒト皮膚における血管新生刺激サイトカインの発現とその作用機序に関する包括的研究	聖マリアンナ医科大学 皮膚科	助教授 相馬　良直
234	タイ産マンゴスチン果実抽出物の多機能性化粧品への応用研究	東北大学大学院 薬学研究科	教授 大泉　　康
235	生体適合性アパタイト粒子の結晶形態制御プロセスの確立とその応用	明治大学理工学部 工業化学科	助教授 相澤　　守
236	メラニン産生の制御機序の解析を介して新しい美白剤を開発するための研究	金沢大学大学院 医学系研究科	助教授 加藤　昌志
237	機能性香料の開発：匂い物質による月経前緊張症（PMS）の治療	長崎大学医歯薬学総合研究科医療科学専攻 病態解析・制御学講座	教授 篠原　一之
238	SOD1 欠損マウスを用いた皮膚炎の発症とケラチノサイト増殖における活性酸素の役割の解明	山形大学医学部	教授 藤井　順逸
239	XVII 型コラーゲン異常に起因する表皮真皮結合破綻の分子機構	北海道大学大学院 医学研究科皮膚科学分野	助教授 澤村　大輔
240	熱応答性インテリジェント高分子の皮膚ゲル化機能を付与した新規化粧品素材の開発	北海道医療大学薬学部	教授 宮崎　正三
241	哺乳動物におけるフェロモンの受容機構と生理作用の解析	北海道大学大学院 薬学研究科	助教授 柏柳　　誠
242	太陽紫外線による皮膚タンパク質の損傷と老化	京都大学原子炉実験所	教授 藤井　紀子
243	近赤外分光法による毛髪中の自由水、結合水の非破壊構造解析	関西学院大学理工学部	教授 尾崎　幸洋
244	動的特性が表情認知に与える影響　　－皮溝（シワ）の分析－	立教大学文学部	教授 長田　佳久

245	超臨界二酸化炭素を用いたナノポーラスシリコーンゲルの合成とその構造特性	京都大学化学研究所 構造解析基礎研究部	文部科学教官助手 妹尾　政宣
246	疾患をカバーするための化粧の有効性と自己意識に与える影響 －顔に疾患を抱える女性たちへのインタビュー調査から－	お茶の水女子大学大学院 人間文化研究科	大学院生 西倉　実季
247	骨髄細胞を用いた皮膚の構築	岡山大学大学院 医歯学総合研究科	教授 許　　浩

●第 15 回（平成 16 年 11 月）

No	研　究　課　題	代　表　研　究　者	
248	ラミニン - 5 由来ペプチドによる表皮細胞遊走活性化の検討	京都大学大学院医学研究科皮膚生命科学講座	助教授 宇谷　厚志
249	新しい皮膚成分の分析手法としてのコレステロールセンサの開発	大阪府立大学 先端科学研究所	助手 椎木　　弘
250	表皮細胞におけるエピプラキンの機能	大分大学医学部生体分子構造機能制御講座	教授 藤原　作平
251	酵母を利用した組み換えヒト型セラミド生産系の開発	広島大学大学院 生物圏科学研究科	助教授 船戸　耕一
252	メラノソーム輸送に必須の因子 Slac2-a の分解メカニズムの解明とメラノソーム輸送制御への応用	理化学研究所	ユニットリーダー 福田　光則
253	皮膚の光音響学的診断法の開発	防衛医科大学校防衛医学研究センター 情報システム研究部門	助教授 佐藤　俊一
254	薬用人参の皮膚老化防止作用と育毛効果の分子メカニズム	東京医科歯科大学 難治疾患研究所	教授 古川　哲史
255	インターロイキン 12 による紫外線防護に関する研究	長崎大学先導生命科学研究支援センター	教授 松田　尚樹
256	大豆ビクニンを用いた日焼け防止クリームの開発	浜松医科大学	助教授 小林　　浩
257	表皮細胞の増殖・分化・細胞死に影響を与える遺伝子群の機能解析システムの構築	大阪大学医学系研究科	教授 竹田　潤二
258	脂質分子集合体の活性酸素種分解機能の解明による新規な抗酸化系の構築	山口大学工学部 応用化学工学科	助教授 吉本　　誠
259	新たな生理機能を付加させることを目的とした新規化粧品素材の酵素的分子創製	岡山理科大学理学部 臨床生命科学科	講師 石原　浩二
260	ビスアンモニウム塩型 Gemini（二鎖二親水基型）界面活性剤の抗菌剤への応用についての検討	京都工芸繊維大学 物質工学科	助教授 老田　達生
261	リン脂質ベシクル上にリポアミノ酸が形成するナノチャンネルとその薬物放出能の検討	金沢大学大学院 自然科学研究科	助手 太田　明雄
262	高齢者の顔面における常在真菌フローラのタイピング－老人性色素斑および脂漏性角化症の新たな発生機序の解明と予防について	筑波大学大学院 人間総合科学研究科	講師 伴野　朋裕
263	ショウガ成分誘導体の美白、抗老化作用の分子メカニズム	東京大学先端科学 技術研究センター	特任助教授 野口　範子
264	シルクプロティン - ポリフェノールコンジュゲートの合成と機能評価	大阪大学大学院 工学研究科物質化学専攻	教授 宇山　　浩
265	皮膚における弾性繊維形成とトロポエラスチンの細胞機能解析	星薬科大学	講師 輪千　浩史
266	口唇裂患者の化粧による外観変化と内面変化について	大阪大学大学院 歯学研究科	教授 古郷　幹彦
267	アミロース工学による分子認識性ナノゲル微粒子の設計と応用	東京医科歯科大学 生体材料工学研究所	教授 秋吉　一成
268	化粧やネイルケアが高齢者のライフスタイルや QOL と免疫能の向上に及ぼす影響	早稲田大学人間科学部	教授 町田　和彦
269	化粧療法による被介護者と介護ボランティアの精神的活性化	仙台大学	教授 吉田寿美子

●第 16 回（平成 17 年 11 月）

No	研究課題	代表研究者	
270	コラーゲンに正しい構造をとらせる、HSP47 誘導剤の発見	熊本大学大学院 医学薬学研究部	教授 水島　徹
271	化粧意識についての日仏文化比較研究 －フランス・ディスクール分析の観点から－	大阪大学大学院言語文化 研究科博士後期課程	大学院生 石丸久美子
272	メラニン生合成阻害作用を有する環状ジアリルヘプタノイド類の美白効果と発がん予防効果に関する研究	星薬科大学生薬学教室	教授 森田　博史
273	ヒト由来の生体素材を用いたテーラーメイド型化粧品基材の創出	信州大学繊維学部 感性工学科	教授 藤井　敏弘
274	プロスタグランジン D2 受容体を標的とした皮膚アレルギー性炎症治療法開発	東京医科歯科大学大学院	助教授 佐藤　貴浩
275	ヒト汗に存在する核酸分解酵素を含有させた化粧品や医薬品軟膏が有する生理作用や薬理作用の推定	島根大学医学部 法医学科教室	教授 竹下　治男
276	色素細胞幹細胞の制御による白斑症治療モデルの開発	岐阜大学大学院 医学研究科	教授 國貞　隆弘
277	脂質を中心とした非蛋白抗原に対する皮膚免疫応答機構の解明とその制御法の確立	京都大学ウイルス研究所	教授 杉田　昌彦
278	「聞香」による香りの言語化プロセスと脳内情報構造化機能の解明	理化学研究所脳科学総合 研究センター	研究員 椎名さやか
279	化粧品の香料がヒト自律神経系に及ぼす生理学的効用の研究	藤田保健衛生大学医学部 生理学講座	助教授 河合　房夫
280	Apollon による細胞老化の制御機構	東京大学 分子細胞生物学研究所	助教授 内藤　幹彦
281	安定分散かつ耐熱性を併せ持つ酵素担持ナノ粒子の設計	筑波大学大学院 数理物質科学研究科	教授 長崎　幸夫
282	骨髄由来表皮細胞の分化ならびに遊走機序の解明	北海道大学病院	助手 阿部理一郎
283	白皮症の病因遺伝子の解明とその遺伝子産物のメラニン色素生成における機能解析	名古屋大学大学院 医学系研究科皮膚病態学	助教授 鈴木　民夫
284	真皮幹細胞を利用した皮膚の若返り治療	京都大学医学研究科先端 領域融合医学研究機構	助手 内藤　素子
285	二酸化チタン上に形成した脂質二重膜への表面特性の影響および UV 照射効果	分子科学研究所	研究技官 手老　龍吾
286	皮膚ボディーイメージ評価尺度 Cutaneous Body Image Scale（CBIS）日本語版の作成	東京女子医科大学附属女 性生涯健康センター	助教授 檜垣　祐子
287	紫外線誘発メラニン合成へのスフィンゴシン 1- ホスフェートの抑制効果の検討	神戸大学大学院 医学系研究科	教授 錦織千佳子
288	皮膚再生を促す non-drug 細胞間脂質類似構造体（リオトロピック液晶）の開発	聖マリアンナ医科大学 難病治療研究センター	助教授 五十嵐理慧
289	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	助教授 竹内　昌治

●第 17 回（平成 18 年 11 月）

No	研究課題	代表研究者	
290	紫外線カット機能材料の開発と化粧品関連素材（ヘアカラーおよび UV カット用品）への利用に向けての基礎研究	大阪教育大学教育学部	教授 織田　博則
291	好熱菌由来カロテノイド化合物の生体膜安定化効果の研究	大阪府立大学大学院理学 系研究科生物化学専攻	教授 原　正之
292	圧電材料基板上のマイクロ流路を用いた単分散多相エマルション生成法の開発	東京工業大学 精密工学研究所	助手 西迫　貴志
293	ツバキ油に含まれるトリテルペンの生合成研究	東京大学大学院 薬学系研究科	助教授 渋谷　雅明
294	肌の質感を容易に評価するシステムの開発	国立木更津工業高等専門 学校機械工学科	助教授 小田　功
295	化粧品素材の皮膚アレルギーにおける新規スクリーニング法の開発	産業医科大学皮膚科学	助教授 椛島　健治
296	中高年者の化粧行動の変動様態と前頭葉認知能との関連に関する神経心理学的研究	名古屋大学大学院 環境学研究科	教授 八田　武志
297	毛形成におけるホスフォリパーゼＣ δ １の機能解析	東京薬科大学生命科学部	教授 深見希代子

298	再構築培養皮膚および角膜を用いた遺伝毒性の評価	国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター薬理部	室長 小島　肇
299	地中海アロマ植物からの白髪予防生理活性物質の探索およびその機能解析	筑波大学大学院生命環境科学研究科 北アフリカ研究センター	助教授 磯田　博子
300	ヒアルロン酸で被覆したキトサン微粒子へのタンパク質のカプセル化と機能評価	慶応義塾大学理工学部生命情報学科	教授 佐藤　智典
301	各種有効成分の効率的な皮膚内送達方法の開発	大阪大学大学院薬学研究科	助教授 近藤　昌夫
302	心地良い香り、及び不快な香りの慣れ（adaptation) 現象 －呼吸パターンと脳内活動部位推定の検討－	昭和大学医学部第二生理学教室	兼任講師 政岡　ゆり
303	老人性色素斑ダーモスコピー画像の自動定量ならびに治療と化粧によるＱＯＬ評価改善	東京女子医科大学東医療センター皮膚科	助教授 田中　勝
304	光照射による分子集合体の構造変換及びその機能化に関する研究	大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻	助手 水上　進
305	慢性掻痒性皮膚疾患における表皮内末梢神経伸展因子の探索	富山大学大学院医学薬学研究部	講師 安東　嗣修
306	表皮細胞接着因子のバイオイメージング法の開発	慶應義塾大学医学部	教授 天谷　雅行
307	皮膚を覆う「毒素のデパート」ブドウ球菌は、なぜ多様な毒素を作れるのか：ゲノムからのアプローチ	東京大学大学院新領域創成科学研究科および東京大学医科学研究所	教授 小林　一三
308	人前化粧における意識	岡山大学大学院社会文化科学研究科	塩田真友子
309	皮膚線維化過程における骨髄由来細胞の動員とそのコラーゲン産生能に関する研究	東海大学医学部基盤診療学系	助教授 稲垣　豊
310	メラノサイト由来リポカリン型プロスタグラジンＤ合成酵素が関与する皮膚組織の恒常性維持機構	東北大学大学院医学系研究科	教授 柴原　茂樹
311	化粧品のリスク認知に関する心理学的研究 －安全とリスクのバランス－	名古屋大学大学院教育発達科学研究科	助手 元吉　忠寛
312	化粧による高齢者の行動変容：高齢夫婦の女性配偶者の化粧による男性配偶者の quality of life の向上と生理学的反応の変化	大分大学医学部脳・神経機能統御講座	助教授 徳丸　治

●第 18 回（平成 19 年 11 月）

No	研　究　課　題	代　表　研　究　者	
313	ビタミンＥの高機能化とさらなる有効利用を目的とし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	准教授 下田　恵
314	新しい生体親和性材料としてのペプチド性人工コラーゲンゲル	早稲田大学理工学術院	教授 小出　隆規
315	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	東京電気大学	教授 平栗　健二
316	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	慶應義塾大学理工学部応用化学科	准教授 藤本　啓二
317	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	講師 飯村菜穂子
318	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物性解析	岡山大学大学院自然科学研究科	教授 神崎　浩
319	Wnt シグナルを標的とした育毛促進作用をもつ天然成分の探索	千葉大学大学院薬学研究院	助教 大槻　崇
320	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	講師 桒原　順子
321	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	准教授 加藤　則人
322	紫外線の皮膚慢性毒性に対するサンスクリーン剤の防御効果を高速・高感度に評価する方法の開発	東北大学大学院医学系研究科	助教 池畑　広伸
323	低分子量 G 蛋白質 Rab27A によるメラノソーム輸送制御メカニズムの解明	東北大学大学院生命科学研究科	助教 伊藤　敬
324	遺伝子改変マウスを用いたヒスタミンの接触性皮膚炎に与える影響の研究	東北大学大学院工学研究科	教授 大津　浩
325	非線形光学現象を利用した真皮コラーゲン分布 *in vivo* 可視化法の開発	大阪大学大学院基礎工学研究科	教授 荒木　勉

326	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	教授 的崎　尚
327	リン脂質代謝酵素ホスホリパーゼ A2 群の皮膚における発現・機能と脂質メタボロミクス	東京都医学研究機構東京都臨床医学総合研究所	副参事研究員 村上　誠
328	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	名古屋大学大学院生命農学研究科	准教授 人見　清隆
329	正常肌およびバリア機能異常肌における角層コルネオデスモゾーム分解過程の研究	旭川医科大学	准教授 山本　明美
330	細胞内シグナル PTEN/P13 キナーゼ経路による白髪化の制御	秋田大学	教授 鈴木　聡
331	蝕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	助教 秋山　庸子
332	全断眠または連続した部分断眠によるストレスマーカーの変動と血流量／血液量／血流速度の変化との関連について	大阪大学保健センター	特任研究員 菅沼　仲盛
333	経済開放政策以降のインドにおける中間層の増加と化粧品の消費動向の変化に関する研究	東北大学大学院 文学研究科	専門研究員 岡光　信子
334	アジア人の「化粧」にみられる身体観、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＞のはざまで－	東北大学大学院 国際文化研究科	教授 山下　博司
335	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	独立行政法人 産業技術総合研究所	研究員 梶原　利一

●第 19 回（平成 20 年 11 月）

No	研　究　課　題	代　表　研　究　者	
336	マイクロエマルションを利用したポリフェノールの皮膚へのデリバリーと光老化防御	神戸薬科大学	教授 北河　修治
337	皮膚組織再生を目的とした生体組織類似コラーゲン組織体の作製	東京医科歯科大学 生体材料工学研究所	特任助教 南　広祐
338	紫外線遮蔽剤用単分散板状酸化セリウムマイクロ粒子の合成及びその形態に由来する付加機能性の実現	東北大学 多元物質科学研究所	准教授 殷　澍
339	細胞外マトリックス分解性微生物酵素を用いた動物原料からコスメトロジー素材への実用的アプローチ	京都府立大学大学院 生命環境科学研究科	教授 渡部　邦彦
340	物質保持能を制御できるコラーゲン擬似分子の作製	大阪府立大学大学院 工学研究科	助教 児島　千恵
341	酵母由来の機能性糖脂質（バイオサーファクタント）の構造及び機能の拡充に関する研究	独立行政法人 産業技術総合研究所	研究員 福岡　徳馬
342	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	熊本大学医学部 薬学研究部	助教 藤原　章雄
343	アスコルビン酸誘導体を用いた新規薬物含有ナノ微粒子製剤の開発	千葉大学大学院 薬学研究院	准教授 森部久仁一
344	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	近畿大学工学部	講師 渡邉　義之
345	コエンザイム Q10（CoQ10）の美肌、抗老化作用におけるミトコンドリア移行の意義	同志社大学生命医科学部	講師 斎藤　芳郎
346	形成外科領域におけるヒト間葉系幹細胞移植を用いた瘢痕形成抑制の実現ならびに問題点の抽出と改善	国立成育医療センター 研究所生殖医療研究部	部長 梅澤　明弘
347	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	准教授 山口　裕史
348	ビタミン C を合成できない毛のない SMP30/GNL 遺伝子破壊ヘアレスマウスを用いた皮膚におけるビタミン C の美白、抗しわ効果の科学的実証	東邦大学薬学部生化学	准教授 石神　昭人
349	角層の若返りが皮膚の若返りに果たす役割	久留米大学医学部 皮膚科学教室	講師 大日　輝記
350	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	准教授 平澤　典保
351	cAMP シグナルを標的にしたヒアルロン酸産生制御メカニズムの研究	横浜市立大学大学院 医学研究科	教授 石川　義弘
352	放射線・紫外線適応応答マーカーを指標とした老化制御因子スクリーニング法の開発	東京都老人総合研究所	主任研究員 三浦　ゆり
353	神経ペプチドおよびストレスによる皮膚バリア機能障害のメカニズム解析	大分大学医学部皮膚科	准教授 片桐　一元

354	タンパク質分解酵素を応用した新しい皮膚代謝促進治療薬の開発	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻	教授 筑波　隆幸
355	グリセリンによる皮膚湿潤、皮膚再生促進、癌促進の関連：アクアポリン３（AQP3）は諸刃の剣か？	明治薬科大学	教授 石橋　賢一
356	表皮ケラチノサイトの角化プロセスにおける PLD/ m TOR シグナリングの関与	岐阜県研究開発財団 岐阜県国際バイオ研究所	主任研究員 大口　健司
357	妊娠期における肌の乾燥メカニズムの究明エストロゲン過剰分泌状態にも関わらず皮膚が乾燥する原因はなにか	京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻	助教 山口　琴美
358	化粧が更年期女性に及ぼすストレス軽減効果についての検討	東京女子医科大学東医療センター 美容・性差医療部	准教授 片井みゆき
359	顔の魅力と人物の印象の相互作用メカニズムに関する認知神経科学的研究	東北大学加齢医学研究所	准教授 月浦　　崇
360	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	慶應義塾大学医学部 耳鼻咽喉科	非常勤講師 五島　史行
361	身体加工と化粧に関する日本及び英語圏における文化表象の分析	お茶の水女子大学 人間文化研究科	大学院生 英　美由紀
362	皮膚科メイクアップケア外来が色素異常症患者および外来化学療法中がん患者の quality of life（QOL）に与える影響	京都大学大学院 医学研究科皮膚科学	助教 谷岡　未樹
363	香料によるメタボリックシンドローム改善効果（内臓型肥満とストレスの関係に着目したアプローチ）	福島大学 保健管理センター	准教授 渡辺　英綱

●第 20 回（平成 21 年 11 月）

No	研　究　課　題	代　表　研　究　者	
364	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	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
365	界面活性粒子を利用した多重エマルションおよびマイクロカプセルの開発	山形大学大学院 理工学研究所	准教授 野々村美宗
366	酸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	東京都市大学工学部 エネルギー化学科	准教授 黒岩　　崇
367	アロエの美白成分クロモン類の生合成研究	東京大学大学院 薬学系研究科	教授 阿部　郁朗
368	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	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
369	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	静岡大学工学部	助教 河野　芳海
370	エレクトロスプレーを利用した高機能性粉体調整技術の開発	独立行政法人 物質・材料研究機構	主幹研究員 川上　亘作
371	アロエ含有物による UV ケアの研究 －紫外線防御と一重項酸素消去作用－	愛媛大学	教授 長岡　伸一
372	加齢に伴う皮膚脂質の変化に対するリピドーム解析	京都府立医科大学	博士研究員 守田麻由子
373	自生ハマナス（Rosa rugosa）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～	弘前大学大学院 理工学研究科	准教授 長岐　正彦
374	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	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
375	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	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
376	ヒトはいかにして化粧にかぶれるのか －一次刺激性皮膚炎を伴わない接触皮膚炎モデルの作成－	東北大学大学院 医学系研究科	教授 相場　節也
377	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	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（MTI）プログラム	特任講師 松井　　毅
378	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	東京大学大学院薬学系研究科生理化学教室	助教 斎藤　康太
379	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	神戸大学大学院 医学研究科	特命教授 廣明　秀一
380	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	東北大学大学院 薬学研究科	教授 大江　知行

381	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	大阪大学大学院 薬学研究科	教授 堤　　康央
382	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	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
383	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：テーラーメード化粧品適正使用を目指して	九州大学大学院 薬学研究院	教授 大戸　茂弘
384	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	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
385	MEMS 触覚センサを用いた髪の手触り感計測に関する研究	東京大学	特任助教 野田堅太郎
386	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ー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ー	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
387	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	金沢大学 医薬保健研究域薬学系	准教授 山下　克美
388	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	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
389	「少女」の化粧　―近代および現代の美容教育からの一考察―	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
390	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	名古屋大学医学部付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
391	「化粧と現代化粧観」、「身体加工と化粧」、「化粧の消費と身体規範の転換ー現代カイロの化粧をめぐる世代間の衝突」	御茶ノ水女子大学大学院 人間文化研究科	博士後期課程 鳥山　純子
392	「台湾と日本の化粧文化の比較研究ー日常生活の実践を中心に」	都留文科大学	准教授 山本　芳美
393	化粧がもつ自尊心昂揚効果に関する発達脳科学的研究	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科	助教 土居　裕和

第 21 回（平成 22 年 11 月）

No	研　究　課　題	代　表　研　究　者	
394	体液中グルコースがトリガーとなり創傷部位を被覆・修復する新規モイストヒーリング剤の開発	大阪大学大学院 基礎工学研究科	准教授 境　　慎司
395	加齢臭成分のバイオマーカーとしての応用研究	名古屋大学大学院 生命農学研究科	教授 内田　浩二
396	新規紫外線障害防護剤の開発・評価	九州大学大学院 薬学研究院	准教授 山田　健一
397	海洋生物に由来する機能性化粧品素材の探索	熊本大学大学院生命科学研究部（薬学系）	教授 塚本佐知子
398	米タンパク質由来チロシナーゼ阻害ペプチドの精製と固定およびその美白効果	新潟大学自然科学系（工学部・機能材料工学科）	教授 谷口　正之
399	毛包器官培養法を用いた育毛促進作用を持つ天然成分の探索	秋田大学大学院 医学系研究科	教授 杉山　俊博
400	肌の透明感を評価する測定手法および測定システムの開発	独立行政法人国立高等専門学校機構木更津工業高等専門学校機械工学科	准教授 小田　　功
401	励起状態近接効果を利用した新規 UVA － UVB ハイブリッド型サンスクリーンの開発	群馬大学大学院工学研究科応用科学・生物化学専攻	助教 吉原　利忠
402	両親媒性多糖デンドリマーを保護剤とした金・白金ナノコロイドによる活性酸素消去活性	奈良女子大学大学院 人間文化研究科	准教授 吉村　倫一
403	色素系化合物の光毒性を抑制する新たな手法の開発	東京大学大学院 薬学系研究科	助教 寺井　琢也
404	海藻カロテノイドの皮膚における光老化抑制作用	京都大学大学院 農学研究科	教授 平田　　孝
405	ヒト表皮角化幹細胞の動態制御を目指した低分子化合物の探索	愛媛大学 上級研究員センター	上級研究員 難波　大輔
406	炎症性皮膚疾患におけるストレス応答性キナーゼ ASK1 の機能解析	東京大学大学院 薬学系研究科	教授 一條　秀憲
407	新たな皮膚タイトジャンクションバリア・角質層バリア機能評価方法の開発	慶應義塾大学医学部 皮膚科学教室・総合医科学研究センター	特別研究講師 久保　亮治
408	皮膚マトリスクメタロプロテアーゼ（matrix metalloptroteinase:MMP)-－ 9 遺伝子過剰発現マウスの作成とその解析	防衛医科大学校皮膚科	准教授 小林　孝志

409	角層細胞間脂質の組成制御による膜透過性ペプチドの経皮吸収に関する研究	千葉科学大学薬学部 生命薬科学科	特担教授 坂本　一民
410	新規ライブイメージング法を用いたメラニン色素輸送の解析	奈良先端科学技術大学院 大学バイオサイエンス研究科	助教 田所　竜介
411	接触性皮膚炎におけるＩL-17 ファミリーサイトカインの役割	東京大学医科学研究所・ フロンティア研究拠点	特任准教授 中江　　進
412	オルゴアルギニン固定化高分子と生体膜との相互作用の科学的検証	摂南大学薬学部	准教授 佐久間信至
413	糖脂質による増殖シグナル向上のメカニズムの解明	独立行政法人産業技術総合研究所生物プロセス研究部門	特別研究員 川島　永子
414	皮膚に存在する環境センサー TRPV チャネルを介した保湿関連物質の分泌制御機構の解明	愛知学院大学薬学部	教授 村木　克彦
415	脂質を標的にした新しい皮膚遅延型アレルギー応答の機序解明と制御	京都大学ウイルス研究所	教授 杉田　昌彦
416	加齢に伴う皮膚真皮細胞外マトリックスの組成変化：バーシカン発現に注目して	京都大学大学院 医学研究科	助教 室賀　絵里
417	デコイ・メラノソームを用いたメラノサイトからケラチノサイトへのメラニン移送阻害の研究	名古屋市立大学大学院 薬学研究科	教授 平島　尚英
418	化粧による顔表情の豊かさをオプティカルフローで表情運動量として定量化する	千歳科学技術大学	教授（特任） 南谷　晴之
419	健康成人女性の化粧行動における心理生理学的研究 －ストレスホルモン系、性ホルモン系への影響	京都府立医科大学大学院 医学研究科	助教 渡邉　映理
420	香りによる快・不快の感情が新生神経細胞の発達に与える影響の研究	奈良県立医科大学先端医学研究機構生命システム医科学１	助教 吉原　誠一
421	仮想呈示と塗布流動解析により化粧品使用感を解析するバーチャルサイコレオメトリーとその応用	首都大学東京大学院 理工学研究科	教授 水沼　　博
422	近代日本コスメトロジーの普及と展開をめぐる－考察～美容家・藤波芙蓉の分析を通じて	奈良女子大学 生活環境学部	准助教 鈴木　則子

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

マイクロエマルションを利用したポリフェノールの皮膚へのデリバリーと光老化防御

神戸薬科大学
北河　修治

To improve the efficiency of the intradermal delivery of polyphenols, we tried to clarify the usefulness of microemulsion by *in vitro* study on excised guinea pig dorsal skin and Yucatan micropig skin. Using microemulsion consisting of isopropyl myristate, 150 mM NaCl solution, Tween 80 and ethanol as a vehicle, the solubility of all the polyphenols such as quercetin, genistein and chlorogenic acid markedly increased and significant amounts of polyphenols were delivered to the skin. For hydrophobic polyphenols water-in-oil microemulsion was more effective. On the other hand, for hydrophilic polyphenols oil-in water microemulsion was more effective. Polyphenols retained in the skin significantly inhibited lipid peroxidation *in vitro* dose-dependently. Furthermore, pretreatment of guinea pig dorsal skin with polyphenols such as genistein and chlorogenic acid, which were contained in microemulsion gel, prevented UV irradiation-induced erythema formation. These findings indicate the potential use of microemulsion for the delivery of polyphenols to protect skin against UV-induced oxidative damage.

1. 緒　言

種々の物質の中で抗酸化剤として知られるポリフェノールに光老化に対する防御作用が期待されている。しかしながら、実際にポリフェノールを皮膚に適用する場合には、皮膚移行性が問題となる。ポリフェノールは水にも有機溶媒にも溶解しにくい化合物であり、また、代表的なポリフェノールであるフラボノイド類は比較的分子量も大きいことから皮膚への移行性は低い。したがって、皮膚への効率的な移行を目的とした場合、何らかの吸収促進系を用いる必要がある。近年、マイクロエマルションが薬物の経皮吸収に有用であることが明らかにされてきた。マイクロエマルションは、油相、水相、界面活性剤、補助界面活性剤より構成される熱力学的に安定な分散系であるが、薬物の溶解度を増大するとともに経皮吸収性を増加することから[1, 2]、水にも有機溶媒にも難溶性のポリフェノールの皮膚への効率的なデリバリーを目指す場合、有望な促進系であると考えられる。

そこで、本研究では、分子量、化学構造、疎水性の異なる種々のポリフェノール（Fig. 1に構造を示す）の皮膚へのデリバリーについてさらに研究を行い、マイクロエマルションによるポリフェノールの皮膚移行性に対する改善効果を観察した。マイクロエマルションには水中油型（o/w型）と油中水型（w/o型）があるが、ポリフェノールの疎水性と有効な型についても観察した。また、局所作用を期待するこれらのポリフェノールは、できるだけ皮膚に留まり、血中へは移行しないことが要求されるため、皮膚透過性についても検討を行った。また、ポリフェノールの皮膚移行に伴う、皮膚の過酸化反応に対する防御作用、紫外線照射による皮膚の紅斑形成に及ぼす影響について*in vitro*及び*in vivo*で観察した。

Enhanced skin delivery of polyphenols by microemulsion and prevention against photoaging
Shuji Kitagawa
Kobe Pharmaceutical University

2. 実　験

2. 1.　実験試料

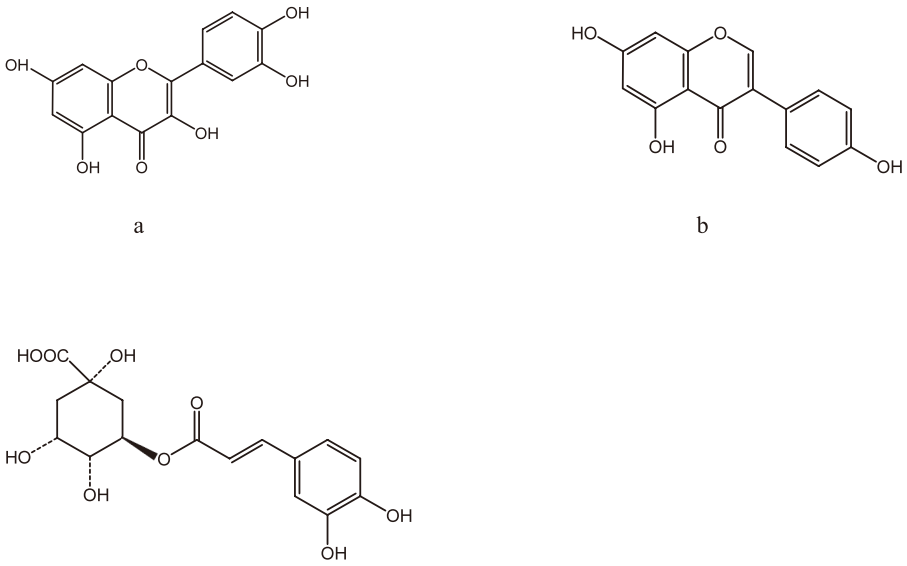
ポリフェノールは試薬会社より購入したものを用いた。神戸薬科大学動物実験指針に従ってハートレー系モルモット（オス、3週齢）皮膚より麻酔下、バリカンによる除毛後、背部皮膚を摘出し、脂肪を除去して用いた[3, 4]。ユカタンマイクロピッグ皮膚は日本チャールスリバーより購入し、脂肪及び皮下組織を藤井らに従って除去して用いた[5]。

2. 2.　マイクロエマルションの調製

油相としてミリスチン酸イソプロピル（IPM）、水相として150 mM NaCl水溶液、界面活性剤としてポリオキシエチレンモノオレエート（Tween80）、補助界面活性剤としてエタノールを用いた。これらをふた付き試験管に加えて、37℃に加温し、ボルテックスミキサーにより撹拌を行い調製した。マイクロエマルションとしては、IPM、150 mM NaCl水溶液、Tween80、エタノールの質量比が8：25：20：47及び4：51：30：15でo/w型のマイクロエマルションA及びK、上記構成成分の質量比が33：7：30：30でw/o型のマイクロエマルションDを用いた。

2. 3.　溶解度の測定

ポリフェノールをマイクロエマルションA、D、K、IPM、150mM NaCl水溶液に過剰量加え、37℃で20時間インキュベーションを行った後、12,000×gで1分間遠心



a　　b

c

Fig.1 Polyphenols tested in this study
(a) quercetin, (b) genistein, (c)chlorogenic acid.

を行い、上清のポリフェノール濃度をHPLC（島津LC-10-AS）で測定した。HPLC分析には、逆相カラムRP-18 GP（4.6mm i.d.、150 mm）を用い、クェルセチン及びゲニステインの定量は、移動相として、水、メタノール、りん酸（容積比100：100：1）を用いた。クロロゲン酸の定量は、移動相としては、水、メタノール、りん酸（容積比140：60：1）を用いた。UV検出器の波長は、クェルセチンは360 nm、ゲニステインは260 nm、クロロゲン酸は327 nmとした。*trans*-フェルラ酸を内部標準とした。

2. 4.　マイクロエマルションの粒子径の測定

マイクロエマルションの粒子径の測定は、粒径アナライザー（大塚電子FPAR-1000）によって行った。マイクロエマルションA、D、Kの平均粒子径は、それぞれ39.8、42.5、12.3 nmであった。

2. 5.　皮膚中移行量の測定

ポリフェノールの皮膚中移行量の測定は、中央にモルモット背部摘出皮膚あるいはユカタンマイクロピッグ皮膚を装着したフランツ型拡散セルを用いて行った。12時間皮膚をプレトリートメント後、ドナー側にポリフェノールを懸濁した試料を入れ、モルモット皮膚の場合は20時間後、ユカタンマイクロピッグの場合は40時間後、皮膚を取り出し、氷冷メタノールで洗浄後、皮膚をホモジェナイズし、抽出試料を遠心し、上清のポリフェノール濃度を上述の条件でHPLCによって測定した。

2. 6.　脂質過酸化の測定

ポリフェノールを２時間インキュベーションし皮膚に移行させ、脂質過酸化に及ぼす影響について、硫酸アンモニウム鉄（Ⅱ）とクエン酸ナトリウムを用いてチオバルビツール酸試験によって観察を行った。

2. 7.　UV 照射による紅斑形成の観察

モルモットの背部皮膚を除毛後、ぬるま湯につけて垢取りを行った。24時間後、ポリフェノールを含有し、ゲニステインについては8.3％エアロジルR972によってゲル様としたマイクロエマルションを、クロロゲン酸については、1.0％カルボポール987によってゲル化したマイクロエマルションを、それぞれモルモット背部の片側に、もう一方にポリフェノールを含有しないマイクロエマルションゲルを塗布した。20時間後、マイクロエマルションゲルをふき取り、皮膚を乾燥後、138μW/cm^{2}の強度でUV-Bランプ（GL20SE）による24分間のUV照射を行った。紅斑形成の評価は写真及び色差計による赤みの計測によって行った。

3．結　果

3. 1.　マイクロエマルションによる溶解度の改善

Table 1に示すように、疎水性の高いポリフェノールであるクェルセチン、ゲニステインともIPM、150 mM NaCl水溶液における溶解度は低く、飽和溶解度でポリフェノールを適用した場合、マイクロエマルションを用いることで有意に改善した[3, 4]。特にw/o型のマイクロエマルションDはo/w型のマイクロエマルションAに比べて、より効果的であった。一方、親水性のポリフェノールであるクロロゲン酸は、150 mM NaCl水溶液においても比較的高い溶解度を示した。マイクロエマルションを用いることで溶解度はさらに増大したが、疎水性のポリフェノール

とは異なり、o/w型のマイクロエマルションAを用いることで溶解度は、150 mM NaCl水溶液に比べて約8倍に増大し、より顕著に改善した。皮膚刺激性を減少するためにアルコール含量を減らしたo/w型のマイクロエマルションKでは、クロロゲン酸の溶解度は344.9±8.1mMと、マイクロエマルションAよりは少し低いものの、150 mM NaCl水溶液に比べて溶解度は約7倍に増大し、顕著な溶解度改善効果を示した。

3. 2. マイクロエマルションによる皮膚中移行の改善

Fig. 2にクェルセチンについて、Table 2にゲニステインの結果を示すように、マイクロエマルションを用いることで、これらの疎水性のポリフェノールの皮膚中移行量は顕著に増大した[3, 4]。また、Fig. 2にクェルセチンについて示すようにマイクロエマルションの構成成分であるTween80やエタノールの単独での皮膚移行促進効果は小さく、マイクロエマルションとして皮膚移行を促進していることが示唆された。また、Table 2にゲニステインについて示すように、これらの疎水性フェノールについては、w/o型のマイクロエマルションDの方が、o/w型のマイクロエマルションAよりも、皮膚移行性の改善効果がより大であった。

一方、親水性のポリフェノールであるクロロゲン酸については、Fig. 3に結果を示すように、150mM NaCl水溶液をvehicleとした場合にも1.49μmol/g skinとクェルセチンやゲニステインに比べて高い皮膚移行量が得られた。この理由の一つとして、150 mM NaCl水溶液でもクロロゲン酸が比較的高い溶解度を示すことがあげられる。しかしながら、150mM NaCl水溶液からのクロロゲン酸の皮膚移行量は、Fig. 2、Table 2に示したマイクロエマルションDをvehicleとして用いた場合のクェルセチン、ゲニステインの皮膚移行量よりも少なく、そのためマイクロエマルションによる改善を試みた。その結果、Fig. 3に示すように、特にo/w型のマイクロエマルションAあるいはKを用い

Table 1　Effects of Microemulsions on Solubility of Polyphenols

Vehicle	Solubility (mM)		
	Quercetin	Genistein	Chlorogenic Acid
150 mM NaCl	0.31 ± 0.15	0.059 ± 0.011	42.6 ± 2.0
IPM	0.64 ± 0.14	0.959 ± 0.097	0.012 ± 0.003
Microemulsion A	29.2 ± 3.1***	80.27 ± 4.63***	406.4 ± 19.4***
Microemulsion D	78.6 ± 8.9***	140.5 ± 13.1***	90.9 ± 3.7***

Data are the means ± S.D. of four experiments. ***, p <0.001, significantly different from the values in NaCl solution and IPM.

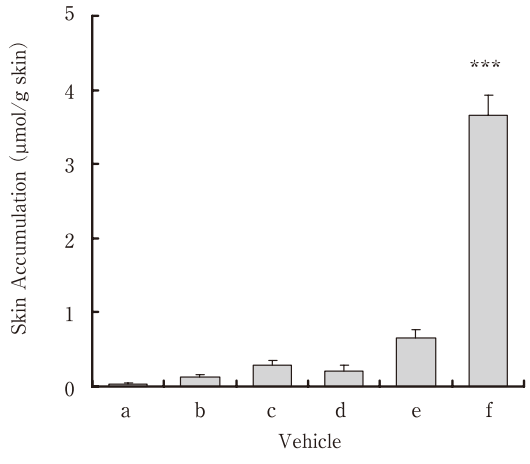


Fig.2　Effects of microemulsion on skin accumulation of quercetin in guinea pig skin applied as a suspension in either 150 mM NaCl solution (a), or isopropyl myristate (b), in a vehicle consisting of Tween80 and 150 mM NaCl solution (30:70) (c), in a vehicle consisting of ethanol and 150 mM NaCl solution (30:70) (d), at 20 mM in microemulsion D (e), at saturated concentration (78.6 mM) in microemulsion D (f). Data are the means± S.D. of four experiments. ***p < 0.001, significantly different from the values in other conditions.

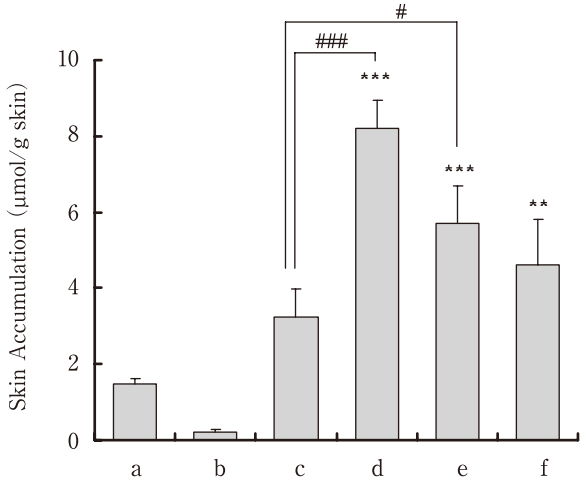


Fig.3　Skin accumulation of chlorogenic acid in guinea pig skin applied at saturated concentration in 150 mM NaCl solution (a), isopropyl myristate (b), microemulsion D (c), microemulsion A (d), , microemulsion K (e), and microemulsion K gel (f). Data are the means ± S.D. of four experiments. **p < 0.01, ***p < 0.001, significantly different from the values in NaCl solution and isopropyl myristate. #p < 0.05, ###p < 0.001, siginificant difference present between data.

ることで、150mM NaCl水溶液に比べて5.5倍あるいは3.8倍と顕著に移行量が増大した。また、その際の皮膚移行量は、マイクロエマルションDをvehicleとして用いた場合のクェルセチン、ゲニステインの皮膚移行量と比べて同等あるいはそれ以上であった。マイクロエマルションを皮膚に塗布する場合には、ゲル化することが必要であるが、Fig.3にマイクロエマルションKをゲル化した場合の例を示すように、ゲル化することで約80％に皮膚移行量が減少したものの、顕著な皮膚移行性が観察された。

モルモット皮膚の場合、毛穴が多く、そこからマイクロエマルションが皮膚内に移行する可能性も考えられる。そこで、ヒト皮膚に性状が類似しているユカタンマイクロピッグの皮膚[6]を用いて同様な検討を行った。Fig. 4にゲニステインの例を示すように、ユカタンマイクロピッグの皮膚を用いた場合にもマアイクロエマルションによる皮膚移行の改善が観察された[3, 4]。また、クェルセチンやゲニステインのような疎水性のポリフェノールではw/o型のマイクロエマルションが、クロロゲン酸のような親水性のポリフェノールではo/w型のマイクロエマルションがより有効であり、モルモット皮膚の場合と同様な結果が得られた。

また、これらのポリフェノールはフランツセルのレセプター側への移行は観察されず、皮膚中に留まることがわかった。さらに、皮膚の凍結切片を調製し、切片中のポリフェノール量を測定することで、皮膚の各深さでのポリフェノールの移行量を求めた。その結果、これらのポリフェノールは、皮膚表面付近に多く存在するものの、皮膚の深部へも移行していることがわかった[3]。

3. 3. 皮膚脂質過酸化に及ぼす皮膚中に移行したポリフェノールの影響

そこで、マイクロエマルションによって皮膚中に移行したポリフェノールの皮膚中での抗酸化作用の発現を観察するために、鉄（Ⅱ）とクエン酸イオンを用いて、マロンジアルデヒドの形成を観察することによって、皮膚の脂質過酸化に及ぼす影響を観察した。その結果、Fig. 5にゲニス

Table 2　Effects of Microemulsions on Intradermal Delivery of Genistein at Saturated Concentration

Vehicle	Skin Accumulation (μmol/g skin)
150 mM NaCl	0.10 ± 0.01
IPM	0.25 ± 0.05
Microemulsion A	3.55 ± 0.60***
Microemulsion D	5.92 ± 1.48***
Microemulsion D#	2.58 ± 0.55***

Data are the means ± S.D. of three experiments. ***, p <0.001, significantly different from the values in NaCl solution and IPM.　D#, gel-like microemulsion D.

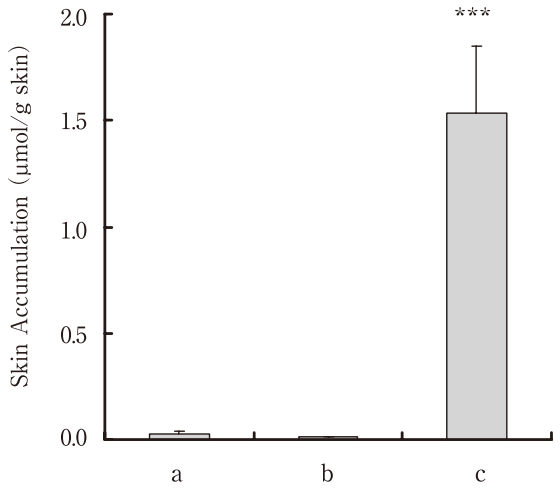


Fig.4　Skin accumulation of genistein in Yucatan micropig skin when applied as a Suspension in either 150 mM NaCl solution (a) or isopropyl myristate (b) and microemulsion D at saturated concentration (140 mM) (c).
Data are the means± S.D. of four experiments. ***p < 0.001, significantly different from the values in NaCl and isopropyl myristate.

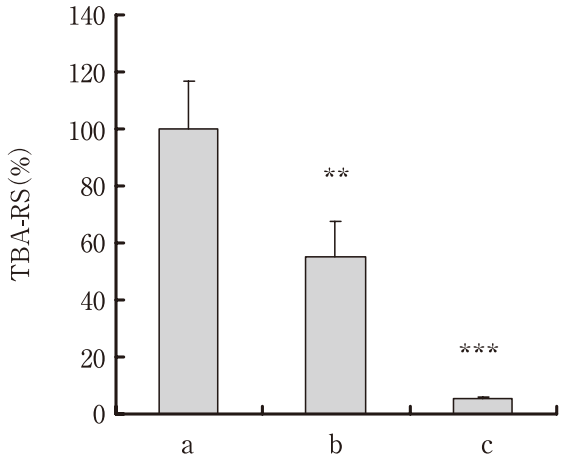


Fig.5　Effect of genistein on lipid peroxidation tested by ammonium iron(II) sulfate and sodium citrate when applied with microemulsion D at 0 mM (a), 20 mM (b) or saturated concentration (140 mM) (c).
Data are the means ± S.D. of four experiments. **p < 0.01, ***p < 0.001, significantly different from the value in the absence of genistein.

テインの例を示すように、皮膚に取り込まれたポリフェノールによって、脂質の過酸化が抑制されていることがわかった[3, 4]。

3. 4. UV 照射による紅斑形成に及ぼすポリフェノールの影響

ポリフェノールを含有し、ゲル様としたマイクロエマルションを皮膚に塗布し、UV照射による紅斑形成に及ぼす影響を観察した。ゲニステインを飽和濃度で含有しエアロジルR972によってゲル様としたマイクロエマルションDあるいはクロロゲン酸を飽和濃度含有しカルボポール987によってゲル化したマイクロエマルションKをモルモット皮膚に塗布することによって、紅斑形成が抑制されることが肉眼観察及び色差計による赤みの指標 a *値の観察（ゲニステインの場合、コントロール値4.5±1.7、飽和濃度の塗布下での値1.0±0.7**（n=6, **p<0.01）[4]、クロロゲン酸の場合、コントロール値5.0±0.8、飽和濃度の塗布下での値0.2±0.2***（n=6, ***p<0.001））によって確認された。

4．考　察

以上の結果より、マイクロエマルションによって、ポリフェノールの溶解度が改善し、皮膚移行も顕著に増大し、皮膚中に移行したポリフェノールは抗酸化作用を発現し、UVによる障害を防御することがわかった。また、疎水性のポリフェノールではw/o型の、親水性のポリフェノールではo/w型のマイクロエマルションがより有効であることがわかった。例えば、クロロゲン酸においては、vehicle中に添加したクロロゲン酸のうち皮膚に移行した割合は、150 mM NaCl水溶液、マイクロエマルションD、マイクロエマルションA、マイクロエマルションKで、それぞれ0.31％、0.32％、0.18％、0.15％であり、o/w型のマイクロエマルションでは、少しではあるが減少することがわかった。これらの結果を総合して考えると、溶解度の増大がマイクロエマルションによるポリフェノールの皮膚移行改善の最大の要因であることが推定される。しかしながら、一般に、媒体中の溶解度の増加は、媒体中での化合物をエネルギー的に安定化させ、皮膚への分配性を下げ、皮膚移行量の増大には結びつかない。マイクロエマルションの場合は、溶解度の増加とともに皮膚移行量も増大する。その理由は明らかでない。一つの可能性は、マイクロエマルションが高密度で皮膚表面に吸着し、界面を中心に存在するポリフェノールの皮膚移行性を上げることである。マイクロエマルションの成分が皮膚の角質層脂質と相互作用し、ポリフェノールの角質層への分配性と角質層の透過性を促進している可能性も考えられる[1, 7]。現在、マイクロエマルションによるポリフェノールの皮膚移行の改善機構についてさらに検討を進めるとともに、イオン性の界面活性剤を用いたマイクロエマルションによるより効率的な皮膚取りこみについて検討を進めている。

5．総　括

以上の結果、ポリフェノールを含有するマイクロエマルションは、ポリフェノールの溶解性を改善し、皮膚移行性を顕著に高めることによって皮膚の光老化を防御するための有用な製剤となりうることが明らかとなった。

謝　辞

本研究を遂行するにあたり、ご支援をいただいたコスメトロジー研究振興財団に厚く御礼申し上げます。また、本研究を実施するにあたり協力いただいた神戸薬科大学製剤学研究室の大学院生、卒業研究生の諸氏に深謝します。

（参考文献）

1）Pappinen S, Urtti A: Microemulsions in topical drug delivery, In : Smith EW, Maibach HI (eds) : Percutaneous penetration enhancers 2nd ED,CRC, Boca Raton, 2006, 109 − 116.

2）Heuschkel S., Goebel A., Neubert R H H, : Microemulsions − modern colloidal carrier for dermal and transdermal drug delivery, J. Pharm. Sci. 97, 603 − 631, 2008.

3）Kitagawa S, Tanaka Y, Tanaka M, et al. : Enhanced skin delivery of quercetin by microemulsion, J. Pharm. Pharmacol., 61, 855 − 860, 2009.

4）Kitagawa S, Inoue K, Teraoka R *et al.*:Enhanced skin delivery of genistein and other two isoflavones by microemulsion and prevention against UV irradiation-induced erythema formation, Chem. Pharm. Bull. 58, 398 − 401, 2010.

5）Fujii M, Yamanouchi S, Hori N, *et al.*:Evaluation of Yucatan micropig skin for use as an in vitro model for skin permeation study, Biol. Pharm. Bull. 20, 249 − 254, 1997.

6）Kurihara-Bergstrom T, Woodworth M, Feisullin S, *et al.* : Characterization of the Yucatan miniature pig skin and small intestine for pharmaceutical applications, Lab. Animal Sci. 36, 396 − 399, 1986..

7）Delgado-Charro MB, Iglesias-Vilas G., Blanco-Mendez J, *et al.* : Delivery of a hydrophilic solutes through the skin from novel microemulsion systems, Eur. J. Pharm. Biopharm, 43, 37 − 42, 1997.

皮膚組織再生を目的とした生体組織類似コラーゲン組織体の作製

東京医科歯科大学生体材料工学研究所
南　広祐

Most the of collagen matrix which is being used in tissue engineering and regenerative medicine is gel or sponge. This type of collagen matrix is good *in vitro* cell culture, but cannot be directly used in our body, for its high inflammatory response and poor mechanical property performance. Our goal is to prepare an artificial skin which possesses the same physical and biological property as that of native skin. As a first step for constructing an artificial skin, we tried to prepare a collagen matrix with similar structure of native skin. To achieve this goal, we executed fibrillogenesis of collagen triple helix in 0.9wt% NaCl and 0.02M Na_2HPO_4 aqueous solution using dialysis cassette. The resulting collagen matrix (F-Col) was composed of microfibrils which regulated D-periodicity. The collagen matrix prepared in this manner showed unfrangible mechanical strength and high swelling ratio. To make the collagen matrix much stronger, we executed air-drying to obtain a tougher collagen matrix (T-Col) which possesses viscoelastic property and high Young's modulus. The dry collagen matrix was composed of microlayers formed by the slow water evaporation. The lack in the collagen fibril triggered the macrophage invasion although the degradation was almost same as F-Col after implantation. Furthermore, the fibrous encapsulation promoted much faster for F-Col, leading to healing response. These indicate that the difference in the landscape (surface geometry) and morphology is crucial for the control of biological properties. These results also indicate that the constructing of a collagen matrix which possesses the resembling structure to that of native skin would able to lead us to apply the collagen in tissue engineering and regenerative medicine.

1. 緒　言

コラーゲンは人体組織を構成するポリペプチドであり、優れた生体適合性を有するため、種々なバイオマテリアル分野に広く応用されている。特に細胞培養用スキャフォードとして一般的に使われており、細胞の２次元細胞培養用としては優れた効果があるものの、３次元細胞培養用には未だ問題がある。問題の一つは、細胞を接着・増殖させるために多孔性構造をさせるが、その内部は直通孔ではないため、内部に浸透することが困難である。その結果、細胞は生着せずに死滅する。３次元細胞培養のために広く行われているエレクトロスピニング法は分解性と直通孔性の面では優れているものの、ポリマーとコラーゲンを混合する必要があるため、有機溶媒による毒性の問題や細胞培養に有効な作製条件を調節する必要がある。また、有機溶媒の毒性とコラーゲン構造破壊など種々の問題が存在する。現在、様々な応用分野にこの方法を用いているものの、まだ実用化されたものは数少ない。

コラーゲンの最大問題は低寸法安定性である。細胞培養時、収縮が起こる問題がある。これは、コラーゲンに細胞を培養した際、体積が変化することを意味する。コラーゲン組織体を組織代替物として加工して生体に移植する場合、問題を起こす可能性が高い。また、移植したコラーゲン組織体が生体内で再構築（remodeling）が行われる際、コラーゲン組織体の生分解が起きる。この生分解が組織の再構築より早く分解するのでデバイスの崩壊に繋がる可能性が高い。寸法安定性を解決するために行われている架橋法は、コラーゲン構造物の分解能力を低下させ、内部の細胞の生着性を低下させる[1)]。現在使用されているコラーゲン組織体はほぼ架橋されたコラーゲンで構成されている。しかし、架橋のため、細胞接着および増殖に有効な官能基を化学的に反応させるので安定した組織層の生成が難しい。

これらの問題は人工皮膚の開発にバリアとして作用する。移植するコラーゲン組織体の寸法安定性と分解性の調節、細胞の定着、増殖、遊走の促進、炎症抑制、高機械的な物性など物理的・生物学的特性を同時に確保する必要がある。本研究グループでは、実用的な人工皮膚を開発するため、コラーゲン組織体の構造制御に着目した。コラーゲン組織体を生体に移植することはこれを細胞の足場として使用することを意味する。細胞足場は、細胞挙動をコントロールする重要な役割を有する。生体内での細胞挙動を制御する微小環境では、足場は不溶性因子として知られており、足場の地形（landscape）や形態（morphology）により細胞の運命が決定される[2)]。現在使用されているコラーゲン組織体は架橋されているゲル（３重ら旋構造：３次構造）が多く、その地形と形態が生体組織と異なる。生体組織は繊維構造を有するコラーゲン複合体であり、ゲルではない。そのため、本研究室ではコラーゲンゲル組織体作製ではなく、生体組織と同様あるいは類似構造を有するコラーゲン組織体

Preparation of a collagen matrix for regeneration of the skin tissue
Kwangwoo Nam
Institute of Biomaterials Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

を作製し、生体組織の物理・生物学的特性を再現することを試みた。

生体組織類似構造はコラーゲン３重ら旋構造を繊維化することから始まる。コラーゲン分子はpHと塩の濃度によって配列が変わると知られている[3, 4] (Scheme 1)。特にNaClの濃度を調節することにより、生体内と類似条件でコラーゲンミクロ繊維の配列を再現することができ、生体コラーゲン繊維と同じ構造を有するコラーゲン構造体を作製することも可能である。即ち、コラーゲンミクロ繊維の配列を人体のコラーゲン配列を同様に作ることにより、生体組織と近い構造を人工的に再現することができ、３次元細胞培養による組織再生が実現可能であると考えられる。また、生体組織類似構造を有するため、生体内での炎症反応などを抑えることが可能である。即ち、コラーゲンミクロ繊維の配列を人体のコラーゲン配列を同様に作ることにより、今まで作られたコラーゲン構造体の中でも生体組織と近い構造を人工的に再現することができ、３次元細胞培養による組織再生が実現可能であると考えられる。

本研究では、人工皮膚に応用可能なコラーゲン構造体の作製を目的とし、生体類似構造を有するコラーゲン構造体を作製する方法とその物性を検討した。人工皮膚作製の重要な要件として、抗収縮性、抗炎症性および生分解性の調節、高機械的物性に注目し、コラーゲン繊維化を利用するコラーゲン構造体を作製することで、最終的には人体の皮膚組織を代替可能な皮膚組織再生の基盤技術の確立を目指した。

２．実験方法

2.1　コラーゲンマトリックスとコラーゲンゲルの作製

2.1.1 コラーゲンマトリックスの作製

コラーゲン0.5wt%と2wt%水溶液を用意し、透析カセットの中に注入（3mL）した後、4℃で$NaCl/Na_2HPO_4$水溶液に入れ、反応させた。24時間後、透析カセットを水で安定させた後（37℃）、コラーゲン構造体を透析カセットから出し、コラーゲン構造体（F-Col）を得た。より緻密な構造を有するコラーゲン構造体を得るため、F-Colを48時間自然乾燥させた後、蒸留水で洗浄し、薄い膜のようなコラーゲン構造体（T-Col）を得た。本報告書では、F-ColとT-Colを同時に示す時にはコラーゲンマトリックスを称した。

2.1.2　コラーゲンゲルの作製

繊維化されていないコラーゲン組織体を得、コラーゲンマトリックスと比べるために、コラーゲン0.5wt%と２wt%水溶液を透析カセットの中に注入（2.5mL）した後、4℃で超純水に入れ３日間透析を行った（F-Gel）。得られたコラーゲンゲルを48時間自然乾燥させた後、pH7.4の水溶液に入れ、24時間安定させ、T-Gelを作製した。

また、化学的に架橋されたコラーゲンゲルを作製し、その特性を調べるためにT-Gelを1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-1-carbodiimide hydrochloride（EDC）とN-hydroxysuccinimide（NHS）含有エタノール30%水溶液で24時間架橋した（ENゲル）[6]。F-Col、T-Col、コラーゲンゲル、そしてENゲルを用いて表面特性、物理的特性と生物学的特性を調べた。

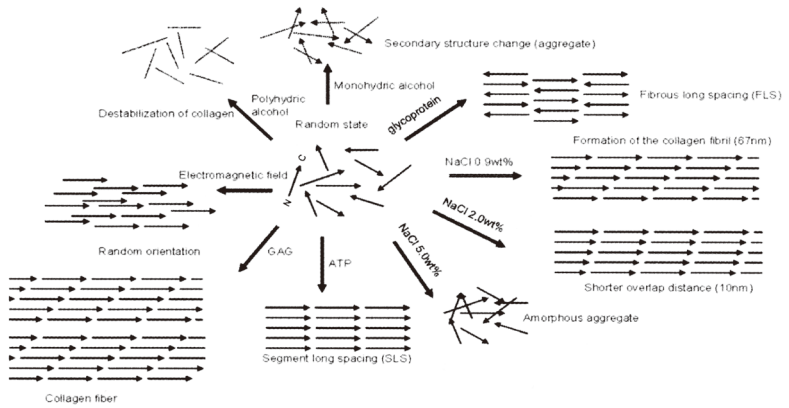
2.2　評価

2.2.1　構造特性観察

コラーゲンマトリックスのミクロ構造観察は、走査型電子顕微鏡（SEM）原子間力顕微鏡（AFM）を用いて行った。SEMを利用してコラーゲンマトリックスの繊維形成を観察した。AFMはコラーゲン繊維の*D*-staggerの有無を確認するとともに繊維の直径を測定し、ナノ構造の観察に使用した。

収縮挙動は37℃での体積の変化を超純水と生理食塩水の中で2週間観察した。また、生理食塩水の中にコラーゲンマトリックス及びコラーゲンゲルをいれ徐々に温度を上昇させ、サンプルの収縮および分解を確認した。

コラーゲンマトリックスの膨潤度、収縮挙動、コラゲナーゼによる生分解性を測定し、コラーゲンゲルと比較した。



Scheme1　Schematic image of change in the collagen alignment according to the solution conditions.

膨潤度の測定は蒸留水（25℃）で行われ、1週間後の含水したコラーゲンマトリックスとコラーゲンゲル重さと乾燥した後の重さを量った。膨潤度は式（1）を使用し計算した。

$$膨潤度\ (Q) = \frac{W_h - W_d}{W_d} \qquad (1)$$

W_h は含水した重さを、W_d は乾燥した重さを表す。また、マトリックスとゲルの含水率を計算するため、式（2）を使用した。

$$含水率\ (WR、\%) = \frac{W_d - W_h}{W_h} \times 100 \qquad (2)$$

2. 2. 2　機械的特性評価

機械的な物性を測定するために、２つの方法で応力・歪み挙動を調べた。F-Colの場合、圧縮実験を行い、圧力に対する機械的な強度を調べた。T-Colの場合、引張試験機を用いて、機械的な強度を測定した。得られたデータは応力・歪み曲線で再計算された後、ヤング率を計算した。

2. 3　コラーゲン繊維組織体の生物学的評価

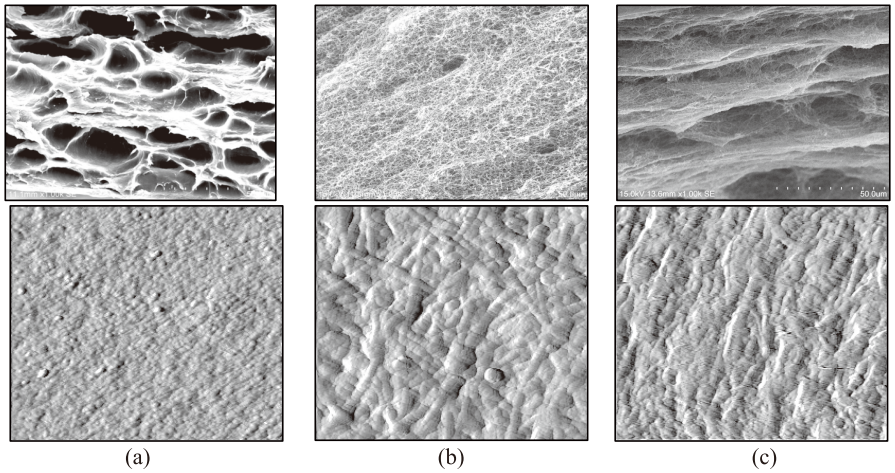
コラーゲン構造体とコラーゲンゲルの細胞挙動を調べるために、ラット由来のL929細胞を用いて*in vitro*実験を行った。コラーゲンマトリックスの生体内での挙動を調べるため、ラットに皮下移植を行った。移植されたコラーゲンマトリックスを2週、8週、24週にて回収し、ヘマトキシリン・エオジン染色とKt-104染色を用いて、組織学的評価を行った。

3. 結果および考察

3. 1　コラーゲンマトリックスの構造

コラーゲンマトリックスは水溶液で安定であり、加水分解することもなかった。SEMで観察した結果コラーゲンゲルとコラーゲンマトリックスの構造は異なることを見出した。Fig. 1に示したように、コラーゲンゲルの場合、大きな空を有する単一構造で構成されていることに対し、コラーゲンマトリックスは緻密な繊維構造で構成されていることが判明された。AFMの結果から、コラーゲンマトリックスのナノ構造はコラーゲン繊維で構成されており、コラーゲンゲルとは異なる繊維構造を有することが明らかとなった。コラーゲン繊維は規則的な*D*-stagger構造を有すること確認された[Fig. 1（a），下]。これは、生体組織と同様なナノ構造を有することを意味する。T-Colを水およびPBSに入れてもF-Colに戻らないこと。また、この繊維構造は自然乾燥後、緻密なミクロ層が形成されるものの、*D*-stagger構造に変化はない。これは、自然乾燥により自由水を増発され、構造再配列が起こるからである[5]。即ち、水の増発はマトリックスの中にミクロ層を構築させると思われる。このミクロ層は皮膚組織など生体組織のミクロ構造と似ている。

コラーゲンマトリックスのマクロ構造を見ると、２つの繊維層（コラーゲン繊維で構成された層）と1つのゲル層（コラーゲン繊維がない層）で構成されていることを見出した。即ち、2つの繊維層がゲル層を囲むサンドイッチ構造である。F-ColとT-Colのサンドイッチ構造は繊維化過程に深く関係する。F-Colの形成過程のスキームをFig 3に示した。コラーゲン水溶液を含んだ透析膜を$NaCl/Na_2HPO_4$水溶液に入れたら外から$NaCl$とNa_2HPO_4が浸透すると同時に中からはHClが漏洩される。HClの漏洩はゲル化を$NaCl$とNa_2HPO_4の浸透は繊維化を起こす。この反応は外から段階的に中に向けて起こる。HClの漏洩が速い場合、ゲル化が先に発生され、繊維化が起こらずに透明なゲル層を形成する。その結果、真中の部分は透明なゲル層が形成され、外の繊維化層に囲まれたようなマトリックスが作製される。T-Colを作製する際、このゲル層が接着剤のような役割を果たし、繊維化層を強く接着させる。これらの結果から、本コラーゲンマトリックスのナノとミクロ構造は生体組織と類似構造を有することを確認した。



(a)　(b)　(c)

Fig.1　The SEM images (upper) and AFM images (below) of (a) F-Gel and (b) F-Coll and (c) T-Col.

3. 2　コラーゲンマトリックスの物理的特性

コラーゲンマトリックスの構造により、その膨潤度に変化が現れた。F-Gelの場合、膨潤度（Q）が50を超えることに対し、F-Colの21に達した（Fig. 2）。一方、T-Colの場合、約3.8であり、F-Colと比べて6倍低膨潤度を示した。前項に述べたように、自由水の蒸発により構造が変化し、低膨潤度を示したと考えられる。その結果、T-Colの全体コラーゲン濃度は21%まで増加し、機械的な強度も上昇すると予測される。一方、ENゲルの膨潤度をT-Colと比べて見ると、T-Colの方が高膨潤度を示していることが確認された（Table 1）。これは、ENゲルの分子内架橋が水の吸収を阻止しており、化学的に架橋されていないT-Colより低膨潤度を有すると考えられる[4]。

コラーゲンゲルとコラーゲンマトリックスを37℃の超純水と生理食塩水に入れ、その安定性を観察した。コラーゲンゲルの場合、1週間でゲルの体積が低下することを確認した（Fig. 3）。一方、コラーゲンマトリックスの場合、体積の変化は見られなかった。これは、コラーゲン3重ら旋の変性に起因する。コラーゲン3重ら旋は45℃付近で変性するものの、37℃では部分的な変性が見られる。3重ら旋構造の変化はコラーゲン間分子間力を弱まり、結果的に分子再位置が発生し、ゲルが収縮する[6]。しかし、コラーゲンマトリックスの場合、繊維構造である4次構造で構成されている。コラーゲンら旋構造に変化が発生しても、繊維の中での分子配列は抑えられると考えられる。

Fig. 4は熱に対するコラーゲンマトリックス（T-Col）の挙動を示している。一般的にコラーゲンは高温（ブタやウシコラーゲンの場合45℃）で変性しゼラチン化する特徴を有する[6]。コラーゲンゲルの場合、高温でコラーゲン変性により、ゲル構造が崩壊する。一方、化学的に架橋したコラーゲンゲルは架橋剤によって異なるものの、65℃以上である[4]。F-Colの場合、マトリックスの崩壊は約50℃で見られた。T-Colの場合、80℃以上の高温でも崩壊が観察されず、収縮された。実際の変性温度を調べた結果、コラーゲンマトリックスの収縮温度はF-Colの場合50℃で、T-Colの場合65℃であり、生体組織の収縮温度と同じである。これは、コラーゲン繊維形成はコラーゲン安定性に関係するからである。Fig. 1に示したように、T-Colのミク

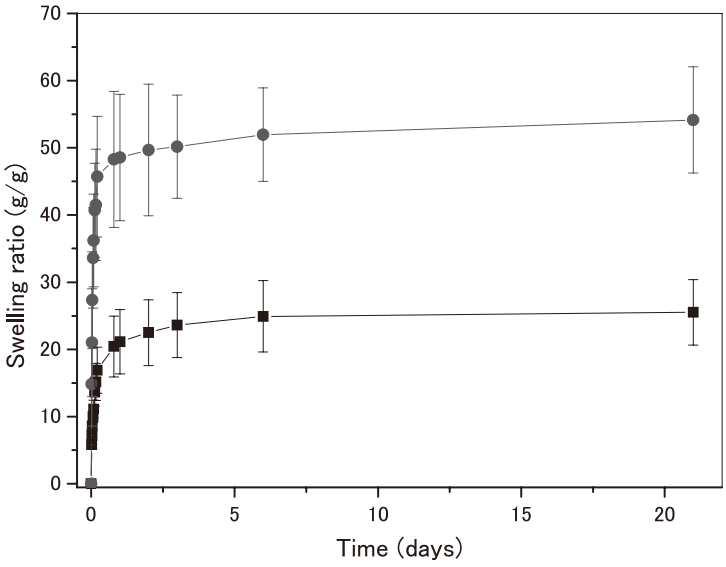


Fig. 2　The swelling ratio of F-Col (black line) and F-Gel (red line).

Table1　Swelling ratio (Q) and water content of F-Gel, F-Col and T-Col

Samples	Swelling ratio (Q)	water content (%)
F-Gel	55.6	99.2
F-Col	21.3	97.5
T-Col	3.8	79.0
EN gel	1.8	69.1

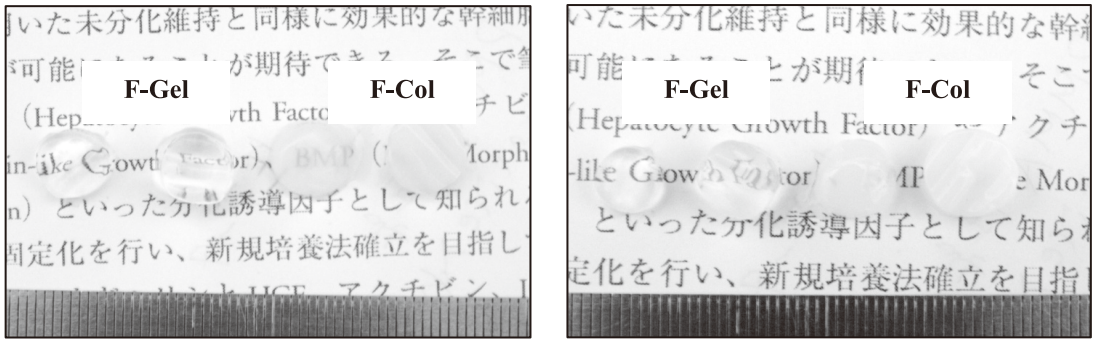


Fig. 3　Collagen gels and collagen matrices after 1 week in water (left) and pH 7.4 aqueous solution (right). Notice the change in the color and the size of collagen gels.

ロ構造はF-Colと比べて緻密な構造を有する。この構造は収縮温度を上乗させ、変性を抑制し、熱に対して比較的に安定な構造を維持させると考えられる。

3. 3　コラーゲンマトリックスの機械的特性

圧縮実験結果をFig 5に示す。コラーゲンゲルの場合、コラーゲンマトリックスと比べ、低強度を有する。また、コラーゲンゲルの場合、90%以上圧縮させたら崩壊されるものの、F-Colの場合は崩壊しないことを見出した（Fig. 5 (a)）。これは、コラーゲン構造に起因する現象であると考えられる。コラーゲンの繊維化によりコラーゲン組織体の強度増加は引張実験を行った際にも観察された。T-ColはT-Gelとほぼ同じ破断変形率を有するものの、ヤング率を大きな増加が確認された[Fig. 5 (b)]。これは、コラーゲンの繊維化はコラーゲンマトリックスの機械的な物性の増加に繋がることを意味する。これらの結果から、機械的な物性はその構造に起因することを示している。また、コラーゲンマトリックスの応力・歪み曲線は歪みの増加とともに上乗することを確認した（J-curve）[7]。これは、コラーゲンマトリックスは生物由来素材としての特徴を有することを意味する。架橋されたコラーゲンの場合、J-curveの特徴を遺失し、プラスチックのように固い挙動を示す。これから安定で生物由来素材の特性を有するコラーゲンマトリックスに架橋剤を使用せず得られることを意味する。

3. 4　生物学的評価

コラーゲンゲルとコラーゲンマトリックスの表面での細胞定着と増殖を観察した（Fig. 6）。その結果、コラーゲンマトリックスとコラーゲンゲル表面に対し、細胞挙動に大きな差は見られなかった。コラーゲン組織体の表面の上に細胞による新規コラーゲン層が見られた。この結果から、*in vitro*でのコラーゲンゲルとコラーゲンマトリックスに対する細胞挙動は同じであることを見出した。

しかし、コラーゲンマトリックスとコラーゲンゲルに対する生体内での生体反応は異なることが分かった（Fig. 7, 8, 9）。コラーゲンゲルの場合、生体内での分解がコラーゲンマトリックスより速いことが判明された。分解はF-Gelの場合、炎症反応を伴うことに対し、F-ColとT-Colの場合、炎症反応が抑えられることが分かった。移植した２週間ではF-Gelの分解はF-Colと比べ変わらなかった。しかし、移植物の周辺にマクロファージの生成が確認された（Fig. 7）。しかし、移植２か月後にはコラーゲンゲルは殆ど残らず、分解した。この反応は組織再構築に必要な自然的反応である[8]。一方、コラーゲンマトリックスの場合、移植2週間マクロファージの生成が抑えられていることを確認した。また、移植2か月後の結果を見ると、マトリックスの

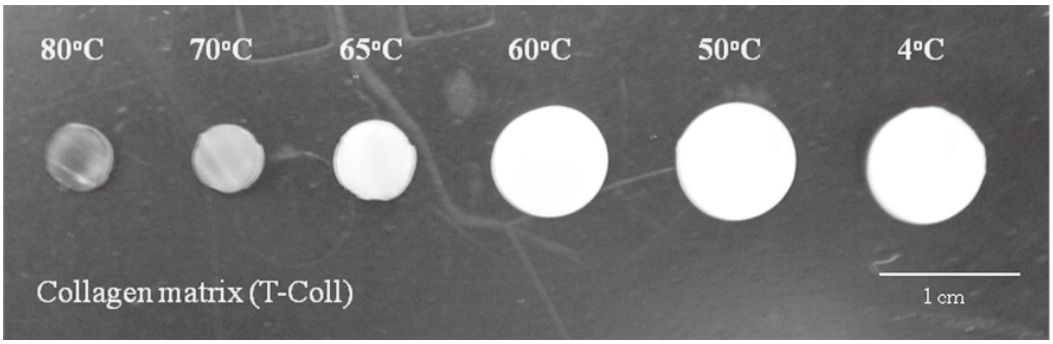


Fig. 4　Change in the size of T-Col according to the temperature.

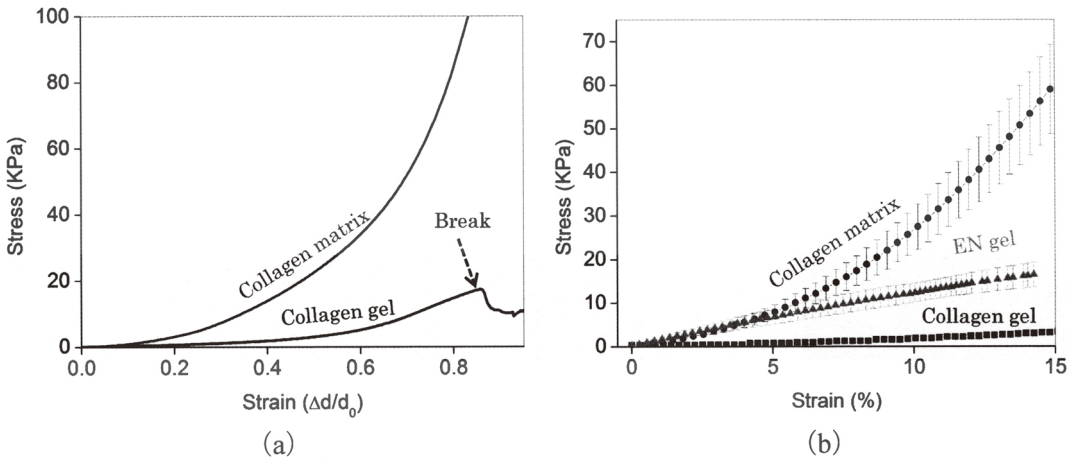


Fig. 5　The mechanical strength of F-Col and T-Col by compression test (a) and elongational test.

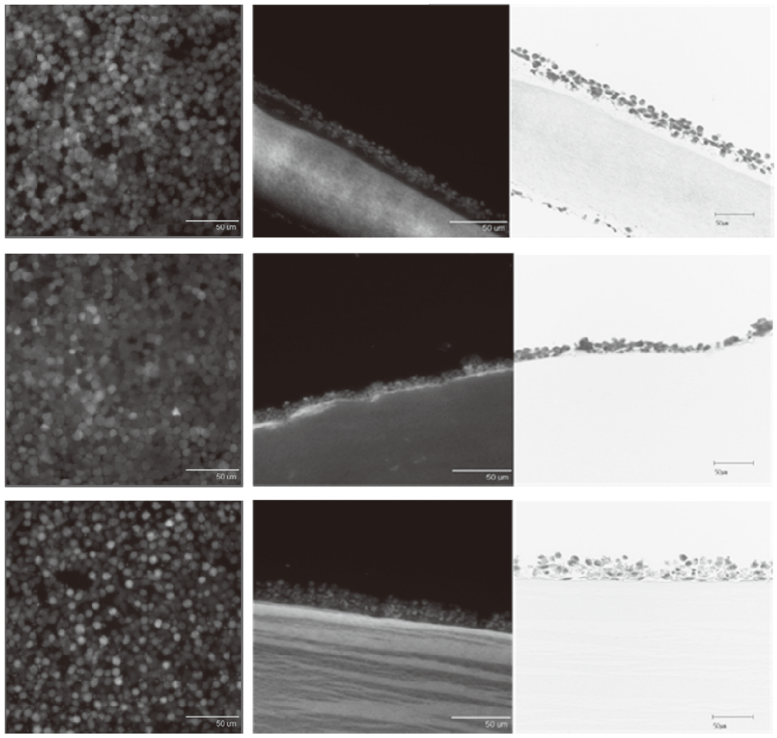


Fig. 6　(Left) Live/dead stained images of cell adhered on the F-Gel (top), F-Coll (middle), and T-Col (below). (Right) H-E-stained histological images of the collagen gel after 2 weeks of implantation. F-Gel (top), F-Coll (middle), and T-Col (below). Magnification, ×200.

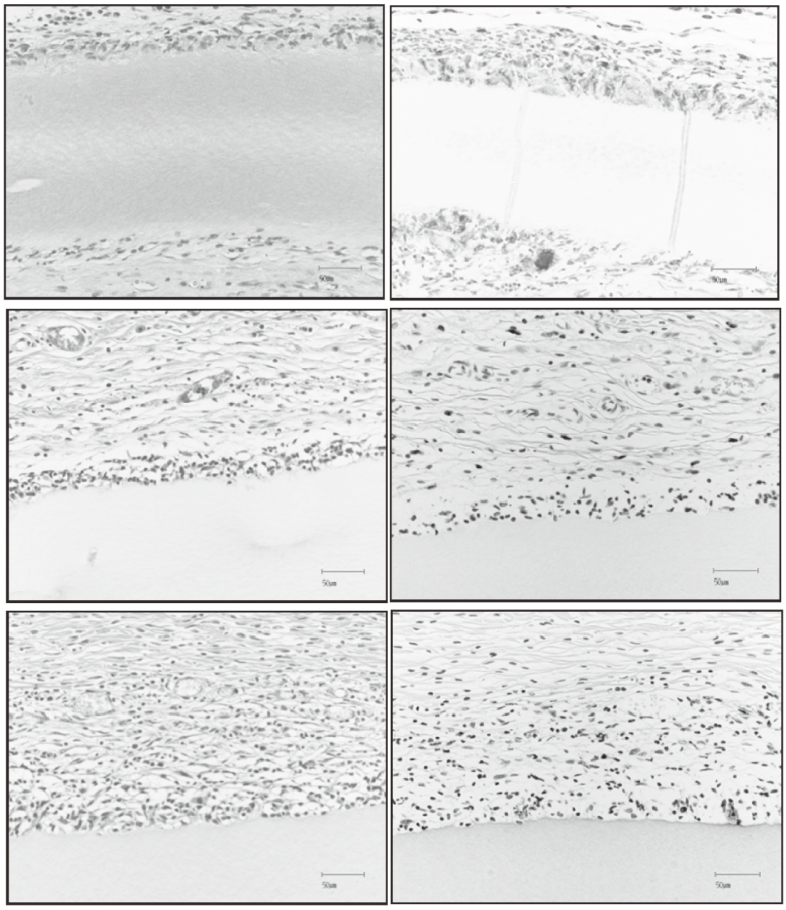


Fig. 7　H-E stained (left) and kt-014 stained (right) images of F-Gel (A,B), F-Coll (C,D), and T-Col (E,F) after 2 weeks of implantation.

周辺組織は炎症反応が抑えられたまま組織再構築が始まっていることが確認された（Fig. 8）。移植されたコラーゲンゲルは生体内では異物として認識されるので炎症反応が発生する。炎症反応を起こすマクロファージはコラーゲンの３重ら旋を特定し反応するインテグリン受容体を有するため、コラーゲンゲルを分解しながら中に浸潤する[9]。そのため、ゲルの周辺は激しい炎症反応が見られるともにゲルの分解は加速される。結局、ゲルの周辺組織の再構築、定着および機能化を遅延させる。

しかし、繊維化されたコラーゲン組織体は炎症反応が抑えられたまま周辺組織の再構築が見られた。F-Colの場合、細胞浸潤が見られたものの、炎症細胞（マクロファージと異物巨細胞）が見られなかった。また、周辺組織のコラーゲン繊維は成熟されていることが確認されていることから、治癒過程に入っていると考えられる。コラーゲンマトリックスが炎症反応を抑える理由は、コラーゲンゲルと異なる表面構造を有することに起因すると考える。コラーゲンゲルとコラーゲンマトリックスは架橋されていないため、同様の化学的性質を有する。しかしながら、コラーゲン繊維構造を有することで、生体は異物として反応しないので異物反応が発生しないと考えられる。これは、微小環境でのコラーゲン表面構造が非常に重要であることを意味する。この結果は、脱細胞組織の皮下移植結果とよく似ていることから、コラーゲン組織体の表面地形と形態により生体の異物反応が制御されると考えられる[10]。即ち、材料の生体組織構造や表面特性は生物学的機能と関連性があることを示している[11]。また、Fig. 3に示したようにコラーゲンの収縮が起きないため、人工皮膚として移植しても収縮する問題はないと思われる。

T-Colの場合、コラーゲンマトリックスの分解が起きなかった。しかし、炎症細胞による周辺組織のカプセル化が発生せず、コラーゲン繊維が生成されていることが明らか

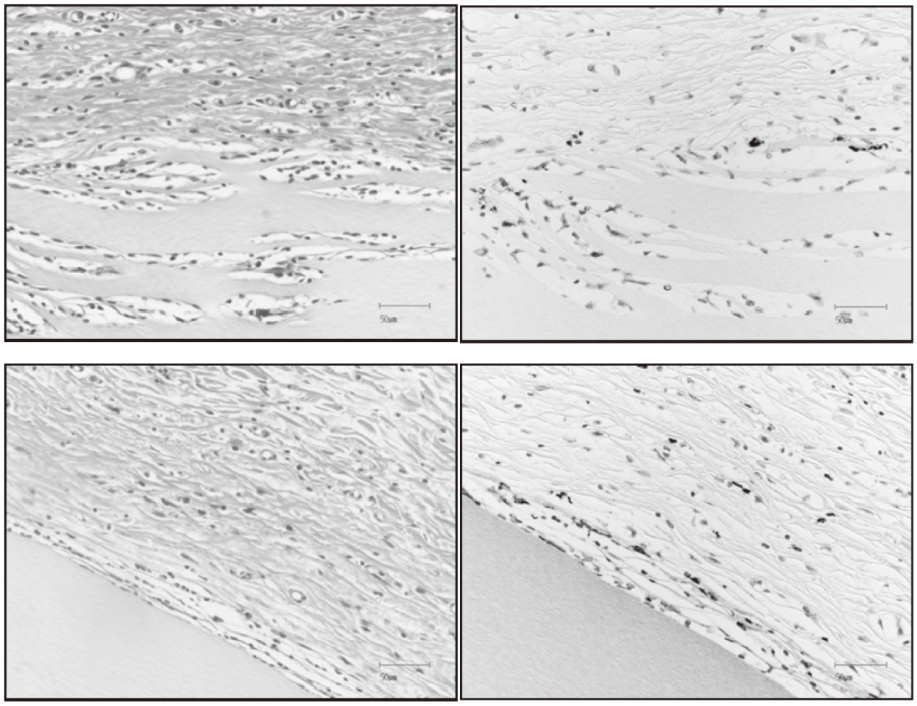


Fig. 8　H-E stained (left) and kt-014 stained (right) images of F-Coll (A, B), and T-Col (C, D) after 8 weeks of implantation.

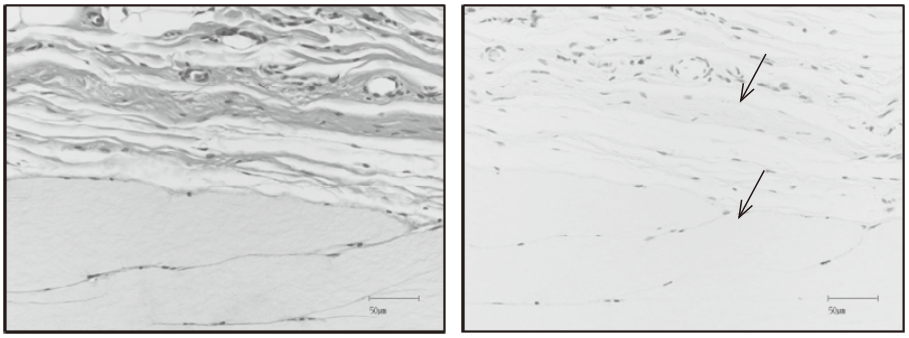


Fig. 9　H-E stained (left) and kt-014 stained (right) F-Coll after6 months of implantation.

となった。これは、組織の再構築には移植物の分解が伴う必要はないことを示している。また、F-ColとT-Colは細胞の定着が見られ、生体組織との融合が示唆された。これを6か月まで延長するとコラーゲンマトリックスは分解が進まず、そのまま残っていることを確認した（Fig. 9）。この時、コラーゲンマトリックスの周辺組織は既に再構築され熟成されたコラーゲン繊維（太い繊維）が見られた。また、コラーゲンマトリックスと生成されたコラーゲン繊維は完全に融合されていることが分かった（矢印）。これは、コラーゲンマトリックスの移植後、移植部位にそのマトリックスは分解せず、生体組織と融合し、その機能を果たすことが可能であることを意味する。類似挙動が移植した脱細胞組織でも見られることから、組織再構築には移植物の分解が伴う必要がないことを示している[10, 12]。即ち、生体内での機能化と周辺組織の再生が同時に得られることを意味する。この時、移植物と生体組織間相互作用は必修である。これは、細胞の定着が不可能な表面を有する移植物（例：架橋コラーゲン）は生体組織から遊離され、機能化できないからである。

これは、人工皮膚として移植した場合、ケロイド（傷痕）の抑制が可能であると期待される。ケロイドの発生は組織再構築と収縮に関係がある[13, 14]。移植後の周辺組織の再構築の際、コラーゲン繊維の過生成と収縮による周辺組織への機械的張力は生体によるコラーゲン繊維形成調節機能を低下させる。コラーゲンマトリックスの場合、寸法安定性を有すると同時に（Fig. 3）、マトリックスの崩壊やマクロファージによる異物反応が見られず、周辺組織の正常な構築と早期治癒が予測される（Fig. 7−9）ことから、皮膚ケロイド生成を抑制するとともに周辺組織との融合が起る可能であると考えられる。

4. 総　括

本研究では、繊維化がコラーゲンマトリックスの作製にとても重要であることを見出した。コラーゲンの繊維化と同時にゲル化が発生し、コラーゲンマトリックスを安定させると考えられる。また、コラーゲンマトリックスの物性は含水率を調節することにより制御可能である。このコラーゲンマトリックスは水と熱に対しての安定性と高機械的な物性を有する。コラーゲン組織体の構造調節の効果は移植実験で明らかとなった。生体組織に近い構造（繊維構造）を有することで炎症反応が抑えられるとともに、治癒過程が速くなることが分かった。本研究で開発したコラーゲンマトリックスを人工皮膚として応用することにより、移植した部位でのケロイドの抑制、早期組織再構築、機能回復が可能であると考えられる。

（参考文献）

1）Nam K, Kimura T, Kishida A. Physical and biological properties of collagen-phospholipid polymer hybrid gels, Biomaterials, 28, 3153–3162, 2007.

2）Warren Sands R, Mooney DJ. Polymers to direct cell fate by controlling the microenvironment. Curr Opin Biotech 18, 448-453, 2007.

3）Wood GC, Keech ML. The formation of fibrils from collagen solutions. The effect of experimental conditions: kinetics and electron microscopic studies. Biochem. J., 75, 588–598, 1960.

4）Kadler KE, Holmes DF, Trotter JA, Chapman JA. Collagen fibril formation. Biochem. J., 316, 1–11, 1996.

5）Nam K, Kimura T, Kishida A. Controlling coupling reaction of EDC and NHS for preparation of collagen gels using ethanol/water co-solvents. Macromol. Biosci., 8, 32–37, 2008.

6）Miles CA, Ghelashvili M. Polymer-in-a-box mechanism for the thermal stabilization of collagen molecules in fibers. Biophys. J., 76, 3243–3252, 1999.

7）Kuznetsova N, Chi SL, Leikin S. Type I collagen is thermally unstable at body temperature. Biochem., 37, 11888–11895, 1998.

8）Nathan C. Points of control in inflammation. Nature 420,846-852, 2002;.

9）Kao WJ, Zhao QH, Hiltner A, Anderson JM. Theoretical analysis of in vivo macrophage adhesion and foreign body giant cell formation on polydimethylsiloxane, low density polyethylene, and polyetherurethanes. J Biomed Mater Res;28,73-79,1994.

10）Funamoto S, Nam K, Kimura T, Murakoshi A, Hashimoto Y, Niwaya K, Kitamura S, Fujisato T, Kishida A. The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels. Biomaterials 31, 3590–3595, 2010.

11）Yip C. Biomaterials in Reparative Medicine: Biorelevant Structure-Property Analysis. Ann N Y Acad Sci 961, 109-111, 2002.

12）Allan B. Closer to nature: new biomaterials and tissue engineering in ophthalmology. Br J Ophthalmol 83, 1235-1240, 1999;.

13）Sussman MD, Effect of increased tissue traction upon tensile strength of cutaneous incisions in rats, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 123, 38–41, 1996.

14）Tuan T-L and Nichter LS. The molecular basis of keloid and hypertonic scar formation. Mol. Med. Today, 4, 19-24, 1998.

紫外線遮蔽剤用単分散板状酸化セリウムマイクロ粒子の合成及びその形態に由来する付加機能性の実現

東北大学多元物質科学研究所
殷　澍、佐藤　次雄

Monodispersed spherical, rod-like, and plate-like cerium oxide particles were successfully synthesized by homogeneous precipitation process followed by calcination in air at 400˚C. Monodispersed rod-like cerium carbonate precursor was produced at 70 ˚C for 2 h using the solution without pre-aging treatment, while monodispersed spherical precursor and plate-like precursor were obtained under the same conditions after pre-aging the solution at 25 ˚C for 72 and 144 h, respectively. In addition, micrometer sized plate-like cerium carbonate hydrate single crystal, $Ce_2(CO_3)_3.8H_2O$, was successfully prepared by another facile precipitation-aging process at room temperature using sodium hydrogencarbonate as precipitate reagent, and could be converted to plate-like cerium oxide CeO_2 by calcination in air at 400˚C. The particle size of $Ce_2(CO_3)_3.8H_2O$ could be controlled by precisely adjusting pH value of the solution and/or adding organic solvents such as ethylene glycol and various alcohols. CeO_2 particles showed the same morphology and slightly decreased particle size compare with those of rod-like, spherical and plate-like precursors. In comparison with commercial CeO_2 nanoparticles, the synthesized plate-like CeO_2 particles showed lower photocatalytic and oxidation catalytic activity, higher slipping characteristic (comfort of use) and higher pearlescent (gloss value) as well as excellent UV-shielding ability, indicating the potential applications as a new type of multifunctional cosmetic materials.

1．緒　言

無機材料による光吸収は、バンド間遷移が利用され、波長400 nm以下の紫外線の吸収には、バンドギャップエネルギー E_g が3eV程度の半導体を用いることが必要である。チタニアや酸化亜鉛は既に紫外線遮蔽材料として利用されているが、高い光触媒活性を有し、活性酸素の生成による化粧品母材や有機成分の光分解、DNAの損傷、皮膚の老化促進などとの関連が指摘されている[1),2)]。更に、ナノ粒子の安全性、酸化亜鉛には短波長側での吸収能力の不足、チタニアには大きな屈折率に起因する肌上に使用した際の白浮き現象などの問題がある[3),4)]。酸化セリウムは可視光領域における透明性が高く、光触媒活性が低いという特長があり、新規無機紫外線遮蔽剤として注目されている[5)−10)]。無機系紫外線遮蔽剤ナノ粒子は凝集しやすく、肌上に塗布したときの使用感が劣るため、使用感の優れた雲母等の板状ミクロン粒子との複合化が行われている。しかし、雲母やタルクは紫外線遮蔽能を有しないため、この様な複合化は紫外線遮蔽能を低下させる[11),12)]。本研究では、新規体質顔料 CeO_2 の合成技術の開発を目標とし、マイクロサイズセリア粒子の形態制御を行い、棒状、球状及び板状の単分散セリア粒子を合成し、特性評価を行うと共に、セリア粒子特性の形態依存性及び形態に由来する付加機能性について検討した。

*
Synthesis of Monodispersed Cerium Oxide UV-Shielding Material with Plate-like Micro-size Particles and Their Additional Functions Related to Their Morphologies
Shu Yin*, Tsugio Sato
Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University

2．実験方法

$Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ を出発原料として用い、尿素、エタノールアミン、ヘキサメチレンテトラミン（HMT）などを沈殿剤として用いた。0.008 MのCe塩と沈殿剤を一定の割合で混合した溶液を調製し50℃以下の低温でエージングを行った後、耐圧瓶に入れ密封し所定温度（70－150℃）で2 h反応を行い、反応後、濾過により沈殿物を回収し、蒸留水及びアセトンを用い洗浄した。低温エージング処理及び反応時間の影響などについて検討を行い、回収した沈殿物を400℃で2 h焼成し、形態が転写された酸化セリウムを得た。

更に、炭酸水素ナトリウムを沈殿剤として用い、低温でエージングを行い、その後の熱処理プロセス無で、板状粒子前駆体の合成を行った。0.008M－0.2Mの硝酸セリウム溶液に0.1－0.5Mの炭酸水素ナトリウム溶液とアルコール類有機溶媒（体積比は0－30vol%）をゆっくり混合させ、得られた沈殿物を25－75℃で1−3日エージングすることによって大きく成長した炭酸セリウム水和物が得られ、溶媒組成を変化させることによって粒子サイズ及び形態に及ぼす影響を検討した。前駆体を空気中400℃で2 h焼成し、形態が転写された酸化セリウムを得た。得られた試料の形態、組成、SEM, XRD, 粒子サイズ分布、拡散反射スペクトル、光沢度、酸化触媒活性、滑り性などを評価し、その機能性について検証した。

3．結果及び考察

0.008M $Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ と0.5M尿素の混合水溶液を、25℃でのエージングを基準として、反応条件の一部を変化さ

せることにより、粒子形態やサイズに及ぼす反応条件の影響を調べた。Ce $(NO_3)_3$－尿素水溶液をエージング無しで直接70℃、２hの反応で生成された粒子は、ロッド状であり（Fig. 1-a)、25℃で72hエージング行った後、70℃で２h加熱処理をすると均一な球状前駆体が得られた（Fig. 1-b)。更にエージング時間を144hに延ばし、70℃で２h加熱処理を行うと、薄い板状炭酸塩前駆体が生成された（Fig. 1-c)。これらの前駆体は、400℃で２h焼成すると形状を保持したままCeO_2に転化した（Fig. 2)。Fig. 3にはロッド状及び球状前駆体粒子及び400℃の空気中で仮焼処理したものの

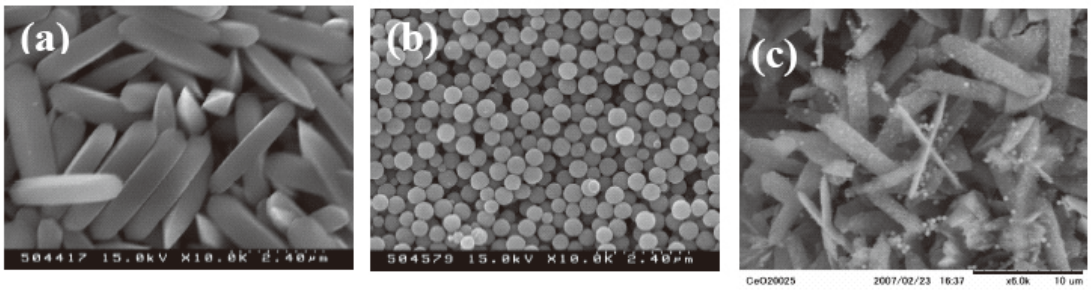


Fig.1　SEM photographs of cerium carbonate precursors synthesized in 0.5M urea aqueous solution at 25℃ with various pre-aging time of (a) 0h, (b) 72h, (c)144h, followed by heat treatment at 70℃ for 2h.

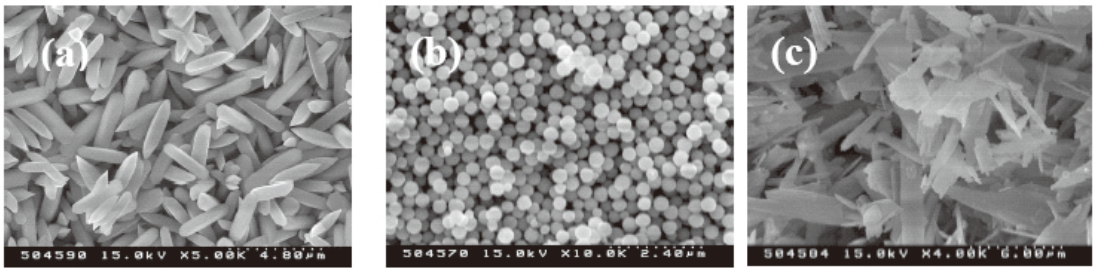


Fig.2　SEM photographs of the (a) rod-like; (b) spherical, and (c) plate-like CeO_2 particles prepared by calcination of cerium carbonate precursors with various morphologies in air at 400℃ for 1h.

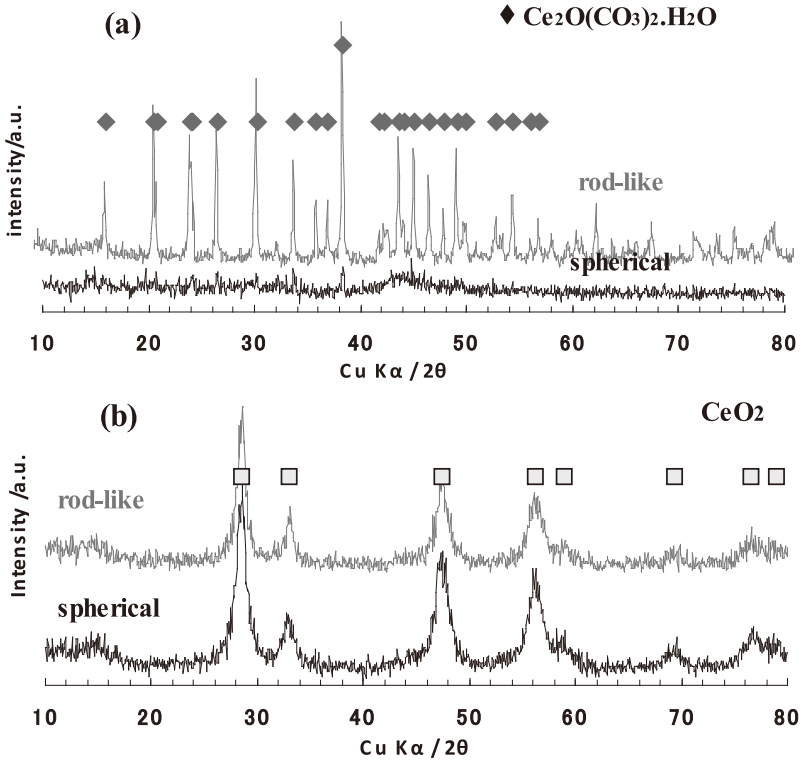


Fig.3　XRD patterns of (a) as-prepared rod-like and spherical cerium carbonate precursors and those of (b) ceria particles obtained after calcination at 400 ℃ for 1h. Rod-like sample was prepared without low-temperature pre-aging ; spherical sample was prepared with low-temperature pre-aging at 25℃ for 72h.

XRDパターンを示す。棒状粒子前駆体は炭酸塩$Ce_2O(CO_3)_2 \cdot H_2O$であるに対し、球状前駆体は結晶度が低く、非晶質に近い状態を示した。また焼成後の生成物はいずれも立方晶ホタル石型CeO_2であることを確認した。仮焼処理することによって、粒子形態を前駆体形態のまま残すことができ、粒子サイズは僅かに減少した。Fig. 4に球状前駆体粒子と酸化物の粒子サイズ分布を示す。非常に狭い粒径分布を示し、優れた単分散性を有することがわかる。粒子サイズは仮焼前の570nmより仮焼後488 nmに減少し、SEM写真と良く一致した。

また、$Ce(NO_3)_3$ 0.008 Mと0.5Mトリエタノールアミンの水溶液をエージング無しで90℃で2h処理した場合、65％の収率で150nm程度のナノサイズ棒状前駆体を得た(Fig. 5)。前駆体の組成は水酸化セリウムであった。尿素水溶液では70－150℃で尿素の加水分解が進行し、アンモニアと炭酸ガスが放出されることによって、pHが上昇し、異なる形態を有する塩基性炭酸セリウム前駆体が得られる。トリエタノールアミンを沈殿剤として用いた場合、炭酸イオンが放出されないため、炭酸塩前駆体の代わりに水酸化物前駆体が生成され、異なる形態の前駆体が得られたと考えられる。低温エージングを行うことによって、溶液中に微細な核が生成され，僅かなpH変化でも生成した核の形態が変化するため、その後高温で速やかに反応を進行させると核成長が進行し、形態の異なる炭酸塩ミクロン粒子が

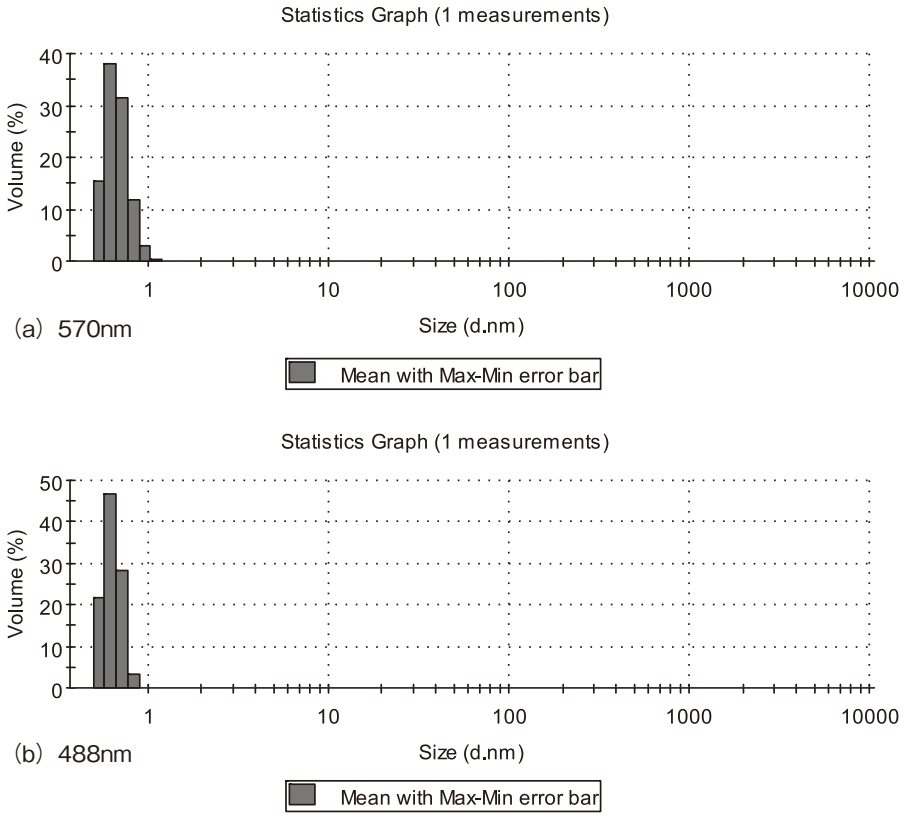


Fig.4 Size distributions of (a) as prepared spherical carbonate precursor and (b)spherical ceria particles prepared by calcination of carbonate in air at 400℃ for 1h.

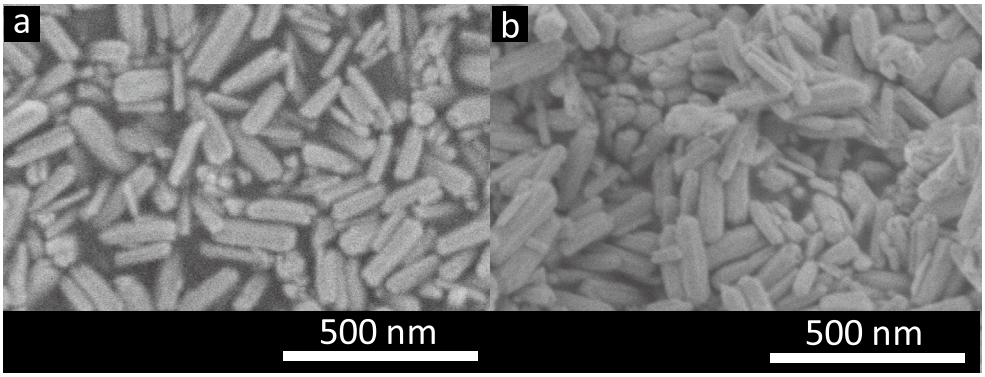


Fig.5 SEM photographs of (a) rod-like precursor synthesized in the presence of triethanolamine, followed by (b) calcination in air at 400℃ for 1h.

成長したと考えられる。尚、沈殿剤として炭酸イオンを生成しないヘキサメチレンテトラアミンを用いた場合、不定形水酸化セリウムとなった。これより、粒子サイズはエージング温度、時間及び反応温度を変化させることによって制御することができた。例えば0.008 M $Ce(NO_3)_3$と0.5 M尿素の水溶液を50℃で24hのエージングを行い、90℃で2h処理することにより、95%の収率で100～500nmの球状前駆体を得ることができた。さらに400℃で仮焼し前駆体を分解すると、前駆体の形態が転写されたCeO_2を合成することができた。

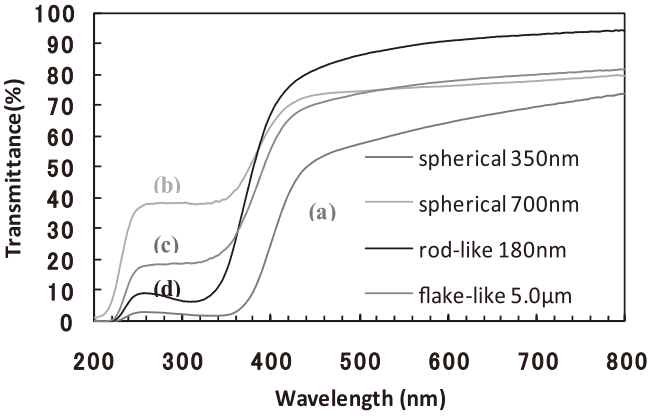


Fig.6 UV-Vis transmittance spectra of ceria thin film consisted of particles with various morphologies. (a) and (b) spherical morphology with particle size of 350nm and 700nm, respectively, (c) rod-like morphology with particle size of 180 nm, and (d) flake-like morphology with particle size of 5.0μm.

生成した棒状CeO_2粒子と球状CeO_2粒子の特性評価を行い、形態の変化による粒子特性への影響を調べた。ゼータ電位測定により、棒状CeO_2、球状CeO_2の等電点はpH 8.06、6.07となった。この等電点の差は、粒子表面の結晶面の違いによるものと考えられる。Fig. 6に示されるように、薄膜透過スペクトルの測定（膜厚12.5 μm）では棒状粒子に比べ球状粒子の透過率が全体的に減少していることが分かった。350 − 400 nmの吸収端はセリアのバンドギャップ構造に由来するものであり、吸収端の変化は粒子サイズの影響と考えられる。

尚、尿素を使う均一沈殿法の代わりに、炭酸水素ナトリウムを沈殿剤として用い、低温でエージングを行うと、直接板状炭酸セリウム水和物前駆体粒子を効率的に合成できることが分かった。

Fig. 7に0.1 M $Ce(NO_3)_3$を出発原料として用い、0.3 M $NaHCO_3$溶液中25℃で24hエージングし合成した炭酸塩前駆体及び更にそれを400℃で仮焼し生成した酸化物のSEM写真を示す。仮焼処理する前の炭酸塩前駆体はEDパターンより単結晶であることが分かる（Fig. 7-a）。仮焼処理によって、粒子サイズが若干減少したものの、形態が保持されていた（Fig. 7-b）。尚、溶媒に20vol%のエタノールを加えた場合、類似した形態が得られ、粒子サイズは水溶液系に比べ減少した（Fig. 7-c, d）。これは溶液中粒子の生成は溶解再析出メカニズムによって進行するため、有機溶媒を

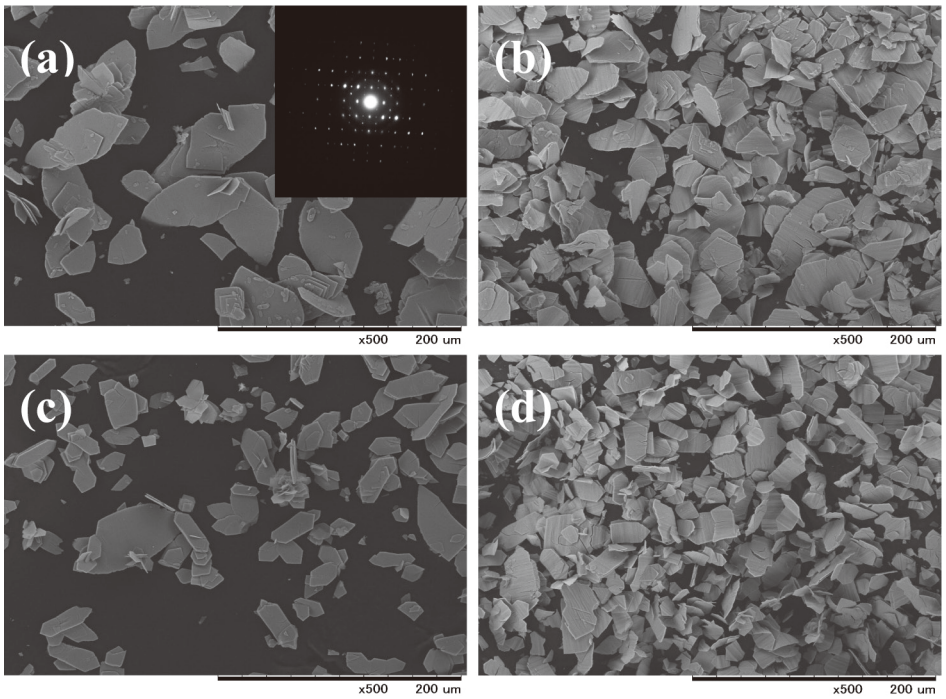


Fig.7 SEM photographs and ED pattern of (a) $Ce(CO_3)_2 \cdot 8H_2O$ synthesized in $NaHCO_3$ aqueous solution, (b) ceria particles synthesized by calcination of (a) in air at 400 ℃ for 1h; (c) $Ce(CO_3)_2 \cdot 8H_2O$ synthesized in $NaHCO_3$ –20vol% EtOH solution, and (d) ceria particles synthesized by calcination of (c) in air at 400℃ for 1h.

加えると、溶媒の誘電率が減少し、溶解度が減少したためと考えられる。エチレングリコール、ポリエチレングリコールなどの有機溶媒の添加も同様の効果が確認された。

Fig. 8に前駆体及び酸化物のXRDパターンを示す。前駆体サンプルの配性向性が高く、20° 付近の（004）ピークが非常に高い強度を示した。尚、10° 付近のピークは層状化合物であることを示唆し、リートベルト解析により試料が層状構造を有することが分かった。

Fig. 9は沈殿剤の影響を示す。炭酸水素ナトリウムの代わりに、炭酸ナトリウム及び炭酸カリウムを沈殿剤として添加した場合、板状と針状粒子の混合物となった。尚、塩化セリウムを出発原料として利用すると、細長い板状粒子になり、硫酸セリウムを出発原料として利用すると、均一性が若干落ち、硝酸アンモニウムセリウムを出発原料とした場合、不定形になった。

尚、Fig. 10に示されるように、$NaHCO_3$濃度と反応温度も生成物の形態に対し大きく影響を与え、高い処理温度では板状ではなく、ナノサイズ八面体或いはファイバー粒子に成長した。これより、板状粒子を作成するため、温度とpHの精密制御が必要であることが示唆された。

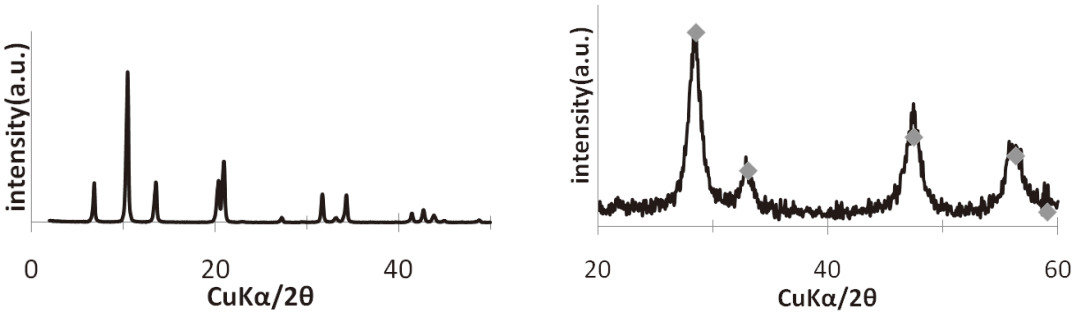


Fig.8　XRD patterns of (a) plate-like $Ce(CO_3)_2 \cdot 8H_2O$ and (b) plate-like CeO_2 particles.

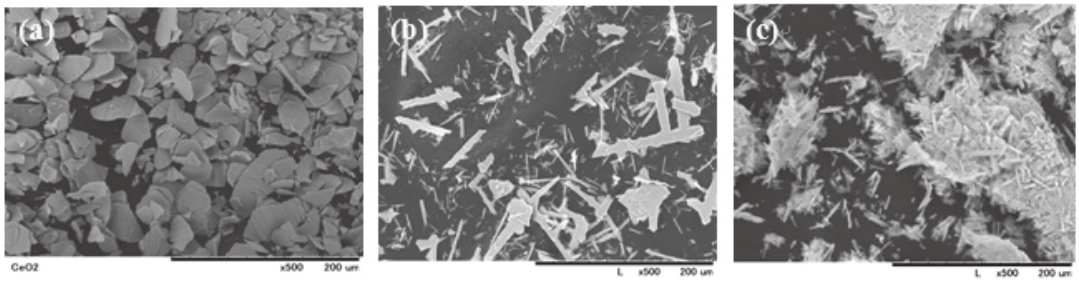


Fig.9　Effect of precipitation reagents on the morphology of the products. (a) $NaHCO_3$; (b) Na_2CO_3 (c) K_2CO_3;

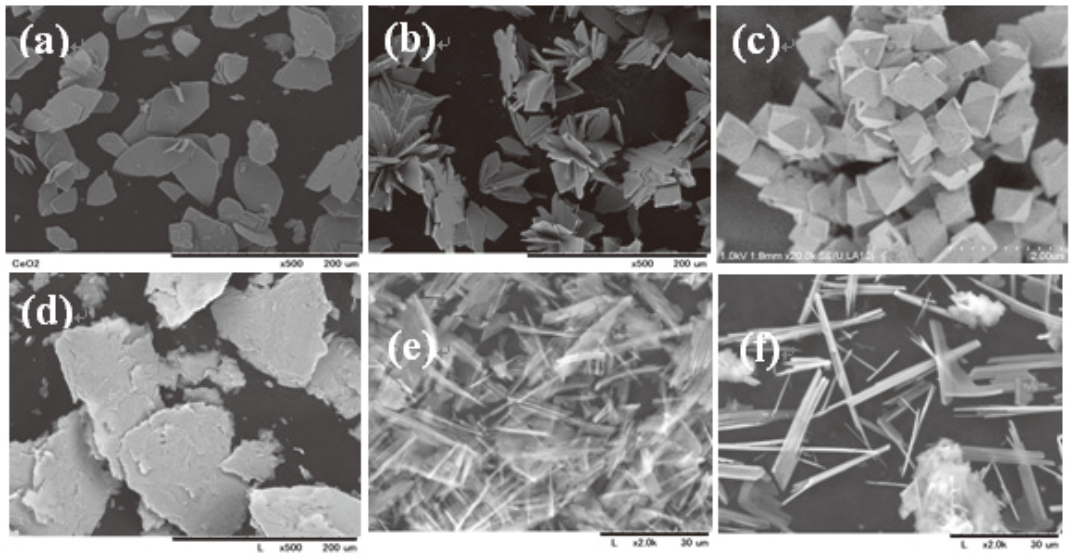


Fig.10　Effect of $NaHCO_3$ concentration and reaction temperature on the morphology of the products. (a) 0.3M $NaHCO_3$, 25℃ ; (b) 0.3M $NaHCO_3$, 75℃ ; (c) 0.3M $NaHCO_3$,150℃ ; (d) 0.45M $NaHCO_3$, 25℃ ; (e) 0.45M $NaHCO_3$, 50℃ ; (f) 0.45M $NaHCO_3$,75℃ .

マイクロサイズ板状セリア粒子はその大きなサイズに由来する付加機能が確認できる。板状セリア粒子をアセトン中に分散し、真空ろ過装置に設置したメンブレンフィルター上に流し込み、ろ過し、乾燥することによって、平坦な表面を持つ試料を調製し、光沢計（日本電色工業社製PG-1M）を用いて、試料表面での20度、60度及び80度鏡面の光沢度を測定したところ、Table 1に示されるように、市販雲母粒子（Yamaguchi Mica Y-3000）よりも高い光輝性を示すことが分かった。

形態制御された単分散均一サブミクロン及びミクロンサイズ酸化セリウムについて、体質顔料として利用するための特性評価として、ランシマット（Rancimate）法による酸化触媒活性評価を行った。10ｇヒマシ油にサンプル0.5ｇを入れ、120℃で、空気10L/minの流速でバブリンブさせ、油中の揮発成分を運んで、100ｍlの水にトラップさせ、水の電気伝導性を測定することによって酸化触媒活性を評価した結果をFig. 11に示す。比較としてTiO_2、ZnO、CeO_2ナノ粒子も用いた。これらの結果からCeO_2ナノ粒子はTiO_2やZnOと比べ、短い誘導時間を有し、非常に高い酸化触媒活性を示したが、板状炭酸塩前駆体と板状CeO_2粒子は誘導時間が長く、低い酸化触媒活性を示した。尚、光照射による溶液中フェノールの光触媒酸化分解について検討を行ったところ、光触媒活性は殆どなく、化粧品して十分利用できると考えられる。これは板状粒子のサイズが大きいため、表面積が小さくなり、低い触媒活性をもたらしたためと考えられる。

化粧品として使用される際の使用感を評価するため、動摩擦係数（滑り性）測定を行った結果をFig. 12に示す。板状酸化セリウムは市販化粧品材料と同程度の動摩擦係数が得られ、化粧品としての利用が可能であると考えられる。

4．総　括

環境に優しいソフト溶液プロセスによって、粒子形態および粒子サイズを精密に制御することに成功した。単分散酸化セリウムマイクロ粒子はＵＶ遮蔽能、光沢性のみならず、低い酸化触媒活性・光触媒活性、優れた摩擦感を示し、材料の形態・サイズに由来する新規機能性を見出した。人体に対する高い「安全性」を有し、優れた紫外線遮蔽機能及び様々な機能性を有する「マルチ機能性体質顔料」としての応用が可能である。

5．謝　辞

本研究は、平成20年度コスメトロジー研究振興財団の研究助成を受けて行ったものである。同助成会に心より感謝致します。

Table 1 Physical properties of plate-like cerium carbonate and ceria particles.

	Plate-like cerium carbonate*	Plate-like cerium oxide**	Commercial mica powders (Y-3000)
20° Average gloss level（GU）	5.8	2.3	1.9
60° Average gloss level（GU）	18.0	12.0	7.2
80° Average gloss level（GU）	8.9	15.4	0.8
Average size（μm）	65	60	23
Average thichness（μm） Aspect ratio	1.2 55	1.2 50	0.33 70

* Synthesized in 0.008M $Ce(NO_3)_3 \cdot 8H_2O$ and 0.1M $NaHCO_3$ solution.
** Synthesized by calcination of cerium carbonate in air at 400℃ for 1h.

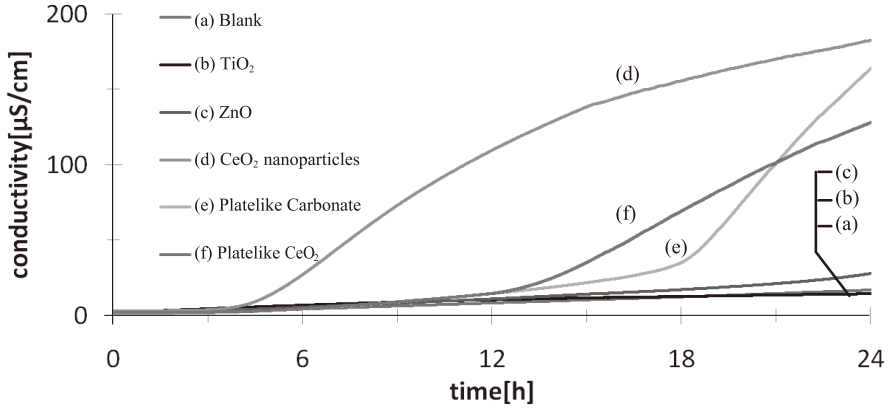


Fig.11　Results of Ranshimat test at 120℃ for various nanoparticles and plate-like samples.

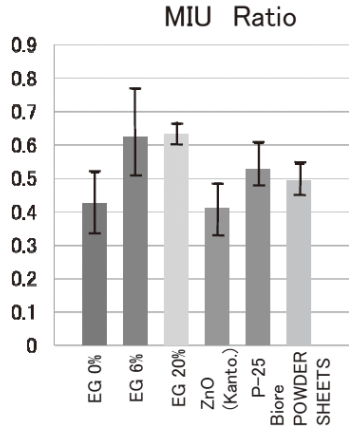


Fig.12 Dynamic friction coefficients of various samples.

(参考文献)

1）G.WAKEFIELD, M.GREEN, S.LIPSCOMB, 他, Modified Titania Nanomaterials for Sunscreen Applications - Reducing Free Radical Generation and DNA Damage, *Mater. Sci. Technol.*, **20**, 985-988, 2004.

2）T.SATO, A.M.EL-TONI, S.YIN, 他, DNA Damage upon UV Illumination in the Presence of Inorganic UV-shielding Materials, *Key Engineering Materials*, **352** 293-296, 2007.

3）T.MEYER, D.BEASLEY, At Common Usage Levels Titanium Dioxide is Not a Substitute for Avobenzone or Zinc Oxide for Broad-spectrum Protection in Sunscreen Products, *J.Am. Acad. Dermatol.*, **56**, AB164-AB164, 2007.

4）M.NEWMAN, M.STOTLAND, J.ELLIS, The Safety of Nanosized Particles in Titanium Dioxide- and Zinc Oxide-Based Sunscreens, *J.Am. Acad. Dermatol.*, **61**, 685-692,2009.

5）R.LI, S.YABE, M.YAMASHITA, 他, UV-Shielding Properties of Zinc Oxide Doped Ceria Fine Powders via Soft Solution Chemical Routes. *Mater. Chem. Phys.*, **75**, 39-44, 2002.

6）佐藤次雄、殷 澍、矢部信良, セリア系新規紫外線しゃへい剤の開発, J Soc. Inorg. *Mater. Jpn*, **9**, 67-75, 2002.

7）佐藤次雄、殷 澍、矢部信良, 非晶質シリカ被覆カルシア固溶セリアナノ粒子の合成と光化学特性, *工業材料*, **50**, 45-48, 2002.

8）T. MASUI , R. HAMADA , G. ADACHI, 他、New method to synthesize BN-coated cerium oxide using condensation of boric acid and 2,2’-iminodiethanol, *J.Alloys Comp.*, **344**, 148-151, 2002.

9）L. SRONEK, J. MAJIMEL, Y. KIHN, 他, New Highly Divided Ce-Ca-Based Oxyfluorides with UV-Shielding Properties: Study of the $Ce_{1-x}Ca_xO_{2-x}$ and $Ce_{1-x}Ca_xO_{2-x-y/2}F_y$ Series, *Chem. Mater.*, **19**, 5110-5121, 2007.

10）佐藤次雄、殷 澍、藤代芳伸、他、シリカ被覆セリアナノ複合体の合成と紫外線遮蔽特性, *粉体及び粉体冶金*, **51**, 107-112, 2004.

11）A. M. EL-TONI, S. YIN, and T. SATO, Synthesis and silica coating of calcia-doped ceria/plate-like titanate ($K_{0.8}Li_{0.27}Ti_{1.73}O_4$) nanocomposite by seeded polymerization technique, *Mater. Chem. Phys.*, **103**, 345-350, 2007.

12）T. SATO, A. M. EL-TONI, S. YIN, 他, Synthesis and UV-shielding Property of Plate-like Potassium Lithium Titanate Coated with Calcia-doped Ceria Nanoparticles, *J. Ceram. Soc. Jpn.*, **115**, 571-576, 2007.

細胞外マトリックス分解性微生物酵素を用いた動物原料からコスメトロジー素材への実用的アプローチ

京都府立大学大学院生命環境科学研究科応用生命科学専攻

渡部　邦彦

Among those hard-to-degrade animal proteins, the most major proteins are extracellular matrix proteins (EMPs) and collagen is one of the representative components. Subsequently to EMPs, a large amount of keratins are also generated mainly from the poultry processing factories and leather industry. We have studied for collagen and keratin degradation by thermophilic bacteria. In this project, we investigated the possibilities of producing cosmetic materials by use of thermophilic bacteria we isolated and their enzymes as a practical approach. The main issues we challenged are (i) preparation of EMPs in lower molecular weight with collagenolytic enzymes, (ii) preparation of keratin fragments from poultry feathers with a thermophilic bacterium, and (iii) investigation of bioactivity for keratin fragments prepared.

1．緒　言

細胞外マトリックスタンパク質は、多細胞動物細胞にとって必須な成分で、動物細胞を外側からひとつずつ包みこむことで細胞の形状保護、内部機能の維持、そして細胞集合体である組織形成を可能にする。このタンパク質はいずれも難分解性動物タンパク質で、コラーゲンが最大成分である。表皮や羽毛等の主成分であるケラチンと共に動物由来の難分解性動物タンパク質では二大成分となっており、産業廃棄物として食品加工産業を中心に、国内だけでも年間200万トン以上排出される[1)]。これらのタンパク質は、難分解性である上に現段階では付加価値のある再生利用先がなく、再生利用につながる研究も進んで来なかったため、大部分が焼却廃棄処分されている。この２つの主要タンパク質およびその分解物は、細胞発生・接着、ガン浸潤など生体内での多様かつ重要な役割に関わっていることが研究の進展と共に明らかになってきており、その生理作用を維持する付加価値の高い機能を持った化粧品や食品の基礎材料として再生利用の期待が高くなってきている（Fig. 1）。

我々は、自然界から難分解性動物タンパク質を強力に分解する新規好熱性細菌を独自に単離し、動物組織でもっとも多量に含まれるコラーゲンおよびトリ羽毛に含まれるケラチンに絞った分解に取り組んでいる[2–3)]。そこでは微生物本体あるいはこれらが生産する酵素タンパク質を用い、酸アルカリの過激な分解とは異なる微生物機能によるマイルドな難分解性動物タンパク質分解を実施し、これらの再生利用を可能にするための研究を展開している。一般に常温で難分解性動物タンパク質に作用する微生物は病原性に関わるものが多いが、好熱性細菌は至適生育温度を60℃以上に持ち、その恐れがないため安全性の高いツールである。さらに好熱性細菌由来の酵素タンパク質は、常温由来の酵素タンパク質に比べ格段に安定である。本研究では、このような利点を生かし、コスメトロジー素材への応用を検討した。

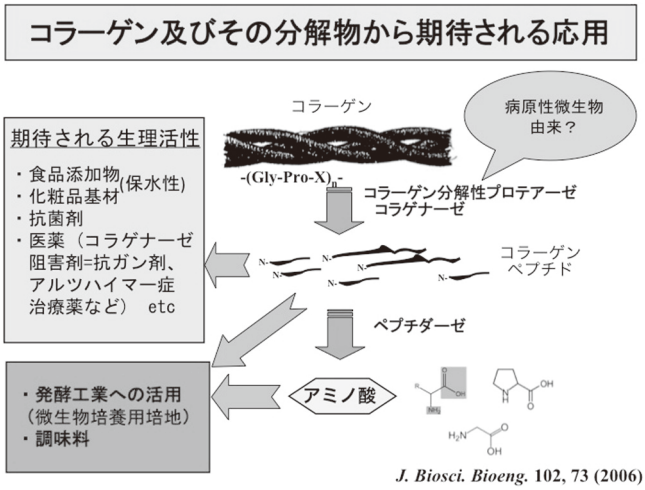


Fig. 1　コラーゲン及びその分解物から期待される応用

2．実　験

2．1　コラーゲン分解系酵素群による細胞外マトリックス（コラーゲン）分解と産物の解析

コラーゲン分解のため我々が京都市左京区から単離した好熱性細菌 *Geobacillus collagenovorans* MO-1株が生産するコラーゲン分解性プロテアーゼ、およびPz-ペプチダーゼ（Pz-A、Pz-B）を精製した後に用いた[2)]。コラーゲン分解性プロテアーゼはコラーゲンを直接分解するエンドタイプの酵素で、オリゴペプチドへの低分化を調査し、Pz-ペプチダーゼは、コラーゲン特異繰り返し配列（Gly-Pro-X）を認識し、Gly-Proの直前で加水分解する特性を用いてさ

Practical applications for production of cosmetic materials from animal proteins by employing microbial enzymes that specifically degrade animal extracellular matrix proteins

Kunihiko Watanabe

Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural University

らに短いペプチドの調製を検討した。コラーゲン分解は、総体積2.5ml（50mM Tris-HCl（pH 7.5），5 mM $CaCl_2$, 2.5 mgコラーゲン（豚Type I））、60℃で適宜コラーゲン分解性プロテアーゼを加え0または4 h反応を行い、煮沸により反応停止した。さらにこの反応溶液に対しPzペプチダーゼの添加後、同温度同条件で二次反応を0または3 hを行い、同様に反応停止させた後、遠心分離（10,000 xg, 5 min）後の上清をサンプルとした。C_{18}カラム（逆相（アセトニトリル／水））による高速液体クロマトグラフィー（HPLC）でペプチドの分離・確認、さらに薄層クロマトグラフィー（TLC）によりアミノ酸検出を行った。

2．2　コラーゲン分解系酵素の1つ、Pz- ペプチダーゼA（Pz-A）の構造解析

G. collagenovorans MO-1株が生産するコラーゲン分解酵素系には特色ある酵素が幾つもあり、その中で特にPz-ペプチダーゼ（Pz-A）を中心に、そのX線による結晶構造解析と特異的阻害剤との共結晶複合体のX線結晶構造解析により、反応機構の解析を行った。

2．3　ケラチン分解産物を用いたコスメトロジー素材の開発

トリ羽毛はケラチン蛋白質を90％以上含むが難分解性であるため、その分解物のコスメトロジー素材への検討は行われていなかった。神戸有馬温泉より単離した*Meiothermus ruber* H328株を用いてトリ羽毛ケラチンの分解系を構築し、この産物の有効利用を検討した。H328株によるトリ羽毛の分解の培養は、60℃で振盪により、YS培地（0.5％（w/v）yeast extract、0.5％（w/v）sucrose）に、３％（w/v）トリ羽毛と、特に0.5％（w/v）$CaCO_3$を添加し0－6日間培養を行った。この培養液を遠心、濾過後、培養上清として得て、アミノ酸分析、MALDI-TOF-MS解析などを行った。

2．4　新素材のコスメトロジー素材としての検討

微生物由来の細胞外マトリックス分解性酵素群を用いた分解物に対し、化粧品、薬品、薬品素材としての価値を検証するため、２．２でトリ羽毛ケラチン分解物に対し、(i) 抗菌活性、(ii) 抗酸化、酸化抑制効果、(iii) 上皮細胞増殖活性化因子について効果を調査した。

2．5　ケラチン分解酵素の各種薬剤に対する耐性調査

M. ruber H328株が生産するケラチン分解酵素を、細胞培養液から抽出し、各種薬剤（界面活性剤、有機溶媒など）に対する耐性を、60℃で処理し、その残存する活性を測定することで調査した。

3．結果および考察

3．1　コラーゲン分解系酵素群による細胞外マトリックス（コラーゲン）分解と産物の解析

まず単離したコラーゲン分解性好熱菌*G. collagenovorans* MO-1株が生産するコラーゲン分解性プロテアーゼを第1段階に用いてコラーゲンペプチドを調製し、さらに２段階目としてコラーゲンのトリペプチド特異配列を認識し、コラーゲン分解ペプチドをさらに小さく分解する同菌株の２つのPzペプチダーゼによる分解を行い、反応産物の解析を行った。

Fig. 2に見られるように、コラーゲン分解性プロテアーゼにより、HPLCで検出出来るコラーゲン由来のペプチドが増加していることが確認された。これは親水性の高い短い溶出時間帯（Fig. 2A）だけでなく、アセトニトリルの割合を増加させた溶出画分でも確認された。また、この酵素の反応物に対し、さらにPzペプチダーゼの添加を行ったものでもいずれも顕著な増加が見られた。しかし、コラーゲンのアミノ酸一次配列は、決して単調な繰り返しではないため、極端に多いペプチドフラグメントに収束することはなかった。

続いて、HPLCで溶出されるペプチドを溶出時間により10画分に分け、遊離と酸加水分解後のアミノ酸をTLCで検出した。その結果、遊離アミノ酸は２つの酵素反応後も極めて少ない量しか検出されないものの、酸加水分解後は、Gly, Pro, Leu, Alaがこの順で顕著に検出された。さらにヒドロキシプロリンも著量観察された。このことは、酵素反応により遊離アミノ酸ではなく、ジペプチド以上の長さのオリゴペプチドに分解され、コラーゲンの成分比で50%近くを占めるGly, Proが最も多いことが判った。さらにコラーゲン分子上で翻訳後修飾により水酸化されたヒドロキシプロリンも確認できることから、ヒドロキシプロリン含有ペプチドも２つの酵素により断片化されることが示された。

3．2　コラーゲン分解系酵素：Pz- ペプチダーゼA (Pz-A) の構造解析[4)]

G. collagenovorans MO-1株が生産するコラーゲン分解酵素系の中で、特にPz-ペプチダーゼ（Pz-A）について、そのX線による結晶構造解析と特異的阻害剤との共結晶複合体のX線結晶構造解析により、反応機構の解析を行った。

これまで、コラーゲンまたはコラーゲン分解物であるコラーゲンペプチドを、コラーゲン分解性酵素に添加して共結晶構造を解析したものは報告されていなかった。そこでコラーゲン特異配列Gly-Proを２回も含むGly-Pro-(*L,D*)-Phe-(PO_2CH_2)-Gly-Pro-Nleを阻害剤に用いて、その共結晶構造の解析を行い、反応機構解析を行った。

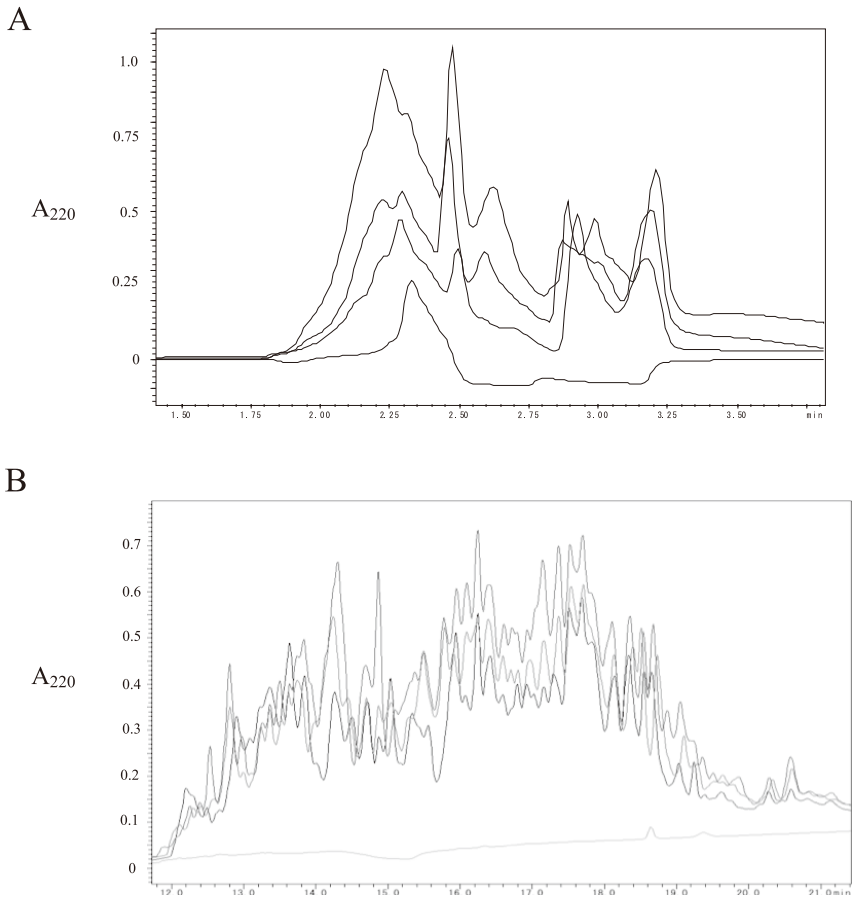


Fig. 2　コラーゲン分解物の逆相クロマトグラフ (A. 1.5-4 min 溶出 ; B, 12-21 min 溶出)
－ コラーゲン分解性酵素反応 0 h、－ 同　4 h, － Pz-A 反応 0 h、－ 同　3 h

Fig. 3　Pz- ペプチダーゼ A の結晶構造 [4)]
α ヘリックスをねじ状コイル、β ストランドを矢印で表示した。中央のボールは活性中心の亜鉛原子を、活性中心には阻害剤 Gly-Pro-(*L,D*)-Phe-(PO_2CH_2)-Gly-Pro-Nle を含んだ複合体結晶となっている。

まず本酵素は、ほ乳類の類似酵素 thimet oligopeptidase（TOP）とは、二次構造的には多くの類似点を有していながら、全体構造としては、大きく異なることが分かった。TOP は、共にメタロペプチダーゼ M3 に属する酵素でありながら 2 枚貝様の構造をしているのに対し、Fig. 3 に示すように本酵素は基質が入り込むための顕著な溝はなく、球状タンパク質の形状を取る。さらに、共結晶に用いた阻害剤の構造から、側鎖を持たない Gly 残基とα水素を持たない Pro 残基を活性中心にはめ込むために、他の残基は入り込めない立体構造をとることをつきとめた。そして、コラ

ーゲンペプチドの入口と出口を、基質の通るトンネル構造を明らかにすることによって特定した。これらの構造は、今後コラーゲンペプチドの酵素合成に有用な知見を与えるものと期待できる。

3．3　*Meiothermus ruber* H328 株を用いたトリ羽毛の液化分解

我々は、兵庫県神戸市にある有馬温泉から、難分解性タンパク質であるエラスチンを積極的に分解する*M. ruber* H328株を単離している。この菌株は、グラム陰性、好気性、無胞子で、赤色の色素を生産し、至適生育温度とpHを、それぞれ50−65℃そしてpH 7.5−10付近にもつ桿菌である。*Thermus*属細菌と近接する16S rRNAを有するが、生育温度でやや低い温度帯を持つことが特徴である。これまで*Meiothermus*属細菌には、強力なプロテアーゼ活性やトリ羽毛ケラチン分解を報告されているものはない。

トリ羽毛は、方法に記されている培養により、6日間でほぼ原形を留めることなく分解され泥状の形状になった(Fig. 4)。これを濾過により濾液と残渣に分け、濾液成分のアミノ酸・ペプチド量とアミノ酸組成を分析した。アミノ酸組成については遊離アミノ酸、加水分解アミノ酸組成を㈶日本食品分析センターに分析依頼し、プロテインデータベースにあるトリ羽毛ケラチンタンパク質のアミノ酸組成比と比較し、よく近似した値が得られた。6日間培養後の培養濾液中の遊離および加水分解アミノ酸が培養に伴い大きく増加した。加えて、培養上清100 gあたりの遊離総アミノ酸が432 mg、加水分解総アミノ酸が1730 mgに達していることが判り、培養上清に含まれるアミノ酸が、羽毛分解に基づくこと、培地に添加した羽毛ケラチン重量の14.4 %、57.7 %が、アミノ酸またはペプチドとして可溶化したことを示した。また培養濾液には、羽毛に多く含まれるSer、Gly、Valが遊離アミノ酸として比較的多く存在しており、トリ羽毛ケラチンがH328株の生産するプロテアーゼにより分解され、この菌株により資化され他の化学物質に変換されたりすることのないことが示された。

この他、ブロイラー鶏の白色羽毛に対しても同様の分解反応を調査したところ、地鶏羽毛と遜色なく分解することが判った。

さらに、走査型電子顕微鏡により培養12日間にわたる羽毛の構造変化を観察したところ、著しい羽毛構造崩壊が培養と共に確認された。また、H328株菌体の羽毛への吸着が観察され、この吸着が羽毛分解に効果的であることが示唆された。

培養濾液中に含まれるペプチド成分として、トリ羽毛ケラチンから得られる中間生成物を調査・解析するため、0−6日間の培養濾液サンプルに対し、産業技術総合研究所関西センターの協力を得て、MALDI-TOF-MS解析を行った。培養とともに、培養スタート時には見られなかった分子量1000以下のシグナルが見られた。しかし、特異なバンドが見られることはなく、アミノ酸レベルにまで分解されるものも少なくないことが判った。その中で、分子質量656付近のバンドが培養と共に上昇していることを見いだし、これをトリ羽毛ケラチンのプロテインデータベースで検索を行ったところ、Ser-Ala-Pro-Thr-Pro-Leu-Alaという配列である可能性が最も高いことが判った。今後、これ以外のケラチン断片の単離を試み、大量生産の可能性を追究したい。また、実用的な分解への応用として、家庭用ゴミ処理機を用いたトリ羽毛の分解促進も可能であることを示している[5)]。

3．4　トリ羽毛分解物の生理活性検索

分解系の検討に引き続きトリ羽毛分解物の生理活性を検討した。

まずH328株の2, 4, 6日間培養後の培養濾液を用いて、*Escherichia coli, Saccharomyces cerevisiae, Aspergillus oryzae*の3菌株に対し、ペーパーディスクに培養濾液を加え、成育阻害を調べることにより抗菌活性試験を行った。しかし100倍希釈までのものには有意な成育阻害・抗菌活

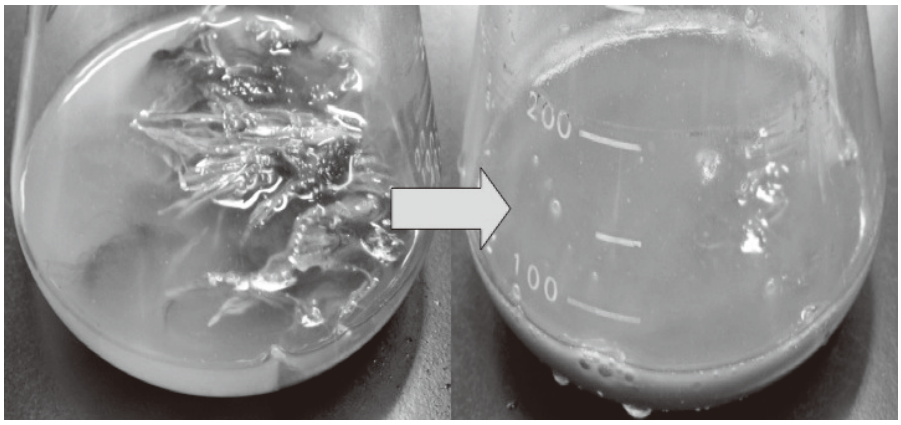


Fig. 4　*Meiothermus ruber* H328 株によるトリ羽毛の分解。培養前（左図）と 60℃ , 6 日間培養後（右図）の培養液。

性は検出できなかった。

さらに、トリ羽毛ケラチンが皮膚細胞へ正の効果を持つ可能性を調査するため、H328株の0および10日間培養後の培養濾液を正常ヒト線維芽細胞（NHDF）に加え、[^{3}H]-thymidineの取り込みを測定することにより細胞増殖効果を調べた。0.03%および10^{-5}%添加したサンプルが、コントロールに対し30ないし60％程増殖効果を示した結果が得られたが、添加量に呼応したdosage effectが見られず、また0日培養濾液と有意な差が見られなかったため、本サンプルに含まれるトリ羽毛分解成分にNHDF細胞増殖に効果があるものは見いだせなかった。

過酸化水素によるラットPC12細胞死誘導に対して、予備実験からトリ羽毛から高温高圧加工されたfeather mealのケラチン分解産物に弱い抑制効果が認められた。そこでトリ羽毛の直接分解物を含む培養濾液の効果を検討した。40倍希釈系列にすることにより、過酸化水素に対する効果は認められなかった。また、培養濾液で24ｈ細胞を前処理した後、過酸化水素を加えてさらに24ｈ培養後、MTT法で生細胞数を測定する系についても検討を行った。しかしながら、前処理することにより培養濾液での細胞毒性が強く認められ、過酸化水素に対する効果を見いだせなかった。予備実験では、同じPC12 細胞で細胞毒性は認められておらず、10倍希釈でも効果が認められている。再び今度は20倍希釈で検討したが、培養濾液に含まれる成分が細胞毒性を示すと考えられた。このことからトリ羽毛分解物の細胞死誘導に対する抑制効果を認めることは出来なかった。

3．5　ケラチン分解酵素の各種薬剤に対する耐性調査

M. ruber H328株は、トリ羽毛を含む培地で培養すると著量のケラチン分解酵素を生産する。この培養液から硫安分画で酵素を集めてくると、すでにかなりの精製度を持ったケラチン分解酵素が調製できる。このケラチン分解酵素は、すでに強力な界面活性剤でタンパク質変性剤でもあるSDSに対して、驚異的な耐性を有していることを見出している。そこでその他の各種薬剤（界面活性剤、有機溶媒など）に対する耐性を、60℃で処理し、その残存する活性を測定することで耐性を調査した。

基本的に60℃での処理も、常温処理に比べ相当過酷な条件である。それにも増して、界面活性剤（Triton X100, Tween 20, CTAB）と有機溶媒（メタノール、エタノール、ブタノール、アセトン、アセトニトリル、DMSO, ベンゼン、エチル酢酸、クロロフォルム）に対して、30－60%の高濃度で30 min以上、中には16日以上活性を保ち続けるということが判った。このような耐性を示すプロテアーゼは、報告例がない。今後、なぜこれほどに耐性なのか、その機構解明を進めると共に、応用面への検討を加えていきたい。

Table 1　ケラチン分解酵素の各種薬剤に対する耐性調査

界面活性剤／有機溶媒	濃度	処理時間	相対活性(%)
none	−	−	100
SDS	30% (w/v)	4 hr	94
Triton X-100	30% (v/v)	30 min	92
Tween20	30% (v/v)	30 min	119
CTAB	30% (v/v)	30 min	99
methanol	60% (v/v)	30 min	114
ethanol	60% (v/v)	16 day	123
buthanol	60% (v/v)	30 min	102
acetone	60% (v/v)	30 min	127
acetonitril	40% (v/v)	30 min	108
DMSO	60% (v/v)	30 min	134
hexane	50% (v/v)	30 min	104
benzene	60% (v/v)	30 min	85
eathyl acetate	40% (v/v)	30 min	118
chloroform	60% (v/v)	30 min	137

（各処理は、酵素濃度 1 mg/ml で 60℃の状態で行った。）

4．今後の実用化への展望

難分解性動物タンパク質を分解する特異な好熱性細菌を単離し、これらがもつ分解系酵素群の生化学的性質を基礎に、細胞外マトリックスの分解生成物から化粧品等の素材開発へ目を向け、検討を行った。今回の研究ではまだその端緒に着いたばかりで、今後より多様な生理活性の調査・検討、再利用先の開発・追究が必要である。また化粧品素材に応用可能な難分解性動物タンパク質として、廃絹分解物の検討も行っており[6)]、今後継続していく計画である。本酵素群が産業廃棄物である難分解性動物タンパク質の分解・リサイクルのためのツールとして応用可能になれば、我々の提唱する「リサイクルバイオテクノロジー」の意義は益々大きいものとなる。

5．謝　辞

本研究の遂行にあたりコスメトロジー研究振興財団から御援助賜りましたこと深く感謝申し上げます。

（参考文献）

1）Suzuki, Y., Tsujimoto, Y., Matsui, H., Watanabe, K. “Decomposition of Extremely Hard-to-Degrade Animal Proteins by Thermophilic Bacteria” J. Biosci. Bioeng., 102, 73-81 (2006)

2）Miyake, M., Shigeri, Y., Tatsu, Y., Yumoto, Y., Umekawa, M., Tsujimoto, Y., Matsui, H., Watanabe,

K.“Two thimet oligopeptidase-like Pz peptidases produced by a collagen-degrading thermophile *Geobacillus collagenovorans* MO-1.” J. Bacteriol., 187, 4140-4148 (2005)

3）Matsui, T., Yamada, Y., Mitsuya, H., Shigeri, Y., Yoshida, Y., Saito, Y., Matsui, H., Watanabe, K. “Sustainable and Practical Degradation of Intact Chicken Feathers by Cultivating a Newly Isolated Thermophilic *Meiothermus ruber* H328.” Appl. Microbiol. Biotechnol., 82, 941-950 (2009)

4）Kawasaki, A., Nakano, H., Hosokawa, A., Nakatsu, T., Kato, H., Watanabe, K. “Exquisite Structure and Reaction Mechanism of Bacterial Pz Peptidase A Toward Collagenous Peptides” J. Biol. Chem., 285, 34972-34980 (2010)

5）Shigeri, Y., Matsui, T., Watanabe, K. “Decomposition of Intact Chicken Feathers by a Thermophile in Combination with an Acidulocomposting Garbage-Treatment Process.” Biosci. Biotechnol. Biochem., 73, 2519-2521 (2009)

6）Suzuki, Y., Matsui, H., Tsujimoto, Y., Watanabe, K. “Enzymatic Degradation of Fibroin Fiber by a Fibroinolytic Enzyme of *Brevibacillus thermoruber* YAS-1. J. Biosci. Bioeng., 108, 211–215 (2009)

物質保持能を制御できるコラーゲン擬似分子の作製

大阪府立大学21世紀科学研究機構ナノ科学・材料研究センター
児島　千恵

Collagen is the most abundant protein in mammals, and it is composed of glycine-proline-(hydroxy)proline (Gly-Pro-Pro(Hyp)) repeats to form a triple helix. It has been used as a biomaterial. For example, collagen gels are useful for long-term slow release in drug delivery applications. However, the release from collagen gels is generally uncontrollable. Therefore, functional collagen materials capable of controlled release are desired. Artificial collagen materials have been studied as an alternative to natural collagens extracted from animals, because natural collagens can be contaminated with infectious pathogens and allergens. However, short collagen peptides cannot form a triple helix, which limits the preparation. Dendrimers have highly controllable sizes, topologies and surface properties, quite different from linear polymers. We have reported that polyethylene glycol (PEG)-attached dendrimers are a potential drug carrier. In addition, dendrimers were used as a knot, whose terminal groups were modified with collagen model peptides to induce the triple helical structures.

In this study, a collagen model peptide ((Pro-Pro-Gly)$_5$)-attached dendrimer was synthesized as a potential functional collagen material. The peptides which clustered at the surface of the dendrimer formed a collagen-like triple helix. Interestingly, the helical structures were thermally reversible, different from a natural collagen. For the biomedical applications, the thermal stability of the triple helical structure in the collagen-mimic dendrimer remains to be improved. Various collagen-mimic dendrimers were prepared by using different generation dendrimers and a longer collagen model peptide, (Pro-Pro-Gly)$_{10}$. The peptide length much affected the triple helical structures, but the dendrimer generation did not. The peptide binding ratio slightly affected it. These results suggest that the peptide length and the peptide density were influenced on the triple helix formation. Interestingly, the (Pro-Pro-Gly)$_{10}$-modified dendrimer assembled below 40°C and the assembly was dissolved by heating. On the other hand, the (Pro-Pro-Gly)$_5$-modified dendrimer did not. The hydrogels using these collagen-mimic dendrimers were prepared. Even though the (Pro-Pro-Gly)$_5$-modified dendrimers formed the hydrogels by cooling only in the presence of ethanol and sodium sulfate, the (Pro-Pro-Gly)$_{10}$-modified dendrimer could in the absence of any additives. In addition, the hydrogel was dissolved at 45°C. Therefore, this kind of collagen-mimic material is useful for drug delivery system and regenerative medicine.

1．緒　言

コラーゲンは細胞外基質に多く含まれる分子量約10万の棒状蛋白質であり、生体材料として有用である。コラーゲンには繰り返し配列があることが知られており、グリシン-プロリン-プロリンの繰り返しペプチドはコラーゲンモデルペプチドとしてよく用いられている。このような繰り返し配列によってコラーゲンは三重ヘリックス構造を形成し、さらに、それらが会合することによってゲル化することが知られている。一方、コラーゲンが熱変性したゼラチンも分子間で見られる三重ヘリックス構造が架橋点となってゲルを生成する。このようなゲルには、水とともに様々な生理活性物質が保持されるため、長期間の徐放化材料として医薬品および化粧品の分野で既に多くの研究されてきた。しかし、保持された生理活性物質の効果を最大限に発現するためには、単なる徐放ではなく何らかの刺激に応答して内包物質を放出するシステムが有効である。しかし、現在のところ刺激応答性のコラーゲン（ゼラチン）ゲルの開発には至っていない。

一方、著者らはこれまでにデンドリマーを薬物運搬体として利用したドラッグデリバリーシステムの研究を行ってきた。デンドリマーは樹状構造をとる合成高分子であり、重合ではなく有機合成によって分子鎖を分岐させながら成長させていくため、段階的に分子量（世代数）を増加させることができる。デンドリマーは分子量が単一であるだけでなく、表面には多数の反応性官能基を、内部には低分子を保持できる空間を有するため、ペプチドの担体や薬物運搬体として有用である。筆者らはこれまでに、デンドリマーに抗がん剤などを内包して薬物運搬体として利用したり、様々な刺激応答性部位を付与することで刺激応答性デンドリマーの作製を行ってきた[1−5]。本研究では、薬物保持能を有するデンドリマーを用いて、薬物の放出を制御することのできる新規コラーゲン擬似分子の作製を行った。そこで、コラーゲンでみられるグリシン-プロリン-プロリン（Gly-Pro-Pro（GPP））の繰り返しペプチドと、ペプチド担体および薬物運搬体であるデンドリマーからなる分子を設計した。コラーゲンの三重ヘリックスは温度によってその形成性が変化することが知られているため、このデンドリマーでは温度による内包物質の放出制御が可能であると考

Preparation of Collagen-Mimic Compounds Capable of Controlled Release
Chie Kojima
Nanoscience and Nanotechnology Research Center, Research Organization for the 21st Century, Osaka Prefecture University

えられる。また、デンドリマーの薬物保持能を利用したハイドロゲルも作製できると考えられる（図１）。本研究では、まず(Pro-Pro-Gly)$_5$(PPG5)をポリアミドアミン(PAMAM)デンドリマー（第４世代）と結合させたコラーゲン擬似デンドリマーを合成した。そして、その高次構造と温度依存性について検討した。次に、上記コラーゲン擬似デンドリマーにおけるコラーゲン様の高次構造の改善のため、様々な世代数のPAMAMデンドリマーを用いてコラーゲン擬似デンドリマーの合成を行い、その高次構造の解析を行った。また、長鎖の (Pro-Pro-Gly)$_{10}$ (PPG10) を用いたコラーゲン擬似デンドリマーも合成し、その高次構造を解析した。そして、そのコラーゲン擬似デンドリマーの会合体についても検討した。さらに、コラーゲン擬似デンドリマーのハイドロゲルの形成性について検討した。

２．実　験

2. 1　コラーゲン擬似デンドリマーの合成

市販のコラーゲンペプチドPPG5およびPPG10を無水酢酸でアセチル化した。次に、PPG5に関しては縮合剤*o*-(7-azabenzotriazol-1-yl) -1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate（HATU）と補助剤、1-Hydroxy-7-azabenzotriazole（HOAt）を用いてポリアミドアミン(PAMAM)デンドリマー（第１世代から第５世代、G1-G5）と反応させ、世代数の異なるコラーゲンデンドリマーを合成した(PPG5-G1; PPG5-G2; PPG5-G3; PPG5-G4; PPG5-G5)。また、PAMAMデンドリマー（G4）に対して反応の仕込み比を調製することで、様々なペプチド結合数のコラーゲンデンドリマーを合成した（(PPG5)$_{0.3}$-G4; (PPG5)$_{0.5}$-G4; (PPG5)$_{0.8}$- G4)。一方、PPG10に関しては縮合剤4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMT-MM)を用いてPAMAMデンドリマー(G4)と反応させた (PPG10-G4)。

2. 2　コラーゲン擬似デンドリマーの同定

^{1}H NMRはJEOL JNM-LA400（JEOL）を用いて行った。

フルオレスカミンによるアミンの定量は以下のように行った。適当な濃度のコラーゲンデンドリマー水溶液（5～10 mg/ml）を調製し、それぞれ400μlに0.5M ホウ酸緩衝水溶液（pH 8.5）を3.6mlに加えた。その後それぞれにフルオレスカミンの アセトン溶液（0.3mg/ml）を200μlずつ加え、ボルテックスした。分光蛍光光度計（FP-6200, JASCO）を用いて、励起波長390nm、蛍光波長479nmで蛍光強度を測定した。アミン濃度が0, 20, 50, 100, 150, 200μMのデンドリマー水溶液を用いて同様の操作を行い、検量線を作成した。

2. 3　コラーゲン擬似デンドリマーの高次構造の解析

各サンプルの水溶液（0.04 mg/ml）を調製し、4℃で24時間以上インキュベーション後、円二色性分散計（J-820, JASCO）を用いて20℃、260−190nmで測定を行った。温度変化測定は、上記と同様にサンプル調製し、4℃で上記と同様の波長で測定した後、10℃から70℃まで5℃毎に昇温、続いて降温し、CDスペクトル測定を行った。なお、各温度では15分間保持した後に測定を行った。温度の調整にはペルチェホルダ（PTC-432L, JASCO）を用いた。

X線粉末回折法（XRD）はMiniFlexII（リガク社製）を用い、30kV, 15mAの出力でCuKa線を使用して行った。

2. 4　PPG10-G4 の会合体の解析

示差走査熱量測定（DSC）はNano-DSC II（Calorimetry Science社製）を用いて、１mg/mlのサンプル溶液を5℃から90℃の範囲で測定した。

透過型電子顕微鏡（TEM）解析では、まず10mg/mlのサンプル溶液を室温でグリッドに滴下し、２%リンタングステン酸水溶液によってネガティブ染色し、試料を調製した。そして、JEOL2000（JEOL）を用いて、200 kVの条件で観察した。

温度変化透過率測定は１mg/mlの水溶液を4℃で12時間以上保持した後、313nmにおける透過率をJASCO V-630を用いて測定した。温度は1℃/minで変化させた。

2. 5　ハイドロゲルの作製

15wt%のPPG10-G4およびPPG10の水溶液を調製し、4℃で12時間以上保持した。その後、ステンレスボールを

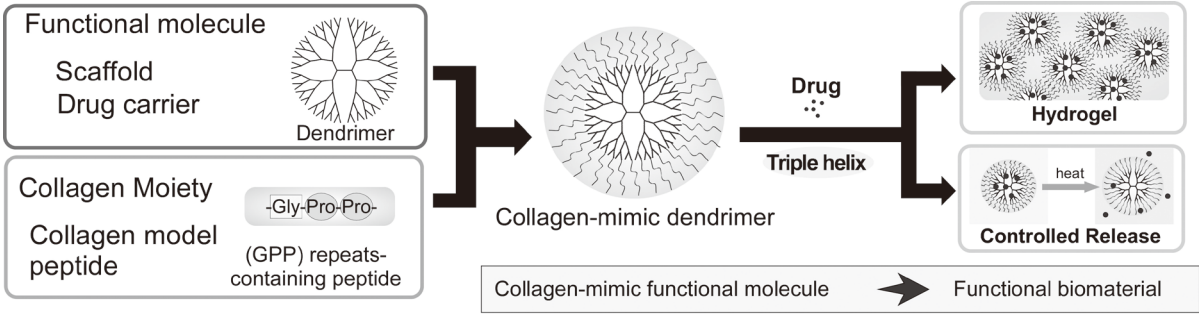


Fig. 1　Design of collagen-mimic dendrimers and application.

上に加え、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃で順にそれぞれ15分間インキュベーションした後に写真を撮影した。ボールが溶液の上もしくは中にある状態をゲル、チューブの底に沈んだ状態をゾルとした。

3．結　果

3. 1　PPG5 を結合した PAMAM (G4)デンドリマー

合成スキームを図２に示す。PPG5をアセチル化した後に、G4のPAMAMデンドリマーのアミン末端と結合させた。得られた化合物の^{1}H NMRスペクトルおよびフルオレスカミンによる残存アミンの定量を行った。その結果より、デンドリマーのほぼ全ての末端にペプチド鎖が結合していることがわかった。次に、このコラーゲン擬似デンドリマーのCDスペクトル測定を行った。コラーゲンの三重ヘリックスでは225 nm付近に正の極大が見られることが知られている。コラーゲンデンドリマーのCDスペクトルではコラーゲン特有のパターンが見られたことから、コラーゲンデンドリマーではコラーゲン様の三重ヘリックスが形成することを明らかにした。ペプチド単独では特徴的なコラーゲンのCDスペクトルが見られなかったことから、デンドリマー表面におけるペプチド集積が三重ヘリックス形成性を惹起することが示唆された[6]。また、XRDの結果から、コラーゲンデンドリマーにおいてコラーゲン三重ヘリックスのパッキングとピッチに起因するシグナルがみられた。このことからも、デンドリマーで見られる高次構造がコラーゲン様の三重ヘリックスであることがわかった。このコラーゲンデンドリマーを用いてハイドロゲル形成を行ったところ、15 wt%、かつ、エタノールと硫酸ナトリウム共存下においてのみ、ハイドロゲルが形成した[6]。

3. 2　PPG5 を結合した PAMAM デンドリマーにおける高次構造形成性の改善[7]

上記のコラーゲンデンドリマー（PPG5-G4）ではコラーゲン様の三重ヘリックス形成が見られたが、その形成性は天然のコラーゲンと比べると低かった。次に三重ヘリックス形成性の向上のために、デンドリマーの構造に着目して、コラーゲンデンドリマーの改善を行った。すなわち、デンドリマーの世代数やペプチド結合率の異なる様々なコラーゲンデンドリマーを合成し、その高次構造形成性について評価した。

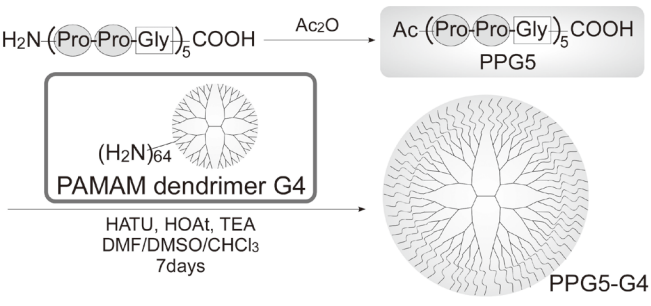


Fig. 2　Synthetic scheme of collagen-mimic dendrimers.

3. 2. 1　PPG5 を結合したデンドリマーにおけるデンドリマー世代数の効果

G1からG5のPAMAMデンドリマーを原料として用い、図２と同様の方法でコラーゲンデンドリマーを合成した。合成した化合物の^{1}H NMRスペクトルおよびフルオレスカミンアッセイにより、デンドリマーに結合したコラーゲンモデルペプチド数を定量した結果を表１に示す。デンドリマーの末端数とペプチド結合数がほぼ一致すること、デンドリマーにおける未反応アミン数がほとんど検出されなかったことから、いずれのデンドリマーでもほぼ全ての末端にペプチド鎖が結合していることがわかった。

これらのコラーゲンデンドリマーのCDスペクトル測定を行った結果を図３に示す。いずれのコラーゲンデンドリマーでも225nm付近にコラーゲン特有の正の極大を示すスペクトルが得られた。しかし、そのパターンはデンドリマーの世代によっては差異が見られなかったことから、デンドリマー世代数はヘリックス形成性に影響を与えないことがわかった。

3. 2. 2　PPG5 を結合したデンドリマーにおけるペプチド結合率の効果

アセチル化したPPG5とG4のPAMAMデンドリマーを原料として用い、様々な比で反応させることにより、ペプチド結合率の異なるコラーゲンデンドリマーを合成した。合成した化合物の^{1}H NMRスペクトルによりデンドリマーに結合したコラーゲンモデルペプチド数を定量した結果を表１に示す。これより、反応の仕込み比に依存してデンドリマーの末端に様々な含率でペプチド鎖が結合したことがわかった。

これらのコラーゲンデンドリマーのCDスペクトル測定

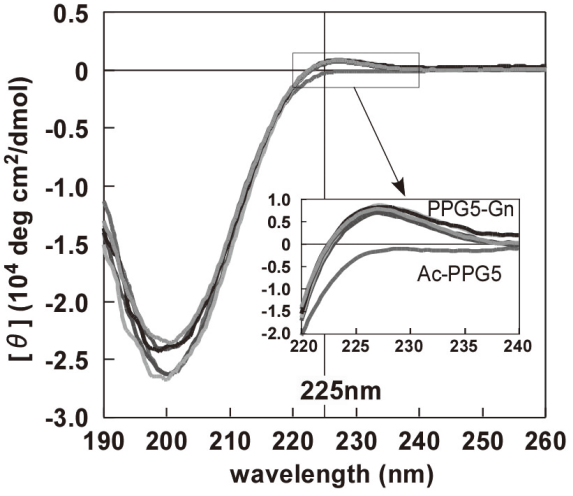


Fig. 3　CD Spectra of PPG5-Gn and Ac-PPG5 in H_2O (20℃, 0.04mg/ml)

を行った結果を図4に示す。ペプチド結合率の異なるコラーゲンデンドリマーでは、末端の83%にペプチドが結合したデンドリマーが最も高いモル楕円率を示した。これは、コラーゲンペプチドが三重ヘリックス構造を形成するためには、ペプチド鎖の密度が重要であることを示唆している。以上より、コラーゲン様の三重ヘリックス構造の形成はコラーゲンペプチドの集積化によって誘起されていると考えられる。コラーゲンの三重ヘリックス形成性を示す指標としてRpn値がある。これは225 nm付近の正の極大ピークと200 nm付近の負の極大ピークの比である[8]。天然コラーゲンが0.11であったのに対して、PPG5デンドリマーで最も効率の高かった$(PPG5)_{0.8}$-G4では0.06であった。したがって、その三重ヘリックス形成性は依然として低調なままであり、コラーゲンデンドリマーのさらなる改善が必要である。

3. 3　PPG10を結合したPAMAM（G4）デンドリマー[9]

3. 2においてPPG5を結合したコラーゲンデンドリマーでは、結合率を変化させることで僅かに高次構造形成性が向上したものの、著しい高次構造形成性の向上はみられなかった。次に、高次構造形成性の改善を目的としてペプチドの鎖長に着目した。PPG5はPPG2と比べて三重ヘリックス構造の形成性が著しく向上することを既に報告している[6]。そこで、より鎖長の長いPPG10をG4デンドリマーに結合させたデンドリマーを作製し、その高次構造形成性について検討した。

まず、図2に示すように、PPG10をアセチル化した後に、G4のPAMAMデンドリマーのアミン末端と結合させた。ペプチドの溶解性の問題により、デンドリマーとの縮合反応も水中で行い、縮合剤は水溶性のDMT-MMを用いた。得られた化合物の^{1}H NMRスペクトルおよびフルオレスカミンアッセイによりデンドリマーのほぼ全ての末端にペプチド鎖が結合していることがわかった。このコラーゲンデンドリマーのCDスペクトル測定においてコラーゲン特有のパターンが見られたことから、コラーゲンデンドリマーではコラーゲン様の三重ヘリックスが形成することが明らかとなった。またこのRpn値は0.13となり、天然コラーゲンに匹敵するものとなった。さらに、XRDの結果からもデンドリマーで見られる高次構造がコラーゲン様の三重ヘリックスであることがわかった。

次に、コラーゲンデンドリマーの三重ヘリックスの温度応答性について検討した。PPG5ではモル楕円率が加温によって徐々に減少するのに対して、PPG10では、ペプチド単独およびコラーゲンデンドリマーのいずれにおいても、ある温度付近で著しいモル楕円率の減少（転移）が見られた。また、ペプチド単独では33℃付近で転移したのに対してコラーゲンデンドリマーでは40℃および65℃で転移がみられたことから、デンドリマーに結合させることで転移点が高温になることがわかった。これは、デンドリマー表層における三重ヘリックス構造の安定化を示唆している。DSCからもこの熱転移を支持する結果が得られた。

コラーゲンはゲル化に際して会合体を形成することが知られている。そこで、本研究ではコラーゲンデンドリマーの会合挙動について検討した。水溶液の濁度について測定したところ、1 mg/mlにおいてコラーゲンデンドリマーは低温で白濁しており、40℃付近で濁度が解消する現象が見られた。この温度はCDにおける一段階目の転移点と一致している。コラーゲンデンドリマーは低温条件では会合体を形成しており、高温にすると会合体が崩壊することが示唆された。

このような温度に応答した会合特性を利用することによってハイドロゲルの作製を行った。PPG5デンドリマー、

Table 1　Characterization of collagen-mimic dendrimers.

Collagen-mimc dendrimer	Number of Terminal amino group	Bound collagen peptide*1	Residual amino group*2
PPG5-G1	8	9	0.06
PPG5-G2	16	19	0.16
PPG5-G3	32	32	0.49
PPG5-G4	64	67	0.96
PPG5-G5	128	121	2.4
$(PPG5)_{0.2}$-G4	64	13	N/A
$(PPG5)_{0.5}$-G4	64	34	N/A
$(PPG5)_{0.8}$-G4	64	53	N/A

*1 Estimated by ^{1}H NMR assay　*2 Estimated by fluorescamine assay

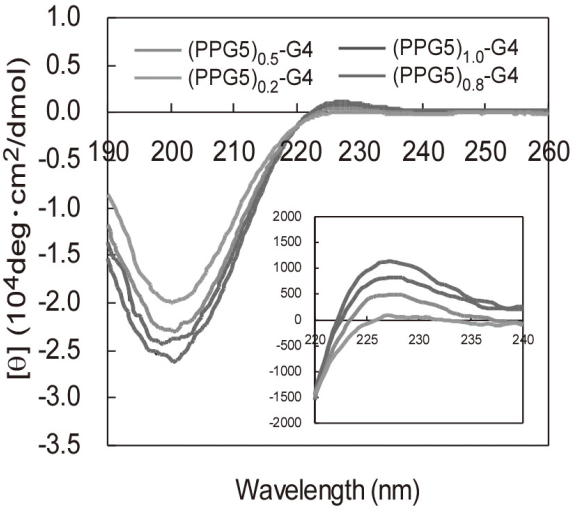


Fig. 4　CD Spectra of (PPG5) n-G4 in H_2O (20℃, 0.04 mg/ml)

PPG10ペプチドでは水溶液中でゲル化しなかったのに対して、PPG10デンドリマーではゲル化することがわかった。得られたPPG10デンドリマーゲルでは低温ではゲルで、45℃以上に加温するとゾル化することがわかった。この温度応答性はコラーゲンの熱変性体であるゼラチンゲルと類似の性質であり、PPG10デンドリマーは人工ゼラチン材料として応用することができる。

4．考　察

本研究では、物質保持能を有するデンドリマーとコラーゲンモデルペプチドを用いて、様々なコラーゲンデンドリマーの作製を行ってきた。そして、PPG5およびPPG10を結合させたコラーゲンデンドリマーでは、1）コラーゲン様の三重ヘリックス構造をとること、2）その三重ヘリックス形成性は温度に依存することを明らかにしてきた。この温度応答性を利用することで、温度に応答した薬物送達を実現することが可能となる。デンドリマーは様々な薬物を保持することができるため、本研究で作製するコラーゲンデンドリマーは温度応答性薬物送達における薬物運搬体として有用である。我々は、モデル薬物としてローズベンガルを用いて、その薬物放出の温度依存性についても検討した。その結果、ヘリックスが解裂する高温条件下では薬物の保持能が低減することを明らかにしてきた[6)]。コラーゲンデンドリマーの応答温度を調節することができれば、生体内で利用できる新規温度応答性薬物運搬体として利用することが可能である。

本研究ではハイドロゲル形成についても検討した。生体に応用するためには、37℃で安定なハイドロゲルを作製する必要がある。PPG10デンドリマーでは上記の条件を満たしていることから、バイオマテリアルとして応用することが可能である。コラーゲンの熱変性体であるゼラチンは30℃付近でゾル化するため、生体内でゲルとして利用するためには架橋が必要である。一方、本研究のコラーゲンデンドリマーでは架橋剤の添加を行うことなく体温付近でのゲル作製が可能であった。また、加温によってゾル化するため、温度応答性薬物送達に応用することもできる。このようなハイドロゲルは温度応答性薬物送達だけでなく、再生医療などへの展開も可能となる。

コラーゲン様の高次構造はペプチド鎖長だけでなく、その配列にも大きく依存することが知られている[10)]。様々な配列でのコラーゲン擬似分子を作製すれば、様々な用途に適した人工コラーゲン材料の設計・作製することが可能となるため、今後の研究の展開が期待される。

5．総　括

本研究では、物質保持能を有するデンドリマーとコラーゲンモデルペプチドを用いて、様々なコラーゲンデンドリマーの作製を行ってきた。そして、デンドリマーの世代数や結合数よりも、ペプチド鎖長を改善することで、天然のコラーゲンに近い性質を示すコラーゲンデンドリマーの作製に成功した。このようなコラーゲン擬似分子は、次世代のコラーゲン（ゼラチン）材料として、医薬品や化粧品などに応用可能であり、新規素材として大いに有用である。また、この手法を用いることにより、古典的な蛋白質であるにもかかわらず機能が完全には解明されていないコラーゲンの生理活性の解析にもつながると期待される。

本研究成果は3つの学術論文にまとめ、2009年にJ.Am.Chem.Soc.誌、2010年にBiopolymers誌、2011年にBiopolymers誌に掲載された[6, 7, 9)]。

本研究は大阪府立大学大学院工学研究科応用化学分野の河野健司教授、原田敦史准教授にご指導いただき、卒業生の津村清子さん（現在、サクラクレパス勤務）、末廣智幸君（現在宇部興産勤務）に協力いただいて、遂行しました。また、DSC測定では京都工芸繊維大学の田中直毅先生に、XRD測定では大阪府立大学の中平敦先生に、XRD解析では東京大学の本郷千鶴博士にご協力いただきました。ここに深謝いたします。最後に、本研究を遂行するにあたり、研究助成をいただいたコスメトロジー研究振興財団に深く感謝いたします。

（引用文献）

1）Kojima C, Kono K, Maruyama K, et al, :Synthesis of polyamidoamine dendrimers having polyethylene glycol grafts and their ability to encapsulate anticancer drugs, Bioconjugate Chem., 11, 910-917, 2000.

2）Haba Y, Kojima C, Harada A, et al, :Preparation of poly(ethylene glycol)-modified poly(amidoamine) dendrimers encapsulating gold nanoparticles and their heat-generating ability, Langmuir, 23, 5243-5246, 2007.

3）Haba Y, Kojima C, Harada A, et al, :Comparison of thermosensitive properties between poly(amidoamine) dendrimers having peripheral N-isopropylamide groups and linear polymers with the same groups, Angew. Chem. Int. Ed., 46, 234-237, 2007.

4）Kono K, Kojima C, Hayashi N, et al, :Preparation and cytotoxic activity of poly(ethylene glycol)-modified poly(amidoamine) dendrimers bearing adriamycin, Biomaterials, 29, 1664-1675, 2008.

5）Kojima C, :Design of stimuli-responsive dendrimers, Expert Opinion on Drug Delivery, 7, 307-319, 2010.

6）Kojima C, Tsumura S, Harada A, et al, :A collagen-mimic dendrimer capable of controlled release, J. Am. Chem. Soc., 131, 6052-6053, 2009.

7）Suehiro T, Kojima C, Tsumura S, et al, :Higher order

structure of short collagen model peptides attached to dendrimers and linear polymers, Biopolymers, 93, 640-648, 2010.

8）Khew SK. Yang QJ, Tong YW, :Enzymatically crosslinked collagen-mimetic dendrimers that promote integrin- targeted cell adhesion, Biomaterials, 29, 3034-3045, 2008.

9）Suehiro T, Tada T, Waku T, et al, :Temperature-dependent higher order structures of the (Pro-Pro-Gly)10-modified dendrimer", Biopolymers, 95, 270-277, 2011.

10）Koide T, :Triple Helical Collagen-Like Peptides: Engineering and Applications in Matrix Biology, Connective Tissue Res., 46, 131-141, 2005.

酵母由来の機能性糖脂質（バイオサーファクタント）の構造及び機能の拡充に関する研究

独立行政法人産業技術総合研究所　環境化学技術研究部門
福岡　徳馬

Biosurfactants (BS) are functional amphiphilic compounds produced by a variety of microorganisms. They show unique properties (e.g. mild production conditions, multifunctionality, higher biocompatibility and environmental compatibility) compared to chemically synthesized counterparts. BS have thus been receiving increasing attention as environmentally advanced surfactants. Mannosylerythritol lipids (MELs), which are amphiphilic glycolipids abundantly produced by yeasts from vegetable oils, are one of the most promising BS because of their excellent surface-active properties and versatile biochemical actions. However, the structural variety of MELs hitherto discovered still remains limited; this makes the broad range of their applications difficult. We thus have continuously developed new types of MELs with different structures and functions.

In this study, we have newly prepared MEL-D, which has no acetyl groups in the hydrophilic sugar moiety, and new diastereomers having the carbohydrate configuration different from the conventional MELs. These novel MEL homologs show specific self-assembling properties and biological actions. Based on their unique properties, they would be expected to apply to pharmaceutical and cosmetic fields.

1．緒　言

バイオサーファクタント（BS）は、微生物が糖質や植物油などの再生可能資源から作り出す両親媒性物質であるが、その高い生体適合性や生分解性に加え、汎用の合成界面活性剤に比べ極少量（1/100 ～ 1/1000）で優れた効果を発揮するなど、「持続可能な社会の構築・発展」に向けて、「環境適合性」と「高性能」を両立した「環境先進型の界面活性剤」として期待されている。

マンノシルエリスリトールリピッド（MEL、図1）は、ある種の酵母によって生産される親水基が糖鎖からなるBSの一種である。MELは、極めて低濃度（10^{-6}M）で高い界面活性（表面・界面張力低下能など）を示すばかりでなく、幅広い濃度（0 ～ 90 wt%）、温度範囲で、単一成分で特異な液晶（スポンジ、キュービック、ラメラなど）を形成し、様々な生理活性（抗微生物活性、抗腫瘍活性、抗体結合能など）を有する。また、商業生産に対応可能なレベル（>100 g/L）まで生産収率が向上しており、既知のBS（数十種類）の中では、最も実用化の可能性が高いとされ、その研究開発が注目されている[1]。最近では、優れた液晶形成能を利用した液晶乳化技術[2]や、皮膚や毛髪に対する高い保湿効果[3)4)]などが見出されたことを契機に、まずは化粧品素材（高機能保湿剤）としてMEL製品化が達成された。さらに医薬、化粧品分野をはじめ、幅広い用途への応用を目指した技術開発が活発に進められている[5]。

MELには、マンノース上の置換基（アセチル基）の結合数、結合位置の異なる同族体（MEL-A、-B、-C；図1）をはじめ、脂肪酸鎖の組成の異なるものなど、これまで数種の同族体が確認されている[6]が、僅かな構造の違いで物性が劇的に変化するというユニークな特性が報告されている[7]。したがって、新規構造の同族体を開発し、構造種のバラエティを拡張してその物性比較を行うことは、MELの用途の飛躍的な拡大に繋がるものと期待される[6]。本研究では、微生物プロセスと化学・酵素合成プロセスを組み合わせて、糖鎖上の置換基や糖鎖の立体構造の異なる新規MEL誘導体を製造することで、医薬、化粧品用途を指向したMEL同族体の製品ラインナップの拡充を狙った。また、各化合物間で物性比較を行うことで構造-機能相関の解明を進め、目的の用途に対応したテーラーメイド的なMEL同族体の提供を目指した。

2．実　験

本研究では、従来技術では得られなかった2種類のMEL同族体を新たに開発し、その物性評価を進めた。

2. 1.　糖鎖の立体構造が反転したMEL『GL』の開発と従来型との機能比較

酵母の一種*Pseudozyma crassa*が、従来のMELとは糖鎖の立体構造が異なるMEL同族体（GL：図２）を生産することを見出した[8]。オレイン酸を原料として該酵母を培養することでGLを生産し、培養液から酢酸エチルで抽出後、カラムクロマトグラフィーを用いて分離・精製した。精製サンプルについて、既存のMELと界面物性の比較を

Expansion of structure and function of yeast glycolipid biosurfactants
Tokuma Fukuoka
Research Institute for Innovation in Sustainable Chemistry, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology（AIST）

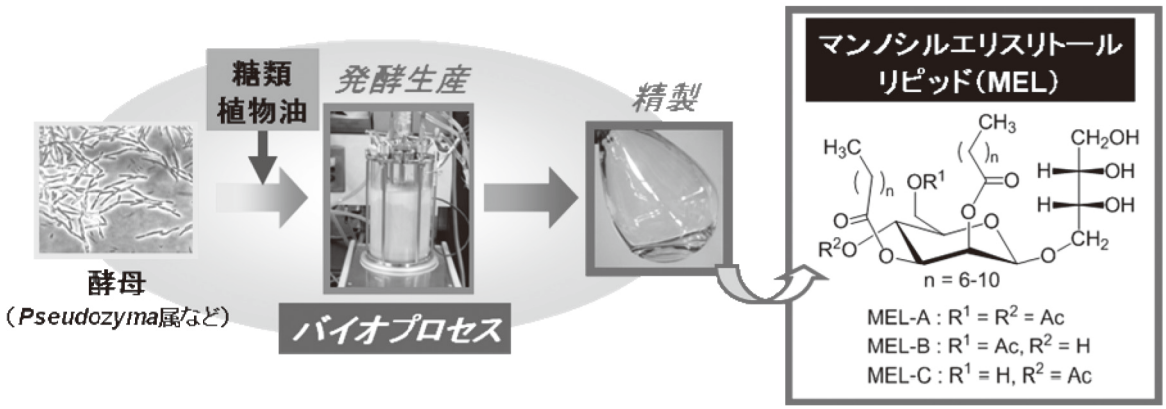


図1　マンノシルエリスリトールリピッドの生産スキームと構造例

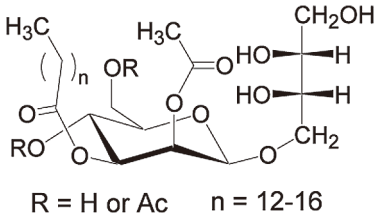


図２　GL の構造式

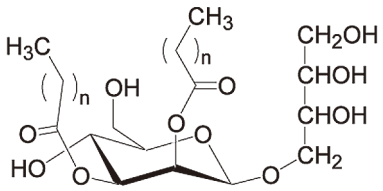


図３　MEL-D の構造式

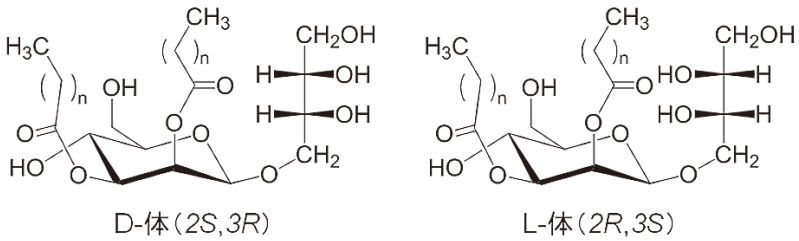


図４　MEL-D（D- 体、L- 体）の構造式

行ったほか、糖鎖の分子認識能の評価の一環として、表面プラズモン共鳴法（SPR）によりMEL同族体（自己組織化膜）と抗体タンパク（免疫グロブリンG；IgG）との結合親和性を調べた。さらに、医薬・化粧品などへの応用を考慮して、酵素（リパーゼ）反応に対するこれらのMEL同族体の添加効果を検証した。

2. 2.　アセチル基を持たない新規 MEL『MEL-D』の開発

触媒にリパーゼを用い、既存のMEL同族体から選択的にアセチル基のみを加水分解することで、糖鎖上にアセチル基を有さないMEL-D（図３）の合成を行った。生成物はカラムクロマトグラフィーを用いて分離・精製し、各種NMR（^{1}H、^{13}C、^{1}H-^{1}H COSY、HMQC、HMBC）測定、分子量測定（MALDI-TOF/MS）、脂肪酸組成分析（GC-MS）などにより構造を同定した。精製サンプルについて、各種機器分析（ウィルヘルミー法、光学顕微鏡観察、光散乱法、X線構造解析など）により、得られたMEL-Dの界面物性について評価し、従来のMEL同族体と比較した。

2. 3.　糖鎖の立体構造が反転した MEL-D の合成と物性比較

出発原料に、MEL及び上述の反転型MELを選び、それぞれからアセチル基を加水分解して糖鎖の立体構造が反転したMEL-D（D-体、L-体；図４）を調製した。得られたMEL-D間で表面張力低下能や会合体形成挙動を比較した。

3．結　果

3. 1.　反転型 MEL（GL）の開発と従来型 MEL との機能比較

*P. crassa*が生産する糖脂質（GL）は、詳細な構造解析の結果、従来のMELに対してエリスリトールの結合向きが逆転した、糖鎖のキラリティーの異なる新しいタイプのMEL同族体であることが見出された。また、2本結合している脂肪酸の一方が極端に短い擬一鎖型糖脂質であることも確認されており、親水基、疎水基ともに従来型とは組成が大きく異なるという特徴があった（図２）。

主成分であるジアセチル型のGL-Aについて、ウィルヘ

ルミー法により表面張力低下能を評価した。GL-Aの室温での臨界会合体形成濃度（CAC）、及びその時の表面張力（γ_{CAC}）は、それぞれ5.2×10^{-6} M、26.5 mN/mであり、従来のMEL-A（CAC = 2.7×10^{-6} [M]、γ_{CAC} = 28.4 [mN/m]）に対してCACが上昇する一方でγ_{CAC}を低下させるといった特徴が見られた。また、GLは水との二成分系での相挙動が従来のMELと大きく異なる様子も観察された。以上の結果より、分子構造の違いが自己集合挙動や水親和性に大きな影響を与えることが示唆された。

これまでの報告から、従来型MELは、抗体タンパク（IgG）に対して強い結合親和性を示すことが分かっている[9]。そこで、MELとGLから自己組織化膜を作製し、SPRを用いて抗体との相互作用を比較検討した。その結果、興味深いことにGLはIgGに対して全く結合性を示さなかった（図５）。両者の結合特性の違いは、糖鎖（エリスリトール部分）の立体構造の違いに起因していることが推定された。

続いて、リパーゼによるエステル加水分解反応に対するMELおよびGLの添加効果を検討した。その結果、MEL、GLとも、酵素種の違いに応じて、大きな反応促進、あるいは反応阻害効果を示すことが分かった。細菌（*Pseudomonas* sp.）由来のリパーゼに対しては、両者とも反応を大きく促進させ、特にGLは非添加系と比べて反応速度を11倍以上と大幅に促進した。一方、有機合成において汎用される酵母菌（*Candida antarctica*）由来のリパーゼBに対しては、MELのみが顕著な阻害効果を示した。さらに、生体内での脂肪分解モデルとしてよく利用される豚膵臓由来リパーゼに対しては、GLのみが大きな阻害効果を示した[10]。

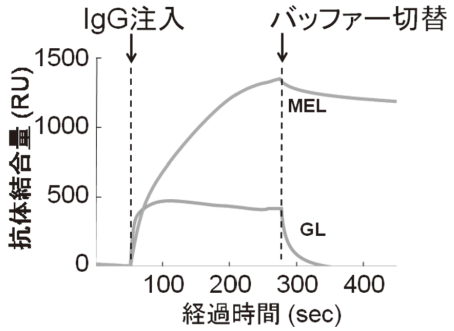


図５　SPR センサーグラム

3. 2.　新規 MEL 同族体（MEL-D）の開発

マンノースの６位のみにアセチル基を有するMEL-B（酵母により量産可能[11]）を出発物に選び、触媒に固定化リパーゼ（Novozym435）を用いて、90％エタノール中、大気下、50℃で１週間撹拌することで、既存のMELよりも高極性の糖脂質がほぼ定量的に得られた。NMR測定の結果、アセチル基由来のピークが消失し、６位のプロトン由来のピークが高磁場側にシフトしていることが確認された。また、分子量測定の結果、出発物からアセチル基の式量42分だけ分子量が減少したこと、脂肪酸組成分析の結果、反応前後で脂肪酸組成に変化がなかったことなどから、本反応によって選択的に６位のアセチル基のみが加水分解されて、目的のMEL-Dが得られたことが確認された。

精製したMEL-Dを用いて、表面張力低下能を評価した。室温におけるMEL-DのCAC = 1.2×10^{-5} [M]、及びγ_{CAC} = 24.6 [mN/m]であり、従来のMELと同様の優れた表面張力低下能を示すことが確認された。また、出発物（CAC = 3.1×10^{-6} [M]、γ_{CAC}=26.1 [mN/m]）に対して、CACが上昇するなど、アセチル基の除去により親水性の向上が見られた。

続いて、水中におけるMEL-Dの分子集合体形成挙動について調べた。MEL-D水溶液の光学顕微鏡観察の結果、MEL-DはCAC値以上の濃度で容易にベシクル状の構造体を形成することが分かった。さらに、各濃度のMEL-D水溶液を調製し、小角Ｘ線散乱測定（SAXS）などを用いて相挙動を解析した結果、全濃度領域にわたって二分子膜構造から成るラメラ相を形成することが確認された（図６）。また、原料であるモノアセチル体のMEL-B（>60 wt%）と比較して、より低濃度（>50 wt%）までラメラ相単相領域が拡大し、さらにラメラ相の層間距離も拡張するなど、ア

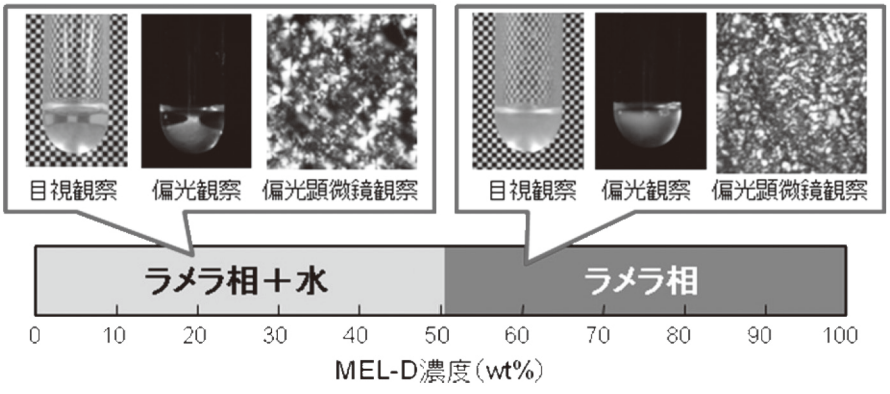


図６　MEL-D の二成分系相図

セチル基の脱離によりMEL分子の水親和性や保水力が向上していることが示唆された[12]。

一方、MEL-Dは、有機溶媒中においても単独で自己集合体を形成することが新たに見出された。顕微鏡観察などから、これがベシクル（逆ベシクル）であることが示された（図７）。溶媒種について検討した結果、直鎖状炭化水素類をはじめ、環状炭化水素類、スクアラン、スクアレン、シリコーンオイルなどでも逆ベシクルの形成が確認された。

3. 3.　糖鎖の立体構造が反転したMEL-Dの合成と物性比較

２種類のMEL生産菌（*Ustilago scitaminea*[13]、*Pseudozyma tsukubaensis*[11]）を用いることで、エリスリトールの立体配置の異なるMEL-B（D-体、L-体）がそれぞれ得られる。これらを原料とし、上述と同様の方法で２種類のMEL-Dを合成した。なお、D-体が従来のMELと同じエリスリトールの立体配置であり、L-体が反転型に当たる。3. 2.で得たMEL-Dは反転型であり、L-体に当たる。

D-体 のMEL-DのCAC=7.1×10^{-6} [M]、γ_{CAC}= 25.7 [mN/m]であり、L-体の方が高いCAC値を示した。これは3. 1.のGL-Aの場合と同じ傾向であった。以上の結果より、エリスリトールの立体配置は、MELの界面活性に大きく影響を及ぼすことが示された。

次に、各サンプルの水中での自己集合挙動を検討した。両者とも容易にベシクルを形成したが、L-体の方がD-体よりも粒子径の大きなベシクルを形成することが確認された。続いて、デカン中でも同様の検討を行った結果、D-体では逆ミセル、L-体では逆ベシクルを形成することが分かった（図8）。以上のように、エリスリトールの立体配置は、MELの会合体形成挙動を大きく変化させることが示された。

4．考　察

反転型MELは、最近新しく見出された新型MELであるが、今回検討を進めた*P. crassa*由来のMEL[8]と、*P. tsukubaensis*が生産するMEL-B[11]の二例しか今のところ見つかっていない。糖鎖のキラリティーの違いは生理活性に強く影響すると予想されるため、医薬・化粧品分野への応用を目指す上で、その物性データの蓄積は極めて重要である。

本研究で、これらの比較検討が初めて行われ、構成要素が同じ糖脂質でも、糖骨格や脂肪酸組成に差異があれば、界面物性、生理活性ともに大きく影響することが検証された。特に、今回MEL同族体にリパーゼ活性の阻害効果が見出されたことで、生体内での脂質分解が鍵となる「肥満防止」や「皮膚炎、肌荒れ改善」など、新しい医薬・化粧品用途への可能性が示唆された。

MEL-Dは、これまで微生物生産物中からはその存在が確認されていなかったが、本研究では既存のMELから選択的にアセチル基のみを加水分解する酵素法の利用により、初めて大量取得に成功した。これまでMELには、アセチル基を２個有するMEL-Aと、１個有するMEL-B、-Cとの

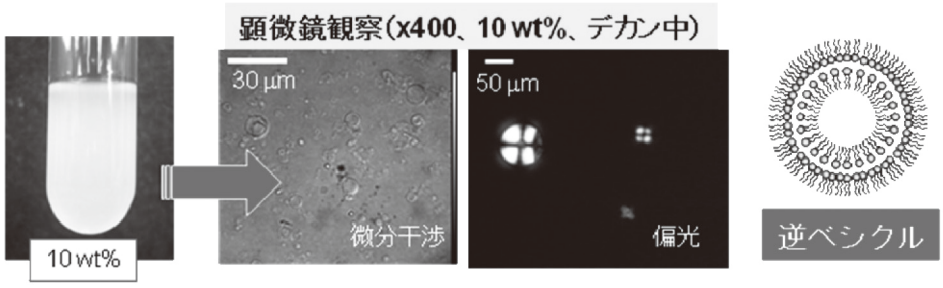


図７　MEL-D が形成する逆ベシクル

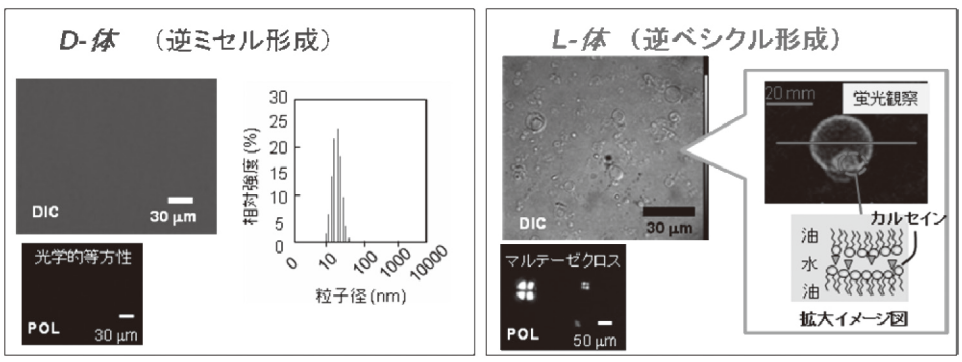


図８　MEL-D の自己集合挙動（10 wt%、デカン中）

間で、ただ一つのアセチル基の有無により物性が劇的に変化するという興味深い特徴が報告されていた[1) 7)]。したがって、今回新たにアセチル基を有さないMEL-Dが得られ、物性評価が行われたことは、MELの構造-機能相関の解明を進め、用途拡大を目指す上で極めて重要である。

実際に、MEL-Dは全濃度範囲にわたって優れたラメラ形成能を有することが確認された。これまで、同じくラメラ形成能に優れるMEL-Bには、セラミド様の優れた肌荒れ改善効果が見出されており[3)]、化粧品素材として製品化されている[5)]。MEL-Dは、その製品ラインナップを拡充する新素材としての可能性を秘めている。

さらに、L-体のMEL-Dには、油性物質中で「逆ベシクル」を形成するという新しい機能が見出された。逆ベシクルは、有機溶媒中で形成する新しい分子集合体であり、マイクロカプセル化、有用物質の放出制御、特異な反応場などへの応用が期待されている[14)]。逆ベシクルを形成する素材に関する報告例は極めて少なく、特に今回のように様々な油性物質中で、単一成分で逆ベシクルを形成する素材は、MEL-Dが初めての報告となる。これらの特性を活用して、乳液、クリームなど油系でのMELの応用が期待される。

以上のように、新規構造のMEL同族体の開発を通じて、特異な分子構造に起因するユニークな特徴を明らかにし、新しい機能利用の可能性を示すことができた。本研究から得られた知見は、BSの新たな用途展開、普及の促進に貢献するものである。

（引用文献）

1）D. Kitamoto, T. Morita, T. Fukuoka, et al., : Self-assembling properties of glycolipid biosurfactants and their potential applications, *Curr. Opin. Colloid Interfac. Sci.*, 14, 315-328 (2009).

2）W. Worakitkanchanakul, T. Imura, T. Fukuoka, et al., : Phase behavior of ternary mannosylerythritol lipid / water / oil systems, *Colloid Surf. B-Biointerfaces*, 68, 207-212 (2009).

3）T. Morita, M. Kitagawa, M. Suzuki, et al., : A yeast glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, shows potential moisturizing activity toward cultured human skin cells: The recovery effect of MEL-A on the SDS-damaged human skin cells, *J. Oleo Sci.*, 58, 639-642 (2009).

4）T. Morita, M. Kitagawa, S. Yamamoto, et al., : Glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, repair the damaged hair, *J. Oleo Sci.*, 59, 267-272 (2010).

5）福岡徳馬, 森田友岳, 井村知弘, ほか2名, : 微生物由来の高機能界面活性剤（バイオサーファクタント）の用途開発, *フレグランスジャーナル*, 37(8), 33-40 (2009).

6）福岡徳馬, : 微生物由来の機能性脂質（バイオサーファクタント）の構造および機能の拡充に関する研究, *オレオサイエンス*, 9(4), 127-133 (2009).

7）T. Imura, N. Ohta, K. Inoue, et al., : Naturally engineered glycolipid biosurfactants leading to distinctive self-assembled structures, *Chem. Eur.* J., 12, 2434-2440 (2006).

8）T. Fukuoka, M. Kawamura, T. Morita, et al., : A basidiomycetous yeast, Pseudozyma crassa, produces novel diastereomers of conventional mannosylerythritol lipids as glycolipid biosurfactants, *Carbohyd. Res.*, 343, 2947-2955 (2008).

9）T. Imura, S. Ito, R. Azumi, et al., : Monolayer assembled from a glycolipid biosurfactant from *Pseudozyma* (*Candida*) antarctica serve as a high-affinity ligand system for immunoglobulin G and M, *Biotechnol. Lett.*, 29, 865-870 (2007).

10）特開2010-248186

11）T. Fukuoka, T. Morita, M. Konishi, et al., : A basidiomycetous yeast, *Pseudozyma tsukubaensis*, efficiently produces a glycolipid biosurfactant; identification as a new diastereomer of conventional mannosylerythritol lipid-B, *Carbohyd. Res.*, 343, 555-560 (2008).

12）T. Fukuoka, T. Yanagihara, T. Imura, wt al., : Enzymatic synthesis of a novel glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid-D, and its aqueous phase behavior, *Carbohyd. Res.*, 346, 266-271 (2011).

13）T. Morita, Y. Ishibashi, T. Fukuoka, et al., : Production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by a smut fungus, *Ustilago scitaminea* NBRC 32730, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 788-792 (2009).

14）H. Kunieda, K. Nakamura, D. F. Evans, : Formation of reversed vesicles, *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 1051-1052 (1991).

アスコルビン酸誘導体を用いた新規薬物含有ナノ微粒子製剤の開発

千葉大学大学院薬学研究院製剤工学研究室

森部　久仁一、山本　恵司、東　顕二郎

Ascorbic acid is widely known as antioxidant agent. Recently, many ascorbic acid derivatives were produced for improvement of the stability. Ascorbyl 2,6 dipalmitate (ASC-DP) is a fatty ester derivative of ascorbic acid. It can't form micelle or liposome structure by itself. However, ASC-DP-distearoylphosphatidylethanolamine-polyethylene glycol 2000 (DSPE-PEG) complex was found to form stable nanoparticles. In this study, we prepared and characterized drug-incorporated ASC-DP/DSPE-PEG nanoparticles. DSPE-PEG was used as one of a solubilizing agent. AmphotericinB (AmB) was used as a model drug. Nanoparticles were prepared by hydration method. ASC-DP/DSPE-PEG nanoparticles were prepared at a molar ratio of 1/1. AmB-loaded nanoparticles were prepared from ASC-DP/DSPE-PEG (1/1 molar ratio) with 10%mol of AmB. Toxicity of AmB-loaded nanoparticles were examined and compared with that of Fungizone® using ddy mouse. Mice were injected intravenously with a single dose of AmB-loaded samples. Minimum lethal dose (MLD) was defined as the minimum dose that produces death in all mice. Renal and hepatic functions were detected by measuring the serum urea, creatinie, GOT and GPT concentrations. The concentration of AmB in plasma after intravenous administration of each sample was determined by high-pressure liquid chromatography. ASC-DP/DSPE-PEG nanoparticles were obtained with the size of ca. 75-110nm. ASC-DP nanoparticles were prepared only when PEG-lipid derivatives were used as solubilizing agent. ASC-DP/DSPE-PEG nanoparticles enable to incorporate hydrophobic drugs, such as AmB, nystatin, fluconazole, and clarithromycin. AmB (10mol%)-loaded nanoparticles were obtained with an average particle size of ca. 170nm and were stable for more than 1 week. MLD of Fungizone was 4.0mg/kg, while that of AmB(10mol%)-loaded nanoparticles was up to 12mg/kg. When AmB (10mol%) nanoparticles or Fungizone was administered to mice at a dose of 2.0mg/kg, Fungizone showed higher renal and hepatic toxicity than AmB(10mol%)-loaded nanoparticles. These results indicated that incorporation of AmB in ASC-DP/DSPE-PEG reduced the toxicity of AmB. AmB(10mol%)-loaded nanoparticles demonstrated higher plasma concentration of AmB than Fungizone when samples were administered to mice at a dose of 1.0mg/kg. In conclusion, AmB was successfully loaded in ASC-DP/DSPE-PEG nanoparticulate system. Because the nanoparticulate system was applicable for the other hydrophobic drugs, it would become a promising drug carrier system.

1．緒　言

アスコルビン酸は抗酸化作用を持ち、医薬品、化粧品原料及び食品添加物等として広く用いられている。近年、アスコルビン酸の安定性を向上させる目的で各種アスコルビン酸誘導体が合成されている。Ascorbyl dipalmitate（ASC-DP）は、アスコルビン酸の２位及び６位にパルミトイル基を導入することにより脂溶性を持たせた誘導体で、抗酸化作用を示すことから化粧品基材等に用いられている。一方Polyethylene glycol（PEG）脂質誘導体は、疎水性の脂質部位に親水性のPEGが結合したもので、乳化剤あるいはリポソーム製剤の血中滞留性向上を目的として使用されている。我々は、ASC-DPとPEG脂質誘導体であるDistearoyl phosphatidylethanolamine-PEG2000（DSPE-PEG）からなる複合体が水中において、サブミクロンレベルの新規微粒子を形成することを見出した。そこで、本研究では、新規薬物担体の調製を目的として、薬物封入ナノ微粒子の調製と物性評価及び毒性・体内動態の検討を行った。

*

Formulation development of novel drug-encapsulated nanoparticles using ascorbyl acid derivatives

Kunikazu Moribe*, Keiji Yamamoto, Kenjirou Higashi

Laboratory of Pharmaceutical Technology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

2．実　験

用いた主な化合物の構造式をFig. 1に示す。モデル薬物にはアンホテリシンB（AmB）を用いた。ASC-DPとDSPE-PEGを種々のモル比で有機溶媒（クロロホルム、メタノール）に溶解させ、溶媒留去により薄膜を調製した。この薄膜に水系溶媒（蒸留水、リン酸緩衝液pH7.4）を加え水和し、得られた微粒子について粒度分布及びゼータ電位測定を行った。ASC-DPナノ微粒子形成条件を検討するため、各種可溶化剤を用いたスクリーニングを行った。また、ASC-DP/DSPE-PEGナノ微粒子に封入できる難水溶性薬物のスクリーニングを行った。全数致死量（MLD）はAmB封入製剤を各種用量でマウスに尾静脈投与し3時間以内での致死数から評価した。腎毒性の指標（Cre、BUN）と肝毒性の指標（GOT、GPT）は、AmB封入製剤をAmB量として１mg/kgまたは２mg/kgマウスに尾静脈投与したのち48時間後の血液サンプルを採取することで評価を行った。各種製剤の血中滞留性は、試料をマウスに尾静脈投与したのち経時的に血液試料を採取し、C18 BOND-ELUTEを用いてAmBを抽出後、HPLCで定量した。

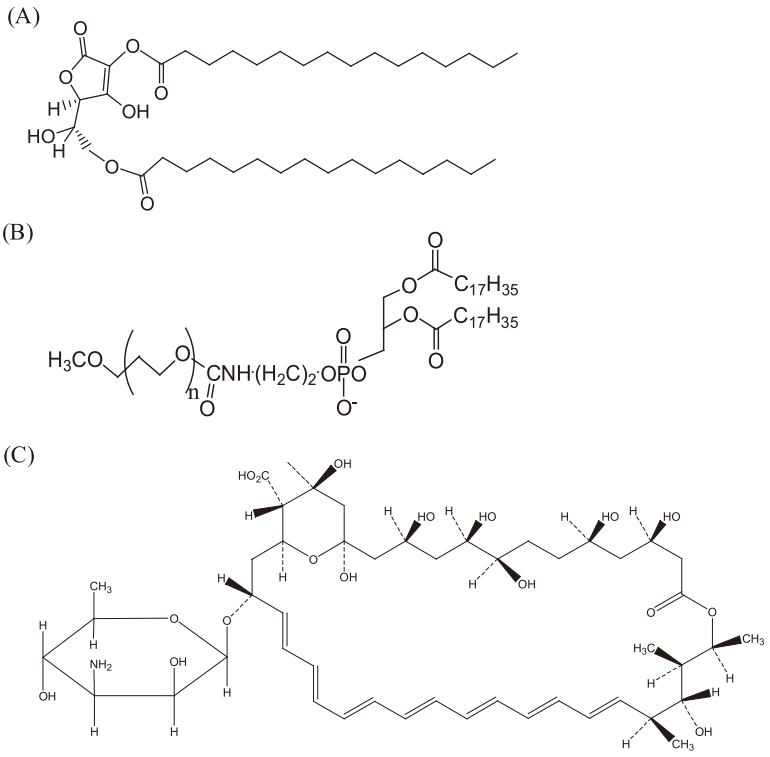


Fig.1　Chemical structure of ascorbyl-2,6-dipalmitate (ASC-DP), (B) distearoylphosphatidylethanolamine polyethylene glycol 2000 (DSPE-PEG), and (C) AmB.

Table 1 The mean particle size of the drug (10 mol%)/ASC-DP/DSPE-PEG (1:1 molar ratio) nanoparticles.

Drug	Mean particle size (nm)	
	After hydration	After storage for 24h
Amphotericin B	170	162
Nystatin	125	120
Fluconazole	79	76
Clarithromycin	133	126
Acetohexamide	189	159
Vitamin D_3	90	89
Coenzyme Q_{10}	102	96
Thioctic acid	80	80

3．結果および考察

ASC-DPと各種界面活性剤をモル比 1:1 の組成で調製した試料について、微粒子形成の検討を行った。その結果、ASC-DP/DSPE-PEGを用いた系では、平均粒子径75-110 nmの微粒子形成が認められ２週間後においても安定に存在するのが観察された。一方、その他の界面活性剤を用いた系では、24時間後には凝集が観察され安定な微粒子は得られなかった。ASC-DP、DSPE-PEG モル比 1:1 の微粒子へ封入可能な薬物について検討したところ、AmB、ナイスタチン、フルコナゾール、クラリスロマイシンといった難溶性医薬品や脂溶性ビタミン、サプリメントで封入可能であることがわかった（Table 1）。

ASC-DP/DSPE-PEGナノ微粒子懸濁液について安定性を評価したところ、２週間にわたって凝集が見られず、粒子径にほとんど変化は認められなかった。安定性に寄与すると考えられる微粒子表面の電荷を評価した結果、ASC-DP/DSPE-PEG微粒子の表面は-37.9 mVに帯電しており、静電反発力が微粒子の安定性に寄与していると考えられた。

次にASC-DP/DSPE-PEGからなる薄膜調製段階において、抗真菌薬Amphotericin（AmB）を10％添加し、薬物封入検討を行った。AmBを添加した試料について粒度分布測定を行ったところ、平均粒子径170nmの微粒子形成が認められ、さらに24時間後においてもAmBの凝集による沈殿が見られず、安定に存在することが観察された。このことから、得られた微粒子にはAmBが封入可能であることが明らかとなった。次にゼータ電位測定を行い微粒子表面の電荷を評価したところ、薬物未封入の微粒子の電位は-39mV、AmB封入微粒子の電位は-34 mVと負電荷の電荷を示し、静電反発力が微粒子の安定化に寄与しているものと考えられた（Table 2）。

AmB封入ナノ微粒子の臨床応用を目的とし、MLD及びCre, BUN, GOT, GPTを指標として急性毒性を評価した。その結果、MLDは市販薬のFungizone（4mg/kg）と比較して、ナノ微粒子製剤の方が顕著に高い値（12mg/kg）を示し、ナノ微粒子化による毒性の軽減が示された。また、AmB封入ナノ微粒子はFungizoneと比較して、AmBの重篤な副作用である腎毒性及び肝毒性を顕著に抑制した。ナノ微粒子に封入したAmBの血中滞留性をFungizoneと比較したところ、AmB封入ナノ微粒子において優位な血中滞留性の増大が観察された（Fig. 2）。

4．総　括

以上の結果から、AmBを封入したASC-DP/DSPE-PEGナノ微粒子は市販のFungizoneと比較して優れたAmB製剤であることが明らかとなった。ASC-DP/DSPE-PEGナノ微粒子には他の難水溶性の薬物の封入も可能であることから、薬物送達キャリアーとしての利用が期待できる。今

Table 2 Mean particle size and zeta-potential of AmB/ASC-DP/DSPE-PEG nanoparticles. [a)]

Sample	Mean particle size (nm) [b)]		Zeta-potential [c)]
	After hydration	Storage for 24 h	(mV)
ASC-DP/DSPE-PEG	67 ± 7	63 ± 5	−39.0 ± 4.3
AmB (1 mol%) /ASC-DP/DSPE-PEG	122 ± 8	122 ± 8	−37.2 ± 1.4
AmB (5 mol%) /ASC-DP/DSPE-PEG	135 ± 2	157 ± 3	−32.6 ± 0.6
AmB (10 mol%) /ASC-DP/DSPE-PEG	170 ± 7	162 ± 5	−33.9 ± 0.4

a) Entrapment efficacy of AmB, which was evaluated by passing the sample solution through 0.8mm filter, was more than 99% in each samples.

b) Mean ± S.D., n = 3

c) Mean ± S.D., n = 5

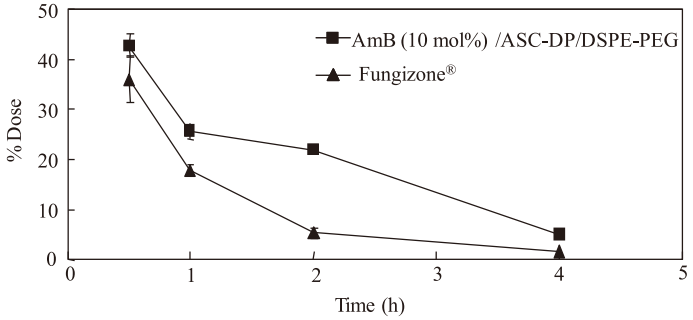


Fig.2 Plasma concentration of AmB after mice were intravenously administered AmB/ASC-DP/DSPE-PEG nanoparticles or Fungizone at a dose of 1.0 mg/kg. Each point represents the mean±SD (n = 3–5).

後は、ナノ微粒子形成に及ぼす組成の影響や得られたナノ微粒子の構造について検討していく予定である。

なお、本研究成果の詳細は参考文献１に発表した。

（参考文献）

1）Moribe K., Maruyama S., Inoue Y., Suzuki T., Fukami T., Tomono K., Higashi K., Tozuka Y., Yamamoto K., Ascorbyl dipalmitate/PEG-lipid nanoparticles as a novel carrier for hydrophobic drugs. Int. J. Pharm.,387, 236-243 (2010).

2）Tanaka, H., Yamamoto, R., Pharmaceutical studies on ascorbic acid derivatives. Yakugakuzasshi 86, 376–383 (1996).

3）Spiclin, P., Găsperlin, M., Kmetec, V., Stability of ascorbyl palmitate in topical microemulsions. Int. J. Pharm. 222, 271–279 (2001).

4）Gopinath, D., Ravi, D., Rao, B.R., Apte, S.S., Renuka, D., Rambhau, D., Ascorbyl palmitate vesicles (Aspasomes): formation, characterization and applications. Int. J. Pharm. 271, 95–113 (2004).

5）Inoue, Y., Yoshimura, S., Tozuka, Y., Moribe, K., Kumamoto, T., Ishikawa, T., Yamamoto, K., Application of ascorbic acid 2-glucoside as a solubilizing agent for clarithromycin: solubilization and nanoparticle formation. Int. J. Pharm. 331, 38–45 (2007).

6）Moribe, K., Tanaka, E., Maruyama, K., Iwatsuru, M., Enhanced encapsulation of amphotericin B into liposomes by complex formation with polyethylene glycol derivatives. Pharm. Res. 15, 1737–1742 (1998).

コエンザイムQ10（CoQ10）の美肌、抗老化作用における ミトコンドリア移行の意義

同志社大学生命科学部
斎藤　芳郎

Coenzyme Q (CoQ) is a well-known electron transporter in the mitochondrial respiratory chain. Furthermore, ubiquinol (UQH_2)—a reduced form of ubiquinone (UQ)—has been shown to act as a radical-scavenging antioxidant. Some studies have reported the beneficial effect of CoQ addition to cultured cells; however, the cellular uptake and distribution of CoQ have not been elucidated. Our recent study suggests that the added UQ10 as well as $UQ10H_2$ mainly localized in the mitochondrial fraction, which is similar to the localization of endogenous CoQ but different from that of αT. These results suggest a certain system which accumulates CoQ preferentially in mitochondria. Benzoquinone ring of CoQ suggests a redox function, while the isoprenic side chain mediates the arrangement of CoQ in the lipid core of biomembranes; however, detail molecular mechanisms of accumulating system of CoQ in mitochondria are still unknown. In the present study, we examined the cellular distribution of CoQ with different isoprenic side chain. At first, we developed the measurement system of short chain homolog of CoQ using HPLC system. Now we examined the cellular uptake and distribution of short chain homolog of CoQ.

1．緒　言

コエンザイムQ（以下CoQ）は、ATP合成に必須の分子であり、酸化型のユビキノール（UQ）と、その還元型であるユビキノン（UQH_2）が存在する[1)]。さらに、UQH_2は活性酸素を消去する抗酸化作用を持つことが知られている[2)]。CoQのベンゾキノン環が酸化還元反応を担い、イソプレン側鎖が生体膜内での分布に関与すると考えられている。ヒトでは、イソプレン側鎖が10残基連なっているCoQ10が主に存在し、ラットなどのげっ歯類ではCoQ9が存在する。CoQ10は、生体内で合成される抗酸化物質の一つであり、主にミトコンドリアで生合成される[3)]。実際、ミトコンドリアでの含量が他の細胞内小器官に比べて多い。CoQ10の生体内含量が加齢と共に減少することなどから、サプリメントとしての摂取が推奨されている。また化粧品にも多数含まれており、美肌効果や肌の若返り作用、抗酸化作用などが期待されている。しかしながら、CoQ10の生理機能およびそのメカニズムについては、不明な点が多い。特に細胞内分布・細胞内小器官への移行メカニズムについては明らかになっていなかった。

筆者らは、これまで神経細胞のモデルであるPC12細胞を用いて、CoQ10の生理機能・抗酸化作用について検討してきた。細胞外から添加したCoQ10の細胞内分布を内在性のCoQ（ラット由来のPC12細胞の場合、CoQ9を生合成する）と比較した結果、両者が類似の細胞内分布を示し、ミトコンドリア画分に多く含まれることを見いだした[4)]。この結果から、細胞外から添加したCoQ10が未知のメカニズムによりミトコンドリアに選択的に蓄積する可能性が考えられた。

本研究では、側鎖構造の異なるCoQを用いて検討を行い、ミトコンドリア移行に重要な化学構造を同定し、コスメトロジーの分野において期待されるCoQ10の機能発現に重要な化学構造を提示することを目的としている。

Significance of translocation of coenzyme Q10 to mitochondria in its whitening and anti-aging effects

Yoshiro Saito
Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University

2．実　験

2. 1.　細胞培養

ラット褐色細胞腫PC12細胞（以下PC12細胞）は、10％非働化ウシ胎児血清および5％非働化ウマ血清を含むDMEM/F12 Mediumを用いて培養した。短鎖CoQ（エタノール溶液）を終濃度10μM添加し、一定時間培養した細胞を各種実験に供した。実験に供した短鎖CoQ（CoQ4およびCoQ7）は、神戸学院大学　薬学部　岡本教授から供与された。

2. 2.　細胞分画

培養した細胞を回収して洗浄後、ホモジナイズバッファー（0.25M sucrose, 0.1mM EDTA, 0.7mM 2-mercaptoethanolを含む50mM Tris-HCl, pH 7.4）に細胞を懸濁し、窒素破砕した。破砕後、500gで10分間、5000gで10分間、105,000gで1時間それぞれ遠心し、沈殿に核、ミトコンドリア、細胞膜を、上清に細胞質画分を得た。得られた各画分について、BCA protein assay kit（Pierce社）を用い、ウシ血清アルブミンを標準物質としてタンパク量を測定した。さらに、各画分についてそれぞれのマーカー酵素であるcytochrome c oxidase（ミトコンドリアマーカー）、NADPH-

cytochrome c reductase（ミクロソームマーカー）、とlactate dehydrogenase（細胞質マーカー）活性を測定し、短鎖CoQの細胞内分布を見積もった。各々の測定方法については、文献5を参照。

2. 3. CoQ および α-トコフェロール（αT）の測定

細胞内CoQ及びαTの測定は、電気化学的検出器（NANOSPACE SI-1, 資生堂、700 mVの条件）を組み合わせた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて測定を行った[6]。CoQは、細胞をPBSに懸濁し、メタノール/ヘキサン（1：5：10）と混合して、遠心後（15,000 rpm、10分間）、上清のヘキサン層を分析サンプルとした。検討した溶媒中で、流速1 ml/min、C18カラム（LC8、5 μm, 250 × 4.6 mm, Sigma-Aldrich）で分離後、還元カラムでUQをUQH_2に還元し、電気化学的検出器により検出した。αTの場合は、PBSに懸濁した細胞を、クロロフォルム/メタノール（1：2：1）と混合し、遠心後（15,000 rpm、10分間）、下層のクロロフォルム層を分析サンプルとした。50 mM過塩素酸ナトリウムを含むmethanol/tert-butyl alcohol（95：5, v/v）を溶媒として用い、流速1 ml/min、C18カラム（LC8、5 μm, 250×4.6 mm, Sigma-Aldrich）で分離後、電気化学的検出器により検出した。

3．結　果

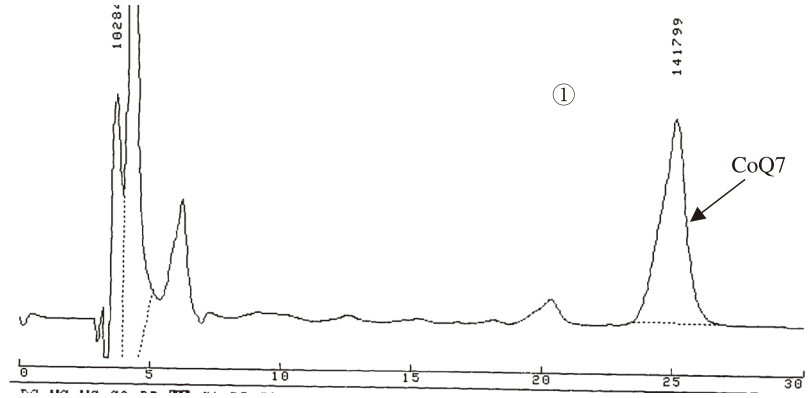
3. 1. 短鎖 CoQ 測定条件の検討

まず、短鎖CoQを分離同定するため、電気化学的検出器を組み合わせたHPLCを用いて、種々の溶媒における分離条件を検討した。その結果、50 mM過塩素酸ナトリウムを含むmethanolの条件で、CoQ 7が25分（図1A）に、CoQ 4が7.5分（図1B）に溶出されることが分かった。CoQ 9は、これまでに確立した50 mM過塩素酸ナトリウムを含むmethanol/tert-butyl alcohol（85：15, v/v）の条件で測定を行った。

3. 2. CoQ7 を用いた解析

10 μM CoQ7で1時間反応した細胞の各画分について、CoQ 9、CoQ 7、α-トコフェロール含量を測定した。これまでの結果から、CoQ 9はミトコンドリア画分のマーカー酵素と類似の分布を、αTは膜画分のマーカー酵素と類似の分布を示すことがすでにわかっている[3]。各々の測定値

A　CoQ7 の HPLC 解析結果



B　CoQ4 の HPLC 解析結果

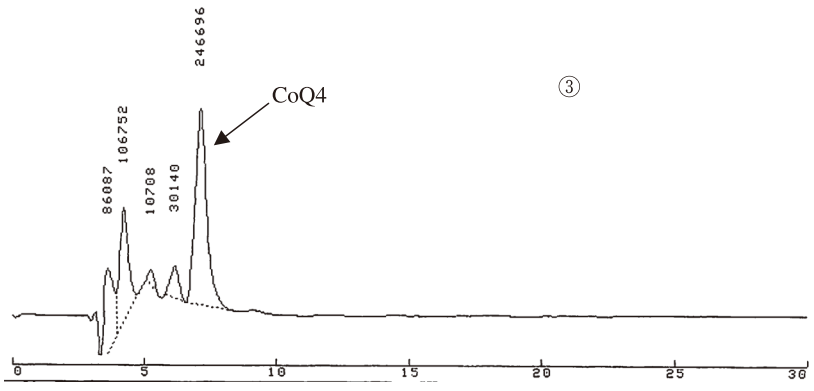


図1　短鎖 CoQ の HPLC 解析結果

を図２にまとめた。各々の面積が、核（N）、ミトコンドリア（M）、細胞膜（Mc）、細胞質（C）への分布（縦軸が各CoQの相対含量、横軸はタンパク質量を示す）を表している。この結果から、CoQ7と内在性のCoQ9の分布に類似性が認められた。一方、膜画分マーカーと類似の分布を示すαTと比較して、CoQ7の分布が異なっていることも確認できた（図2）。以上の結果から、CoQ7は、CoQ9と同じくミトコンドリアに分布すると考えられた。

3. 3.　CoQ4 を用いた解析

CoQ７と同様の解析を、CoQ４でも行った。図３に得られた結果をまとめた。この結果から、CoQ４は、内在性の

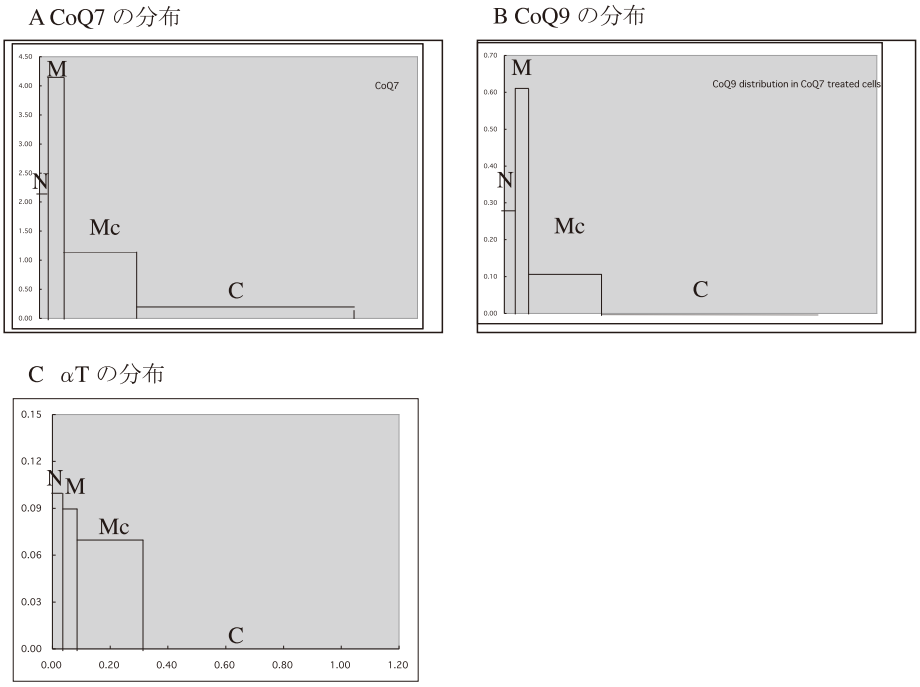


図２　CoQ7 処理細胞における CoQ7、CoQ9、αT の細胞内分布
各々の面積が、核（N）、ミトコンドリア（M）、細胞膜（Mc）、細胞質（C）への分布（縦軸が各化合物の相対含量、横軸はタンパク質量を示す）を現している。

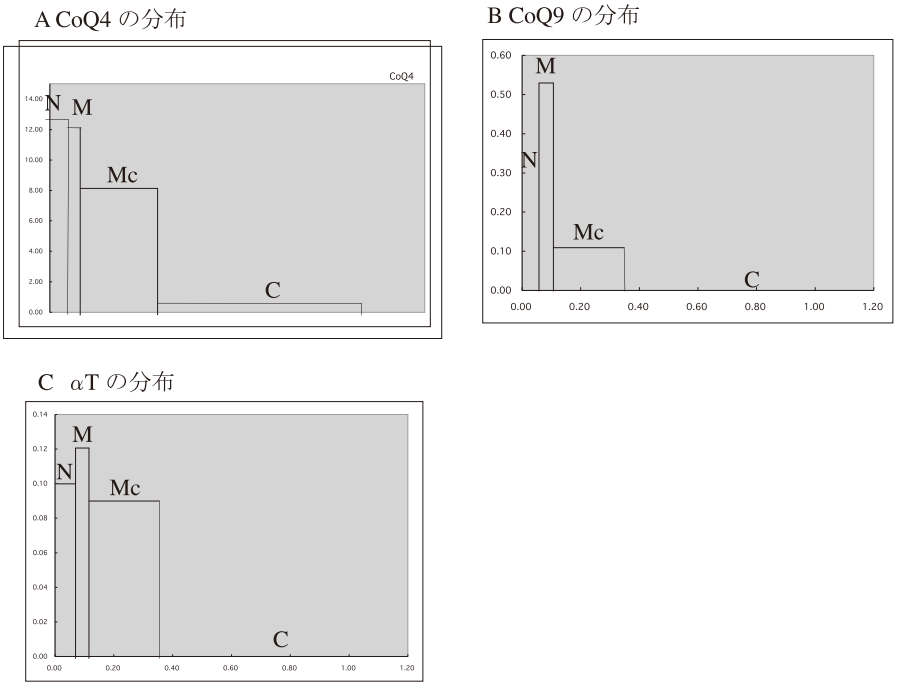


図３　CoQ4 処理細胞における CoQ4、CoQ9, αT の細胞内分布

CoQ９とは異なり、膜画分へ多く分布する可能性が考えられた。同サンプル中のαTの分布と比較すると、CoQ４の分布に類似性が認められる。これらの結果から、CoQ４の場合には、CoQ９やCoQ７とは異なる細胞分布を示すと考えられた。

４．考　察

以上の結果から、CoQがミトコンドリアに移行するために必要な側鎖の繰り返しが、7では十分条件を満たしており、４より長い側鎖が必要であることが分かった。今後、CoQ５またはCoQ6で検討を行うことにより、ミトコンドリア移行に必要な化学構造が決定できると考えられる。また、CoQのミトコンドリア移行メカニズムが、細胞の種類の違いで変わるかという点も今後の課題である。

（文献）

１）Lenaz, G., Fato, R., Formiggini, G. et al. The role of Coenzyme Q in mitochondrial electron transport. *Mitochondrion* **7 Suppl**, S8-33, 2007

２）Shi, H., Noguchi, N. and Niki, E. Comparative study on dynamics of antioxidative action of alpha-tocopheryl hydroquinone, ubiquinol, and alpha-tocopherol against lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 334-46, 1999

３）Fernandez-Ayala, D.J., Brea-Calvo, G., Lopez-Lluch, G., and Navas, P. Coenzyme Q distribution in HL-60 human cells depends on the endomembrane system. *Biochim. Biophys. Acta* **1713**, 129–37, 2005

４）Saito, Y., Fukuhara, A., Nishio, K. et al. Characterization of cellular uptake and distribution of coenzyme Q10 and vitamin E in PC12 cells. *J. Nutr. Biochem.*, **20**, 350-357, 2008

５）Saito, Y., Yoshida, Y., Nishio, K., Hayakawa, M., and Niki, E. Characterization of cellular uptake and distribution of vitamin E. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1031**, 368–75, 2004.

６）Yoshida, Y., Hayakawa, M., Habuchi, Y., and Niki, E. Evaluation of the dietary effects of coenzyme Q in vivo by the oxidative stress marker, hydroxyoctadecadienoic acid and its stereoisomer ratio. *Biochim. Biophys. Acta,* **1760,** 1558–68, 2006.

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

東京都市大学工学部エネルギー化学科
黒岩　崇

Synthesis of a trehalose lipid via lipase-catalysed condensation between trehalose and myristic acid in low-water organic media was investigated. A trehalose lipid (monomyristoyl trehalose) was obtained using immobilized lipase B from *Candida antarctica* (Novozym 435). The product yield was significantly affected by reaction conditions, such as the initial water concentration in organic solvents, the initial water and the amount of added molecular sieves. The product yield varied in the range 0–25%. The effects of the reaction conditions were discussed in relation to the quantitative distribution of water in the reaction system, *i.e*., water adsorbed onto immobilized enzymes, water adsorbed onto molecular sieves, and free water dissolved in the organic solvent. We developed a comprehensive method for evaluating the effects of water on the product yield.

1．緒　言

機能性糖質として注目されているトレハロースに中～長鎖脂肪酸が結合したトレハロース脂質は、抗菌性や抗腫瘍性を有する機能性物質である[1, 2, 3]。このトレハロース脂質と、既に化粧品分野で利用されている脂質二分子膜小胞体リポソームとを組み合わせることで、トレハロース脂質の生理機能と、リポソーム化粧品の特長である浸透性・安全性・良好な使用感を合わせ持つ、付加価値の高い化粧品素材の開発が期待できる。

トレハロース脂質を合成する際、トレハロースへの脂肪酸導入に使われる水酸基は、トレハロース１分子中に８個も含まれているため、通常の化学合成法では得られるトレハロース脂質の構造を厳密に制御することは容易ではない。一方、反応の位置選択性が高い酵素反応を利用してトレハロース分子内の特定の水酸基だけに脂肪酸鎖を導入できれば、安全性や選択性に優れた合成プロセスを構築でき、人体に直接使用する化粧品としての諸特性を制御しやすいというメリットが期待できる。

酵素を用いた合成反応においては、反応平衡の観点から、水を含まない、あるいは水の含有量が非常に少ない非水溶媒中での反応が有利である。既往の研究において、有機溶媒中の微量水分の影響が重要であることが指摘されている[4, 5, 6]。しかし、効率的な合成プロセスの構築に向けて、反応系での水の存在状態を考慮して反応操作因子と合成収率の関係を定量的かつ統一的に評価する手法は十分確立されているとはいえない。

Development of value-added liposomal cosmetics based on physiological activities of enzymatically synthesized trehalose lipids

Takashi Kuroiwa

Department of Chemistry and Energy Engineering, Faculty of Engineering, Tokyo City University

そこで本研究では、トレハロース脂質を利用した高機能化粧品の開発を目指し、酵素を利用したトレハロース脂質の合成条件を検討した。効率的な反応操作を行うための条件設定に関する基礎的知見を得ることを目的とし、反応系の微量水分の影響に着目して行った研究について報告する。

2．実　験

2. 1.　有機溶媒中での酵素反応によるトレハロース脂質の合成

酵素としては、Novo Nordisk社製の固定化リパーゼ“Novozym 435”を用いた。本酵素は*Candida antarctica*由来のリパーゼ（フラクションB）を粒径0.3 ～ 0.9 mmの多孔性アクリル樹脂担体に固定化したものである。

トレハロース二水和物およびミリスチン酸（各0.05mol）とNovozym 435（100mg）、さらに脱水剤としてモレキュラーシーブ3A（0 − 400 mg）を30mL容のフラスコに入れ、種々の有機溶媒５mLを加えて40℃でインキュベートして合成反応を行った。所定の時間反応させた後、溶媒をエバポレートして除去し、残渣にクロロホルム/メタノール混合液（体積比2：1）を加え、不溶物をろ過により除去した。減圧下で溶媒を蒸発除去した残渣を分析に供した。

2. 2.　Novozym 435 およびモレキュラーシーブ 3A への水の吸着挙動評価

所定量のNovozyme 435およびモレキュラーシーブ3Aを所定の水分濃度に調整した有機溶媒中に投入し、密閉しながら40℃でインキュベートした。100h後、液相の水分濃度をカールフィッシャー水分計により定量し、(1) 式を用いて吸着水分量を求めた。

$$q_e = q_i + V\,(C_i - C_e)\,/m \qquad (1)$$

ここでqは吸着水量 [g-water/g-solid]、Vは溶媒の体積 [L]、Cは液相の水分濃度 [g/L]、mは添加した固体の質量 [g]である。添え字iは実験開始時の初期値、eは実験終了

時の最終値であることを示す。

2. 3. 生成物の定量

反応生成物は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて定量した。オクタデシルシリカを充填した逆相カラムを用い、メタノール/水混合液（体積比85：15）を移動相としてカラム温度40℃、移動相流速1.0 mL/minの条件で分析を行った。既往の方法[7]により化学的に合成したトレハロース脂質を標準物質とし、示差屈折検出器によるピーク面積からトレハロース脂質の生成量を求めた。

3．結果および考察

3. 1. 固定化リパーゼを用いたトレハロース脂質の合成

今回検討した反応は、トレハロースの水酸基とミリスチン酸のカルボキシル基との脱水縮合によりトレハロース脂肪酸エステルを形成させるものである。油脂をはじめとする脂肪酸エステルの加水分解反応を触媒するリパーゼは、水が極端に少ない条件下では加水分解の逆反応である脱水縮合によるエステル化反応を触媒する。そこで、有機溶媒中でリパーゼを用いてトレハロースとミリスチン酸からのトレハロース脂質の合成を行った。種々の有機溶媒を用いて検討した結果、2-メチル-2-ブタノール（*tert*-アミルアルコール）およびアセトンなどの溶媒中で反応の進行が認められた。図１に、2-メチル-2-ブタノール中で反応を行った際の生成物のHPLCクロマトグラムを示す。酵素反応サンプル中にも、化学的に合成されたトレハロース脂質（トレハロース１分子に１分子のミリスチン酸が結合したもの）と同一の保持時間のピークが検出された。

3. 2. トレハロース脂質の収率に対する操作因子の影響

トレハロース脂質の収率に対する各種操作因子の影響について、2-メチル-2-ブタノールを溶媒とする反応系で検討した。その結果、トレハロース脂質の収率は、溶媒初期水分濃度およびモレキュラーシーブ添加量により顕著に変化することを明らかにした（図２）。これら以外にも、反応系内の水分濃度およびその分配に関連すると考えられる操作因子が生成物の収率に影響を及ぼす結果が得られたが、いずれの因子の影響もそれぞれ独立したものではなく、相互に影響しあっていることが示唆された。

3. 3. 合成収率に対する微量水分の影響評価

反応系の水は反応の平衡に影響を及ぼすばかりでなく、酵素活性にとっても重要な役割を果たすことが知られている[4]。すなわち、加水分解の逆反応である脱水縮合反応では、過剰な水の存在は合成を妨げる方向に作用する。一方、酵素の水和状態は活性の発現に大きくかかわり、全くの“無水”状態では酵素活性が著しく低下してしまう場合がある[8, 9]。従って、反応系の水の影響を考慮して操作条件を決定することが重要となる。本研究では、各操作因子の影響を統一的に評価するため、反応系における水の分布状態に着目した。本反応系は、溶媒（液相）、固定化酵素（固相）及びモレキュラーシーブ（固相）が共存する多相反応系であり、反応系に含まれる水は各相に分配した状態で存在していると考えられる（図３）。そこで、各相間の水の分配挙動を明らかにし、系内の水の物質収支に基づいて反応系における水の分布状態を定量化することを試みた。

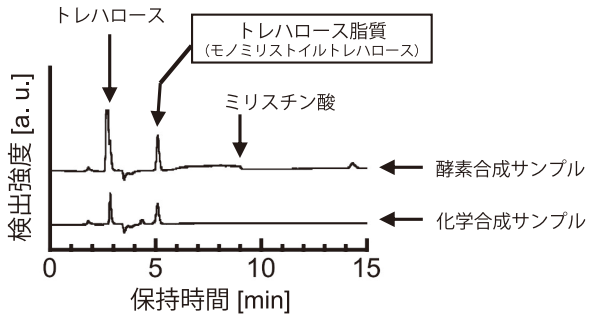


図１　酵素反応により合成したサンプルと化学的に合成したサンプルのHPLCクロマトグラム

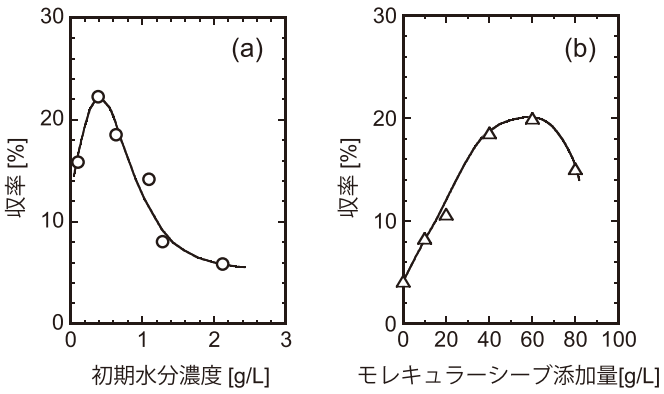


図２　トレハロース脂質の合成収率に対する (a) 初期水分濃度および (b) モレキュラーシーブ添加量の影響（反応時間 72 h）

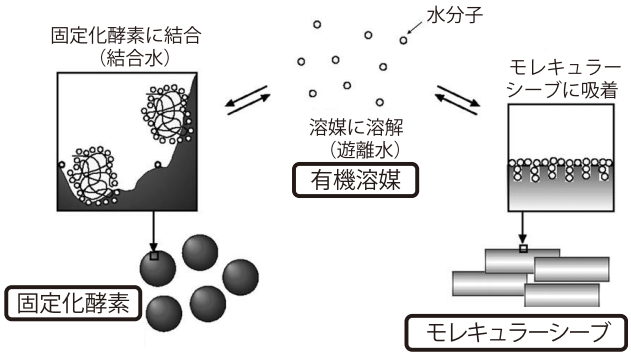


図３　反応系における水の分布状態の模式図

図４に、40℃の2-メチル-2-ブタノール中におけるNovozym 435およびモレキュラーシーブ3Aに対する水の吸着等温線を示す。いずれも、液相の水分濃度の増大に伴い固相への吸着水量が増大し、水分濃度の高い領域では吸着水量は飽和する挙動を示した。実験データ（図中のプロット）は、式 (2) で表わされるLangmuir型の吸着モデル（図中の実線）によく一致した。

$$q_e = q_s C_e / (K + C_e) \qquad (2)$$

ここで、Kは吸着定数 [g/L]であり、添え字sは飽和状態における値であることを示す。

図４の結果からカーブフィッティングにより式 (2) 中の吸着パラメーター（q_sおよびK）を求め、これを用いて反応系における水の物質収支をとると、反応開始時の諸条件から反応終了時の各相への水の分布状態を推算することができる。図５には、反応開始時の溶媒中の初期水分濃度および反応終了時の溶媒中の最終水分濃度（水の分布状態を考慮して推算）と、反応時間72 hにおけるトレハロース脂質の合成収率との関係を示す。本反応系では、初期水分濃度が同じ場合であっても、例えば図２(b) のようにモレキュラーシーブの添加量など他の操作因子を変えることで水の分布状態が変化するため、初期水分濃度だけでは合成収率の最適条件を評価することはできない（図５(a)）。これに対し、反応系の水の分布状態を考慮して求められた最終水分濃度と合成収率のとの間には良好な相関関係が認められた（図５(b)）。トレハロース脂質の合成収率は、最終水分濃度0.1 g/L付近で最も高く、この値より低い条件でも高い条件でも合成収率が低下することが分かった。この結果から、反応系の水の分布状態を考慮することで合成収率に対する操作因子の影響を定量的に評価することができることが示された。このアプローチはスケールアップ時などにおける操作条件の最適化にも有用な指針を与えると期待できる。

４．総　括

本稿では、付加価値の高い化粧品素材の開発に向けて、酵素反応を利用したトレハロース脂質の合成における各種反応条件の影響について検討した結果を報告した。トレハロースとミリスチン酸のエステル化反応によるトレハロース脂質の合成を、有機溶媒中で固定化リパーゼを用いて行い、種々の操作因子がトレハロース脂質の収率に影響を及ぼすことを明らかにした。さらに、各操作因子を個別に評価するのではなく、反応系における水の分布状態に着目して考察することで、操作因子の影響を定量的・統一的に評価し最適化の指針を示すことができた。

筆者らの研究グループでは、今回報告した検討と並行して、機能性成分を包含したリポソームの効率的製造技術の開発にも取り組んでいる。この技術と本報告の成果とを融合・発展させることで、高機能なリポソーム化粧品の開発が実現できると期待される。その際、トレハロース脂質とリポソームを構成する脂質分子間の相互作用を物理化学的な観点から詳細に解析することが必要になると考えている。今後は、異種分子からなる分子集合体の動的・静的な挙動という視点から、トレハロース脂質を組み込んだリポソーム化粧品の作製技術について理解を深めていきたい。

謝　辞

本研究を実施するにあたりご支援をいただきました財団法人コスメトロジー研究振興財団に深く感謝いたします。また、本研究の遂行にあたり多大なご教授を賜りました筑波大学大学院生命環境科学研究科准教授 市川創作先生に心より御礼申し上げます。

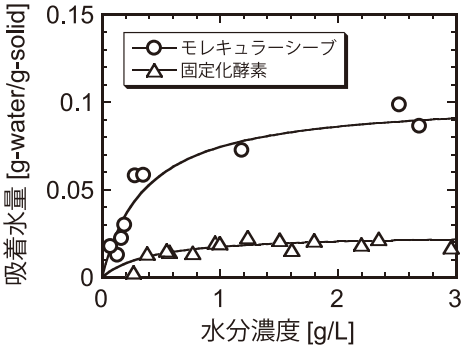


図４　2- メチル -2- ブタノール中における固定化酵素（Novozym435）およびモレキュラーシーブの吸着等温線（実験温度 40℃）

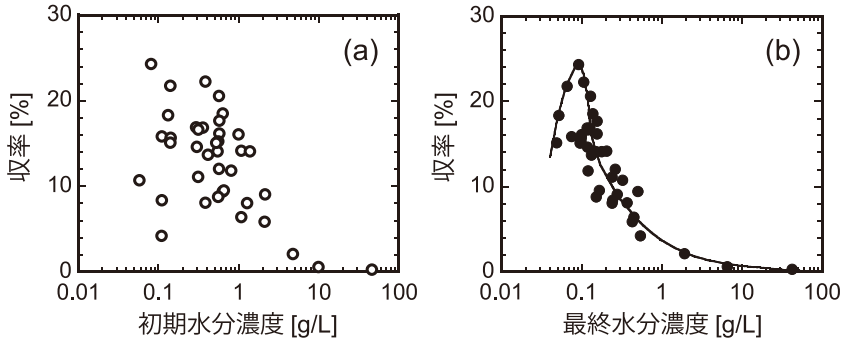


図５　トレハロース脂質の合成収率に対する (a) 初期水分濃度および (b) 最終水分濃度の影響（反応時間 72 h）

（引用文献）

1）Nishikawa Y, Yoshimoto K, Okada M, *et al.*: Chemical and biochemical studies on carbohydrate esters. V. Anti Ehrlich ascites tumor effect and chromatographic behaviors of fatty acyl monoesters of sucrose and trehalose, Chem. Pharm. Bull., **25**, 1717-1724, 1977.

2）Kohya H, Ishii F, Takano S, *et al.*: Antitumor effect of a synthetic cord factor, 6,6'-di-O-decanoyl α, α-trehalose (SS554), in mice, Jpn. J. Cancer Res., **77**, 602-609, 1986.

3）Okabe S, Suganuma M, Tada Y, *et al.*: Disaccharide esters screened for inhibition of tumor necrosis factor-α release are new anti-cancer agents, Jpn. J. Cancer Res., **90**, 669-676, 1999.

4）Yamane T.: Importance of moisture content control for enzymatic reactions in organic solvents: a novel concept of 'microaqueous', Biocatalysis, **2**, 1-9, 1988.

5）Chen J, Kimura Y, Adachi S: Synthesis of linoleoyl disaccharides through lipase-catalyzed condensation and their surface activities, J. Biosci. Bioeng., **100,** 274–279, 2005.

6）Zhang X, Adachi S, Watanabe Y, *et al.*: Prediction of the equilibrium conversion for the synthesis of acyl hexose through lipase-catalyzed condensation in water-miscible solvent in the presence of molecular sieve, Biotechnol. Prog., **19**, 293-297, 2003.

7）池本毅, 南野博美: 特開平5-168893, 1993.

8）Rupley JA., Gratton E. and Careri G.: Water and globular proteins, Trends Biochem. Sci., **8**, 18–22, 1983.

9）Affleck R, Xu ZF, Suzawa V, *et al.*: Enzymatic catalysis and dynamics in low-water environments, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**, 1100–1104, 1992.

多様な皮膚酸化傷害を制御するガロイル化フラボノイド素材の探索

徳島大学大学院ソシオ・アーツ・アンド・サイエンス研究部
増田　俊哉

Potent inhibitory activity of the leaves of *Myrica rubra* against both chemical and enzymatic (tyrosinase and lipoxygenase) oxidations was found in this project. Constituent analysis of the most active ethyl acetate-soluble part of the methanol extract of the leaves clarified the structures of eight major compounds. The tyrosinase and lipoxygenase inhibitory activities and DPPH radical scavenging activity of the isolated compounds were measured as indication of inhibition capacity for the enzymatic and chemical oxidation related to skin injury. The obtained data revealed that enhanced chemical and enzymatic antioxidant activities of the constituents mainly depended on the galloyl group on the compounds.

1．緒　言

生体の酸化的傷害は酸素のある限り避けることはできないが，その酸化を遅延させるような制御は可能である。ところで，皮膚は，人において酸化傷害が顕著に現れるところの一つと考えられる。なぜなら皮膚は直接大気中の酸素と接し，酸化のトリガーとなる太陽光を浴び，また，環境中の重金属のような酸化開始剤にさらされる機会も多いからである。またそのような化学的原因による酸化以外にもアラキドン酸の酵素酸化のような各種生体酸化酵素反応も皮膚にとっては重篤な傷害ともなり得る。なお，皮膚の酸化の制御は，酸化傷害が重篤になってから処方される医薬品以外に，日常において使用される化粧品に予防的な効果を期待することが可能と考えられる。しかしその一方で，皮膚の酸化傷害の原因は多様であり，これを完全かつ予防的に制御するには，それぞれに適応する制御剤が多数必要になり，現状では実際上完全制御は困難である。ところで，一連の類似物質が様々な酸化に対する多様な制御能を併せ持てば，完全制御の可能性を有する製品素材の開発に近づけることになると考えられる。そのような目的達成のため，本研究ではガロイル化されたフラボノイドに着目する。フラボノイドは化学的な酸化制御能が強く，また，ある種のフラボノイドにはリポキシゲナーゼのような酸化酵素に対する制御能も認められている。さらにガロイル基にも同様な制御作用が期待でき，したがって，それらが複合した物質には，必然的に多様な制御能が期待できるからである。そこで，本研究では，そのようなガロイル化された多数のフラボノイドをまず身近な天然素材に探索し，更にその制御特性を化学構造を基盤に解明することにより，多様な皮膚酸化傷害に完全に適応できるガロイル化フラボノイドを見出し，新しい化粧品素材として構築することを目的として研究を行った。

本研究では，天然素材として，これまでの我々の研究室で取り扱った植物の中から，ガロイルフラボノイド含有が期待されるヤマモモ葉を対象に実験を行った[1-3]。ヤマモモは，中国原産のバラ科高木であり，その実はフルーツとして食される。一方，樹皮は楊梅皮という生薬として知られ、タンニンに富み，止瀉作用や消炎作用があるとされている[4]。このヤマモモは，四国においては，徳島県の県木，高知県の県花として身近でなじみ深い植物であり，葉部は健康茶としての民間利用実績も見られる。

Chemical Survey for the Galloyl Flavonoids Exerting Protective Effects against Various Oxidative Skin Injuries

Toshiya Masuda
Institute of Socio Arts and Sciences, University of Tokushima

2．実　験

2・1　研究材料

ヤマモモ（*Myrica rubra*）は，徳島県小松島市櫛淵町のみその農園（仁木博之氏）より枝を入手し，その葉部（1.7 kg）を室温にて，20Lのメタノールに10日間浸漬した。それをろ過し，減圧下で，メタノールを留去したもの（309 g）をヤマモモ抽出物とした。

2・2　DPPHラジカル消去能の測定[1]

サンプル液100 μLを試験管に取り、4.8 mLのメタノールを加えた。更に、5 mMのDPPH液を加え、よく攪拌し、この時を0時として30分後に517 nmの吸光度を測定した。サンプルをメタノールに置き換えたものをコントロール、DPPHをメタノールと置き換えたものをブランクとして、測定は3連で行い、下式を用いて活性強度を算出した。

活性強度＝（コントロールAbs）－（サンプルAbs）＋（ブランクAbs）

2・3　チロシナーゼ阻害活性の測定[3]

8×12の96穴マイクロプレートを用いて以下のように条件を設定した。A（3セル）、B（1セル）、C（3セル）、

D（1セル）の計8セルを用いて、A：1/15M リン酸緩衝液（pH=6.8）120 μL、チロシナーゼ溶液（355 units/mL）40 μL 、B：1/15 Mリン酸緩衝液（pH=6.8）160 μL、C：1/15 Mリン酸緩衝液（pH=6.8）80 μL 、チロシナーゼ溶液（355 units/mL）40μL、2.5 mg/mL試 料 溶 液40μL、D：1/15 Mリン酸緩衝液（pH=6.8）120 μL、2.5 mg/mL試料溶液40 μLをそれぞれ加えて撹拌後、23℃で10分間静置した。1/15 Mリン酸緩衝液（pH=6.8）に溶解した2.5 mM L-DOPA溶液をそれぞれのセルに40 μL加え、23℃で10分間、波長475 nmにおける吸光度を測定した。ポジティブコントロールとしてコウジ酸を用いた。阻害率は以下の式を用いて算出した。

阻害率（%）＝〔{(A−B)−(C−D)}／(A−B)〕×100

2・4　リポキシゲナーゼ阻害活性の測定[5)]

石英セルに0.1 M（pH = 8.0）トリス塩酸緩衝液を2.9 mL、1 mMリノール酸液（in MeOH）を50 μL、サンプル液を20 μL加え、ラップで封をし撹拌した。検出器にセットし、25℃で10分間静置させ、その後、リポキシゲナーゼ液（13200 units/mL）を5μL加え、再びラップで封をし撹拌後、すみやかに検出器にセットし234 nmの吸光度を経時分析した。サンプルをメタノールに置き換えたものをコントロールとした。測定は3連で行い、下式をもちいて阻害率を算出した。なお、ポジティブコントロールとしてNDGAメタノール溶液を用いた。阻害率の算出には5分後の吸光度変化率を用いた。

阻害率（%）＝（コントロール ΔAbs −サンプル ΔAbs）／（コントロール ΔAbs）×100

2・5　ヤマモモ抽出物の分画

ヤマモモ抽出物300 gをメタノール2 Lと蒸留水220 mLに溶かした。これをヘキサン2 Lで分配し、メタノール分画層とヘキサン分画層を得た。ヘキサン分画層は濃縮・乾固し26.7 gのヘキサン可溶部を得た。続いて、メタノール分画層を減圧下で濃縮し、メタノールを除去し、更に蒸留水を2 L加え、酢酸エチル2L、及び1Lで計2回分配を行い、酢酸エチル層を減圧下で濃縮・乾固し64.2 gの酢酸エチル可溶部を得た。次に、水飽和させたブタノール2 Lで水分画層を分配し、それぞれ減圧下で濃縮・乾固し、ブタノール可溶部を91.6 g、そして水可溶部を得た。

2・6　ヤマモモカロイルフラボノイド類の単離

シリカゲル（Silica gel 60）500 gに、ヤマモモ抽出物酢酸エチル可溶部64 gを1%酢酸/クロロホルムと少量のメタノールで溶かし吸着させた。1%酢酸5%メタノール/クロロホルムを2 L流し、更にメタノール濃度を10%、20%、30%、40%、50%、70%、100%と上げて、それぞれ2Lずつカラムに流し分画した。それぞれの分画を減圧下で濃縮乾固し5%溶出部は11.2 g、10%溶出部は11.1 g、20%溶出部は20.0 g、30%溶出部は30.0 g、40%溶出部は13.8 g、50%溶出部は13.7 g、70%溶出部は2.32 g、100%溶出部は1.36 gを得た。そのうち50%溶出部（13 g）を ODS（Cosmosil 140 C18-OPN）カラムクロマトグラフィーに供し，10% から 100%のメタノール―水で溶出した。そのうち，40%メタノール溶出サンプル（0.6 g）を分取HPLC［TSK-GEL ODS-80TS（20×250 mm）column（Solvent: 1% AcOH in CH_3OH-1% AcOH in H_2O=9 : 11)］にて精製し，化合物 **1**（179 mg）と **5**（42 mg）を単離した。30%メタノール溶出サンプル（30 g）を再度 ODSのカラムクロマトに供し1%酢酸含有メタノール（5%から100%）で溶出した。その40%メタノール溶出サンプル（600 mg）をSephadex LH-20カラム（1% AcOH in CH_3OH）に供し，続いて分取 HPLC［TSK-GEL ODS-80TS（20×250 mm）column（Solvent: 1% AcOH in CH_3OH-1% AcOH in H_2O=9 : 11）により **2**（161 mg）と **3**（49 mg）を得た。5%メタノール溶出サンプル（55 mg）についても分取HPLC（Solvent : CH_3CN-1% AcOH in H_2O=1:3）で精製し **6**（27 mg）と **7**（17 mg）を単離した。次に最初のODSカラムの40%メタノール溶出部（14 g）を再度 ODSのカラムクロマトに供し 1%酢酸含有メタノール（5%から100%）で溶出し，その30%メタノール溶出サンプル（520 mg）を分取HPLC（Solvent : CH_3CN-1% AcOH in H_2O=9 : 11）にて精製し **1**（151mg）, **4**（7 mg）と **5**（17mg）を単離した。また，最初のカラムの5%メタノール溶出部（1 g）についても，再度 ODS カラム（30% methanol containing 1% AcOH in H_2O）と分取 HPLC（Solvent : CH_3CN-1% AcOH in H_2O=3 : 17）にて精製し **8**（7 mg）を得た。

3．結果および考察

3・1　ヤマモモ抽出物酢酸エチル可溶画分の成分分析と成分の構造解析

ガロイルフラボノイドの存在が期待されるヤマモモ葉部メタノール抽出物には，我々の研究室におけるスクリーニング実験において，顕著なラジカル消去活性（IC_{50} 6 μg/mL），チロシナーゼ阻害活性（IC_{50} 0.23 mg/mL），リポキシゲナーゼ阻害活性（IC_{50} 26 μg/mL）が認められていた。ラジカル消去活性は，幅広い酸素性ラジカル種（いわゆる活性酸素）の消去能に連動し，常に外気に触れる皮膚における様々な障害を取り除く可能性のあるものである。一方リポキシゲナーゼは炎症に関わる酵素であり，チロシナーゼは皮膚のシミ，ソバカスなどの原因となる酸化酵素である。ヤマモモ抽出物が有するこれらの阻害等の活性は，我々

がこれまでスクリーニングしてきた沖縄産の薬草類の機能に匹敵するものであった[1, 2]。そこで，活性を指標にして成分を明らかにすべく溶媒分画を行ったところ，その活性は主に酢酸エチル可溶画分に移行した。酢酸可溶画分が含有する成分をグラジエントHPLC法を用いて総分析した結果を図１に示した。この中に活性を有するガロイルフラボノイドが存在すると仮定し，それぞれのピーク物質の単離を試みた。結果，実験方法に示したように，８種の物質の単離に成功した。その物質の機器分析データは以下のとおりである。

1. $[\alpha]^{25}_{D}$ -127° (*c* 1.0, CH_3OH) ; ESI-MS m/z (M+Na)$^+$: Calcd for $C_{21}H_{20}O_{12}Na$: 487.0852, Found: 487.0877. NMR δ_H (acetone-d_6) : 6.24 (1H, d, J=2.0 Hz, H6) , 6.45 (1H, d, J=2.0 Hz, H8) , 7.08 (2H, s, H2' and H6') , 5.44 (1H, brs, H1") , 4.22 (1H, brs, H-2"), 3.77 (1H, dd, J=9.0 and 2.6 Hz, H3") , 3.36 (1H, t, J=9.0 Hz, H4") , 3.52 (1H, m, H5") , 0.92 (3H, d, J=6.1 Hz, H6") . NMR δ_C (CD_3OD) : 159.2 (C2) , 136.2 (C3) , 179.4 (C4), 162.9 (C5) , 99.7 (C6) , 165.6 (C7) , 94.6 (C8) , 158.3 (C9), 105.7 (C10), 121.9 (C1' and C6'), 146.6 (C3' and C5') , 137.7 (C4') , 103.4 (C1"), 71.9 (C2"), 72.0 (C3"), 73.2 (C4"), 71.8 (C5"), 17.6 (C6") . **2.** $[\alpha]^{25}_{D}$ -4° (*c* 0.5, CH_3OH) ; ESI-MS m/z (M+Na)$^+$: Calcd for $C_{28}H_{24}O_{16}Na$: 639.0962, Found: 639.0984. NMR δ_H (CD_3OD) : 6.19 (1H, d, J=2.0 Hz, H6), 6.35 (1H, d, J=2.0 Hz, H8), 6.97 (2H, s, H2' and H6') , 5.50 (1H, d, J=1.5 Hz, H1") , 5.62 (1H, dd, J=3.3 and 1.5 Hz, H2") , 4.03 (1H, dd, J=8.5 and 3.3 Hz, H3"), 3.43-3.45 (2H, complex, H4" and H5"), 1.03 (3H, d, J=5.5 Hz, H6") , 7.07 (2H, s, H2"' and H6"') . NMR δ_C (CD_3OD) : 159.4 (C2), 135.6 (C3) , 179.3 8C4), 163.1 (C5), 99.8 (C6), 165.7 (C7), 94.7 (C8) , 158.4 (C9) , 105.8 (C10) , 121.8 (C1') , 109.6 (C2' and C6' or C2"' and C6"') , 146.8 (C3' and C5' or C3"' and 5"') , 137.9 (C4') , 100.4 (C1") , 73.5 (C2") , 70.7 (C3") , 73.8 (C4"), 72.2 (C5"), 17.8 (C6"), 121.2 (C1"') , 110.4 (C2"' and C6"' or C2' and C6') , 146.4 (C3"' and 5"' or C3' and C5') , 139.9 (C4"') , 167.5 (C7"') . **3.** $[\alpha]^{25}_{D}$ -118° (*c* 0.1, CH_3OH) ; ESI-MS m/z (M+Na)$^+$: Calcd for $C_{28}H_{24}O_{16}Na$: 639.0962, Found 639.0974. NMR δ_H (CD_3OD) : 6.20 (1H, d, J=2.0 Hz, H6) , 6.37 (1H, d, J=2.0 Hz, H8) , 7.00 (2H, s, H2' and H6') , 5.28 (1H, d, J=1.9 Hz, H1") , 4.48 (1H, dd, J=3.4 and 1.9 Hz, H2") , 5.25 (1H, dd, J=9.3 and 3.4 Hz, H3") , 3.67 (1H, t, J=9.3 Hz, H4") , 3.72 (1H, m, H5") , 1.00 (3H, d, J=5.8 Hz, H6") , 7.17 (2H, s, H2"' and H6"') . **4.** $[\alpha]^{25}_{D}$ +13° (*c* 0.1, CH_3OH) ; NMR δ_H (acetone-d_6) : 6.26 (1H, d, J=2.0 Hz, H6), 6.51 (1H, d, J=2.0 Hz, H8), 7.50 (2H, s, H2' and H6') , 5.19 (1H, d, J=7.8 Hz, H1") , 3.83 (1H, dd, J=9.5 and 7.8 Hz, H2"), 3.68-3.58 (3H, complex, H3", H5", and H6"), 3.93 (1H, brd, J=3.1 Hz, H4") . NMR δ_C (CD_3OD) : 158.5 (C2 or C9), 136.0 (C3), 179.4 (C4), 162.9 (C5), 99.8 (C6), 166.0 (C7) , 94.7 (C8), 158.3 (C9 or C2) , 103.6 (C10) , 121.7 (C1') , 110.0 (C2' and C6') , 146.4 (C3' and C5') , 138.1 (C4') , 105.6 (C1") , 73.3 (C2"), 75.1 (C3"), 70.0 (C4") , 77.2 (C5") , 61.9 (C6") . **5.** $[\alpha]^{25}_{D}$ -83° (*c* 0.1, CH_3OH) ; ESI-MS m/z (M+Na)$^+$: Calcd for $C_{28}H_{24}O_{17}Na$: 655.0911, Found 655.0869. NMR δ_H (acetone-d_6) : 6.20 (1H, d, J=2.0 Hz, H6) , 6.43 (1H, d, J=2.0 Hz, H8) , 7.22 (2H, s, H2' and H6') , 5.93 (1H, d, J=8.0 Hz, H1") , 5.50 (1H, 9.8 and 8.0 Hz, H2") , 4.00 (1H, dd, J=98 and 3.2 Hz, H3") , 4.08 (1H, d, J=3.2 Hz, H4") , 3.71 (3H, complex, H5" and H6") , 7.40 (2H, s, H2"' and H6"') , NMR δ_C (CD_3OD) :

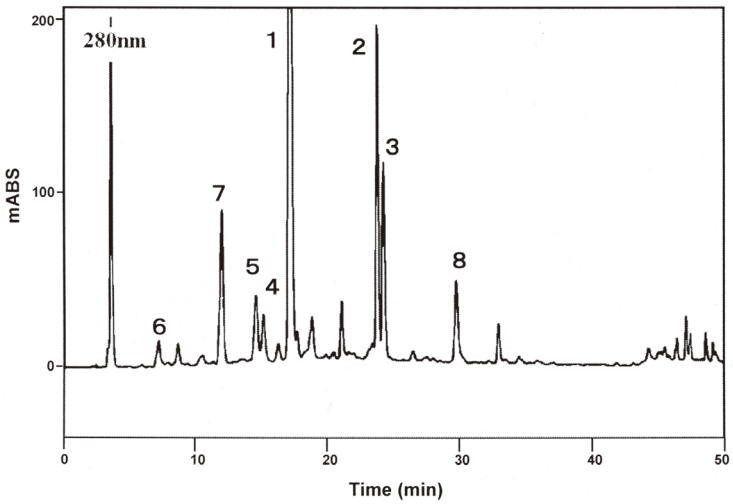


図１　HPLC analytical profile of the ethyl acetate-soluble fraction of the methanol extract of *Myrica rubra*. Analytical Conditions : Column, TSK-GEL ODS-80TS (4.6 ×150 mm) ; Solvent, A, 0.1% H_3P0_4 aq., B, CH_3CN ; Gradient system, a linear gradient from 10% of solv. B to 40% of solv. B (40min) and then 100% of solv. B (50min) ; Flow rate, 1 ml/min ; Detection, 280 nm.

158.1（C2），135.3（C3），175.4（C4），163.0（C5），99.6（C6），165.5（C7），94.4（C8），157.9（C9），105.8（10），121.9（C1’ or C1”’），109.8（C2’ and C6’ or C2”’ and C6”’），146.3（C3’ and C5’ or C3”’ and C5”’），137.8（C4’ or C4”’），101.3（C1”），74.6（C2”），73.4（C3”），70.5（C4”），77.4（C5”），62.0（C6”），121.6（C1”’ or C1’），110.6（C2”’ and C6”’），146.2（C3”’ and C5”’ or C3’ and C5’），139.8（C4”’ or C4’），168.3（C7”’）. **6**. $[\alpha]^{25}_{D}$ +13°（*c* 0.1, CH_3OH）; NMR δ_H（CD_3OD）: 4.75（1H, brs, H2），4.16（1H, m, H3），2.84（1H, dd, J=16.6 and 4.5 Hz, H4a），2.72（1H, dd, J=16.6 and 2.9 Hz），5.91（1H, d, J=2.4 Hz, H6），5.93（1H, d, J=2.4 Hz, H8），6.51（2H, s, H2’ and H6’）. **7**. $[\alpha]^{25}_{D}$ -83°（*c* 0.1, CH3OH）; NMR δ_H（CD_3OD）: 4.96（1H, brs, H2），5.52（1H, m, H3），2.97（1H, dd, J=17.1 and 4.5 Hz, H4a），2.84（1H, dd, J=17.1 and 3.0 Hz, H4b），5.95（2H, s, H6 and H8），6.49（2H, s, H2’ and H6’），6.94（2H, s, H2” and H6”）. **8**. NMR δ_H（$CDCl_3$）: 7.55（2H, m, H2 and H6），7.41（3H, m, H3, H4, and H5），7.79（1H, d, J=16.1 Hz, H7），6.46（1H, d, J=16.1 Hz, H8）.

詳細は省略するが，以上のデータから，単離した物質の化学構造を解析した結果，**1**から**5**は，ミリセチンを母核とするフラボノールグリコシドであることが判明し，加えて，**2**，**3**，**5**は，予想通りガロイル化されたものであることがわかった。一方，**6**，**7**は，エピガロカテキンであることがわかり，加えて，その立体化学は，お茶のカテキンと同じものであることがわかった。なお，**7**は，**6**がさらにガロイル化されたエピガロカテキンガレートであることがわかった。一方で，**8**は収量的には多かったが，フェノール基のない桂皮酸であることが判明した（図２）。

３・２　単離物質の活性

ヤマモモより単離できた8種の成分のDPPHラジカルの消去活性，チロシナーゼ阻害活性，リポキシゲナーゼ阻害活性を測定した。その結果を図３にまとめて示した。

図３Ａには，各物質５μMにおけるDPPHラジカルの消去活性をDPPHによる517 nmの吸光度減少度で示した。化合物**8**は，活性を示さなかったが，他の物質はこの濃度でいずれも消去活性を示した。なお，ガロイル基を有する**2**，**3**，**5**，**7**については，そのラジカル消去能が2倍程度高く，ガロイル基の強いラジカル消去効果が表れたといえる。

図３Ｂには，各物質のリポキシゲナーゼ阻害活性を示した。8化合物の中では，**7**が最も低濃度で活性を示し，それに**1**と**6**が続いた。一方，**4**，**5**，**8**については，100μMにおいてもほとんど活性を認めなかった。強い活性を示した**6**と**7**は，いずれもエピガロカテキンであり，**7**はさらにカロイル化されているものである。したがって，エピガロカテキン骨格には，リポキシゲナーゼ活性が存在し，それがさらにガロイル化されると，その活性が増強することが示唆された。

図３Ｃには，チロシナーゼ阻害活性を示した。いずれの化合物も0.1から1 mMにおいて，阻害活性を示したが，特に群を抜いて強力なものはなかった。しかしながら，ガロイル化された**2**，**3**，**5**，**7**については，ガロイル化されていないものより低濃度で強い活性を示し，ガロイル基の活性増強効果があるものと思われた。

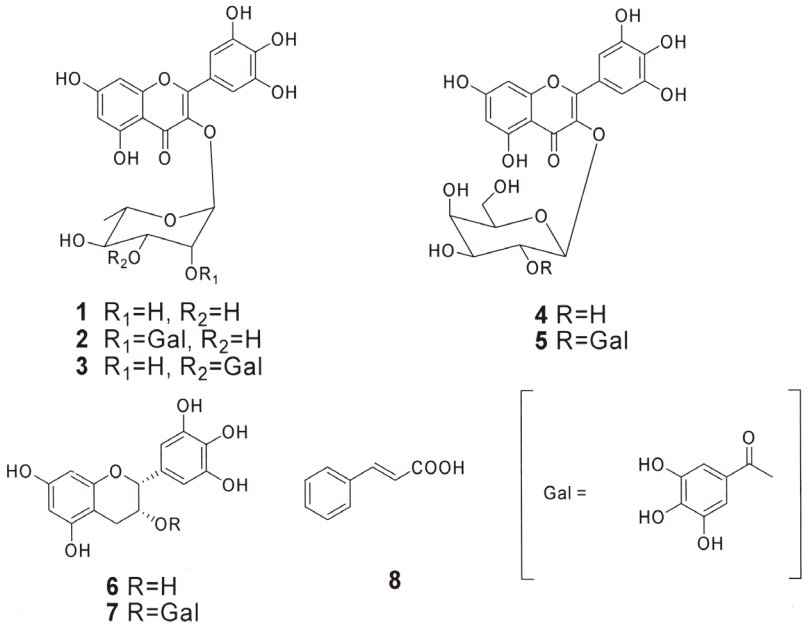
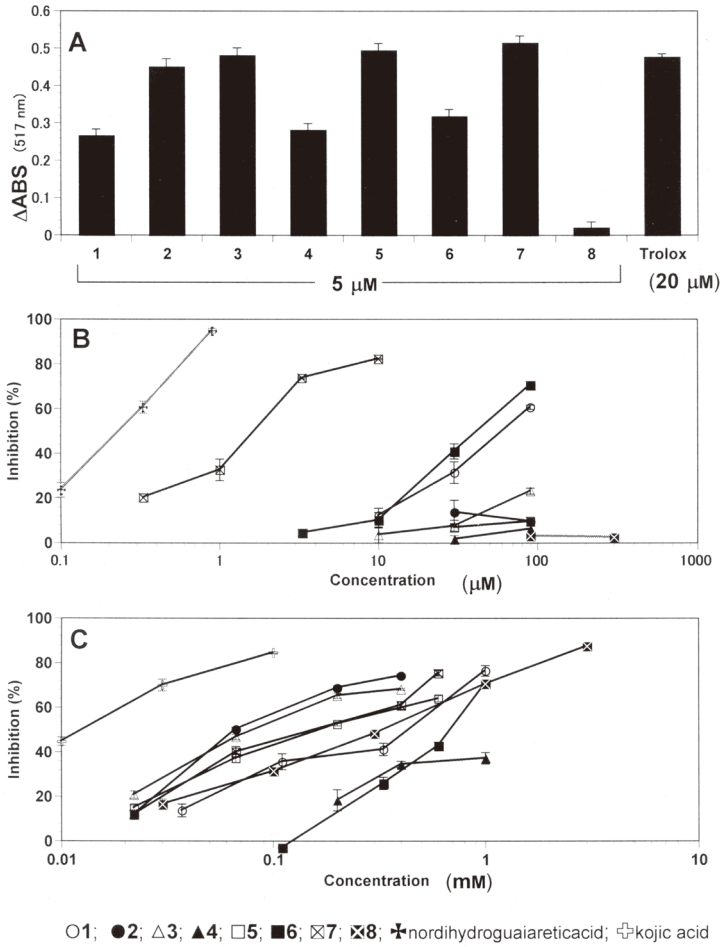


図２　Chemical structures of the isolated compounds **1**-**8** from the leaves of *Myrica rubra*.



○1; ●2; △3; ▲4; □5; ■6; ⊠7; ⊠8; ✢nordihydroguaiareticacid; ✣kojic acid

図３　Chemical and enzymatic antioxidant activity of the isolated compounds **1**-**8** from *Myrica rubra*. Panel A : DPPH radical scavenging activity; Panel B : Lipoxygenase inhibitory activity; panel C : Tyrosinase inhibitory activity. All data are presented as mean± S.D. (n=3).

４．総　括

本研究により，四国地区において身近な植物資源であるヤマモモの葉部に各種のガロイル化フラボノイドの存在を確認した。さらに，それらのガロイル化フラボノイドが，ラジカルの消去機能，リポキシゲナーゼやチロシナーゼのような酸化劣化酵素の制御能に優れていることを発見した[6)]。なお，今回の結果は，あくまで*in vitro*の結果であるため，実際の皮膚における効果は，いまだ定かではない。今後は，ケラチノサイトやメラノサイトのような皮膚由来の培養細胞系や実際の動物を用いた実験系により，単離したガロイルフラボノイドの効果を検証していくことが必要と思われる。

（参考文献）

1）Masuda, T., Yonemori, S., Oyama, Y. et al., :Evaluation of the antioxidant activity of environmental plants: activity of the leaf extracts from seashore plants. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1749-1754 ,1999.

2）Masuda, T., Oyama, Y., Inaba, Y. et al., :Antioxidant-related activities of ethanol extracts from edible and medicinal plants cultivated in Okinawa, Japan. *J. Jpn Soc. Food Sci. Technol.*（in Japanese）, **49**, 652-661, 2002.

3）Masuda, T., Fujita, N., Odaka, Y. et al., :Tyrosinase inhibitory activity of ethanol extracts from medicinal and edible plants cultivated in Okinawa and identification of a at-soluble inhibitor from the leaves of *Nandina domestica*., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2316-2320, 2007.

4）Inoue, I., Arai, Y., and Nagai, M. : Diarylheptanoids in the bark of *Myrica rubra* Sieb. et Zucc., *Yakugaku Zasshi*（in Japanese）, **104**, 37-41, 1984.

5）Ha, T. J., Nihei, K.-I., and Kubo I., :Lipoxygenase inhibitory activities of octyl gallate. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 3177-3181, 2004.

6）Masuda, T., Someya, T. and Fujimoto, A. :Phenolic inhibitors of chemical and enzymatic oxidation in theleaves of *Myrica rubra*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 212-215, 2010.

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

静岡大学工学部
河野　芳海

Because of their non-toxicity, naturally occurring dyes are potentially suitable for the use of cosmetics. However, their instability obstructs the wide use of the natural dyes as a colorant. This study was focused on the enhancement of the stability of the natural dye by making composite with inorganic host materials. Anthocyanin dye was successfully adsorbed on the HMS type mesoporous silicas containing small amount of aluminum. The adsorption of the anthocyanin was enhanced by modifying the silica surface to be hydrophobic. However, the improvement in the light fastness of the adsorbed anthocyanin was not observed in the complex with HMS. Annatto dye was rather hydrophobic dye, so that the adsorption on the clay interlayer was difficult. Modification of the montmorillonite (cation-exchangeable clay) with cationic surfactant made it possible for the annatto dye to be incorporated in the clay interlayer, because the interlayer space became hydrophobic by the surfactant. Anion-exchangeable hydrotalcite was also able to adsorb the annatto by modification with anionic surfactant. The durability against visible light irradiation was enhanced by the incorporation of the annatto dye into the clay interlayer modified with the proper surfactant. The main cause of the stability enhancement was suggested to be the hindrance of the incorporated dye from the external oxygen molecules.

1．序　論

現在，身の回りの多くの製品を着色する色材として合成着色料が使用されているが，その中には人体や環境への有害性が疑われるものが少なくない。これに対し，天然素材を原料とする天然色素は一般的に合成色素に比べて安全性に優れている。このため化粧品のように，人体に直接触れる製品への応用に特に向いていると考えられる。また天然素材ということで，消費者に対するイメージも好ましい。しかし，天然色素はその安全性と引き換えに，色の安定性に劣るという重大な欠点がある。そのため天然色素を製品に使用する際は，退色を防ぐために添加剤を加えるなどの工夫を必要とするが，そうすると添加剤自体の有害性の有無も考慮しなければならない等の問題が生じる。このようなこともあり，現状では天然色素が広範に利用されているとは言い難い。耐久性の問題が解決されれば，化粧品をはじめとする多くの製品の着色材料として，天然色素が利用される可能性が広がるものと考えられる。

有機材料の耐久性を向上させるために，安定性の高い無機材料と組み合わせるという方法が知られている。例えばポリマー中に粘土微粒子を分散させることにより，気体遮断性能[1)]に加えて耐熱性[2)]の改善が可能である。またメソ細孔体の内部に色素分子を導入した複合体は，色素単体に比べて耐光性や耐熱性が改善されることが報告されている[3,4)]。

そこで本研究では，天然色素を無害な無機ホストと複合化することで安定性向上を図った。これまでの研究で，カチオン性天然色素であるアントシアニン（図１a）を，カチオン交換性粘土のモンモリロナイト層間に挿入して安定性の向上が可能であることが分かっている[5)]。またアントシアニンの発色部分の構造モデルである合成フラビリウム色素は，直径３nm程度の細孔を有するメソポーラスシリカと複合化することで安定化が可能であった[6)]。コチニール色素やベニバナ黄色素などのアニオン性の天然色素についても，アニオン交換性の層状化合物であるハイドロタルサイトの層間に取り込むことで安定性の向上効果が見られたが，同じくアニオン性天然色素でも，長いポリエン鎖を有するアナトー色素（図１b）は疎水性が高いために極性空

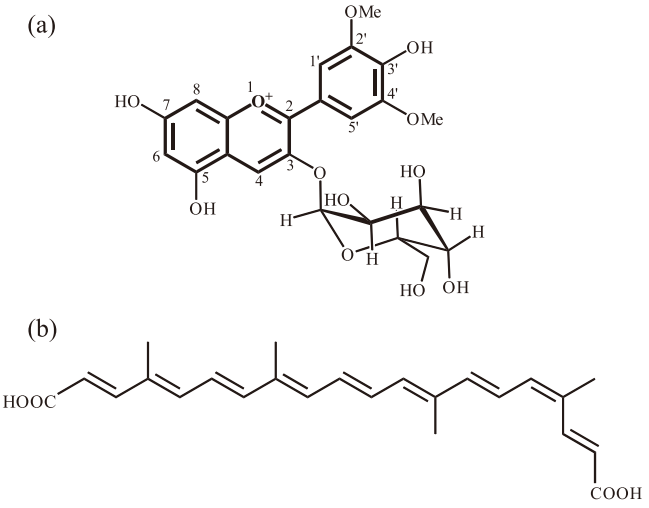


図１　(a) アントシアニン（マルビジン−３−グルコシド）の構造。フラビリウム骨格部分を太線で示す。(b) ノルビキシン（アナトー色素の主成分のひとつ）の構造。

Development of natural dye/inorganic host composite materials for the use of cosmetics

Yoshiumi Kohno
Faculty of Engineering, Shizuoka University

間であるハイドロタルサイト層間に複合化できず，安定化できなかった[7]。

本研究はこれらの結果を踏まえ，まずカチオン性天然色素のアントシアニンをメソポーラスシリカと複合化した場合の安定化効果を検討した。またアナトー色素については，粘土層間を界面活性剤で修飾し疎水化した有機修飾粘土との複合化を試み，耐光性の向上が見られるか調べた。

2．実験方法

アントシアニンについては，市販のブドウ果皮色素（関東化学）をメタノールに溶解した後に多量のジエチルエーテルに分散させ，沈殿を遠心分離で回収して純化したものを用いた。これを以降ANと表記する。アナトー色素については和光純薬の市販品をそのまま使用した。

メソポーラスシリカとしてHMSを前報[6]と同様の方法で調製した。簡単に記すと，シリカ源にはオルトケイ酸テトラエチルを使用し，構造規定剤としてドデシルアミン水溶液を加え，生じた沈殿を630℃で焼成した。アルミニウムを加える際は，ドデシルアミン水溶液とともに所定量の$Al(NO_3)_3$を加えた。アルミニウムを加えたHMSをAl（x）HMSと表記する。ここでxはSiに対するAlの仕込み量（mol %）である。また，得られたHMSに対し既報[8]に従い，十分に乾燥させた後に*n*-プロピルトリエトキシシランのトルエン溶液を還流させて疎水化処理を行った。

モンモリロナイトは市販品（クニミネ工業クニピアF，KFと表記）を使用した。KFにカチオン交換容量の２倍量のオクチルトリメチルアンモニウム（OTMA）もしくはドデシルトリメチルアンモニウム（DDTMA）の水溶液を加えて層間カチオンを界面活性剤分子と交換し，有機修飾を行った。得られた試料をOTMA-KFもしくはDDTMA-KFと記載する。

ハイドロタルサイト（HT）には市販品を使用した。HTの層間アニオンは単純なイオン交換では交換しにくいが，いったんHTを焼成して不定形とした後，水に漬けると層状構造が回復する性質（メモリー効果）を利用して，層間アニオンを交換した。すなわち，HTを500℃で焼成した後に，焼成体をSDSあるいはSDBSの水溶液と混合し，陰イオン界面活性剤を層間に取り込みつつ層状構造を再構築させ，層間の有機修飾を試みた。得られた試料をSDS-HTあるいはSDBS-HTと記す。

HMSへのANの複合体は，ANの水・エタノール混合溶液にHMSを混合し，冷蔵庫内で３日間保持して吸着平衡に達した後に濾過・乾燥させて調製した。

有機修飾粘土とANAとの複合化は，ANAのエタノール溶液にOTMA-KF，DDTMA-KF，SDS-HT，SDBS-HTをそれぞれ混合して吸着させることで行った。

ANやANAとそれぞれの無機ホストとの複合体に，100 Wハロゲンランプからの可視光を照射し，色素の極大吸収波長における吸光度の減少度合いを拡散反射スペクトルで測定することで，各試料の耐光性を評価した。

3．実験結果

3. 1　アントシアニンのメソポーラスシリカへの複合化

まず，無機ホストとして使用するメソポーラスシリカの構造を確認した。図２に，種々のAl仕込み量で調製したHMSのXRDパターンを示す。Al量が1.5 mol％までの試料では，$2\theta = 2°$ 付近に回折ピークが見られた。これは文献[9]と一致しており，ワームホール状のメソ細孔構造が形成されていることが確認された。いっぽうAl（3.0）HMSでは2° 付近のピークが小さいことより，多量のAl混入によりメソ構造の形成がやや阻害されたものと推測される。

これらのHMSにアントシアニンを吸着させた際の，色素複合体の拡散反射紫外可視吸収スペクトルを図３に示す。Alを含まないAN/HMSではANの吸着量が少なく，着色

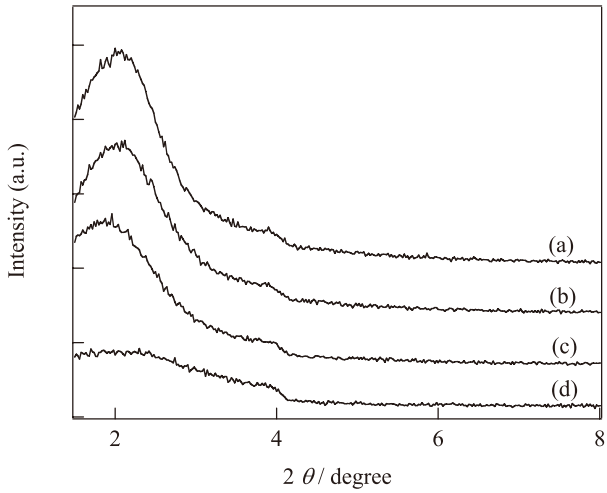


図２　合成したHMSのXRDパターン。(a) HMS, (b) Al(1.0) HMS, (c) Al(1.5)HMS, (d) Al(3.0)HMS。

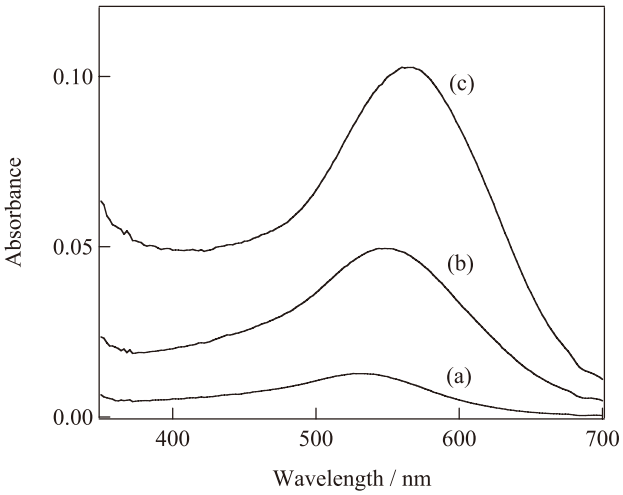


図３　種々のAl添加量のAN/HMS複合体の拡散反射UV-vis吸収スペクトル。

度合いも低いが，Al添加量が増すとANによる着色が増大した。以上より，AN複合体に十分な着色度を与えるには，メソポーラスシリカへのAlの添加が必要であることが分かった。一般に，メソポーラスシリカに微量のAlが混在すると，シリカ骨格内のSi^{4+}がAl^{3+}により置換され，不足する電荷のために固体酸点を形成することが知られている[10]。ANはカチオン性，すなわち塩基性の天然色素であるため，負電荷を有する酸性サイトとの間で静電的相互作用が生じて，ホストへの色素の吸着が促されたものと考えられる。

ここで，プロピルトリメトキシシランを用いてHMSに疎水化処理を施したところ，表1に示すように疎水化処理しないものに比べてANの吸着量がさらに増加した。また，HMSへのAl添加量が多いほど，疎水化処理による吸着量増加の比率は高くなった。CH_2伸縮振動領域（2800～3000 cm^{-1}）の赤外吸収強度を観測し，疎水基（プロピル基）の導入量を各試料で比較したところ，HMSへのAl添加量とプロピル基の量が比例した。プロピルトリメトキシシランはAl添加により生じた末端ヒドロキシル基と反応してHMS表面に固定されるため，Al添加量とプロピル基の量に比例関係が生じたと考えられる。

これらのAN/HMS複合体にハロゲンランプからの可視光を600分照射した際の，AN吸光度の保持率を図4に示す。上記のとおり，ホストによってANの吸着量は大きく異なったものの，残念なことに色素の耐光性という点では大差は見られなかった。HMSの疎水化によりAN 吸着量は大きく増加したが，耐光性は逆に若干低下した。

結論として，メソポーラスシリカHMSに対してAlの添加や疎水化処理を行うことにより，天然色素アントシアニンを複合化することが可能となったが，それによる耐光性の向上効果は確認できなかった。

3. 2　アナトー色素の有機修飾粘土への複合化

まず，無機ホストとして使用するモンモリロナイト（KF）やハイドロタルサイト（HT）が界面活性剤を層間に取り込んで有機修飾されているか，XRDパターンを測定して確認した。図5に，KFおよびHTを界面活性剤で有機修飾した際のXRDパターンの変化を示す。いずれも，界面活性剤の添加により底面反射を示すピークが低角側にシフトしており，層間距離の拡大が確認された。図5[A]において，KFの層間距離は0.23 nmであるが，OTMAを加えた際は層間距離は0.43 nm，DDTMAでは0.83 nmと計算された。また図5 [B]では，HTの層間距離は0.30 nmであったが，SDSを加えると2.29 nm，SDBSの場合は2.43 nmと計算された。上記の層間距離はいずれも文献[11, 12]と一致しており，

表1　HMS 疎水化処理の有無による AN 吸着量の違い

	AN　吸着後の極大吸光度		疎水化による吸光度増大率
	未処理	疎水化処理後	
HMS	0.0127	0.0155	1.21
Al (1.5) HMS	0.0495	0.1444	2.92
Al (3.0) HMS	0.1026	0.5661	5.52

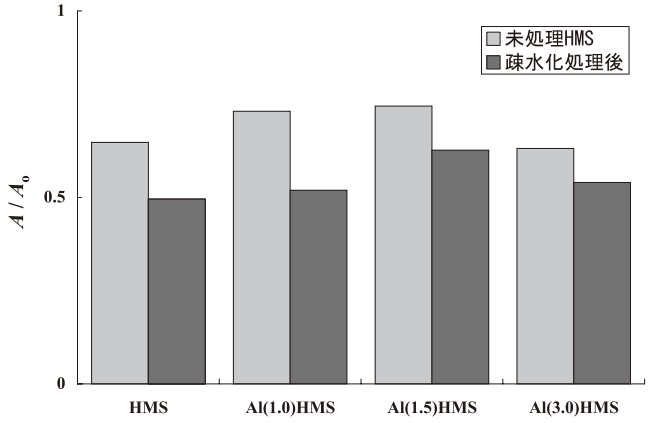


図4　可視光 600 分照射前後の，種々の AN/HMS 複合体における AN 吸光度の保持率。縦軸は初期吸光度に対する可視光照射後の吸光度の比（A/A_0）を示す。淡色は疎水化処理しない HMS，濃色は疎水化処理後の HMS をホストに使用した場合の保持率を示す。

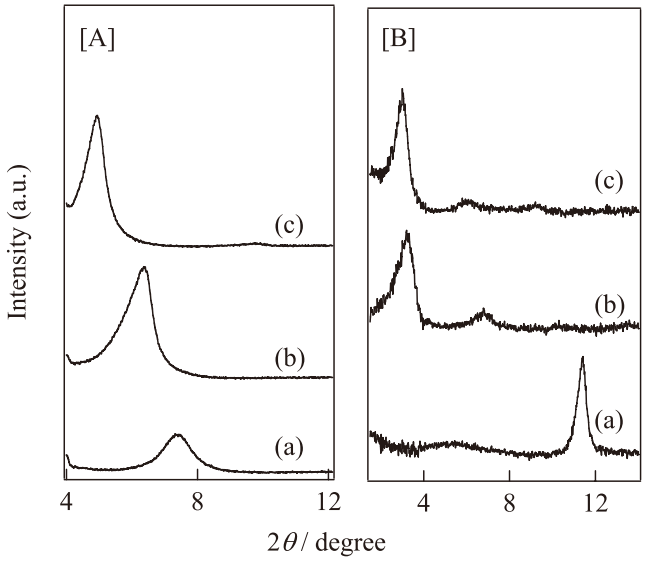


図5　界面活性剤で粘土層間を有機修飾した際の XRD パターンの変化。[A] (a) KF, (b) OTMA-KF, (c) DDTMA-KF, [B] (a) HT, (b) SDS-HT, (c) SDBS-HT。

層間が界面活性剤で有機修飾されていることが確認された。

これらの有機修飾粘土にアナトー色素（ANA）を吸着させたが，その際にXRDパターンに変化は見られず，色素吸着による層間距離の変化は確認できなかった。しかし，有機修飾粘土の層状構造が，色素の吸着操作で破壊されることはないことが確認された。

有機修飾粘土とANAとの複合体の吸収スペクトルを図６に示す。図６[A]のKF複合体では，ANA/OTMA-KF，ANA/DDTMA-KFとも，点線で示すANA溶液のスペクトルと比べて長波長側へのシフトが見られた。これは，有機修飾KFの層間にANA色素分子が取り込まれ，直鎖状に近いコンフォメーションをとることで励起エネルギーの低下を生じたものと解釈できる。いっぽうANA/SIOでは溶液と比べて短波長シフトし，また微細構造が失われてピークがブロードニングした。これは，SIO表面でのANA分子の凝集体の形成を示唆する。図６[B]のHT複合体でも，同様のスペクトル変化が見られた。すなわちANA/SDS-HT，ANA/SDBS-HTともに，ANAがHT層間のSDS相あるいはSDBS相に取り込まれたため，吸収ピークの長波長シフトが観測されたと考えられる。

これらの複合体に可視光を照射した際の耐光性を比較した結果を図７に示す。KF複合体（図７[A]）では，ANA/SIOに比べてANA/OTMA-KFやANA/DDTMA-KF複合体は高い耐光性を示し，特にANA/DDTMA-KFでの耐光性の改善が顕著であった。いっぽうHT複合体（図７[B]）においては，ANA/SDS-HT，ANA/SDBS-HTともにANA/SIOと比べて非常に大きな耐光性向上効果を示すことが分かった。なお，KF複合体とHT複合体では光照射条件が異なるため，この２種の試料間で耐光性を比較することはできない。

以上の結果より，ANAはカチオン交換性粘土であるKF，アニオン交換性粘土であるHTのいずれに対しても，層間を界面活性剤で有機修飾することにより吸着が可能であることが分かった。ANAは有機修飾粘土の層間に吸着され，耐光性の向上が見られた。耐光性向上効果はHT複合体のほうが顕著であった。

４．考　察

これまでに，モンモリロナイト層間へのアントシアニンの吸着・メソポーラスシリカ細孔内へのフラビリウム色素

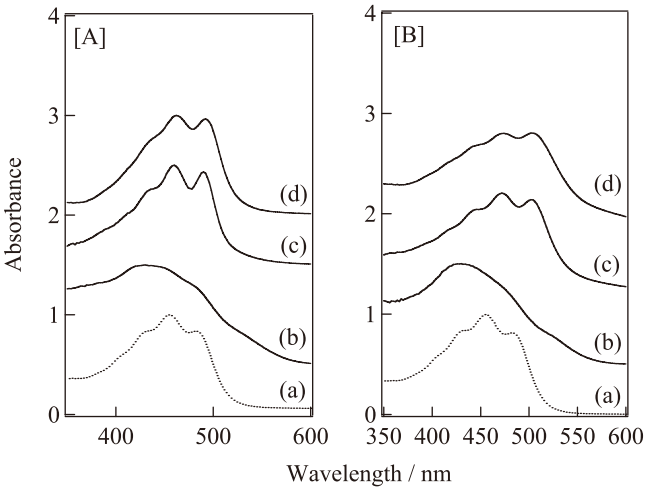


図６　種々の有機修飾粘土とANA色素との複合体の拡散反射UV-vis吸収スペクトル。点線はANAエタノール溶液を示す。[A] (a) ANAエタノール溶液, (b) ANA/SIO, (c) ANA/OTMA-KF, (d) ANA/DDTMA-KF, [B] (a) ANAエタノール溶液, (b) ANA/SIO, (c) ANA/SDS-HT, (d) ANA/SDBS-HT。

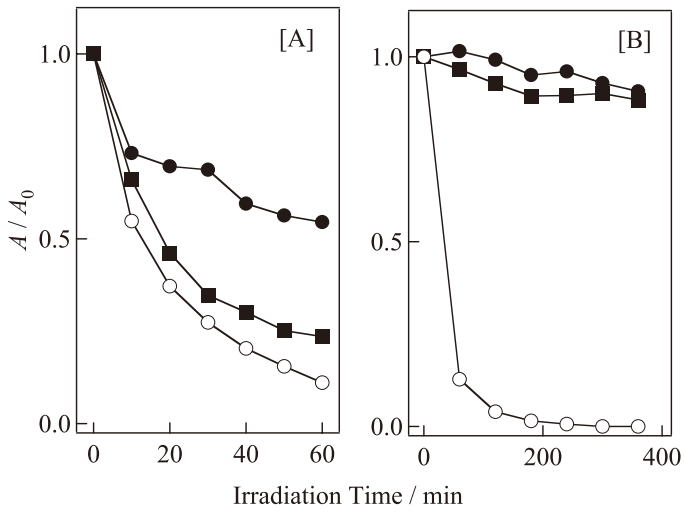


図７　種々の有機修飾粘土とANA色素との複合体の可視光照射下での吸光度保持率の経時変化。[A] ○ ANA/SIO, ■ ANA/OTMA-KF, ● ANA/DDTMA-KF, [B] ○ ANA/SIO, ■ ANA/SDS-HT, ● ANA/SDBS-HT。

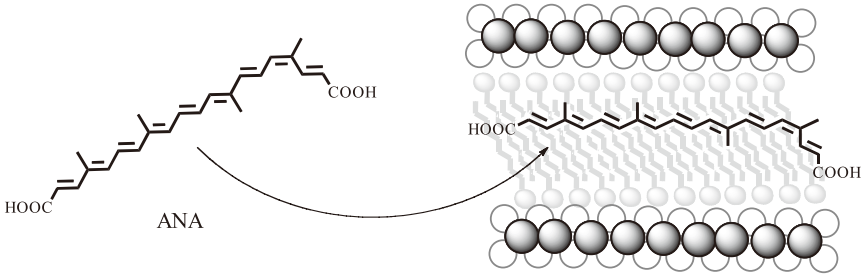


図８　有機修飾粘土層間へのアナトー色素の吸着・複合化

の吸着・ハイドロタルサイト層間へのコチニール色素の吸着において，いずれも耐光性の向上が確認されている[5-7]。これらの無機ホストはいずれも極性の強いものであり，同じく極性を持つイオン性の色素分子との間で静電的相互作用が考えられる。そのため，吸着した際の安定性向上の要因として，無機ホストによる外界との遮蔽効果（酸素との接触遮断）のほか，ホストと色素間での静電的相互作用も安定性向上に効果があると考えてきた。

いっぽう本研究において，有機修飾粘土へのアナトー色素の複合化により安定性が向上したのは，層間へ色素分子が吸着したのが理由と考えられるが，有機修飾粘土では層間の極性は弱く，静電的相互作用の効果はあまり強くないと考えられる。それでも安定化効果が見られたことより考えると，層間で色素分子が外界から隔絶されることによる酸素接触の遮断が，安定性向上の主要因として挙げられる。ANA/DDTMA-KFに比べてANA/OTMA-KFで耐光性向上の効果が小さかったのは，OTMAがDDTMAよりアルキル鎖が短く，ANA分子の層間への取り込みが十分でなかったことが考えられる。また，KF複合体よりHT複合体のほうが耐光性の向上が大きかったが，これはANAが疎水性が強いながらも末端にカルボキシル基を有するアニオン性色素であるため，粘土層自体に負電荷を有するKFへの挿入には反発力が生じる反面，層が正電荷を持つHT層間にはスムーズに取り込みが行われたのではないかと考えられる。

アントシアニンはメソポーラスシリカと複合化しても安定性の向上は見られなかった。この理由としては，ANがHMSの細孔内に吸着せず外表面に吸着したために酸素遮断効果が得られなかったのではないかと考えている。AlHMSではHMSに比べてANの吸着量は増加したが，これはAlの添加によりHMSの細孔内だけでなく外表面においても酸性サイトが生じるため，そこへの吸着が進んだものと考えられる。またANは水溶性ではあるが比較的に疎水性を示す分子であるため，HMSへの疎水化処理を行った場合，さらにAN分子の吸着に適した環境が構築されて吸着量の増加が見られたものと考えられる。しかし，天然アントシアニンのモデル物質であるフラビリウム色素ではメソポーラスシリカ細孔内への吸着が進んで安定性が向上するのに対し，なぜANでは細孔内に吸着しないのか，その理由は現在のところ不明であり，詳細の解明には今後の研究が必要である。

（参考文献）

1）Yano K., Usuki A., Okada A., *et al.*: Synthesis and properties of polyimide–clay hybrid, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **31**, 2493-2498, 1993.

2）Glimann J. W., Jackson C. L., Morgan A. B., *et al.*: Flammability properties of polymer-layered-silicate nanocomposites. Polypropylene and polystyrene nanocomposites, *Chem. Mater.*, **12**, 1866-1873, 2000.

3）Gabelica Z., Valange S., Shibata M., *et al.*: Stability against color fading of azo dyes encapsulated in Ca-aluminosilicate mesoporous substrates, *Microporous Mesoporous Mater.*, **44-45**, 645-652, 2001.

4）Itoh T., Yano K., Fukushima Y.: Photostabilized Chlorophyll a in mesoporous silica: Adsorption properties and photoreduction activity of Chlorophyll a., *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 13437-13441, 2002.

5）Kohno Y., Kinoshita R., Ikoma S., *et al.*: Stabilization of natural anthocyanin by intercalation into montmorillonite, *Appl. Clay Sci.*, **42**, 519-523, 2009.

6）Kohno Y., Tsubota S., Shibata Y., *et al.*: Enhancement of the photostability of flavylium dye adsorbed on mesoporous silicate, *Microporous Mesoporous Mater.*, **116**, 70-76, 2008.

7）Kohno Y., Totsuka K., Ikoma S., *et al.*: Photostability enhancement of anionic natural dye by intercalation into hydrotalcite, *J. Colloid Interface Sci.,* **337**, 117-121, 2009.

8）Shimizu K., Hayashi E., Hatamachi T., *et al.*: Acidic properties of sulfonic acid-functionalized FSM-16 mesoporous silica and its catalytic efficiency for acetalization of carbonyl compounds, *J. Catal.*, **231**, 131-138, 2005.

9）Marín-Astorga N., Pecchi G., Pinnavaia T. J., *et al.*: Mesostructured silicas as supports for palladium-catalyzed hydrogenation of phenyl acetylene and 1-phenyl-1-hexyne to alkenes, *J. Mol. Catal. A: Chem.*, **247**, 145-152, 2006.

10）Inagaki S., Yamada Y., Fukushima Y.: Synthesis of mesoporous aluminosilicates from layered silicates containing aluminium, *Stud. Surf. Sci. Catal.*, **105,** 109-116, 1997.

11）Ogawa M., Shirai H., Kuroda K., *et al.*: Solid-state intercalation of naphthalene and anthracene into alkylammonium-montmorillonites, *Clays Clay Miner.*, **40**, 485-490, 1992.

12）Bouraada M., Lafjah M., Ouali M. S., *et al.*: Basic dye removal from aqueous solutions by dodecylsulfate- and dodecyl benzene sulfonate-intercalated hydrotalcite, *J. Hazard. Mater.*, **153**, 911-918, 2008.

Ⅱ． 生体作用、安全性に関する分野

形成外科領域におけるヒト間葉系幹細胞移植を用いた瘢痕形成抑制の実現ならびに問題点の抽出と改善

独立行政法人国立成育医療研究センター　生殖・細胞医療研究部
梅澤　明弘

We have recently reported that implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells significantly inhibits dermal scar formation in rats and pigs. Human mesenchymal stem cells can be isolated by aspiration of bone marrow without difficulties. Dermatoscopical analysis revealed that this novel approach ensures safety and efficacy: There was a significant decrease in the percentage of scar formation. Thus, mature scar was reduced in a quantity and distribution of scar was altered during the repair process. These results suggest that implantation of marrow-derived mesenchymal stem cells decreases visible scar formation. It is also noteworthy that usage of somatic stem cells does not have ethical problem unlike human embryonic stem cells. After approval of Institutional Review Board, we aim to perform a clinical trial of cell-based therapy using mesenchymal stem cells.

1．緒　言

これまで、骨髄由来の間葉系幹細胞は骨、筋、神経、軟骨、脂肪細胞などに分化し、生体に移植するとその環境に合わせて分化することが報告されてきた。ヒトに近い皮膚構造を有するブタの皮膚縫合創に骨髄由来間葉系幹細胞を自家移植することでも同様の効果が確認されており、ヒトでも同様の効果が得られる可能性が高いと考えられる。現段階では骨髄由来間葉系幹細胞移植により移植細胞がどのような細胞に分化したのか、周囲の組織にどのような影響を与えて皮膚構造が再生したのかが不明であり、本研究では２年間で実験動物を用いてそのメカニズムを明らかにし、ヒトへの臨床応用を試みヒト間葉系幹細胞移植の評価を行う。

本研究は、ヒト間葉系幹細胞を生体外で培養・増殖させ、それを投与する「細胞治療」と、縫合創の「瘢痕化抑制」を目指す。これまでラット、ブタにおいて効果が認められており、そのメカニズムを解明しヒトに応用することで先天性疾患の治療や美容形成手術に大きく貢献する。

形成外科領域においてScarless wound healingは長年の研究課題とされており、実際の臨床現場でも手術手技や創傷被覆剤、成長因子の投与などの工夫により、瘢痕の軽減が試みられてきた。しかし、瘢痕の質を改善することはできても、消失させるまでには至っていない[1, 2]。

一方、骨髄由来の間葉系幹細胞（MSC：Mesenchymal stem cell）は再生医療の細胞源として有用性が高いと考えられている[3]。特に自家移植が可能であるため、感染症や免疫拒絶の心配がなく、実際に臨床応用に使用されている細胞である[4, 5]。MSCは、間葉系への多分化能を有するだけではなく、生体移植によって周囲の環境に合わせて分化・再生することも報告されており[6, 7]、皮膚創傷の再生にも関与する可能性を示唆している。著者らはこのMSCの能力に注目し、MSCが皮膚創傷治癒に与える影響を研究してきた。その結果、ラットとブタにおいて、MSC投与により皮膚の急性創傷瘢痕形成が抑制され、正常に近い皮膚構造が再生された[8, 9, 10]。これまでの基礎的知見を中心に紹介する。

Inhibition of dermal scar formation by cell-based therapy using human mesenchymal stem cells

Akihiro Umezawa

Department of Reproductive Biology, National Research Institute for Child Health and Development

2．実　験

2. 1　ヒト間葉系幹細胞移植後組織の経時的変化（創治癒過程）の観察

実験動物（ラット）の骨髄液からMSCを単離する。また、骨髄液を採取したラットを創傷モデル動物とし、得られた細胞の自家移植を行う。皮膚切開創作成後早期から、経時的に細胞移植を行った組織を採取し、免疫組織化学を用いて比較検討を行う。

2. 2　細胞マーカーの検討および細胞の規格設定

細胞移植に用いる細胞の規格設定を行う。得られた細胞に対する網羅的遺伝子発現解析と免疫不全動物への移植を並行して行うことで、in vivoとin vitroの相関を判定する。

3．結　果

3. 1　MSC がラットの急性皮膚創傷に与える影響

ラットの大腿骨より骨髄血を採取し、培養皿に接着する細胞をMSCとして使用した。ラットの背部4ヶ所の真皮内にMSCを局注し、直後に１㎝の皮膚全層切開を加えた。皮膚全層切開創へのMSC移植後７日目の肉眼的観察結果では、コントロールにおいてわずかに創を認識できるが、MSC移植創では創は認識しにくくなっていた。14日目のコントロールの組織像では創の範囲に一致して膠原線維の

乱れと皮膚付属器の欠損を認めた。MSC移植創では創の範囲の判別が困難であり、正常組織に近い状態で治癒していることが確認された。これらの瘢痕を評価するために、Singerらによる組織像のスコアリング[11]を応用した。その結果、MSC移植創が有意に高得点となり、正常組織に近い状態であるという結果が得られた。

GFPラットの培養細胞を用いた研究では、創に移植したGFPラットのMSCは創の肉芽底面と周囲の真皮直下に分布していることが確認され、創傷治癒に影響を与えていると考えられている。そして、MSCは創に移植されると大部分がビメンチン陽性となり、線維芽細胞様の細胞に分化していた。また、筋線維芽細胞に分化していないことから、瘢痕拘縮抑制に有利に働いていると考えられた。さらに、MSCの培養段階では陰性だったCD31が、MSC移植後に陽性化していることが確認され、創周囲の血管形成に何らかの影響を与えている可能性が示唆されている。

Western blottingを行ったところ、ラットのMSCはHGF（Hepatocyte growth factor）を強く発現していることが確認された。HGFには、TGF β1（Transforming growth factor）を抑制する作用があり、TGFβ1は創の線維化・瘢痕化を引き起こす代表的な成長因子として知られている。そのため、MSCに含まれるHGFがTGFβ1の作用を抑制することで瘢痕化が抑制されたことが予測される。また、炎症反応が線維化を促進することも知られているが、MSC移植創では有意に炎症細胞の数が減少していた。つまり、MSCを移植することで、創傷治癒の炎症期の炎症細胞浸潤が抑制され、瘢痕形成抑制に寄与している可能性が考えられた。

3. 2　MSCがブタ皮膚創傷治癒に与える影響

次に著者らは、よりヒトと皮膚構造が似ているとされるブタ皮膚における研究も行った。ラットと同様にブタ皮膚全層切開創へMSCの自家移植を行ったところ、移植後28日目の時点でコントロールに比して肉眼的に瘢痕は目立たず、組織学的にも有意に正常皮膚に近い状態に創が治癒していることが確認された。また、MSC移植創では筋線維芽細胞の出現が抑制され、弾性線維が出現していることが観察された。

3. 3　ヒト間葉系幹細胞移植後組織の経時的変化（創治癒過程）の観察

国立成育医療センターで得られる様々な組織から単離されるヒト間葉系細胞を用いて実験動物への移植を行い、創傷治癒効果を判定した。皮膚全層切開層へのMSC移植後７日目の肉眼的観察結果では、コントロールにおいてわずかに創を認識できるが、MSC移植層では創は認識しにくくなっていた。14日目のコントロールの組織像では創の範囲に一致して膠原繊維野乱れと皮膚付着器の欠損を認めた。これらの瘢痕を評価するために、Singerらによる組織像のスコアリングを応用した。その結果、MSC移植層が優位に高得点になり、正常組織近い状態であるという結果が得られた。

3. 4　細胞マーカーの検討および細胞の規格設定

MSCは創に移植されると大部分がビメンチン陽性となり、繊維芽細胞様の細胞に分化していた。また、筋繊維芽細胞に分化していないことから、瘢痕拘縮抑制に有利に働いていると考えられた。さらにMSCの培養段階では陰性だったCD31が、MSC移植後に陽性化していることが確認され、創周囲の血管形成に何らかの影響を与えている可能性が示唆された。

4．考　察

これまでに皮膚創傷に対するMSCの作用に関する報告はあるが、創傷の治癒期間を早める目的の研究が多く、瘢痕を目立たなく治癒させるための研究は胎仔を利用したものに散見されるのみである。本方法は瘢痕を消失させることを究極の目的としており、そのために一次治癒の創を対象とし、真皮縫合を行うなどの瘢痕を抑制するための良好な条件を整えることに留意した。通常行われている瘢痕形成術や腫瘍切除術にMSC移植を加えることで、皮膚創傷の瘢痕化を抑制できる結果となった。形成外科領域においてScarless wound healingは長年の研究課題であり、これまでは主に手術手技や創傷被覆剤の工夫、成長因子の投与などが試みられてきた。ラット、ブタにおいて効果が認められており、そのメカニズムを解明しヒトに応用することで、今後、口唇裂や合多指症などの先天性疾患の術後の瘢痕抑制や、乳房再建等の美容手術などでも同様に瘢痕を目立たなくする治療に貢献でき、それらを求める患者は相当数存在と考えられることから、今後臨床に広い範囲で貢献する時期も近いことが期待される。

本方法は、通常の腫瘍切除術とほぼ同様に、患者に身体的負担を最小限とするよう配慮して計画されている。骨髄採取が必要であること、培養細胞が必要量に達するまでの期間を予測して待機するということが負担として考えられるが、実際には骨髄採取に困難はなく、手術日の設定も通常の手術申し込みの場合と大きく変わることはなかった。骨髄採取とMSC移植は当院で、細胞培養は成育医療センターで行う、と２施設間での細胞の搬送が必要であるが、連携はスムーズで、培養や手術に支障を生じることはなかった。

移植による瘢痕抑制の評価であるが、中央の腫瘍再発部を除くと、肉眼的所見に加えてマイクロスコープ（スカラ、30倍）上でも瘢痕は相当目立たなくなっている。それは、

同一患者のMSC移植を行わなかった他の瘢痕と比べても同様の結果を認めた。

これまでに、皮膚創傷に対するMSCの作用に関する報告はあるが[12]、創傷の治癒期間を早める目的の研究が多く、瘢痕を目立たなく治癒させるための研究は胎仔を利用したものに散見されるのみである[13]。本方法は、瘢痕を消失させることを究極の目的としており、そのために1次治癒の創を対象とし、真皮縫合を行うなど瘢痕を抑制するための良好な条件を整えることに留意した。私たちが通常行っている瘢痕形成術や腫瘍切除術にMSC移植を加えることで、皮膚創傷の瘢痕化を抑制することが可能であれば、今後、先天性疾患の治療や形成外科的美容学的手術に大きく貢献することが期待される。

(引用文献)

1）Spyrou GE, Naylor IL.: The effect of basic fibroblast growth factor on scarring. Br. J. Plast. Surg., 55, 275-282, 2002.

2）Akita S, Akino K, Imaizumi T, et al.: The quality of pediatric burn scars is improved by early administration of basic fibroblast growth factor. J. Burn Care Res., 27, 333-338, 2006.

3）Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al.: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science, 284, 143-147, 1999.

4）永谷憲歳，北村惣一郎：臨床応用－再生医療の実際－心血管　心不全, 日本臨牀, 66, 978-983, 2008.

5）Ohgushi H, Kotobuki N, Funaoka H, et al.: Tissue engineered ceramic artificial joint--ex vivo osteogenic differentiation of patient mesenchymal cells on total ankle joints for treatment of osteoarthritis. Biomaterials, 26, 4654-4661, 2005.

6）Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al.: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature, 418, 41-49, 2002.

7）Kamiya K, Fujinami Y, Hoya N, et al.: Mesenchymal stem cell transplantation accelerates hearing recovery through the repair of injured cochlear fibrocytes. Am. J. Pathol., 171, 214-226, 2007.

8）Satoh H, Kishi K, Tanaka T, et al.: Transplanted mesenchymal stem cells are effective for skin regeneration in acute cutaneous wounds. Cell Transplant., 13, 405-412, 2004.

9）中島龍夫，佐藤博子，貴志和生，ほか:臨床応用への道　形成外科領域での再生医療の最近の動向. ティッシュエンジニアリング, Jun:163-168, 2007.

10）落合博子，貴志和生，中島龍夫，ほか：創傷治癒. 病理と臨床, 27, 364-366, 2009.

11）Singer AJ, Thode HC Jr, McClain SA.: Development of a histomorphologic scale to quantify cutaneous scars after burns. Acad. Emerg. Med., 7, 1083-1088, 2000.

12）Yoshikawa T, Mitsuno H, Nonaka I, et al.: Wound therapy by marrow mesenchymal cell transplantation. Plast. Reconstr. Surg., 121, 860-877, 2008.

13）Kishi K, Ohyama K, Satoh H, et al.: Mutual dependence of murine fetal cutaneous regeneration and peripheral nerve regeneration. Wound Repair Regen., 14, 91-99, 2006.

ビタミンCを合成できない毛のないSMP30/GNL遺伝子破壊ヘアレスマウスを用いた皮膚におけるビタミンCの美白、抗しわ効果の科学的実証

東邦大学薬学部生化学
石神　昭人

Vitamin C is said that the skin aging is prevented, and there are wrinkle prevention and whitening effectiveness. However, scientific data that proves the effect is a little. The human cannot synthesize vitamin C in the body, however, the dog, the cat, and the mouse can synthesize vitamin C. We recently developed the SMP30/GNL gene destruction mouse without hair that was not able to synthesize vitamin C in the body. In the present study, we examined the time course of vitamin C distribution in the skin by using SMP30/GNL gene destruction mice. After oral vitamin C administration, vitamin C content in the skin peaked at 6 h and then decreased. Thus SMP30/GNL gene destruction mice without hair as a human-like is very useful whole-body animal model for investigating the movement and functions of vitamin C in the skin.

1．緒　言

ビタミンCは皮膚の老化を防ぎ、しわ予防、美白効果があるといわれている。しかし、その効果を実証する科学的データは少ない。ヒトは体内でビタミンCを合成できない。しかし、犬や猫、マウスは体内でビタミンCを合成できる。我々は、ビタミンCを体内で合成できないSMP30/GNL遺伝子破壊マウスを作製し、長期的なビタミンCの不足は寿命を短くすることを明らかにした[1-4]。即ち、ビタミンCを体内で合成できないマウスに1日必要量の2.5%のビタミンCを毎日与え、マウスの生存率を調べた。その結果、ビタミンCが不足したマウスは普通のマウスに比べて早期に死亡し、その死因は臓器全体が萎縮するヒトの老衰症状そのものであった。ビタミンCは皮膚線維芽細胞で合成されるコラーゲンに含まれるアミノ酸、プロリンおよびリシンの水酸化反応を触媒する酵素の補因子として働き、コラーゲン分子の重合に重要な役割を果たす。そのため、ビタミンCが不足するとコラーゲン分子の重合がうまくいかず、キメの粗い肌になってしまう。我々は、最近、ビタミンCの皮膚での働きを詳しく調べるため、ビタミンCを合成できない毛のないヘアレスマウスの開発に成功した。このマウスは肌のシミを防ぐ美白試験や紫外線照射によるしわの形成阻害などの評価試験に用いることができる。

本研究では、ビタミンCを合成できない毛のないSMP30/GNL遺伝子破壊ヘアレスマウスを用いて、ビタミンCの経口1回摂取による皮膚へのビタミンCの移行速度、移行量を測定した。

Vitamin C beautification and whitening in the skin that used SMP30/GNL gene destruction mouse without hair that cannot synthesize vitamin C and scientific proof in effect of anti-wrinkle

Akihito Ishigami
Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toho University

2．実　験

2.1　皮膚でのビタミンC保持率の測定

野生型マウス（C57BL/6）およびビタミンCを合成できないSMP30/GNL遺伝子破壊ヘアレスマウスを生後3ヵ月齢までマウスが必要とする1日必要量の100%（7mg/日）のビタミンCを与えて飼育した。また、皮膚でのビタミンC保持率を求めるため、生後2ヵ月齢から1ヵ月間、1日必要量の2.5%（0.175mg/日）のビタミンCを与えるSMP30/GNL遺伝子破壊ヘアレスマウス群も用意した。

2.2　ビタミンCの皮膚への移行速度、移行量の測定

SMP30/GNL遺伝子破壊ヘアレスマウスを生後2ヵ月齢までマウスが必要とする1日必要量の100%（7mg/日）のビタミンCを与えて飼育した。その後、生後2ヵ月齢から1ヵ月間、1日必要量の2.5%（0.175mg/日）のビタミンCを与えた。1ヵ月後、経口ゾンデを用いて1日必要量の50%（3.5mg/日）のビタミンCを投与した。経口投与後、経時的（3, 6, 12, 24時間）に皮膚を採取し、ビタミンCの皮膚移行速度を測定した。

2.3　ビタミンCの定量

ビタミンCの定量はHPLC、電気化学検出器を用いて行った[5]。ビタミンCの分離はAtlantis dC18 5μmカラム（4.6×150mm）、移動相は50mM リン酸バッファー（pH 2.8）、54μM EDTA、2%メタノールを用いた。流速は1.3mL/分であった。電気化学検出器の電極にはグラッシーカーボン電極を用い、+0.6Vの電圧をかけて電気信号を記録した。データ解析はウォーターズEmpower 2を用いた。

3．結　果

3.1　皮膚でのビタミンC保持率

生後3ヵ月齢の野生型マウスの皮膚中ビタミンC量は0.27±0.02μmol/皮膚gであった（図1）。一方、SMP30/

GNL遺伝子破壊ヘアレスマウスに生後３ヵ月齢まで１日必要量の100％（７mg/日）および生後２ヵ月齢から１ヵ月間、１日必要量の2.5％（0.175 mg/日）のビタミンCを与えた群では、皮膚中のビタミンC量はそれぞれ0.32±0.04 μmol/皮膚gおよび0.03±0.01 μmol/皮膚gであった。このように1ヵ月間、1日必要量の2.5％のビタミンCを与えたSMP30/GNL遺伝子破壊ヘアレスマウスの皮膚でのビタミンC保持率は、野生型マウスおよび１日必要量の100％のビタミンCを与えた群の皮膚中ビタミンC量を100％とした場合、それぞれ10.6％および8.9％であった。

3. 2　経口1回摂取による皮膚へのビタミン C の移行

経口投与後、皮膚へのビタミンCの移行速度を調べるため、SMP30/GNL遺伝子破壊ヘアレスマウスに生後２ヵ月齢から１ヵ月間、１日必要量の2.5％（0.175 mg/日）のビタミンCを与えて、ビタミンC不足状態にした。このマウスに1日必要量の50％（3.5 mg/日）のビタミンCを１回、経口投与してビタミンCの皮膚移行量を経時的に測定した。経口投与後、皮膚中ビタミンC量は経時的に増加し、６時間で最大となった（図２）。また、12時間では減少し、それ以降24時間まで変化はなかった。

4．考　察

ビタミンCを合成できないSMP30/GNL遺伝子破壊ヘアレスマウスを用いてビタミンCの経口1回摂取による皮膚へのビタミンCの移行速度を調べた。経口投与後、ビタミンCは経時的に皮膚に移行し、６時間で最大となることが分かった。ヒトでもビタミンCを経口摂取後、同様に皮膚中ビタミンC量が６時間で最大となるかは明らかではない。本研究で用いたビタミンCを合成できないSMP30/GNL遺伝子破壊ヘアレスマウスは皮膚でのビタミンCの解析にとても有用であると考えられる。

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。

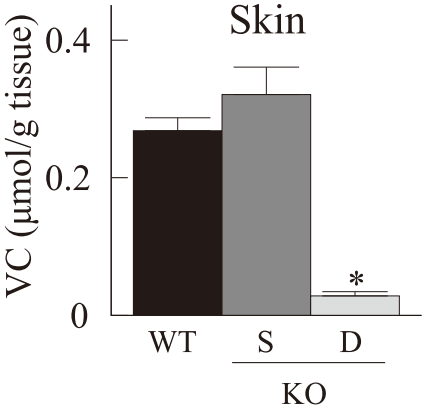


図１　生後３ヵ月齢の野生型マウス（WT）およびSMP30/GNL遺伝子破壊ヘアレスマウス（KO）の皮膚中ビタミンC量
SMP30/GNL遺伝子破壊ヘアレスマウスに１日必要量の100%（S）および生後２ヵ月齢から１ヵ月間、１日必要量の2.5%（D）のビタミンCを与えた。*$P < 0.05$

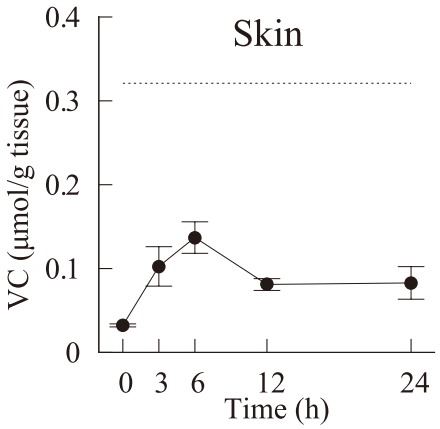


図２　経口1回摂取によるビタミンCの皮膚への移行速度
SMP30/GNL遺伝子破壊ヘアレスマウスに生後２ヵ月齢から１ヵ月間、１日必要量の2.5%のビタミンCを与えて、ビタミンC不足状態にした。このマウスに１日必要量の50%のビタミンCを１回、経口投与した。投与後、経時的に皮膚中のビタミンC量を測定した。点線は、SMP30/GNL遺伝子破壊ヘアレスマウスに１日必要量の100%のビタミンCを与えた場合の皮膚中ビタミンC量を示す。

（引用文献）

1）Ishigami, A. and Maruyama, N.: (REVIEW ARTICLE) Significance of SMP30 in Gerontology. Geriatr. Gerontol. Int., 7, 316-325, 2007.
2）石神昭人、佐藤安訓、丸山直記：機能解明！ SMP30はビタミンC合成に重要な酵素．基礎老化研究, 30, 11-14, 2006.
3）石神昭人：ビタミンCの不足が老化に及ぼす影響．ビタミン, 81, 303-308, 2007.
4）Kondo, Y., Inai, Y., Sato, Y. *et al.*: Senescence marker protein 30 functions as gluconolactonase in L-ascorbic acid biosynthesis and its knockout mice are prone to scurvy. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 103, 5723-5728, 2006.
5）Sato, Y., Uchiki, T., Iwama, M. *et al.*: Determination of dehydroascorbic acid in mouse tissues and plasma by using tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride as reductant in metaphosphoric acid/ethylenediaminetetraacetic acid solution. Biol. Pharm. Bull., 33, 364-369, 2010.

cAMPシグナルを標的にしたヒアルロン酸産生制御メカニズムの研究

横浜市立大学大学院医学研究科
石川　義弘、横山　詩子

Hyaluronic acid is a kind of mucopolysaccharide and exists abundantly as extracellular matrix in skin, article, lens and other organs. Skin folding as seen with aging is shown to be related to a decrease in the content of hyaluronic acid in skin. Supplemental uptake of hyaluronic acid and addition to cosmetic ointment as well as direct skin injection of hyaluronic acid itself have been commonly employed. Further, in the treatment of article inflammation or lens injury, hyaluronic acid has been used widely in medicine. It has been known that stimulation of G protein-coupled receptors is necessary to produce hyaluronic acid, leading to increased cell migration or proliferation. However, the exact molecular mechanism of this signal transduction in cells has remained undetermined. We have investigated the molecular mechanisms of hyaluronic acid production through cAMP signal in our laboratory. We have demonstrated that the activation of cAMP signal is essential and resulting increase in hyaluronic acid synthase enzyme expression follows. Because cAMP is produced by adenylyl cyclase, a membrane-bound enzyme that is activated by Gs protein, leading to the conversion of ATP to cAMP, it is necessary to investigate the molecular mechanisms of adenylyl cyclase activation that leads to increased hyaluronic acid production. Adenylyl cyclase enzyme has many isoforms, from type I to IX, which show distinct tissue distribution and biochemical properties. Because the hyaluronic acid production has been best demonstrated in vascular smooth muscle cells in our laboratory, we examined adenylyl cyclase isoforms that are responsible for hyaluronic acid production. We also examined the effect of stimulating these adenylyl cyclase isoforms in an isoform-specific manner using forskolin derivatives that have increased specificity to these isoforms. We also examined the effect of overexpressing adenylyl cyclase isoforms in these cells to explore changes in intracellular cell signaling as well as changes in hyaluronic acid production. Accordingly, we found that specific isoforms of adenylyl cyclase are more responsible for hyaluronic acid production and thus cell migration thereafter, and that these isoforms play an important role in not only hyaluronic acid production, but regulating vascular function such as vasodilatation or endothelial thickening. Our results have indicated that it is important to understand the role of each adenylyl cyclase to regulate hyaluronic acid production. Pharmacological stimulation of a specific isoform of adenylyl cyclase may enable us to enhance the production of hyaluronic acid specifically. Development of such specific stimulator of adenylyl cyclase may be used in the treatment of conditions where decrease in hyaluronic content is involved. Indeed, our results have suggested that such strategy is pharmacologically feasible.

1．緒　言

ヒアルロン酸はムコ多糖の一種であり、皮膚をはじめとして関節や硝子体などにおける細胞外器質として豊富に存在する。加齢に伴う皮膚のたるみやシワではヒアルロン酸含有量の低下が関与しており、近年では健康補助食品としての摂取や、化粧品の添加物としての使用、さらには美顔術としてのヒアルロン酸注入が行われている。これ以外にも関節炎や角結膜上皮障害における治療など、幅広く医療に利用されている。ヒアルロン酸の産生にG蛋白共役型のホルモン刺激が関与することは以前より知られていたが、その詳細なメカニズムは不明であった。G蛋白共役型のホルモン刺激によってヒアルロン酸産生の亢進とともに、細胞増殖や遊走が亢進することが報告されてきたが、これらの細胞機能を特異的に制御することが可能なのか、あるいはその細胞内シグナルの制御は独立して行われているのかは不明であった。

*

Regulation of hyaluronic acid production via cAMP signal

Yoshihiro Ishikawa*, Utako Yokoyama
Yokohama City University Graduate School of Medicine

我々の研究室では、G蛋白共役型ホルモンによるcAMPシグナルの分子メカニズムを長年にわたって研究してきたが、最近の成果によればヒアルロン酸の産生制御にはcAMPシグナルの活性化が必要であり、平滑筋細胞や繊維芽細胞においてヒアルロン酸産生酵素の一つであるHas2の転写レベルでの亢進が重要な役割を果たしていることがわかった[1)]。さらにcAMPシグナルの標的酵素として、従来考えられていたプロテインキナーゼA以外に、Epacと呼ばれるG蛋白質調節因子が細胞遊走の調節に重要な役割を果たしており、プロテインキナーゼAとEpacに機能分担が存在することがわかってきた[2, 3)]。このことは、ヒアルロン酸産生と細胞遊走の制御メカニズムが異なる可能性を示唆する。

本申請では、G蛋白共役型ホルモンによるアデニル酸シクラーゼの活性化が引き起こすcAMPシグナルがヒアルロン酸産生を如何に制御するかを検討し、血管平滑筋細胞を含めて細胞外器質の産生を特異的に制御する酵素サブタイプを含めた検討をおこなった。さらに特定のアデニル酸シクラーゼサブタイプの制御剤が、将来的な薬物開発の対象となりうるかについて検討した。

2．実　験

HAS 発現の定量

トータルRNA はプールされたラット組織から抽出した。cDNAの合成およびRT-PCRは過去の文献に記載された方法を用いた。PCR増幅に用いたプライマーの塩基配列はラットのものを用い、遺伝子バンクからの配列を元に合成した。定量的なRTPCR反応においては、それぞれのテンプレートは少なくとも３回の定量を行い、再現性を検討した。それぞれの遺伝子の定量に当たってはGAPDHをコントロールとして用いた。GAPDHの定量に当たっては、市販のキットであるTaqMan Rodent GAPDH control reagent kit（Applied Biosystems, Foster City, CA）を用いた。

細胞培養

Wisterラットの血管平滑筋細胞を初代培養して使用した。ラット胎生期21日を中心に採取した。組織片は切り刻まれ、800μlのcollagenase/dispase enzyme mixture を添加し、37度にて15分間の消化をおこなった。細胞浮遊液を遠心し、培養液を4collagenase mixture IIに変えてさらに37度において12分間おこなった。細胞浮遊液はgrowth media mixtureに移され、35ｍｍのPoly-L-Lysin皿を用いて培養を行った。培養期待は5% CO_2の条件であり、37度にて施行した。細胞はそれぞれ4－6回の継代培養中に使用し、alpha-smooth muscle actinの発現が99％以上に見られることを確認して使用した。

ヒアルロン酸の定量

ヒアルロン酸は細胞培養液中に放出された量を定量した。牛軟骨から抽出されたヒアルロン酸結合蛋白をラテックスにラベルし、凝集を指標として定量することで行った（LPIA Ace, Fujirebio Inc, Tokyo）。ヒアルロン酸の定量はduplicateで製造者のプロトコールに基づいて行い、Hitachi 7070 analysis system（Hitachi, Tokyo）を用いて800nmにおける吸光度分析をおこなった。

siRNA 実験

二重鎖siRNAをアデニル酸シクラーゼ２、５、および6型の塩基配列から特定部分を選択しておこなった。コントロールにはQIAGENにて作製されたものを用いた。製造者の推奨するプロトコールに基づいて、siRNA（300 pmol）、Lipofectamin RNAiMAX（Invitrogen, San Diego, CA）を用いた。

アデノウイルス実験

ラット2型アデニル酸シクラーゼ全長cDNAをシャトルベクターに組み込んで、同サブタイプを発現するアデノウイルスを作製した。作成に当たってはAdenoX adenovirus construction kit（Clontech, Tokyo, Japan）を用いた。6型アデニル酸シクラーゼを発現するアデノウイルスにおいては、サイトメガロウイルスプロモーターを用いた。作成に当たってはhomologous recombination methodを用いた。

cAMP 産生能の検討

細胞を24穴プレートにおいて培養し、24時間の血清無添加条件のあとにcAMP産生を定量した。定量に当たっては事前に0.2 mM IBMXを添加し20分間のpreincubationをおこなった後に、各試薬を加えてさらに10分間incubateした。産生反応は培養液を除去し、400μlのice-cold trichloroacetic acid（7.5%）を各穴に加えて終了させた。サンプルは10μl acetyc anhydride, 20μl triethylamine (Sigma)を加えてアセチル化させた。これらのサンプルを50μl取り出し、12,000 cpm ^{125}I-cAMP（Perkin Elmer, Waltham, MA）50μlウサギ血清 anti-cAMP 抗体（diluted 1:3000, Millipore, Billerica, MA）と４度の条件で一晩incubationをおこなった。50μlヤギ抗ウサギ抗体（magnetic bead coated, QIAGEN, Tokyo）を加えて室温条件化で揺らしながら１時間incubateした。Bound from freeの分離においては、Milliporeフィルターを用いておこなった。残存した放射能活性を測定し、標準曲線と対比することによりcAMP産生量の定量をおこなった。cAMP産生量は蛋白濃度で補正した。

PKA 活性

PKA活性はアッセイキットを用いて測定した（StressGen Biotechnologies, Ann Arbor, MI）。測定法の詳細は製造者のプロトコールに従った。

3．結　果

PGE-EP4 シグナルによるヒアルロン酸産生の制御

我々はヒアルロン酸の産生能力を、これまでに検討してきた血管平滑筋細胞を用いて調べた。これまでの研究結果から、動脈管などから採取された血管平滑筋細胞におけるヒアルロン酸産生能力が高いことがわかっている。プロスタグランジン刺激によって、ヒアルロン酸産生が亢進することは従来の結果からも示唆されているが、はたしてどのようなサブタイプによる産生が最も強いのかを検討した。PGE1, PGE2, およびEP4アゴニストであるONO-AE1-329を用いて刺激したところ、容量依存性にヒアルロン酸産生が増加した。最終的な増加は48時間後の定量において判断した。PGE1刺激によるヒアルロン酸の産生はEP4アンタゴニストであるONO-AE3-208によって阻害された。一方でEP1およびEP3に対する拮抗剤を使用しても抑制は見られていなかった。これらの結果からEP4による刺激

がヒアルロン酸の産生を引き起こすことが推測された。

cAMP 産生を介したヒアルロン酸産生の制御

上記の結果から、ヒアルロン酸産生においてEP4の刺激が重要であることが推測された。そこで、EP4の選択的な刺激剤であるONO-AE1-329を用いて、血管平滑筋を刺激し、用量依存性と時間依存性を検討することにより、ONO-AE1-329によるヒアルロン酸産生効果を確認することとした（図１）。容量依存的なEP4アゴニストによるヒアルロン酸産生の検討として、血管平滑筋細胞を培養条件下でEP4の選択的なアゴニストであるONO-AE1-329を48時間に渡って添加し、ヒアルロン酸の産生を比較した。培養液中に浸出するヒアルロン酸を凝集法を用いて定量した。いずれも容量依存性にヒアルロン酸産生が増加していることがわかった。さらに、時間依存的なEP4アゴニストによるヒアルロン酸産生を検討した。上記と同様にEP4アゴニストであるONO-AE1-329を用いて、血管平滑筋細胞を培養し、刺激をおこなった。4、24、２日、4日間におけるヒアルロン酸の産生を比較したところ、時間依存性にヒアルロン酸産生が増加することがわかった。さらにEP4アゴニストによるヒアルロン酸産生は、PKAの選択的阻害によって抑制されたことから、EP4刺激がcAMPの産生を上昇させ、PKAシグナルを賦活化することによってヒアルロン酸産生を上昇させるメカニズムが確認された。

ヒアルロン酸産生の分子メカニズム

ヒアルロン酸の産生に当たっては、これまでに３種類のヒアルロン酸産生酵素の存在が知られている。そこで、EP4を介したシグナル系において、どのサブタイプが関与しているのかを検討した。検討に当たっては、制御メカニズムとしてもっとも基本的な転写調節レベルでの制御が想定されたため、まずはRT-PCRを用いて、mRNAの定量をおこなった。HAS1,HAS2, HAS3の三つのサブタイプに特異的なプライマーを用いてRT-PCRによる、それぞれの定量をおこなった。EP4選択的な刺激剤であるONO-AE1-329を10^{-6}Mの濃度において、血管平滑筋を刺激した後にRNAを抽出し、選択的なプライマーを用いて定量をおこなったところ、HAS1およびHAS3に比較して、HAS ２発現の圧倒的な増加が観察された（図２）。さらにこの結果を確認するために、時間依存的なHAS2 mRNA発現量の変化で観察した。ONO-AE1-329, TGF b、PDGF-BBのそれぞれを、10^{-6}M, 10ng/ml, 10ng/mlの濃

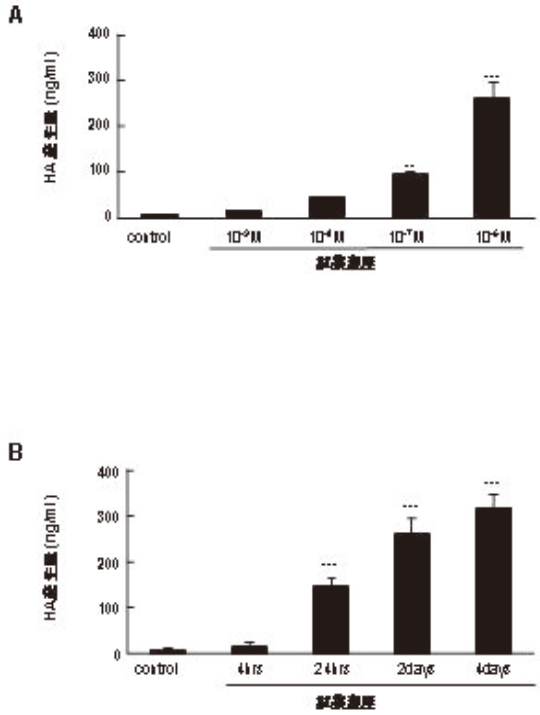


図1．EP4 アゴニストによるヒアルロン酸産生制御

A. 容量依存的な EP4 アゴニストによるヒアルロン酸産生。
血管平滑筋細胞を培養条件下で EP4 の選択的なアゴニストである ONO-AE1-329 を 48 時間に渡って添加し、ヒアルロン酸の産生を比較した。培養液中に浸出するヒアルロン酸を凝集法を用いて定量した。いずれも容量依存性にヒアルロン酸産生が増加している。

B. 時間依存的な EP4 アゴニストによるヒアルロン酸産生。
EP4 アゴニストである ONO-AE1-329 を用いて、血管平滑筋細胞を培養し、刺激をおこなった。4、24、２日、４日間におけるヒアルロン酸の産生を比較した。

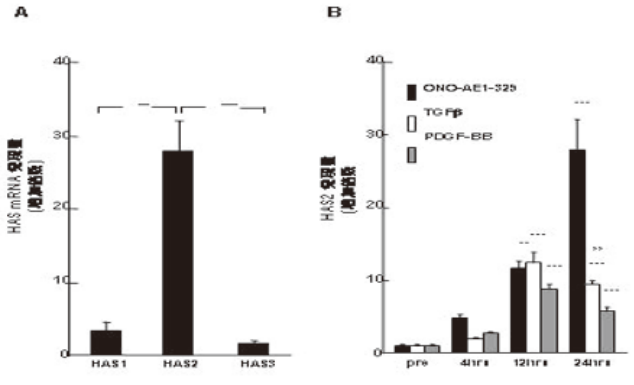


図2．EP4 アゴニストによるヒアルロン酸産生酵素発現の変化

A. RT-PCR によってヒアルロン酸産生酵素のサブタイプ（HAS1,HAS2, HAS3）のm RNA 発現を定量した。EP4 選択的な刺激剤である ONO-AE1-329 を 10^{-6}M の濃度において、血管平滑筋を刺激した後に RNA を抽出し、選択的なプライマーを用いて定量をおこなった。HAS1 および HAS3 に比較して、HAS ２発現の圧倒的な増加が観察された。

B. 時間依存的な HAS2 m RNA 発現量の変化で観察した。ONO-AE1-329, TGFb、PDGF-BB のそれぞれを、10^{-6}M, 10ng/ml, 10ng/ml の濃度で刺激し、HAS2 の発現を RT-PCR において定量した。いずれも時間依存的に発現を増加させたが、ONO-AE1-329 による増加効果が最も強力であった。

度で刺激し、HAS 2の発現をRT-PCRにおいて定量した。いずれも時間依存的に発現を増加させたが、ONO-AE1-329による増加効果が最も強力であることがわかった。

以上の結果から、ヒアルロン酸産生増強の分子メカニズムとして、EP4刺激を介してPKAの活性化がおこり、これによるHAS2の選択的な転写促進がおこり、最終的に血管平滑筋細胞におけるヒアルロン酸分泌が促進されるメカニズムが想定された。

平滑筋におけるアデニル酸シクラーゼサブタイプの発現

EP4刺激はG蛋白質共役型受容体の活性化をへて、Gs蛋白質の活性化、および引き続くアデニル酸シクラーゼの活性化を経てcAMP産生を引き起こす。この下流に存在するPKA刺激がHAS 2の転写促進因子として働くことがわかった。しかるに血管平滑筋には多数のアデニル酸シクラーゼサブタイプが発現している。我々は特定のアデニル酸シクラーゼサブタイプがこのプロセスに重要な役割を果たす仮説をたてた。そこで定量的なRT-PCR法を用いて、どのアデニル酸シクラーゼサブタイプが血管平滑筋細胞に多く発現するかを検討した。

RT-PCRの結果から、平滑筋細胞には1および8型を除くすべてのサブタイプの発現が検出された。この中ではとくに2および6型の発現がおおいことがわかった。そこで2および6型のそれぞれの関与を検討するために、siRNAの手法を用いて、それぞれのアデニル酸シクラーゼサブタイプの欠損実験をおこなった。いずれのサブタイプの欠損においてもPGE 1を介したcAMP産生能は顕著な低下を示した。このことから両サブタイプは、いずれもPGE1刺激の下流に存在することが推測された。そこでこれらのサブタイプによるヒアルロン酸産生を比較したところ、6型サブタイプの欠損時においてヒアルロン酸産生能が低下するが、2型ないし5型の欠損時にはそのような産生低下はみられないことがわかった。

さらにアデノウイルスをもちいて、2型および6型サブタイプの過大発現をおこしたところ、2型サブタイプの過大発現においてはヒアルロン酸産生は上昇しなかったが、6型サブタイプの過大発現によってヒアルロン酸産生が顕著に増加することがわかった。以上の結果から、血管平滑筋細胞に発現する多数のアデニル酸シクラーゼサブタイプの中でも、6型サブタイプがEP4刺激によるヒアルロン酸産生に重要な役割を果たしていることが想定された。

さらに2型および6型に選択的な刺激薬を用いた実験からは、アデノウイルスによるアデニル酸シクラーゼ蛋白発現と同等の効果が、アデニル　酸シクラーゼ選択的刺激薬によって得られることがわかった。このことは、アデノウイルスを使うことなく、薬理学的な手法を用いることにより、ヒアルロン酸産生を制御できる可能性を示唆する。

4．考　察

ヒアルロン酸は細胞外器質として様々な作用を持つことが知られているが、その発現調節は十分わかっていない。我々は少なくとも血管平滑筋細胞によるヒアルロン酸産生にはEP4刺激が重要な役割をはたし、EP4によるアデニル酸シクラーゼの活性化およびヒアルロン酸産生酵素の転写刺激を介して、ヒアルロン酸の産生が上昇することを示した。

これまでの実験で得られた結果で重要と考えられることは、これらの刺激が細胞内シグナル系をへて発揮されるが、関与する酵素サブタイプが特定されたことである。受容体レベルではEP4が主要な役割を果たし、その下流にあるアデニル酸シクラーゼのサブタイプに関しては6型サブタイプが重要な役割をになっている。さらに大切なことはヒアルロン酸産生酵素サブタイプであり、3種のサブタイプの中でも2型のみがEP4刺激によって転写活性が増強され、ヒアルロン酸産生を亢進させることがわかった。これらの結果から、ヒアルロン酸産生の分子メカニズムとして、高度に分化した特定のサブタイプを通じたシグナル伝達系が細胞内で構築されている可能性がしめされた。

細胞内には多数の酵素が存在し、その酵素サブタイプには複数存在することが知られている。シグナル伝達の過程においては、異なったサブタイプが相補的に作用し、同じような結果を生む場合と、それぞれのサブタイプが異なった機能を担っている場合がある。PGE刺激によるヒアルロン酸産生に関しては後者の可能性が考えられる。EP4、アデニル酸シクラーゼ6型、およびヒアルロン酸産生酵素2型のそれぞれが機能的に共役していることがわかったが、その共役を可能とするメカニズムは不明である。いわゆるカベオリンなどのスカフォールド蛋白質などを通じて、特定のサブタイプ蛋白が重合している可能性も考えられる。そのような検討に当たっては免疫沈降法や細胞における免疫染色法を用いた検討が必要であると考えられ、今後の検討課題である。また、今回の研究結果から、特定のアデニル酸シクラーゼサブタイプを制御する活性薬理物質が、ヒアルロン酸欠乏組織などにおけるヒアルロン酸産生促進に応用できる可能性が示された。皮膚科学や整形外科分野を含めて、今後どのような分野において活用できるのかを検討する必要がある。

（引用文献）

1）Yokoyama U, Minamisawa S, Hong Q, Segi-Nishida E, Ghatak S, Iwasaki S, Iwamoto M, Misra S, Tamura K, Hori H, Yokota S, Tool BP, Sugimoto Y, and **Ishikawa Y**: Chronic activation of the prostaglandin receptor EP4 promotes hyaluronan-mediated

neointimal formation in the ductus arteriosus. ***J. Clin. Invest.*** 116; 3026-3034, 2006

2）Ulucan C, Wang X, Baljinnyam E, Bai Y-Z, Okumura S, Sato M, Minamisawa S, Hirotani S, and **Ishikawa Y**: Developmental changes in gene expression of Epac and its upregulation in myocardial hypertrophy. ***Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*** 293; H1662-72, 2007

3）Yokoyama U, Minamisawa S, Quan H, Akaike T, Suzuki S, Jin M, Jiao Q, Watanabe M, Otsu K, Iwasaki S, Nishimaki S, Sato M, and **Ishikawa Y**: PGE2-activated Epac promotes neointimal cushin formation of the rat ductus arteriosus by a process distinct from that of PKA. ***J. Biol. Chem.*** 283; 28702-28709, 2008

放射線・紫外線適応応答マーカーを指標とした老化制御因子スクリーニング法の開発

東京都健康長寿医療センター研究所分子機構研究チーム
三浦　ゆり

Organisms are exposed to various stresses such as oxidative stress and other environmental stresses, resulting in the diverse pathophysiological and pathological conditions with age. However, it is also known that low dose stress induces the adaptive response, which exerts protective effects against a subsequent higher dose. Radiation adaptive response has been widely observed in various biological systems. The protective responses are expected to bring anti-aging effects in dermal cells. Thus, in order to find anti-aging factors involved in adaptive response, we try to explore the biomarkers of radiation adaptive response in dermal cells, and lead to develop the protective agents against dermal aging. In the present study, we examined radiation adaptive response in dermal fibroblast, and explored the low dose irradiation-responsive proteins using proteomics on two-dimensional (2-D) PAGE. As a result, 0.1Gy pre-irradiation followed by 2-Gy challenging-irradiation at 3-hr interval induced radiation adaptive response in dermal fibroblast. From proteomics analyses of protein profiles of 0.1Gy- or non-irradiated dermal fibroblast, some candidate proteins, which are responsible for radiation adaptive response, were revealed.

1. 緒　言

老化には、遺伝的要因と環境的要因の両方が深く関与しているが、環境的要因の中で最も重要なのは活性酸素・フリーラジカルによる酸化ストレスである。しかし、ひとくちに酸化ストレスと言っても、老化に実際に関与しているのは一度に多くの細胞を死に至らしめるような強い酸化ストレスではなく、それほど強くはないが持続的な酸化ストレスである。酸化ストレスの生体影響に関する研究は、活性酸素・フリーラジカルが様々な疾患や炎症などに深く関与することが明らかにされて以来、様々な研究者から注目を集めているが、現在のところ酸化障害あるいは細胞死を引き起こすような強いストレス負荷の研究がほとんどであり、老化や慢性疾患のモデルとなるような低レベルの持続的なストレスに関してはほとんど明らかにされていないのが現状である。しかし、老化による細胞の機能低下とその機構を明らかにするためには、低レベルの酸化ストレスに的を絞った研究が必要である。特に皮膚は、紫外線、環境放射線、環境汚染物質など様々な刺激に直接曝される部位であり、皮膚老化の制御を目的とした研究をするためには、放射線や紫外線の低線量照射による老化モデルの構築と、その解析が必要不可欠であると考えられる。

弱い（低レベルの）酸化ストレスによる生体への影響を考えるときは、強い（高レベルの）酸化ストレスにはない特異的な現象について考慮する必要がある。それが、ホルミシスあるいは適応応答と呼ばれる現象である。「ホルミシス（hormesis）」という言葉は、ギリシア語の「hormo（興奮する）」が語源になっており、「大量では有害なさまざまな毒物などが、少量ではかえって生理機能の刺激効果をもたらすこと」と定義されている。つまり、ストレスもその強さがマイルドであれば、生体にとってプラスの効果をもたらすということである。放射線に関しては、低線量放射線照射により放射線適応応答が引き起こされることが知られている。放射線適応応答は、予め低線量放射線を照射することにより高線量放射線に対する放射線抵抗性を獲得することであり、この防御応答は様々な生物で観察されている[1, 2]。放射線適応応答に関与する因子は、DNA修復関連因子など様々な酵素やタンパク質が知られている[3]。しかし、多様な実験系において様々な指標を用いて研究されているため、その分子機構は多様であり、それぞれの細胞、あるいはそれぞれの照射条件により関与する因子も様々であると考えられる。

皮膚は、環境放射線に直接曝される部位であるため、皮膚老化につながる酸化的傷害だけでなく、適応応答も引き起こされていると考えられる。放射線適応応答を活性化する因子は、酸化障害の蓄積を防御し老化を防止する因子であり、老化制御因子と考えられる。このため、皮膚老化を遅らせて肌をみずみずしく保つためには、酸化ストレスを抑え込むことを目的とした抗酸化化粧品の開発だけでなく、細胞自身のもつこのようなストレス応答能を高め、防御機構を活性化させることも重要であると考えられる。

そこで本研究では、皮膚線維芽細胞を用い、低線量放射線照射による細胞への影響をタンパク質レベルで解析し、細胞の自己防御応答である適応応答の活性化因子を探索することを目的とする。発現プロテオミクスを用いて、低線

Proteomic Research for Biomarker of Adaptive Response to Ionizing and Ultraviolet Radiation
Yuri Miura
Research Team for Functional Genomics, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

量放射線照射による細胞への影響を解析し、細胞の自己防御応答である適応応答によって発現変動するタンパク質、すなわち適応応答マーカーを探索する。今後、抗体等を用いてこの適応応答マーカーを高感度かつ簡便に検出する系を構築し、適応応答マーカーを指標とした老化制御作用を持つ化合物のスクリーニングから、適応応答活性化という新たなメカニズムによる皮膚老化防止剤の開発につなげる。

2. 実　験

2. 1　培養細胞

細胞は、ヒト皮膚由来の線維芽細胞であるTIG-118を用いた。培地は10% FBS, 1% penicillin-streptomycinを含むα-MEMを用い、37℃、5% CO_2 / 95 % air中で培養した。

2. 2　X線照射

X線は、X線照射装置（MBR-1505R2：日立メディコ）を用い、室温で照射した。低線量照射は、5.5 mm Al+ 2.1 mm Cuのフィルターを用いて、管電流2mA、管電圧100 kV、線量率0.01Gy/minで行い、0.1Gy照射した。また、適応応答実験の場合の追加照射は、0.5mm Al + 0.1mm Cuのフィルターを用いて、管電流5mA、管電圧150kV、線量率0.16Gy/minで行い、2Gy照射した。照射しない細胞群（対照群）も照射群が照射している時間帯は室温に放置した。

2. 3　放射線適応応答実験

細胞は、X線を照射する1日前に細胞数を計測し、フラスコにプレートした。適応応答は、あらかじめ照射する低線量放射線照射の後、一定間隔後に高線量の追加照射を行い、追加照射による放射線障害があらかじめ低線量照射を行うことによって、軽減されるかどうかを調べるものである。そこで、あらかじめの低線量放射線と追加の高線量放射線を、それぞれ照射する群としない群に分け、全部で4群の細胞を用いて適応応答を評価した。即ち（低線量照射有-追加照射有）、（低線量照射有-追加照射無）、（低線量照射無-追加照射有）、（低線量照射無-追加照射無）である。細胞は、それぞれの条件で低線量照射と追加照射を行った後、37℃ 5 %CO_2雰囲気下で２日間培養し、２日後の細胞数増加を調べた。

2. 4　二次元電気泳動

細胞を低線量照射群と非照射群に分け、低線量照射群に0.1Gy照射を行った。照射3時間後に照射群、非照射群とも細胞を回収し、細胞分画キットを用いて核画分を分取した。分取した核画分から、タンパク質抽出バッファー（8.5M urea, 0.2% SDS, ２% Triton-X100, ３% 2-mercaptoethanol, ２% Pharmalyte[3−10]）を用いて、還元的にタンパク質を抽出した。タンパク質二次元電気泳動とプロテオーム解析は、以下のように行った（http://proteome.tmig.or.jp/2D/2DE_method.html）[4]。

あらかじめ膨潤させておいた等電点電気泳動用ストリップゲル（Immobiline DryStrip, pH4−7, 18cm: GE Healthcare）に抽出した核画分タンパク質をのせ、一次元目の等電点電気泳動を行った（CoolPhoreStaar IPG-IEF Type P, Anatech）。ストリップゲルを還元化、アルキル化処理後、SDS-PAGEを行った（CoolPhoreStar SDS-PAGE Dual-200, Anatech）。泳動ゲルを蛍光染色し（SYPRO-Ruby）、ゲルスキャナーを用いて泳動像を取り込み、ゲル間のディファレンシャルディスプレー解析を行った（PDQuest, Bio-Rad）。非照射細胞の泳動像と低線量照射細胞の泳動像のスポットをマッチングさせ、発現が変動するタンパクスポットを探索した。

2. 5　タンパク質の同定

発現の変動したスポットを、スポットカッターを用いて切り出し、脱色処理後にトリプシン（Promega）とリシルエンドペプチダーゼ（和光純薬）により酵素消化を行った。得られたペプチドをゲル片より抽出し、ターゲット上でマトリクス（α-cyano-4-hydroxycinnamic acid）と混合した後、MALDI-TOF質量分析計（AXIMA-CFR; Shimadzu Biotech）を用いて質量分析を行い、ペプチドマスフィンガープリンティングを得た。Mscot検索サイト（Matrix Science, London, UK, see http://www.matrixscience.com）を利用して、スポットの同定を行った。

3. 結　果

3. 1　低線量放射線適応応答

まず、皮膚線維芽細胞において低線量放射線適応応答の起きる条件を検討した。生体が適応応答を起こすためには、あらかじめの照射と追加照射、さらにその間の間隔を決めることが重要である。そこで、あらかじめの照射（低線量照射）については０から1Gyまで、また追加照射（高線量照射）については1Gyから5Gyまで検討し、適応応答がもっとも顕著に現れる照射条件を求めた。また、あらかじめ照射と追加照射の間隔は、３時間と24時間について検討した。その結果、あらかじめ照射を0.1Gyで行い、2Gyの追加照射を3時間後に照射することにより、追加照射による細胞増殖阻害が最も抑制され、皮膚線維芽細胞において適応応答がおきることが明らかになった（図１）。

3. 2　二次元電気泳動による放射線適応応答因子の解析

そこで次に、適応応答が発現する照射条件でX線を照射し、プロテオミクス解析を用いて照射後の核タンパク質の解析を行った。0.1Gy照射3時間後に細胞を回収し、細胞分画キットにより核タンパク質を抽出した後、等電点電気

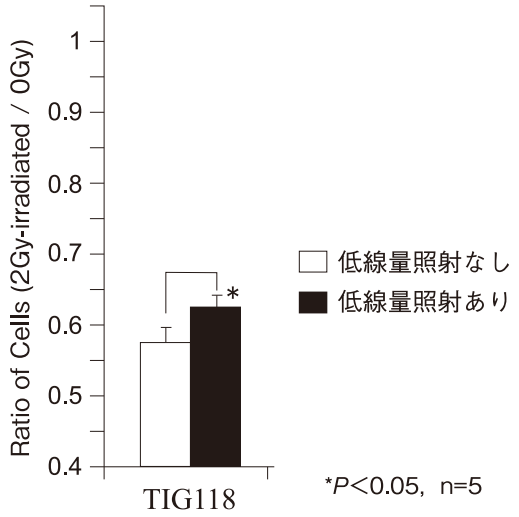


図１　皮膚線維芽細胞における適応応答
皮膚線維芽細胞である TIG-118 にあらかじめ 0.1Gy 照射し、３時間後に 2Gy 照射して、２日間培養後の細胞数を計測した。あらかじめ 0.1Gy 照射をした細胞としない細胞で、それぞれ 2Gy 照射による細胞増殖阻害を計算した。あらかじめ低線量照射を行ったものの方が、2Gy 照射による細胞数の低下が少なく、増殖阻害が軽減されていることが示された。

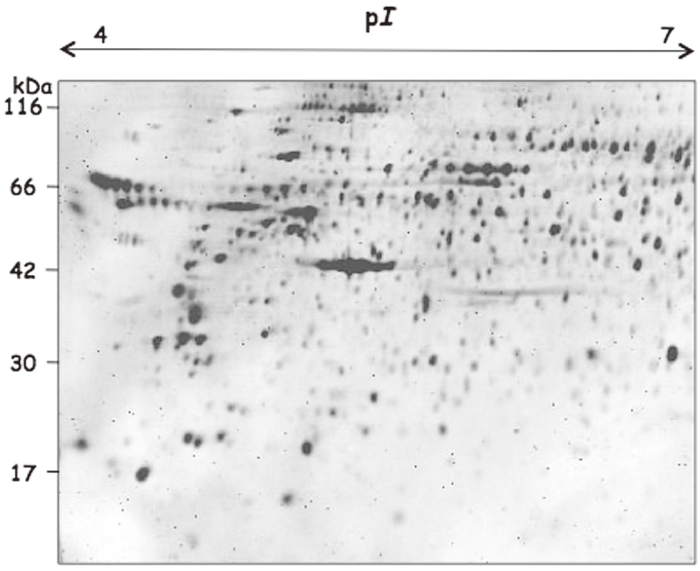


図２ 皮膚線維芽細胞の核画分タンパク質の二次元電気泳動像
（0.1Gy 照射３時間後）
TIG-118 に 0.1Gy 照射し、３時間後に細胞を回収して細胞分画を行った。核画分を分取してタンパク質を抽出し、二次元電気泳動を行った。

泳動とSDS-PAGEを行った。図２に0.1Gy照射3時間後の核タンパク質の二次元電気泳動像を示す。低線量照射を行った細胞と行わない細胞について、得られた2-D画像をPDQuest（Bio-Rad）を用いて解析し、低線量照射により核内の発現が変動するタンパク質を探索した。その結果、0.1Gy照射によって増加するスポットを18スポット、減少するスポットを８スポット検出した。これらのタンパク質スポットについてMALDI-TOF/MSを用いたペプチドマスフィンガープリンティングにより同定を行い、放射線適応応答との関連性について検討している。

4. 考　察

低刺激のストレスによって引き起こされる防御応答の一つである適応応答は、今まで様々な生物で観察されてきた。ほ乳類細胞で初めて放射線適応応答を報告したのは1984年Olivieriらである[1)]。彼らがヒトのリンパ球における放射線適応応答を報告して以来、低線量放射線による適応応答は様々な実験系で様々な指標を用いて行われてきた。我々の実験系でも、若齢ラットから初代培養したアストロサイトにおいて、細胞増殖阻害を指標とした放射線適応応答が起きることを報告している[5)]。今回の皮膚由来線維芽細胞を用いた実験により、比較的PDLの若い皮膚線維芽細胞では、放射線適応応答が起きることが明らかになった。

そこで、放射線適応応答の分子機構について考察した。まず、あらかじめの低線量照射による軽度の傷害（DNA

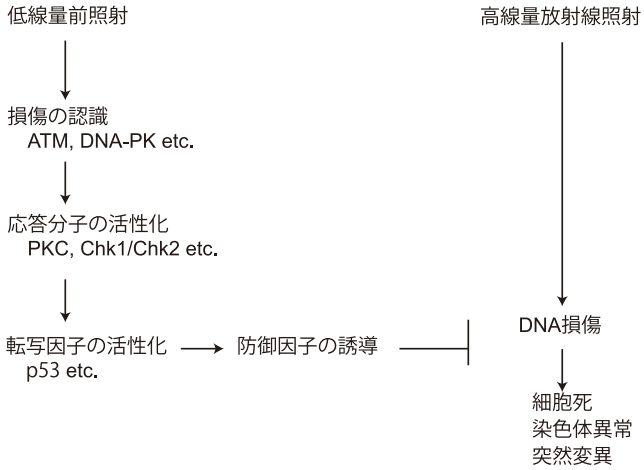


図３　放射線適応応答のメカニズム

二本鎖切断や膜構造の変化など）をセンサー分子が認識し，次にシグナル伝達分子が活性化して情報を伝達した後，最後にDNA修復酵素やストレス防御因子などの防御能を持ったタンパク質が合成されると考えられる（図３）[2)]。

あらかじめの低線量照射と高線量の追加照射の間の間隔に最適時間が存在するのは、この反応にかかる時間であると考えられるので、本実験系で適応応答が引き起こされる低線量照射後３時間後に細胞を回収し、この時核内において発現変動するタンパク質をプロテオーム解析により調べた。これらのタンパク質は、放射線適応応答において防御因子の誘導に関与するタンパク質である可能性があると考

えられる。今後、これらのタンパク質とその適応応答における役割を明らかにし、適応応答を活性化する因子の発見に繋げたい。

謝　辞

本研究を遂行するにあたり、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心より御礼申し上げます。

（参考文献）

1）Olivieri, G., Bodycote, J., Wolff, S.: Adaptive response of human lymphocytes to low concentrations of radioactive thymidine. *Science* **223**:594-597; 1984.

2）Miura, Y.: Oxidative stress, radiation-adaptive responses, and aging. *J Radiat Res*（*Tokyo*）**45**:357-372; 2004.

3）Miura, Y., Endo, T.: Survival responses to oxidative stress and aging. *Geriatr. Gerontol. Int.* **10**:S1-S10; 2010.

4）Miura, Y., Kano, M., Abe, K., et al.: Age-dependent variations of cell response to oxidative stress: proteomic approach to protein expression and phosphorylation. *Electrophoresis* **26**:2786-2796; 2005.

5）Miura, Y.: Proteomic approach for biomarker discovery in radioadaptive responses –Age-dependent variations of cell response to low-dose radiation- *Biol. Sci. Space* **23**:17-22; 2009.

神経ペプチドおよびストレスによる皮膚バリア機能障害のメカニズム解析

大分大学医学部皮膚科学[1]、獨協医科大学越谷病院皮膚科[2]
片桐　一元[1,2]、波多野　豊[1]、倉橋　理絵子[1]

Chronic stress inhibits the recovery of permeability barrier function via induction of glucocorticoids as an end-product of hypothalamic - Pituitary - Adrenal axis. In this study, we examined an effect of acute stress on the barrier function in mice. Acute stress, which was induced by transfer of mice to a new cage and keeping them with a crowded condition for 12 hours, inhibited the recovery of barrier function after acute disruption by tape stripping. Chemical denervation by capsaicin abolished the inhibitory effect of the stress. Intradermal administration of substance P, which is a candidate of stress mediator in this system, inhibited the barrier recovery. These results suggest that acute stress inhibits the barrier recovery as well as chronic stress via activation of peripheral nerve.

1．緒　言

ストレスがアトピー性皮膚炎に悪影響を与えることをしばしば経験する。実験的にもストレスが炎症反応を増強し[1)]、皮膚バリア機能障害を助長することなどが報告され[2,3)]、臨床経験を裏付けている。ストレスには、慢性ストレスと急性ストレスがあり、慢性ストレスではHPA axisにより誘導されるglucocorticoidsが最終メディエーターとして作用し、バリア機能を障害するとされている[4)]。一方、急性ストレスのメディエーターとしては、末梢神経由来因子の役割が重要視されている[5,6)]。

近年、我々は、Th2サイトカインが皮膚バリア機能の回復を阻害すること[7)]、さらに、ヒスタミンの外用が末梢神経機能を介して、Th2サイトカインを誘導し、皮膚バリア機能回復障害性に作用することを見いだしている。

今回、我々は、急性ストレスが皮膚バリア機能に及ぼす影響と末梢神経関連因子の関与について検討し、そのメカニズムの一部を明らかにしたので報告する。

2．実　験

2.1　マウス

6－10週齢、雌のC57BL/6マウス、肥満細胞欠損マウス（WBB6F1-W/Wv）を用いた。

2.2　皮膚バリア機能回復能の検証

5日前に剃毛した腹部皮膚に4－5回のテープストリッピングを行い、皮膚バリア機能を破壊し、その回復過程を経表皮水分喪失 (TEWL) を指標に皮膚バリア機能回復率として評価した。TEWLはTewameter® TM210, Courage & Khazawa, Germany) を用いて測定した。バリア破壊はTEWL 50－70 g/m^2/hを目安に調節し、バリア破壊前、破壊直後、3時間後、6時間後のTEWLを測定した。回復率を以下の方法で計算し、Barrier recovery（%）として表記した：1－（バリア破壊3時間後もしくは6時間後のTEWL－バリア破壊直前のTEWL）／（バリア破壊直後のTEWL－バリア破壊直前のTEWL）。

2.3　ストレス負荷

既に確立されている方法である新しいケージへの移入と過密飼育環境によるストレス負荷を行った[2)]。通常4匹／ケージで飼育するが、新しいケージに8匹ずつ入れ、皮膚バリア機能回復能の評価直前12時間の過密環境負荷を行った。対照群は5日前に新しいケージに移し、4匹／ケージで飼育しているマウスを用いた。

2.4　機能的除神経

ストレス負荷をかける2週間前にカプサイシン（50 mg/kg、2日間）を皮下投与した。実験終了後に、マウス耳介にカプサイシンを外用し、耳介腫脹の有無により除神経を確認した。

2.5　Th2 サイトカイン中和抗体の投与

皮膚バリア破壊30分前に、IL-4, IL-13の中和抗体（各833 ng in 50 μl/site, R&D Systems）を皮内注射した。

2.6　ストレスメディエーターの投与

ストレスメディエーターとして知られている、サブスタンスP（100 nmol/site、ペプチド研究所）とcorticotropin-releasing factor（CRF：0.05 ml of 10 μM, Sigma）を皮膚バリア破壊直後に皮内注射し、皮膚バリア機能の回復過程への影響を観察した。CRFの機能評価のために、Evan blue

＊ Effect of psychological stress and neuropeptides on cutaneous permeability barrier function
Kazumoto Katagiri*[1,2], Yutaka Hatano[1], Rieko Kurahashi[1]
Department of Dermatology, Faculty of Medicine, Oita University[1]
Department of Dermatology, Dokkyo Medical University Koshigaya Hosipital[2]

を静脈内投与し、CRFを耳介皮内に投与し、30分後の耳介皮膚へのEvans blueの漏出を吸光度計で測定した。

3．結　果

3. 1　急性ストレスによる皮膚バリア機能回復障害

ストレス負荷により、3時間後（Fig. 1）および6時間後の皮膚バリア機能の回復が障害された。

3. 2　機能的除神経による急性ストレスによる皮膚バリア機能回復障害の阻止

機能的除神経を誘導されたマウスでは、急性ストレスによる皮膚バリア機能回復障害が観察されなかった。また、正常マウスと比べて、皮膚バリア機能回復が促進されていた（Fig. 1）。

3. 3　Th2 サイトカイン中和抗体の影響

Th2サイトカイン中和抗体のバリア破壊30分前の投与により、急性ストレスによる皮膚バリア機能回復障害作用はわずかに阻害される傾向にあったが、有意な阻害効果ではなかった（Fig. 2）。

3. 4　ストレスメディエーターによる皮膚バリア機能回復障害

サブスタンスPの皮内投与により、3時間後、6時間後の皮膚バリア機能回復障害が誘導され、Th2サイトカインの中和抗体の前投与で、その効果は阻止されたが（Fig. 3）、CRFの投与は皮膚バリア機能回復に影響を及ぼさなかった（Fig. 4）。CRFの機能を評価するために行ったEvans blueの漏出実験では、CRF投与により有意な色素の漏出があり、CRFは機能的に作用し、肥満細胞の脱顆粒などを誘導し、血管透過性を亢進していることが確認された。

3. 5　肥満細胞欠損マウスでのサブスタンス P による皮膚バリア機能回復への影響

肥満細胞欠損マウスではサブスタンスPによる皮膚バリア機能回復阻害効果が観察されなかった。

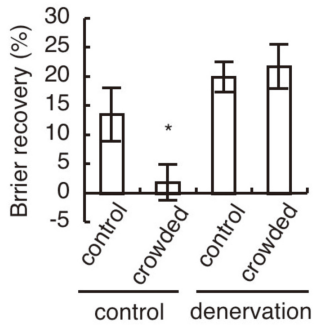


Fig. 1　Acute stress inhibits the recovery of barrier function via activation of peripheral nerves.
Stress was induced by transfer of mice to a new cage and keeping them with a crowded condition for 12 h. Denervation was achieved by systemic administration of capsaicin 14 days before barrier disruption and abolished the inhibitory effect of the stress on barrier recovery. Data was subjected to analysis by Student's *t*-test. *P<0.05

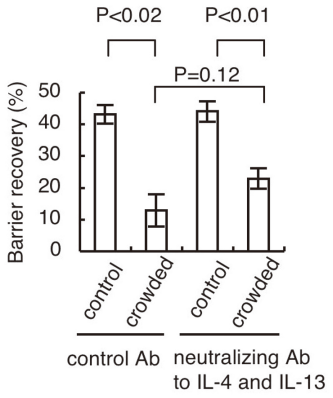


Fig. 2　Pretreatment with neutralizing antibodies to Th2 cytokine did not fully abolish the inhibitory effect of the stress on barrier recovery.

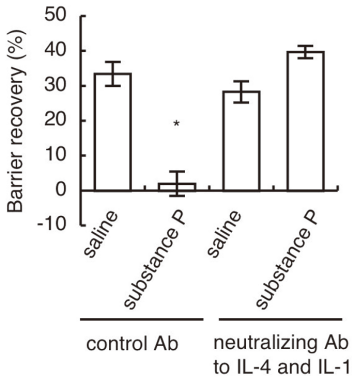


Fig. 3　Intradermal administration of substance P inhibited the recovery of barrier function via induction of Th2 cytokine.

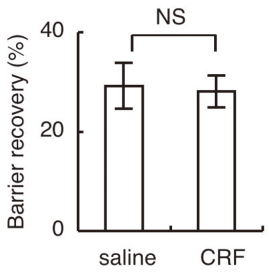


Fig. 4　Intradermal administration of corticotropin-releasing factor (CRF) did not affect the recovery of barrier function.
NS: not significant

4．考　察

ストレスによる皮膚バリア機能回復障害は、マウスやラットだけでなく、ヒトでも確認されている[8]。その際に対象となるストレスは、慢性ストレスであり、glucocorticoidsの受容体antagonistを用いた実験から、HPA axisの最終メディエーターであるglucocorticoidsが表皮細胞、脂質代謝に影響を及ぼし、皮膚バリア機能の回復障害を誘導すると考えられている[4]。今回の研究では、我々の見いだした「末梢神経を介したTh2サイトカイン誘導による皮膚バリア機能回復障害作用」が、ストレスによる皮膚バリア機能回復障害のメカニズムである可能性について検討した。

除神経を施したマウスではストレスによる皮膚バリア機能回復障害効果が消失したことから、急性ストレス負荷時には、末梢神経由来因子により皮膚バリア機能回復障害が誘導されることが明らかになった。ヒスタミン外用により末梢神経由来因子を介して誘導されるTh2サイトカインがストレス負荷時の最終メディエーターであることを想定していたが、Th2サイトカインの中和抗体を用いた今回の実験結果からは、その影響は部分的なものであると思われた。但し、今回の研究では、12時間のストレス負荷直後に中和抗体を投与しており、ストレス負荷におけるTh2サイトカインの役割を正確に検証するには、量的、時間的条件を再設定する必要があるものと思われる。

一方、ストレスメディエーターの直接的影響を検討したところ、サブスタンスPにはバリア機能回復障害効果があるが、CRFにはその効果が無いことが明らかとなった。サブスタンスPの効果は肥満細胞に依存し、Th2サイトカインの中和抗体で阻止された。CRFが肥満細胞の脱顆粒を誘導することが知られており、Evans blueを用いてCRFの機能を検証したところ、CRFが有効に機能していることが明らかとなった。これらは、ストレスメディエーターの種類によって肥満細胞への作用が異なることを示唆する非常に興味深い結果である。

我々が用いた12時間の環境変化によるストレスは、従来、皮膚バリア機能回復障害を誘導するために用いられた方法（24時間から14日間）[2, 3, 9]と比較すると時間的には短いものの、拘束ストレスなどのような数時間で誘導される急性ストレスとは異なり、慢性ストレスの要素も含まれている。しかし、逆に、慢性ストレスによるglucocorticoidsを介した表皮細胞を標的とした影響が十分発揮されるには不十分な時間とも言える。急性ストレスでは末梢神経からサブスタンスPが放出され、hair cycleなどに影響を及ぼすことが報告されているが[6]、皮膚バリア機能へ及ぼす影響は不明であった。今後は、慢性ストレスにおける皮膚バリア機能障害における末梢神経由来因子の役割などを明らかにしていく必要がある。サブスタンスPは炎症や掻痒を増強させることも知られており、皮膚バリア機能回復障害の誘導能を考え合わせると、アトピー性皮膚炎治療の重要な標的分子であると思われる。

(References)

1）Saint-Mezard P, Chavagnac C, Bosset S et al, : Psychological stress exerts an adjuvant effect on skin dendritic cell functions in vivo, J. Immunol., 171, 4073-4080, 2003.

2）Denda M, Tsuchiya T, Elias PM et al, : Stress alters cutaneous permeability barrier homeostasis, Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 278, R367-372, 2000.

3）Choi EH, Brown BE, Crumrine D et al, : Mechanisms by which psychologic stress alters cutaneous permeability barrier homeostasis and stratum corneum integrity, J. Invest. Dermatol., 124, 587-595, 2005.

4）Choi EH, Demerjian M, Crumrine D et al, : Glucocorticoid blockade reverses psychological stress-induced abnormalities in epidermal structure and function, Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 291, R1657-1662, 2006.

5）Kawana S, Liang Z, Nagano M et al, : Role of substance P in stress-derived degranulation of dermal mast cells in mice, J. Dermatol. Sci., 42, 47-54, 2006.

6）Katayama M, Aoki E, Suzuki H et al, : Foot shock stress prolongs the telogen stage of the spontaneous hair cycle in a non-depilated mouse model, Exp. Dermatol., 16, 553-560, 2007.

7）Kurahashi R, Hatano Y, and Katagiri K, : IL-4 suppresses the recovery of cutaneous permeability barrier functions in vivo, J. Invest. Dermatol., 128, 1329-1331, 2008.

8）Garg A, Chren MM, Sands LP et al, : Psychological stress perturbs epidermal permeability barrier homeostasis: implications for the pathogenesis of stress-associated skin disorders, Arch. Dermatol., 137, 53-59, 2001.

9）Denda M, Tsuchiya T, Hosoi J et al, : Immobilization-induced and crowded environment-induced stress delay barrier recovery in murine skin, Br. J. Dermatol., 138, 780-785, 1998.

タンパク質分解酵素を応用した新しい皮膚代謝促進治療薬の開発

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻 生命医科学講座 口腔病態薬理学分野
筑波　隆幸

Cathepsin E is an endolysosomal aspartic proteinase predominantly expressed in immune related cells. In our previous study, cathepsin E-deficient mice displayed atopic dermatitis. In addition, macrophages derived from cathepsin E-deficient mice showed an accumulation of the lysosomal membrane sialoglycoproteins, LAMP-1 and LAMP-2, and, consequently, an elevation in lysosomal pH. However, the molecular mechanism by which cathepsin E deficiency causes atopic dermatitis remains unclear. In this report, we demonstrate that cathepsin E-deficient macrophages showed an increased reactive oxygen species production and up-regulation of oxidized peroxiredoxin-6, but decreased antioxidant glutathione. Moreover, cathepsin E-deficient macrophages displayed higher sensitivity to cell death by oxidative stress treated with H_2O_2 and paraquat. Higher-sensitivity of cathepsin E-deficient macrophages to infection with *Staphylococcus aureus* was observed. These results indicate that cathepsin E deficiency causes increased oxidative stress, suggesting that these abnormalities in cathepsin E-deficient cells are presumably involved in the abnormal host defense of these mice.

1．緒　言

アトピー性皮膚炎の有病率は年々増加してきており、現代社会において国民病といっても過言ではない。2001年および2002年に行われた厚生労働省の調査では、小学生の実に11％がアトピー性皮膚炎に罹患していると報告された。しかしながら、同疾患は遺伝的要因と環境的要因が複雑に影響するため、分子メカニズムは良く分かっていないのが現状である。

我々は、偶然にもアトピー性皮膚炎の発症にはプロテアーゼ（タンパク質分解酵素）であるカテプシンEが、アトピー性皮膚炎発症に関与している事を見出した[1,2]。カテプシンEは動物細胞に存在するアスパラギン酸プロテアーゼの一種であり、免疫担当細胞や皮膚上皮細胞など細胞特異的に存在する。我々はカテプシンEのノックアウトマウスを作製したところ、このマウスがアトピー性皮膚炎様症状を呈した[1]。すなわち、引っ掻き行動を繰り返し、顔面、頸部、背部にアトピー性皮膚炎様症状を呈するようになる。病理組織学的解析では、表皮の肥厚と皮下組織への細胞浸潤が認められた。さらに、血清学的解析でも高好酸球血症と高IgE血症が認められた。

この分子メカニズムを解明するために、我々は野生型およびカテプシンEのノックアウトマウス由来のマクロファージを使って比較解析を行ったところ、リソソーム膜タンパク質の蓄積が起こっている事を見出した[3,4]。さらに最近、カテプシンEのノックアウトマクロファージでは酸化ストレスの上昇している可能性を示唆するデータを得た。そこで本研究では、カテプシンEをターゲットにした創薬研究に応用するため、マウスおよびマクロファージで酸化ストレスが関与しているのかどうかの基礎的研究を行った。

Development of a novel therapeutic application for allergic skin diseases using intracellular proteases
Takayuki Tsukuba
Department of Dental Pharmacology, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University

2．実　験

2．1　マウス

カテプシンEのノックアウトマウスはスピードコンジェニックによりC57BL/6に99.5％以上遺伝的背景が同じマウスを用いた[1～4]。また野生型マウスはC57BL/6マウスを用いた。

2．2　腹腔マクロファージの調製

実験には８～12週齢のマウスを4.0％のチオグリコレートを腹腔内投与した方法[3]を用いた。投与３．５日後に赤血球溶解バッファーで腹腔内を洗浄しながらマクロファージを採取した。採取後、10％牛胎児血清、100U/mLペニシリンおよび100μg/mLストレプトマイシン含有RPMI-1640培地にて37℃で培養した。

2．3　二次元電気泳動法

二次元電気泳動法は以前報告した方法で行った[3]。簡単に述べると、細胞抽出液をIPGストリプスに掛け、マルチフォアーIIを用いて等電点電気泳動を行った。その後、ストリプスを15分間 6 M urea, 30% glycerol, 1 % SDS, and 64 mM dithiothreitol 含有50 mM Tris-HClバッファー, pH8.8で平衡化した後、更に135mM iodoacetamideを含む同バッファーに15分間浸漬した。その後、10％ SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。泳動後、銀染色でタンパク質を染色した。切り出されたタンパク質はマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析

機（島津製作所製）で解析した。タンパク質の同定にはマスコットサーチエンジン（マトリクスサイエンス社製）を用いて行った。

3．結　果

3．1　二次元電気泳動の解析による変動するタンパク質の同定

我々は野生型およびカテプシンEのノックアウトマウス由来のマクロファージにおける細胞内のタンパク質を比較する目的で、両細胞の抽出液について２次元電気泳動を行った。図１に示すように、野生型に比べてカテプシンEノックアウトマクロファージでは約38kDaのタンパク質のスポットが増加していた。さらに約31kDaのタンパク質に関して、酸性側のスポットが増加していたが塩基性側のスポットが消失していた（図１A）。これらのタンパク質に関してプロテオーム解析を行ったところ、それらのN末端アミノ酸配列から38kDaのタンパク質はアネキシンA１であり、31kDaの増加、減少しているタンパク質は、両者共にペルオキシレドキシン－６であることが分かった（図１A）。

ペルオキシレドキシン－６は細胞内で抗酸化タンパク質として機能し、還元型と酸化型として存在することが知られている。そこで、同定されたタンパク質が還元型および酸化型のペルオキシレドキシン－６である事を精査するため、マクロファージに過酸化水素（25μM）を37℃、20時間マクロファージを培養して、細胞抽出液を２次元電気泳動で比較した。両タンパク質スポットを比較すると、還元型ペルオキシレドキシン－６が酸化型へ移行している事が確認された（図１B）。以上の結果より、カテプシンEのノックアウトマクロファージでは、アネキシンA1と酸化型ペルオキシレドキシン－６が増加し、還元型ペルオキシレドキシン－６が減少している事が明らかになった。

3．2　酸化ストレス関連分子の解析

アネキシンA1はストレスタンパク質の一種として知られており、さらにペルオキシレドキシン－６は細胞内で抗酸化ストレスタンパク質として機能する。これらの事実から、カテプシンEノックアウトマクロファージは酸化ストレスを受けているために、これらのタンパク質が増加している可能性が考えられた。

そこで、酸化ストレスに関連する分子について解析を行った。細胞内のスーパーオキサイド（O^{2-}）、及び過酸化水素（H_2O_2）を定量すると、有意に野生型に比べカテプシンEノックアウトマクロファージで多量に存在した（図２AおよびB）。

他方、還元物質の量を定量した。細胞内に最も多量に存

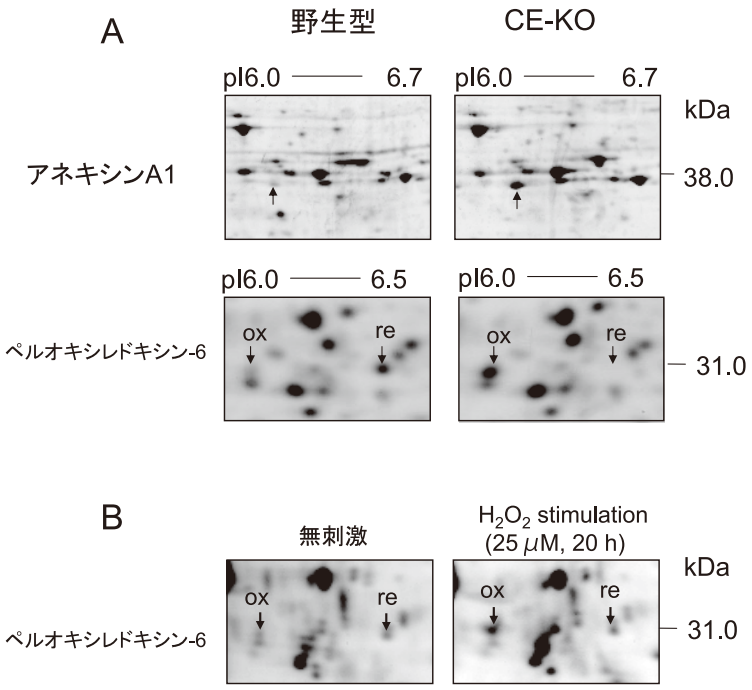


図１
A：野生型およびカテプシンEのノックアウトマウスマクロファージの２次元電気泳動像
（上段）カテプシンEのノックアウトマウスでアネキシンA1が増加している
（下段）カテプシンEのノックアウトマウスで還元型ペルオキシレドキシン－６が増加し、酸化型ペルオキシレドキシン－６が減少している。
B：野生型マクロファージの過酸化水素による変動

在する還元物質はグルタチオンである。そこで、還元型グルタチオン（GSH）を定量すると、逆にカテプシンEノックアウトマクロファージでは有意に減少している事が明らかになった（図2C）。

生体内でも酸化ストレスの影響が観察されるのかどうか、マウスの血清に関して検討した。過酸化水素（H_2O_2）を定量すると、野生型に比べカテプシンEノックアウトマウスで有意に多量に存在した（図2D）。これ等の結果より、生体及び細胞レベルにおいて、カテプシンEが欠損すると酸化ストレスが起こる事が示唆された。

3．3　　酸化ストレスによる細胞死の影響

もしカテプシンEノックアウトマクロファージにおいて、細胞内で酸化ストレスが上昇しているならば、同細胞は酸化ストレス刺激に対する感受性も上昇していることが考えられる。この事を確かめるために、野生型およびカテプシンEノックアウトマクロファージにおいて活性酸素種による刺激に対する細胞死の影響について検討した（図3）。両マクロファージに過酸化水素（H_2O_2）（0 ～ 200μM）とミトコンドリア依存性酸化ストレス誘導剤であるパラコート（0 ～ 2000μM）を加えた後、37℃ 24時間でインキュベーシ

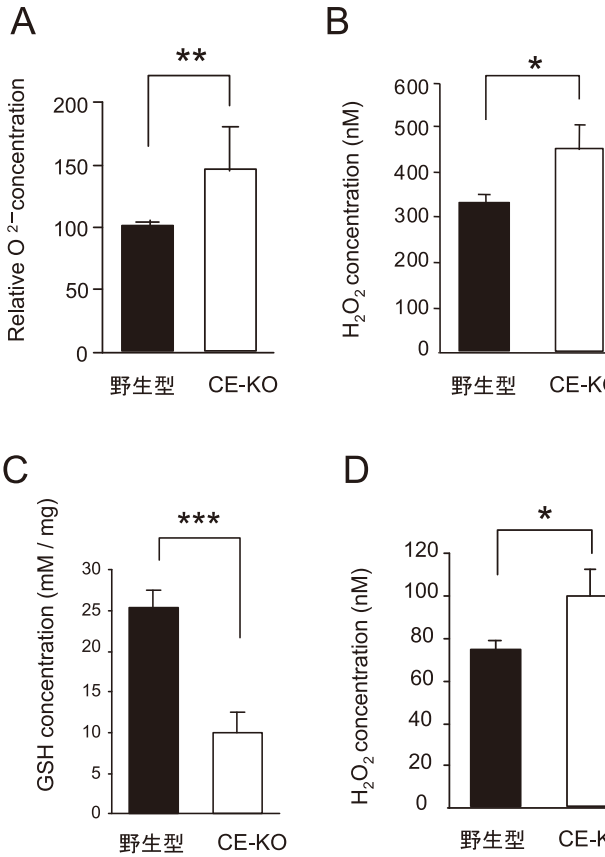


図2

A：野生型およびカテプシンEのノックアウトマウスマクロファージの細胞内スーパーオキサイド（O^{2-}）量。両マクロファージをザイモサン刺激後、ケミルミネッセンス反応で計測した。

B：野生型およびカテプシンEのノックアウトマウスマクロファージの過酸化水素（H_2O_2）量。両細胞を24時間培養後、Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kitで定量した。

C：野生型およびカテプシンEのノックアウトマウスマクロファージの還元型グルタチオン（GSH）量。マクロファージの細胞抽出液を合成基質DTNBと反応後、吸光度420nmで測定し、算出した。

D：野生型およびカテプシンEのノックアウトマウスの血清中の過酸化水素（H_2O_2）量。両マウス血清を24時間培養後、Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kitで定量した。

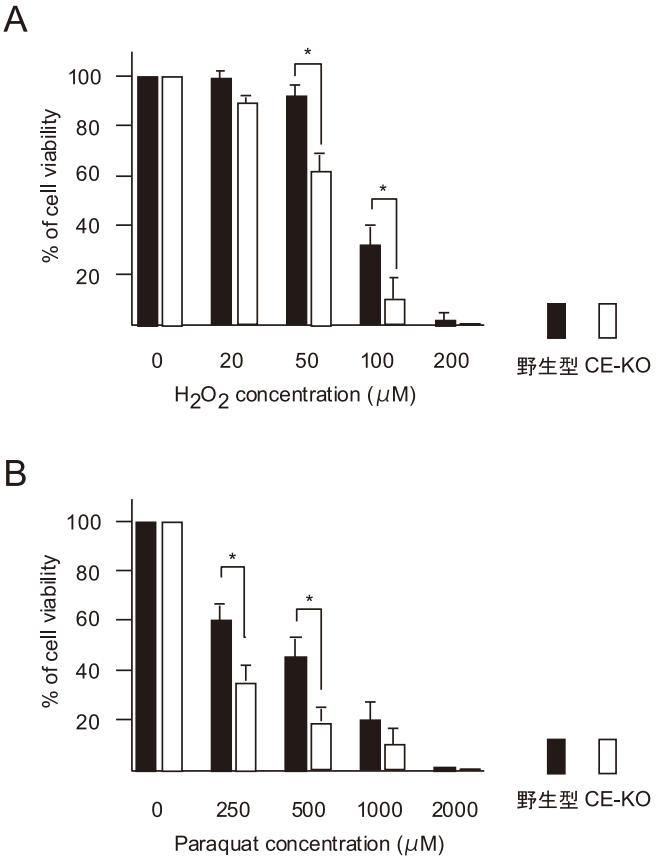


図3

A：野生型およびカテプシンEのノックアウトマウスマクロファージの過酸化水素による細胞生存率。　両マクロファージに過酸化水素（H_2O_2）（0 ～ 200μM）37℃、24時間でインキュベーションし、Cell counting kit-8を用いて細胞生存率を算定した。

B：野生型およびカテプシンEのノックアウトマウスマクロファージのパラコートによる細胞生存率。　両マクロファージにミトコンドリア依存性酸化ストレス誘導剤であるパラコート（0 ～ 2000μM）を37℃、24時間でインキュベーションし、Cell counting kit-8を用いて細胞生存率を算定した。

ョンし、Cell counting kit-8（同仁化学）を用いて細胞生存率を算定した（図3 A及びB）。野生型に比べ、カテプシンEノックアウトマクロファージは、過酸化水素50および100 μMで、パラコートは250および500μMの濃度で統計学的に有意に高い細胞死を起こす事が分かった。従って、カテプシンEノックアウトマクロファージは、酸化ストレスに対して高い感受性を持つ事が示され、細胞内酸化ストレスを受けている事がこの実験でも確認された。

3．4　黄色ブドウ球菌による細胞死の影響

アトピー性皮膚炎患者は黄色ブドウ球菌に対する感受性が高いため、皮膚炎が起こる事が知られている。そこでカテプシンEノックアウトマクロファージが野生型に比べて細胞死を起こしやすいのか否かについて検討を行った。マクロファージと黄色ブドウ球菌の比率を１：100で37℃30分間貪食させた後、１～４時間インキュベーションし、Cell counting kit-8を用いて細胞生存率を算定した（図4）。処理後４時間の野生型のマクロファージが80％以上生存していたのに対して、カテプシンE欠損マクロファージでは生存率が有意に減少しており、65％しか生存していなかった。これらの結果から、カテプシンEノックアウトマクロファージは、黄色ブドウ球菌感染による生存率も減少している事が分かった。

4．考　察

本研究では、免疫担当細胞であるマクロファージを用いて、野生型およびカテプシンEのノックアウトマウスの細胞内のタンパク質を比較した。変動する分子として同定したのは、アネキシンA1とペルオキシレドキシンー６であり、特に後者に関しては酸化型が増加し、還元型が減少していた。従って、カテプシンEノックアウトマクロファージは酸化ストレスを受けている可能性が推測された。事実、カテプシンEノックアウトマクロファージでは活性酸素種であるスーパーオキサイド（O^{2-}）、及び過酸化水素（H_2O_2）が有意に増加し、逆に還元物質であるグルタチオンは有意に減少していた。また、酸化ストレス刺激である過酸化水素とパラコート処理を行ったところ、カテプシンEノックアウトマクロファージはいずれも低濃度で細胞死を起こした。また、アトピー性皮膚炎発症の原因菌の1つである黄色ブドウ球菌に対して、カテプシンEノックアウトマクロファージは低濃度で細胞死を起こした。このような結果から、カテプシンEノックアウトマクロファージは、酸化ストレスを受けているために様々な異常を惹起していると考えられる。

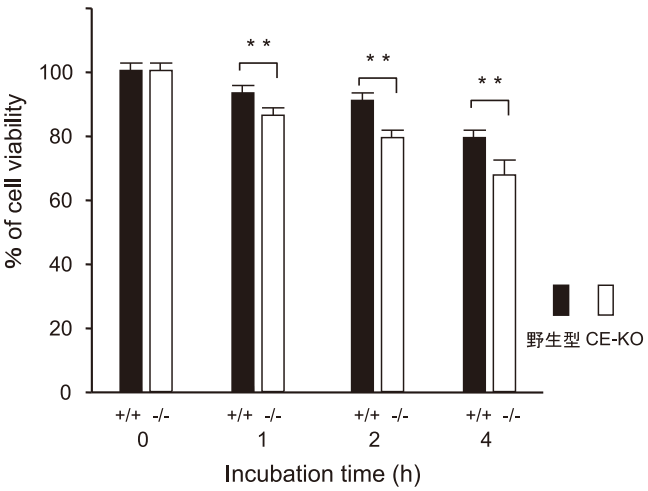


図４　野生型およびカテプシンＥのノックアウトマウスマクロファージの黄色ブドウ球菌取り込み後の細胞生存率。　両マクロファージと黄色ブドウ球菌の比率を１：100 で 37℃、30 分間貪食させた後、１～４時間インキュベーションし、Cell counting kit-8 を用いて細胞生存率を算定した。

では、なぜカテプシンE欠損が酸化ストレスを引き起こすのであろうか。我々は、酸化ストレスの直接的原因の１つとして、カテプシンEノックアウトマクロファージでは、オートファジー不全とそれに伴うミトコンドリアの代謝不全を起こしている事を見出している。オートファジーは生体内の不要なタンパク質をリソソーム系で分解する生理反応であり、古くなったミトコンドリア等のオルガネラは、このメカニズムで除去される。従って、カテプシンE欠損により、リソソーム分解能が低下し、そのためにオートファジーによる古くなったミトコンドリアが除去されないために、酸化ストレスが上昇している可能性が高い。

一方、カテプシンEノックアウトマウス由来の血清中でも過酸化水素レベルが上昇していた事から、個体レベルでも酸化ストレスが上昇している可能性が示唆された（図２D）。興味深い事に、酸化ストレスの上昇とアトピー性皮膚炎の発症には、相関関係があることは多くの研究で示唆されている（総説参照５）。従って、本研究で示したように、カテプシンE欠損が、酸化ストレスの上昇をもたらし、酸化ストレスの上昇がアトピー性皮膚炎の発症の原因となっている可能性が高いと考えられる。

5．総　括

カテプシンEの欠損により、細胞レベルでの酸化ストレスの上昇が認められた。この酸化ストレスは個体レベルでも同様に認められる事から、酸化ストレスの上昇が、アトピー性皮膚炎の発症と関連するのではないかと考えられる。本研究で得た知見が、今後アトピー性皮膚炎治療薬への分子基盤になる事を期待したい。

（参考文献）

1）Tsukuba T, Okamoto K, Okamoto Y, et al: Association of cathepsin E deficiency with development of atopic dermatitis. J. Biochem. 134, 893-902, 2003

2）Tsukuba T, Yamamoto S, Yanagawa M, et al : Cathepsin E-deficient mice show increased susceptibility to bacterial infection associated with the decreased expression of multiple cell surface Toll-like receptors. J. Biochem. 140, 57-66, 2006

3）Yanagawa M*. Tsukuba T*. Nishioku T, et al: Cathepsin E deficiency induces a novel form of lysosomal storage disorder in macrophages showing the accumulation of lysosomal membrane sialoglycoproteins and the elevation of lysosomal pH. J. Biol Chem. 282, 1851-1862, 2007 *Both authors contributed equally to this work

4）Kakehashi H, Nishioku T, Tsukuba T, et al : Differential regulation of the nature and functions of dendritic cells and macrophages by cathepsin E. J. Immunol. 179, 5728-5737, 2007.

5）Okayama Y: Oxidative stress in allergic and inflammatory skin diseases. Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 4, 517-519. 2005 (Review)

ヒトはいかにして化粧品にかぶれるのか
一次刺激性皮膚炎を伴わない接触皮膚炎モデルの作成

東北大学大学院医学系研究科皮膚科学講座
相場　節也

To investigate the role of platelets in the process of sensitization of allergic contact dermatitis, we first examined that hapten stimulates CD40 ligand release from platelets in vitro. When platelets obtained from healthy volunteers were stimulated with a representative hapten, DNCB and one of danger signals, ATP, they significantly released CD40L in a dose-dependent fashion. Next, we examined using DNA microarray how ATP, which is released from platelets by various stimuli, e.g., thrombin, collagen, von Willebrandfactor, ADP, vasopressin, platelet-activating factor, and Ca^{2+} ionophores affects immune response by keratinocytes. We identified several immune-related genes whose expression is augmented in ATP-stimulated human keratinocytes by DNA microarray. The statistical analysis of the microarray data revealed that, besides IL-6, the expression of several novel genes such as IL-20, CXCL1-3, and ATF3 was significantly augmented in ATP-stimulated keratinocytes. These data were validated by quantitative real-time RT-PCR. We also confirmed the augmented production of IL-6, IL-20, CXCL1 by ELISA and that of ATF3 by Western blotting. These studies characterized (1) production of IL-6 and IL-20, (2) chemotaxis for neutrophils via CXCL1-3, and (3) ATF3 activation as possible roles of ATP-stimulated keratinocytes. Finally, we demonstrated the presence of extracellular ATP in the sensitization phase of allergic contact dermatitis in vivo by using agarose beads coupled with lucifearase. These studies suggest that platelets may play a crucial role in sensitization of allergic contact dermatitis and that platelets may surrogate the role of irritant dermatitis in sensitization.

1．緒　言

化粧品開発においては、化粧品による接触皮膚炎をいかに防止するかは永遠のテーマであり、したがって、アレルギー性接触皮膚炎のメカニズムの解明は、化粧品の安全性を担保するうえで不可欠な課題である。現在、接触皮膚炎は、実験動物を用いた多くの研究により、感作相と惹起相に分けられること、そして、感作相における強い一次刺激性皮膚炎の存在が惹起相における免疫反応の誘導に必須であることが明らかにされている。しかし、ヒトの接触皮膚炎においては、患者のほとんどは、発症前に、このような強力な一次刺激性皮膚炎の存在を自覚していない。また、現実的に、一次刺激性皮膚炎を惹起するような化粧品が市場に広く流通することも考えにくい。これらの事実は、ヒトの接触皮膚炎の感作過程においては、マウス接触皮膚炎モデルとは全くことなった機序が存在していることを示唆しているように思われる。

近年、ノックアウトマウスを用いて接触皮膚炎の解析が多数試みられ、接触皮膚炎感作に必要な分子が次々と明らかにされてきている。そのなかで、Moodycliffeら[1]は、マウス接触皮膚炎感作には、CD40Lの存在が不可欠であることを報告した。CD40Lは、以前から活性化Ｔ細胞に発現することがよく知られていた分子であるが、近年、活性化された血小板がCD40Lを放出すること、また、CD40Lのノックアウトマウスで抗体産生などの免疫反応が著明に抑制されること、さらには、このマウスにCD40Ｌを有するマウス由来の活性化血小板を移入するのみで免疫反応を回復させることができるなどの報告が相次いだ[2]。

血小板が、様々な機械的、化学的刺激により活性化することを考えると、ヒトにおける接触皮膚炎の成立にも血小板が何らかの役割をはたしている可能性が推測される。また、血小板が種々の刺激により細胞外に放出するCD40LやATPは、樹状細胞のCD40やATP受容体に作用して樹状細胞を活性化させることが知られている。そこで、本研究においては、血小板をハプテンにて刺激した際にCD40Lが遊離されるか否か、また、細胞外のATPが表皮角化細胞にどのような影響を与えるかを検討した。最後に、ハプテン塗布によりマウス皮膚においてATPが実際に遊離されるか否かも検証した。

2．実験方法

1）血小板の分離

健常人ボランティアよりヘパリン採血した末梢血を素早く等量のPBSで稀釈し22℃、800ｇ ５分間遠心することにより濃縮された血小板を含む分画を作成した。それを１％FCSを含むPBSで洗浄後10％ FCS添加RPMI-1640培地に浮遊させ以下の実験に用いた。

How do cosmetics sensitize humans? Analysis of a possible role of platelets.
Setsuya Aiba
Department of Dermatology, Tohoku University Graduate School of Medicine

2）血小板からの CD40L 放出

血小板からのCD40Lの放出は、種々の濃度の異なった化学物質で24時間刺激後に培養上清を回収し、上清中のCD40Lを市販のCD40Lに対するELISA kitを用いて定量した。

3）ヒト表皮細胞培養及び培養条件

ヒト正常表皮細胞NHEKsはKurabo（Osaka, Japan）より購入した新生児包皮細胞を使用した。NHEKsの培養は75 cm^2フラスコを用い、表皮角化細胞増殖用培地（HuMedia-KG2；Kurabo）を用いて5％ CO_2、37℃飽和水蒸気圧下で行った。実験には第三継代の細胞を使用した。また、実験を行うにあたり、HuMedia-KG2に含まれるハイドロコーチゾンはNHEKsにおける免疫修飾活性に影響を与えることが知られていることから、これを避けるために実験を行う24時間前にハイドロコーチゾンのみを除いたHuMedia-KG2に置換した。

4）RNA 抽出

培養細胞からのTotal RNAの分離および抽出はRNeasy Mini kit（Qiagen, Santa Clarita, CA）を用いて行った。操作手順についてはメーカーから供与されたプロトコールに従い、抽出したTotal RNAはOD260により定量した。また、Total RNAはRNA6000 Nano KitおよびAgilent 2100 bioanalyzer（Agilent Technologies, Santa Clara, CA）を用いて、純度ならびにRNA Integrity Number（RIN）の測定を行った。

5）DNA マイクロアレイ解析

DNAマイクロアレイは一色法を用いて、以下のように行った。なお、DNAマイクロアレイに用いるTotal RNAは、コントロールまたはATP（100μM）刺激1時間後のものを使用した。また、抽出・精製したTotal RNAを用いた二本鎖cDNA合成およびCyanine-3（Cy3）標識cRNA合成にはCyanine-3 using Quick Kit（Agilent Technologies）を使用した。DNAマイクロアレイは常法にのっとりマイクロアレイスライド(44K Whole Human Genome*; Agilent technologies）を用いて行った。また、データの解析は、GeneSpring GX 7.3.1（Agilent technologies）を用いて行い、さらに結果の生物学的解釈には、Gene Ontology（http://www.geneontology.org/）を用いた。

6）定量 RT-PCR

DNAマイクロアレイの結果は、定量的real-time PCRにより確認した。

以下に使用した各プライマーおよびTaqMan probeを示す。

Specific primers used for the quantitative RT-PCR

Transcript	Forward primer	Reverse primer
IL-6	5'-GGTACATCCTCGACGGCATC-3'	5'-GCCTCTTTGCTGCTTTCACAC-3'
IL-20	5'-TTCTGCAATGGATGGAGGAG-3'	5'-TGAAGACTGGAGCTCTTGACCTCG-3'
CXCL1	5'-AAGGAGGCCCTGCCCTTATAG-3'	5'-ATTAGGCACAATCCAGGTGGC-3'
CXCL2	5'-GGTTTGCAGATATTCTCTAGTCATTTG-3'	5'-TGGATTCCTCAGCCTCTATCAC-3'
CXCL3	5'-ATTATCTCACATTATGTGTTCAAC-3'	5'-ATTAAACAAGGCATTATGCCC-3'
ATF3	5'-GGAAGAGCTGAGGTTTGCCA-3'	5'-TGACTGATTCCAGCGCAGAG-3'
GAPDH	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'

TaqMan probes used for the quantitative RT-PCR

Transcript	TaqMan probe
IL-6	5'-(FAM)-CAGCCCTGAGAAAGGAGACATGTAACAAGA-(TAMRA)-3'
IL-20	5'-(FAM)-AATAGGAGGAAAGTGATGCTGCTGCTAAGA-(TAMRA)-3'
CXCL1	5'-(FAM)-ACAGAAGAGGAAAGAGAGACACAGCTGCA-(TAMRA)-3'
CXCL2	5'-(FAM)-TCTTCGTGATGACATATCACATGTCAGCCA-(TAMRA)-3'
CXCL3	5'-(FAM)-GCTGAAGTTTCCCTTAGACATTTTATGTCT-(TAMRA)-3'
ATF3	5'-(FAM)-AGAACAAGCACCTCTGCCACCGGA-(TAMRA)-3'
GAPDH	5'-(FAM)-TGGCAAATTCCATGGCACCGTCA-(TAMRA)-3'

7）ELISA

細胞上清中のサイトカインの定量（IL-6、IL-20およびCXCL1）は、市販のELISA kitを用いてメーカーから供与されたプロトコールに基づき行った。

8）タンパク質調製とウエスタンブロット解析

NHEKsを1 mM バナジウム酸塩（Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan）を含む氷冷phosphate buffered saline（PBS）にて二回洗浄後、細胞可溶化液（0.5 M Tris-HCl pH6.8）、10％ SDS、20％ グリセロール、1× プロテアーゼインヒビターカクテル（Complete, Mini; Roche, Basel, Switzerland）、0.2％ ブロモフェノールブルー）を添加し、スクレイパーにて細胞を可溶化した。その後、BCA protein assay（Thermo Scientific, Rockford, IL）を用いてタンパク量を定量した。調製したタンパク質を10－20％ ポリアクリルアミドゲル（ATTO, Tokyo, Japan）にて泳動し、次に、polyvinylidene difluoride（PVDF）膜に転写した。Western blottingは、一次抗体にphospho-tyr705-STAT3 antibody、total STAT3 antibody（Cell Signaling Technology）、Anti-ATF3（ATLAS, Stockholm, Sweden）、およびAnti-β-Actin (mouse) (Sigma-Aldrich) 抗体、2次抗体にAnti-rabbit IgG, HRP-linked AntibodyまたはAnti-mouse HRP-linked Antibody（Cell Signaling Technology）を用い基質にLumiGLO^R chemiluminescent reagent（Cell Signaling Technology）を加えて化学発光にて検出した。

9）統計解析

DNAマイクロアレイを除く各実験で得られたデータは、mean±S.E.M.で表した。また、二群間の統計解析に基づく差異は、Student's *t*-test（両側）によって決定した。二群間以上、すなわち多群間における統計解析における差異は、Dunnet's multiple comparison testによって決定した。また、$P<0.05$は統計学的に有意であると見なした。

10）in vivo ATP imaging

細胞外に放出されたATPをin vivoで確認する目的で、私たちはEluc ルシフェラーゼをアガロースに固相化したビーズを作成した。これをあらかじめルシフェフェリンを腹腔内投与したマウス皮下に投与することにより投与部位周囲に存在するATPをIVIS 100（Zenogen）を用いてimagingすることが可能となった。

3．結果と考察

1）血小板からの CD40L の放出

血小板を 1×10^8/mlに浮遊し、それに10μM, 30μM, 100μMのDNCB、100μM, 300μM, 1000μMの$NiCl_2$、100μM, 300μM, 1000μMのATPを加えて24時間培養し、培養上清中のCD40Lの存在をELISAにて検討した。その結果、図1のようにDNCBとATP刺激において血小板から未刺激対照と比較して明らかに有意なCD40Lの放出が認められた。

CD40Lによる樹状細胞の活性化は、IL-12の産生増加とT細胞刺激活性の増強効果を伴っており接触皮膚炎の誘導に重要な役割を果たしていることが推測される[3)]。

2）DNA マイクロアレイを用いた ATP 処理 NHEKs における遺伝子変動解析

次に、細胞外ATPの皮膚免疫における役割の解明を目的として、ATP（100μM）で1時間刺激、または未処理のNHEKsにおけるDNAマイクロアレイ解析を行った。なお、発現変動の認められた遺伝子の絞り込みは、図2に示したストラテジーにて行った。

まず、同じ実験を3回繰り返し行い、mRNA発現量の平均値が未処理群と比較して2倍以上増加した遺伝子336個

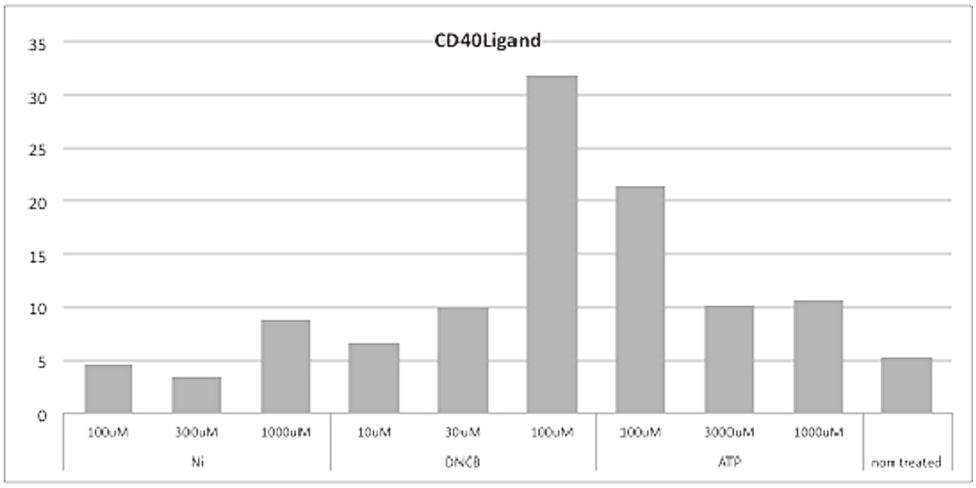


図1　ハプテン、ATP 刺激血小板からの CD40L の放出

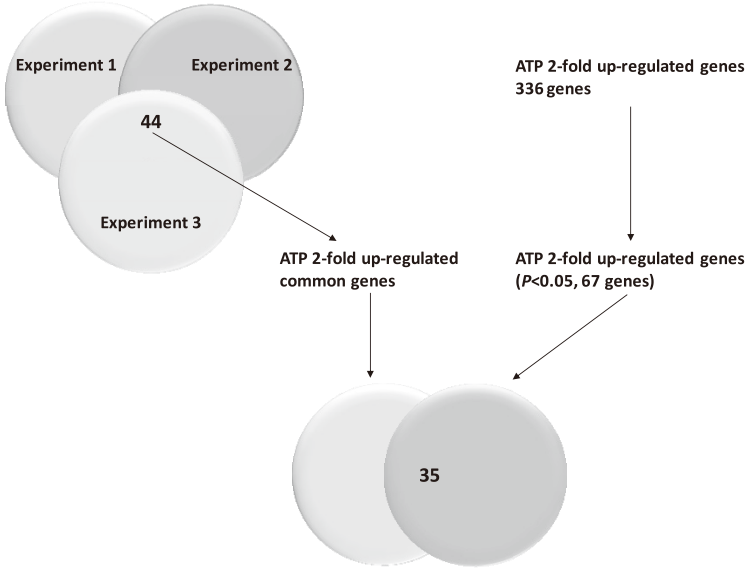


図2　ATP 処理 NHEKs で変動する遺伝子の同定アルゴリズム

を選択した。次に、これらに対してPaired Student's *t*-testを行い、有意差（$P<0.05$）の認められた遺伝子67個を抽出した。一方、3回の実験全てに共通して未処理群の2倍以上発現が増加した遺伝子44個を抽出し、これらと先の67個のうち、共通する遺伝子35個を抽出した。3回いずれの実験においても2倍以上発現が増加し、かつ有意差（$P<0.05$）の認められた合計35個の遺伝子リストをTable 1にまとめた。これら35個の遺伝子につき、Gene Ontology（GO）データベース（http://www.geneontology.org/）を用いて、遺伝子の機能を分類した。各GO termにおいて選定された遺伝子は、Fischer's exact testによる統計解析を行って有意差（$P<0.05$）の認められたもの、すなわち、各GO termに分類される遺伝子群の存在が偶然ではないと判断されたものとした。

その結果、inflammatory response（GO: 6954）、immune response（GO: 6955）およびdefense response（GO: 6952）など、免疫応答に関与する遺伝子がATP刺激により上昇することが判明した（表2）。そればかりか、これらのGO termに含まれる遺伝子として、既に報告のある*IL-6*をはじめ[4, 5]、新たに*IL-20*、*CXCL1*、*CXCL2*、*CXCL3*、*GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle*（*GEM*）、ならびに*V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homologue*（*V-fos*）などの免疫応答因子が誘導されることを見出した（表3）。

さらに、同定された35個の遺伝子群の中に、cAMP response element binding protein（CREB）/ATFファミリーに属するATF3が認められた。本遺伝子は、Table 2においてはGO: 50794、50789、31323、19219、6350に含まれ、幅広い機能を有する転写活性因子の一つであり、ストレスに応答して誘導されることが広く知られている[6, 7]。2007年、Gilchristら[8]によるシステム生物学的手法を用いた解析により、本転写因子はToll様受容体4（TLR4）を介して活

表1　ATP刺激表皮細胞で変動した遺伝子リスト

Description	Gene Symbol	Genbank	Ratio Average	*P*-value
Nuclear receptor subfamily 4A3	NR4A3	NM_173198	52.440	0.01
Nuclear receptor subfamily 4A1	NR4A1	NM_002135	49.328	0.00377
Interleukin 6 (interferon, beta 2)	IL6	NM_000600	31.527	0.00293
Nuclear receptor subfamily 4A2	NR4A2	NM_006186	18.561	0.0107
FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	FOSB	NM_006732	14.454	0.0224
Activating transcription factor 3	ATF3	NM_004024	12.071	0.00327
Dual specificity phosphatase 1	DUSP1	NM_004417	10.902	0.00168
	BG950086	BG950086	6.941	0.0125
Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	CXCL3	NM_002090	5.880	0.0094
Regulator of G-protein signalling 2, 24kDa	RGS2	NM_002923	5.395	0.00537
V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	FOS	NM_005252	4.709	0.0308
CDNA clone IMAGE:4689481	BC022398	BC022398	4.679	0.00173
Forkhead box A1	FOXA1	NM_004496	4.664	0.0199
Interleukin 20	IL20	NM_018724	4.656	0.0472
Serum/glucocorticoid regulated kinase	SGK	NM_005627	4.557	0.0403
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	MAP3K8	NM_005204	4.511	0.000538
Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	CXCL2	NM_002089	4.481	0.00044
SNF1-like kinase	SNF1LK	NM_173354	4.072	0.0435
Neural precursor cell expressed	NEDD9	NM_006403	3.495	0.00124
Hypothetical gene	LOC400573	BC063383	3.296	0.000304
Cbp/p300-interacting transactivator	CITED2	NM_006079	3.111	8.54E-05
CDNA clone IMAGE:4557810	AK131023	AK131023	3.030	0.00114
Hyaluronan and proteoglycan link protein 4	HAPLN4	NM_023002	3.024	0.0123
Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	CXCL1	NM_001511	2.944	0.00492
ATG9 autophagy related 9 homolog B	NOS3AS	NM_173681	2.857	0.0103
TSC22 domain family, member 1	TSC22D1	NM_183422	2.799	0.000213
keratin pseudogene	LOC339240	NR_001443	2.782	0.0127
Endothelin 1	EDN1	NM_001955	2.712	2.31E-07
AF079535 3-phosphoinositide dependent protein kinase-1	THC2338704		2.662	0.0126
Q9L015 (Q9L015) KHG/KDPG aldolase	THC2376764		2.498	0.0409
GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle	GEM	NM_005261	2.475	0.00141
	Unknown		2.463	0.000133
Rho family GTPase 3	RND3	NM_005168	2.453	0.00319
	Unknown		2.372	0.0437
Mov10l1, Moloney leukemia virus 10-like 1	MOV10L1	NM_018995	2.351	0.0495

表２　ATP 刺激表皮細胞で発現が変動した遺伝子の Gene Ontology 解析

GO term	Genes in the Category	*p* -value
GO:7582: physiological process	22	0.040000
GO:50794: regulation of cellular process	16	0.000030
GO:50789: regulation of biological process	16	0.000086
GO:51244: regulation of cellular physiological process	15	0.000059
GO:50791: regulation of physiological process	15	0.000094
GO:7165: signal transduction	14	0.000040
GO:7154: cell communication	14	0.000533
GO:31323: regulation of cellular metabolism	12	0.000211
GO:19222: regulation of metabolism	12	0.000297
GO:7275: development	11	0.000489
GO:6950: response to stress	10	0.000002
GO:50896: response to stimulus	10	0.000986
GO:7166: cell surface receptor linked signal transduction	9	0.000115
GO:19219: regulation of nucleobase	9	0.008960
GO:50874: organismal physiological process	8	0.009560
GO:6355: regulation of transcription, DNA-dependent	8	0.017800
GO:6351: transcription, DNA-dependent	8	0.020400
GO:45449: regulation of transcription	8	0.025400
GO:6350: transcription	8	0.031800
GO:9613: response to pest, pathogen or parasite	7	0.000004
GO:43207: response to external biotic stimulus	7	0.000007
GO:9605: response to external stimulus	7	0.000098
GO:6955: immune response	7	0.000210
GO:6952: defense response	7	0.000373
GO:9607: response to biotic stimulus	7	0.000475
GO:7242: intracellular signaling cascade	7	0.003300
GO:43412: biopolymer modification	7	0.022000
GO:6954: inflammatory response	6	0.000001
GO:9611: response to wounding	6	0.000038
GO:7186: G-protein coupled receptor protein signaling pathway	6	0.000509
GO:7049: cell cycle	6	0.001910
GO:6793: phosphorus metabolism	6	0.002740
GO:6796: phosphate metabolism	6	0.002740
GO:48523: negative regulation of cellular process	6	0.004290
GO:48519: negative regulation of biological process	6	0.006230

表３　ATP 刺激 NHEKs で優位に発現が増加した免疫関連遺伝子

Description	Gene Symbol	Genbank	Ratio				*p* -value
			Exp 1	Exp 2	Exp 3	Average	
Interleukin 6	IL6	NM_000600	28.128	24.105	46.218	31.527	0.00293
Activating transcription factor 3	ATF3	NM_004024	15.966	12.907	8.534	12.071	0.00327
Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	CXCL3	NM_002090	3.811	7.122	7.491	5.880	0.0094
V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene	FOS	NM_005252	6.325	2.574	6.416	4.709	0.0308
Interleukin 20	IL20	NM_018724	3.005	3.505	9.585	4.656	0.0472
Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	CXCL2	NM_002089	3.637	4.646	5.324	4.481	0.0194
Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	CXCL1	NM_001511	2.249	3.246	3.497	2.944	0.00492
GTP binding protein	GEM	NM_005261	2.496	2.964	2.050	2.475	0.00141

（ohara H, et al. *J. Dermatol. Sci.*, **58**:143-151, 2010）

性化したマウスマクロファージにおいて、Rel（NF-κBの構成因子）と共にIL-6およびIL-12p40のプロモーター領域に結合することにより、これらの転写を抑制することが明らかにされた。この報告以来、TLRを介した免疫応答に対するATF3の機能解析が進展し、本転写因子がTLRを介した免疫応答において負の調節因子として振舞うことは、疑いようのないものになってきている[9, 10]。表皮細胞にはTLR2およびTLR4が発現しており[11, 12]、本受容体を介したサイトカインやケモカインの産生は、生体防御反応において重要な役割を担っているものと思われる。これらのことから、ATF3は、表皮細胞におけるTLR4を介するシグナルに対して同様に機能することが推察されたため、今後、本転写因子を免疫応答因子の一つとして扱うこととした。

また、今回ATP刺激により新たに発現が見出されたIL-20は、mRNAレベルで皮膚や気管に低レベルで発現していることが判っており、その機能としてIL-20を過剰発現させたトランスジェニックマウスは、表皮形成の異常により、出生後数日のうちに死に至るなどの現象から、皮膚の形態形成やその維持に重要な役割を担っていることが明らかとなっている[13]。また、本サイトカインはTNF-αなどの産生による免疫応答の惹起、さらにはIL-6と同様にチロシンキナーゼであるJanus kinase（JAK）を介したSTAT3のリン酸化により表皮増殖を促し、創傷治癒や皮膚の恒常性維持に貢献しているものと考えられる[13, 14]。一方、CXCL1、CXCL2およびCXCL3はそれぞれ白血球の動員作用を有しており、細胞や組織に傷害や炎症が起こると産生される。血管内の白血球は、細胞表面に発現する膜7回貫通Gタンパク共役型受容体であるCXCR2を介してケモカイン産生部位に集まり、血管内皮細胞層に接着する。次に、血管内皮細胞の間を通り抜け、血管外へと遊走した後、傷や炎症部位に到達して抗原を攻撃することにより、創傷治癒や免疫応答に重要な役割を果たす。さらに、血管内皮細胞にもCXCR2が発現しており、本受容体を介した血管新生が報告されている[15, 16]。一方、*GEM*と*V-fos*は免疫応答因子に分類されているものの、これらは様々なシグナル伝達に関与しており、かつ非常に多くの機能を発揮するため、本研究における解析対象として取り扱わないこととした。以上のように、今回、IL-6、IL-20、CXCL1、CXCL2、CXCL3およびATF3に着目し、研究を進めることとした。

2）DNAマイクロアレイ解析のmRNAおよびタンパクレベルでの検証

次に、同定されたATPにより誘導される*IL-6*、*IL-20*、*CXCL1*、*CXCL2*、*CXCL3*および*ATF3*のmRNA発現変動をTaqMan probeを用いた定量RT-PCR法により確認した。また、その際に発現の経時変化についても検討を加えた。すなわちATP（100μM）刺激後0、0.5、1、1.5、2、3、6、12、24時間におけるmRNAの発現を解析したところ、いずれの免疫応答因子もATP刺激30分後において有意に発現誘導された。この変化は約1時間後に最大となり、2時

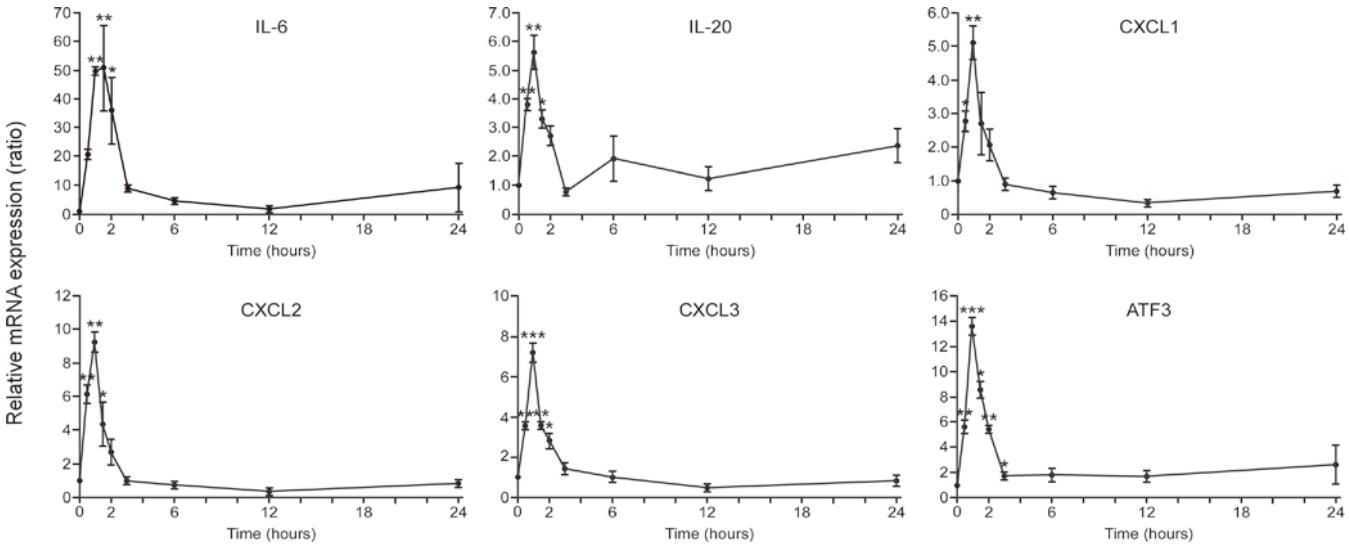


図3　DNAマイクロアレイ解析結果のquantitative real-time RT-PCRによる検証

NHEKs were treated with 100μM of ATP for different time periods. Total RNA was extracted at the indicated times and IL-6, IL-20, CXCL1, CXCL2, CXCL3 and ATF3 mRNA were examined by quantitative real-time RT-PCR. The mRNA expression by ATP-stimulated NHEKs was normalized using that of GAPDH. The ratio was demonstrated by the normalized mRNA expression by ATP-stimulated NHEKs divided by that of control cells (time 0). The data represent the mean±S.E.M. (n=3). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 indicate a statistically significant difference in comparison to cells that were time 0.

間後以降は時間の経過に伴って減弱した（図３）。本検討結果は、DNAマイクロアレイの結果を裏付けるものとなった。

同様に、タンパクレベルでの検証も試みた。図４に結果を示したが、IL-6およびIL-20において時間依存的な産生の亢進が認められた。さらに、IL-20はATP刺激後6時間以降に産生されるのに対し、IL-6は1時間以降に産生が認められ、早い段階で産生されることが明らかとなった（図４A, B）。また、CXCL1は未処理群においても時間依存的な産生が認められ、ATP刺激によるmRNAの誘導にも関わらず､その産生において有意な差は認められなかった（図４C）。

また、データーは示さないが、これらのタンパク産生増加は、ATPの容量に依存していた。

引き続き、ATP刺激が発現亢進することが初めて明らかとなったATF3のタンパク質レベルにおける発現のタイミングを精査するため、その発現変動を経時的に追跡することとした。ATP刺激後、0、0.5、1、2、4、8、12、24時間におけるATF3の発現解析を行ったところ、ATF3の発現は、ATP刺激１時間から４時間後に亢進し、以降、時間の経過とともに徐々に減弱する傾向が認められた（図４A, B）。このことから、細胞外ATPによるシグナルは、刺激開始後約1時間でATF3のタンパク質合成レベルに達することが明らかとなった。

ATF3は、様々なストレスによって誘導される転写因子であり、細胞周期や細胞保護、またはアポトーシスなどの多くの細胞内イベントに関与している[6, 7]。そればかりか、最近、TLR2/6ヘテロ二量体、TLR3、TLR4、TLR5、TLR7およびTLR9などのTLRシグナルを介する炎症反応において、負の調節因子として機能する可能性が示唆された[8－10]。NHEKsにおいてはTLR2およびTLR4が発現しており[11, 12]、細胞外ATPにより誘導されるATF3は、免疫応答を抑制することも考えられることから、ヒト表皮における本転写因子の機能に興味が持たれる。

以上の結果は、血小板が様々な刺激により活性化されATPを放出することを考慮すると[17]、血小板の活性化が、ATP放出を介して皮膚免疫に多大な影響を及ぼす可能性を示唆している。我々もATPがプテンによる直接刺激と協調して樹状細胞の活性化を亢進させることを報告しているが[18]、それに加えて、ATPが表皮細胞やその他皮膚構成細胞に作用してIL-6などの産生を介して樹状細胞の活性化に影響を与えることが明らかとなった。

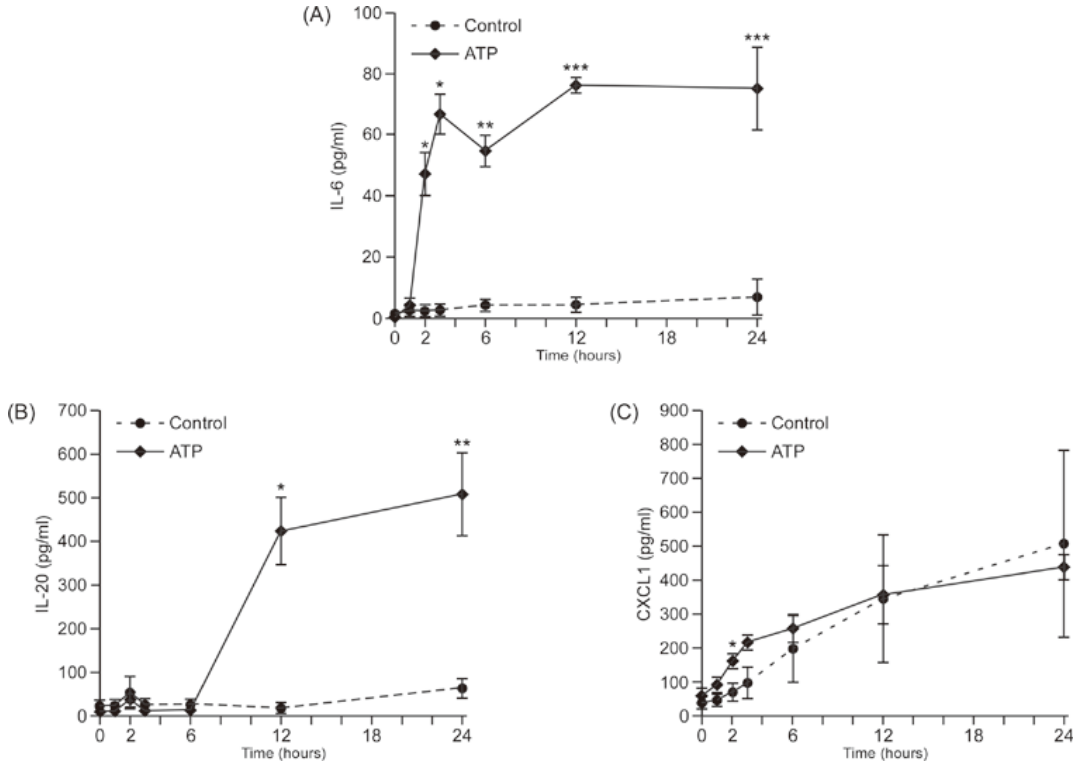


図４　DNAマイクロアレイ解析のタンパクレベルでの検証

NHEKs were cultured in the presence or absence of 100μM of ATP for indicated time periods. After culture, IL-6 (A), IL-20(B) and CXCL1(C) in the culture supernatant were measured by ELISA. Results are expressed as picograms/ml and represent the mean±S.E.M. (n=3). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 indicate a statistically significant difference in comparison to cells that were non-treated (Control).

4）ハプテン刺激による皮膚からの ATP 放出

未感作マウス皮膚にハプテンを塗布し、経時的に塗布部位皮膚における細胞外ATPの存在を固相化ルシフェラーゼにより検出した。その結果、ハプテン塗布１時間で皮膚における細胞外ATPが検出できた。

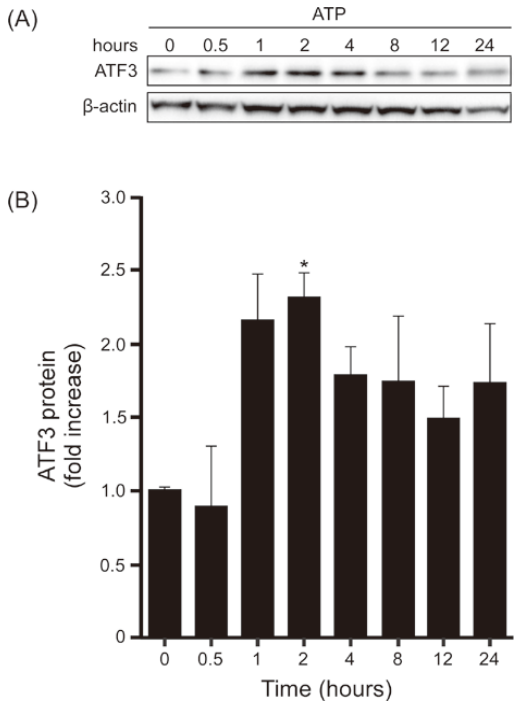


図５　細胞外 ATP による ATP3 タンパクの誘導

NHEKs were stimulated with 100μM of ATP for indicated time periods. (A) A representative western blotting from three independent experiments is shown. (B) The ATF3/β-actin ratios were determined as fold increase compared with control (time 0). The intensity of the corresponding ATF3 bands was analyzed using densitometry. The data are the mean ± S.E.M. (n=3). *P<0.05 indicates a statistically significant difference in comparison to cells that were time 0.

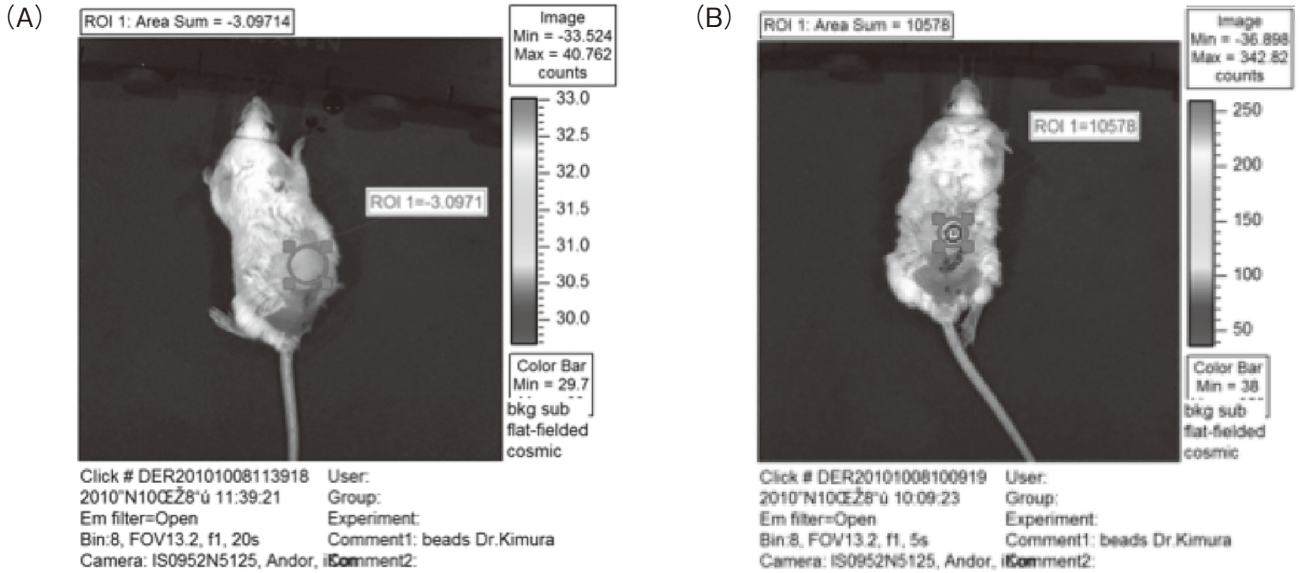


図６　ハプテン刺激皮膚における細胞外 ATP の検出
（A）未処理　（B）DNCB 塗布１時間後

4．結　語

今回の研究により、ハプテンおよびATP刺激により血小板からCD40Lが放出されることが明らかになった。また、血小板から種々の刺激で放出されるATPにより表皮細胞から免疫反応に関与するサイトカイン、ケモカインが放出されることも明らかとなった。また、実際に、ハプテン塗布皮膚には、細胞外にATPが存在していることも証明した。種々の刺激で活性化する血小板が、接触皮膚炎感作過程における樹状細胞活性化に関与していることが示唆された。

（文献）

1）Moodyclliffe A.M., Shreedhar V., Ullrich S.E., et al. CD40-CD40 ligand interactions in vivo regulate migration of antigen-bearing dendritic cells from the skin to draining lymph nodes. *J. Exp. Med*., **191**, 2011-2020 (2000).

2）Elzey B.D., Tian J., Jenxen R.J., et al. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments. *Immunity*. **19**, 9-19 (2003).

3）Cella M., Scheidegger D., Palmer-Lehmann K., et al. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J. Exp. Med*., **184**, 747-52 (1996).

4）Inoue K., Hosoi J., Denda M. Extracellular ATP has stimulatory effects on the expression and release of IL-6 via purinergic receptors in normal human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, **127**, 362-371 (2007).

5）Yoshida H., Kobayashi D., Ohkubo S., et al. ATP stimulates interleukin-6 production via P2Y receptors in human HaCaT keratinocytes. *Eur. J. Pharm*., **540**, 1-9 (2006).

6）Lu D., Wolfgang D.C., Hai T. Activating transcription factor 3, a stress-inducible gene, suppresses ras-stimulated tumorigenesis. *J. Biol. Chem*., **281**, 10473-10481 (2006).

7）Yan C., Lu D., Hai T., Boyd D.D. Activating transcription factor 3, a stress sensor, activates p53 by blocking its ubiquitination. *EMBO. J*., **24**, 2425-2435 (2005).

8）Gilchrist M., Thorsson V., Li B., Rust G.A., et al. Systems biology approaches identify ATF3 as a negative regulator of Toll-like receptor 4. *Nature*, **441**, 173-178 (2006).

9）Khuua H.C., Barrozo M.R., Hai T., et al. Activating transcription factor 3 (ATF3) represses the expression of CCL4 in murine macrophages. *Mol. Immunol*., **44**, 1598-1605 (2007).

10）Whitmore M.M., Iparraguirre A., Kubelka L., et al. Negative regulation of TLR-signaling pathways by activating transcription factor-3. *J. Immunol*., **179**, 3622-3630 (2007).

11）Kawai K., Shimura H., Minagawa M., et al. Expression of functional Toll-like receptor 2 on human epidermal keratinocytes. *J. Dermatol. Sci*., **30**, 185-194 (2002).

12）Song I.P., Park Y-M., Abraham T., et al. Human keratinocytes express functional CD14 and Toll-like receptor 4. *J. Invest. Dermatol*., **119**, 424-432 (2002).

13）Blumberg H., Conklin D., Xu W.F., et al. Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. *Cell,* **104**, 9-19 (2001).

14）Kunz S., Wolk K., Witte E., et al. Interleukin (IL)-19, IL-20 and IL-24 are produced by and act on keratinocytes and are distinct from classical ILs. *Exp. Dermatol*., **15**, 991-1004 (2006).

15）Addison C.L., Daniel T.O., Burdick M.D., et al. The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J. Immunol*., **165**, 5269-5277 (2000).

16）Belperio J.A., Keane M.P., Arenberg D.A., et al. CXC chemokines in angiogenesis. *J. Leukoc. Biol*., **68**, 1-8 (2000).

17）Beigi R., Kobatake E., Aizawa M., et al. Detection of local ATP release from activated platelets using cell surface-attached firefly luciferase. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol*. **276**, C267-278 (1999)

18）Ohtani T., Mizuashi M., Nakagawa S., et al. TGF-beta1 dampens the susceptibility of dendritic cells to environmental stimulation, leading to the requirement for danger signals for activation. *Immunology* **126**, 485-499 (2009)

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

金沢大学医薬保健研究域薬学系遺伝情報制御学研究室

山下　克美

Cdc25B is a cell cycle regulator that activates CDK/cyclin complex that leads to mitotic entry. Recently, we found that Cdc25B is degraded by cellular stresses that activate stress-activated MAP kinases p38 and JNK and that such stresses cell cycle retardation. We also indicated that the Cdc25B degradation is mediated by phosphorylation of Cdc25B by such kinases followed by ubiquitylation by $SCF^{\beta TrCP}$. We identified that the responsible sequence in Cdc25B for the interaction with $SCF^{\beta TrCP}$ is in N-terminal 175 amino acids. Using such Cdc25B-derived peptide, we established a fluorescent protein-based bio-imaging system that enables us to detect the stress-specific interaction between the Cdc25B-peptide and βTrCP1, a substrate-recognition component in $SCF^{\beta TrCP}$. For this purpose, we applied the bimolecular fluorescence (BiFC) method. We made two fusion constructs; N-terminal GFP fragment was fused to N-terminal Cdc25B fragment and N-terminal deletion construct of βTrCP1 was fused to C-terminal GFP fragment. Such two constructs were further fused to make one artificial gene. Although such GFP-derived fragments do not emit green fluorescence when they are separated each other, the green fluorescence can be detected when two GFP-derived fragments were reconstituted through Cdc25B-βTrCP1 interaction that is induced by cellular stress to phosphorylate Cdc25B. We were not able to detect green fluorescence not only co-transfection of the Cdc25B-βTrCP1 Bi-FC probe with JNK1 but also after application of non-genotoxic stress, such as anisomycin and NaCl to probe-transfected cells. Furthermore, such stress-derived green fluorescence was detected by flow cytometry-based methods, where we used a tetracycline-controlled expression cell lines.

1．緒　言

環境中の化学物質の中には細胞に対し毒性を有するものが数多く存在する。細胞に対する毒性の中には、細胞膜や微小管等の細胞骨格、さらには細胞内小器官を標的とし損傷を誘発する結果、細胞の機能低下が引き起こされる。このような化学物質に対する一般的な細胞毒性を検出する方法は数多く確立されており、実際の現場で広範に使用されている。化学物質の細胞毒性のうち重要なもののひとつに発がん性がある。化学発がん物質のうち、ゲノムDNAを標的とし、遺伝子損傷を誘発する遺伝毒性発がん性物質は、突然変異ひいては細胞がん化が誘発されることもある。一般に、化学物質の有する遺伝毒性発がん性は、突然変異誘発活性が有用な指標となるため、遺伝毒性化学物質の発がん性は、エイムステストをはじめとして数多く方法を用いて短期で推定可能である。一方で、これらの簡便な短期遺伝毒性試験で陰性を示すもののなかには長期動物実験で発がん性が検出されるものも多くある。

一般に、直接的、間接的かにかかわらずゲノムの恒常性を脅かす刺激は発がん刺激となりうるため、このような刺激を受けた細胞はがん細胞の特徴であるゲノム不安定性を有するようになる。発がん刺激はゲノム不安定性が引き起こされる前に必ず細胞周期制御のかく乱を引き起こすことから、細胞周期進行停止にかかわる生体内の反応を検知することで、遺伝毒性・非遺伝毒性刺激にかかわらずより広範な発がん性刺激を検出することが可能になる（図１）。

私達は、細胞周期制御因子のCdc25AとCdc25Bが非遺伝毒性細胞ストレスにより分解されることを発表した[1)]。このうちCdc25Aは遺伝毒性ストレスによっても分解されることがすでに知られていたため[2, 3)]、Cdc25Bについて分解機構を解析したところ、（１）Cdc25Bの特異的なセリン残基が、ストレス応答性MAPキナーゼであるp38やJNKによりリン酸化されること、（２）そのリン酸化された部位にF-boxタンパク質として分類されるβTrCPを基質認

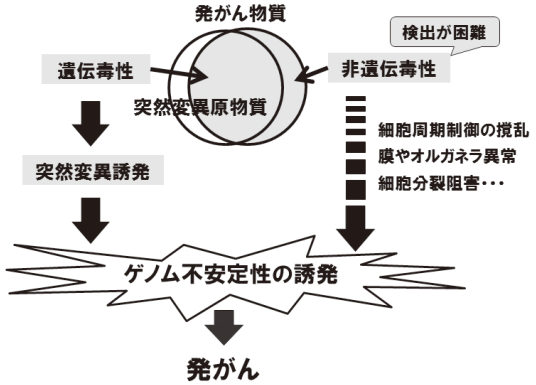


図１．化学物質による発がん機構
遺伝毒性化学発がん物質は突然変異を誘発し、非遺伝毒性化学発がん物質は、細胞内のゲノム以外の成分を標的とすることで細胞機能をかく乱しゲノム不安定性を誘発することが、細胞の発がんにつながる。

Application of BiFC system to detect cellular stress that induces skin aging and cancers

Katsumi Yamashita

Laboratory of Cell Biology, Institute of Medical, Pharmaceutical, and Health Sciences, Kanazawa University

識サブユニットするユビキチン化酵素であるSCF$^{\beta TrCP}$ [4, 5]がリクルートされ、Cdc25Bがユビキチン化されることが明らかとなった。さらに、このような細胞ストレスにより、細胞周期停止が引き起こされることが明らかになったため、細胞周期制御因子であるCdc25Bの分解を誘発するような細胞ストレスは、発がん刺激となりうることが推測された。そこで本研究においては、これらの生化学反応を利用して、ストレス刺激特異的なCdc25BとβTrCPの相互作用を、蛍光タンパク質を利用したバイオイメージングにより検出するシステムの構築を行った。本研究では、バイオイメージングとして、二分割し蛍光を発する能力を喪失した蛍光タンパク質断片が、再構成により再び蛍光を発するBimolecular fluorescence complementation（BiFC）法[6, 7]を用いた。

2．実　験

2．1　BiFC プローブプラスミドの作成

Cdc25Bは、p38/JNKにより安定性に関わるリン酸化を受ける部位である101番目と103番目のセリン残基（以下、S101およびS103と略記）が含まれる、N-末端より175番目までの断片を使用した。βTrCPは、βTrCP1とβTrCP2のうちβTrCP1を実験に使用した（Cdc25Bのユビキチン化能は同程度であった）。βTrCPは、N-末端側約200アミノ酸までの領域にSCF複合体構成に関わるF-boxと呼ばれる領域を、約300アミノ酸より下流のC-末端側に、基質認識と結合に関わるWD-domainと呼ばれる領域を有する。本研究では、プローブタンパク質がSCF複合体に取り込まれ、ユビキチン化されることがないように、N-末端領域の約210アミノ酸を決しつさせた、F-βTrCP1を用いた。

Bi-FCのGFP蛍光タンパク質としてはMBL社より発売のmonomeric Kusabira-Green（mKG）をベースとした、CoralHue® Fluoro-chase Kitを利用した。本キットでは、mKGのN-末端側170アミノ酸断片（mKGN）とC-末端側52アミノ酸断片（mKGC）を使用する。

まず、mKGNの下流にFLAGタグを付加したCdc25B-N175断片を融合させたmKGN-FLAG-Cdc25B/N175プラスミドと、F-βTrCP1の下流にmKGC融合させたF-βTrCP1-mKGCプラスミドを作成した。さらに両者を、GGS配列を5個タンデムに結合させた断片をはさんで、N-末端側にmKGN-FLAG-Cdc25B/N175を、C-末端側にF-βTrCP1-mKGCを融合させ、mKGN-FLAG-Cdc25B/N175-$(GGS)_5$-F-βTrCP1-mKGCがひとつのペプチドとして発現されるようなプローブプラスミドを作成した。

2．2　細胞への遺伝子導入

細胞への遺伝子導入は、Lipofectamine2000を用いた[8]。また、テトラサイクリン誘導発現細胞株は、Tet-onプラスミドを安定的に発現するHeLa細胞に、上記のプローブ遺伝子をテトラサイクリン応答性配列の下流に配したプラスミドDNAを導入して得た。すなわち、プラスミド上に存在するブラストサイディン耐性遺伝子を利用し、テトラサイクリン誘導性安定発現細胞株を分離した。

2．3　顕微鏡観察

JNK及び化学物質処理細胞の蛍光は、キーエンス社のBZ-9000蛍光顕微鏡を用いて観察した。

2．4　Flow Cytometry

テトラサイクリン誘導発現細胞を1μg/mLのドキシサイクリンで24時間処理しプローブタンパク質を発現させたのち、検定化学物質をさらに24時間処理した。その後、細胞を回収し、Flow cytometer（Becton-Dickinson, FACSCalibur）を用いてmKGに由来する緑色蛍光を計測した。

3．結　果

3．1 プローブ遺伝子とJNKの細胞への一過的発現による BiFC の検出

図2に、本研究の原理となる細胞ストレスにより活性化されたp38やJNKによりリン酸化されたCdc25BのSCF$^{\beta TrCP}$によるユビキチン化の模式図を示した。即ち、細胞ストレスによりストレス応答性のJNKやp38が活性化され、Cdc25BのS101とS103がリン酸化される。そのリン酸化が引き金となり、ユビキチン化酵素であるSCF$^{\beta TrCP}$複合体のβTrCPタンパク質がCdc25BのS101/103付近に結合し、Cdc25Bがポリユビキチン化され、プロテアソームで分解される。

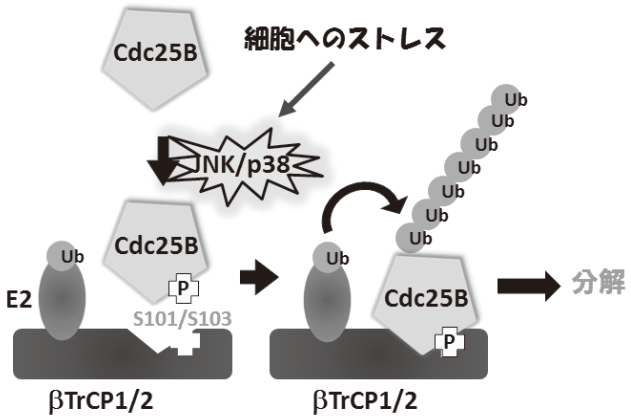


図2．細胞周期制御因子 Cdc25B が細胞へのストレスにより分解される機構
細胞がストレスを受けると JNK や p38 のストレス応答性 MAP キナーゼが活性化される。これらのキナーゼにより、Cdc25B の 101 番目と 103 番目のセリン残基がリン酸化されると、ユビキチン化酵素の SCF$^{\beta TrCP}$ との相互作用が生じ Cdc25B がポリユビキチン化され、プロレアソームで分解される。

図３にはこれら一連の反応過程で起きるCdc25BとβTrCPのストレス誘発性相互作用を利用したBiFCの模式図を示した。２．実験の項に記載されているように、mKGN-Cdc25B/N175断片-βTrCP断片-mKGCというプローブペプチドを細胞で発現させる。この状態では、mKGNとmKGCは遠くの位置にあるため蛍光を発することはない。ストレスによりJNKが活性化されCdc25BのS101/103がリン酸化されると、Cdc25BとβTrCP間に相互作用が起きるため、結果的にmKGNとmKGCが近接し、これらは自発的に再構成される。再構成されたmKGは再び蛍光を発するため、プローブ導入細胞が緑色蛍光を発することになる。

まずモデルシステムとして、プローブ遺伝子をCos7細胞へ一過的に発現させる際に、同時にJNK（実験では赤色蛍光を発するmCherry遺伝子にJNK1融合させたものを使用）とその活性化遺伝子であるMKK7を導入し、BiFCが生じるか否かについて検討した。その結果、図４に示されるように、JNK1発現細胞特異的にBiFC、即ち緑色蛍光が観察され、プローブの有効性が確認された。

３．２　プローブ遺伝子を一過的に発現する細胞のNaCl処理によるBiFCの検出

JNKを用いたモデルシステムによりBiFCプローブの蛍光出現が確認されたため、次に薬剤処理によるBiFCプローブの応答を検討した。化学物質としては、JNKやp38の活性化を誘導することが知られており、私たちの研究でもCdc25B分解効果が確認されているアニソマイシン[1]と、胃がんの発がんプロモーターとして知られるNaClを用いた[9, 10]。Cos7細胞へBiFCプローブを一過的に導入24時間後に、アニソマイシンの場合は50 ng/mLとなるように培地へ添加した。NaClの場合は、培地中のNaCl濃度を約150 mMとし、その最終濃度が250 mMになるように添加した。そして、薬物処理24時間後に蛍光顕微鏡にてBiFC出現の有無を検討した。その結果、図５に示されるように、アニソマイシン（図ではAnisomycinと表記されている）、NaClの場合ともBiFCが観察された。また、プローブ導入細胞としてHeLa細胞を使用した場合でも同様の結果が得られたため、本プローブの一過的発現により非遺伝毒性化学物質誘発性の、Cdc25B分解を誘発する細胞ストレスが検出できるものと判断した。

３．３　プローブ遺伝子をテトラサイクリンにより誘導的に発現できる細胞のNaCl処理によるBiFCの検出とFACS利用した解析

これまでの研究でBiFCプローブの有効性が確認されたため、次に非遺伝毒性の強さの定量化を試みた。定量化には、BiFCによって生じる緑色蛍光をFlow cytometryにより検出することを計画した。細胞への一過的発現ではプローブ導入細胞数及び一細胞あたりに導入されるプローブ数にばらつきが生じるため、実験ごとに一定の数値が得られない懸念がある。そこで、プローブを安定的に発現する細胞の樹立を行った。

Cdc25B断片及びβTrCP断片の恒常的発現は、細胞に対し毒性を示すことが予想されたため、誘導的に発現できる方法を用いた。使用したのはテトラサイクリン誘導発現系であり[9, 10]、テトラサイクリン誘導体であり安定なドキシサイクリン添加によりプローブ発現が誘導される。

分離された細胞を用いて250 mM NaClによるBiFCを蛍光顕微鏡にて観察した。細胞に5 μg/mLのドキシサイクリンを添加し24時間後に培地の最終NaCl濃度が250 mMとなるようにNaClを添加し、24時間後にBiFCを観察した。一過的発現ほど強いシグナルではないが蛍光が観察さ

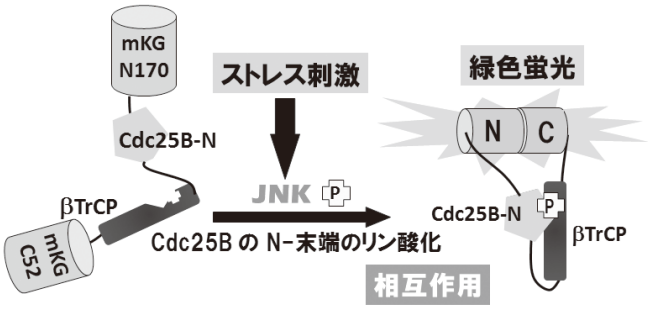


図３　Cdc25B-βTrCP の相互作用を利用した BiFC
Cdc25B の N- 末端断片と βTrCP の C- 末端断片を、図のように緑色蛍光タンパク質断片 mKGN170 と mKGC52 との融合タンパク質として細胞で発現させる。その細胞へストレスが加わると JNK がリン酸化され βTrCP との相互作用を介して、mKG 断片の再構成が起きる結果、細胞から緑色蛍光が発せられる。

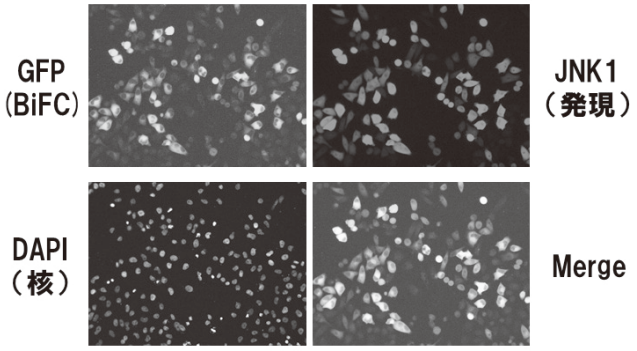


図４　細胞への BiFC プローブの一過性発現による JNK1 誘導性の緑色蛍光の出現
Cos7 細胞へプローブとともに Cdc25B をリン酸化する JNK1 およびその活性化酵素遺伝子の MKK7 を同時に一過的に発現させ、BiFC 効果を観察した。ほとんどの JNK 発現細胞において緑色蛍光が検出され BiFC が生じていることがわかる。

れた。また、一過的発現の場合とは異なり、顕微鏡の視野中にあるすべての細胞で蛍光が観察された。次に、Flow cytometry解析を行った。その結果が図6に示されている。この実験では、250 mM NaCl存在下、12時間、24時間、48時間後に細胞を回収し、Flow cytometryを行った。ドキシサイクリン（図ではDoxと表示されている）の添加前にはシグナルはほとんど検出されないが、ドキシサイクリン添加によりプローブを発現させただけで強いシグナルが出現することがわかる。これは、プローブ分子間の非特異的な相互作用に由来すると考えられる（考察においてもう一度述べる）。一方、NaCl処理により明らかなシグナルの増強が見られる。またNaCl処理によるシグナルは、NaCl処理時間とともに増加傾向にあることがわかり、Flow cytometryによりBiFCの検出が可能であることが判明した。

4．考　察

化学物質の遺伝毒性を短期間にかつ簡便に検出する方法は樹立されており、突然変異原性を指標にした発がん性評価が行われている。一方、突然変異原性を示さないにもかかわらず、動物実験において長期かつ高用量投与により発がん性が検出される、非遺伝毒性化学発がん物質が数多く存在する。非遺伝毒性化学発がん物質は、細胞内標的がひとつではなく、決まった生物活性を示すわけではないために、発がん性評価が困難であり、簡便な短期検定法は存在しないのが現状である。

発がんは必ずゲノム異常を伴う。ゲノムを直接の標的としない非遺伝毒性発がん物質（刺激）においてもそれは例外ではないと考えられる。一方、ゲノム異常の初期過程においては、細胞周期の亢進や停止が検出される。遺伝毒性刺激による細胞周期チェックポイントでは、細胞周期の一時的な進行停止が誘発される。非遺伝毒性ストレスにおいては、ゲノム以外の細胞構成成分に損傷が誘発されると考えられるが、このような非ゲノム性の損傷は細胞機能の低下を誘発し、一時的な細胞周期進行遅延の原因となる可能性がある。

私達は、まさに細胞周期制御因子であるCdc25Aと

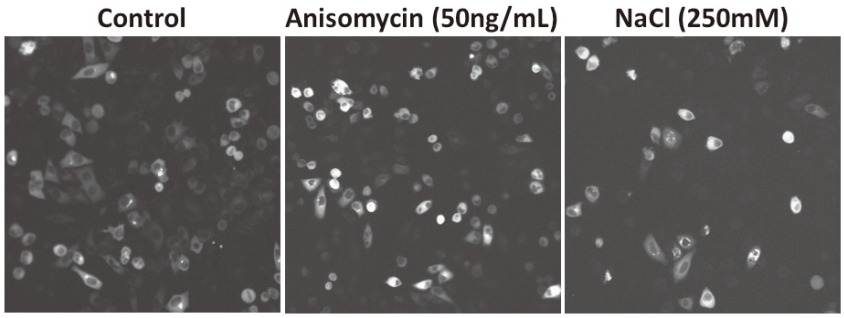


図5　BiFC プローブの一過性発現による非遺伝毒性化学物質誘発性の緑色蛍光の出現
図4と同様に、Cos7 細胞へ BiFC プローブを一過的に導入し、24 時間後にそれぞれの化学物質を加えた。さらに 24 時間後に細胞の蛍光観察を行った。

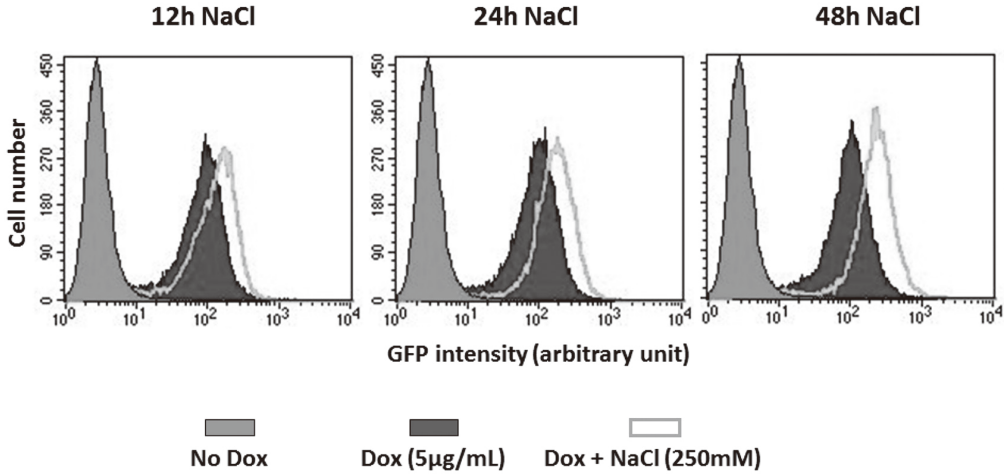


図6　BiFC プローブ誘導発現細胞を用いた Flow cytometry による緑色蛍光の検出
BiFC 誘導発現 HeLa 細胞を 5μg/ml のドキソルビシン（Dox）で 24 時間処理し、BiFC プローブの発現を誘導した後、培地の NaCl 濃度が 250 mM になるように加え、さらに細胞を培養した。それぞれの NaCl 処理時間で細胞を回収し Flow cytometry（FACS）解析を行った。

Cdc25Bが非ゲノム損傷性のストレスにより分解され、そのようなストレスは細胞周期遅延を誘発することを明らかにした。従って、このようなCdc25AやCdc25B分解を誘発するストレスは、非遺伝毒性発がん刺激である可能性がある。

本研究は、このようなコンセプトの基に、非遺伝毒性発がん刺激を検出する方法の構築を目指したものである。特に、これまでの研究成果としてCdc25Bが非遺伝毒性刺激特異的に$SCF^{\beta TrCP}$によりユビキチン化を受けたのち分解されることがわかっていたために、Cdc25B分解システムを利用した方法を確立した。

非遺伝毒性ストレス検出のために、より簡便な方法としてタンパク質相互作用を利用したBiFC法を応用した。本方法では、ストレス依存的なJNK/p38の活性化によりCdc25Bと$SCF^{\beta TrCP}$複合体のβTrCP分子間で相互作用が起きることを利用し、蛍光タンパク質断片を再会合させる。再会合した断片は自発的に再構成され、蛍光が出現する。

私たちの結果では、一過性発現系ではストレス刺激に伴う再会合の結果、強い蛍光シグナルが検出されたことから、基本原理としては完成されたものと考える。一方、誘導発現性安定細胞株を用いた実験では、プローブタンパク質の発現に伴い、かなり強い蛍光の出現が認められた。この細胞では、ストレス刺激に伴い蛍光の増強が認められたため、ストレス検出系としては利用可能であると考えられるが、今後より実用的なシステムにしていくためにはプローブの発現に伴う蛍光の抑制が課題である。BiFCではタンパク質分子間の非特異的な相互作用はあまり強くないと考えられてきたが、本研究では、プローブ発現自体で高い相互作用が認められた。この蛍光は、βTrCPとの相互作用が極めて低い突然変異型のCdc25B断片を使用した場合にも認められたため、BiFC系が有する内在的な欠陥である可能性がある。今後の検討が必要である。

本研究でFlow cytometryを利用した蛍光検出が可能であることが判明した。Flow cytometryにより蛍光強度の定量化が可能になることから、化学物質の非遺伝毒性ストレスの強度を定量化でき、ひいては発がん強度の定量化も可能となることも期待される。プローブ発現によりバックグラウンド上昇を抑制することができれば、非遺伝毒性発がん物質の短期検索法として有用であることが期待できる。

5．総　括

皮膚は、化粧品をはじめとする多くの化学物質に恒常的に暴露されている。化学物質による皮膚ストレスは皮膚老化や皮膚がんの原因となる。皮膚ストレスを誘発する化学物質は必ずしも突然変異を誘発するわけではない。皮膚細胞の細胞分裂を抑制するような化学物質を簡便かつ迅速に検出するシステムの確立が必要である。本研究で開発した方法は、そのような皮膚ストレスを誘発する非遺伝毒性化学物質を検出する方法となりうることが示された。今後は、本方法の改良及びこの科学的原理を応用した方法の開発により、皮膚に対し危険な化学物質を排除し、安全性の高い化粧品や添加物が開発されることが期待される。

（引用文献）

1）Uchida S, Yoshioka K, kizu R, et al,: Stress-Activated Mitogen-Activated Protein Kinases c-Jun-NH2-Terminal Kinase and p38 Targets Cdc25B for Degradation. Cancer Res. 69, 6438-6444, 2009.

2）Busino L, Donzelli M, Chiesa M, et al,: Degradation of Cdc25A by β-TrCP during S phase and in response to DNA damage. Nature 426, 87-91, 2003.

3）Jin J, Shirogane T, Xu L, et al,: $SCF^{\beta\text{-}TRCP}$ links Chk1 signaling to degradation of the Cdc25A protein phosphatase. Genes Dev. 17, 3062-3074, 2003.

4）Latres E, Chiaur D S, Pagano M.: The human F box protein β-Trcp associates with the Cul1/Skp1 complex and regulates the stability of β-catenin. Oncogene 18, 849-854, 1999.

5）Winston J T, Strack P, Beer-Romero P, et al,: The $SCF^{\beta\text{-}TRCP}$-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in IkappaBalpha and beta-catenin and stimulates IkappaBalpha ubiquitination in vitro. Genes Dev. 13, 270-283, 1999.

6）Hu CD, Chenenov Y, Kerppola TK.: Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. Mol. Cell 9, 789-798, 2002.

7）Hu CD, Kerppola TK.: Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. Nature Biotech. 21, 539-545, 2003.

8）Uchida S, Kuma A, Ohtsubo M, et al,: Binding of 14-3-3β but not 14-3-3σ controls the cytoplasmic localisation of CDC25B: binding site preferences of 14-3-3 subtypes and the subcellular localisation of CDC25B. J. Cell Sci, 117, 3011-3020, 2004.

9）Ohgaki H, Kato T, Morino K, et al,: Study of the promoting effect of sodium chloride on gastric carcinogenesis by N-methyl-N'-nitorosoguanidine in inbred Wister rats. Gann 75, 1053-1057, 1984

10）Takahashi M, Nishikawa A, Furukawa F, et al,: Carcinogenesis 15, 1429-1432, 1994.

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

独立行政法人国立成育医療研究センター研究所　周産期病態研究部

秦　健一郎

Epigenetic regulation is necessary for normal development. Not only for development, it has crucial roles to maintain stemness of melanocyte. Usually melanocyte stem cells in hair follicle produce melanin for pigmented hair. If these stem cells lose melanin production, hair change into gray. To clarify epigenetic mechanisms, we compared melanocyte stem cells in gray hair follicle and those in pigmented hair follicle. We found dozens of genomic regions which DNA methylation status are different between gray hair follicle and pigmented hair follicle. These might cause critical change of related gene expression levels.

1．緒　言

DNAメチル化やヒストンタンパク質の化学的修飾は、哺乳類の発生と生存に必須のエピジェネティックな遺伝子発現制御機構である。これらのエピジェネティクス機構は、発生過程の脱分化や分化過程でダイナミックに変化し、細胞の全能性あるいは多能性分化能を維持させ、その逆に細胞系譜の命運決定に重要な役割を担う。発生過程のみならず、組織幹細胞の分化能維持や、最終分化後の恒常性維持にも、同様の機構が働いている。最近、ES細胞やiPS細胞のDNAメチル化状態やヒストンの修飾状態を網羅的に解析した結果が報告された[1)]。それぞれの修飾状態は、細胞の起源や細胞株によって僅かに異なり、それぞれの細胞の個性を産み出していると考えられる。細胞は、環境要因等の外部からの刺激を含め、なんらかの要因によって遺伝子発現変化が誘導され、組織の再生や分化につながっていくと考えれる。しかもそのような要因が失われても、遺伝子発現の変化は長期にわたって続く場合がある。このような変化は、一旦分化した組織・臓器が異分化を起こさないように恒常性を維持するのに必須であると共に、近年、いわゆる生活習慣病等の原因が、胎児期や新生児期・幼児期の環境に遡る可能性が指摘されている[2, 3)]。再生医療の分野をこのような観点から捉えると、治療に用いる幹細胞を、臨んだ形質をもつ細胞に正確にかつ効率よく分化させ、しかもその形質を維持させる事ができなければ、安全かつ長期にわたる治療効果は期待できない。

全能性・多能性を有する幹細胞は、一旦分化した後は、脱分化能や異分化能を抑制せねばならない。すなわち、幹細胞の分化過程では、分化後には必要とされない遺伝子群を、長期にわたり安定して抑制することが、個体の恒常性の維持に必須であると考えられている。このような長期安定した遺伝子制御情報の担い手として、エピジェネティックな機構が働いており、様々な臓器の分化過程で、普遍的な役割を担っていると考えられている[4)]。

毛包の色素幹細胞は上皮系幹細胞と同じく、皮脂腺下部のバルジに存在する[5)]。毛髪が抜け落ち、新たな毛髪が形成する時にバルジにある色素幹細胞が分化し、形成途中の毛球部に取り込まれながら皮下脂肪層へ移動する。そして、成熟した毛球部を形成し、毛幹にメラニン色素を供給する。毛髪はこのような周期を繰り返す。しかし、ジェノトキシックな影響[6)]や、不要なアポトーシスの発生[7)]により色素幹細胞が枯渇する状況になると、分化した色素細胞を供給できなくなり白髪が発生する。また、分化した色素細胞が形成されても、何らかの原因により毛球部への移行が損なわれたり、あるいは何らかの原因によりメラニン合成酵素の不調がきたしても白髪は形成される[8)]。色素細胞の移動能については、毛乳頭細胞の間に細胞外マトリックスを介した相互作用も推測されている[9)]。このように白髪形成には幾つかの説が唱えられ、ある種の化合物（p-aminobenzoic acid）は白髪の回復に有効との報告もあるが[10)]、エピジェネティクスと関連性は検討されていない。

本研究は、エピジェネティックな機構を介した色素（幹）細胞のメラニン産生能制御機構を解析し、同機構を介したメラニン産生能の人為的操作法開発に資する知見を得ることを目的とする。本研究で対象とする幹細胞の一種である色素幹細胞は、皮膚に色素細胞を供給し、紫外線からの防御、個体識別などの生物学的に重要な役割を担っている。分化した色素細胞から産生されるメラニンは皮膚色や毛髪色を決定し、前述の機能に深く関与しているとともに、美容上の観点からも重要な意味を持っている。通常幹細胞は、自己再生のための対称性分裂と共に、非対称性の分裂を繰り返して分化細胞を供給し続け、生命の恒常性維持に深く関与する細胞である。しかし、色素幹細胞、特に毛包の色

Epigenetic regulation in maintenance of stemness of melanocyte stem cells in hair folicle

Kenichiro Hata

Department of Maternal-Fetal Biology
National Research Institute for Child Health and Development

素幹細胞は、成人後比較的早い時期からの白髪形成に見られるように、何らかの原因により生涯を通じて成熟した分化色素細胞を供給し続けることができない特殊な幹細胞である。また色素幹細胞は、比較的容易に生体試料を入手することが可能であり、幹細胞としての性質の維持と破綻を比較解析するのに有用なモデル系である。

前述の白髪形成の原因として、ジェノトキシックな要因あるいはアポトーシス異常による色素幹細胞自身の死滅、分化色素細胞周囲の上皮系細胞または間葉系細胞との相互作用不良によるメラノジェネシス異常などが提唱されているが、いまだ十分に解明されていない。幹細胞から終末細胞への分化を制御する機構に、DNAメチル化などのエピジェネティクスが関与する事例が既に報告されているが、白髪形成過程をそのような観点から解析した報告は無い。本研究では、色素幹細胞の分化に関与するエピジェネティクな要因を解析し、新たな白髪発生の分子機構や予防策に関する知見を見出すことを目標とする。さらには、本研究の進展により、幹細胞多能性維持の普遍的メカニズムの理解にも、重要な貢献を成すことが期待される。

2．実験方法

1)「試料回収調製」

ヒト個体の遺伝的多様性の影響を除くため、白髪を有する同一人から、白髪と黒髪を採取した。採取した毛髪から、色素細胞と近接する毛包上皮系細胞部あるいは色素細胞に隣接する間葉系細胞（毛乳頭細胞）を顕微鏡下で単離する。採取した毛包上皮系細胞部からは直接、または毛乳頭細胞は分離後培養増幅した後に、ゲノムDNAを調製した。

2)「網羅的 DNA メチル化解析」

調製したゲノムDNAは、bisulfite法により、非メチル化シトシンをウラシルに変換した後に、illumina社のビーズアレイシステム（Infunium HumanMethylation 27K）を用い、ゲノム上の約2万7千箇所のプロモーター領域近傍のCpG配列を中心に、DNAメチル化状態を検証した。

3．結　果

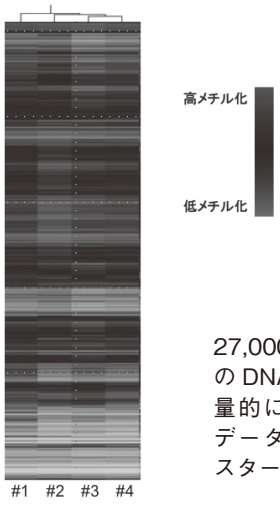
回収したゲノムDNAの網羅的DNAメチル化解析を、4つの検体について行った（図１）。レーン#1と#2が白髪由来、#3と#4が黒髪由来である。約27,000箇所のDNAメチル化定量解析結果を階層クラスター解析をすると、#3と#4が比較的近いことがわかる。その一方で、細部を見ると、DNAメチル化異常体が異なる部分も散見される。一方、#1と#2のDNAメチル化状態は、黒髪由来の#3、#4と大きくは異ならないが、#3と#4の間に見られる類似性に比べると、差異が大きい系統である事が見て取れる。また、#1と#2の相同性は、#3と#4の相同性と比較して変化が大きく、エピジェネティックな観点からは、やや不均一な集団となっている可能性が考えられる。

図２は、サンプル#2と#3で定量解析した各CpGをドットで表し、DNAメチル化状態を比較した図である。ほぼ傾き１の直線上に乗る点が大多数であり、ほとんどのゲノム領域では、白髪でも黒髪でも類似のDNAメチル化状態を保っている可能性が推測される。一方で、傾き１の直線から大きく離れたドット（ゲノム領域）は、DNAメチル化状態が大きく変化している領域であり、今後、これらのDNAメチル化状態の変化の生理的意義の解析が、重要であると考えられる。

今年度は本助成を利用して以上の解析を行ったが、今後は、以下の要領で解析を進めていく。

「遺伝子発現解析」同じく調製した細胞からtotal RNAを回収し、発現マイクロアレイ解析を行い、白髪・黒髪で発現量の異なる遺伝子をスクリーニングする。

「標的候補領域の決定」今年度の網羅的DNAメチル化解



27,000 箇所の CpG 配列の DNA メチル化状態を定量的に測定し、取得したデータに対して階層クラスター解析を行った。

図１　網羅的 DNA メチル化解析結果の比較

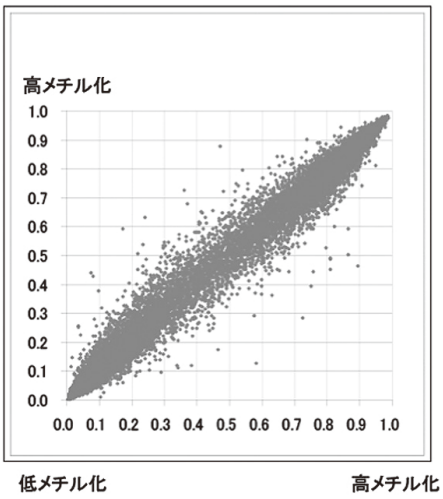


図２　二検体間での DNA メチル化状態比較

析結果を基に、遺伝子発現解析と網羅的DNAメチル化解析の二つのデータを参照し、白髪が形成される際に、発現量とメチル化状態が同時に変化する領域を絞り込む。
「人為的黒髪白髪誘導条件の検討」次に、これらの絞り込まれた数カ所の遺伝子領域に着目して、化学物質等による黒髪化および白髪化の人為的な誘導の可能性を検討する。例として、前述細胞に白髪改善効果が知られているp-aminobenzoic acidを加え、白髪および黒髪の毛髪由来細胞の遺伝子発現状態やメチル化状態の変化を検証する。これらの網羅的発現解析とエピゲノム解析結果、および誘導モデル系での詳細の検証を統合的に行う事で、白髪予防薬剤の開発、抗白髪サプリメントの開発、食生活指導プログラム開発等々の医学的、美容医学的領域に展開が可能である。

4．考　察

高齢化社会を迎え、医学的観点からの疾病や老化のみならず、老徴の克服を含めたコスメトロジーに対する国民の希求が高まっている。本研究課題の成果により、基礎医学的には、色素幹細胞分化および毛髪色加齢変化におけるエピジェネティクスの役割という新しい概念を提案することができる。また､コスメトロジーの観点からは､多くの人々の美容上の大きな悩みである「白髪」改善へのアプローチ方法を示すことが期待できる。近年薄毛対処法は、複数種の医薬品の登場により改善の手立てが提供されてきているが、白髪に関しては未だに有力な解決策が提示されておらず、本研究の成果が重要な知見をもたらすと期待できる。

（参考文献）

1）Lister R, Pelizzola M, Kida YS, Hawkins RD, Nery JR, Hon G, et al. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. Nature. Mar 3;471 (7336) : 68-73.

2）Heijmans BT, Tobi EW, Lumey LH, Slagboom PE. The epigenome: archive of the prenatal environment. Epigenetics. 2009 Nov 16;4 (8) :526-31.

3）久須美真紀、中林一彦、秦健一郎. 体外培養・長期培養の胚発生への影響：動物実験と臨床データから. J Mammal Ova Res 2008;25 (4) :221-30.

4）Surani MA, Hayashi K, Hajkova P. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. Cell. 2007 Feb 23;128 (4) :747-62.

5）Nishimura R, Hayashi M, Wu GJ, Kouchi H, Imaizumi-Anraku H, Murakami Y, et al. HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. Nature. 2002 Nov 28; 420 (6914) : 426-9.

6）Inomata K, Aoto T, Binh NT, Okamoto N, Tanimura S, Wakayama T, et al. Genotoxic stress abrogates renewal of melanocyte stem cells by triggering their differentiation. Cell. 2009 Jun 12;137 (6) :1088-99.

7）McGill GG, Horstmann M, Widlund HR, Du J, Motyckova G, Nishimura EK, et al. Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. Cell. 2002 Jun 14;109 (6) :707-18.

8）Tobin DJ, Paus R. Graying: gerontobiology of the hair follicle pigmentary unit. Exp Gerontol. 2001 Jan;36 (1) : 29-54.

9）Ideta R, Soma T, Tsunenaga M, Ifuku O. Cultured human dermal papilla cells secrete a chemotactic factor for melanocytes. J Dermatol Sci. 2002 Jan;28(1):48-59.

10）Cline DJ. Changes in hair color. Dermatol Clin. 1988 Apr;6 (2) :295-303.

Ⅲ． 精神、文化に関する分野

顔の魅力と人物の印象の相互作用メカニズムに関する認知神経科学的研究

東北大学加齢医学研究所脳機能開発研究分野

月浦　崇

The Beauty-is-Good stereotype refers to the assumption that attractive people possess sociably desirable personalities and higher moral standards. Although this stereotype is often observed in human societies, its neural mechanisms are largely unknown. To investigate this issue, we scanned female participants with functional magnetic resonance imaging (fMRI) while they made attractiveness judgments about male faces and goodness judgments about hypothetical actions. Activity in the medial orbitofrontal cortex increased as a function of both attractiveness and goodness ratings, whereas activity in the insular cortex decreased with both attractiveness and goodness ratings. Within each of these regions, the activations elicited by attractiveness and goodness judgments were strongly correlated with each other, supporting the idea of similar contributions of each region to both judgments. Moreover, activations in orbitofrontal and insular cortices were negatively correlated with each other, suggesting an opposing relationship between these regions during attractiveness and goodness judgments. These findings have implications for understanding the neural mechanisms of the Beauty-is-Good stereotype.

1．緒　言

「惚れてしまえばアバタもエクボ」という諺が示すように，顔の魅力と人物の内面の印象との間には密接な関係があることはよく知られている．このような認知過程は「Beauty-is-Good（BG）ステレオタイプ」[1]と呼ばれ，ここ数十年に渡って社会心理学者によって研究が進められてきた．例えば，先行研究では魅力的な顔を持った選挙の候補者はより多くの票を集めたり[2]，魅力的でない顔の容疑者は魅力的な顔の容疑者と比較してより有罪と判断される傾向がある[3－6]，ということが報告されている．しかしながら，BGステレオタイプがどのような脳内メカニズムを基盤としているのかについては，未だ明らかにはなっていない．本研究では，顔の魅力と人物の善悪の印象の相互作用であるBGステレオタイプの神経基盤を，機能的磁気共鳴画像（fMRI）による脳機能イメージングを用いて明らかにすることを目的とした．

先行研究では，眼窩前頭皮質は魅力的な顔を処理している際に有意な賦活を示し[7－10]，また同領域の賦活は倫理的に良いとされる行動を判断している際にも観察されることが報告されている[11, 12]．一方，島皮質は魅力的でない顔を処理している際や[10, 13]，倫理的に悪いと判断される行動の処理の際に有意な賦活を示すことが報告されている[12–14]．これらの研究は，眼窩前頭皮質や島皮質は顔の魅力判断や行動の善悪の判断にそれぞれ異なった方向性をもって関与していることを示している一方，顔の魅力と人物の善悪の印象の判断の相互作用に関与しているのかどうかは解明されていないのが現状である．

本研究では眼窩前頭皮質と島皮質がBGステレオタイプに重要な脳領域であると仮定し，この仮説を健常な大学生被験者を対象としてfMRIを用いて検証した．おそらく①眼窩前頭皮質は顔の魅力判断と人物の善悪の判断に共通して関与し，その活動は顔の魅力や人物の善悪が向上するにつれて増加する，一方②島皮質は顔の魅力判断と人物の善悪の判断に共通して関与するが，その活動は顔の魅力や人物の善悪が低下するにつれて増加するであろう．また，③これら２つの領域はBGステレオタイプの処理において異なった方向性を持って関与することが考えられることから，その２領域の神経活動は負の相関関係を示すであろう．

Shared brain activity for facial attractiveness and personality goodness: Implications for the Beauty-is-Good stereotype

Takashi Tsukiura

Department of Functional Brain Imaging, Institute of Aging, Development and Cancer（IDAC）, Tohoku University

2．実　験

2. 1.　被験者

20名の右利き，健常成人女性（平均年齢23.4歳）が本実験に参加した．すべての被験者は，実験の開始前に実験内容と安全性，被験者の権利について十分な説明を受け，文書によって実験参加への同意を行った．本実験の内容は学内の倫理委員会によって事前に審議され，承認を受けていた．

2. 2.　実験刺激

本研究では，Ⓐ顔の魅力判断課題，Ⓑ行動の善悪判断課題，Ⓒ明るさ判断課題，の３種類の課題が準備された．Ⓐ顔の魅力判断課題においては，270枚の男性顔写真が使用された．すべての顔写真の刺激は256×256ピクセルの白黒写真（背景は黒）に加工された．Ⓑ行動の善悪判断課題においては，270の短い文が使用された．これらの文章には人間の「行動」が記載されており，それらの「行動」に

図１　実験刺激の例．A) 顔の魅力判断課題，B) 行動の善悪判断課題，C) 明るさ判断課題．

は，とても悪いもの（例えば「彼は友人を騙してお金を取った」）からとてもよいもの（例えば「彼は溺れている犬を助けた」）まで，様々な行動パターンが含まれていた．Ⓒ明るさ判断課題（統制課題）では，８種類の明るさをもったグレースケールの四角形刺激（256×256ピクセル）が準備された（黒が最も暗く，白が最も明るい）．実験刺激の例を図１に示す．

2. 3.　実験手続き

本研究において，Ⓐ顔の魅力判断課題とⒸ明るさ判断課題では，すべての刺激はそれぞれ2.5秒間提示され，Ⓑ行動の善悪判断課題では，それぞれ4秒間提示された．刺激間間隔は0.5秒から5秒の間でランダムに設定された．Ⓐ顔の魅力判断課題では，被験者は270枚の写真が一枚ずつ提示され，それぞれの顔の魅力を，「全く魅力的でない」から「とても魅力的である」まで８段階で判断した．Ⓑ行動の善悪判断課題では，被験者は270の文章が一つずつ提示され，それぞれの文章から受ける人物の善悪の印象を，「とても悪い」から「とても良い」までの８段階で判断した．Ⓒ明るさ判断課題では，被験者は90枚の四角形刺激が一枚ずつ提示され，それぞれの刺激の明るさを「とても暗い」から「とても明るい」までの８段階で判断した．この課題はⒶとⒷの課題に対する視知覚とボタン押し運動に対する統制課題として使用された．

2. 4.　画像の取得と解析

すべてのMRI画像はGE社製４テスラのMRIスキャナーによって撮像された．刺激はゴーグルタイプのディスプレイに提示され，ボタン押しは光ファイバーケーブルを通して反応を取得できる８ボタンの反応ボックスによって計測された（左手に４つ，右手に４つのボタンを持つ）．スキャンに伴うノイズは耳栓によって軽減され，頭部はクッションを使って固定することによって，動きが抑制された．位置決めの画像が撮られた後，EPI法によるfMRI撮像が行われた（64×64 matrix，TR=1500 ms，TE=31 ms，Flip angle=60 degree，FOV=24 cm，34 slices，3.8 mm厚スライス）．

データ解析にはSPM５ソフトウェアを使用した．統計解析のための事前処理の後，統計解析が行われた．統計解析では，１）．顔の魅力と行動の良さに対して共通して賦活が増加していく領域，２）．顔の魅力と行動の良さに対して共通して賦活が減少していく領域，が求められた．また，３）．１）と２）で同定された領域間の機能的関連を，相関解析（ピアソン）によって検証した．

3.　結　果

3. 1.　顔の魅力と行動の良さに対して共通に賦活が増加する領域

図２に示すように，Ⓐ顔の魅力判断課題とⒷ行動の善悪

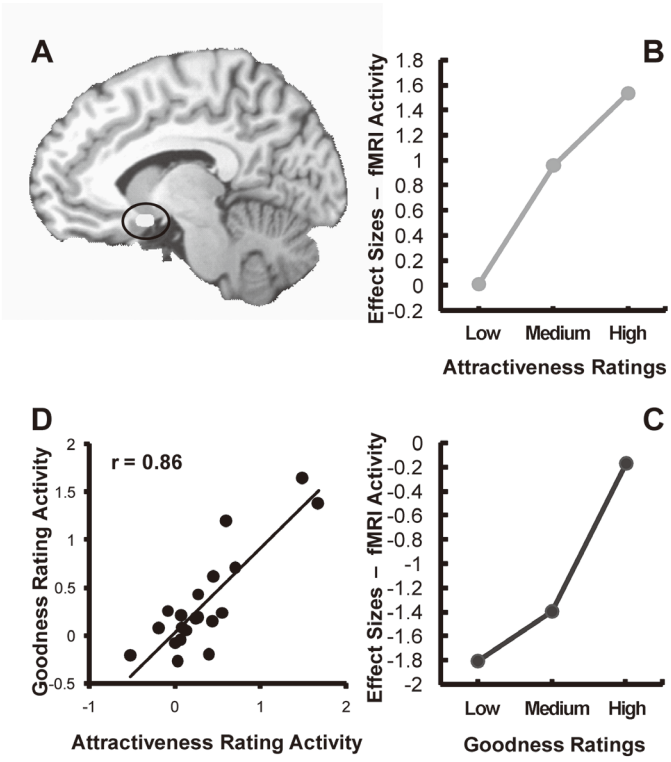


図２　眼窩前頭皮質の賦活と２課題間の相関．A) 眼窩前頭皮質の賦活，B) 顔の魅力判断課題における眼窩前頭皮質の賦活パターン，C) 行動の善悪判断課題における眼窩前頭皮質の賦活パターン，D) 眼窩前頭皮質の賦活における顔の魅力判断課題と行動の善悪判断課題の間の相関．

判断課題において，判断の値の上昇にしたがって賦活が増加する領域として，右の内側眼窩前頭皮質が同定された．また，この領域の賦活に関してⒶとⒷの課題の間での相関解析を行ったところ，有意な正の相関が認められた（r=0.86, p<0.01）．

3. 2. 顔の魅力と行動の良さに対して共通に賦活が減少する領域

図３に示すように，Ⓐ顔の魅力判断課題とⒷ行動の善悪判断課題において，判断の値の上昇にしたがって賦活が減少する領域として，右の島皮質が同定された．また，この領域の賦活に関してⒶとⒷの課題の間での相関解析を行ったところ，高い正の相関が認められた（r=0.78, p<0.01）．

3. 3. 内側眼窩前頭皮質と島皮質との機能的関連

先の解析で同定された内側眼窩前頭皮質と島皮質の機能的関連を検証するために，２つの領域から得られた賦活に関して相関解析を行ったところ，２つの領域の間に有意な負の相関を認めた（r= − 0.41, p<0.01）．図４に相関解析の結果を示す．

4. 考　察

本研究では，「顔の魅力」と「行動の良さ」が向上するのに伴って，内側の眼窩前頭皮質の賦活が増加することが認められた．このことは，魅力的な顔や行動の良さは人間にとって報酬としての機能を持つことを反映しているのであろう．多くの先行研究では，眼窩前頭皮質は報酬の処理において重要な役割を果たすことが報告されている[15−18]．実際にいくつかの脳機能イメージング研究では，魅力的な顔[19, 20]や倫理面・行動面での善良[21−23]さは，脳内で社会的な報酬として処理される可能性が示唆されている．おそらく，本研究で認められた内側眼窩前頭皮質の賦活は，BGステレオタイプの処理における「顔の美しさ」と「行動の善良さ」を媒介し，それらの情報を一種の報酬として処理していたことを反映しているのであろう．

一方，本研究において同定された島皮質では，「顔の魅力」と「行動の良さ」の低下にしたがって，その賦活が逆に増加していることが示された．このことは，島皮質が魅力的でない顔[10, 13]や倫理面での悪さ[12−14]に対して反応する，という先行研究の結果と一致している．別の先行研究は，

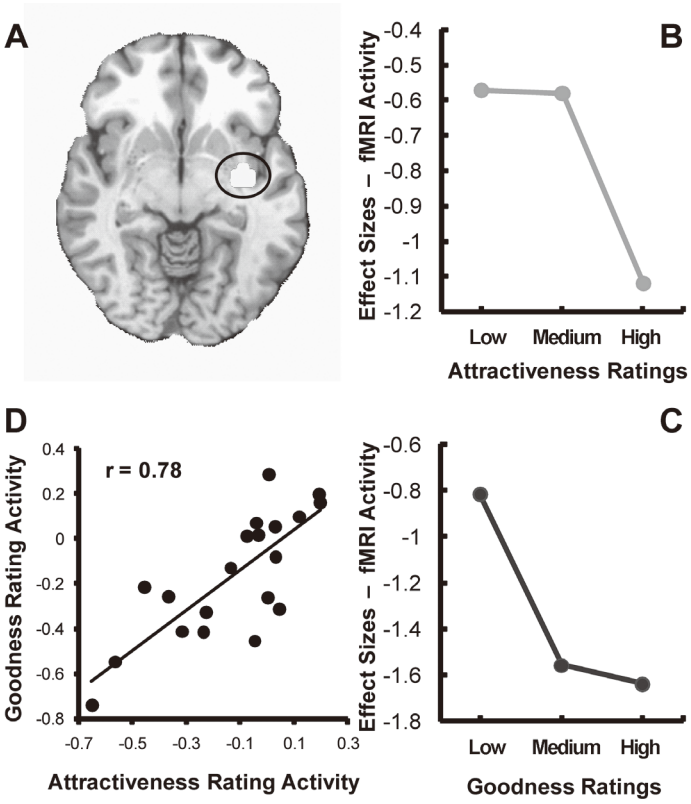


図３　島皮質の賦活と２課題間の相関．A) 島皮質の賦活，B) 顔の魅力判断課題における島皮質の賦活パターン，C) 行動の善悪判断課題における島皮質の賦活パターン，D) 島皮質の賦活における顔の魅力判断課題と行動の善悪判断課題の間の相関．

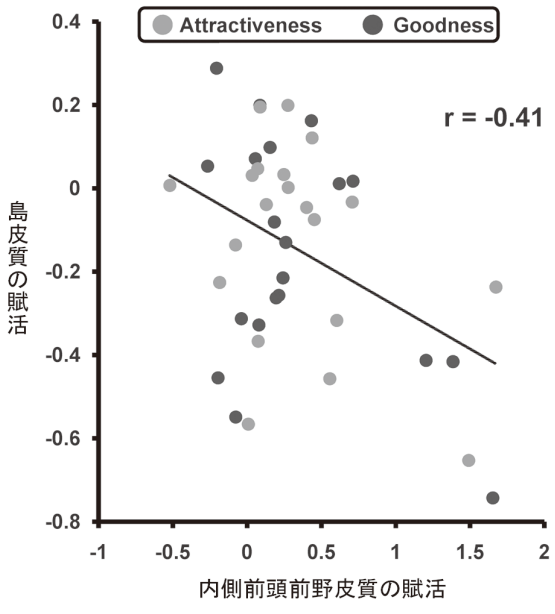


図４　眼窩前頭皮質と島皮質の相関

島皮質の有意な賦活は，罰[24]，嫌悪や恐れ[25]，社会的痛み[26]，不公平さ[27]などの避けるべきネガティブな情報の処理において観察されることを示している．おそらく本研究で観察された島皮質の賦活は，BGステレオタイプの処理における「顔の魅力の低さ」と「行動の悪さ」を媒介し，それらの情報を避けるべきものとして処理していたことを反映しているのであろう．

さらに，本研究で同定された内側眼窩前頭皮質と島皮質の賦活は有意な負の相関を示した．このことは，これらの２領域の機能的連関を基盤として，BGステレオタイプの情報処理が行われている可能性を示唆している．BGステレオタイプに関する心理学的研究では，BGステレオタイプの心理的基盤として，①ポジティブバイアス，②ネガティブバイアス，③ポジティブバイアスとネガティブバイアスの組み合わせ，の３つの可能性を報告している．①ポジティブバイアスとは，ポジティブな刺激に対して反応する心理的傾向を示しており，②ネガティブバイアスとは，ネガティブなものを避けようとする反応の心理傾向を示している．本研究ではポジティブなものに対する反応として内側の眼窩前頭皮質の賦活を同定し，ネガティブなものに対する反応として島皮質の賦活を同定した．このことは，BGステレオタイプは２つの異なったシステム，すなわちポジティブバイアスとネガティブバイアスの両方が関与することを示唆している．本研究で同定された内側眼窩前頭皮質と島皮質の間の有意な負の相関関係は，BGステレオタイプにおける２つのシステムの連関によって，我々の人物に対する反応バイアスが決定される可能性を示しており，③ポジティブバイアスとネガティブバイアスの組み合わせ，がBGステレオタイプには重要なのであろう．

（参考文献）

1）Dion K, Berscheid E, and Walster E: What is beautiful is good. J. Pers. Soc. Psychol., 24, 285-290, 1972.

2）Efran MG, and Patterson E: Voters vote beautiful: The effect of physical appearance on a national debate. Can. J. Behav. Sci., 6, 352-356,1974.

3）Burke DM, Ames MA, Etherington R, and Pietsch J: Effects of victim's and defendant's physical attractivenss on the perception of responsibility in an ambiguous domestic violence case. J. Family. Violence, 5, 199-207, 1990.

4）Efran MG: The effect of physical appearance on the judgment of guilt, interpersonal attraction, and severity of recommended punishment in a simulated jury task. J. Res. Pers., 8, 45-54, 1974.

5）Kulka RA and Kessler JB: Is justice really blind?-The influence of litigant physical attractiveness on juridical judgment. J. App. Soc. Psychol., 8, 366-381, 1978.

6）Piehl J: Integration of information in the "courts:" Influence of physical attractiveness on amount of punishment for a traffic offender. Psychol. Rep., 41, 551-556, 1977.

7）Bray S, Rangel A, Shimojo S, Balleine B, and O'Doherty JP: The neural mechanisms underlying the influence of pavlovian cues on human decision making. J. Neurosci., 28, 5861-5866, 2008.

8）Ishai A: Sex, beauty and the orbitofrontal cortex. Int. J. Psychophysiol., 63, 181-185, 2007.

9）Kranz F, and Ishai A: Face perception is modulated by sexual preference. Curr. Biol., 16, 63-68, 2006.

10）O'Doherty J, Winston J, Critchley H, Perrett D, Burt DM, and Dolan RJ: Beauty in a smile: the role of medial orbitofrontal cortex in facial attractiveness. Neuropsychologia, 41, 147-155, 2003.

11）Moll J, Krueger F, Zahn R, Pardini M, de Oliveira-Souza R, and Grafman J: Human fronto-mesolimbic networks guide decisions about charitable donation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 103, 15623-15628, 2006.

12）Zahn R, Moll J, Paiva M, Garrido G, Krueger F, Huey ED, and Grafman J: The Neural Basis of Human Social Values: Evidence from Functional MRI. Cereb. Cortex., 19, 276-283, 2008.

13）Krendl AC, Macrae CN, Kelley WM, Fugelsang JA, and Heatherton TF: The good, the bad, and the ugly: an fMRI investigation of the functional anatomic correlates of stigma. Soc. Neurosci., 1, 5-15, 2006.

14）Hsu M, Anen C, and Quartz SR: The right and the good: distributive justice and neural encoding of equity and efficiency. Science, 320, 1092-1095, 2008.

15）Martin-Soelch C, Leenders KL, Chevalley AF, Missimer J, Kunig G, Magyar S, Mino A, and Schultz W: Reward mechanisms in the brain and their role in dependence: evidence from neurophysiological and neuroimaging studies. Brain Res. Brain Res. Rev., 36, 139-149, 2001.

16）McClure SM, York MK, and Montague PR: The neural substrates of reward processing in humans: the modern role of FMRI. Neuroscientist, 10, 260-268, 2004.

17）O'Doherty J: Reward representations and reward-related learning in the human brain: insights from neuroimaging. Curr. Opin. Neurobiol., 14, 769-776, 2004.

18）Rolls ET: The orbitofrontal cortex and reward.

Cereb. Cortex, 10, 284-294, 2000.
19) Aharon I, Etcoff N, Ariely D, Chabris CF, O'Connor E, and Breiter HC: Beautiful faces have variable reward value: fMRI and behavioral evidence. Neuron, 32, 537-551, 2001.
20) Cloutier J, Heatherton TF, Whalen PJ, and Kelley WM: Are attractive people rewarding? Sex differences in the neural substrates of facial attractiveness. J. Cogn. Neurosci., 20, 941-951, 2008.
21) Bartels A, and Zeki S: The neural correlates of maternal and romantic love. Neuroimage, 21, 1155-1166, 2004.
22) Izuma K, Saito DN, and Sadato N: Processing of social and monetary rewards in the human striatum. Neuron, 58, 284-294, 2008.
23) Singer T, Kiebel SJ, Winston JS, Dolan RJ, and Frith CD: Brain responses to the acquired moral status of faces. Neuron, 41, 653-662, 2004.
24) O'Doherty J, Critchley H, Deichmann R, and Dolan RJ: Dissociating valence of outcome from behavioral control in human orbital and ventral prefrontal cortices. J. Neurosci., 23, 7931-7939, 2003.
25) Phan KL, Wager T, Taylor SF, and Liberzon I: Functional neuroanatomy of emotion: a meta-analysis of emotion activation studies in PET and fMRI. Neuroimage, 16, 331-348, 2002.
26) Eisenberger NI, Lieberman MD, and Williams KD: Does rejection hurt? An FMRI study of social exclusion. Science, 302, 290-292, 2003.
27) Sanfey AG, Rilling JK, Aronson JA, Nystrom LE, and Cohen JD: The neural basis of economic decision-making in the Ultimatum Game. Science, 300, 1755-1758, 2003.

身体加工と化粧に関する、日本及び英語圏における文化表象の分析

お茶の水女子大学大学院博士後期課程
英　美由紀

Based on the view that the body is an intersecting site for power relations in society such as gender and race, this research focuses on Asian women's bodies on which beauty practices, particularly cosmetic surgery, one of the most typical modern example, are performed. This present report overviews the related theories: while some look at these bodies as a reflection of asymmetrical racial power relations, the others explore the possibility of the subversion of the dominant power structure. An introduction to these critical theories in the West in this report aims to share theoretical knowledge and activate discussions on this issue in Japan.

本研究は（1）身体加工や化粧を論ずるための理論枠組の整理、（2）日本及び英語圏における表象作品の分析を目的とするものである。研究期間は2年であり、初年度の研究はジェンダーを主眼としながら、これらの美容行為が歴史的に特定のジェンダー、すなわち女性に関連づけられるようになった経緯や、この問題について活発な議論がなされてきた英語圏の理論動向の概略を示した。社会・文化的構築物とみなされる身体は種々の実践を通じ、既存の諸規範や構造を上書きする一方、それらを揺るがし、再構築する潜在的な可能性も有するという思潮を背景に、これまで（とりわけフェミニズムの文脈で）否定的に捉えられてきた女性の美容行為の意味づけに一部変化が生じているためである。

美容行為は当初ジェンダーの観点から問題化されることが多かったが、それがこの問題の唯一の分析軸でないことは言うまでもない。例えばアメリカでは美容外科における有色人患者の割合が増加傾向にあることが指摘され、2007年には全美容外科手術件数の約４分の１にのぼった――ヒスパニック系、アフリカ系患者は前年比各８％、アジア系患者は同26％の増加 ―― とされるが[1)]、この点に着目し新たに人種の視点を導入することも可能となる。しかしこれまでの美容外科に関するフェミニストの議論は人種の観点を欠いており、また人種に言及した場合であっても、その扱いは疑問の余地を残すものであったとクレシダ・J・ヘイズ（Cressida J. Heyes）は指摘する。ヘイズがとりわけ再考の必要性を訴えるのは、アジア人系アメリカ人の美容外科手術を批判的に考察したユージニア・コー（Eugenia Kaw）の論考である。コーはアジア人的な身体的特徴を外科的に消去するような手術は、白人的な美の基準にもとづいた身体規範の（再）生産であるとした。それに対し、身体行為を通じた人種的規範や権力関係の攪乱という潜在的可能性も看過されるべきではないとするのが、ヘイズの主張である。

美容行為をめぐっては以上のような議論が提出されてきていることから、今年度はアジア人の美容外科手術に焦点を当てたコーとヘイズの議論を中心に、人種の文脈においても近年理論枠組が変化しつつあることを概観した。また従来は欧米の強力な影響のもとに形成されたと考えられがちであった現代日本の美の規範を、より双方向的な、複雑な様相をはらむものとして捉え直したローラ・ミラー（Laura Miller）の研究にも着目した。さらにこうした理論動向が日本の文化表象テクストにも反映されていることを考察した。

1．美容行為における人種の議論

自身が編著者の1人である本の中の１章、“All Cosmetic Surgery is ‘Ethnic’: Asian Eyelids, Feminist Indignation, and the Politics of Whiteness”において、これまでのフェミニストによる身体政治の分析を、「詳細に論じることなしに人種に言及している」として批判したヘイズは[2)]、その例としてエリザベス・ハイケン（Elizabeth Haiken）やアン・バルサモ（Ann Balsamo）の名を挙げている。前者は20世紀アメリカにおける美容外科の発展をたどった *Venus Envy : A History of Cosmetic Surgery* 中の１章で人種問題を取り上げ、アメリカで理想とされる身体美が白人、とりわけアングロサクソンや北欧系のそれであると述べている[3)]。しかしヘイズによれば､ハイケンの著作も「現代世界の倫理的・政治的複雑さよりも、構造的な全体像」を示したに過ぎない[4)]。また *Technologies of the Gendered Body: Reading Cyborg Women* を著した後者も、美容外科医が参照するテキストに掲載されているのが白人女性である事実などには触れているが[5)]、人種の問題に深く踏み込むことはしていない。

The Representation of Cosmetic Surgery and Makeup in Japan and Anglo-American Countries : An Analysis from a Cultural Perspective
Miyuki Hanabusa
Postgraduate School of Ochanomizu University

一方、分析の軸足を全面的に人種に置いた研究も少数は存在する。サンダー・L・ギルマン（Sander L. Gilman）による美容外科の文化史、*Making the Body Beautiful : A Cultural History of Aesthetic Surgery*はその代表的な例である。彼は典型的な西欧美が支配的規範となっている状況においては、美容外科手術の基本的な動機は「『人種的』差異のしるしと見られる個所を修正すること」、言い換えれば「『白人として通用し』ようとする欲望」であるという[6]。同書はユダヤ人をはじめとする人種的少数者の手術を扱い、日本の美容外科の発展についても一定の紙面を割いている。しかしギルマンの研究は「人文学的・歴史的理解に非常に重要」ではあるものの、「ジェンダーがいかにこうした現象を構造化しているかについての扱いは表層的、説明的な域を出ない」として、ヘイズによりその功罪が指摘されている[7]。

2．コーと後継者たち――その問題点

ヘイズはフェミニストの美容外科の文献における人種への問題意識の希薄さとともに、その扱い方についても疑問を表明しているが、その代表として取り上げられるのがコーである。コーの1993年の論文“Medicalization of Racial Features: Asian-American Women and Cosmetic Surgery”は、そのテーマの希少性――アジア系アメリカ人に焦点をあてた美容外科研究――と、後にデータを更新してオックスフォード大学出版局発行の論文集*The Politics of Women's Bodies : Sexuality, Appearance and Behavior*に収められ版を重ねたことから、「最も広範に引用される、人種性の消去としての美容外科手術に関するフェミニストのテキスト」として[8]、その影響力が長く続いた。

コーの論文はまず、1999年にアジア系アメリカ人が全美容外科患者（顔面の施術）に占めた割合が全米における住民の比率を２％上回る６％であり、その施術箇所も特定であった――白人女性が手術により変えようとする箇所が人種的なアイデンティティを示す従来的な指標とは基本的に一致しないのに対し、アジア系アメリカ人の場合は、「小さくて細い目」や「低い鼻」などそうした指標と一致した――事実を挙げる。（2007年の北米においてもアジア系患者に最も人気のある手術は重瞼術、整鼻術、豊胸であった事実は、依然としてこの傾向に変化がないことを伝えている[9]。）そしてここに人種的マイノリティに独自の身体観、つまりこうした集団の成員は支配的な文化によって形成された身体イメージを内在化することで、「自身の身体部分を嫌悪し、傷つけ、修正する」ものであることを指摘する。言い換えればアジア系住民が手術により達成しようとする美の基準は、「人種イデオロギーに誘導されている」というのである[10]。 コーの議論は身体を媒介とした個人と社会構造の関係を共謀として捉え、前者の後者への能動的な働きかけの余地を想定しないものと言えるが、この「コー・モデル」は続く研究者たちにも長く受け継がれていくことになる。

3．理論枠組のシフト

コーに代表されるようなフェミニストによる人種の議論の問題は、近年の思潮で女性の美容外科手術がエンパワーメントの手段として賞賛されるようになっていることとの間の「ダブルスタンダード」にあると、ヘイズは言う[11]。すなわち白人女性の手術に想定される規範や権力秩序への抵抗や攪乱の契機が、有色人女性には想定されていないというのである。

ヘイズ自身も言及しているように、このような主張はキャシー・デイヴィス（Kathy Davis）によってもなされてきた。デイヴィスの2003年の著作*Dubious Equalities and Embodied Difference : Cultural Studies on Csosmetic Surgery*には、人種的マイノリティの手術が通常「白人の美容外科手術ほどには正当化のための言説空間を持たない」ことに対する疑問が呈されている。白人の手術にはエンパワーメントの契機が模索される一方、人種的特徴を消去するような手術は「『内在化された人種主義』の徴候か、抑圧的な外見の規範との背信的な共謀」とみなされるというのである。しかしこのような手術は、「人種的なアイデンティティの徹底的な拒絶」に還元されるのではなく、「体制に抵抗する方法」として模索されるべきだというのがデイヴィスの主張である[12]。

同様の観点から、フェミニストの人種に関する美容外科の文献は「『個人の行為の構造的な過剰決定』に陥っている」とするヘイズも、「女性の共謀、抵抗、受動性、エイジェンシーのより精緻な分析」の必要性を説く。そして「人種的少数者による美容外科手術の典型」であり、「最も多く議論の対象となってきた、政治的に議論の余地を残す現代の・・・施術」であるアジア人の重瞼術に焦点を当てたコーの論考を議論の俎上に載せ、その欠点――少ないインタビュー・データからの普遍化の傾向、内在化された人種差別主義という偏狭な分析による弊害、アプリオリな結論――を指摘するのである[13]。

ヘイズはまた一重瞼や重瞼術がアジア人に特有であるかのようなコーの議論の前提そのものを問い直し、生来二重瞼を有するアジア人は多く存在し、重瞼術はアンチエイジングの目的で白人にも施されるという事実に注意を喚起する。そもそも目を「アジア人」と「非アジア人」型に、手術を「白人」と人種的マイノリティのそれに類別すること自体、単純な二分法に陥っていることに他ならない。そして必ずしも一方向的ではない美容外科の可能性―例えば異国趣味（エキゾチシズム）やエロチシズムの獲得を目的とした、白人による「人種的」身体特性の外科的盗用―を示唆することで、ヘ

イズは従来のアジア人の重瞼術の議論に見られる「典型を超え」ようとするのである[14]。

このような見方は日本人の美容行為に関しても提出されている。日本は他のアジア諸国と同様、西欧に多大な影響を受けてきた歴史的・社会的背景を有し、それは理想美の基準にも及ぶことから、しばしば白人的な身体規範との関連から捉えられてきた。しかしミラーは*Beauty Up: Exploring Aesthetics of Modern Japan*において、支配－被支配という定式化された欧米との関係を土台に論じられがちであったエステや化粧品等の日本の美容関連商品・サービスを、「クレオール化（creolization）」、「混交（syncretization）」等の概念を用いながら、より相方向的な文脈において捉え直している。これらの概念はミラー自身により、「文化的な相互浸透のプロセスであり、二つ以上の異なった文化が混交し独自の結果を生成するもの」と定義され、日本の美容関連商品やサービスを欧米からの影響とするのは「（白人の側からの）自民族中心的な態度」であり、明治期の美のイデオロギーへの変化さえ「必ずしも欧米のスタイルの単純な模倣とはいえない」と言う。とりわけ1990年代初頭以降の日本における美しさのタイプの拡がりには、「人種的純粋さや同質性といった理想の拒絶」や「人種的盗用」などの様々な意味を見出すことができるとして、エンパワーメントとしての意義を強調している[15]。

4．日本のテクストにおける美容外科表象

日本における美容外科の発達は比較的遅く、標榜科として認可されたのはようやく1978年になってのことである。しかし1990年代に入ると美容外科クリニックの数は倍増し[16]、2000年頃にはかつて９対１だった再建手術と美容手術の割合が逆転した[17]。また患者の低年齢化の傾向も指摘されるようになっている[18]。

このような状況にあって、美容外科は様々な表象テクストでも主題として取り上げられるようになった。それについてはこれまでにも拙論“Reading Dual Meanings of Power on Young Women's Bodies: The Representation of Cosmetic Surgery in Japanese Manga”などで考察している。男－女のみならず、白人－有色人という二項対立的な構図においても、その各一方のみが医療対象と関連づけられてきた文化言説を問い直すと同時に、美容外科手術が施される若い女性登場人物の身体に従来の人種にまつわる規範や秩序の攪乱の契機が見出されることを検証したものである[19]。

（引用文献）

1）Heyes CJ, Jones M, : Cosmetic Surgery: a feminist primer, Ashgate, Farnham and Burlington, 2009, 4.

2）Heyes CJ, : All cosmetic surgery is “ethnic”: Asian eyelids, feminist indignation, and the politics of whiteness, In : Heyes CJ, Jones M (eds): Cosmetic surgery: a feminist primer, Ashgate, Farnham and Burlington, 2009, 193.

3）Haiken E, : Venus envy: a history of cosmetic surgery, The John Hopkins University Press, Baltimore, 1997, 175-227.

4）Heyes, 193.

5）Balsamo A, : Technologies of the gendered body: reading cyborg women, Duke University Press, Durham and London, 1996, 59-61.

6）Gilman SL, : Making the body beautiful: a cultural history of aesthetic surgery, Princeton University Press, Princeton and Oxford, 1999, xvii-xviii.

7）Heyes, 192.

8）Heyes, 194.

9）Heyes, 201.

10）Kaw E, : Medicalization of racial features: Asian-American women and cosmetic surgery, In : Weitz R (ed): The politics of women's bodies: sexuality, appearance and behaviour, 2nd ED, Oxford University Press, Oxford, 2002, 185, 189.

11）Heyes, 192.

12）Davis K, : Dubious equalities and embodied differences: cultural studies on cosmetic surgery, Rowan and Littlefield Publishers, Lunham, 2003, 94, 101.

13）Heyes, 193.

14）Heyes, 200-201.

15）Miller L, : Beauty up: exploring aesthetics of modern Japan, University of California Press, Berkeley and Los Angeles, 2006, 3-5, 23, 26, 32, 204.

16）石井政之, : 肉体不平等, 平凡社新書, 2003, 151頁． 山下柚実, : 美容整形―「美しさ」から「変身」へ, 文藝春秋, 2001, 262頁.

17）塩谷信幸, : 美容外科の真実, 講談社, 2000, 12頁.

18）Gilman, 101-102.

19）Hanabusa M, : Reading dual meanings of power on young women's bodies: the representation of cosmetic surgery in Japanese manga, In : International research in children's literature, 1, 1, 2008: 82-98.

白斑に対するメイクアップケア外来は白斑患者のQOLを改善する

京都大学大学院医学研究科皮膚科学
谷岡　未樹

Background Cosmetic camouflage is important for patients with vitiligo vulgris. However, few studies have investigated its benefit for vitiligo patients.
Objectives To analyze the psychological effects on patients with vitiligo vulgaris by camouflage lessons performed in vitiligo clinics in Kyoto University Hospital and Fukui Red Cross Hospital, Dermatological Life Quality Index (DLQI) questionnaires were collected before and one month after camouflage lessons.
Patients Patients with vitiligo vulgaris, who visited our clinics in 2008 and had never experienced camouflage, were enrolled in this study. They took camouflage lessons and continued subsequent self-camouflage for one month. Control patients took no lessons and no camouflage.
Results Camouflage improved the scores of Dermatological Life Quality Index (DLQI), compared with those without camouflage (p=0.005). Camouflage improved DLQI scores from 5.90 to 4.48. In DLQI subcatecories, camouflage lessons improved a subcategory of "symptoms and feelings" (p=0.0037).
Conclusions These data supported the idea that camouflage for patients with vitiligo not only covers the white patches but also improves their quality of life.

1．緒　言

京都大学皮膚科では2005年4月より白斑専門外来を開設し、これまでに200例以上の「白斑」を呈する疾患を集積してきた[1)]。また，2007年より色素異常症に対するメイクアップケア外来を定期的に開催している。2008年10月より福井赤十字病院皮膚科でも同様に白斑専門外来とメイクアップケア外来を立ち上げた。我々はこれまでに、「白斑」を呈する疾患の鑑別診断およびその治療ならびにメイクアップケア外来を通じて得られた化粧ニーズやカモフラージュメイクの工夫について報告してきた[1-9)]。

尋常性白斑の治療は、ナローバンドUVB治療の進歩によっても、その効果が現れるまでには一定の時間を要するし、治療に反応しない患者も存在する。また、尋常性白斑は生命を脅かす疾患ではないが、病変が目に見えるため、特に露出部に病変が存在する場合にはその心理的および社会的影響は大きい。そこでカモフラージュメイクが重要な役割を果たすことになる。白斑を他人から見えなくすることで患者は安心感を取り戻し、高いQOLにつながる[5)]。京都大学皮膚科および福井赤十字病院皮膚科ではメイクアップケア外来を開設し、白斑患者のメイク指導に当たっている。その過程で、様々なカモフラージュメイク技法を患者に紹介し、新規のカモフラージュメイクにおける工夫を行ってきた[6)]。広範囲の白斑に対しては境界部にグラデーションを付けてコントラストをなくすことで非常に目立ちにくくなる。また、カモフラージュメイクが日常生活中に落ちてくることが課題であったため行われるようになった工夫が非アルコール性皮膜（キャビロン®）を用いたメイク後のカバーである[7, 8, 9)]。カモフラージュメイクにより白斑は全くわからないようにできるが、それだけにカモフラージュメイクが他人の前ではがれ落ちることはなんとしても避けたい。非アルコール性皮膜をメイク後に使用することで入浴するまでメイクが落ちないようになった。本研究では、これらの工夫をふまえて、メイクアップケア外来が尋常性白斑患者に与える影響についてDermatology Life Quality Index（DLQI）を用いたアンケート調査により評価した。また、3年間におけるメイクアップケア外来のまとめについて報告する。

Camouflage for patients with vitiligo vulgaris improved their quality of life

Miki Tanioka

Department of Dermatology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan.

2．実　験

メイクアップケア外来が尋常性白斑患者のQOLに与える影響を、両施設の倫理委員会の承認を経て、メイクアップケア外来受講前後におけるDermatology Life Quality Index（DLQI）を用いたアンケート調査で評価した[10)]。対照群はメイクアップケア教室を受講していない白斑患者とした。メイクアップケア外来はボランティアスタッフにより行われ、使用するメイク用品は患者に無償提供された。研究はヘルシンキ宣言に基づいて、倫理委員会の承認を受けたプロトコール通り実施された。

メイクアップケア外来受講者は、受講前と受講後１ヶ月目にアンケートに回答した。また、メイクアップケア外来の非受講者は、１ヶ月の間隔を空けてアンケートに回答した。メイクアップケア外来を受診するかどうかは、患者の

自由意志を優先した。

3．結果と考察

メイクアップケア教室に参加した患者のプロフィールについて、患者の年齢、罹病期間、性別は受講群と非受講群に優位差はなかった。露出部の病変は受講群の方が高い比率であった。メイクアップケア外来を受講して白斑に対してカモフラージュメイクを行っている患者はDLQI総スコアが5.90から4.48に改善した（図１）。一方、非受講群では、DLQI総スコアが3.18から4.36に悪化した。両群におけるこの変化は優意差をもっていた（p<0.005）。

非露出部に病変のある患者を除いた27人について解析してみても、カモフラージュメイクはDLQI総スコアの改善と関連していた（*P*=0.01）。

DLQIサブスコアについてその変化を表にまとめた（図２）。６つのサブスコアのうち、メイクアップケア外来受講群では症状／感情のスコアが改善していた。これは、カモフラージュメイクにより服装や日常生活の自由度が増したことによると推測された。

2007年10月から2010年９月までの３年間でメイクアップケア外来に105名の患者が受診した。参加したのは男性18人、女性87人であり、男女比は1：4.8であった。年齢は１歳から81歳まで分布し、平均年齢は48.6歳であった（表１）。疾患の内訳は尋常性白斑（78人）が74.3%を占めた（表２）。その他に全身性エリテマトーデス（４人）、円板状エリテマトーデス（３人）、術後瘢痕（３人）、酒さ（３人）と続いた。メイクアップケア外来を施した部位は顔面78人（74.3％）、手24人（22.9％）、頸部16人（15.2％）、体４人（3.8％）、下肢3人（2.9％）であった（表３）。なお、105人の患者のうち10名は2回以上メイクアップケア外来を受診していた。

4．総　括

これらのアンケート結果から、本研究で行われたメイク

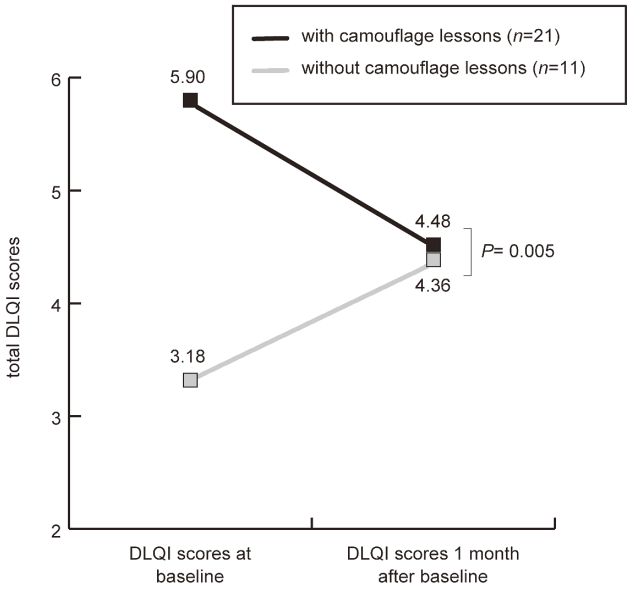


Figure 1　Total DLQI scores of vitiligo patients with or without camouflage.

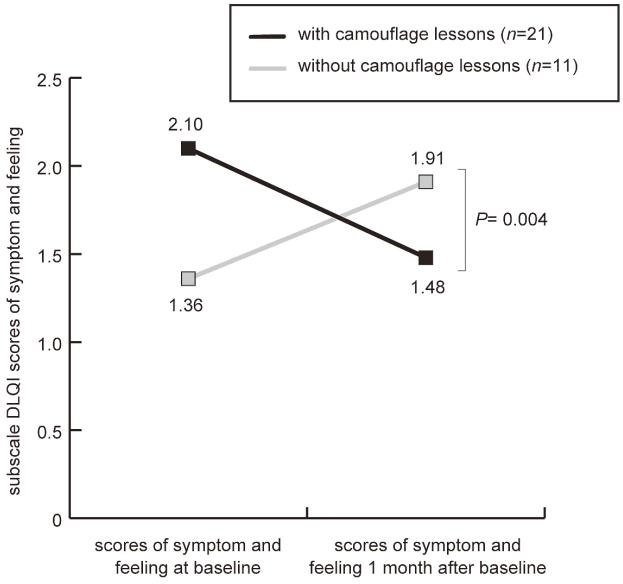


Figure 2　Scores of “symptoms and feelings” of vitiligo patients with or without camouflage.

Table 1　Ages of the patients participating Make-Up Care Clinic.

Age	Number of patients
0 ～ 10 y.o.	7
10 ～ 19 y.o.	9
20 ～ 29 y.o.	9
30 ～ 39 y.o.	12
40 ～ 49 y.o.	5
50 ～ 59 y.o.	14
60 ～ 69 y.o.	24
70 y.o. ～	25
Average	48.6 y.o.

Table 2　Sites for camouflage at the Make-Up Care Clinic.

Sites	Numbers (%)
Face	78 (74.3%)
Hands	24 (22.9%)
Neck	16 (15.2%)
Body	4 (3.8%)
Lower extremities	3 (2.9%)

(Sites can be overlapping.)

Table 3　Skin diseases of the Make-Up Care Clinic patients.

Disease name	Patients number (%)
Vitiligo Vulgaris	78（74.3%）
Systemic erythematodes	4（3.8%）
Discoid erythematodes	3（2.9%）
Postoperative scar	3（2.9%）
Rosacea	3（2.9%）
Dermatomyositis	2（1.9%）
Vogt-koyanagi-Harada disease	2（1.9%）
Hyperpigmentation due to anti-cancer drugs	2（1.9%）
Angioma	2（1.9%）
Café-au-lait spots	1（1.0%）
Posttraumatic scar	1（1.0%）
Alopecia	1（1.0%）
Dyscromatosis symmetrica hereditaria	1（1.0%）
Porokeratosis	1（1.0%）
Scleroderma	1（1.0%）

アップケア外来は白斑患者のQOL改善に貢献していると考えられる。ただし、メイクアップケア外来に参加を表明しなかった患者は、受講者に比べて、もともとQOLが低下していた可能性や、治療に積極的でなかった可能性がある。しかし、このような臨床試験では、厳密な意味での対照群を設定することが難しい。本調査により、少なくともメイクアップケア外来は患者のQOL向上に貢献する可能性が示唆される。カモフラージュメイクは医学的治療ではないが、カモフラージュメイクが適応となる患者に対しては、患者の同意があれば積極的に導入してよい選択肢の一つであると考えられた。

（文　献）

1）Tanioka M, Yamamoto Y, Kato M, Takahashi K, Miyachi Y. Vitiligo vulgaris and autoimmune diseases in Japan: a report from Vitiligo Clinic in Kyoto University Hospital. *Dermato-Endocrinology* 1 (1) : 43-5, 2009.

2）Matsunaga H, Tanioka M, Utani A, Miyachi Y. (Corresponding author)　Familial case of piebaldism with regression of white forelock. *Clin Exp Dermatol* 33 (4) : 511-2, 2008

3）Tanioka M, Takahashi K, Miyachi Y. Narrow band ultraviolet B therapy for inflammatory vitiligo with raised borders associated with Sjogren syndrome. *Clin Exp Dermatol* 34 (3) : 418-20, 2009.

4）谷岡未樹、宮地良樹 ビタミンD3は尋常性白斑に有効か？. **EBM皮膚疾患の治療** p186-190, 2008-2009.

5）Tanioka M, Yamamoto Y, Mayumi Kato, Miyachi Y. Camouflage lessons for vitiligo patients improved their quality of life. In submission

6）Tanioka M, Miaychi Y. Camouflage for vitiligo (Review Article). *Dermatol ther* 22 (1) : 90-93, 2009.

7）谷岡未樹、宮地良樹　非アルコール性皮膜キャビロンを用いた尋常性白斑のメーキャップ法. **臨床皮膚科**　増刊号「最近のトピックス2008」62 (5増) ; 140-143, 2008.

8）Tanioka M, Miyachi Y. Waterproof camouflage for vitiligo of the face using Cavilon™ 3M as a spray. *Euro J Dermatol* 18 (1) : 93-94, 2008.

9）Tanioka M, Miyachi Y. Camouflaging vitiligo of the fingers. *Arch Dermatol* 144 (6) : 809-810, 2008.

10）Tanioka M, Yamamoto Y, Katoh M, Miaychi Y. Camouflage for patients with vitiligo vulgaris improved their quality of life. *J Cosmet Dermatol* 9 (1) : 72-5, 2010.

高齢者のエンゼルケアの標準化と教育コンテンツの開発

名古屋大学医学部附属病院卒後臨床研修・キャリア形成支援センター
平川　仁尚

Purpose and Background

At the terminal stage of life or even after the death, paying attention to their appearance could contribute to improve the quality of life for the elderly themselves, as well as for their family members. They often call the post obitum treatment “Angel Care” and the embalmer’ art “Angel Make”, which are generally practiced by nurses.
However, the nurses have little formal training about Angel Care or Angel Make. In most cases, it is their experienced senior staffs who teach them how to practice.

Therefore, it would contribute to improve a quality of Angel Care/Make if we develop a practical and standard methodology to offer such practices to nurses. As those who die at care facilities for the elderly or their homes are increasing, caregivers, nurses and their family members would be more and more involved in such make-up practice. To improve a quality of Angel Care/Make, we need to develop more appropriate and organized methodology for all concerned.
The purpose of this research is to promote standardizing technical know-how of Angel Care/Make for an elderly person by collaboration with professional beauticians and hairdressers. And at the same time, we aim to develop educational materials easy to understand and practice for nurses, caregivers and their family members.

Results and Discussions

Research duration was one year, from December in 2009 to November in 2010. This research has been explored by three working groups. First is the Center for postgraduate clinical training and career development, Nagoya University Hospital. The second one is NPO All Japan beautician training Association which has been studying cosmetic care for elderly persons mainly in Aichi area. And the last one is Doho University Social welfare Department.
These working groups had addressed 4 tasks in parallel as follows.

1. We develop an Angel Care/Make guideline for all professionals concerned in order to standardize Angel Care/Make practice.
2. We put together a set of change of appearance around the time of terminal stage by reviewing texts of geriatrics and legal medicine.
3. We create a conceptual diagram related to Angel Care/Make (4-level Ladder of Beauty Care Model for an Elderly Person) based on the knowledge obtained by task 2.
4. We develop an educational Angel Care/Make set of contents which is easy to practice especially for nonprofessionals (please refer http://hirakawa-lab.org/). The author has already put into practice to make sure that the set of contents works at the official workshop in Center for Postgraduate Clinical Training and Career Development, Nagoya University Hospital. The 4-level conceptual diagram we have developed shows that a preparation for Angel Care/Make begins well before the terminal stage of life, what reflects to the Angel Care/Make is how the person becomes self-supporting and how the person could keep his/her personality beautifully. To obtain a successful Angel Care/Make, we need to help the person to lead his/her own way of life all through the consecutive stage to a last moment even after death.

The achievement of this research is as follows.

1) We make people more aware that cosmetology has a strong relation with our quality of life. 2) We open various application possibilities of cosmetology for medicine, nursing care, and welfare services, which would contribute to develop a quality of life at not only the end stage of life but also a whole stage of life for an elderly person. 3) We expect to improve academic value of cosmetology for the elderly if an idea of Angel Care/Make become widely recognized in our society and more and more professionals concerned participate in the cosmetology. In fact, though the above mentioned workshop was not a program for an Angel Make practice, we were requested by the participants to give more opportunities for them to learn an Angel Make practice. It suggests that we should respond to such strong needs for learning Angel Make practice from the professionals engaged in the terminal care for the elderly. And by shedding lights on the Angel Care/Make practice and developing its educational guideline, we show what we need more to explore in this educational practice.

We hope that the achievement of this research will be verified scientifically in near future.

1．諸　言

高齢者の看取りが増加している。高齢者の終末期においては、やせ、浮腫み、体液汚染など見た目に問題が生じることが多い。こうした見た目の問題は、高齢者本人のみならず家族の心情も害するものである。終末期および死後においても、身だしなみを整えることで、高齢者本人及び家族のクオリティー・オブ・ライフに寄与するであろう。

こうした観点から、筆者らは、先行的に終末期の整容・美容ケアの重要性に関して明らかにしている[1)]。また、必ずしも終末期ではないが、高齢者の整容・美容ケアの必要性・有効性に関する研究が散見される。しかし、本格的な報告書としては1冊のみ[2)]で、ほとんど関連書籍を検索できなかった。つまり、こうした分野の取り組みは遅れており、経験や試行錯誤により行われているのが現状であると

Standardization of Angel care for elderly person and development of education contents

Yoshihisa Hirakawa

Center for postgraduate clinical training and career development, Nagoya University Hospital

推察される。

死後の処置はエンゼルケア、死後の化粧はエンゼルメイクと呼ばれることが多く、看護師が主に担当している。しかし、看護師はエンゼルケア・メイクに関する系統的な教育を受けておらず、オン・ザ・ジョブ・トレーニングにより学ぶことが多い。エンゼルケア・メイクに関する具体的かつ標準的な方法論を確立し、看護師に示すことでその質の向上が期待される。

また、高齢者の死亡場所として、病院外、つまり高齢者介護施設や在宅が増えていくことが予想されている。病院外では、看護師はもちろんのこと、介護士や家族がエンゼルメイクに関わることが多くなる。そのため、高齢者のエンゼルケア・メイクの質を向上させるためには、前述の標準的な方法論を介護士や家族にも理解しやすいように教育の在り方も検討すべきである。

本研究の目的は、整容・美容の専門職である理・美容師との協働で、高齢者のエンゼルケア・メイクの標準化を行うことである。同時に、看護師、介護士、家族に分かりやすい教育用資材を開発することである。

2. 実　験

研究期間は、2009年12月から2010年11月末までであった。本研究は、名古屋大学医学部附属病院卒後臨床研修・キャリア形成支援センター、愛知県を中心に長年に亘り高齢者の整容・美容に取り組んでいるNPO全国福祉理美容師養成協会、ならびに同朋大学社会福祉学部から構成されるワーキンググループにより実施された。ワーキンググループにおいて、次の4つの課題に並行して取り組んだ。

1）高齢者のエンゼルケア・メイクの標準化を目的として、エンゼルケア・メイクに関わる全ての専門職を対象としたエンゼルケア・メイクに関する教育ガイドラインを作成した（資料1）。

2）老年医学および法医学に関する教科書[3-5]をレビューし、整容・美容に関する高齢者の終末期および死直後の変化をまとめた。

3）2）を基にワーキンググループにおいてエンゼルケア・メイクに関する概念図（4段階高齢者理美容ラダー）を作成した（資料1）。

4）専門家でなくても理解できるようにイラスト等を用いてエンゼルケア・メイクに関する教育コンテンツを開発し、筆者が主催した名古屋大学医学部附属病院卒後臨床研修・キャリア形成支援センター公認ワークショップで実際に用いた。

3. 結　果

3・1　エンゼルケア・メイクに関する教育ガイドライン

資料1に示した。

3・2　整容・美容に関する高齢者の終末期および死直後の変化

高齢者の終末期の変化として、鼻毛・眉毛・耳毛の伸び、やせ、浮腫み、肌荒れ、後頭部の薄毛（寝たきりによる擦れによる）、体液汚染などが挙げられた。また、死直後の変化として、死体現象と定義、死斑、死後弛緩・硬直、死体温の低下、感想、角膜混濁などが挙げられた。

3・3　エンゼルケア・メイクに関する概念図

資料1の右下に示したように、エンゼルケア・メイクに関する概念図を作成した。この概念図は、エンゼルケア・メイクの準備は死後から始まるのではなく、自立の段階からその人らしい美しさを追求し続けた結果がエンゼルメイクへとつながることを表現している。つまり、エンゼルケア・メイクには、自立から死後まで一貫して、全身状態の変化に対応しながら、その人らしさを追求する姿勢が重要であることを示している。

3・4エンゼルケア・メイクに関する教育コンテンツ

3・4・1

主にエンゼルケア部分は、教育用コンテンツとして、筆者の研究室のホームページ（http://hirakawa-lab.org/）上にオープンソースとした。それを資料2として示す。

3・4・2　エンゼルメイクについて

美しさの基本要件として、次の3点を挙げた。

1）清潔（生前からいつも、気を付けて欲しい事）
- 目やに
- 鼻毛・ひげ
- 臭い
- よだれ
- 汗・べたつき

2）その人らしさ
- トレードマーク（髭・帽子・スカーフ・香り・髪色など）

3）肌色・くすみ・肌のつや

また、エンゼルメイクのポイントとして、以下の6点を挙げた。

1）顔全体が乾燥しているので温かいタオルでマッサージをする
2）髪のはねはトリートメントなどをつけて整える
3）睫毛に少しマスカラをつけると、影が出来て安らかな顔に見える
4）顔色を明るくするためにほんのり丸く頬紅を付ける
5）口紅は普段使っていたものをうっすら付ける
6）耳たぶにも少し頬紅を付けることで血色がよく見える

最後に、前述のワークショップで用いたパワーポイント資料を示す（資料3）

4．考　察

本研究では、エンゼルメイクおよびエンゼルケアの標準化とその質の向上に資する教育資材の開発に取り組んだ。本研究の成果により、１）コスメトロジーが人々のクオリティー・オブ・ライフと関係が深いことを広く啓発できる、２）医学・看護・福祉の分野へのコスメトロジーの応用可能性を高め、終末期のみならず高齢者生活全般の質の維持向上に資する、３）エンゼルメイクの必要性に関する認知度が高まり、高齢者に関わる様々な分野の専門職がコスメトロジーに参画することで、高齢者分野におけるコスメトロジーの学問的意義を向上させることなどが期待される。実際に、前述のワークショップはエンゼルメイクを主目的とした教育プログラムでなかったにも関わらず、参加者からエンゼルメイクについてもっと学習したいという要望が出され、高齢者の終末期ケアに関わる専門職の間でエンゼルメイクの学習ニーズがあることが示唆された。また、本研究の成果により医療・介護・福祉の専門職が協働してエンゼルメイク・ケアに関する教育ガイドラインを策定できたことは、この分野の教育活動の方向性を示すことにつながり、有意義であったと考える。今後は、この教育ガイドラインを含めて、本研究の成果の科学的検証が待たれる。

（参考文献）

１）平川仁尚, 葛谷雅文, 加藤利章, ほか1名, : 高齢者の整容・美容ケアに関する看護・介護職員の意識, ホスピスケアと在宅ケア, 16, 10-15, 2008.
２）福祉理美容研究会, : 福祉時代の新しい理美容, ぎょうせい, 東京, 2001.
３）舟山眞人, : 個体死・死体現象, 福島弘文編, : 法医学, 南山堂, 東京, 2002, 9-23頁.
４）池田典昭, : 死体現象, 石津日出雄, 高津光洋編, : 標準法医学・医事法, 医学書院, 東京, 2006, 260-274頁.
５）那谷雅之, : 死体現象, 死後変化, 勝又義直, 鈴木修編, : NEW法医学・医事法, 南江堂, 東京, 2008, 39-46頁.

（資料1－1）

高齢者の終末期および死後における整容・美容ケア教育ガイドライン

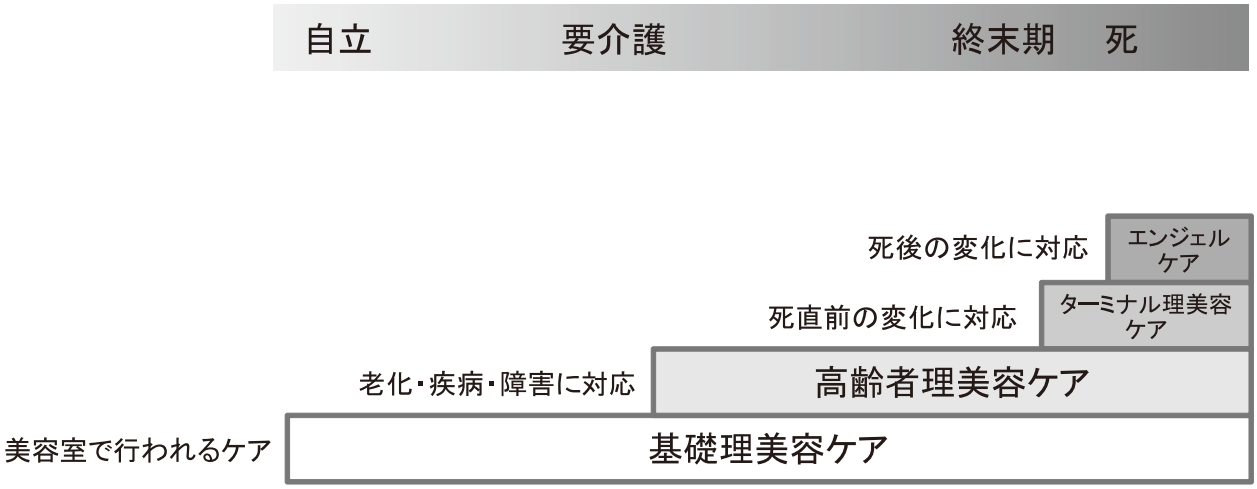
一般目標	行動目標	備考
1.生命倫理 「その人らしさ」の大切さを理解する	1)安楽死・尊厳死について述べることができる	安楽死は法的に認められていないことなど
	2)エイジズム（年齢による差別）について述べることができる	年齢を理由に過少ケアをしないことなど
2.終末期の定義 終末期の定義について理解を深める	1)日本老年医学会の立場表明、WHO[*1]の定義について述べることができる	
3.インフォームドコンセント 高齢者本人と家族の意思を尊重することの重要性を理解する	1)高齢者本人と家族の意思確認の方法について述べることができる	リビングウィル、エンゼルケア、遺体の搬送方法など
4.高齢者の生活の質 高齢者の QOL[*2]について理解を深める	1)QOL の評価方法を知り、対応を考えることができる	高齢者総合機能評価など
5.家族ケア 終末期ケアにおける家族ケアの重要性を理解する	1)介護保険制度等で受けられる社会支援について述べることができる	訪問理美容サービスなど
	2)高齢者本人や家族に共感する態度を示すことができる	傾聴の方法、グリーフケアなど
	3)状況説明が適切にできる	施設での様子、病状など
	4)高齢者本人の整容・美容にも気を配ることができる	整容が乱れると家族にも心理的負担をかけることなど
6.チームアプローチ 多職種間のコミュニケーションの重要性を理解する	1)チームアプローチを必要とする場面を述べることができる	褥瘡、口腔ケア、入浴など
	2)多職種カンファレンスに積極的に参加することができる	
	3)理美容師との協働の必要性を述べることができる	手足顔のマッサージ、ボランティア、エンゼルメイクなど
7.緩和医療・ケア・技術 非医療者が実践すべきケアについて理解する	1)苦痛の評価方法を知り、対応を考えることができる	フェイススケール、NGSSE[*3]など
	2)高齢者の苦痛の特徴について述べることができる	高齢者は痛みを感じにくいなど
	3)終末期の医療行為について述べることができる	酸素吸入など
	4)非医療者に認められているケアについて述べることができる	整容・美容ケア、環境ケアなど
	5)心理的ケア、スピリチュアルケアについて述べることができる	
8.コミュニケーション 高齢者本人や家族とのコミュニケーションの重要性を理解する	1)非言語的コミュニケーションを積極的に活用することができる	パーソナルスペースなど
	2)状況に応じた適切な声かけができる	
	3)コミュニケーションにおける整容・美容の意義について述べることができる	面会の日や誕生日などの節目にメイクをすることなど

（資料1－2）

一般目標	行動目標	備考
9.死の教育 自身の死生観を涵養することができる	1)自分の死を考える	
	2)死の概念と定義を述べることができる	
	3)死の兆候を述べることができる	
	4)高齢者と死を述べることができる	
	5)死生観の歴史を述べることができる	
	6)日本人の信仰と死生観を述べることができる	死を語ることはタブー視されることなど
	7)死のあり方に対する社会的・法的な考え方を述べることができる	脳死、心臓死など
10.環境 QOL の重要な要素であることを理解する	1)環境の要素について述べることができる	音楽、光、臭い、通路の確保など
11.終末期の整容・美容 メイクは死の前後のみならず要介護状態になった時から始まることを理解する	1)見た目の変化の影響について述べることができる 2)高齢者の終末期の整容・美容ケアに関する基礎理論を説明できる	4 段階高齢者理美容ラダー*4 など

＊1　WHO(World Health Organization)・・・(国連)世界保健機構
＊2　QOL(Quality of Life)・・・生活の質
＊3　NGSSE(the Nagoya Graphical Symptom Scale for Elderly)・・・名古屋式高齢者苦痛可視化スケール
＊4　4 段階高齢者理美容ラダー

4段階高齢者理美容ラダー



参考文献
「高齢者終末期ケアに関わる介護スタッフの教育」平川仁尚　植村和正　GeriatricMedicine(老年医学)4月号

（資料2）

死後のケア
（死後の処置）

1

入居されていた高齢者が亡くなられたとき
「エンド・オブ・ライフケア」のひとつとして
死後のケアを行います。

2

目的は、

ご遺体を、死によって起こる外観の変化を目立たないようにし、清潔に美しく保ち、その人らしい姿を整え、他界への旅立ちの準備をする。

体液や排泄物の流出による汚染を防ぐ。

病原微生物の飛散を防ぎ、ご家族や親しい方への感染を予防する。

3

死後ケアは、
医師によって死亡が確認された後、
死後硬直が始まる前
（死後2～3時間）までに
終えます。

4

ご家族・親しい方が希望されるのであれば
最後のふれあいの機会であり、今までの介護を
振り返り、意味づけるきっかけとなったり、介護の
満足感につながるため、一緒にさせて頂きます。
その時には、宗教・信仰や亡くなられた方の
生前の希望などを確認し、死後のケアが
風習や儀式に影響しないよう配慮します。

5

必要物品

6

病院ではエンゼルセット（死後処置セット）として、
以下の物品が揃えられています。

ガウン、マスク、手袋
清拭用具（タオル2・3本、微温湯、バケツまたは微温湯で絞ったタオル2・3本）
美容用具（くし、ヘアブラシ、爪切り、電気髭剃り など）
歯ブラシ、口腔ケア用のポンジやガーゼ、脱脂綿、青梅綿、ガーゼ、綿棒
ピンセット（または割りばし）、絆創膏、膿盆、便器、紙おむつ
白い布（30cm四方）、着衣（本人や家族の希望のものをあらかじめ
準備しておいてもらう。ヘアピース（かつら）や髪飾りなども。）

エンゼルケアキット（必要物品がひとまとめに揃えられたもの）も販売されています。
このようなセットを用意しておくと、急なケアの時にもあわてなくて済むでしょう。

7

死後のケアを始める前に

医師により死亡確認が行われたあと、ご遺体と親しい方とでお別れの時間を過ごして頂きます。

死後のケアにあたり、ご遺体の着衣や宗教上の配慮などを家族に確認し、着衣や身に着けられるものをお預かりします。

家族や親しい方に、死後のケアを一緒にされるか確認します。
死後のケアに参加することには、個々人に様々な考え方や思いがありますので、決して無理強いはしないようにしましょう。

8

死後のケアを始めます

9

まず、

感染予防のマスク、ガウン、手袋を着用します。
これから最期のケアをさせて頂く気持を、
合掌で伝えます。

ご家族の希望で、
死後のケアを一緒にさせて頂く場合にも、
感染予防の視点から、マスクなどを
着用してもらうことが望ましいでしょう。

10

ご遺体につけられたものを取り外し、ご遺体の外観を整える準備をします。

医療器具（心電図モニター、エアウエイ）、
チューブ類（酸素マスクや経鼻カニューレ、点滴ルート）を取り外します。

ペースメーカーを挿入されているご遺体の場合は、
医師により抜去・縫合の必要がありますので、事前に確認しておきます。

傷や点滴の後を、絆創膏でカバーします。

11

体内の内容物を排出します

12

最初に、

亡くなられた後、筋肉が弛緩して
体内の内容物が体外に出やすくなります。
その時にご遺体やベッドが汚れることが
ありますので、それを防ぎます。

次に、

体を、右側を下にして口を開いてから、
膿盆を頬にあて、心窩部を押して 、
胃の内容物を出します。

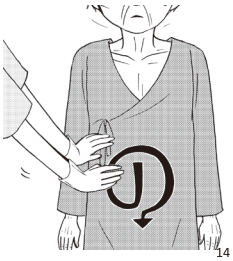
13

尿の排出は、

便器、紙おむつをあて、体を仰向きにします。
下腹の陰部に近い骨（恥骨といいます）を押すことで膀胱が圧迫され、
膀胱内に残った尿を排出します。

最後に、

腹部を「の」の字を描くように圧迫して、
腸に残っている便を排出します。
体は、左側を下にし、
腹部を押しながら直腸内の便を
排出します。



14

ご遺体を美しく整え分泌物を防ぎます

15

まず、

清拭タオルで顔を拭き、眼脂を取り除いたのち、目を閉じます。
目が閉じにくい場合には、ティッシュペーパーを1cm角にカットし、眼球の上に乗せたあと、瞼をあわせます。または、二重瞼用接着剤を瞼の内側に薄く塗り、瞼をあわせることもできます。

そして、

口腔からの異臭を防ぐために、ガーゼや歯ブラシ、スポンジなどを使って口腔清拭をします。舌の上も丁寧に拭き、最後は口腔内に残った水分をしっかりと拭います。唇の乾燥が気になる時には、リップクリームやワセリンを塗ります。顎は死後硬直が最初に現れますので、口腔ケアの後、早めに義歯を入れます。

16

次に、

頭髪の汚れが気になる場合は、ドライシャンプーや洗髪をして整髪します。
全身を両手→胸腹部→足→背部→陰部の順に清拭します。

それから、

体内の分泌物が体外に出ないように栓をするために詰め物をします。
鼻→口→耳→膣→肛門の順に、割り箸またはピンセットを使って、綿を詰めていきます。割り箸を使う場合には皮膚や粘膜を傷つけやすいので特に注意して行います。脱脂綿は水分を吸い、青梅綿は油をはじく性質があるので、詰めるときには脱脂綿→青梅綿という順番で詰めるとよいでしょう。脱脂綿が無い場合、青梅綿だけでも不足はないでしょう。

17

鼻は、

鼻の先端を少し持ち上げて、綿が鼻腔の奥から喉に向かうように詰めていきます 。鼻腔まで詰めると、分泌物の状態によっては小鼻が開いたり、綿が顔からはみ出して容貌が変わり、外観を損ねる場合があります。

綿を詰めていて鼻の付け根が膨らんで見えたり、鼻の穴から綿が見えるようであれば詰め過ぎの状態ですので、時々詰め過ぎではないか注意して見ながら行います。

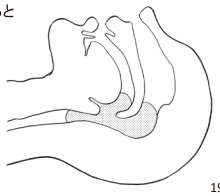
耳の方は、

浸出液、出血の可能性がある場合に脱脂綿を軽く詰めます。

18

口は、

舌を巻きこまないように指で押さえながら、綿を詰めます。綿の量や気道の太さにもよりますが、おおよそ20cm程の綿を詰めていくと、喉の奥の方まで詰めることができます。舌の付け根から綿が見えるようでしたら、詰め過ぎの状態といえるでしょう。ご遺体がやせ過ぎで、生前のイメージからかけ離れてしまっている時には、口角の内側に少し綿をいれて頬に膨らみを出すこともできます。しかし、入れ過ぎると生前の容貌を損なうので注意して、容貌の変化を見ながら慎重に行います。



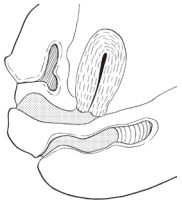
19

肛門は、

体の左側をして綿を詰めていきます。綿の量や直腸の大きさによりますが、綿を20cmほど詰めると肛門から直腸を塞いでいる状態 になるでしょう。

女性の場合は、

体を仰向きにして綿を詰めていきます。
7cmほど綿を詰めると膣を塞いでいる状態になるでしょう。ここでしっかり詰めておくと、尿道を圧迫するので、尿道に詰める必要が無くなります。



20

下着は、

紙おむつまたは尿パットとT字帯をあてます。ご家族によっては普通の下着の着用を希望される場合もあるでしょう。綿を詰めていますので分泌物が体外に出る心配は考えなくてもよいのですが、念のためパットをあてておくと安心でしょう。

髭そり、爪切りも

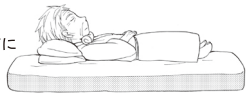
髭剃り、手足の爪切りを行います。髭剃りは、電気カミソリや二枚刃の剃刀を用いた方が、皮膚の状態を美しく保てます。

21

最後に、

衣服を着せます。和式の場合、襟を左前に合わせ 、紐を、女性はへその高さ、男性は腰骨の高さで縦結びにします。死に化粧をし、生前の姿に近づけます。

体を自然な形に整え、両手をお腹の上に重ねます。
口が開いてしまう場合は
早めに枕を高くして、
丸めたタオルをあごの下に
入れておきます。



口が開かなくなってからタオルをはずします。

22

お別れをしていただきます

白い布を顔にかぶせます。

末期の水を準備し、家族や親しい人に行ってもらいます。

23

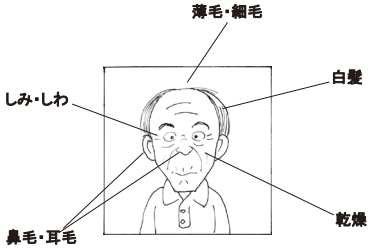
参考文献

日野原重明他（1993），系統看護学講座　専門基礎2　解剖生理学，医学書院，第4版第9刷
藤原和子（2007），これでわかった看取りのケアQ&A，月刊ナーシング，27巻3号，5-14
深井喜代子編（2009），新体系看護学全書　第12巻　基礎看護学③　基礎看護技術Ⅱ，メヂカルフレンド社，第1版，185-190
井上幸子，平山朝子，金子道子編（1999），看護学体系　第8巻　看護の方法3，日本看護協会出版会，第3版，235-236
板垣知佳子（2001），臨終後処置の基本技術　後輩に伝えたい，看護学雑誌，65号2巻，122-127
小林光恵編著（2006），ケアとしての死に化粧　エンゼルメイク研究会からの提案，日本看護協会出版会，第1版第3刷
志自岐康子，松尾ミヨ子，習田明裕，金澤子編（2007），ナーシンググラフィカ⑩　基礎看護学－基礎看護技術，メディカ出版，初版，445-448
杉野佳江編（2003），標準看護学講座13巻　基礎看護学2，金原出版，第5版，423-425
薄井坦子他（2002），系統看護学講座　専門２　基礎看護学2，医学書院，第13版，335-336

24

（資料3）

老化に伴う変化



1

美容の視点から見た高齢者の変化

≪髪≫
薄毛・はり、こしが無くなる・白髪

≪肌≫
シミ・しわ・はり、つやが無くなる、乾燥気味

≪その他≫
長い耳毛、鼻毛、眉毛

2

寝たきりになった場合

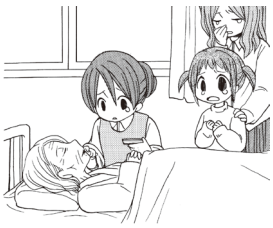
・目やに、鼻毛、後頭部が擦れて裂毛
・シャンプー、髭剃りが困難
・汗・べたつき・臭い

・鏡を見なくなる
・理美容周期の伸び　=美容に対する関心 ⇩

3

人生の最期には・・・・

- やせ
- むくみ
- 肌荒れ・乾燥
- 髪の乱れ
- 汚染



⇒本人・家族の精神的苦痛

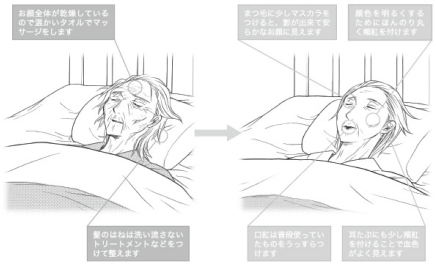
4

エンゼルメイク

- 看護師が主に担当しているが、家族参加も推奨されている
- エンジェルメイクの目標は、「その人らしさ」（＝尊厳）
- 日常ケアの延長線上

5

エンゼルメイクのポイント（その1）



6

エンゼルメイクのポイント（その2）

- 急激な乾燥と体温の低下
  ⇒蒸しタオルとマッサージ
  ⇒クリームで脂分を補う
- 顔色が悪い
  ⇒頬、耳たぶ、瞼にチークで赤みを足す
- 肌が傷みやすい
  ⇒ひげ剃り等で傷がつくと茶色く焦げたような状態になる

7

コスメトロジー研究雑感

平成 20 年度　研究助成

コスメトロジーと経皮吸収

北河　修治

私が現在勤務しています神戸薬科大学は前身が神戸女子薬科大学で、そのためもあって女子学生が約７割を占めています。薬剤師養成を目指した６年制教育を行っていますが、一方で化粧品業界への憧れは強く、女子学生の２～３割は化粧品会社への就職を希望しています。医療の分野でも化粧はとても重要で、患者さんの QOL を高めるためにとても貢献度大で、病院の発表会等を聴きますと遅まきながら、病院でもその重要性が認識されて来たようです。ところで、化粧品ですが、主成分を含めて、その経皮吸収性は厳密に評価されているのでしょうか？電車や新聞、雑誌の広告を見ると、ちょっと首をかしげることがあります。私は、この３月で還暦を迎えましたが、大学４年生のとき以来、膜透過に関する研究を続けています。分子量の高い物質の皮膚内への取りこみは非常に起こり難い現象だと思います。皮膚表面で保湿作用をして働いているのかなと感じています。化粧品にはいろんな成分が配合されていますが、逆に低分子については経皮吸収されて全身に循環する可能性もあると思います。特に構成する他成分と皮膚の角質層との相互作用の結果、経皮吸収性は化合物単独の場合とは異なっていることも想定されます。これから化粧品がさらに利用され、人々の心を豊にし、生活の質の向上にさらに貢献していくには、経皮吸収性の科学的な評価が欠かせないと思います。定年まであと５年ですが、医薬品を含めて、経皮吸収性の科学的な評価に貢献できればと願っています。

（神戸薬科大学）

平成 20 年度　研究助成

組織工学とコスメトロジー

南　広祐

コラーゲン、ゲラチン、エラスチン、グリコサミノグリカンは生体に豊富に存在する。組織工学分野では、細胞適合性、副産物の生成の抑制、高強度で３次元細胞培養可能なスキャフォードの作製、血管新生誘導、カプセル化抑制など、再生医療への応用を目指す研究が多い。コラーゲンは細胞外マトリックスを構成する主タンパク質であり、生体組織の物理的・生物学的特性を維持するため最も重要な役割を果たす。一方、コスメトロジー分野では、コラーゲンの吸水性に注目した研究が多い。特に、人間の皮膚組織はコラーゲン成分が最も多いため、化粧品を始め薬剤としても使用されている。これは、皮膚の潤いなどを回復することを目的とする。

組織工学とコスメトロジーは関連性が低いように見られものの、人間の生活の質 (QOL) の向上に貢献を目的とする分野である共通点を有する。組織工学観点から見た人工皮膚は皮膚機能の回復であるものの、美容効果までは視野に入れていない。しかし、美容効果は最も重要である。例えば、現在最も注目を集めているのは皮膚移植後のケアーである。人工皮膚移植により患者の生命が助かったものの、醜い移植部位あるいは傷痕発生などの副作用がある場合、患者の精神的問題に繋がる可能性が非常に高い。ここにコスメトロジーが指向する「美」という概念を入れることで、傷痕の抑制、発毛、移植部位と周辺部位の皮膚色統一などより優れた機能を有する人工皮膚の開発が可能になると考える。その方法は単純な人工皮膚組織の作製以外にも、塗る人工皮膚、注射用人工皮膚など様々な戦略樹立がある。

人間は「美」を望んでいる。また、その「美」を手に入れるため、様々な指導が試されている。そのため、組織工学とコスメトロジー間より深い交流を通じて両研究分野の融合が望ましい。これは、人間の生活の質の向上、産業への応用など社会への波及効果を目指した研究以外にも、人体の不思議の究明など医学、生物学に貢献可能な新領域への挑戦が必要であると考える。

（東京医科歯科大学生体材料工学研究所）

平成 20 年度　研究助成

化粧品の安全性と環境負荷を意識した機能性素材開発

殷　澍

材料の機能性は粒子サイズ、粒子形態に大きく影響されることが知られている。ナノ粒子が紫外線防御製品に使われるのは要因として、可視光波長よりも十分に小さいナノ粒子は光の散乱が少なく、透明性が高くて、紫外線防御効果が高い点が挙げられる。しかしながら、化粧品関連材料について、性能だけではなく、人体に対し、安全であることが非常に重要である。一つの例を挙げると、100 nm 以下のナノサイズの素材は皮膚の毛穴を通して、人体に入ることが懸念されるため、日本をはじめ欧米諸国などがナノマテリアルの安全性を評価し、リスクを規制・管理するための取り組みが活発になってきている。そこで、化粧品素材に関する開発はこうした様々なニーズに応えるため、多彩な工学的手法を駆使し、化学、物理、光学、結晶学の知識を集約・活用することによって、「ナノ」だけではなく、様々なバリエーションを有する素材の開発、或は材料の新しい機能性を生み出すことが重要であり、今後も学際的な学問の融合によって、様々な新素材、或はマルチ機能性素材の出現が期待される。尚、高い機能性を有する材料を合成するため、環境負荷を犠牲にしてはいけない。環境に優しい、環境負荷の低いプロセスを採用し、尚且つ生産性の向上及び高い機能性を維持することが大事であり、今後、安全性と環境負荷を意識した機能性素材開発は、ますます重要になると信じる。

（東北大学多元物質科学研究所）

平成 20 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

渡部　邦彦

実を言えば、コスメトロジーという言葉を、この研究振興財団の研究助成があることを知るまで知らなかった。この言葉がカバーする領域の広さ、そして間接的にでも関係する領域がいかに多岐に渡っているかを知ると、不思議の国のアリス状態だった。化粧品という言葉の持つイメージは、美の実現や促進、あるいは人の心に必ず存在する美への憧れや希望につながるせいか、水面を泳ぐ白鳥の優雅さと同類に見なすことが出来よう。それに対し、コスメトロジーは、医学、生命科学もあれば心理学、哲学などの学術領域も含み、基礎的な事項から応用的なものまで、あまねくカバーして化粧品を裏支えするものであろう。だからこそコスメトロジーは、泳ぐ白鳥の優雅さとは裏腹に、水面下で行われる優雅さとは縁遠い水かき作業に通じる、地味な汗かきの集積にイメージできるのではなかろうか。また違ったたとえ方をすれば、皆に愛されるバラの花も、臭くて汚い牛糞肥料がうまく醸成されるほど、きれいに咲くことになぞらえられるかも知れない。

微生物と化学の交わる研究領域で仕事をしていると、そこから育っていく最近の学生は、少なからず一度は化粧品会社への就職に憧れるようだ。就職を希望する企業として、ひんぱんに彼らが口にする化粧品業界だが、人気が高い業界への就職はそうそう甘くはないことを就職活動の末、知ることになる。就職難が叫ばれる昨今、彼らの矢が尽き弓折れる前に、僅かの足しにでもなるならコスメトロジーという言葉を教養の一語として教え、一度はそれが何かを考えさせておきたい。しかし、コスメトロジーという言葉を的確な日本語で言い表すことが出来ないだろうか。医食同源のように、人の心を捉える言葉で表現できたらと願う。

（京都府立大学大学院生命環境科学研究科）

平成 20 年度　研究助成

コスメトロジー研究と私

児島　千恵

私は平成 20 年秋より 2 年間、コスメトロジー研究振興財団の援助を受けて、「物質保持能を制御できるコラーゲン擬似分子の作製」の研究を行った。ご存知のとおり、当該財団が援助する対象は 1）素材、物性に関する分野、2）生体作用、安全性に関する分野、3）精神、文化に関する分野の 3 領域である。これを既存の学問領域に当てはめると、化学、物理、生物、医学、社会科学などに対応すると思われる。コスメトロジー（化粧品学）はこのような様々な分野と関連しており、その研究の遂行においてはこれらを融合させることが必要である。言い換えると、コスメトロジー研究は異分野融合研究の良い例であると言える。

上記の研究が研究助成に採択された平成 20 年、著者は大阪府立大学大学院工学研究科にて助教として研究を行っていたが、平成 21 年 1 月より同大学の 21 世紀科学研究機構ナノ科学・材料研究センターのテニュア・トラック講師に着任し、自身の研究室をもつことになった。新しい研究室を立ち上げるにあたって、「異分野融合による次世代バイオマテリアルの創製」を研究テーマとして掲げた。そして、その一つのプロジェクトとして、「物質保持能を制御できるコラーゲン擬似分子の作製」を行い、得られた成果を J. Am. Chem. Soc. に 1 報、Biopolymers に 2 報報告した。特に、今年掲載される 3 報目の論文では、材料作製だけでなく、詳細な物性評価を行うために、他大学の先生や他分野の先生と協力して研究を進めることができた。このようにコスメトロジー研究が、私の異分野融合の研究を進める一つのきっかけになったように思う。改めて助成していただいたコスメトロジー研究振興財団の関係者の皆様に深謝したい。

私の研究背景は高分子化学および分子生物学であるが、現在は物理の研究者や医学部の研究者などとの連携によって様々な研究プロジェクトを進めている。今後も、コスメトロジーをはじめとする日本の科学技術の発展に貢献したいと考えている。

（大阪府立大学21世紀科学研究機構ナノ科学･材料研究センター）

平成 20 年度　研究助成

生物由来の素材を化粧品に

福岡　徳馬

我々の研究グループでは、「バイオサーファクタントの製品を世に出そう」を合言葉に、チーム一丸で研究に取り組んできた。バイオサーファクタント（BS；微生物由来の界面活性剤）は、発見されてから数十年になるが、生産に関する研究（農学）と機能評価（理学・工学）の連携が十分でなく、実用化までは大きな壁があった。現在でも BS の実用化例は限られたものしかない。我々は、微生物学、有機化学、界面科学など、異分野の研究者がチーム内で密に連携することで、加速的に研究を展開することができ、BS の生産技術や構造－物性相関に関する様々な知見を得ることができた。その結果、我々が量産化に成功し、今回助成対象として採択頂いた糖脂質型 BS（MEL）は、多様な産学官連携の成果もあり、幸運にもこの助成期間に、まずは化粧品素材（高機能保湿剤）として製品化される運びとなった。

化粧品分野は他の産業と比較しても、高機能、高付加価値な素材が受け入れられやすい分野であり、優れた性能を示すことが出来れば（ここが最も大切であるが）、新素材参入のハードルが低く、新陳代謝の活発な分野という印象がある。BS は製造コストの面で、既存の化学品とはまだまだ差があるが、特に、化粧品素材は人に直接触れる素材であるため、生物由来の素材であることは、安全性やイメージの部分でも非常に有利である。コスメトロジーの分野で、生物由来の素材である BS を積極的に利用する意義は非常に高く、今後も用途範囲は拡大できると考える。

世間一般での BS の知名度が未だ低いことは、様々な場面で研究内容を紹介する機会を得る度に強く感じる。しかし、低炭素社会、循環型社会の形成が求められている昨今において、再生可能資源を原料に、バイオプロセスによって製造される BS が活躍できる場面は、今後さらに増えてくると考える。今後、二の矢、三の矢の BS 製品が世に出て、より幅広い分野に BS が普及することを願って、研究開発をさらに発展させたい。

（産業技術総合研究所）

平成 20 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

森部　久仁一

アスコルビン酸は抗酸化作用を持ち、医薬品、化粧品原料及び食品添加物等として広く用いられている。近年、アスコルビン酸の安定性を向上させる目的で各種アスコルビン酸誘導体が合成されてきた。今回の研究に用いた、ASC-DP はアスコルビン酸の 2 位及び 6 位にパルミトイル基を導入することにより脂溶性を持たせた誘導体だが、それ以外にもアスコルビン酸の 6 位にアシル基を導入したアスコルビン酸モノパルミテート、アスコルビン酸モノステアレート、グルコース残基を導入したアスコルビン酸 -2- グリセリドなどが化粧品分野で利用可能あるいはすでに利用されている。各種アスコルビン酸誘導体は抗酸化作用や美白効果を示すものが多い。ASC-DP は水に不溶のため DSPE-PEG と薬物を加えたナノ微粒子複合体を調製した。これは ASC-DP に加えて薬物の作用・効果も同時に期待される。とくにビタミンや他の抗酸化剤などとナノ微粒子化することで皮膚に塗布する製剤としての利用が可能である。ASC-DP 以外のアスコルビン酸誘導体も適した添加剤と複合化することで各種薬物を保持した担体としての利用が可能となる。リポソームやエマルション、脂質複合体は各種クリームやローション剤として化粧品分野で多用されている。今回紹介したアスコルビン酸誘導体をこれらとうまく併用することで、アスコルビン酸由来の酸化防止作用に加えて各種薬物や成分の作用を皮膚にうまく適応させることが可能になると思われる。また、化粧品は医薬品製剤と比較して非常に多くの成分がバランスよく製品中に含有されている。これらの成分は、それ自身で十分効果を発揮するものもあれば、他の添加剤の助けを借りることで作用が発揮されるものもある。アスコルビン酸誘導体も他の成分と併用することでその成分の効果を従来以上に引き出すポテンシャルがあると思われる。アスコルビン酸誘導体を用いた今後の研究開発に期待したい。

（千葉大学大学院薬学研究院製剤工学研究室）

平成 20 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

斎藤　芳郎

この度、コスメトロジー研究振興財団研究助成を頂き、心から感謝申し上げます。今回助成いただいた研究では、化粧品などに多く使われているコエンザイムＱの細胞内分布について検討しました。コエンザイムＱは、ミトコンドリアで生合成され、ATP の合成に重要な役割を果たしています。その一方で、活性酸素を消去する抗酸化作用も有しており、我々の健康維持にとても大切な因子と言えます。コエンザイムＱが加齢と共に減少することから、化粧品への添加だけでなく、サプリメントとしての摂取も推奨され、一時期は新聞やテレビでも大きく取り上げられました。現在でも使われていますが、このブームもピークを越えたように思われます。このような流行り廃りは致し方ないかもしれませんが、コエンザイムＱに関して、何故加齢と共に減少するのか？、またサプリメントとして摂取するメリットがどのくらいあるのか？といったところに未だ不明な点が多いのも事実です。このような疑問が解明されることが、コエンザイムＱの持続的発展には欠かせないと思われます。コスメトロジーにおけるコエンザイムＱの効果について、ATP 合成に関する作用が重要なのか、または抗酸化作用が重要なのかという疑問が明らかになれば、より機能性の高い化粧品開発にも役立つと思われます。コエンザイムＱは現在パーキンソン病の治療薬としての可能性についても検討されており、コエンザイムＱの生理作用解明は、様々な分野に貢献できると考えられる。今回助成していただき遂行した研究をさらに発展させ、人類の健康維持・増進に貢献できるよう努力していきたいと思います。

（同志社大学生命科学部）

平成 21 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

黒岩　崇

私が所属する工学部エネルギー化学科では、自然エネルギーを利用した発電システムや水素エネルギー利用技術などへの興味・関心が学生の大学選び・学科選びのきっかけになっているケースが多いと思われます。おそらく、化粧品に関わる知識や技術を身につけたいと意識して勉学をスタートする学生はほとんどいません。ところが、バイオテクノロジー関連の講義で化粧品に関するトピックスを扱っていることもあってか、意外にも、卒業研究に向けた研究室見学の際などに「実は化粧品（あるいは化粧品産業）に興味があった」と告白してくる学生が（男女を問わず）一定数いることに驚かされます。このことは、化粧品が生活に浸透していることに加え、化粧品の特性や効能の基礎を与えるサイエンスとテクノロジー、すなわちコスメトロジーがカバーする学問・技術領域が、広く理工系の大学生にとって魅力的な対象を含んでいることを示していると考えます。

私の研究テーマは、両親媒性分子の集合体やエマルションをはじめとする分散系を扱うものが多く、コスメトロジーとの関連も深いと感じています。この度の研究助成をきっかけに、ますます化粧品分野での可能性を意識して研究を発展させ、コスメトロジーの深化に少しでも貢献できれば幸いです。最後に、今回、私の研究テーマをご採択いただき、研究の機会を与えてくだ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御礼申し上げます。

（東京都市大学工学部エネルギー化学科）

平成 21 年度　研究助成

「コスメトロジーって何？」から始まって

河野　芳海

学生時代，私は固体触媒化学を専門として学びましたが，その後，有機色素を扱う研究室に移籍することになりました。そこで，固体触媒に用いるような無機物質をホストとして，これに有機色素を吸着させて複合材料を作るという研究を始めてみることにしました。

とはいえ私は，過去も含めて「コスメトロジー」とは無縁の世界。化粧なんて・・・とりわけ，女性がなぜそんなことにたくさんのお金と手間をかけようとするのか，全然分かりませんでした。そんな私が化粧品に興味をもつようになったきっかけは，ある業界の方から「この材料は化粧品用途として使えるのでは」と声をかけられたところからでした。

用途について深い考えのなかった私は，なるほどそうかと気軽に考え，まずは，と化粧について書かれた本を読んでみました。そこには次のようなことが書かれていました――化粧は決して無駄なことではない。美しく見られることそれ自体より，美しさを追求する「心」の作用で，実際に精神的な安定が得られ，健康を保つことができる――私は驚き，しかし，その通りだと思いました。そして，それに気づかなかった自分を恥じ入りました。

本来そのような力を秘めた化粧品に，もし体を害する成分が含まれていたらどうなるか。もちろんすぐに影響が現れるような激しい成分が使われることはないでしょう。しかし，化粧が人の「心」に作用するものである以上，もし有害だったらどうしよう・・・そのような不安は払拭されねばなりません。自然に近い，体になじむものから作られていれば，使う人の心にも，より自然になじむのではないか，その一端として，化粧品の着色に天然色素が広く使えれば，安心できる製品として，いわゆる数値では表せないような面で化粧の効果も上がるのでは，と期待できます。

そのようなコスメトロジーの発展に，少しでもお役に立てるとしたら無上の喜びです。そのような機会を戴けたことを感謝しています。

（静岡大学工学部）

平成 20 年度　研究助成

再生医療とコスメトロジー（化粧品学）

梅澤　明弘

「平成22年は再生医療元年」と言われるくらい、再生医療が現実の医療として進んでいます。新たな医療として、骨、軟骨、心臓、歯、ホルモン、代謝の病気にかかっている患者さんに対して、細胞製剤を移植して治療します。これらの治療では、骨の中の細胞が変身して、組織に移植され力を発揮します。骨からの細胞だけではありません。胎盤から、子宮内膜から、月経血から、臍帯から、皮膚から、たくさんの大切な細胞が増えて、変身して、力を発揮します。ヒト iPS 細胞が話題になり、マスコミで話題として紹介されています。 iPS 細胞も、細胞が神経や心筋や骨格筋や血管になって、患者様の症状を軽くしたり、治したりすることが期待されています。細胞にもしっかり働いてもらって、わたし達を元気にしてもらいたいと思っています。写真は、昨年の11月6日に NHK や新聞に報道された ES 細胞というお薬です。SEES という名前は、種という意味でシーズと読みます。真ん中のみっつの i は子ども病院のマークです。難病で苦しんでいる子どもたちを救うための細胞製剤です。このように書くと再生医療の分野における対象疾患は難病というイメージとなってしまいますが、実際はコスメトロジーが果たしてきた役割は極めて大きいところがございます。インターネット上で「再生医療」と検索すると、コスメトロジー領域における記事が数多く紹介されることからも分かります。皮膚のしわ取り、白斑、にきび跡の軽減、瘢痕のない創傷治癒等が細胞を移植することで実現しています。現在は、再生医療に対しては、医師法、薬事法のいずれにおいても国の審査を通じて行うことになります。また、指針以前から行ってきた治療に関しては、審査を受ける必要はありませんが徐々にその割合が少なくなり、再生医療を行うにはヒト幹指針に従うか、薬事法下で行うかに限られてくると思われます。その一方､昨年 11 月 1 日のヒト幹指針の改定により、重篤な疾患のみならずコスメトロジー領域における再生医療の申請が認められたことにより、自由診療で行われる再生医療と、同時に臨床研究の場でコスメトロジー分野の再生医療が行われてくるものと予想しております。

（国立成育医療研究センター）

平成 20 年度　研究助成

コスメトロジーと薬学教育

石神　昭人

私は大学薬学部において香粧品学（化粧品学）の講義を行っています。薬事法での化粧品、医薬部外品、医薬品の定義は明らかに異なります。化粧品は薬事法第２条第３項で、次のように定義されています。『人の身体を清潔にし、美化し、魅力を増し、容貌を変え、又は皮膚若しくは毛髪を健やかに保つために、身体に塗布、散布その他これらに類似する方法で使用されることが目的とされている物で、人体に対する作用が緩和なものをいう』。つまり、化粧品は医薬品とは異なり、健常人を対象として人体を清潔に保つという衛生的な面と美しく装うということがその目的であって、医薬品のように治療、診断、予防といった身体の構造、機能に影響を及ぼすような目的ではなく、生理機能が緩和なものです。また、化粧品は日常生活において毎日また長期に渡って連用されるものであるため、あらゆる条件を考えに入れ、使用上安全でなくてはならず、副作用は許されません。これに対して、医師が用いる医薬品は疾病時にのみ使用するものですから、病気を治すことが第一目的であり、治療時の効能が優先され、これとのバランスで弱い副作用は止むをえない場合が多くあります。このように考えると化粧品の安全性のレベルは医薬品以上に高いのではないでしょうか。ドラックストアーでは必ず化粧品が販売されています。そのため、化粧品の科学的基礎知識やその効能の限界を知ることは薬剤師にとってとても大切です。しかし、化粧品は医薬品のように無いと生命の危険に及ぶものではありませんので、薬剤師の国家試験にも化粧品に特化した問題は出ません。最近では化粧すると入院患

者さんの状態が良くなったり、アロマテラピーなど代替医療の可能性も模索されています。現代の科学では精神を科学的に明らかにすることがほとんどできていません。将来、コスメトロジーが医療の分野でも大きく発展することを期待しています。

（東邦大学薬学部生化学）

平成 20 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

石川　義弘

医学研究とはなんであろうかと考えるに、科学的な手法や概念を用いて、人体を研究することと言えるかもしれない。コスメトロジーとはいわゆる美容術あるいは化粧品学を指すことが知られているが、美容がそもそも人体をいかに健康に美しく保つことであると考えれば、コスメトロジーも医学の一部分ではないだろうか。だとすれば、医学研究上の手法や概念を、コスメトロジーに応用することは決して難しいことではないと考えられる。ところが、実際に見回してみると、コスメトロジーにどれだけ厳密な医学的な手法が導入されているか、疑問に感ずることもある。これは単に手法だけの問題ではなく、どれだけ多数の医学研究者がコスメトロジー分野の研究に参入しているかにもかかわっていると思われる。あるいは医学研究者あるいはコスメトロジー研究者の独断もあるのかもしれない。

今回我々はヒアルロン酸研究をテーマとして、コスメトロジー研究に初めて参画させていただいた。ヒアルロン酸は細胞生物学を専攻している研究者にとっては重要な細胞外基質であり、血管平滑筋や線維芽細胞などの遊走を制御する基本的な物質である。しかし、同じヒアルロン酸を、コスメトロジーの分野から見てみると、シワの改善やアンチエイジングに重要な物質成分である。よくよく考えてみれば、両者は細胞外基質として同一であり、細胞外基質が皮膚を含めた外形を調整すればコスメトロジーであり、血管形態を調整すれば細胞生物学となる。つまり、同じ現象を見ているのである。

同じ現象を、立場の異なった人間が見ると全く別のものに見えてしまうことはよくある。大切なのは、お互いの視点を共有することであり、自分以外の視点でものを考えてみることである。そこから研究のブレークスルーが生まれてくるのではないだろうか。たとえばボツリヌス毒素のアンチエイジングへの応用のように、画期的な手法と概念を打ち出した両者の共同作業を目指していくべきだろう。

（横浜市立大学医学部）

平成 20 年度　研究助成

ヤヌスの顔

三浦　ゆり

皮膚は日常的に紫外線や放射線、さらには物理的刺激や乾燥など、さまざまなストレスに曝されている。なかでも紫外線や放射線などによって生じる酸化ストレスは皮膚に対する主要な刺激の一つであり、直接細胞の老化に関わる。このため、現在のスキンケア製品はとにかく酸化ストレスを封じ込める作戦で開発されてきた。しかし、果たして酸化ストレスは本当に生体に対して害を及ぼすだけなのだろうか。「薬」が「毒」に、「毒」が「薬」にもなるように、酸化ストレスにも「ヤヌスの顔」があるのではないだろうか。

進化の過程で酸化ストレスを克服してきた我々は、活性酸素・フリーラジカルに対する様々な防御システムをもっている。その中でも重要なのが、「適応応答」である。弱いストレスが刺激になって、本来持っている防御システムを活性化する適応応答は、最初の「弱いストレス」なしには起こらない。つまり、適度な酸化ストレスは適応応答をひき起こすための「薬」になるのである。皮膚にとって、酸化ストレスは、環境から常に降り注ぐ「弱いストレス」である。この「弱いストレス」をアンチエイジングに役立てることはできないだろうか。皮膚細胞の適応応答を活性化させることができれば、今までにないスキンケア戦略に貢献できるのではないかと考え、今後も研究を続けていきたい。

最後に、本研究にご助成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心より御礼申し上げます。

（東京都健康長寿医療センター研究所分子機構研究チーム）

平成 20 年度　研究助成

コスメトロジーの観点から見た本研究の展開

片桐　一元

アトピー性皮膚炎の病態を想定してアレルギー性炎症やストレスが皮膚バリア機能に及ぼす影響を明らかにしてきた。皮膚バリア機能は皮膚最外層の角質がその主要な役割を担っている。炎症やストレスは皮膚（真皮）あるいはもっと深部で起きている現象であり、当初は角質機能にこれほど影響を及ぼすとは考えていなかった。また、多くの知見は動物を用いた実験で明らかにしてきたが、*in vitro* と *in vivo* では皮膚バリア機能の反応性が大きく異なり、*in vivo* では実に速やかにバリア機能が変化する。また、実験では Th2 サイトカインやサブスタンスＰはごく微量で皮膚バリア機能に重大な影響を及ぼしており、非常に繊細な制御機能によって角質が維持されていることを感じさせられた。その一方、別の実験系で検討したところ絶食や年齢による影響は少なく、生体の恒常性維持のメカニズムは非常に強固なものであることも感じている。

皮膚バリア機能異常は皮膚の肌理、シワなど密接にコスメトロジーと関連する。ストレスは昔からお肌の大敵とされているが、今回の研究で明らかになったように、そのメディエーターによっては皮膚バリア機能に悪影響を及ぼさないものもある。また、ストレスの種類や程度によっては好影響を及ぼすものもあるかもしれない。外因性機能分子による皮膚機能改善だけでなく、良いストレス、皮膚への良い刺激などを利用した内因性の皮膚機能改善に着目したコスメトロジーの発展も期待したい。

（大分大学医学部皮膚科、獨協医科大学越谷病院皮膚科）

平成 20 年度　研究助成

コスメトロジー研究を歯科の研究者が行う

筑波　隆幸

私がコスメトロジー研究、中でも皮膚科学領域の重要なテーマであるアトピー性皮膚炎の研究を行うようになろうとは、10 年前には夢にも考えなかった。というのは、私の研究テーマは､細胞が持っているタンパク質分解酵素（プロテアーゼ）であるカテプシンと称される一群の機能と病態の解析だったからである。カテプシン群は動物細胞では、20 種類以上存在する酵素群であり、大部分が細胞内小器官の１つであるリソソームに多量に存在する。中でもカテプシンＥという酵素は、非典型的な酵素であり、免疫担当細胞や皮膚にのみ存在しており、その機能は全く不明であった。

しかし、カテプシンE欠損マウスを作製すると事態は一変した。カテプシンE欠損マウスがアトピー性皮膚炎様症状を呈したからである。本マウスがこのような発症をするとは全く予想しておらず、研究テーマに引きずられるように、アトピー性皮膚炎の研究をすることになった。私は歯学部出身なので、皮膚科学に関していうと、学生時代に数時間の講義を受けた程度であり、全くの素人同然であった。そこで、アトピー性皮膚炎に関する専門書や論文を手当たり次第に読んだ。診断法や治療法も勉強した。この様な経験は、臨床の知識と言えば、歯科領域しか知らない私にとって、極めて興味深く貴重であった。

そうすると次第に、アトピーという言葉に敏感になり、新聞や雑誌でも、アトピー性皮膚炎特集を読むようになった。さらに、道行く人の何人かがアトピー性皮膚炎を患っているかどうかを判断できるようになってきた。無意識に、顔面や頸部を凝視しており、詳しくチェックするようになったからである。こうなってくると研究病の１つと言ってもよいかもしれない。

歯学部では、やはり歯科と関連がある研究が活発であり、皮膚に関する研究テーマで研究費を修得するのは難しい。しかしながら、幸いにも貴財団より、皮膚科学に関する研究を、歯科の研究者にも与えていただいた。ここに深く感謝申し上げます。　（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科）

平成 21 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

相場　節也

今回、コスメトロジー研究振興財団助成金を交付頂き有り難うございました。現在、医療の分野では、Evidenced based medicine（EBM）という名の下に科学的根拠のある医療の提供が求められています。しかし、化粧品分野では、まだまだ、Evidenced based cosmetology という概念は定着していません。また、これからの化粧品開発における動物実験に対する社会的、法的制約は、さらに科学的根拠のある化粧品の開発を困難にすることが予想されます。その行き着く先は、法的に許されるギリギリのキャッチフレーズにより集客したり、あるいは、インターネットを利用し情報を巧みに操作した営業重視の化粧品会社の乱立です。しかし、科学立国たる日本においては、まだまだ、眠った化粧品応用への可能性のある材料、科学技術が多数存在することが予想されます。その意味で、コスメトロジー研究振興財団の化粧品関連研究に対する研究助成は、将来を見据えた素晴らしい企画であり、これからも継続していただきたいと思います。さらに、今後、化粧品会社自身が、動物実験を用いた新規化学物質の開発がむずかしくなることを予想すれば、この助成をさらに拡大し、基礎分野の開発は大学で行い、それを新規化粧品開発に結びつけるような新たなシステム造りにも挑戦していただきたいと思います。

（東北大学大学院医学系研究科皮膚科）

平成 21 年度　研究助成

化粧と化学物質

山下　克美

薬も用法を誤れば毒であるように、化粧品も使い方を間違えれば（乳児が誤って飲んだり食べたりする以外にどう間違えるか想像はできないが）、皮膚に悪い影響があるのではないかと常々思っている。化粧品には、考えただけでも香料や色素をはじめそれらを溶かす溶剤、基質などがふくまれており、化学物質のかたまりであろう。そのような化学物質のかたまりを皮膚につけていて、皮膚の代謝活動が健康的に維持されつづけられるのであろうかと心配になってくる。ところが、化粧で問題になるのはかぶれなど個人の体質に関わると判断されることで、実際は問題どころか、化粧をするとしないとでは皮膚老化のスピードが違うことも多いらしい。少なくとも、化粧をすることで皮膚を覆う層ができ、もしその中に紫外線をカットする成分でも含まれていたら、紫外線による皮膚老化は阻害されることは納得できる。

私自身は、化学物質の発がん性と関連した研究を行っているため、ほとんどの化学物質には毒性があり、がんを起こす可能性があると考えている。薬の場合のいわゆる薬効は、使い方と使う量次第なのであり、危険値よりも低い用量で薬としての効果を示すならば薬になる。要は命と引き換えなので、少しの毒性には目をつぶってくださいということである。しかし、化粧品はそうはいかない。化粧をするかしないかは生きるか死ぬかの問題ではないので（生きるか死ぬかの問題という声もよく聞くが）、毒性が出ては困る。そう考えると、使用する化学物質について絶対に安全というポイントを探さなくてはいけない化粧品会社の安全性チェックは、さぞかし大変であろうと想像される。しかも今はなんでも“機能性”の時代である。それこそ、皮膚老化を抑えるとか、シミができないとか、最近では幹細胞を活性化させて皮膚を若返らせる、いうような付加価値が必要とされる。常に新しい化学物質を探し続けなければいけないので、新しい検定法とそれに伴う安全性検査も多様になると思われる。学問的にも興味深い分野である。

私自身は、現在は発がん性を中心とした毒性を細胞分裂の観点から研究しているが、毒と薬は表裏一体でありさじ加減ひとつである場合も多い。即ち、毒性研究は裏から見れば機能性研究でもあり、コスメトロジーはまさに毒性研究と機能性研究である。本研究助成を機会に、機能性研究へ展開できればと考えている。

（金沢大学医薬保健研究域薬学系遺伝情報制御学研究室）

平成 21 年度　研究助成

多様性を生み出すエピジェネティクスがコスメトロジーに貢献できる事

秦　健一郎

私が産婦人科医として臨床で働いていたころ、いわゆる出生前診断をはじめとする、巷間言われる所の「究極の個人情報」である遺伝情報を調べる必要がある症例の診断治療は、社会的倫理的な側面でいろいろと多方面に気遣いが必要で、正直なところ気の重いものでした。

それから 10 年以上が経ち、とっくにヒトゲノムプロジェクトは終了し、いまや遺伝子解析は、どこでも誰でもできる検査手技になりました。これから数年もすれば、一人分の全配列が 1,000 ドル程度で読み取れるという時代になったというのに、「究極の個人情報」とやらはまだまだ謎だらけです。今までは遺伝子の塩基配列とメッセンジャー RNA だけを調べていたのが、これからはシトシンのメチル化、ノンコーディング RNA、ヒストンのメチル化やアセチル化……と、調べなければならない事がどんどん増えてきています。一方で、このような遺伝学的な解析を生業として、しみじみと感じる事があります。よく言われているありていな事なのですが、多様性が残されていることはとても大切だ、という事です。おそらく遺伝情報には、我々の想像もつかない過酷な環境を生き延びて来た人類の進化の歴史が刻まれています。

エピジェネティックな情報は、このような遺伝情報が元来持っている多様性を更に広げてくれる大切なメカニズムです。一方でエピジェネティックな情報は可逆的なので、うまく操作できれば、組織を若返らせたり、効率よく分化させるのに役立つので、コスメトロジーとは相性の良い学問領域だと考えています。今回の助成をきっかけに、少しでも貢献できる研究を展開していきたいと思います。

（国立成育医療研究センター研究所周産期病態研究部）

平成 20 年度　研究助成

脳から考えるコスメトロジー

月浦　崇

サスペンスドラマをみていると，我々は様々な登場人物の中から「コイツが怪しそうだ」と人相や振る舞いから勝手に妄想して楽しんでいる．そのように視聴者に妄想させるだけの技量をもつ俳優さんの演技力には脱帽するが，そもそもなぜ我々は人相などの外見だけでサスペンスドラマの結末である犯人まで妄想してしまうのであろうか？ここには案外深くて面白い人間の認知過程の妙が含まれているのである．

長年，顔の刺激を使った研究をしていると，顔は本当に様々な表情をもっていることに気づかされる．笑顔や怒った顔などの，いわゆる「表情」はもちろん表情のひとつではあるが，たとえ無表情な顔であったとしても，私たちは様々な表情をそこから感じ取ることができる．たとえば，美しい女性の顔写真をみて「この顔は自分の好みだな」などと思う時には，大抵は表面的に見える顔の物理的な特性だけではなく，その人との楽しい時間をあれこれ想像したりして，「勝手に」その人物に対する良い印象（虚像？）まで作り上げてしまう．しかし目の前にあるのは単に顔の形の情報だけであり，その他の妄想のすべては顔から脳が創り出した創造的産物なのである．換言すれば，私たちが見ている顔は，私たち自身はリアルだと感じているけれども，実は脳が創りだしたバーチャルなものをたくさん含んでいるのでる．だからこそ，顔の見え方は脳を媒体とした途端に絶対的なものではなくなり，その時その時で様々に変容し得るのである．

化粧の目的の一つは，顔を魅力的に見せるためである．先述したとおり，魅力的な顔は単に顔の表面的な「美」を他者に感じさせるだけでなく，その「美」を通して社会的関係性までも他者に創造させることができる．さらに化粧をした魅力的な顔を，鏡を通して自分にフィードバックさせることで，他者だけでなく自分自身の中にも社会的存在である自分を創造させることができるようになる．かくも化粧は社会的存在である人間の内面をより豊かに表現することにつながるわけであるが，それもすべて脳が媒体となって引き起こしていることなのである．だからこそ，脳を通してコスメトロジーの研究をすることは，顔の「美」と人間の内面の関係性の本質に迫るために重要な方法論のひとつなのかもしれない．

さて，ここまで偉そうなことを書いてきたが，実は私はサスペンスドラマをみても最初から犯人を当てることは苦手である．いくら長年研究をしていても，私が顔から人の内面を読み取る脳の能力はあまり鍛えられていないようである．　（東北大学加齢医学研究所脳機能開発研究分野）

平成 20 年度　研究助成

身体の外見の操作をめぐって　―近年の傾向

英　美由紀

本研究の主題とした美容外科手術は、英語では“cosmetic surgery”とも呼ばれるように、化粧とともに社会における美の規範に沿って身体の外見を整える行為だが、両者を厳然と分けてきたのは言うまでもなく身体への外科的な介入の有無である。ところが近年非外科的な（non-surgical）施術、例えばボトックス等の注入が登場したこともあり、両者間の境界はより曖昧なものになりつつあるようだ。実際アメリカではこうした施術の爆発的な人気が従来的な美容外科手術の件数を減少させる結果となっているとするデータもある。

また美容外科手術はより広範な「身体加工（body modification）」という枠組みでも捉えられるが、ピアスやタトゥーをはじめ様々な外見の操作を含むこうした加工は、時として過度に施されることで、却って社会における理想美から逸脱する場合もある。ここではこれまで美容行為を論じる際にしばしば用いられてきた「向上（enhancement）」の言説自体が問い直されることになる。

これらの状況を一端としながら、身体の外見をめぐっては今後も新たな様相が立ち現れることと思われ、一研究者としてその動向を注視していきたいと考える。

（お茶の水女子大学大学院博士後期課程）

平成 20 年度　研究助成

カモフラージュメイクは皮膚疾患治療の一助となる

谷岡　未樹

京都大学皮膚科では 2007 年 10 月より色素異常症に対するメイクアップケア外来を定期的に開催しており、開設から 3 年を迎えた。3 年間のメイクアップケア外来には小児から高齢者まで幅広くメイクアップケア外来を受講していた。対象疾患は、メイクアップケア外来設立の経緯もあり白斑が多数を占めた。対象疾患を広げてからは、膠原病に伴う皮膚症状の件数が増加してきており、術後瘢痕や外傷後瘢痕にも施行している。皮膚外科手術後の患者 QOL 向上に寄与できる可能性がある。部位別には、露出部がほとんどであったが、体幹や下肢のカモフラージュを希望した患者も存在し、そのニーズの幅広さを感じさせた。

白斑をはじめ皮膚疾患は生命を脅かす疾患ではないが、患者の QOL を低下させていることが報告されている。我々は、白斑に対するカモフラージュメイクの影響について調査し、QOL の向上が認められることをすでに報告している。当院のみならず、他施設でもさまざまな皮膚疾患に対してカモフラージュメイクが QOL に与える影響が検討されており、血管腫、アトピー性皮膚炎、尋常性ざそうなど様々な疾患でその QOL 向上効果が報告されている。今後は、皮膚疾患に合わせた化粧品を選択することが重要であり、疾患ごとにカモフラージュメイクの有用性に関するエビデンスを蓄積していくことが求められているといえる。

我々の調査やこれまでの報告から、適切に実施されればカモフラージュメイクが皮膚疾患患者の QOL を向上させることは疑いがない。しかし、現状では、医療保険制度に化粧指導が含まれていない。また、カモフラージュメイクは各施設で独自の方法で提供されているのが現状である。各地域の拠点病院においてカモフラージュメイクにアクセスできるようにすることが望ましい。今後、どのような枠組みを持ってメイクアップケア外来を患者のアクセスしやすいものにしていくかが最大の課題といえる。

（京都大学大学院医学研究科皮膚科学）

平成 21 年度　研究助成

高齢者介護施設におけるコスメトロジーの意義

平川　仁尚

高齢者介護施設におけるコスメトロジーの意義について老年医学的な視点から考えてみると、2つの視点があるように思う。1つは、高齢者にいかに最期までその人らしく美しく過ごしてもらうかという視点である。残念ながら、高齢者の美容については、世間一般では必ずしも前向きに評価する意見ばかりではない。我々は先行研究として2008年に「中学生の高齢者イメージに関する調査」を行ったが、それによると、高齢者は日常生活において化粧をすると考える生徒は必ずしも多くなく、また、高齢者には茶色、灰色、黒など比較的地味な色が似あうと考えている生徒が多かった。この世代は主介護者を支える重要な役割を担うと考えられ、高齢者のクオリティー・オブ・ライフにとって見た目の良し悪しは非常に大きな意味を持つことを更に啓発していく必要があると感じる。もう1つは、介護する人のコスメトロジーという視点である。介護する側が美意識を持たないと、介護される側にも当然美容に関して負の影響を与える。また、高齢者に質の高いケアを提供していくには介護職と家族との良好なコミュニケーションは欠かせないが、身だしなみが整っているのといないのとでは、家族の介護職に寄せる信頼の度合いも大きく異なるであろう。このように、高齢者本人、家族、介護職といった高齢者に関わる全ての人を対象にコスメトロジーの意義について教育を行っていく必要があると考える。

（名古屋大学医学部附属病院卒後臨床研修・
キャリア形成支援センター）

付　　録

事業報告書（平成22年度）
役　　員

事 業 報 告 書

（自平成 22 年 4 月 1 日　　至平成 23 年 3 月 31 日）

《研究助成等の選考関連》

2010	5	7	公募開始	全国301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２HPに掲載
	7	2	公募締切り	応募数101件
	9	7	選考委員会（分科会１）	素材、物性に関する分野の選考
	9	9	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	3	選考委員会（分科会３）	精神、文化に関する分野の選考
	9	27	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29課題を選考
	11	25	表彰贈呈式	設立20周年記念特別講演 「導電性高分子の発見とセレンディピティー ～ポリアセチレン研究の34年を振り返って～」 筑波大学名誉教授・日本学士院会員、2000年ノーベル賞受賞者 白川英樹 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
2011	2	中旬	持ち回り企画委員会	平成23年度の研究助成課題選考に関して

《理事会関連》

2010	6	15	通常理事会	平成21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、評議員の選任、選考委員の選任、株主としての議決権行使、報告事項
	6	15	臨時理事会	理事長・専務理事の互選、公益財団法人における最初の評議員剪定委員会への候補者推薦
	11	25	通常理事会	平成22年度（第21回）研究助成者等の承認、 平成23年度事業計画及び予算案の承認、 公益財団法人コスメトロジー研究振興財団定款（案）の承認、役員及び評議員の報酬等並びに費用に関する規程（案）の承認､理事会運営規則（案)･評議員会運営規則（案)･選考委員会規則（案)･助成金等交付規程（案)･研究助成引当資産に関する規程（案）の承認、報告事項
2011	3	23	臨時理事会	平成23年度事業計画及び予算の修正の承認、 公益財団法人コスメトロジー研究振興財団定款（案）の修正の承認、公益財団法人への移行認定申請の承認、報告事項

《評議員会関連》

2010	6	15	通常評議員会	平成22年度事業報告及び収支決算報告、理事・監事選任、報告事項
	11	25	通常評議員会	平成22年度（第21回）研究助成者等の承認、 平成23年度事業計画及び予算案の承認、 公益財団法人コスメトロジー研究振興財団定款（案）の承認、役員及び評議員の報酬等並びに費用に関する規程（案）の承認､理事会運営規則（案)･評議員会運営規則（案)･委員会規則（案)･助成金等交付規程（案)･研究助成引当資産に関する規程（案）の承認、報告事項
2011	3	23	臨時評議員会	平成23年度事業計画及び予算の修正の承認、 公益財団法人コスメトロジー研究振興財団定款（案）の修正の承認、公益財団法人への移行認定申請の承認、報告事項

《最初の評議員選定委員会関連》

2010	7	30	最初の評議員選定委員会 議長の選出と最初の評議員選任	

《その他》

2010	3	末	財団活動の情報更新	当財団HPへ平成22年度事業計画等を記載
	6	末		当財団HPへ平成21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」18号の概要を当財団HPに掲載

役　　員

平成 23 年 3 月 31 日現在

理事長	小林禮次郎	㈱コーセー　取締役相談役
専務理事（常勤）	有本　　亨	（元厚生省薬務局安全課長）
理　事	磯邊　律男	株式会社博報堂　相談役（元国税庁長官）
	宇佐美昭次	早稲田大学　名誉教授
	内山　　充	公益社団法人薬剤師認定制度認証機構　代表理事
	小林　一俊	株式会社コーセー　代表取締役社長
	新村　嘉也	高砂香料工業株式会社　取締役相談役
	西川　武二	慶應義塾大学　名誉教授
	野呂　影勇	早稲田大学　名誉教授
	廣部　雅昭	東京大学　名誉教授
	山﨑　幹夫	元新潟薬科大学　学長
監　事	小田倉正典	公認会計士
	黒田　節哉	弁護士
評議員	石倉　伸治	元株式会社コーセー　常務取締役
	上野　芳夫	元東京理科大学　薬学部教授
	小林　保清	株式会社コーセー　代表取締役会長
	齊藤　　勲	公益財団法人日本食品化学研究振興財団　専務理事 （元厚生省大臣官房審議官）
	内藤　　昇	株式会社コーセー　取締役
	長野　哲雄	東京大学大学院　薬学系研究科教授
	西岡　　清	横浜市立みなと赤十字病院　名誉院長
	花輪　隆昭	昭和館　館長（元厚生省援護局長）
	原田　敬之	東京女子医科大学　名誉教授
	溝口　昌子	聖マリアンナ医科大学　名誉教授
	宮﨑　榮三	東京工業大学　名誉教授

＊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.19／2011　　非売品

2011年８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

©2011　　不許複製　禁無断転載