

ごあいさつ

財団法人コスメトロジー研究振興財団は、平成2年7月に設立されて以来、一貫してコスメトロジー(化粧品学)分野の発展のための活動を続けてまいりました。

当財団の事業活動は、幸いにも多くの方々から厚いご理解ご賛同をいただくことができ、この種の分野では初めての研究振興活動であるにもかかわらず大変順調に成果をあげつつあります。過去三年間において助成を決定した研究課題は50件を越えています。しかも、幅広い学問分野から参集した優れた研究者が推進する課題であり、関係各界から注目を集めるとともに、高い期待が寄せられております。

当財団は研究助成のほかにも、コスメトロジーにかかわる国際交流の推進や援助、長年にわたり多大な功績を挙げられた方々に対する功労表彰などを行っております。また、表彰式等の折りには、興味あるテーマをとりあげ、高名な先生方に講演をお願いしてまいりました。

そして、ここに研究助成とその成果、今までの事業活動内容を「研究報告」創刊号にまとめて皆様に御報告できる運びになりました。

このような活動ができますのも、日ごろからコスメトロジーに心を寄せていただいております皆様の暖かいご支援ご協力の賜と深く感謝申しあげの次第でございます。

今後とも、時代に即応した、質の高い活動を続けていきたいと考えておりますので、今まで以上に当財団の活動を暖かく見守ってくださいますようお願い申し上げます。

平成5年9月

財団法人コスメトロジー研究振興財団
理事長 **小林 孝三郎**

ごあいさつ

■研究報告

I. 平成2年度助成研究課題

・ 染毛剤成分の代謝に関する研究	2
(財)食品薬品安全センター秦野研究所	中尾美津男
・ ドレイズ試験代替法の開発ーヒト細胞, 昆虫細胞を用いた 高感度迅速試験法の開発研究	12
理化学研究所	大野 忠夫
・ リン脂質ベシクル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	18
筑波大学化学系	古澤 邦夫
・ 化粧品が意識性に及ぼす効果の研究	27
早稲田大学人間科学部	春木 豊
・ 胆汁酸生合成のメカニズムに関する研究	40
東京工業大学理学部	藤本 善徳
・ 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	46
東京理科大学薬学部	牧野 公子
・ 皮膚用DDSとしての高分子脂質リポソームの基礎研究	51
早稲田大学理工学部	西出 宏之他
・ 皮膚の老化に伴うエラスチン遺伝子発現の動態	59
慶應義塾大学医学部	多島 新吾
・ 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	62
横浜市立大学医学部	佐々木哲雄
・ 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	67
東京大学医科学研究所	金ヶ崎士朗
・ 皮膚の糖脂質	72
山口労災病院皮膚科	浜中すみ子他
・ 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	80
京都大学薬学部	瀬崎 仁他
・ 皮膚への作用性を有する各種糖脂質の合成	90
千葉大学薬学部	中川 昌子

II. 平成3年度助成研究課題	
・ 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	98
	横浜国立大学工学部 国枝 博信
・ 活性酸素, フリーラジカルによる生体膜傷害の防止に関する研究	106
	東京大学先端科学技術研究センター 二木 鋭雄
・ 化粧品原料として竹節人参の組織培養による 物質生産ならびに大量増殖に関する研究	110
	広島大学医学部 神田 博史
・ 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	121
	京都大学工学部 松本 孝芳
・ 香料に関する定量的解析—香りの強さ, 香りの質, 構造活性相関, “なれ”, 香料センサーに関する研究	131
	北海道大学薬学部 栗原 堅三
・ メラニン生合成の調節	137
	東北大学医学部 柴原 茂樹
・ アルツハイマー型老年痴呆症, ぼけ症状を呈する人々への 化粧品による情動活性化の研究	146
	同志社大学文学部 浜 治世
・ 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	153
	東京医科歯科大学 畑 隆一郎
■記念講演	
I. 平成2年度記念講演 遅延型過敏症とサイトカイン	157
	東京大学薬学部 大沢 利昭
II. 平成3年度記念講演 コスメトロジー考	164
	一橋大学 名誉教授 南 博
III. 平成4年度記念講演 化粧品科学への人間工学的アプローチ	172
	工業技術院 生命工学工業技術研究所 吉田 倫幸
■コスメトロジー研究雑感	
I. 平成2年度助成研究課題研究者	177
II. 平成3年度助成研究課題研究者	184
■付 録	
事業報告書	
I. 平成2年度事業報告	191
II. 平成3年度事業報告	196
III. 平成4年度事業報告	202
設立趣旨書	208
寄附行為	209
助成金等交付規程	218
役員	221

研究報告



- I 平成 2 年度助成研究課題
- II 平成 3 年度助成研究課題



I. 平成2年度助成研究課題

染毛剤成分の代謝に関する研究

勸食品薬品安全センター 秦野研究所

中尾 美津男

Regioselectivity in *N*-acetylation of nitro-*p*-phenylenediamine (NPDA, 2-nitro-1,4-diaminobenzene), a widely used hair dye component, by rat liver cytosolic *N*-acetyltransferases was studied in relation to its substituent effects on enzymatic *N*-acetylation of mono-substituted anilines. NPDA was acetylated specifically at the *N*⁴-position to afford the *N*⁴-monoacetate, a major urinary metabolite in the rat, when incubated with rat liver cytosol fortified with acetyl-coenzyme A. *N*¹-Acetylation of NPDA did not take place even when the *N*⁴-monoacetate was used as a substrate, suggesting a strong steric hindrance effect of the *ortho* nitro group on the enzymatic *N*¹-acetylation. The steric hindrance effect of the nitro group on the cytosolic *N*-acetylation of the *ortho* amino group was revealed by a comparative study carried out by using aniline, three respective regioisomers of nitroanilines and phenylenediamine (PD)s as model substrates. The comparative study also indicated the enzymatic *N*-acetylation of the mono-substituted anilines to be strongly influenced by the electronic effect of the substituents.

Regioselective *N*-acetylation in the hepatic cytosol was also investigated with *N*¹- and *N*⁴-monoacetates of 1,2,4-triaminobenzene (TAB). The monoacetates yielded the *N*¹, *N*⁴-diacetate, another major urinary metabolite of the hair dye component, in the rat, without concomitant formation of the *N*², *N*⁴-diacetate or the *N*¹, *N*², *N*⁴-triacetate. The triacetate was formed only from the *N*¹, *N*²-diacetate in the enzymatic reactions. A comparative study, carried out by using *N*-monoacetates of three regioisometric PDs, indicated that the *N*-acetyl group had a potent steric hindrance effect on the primary amino group at the *ortho* position.

Thus, the present *in vitro* study strongly suggested that the two major urinary metabolites, NPDA *N*⁴-acetate and TAB *N*¹, *N*⁴-diacetate, of the hair dye component could be formed, at least in the rat liver, by the enzymatic *N*-acetylation of the corresponding amines.

1. 緒言

染毛剤は古くから広く使用されてきたにもかかわらず、その安全性に関してはあまり検討されていなかった。1975年 B. N. Ames ら¹⁾によって市販の酸化型染毛剤の中に微生物に対して変異原性が認められるものがあり、その変異原性の本体は染毛剤構成成分の芳香族アミン類であることが報告された。以来、染毛剤およびその構成成分の安全性評価のための試験が数多く実施されてきた²⁻⁵⁾。

しかし、染毛剤構成成分の生体内動態、特に代謝に関する報告はあまり多くない⁶⁻¹⁰⁾。そこで本研究は染毛剤の安全性に関する研究の一環としてセミパーマネントヘアカラーの主要な構成成分であり、変異原性^{11, 12)}、染色体異常誘発性¹³⁾、姉妹染色分体交換誘発性¹⁴⁾、不定期DNA合成誘発性¹⁵⁾等が認められ、発癌性^{16, 17)}も報告されている nitro-*p*-phenylenediamine (NPDA, 2-nitro-1,4-diaminobenzene) の代謝について検討した。我々は既に NPDA を投与したラット

の尿中から、2種類の代謝物を検出した。一つは NPDA N^4 -acetate であり、もう一つは 1, 2, 4-triaminobenzene (TAB) N^1, N^4 -diacetate であった¹⁸⁾。NPDA N^1, N^4 -diacetate はその前駆体と考えられる NPDA N^4 -acetate あるいは TAB N^4 -acetate を投与した尿中からも検出された。しかし、TAB N^1, N^4 -diacetate を投与した尿中からは TAB N^1, N^2, N^4 -triacetate は検出されなかった¹⁹⁾。したがって、NPDA の代謝経路は NPDA \rightarrow NPDA N^4 -acetate \rightarrow TAB N^4 -acetate \rightarrow TAB N^1, N^4 -diacetate であると考えられる。この経路の中で NPDA および TAB N^4 -acetate のアミノ基の N -アセチル化に位置選択性が認められた。そこで、このアミノ基の選択的 N -アセチル化がラット肝を用いても *in vivo* と同様の結果を与えることを確認すると共に nitroaniline, phenylenediamine (PD) 等のモデル化合物を基質として用いて *in vitro* における選択的 N -アセチル化についても検討した。

2 実験材料および方法

2.1 試薬

NPDA N^1 -acetate を Atkinson らの方法²⁰⁾、NPDA N^4 -acetate を Bulow らの方法²¹⁾ にしたがって合成した。TAB N^1 -acetate, TAB N^2 -acetate, TAB N^4 -acetate を Kehrman らの方法²²⁾ にしたがって合成した。合成した TAB N -monoacetate には無水プロピオン酸を加え、 N, N' -dipropionate 誘導体とした。TAB N -monoacetate の N, N' -dipropionate 誘導体のそれぞれの融点は、TAB N^1 -acetate 204°C、TAB N^2 -acetate 200°C および TAB N^4 -acetate は 200°C であった。また、*o*-PD N -acetate を Macallum の方法²³⁾、*o*-PD N, N' -diacetate を Rugheimer の方法²⁴⁾、*m*-PD N, N' -diacetate を Phillips の方法²⁵⁾ にしたがってそれぞれ合成した。その他の試薬については東京化成工業(株)等から購入して使用した。

2.2 肝可溶性画分の調製

動物には6週齢、体重200–210g の Sprague-Dawley 系雄性ラット(日本チャールス・リバー(株), Crj:CD(SD))を使用した。

動物を断頭、放血死させ、直ちに肝臓を摘出した。3倍量の1.15%塩化カリウム溶液を加え、氷冷下テフロンペスル付ホモジェナイザーでホモジェナイズした。ホモジェネートを105,000×g、60分間冷却遠心分離した上清を酵素反応に使用した。Lowry らの方法²⁶⁾ によってタンパク質の定量を行った。

2.3 インキュベーションおよび高速液体クロマトグラフィー(HPLC)試料の調製

Lower らの方法²⁷⁾ を改良してインキュベーションを行った。反応液の組成は0.05mlのプロピレングリコールに溶解した基質(芳香族アミン)1.0 μmol, 1.0 μmol アセチルコエンザイム A (アセチル-CoA), 100 μM トリス塩酸緩衝液(pH 7.5) および肝可溶性画分(4.3mg タンパク質相当)であり、全量を1.0mlとした。反応液に基質を加えることによって反応を開始し、37°C、30分間インキュベートした。反応終了後、氷冷下1N水酸化ナトリウムを0.1mlを加えた。次いで、反応液にHPLC用の内部標準物質を加えた後、3倍量の酢酸エチル/*n*-ブタノール(1:1, v/v;使用前に水で飽和した)で2回抽出した。Aniline および nitroaniline 類の代謝物の抽出には酢酸エチルを使用した。有機層を50°C以下で減圧下濃縮乾固し、50%メタノール溶液に溶解し、HPLC試料とした。なお、芳香族アミン類のアセチル化合物の反応液からの回収率は85%以上であった。

2.4 HPLC, 紫外吸収スペクトルおよび質量スペクトル

代謝物の分離を高速液体クロマトグラフ(株島津製作所, LC-6A システム)によって行った。カラムにはShim-pack CLC-ODS(株島津製作所)を用い、流速0.6ml/min, 検出には紫外分光

Table 1. Chromatographic and Spectral Data of Nitro-*p*-phenylenediamine, Its *N*-Acetates, and 1,2,4-Triaminobenzene-*N*-Acetates

Compound	HPLC ^a			TLC ^b Rf value	UV λ_{max} nm (ϵ)	Mass spectral data m/z (relative intensity, %)
	Retention times (min)					
	1	2	3			
Nitro- <i>p</i> -phenylenediamine	18.2			0.65	243 (18600)	153 (M ⁺ , 100), 107 (73), 80 (47), 53 (39)
<i>N</i> ¹ -acetate	16.2			0.74	248 (19100)	185 (M ⁺ , 20), 153 (100), 107 (78), 80 (27), 53 (29)
<i>N</i> ² -acetate	25.8			0.46	253 (22700)	195 (M ⁺ , 47), 153 (100), 107 (88), 80 (33), 53 (42)
<i>N</i> ¹ , <i>N</i> ² -diacetate	29.2			0.66	253 (23500)	237 (M ⁺ , 24), 195 (58), 153 (100), 107 (43), 53 (15)
Acetanilide ^c	32.8					
1,2,4-Triaminobenzene ^d	9.8			0.56	232 (21600), 261 (18100)	291 (M ⁺ , 49), 235 (34), 176 (66), 122 (66), 57 (100)
<i>N</i> ¹ -acetate ^d	15.2			0.51	232.5 (20900), 260 (17300)	277 (M ⁺ , 67), 221 (36), 179 (56), 165 (44), 122 (100)
<i>N</i> ² -acetate ^d	16.4			0.52	231 (25400), 262 (21800)	277 (M ⁺ , 58), 221 (40), 179 (38), 165 (57), 122 (100)
<i>N</i> ⁴ -acetate ^d	19.6			0.52	232 (21600), 261 (18100)	277 (M ⁺ , 69), 221 (51), 179 (19), 165 (100), 122 (96)
<i>p</i> -Phenylenediamine						
<i>N</i> ¹ , <i>N</i> ² -diacetate ^c	22.8					
1,2,4-Triaminobenzene						
<i>N</i> ¹ , <i>N</i> ² -diacetate		12.0		0.23	223 (18800), 255 (10900), 300 (2300)	207 (M ⁺ , 39), 147 (51), 123 (46), 122 (100), 95 (45)
<i>N</i> ¹ , <i>N</i> ⁴ -diacetate		21.2		0.33	225.5 (29600), 255 (12000), 302 (5100)	207 (M ⁺ , 66), 147 (57), 123 (82), 122 (100), 95 (52)
<i>N</i> ² , <i>N</i> ⁴ -diacetate		14.0		0.27	213 (15900), 260 (12000)	207 (M ⁺ , 72), 147 (76), 123 (88), 122 (100), 95 (52)
<i>N</i> ¹ , <i>N</i> ² , <i>N</i> ⁴ -triacetate		39.6		0.37	230 (19300), 260 (16000)	249 (M ⁺ , 61), 165 (62), 147 (63), 123 (64), 122 (100)
<i>N</i> ⁴ -Acetylsulfanilamide ^c		26.0				

^a 1: Mobile phase, acetonitrile-water (15:85, v/v); column Shim-pack CLC-ODS; flow rate, 0.6 ml/min. 2: Mobile phase, chloroform-ethanol (95:5, v/v); column Shim-pack CLC-SIL; flow rate, 2.0 ml/min. 3: Mobile phase, methanol-water (10:90, v/v); column Shim-pack CLC-ODS; flow rate, 0.6 ml/min.

^b Mobile phase, chloroform-methanol-25% ammonia water (60:10:1, v/v).

^c Internal standard for HPLC. Plates: Slica gel 60 F₂₅₄ (E. Merck).

^d *N*¹,*N*²-Dipropionate derivative.

Table 2. Chromatographic and Spectral Data of Nitroanilines, Aniline and Their *N*-Acetates

Compound	HPLC ^a		UV Ethanol λ_{max}	nm (ϵ)	Mass spectral data m/z (relative intensity, %)
	Retention times (min)				
	1	2			
<i>o</i> -Nitroaniline	15.8				
<i>o</i> -Nitroaniline <i>N</i> -acetate	11.2		233 (17000)	180 (M ⁺ , 15), 138 (100), 92 (40), 65 (41), 63 (20), 52 (21)	
<i>m</i> -Nitroaniline	11.6				
<i>m</i> -Nitroaniline <i>N</i> -acetate	14.2		241 (22900)	180 (M ⁺ , 22), 138 (100), 92 (52), 65 (37), 64 (14), 63 (16)	
<i>p</i> -Nitroaniline	9.6				
<i>p</i> -Nitroaniline <i>N</i> -acetate	15.2		315 (14400), 224 (10860)	180 (M ⁺ , 25), 138 (100), 108 (56), 92 (29), 65 (42), 63 (24)	
2,4-Dinitroaniline ^b	19.8				
Aniline	12.0				
Acetanilide	14.6		241 (16000)	135 (M ⁺ , 25), 93 (100), 66 (23), 65 (20)	
<i>m</i> -Nitroaniline <i>N</i> -acetate ^b	22.0				

^a 1: Mobile phase, methanol-water (1:1, v/v), 2: mobile phase, methanol-water (4:6, v/v), and other conditions as described in the text.

^b Internal standard for high pressure liquid chromatography.

光度計検出器(株島津製作所, SPD-6A)を使用し, 検出波長254nmで行った。紫外吸収スペクトルについては各試料のエタノール溶液を自記分光光度計(株島津製作所, UV-201A)を用いて測定した。また, 質量スペクトルを質量分析計(株

島津製作所, QP-1000)を用いて, イオン化電圧70eV, イオン源温度290°Cで直接導入法によって測定した。標準品のHPLCによって測定した保持時間, 紫外吸収および質量スペクトルデータをTable 1, 2および3に示した。

Table 3. Chromatographic and Spectral Data of Phenylenediamines and Their *N*-Acetates

Compound	HPLC ^a Retention times (min)		UV Ethanol λ_{max}	nm(ϵ)	Mass spectral data m/z (relative intensity, %)
	1	2			
<i>o</i> -Phenylenediamine	5.6				
<i>N</i> -monoacetate	11.6		292 (2870) 208 (24100)	150 (M^+ , 46), 133 (26), 108 (100), 107 (39), 80 (56), 53 (25)	
<i>N,N'</i> -diacetate	22.8		214 (20700)	192 (M^+ , 20), 133 (35), 132 (36), 108 (100), 107 (31), 80 (32)	
<i>p</i> -Phenylenediamine <i>N,N'</i> -diacetate ^b	31.6				
<i>m</i> -Phenylenediamine	8.0				
<i>N</i> -monoacetate	12.4		296 (2580) 223 (26900)	150 (M^+ , 54), 108 (100), 81 (22), 80 (29), 53 (14)	
<i>N,N'</i> -diacetate	26.4		234 (29300)	192 (M^+ , 22), 150 (34), 108 (100), 81 (12), 80 (21)	
<i>p</i> -Phenylenediamine <i>N,N'</i> -diacetate ^b	20.4				
<i>p</i> -Phenylenediamine	6.4				
<i>N</i> -monoacetate	8.8		260 (15000)	150 (M^+ , 47), 108 (100), 107 (38), 80 (33), 53 (23)	
<i>N,N'</i> -diacetate	20.4		265 (23000)	192 (M^+ , 32), 150 (22), 108 (100), 107 (31), 80 (23), 53 (16)	
<i>m</i> -Phenylenediamine <i>N,N'</i> -diacetate ^b	26.4				

^a 1: Mobile phase, methanol-water-acetic acid (15:85:0.1, v/v), 2: mobile phase, methanol-10 mM phosphate buffer, pH 7.5 (2:8, v/v), and other conditions as described in the text.

^b Internal standard for high pressure liquid chromatography.

3. 結果

3.1 NPDA およびその *N*⁴-acetate の *N*-アセチル化反応

アセチル-CoA 存在下, ラット肝可溶性画分中で NPDA をインキュベートし, HPLC 用内部標準物質を添加した後, 酢酸エチル/*n*-ブタノールで抽出し, HPLC によって代謝物を検索した。クロマトグラム上には基質の他に保持時間 25.8 分にピークが検出された。このピークは加熱 (100°C, 5 分間) した可溶性画分およびアセチル-CoA 不存在下には検出されなかった。この代謝物を高速液体クロマトグラムの保持時間, 紫外吸収スペクトルおよびマススペクトルを標準品と比較した結果, NPDA *N*⁴-acetate であることが明らかになった。しかし, NPDA *N*¹-acetate および NPDA *N*¹, *N*⁴-diacetate は検出されなかった (Table 4)。

NPDA *N*⁴-acetate を基質とした場合も NPDA *N*¹, *N*⁴-diacetate は検出されなかった (Table 4)。

3.2 TAB *N*-mono- および *N,N'*-diacetate の *N*-アセチル化反応

4 位のアミノ基の *N*-アセチル化は, TAB の *N*¹-acetate および *N*²-acetate を NPDA と同様の条件でインキュベートした場合にも起こった。つまり, TAB *N*¹-acetate および TAB *N*²-acetate を基質とした反応液に内部標準物質を添加した後, 酢酸エチル/*n*-ブタノール抽出液には, クロマトグラム上にそれぞれ唯一の代謝物である TAB *N*¹, *N*⁴-diacetate (保持時間, 21.2 分) および TAB *N*², *N*⁴-diacetate (保持時間, 14.0 分) のピークが認められた (Table 1)。各々の代謝物を HPLC の再クロマトグラフィー, 紫外吸収およびマススペクトルの検討により確認した (Table 1 および 4)。しかし, それぞれの抽出液には TAB *N*¹, *N*², *N*⁴-triacetate に相当するクロマトグラム上のピークは認められなかった (Table 4)。

1 位のアミノ基の *N*-アセチル化は, TAB *N*⁴-acetate を前述の条件でインキュベートした場合に起こった。TAB *N*⁴-acetate を基質とした

Table 4. *N*-Acetylation of Nitro-*p*-phenylenediamine, 1,2,4-Triaminobenzene *N*-Mono- and *N*, *N'*-Di-acetates by Rat Liver Cytosol

Substrate ^a	Possible metabolite	Metabolite formed (nmol/mg protein/30 min)
Nitro- <i>p</i> -phenylenediamine	Nitro- <i>p</i> -phenylenediamine N^1 -monoacetate	0
	N^4 -monoacetate	28.7
	N^1, N^4 -diacetate	0
Nitro- <i>p</i> -phenylenediamine N^4 -monoacetate	Nitro- <i>p</i> -phenylenediamine N^1, N^4 -diacetate	0
1,2,4-Triaminobenzene N^1 -monoacetate	1,2,4-Triaminobenzene N^1, N^2 -diacetate	0
	N^1, N^4 -diacetate	9.4
	N^1, N^2, N^4 -triacetate	0
N^2 -monoacetate	1,2,4-Triaminobenzene N^1, N^2 -diacetate	0
	N^2, N^4 -diacetate	11.1
	N^1, N^2, N^4 -triacetate	0
N^4 -monoacetate	1,2,4-Triaminobenzene N^1, N^4 -diacetate	17.3
	N^2, N^4 -diacetate	0
	N^1, N^2, N^4 -triacetate	0
1,2,4-Triaminobenzene N^1, N^2 -diacetate	1,2,4-Triaminobenzene N^1, N^2, N^4 -triacetate	27.9
	N^1, N^4 -diacetate	0
	N^2, N^4 -diacetate	0

^a Each substrate (1 mM) was incubated at 37°C for 30 min with rat liver cytosol (4.3 mg protein/ml) in the presence of acetyl-CoA (1 mM) in 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing propylene glycol (5%, v/v). Propylene glycol which had no effect on the enzymatic reactions was used for dissolution of the substrates.

反応液中から唯一の代謝物である TAB N^1, N^4 -diacetate を HPLC により分離し、紫外吸収およびマススペクトルによって確認した (Table 1 および 4)。しかしながら、TAB N^2, N^4 -diacetate および TAB N^1, N^2, N^4 -triacetate は検出されなかった (Table 4)。

TAB N^1, N^2, N^4 -triacetate が代謝物として反応液中から検出されたのは、TAB N^1, N^2 -diacetate を基質とした場合のみであった。TAB N^1, N^4 -diacetate および N^2, N^4 -diacetate を基質とした場合には TAB N^1, N^2, N^4 -triacetate は検出されなかった (Table 4)。

3.3 Nitroaniline 類の *N*-アセチル化反応

Aniline のベンゼン環にニトロ基を導入した場

合のアミノ基の *N*-アセチル化に及ぼす影響を検討するためにアセチル-CoA 存在下、ラット肝可溶性画分を用いて、*o*-, *m*-, および *p*-nitroaniline を基質として NPDA と同様の条件でインキュベートした。反応液中の *N*-アセチル化代謝物 nitroaniline *N*-acetate を、内部標準物質を添加した後、酢酸エチルで抽出、HPLC により溶出し、再クロマトグラフィーを行い、その保持時間および紫外吸収、マススペクトルを標準品と比較検討し確認した (Table 2)。

Aniline のベンゼン環にニトロ基を導入することによって、その酵素的 *N*-アセチル化率は aniline のそれに比較して著しく減少した (Table 5)。3 種の nitroaniline の中で *m*-nitroaniline の酵素的 *N*-アセチル化率が最も高かったが、その被

Table 5. *N*-Acetylation of Aniline and Nitroanilines by Rat Liver Cytosol

Substrate ^a	<i>N</i> -Acetate formed (nmol/mg protein/ 30 min)	Relative acetylation
Aniline	38.6	1.00
<i>o</i> -Nitroaniline	0.0	0.00
<i>m</i> -Nitroaniline	19.5	0.51
<i>p</i> -Nitroaniline	4.8	0.12

^a Incubations were carried out under the same conditions as described in Table 4.

N-アセチル化率は aniline の1/2であった。*p*-nitroaniline に対する酵素的*N*-アセチル化率は *m*-nitroaniline のその1/4であり、*o*-nitroaniline のアミノ基は全く*N*-アセチル化を受けなかった。

3.4 PD類およびその*N*-monoacetate類の*N*-アセチル化反応

Anilineのベンゼン環にアミノ基あるいはアセチルアミノ基を導入した場合のアミノ基の*N*-アセチル化に及ぼす影響について検討した。

o-, *m*-, および*p*-PDならびにそれぞれの*N*-monoacetateを用い、アセチル-CoA存在下、肝可溶性画分を加え、前述と同様の条件でインキュベートした。PD類の*N*-アセチル化代謝物であるPD*N*-monoacetate類およびPD*N*, *N'*-diacetate類の確認、PD*N*-monoacetate類の代謝物PD*N*, *N'*-diacetate類の確認を前述のnitroaniline*N*-acetateと同様の方法で行った(Table 3)。Anilineのベンゼン環へのアミノ基の導入は、酵素的*N*-アセチル化率をanilineの1.7-1.9倍増加させた(Table 6)。*o*-PDの酵素的*N*-モノアセチル化率は、他の位置異性

体である*m*-および*p*-PDのそれらよりも高かった。しかし、PD*N*, *N'*-diacetateの生成については、*m*-および*p*-PDが総酵素的*N*-アセチル化率の約15%であるのに対して*o*-PDの場合には*N,N'*-diacetateは全く生成しなかった。

Anilineのベンゼン環にアセチルアミノ基を導入した場合、*o*-PD*N*-monoacetateの酵素的*N*-アセチル化率はanilineに比較して著しく減少した。一方、*m*-PD*N*-monoacetateの*N*-アセチル化率もanilineに比較して僅かに減少したが、*p*-PD*N*-monoacetateの*N*-アセチル化率は増加した。

3.5 NPDAの*N*-アセチル化反応におけるパラオクソンの影響

NPDA *N*¹-acetateを基質としてアセチル-CoA存在下、ラット肝可溶性画分中でインキュベートした場合、反応液中から基質の他にNPDA, NPDA *N*⁴-acetateおよびNPDA *N*¹, *N*⁴-diacetateが検出された。しかし、上述の反応液中に0.1Mパラオクソン(脱アセチル化酵素の阻害剤)を添加した場合、NPDAおよびその*N*⁴

Table 6. *N*-Acetylation of Aniline, Phenylenediamines and Their *N*-Monoacetates by Rat Liver Cytosol

Substrate ^a	<i>N</i> -Acetates formed (nmol/mg protein/30 min)		Total acetylation ^b
	<i>N</i> -Monoacetate	<i>N,N'</i> -Diacetate	
Aniline	39.4		39.4 (1.00)
<i>o</i> -Phenylenediamine	74.1	0.0	74.1 (1.88)
<i>m</i> -Phenylenediamine	64.1	10.4	74.5 (1.89)
<i>p</i> -Phenylenediamine	56.9	10.9	67.8 (1.72)
<i>o</i> -Phenylenediamine <i>N</i> -monoacetate		2.3	2.3 (0.06)
<i>m</i> -Phenylenediamine <i>N</i> -monoacetate		32.1	32.1 (0.81)
<i>p</i> -Phenylenediamine <i>N</i> -monoacetate		44.0	44.0 (1.12)

^a Incubations were carried out under the same conditions as described in Table 4.

^b Numerals in parentheses represent relative acetylation based on the summed values of *N*-mono- and *N,N'*-di-acetates.

Table 7. Effect of Paraoxon on *N*-Acetylation of Nitro-*p*-phenylenediamine and Its *N'*-Acetate by Rat Liver Cytosol^a

Substrate	Metabolites formed (nmol/mg protein/30 min)			
	Nitro- <i>p</i> -phenylenediamine	Nitro- <i>p</i> -phenylenediamine <i>N'</i> -acetate	Nitro- <i>p</i> -phenylenediamine <i>N'</i> -acetate	Nitro- <i>p</i> -phenylenediamine <i>N',N'</i> -diacetate
Nitro- <i>p</i> -phenylenediamine <i>N'</i> -acetate Complete	50.7	14.6	-	6.0
+ Paraoxon (0.1 mM)	4.3	3.0	-	11.8
Nitro- <i>p</i> -phenylenediamine Complete	-	28.7	0	0
+ Paraoxon (0.1 mM)	-	26.5	0	0

^a Incubations were carried out in the absence and in the presence of paraoxon under the same conditions as described in Table 4.

-acetateの生成は著しく減少した(Table 7)。一方、NPDAを基質とした場合、上述の条件下、パラオクソンの存在の有無にかかわらずNPDA *N'*-acetateおよびNPDA *N'*, *N'*-diacetateは全く生成せず、NPDA *N'*-acetateのみが生成した。また、その被*N*-アセチル化率にもほとんど変化が認められなく(Table 7)、パラオクソンの添加によるNPDAの4位のアミノ基の*N*-

アセチル化への影響は認められなかった。NPDA *N'*-acetateおよび*o*-nitroanilineを基質とし、パラオクソンを添加した場合もNPDAの1位のアミノ基と同様に、それぞれのアミノ基は全く*N*-アセチル化を受けなかった。

4. 考察

NPDAの*N*-アセチル化が4位のアミノ基に選択的に起こることが*in vivo*同様、アセチル-CoA存在下、雄性ラット肝可溶性画分を用いた実験においても明らかになった(Table 4およびFig. 1)。

NPDAのモデル化合物nitroanilineの3種の異性体を基質として、その*N*-アセチル化について検討した結果、*o*-nitroanilineのアミノ基は全く*N*-アセチル化を受けず、*m*-および*p*-nitroanilineのアミノ基は*N*-アセチル化を受けた(*m*>*p*)が、anilineの酵素的*N*-アセチル化率に比較して著しく減少した(Table 5)。したがって、NPDAの1位のアミノ基が*N*-アセチル化を受けない原因は、隣接するニトロ基の主に立体障害によるものと考えられる。

Brayら²⁸⁾はラット肝の水抽出物を用いて、数種の芳香族アミンの*N*-アセチル化合物の酵素的脱アセチル化について検討し、nitroaniline *N*-acetateの3種の異性体の酵素的脱アセチル化は、*o*>>*m*>*p*の順であることを報告している。本研究におけるラット肝脱アセチル化酵素は、パラオ

クソンによって著しく阻害を受けた。即ち、NPDA *N*¹-acetateの脱アセチル化酵素は0.1Mパラオクソンの添加により、約92%の阻害を受けた(Table 7)。そこで、脱アセチル化酵素をほぼ完全に阻害する条件である0.1Mパラオクソン存在下、基質としてNPDA, NPDA *N*⁴-acetateおよび*o*-nitroanilineを用いてアセチル-CoAと共にインキュベートしたが、3種の基質共、反応液中に*N*¹-acetateまたは*N*-acetateは検出されなかった。したがって、ニトロ基は*o*-位のアミノ基の*N*-アセチル化を完全に阻害することが明らかになった。

TAB *N*, *N*'-diacetateの*N*-アセチル化によるTAB *N*¹, *N*², *N*⁴-triacetateの生成は、肝可溶性画分中TAB *N*¹, *N*²-diacetateを基質とした場合のみ生成した。その他の異性体であるTAB *N*¹, *N*⁴-diacetateおよび*N*², *N*⁴-diacetateを基質とした場合にはアミノ基は*N*-アセチル化を受けずTAB *N*¹, *N*², *N*⁴-triacetateは生成しなかった(Table 4)。同様の選択的*N*-アセチル化はTAB *N*, *N*'-diacetateを投与した場合の*in vivo*においても認められた。また、PD類およびその*N*-monoacetate類, TAB *N* *N*'-monoacetate類およびそのTAB *N*, *N*'-

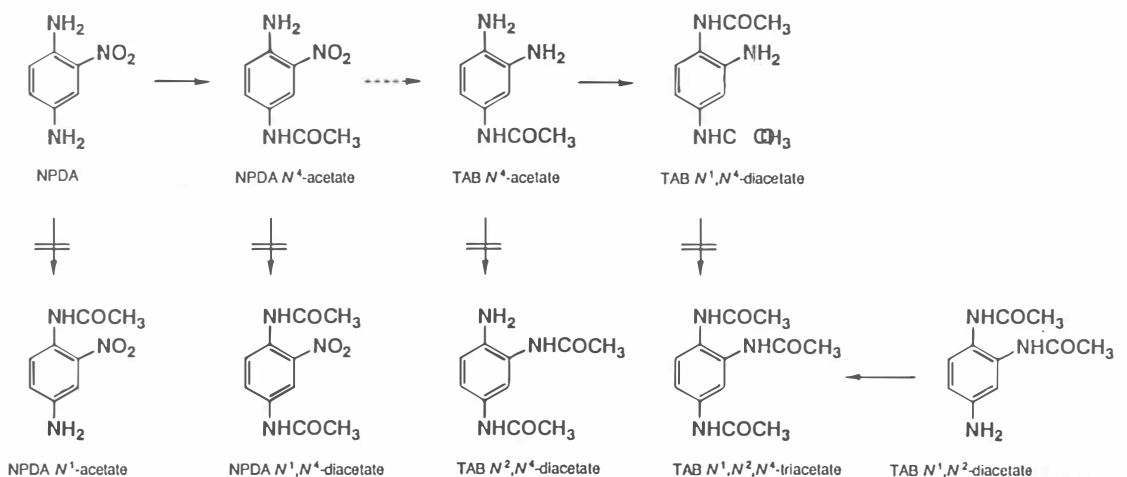


Fig. 1. Regioselective *N*-Acetylations of NPDA and TAB *N*⁴-acetate by Rat Liver Cytosol Fortified with Acetyl-CoA

diacetate類を基質とした場合にも隣接するアセチルアミノ基によってアミノ基の*N*-アセチル化が起こらないことから、アセチルアミノ基は、その立体障害によって*o*-位のアミノ基の*N*-アセチル化を阻害すると考えられる。

TAB *N*⁴-acetate は *in vivo* と同様にアセチル-CoA 存在下、ラット肝可溶性画分を用いても、1位のアミノ基のみ選択的に*N*-アセチル化を受け、TAB *N*¹, *N*⁴-diacetate を生成した。しかし、2位のアミノ基が*N*-アセチル化を受けた TAB *N*², *N*⁴-diacetate および TAB *N*¹, *N*², *N*⁴-triacetate は生成しなかった (Table 4 および Fig. 1)。この TAB *N*⁴-acetate の1位のアミノ基の選択的*N*-アセチル化は、酵素基質相互作用における立体的な影響によるものと考えられる。

酵素的*N*-アセチル化の立体障害と考えられる報告として、Glinskunら²⁹⁾は、ラット肝可溶性画分を用いて2,4-diaminotoluene の*N*-アセチル化について検討し、4-acetylamino-2-aminotoluene の特異的生成を認めているが、2-acetyl-4-aminotoluene および2,4-diacetylamino-2-aminotoluene を検出していない。また、Granthamら³⁰⁾も2,4-diaminoanisole をラットに投与した尿中から2,4-diaminoanisole の *N*⁴-monoacetate および *N*², *N*⁴-diacetate を検出しているが、*N*²-acetate を検出していない。

NPDAは、微生物に対する変異原性を有する^{1, 11-12)}が、その代謝物であるNPDA *N*⁴-acetate の変異原性はNPDAに比較して低い³¹⁾、したがって、NPDAの不活性化酵素として、*N*-アセチル化酵素によるアミノ基の*N*-アセチル化反応は重要であると考えられる。

最後に、本研究に対してご援助頂きました(財)コスメトロロジー研究振興財団に厚くお礼申し上げます。

引用文献

- 1) B. N. Ames, H. O. Kammen and E. Yamasaki, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72, 2423 (1975)
- 2) T. Wernick, B. M. Lanman and J. L. Fraux, Toxicol. Appl. Pharmacol., 32, 450(1975)
- 3) C. Burnett, M. M. Jacobs, A. Seppala and P. Shubik, J. Toxicol. Environ. Health, 6, 247 (1980)
- 4) A. L. Giles, C. W. Chung and C. Kommineni, J. Toxicol. Environ. Health, 1, 433(1976)
- 5) G. Iyer, K. Kannan and R. R. Khan, J. Scient. Ind. Res., 44, 392(1985)
- 6) P. H. Grantham, L. Mohan, T. Benjamin, P. P. Roller, J. R. Miller and E. K. Weisburger, J. Environ. Pathol. Toxicol., 3, 149(1980)
- 7) H. Hofer and E. Hruby, Fd. Chem. Toxicol., 21, 331(1983)
- 8) Y. M. Ioannou and H. B. Matthews, J. Toxicol. Environ. Health, 16, 299(1985)
- 9) R. L. Bronaugh and E. R. Congdon, J. Invest. Dermatol., 83, 124(1984)
- 10) L. J. Wolfram and H. I. Maibach, Arch. Dermatol. Res., 277, 235(1985)
- 11) Y. Takeda and R. Yoshimura, Eisei Kagaku, 24, 322(1978)
- 12) M. M. Shahin, C. Choppy and N. Lequesne, Environ. Mutagen., 7, 535(1985)
- 13) W. F. Benedict, Nature, 260, 368(1976)
- 14) P. E. Perry and C. E. Searle, Mutat. Res., 56, 207(1977)
- 15) C. N. Martin, A. C. McDermid and R. C. Garner, Cancer Res., 38, 2621(1978)
- 16) G. Reznik and J. M. Ward, Fd. Cosmet. Toxicol., 17, 493(1979)
- 17) R. R. Maronpot, M. B. Skimkin, H. P. Witschi, L. H. Smith and J. M. Cline, J. Natl. Cancer Inst., 76, 1101(1986)
- 18) M. Nakao and Y. Takeda, J. Toxicol. Environ. Health, 11, 93(1983)
- 19) M. Nakao, Y. Goto, Y. Matsuki, A. Hiratsuka and T. Watabe, Chem. Pharm. Bull., 35, 785 (1975)

- (1987)
- 20) C. M. Atkinson, C. W. Brown, J. McIntyre and J. C. E. Simpon(deceased), *J. Chem. Soc.*, 1954, 2023
- 21) C. Bulow and E. Mann, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 30, 977(1897)
- 22) F. Kehrmann and C. Mermod, *Helv. Chim. Acta*, 10, 62(1927)
- 23) A. D. Macallum, *J. Soc. Chem. Ind.*, 42, 468 (1923)
- 24) A. D. Rugheimer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 39, 1653(1906)
- 25) M. A. Phillips, *J. Chem. Soc.*, 1928, 172
- 26) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951)
- 27) G. M. Lower, Jr. and G. T. Bryan, *Biochem. Pharmacol.*, 22, 1581(1973)
- 28) H. G. Bray, S. P. James, W. V. Thorpe and M. R. Wasdell, *Biochem. J.*, 47, 483(1950)
- 29) T. Glinsukon, T. Benjamin, P. H. Grantham, E. K. Weisburger and P. P. Roller, *Xenobiotica*, 5, 475(1975)
- 30) P. H. Grantham, T. Benjamin, L. C. Tahan, P. P. Roller, J. R. Miller and E. K. Weisburger, *Xenobiotica*, 9, 333(1979)
- 31) K. G. Dossou, M. Robinet, F. Callais, B. Festy and P. H. N'guyen, *Ann. Falsif. Expert. Chim. Toxicol.*, 80, 361(1987)

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
大野 忠 夫

As a partial alternative to the Draize eye irritation test for detergents which are used in shampoos or rinses and general chemicals which have been known toxic to human, we developed a sensitive assay protocol for measuring release of lactate dehydrogenase (LDH) activity into the medium from cultured human cells. Results suggest that some commonly used detergents have relatively high cytotoxicity at low concentrations than the cytotoxicity assumed from their ED₅₀. This method was applied to commercial eye drops. We found that 8 of 9 eye drops tested were apparently cytotoxic to human cells because of undescribed component. One of these eye drops stimulated LDH release into tears 10 second after application to human eyes.

Insect cell lines, instead of human cells, were tested their sensitivity to anti-tumor drugs. Although some of the cells showed high sensitivity to the drugs, patterns of the sensitivities to the drugs were different from those of human cell lines.

1. 緒 言

現在、化粧品、シャンプー、リンス等、体表に適用する化成品の毒性・安全性試験は、ウサギ眼・皮膚に当該品を直接投与し、生じた炎症反応を指標にして経時的に観察、評価点を与えていくというドレイズ試験法によって行われている。この方法は、ヒト眼・皮膚の代替としてウサギを使用するものであるが、刺激性の評価には客観性に難があり高度の熟練を要する。しかも、障害の多くは非可逆性のため、ウサギの繰り返し使用はできない^{1,2)}。このため、多種多様な化成品を対象に行わなければならない毒性・安全性試験法としては、迅速性、経済性にも問題がある。

衆知のように、欧米における熾烈な動物実験反対運動はわが国にも波及してきており動物実験の廃止を求める会などの団体が結成されている。ウ

サギ眼に対するドレイズ試験法は残虐性が高いため、動物愛護の立場からは国際的にも最大の攻撃目標になっている。

ドレイズ試験法の本質をなすものは細胞に対する試験物質の障害性である。本研究は、in vitro細胞培養法を応用し、ドレイズ試験法の欠点である客観性、迅速性、経済性、残虐性を大幅に改善した試験法を開発することを目的とし、2年間の計画で実施したものである。

2. ヒト細胞からの遊離酵素を指標にした シャンプー、リンスに利用される界面 活性剤の安全性試験法の開発

2.1 はじめに

安全性試験法のなかで、培養細胞を利用する場合、その指標のとりかたにもいろいろあるが、特

定の代謝反応をねらわず、できるだけ広く一般的な毒性を知ろうとする場合、現在では、細胞の生死、増殖性を指標にするのが、最も単純で、大量かつ迅速な検体処理に適する。さらに、細胞から遊離されてくる酵素活性を指標とする方法により、極めて低濃度の界面活性剤のヒト細胞膜破壊の程度が実測できる。これを多種類の界面活性剤に適用し、スクリーニング方法としての実用性、限界、ドレイズ試験法との平行性などを綿密に測定することとした。

Anuforoら³⁾は、tetracyclin処理で遊離されてくる細胞内酵素活性は対照に対する相対量でASAL (arginosuccinate lyase) > LDH (lactate dehydrogenase) > GPT (glutamate pyruvate transaminase) > GOT (glutamate oxaloacetate transaminase) > AP (alkaline phosphatase)の順であったと報告している。我々は細胞質にあって、測定しやすく相対的に安定なLDHを指標とした。臨床検査用に市販されている血清LDH活性測定用キットを利用すればLDH活性測定は極めて単純である。LDHは、ASALやGPTに比べて、どの細胞でも一般に活性が高く測定しやすい酵素である。細胞の前培養さえできていれば、検体処理、培養上清分離、LDH測定の自動化も容易である。

2.2 実験

我々は主にヒト肺癌細胞SQ-5を使用した。またヒト正常2倍体線維芽細胞NB1RGBを含め他のヒト細胞についても検討した。培養用培地はMEMに10%ウシ胎児血清(FBS)を添加したものである。96穴培養プレートに1000cells/well播種し、0.1mlの培地で3日間培養後、PBSで洗浄し試験に供した。試験の対象とした界面活性剤は表1に示した。添加後、20分間室温でインキュベートし培養上清に漏出したLDH活性を測定した。その後0.3%の界面活性剤C(表1)を加えて細胞も含めて溶解し測定した全LDH活性を100%とし、細胞毒性を%で表示した。

昆虫細胞の場合は昆虫細胞用培地を使用した。他の条件はヒト細胞とほとんど同じである。

LDH活性測定には臨床検査用LDH測定キットを使用した。

2.3 結果

表1にあげた界面活性剤についてヒト細胞を使用した結果はToxicology in Vitro誌に発表した⁴⁾。簡略に述べると、表1に示した界面活性剤C, D, Iについて、低用量領域で詳細に検討したところ、界面活性剤CのED₅₀は0.023%, Dでは0.032%, Iでは0.020%で、相対的に言えば、DはC, Iよりも安全性が高く、CとIはほとんど同じと推定された。

しかし、CとIの用量反応曲線は途中でクロスしていたためわずか1%の細胞死を引き起こす用量ED₁を比較すると、Cでは0.0091%, Iでは0.015%となり、ED₅₀で見られていたCとIの関係とは異なり、低用量領域ではIに比較してCの毒性がより強く残存していることが判明した。ED₅₀でははっきり差があるDとIのED₁は、同一であった。

Watanabeらによるドレイズ試験法の結果計算されたドレイズスコア20を与える用量(w/v%)で表示したDS₂₀値⁵⁾と、計算されたED₅₀の相関関係をみたところ、被験物質がわずか10検体で

表1 試験対象界面活性剤

Chemical	Abbreviation
Nonionic detergents	
Polyoxyethylene (10) nonyl phenyl ether	B
Polyoxyethylene (9) lauryl ether	F
Polyoxyethylene (10) lauric acid	I
Anionic detergents	
α-olefinic sodium sulfonate	A
Polyoxyethylene (2) laurylether sodium sulfonate	J
Cationic detergents	
Alkyl benzyl dimethyl ammonium chloride	G
Pentaetoxy stearyl ammonium chloride	H
Stearyl trimethyl ammonium chloride	K
Amphoteric detergents	
Lauryl dimethyl methyl amino betaine acetate	C
Alkyl imidazolin	D

あるにもかかわらず、高い相関関係が観察された(図1)。

2.4 考察

現在では多くの酵素活性の測定が高感度で可能なため、細胞内酵素を測定する方法は、比較的少数の細胞があれば試験可能であり、試験系全体を高感度化しやすい利点をもっている。酵素の高い基質特異性を利用すれば、特定の代謝反応をねらい打ちにした毒性試験系の設計も可能であるが、大量迅速処理を旨とする動物実験代替法の立場からは、そのような場合はむしろ精製酵素による生化学的検査法が有利となり、一般毒性試験の目的から離れてくる。

細胞の生死をマーカーとする毒性試験の観点から見ると、特に遊離酵素測定法は、死細胞を直接測定できるというMTT法⁶⁾やneutral red法⁷⁾にない特徴を持ち、試験対象物質の低濃度領域における直接的な細胞傷害活性が正確に測定可能である。細胞内残存酵素量を同時に測定できれば、生存細胞数の測定も同時に可能となる。

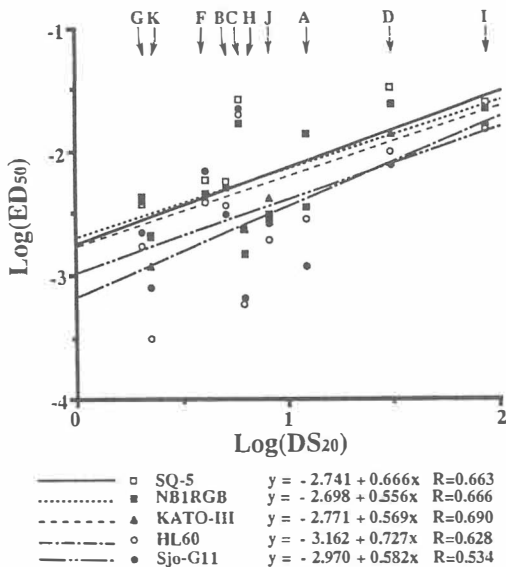


図1 In vivo ドレイズ試験法によるデータと in vitro 安全性試験法(LDH法)との相関関係

本研究により、一部の界面活性剤は、弱い細胞毒性を示す用量領域(ED₁領域)で、それらのED₅₀値の順から期待されるよりも、相対的に見て強い細胞毒性が残存していることが判明した。

しかし、酵素測定法も、

- 1) 確実に死んだ細胞を測定できる反面、細胞膜破壊が起こらなければ酵素は遊離してこないため、膜破壊以前の状態で死んでいる細胞は測定できない、
- 2) 酵素の種類によっては細胞内でも不安定なものがあり、細胞のわずかな生理状態の変動に大きく影響されやすい、
- 3) 酵素自体に直接作用する化合物は、細胞毒性試験が容易ではなく、複雑な補正計算を必要とする、等の問題点をもっている。

本法ではLDHを選択したため、上記2)の点は避けられるものの、汎用されている界面活性剤であるsodium dodecyl sulfateはLDH活性を直接阻害するため、本法を適用するためには、直接阻害が起きない低用量領域をあらかじめ選択しておく必要がある。

3. 昆虫細胞株を指標にした制癌剤の迅速細胞毒性試験法の開発

前項で開発した安全性試験法を、界面活性剤のみならず、一般的な化学合成品に適用できるか否か、特に制癌剤を対象にして検討した。また、細胞としてはヒト細胞に比べ、培養がはるかに容易で、炭酸ガスインキュベーターを必要とせず、室温で増殖する昆虫細胞株を対象とし、制癌剤に対しヒト細胞と同等な反応を示すものを探索した。表2にその結果をまとめたものを示す。

この結果は、ヒト子宮頸部癌細胞株であるHeLa細胞に比べ、各種昆虫細胞株の制癌剤に反応するパターンは異なり、これらの細胞株をうまく組み合わせればヒト細胞株と同様の結果が得られるが、組み合わせの分だけ試験回数が増え、ヒト細胞を用いる場合に比べ、必ずしも有利な試験

表2 各種制癌剤の昆虫細胞に及ぼす影響。

表の最上段は細胞名、左側カラムは薬剤名である。NIH-SaPe-4からBM-Nまでは各種昆虫細胞株名、HeLa S3, Y79, HL60はヒト癌細胞株、FM3Aはマウス癌細胞株。数値は3日間培養時の各薬剤の最小増殖阻害濃度($\mu\text{g/ml}$)を表す。

	NIH-SaPe-4 (RCB280)	NIAS-PX-58 (RCB556)	NIAS-PX-64 (RCB412)	SES-BoHo-15A (RCB430)	BM-N (RCB457)	HeLa S3 (RCB271)	Y79 (RCB427)	HL60	FM3A (RCB086)
cyclophosphamide	10000	10000	10000	5000	5000	5000	10000	2500	5000
carboquone	25	25	25	12.5	12.5	0.78	6.3	0.78	3.1
TESPA *	500	250	250	250	250	10	40	1.25	40
methotrexate	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000	>5000
diethylstilbestrol	>25000	391	25000	98	<12	78	78	20	39
5-fluorouracil	1600	100	200	400	100	98	200	24	1600
tegafur	2500	625	5000	1250	625	5000	10000	5000	5000
ancitabin	10000	>10000	>10000	10000	10000	5000	5000	<4.9	9.8
bleomycin	125	125	250	250	62.5	125	500	2.0	62.5
mitomycin C	12.5	100	200	200	100	3.1	3.1	0.20	6.3
neocarzinostacin	0.78	25	>200	12.5	6.3	0.63	10	0.31	20
daunomycin	0.39	6.3	25	100	6.3	0.31	0.63	<0.02	2.5
adriamycin	0.78	1.6	12.5	200	6.3	0.125	8.0	0.016	>8.0
actinomycin D	<0.002	0.0039	0.063	0.063	0.031	<0.002	0.0039	<0.002	1.0
chromomycin A3	<0.002	<0.002	0.0039	0.031	0.063	<0.002	0.0039	0.0039	2.0

* triethylenethiophosphoramide

法とならないことを示している。

4. 市販目薬の安全性試験

4.1 はじめに

本研究で開発した遊離LDH活性測定法(以下、LDH法と略称する)は、前述したようにneutral red法やMTT法に比較して高感度であり、わずかの量の細胞破壊が被験物質によって起こっても検出可能である。

この高感度という特性によって、実際に人間に適用されており実用化していて、しかもすべての人が安全であると信じている(はずの)製品が本当に細胞破壊を引き起こさないか、我々は市販の目薬を対象にLDH法を適用してみた⁷⁾。

市販目薬を対象とした理由は、

- 1) 目薬に含まれている成分はすべてドレイズ試験を適用された物質のほずであり、
- 2) ヒトの眼に直接適用するため、最終製品としてもドレイズ試験を通過しているほずであり、
- 3) 安全性は保証されていなければならない(少なくとも期待される成分の薬用効果に比べ非

特異的毒性はないはずの低濃度にしてある)ほずで、

- 4) LDH活性は涙中でも測定できるため、もし、何らかの細胞毒性が発見されたら、in vivoに目薬を適用してその毒性を検証できる可能性がある、からである。

4.2 実験

方法は前述の2.の場合と同様である。目薬としては、市販品9品目をランダムに選び、スーパーマーケット内の薬店で購入した。これをそのままPBSで希釈し、検体とした。

4.3 結果

市販目薬の能書に記載されていた有効成分は表3のとおりである。

3種のヒト癌細胞株を標的細胞にしてLDH法を適用した結果を表4にまとめた。試験した9種の目薬のうち、7種までが明かな細胞毒性を示し、1種(TG)はHL60細胞にのみ細胞毒性を示した。

そこで、目薬の成分のうち毒性を示すものを検

表3 市販目薬の能書に記載されていた有効成分

Eye Drops (abbreviation)	PV	RN	RP	RS	SN	TA	TE	TG	TM
Lot No.	16727	0040	021	11771	NU391	12052	031B1	011B1	A053
Maker Code	A	B	B	C	D	E	F	F	G
Reported content (mg/ml)									
Panthenol	0	1	0	0	0	0	0	0	0
L-Asparatic acid potassium salt	0	10	10	0	3.5	10	5	0	0
Glycyrrhizic acid potassium salt	0	1	0	1	1	0	0.5	0.5	0
Naphazoline hydrochloride	0	0.03	0.03	0	0	0.03	0	0	0.02
Neostigmine methyl sulfate	0	0.05	0.05	0.02	0.02	0.03	0.02	0	0
Chlorpheniramine maleate	0	0.1	0	0	0.1	0.3	0.2	0.2	0.3
Aminoethanesulfonic acid	0	0	10	0	1	0	5	5	5
Sodium chondroitin sulfate	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Allantoin	0	0	0	1	0	0	1	0	1
Zinc sulfate	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Tetrahydrozoline hydrochloride	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0
Lysozyme	0	0	0	0	0	5	0	0	0
Flavine-adenine dinucleotide	0	0	0.5	0	0	0	0	0.5	0
Pyridoxine	0	0.5	1	1	1	0	1	1	0
Cyanocobalamin	0	0	0	0	0.1	0	0	0	0

出すため、能書にしたがって各成分をPBSに溶解した再構成目薬を作成し、LDH法にかけたところ、すべての再構成目薬は全く細胞毒性を示さなかった。したがって、細胞毒性を示す成分は能書に記載されていないものであることが判明した。

4.4 考察

市販目薬は我国では百種以上が販売されているといわれており、それぞれの最終製品の毒性試験結果は公表されていない。目薬に添加できる各成分についての毒性はドレイズ試験法で調べられているはずで(現時点で筆者らにこのデータは入手できていない)、それに十分な安全率を掛けた濃度で添加されているはずだからである。すなわち、目薬は全く安全である(に違いない)という信念に基づいて広く市販されていると筆者らも考えていた。

しかしながら、これらのうちわずか9種を調べたにもかかわらず、その8種までが細胞毒性があり、明らかに毒性がないのはわずか1種にすぎないという結果は驚きであった(表4)。

確かに、培養細胞を用いた我々のLDH法は高

感度であり、それ故にin vitroでは毒性が検出できるが、その細胞毒性の程度はin vivo(つまりヒト裸眼)では問題にならない少なさなのかもしれない。

筆者らの試験では、調査した市販目薬のなかには、細胞に添加してわずか1分で明らかにLDHを遊離させるものがあり、それは実際にヒト裸眼に適用すると涙中のLDH活性を上昇させた(未

表4 3種のヒト癌細胞株に対する9種の市販目薬の細胞毒性

ASSAY	LDH			
	CELL	SQ-5	HIL60	Sjo-G11
EYE DROPS	ED50(%)	ED50(%)	ED50(%)	ED50(%)
PV	24.2 (23.0 ~ 25.4)*	6.4 (5.6 ~ 7.3)	8.1 (7.8 ~ 8.4)	
RN	55.2 (51.4 ~ 59.3)	17.2 (13.6 ~ 20.9)	27.0 (24.8 ~ 30.5)	
RP	65.5 (62.8 ~ 68.4)	24.5 (20.1 ~ 29.6)	30.2 (29.2 ~ 30.9)	
RS	42.3 (38.1 ~ 46.5)	11.8 (7.8 ~ 16.3)	19.1 (15.6 ~ 23.1)	
SN	52.2 (45.2 ~ 57.2)	31.2 (30.4 ~ 32.0)	36.5 (36.1 ~ 37.0)	
TA	62.8 (55.6 ~ 72.2)	11.1 (8.3 ~ 14.0)	27.7 (25.1 ~ 30.5)	
TE	38.8 (34.5 ~ 43.0)	8.8 (7.5 ~ 10.2)	18.1 (16.2 ~ 20.2)	
TG	Undet. **	14.5 (8.1 ~ 20.1)	Undet.	
TM	Undet.	Undet.	Undet.	

ED50 values were determined from the dose-response curves shown in Fig. 2, Fig. 3a and b, and Fig. 4

*Figures in parentheses are confidence limits of the values shown on the line above.
** Undetectable

発表)。この結果からは、ヒト眼の外界に接する表層細胞の少なくとも一部は目薬の滴下によって破壊されると想定せざるを得ない。しかもそれを引き起こしている成分は、能書に公表されているいわゆる有効成分ではなく、未記載の(したがって従来は誰もその毒性を疑わない安全なはずの)成分だとしか考えられないのである。

5. 総括

前項のように、わずかな種類の市販製品の細胞毒性を調べただけで一般論を述べるのは時期尚早かもしれないが、我々の得た試験結果は、従来の毒性試験法の考え方について一種のパラダイムの変更を求めているように思われる。

すなわち、少なくともドレイズ試験法を含む局所刺激性試験については、従来のように *in vivo* で調べた毒性試験結果(動物で毒性が発現するまで用量を増加させていって測定する)に十分な安全率を掛け、それによって最終製品を作成するという手順よりも、*in vitro* の試験法によって検出しうる最大無毒用量を求め、それを *in vivo* 局所刺激試験に適用し安全性を確かめた上で製品化するという、従来とは逆の方法を取るのである。こうすれば不幸にして *in vivo* で毒性が出た動物を除いて、ほとんどの動物は再使用に耐え得るはずであり、動物実験を大幅にセーブできるはずであ

る。

もちろん、製品の種類によっては、毒性があってもなおかつ有効性のメリットが大きいという有効性-毒性のバランスの問題があろう。しかし、目薬のような直接医療現場の制御下で使用されない汎用製品においては、最大無毒用量でなお有効な効果がないものならば、販売許可を出すべきではないのではなかろうか。

文献

- 1) Marzulli F. N. and Ruggles, D. I.: J. Ass. off. Analt. Chem., 56: 905-914, 1973.
- 2) Weil C. S. and Scala, R. A.: Toxic. appl. Pharmac., 19: 276-360, 1971
- 3) Anuforo, D. C., Acosta, D. and Smith, R. V. In Vitro., 14: 981-988, 1978.
- 4) Sasaki, T., Kawai, K., Saijo-Kurita, K., and Ohno, T.: Toxicol. in Vitro, 6: 451-457, 1992.
- 5) Watanabe, M., Watanabe, K., Suzuki, K., Nikaido, O., Ishii, I., Konishi, H., Tanaka, N., and Sugahara, T.: Toxic. in Vitro, 3: 329-334, 1989.
- 6) Mosmann, T.: J. Immun. Meth. 65: 55-63, 1983.
- 7) Borenfreund, E. and Puerner, J. A.: Toxicol. Lett. 24: 119-124, 1985.
- 8) Sasaki, T. and Ohno, T.: in submission.

リン脂質ベシクル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

古澤 邦夫

Mixed vesicles including phosphatidylcholine(PC), phosphatidyl serine(PS) and amphoteric crown ether compound(C_{18} -OCH₂-18-crown-6) with different component fractions were prepared and their ion-complexing phenomena was examined by measuring their electrophoretic mobilities in different salt solutions. The crown ether compounds retained their selectively ion-complexing ability for some special cations(K^+ and Ba^{2+}) even on the vesical surfaces. The zeta-potentials of the mixed vesicles of PC+PS+crown were determined extensively by fraction of the PS component and variation in metal cations in aqueous solution. That is, this parameter shifted remarkably in a negative direction with increase in the PS-fraction only in salt solutions containing K^+ or Ba^{2+} . No shifting of zeta-potentials could be detected in the case of (i)PC+PS vesicles without crown ether or, (ii)salt solutions that did not complex with the crown ether(Li^+ or Ca^{2+}).

1. 緒言

生体膜は多種類の脂質分子の二分子膜が流動的に二次元に広がっているところに種々のタンパク質などの機能性物質が組み込まれた構造をとっており¹⁾, ここを通してイオンの選択透過や情報の伝達など様々な機能がなされている。また、リン脂質ベシクル(リポソーム)は、生体膜のモデルとしてイオンの吸着性や透過性の研究に広く利用されている²⁾が、イオン透過の研究モデルとしては不十分な点もある。それは生体膜にはイオンの濃度勾配に基づく受動輸送以外にcarrierやchannelと呼ばれる特異なタンパク質等によって促進輸送も行うという高度な機能を有するからである³⁾。

一方、コロイド化学的な側面から眺めるとベシクルは個々のリン脂質分子の集合体から成る疎水コロイドであるため、極性基の異なるリン脂質や特異な機能をもつ両親媒性物質を混ぜ合わせた混

合ベシクルを調製し、それらの物性を研究することから、機能性粒子としての機能発現のメカニズムを調べる対象として有用である。

我々は今までホスファチジルエタノールアミン(PE)およびホスファチジルセリン(PS)ベシクルの表面に各種金属陽イオンの結合性をコロイド化学的手法で調べたところ^{2), 4)}, $K^+ < Mg^{2+} < Ca^{2+} < La^{3+} < Th^{4+}$ の順序で強くなることを見いだし、結合性の強さに応じてこれら各種陽イオンは2種類の異なった機構でベシクル粒子の凝集を誘起することがわかった²⁾。その第一は荷電中和の機構で、ベシクル表面の電荷が中和されて粒子間のVander Waals引力で凝集する機構である⁵⁾。この凝集はベシクル表面への結合力の強い多価陽イオン(La^{3+} や Th^{4+})を添加すると起こる。第二の機構は二価金属陽イオン(Ca^{2+} や Mg^{2+})が起こす粒子間結合、すなわち、2個の粒子間にまたがったこれらイオンの橋かけ形成が原因で起

こる凝集である。第二の機構で凝集する場合は金属陽イオンの凝集限界濃度はベシクル濃度の増加と共に減少する傾向が見られた²⁾。

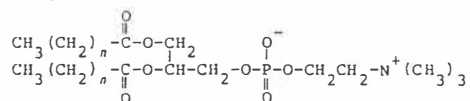
本研究では各種リン脂質の単独ベシクルに加えて、長鎖の炭化水素鎖をもつクラウンエーテル化合物を機能性物質に選び、各種リン脂質に混ぜ合わせた混合ベシクルを調製した。酸素原子と炭素原子が環状に配列したクラウンエーテル化合物はオキシエチレン基と同様に水素結合性の親水基であると共に、選択的に特殊な金属イオンと錯形成する能力があることは広く知られた事実である⁶⁾。また、その側鎖に疎水基を導入することにより非イオン界面活性剤としても機能する。従って、ベシクル構成成分としてこれを混入させると両親媒性クラウンエーテルが備えているイオン選択的錯形成、組織的分子会合性および界面吸着性等の基本特性をベシクル粒子の形態で付与することができると期待される。ここでは種々な条件下で形成されたクラウンエーテル混入ベシクルの機能性、特に各種陽イオンとの相互作用について、それらの電気泳動実験より検討した。

2. 実験

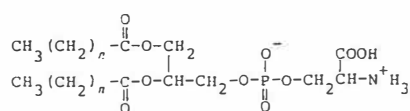
2.1 試料

リン脂質の基本試料としては卵黄から抽出したL- α -ホスファチジルコリン(PC)を使用した。PCは正および負に荷電した基を1個ずつもつ中性リン脂質の典型である。このPCに牛の脳から抽出したL- α -ホスファチジルセリン(PS)および長鎖クラウンエーテルをいろいろな組成で加えた混合ベシクルを調製した。PSはリン酸基とアミノ基に加えカルボキシル基を持つ酸性リン脂質である。長鎖クラウンエーテルには炭素数18の直鎖のアルキル基をもつoctadecyloxymethyl-18-crown-6(C₁₈-OCH₂-18-crown-6, 混合ベシクル系ではcrownと表記する)を使用した。この化合物は群馬大学工学部桑村研究室で合成され、精製されたものをそのまま使用した。Fig.-1に

PC : L- α -Phosphatidylcholine (from frozen egg yolk)



PS : L- α -Phosphatidyl-L-serine (from Bovine Brain)



CH₃(CH₂)₁₇-OCH₂-18-crown-6

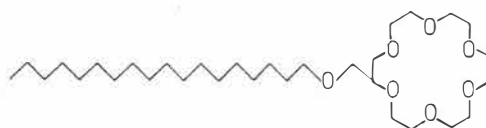


Fig. 1 Molecular structures of PC, PS and C₁₈-OCH₂-18-crown-6

これら化合物の構造式をそれぞれ示す。本実験では4種類の金属塩化物(BaCl₂, KCl, CaCl₂, LiCl)を使用した。いずれも市販(和光純薬株)の特級品をそのまま使用した。これらの金属陽イオンとC₁₈-OCH₂-18-crown-6との錯形成安定度(K)は、水中、25°Cにおいてlog Kで3.87(Ba²⁺)>2.03(K⁺)>~0.5(Ca²⁺)>~0(Li⁺)の順である⁶⁾。また水相として使用した水はすべて2回蒸留し、Barnstead(USA)社のNANO Pureシステムで精製したものを用了。

2.2 ベシクルの調製

ベシクルの調製は主にExtrusion法(押し出し法)で行った。この方法は“凍結-融解”を繰り返してunilamellarityとtrapping効率を著しく増大させることができ、またフィルター孔径を変えることによってベシクルの粒径を任意に制御できる特徴をもつ。まず、通常の超音波法と同様に試料を懸濁させてLarge Multilamellar Vesicles(LMV)を作り、次にこのLMVを液体窒素中に入れて凍らせ、40~60°Cの温水中に入れて解凍する“凍結-融解”の操作を5回繰り返した。その後Lipex Biomembran社製のEx-

truder 装置の中にポリカーボネート製フィルター (Nuclepore 社製) を2枚重ねて敷き、その中に試料溶液を注入した。次に窒素ガス20~30atmの圧力でベシクルをフィルターから押し出す操作をまず0.2 μm 孔径のフィルターで5回繰り返し、さらにフィルターを0.1 μm 孔径のものに変えて5回繰り返し Unilamellar Vesicles (UV) を調製した。

参照のため超音波分散法によってもベシクルを調製し、従来と同様^{2), 4)}に遠心処理とゲル濾過法で精製後使用した。

2.3 ベシクルの粒子径分布および膜構造の観察

リン脂質に長鎖クラウンエーテルを種々な割合で混合して調製したベシクルの粒径分布を動的光散乱法で測定した。測定には大塚電子(株)製の粒子解析装置 (LPA-3000) を使用した。また、いろいろな組成から成る混合ベシクルの膜構造を電子顕微鏡で観察した。各種ベシクルを酢酸ウランで染色し、日立製作所製透過型電子顕微鏡 (H-800型) により加速電圧200kVで観察した。

2.4 電気泳動測定

各種リン脂質の単独ベシクルおよびクラウンエーテル混入の混合ベシクル表面への各種金属陽イオンの吸着作用を調べるためにベシクル粒子の電気泳動速度を測定した。まずベシクル懸濁液 ($C_p \sim 0.005\text{g/dL}$) 2mL に各種濃度の塩溶液10mLを密栓付き試験管に取り、20 $^{\circ}\text{C}$ で一晩ゆるやかに転倒かくはんした後電気泳動測定を行った。各試料の電気泳動速度は顕微鏡電気泳動装置 (Rank Brother M-2) により25 $^{\circ}\text{C}$ で求め、Helmholtz-Smoluchowski式より ζ -電位を算出した。

3. 結果および考察

3.1 混合ベシクルの形状と膜構造

Fig.-2はExtrusion法で調製したPC単独ベシクルおよびPC+crown(1:1)混合ベシクルの粒

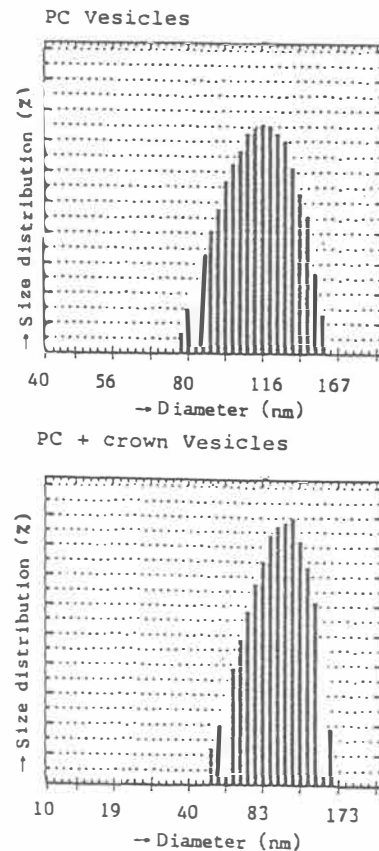


Fig. 2 Distribution curves of particle sizes of PC and PC + crown(1:1)vesicles.

子径分布曲線を示す。これらの試料はいずれも最後に孔径0.1 μm のポリカーボネートフィルターを用いて調製したものであるが、フィルターの孔径に合致した平均粒子径をもつ単分散ベシクルが調製されていることがわかる。また、いずれも粒子の分散は著しく安定で、2~3日間放置しても粒子径分布の変化はほとんど認められないことが確認された。このような傾向は他の混合ベシクル、例えばPC+PS+crown混合ベシクルにおいても同様に認められた。

Fig.-3は超音波分散法で調製したPC+crown(1:1)混合ベシクルの電子顕微鏡写真を示す。混合ベシクルにおいても明確なラメラ構造が認められ、二分子膜の存在がはっきりと確認される。ラメラ構造は $\text{C}_{18}\text{-OCH}_2\text{-18-crown-6}$ の含有量を

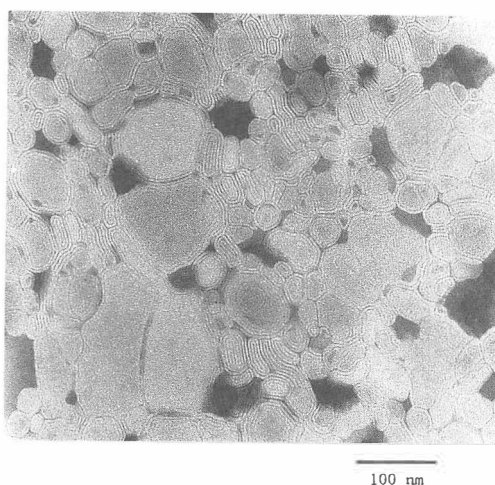


Fig. 3 Electron micrograph of the PC + crown (1:1) vesicles stained by uranyl acetate.

2倍に増大させたベシクルの場合でも同様に観察されることから本研究に使用したクラウンエーテル分子はリン脂質との相溶性がよく造膜性に優れた特質をもつことがわかる。

3.2 PC単独ベシクルへの各種金属イオンの吸着性

クラウンエーテルで修飾されたリン脂質ベシクルへの金属イオンの吸着作用を調べる前に、まずPC単独ベシクルへの金属イオンの吸着性を各種金属塩水溶液中で処理したベシクル粒子の ζ -電位を測定して調べた。Fig.-4はそれらの結果をまとめたものである。PC分子は電気的には中性な物質であるが、本実験では金属を添加しない場合PCベシクルは $-40 \sim -50 \text{ mV}$ の負電位を示した。この原因については今のところ明確な説明を与えることはできないが、ここでは塩添加によってベシクルの ζ -電位がどれだけ正側へシフトしたかで各種カチオンとの相互作用の強さを調べることにした。Fig.-4より金属イオン濃度が $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ になると金属イオンの一価と二価による電位の差が生じる。もちろん負に帯電した膜表面へのScreening効果は一価イオンと二価イオンでは異なるが⁵⁾、とくに Ca^{2+} イオン添加の

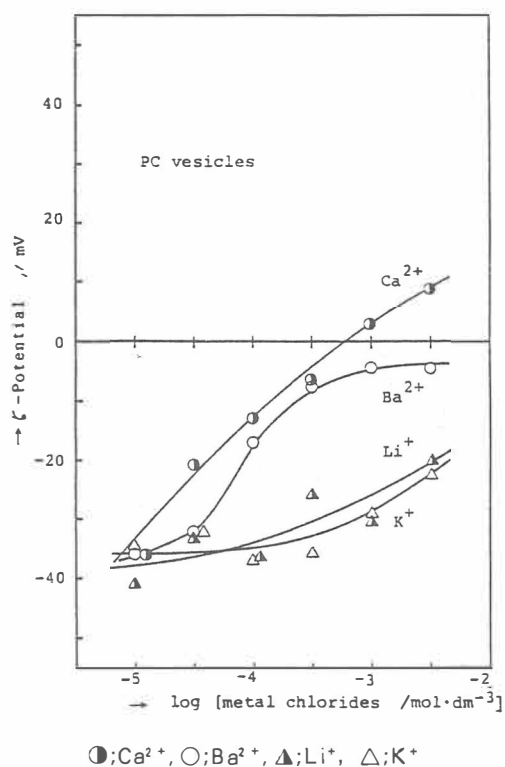


Fig. 4 ζ -Potential of PC vesicles in various salt solutions.

系で観察される濃度 $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 近辺からの ζ -電位の正側への大きなシフトは Ca^{2+} イオンのリン脂質ベシクルへの高い吸着性に基づくものと思われる⁷⁾。

3.3 PC+crown 混合ベシクルと金属イオンの相互作用

Fig.-5はPCに $\text{C}_{18}\text{-OCH}_2\text{-18-crown-6}$ を重量比で1:0.5の割合で混合して得たベシクルを試料に用いた際の結果で、各種金属イオンの濃度と ζ -電位の関係がプロットされている。まず、クラウンエーテルとの錯形成安定度が小さい Li^+ イオンや Ca^{2+} イオンを添加した場合はPC単独ベシクルの場合(Fig.-4)とほぼ同じ曲線が得られ、クラウンエーテルを混入した効果は認められない。一方、錯形成安定度の大きい K^+ イオンや Ba^{2+} イオンの添加系では金属イオンの濃度の増

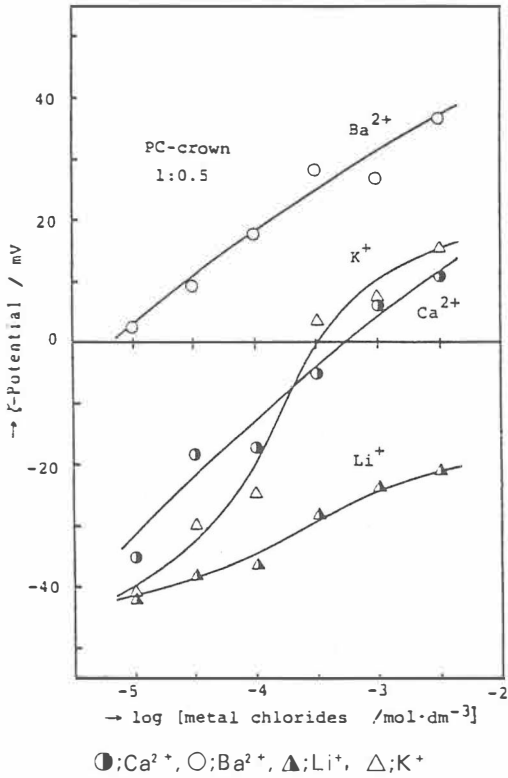


Fig. 5 ζ -Potential of PC+crown(1:0.5)vesicles in various salt solutions.

加と共に ζ -電位は正側へ大きくシフトしている。特に Ba^{2+} イオン添加の場合その傾向は顕著で、既に $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ でベシクルは正の ζ -電位を示すことがわかる。これは Ba^{2+} イオンのクラウンエーテルへの錯形成安定度が高いことに加えて二価陽イオンによる高い静電効果に基づくものと思われる。

このようにクラウンエーテルは溶存状態で示す選択的金属イオン錯形成能をベシクル表面でもそのまま保持し、ベシクル粒子にイオンを選択的に吸着する新しい機能を付与することがわかる。

次にPC量を一定にしてベシクル中のクラウンエーテル含有量を変化させた際の ζ -電位の変化を調べた。Fig.-6は各種混合ベシクルを K^+ イオンで吸着処理した際の結果を示す。クラウンエーテル含有量が多くなるほど K^+ イオンの錯形成量

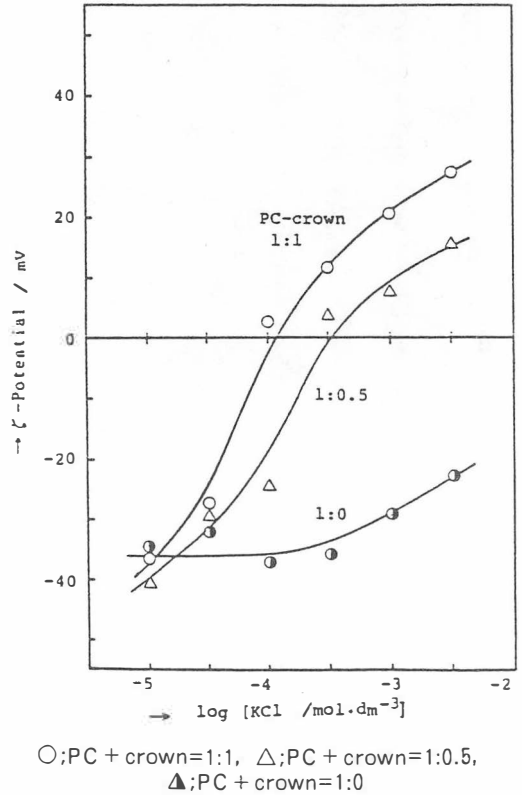


Fig. 6 ζ -Potential of PC+crown vesicles with different component fractions in KCl aqueous solutions.

が増大して、 ζ -電位は正側へ大きく変化することがわかる。

Fig.-7は添加塩として Ba^{2+} を用いた場合の結果である。 Ba^{2+} は二価陽イオンであると同時にクラウンエーテルと最も錯形成安定度が高いため $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ の低濃度で既に正の ζ -電位を示し、濃度の増加と共に大きく正側へシフトしている。ここで興味深いことはいずれのクラウンエーテル混入ベシクルにおいても塩濃度の増加で対イオンによるScreening効果が全く現れず単調に ζ -電位の増加のみが認められることである。同様な傾向はO/W型エマルジョンを試料に用いた場合は認められない⁸⁾ことから、バックグラウンドとしてのPCの極性基がこの現象に関与していることは確かであるが明確な説明を記述するこ

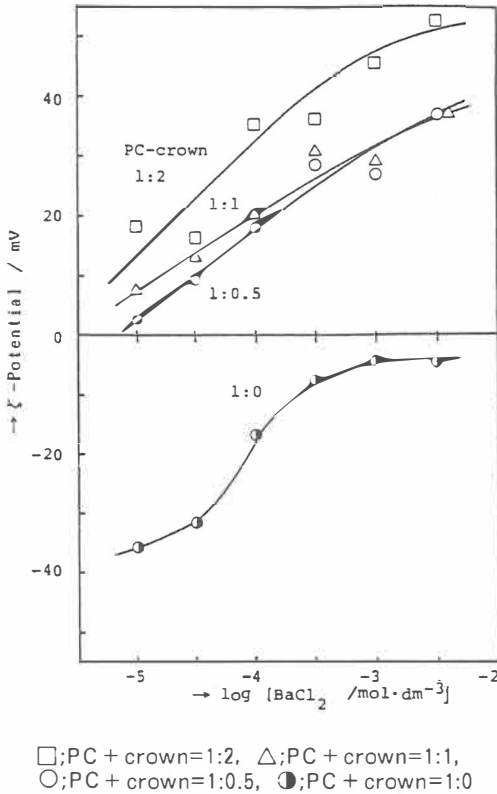


Fig. 7 ζ-Potential of PC+crown vesicles with different component fractions in BaCl₂ aqueous solutions.

とは今のところできない。

Fig.-8はLi⁺イオンを添加した場合の結果を示す。クラウンエーテルとの錯形成安定度が小さく、混合ベシクル表面との相互作用が少ないためにクラウンエーテル含量の違いによるζ-電位の変化はほとんど認められない。

3.4 PC+PS+crown 混合ベシクルと金属イオンの相互作用

次にリン脂質を2種類混ぜ合わせた混合ベシクル系をクラウンエーテルで修飾した際の金属イオンの錯形成効果を調べた。リン脂質混合ベシクルはPCとPSを合わせた総量は常に一定として両脂質の割合を変化させ、ここに一定量のクラウンエーテルを混入させてベシクルを調製した。

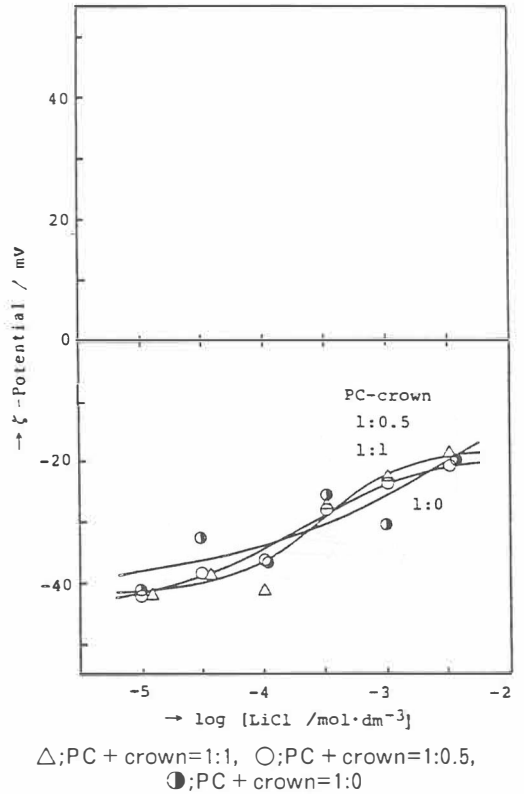
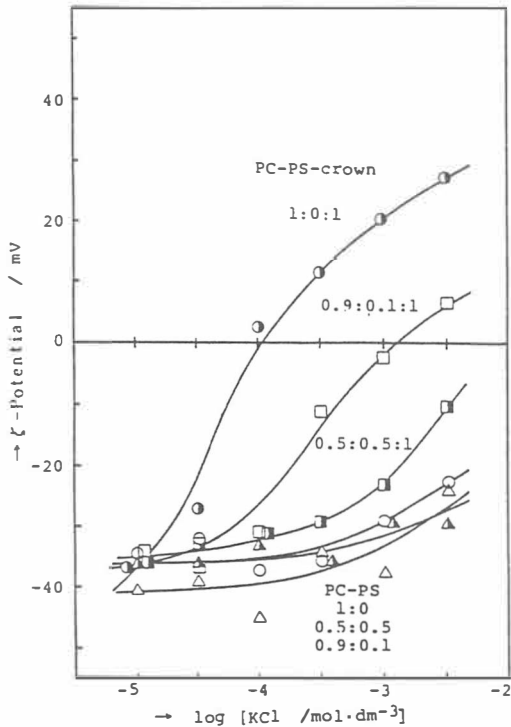


Fig. 8 ζ-Potential of PC+crown vesicles with different component fractions in LiCl aqueous solutions.

Fig.-9に各種PC+PS混合ベシクル系およびPC+PS+crown混合ベシクル系を様々な濃度のKCl水溶液で吸着処理した際のζ-電位の変化を測定した結果を示す。PC+PS混合ベシクル系ではPCとPSの組成を変化させてもKCl濃度によるζ-電位の変化の様子はあまり変わらず常に負のζ-電位を示すことがわかる。これはPCとPSのKClに対する相互作用はあまり変わらないことを示す。一方PC+PS+crownの3種混合ベシクル系ではPCとPSの混合の割合でζ-電位のKCl濃度依存性は大きく変化する。すなわち、KCl濃度が増大すると、PS含有量に応じてζ-電位は負側へ大きくシフトする。この際PS含量の影響が極めて顕著であり、例えば10⁻³mol·dm⁻³KCl濃度の溶液中で、リン脂質に1割のPS



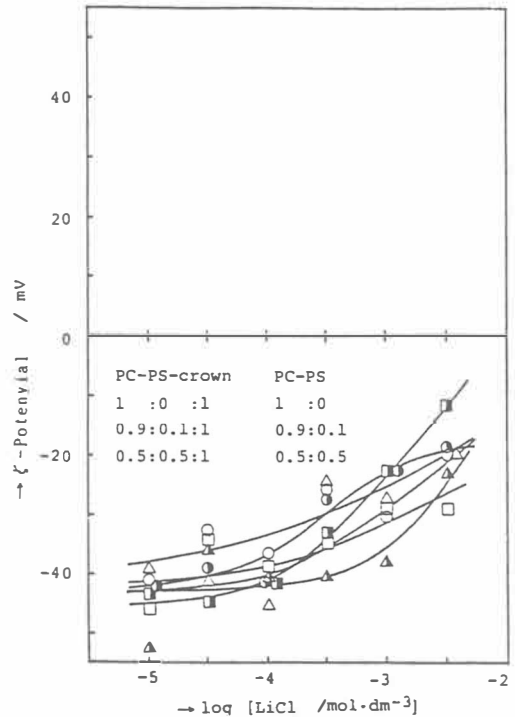
●; PC+PS+crown=1:0:1, □; PC+PS+crown=0.9:0.1:1, ▣; PC+PS+crown=0.5:0.5:1, ○; PC+PS=1:0, ▲; PC+PS=0.5:0.5, △; PC+PS=0.9:0.1

Fig. 9 ζ-Potential of PC+PS+crown and PC+PS vesicles with different component fractions in KCl aqueous solutions.

を含有させるとζ-電位はPS含量が零の系に比べて20~30mV低下することがわかる。つまり、ベシクルの構成成分にPSを加えるとζ-電位が引き下がるという効果が現れるのはクラウンエーテルを混合した場合に限られることがわかる。

Fig.-10にLiClを添加した場合の3種混合ベシクルに対するζ-電位の測定結果を示す。クラウンエーテルとの錯形成能の低いLi⁺イオン添加の場合はK⁺イオンの場合とは対照的にPC+PS混合系およびPC+PS+crown混合ベシクル系共にPS含量の影響は現れないことがわかる。

このようなPC+PS系ではPSの影響が現れず、PC+PS+crown混合ベシクル系で、かつクラウンエーテルと錯形成能の高い金属イオンを添加し



●; PC+PS+crown=1:0:1, □; PC+PS+crown=0.9:0.1:1, ▣; PC+PS+crown=0.5:0.5:1, ○; PC+PS=1:0, ▲; PC+PS=0.5:0.5, △; PC+PS=0.9:0.1

Fig. 10 ζ-Potential of PC+PS+crown and PC+PS vesicles with different component fractions in LiCl aqueous solutions.

た場合に限りPSを混合した効果が現れるという、クラウンエーテル基の錯形成が関与したベシクル表面での特異な界面動電現象について次のように考察した。

まず、PSがベシクルのζ-電位を負側へ引き下げる効果を示すのはPSはPCと違って分子構造中にカルボキシル基を持っており、これが溶液中で解離して負電荷をもつカルボン酸イオンになるためであることは容易に理解できる。また、PSがζ-電位を低下させる度合いが金属イオンの種類や濃度によって異なるのはクラウンエーテルとのこれらイオンの錯形成がカルボキシル基の解離に影響を与えるためであろう。すなわち、Fig.-11の模式図で示すようにベシクル表面に存

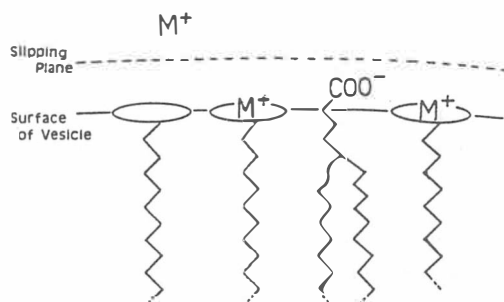
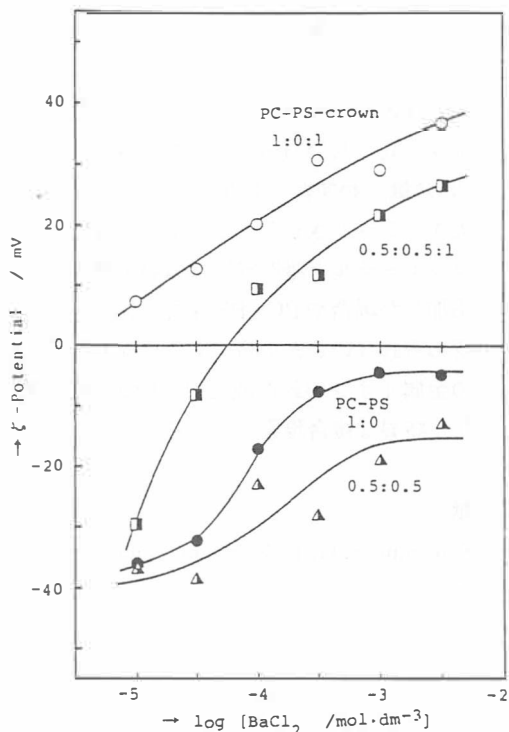


Fig.11 Schematic picture showing the surface structure of PC + PS + crown vesicle.

在するクラウンエーテル基が金属イオンとの錯形成によって正に帯電すると、その静電効果によって同様にベシクル表面に存在するPSの負のカルボキシル基の解離を促進するものと思われる。さらに電気泳動の ζ -電位は粒子表面からある距離離れたところ、すなわちSlipping planeにおける電位であるから、カルボキシル基が幾分外水相側へ突き出していればPSの含まれる比率が小さくても効果的に ζ -電位を引き下げることは可能であろう。このような考えはPC+PS+crown混合ベシクル系にBa²⁺を添加した系にも適用できる。その結果をFig.-12に示す。K⁺イオンに比べBa²⁺イオンを添加した場合はより低濃度領域でPSの混合による効果が認められる。Ba²⁺イオン濃度を高めるとPSの混合効果が小さくなるのは、カルボン酸イオンの負の電位効果よりもBa²⁺とクラウンエーテル基の錯形成定数が大きく、かつ二価イオンであるために正の電位効果がより強いと考えられる。

4. 結論

長い炭化水素鎖をもつクラウンエーテル(C₁₈-OCH₂-18-crown-6)と極性基の異なるリン脂質PCおよびPSをいろいろな割合で混合したベシクルを作製し、クラウンエーテル基の持つ金属イオン選択性錯形成挙動がベシクル粒子の表面でいかに現れるか、またPCとPSの混合比を変え



○;PC + PS + crown=1:0:1, □;PC + PS + crown=0.5:0.5:1, ●;PC + PS=1:0, △;PC + PS=0.5:0.5

Fig.12 ζ -Potential of PC+PS + crown and PC + PS vesicles with different component fractions in BaCl₂ aqueous solutions.

て粒子表面の電位効果を変化させるとクラウンエーテル基の錯形成挙動がどのように影響を受けるかを調べるために、種々な溶液条件下でベシクルの ζ -電位を測定し、次のような結論を得た。

- 1) PCやPSにいろいろな割合でC₁₈-OCH₂-18-crown-6を混合した場合でもラメラ構造を有する単分散性の高いベシクルが調製された。また、クラウンエーテル基が溶液中で有する選択的金属イオン錯形成能はベシクル表面でもそのまま保持され、ベシクル粒子に金属イオンを選択的に吸着する新しい機能を付与することができる。
- 2) PC+crownの混合ベシクルは錯形成安定度の高いK⁺やBa²⁺の水溶液中において、それらのイオン濃度を増大させてゆくと大きな正

の ζ -電位を示すが、対イオンによる Screening 効果は現れず $10^{-2}\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ 近辺まで単調に ζ -電位を増加させる。

- 3) PC+PS+crown の混合ベシクルは錯形成安定度の高い K^+ や Ba^{2+} を含む水溶液中でのみ、PS 含量のわずかな増加で ζ -電位を負側へ大きくシフトさせる。このような現象はクラウンエーテルと錯形成能の低い金属イオンを添加した場合やPC+PS混合ベシクル系では認められないことから、クラウンエーテルへの金属イオンの錯形成とPSの極性基が関与した特異な複合現象と言える。

文 献

- 1) S. J. Singer, G. L. Nicolson, *Science*, 175, 720 (1972)
- 2) K. Furusawa, H. Kakoki, M. Matsumura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 57, 3414(1984)
- 3) 妹尾 学, “膜の化学”, 大日本図書(株), (1987)p. 114
- 4) 古澤邦夫, 鹿子木宏之, 武居俊明, 日化, 1984, 992
- 5) E. J. W. Verway, J. Th. G. Overbeek, “Theory of the Stability of Lyophobic Colloid” Elsevier, Amsterdam(1948)
- 6) R. M. Izatt, D. P. Nelson, J. H. Rytting B. L. Haymore, *J. Am. Chem. Soc.*, 93, 1619(1971)
- 7) J. Marra, *Biophys. J.*, 50, 815(1986)
- 8) 古澤邦夫, 小幡千春, 松村英夫, 桑村常彦, 日本膜学会第11年会講演要旨集, 55(1989)

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

春 木 豊

This study consists of two parts, namely Study I and II. In Study I, we studied how making up and removing it influence the mood of the person concerned. We also studied whether or not any difference is observed in the influence on mood by personality. The subjects were women's college students. We had those who had seldom made up done so and measured the change of mood by SD method. On the contrary, we had those who had usually made up removed the makeups and measured the influence on mood by the same method. The personalities were examined by MPI(EPQ). The result was that much change of the mood occurred in both cases. The influence on mood by removing makeup was, however, more. Though the difference by personality was also observed, it was not so distinct.

In Study II, we studied the feeling of the adults surrounding the subjects for make-up by research. As the interest in makeup starts to increase in girls' high school students, we studied the feeling of the adults for the making up behaviour of the girls' high school students. In order to clarify the peculiarity of feeling for makeup, we compared it with the feelings for hairstyle and dressing. And in order to see the peculiarity of makeup, we studied the feeling of the persons surrounding the subjects for the makeup of college students and compared it with that for the makeup of the girls' high school students. The result was that the feeling of the adults for the makeup of girls' high school students was considerably peculiar in comparison with that for the makeup of college students and negative to it. The feeling for the makeup of college students becomes positively affirmative, therefore it can be said that this dramatic change is a trait of makeup. However we were unable to investigate the cause of this fact.

1. 緒 言

化粧は美容のために行うといえるが、美しくみせるということは、そうすることによって何らかの効果や影響を持つということであろう。

その心に与える効果は、化粧をしている本人の心に対するものを考えることができる。また一方で、本人の周囲の人達に対するものも考えることができるであろう。

そこで本研究ではこれを二つに分け、研究Iでは化粧をしたり化粧をとったりしたときの本人の意識状態がどのように変化するかを調べた。次に

研究IIでは、化粧をすることに対して周囲の人達の意識を調べることにした。

2. 研究 I

本研究では、化粧をしたりとったりしたときの意識性の変化を調べることにした。まず実験1では、日常化粧をしない人に化粧をしてもらい、その気分の変化を調べ、実験2では逆に日常よく化粧をしている人にその化粧をとってもらって、その気分の変化を調べることにした。

Effects of makeup to one's awareness

Yutaka Haruki

2.1 実験I

目的

化粧の経験のない女性に化粧をほどこし、主観的感情の変化を測定する。そしてこの変化が、単に化粧をしたことのみによるのか、化粧をし、他者からみられる(他者の反応を知る)ことによって生ずるのかを調べることにした。またそのことが本人の性格とどのように関わるかも調べた。

方法

・被験者

化粧の経験がないかほとんど日常化粧をしない18歳～23歳までの女子大学生33名(主として早稲田大学人間科学部学生)

化粧用具および化粧の実施・化粧用具は次のものであった。乳液、収れん性化粧水、ファンデーション(2色)、頬紅(3色)、口紅(6色)、アイシャドウ(12色)、コットン、クレンジングローション、洗顔料。以上の用具を用いて、実験者が本人の雰囲気および服装に合うようにナチュラルメイクをほどこした。なおメイクは乳液、収れん化粧水、ファンデーション、頬紅、アイシャドウ、口紅の順で行った。

・調査用紙

主観的感情(気分)を測定することは大変難しいが、岩下(1979)を参考にして化粧と関係があると思われる形容詞対を33対選び、7段階評定によりチェックしてもらうことにした(SD尺度)。

またパーソナリティ検査としてMPIを用いた。

・手続き

化粧は個室でほどこした。被験者にはまず化粧をする前に現在の感情状態をSD尺度で評定してもらった。次に実験者は被験者に上記の要領で化粧をした。この間はなるべく化粧についての会話はしないようにした。化粧が終了したならば被験者に鏡を見てもらい、その後再びその時の主観的感情の評定をSD尺度で評定を

してもらった。そして、化粧をしたまま一時間ほど校舎内を自由に行動してもらい、化粧室に戻ってもらった。戻ったならば、再びその時の主観的感情評定をSD尺度で評定してもらった。MPI尺度のチェックをもしてもらい、最後に化粧をとって帰ってもらった。

結果

化粧直前(T1)と化粧直後の気分(T2)および一時間後(T3)の気分(意識性)の変化についてみると、形容詞対全体については、図1のようになった。各形容詞について、T1, T2, T3の間で変化したかどうかをみるため検定をしたところ、有意差のあったのは次の通りであった。

(1) 化粧直前(T1)と化粧直後(T2)の間で変化のあったもの

しみじみとした→うきうきした
暗い→明るい
重々しい→軽やかな

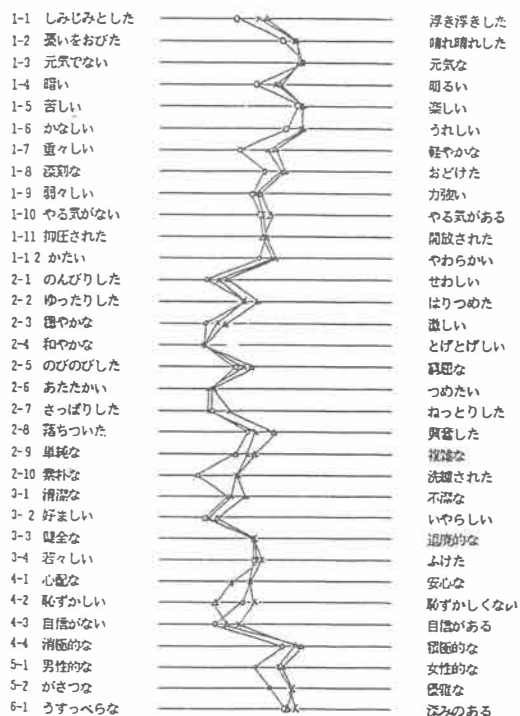


図1 T1, T2, T3別の測定値平均の変化
○-○T1, △-△T2, ×-×T3

深刻な→おどけた
 のんびりした→せわしい
 落ちついた→興奮した
 素朴な→洗練された
 清潔な→不潔な
 男性的な→女性的な
 がさつな→優雅な

(2) 化粧直後(T2)から一時間後(T3)の間で変化のあったもの

ねっとりした→さっぱりした
 心配な→安心な
 恥ずかしい→恥ずかしくない

(3) 化粧直前(T1)と一時間後(T3)の間で変化のあったもの

しみじみとした→うきうきした
 重々しい→軽やかな
 素朴な→洗練された
 自信がない→自信がある
 男性的な→女性的な
 がさつな→優雅な

次にMPI尺度により外向 — 内向のパーソナリティを調べたが、まず外向性のパーソナリティと内向性のパーソナリティで化粧による気分変容に差があるかどうかをみるために、化粧直後と一時間後の結果を比較した。なお、化粧直前については、外向 — 内向で差がなかった。化粧直後については、外向性のパーソナリティの人(12名)の方が、内向性のパーソナリティの人(12名)よりも「おどけた」と「深みのある」という気分になっている。一時間後の結果については、外向性の人の方が内向性の人よりも「うきうきした」、「明るい」、「おどけた」という気分が高かった。

また、外向性の人のみについて、化粧直前(E1)、化粧直後(E2)、一時間後(E3)について気分の変化をみると、有意な変化のあったのは次の通りであった。

(1) 化粧直前から化粧直後への変化

深刻な→おどけた
 男性的な→女性的な

がさつな→優雅な

(2) 化粧直後から一時間後への変化
 有意差のある変化はみられなかった。

(3) 化粧直前から一時間後への変化

悲しい→うれしい
 男性的な→女性的な
 がさつな→優雅な

同様に、内向性の人についてみると次の通りであった。

(1) 化粧直前から化粧直後への変化

暗い→明るい
 やる気がない→やる気がある
 穏やかな→激しい
 落ちついた→興奮した

(2) 化粧直後から一時間後への変化

深みのある→うすっぺらな

(3) 化粧直前から一時間後への変化

恥ずかしい→恥ずかしくない
 素朴な→洗練された
 自信がない→自信がある

考 察

ほとんど化粧をしたことのない女子学生に化粧をさせることによって、ある種の気分に変化が起こることが明らかとなった。一般的に明るく、興奮した傾向になり、女性的な気分になるといえる。このような変化は、化粧直後と他人と接触した後(一時間後)とでは大きな差異がないことから、化粧そのものによって引き起こされるといえる。他人との接触によって新たに引き起こされた気分の変化は、恥ずかしさや心配、自信に関する気分であって、これは化粧することによって生じた不安が他人と接触することによって解消されたと考えられる。

パーソナリティによって、化粧の効果が異なることもわかった。まず外向的なパーソナリティの人に比べて内向的なパーソナリティの人の方が、多様な変化をうけやすいということである。化粧

直後の変化は内向性のほうが多くの気分で変化している。外向的な人は女性的になったといった程度の変化であるが、内向性の人の方が繊細な変化を示しており、明るく、興奮させるという活動的な効果を持っている。また、内向性の方は、他人との接触によっても固有な変化を示しており、恥ずかしいとか自信がないの気分がプラスの方向に変化している。いずれにせよ外向性の方も内向性の方も自分がない性格傾向を引き起こす効果を化粧はもっているといえる。

2.2 実験Ⅱ

目的

実験Ⅰでは、化粧の経験のない者に化粧をすることによる気分の変化をみたが、実験Ⅱでは逆に化粧をしている人にそれをとってもらったときどのような変化が見られるかを調べた。このことによって、逆の面から化粧の効果を知ることができることが期待された。

方法

・被験者

日常化粧をしている女子大学生(20~24歳)25名。

・化粧用具

化粧用具は化粧をとるためと実験後の化粧のためのものである。クレンジングローション、コットン、化粧水、乳液。

・検査用紙

化粧による気分の変化の測定は実験Ⅰと同じものであった。パーソナリティ検査はアイゼンクのEPQ(Eysenck Personality Questionnaire)を用いた。

・手続き

化粧を取る手続きは個室で行った。化粧を取る前に化粧をしている顔を鏡で見た上で、その時の主観的感情をSD尺度でチェック(T1)をした。その後自分でクレンジングローションとコットンで化粧を落としてもらった。その顔を

鏡で見てもらい、同様にSD尺度にチェック(T2)をした。そして、その後そのままの顔で自由に校舎内で移動してもらい(約30分間)、再び個室にもどってもらって鏡を見ながら今の気分について再びSD尺度にチェックしてもらった(T3)。

結果

実験Ⅰと同様に、3個のSD尺度の間で、有意に変化のあったものの形容詞対のリストを上げると以下の通りであった。

(1) 化粧をとる直前(T1)と化粧をとった直後(T2)の間で変化のあったもの

明るい→暗い
積極的な→消極的な
元気な→元気でない
自信がある→自信がない
うれしい→かなしい
安心な→心配な
恥ずかしくない→恥ずかしい
力強い→弱々しい
やる気がある→やる気がない
優雅な→がさつな
楽しい→苦しい
うきうきした→しみじみした
洗練された→素朴な
女性的な→男性的な
ねっとりした→さっぱりした
せわしい→のんびりした
激しい→穏やかな

(2) 化粧をとった直後(T2)から30分後(T3)の間で変化のあったもの

いずれの形容詞についても差がなかった。

(3) 化粧をとる直前(T1)と30分後(T3)の間で変化のあったもの

積極的な→消極的な
元気な→元気でない
自信がある→自信がない
うれしい→かなしい

恥ずかしくない→恥ずかしい
 やる気がある→やる気がない
 優雅な→がさつな
 うきうきした→しみじみした
 洗練された→素朴な
 女性的な→男性的な
 せわしい→のんびりした
 明るい→暗い
 安心な→心配な
 楽しい→苦しい
 ねっとりした→さっぱりした

次にEPQ尺度により外向性のパーソナリティ(14名)と内向性のパーソナリティ(11名)に分け、パーソナリティによって化粧除去の効果に差がみられるかどうか調べた。

外向性パーソナリティの人達については以下の通りであった。

(1) 化粧除去直前と直後に有意な変化のあったもの

明るい→暗い
 積極的な→消極的な
 元気な→元気でない
 安心な→心配な
 恥ずかしくない→恥ずかしい
 やる気がある→やる気がない
 優雅な→がさつな
 うきうきした→しみじみした
 洗練された→素朴な
 女性的な→男性的な
 ねっとりした→さっぱりした
 自信がある→自信がない
 うれしい→かなしい
 力強い→弱々しい
 せわしい→のんびりした
 深みのある→うすっぺらな

(2) 化粧除去直後から30分後の間で有意な変化のあったもの

いずれの形容詞についても差がなかった。

(3) 化粧除去直前と30分後の間で有意な変化の

あったもの

やる気がある→やる気がない
 洗練された→素朴な
 女性的な→男性的な
 積極的な→消極的な
 恥ずかしくない→恥ずかしい
 優雅な→がさつな
 せわしい→のんびりした
 深みのある→うすっぺらな

内向性パーソナリティの人達の化粧除去の効果は以下の通りであった。

(1) 化粧除去直前と直後に有意な変化のあったもの

積極的な→消極的な
 うきうきした→しみじみした
 洗練された→素朴な
 明るい→暗い
 元気な→元気でない
 自信がある→自信がない
 うれしい→かなしい
 恥ずかしくない→恥ずかしい
 力強い→弱々しい
 やる気がある→やる気がない
 優雅な→がさつな
 楽しい→苦しい

(2) 化粧除去直後から30分後の間で有意な変化のあったもの

いずれの形容詞についても差がなかった。

(3) 化粧除去直前と30分後の間で有意な変化のあったもの

積極的な→消極的な
 うきうきした→しみじみした
 洗練された→素朴な
 明るい→暗い
 自信がある→自信がない
 うれしい→かなしい
 恥ずかしくない→恥ずかしい
 やる気がある→やる気がない
 楽しい→苦しい

EPQでは情緒安定 — 不安定の次元がある。このパーソナリティの次元について化粧除去の気分及ぼす影響を分析した。有意な変化のあったものは以下の通りである。

情緒不安定な人達(13名)については以下の通りであった。

(1) 化粧除去直前と直後に有意な変化のあったもの

明るい→暗い
積極的な→消極的な
やる気がある→やる気がない
優雅な→がさつな
うきうきした→しみじみした
洗練された→素朴な
女性的な→男性的な
ねっとりした→さっぱりした
元気な→元気でない
自信がある→自信がない
うれしい→かなしい
恥ずかしくない→恥ずかしい
楽しい→苦しい
せわしい→のんびりした
単純な→複雑な

(2) 化粧除去直後から30分後の間で有意な変化のあったもの

いずれの形容詞についても差がなかった。

(3) 化粧除去直前と30分後の間で有意な変化のあったもの

積極的な→消極的な
やる気がある→やる気がない
優雅な→がさつな
楽しい→苦しい
うきうきした→しみじみした
洗練された→素朴な
女性的な→男性的な
うれしい→かなしい
恥ずかしくない→恥ずかしい
せわしい→のんびりした

情緒安定のパーソナリティの人達(12名)につい

ては以下の通りであった。

(1) 化粧除去直前と直後に有意な変化のあったもの

元気な→元気でない
自信がある→自信がない
恥ずかしくない→恥ずかしい
力強い→弱々しい
洗練された→素朴な
積極的な→消極的な
安心な→心配な
やる気がある→やる気がない
うきうきした→しみじみした

(2) 化粧除去直後から30分後の間で有意な変化のあったもの

いずれの形容詞についても差がなかった。

(3) 化粧除去直前と30分後の間で有意な変化のあったもの

恥ずかしくない→恥ずかしい
洗練された→素朴な
積極的な→消極的な
やる気がある→やる気がない

考 察

化粧除去直前と直後の間に多くの形容詞対(全体の約半分)についての気分の変化がみられた。このことから化粧に慣れていると素颜に対してやや否定的な感情を持つといえる。また、30分他人と接触してきた後の評価も直後の場合とほぼ変わりではなく同一である。このことは、除去した場合は他人の評価はプラスの方向に働かないといえる。ただし、30分間に被験者が他人と接触した状況は様々なので、決定的なことはいえない。

次にパーソナリティとの関係であるが、外向 — 内向の次元についてみると、外向性の人は化粧除去直前と直後の間に多くの感情の変化がみられる。これは全体の変化と同じであり、全体の変化はほぼ外向性の人の結果が影響しているといえる。30分間の他人との接触によって、自信のなさや、元気の喪失や、心配は除去されているが、あ

まり直後と変化はない。

内向性の人は、外向性の人に比較して化粧除去による気分の変化はやや少ないが、やはり多様な感情の変化を示している。内容も差異はない。また、同様に30分間の他人との接触についても、やや元気のなさが回復した程度であり変化は見られない。これも基本的には外向性の人と変わらないが、陰鬱な気分が後まで残る傾向がみられる。

情緒安定 — 不安定の次元については、外向 — 内向の次元とさほど違った傾向はみられない。情緒不安定の人はやはりかなりの化粧除去による感情の変動が見られ、30分間の対人接触によってもさほど変化は起こらなかったといえるが、自信や元気さについて解消されている部分はある。情緒安定の人達は不安定の人達よりは、化粧除去による感情の変化は少ないが、不安定な人達よりは、気分の陰鬱さの変化はないといえる。また、30分間の対人接触後には、心配や自信の喪失は解消され、不安定な人達よりは気分の変化は回復される傾向があるようにみえる。

総合的考察

研究Ⅰにおいては化粧をつけるのととるのとの両方向から化粧が気分及ぼす影響を調べたのであるが、つけるのと除去することの間には差があるようである。すなわち、つけるよりは除去するほうが気分と与える影響が大きい。つけるほうは、主として明るさの気分に関係しているが、除去のほうはその他に、やる気がない、元気がない、消極的といった動機づけに影響し、心配、自信がない、恥ずかしいといった不安傾向を起こしている。

また、つけるほうは、対人接触によって興奮傾向がおさまるなど多少とも影響を受けているが、除去のほうは全くといっていいほど変化はなく、化粧そのものの影響が気分と反映するといえる。

パーソナリティが及ぼす効果についてみると、尺度が異なるので厳密にいうと比較はできないが、MPI、EPQともアイゼンクの作成したものであり内容的にも基本的な違いはない。その結果は、

全体の結果と同様、外向性についても内向性についても除去のほうをつけるよりも気分と与える影響は大であるといえる。つけるほうは内向性と外向性で、例えば前者のほうは興奮など気分の高揚について外向性と違う効果がみられたが、除去については、両者の間には顕著な差は認められない。やや外向性のほうが影響が大きく出る傾向はみられる。

つけるのと除去とで共に変化のみられたのは次の通りであった。変化の方向は両者で逆である。これらは化粧の本質を示すものといえることができる。

明るい — 暗い

優雅な — がさつな

うきうきした — しみじみとした

洗練された — 素朴な

女性的な — 男性的な

せわしい — のんびりした

化粧は女性的で優雅で洗練された気分をおこし、うきうきした明るい気分を生む。そしてせわしきさの気分がある。これらをよくみてみると、最初の三つは化粧について抱かれている、むしろ観念といえることができる。次の二つは、つけたり除去したりすることによって生ずる直接的な気分であろう。せわしきは日常生活で、外出時に化粧をし、家にいるときにはつけないといった生活習慣からくるものであるように思われる。

3. 研究Ⅱ

目的

今までは化粧をする本人の気分と与える影響について調べてきたが、次に他者から見た化粧について調べる。化粧はする人によってかなり異なった印象を与え、知的な、華やかな、洗練されたなどのポジティブな印象を与えることもあれば、派手な、けばけばしい、いやらしいなどのネガティブな印象を与えることもある。ここでは「高校生の化粧」について、女性がつ印象を調べた。化

粧と対比させるために服装や髪型、素颜についても調査した。また、高校生と比較するために大学生の化粧についても調査を行った。

方 法

・回答者

20代から50代前半の社会人の女性および女子大学生91名を対象に調査を行った。

・調査用紙

調査用紙は三部構成になっており、一部は回答者本人の化粧経験と化粧の好みについて聞いており、20項目ある。二部は高校生のファッションについてで休日に女子高校生が外出するのにふさわしいと思う髪型・化粧・服装についての項目である。髪型については髪型や髪の結び方など12項目についての許容度、化粧については化粧の許容度、化粧の種類別の許容度、化粧機会などについての35項目、服装についてはスカート丈、靴の種類、アクセサリーについて18項目の許容度である。三部は、形容詞群で、「素颜」、「女子大学生の化粧」、「女子高校生の化粧」に関して聞いており、形容詞群それぞれ28項目である。

・手続き

調査場面は、社会人は早稲田大学エクステンションセンターの講義にて行った。講義終了後、受講生に調査用紙を配付し、その場で記入してもらい回収した。その他の社会人は、調査用紙を渡して記入を求め、郵送にて回収した。

学生は学内にて四年生の子学生に配付し、その場で記入してもらい回収した。また、他の女子大学生にも調査用紙を渡して記入を求め、郵送にて回収した。

結 果

結果を分析するにあたり、社会人を年齢によって社会人A(35歳～56歳)、社会人B(21歳～34歳)というように分類した。最終的に全回答者は社会人A群(28名)、社会人B群(28名)、学生群(35

名)の三群に分類された。

1. 高校生のファッションについて

女子高校生が休日に外出するときふさわしいファッションについて、髪型、化粧、服装の三つにわけて分析した。

(a) 髪 型

髪型全項目の許容度を図2.1に示す。脱色、染髪に強い抵抗感があり、パーマヘアには多少抵抗感があることがわかる。

また、ロングストレートヘア、セミロングストレートヘア、脱色、染髪に関しては世代間で許容度に差がみられた。

社会人Aの方が社会人Bよりも許容度が低い項目を以下に示す。

ロングストレートヘア

セミロングストレートヘア

社会人Aの方が学生よりも許容度が低い項目を以下に示す。

ロングストレートヘア

セミロングストレートヘア

脱色

染髪

(b) 化 粧

女性が化粧を始めるのに適すると判断された年齢は、18.3歳であった。この結果では世代に

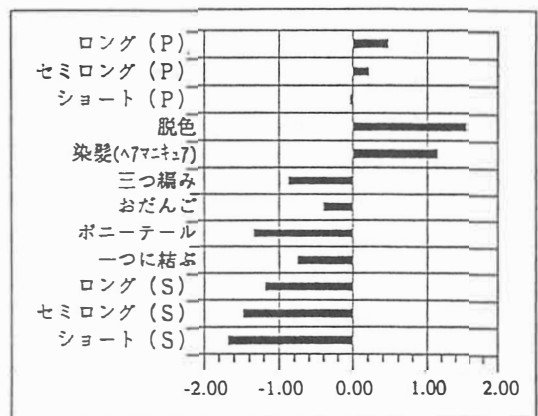


図2.1 髪型全項目の許容度
注：+は非許容，-は許容である

よる差はみられなかった。また、その理由としては高校を卒業し、社会へ出てもおかしくない年齢であることが一番多くあげられていた。その他には、制服には化粧が似合わないこと、素顔でも十分に綺麗であることなどが多くあげられていた。

化粧の許容：女子高校生が化粧をしても良いかという質問に対しての回答の平均値は、7段階評定で3.53であった。世代間での有意な差はみられず、全体的に「やや悪い」という結果となった。

化粧の種類による許容：次に、化粧の項目ごとに許容の程度を調べた。その結果、リップクリーム(無色)、リップクリーム(色つき)、コロンの三項目だけが「良い」方向の回答で、その他の項目は全て「悪い」方向の項目であった。結果を図2.2～2.6に示す。図2.2～2.6は各化粧項目の好みの平均値と合わせて表示しており、この結果から、許容の程度は回答者自身の好みに影響を受けていないように思われる。

また、各化粧品品について色ごとに分析を行ったところ口紅、マスカラ、マニキュアについては色によって有意差が見られた。どの化粧においてもピンク系のものが他の色よりもやや抵抗感が少なかった。口紅とマニキュアに関してはピンク系が赤系、ローズ系、ブラウン系それぞれより有意に抵抗感が少なかった。またマスカラに関しては透明が茶色、青色、紫色よりも有意に抵抗感が少なかった。

化粧機会についての許容：高校生が化粧する機会に関しては、「毎日する」ではかなり「悪い」とする回答が得られ、一方「特別なときのみする」では「良い」方向の回答が得られた。また、「毎日する」では社会人Aの方が学生よりも有意に抵抗感が強く、「特別なときのみする」では社会人Aの方が社会人Bよりも有意に抵抗感が弱かった。

(c) 服装

女子高校生の服装の各項目についての許容度

を図2.7に示す。スカート丈がくるぶしまでという項目とかかとの高い靴の項目とアクセサリーのアンクレットの項目に抵抗感があるが、全体的には許容されている項目が多い。

社会人Aの方が社会人Bよりも靴のローファー、ネックレス、イヤリングについて許容度が有意に低く、社会人Aの方が学生よりもネックレスについて許容度が低かった。ハイヒールに関する二項目についてはかなりの抵抗感がみられた。

2. 化粧に関する形容詞について

「素顔」、「女子大学生の化粧」、「女子高校生の化粧」の三要因についての印象をそれぞれ28項目からなる形容詞群に5段階のSD法で答えてもらい、結果を分析した。その平均値を図2.8～図2.10に示す。

社会人Aの方が社会人Bよりも有意に高かった項目は「女子高校生の化粧」に対する印象のけげばしいであった。

社会人Aの方が学生よりも有意に高かった項目は「素顔」に対する印象の、色っぽい、女っぽい、「女子大学生の化粧」に対する印象の、けげばしい、「女子高校生」に対する印象の、けげばしい、不気味な、であった。

学生の方が社会人Bよりも有意に高かった項目は「女子高校生の化粧」に対する印象の、華やか、であった。さらに、全要因と各要因それぞれについて因子分析を行った。その結果、

全要因については、

因子1 健康的で明るい若々しさ

因子2 いやらしく見苦しく不健康

因子3 大人の女性の華やかさ色っぽさ

女子高校生の化粧については、

因子1 不快でだらしく不自然

因子2 健康で清潔な明るさ

因子3 知的できれいな女っぽさ

女子大学生の化粧については、

因子1 不快でけげばしいいやらしさ

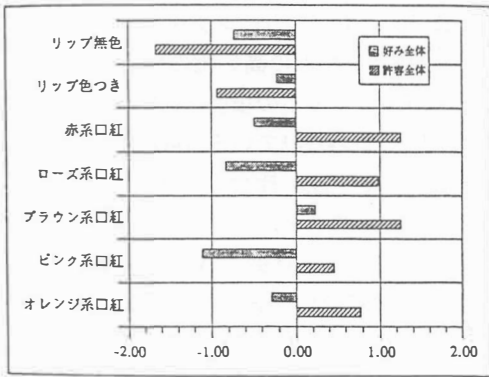


図2.2 化粧品の好みと許容度
注：+は非許容，-は許容である

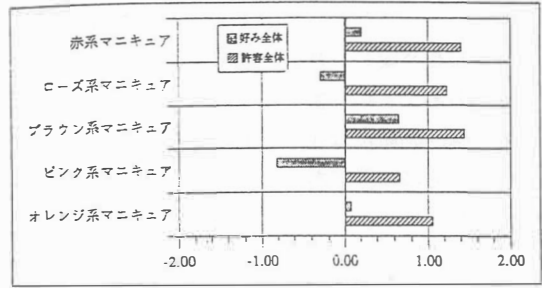


図2.5 化粧品の好みと許容度
注：+は非許容，-は許容である

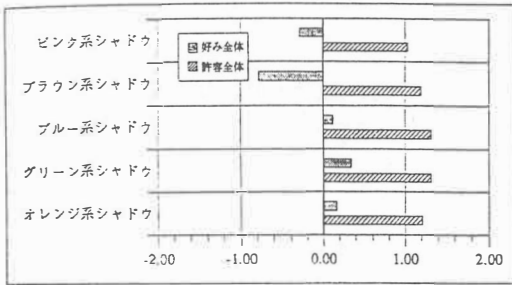


図2.3 化粧品の好みと許容度
注：+は非許容，-は許容である

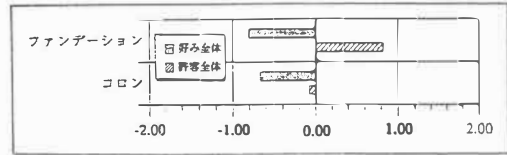


図2.6 化粧品の好みと許容度
注：+は非許容，-は許容である

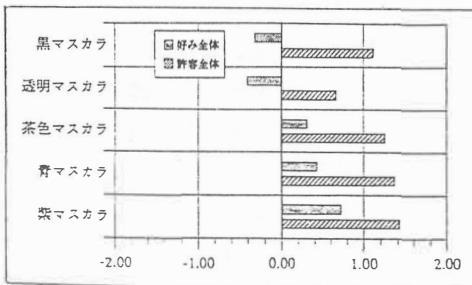


図2.4 化粧品の好みと許容度
注：+は非許容，-は許容である

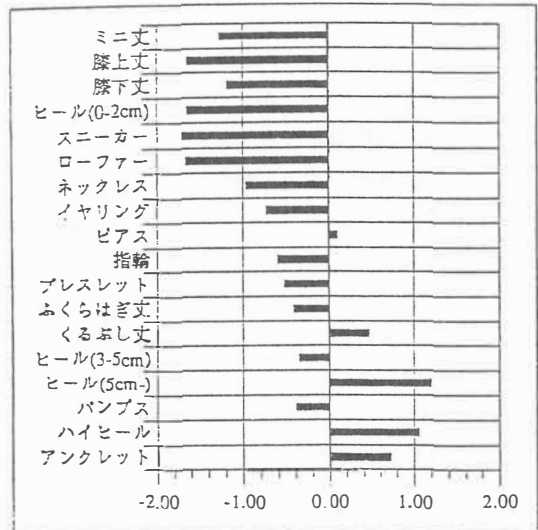


図2.7 服装全項目の許容度
注：+は非許容，-は許容である

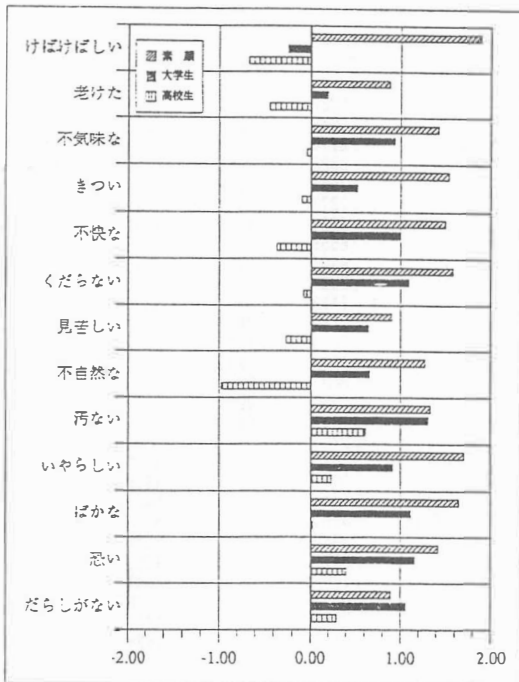


図2.8 形容詞の対象別グラフ
注：+はあてはまる，-はあてはまらない

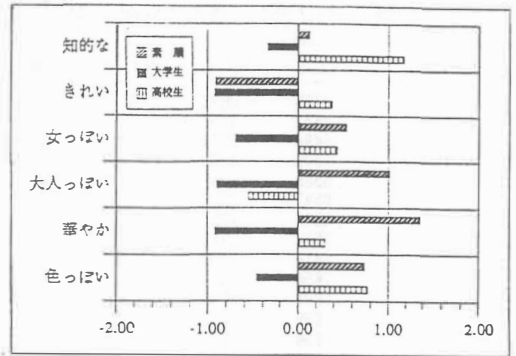


図2.10 形容詞の対象別グラフ
注：+はあてはまる，-はあてはまらない

因子2 知的で上品で健康的
因子3 明るく華やかで若々しい女っぽさ
素顔については、
因子1 不快でけばけばしいいやらしさ
因子2 上品で明るく魅力的な女っぽさ
因子3 だらしなさと大人っぽさ
となった(表1~4)

考 察

女性が化粧を始めるのに適した年齢を18歳前後と答えている人が圧倒的に多い。また、化粧を始める年齢は20年前と現在とでは差がなく、他の項目に比べて化粧の項目は世代の差があまりみられなかった。このことは、女性は世代に関係なく、高校生の化粧に対して同じ認識を持っていることが考えられる。

また、他のファッション、つまり髪型・服装の許容範囲と比較すると、髪型・服装よりも化粧は許容範囲が狭く、不自由であることが示された。

高校生にふさわしい化粧として認められているものはリップクリーム(無色)、リップクリーム(色つき)、コロンのみであった。特にアイシャドウ、透明以外のマスカラは色に関わりなく抵抗感が強く、口紅、マニキュアに関しては赤系、ローズ系、ブラウン系といった落ち着いた感じの色に抵抗感が強く見られた。このことから顔に色をつけることに、より抵抗感があるように見受けられ

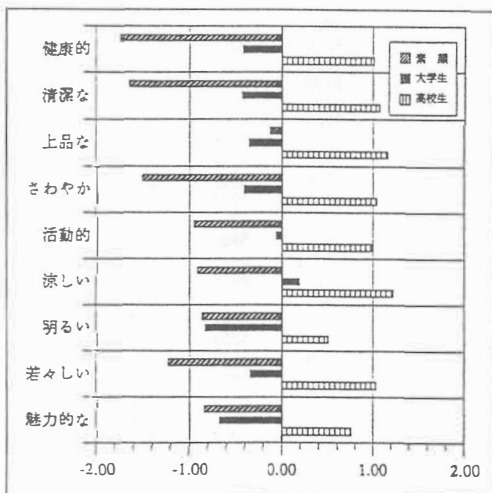


図2.9 形容詞の対象別グラフ
注：+はあてはまる，-はあてはまらない

表1 全要因における形容詞全体の因子負荷量

	因子1	因子2	因子3	共通性
健康的	.8725	-.2688	-.0751	.8391
清潔な	.8581	-.3150	-.0116	.8356
上品な	.6494	-.2274	.3661	.6075
不自然な	-.5300	.4313	.0158	.4672
明るい	.6589	-.2081	.3273	.5845
さわやか	.8547	-.3356	.0577	.8165
知的な	.5598	-.2751	.4856	.6248
活動的	.7554	-.2315	.0639	.6283
げばげばしい	-.5414	.4460	.3586	.6206
涼しい	.7659	-.1616	-.0573	.6583
きれいな	.5994	-.2796	.4047	.6013
若々しい	.7899	-.2862	.0605	.7096
魅力的な	.6856	-.2476	.3679	.6667
だらしない	-.1340	.5816	-.1869	.3911
見苦しい	-.2576	.7371	-.1032	.6204
老けた	-.3549	.5897	.1291	.4904
不気味な	-.2926	.8231	-.0535	.7660
きつい	-.2821	.6894	.1804	.5875
汚い	-.1424	.7354	-.1076	.5726
いやらしい	-.2706	.8130	.1289	.7508
ばかな	-.3815	.7874	.0103	.7656
不快な	-.4273	.7720	.0488	.7810
くだらない	-.3916	.7358	-.0611	.6985
恐い	-.1832	.7561	-.0071	.6053
大人っぽい	-.1885	.0834	.7137	.5518
華やか	-.0152	.0761	.8439	.7182
色っぽい	.2367	-.0237	.7382	.6016
女っぽい	.1958	-.0121	.7209	.5882
寄与率(%)	27.4861	25.3915	11.9406	
累積寄与率(%)	27.4861	52.8776	64.8183	

表2 女子高校生の化粧要因における形容詞全体の因子負荷量

	因子1	因子2	因子3	共通性
不自然な	.4782	-.1441	.0506	.2520
だらしない	.6654	.0201	.0955	.4522
げばげばしい	.4802	-.2451	-.0811	.2972
見苦しい	.8063	-.1990	.1758	.7206
老けた	.5651	-.2559	.2564	.4506
不気味な	.8312	-.1642	-.1502	.7405
きつい	.6535	-.1347	.0695	.4500
汚い	.7408	-.0616	.0561	.5557
いやらしい	.8520	-.1131	-.0057	.7387
ばかな	.7962	-.2121	.0826	.6859
不快な	.7649	-.2422	.1729	.6735
くだらない	.7582	-.1723	.1378	.6235
恐い	.7770	-.1890	-.0288	.6403
健康的	-.2011	.8572	-.1111	.7875
清潔な	-.2487	.8216	-.0809	.7435
上品な	-.1624	.6765	.3236	.5888
明るい	-.1610	.6869	.3268	.6042
さわやか	-.2431	.7802	-.2905	.7323
活動的	-.0407	.6922	-.1845	.5148
涼しい	-.1237	.7394	-.1596	.5874
若々しい	-.0993	.8135	-.1240	.6871
魅力的な	-.1906	.5537	-.5163	.6095
大人っぽい	.0700	.1467	.6300	.4233
知的な	-.2956	.4415	-.4971	.5294
華やか	-.0374	.3180	.7072	.6027
色っぽい	-.1554	.2603	-.7851	.7083
きれいな	-.2187	.4411	-.5430	.5373
女っぽい	-.0282	.1811	.7979	.6703
寄与率(%)	25.3737	21.3289	12.6797	
累積寄与率(%)	25.3737	46.7026	59.3823	

表3 女子大学生の化粧要因における形容詞全体の因子負荷量

	因子1	因子2	因子3	共通性
げばげばしい	.5282	-.1405	-.0213	.2992
見苦しい	.6946	-.1307	-.3357	.6122
老けた	.6226	-.2572	-.1401	.4734
不気味な	.8823	-.0853	-.0543	.7887
きつい	.7681	-.0120	.0548	.5932
汚い	.7373	-.1838	-.0522	.5801
いやらしい	.8280	-.1974	.1273	.7407
ばかな	.8556	-.2637	.0882	.8094
不快な	.8301	-.0752	-.1819	.7277
くだらない	.7387	-.2032	-.2016	.6276
恐い	.7102	-.0346	-.0436	.5075
健康的	-.1136	.7929	.1348	.6597
清潔な	-.1960	.7732	.2674	.7078
上品な	-.1019	.7835	.2817	.7037
さわやか	-.3037	.5847	.4862	.6706
知的な	-.2285	.6225	.5027	.6924
活動的	-.1344	.6903	.2208	.5433
涼しい	-.2735	.5129	.1534	.3614
不自然な	.2648	.0214	-.4073	.2365
明るい	.0071	.4305	.4899	.4254
大人っぽい	-.0944	.2189	.5452	.3541
だらしない	.4591	.1264	-.5118	.4887
華やか	.2382	.3381	.6087	.5415
色っぽい	.0871	.3058	.7287	.6322
きれいな	-.1962	.3830	.6687	.6324
女っぽい	-.0372	.2728	.7716	.6712
若々しい	-.2611	.4539	.4700	.4951
魅力的な	-.1155	.4015	.6684	.6213
寄与率(%)	24.9729	16.6289	16.2438	
累積寄与率(%)	24.9729	41.6018	57.8456	

表4 素顔要因における形容詞全体の因子負荷量

	因子1	因子2	因子3	共通性
げばげばしい	.3628	-.1748	-.0885	.1700
老けた	.5118	-.2618	-.3483	.4517
不気味な	.6601	-.2358	-.0082	.4914
きつい	.6343	-.0224	.0091	.4029
汚い	.6357	-.2240	-.0777	.4603
いやらしい	.8270	-.0318	.0541	.6879
ばかな	.7661	-.2037	.0523	.6311
不快な	.8034	-.2189	-.1844	.7274
くだらない	.6346	-.1547	-.1001	.4367
恐い	.7260	-.0139	-.0737	.5327
健康的	-.1043	.5238	-.0176	.2855
清潔な	-.2114	.6732	.0932	.5066
上品な	-.1538	.5002	-.0787	.2814
明るい	-.1452	.6284	.0729	.4213
さわやか	-.2218	.7215	.0546	.5727
知的な	-.0782	.5862	-.1519	.3728
活動的	-.3163	.5945	.0432	.4553
涼しい	-.1380	.4819	.0022	.2513
きれいな	-.1024	.6335	.1523	.4350
女っぽい	.1263	.3492	.1245	.1534
若々しい	-.3310	.5259	-.0117	.3863
魅力的な	-.1829	.6140	-.0846	.4176
不自然な	.1900	-.2865	-.4499	.3206
大人っぽい	-.1556	.2675	-.5401	.3874
だらしない	.3971	-.2820	.5126	.4999
華やか	.0350	.3006	-.4283	.2750
色っぽい	.1667	.2125	-.6106	.4316
見苦しい	.4255	-.2262	-.5048	.4871
寄与率(%)	19.0761	16.9247	6.6172	
累積寄与率(%)	19.0761	36.0008	42.6180	

た。特に目の周辺の化粧は、完璧な化粧をしているように感じられるためか特に抵抗感が強かった。女子高校生の化粧に非許容の回答をした理由の一つに、若いうちは素顔がきれいだから余計なことはしなくてもよい、というものがあつた。それゆえに化粧をすることによって素顔のイメージから離れてしまうことがより抵抗感を強くしているのであろう。

非許容の位置にありながらもピンク系、オレンジ系の口紅、マニキュアは他の項目に比べると明らかに抵抗感が弱い。これらの色は暖色系に属し、オレンジは温かさ、家庭的、陽気な、元気等のイメージがあり、ピンクは女性らしさ、化粧、幸せ、やわらかさ等の、どちらかといえば女子高校生にふさわしいと考えられるイメージがある。また、同じ暖色系でも赤系は代表的なセクシーカラーであるので女子高校生の化粧に関しては抵抗感が強くなっているのであろう。ピンク系に関してはさらに女性の肌の色により近いということで、化粧をしても素顔のイメージからあまり離れないのではないだろうか。この理由により、ピンク系は他の色に比べるとやや抵抗感が弱いと考えられた。

また、「女子高校生の化粧」、「女子大学生の化粧」に対するイメージを比較すると、「女子高校生の化粧」は形容詞による評価の因子分析の結果から、不自然で不快でくだらなく、しかし汚さやいやらしさはないという因子、不健康で魅力的ではなく若々しさが無いという因子、大人ぶっていて知的ではなく背伸びしているという因子が抽出された。それに対し「女子大学生の化粧」からは、多少けばけばしいがいやらしさや不快さはな

いという因子、清潔で活動的でさわやかであるという因子、大人っぽくてしかも若々しく華やかなという因子が抽出された。

高校生と大学生の化粧に関してはほぼ逆の印象が与えられた。しかし、高校生と大学生の化粧に共通しているのは大人っぽさであった。このことから化粧によって人は大人っぽくなるとみられていることがわかる。しかし、「大人っぽい」という同じ因子について高校生では否定的な結果が現れており、高校生では化粧が良い意味では受け取られていないことがわかる。これは、化粧は「大人」のものという印象が強く、高校生ではその年齢に達していないからだと考えられる。化粧の許容年齢についての質問に、高校を卒業して社会的に「大人」として認められる年齢がふさわしいと答えた人が多いことから化粧は「大人」のものという印象が強いことがうかがわれる。

一方大学生の化粧については、18歳以上であるためかやや肯定的に捉えられている。大学生は化粧をすることによって、知的さ、上品さ、活動的であり華やかになる、といった肯定的な要素と社会的に認められるための必要条件があてはまることが示されている。

就職して会社に入っても全く化粧をしないことはある意味で礼儀に欠け、社交的ではないとみなされる。しかし化粧の仕方によっては水商売の女性のような印象を人に与えることになる。このように化粧は社会的なイメージと性的なイメージとを持ち合わせている。今回の調査結果からは社会的なイメージが強く出ているように思われる。

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
藤本善徳

Cholic acid biosynthesis from cholesterol involves C-24/C-25 bond cleavage. A precursor of the bond cleavage reaction is $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -trihydroxycoprostan-26-oic acid (THCA) and this acid is converted into cholic acid by a mechanism similar to that of the β -oxidation of fatty acids. This research has focused on the stereochemical aspects of this C-C bond cleavage reaction and led to the following findings.

Evidence of the enzymatic formation of 24-oxo-THCA from Δ^{24} -THCA has been obtained for the first time by the use of ^{13}C as a tracer. All of the four stereoisomers of $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha, 24$ -tetrahydroxycoprostan-26-oic acid (TeHCA) were formed when THCA was incubated with rat liver mitochondrial fraction. In contrast, (24R, 25R)-THCA was formed when 700g supernatant fraction was used for incubation. The (25R)-stereochemistry is noteworthy, since (3S)-hydroxy intermediate is known for β -oxidation of fatty acids. 27-Nor analogs of THCA and Δ^{24} -THCA were also incubated with the mitochondrial fraction to give a mixture of (24R)- and (24S)-24-nor-TeHCA.

1. 緒言

コール酸(1)に代表される胆汁酸類は肝臓においてコレステロールから生合成される。コレステロールがまず骨格における水酸化等の変化をうけ、 $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -trihydroxycoprostan-26-oic acid (THCA) (2)となり、さらに側鎖末端の酸化を受けて $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -trihydroxycoprostan-26-oic acid (THCA) (2)となり、これが、 β -酸化タイプの反応で側鎖のC-24とC-25の間で切断をうけ、コール酸が生合成されるとされている¹⁾。

我々はステロイド代謝における炭素-炭素結合切断のメカニズムの研究(例えば、昆虫における植物ステロールのコレステロールへの変換機構²⁾、微生物による植物ステロールの側鎖切断の機構³⁾を解明してきた)の一環として、本炭素-炭素結合切断を取り上げ、どのような立体化学的制御のもとに反応が進行しているのかを含めて有機化学

的立場からその詳細について解明を試みることにした。

我々は先に、この反応の中間体と考えられる $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha, 24$ -tetrahydroxycoprostan-26-oic acid (TeHCA) (3)の24位、25位に関する4

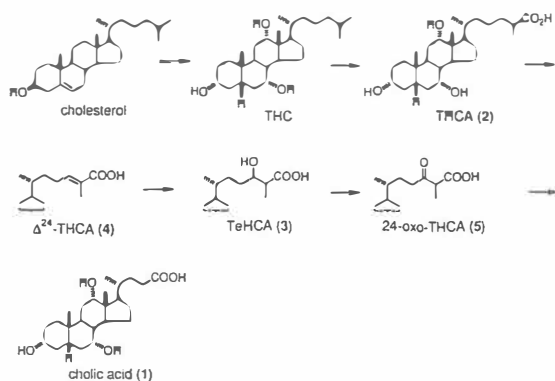


Fig. 1 Biosynthetic pathway of cholic acid
The COOH residue can be regarded as COSCoA in the biological system.

Studies on the biosynthesis of bile acid

Yoshinori Fujimoto

種の立体異性体の合成法を開発しその立体配置を確定した(この結果以前に報告されていた立体化学は訂正を要することが明らかとなった)⁴⁾。

次いで、この4種の異性体をラット肝ミトコンドリアとインキュベートすると、いずれもコール酸に変換されることを報告した⁵⁾。この立体選択性の欠如は注目に値しよう。

このような背景のもとに以下に示す実験を実施した。

2 / 3. 実験および結果

2 / 3. 1. ¹³C 標識 THCA (6) および Δ^{24} -

THCA (7) の合成

従来の研究では胆汁酸の生合成研究は放射性同位元素(¹⁴C)を用いて行われてきた。今回、新しいアイデアとして初めて我々は安定同位元素(¹³C)で標識した THCA および Δ^{24} -THCA を合成し、これらをインキュベートすることにより、予想される TeHCA および 24-オキソ THCA を含めて代謝物を ¹³C-NMR で分析することにした。¹³C の導入部位は合成の簡便さを考慮して 27 位とすることにした。^{[27-¹³C]-THCA (6) および [27-¹³C]- Δ^{24} -THCA (7) を目的化合物とし、Fig. 2 に示す方法で合成することができた。すなわち、アルデヒド(8)を原料とし ¹³C 標識イリド(9)と反応させ、不飽和エステル(10)を得た。これを加水分解し(7)を得た。また、(10)を接触還元後、加水分解し(6)を得た。}

(7)の¹³C-NMRスペクトルは δ 12.37および21.02に強いピークを示し、 Δ^{24} に関してトランス体が95%シス体が5%の混合物であった。(6)は δ 17.55および17.75に強いシグナルを示し25位のR/S体の混合物であった。さらに、ODSカラムによるHPLCのTHCAの25位立体異性体の溶出順序は報告されているので、本サンプルを同様な条件で分離しNMRにて27位が δ 17.55に観察される異性体が25S体、17.75のものが25R体とアサインできた。

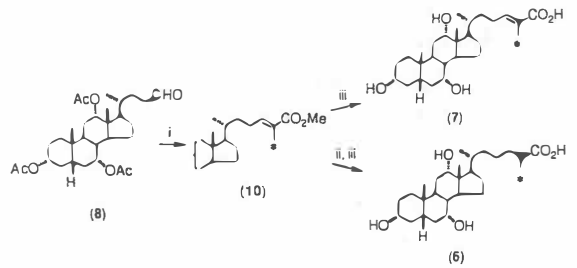


Fig. 2 Synthesis of ¹³C-labelled Δ^{24} -THCA and THCA
Reagents: i, $[\text{Ph}_3\text{PCH}(\text{}^{13}\text{CH}_3)\text{CO}_2\text{Me}]^+\text{Br}^-$ (9), n-BuLi; ii, $\text{H}_2/10\%\text{Pd-C}$; iii, KOH-MeOH

2 / 3. 2. ラット肝無細胞酵素系における Δ^{24} -THCA の 27-nor-3 α , 7 α , 12 α -tri-hydroxycoprostan-24-one への変換

上で合成した¹³C-標識体(各1.0mg)をラット肝無細胞酵素系(10,000g 上清, Tris緩衝液pH8.5, Mg^{2+} , ATP, CoA, NADを添加, 蛋白量10 mg/ml)と37.5°C, 1時間インキュベートした。エタノールおよび10%NaOHを加え5時間還流した。酢酸エチルで抽出し、濃縮残渣をLH-20(メタ

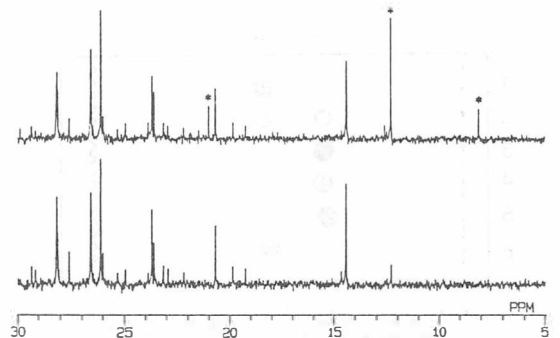


Fig. 3 ¹³C-NMR spectra (in part) of incubation product
Upper: derived from $[\text{}^{13}\text{C}]-\Delta^{24}$ -THCA (7).
Lower: background from incubation medium. Asterisk signals at δ 21.02, 12.37 and 8.16 are due to (Z)- and (E)-C-27 carbons of (7), and a new carbon, respectively.

ノールで溶出)を通した後、 ^{13}C -NMRを測定した。未反応の原料シグナルの他に、新たなシグナルが ^{13}C 標識 Δ^24 -THCAのインキュベーションサンプルに観察された⁶⁾。

この化学シフトと ^{13}C 標識の化学的環境から、このシグナルは27-nor-3 α , 7 α , 12 α -trihydroxy-coprostan-24-one(11)の26位の炭素に帰属されると考えた。事実、合成した標品のC-26は全く同じ化学シフトを示した。

さらに、先の濃縮残渣をp-TLCにて標品ケトンに相当する部分を分離しトリメチルシリルエーテル誘導体としGC-MSにより分析したところ、保持時間が標品ケトンと同じ位置にピークを示し、そのマススペクトルは標品より1マス高くシフト

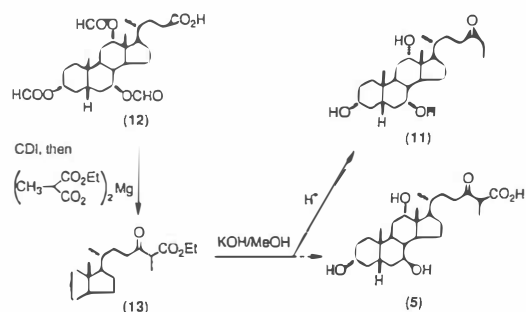
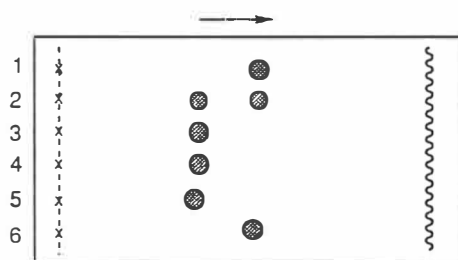


Fig.4 Attempted synthesis of 24-oxo-THCA(5)



- 1: After completion of hydrolysis
- 2: After addition of 1 eq. of sat. aq. NH_4Cl
- 3: After addition of excess sat. aq. NH_4Cl
- 4: authentic ethyl ketone (11)
- 5: THCA (2)
- 6: cholic acid (1)

Fig.5 Chemical stability of 24-oxo-THCA(5)
TLC was performed by Merck RP18-F254 plate with $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ (9:1) as a developing solvent.

していた。

さらに、TeHCAの4種の立体異性体のいずれが(酵素的に酸化されて)エチルケトン体を与えるのかを、標識されていないTeHCAを同様な条件でインキュベーションして調べたところ、いずれの異性体からもエチルケトン体(11)を与えることがわかった。

THCAを基質としたインキュベーションではエチルケトン体のC-26のシグナルは観察されなかった。

2/3.3. 24-Oxo-3 α , 7 α , 12 α -trihydroxy-coprostan-26-oic acidの化学的安定性

上の実験結果は、 Δ^24 -THCAが酵素反応(hydratase, oxidase)にて24-oxo-3 α , 7 α , 12 α -trihydroxycoprostan-26-oic acid(またはそのCoAエステル)に変換された後に化学的に脱炭酸したと考えられるので、標記化合物の合成を試みた。

コール酸トリホルミルエステル(12)をイミダゾライドとして活性化しマロン酸の半エチルエステルのマグネシウム塩と反応させケトンエステル(13)を得た。これをKOH/MeOHで加水分解した。この反応溶液は逆相TLCでケトカルボン酸のスポットを示す。しかしながら、この混合物を抽出に先立ち中和するために、2N-HClまたは飽和 NH_4Cl を加えてTLCを追いかけると、徐々に上記のスポットは消えて新たにエチルケトン体(11)に相当するスポットが現れてくることわかった⁶⁾。

2/3.4. TeHCAの生成過程における立体化学について

2/3.4.1. THCAのインキュベーション

既に、THCAがラット肝の無細胞系でcholic acidに変換されることは実験的に確かめられている。また、この無細胞酵素系でNAD非存在下では、TeHCAが微量生成することも報告がある。今回、4種のTeHCAの立体異性体のうちいずれ

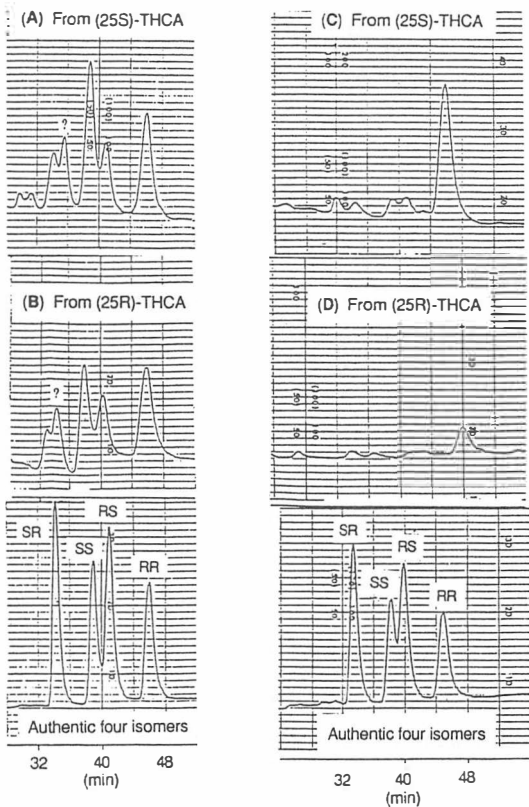


Fig.6 HPLC analysis of TeHCA(3) formed upon incubation of (25S)- and (25R)-THCA(2) (A) and (B): With mitochondrial fr.; (C) and (D) with 700g sup. Analysis was performed in the form of p-bromophenacyl ester, using an ODS column with MeOH-H₂O system as an eluting solvent.

が生成するのかを調べた。

まず、ラット肝のミトコンドリア分画を用いて NAD 非存在下で (25R)- および (25S)-THCA をインキュベートし生ずると考えられる TeHCA を p-プロモフェナシルエステル誘導体として HPLC にてしらべたところ、4種の TeHCA 異性体がいずれも確認された (Fig.6)。また、このインキュベーションで Δ^{24} -THCA も生じていることが認められた⁷⁾。

次に、700g 上清を用いて NAD 非存在下で同様な実験を行った。Fig.6 に示すとおり、(24R, 25R)-TeHCA が主に生成することがわかった。Crude な無細胞酵素系で (24R, 25R) 体が得られ

るという結果は他のグループによっても報告されている⁸⁾。

THCA の 25 位の立体異性体のうちいずれが代謝されるのかに関しては、われわれの上記の結果は両異性体とも変換されることを示している。最近、同様な趣旨の報告がなされた。

[27-¹³C]-THCA のインキュベーションでは、25S 体 (δ 17.55) の方が 25R 体 (δ 17.75) より多く回収される。

2 / 3. 4. 2. (E) および (Z)- Δ^{24} -THCA のインキュベーション

Δ^{24} -THCA には (E) 体および (Z) 体がある。このうちいずれがコール酸に変換されるかをラット肝の無細胞酵素系で調べた。

NAD を添加して (E) 体をインキュベートすると TeHCA の生成は認められず、コール酸の生成が確認された。しかしながら、(Z) 体からは TeHCA、コール酸の生成はともに認められなかった。現在、得られた TeHCA の立体化学について THCA を基質とした場合と同様な結果か否か確認しているところである⁷⁾。

2 / 3. 5. ハイブリッド基質、27-nor-THCA および Δ^{24} -27-nor-THCA の代謝物

脂肪酸の β 酸化では、3S の立体配置を有する β -ヒドロキシカルボン酸が中間体であることが知られている。今回の 24R, 25R 体とは β 位の立体化学が R であり脂肪酸の場合と逆である。そこで、THCA の炭素を一つ取った、27-nor-THCA および Δ^{24} -27-nor-THCA (14 および 15) を合成し、これから生じる 27-nor-TeHCA (16) の立体化学を調べてみるのは脂肪酸の β 酸化の酵素系と胆汁酸生合成系の酵素系の比較の点から大変興味深い。

まず、これらがラット肝の無細胞酵素系 (ミトコンドリア画分, NAD 添加) で基質となり得るかを調べ、(14) は 7.7% (15) は 17.5% の収率で cholic acid に変換されることを示した。この変換率はむしろ対応する THCA 等よりもよい値であった。

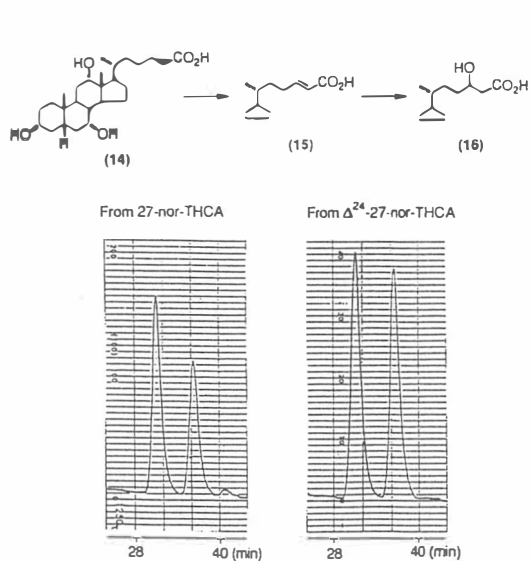


Fig.7 HPLC analysis of 27-nor-TeHCA(16) formed upon incubation of 27-nor-THCA (14) and Δ^{24} -27-nor-THCA(15) with mitochondrial fr. Analysis was performed in the form of p-bromophenacyl ester, using an ODS column with MeOH-H₂O system as an eluting solvent. Authentic(24S)-and(24R)-27-nor-TeHCA were eluted at 29.0 and 36.4 min, respectively.

27-nor THCA を、ラット肝無細胞酵素系のミトコンドリア分画を用いNAD非存在下にインキュベートしたところ、Fig.7に示すように24位の2つの異性体27-nor-TeHCA(16)が共に生成することがわかった。これはTHCAを基質とした場合に見られる結果と同様である⁹⁾。

700g上清によるインキュベーションは現在検討中である。

4. 考 察

胆汁酸の生合成におけるβ酸化類似のC-C結合切断反応に関して有機化学的立場から種々検討を加えた。

今までに行われていた放射性同位元素¹⁴Cによるトレーサー実験でなく、安定同位元素¹³Cによるトレーサー実験を初めて胆汁酸の生合成の研究に導入した。通常の実験室で放射能による汚染を

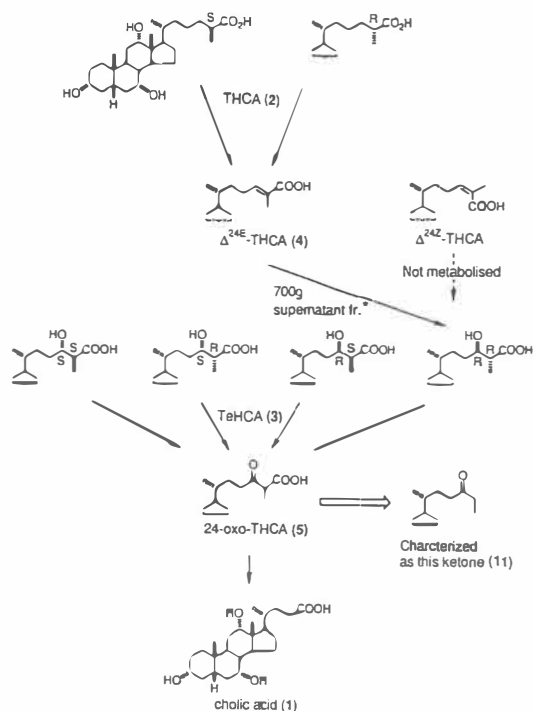


Fig.8 Summary of the Present Work

*When mitochondrial fr. was employed, four stereoisomers of TeHCA were formed.

気にすることなく実験を行うことができる以外に、代謝物を分離することなく、¹³C-NMRにより生成物の構造を調べることができる。この利点を生かして、今まで未報告の24-oxo-THCAが Δ^{24} -THCAから生成することを間接的に示すことができた。

なお、27-nor-3 α , 7 α , 12 α -trihydroxy-coprostan-24-oneについて、ウシガエルの胆嚢から単離の報告があるが¹⁰⁾、24-oxo-THCAから2/3.3.に示したように化学的分解により生じたものと考えられる。

最近、このβ酸化様反応の酵素学的研究が進歩しつつあり、脂肪酸分解系の酵素との比較の議論が可能になりつつある^{1b)}。例えば、bile acid CoA ligase(ミトコンドリアに存在)やbile acid oxidase(ペルオキシゾームに存在)は palmitoyl-CoA ligaseやfatty acid oxidaseとは異なるものであるとか、bifunctionalなbile acid hy-

dratase/dehydrogenase (ペルオキシゾームに存在)はfattyacid peroxisomal β -oxidation 酵素と似通ったものであるとか、thiolase(ペルオキシゾームに存在)は脂肪酸thiolaseと同一のものであるとか言われている。

我々は、基質および代謝中間体の化学的構造に基づいて酵素の性質を比較を試みようとするものである。ここに示した結果で、注目すべきは知見は：

- 1) ミトコンドリア分画および700g上清を用いたときの生成するTeHCAの立体化学が明らかに異なることである。
- 2) 700g上清を用いたときに生成するTeHCAは24R, 25R体であり、脂肪酸における β -ヒドロキシ酸(3S)と水酸基の立体化学が反対であることである。

この事実はhydratase酵素の反応における立体的要因に、胆汁酸と脂肪酸では差異があることを示すものである。

この点について、さらに知見を得るために、胆汁酸と脂肪酸のハイブリッド基質27-nor-THCAについて調べた結果、やはりミトコンドリア分画では(24R)-および(24S)の2つの24-ヒドロキシ酸が生じることがわかった。

以上、ラット肝無細胞系において立体化学を考慮しつつ基質と生成物の関係(Fig.8)を明らかにしてきたが、今後は上に記した興味ある発見の原因をより精製した酵素系を用いた実験系で解きあかしていく必要がある。

引用文献

1) 最近の Review : a), I. Bjorkhem, J. Lipid

- Res., 33, 455, (1992); b) D. W. Russell and K. D. R. Setchell, Biochemistry, 31, 4737(1992).
- 2) M. Morisaki, Y. Fujimoto and N. Ikekawa, 'Metabolic Aspects of Lipid Nutrition in Insects,' eds, T. E. Mittler and R. H. Dadd, Westview Press, Colorado, 1983. p.17; N. Ikekawa, M. Morisaki and Y. Fujimoto, Acc. Chem. Res., in press.
 - 3) Y. Fujimoto, C. -S. Chen, A. S. Gopalan and C. J. Sih, J. Am. Chem. Soc., 104, 4720(1982); idem, J. Am. Chem. Soc., 104, 4721(1982).
 - 4) T. Kinoshita, M. Miyata, S. M. Ismail, Y. Fujimoto, K. Kakinuma, N. Ikekawa and M. Morisaki, Chem. Pharm. Bull., 36, 134(1988).
 - 5) Y. Fujimoto, T. Kinoshita, I. Oya, K. Kakinuma, N. Ikekawa and M. Morisaki, Chem. Pharm. Bull., 36, 142(1988).
 - 6) M. Yuri, M. Tokumoto, N. Hara, Y. Fujimoto, N. Kobayashi and M. morisaki, Chem. Pharm. Bull., in press ;由利正利, 徳元真理絵, 原典行, 藤本善徳, 小林典子, 森崎益雄, 日本薬学会第113年会(大阪)発表。
 - 7) 小林典子, 宇都宮禎子, 平賀伴子, 森崎益雄, 大谷いずみ, 藤本善徳, 日本薬学会第13年会(大阪)発表。
 - 8) M. Une, I. Morigami, K. Kihira and T. Hoshita, J. Biochem., 96, 1103(1984).
 - 9) Y. Fujimoto, unpublished work.
 - 10) Y. Noma, M. Une, K. Kihira, M. yasuda, T. Kuramoto and H. Hoshita, J. Lipid. res., 21, 339(1980).

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
牧野 公 子

We prepared liposomes containing 5,6-CF, the surface of which was coated with carboxymethyl cellulose or hyaluronic acid. Above the phase transition temperature of the lipids composing the liposomes, almost 100% of 5,6-CF was released from the liposomes within 30mins, although little release of 5,6-CF was observed at and below the phase transition temperature. Surface charge density of the liposomes was changed by the adsorption of hyaluronic acid or carboxymethyl cellulose on liposome surface. Also, we measured the zeta potential values of DMPC, DPPC or DSPC liposomes at various temperatures. Neutral liposomes were found to exhibit non-zero zeta potentials in an external electric field even when dispersed in solution at pH7.4. A model for the orientation of lipid head groups was proposed to explain the observed non-zero zeta potentials. The dependence of the zeta potential on temperature and ionic strength was analyzed via this model to obtain the information on the direction of the lipid head groups in the liposome surface region. The direction of the lipid head group was found to be sensitive to the temperature and the ionic strength of the medium. At low ionic strengths, the phosphatidyl groups locate at the outer portion of the head group region. With increasing ionic strength, the choline groups move outward to the outer region of the bilayer surface. At constant temperature, as the ionic strength decreases, the choline group approaches the surface while the phosphatidyl group hides behind the surface. At the phase transition temperature of the lipid, the phosphatidyl group lies in the outer-most region of the surface and the choline group is in the inner-most region.

要 旨

カルボキシメチルセルロースまたはヒアルロン酸を表面に吸着させたリポソームに5,6-CFを内包して種々の温度において5,6-CFの放出挙動を検討した。このリポソームはそれを構成するリン脂質の相転移温度付近以下の温度ではほとんど5,6-CFを放出しないが、相転移温度以上では30分以内に放出量とその最終値のほぼ100%に達した。この時、表面に多糖類を持たないリポソームと表面にカルボキシメチルセルロースまたはヒアルロン酸を吸着させたリポソームからの5,6-CF放出

量を比較すると、ヒアルロン酸の表面への吸着によってリポソームからの5,6-CF放出が抑制されることが明らかになった。次に、リポソームのゼータ電位を測定した結果、カルボキシメチルセルロースまたはヒアルロン酸が表面に吸着することによって表面電荷密度が変化するという結果を得た。さらに我々はこのリポソームからの温度に依存した内容物の放出挙動を知るために、リン脂質の動きの温度依存性に注目して種々の温度におけるゼータ電位の値からリポソームのリン脂質の頭部の運動性を見積った。その結果、リン脂質の相転移温度付近でリン脂質の頭部は最も広がった

Temperature-controlled release from hyaluronic acid-coated liposomes.

Kimiko Makino

形を取りうると考察された。

1. 緒言

リポソームからの内容物の放出制御は薬物放出あるいは化粧品へのリポソームの配合に関連して多くの研究者によって検討されてきた。その1つはリポソームの安定性の制御の問題であり、我々の研究室において多糖類でリポソーム表面を被覆することによってリポソームの安定性を増すという結果を得た。即ち、リン脂質リポソームを界面活性剤を含む溶液中に再分散すると、界面活性剤によってリポソームからの内容物放出は促進されるが、表面をカルボキシメチルキチン、カルボキシメチルセルロース、ヒアルロン酸(ヒアルロン酸は刺激性が低く、保湿性が高いことから医薬品、化粧品の原料として注目されている。)で被覆するとリポソームからの内容物放出は抑制される。一方、温度に依存したリポソームからの内容物の放出制御の点に関して、1980年代にリポソームの内容物(例えば5,6-CFのような蛍光物質)の放出速度がリポソームの相転移温度付近で急に大きくなるかあるいは最大値を示すことが報告されている。我々はこの結果はリポソームの構造が温度に依存して変化することを示唆すると考え、このリポソームの構造を制御することによってリポソームの内容物の放出制御が可能になると推察した。

本研究は、リポソームリン脂質の頭部および炭素鎖の運動性が温度によって受ける影響を知り、さらにこのリポソーム表面に吸着しているカルボキシメチルセルロースとヒアルロン酸の吸着量とこれらの多糖類の構造とリポソーム全体の構造の温度依存性を検討して、これらの多糖類がリポソームを補強する機構と内容物の放出機構を解明することを目的としている。

2. 実験

2.1 リポソームの調製

水または5,6-CF水溶液を内包し、ジミリストイルフォスファチジルコリン(DMPC)または、ジパルミトイルフォスファチジルコリン(DPPC)または、ジステアロイルフォスファチジルコリン(DSPC)を構成成分とするリポソームを調製した。

DMPC, DPPC, DSPCをクロロホルムに溶解し、この溶液に各リン脂質の相転移温度の10度下の温度において蒸留水または5,6-CF水溶液を乳化分散してW/Oエマルジョンを調製した後、リン酸緩衝液中(pH7.4, イオン強度0.154)にこのエマルジョンを加え、10分間攪拌し、さらにリン酸緩衝液を加えて3時間攪拌してクロロホルムを蒸散させた。調製されたリポソームを遠心機上で3回リン酸緩衝液で洗浄してサンプルとした。

調製中にカルボキシメチルセルロース(CMC)溶液またはヒアルロン酸(HA)溶液を加えることによって表面にこれらの多糖類を吸着したDMPC, DPPC, DSPCリポソームを調製した。

2.2 5,6-CFの放出速度の測定

5,6-CFを含むヒアルロン酸またはカルボキシメチルセルロースで表面を被覆したリポソームをpH7.4のリン酸緩衝液中に分散後、リポソームを構成しているリン脂質の相転移温度の前後5, 10度と相転移温度において振盪し、経時的にサンプリングして10000rpmで遠心して上澄の蛍光強度を測定した。対照として10mM SLSを含有するリン酸緩衝液中に分散して相転移温度において3時間振盪したリポソームの上澄の5,6-CF濃度を100%とした。

2.3 DMPCリポソーム, DPPCリポソーム, DSPCリポソーム, CMC-DMPCリポソーム, CMC-DPPCリポソーム, CMC-DSPCリポソーム, HA-DMPCリポソーム, HA-DPPC

リポソーム、HA-DSPCリポソームを調製し、種々のイオン強度のリン酸緩衝液中にリポソームを再分散し、種々の温度においてゼータ電位を測定した。測定にはPEN KEM System 3000を用いた。ゼータ電位の値から表面電荷密度の温度依存性を評価した。

2.4 リポソーム表面に吸着したCMCとHAの量の測定

DMPCリポソーム、DPPCリポソーム、DSPCリポソームをCMC水溶液とHA水溶液中に分散し、種々の温度における吸着量を分散液中に残ったCMC濃度とHA濃度を液体クロマトグラフィーを用いて評価した。

結果

1. 経時的な5,6-CFの放出

経時的な5,6-CFの放出率を次式によって求めた。

$$\text{放出率(\%)} = \frac{H_t - H_0}{H_{100\%} - H_0} * 100$$

H_t : 時間tにおけるサンプルの蛍光強度

H_0 : 時間0におけるサンプルの蛍光強度

$H_{100\%}$: SLSで処理したサンプルの蛍光強度

図1に示すようにDSPCリポソームからの5,6-CFの放出率は45度と50度では低いが、55度以上では30分以内にはほぼ100%に達している。ヒアルロン酸で表面を被覆することによって5,6-CFの放出率は45度と50度において低下した。カルボキシメチルセルロースによる被覆は5,6-CFの放出率に影響を与えない。このような5,6-CFの放出率の温度依存性はDSPCリポソームの相転移温度が55度付近にあることと対応している。他のDPPC、DMPCリポソームおよび、カルボキシメチルセルロース、ヒアルロン酸で表面を被覆したDPPC、DMPCリポソームからの5,6-CFの放出に関しても同様の傾向が見られた。

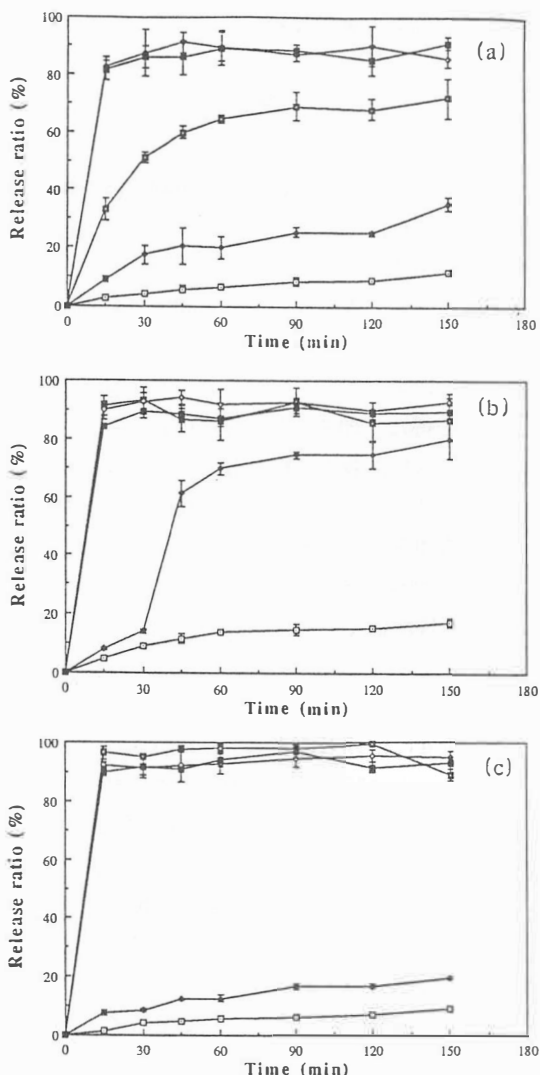


Fig. 15,6-CF leakage from DSPC liposomes (a), from DSPC liposomes coated with carboxymethyl cellulose(b), and from DSPC liposomes coated with hyaluronic acid(c) at various temperatures:(□)45°C, (◆)50°C, (□)55°C, (◇)60°C, (■)65°C

2. リポソーム脂質の頭部構造の温度、イオン強度依存性

DMPC、DPPC、DSPCで調製したリポソームはこれらのリン脂質が電氣的に中性であるにもかかわらず、pH7.4のリン酸緩衝液中で0でないゼータ電位を示した。また、このゼータ電位の値はイオン強度と温度を変えると変化した。こ

のように中性リン脂質リポソームの表面の電荷分布は温度とイオン強度に依存する。リポソーム表面の脂質頭部の向きが温度とイオン強度に依存して変化すると考え、この現象を説明するモデルを提出した。

図2に示すように DSPC リポソームのゼータ電位はイオン強度と温度に依存して変化した。イオン強度が低いときにはより大きな負の値を示すがイオン強度の増加に伴いゼータ電位の絶対値は減少して、あるイオン強度で0を通り、それ以上高いイオン強度の溶液中では電位が反転して正の値を示した。また、温度に関しては50度で最も低い値を示した。DMPC, DPPCのゼータ電位に関しても同様のイオン強度および温度依存の傾向が示された。

この実験に用いた脂質が電氣的に中性であるにもかかわらず、0でないゼータ電位を示し、かつその値がイオン強度の増加に伴って反転したことを説明するために、我々は、図3に示すような2枚の電荷層を持つモデルを作った。このモデルではゼータ電位のイオン強度および温度依存性をリポソーム表面のリン脂質頭部の構造変化として説明した。フォスファチジル基の負電荷からコリン基の正電荷に向かう電気双極子がイオン強度に依存して変化すると考察した。個々のリン脂質分子については、双極子の長さを l とし、膜面に垂直な

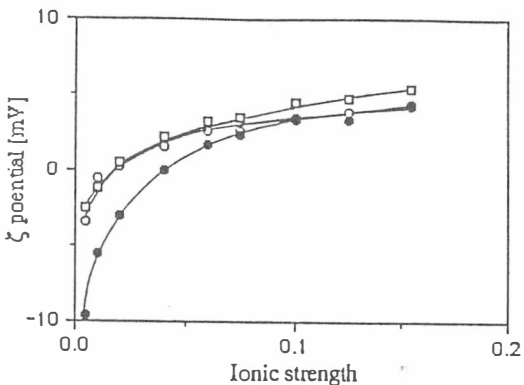


Fig. 2 Ionic strength dependence of the zeta potential of DSPC liposomes at several temperatures: (○)45°C, (●)50°C, (□)55°C

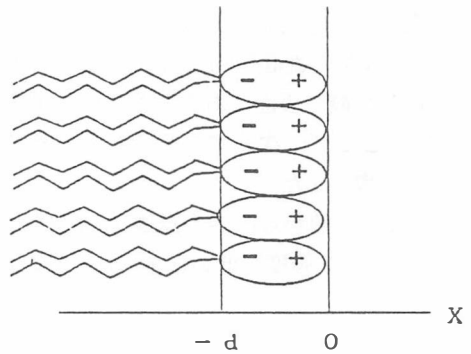


Fig. 3 Schematic representation of the head group region.

方向へのこの双極子の写影を d 、リポソームの表面における脂質1個当たりの表面積を S とする(図4)リポソーム表面に対する頭部の傾きは d で表される。ここで $-l < d < +l$ であり、頭部がフォスファチジル基の負電荷が最も表面にありコリン

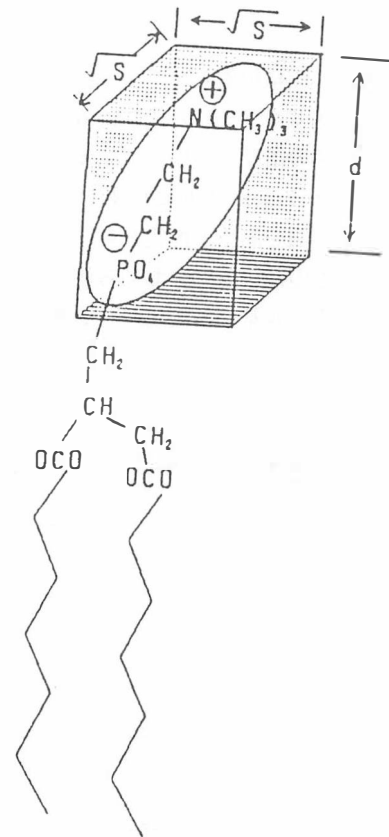


Fig. 4 Lipid head group region.

基の正電荷が最も内側にあるとき $d = -l$ 、フォスファチジル基の負電荷が最も内側に入りコリン基の正電荷が最も表面にあるときに $d = +l$ となる(図5)。ここで、次式で与えられるパラメーター d/\sqrt{S} を導入した。

ゼータ電位の値から d/\sqrt{S} を見積り、図6を得た。図6より、イオン強度が低いとき、フォスファチ

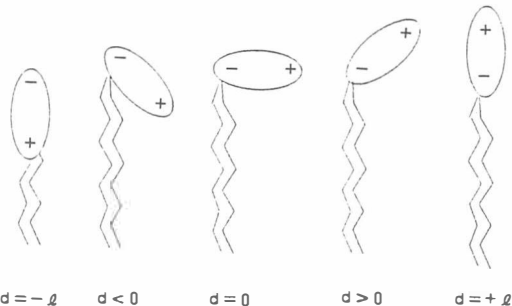


Fig. 5 Model for the conformation of lipid head groups.

ジル基が頭部の外側に位置し、イオン強度が高くなるとコリン基がリポソーム外側に位置する傾向が見られた。一定の温度において、イオン強度が増加すると、コリン基が表面に位置し、フォスファチジル基が内側を向くと推定した。リン脂質の相転移温度付近の他の温度における状態に比べて、フォスファチジル基が外側にコリン基が内側にあると考えられる。

また、カルボキシメチルセルロース、ヒアルコ

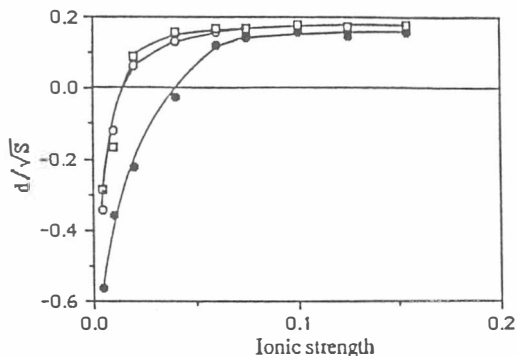


Fig. 6 Ionic strength dependence of d/S of DSPC liposomes at several temperatures: (○)45°C, (●)50°C, (□)55°C

ン酸で表面を被覆することによって、どの温度においてもリポソームのゼータ電位の絶対値は減少した。

3. リポソーム表面へのカルボキシメチルセルロースおよびヒアルロン酸の吸着量は現在検討中である。

以上の結果は以下の学会で報告し、かつ学術誌に発表した。

“Temperature- and ionic strength-induced conformational changes in the lipid head group region of liposomes.” K. Makino, H. Ohshima and T. Kondo, 7th International Conference on Surface and Colloid Science, July 7-13, '91 Compiègne, France.

“リポソーム脂質の頭部構造-温度 イオン強度依存性” 牧野公子, 山田 武, 木村真理子, 岡隆史, 大島広行, 近藤 保, 第44回コロイドおよび界面化学討論会 9月27日-29日 埼玉大学

“Temperature- and ionic strength-induced conformational changes in the lipid head group region of liposomes as suggested by zeta potential data.” K. Makino, T. Yamada, M. Kimura, T. Oka, H. Ohshima and T. Kondo, Biophys. Chem., 41(1991)175-183.

皮膚用 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

西出宏之・土田英俊

Liposomes composed of polymerized phospholipids possess enormous stabilities against mechanical stress, detergents, long term storage, and phospholipases, and are one of the potential candidates for usage as a skin-drug delivery system (DDS). Formation profile of the polymerized phospholipids derived from 1,2-bis(2,4-octadecadienoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine was first described, and their molecular weight was estimated. Stability of the liposome structure was demonstrated by the addition test of detergent such as Triton X-100. Viscosity of the liposome solution coexisted with water-soluble polymers provided its rheological characteristics. Encapsulation efficiency by the liposome was studied in the view point of concentration of encapsulated material and lamellarity of the liposome by using hemoglobin as an example. The encapsulation profile was also influenced by pH and ionic strength of the solution. The liposomes could be freeze-dried with a small amount of sugar, suggesting that the liposome would be utilized as dry powder for skin-DDS.

1. 緒言

ここ十年來我々は、人工赤血球としてヘモグロビンを安定に含有するリポソーム(脂質小胞体: 粒径0.05~0.5 μ m 微小マイクロカプセル)に用いるリン脂質誘導体の合成化学的な研究を展開してきたが、その物質群の一つに高分子脂質リポソームがある¹⁻⁵⁾。1,2-Bis(2,4-octadecadienoyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine を紫外光または γ 線照射重合して得られる高分子脂質リポソームであり、その特徴は次のように列挙できる。①リポソーム2分子膜がリン脂質分子間の共有結合(重合反応による架橋)により安定化されており、例えば界面活性剤によっても小胞体構造は破壊されない。②生化学的にも安定で、例えばホスホリパーゼAおよびDによっても直ちには加水分解されない。③しかも重合後脂質部には不飽和結合が残るので緩慢に代謝される。④リポ

ソーム作製の常法に従って内包物質をカプセル化後、照射重合して安定構造に誘導できる。⑤小胞体として物理的に強靱である。⑥相分離や小胞体間の融合なしに、高濃度の分散液が保持できる。

本研究ではこれら特性を有する新しい高分子脂質リポソームを、皮膚用 DDS(薬物運搬体)としてはじめて新しく展開するための基礎知見を得て、乳化化粧品とは全く異なる新しい運搬システムの可能性を明らかにしようとするものである。すなわち特徴①~⑥に対応して次の効果が期待される。(a)界面活性剤に対する強い抵抗性①に基づき、安定な皮膚用 DDSとして適用する。(b)生化学的安定性②により、急速な代謝や皮膚細胞との直接相互作用を抑制しながら、角層~表皮~真皮への浸透が可能。(c)③により毒性低減が計れる。(d)④・⑤に基づき内包物質の種類(油~水溶性)に制約がなく、また広い濃度範囲での内包が可能となる。(e)⑥に起因して、溶液物性(レオロ

Study on Polymerized Phospholipid Liposomes as a Drug Delivery System for Skin

Hiroyuki Nishide・Eishun Tsuchida

0.73Mrad)し、高分子脂質リポソームを得た。これを遠心濃縮(8wt%)、pH調整後(pH7.4)測定に用いた⁹⁾。

デキストラン(M_w 19,800)、ヒトアルブミンはSigma社製をそのまま使用した。ポリエチレンオキシド(PEO, M_w20,000, 和光純薬)は透析精製して用いた。

粘度(37°C)はE型回転粘度計(東機産業)を使用して、ズリ速度(D)が7.5s⁻¹での値を取った。

2.5 ヘモグロビン溶液の調製

期限切れヒト赤血球を生理食塩水で二倍に希釈し、一酸化炭素雰囲気下振盪して赤血球中のヘモグロビン(Hb)を一酸化炭素化(HbCO)した。遠心洗浄後の濃厚赤血球([Hb]=25g/dl)にジクロロメタンを添加して溶血させ、ストローマ成分を遠心分離した。残留ジクロロメタンを減圧留去後、加熱処理(60°C)、変性した共存蛋白質を遠心分離した。透析後pH、イオン強度を調節して、限外濾過濃縮により高純度の濃厚Hb溶液を得た¹⁰⁾。

2.6 高分子脂質リポソームへの内包

混合脂質薄膜にHbCO溶液を添加して、多重層リポソームを得た。これをエクストルーダー処理して、粒径200nmφのHbを内包したリポソームとした。ゲル濾過(Sepharose CL-4B)によりリポソーム外水相の未内包Hbを除去、遠心分離により濃縮した。

リポソームを構成するDODPCの高分子化は、得られたHbリポソーム分散液をCO雰囲気下、4°C、0.75Mradのγ線(⁶⁰Co)照射して行った。重合率は約70%であった^{7, 11)}。

2.7 リポソームの被覆層数、内水相濃度の測定法

1個のリポソームの内水相体積V_{in}と構成脂質分子数Nは、各々式(2)、(3)により層数nの関数として表すことができる¹²⁾。ここでリポソーム半径(r)=100nm、無水状態の二分子膜厚(d)=

5nm、二分子膜間水層(d_w)=1.3nm、平均分子占有面積(S)=0.36nm²とした。

$$V_{in}(\text{cm}^3) = \frac{4}{3}\pi \{r-n(d+d_w)+d_w\}^3 \times 10^{-21} \quad \text{-----}(2)$$

$$N = \frac{4\pi}{S} \sum_{i=1}^n [\{r-(i-1)(d+d_w)\}^2 + \{r-i(d+d_w)+d_w\}^2] \quad \text{-----}(3)$$

単位脂質重量当りのリポソーム体積V_{calc}(cm³/g)は(4)式にて表せられる。ここでMは平均分子量、N_Aはアボガドロ数である。

$$V_{calc}(\text{cm}^3/\text{g}) = \frac{\frac{4}{3}\pi r^3 \times 10^{-21}}{M \times \frac{N}{N_A}} \quad \text{-----}(4)$$

他方、添加脂質重量をm(g)、リポソーム総体積をV(cm³)とすると、単位脂質重量当りのリポソーム体積の実測値であるV_{meas}は、以下で求められる。リポソーム分散液にグルコースm'(g)を添加し、V'(g)に定容すると見かけのグルコース濃度C_{app}はm'/V'(g/cm³)となるが、グルコースはリポソームの外水相にのみ存在しているのでリポソームの遠心分離後にこの濃度を定量する。C_{app}との差はリポソームの総体積分になるので、(5)式によりV_{meas}が算出される。

$$V_{meas}(\text{cm}^3/\text{g}) = \frac{V}{m} = \frac{V'(1-C_{app}/C)}{m} \quad \text{-----}(5)$$

被覆層数(n)は、V_{meas}=V_{calc}からNを計算して(6)式から算出される。リポソームのHb内包効率は、単位脂質重量当りのHb重量比([Hb]/[Lipid]比)として表される。Hbリポソーム分散液中のリン脂質濃度とHb濃度は各々Allen法、シアノメト法にて定量した。

リポソーム内のHb溶液の濃度([Hb]_{in})は、(6)式から算出される。

$$[\text{Hb}]_{in}(\text{g}/\text{dl}) = \frac{[\text{Hb}]}{[\text{Lipid}]} \frac{M \times \frac{N}{N_A}}{V_{in}} \times 100 \quad \text{-----}(6)$$

2.4 リポソーム粉末の調製

Hb リポソーム分散液(脂質濃度 $1\text{g}/d\text{l}$)にショ糖($50\sim 150\text{mM}$)添加し、冷媒(メタノールドライアイス)により速やかに凍結し、減圧乾燥してリポソームの粉末を得た。これに粉末に純水を添加し、元の成分濃度に調整した後、フィルター($0.8\mu\text{m}\phi$)を通過させ、粒径と内包Hbの漏出量をゲル濾過で分離、定量し、漏出率を測定した⁷⁾。

3. 結果と考察

3.1 高分子脂質リポソームの生成

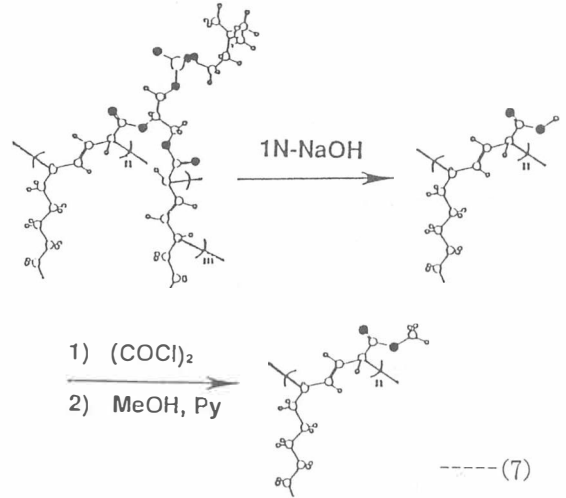
DODPC(式1)はアシル鎖の各々に重合活性の高いジエン基をもつ脂質である。水に分散後、超音波照射すると容易に2分子膜小胞体リポソームを生成する。これに紫外光を照射すると脂質分子内のジエン基の一部が励起されるが、脂質分子は2分子膜内で配向しているので近接するジエン基間で共有結合を生じ易く、連鎖的に重合が進む(Fig.1)。 γ 線照射では、水の分解により生じたOHラジカルが、親疎水界面に存在するジエン基を攻撃して重合が開始される。どちらの方法でも、重合に際し小胞体の形状はそのまま保たれるので、高分子脂質リポソームに変換される。

生成した高分子脂質は、式1のように分子内に2つのジエン基を有することから一種の架橋体であり、正確な分子量測定は困難とされていた。そのため後述のような特性がありながら、高分子脂質の分子量(重合度)は知られていなかった。特に医薬用に高分子脂質を利用するためには、分子量の把握は不可欠である。そこで高分子脂質のグリセロホスホコリン部を除去し、メチルエステル化する



Fig.1 Polymerization of DODPC in a liposome.

ることにより有機溶媒に可溶性高分子へ誘導し(式7)、GPCにて分子量を測定した^{6, 7)}。紫外光照射により重合した高分子脂質の分子量は、 $M_n=5.4\times 10^3$, $M_w=6.9\times 10^3$, γ 線照射重合では $M_n=1.5\times 10^4$, $M_w=4.1\times 10^4$ であった。



紫外光の継続照射(半日)や大気下で長期保存(1週間)した試料では、分子量の低下が認められた。高分子脂質は重合(高分子化)後もアシル鎖部に不飽和結合を有するので、この部位が引き金となって高分子脂質の分解が生起していると示唆される。生化学的な代謝や毒性を考慮した場合、高分子脂質の一つの可能性を示している。

3.2 界面活性剤に対する安定性

オリゴエチレンオキシドモノオクチルフェニルエーテル(Triton X-100)など界面活性剤は脂質リポソームを容易に破壊する。通常の卵黄レシチンより作成したリポソームの水溶液にTriton X-100を加えていくと、光散乱強度はいったん増大そして減少した(Fig.2)。これは界面活性剤によるリポソームの破壊と脂質の可溶化に対応している。DODPCについても、重合前は卵黄レシチンと同じく、界面活性剤により小胞体は破壊された。それに対し、高分子リポソームではTriton X-100の添加によっても水溶液の光散乱度は

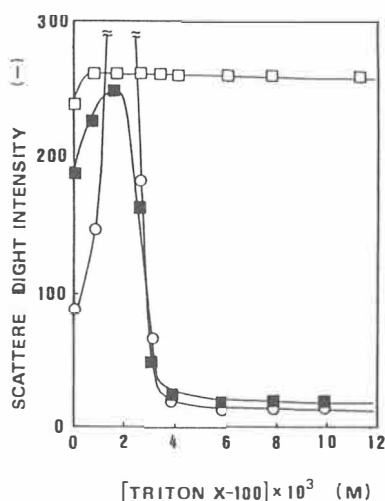


Fig.2 Scattered-light intensity change at 90° for liposomes induced by the addition of Triton X-100 with different concentration. (\square) DODPC polymerized by γ -irradiation, (\blacksquare) DODPC before polymerization, and (\circ) egg yolk lecithin liposomes (as reference).

変化せず、リポソーム構造を保っていることがわかった。

高分子脂質リポソーム水溶液は3ヶ月放置後も、相分離や沈澱を全く生じなかった。さらに後述のHbを内包した高分子脂質リポソームでは、Hbの漏出は認められなかった。これらの事実は、高分子脂質リポソームが保存時または界面活性剤共存下でも十分に内包物を保持して存在していることを示している。

3.3 水溶性高分子との相互作用

高分子脂質リポソームに種々の水溶性高分子を加え、溶液系の粘度を回転粘度計で測定した。この実験は皮膚組織での相互作用を推定するため、また分散液としての溶液物性(レオロジー触感)を調節するための一知見と考えた。

高分子脂質リポソーム8%水溶液に、PEO、多糖類デキストラン、ヒトアルブミンを添加し、溶液粘度の上昇をプロットした(Fig.3)。前2者の添加では、ある濃度から粘性は急激に増加したのに対し、後者での粘度上昇はわずかであった。前

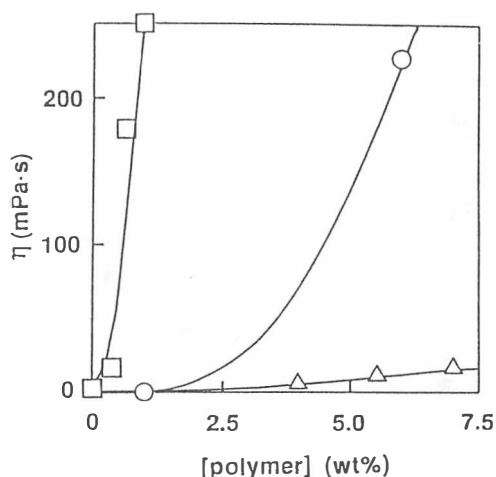


Fig.3 Changes in the solution viscosity of polymerized phospholipid liposomes by the addition of water-soluble polymers. PEO(\square), dextran(\circ), albumin(\triangle).

者では水溶性高分子との相互作用による微粒子の凝集が考えられる。これに対し、球状タンパク質は凝集を引起し難いことがわかった。

今後、リポソームの粒径および脂質構成成分による表面電荷を調整することにより、相互作用さらにはレオロジー物性を増減する知見が不可欠である。

3.4 機能物質内包における濃度と調整温度の影響

高分子脂質リポソーム内に機能物質を効率高く内包する要件を、機能物質としてHbを例に実験した。

原料Hb溶液を濃厚にするとリポソーム内Hb量も増大すると考えられる。Hb濃度を43g/dlまで増加させても、リポソームの被覆脂質層数n値はほぼ一定(1.4枚)であったが、リポソームに内包されたHbの濃度 $[Hb]_{in}$ は調製時のHb溶液の濃度とともに増大した(Fig.4)。しかし、原料Hb濃度が高くなると $[Hb] - [Hb]_{in}$ は大きくなってきた。高濃度になるとHb分子同士でfloculate(ゆるい会合体)が形成され、Hb溶液粘度は急激に増大し、内包効率が頭打ちになった

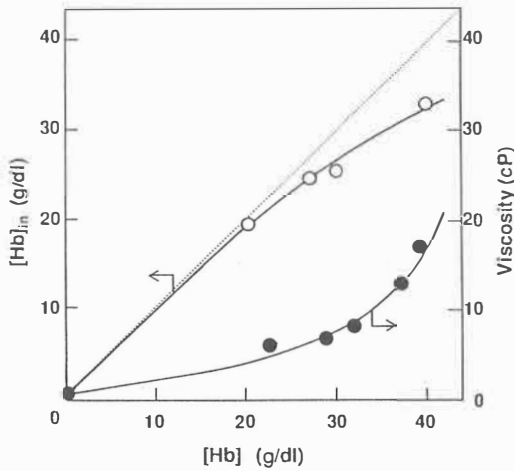


Fig.4 Encapsulation profiles of Hb into liposomes with increasing fed Hb concentration (○) and the solution viscosity (●) at shear rate = 11.5 sec^{-1} .

と考えられる。しかし高濃度溶液を用いることにより [Hb]/[Lipid] 比は確実に向上する。

次に熱安定性を有する HbCO を用い、高い温度で溶液粘度を下げ、カプセル化し、内包物質濃度 $[\text{Hb}]_{\text{in}}$ の向上を試みた (Fig.5)。Hb 濃度一定 (31 g/dl) のもと 4°C から 10°C になると、溶液粘度の低下に対応して $[\text{Hb}]_{\text{in}}$ は急激に増大した。しかし層数 (n) も温度とともに増加した。実際、内包後 $[\text{Hb}]/[\text{Lipid}]$ 比 (Fig.6) は、温度が高くな

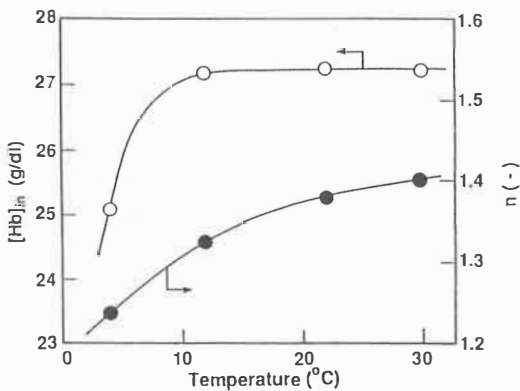


Fig.5 Influence of the preparation temperature on n and $[\text{Hb}]_{\text{in}}$. ($[\text{Hb}] = 31 \text{ g/dl}$, $[\text{NaCl}] = 0.6 \text{ g/dl}$, $\text{pH} = 7.0$)

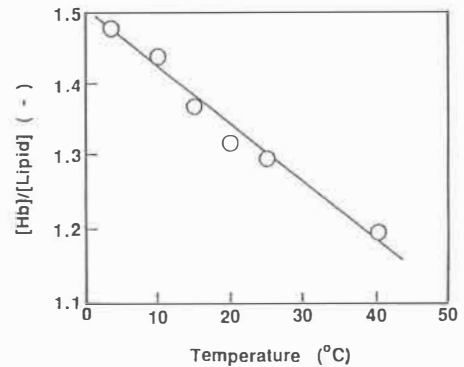


Fig.6 Influence of the preparation temperature on the $[\text{Hb}]/[\text{Lipid}]$ ratio. ($[\text{Hb}] = 40 \text{ g/dl}$, $[\text{NaCl}] = 0.57 \text{ g/dl}$, $\text{pH} = 6.9$)

るほどむしろ減少した。粒径調整に際して、フィルター細孔内でリポソームはズリ応力を受けて小さな粒径へと変化するが、膜構成分子の運動性が高くなると、より多重層単位での変形が容易となるため、層数の大きなリポソームが形成されたと考えられる。

従って、内包機能物質の変性防止も考えあわせ、リポソームの調製は低温で実施すべきと結論づけられた。

3.5 機能物質内包における pH, イオン強度の影響

膜構成成分として脂肪酸を導入して、リポソームの脂質分子膜表面を負に帯電させると、層間での静電反発によりリポソームの層数低下が期待できる。Hb 分子も等電点を $7.0 (25^\circ\text{C})$ に有する電荷を帯びた分子であり、脂質膜表面との相互作用については内包効率は pH によって変化するものと考えられる。

各 pH の Hb 溶液でリポソームを調製したところ、pH 上昇とともに脂質層数 (n) の減少が認められた (Fig.7)。高 pH では脂肪酸の解離度は高くなり ($\text{pK}_a = 7.4$)¹³⁾、脂質分子膜間の静電反発により層数の少ないリポソームが形成される。一方、Hb の等電点よりも低い pH では Hb は正に帯電し、負に帯電した脂質分子膜との親和性が増

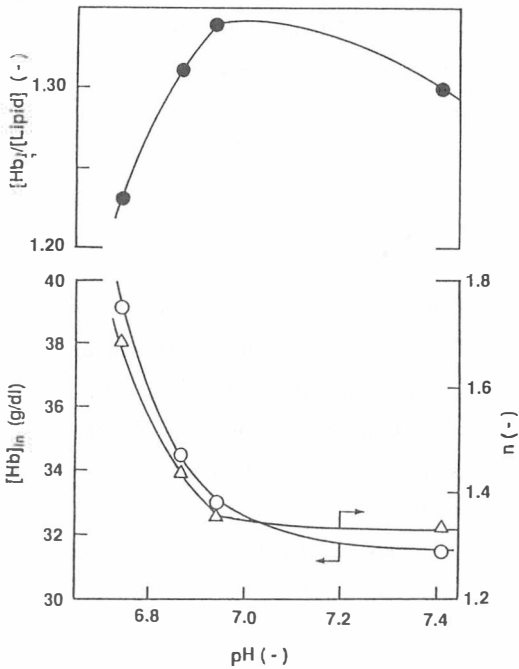


Fig.7 Influence of pH of Hb solutions on the [Hb]/[Lipid]ratio(●), n(Δ), and [Hb]_i(○). ([Hb]=40g/dl, [NaCl]=0.6g/dl, 4°C)

すため[Hb]_iは急激に増加する。このようにpHが低くなると、[Hb]_iは上昇nが増加し、高くなると[Hb]_iが低下nが減少するといった相殺する挙動となった。内包物質の等電点付近のpHでリポソーム調製することにより最も高い[内包物質]/[脂質]比が得られた。

溶液イオン強度が上昇すると電荷遮蔽効果により脂肪酸間の反発が低下、層数が増大した(Fig. 8)。[Hb]_iも塩濃度増大とともに減少したので、[内包物質]/[脂質]比は塩濃度の低い条件でのみ高く保てることがわかった。

3.6 高分子脂質リポソームの粉末化

高分子化リン脂質リポソームが凍結融解を繰り返しても粒径分布や内包物質の漏出が認められないことから¹¹⁾、リン脂質二分子膜が非常に強靱であることが明らかとされてきた。そこでさらに乾燥体としての形態保持能について検討した⁷⁾。

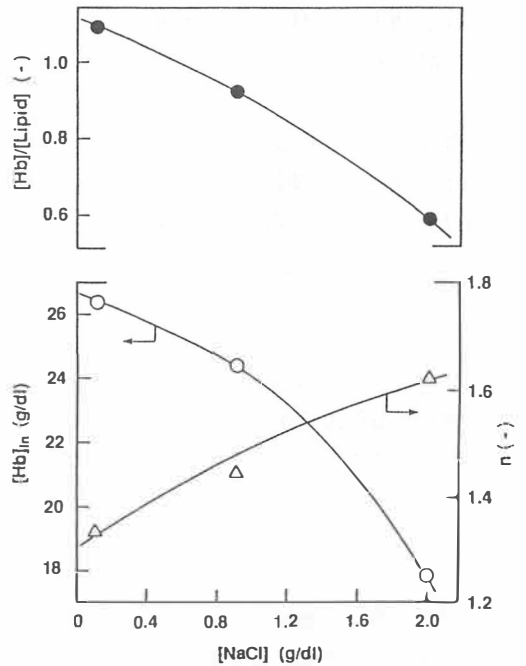


Fig.8 Influence of NaCl concentration in Hb solutions on the [Hb]/[Lipid]ratio(●), n(Δ), and [Hb]_i(○). ([Hb]=27g/dl, pH=7.1, 4°C)

高分子化脂質リポソームの分散液をそのまま凍結乾燥粉末としたあと、純水に再分散させると、粒径は増大するが、内包物質Hbの漏出は認められなかった(Fig.9)。従って粒径の増大はリポソーム構造が破壊されたのではなく、単に粉末化したリポソームが凝集し、分散し難くなっているため

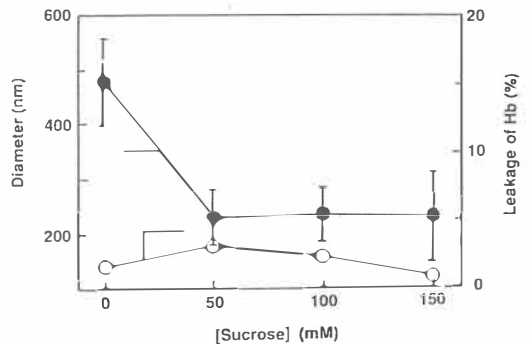


Fig.9 Changes in diameter and leakage of Hb from the polymerized phospholipid liposomes after freeze-drying and rehydration.

と考えられる。高分子化していないリポソームでは粒径が増大し、Hbの漏出も80%に達することから、高分子脂質による安定性の向上は明らかである。

分散性を向上させるために、一例としてショ糖を50mM添加して凍結乾燥を行い、純水に再分散させたところ、平均粒径約200nmのリポソーム分散液にきわめて容易に復元することができた。

このように機能物質の内包に際しては、内包物質の溶液特性や、脂質分子、脂質膜との相互作用を考慮した条件設定が重要となる。また、高分子脂質を用いることにより、乾燥粉末としてもリポソームは十分に安定性を保持していることが明らかとされた。リポソーム表面は生体膜を構成する脂質成分と同じであり、生体適合性や安全性に優れ、反面、高分子脂質であるために内包物質の漏出や急速な代謝さらには皮膚細胞との直接相互作用を抑制し、角層～表皮～真皮へ緩慢に浸透するといった、皮膚用DDSに備えるべき機能が期待される。

引用文献

- 1) E. Tsuchida and H. Nishide, "Liposomes as Drug Carriers", Ed. by G. Gregoriades, p569, John Wiley, New York (1988).
- 2) H. Ohno, Y. Ogata, and E. Tsuchida, *Macromolecules*, 20, 929, (1987).
- 3) S. Takeoka, H. Ohno, N. Hayashi, and E. Tsuchida, *J. Control. Rel.*, 9, 177 (1989).
- 4) Y. Matsushita, K. Eshima, T. Shindo, Y. Yamamoto, E. Hasegawa, H. Nishide, and E. Tsuchida, *Biochim. Biophys. Acta*, 901, 166 (1987).
- 5) E. Tsuchida, H. Nishide, M. Yuasa, T. Babe, and M. Fukuzumi, *Macromolecules*, 22, 66 (1989).
- 6) S. Takeoka, N. Kimura, H. Ohno, and E. Tsuchida, *Polym. J.*, 22, 867 (1990).
- 7) H. Sakai, S. Takeoka, H. Yokohama, H. Nishide, and E. Tsuchida, *Polym. Adv. Tech.*, 3, 389 (1993).
- 8) H. Ohno, Y. Ogata, and E. Tsuchida, *J. Polym. Sci. Part A*, 24, 2959 (1986).
- 9) 牧野千里, 木村登, 長谷川悦雄, 土田英俊, 日化誌, 1991, 1102
- 10) 酒井宏水, 横浜裕明, 武岡真司, 西出宏之, 土田英俊, 輸血誌, 38, 322 (1992).
- 11) E. Tsuchida, *Biomat. Art. Cells Immob. Biotech.*, 20, 337 (1992).
- 12) S. Takeoka, K. Terase, H. Yokohama, H. Sakai, H. Nishide, and E. Tsuchida, *J. Macromol. Sci.*, (1993) in press.
- 13) J. F. Tocanne, and J. Teissie, *Biochim. Biophys. Acta*, 1031, 111 (1990).

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

多島新吾

Tropoelastin(65kd) was found to be converted to a lower molecular weight fragment (45kd) in the cultured medium in chick smooth muscle cell culture. The conversion was found to be time-dependent by pulse-chase experiment using cell culture system. This was also confirmed by chase experiment in test tube. These results indicate that the processing of tropoelastin was mediated by a protease present in the cultured medium. In fact the conversion was specifically inhibited by 1mM EDTA and not by NEM and PMSF. The processing of tropoelastin is of vital importance for understanding tropoelastin metabolism.

1. 緒言

老化に伴う皮膚の変化のうち senile elastosis (老人性弾力線維症)は老人の日光曝露部の皮膚真皮表層にエラスチン線維が蓄積する状態で、長期の紫外線照射によりエラスチン線維に何らかの異常が生じるために発生すると考えられている。現在まで、senile elastosis 中のエラスチン架橋(デスモシン, イソデスモシン)量が増加していること、エラスチン発現量に変化がないことがすでに知られている。この事実は局所のエラスチン合成活性には異常は認められず、合成後のエラスチンタンパクの修飾,あるいは分解に異常が存在していることを示唆する。エラスチンの分解過程はいまだ不明の点が多く主に白血球由来のエラスターゼが知られているのみである。また分解を受けたエラスチンペプチドがさらにどのような代謝をうけるのか、不明である。我々はエラスチンの分解物が組織中に比較的安定に存在し、かつその後架橋形成にも関与し、より不安定なエラスチン線維を形成するという仮定に基づき、まずエラスチン分解物の同定、分解メカニズムについて検討

を行った。

2. 実験

受精後20日目の鶏胚動脈より酵素消化法(コラゲナーゼ, エラスターゼ)を用いて平滑筋細胞を単離した。以下の実験には初代培養細胞のみを用いた。細胞がconfluentの状態になるまで10%牛胎児血清添加 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)にて培養した。0.5%牛胎児血清添加 DMEMにて48時間培養し、その最終6時間をバリリン不含 DMEM 中に [^3H]バリリン(60Ci/mmol)でタンパクを標識した。pulse-chaseの実験ではバリリンで標識後 cold バリリン(100 μM)をし加え chase した。バリリン以外では [^{35}S]メチオニン(1000Ci/mmol), [^3H]グルコサミン(50Ci/mmol), [^3H]マンノース(30Ci/mmol)で標識した。培地中のタンパクはプロテアーゼインヒビター(1mM EDTA, NEM, PMSF)中で30%硫酸で沈澱させ、4~15% gradient SDS polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)を行い、オートラジオグラフィーを行った。必要の場合

Elastin gene expression in the aged skin

Shingo Tajima

合デンシトメーターで各タンパクの相対量を比較した。

3. 結果

すでに我々は培養平滑筋細胞がフィブロネクチン、コラーゲンの他に分子量65kdのトロポエラスチン分子を活発に合成していることを報告した。今回の実験でトロポエラスチンより低分子のタンパク(45kd)を認め、このタンパクがトロポエラスチン由来のペプチドであることを各種標識RIおよびエラスチン抗体を用いて検討した。トロポエラスチンはすでに糖鎖を有さないこと、メチオニン残基を有さないこと、シスチン残基をC末端(Fig.1B, 矢印)に2残基有することがわかっている。65kd, 45kd.いずれのタンパクも、グルコサミン、マンノース、メチオニンのとりこみが認められず(Fig.1A; lane 1, 2, 3)またシスチンのとりこみが認められた(Fig.1A; lane4)。このことは45kd ペプチドはC末端が切断されたものでなくN末端から約20kdのフラグメントが切断されて

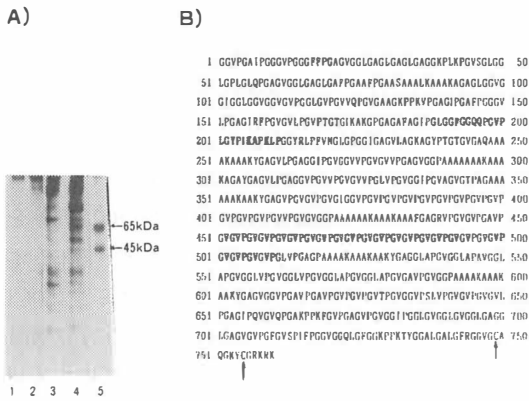


Fig.1A 各種 RI にて標識した培地中のタンパクのSDSPAGE 後オートラジオグラフィー。^[3H]グルコサミン (lane 1), ^[3H]マンノース (lane 2), ^[35S]メチオニン (lane 3), ^[35S]シスチン (lane 4) により標識した。非標識培地をトロポエラスチンモノクローナル抗体にて染色 (lane 5)。

1B cDNA より推定されるニトロエラスチンの全アミノ酸配列 (太線は alternate splicing をうける配列。矢印は C 末端に存在するシスチン残基)

生じる可能性が考えられた。タンパクをプロットしエラスチン抗体で染色した結果65kd, 45kd いずれのタンパクも特異的に検出された。以上の結果より45kd タンパクは65kd タンパクに由来する可能性が示唆された。一方エラスチン mRNA は multiple alternate splicing を認めることがすでに報告されている。アミノ酸配列では2カ所の配列が splice out される (Fig.1B 太文字) ことが報告されているが、いずれの配列の鎖長もたかだか62残基であり (約6.2kd) 65kd から45kd への変換は alternate splicing の産物による可能性は低いと思われた。したがって45kd ペプチドは65kd トロポエラスチンが合成されてから分解をうけて生じた産物であると考えられた。

45kd タンパクが65kd トロポエラスチンの分解産物であることを検討するために pulse-chase

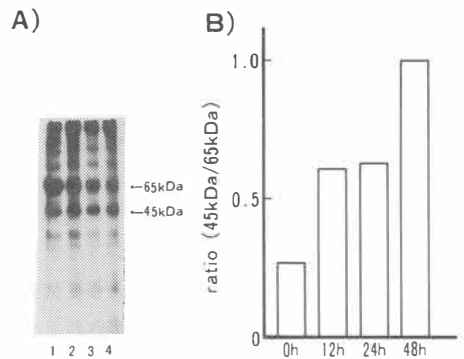


Fig. 2 pulse-chase 実験。培養平滑筋細胞を^[3H]バリンで6時間標識し0 (lane 1), 12 (lane 2), 24 (lane 3), 48 (lane 4) 時間 chase した。B は A の結果をデンシトメーターで定量した。

の実験を行った (Fig.2)。この結果 chase の時間経過とともに45kd の65kd タンパクに対する割合が増加していくことが示され45kd が65kd の分解により生じる可能性が考えられた。以上の結果をさらに証明するために65kd タンパクを DEAE セルロースカラムを用いて partially に精製し、同様の実験を行った。その結果 chase の時間とともに45kd の65kd に対する割合が増加していくことが判明した (Fig.3)。45kd が分解過程で生じるのに培地中に存在するプロテアーゼが関与している

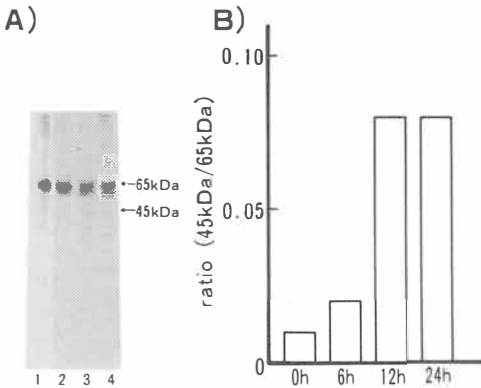


Fig. 3 partially purified tropoelastin を平滑筋細胞培地に加え、0(lane 1), 6(lane 2), 12(lane 3), 24(lane 4)時間 chase した。B は A の結果をデンストメータで定量した。

可能性を検討するために培地を試験管内で各種プロテアーゼインヒビター存在下で incubate して 65kd と 45kd の割合を検討した (Fig.4)。

その結果 NEM, APMSF では分解は抑制されず、EDTA 1mM 存在下においてのみ抑制された。このことは分解に関与する酵素は金属プロテ

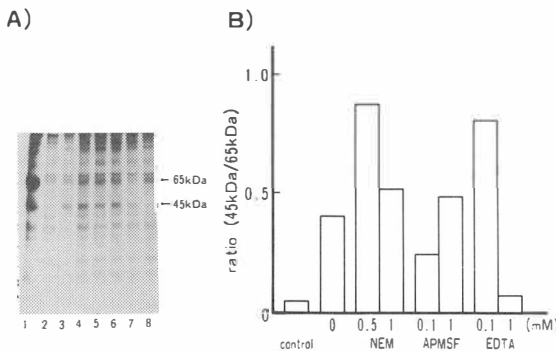


Fig.4A [³H]バリンで標識した培地を各種プロテアーゼ存在下で試験管内で反応させた結果のオートラジオグラフィー, lane 1; 培地中のタンパク。lane 2; 無添加で反応。lane 3,4; NEM 各々 0.5, 1mM 存在下で反応。lane 5,6; APMSF 各々 0.1, 1mM 存在下。lane 7,8; EDTA 各々 0.1, 1mM 存在下。B は A の結果をデンストメータで定量した。

アーゼによると考えられた。

4. 考察

今回の実験結果よりエラスチン分子は 65kd から 45kd へと低分子化をおこし、この分解は①比較的すみやかに培地中で生じる。②分解は at random に生じるのではなく、おそらく N 末端から約 20kd のフラグメントが切断される。③45 kd の分解物は比較的安定に存在している。④この分解はおそらく培地中に存在する金属プロテアーゼにより生じることが示唆された。現在エラスチンを分解する酵素としてエラステラーゼがよく知られている。この酵素は数種類のプロテアーゼの集合体であり、脾臓由来、多形核 (PMN) 白血球由来、マクロファージ由来のものが知られている。代表的な PMN エラステラーゼはセリンプロテアーゼに属しエラスチン以外にⅢ型コラーゲンを分解するなどの点より本実験で示唆されたプロテアーゼとは性状が異なると考えられる。マクロファージエラステラーゼは分泌型の金属プロテアーゼであるが¹⁾、本実験にマクロファージが混入している可能性は低い。したがって本実験の金属プロテアーゼは平滑筋細胞により分泌されるものと考えられた。

本実験で最も興味深い点は 45kd タンパクが安定であり、intact なエラスチンが形成されるに当たり 45kd 同士あるいは 65kd と 45kd タンパク同士が架橋を形成する可能性がある点である。今後不溶性エラスチンが沈着する細胞画分について 45kd タンパクの代謝という点から検討する予定である。

文献

- 1) Banda, M. J. and Werb, Z.: Biochem. J. 193, 589-605(1981).

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
佐々木 哲 雄

Since Werner's syndrome (WS) and progressive systemic sclerosis (PSS) have some similar phenotypic expressions, we performed a comparative study on the responsiveness of those cultured cells to basic fibroblast growth factor (bFGF). Skin fibroblasts were obtained by outgrowth culture of the biopsies from a WS and two PSS patients and used after only one passage in these experiments. The medium used was supplemented with fetal bovine serum in 10% all the time through these cultures. Cell proliferation was stimulated in the presence of bFGF to a similar extent in these three cell cultures (up to 2.5 times of the culture without it). Collagenase production per cell in the presence of bFGF was also increased; the responsiveness of WS cells was lower than that of PSS cells. The significance of this difference in the responsiveness to bFGF remains to be clarified.

1. 緒 言

Werner症候群(WS)は常染色体劣性遺伝性疾患で、いわゆる早老性症候群の代表的なものである¹⁾。WSはまれな疾患ではあるが、老化のモデル疾患としてのみならず、その独特の表現型、強皮症様皮膚所見、創傷治癒の遷延など極めて特徴的な所見を有する疾患として注目されている。WSの培養線維芽細胞を用いた研究は少なくないが、増殖因子に対する応答性を検討したものは少ない²⁾。

basic fibroblast growth factor (bFGF)はヘパリンに強い親和性を示す因子 heparin-binding (fibroblast) growth factor (HBGF)ファミリーの一つで、線維芽細胞や血管内皮細胞など多くの細胞に対して増殖促進活性を示す³⁾。

今回はWS細胞の細胞成長因子に対する応答性

として、bFGFに対する反応性を検討した。その対照細胞として、全身性強皮症(PSS)皮膚由来培養線維芽細胞を用いた。PSSは皮膚のみならず肺、食道をはじめ諸臓器の線維化を主徴とし、膠原病あるいは自己免疫疾患に分類されている⁴⁾が、皮膚症状の一部にWSと類似性がみられる⁵⁾ことから、両疾患患者皮膚由来細胞の比較を試みた。

2. 実 験

使用したbFGFはリコンビナントヒトbFGFで、科研製薬から供与を受けた。

対象とした患者はWS1例(以下同細胞をWSと記す)、PSS2例(同細胞をPSS1、PSS2と記す)で、皮膚生検もほぼ同時に行い、以後可能な限り同条件で培養した(表1)。すなわち、生検皮膚の一部から型の如く outgrowth culture⁶⁾を行い、

Responsiveness of Werner's syndrome cultured skin fibroblasts to growth factors

Tetsuo Sasaki

表1 対象患者と培養細胞

患者	性	生検時年齢	診断	生検部位	生検日	細胞	継代
S K	女	52	Werner	前腕伸側	1991.2.5	WS	1回
M E	女	64	PSS	前腕伸側	1991.2.4	PSS1	1回
I S	男	57	PSS	腹部	1991.2.4	PSS2	1回

WSとPSS1は3月19日に、PSS2は4月24日にそれぞれ24 well dishに継代した。継代は12-16日(WSは13日、PSS1は12日、PSS2は16日)後の培地交換時にbFGFを最終濃度0.1, 1, 10, 10², 10³, 10⁴(一部の実験)ng/mlとなるように各wellに加えた(day 0)。さらに3日後(day 3)に培地交換とともにday 0と同様にbFGFを添加した。その3日後(day 6)に培地を除去し、細胞蛋白質量の測定⁷⁾を行なった。なお、培地はDulbecco's Modified Eagle's Mediumを用い、胎牛血清(FBS)は常に10%で実験を行なった。Day 0, 3, 6に採取した各培養液は-20℃に保存した。培養液中に分泌されたコラゲナーゼの酵素活性はFITCで標識したI型コラーゲンを基質として既報⁸⁾のごとく測定した。

3. 結果

3.1 細胞増殖に対するbFGFの効果

Day 6における細胞蛋白質量の測定結果を表2に示した。いずれの細胞系においてもbFGF添加により、その濃度に依存して細胞増殖が促進される傾向がみられた。今回の細胞系では、いずれも最高でもbFGF無添加の場合の2.5倍前後(WSは2.6倍、PSS1は2.5倍、PSS2は2.2倍)であった(表2)。

3.2 コラゲナーゼ産生に対するbFGFの効果

bFGFは培養皮膚線維芽細胞のコラゲナーゼ産生を濃度依存的に増強させた。bFGF添加により培地1ml当たりに分泌されたコラゲナーゼ活性はPSS1>PSS2>>>WSであった(図1~3)。

表2 細胞蛋白質量に対するbFGFの効果*

細胞	bFGF (ng/ml)					
	0	0.1	1	10	10 ²	10 ⁴
WS	14.8(1)**	18.5(1.3)	27.3(1.9)	31.3(2.1)	21.2(1.4)	38.6(2.6) ND***
PSS1	41.8(1)	49.1(1.2)	61.8(2.2)	102.8(2.6)	78.3(1.0)	70.7(1.8) ND
PSS2	51.1(1)	38.5(0.8)	44.8(0.8)	89.2(1.7)	113.0(2.2)	90.0(1.8) 94.8(1.0)

* bFGFを0~10⁴ng/ml含有する培養液で6日間(3日後に1回培養液交換)培養後、細胞成分の蛋白質量を測定した(μg/well)。
 ** ()内にはそれぞれの細胞系におけるbFGF無添加の値に対する比率を示した。
 *** 旅行せず。

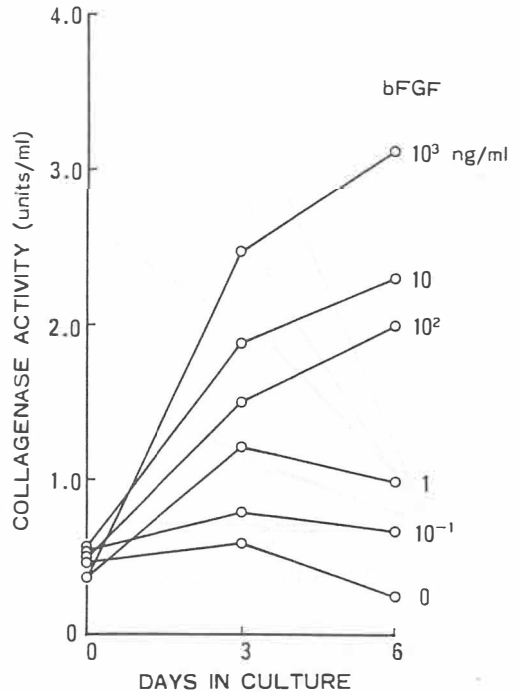


図1 WS線維芽細胞コラゲナーゼ産生に対するbFGFの効果

Day 0, 3, 6における培養液中に分泌されたコラゲナーゼ活性を培養液1ml当たりのunitとして示した(図2, 3も同様)。10ng/mlまで濃度依存性に産生が刺激された。

分泌されたコラゲナーゼ活性を細胞蛋白質量当たりで表わしてもその値は、PSS1>PSS2>>WSであった(表3)。しかしながら、各細胞系において、細胞蛋白質量当たりの分泌されたコラゲナーゼ活性をbFGF無添加の培地の同活性に対する比で示すとPSS1>>PSS2>WSとなり、PSS2とWSの差が減少し、PSS1とPSS2の差が拡大した(表3)。

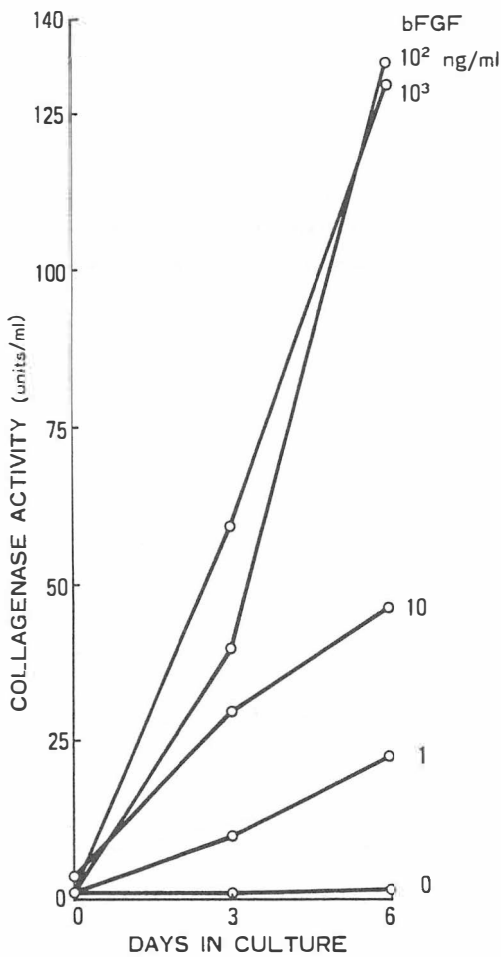


図2 PSS 1 線維芽細胞コラゲナーゼ産生に対する bFGF の効果
10² ng/ml まで濃度依存性に産生が刺激された。

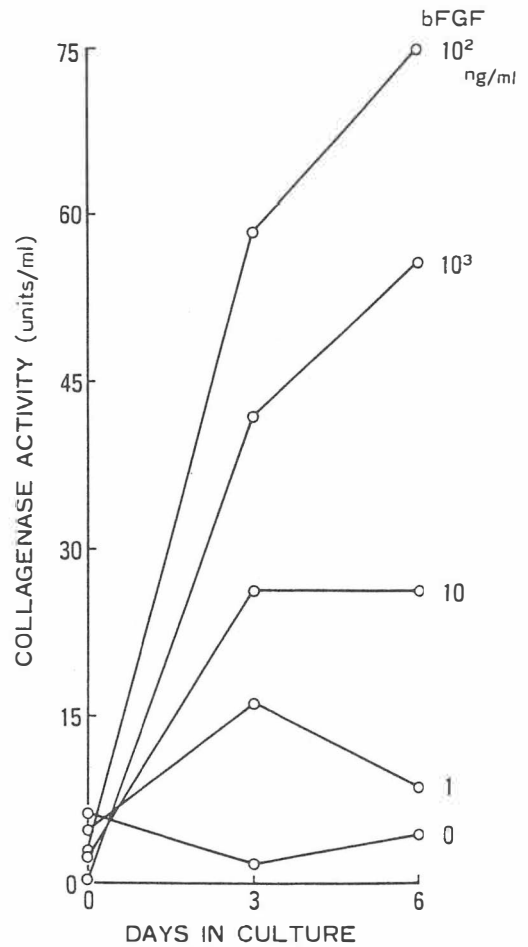


図3 PSS 2 線維芽細胞コラゲナーゼ産生に対する bFGF の効果
10² ng/ml まで濃度依存性に産生が刺激された。

表3 細胞当たりのコラゲナーゼ産生に対する bFGF の効果*

細胞	bFGF (ng/ml)					
	0	0.1	1	10	10 ²	10 ³
WS	17.8(1)**	36.5(2.1)	35.8(2.1)	73.6(4.3)	94.2(5.5)	81.2(4.7)
PSS1	33.0(1)	ND***	241.0(7.3)	450.5(13.7)	1698(51.5)	1691(51.2)
PSS2	87.4(1)	101.7(1.2)	187.6(2.2)	289.9(3.3)	663.0(7.6)	617.0(7.1)

* bFGFを0~10⁴ ng/ml含有する培養液で6日間(3日後に1回培養液交換)培養後、培養液中に分泌されたコラゲナーゼの活性を細胞蛋白量当りで示した(units/ng protein)。

** ()内にはそれぞれの細胞系におけるbFGF無添加の値に対する比率を示した。

*** 施行せず。

4. 考 察

WS 線維芽細胞は血小板由来増殖因子 (PDGF) や FGF の増殖刺激に対する応答性は低く(血清を涸渇させた場合), FBS(20%)の増殖刺激に対しては対照と変わらず充分に応答するという実験結果がすでに報告されている²⁾。今回我々は常に10%FBS存在下で培養を行なった。それが bFGF の細胞増殖刺激活性に対して WS と PSS ではほぼ同程度の応答性を示した事実の理由と思われる。1988年平井ら⁹⁾はその低応答性の理由とし

てWS細胞内における蛋白のリン酸化の低下が考えられるとした。1991年河野ら¹⁰⁾はWS細胞の増殖低下はPDGFレセプターの合成低下による可能性を示した。しかしながら、WS線維芽細胞におけるFGFのシグナル伝達に関する詳細な検討の報告はみられていない。

1992年Millisら¹¹⁾は、WS線維芽細胞およびin vitroで継代を重ねたヒト皮膚線維芽細胞においてはmetalloproteinase(コラゲナーゼとstromelysin)の遺伝子発現は亢進し、TIMPの発現は低下しているという成績を発表している。WS線維芽細胞においてはPDGFのコラゲナーゼ産生刺激に対して応答性が低下していることがすでに示されている²⁾が、bFGFのコラゲナーゼ産生に対する効果は我々の知る限りこれまで報告されていない。bFGFのコラゲナーゼ産生刺激効果に対する応答性もWSではPSSに比べて低下していることが今回の実験で示された。しかしながら、対照としたPSS1とPSS2でもその応答性に相当な差がみられたので、その意義は今後なお検討を要するものと思われる。

5. 総括

WSとPSSは皮膚症状など一部の表現型に類似性がみられるため、今回は両疾患患者皮膚由来培養線維芽細胞のbFGFに対する応答性を細胞増殖とコラゲナーゼ産生で比較した。対象はWS(52歳女性)とPSS(64歳女性, 57歳男性)で、同時に生検され、同様に1回継代された培養細胞にリコンビナントヒトbFGFを 10^4 ng/mlまで各種濃度に添加し、3日後、6日後に培養液中に分泌されたコラゲナーゼの活性を、6日後の細胞蛋白量をそれぞれ測定した。培養液中の胎牛血清は常に10%とした。コラゲナーゼ産生はbFGFにより濃度依存的に増強された。6日後の細胞蛋白量はbFGF添加により3種の細胞系でほぼ同程度に増加した(無添加の2.5倍前後)。6日後の細胞蛋白当たりのコラゲナーゼ産生をbFGF無添加の場合

と比較すると、PSS1, PSS2, WSの順にbFGFに対する応答性が強かった。このbFGFに対する応答性の差の意義は今後なお検討を要するものと思われる。

文献

- 1) Epstein, C. J., Martin, G. M., Schultz, A. L., Molsky, A. G. :Werner's syndrome. *Medicine*, 45, 177-201, 1966.
- 2) Bauer, E. A., Silverman, N., Busick, D. F., Kronberger, A., Deuel, T. F. :Diminished response of Werner's syndrome fibroblasts to growth factors PDGF and FGF. *Science*, 234, 1240-1243, 1986.
- 3) Burgess, W. H., Maciag, T. :The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 58, 575-606, 1989.
- 4) 佐々木哲雄 : 病気の生化学(170) 全身性強皮症。代謝, 27, 65-76, 1990.
- 5) 剣持つる代, 佐々木哲雄, 中嶋 弘 : Werner症候群と全身性強皮症との比較研究。横浜医学, 43, 115-119, 1992.
- 6) Sasaki, T., Arai, K., Ono, M., Yamaguchi, T., Furuta, S., Nagai, Y. :Ehlers-Danlos syndrome:a variant characterized by the deficiency of pro α 2 chain of type I procollagen. *Arch Dermatol.*, 123, 76-79, 1987.
- 7) Bradford, M. M. :A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254, 1976.
- 8) Nagai, Y., Hori, H., Hattori, S., Sasaki, T. : PMN-derived fibroblast-stimulating factor. In: *Mixed Connective Tissue Disease and Anti-nuclear Antibodies*, 229-234. Ed. R. Kasukawa and G. C. Sharp, Elsevier, Amsterdam, 1987.

- 9) Hirai, M., Amagai, M., Tajima, S., Nishikawa, T., Shimizu, N. :Mitogen-mediated protein phosphorylation in Werner's syndrome fibroblasts. *Cell Struc Func.*, 13, 471-480, 1988.
- 10) 河野幹彦, 森 聖二郎, 神崎哲人, 森崎信尋, 斎藤康, 吉田 尚 : Werner症候群における細胞増殖低下機構-血小板由来成長因子受容体との関連について-。日老医誌, 28, 233-234, 1991.
- 11) Millis, A. J. T., Hoyle, M., McCue, H. M., Martini, H. :Differential expression of metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase genes in aged human fibroblasts. *Exp Cell Res.*, 201, 372-379, 1992.

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

— Dithranol を例として

東京大学医科学研究所

金ヶ崎 士 朗

Radical species probably formed during autooxidation of dithranol, 1,8-dihydroxy-9-anthrone, are considered to be responsible for antipsoriatic effect of this drug. By using spin-trapping ESR spectroscopy, we investigated whether or not radical species, such as oxygen radical and organic radical, were generated in the presence of dithranol in organic solvent, in aqueous solution or after incorporation of the drug into keratinocytes. In DMSO, O_2^- was found to be formed from molecular oxygen with the aid of dithranol. The reaction was greatly enhanced by near-UV irradiation. In DMSO-PBS mixture, O_2^- was also formed but it rapidly converted to $\cdot OH$. After incubation of the drug with keratinocytes, organic radical was formed from dithranol. Microsome and mitochondria were found to be responsible for the formation. Although dithranol exhibited cytotoxicity, no indicative of lipid peroxidation was found. Since oxygen radical scavengers prevent cytotoxic effect of dithranol, at least a part of the cytotoxic effect is due to oxygen radical species.

1. 緒 言

Dithranol (1,8 dihydroxy-9-anthrone) はヒフの増殖性病変である乾癬の治療薬として古くから用いられている¹⁾。この化合物は強い還元作用を持ち、光や酸素によって容易に酸化されて10-anthranil radical に変化し、同時に一重項酸素あるいはスーパーオキシドアニオンのような活性酸素を生ずる。そしてこれらのラジカルや活性酸素が Dithranol の抗乾癬作用の要因であると報告されている^{2) 3)}。しかしながら、これまでの報告においては、Dithranol の酸化に際し生成される活性酸素種の正確な同定はなされていない。また、産生されるフリーラジカル種と細胞に対する生理活性との相関性も充分には解明されていない。

一方、ある種の anthraquinone 系化合物には発癌性・発癌 promotor 性のあることが知られており⁴⁾、それらの生理活性にフリーラジカルの関与を示唆するデータが蓄積されつつある^{5) 6)}。anthraquinone の一種である Dithranol には抗乾癬作用だけでなく、発癌 promotor 作用⁷⁾ や突然変異原性のあることも報告されている⁸⁾。

そこで本研究では、ESR 法によって、Dithranol の酸化過程で生成されるフリーラジカル種を同定し、それらのラジカル種の生成に対する光照射の影響を調べると共に、培養ケラチノサイト細胞を用い、Dithranol の細胞障害性とフリーラジカルの相関性を検討した。

OXYGEN RADICAL FORMATION DURING OXIDATION OF DITHRANOL AND ITS EFFECT ON KERATINOCYTES

Shiro Kanegasaki

2. 実験

Dithranol (Sigma 製) は使用直前に暗所で dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解した後、適当な溶媒で稀釈した。

Dithranol 由来の有機フリーラジカルの生成は直接 ESR スペクトルを測定した。

活性酸素ラジカル種は DMPO (5,5'-dimethyl-pyrroline-1-oxide) を用いたスピントラップ ESR 法⁹⁾ により検出した。

細胞内過酸化脂質ラジカルの生成を測定するためには、あらかじめ細胞に取り込ませた DHA (docosahexaenoic acid) 由来の過酸化脂質から生じるアルキルラジカルを POBN (2-(4-pyridyl-1-oxide)-1-N-tertbutylnitrone) でトラップし、その ESR スペクトルを測定する方法¹⁰⁾ を用いた。

フリーラジカル生成に対する光照射の実験には、キセノンランプ (Cermax 社 (米) 製, LX150-300, 150W, 10A, 波長範囲 300nm-900nm) を使用した他、昼光色蛍光灯も使用した。対照実験は完全に遮光した状態で行った。

細胞系としては、マウス皮膚上皮細胞由来のケラチノサイト (BALB/MK-2) を用いた。FBS 培養液中で 4日間培養した細胞をトリプシン処理し、遠心沈殿したペレットを PBS (-) で洗浄後同溶液に懸濁した。この細胞懸濁液に Dithranol を加え、添加直後および一定時間 incubate した後、直接並びにスピントラップ剤を加え ESR スペクトルを測定した。

Dithranol ラジカル生成に関与する細胞分画の検討に当たっては、上記の方法で集めたケラチノサイトを等張溶液中で超音波処理した後、遠心分離法によって mitochondria, microsome および cytosol の各分画を採取した。これらの分画に Dithranol を加えて incubate した後、細胞の場合と同様の方法で ESR スペクトルの測定を行った。

Dithranol の細胞障害性は、ケラチノサイト

に取り込ませた ^{51}Cr の放出を指標とした。96穴のプラスチックプレートにケラチノサイト (10^3 /穴) を移植し、3日間培養した。この細胞に ^{51}Cr -sodium chromate を加え 37°C 90分間 incubate した。細胞外の ^{51}Cr を培養液で洗浄除去した後、Dithranol を含む培養液で一定時間 incubate した後、培養液中の放射能と細胞中の放射能を別々に測定した。

Dithranol の細胞障害にフリーラジカルが関与するか否かを調べる実験では、上記のごとく ^{51}Cr を取り込ませた細胞を各種のフリーラジカルスカベンジャーないしはスピントラッパー存在下で Dithranol 処理し、 ^{51}Cr 放出量を比較した。

3. 結果および考察

1. Dithranol の自動酸化によるスーパーオキシドラジカルの生成とそれに由来する活性酸素種の生成

1.1 DMSO 中での反応

Dithranol を DMSO に溶解した直後に測定した ESR スペクトルを Fig. 1a に示す。スペクトルには O_2^- のスピニアダクトである DMPO-OOH のシグナルのみが観察された。スピニアダクトの生成は、嫌気的条件下では観察されず光照射の有無にかかわらず認められた。反応液を長時間暗所に放置した場合には DMPO-OOH のシグ

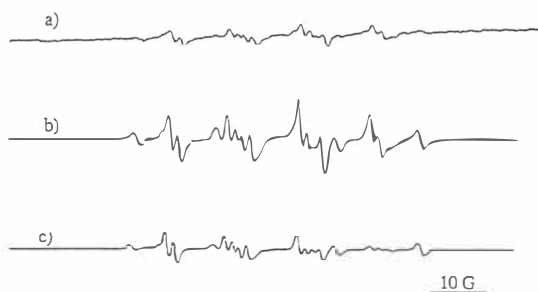


Fig. 1 Dithranol の DMSO 溶液に DMPO を添加した時に観察される ESR スペクトル
5mM Dithranol 溶液に 180mM DMPO を添加して測定。a) DMPO 添加直後, b) 暗所に 6 時間放置後, c) 蛍光灯下に 6 時間放置後。但し感度を 1/20 にして測定

ナルの他に $\cdot\text{OH}$ の生産を示唆する DMPO-CH_3 の小さなシグナルが見られた(Fig. 1b)。光照射条件下に放置した場合には DMPO-OOH のシグナル強度は約10倍近くまで増加し(Fig. 1c)、光照射が O_2^- 産生を著しく増強させることを示した。また、上記DMSO溶液中では、以下のDMSO-PBS(1:1)混合反応液中とは異なり、長時間光照射して放置しても $g=2.0$ の有機ラジカルは観察されなかった。この結果は O_2^- が直接には有機ラジカルの生成に関与しないことを示している。

1.2 DMSO-PBS(pH7.4)(1:1)混合液中での反応

Dithranol 溶液を調整した直後のスペクトルを Fig. 2a に示す。この場合主なシグナルは $\cdot\text{OH}$ 由来と思われる DMPO-CH_3 のシグナルで、この他に O_2^- 存在を示す DMPO-OOH の小さなシグナルが観察された(Fig. 2a)。反応液中にSODを加えておいた場合には DMPO-OOH のシグナルは観察されず(Fig. 2b)、 catalase 存在下では DMPO-CH_3 のシグナル強度は1/4に低下した(Fig. 2c)。さらに反応液中にSODと catalase を加えた場合には、 DMPO-OOH のシグナルも DMPO-CH_3 のシグナルも現れなかつ

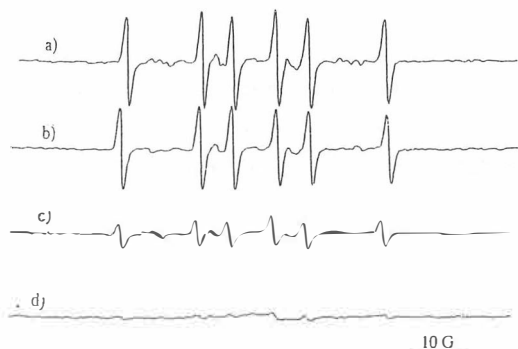


Fig. 2 DithranolのDMSO-PBS(1)溶液にDMPOを添加した時に観察されるESRスペクトルと活性酸素スカベンジャーの影響
5mM Dithranol溶液に180mM DMPOを添加して測定。a) 対照； b) 1000U/ml SOD添加，c) 5000U/ml catalase添加
d) SODとcatalase添加

た(Fig. 2d)。反応液に鉄のキレーターを加えた場合には DMPO-CH_3 シグナル強度がやや低下した。これらの結果から、Dithranolは水溶液中でも自動酸化されて O_2^- を生成する。しかし、水溶液中ではDMSO中と異なり、生成された O_2^- は、これから生じた H_2O_2 とのHarber-Weiss反応あるいは、反応液中に微量に含まれる鉄を触媒とするFenton反応によってすみやかに $\cdot\text{OH}$ に変換されることが示された。

反応溶液を長時間暗所に放置した場合には DMPO-OOH と DMPO-CH_3 のシグナルが観察されたのに対して昼色光下で放置した場合には、これらのシグナルに加えて $g=2.0$ の有機ラジカルが観察された(Fig. 3a)。反応液中にSODを添加しておくとそのシグナルの強度は増大し(Fig. 3b)、 catalase があると減少した(Fig. 3c)。DMSO100%の反応液中では反応液を長時間光照射することによって O_2^- 産生量が増加しても有機ラジカルは観察されなかったこと(Fig. 1c)および上記DMSO-PBS混合反応液中に catalase を加えておくと有機ラジカルの強度が半減したことを合わせて考えると、 $g=2.0$ の有機ラジカルの

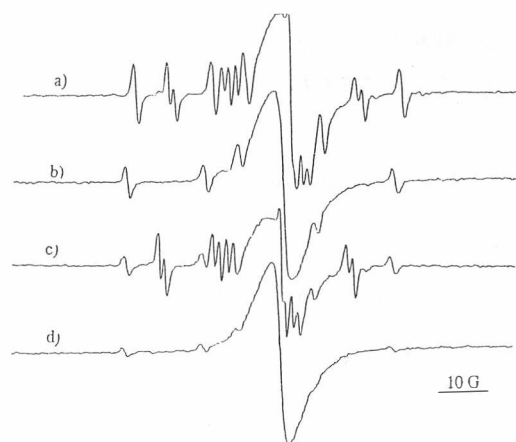


Fig. 3 Dithranol有機ラジカル生成に対する光照射の影響
60mM Dithranol溶液(DMSO-PBS(1:1))に a) 無添加，b) 1000U/ml SOD，c) 5000U/ml catalase，d) SODとcatalaseをそれぞれ加え，蛍光灯下に6時間放置後180mM DMPOを加えて測定。

生成には光が必要であるが O_2^- は直接関与せず、 H_2O_2 が関与していると考えられた。

昼色光下で見られた反応が近紫外光線によることを確かめるために、キセノンランプ(300nm以上)を用いて同様の実験を行った。結果はFig. 2の結果と同様で、反応液調製直後にはまずDMPO-OOHとDMPO-CH₃のシグナルが観察された(Fig. 4a)。この液を暗所に20分放置した場合のESRスペクトルは、調製直後のものとはほとんど変わらない(Fig. 4b)が、光照射下20分放置した場合にはDMPO-CH₃のシグナル強度は1/2に低下し、代って $g=2.0$ の有機ラジカルのシグナルが観察された。したがって昼色光下で観察されたフリーラジカルの生成が近紫外光線下で生じることが確かめられた(Fig. 4c)。

2. ケラチノサイト存在下でのフリーラジカルの生成とDithranolの細胞障害作用

2.1 培養ケラチノサイト細胞にDithranolを加えた反応液を室温でincubateした後DMPOを加えてESRスペクトルを測定したところ、DMPO-OOHのシグナルもDMPO-CH₃のシグナルも観察されず、 $g=2.0$ の有機ラジカルのシグナルのみが観察された。



Fig. 4 Dithranol溶液にキセノンランプを照射した時に観察されるESRスペクトル。
5mM Dithranol溶液(DMSO-PBS(1:1))に
a) 調製直後、b) 20分間暗所に放置後、およびc) 20分間キセノンランプ照射後180mM DMPOを添加して測定。

そこで、このラジカル生成に細胞成分が関与しているか否かを調べるために、細胞をhomogenateした後遠心分画し、mitochondria, microsome, cytosolおよびcell debrisの分画についてDithranolを加え、上記と同様の実験を行った。結果は、mitochondria, microsomeおよびcell debrisの存在下で有機ラジカルが観察され、Cytosolを加えた系ではラジカルのシグナルは観察されなかった。

2.2 ケラチノサイト中で脂質の過酸化反応が生じるか否かを調べた。Dithranolは水溶液中で O_2^- 、 $\cdot OH$ 、 H_2O_2 を生成することが明らかになったので、これらの活性酸素種存在下でケラチノサイト細胞膜において過酸化脂質が産生されるか否かを調べた。このため、あらかじめDHAを取り込ませたケラチノサイトにDithranolを作用させ、DHAから過酸化脂質が生成される時にまず産生されると考えられているアルキルラジカルをPOBNでトラップする方法で検討した。その結果、対照として二価鉄を加えた反応系ではPOBNのスピンアダクトが観察されたが、Dithranol添加反応系ではPOBNのスピンアダクトは観察されず、この条件下では細胞の脂質の過酸化反応が起こっているという証拠は得られなかった。

2.3 Dithranolの細胞障害性を⁵¹Crの放出を指標として調べた。あらかじめ⁵¹Crを取り込ませたケラチノサイトにDithranolを加えてincubateし、その間に放出される⁵¹Cr量を対照の細胞の値と比較した。0.5mM Dithranolで4時間後から有意に⁵¹Cr放出の増加が見られ(Fig. 5)、この濃度でDithranolに細胞障害性のあることが確かめられた。

2.4 Dithranol細胞障害性に対するフリーラジカルスカベンジャーの影響を調べた。2.3と同様の系に0.5mM Dithranol添加直前にSOD、

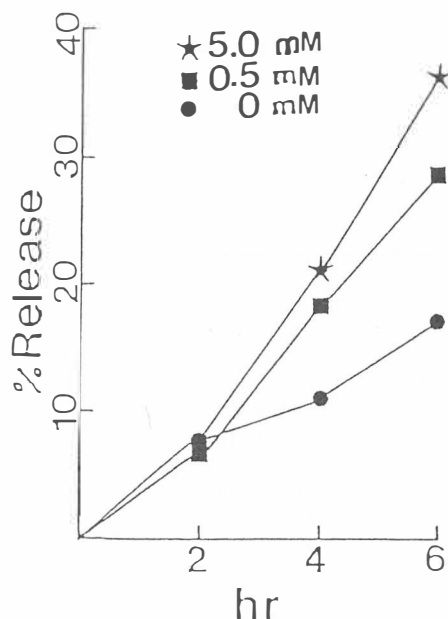


Fig. 5 培養ケラチノサイト細胞からの⁵¹Cr release に対するDithranolの影響。

catalase, POBN, DMPO等を加え、Dithranolによる⁵¹Cr放出の促進がこれらのフリーラジカルスカベンジャーの処理によって抑制されるか否かを調べた。この結果、SOD処理の場合にのみ約30%の低下が見られ、O₂⁻産生がDithranolの細胞障害性の一部に関与していることが明らかになった。

以上の結果から、Dithranolは水溶液中で自動酸化してO₂⁻を産生し、近紫外波長の光線はこのO₂⁻産生を促進すること、O₂⁻からは・OHが速やかに産生されることが明らかになった。さらに⁵¹Cr放出を用いた実験でケラチノサイトは、低濃度のDithranolによって傷害され、その原因の一部にはDithranol存在下で生成されるO₂⁻が関与していることが示された。

総括

- 1) Dithranolは酸素存在下で自動酸化によってO₂⁻を生成する。
- 2) 近紫外部から可視部に至る光線の照射はO₂⁻産生を増大させる。

- 3) 水溶液中でDithranol自動酸化により生成されたO₂⁻はH₂O₂をへて・OHに変換される。
- 4) H₂O₂存在下で光を照射するとDithranolから有機ラジカルが生成される。
- 5) ケラチノサイト存在下では、O₂⁻、・OHは検出されず有機ラジカルの生成が観察された。
- 6) ケラチノサイトにおける有機ラジカルの生成には細胞のmitochondria, microsome中の酵素の関与が推定された。
- 7) Dithranolは0.5mM、4時間処理でケラチノサイトの⁵¹Cr放出を促進した。
- 8) Dithranolによる⁵¹Cr放出の促進がSODによって低下したことからDithranolによる細胞障害性にO₂⁻が関与すると考えられる。
(研究実施者 上野郁子, 于徳山)

引用文献

- 1) Ashton, R. E., Andre, P., Lowe, N. J. and Whitefield, M. J. Am. Acad. Dermatol. 9, 173-192(1983).
- 2) Bruce, J. M., Kerr, C. W. and Dodd, N. J. F. J. Chem. soc. Faraday Trans, 1, 83 85-89 (1978)
- 3) Fuchs, J. and Packer, L. J. Invest, Dermatol. 92, 677-682(1989).
- 4) Uraguchi, K., Saito, M., Noguchi, Y., Takahashi, K., Enomoto, M. and Tatsuno, T., Food Cosmet. Toxicol. 10, 193-207(1972).
- 5) Akuzawa, S., Yamaguchi, H., Masuda, T. and Ueno, Y., Mut. Res. 266, 63-69(1992).
- 6) Ueno, I., Hoshino, M., Maitani, T., Kanegasaki, S. and Ueno, Y., Free Radical Res. Com. in press.
- 7) Boch, F. G. and Burns, R., J. Natl. Cancer Inst. 30, 393-397(1963).
- 8) Gillberg, B. O., Zetterberg, G. and Swanbeck, G., Nature 214, 415(1967).
- 9) Ueno, I., Kohno, M., Mitsuta, K., Mizuta, Y. and Kanegasaki, S. J. Biochem. 105, 905-910 (1989).
- 10) North, J. A., Spector, A. A. and Buettner, G. R. J. Biol. Chem. 267, 5743-5746(1992).

皮膚の糖脂質

山口労災病院

東京都臨床医学総合研究所

浜 中 すみ子 ・ 鈴木 實

Human epidermis gave two glycolipid bands that migrated faster than glucosylceramides and two bands that migrated like glucosylceramide and galactosylceramide, respectively, on TLC. The two faster migrating glycolipids (GL-I and GL-II), which exhibited alkali-lability, were purified by conventional DEAE and silica gel column chromatographies, and further by HPLC on a silica gel column. Structure determination of the two components, named GL-I 3 and GL-II 3, which were finally purified from GL-I and GL-II, respectively, by HPLC on a reversed column, was performed by means of $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy, fast atom bombardment mass spectrometry, and component analysis involving GLC-mass spectrometry. GL-I 3 was determined to be a mixture of glucosyl β 1-N-(ω -O-linoleoyl) triacontanoyl and -dotriacontanoyl-eicosasphingene, and one of the two components of GL-II 3 was determined to be glucosyl β 1-N-(ω -O-linoleoyl) triacontanoyl-trihydroxeicosasphingene. GL-I 3 and GL-II 3 were the major components of GL-I and GL-II, respectively, and both the latter contained additional four components, which were heterogeneous as to the ceramide portion. This paper reports the structures of acylglucosylceramides isolated from human epidermis together with $^1\text{H-NMR}$ spectra and mass spectra demonstrating their molecular weights. The structure of molecular species containing trihydroxysphingosine having a double bond is novel.

はじめに

1929年, BurrとBurrによって初めて必須脂肪酸の概念が提唱された¹⁾。ラットを無脂肪食で飼育すると, 皮膚の落屑, 体重減少, 不妊, 水分消費の増加, 尿量減少を生じ, 易感染性となり死に至る。これらの症状は ω -6不飽和脂肪酸(リノール酸, γ -リノレン酸, ジホモ γ -リノレン酸, アラキドン酸)の投与で著しく改善されることから, 生存に必須の脂肪酸の存在することが認識された。その後, 臨床的に必須脂肪酸欠乏症が注目されるようになったのは1970年代に高カロリーの非経口的栄養補液(経静脈投与)が盛んに行なわれるようになってからである²⁾。

臨床症状はリノール酸を50%含む大豆油を原料とした乳化脂肪の投与で改善された。必須脂肪酸欠乏時には多くの症状が報告されている³⁾が⁴⁾, 臨床的にとくに注目されるのは皮膚症状, 易感染性⁵⁾, 血小板数減少およびその機能低下, 体重増加不良などがあげられる⁶⁾。これらの症状のうち体重減少, 尿量減少, 水分消費の増加は皮膚からの水分漏出の結果生じる二次的変化であり, 水分漏出はリノール酸を外用するだけでも阻止できることが明らかとなると, 皮膚に水分漏出を防ぐ保護バリアーが存在するのではないかと想定されるようになった⁷⁾。

Glycolipids of Mammalian Epidermis

Sumiko Hamanaka · Minoru Suzuki†

1. 皮膚脂質の研究

人体の約70%を占める水分を保持し、紫外線や異物・微生物などから人体を保護することは皮膚の重要な機能である。皮膚が基底細胞、有棘細胞、顆粒細胞と分化し、最終的に角質細胞となって角層を形成する目的の1つは、角層で水分保護バリアー (transepidermal water permeability barrier) をつくることである(図1)⁶⁾。角層には細胞間に脂質の層状構造 (intercellular lipid lamellae) が観察され、この脂質構造がバリアーの本体であろうと考えられている⁷⁾。角層を構成する脂質はトリグリセリド、セラミド、ステロール、ステロール/ワックスエステル、アルカン、スクワレンであり、リン脂質や糖脂質はほとんど含まれていない(表1)⁸⁾。角層の脂質はセラミドを豊富に含み、しかもセラミドの分子種は7種と多様である。もっとも特徴的なセラミドはアシルセラミドであり、酸アミド結合脂肪酸が ω -ヒド

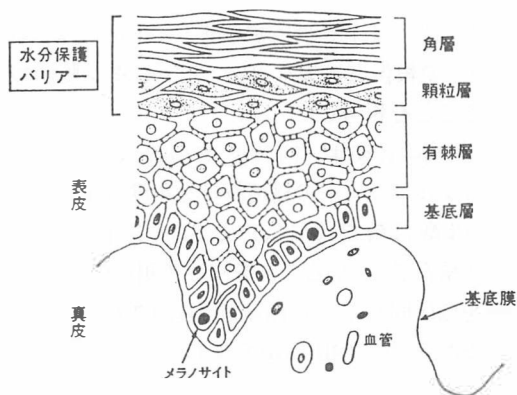


図1 皮膚の構造
基底層、有棘層、顆粒層、角層は、それぞれ基底細胞、有棘細胞、顆粒細胞、角質細胞よりなる。〔標準皮膚科学(医学書院)を一部改訂〕

表1 ヒト表皮細胞の脂質組成

脂質	基底層/ 有棘層	顆粒層	角層
極性脂質	44.5	25.3	4.9
コレステロール硫酸塩	2.6	5.5	1.5
中性脂肪	51.0	56.5	77.7
遊離ステロール	11.2	11.5	14.0
遊離脂肪酸	7.0	9.2	19.3
トリグリセリド	12.4	24.7	25.2
ステロール/ワックスエステル	5.3	4.7	5.4
スクアレン	4.9	4.6	4.8
n-アルカン	3.9	3.8	6.1
スフィンゴ脂質	7.3	11.7	18.1
グルコシルセラミド	3.5	5.3	trace
セラミド	3.8	8.8	18.1
計	99.1	101.1	99.3

ロキシ脂肪酸で、その ω 末端にリノール酸がエステル結合をしている⁹⁾。

このアシルセラミドは脂質を層状に構築するのに必要であろうと考えられている。バリアーを形成する脂質がどこから由来するのか明らかにするために緻密な電顕的観察が続けられた結果、顆粒細胞に存在する小器官である層板顆粒 (lamellar body, keratinosome, cementosome, Odland body, membrane coating granule などの名称でよばれる) で生成されることが明らかとなった¹⁰⁾。層板顆粒は100~300nmの球形ないし卵形の顆粒で、生体膜に包まれ、内部にdiscと表現される層状構造をもつ(図2)¹¹⁾。内容物はクロロホルム-メタノール処理により消失すること¹²⁾、水分の保持能力が衰えた皮膚では層板顆粒は空虚となること¹³⁾から内容物は脂質であり、水分保護に重要な役割を担うことが推定された。電顕的に、層板顆粒がゴルジ体から細胞膜へと移動し、膜と融合したのち内容物を細胞外の角層直下に放出するのが観察された。放出された層板構造物は角層細胞間に伸展し、層状脂質となる(図3)¹⁴⁾。

* 1 ①肉眼的所見：成長停止，体重減少，皮膚乾燥，落屑，肥厚，脱毛，生殖異常，血尿，創傷治癒遅延，易感染性など。②顕微鏡的所見：皮膚の角質異常，肝の脂肪浸潤，腎壊死など。③生理・生化学的所見：水分消費量や基礎代謝の増加，血小板減少症，血清および各臓器脂肪酸構成の変化，細胞膜透過性の変化，ミトコンドリア細網内皮系などの機能変化など。

* 2 必須脂肪酸欠乏時には肺炎に罹患しやすい。

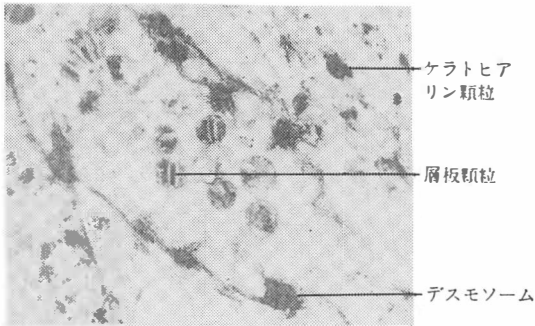


図2 顆粒細胞の電顕像
層板顆粒を示す。〔Dermatology, Sandoz 著
(Medical Publications)より抜粋〕

表皮脂質の分析が進むにつれ、顆粒層で糖脂質が増加すること(表1)、さらに層板顆粒にはめずらしい糖脂質アシルグルコシルセラミドが豊富に存在し、角層に至ると糖脂質が消失することが明

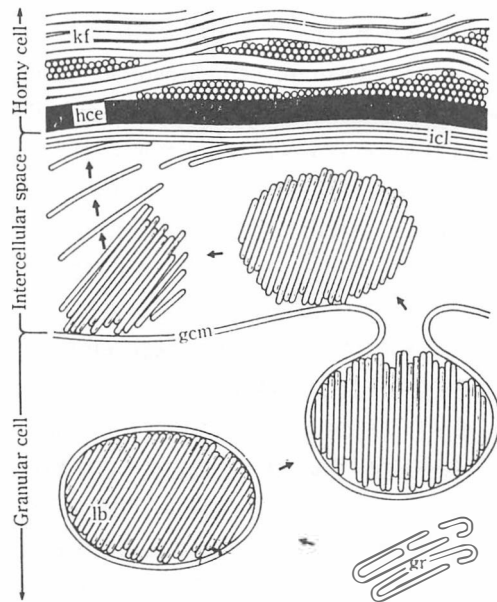


図3 水分保護バリアーとしての脂質構造が形成される過程の電顕的模式図¹⁴⁾
Granular cell : 顆粒細胞, Intercellular space : 細胞間隙, Horny cell : 角質細胞, gr : ゴルジ体, gcm : 顆粒細胞膜, icl : 細胞間層状脂質, hce : 角質細胞膜, kf : ケラチンフィラメント, lb : 層板顆粒。

らかとなった。このことから、表皮では糖脂質は細胞分化に従って著明に変化し、また、水分保護バリアーである層状脂質に形成するために、まずアシルグルコシルセラミドが合成され、ついで糖が切断されアシルセラミドとなることにより、重要な脂質成分の1つが供給されていると考えられる。そこで、表皮糖脂質の解析、とりわけアシルグルコシルセラミドの解析が注目された。

2. 表皮糖脂質の構造研究

Grayはブタとヒト表皮から糖脂質を単離・構造解析を行ない、各種グルコシルセラミドの構造解析に関して報告した¹⁵⁾。これらグルコシルセラミドはシリカゲルTLC上で4成分に分離され、このなかでもっとも非極性な成分はグルコースの3位に脂肪酸を有するアシルグルコシルセラミドであることを示した。そしてこの脂肪酸はリノール酸が主で、ブタで77.4%、ヒトで56.2%を占めることを報告した¹⁶⁾。1983年、Downingらのグループはブタ表皮を用いて追試を行ない、その結果、セラミドを構成する酸アミド結合脂肪酸はGrayの報告とは異なり ω -ヒドロキシ脂肪酸であることを報告した¹⁷⁾。

2年後の1985年、同グループは、このアシルグルコシルセラミドの構造解析を再度行なって、リノール酸は糖ではなく ω -ヒドロキシ脂肪酸とエステル結合をしていることを初めて明らかにした¹⁸⁾。時をほぼ同じくしてBowserらのグループがブタ表皮から¹⁹⁾、内田らがモルモット表皮から²⁰⁾、ほぼ同様の構造のアシルグルコシルセラミドを検出し報告した。他にラット²¹⁾、ウマ²²⁾のアシルグルコシルセラミドも解析された。

これらの研究結果から、哺乳類の表皮糖脂質には以下の特徴が認められた(図4)。

①動物種属間に差は認められない。②糖脂質は薄層クロマト上で4成分検出され、これらはすべて糖としてグルコースをもつ。③主成分はアシルグルコシルセラミドであり、その構造はグルコー

で分離すると6成分に分けられた。アルカリ処理を行なってTLCで分析してみると、非極性の2成分(Rf値の大きい成分をGL-I, 小さい成分をGL-IIとする)はRf値のより小さい糖脂質となった(図6)。その際, GL-IとGL-IIはそれぞれ脂肪酸を遊離していた。遊離脂肪酸はリノール酸であり, 他の脂肪酸は検出されなかった。GL-IとGL-IIの構成糖はおのこのグルコース1糖であった。すなわちヒト表皮糖脂質には2成分のアシルグルコシルセラミドが存在し, エステル結合脂肪酸はリノール酸であると結論された。

GL-I, GL-IIをODSカラムを用いたHPLCで精製したところ, それぞれ大きく5成分に分離された。HPLCクロマトグラムから各成分の構成比を算出し, GL-Iの主成分であるGL-I3とGL-IIの主成分であるGL-II3について構造解析を行なった。GL-I3およびGL-II3の負イオンFAB(高速原子衝撃)マススペクトルでは, 擬似分子イオン($[M-H]^-$)が m/z 1200および1226(図7A), m/z 1216および1242(図7C)にそれぞれ明瞭に検出されている。さらにマトリックスである3-ニトロベンジルアルコール(NBA)が分子に付加したことに起因するイオン($[M+MBA]^-$)も m/z 1354および1380(図7A),

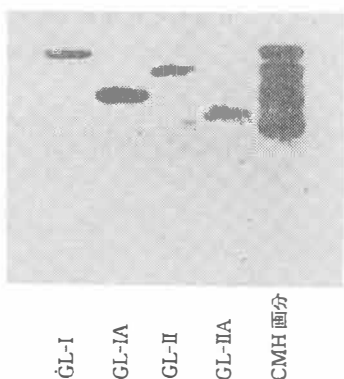


図6 アルカリ処理をほどこしたGL-IとGL-IIの薄層クロマトグラム
GL-I A: アルカリ処理後のGL-I, GL-II A: アルカリ処理後のGL-II。CMH画分: ヒト表皮糖脂質のセラブロシド画分。

m/z 1370および1396(図7C)にそれぞれ観察されている。このことからGL-I3およびGL-II3はそれぞれ, 分子量1201および1227と, 1217および1243の混合物であることがわかった。

次に, アルカリ処理後のFABマススペクトルでは($[M-H]^-$)および($[M+NBA]^-$)に起因するピークが262amuシフトした形(m/z 938および964と m/z 1092および1118(図7B), m/z 954および980と m/z 1108および1134(図7D)]で出現している。アルカリ処理後のこの262amuの質量差は, リノール酸脱離の質量差に完全に一致している。

これらGL-I3およびGL-II3の 1H -NMRスペクトルでは, とともに共通して出現しているシグナル, すなわちシグナルe (2.30ppm: エステル結合カルボニル基の α -メチレンプロトン), f (2.77ppm: 二重結合間のメチレンプロトン), g (4.06ppm: エステル結合に隣接したメチレンプロトン)が観察されている(図8)。常法に従ってアルカリ処理を施し, ODSカラムで精製したあとのそれぞれの 1H -NMRスペクトルでは, シグナ

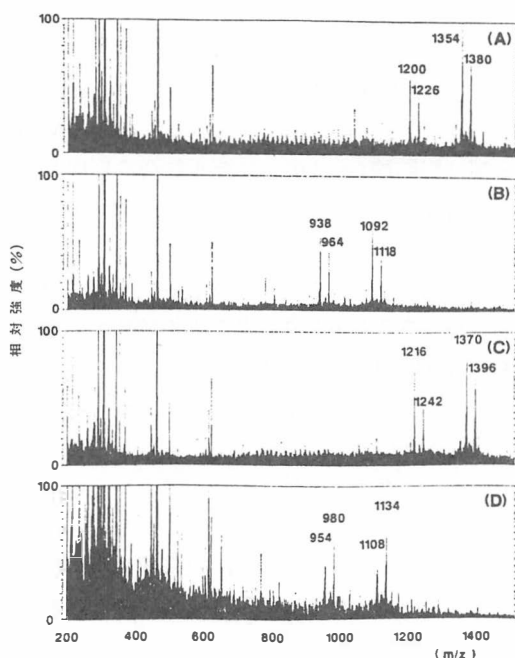


図7 負イオンFABマススペクトル
(A)GL-I3 (B)アルカリ処理後のGL-I3, (C)GL-II3, (D)アルカリ処理後のGL-II3。

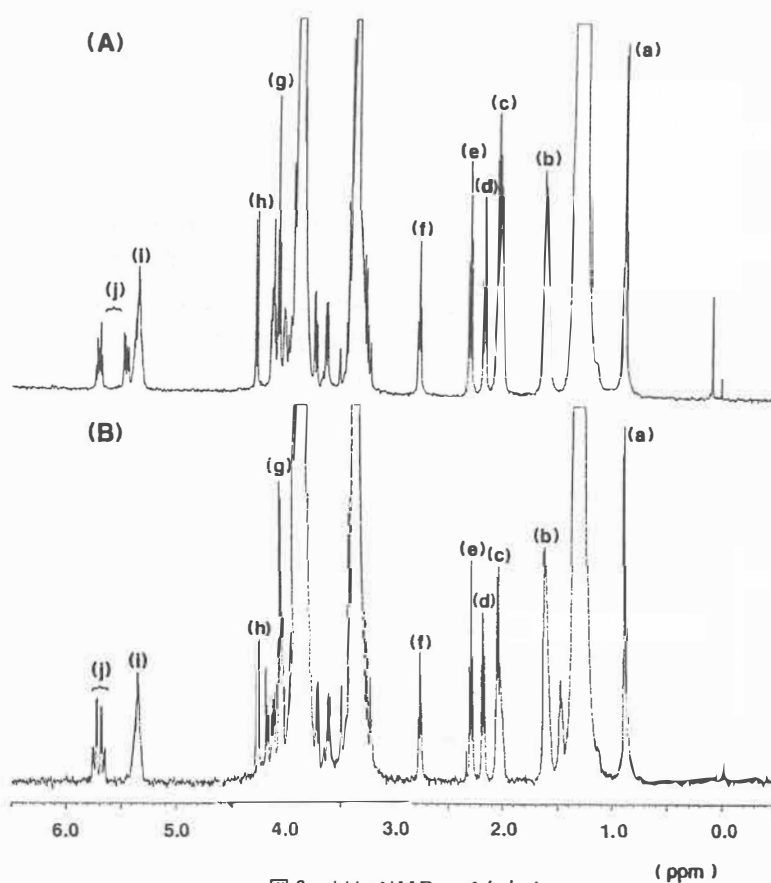


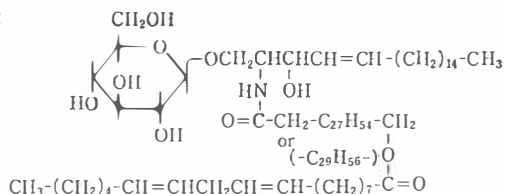
図8 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル
(A) GL-I3, (B) GL-II3.

ル e と f は消失し、かつ g は 3.63ppm に高磁場シフトする。このことは各アシルグルコシルセラミドがアルカリ処理により脂肪酸すなわチノール酸を遊離した結果 ω -ヒドロキシ基が新たに生成していることを示している。またアルカリ処理によりシグナル a では 2 個のメチル基 (6H) が 1 個分 (3H) 減少していることも上述の結果を支持している。さらにアルカリ処理によりシグナル i の強度はそれぞれ約 25% 減少したことから、シス二重結合由来のプロトンの 75% がリノール酸由来で、残り 25% が酸アミド結合の ω -ヒドロキシ脂肪酸由来であろうと考えられた。GL-I3 のシグナル j は、スフィンゴシンのトランス二重結合由来であるものの、一方 GL-II3 における j は上述のものと異なり、フィトスフィンゴシンに存在するト

ランス二重結合由来であろうと考えられた。

次に、GLC/MS を用いてセラミド側の構造解析を行なった。アシルグルコシルセラミドのセラミドを構成する ω -ヒドロキシ脂肪酸は、前述の FAB マススペクトルから得られた分子量を考慮すると、きわめて長鎖なものであろうと考えられた。そこで TMS 誘導体に比べ安定で、かつ低温で分析可能なメチル誘導体として GLC/MS 分析を行なった。加えて、このメチル誘導体のマススペクトルは、特徴的なフラグメントイオンを生成することが知られており、解析が容易になると予測された。アルカリ処理後の GL-I3 および GL-II3 の GLC/MS 分析の結果、GL-I3 のスフィンゴシン塩基は d20:1、酸アミド結合 ω -ヒドロキシ脂肪酸は C30:0 および C32:1 と同定された。

GL-I3 :



GL-II3 :

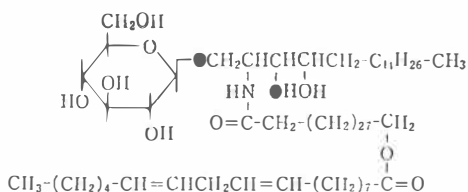


図9 ヒト表皮アシルグルコシルセラミド(エピデルモシド)の構造

このことは、GL-I3のセラミド部分はd20:1-C30:0-C18:2およびd20:1-C32:1-C18:2の2種類の存在を示しており、この結果は前述のFAB/MSの結果ときわめてよく一致している。一方、GL-II3では、スフィンゴシンは二重結合の位置はまだ決定されていないものの、t20:1、 ω -ヒドロキシ脂肪酸としてはC30:0が同定された。GL-I3はこれまでブタ、モルモットで確認され、ウマ、ラットにも共通する物質である。しかしGL-II3はこれまで報告されていない糖脂質であり、ヒト表皮に特有のアシルグルコシルセラミドである可能性がある(図9)。このような表皮特有のアシルグルコシルセラミドに対し、エピデルモシドと命名した。

おわりに

必須脂肪酸欠乏時では、エピデルモシドのアシル基はオレイン酸に置き換わっているのが観察されたこと²⁵⁾、アラキドン酸を投与しても、エピデルモシドのアシル基はリノール酸であったこと(アラキドン酸がリノール酸にretroconversionされている)²⁶⁾から、表皮はリノール酸を必須としていることは明らかである。リノール酸はエピデルモシドという表皮特有の糖脂質の必須成分と

して生体に要求される脂肪酸であったと結論される。エピデルモシドは明らかに機能を有する糖脂質であり、その特有な構造が、層板顆粒内の脂質をディスク状に保つように役だっていることが想像されるが、詳しい局在、他の成分とどのように相互作用して脂質の層板構造をつくるのか、長鎖の ω -ヒドロキシ脂肪酸とリノール酸のエステル結合でなければならないのはなぜなのか、水分保持の分子機作は何なのかなど、今後の研究に期待したい。

また、必須脂肪酸欠乏時、あるいは高カロリー補液時に投与される乳化脂肪の役割が、ともすればエネルギー論に偏りがちな今日の医療において、リノール酸はそれ自身、人体に必須要素であることを強調しておきたい。

本研究は山口大学医学部皮膚科の麻上千鳥教授、東京都臨床医学総合研究所の鈴木明身博士(生体膜)、稲垣冬彦博士(生理活性物質)各氏との共同研究であり、ここに深謝します。また、つねに暖かいご支援をいただいた恩師山川民夫先生に深謝いたします。

文献

- 1) Burr, G. O., Burr, M. M. : *J. Biol. Chem.*, 82, 345-367(1929)
- 2) Collins, F. D., Sinclair, A. J., Royle, J. P., Coats, D. A., Maynard, A. T., Leonard, R. F. : *Nutr. Metabol.*, 13, 150-167(1971)
- 3) 田代亜彦・真島吉也・山森秀夫・林田和也・堀部和夫・奥井勝二 : 小児外科, 19, 1013-1021(1987)
- 4) 村上龍助・藤田 位・木村彰宏・中村 肇 : 日新生児会誌, 17, 404-411(1981)
- 5) Hansen, H. S. : *TIBS*, 11, 263-265(1986)
- 6) Elias, P. M. : *Arch. Dermatol. Res.*, 270, 95-117(1981)
- 7) Lavker, R. M. : *J. Ultrastr. Res.*, 55, 79-86(1976)
- 8) Lampe, M. A., Williams, M. I., Elias, P. M. : *J. Lipid Res.*, 24, 131-140(1983)

- 9) Wertz, P. W., Swartzendruber, D. C., Abraham, W., Madison, K., Downing, D. T. : *Arch. Dermatol.*, 123, 1381-1384(1987)
- 10) Van Golde, L. M. G., Van den Bergh, S. : in *Lipid Metabolism in Mammals*(ed. Snyder, F.), Vol.1, pp.1-33, Plenum, New York (1977):Gan-Elepano, M., Aeberhard, E., Mead, J. F.: *Lipids*, 16, 790(1981)
- 11) Odland, G. F. : *J. Invest. Dermatol.*, 34, 456 (1966)
- 12) 鈴木啓之・石川勝利 : 日皮会誌, 83, 616(1973)
- 13) Tezuka, T.: *Dermatologica*, 166, 57-61(1983)
- 14) Wertz, P. W., Downing, D. T. : *Science*, 217, 1261-1262(1982)
- 15) Feay, G. M., White, R. J. : *J. Invest. Dermatol.*, 70, 336-341(1978)
- 16) Gray, G. M., White, R. J., Major, J. R. : *Biochim. Biophys. Acta*, 528, 127-137(1978)
- 17) Wertz, P. W., Downing, D. T., : *J. Lipid Res.*, 24, 753-757(1983)
- 18) Abraham, W., Wertz, P. W., Downing, D. T. : *J. Lipid Res.*, 26, 761-766(1985)
- 19) Bowser, P. A., Nugteren, D. H., White, R. J., Houtsmuller, U. M. T., Prottey, C. : *Biochim. Biophys. Acta*, 834, 419-428(1985)
- 20) Uchida, Y., Iwamori, M., Nagai, Y. : *Jpn. J. Exp. Med.*, 58, 153-161(1988)
- 21) Wertz, P. W., Cho, E. S., Downing, D. T. : *Biochim. Biophys. Acta*, 753, 350-355(1983)
- 22) Wertz, P. W., Colton, S. W. -Vi, Downing, D. T : *Comp. Biochem. Physiol. [B]*, 75, 217-220 (1983)
- 23) Hamanaka, S., Yamaguchi, Y., Yamamoto, T., Asagami, C. : *Biochim. Biophys. Acta*, 961, 374-377(1988)
- 24) Hamanaka, S., Asagami, C., Suzuki, M., Inagaki, F., Suzuki, A. : *J. Biochem.*, 105, 684-690(1989)
- 25) Melton, J. L., Wertz, P. W., Swartzendruber, D. C., Downing, D. T. : *Biochim. Biophys. Acta*, 921, 191-197(1987)
- 26) Hansen, H., Jensen, B., von Wettstein-Knowles, P. : *Biochim. Biophys. Acta*, 878, 284-287(1986)

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

瀬崎 仁・山下 富義・橋田 充

For the rational design of formulation of substances which affect physiological function of skin, it is important to establish analytical methods for their percutaneous absorption. A physiological skin diffusion model considering the first stratum corneum layer with polar and nonpolar routes and the second viable epidermis plus dermis layer combined with blood vessel compartment was constructed, and the corresponding Laplace transformed equations for percutaneous penetration in the finite dose system were derived from the Fick's diffusion law. By employing the numerical inversion of these image equations to the real time course by the fast inverse Laplace transform (FILT) algorithm, percutaneous penetration of drugs was theoretically discussed in connection with their lipophilicities. In addition, the mechanisms of action of penetration enhancer, which has been the most promising in the methodology for the enhancement of percutaneous absorption of impermeable drugs, were analyzed. Based on these analytical results, the fundamental directions for the use of an enhancer in formulations of various drugs was systematized.

1. 緒言

近年、皮膚生理機能の賦活を目的とした各種薬物(化粧品素材)の開発が活発に進められているが、これらを科学的合理性に基づいて実用化するためには、その皮膚透過性を客観的に評価し制御するための方法論の確立が重要である。しかしながら、現在一般に用いられている薬物皮膚透過の評価解析法は、Fickの第二式に基づく時間次元の解析解の誘導に大きな制限があるために薬物適用を懸濁条件下(infinite dosing)に固定し、かつ皮膚を均一な一枚膜とみなしたモデルで解析するか、皮膚を二枚膜とみなした場合はグラフ法で解析するしか方法がなく、実際のin vivoにおける皮膚透過現象の評価、解析、予測とは大きな隔たりを残している。これらの結果として、吸収促進の機構解明も進んでおらず、吸収改善法の開発も試行錯誤的アプローチの段階にとどまっているのが現

実である。

本研究では、以上のような現状認識の上に立って、薬物や化粧品素材の皮膚透過現象を物質拡散を基本として統一的に解析することを目的とし、高速ラプラス逆変換アルゴリズムを利用することによって、皮膚の解剖学的特性に基づいた複合的な拡散モデルと実験結果として得られる透過データとの統合を行った。具体的には、先ずin vitroおよびin vivo系に対応する皮膚透過モデルの考案およびラプラス次元での解析解の誘導を行い、その後実験で得られた透過データの解析から皮膚の特性データを抽出し、透過促進法の機構解明とそれに基づく合理設計を試みた。

2. モデルの構築と薬物皮膚透過のシミュレーション

薬物の経皮吸収パターンを精度良く予測できる

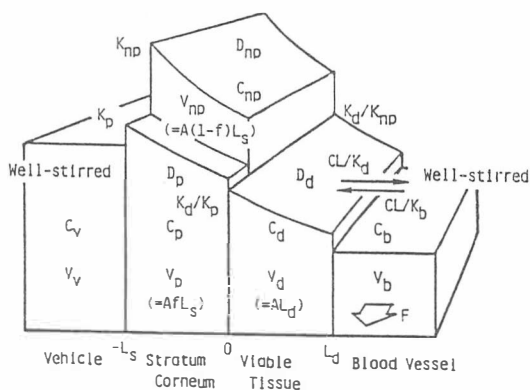
Establishment of the Analytical Method for Percutaneous Absorption of Substances Which Affect Physiological Function of Skin

Hitoshi Sezaki, Fumiyoshi Yamashita and Mitsuru Hashida

手段を開発するためには、皮膚の生理学および解剖学的な構造を踏まえた上で、薬物の経皮吸収機構を *in vitro* から *in vivo* までを包括的に説明できる経皮吸収モデルを構築しなければならない。そこで、先ず薬物経皮吸収に関するこれまでの知見をもとに生理学的皮膚拡散モデルを構築し、モデルに基づいた解析解の誘導を行った。

2.1 生理学的皮膚拡散モデルの構築および理論式の誘導

薬物の皮膚透過経路としては、大きく角質層を透過する経路と毛穴等を透過する経付属器官経路の二つに分けられている。Scheuplainらは一連の *alkanol* を用いて *in vitro* 皮膚透過実験を行い、親水性の高い *alkanol* では透過係数が炭素数の増加によらず一定であるのに対し、ある程度の炭素数を有する *alkanol* では炭素数の増加に伴い透過係数が増大することを報告している¹⁾。角質層を透過した薬物は、さらに生きた表皮および真皮上部を透過後脈管系に入り全身系へ運ばれるが、非常に親油性の高い薬物では、角質層に対する親和性が高く相対的にこれらの層が律速過程となることが知られている²⁾。



D: Diffusion Coefficient A: Effective Area
 K: Partition Coefficient f: Area Fraction
 C: Concentration CL: Clearance
 V: Volume F: Blood Flow
 L: Diffusion Length

Fig.1 Physiological Skin Diffusion Model

そこで我々は、これらの研究結果を説明可能なモデルとして、皮膚に投与された薬物が角質層の極性および非極性経路を拡散し、さらに連続する過程として、生きた表皮および真皮の拡散、血管壁透過、血流による運び去りを受けると仮定した皮膚拡散モデルを構築した(Fig.1)。

薬物は *finite* 系で投与され、基剤中および血管コンパートメント中で *well-stirred* 状態にあると仮定した場合、各層において以下に示す Fick の式、初期条件および境界条件は次のように表すことができる。

Fick の式 :

$$\frac{\partial C_v}{\partial t} = D_p \left(\frac{\partial^2 C_p}{\partial x^2} \right) \quad \frac{\partial C_{np}}{\partial t} = D_{np} \left(\frac{\partial^2 C_{np}}{\partial x^2} \right) \quad \frac{\partial C_d}{\partial t} = D_d \left(\frac{\partial^2 C_d}{\partial x^2} \right)$$

初期条件 :

$$C_v = C_0 \quad C_p = C_{np} = C_d = C_b = 0$$

境界条件 :

$$x = -L_s$$

$$V_d \left(\frac{dC_b}{dt} \right) = \left(\frac{CL}{K_d} \right) C_d - \left(\frac{CL}{K_b} \right) C_b - FC_b$$

$$-D_d \left(\frac{\partial C_d}{\partial x} \right) = \left(\frac{CL}{K_d} \right) C_d - \left(\frac{CL}{K_b} \right) C_b$$

$$x = 0$$

$$D_p A f \left(\frac{\partial C_p}{\partial x} \right) + D_{np} A (1-f) \left(\frac{\partial C_{np}}{\partial x} \right) = D_d A \left(\frac{\partial C_d}{\partial x} \right)$$

$$C_d = \left(\frac{K_d}{K_p} \right) C_p = \left(\frac{K_d}{K_{np}} \right) C_{np}$$

$$x = L_d$$

$$V_d \left(\frac{dC_v}{dt} \right) = D_p A f \left(\frac{\partial C_p}{\partial x} \right) + D_{np} A (1-f) \left(\frac{\partial C_{np}}{\partial x} \right)$$

$$C_p = K_p C_v \quad C_{np} = K_{np} C_v$$

また、吸収速度 dQ/dt 、基剤中残存量 X_v 、各層での薬物量 (M_p 、 M_{np} 、 M_d 、 M_b) は次のように表され、

$$\frac{dQ}{dt} = FC_b$$

$$X_v = C_v V_v$$

$$M_p = \int_{-L_s}^0 C_p A f dx \quad M_{np} = \int_{-L_s}^0 C_{np} A (1-f) dx \quad M_d = \int_0^{L_d} C_d A dx$$

$$X_b = C_b V_b$$

これらの式をラプラス変換し、ラプラス次元での累積吸収量(Q), 基剤中残存量(X_v), 皮膚中薬物量(M), 末梢血管内薬物量(X_b)の式が誘導される。

$$\begin{aligned} \bar{Q} &= WZ_d X_0 (Z_{np} \sinh \alpha_p + Z_p \sinh \alpha_{np}) (V_b f + F) / s k(s) \\ \bar{X}_v &= V_v (Z_{np} \sinh \alpha_p \cosh \alpha_{np} + Z_p \cosh \alpha_p \sinh \alpha_{np}) (W \sinh \alpha_d + Z_d \cosh \alpha_d) \\ &\quad + Z_d \sinh \alpha_p \sinh \alpha_{np} (Z_d \sinh \alpha_d + W \cosh \alpha_d) / s k(s) \\ \bar{M} &= \bar{M}_p + \bar{M}_{np} + \bar{M}_d \\ \bar{M}_p &= Z_p X_0 \{ (Z_{np} \sinh \alpha_p \sinh \alpha_{np} + Z_{np} (\cosh \alpha_p - 1) (\cosh \alpha_{np} + 1)) (W \sinh \alpha_d + Z_d \cosh \alpha_d) \\ &\quad + Z_d \sinh \alpha_p (\cosh \alpha_p - 1) (Z_d \sinh \alpha_d + W \cosh \alpha_d) \} / s k(s) \\ \bar{M}_{np} &= Z_{np} X_0 \{ (Z_{np} \sinh \alpha_p \sinh \alpha_{np} + Z_p (\cosh \alpha_p + 1) (\cosh \alpha_{np} - 1)) (W \sinh \alpha_d + Z_d \cosh \alpha_d) \\ &\quad + Z_d \sinh \alpha_p (\cosh \alpha_p - 1) (Z_d \sinh \alpha_d + W \cosh \alpha_d) \} / s k(s) \\ \bar{M}_d &= Z_d X_0 (Z_{np} \sinh \alpha_p + Z_p \sinh \alpha_{np}) (Z_d \sinh \alpha_d + W (\cosh \alpha_d - 1)) / s k(s) \\ \bar{X}_b &= W Z_d V_b X_0 (Z_{np} \sinh \alpha_p + Z_p \sinh \alpha_{np}) (V_b f + F) / s k(s) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} k(s) &= V_v \{ (Z_{np} \sinh \alpha_p \cosh \alpha_{np} + Z_p \cosh \alpha_p \sinh \alpha_{np}) (W \sinh \alpha_d + Z_d \cosh \alpha_d) \\ &\quad + Z_d \sinh \alpha_p \sinh \alpha_{np} (Z_d \sinh \alpha_d + W \cosh \alpha_d) \} \\ &\quad + Z_d \{ (Z_{np} \sinh \alpha_p \sinh \alpha_{np} + Z_{np} (\cosh \alpha_p - 1) (\cosh \alpha_{np} + 1)) (W \sinh \alpha_d + Z_d \cosh \alpha_d) \\ &\quad + Z_d \sinh \alpha_p (\cosh \alpha_p - 1) (Z_d \sinh \alpha_d + W \cosh \alpha_d) \} \\ &\quad + Z_{np} \{ (Z_{np} \sinh \alpha_p \sinh \alpha_{np} + Z_p (\cosh \alpha_p + 1) (\cosh \alpha_{np} - 1)) (W \sinh \alpha_d + Z_d \cosh \alpha_d) \\ &\quad + Z_d \sinh \alpha_p (\cosh \alpha_p - 1) (Z_d \sinh \alpha_d + W \cosh \alpha_d) \} \end{aligned}$$

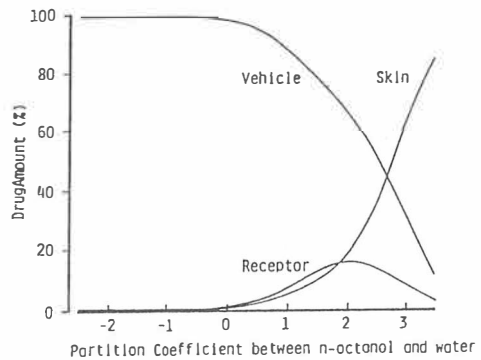
$$\begin{aligned} \alpha_p &= L_v \sqrt{s/D_p} & \alpha_{np} &= L_{np} \sqrt{s/D_{np}} & \alpha_d &= L_d \sqrt{s/D_d} \\ Z_p &= K_p V_p / \alpha_p & Z_{np} &= K_{np} V_{np} / \alpha_{np} & Z_d &= K_d V_d / \alpha_d \end{aligned}$$

一方、in vitro系では血流による全身系への移行過程はなく、実験は基本的にレシーバ側でsink conditionが成立した形で行われる。したがって、上の式で血管壁透過クリアランスCLおよび血流Fが無限に大きいことを仮定することにより、in vitro実験系に対応した解析式を誘導することができる。

2.2 高速ラプラス逆変換(FILT)アルゴリズムを利用した薬物皮膚透過および経皮吸収促進のシミュレーション

先に示したようなラプラス次元の式を解析的に逆変換することは困難であるが、これらの式を数値的に逆変換する方法として高速ラプラス逆変換(FILT)が細野によって考案された^{3, 4)}。そこで、このアルゴリズムを利用し薬物の経皮吸収動態および経皮吸収促進のシミュレーションを行った。

薬物の経皮吸収は物理化学的な視点より拡散過程と分配過程からなるが、基本的には前者が薬物



Constants: $D_p = 3.2 \times 10^{-6} (\text{cm}^2/\text{hr})$, $D_{np} = 3.2 \times 10^{-6} (\text{cm}^2/\text{hr})$, $D_d = 3.2 \times 10^{-6} (\text{cm}^2/\text{hr})$,
 $A = 3.14 (\text{cm}^2)$, $L_s = 0.0025 (\text{cm})$, $L_d = 0.08 (\text{cm})$, $f = 0.001$, $V_v = 1.0 (\text{ml})$,
 $\epsilon_p = \epsilon_d = \epsilon_v = \epsilon_w = 23.4 ((\text{cal}/\text{cm}^3)^{1/2})$, $\epsilon_{np} = 9.5 ((\text{cal}/\text{cm}^3)^{1/2})$,
 $\epsilon_{\text{oct}} = 10.3 ((\text{cal}/\text{cm}^3)^{1/2})$

Fig.2 The Amounts of Drug Appearing in Receptor, Remaining in Vehicle, and Accumulating in Skin at 24 hr after the Start of Diffusion as a Function of Partition Coefficient between n-Octanol and Water

の分子体積に依存するのに対して、後者は薬物の親油性によって決定されると考えることができる。薬物の皮膚への分配係数は、薬物、基剤、および皮膚の溶解度パラメータを用いて次のように表すことができる⁵⁾。

$$\log K_i = [(\delta_x - \delta_v)^2 - (\delta_x - \delta_i)^2] v_x / 2.303RT \quad (i = p, np, d)$$

K: Partition Coefficient δ : Solubility Parameter v : Molar Volume
R: Gas Constant T: Absolute Temperature i: Skin x: Drug v: Vehicle

この理論を用いることによって薬物の octanol / 水間分配係数と皮膚基剤間分配係数を関連づけることも可能である。そこで、式に基づいて in vitro系を仮定し、薬物の octanol / 水間分配係数と水を基剤としたときの24hr後の皮膚透過量、基剤中薬物量、皮膚中薬物量の関係をシミュレーションした(Fig.2)。薬物の皮膚透過はある分配係数をもつ薬物での最大となったのに対し、皮膚中薬物量は分配係数の増加にしたがって増加し、基剤中薬物量は一様に減少することが示された。これは、薬物の親油性の増大に伴い皮膚に対する分配が増加するため皮膚透過が増大するが、ある点を越えると角質層以下の層の透過が律速となり、さらに基剤中濃度の過度の減少に示されるように薬物の皮膚中での活動度勾配が小さくなる結果、

皮膚透過が減少することを意味している。

以上のシミュレーションで示されるように、この生理学的皮膚拡散モデルでは異なる親油性を有する薬物の皮膚透過を統一的に説明できるため、経皮吸収促進の機構解明においても有用であると考えられる。一般に、吸収促進効果は対象とする薬物の物理化学的性質に応じて異なることが知られているが^{6, 7)}、これは吸収促進剤の作用部位と薬物の皮膚透過経路の関連によると考えることができる。また、吸収促進機構としては、薬物の皮膚中での移動度を促進する拡散性の増大、および皮膚中での薬物の濃度勾配を大きくすることによって皮膚透過を促進する皮膚への分配性の増大の二つの機構が考えられる。そこで、先のシミュレーションをもとに角質層の各透過経路での拡散性および分配性を増大させた場合について、薬物

親油性と促進効果との関係をシミュレーションにより検討した(Fig.3)。

吸収促進効果は、吸収促進剤の作用部位が薬物透過の律速過程と一致したときに最大の効果が得られると考えられる。したがって、Fig.3に示されるように吸収促進剤が角質層非極性経路に作用する場合にはベル型の関係が得られ、極性経路に作用する場合には親水性の高い薬物ほど促進されることになる。一方、吸収促進剤の作用機構によって促進効果が異なり、特に皮膚中薬物量に関しては、拡散を増加させた場合はほとんど変化がみられないのに対し、分配を増加させた場合は顕著に増大する結果となる。我々はこれまでに、Azone, 1-geranylazacycloheptan-2-one (GACH), 1-farnesylazacycloheptan-2-one (FACH)において5種類の薬物を対象に皮膚透過

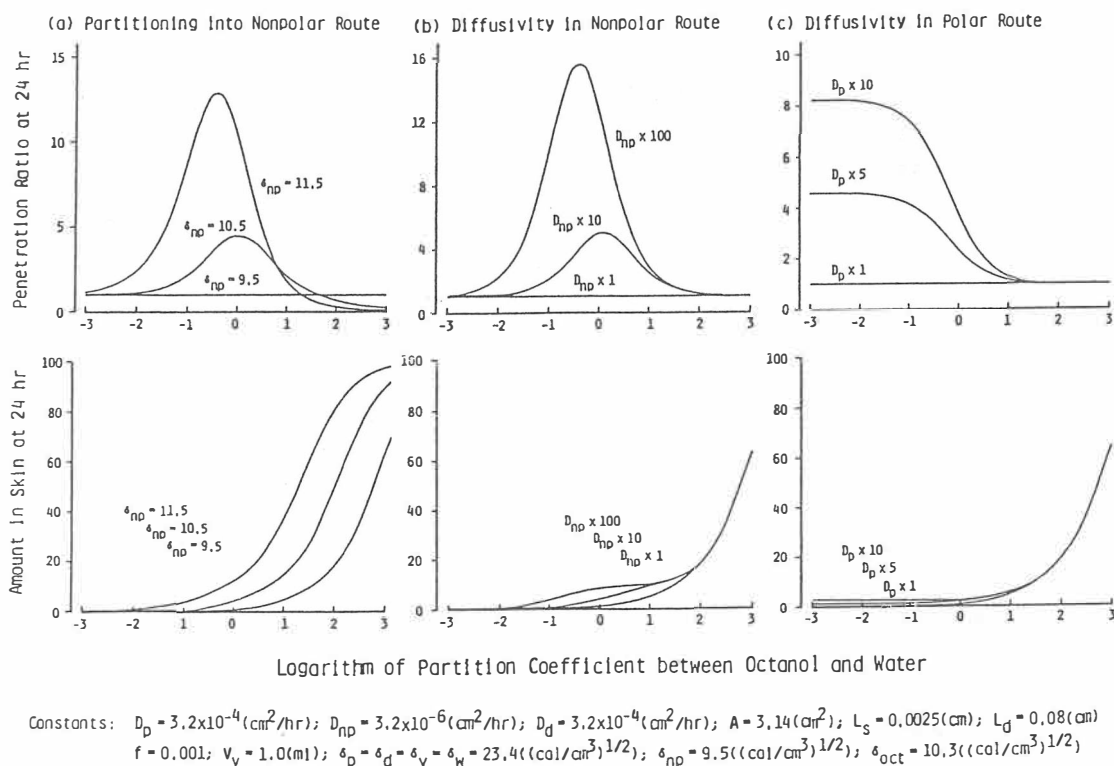


Fig.3 Effect of Each Parameter on Penetration Ratio(A) and Drug Amount in Skin(B) at 24 hr against Logarithm of Partition Coefficient between n-Octanol and water

実験を行った結果、分配係数1付近の薬物で促進効果が最も大きく、またこれら促進剤が各薬物の皮膚中薬物量を顕著に増大させることを報告しているが⁹⁾、今回のモデルに基づき、これら吸収促進剤が薬物の非極性経路への分配を増加させると仮定することで、各薬物に対する皮膚透過促進が説明できることが明らかとなった。

3. 経皮吸収促進剤の作用機構解析

各種吸収促進法を利用した経皮投与製剤の開発においては、薬物の本体の皮膚透過性と薬物治療に要求される薬物送達速度を考慮した上でその適用条件を設定することが必要である。しかしながら、これらの製剤設計は試行錯誤的に行われているのが現状であり、基本的な設計指針となる吸収促進に関する定量的な解釈が要求されている。そこで、経皮吸収促進法として現在最も注目されている経皮吸収促進剤を例として *in vitro* 皮膚透過実験を行い、種々の物理化学的性質を有する薬物の経皮吸収に及ぼす吸収促進剤の用量依存的効果について理論的な考察を行った。

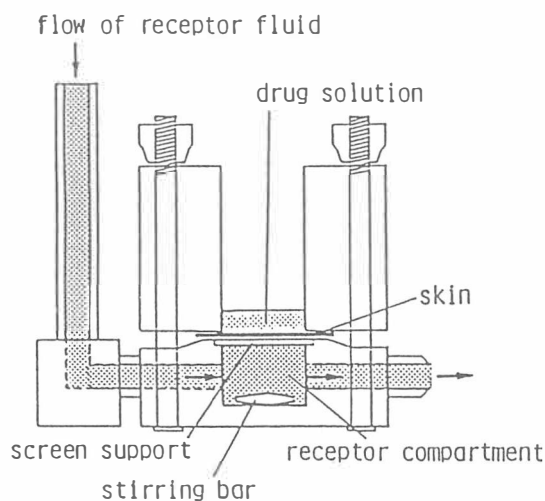


Fig.4 Flow-through Type Diffusion Cell

3.1 *in vitro* 皮膚透過実験の方法

吸収促進剤の薬物皮膚透過に及ぼす影響としては、基剤中での薬物との相互作用および皮膚に対する直接作用が考えられる。本研究では、吸収促進剤の皮膚に対する影響のみを解析する目的で、吸収促進剤の前処理条件下 *in vitro* 皮膚透過実験を行った。また、モデル解析をより単純化するため、flow-through 型拡散セル (Fig.4) を使用し、レシーバ側で sink condition が成立した形で透過実験を行った。透過実験は以下に示す方法で行った。モルモット背部より摘出した皮膚をセルに装着し、ドナー側を種々の濃度の促進剤のエタノール溶液 0.2ml で 24hr 前処理したのち、残存するエタノールをドライヤーで除去し、1あるいは 2 mM の薬物の水溶液 1ml を投与した。また、tape stripping を 15 回行うことにより角質層を除去した皮膚を用いて、24hr 生理食塩水で前処理後薬物の生理食塩水溶液 1ml を投与して同様の実験を行った。レシーバ側は常に生理食塩水を灌流し、薬液投与後灌流液中に出現する薬物量を経時的に測定した。また、実験終了時には、ドナー中および皮膚中に残存する薬物量も併せて測定した。薬物の定量は、液体シンチレーションカウンターを用いて行った。

3.2 対象薬物と吸収促進効果の関係

吸収促進剤には、これまでの研究で⁹⁾ 優れた促進効果を有し皮膚刺激性の低いことを報告している 1-geranylazacycloheptan-2-one (GACH) を選び、対象薬物には異なった親油性を有する mannitol (MT), cytosine β -D-arabinofuranoside (ARA-C), acyclovir (AC), 5-fluorouracil (5-FU), 6-mercaptopurine (6-MP), hydrocortisone (HC), butylparaben (BP) を用いて *in vitro* 皮膚透過実験を行った。これらの薬物のオクタノール/水間分配係数を測定した結果、それぞれ 0.00155, 0.00939, 0.0304, 0.144, 0.654, 7.42, 371 であった。

Fig.5 は、各薬物について GACH の各種適用

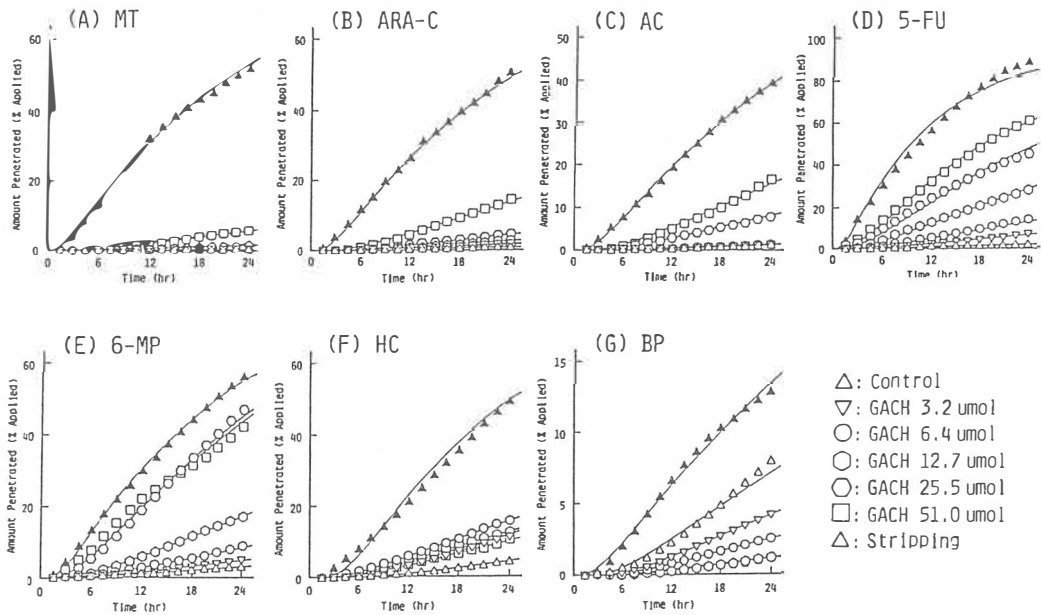


Fig.5 Percutaneous Penetration of MT(A), ARA-C(B), AC(C), 5-FU(D), 6-MP(E), HC(F), and BP (G) through Intact Guinea Pig Skin Preloaded with Ethanolic Solution of Different Doses of GACH or through Tape-Stripped Skin

Table 1 Amounts of Drugs Recovered at the End of 24 hr Diffusion Experiment with Different Doses of GACH

Drug	Preloading dose of GACH (μmol)	Recovery (%)				Drug	Preloading dose of GACH (μmol)	Recovery (%)			
		Donor	Skin	Receptor	Total			Donor	Skin	Receptor	Total
MT	0	95.72±0.25	1.05±0.16	0.53±0.04	97.30±0.13	6-MP	0	91.24±3.86	6.69±2.07	2.96±1.63	100.88±3.66
	3.2	93.30±1.67	1.73±0.11	0.60±0.12	96.64±1.54		3.2	84.21±3.99	11.43±3.14	5.03±1.27	100.66±1.90
	6.4	93.14±0.77	1.99±0.64	1.44±0.15	96.66±0.52		6.4	77.61±5.72	16.35±6.21	8.54±2.36	101.49±2.46
	12.7	93.24±0.86	1.83±0.37	0.98±0.04	96.06±0.93		12.7	63.79±5.08	17.32±7.23	17.05±3.46	98.16±4.68
	25.5	92.78±4.57	2.39±0.16	1.86±1.35	97.03±3.39		25.5	34.82±3.92	23.67±9.04	47.27±6.31	105.75±2.22
	51.0	71.06±12.67	6.38±1.91	6.16±1.76	83.60±13.10		51.0	37.04±4.69	16.35±1.60	42.63±6.54	95.92±0.92
	stripping	27.62±13.86	4.60±2.46	52.36±10.44	84.47±8.70		stripping	23.88±8.38	8.27±4.78	56.56±11.73	88.71±2.95
ara-C	0	92.67±0.69	2.69±1.02	0.91±0.13	96.37±1.49	HC	0	66.27±7.44	24.25±5.07	4.31±2.85	94.83±3.37
	3.2	90.14±3.44	2.81±0.60	1.65±0.80	94.60±2.25		3.2	60.62±4.38	30.46±3.74	11.64±1.03	92.72±3.01
	6.4	91.13±2.77	3.81±0.68	1.96±0.65	96.91±2.93		6.4	45.18±6.97	34.10±5.91	15.49±2.50	94.77±2.40
	12.7	90.62±2.22	5.47±2.14	2.87±0.74	98.86±0.75		12.7	49.98±4.09	32.23±5.16	12.43±0.75	94.63±2.96
	25.5	86.81±3.07	4.93±0.54	4.60±0.56	96.34±2.71		25.5	41.92±5.44	47.25±2.88	11.94±4.06	101.10±1.49
	51.0	71.35±1.44	10.50±1.77	14.66±1.98	96.51±2.19		51.0	32.78±7.18	67.16±11.69	10.24±1.60	100.18±5.90
	stripping	33.84±10.38	7.35±3.82	50.35±14.26	91.56±1.37		stripping	23.54±4.18	13.22±1.24	48.82±0.95	85.57±4.05
AC	0	96.17±0.83	3.27±0.14	1.19±0.31	100.62±0.66	EP	0	8.10±1.33	29.90±3.55	7.99±1.72	46.99±1.12
	3.2	92.22±0.73	4.34±2.39	1.22±0.31	97.79±1.97		3.2	9.62±1.02	55.84±3.28	4.23±1.64	69.59±2.28
	6.4	96.18±4.62	6.01±0.49	1.61±0.40	102.79±4.88		6.4	8.59±0.84	65.29±6.38	2.65±0.79	76.43±6.44
	12.7	92.37±6.14	6.28±0.48	1.49±0.36	100.13±4.86		12.7	8.41±0.53	68.48±4.14	1.21±0.52	78.09±3.66
	25.5	85.10±1.79	8.17±1.92	8.24±2.76	101.50±2.00		25.5	12.23±1.72	75.39±12.17	1.21±0.06	88.83±13.78
	51.0	66.23±10.64	16.88±3.83	16.89±5.16	99.01±2.21		51.0	10.33±2.33	79.66±3.18	0	89.99±0.78
	stripping	41.01±12.17	10.91±0.97	39.73±13.74	91.66±1.37		stripping	6.39±1.92	33.72±9.16	12.76±3.81	51.87±6.48
5-FU	0	97.66±2.71	3.09±1.01	2.09±1.60	102.84±1.68						
	3.2	77.95±1.04	6.84±3.72	6.99±2.80	91.79±0.97						
	6.4	74.86±2.65	7.53±0.52	13.65±2.60	96.04±1.35						
	12.7	57.31±6.53	10.03±1.81	28.07±6.80	96.41±0.86						
	25.5	45.72±4.94	9.65±1.86	44.98±6.77	100.24±1.24						
	51.0	24.98±4.04	4.75±0.78	60.90±7.13	90.63±4.41						
	stripping	4.77±3.16	2.14±0.79	89.38±3.82	95.76±0.54						

The recoveries at 24 hr are expressed as mean±S.D.

条件下 *in vitro* 皮膚透過実験により得られた累積透過量-時間曲線を示している。いずれの薬物においても tape-stripping により角質層を除去した皮膚での透過が最も大きく、コントロールに比べラゲタイムも顕著に短いことから、薬物の皮膚透過において角質層が強力なバリアーとして機能していることが明らかとなった。一方、GACH は基本的に用量依存的な薬物透過促進を示したが、幾分親油性の高い HC に対しては $6.4 \mu\text{mol}$ で最大の効果を示し、非常に親油性の高い BP に対しては適用量の増加に伴い皮膚透過を減少させることが明らかとなった。このように透過パターンに対する GACH の影響が薬物間で異なったのに対し、Table 1 に示されるように GACH はすべての薬物に対し用量依存的に実験終了時の皮膚中薬物量を増大させることが明らかとなった。GACH 前処理による皮膚透過促進効果を、薬物のオクタノール/水間分配係数に対しプロットを行った結果、促進効果についてはベル型の関係が得られた (Fig.6)。一方、皮膚中薬物量は薬物の親油性が高いほど大きく、GACH 適用により顕著に

増大することが示された。これらの結果から、先のシミュレーションとの対応により GACH が用量依存的に薬物の皮膚への分配性を増加させることによって皮膚透過を促進することが示唆された。

3.3 生理学的皮膚拡散モデルに基づく促進機構の解析

GACH の皮膚透過促進機構をより厳密に解明し、*in vitro* での経皮吸収動態を精密に予測することを目的として、先に述べた生理学的皮膚拡散モデルに基づいた解析を行い、GACH 適用時の経皮吸収動態を拡散と分配のパラメータに還元した。ここで、各経路における皮膚透過パラメータを評価するために次のような2つの仮定をおいた。高投与量の GACH で tape-stripping を行った皮膚を前処理した場合においても各薬物において透過促進が見られなかったため、GACH は角質層以下の層には影響を与えず、各薬物の角質層以下の層での皮膚透過パラメータは tape-stripping を行った皮膚での透過曲線を一枚膜皮膚モデルの解析により得られたパラメータに近似でき

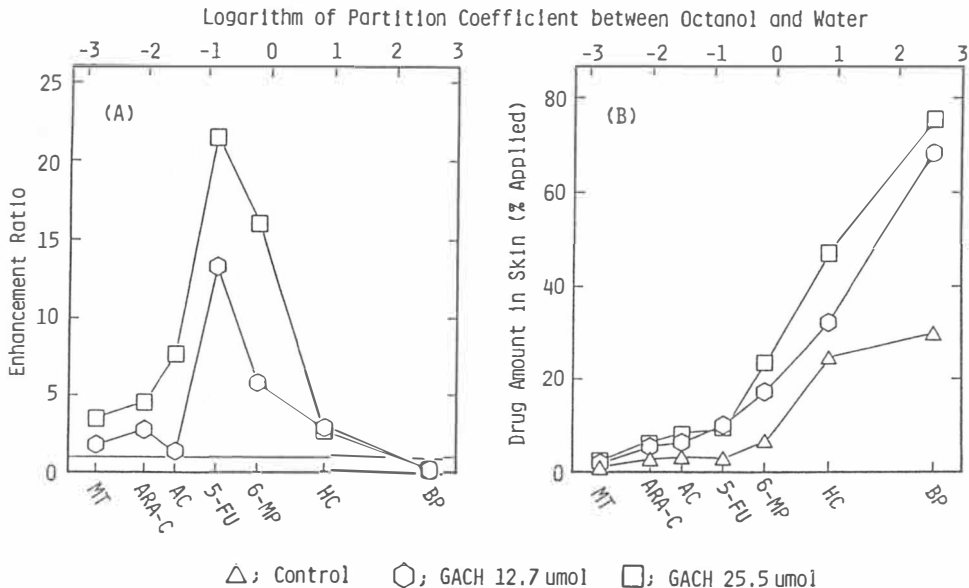


Fig.6 Relationship between Drug Lipophilicities and Enhancement Ratios(A) and Drug Amounts in Skin (B) at 24 hr at the Pretreatment of GACH

Table 2 Diffusion and Partition Parameters in Each Domain at the Pretreatment with Different Doses of GACH

Drug	Preloading dose of GACH (μmol)	Polar route		Nonpolar route		Viable tissue		Drug	Preloading dose of GACH (μmol)	Polar route		Nonpolar route		Viable tissue	
		D _p '	K _p '	D _{np} '	K _{np} '	D _d '	K _d '			D _p '	K _p '	D _{np} '	K _{np} '	D _d '	K _d '
		(hr ⁻¹)	(x10 ⁶ cm ³)	(hr ⁻¹)	(cm ³)	(hr ⁻¹)	(cm ³)			(hr ⁻¹)	(x10 ⁶ cm ³)	(hr ⁻¹)	(cm ³)	(hr ⁻¹)	(cm ³)
MT	0	39.9	7.27	---	---	0.0812	0.693	6-MP	0	39.9	7.27	8.72	0.000146	0.0696	1.04
	3.2	49.6	8.99	---	---	0.0812	0.693		3.2	49.6	6.99	4.74	0.000601	0.0696	1.04
	6.4	42.1	19.8	---	---	0.0812	0.693		6.4	42.1	19.8	3.69	0.00123	0.0696	1.04
	12.7	41.8	13.0	---	---	0.0812	0.693		12.7	41.8	13.0	2.28	0.00604	0.0696	1.04
	26.6	49.6	22.3	---	---	0.0812	0.693		26.6	49.6	22.3	1.60	0.0469	0.0696	1.04
	61.0	48.6	90.4	---	---	0.0812	0.693		61.0	48.6	90.4	3.16	0.0270	0.0696	1.04
	stripping	---	---	---	---	0.0812	0.693		stripping	---	---	---	---	---	0.0696
ARA-C	0	39.9	7.27	3.62	0.000102	0.0606	0.763	HC	0	39.9	7.27	3.16	0.00167	0.0276	3.19
	3.2	49.6	6.99	3.63	0.000206	0.0606	0.763		3.2	49.6	6.99	3.26	0.00600	0.0276	3.19
	6.4	42.1	19.6	2.94	0.000166	0.0606	0.763		6.4	42.1	19.6	3.68	6.76	0.0276	3.19
	12.7	41.8	13.0	4.87	0.000280	0.0606	0.763		12.7	41.8	13.0	1.27	9.02	0.0276	3.19
	26.6	49.6	22.3	6.66	0.000376	0.0606	0.763		26.6	49.6	22.3	0.408	10.6	0.0276	3.19
	61.0	48.6	90.4	1.93	0.00393	0.0606	0.763		61.0	48.6	90.4	0.468	12.9	0.0276	3.19
	stripping	---	---	---	---	0.0606	0.763		stripping	---	---	---	---	---	0.0276
AC	0	39.9	7.27	5.19	0.0000910	0.0666	0.666	BP	0	39.9	7.27	0.191	0.238	0.0666	0.279
	3.2	49.6	6.99	1.34	0.000298	0.0666	0.666		3.2	49.6	6.99	0.0680	2.86	0.0666	0.279
	6.4	42.1	19.6	1.08	0.0000766	0.0666	0.666		6.4	42.1	19.6	0.0498	6.68	0.0666	0.279
	12.7	41.8	13.0	2.38	0.000164	0.0666	0.666		12.7	41.8	13.0	0.0276	13.0	0.0666	0.279
	26.6	49.6	22.3	1.66	0.00345	0.0666	0.666		26.6	49.6	22.3	0.0502	19.8	0.0666	0.279
	61.0	48.6	90.4	2.39	0.00460	0.0666	0.666		61.0	48.6	90.4	---	---	0.0666	0.279
	stripping	---	---	---	---	0.0666	0.666		stripping	---	---	---	---	---	0.0666
6-FU	0	39.9	7.27	4.43	0.000183	0.0860	1.80	6-FU	0	39.9	7.27	4.43	0.000183	0.0860	1.80
	3.2	49.6	6.99	4.30	0.000896	0.0860	1.80		3.2	49.6	6.99	4.30	0.000896	0.0860	1.80
	6.4	42.1	19.6	6.60	0.00136	0.0860	1.80		6.4	42.1	19.6	6.60	0.00136	0.0860	1.80
	12.7	41.8	13.0	6.26	0.00362	0.0860	1.80		12.7	41.8	13.0	6.26	0.00362	0.0860	1.80
	26.6	49.6	22.3	6.88	0.00774	0.0860	1.80		26.6	49.6	22.3	6.88	0.00774	0.0860	1.80
	61.0	48.6	90.4	6.78	0.0178	0.0860	1.80		61.0	48.6	90.4	6.78	0.0178	0.0860	1.80
	stripping	---	---	---	---	0.0860	1.80		stripping	---	---	---	---	---	0.0860

る。また、水を基剤とした場合親水性の高い薬物では親油性の程度に依らず一定の皮膚透過を示すことを考慮して、非常に親水性の高い mannitol は角質層極性経路のみを透過すると仮定し、他の薬物における極性経路での皮膚透過パラメータは mannitol のパラメータを代用できると仮定した。

以上の仮定のもとで、実験の結果得られた累積透過量-時間曲線をラプラス次元の解析式に高速ラプラス逆変換アルゴリズムを利用した非線形最小二乗法プログラム MULTI (FILT) を用いて当てはめ、各層での拡散および分配パラメータを算出した (Table 2)。また、解析の結果得られたパラメータを用いて実験終了時における基剤中残存量および皮膚中薬物量をシミュレーションし、実測値との比較を行った。

基剤中残存量：
 (Estimated) = 1.022 * (Observed)
 (r = 0.983, n = 49)

皮膚中薬物量：
 (Estimated) = 1.072 * (Observed)
 (r = 0.901, n = 49)

基剤中残存量および皮膚中薬物量のいずれにおいても計算値は実測値と良く一致した。この結果より、本モデルに基づく解析は種々の薬物の皮膚透過を正確に表すことができるため極めて有用な方法と考えられる。

GACH の角質層極性経路への影響は小さく、分配パラメータを最大約 10 倍増加させたが、拡散パラメータはほとんど変化させなかった。一方、GACH はその前処理量に依存して非極性経路に対する分配パラメータを顕著に増加させた。このように GACH は薬物の角質層非極性経路への分配を増加させることが解析的にも明らかとなり、シミュレーションにより予測された結果と一致した。しかしながら、GACH による非極性経路への分配パラメータの増加の程度は薬物間で異なったため、さらにこれらの関係についてより詳細な検討を行った。

本実験では促進剤は前処理により投与したので基剤中での薬物と促進剤との相互作用は無視でき、薬物の皮膚への分配の変化は促進剤による

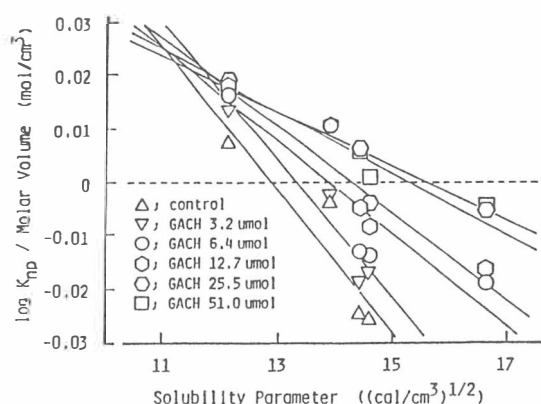


Fig.7 Relationship between solubility Parameters of Drugs and Logarithms of Partition Coefficients between Nonpolar Route and Vehicle Devided by their Molar Volume

皮膚の溶媒の性質の変化として考えられる。そこで、正則溶液理論に基づいて以下に示す式を誘導し、皮膚および基剤の溶解度パラメータを算出した。

$$(\log K_{np})/V_x = \{(\delta_x - \delta_v)^2 - (\delta_x - \delta_{np})^2\} / 2.303RT$$

理論式に基づいて、X軸に薬物の溶解度パラメータを、Y軸に解析により求められた角質層非極性経路に対する分配係数を薬物のモル体積で除した値をプロットした(Fig.7)。ここで、薬物の溶解度パラメータおよびモル体積はFedorsの方法に従って計算し¹⁰⁾、また角質層非極性経路の体積は0.015cm³と仮定した。各GACH処理群において良好な直線関係を示し、本解析の妥当性が証明された。GACHの適用量の増加に伴い、回帰直線の傾きは小さくなり、X切片は大きくなる傾向がみられた。この傾きおよびX切片から基剤および角質層非極性経路の溶解度パラメータを計算した。基剤の溶解度パラメータはGACHの適用量に依らず $17.3 \pm 0.3 (\text{cal/cm}^3)^{1/2}$ と一定であり、GACHは前処理下では基剤の性質を変化させないこと、および基剤中での薬物とGACHの相互作用が無視できることが明らかとなった。一方、非極性経路の溶解度パラメータはGACHを0, 3.2, 6.4, 12.7, 25.5, 51.0 μmol適用した場

合それぞれ8.1, 8.8, 10.8, 11.4, 13.2, 13.7 (cal/cm³)^{1/2}とGACHの適用量に応じて顕著に増加し、GACHの非極性経路への浸透によりその経路がより極性の高いほうへ移動していることが明らかとなった。また、GACHの溶解度パラメータは9.25(cal/cm³)^{1/2}であり、GACHの高投与量を適用したときに非極性経路の溶解度パラメータがこの値より大きくなることは単純な混合溶媒の理論では説明不可能である。GACHと構造の類似しているAzoneが脂質膜の水和を増加させることが報告されており¹¹⁾、GACHもまた同様なメカニズムにより非極性経路の水和を促進し極性を増加させていると推測される。

このようにGACHは用量依存的に角質層非極性経路の溶解度パラメータを増加させることによって、薬物の皮膚への分配を増加させ皮膚透過を促進することがモデル解析により明らかとなった。以上の解析により、薬物の分子構造と皮膚透過あるいは吸収促進剤による効果までを統一的に議論し、シミュレーションすることが可能となった。

4. 結論

以上、FILTアルゴリズムの利用により複雑なモデルに対しても皮膚透過現象を時間推移として取り扱うことが可能であり、皮膚の解剖学および生理学的な構造を経皮吸収モデルに組み込むことによって、種々の薬物に対して薬物の分子構造をもとに皮膚透過現象および吸収促進までを理論的に説明することが可能となった。今回、GACHを一例として皮膚透過モデルに基づいた吸収促進の機構解析を行った結果、この促進剤は薬物の角質層非極性経路への薬物分配を増加させることによって皮膚透過を促進することが明らかとなったが、正則溶液理論を適用しさらに詳細な物理化学的検討を加えた結果、GACHは非極性経路の溶解度パラメータを増大させ、薬物の分配を増大していることが示された。このように、吸

収促進剤適用時における皮膚固有のパラメータの
みを抽出することで、種々の薬物に対してその皮
膚透過を再構築することが可能になった。

references

- 1) R. J. Scheuplein et al, *Physiol., Rev.*, 51:702-747(1971)
- 2) R. H. Guy et al, *Pharm. Res.*, 5:737-758(1988)
- 3) T. Hosono, *Radio Sci.*, 16:1015-1019(1981)
- 4) Y. Yano et al, *Chem Pharm. Bull.*, 37:1035-1038(1989)
- 5) K. B. Sloan et al, *J. Invest. Dermatol.*, 87:244-252(1986)
- 6) R. B. Stoughton, *Arch Dermatol.*, 118:474-477(1982)
- 7) B. W. Barry et al, *J. Pharm. Pharmacol.*, 39:535-546(1987)
- 8) H. Okamoto et al, *J. Pharm. Sci.*, 80:39-45(1991)
- 9) H. Okamoto et al, *J. Pharm. Sci.*, 77:418-424(1988)
- 10) R. F. Fedors, *Polymer Eng. Sci.*, 14:147-154(1974)
- 11) A. J. I. Ward et al, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 14:1155-1166(1988)

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

中川昌子

Synthesis of four diastereomeric cerebroside B_{1a} (1a) and B_{1b} (1b) has been achieved. The crucial step in the synthesis of cerebroside B_{1b} consists in a regio- and stereoselective formation of the *erythro*-sphingosine moiety by the reaction of dienal 4 with 2-nitroethanol followed by resolution with optically active α -hydroxypalmitic acids. Using the aglycone thus obtained, the first total synthesis of optically active cerebroside B_{1a} and B_{1b} was accomplished. The absolute configuration of 1b was determined to be (2S, 3R, 4E, 8Z, 2'R)-1-O-(β -D-glucopyranosyl)-N-(2'-hydroxyhexadecanoyl)-4,8-sphingadienine.

Our developed methods for preparation of *erythro*-sphingosine has been applied to the first total synthesis of symbioramide(2), a novel ceramide obtained from the cultured dinoflagellate *Symbiodinium sp.*, which is the first example of SR Ca²⁺-ATPase activator of marine origin and also exhibits antileukemic activity and simultaneously established the complete stereostructure of 2 to be (2S, 3R, 2'R, 3'E)-N-(2'-hydroxy-3'-octadecenoyl)-dihydro-sphingosine.

A new sphingosine derivative(3) isolated and characterized as an N-lauroyl derivative from *Anemonia sulcata* collected near Sousse, was also synthesized and the L-*erythro* configuration of 3 was firmly established.

はじめに

糖脂質は生体膜の主要な構成成分であり生体における生物認識に重要な役割を果たしていることが近年の細胞表層の分子生物学の発展に伴い明らかになってきた。糖脂質のなかにスフィンゴシン塩基を含むスフィンゴ糖脂質がある。

最近蕃香や大豆などから単離されたセレブロシド B_{1a} および B_{1b} はスフィンゴ糖脂質であり、抗潰瘍性があることが見出された。

一方、近年海洋天然物からも種々の生物活性を示す新規なセラミドが単離されている。これらのものは微量のため絶対構造が決定されておらず、また十分な生物活性を検討するに到っていないものが多々知られている。

さらにこれらのスフィンゴ糖脂質やセラミドには皮膚への保湿剤としての効果も期待される。

本研究においては、以下に示す種々の糖脂質、および関連化合物の合成とともに対応する非天然型セレブロシド、セラミドの合成も行い、これらの生物活性について検討する¹⁰⁾。

1. セレブロシド B_{1a} (1a) および B_{1b} (1b) の合成とその絶対構造の決定

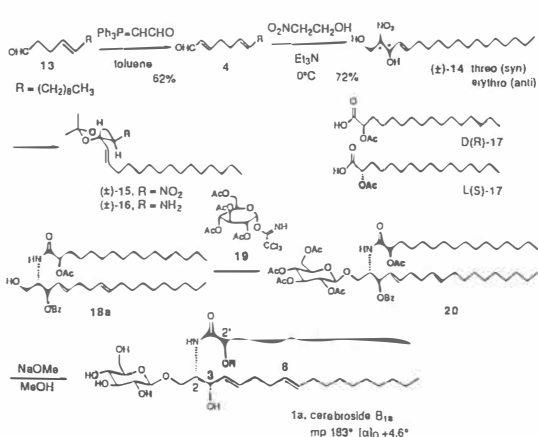
スフィンゴシン、セラミド、セレブロシド類の簡易合成法の開発

2. Ca²⁺-ATPase 活性作用を有する(+)シビオラミド(2)の合成

このセラミドは沖縄産二枚貝に共生する渦べん毛藻 *Symbiodinium sp.* より単離された。Ca²⁺-ATPase を活性化する初めての海産由来の物質

Synthesis of Sphingolipids Which Affect Physiological Function of Skin

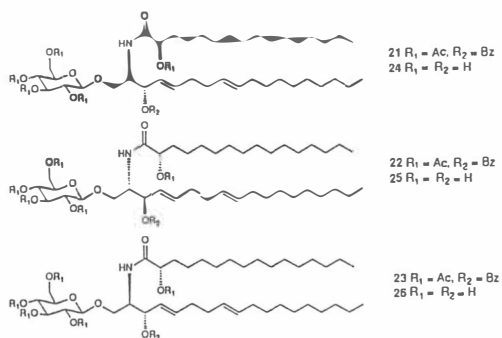
Masako Nakagawa



Scheme 3

1.3 Cerebroside B_{1a}の合成

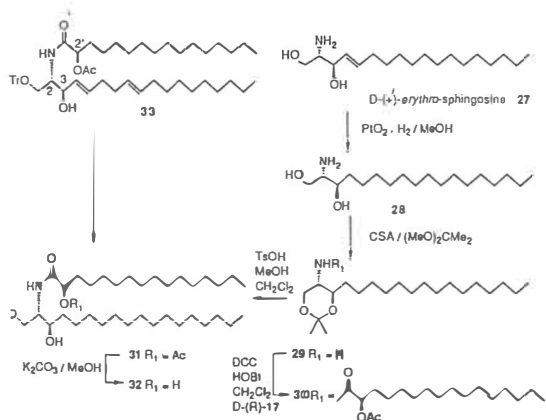
ニトロアルドール反応に必要な dienal **4** は先に得られた enal **13** を Wittig 試薬 $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CHCHO}$ とトルエン中加熱還流することにより得た。次に **4** とニトロエタノールの反応を種々に検討した結果、 Et_3N 溶媒中、 0°C で4日間放置すると位置選択的に1, 2付加体 **14** が *syn*, *anti* 体の混合物として72%の収率で得られることが判った。この時点における **14** の *syn*, *anti* ジアステレオ選択性は良好ではないが、この混合物を分離することなく acetonide に導いた後、 Et_3N と加熱すると、*syn* 体より安定な *anti* 体、即ち、スフィンゴシンと同じ相対関係をもつ *erythro* 体 **15** に、容易に異性化させることができる。このようにして得られた acetonide **15** を LiAlH_4 または $\text{Al}(\text{Hg})$ でニトロ基のみを還元すると aminoacetonide **16** が得られた。次に **16** を *D(R)*-アセトキシカルボン酸 *D(R)*-**17** と縮合させ2つのジアステレオマーからなるセラミド体 **18** を得た。**18** をトリチル化後2つのジアステレオマーを分離し、その一方の異性体 **18a** をイミデート法により **19** でグリコシル化し、次で保護基をはずすとセレブロシド *B*_{1a} **1a** が得られ、蕃香から得られた標品と、スペクトルデータ、融点が一致した。一方 **18b** からは **21** を経由して **24** を、また (±)-**16** と *L(S)*-**17** からは **22** と **23** を經由



してそれぞれセレブロシド *B*_{1a} の異性体、**25**, **26**の合成に成功した。

1.4 セレブロシド *B*_{1b}の絶対配置の決定

セレブロシド *B*_{1a} の全合成に成功したので、次に2位と3位の絶対配置を決定するために、天然の *D*-(+)-エリスロー スフィンゴシン **27** から **30** に導き加溶媒分解し **31** にした。一方セレブロシド *B*_{1b} 合成中間体 **33** を還元後、脱トリチル化して得られた **31** は天然品より誘導された **31** とスペクトルデータ、融点 ($\text{mp} 121.5\text{--}124^\circ\text{C}$), $[\alpha]_D +9.6^\circ$ が完全に一致することから、セレブロシド *B*_{1b} および *B*_{1a} の2位と3位は天然のスフィンゴシンと同じ *D-erythro* 型の絶対配置を有していることが証明された。2位については既に *D(R)*-**17** を用いていることからセレブロシド *B*_{1a} と *B*_{1b} の絶対構造は **1b** が (2*S*, 3*R*, 4*E*, 8*Z*, 2'*R*)-1-*O*-(β-*d*



Scheme 4

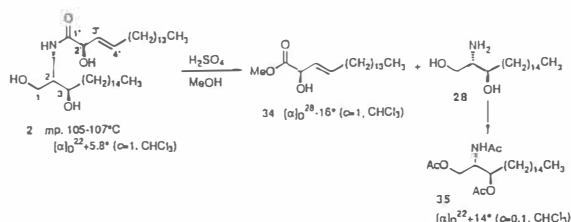
-glucopyranosyl)-N-(2'-hydroxyhexadecanoyl)-4,8-sphingadine, **1a**は4E, 8E-異性体であると決定した。

2. Ca²⁺-ATPase 活性作用を有する (+)シンビオラミド(2)の合成

2.1 序論

セラミド類を始めとするスフィンゴシン誘導体は、古くから細胞膜の構成成分として知られているが、近年ではそれ自身生理活性を有することが見出され、注目を集めている³¹。また動・植物より多様な構造と生物活性を有するスフィンゴシン類が数多く見出され、構造決定されているが、特に近年では海産動物および海産微小生物の生物活性物質の探索が進展し、海洋産のスフィンゴシン誘導体も数多く見出されている³²。

Symbioramide **2**は1988年小林らにより、沖縄産二枚貝ヒシガイの一種 *Fragum sp.* のえら細胞内に共生する渦べん毛藻 *Symbiodinium sp.* より単離構造決定された新規セラミドである。生物活性については、SR Ca²⁺-ATPase 活性化作用を有することが知られており、海産物由来では最初の例である。またその構造については、メタノリシスにより D-erythro-dihydrospingosine **28** と methyl 2-hydroxyoctadec-3(E)-enoate **34** が得られることから決定されている。2位, 3位の絶対配置については、**28** をトリアセチル体 **35** に導き D-erythro 型, すなわち (2S, 3R) 配置と決定されたが、2'位の絶対配置, すなわち α -hydroxy- β , γ -unsaturated ester **34** の絶



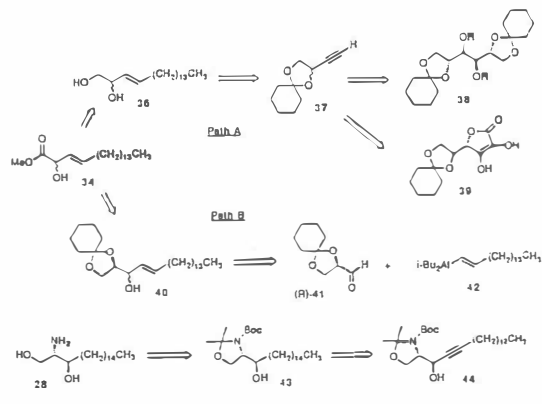
Scheme 5

対構造については未決定のままであった³³ (Scheme 5)。

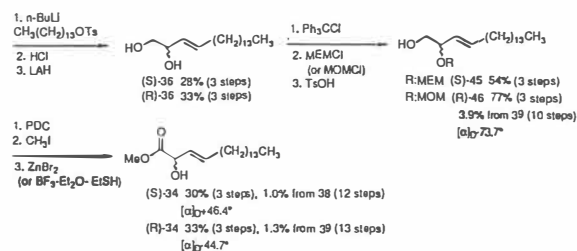
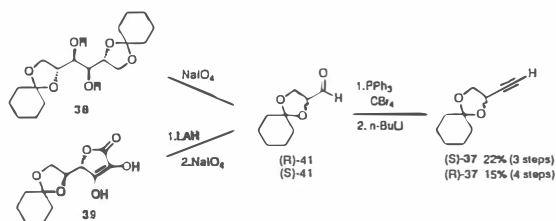
筆者は以上のことを考慮のうえ symbioramide **2** の全合成に着手した。光学活性な α -hydroxy- β , γ -unsaturated ester **34** の合成については、まず Path A に示されるように、絶対構造を明確にする目的で出発原料として、D-マンニトール誘導体 **38**, または L-アスコルビン酸誘導体 **39** を用いた。これらをそれぞれ対応する光学活性なアルキン **37** とし、さらにアルケンジオール **36** を経て、(S)-**34** および (R)-**34** へ導くこととした。また別ルート Path B として、D-グリセルアルデヒド誘導体 **41** とアラナート **42** との反応により光学活性なアリルアルコール **40** を合成し、これを **34** へ導くこととした。またアミノジオール, 即ちスフィンゴシン骨格の合成については、S.Nimkar ら, H.-E.Radunz らの L-セリン誘導体 **44**³⁴ を用いて、これをテトラヒドロ体 **43** とした後、**28** へ導くことにした (Scheme 6)。

2.2 光学活性 α -ヒドロキシ不飽和脂肪酸エステル **34** の合成

光学活性な脂肪酸エステル **34** の合成は、出発原料として D-マンニトール誘導体 **38** および L-アスコルビン酸誘導体 **39** を用いた。これらをアルデヒド (R)-**41**, (S)-**41** とし、さらにアルキン (S)

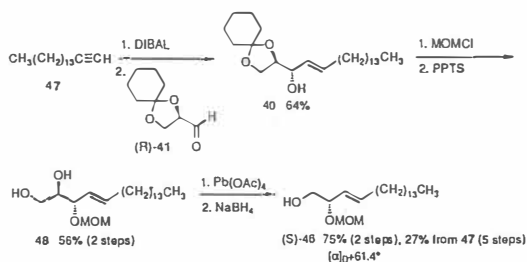


Scheme 6

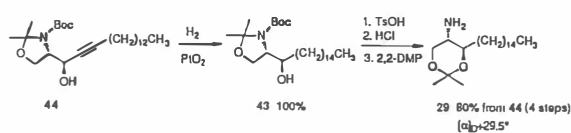


Scheme 7

-37 (22% (3工程)), (R)-37 (15% (4工程))へと導いた。これらをアルキル化, 脱保護, 三重結合の還元により, アルケンジオール(S)-36 (28% (3工程)), (R)-36 (33% (3工程))へ変換し, さらにトリチル化, MEM化(MOM化), 脱トリチル化を経て(S)-45 (54% (3工程)), (R)-46 (77% (3工程)), 39から3.9% (10工程)とした。これらを酸化, メチル化の後脱保護すると, 2-ヒドロキシ-3-オクタデセン酸メチル(S)-34 (30% (3工程))が, 38から1.0% (12工程), (R)-34 (33% (3工程))が, 39から1.3% (13工程)の収率でそれぞれ得られた。比旋光度を天然物由来の34と比較することにより, symbioramideの構成脂肪酸2の絶対配置は, L-アスコルビン酸誘導体39由来の34, 即ち(R)配置であることが判った(Scheme7)。



Scheme 8



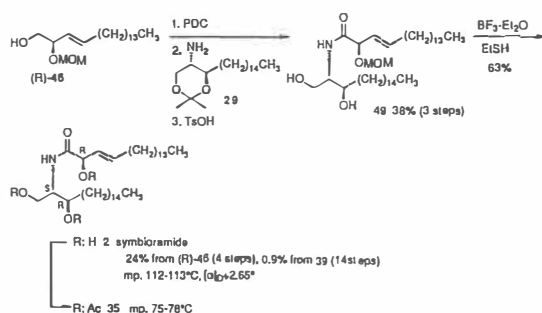
Scheme 9

また別ルートとしてアラナートを用いた反応について検討した。1-ヘキサデシン47をアラナートとした後アルデヒド(R)-41を反応させると, 光学活性なアリルアルコール40が得られ(64%), MOM化, 脱保護により, ジオール48とし(56% (2工程)), さらに酸化, 還元を経てアルコールを得た[75% (2工程), 47から27% (5工程)]が, 比旋光度の符号から, 非天然型の脂肪酸(S)-46であることが判った(Scheme 8)。

2.3 (+)-シンビオラミド(2)の全合成⁷⁾

アミノジオール骨格についてはL-セリン誘導体44⁶⁾を出発原料に用い, 接触還元でテトラヒドロ体43とし(100%), さらに脱アセトニド化, 脱Boc化, アセトニド化によりアミノアセトニド29とした[44から80% (4工程)](Scheme9)。

アスコルビン酸由来のアルコール(R)-46を酸化, 29との縮合, 脱アセトニド化を経て49とした(38% (3工程))。次で49を脱MOM化すると, 目的とする(2S, 3R, 2'R)配置をもつ symbioramide₂を得ることができた[(R)-46から24% (4工程), 39から0.9% (14工程)]。合成した2は天然



Scheme 10

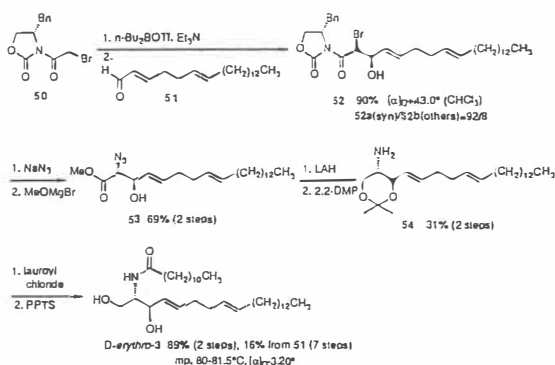
物と完全に一致し、また2をトリアセチル体47に導き、天然物のトリアセチル体と完全に一致したことで確認した(Scheme10)。

3. (+) *Erythro*-N-lauroyldocosasphinga-4,8-dienine(3)の合成とその絶対構造の決定

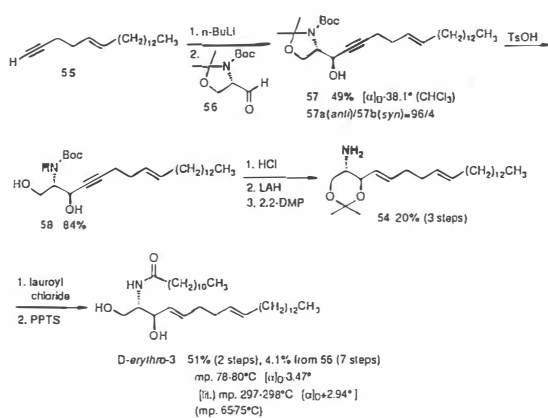
イソギンチャク的一种 *Anemonia sulcata* の触手より単離された新規セラミド(+)-*erythro*-N-lauroyldocosasphinga-4,8-dienine³⁾ について、2種の異なったキラル合成法によりD-*erythro*-3を合成し、その融点について真偽し、また絶対構造を決定した⁹⁾。

キラルなオキサゾリジノン50をポロンエノレートとした後、ジェナール51を反応させると立体選択的にβ-synのプロムヒドリン52が得られた(90%)。52をアジド置換した後、メタノリシスによりメチルエステル53とした[69%(2工程)]。53を還元、アセトニド化によりアミノアセトニド54とした後[31%(2工程)]、ラウロイル化、脱アセトニド化すると、D-*erythro*-3を得ることが出来た[89%(2工程)、54から16%(7工程)]。融点は、80°C前後の値を示し、また比旋光度は文献記載値とは逆の符号を示した(Scheme11)。

またアルキン55をリチオ化した後、L-セリナル誘導体56と反応させると、立体選択的にanti付加体57aが得られた(47%)。57aを脱アセ



Scheme 11



Scheme 12

トニド化により58とし(84%)、脱Boc化、三重結合の選択的還元、アセトニド化を経て、アミノアセトニド54とした後[20%(3工程)]、アシル化、脱保護すると、D-*erythro*-3を得ることが出来た[51%(2工程)、56から4.1%(7工程)]。融点はやはり80°C付近の値を示し、また比旋光度についても文献記載値と逆の符号を示した(Scheme12)。さらにこの2種のキラル合成で得られたD-*erythro*-3は、先に別途合成で得られた(-)-3と各種データが完全に一致した。また融点についても、Guyot博士より戴いた天然の標品について自ら測定したところ、合成品とほぼ同じ値を示した。

以上のことにより、天然物の文献記載の融点は誤りであり、実際は80°C付近の値であることが判った。またその絶対構造は、天然には非常に珍しいL-*erythro*型、すなわち(2R, 3S)配置であることが判った。今後生物活性についても検討する予定である。

文献

- 1) E. Okuyama and M. Yamazaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 2209(1983)
- 2) a) S. Kodato, M. Nakagawa, K. Nakayama, and T. Hino, *Tetrahedron*, **45** (no.23), 7247 (1989); b) S. Kodato, M. Nakagawa, and T. Hino, *ibid.*, **45**(No.23), 7263 (1989).

- For other total synthetic works of 1b: K. Mori and T. Kinsho, *Liebigs Ann. Chem.*, 807 (1988); c) N. P. Singh and R. R. Schmidt, *J. Carbohydrate Chem.*, 8, 199 (1989).
- 3) K. -A. Karlsson, in 'Biological Membranes,' ed. D. Chapman, Academic Press, London, 1982, Vol. 4, p. 1.
- 4) a) P. G. Nielsen, J. S. Carle, and C. Christophersen, *Phytochemistry*, 21, 1643 (1982); b) J. H. Cardellina and R. E. Moore, *Phytochemistry*, 17, 554 (1978).
- 5) J. Kobayashi, M. Ishibashi, H. Nakamura, Y. Hirata, T. Yamasu, T. Sasaki, and Y. Ohizumi, *Experientia*, 44, 800 (1988).
- 6) S. Nimkar, D. Menaldino, A. H. Merrill, and D. Liotta, *Tetrahedron Lett.*, 29, 3037 (1988); H. -E. Radunz, R. M. Devant, and V. Eiermann, *Liebigs Ann. Chem.*, 1103 (1988).
- 7) a) M. Nakagawa, J. Yoshida, and T. Hino, *Chem. Lett.*, 1407 (1990); b) J. Yoshida, M. Nakagawa, H. Seki, and T. Hino, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 343 (1992).
- 8) K. Chebaane and M. Guyot, *Tetrahedron Lett.*, 27, 1495 (1986).
- 9) M. Nakagawa, A. Tsuruoka, J. Yoshida, and T. Hino, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 603 (1990).
- 10) T. Hino and M. Nakagawa, *ファルマシア*, 27, No.11 (1991).

II. 平成3年度助成研究課題

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
国枝博信

We have found that reverse vesicles can be formed by mixing biocompatible surfactants such as lecithin-lysolecithin, N^o-lauroyl arginine methylester hydrochloride (LAM)-lecithin, LAM-glycerol monoaurylether, sucrose monoalkanoate (DKE)-hexanol, DKE-hexaethyleneglycol hexadecyl ether (R₁₆EO₆).

We have investigated the structure of reverse vesicles with the help of phase diagrams, small-angle X-ray scattering, video enhanced microscopy, freeze-fractured transmission electron microscopy. We have confirmed that reverse vesicles form from lamellar liquid crystal swelling a large amount of oil. We have also determined and reported spontaneous formation of reverse vesicles from an isotropic solution in a DKE/R₁₆EO₆/decane system. The effect of the mixing ratio of surfactants and water content on the stability of reverse vesicles was also investigated in the DKE system.

1. 緒言

リン脂質などの両親媒性分子を水に分散させると生体膜の基本構造¹⁾と同様の親水基を外側に向けた2分子膜が閉じたベシクルあるいはリポソームと呼ばれる小胞体を形成する。ベシクルは1964年の発見以来²⁾、基礎・応用の両面から広く研究され、現在も物理化学、生物化学(物理)などの分野の主要な研究対象の一つである^{3, 4)}。それに反して、炭化水素など非極性溶媒中に分散する親水基が内側を向いた逆2分子膜からなる小胞体、逆ベシクルは知られていなかった。一般に界面活性剤などの両親媒性分子を単に油と混合すると分子分散溶液、逆ミセル溶液、または溶けずに固体が分散あるいは沈澱するのみである。このため、通常のベシクルと比較して発見が遅れたものと考えられる。

逆ベシクルは新しい自己組織体であり、界面活性剤の会合原理に新たな知見を与えたり、生体膜

の安定性に対する知識を加えることができ、さらに非極性溶媒中の分散系の安定性に関する研究対象になるなど基礎研究にとって極めて重要な意味を持つ。それだけでなく、油中での有用物質の保持、放出制御、マイクロカプセル化など化粧品を初めとする広い分野で応用が考えられる。

我々は従来の発想と異なり、逆ベシクル生成には親水基間の相互作用を調節することが必要であるとの認識から少量の水を添加することにより、通常のポリオキシエチレン型非イオン界面活性剤を用いて世界で初めて逆ベシクルを発見することに成功した⁵⁻⁷⁾。さらに同様の考えで、イオン性界面活性剤あるいは非イオン-イオン混合界面活性剤系においても逆ベシクルを生成することができた^{8, 9)}。ところが、今まで発見された逆ベシクルは何れも極めて不安定であり、すぐ沈降、分離してしまう。

本研究は逆ベシクルの基礎・応用に関する継続的研究の第一段階として、化粧品などの分野に用

いることのできる生体適合性の良い界面活性剤を使用して逆ベシクル生成の可能性を検討し、その構造を確認し、さらに生成・安定条件を明らかにして粒径を制御する手段を見いだすことにある。将来的には逆ベシクルの基礎研究のみならず応用研究に発展させる考えである。

本報告においては最初、種々の生体適合性界面活性剤系における逆ベシクル生成について述べた後、安定な逆ベシクルを生成するショ糖エステル系における詳しい研究結果を報告する。

2. 実験

2.1 試料

レシチンはLucus Meyer社製の精製大豆レシチン(Epicron 100)を用いた。塩酸N-ラウロイルアルギニンメチルエステルはスペイン国立化学技術繊維研のInfante博士により提供された試料である。リゾレシチン、ヘキサエチレングリコールヘキサデシルエーテル($R_{16}EO_6$)は日光ケミカルズ(株)製である。ショ糖エステルは第一工業製薬(株)製である。モノ脂肪酸含量は95%以上であり、脂肪酸の鎖長分布は C_{14} 10%, C_{16} 40%, C_{18} 50%である。

2.2 実験方法

2.2.1 光学顕微鏡観察

逆ベシクルの観察にノマルスキー型微分干渉顕微鏡(ニコンX2F-NTF-21)に画像処理装置、Argus10(浜松ホトニクス)を用いるVideo Enhanced Microscopy (VEM)を使用した^{10, 11)}。蛍光顕微鏡はオリンパス製(BH2-RFC)を用い、高感度テレビカメラをつかい、水溶性蛍光物質Calceinを添加し、逆ベシクルのベシクル膜を観察した。

2.2.2 電子顕微鏡

凍結切断法で試料を調製し、透過型電子顕微鏡で観察した¹²⁾。試料ホルダーに逆ベシクル分散液を載せ、液体窒素で153Kまで冷却した。凍結

した試料を切断装置(Eiko FA-2/2A)を用い 2.7×10^{-5} Paの高真空下で切断した。切断試料を白金および炭素でShadowingを行いレプリカを作製した。レプリカを透過型電子顕微鏡(日本電子, JEOL JEM-1200EX)で観察した。

2.2.3 小角X線散乱(SAXS)

液晶あるいは遠心分離機で沈降させた逆ベシクルをX線用毛細管(直径1.5mm)に詰め熔封した。2分子膜の面間隔を出力18kWの小角X線装置(理学, RU-300)で測定した⁶⁾。

2.2.4 FT-PGSE NMR法

スウェーデン, ルント大学(Lindman教授, およびOlsson博士)の協力により, フーリエ変換パルス磁場勾配スピネコーNMR法により溶液中の界面活性剤の拡散係数を測定した¹³⁾。

3. 結果と考察

3.1 生体適合性界面活性剤による逆ベシクル生成(成果1)

逆ベシクルは通常のベシクル, リポソームと全く対称的な自己組織体であるから, その生成条件も逆になる。即ち, 通常のベシクルにおいては疎水基間の相互作用が2分子膜形態を維持し, 親水基は水との親和性に寄与していると考えられる。一方, 逆ベシクルの場合は, 疎水基(親油基)は溶媒との親和性に寄与するため, 通常の炭化水素鎖で充分であり, 親水基は逆2分子膜構造を維持するため強い相互作用が必要であると考えられる。従って, 通常のベシクル生成には比較的親油性の両親媒性物質が用いられるのに対して, 逆ベシクルの場合は親水性の必要がある。ただし, 油中の両親媒性分子は液体状態でなければ逆ベシクルを形成しない。

以上の考え方を基に, レシチン-リゾレシチン系LAM系, ショ糖エステル-ヘキサノール系, リゾレシチン-モノグリセリド系で逆ベシクルを生成し, VEM, 蛍光顕微鏡で逆ベシクル構造を明らかにした。このように, 逆ベシクルの一部の

特殊な界面活性剤系で生成するのではなく、一般的な現象であることが分かった。

3.2 逆ベシクルの微細構造(成果2)

ショ糖エステル-ヘキサノール系において、安定な逆ベシクルが生成することが明らかになったのでその構造を検討した。脂肪酸が一つついたショ糖エステルは極めて親水性の強い界面活性剤であり、特に脂肪酸が直鎖の飽和炭化水素鎖からなる場合、油には溶解しない。したがって、ヘキサノールのような両親媒性物質を加えて膜を柔軟にする必要がある。図1に相平衡図を示す。図のようにある混合比率でラメラ液晶相が出現し、低濃度側では液晶と油相の2相系が得られた。ここで系を攪はん、超音波処理すると、図2の写真に示すように、逆ベシクルが生成する。この系に、水溶性の色素 Calcein を添加して、蛍光顕微鏡で観察すると(図3)ベシクル膜だけ輝いて見え、確かに内外相が油であることが確認された。さらに、

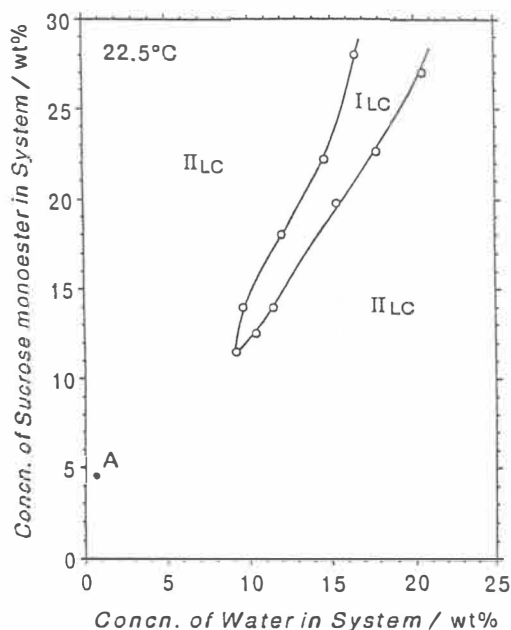


図1 ショ糖エステル/ヘキサノール/水/デカン系の相図。ヘキサノール濃度は系に対して9%一定である。I_{LC}はラメラ液晶1相領域を表し、II_{LC}は液晶を含む2相領域を示す。

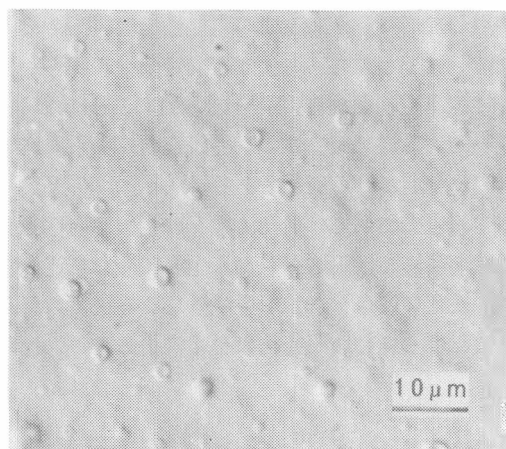


図2 図1中のA点において生成した逆ベシクルのVEM写真。

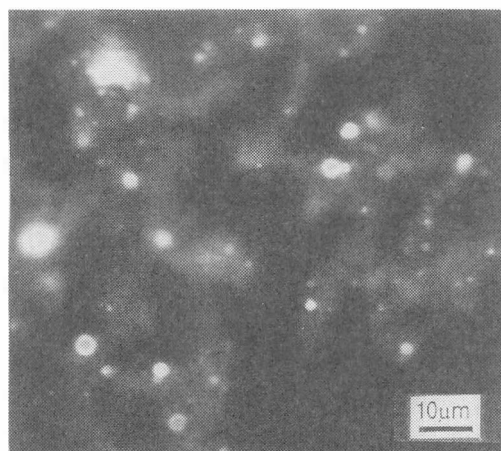


図3 図2の系に蛍光色素 Calcein を添加した蛍光顕微鏡写真。

微細な逆ベシクルに関しては凍結切断法でレプリカを調製し、透過型電子顕微鏡で観察した。結果を図4に示す。図中に比較的大きい逆ベシクルが3つある。上のベシクルはちょうど中程を切断されており、内相、外相とも同じ模様を示し、両相が油であることが分かる。一方、下の右側にあるベシクルは下の部分で切断されており、内相の油は取り除かれている。ベシクルの縁にそって、多重膜が観察される。この厚さを測定すると約10nm

である。この厚さが妥当なものか確認するため、ベシクルを遠心分離機で沈降させ、小角X線散乱測定を行ったところ、面間隔が10.9nmであり、電頭の結果と良い一致を見た。すなわち、図4のベシクルの膜は2分子膜に相当している。CPKモデルによるとショ糖エステル(ステアリン酸エステル)2分子の伸びきった長さは約6.5nmであり、2分子膜は油を層間に膨潤し、親水基間がついている逆2分子膜である。このように、ショ糖エステルが油中で生成する分散系は逆ベシクルであることが確認された。

3.3 逆ベシクルの自発的生成(成果3)

以上述べてきたように、ショ糖エステルなど種々の生体適合性界面活性剤系で逆ベシクルが生成することが明らかになった。ここでは、ショ糖エステル/ヘキサエチレングリコールヘキサデシルエーテル($R_{16}EO_6$)/デカン系で、水を添加しなくても逆ベシクルを生成することを見いだしたので報告する。

図5は30°Cにおける上記3成分系の相平衡図である。 $R_{16}EO_6$ が多い領域では等方性の1液相が得

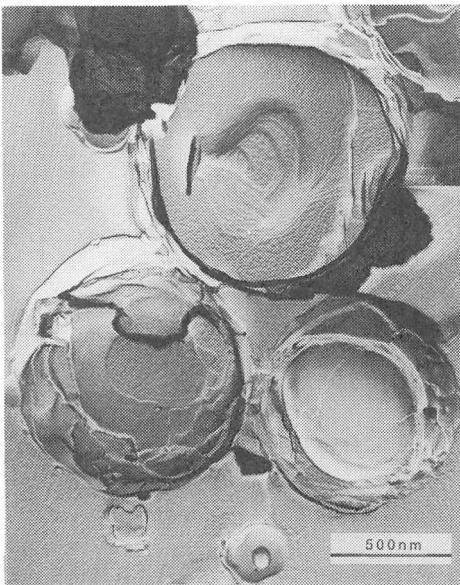


図4 逆ベシクルの凍結断面法による透過電顕写真。

られる。一方、ショ糖エステルの多い領域では液晶が出現する。偏光顕微鏡の観察でラメラ液晶であることが分かった。通常、ラメラ液晶は水の多い領域で形成され、水無しの系で生成するという報告はショ糖エステル系を除いて殆どない¹⁴⁾。このラメラ液晶は親水基間がついており、炭化水素鎖間が離れた構造であると考えられ、いわば逆ラメラ液晶と言える。液晶相の構造をより明らかにするため小角X線散乱で面間隔を測定した。

図6は典型的なSAXS曲線を示す。2つのピークが観測され、その比は1:2であり、ラメラ液晶であることが分かる¹⁵⁾。このラメラ液晶の模式図を図7に示す。SAXSで求められる面間隔は図中のdである。もし、逆2分子膜の長さ、 d_s がデカンの含有量に依存せず、また、各分子の部分モル容積が純粋の場合と同じと仮定すると、次の式が成立する⁶⁾。

$$d = d_s / \phi_s$$

ここで ϕ_s は界面活性剤の容量分率である。界面活性剤の密度を1.0としたときの面間隔と容量分率の逆数との関係を図8に示す。図のように直線関係が得られ、逆2分子膜の厚さはほぼ4.4nm

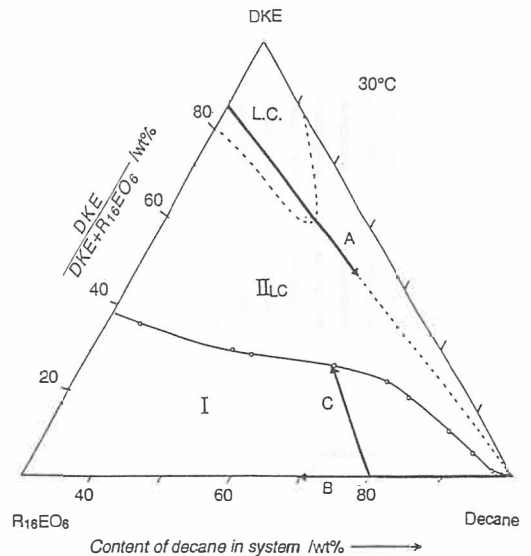


図5 ショ糖エステル/ $R_{16}EO_6$ /デカンの相平衡図。

である。前に述べたように伸びきったショ糖ステアリン酸エステル2分子の長さは6.5nmであり、液晶中ではかなり短くなっていることが分かる。液晶状態では炭化水素鎖は融解状態にあるため、この結果は妥当であると考えられる。また、図から分かるように油の含有量増大と共に面間隔は大きく広がっており、この液晶が逆ラメラ液晶であることは明らかである。

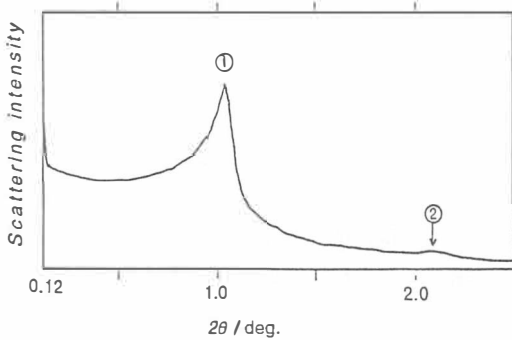


図6 典型的なSAXS曲線。組成はショ糖エステル48%, $R_{16}EO_6$ 12%, デカン40%である。

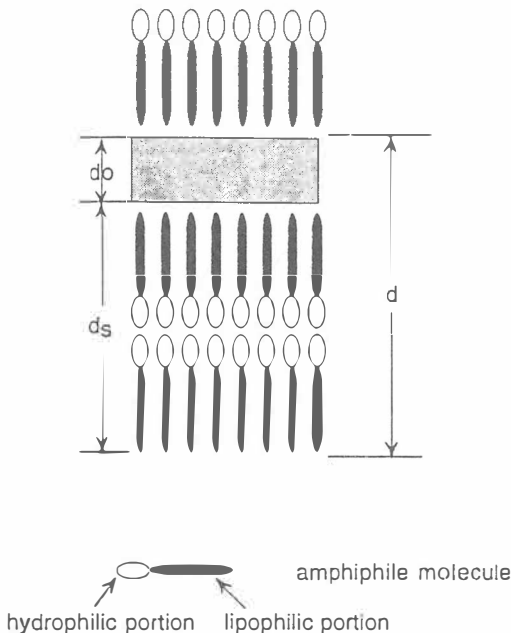


図7 “逆”ラメラ液晶の模式図。SAXSでは図中のdが求められる。

一方、等方性溶液の構造をフーリエ変換磁場勾配スピネコーNMR (FT-PGSE)法で拡散係数を求めることから推定した。 $R_{16}EO_6$ などポリエチレングリコール型非イオン界面活性剤油溶液(水を含まない)では、ほとんど逆ミセルを形成していないことが知られている¹⁶⁾。図9に $R_{16}EO_6$ のエチレングリコール部分をシグナルを利用してNMRで求めた $R_{16}EO_6$ の拡散係数の結果を示す。測定した組成は図5に示してある。ショ糖エステ

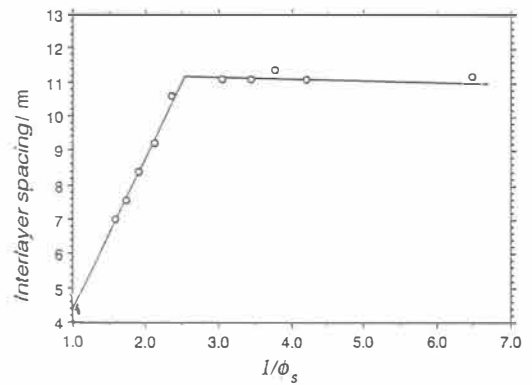


図8 “逆”ラメラ液晶の面間隔と界面活性剤の容積分率との関係。測定は図5中のA線で行っている。

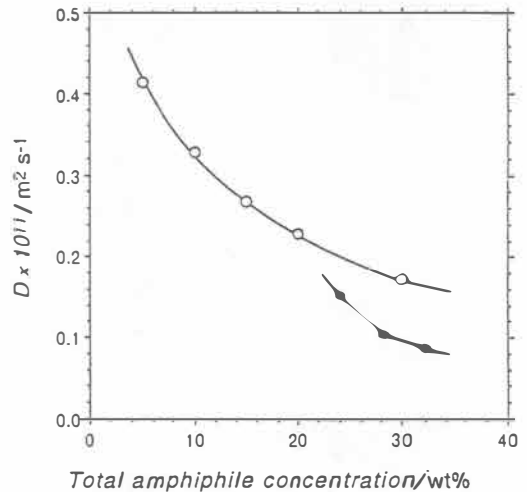


図9 等方性溶液中の $R_{16}EO_6$ の自己拡散係数。白丸はショ糖エステルを含まない系で図5のB線に相当する。黒丸は図5のC線に相当する。

ルが存在しない場合、拡散係数は大きな値を示し、界面活性剤はほぼ単分散溶解していると考えられる。ショ糖エステルが加わると拡散係数は大きく低下し、逆ミセル形成が起きていると推定できる。NMRのシグナルを比較しても、ショ糖エステルを含まない場合、鋭いピークが得られるのに対し、含む場合はブロードなピークが得られ、界面活性剤分子の配向性が高まっていることが分かった。

逆ベシクルは図5の液晶を含む2相領域(特に界面活性剤低濃度)で生成する。この場合、逆ベシクルの生成法は2つ考えられる。1)図5の逆ラメラ液晶を調製し、それをデカン中に細かく分散する方法と、2)最初等方性の逆ミセル溶液を調製して、それをデカンで希釈する方法である。

1)は通常ベシクル生成法であり、大きな塊の液晶をVortex Mixerあるいは超音波などを用いて機械的に細かくする方法である。一方2)はショ糖エステルと $R_{16}EO_6$ の油に対する溶解度の差を利用する方法である。すなわち、前者の油への単分散飽和濃度は極めて小さく(例えばヘプタンに対して0.01%以下)^{17, 18)}、逆に $R_{16}EO_6$ は100倍程度大きいと推定できる。したがって、図5の等方性溶液を調製して、それをデカンで希釈すると、最初に存在していた逆ミセルから $R_{16}EO_6$ が油中に拡散していき、逆ミセル中ではショ糖エステルの割合が増していき、最後にラメラ液晶(逆ベシクル)として、分散すると考えられる。したがって、2)の方法では1)と比較してより細かい逆ベシクルが生成すると予想される。図10に両者の方法で生成した逆ベシクルのVEM写真を示す。予想どおり、2)の方法では細かい逆ベシクルが生成していることが分かる。2)の方法は逆ベシクルが希釈により自発的に生成するという意味で極めて重要なものとする。

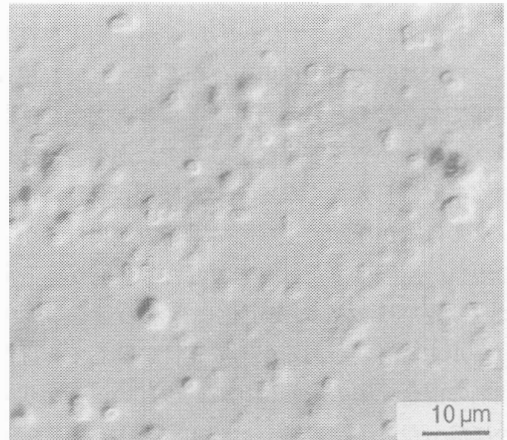
3.4 逆ベシクルの安定性(成果4)

ショ糖エステル- $R_{16}EO_6$ 系の逆ベシクルの安定性は水の添加量に大きく依存する。図11に両界面活性剤の混合比率と水の添加量を変えた相図を

示す。相図上には逆ベシクルの安定・不安定の領域も同時に示す。逆ベシクルの調製法は次のように行った。所定の組成の試料をVortex Mixerで攪はんした後、水浴型の超音波処理装置で30-60分程度、超音波をあてた後、 $0.6\mu\text{m}$ の穴を持つポリカーボネイトフィルターで濾過して逆ベシクルを得た。

$R_{16}EO_6$ の割合の多い領域では少量の水が加わることにより等方性の逆ミセル溶液相が広がる。一方、ショ糖エステルの多い領域では液晶を含む2液相が広がっている。水を多量に加えて上の境界に達すると液晶は消え、等方性の2液相からな

1)



2)

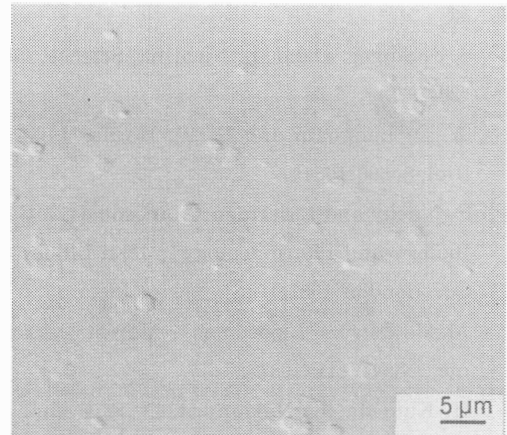


図10 1)の方法により生成した逆ベシクルと2)の方法により生成した逆ベシクルのVEM写真。

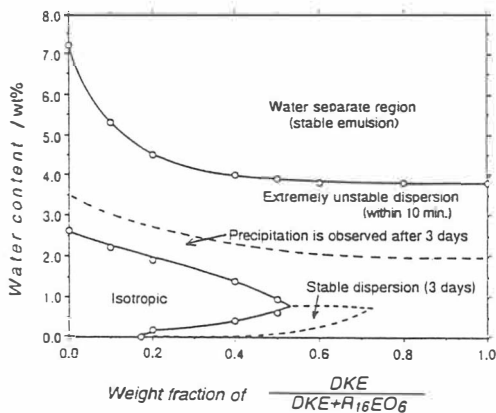


図11 逆ベシクルの安定性に及ぼす水の添加効果。界面活性剤濃度は3%一定である。

る2相領域に入る。すなわち、水が過剰に存在すると親水基間の相互作用を作用を弱め、液晶構造を保てなくなると考えられる。事実、図中の逆ベシクルの極めて不安定なところでは逆ベシクルはすぐに融合し大きくなる現象が観察された。逆ベシクルは水が極端に少なくても不安定になるがこの現象の原因はまだはっきりしない。しかし、図より、逆ベシクルの安定化には水の量をコントロールする必要があるが、安定性に関して界面活性剤の混合比率の影響は比較的少ないことが明らかになった。

文献

- 1) S. J. Singer, and J. L. Nicolson, *Science*, 175, 720(1972).
- 2) A. D. Bangham and R. W. Horne, *J. Mol. Biol.* 8, 660(1964).
- 3) P. Machy and Leserman, "Liposomes in Cell Biology and Pharmacology", John Libbey & Co., London(1987).
- 4) M. J. Ostro, "Liposomes", Marcel Dekker, Inc., New York(1987).
- 5) H. Kunieda, K. Nakamura, D. F. Evans, *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 1051(1991).
- 6) H. Kunieda, K. Nakamura, H. T. Davis, and

D. F. Evans, *Langmuir*, 7, 1915(1991).

- 7) H. Kunieda and M. Yamagata, *J. Colloid Interface Sci.*, 140, 277(1992).
- 8) H. Kunieda, S. Makino, and N. Ushio, *J. Colloid Interface Sci.*, 147, 286(1991).
- 9) 中村和吉, 町山美昭, 国枝博信, *油化学*, 41, 480 (1992).
- 10) B. Kachar, D. F. Evans, and B. W. Ninham, *J. Colloid Interface Sci.*, 100, 287 (1984).
- 11) D. D. Miller, J. R. Bellare, D. F. Evans, Y. Talmon, and B. W. Ninham, *J. Phys. Chem.*, 91, 674(1987).
- 12) W. Jahn and R. Strey, *J. Phys. Chem.*, 92, 2294(1988).
- 13) P. Stilbs and M. E. Mosely, *Chem. Scr.*, 15, 176(1980).
- 14) T. M. Herrington and S. S. Sahi, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65, 1677(1988).
- 15) P. Ekwall, L. Mandell, K. Fontell, *Mol. Lig. Cryst.*, 8, 157 (1969)
- 16) A. Kitahara, *J. Phys. Chem.*, 69, 2788(1965).
- 17) H. Kunieda and M. Yamagata, *Colloid Polym. Sci.*, accepted.
- 18) H. Kunieda, N. Ushio, and M. Miura, *J. Colloid Interface Sci.*, submitted.

研究成果

成果1) Reversed Vesicles from Biocompatible Surfactants. H. Kunieda, K. Nakamura, M. R. Infante, and C. Solans, *Advanced Materials*, 4, 291-293(1992).

成果2) Reverse Vesicles: Counter Structure of Biological Membranes. H. Kunieda, M. Akimaru, N. Ushio, K. Nakamura, *J. Colloid Interface Sci.*, in press.

成果3) Spontaneous Formation of Reverse Vesicles. K. Nakamura, H. Kunieda, U. Olsson, and B. Lindman, in preparation.

成果4) Stability of Reverse Vesicles. H. Kunieda, K. Nakamura, A. Uemoto, N. Azemar, and C. Solans, 研究継続中.

活性酸素, フリーラジカルによる生体膜傷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

二 木 鋭 雄

There is now an increasing number of experimental and epidemiological evidence which indicates that the oxidations of biological molecules and membranes induced by active oxygens and free radicals are involved in a variety of pathological events, cancer and even aging processes. The aerobic organisms are protected against these oxidative stress by an array of defense systems with different functions. Among others, the radical-scavenging antioxidants play an important role to inhibit a chain initiation and break the chain propagation. This study has been performed aiming at elucidating the dynamics and mechanism of action of various natural and synthetic radical-scavenging antioxidants, especially the effect of reaction medium on them. A number of aminophenols, chromanols and related compounds have been studied in homogeneous solution, micelle, liposomal membranes and in *ex vivo* systems. The antioxidant activities of various natural and synthetic carbazoles were studied in the oxidations of methyl linoleate in homogeneous solution and soybean phosphatidylcholine liposomes in aqueous dispersions induced by free radicals. Carazostatin, 1-heptyl-3-hydroxy-2-methyl carbazole, which was isolated from a culture of *Streptomyces Chromofuscus* was found to be a strong antioxidant in both oxidation systems. It was also found that the physical factors such as location and mobility of antioxidant in the microenvironment as well as chemical reactivity toward radicals are important in determining the overall antioxidant potency.

1. 緒 言

活性酸素種やフリーラジカルによって誘起される生体分子や生体膜の酸化的傷害が、種々の疾病、癌、老化とも関わることが明らかになりつつある。それに伴い、生体を持つこれら酸化的傷害に対する防御システムに興味を持たれている¹⁾。生体は活性酸素種やフリーラジカルの生成を抑える予防的抗酸化物、ラジカルを捕捉安定化する抗酸化物、さらには修復、再生酵素を有している。本研究ではラジカル捕捉型抗酸化物について、特に種々のフェノール、クロマノール、カルバゾールおよび類縁化合物の抗酸化活性、ビタミンE(α -トコフェロール)の膜における抗酸化作用のダイナ

ミックスについて検討した。

2. 実 験

2.1 試 薬

酸化反応では、生体脂質のモデルとして高度不飽和脂肪酸エステル1種であるリノール酸メチル(MeLH)、およびリン脂質1種である大豆ホスファチジルコリン(soyPC)をそれぞれ常法により精製した後、基質として用いた。抗酸化物は市販のものをそのまま用いた。使用した化合物を図1に示す。連鎖開始剤としては市販の脂溶性アゾ化合物2,2'-アゾビス(2,4-ジメチルバレロニトリル)(AMVN)と、水溶性アゾ化合物2,2'-ア

A Study on the Inhibition of Oxidative Damage of Biological Membranes Induced by Active Oxygens and Free Radicals

Etsuo Niki

ゾビス(2-アミノプロパン)ジヒドロクロリド(AAPH)を用いた。

スピラベル剤として、シグマ社製のステアリン酸のドキシル誘導体(NS)を用いた。ラベル剤はベンゼン溶液を丸底フラスコにとり、ベンゼンを減圧下除去してフラスコ壁に薄膜とし、そこへリポソームサスペンションを添加、インキュベートして取り込ませた。

2.2 実験操作

2.2.1 均一溶液系における酸化反応実験

MeLH453mM, AMVN0.20mMに各種抗酸化物を5 μ M加えた均一溶液を37 $^{\circ}$ C大気下で反応し、酸化により生成するリノール酸メチルの共役ジエンヒドロペルオキシドをHPLC-UVで分析した。分析条件は、カラムLC18(Supelco), Eluent MeOH/H₂O 95/5(v/v)で分離し、UV 234nmで測定した。

2.2.2 ミセル系における酸化反応実験

MeLH 143mM, AAPH 5mMを加えたSDSミセルに抗酸化物を5 μ M加え、37 $^{\circ}$ C, 大気下で反応を行ない、MeLH酸化過程における酸素吸収速度をO₂モニターを用いて測定し、酸化速度を求めた。

2.2.3 リポソーム膜系における酸化反応実験

soy PC 5mM, AMVN 1mMのリポソーム膜を作製し、37 $^{\circ}$ C, 大気下で酸化反応を行ない、酸化により生成する共役ジエンヒドロペルオキシドをHPLC-UVで定量した。分析は、Supelco社製のシリカカラムを用い、Eluent MeOH/40mM phosphate 90/10(v/v)で分離し、UV234nmで測定した。

2.2.4 ESR 測定

スピラベル剤の減少はそのESR吸収強度の変化を測定することにより行なった。ESRスペクトルの測定は、水溶液用石英偏平セルと温度可変装置付キャビティを使用し、日本電子(株)製、X-バンド, FE-1Xを用いて行なった。

3. 結果と考察

3.1 均一溶液系における各種抗酸化物の抗酸化活性

アセトニトリル均一溶液系における各種抗酸化物の抗酸化活性を比較したところ(図1), 天然に存在する抗酸化物である α -トコフェロール(1)が最も優れた抗酸化活性を示し、構造の類似したクロマノール類も(1), (2)>(3), (4)>(5)の順にいずれも優れた活性を示した。フェノール類に関してみると(1), (2), (3), (4)>(30), (37), (5), (20), (32), (7)>(10), (8)>(33), (34)の順になり(35), (36), (38)は抗酸化活性を示さなかった。クロマノール類>アミノフェノール類>インドール類>メトキシフェノール類>クレゾール類となることからパラ位やオルト位により強い電子供与

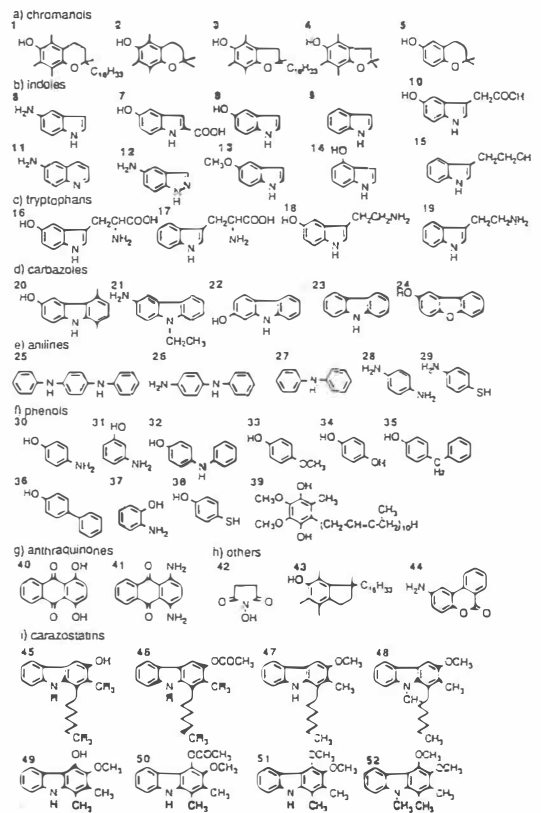


Fig.1 Antioxidants used in this study

性の置換基がくるものほど、優れた抗酸化活性を示すと考えられる。

放線菌より単離された天然化合物である(45)²¹は(1)の約半分程度の優れた活性を示し、(49)も弱い抗酸化活性を示したが、これらの誘導体である(46)、(47)、(48)、(50)、(51)、(52)はいずれも活性を示さなかった。アミノ基は(21) > (20)、(6) > (7)、(28) > (30)、(29) = (38)より、ヒドロキシル基より速くラジカルと反応できるということも推測できる。また(25)は最もすぐれた抗酸化物のひとつである(2)と同程度の、(26)も(25)には若干劣るが(28)よりも優れた活性を示すのに対し(27)は活性を示さなかった。以上のことより、水素が抜けた後のラジカルがより安定なものほど強い抗酸化活性を示すと思われる。トリプトファン類のみミセル系で測定を行なった(アセトニトリルに不溶であるため)ので定性的な評価しかできないが、(16)は活性を示したが(15)は活性を示さなかった。アミノ基、ヒドロキシル基を持たない(9)、(13)、(15)、(23)、活性基がメタ位にある(14)、(22)、(31)、環が電子欠乏となる(11)、(12)、(24)、(44)はいずれも抗酸化活性を示さなかった。

3.2 α-トコフェロール(1)の抗酸化活性に及ぼす溶媒効果

リノール酸メチルの酸化を各種均一溶媒系で行なったところ、溶媒によりリノール酸メチルの酸化速度は異なりα-トコフェロール(1)の抗酸化活性も溶媒の影響をうけることが分かった(図2)。

極性溶媒中で(1)の活性がおちることについて Pryor ら³¹は、クロマン環酸素がクロマノキシラジカルを共鳴安定化するために、(1)が強い抗酸化作用を示すが、プロテック溶媒中ではエーテル酸素の対電子が水素結合することにより抗酸化活性が低下すると報告している。そこでエーテル酸素をもつ(1)とこれに類似しクロマン環酸素をもたない(43)とを、各々プロテックなメタノール中およびアプロテックなヘキサン中で酸化を行ない、これに対する(1)、(43)の抗酸化活

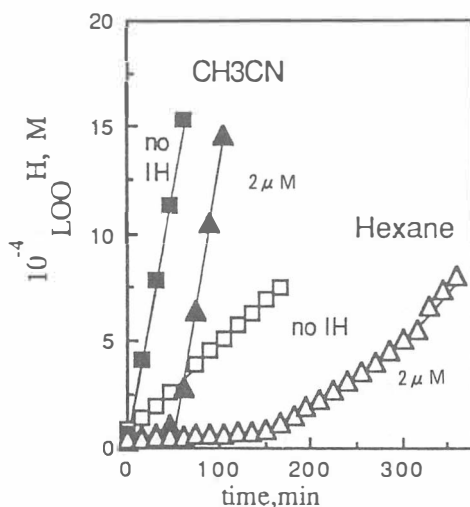


Fig.2 Rate of the oxidation with and without(1) in acetonitrile and hexane. [MeLH]=453mM;[AMVN]=0.20mM

性を調べた。(1)も(43)もともにヘキサン中でメタノール中より約6倍優れた活性を示しエーテル酸素の有無による影響は見られなかった(図3)。このことから(1)の活性がプロテック溶媒中で低下するのはエーテル酸素の水素結合によるものでなく、フェノール性水素の水素結合によるものと考えられる。

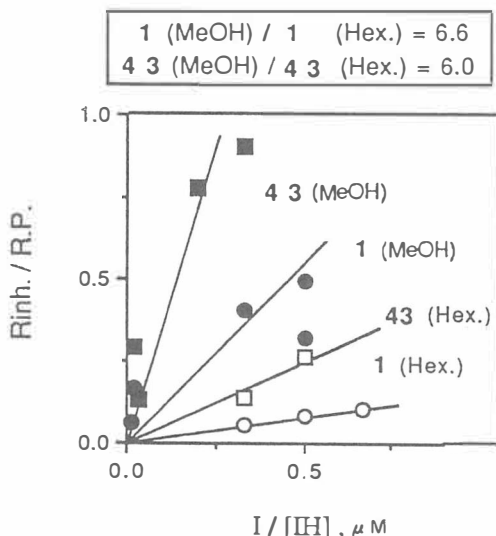


Fig.3 Solvent effect on the antioxidant activities of 1 & 43 in the oxidation of methyl linoleate

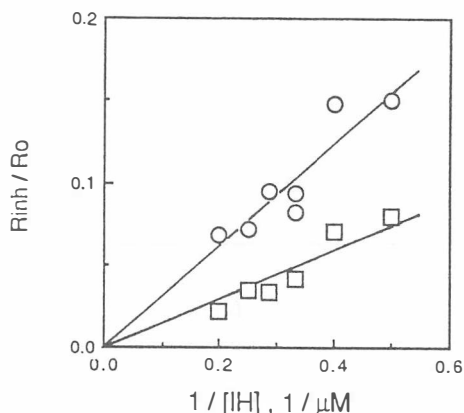


Fig.4 The relationship between R_{inh}/R_o and $1/[IH]$ in the oxidation of methyl linoleate in acetonitrile. $[AMVN]=0.20mM$; $[MeLH]=453mM$ $37^\circ C$ under air

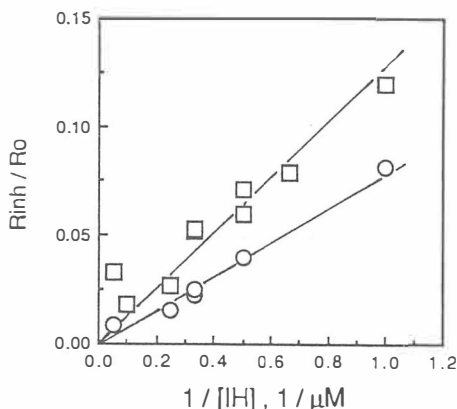


Fig.5 The relationship between R_{inh}/R_o and $1/[IH]$ in the oxidation of soybean PC liposomal membranes. $[AMVN]=1mM$; $[soyPC]=5mM$; $37^\circ C$ under air

3.3 α -トコフェロールの膜中における抗酸化活性

天然化合物である(1)と(45)の抗酸化活性をリポソーム膜中で比較したところ均一溶液系では(1)の方が優れた活性を示したのに対し、リポソーム膜中では(45)の方が優れた活性を示した(図4, 5)。また(1)と類似しているが側鎖のない化合物(2)は均一溶液系では(1)と同程度の、またリポソーム膜中では(45)と同程度の優れた活性を示すことが分かった。このことから(1)はその側鎖の影響により膜中での動きが制限されていることが示唆される。

3.4 スピンラベル法によるトコフェロールの膜中での抗酸化活性の評価

スピンラベル剤であるドキシルステアリン酸には抗酸化作用があり、それ自身ラジカルと反応して消費されていく。リポソーム膜に α -トコフェロールとドキシルステアリン酸を共存させると、両者ともにラジカルを競争的に捕捉して減少して

いく。 α -トコフェロールがラジカルを捕捉する分だけ、スピンラベル剤の消費は抑えられる。大変興味深いことに、ドキシルステアリン酸の作用部位であるN-オキソドを膜の内部深くにおくほど、 α -トコフェロールはドキシルステアリン酸の消費を抑制しにくくなることが分かった。すなわち、 α -トコフェロールの活性部位であるフェノール性OH基は膜表面にあり、ラジカルが膜の内部に入るほど捕捉しにくいことが明らかとなった。

文献

1. 二本鋭雄, 活性酸素種の化学, 日本化学会編, PP. 177-190, 学会出版センター, 東京, 1990.
2. Kato, S., Kawai, H., Kawasaki, T., Toda, Y., Urata, T. and Hayaishi, Y., J. Antibiotics, 42, 1879-1881(1989).
3. Pryor, W. A., Strickland, T. and Church, D. F., J. Am. Chem. Soc., 110, 2224-2229 (1988).

化粧品原料として竹節人參の組織培養による 物質生産ならびに大量増殖に関する研究

広島大学医学部

神田博史

Panax japonicus C. A. Meyer is a perennial herb of the Araliaceae family, indigenous to Japan and China. *Panax japonici* Rhizoma (Chikusetsu-ninjin, in Japanese), the dried rhizome of this plant, has been utilized for hundreds of years in Japan as a drug for gastroenteric disorder, antiulcer, expectorants, and antipyretics. Several oleanane saponins, chikusetsusaponin-I_b, -IV, -IV_a, and -V, along with dammarane saponins, chikusetsusaponin-I_a and -III were isolated from the rhizome of this plant. The composition of saponins in the rhizome of Satsumaninjin, which limited distribution in South Kyushu, was remarkably different from that of other *P. japonicus* specimens collected from other places in Japan.

Callus induced from various organs of an *in vitro* plantlet gave embryogenesis on the Murashige-Skoog's (MS) medium containing 1 ppm 2, 4-D at higher yield and in shorter incubation time than that of intact plant. When the mature embryo were cultured on the 1/2 MS medium supplemented with GA and BAP (each 1 ppm), shoot formation was induced. Subsequently the shoots were transferred to the 1/2 MS medium supplemented with 1 ppm GA and 10 ppm BAP to form multiple shoot complexes. When the shoots were subcultured in the medium containing 2 or 4 ppm IBA, rooting occurred to form plantlets.

From tissue callus of *P. japonicus* grown in South Kyushu, two dammarane saponins, ginsenosides Rg₁ and Re, and an oleanane saponin (desglucosyl chikusetsusaponin-IV) together with chikusetsusaponin-IV were isolated. From the callus of Hiroshima origin, three new oleanane saponins along with chikusetsusaponin-IV and -IV_a were isolated.

第1節 トチバニンジンの不定胚分化による増殖について

これまで育毛促進効果を有する生薬として当薬(センブリ)何首烏(ツルドクダミ)竹参(トチバニンジン)番椒(トウガラシ)等が報告され、現在、養毛剤として市販されている。また、最近生薬「甘草」の油性エキス(フラボノイド分画)に抗チロシナーゼ作用、紫外線吸収作用、過酸化脂質抑制作用、抗菌作用があることが確認され、化粧品原料としてスキンケアに広範囲な利用が期

待されている。

今回、その中から竹節人參を選び、大量増殖に関する検討、並びに、化学的品質に関する評価を行った。

トチバニンジン (*Panax japonicus* C. A. MEYER, ウコギ科 Araliaceae) は、日本特産の多年生草本で、北海道、本州、四国、九州の山地の樹陰に自生する。根茎は結節があって地中を長く横走、やや肥厚し白色、各節の上面に茎を付着していた跡がある。根茎が竹の節に似ることから竹節人參と呼ばれるが、その根茎を通例湯通しした

Studies on the Constituents and Mass-propagation in Cultures of *Panax japonicus* for Cosmetic Materials.

Hiroshi Kohda

ものを生薬「竹節人參」とする。*Panax*属植物で根茎が発達したものは他にも多数あり、中国西南部にも同名の植物がある他、節間が細く長く延びた数珠状の根茎を持つ珠子参(*P. japonicus* C. A. MEYER var. *major* (BURK.) C. Y. WU et K. M. FENG), 小葉が竹節人參に較べて細長い狭葉竹節参(*P. japonicus* C. A. MEYER var. *angustifolius* (BURK.) CHENG et CHU)などが知られている。一方薬用人參として有名なオタネニンジン(直根型で、同じ型のものにはアメリカ人參(広東人參, 洋参, *P. quinquefolium* L.), 三七人參(田七, 金不换, *P. notoginseng* (BURK.) F. H. CHENG)など約5種が知られている。

竹節人參は、福井、長野、山形、群馬、香川、鹿児島などの各県が産地であり、ほとんど野生株の採取に頼っているが、近年試作が行われている。10~11月頃、野生の根茎を掘り、細根を除いて水洗、湯通して乾燥する。竹節人參は、配合剤(健胃剤、去痰剤など)の原料とするが、漢方の方剤(処方)に人參と使い分けて用いることがある。その含有成分については主としてサポニン類について詳細な研究がなされてきた¹⁻⁴⁾。これらの研究から、自生地によるサポニン類の質的、量的変異が認められ⁵⁻⁹⁾、産地による品質の不均一性が大きいことが明らかとなった。また、近年の乱獲により野生株が減少し、資源の枯渇も懸念されるが、本植物の栽培法はいまだ確立されていない。このような現状から、本研究は、組織培養によるトチバニンジン(トチ)の優良品種の育成とその増殖による資源確保を目的とした。

そこで、各器官の組織を用いた培養法を検討し、その増殖法を確立した。各器官としては、花芽、茎、葉、および根茎を用いて培養した。

第1項 各器官からのカルスおよび不定胚形成

カルス誘導と再分化、あるいは不定胚分化等は、培養条件のうち、とくに添加ホルモンの種類と濃度に影響され、また、実験に用いる器官によっても差異があることが報告されている。このためト

チバニンジン(トチ)の各器官の組織を用いて、カルス化と不定胚分化に関して検討し、下記の結果を得た。

1. トチバニンジン花芽からのカルスおよび不定胚形成

1.1 カルスの誘導

基本培地は、Murashige & Skoog(MS)培地¹⁰⁾とし、植物ホルモンとして、2, 4-dichlorophenoxyacetic acid(2, 4-D)を1ppm添加し、滅菌した花芽を植え付けた。そして、まず光の影響を検討するため、全日長下および暗黒下で培養した。15週間培養した結果、全日長下における培養では、カルス化することなく、緑色を呈した花序の個々の花芽が生長し、一部には、開花するものも認められ、増殖の目的には不適當であった。このため、以下のカルス誘導はすべて暗黒下で行った。

花芽切片を2, 4-D 1ppmまたは α -naphthaleneacetic acid(NAA)1ppm添加MS培地で15週間培養した結果、2, 4-DおよびNAA添加区とも100%のカルス化が認められた。形成カルスの生重量を比較すると、2, 4-D添加区がNAA添加区に比べ約3倍であった。

1.2 不定胚形成

2, 4-Dによる誘導カルスは、散形花序全体がカルス塊となり、最初淡黄白色の柔らかいカルスであったが、だいに淡褐色の部分が増えるようになり、15週間後には球状胚から心臓型胚に至る各ステージの不定胚が形成された。不定胚形成率は80%と良好であった。

1.3 胚の生育と二次不定胚

これら不定胚を形成したカルスは同一条件下6週間毎に継代することにより、各世代ほぼ同等のカルス増殖と同時に全カルス切片より不定胚形成が認められた。しかし、これらの不定胚は球状胚から心臓型胚まで、胚の生育状態が不均一であるため、胚の生育促進と二次不定胚の形成を目的として、球状胚のみを選び、その切片をNAAと6-benzylaminopurine(BAP)添加培地で、全日長下10週間培養した。結果はFig. 1に示す通り、

花芽由来の不定胚はNAA 2ppmとBAP 5ppmおよび10ppm添加区において、二次不定胚の形成率が100%と良好であった。このうちNAA 2ppm, BAP 10ppm添加区はその重量増加率から、二次不定胚の成熟促進が認められ、大部分の胚が心臓型胚を形成した。NAA 2ppmとBAP 2.5, 5および10ppm添加区では約半数の切片から平均1~2本のshoot形成が認められた。この傾向はNAA 1ppm添加区においてもみられ、約30%の切片から平均1本のshoot形成が認められた。

なお、NAA 3ppm添加区では、二次不定胚の形成、胚の成熟促進ともに不良で、再びカルス化する切片も認められた。

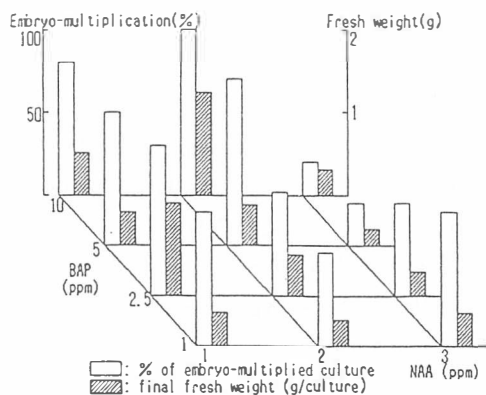


Fig. 1 Embryo Multiplication from Flower Bud Culture condition: in MS medium, at 25 ± 1 °C, under continuous light, in 10 weeks.

2. 根茎からのカルスおよび不定胚形成

2.1 カルスの誘導

根茎切片を花芽切片と同様に、2, 4-D 1ppm, NAA 1ppm添加MS培地で、暗黒下15週間培養した結果、2, 4-D 1ppm添加区で55%, NAA 1ppm添加区で64%の切片がカルス化した。しかし、両添加区ともカルスの増殖が不良で、継代を重ねるに従って増殖が阻害され、枯死するカルスが多く、不定胚分化には至らなかった。このため、2, 4-Dとkinetinの組合わせによる添加濃度を検討した。

根茎切片を2, 4-Dおよびkinetinの0, 0.02, 0.2, 2ppm添加培地で、暗黒下6週間培養を行った結果、カルス形成が認められたのは、2, 4-D 0.02ppmとkinetin 0.02, 0.2ppmの添加区、2, 4-D 0.2ppm添加区の全区および2, 4-D 2ppmとkinetin 0, 0.02, 0.2ppm添加区である。しかし、2, 4-D 0.2ppmとkinetin 0, 0.02, 0.2, 2ppmの組合せの添加区以外ではカルスの増殖率も低下し、枯死するに至った。2, 4-D 0.2ppm添加区のうち、kinetin 2ppmとの組合せ添加区が最も良好で、6週間培養後のカルス生重量は0.7gであった。

2.2 不定胚形成

2, 4-D 0.2ppm, kinetin 2ppm添加区による誘導カルスは6週間毎に約1年間継代を繰り返したところ、40%のカルス切片からX不定胚形成が認められた。不定胚形成状態は花芽由来カルスからの不定胚形成と同様であった。なお、1年半後には2, 4-D 0.2ppm添加全区において、継代培養カルスより不定胚分化が認められた。

2.3 胚の生育と二次不定胚

次に2, 4-D 0.2ppm, kinetin 2ppm添加区において得られた不定胚を、0, 0.2, 2.0, 20ppmの濃度のNAAおよびBAP添加培地で全日長下、6週間培養したところ、いずれの組合せにおいても二次不定胚の形成率は100%であった。NAA 20ppm添加区を除いたほぼ全区で、約10倍の増加率が認められ、二次不定胚の形成と成熟促進が確認された。

なお、NAA-kinetin, indole 3-acetic acid (IAA)-kinetinの添加実験を行った結果、NAA-BAPの添加区に比べ、二次不定胚の形成率には差がないものの、その増加率はいずれも劣り、さらに、異常組織を形成するものが多く認められた。

3. 茎および葉のカルス形成

葉切片および茎切片を2, 4-D 1ppmおよびNAA 1ppm添加培地で、暗黒下15週間培養した

結果、葉切片のカルス化率は2, 4-D, NAA添加区とも100%であった。生重量は他の器官に比べ、最高値を示した。一方、茎切片のカルス化率は低く、15週間の培養期間中に、カルス化することなく枯死する切片が多かった。これら葉および茎由来のカルスを継代したが、いずれも不定胚分化には至らなかった。

4. まとめ

以上、トチバニンジンの花芽、茎、葉および根茎の各部位を用いた組織培養を検討した結果、すべての部位がカルス化した。このうち、葉を用いた場合、カルス化率とカルスの重量増加に関しては、最高の結果が得られたが、増殖につながる不定胚誘導には至らなかった。花芽由来のカルスは15週間の培養中に不定胚を形成した。また、根茎の場合には約1年間の継代培養後、不定胚誘導に成功した。次に、花芽由来および根茎由来の不定胚を用いて発芽の検討を行った。

第2項 胚の発芽について

1. 不定胚の発芽条件の検討

花芽由来の不定胚の場合、さきの二次不定胚の形成培地において、shoot形成が認められたが、大部分の胚および根茎由来の胚は、同一培地で培養を続けると発芽することなく、再びカルス化したり、異常組織を形成したりした。そこで不定胚の発芽条件について検討した。

予試験的に、花芽および根茎由来の両不定胚をgibberellin A₃ (GA)およびBAP各1ppmを添加したMS培地で継代培養すると、大部分の胚は正常に発芽することなく、再びカルス化したり、異常な組織形成をすることが明らかとなったので、無機塩濃度を1/2および1/4としたMS培地にGA, BAPを添加し、発芽状況を検討した。この結果、GA 1ppmおよびGA, BAP各1ppmを添加した両1/2MS培地で、それぞれ80%および85%の胚が発芽した。

2. まとめ

以上より、成熟胚の発芽はGA, BAP各1ppm添加1/2MS培地が適していることが明らかとなった。本添加区においてはshootのみ形成するものや、shootと発根が同時に起こるものなどが認められた。また、6週間後には根茎の形成が認められるものもあった。

第3項 発根について

1. 発根条件の検討

胚の発芽に際し、shoot形成と同時に発根するものも一部認められたが、shoot形成のみにとどまるものが大部分であった。そこでshootの発根について検討した。

IAA添加区では発根する個体は認められなかった。Indole-3-butyrlic acid (IBA)添加区では1および2ppm添加区とも発根が認められるものの、8個体中6個体のshootはshoot基部からカルス化が起こり、15週間後にはshoot全体がカルス化するに至った。NAA 1ppm添加区では、すべてのshootが発根し、平均発根数6.8本と良好な結果が得られた。0.5ppm添加区においても10個体中6個体のshootから根の形成が認められた。

2. まとめ

以上より、shoot形成した個体の発根にはNAA 1ppm添加区が適していることが明らかとなった。これらの幼植物はバーミキュライトへ移植し栽培中である。

不定胚によるトチバニンジンの増殖法の模式図をChart 1に示す。

第2節 トチバニンジンのクローン増殖

*Panax japonicus*の花芽および根茎由来カルスから誘導した不定胚による増殖法については前に述べた。しかし、2年間の継代中に、カルスの不定胚形成能および不定胚の再分化能は次第に低下し、ついには失われて、不定胚からのshootも

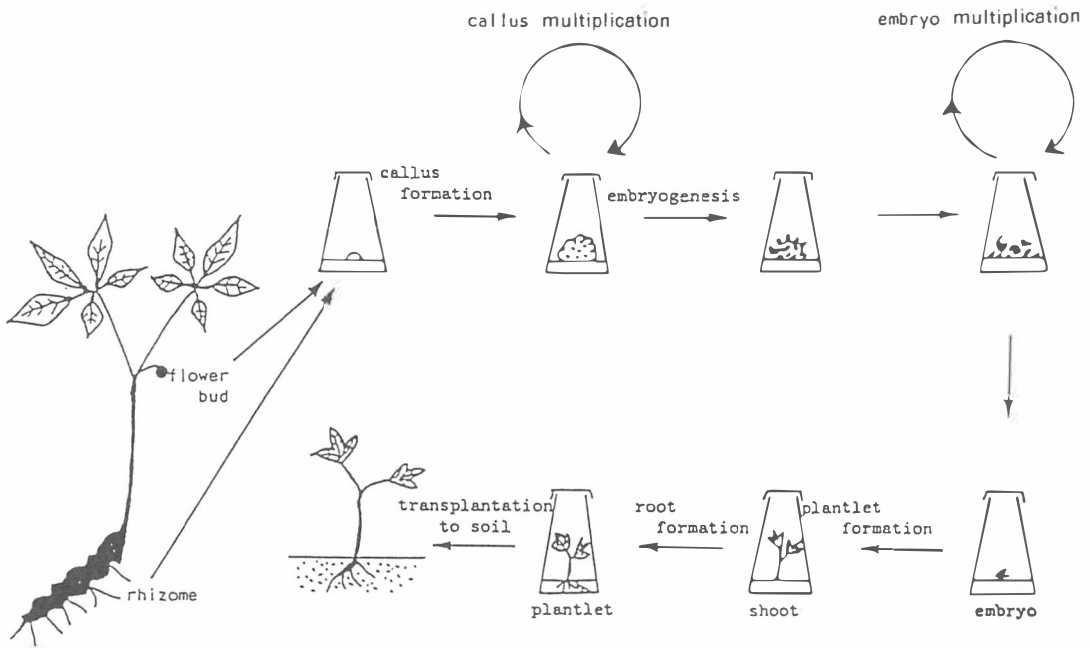


Chart 1 *In vitro* Multiplication of *Panax japonicus*

異常な形態を示すものが観察された。よって、不定胚形成能を保持したカルスおよび再分化能を保持した不定胚を得るため、*in vitro*の様々な器官を培養し、そのカルス誘導と不定胚形成について検討した。また、別に*in vitro*のshootを用いて multiple shoot の形成によるクローン増殖を試みた。

第1項 *in vitro* 植物器官からのカルスおよび不定胚形成

まず、不定胚形成能の回復を目的として*in vitro*の花芽、葉、茎、根茎様組織、細根切片を、1ppm 2, 4-Dを添加したMS培地に植え付け、25°C、暗黒下で培養した。4.5ヶ月後には全種類の切片からカルス誘導できた。*in vitro*の花芽から誘導したカルスからは約2ヶ月後に不定胚が形成された。カルス表面に未熟な、あるいは成熟した不定胚が観察された。*in vitro*の葉と茎から誘導したカルスも4.5ヶ月培養した後に不定胚を形成した。第1節に述べたように親植物の葉や茎切片から誘導したカルスからは不定胚は形成されな

かったが、*in vitro*の葉や茎切片から誘導したカルスは不定胚を形成することが明らかとなった。さらに、今回得られた不定胚形成の比率を、第1節のものと比べてみると、*in vitro*の切片の方が不定胚形成の量が多く、期間も短いようである。これらの結果は、ミシマサイコで得られた結果とよく一致していた。1ppm GAと1ppm BAPを加えた1/2MS培地上での成熟胚の発芽率は前の結果と同様であった。

第2項 *in vitro* 植物器官からの multiple shoot 形成

次に、クローン植物を得ることを目的として、不定胚から再分化させた正常なshootから multiple shoot を形成させるための検討を行った。BAP-GAを含むMS培地およびBAP-GA、BAP-IAAそしてBAP-NAAを含む1/2MS培地に*in vitro*のshootを植え付けた。その結果、multiple shoot 形成に最もふさわしい条件は、1/2MS培地に1ppm GAと10ppm BAPを添加した培地で1株当たりshoot 11本が形成された。1/2

MS培地に5ppm GAと1あるいは5ppm BAPを添加した培地では、1株当たりshoot6本が形成された。MS培地に加えられた様々な量のGA-BAPのほとんどがmultiple shoot形成に効果的であることを示している。しかし、shootの数は、対応する1/2MS培地で得られるものより少なかった。従って、以後multiple shoot形成には1ppm GAと10ppm BAPを含む1/2MS培地を用いることとした。

第3項 発根条件の検討

次に、得られたshootを発根させるため様々な濃度のIAA, IBA, NAAを添加したMS培地に移植した。その結果、2あるいは4ppm IBAを加えた培地が発根に適しており、良好な幼植物形成がなされた。よって、この条件を発根のステージに用いることとした。

第3節 トチバニンジンのカルスのサポニンについて

*Panax*属植物を主成分であるサポニン組成の面からみると、トチバニンジンに代表される根茎型の*Panax*は、オレアノール酸サポニンを主サポニンとして含み、ダマラン系サポニンはそれぞれに特徴的に含まれている。一方、オタネニンジンに代表される直根型の*Panax*はダマラン系サポニンを主サポニンとして含み、オレアノール酸サポニンは微量しか含まないか、全く含まないという共通性がある。

竹節人參の成分については主としてサポニン類について詳細な研究がなされてきた。竹節人參(九州南部を除く)の根茎のサポニンについては、庄司ら¹⁻³⁾によって研究が行われ、オレアノール酸サポニンとして、Chikusetsusaponin-IV, -V, -I_b, -IV_aが、ダマラン系サポニンとして、Chikusetsusaponin-III, -I, -I_aが報告されている。また、地上部のサポニンについては、矢原ら⁴⁻⁸⁾によって研究が進められ、九州南

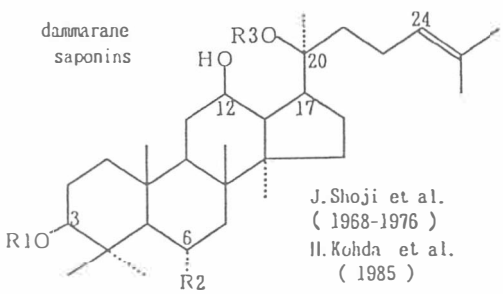
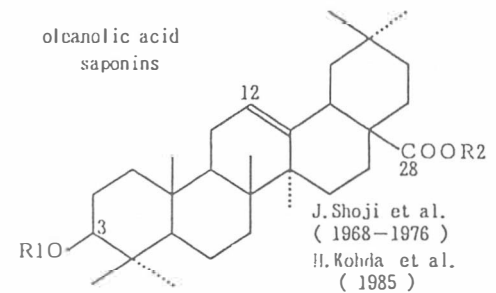
部を除く日本に広く野生する竹節人參葉のサポニンは、生育地に特徴的で太平洋側と日本海側は全く異なっていることが明らかとなった。太平洋側では20(S)-protopanaxatriol系サポニンのみであるが、日本海側は20(S)-protopanaxadiol系サポニンのみで、しかも12-keto体であり、さらに鳥取型と新潟型に分かれる。一方、竹節人參の中で九州南部に野生するいわゆる薩摩人參と呼ばれるものは、日本の普通の竹節人參と比較して外部形態には差がないが、神田らは薩摩人參の根茎のサポニンについて検討し両者の間に明らかな差が認められたことを報告した¹¹⁾。薩摩人參のサポニン組成は、従来報告されている竹節人參より薬用人參に近いものであった。これらの2つのタイプの竹節人參を材料として組織培養を行い、制御された環境下、つまり同一培養条件下において、カルス中に生産される成分に差が現れるか否か検討した。

第1項 広島産竹節人參と鹿児島産竹節人參の成分の違い

神田等¹¹⁾は、竹節人參の中で南九州に野生するいわゆる薩摩人參と呼ばれるものは、日本の普通の竹節人參と比較すると、地上部および地下部の外部形態には差がなかったが、根茎のサポニン分画には明らかに差が認められたことを報告している(Chart 2)。

そこで、広島産のトチバニンジン(従来報告のあった竹節人參に相当するもの)と、鹿児島産のトチバニンジン(神田等の報告する薩摩人參に相当するもの)から誘導したカルスについてサポニン成分の検討を行った。それぞれのカルスについてメタノール抽出を行い、その粗サポニン分画についてFig. 2に示すようにTLCで定性分析を行った。

その結果、成分パターンの異なるトチバニンジンから誘導したカルスのサポニン分画は、ある程度、原植物の成分を反映していた。



○ "Chikusetzu-Ninjin"
● "Satsuma-Ninjin"

- | | | | |
|--|-------------------------------|------|-------------------|
| | R1 | R2 | |
| ○ chikusetsusaponin IVa | : -GlcUA | -Glc | |
| ○● chikusetsusaponin IV | : -GlcUA ⁴ -Ara(f) | -Glc | |
| ○● chikusetsusaponin V (=ginsenoside Ro) | : -GlcUA ² -Glc | -Glc | |
| ○ chikusetsusaponin Ib | : -GlcUA ⁴ -Ara(f) | -II | \swarrow
Glc |
-
- | | | | |
|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|--|
| | R1 | R2 | R3 |
| ○ chikusetsusaponin III | : -Glc ² -Glc | -II | -II |
| | \swarrow
Xyl | | |
| ○ chikusetsusaponin Ia | : -Glc ⁶ -Xyl | -II | -II |
| ● ginsenoside Rb ₁ | : -Glc ² -Glc | -II | -Glc ⁶ -Glc |
| ● ginsenoside Rc | : -Glc ² -Glc | -II | -Glc ⁶ -Ara(f) |
| ● ginsenoside Re | : -II | -O-Glc ² -Rha | -Glc |
| ● ginsenoside Rg ₁ | : -II | -O-Glc | -Glc |
| ● gypenoside XVII | : -Glc | -II | -Glc ⁶ -Glc |
| ● notoginsenoside R1 | : -II | -O-Glc ² -Xyl | -Glc |
| ● notoginsenoside R2 | : -II | -O-Glc ² -Xyl | -II |
| ● notoginsenoside R4 | : -Glc ² -Glc | -II | -Glc ⁶ -Glc ⁶ -Xyl |

Chart 2 Saponins from Rhizomes of *Panax japonicus*

	V	WIVa	Re III	Rg ₁
std. x	○ ○	○ ○	○ ○	○
HC x	○ ○ ○ ○	○		
HR x	○ ○		○	
KR x	○ ○ ○ ○	○	○ ○ ○	
KC x	○ ○ ○	○	○	

Plates: silica gel HF₂₅₄. Solvent: CHCl₃-MeOH-H₂O (30:17:4)
 Colour reagent: H₂SO₄
 std.: standard saponins
 III, IV, IVa, V: chikusetsusaponins-III, IV, IVa, V
 Re, Rg₁: ginsenosides Re and Rg₁
 Samples: crude saponin fractions of *Panax japonicus*
 HC: callus induced from the plant of Hiroshima origin
 HR: rhizome of the plant of Hiroshima origin
 KR: rhizome of the plant of Kagoshima origin
 KC: callus induced from the plant of Kagoshima origin

Fig. 2 Thin-layer chromatogram of saponins from rhizomes and calli of *Panax japonicus* of different origin

第2項 カルスの増殖と成分の抽出

1. カルスの増殖条件

広島県産トチバニンジンのカルス(以下, 広島

産由来カルスと略す)は, 根茎から誘導したものをを用いた。2, 4-D 10⁻⁶M-kinetin 10⁻⁵M添加MS培地上, 25±2°C, 暗黒下で誘導したカルスを, 同条件で6週間毎に継代を繰り返し, 2年間培養して安定したものについてメタノール抽出を行い, TLCで定性分析を行ったところ, 数種のサポニンの存在を認めた。

そこで, カルスのみを大量に得るため, さらに他の植物ホルモンとしてIAA, IBAについても検討を行った。MS基本培地に, IAA:kinetin=0, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴M:0, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴M, あるいはIBA:kinetin=0, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴M:0, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴Mを添加し, 2, 4-D:kinetin=10⁻⁶:10⁻⁵M添加MS培地で培養したカルスを植え付け, 暗黒下, 25±2°Cで培養した。6週間培養した結果, IBA 10⁻⁴Mの系でカルス増殖が旺盛であった。そのうちカルス生長とメタノールエキスのTLCパターンから判断して IBA:kinetin=10⁻⁴:10⁻⁶M添加MS培地をカルス

増殖用最適培地とした。上記培地に移植したカルスは6週間毎に継代し、同時に残ったカルスを収穫した。植物ホルモンの違いによるカルスの成分パターン之差は認められなかった。

鹿児島県産トチバニンジンのカルス(以下、鹿児島産由来カルスと略す)については、2, 4-D 5×10^{-6} M 添加MS培地上、 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、暗黒下で誘導したカルスを、同条件で6週間毎に継代を繰り返し、広島産と同様に収穫した。

2. 広島産由来カルス成分の抽出

収穫した広島産由来カルスは凍結乾燥後(Dry wt. 93 g)、熱メタノールで抽出、メタノールエキス27 gを得、各種クロマトグラフを繰り返した。メタノールエキスのうち26 gを多孔性樹脂DIAION HP-20にて分画し、粗サポニン分画を2.47 g得た。そのうち2.4 gをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、フラクション1-50に分画した。フラクション3, 4からは、メタノールからの結晶化により、結晶(それぞれ、8mg, 20 mg)が析出し、それらは標品との比較により、 β -sitosterol- β -D-glucosideと同定した。また、フラクション26からは、逆相のクロマトグラフによる分離精製を繰り返しCompound 3(9mg)を、フラクション29からはCompound 1, 4(各7 mg)を得た。フラクション34からは、逆相のクロマトグラフにより、Compound 2(10mg)を、フラクション40からCompound 5(17mg)を、フラクション41からCompound 6(7mg)を得た。

3. 鹿児島産由来カルス成分の抽出

鹿児島産由来カルスについても凍結乾燥後(dry wt. 105 g)、熱メタノールで抽出、メタノールエキス41 gを得、各種クロマトグラフを繰り返した。メタノールエキスをDIAION HP-20にて分画し、粗サポニン分画3.7 gを得た。それをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、フラクション1-23に分画した。フラクション5からは、Compound 7(10mg)を、フラクション11からはCom-

pound 8(8mg), 10(4mg)を、またフラクション17からはCompound 9(21mg)を単離した。

第3項 既知化合物の同定

1. 広島産由来

Compound 1, 2は、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、旋光度を測定した結果、標品との比較により以下のように同定した。

1, 2のゲニン部の $^{13}\text{C-NMR}$ シグナルを、既に報告されているサポニンのデータと比較したところ、いずれもoleanoic acidをゲニンとすることがわかった。

$^{13}\text{C-NMR}$ においてCompound 1の糖部のシグナルのうち、 δ 105.8ppmと δ 95.2ppmの2つのアノメリックカーボンのシグナルが観測されたことによって、2つの単糖の存在が示唆された。また、A環およびC-28位のカルボキシル基のグリコシレーションシフトから、それらは3-グリコサイドおよびエステルグリコサイドであることが明らかとなった。2つの単糖類は $^{13}\text{C-NMR}$ の糖部のシグナルパターンから、 β -glucoseと β -glucuronic acidであることが明らかとなった。

上記のことより、1の構造は、 β -D-glucopyranosyl oleanolate-(3)- β -D-glucuronopyranoside か β -D-glucuronopyranosyloleanolate-(3)- β -D-glucopyranoside のどちらかと考えられた。前者は親植物であるトチバニンジンの成分として既に報告されているchikusetsusaponin IV_a (C-IV_a)であるが、1の $^{13}\text{C-NMR}$ データをC-IV_aのものと比較すると、よい一致を示した。 β -glucuronic acidの6位の炭素のケミカルシフトに若干の差が見られるが、これは塩を形成しているためと思われる。青山ら¹²⁾は、竹節人參の粗サポニンはマグネシウム塩を形成していることを報告している。C-IV_aを塩のまま測定を行ったところ1と同様な変化が認められた。よって、1はC-IV_aと同定した。

同様に、Compound 2について検討したところ、 $^{13}\text{C-NMR}$ データより3つの単糖類の存在が

示され、それらは β -glucose, 4-substituted β -glucuronic acid, α -arabinofuranose と推定された。予想されるいくつかの oleanolic acid glycoside のうち、chikusetsusaponin IV (C-IV) の ^{13}C -NMR スペクトルとよい一致を示し、2 は C-IV と同定した。

また、Compound 3 については竹節人参の既知化合物とは一致しなかったが、同じウコギ科の *Cussonia spicata* から得られている 3-(4- α -L-arabinofuranosyl)- β -D-glucosyloleanolic acid¹³⁾ (=desglucosylchikusetsusaponin IV, prosapogenin of chikusetsusaponin IV) について報告された ^{13}C -NMR データと比較したところ、同一物質と思われた。その報告には ^{13}C -NMR の糖部のデータしか記載されていなかったため、ゲニン部は他のオレアナン系 chikusetsusaponin のデータと合わせて比較したところよく一致した。また引用文献¹³⁾ の報告の糖部シグナルの一部の帰属に明らかな間違いが認められた (glucuronic acid の 3 位と 4 位の炭素の帰属を、それぞれ arabinose の 3 位, 2 位と入れ替えた)。

なお、広島産由来のカルスから単離した化合物のうち、4~6 は糖部構造が新しいものであり、 ^{13}C -NMR データよりゲニンはいずれも oleanolic acid であることが明らかとなった。その構造は Chart 3. に示したように推定し、それに従って ^{13}C -NMR の糖部の assignment については、収量が低かったため詳細については検討していない。

2. 鹿児島産由来

Compound 7, 8, 9 は、 ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, 旋光度を測定した結果、標品との比較により以下のように同定した。

7, 8, 9 のゲニン部の ^{13}C -NMR シグナルを、既に報告されているサポニンのデータと比較したところ、7, 8 のゲニンはいずれも 20(S)-protopanaxatriol であり、9 のゲニン部は oleanolic acid であることが明らかとなった。

^{13}C -NMR データの標品との比較により、既知サポニンのうち原植物から報告されているものとして、Compound 7 を ginsenoside Rg₁, 8 を ginsenoside Re, 9 を chikusetsusaponin IV (=2) と同定した。

さらに Compound 10 は、広島産由来のカルスから得られた 3 と同一物質である 3-(4- α -L-arabinofuranosyl)- β -D-glucuronosyloleanolic acid であった。なお、本化合物の報告は原植物(薩摩人参)にはまだない。

第 4 項 まとめ

従来報告されている竹節人参と薩摩人参は成分的に大きな差異がある。つまり、前者が主にオレアナン系サポニンを含むのに対して、後者ではダマラン系サポニンが主であることである。今回、広島産トチバニンジン(従来の竹節人参)由来のカルスからは chikusetsusaponin -IV, -IV_a の他、オレアナン系サポニンのみを単離した。一方、鹿児島産(薩摩人参)由来のカルスからは chikusetsusaponin -IV の他、ダマラン系の 20(S)-protopanaxatriol をゲニンとする ginsenoside-Rg₁, -Re を単離した。このようにカルスの生産するサポニンはそれぞれの原植物の成分を反映したものであった。同じ培養条件下において広島産と鹿児島産のカルス成分が異なり、それぞれ原植物を反映する成分パターンを示したことから、従来の竹節人参と薩摩人参のサポニン類の差異は本質的な差異によるものであり、環境的なものではないことが裏付けられた。従来、それらは同一種として扱われてきたが植物分類学的にも検討を要する。その他の点では、日本の普通の竹節人参に特徴的な 20(S)-protopanaxadiol 系の chikusetsusaponin III の他、いずれのカルスでも diol 系の化合物は確認されておらず、カルスにおいてこの系統のサポニンが確認されないということは興味深い。また、原植物の主化合物である chikusetsusaponin V は今のところ単離されていない。カルスから単離したサポニンの構造を

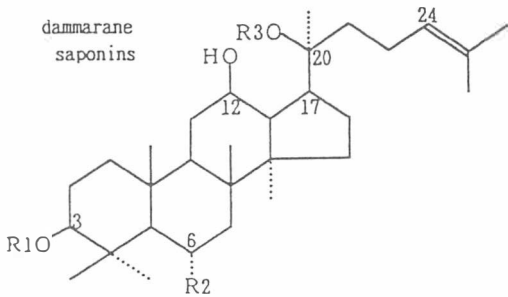
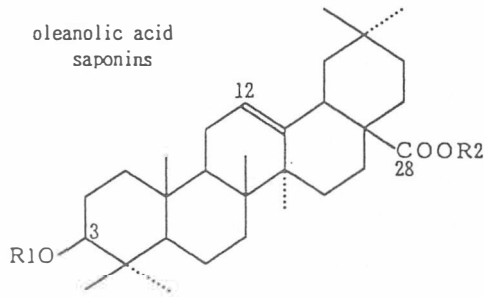


Chart 3 Saponins from Callus Induced from *Panax japonicus*

Chart 3に示した。

総論

現在、市場品の生薬「竹節人參」は国内産および中国からの輸入品を取り扱っている。これらの材料には上記のごとく化学的に本質的な差があることが明らかとなった。化粧品材料として竹節人參を使用するにあっても輸入品と国内産、さらには国内産でも薩摩系とその他の地域のものでは効果に差があることが予想される。天産品である以上、多少のバラツキは致し方ないとしても均一な生薬の安定供給、使用が望まれる。

均一材料の大量生産を期待して、植物組織培養を手段としてカルス生産、種苗生産を行った。カルス誘導に成功し、原植物の本質的な差がそのまま反映された二次代謝産物生産が認められた。しかしながら、20(S)-protopanaxadiol系の化合

○ Callus induced from "Chikusetsu-Ninjin"

● Callus induced from "Satsuma-Ninjin"

- | | R1 | R2 |
|----------|-------------------------------|-------------------------------------|
| ○ 1 | : -GlcUA | -Glc:chikusetsusaponinIVa |
| ○● 2, 9 | : -GlcUA ⁴ -Ara(f) | -Glc:chikusetsusaponinIV |
| ○● 3, 10 | : -GlcUA ⁴ -Ara(f) | -H :desglucosyl-chikusetsusaponinIV |
| ○ 4 | : -GlcUA ² -Glc | -H |
| | | ↙ Ara(f) |
| ○ 5 | : -GlcUA ² -Glc | -Glc |
| | | ↙ Ara(f) |
| ○ 6 | : -GlcUA ⁴ -Glc | -Glc |

- | | R1 | R2 | R3 |
|-----|------|--------------------------|----------------------------------|
| ● 7 | : -H | -O-Glc ² -Rha | -Glc :ginsenosideRg ₁ |
| ● 8 | : -H | -O-Glc | -Glc :ginsenosideRe |

物の生産が認められないため、カルス成分では本物質による効果は期待されない。

一方、不定胚増殖法は人工種子材料にもなる遺伝的に安定した増殖法であり、誘導に成功したことは今後、均一な種苗の大量生産の道を開くことになり、均一な生薬の安定供給につながるものと思われる。

今後、薩摩産、広島産(その他の地域の系)トチバニンジン、さらには各々の培養植物、カルス成分について生理作用を検討する予定である。

引用文献

- 1) 近藤紀子, 庄司順三, 薬学雑誌, 88, 325(1968).
- 2) 近藤紀子, 庄司順三, 南雲昇, 小松信彦, 薬学雑誌, 89, 846(1969); N. Kondo, Y. Marumoto and J. Shoji, Chem. Pharm. Bull., 19, 1103 (1971).
- 3) N. Kondo, K. Aoki, H. Ogawa, R. Kasai and

- J. Shoji, *Chem. Pharm. Bull.*, 18, 1558(1970).
- 4) T. -D. Lin, N. Kondo and J. Shoji, *Chem. Pharm. Bull.*, 24, 253(1976).
- 5) S. Yahara, O. Tanaka and T. Komori, *Chem. Pharm. Bull.*, 24, 2204(1976).
- 6) S. Yahara, K. Kaji(Née Matsuura) and O. Tanaka, *Chem. Pharm. Bull.*, 27, 88(1979).
- 7) S. Yahara, K. Matsuura, R. Kasai and O. Tanaka, *Chem. Pharm. Bull.*, 24, 3212(1976).
- 8) S. Yahara, R. Kasai and O. Tanaka, *Chem. Pharm. Bull.*, 25, 2941(1977).
- 9) S. Yahara, O. Tanaka and I. Nishioka, *Chem. Pharm. Bull.*, 26, 3010(1978).
- 10) T. Murachige and F. Skoog, *Physiol. Plant*, 15, 473(1962).
- 11) T. Morita, O. Tanaka and H. Kohda, *Chem. Pharm. Bull.*, 33, 3852(1985).
- 12) 青山新次郎, 薬学雑誌, 49, 678(1929); *idem*, *ibid.*, 50, 1076, 1163(1930).
- 13) J. Gunzinger, J. D. Msonthi and K. Hostettman, *Phytochemistry*, 25, 2501(1986).

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

松本孝芳

Microscopic structure and properties of ultra fine colloidal particles in aqueous systems were studied using a small angle X-ray scattering and rheological methods. The fine particle studied are micelles of N^{α}, N^{α} -dimethyl- N^{ϵ} -lauroyllysine (DMLL, ampho-teric surfactant) and octa(oxyethylene)monododecylether (C12E8, nonionic surfactant), a small vesicle of didodecyldimethyl ammonium bromide (DMA, cationic surfactant) and a globular protein molecule of ovalbumin (OA).

The scattering intensity I changes according to $I = K_1 q^{-4} + K_2$ in a relatively wide angle region. Here q is the wave vector and K_1, K_2 are constants. The surface roughness defined by the ratio of O_{so}/O_s , where O_s and O_{so} are the specific inner surface of the colloidal particle and a completely smooth sphere, are ca. 3.5 for the DMLL micelle, ca. 2 for the C12E8 micelle, ca. 1.7 for the OA molecule and ca. 5 for the DMA vesicle.

The rheological properties of the OA colloids are very characteristic, i.e. the systems show yield stress σ_y and rigidity G at extremely low concentration of 10^{-4}g/ml and the values of σ_y and G remain almost constant over a wide concentration range from 0.1 to 30 wt%. This phenomenon suggests that the OA system has some auto-controlled mechanism in order to suppress the increase in σ_y and G .

1. 緒言

近年、世の中の多様化および技術的高度化に伴い、種々の機能性を持つ材料として、多くの超微粒子分散系が注目されている。例えば、合成両親媒性物質のミセル、ベシクルおよびその他の二分子膜系は、生体類似コロイド系として種々の刺激-応答系あるいは人工細胞等への利用が試みられている¹⁻³⁾。しかし、それらの試みの多くは実験室段階あるいは可能性の示唆の段階にあり、実用には至っていないのが現状であろう。このような超微粒子分散系を機能性材料として扱う場合、それらの表面(あるいは界面)の持つ意味は非常に大きい。これは粒子の体積に比べて表面の占める割合が大きいからであり、ここに超微粒子系の特徴がある^{4) 5)}。

超微粒子の表面状態は、系の化学的および物理的特性に重要な影響を与える。それではコロイド粒子における表面構造が十分理解されているかという点必ずしもそうではない。固体粒子の場合は、ある分子を吸着させることによって、表面に関する情報がある程度は得ることができる。また最近では光電子分光法あるいは電子回折等も表面構造の解析に利用されている^{6, 7)}。しかしミセル、二分子膜および細胞膜等生体膜あるいは球状タンパク質の表面に関しては、この方法はほとんど利用されていない。それは、これらの粒子表面では分子の運動性が極めて活発であると予想されること、また、これらの粒子を系外に取り出すと粒子そのものが破壊されてしまうからである。従ってこれらの超微粒子が水中に分散している状態のままで、これらの系の表面構造に関する情報を得ることが

Structure and Properties of Disperse Systems of Ultra Fine Particle and Development of Auto-Controlled Colloids

Takayoshi Matsumoto

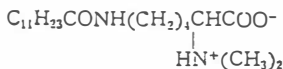
望ましい。

このような観点から、ここでは超微粒子、例えばミセル、微小ベシクルおよび球状タンパク質等の微細構造および表面構造に関する小角 X 線散乱(SAXS)を用いた定量的解析結果について述べるとともに、球状タンパク質コロイド系のレオロジーの特異挙動について述べる。

2. 実験及び解析方法

2.1 試料

試料としては図1に示す両親媒性物質、 N^{α} , N^{ϵ} -dimethyl- N^{ϵ} -lauroyl lysine (DMLL), n-dodecyl octa(oxyethylene glycol) monoether (C12E8), didodecyl dimethyl ammonium bromide(DMA)および鶏卵の卵白に含まれる球状タンパク質であるオヴォアルブミン(OA)の水コロイド系を用いた。ここでDMLL(味の素, 分子量 $M_o=356$)は α -アミノ酸の両性界面活性剤, C12E8(日光ケミカル, $M_o=538$)は非イオン性界面活性剤, DMA(関東化学, $M_o=462$)は二本鎖型陽イオン性界面活性剤である。OA(Sigma, grade V)はSDS-PAAゲル電気泳動によって、単一のタンパク質から構成されていることが確認



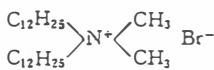
$N^{\alpha}N^{\epsilon}$ -dimethyl N^{ϵ} -lauroyl lysine (DMLL, Ajinomoto)

$M_o=356$



dodecyl octa(oxyethylene glycol) monoether (C12E8)

$M_o=538$



didodecyl dimethyl ammonium bromide (DMA)

$M_o=462$

Fig.1 Chemical formula of the surfactant employed. M_o is the molecular weight.

された。また、光散乱から求めたOAの重量平均分子量は 4.37×10^4 である。

界面活性剤は蒸留水に超音波分散させることによって、OAは20mM 磷酸緩衝液(pH7.0)に溶解させることによって測定試料とした。

2.2 測定

SAXS測定は6m点収束X線カメラ(京都大学超強力X線装置)を用いた⁸⁾。X線の波長は1.542Å(CuK α)である。試料は両面にマイカ製の窓を持つ液体用セルに入れ、試料の厚さは1.5mmで測定した。

レオロジー測定は円錐円板形ワイセンベルグレオゴニオメーター(Sangamo Controls, R18)を用いた。円錐角は 1.77° 、円錐直径は7.0cmである。

2.3 SAXSによる表面解析

表面に関する情報はSAXSの広角領域から得られる。Porod⁹⁾, Luzzati¹⁰⁾, Kratky¹¹⁾らによれば、二相系における散乱強度Iは、二相境界で電子密度の遷移が鋭く生じる場合、次式で表される。

$$I = K_1 q^{-4} + K_2 \quad (1)$$

ここで K_1 , K_2 は定数, $q = (4\pi/\lambda)\sin\theta/2$ である。 λ はX線の波長, θ は散乱角である。(1)式の定数項 K_2 は、系内即ち、分散相あるいは分散媒あるいはその両者内における原子の大きさ程度の電子密度の揺らぎに起因する散乱項である。従って、分散系内部における電子密度の揺らぎが無視できる、即ち電子密度が比較的均質である場合 $K_2=0$ となる。(1)式によれば Iq^4 と q^4 の関係は直線となり、縦軸の切片および勾配より K_1 および K_2 を求めることができる。

(1)式が成立する場合、分散粒子の表面(分散媒との界面)に関する重要な量、比内部表面積(specific inner surface) O_s を次式から求めることができる。

$$O_s = \frac{\pi w_i K_1}{Q_o} \quad (2)$$

ここで w_1 は分散媒の体積分率, Q_s は次式で与えられる不変量である。

$$Q_s = \int_0^\infty \bar{i}_s^2 dq \quad (3)$$

ここで $\bar{i} = I - K_2$ である。分散粒子の大きさが均質である系では, O_s は次の意味を持つ。

$$O_s = \frac{\text{粒子の表面積}}{\text{粒子の体積}} \quad (4)$$

3. 結果と考察

3.1 表面構造

3.1.1 DMLL ミセル系

DMLL は水中ではほぼ球形に近いミセルを形成して分散している。光散乱から求まるミセル半径は約 21.7 Å, 重量平均分子量 M_w は約 2.40×10^4 である。従って会合数 ($N_{ag} = M_w/M_0$) は 67.4, 分子 1 個当りのミセル表面の占有面積 S は 87.6 \AA^2 である¹²⁾。DMLL 分子の長さは全ての C-C 結合が trans-trans (TT) 構造をとると約 25 Å, リシン部の C-C 結合が trans-gauche (TGTG) 構造をとるとき約 23 Å である。従ってミセル半径 21.7 Å はほぼ妥当な値とみなせる(表 1)。

図 2 には DMLL/水コロイド系の 0.5, 1 および 3 % における Iq^4 と q^4 の関係を示す。この関係は横軸に平行な(即ち $K_2=0$)直線で表される。これは DMLL ミセル内部および分散媒が比較的均質であることを意味する。後述するが他のミセル系では K_2 は有限値を持つ。図 3 には DMLL/水コロイド系における Iq^2 と q の関係を示す。広角側でのデータのばらつきはあるが図上積分により Q_s を求めることができる。

SAXS 解析から求まる DMLL ミセルの表面に関する特性値を表 2 に示す。表面に凹凸の全くな

Table 1 Characteristics of a DMLL micelle

$M_w/10^4$	N_{ag}	$R/\text{\AA}$	$S/\text{\AA}^2$	$c_0/10^{-5} \text{ g ml}^{-1}$
2.40	67.4	21.7	87.6	7.70 (216 μM)

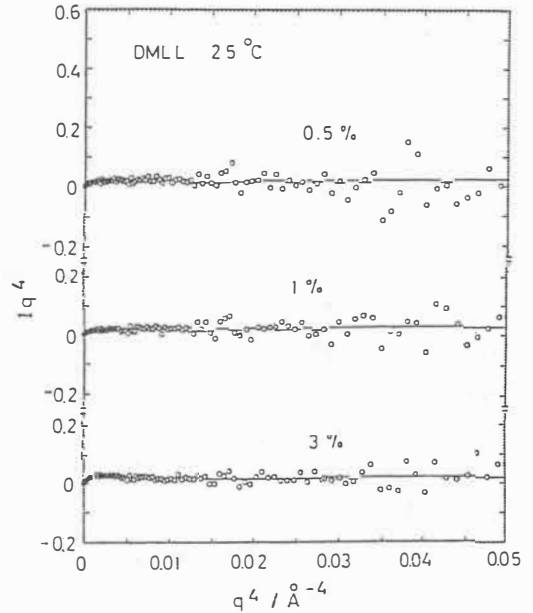


Fig.2 Iq^4 plotted against q^4 for 0.5, 1 and 3 wt% DMLL aqueous colloids.

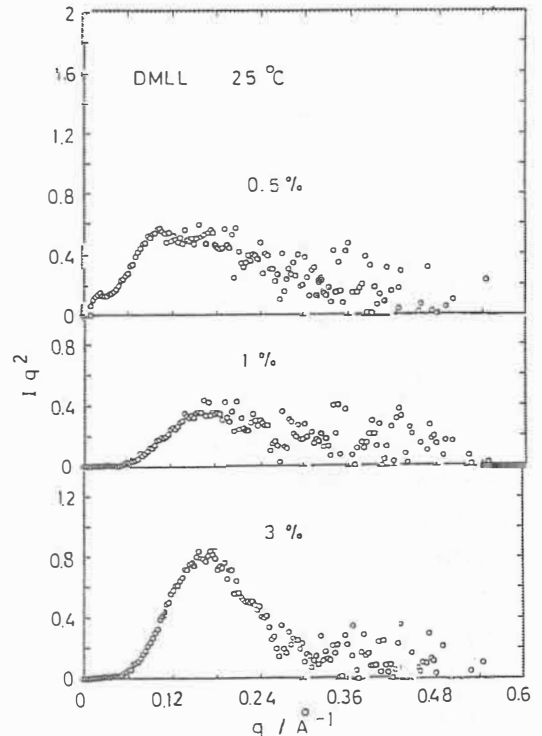


Fig.3 Iq^2 plotted against q for 0.5, 1 and 3 wt% DMLL aqueous colloids.

Table 2 Surface characteristics of a DMLL micelle

c / wt%	Q_q	K_1	$O_s / \text{\AA}^{-1}$	O_s/O_{s0}^*
0.5	0.137	0.0206	0.470	3.41
1	0.0852	0.0150	0.547	3.96
3	0.139	0.0191	0.419	3.04

* $O_{s0} = 3/R$

い完全に滑らかな球体(半径R)の比内部表面積 O_s は表面積/体積 = $3/R$ で、Rとしてミセル半径21.7Åを用いれば $O_s = 0.138 \text{\AA}^{-1}$ となる。従って表2の最後の欄に示されるように、DMLLミセル系の O_s/O_{s0} は平均3.5である。これはDMLLミセルは同じ大きさの完全に滑らかな球のほぼ3.5倍の表面積を持つことを意味する。ここで上記のように表面粗さを評価するときの尺度について述べる。図2の直線近似の $q^4/\text{\AA}^{-4}$ の範囲はほぼ0.004~0.045である。これは $q/\text{\AA}^{-1}$ の範囲にして0.25~0.46、 $q^{-1}/\text{\AA}$ ではほぼ4~2.2に相当する。即ちミセルの表面粗さを観察する尺度はこの程度であるとみなせる。これはミセル半径21.7Åと比較して十分小さいと言える。

図4には以上の実験結果から得られたDMLLミセルのモデルを示す。表面積は球体のほぼ3.5倍になるように、DMLL分子模型はリシン部のC-C結合がTGTG構造として、また会合数は66として描かれている。

3.1.2 C12E8ミセル系

C12E8/水コロイド系の25°Cおよび60°Cにおけるミセルの特性値を表3にまとめる。25°Cではミセル半径は28.3Å、会合数 N_{ag} は約84である¹⁴⁾。このミセルは主に疎水部アルキル鎖の充填されているコア部(半径 R_c)と主にエチレングリコール鎖の充填されている外殻部(半径 R_m)から構成されている。また25°Cにおける1分子鎖当たりのミセル表面の占有面積Sは 122\AA^2 と比較的大きい。

C12E8/水コロイド系で特徴的なことは、等方均質液体相(L₁)において系は直行偏光子顕微鏡下でも偏光は認められないが¹³⁾、SAXSからは等方相と規則構造(面心立方構造)の共存が確認さ

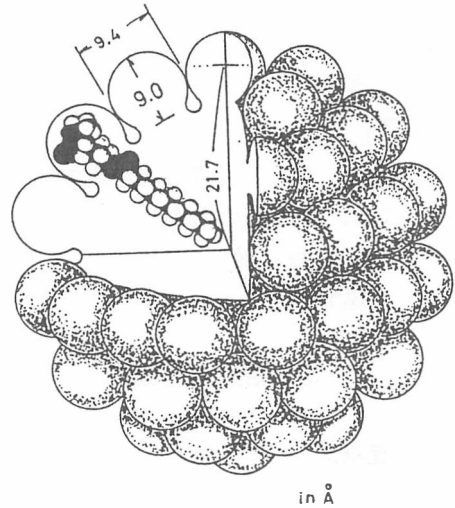


Fig. 4 A model of the DMLL micelle. Aggregation number is 66 and surface area of the micelle is about 3.5 times that of a completely smooth sphere.

れていることである¹⁴⁾。

図5(a,b)にはC12E8/水コロイド系の10および20%における Iq^4 と q^4 の関係および2.5~20%における $\bar{I}q^4$ と q^4 の関係を示す。前者は有限の勾配を持つ直線で表される。即ち(1)式が成立し、 K_2 は有限値となる。これはC12E8ミセル内部の電子密度の不均質性が無視できないことを意味する¹⁵⁾。C12E8分子は疎水部のアルキル鎖と親水部のエチレングリコール鎖で構成され、それぞれミセルの中心部と外殻部を構成していると考えられる。これがミセル内における電子密度の不均質性に関連していると見なせる。DMLLミセルもC12E8ミセルも共に水中で親水部付近にある程度の束縛水を保有していると考えられている^{16・17)}。しかし、両系に(1)式が適用されることから、これらの束縛水はミセルと分散媒界面で電子密度の変化を緩やかにするほどには多量でない、あるいはそのようには作用しないと言える。

Table 3 Characteristics of a C₁₂E₈ micelle

T/°C	$n_v/10^4$	N_{ag}	$R/\text{\AA}$	$R_c/\text{\AA}$	$R_m/\text{\AA}$	$S/\text{\AA}^2$	$c_0/10^{-5} \text{ g ml}^{-1}$
25	4.42	82.2	28.3	21.4	6.9	123	4.67 (86.8UM)
60	5.85	108.7	30.4	24.6	5.8	107	3.20 (59.5UM)

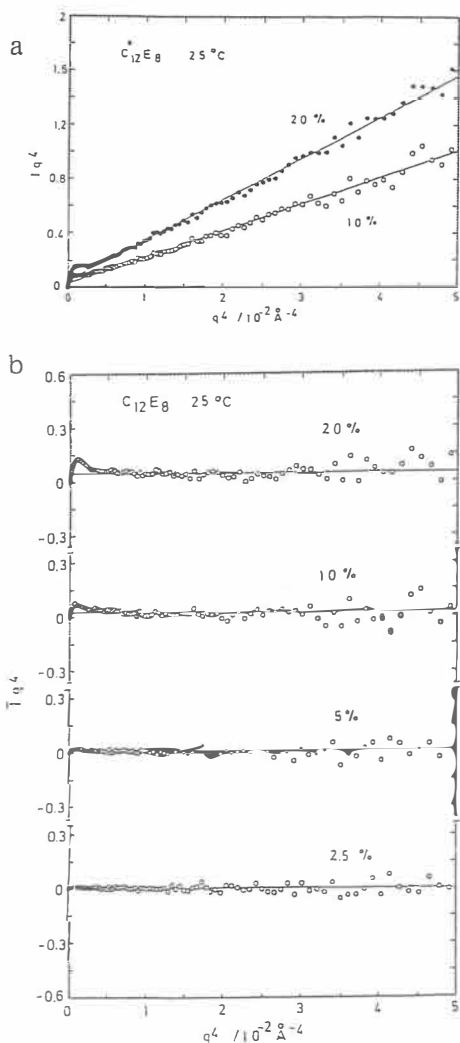


Fig.5 Iq^4 and $\bar{I}q^4$ Plotted against q^4 for $C_{12}E_8$ micelle colloids.

図5bによれば、 $\bar{I}q^4$ と q^4 の関係はいずれの濃度でも横軸に水平な直線で表される。これは図5aから求まる K_2 の値が妥当であることを示す。直線で表される $q^4/\text{Å}^{-4}$ の範囲は0.004~0.045である。従って、DMLLミセルのときと同様表面構造を算定する尺度は十分小さいと言える。表4には等方均質相にある $C_{12}E_8$ ミセル系の表面構造に関する特性値を示す。 O_s/O_{s0} の値はいずれの条件でも1.9~2程度である。即ち、 $C_{12}E_8$ ミセルは半径の等しい滑らかな球体のほぼ2倍の表面積を持つと言える。 $C_{12}E_8$ ミセルの特徴は中心部と外

Table 4 Surface Characteristics of a $C_{12}E_8$ micelle

$c / wt\%$	K_1	K_2	Q_q	$O_s / \text{Å}^{-1}$	O_s / O_{s0}^*
2.5	0.00425	1.20	0.0617	0.211	1.99
5	0.00924	5.05	0.125	0.206	1.94
10	0.0261	19.9	0.366	0.202	1.91
20	0.0488	29.9	0.640	0.192	1.81
30(30°C)	0.0469	16.5	0.524	0.197	1.86
30(60°C)	0.0535	20.6	0.575	0.205	2.08

* $O_{s0} = 3/R$

殻部からなり、前者の半径は21.4Å、外殻部の厚さはほぼ6.9Åであること、また、ミセル表面における1分子の占有面積は122.4Å²と比較的大きいことである。一方、 $C_{12}E_8$ 分子長については、最も伸びきった状態でアルキル鎖部が15.9Å、エチレングリコール部が32.0Åである。アルキル鎖部の長さはミセル中心部の半径R_cにほぼ対応しているが、エチレングリコール鎖の長さはミセル外殻部の厚さ(R-R_c)よりはるかに長い。さらに1分子鎖当たりのミセル表面の占有面積の大きさを考慮すると、エチレングリコール鎖はミセル表面でかなり広がったコンフォメーションにあると予想される。また、エチレングリコール鎖は、結晶状態では-C-C-O-結合がTTG構造をとらせん構造が安定であることが報告されている¹⁸⁾。しかしこのTTG構造では全ての酸素原子はらせんの内側に配位することおよびエチレングリコール部は、なおミセル外殻部の厚さよりはるかに長い。このTTG配位の一部のGをḠに変えることによって、エチレングリコール部のらせんの半径を大きくすることができると共に、全ての酸素原子をらせんの外側に配位させることができる。図6にはDMLLミセルと同様の手法で作成された $C_{12}E_8$ ミセルのモデルを示す。会合数は82として描かれている。 $C_{12}E_8$ 分子のエチレングリコール部のらせん半径は6~7Åで、その占有面積はミセル表面における1分子鎖当たりの占有面積にほぼ等しい。DMLLミセルと $C_{12}E_8$ ミセルモデルを比較すると、 O_s/O_{s0} の値は前者では約3.5、後者では2である。モデルではこの違いがミセル

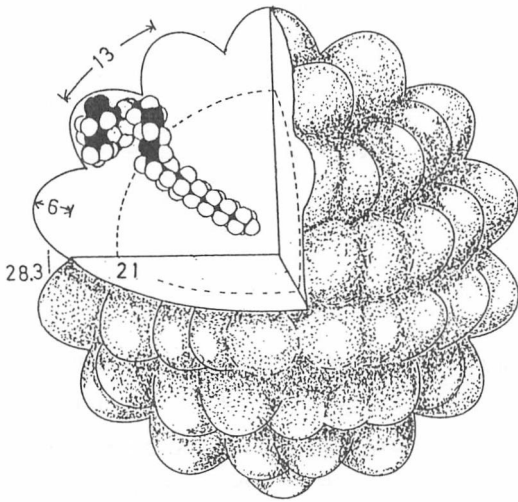


Fig.6 A model of the $C_{12}E_8$ micelle. Aggregation number is 82 and surface area of the micelle is about twice that of a smooth sphere. All figures are in angstroms.

表面の粗さによく反映されている。

3.1.3 オヴォアルブミン系

オヴォアルブミン(OA)分子は385の α -アミノ酸で構成されている球状タンパク質である。組成的にはリシンで構成されているDMLLミセルに類似している。しかし、前者では構成成分は共有結合で結ばれているが、後者では個々のDMLL分子は疎水結合で凝集しているものの、本質的には独立である。後述するようにこの差がOA分子とDMLLミセルの表面構造に敏感に反映している。OA分子の水中における形態および分散状態については筆者らの詳細な研究がある¹⁹⁻²¹⁾。それによればOA分子は半径約25Åの球状タンパク質であり、濃度0.1%以下では一分子(未会合)状態で、濃度0.1~40%ではほぼ二分子会合体として分散していることが判明した。また、OA分子は20°C以下ではほとんど熱変性を受けないこと、および60°C以上では熱変性によって個々の球形は保持しながらも数珠状に会合することが明らかにされている(後述)。ここではOA分子の表面構造のみに着目する。図7には未変性OAコロイド系の濃度4.8, 9.1および16.7%, 20°Cにおける Iq^4 と q^4

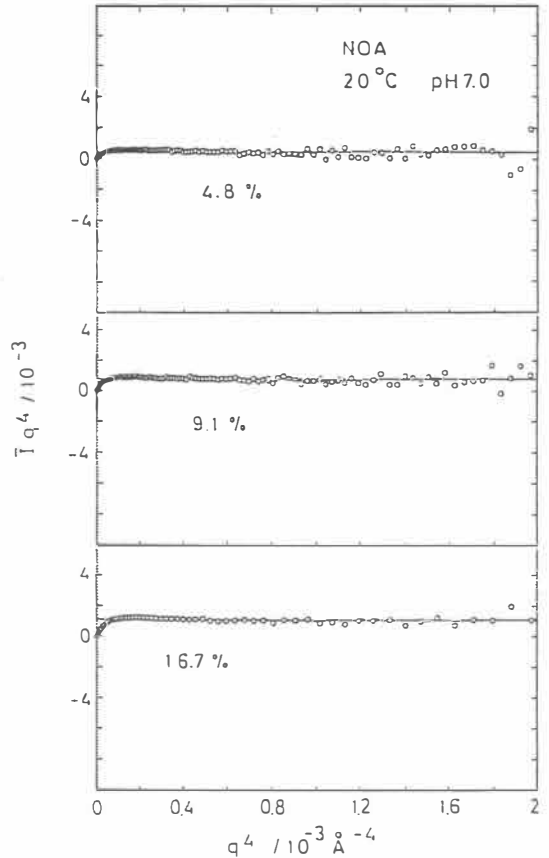


Fig.7 Iq^4 plotted against q^4 for aqueous colloids of native ovalbumin molecules.

および Iq^2 と q^2 の関係を示す。前者の関係は水平な直線で表され、(1)式が成立する。表5にはOA/水コロイド系における濃度0.5~16.7%にわたるOA分子の表面特性を示す。前述のように、この濃度範囲ではOA分子は2分子程度会合しているが、会合体においても個々の分子の形状はほぼそのまま保持されているので、 O_{s0} として $3/R$

Table 5 Characteristic values of the native OA molecule in aqueous colloids at pH 7.0

$c/wt\%$	$\kappa_1/10^3$	κ_2	$o_q/10^{-3} \text{ \AA}^{-3}$	$o_n/\text{\AA}^{-1}$	o_s/o_{s0}
0.5	0.407	0	5.79	0.205	1.71
0.7	0.506	0	7.61	0.207	1.73
1.0	0.754	0	11.2	0.209	1.74
4.8	0.457	2.14	6.42	0.213	1.78
9.1	0.801	2.14	11.0	0.208	1.73
16.7	1.11	1.40	13.3	0.218	1.82

^a $o_{s0} = 3/R, R = 25.1 \text{ \AA}$

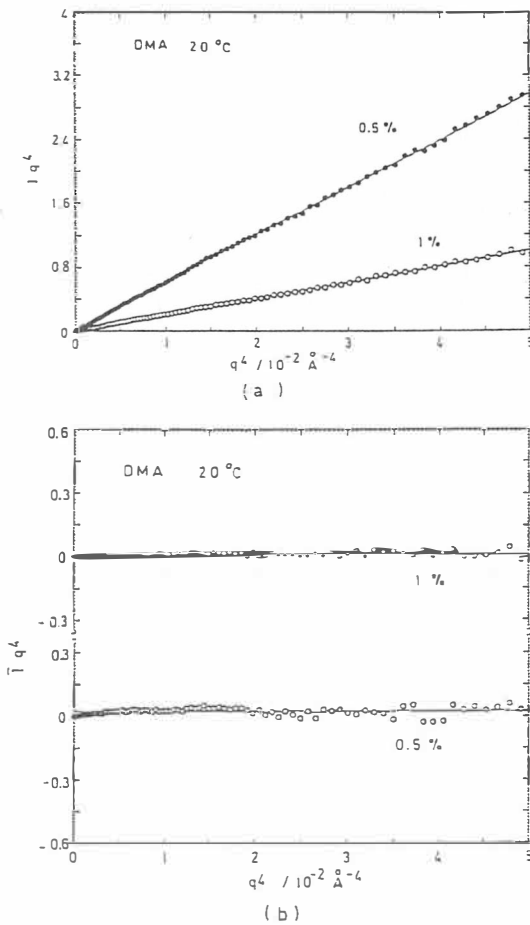


Fig. 8 (a) Iq^4 plotted against q^4 for 0.5 and 1 wt % DMA aqueous colloids.
 (b) $\bar{I}q^4$ plotted against q^4 for 0.5 and 1 wt % DMA aqueous colloids.

($=0.120$)を用いることができる¹⁹⁻²¹⁾。 O_s/O_{s_0} の値は平均1.75である。この値は α -アミノ酸で構成されるDMLLミセルの値3.5の1/2である。これはOA分子は α -アミノ酸の共有結合で構成されているが、DMLLミセルの構成アミノ酸はそれぞれ本質的に独立性が高く、このため前者では後者より熱運動がかなり制限されていることも一因と考えられる。

3.1.4 DMAコロイド系

DMA分子は水中で多彩なベシクル構造を形成する。この系は塩濃度の高い場合は多重ベシクル

を形成することが報告されている^{22, 23)}。一方、低塩濃度で形成される直径数 μm のリポゾーム状の球形粒子は、ごく希薄系で存在する微小ベシクルの集合体であることが観察されている。また電子顕微鏡観察によれば、この微小ベシクルの大きさは比較的均質である^{24, 25)}。さらにSAXSによれば、この微小ベシクルは半径約64 \AA の球状体で、厚さ約41 \AA のDMA二分子膜で構成され、中心部に半径約23 \AA の中空部を持つと考えられている²⁵⁾。ここではこの微小ベシクルの表面構造についてのみ述べる。

図8(a, b)にはDMA/水コロイド系に関する $Iq^4 - q^4$ および $\bar{I}q^4 - q^4$ の関係を示す。前者は勾配を持つ直線で表され、後者は水平な直線で表される。即ち(1)式が正確に成り立つことが解る。これはDMA微小ベシクルと分散媒界面における電子密度の変化は比較的鋭いことおよび微小ベシクル内部の電子密度の不均質性は無視できないことを意味する。特に後者の点はこの微小ベシクル中心部に中空部が存在することに対応していると見なせる。表6にDMA微小ベシクルの表面構造の特性値を示す。ここで O_{s_0} として、微小ベシクルを構成する二分子膜と中心部および外側の二つの界面を考慮して、 $O_{s_0} = 3/23 + 3/64$ を用いている。 O_s/O_{s_0} の値はほぼ5である。これはDMA微小ベシクルの表面は完全に滑らかな球体のほぼ5倍の表面積を持つことを意味する。この値は前述の両性ミセル、非イオン性ミセルおよびOA球状分子の値と比較してかなり大きい。この理由として、DMA分子は対イオンとして Br^- を持つこと、 Br^- はH, CおよびN原子と比較して電子密度が高いことが関係していると思われる。即ちX線は電子密度の差を検出しているので、DMAベシ

Table 6 Surface characteristics of a DMA small vesicle

$c/\text{wt}\%$	K_1	K_2	Q_q	$O_s/\text{\AA}^{-1}$	O_s/O_{s_0}
0.5	0.0249	59.4	0.0880	0.884	4.99
1.0	0.0136	20.0	0.0470	0.900	5.08

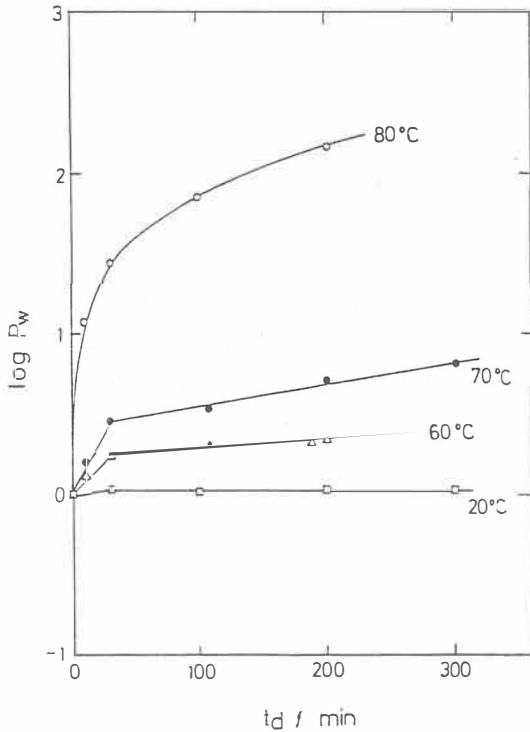


Fig.9 Weight average degree of association P_w plotted against denaturation time t_d at various denaturation temperatures.

クルと分散媒界面において、激しくブラウン運動しているであろう Br^- 相が、界面として検出されていると考えられる。これが O_s/O_{s0} の値を大きくしている原因の一つであろう。

3.2 OAコロイド系の特異性

ここではOA系に関して、熱変性に伴う分子量、分子形態およびレオロジー的性質の特異性について述べる。図9に種々の変性温度における分子量 M_w と変性時間 t の関係を示す。変性温度60, 70, 80°Cでは、時間経過とともに分子量は未変性OAの値 (4.37×10^4) より増大する。これはOAが加熱により変性し、会合体を形成するというこれまでの考えを支持する。

未変性および種々の熱変性条件(70°C, 10~200 min 80°C, 10, 20min)における試料のNSDS法ゲル電気泳動によれば、いずれの変性条件でもOA単量体が存在するが、その量は変性温度、変

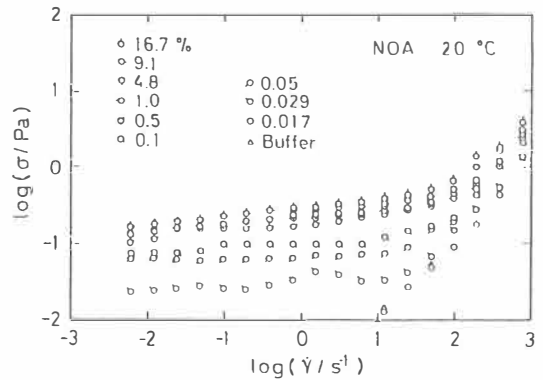


Fig.10 Flow curves of the OA colloids in the phosphate buffer(20mM, pH7.0) over a wide concentration range from 0 to 16.7%.

性時間の増加とともに減少する。これは、熱変性初期にOA単量体が消失するという従来の考えとは異なる。一方、SDS法電気泳動では熱変性試料でもOA単量体の泳動位置を示す。これは、熱変性による分子量の増加はOA単量体同士の化学結合ではなく、SDSによって容易に分離する会合に起因することを示す。

図10に種々の濃度のOA-リン酸緩衝液溶液の定常流動曲線を示す。いずれの系にも平坦部が見られ系内に規則構造が存在していることが示唆される。このデータの非常に特異な点は、極めて希薄な系 ($10^{-3} \sim 10^{-4} \text{ g/ml}$) でも平坦部が存在し、濃度が高くなるにつれて平坦部の降伏値の上昇が鈍化していることである^{19, 20)}。図11に降伏応力 σ_y の濃度 c 依存性を示す。この図には、普通の分散系 L1, L2(ラテックス分散系), TF(チタネート繊維分散系)およびCB(カーボンブラック分散系)の挙動も示してある。これらの系とOA系を比較すると、後者では σ_y の c 依存性が極めて少ないことが解る。OA系の降伏応力の実験値にDLVO理論を適用したところ、理論式中のデバイヒュッケルパラメータ κ はOA濃度の1/2乗に比例し増加することになる²⁶⁾。電荷数1と想定した溶液中のイオンの濃度 n は、この κ の値から濃度に対して1乗の割合で増加すると考えられる。この結果から、濃度上昇と共に降伏応力値の増加が鈍化することはOAから出るイオンと密接な関

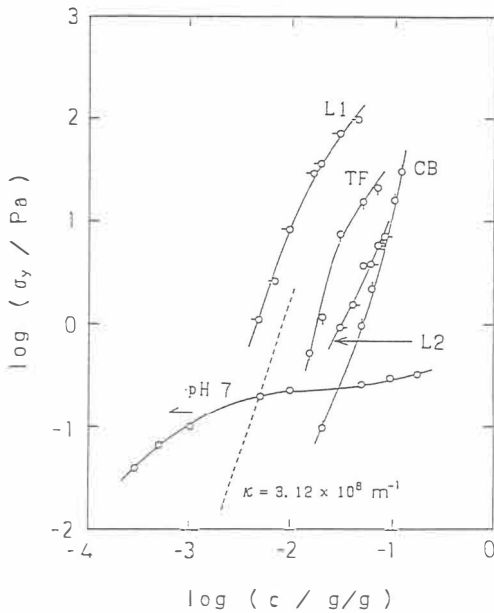


Fig.11 Shear stress σ_y at $\dot{\gamma} = 3s^{-1}$ in the plateau region of the flow curve is plotted against the OA concentration c . Open circle: data at pH 7.0. The yield stress or the rigidity are also plotted for various colloids of polystyrene beads(L1, L2), carbon black (CB) and titanate fiber(TF). The dashed line is the rigidity calculated by Eq.(5) using the DLVO theory for $\kappa = 3.12 \times 10^{-8} m^{-1}$.

係にあり、OA内に降伏応力の増加を抑えるような何らかの自己制御機構が働いているのではないかと推測される。

図12に、降伏応力 σ_y とOA濃度 c の関係を、変性および未変性試料に対して示す。前述の自己制御機構は熱変性によるゲル化によってほぼ完全に破壊される。また、 σ_y および剛性率の急激に増加する濃度 c^* は卵白中のOAの濃度5.9%にほぼ等しい。

文献

- 1) 化学総説40, 分子集合体, 日化会編, 1983, 化学増刊, 人工細胞へのアプローチ, 化学同人, 1983
- 2) T. Kunitake, N. Nishizuka, H. Higashi, H. Nakashima, J. Am. Chem. Soc., 106,1978 (1984).

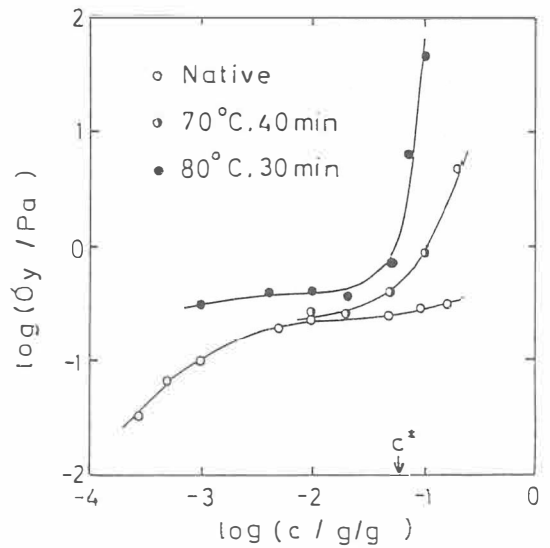


Fig.12 Yield stress σ_y plotted against the OA concentration c for native and denatured colloids.

- 3) J. H. Fendler, W. L. Hinza, *ibid.*, 103, 5439 (1981).
- 4) 木村啓作, 表面, 22,613(1984), 化学と工業, 38, 761(1985)
- 5) 賀集誠一郎, 化学, 40,582(1985).
- 6) 表面の評価技術, 特集, 日本結晶学会誌, 29 (1987).
- 7) 岩見基弘, 平木昭夫, 表面, 21,277(1983).
- 8) H. Hayashi, F. Hamada, S. Suehiro, N. Masaki, T. Ogawa, H. Miyaji, *J. Appl. Cryst.*, 21, 330(1988).
- 9) G. Porod, *Koll. Z.*, 124, 838(1951), 125, 51 (1952).
- 10) V. Luzzati, J. Witz, A. Nicolaieff, *J. Mol. Biol.*, 3, 367(1961).
- 11) O. Kratky, *Prog. Biophys.*, 13, 105(1963).
- 12) T. Matsumoto, *J. Disp. Sci. Tech.*, 12, 503 (1991).
- 13) D. J. Mitchel, G. T. J. Tiddy, L. Waring, T. Bostoch, M. P. MacDonald, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. I*, 79, 975(1983).
- 14) T. Matsumoto, H. Zenkoh, *Cool. Polym. Sci.*,

- 23) T. Kunitake, J. Macromol. Sci., A13, 587 (1979).
- 24) T. Matsumoto, T. Heiuchi, K. Horie, Coll. Polym. Sci., 267, 71(1989).
- 25) T. Matsumoto, Coll. Polym. Sci., 270, 492 (1992).
- 26) T. Matsumoto, H. Inoue, Chem. Phys., 166, 299(1992).

香料に関する定量的解析

— 香りの強さ, 香りの質, 構造活性相関, “なれ”, 香料センサーに関する研究 —

北海道大学薬学部

栗原 堅三

1. We measured the turtle olfactory bulbar responses to six pairs of highly pure optical isomers. With all odorants tested, there was no difference in odor threshold and intensity in the whole concentration range examined between the optical isomers. The difference in odor quality between optical isomers greatly varied with species of odorants.
2. The ability of the olfactory receptors to discriminate odorants having similar structures was abolished by increasing temperature up to 40°C, whereas discrimination of odorants having quite different structures was much less affected. The results suggested that the structures of the receptor sites for odorants are greatly affected by a fluidity change of the lipid layer of the receptor membranes. The results also suggested that desensitization (adaptation) occurs not at a cell level but at a receptor site level.
3. The membrane potential changes of liposome, which is a model for odor sensor, in response to odorants were measured with a voltage-sensitive fluorescence dye. The magnitudes of the responses to odorants greatly depended on membrane composition of liposomes. It was suggested that various odorants can be identified by the response patterns of liposomes having different compositions.

1. 嗅覚器の光学異性体識別能¹⁾

嗅覚器が光学異性体間のおいさをどの程度識別するかに関しては、昔からヒトの官能試験の結果をもとに議論されてきたが、明確な結論は得られていない。本研究においては、カメ嗅覚器を用いて各種の光学異性体のおいさ強度および質の間に差があるかどうかを定量的に調べた。一般に、おいさ強度に関しては、電気生理的方法により定量的評価がなされてきたが、おいさの質を定量的に評価する方法がなかった。本研究において、我々は定量的な交差順応法を開発し、おいさの質の差異を定量的に評価する方法を確立した。この

方法をカメ嗅覚器に適用し、光学異性体間のおいさの質の差異を定量化した。

(1) 光学異性体間のおいさ強度の差

光学異性体の中では、l-カルボンとd-カルボンが最も大きな差異があるとされてきた。l-カルボンの閾値とd-カルボンの閾値が本当に異なっているかどうかを調べるために、カメ嗅覚器のl-およびd-カルボンの応答を測定した。図1は、各濃度のl-カルボンおよびd-カルボンを与えたときのカメ嗅覚器の応答のパターンを示す。l-カルボンを与えると、濃度の増加に伴って応答は増大し、d-カルボンを与えたときにもl-カルボ

Quantitative analysis on perfume; Studies on intensity and quality of perfume, structure-activity relationship, adaptation, and perfume sensor

Kenzo Kurihara

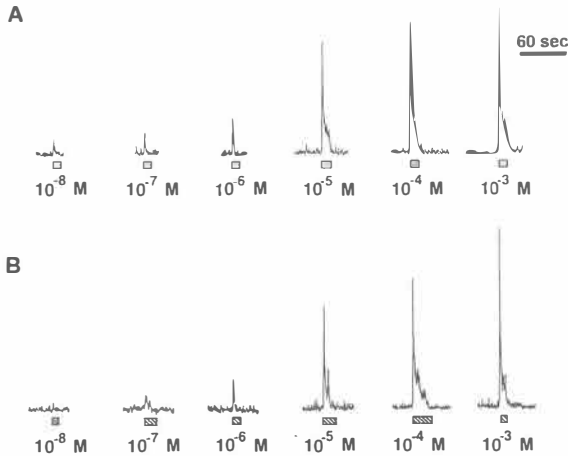


図1 各濃度のl-カルボン(A)及びd-カルボン(B)に対するカメ嗅覚応答。

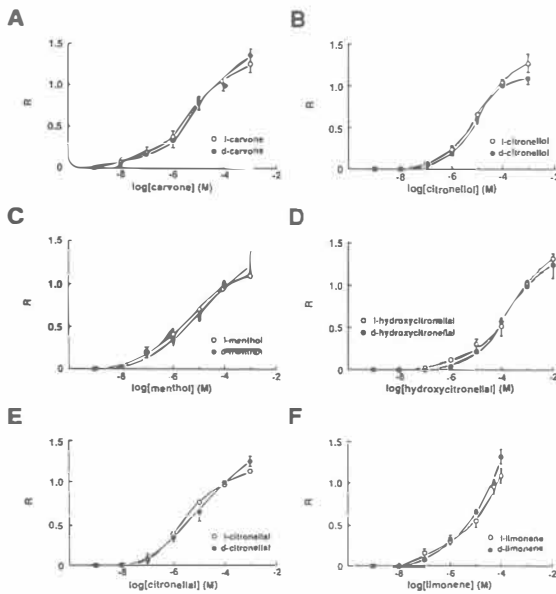


図2 各種光学異性体に対するカメ嗅覚器の濃度-応答曲線。

ンと同様の応答が生じた。

図2は、各種のd-体およびl-体をカメ嗅上皮に与えたときの濃度-応答曲線を示す。横軸は刺激に用いたd-体およびl-体の濃度を、縦軸はその時の応答の相対応答強度を表す。いずれの場合も、おおいの強度および閾値濃度は、d-体とl-体間

で差がないことを示している。

(2) 光学異性体間のおおいの質の差

d-体とl-体間のおおいの質の差は、以下のような方法で解析した。l-リモネンを与えると応答が現れるが、すぐに順応し、応答が消失する。この状態でd-リモネンを与えても、小さな応答しか現れない。このことは、d-リモネンとl-リモネンは同じ受容サイトに結合して応答を引き起こすため、カメは両者のおおいを識別できないことを示唆する。一方、l-リモネンを与えた後に、l-リモネンとは全く異なるおおいを有するn-アミルアセテートを与えた場合には、n-アミルアセテートを単独で与えたときと同じ大きさの応答がみられた。このことから、カメ嗅覚器におけるl-リモネンとn-アミルアセテートの受容サイトは全く独立であり、カメは2つのおおいを完全に識別することが推測される。ただし、このような実験方法では、最初に与えるおおい物質の濃度が2番目の応答に大きく影響する。したがって、より定量的な解析を行うために、最初に与えるおおい物質の濃度を系統的に変化させ、2番目の応答に対する影響を調べた。

図3Aは、各種濃度のl-リモネンで順応させた後の 5×10^{-5} M d-リモネンに対する応答を示す。 5×10^{-5} M d-リモネンを単独で与えたときには、図中の左端のパターンのような応答が生じる。最初に与えるl-リモネンの濃度を高くするにつれ、l-リモネンに対する応答は増大し、2番目に与えるd-リモネンに対する応答は減少した。最初に与えるおおい物質、すなわちl-リモネンに対する応答強度を横軸に“ R_1 ”としてプロットし、2番目に与えたおおい物質、すなわちd-リモネンに対する応答強度を縦軸に“ R_2 ”としてプロットすると、図3Bのグラフが得られる。縦軸、横軸ともに、d-リモネンを単独で与えたときの応答強度を“1”としている。リモネンの場合では、最初に与えるl-リモネンの応答を増大させると、2番目に与える 5×10^{-5} M d-リモネンに対する応

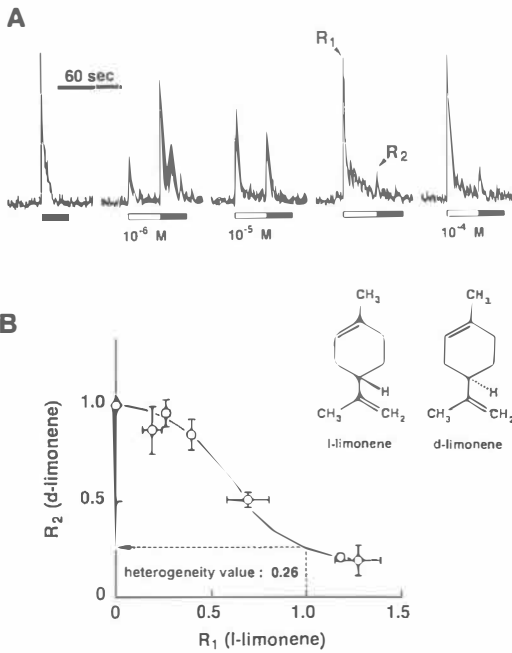


図3 各濃度のl-リモネンを与えたのちの 5×10^{-5} M d-リモネンの応答パターン(A)。R₂(d-リモネンに対する応答)をR₁(l-リモネンに対する応答)に対してプロットした(B)。

答の顕著な減少が見られた。この結果は、カメ嗅覚器におけるl-リモネンとd-リモネンの受容サイトはほぼ同一であることを示唆した。

リモネンの場合と同様の実験を、他のにおい物質についても行った(図4)。カルボンの場合、最初に与えるl-カルボンに対する応答を増大させても、2番目に与えるd-カルボンに対する応答はあまり減少しなかった。したがって、カメ嗅覚器におけるd-カルボンとl-カルボンの受容サイトは互いに異なっており、カメはd-カルボンとl-カルボンを識別していると考えられる。他のにおい物質についても同様の実験を行った。R₁が1のときの応答の大きさは、カルボン>シトロネロール>メントール>ヒドロキシシトロネロール>シトロネロール>リモネンであった。本実験の結果から、カメ嗅覚器はある種の光学異性体のおい物質を識別していることが示唆された。ただし、識別の程度は、カルボンのように明確に識別

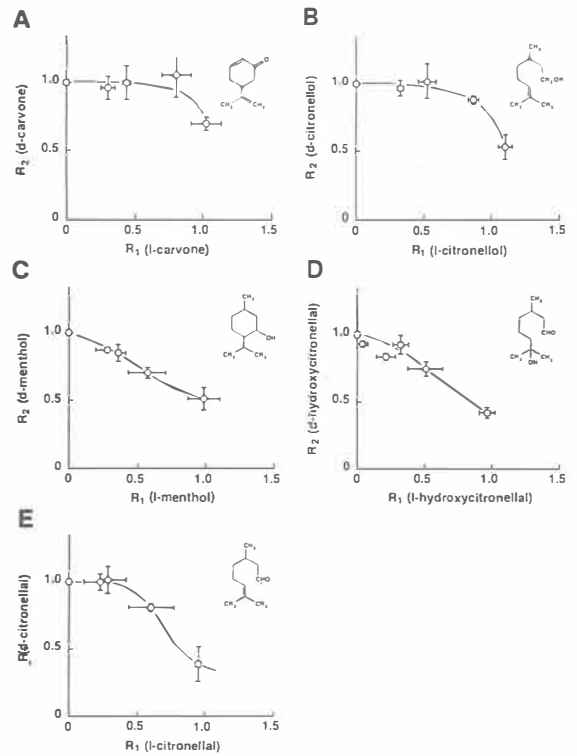


図4 各種光学異性体に関するR₂とR₁の関係。

されるものから、リモネンのようにほとんど識別されないものまでさまざまであった。

2. においの受容サイトに対する膜流動性変化の影響

—温度上昇に伴うにおい識別能の低下—

一般におい分子の受容・識別は、嗅細胞膜上の受容蛋白質を介して行われていると考えられている²⁾。一方におい分子は一般的に疎水性であり、におい受容には受容膜の脂質層とにおい分子との相互作用も無視できない³⁾。もしにおい受容に脂質が重要な役割を果たしているとする、嗅上皮の温度を変えて膜流動性を変化させると、におい受容に影響を及ぼすことが期待される。

そこで本研究では、5°Cから40°Cの温度範囲でにおい応答がどのように変化するか、また異なる

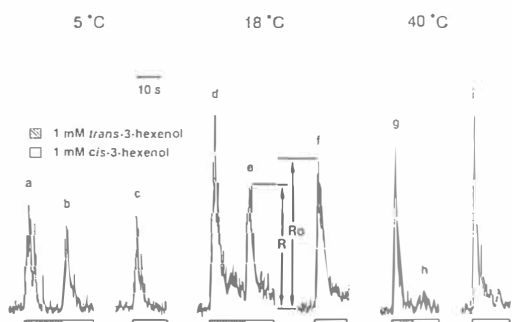


図5 各温度におけるトランス-3-ヘキセノールとシス-3-ヘキセノール間の交差順応パターン。

においの識別能がどのように変化するかを検討した。また、カメ嗅上皮に含まれる遊離細胞およびカメ嗅上皮より抽出した脂質より作製したリポソームの膜流動性変化を測定し、におい識別能変化と脂質層の流動性変化を比較した。

実験にはクサガメを用い、嗅球からの誘起脳波を測定した。あらかじめ各温度のリンガー液を嗅上皮に与えたのち、同じ温度のにおい物質溶液を与えた。膜流動性変化は、1,6-ジフェニル-1,3,5-ヘキサトリエン(DPH)の蛍光偏光解消法により測定した。

図5は、5°C、18°C、40°Cにおいてトランス-3-ヘキセノールとシス-3-ヘキセノールに交差順応法を適用したときの応答パターンを示している。このとき、両者を単独で与えたときの応答の高さがほぼ同じになるような濃度におい物質溶液を用いた。5°Cにおいて、まず、トランス体(a)を与え、順応後すぐにシス体(b)を与えた。(c)はシス体を単独で与えたときの応答である。5°Cでシス体は本来(c)の応答を与えるが、トランス体(a)の後に与えても応答はほとんど抑制されることなく現れている。18°Cでも、トランス体(d)の後にシス体(e)を与えた。(f)は18°Cでのシス体単独の応答である。トランス体(d)の後にシス体(e)を与えると、部分的に抑制されるだけで大きな応答を与えた。40°Cでは、シス体(i)単独では大きな応答が現れるが、トランス体(g)の後にシス体(h)を与えると応答はほとんど現れなかった。

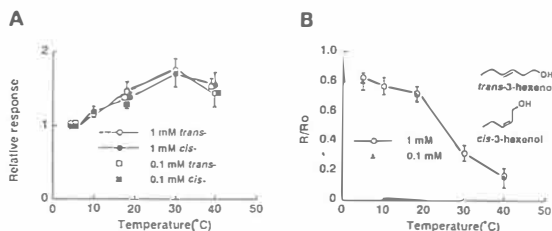


図6 トランス-3-ヘキセノールとシス-3-ヘキセノールの応答の温度依存性(A)と識別能の温度依存性(B)。

図6Bでは、シス-3-ヘキセノールを単独で与えたときの応答(R_0)に対する2番目に与えたシス-3-ヘキセノールの応答(R)の相対値(R/R_0)を温度に対しプロットしている。5°Cで約8割あった識別能が、40°Cでは約2割程度にまで減少した。1mMおよび0.1mM濃度のヘキセノールを用いたときに、同様な結果が得られた。図6Aは、それぞれにおい物質を単独で与えたときの応答の温度依存性を示している。横軸は温度、縦軸は5°Cのときの応答を1としたときの相対値を表している。応答は30°Cくらいまで増大し、その後少し減少する傾向にあった。0.1mM濃度のヘキセノールを用いたときにも、同様な結果が得られた。

図7は、今回用いた8組のにおいについて、5°Cにおける交差順応の比に対する40°Cにおける交差順応の比を求めた結果を示している。においが似ている組み合わせでは、40°Cで識別能が低下したが、においが異なっている組み合わせではあまり大きな低下はみられなかった。

温度を上げると、受容膜の流動性が増大することが考えられる。図8Aはカメ嗅上皮から遊離し

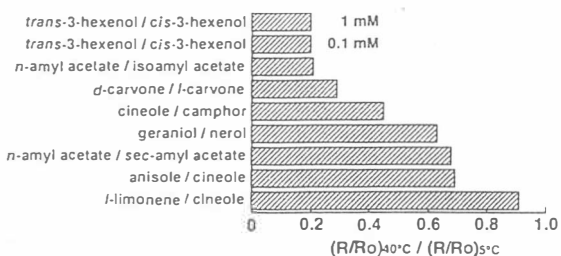


図7 5°Cにおける交差順応の比に対する40°Cにおける交差順応の比

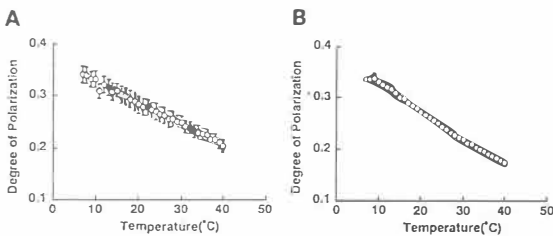


図8 カメ嗅上皮に含まれる遊離細胞の膜流動性変化の温度依存性(A)とカメ嗅上皮から抽出した脂質により作製したリポソームの膜流動性変化の温度依存性(B)。

た細胞の膜流動性変化の温度依存性を、そして図8Bはカメ嗅上皮から抽出した脂質より作製したリポソームの膜流動性変化の温度依存性を示している。どちらの場合も、温度の上昇にともなって膜流動性が増大している。膜流動性が増大する領域は、におい識別能低下の温度領域(図6B)によく対応している。

以上の結果より40°Cにおいてにおいの識別能が低下した機構について、次のような3つの可能性が考えられる。第一の可能性は、受容膜には脂質と蛋白質から構成される受容サイトが存在し、におい物質は通常このサイトに吸着する。5°Cや18°Cでは受容膜がきちっとした構造をとっているのので、例えばトランス体とシス体は別々のサイトに結合する。温度を上げると、脂質層の流動性が増し、この結果トランス体とシス体は同一の受容サイトに結合するようになり、両者は識別されなくなるものと考えられる。二つめの可能性としては、温度を上げると受容蛋白質のコンホメーションが変化し、識別能が変化することが考えられる。ただし、一般の蛋白質の場合、リガンドに対する特異性が40°Cくらいで変化する例は知られていない。例えば、L-体アミノ酸に対する結合蛋白質が40°CになるとD-体も結合するようになるとは考えられない。ただし、嗅覚系の受容蛋白質が非常に特別な性質を持っているなら、この可能性は否定できない。最後の可能性としては、温度を上げると脂質の流動性が増大し、その結果受容蛋白質のコンホメーションが変化するため識別能が変化す

ることが考えられる。このような可能性も通常の膜蛋白質の場合には有り得ないと思われるが、嗅覚系の蛋白質が特別な性質を持っているなら、その可能性は否定できない。

また本実験結果は、においの脱感作機構に関しても重要な情報を提供している。脱感作に Ca^{2+} が関与しているという説では、脱感作は嗅線毛膜のイオンチャンネルを介して細胞内に流入した Ca^{2+} がcAMP依存性チャンネルを内側から閉じるために起こると考えられている^{4, 5)}。この説に従うと、 Ca^{2+} は細胞内を拡散するので、脱感作は細胞全体で起こるはずである。したがって、図5に示すように、5°Cや18°Cにおいてトランス体を与えたあとにシス体の応答が現れたことは、それぞれの受容サイトは別々の細胞に存在することを意味している。ただしこのような解釈では、40°Cで2番目に与えたシス体の応答が消失するという実験結果は説明できない。一方、脱感作は細胞全体ではなく、個々の受容サイトレベルで起こるとすると、本実験結果を説明できる。すなわち、トランス体とシス体の受容サイトは同一の細胞にあり、脱感作は各受容サイトレベルで起こると考える。5°Cや18°Cでは、トランス体の受容サイトが脱感作してもシス体のサイトは不活性化されないので応答が現れる。40°Cにすると、膜流動性が増大してトランス体およびシス体とも同一のサイトに結合するようになり、トランス体の後のシス体の応答は現れない。

3. おいセンサーとしてのリポソーム

各種の組成を有するリポソームを作製し、膜電位感受性色素により、におい物質を与えたときの膜電位変化を測定した⁶⁾。図9は、フォスファチジルコリン(PC)にフォスファチジルセリン(PS)およびフォスファチジン酸(PA)を添加したときの各種においに対する膜電位変化を示している。脂質組成の違いにより、各種においに対する応答パターンが大きく異なるのがわかる。

図10では、リン脂質にコンカナバリン A(Con A), ロイシルロイシン(Leu-Leu), ポリリシン(Poly-Lys)を添加したリポソームの各種においての応答パターンを示している。なおの種類のごとに、応答パターンが異なるのがわかる。以上の結果は、数種の異なる組成の膜を作製し、これに対する応答パターンの違いにより、なおの識別が可能であることを示唆した。

文献

- 1) Taniguchi, M., Kashiwayanagi, M. and Kurihara, K., *Am. J. Physiol.*, 262, R99-R104 (1992)
- 2) Buck, L. and Axel, R., *Cell*, 65, 175-187(1991)
- 3) Enomoto, S., Kashiwayanagi, M. and Kurihara, K., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1062(1), 7-12(1991)
- 4) Nakamura, T. and Gold, G. H., *Nature*, 325, 442-444(1987)
- 5) Kurahashi, T. and Shibuya, T., *Brain Res.*,

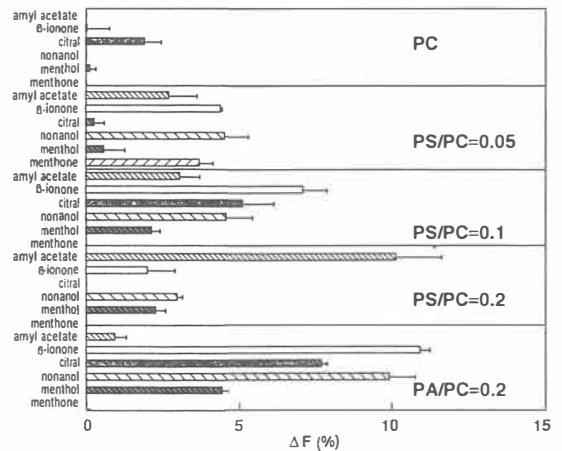


図9 異なる脂質組成を有するリポソームの各種において物質に対する膜電位変化。なお物質の濃度は、いずれも 10^{-6} Mである。

515, 261-268(1990)

- 6) Enomoto, S., Kawashima, S., Yoshimura, A. and Kurihara, K., *Sensors and Materials*, 4, 153-164(1992)

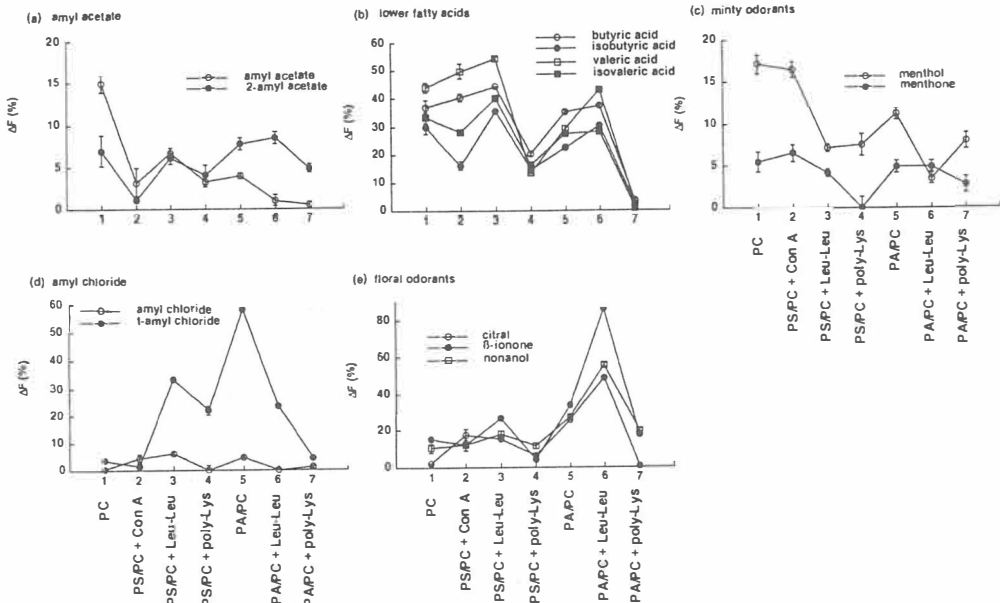


図10 異なる組成を有するリポソームの各種において物質に対する応答パターン。

メラニン生合成の調節

東北大学医学部

柴原茂樹

Tyrosinase is a rate-limiting enzyme in melanin biosynthesis and tyrosinase-related protein (TRP) is responsible for the formation of black melanin rather than brown. To identify the cis-acting element(s) required for pigment cell-specific gene transcription, we analyzed the promoter function of two pigment cell-specific genes encoding human tyrosinase and TRP by transient expression analysis. The fusion genes were constructed by inserting the 5'-flanking region of the human tyrosinase gene or TRP gene upstream from the firefly luciferase gene and were introduced into human melanoma cells and cervical cancer cells (HeLa cells). We thus identified the enhancer sequence of 39 base pairs (bp), located about 1.8 kb upstream from the transcription initiation site of the human tyrosinase gene, that is responsible for its pigment cell-specific expression. Furthermore, we found the presence of enhancer-like activity in the first intron of the human TRP gene that enhances the transient expression of the reporter (luciferase) gene. However, this enhancer-like activity is detected not only in melanoma (pigment) cells but also in HeLa cells.

1. 緒言

色素細胞はメラニン合成という特異な形質を持つ細胞であり、高等動物ではメラノサイトとして全身の皮膚に分布する神経堤 (neural crest) 由来のものと、色素上皮細胞として脳由来の網膜に存在するものの二種類がある。日常経験する“日焼け”という現象からも明らかのように、メラニンの主な機能は紫外線に対する防護作用である。事実、メラニンを欠損する先天性白皮症 (アルビニズム) 患者では、日光に曝露される部位の皮膚がんの発生頻度が高い。すなわち、日焼けは一種の生体防御反応でもある。日焼け以外にも、様々な皮膚の炎症後に色素沈着の起こることが知られているが、このような色素沈着 (メラニン量の増加) が起こる機構はよくわかっていない。

本研究では、メラニン合成の律速酵素であるチロシナーゼとその関連蛋白である tyrosinase-

related protein (TRP) という二つの色素細胞特異的蛋白に着目し、メラニン合成の調節機構の一端を明らかにする。チロシナーゼはメラニン合成の最初の二つの反応 (チロシンからドーパ、ドーパからドーパキノン) を触媒する銅酵素であり、ドーパキノン以降は非酵素的にも反応が進みメラニンが生成される。TRP はチロシナーゼとアミノ酸レベルで約40%の相同性を持ち、黒いメラニンの生成に必要とされる。

本研究では、メラニン生合成に関与するチロシナーゼと TRP という二つの色素細胞特異遺伝子の転写に必須な領域を決定する。

2. 実験

2.1 無細胞転写系におけるヒトチロシナーゼ遺伝子と TRP 遺伝子のプロモーター機能解析 マウスメラノーマ細胞より無細胞転写系を確立

し、上記色素細胞特異遺伝子のプロモーター活性を調べる。5'上流領域に種々の欠損を持つ鋳型DNAを用いて、転写に必要な領域を決定する。

2.2 一時的発現による色素細胞特異遺伝子のプロモーター機能解析

当該遺伝子の5'上流領域をプロモーターとして持ち、ホタルルシフェラーゼ(luc)をレポーターとして持つような融合遺伝子を構築し、ヒトメラノーマ細胞とHeLa細胞に導入しlucの一時的発現を調べることにより、色素細胞に特異的なプロモーター活性とその発現に必要な領域を調べた。この際、内部コントロールとしてSV40プロモーターの下流にβ-ガラクトシダーゼ遺伝子を持つプラスミドを上記融合遺伝子と同時に細胞に導入・発現させた。

2.3 色素細胞特異遺伝子の転写因子の同定

ヒトメラノーマ細胞より核抽出液を調製し、ゲルシフト法やフットプリント法を駆使して、色素細胞特異遺伝子の5'上流領域に結合する蛋白質を解析する。

3. 結果

3.1 無細胞転写系におけるチロシナーゼ遺伝子とTRP遺伝子のプロモーター活性

チロシナーゼ遺伝子とTRP遺伝子はメラノーマ由来の無細胞転写系において転写されるが、ヒトHeLa細胞由来の無細胞転写系では転写されなかった。よって、メラノーマ細胞にはこれら二つの遺伝子の色素細胞特異的転写に必須な因子が存在すると思われる。

3.2 チロシナーゼ遺伝子の色素細胞特異的発現の分子機構

3.2.1 マウスとヒトチロシナーゼ遺伝子のプロモーター機能は同等ではないトランスジェニックマウスを利用したマウスチ

ロシナーゼ遺伝子のプロモーター機能の解析により、転写開始点の上流270塩基対(bp)内に色素細胞特異的発現に必要なシスエレメントが存在することが報告されている。しかし、ヒトチロシナーゼ遺伝子のプロモーター機能を一時的発現により解析すると、転写開始点の上流600bp内には色素細胞特異的発現に必要なシスエレメントの存在を確認できなかった。すなわち、同遺伝子のプロモーター領域の下流にレポーター遺伝子(luc)を持つ融合遺伝子をメラノーマ細胞とHeLa細胞に導入し、その一時的発現を調べると、両者で有意な違いは検出できなかった。一方、このような系でも、マウスチロシナーゼ遺伝子の転写開始点の上流270bpが存在すれば、レポーター遺伝子はメラノーマ細胞(色素細胞)特異的に発現した。

3.2.2 ヒトチロシナーゼ遺伝子の色素細胞特異的エンハンサーの同定

ヒトチロシナーゼ遺伝子のさらに上流領域を同様に解析したところ、転写開始点の上流約1.8キロbpの部位に色素細胞特異的発現に必要なシスエレメント(約200bp)が存在することが判明した。しかも、この部位をSV40遺伝子プロモーターの上流につなげても、レポーター遺伝子の一時的発現は色素細胞特異的であった。また、そのエレメントを逆向きに組み込んでも、その機能に変化はなかった。よって、このシスエレメントはヒトチロシナーゼ遺伝子の色素細胞特異的発現に必須なエンハンサーである。

3.2.3 色素細胞特異的エンハンサーの決定

ヒトチロシナーゼ遺伝子の転写開始点の上流約1.8キロbpの部位に存在する上記シスエレメント(約200bp)の機能をさらに詳細に解析し、39bpの領域があれば、レポーター遺伝子は色素細胞特異的に発現された。

3.3 ヒトTRP遺伝子のプロモーター機能解析

ヒトTRP遺伝子のプロモーター機能を3.2と同様に解析した。ヒトチロシナーゼ遺伝子と異なり、ヒトTRP遺伝子の上流約4キロbpの領域内には、

色素細胞特異的エンハンサーの存在を示唆する結果は得られなかった。しかし、ヒトTRP遺伝子の第一イントロン内に細胞非特異的なエンハンサーの存在が示唆された。すなわち、このイントロンが存在すると、レポーター遺伝子の発現がメラノーマ細胞とHeLa細胞の両方で著明に増加した。

4. 考 察

ヒトチロシナーゼ遺伝子の色素細胞特異的発現に必須なエンハンサーの領域(39bp)を決定した。同エンハンサーは転写開始点の上流約1.8キロbpの部位に存在する。この39bpの中にはCATGTGモチーフが存在しており、このモチーフはヘリックスループヘリックス構造を持つDNA結合蛋白質の認識部位であることが知られている。今後、このエンハンサーに作用する蛋白質因子を同定し、精製する。

一方、ヒトTRP遺伝子では、色素細胞特異的発現に必須なエンハンサーを見いだせなかった。その代わりに、第一イントロン内に細胞非特異的なエンハンサー様活性を検出した。今後このイント

ロン内のエンハンサー様活性の実体を解明すると共に、ヒトTRP遺伝子の色素細胞特異的発現に必須なエンハンサーの検索を行う。

5. 研究発表

1. Shibata, K., Takeda, K., Tomita, Y., Tagami, H. and Shibahara, S. :Down-stream region of the human tyrosinase-related protein gene enhances its promoter activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184:568-575, 1992.
2. Shibata, K., Muraosa, Y., Tomita., Y., Tagami, H. and Shibahara, S. :Identification of a cis-acting element that enhances the pigment cell-specific expression of the human tyrosinase gene. *J. Biol. Chem.* 267, 20584-20588, 1992.
3. Shibahara, S. :Functional analysis of the tyrosinase gene and brown-locus protein gene promoters. *J. Invest. Dermatol.* 100, 146S-149S, 1993.

別 添 資 料
— 成果発表論文抜粋 —

発 表 1

1 - 1 掲載誌

BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS
Vol. 184, No. 2, 1992 Pages 568-575

1 - 2 表 題

DOWNSTREAM REGION OF THE HUMAN TYROSINASE-RELATED PROTEIN GENE
ENHANCES ITS PROMOTER ACTIVITY

1 - 3 要 約

We have cloned and sequenced the human genomic DNA segments encoding the 5'-flanking region and the first two exons of the tyrosinase-related protein (TRP) gene, a pigment cell-specific gene. Functional analysis of its promoter suggests that the downstream region of the TRP gene, including the first intron, enhances the transient expression of the luciferase gene under control of the TRP gene promoter about 16- to 20-fold. This enhancer-like activity is detected not only in melanoma cells but also in HeLa cells whose TRP gene expression is assumed to be repressed. We suggest a possibility that the downstream region is not sufficient to confer pigment cell-specific expression, but is required for efficient transcription of the TRP gene in pigment cells. ©1992 Academic press, Inc.

1 - 4 図表等 (次頁)

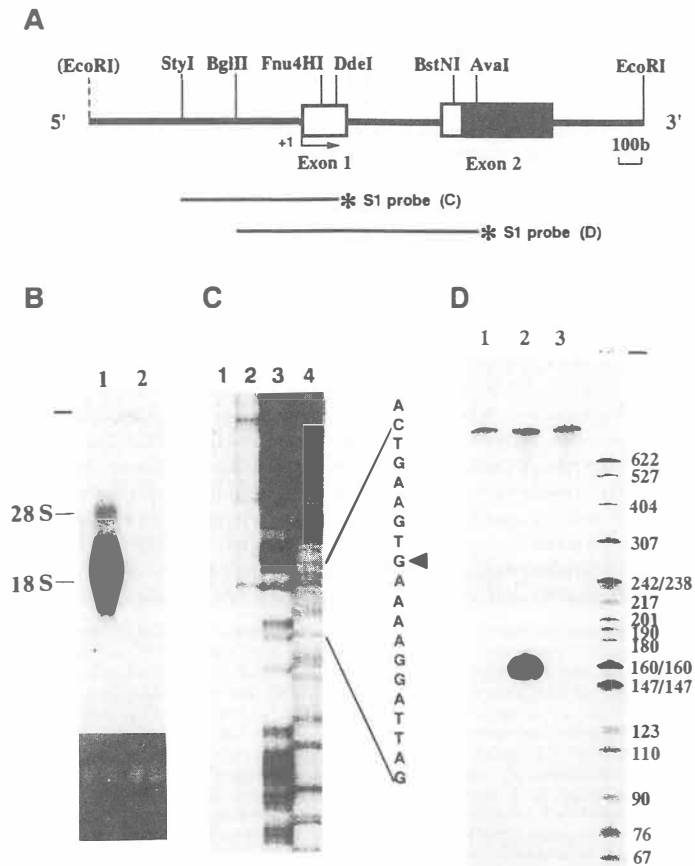


Fig. 1. Structural organization of the 5'-region of the human TRP gene.

A. Schematic representation of the human TRP gene. The direction of transcription is from left to right. Shown are the sites for only relevant restriction enzymes. The *EcoRI* site located at the 5'-end of the gene represents the linker sequence. Solid lines represent flanking and intronic DNA segments. The 5'-untranslated and the protein-coding regions are indicated by open boxes and a closed box, respectively. The S1 probes used in C and D were also shown and asterisks indicate the sites of end-labeling. B. Northern blot analysis. Each lane contained 10 μ g of total RNA prepared from MeWo melanoma cells (lane 1) and HeLa cells (lane 2). A small horizontal bar indicates the origin of lanes. A bottom panel shows the stained rRNA (18S and 28S) representing variability in the amounts of RNA loaded. The hybridization probe used was the *RsaI/RsaI* fragment (806/1554) excised from human TRP cDNA (11). C. Identification of the transcription initiation site. Shown is an autoradiogram of a sequencing gel. Lane 1, protected products with HeLa cell RNA; lane 2, protected products with human melanoma RNA. Lanes 3 and 4, chemically cleaved products of the S1 probe, representing purines and pyrimidines, respectively. Capital letters, shown along the sequencing ladder, denote the sequence of the sense strand (see Fig.2). An arrow indicates the putative transcription initiation site. D. S1 mapping analysis for the presence of correctly spliced transcripts. Lane 1, protected products with HeLa cell RNA; lane 2, protected fragments with human melanoma RNA; and lane 3, protected products with yeast tRNA. The size markers shown are pBR322 plasmid DNA digested with *MspI* and given in bases.

```

-200                                     GGTAAATGTTGAATAACAGTTGAATA-ACAGAATAAAAA-AA
-203                                     TCATCTTGTTTCTCTCTTGGTATACAGATAAGAAAAATAA
-159  AATCTCTGCAAAGTAAAC-AAATCTCACTAGTTTATCTGACTTGTAATCCAAATTAGTGCTTCTGGCCCTTTC1ATAAAC
-160' AATCAGTACAACGAAAGCAAAATCTCTCAGCGTCTCTAATACATCTTCCAATCAGTGTCTGACCTTCTTCTTAAGAC
-80   TTTAAGCATCACAGGAAATCAGTTGGAAGGGAATCATGTGCTGATCAAGTCTTAAAGGGCAGAAATATCACTGAAGT
-80'  TTTAACCATCACAGGAAACCAGTGGGGAGGGAGTCATGTGCTG-CCTAGTAGTTAAAGGGCAGGAGAAATCACTGGTGT
1    *GA-AAAGGATTAGTAAAGGGTGGAAAAAAGACCAGCCCGCCGCTAGTTGGGTGAGCAGATTTGGGATTAATATCAG
-1'  GAGAGGGATTAGTGAAGCTGSAAGAGAGGACCAAG---CCCTCCAGTGTGAGGAATCTGGCTTGGGATTTACTGTCTG
80   GCAGCAATCCACAT---GCACCTAACAGTTCAGGTGAGAGGACAAAGACACAAGCAAAATATAAAACATCAATTTCTA
78'  GCAGAAAATCTCTTCGGGCAATTAACAG---CTGECAT  CAGGGGAAAAG-CAGAC-CCAAA---CAACACT-AGCTCTG
157  AGAGAAGTTCATCAGAGACATCTTTCAGCAATGTGAGTACTGGAAAGAGTCCATGGGGAGTGGGTGGACACGTGCCA
149' AAGGAGATCAGCAGAGAAACCTTCCAGGATTCATGCTACTGGTGAGCAG--CTCTGTG--GTGGT---AC---CCT
237  AAATCCATTAGTGTAAAGGACCTTAAATCACAGAAATTAACCTTCTGGAAATCTGTCCCAATCTCTCTCAGCTCCA
217' TGTGACCA-AAGCTCTAGGAAC----ATGAAGGAGATTGCTTGTCTATAAACCTGTTTCTCATCTCCCTTCATTTCCA
317  AGGTTAAATTAATGTAATTAATGATGGTGACCTGCTAATTCATGCTTTTGATACATGATATCTA--GTATGATATATA
291' TGG-----TTAACTATTACT-ATGGTAGTCACCAACTAGTGGATGCTTTTGGTAAATGACATCTATGGAAGCTCTTTTG
395  TATAAACAATAAGCAGGAGACAGGGAATTAATATTTGGGTATCACACATCGAGGTGTATATATGCCAAATTTTAAAG
365' GATCA-----240 bp-----TGAGT-TCTGTCTAGCTATTATGCTCCAGATATTTAAAG
475  GTAATAACTACTACTTTTATTTATTTGTGAAATGTCATTTACAT-ATGGGTCCATTTTGAAGTGGTTTGGGAAGGGGG
652' GTGAAATAATTTTTGACTATTTGTTTGAATAATGTTGTTTACATGAAAGATTCATTTCGGGAGTGGGTTGAAAAGTATG
554  CATACATTTTAAAGTACCAAGAAAAACTTGCATAATCTCATTTT-ACTTCTCTTTTTCAGTGGATTTCCTCAGCTG
732' CAAAAAAGACTTTGCAAC-----TCTGTTTTGCCTTTTCTGTTTTTTCAGTGTATTTTCATCTGAGCA
633  CTTCACTCTCTCTACACAAGAGCTGCAAAACAGGCTTTTGTTTTGCACCTCTAATTCAGCAGATG
795' CCCCTGCTTCTCCATGCAAGAGCAGCATAGGAGACCTGTGTTTGAACCTCTGCTTCGGAAGAAATG

```

Fig. 2. Nucleotide sequence of upstream and downstream regions of the human TRP gene. The top line represents the nucleotide sequence of the 5'-flanking region, exon 1, intron 1 and a part of exon 2 of the human TRP gene, and the bottom line represents that of the mouse counterpart (13,14). The nucleotide sequences of exons are printed in shaded areas. The putative transcription initiation site of the human TRP gene (nucleotide residue 1) is shown by an asterisk. Nucleotide residues are numbered in the 5' to 3' direction, and nucleotides on the 5' side of residue 1 are indicated by negative numbers. The translational initiation codon located in the exon 2 is boxed. The three elements, found in other pigment cell-specific genes, are overlined (13). Double overlines represent the recognition sites for three enzymes: *Fnu4HI*, *DdeI* and *BstNI* (see Fig.1A). Small vertical lines between both sequences indicate identical nucleotide residues and small horizontal bars represent gaps. Two other 5'-splicing sites of the mouse intron 1 are indicated by closed triangles (14). The middle portion (240 bp) of the mouse intron 1 is not shown, because no sequence similarities are found.

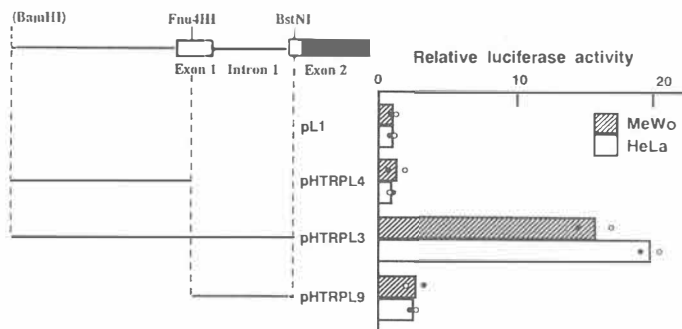


Fig. 3. Functional analysis of the human TRP gene promoter. MeWo human melanoma cells and HeLa cells were cotransfected with β -galactosidase expression vector, pCH110 and the fusion genes containing the human TRP gene promoter upstream of the luciferase gene. Both upstream and downstream regions of the TRP gene used for construction of fusion genes are shown at the left panel. The *BamHI* site located at the 5'-end of the upstream region represents the linker sequence used for construction. Cellular extracts were prepared from transfected cells and assayed for luciferase and β -galactosidase activity as an internal control. Luciferase activity was divided by β -galactosidase activity and shown as a ratio to the value obtained with pL1, a promoterless luciferase expression vector. The data shown are averages of two independent experiments as indicated by closed or open circles.

発表 2

2-1 掲載誌

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY

Vol. 267, No. 29, 1992 pp.20584-20588

2-2 表題

Identification of a *cis*-Acting Element That Enhances the Pigment Cell-specific Expression of the Human Tyrosinase Gene

(Received for publication, June 8, 1992)

2-3 要約

To identify the *cis*-acting element that is responsible for the pigment cell-specific expression of the human tyrosinase gene, we analyzed the promoter activity of its 5'-flanking region by transient expression assays. The fusion genes were constructed by inserting the 5'-flanking region of the human tyrosinase gene upstream from the firefly luciferase gene and were introduced into human melanoma cells and HeLa cells. We thus found the element, located between 2.7 and 1.8 kilobase pairs upstream from the transcription initiation site, that enhances the transient expression of the luciferase reporter gene in melanoma cells, but not in HeLa cells, the tyrosinase gene expression of which is not detectable. Using the fusion genes containing putative enhancer elements under the control of the heterologous simian virus 40 promoter, we identified the pigment cell-specific enhancer of ~200 base pairs(bp) between -2.0 and -1.8 kilobase pairs and localized the core sequence to a 39-bp region. This 39-bp core element was then confirmed to direct the melanoma cell-specific expression of the reporter gene under the tyrosinase gene promoter. We thus propose that this core element is responsible for the pigment cell-specific expression of the human tyrosinase gene.

2-4 図表等 (次頁)

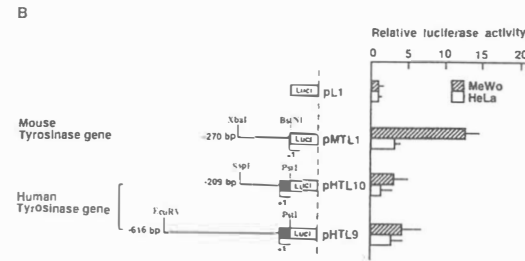
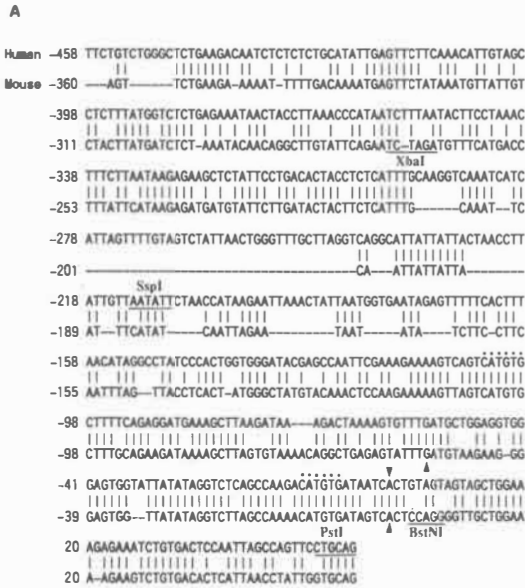


FIG. 1. Comparison of nucleotide sequences and function of human and mouse tyrosinase gene promoters. *A*, comparison of the nucleotide sequences. The *top line* represents the nucleotide sequence of the human tyrosinase gene promoter (8, 9), and the *bottom line* represents that of the mouse gene (12, 14). *Closed triangles* indicate the major transcription initiation sites (residue 1) and the second initiation site of the mouse gene (12). The nucleotides on the 5'-side of residue 1 are indicated by *negative numbers*. Relevant restriction sites and the CATGTG motif are also indicated. *B*, transient expression analysis. MeWo human melanoma cells and HeLa cells were cotransfected with β -galactosidase expression vector pCH110 and the fusion genes containing the tyrosinase gene promoters upstream from the luciferase gene. The promoter regions used for construction of fusion genes are schematically shown to the *left*. The direction of transcription is from left to right as indicated by *arrows*, and the transcription initiation site is numbered +1. The exons coding for the 5'-untranslated regions are indicated by *closed boxes*. The number shown at the 5'-end of each upstream region represents the position from the transcription initiation site. Luciferase activity was divided by β -galactosidase activity (an internal control) and is shown as a ratio to the value obtained with pL1 (relative luciferase activity). The data shown are the mean \pm S.D. of three independent experiments.

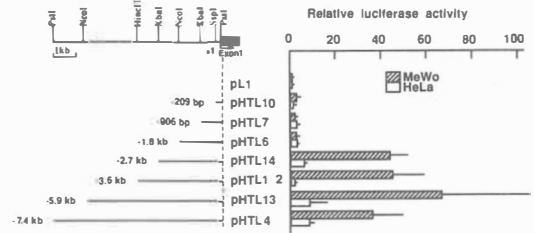


FIG. 2. Functional analysis of human tyrosinase gene promoter. The upstream regions of the human tyrosinase gene used for construction of fusion genes are shown to the *left*. The relative luciferase activity is shown to the *right*. Other conditions were the same as described for Fig. 1.

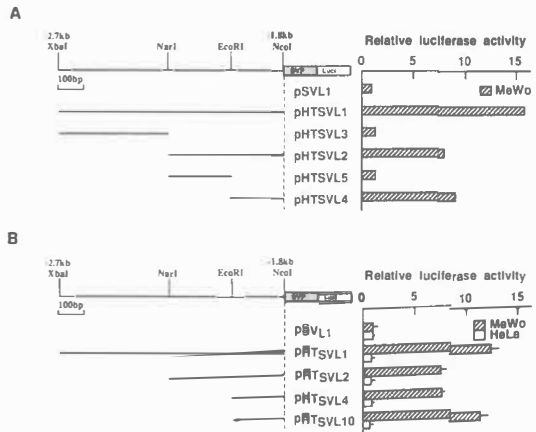


FIG. 3. Functional analysis of enhancer element using heterologous promoter. *A*, presence of the enhancer element. The *XbaI/NcoI* fragment, identified in Fig. 2, is enlarged, and the upstream regions of the human tyrosinase gene used for enhancer analysis are shown to the *left*. The upstream regions were inserted upstream from the SV40 promoter. The data shown were obtained from one experiment. *B*, presence of the enhancer element conferring pigment cell-specific gene expression. pHTSVL10 carries the enhancer element in the opposite orientation, as indicated by the *arrow*.



FIG. 4. Comparison of pigment cell-specific enhancer of human tyrosinase gene with homologous sequence found in mouse counterpart. *A*, nucleotide sequence of the pigment cell-specific enhancer of the human tyrosinase gene. Shown is the nucleotide sequence of the *EcoRI/NcoI* fragment ($-2.0/-1.8$ kb), containing the enhancer element of the human tyrosinase gene (*top line*). The *bottom line* represents the nucleotide sequence of the putative mouse homolog (14). Nucleotide residues are tentatively numbered in the 5' to 3'-direction for the human element (see "Experimental Procedures"), and the nucleotide residues of the mouse homolog were renumbered according to our assignment of the transcription initiation site (12). Indicated are the recognition sites for the enzymes used for construction of the fusion genes. *Vertical lines* between both sequences indicate identical nucleotide residues, and *dashes* represent gaps. The core element is from 142' to 180', and the CATGTG motif is *dotted*. The *overline* indicates the sequence similar to the consensus sequence of octamer-binding proteins. *B*, functional analysis of the mouse sequence homologous to the human enhancer element. The *PacI/NcoI* fragment ($-1325/-1105$) of the mouse tyrosinase gene was located upstream from the SV40 promoter/luciferase fusion gene.

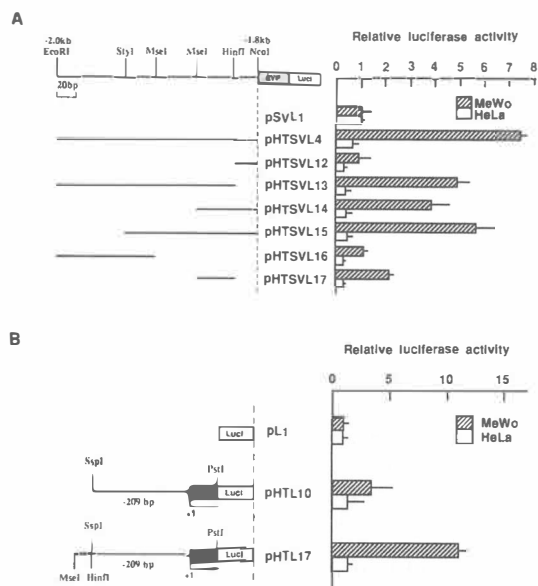


FIG. 5. Identification of core element in pigment cell-specific enhancer of human tyrosinase gene. *A*, functional analysis using the SV40 promoter. The *EcoRI/NcoI* fragment, identified in Fig. 3, was dissected, and its enhancer activity was analyzed. *B*, functional analysis using the tyrosinase gene promoter. The *MseI/HinfI* fragment, containing the core sequence of the enhancer, was analyzed for enhancer activity.

アルツハイマー型老年痴呆症，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
浜 治 世

This study aims at demonstrating the effectiveness of the use of cosmetics on elderly people with Alzheimer disease and on those with senile dementia symptoms.

Our hypothesis is that the use of cosmetics may heighten their self-image and accompanying that the subjects' senile dementia symptoms might be improved or slowed. The experiment consists of two parts. Fifty three elderly people-all females-were recommended by the doctors of an elderly people's health care center to participate in Experiment I. From these 36 were selected-17 who were staying at the center and 19 who went to the center as out-patients. The average age of the subjects was 82. Five were recommended for Experiment II by a psychiatrist at a public hospital from away his out-patients with Alzheimer disease. Those 5 are to participate in our experiment on a contributing long-term basis. Their average age is 66.

The results reveal:(1)Fundamental frequencies(F₀)of the voices of almost all subjects increased after they received a makeup application, and those frequencies got higher as the sessions progressed. This suggests that the makeup applications raise the subjects' feeling to a positive state. (2)The time spent looking at themselves in the mirror after the makeup application also increased session by session. (3)Besides our objective analysis of the data, their family members, doctors and nurses also reported to us that the senile dementia conditions of the subjects had improved. In this report, only one case of each experiment was reported in detail.

1. 緒 言

近年，わが国では高齢化社会を迎え，現在9人に1人が65歳以上の高齢者であるが，今後さらに増え続けて21世紀には4人から5人に1人が高齢者になると予想されている。高齢化に伴い，当然，老人性痴呆症者の増加も予想される。痴呆症者への対応が早急に求められているところであるが，今のところ痴呆に対する有効な薬物療法はなく，また彼らに対する適切な対応についても確立されていないのが現状である。われわれ同志社大学臨床心理学グループ^{1)・2)}は，数年来，老人性痴呆

症の情動の活性化と問題行動の軽減を目的として，痴呆症状を呈しはじめている女性の老人に化粧を施術することを試みてきた。その結果，化粧は自分の容姿に対する関心を高め，他の日常生活の場面でも意欲が見いだされ，会話や積極的な行動が増加する，行動が落ちついてくるなど好ましい効果をもたらすことが実証されてきた。これらの化粧の効果は，直接的には痴呆老人の感情面・意欲面を高めることに見いだされたが，間接的には痴呆老人の介護や対処で負担を感じている家族や施設の介護にあたる者にも心理的に効果をもつことができると考えられる。

Study of Emotional Activation by Cosmetic Application on Elderly People with Alzheimer Disease and on Those with Senile Dementia Symptoms

Haruyo Hama

化粧(Make-up)の心理学的研究の歴史は比較的浅いが、Hamid³⁾やGrahamら⁴⁾など欧米の研究者によって始められた。彼らの研究は、化粧をすることによって女性の身体的魅力が高められるばかりでなく、その人の人格特性も他者から、より好ましく評価されるようになることを示唆した。また、Farinaら⁵⁾は、精神疾患による入院患者を調査して、適応と身体的魅力および自己認知との間には正の相関が見られたことを指摘している。さらにGrahamら⁶⁾は、一般的に化粧行動から遠ざかっていると思われる高齢者であっても、化粧がもたらすポジティブな効果は大きいことを示唆している。余語ら⁷⁾は化粧行動の基礎的研究を行ってきたが、その一つの成果として、素顔よりも自分で化粧を施したときの方が、さらに専門技術者によって施術されたときの方が、自信と満足度がより強く得られることを見いだした。このように、化粧と化粧行動が女性に与える正の効果を積極的に利用し、臨床場面で化粧行動を取り入れたものを筆者は、“化粧を手がかりとした情動活性化療法”と名づけている。浜ら⁸⁾、Hamaら⁹⁾、ならびにHibinoら¹⁰⁾の行った、陰性症状を示す精神分裂病患者、うつ病患者の情動活性化の手段としての化粧療法は、この文脈において化粧行動の臨床場面での可能性を実験的に立証したものといえる。

一般に痴呆症といわれるものの90%が老年性痴呆と血管性痴呆によるものであるが、“ぼけ症状”は健常高齢者の単なる物忘れや記憶違いを指している“ぼけ”と明らかに区別されるものである。いずれの痴呆においても失認、失行、失見当、知能・日常生活能力の低下、記憶障害や、これらの精神障害に起因する問題行動、異常言動および身体症状がみられ、しかも本人の病識の浅いことが特徴である。

本研究の仮説は、痴呆は環境的要因や精神的要因によって左右されるというものである。すなわち、痴呆老人は精神機能が低下しているとはいえ、情動面での機能はかなり保持されていることが多

く、情動を表出できないからといって感受性が損なわれているときめつけることは間違っていると考える。本研究はこのような仮説に基づいて、痴呆老人の情動活性化の手段として化粧を用いる。われわれは、化粧施術は“ぼけ”症状を改善するか、あるいはその進行を遅らせる可能性があると考えている。また、痴呆症者の実験への参加行為自体が気分転換の効果をあげ、化粧への動機づけを高め、それが情動の活性化に導くこととなるといえよう。さらに、施術後、周囲の人からきれいになったとほめられることが報酬となり、化粧行為が強化されるので、われわれの化粧療法は条件づけの原理に基づく行動療法のひとつであるといえよう。

2. 方法

研究は後述するように実験Ⅰと実験Ⅱによって構成された。実験Ⅰでは各被験者に週1回10セッションを単位として約3か月間化粧を施行する。実験Ⅱでは、ひとりの被験者を長期間にわたって実験観察する。

2-1. 被験者

実験Ⅰの被験者には京都市内にある老人保健施設の院長に依頼し、施設に入所中か、あるいはまた、日中のみ預かるデイケア制度を利用している老年者(女性)の中からアルツハイマー型老年性痴呆症者および血管性痴呆症者を紹介していただいた。

参加した被験者の総数は53名であった。しかし、これらの被験者の中、17名は種々の事情で実験(化粧)を週1回10セッション以上続けることができなかった。われわれが、これまで精神分裂病やうつ病者に行ってきた研究^{8, 9, 10)}の結果から、“化粧”の効果は少なくとも10回以上続けることによって評価できると考えるので、本報告では17名のデータは除外することにした。そこで実験Ⅰの被験者は、老人性痴呆症状を呈する女性の老人

36名(入所中の被験者17名, デイケアの被験者19名)で, 年齢範囲は71歳から93歳で, 平均年齢は82歳であった。このうち, 国立精研式痴呆スクリーニング・テストとDSM-III-Rの判断基準により典型的痴呆とみなされる被験者は14名で, 他の22名は痴呆の境界線にあるものであった。これらの被験者はすべて薬物の投与もしくは特別なリハビリテーションを受けていない。

実験Ⅱの被験者は, 京都府立医科大学精神科教室の教授ならびに神経内科学教室の教授に依頼し, 通院中のアルツハイマー型老年性痴呆症者を紹介していただいた。後述の症例の被験者Aは, 3年前に精神科医によりアルツハイマー型老年痴呆症と診断された。痴呆の程度は中等度である。記憶場所に関する見当識に問題がある。主治医によって行われた知能検査の結果は, Mini-Mental Stateで1991年12月に13点, 1992年10月に4点, 11月に6点であった。家族状況は, 長女と孫の3人暮らしで, 介護は長女が行っている。病院の診察は週1度で薬物が投与されている。症状には, 曜日や時間の失認, 物忘れ, 外出して1人で帰れなくなる, などがみられる。実験開始時の年齢は62歳。

2-2. 実験者

美容の訓練を受けた女性4名。

2-3. 化粧室および装置

化粧施術室と隣室のモニター室で構成される。化粧施術室には高さ80cm, 幅1mのハーフミラー三面鏡と, 被験者が座る上下電動式化粧施術用椅子が設置された。その他, 給湯付き洗面台, 化粧品やタオルなどを備える化粧品棚が置かれた。三面鏡の裏側および鏡台上にはVTRカメラが設置された。三面鏡の裏側のカメラは化粧中の被験者の様子, 鏡台上のカメラは待機中の被験者の様子と室内全体の様子を撮影し, いずれもモニター室のディスプレイ・テレビ上に映し出された。VTRカメラはモニター室から遠隔操作で上下左右に方向を変えることが可能であった。三面鏡台

左側と後方に被験者の音声を収録するためのマイククロフオンを設置した。モニター室には被験者の行動の観察用のディスプレイ・テレビの他に, 映像と音声を同時に収録するためのビデオ録画装置を設置した。実験では, 実験者の1人が被験者の化粧を施術し, 別の実験者はディスプレイ・テレビの映像を見ながら被験者の顔が画面からはずれないようにカメラを遠隔操作して観察を行った。

2-4. 手続き

実験Ⅰでは, 各被験者につき, 週1回の頻度で10回以上を実施した。すべての実験セッションで化粧の直前・直後に被験者の音声を録音した。被験者はB5判上質紙に大きく書かれた“あいうえお”という母音を呈示されて音読するよう求められた。音声の録音は, マイククロフオン(SONY: Electric Condenser Microphone)を被験者の口から5cmから10cmの距離で集音し, デジタル・オーディオ録音機(SONY)で記録した。視力が低下していたり, 他の理由で文字が読めない被験者については, まず実験者が“あいうえお”と発声して, 同様に発声するよう求めた。化粧の施術段階では, まず化粧水, 乳液, 下地クリームなどの基礎化粧品で肌を整え, つぎに必要なに応じてコンシーラーやファウンデーション, 粉白粉, 眉墨, 口紅, 頬紅を被験者の顔に施した。化粧の施術の所要時間は, 約10分であった。実験Ⅱでは, 化粧は週1回の頻度で計46回行われ, 現在も進行中である。各回の実験には被験者の長女が同伴し, 実験中介護者は後方のソファに座って施術の終了まで待ってもらった。

3. 結果と考察

3-1. 実験Ⅰについての結果と考察

3-1-1. 音声の分析

音声分析器(KAY: Visi-Pitch 6095/6097)を用いて, DATによって録音した音声を, 化粧施術前後での平均基本周波数(図中では平均F。とす

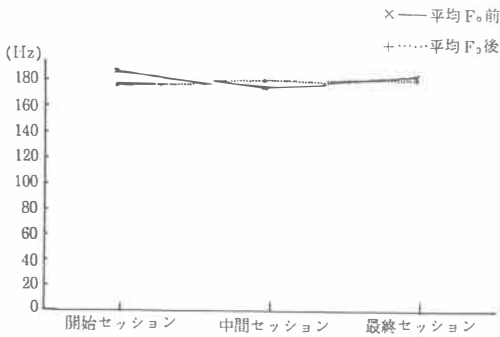


図1 化粧前後の音声の平均基本周波数

る)と基本周波数(F₀)レンジについて比較した。また、実験初期の数セッション、中間期の数セッション、後期の数セッションのあいだで平均基本周波数を比較した。図1は全被験者の平均基本周波数を示す。

3-1-2. 行動の分析

ビデオに収録された被験者の言語行動および非言語行動を、実験セッションごとに分析し比較した。分析の対象となった指標は、①微笑時間の割合(総セッション時間に対する百分率)、②目を閉じている時間の割合、③1分間あたりの瞬目の頻度、④待機用椅子に座っている30秒間中に鏡を見ている時間であった。それぞれの指標に関して、実験者はレクチグラフによって測定し、ペンのスピードは1mm毎秒に設定し、被験者が行動している間ボタンを押し続けた。①、②、④に関しては、そのボタンを押し続けた長さを測り、時間に換算した。

われわれは上述の各指標について、全被験者のデータに基づいて分析したが、すべて有意な差はみられなかった。これは個人差が大きすぎるためであると思われる。したがって、本研究のような実験では、事例毎に化粧の前と後、セッションごとの効果などを詳細に検討する方法のほうが適切であると考え、各事例ごとに結果を詳細に分析し、検討を行った。ここでは限られた紙面のために、実験Ⅰおよび実験Ⅱのなかからとくに興味あると思われる症例を一例ずつあげて考察することとした。

3-2. 実験Ⅰの症例

3-2-1. 被験者W

被験者W(82歳)は2年前に脳梗塞発作をおこし、脳血管性痴呆と診断されるが、日常生活にとくに問題はない。平成3年7月に老人保健施設に入所したが、その時点での知能検査(国立精研式痴呆スクリーニング・テスト)の結果は12点であった。

家族は被験者の三女夫婦、孫の3名で、在宅時には三女が介護している。

3-2-2. 結果と考察

この被験者は週1回“化粧療法”を行い、現在も継続中である。結果の分析は17回目までの資料を用いた。

被験者Wは“この歳になってお化粧がしてもらえるなんて”、“女の命は顔だから”と実験への参加を第1回目から非常に喜び、毎回積極的に参加している。顔面麻痺の後遺症で右目が伏せ目がちであること、顔にしみが多くできたことを気にしており、実験が進むにつれてそれを隠してほしいといった化粧方法に対する要求も出てくるようになった。

図2は鏡の直視時間(累積)を化粧施術前後で比較したものである。分析対象となったデータは9セッションを合計したものである。化粧施術前後について1要因の分散分析を行った結果、直視時間のあいだに有意な差がみられた($F=15.61$, $df=1, 8$, $p<.01$)。このことから、被験者は化粧

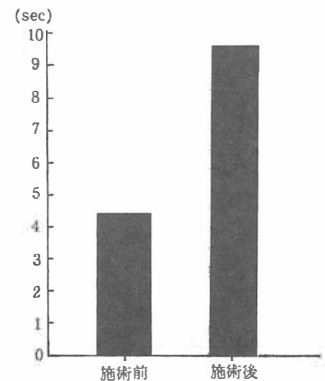


図2 化粧中に鏡を熟視していた時間

後に自己像の変化に対する興味を高めたものと考えられる。

化粧後に周囲の人からほめられるのが嬉しいようで、自らそれを報告する。また、家族の話によると、実験(化粧)を受けるようになってから非常に明るくなり、積極性や社会性が出てきたということである。

3-3. 実験Ⅱの症例(被験者A)

3-3-1. 行動の変化

化粧に対する興味は、第1セッションより高く、化粧方法についての話が中心となる。実験開始から1か月頃から朝の洗顔が習慣となり身だしなみも整えられるようになったとの報告を長女より受ける。簡単な化粧をして来室することも度々見受けられ、実験開始後5か月頃からは、実験直前に美容院に通うことも習慣となる。

3-3-2. 音声の変化

図3は化粧施術前後の平均基本周波数を示す。録音状態不良のため第2, 7, 12, 16~21セッションの数值は欠損しているが、徐々に増加している。化粧施術前後で差があるか、また実験開始時とセッションを重ねた後での差を調べるために、最初の5セッションと最後の5セッションについて2要因の分散分析を行った。その結果、化粧施術前後では有意な差は生じなかったが、実験開始時とセッションを重ねた後では有意な差がみられた($F=1087.353$, $df=1, 1$, $p<.01$)。つまり実験

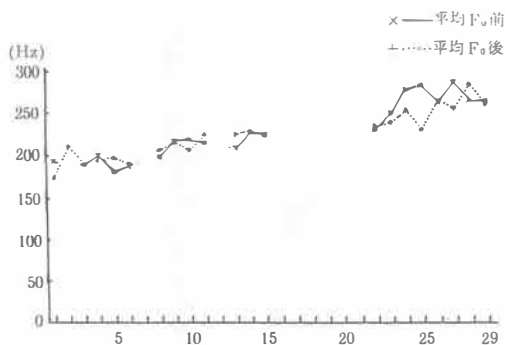


図3 化粧前後の音声の平均基本周波数

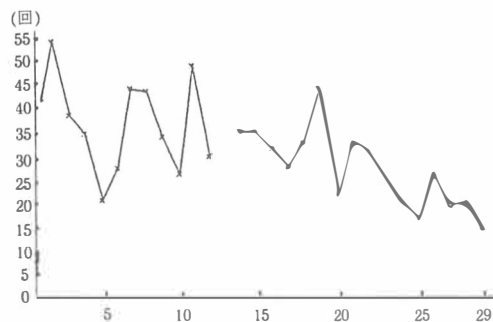


図4 化粧中の瞬目の頻度

の経過とともに平均基本周波数は増加し、化粧によって声が明るくなっていることが分かる。

第5セッションの段階で、“あいうえお”の語尾を伸ばして歌うように発声するようになった。また第20セッションの頃より“あいうえお”と言うように教示した直後に、“なんて言うんですか”と教示内容を忘れてしまうようになる。

3-3-3. 瞬目の変化

図4は1分あたりの瞬目頻度、図5は目を閉じている時間の割合を示す。第19セッション以前では瞬目の増加と目を閉じている時間の増加は同時にみられることが多い。しかし、第19セッション以降、目を閉じている時間は徐々に増加しているにもかかわらず、瞬目は減少してきている。これは、被験者が情動面で安定してきただけでなく、覚醒水準自体が低下しているものと考えられる。図6は微笑時間の割合を示す。第12セッションまでは

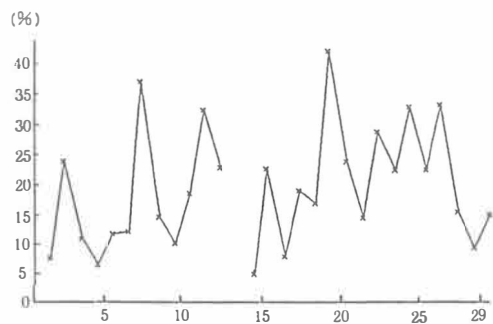


図5 全セッション時間に対する閉目時間

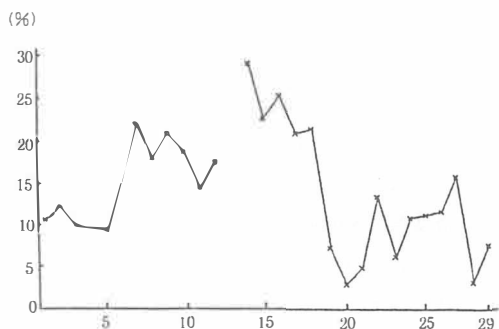


図6 全セッション時間に対する微笑時間

増加しているが、第14セッションから第20セッションまでは減少している。その後再び増加は始めているが、実験開始当初より全般的に値は低い。

3-3-4. その他の変化

化粧中、化粧品の香料について敏感に反応し“いい香り”などと感想を述べることが多い。それ以外にも、“ふわぁとして”、“こう、何とも言えない”、“気持ちのよい”、“すうっと”、“この辺がこう霞がかかったようで”、などの快感情の表現がセッションを重ねるごとに増加している。形容詞を多用した表現をすることがあり、意味がわかりにくい時もある。しかし、実験者に自分が喜んでいることを示そうとする意図がみられることは、化粧の効果の一つであるといえる。化粧後に手鏡で顔をみると“私がしても同じようにはならない”と実験者による化粧を喜んでおり、“別人のよう”になれたことを楽しんでいる。

3-3-5. 歌唱、習字の試み

第13セッションから、化粧後に習字をすることを試みる。被験者は習字を教えていた経験があるため、簡単な手本を提示したことで不機嫌になった。また、たまたま被験者と同年代の別の被験者が同席したが、そのことにより競争心、対抗心を呼び起こしたようで、以後、実験室に同世代の人間がいると書くことを拒絶するようになる。第25セッション頃から、“夜”を“応”と書いたり、“りんりん”を“りしりし”と書くなど、誤字、

脱字、文字新作が目立つようになる。

被験者に習字の経験があることが、逆に実験中の習字への導入を難しくし、実験者を教え子に見立てて習字の心得を話し始めることが多い。そのため、習字への導入に失敗した場合には、歌を歌うことを試みた。歌に対しては抵抗が少ないようで、家でも練習していると長女より報告を受ける。

3-3-6. 実験室外での変化

第22セッション(平成4年8月23日)の翌日、被験者は自宅にて原因不明の意識障害を起こし倒れた。当初、抗てんかん薬を処方していたようであるが、現在服用はしていない。抗てんかん薬によって覚醒水準が下がるとはないと、主治医は述べている。この直後から被験者の体重の減少は一目瞭然で体力の低下が著しい。10月より睡眠薬を漢方薬にかえたところ、2週間ほどで排泄時の失敗がなくなり、10月18日以降失敗はみられないとのことである。

長女によれば、化粧実験開始前は5~7歳の子供に興味を示していたが、最近では1~3歳の子供に興味を示すようになってきているそうである。この年齢の低下は、被験者の退行現象を示すものと考えられる。被験者も“なんかこの頃は私は変や”、“前と違う”と痴呆について自覚しているような発言をする。しかし、被験者の礼儀正しさは実験を通じて保たれていることや、実験指導者に会うともう何か月も前のことをはっきり覚えていて、“あなたはこの前、とてもお上手に私にお手本を書いてくれましたね”などと記憶再生できたことなどを考え合わせると、痴呆が進行しているとい概には言えない。

朝、洗顔後に化粧水やクリームをつける習慣ができたことや、自分で化粧を試みた時、クリームと間違えて塗り薬をつけたこと、頬紅をぬりすぎて顔中を真っ赤にしてしまったことを長女は報告しており、このことから化粧が被験者に意欲面での積極性を支えていると考えられる。また、化粧を施術した日は非常に機嫌がよくなり実験への参加自体が被験者の日常生活にめりはりを与えてい

る。

以上、実験Ⅰおよび実験Ⅱをとおして、化粧を手掛かりとして用いた情動活性化療法は老人の様々な問題行動を改善するのに有効であり、平板になりがちな老人の生活パターンにリズムをつける意味でも、痴呆進行を遅らせる好ましい刺激になると考えられる。化粧がいわゆる“ぼけ”症状の改善あるいはその進行をとどめるのみならず、“ぼけ”の症状の予防にも役立つことができるならば、本研究の成果が Cosmetology に及ぼす意義はさらに深いものとなろう。

引用文献

- 1) 浜 治世・浅井 泉・余語真夫 1991 化粧による情動活性化の試み 日本健康心理学会第4回大会発表論文集
- 2) 浅井 泉・余語優美・浜 治世 1992 老人性痴呆の情動活性化の試み 日本心理学会第4回大会発表論文集, 662.
- 3) Hamid, P. N. 1972 Some effects of dress cues on observational accuracy, a perceptual estimate, and impression formation. *Journal of Social Psychology*, 86, 279-289.
- 4) Graham, J. A. & Jouhar, A. J. 1981 The effects of cosmetics on person perception. *International Journal of Cosmetic Science*, 5, 25-26.
- 5) Farina, A., Burns, G. L., Austad, C., & Bugglin, C. 1986 The role of physical attractiveness in the readjustment of discharged psychiatric patients. *Journal of Abnormal Psychology*, 95, 139-143.
- 6) Graham, J. A. & Kligman, A. M. (Eds.) 1985 *The psychology of cosmetic treatments*. New York:Prager.
- 7) 余語真夫・津田兼六・浜 治世・鈴木ゆかり・互恵子 1990 女性の精神的健康に与える化粧の効用 健康心理学研究, 3, 28-32.
- 8) 浜 治世・日比野英子・藤田祐子 1990 化粧による情動活性化の試み 日本心理学会第54回大会発表論文集, 714.
- 9) Hama, H., Matsuyama, Y., Fukui, K., Shimizu, H., Nakajima, T., Kon, Y., & Nakamura, K. 1990 Using cosmetics for therapy. In B. Wilpert, H. Motoaki, & J. Misumi (Eds.), *Proceedings of the 22nd International Congress of Applied Psychology*, Vol. 3, Hillsdale:Lawrence Erlbaum Associates. p. 271. (Audio-Visual)
- 10) Hibino, E., Asai, I., Hama, H., Fujita, Y., Oshibe, K., Inoue, T., Dan, T., & Ueda, H. 1990 A clinical study of using makeup for schizophrenic and depressive patients. In B. Wilpert, H. Motoaki, & J. Misumi (Eds.), *Proceedings of the 22nd International Congress of Applied Psychology*, Vol. 2, Hillsdale:Lawrence Erlbaum Associates. p. 199.

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 難治疾患研究所

畑 隆一郎

L-Ascorbic acid 2-phosphate(Asc 2-P), a long-acting vitamin C derivative, stimulated transcription of genes for $\text{pro}\alpha_1(\text{I})$ and $\text{pro}\alpha_2(\text{I})$ collagen in normal human skin fibroblasts after 8 h of treatment in the absence or in the presence of cycloheximide, indicating Asc 2-P stimulates transcription of type I collagen genes in the absence of protein synthesis. The transcriptional rate in these cells reached the maximum value after 40 h of treatment, and at that time it was 3 to 4 times higher than that of the control cells cultured in the absence of Asc 2-P. Steady state levels of mRNAs for $\text{pro}\alpha_1(\text{I})$ and $\text{pro}\alpha_2(\text{I})$ chains were also increased to be 3 to 4 times higher than the control levels by treatment of the cells with Asc 2-P for 72 h. When the fibroblasts obtained from a patient with Ehlers-Danlos syndrome were treated with Asc 2-P, the derivative also stimulated transcription of the gene for $\text{pro}\alpha_1(\text{I})$ chain and accumulation of mRNA for $\text{pro}\alpha_1(\text{I})$ chain. On the other hand, Asc 2-P failed to stimulate transcription of the $\text{pro}\alpha_2(\text{I})$ gene or an increase in mRNA for $\text{pro}\alpha_2(\text{I})$ chain. Sodium ascorbate showed effects quite similar to those of Asc 2-P, when fibroblasts obtained from a normal control or the patient were cultured for 16 h with it.

These results indicate the existence of *cis*-regulatory elements responsible for transcriptional activation by Asc 2-P or ascorbic acid in $\text{pro}\alpha_1(\text{I})$ and $\text{pro}\alpha_2(\text{I})$ genes of normal fibroblasts. These data also suggest some defect(s) of these elements in the $\text{pro}\alpha_2(\text{I})$ gene of the patient with Ehlers-Danlos syndrome.

1. 緒言

細胞外マトリックスが細胞の増殖, 細胞の機能制御に大きな役割を果していることが明らかにされつつある。我々は個体の発生, 老化, および生体のホメオスタシスの維持において, 細胞外マトリックスが重要な機能を持つことから, 細胞外マトリックスを神経系, 内分泌系, 免疫系とならぶ第四の生体制御系として位置づけ¹⁾, その代謝調節機構と作用機構を分子レベルで明らかにしたいと考えている。

I型コラーゲンは細胞外マトリックスの主要成

分であり, 高等動物においては, 生体蛋白質のおよそ20%を占め, 組織形成, 多細胞体制の維持に必須の成分である。

I型コラーゲンの構造の異常, あるいは合成の低下は骨形成不全症, エーラー・ダンロス症(EDS), 壊血病の病因となり, 器官の形成異常, 機能不全を引き起こし, 重症の場合は個体の死を招く。一方, I型コラーゲンの組織への異常な蓄積は, 肝硬変, 動脈硬化, 強皮症等の臓器線維症を引き起こす。それ故, 正常な細胞ではI型コラーゲンを構成する $\alpha_1(\text{I})$ 鎖と $\alpha_2(\text{I})$ 鎖遺伝子の発現は厳密に調節されていると考えられる。

Molecular Cell Biological Studies on the Regulation of Growth and Collagen Metabolism in Human Skin Fibroblasts by Vitamin C and Epidermal Growth Factor

Ryu-Ichiro Hata

我々は細胞外マトリックスの代謝調節の研究中に、上皮成長因子(EGF)とビタミンC(VitC)および活性持続型ビタミンC(Asc2-P)が共に種々の細胞の増殖を促進するが、I型コラーゲンに関しては、ビタミンCとAsc2-Pが合成を活性化するのに対して、EGFは合成の阻害をすることを見いだし²⁻⁴⁾、さらに、これがI型コラーゲンの遺伝子の転写レベルの調節であることを明らかにした⁵⁾。

本研究では皮膚の組織形成と代謝調節機構を明らかにすることを目的として、この分子機構を解析した。

2. 実験方法

正常および $\alpha_2(I)$ 鎖の合成欠損を示すEDS患者⁶⁾の皮膚線維芽細胞を10%のウシ胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル培地で定常期まで培養後Asc2-PあるいはVitC存在下に時間を変えて培養し、I型コラーゲンを構成する $\alpha_1(I)$ 鎖と $\alpha_2(I)$ 鎖遺伝子の転写活性、mRNA量、およびそれぞれのポリペプチド鎖の合成量を調べた。方法は既報の方法によった^{5, 6)}。

3. 結果及び考察

3.1 活性持続型ビタミンCによるヒト皮膚線維芽細胞のI型コラーゲン遺伝子の転写活性化のキネティクス

正常細胞をAsc2-Pで処理すると、8時間後には $\alpha_1(I)$ 鎖、および、 $\alpha_2(I)$ 鎖遺伝子の転写活性は有意に上昇し、また、シクロヘキシミドを共存させて、蛋白質の合成を95%阻害しても、両遺伝子の転写活性化は同様に起こる(Fig.1A)。これらの結果はAsc2-P処理によるシグナルは、新たな蛋白質合成を介さずに直接 $\alpha_1(I)$ 鎖と $\alpha_2(I)$ 鎖の遺伝子を活性化することを示している。転写活性はAsc2-P処理40時間後に最大を示し、以後漸減した。mRNA量はこれを追いかけるように増加し、処理3日後に最大となった⁷⁾。

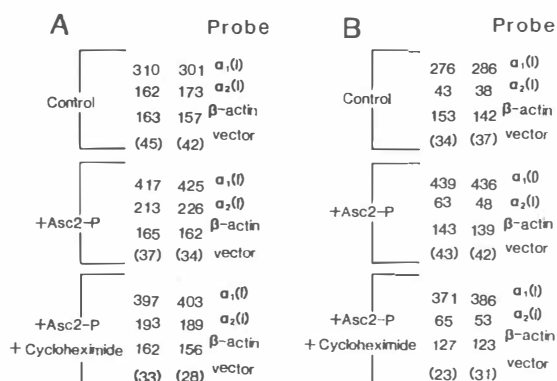


Fig.1 Hybridization of mRNA precursors during in vitro transcription. A, normal control; B, EDS.

16時間の処理ではAsc2-PとVitCによる $\alpha_1(I)$ 鎖と $\alpha_2(I)$ 鎖遺伝子の転写活性化、mRNA量、コラーゲン合成量に差はなく、長時間処理によって観察された両者の効果の差³⁾は、その安定性の差によると考えられる(Table 1)。

さらに、Asc2-P処理による時間変化を調べると、転写活性化、およびmRNA量は、未処理の細胞の3倍となったが、ポリペプチド鎖の合成は最大6倍に活性化されており、Asc2-PはI型コラーゲン遺伝子の転写活性化の他に、mRNAの安定化、あるいは、翻訳過程の活性化作用もあると考えられる⁷⁾。

3.2 エーラー・ダンロス症患者皮膚線維芽細胞における $\alpha_2(I)$ 鎖の遺伝子の転写異常 EDS患者細胞における $\alpha_2(I)$ 鎖の発現異常

Table 1 Effects of Sodium Ascorbate and Ascorbic Acid 2-Phosphate on the Expression of Type I Collagen Genes^a

	DNA Content (%)	Protein Synthesis (%)		Relative ^b Rate of Collagen (%)	Type I Production (%)		mRNA Level (%)		Primary Transcripts (%)	
		COL	NCP		α ₁	α ₂	α ₁	α ₂	α ₁	α ₂
Control	100 ± 2	100 ± 9	100 ± 12	7.0 ± 0.6	100	100	100	100	100	100
+NaAsc	124 ± 9	201 ± 9	124 ± 14	10.7 ± 0.4	223	244	171	180	180	202
+Asc2-P	117 ± 1	218 ± 10	147 ± 4	10.0 ± 0.4	233	225	164	175	205	234

^aHuman skin fibroblasts were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum in the absence or presence of 0.2 mM sodium ascorbate (NaAsc) or 0.2 mM ascorbic acid 2-phosphate (Asc 2-P) for 16 hours.

^bRelative rate of collagen production to total protein production.

原因を明らかにするために患者細胞を上記と同様の処理をすると、 $\alpha_1(I)$ 鎖についてはAsc2-P処理により正常細胞と同様に転写の活性化、mRNA量の増加、 $\alpha_1(I)$ 鎖の合成活性化が起こったが、 $\alpha_2(I)$ 鎖の場合は、Asc2-P未処理の時は正常細胞と比較して転写は1/4、mRNA量は1/10以下であり、 $\alpha_2(I)$ 鎖の合成は全く検出されなかった(Fig.1B)。Asc2-Pで8時間から6日間の処理では、 $\alpha_2(I)$ 鎖遺伝子の転写活性化、mRNA量の上昇は起こらず、 $\alpha_2(I)$ 鎖の合成も検出できなかった。EDS患者細胞の $\alpha_2(I)$ 鎖遺伝子をSouthern Blot法で調べると、そのサイズおよび遺伝子量は正常細胞と違いはなかった。これらの結果は、このEDS患者細胞においては、 $\alpha_2(I)$ 鎖遺伝子の転写機構に異常があり、Asc2-Pによる活性化を受けないと考えられる⁷⁾。

4. 総括

VitCは抗壊血病因子として発見された。VitCはコラーゲンの合成において、コラーゲン分子特有のヘリックス構造を形成するのに必須であるヒドロキシプロリン形成の際の酵素のコファ

クターとしての役割が報告されていたが、本研究は、VitCあるいはAsc2-Pのシグナルが直接I型コラーゲン遺伝子の転写を活性化することが明らかにした。この機構をさらに解明することにより、細胞の代謝を活性化する、新しい型の化粧品開発に有効であると考えられる。

文献

- 1) R. Hata and H. Senoo: Tiss. Cult. Res. Commun. 11:337-343, 1992.
- 2) R. Hata, H. Sunada, K. Arai et al.: E. J. Biochem. 173:261-267, 1988.
- 3) R. Hata and H. Senoo: J. Cell. Physiol. 138: 8-16, 1989.
- 4) 畑 隆一郎, 妹尾 春樹: 日経サイエンス 1992年2月号:88-97.
- 5) S. Kurata and R. Hata: J. Biol. Chem. 266: 9997-10003, 1991.
- 6) R. Hata, S. Kurata and H. Shinkai: E. J. Biochem. 174:231-237, 1988.
- 7) S. Kurata, H. Senoo and R. Hata: Exptl. Cell Res. 206:63-71, 1993

記念講演



平成 2 年度記念講演 大沢 利昭
平成 3 年度記念講演 南 博
平成 4 年度記念講演 吉田 倫幸
(敬称略)



遅延型過敏症とサイトカイン

大 沢 利 昭

東京大学薬学部 生体異物・免疫化学 教授

場所 野口英世記念会館
日時 平成3年3月29日(金)

只今、ご紹介にあずかりました大沢でございます。

本日、コスメトロジー研究振興財団の第1回表彰、贈呈式に当たりまして、記念講演をさせていただきますことは、誠に光栄に存じます。理事長始め関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。本日、私に与えられましたテーマは化粧品にも関連の深い「遅延型過敏症とサイトカイン」と言うことでございます。後から申し上げますように確かに遅延型過敏症は様々なサイトカインによって引き起こされる炎症性の局所反応でありますけれども、その機序ということになりますと誠に複雑でございます。免疫関連の生体现象の中でもその分子的な解析が最も遅れている分野であります。そういう点でこの課題は大変お話ししづらいわけあります。そこでまず皆様方既に良くご存知かとは思いますが、遅延型過敏症とはどんな生体反応であるかということについて、ごく簡単な基礎的なことからお話ししたいと思います。

1890年に結核菌の発見者であったコッホは、結核に感染したモルモットの皮内に結核菌あるいは結核菌抽出物を注射致しますと、一日か二日後に局所に発赤、硬結が見られることを発見しました。これがコッホ現象と言われるものです。コッホはこれを結核の診断に用いました。

これが皆様方ご存知のツベルクリン反応の最初の発見であります。

その後、50年程たちました1942年にニューヨー

クのランドシュタイナーとチェースが、ツベルクリン陽性のモルモットにPPD(purified protein derivative)即ちツベルクリンを注射した後、その血液を採取して、白血球と血清に分けそれぞれをツベルクリン陰性のモルモットに移す実験を行いました。その結果、血清を移してもツベルクリン陽性に変えることができないが、白血球を移すとツベルクリン陰性のモルモットが陽性になる、陽転することを見つめました。ツベルクリンに対する反応性は血清中の抗体が担っているわけではなく、リンパ系の細胞が担っていることを示したわけです。要するにツベルクリン反応は血清中抗体をエフェクター分子とする体液性免疫ではなくてリンパ系細胞をエフェクターとする細胞性免疫であることを明確に示したことになります。その後、モルモットから採取した白血球をT細胞に対する抗体で処理をしてT細胞を取ってしまった場合も検討されました。T細胞を除いた白血球を移してもツベルクリンを陽転させることはできません。陰性のモルモットは陰性のままです。T細胞を取らない状態のまま白血球を移すと陽転します。同じ結果はねずみを用いた実験でも得られました。

これらの実験によって、ツベルクリンに対する反応性、即ち抗原に対する情報を担っていて、抗原と反応する細胞はT細胞であることが解りました。T細胞、B細胞の二グループに大別されるリンパ球のうちT細胞であると限定されたわけです。

現在では、このT細胞はDelayed Hypersensitivity、遅延型過敏症の頭文字Dを付してT_D細胞と呼ばれ、このT細胞はCD4抗原陽性のヘルパー型T細胞であると解っております。

ところで今お話し致しましたツベルクリンによる皮膚反応は蕁麻疹や湿疹といくつかの点で非常に異なっています。第1に発現に要する時間の点です。蕁麻疹等では抗原と接触しますと、たかだか2〜3分以内に皮膚反応が見られます。ツベルクリン反応では、皆様方、診断で既にご存知のように皮膚の発赤とか腫脹、即ちふくれが最大に達するには、少なくとも24時間から48時間位かかります。そこでツベルクリン反応に代表される過敏症は遅発型あるいは遅延型過敏症と呼ばれます。またはこれをタイプ4のアレルギーとも言います。一方、蕁麻疹や湿疹は、即時型過敏症(Immediate Hypersensitivity)に属し、その内のタイプ1のアナフィラキシー型反応に分類されています。

第2にツベルクリン反応では、陽性動物のT細胞によって陰性動物を陽転できます。即ち、細胞性免疫であります。一方蕁麻疹等では、関与する物質は抗体です。エフェクター分子がIgEと呼ばれる抗体です。

第3に病理組織学的にも異なります。蕁麻疹や湿疹の場合、局所に好中球を主体とする顆粒球の浸潤が見られますが、ツベルクリン反応の場合、早い時期からマクロファージを主体とする単核球の浸潤が生じます。局所に単核球の浸潤が起こる点は、後から申し上げます様に遅延型過敏症の機構を考える上で大変大切なところです。

ところで遅延型過敏症はジョーンズモート型反応、ツベルクリン型反応、接触過敏症、肉芽腫形成反応の4つに大別することができます。

例えば、人の血清をほんの少しモルモットの皮下に注射しておきまして、およそ4日位、まだ体液性の抗体が血清中に現われてこない、抗体が検出されない早い時期に、前述の人の血清を再び皮内に注入してやりますと、およそ24時間位で皮膚の腫脹が最高に達する反応が起きます。これは1

〜2週間位で消失します。これがジョーンズモート型反応です。この反応では、局所には、顆粒球の中でも好塩基球の浸潤が非常に大きいことが解っています。そのため、好塩基球性過敏症と称される場合があります。この点が他の遅延型過敏症と違います。ジョーンズモート型反応の第2の特徴として、毛細血管の拡張や透過性の亢進による皮膚の発赤、腫脹が起こるが、他の型に見られるフィブリン網の形成による硬結は生じない点が挙げられます。さらにこの型の反応は、人では対応病変がよく解っていません。つぎにツベルクリン型反応は結核菌ばかりではなく、細胞内寄生性を持つ細菌とか原虫に感作された免疫動物の皮内にそれらの抗原を注射した時、48時間位で腫脹が最大に達する反応であります。組織学的にはマクロファージとリンパ球の強い浸潤が見られますが、特に人の場合、顆粒球の浸潤は殆んど見られません。この点はジョーンズモート型や先程触れた即時型過敏症の場合と非常に違います。ツベルクリン型反応のエフェクター細胞と言うか、実際に働いている細胞は、おそらくマクロファージであると考えられるわけです。後ほどその機構の説明を致します。

接触過敏症では、重金属や漆、ピクリールクロリドあるいはジニトロクロールベンゼン等に代表される低分子物質によって感作が生じます。この型の遅延型過敏症がおそらく最も化粧品に関連が深いと思います。元来、低分子物質には抗原性はありませんが、生体内の蛋白質等の高分子物質と結合して免疫原性を獲得し、T細胞に対する免疫が行われます。その後、抗原が来ますと反応が起こる手順となります。3日とか4日位で免疫が完成しまして、その後、抗原と出会いますと48時間位で最高に達する炎症を起こします。ツベルクリン型反応は真皮で生じる反応です。ところが接触過敏症は表皮に起こる反応であります。後からも申し上げますが、T細胞が免疫をされたり、あるいは活性化されたりする時には、抗原をT細胞に対して提示するというか、接触を助ける細胞が必要

です。これを抗原提示細胞と言いますが、真皮で生じるツベルクリン型反応の場合ではマクロファージがそれに当たります。表皮で起こる接触過敏症の場合には表皮にあるランゲルハンス細胞が抗原提示細胞として働いていると考えられています。その寄与は高いと考えています。

肉芽腫形成反応は、結核とか癩とかあるいは梅毒とか、色々な真菌症等の感染症で見られます。臨床的には遅延型過敏症の中でも症状が重いものです。これらの細菌あるいは真菌は、マクロファージ細胞の中に入っても分解され難いからであります。真菌あるいは原虫が細胞内で増殖しますとマクロファージは連続的な刺激を受けて活性化します。その結果、マクロファージ由来と考えられる非常に大きな類上皮細胞ができて、肉芽腫が形成されるに至ると思われれます。

次に、遅延型過敏症の病態の生成過程について述べます。

特異的にある抗原によって免疫を受けてしまったT_H細胞が対応する抗原と接触しますと、活性化されて色々なサイトカインが出てきます。T細胞から出てくるサイトカインはリンフォカインと称されます。このリンフォカインによって、発赤、腫脹、あるいはフィブリンの沈着とかの病態が引き起こされるものと、現在では考えられています。実のところ、この点について研究の現状をお話することが、今回の講演の主たる目的であります。しかしながら、詳しいメカニズムがどの程度解っているかと問われますとはなはだ心許ない状態にあります。どうも今だにすっきりと解っていないのが実状であります。

元来、あるサイトカインなりリンフォカインがある種の疾患の発現と相関しているかどうかを言うためには手続きが要ります。まずはその疾患の局所でそのリンフォカインが確かにあるかどうか、それが検出されるかどうかを確かめます。

それからまた、疾患の局所のリンパ球を取って来まして、その疾患に関連した抗原で刺激した時にリンパ球からそのリンフォカインが出てくるかど

うかを調べます。さらにこれは非常に大切なことですが、必要量のリンフォカインを用意して実験動物に注射した時に、その疾患自身あるいは疾患と直接関連する二次的な現象が発現して来るかをしっかりと確かめます。しかし後から申し上げますが、遅延型過敏症とサイトカインの関連につきましては、実験的にはっきりと言えるものが、はなはだ少ないと言うのが現状であります。

遅延型過敏症の発現に関係すると考えられてきた代表的な炎症性リンフォカインを示します。従来の方式による分類です。

主にマクロファージ作用性のリンフォカインが挙げられています。近年色々なリンフォカインなりサイトカインが精製されたり、あるいは遺伝子クローニングが行われて組換え体によりそれらが大量に得られる様になりました。これらを使って、生理活性を調べたところ、大部分のリンフォカインがかなり多機能であることが解ってきました。従いまして、あるリンフォカインをこれは炎症に関係するもの、これは分化増殖に主として関係するもの等ときちんと分類することが難しくなっています。実際に炎症に関係するリンフォカインは他にもあります。しかしながら現時点では、ここに挙げたものが遅延型過敏症の発現に関連する代表的なリンフォカインであるとお考えになって結構かと思えます。

もともとリンフォカインが世の中に知られる様になったのは1960年代の後半です。具体的には、マクロファージ遊走阻止因子、即ち Migration Inhibition Factor (MIF) の研究成果からです。1966年にニューヨークのブルームと当時まだニューヨーク大学にいましたジョン・デービットが、感作されたリンパ球をその抗原で刺激するとマクロファージの遊走を阻止する因子が放出されることをそれぞれ独立に初めて発見しました。即ち、マクロファージを毛細管に詰めておきますと、自然に自分で遊走して管外に出ますが、遊走阻止因子を入れて置きますと動き回りません。先程申し上げましたように遅延型過敏症、特にツベルク

リン型反応や接触皮膚炎の場合、局所におけるマクロファージの浸潤は著明です。遊走阻止因子はマクロファージの遊走を抑え、炎症局所に蓄積させる働きを持つ典型的な炎症性リンフォカインであると言えます。

確か今から10年前あるいはもう少し前かも知れませんが、今はこの因子の大家となっているコネチカット大学のスタンレー・コーエンが色々な遅延型過敏症疾患とマクロファージ遊走阻止因子の関係を調べています。その結果、例えば遅延型過敏症関連のサルコイドーシス等の患者の血清には確かに正常人に比べて有意に高いMIF活性があることを証明しています。この例からも、炎症性リンフォカインであるMIFと遅延型過敏症とは直接に関連していると考えられるわけです。

こんな具合にして、リンフォカインの歴史は確かにMIFから始まっていますが、その後の研究は遅々として進まずの感があります。スライドに記載した炎症性リンフォカインの中でリンホトキシンについては、ジェネティックと私共の研究室で遺伝子クローニングを成功させ、組換えのリンホトキシンの大量調製が可能となっていますが、その他のものについてはアッセイ系が非常に複雑であることもありまして、いまだに精製とか組換え体の大量調製があまり成功していないようであります。他のリンフォカイン、例えば、IL-2、IL-4とか、IL-5とか、それからIL-6とかの分化増殖因子の場合、遺伝子クローニングが終り、大量調製が可能になり、研究が進展しているのとは対照的であります。大量調製に至っていないことが遅延型過敏症の発症機構とサイトカインの関連が解明されないでいる一つの原因ではないかと思っている次第です。いずれにしましても、炎症にかかわるサイトカインの働きがさらに解明されて次に発現を抑制する物質が開発されるまでになりますと、おそらくより安全性の高い化粧品の新製にもつながって来るのではないかと思います。私もずっとこの炎症性リンフォカインの研究を行っていますが、その一つの方向として、安全性

の高い化粧品の開発にもつなげたいと考えてきました。

ここで現在不明なところが有り過ぎますが、ともあれこれまで知られているこれらサイトカインの生理活性を基に、遅延型過敏症発現の過程を無理に推論して見たいと思います。

まず、抗原によって感作されたT_H細胞が再び抗原に出会いますと活性化されます。このとき先程申し上げましたが、マクロファージやランゲルハンス細胞によって、抗原が免疫されたT細胞に提示されなければなりません。マクロファージが抗原を一度取り込んでこれを処理した後、抗原の破片を自分自身の細胞の表面に並べるわけです。これがT細胞を刺激します。面倒臭いことを言いますと、この際にはマクロファージとT細胞の間で主要組織適合性抗原の一種、クラス2抗原の一致が必要であります。このT細胞はこれも先程申しましたようにCD4抗原陽性のヘルパー型T細胞です。ヘルパー型T細胞にも種類がございますが、ここで働くのはインターロイキン4を産生するTh-2ではなく、インターロイキン2やガンマーインターフェロンを産生し、かつ種々の炎症性リンフォカインを産生するTh-1と呼ばれるヘルパー型T細胞であります。この細胞が抗原で刺激されると遅延型過敏症に関連した色々なサイトカインが出てきます。そのうちの一つにMCF、即ちマクロファージ走化性因子、別名遊走因子があります。これがマクロファージを反応局所に呼び寄せます。MCFについては従来から熊本大学の林教授が非常に詳しい研究を展開されました。林教授の大変な業績は、このような走化性因子が確かに遅延型過敏症に関連があることをかなり明確にされた点にあります。教授はモルモットのツベルクリン反応層から、マクロファージに対して走化活性を持つ様々な物質を単離しておられます。そのうちの一つがリンフォカインと α_2 -グロブリンの複合体です。このリンフォカインの本体については良く解っていないところがあります。

最近、私のところで活性化された人のT細胞ハ

イブリドーマから、マクロファージに特異的に走化活性を持つペプチドを単離しまして、その構造を決定しております。これについては後で簡単にお話し申し上げたいと思います。いずれにしましてもマクロファージの呼び込み屋がいるわけです。

呼び込まれたマクロファージは、今度はマクロファージ遊走阻止因子MIFによって局所に留め置かれます。研究の歴史が長いMIFですが、先程述べた事情で天然因子の精製は行われておりません。最近になりまして、私共はやはり人のT細胞ハイブリドーマから2種類のMIFの精製に成功致しました。今、遺伝子クローニングを行っています。これが完了して組換え因子が出来ますと、遅延型過敏症の機構の解析に大きく貢献するのではないかと期待しているところです。なお、MIF的な活性をもつサイトカインとして、ガンマーインターフェロンとかインターロイキン4があります。これらは私共が精製したMIFよりもはるかにMIF活性が弱いと思いますが、確かに活性があります。局所に集ったマクロファージは、今度はマクロファージ活性化因子(Macrophage Activating Factor)によって活性化されます。マクロファージは、機能が多様化した細胞でありますので、各々の機能に対応して活性化因子も複数あります。例えば、ガンマーインターフェロンとか、リンホトキシンとか、あるいはガンの治療に関連して一時大きな注目を集めたTNF(腫瘍壊死因子)等も活性化機能があります。いずれにしろこの因子の作用によってマクロファージの抗原貪食あるいは抗原処理能力が高まりまして局所における遅延型過敏症反応が増幅されることとなります。マクロファージは元来リソゾーム酵素に富んだ細胞でありまして活性化されるとリソゾームの内容物を放出したり、あるいは活性酵素 O_2^- の産生放出を行ったりして、炎症反応に直接参加することも大いに考えられています。これに関連しまして我々は、マクロファージの活性酸素放出を増大させる活性化因子の完全精製に成功しました。この面からも遅延型過敏症の解析に役立つのでは

ないかと思っております。

遅延型過敏症の場合、病態として発赤とか腫脹が生じますので、毛細血管の拡張とか透過性の増大を伴います。リンフォカインの一種である皮膚反応惹起因子や血管透過性因子が関連すると考えられています。皮膚反応惹起因子については最近までその存在すら疑われておりました。もしかするとマクロファージ走化性因子と同じものではないかとも言われました。ところが最近になりまして、活性化された人の単核細胞の培養上清から72個のアミノ酸からなる皮膚反応惹起因子が精製確認されました。そして、インターロイキン8と名付けられました。これは他の機能として好中球を反応箇所に呼び寄せる働きが著明であることも解ってきています。

皮膚反応惹起因子に比べ、血管透過性因子の働きについてはかなり良く解っております。例えば、分子量約39,000の因子が知られています。この因子がおそらくハーゲマン因子を介しまして最終的にキニンを生成させます。そして、そのキニンによる血管透過性亢進作用、あるいは血管拡張作用が起きてくると考えられています。血管透過性が増大しますと、フィブリノーゲンの浸出が生じ、フィブリン網の形成が亢進され硬結現象となるわけであります。それともう一つ、リンホトキシンはある種の組織細胞に非特異的に障害作用を及ぼし、発症に一役買っている場合もあるのではないかと考えられています。

以上のように遅延型過敏症の発症機構は、炎症性リンフォカインに関する分子レベルでの同定や生理活性の詳細な解析が済んでいないことがあります。まだまだよく解っておりません。私共は炎症性リンフォカインについて長年検討を進めていますが、まだまだでございます。

今日のお話しの最後の話題と致しまして、私共の行いました仕事の中からマクロファージ走化性因子(MCF)に関する研究について大ざっぱなお話しを申し上げたいと思います。先程申し上げましたようにMCFについては熊本大学の林教授あ

るいは神原教授の優れた業績がありまして、遅延型過敏症との関連がかなり明確になっています。しかしこの先生方が働きを明らかにされた因子の多くは、抗体関連のもので、リンフォカイン性のものについては、まだまだ詳しい解析には至っておりません。私共はリンフォカインであるMCFを何とか解析したいと考えました。そこでまずリンフォカインを産生する人のT細胞と人のT細胞由来の白血球を細胞融合しまして、増殖性のある人T細胞ハイブリドーマを作りました。これを細胞培養してMCFをたくさん産生させ精製しようとしたわけでありまして、まず、たくさんのT細胞ハイブリドーマを樹立しまして種々の生理活性を調べました。その結果D6-18と命名したハイブリドーマ株のMCF活性が高いことが解り、これを使ってMCFの精製をすることとしました。

MCF活性を測るためにはボイデンチャンバーを使います。チャンバーは二つの室に分かれていて、その間が穴のあいたメンブレンで仕切られています。上の方にマクロファージを置きまして、下にMCF活性があると思われるものを置きます。そうするともし活性があれば、マクロファージは穴を通して下の部屋に出てきます。出てきた数を数えることで、MCF活性が測れることとなります。D6-18細胞は培養を始めますと直ちに10分位でMCFを放出します。そして90分位でそのレベルが維持されることが解っています。

実験では、有名な走化性ポリペプチドfMet-Leu-Pheをコントロールに使いました。これはフォルミルメサイオニンとロイシン、フェニルアラニンのトリペプチドですが、マクロファージも顆粒球も両方呼び込みます。

それに比べ、D6-18細胞の培養上清は、マクロファージに特異的で顆粒球の呼び込みを殆んどしません。次に我々の血液中のT細胞、末梢血のT細胞をマイトージェニックレクチンであるPHAで活性化させてみました。そうしますと、その培養上清は、走化活性を示します。活性化させないT細胞の培養上清の場合、走化活性があり

ません。T細胞の中にもともとMCFがあり、何らかの刺激を受けると外に出てくると考えられるわけです。確かに活性化していないT細胞をホモジナイズして、その上清を調べますと走化活性を示します。この実験は、MCFがT細胞に貯えられていることを支持しています。

次に、T細胞ハイブリドーマの細胞上清の持つMCFと末梢血T細胞ホモジネート上清のものが同じかどうかを調べました。バイオゲルP2によるゲル濾過を試みたところ分子量がほぼ同じであり、同じ物質と考えられます。因みにT細胞をホモジナイズした上清は、やはりマクロファージに非常に特異的な走化活性を示すことも確かめました。

アナフィラキシー反応のような即時型アレルギーの場合、発現に際してマストセルからヒスタミンが出てきます。ヒスタミンの放出を抑える薬剤としてダイソジウムクロムグライケートがあります。この薬剤の存在下でD6-18細胞から一体MCFが出てくるかどうかを調べました。結果的にMCFの放出が非常に良く抑えられることが解りました。マストセルの顆粒の中にヒスタミンが貯えられていますが、この薬剤は脱顆粒を抑えることが解っています。

このことからMCFもT細胞中の顆粒の中にあるのではないかと考えてみました。そこで今度はT細胞をパーコールの密度勾配遠心にかけてみました。もし顆粒の中であれば顆粒は重いから、その部分に活性があるはずで、予測通り重い部分に活性がありました。軽い部分にも若干活性がありましたが、これはホモジネートする際に顆粒が壊れて放出したものと考えられます。これらのことからMCFはT細胞の顆粒の中に入っているであろうことが解ってまいりました。

次に、D6-18細胞を大量に培養しまして、ホモジナイズし、その上清からMCFを取り出し、各種イオンクロマトグラフィーと逆相HPLCを組合わせて精製致しました。詳しいことは申し上げませんが、こうして精製したもののアミノ酸配

列をプロテインシークエンサーで調べましたところ、たった9つのアミノ酸で出来ているノナペプチドであることが解りました。この程度ですと合成が出来ます。実験を進めまして、合成したペプチドの場合でも人の単球とかモルモットのマクロファージに対して 10^{-8} から 10^{-9} モルで非常に強いMCF活性を示すことが解りました。これが本当に炎症といいますか、遅延型過敏症に関係があるかどうかを調べる場合には抗体を作ることが非常に大切です。合成ペプチドをキャリアーとしてのキーホールリンペードヘモシアニンに結合させて免疫をしまして抗体を作りました。この抗体をスライドの上に塗布しましたT細胞に働かせてアビシンビオチンペルオキシターゼ法で染めます。そうしますと、細胞周辺部の顆粒が抗体と結合して良く染まっていることがわかります。抗体を作ってみることで、MCFがT細胞の周辺にある顆粒に存在し、刺激を受けるとそれが放出されるということが、かなりはっきり解ってきたわけがあります。

今日は、皆様にお見せするOHPを二枚用意してあるのですが、時間の関係もあり投影は省略して説明します。

実際に疾患の場合、このMCFがあるかどうかを確かめるために種々の遅延型過敏症関連疾患について調べております。そうすると扁平苔癬とい

う青紫色の扁平な発疹の出来る病気の病変部組織の細胞がやはりこの抗体によって良く染まるということが確かめられました。このことから確かにこのMCFが関与しているらしいことが解ってまいりました。

以上のように遅延型過敏症の発現にはいくつものサイトカインが関与します。そしてそれらの産生とか作用の発現に当たっては、相互に影響を及ぼし合ってネットワークを形成していますから、それらの機能は極めて複雑であります。いずれにしても、これらのサイトカインを分子レベルで解析し、大量調製へと進める必要があります。そうすることで近年発展の目覚ましい分子免疫学の中で、かなり取り残された感のある遅延型過敏症の解析がもっともっと進んでいくはずで、私共の研究室でもその分野に向けて大きな努力を払っているわけであり、こうした研究の成果によって遅延型過敏症の抑制機構が明らかになり、関連サイトカインの活性抑制物質が開発されるようになると、それはより安全な化粧品の開発につながっていくのではないかと思います。

最後の方をちょっと急ぎましてOHP2枚を割愛してしまいました。冒頭申し上げましたように、今日は研究途中の大変難しい課題を取りあげました。非常に雑駁なお話しにも関わらずご静聴頂き感謝します。

コスメトロジー考

南 博

一橋大学 名誉教授

場所 薬学会館長井記念館
日時 平成3年11月18日(月)

南でございます。実はこういうところではお話し難いんです。むしろ僕が講義を聞きまして勉強させていただいた方が妥当と思われる専門家の方達ばかりが聞き手ですので、内心、気遅れを感じないわけにはいきません。

私は風俗史とか流行の歴史とか社会心理学の方を主にやっておりますが、他の分野に進む可能性もありました。父が医者なものですから、私を開業医にさせたかったらしいんですね。それで東大の医学部にも入りましたが、ちょっと反抗しまして別の道を選びました。その頃、薬理学の教授は田村先生だったと思います。薬理学で思い出すのは、ベラドンナのことだけです。覚えているのは、そういう程度なんです。生理学は橋田先生に教えていただいて、それから後、京大の心理学に来ないかということで心理学に移りました。

その後、アメリカで研究を続けましたが、日本に帰ってみると、社会心理学というのをやっている人は殆どいませんでした。人間は他人のやらない所をやった方がいいですね。たとえ、あまり成績が良くなくっても、誰もやっていなければ比較できないじゃないですか。そういうことで、もう亡くなりましたが、吉井先生から阪大の生理学へというお話がございましたが、社会心理学の方でずっと通しました。

今日、お話できるとすれば、「社会心理学の面からの化粧学」ということになりましょうか。私は“学”と名のつくことが好きなんです。ある専門の先生と『江戸学辞典』(弘文堂、1983)という

のを出しましたが、その江戸研究の大先生が、「南さん、江戸についての学問を何というんですか。」というので、「それは江戸学しかないです。」「英語に訳すとどうなりますか。」「EDOLOGYに決まっているじゃないですか。」(笑)などと話し合ったいきさつがあります。

ところで、コスメトロジーというのは皆さんよくご存知のように、本来、英語では2つの意味があって、1つは、美容術ですね。日本では明治時代から美顔術とか、美貌術といい慣らされておったようです。もう1つは、学問としての化粧学になります。つまり、コスメトロジーという言葉には、技術面と理論面の両面があるわけです。ついでに申しますと、英語で心理学のことをサイコロジーと申しますが、この単語にも両義性があり、アメリカの心理学者の中でもどっちと解するべきか、よくわからない場面も出てきます。つまり、サイコロジーといいますが、心理学という側面だけではなくて、心理、または「こころ」という意味も入ってまいりますので、これがしばしば混同されてくるわけです。コスメトロジーの場合もそれと同じことが言えますが、ここでは昔の用法ではなくて、学問としてのコスメトロジーであるということだと思います。先程、申し上げました江戸時代、あるいは江戸の研究には化粧学の面では充分ではないと思うんですが、この時代の化粧に関わる事柄がいろいろ出ております。

私は日本人の研究を多年やっておりますが、日本人論というのは非常にたくさんあります。皆さ

んの中にはお読みになった方もおられると思いますが、一番早かった文献に、戦後、ルース・ベネディクトというアメリカの女性人類学者が書いた『菊と刀』というのがございます。私は戦前から戦後2年間、続けて約8年アメリカにおりました。ベネディクトは非常に優れた人類学者であります。日本語を知らないで、日本史を勉強しないであの本を書いたと思うのです。と言うのは、この本は非常に有名になりましたが、基本的には歴史的な配慮が足りないという部分があります。やはり、学問は学問の歴史を知らないと困る。この事は他の分野にもあてはまります。例えば、皆さんの中には物理学を勉強なさった方もおられると思いますが、物理学者は今でもニュートン力学を学びます。ニュートンの業績を古典として読む。古典として読むという意味は何かについて考える必要があります。ニュートンはあの時代に、学問の発達しつつある当時のレベルの中で、新しい考え方を出してきた。今日ではもはや理論としては古い。成果としては古いんですが、方法論として、ニュートンの発想であるとか論理というものは今日でも生きている。それが古典というものです。コスメトロジーは本当に新しい学問であり、私はやっぱり研究する以上は化粧論ではなく、化粧学でなければならないと思います。

論と学の違いはどこにあるかと申しますと、論というのは思いつきでもできる。思いつきでも書けるのが論なんです。「日本人論」というのは沢山ございます。皆さんご承知と思いますが、中根千枝さんの「タテ社会」とか、土居さんの「甘えの構造」とかいうものがありますが、それは非常に思いつきはいいんですが、裏付けというと「う〜ん」ということなんです。中根さんとか土居さんのような、同業学者のことをあまり言うてはいけないんですが、私は反省上言っているのであえて言いますが、やっぱり違うのではないかと。つまり、思いつきはいいんですけれども、前提が間違っている。前提が間違っていると、全部終りまで間違っている。コンピュータと同じで、イン

プットするもの、即ち最初に食べさせるものが悪ければ、技術的には非常に精密に処理され結果が出るが、コンピュータからアウトプットされるものは精密な不正確さということになるんですね。それに気をつけなければいけないと思います。

地道に勉強している間にどこかで引っ掛かるもの、あるいはひらめくものがある。それを裏付けていくというのが、学であると思います。従って、化粧論と化粧学との違いの中にも、そういう「思いつき」、「ひらめき」の問題が出てまいります。私はその道の専門ではありませんが、皮膚科学とか医学の面でなさっている皆さんの研究は、単なる思いつきではなく、当然「ひらめき」とその実証ということになる訳です。

私は化粧史に関心があります。中でも特に興味があるのは風俗としての化粧であります。

従来の歴史というものは、政治の歴史であれ、経済の歴史であれ、支配者側のそれです。この流れの中で心理学は昔の英雄豪傑とか、今なら独裁者ヒットラーの心理分析などという分野ではかなり良い業績を上げています。アメリカにおりました当時、ベネディクトの書いた下書きの原稿のようなものを見せてもらいました。アメリカは初めから勝つ気でおりますから当然ですが、日本の占領政策のいわば参考資料として書いたものであることが明らかで、そこにもやはり支配者側の論理が優先されています。

特に私は社会心理学をやっておりますので、気が付くのですが、独裁者の側ではなくて支配される側の人たちの歴史というものがもっと大事ではないかと思えます。支配者、独裁者が書いたものとか演説などはいろいろあります。第二次世界大戦を例にして、話を敷衍します。アメリカは表現の自由の国です。特にルーズベルトの時代は最大の自由を保障しておりました。例えばヒットラーの演説とか、ナチスの宣伝大臣であったゲッベルスという人の演説などは、全部、次の日の『ニューヨークタイムス』の第一面を潰してつぶさに報道されます。また今年も、段々近づいてま

いりましたが、パールハーバーの時もそうでした。アメリカは甚大な損害を受けた直後いわば自己反省をして、あの時、司令官達はどこにいたか等を深く追及し報道しました。実は、現場に司令官達はいなかったんです。あれは確かにウィークエンドでした。それで、油断したからこういうことになったわけで、司令官はすぐに辞めさせられたことになっているんです。そのころ私はアメリカへ行ってから1年以上経っておりまして、友達もたくさんできていました。今はそんなことはないと思いますが、経験によるとアメリカには意外に地理音痴の人が多くいますよ。大学生とかもみんな僕らが行くと「おいおい、ハワイというのはどこの国なんだい。ハワイという国はどこにあるんだ」と、本気でそう聞くんです。まあ、これはちょっと笑い話としまして、やっぱりアメリカは世界一の大国であると意識してますね。中国でいうような中華思想ですね。世界の中心であるという考えがありますから、地理が駄目、外国語が駄目、になってしまうわけです。私が見たベネディクトの原稿やその他いろいろなものの中にも、やっぱり見間違いがあったんですね。例えば、日本軍の司令官とか軍隊などについては、それはもう非常に詳しく調べていたんですが、肝心の日本の国民、一般の民衆が、戦争の時に何を考えているのかについては、検討不足でした。上陸して日本を占領した場合に、日本人は子供まで抵抗するだろうとか、そういう考え方がアメリカの中にならあったんです。

この考え方はやはり、アメリカ人が近代史の資料を集め、日本の当時の思想、支配者については良く調べたけれども、民衆一般の人達がどういう考えかということあまり研究していなかったことに起因しています。

私が社会心理という名目で前からやっているのは何かといいますと、従来の歴史には残されなかったものの研究です。一般の人達を書いたものは残らない。それから、大勢の人の前で演説をしたりしない。しかし、一般民衆がその当時、実際

に何を考えているかというのは本当は問題であります。ヒットラーが成功したのは何といてもユダヤ人の排斥という民衆意識があって、そうでない人達がいれば、ユダヤ人を憎むようにしむけていったということにあったわけです。

第二次大戦前、ナチス台頭の時代に、ドイツ国民は何をを考えていたかということの研究が殆どなされていなかった事実は明らかです。ソビエト戦争で負け始めたその頃から、ドイツが敗戦したらヒットラーはどうするだろうかというようなことが、アメリカの心理学者達の研究テーマでありました。これには三通りのケースが考えられていたわけです。

1つは、ヒットラーは捕虜になるだろうということ。もう1つは、逃亡か亡命をするだろう。そして3つ目は、ヒットラーは自殺をするだろう。この3つの可能性があったんですね。もう今は結果が出てしまったので意味がありませんが、これはクイズとしては非常に面白い課題です(最もクイズとするには余りにも深刻ではありません)。結局、ヒットラーは自殺するだろうという結論は見事に当たった。しかし、その場合に、やはり、ヒットラー個人のパーソナリティということだけではなくて、ドイツ国民がヒットラーを本当に支持しているのかどうかということが分析されたからこそ、こういう結果が出たわけです。例えば、ヒットラーが亡命しようとしても、ヒットラーを秘かに助けようとする人があり得るかどうか、あるいは捕虜になるかも知れないという時に、ドイツの民衆がヒットラーを支持して抵抗運動をするかどうかというようなことを消去法で考えていくと、やはりヒットラーは自殺するしかなかったわけです。

私は、日本の歴史家の先生方も沢山知っていますが、民衆の歴史というのをやっている人は非常に少ないですね。私自身は、民衆は演説をしないし書いたものも残さないが、世の中には何か間接的な形で民衆の思想、考え方を反映するものがあるに違いないと考えました。そこで、戦後、す

ぐに私が始めたのは、大衆文化の研究です。大衆文化の中に日本人の生活心理が反映されているに違いないということで、まず流行歌を対象としました。調べて見ると、日本では他の国と非常に違い、殆ど全部とっていい程悲しい歌が多いんですね。単語を拾ってみますと、一番多いのは「別れ」と「涙」です。それから、あきらめ、運命、さだめ。場所というと高原、駅です。

そうすると、やっぱり日本人の中には幸福であるということに対する恐怖心があることが解明されてきます。私は仮に幸福危険度とっているんですが、そういうものがある。いまこの話はいたしません、この様な方法論で、民衆の心理を解明できます。

考えてみますと、私は民衆の思想の反映であるという観点で、自分の専門としての社会心理学の立場から化粧というものを追求しているわけです。つまり、その国の大部分の人達が一斉にある行動をとろうとする。あるいはそういう行動をとろうとする傾向がみられるということが、民衆の心理であります。ですから私の言っている日本人学はやはり民衆心理の研究から始まります。風俗あるいは流行という面から考えますと、一番目につきやすく分析しやすい1つは化粧、あとは、日本では服装を主体とするファッションですね。

ファッションという言葉は、もともとは物を作るという意味があったんですが、これについてはごく最近も、『装苑』（『装苑アイ』No.5, 1991, pp.1922）という雑誌の中にミニスカートの流行というようなことを書きました。

化粧についても化粧学というような名前で私が一応問題の提起を致しましたので、社会心理学の立場で今後も皆さんにいろいろ教えていただいて勉強を続けていくつもりでおりますが、それにはどうしても、いわゆる比較文化ということが必要になります。日本人の心理と言いましても、例えば、アメリカ人とかヨーロッパ人とどこが違うかというようなことが問題になるわけであります。私は『化粧学』という本を書きました（『化粧と

ゆらぐ性』ネスコ刊、文藝春秋発売 1991）。私の悪い癖ですが、本を書いてもなかなか自分の本を読まないんです。映画監督でも二通りあって、自分の作った作品を何回も劇場に行ってみて、喜んだり悲しんだりする人と、絶対二度と見ない、とても見てられないという人があるわけです。私の読まないというのは自信のなさを示すものでもあるんです。「よくまあ、こういうことを書いて本にした」、「皆さんにただで配るならいいけれども、読者にお金を出させるのは申し訳ない」ということもあるんで、なかなか読む気にならないんです。しかし、今日、こうやって皆さんの前でお話をするということになりましたので、私の『化粧学』との中で、二、三、気の付いたことをお話することにいたします。

1つは何かといいますと、すでに研究された方もおられると思いますので教えていただきたいんですが、日本人の化粧にも、化粧の地域差というものがあるかどうかということです。『江戸学辞典』にも書かれていますが、優れた文物の生じるころはご承知のように江戸時代の中期位までは圧倒的に上方ですね。関西です。関西から関東に化粧というものは流れてきた。関西の人に言わせればそれは江戸の方に下って行ったということになるわけです。

江戸の市民というのは、関西、即ち大阪、京都の人達に対して、心理学的言葉を使えば意識あるいは無意識の内に劣等感を持っていた、と考えられます。上方から江戸に来たもの、これは化粧品に限りません。服飾なども上方から江戸という、つまり低い所の下って来た。下り物といってますが、この下り物は絶対に良い。江戸の市民の作るものよりも良い。「おしろい」、これは当然下り物ですね。「べに」も下り物です。それで、下り物は良いものだ。下り物でないもの、これは“くだらない”ものです。くだらないという言葉の語源はここにあるんですね。これはギャグではなくて本当にそうなんです。中期以後になりますとそれが変わってきて、江戸にとって特に大阪はいわば

ライバルになりまして、大阪に対して対抗できる江戸のものができないかということになってきました。それまでは、大阪に限らずいわゆる上方から江戸店(ダナ)とって江戸に支店を出したんです。中期以後になりますと、江戸の独自性が現われてきます。江戸の文学にはいろいろなものがありますが、その中に化粧に関することが語られています。それによれば、上方の女性は厚化粧です。この厚化粧という意味は、今の言葉でいうと趣味が良くないに当たります。江戸の女性は薄化粧、今の言葉で言えばすっきりしているというわけですね。

では、何故そうなったのか。学問の面から見れば、そういう伝承とか事実があったということだけでは単に記述に過ぎない。問題は、何故上方は厚化粧で江戸は薄化粧なのかという点です。これを考えてみますと3つの視点があります。

1つは歌舞伎の世界の影響です。これはもう上方です。今の江戸歌舞伎は上方から江戸に来たものです。最近、襲名した雁治郎なども、初代は上方の名優です。上方の女性は歌舞伎役者の扮装とか服装、あるいは模様というものを取り入れます。ご承知の市松模様というのは、市松という歌舞伎役者の袴の模様からきたものですね。女性の服装というものは非常に歌舞伎の女形の影響を受けています。歌舞伎の役者は舞台のための厚化粧をします。女形は男性ですから、普段、白粉はつけていない。できるだけ厚化粧した方が男らしさが消える。それを真似たということが1点です。

江戸という都会は武士の世界です。2番目にこの影響が大きい。江戸は町人の世界と言われておりますが、それは中期以後、幕末に近づく時代について言えることであって、それまでは江戸はやはり今の言葉でいえば軍事的な意味を持っていた。そして、町民と武士の間に一応、対立のようなものがあってすけれども、基本的にはやはり武家の支配する都市であった。流行というものは上から下に流れるものと、下から上に流れるものがございます。当時の江戸では武家から町民の流

れが支配的であったと思われます。

皆さんご存知の方が多いと思いますけれども、武士道の解説、あるいは武士道の教訓用のテキストに『葉隠れ』というのがあります。これに「武士は化粧しなければならぬ」と読める下りがあります。化粧とはっきり書いてあるわけではありませんが、例えば病気がかりで顔色も悪いのに、そのまま殿様の前に出るのは失礼である。従って、頬紅をつけて良い顔色でお目通りしなければいけないということが書いてあるんです。

また、武士同士の間で命の取り合いをやるようなことがございます。武士は死に際が大事であって、死んでから、着ていた物、顔などのいろいろな所から武士の身だしなみが評価されます。できるだけ清潔で、ちゃんとした服装で死ななければいけないわけです。

戦争中は(故意かどうか)、その意味を間違えられてまして、「武士道とは、死ぬことと見つけたら」ということだけが有名になってしまいました。あれを書いたのは山本という人ですね。この人が言っているのはそういうことよりも「身だしなみ」ということで、いつ殺されても死体になってみともないのは困ることを強調しています。これらの点から見て、武張った男性の世界でむしろ化粧の作法が非常にやかましく言われていたんですね。これが、第2点です。

第3点、これは中期以後ですが、「粹」という言葉が出てくるようになったことであります。私の京大時代の恩師である、九鬼周造先生が『粹の構造』という本を書いておられます。お読みになられた方も多いと思いますが、この中で先生は粹ということ「さっぱりしている」、「淡白である」、「あまり目立たない。目立たないけれどもエレガントである」というふうに言っておられます。そういう意味で薄化粧の方が良いということでもあります。

しかしこれに対する反論もあって、やはり女性の化粧というのは定められた法律であるというような表現を使っている本もあります。女性の身

だしなみというものは男性に快い感じを与える必要があるというわけです。特に身内ですね。夫であるとか、舅であるとか、家族内の男性に対していつもきれいにお化粧をしていなくてはならない。それには厚化粧よりも薄化粧の方が清潔な感じを与えるということです。その意味では、服飾の歴史をご覧になって気がつくと思いますが、江戸期では武士の方が奥方よりも服装に気を使っています。今でも歌舞伎をご覧になればわかると思います。いずれにしろ薄化粧と厚化粧の問題は、論議が尽きているとは思いません。もっと研究されなければならないわけで、関東と関西の違いということを一つ問題としてこれからもっと勉強していきたいと思います。

今話した三つの視点とは別に検討すべき事柄がたくさんあります。例えば、上方でも西鶴のような人になると非常に醒めたものがありますから、西鶴の作品を見ると、顔の白い人でもその上にまた白くしようとして、お化粧をするのはおかしい、ということをおっしゃいます。

江戸の方では1つ、吉原という所に関連して「化粧」が語られています。吉原は江戸の幕府が作った極めて政策的なものであって、町人の不満などを発散させる場所です。これは悪い場所であるとされ、従って、これは初めから悪所と呼ばれました。悪場所ですので侍が個人的にそこに行く場合は、大小を預けて一般として行ったわけですが、その時にその遊女は位が高くなればなるほど薄化粧であり、いわゆる“すっぴん”でもかまわない。段々ランクが下がってくると厚化粧してもかまわないというようなことが書かれております。

春山先生の本などもございますので、お読みになっておられる方もいらっしゃると思いますが、皆さんの中には西洋の化粧の歴史についても研究されている方もおられると思います。メイキャップ行為の社会的容認に関する問題は、私自身の研究課題なので、この点について皆様方の研究成果なりお考えを教えてくださいたいと思います。人の

前で顔を直すということに対して非難されなくなったのは比較的近代です。

1920年頃になりますと、コンパクトを出して人の前でお化粧を直しても非難されなくなりました。それ以前は女性が行う最も失礼な行為は、人の前で顔を直すということだったんです。

そうしますと、化粧を直す、顔を直すということ、言いかえれば対人関係の中で何故お化粧をすることを遠慮しなければいけないかが、考察の対象になります。これがまだ私にはわからないんです。イギリスで書かれたものを見ると、メイクアップについていろいろな保守的意見が出されたのは1920年代ですね。ご承知のようにメイクアップという言葉が日本に入ってきたのは、大体、1920年代の頭でありまして、いわゆるモダニズム時代を代表する言葉の一つです。

これに関連して滑稽な話があります。1930年頃、昭和の初めですが、アメリカに「キスアンドメイクアップ」という映画があったんです。ご覧になりましたか？ 日本版のタイトルが「接吻とお化粧」というんです。実は「キスアンドメイクアップ」というのは命令形なんです。“メイクアップ”というのは顔のメイクアップというのではなくて、仲直りという意味なんです。原語に即していえば「接吻して仲直りしなさい」というタイトルなんです。それを両方とも名詞を取ったのでそういう訳になったんですね。メイクアップという言葉をお化粧ということで使い始めたのは、大体、その頃なんですね。

さて、特に日本の場合、女性がお化粧をした時には、笑っちゃいけないというような話があるんです。ここでは皆さん平気で笑っておられますがね。私の母は明治生まれの人間ですが、戦後に総理大臣になった人の奥様と親しくしていました。有名な美人ですが、その奥様が笑ったのを誰も見たことがないというんですね。1回笑うとそれだけシワが増えるというので笑わない。ついに誰もその奥様の笑顔を見たことがなかったという有名な話があるんですね。

私が、戦後日本に帰って来て一番目についたのは、日本の女性には表情が無いということです。表情が無くて、お面を、マスクをかぶっているように感じました。まだ、ほとんどの女性がお化粧をしていませんでしたね。もちろん、戦後2年位ですから、まだお化粧どころではなかったという方も多かったのでしょう。それはそれとして、お化粧しないためになおさら顔の表情が無いということもあるんですね。当時、化粧をしなかったのは日本人は自分自身のことよりも周りの人とか、つまり世間体とか、世間の目ということ意識するためでしょうか。

そう言えば、中国の考え方に、人間は喜怒哀楽を表わしてはいけない、感情を表現しないということがあるんですね。そういう影響もあったと思いますが、当時の日本人はなるべく顔に表情を出さないようにしていたし、表情を出す場合は建前の表情で済ませ、本音は出さない部分がありました。アメリカとはずいぶん違います。アメリカの政党は共和党と民主党がありますね。どちらの党の政治家も懸案事項に対する態度表明が非常にすっきりしています。アメリカがドイツと戦いはじめました時の話です。開戦と同時に戦争反対の政治家達は追党ということになって、良かった、良かったというわけです。南部にいる学生などは今は少なくなりましたが、アメリカの歴史の中で一番良かったのはリンカーンが殺されたことだと本気でそう思っているんです。そして、それをおおびらに表現します。

アメリカ人の僕の友達が日本で国会中継のテレビを見ていて「笑っているのはおかしい。白熱した議論、対立した意見が出ているのに。」とすぐ言いましたね。それから何かの議論で答弁できなくなった政治家が何となく笑う点もおかしいと言っていますね。あれは私の解釈では笑いの先取りで、人に笑われる前に自分が笑ってしまうと他人にとって笑いがいなくなる一種の先制攻撃であるということなんです。全くの無表情や、あるいは本音と違う、つまり、建前の表情は国際摩擦

とか、いろいろ申しますけれども、政治、経済にあっては当然ですけども、日本人の場合、やっぱり表情一つで誤解や摩擦の基になるということもありますね。ですから、私はコスметロジーのような学問の場合には、どうしたら西洋人にもすぐわかるような表情を出せるかや、そういう表情を演出できる化粧は何かの研究を含むべきだと思いますね。この点の解明が進めば、ずいぶんと感情面での摩擦が減るに違いない。化粧の国際化ということを考えていく必要があるゆえんです。

ソビエトにおける社会の動きと風俗としてのコスメティックとの関連に関心を持っています。新聞でご覧になった方もあると思いますが、最近になってモスクワに非常に高級な美容院ができました。そこにお客として来ている女のお医者さんの写真が新聞に出了ました。非常に収入がある方ですとそういうところに行ける。そうすると、その美容院の外に人垣ができます。集まった人々が「あの人はおカネがあるからできるけれど、私達はお化粧どころじゃない。食べるものにも不自由なのでお化粧どころではない。」と言っていたことが、記事になっておりました。中国はソビエトほど、そういうところは厳しくはないですね。収入にかかわらずかなり急速に美容に対する関心が若い人の間に広がっております。北京とか、主な都会では美容のセンターが段々できてくるようになった。

国際比較をやってみますと、化粧と社会体制との関係が非常にはっきりとわかるんです。例えば、中国の場合、文化大革命があった時には、誰もお化粧をしていない。文化大革命直後に私は中国にまいりまして、直接その様子を見ました。その後も何度か中国に行ってますが、お化粧の中で最後まで採用されないのはマニキュアですね。フェイシャルの方は普及しています。外人相手のお店に行きますと、2年位前からやっとお化粧の売り場にいる女性の店員の人がマニキュアをしているようになった。日本に来ている中国の女性でも、ほんの一部の人ですがマニキュアをしている。

マニキュアは何故最後に残るのかということとは

1つの課題です。女性の場合特にそうだと思いますが、マニキュアをしている人はあまり手を使わないですね。つまりは労働意識、働く意識というもの、勤労意欲、そういうことの関係で出て来たのではないかというふうに私は思います。ペディキュアもそうですね。東と西のベルリンの壁が破れましたね。あの時にちょうど現場にいた日本人の人が言っているんですが、壁が壊れてドーっと人が西側に入りますね。男性が一番先に駆けつけるのは西のストリップ劇場なんだそうです。政治がどうこういうよりは、とにかくストリップ劇場の方が大事かどうかわかりませんが、そういうことがあったそうです。東側の男性は、解放のシンボルとして性を享楽するストリップを通して体制の崩壊、自由の到来を実感したと言えなくもありません。そうすると将来、社会状況の変化によって

は体制再構築を目論む側の仕かけでお化粧というものを何か直接セクシャルなものと結びつけて、性的なものと結びつけて、お化粧することイコール道徳的退廃というような考えがまたよみがえって来る可能性があるのではないかとも思います。

私は中国の人民大学というところで、毎年講義をすることになっているんですが、今後、化粧心理学の面でも中国の状況を研究したいと思います。個人の化粧と対人的な化粧の関係、私は日本人なので、やっぱりそれが大きな課題、関心事になっているわけです。

最初の30分程は直接お化粧とは関係のないことを話しましたが、少しはお役に立ったのではないかと、ということでご勘弁願いたいと思います。

ちょうど時間になりましたので、この辺で終わります。どうもありがとうございました。

化粧品科学への人間工学的アプローチ

吉田 倫幸

通産省工業技術院 製品科学研究所
(新 生命工学工業技術研究所)

場所 薬学会館長井記念館
日時 平成4年11月

ただ今ご紹介に預かりました吉田です。

通産省工業技術院の製品科学研究所で、主に感情の研究をしております。今日はコスメトロジー研究振興財団の第3回表彰・贈呈式に当たり、記念講演を仰せつかりまして大変名誉なことと感じております。関係各方面の方々に厚く御礼申し上げます。

「化粧品科学への人間工学的アプローチ」について少しお話します。私自身は化粧品に関してはずぶの素人ですが、化粧品を通して如何して我々の心の内面を引き出すかということについて人間工学的に考えてみたいと思います。

このような壇上に立って非常に緊張していますので、本題に入ります前に、まずは日頃慣れ親しんでいます自分の名前についてお話します。そうすることで自分自身の心をリラックスさせたいと思います。

私は自分の研究についてお話しする時に、自分の名前に使われている字を紹介します。倫「とも」と幸「ゆき」の字です。これ(倫幸)はなかなかそのように(ともゆき)読んで頂けません。残念ですが、「みちゆき」とか「のりゆき」とかと読まれます。

それはおくとして、自分の名前は倫理の「倫」と幸福の「幸」であると説明します。状況によっては不倫の「倫」、不幸の「幸」であるかもしれません。考えてみますと、我々の心は「倫理的で幸福である」場合もあれば、その逆の側面を見せる時もあるわけです。私自身とて人並みに感情の

起伏を持っていますので、まさにこの両面で揺れ動きながら感情の研究を進めています。話は一般的になりますが、「ゆらぎ」は心の活動にとって本質的であり、この辺りが私の脳波のゆらぎ研究の出発点であるとも言えます。

私は素人ではありますが、最近化粧品あるいは化粧品について色々考える機会が増えました。小さい頃には「化粧した女性はなにかやだな」という化粧拒否の感覚がありました。この年になりますと多少変わって、近頃では、ある時はけばけばしいほどの化粧が良いとか、他の時は清楚な化粧がいいとか感じるようになり、何れにしても化粧に対しては肯定的になりつつあります。

ご覧のように私の眉毛は薄い方です。実はこの間、家内のアイブローを借りて試しに描き足してみました。なかなか気持ちのいいものです。「目がはっきりしてきたぞ」などと感じました。「化粧をするということが我々の内面の何かを引き出している。それが活力となって生活に潤いをもたらす。」と最近感じてきたわけでありました。

南博先生はある雑誌でコスメトロジーの体系を美容自然科学、美容人間科学、美容社会科学に大別され、さらにそれぞれを細分化して考察されています。私はこの体系にそって言えば、感情生理工学と言うべき分野を提唱してきました。

感情は言わば心の中の隠れた内面であり、なかなか表面に現れにくいこともあります。本人が言葉で「良い」といっても、内なる感情は逆に「いやだ」といっている場合もあります。本当の感情

を知るには、この内なる感情を少しでも客観的な手法で取り出すことが望まれます。

先程私は感情生理学に触れましたが、感情生理学アプローチとは「感情や随伴する生理的变化からそれを引き起こす刺激あるいは空間を評価する手続きである」と定義して研究を進めております。「我々が化粧をする時、どんなところに注目するのか?」、この間の事情を私なりに考えて、それらを旨く引き出すやり方を提案してみたいと思います。

まず、感情を説明する次元について考えたいと思います。このスライドは1950年代にシュルスバークが提案したモデルです。軸の要素には色々なモデルが考えられます。例えば、快-不快の軸やこの図のように注意-拒否の軸などです。彼はこれらの軸で作られた空間に顔写真の表情(感情)を数値的にプロットすることができると思っています。

私は自分の研究を通して、2つの軸、ひとつは快-不快の軸と、もうひとつは覚醒度、すなわち、興奮-鎮静の軸を用いて、図のような形で快適性を包括的に表すことができるのではないかと考えています。楕円の上の部分が、快でポジティブな領域、下がネガティブな領域です。快適と目される領域には、ある程度リラックスして鎮静している状態、多少覚醒度が高く気分の良い状態、興奮領域のある部分が含まれるであろうと考えています。

赤い部分は快適というよりはワクワク、快感、興奮などの状態に当たります。快-不快の軸で見ると、この状態が昂じると快感そのものは次第に低下して、最終的には興奮のみの状態になります。この図で言えば、楕円のこの部分が多少へこんだ形になります。

次に不快と称されるこの部分は、イライラとか、怒りとか、気分が悪いとかの領域ですが、興奮が高まればその判断も薄らいでいきます。また鎮静状態の場合は、不快感は急速に低下してきます。人は通常この点線で示す領域に落ち着いているので

あろうと考えているわけです。

このスライドは立体的な楕円になっています。先程説明したスライドはこの立体の一部分に当たります。すなわち快適性の領域は色々な覚醒水準で存在し、その程度がこの立体で示されるわけです。例えば、眠りに入る状態を考えてみます。眠りに入る状態では、感情の部分、いわゆる「意識」はずっと減って、いづれ無くなってしまいます。全体として言えば、このような紡錘体で、先程の評価の領域を示すことができるというのが私の感情に関するモデルです。

話を変えます。先程、自分の名前を引き合いに出して、意識の二重性に触れました。我々には、現実の認識と、こうありたいと思う意識が必ず存在すると心理学上考えられています。

3種のパターンをスライドに示しました。パターン1のように、現実と今存在する自己と理想としてこうありたいと思う自己が余りにもかけ離れている時には、現実の自己を理想の自己に近づけるのは難しいものです。一方、パターン2のように、現実的な自己と理想とする自己がクロスしている時や、両者間の距離が短い時、理想自己に向かって現実的自分を近づけていこうとするモチベーション(動機づけ)が沸いてくるわけです。パターン3では現実自己と理想自己が一致していて、改善・進歩の余地はありません。従って、新しい創造、クリエイティブな意識はパターン2の状態で生まれるのではないかと思います。

化粧は、ちょうどこの状態を作り出すのに最適であろうと考えられます。

人の顔の写真を用いて行った実験を紹介します。生(現存する人)の資料で説明するとよいのですが、当人に失礼になるのでは、と思い、急きょイラストにして示すことにしました。まず、被験者の色々な表情を写真に撮ります。その時の髪型、輪郭、眉毛等の要素を微妙に変化させて本人に見せます。本人の判断から本人が一番好ましいと思う容貌を捜す実験です。この方法で、先程説明した意識上での、現実自己と理想自己の関係を調べる

ことができるのではないかと考えました。

肌の色をほんの少しずつ変えるだけで同じ表情でも受けとられる感じが違います。

輪郭を縮めたり、広げたりしても、このように違ってきます。

色々な組み合わせの顔をたくさん造り、本人に見せて、「好みに合う」とか、「これはいやだ」と繰り返し判断してもらいます。言い換えれば、普段なかなか本人の意識に上らない領域のものまで画面上に見せることで同時に本人の学習を促していきます。これは今流行りのニューラルネットと呼ばれる方法です。色々な要素を組み合わせた表情をM個の情報量とし、本人の好みを最終アウトプットとします。この時、各要素について強弱の段階をつけて提示して、繰り返し学習判断させます。そうしますと、この図に示す「内部表現」なるものが浮かび上がってきます。私はこれを当人の心の中の顔であると捉えます。学習とは、個々の情報(容貌)を教師として、イエス、ノーの答えから、その人の心の中の顔を逆推定できるように、要素にウェイトをかけていく過程を言います。この方法で理想の顔を作っていくことができます。

理想とする顔が確定すれば、それとそれ以外の顔を提示した際の心理的、生理的反応を比較検討することができます。ここで、顔とは離れますが、普段目に触れるありふれた品物を検討した事例を紹介します。3種類の品物の色彩を変化させた実験です。

まず、まるっきり人工物である車の「ボディー色」の例です。次は食パンの色についてです。これは人工物ではあるが、ある種の自然性を持っているものの例です。もうひとつはバナナを対象とします。バナナは植物であり自然そのものです。

車の事例についてスライドをさっと流します。

今お見せした車の色はどの色をとっても私には差程、違和感がありません。皆様もそう感じたのではないかと思います。余談ですが、「何色でしたか？」の質問に対して、かなりの人が「車のど

の部分の色を答えるのですか？」と確認を求めました。どうも下の部分の灰色が気になるようです。何れにしても車の場合、どのボディー色でも心理的には許せるという結果です。

次はパンの事例です。

スライドを5-6枚流します。パンは色によってはずくておいしそうではありません。「食べてもいいな」と思う色と、「これはちょっと」と思う色がありました。車の事例と比較しても色によって受ける印象が大変違います。もっとも、ある被験者にとってはおなかがすいている時は何でもおいしく見えるという結果でもあります。どういう状態の時観察したのかということも重要であるわけです。

次はバナナの例です。

黄色や熟し切っていないと見ることのできる緑色のバナナは食べられそうですが、その他の色になりますと「えっ」という感じです。

以上が人工物から自然物までを対象として形態を保持しながら色を変えた時、我々がどのような応答をするかを調べた心理的な実験です。

次にこうした色違いの刺激に対して脳はどのように反応しているのか示します。刺激に対する脳の応答は頭の各部位から脳波として取り出すことができます。この例では15の部位から取っています。後ろの方(後頭部)と前の方(前頭部)で脳波のパターンが違います。これは電位分布を頭皮上地図で表したものです。

これは車のボディー色に対するある被験者の応答です。刺激を受けてから260m sec経った時点での脳表面電位分布図です。右の後頭部、頭頂の連合野に応答が出ています。この部分は形とか、イメージに関わり深いところですが、また、色によってパターンが異なります。この被験者では赤、黒、黄色に対する反応が非常に大きいですね。

パンの例です。車の場合、電位の高い部位が右後頭部の方に限局されていましたが、この場合、左半球側にも赤い部分、すなわち電位の高い部位が認められます。紫色の場合、黒と同様に、右の

前頭部の部分の電位がぐっと下がっています。

これはバナナの例です。前2例に比べてこの脳波パターンは色によってかなり劇的に変わっています。右頭頂から左前頭部にかけて変化があります。

以上のことから、同じ被験者であっても対象物によって応答が違うこと、および色によって応答パターンに明らかな差が認められます。私は、顔を対象物としてこの手法を適用することができると考えています。

先程触れましたように、まず「ニューロ」で学習を繰り返しながら理想的な顔を作ります。次にその顔をベースに肌の色等の要素を変化させて心理的、生理的に調査検討することができます。

最初の段階で、化粧に着目する我々はこの手法で次の2点を明らかにすべきであると思います。ひとつには、社会的あるいは常識的に許容できるぎりぎりの線での理想的な顔を捜すことです。もうひとつには理想的な自己かどうかは別として、社会的な限界を取り払って、その人がどんな風になってみたいのかということです。そしてこの二つの間の関係を探ることでその人が本来持っている心の内の優れて感性的な部分を正確に引き出すことができるであろうと思います。その上で、その結果を生理的な手法で確認することもできるのではないかと考えています。なお、車、食パン、バナナに関するデータはつい最近収集したものでこの機会に初めて公開するものです。

多数の事例を重ねて整理した上でないと確かなことは言えませんが、次のことが結論づけられそうです。すなわち、「経験上、それほど変わるはずがないと判断している自然物の一定限度以上の属性変化に対する応答は非常に大きい。一方で、どうにでも変わり得る人工物の変化に対する応答は小さい。」ということです。

我々が実験上大切にしていることがあります。心理的反応のスケールをどうするかということです。人は刺激を受けると生理的にも、心理的にも変化します。それぞれをきちんと定量的におさ

ることで初めてその対応関係をつかむことができます。

まず、心理的な評価に際し、我々は気分のみよしあし、意識の高低に代表される項目でスケールリングします。この図では目盛りが-100から+100になっています。

ある人が刺激を受けた時、0から+100あるいは0から-100の目盛りを設定した場合、どのくらいの量として感じたかを主観で評価してもらいます。例えば実験前の安静時と実験中の心理状態をこの方法でチェックします。この例ではその差を刺激による心理的な変化として捉え生理的变化と対応づけています。

次に生理計測ですが、我々のところでは最近、生理的变化を実時間で観察できる装置を開発しました。得られた生理データを用いて、心理スケールで評価した気分とか意識を詳細に検定、評定することもやっています。

専門的になってしまいますが、脳波測定について簡単にお話します。先程触れましたように、たくさん電極を頭につけます。通常は、電極と電気的処理装置を電線で結びますので実験中被験者の動作が拘束されることがあります。最近では、拘束をさけるためにテレメーターを採用し、反応を電波で飛ばすことで無線化しています。これにより被験者に負担をかけず実験がスムーズに行えるようになりました。

ご存知だとは思いますが、得られた脳波から α 波のみをフィルタによって分離します。そして α 波が一定電位を横切る点をパルスに置き換えます。パルスの発生間隔を時間的にプロットしますと α 波のリズムがはっきりします。この解析法を用いた我々の研究によって、心理的に快の状態と不快の状態では α 波のリズムに違いが出てくるのがわかってきました。

実験では映像や匂いなどの刺激を提示して脳波を取り出すと同時に先程の心理的評価を合わせて行います。

これが生の脳波です。これが α 波です。出たり

消えたりしています。 α 波の振幅には個人によって大きい、小さいの違いがあります。この大きさの違いは、例えば電極のつけ方や、被験者が太っていたりやせていたりすることでも変化します。そのため、フィルターを通して安定した部分の α 波の周期だけを情報として取り出します。ここの部分の波は振幅が小さいので α 波とは認識しませんのでパルスを出しません。これは我々が開発したオリジナルな方法です。そうしますと刺激に対する応答をパルス間隔の時系列として取り出すことができます。パルス周期はコンピュータで自動的に計測します。ちょうど心臓の鼓動を測るのと似ています。心臓のドッキンドッキンを頭のリズムに置き換えてイメージして頂ければ分かりやすいと思います。

これが α 波のリズムを取り出して整理した図です。香りを与える、ホラー映画に出てくる怪奇な場面を見せる、あるいは自然風景を見せるなど我々の五感に訴える刺激を与えた実験の結果です。図は刺激を与えた後の安静時に示す α 波のリズムをスペクトルに置き換えたものです。

まず、370余のデータを取り、スペクトルの低周波数領域の傾きの大きさの順にソーティングします。次に高いもの30、低いもの30をそれぞれ平均して図に表しています。感性を扱う世界ではしばらく前から「 $1/f$ ゆらぎ」が色々話題になっています。小川のせせらぎ、クラシック音楽などの我々が一般的に心地よく感じるであろう現象において、ゆらぎのスペクトルは f (周波数)の逆数に比例してエネルギー(スペクトル値)が低下する

とする説です。ここに示す脳波も $1/f$ ゆらぎに近いスペクトルとそうでないものに分けることができます。

ここは感情との関わりの深い前頭左部位です。こちらと同じく左側の頭頂部位です。 $1/f$ に近いスロープ(傾き)のデータとそれより傾きの小さいデータに別れます。ここに先程の30例の平均心理評価値を対応させました。赤い方がムード(気分)で、青い方が意識の評価値です。 $1/f$ ゆらぎに近いこのパターンではムードの値は高く(気分がよいこと)、意識に関する値は若干低くこの程度になっています。一方、傾きが低い場合、気分の値は小さく、意識に関する値は高いという結果です。

このように、我々がある刺激にตอบสนองした感覚を α 波のスペクトルで調べることができます。我々のところではこの方法をルーチン化してしまっていて、色々な事象をこれで評価しています。もちろんこれだけで全てが解るわけではなく、他の生理的測定手法を併用しながら検討しています。

以上簡単な事例を通しての提案であり、めりはりが利かなかつたさらいはありますが、提案した方法で化粧行為の諸側面を感性工学的に解析することが可能であり、有益であると私は考えています。すなわち、どのような化粧が社会的に望まれるかということや、人がその内面で描く理想の容貌を捉え、かつ、それを生理的手法で客観的に確認することができるのではないかと思うわけです。

時間になりましたので私の話をこれで終わらせて頂きます。ご静聴ありがとうございました。

(スライド19枚省略)

コスメトロジー研究雑感



I 平成2年度助成研究課題研究者

II 平成3年度助成研究課題研究者



染毛剤とコスメトロジー

中尾 美津男

染毛剤は頭髪用化粧品の一つであり、高齢化社会の進行およびヘアファッションの多様化等を背景に今後その需要の増加が予想される。染毛剤が商品化されてから100年以上経つにもかかわらずその安全性に関しては1975年“染毛剤の中に微生物に対して変異原性が認められるものがある。”というエイムスらの報告以前にはあまり検討されていなかった。しかし、その報告以来今日まで数多くの安全性評価に関する研究が行われて来た。その結果発癌性等が認められる数種の染毛剤成分の使用が中止された。

われわれも、染毛剤の安全性に関する研究の一環としてその代表的な構成成分であるパラフェニレンジアミンおよびニトロパラフェニレンジアミンという2種類の芳香族アミンについて“生体内動態”という観点から研究を行ってきた。両化合物とも染毛剤成分として重要な化合物であり、パラフェニレンジアミンについては工業化学製品中間体としても広く使用されている化合物である。しかし、研究開始当時生体内動態に関する文献はほとんどなかった。以来、この2種類の成分の吸収、生体内分布、代謝および排泄について検討を行い全容とまではいかないまでも種々の事実が明らかになった。今回、ニトロパラフェニレンジアミンの代謝経路でアミノ基のN-アセチル化に位置選択性が認められることが明らかになった。以上のように、染毛剤を通じてコスメトロジーとい

う分野に関わって来たが、勿論、染毛剤＝化粧品ではなく、今後も、化粧品の生体内動態に関する研究を通して、その安全性について考えて行きたいと思っている。

本研究に対してご援助頂きましたコスメトロジー研究振興財団に厚くお礼申し上げます。

(食品薬品安全センター)

コスメトロジーにおける in vitro安全性試験法の位置

大野 忠夫

従来、化粧品の成分の毒性・安全性試験は、ほとんどが動物を使ったin vivo試験が行われてきた。我国でも、昭和62年6月に厚生省から通達が出されている。

しかし衆知のように海外における動物実験反対運動は熾烈で、動物実験を行うメーカーの製品不買運動はもとより、メーカーに対する爆弾脅迫や、製品への毒物混入脅迫などまでが日常茶飯事化している。英国では反対運動家からの脅迫電話一本のために、当該会社の株価が大幅に下落し100億円単位の損害がでるといふ事件まで発生した。単に動物が可愛そうだからという感情論をとくに越えた社会問題なのである。

このような現状を背景に、1992年、EC議会では、動物試験使用成分を配合した化粧品の禁止が検討された。本当に近い将来ヨーロッパ各国で禁止されるかは問題が残るにしても、確固たる国際機関がこのような討議をすること自体、もはや動物実験に代わる安全性・毒性試験法の開発が待たなしの緊急状態であることを如実に示している。

本研究は、ヒト培養細胞を用いる利点を利用した高感度試験法を開発したもので、動物実験代替法開発研究全体からみれば、ささやかな成果の一つにすぎない。

しかし、本研究成果を適用し、目薬という化粧品に隣人にあたる市販製品を検査した結果は、研究報告書に記載したように、従来の毒性試験法のパラダイムの変更をせまる程のインパクトを我々自身に与えた。

実際に、世にこれを問うには、研究報告書の内容は微々たるものであり、更なる研鑽を積んでいかねばならないが、コスメトロジー研究振興財団の研究助成金は、少なくとも本研究において真価を発揮したのである。ここに記して深謝申し上げる次第である。

“本当に有り難うございました。”

(理化学研究所)



本研究とコスメトロジーの 関係

古澤 邦夫

人間の皮膚などの表面を美しく修飾することがコスメトロジーの目的であるとすれば、これは正しく表面化学の目指すものであり、分子や原子レベルでの表面修飾法を開発することはコスメトロジーにおいても最も重要な研究課題とみなすことができよう。その意味において、細胞や血球膜などあらゆる生体表面の基本的骨格を成すリン脂質二分子膜の小胞体でなるベシクルを試料に用いて、その新機能発現の原理を探索した本研究はコスメトロジーの理学的なモデル研究であり、ここで得られた新しい知見はコスメテクスの開発やその応用においても重要な情報を提供するものと信じる。特に、脂質表面の静電的相互作用は非常に遠達性の相互作用であり、表面への付着や吸着現象に重要な影響を及ぼすであろうことを考えると、

本研究で発見された新しい複合現象はコスメトロジー分野においても重要な現象と考える。

さらに、本研究では一環してベシクル粒子を実験試料に用いて各種測定を行っているが、これは今後の化粧品開発やその有用性を調べる際の実験試料としてベシクルが益々利用されて行くことを暗示するものとして興味深い。それはベシクルは生体膜と同じ成分のリン脂質二分子膜からなり、ベシクルとの相互作用を調べることにより、各種機能性化学物質と生体表面との親和性、刺激性、有害性などの有用な知見を得ることができるからである。また、ベシクルは典型的な分子集合体であるため、種々な分子を任意に混入し研究に適した性質の生体膜を調製することも可能である。さらにベシクルは、コロイド状の膜試料であるため、膜との相互作用の研究にNMR、赤外や紫外吸収、熱測定、電気泳動測定など各種の物理化学的実験手段を適用することが容易であり、コスメトロジー領域での研究に新しい実験法の適応を可能にするものとしても注目に値する。(筑波大学)



コスメトロジー観の変容を めざして

春木 豊

化粧品というと通常は、美しくなりたいための行為であるとする。すなわち美容という観点からみられる。しかし、われわれ研究室の化粧品に対する興味は、美醜に関わらず顔面の様子、あるいはもっと一般的に髪型や服装なども含めて、身体のある方、あるいは変容が精神にどのような影響を及ぼすかの追求である。

われわれの別の研究によると、精神と深いつながりがありそうな身体の部位は上半身であることがわかってきている。なかでも顔面は最も強い関係がある。そこで、美容とは別に顔面の変容(化粧品)が精神状態に及ぼす影響を調べることは、身



コスメトロジー雑感

牧野 公子

日本女性は最近とみに美しくなったとよく聞かれます。数年前、私はアメリカに1年余り滞在する機会を得ましたが、確かにそう思われることも多いようでした。その1つの理由はほとんどのアメリカの女性は化粧をしていないこと、しかも日本と比べ湿度が低いために皮膚のみずみずしさに欠けるためではないかと思えます。同時に、一般女性には化粧というものの認識があまり無いのではないかと思えました。この場合、皮膚の手入れを含めて化粧ですが、乾燥がひどいので化粧をしても甲斐がないのではないのか、化粧をしないから皮膚が乾燥するのは定かではありませんが、かく言う私も1年あまりのアメリカ滞在の後、帰国した際には日焼けしてかさかさの肌の自分を発見しました。アメリカのスーパーマーケットで化粧水を見つけるのは大変困難でした。非常に高価なパック剤や乳液、香水はデパートで簡単に見つかるのですが、田舎の大学町では日本ほど安価に容易に化粧水はみつからなかったようです。一方でヨーロッパの列車に“禁煙席”と並んで“禁香水席”がみられ、これなどは過剰な化粧の人が結構多いことを示しているのでしょう。この意味では日本女性は程々に化粧をし、化粧先進国であると言えるでしょう。経済摩擦がとやかく言われる昨今、一つ、日本製の乳剤をもって、外国との関係を滑らかなものにしてはいかがでしょうか。

さてこの度私は(財)コスメトロジー研究振興財団からヒアルロン酸修飾リポソームの研究で第一回研究助成金を頂きましたことに紙面を借りて御礼申し上げます。皮膚の保湿を目的とした化粧品品の基礎研究の一助になれば幸いに存じます。

(東京理科大学)



本研究成果のコスメトロジーに及ぼす影響

西出 宏之

本研究の目的は、物理的かつ生化学的に極めて安定な小胞体高分子脂質リポソームを皮膚用DDS(薬物運搬系)として展開する基礎知見を得ることにある。

リポソーム(脂質小胞体:粒径0.05~0.5 μ m微小マイクロカプセル)に用いるリン脂質誘導体の合成化学的な研究を我々は展開してきたが、その物質群の一つに高分子脂質リポソームがある。ビス(オクタデカディエノイル)グリセロホスホコリンを紫外光照射重合して得られる高分子脂質リポソームであり、その特徴は次のように列挙できる。①リポソーム2分子膜がリン脂質分子間の共有結合により安定化されており、例えば界面活性剤によっても小胞体構造は破壊されない。②生化学的にも安定で、例えばホスホリパーゼによっても直ちには加水分解されない。③しかも重合後脂質部には不飽和結合が残るので緩慢に代謝される。④リポソーム作製の常法に従って内包物質をカプセル化後、光重合して安定構造に誘導できる。⑤小胞体として物理的に強靱である。⑥相分離や小胞体間の融合なしに、高濃度の分散液が保持できる。すなわち特徴①~⑥に対応して次の効果が期待される。

(a) 界面活性剤に対する強い抵抗性①に基づき、安全な皮膚用DDSとして適用しうる。(b) 生化学的安定性②により、急速な代謝や皮膚細胞との直接相互作用を抑制しながら、角層~表皮~真皮への浸透が可能。(c) ③により毒性低減が計れる。(d) ④・⑤に基づき内包物質の種族(油~水溶性)に制約がなく、また広い濃度範囲での内包が可能となる。(e) ⑥に起因して、溶液物性(レオロジー)を調節可能で、クリーム状の触感も検討対

象となりうる。これらの特性は乳化系はもちろんのこと、既知のリン脂質リポソーム、ニオソームでは実現不可能であり、まさに次世代の皮膚用DDS開発に繋がる波及効果を期待できる。

(早稲田大学)



コスメトロジーとの関連

多島 新吾

皮膚の老化を防止することは化粧品の最大の目標と思われる。皮膚の老化はシワの形成で代表される。現在まで皮膚のシワの発生機序、形成機序について不明の点が多いが、エラスチン線維の量的あるいは質的異常と関連している可能性が考えられる。例えばエラスチン代謝異常症(皮膚弛緩症、弾力線維変性性仮性黄色腫)などではシワの形成が著明に認められる。ではシワはエラスチンのどのような異常により形成されるか、現在まで不明であるが、おそらくエラスチンの最も重要な弾力性に異常が生じるためと思われる。弾力性を生じるものになるのは架橋構造であり、おそらく架橋形成に何らかの異常があるものと思われる。

本研究ではエラスチン分子(トロポエラスチン)が培養細胞の培地中ですみやかに分解をうけ特異的な45kdのポリペプチドへと低分子化されることを報告した。この分解物は安定であり、おそらく組織中でもそのまま保持され架橋を形成するか、あるいはintactなトロポエラスチンと架橋を形成する可能性がある。このようにして形成されるエラスチン線維は本来のintactなトロポエラスチン同士で形成される架橋とは異なり、おそらく機能上異常なエラスチン線維となるとと思われる。今後この点の可能性も含めてエラスチンの分解過程を検討していきたい。(慶應義塾大学)



コスメトロジーの観点から みた本研究の展開

佐々木 哲雄

老化の機序の解明は医学、生物学の最も重要な目的の一つである。それは人間の寿命の延長をもたらすであろうし、老化に伴って生じる種々の疾病の病因解明にもつながるであろう。近年の分子生物学の進歩は、いわゆる遺伝性疾患に留まらず各種の癌の発生にも遺伝子の異常が関与していることを次々に明らかにしつつある。しかしながら、老化の機序は遺伝子のレベルではなお明らかにされていない。早期に種々の老化徴候を呈する遺伝性疾患の原因を探究することは、老化の機序を研究する際の有力なアプローチの一つであろう。その意味でWerner症候群は恰好の研究対象である。

Werner症候群の細胞レベルの異常としてその増殖能の低下があげられる。その原因としては細胞増殖因子に対する応答性の異常、すなわち情報伝達機構の異常が推定される。そのような仮説に基づき本研究が計画された。これまでの研究では本症の原因究明には程遠いが、最近本症の原因遺伝子の染色体上の位置が明らかにされたので、今後はよりの絞った研究が可能となると期待される。

老化の機序の解明はこれまで生理的現象としてあまり顧みられなかった皮膚の種々な老化徴候の原因の解明とその予防にもつながるであろう。その意味で本研究は皮膚科学やコスメトロジーにも大いに関係しており、さらに研究を続けてゆきたい。(横浜市立大学)



本研究成果のコスメトロジー に及ぼす影響

金ヶ崎 士朗

ヒトの皮膚は、外来の病原性微生物や有毒化合物から生体を防御するための第一のバリアーである。ヒトは、古くからこの皮膚を保護し、清潔に美しく保つために各種の薬物や化粧品を用いて来た。乾癬症は、ヒトの皮膚に発生する原因不明の病気で皮膚細胞の異常な増殖がみられることから種々の治療方法が試みられてきた。Dithranol は anthraquinone 系化合物で、この病気の治療薬として有効とされているが、その作用機作には不明な点が多い。

本研究では、この薬物の作用機作を明らかにすることを第一の目的としたが、この化合物の特性として自動酸化によってフリーラジカルを産生することが知られている。近年の研究からフリーラジカルは生体内の各種の生理的、病理的反応に関与することがわかって来ている。一方、環境中の汚染物質や日常利用しているある種の医薬品や化粧品が光化学反応によって生体に有害なフリーラジカルを生じることが知られるようになった。この場合、光源としては太陽光線に含まれる紫外線に注意がむけられる場合が多い。しかし、現在ヒトは近紫外部から可視部に至る波長の光線を出す蛍光灯下で一日の大半を過ごすのが普通であり、太陽光線と共に蛍光灯の影響も無視できないと考えられる。今回の実験は室内灯下で行い、近紫外部から可視部に至る波長既知のキセノンランプ光線下での結果と比較した。その結果、この化合物による O₂ 生成は蛍光灯照射下で著しく増加することが明らかにされた。このようにして生成した O₂ は Dithranol の細胞障害性に関係している。

今回の研究では、Dithranol という Anthraquinone 系薬物とフリーラジカルとの関係

を取り上げたが、光照射を直接うける化粧品の開発にあたっては、蛍光灯のような弱い光線下でのフリーラジカルの生成も無視できない場合があることを示すものである。(東京大学)



感想

浜中 すみ子

ヒトの成分の約60%は水分である。我々が乾燥した地上で生存できるのは皮膚に水分を保護するバリアーが存在するからである。このバリアーの研究は1930年頃、始まっている。現在、皮膚には特有なセラミドがあり、このセラミドがバリアーを形成するのに必須の成分であることが知られてきた。リノール酸を結合するこのセラミドは、アシルグルコシルセラミド由来であることが推定され、ブタで、その構造が決定された。しかし周知のごとく、ヒトは他の哺乳類のように厚くて保温・保湿豊かな有毛性皮膚を持たない。ヒトのこの滑らかな皮膚の秘密を知ることが、化粧品学の目的のひとつである「若々しくみずみずしい肌を保つ」カギになるであろう。私は診療に従事する皮膚科医の立場からヒト皮膚の脂質解析の必要性を感じていた。それは何よりも臨床応用を念頭に置いたからである。今回のヒト表皮アシルグルコシルセラミド(エピデルモシド)の構造決定は皮膚水分保護バリアー解明のワンステップになると思うし、また同時にヒト特有のエピデルモシドを発見したことから、ヒトの特殊性をも示したと思う。今までの研究から、エピデルモシドが結合する脂肪酸がリノール酸からオレイン酸に変換しただけでも水分漏出が始まり動物は死に至ることが明らかになっている。しかしながら水分保護能は哺乳類に共通するタイプのエピデルモシドで充分なはずである。なぜヒトはわざわざ珍しいエピデルモシドを生合成するのであろうか。私はヒト型エピ

デルモシドが存在することが、ヒトが素肌をさらして生き得る可能性を意味すると仮定してみたい。この仮定のもとで、ヒト型エピデルモシドが将来化粧品あるいは外用剤として皮膚に補充されれば、皮膚からみたヒトの life span 延長の可能性、即ち、若返りの秘薬が実現することになるであろう。

(山口労災病院)



私のコスメトロジー雑感

中川 昌子

化粧品は古代から、いろいろな形で使用されてきたにも拘らず、学問の対象として興味がもたれ、科学的な基盤に立脚した研究が始められたのは、極最近のことではないかと思われる。老化現象の科学的な追求が多方面の研究者によってなされているが、皮膚の老化のメカニズムがもし明らかに

なれば、寿命を延ばすことは叶わぬまでも、生きている間は少なくとも顔をはじめとする全身の皮膚の外観をより若々しく保つことが出来るようになるのではないかと期待される。

著者らの今回の研究はスフィンゴ糖脂質やセラミドなど皮膚への保湿剤としての効果が期待される天然物1, 2, 3の合成である。これら天然物はいずれも微量しか得られず、生物活性や皮膚への作用などを見るためには量的な確保が急務である。そこで筆者らは短工程で安価なそして種々の誘導体の合成にも適応可能な合成ルートを開発した。これら生物活性物質の合成はまだ本題の目的には遥か遠いものではあるが、これらの合成法を利用して将来有用な関連化合物が合成されることを期待している。保湿剤が化粧品に重要な位置を占めるようになり、その保湿剤の一つとしてスフィンゴ脂質が注目をあびるようになりつつあることは、この方面の化学に携わっている者にとっては大変に心強いことである。(千葉大学)

当該研究のコスメトロジーに及ぼす影響

国枝 博信

逆ベシクルは油中で生成する新しく発見された自己組織体であり、新しい機能を発現する新素材になりうる可能性を持つ。まず、逆ベシクル中に油性の有用物質を閉じ込め、徐放する素材になりうる。また、水溶性物質も2分子膜中の親水部に保持することが可能である。この点に関しては逆ミセル系と同様であるが、逆ミセルと異なり、逆ベシクルは油中に溶解しているのではなく分散しているため、生体に対する刺激が少ないと考えられる。さらに逆ベシクルは本質的に無限会合体であるラメラ液晶からなるため、界面に対する吸着性も良いと考えられ、皮膚などへの保護膜にも使える可能性がある。(横浜国立大学)

コスメトロジーの観点から見た本研究の展開

二木 鋭雄

我々は、生命現象を「化学素反応の集積」としてとらえ、そのダイナミックス、メカニズムを解明することによりはじめてそれを理解し、さらにはある特定の反応を促進したり、また逆に抑えることが可能になると考え、それをストラテジーとして研究を進めている。特に、近年は活性酸素種やフリーラジカルが生体に及ぼす影響について研究を進めているが、それに関連して、皮膚のこれ

ら活性種による変性やその抑制について、反応論というアプローチで取り組んでいる。すなわち、光や熱、薬物により皮膚の表面で生成した活性酸素種やフリーラジカルが、どのように脂質、タンパク質などを攻撃し、それによりどのような変化が起こるかについて、その素反応を明らかにすることを目指している。と同時に、それをもとにして、これらの反応を如何にして制御することができるかについても研究している。

従来の医学が対症療法的な治療によるものであったのに対して、今後の医学の中心が予防医学の方向に進むべきであると同様に、コスメトロジーも単に表面を繕うことから、より根本的なところから取り組むことが重要になると考えられる。すなわち、皮膚においてどのような変化が起こっているのかを、より反応化学的な目で眺めることの重要性が広く受け入れられていくと思われる。そういう意味で、本研究のアプローチは先端的であると考えている。

勿論、自然科学というものが単に物理学、化学、生物学、薬学だけの枠内にとじこもり、それだけで評価されるものではなく、社会、あるいはより広く生態系との関わりも合わせて考えることが必要であると同様に、コスメトロジーも単なる自然科学的観点だけではなく、心理学、美学とも深く関わるものであることは忘れてはならず、これらすべてを如何に融合させていくかを探ることも本研究の、そしてコスメトロジーの共通の研究課題であると言えよう。(東京大学)



本研究成果のコスメトロジー に及ぼす影響

片岡 一則

近年のバイオテクノロジーならびに皮膚科学の急速な進歩に伴い、コスメトロジーの分野においても、皮膚組織に好ましい作用を示す生理活性物質を積極的に取り入れた機能性化粧品の研究・開発が日増しに盛んとなってきている。このような研究・開発においては、新たな生理活性を発現する新規物質の探索とともに、これらの生理活性物質を安定に配合し、期待通りの機能を発現させるための新しい化粧品調剤技術の開発が急務となっている。ペプチド類をはじめとして、生理活性物質には不安定なものが多く、化粧品成分として実用化するためには、その安定化が不可欠であるとともに、これらの物質の徐放化を通じての作用の時間制御も重要な課題である。

上記のような課題を解決する最も有力な方法は、化粧品成分を安定に保持し、また、その皮膚滞留性、組織浸透性を改善するための担体システムの構築である。本研究で取り組むブロック共重合体ミセルは、サイズ的には超微粒子(約50nm)の範囲にあり、また、明確な core-shell 構造を有するために、core 部分に安定に生理活性物質を包接することが可能である。さらに、ミセルの安定性や core 部分の疎水性等を調節することによって、包接した物質の放出速度を広範囲に制御することもできる。ミセル表面には、糖鎖等の生体と特異な相互作用を期待できる分子、あるいは温度や pH 等の外部環境変化に応じて物性を変化させる高分子鎖等を連結させることも可能であり、高分子ミセル本来の有する利点に加えて、これらの諸機能を賦与することによって、さまざまな生理活性物質の作用制御を通じてコスメトロジーに多大な貢献をなすことが期待される。(東京理科大学)



コスメトロジー領域における 乳酸菌の遺伝子工学

桐村 光太郎

人間の小腸下部に在住する乳酸菌(ビフィズス菌を含む)は、乳酸を生成することにより他種の雑菌の繁殖を抑えている。また、乳酸菌がビタミンをはじめとする生体に必要な微量栄養素や免疫賦活作用物質を生産することも明らかにされている。このため、乳酸菌は、人間の健康維持・増進に寄与する有用な微生物としての認識が高まっている。一方、乳酸菌の培養液がやけどの回復を早め、皮膚の感染症を防ぐことも発見されている。これらの特長から、乳酸菌培養液は約30年前より化粧品素材として利用されており、実際の使用においても保湿作用や抗酸化作用が長所として認められている。

このような背景から、化粧品素材としての利用に適した乳酸菌の育種をテーマとして、筆者は研究を進めている。具体的には、遺伝子工学を適用して乳酸菌の特定の能力を強化することを試みており、現在は初歩の段階、すなわち形質転換法や宿主・ベクター系の構築を行っている。一方、皮膚への刺激作用が極めて少ない界面活性剤としてアルキルグリコシド類が知られている。筆者は、この一種であるアルキルβ-グルコシドの酵素的合成を目的として、乳酸菌の生産する当該酵素のクローニングと遺伝子レベルでの研究を進めている。これらの研究を実用的な系にまで高めることができれば、化粧品素材として極めて有用なセラミドやヒアルロン酸の生産性に優れた乳酸菌の造成も可能になるものと期待している。

今後の化粧品は、素材の生理活性を十分に生かして、皮膚に優しく単純なものが指向されるようになるであろう。一時的な流行によるものではなく、いつまでも変わらず優れた品質を保った化粧

品を作成するための基礎学問として、コスメトロジーは必要不可欠である。筆者の研究の成果が、この領域のさらなる発展に貢献できるように、今後なお一層の努力を継続する所存である。

(早稲田大学)



本研究成果のコスメトロジー に及ぼす影響

神田 博史

最近、薬用化粧品、薬用養毛剤を多く見かけるようになった。しかしながら、生薬を材料としている場合、品質の不均一性が必ず問題になってくる。生薬は殆どの場合、野生品の採集品であり、ロットによって薬理効果に非常にバラツキを生じる。天産品である以上、多少のバラツキは致し方ないにしても、放置できない問題である。本研究は、材料の品質保持と安定供給を目的としており、上記問題が解決できコスメトロジーに貢献できるものと確信する。事実、トチバニンジンに地域的差異が認められ、化学成分的に同一でないことが明らかとなった。

(広島大学)



本研究成果のコスメトロジー に及ぼす影響

松本 孝芳

近年社会的価値観の多様化に伴い、種々の物性をもつ化粧品の開発が期待されている。当研究では粒子の大きさに注目し、超微粒子(ここでは直径あるいは代表的長さ10nm以下の粒子をいう)コロイド系の構造と物性について、および物性を自ら制御できる概念をもつ自己制御コロイド系の開発について基礎的観点からの研究を行っている。

化粧品の製造において、分散粒子の大きさは種々の物性、例えば艶、皮膚への浸透性、被覆力、

系の安定性、紫外線吸収能等に影響を及ぼすと思われる。またこれらの特性は粒子の表面構造(粗さ)の影響も強く受けると考えられる。当研究では超微粒子の表面構造を液体に分散しているそのままの状態、SAXSを用いて定量的に把握できることを明らかにした。この方法を用いて、超微粒子化粧品の構造と物性の関係がより基礎的且つ詳細に検討できよう。また、蛋白質コロイド系は極めて特異なレオロジー特性を示すことが明らかにされた。それは極めて広い濃度範囲(0.1~40 wt%)で、降伏値および剛性率が一般のコロイド系より遙かに低い一定値を保持するという点である。この理由は明らかでないが、高濃度でありながら系の流動性は高いというコロイド系も化粧品の製造に役立つと思われる。自己制御コロイド系の体質については、今後さらに研究を続ける予定である。

(京都大学)



本研究成果のコスメトロジー に及ぼす影響

滝川 雅浩

本研究の成果は、個々の化粧品が光接触性皮膚炎を起こす原因となり得るか否かの安全性のスクリーニングに利用することができる。化粧品に含まれる香料、植物由来の成分は、現在においても光接触アレルギー能を有するものが存在すると考えられ、さらにはサンスクリーン、ボディローションはそれ自体日光曝露を前提として使用されるため、本モデルを用いた光アレルギー能のスクリーニングは利用価値が高い。またマウスを用いるため、個々の化粧品における接触光過敏症の免疫学的な機序解明を可能とする。

本研究のサンスクリーンの効果判定に関する部分についての成果は、サンスクリーンのUVA遮断効果を生体系を用いて評価し得ることである。サンスクリーンによるUVAの遮断は、臨床的に

UVAを作用波長とする疾患が多いこと、UVAが色素沈着の原因波長となること、等より注目を集めている。この意味において、本研究は従来の物理学的計測法に加えて、in vivoの系でのサンスクリーンの効果の評価を可能とする。

(浜松医科大学)



本研究成果のコスメトロジー に及ぼす影響

柴原 茂樹

今後我が国における高齢人口は増加の一途をたどることが予想される。しかも、日本人の意識の変化は大きく、単に健康で長生きできればよいというわけではなく、その余生の質が問題とされている。今や、美しく老いたいという願望は必ずしも女性だけのものではない。実際、相当数の人々が皮膚の老化の指標の一つである色素沈着(いわゆるシミ)を気にしており、このシミを予防できるような化粧品・薬剤の開発を待ち望んでいる。そして、この皮膚の老化現象には紫外線が深く関与していると思われる。

日常経験する“日焼け”という現象からも明らかのように、メラニンの主な機能は紫外線に対する防護作用である。日焼け以外にも、様々な皮膚の炎症後に色素沈着の起こることが知られているが、このような色素沈着(メラニン量の増加)が起こる機構はよくわかっていない。それどころか、メラニン合成に関与する蛋白質(二種類のTRP)が新しく発見され、メラニン合成は従来考えられているよりはるかに複雑な過程を経ていることが明らかになってきた。従って、その合成にも様々なレベルにおける複雑な調節機構が存在するものと推定される。

本研究により、ヒトチロシナーゼ遺伝子の発現制御に関与するシスエレメントが決定され、今後、このエレメントに作用する蛋白質因子の解析が可

能となった。よって、本研究成果はメラニン合成の未知の調節機構の解明への突破口となるばかりでなく、種々の物質(化粧品)がこのような蛋白質因子の発現に与える影響をスクリーニングすることも可能になる。すなわち、種々の物質が色素細胞特異遺伝子の転写やその転写に関与する蛋白質因子の発現へ与える影響などを調べることができる。以上のように、本研究成果はヒトにおける色素沈着の新しい観点からの予防法や治療法の開発への第一歩となる。

(東北大学)



コスメトロジーの観点から 見た本研究の意義

浜 治世

本研究は、われわれが提唱した“化粧品を手がかりとした情動活性化療法”が、アルツハイマー型老年性痴呆症者やいわゆる“ぼけ”症状を呈する人々の痴呆症状を改善し、情緒を活性化し、その結果、化粧品することを長らく忘れていた人々に再び美粧行為や化粧品へのモチベーションを喚起する有力な手段であることを実証した。この新しい知見は、これまで一般的に信じられてきた化粧品は自己表現のためであり、また第三者に好印象を与えるためのものであるという考え方に変革をもたらすものである。

われわれの研究に被験者として参加して下さった53名の老人の方々(主にアルツハイマー型老年性痴呆と診断されている者)は、64歳から92歳と広範囲であったが、これらの人々のうち誰ひとりとして“化粧品療法”を拒否した者はいない。それどころか、“ぼけ症状”が初期段階の被験者は、われわれの実験を開始するまでは、抑うつ的で感情が平板化していた人々であったが、セッションを重ねるごとに週一回の“化粧品療法”を待ちわびるようになり(このことは記憶障害が改善された証拠である)、その変化には精神科医も家族もお

どろかれたほどである。このような変容は、われわれが精神分裂病者やうつ病者を対象にして“化粧品療法”を行った先行研究によっても確かめられている。

これからのコスメトロジーは、単にビジネス産業として化粧品界に貢献することに甘んじることなく、人々の心の健康、安寧(ウェルビーイング)のために積極的役割を担うものとならねばならないと考える。このことは、とりもなおさず、コスメトロジー研究振興財団理事長小林孝三郎氏が目標に掲げられている“より豊かで美しい人間生活の実現”につながるものである。“化粧品”が、老年性痴呆症者の“ぼけ”症状の改善あるいはその進行を遅らせるのみならず、“ぼけ”の症状の予防にも役立つことが可能となれば、本研究の成果がコスメトロジーに及ぼす影響と意義はまことに深いものとなろう。なお最後に、コスメトロジーは、本研究が示唆したように心身の病める人々に幸福をもたらすだけではなく、それらの人々を介護する家族や周囲の人々にも心の安らぎを与えるものだという誇りと使命を抱いて、高齢化の進む21世紀へ向けて飛翔することを心から祈るものである。(同志社大学)



本研究成果のコスメトロジー に及ぼす影響

阿部 正彦

コスメトロジーを論じる場合、人間生活と深いかわりを持つ化粧品の存在は不可欠であり、その役割・機能は重要な意味を持つ。衆知のごとく、化粧品の中には界面活性物質(剤)がかなり利用されており、特に、高付加価値系であるマイクロおよびマクロエマルションの調製・物性が重要な因子となっている。

本研究では、マイクロおよびマクロエマルションの溶液物性をより解明するために、下記の研究

を行った。

「ジミリストイルホスファチジルコリンによるO/W型マイクロエマルションの物性」では、天然界面活性物質を用いたO/W型マイクロエマルションの生成条件およびその物性は、水溶液中の無機電解質の濃度やpHにかなり存在することが分かった。

「Molecular Interactions between Lipid and Some Steroids in a Monolayer and a Bilayer」では、単分子膜および二分子膜中におけるジパルミトイルホスファチジルコリンの疎水基とステロイドとの相互作用は、ステロイドの側鎖や二重結合の減少に伴い増加することが分かった。

「アニオン/カチオン界面活性剤混合系マイクロエマルションの物性」では、アニオン界面活性剤(アルキル硫酸ナトリウム)/カチオン界面活性剤(塩化アルキルトリメチルアンモニウム)/デカン/アルコール/塩水系で調製した場合、アルコールの炭化水素鎖長が3以下の時に、水と油を大量に可溶化したマイクロエマルションが生成した。さらに、その相挙動は、温度および塩濃度にほとんど存在しない特異な系であることを見いだした。

「O/W型マイクロエマルションの界面電氣的研究」では、アニオン界面活性剤のゼータ電位の無機電解質濃度依存性がマイクロエマルション粒子の表面電荷密度の変化に起因すること、両性および非イオン界面活性剤によるマイクロエマルションの粒子表面には正電荷よりも負電荷が優先的に吸着すること、さらに新規導出した理論式により無機電解質イオンの結合定数やマイクロエマルションの会合数を求めることに成功した。

これらの成果は、コスメトロジー分野における化粧品としての材料設計にかなりの寄与が期待できるものと確信する。(東京理科大学)



当該研究がコスメトロジー研究に及ぼす影響について

齋藤 美穂

肌色に関する研究は様々な分野で進められているが、心理学でもその研究領域を拡大させている。特に最近では紫外線の有害性も報じられ、肌に対する関心が高まっているのと同時に、ホワイトニ

ングへの一般の興味も増加する一方である。また日本では古くから「色の白いは七難隠す」といわれ、肌の白さに対するポジティブなイメージがあるようだ。しかし色の白いことの好ましさがどのような心理的概念に基づいているのかどうかを調査した研究はないため、今回そのテーマに取り組むことにした。色白の心理的嗜好構造を探ることが出来たならば、流行や一過性の事象に左右されない方向性を、この研究の成果はコスメトロジーにもたらすものと考えている。（早稲田大学）

付 録



事業報告書

- I 平成 2 年度事業報告
- II 平成 3 年度事業報告
- III 平成 4 年度事業報告

設立趣旨書

寄附行為

助成金等交付規定

役 員



事業報告書

(自 平成2年7月5日 至 平成3年3月31日)

1. 初年度事業 (平成2年度)

当財団は、平成2年6月29日厚生省より認可を受け、翌7月5日に登記を完了しました。9月17日に設立総会及び第1回理事会・評議員会を開催して、以下のような初年度事業を計画し、実行しました。

自然科学や社会科学の各分野にわたり、ひろくかかわりをもつ化粧品を総合的に体系化することを目的として

- ①化粧品学の調査・研究に関して顕著な成績をあげた研究者や機関に対して功労金をもってこれを表彰する。(1件あたり100万円)
- ②皮膚の生理機能や老化機構の解明、美容に役立つ素材の研究等、化粧品学に関連した生命科学、その他の分野の調査・研究に対する助成を行う。
(1件あたり200万円)
- ③化粧品学の調査・研究にたずさわる研究者の海外派遣や招聘に対して資金援助を行う。(1件あたり50万円)

2. 選考の経緯

当財団の初年度各事業につきましては、平成2年11月1日より募集を開始し、平成3年1月末をもって締切りましたが、多数の方からのご応募をいただきました。

今回は当財団の初年度でもあり、準備期間が短かった関係で、応募については推薦制を主とさせていただき、平成3年2月22日に選考委員会を開催し、理事長、理事及び評議員に報告、了承を経て受賞者を最終決定いたしました。

3. 第1回功労表彰・研究助成等の結果

以下の通り、合計21件が決定され合計功労金300万円、研究助成金3,200万円、国際交流援助金100万円が交付されました。なお、受賞された方々のお名前は次項の通りです。

功労表彰 (小林孝三郎賞)	3 件
研 究 助 成	16 件
国 際 交 流 援 助	2 件

第3号議案 平成3年度助成金等交付対象者の募集方法に関する件

平成3年度の助成金等交付対象者の募集方法については、当財団「助成金等交付規程」第4条1項及び2項によるほか、同条第3項の規程により、その要綱を次の如く定める。

原則として全国の主要大学、公的研究機関、病院の施設内公募とし、単科大学にあつては学長、総合大学にあつては学部長、研究機関にあつてはその代表者、病院にあつては病院長の推薦を要するものとする。これら諸機関の選考基準は次のとおりとし概ね100ヶ所を目途とする。

- ①役員、選考委員の所属する大学、機関等
- ②助成、表彰の実績を有する研究員の所属する大学、機関等
- ③役員が推薦する機関等
- ④その他化粧品関連の研究が活発な大学、機関等

なお、今年度の募集期間は7月1日より9月20日までとする。

第4号議案 選考委員前厚生省薬務局審査課化粧品審査室長 平井俊樹氏の転出に伴う退任及び新たに手塚 満氏を選考委員に選任する件

4. 会議等

理事会

第一回理事会

日 時 平成2年9月17日（月）
場 所 東京都千代田区丸の内 パレスホテル
出席理事数 10名（現在理事数 12名）
出席監事数 1名（現在監事数 2名）

報告事項

理事、理事長、監事、評議員の選出を寄付行為附則第2項により決定した旨を報告、全員の了承を得た。

決議事項

- 第1号議案 初年度（平成2年度）事業計画及び収支予算案承認の件
- 第2号議案 選考委員の選出承認の件
- 第3号議案 助成金交付規程承認の件

評議員会

第一回評議員会

日 時 理事会と同時開催につき理事会に同じ。

出席評議員数 11名（現在評議員数 15名）

報告事項、決議事項共に理事会と同様である。

選考委員会

日 時 平成3年2月22日（金）

場 所 東京都千代田区丸の内 パレスホテル

出席選考委員数 11名（現在選考委員数 11名）

報告事項

選考委員厚生省平井俊樹氏の転勤に伴い同氏が手塚満氏に変更された、次回理事会で承認の予定

決議事項

第1号議案 選考委員長選出の件

第2号議案 平成2年度表彰、助成及び援助選考の件

第一回表彰・贈呈式

日 時 平成3年3月29日（金）

場 所 東京都新宿区大京町 野口英世記念会

5. その他

平成3年5月小田倉監事及び黒田監事に平成2年度事業概要報告並びに、収支計算書、正味財産増減計算書、貸借対照表及び証憑書類、帳簿等の監査を受けいづれも適法正確である旨、両監事より報告があった。

第1回 功労表彰・研究助成を受けられたかたがた

(K-功労表彰・J-研究助成・H-国際交流援助)

管理番号	研究題目	分野	代表研究者
K90-01	外用タール色素の衛生化学的検索	衛生化学	東京薬科大学助教授 永山 富雄
K90-02	色材の表面、界面及び改質層とその分析に関する研究	応用界面化学	武蔵工業大学自然科学系教授 高岡 京
K90-03	界面活性物質の基礎及び応用に関する研究	応用界面化学	東京理科大学理工学部教授 荻野 圭三
J90-01	染毛剤成分の代謝に関する研究	薬物代謝	食品薬品安全センター薬野研究所 中尾 美津男
J90-02	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	組織培養学	理化学研究所 副主任研究員 大野 忠夫
J90-03	リン脂質膜の表面修飾と分子集合体としての機能発現に関する研究	界面物理化学	筑波大学化学系助教授 古澤 邦夫
J90-04	化粧品が意識性に及ぼす効果の研究	心理学	早稲田大学人間科学部教授 春木 豊
J90-05	胆汁酸生合成のメカニズムに関する研究	生物有機化学	東京工業大学理学部助教授 藤本 善徳
J90-06	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	薬品物理化学	東京理科大学薬学部助手 牧野 公子
J90-07	皮膚DDSとしての高分子脂質リポソームの基礎研究	高分子合成	早稲田大学理工学部教授 西井 宏之
J90-08	皮膚の老化に伴うエラスチン遺伝子発現の動態	皮膚科学	慶應義塾大学医学部講師 多島 新吾
J90-09	Werner症候群患者皮膚由来培養線維芽細胞のサイトカイン細胞成長因子に対する応答性	皮膚科学	横浜市立大学医学部助手 佐々木 哲雄

管理番号	研究題目	分野	代表研究者
J90-10	光化学反応によるフリーラジカルの産生と表皮培養細胞に対する影響	医科学 生化学	東京大学医科学研究所教授 金ヶ崎 士朗
J90-11	色素性皮膚病変に対するレーザー療法の研究	皮膚科学	帝京大学医学部助教授 渡辺 晋一
J90-12	表皮糖脂質の生化学的、形態学的並びに臨床的研究(エピデルモシド)	皮膚科学 生化学	山口労災病院皮膚科部長 浜中 すみ子
J90-13	生体の酸化的障害に対する防御機構の生化学的研究 ービタミンEの活性発現機構の解析ー	生化学	東京大学薬学部助手 新井 洋由
J90-14	皮膚生理機能賦活物質の経皮吸収に対する評価解析理論の確立	薬剤学	京都大学薬学部教授 瀬崎 仁
J90-15	皮膚への作用性を有する各種糖脂質の合成	有機合成化学	千葉大学薬学部助教授 中川 昌子
J90-16	新製剤法及び新素材を用いた化粧品の品質確保に関する研究	衛生化学	国立衛生試験所環境衛生化学部長 武田 明治
H90-01	化粧人工義手 コンピュータによる色調の合成と、コンピュータ制御による回転式成型	機械 生産工学	シンガポール国立大学講師 Swee Hin TEOH (受入責任者:早稲田大学 梅津光生)
H90-02	炎症性サイトカインの作用機序の解析	免疫学	東京大学薬学部研究生 樋口 昌宏

(敬称略 受付順)

事業報告書

(自 平成3年4月1日 至 平成4年3月31日)

1. 2年度事業(平成3年度)

初年度に引き続き以下のような事業を計画し、実行しました。

自然科学や社会科学の各分野にわたり、ひろくかかわりをもつ化粧品を総合的に体系化することを目的として

- ①化粧品学の調査・研究に関して顕著な成績をあげた研究者や機関に対して功労金をもってこれを表彰する。(1件あたり100万円)
- ②皮膚の生理機能や老化機構の解明、美容に役立つ素材の研究等化粧品学に関連した生命科学, その他の分野の調査・研究に対する助成を行う。
(1件あたり200万円)
- ③化粧品学の調査・研究にたずさわる研究者の海外派遣や招聘に対して資金援助を行う。(1件あたり50万円)

2. 選考の経過等

本年度の各事業につきましては平成3年7月より募集を開始し平成3年9月末をもって締切ました。本年度は一般公募を原則とし全国約120カ所の大学・病院, 研究機関等にダイレクトメールにて送付する他8誌の関係学術雑誌にも広告しました結果多数の応募をいただきました。

応募者の研究分野が多岐にわたった為, 選考委員会に4分科会を設け2回にわたる予備選考を行い平成3年10月18日(金)パレスホテルにおいて本選考委員会を開催し受賞候補者を決定し10月末理事長, 理事, 評議員に報告, 諒承を得て受賞者を最終決定いたしました。

3. 第2回功労表彰・研究助成等の結果

以下のとおり合計29件が決定され功労金300万円, 研究助成金4,400万円, 国際交流援助金200万円が交付されました。

功労表彰(小林孝三郎賞)	3件
研究助成	22件
国際交流援助	4件

第2回 功労表彰・研究助成を受けられたかたがた

(K－功労表彰・J－研究助成・H－国際交流援助)

管理番号	研究題目	分野	代表研究者
K91-01	美容器官としての皮膚	皮膚科学	東京女子医科大学名誉教授 中村 敏郎 (日本皮膚科学会推薦)
K91-02	化粧品品の安全性確保	衛生化学 化粧品科学	日本毛髪科学協会名誉研究所長 田村 健夫 (日本毛髪科学協会推薦)
K91-03	エマルション及び可溶化系での添加物の酸化安定性の研究	化粧品科学 物理化学	日本大学薬学部教授 佐藤 孝俊 (東京化粧品工業会推薦)
J91-01	培養表皮細胞及び線維芽細胞におけるグリコサミノグリカン及びコラーゲンの代謝	生化学	東京薬科大学教授 森 陽
J91-02	生体適合性逆型ベシクルの生成、安定化と応用に関する研究	溶液論 界面化学	横浜国立大学工学部助教授 国枝 博信
J91-03	活性酸素、フリーラジカルによる生体膜傷害の防止に関する研究	有機生化学	東京大学先端科学 技術研究センター教授 二木 鋭雄
J91-04	パッチテスト結果のコンピューター処理システムの開発	皮膚科学 接触皮膚炎	名古屋大学医学部附属病院分院 皮膚科長 早川 律子
J91-05	新しいDDS剤型としての高分子ミセルの設計と機能開発	高分子合成 DDS	東京理科大学 生命科学研究所助教授 片岡 一則
J91-06	化粧品素材としての利用が可能な乳酸菌の新規育種技術の開発	応用生物化学	早稲田大学理工学部専任講師 桐村 光太郎
J91-07	皮膚過敏症に対するマスト細胞の役割 — マスト細胞欠損動物を用いた検定法の開発 —	実験病理学	大阪大学医学部教授 北村 幸彦
J91-08	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	生薬、薬用 生物学	広島大学医学部助教授 神田 博史
J91-09	マウス悪性黒色種を用いたチロシナーゼ抑制因子の精製と応用	皮膚科学 メラニン色素	北里大学医学部講師 亀山 孝一郎
J91-10	界面活性剤を含む溶液混合系の相挙動と濡れの挙動に関する研究	界面化学 物理化学	九州大学理学部助教授 荒 殿 誠

管理番号	研究題目	分野	代表研究者
J91-11	超微粒子分散系の構造と物性及び自己制御コロイド系の開発	高分子物性 コロイド物性	京都大学工学部助手 松本孝芳
J91-12	接触光過敏症のマウスモデルを用いた化粧品による光アレルギーのスクリーニング及びサンクリーン効果の評価	光生物学 皮膚免疫	浜松医科大学教授 滝川雅浩
J91-13	香料に関する定量的解析	感覚生理学	北海道大学薬学部教授 栗原堅三
J91-14	メラニン生成の調節	分子生物学	東北大学医学部教授 柴原茂樹
J91-15	アルツハイマー型老年痴呆症、ぼけ症状を呈する人々への化粧品による情動活性化の研究	感情心理学 臨床心理学	同志社大学文学部教授 浜治世子
J91-16	ビタミンCと上皮成長因子によるヒト皮膚線維芽細胞の増殖とコラーゲン代謝調節機構の分子細胞生物学的研究	分子細胞生物学 医化学	東京医科歯科大学助手 畑隆一郎
J91-17	人工皮膚を用いた皮膚の形成機構及び皮膚の反応性試験に関する研究	細胞生物学	広島大学理学部教授 吉里勝利
J91-18	サンスクリーンの紫外線性表皮障害に対する防御作用の免疫生物学的研究	皮膚科学	京都大学医学部講師 古川福実
J91-19	ダイレクトスキンセンサーを用いて測定した皮膚と加齢の関係	老年病学 動脈硬化	慶應義塾大学医学部助手 本間聡起
J91-20	各種界面活性物質によるマクロ及びマイクロエマルジョンの調製並びに物性に関する物理化学的研究	応用界面化学	東京理科大学理工学部講師 阿部正彦
J91-21	『色白』の嗜好構造に関する一考察	心理学 色彩心理学 造形心理学	早稲田大学人間総合研究センター 齋藤美穂
J91-22	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	環境科学 毒性学	国立公衆衛生院労働衛生学部室長 市川勇
H90-01	培養細胞を用いた化学物質の安全性研究	毒性学 細胞生物学	ウプサラ大学毒性学部助教授 Björn Ekwall (受入責任者: 小野宏輔食品薬品安全センター)
H90-02	化粧品と環境に関する諸問題	化粧品科学	国立衛生試験所室長 木嶋敬二

(敬称略 受付順)

4. 会議等

理事会

第一回通常理事会

開催日時 平成3年6月6日(木)

開催場所 東京都千代田区丸の内 パレスホテル会議室

理事総数 12名 出席者 11名

監事 2名 出席者 2名

1. 報告事項

事務局より理事長の小林孝三郎氏が健康上の理由で欠席されているので寄付行為第18条2項の規定により専務理事が議長の代行を行う旨報告、全員の諒承を得た。

2. 決議事項

第一号議案 初年度(平成2年度)事業報告について

第二号議案 (平成2年度)収支決算書について

第三号議案 平成3年度助成金等交付対象者の募集方法に関する件

第四号議案 選考委員前厚生省薬務局審査課化粧品審査室長 平井俊樹氏の転出に伴う退任及び新たに手塚満氏を選考委員に選任する件について。

評議員会

第一回通常評議員会

開催日時・場所 理事会と同時開催につき理事会に同じ。

評議員総数 15名 出席者 9名

欠席数 6名

(うち委任状による表決権行使6名何れも各議案に賛成)

第二回通常理事会

開催日時 平成4年3月23日(月)

開催場所 東京都千代田区丸の内 パレスホテル会議室

理事総数 12名 出席者 7名

欠席数 4名

(うち委任状による表決権行使4名何れも各議案に賛成)

監事 2名 出席者 1名

欠席数 1名

表彰贈呈式

開催日時 平成3年11月18日（月）

開催場所 東京都渋谷区渋谷2-12-15 日本薬学会会長井記念館

その他

平成4年6月12日小田倉監事及び黒田監事から平成3年度の事業報告並びに収支計算書、正味財産増減計算書、貸借対照表及び証憑書類、帳簿等の監査を受けいづれも適法正確である旨、報告があった。

事業報告書

(自 平成4年4月1日 至 平成5年3月31日)

1. 3年度事業(平成4年度)

昨年に引き続き以下のような事業を計画し、実行しました。

自然科学や社会科学の各分野にわたり、ひろくかかわりをもつ化粧品を総合的に体系化することを目的として

- ①化粧品学の調査・研究に関して顕著な成績をあげた研究者や機関に対して功労金をもってこれを表彰する。(1件あたり100万円)
- ②皮膚の生理機能や老化機構の解明, 美容に役立つ素材の研究等化粧品学に関連した生命科学, その他の分野の調査・研究に対する助成を行う。
(1件あたり200万円および100万円)
- ③化粧品学の調査・研究にたずさわる研究者の海外派遣や招聘に対して資金援助を行う。(1件あたり50万円)

2. 募集及び選考の経過

本年度の各事業につきましては平成4年5月11日より募集を開始し同4年7月20日をもって締切りました。本年度も一般公募を原則とし全国約120カ所の大学・病院・研究機関等にダイレクトメールで推薦書を送付するほか8誌の関係学術雑誌にも広告し, その結果多数の応募をいただきました。

応募者の研究分野が多岐にわたった為, 選考委員会に4分科会を設けそれぞれにおいて予備選考を行い平成4年10月1日(木)パレスホテルにおいて本選考委員会を開催し受賞候補者を決定し11月末理事長・理事・評議員の諒承を得て受賞者を最終決定しました。

3. 第3回功労賞・研究助成等の結果

以下のとおり合計20件が決定され功労金200万円, 研究助成金2,400万円, 国際交流援助金250万円が交付されました。

功労表彰(小林孝三郎賞)	2件
研究助成	13件
国際交流援助	※ 5件

※国際交流援助については11月以降3件の追加がなされて合計5件になった。

第3回 功労表彰・研究助成を受けられたかたがた

(K-功労表彰・J-研究助成・H-国際交流援助)

管理番号	研究題目	分野	代表研究者
K92-01	化粧品などに多く使われる化学物質による光線接触ヒフ炎の提唱とその解明	皮膚科学	信州大学医学部名誉教授 高瀬吉雄 (日本皮膚科学会推薦)
K92-02	複合脂質と生体反応	生化学	帝京大学薬学部教授 野島庄七 (日本薬学会推薦)
J92-01	ヒトリゾチームタンパク質を分泌する酵母突然変異体を用いた素材生産の効率化研究	分子生物学 遺伝子	広島大学理学部助手 鈴木克周
J92-02	光熱変換分光法による薬物の組織及び細胞への非侵襲吸収計測法の開発	分析科学	東京大学工学部教授 澤田嗣郎
J92-03	化粧品の紫外線照射による光酸化メカニズムの研究	物理化学 界面科学	明星大学理工学部教授 日高久夫
J92-04	水素添加大豆リン脂質を用いた油性ゲル、水性ゲルの保湿作用に関する研究	薬学	昭和薬科大学薬学部講師 藤井まき子
J92-05	アスパラギン酸プロテアーゼ類の蛋白工学的改変によるケラチナーゼの開発	蛋白工学 生化学	東京大学理学部助手 井上英史
J92-06	神経ペプチドによる皮膚炎症反応の成立機序とその特異的制御	内科学 アレルギー学	千葉大学医学部助手 岩本逸夫
J92-07	皮膚の機能と脂質代謝に関する基礎的研究	生化学	新潟大学医学部教授 小野輝夫
J92-08	転移因子を用いたアントシアニン色素合成遺伝子と発現調節因子遺伝子の解析	分子遺伝学 分子生物学	東京理科大学基礎工学部教授 飯田滋

管理番号	研究題目	分野	代表研究者
J92-09	モノクローナル抗体を用いた紫外線誘発DNA損傷の定量とメラニン色素のサンスクリーン効果の実験的証明	皮膚科学	奈良県立医科大学大学院生 小林 信彦
J92-10	皮膚老化における染色体構造の変化と遺伝子修復機能に関する研究	細胞生理学	理化学研究所主任研究員 花岡 文雄
J92-11	アスコルビン酸2-グルコシドの生物学的有用性研究 -経皮吸収によるビタミンC活性発現の評価-	免疫薬理学	岡山大学薬学部教授 山本 格
Js-92-01	病院看護における化粧品に関する研究	基礎看護学	埼玉県立衛生短期大学教授 大河原千鶴子
Js-92-02	高齢者のおしゃれ行動とその評価に関する研究	人間行動科学	北海道教育大学教育学部助教授 藤 森 立 男
H92-01	マン・マシン・コミュニケーションの研究	心理学 人間工学	信州短期大学人文学部講師 落 合 勲
H92-02	天疱瘡抗原とデスモソーム類天疱瘡抗原の解析	皮膚科学 皮膚免疫学 生化学	慶應義塾大学医学部講師 橋 本 隆
H92-03	化粧品と環境に関する諸問題及び化粧品の安全性試験代替法に関する協議	化粧品 行政	厚生省薬務局係長 井 尻 潤
H92-04	同 上	化粧品 行政	厚生省薬務局化粧品基準調査官 飯 田 勝 章
H92-05	欧米諸国及び日本の化粧品規制の現状把握 (第4回化粧品規制に関する国際会議参加)	化粧品 行政	タイ国厚生省薬務局局长 Morakot Kornkasem (受入責任者: 日本化粧品工業連合会 有本 享)

(敬称略 受付順)

4. 会議等

理事会

第一回通常理事会

開催日時 平成4年11月25日(水)午後3時

開催場所 東京都渋谷区渋谷2-12-15 日本薬学会長井記念館

理事総数 12名 出席 10名 委任状出席 2名

監事 2名 出席 1名

決議事項1 第3回表彰・助成金交付者の決定について
表彰等の候補者について審議が行われ前掲の如く決定された。

決議事項2 平成5年度事業計画及び予算が審議、決定された。

決議事項3 選考委員の選任について

手塚委員の退任及び新委員3名の追加就任が提案され全員一致で承認された。

追加新任選考委員

西沢元仁 二木鋭雄 増山英太郎

決議事項4 寄附行為第2条の変更について

財団事務所の移転の提案がなされ全員一致で承認。

(東京都中央区八丁堀1-9-9 → 中央区銀座3-5-12)

報告事項 平成4年7月27日 東京都文京区本駒込6-19-3

小林孝三郎氏より(株)コーセーの株式20万株の寄附を受け基本財産として1,000万円(額面1株50円)を計上した。
配当金を運用財産として使用する予定。

評議員会

第一回通常評議員会

開催日時・場所・議題ともに理事会に同じ。

評議員総数 14名 出席 6名 委任状出席 8名

選考委員会

第一回選考委員会

開催日時 平成4年4月22日(水)

開催場所 東京都千代田区丸の内1-1-1 パレスホテル会議室

選考委員総数 10名 出席 8名 欠席 2名

決議事項 平成4年度研究助成選考方式について
奨励研究の設置
分科会の設置について
功労表彰の選考方式について
国際交流の選考方式について

分科会Ⅰ

開催日時 平成4年9月8日(火)午後5時
開催場所 東京都港区虎の門1-8-7 富田屋会議室
決議事項 素材・物性にかかわる分野の選考

分科会Ⅱ

開催日時 平成4年9月18日(金)午後5時30分
開催場所 東京都千代田区丸の内1-9-1 ルビーホール会議室
決議事項 生体及び安全性にかかわる分野の選考

分科会Ⅲ

開催日時 平成4年9月28日(月)午後5時
開催場所 東京都新宿区西新宿6-6-2 東京ヒルトンホテル会議室
決議事項 精神・文化にかかわる分野の選考

本選考委員会

開催日時 平成4年10月1日(木)午後5時30分
開催場所 東京都千代田区丸の内1-1-1 パレスホテル会議室
選考委員総数 12名 出席 11名 欠席 1名
決議事項 分科会の選考結果を持ち寄り慎重な討議を重ねた結果
受賞候補者を決定した。

選考委員会(平成5年第1回)

開催日時 平成5年3月5日(金)午後5時30分
開催場所 東京都千代田区丸の内1-9-1 ルビーホール会議室
選考委員総数 11名 出席 9名 欠席 2名
決議事項 平成5年度研究助成の選考方式について
報告事項 平成5年度の事業計画及び予算について

表彰贈呈式

開催日時 平成4年11月25日(水)午後4時

開催場所 東京都渋谷区渋谷2-12-15 日本薬学会会長井記念館

その他

平成5年5月18日小田倉監事及び黒田監事から平成4年度の事業報告並びに収支計算書、正味財産増減計算書、貸借対照表及び証憑種類、帳簿等の監査を受け、いずれも適法正確である旨報告があった。

以 上

平成2年7月5日

財団設立趣意書

厚生大臣
津島雄二 殿

財団法人 コスメトロジー研究振興財団
設立者 小林 孝三郎

我が国の化粧品に関連する科学技術の進歩はめざましく、今日では皮膚科学や健康・衛生の分野からバイオテクノロジーやライフサイエンスという科学技術の最先端にまで広がっております。

化粧品の役割や機能も、単に皮膚を清潔に保ったり、身だしなみとしての粧いということにとどまらず、自己表現の手段や精神的充足感といった方向へのウエイトも高くなってまいりました。

一方、「日本の将来推計人口」によると、60歳以上の高齢者が年々増加し、20年後には現在の倍となって総人口の30%を占めるといわれています。産業の各分野や諸研究機関において高齢化社会への対応が検討されており、化粧品分野においても老化機構の研究、皮膚生理機能の解明による皮膚恒常性(ホメオスターシス)、安全性等に関する調査・研究がなされています。

現在、経済大国日本はかつてない繁栄期にあります。真に豊かな国民生活を実現していくためには、心の豊かさを大切にしていくことが必要であり、また、今後本格的な高齢化社会の到来を迎え、国民のひとりひとりが心身ともに健全で、長い人生を生きがいを持って暮らしていけることが何よりも重要になってきております。

このような時代に、人々の意識の変化や高齢化に対応したコスメトロジー(化粧品学)の研究を積極的に振興していくことは、国民の生活を美しく豊かなものとしていくために大きな意義を持つと考えられ、コスメトロジーに関する調査・研究およびその助成等を行うことを目的とした当財団が設立されました。

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お役に立てることを念願して、積極的な事業活動を展開してまいりたいと思います。

財団法人 コスメトロジー研究振興財団寄附行為

第1章 総 則

(名 称)

第1条 本財団は、財団法人 コスメトロジー研究振興財団と称する。

(事務所)

第2条 本財団は、事務所を東京都中央区銀座3丁目5番12号に置く。

(目 的)

第3条 本財団は、コスメトロジー（化粧品学）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とする。

(事 業)

第4条 本財団は、前条の目的を達成するために次の事業を行う。

- (1) 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
- (2) 皮膚の生理機能や老化機構の解明、美容に役立つ素材の研究等コスメトロジーに関連した生命科学その他の分野の調査研究に対する助成
- (3) (1)及び(2)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
- (4) コスメトロジーに関する各種資料の収集及び普及
- (5) その他財団の目的を達成するために必要な事業

第2章 財産及び会計

(財産の構成)

第5条 本財団の財産は、次に掲げるものをもって構成する。

- (1) 設立当初の財産目録に記載された財産
- (2) 寄附金品
- (3) 財産から生じる収入
- (4) 事業に伴う収入
- (5) その他の収入

(財産の種別)

第6条 本財団の財産は、基本財産及び運用財産の2種とする。

- 2 基本財産は、次に掲げるものをもって構成する。
 - (1) 設立当初の財産目録中、基本財産の部に記載された財産
 - (2) 設立後に基本財産とすることを指定して寄附された財産
 - (3) 理事会において運用財産から基本財産に繰り入れることを議決した財産

- 3 運用財産は、基本財産以外の財産とする。

(財産の管理)

第7条 本財団の財産は、理事長が管理し、その方法は、理事会の議決を経て、理事長が別に定める。

- 2 基本財産のうち現金は、郵便官署若しくは確実な金融機関に預け入れ、確実な信託会社に信託し、又は国債、公債等の確実な有価証券にかえて保管しなければならない。

(基本財産の処分の制限)

第8条 基本財産は、これを処分し、又は担保に供することができない。ただし、本財団の事業遂行上やむを得ない理由があるときは、理事会及び評議員会においてそれぞれ理事現在数及び評議員現在数の4分の3以上の議決を経、かつ、厚生大臣の承認を得てその一部を処分し、又は担保に供することができる。

(経費の支弁)

第9条 本財団の経費は、運用財産をもって支弁する。

(事業計画及び予算)

第10条 本財団の事業計画及びこれに伴う予算に関する書類は、理事長が作成し、毎会計年度開始前に、理事会及び評議員会においてそれぞれ理事現在数及び評議員現在数の3分の2以上の議決を経て、厚生大臣に届け出なければならない。これらを変更する場合も同様とする。

(暫定予算)

第11条 前条の規定にかかわらず、やむを得ない理由により予算が成立しないときは、理事長は、理事会の議決を経て、予算成立の日まで前年度の予算に準じ、収入支出することができる。

- 2 前項の収入支出は、新たに成立した予算の収入支出とみなす。

(事業報告及び決算)

第12条 本財団の事業報告及び決算は、毎会計年度終了後、理事長が事業報告書、収支計算書、正味財産増減計算書、貸借対照表及び財産目録等として作成し、監事の監査を受け、理事会及び評議員会においてそれぞれ理事現在数及び評議員現在数の3分の2以上の議決を経て、財産総額に変更が生じた場合には、2週間以内に登記し、登記簿の謄本を添え、その会計年度終了後3ヶ月以内に厚生大臣に報告しなければならない。

(長期借入金)

第13条 本財団が資金の借入をしようとするときは、その会計年度の収入をもって償還する短期借入金を除き、理事会及び評議員会において理事現在数及び評議員現在数の3分の2以上の議決を経、かつ、厚生大臣の承認を得なければならない。

(義務の負担及び権利の放棄)

第14条 予算で定めるものを除き、本財団が新たに義務を負担し、又は権利を放棄しようとするときは、理事会及び評議員会において理事現在数及び評議員現在数の3分の2以上の議決を経、かつ、厚生大臣の承認を受けなければならない。

(会計年度)

第15条 本財団の会計年度は、毎年4月1日に始まり、翌年3月31日に終わる。

第3章 役員

(種類及び定数)

第16条 本財団に、次の役員をおく。

理事 10名以上15名以内
監事 2名

- 2 理事のうち1名を理事長とする。また、理事の中から専務理事及び常務理事を各1名置くことができるものとする。

(選任等)

第17条 理事及び監事は、評議員会で選任する。

- 2 理事は、互選により理事長を選任する。また、必要に応じて専務理事及び常務理事を互選により選任する。
- 3 理事、監事及び評議員は、相互にこれを兼ねることはできない。
- 4 理事のいずれか1名とその親族その他特別の関係にある者の合計数は、理事総数の3分の1を超えてはならない。
- 5 監事は、相互に親族その他特別の関係にある者であってはならない。
- 6 理事に異動があったときは、2週間以内に登記し、登記簿の謄本を添え、遅滞なくその旨を厚生大臣に届け出なければならない。
- 7 監事に異動があったときは、遅滞なくその旨を厚生大臣に届け出なければならない。

(職務)

第18条 理事長は、本財団を代表し、その業務を総理する。

- 2 専務理事(専務理事が欠員の場合は常務理事とする。)は、理事長を補佐して事務を処理し、理事長に事故があるときは又は理事長が欠けたときは、その職務を代行する。
- 3 理事は、理事会を構成し、この寄附行為に定めるところにより本財団の業務を議決し、執行する。
- 4 監事は、次に掲げる職務を行う。

- (1) 財産及び会計を監査すること
- (2) 理事の業務執行状況を監査すること
- (3) 財産、会計及び業務の執行について、不正の事実を発見したときは、これを理事会及び評議員会並びに厚生大臣に報告すること
- (4) 前号の報告をするため必要があるときは、理事会及び評議員会の招集を請求し、又は招集すること

(任期)

第19条 役員の任期は、2年とする。ただし、再任を妨げない。

- 2 補欠又は増員により選任された役員の任期は、前任者又は現任者の残任期間とする。
- 3 役員は、辞任又は任期満了の場合においても、後任者が就任するまでは、その職務を行わなければならない。

(解任)

第20条 役員が次のいずれかに該当するときは、理事会及び評議員会において、それぞれ理事現在数及び評議員現在数の3分の2以上の議決によりこれを解任することができる。

- (1) 心身の故障のため職務の執行に堪えないと認められるとき
 - (2) 職務上の業務違反その他役員たるにふさわしくない行為があると認められるとき
- 2 前項の場合、理事会及び評議員会において、議決の前に、その役員に弁明の機会を与えなければならない。

(報酬)

第21条 役員は無給とする。ただし、常勤の役員は有給とすることができる。

- 2 役員には費用を弁償することができる。
- 3 前2項の報酬及び弁償費用に関し必要な事項は、理事会の議決を経て、理事長が別に定める。

第4章 理事会

(構成)

第22条 理事会は、理事をもって構成する。

(権能)

第23条 理事会は、この寄附行為に別に定めるもののほか、本財団の業務に関する重要な事項を議決し、執行する。

(種類及び開催)

第24条 理事会は、通常理事会と臨時理事会の2種とする。

- 2 通常理事会は、毎年2回開催する。

- 3 臨時理事会は、次のいずれかに該当する場合に開催する。
 - (1) 理事長が必要と認めるとき
 - (2) 理事現在数の3分の1以上から会議の目的である事項を記載した書面をもって招集の請求があったとき
 - (3) 第18条第4項第4号の規定により、監事から招集の請求があったとき

(招 集)

第25条 理事会は、理事長が招集する。

- 2 理事長は、前条第3項第2号及び第3号に該当する場合は、その日から14日以内に臨時理事会を招集しなければならない。
- 3 理事会を招集するときは、理事に対し、会議の日時、場所、目的及び審議事項を記載した文書をもって、少なくとも7日前までに通知しなければならない。ただし、理事全員の承諾があるとき又は緊急を要するときは、この日を短縮することができる。

(議 長)

第26条 理事会の議長は、理事長がこれに当たる。

(定足数)

第27条 理事会は、理事現在数の3分の2以上の出席がなければ開催し、議決することができない。

(議 決)

第28条 理事会の議事は、この寄附行為に定めるもののほか、出席した理事の過半数をもって決し、可否同数の場合は、議長の決するところによる。

(書面表決等)

第29条 やむ得ない理由のため理事会に出席できない理事は、予め通知された事項について書面をもって表決し、又は他の理事を代理人として表決を委任することができる。

- 2 前項の場合における前2条の規定の適用については、その理事は、出席したものとみなす。

(議事録)

第30条 理事会の議事については、次の事項を記載した議事録を作成し、これを保存しなければならない。

- (1) 理事会の日時及び場所
- (2) 理事の現在数
- (3) 出席した理事の数及び氏名（書面表決者及び表決委任者の場合にあっては、その旨を付記すること）
- (4) 審議事項及び議決事項
- (5) 議事の経過の概要及びその結果
- (6) 議事録署名人の選任に関する事項

- 2 議事録には、議長のほか、出席理事の中からその会議によって選出された議事録署名人2人以上が、署名押印しなければならない。

第5章 評議員及び評議員会

(評議員)

第31条 本財団に、評議員10名以上20名以内を置く。

- 2 評議員現在数は、理事現在数を下回らないものとする。
- 3 評議員は、理事会で選出し、理事長がこれを委嘱する。
- 4 評議員は、役員を兼ねることができない。
- 5 役員いずれか1名と親族その他特殊の関係にある評議員の合計数又は評議員のいずれか1名及びその親族その他特殊の関係にある評議員の合計数は、評議員現在数の3分の1を超えてはならない。
- 6 評議員には、第17条（選任等）第4項、第19条（任期）、第20条（解任）及び第21条（報酬）（第21条第1項ただし書を除く。）の規定を準用する。この場合において、これらの条文中「理事」及び「役員」とあるのは「評議員」と読み替えるものとする。

(評議員会)

第32条 評議員会は、評議員をもって構成する。

- 2 評議員会は、理事長が招集する。
- 3 評議員会は、通常評議員会及び臨時評議員会とする。
- 4 通常評議員会は、毎年2回これを招集する。
- 5 臨時評議員会は、次のいずれかに該当する場合に開催する。
 - (1) 理事長が必要と認めたとき。
 - (2) 評議員現在数の3分の1以上から会議の目的である事項を記載した書面をもって招集の請求があったとき
 - (3) 第18条第4項第4号の規定により監事から招集の請求があったとき
- 6 評議員会を招集するときは、評議員に対し、会議の日時、場所、目的及び審議事項を記載した文書をもって少なくとも7日前までに通知しなければならない。ただし、評議員全員の承諾があるとき又は緊急を要するときは、この日を短縮することができる。
- 7 評議員会の議長は、評議員会において互選する。
- 8 評議員会は、この寄附行為に定めるもののほか、理事長の諮問に応じ、必要な事項について審議し、助言する。
- 9 評議員会には、第27条から第30条（定足数、議決、書面表決等、議事録）までの規定を準用する。この場合において、これらの条文中「理事会」及び「理事」とあるのは、それぞれ「評議員会」及び「評議員」と読み替えるものとする。

- 10 前各項に定めるもののほか、評議員会の運営に関し必要な事項は、理事会で定める。

第6章 選考委員会

(助成金交付規程)

- 第33条 本財団は、第4条に基づく助成金等を交付するため、理事会及び評議員会において、それぞれ理事現在数及び評議員現在数の3分の2以上の議決を経て、別に助成金交付規程を定める。
- 2 助成金交付規程の変更は、理事会及び評議員会において、それぞれ理事現在数及び評議員現在数の3分の2以上の議決を要する。

(選考委員会)

- 第34条 本財団には、第4条に規定する助成の対象となる者を選考するため、選考委員会を置く。
- 2 選考委員会は、10名以上15名以内の委員をもって構成する。
- 3 委員は、学識経験のある者のうちから理事会で選出し、理事長が委嘱する。ただし、本財団の役員は、2名を超えてこれに当ててはならない。
- 4 委員の任期は、2年とする。ただし再任を妨げない。
- 5 委員には、第17条(選任等)第4項の規定を準用する。この場合において、同項中「理事」とあるのは「選考委員」と読み替えるものとする。
- 6 前各項に定めるもののほか、選考委員会及び選考委員に関し必要な事項は、理事会で定める。

第7章 事務局

(設置)

- 第35条 本財団の事務を処理するため、事務局を置く。
- 2 事務局には、事務局長及び所要の職員を置く。
- 3 事務局長及び職員は、理事長が任免する。
- 4 事務局の組織及び運営に関し必要な事項は、理事会の議決を経て理事長が定める。

(備付け書類及び帳簿)

- 第36条 本財団の主たる事務所に、民法第51条に規定するもののほか、次に掲げる書類及び帳簿を備えなければならない。
- (1) 寄附行為
- (2) 理事、監事、評議員及び職員の名簿並びに履歴書
- (3) 許可、認可等及び登記に関する書類

- (4) 寄附行為に定める機関の議事に関する書類
 - (5) 収入、支出に関する帳簿及び証拠書類
 - (6) 財産及び負債の状況を示す書類
 - (7) その他必要な書類及び帳簿
- 2 前項の書類は、永年保存しなければならない。ただし、前項第5号及び第6号の書類及び帳簿は10年以上、第7号の書類及び帳簿は3年以上保存するものとする。

第8章 寄附行為の変更及び解散

(寄附行為の変更)

第37条 この寄附行為は、理事会及び評議員会において、それぞれ理事現在数及び評議員現在数の4分の3以上の議決を経、厚生大臣の認可を得なければ変更することができない。

(解 散)

第38条 本財団は、民法第68条第1項第2号、第3号及び第4号の規定によるほか、理事会及び評議員会において、それぞれ理事現在数及び評議員現在数の4分の3以上の議決を経、かつ、厚生大臣の認可があったとき解散することができる。

- 2 民法第71条後段により、正当な理由なくして引き続き3年以上事業を行わないことにより設立許可を取り消される場合の事業とは、寄附行為第4条第1号から第4号までに掲げる事業とする。

(残余財産の処分)

第39条 本財団が解散のときに有する残余財産は、理事会及び評議員会において、それぞれ理事現在数及び評議員現在数の4分の3以上の議決を経、かつ、厚生大臣の許可を得て、国若しくは地方公共団体又は本財団と類似の目的を有する公益法人に寄附するものとする。

第9章 雑 則

(委 任)

第40条 この寄附行為に定めるもののほか、本財団の運営に関し必要な事項は、理事会の議決を経て、理事長が別に定める。

附 則

- 1 この寄附行為は、本財団の設立許可があった日から施行する。
- 2 本財団の設立当初の役員は、第17条第1項及び第2項の規定にかかわらず設立者の定めるところによるものとし、その任期は第19条第1項の規定にかかわらず平成4年3月31日までと

する。

- 3 本財団の設立初年度及び次年度の事業計画及び収支予算は、第10条の規定にかかわらず設立者の定めるところによる。
- 4 本財団の設立初年度の会計年度は、第15条の規定にかかわらず設立許可のあった日から平成3年3月31日までとする。

助成金等交付規程

第 1 章 総 則

(目 的)

第 1 条 本規程は、財団法人 コスメトロジー研究振興財団(以下「本財団」という。)寄付行為第 4 条 1 号から第 4 号に掲げる事業に係る助成金及び同条第 5 条に掲げる事業に係る功労金(以下「助成金等」という。)に関する交付及び交付後の管理を公正かつ厳正に行うため、本財団寄付行為第 33 条第 1 項の規程に基づいて定めるものである。

(助成金等の交付対象)

第 2 条 助成金等は、本財団寄付行為第 3 条に定める目的にかなう研究を行う研究機関又は研究者に、これを交付する。

(交付の対象となる経費)

第 3 条 助成金等の交付の対象となる経費は、主として、研究に直接要する物品の購入費用、その他研究推進に必要な費用又は渡航費用・滞在費・海外留学・海外視察及び外国人研究者の招聘に直接要する費用とする。

第 2 章 助成金等交付手続

(募集手続)

第 4 条 助成金等の交付対象者(以下「受給者」という。)を選出するため、毎年 1 回公開された専門誌に広告を掲載して、申請者を募集するほか、学会、大学等の外部機関に対し、推薦を依頼することができる。

- 2 募集方法、募集人員、募集時期、推薦依頼に関する事項、交付金額等、受給者選出のために必要な事項は、理事会で定める。

(選 考)

第 5 条 助成金等の受給者の選考は、募集締切日後遅滞なく本財団寄付行為第 34 条に定める選考委員会(以下「委員会」という。)が公正かつ厳正に、これを行うものとする。

(選出及び結果の発表)

第 6 条 委員会において受給者の選考手続が終了した場合、理事会及び評議員会は、委員会の選考結果に基づき、受給者及び交付金額を決定し、理事長は、その結果を第 4 条第 1 項の広告に用いたのと同じ専門誌に発表するとともに、決定された受給者にその旨を通知する。学会、大学等外部機関に対し申請者の推薦を依頼した場合は、当該機関に対してもその結果を通知するものとする。

第3章 選考委員会の運営

(招集)

第7条 委員会は、理事長がこれを招集する。

- 2 委員会を招集するには、会日の1週間前までに各委員に対して会議の内容、日時、場所を明記した書面をもって、その旨を通知するものとする。

(委員長)

第8条 委員会の委員長は、委員の互選で定めるものとする。

(定足数及び議決要件)

第9条 委員会は、過半数の委員の出席により成立し、委員会の決議は、出席委員の3分の2以上の賛成によりこれをなすものとする。

(議事録)

第10条 委員会の議事については、その経過の要領及び結果を記載した議事録を作成し、委員長が記名捺印するものとする。

(選考結果の報告)

第11条 委員長は、理事長に対し、前条の議事録を添えて選考結果を報告するものとする。

第4章 受給者の義務

(収支の報告等)

第12条 第6条に基づき決定された受給者は、助成金等の収支に関する書類を整理保管し、本財団の会計年度末日経過後遅滞なく、収支決算報告書及び研究経過報告書等を作成し、理事長に提出しなければならない。

(研究題目の変更又は研究等の中止)

第13条 受給者が助成金等の交付の対象者となっている研究題目等に関し重要な変更をしようとするとき、又は研究等を中止しようとするときは、その旨を理事長に報告し、その承認を得なければならない。

(研究の報告)

第14条 受給者は、研究結果等を理事会に書面をもって報告しなければならない。

- 2 本財団は、第12条の経過報告書及び前項の報告書の全部又は一部につき、刊行物その他の適宜の方法をもって発表することができる。

(研究等の発表)

第15条 受給者が研究結果等を発表する場合は、本財団から助成金等の交付を受けて為したものであることを明らかにしなければならない。

- 2 受給者が研究結果等を刊行物に掲載した場合は、その写しを添付して、理事長に報告しなければならない。

(その他の業務)

第16条 受給者は、その選出された意義を十分認識し、研究結果等をあげるよう最大の努力を払わなければならない。

第5章 その他

(取消し又は返還要求)

第17条 理事長は、受給者が次の各号のいずれかに該当すると認めた場合は、理事会及び評議員会の議決を経て、助成金等の交付決定の取消し、又は返還を求めることができる。

- (1) 助成金等の交付による研究等を中止したい旨申し出のあったとき
- (2) 本規程に違反のあったとき
- (3) その他受給者又は受賞者としてふさわしくない行為があったとき、又は特別な事情があったとき

(規程の変更)

第18条 本規程の変更は、寄付行為第33条第2項によるものとする。

同条の規程による変更決議があった場合は、理事長は、その旨を厚生大臣に届け出るものとする。

附 則

本規程は、平成2年7月5日から施行する。

平成5年4月1日現在

役員

理事長	小林 孝三郎	(株)コーセー代表取締役会長
専務理事	佐藤 大正	
理事	磯邊 律男	(株)博報堂代表取締役社長
理事	宇佐美 昭次	早稲田大学理工学部教授
理事	大澤 利昭	東京大学名誉教授
理事	小林 禮次郎	(株)コーセー代表取締役社長
理事	菅原 正文	高砂香料工業(株)代表取締役社長
理事	高山 富士雄	安田信託銀行(株)取締役会長
理事	中村 芳郎	慶応義塾大学医学部教授
理事	西川 武二	慶応義塾大学医学部教授
理事	花輪 隆昭	環境衛生金融公庫理事
理事	宮澤 香	東京化粧品工業会顧問
監事	小田倉 正典	公認会計士
監事	黒田 節哉	弁護士
評議員	上野 芳夫	東京理科大学薬学部教授
評議員	大隈 孝一	名城大学理事長
評議員	緒方 宏泰	明治薬科大学教授
評議員	北原 文雄	東京理科大学工学部教授
評議員	近藤 保	東京理科大学薬学部教授
評議員	佐々 隆之	内科医師
評議員	高橋 久	帝京大学医学部教授
評議員	中村 桂子	早稲田大学人間科学部教授
評議員	野呂 影勇	早稲田大学人間科学部教授
評議員	廣部 雅昭	東京大学薬学部教授
評議員	宮崎 榮三	東京工業大学理学部教授
評議員	山崎 幹夫	千葉大学薬学部教授
評議員	山本 晴彦	神奈川大学理学部教授
評議員	渡辺 徹	日本薬剤師会専務理事

*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 東京都中央区銀座三丁目5番12号

電話 東京03(3564)6731

コスメトロジー研究報告 Vol.1 '93

非売品

1993年9月1日発行

編者 佐藤大正, 宮川安正

発行 財団法人 コスメトロジー研究振興財団
〒104 東京都中央区銀座三丁目5番12号
電話 東京 03 (3564) 6731

製作 アサヒメディカル
〒103 東京都中央区日本橋二丁目9番5号
電話 東京 03 (3271) 1571(代表)

印刷 セイブン企画

©1993

不許複製 禁無断転載