

## ごあいさつ

当財団発足以来、早くも4年の歳月が流れました。

この間、化粧品を取り巻く諸環境は大きく様変わりしています。化粧品が担う社会的及び文化的側面の解明が進み、また同時に皮膚科学領域の知見が急速に蓄積されつつあります。一方化粧品産業界においては商品の高機能化、国際化のうねりの中で、世界的な規模で、戦略建て直しが模索されています。

このような状況の下、化粧品の今ある姿を明らかにし、今後あるべき姿を指し示す Cosmetology（化粧品学）の構築を目指す当財団の着実な事業活動は、多くの人々の賛同を得ることができて、順調に推移して参りました。

なかんずく、既成の学問領域にこだわらず、境界領域の研究課題を広く公募しての研究助成活動は、そのユニークさ、選考の適切さなどで、関係各界の注目を集めており、Cosmetologyの進展に寄与するところ大であるとの評価を得ております。

さて、この度、昨年に引き続き、上記助成研究課題に関する平成6年度報告をまとめ、皆様にお届け致します。参考にして頂ければ幸いです。

私どもは、皆様方にご理解をいただきながら、Cosmetologyの更なる発展を願い、諸活動を強力に推進していく所存であります。今までも増して、当財団の活動を温かく見守って下さいますようお願い申し上げます。

平成6年8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. 素材, 物性に関する分野

- ・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 ..... 2  
国立衛生試験所 武田 明治
- ・新しいDDS剤型としての高分子ミセルの設計と機能開発 ..... 10  
東京理科大学 片岡 一則
- ・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 ..... 18  
早稲田大学理工学部 桐村光太郎
- ・水-ノナン-エチレングリコールモノブチルエーテルからなる  
3成分2相系の相挙動に関する熱力学的考察 ..... 23  
九州大学理学部 荒殿 誠
- ・各種界面活性物質によるマクロおよ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 ..... 29  
東京理科大学理工学部 阿部 正彦

## II. 生体作用, 安全性に関する分野

- ・太田母斑に対するQスイッチ・ルビーレーザーの治療効果 ..... 44  
帝京大学医学部 渡辺 晋一
- ・細胞内脂質輸送機構の解析  
-細胞内ビタミンE特異的輸送タンパク質の構造と意義- ..... 50  
東京大学薬学部 新井 洋由
- ・皮膚線維芽細胞とガン細胞の細胞間相互作用による  
マトリックス分解酵素の産生 ..... 57  
東京薬科大学 森 陽
- ・パッチテスト結果のコンピューター処理システム開発研究 ..... 66  
名古屋大学医学部附属病院分院 早川 律子
- ・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- ..... 72  
大阪大学医学部 北村 幸彦
- ・チロジナーゼ抑制因子の精製と応用 ..... 77  
北里研究所メディカルセンター病院 亀山孝一郎
- ・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  
スクリーニングおよびサンスクリーンの効果の評価 ..... 82  
浜松医科大学 滝川 雅浩

・人工皮膚を用いた皮膚の形成機構に関する研究 .....	86
	広島大学理学部 吉里 勝利
・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 .....	91
	浜松医科大学 古川 福実
・皮溝と加齢の関係-Direct Skin Sensorを用いた検討- .....	96
	慶應義塾大学医学部 本間 聡起
・開放型セルを用いたレーザー光音響法による経皮吸収測定 .....	103
	東京大学工学部 澤田 嗣郎
・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 .....	107
	千葉大学医学部 岩本 逸夫
・皮膚の機能と脂質代謝に関する基礎的研究 .....	115
	新潟大学医学部 小野 輝夫
・転移因子を用いたアントシアニン色素生成遺伝子と その発現調節因子遺伝子の解析 .....	119
	東京理科大学基礎工学部 飯田 滋
・皮膚の老化における染色体構造の変化と遺伝子修復機構に関する研究 .....	125
	理化学研究所 花岡 文雄

■ 記念講演

平成5年度記念講演 酸素分子の二重性格性について .....	131
	東京大学薬学部 廣部 雅昭

■ コスメトロジー研究雑感 .....

141

■ 付 録

平成5年度事業報告 .....	151
役員一覧 .....	157
表彰・助成対象者一覧 .....	158

# 研究報告

---



- I 素材、物性に関する分野
- II 生体作用、安全性に関する分野



## I. 素材, 物性に関する分野

# 新製剤法及び新素材を用いた化粧品の品質確保に関する研究

国立衛生試験所

武田 明治

国立衛生試験所 東京都立衛生研究所 愛知県衛生研究所 神奈川県衛生研究所 埼玉県衛生研究所  
木嶋敬二 鈴木助治 河村典久 堀田佳哉・岸美智子 石野正蔵

Functional cosmetics make the best use of recent technical advancement in such field as formulating technology, new materials and biotechnology.

We want establish routine analysis for quality and prossing control.

In this study, a method has been developed for the simple and rapid analysis of anionic preservatives such as p-hydroxybenzoic acid esters, sodium dehydroacetic acid and sodium sorbic acid in cosmetic products by high performance liquid chromatography (HPLC). These cosmetic products are foundation contain nylon fine powder, titanium dioxide fine power as a new materials, rinse in shampoo by new formulating technology and eye liner.

The present method consists of two steps ; firstly extraction and cleaning up and secondly, quantification by HPLC.

HPLC conditions ; Column, ODS silica gel column Mobile phase, ① 0.002 M cetyltrimethylammonium chloride/0.05 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{MeOH} \cdot \text{CH}_3\text{CN}$  (50 : 35 : 15) (pH 5.2 with  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) ②  $\text{MeOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$  (60 : 40)

The present method was applicable to the determination of anionic preservatives in commercial products without interference of other cosmetic ingredients.

## 1. 緒 言

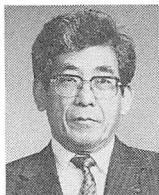
これまで化粧品は製品の安定性、使用性、製造技術および品質管理などが中心であった時代、低感作性原料など安全性が重要視された時代を経て現在は技術革新と平行して高令化社会を迎えるにあたり、老化制御に対する期待など化粧品の有用性の問題がクローズアップされてきた。

いわゆる機能性化粧品といわれるものは、生物学、物理学、薬学、心理学など多くの学問分野が関与したライフサイエンスを基盤としてバイオテ

クノロジーやファインケミストリーによる新素材の開発研究、更にこれらを取り入れた新製剤技術の開発によって行われているものである。これらの新素材を含有又は新製剤技術によって製造された化粧品中の添加成分の分析法および添加成分と基剤との相互作用を考慮した現象を追求し、目的に合った分析法を確立し、化粧品の品質確保に寄与することを目的として実験を行った。

本研究においてはこれら化粧品のうち、新原料として微粒子酸化チタン、微粒子ナイロンパウダー等、新製剤としてリンスインシャンプー、上記の新原料を含有するファンデーションそして安全性への配慮が必要な眉目化粧品類であるアイライナーを対象として製品中に含有されるアニオン型防腐剤の分析法の確立を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて行った。

Studies on quality control of cosmetics using new types of formulating technology and materials.



Akiharu Takeda

National Institute of Hygienic Sciences

## 2. 試薬、試料および装置

### 2.1 試薬、試料

ソルビン酸カリウム (SOA-K) は市販試薬一級、デヒドロ酢酸ナトリウム (DHA-Na) は市販試薬99%以上、塩化ステアリルトリメチルアンモニウムは「粧原基」品、ヤシ油脂脂肪酸メチルタウリンナトリウムは「粧外規」品を各々用いた。シリカゲルは Kieselgel-60 (メルク社製) を 105°、2時間活性化し、シリカゲルデシケータ中に保存したものをを用いた。その他の試薬は、すべて市販特級品を用いた。

実験に用いた試料は

#### (A) ファンデーション

微粒子ナイロンパウダー配合ファンデーション (A-1) および微粒子酸化チタン配合パウダーファンデーション (A-2) でいづれもメチルパラベンを0.3%含有するもの

#### (B) リンスインシャンプー

ヤシ油脂脂肪酸メチルタウリンナトリウム、塩化ステアリルトリメチルアンモニウムを主基剤としたもので安息香酸ナトリウム0.5%含有するもの

#### (C) アイライナー

ポリメタクリル酸配合乳化型液状アイライナー (C-1) 及びペンシル型固形アイライナー (C-2) で前者はメチルパラベン0.05%、後者はプロピルパラベンを0.1%含有するものを各々用いた。

### 2.2 装置

高速液体クロマトグラフは一般に市販されている装置を、検出器、データ処理装置も汎用されているものを使用した。またHPLC用カラムは市販パックドカラムを用い、オクタデシル化した平均粒子径5 $\mu$ m、内径4.0~4.6mm、長さ125~250mmのものを使用した。

## 3. 実験方法および結果

### 3.1 ファンデーション中のメチルパラベンの定量

#### 3.1.1 メチルパラベン標準溶液

メチルパラベン100.0mgを精秤し、メタノールにとかし100.0mlとし、これをメタノールで希釈し、10、20、30、40ppmの溶液を調製した。なお抽出方法の検討には50、100、200ppmの溶液を用いた。

#### 3.1.2 抽出方法の検討

試料A-1、A-2を各々0.5gを精秤し、これにアセトニトリル、エタノールまたはテトラヒドロフランを加えて10.0mlとし超音波浴で5分間分散した後、遠心分離 (3500rpm、10分間) し上層をメンブランフィルター (0.45 $\mu$ m) で濾過し、HPLCに注入した。さらに上記の操作を2回繰り返す、同様にHPLCに注入した。抽出回数及び溶媒の違いによる抽出率を算出し、Table 1. に示した。

Table 1より各溶媒による抽出率は良好でほぼ同じ傾向であった。しかしアセトニトリルに比べてエタノール、THFは遠心分離できれいな上澄液が得られず混濁が強く、アセトニトリルの場合はほとんど混濁せず優れていた。従って抽出にはアセトニトリルを用いた。更に超音波処理の時間、試料の加温時間等を検討したが処理時間を5分にすれば加温の必要がないことがわかった。

Table 1. 抽出溶媒の違いによる抽出率

試料	溶媒	試料量(g)	抽出率 (%) <sup>1)</sup>			
			1	2	3	計
A-1	アセトニトリル	0.501	92.4	6.1	1.2	99.7
	エタノール	0.506	96.7	5.7	0.7	103.1
	THF	0.503	101.0	5.3	0.4	106.7
A-2	アセトニトリル	0.501	100.0	4.2	0.8	105.0
	エタノール	0.504	98.2	6.4	0.9	105.5
	THF	0.502	101.7	5.3	0.7	107.7

1) メチルパラベン配合量 (0.3%) に対する各画分より得た定量値の割合

### 3.1.3 試験溶液の調製

試料A-1、A-2各々0.5gを50mlの遠心管にとり、アセトニトリル10mlを加え、超音波浴中で5分間分散させる。これを遠心分離（3000rpm、10分間）後上澄液を50mlのメスフラスコにとりさらにこの操作を2回繰り返してアセトニトリル層をメスフラスコに分取し、アセトニトリルを加えて全量を50.0mlとしたメンブランフィルター（0.45μm）で濾過し、HPLCに注入した。

### 3.1.4 ファンデーション中のメチルパラベン のHPLCクロマトグラム

Fig.1に示すHPLCの条件で試料A-1、A-2中のメチルパラベンの分離を行った。各々のクロマトグラムを示した。

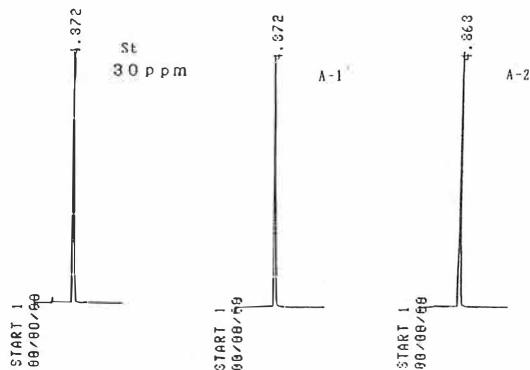


Fig.1 試料A-1、A-2および標準溶液中のメチルパラベンのHPLCクロマトグラム

HPLCの測定条件

カラム；TSK gel ODS 80T<sub>M</sub>（4.6mm i.d. × 150mm）

移動相；0.002M 塩化セチルトリメチルアンモニウム / 0.05M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · MeOH · CH<sub>3</sub>CN（50:35:15）（pH5.2リン酸）

カラム温度；40°

流速；1.0ml/min

UV検出器；254nm

注入量；10μl

### 3.1.5 検量線の作成

3.1.1で得られたメチルパラベン標準溶液（10、20、30、40 ppm）をFig.1の条件で操作し、得られたピーク面積とメチルパラベンの注入量から検量線を作成した。その結果をFig.2に示した。

ピーク面積（×1000）

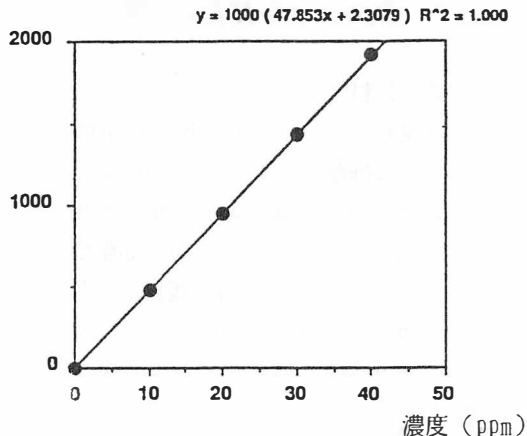


Fig.2 メチルパラベンの検量線

### 3.1.6 回収率の検討

2.1A-1、A-2の試料について3.1.3に従い試験溶液を調製し、HPLCにより定量した結果をTable 2に示した。n=5の平均回収率からC・V%も小さく良好な結果が得られた。

Table 2 試料A-1、A-2の回収率（n=5）

試料	試料濃 (μg)	回収率 (%)	平均回収率 (%)	C V (%)
A-1	0.500~0.509	95.3~96.3	95.5	0.5
A-2	0.503~0.504	95.7~96.7	96.1	0.4

## 3.2 リンスインシャンプー中のアニオン性防腐剤の定量

### 3.2.1 アニオン性防腐剤標準溶液

安息香酸ナトリウム（BA-Na）、SOA-K、DHA-Na、パラベン類（PHBAE）（メチル、エチル、プロピル、ブチルエステル）各100.0mgを各々メタノールに溶解し、これを更に適宜メタノールで希釈し標準溶液とする。

### 3.2.2 リンスインシャンプー中へのアニオン性防腐剤の添加

BA-Na、SOA-KおよびDHA-Naの50.0mg/mlの水溶液を調製し、各々2.0mlをと、これにリンスインシャンプーを加えて、合計重量を20.0gとし、よくかき混ぜたものを試料BA-Na、

試料SOA-K、および試料DHA-Naとする。またPHBAEは各エステルそれぞれ50.0mg/mlのメタノール溶液を調製し、0.1mlずつ同一容器にとり、メタノールを揮散させた後リンスインシャンプーを加え、合計重量10.0gとし、よくかき混ぜたものを試料（PHBAE-1）、各エステル溶液0.2mlずつ取り同様に調製した試料（PHBAE-2）および各エステル溶液0.5mlずつ取り同様に調製した試料（PHBAE-3）を調製した。

### 3.2.3 試験溶液の調製

#### 3.2.3.1 メタノール抽出法

各試料約0.5gを精密にはかり、5mlのメタノール及び無水硫酸ナトリウム5gをかきまぜ、さらにメタノール20mlを加え、40℃で20分間加温する。これを氷冷した後、遠心分離（3000rpm、10分間）し、上澄み液をとる。残留物にメタノール20mlを加え同様の抽出を行う。上澄み液を合わせエバポレーター（40℃以下）で濃縮し、メタノールで正確に20mlとし試験溶液とする。

#### 3.2.3.2 シリカゲルカラム法<sup>1)</sup>

3.2.3.1と同様に操作し上澄み液を合わせ以下つぎのように操作する。エバポレーター（40℃以下）で濃縮し更にメタノールを完全に留去する。これを約3gのシリカゲルにまぶしてよく分散させる。別に予めシリカゲル3gをヘキサン・酢酸エチル（97:3）を用いて充填したカラムに、減圧しながら積層させた。さらにこの混液を用いてフラスコ中に残留したシリカゲルをカラム中に洗い込む。ついでカラムにヘキサン・酢酸エチル（97:3）を流し、はじめの溶出液60mlを除く、つぎにヘキサン・酢酸エチル（80:20）で溶出し、留出液60mlを分取し、これを溶出液Aとした。さらに、カラムにメタノールを流し、溶出液60mlを分取し、これを溶出液Bとする。A及びBの溶出液を各々エバポレーター（40℃以下）で約1mlまで濃縮し、メタノールで正確に20mlとし試験溶液A、Bとし、適宜希釈してその20μlをHPLCに注入した。

### 3.2.4 検量線の作成

3.2.1で得られた各アニオン性防腐剤標準溶液はSOA-K、DHA-Naの濃度20、50、100μg/ml、BA-Na、PHBAE、10、20、40μg/mlで得られたピーク面積とアニオン性界面活性剤の注入量から検量線を作成した。原点を通る直線関係が成立した。HPLCの測定条件はFig.1と同じであるがカラムにはSuperspher 100（RP-18（e））（4mm i.d.×125mm）を用いた。

### 3.2.5 回収率の測定

リンスインシャンプーにアニオン性防腐剤を添加した試料BA-Na、SOA-K及びDHA-Naを3.2.3.2シリカゲルカラム法で処理した。溶離液A中にはBA-Na、SOA-K、DHA-Naは検出されず、溶離液Bより各々BA-Na、SOA-K、DHA-Naを検出した。その時の回収率をTable 3に示した。試料PHBAE1～3からは溶離液A中にはPHBAEを検出したが、溶離液B中からはPHBAEは検出されなかった。これらの回収率をTable 4に示した。PHBAE-3は若

Table 3 試作リンスインシャンプーへのBA-Na, SOA-K, DHA-Naの添加回収結果

	添加量(%)	含量(%)	回収率(%)	変動係数
BA-Na	0.51	1.05	103.9	0.2
SOA-K	0.50	0.50	94.2	3.5
DHA-Na	0.52	0.52	91.4	4.0

Table 4 試作リンスインシャンプーへのPHBAE（メチル、エチル、プロピル及びブチルエステル）の添加回収結果

		添加量(%)	回収率(%)	変動係数
PHBAE-3	メチルエステル	0.25	85.8	1.5
	エチルエステル	0.25	85.9	1.8
	プロピルエステル	0.25	84.6	0.6
	ブチルエステル	0.24	86.1	2.5
	合計	0.99		
PHBAE-2	メチルエステル	0.10	92.0	1.9
	エチルエステル	0.10	101.3	0.6
	プロピルエステル	0.10	92.6	2.1
	ブチルエステル	0.09	91.0	0.4
	合計	0.39		
PHBAE-1	メチルエステル	0.05	94.6	1.8
	エチルエステル	0.05	108.6	4.4
	プロピルエステル	0.05	94.6	1.3
	ブチルエステル	0.05	91.9	1.1
	合計	0.20		

干低い値を示したが概ね良好な結果が得られた。溶離液 B 中の BA-Na、SOA-K、DHA-Na のクロマトグラムを Fig.3 に示した。

また、2.1 (B) 中の BA-Na の定量を行ったところ 0.54% であり、その他のアニオン性防腐剤は検出されなかった。

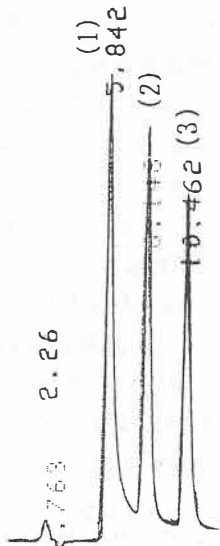


Fig.3 試作リンスインシャンプー中の BA-Na, SOA-K, DHA-Na の HPLC クロマトグラム  
(1) DHA-Na (2) SOA-K (3) BA-Na  
HPLC の測定条件  
カラム: Superspher 100 (RP-18 (e))  
(4mm i.d. × 125mm)  
注入量: 20  $\mu$ l  
その他は Fig.1 と同じ

### 3.2.6 市販リンスインシャンプーの分析

市販リンスインシャンプーのうち安息香酸塩含有の表示のある 2 品目 (製品 A、B) について 3.2.3.1 メタノール抽出法で処理し HPLC により分離し、235nm で検出を行い、BA-Na をピーク面積値による絶対検量線法によって定量を行ったところ BA-Na として 0.48% 及び 0.53% の安息香酸塩が検出された。この場合、製品 A にはパラベンの記載があり確認したところ、イソブチルパラベンであった。3.2.3.1 のメタノール抽出法は簡便で再現性のある方法であるがパラベン類

と酸類が同時に分析されるので以下の検討を行った。

### 3.2.7 安息香酸ナトリウムとパラベン共存製品における HPLC による分離

検出波長 254nm では BA-Na とプロピルパラベンなどは近い保持時間を示すが 235nm の検出では BA-Na の濃度 40  $\mu$ g/ml の時に各パラベン 4  $\mu$ g/ml 及び 8  $\mu$ g/ml の濃度で共存していてもほとんど検出されなかった。BA-Na とパラベンは HPLC では移動相の条件により分離が可能であり、試験溶液中の濃度を適当に選ぶことにより、シリカゲルカラムを用いる分離を行わず定量が可能であった。

### 3.3 アイライナー中のメチルパラベン及びプロピルパラベンの定量

#### 3.3.1 標準溶液の調製

3.2.1 アニオン性防腐剤標準溶液に準じてパラベン類の標準溶液を調製した。

#### 3.3.2 試験溶液の調製

固型アイライナーの場合は試料約 0.1g を精秤し、アセトンを加えて、20 分間超音波処理をする。更にアセトンを加えて 10ml とした後、上澄み液を 0.5  $\mu$ m のフィルターを用いて濾過し、試験溶液とした。

液状アイライナーの場合は試料約 0.2g を精秤し、メタノールを加えて、40° 水浴中で 10 分間加温した後、20 分間超音波処理をした。更にメタノールを加えて、10ml とした後、上澄み液を 0.5  $\mu$ m のフィルターを用いて濾過し、試験溶液とした。

#### 3.3.3 検量線の作成

3.2.1 で調製した PHBAE 標準溶液 (0~40 ppm) を用いて検量線を作成した。6 種類の PHBAE は各々完全に分離した。この場合カラムに Wakosil ODS 5C18 (4.6mm id × 250mm)、移動相はメタノール・水 (60:40)、検出波長は 254nm を用いた。この条件により各々の検量線はいずれも原点を通る直線が得られた。

### 3.3.4 抽出方法の検討

#### 3.3.4.1 固形アイライナー

固形アイライナー中のパラベンの分析については報告がみられない。そこでまず、試料から超音波を用いて分散させることにより、パラベンを最も効率よく抽出する溶媒について検討した。

試料C-2 0.1gを精秤し、水、50%エタノール、メタノール、アセトン、酢酸エチル、クロロホルム及びn-ヘキサンの各溶媒約8mlを加えて、20分間超音波処理することにより、それぞれ抽出し、その測定値を比較した結果をTable 5に示した。

Table 5 各種抽出溶媒による固形アイライナー中のn-プロピルパラベンの分析

溶 媒	分析値(% ,w/w)	抽出率 <sup>a)</sup>
水	0.053	53
50%エタノール	0.092	92
メタノール	0.095	95
エタノール	0.093	93
アセトン	0.100	100
酢酸エチル	0.075	75
クロロホルム	0	0
n-ヘキサン	0	0

a) 抽出率は、溶媒としてアセトンを用いた際の分析値を100と換算した場合の数値

各々の抽出率は、アセトンを用いた際の分析値を100と換算した場合の数値で表した。極性の高い水及び50%エタノールでは、十分に分散がされにくく抽出率もそれぞれ53%及び92%であった。メタノール、エタノール及び酢酸エチルでは、試料の分散はされたが、抽出率はそれぞれ95%、93%及び75%であった。また酢酸エチルは、クロマトグラム上でn-プロピルパラベンとほぼ同一保持時間に溶媒ピークを認めるため、適当でなかった。更に極性の低い溶媒であるクロロホルム及びn-ヘキサンによりパラベンは抽出されなかった。しかし、アセトンでは試料はよく分散され、分析値が最も高い値を示した。

#### 3.3.4.2 液状アイライナー

液状アイライナー中のパラベンの分析については齊藤ら<sup>2)</sup>の報告を参考にして行った。すなわち、試料C-1を0.2g精秤し、固形アイライナーと同様に、超音波処理によるパラベンの抽出溶媒

について検討し、その測定値を比較した結果をTable 6に示した。それぞれの抽出率は、メタノールを用いた際の分析値を100と換算した場合

Table 6 各種抽出溶媒による液状アイライナー中のメチルパラベンの分析

溶 媒	分析値(% ,w/w)	抽出率 <sup>a)</sup>
水	0.051	88
50%エタノール	0.058	100
メタノール	0.058	100
エタノール	0.057	98
アセトン	0.058	100
酢酸エチル	0.056	96
クロロホルム	0.056	96
n-ヘキサン	0	0

a) 抽出率は、溶媒としてメタノールを用いた際の分析値を100と換算した場合の数値

の数値で表した。試料は風乾しやすく、溶媒への溶解を容易にするため、まず40°の水浴中で10分間加温することとした。抽出溶媒に水を用いた場合には、88%と十分な抽出率が得られなかった。また、n-ヘキサンではパラベンは抽出されなかった。更に50%エタノール、メタノール、エタノール、アセトン、酢酸エチル及びクロロホルムでは、ほとんど同率で高率にパラベンが抽出された。そこでパラベン以外の成分が溶解しにくく、上澄み液を濾過する際容易なメタノールを抽出溶媒として用いた。

#### 3.3.5 回収率の測定

試料C-1、C-2のアイライナーの分析結果をTable 7に示したが、固形アイライナーにはプロピルパラベンが0.100%、液状アイライナーには0.058%含有されていた。

Table 7 試料C-1, C-2パラベン含量

	n	パラベン含量(%)	変動係数(%)
C-2	3	0.100	0.44
C-1	3	0.058	1.84

#### 3.3.6 市販アイライナーの分析

市販アイライナー(固形)を3.3.2試験溶液の調製に準じて処理し、分析した結果をTable 8に示した。各々n-プロピルパラベンが0.064%及び0.075%含有されており、他のパラベン類は含

まれていなかった。市販アイライナー（固形）A、B社のクロマトグラムをFig.4に示した。

Table 8 市販の固形アイライナー中のn-プロピルパラベン含量

	n	パラベン含量(%)	変動係数(%)
A社	3	0.064	0.91
B社	3	0.075	0.75

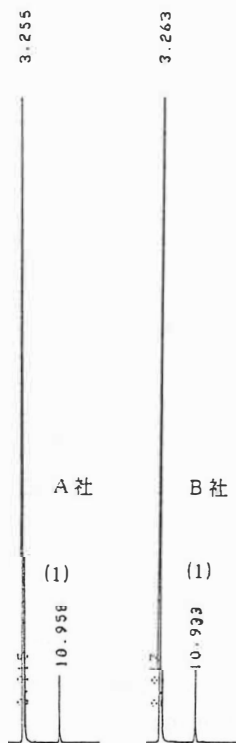


Fig.4 市販固形アイライナーのHPLCクロマトグラム  
HPLCの測定条件は本文中に記載  
(1) n-プロピルパラベン

#### 4. 考察とまとめ

##### 4.1 ファンデーション中のメチルパラベンの定量

THFを抽出溶媒に用いるとHPLCのピークは若干ブロード化してピーク高さが低くなる（エタノールの場合の20%減）のでこの場合標準溶液

もTHFを用いて調製する必要がある。

また、微粒子ナイロンパウダー3%含有の頬紅に0.3%の割合でメチルパラベンを含有したモデル試料を3.1.3試験溶液の調製法またはアセトニトリルの代わりにメタノールを用いる方法で試験溶液を調製し、Fig.1に準じて測定を行った。ただし移動相は0.002M臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム/0.05M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>・MeOH・CH<sub>3</sub>CN（50:35:15）（リン酸でpH5.2に調製）を用いた。その結果、回収率はアセトニトリル（83%）を用いるよりメタノール（94%）を用いる方が良い回収率が得られた。

これらのこと及び3.1の実験結果から、抽出溶媒にアセトニトリルまたはメタノールのいずれか製品によって使い分け、超音波処理を行うことによって微粒子酸化チタンや微粒子ナイロンパウダーに配合されているパラベンの吸着現象は分析上特に考慮する必要はないことがわかった。

##### 4.2 リンスインシャンプー中のアニオン性防腐剤の定量

リンスインシャンプーはシャンプー成分（アニオン、両性、非イオン界面活性剤など）とリンス成分（カチオン、非界面活性剤及びシリコン類など）の組合せでできている。安息香酸ナトリウムの定量においては単に無水硫酸ナトリウムを加えメタノール抽出によっても良好な結果が得られることがわかった。更にHPLCの測定条件に関しては移動相に0.002M臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム/0.05M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>・MeOH・CH<sub>3</sub>CN（50:35:15）、検出波長235nmでも測定が可能である。またサリチル酸ナトリウムに関しては移動相に0.002M臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム/0.05M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>・MeOH・CH<sub>3</sub>CN（20:35:15）（リン酸でpH5.2に調製）を用いると保持時間約7分で測定することができた。リンスインシャンプーの場合はシリカゲルカラム法で分析が可能であるが検出波長235nmを用いるとBA-NaとPHBAEが共存していても

試験溶液中の濃度を適当に選ぶことによりシリカゲルカラム法を用いずメタノール抽出法でよいことがわかった。

#### 4.3 アイライナー中のメチルおよびプロピルパラベン

アイメイクアップの中でアイライナーは眼の粘膜の近くに使用するので安全性の点で注意が必要である。また顔料の使用を初め処方も複雑であるので分析上困難なタイプの一つでもある。3.3.2の試験溶液の調製で固形アイライナーはアセトンで、液状アイライナーはメタノールを抽出溶媒に用いる以外に試料に無水 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ およびメタノールを加え、スパーテルでよくすりつぶし、振とう機で10分間振とうし、更に $40^\circ$ の水浴中で10分間加温する。ついで10分間超音波処理を行う。更に遠心分離(3000rpm、10分間)を行う。残渣をメタノールで上記と同様に再抽出し、メタノール層を合わせ $40^\circ$ 以下で減圧濃縮し、メタ

ノールで一定量とする。これをHPLCに注入し試料C-1、C-2の回収率を測定したところC-1については100.0% C-2については90.4%の回収率が得られた。しかしながらアイライナーの製品は種類も多く、前述の様に製品中に含有する成分も多岐に渡っている。そのため妨害成分の検出などには十分注意し、分散、分離が困難な場合には分析を行うにあたって液を分配法<sup>2, 3)</sup>、カラム抽出法<sup>2, 4)</sup>などを応用した前処理操作が必要と考えられる。

#### 文 献

- 1) 日本薬学会編“衛生試験法注解”P.890、金原出版、東京、1990
- 2) 齊藤恵美子ら、衛生試験所報告、106、97(1988)
- 3) 鎌田国広ら、東京都衛研年報、32、99(1981)
- 4) 三上栄一ら、衛生化学、32、34(1986)

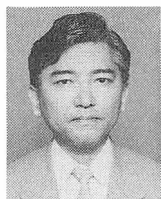
# 新しいDDS剤型としての高分子ミセルの設計と機能開発

東京理科大学生命科学研究所

片岡 一 則

Supramolecular structures, such as lipoproteins and viruses, occur *in vivo* as natural carrier systems. In mimicking such vehicles, we have been studying micelle-forming polymeric drugs as a novel type of drug carrier. Polymeric micelles based on AB block copolymers of polyethylene oxide (PEO) and poly- $\beta$ -benzyl-L-aspartate (PBLA) were prepared. Such polymeric micelles are expected to physically incorporate drugs. AB block copolymers were synthesized using amino-terminated PEO to initiate the polymerization of  $\beta$ -benzyl-L-aspartate-N-carboxyanhydride (BLA-NCA). The composition and molecular weights of the block copolymers were established by  $^1\text{H-NMR}$ . Micellar solutions of PEO-PBLA block copolymer were characterized by dynamic light scattering. Fluorescence probe techniques were used to study the polymeric micelles. From changes in the fluorescent intensity and shifts in the excitation spectrum of pyrene upon micellization, critical micelle concentrations (CMC) of PEO-PBLA block copolymers were obtained. The vibrational structure of monomer pyrene fluorescence was altered in PEO-PBLA micellar solutions consistent with low polarity within the PBLA core. In PEO-PBLA micellar solutions, 1,3-(1,1'-dipyrenyl)-propane intramolecular excimer emission, relative to monomer emission was very small; this indicated very low mobility of PBLA segments within the micellar core. Further evidence for the limited motion of PBLA segments in the micellar core was obtained by  $^1\text{H-NMR}$ . This limited motion of the PBLA segments in the micellar core is in contrast to low molecular weight surfactants which commonly show a higher degree of motion within their cores. The ability of PEO-PBLA micelles to solubilize hydrophobic molecules was studied by UV and fluorescence spectroscopy using pyrene. Enhanced solubility of pyrene was determined with increasing concentrations of PEO-PBLA. Then, potential of entrapping Adriamycin (ADR) within micelles based on PEO-PBLA block copolymers was investigated. The loading process involved bringing ADR and PEO-PBLA into an aqueous milieu from *N,N*-dimethylformamide (DMF) through a simple dialysis procedure. Evidence for the physical entrapment of ADR within the micelles was derived from fluorescence spectroscopy, where considerable quenching of fluorescence was observed for ADR associated with the micelles. In addition, quenching experiments, using a water-soluble quencher (iodide ( $\text{I}^-$ )), showed that the fluorescence of ADR, present in micellar solutions, was largely unaffected by  $\text{I}^-$ , whereas the fluorescence of free ADR was readily quenched. As a result of the entrapment of ADR within the polymeric micelles, the drug slightly binds serum albumin as evidenced by gel permeation chromatography (GPC). In contrast, free ADR readily binds serum albumin in aqueous solutions. The finding suggests that ADR is stably entrapped within PEO-PBLA micelles. The ADR imbued within the micelles is expected to display markedly dissimilar pharmacokinetics relative to free ADR.

## Design of Polymeric Micelles for Novel Carriers in Drug Delivery Systems



Kazunori Kataoka

Research Institute for  
Biosciences  
Science University of Tokyo

## 1. 緒言

近年、経皮あるいは経粘膜的に、薬物等の生理活性物質を体内に制御されたモードで供給する薬物送達システム (DDS) の研究が国内外で大きな注目を集めている<sup>1)</sup>。このようなシステムは、

体内で作用する薬物のみならず、皮膚角質層などの体表部位に作用する生理活性物質や香料成分の制御放出の実現を通じてコスメロジー分野においても大きな貢献をなすことが期待される。薬物を制御されたモードで供給するためには、薬物を安定に保持し、また、必要に応じて制御放出される機能を有する担体システムの設計が重要な課題である。本研究では、親水性連鎖と疎水性連鎖とからなるブロック共重合体が、水溶液中で疎水性連鎖を内核、親水性連鎖を外殻とする安定な多分子会合体（高分子ミセル）を形成することに着目し、その内核を薬物のマイクロ・リザーバーとして利用する新規薬物担体システムの構築を行った。このような高分子ミセルには、〔1〕難溶性物質の包接化による溶解性向上、〔2〕凍結乾燥状態あるいは溶液状態での優れた安定性、〔3〕内核からの薬物制御放出、〔4〕外殻表面への生体組織親和性分子あるいは刺激応答分子（インテリジェント化）の連結、等の様々な利点が期待され、DDS用の新剤型として高い有用性が見込まれる<sup>2-4)</sup>。

本研究の目的を達成せしめるためのブロック共重合体としては、〔1〕ミセルの外殻を形成する親水性のセグメントとミセルの内核としてマイクロ環境を形成するセグメントの2種類の役割分担の明確なセグメントを有すること、〔2〕薬物等を導入可能な官能基を有すること、〔3〕良好な生体適合性を有すること、という3つの特色を備えたポリエチレンオキシド/ポリアミノ酸ブロック共重合体に着目した。第1年度においては疎水性ブロックとしてポリ(β-ベンジル-L-アスパルテート)(PBLA)を選び、種々連鎖長を変えたPEO-PBLAブロックコポリマーを合成し、そのミセル形成能と疎水性モデル薬物(ピレン)の取り込み能(Fig.1参照)を評価した。また、第2年度においては、実際の薬物として疎水性制ガン剤アドリアマイシン(ADR)の導入を行い、高分子ミセル型ドラッグとしての有用性について検討した。

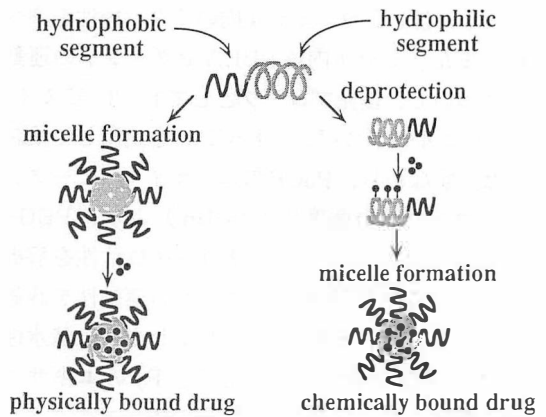


Fig.1 Drug loading of polymeric micelles

## 2. 実験

PEO-PBLA ブロックコポリマーは Fig.2 に示すように、β-ベンジル-L-アスパルテート-N-カルボン酸無水物(BLA-BCA)を片末端に一級アミノ基を有するポリエチレンオキサライドを開始剤として、重合することによって合成した<sup>5)</sup>。この際、PEOとPBLAの分子量を種々変えたブロックコポリマーを合成した。これを水溶液中に溶解し、PEO-PBLA ミセルを得た。

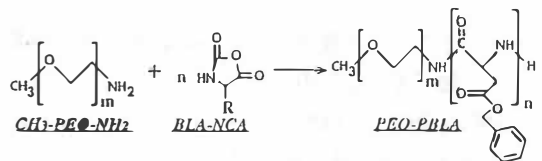


Fig.2 Synthesis of micelle-forming AB block copolymers based on PEO and poly(amino acids)

PEO-PBLA ミセルの特性解析については、蛍光プローブ法により行い、蛍光プローブとしてピレン(Py)を使用した<sup>6)</sup>。水溶液中のブロックコポリマーの濃度変化に伴うPyモノマーの光強度変化、および励起スペクトルシフトより、分子量の異なる各PEO-PBLAブロックコポリマーにつきCMCを測定した。その際、Pyモノマーの蛍光スペクトルの第一ピーク、第三ピーク

比 (I/III) より、ミセル内のマイクロ極性を調べた。また、ミセル内核 PBLA セグメントの運動性について、蛍光プローブとして 1、3-ビス (1-ピレニル) プロパン (P3CP) を使用して検討した。すなわち、P3CP のエキサイマーピーク、モノマーピーク強度比 ( $I_e/I_m$ ) より、PEO-PBLA ミセルのミセル内核のマイクロ粘性を解析し、ミセル内 PBLA セグメントの運動性を評価した。さらに、PEO-PBLA ミセルへの疎水性プローブの可溶性については、Py のエキサイマー形成、および Py モノマーの蛍光スペクトルの I/III 比変化の導入量依存より導入を確認し、種々の導入法について検討を行った。

ミセル中への ADR 導入は以下のように行った。ADR 塩酸塩を DMF 下に少量のトリエチルアミンを入れて溶解し、さらにそこに PEO-PBLA ブロックコポリマーを溶かした。一晩暗所で攪拌の後、溶液を 0.1M 酢酸バッファー (pH5.5) に対して透析し、引き続いて蒸留水で透析を行い、ミセルを得た。ミセル中に捕捉された ADR の量は 485nm の吸光度より算定した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 ブロック共重合体ミセルの調製とモデル薬物 (ピレン) の導入

PEO-PBLA ブロックコポリマーは、PEO と PBLA 鎖の分子量を種々変えたものについて合成を行った。PBLA 中の BLA ユニット数が 20 以下で PEO セグメントの分子量が 5000 以上の試料は水溶性を示した。また、いずれの試料も水溶液中でミセルを形成することが動的光散乱測定より明らかとなった。平均粒径は約 20nm 程度である。重量平均分布より少量の二次凝集体と考えられる粒子が平均粒径 100nm 程度に観察された。一方、5-10 について静的光散乱よりミセル分子量を算定すると、 $2.8 \times 10^6$  と求められた。これより、会合数はおよそ 400 となる。但し、この値には、二次凝集体の寄与も含まれている。

次に、ピレンの蛍光挙動からこれらブロック共重合体ミセルの臨界ミセル濃度 (CMC) を評価した。異なる濃度のブロック共重合体共存下におけるピレンの蛍光スペクトルならびに励起スペクトルをそれぞれ Fig.3 と Fig.4 に示す。ブロック

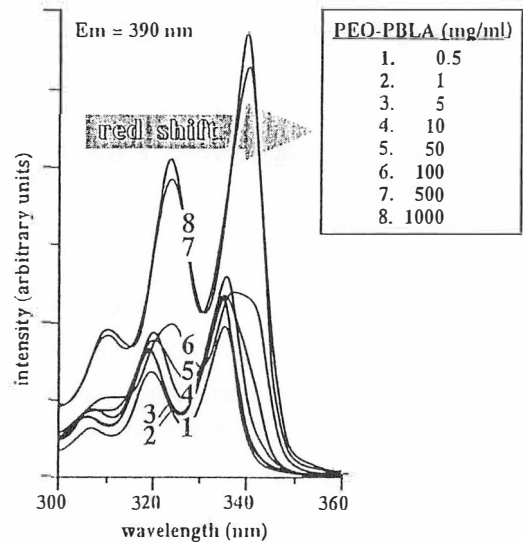


Fig.3 Excitation spectra of pyrene in PEO-PBLA aqueous solutions. Sample is 5-10. The Concentration of pyrene is  $6.0 \times 10^{-7}$  M.

共重合体の濃度上昇に伴って赤色シフトが認められる。特に、ピレンの (0, 0) バンドに由来する 334nm のピークがミセルに取り込まれることによって 339nm にシフトしていることがわかる。この励起スペクトルにおける 334nm とのピーク比から CMC を見積ることが可能である<sup>7)</sup>。また、ピレンの蛍光強度は周囲の極性に依存するため、蛍光強度変化からも CMC を決定することができる<sup>8)</sup>。Fig.5 には、蛍光強度及び 339nm と 334nm の強度変化比をブロック共重合体濃度に対してプロットした結果を示す。図より、約 5-10mg/l の範囲で蛍光強度あるいはピーク強度比が急激に変化しており、CMC がこの濃度領域にあることが明らかである。

また、ピレンの蛍光スペクトルにおいて、その振動微細構造はピレンの置かれている局所極性に

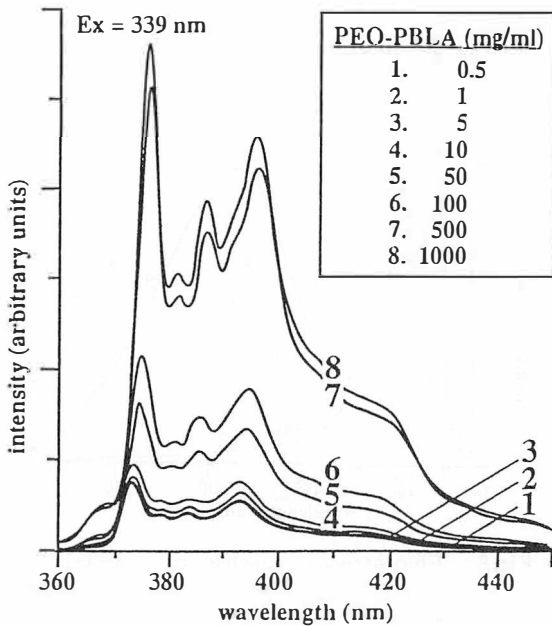


Fig.4 Fluorescence spectra of pyrene in PEO-PBLA aqueous solutions. Sample is 5-10. The concentration of pyrene is  $6.0 \times 10^{-7} M$ .

敏感であることが知られている (Ham 効果)<sup>9)</sup>。そこでバンド I ((0, 0) バンド) とバンド III ((0, 2) バンド) の比 (I/III 比) を取り、ブロック共重合体濃度に対してプロットした結果を Fig.6 に示す。CMC 以下の領域においては、I

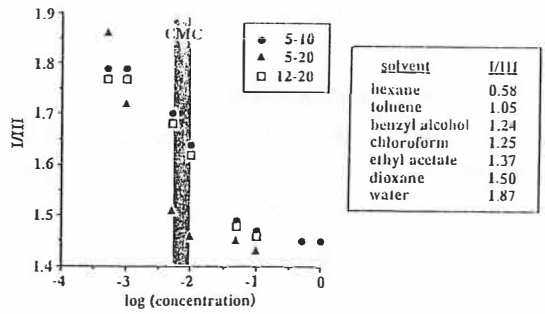


Fig.6 I/III vibrational band ratio of pyrene as a function of logarithm PEO-PBLA concentration. The concentration is expressed in units of mg/ml.

／III 比は水溶液中のピレン (約 1.87) と同程度の高い値を示すが、CMC を境にその値は小さくなり約 1.45 程度の値となる。これは、ブロック共重合体のミセル形成に伴ってピレンがミセル内核に取り込まれたものと考えられる。アスパラギン酸ユニットの保護基であるベンジルアルコール中では、ピレンの I/III 比は 1.24 であり、ミセル中の値の方がやや大きい。このことについては、PBLA 骨格のアミド構造の寄与や内核と外殻界面に位置するピレンの寄与等が考えられる。以上の結果より、ブロック共重合体ミセル内核に疎水性物質を非共有結合的に導入することが可能であり、さらに低い CMC 値からは、このミセル形態

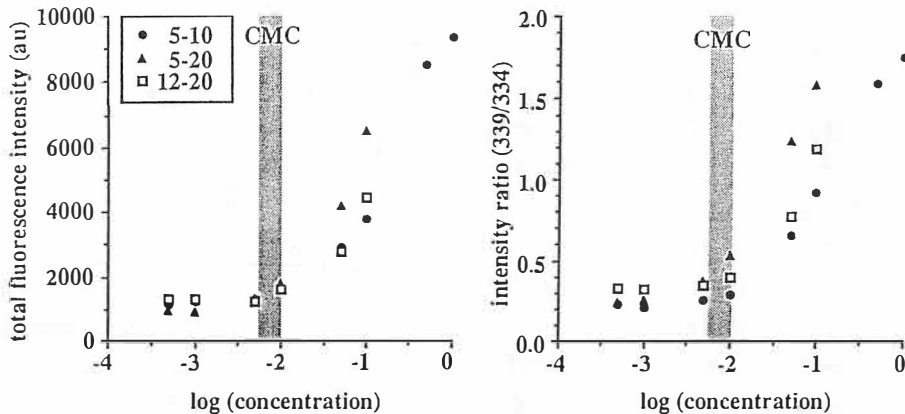


Fig.5 The total fluorescent intensity of monomer emission and the intensity ratio (339/334) from the excitation spectra of pyrene versus logarithm PEO-PBLA.

が熱力学的に極めて安定であることが示された。

### 3.2 ミセル内核の粘性評価

薬物を安定に内核に保持するためには、内核が固体状態であることが望ましい。すなわち、内核局所の粘性が高ければ薬物の局所拡散が妨げられ、外部へのリリースが抑制されるからである。そこで、ミセル内核の局所粘性をピレンダイマー（P3CP）（Fig.7参照）のエキサイマー発光強度から見積もることとした。P3CPは粘性の低い環境下では分子内回転が容易な為、顕著なエキサイ

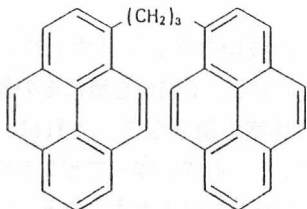


Fig.7 Structure of 1,3-(1,1'-dipyrenyl)propane (P3CP)

マー発光を480nm付近に示すことが知られている<sup>10)</sup>。このエキサイマー発光強度はマイクロ粘性の上昇とともに低下することから、エキサイマー発光強度 ( $I_e$ ) とモノマー発光強度 ( $I_m$ ) の比 ( $I_e/I_m$ ) より P3CP 周囲のマイクロ粘性を評価することができる<sup>11)</sup>。Fig.8に例を示したが、SDSミセルに比して、ブロック共重合体ミセル中ではP3CPエキサイマー発光はほとんど認められず、 $I_e/I_m$  値も極めて低いことが明らかとなった。すなわち、ブロック共重合体ミセル内核では、高分子鎖の運動性がかかなり低く、そのために内核に保持された物質の動きも大幅に束縛されているものと考えられる。このことは、別途、<sup>1</sup>H-NMRにおいてフェニル環のプロトンに由来するピークがミセル形成後は極端に小さくまたブロードになることから支持された。

次にピレンのミセル内への導入を促進する目的で、通常の攪拌での導入の他に加温処理、超音波処理の効果を調べた。Fig.9より、導入量はPEO-PBLAの濃度に依存することが示され、

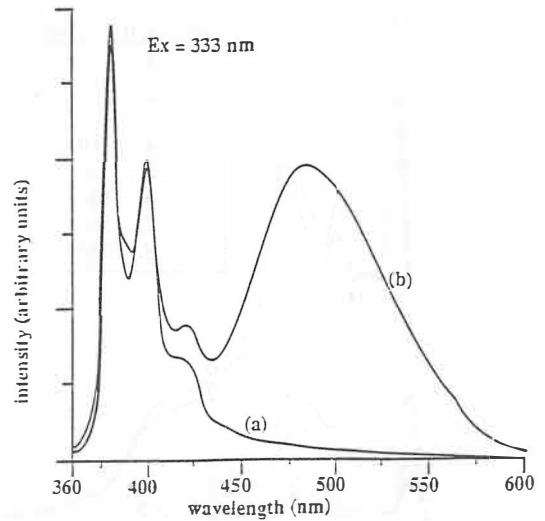


Fig.8 Fluorescence spectra of 1,3-(1,1'-dipyrenyl)propane in PEO-PBLA and SDS micellar solutions. Samples are 12-20 at a concentration of 0.10 mg/ml and SDS at a concentration of 3.0 mg/ml. The concentration of 1,3-(1,1'-dipyrenyl)propane is  $2.0 \times 10^{-7}$  M.

加温処理、超音波処理効果により、水中でのピレンの溶解度 ( $6.0 \times 10^{-7}$  M) の500倍を溶解可能であることが示された。この疎水性薬物モデルとしてのピレンの導入測定から、導入法を工夫するこ

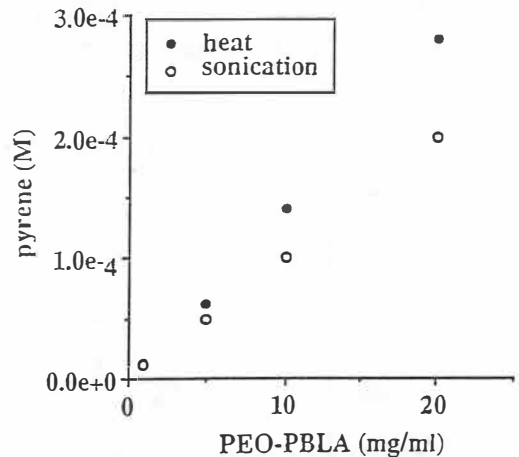


Fig.9 The solubilization of pyrene in PEO-PBLA micellar solutions. The loading of pyrene was facilitated by heating at 80°C, sonication. Pyrene has a solubility in water of  $6.0 \times 10^{-7}$  M.

とにより、疎水性物質の導入量をかなり増加することが可能であり、PEO-PBLAブロックコポリマーの薬物担体としての有用性が期待された。

### 3.3 ブロック共重合体ミセル中へのアドリアマイシン (ADR) の導入と安定性の評価

ピレンでの結果をふまえ、実際の薬物としてADRの取り込みを行った。導入法は、実験の項に詳述したように有機溶媒 (DMF) から緩衝液への透析平衡法である。ミセル中に取り込まれないフリーのADRは限外ろ過により除去した。この方法により、ミセル重量に対して10%の割合でADRを導入可能であることがミセルの吸光度測定より明らかとなった。また、動的光散乱よりADR内包ミセルの直径は約35nmと求められた。この値は、ADRを内包しない場合に比して若干大きめの値となっている。ADR内包ミセルは凍結乾燥保存が可能であり、再溶解後もミセル直径に変化のないことが確認された。

次にミセル内に保存されたADRの安定性をゲルろ過クロマトグラフィー (GPC) により評価した。結果をFig.10に示す。Fig.10は、PBS中に保存したミセルのGPCであるが、排除限界に単分散のミセルピークが認められる。この試料を10mg/ml濃度のアルブミン溶液中に共存させた時の時間経過をあわせてFig.10に示す。5時間経過後もミセルピークの強度に変化は認められず、その安定性が確認された。なお、ウサギ血清を用いて評価した場合にも同様の結果が得られている。また、ミセル内包ADRについては内部遮蔽効果による著しい消光が認められた。時間経過とともにわずかな蛍光強度の増加が観察されたが、その程度は極めて小さく、内核に保持されたADRは、少なくともPBS中ではほとんど外部に放出されないことが判明した (Fig.11)。

さらに蛍光の消光剤であるヨウ素イオンによるADR蛍光の消光度合を調べることからADRのミセル内存在状態を評価した。ヨウ素イオンは負荷電を有しかつ水和しているため、ミセル内核の

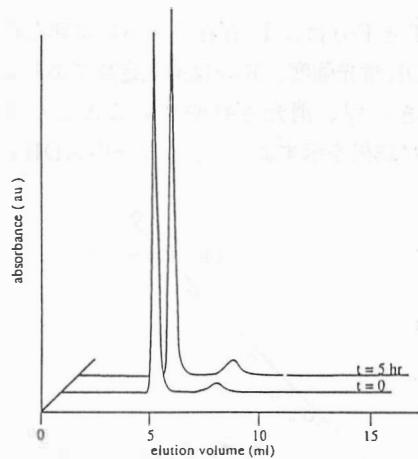


Fig.10 Stability of PEO-PBLA micelles after incubation with albumin (10 mg/ml in PBS, 0.1, pH7.4), analyzed by gel permeation chromatograms (GPC). The concentration of ADR is 10 mg/ml.

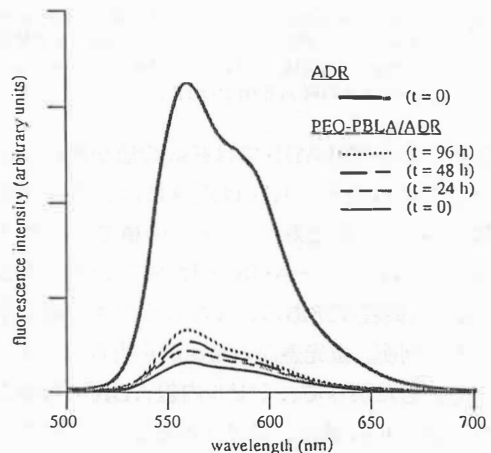


Fig.11 Fluorescence emission spectra of ADR and PEO-PBLA/ADR micelles in PBS buffer (0.10M, pH7.4). The concentration of ADR is 10 mg/ml.

ような疎水的ミクロ環境には浸透しにくいはずである。したがって、ADRがミセル内核に確かに保持されていればヨウ素イオンにより消光しにくいことになる。その評価は(1)式に示すStern-Volmerの式で行われる。

$$F_0/F = 1 + K_{sv} [I^-] \quad (1)$$

ここでFとF<sub>0</sub>は、I<sup>-</sup>存在下あるいは非存在下でのADR蛍光強度、K<sub>sv</sub>は消光定数でありこの値が大きい程、消光されやすいこととなる。Fig.12に結果を示すように、フリーのADRに

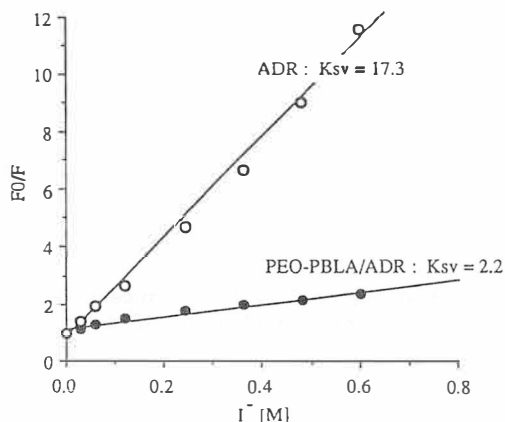


Fig.12 Stern-Volmer plots for ADR incorporated into PEO-PBLA micelles in PBS buffer (0.1M, pH7.4). The concentration of ADR is 5 mg / mℓ.

比してミセル内包ADRではK<sub>sv</sub>の値が極めて小さいことがわかる。K<sub>sv</sub>は正確には、消光速度定数(k<sub>q</sub>)と蛍光寿命(τ<sub>0</sub>)の積であらわされる。τ<sub>0</sub>はフリーADRと比べてミセル内包ADRでは同程度かあるいはむしろ小さい値を示すことが別途、蛍光寿命の測定から明らかとなっている。したがって、ミセル内包ADRで観測された小さいK<sub>sv</sub>値は、消光速度定数k<sub>q</sub>が小さいことに由来するためと結論される。すなわち、ADRはミセル内核に安定に保持される結果、I<sup>-</sup>との衝突頻度が下がり、消光されにくいものと考えられる。この結果は、ミセル内包ADRが化学的に安定であることとも一致するものである。

#### 4. 総括

以上の結果より、PEO-PBLAブロック共重合体は水溶液系でミセルを形成し、また、その内

核に疎水性薬物を内包可能であることが明らかとなった。ミセル内核は、通常の界面活性剤ミセルと異なり固体状態であるため、保持された薬物は外部に拡散することなく安定に存在できることが特徴である。事実、ミセルに保持されたアドリアマイシンはI<sup>-</sup>による消光を受けず化学的にも安定であることが示された。このブロック共重合体ミセルは凍結乾燥状態での保存も可能であり製剤上の利点も大きい。内核に保持し得る薬物としては、アドリアマイシン以外に消炎剤インドメタシンも適用可能であることも予備的に確認している。内包薬物の選択が広く、優れた安定性を有する本ブロック共重合体ミセルは、薬物や香料等のキャリアーとして、薬学ならびに化粧品分野において広範な応用が今後期待できるものと考えられる。

#### 文献

- 1) Advances in Drug Delivery Systems, Vol. 5, Eds. J. M. Anderson, S. W. Kim, J. Kopecek, Elsevier, Amsterdam, 1993
- 2) K. Kataoka, G. S. Kwon, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, J. Controlled Release **24**, 119 (1993)
- 3) M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, H. Ekimoto, C. Shibasaki, K. Kataoka, Cancer Res. **51**, 3229 (1991)
- 4) G. S. Kwon, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, K. Kataoka, Pharm. Res. **10**, 970 (1993)
- 5) M. Yokoyama, S. Inoue, K. Kataoka, N. Yui, T. Okano, Y. Sakurai, Makromol. Chem. **190**, 2041 (1989)
- 6) K. Kalyansundaram, J. Thomas, J. Amer. Chem. Soc. **99**, 2039 (1990)
- 7) C. Zhao, M. Winnik, G. Riess, M. D. Croucher, Langmuir **6**, 514 (1990)
- 8) R. C. Mast, L. V. Haynes, J. Colloid Interface Sci. **53**, 35 (1975)
- 9) A. Nakajima, Bull. Chem. Soc., Jpn. **44**, 3272

- (1971)
- 10) K. A. Zachariasse, W. Vaz, C. Sotomayor, W. Kunhnle, *Biochem. Biophys. Acta*, 688, 323 (1982)
- 11) H. Dangreau, M. Joniau, M. Cuyper, I. Hanssens, *Biochemistry*, 21, 3594 (1982)
- 12) P. Bahadur, N. V. Sastry, T. K. Rao, *Colloids and Surfaces* 29, 343 (1988)

# 化粧品素材としての利用が可能な乳酸菌の新規育種技術の開発

早稲田大学理工学部

桐村 光太郎・宇佐美 昭次

A gene relating to  $\beta$ -glucoside utilization of *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* IFO 12968 was cloned and expressed in *Escherichia coli* JM 109. In a 3.4 kb-gene fragment, two open reading frames (ORF1, 1.47 kb; ORF2, 0.98 kb) were sequenced. Although functions of these genes were not correctly determined through the homology research on the genes and proteins. However, since the ORF2 protein showed homologies to the *lac* repressor, it seems likely that these genes code proteins relating to  $\beta$ -glucoside transport.

## 1. 緒言

乳酸菌とは糖類をエネルギー源として乳酸を主要な代謝産物とする発酵を行う細菌の総称である。乳酸菌と人類との関わりは古くからあり、人類の歴史の歩みとともに、種々の有用な乳酸菌が選択、育種され、多様な発酵食品が開発された。バター、チーズ、発酵乳、ワイン、漬物等がこれらの代表例である。こうした発酵食品は特有な風味によるおいしさ、乳酸菌の作用による保存性と消化性の向上が特徴である。さらに、食品製造関連のみならず、最近では乳酸菌の有する他の有用機能も明らかにされ始めた。その顕著な例としては腸内乳酸菌の機能があげられ、人間の小腸下部に主に検出される腸内乳酸菌は乳酸を生成することで多種の雑菌の繁殖を抑えることが判明している。また、乳酸菌には免疫賦活作用など多彩な生体調節機構が見いだされており、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た

り皮膚の感染症を防ぐことが発見されたことをきっかけとして、約30年前よりこれを化粧品素材として利用することが始められた。実際に乳酸菌培養液を化粧品に添加すると皮膚の保湿作用や抗酸化作用が向上するため、有用な化粧品素材と考えられる。今後は乳酸菌の代謝産物の化粧品素材としての新規機能の調査と、乳酸菌自体を添加した化粧品の開発が予想される。しかし、実用性を考えた場合には、解決しなければならない問題も多く、このためには乳酸菌を遺伝的に改良するための育種技術を確立し、乳酸菌の新規な機能を開発する必要がある。

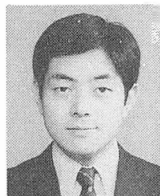
本研究は、化粧品素材としての利用に適した乳酸菌に関する、遺伝子工学を利用した育種技術を開発することを目的としている。本研究により化粧品素材としての利用に適した多機能性乳酸菌の育種が可能であると考えている。

## 2. 実験方法

### 2.1 使用菌株

供試菌として、セロビオース発酵性を有する *E. faecalis* subsp. *liquefaciens* IFO12968 を用いた。また遺伝子クローニングの際の宿主菌としては、大腸菌 *Escherichia coli* JM 109 を用いた。

Development of New Breeding Systems for Lactic Acid Bacteria Available as Cosmetic Materials



Kohtaro Kirimura

School of Science and Engineering  
Waseda University

## 2.2 培養方法

*E. faecalis*の液内培養には、ペプトン、酵母エキス、グルコースを主成分とするPYG培地を用い37℃にて静置培養を行った。*E. coli*の培養には、バクトトリプトン、酵母エキス、NaClより成るLB培地を用い、必要に応じて形質転換前培養用にM9培地（最小培地）、本培養に2YT培地（LBより富栄養なもの）を使用しいずれも37℃にて培養した。また、*E. Coli*の形質転換体の選択および培養のときには、上記の培地にアンピシリンを終濃度で100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように培地に添加した。

## 2.3 DNAの調製

*E. faecalis*を培養後集菌し、bufferに懸濁した後、リゾチームおよびSDSを加えて溶菌させ、proteinase K処理、RNase A処理、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行い、全DNAを精製した。

*E. coli*からの組換えプラスミドおよびシャロミドの抽出は、アルカリSDS法に従って行った。また必要に応じてQIAGENプラスミド精製キットも使用した。

DNAの分子量測定は、アガロースゲル電気泳動後、エチジウムブロマイド染色し、UVライト照射により行った。

## 2.4 大腸菌の形質転換

*E. coli*の形質転換はHanahanの方法に従って行った。この際、形質転換体の選択には、5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-glu)を利用した。X-gluは $\beta$ -glucosidaseにより分解されると青く呈色する。そこでX-gluを含む培地で青色に呈色したコロニーを採取し、解析を行った。また、シャロミドベクターを用いた場合は、ファージベクターの場合と同様*in vitro* packagingキットを用いて行った。

## 2.5 塩基配列の決定

ベクター中の挿入断片の縮小化は、制限酵素による消化およびライゲーション反応を繰り返すことにより行った。また、exonuclease IIIおよびmung bean nucleaseの反応を取り入れたDeletionキットも利用した。得られたディレクションプラスミドの塩基配列の決定は、Sangerの方法に従い、蛍光オートマチックシーケンサーを利用して行った。また、必要に応じて既知の塩基配列からDNAシンセサイザーによって合成したプライマーを用いてPCRを行いPCR産物を塩基配列決定の際に用いた。

## 2.6 *in vivo*における遺伝子発現

各オープンリーディングフレームをPCRにより増幅させ、発現ベクターであるpUC18、pBluescript II、pKK223-3に連結し、組換えプラスミドを構築した。この組み換えプラスミドを用いて*E. coli* JM109に形質転換し、形質転換体を*lac*および*tac*プロモーターの誘導剤であるisopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (IPTG)とアンピシリンを添加した培地で培養した。約24時間培養後、集菌・洗菌し、TME bufferに懸濁し、超音波処理により細胞を破碎した。遠心分離した上清をSDS-PAGEにより分離し、クマジーブルー染色でタンパク質の検出を行った。同様の系で、IPTGを添加しない場合の結果と比較することにより目的タンパク質の同定を行った。

## 3. 実験結果および考察

### 3.1 セロビオース資化性遺伝子を含むプラスミドpEFG3の塩基配列の決定

*E. faecalis*より全DNAを抽出し、制限酵素EcoRIにて消化後、*E. coli* JM109を宿主、pUC18をベクターとしてショットガンクローニングを行った。X-gluを含有する選択培地上で青色を呈するコロニーが6個得られたが、得られ

たクローンの保持するDNA断片は、サザンハイブリダイゼーションおよび制限酵素分析により、pEFG1、pEFG2、pEFG3の3種に大別できることが判明した。この中で、pEFG3を保持する大腸菌は、セロビオースを唯一の炭素源として生育可能であった。そこでpEFG3について塩基配列を含めた詳細な解析を行うことにした。

pEFG3を縮小化したプラスミドを数種作成し、それらのLB培地上でのX-gluの発色をβ-glucosidase活性として、FIG.1に示した。

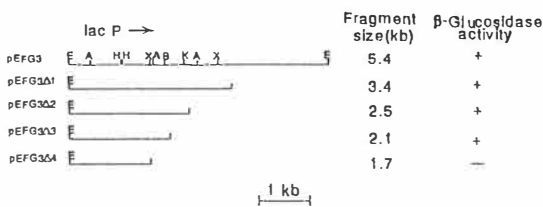


FIG.1. Deletion analysis of the insert of pEFG3. Restriction endonucleases : A, *AccI* ; B, *BamHI* ; E, *EcoRI* ; H, *Hind III* ; K, *KpnI* ; X, *XbaI*.

FIG.1より当該遺伝子を約2.1kbの領域に限定した。このDNA断片の塩基配列の決定を行うために、pBluescript IIをベクターとしてサブクローニングを行いFIG.2に示すようなsequencing strategyで塩基配列を決定した。その結果951bpと978bpの2つのオープンリーディングフレーム（以下ORF1、ORF2と略）が存在していることが判明した。しかもこのORF1とORF2

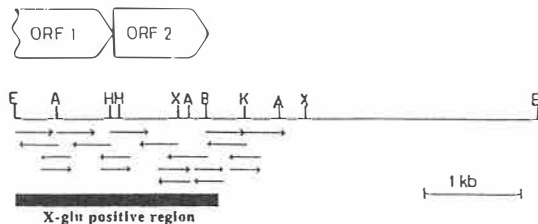


FIG.2. Sequencing strategy for the X-glu positive region of pEFG3

The arrows denote the direction and extent of sequence determination. The open reading frames are shown as ORF1 and ORF2. Restriction endonucleases : A, *AccI* ; B, *BamHI* ; E, *EcoRI* ; H, *Hind III* ; K, *KpnI* ; X, *XbaI*.

2は18bpしか離れておらず非常に近接していた。ORF2の終止コドンの直後には、安定なステム・ループ構造の形成可能な配列が見出され、ORF2の終止コドンで転写は終結するものと考えられた。なお、ORF1は完全長ではなく上流部分が欠けていることが示唆された。

### 3.2 pEFG3の上流域のクローニング

*E.faecalis*の全DNAを抽出した後*Kpn I*で完全消化後、コスミドベクターの一種であるCharomid 9-36をベクター、宿主は*E.coli* JM 109を用いて*E.faecalis*のゲノムDNA 2-16Kb断片を含む組み換え体を約5000個取得した。pEFG3の*EcoR I*-*Kpn I*断片約2.4Kbをプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションを行ったところハイブリダイズするクローンを3個取得した。その組み換えシャロミドを抽出し、*Kpn I*で消化後、電気泳動し、サザンハイブリダイゼーションを行った結果をFIG.3に示した。

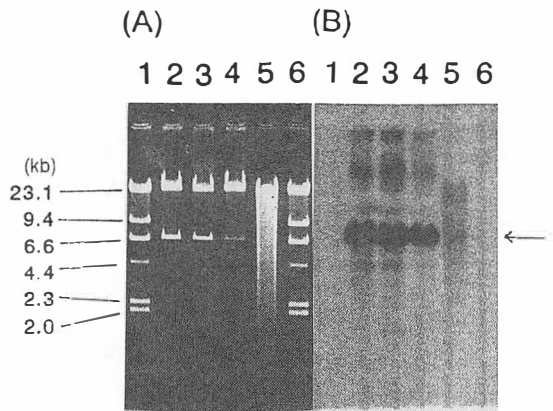


FIG.3. Southern hybridization analysis.

(A) Lane 1,6,  $\lambda$  DNA digested with *Hind III*. Lane 2, recombinant charomid (1) digested with *Kpn I*. Lane 3, recombinant charomid (2) digested with *Kpn I*. Lane 4, recombinant charomid (3) digested with *Kpn I*. Lane 5, *E. faecalis* chromosomal DNA digested with *Kpn I*.

(B) Hybridization analysis of the Southern transfer of the DNAs from gel (A), using labelled 2.4kb *EcoRI*-*KpnI* fragment of pEFG3 as a probe.

この約6.7Kbの *Kpn* I断片をpBluescriptIIKS+にサブクローニングし、FIG.4に示すようなディレクションプラスミドを得て塩基配列を決定した。これにより完全長のORF1は1470bpから成るオープンリーディングフレームであることが判明した。ORF1の上流にはプロモーターやSD配列と推測できる領域が存在していた。決定した塩基配列のうち2.7KbをFIG.5(次頁)に示した。

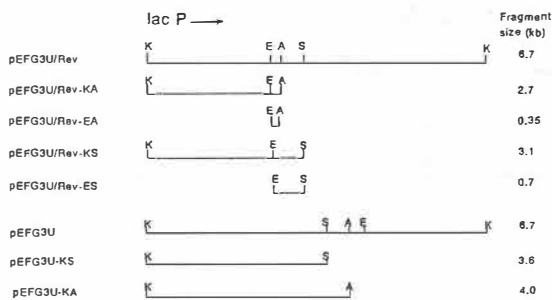


FIG.4. Deletion plasmids of pEFG3U and pEFG3U/Rev. The arrow indicates the direction of *lac* promoter in pBluescript II. Restriction endonuclease used are as follows: A, *Apa*I; E, *Eco*RI; K, *Kpn*I; S, *Spe*I.

### 3.3 各オープンリーディングフレームの機能についての検討

ORF1、ORF2それぞれについてアミノ酸レベルでの相同性を調べたところ、ORF1、ORF2ともに他生物起源の $\beta$ -glucosidaseとの相同性は低かった。むしろORF1はsucrose-6-phosphate hydrolaseやsucrose  $\alpha$ -glucosidaseと高い相同性を示し、ORF2は*lac*リプレッサータンパク質と高い相同性を示した。

さらに各々のORF産物の機能を調べるために、塩基配列のデータをもとにORF1のみを含む領域、ORF2のみを含む領域、ORF1とORF2双方を含む領域をPCRにより増幅し、ベクターpUC18、pBluescript II、pKK223-3にクローニングした。ORF2のみを含む領域と、ORF1とORF2双方を含む領域をクローニングしたものは、IPTGの存在下X-gluを分解して青色を呈するクローンが得られた。これより特にORF2

産物が、*E. coli*の $\beta$ -glucosideの利用に深く関わっていることが判明した。さらに遺伝子発現と遺伝子産物同定のために*in vivo*での遺伝子発現状況を調べた結果、FIG.6に示すように約36 KDaのタンパクが発現していることが判明した。これはORF2の塩基配列より推定した分子量と一致していた。ORF1、ORF2ともに $\beta$ -glucosidase遺伝子をコードしている可能性は極めて低いにも関わらず、*E. coli* JM109に $\beta$ -glucosidase資化能を与えている理由についての詳細は不明である。しかし、以上の結果は、*E. faecalis*由来のORF産物が直接的に、または他の糖取り込み制御機構の抑制によって、*E. coli*のcryptic  $\beta$ -glucoside-PTSを活性化したことを強く示唆している。

## 4. 結 言

*E. faecalis*由来の $\beta$ -glucoside資化性遺伝子の塩基配列を決定したところ、約3.4Kbの領域

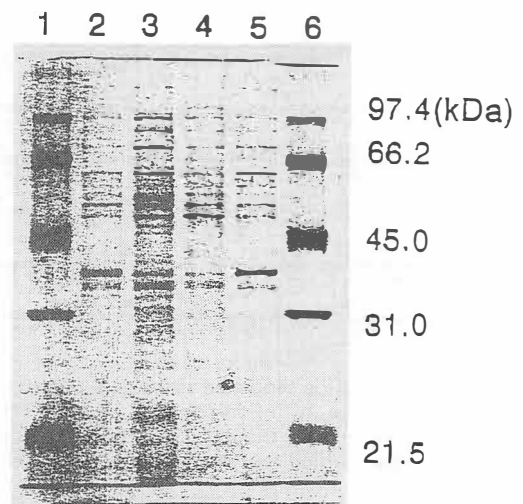


FIG.6. SDS-PAGE of the crude extract from *E. coli* transformants harboring ORF2 gene. Lanes 1,6, molecular weight markers. Lanes 2,5, transformants with IPTG (inducer) Lane 3, transformants without IPTG Lane 4, *E. coli* JM109 harboring pUC18

```

10      20      30      40      50      60
AACCGCTTATCATARAATGTAATTTATATATATATTTTGGATTAAATAGATTATAT
70      80      90      100     110     120
ATGTTATACCGTTCGATTTCTGCAATTTGTTTATACCTATAGACTACTACTATTTCT
-35
130     140     150     160     170     180
AATAAGGACCACTTACTTATGTCACCACTATGACCACTGACTGATGATACCTTAC
50      H S S I A H H D U T O E L A Y
190     200     210     220     230     240
TGGCCCTTATCTTCTGGACATCTGCTACCTCGAARATCTACTTCTATATCGGCA
A P V S S U T S A H L E H L T S I I A Q
250     260     270     280     290     300
ATCTAGTGGCGTTTAAAGTATCATATTCACCCACGACGAGGACTAATGATCCCA
S S U A F K V H I O P Q T G L L H D P H
310     320     330     340     350     360
CGGTTTTTCATTTCAATACCCAGTGCATTTATTTATCAGCCGTTTCCCTTTGGG
G F S V F H H Q U H L F Y Q A F P F G S
370     380     390     400     410     420
TGTTCAGCGACTAARAAGTTGGCCCACTTACTTCCCACTTAAATCTACTGGGAT
U H G L K S U A H L T S S G L I H U O Y
430     440     450     460     470     480
TGAAGGAATTGCCTTCTCCGACTCGAATGATTCATGCGCTATACGCGCTC
E G I A L S P O S E V O S H O U V S O S
490     500     510     520     530     540
AGCTTTACCACTAGATACCACTACTGTTTATTTATACAGAAATGTTTCGATCA
A L P I O H Q L C L F Y T O H U A O O T
550     560     570     580     590     600
TTGGCAGGATTCGATATCAAAATATGCAATGGCTGAAATCTTAGTGCCATCA
U O R A F Y Q N I A U L H S L O A I T K
610     620     630     640     650     660
GGAACTACCCATCTCCACCAATGACCACTTACTTCCCACTTTCGATCCGAT
E S T P F L P I O P H V S S H F A O P H
670     680     690     700     710     720
GGTATTTCTTATCAGACGACTGTTTATTTATGCTGACTAGTATTAATGACCA
U F P V Q E G O L U L I O A S O L H O Q
730     740     750     760     770     780
AGGAARAATTTGGTGTATTTTCTAAGATCGAAGTACCACTTTCATCACTGG
G K I U V Y F S K G A H U V K H F H O L G
790     800     810     820     830     840
CGAATGACGTTCCACCGAARATGAGCTACATGGTTGAAATGCCCCAATTTG
E L T F T G O E L O V H U E C P H L U F
850     860     870     880     890     900
TATTGATCGGCGCTGCTTATTTATTTCCCAAGGCTTACTTCCATCTGTAARA
I O G A P U L L F C C O G L S P S U V K S
910     920     930     940     950     960
TTATCAGAAATCTATCCARATATGACCACTGGCTGAAACGTTGATTTGGAATCT
V O H I V P H H V T L A E T F O L E H L
970     980     990     1000    1010    1020
TTCTTATGCTCAGCGTGGACCTTTTGAARATTTAGATGAGGGTTTGTGCTCAGCC
S L U Q O A G P F E H L G E O F O U V A T
1030    1040    1050    1060    1070    1080
TCAGCCCTTATGACCGCAATGGCTGACTGGCTGCGTTCGATGGATGGTTGCCA
O P F H A P O O A A L A U S M I O L P E
1090    1100    1110    1120    1130    1140
AATCACTTACCAAGTATGTTGGAGGTTGGCCAAATGGCTTAACTGTTGTAARA
I T Y P S O U E O U A H O L S L U K E L
1150    1160    1170    1180    1190    1200
CACAAATCACACCGAARATTTTCARATTCAGTTCGAAACGAAATGCTTCGTC
T I H H O K L F Q Y P U S E T E H L A Q
1210    1220    1230    1240    1250    1260
ATCCGCCACTACTTATCAAAATGGCTGCAATTTTATCTACTGCTTCTTTGATTA
S A T T L S H O C H F L S T A S F E L E
1270    1280    1290    1300    1310    1320
AGTGGATATCCCAAAATGAGATTGCTTTATTCGGCTTTAGCGAAGCAACGGTTC
U O I P K H E I A F I A L L A H E T O S
1330    1340    1350    1360    1370    1380
AARAAGACTTTTAACTTATGATACCACTCAAGTAAATACCCCTTATCGAARAT
K O L L I C T I O T I H G K I T L O A T F
1390    1400    1410    1420    1430    1440
TGC TGGCCACCTTTTCTGTAARAATGTCGCACCACTCTCGTGAARATTAARA
A O O P F A E K V G C I A E T K I A K H
1450    1460    1470    1480    1490    1500
TAACTCACTGATTAACCTATTTTGTGATGCTGCTGTCAGAAATTAIO TAA
K S U Q L T I F U O G C S U A E I V U H K
1510    1520    1530    1540    1550    1560
AGTGAARAACCACTGACTGCTGCTTCCAGATTAAGCCGACCACTTCTTCTCT
G E K T H T G A F F P O K A Q O V L W L
1570    1580    1590    1600    1610    1620
ATCCAAAGCCGAAACCTGTTTATGACTGGAAATACGAAATTAAGATGATG
S K T A K A C F V E L E H T H H *
1630    1640    1650    1660    1670    1680
GTGAATTTGATGGTGAATTAACCTGACTGAGCAAGCTTCTGCGGCTGAGCC
H U U K L T O G U A K L A G U S P T
1690    1700    1710    1720    1730    1740
AAGGTAAGCCGCTGATTAATTAATGATTTAGTCTGCTCAARAARATTAAG
T U S A U I H H V O V L S O K T I G K U
1750    1760    1770    1780    1790    1800
TCATCAAGCACTGGAARATTAATTAACCACTTATGACTGACCAAGGCTTCC
H O A H E E L H V Q P H O L A A S L Q O
1810    1820    1830    1840    1850    1860
AARAAGTACCGCTGATTTGATGCTTCCCTTCTGCTGATTAAGATTTTGT
K S T Q L I G L U F P S U S H P F F G E
1870    1880    1890    1900    1910    1920
ATTAATTAACCACTGGAARATTAATTAACCACTTATGACTGACCAAGGCTT
L I E T L E A K L F A T O G V K U I L C O
1930    1940    1950    1960    1970    1980
TAGTGAARAAGTCCGAAARAAGCCGCTTATTAAGTCTGCTCAARAARAT
S E K O P E K E A A V L A H L A A H K U
1990    2000    2010    2020    2030    2040
GGACCGTATTAACCTGACCACTTACTGATTAACCACTGATTAAGATTTT
G O U I T O S H H L A I H E V E H U S L
2050    2060    2070    2080    2090    2100
ACCAATTTGCTTCCCTTCCCTTCCCTGACCACTTCCCAATTTGCTTCCGAA
P I U S F O A F L A P G I P I U S S O
2110    2120    2130    2140    2150    2160
CTTTCAGCGGCAARAAGCCGCTTATTAAGTCTGCTCAARAARATTAAG
F O O O Q K A T E A L F A S O S O K I A
2170    2180    2190    2200    2210    2220
AATTAATGCTGATTAACCAAGCCGCTTATTAAGTCTGCTCAARAARATTA
I I T O A H H T O A P S O V A L C O V Y K
2230    2240    2250    2260    2270    2280
ACCAARATTAARAATTAAGCCGCAARAAGCCGCTTATTAAGTCTGCTCA
Q T H E K Y G A O K T I L Q I O H O T S
2290    2300    2310    2320    2330    2340
ACCAARATTAARAATTAAGCCGCAARAAGCCGCTTATTAAGTCTGCTCA
T T L K H L E I E A L L Q H K T U O G O I
2350    2360    2370    2380    2390    2400
CTTTCAGCGGCAARAAGCCGCTTATTAAGTCTGCTCAARAARATTAAG
F C T O G L T A I T U H H I A O K L K I
2410    2420    2430    2440    2450    2460
ATCAATTTGCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCT
S I P E E L K U I G V O G T K L I K A I
2470    2480    2490    2500    2510    2520
TCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCTTCCCT
A P Q L S T I U O P I G E H C O U H I O
2530    2540    2550    2560    2570    2580
CTTTCAGCGGCAARAAGCCGCTTATTAAGTCTGCTCAARAARATTAAG
L L L A R A H H D P O V A L E E H Y P I P
2590    2600    2610    2620    2630    2640
GATTCAGCTATCATTTCTGATTTCTGATTTCTGATTTCTGATTTCTGAT
I Q L S L S E S C *
2650    2660    2670    2680    2690    2700
ATCTTATTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCTTCT

```

FIG. 5. Nucleotide sequence of the genes from *E. faecalis*, which control  $\beta$ -glucoside utilization in *E. coli*. Putative initiation codons (ATG) are at bp140 and 1631. In the downstream of the termination codon (\*), the putative transcriptional terminator at bp2610 to 2639 is indicated by inverted arrows, which represent the proposed stem of the stem-loop structure.

の中に2つのオープンリーディングフレーム (ORF1: 約1.5Kb; ORF2: 約1.0Kb) が存在していることが判明した。ORF1、ORF2は両者とも $\beta$ -glucosidaseをコードする遺伝子ではなく、むしろ*E. coli*の $\beta$ -glucoside輸送機構に

関与するタンパク質である可能性が高い。これらの遺伝子を*E. coli*内で発現させた場合、 $\beta$ -glucoside輸送が可能になり、 $\beta$ -glucoside資化能を獲得していることが示唆された。

# 水-ノナン-エチレングリコールモノブチルエーテルからなる 3成分2相系の相挙動に関する熱力学的考察

九州大学理学部

荒 殿 誠

The phase behavior of a ternary two-phase system composed of water, nonane, and ethylene glycol monobutyl ether (C4E1) was investigated thermodynamically. The compositions of the water and nonane phases were measured precisely as a function of the total concentration of C4E1 and temperature under atmospheric pressure by gas liquid chromatography. A new kind of criterion of ideality for the two-phase equilibrium was proposed and examined by using the composition data obtained. The composition region of ideal dilute solution behavior was determined for the two phases as a function of temperature. It was suggested that the formation of the aggregate of C4E1 in the water phase is enhanced at lower temperatures and that in the nonane phase at higher temperatures, respectively. Furthermore the entropy and enthalpy of transfer of ether molecules from the water to the nonane phase were evaluated not by calorimetry but by applying the thermodynamics to the composition data. The transfer was found to accompany the positive entropy and be endothermic.

## 1. 緒 言

マイクロエマルジョン<sup>1-3)</sup>、多重臨界点<sup>4, 5)</sup>、油相と水相間における活性剤相の濡れの挙動<sup>6-8)</sup>あるいは関連した種々の事柄<sup>9)</sup>を理解するために、水、油、および非イオン性界面活性剤を含む多成分系の相挙動に関して多くの研究が報告されている。相の平衡組成とそれらの熱力学的解析は構成成分の移行に伴う熱力学量を与え、さらに我々が以前に報告したように2相間の界面形成に関する、より深い理解をもたらす<sup>10)</sup>。3成分系についての相境界は光学的方法などによって決定されてきたが、与えられた条件下での平衡組成は

この方法では求められない。これらの点から考えて、平衡組成を求める実験手法を確立し、その結果を解析する熱力学式を導出することは重要なことであり、ゆらぎと相図の理論の結果に応用することにより会合体の構造に関する情報をも得られる可能性がある<sup>11)</sup>。

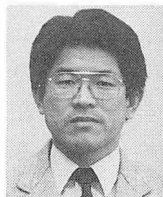
この研究では水、ノナンおよびC4E1からなる3成分系を選び、各相の組成をガスクロマトグラフ法<sup>12)</sup>を用いて温度の関数として正確に求めた。さらに理想性、会合体形成、移行の熱力学量を検討する熱力学関係式を導出し適用した。

## 2. 実 験

### 2.1 試 料

水はアルカリ性過マンガン酸カリウム溶液から3回蒸留したもの、ノナンとC4E1は市販特級試薬を蒸留したものをを用いた。ガスクロマトグラフにより純度は、それぞれ99.9%以上であると判断された。

Thermodynamic Consideration on Phase Behavior of the Ternary Two-Phase System of Water, Nonane, and Ethylene Glycol Monobutyl Ether



Makoto Aratono  
The Faculty of Science  
Kyushu University

## 2.2 測定

ガスクロマトグラフ (HITACHI263-70) により平衡組成は決定された: 水とノナン等の等重量混合物に所定量のC4E1を加えた混合物を1時間程度激しく混合した後、1-30時間をかけて完全に相分離させた。この後、各相の少量をガスクロマトグラフに導入しピーク面積をクロマトグラフ積分計 (HITACHI D-2500) により求め、検量線により組成に換算した。組成決定の実験誤差はモル分率で水、ノナンおよびC4E1に対してそれぞれ  $6 \times 10^{-3}$ 、 $1 \times 10^{-4}$ 、 $3 \times 10^{-4}$  であった。

## 3. 結果と考察

### 3.1 温度一定下での2相の組成

水相とノナン相をそれぞれ上つき添え字 W と O で、水、ノナン、C4E1の各成分をそれぞれ下つき添え字 1、2 および 3 で示す。平衡組成は温度と C4E1 の全モル分率  $x_3$  の関数として測定された。図1では平衡組成が  $x_3$  に対してプロットされ、図2では  $x_3^W$  vs  $x_3^O$  プロットの形で示されている。なお図2中の黒丸は第3相が出現する点であり、

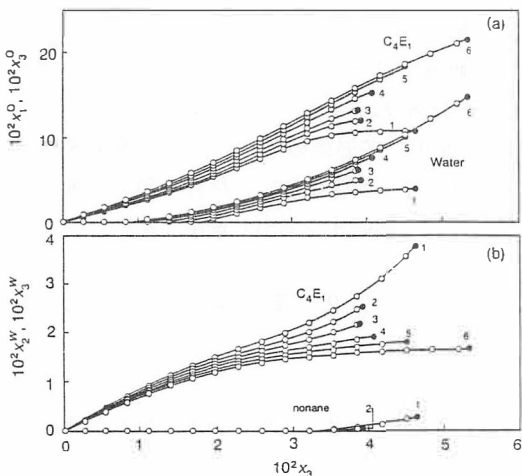


Fig.1 Mole fraction of component vs total mole fraction of C4E1 curves at constant temperatures : (a) in the water phase, (b) in the nonane phase ; (1)  $T = 293.15\text{K}$ , (2) 295.65, (3) 298.15, (4) 300.65, (5) 303.15, (6) 305.65.

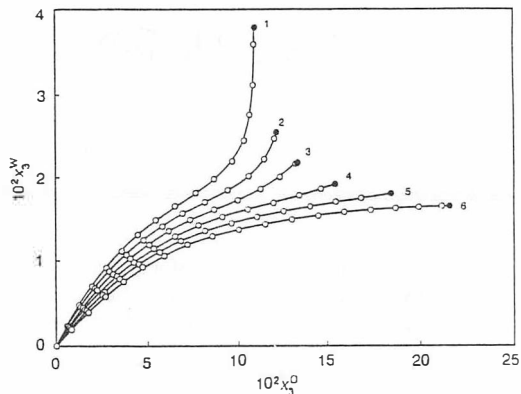


Fig.2 Mole fraction of C4E1 in the water phase vs mole fraction of C4E1 in the nonane phase curves at constant temperatures : (1)  $T = 293.15\text{K}$ , (2) 295.65, (3) 298.15, (4) 300.65, (5) 303.15, (6) 305.65.

以下においてはこの全濃度における水相でのモル分率を  $x_3^W$ 、油相でのそれを  $x_3^O$  で表す。温度の上昇によりノナン相でのC4E1の濃度は増大し、水相でのそれは減少する。これは油-非イオン性界面活性剤2成分系の上部臨界溶解現象および水-非イオン性界面活性剤2成分系の下部臨界溶解現象が3成分系の相挙動に大きく影響を及ぼしていることを示している<sup>13)</sup>。

図1bで見られるノナンの溶解度の急激な増加は、この濃度がノナンが存在しない場合の水相中での会合体形成の濃度に近いことから<sup>12, 14, 15)</sup>、水相中での会合体形成に関係していると思われる。したがって、ノナン相においても水が検出され始める濃度付近で会合体形成が始まっていると思われる。会合体形成に関して、次のことを指摘しておく: 第1に、低い温度におけるほぼ一定の  $x_3^O$  と高い温度におけるほぼ一定の  $x_3^W$  は、水相とノナン相において会合体が形成されている1つの証拠である<sup>16)</sup>。第2に2つの比  $x_1^O/x_3^O$  と  $x_2^W/x_3^W$  が温度にほとんど依存しないことは、水とノナンの相互溶解度の上昇が、水とノナンの2成分系の相互溶解度の上昇ではなく、C4E1会合体の存在により主に引き起こされていることを示している。

ところで得られた結果を熱力学的な見地から検

討してみる。溶液の性質は会合体形成により変化した理想溶液の挙動からはずれてくるだろう。この点を吟味するのに溶液の束一的性質が役立つことは良く知られているが、各相の組成関係も2相系の理想希薄溶液の一種の基準となりうることを示す。3成分2相系の平衡条件を表す3つの連立方程式

$$-\Delta_{ws,r}^0 dT + \Delta_{wv,r}^0 dp + \mu_{r1}^0 dx_1^0 + \mu_{r3}^0 dx_3^0 - \mu_{r2}^w dx_2^w - \mu_{r3}^w dx_3^w = 0, r=1,2,3 \quad (1)$$

を解くとノナン相における組成の関係は

$$(\partial x_r^0 / \partial x_3^0)_{T,p} = - (x_1^w \mu_{13}^0 + x_2^w \mu_{23}^0 + x_3^w \mu_{33}^0) / (x_1^w \mu_{1r}^0 + x_2^w \mu_{2r}^0 + x_3^w \mu_{3r}^0), r=1,2 \quad (2)$$

で与えられる。ここで

$$\Delta_{wv,r}^0 = y_r^0 - y_r^w, y = s,v \quad (3)$$

は成分 $r$ の水相からノナン相への移行の熱力学量であり、また

$$\mu_{ij} = \partial \mu_i / \partial x_j \quad (4)$$

である。ノナン相が理想希薄溶液であれば式2の右辺はモル分率だけの項で

$$(\partial x_r^0 / \partial x_3^0)_{T,p} = - x_r^0 [x_3^w (1 - x_r^0) - x_3^0 (1 - x_r^w)] / x_3^0 [x_r^w (1 - x_3^0) - x_r^0 (1 - x_3^w)] \quad (5)$$

と書かれる。式5の両辺は別々に実験から求められるのでノナン相が理想希薄溶液であるかどうかを吟味するのに利用できる。水相に対する式5の類似式を利用して水相の理想性も検討できる。これまで2相系の理想挙動の基準として、傾き1を持つ  $\ln x_3^w$  vs  $\ln x_3^0$  直線が利用されてきたが、このことは式5の代わりに式1から得られる簡単な関係

$$(\partial x_3^w / \partial x_3^0)_{T,p} = x_3^w / x_3^0 \quad (6)$$

を利用することと等価である。しかしながら実験結果に式6を適用しても、独立に2相の理想性は吟味できない。この点において式5は式6よりも有用であることを指摘しておく。

式5の左辺(LHS)は  $x_1^0$  vs  $x_3^0$  曲線から、右辺(RHS)は図1aから計算された。LHSの値は、以後  $x_3^{0,n}$  と記すモル分率においてRHSの値からずれ始めた。水相に対する式5の類似式により  $x_3^{w,n}$  も決定された。これらの値は  $x_3^{w,t}$  お

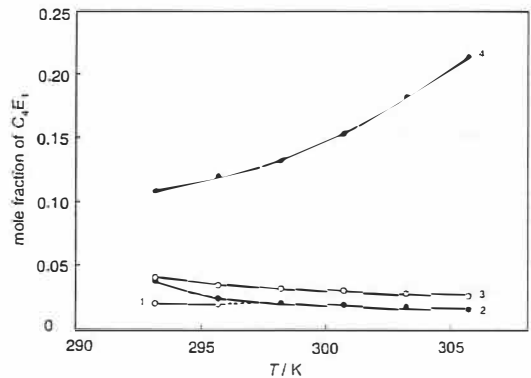


Fig.3 Mole fraction of C4E1 vs temperature curves: (1)  $x_3^{w,n}$ , (2)  $x_3^{w,t}$ , (3)  $x_3^{0,n}$ , (4)  $x_3^{0,t}$ .

よび  $x_3^{0,t}$  の値とともに図3に温度の関数として示されている。温度の上昇により  $x_3^{0,n}$  の値は減少し、 $x_3^{0,t}$  の値は増加している。これは油に富む相では、高い温度において会合体形成が促進され、したがってC4E1の溶解度が増加することを示唆する。一方、水に富む相においては、温度の上昇により  $x_3^{w,n}$  の値は僅かに増加し、 $x_3^{w,t}$  の値は減少している；すなわち高い温度で会合体形成は減少し、したがって溶解度も低下する。さらに低い2つの温度では水相およびノナン相の両相で会合体が存在していることが分かる。

### 3.2 相プリズム

3成分系の相挙動の温度依存性を示すために、異なる温度でのギブズ三角形を重ね合わせた相プリズムを組立て図4に示してある。ここで三相領域も中心の三角形で示されている。温度の上昇に伴い中間相の組成は時計まわりに、2相の平衡組成を結ぶ平衡連結線は反時計まわりに回転していることが分かる。このことはC4E1の親水性が温度の上昇により低下していることを示している。2成分系の上部および下部臨界溶解温度近傍での溶液挙動から考えて、C4E1分子は水相においては水和を通してどちらかと言えばエネルギー的に、またノナン相においてはどちらかと言えばエントロピー的に安定な状態にあると言えるだろう。

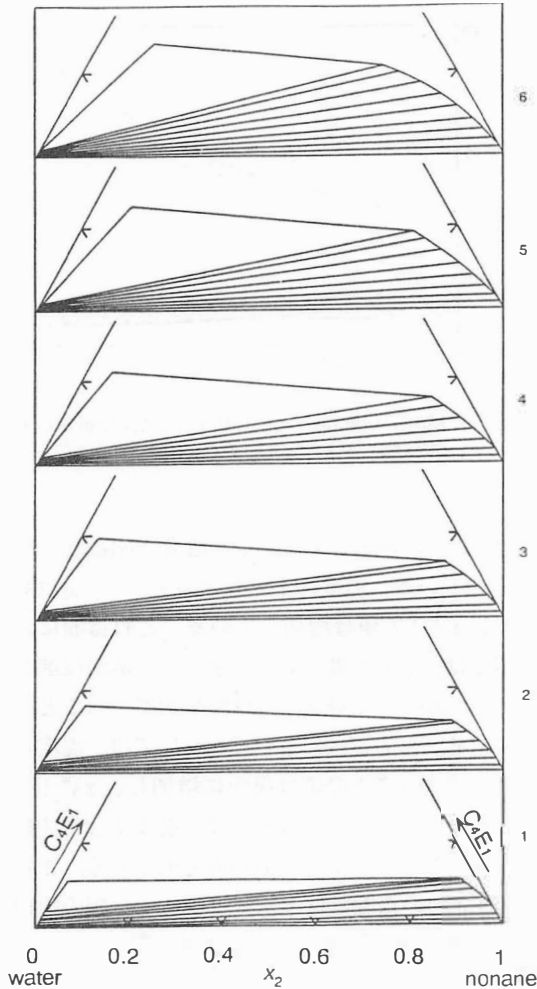


Fig.4 Phase prism constructed at different temperatures : (1)  $T = 293.15\text{K}$ , (2)  $295.65$ , (3)  $298.15$ , (4)  $300.65$ , (5)  $303.15$ , (6)  $305.65$ .

### 3.3 移行の熱力学量

式1からC4E1分子の移行のエントロピーが次式で与えられる：

$$\Delta_{\text{w}3}^{\text{O}} = \left[ \mu_{31}^{\text{O}}(\partial x_1^{\text{O}}/\partial T)_{p,x_m^{\text{O}}} + \mu_{33}^{\text{O}}(\partial x_3^{\text{O}}/\partial T)_{p,x_m^{\text{O}}} \right] - \left[ \mu_{32}^{\text{W}}(\partial x_2^{\text{W}}/\partial T)_{p,x_m^{\text{W}}} + \mu_{33}^{\text{W}}(\partial x_3^{\text{W}}/\partial T)_{p,x_m^{\text{W}}} \right] \quad (7)$$

ここで  $x_m^{\text{O}}$  は式1に現われているモル分率のうちの1つである。対応するエンタルピーは

$$\Delta_{\text{w}3}^{\text{O}} h_3 = T \Delta_{\text{w}3}^{\text{O}} \quad (8)$$

で与えられる。

したがって、移行のエントロピーやエンタルピーが熱測定によってのみならず、2相の組成を温度の関数として測定することによっても得られることに注意すべきである。理想希薄溶液の挙動が観測される領域では式7は

$$\Delta_{\text{w}3}^{\text{O}} = - (RT/x_3^{\text{W}})(\partial x_3^{\text{W}}/\partial T)_{p,x_3^{\text{O}}} \quad (9)$$

のように簡単な式となる。 $\Delta_{\text{w}3}^{\text{O}}$ の値は、式9を図5に示された  $x_3^{\text{W}}$  vs  $T$  曲線に適用して得られた。

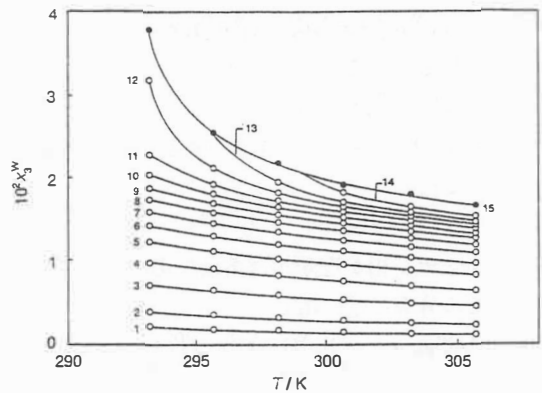


Fig.5 Mole fraction of C4E1 in the water phase vs temperature curves at constant mole fraction of C4E1 in the nonane phase : (1)  $10^2 x_3^{\text{O}} = 0.5$ , (2) 1, (3) 2, (4) 3, (5) 4, (6) 5, (7) 6, (8) 7, (9) 8, (10) 9, (11) 10, (12) 11, (13) 12, (14) 14, (15)  $x_3^{\text{O},t}$  vs  $T$ .

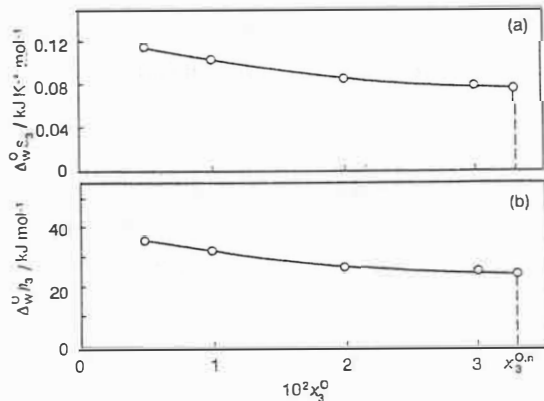


Fig.6 Entropy and enthalpy of transfer of C4E1 molecules from the water to the nonane phase at  $298.15\text{K}$  : (a) entropy, (b) enthalpy.

図6に $\Delta_w^p s_3$ の値と対応する $\Delta_w^p h_3$ の値が298.15 Kにおいて $x_3^0$ に対してプロットされている。C4E1分子の水相からノナン相への移行は、エントロピーの増大を伴い吸熱的であることが分かる。このことは、ノナン相よりも水相において分子間の引力的な相互作用が分子の運動と配向を束縛していることを示している。さらにこのことは、上に述べたC4E1分子は水相においては水和を通してどちらかと言えばエネルギー的に、またノナン相においてはどちらかと言えばエントロピー的に安定な状態にあるということを強く支持している。

我々の次の論文では、C4E1分子の水/ノナン界面における吸着挙動が、界面張力の測定結果とその熱力学的解析およびこの論文で得られた結果をもとにして議論される予定である。

## 引用文献

- 1) (a) Kahlweit, M. ; Strey, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1985, 24, 654-668.  
(b) Kahlweit, M. ; Strey, R. ; Haase, D. ; Kurnieda, H. ; Schmeling, T. ; Faulhsaber, B. ; Borkovec, M. ; Eicke, H.-F. ; Busse, G. ; Eggerr, F. ; Funck, T. ; Richmann, H. ; Magid, L. ; Soderman, O. ; Stilbs, P. ; Winkler, J. ; Dittrich, A. ; Jahn, W. J. *Colloid Interface Sci.* 1987, 118, 436-453.  
(c) Kahlweit, M. ; Strey, R. ; Haase, D. ; Firman, P. *Langmuir* 1988, 4, 785-790. (d) Kahlweit, M. ; Strey, R. ; Busse, G. J. *Phys. chem.* 1990, 94, 3881-3894.
- 2) Shinoda, K. ; Lindman, B. *Langmuir* 1987, 3, 135-149.
- 3) Kurnieda, H. J. *Colloid Interface Sci.* 1989, 133, 237-243.
- 4) (a) Widom, B. J. *Chem. Phys.* 1975, 62, 1332-1336. (b) Widom, B. *Langmuir* 1987, 3, 12-17.
- 5) Lovellette, M. J. *Phys. Chem.* 1981, 85, 1266-1270.
- 6) (a) Kahlweit, M. ; Strey, R. ; Firman, P. ; Haase, D. *Langmuir* 1985, 1, 281-288.  
(b) Kahlweit, M. ; Strey, R. ; Firman, P. J. *Phys. Chem.* 1986, 90, 671-677.  
(c) Kahlweit, M. ; Strey, R. ; Aratono, M. ; Jen, J. ; Schubert, K. V. *J. Chem. Phys.* 1991, 95, 2842-2853.
- 7) Chen, L.-J. ; Jeng, J. ; Robert, M. ; Shukla, K. P. *Phys. Rev. A.* 1990, 42, 4716-4723.
- 8) Aratono, M. ; Kahlweit, M. *J. Chem. Phys.* 1991, 95, 8578-8583.
- 9) Degiorgio, V. ; Corti, M. ; *Physics of Amphiphiles : Micelles, Vecicles and Microemulsions ; North-Holland Physics Publishing : Amsterdam ; 1985, and references cited in.*
- 10) (a) Aratono, M. ; Motomura, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1985, 58, 3205-3209.  
(b) Aratono, M. ; Motomura, K. *J. Colloid Interface Sci.* 1987, 117, 159-164.  
(c) Aratono, M. ; Nakayama, S. ; Ikeda, N. ; Motomura, K. *Colloid Polym. Sci.* 1990, 268, 877-882.
- 11) Teubner, M. *J. Chem. Phys.* 1992, 96, 3811-3813.
- 12) (a) Kilpatrick, P. K. ; Gorman, C. A. ; Davis, H. T. ; Scriven, L. E. ; Miller, W. G. *J. Phys. Chem.* 1986, 90, 5292-5299.  
(b) Kipatrick, P. K. ; Davis, H. T. ; Scriven, L. E. ; Miller, W. G. *J. Colloid Interface Sci.* 1987, 118, 270-285.
- 13) Kahlweit, M. ; Lessner, E. ; Strey, R. *J. Phys. Chem.* 1983, 87, 5032-5040.
- 14) Quirion, F. ; Magid, L. J. ; Drifford, M. *Langmuir* 1990, 6, 244-249.
- 15) Elizalde, F. ; Gracia, J. ; Costas, M. *J. Phys. Chem.* 1988, 92, 3565-3568.
- 16) Harusawa, F. ; Saito, T. ; Nakajima, H. ; Fukushima, S. *J. Colloid Interface Sci.* 1980, 74, 435-440.
- 17) Manabe, M. ; Koda, M. ; Shirahama, K. *Bull.*

Chem. Soc. Jpn. 1975, 48, 3553-3556.

- 18) Prigogine, I. ; Defay, R. ; Chemical Thermodynamics ; Everett, D. H., Trans. ; Longmans : London, 1954 ; p393.
- 19) Sassen, C. L. ; Filemon, L. M. ; de Loos, T. W. ; de Swaan Arons, J. J. Phys. Chem. 1989, 93, 6511-6516.
- 20) Aratono, M. ; Nagoya, F. ; Takiue, T. ; Ikeda, N. ; Motomura, K. to be published.

### 研究成果

- 1) Thermodynamic study on phase transition at the water/undecyl alcohol interface  
M. Aratono, T. Takiue, N. Ikeda, A. Nakamura, and

K. Motomura, J. Phys. Chem. 1993, 97, 5141-5143.

- 2) Thermodynamic consideration on phase behavior of the ternary two-phase system of water, nonane, and ethylene glycol monobutyl ether  
M. Aratono, F. Nagoya, T. Takiue, and N. Ikeda, J. Phys. Chem. 1993, 97, 13820-13823.
- 3) Thermodynamic study on adsorption of the ternary two-phase system of water-nonane-ethylene glycol monobutyl ether  
M. Aratono, F. Nagoya, T. Takiue, and N. Ikeda, J. Colloid Interface Sci. 1994, in press.

# 各種界面活性物質によるマクロおよ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

東京理科大学理工学部  
阿部正彦

Properties of the o/w type microemulsion with dimyristoylphosphatidylcholine, properties of the microemulsion with anionic/cationic mixed surfactants, phase behavior of amphoteric surfactant multi-phase microemulsion, binding constants of inorganic electrolytes and aggregation numbers of the o/w type microemulsion with an amphoteric surfactant, and molecular interactions between lipid and some steroids in a monolayer and in a bilayer (w/o/w type macroemulsion) were investigated from the point of colloid and surface chemistry. The properties of microemulsion were dependent extensively on both salinity and pH values. The middle-phase microemulsion with mixtures of anionic/cationic surfactants was independent of both temperature and salinity. The formation of the DMLL microemulsion was strongly depend both on pH and on salinity. The DMLL microemulsion near the isoelectric point was found to have some attractive features compared with other surfactants such as sulfonates and/or nonionics. The adsorption density of DMLL molecules on the surfaces of o/w type microemulsions increased as the pH approached that of the isoelectric region ; then the surfactant number on the surface of unit microemulsion was able to be obtained if we specified the diameter of the microemulsion. The interaction between hydrophobic groups of DPPC and steroids in both the monolayer and the bilayer membranes (w/o/w type macroemulsion) was found to increase with decreases in the number of side chains and double bonds in the steroid molecules involved.

## 1. 天然界面活性物質によるO/W型マイクロエマルジョンの物性<sup>1)</sup>

### 1.1 緒言

一般に、水と油との界面張力は大きい(約50 mN/m)ため混じり合わないが、界面活性剤などの両親媒性物質を添加すると、その界面張力は大幅に低下して相互溶解し、“マクロ”エマルジョンとして分散させることが可能である<sup>2)</sup>。

しかし、マクロエマルジョンは熱力学的非平衡系であるため静置安定性が悪く、やがては相分離を起こす系である。一方、熱力学的平衡系である“マイクロ”エマルジョンは、“マクロ”エマルジョンのように水と油をかなり高い比率で含んだ系でありながら、粒子径が非常に小さく(10~100nm程度)、外観は透明で(勿論、透明でないものもある)、しかも安定な一液相であることから高付加価値を有する系としてかなり多くの研究がなされている<sup>3-6)</sup>。

Physicochemical Studies on Preparation and Properties of Microemulsions with Various Surface Active Agents



Masahiko Abe

Faculty of Science and Technology  
Science University of Tokyo

エマルジョンが、食品、化粧品あるいは医薬品等の分野において利用される場合、その可溶性能、生体適合性、生体内分解性等を考慮し、使用する界面活性剤の選択に十分注意を払わなければならない。生体膜構成成分であるホスファチジルコリンは、ドラッグキャリアーを目的とした二分子膜(リポソーム)<sup>7, 8)</sup>や脂肪乳剤(リピッドマイク

ロスフェア)<sup>9, 10)</sup>などの研究に用いられており、また工業的には、化粧品あるいは食品用乳化製品等に広く利用されている安全性の高い天然の界面活性物質である。しかし、このホスファチジルコリンを用いた研究の多くは、“マクロ”エマルションに関するものであり、“マイクロ”エマルションに関するものは少ない<sup>11, 12)</sup>。そこで本研究では、ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)を用いたO/W型マイクロエマルションを調製し、その物性に及ぼす飽和炭化水素の炭化水素鎖長、塩濃度、pH等の影響を、粒子径ならびにゼータ電位の測定により検討した。

## 1.2 実験

1.2.1 マイクロエマルションの調製：所定濃度の塩水とDMPC(L- $\alpha$ -Dimyristoylphosphatidylcholine: DMPC)との混合液に、所定量のアルコールおよび飽和炭化水素を添加して十分に振とうした後、30℃の恒温槽に静置することにより、O/W型マイクロエマルションを調製した。

1.2.2 相状態の判定および粘度の測定：相状態の観察は、1.2.1項で調製した試料をテフロンライナーキャップ付きネジ口試験管に封入し、試験管ミキサーにより充分振とうした後、30℃(±0.1℃)の恒温水槽中で静置して行った。相状態の判定は、分離相の有無、溶解状態や流動性の確認、並びに偏光顕微鏡を用いて行った。また、粘度の測定にはウベローデ粘度計を用い、30℃恒温下で測定を行った。

1.2.3 粒子径の測定：マイクロエマルションの粒子径の測定は、光散乱測定装置(4700 Submicron particle analyzer、MALVERN社製)を用いて動的光散乱法により行った。光源としてアルゴンレーザ(COHERENT社製：最大出力5W、波長488nm)を用い、30±0.1℃恒温水槽中において測定した。

1.2.4 ゼータ電位およびpHの測定：マイクロエマルションの $\zeta$ -電位測定は、 $\zeta$ -電位測

定装置(Zetasizer III、MALVERN社製)を用いて、フリンジモードのレーザドップラー電気泳動法により行った。

## 1.3 結果および考察

1.3.1 マイクロエマルションの生成：一般に、ジミリストイルホスファチジルコリンなどのレシチンは疎水性ならびに疎油性が強く、また水に対する溶解度が極めて小さく(cmcは25℃で、 $10^{-7} \sim 10^{-10}$  mol/dm<sup>3</sup>程度<sup>13)</sup>)水にも油にも溶けにくい物質であることから、マイクロエマルションを生成するためにはコーサーファクタントの添加が不可欠である。そこで、コーサーファクタントとして、両親媒性物質であるプロパノールを加えたところ、O/W(Oil-in-Water)型マイクロエマルションの生成が確認された。図1に、DMPCを用いたマイクロエマルション生成に及ぼすプロパノールおよびテトラデカン濃度の影響を示す。

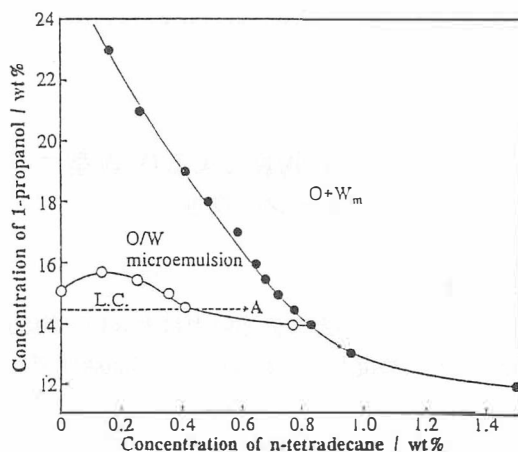


Fig.1 Phase diagram of DMPC/n-tetradecane/1-propanol/water microemulsion systems at 30°C and pH=5. The concentration of DMPC is 0.5 wt%

ここで、たて軸は水相に対するプロパノール濃度(wt%)を表わし、横軸は系全体に対する飽和炭化水素濃度(wt%)を表わす。また、図中の●印は飽和炭化水素の可溶化限界領域(二相分

離領域)、○印は液晶相から一液相 O/W 型マイクロエマルジョンに変化する領域を示す。この二つの曲線の交点における飽和炭化水素の添加量が、O/W 型マイクロエマルジョン中に可溶化できる油の最大可溶化量に相当し、テトラデカンの場合 0.82wt% であることが分かった。

1.3.2 マイクロエマルジョンに及ぼす飽和炭化水素の影響：飽和炭化水素の添加濃度を図1の破線 A (プロパノール濃度が 14.5 wt% 一定の場合) に沿って増加させると、溶液は半透明で粘稠な状態から、透明で流動性に富んだ状態へと変化した。この飽和炭化水素の添加量の低い領域で得られる粘稠な溶液を、偏光板を用いて直行ニコル下で観察したところ光学的に異方性を示し、また偏光顕微鏡によりラメラ (lamellar) 液晶特有の組織像が観察された。そこで、この溶液の粘性に及ぼす飽和炭化水素の添加濃度の影響について図2に示す。図2から明らかなように、溶液の粘性は飽和炭化水素濃度の増加に伴い徐々に減少し、油の濃度が 0.4wt% 以上でほぼ一定となった。一般に、分散溶液の粘性はその構成分子間の相互作用に依存すると考えられる。すなわち、飽和炭

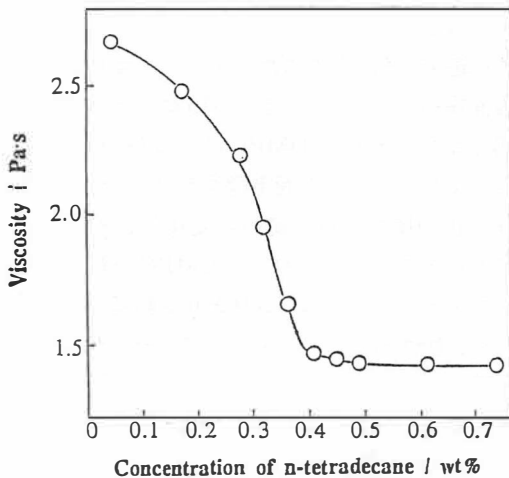


Fig.2 Effect of the concentration of n-tetradecane on viscosity for DMPC/1-propanol/water systems at 30°C and pH=5. The concentrations of DMPC and 1-propanol are 0.5 wt% and 14.5 wt%, respectively

化水素の添加量が低い領域では、DMPCの炭化水素鎖同士の疎水基間相互作用により運動が束縛された、いわゆる層状のラメラ構造を形成しているため粘性は大きくなる。しかし、飽和炭化水素の添加量の増加に伴い、このラメラ構造の疎水部分に油分子が入り込み層間隔が徐々に広がり、炭化水素鎖同士の相互作用が弱まる。その結果、ある濃度 (図2では 0.4 wt%) 以上の油を添加したときに油/水界面が曲率を持つようになり、球状のマイクロエマルジョンへ構造変化したものと考えられる。

1.3.3 マイクロエマルジョンに及ぼすコーサーファクタントの影響：マイクロエマルジョンの粒子径に及ぼすプロパノールの添加濃度の影響を図3に示す。図3から明らかなように、プロパノール濃度の増加に伴いマイクロエマルジョンの粒子径は減少した。一般に、プロパノールなどのアルコールは、界面活性剤分子と共に油/水界面に配向して界面張力を低下させる働きのあることが知られている。例えば、非イオン系界面活性剤

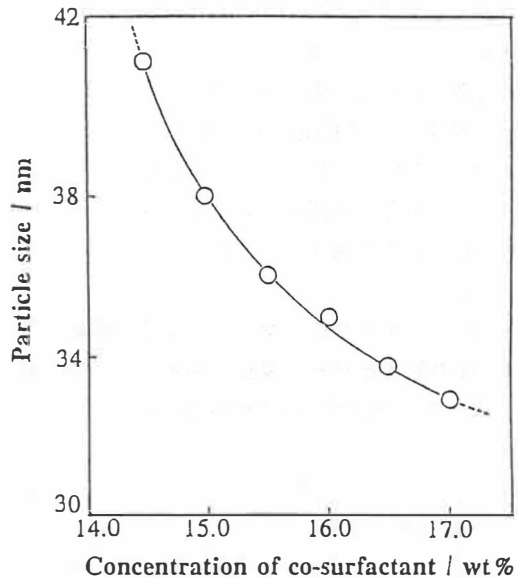


Fig.3 Effect of the concentration of cosurfactant on particle size for DMPC/n-tetradecane/water microemulsion systems at 30°C and pH=5. The concentrations of DMPC and n-tetradecane are both 0.5wt%

( $C_{16}POE_{30}$ ;  $1 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ ) を添加した水-ベンゼン系に、 $1 \times 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$  の1-プロパノールを加えると、界面張力は  $6.67 \text{ mN/m}$  から  $1.80 \text{ mN/m}$  に低下する<sup>14, 15)</sup>。また、Harkins<sup>16)</sup> は、油/水の界面張力の低下は分散液滴粒子の大きさの減少をもたらすと述べていることから、プロパノールの添加により油/水界面の界面張力が低下したため、マイクロエマルジョンの粒子径は減少したものと考えられる。

1.3.4 マイクロエマルジョンの相挙動に及ぼす添加塩の影響：油の最大可溶化量はNaCl濃度の増加に伴い減少した。さらに、塩濃度の影響を検討するため粒子径の測定を行ったところ、いずれのプロパノール濃度においても添加塩濃度の増加に伴い粒子径は減少することが分かった。これらの結果から、NaClの添加は、プロパノールの添加と同様にDMPCマイクロエマルジョン系の親水性を高める働きがあるものと考えられる。この様な傾向は、 $N^{\alpha}$ 、 $N^{\alpha}$ -ジメチル- $N^{\epsilon}$ -ラウロイルリジン（合成両性界面活性剤）マイクロエマルジョン系<sup>17)</sup>にも認められることから、両性界面活性剤の等電領域における特異的な現象であると考えられる。両性界面活性剤では、塩添加による現象としてKrafft点の低下が知られているが<sup>18)</sup>、このことも系の親水性が増加したことを意味しており、本研究における粒子径、あるいは最大可溶化量が減少する要因の一つであると考えられる。

1.3.5 マイクロエマルジョンの相挙動に及ぼすpHの影響とゼータ電位：飽和炭化水素の最大可溶化量に及ぼすpHの影響を図4に示す。図4から明らかなように、マイクロエマルジョン中に取り込まれる油の最大可溶化量は、pH7付近から急激に減少した。これは、pH7以上のアルカリ性側では、pHの増加に伴い系全体の親油性が減少する傾向にあることを示唆している。このような現象は、マイクロエマルジョンの表面に配向したDMPCの親水基のイオン性がpHに依存することに起因するものと考えられる。そこで、

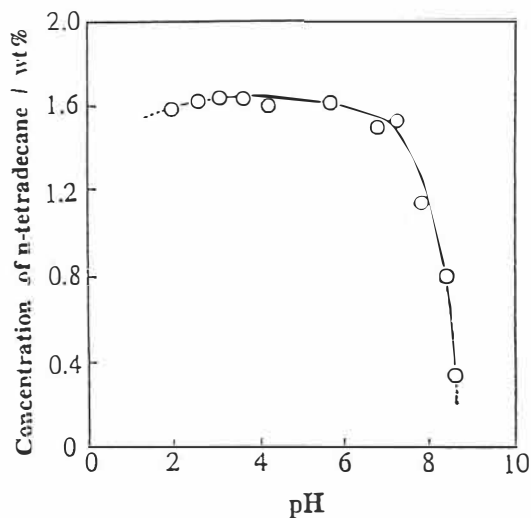


Fig.4 The maximum concentration of *n*-tetradecane for the microemulsion formation in DMPC/1-propanol/brine microemulsion systems at 30 °C. The concentrations of DMPC and 1-propanol are 1.0wt % and 14.0wt%, respectively

マイクロエマルジョン表面におけるDMPCの極性基の挙動を詳細に検討するため、pH変化によるO/W型マイクロエマルジョンの $\zeta$ -電位を測定した。この際、DMPCおよびプロパノールの濃度は一定とし、さらにイオン強度を一定とするため、NaClを  $5 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$  添加した。この $\zeta$ -電位の値から求めたマイクロエマルジョンの表面電荷密度 ( $\sigma_s$ ) を、図5に示す。図5から明らかなように、DMPCによるO/W型マイクロエマルジョンの表面電荷密度は、pHの増加に伴い正の値から負の値へと変化し、pH3.2付近でゼロとなった。これは、DMPCが親水基内にトリメチルアンモニウム基とリン酸基を持つことから、酸性側ではトリメチルアンモニウム基の正電荷が、また、アルカリ性側ではリン酸基の負電荷の寄与が強くなるためであると考えられる。

次に、O/W型マイクロエマルジョン粒子径に及ぼすpHの影響について検討した(図6)。図6から明らかなように、粒子径はpH3~7の等電点領域で極大を示した。この領域では、表面電荷密度の絶対値が特に低い(図5)ことから、他の

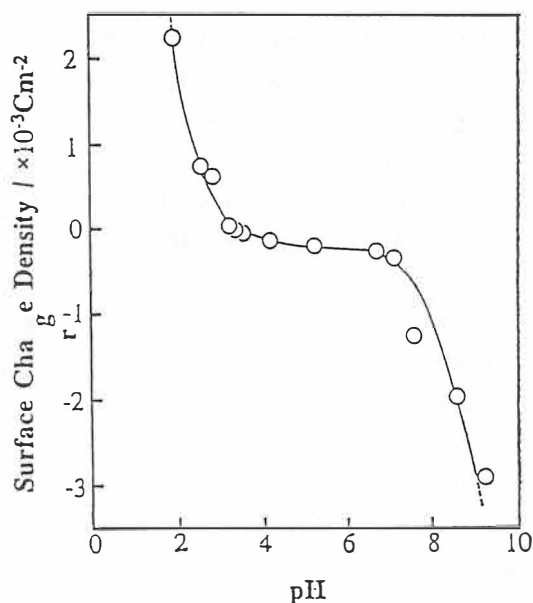


Fig.5 Surface charge density of DMPC/*n*-tetradecane/1-propanol/brine microemulsion systems at  $5 \times 10^{-3} \text{M}$  of NaCl aqueous solution as a function of pH at 30°C. The concentrations of DMPC and 1-propanol are 1.0wt% and 14.0 wt%, respectively

pH領域に比べマイクロエマルジョン表面に配向した親水基同士の反発（イオン-イオン相互作用）が弱まり、相対的に疎水性が強まるため、粒子径が大きくなったものと考えられる。

## 2. アニオン/カチオン界面活性剤混合系マイクロエマルジョンの物性<sup>19)</sup>

### 2.1 緒言

一般に、二種類以上の界面活性剤を混合した場合、その組み合わせにより界面活性剤単独系では認められない優れた機能や複合効果の現れることが知られている<sup>20)</sup>が、アニオン界面活性剤とカチオン界面活性剤を混合すると沈澱物が生成したり、界面活性が失われることが多い。しかし、混合方法によっては優れた特性を発揮することが可能となる<sup>21)</sup>。そこで本研究では、典型的なアニ

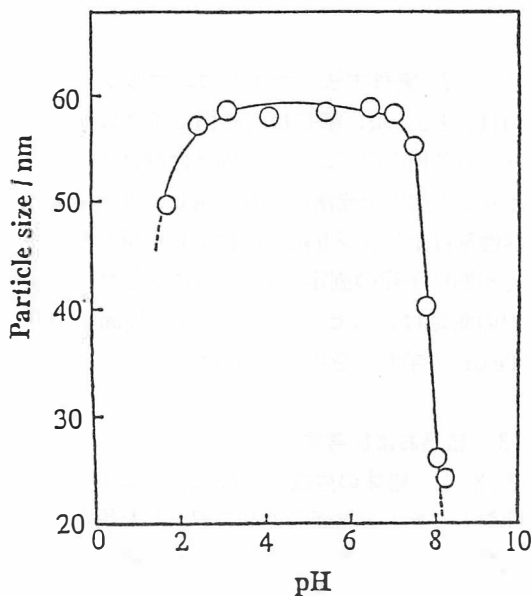


Fig.6 Effect of pH on particle size for DMPC/*n*-tetradecane/1-propanol/brine microemulsion systems at 30°C. The concentrations of DMPC and 1-propanol are 1.0wt% and 14.0wt%, respectively

オン界面活性剤であるアルキル硫酸ナトリウムとカチオン界面活性剤である塩化アルキルトリメチルアンモニウムを用いて、それらの混合界面活性剤/油/アルコール/水系の多相マイクロエマルジョンを調製し、油/水界面における親水性相互作用と親油性相互作用のバランス並びにそれらの強度からマイクロエマルジョンの生成を考察するとともに、ミドル相マイクロエマルジョンの可溶化パラメーター、流体力学的粒子径、界面張力について検討した。

### 2.2 実験

2.2.1 界面活性剤：アニオン界面活性剤は日本サーファクタント(株)から提供されたアルキル硫酸ナトリウム（炭化水素鎖長が10,12,14,16）をエタノール再結晶、エーテル抽出した後、試料に供した。また、カチオン界面活性剤は塩化アルキルトリメチルアンモニウム（炭化水素鎖長が10,12,14,16）を用いた。これは、東京化成(株)製

特級品を数回アセトンで再結晶した後、試料に供した。

2.2.2 実験方法：マイクロエマルジョンの調製は、1.2.1項に準じた。多相マイクロエマルジョンの各相中のアニオン界面活性剤はエチルバイオレット抽出分光法により定量し、カチオン界面活性剤はオレンジII抽出法により定量した。流体力学的粒子径の測定は1.2.3項に準じた。界面張力の測定は、スピニングドロップ界面張力計（Texas大学製）を用いて行った。

### 2.3 結果および考察

2.3.1 錯体の生成：一般に、アニオン界面活性剤とカチオン界面活性剤を混合した場合、反対の電荷を持つ親水部同士が結合して錯体を生成する。そこでまず、アルキル鎖長が12のSDSとDTACの混合モル比と混合の際生成する錯体の溶解温度（クラフト点）との関係を検討した（図7）。SDSのクラフト点は16℃、DTACのクラフト点は0℃以下である<sup>22)</sup>が、図7から明らか

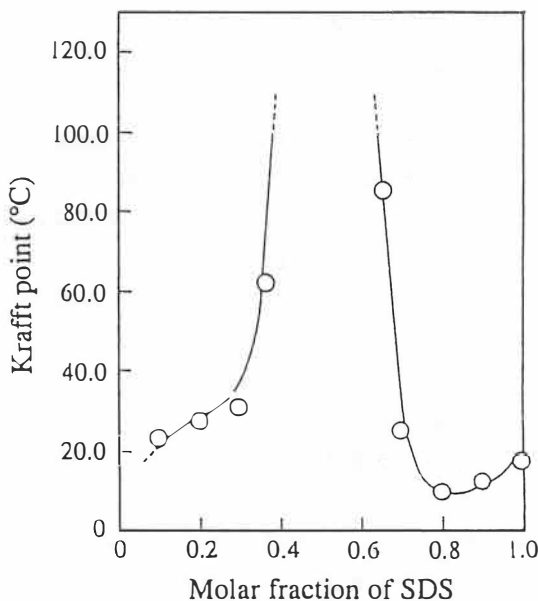


Fig.7 Relationship between Krafft Point and Molar Fraction of SDS for Mixed Aqueous Solution of SDS and DTAC

なように、両者の混合モル比が1 : 1付近で形成した錯体のクラフト点は100℃以上になることが分かる。このことから、SDSとDTACの混合モル比が等モルに近づくほど、水への溶解性は著しく低下するものと考えられる。

2.3.2 マイクロエマルジョンの生成：イオン性界面活性剤は親水基がイオン解離するため、親水性と親油性のバランスはかなり親水性側に偏っている。このため、SDS単独あるいはDTAC単独の界面活性剤を用いてマイクロエマルジョンを調製したところ、添加したアルコールの炭化水素鎖長（CCN）が4以上、すなわち比較的親油性の強いアルコールを用いたときにマイクロエマルジョンは相変化を示し、ミドル相マイクロエマルジョンを生成した。このマイクロエマルジョン相は、アルコール濃度の増加に伴い下相（O/W型）から過剰の油相と水相を伴うミドル相を経て、上相（W/O型）へと連続的に変化した。

一方、SDS水溶液にDTAC水溶液を混合した場合、不溶性の白色結晶（錯体）が析出したが、この系にアルコールを添加したところ錯体は溶解した。そこで、各種アルコールを添加してSDS/DTAC界面活性剤混合系マイクロエマルジョンの調製を試みたところ、CCNが3以下のアルコールを用いた場合のみ、ミドル相マイクロエマルジョンの生成が確認できた。また、プロパノール添加に伴う界面活性剤混合系の多相マイクロエマルジョンの相挙動は、SDS単独あるいはDTAC単独系の相挙動とは異なり、プロパノール濃度増加に伴い上相マイクロエマルジョン、ミドル相マイクロエマルジョン、下相マイクロエマルジョンへと変化した。すなわち、SDSあるいはDTAC単独系の場合、界面活性剤自身の親水性が強くそれぞれ水中でミセルを形成し易いため、系全体の親水性と親油性のバランスをつり合わせるには親油性の強いアルコール（ $CCN \geq 4$ ）の添加が必要となる。一方、SDSとDTACを混合した際に生成する錯体は疎水性が強いことから、

ミドル相マイクロエマルジョンを生成するためには親水性の強いアルコール ( $CCN \leq 3$ ) の添加が必要となったものと考えられる。ただし、界面活性剤単独系の場合、添加されたアルコールはコーサーファクタントとしての機能を発揮するが、界面活性剤混合系の場合には添加されたアルコールはコーサーファクタントとしてではなくコーソルベントとして作用し、不溶性の界面活性剤錯体の溶解度を増加させるものと思われる。

2.3.3 塩濃度の影響：種々の混合モル比において生成するミドル相マイクロエマルジョンの流体力学的粒子径 ( $H_D$ ) に及ぼす塩濃度の影響を図8に示す。SDSならびにDTAC単独系（ペンタノール濃度4wt%）の場合、高塩濃度領域に

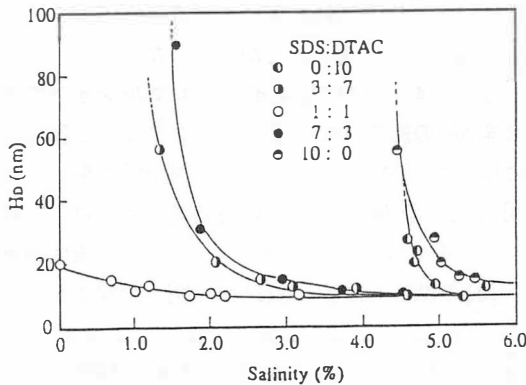


Fig.8 Relationship between Hydrodynamic Diameter ( $H_D$ ) of Middle Phase Microemulsion and Salinity for Various Mixing Ratio of SDS and DTAC/*n*-Decane/1-Propanol/Brine Systems at 30°C

おいてのみ、ミドル相マイクロエマルジョンが生成し、その  $H_D$  は塩濃度に大きく依存した。一方、SDSとDTACを等モル混合した場合、ミドル相マイクロエマルジョンは低い塩濃度領域においても生成し、その  $H_D$  は塩濃度にほとんど依存しないことが分かった。これは、SDSとDTAC間の静電的相互作用により親水部に存在する電荷の中和が起こるため、塩の添加に伴うイオン強度の変化に影響を受けなかったものと考えられる。

2.3.4 温度の影響：SDSとDTACを混合すると電荷の中和が起こるため、一種の非イオン

性界面活性剤と考えることができるので、SDS/DTAC混合界面活性剤によるマイクロエマルジョンの相挙動（ミドル相マイクロエマルジョンの最適プロパノール濃度と可溶化パラメーター）に及ぼす温度の影響を検討した（図9）。図9から明らかのように、最適プロパノール濃度や可溶化パラメーターは温度に依存せず一定となった。また、メタノールやエタノールを用いて同様な実験

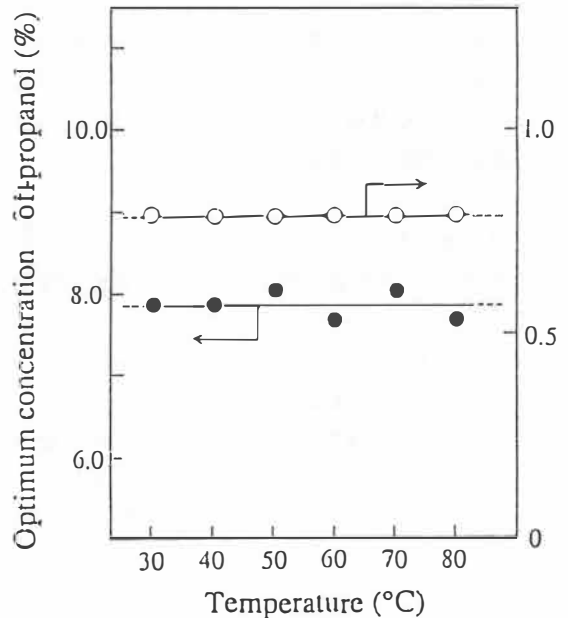


Fig.9 Effect of Temperature on Optimum Concentration of 1-Propanol and Solubilization Parameter ( $\sigma$ ) of Middle Phase Microemulsion for SDS/DTAC/*n*-Decane/1-Propanol/Brine Systems

を行ったところ、同じ傾向を示した。

これらのことから、生成したマイクロエマルジョンの相挙動は、界面活性剤、飽和炭化水素、アルコールの炭化水素鎖長に依存することが分かり、特に界面活性剤混合系によるマイクロエマルジョンは塩濃度や温度に影響を受けにくい特異な系であることが分かった。

### 3. 両性界面活性剤を用いたマイクロエマルジョンの物性<sup>17)</sup>

#### 3.1 緒言

多相マイクロエマルジョンに関する研究は、アニオン界面活性剤や非イオン界面活性剤について数多く行われているが、両性界面活性剤についてはほとんどない。そこで本研究では、アミノ酸から誘導され、生体や環境に対する安全性の高いアミノ酸系両性界面活性剤を用いて多相マイクロエマルジョンを調製し、その生成条件に及ぼすpH、塩濃度、温度の影響を検討した。

#### 3.2 実験

3.2.1 界面活性剤：アミノ酸系界面活性剤であるN<sup>α</sup>、N<sup>α</sup>-ジメチル-N<sup>ε</sup>-ラウロイルリジン（DMLL）は、味の素(株)中央研究所から提供されたものをそのまま用いた。

3.2.2 実験方法：DMLLの酸解離指数はそれぞれ電位差滴定により求めた<sup>17)</sup>。多相マイクロエマルジョンの調製および物性測定は1.2項に準じた。

#### 3.3 結果

3.3.1 DMLLの酸解離定数および等電点：DMLLは水溶液のpHに依存して3種類の異なる構造（カチオン型、双イオン型、アニオン型）をとるので、それらの酸解離定数を求めたところ、pK<sub>a1</sub>=2.2、pK<sub>a2</sub>=9.8となり、また、等電点pH<sub>i</sub>=6.0となった。そこで、各pHにおける双イオン型、カチオン型、アニオン型のDMLLのモル分率を求めたところ、図10に示す関係が得られた。DMLL単独水溶液の場合、pH5以下の領域においてカチオン型/双イオン型混合系、pH7以上の領域においてアニオン型/双イオン型混合系となることが分かった。また、両性型のモル分率がほぼ1となる等電領域はpH5~7の範囲に存在することが分かった。

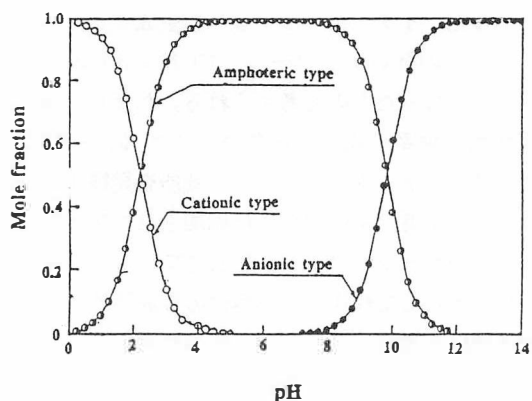


Fig.10 Effect of pH on mole fraction of each type of DMLL at 25°C.

3.3.2 DMLLの溶解温度：塩濃度が増加しても溶解温度は等電点領域に近づくほど増加した。また、中性領域において塩濃度の増加に伴い溶解温度は減少することが分かった。

3.3.4 DMLLマイクロエマルジョンに及ぼすpHの影響：コーサーファクタント濃度増加に伴う相挙動はWinsor型の相変化<sup>23)</sup>を示した。図11に、塩濃度が0.3%の時の各マイクロエマルジョンを生成するコーサーファクタント濃度領域とpHの関係を示す。図11から明らかなように、

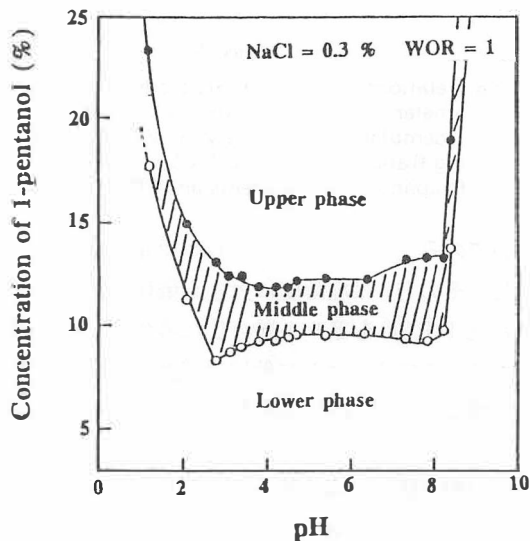


Fig.11 The range of cosurfactant concentrations which lead to multiphase microemulsion formation for solutions containing 0.3% NaCl, as a function of pH (at 25°C).

Winsor 型の相変化は広い pH 範囲で起こり、ミドル相マイクロエマルジョンを生成するためのペンタノールの必要量は酸性側あるいはアルカリ性側の方が等電点領域よりも大きかった。図 12 に、塩濃度が 0.3% の時の最適コーサーファクタント濃度における可溶化パラメーターと pH の関係を示す。可溶化パラメーターは等電点領域に近づくに従い減少したが、pH3 および pH8 において極小を示すことが分かった。それらの pH ではまた

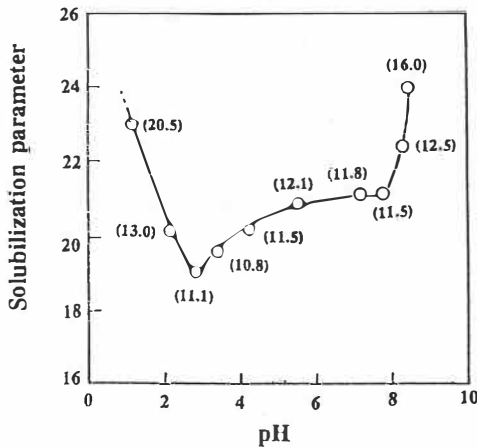


Fig.12 pH-dependence of optimum concentration of cosurfactant at 25°C (NaCl 0.3%).

界面張力は極大値を示したが、マイクロエマルジョンの粒子径は極小値を示した。また、いずれの pH においても、マイクロエマルジョンの生成領域に及ばず温度の影響は小さく、酸性側における最適コーサーファクタントは温度の上昇に伴い増加したが、アルカリ性側では減少し、等電点領域付近においては温度にほとんど影響しなかった。

### 3.4 考察

紙面の関係で詳細は省略するが、イオン強度一定における DMLL マイクロエマルジョンの pH 依存性も、前述した Winsor の R 理論<sup>23)</sup> で解釈できる。最適コーサーファクタント濃度において親水性相互作用と親油性相互作用のバランスはつり合い、R は 1 となる。したがって、最適コー

サーファクタント濃度が大きい系ほど親水性相互作用は大きくなる。さらに、可溶化パラメーターは、最適コーサーファクタント濃度におけるミドル相マイクロエマルジョンへの水と油の相互可溶化能力を示す指標として用いられるが、親水性相互作用と親油性相互作用が共に大きな値でつり合うときほど、この可溶化パラメーターは大きくなる<sup>24, 25)</sup>。したがって、最適コーサーファクタント濃度および可溶化パラメーターが極小を示した pH3 および pH8 において親水性相互作用が極小になるものと考えられる。また、pH 変化により最適コーサーファクタント濃度が変化したのは、DMLL の 3 種類の型のモル分率の変化に起因するものと考えられる。特に、pH3 および pH8 において DMLL の双極子-イオン間の相互作用により膜に凝集力が働き、DMLL 分子が油/水界面 (マイクロエマルジョンの表面) に密に配向するため、系の親油性相互作用が増加 (親水性相互作用が減少) したものと考えられる。

## 4. 両性界面活性剤を用いた O/W 型マイクロエマルジョンの会合数と結合定数<sup>26)</sup>

### 4.1 緒言

前節で、DMLL による多相マイクロエマルジョンの相挙動を検討したところ、マイクロエマルジョンの生成条件は親水基からのプロトンの解離、または親水基へ対イオンの結合に影響されることが示唆された。すなわち、この親水基の解離によって油/水界面における親水性相互作用が変化すると考えられることから、マイクロエマルジョンの生成並びに相挙動を解釈するには、親水基の荷電状態の検討が不可欠である。そこで本研究では、下相マイクロエマルジョンの移動度の測定を行い、pH によるマイクロエマルジョン表面の荷電状態の変化について DLVO 理論を用いて検討した。

## 4.2 実験

4.2.1 実験方法：モビリティの測定は、ゼータサイザーⅢを用い、フリンジモードのレーザードップラー電気泳動法により行った。その他の測定については、前述した通りである。

## 4.3 結果

図13に、下相マイクロエマルジョンのゼータ電位とpHの関係を示す。なお、ゼータ電位はモビリティの値からHenryの式<sup>27)</sup>により求めた。pHの増加に伴いゼータ電位は正の値から負の値

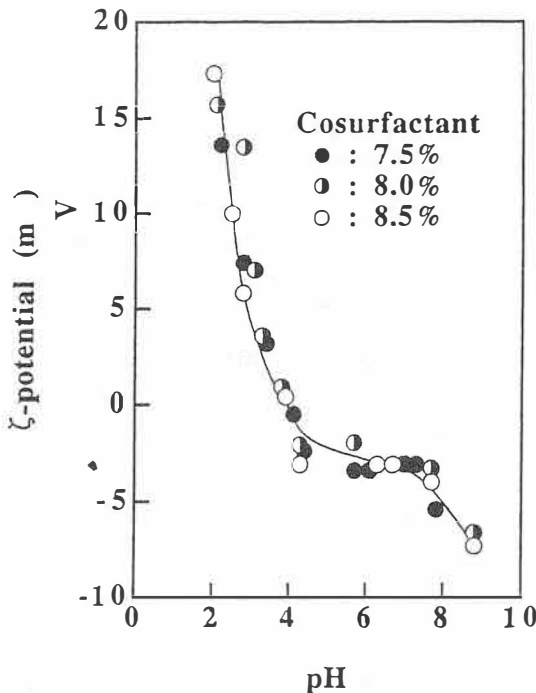


Fig.13  $\zeta$ -potential of the lower phase (O/W type) microemulsion as a function of pH at various concentrations of cosurfactant (25°C, NaCl 0.3%).

へと変化した。また、いずれのコーサーファクタント濃度においてもゼータ電位はpH3.9でゼロとなった。図14に、下相マイクロエマルジョンの粒子径とpHの関係を示す。ゼータ電位を表面電位に等しいと仮定すると、ゼータ電位および粒子径の値によりO/W型マイクロエマルジョンの

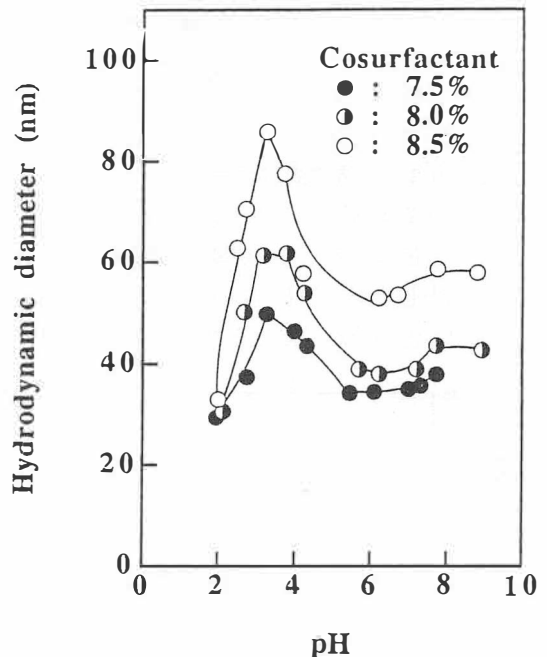


Fig.14 Hydrodynamic diameter of the lower phase (O/W type) microemulsion as a function of pH at various concentrations of cosurfactant (25°C, NaCl 0.3%).

表面電荷密度を算出できる<sup>28)</sup>。得られた表面電荷密度とpHの関係を図15に示す。いずれのコーサーファクタント濃度においても表面電荷密度はpHの増加に伴い正の値から負の値へと変化する、pH3.9においてゼロとなることが分かった。DMLLの等電点はpH6であるので、pH6においてDMLLに由来する正味の電荷はゼロとなるものと考えられるが、表面電荷密度は負の値を示した。このことから、DMLL分子が電気的に中性となる等電点領域においても、マイクロエマルジョン表面には溶媒中のアニオンが吸着しているものと考えられる。等電点領域において、特に電解質として加えたNaCl濃度が高いことから、マイクロエマルジョンの表面には塩素イオンの方がナトリウムイオンよりも優先的に吸着しているものと考えられる。また、コーサーファクタント濃度の増加に伴い下相マイクロエマルジョンの粒子径は増加した。これは、コーサーファクタント濃

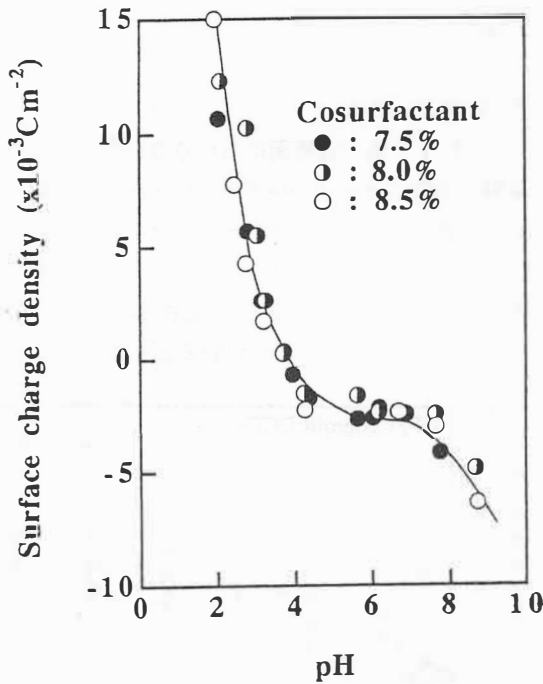


Fig. 15 Surface charge density of the lower phase (O/W type) microemulsion as a function of pH at various concentrations of cosurfactant (25°C, NaCl 0.3%).

度の増加に伴い疎水性が増加するため、1粒子当たり可溶化される油の量が増加するものと考えられる。さらに、粒子径はpH3およびpH8において極大を示したが、これは前節で述べたように、DMLL分子間の凝集力により親水性相互作用が減少し、親油性相互作用が増加するためと考えられる。

#### 4.4 考察

O/W型DMLLマイクロエマルジョンの表面電荷密度は、DMLL分子の吸着密度やプロトン、ナトリウムイオン、塩素イオンのDMLLの親水基への結合に依存する。まず、対イオンがすべてとれた構造を有するアニオン型のDMLLが均一に吸着するようなマイクロエマルジョンを考える。さらに、そのDMLLの親水基にプロトン、ナトリウムイオン、塩素イオンが結合して表面電荷密

度に変化する。すなわち、 $[\text{COO}^-]$ の吸着点にはプロトンとナトリウムイオンが競争的に結合し、一方、 $[\text{N}(\text{CH}_3)_2]$ の吸着点には、まずプロトンが結合した後、正に帯電した親水基 $[\text{HN}^+(\text{CH}_3)_2]$ にのみ塩素イオンが結合するモデルを考える。

イオンの結合によるヘルムホルツ自由エネルギー変化は、静電的な正味の仕事、イオンの吸着(結合)による仕事および配置エントロピーの寄与を考える式を出発として、 $[\text{COO}^-]$ へのプロトンとナトリウムイオンの単位面積当たりの最大吸着数、 $[\text{HN}^+(\text{CH}_3)_2]$ へのプロトンと塩素イオンの単位面積当たりの最大吸着数、各イオンのマイクロエマルジョン表面における電気化学ポテンシャルエネルギー、DMLLの吸着密度、酸解離定数を考慮すると、最終的に次式が得られる(詳細は参考論文26)参照)。

$$K_{\text{Na}} - K_{\text{Cl}} = (1/C) \left[ \frac{1}{(1+10^{-\text{pH}}/10^{-\text{pK}_a^2})} - \frac{1}{(1+10^{-\text{pK}_a^2}/10^{-\text{pH}})} \right] = -0.20 \text{ (M}^{-1}\text{)}$$

ここで、 $C=C_{\text{Na}}=C_{\text{Cl}}=0.10\text{M}$ とした。また、pH6付近においてDMLLに由来する正味の電荷はゼロとなることから、次式が得られる。

$$K_{\text{Na}} \exp(-e\zeta/kT) - K_{\text{Cl}} \exp(e\zeta/kT) = (\sigma/eC) (1/N)$$

これらの式を用いてナトリウムイオン、塩素イオンの結合定数、DMLLの吸着密度(N)を求めたところ、次の関係が得られた。

$$\begin{aligned} 0 < K_{\text{Na}} < 0.91 \\ 0.20 < K_{\text{Cl}} < 1.11 \\ K_{\text{Cl}} - K_{\text{Na}} &= 0.20 \\ N > 0.79 \end{aligned}$$

吸着密度Nを0.8とし、図14の粒子径を基にしてマイクロエマルジョン単位当たりのDMLL分子の会合数は約4000であることが分かった。

## 5. W/O/W型マクロエマルジョン（リポソーム）中におけるリン脂質とステロイドの相互作用<sup>29)</sup>

### 5.1 緒言

一般に、W/O/W型マクロエマルジョン（リポソーム）の安定性を向上させるために、リン脂質／コレステロール／荷電物質の3成分系で調製されているものが多い<sup>30)</sup>。リポソームをドラッグキャリアーとして応用するためには、リポソームの膜としての安定性および安全性の向上、また、徐放などの処方融通性を高めることが不可欠であるため、界面化学および物理化学的観点からの各種ステロイドの影響を検討することは重要である。そこで本研究では、自然界に存在する代表的な種々のステロイドおよび半合成されたステロイドを用いて、単分子膜を生体膜の最小単位と考え、リン脂質／ステロイド混合単分子膜の物性並びにリポソームの安定性に及ぼすステロイドのセグメントおよび側鎖構造の影響を検討した。

### 5.2 実験

5.2.1 試料：リン脂質として日本油脂㈱から提供されたL- $\alpha$ -ジパルミトイルホスファチジルコリン（純度99.6%以上）を、荷電物質として市販品のリン酸水素ジヘキシルを、ステロイドとしてコレステロール、 $\beta$ -コレスタノール、 $\beta$ -シトステロール、スチグマステロール、4,22-スチグマスタジエン-3-オンを用いた。内水相マーカー物質としてグルコースを、緩衝塩溶液として調製したリン酸緩衝化生理食塩水を、蛍光プローブとしてピレンを用いた。

#### 5.2.2 実験方法

気／液界面におけるリン脂質とステロイドの混合単分子膜の表面膜圧の測定は、協和界面科学㈱製の表面膜圧計を用いて、Wilhelmy法により行った。リポソームの調製はSzokaらの方法<sup>31)</sup>に従って逆相蒸発法（REV）により行った。膜透過性の測定は、リポソーム内水相に保持された

グルコースのリポソームからの放出の経時変化から検討した。

### 5.3 結果と考察

5.3.1 気／液界面における混合単分子膜の挙動：脂質二分子膜の横方向の分子間相互作用は、気／液界面に形成する単分子膜のそれと類似した傾向を持つので、まずリン脂質とステロイド類のモル比を7：3（動物細胞の細胞膜と同一の組成）<sup>32)</sup>にした場合の $\pi$ -A曲線を図16に、また

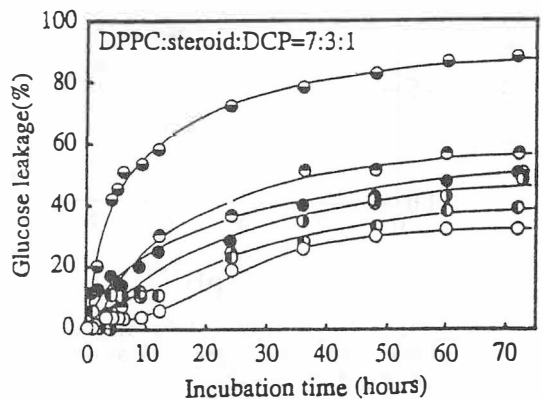


Fig.16 Time dependence of glucose leakage (DPPC:steroid:DCP = 7:3:1) : ○, without steroid ; ●, 4,22-stigmastadien-3-one ; ■, stigmasterol ; ▲,  $\beta$ -sitosterol ; ◆,  $\beta$ -cholestanol ; ○, cholesterol.

その組成比を5：5（動物の赤血球と同一の組成）<sup>33)</sup>を図17に示す。図から明らかなように、リン脂質とステロイドとからなる混合単分子膜はステロイドの種類に依存せず凝縮膜を形成した。図には示していないが、混合単分子膜の圧縮弾性率は同一親水基（水酸基）をもつ4種類のステロイドの場合ほとんど同じであったが、親水基が異なるスタジエンを用いた場合はかなり異なった。本研究で得られた見かけの1分子当たりの分子占有面積および圧縮弾性率などから、気／液界面におけるステロイドの配向状態をモデル化すると図18となった。スタジエンを用いた混合単分子膜の場合（5：5）、明確な二段階の崩壊を示したことから、混合単分子膜中で相分離<sup>34)</sup>しているも

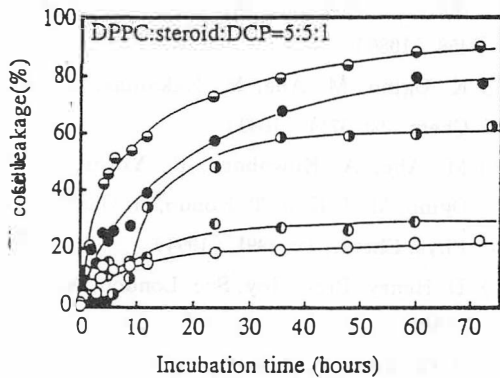


Fig.17 Time dependence of glucose leakage (DPPC : steroid : DCP = 5 : 5 : 1) : ●, without steroid ; ●, stigmasterol ; ○, β-sitosterol ; ●, β-cholestanol ; ○, cholesterol.

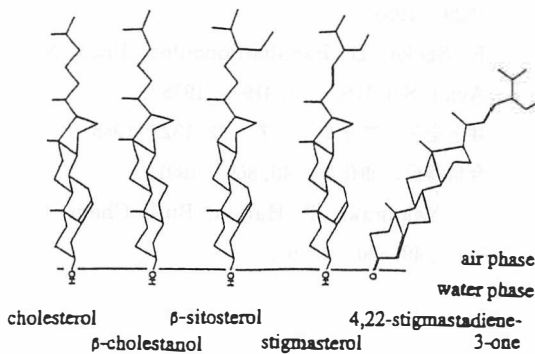


Fig.18 Model of orientation of steroids at air/water interface.

のと考えられる。これらのことから、混合単分子膜中におけるリン脂質とステロイドの疎水基間の相互作用（凝集力）は、ステロイドの二重結合がなく、かつ、側鎖の枝分かれが少ないほど大きくなり、スチグマスタジエン < β-シトステロール < コレステロール < β-コレステロールの順になることが分かった。

5.3.2 脂質二分子膜の膜透過性：グルコース放出率（膜透過性）は各種ステロイドの添加により低下し、膜が安定になることが分かった。また、膜透過性はステロイドの種類に依存し、コレステロール < β-コレスタノール < β-シトステロール < スチグマスタジエンの順となり、側鎖構

造の違いによるリン脂質とステロイドの疎水基間相互作用が大きいステロイドほど低下した。一方、ステロイド環部の構造が異なる場合は、前述した傾向とは異なることが分かった。また、リン脂質に対するコレステロールのモル比が5:5のとき、膜は最も安定になると言われているが、ステロイドの種類によりそのモル比は異なることが分かった。

5.3.3 脂質二分子膜中の微視的流動性および極性：リン脂質とステロイドの疎水基間相互作用が弱いものほど膜がルーズとなるために流動性が増加し、膜透過性も増加すること等が分かった。

### 謝 辞

当財団からの研究助成のお蔭で、参考文献に記載してある No.1、No.17、No.19、No.26、No.29 を研究成果とすることができました。ここに、感謝の意を表します。

### 参考文献

- 1) 阿部正彦、矢島 勲、荻野圭三、椿 信之、中野善郎、色材協会誌、65, 212 (1992).
- 2) 荻野圭三、太田基巳、油化学、23, 28 (1974).
- 3) J. H. Schulman, D. P. Riley, J. Colloid Interface Sci., 3, 833 (1948).
- 4) 国枝博信、篠田耕三、日本化学会誌、11, 2001 (1972).
- 5) M. Nakamae, M. Abe, K. Ogino, J. Colloid Interface Sci., 135, 449 (1990).
- 6) B. H. Robinson, Chem. Britain, 26, 342 (1990).
- 7) 菊池 寛、井上圭三、油化学、34, 784 (1985).
- 8) 北野博己、表面、25, 231 (1987).
- 9) A. Wretling, J. Parenteral Enteral Nutri., 5, 230 (1981).
- 10) F. Ishii, I. Sasaki, H. Ogata, J. Pharm. Pharmacol., 42, 513 (1990).
- 11) 金子晃久、篠田耕三、油化学、37, 740 (1988).
- 12) D. Capitani, A. L. Segre, R. Sparapani,

- Langmuir, 7, 250 (1991).
- 13) 野島庄七, 砂本順三, 井上圭三, “リポソーム”, p.9, 南江堂 (1988).
  - 14) 荻野圭三, 阿部正彦, 西野 宏, 燃料協会誌, 67, 167 (1988).
  - 15) 阿部正彦, 西野 宏, 荻野圭三, 燃料協会誌, 67, 856 (1988).
  - 16) W. D. Harkins, F. E. Brown, J. Am. Chem. Soc., 41, 499 (1919).
  - 17) M. Abe, A. Kuwabara, K. Ogino, H. Ohshima, T. Kondo, M. J. Kim, J. Surface Sci. Technol., 8, 155 (1992).
  - 18) 辻井 薫, 油化学, 29, 662 (1980).
  - 19) 阿部正彦, 矢島 勲, 荻野圭三, 石油学会誌, 36, 326 (1993).
  - 20) K. Ogino, M. Abe, “Mixed Surfactant Systems”, Marcel Dekker, New York (1992).
  - 21) 鈴木 洋, “界面と界面活性物質”, 産業図書, p. 119 (1990).
  - 22) 関根正巳 他, “ハンドブッカー化粧品・製剤原料—改訂版”, 日光ケミカルズ, p.299 (1977).
  - 23) P. A. Winsor, Chem. Rev., 68, 1 (1968).
  - 24) 仲前昌人, 阿部正彦, 荻野圭三, 石油学会誌, 31, 458 (1988).
  - 25) K. Ogino, M. Abe, M. Nakamae, J. Phys. Chem., 93, 3714 (1989).
  - 26) M. Abe, A. Kuwabara, K. Yoshihara, K. Ogino, M. J. Kim, T. Kondo, H. Ohshima, J. Phys. Chem., 98, 2991 (1994).
  - 27) D. Henry, Proc. Roy. Soc. London, A133, 106 (1931)
  - 28) H. Ohshima, T. W. Healy, L. R. White, J. Colloid Interface Sci., 90, 17 (1982).
  - 29) H. Yamauchi, Y. Takao, M. Abe, K. Ogino, Langmuir, 9, 300 (1993).
  - 30) M. Nishijima, M. Nojima, Farumashia, 22, 1329 (1988).
  - 31) F. Szoka, D. Papahadjopoulos, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 4194 (1978).
  - 32) 井上圭三, フェルマシア, 22, 1329 (1988).
  - 33) 今泉勝巳, 油化学, 40, 869 (1991).
  - 34) M. Nakagaki, T. Handa, Bull. Chem. Soc. Jpn., 49, 880 (1976).

## II. 生体作用, 安全性に関する分野

# 太田母斑に対するQスイッチ・ルビーレーザーの治療効果

帝京大学医学部

渡 辺 晋 一

Previous treatments for nevus of Ota have either been ineffective or have caused scarring. In this study, selective photothermolysis was employed for the treatment of this serious cosmetic problem.

A Q-switched ruby laser was used to deliver 6 J/cm<sup>2</sup> pulses at a wavelength of 694 nm and with a pulse duration of 30 ns. A total of 114 patients with nevus of Ota were treated, with treatment intervals ranging from 3 to 4 months. The clinical efficacy of laser treatment was evaluated by comparative photographic analysis. Five treatment response levels were defined based on the percentage of pigment lightening compared with the original color: "excellent" for 70% or more lightening, "good" for 40% to 69%, "fair" for 10% to 39%, "unchanged" for 9% or less, and "worsened" for darkening.

The efficacy rate (i.e., the percentage of patients in whom the treatment responses were good or excellent) was 13% (3/23) in patients treated once, 72% (18/25) in those treated twice, 97% (30/31) in those treated three times, and 100% (35/35) in those treated four or more times. No hypertrophic or atrophic scarring was observed in any of the patients. However, transient postinflammatory hyperpigmentation of 2 months' duration was noted in a few patients.

Selective photothermolysis using the Q-switched ruby laser appears to be a safe and effective method for lightening or eliminating nevus of Ota.

## 1. 緒 言

太田母斑は顔面、特に三叉神経の一枝あるいは二枝領域に生ずる青色から灰褐色の色素異常症で、東洋人に多くみられ、我が国では0.6%の頻度で見られるとされている<sup>1)</sup>。太田母斑は生命的に問題となる疾患ではないが、本症が顔面に生ずることから美容的には深刻な問題である。治療としては植皮、皮膚削剝術、ドライアイス圧抵術などが行なわれていたが、外科療法の場合手術創を残すこと、ドライアイス圧抵術では、病変の部位によってはある程度効果が認められるものの、必ず

しも有効とはいえず、強く圧抵し過ぎると癍痕がみられるなどといった欠点があった。

一方、明確な理論と実験の裏付けがないままレーザーが太田母斑の治療に使用されたことがあるが、治療効果が乏しいうえに癍痕等の副作用が多く認められ、レーザー療法はむしろ有害であるとの考えが主流を占めるようになった。しかし近年、selective photothermolysis (SP) というレーザー療法の治療指針が提唱され<sup>2)</sup>、この条件を満たしたレーザーならば、癍痕を残すことなく、色素性皮膚病変の治療が可能であることが示された。具体的には、i) ターゲットに特異的に吸収される光を、ii) ターゲットを破壊するのに十分な照射エネルギーで照射し、かつiii) レーザー照射を目的とするターゲットの熱の拡散時間以内に終了しなければならない<sup>3)</sup>。かつてのレーザー療法はこのレーザーの照射時間に注意が払われず、連続照射のレーザーを使用していたため、ケロイド等の副作用が認められたわけである

### Efficacy of the Q-Switched Ruby Laser in the Treatment of Nevus of Ota.



Shinichi Watanabe

School of Medicine  
Teikyo University

(図1)。

そこで今回我々は、SPの条件を満たすパルス照射のレーザー (pulsed laser) を使用し、太田母斑患者の治療を行い、その有用性を検討した。

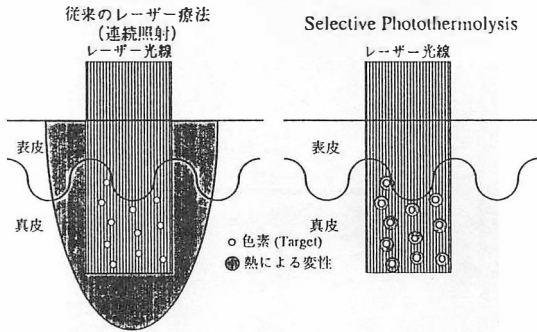


図1 従来のレーザー療法 (連続照射) と selective photothermolysis (パルス照射) の違い

## 2. 実験

### 2.1 使用レーザー

使用したレーザーは東芝製の臨床研究用 Q-switched ruby laser で、この機械は波長 694.3 nm、照射時間 30 ns のレーザー光を照射する。

### 2.2 対象患者

対象患者は当科を受診した太田母斑患者で、その内訳は、男 25 名、女 89 名の計 114 名で、年齢は 8 歳から 63 歳までであった。人種はすべて黄色人種であり、国籍は 1 名が韓国人で、他はすべて日本人であった。

### 2.3 レーザー照射

レーザー照射は無麻酔あるいはリドカインクリームによる表面麻酔後に行い、眼の周囲を照射する場合はプラスチック製の光を通さないコンタクトレンズを装着し、眼をレーザー光から保護した。レーザーの照射間隔は 3 から 4 か月で、使用したレーザーのエネルギー密度は 6 J/cm<sup>2</sup> であった。

### 2.4 効果判定

それぞれレーザー照射前に臨床写真をとり、その臨床写真を元に、治療前後の改善度を判定した。効果判定はレーザー照射後 3 から 4 か月後の次回レーザー照射時の直前に行った。

### 2.5 判定基準

効果判定は、著効、有効、やや有効、不変、悪化の 5 段階で判定したが、効果判定の基準は治療前の病変部皮膚色を 100% として、不変は 10% 未満の改善、やや有効は 40% 未満、有効は 70% 未満、著効はそれ以上の改善のみられたもので、悪化とは色素増強のみられたものとした。

### 2.6 病理検査

約半数の症例で、レーザー照射前の病変部皮膚あるいはレーザー照射部位の皮膚生検を行い、病理学的検索を行った。

## 3. 結果

### 3.1 治療経過

照射直後に照射野に一致し、皮膚が白くなる immediate whitening が認められたが、この現象は 15 分ほどで消失した。さらに照射後 1~2 分して照射野からその辺縁にかけて蕁麻疹様の紅斑が生じたが、翌日には腫れはかなり軽減した。しかし眼瞼周囲などでは腫れが著しく、数日間腫脹が続くことがあった。また血管の脆い老人の皮膚では、特に眼のまわりに皮下出血をきたしたが、皮下出血は、約十日ほどで消褪した。症例により、照射直後、部分的に点状の糜爛がみられたり、あるいは照射翌日に小水疱がみられた症例もあったが、大部分の症例は明瞭な糜爛や小水疱のみられないまま経過し、数日するとレーザー照射野に褐色の痂皮・落屑が附着するようになった。その痂皮・落屑は 1 週間から 10 日ほどすると剥がれ落ちたが、痂皮・落屑が剥がれると、epidermal pigmentation の強い症例では褐色の色調は軽減

し、むしろ青みが目立つようになった。しかし大部分の症例では、落屑が剥がれても色調の変化はほとんど認められなかった。また一部の症例で照射部位に一致して炎症後の色素沈着が認められたが、その色素沈着も1~2か月で消褪した。色調はレーザー照射後徐々に薄くなり、通常2回目のレーザー照射後には患者自身が色調の薄くなったのに気付くようになることが多かった。

### 3.2 治療成績

1回レーザー照射を受けた患者23名中、7名が不変、13名がやや有効、3名が有効であったが、2回レーザー照射を受けた患者25名中、7名がやや有効、16名が有効、2名が著効、3回レーザー照射を受けた患者31名中、1名がやや有効、26名が有効、4名が著効、4回レーザー照射を受けた患者17名中、2名が有効、15名が著効、そして5回以上レーザー照射を受けた患者18名はすべて著効を示した(図2-4)。有効以上を有効率として計算すると、1回照射で13%、2回照射で72

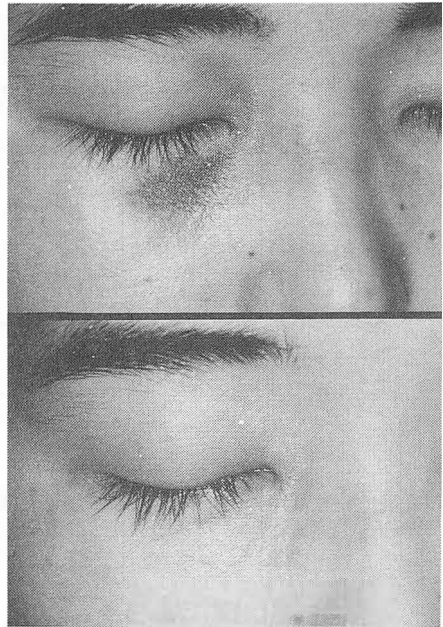


図3 治療前(上図)とレーザー照射5回後(下図)の太田母斑患者臨床像



図2 治療前(上図)とレーザー照射4回後(下図)の太田母斑患者臨床像

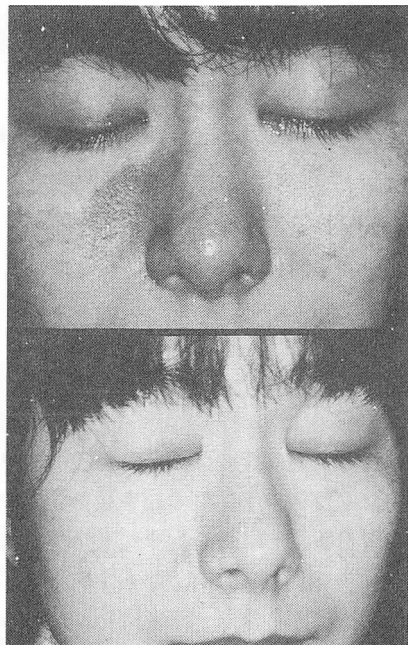


図4 治療前(上図)とレーザー照射5回後(下図)の太田母斑患者臨床像

％、3回照射で97％、4回照射で100％となり、徐々にではあるが4回以上照射すると100％の有効率を示した(図5)。なお、数例の患者で治療後一過性の色素沈着がみられたが、瘢痕などの副作用は一例も見られなかった。ただし、皮膚削剥術、ドライアイス圧抵術を行っている症例では、瘢痕の程度に応じ、改善度が劣っていた。

### 3.3 病理組織検査

レーザー照射前の病変部皮膚では真皮の浅層から深層にかけて、細長い胞体を有し、褐色の色素を有する真皮内メラノサイトが散在して認められた(図6)。レーザー照射直後には、表皮真皮境界部の所々に小水疱が認められ、また表皮基底細胞を中心に細胞内の空胞が認められた。真皮内メラノサイトは破裂し、細胞膜は不明瞭となり、その胞体内あるいはその辺縁に中心が白く抜けたメラノゾームやポップコーン状に破裂したメラノゾームが散在している像が多数認められた(図

7)。しかし、真皮内メラノゾーム以外の細胞やその周りの膠原線維には全く変性像は認められなかった(図8)。

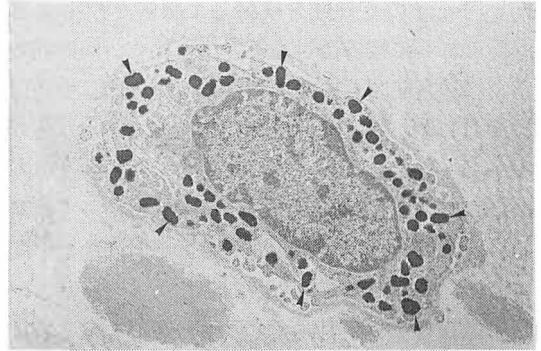


図6 レーザー照射前の真皮内メラノサイト。成熟したメラノゾーム(矢印)が多数認められる。

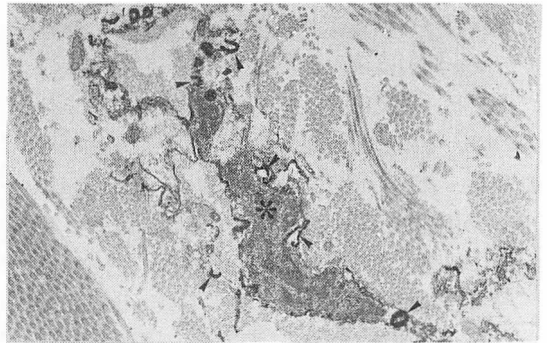


図7 レーザー照射直後の真皮内メラノサイト(\*)。破壊されたメラノゾーム(矢印)が多数認められる。

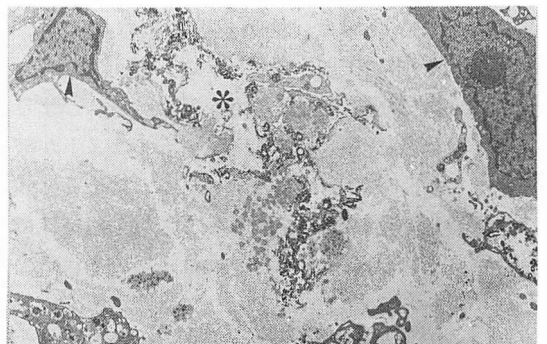


図8 レーザー照射直後の真皮内メラノサイト(\*)。メラノゾームを含有していない線維芽細胞(矢印)などには変性像は全く認められない。

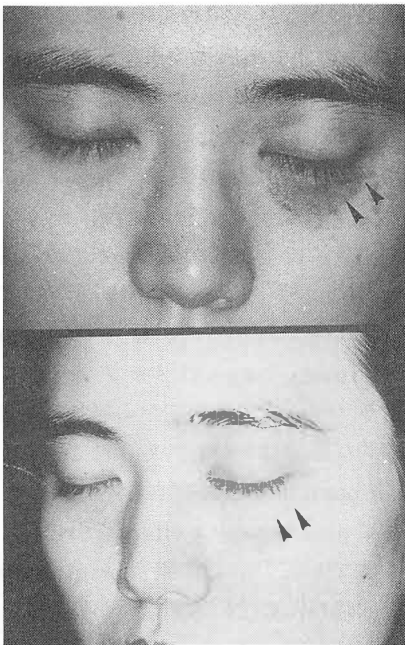


図5 治療前(上図)とレーザー照射5回後(下図)の太田母斑患者臨床像。矢印は当院来院前に受けた縫縮手術のあと。

#### 4. 考 察

すでに、太田母斑患者に対する Q-switched ruby laser の有効性を検討した報告<sup>4, 5)</sup>があるが、これらの報告は対象患者が少なく、照射回数および観察期間もまちまちであったため、太田母斑患者に対する Q-switched ruby laser の有効率がはっきりしなかった。しかし、今回我々は多数の太田母斑患者を比較的長期間にわたって観察し、治療効果と観察期間あるいは照射回数との間に密接な関係があることが判明した。つまり太田母斑はレーザー照射後すぐに色調が薄くなるわけではなく、徐々に色調が薄くなり、その改善には時間がかかること、そして有る程度の照射回数が必要なこと、そしてこれらの条件をみたせば 100%改善がみられることが明らかにされた。さらにレーザー照射直後の病変部皮膚の電顕観察を行ったところ、真皮内メラノゾームの破壊がみられるものの、その辺縁の膠原線維には全く変化がみられなかった。このことから、Q-switched ruby laser が瘢痕を残すことなく、色素病変のみを選択的に破壊することが確かめられた。

一方、入れ墨患者では、同じ Q-switched ruby laser を照射しても、照射後一週間ほどで痂皮・落屑がとれると、その時点で色調の著明な改善が認められる<sup>6)</sup>。このように太田母斑と入れ墨では、病変が真皮にあるという点で共通しているにもかかわらず、治療態度が異なるのは、ターゲットが太田母斑ではメラニンで、多くの入れ墨の場合は炭素であるためと思われる。つまり、メラニンは熱に強いため真皮内メラノサイトが破壊されても、破壊されたメラノゾームはそこに残存し、炎症反応によって引き起こされた組織球に貪食され、リンパ節などに運ばれて初めて色調の改善がみられるわけである。これに対し多くの入れ墨は、炭素が組織球に貪食されて生じたものであるため、レーザー照射により、炭素を貪食した細胞が破壊されると同時に炭素自身も熱に弱い

ため瞬間的に燃え尽きてしまう。そのため、色調の改善が照射後すぐにみられるものと考えられた。

ところで太田母斑のレーザー治療の際に、観察期間と照射回数のうちどちらが色調の改善により重要な役割を担っているのかはいまのところ不明である。しかし、たった2回しかレーザー照射を受けていない患者でも、2回目の照射後半年から一年後の間にもさらに色調の改善がみられたので、照射回数よりは時間の経過が必要で、時間が経たないと色の改善は認められないものと考えられた。さらに、太田母斑ではレーザー照射後に破壊されたメラノゾームのすべてがリンパ節に移動するとは限らないので、一部はそこに残存することとなり、追加照射が必要となる。しかし、照射間隔をどの程度とったら最も少ない照射回数で最大の治療効果が上がるのかはいまのところ不明である。

一方、扁平母斑や肝斑などの basal pigmentation では Q-switched ruby laser を照射すると、照射直後に照射部位の表皮だけがきれいに剝離され、糜爛面となるが、太田母斑では一部の症例で点状の糜爛が認められるのみで、immediate whitening が照射直後の主な皮膚反応である。従って、Q-switched ruby laser を照射すると太田母斑などの dermal melanosis と basal pigmentation との鑑別が容易である。また血管の脆弱な老人皮膚では、特に眼瞼周囲で、レーザー照射直後に皮下出血が認められたが、basal pigmentation が原因である色素病変ではこの皮下出血は認められなかった。Q-switched ruby laser の primary target はメラノゾームであるため、メラノゾーム含有細胞から離れた血管壁には、直接的な影響はないと考えられている。しかし、high peak power を有するパルスレーザーでは生体に photoacoustic effect を引き起こすことが知られていて<sup>7)</sup>、この場合 primary target から比較的離れた部位にも衝撃波が伝わる。従って、Q-switched ruby laser 照射直後にみられた皮下出血は、このレーザー照射による衝撃波により生じたものと考えられた。

いずれにしろ、今迄有効な治療法がなかった太田母斑に対し、有用な治療法が開発されたことは画期的なことであり、今後さらにより有効なレーザー療法を発展させるために、最適のエネルギー密度や、レーザーの照射間隔などを明らかにし、さらに将来に生ずるかもしれない副作用の発現を注意深く観察する必要があると思われる。

## 文 献

- 1) Hidano A, Kajima H, Ikeda S, Mizutani, Miyasato H, Nimura M. Natural history of nevus of Ota. Arch Dermatol 1967; 95: 187-95.
- 2) Anderson RR, Parrish JA. Selective photothermolysis: Precise microsurgery by selective absorption of pulsed radiation. Science 1983; 220: 524-7
- 3) Watanabe S, Anderson RR, Brorson S, Dalickas G, Fujimoto JG, Flotte TJ. Comparative studies of femtosecond to microsecond laser pulses on selective pigmented cell injury in skin. Photochem Photobiol 1991; 53: 757-62.
- 4) Goldberg DJ, Nychay SG. Q-switched ruby laser treatment of nevus of Ota. J Dermatol Surg Oncol 1992; 18: 817-21.
- 5) Geronemus RG. Q-switched ruby laser therapy of nevus of Ota. Arch Dermatol 1992; 128: 1618-22.
- 6) Taylor CR, Gange RW, Dover JS, Flotte TJ, Gonzalez E, Michaud N, Anderson RR. Treatment of Tattoos by Q-switched ruby laser. Arch Dermatol 1990; 126: 893-9.
- 7) Watanabe S, Flotte TJ, McAuliffe DJ, Jacques SL. Putative photoacoustic damage in skin induced by pulsed ArF excimer laser. J Invest Dermatol 1988; 90: 761-6.

# 細胞内脂質輸送機構の解析

## — 細胞内ビタミンE特異的輸送タンパク質の構造と意義 —

東京大学薬学部

新井 洋 由

$\alpha$ -Tocopherol, the most biologically active form of vitamin E, is a lipid-soluble antioxidant, which can inhibit the peroxidation of membrane lipids.  $\alpha$ -Tocopherol is widely distributed throughout the mammalian tissues, where it is found in the membranes of intracellular organelles. The mechanism by which  $\alpha$ -tocopherol is transported to intracellular organelles has not yet been clarified.  $\alpha$ -Tocopherol transfer protein which facilitate the transfer of this vitamin between membranes was detected in rat liver cytosol by us and others. We have recently succeeded in purification of  $\alpha$ -tocopherol transfer protein and showed that the protein has Mr. of about 30 kDa and is composed of two charge isomers. Furthermore, we have isolated the cDNA encoding  $\alpha$ -tocopherol transfer protein and deduced the primary amino acid sequence. The protein is unique and is not identical to any other proteins ever reported. Both Western and Northern blot analyses revealed that  $\alpha$ -tocopherol transfer protein is expressed exclusively in the liver in rats. Surprisingly,  $\alpha$ -tocopherol transfer protein has been found to exhibit a structural homology with the cellular retinal binding protein present only in retinal epithelial cells and with SEC 14 protein that bind to and transfer specifically phosphatidylinositol and phosphatidylcholine. These three proteins may form a new family of lipid binding/or transfer proteins.

### 1. 緒 言

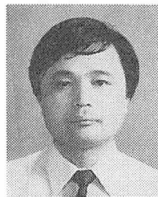
活性酸素やフリーラジカルにより生ずるいわゆる酸素毒性に対して、生体は一連の防御システムを備えている。ビタミンE（別名トコフェロール）は脂溶性のラジカル捕捉型抗酸化物として生体内で最も重要なものであり、生体膜における脂質の連鎖的過酸化反応を抑えることにより、生体膜の酸化傷害を防いでいる。ビタミンEの抗酸化物としての化学的特性や、様々な病態との関係等についてはかなり詳細に解析されてきている。—

方、生体という不均一な場においては、いかにして必要な時に、必要な場に、そして必要な量を正しく供給するかということは非常に重要な問題である。

ビタミンEのように水に溶けない物質の輸送には、生体は複雑な機構でこれに対処している。まず、小腸から吸収されたビタミンEは、小腸で合成されるリポタンパク質の1つであるキロミクロンとともに、リンパ管を経て血管中へと輸送される。さらに、各臓器への輸送にも血漿リポタンパク質が利用されている。しかし、ビタミンEのリポタンパク質への結合は物理化学的性質によるものであり、特別な結合因子が存在しているわけではない。従って、その輸送もリポタンパク質代謝にそったいわば受動的な輸送といえる。

一方、細胞内においては、ビタミンEは主に細胞内小器官の膜脂質二重層に存在しており、細胞の外から供給されたビタミンEは、何らかの方法で各小器官に輸送されているはずである。しかし

Mechanism of intracellular lipid transport  
— Structure and function of  
 $\alpha$ -tocopherol transfer protein —



Hiroyuki Arai

Faculty of Pharmaceutical  
Sciences  
The University of Tokyo

これまで、ビタミンEの細胞内輸送機構に関しては殆ど知見がなかった。このような背景のもとに、我々は細胞内のビタミンEの輸送機構というものに興味をもち研究を開始した。最近我々は、ビタミンEの細胞内輸送に関すると考えられるユニークな細胞内タンパク質の単離、一次構造の解明に成功した。その結果、ビタミンEの体内動態を制御する新たな機構が見えてきた。ここでは、この新規細胞内ビタミンE特異的輸送タンパク質について最近の知見を紹介する。

## 2. $\alpha$ -トコフェロール輸送タンパク質の同定と精製

我々は、動物の臓器の可溶性画分中にビタミンEの膜間輸送を促進する因子があるのではないかと考え、検索を行った<sup>1)</sup>。方法は、ビタミンEの一つである $\alpha$ -トコフェロールの放射標識体を組み込んだリポソームをドナーに、また、ラット肝臓より調製した比較的重い(10,000×g遠心で沈殿する)膜画分をアクセプターに用い、リポソームから膜画分への $\alpha$ -トコフェロールの移行率を測定することにより輸送活性を測定した。図1に示すように、何も試料を加えなくてもある程度の速度で $\alpha$ -トコフェロールはリポソームから膜画分への経時的な移行がみられたが、ここに、ラット肝臓から調製した可溶性画分を加えると、移行速度の有意な増加が観察された。従って、この可溶性画分には、 $\alpha$ -トコフェロールの膜間輸送を促進する何らかの因子が存在すると考えられ

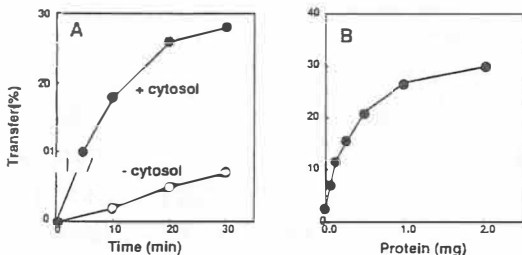
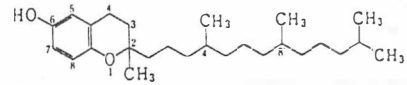


図1 ラット肝可溶性画分による $\alpha$ -トコフェロールの膜間輸送促進

た。そこで、この因子の性状を解析した結果、熱に対して不安定であること、トリプシン消化によって失活すること、などからタンパク質であると予測された。さらに、可溶性画分をゲル濾過カラムにかけて、この因子の分子量を調べたところ、約3万の位置に活性が溶出された。

ビタミンEには、図2に示すようにクロマン環のメチル基の数や位置の違いによって、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ といった同族体が存在する。



トコロール

(2-メチル-2-(4', 8', 12'-トリメチルトリデシル)-6-クロマンオール)



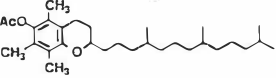

Toc	トコロール	分子式	分子量
$\alpha$ -	5, 7, 8-トリメチル-	$C_{29}H_{50}O_2$	430.71
$\beta$ -	5, 8-ジメチル-	$C_{28}H_{48}O_2$	416.69
$\gamma$ -	7, 8-ジメチル-	$C_{28}H_{48}O_2$	416.69
$\delta$ -	8-メチル-	$C_{27}H_{46}O_2$	402.66

図2 ビタミンE同族体の構造

そこで見いだされたタンパク質がこれらの同族体の中でどれをよく認識するか調べてみた。リポソームに放射標識した $\alpha$ -トコフェロールとともに、過剰量の無標識類似体を加え、競合実験によってその特異性を調べた。その結果、表1に示すように、無標識の $\alpha$ -トコフェロールを過剰に加えると、 $\alpha$ -トコフェロール標識体のみかけ上の移行は顕著に低下したが、クロマン環のメチル基の数が1つ少ないだけの $\gamma$ -トコフェロールを加えても競合率は低いということが分かった。また、フェノール性水酸基をブロックした $\alpha$ -トコフェロール酢酸や、酸化体の $\alpha$ -トコフェリルキノンでは殆ど競合阻害は見られなかった。従って、このタンパク質は、ビタミンE同族体のなかでも $\alpha$ -トコフェロールを特異的に認識し輸送することが判明し、我々は $\alpha$ -トコフェロール輸送タンパク質( $\alpha$ TTP)と名付けた。その後長い間、このタンパク質の実体は不明のままであったが、最近、このタンパク質の完全精製に成功した<sup>2)</sup>。

$\alpha$ TTPは以下の各操作で精製した。ラット肝

表1 ビタミンE輸送タンパク質の基質特異性

Competitor	[ <sup>14</sup> C] α-Toc.Transfer(%/30min)	
	I	II
None	16.1	14.6
α-Tocopherol 	0.0	0.0
γ-Tocopherol 	5.8	5.3
α-Tocopherol acetate 	13.0	12.9
Tocopherol quinone 	16.2	13.2

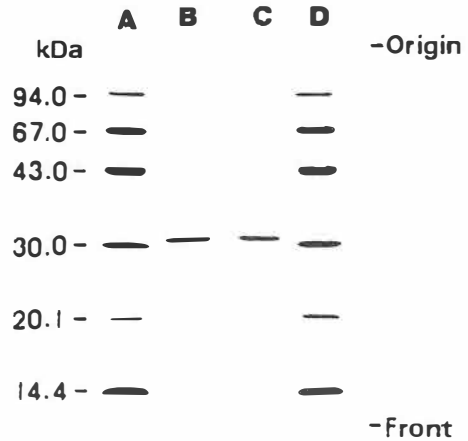


図3 ビタミンE輸送タンパク質のSDS-PAGEパターン

レーンA,D: 分子量マーカー  
レーンB : 等電点5.1アイソフォーム  
レーンC : 等電点5.0アイソフォーム

### 3. α TTPの性質

#### 1) 基質特異性

精製したαTTPを用いた場合も、α-トコフェロールに対して強い選択性を示した。また、2つのアイソフォームの間で基質特異性には差はみられなかった。現在のところ、これら2つのアイソフォームの機能的違いは明らかになっていない。一方、αTTPは、α-トコフェロールを結合して、シャトル機構によって膜間輸送を促進することが判明し、αTTP1分子当り1分子のα-トコフェロールが結合することが、精製タンパク質を用いた実験から明らかになった。

#### 2) 局在性

まず、精製タンパク質を用いて各種モノクローナル抗体を作製した。それらの中には、等電点の異なる2つのアイソマーを共に認識する抗体、および一方のアイソマーのみを認識する抗体が得られた。このことは2種類のアイソマーが免疫化学的に似ているが、異なる部分も存在することを示している。

臓のホモジェネートから10,000×g遠心上清を集め、pH 4.5の酸処理を行い、その上清を硫酸分画後、ゲル濾過(セファデックスG-75)、イオン交換(DEAEセファロース)、ヒドロキシアパタイト、クロマトフォーカシング、ブルーセファロースの各クロマトグラフィーで完全精製品を得ることができた。αTTPは、クロマトフォーカシングの段階で、等電点5.1および5.0の2つのピークに分かれた。最終精製品はどちらのアイソフォームも約1000倍の精製倍率であり、ラット肝臓可溶画分の全タンパク質のうち2つ合わせて約0.2%を占める比較的豊富なタンパク質であることが分かった。精製品のSDS-PAGEパターンでは、どちらのアイソフォームも分子量30,500の単一バンドを示し(図3)、また、ゲル濾過カラムによる活性の溶出位置から算出される分子量も約3万であったことから、このタンパク質はモノマーで活性を示すことが明らかになった。

次に、両アイソマーを認識する抗体を用いて、 $\alpha$ TTPの臓器分布を調べたところ、興味深いことに、ラット各臓器の中で本タンパク質は肝臓にしか存在しないことがわかった。しかし、様々な肝臓細胞株を調べてみたところ、いずれにも $\alpha$ TTPは発現していなかった<sup>3)</sup>。また、ラット肝臓実質細胞の初代培養系を用いて $\alpha$ TTPの発現を調べると、培養開始後24時間内に実質細胞から速やかに消失していった。以上のように、 $\alpha$ TTPは、「肝臓特異的に発現しているタンパク質」であり、しかも「分化特異的に発現するタンパク質」であることが明らかになった。

#### 4. $\alpha$ TTP 遺伝子のクローニング

$\alpha$ TTP 特異的抗体を用いて、ラット肝臓cDNAライブラリーから遺伝子クローニングを行った結果<sup>4)</sup>、全長2194bpの $\alpha$ TTPをコードするクローンが得られた。そこから推定されるタンパク質は、278個のアミノ酸をコードし(図4)、これから算出される分子量は31,845となり、精製タンパク質のものとよく一致していた。また、 $\alpha$ TTPはこれまでに報告されているどのタンパク質とも異なり、新規のタンパク質であることが分かった。全体的にそれほど疎水性は高くなく、疎水性基質と結合するようなドメインは一次構造からは推定できなかった。しかし、C末端側に疎水性アミノ酸が比較的多く存在していたことから、C末端側部分に基質(の特に疎水部)結合部位が存在している可能性が示唆された。また3'非翻訳領域は約1300bpと比較的長く、そのなかにmRNAの半減期を短くするシグナルといわれているAUUUA配列が4箇所存在していた。本タンパク質は肝初代培養系において速やかに消失したことを述べたが、このmRNAの特徴を反応しているかもしれない。

得られた遺伝子が2つの等電点の異なるアイソマーのどちらをコードするか、モノクローナル抗体を用いて発現したタンパク質との反応性で調べ

```

-70      -60      -50      -40      -30      -20
GCGCGGTTATTCCCATGACCCGCGGGCAGCTTCGGGAACCAAAGTCTTTGGGTTCCG
-10      10      20      30      40
GGGGGGCGGGGCATGGCAGAGATGCGGCCGGGGCCAGTGGTTGGAAACAGCTCAAGGAG
          M A E M R P G P V V G K Q L N E
50      60      70      80      90      100
CAGCCCGACCACTCGCCCTGGTCCAGCCGGCCGTCGCGAACTGAGGCGCGGGCCGAC
Q P D H S P L V Q P G L A E L R R R A Q
110     120     130     140     150     160
GAGGAGGGGTCGCGAGACCCCGCAGCCGTCACAGACGCTTCTTGTGGATTCTCTG
E E G V P E T P Q P L T D A F L L R F L
170     180     190     200     210     220
CGTCCCGGGATTTCGACTGGACCTGGCCGCTTAATGAAACATATTACAAATGG
R A R D F D L D L A W R L M K N Y Y K W
230     240     250     260     270     280
CGAGCAGAATGTCAGAACTAAGTCAGACTACACCCCTAGAAGTATCCTGGACTTCTG
R A E C P E L S A D L H P R S I L G L L
290     300     310     320     330     340
AAGCTGGCTACCATGGAGTTCCTGAGTCCAGGGATCCGACTGGCAGTAGTCTCTCATT
K A G Y H G V L R S R D P T G S R V L I
350     360     370     380     390     400
TACCGAATTCCTATTGGGACCCAAAGTTTTTACAGCTATGATGTTTCGTGTAAGT
Y R I S Y W D P K V F T A Y D V F R V S
410     420     430     440     450     460
CTGATCACATCAGAGCTCATTGTACAGGAGGTGGAACTCAACGGAAATGGAGTCAAGGCT
L I T S E L I V Q E V E T Q R N G V K A
470     480     490     500     510     520
ATATTTGACCTGGAAGGCTGGCAGATTTCTCATGTCTTTCAAATTCACCCATCTGTAGCC
I F D L E G W Q I S H A F Q I T P S V A
530     540     550     560     570     580
AAGAAGATTGCTGCTGTAGTACAGATTCCTTCCATTGAAAGTTCGTGGATCCATTGG
K K I A A V V T D S F P L K V R G I H L
590     600     610     620     630     640
ATAAATGAGCCGGTCAATTTCCATGCTGTCTTTCCATGATTAACCACTTCTGACTGAA
I N E P V I F H A V F S M I K P F L T E
650     660     670     680     690     700
AAGATTAAGGGTCGGATTACATCGATGGGAACAATATAAATCAAGCCTACTTCAGCAC
K I K G R I H L H G N N Y K S S L L Q H
710     720     730     740     750     760
TTCCAGACATCTTCTCTGGAATATGGTGGTAAGCAGCTCCATGGAGATATTGT
F P D I L P L E Y G G N E S S M E D I C
770     780     790     800     810     820
CAGGAGTGGCAAAATTTTAAATGAAGTCTGAAGATATCTCAGCAGCATTTCTGAGACC
Q E W T N F I M K S E D Y L S S I S E T
830     840     850     860     870     880
ATCCAAATGAGAAGTTGTTTCTGGAATGACTTCATCAAATCAAGGATGGATTCTA
I Q *
890     900     910     920     930     940
TCTGGTTACTAAACTCAAGACCAAACCTTCTAAACGAATGATCCTTATCTGATCTTAA

```

図4 ビタミンE輸送タンパク質

た結果、等電点5.0のアイソマーをコードすることが明らかになった。我々は、このクローン以外に5つの別のクローンを単離したが、いずれも同じアイソマーをコードするクローンしか得られなかった。肝臓内において、2つのアイソマーはタンパク質的にはほぼ同量発現している。従って、2つのアイソマーは同じ遺伝子にコードされており、翻訳後の修飾の違いによって生じた可能性も考えられる。しかし、現在2つのアイソマーの構造的相違はまだ明確ではなく、また機能的役割分担も含めて今後解決されなければならない問題である。

## 5. 既知のタンパク質との相同性

得られたラット  $\alpha$ TTP のアミノ酸配列と既知のタンパク質とのホモロジーを検索した結果、興味深いホモロジーがあることが見いだされた。1つは眼の網膜に存在し、11-シス-レチナールを特異的に結合するタンパク質 (CRALBP, cellular retinaldehyde binding protein) であり、もう1つは、酵母の SEC14 タンパク質である。CRALBP は 1988 年にクローニングされたが、他のレチノイド結合タンパク質、例えばレチノール結合タンパク質やレチノイン酸結合タンパク質などとは全くホモロジーがない。このタンパク質は、眼の網膜上皮細胞内に存在し、視細胞にレチナールを供給する役割を持つと考えられている。一方、SEC14 は、酵母の分泌変異株の1つから得られた遺伝子であり、その機能は、分泌過程の中で特にゴルジ体の関与する過程において必須であることがわかっている。また、このタンパク質は、リン脂質の中でホスファチジルイノシトールとホスファチジルコリンの膜間での交換輸送を行う活性を有することが知られている。しかし、この活性と分泌過程における機能との関連は現在のところ明確ではない。これらのタンパク質の間でのホモロジーを調べると、 $\alpha$ TTP と CRALBP の間では約 54%、 $\alpha$ TTP と SEC14 の間で約 40% であった。

以上のように、 $\alpha$ TTP は、2つの全く異なる脂質、すなわちレチナールとホスファチジルイノシトール (およびコリン) を輸送するタンパク質と相同性が高いことが判明し、これらが脂質輸送タンパク質としての新しいファミリーを形成している可能性が考えられる。これらのタンパク質は、輸送する基質は異なっても機能的類似性があるかもしれず、それについては後に議論する。

## 6. $\alpha$ TTP の生理的役割

当初、我々は、ビタミン E のような脂溶性分子を細胞内で各小器官に運ぶためには、何らかの輸送担体が必要であろうという考えのもとに、 $\alpha$ -トコフェロールの輸送タンパク質の検索を始めた。最初に用いた材料がラットの肝臓可溶性画分であったため、すぐにそのようなタンパク質を同定することができ、こうしたタンパク質は恐らくすべてのビタミン E を必要とする臓器に存在すると思われた。しかしながら、その後  $\alpha$ TTP の性状が解析されるに従い、 $\alpha$ TTP は肝臓にのみ特異的に発現していることが明らかになってきた。従って、我々が同定、精製した  $\alpha$ TTP は、 $\alpha$ -トコフェロールの細胞内輸送を普遍的に担うタンパク質ではなく、むしろ、肝臓特有の機能を担うタンパク質であることが予想されてきた。そこで、これまでのビタミンの体内動態に関する知見をもとに、 $\alpha$ TTP の性状から予想される  $\alpha$ TTP の生理的役割を推察してみたい。

既に述べたように、自然界のビタミン E にはメチル基の数や位置の違いによって、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ -トコフェロールなどの同族体が存在する。一般に食物の中には  $\alpha$ -トコフェロールよりも  $\gamma$ -トコフェロールのほうが多い。例えば、ダイズ油では  $\gamma$  体は  $\alpha$  体の約 6 倍多く含まれる。生体はこれらのトコフェロールを食餌として摂取しているが、ヒトやラットなど哺乳動物の生体内には  $\alpha$ -トコフェロールのほうが多く存在する。例えば、健康人血しょう中の  $\alpha$ -トコフェロール濃度は  $\gamma$ -トコフェロールに比較して 5~20 倍高い。従って、哺乳動物にはこれらトコフェロール同族体を識別して  $\alpha$ -トコフェロールを選択的に摂取する機構が存在するはずである。また、実験的に  $\alpha$ -トコフェロールの投与量を増加させると、脂肪酸の吸収などとは異なり、体内への  $\alpha$ -トコフェロールの摂取率が低下することから摂取機構には飽和過程があることが示唆されていた。しかし、

高等動物がいかにしてトコフェロール同族体を識別し、一定量を摂取しているかについてはこれまでまったく不明のままであった。

最近、米国のKaydenおよびカナダのIngoldの共同研究によって、吸収されたビタミンEの体内動態が詳細に解析され、一つの説が出された<sup>5)</sup>。彼らの実験によると、まず $\alpha$ -トコフェロールと $\gamma$ -トコフェロールは、小腸での吸収段階ではいずれも同程度の効率で吸収され、キロミクロンに結合しリンパ管へ放出されることがわかった(図5)。キロミクロンは血液中で代謝を受け、一部のトコフェロールは各末梢組織に受け渡されるが、

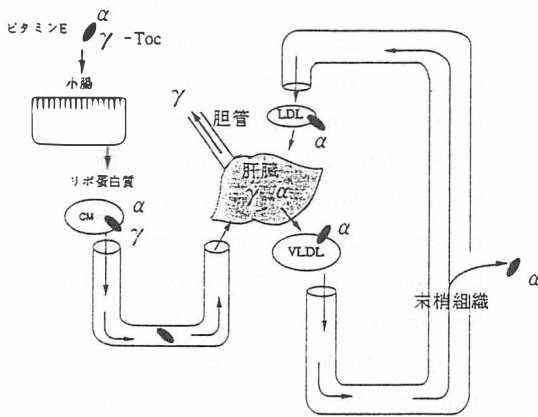


図5 ビタミンEの体内動態

残りはキロミクロン粒子とともに一旦肝臓に取り込まれる。肝臓に取り込まれたトコフェロールは、次に肝臓で合成されるリポタンパク質である高密度リポタンパク質(VLDL)に結合して再び血液中に放出される。興味深いことに、肝臓に取り込まれたトコフェロールのうち、 $\alpha$ -トコフェロールのみがVLDLに結合して再び血液中に放出されるが、 $\gamma$ -トコフェロールはVLDLにはほとんど結合していなかった。VLDLは血液中で最終的にはLDLまで代謝されるが、これらのリポタンパク質を介して各組織に $\alpha$ -トコフェロールが供給される。こうして生体内には $\alpha$ -トコフェロールが選択的に蓄積していくものと考えた。言い換えれば、生体内におけるトコフェロー

ル同族体の識別は、小腸における吸収段階にあるのではなく、肝臓内にあることが提唱されたのである。我々が精製した $\alpha$ TTPは、同族体のなかで $\alpha$ -トコフェロールを選択的に認識し、しかも生体内において肝臓にのみ存在する。これらの結果は、ビタミンE同族体の肝臓での識別にこの輸送タンパク質が関与していることを強く示唆している。そこでこのような仮説に基づいて、 $\alpha$ TTPの肝細胞内での役割を考察してみた。

キロミクロンレムナントは、肝臓内に取り込まれた後ライソソームで分解され、結合していた $\alpha$ -および $\gamma$ -トコフェロールが遊離される。これらのトコフェロールはライソソーム膜を通過して細胞質側に放出されるが、これらのうち $\alpha$ 体だけが細胞質に存在する特異的輸送タンパク質に結合する。はじめに述べたように、 $\alpha$ -トコフェロールはVLDLに選択的に取り込まれて血液中に再放出されると考えられるので、 $\alpha$ TTPは結合した $\alpha$ -トコフェロールをVLDLが合成されるオルガネラまで輸送する機能を持つと考えられる。VLDLは小胞体膜で合成されゴルジ装置を経て分泌されており、 $\alpha$ TTPはこれらのオルガネラのどこかを認識し、 $\alpha$ -トコフェロールを効率良くVLDLに運ぶ機能を担っているものと考えられる。 $\alpha$ TTPをクローニングした結果、このタンパク質が、酵母のSEC14とホモロジーがあることを前に述べた。SEC14は分泌過程に必須のタンパク質であり、電顕による観察の結果、細胞質のみならず一部はゴルジ体膜にも結合していることが示されている。もし、 $\alpha$ TTPも同様の性質を有しているならば、ゴルジ体において $\alpha$ -トコフェロールを分泌過程にあるVLDLに受け渡しているかもしれない。現在我々は、このような仮説に基づき解析を続けている。一方、 $\gamma$ -トコフェロールは、本輸送タンパク質に結合できず、効率良く再循環されないために体内濃度が低下するものと考えられる。

血液中を循環するリポタンパク質は、絶えず肝臓に取り込まれて代謝されている。例えばヒト

血漿リポタンパク質の主要成分であるLDLの約2/3量は肝臓に取り込まれて代謝されている。肝臓は再び新たなリポタンパク質(VLDL)を合成して再び血液中に分泌する。従って、血漿リポタンパク質に結合した $\alpha$ -トコフェロールも、血液中を循環している間に一旦は肝臓内に取り込まれなければならない。ここで $\alpha$ TTPに結合したトコフェロールだけがVLDLと共に再循環されるならば、肝臓内の $\alpha$ TTPが体内を循環する $\alpha$ -トコフェロール量を規定している可能性が考えられる。はじめに $\alpha$ -トコフェロールの摂取量には飽和性があることを述べたが、その分子機構の実体がこの $\alpha$ TTPであるのかも知れない。現在、 $\alpha$ TTPの発現にどのような調節機構があるのか全く不明であるが、 $\alpha$ TTP発現の調節により生体内ビタミンE量を制御する機構も考えられ、今後の興味深い問題である。

ところで、古くからビタミンE欠乏症という先天性疾患が知られていた。このような患者では、筋肉、神経に異常が発生し、反射消失、運動失調、感覚異常、筋力低下等の症状が現れる。欠乏症の原因の1つは、リポタンパク質の構成成分の一つであるアポBが合成できないために血液中のリポタンパク質が欠損し、ビタミンEを血液中で輸送できないことによる。またこれとは別に、リポタンパク質合成は正常であるにも関わらず、原因不明のビタミンE欠乏症があることが知られていた。最近この患者におけるトコフェロールの体内動態が解析され、その結果、小腸ではビタミンEを正常人と同じように吸収できるが、その後 $\alpha$ -トコフェロールも $\gamma$ -トコフェロールと同様にすばやく排泄してしまうために欠乏症に陥るということが明らかにされた。従って、このような先天性患

者では $\alpha$ TTPが欠損していると考えようまく説明できる。現在我々はラットのcDNAをもとにヒト肝臓にも非常によく似たタンパク質があることを確認し、そのcDNAを単離している。近い将来、これらの遺伝子を材料にビタミンE欠乏症の原因の1つが明らかになるかも知れない。

## 参考文献

- 1) Mowri, H., Nakagawa, Y., Inoue, K. and Nojima, S. : Enhancement of the transfer of  $\alpha$ -tocopherol between liposomes and mitochondria by rat-liver protein (s) .  
Eur. J. Biochem., 117, 537-542 (1981)
- 2) Sato, Y., Hagiwara, K., Arai, H. and Inoue, K. : Purification and characterization of  $\alpha$ -tocopherol transfer protein from rat liver.  
FEBS lett., 288, 41-45 (1991)
- 3) Mowri, H., Nojima, S. and Inoue, K. : Lack of protein-mediated  $\alpha$ -tocopherol transfer between membranes in the cytoplasm of ascites hepatomas.  
Lipids, 23, 459-464 (1988)
- 4) Sato, Y., Arai, H., Miyata, A., Tokita, S., Yamamoto, K., Tanabe, T. and Inoue, K. : Primary structure of  $\alpha$ -tocopherol transfer protein from rat liver : Homology with cellular retinaldehyde binding protein.  
J. Biol. Chem., 268, 17705-17710 (1993)
- 5) Kayden, H. J. and Traber, M.G. : Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans.  
J. Lipid Res., 34, 343-358 (1993)

# 皮膚線維芽細胞とガン細胞の細胞間相互作用による マトリックス分解酵素の産生

東京薬科大学

森 陽

The involvement of tumor cell-fibroblast interaction in matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) production was examined. Co-cultures of human skin fibroblasts with human MCF-7 cells of epithelial origin showed increased MMP and TIMP production when compared to cultures of the individual cells. The effect was dependent on the cellular ratio between human skin fibroblasts and MCF-7 cells. The stimulatory factors can be detected in the conditioned medium from MCF-7 cell cultures. The addition of membrane fractions prepared from MCF-7 cells to the fibroblast cultures also stimulated MMP and TIMP production. However, kinds of increased MMPs were different from kinds of MMPs induced by soluble factors released from tumor cells.

These results demonstrated that MCF-7 cells have two forms of stimulatory factor: MMP stimulatory factors that is present at outer surface of MCF-7 cells and MCF-7 cells derived factors that stimulate MMP production of fibroblasts.

## 1. 緒言

皮膚病変や皮膚障害においてサイトカインの関与が報告されているがサイトカインと組織破壊に関連する酵素との関係は必ずしも明確ではない。

著者は皮膚線維芽細胞と表皮細胞など種々の細胞間の相互作用によって皮膚線維芽細胞の産生する細胞外マトリックス分解酵素の変動を調べているうち、皮膚線維芽細胞とガン細胞の相互作用に興味ある現象を見いだした。そこで、細胞外マトリックスの分解に関与する酵素の中で特にマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) に着目した。

MMPsはその基質特異性の違いから3つのグループに大別される。第1グループは、間質の主要構成成分であるI型コラーゲンを基質とする組織性コラゲナーゼ (MMP-1) に代表されるものである。第2グループは、基底膜の構成成分であるIV型コラーゲンを分解するMMPであり、これには72kDa.IV型コラゲナーゼ (MMP-2) および92kDa.IV型コラゲナーゼ (MMP-9) の2種類が知られている。これら酵素は変性コラーゲンであるゼラチンに対しても強い分解活性を示すことからゼラチナーゼとも呼ばれている。第3のグループは、ストロムライシン (MMP-3) に代表されるもので前者の中間的な基質特異性を有し、プロテオグリカン、ラミニンやフィブロンクチンなども分解する。またMMP-3はproMMP-1やproMMP-9の活性化にも関与していることが知られている。一方、これらMMPs産生細胞から共に産生され1:1のモル比でMMPsを不活化する組織性メタロプロテアーゼインヒビター (TIMP) が知られている。従って今日では局所におけるMMPsとTIMPの量的

Production of matrix degrading enzymes by skin fibroblast-tumor cell interaction



Yo Mori

Tokyo College of Pharmacy

バランスの崩れが細胞外マトリックスの分解を誘起すると考えられている。

以上のことから著者は、正常ヒト乳腺上皮細胞および乳ガン細胞株 MCF-7、および BT-20 細胞を使用し、正常ヒト線維芽細胞との細胞間相互作用の面から MMP および TIMP 産生について検討を加えた。

## 2. 実験材料および実験方法

### 2.1 培養器具および試薬

細胞培養プラスチック器具は Corning 製；Eagle's minimum essential medium (MEM) は Gland Island Biochemical Co. 製；Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> free phosphate-buffered saline (PBS (-)) は日水製薬製；fetal bovine serum (FBS) は M. A. Bio-products 製；alkaline phosphatase-conjugated goat anti-(rabbit IgG) IgG, alkaline phosphatase-conjugated donkey anti-(sheep IgG) IgG, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, Nitro Blue Tetrazolium は Sigma 製；Sephadex G-75 は Pharmacia 製；gelatin は DIFCO Laboratories Co. 製；human recombinant Transforming Growth Factor (TGF)  $\alpha$  は GIBCO BRL 製；polyclonal goat anti-(human TGF  $\alpha$ ) IgG は R&D Systems Inc. 製；human platelet TGF  $\beta$  1 はキング醸造製をそれぞれ購入し使用した。なお Sheep anti-(human proMMP-1, MMP-3 および TIMP) および Rabbit anti-(human proMMP-2) 抗体は Kansas 大学医学部 Hideaki Nagase 教授より提供を受けた。

その他の試薬は全て特級試薬を使用した。

### 2.2 細胞培養および処理方法

ヒト乳ガン細胞株 MCF-7 細胞および BT-20 細胞は防衛医科大学校 小佐野博史博士より、正常ヒト皮膚線維芽細胞はグレース株式会社中央研

究所 竹沢俊明博士よりそれぞれ提供を受けた。正常ヒト乳腺上皮細胞はクラボウより Mammary Pack Kit を購入し使用した。細胞は 5% CO<sub>2</sub>-95% air 気相下、37°C で 75 cm<sup>2</sup> flask を用いて培養し、細胞が confluent になった時点で随時継代した。その際、培養液は線維芽細胞、MCF-7 細胞および BT-20 細胞については 10% (v/v) FBS/MEM を、正常ヒト乳腺上皮細胞は Mammary Pack Kit に付属していた MEGM を使用した。なお全ての実験において線維芽細胞は継代数 12-22 のものを、正常ヒト乳腺上皮細胞は継代数 9-10 のものを使用した。

混合培養は線維芽細胞が confluent になった時点で乳腺上皮細胞、MCF-7 細胞あるいは BT-20 細胞を混合し、10% (v/v) FBS/MEM で 24 h 培養した後、0.2% (w/v) LAH/MEM で洗浄、同培養液に交換した。また MCF-7 細胞培養上清、MCF-7 細胞膜画分による線維芽細胞の処理は、線維芽細胞が confluent になった時点で 0.2% (w/v) LAH/MEM で洗浄後、同培養液中で実施した。それぞれの培養上清は培養処理 48h 後に回収し、-20°C で凍結保存し試料とした。

### 2.3 MCF-7 細胞培養上清の調製

MCF-7 細胞を 75 cm<sup>2</sup> flask で培養し、confluent になった時点で 0.2% (w/v) LAH/MEM で洗浄し、同培養液に交換した。48h 後に培養上清を回収、4°C、1,000rpm で 5min 遠心分離し、さらに上清を 45  $\mu$ m のシリンジフィルターにて細胞を完全に除去した。回収した上清はフィルター OM-5 membrane (岩城硝子社製) を用いて限外ろ過をし、100 倍に濃縮したものを -20°C で凍結保存し試料とした。

### 2.4 MCF-7 細胞膜画分の調製

Biswas らの方法<sup>1)</sup>に従って調製し、試料とした。

## 2.5 MMP-3およびゼラチナーゼの活性測定

培養液中の潜在型MMP-3およびゼラチナーゼの活性化は培養液に2mM APMA (50mM Tris-HCl/150mM NaCl/10mM CaCl<sub>2</sub> (pH 7.5) に溶解) を等量添加し、ゼラチナーゼ活性は5min、またMMP-3活性は30min 37°Cでそれぞれインキュベーションして実施した。MMP-3の活性測定は [<sup>3</sup>H] カルボキシメチル化トランスフェリンを基質<sup>2)</sup>とし、10 μlの基質溶液 (3mgトランスフェリン/ml、240,000dpm/mgトランスフェリン) に活性化した酵素液10 μlを加え37°Cで一定時間反応させた後、氷冷した3.3% (w/v) トリクロル酢酸 (TCA) を200 μl加え、8,000 × gで5min遠心分離し得られた上清100 μlの放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。ゼラチナーゼ活性測定はCowston and Barrettの方法<sup>3)</sup>で調製した [<sup>14</sup>C] アセチル化Type Iコラーゲンを60°C、20minインキュベーションしゼラチン化させたものを基質とした。200 μlの基質溶液 (4mgゼラチン/ml、3,000 dpm/mgゼラチン) に活性化した酵素液100 μlを加え37°Cで一定時間反応させた後、60% (w/v) TCAを100 μl加え、8,000 × gで5min遠心分離し得られた上清100 μlの放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。なお酵素活性1 unitは上記条件下で1 minに1 μgのゼラチンを分解する酵素量とした。

## 2.6 Western blotting法

細胞培養上清に終濃度3.3%になるようTCAを加え、8,000 × gで5min遠心分離し、得られた沈殿にLaemmliの方法<sup>4)</sup>に従って調整したsample solutionを加え、7.5%から13% (w/v) アクリルアミドゲルを用いてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った後、ゲルをtransfer buffer (20mM Tris/150mM glycine/20% (v/v) methanol/0.1% (w/v) SDS) に浸したニトロセルロース膜に密着させ、セミドライ型転写装置 (マリソル社

製) を用いて200mAで1h転写させた。転写後ただちにニトロセルロース膜をドライミルク溶液 (10% (w/v) fatty-free dry milk/10mM Tris-HCl/0.9% (w/v) NaCl/0.02% (w/v) NaN<sub>3</sub> (pH 7.5)) に浸し10minのblockingを行い、ついで蒸留水およびTBS buffer (50mM Tris-HCl/200mM NaCl (pH 7.5)) にて数回洗浄した。洗浄後1% (w/v) BSA/PBS (-) で希釈した1次抗体溶液に4°Cで12h以上浸した。1次抗体結合後、blockingおよび洗浄を同様に行い1% (w/v) BSA/PBS (-) で希釈したアルカリフォスファターゼを結合した2次抗体溶液に室温で1h浸した。その後TBS bufferで数回洗浄し、基質溶液 (0.4mM Nitro Blue Tetrazolium/0.4mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphateを100mM Tris-HCl/100mM NaCl/5mM MgCl<sub>2</sub> (pH 8.0) に溶解) に浸し適当な時間発色させた。発色後、蒸留水およびTBS bufferですばやく洗浄しstop solution (20mM Tris-HCl/5mM EDTA (pH 8.0)) に適当な時間浸した後、ろ紙にて脱水し乾燥した。

## 2.7 Gelatin zymography

ゼラチン (1.2mg/ml) を含む7.5% (w/v) アクリルアミドゲルを用いて非還元条件下で、Laemmliの方法<sup>4)</sup>に従いSDS-PAGEを行った後、ゲル中からSDSを除去するため2.5% (v/v) Triton X-100を含むbuffer (50mM Tris-HCl/5mM CaCl<sub>2</sub>/1 μM ZnCl<sub>2</sub>/0.02% (w/v) NaN<sub>3</sub> (pH 7.5)) で1h洗浄後、37°Cで適当な時間Triton X-100を含まない上記buffer中でインキュベーションした。その後ゲルを染色液 (0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue/50% (v/v) methanol/20% (v/v) acetic acid) 中、静かに浸とうしながら10min染色し、その後30% (v/v) methanol/1% (v/v) formic acidにて脱色処理を行った。

### 3. 実験結果

#### 3.1 正常乳腺上皮細胞あるいは乳ガン細胞株 (MCF-7およびBT-20細胞) と正常線維芽細胞との混合培養における MMPs および TIMP 産生の検討

正常乳腺上皮細胞あるいは2種の乳ガン細胞株 (MCF-7およびBT-20細胞) と正常線維芽細胞との混合培養における MMP および TIMP 産生をウエスタンブロット法により検討した。Fig.1に示したように線維芽細胞単独のみでも proMMP-1 [A]、proMMP-3 [B] および TIMP [C] 産生を認めた (lane 1) が、MCF-7細胞と混合培養することにより、それぞれ10倍、4.2倍、1.8倍増加した (lane 3)。しかしながら、正常乳腺上皮細胞 (lane 2) あるいはBT-20細胞 (lane 4) との混合培養ではTIMP産生はMCF-7細胞との混合培養時とほぼ同様であるが (それぞれ1.56倍および1.6倍) proMMP-1 および proMMP-3産生には顕著な変化は認められなかった。また正常乳腺上皮細胞、MCF-7細胞およびBT-20細胞それぞれ単独 (lanes 5-7) ではこれらの産生はいずれも認められなかった。

次に、proMMP-2産生についてもウエスタンブロット法およびゼラチンザイモグラフィにより検討した (Fig.2)。正常乳腺上皮細胞と線維芽細胞との混合培養 (lane 2) では、線維芽細胞単独 (lane 1) と比べ変化を認めなかった。しかしMCF-7細胞 (lane 3)、あるいはBT-20細胞 (lane 4) と線維芽細胞との混合培養では proMMP-2産生はそれぞれ2.94倍および3.15倍の増加が認められた。また正常乳腺上皮細胞、MCF-7細胞、BT-20細胞それぞれ単独 (lanes 5-7) では、proMMP-2産生はいずれも認められなかった (Fig.1-2)。

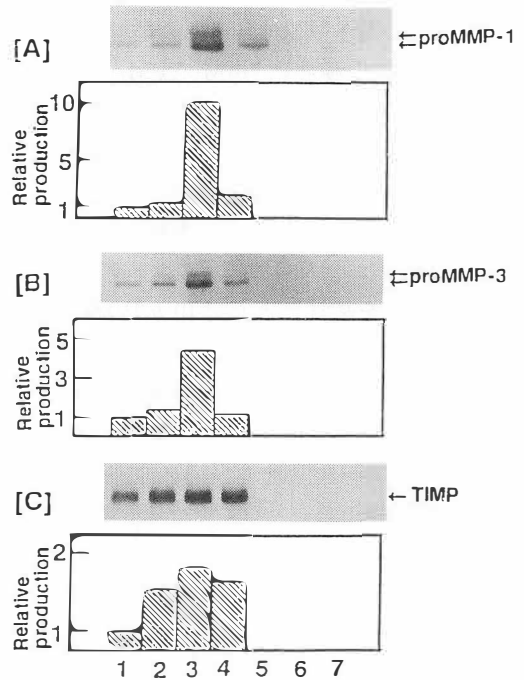


Fig.1 Production of MMPs and TIMP by human skin fibroblasts cocultured with normal or neoplastic breast cells. Confluent fibroblasts at the 18th passage were cocultured with normal or neoplastic breast cells in 10% (w/v) FBS/MEM for 24h, and then the medium was changed to 0.2% (w/v) LAH/MEM and incubated further for 48h. The harvested medium was performed to western blot with antibodies against proMMP-1 [A], proMMP-3 [B], or TIMP [C] as described in the methods. Lane 1, human skin fibroblast (HSF); lane 2, coculture of HSF and normal human mammary epithelial cells (HMEC); lane 3, coculture of HSF and MCF-7 cells; lane 4, coculture of HSF and BT-20 cells; lane 5, HMEC; lane 6, MCF-7 cells and lane 7, BT-20 cells.

#### 3.2 MCF-7細胞と正常線維芽細胞との混合培養による MMPs および TIMP 産生におよぼす MCF-7細胞数の影響

MCF-7細胞と線維芽細胞との混合培養における MMPs および TIMP 産生におよぼす MCF-7細胞の細胞数の影響を検討した。Fig.3に示され

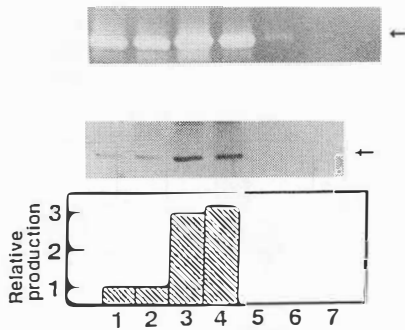


Fig.2 Production of proMMP-2 by HSF cocultured with normal or neoplastic breast cells. The conditioned medium in Fig.1 was performed to gelatin zymography or western blot with antibody against proMMP-2 as described in the methods. Lane 1, HSF ; lane 2, coculture of HSF and HMEC ; lane 3, coculture of HSF and MCF-7 cells ; lane 4, coculture of HSF and BT-20 cells ; lane 5, HMEC ; lane 6, MCF-7 cells and lane 7, BT-20 cells.

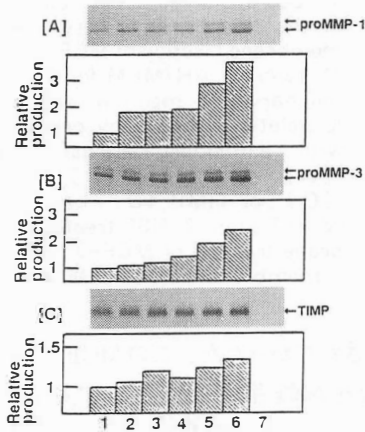


Fig.3 Production of MMPs and TIMP in coculture of HSF and MCF-7 cells. Confluent HSFs at the 17th passage were cocultured with various cell number of MCF-7 cells in 10% (w/v) FBS/MEM for 24h, and then the medium was changed to 0.2% (w/v) LAH/MEM and incubated for 48h. The harvested medium was performed to western blot with antibodies against proMMP-1 [A], proMMP-3 [B], or TIMP [C] as described in the methods. Lane 1, HSF ; lanes 2-6, HSF cocultured with MCF-7 cells (ratios of cell number of HSF : MCF-7 ; 32 : 1, 16 : 1, 8 : 1, 4 : 1 and 2 : 1, respectively) and lane 7, MCF-7 cells.

たように、線維芽細胞のみ (lane 1) と比較し、MCF-7細胞の細胞数を段階的に増やしながら混合培養する (lanes 2-6) と、MCF-7細胞の細胞数の増加に従って proMMP-1 [A]、proMMP-3 [B] および TIMP [C] 産生の増加が認められ、線維芽細胞と MCF-7細胞の細胞数比が 2:1 (lane 6) のときは増加率がそれぞれ 3.7倍、2.4倍および 1.3倍であった。しかしながら MCF-7細胞のみ (lane 7) では、これらの産生はいずれも認められなかった (Fig.3-4)。

次に、proMMP-2産生についても同様検討した。Fig.4に示したように、混合培養における MCF-7細胞数が増えるに従って proMMP-2産生は増加し (lanes 2-6)、線維芽細胞と MCF-7細胞の細胞数比が 2:1 (lane 6) のとき 4.3倍まで増加した。しかし MCF-7細胞のみ (lane 7) では、proMMP-2産生は全く認められなかった。

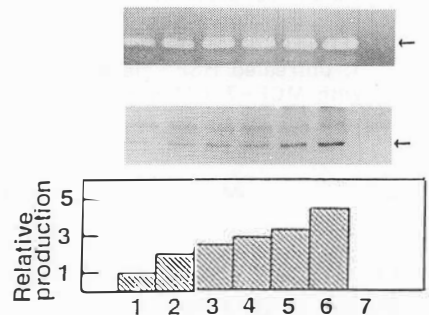


Fig.4 Production of proMMP-2 in coculture of HSF and MCF-7 cells. The conditioned medium in Fig. 3 was performed to gelatin zymography or western blot with antibody against proMMP-2 as described in the methods. Lane 1, HSF ; lanes 2-6, HSF cocultured with MCF-7 cells (ratios of cell number of HSF : MCF-7 ; 32 : 1, 16 : 1, 8 : 1, 4 : 1 and 2 : 1, respectively) and lane 7, MCF-7 cells.

### 3.3 線維芽細胞の MMPs および TIMP 産生におよぼす MCF-7細胞の培養上清の影響

Fig.5に示したように MCF-7細胞培養上清中

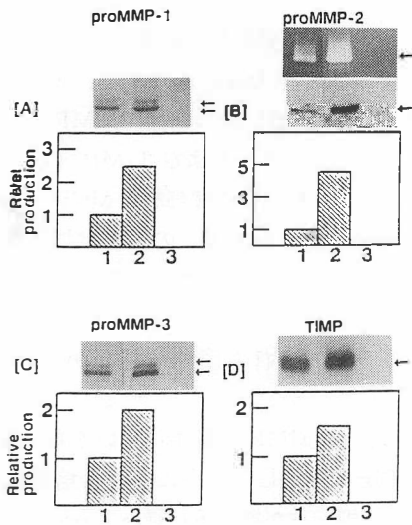


Fig.5 Effect of MCF-7 conditioned medium (MCF-7-CM) on the production of MMPs and TIMP by HSF. Confluent HSFs at the 18th passage were treated with MCF-7-CM in 0.2% (w/v) LAH/MEM for 48h, and then the harvested medium was performed to gelatin zymography or western blot with antibodies against proMMP-1 [A], proMMP-2 [B], proMMP-3 [C], or TIMP [D] as described in the methods. Lane 1, untreated HSF; lane 2, HSF treated with MCF-7-CM and lane 3, MCF-7-CM.

(lane 3) には proMMP-1 [A]、proMMP-2 [B]、proMMP-3 [C] および TIMP [D] のいずれも検出されなかったが、この培養上清を線維芽細胞に添加し培養する (lane 2) と、混合培養したときと同様 proMMP-1、proMMP-2、proMMP-3 および TIMP 産生の顕著な増加が認められた。

### 3.4 線維芽細胞の MMPs および TIMP 産生におよぼす MCF-7 細胞膜の影響

MCF-7 細胞の細胞膜画分を線維芽細胞に添加したときの MMPs および TIMP 産生を検討した (Fig.6)。MCF-7 細胞膜画分 (lane 3) には proMMP-1 [A]、proMMP-2 [B]、proMMP-3 [C] および TIMP [D] いずれ

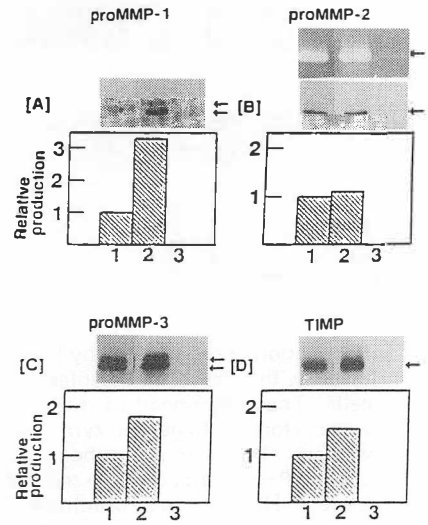


Fig.6 Effect of plasma membrane of MCF-7 cells on the production of MMPs and TIMP by HSF. A high-speed membrane ( $100,000 \times g$ ) fraction was prepared from sonicated MCF-7 cells as described in the methods. Confluent HSFs at the 19th passage were treated with membrane fraction of MCF-7 cells in 0.2% (w/v) LAH/MEM for 48h, and then the harvested medium was performed to gelatin zymography or western blot with antibodies against proMMP-1 [A], proMMP-2 [B], proMMP-3 [C], or TIMP [D], Lane 1, untreated HSF; lane 2, HSF treated with membrane fraction of MCF-7 cells and lane 3, membrane fraction of MCF-7 cells.

も検出されなかったが、この MCF-7 細胞の細胞膜画分を線維芽細胞に添加することにより proMMP-1、proMMP-3 および TIMP 産生が促進した (lane 2)。しかしながら proMMP-2 産生には変化が認められなかった ([B] lane 2)。

### 3.5 線維芽細胞のゼラチナーゼ活性におよぼす MCF-7 細胞培養上清の影響

これまで MCF-7 細胞培養上清により線維芽細胞の MMPs 産生が促進することが明らかとなったが、同時にこれらの阻害活性を有する TIMP 産生も促進することが示された。そこで実際の活性発現におよぼす影響について検討した。Fig.7

に示したようにMCF-7細胞培養上清にはゼラチナーゼ活性はほとんどないが、MCF-7細胞培養上清を線維芽細胞に添加することにより、ゼラチナーゼ活性は、3-5倍に有意に増加した。

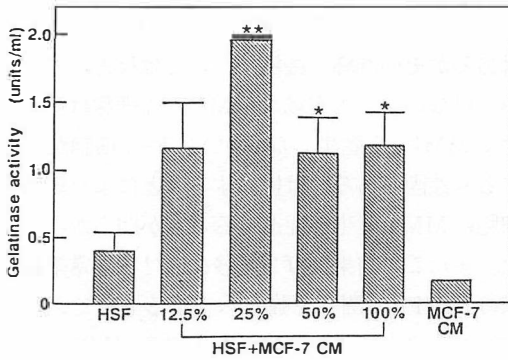


Fig.7 Effect of MCF-7-CM on the gelatinase activity produced by HSF. Confluent HSFs at the 12th passage were treated with MCF-7-CM (12.5%, 25%, 50%, and 100%, respectively) in 0.2% (w/v) LAH/MEM for 48h. The harvested medium was performed to assay for gelatinase activity as described in the methods. Results are presented as the mean  $\pm$  SD of 3 wells. \* and \*\*, significantly different from untreated HSF ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively).

### 3.6 線維芽細胞の増殖におよぼすMCF-7細胞培養上清の影響

線維芽細胞の増殖におよぼすMCF-7細胞培養上清の影響を検討した。Table.1に示したようにMCF-7細胞培養上清は線維芽細胞の増殖を無血清および5%血清存在下ともに有意に増加させた。

## 4. 考察

今回、正常乳腺上皮細胞と2種の乳ガン細胞株を用い正常線維芽細胞との混合培養によるMMPs産生を検討した。MCF-7細胞との混合培養ではproMMP-1、proMMP-2およびproMMP-3産生が著しく増加した。BT-20細胞においてはproMMP-2産生は増加したが他のMMP産生ではあまり変化が認められなかった。

Table 1. Effect of MCF-7-CM on the growth of HSF in growth phase.

Treatment	Cell number ( $\times 10^{-4}$ cells/well)	
	Serum concentration (%, v/v) <sub>0</sub>	Serum concentration (%, v/v) <sub>5</sub>
Control	3.81 $\pm$ 0.17	5.85 $\pm$ 0.44
MCF-7-CM (100%)	4.90 $\pm$ 0.66 **	6.50 $\pm$ 0.43 *

HSFs at the 19th passage ( $3 \times 10^4$  cells/well) were incubated in 12 multiwellplate for 2 h, and then medium was changed to MEM or 5% (v/v) FBS/MEM containing condensed MCF-7-CM corresponding to 100% (v/v) original CM. After 48 h cultivation, cell number of HSF was counted. The data are expressed as the mean values  $\pm$  SD of 6 wells. \* and \*\*, significantly different from control ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively).

一方、正常乳腺上皮細胞との混合培養ではMMP産生はほとんど影響がなかった。また正常乳腺上皮細胞や乳ガン細胞株自体にはこれらのMMP産生能は認められなかった。このことから混合培養によるMMP産生の増加は正常乳腺上皮細胞では見られず、乳ガン細胞株にのみ認められるが、細胞株によっても異なることも明らかとなった。さらにMCF-7細胞と線維芽細胞の混合培養の細胞数比を変化させたところ、MCF-7細胞の細胞数に依存してMMPs産生が増加した。混合培養において免疫蛍光法によりproMMP-1、-2および-3の産生細胞を検討したところ、proMMP-1および-3の増加は線維芽細胞の産生能の促進の結果であることが明らかとなった。(未発表データ)

この線維芽細胞<sup>5-6)</sup>のMMPs産生を促進させる因子としてMCF-7細胞から産生される液性因子によるものと、MCF-7細胞と線維芽細胞が接着することによる場合<sup>7)</sup>が考えられる。

MCF-7細胞の培養上清を線維芽細胞に添加したところ、混合培養の時と同様proMMP-1、proMMP-2、proMMP-3およびTIMP産生が促進したのに対し、MCF-7細胞の細胞膜画分添加ではproMMP-1、proMMP-3およびTIMP産生は促進するもののproMMP-2産生には変化が認められなかった。従ってMCF-7細胞の産生するMMP産生促進因子は細胞膜と液性因子とで異なることが示唆された。

一方、MMPsは、通常はこれらの産生細胞が

同時に産生すると理解されている。組織性メタロプロテアーゼインヒビター (TIMP) と 1:1 のモル比で複合体を形成することにより不活化される。proMMP-2 および proMMP-3 はそれぞれ TIMP-2 と TIMP-1 と特異的に結合し活性化を阻害する。従って局所での MMPs と TIMP との量的バランスが MMP 活性発現に重要であるとされている。

Schultz ら<sup>8)</sup> は、rTIMP-1 は腹腔内投与によりマウス B16 メラノーマの肺転移を抑制すること、Kohkha ら<sup>9)</sup> は、TIMP-1 のアンチセンス cDNA を正常マウス 3T3 細胞に発現させて TIMP-1 の産生を抑制すると浸潤性と転移能を獲得した細胞が得られることを、逆に Declerck ら<sup>10)</sup> は TIMP-2 の cDNA を導入発現させることにより転移能が低下することを報告している。これらの事実は TIMP が転移抑制遺伝子産物のひとつであることを示すと共に、MMP と TIMP 産生の量的不均衡が転移性浸潤を誘起する要因になっている可能性を示唆している。

今回線維芽細胞のゼラチナーゼ活性におよぼす MCF-7 細胞培養上清の影響を検討したところ、線維芽細胞のゼラチナーゼ活性の有意な増加を認めた。従って MCF-7 細胞の培養上清を線維芽細胞に添加することにより線維芽細胞の MMP および TIMP 産生は共に増加するが、全体として MMP 産生が TIMP に対し優位であることが明らかとなり MCF-7 細胞と正常細胞との相互作用による MMPs の増加が転移浸潤に強く関与していることが示唆された。

一方、MCF-7 細胞培養上清添加により線維芽細胞の増殖は有意に促進されることが明らかとなり、このことから線維芽細胞の MMP 産生を促進するのは MCF-7 細胞培養上清中の増殖因子である可能性が示唆された。また MCF-7 細胞培養上清をゲルろ過にて分離した場合、ゼラチナーゼおよび proMMP-3 産生促進活性は異なることが示され、また先の線維芽細胞に MCF-7 細胞培養上清あるいは細胞膜画分を添加したときの MMP 産

生促進作用の結果と併せて、線維芽細胞の MMP 産生を促進させる因子は増殖因子を含めて複数存在することが示唆された。

以上、乳ガン細胞株 MCF-7 細胞と正常線維芽細胞との細胞間相互作用について検討した。in vivo での MCF-7 細胞の転移能を検討した報告はあるがその詳細な機構についてはほとんど明らかではないが、本実験から MCF-7 細胞は自らは全く MMPs を産生しないが MCF-7 細胞が産生する液性因子あるいは接着することにより線維芽細胞は MMP 産生を促進することが明らかとなった。またこの結果はガン転移における正常細胞由来の MMPs の関与を強く示唆するものである。しかも今日までガン細胞の産生する MMP 産生促進活性が液性因子および接着の二通りで行われる例は MCF-7 細胞が最初であり、またこの MMP 産生を促進させる因子は、複数存在することが示唆された。しかしこれらの因子については同定するまでには至らず、さらに検討が必要であると考えられる。

## 引用文献

- 1) Biswas, C. and Nugent, M. A. (1987) J. Cell. Biochem., 35, 247-258
- 2) Vater, C. A., Nagase, H. and Harris, E. D. Jr. (1986) Biochem. J., 237, 853-858
- 3) Cawston, T. E. and Barrett, A. J. (1979) Anal. Biochem. 99, 340-345
- 4) Laemmli, U. K. (1970) Nature (London), 227, 680-685
- 5) Nakajima, M., Chop, A. M. (1991) Semin. Cancer Biol., 2, 115-127
- 6) Pyke, C., Ralfkiaer, E., Huhtala, P., Hurskainen, T., Dano, K. and Tryggrason, K. (1992) Cancer Res., 52, 1336-1341
- 7) Nabeshima, K., Lane, W. S. and Biswas, C., (1991) Arch. Biochem. Biophys., 285, 90-96
- 8) Shultz, R. M., Silberman, S., Persky, B., Bajkowski, A.S. and Carmichael, D.F. (1988)

Cancer Res., 48, 5539-5545

M. (1992) Cancer Res., 52, 701-708

- 9) Kohka, R., Waterhouse, P., Yagel, S., Lala, P. K., Overall, C. M., Norton, G. and Denhardt, D. T. (1989) Science, 243, 947-950
- 10) Declerck, Y. A., Perez, N., Shimada, H., Boone, T. C., Langley, K. E. and Taylor, S.

(本研究の一部は第65回日本生化学大会(1992)において中島、伊東、森によって発表された。)

# パッチテスト結果のコンピューター処理システム開発研究

名古屋大学医学部附属病院分院

早川 律子

The research members of Japanese Society for Contact Dermatitis (JSCD) have cooperated to study about the optimal concentrations and vehicles of patch test allergens from 1975.

Since the every year data from collaborators has come to a vast volume, we introduced a computer system into the patch test data processing. When we took the case cards of coresearch from JSCD members, we input the code number of the institute, patient's number, sex, age, occupation, and the date of testing.

We are able to print out the table of patch test results, positive ratios of the allergens patch tested, graphs of positive ratios and the patients' name who positively reacted to one or more tested allergens.

In this paper, the patch test results in 1992 and 1993 are reported.

In 1992, we costudied about two kinds of preservatives (Kathon® CG and formaldehyde) and a tar dye (Lithol Rubine BCA). 997 (141 males and 856 females) patients with skin diseases were patch tested in 37 institutes. The optimal concentrations of Kathon® CG and formaldehyde were 100 ppm/aq and 1.0% aq respectively. The optimal concentration of Lithol Rubine BCA was 1.0% pet and its impurity was 0.1% pet.

In 1993, we costudied about metal allergens such as gold and mercury. At present, 601 (142 males and 459 females) case cards have been collected and the data were input into computer. Since we have had only a short time after finishing 1993's coresearch, all the data have not been input into computer and we have not reached to the conclusion about the optimal concentrations and the most suitable chemicals as patch test allergens.

**Key words :** Patch testing, computer system, Kathon® CG, formaldehyde, R-202, Lithol Rubine BCA, gold, mercury

## 緒 言

日本接触皮膚炎学会のパッチテスト研究班は、1975年以來毎年共通テーマを設定して、パッチテストアレルゲンの至適濃度、該当アレルゲンに最も適した基剤、パッチテスト材料などについて共同研究を行ってきた。近年共同研究の参加施設の増加に伴い、毎年収集されるデータは膨大となり、集計には多大のエネルギーを要するように

なった。このため、日本接触皮膚炎学会の事務局が置かれている名古屋大学医学部附属病院分院皮膚科に從來からあったコンピューター<sup>1)</sup>に新たにハードディスク AV-6016HGをつけて、日本接触皮膚炎学会の共通研究テーマパッチテスト結果のコンピューター処理を計画した。

## 開発ソフト

1) 製品名・アレルゲン名検索, 2) 重複入力チェック, 3) パッチテスト(製品・アレルゲン)セット別陽性率印刷, 4) 製品とアレルゲンのテスト患者名リスト作成, 5) 製品・一般名別テスト患者リスト作成, 6) 空きアレルゲンコード作成, 7) 施設別陽性率印刷, 8) 全施設陽性率作成, 9) 患者別テストセット一

The Study for Developing Computer System of Patch Test Results



Ritsuko Hayakawa

Nagoya University Branch Hospital

覧表作成, 10) 対象患者の性別・年齢別分布表作成の10種のソフトを開発した。

## コンピューターシステム

### 1. 入力

図1にコンピューターのハードウェアを図示した。各施設より送付されて来たケースカードの記載項目に基づき、患者のコード番号(各施設にコード番号をつけ、送付された順に numbering した: 例えば 001-0001, 001は施設コード, 0001は001の施設からケースカードが最初に送付

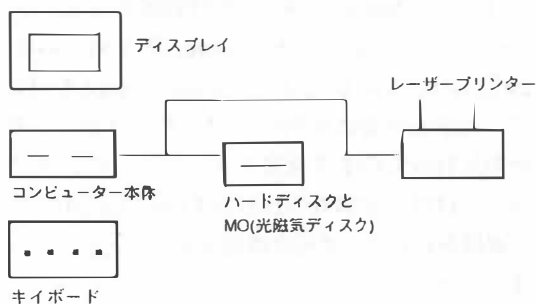


図1 コンピューターシステム

されて来たことを表す), イニシャル, 性別, 年齢, 職業を入力する。ついで各例のパッチテスト施行日, 貼付部位, セット名, パッチテスト結果を入力する。後日パッチテスト結果が変更された場合には, 変更コードで入力しなおす。最後に診断名を入力する。

### 2. プリントアウト

#### 1) 対象患者の背景

パッチテストを施行した患者の年齢, 性別表がプリントアウトされる。

#### 2) パッチテスト結果の一覧表

パッチテスト結果が貼付年月日の早い症例から順にプリントアウトされる。ついでパッチテスト結果の集計表, 陽性率, 陽性率のグラフ, アレルゲン別陽性例がプリントアウトされる。パッチテスト結果は各施設別と全施設の結果の

まとめとがプリントアウトされる。

## 実 験

### 1. 1992年共同研究

1992年はタール色素赤色202号(Lithol Rubine BCA)とその不純物のパッチテスト至適濃度と陽性頻度の検討, 殺菌・防腐剤であるKathon®CGとformaldehydeのパッチテスト至適濃度の検討を行った。

#### 1.1 赤色202号(Lithol Rubine BCA)とその不純物

法定色素赤色202号(Lithol Rubine BCA)はFDA名をD&C Red No.7, C.I.No.15850, C.I.名をPigment Red 57と称される赤色のタール色素で, 本邦では昭和31年より化粧品に使用されており, 最近最も繁用されている色素の1つである。図2に赤色202号の化学構造を示す。現在, 多くの赤色タール色素が, その感作性や催奇性などの問題で使用が制限されているが, 赤202号は安全性に優れた色素とされて来た<sup>2)</sup>。しかるに, 近年赤色202号によるアレルギー性接触皮膚炎が報告され<sup>3)</sup>, その原因が夾雑する不純物である可能性が指摘された<sup>4)</sup>。パッチテスト用試料を以下のように作成した。約260gの市販の赤色202号を10gずつ遠沈管にとり, メタノール50mlを加えて, 3000rpmで遠心分離して上澄液を分取した。市販品, メタノール不溶物(精製

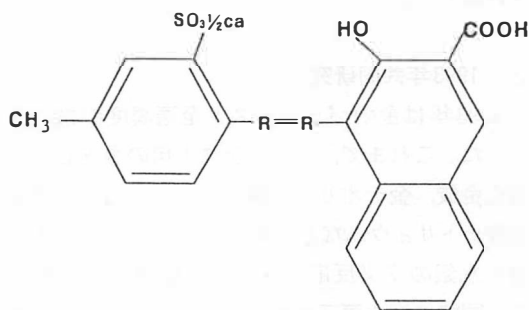


図2 R-202号の化学構造

品)は1.0%白色ワセリン (pet), メタノール可溶物 (不純物)は0.1% petを作成した。

### 1.2 Kathon® CGとFormaldehyde

Kathon® CGはローム・アンド・ハース社で開発された水溶性防腐剤で, 本邦では1987年より化粧品に使用されている。図3にKathon® CGの化学構造を示した。Formaldehydeは殺菌防腐剤として医薬品, 家庭用品, 工業分野で汎用されている他, formaldehyde resinや

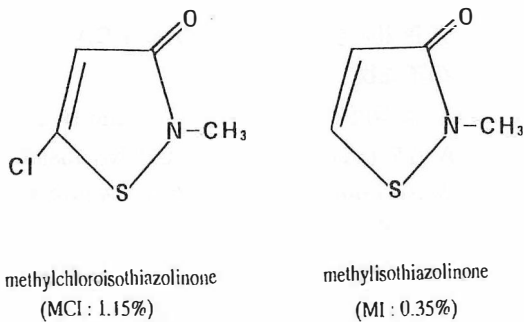


図3 Kathon CGの化学構造

formaldehyde releaserから遊離され, 広く生活環境に存在しているため, formaldehydeによるアレルギー性接触皮膚炎は難治性である。我が国ではformaldehydeは現在化粧品に使用することが禁止されているが, 欧米ではFormaldehyde releaserである殺菌・防腐剤が化粧品に使用されている。Kathon® CGは100 ppm, 50ppm, 25ppm水溶液 (aq)を作成し, formaldehydeは2%, 1%, 0.5%, 0.2% aqを作成した。

### 2. 1993年共同研究

1993年は金のパッチテスト至適濃度の検討を行った。これまで, パッチテスト用の金として, 塩化金酸, 金チオリンゴ酸ナトリウム, 金チオ硫酸ナトリウムなどが用いられてきた<sup>5)</sup>。また金と水銀の交叉反応の可能性が指摘されている<sup>5)</sup>ので同時に塩化第二水銀アミドを貼布して交叉反応の有無を検討した。塩化金酸は3水塩と4水塩

の両者について検討した。0.4% pet, 0.2% pet, 0.1% pet塩化金酸3水塩と4水塩, 1.0% pet, 0.5% pet, 0.25% pet金チオリンゴ酸ナトリウム, 1.0% pet, 0.5% pet, 0.25% pet金チオ硫酸ナトリウムと1.0% pet塩化第二水銀アミドを作成した。また1992年の共同研究の継続としてKathon® CG 100ppmのパッチテスト陽性頻度を観察した。

### 3. パッチテスト

48時間閉鎖パッチテストにより検討した。

#### 3.1 方法

Finn Chamber® (EPITEST Ltd Oy Helsinki, Finland)とScanpor® (NORGE-SPLASTER A/S, Oslo, Norway) tapeを用いて, 対象の背部に48時間貼付した。ワセリン基剤の試料はそのまま適量をFinn Chamber®の中心に付け, 水溶液の試料はFinn Chamber®に濾紙をいれて, 濾紙に適量を滴下した。

#### 3.2 判定

判定は除去後1時間と24時間にICDRG基準<sup>6)</sup>に従って行った。

## 結 果

### 1. 1992年共同研究

1992年には男性141例 (平均年齢46.3±19.0歳), 女性856例 (平均年齢38.9±16.3歳)の合計997例にパッチテストを施行した (表1)。試験試料の48時間, 72時間判定時のパッチテスト陽性率を表2, 表3に示した。48時間判定の+以上の陽性率は市販赤色202号1% petは17例, 精製赤色202号1% petは10例, 不純物0.1% petは12例, Kathon® CG 100ppm, 50ppm, 25ppm, formaldehyde 2.0% aq, 1.0% aq, 0.5% aq, 0.2% aqはそれぞれ15例, 11例, 9例, 35例, 14例, 10例, 10例であった。白色ワセリンは2例, 蒸留水は4例であった。72時間判定の+以上の陽性率は市販赤色202号1% petは15例, 精製





ppmと濃度を低くしても差がなく、Kathon® CGのパッチテスト至適濃度は100ppmと決定した<sup>8)</sup>。Formaldehyde 2.0% aqは明らかに刺激反応(IR)と判定された例があり、+?反応が48時間判定で77例、72時間判定で61例と1.0% aqに比較して2倍以上の例に認められた。0.5% aqでは反応が弱く、明らかなアレルギー歴を有する患者で+?反応を呈した例があり、アレルギー例を見落とす可能性があった。従って、formaldehydeは1.0% aqを指摘濃度と決定した<sup>8)</sup>。

1993年の共同研究の結果より塩化金酸3水塩0.4% pet、0.2% petでは明らかな刺激反応が48時間判定時にそれぞれ31例、19例、72時間判定時に25例、13例と他の試料の0乃至9例と比較して圧倒的に頻度が高く、パッチテストアレルギーとしては不適当であることが判明した。塩化金酸3水塩0.1% petと塩化金酸4水塩0.1% petは略同様の陽性率を示した。金チオリンゴ酸ナトリウムに比較して金チオ硫酸ナトリウムは陽性率が高く、+?反応を呈する例も多かった。パッチテスト結果から金チオリンゴ酸ナトリウムの方がパッチテストアレルギーとしては適当と考えられる。塩化金酸3水塩0.1% petと金チオリンゴ酸ナトリウム0.25% pet以上の陽性例は48時間判定では6例、38例、72時間判定では9例、50であった。従って塩化金酸3水塩は0.4% pet、0.2% petでは刺激反応を呈する例が多く、0.1% petではアレルギー例を見落とす可能性が推測さ

れる。塩化第二水銀アミド1.0% petの陽性率と、試験した試料中では勘案すると金チオリンゴ酸ナトリウム0.25% petが金のアレルギーを同定するには最も適したアレルギーと推定されるが、1994年の全てのデータが入力されていないので、最終結論を保留する。

## 文 献

- 1) 早川律子:パッチテスト結果のコンピューター処理について、皮膚34増14:183-184,1992
- 2) 日本化粧品工業連合会:法定色素ハンドブック、薬事日報社、東京、1988,37-39,72,397-422
- 3) 内海美穂子、須貝哲郎、庄司昭伸、渡辺加代子:赤色202号(Lithol Rubine BCA)による口紅皮膚炎、皮膚33増11:238-244,1991
- 4) 生野麻美子、鹿庭正昭、化粧品工業連合会色素専門部会:赤色202号による接触皮膚炎、皮膚34増12:203-208,1992
- 5) 鈴木真理、早川律子:金属パッチテストの陽性頻度、皮膚34増14:35-43,1992
- 6) パーティル・マグヌッソン:貼布試験、日皮会誌82:621-628,1972
- 7) 西原修美:赤色202号とその不純物のパッチテスト結果及び黒皮症患者の推移、皮膚35増16:37-44,1993
- 8) 片岡葉子:FormaldehydeおよびKathon® CGのパッチテスト至適濃度の検討、皮膚35増16:45-54,1993

# 皮膚過敏症に対するマスト細胞の役割

## — マスト細胞欠損動物を用いた検定法の開発 —

大阪大学医学部

北村 幸彦

Mast cell-deficient rats and mice were characterized in molecular and cellular levels. The *Ws* locus of rats and the *W* locus of mice encode the *c-kit* receptor tyrosine kinase. The *Ws* locus is a 12 base deletion at the tyrosine kinase domain of *c-kit*. The  $W^{Jic}$ ,  $W^n$  and  $W^f$  are three different point mutations of the tyrosine kinase domain of the *W* (*c-kit*) locus. The molecular characteristics of the  $W^{Jic}$ ,  $W^n$  and  $W^f$  mutant alleles were consistent with the numbers of skin mast cells in heterozygous and homozygous mutant animals. The coding region of the  $W^{sh}$  mutant allele was normal, but the *c-kit* gene was not transcribed in cultured mast cells derived from the spleen of  $W^{sh}/W^{sh}$  mice.

### 1. 緒言

マスト細胞は皮膚など外界と接する器官の結合組織に多く存在する細胞で、表面には高親和性のIgEレセプターが存在し、細胞質内には好塩基性色素により染色される顆粒を持っている。この好塩基性顆粒にはヒスタミンや蛋白質酵素とともに、プロテオグリカンが含まれており、好塩基性色素と結合するのはこのプロテオグリカンである。表面に高親和性IgEレセプターを発現すること、ヒスタミンを含む好塩基顆粒を細胞質内に含むことは、マスト細胞と好塩基球が共通に持つ特徴であり、この2種類の細胞のみが即時型アレルギー反応のエフェクター細胞として働く。

即時型アレルギー反応は、マスト細胞あるいは好塩基球の表面に発現しているIgEレセプター

に結合しているIgE分子が多価の抗原により架橋されることによりはじまる。IgEレセプター分子同士が架橋されたマスト細胞と好塩基球は好塩基顆粒を放出し、好塩基顆粒に含まれる活性物質により炎症反応が引き起こされるのである。

化粧品に対する過敏反応の中には、1) マスト細胞あるいは好塩基球が存在しなければ起こらない即時型アレルギー反応、2) マスト細胞の存在は必須でないが、マスト細胞が存在すれば、その反応が増強される反応、3) マスト細胞が関与しない反応、の3種類が含まれていると考えられる。本研究の本来の目的は、マスト細胞を遺伝的に欠損するマウスとラットを用いて、この3種類の反応を区別する検定法を開発することであるが、マスト細胞欠損動物について、最近その原因遺伝子が明らかにされたことによって、マスト細胞欠損の原因を分子レベルで解析できるようになった。そこで本研究では、使用するマスト細胞欠損動物の分子レベル、細胞レベルの解析が中心となった。

### 2. 材料と方法

材料と方法については、本研究助成金によって出版することができた原著論文に詳しく書いてあ

Roles of Mast Cells on Skin Hypersensitivity:  
Development of Evaluating System by Using Mast Cell-  
Deficient Animals



Yukihiro Kitamura

Medical School  
Osaka University

るので省略する。なお上記論文は本報告書に添付する。

### 3. 主な結果

#### 3.1 マスト細胞欠損ラット

我々は八木記念パークの丹羽と近藤によって発見された *Ws/Ws* ラットがマスト細胞を欠損していることを見つけ、さらに *Ws* 遺伝子座がマウスにおいて、マスト細胞の分化に重要な役割をはたす *W* 遺伝子座と同様に *c-kit* レセプター・タイロシカイネースをコードしていることを示した。

マスト細胞の存在は、通常組織片を好塩基性色素で染色して調べている。好塩基性色素で染色されるのはプロテオグリカンである。マスト細胞の分化過程において、プロテオグリカンを含む好塩基顆粒の出現により、高親和性 *IgE* レセプター (*FcεRI*) の発現の方が早く起こると考えられているので、*FcεRI* のメッセンジャー RNA (mRNA) の発現を *Ws/Ws* ラットと正常対照 (+/+) ラットの皮膚組織から抽出した RNA を逆転写酵素で cDNA にかえ、PCR で増幅した後、Southern blot を行って調べた。また *Ws/Ws* ラットと +/+ ラットの皮膚切片を用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、*FcεRI* を発現している細胞を同定した (発表論文3)。

+/+ ラットの皮膚では、*FcεRI* の mRNA の存在を cDNA の Southern blot で検出でき、発現している細胞をマスト細胞と同定できたが、*Ws/Ws* ラットの皮膚では *FcεRI* の mRNA を発現している細胞は存在しなかった。*Ws/Ws* ラットの皮膚は好塩基性色素で染色される分化したマスト細胞だけでなく、*FcεRI* の mRNA を発現した段階のマスト細胞の前駆細胞も欠損していることがわかった (発表論文3)。

#### 3.2 マスト細胞と好塩基球の分化統御機構の相違

マスト細胞と好塩基球は前述したように、即時

型アレルギー反応のエフェクター細胞であり、ともに多分化能血液幹細胞の子孫であるが、電子顕微鏡で見ると、容易に区別し得る細胞である。マウスは好塩基球の数が極端に少なく、また血液量も少ないために、好塩基球の研究には不向きであった。我々は *c-kit* 遺伝子座の小欠失のためにマスト細胞を欠損している *Ws/Ws* ラットを用いて、マスト細胞と好塩基球の分化制御機構の相違について研究した。

*Ws/Ws* ラットに消化管寄生虫 *Nippostrongylus brasiliensis* (NB) を感染させると、好塩基球数は50倍以上に上昇する。この上昇の程度は +/+ ラットとの有意差がないが、negative control として用いたヌードラットでは、好塩基球の増加反応はまったく起こらない。NB を感染させた *Ws/Ws* ラットでは皮膚のマスト細胞はまったく増加しない。消化管では NB 感染前には存在しなかったマスト細胞が出現するが、+/+ ラットの10%程度にとどまる。ヌードラットでは NB 感染による消化管マスト細胞の増加がみられないが、ヌードラットの皮膚には +/+ ラットの皮膚よりもむしろ多数のマスト細胞が存在する (発表論文5)。

皮膚のマスト細胞は結合組織型、消化管のマスト細胞は粘膜型に分類されているが、結合組織型マスト細胞、粘膜型マスト細胞、好塩基球の分化制御を主に行っている細胞は上記の実験結果から、結合組織型マスト細胞の分化制御は線維芽細胞、粘膜型マスト細胞の分化制御は線維芽細胞と T リンパ球の両方、好塩基球の分化制御は T リンパ球と考えられた (発表論文5と7)。

線維芽細胞の生産するマスト細胞と好塩基球の主な分化制御因子は stem cell factor (SCF)、T リンパ球の生産する主な分化制御因子はインターロイキン3 (IL-3) であることはわかっているため、結合組織型マスト細胞、粘膜型マスト細胞、好塩基球の主な分化制御因子は表1のようにまとめられた。

表1 マスト細胞と好塩基球の主な分化制御因子

細胞	主な分化制御因子
結合組織型マスト細胞	SCF
粘膜型マスト細胞	SCFとIL-3
好塩基球	IL-3

### 3.3 マウス*c-kit* 遺伝子異常とマスト細胞数

マウスでは*c-kit* 遺伝子座の突然変異が数多く知られており、その中には日本で発見されたものもある。我々は日本で発見された  $W^{Jic}$  と  $W^n$  と、ユニークな症状を示す  $W^f$  と  $W^{sh}$  について、突然変異遺伝子の分子レベルの異常と皮膚マスト細胞数の間の関係を調べた。

図1で示すように  $W^{Jic}$ 、 $W^n$ 、 $W^f$  はいずれも *c-kit* レセプター・タイロシンカイネースのタイロシンカイネース部位の点突然変異であるが、各々の突然変異遺伝子のホモ、あるいはヘテロ動物の皮膚マスト細胞数を説明しうるような分子的異常を示した(発表論文6)。

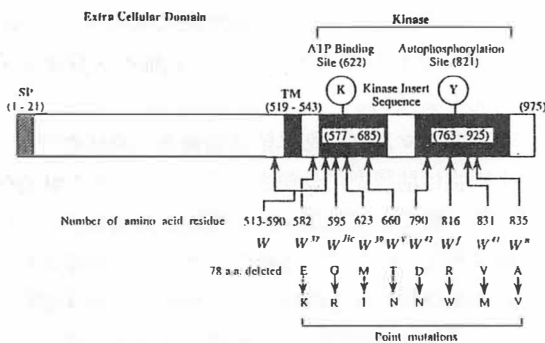


図1 種々の突然変異マウスにおける*c-kit* 蛋白質。アミノ酸は initiation codon からの番号で示してある。mis-sense 突然変異はアミノ酸を1字の記号で示す。略号: SP, シグナルペプチド; TM, 細胞膜貫通部位; aa, アミノ酸

ところが  $W^{sh}$  については、コーディング領域に異常を認めないにもかかわらず、 $W^{sh}/W^{sh}$  由来の培養マスト細胞は、*c-kit* の mRNA をまったく発現していない。小脳、睾丸、脾臓では *c-kit* の mRNA を認めたので、 $W^{sh}$  突然変異遺伝子は、*c-kit* の調節領域に異常が起こり、その

結果として、細胞種特異的に *c-kit* の転写が障害していると考えられた(発表論文1)。

## 4. 考察

SCFが*c-kit* レセプター・タイロシンカイネースに結合することによって始まるシグナルが、マスト細胞の分化・増殖・生存にきわめて重要な役割を演じていることが、*c-kit* 遺伝子に異常を持つマウスとラットを解析することにより明らかになった。

すでに述べたように、マウスとラットでは繊維芽細胞が生産するSCFに加えて、Tリンパ球が生産するIL-3も、粘膜型マスト細胞の分化制御に関係しているが、ヒトではIL-3のレセプターを持ったマスト細胞は知られておらず、SCFが現在までにわかっている唯一のマスト細胞の分化制御因子である。一方IL-3はマウス・ラットばかりでなくヒトにおいても好塩基球の主要な分化制御因子である。

本研究の当初の目的はマスト細胞欠損動物を用いて、皮膚過敏症に対するマスト細胞の役割を調べることであったが、研究の進展上、主としてマスト細胞欠損動物の性格付けを分子レベルで行うことになった。現在では分子レベルでの性格付けなしには、正しい研究材料とみなされにくくなっているからである。今後は改めてマスト細胞欠損動物による皮膚過敏症の研究を行いたいと考えている。

特に  $W_s/W_s$  ラットについては、我国で発見されたものであり、 $W_s/W_s$  ラットの性格付けについての我々の論文が出版されるにつれて、外国からも分与の希望が多く寄せられている。遺伝的背景と微生物コントロールの両面で  $W_s/W_s$  ラットは実験動物として完成されつつあり、今後の利用が期待できる。

### 発表論文

- 1) Tono T, Tsujimura T, Koshimizu J, Kasugai

- T, Adachi S, Isozaki K, Nishikawa SI, Morimoto M, Nishimune Y, Nomura S and Kitamura Y : *c-kit* gene was not transcribed in cultured mast cells of mast cell-deficient  $W^{s/h}/W^{s/h}$  mice that have normal number of erythrocytes and normal *c-kit* coding region. Blood 80 : 1448-1453, 1992.
- 2) Jippo-Kanemoto T, Adachi S, Ebi Y, Matsuda H, Kasugai T, Nishikawa SI and Kitamura Y : BALB/3T3 fibroblast conditioned medium attracts cultured mast cells derived from *W/W* but not from *mi/mi* mutant mice, both of which are deficient in mast cells. Blood 80 : 1933-1936, 1992.
  - 3) Onoue H, Maeyama K, Nomura S, Kasugai T, Tei H, Kim HM, Watanabe T and Kitamura Y : Absence of immature mast cells in the skin of *Ws/Ws* rats with a small deletion at tyrosine kinase domain of the *c-kit* gene. Am J Pathol 142 : 1001-1007, 1993.
  - 4) Jippo-Kanemoto T, Kasugai T, Yamatodani A, Ushio H, Mochizuki T, Tohya K, Kimura M, Nishimura M and Kitamura Y : Super-normal histamine release and normal cytotoxic activity of beige ( Chediak-Higashi syndrome ) rat mast cells with giant granules. Arch Int Allergy Immunol 100 : 99-106, 1993.
  - 5) Kasugai T, Okada M, Morimoto M, Arizono N, Maeyama K, Yamada M, Tei H, Dohmae K, Onoue H, Newlands GFJ, Watanabe T, Nishimune Y, Miller HRP and Kitamura Y : Infection of *Nippostrongylus brasiliensis* induced normal increase of basophils in mast cell-deficient *Ws/Ws* rats with a small deletion at the kinase domain of *c-kit*. Blood 81 : 2521-2529, 1993.
  - 6) Tsujimura T, Koshimizu U, Katoh H, Isozaki K, Kanakura Y, Tono T, Adachi S, Kasugai T, Tei H, Nishimune Y, Nomura S and Kitamura Y : Mast cell number in the skin of heterozygotes reflects molecular nature of *c-kit* mutation. Blood 81 : 2530-2538, 1993.
  - 7) Arizono N, Kasugai T, Yamada M, Okada M, Morimoto M, Tei H, Newlands GFJ, Miller HRP and Kitamura Y : Infection of *Nippostrongylus brasiliensis* induces development of mucosal-type but not connective tissue-type mast cells in genetically mast cell-deficient *Ws/Ws* rats. Blood 81 : 2572-2578, 1993.
  - 8) Kitamura Y, Kasugai T, Morimoto M, Tei H, Tsujimura T, Niwa Y, Yamada M and Arizono N : Development of mast cells and basophils. Usefulness of mutant mice and rats. Progress in Allergy and Clinical Immunology ( eds, Miyamoto T, Okuda M ) , Hogrefe & Huber Publishers, Tronto, PP 477-484, 1992.
  - 9) Kitamura Y, Kasugai T, Nomura S and Matsuda H : Development of mast cells and basophils. In Immunopharmacology of Mast Cells and Basophils ( ed, Foreman JC ) Academic Press, London, PP 5-27, 1993.
  - 10) Kitamura Y, Kasugai T, Arizono N and Matsuda H : Development of mast cells and basophils : Processes and regulation mechanisms. Am J Med Sci, 306 : 185-191, 1993.
  - 11) Hirata T, Morii E, Morimoto M, Kasugai T, Tsujimura T, Hirota S, Kanakura Y, Nomura S and Kitamura Y : Stem cell factor induces outgrowth of *c-kit*-positive neurites and supports the survival of *c-kit*-positive neurons in dorsal root ganglia of mouse embryos. Development, 119 : 49-56, 1993.
  - 12) Kasugai T, Oguri K, Jippo-Kanemoto T, Morimoto M, Yamatodani A, Yoshida K, Ebi Y, Isozaki K, Tei H, Tsujimura T, Nomura S, Okayama M and Kitamura Y : Deficient dif

ferentiation of mast cells in the skin of *mi/mi* mice : Usefulness of in situ hybridization for evaluation of mast cell phenotype. *Am J Pathol.* 143 : 1337-1347, 1993.

- 13 ) Morimoto M, Kasugai T, Tei H, Jippo-Kanemoto T, Kanakura Y and Kitamura Y : Age-dependent amelioration of hypoplastic anemia in *Ws/Ws* rats with a small deletion at the kinase domain of *c-kit*. *Blood*, 82 : 3315-3320, 1993.

# チロジナーゼ抑制因子の精製と応用

北里研究所メディカルセンター病院

亀山 孝一郎

Using antibodies that recognize either tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP1), or tyrosinase-related protein-2 (TRP2, DOPAchrome tautomerase), the quantities of those melanogenic enzymes were analyzed in five melanoma cell lines that possess various degrees of melanin production. There was a positive correlation between quantities and synthetic rates of those melanogenic enzymes and their melanin formation. Surprisingly, pigmented cells showed higher levels of melanogenic inhibitors activity. These results clearly suggest that melanin production is regulated by a subtle balance between the activities of these enzymes and other factors such as the melanogenic inhibitor.

## 概要

メラニン産生に関与する3つの酵素、すなわち、チロジナーゼ、チロジナーゼ関連蛋白1、チロジナーゼ関連蛋白2 (DOPAchrome tautomerase) を認識する抗体を用いて、これらメラニン産生に関与する酵素の量とメラニン産生の関係について検討した。なお使用した細胞はメラニン産生能の異なる5つの細胞株である。JB/MS-Wを除くすべての細胞は4日間のMSH処理にてメラニン産生能を4倍から30倍まで増加した。JB/MS-Wのメラニン産生能はMSHの処理の有無にかかわらずバックグラウンド以下であった。これら3つの酵素の量ないしは合成速度と細胞のメラニン産生能の間には正の相関関係が認められた。JB/MS-Wを用いて熱耐性型のチロジナーゼ抑制因子の精製を行ったところ、20,000倍以上の精製

効率であった。また各細胞が有している熱耐性型チロジナーゼの抑制因子の量を検討したところ、驚くべきことに、メラニン産生の高い細胞のほうが低い細胞よりも、大量のチロジナーゼ抑制因子を有していた。MSH処理をした際にはメラニン産生が上昇するが、この際にはチロジナーゼ活性の上昇とメラニン産生の抑制因子の活性の低下が観察された。興味深いことには熱耐性型のチロジナーゼ抑制因子はチロジナーゼの活性だけでなく、チロジナーゼ関連蛋白2 (DOPAchrome tautomerase) の活性も抑制した。これらの結果はメラニン産生がチロジナーゼ、チロジナーゼ関連蛋白1、2およびそれらの抑制因子により微妙に制御されていることを強く示唆する。さらに熱耐性型の抑制因子のメラニン産生後期に及ぼす影響を人由来のメラノーマを用いて検討したところ、抑制因子は5,6-dihydroxyindole (DHI) の酸化反応をチロジナーゼの存在下、あるいは非存在下にて抑制した。このことはこの抑制因子がメラニン産生の各種段階にてメラニン産生を制御していることを示唆している。

## Purification of melanogenic inhibitor



Koichiro Kameyama

Kitazato Institute  
Medical Center Hospital

## 材料および方法

### 1. 培養細胞

C57/BL6 マウス由来の JB/MS メラノーマ細胞およびそのサブクローン、B16F10 メラノーマ細胞を用いた。培養は10%の牛の血清を添加した Dulbeccos' modified Eagle's medium を用いた。

### 2. 抗体

チロジナーゼのC末端を認識する Anti-PEP7 抗体、チロジナーゼ関連蛋白1を認識する TMH1 モノクローナル抗体、チロジナーゼ関連蛋白2を認識する Anti-PEP8 抗体を用いた。

### 3. フローサイトメトリー

$2 \times 10^6$  個の細胞を70%エタノールにて固定した後に50 $\mu$ lの抗体を加え、4 $^{\circ}$ Cにて1時間反応させた後に FITC をラベルした2次抗体を反応させた。2回洗浄の後に解析を行った。

### 4. メラニン産生能の評価

$^{14}$ C-tyrosine を用いメラニン産生を測定した。

### 5. 免疫沈降法

$^{35}$ S-methionine を用いて型どおり行った。

### 6. チロジナーゼ抑制因子の精製

JB/MS-W メラノーマ細胞をヌードマウスに植え込み採取した。腫瘍500グラムあたり2.5リッターの純水を加え Polytron disruptor にて細胞を粉碎した。酢酸にて pH5.3 として 65 $^{\circ}$ C 1時間処理した。40,000G、10分遠心し、上澄みを採取した。次に0.45 $\mu$ mのミリポアを通過させ Ultra-filtration にて分子量1,000以下を採取した。NH<sub>4</sub>OH にて pH8.5 とし DEAE25 を通過した後に酢酸にて pH を 3.5 として Dowex50w-8 を通過させた。Evaporation の後にメタノール

を添加し、40,000G、20分遠心、上澄みを採取した。そしてクロロホルムを添加し40,000G、20分遠心し、脱塩の後に順相シリカゲルを通過させチロジナーゼ抑制活性を有する部分を採取した。

### 7. Gelfiltration Chromatography

細胞成分を1% NP40 にて抽出した後に SephadexG75 を通過させた。

### 8. チロジナーゼの精製

B16 メラノーマを用いて、カラム電気泳動法にて精製を行った。

### 9. 抑制因子のDHIに及ぼす影響

生成した DHI は東ソーの4mm $\times$ 25cm RP-18 カラムを用いて HPLC にてモニターした。溶媒は0.15 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>/methanol (75%:25%), pH2.5 を用い、毎分0.5mlにて流した。DHIの検出は東ソーの紫外線検出器にて波長280nmにて行った。

## 結果

### 1. メラニン産生能と MSH の効果

チロジナーゼが触媒する反応である tyrosine hydroxylase、メラニン産生、DOP Achrome tautomerase の活性の間には正の相関関係が認められた (表1)。

表1 各種細胞のメラニン産生能(pMOL/10<sup>5</sup> cells/h)

	メラニン類似	Tyrosine hydroxylase	メラニン産生能	DOP Achrome tautomerase
JB/MS	++	137	19	132
JB/MS P	+	101	14	48
JB/MS W	-	6	2	4
JB/MS-B	++	980	275	148
B16F10	++	725	32	116

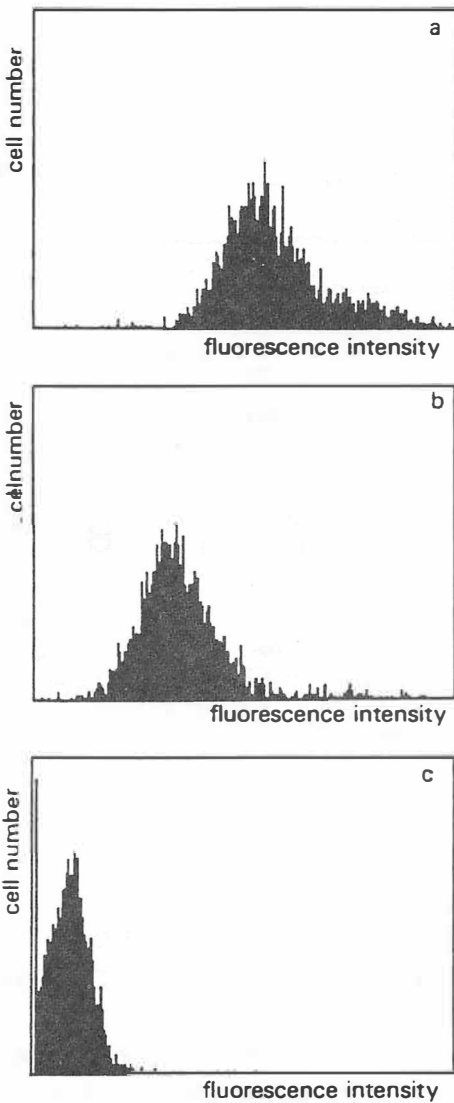


図1 Flow cytometric analysis of tyrosinase  
a. JB/MS tyrosinase, b. JB/MS-W tyrosinase, c. Negative control

2. メラニン産生に關与する酵素の量および合成速度

フローサイトメトリーの結果を図1に示す。メラニン産生の異なる細胞間においてメラニン産生量とチロジナーゼの量との間には正の相関関係が認められた(図1、2)。またチロジナーゼ、チロジナーゼ関連蛋白1、2の合成速度とメラニン産生能の間にも正の相関関係が認められた(図3)。

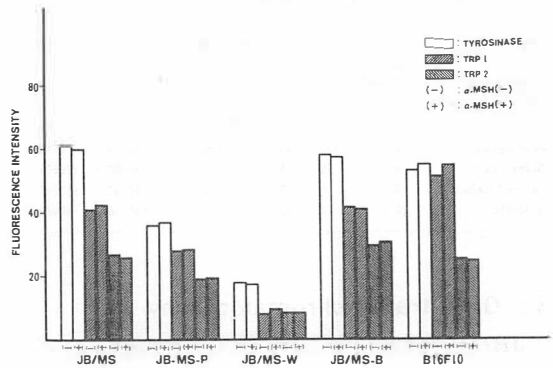


図2 Flow cytometric analysis of tyrosinase, TRP1 and TRP2

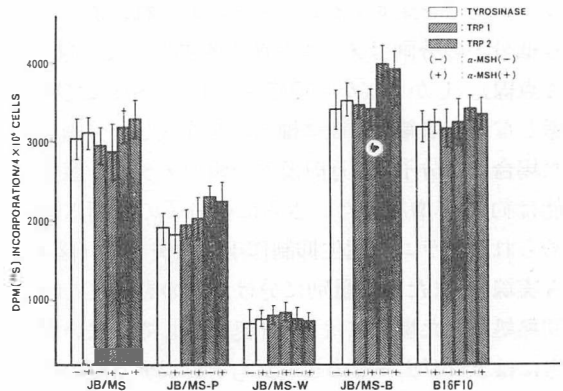


図3 Synthesis of tyrosinase, TRP1 and TRP2

3. チロジナーゼ抑制因子の精製

100グラムのJB/MS-W細胞を100mlの純粋を用いて精製を行った際の代表的なデータを示す(表2)。Dowex50WX-8以降の段階は蛋白濃度が低く測定限度以下のため実際の精製効率率は判定不能であった。しかしその後順相クロマトグラフィーの精製法を加えることにより、ほぼシングルピークの活性を得ることができた。

異なるメラニン産生能を有する細胞よりチロジナーゼ抑制因子を精製しその活性を比較したところ、驚くべきことにメラニン産生能とチロジナーゼ抑制因子の活性との間には正の相関関係が認められた。

表2 チロジナーゼ抑制因子の精製効率

段階	総電量 (mz)	総量 (ml)	抑制率 (%)	総合抑制活性 (unit)	特異的抑制	精製効率
最初の抽出液	100,000	500	76	1000	0.01	1
pH5.5-6.5.C処理	80.0	450	65	675	8.44	844
Ultrafiltration	24.5	430	60	538	21.96	2196
DEAESephadex	4.5	430	55	430	95.56	9556
Dowex50W X 8	<0.1	20	15	5	>50.00	>10000
chloroform抽出	<0.1	5	28	3	>50.00	>10000
順相HPLC	<0.1	4	20	3	>50.00	>10000

#### 4. Gel filtration chromatography

JB/MS細胞の1% NP40抽出液をSephadexG75を通過させて分子量別に分けて、精製したチロジナーゼに加えメラニン産生能に対する効果を検討した。その結果、分子量約7万のところにメラニン産生を促進するピークが認められ、またより低分子の分画はメラニン産生を抑制した(図4A点線)。しかしながら細胞を4日間MSHにて刺激しながら培養した後に抽出液を作成し、分画した場合には分子量7万前後の分画のメラニン産生能は約20倍増加した。さらに低分子の分画に認められたメラニン産生抑制作用は消失した(図4A実線)。また分子量別に分けたものを65°C1時間熱処理した場合にはMSH処理をしていない場合にはチロジナーゼのピークもチロジナーゼの抑制因子のピークも残るが(図4B点線)、MSH処理をしている場合には驚くべきことに、低分子分画に認められたチロジナーゼに対する抑制因子は逆に促進因子となった(図4B実線)。

#### 5. チロジナーゼ抑制因子のチロジナーゼ、チロジナーゼ関連蛋白2、メラニン産生に及ぼす効果

チロジナーゼの抑制因子をチロジナーゼが触媒する tyrosine hydroxylase activity に対する効果を検討したところ1280倍までチロジナーゼ抑制因子を希釈しても酵素反応を抑制した(図5上段)。メラニン産生についても1280倍まで希釈しても抑制効果が観察された。また興味深いことには10倍希釈までの高濃度においてはチロジナーゼ関連蛋白2(DOPAchrome tautomerase)

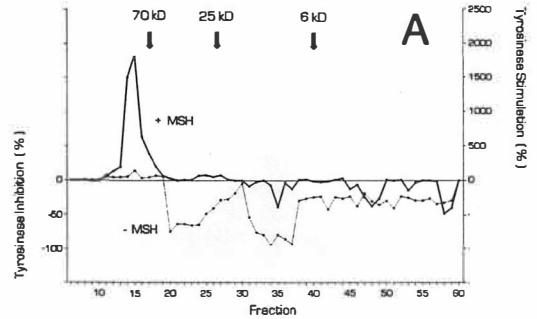


図4A

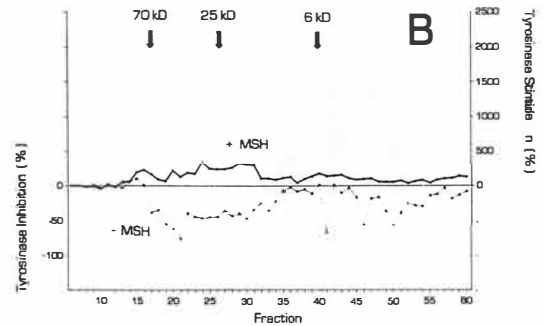


図4B

の活性をも抑制した(図5中段)。またメラニン産生は1280倍まで抑制因子を希釈しても認められた(図5下段)。

次に抑制因子のDHIの酸化に及ぼす影響を検討したところ37°C、60分の処理にて10%のDHIが失われた(図6a,b)。DHIをチロジナーゼの存在下にて同処理をしたところ50%のDHIが失われた(図6c)。しかしながらDHIをチロジナーゼと抑制因子の存在下にて処理したところDHIの低下率はわずか25%であった(図6d)。興味深いことにはDHIを抑制因子の存在下のみにて処理した場合にはDHIの量は全く不変であった(図6e)。

## 考 察

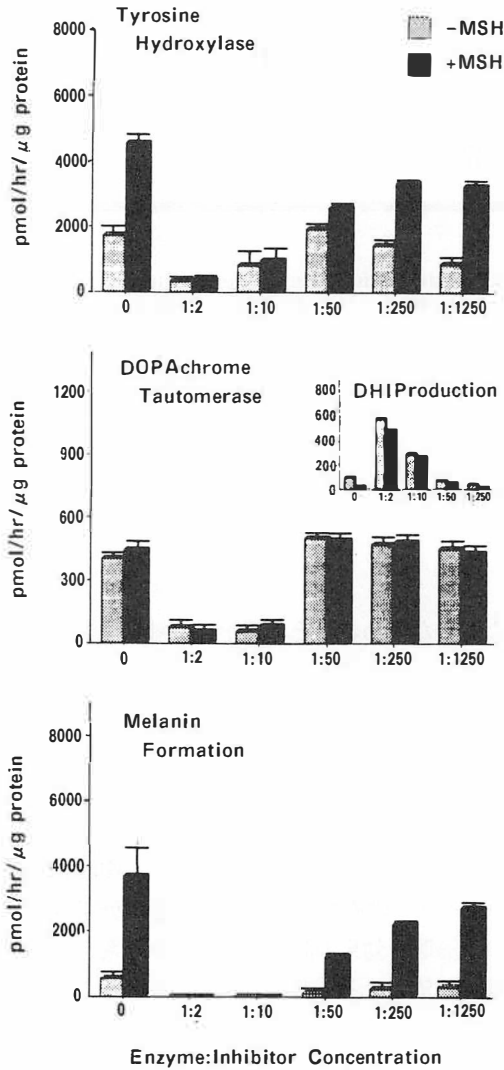


図 5

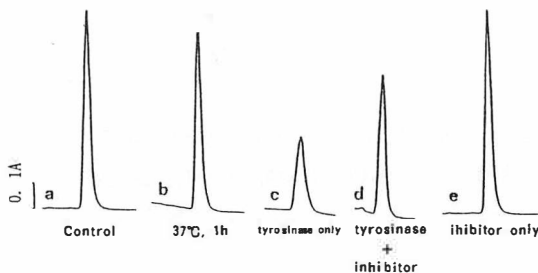


図 6

メラニン産生の盛んな細胞ほどチロジナーゼの抑制因子をよりたくさん有していることは興味深い結果であった(表3)。またこの抑制因子がMSH処理にて活性を失い、さらに熱処理をすることによりメラニン産生を逆に刺激した(図4)。以上の結果はチロジナーゼの抑制因子が実はチロジナーゼ抑制因子-中性因子-チロジナーゼ促進因子と変化することでメラニン産生を制御していることを明らかにした。またよりたくさんのメラニン産生を制御するためにはよりたくさんの制御因子(抑制因子)が必要とされることを明らかにした。また抑制因子のDHIに及ぼす影響を検討したところ抑制因子はDHIの特発的な酸化のみならず、チロジナーゼ依存性の酸化を抑制した。以上の結果はチロジナーゼの抑制因子として我々が追っていたものが、チロジナーゼが触媒するメラニン産生初期のtyrosine hydroxylaseだけでなくDOPAchrome tautomerase、そしてDHI oxidationをも制御していることを示唆する。

さて精製の結果であるが従来の方法に順相クロマトグラフィーの手段を加えることにより、紫外線235nmにてほぼシングルピークの分画が採取された。このメラニン産生の制御因子の構造決定を行うことにより、生体内におけるメラニン産生の制御機構が明らかになることが期待される。現段階での精製効率は20,000倍であった。

表3 メラニン産生能に対するチロジナーゼ抑制因子の効果

	粗精製分画	低分子分画
コントロール	16 ± 2 pmol/16h	
JB/MS	86%	73%
JB/MS-P	80%	70%
JB/MS-W	60%	42%
JB/MS-B	88%	76%
B16F10	86%	72%

# 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およびサンスクリーンの効果の評価

浜松医科大学

滝川 雅 浩

Contact photosensitivity (CPS) is successfully induced in mice by application of photosensitizing agents plus irradiation with ultraviolet A (UVA). By using this mouse model, we evaluated the photoallergenicity of cosmetic agents and the protective-ness by sunscreens. Photoallergic cutaneous responses were induced by photosensitizing agents, including tetrachlorosalicylanilide (TCSA), tribromosalicylanilide, bithionol, musk ambrette, and methylcoumarin. In CPS to TCSA, two UVA-absorbing sunscreens, benzophenone-3 and Parsol 1789, dramatically inhibited the CPS response, whereas the two UVB-absorbers, p-aminobenzoic acid and 2-ethyl-hexyl-p-methoxycinnamate, exhibited much less suppressive effect. These findings indicated that the murine CPS model is useful for screening of photoallergenicity of cosmetics and evaluation of photoprotectiveness by sunscreens.

## 1. 緒 言

我々はマウスを用いた接触光過敏症の実験モデルを確立し、テトラクロロサリチルアニリド (TCSA) の光アレルギー反応を、剃毛腹部にTCSAを塗布し同部に長波長紫外線 (UVA) を照射することにより誘導しうることを示した<sup>1, 2)</sup>。この過敏症反応はT細胞による遅延型反応であり<sup>1-3)</sup>、主要組織適合抗原遺伝子複合体に支配されている<sup>1, 4)</sup>。このマウスの実験系を化粧品の光アレルギー能のスクリーニングおよびサンスクリーンのUVAに対する遮断効果の評価に利用することは可能である。

化粧品には古くは殺菌剤であるハロゲン化フェノールや人工香料であるマスクアムブレットを含

んだものが使われ、それらが光接触皮膚炎の原因となった。現在使われているあるいは将来使われる化粧品にも光アレルギーを惹起する新たな物質が含まれている可能性があり、個々の化粧品における光アレルギー能のスクリーニングが必要とされる。また一方では現在サンスクリーンの使用が注目されており、その遮断波長として中波長紫外線 (UVB) のみならずUVAの遮断が期待されている。遮断効果の評価において生体系を用いての検討が望まれるが有用な方法は確立していない。本研究ではこうした化粧品による光アレルギー能のスクリーニングとサンスクリーンの効果の評価という2点について、接触光過敏症のマウスモデルを用いて検討した。

## 2. 実 験

### 2.1 光アレルギー能のスクリーニング

基本となる接触光過敏症の感作と惹起のプロトコールは、マウス剃毛腹部に試験物質を塗布しUVA照射を行い光感作し (day 0, 1)、day 5に耳翼に試験物質塗布プラスUVA照射を行い光惹起する方法である<sup>1)</sup>。過敏症の程度は光惹起

Screening for photoallergenicity of cosmetic agents and evaluation of photo-protection by sunscreen agents using a mouse model of contact photosensitivity



Masahiro Takigawa  
Hamamatsu University  
School of Medicine

の翌日耳翼腫脹を測定し、耳翼厚の増加分をもって表した。光アレルギーを通常の接触アレルギーと区別考慮するために、惹起の際、左耳翼に光惹起、右耳翼に単に試験物質を塗布するだけの惹起を行った<sup>1)</sup>。また過敏症反応を増強させるために光感作の2日前にシクロフォスファミドを腹腔内投与する群をも併せて検討した<sup>5, 6)</sup>。試験物質としては、TCSA、トリプロモサリチルアニリド(TBS)、ピチオノール、マスクアムプレットを検討した。

## 2.2 サンスクリーン剤の効果の評価

TCSAを光ハプテンとする接触光過敏症において、光惹起の際、UVA照射前に耳翼にサンスクリーン剤を塗布し、耳翼腫脹の抑制度を調べた<sup>7)</sup>。サンスクリーン剤としてはbenzophenone-3, Parsol 1789, p-aminobenzoic acid (PABA), 2-ethyl-hexyl-p-methoxycinnamate (EHMC)を用い、1%および5%にエタノールにて溶解したものを検討した<sup>7)</sup>。

TCSAと表皮細胞との結合物の定量は、TCSA塗布、UVA照射した耳翼より表皮細胞浮遊液を作製、これをfreezing/thawing, sonicationして抽出物を得、TCSA結合物の吸収波長である260nm付近での吸光度を測定することによって行った<sup>8)</sup>。結果は無処置表皮細胞抽出物の吸光度でサブトラクションして表した。

## 3. 結果

### 3.1 光接触性皮膚炎を起こす種々の物質の光アレルギー能

マウス剃毛腹部に試験物質であるTCSA、トリプロモサリチルアニリド、ピチオノール、マスクアムプレットを塗布後UVAを照射し、耳翼に当該物質プラスUVA照射にて惹起した。この結果、全ての検討物質において有意な耳翼腫脹が認められ、光アレルギー能が確認された<sup>9)</sup>。特にTCSAは強い光接触性皮膚炎反応を示した。UVA照射無しに感作物質塗布のみを行った右耳の腫脹は非常に弱く、得られた反応が光アレルギー反応であることが確認された<sup>1)</sup>。光感作の2日前にシクロフォスファミドを腹腔内投与することにより、耳翼腫脹反応の比較的弱い物質でも実質的な耳翼腫脹を得ることができた<sup>6)</sup>。

### 3.2 TCSA接触光過敏症におけるサンスクリーン剤の抑制効果

TCSAを光ハプテンとする接触光過敏症において、光惹起の際、UVA照射前に耳翼にサンスクリーン剤であるbenzophenone-3, Parsol 1789, PABA, EHMCを塗布し、耳翼腫脹の抑制度を検討した。Figure 1に示すように、benzophenone-3, Parsol 1789はUVAサンスク

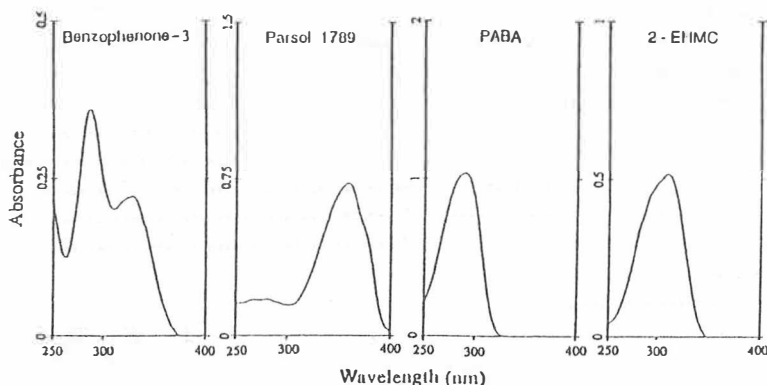


Fig.1 Absorption spectra of four sunscreen ingredients

リーンであり、PABA, EHMCはUVBサンスクリンである。Table 1に結果を掲げる。5%溶液においてはbenzophenone-3, Parsol 1789は強い抑制効果を示し、PABA, EHMCの抑制は中等度であった(experiment 1)。1%溶液ではbenzophenone-3, Parsol 1789は依然強く接触過敏症を抑制し、PABA, EHMCは影響を与えなかった(experiment 2)。よってUVAサンスクリンはUVBサンスクリンより明らかに強いサンスクリン効果を示した。またこのサンスクリンの抑制効果は通常の接触過敏症であるDNFB接触過敏症には何ら影響を与えなかった(experiment 3)。

Table 1 Effects of sunscreens on the elicitation of contact photoallergy and ordinary contact allergy

Group	Sensitization	Challenge	Sunscreen agent	Ear swelling response $\pm$ SE ( $\times 10^{-2}$ cm)
Experiment 1 (5% sunscreen solution)				
A	TCSA/UVA	TCSA/UVA	Benzophenone-3	0.3 $\pm$ 0.22 <sup>a, b</sup>
B	TCSA/UVA	TCSA/UVA	Parsol 1789	0.5 $\pm$ 0.20 <sup>a, b</sup>
C	TCSA/UVA	TCSA/UVA	PABA	2.0 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>
D	TCSA/UVA	TCSA/UVA	2-EHMC	2.1 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>
E	TCSA/UVA	TCSA/UVA	Vehicle	4.5 $\pm$ 0.59
F	-	TCSA/UVA	-	0.5 $\pm$ 0.18
Experiment 2 (1% sunscreen solution)				
A	TCSA/UVA	TCSA/UVA	Benzophenone-3	1.0 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>
B	TCSA/UVA	TCSA/UVA	Parsol 1789	0.8 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>
C	TCSA/UVA	TCSA/UVA	PABA	3.3 $\pm$ 0.46 <sup>c</sup>
D	TCSA/UVA	TCSA/UVA	2-EHMC	3.5 $\pm$ 0.18 <sup>c</sup>
E	TCSA/UVA	TCSA/UVA	Vehicle	4.3 $\pm$ 0.25
F	-	TCSA/UVA	-	0.8 $\pm$ 0.25
Experiment 3 (5% sunscreen solution)				
A	DNFB	DNFB	Benzophenone-3	8.1 $\pm$ 0.51 <sup>c</sup>
B	DNFB	DNFB	Parsol 1789	9.0 $\pm$ 0.70 <sup>c</sup>
C	DNFB	DNFB	PABA	8.5 $\pm$ 0.96 <sup>c</sup>
D	DNFB	DNFB	2-EHMC	8.5 $\pm$ 0.87 <sup>c</sup>
E	DNFB	DNFB	Vehicle	8.9 $\pm$ 0.88
F	-	DNFB	-	1.8 $\pm$ 0.25

<sup>a</sup>  $p < 0.01$ , compared with Group E.

<sup>b</sup>  $p < 0.01$ , compared with Groups C and D.

<sup>c</sup> statistically not significant, compared with Group E.

UVAサンスクリンであるbenzophenone-3, Parsol 1789はUVBサンスクリンである

PABA, EHMCより顕著なTCSA表皮細胞結合物生成に対する抑制を示し(Figure 2)、サンスクリンがTCSAと表皮細胞の結合を阻止することによって接触光過敏症の惹起反応を抑えることが示された<sup>7)</sup>。各サンスクリンの抑制度をTable 2に掲げる。

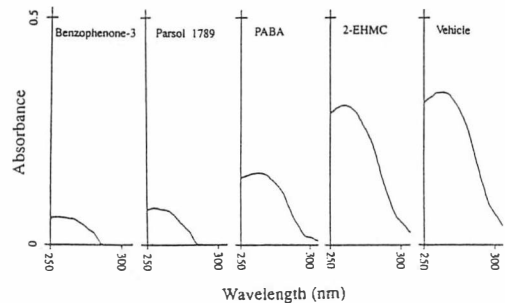


Fig. 2 Absorbance spectrum of TCSA-epidermal cell photoadducts formed in earlobes. Five % solutions of sunscreen were applied to earlobes before irradiation. The values represent the absorbance of extracts equivalent to  $2 \times 10^7$  cells/ml. The data were expressed by subtracting the absorbance of extracts from the same number of epidermal cells obtained from mice untreated with TCSA and sunscreens.

Table 2 Amounts of TCSA-epidermal cell photoadducts formed in earlobes

Sunscreen agent <sup>a</sup>	Absorbance at peak absorption wavelength $\pm$ SE <sup>b</sup> ( $\times 10^{-2}$ )
	Benzophenone-3
Parsol 1789	10 $\pm$ 1 <sup>c</sup>
PABA	21 $\pm$ 4 <sup>d</sup>
2-EHMC	26 $\pm$ 3 <sup>d</sup>
Vehicle	27 $\pm$ 4

<sup>a</sup> Five % solutions were applied to earlobes before irradiation.

<sup>b</sup> The data represent the mean of peak absorbance between 254-262 nm in extracts equivalent to  $2 \times 10^7$  cells/ml.

<sup>c</sup>  $p < 0.05$ , compared with the vehicle group.

<sup>d</sup> statistically not significant, compared with the vehicle group.

#### 4. 考察

今回の実験結果はマウス接触光過敏症が化粧品

の光アレルギー能のスクリーニングおよびサンスクリーンのUVAに対する遮断効果の評価に利用できることを示した。各光感作物質の耳翼腫脹度には差があり、惹起反応の弱いものもあったがシクロフォスファミドを前投与することにより反応をより顕現化することができた。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暴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と考えられる。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。

TCSA 接触光過敏症モデルはUVA サンスクリーンの光遮断能を評価するうえで、有用であることも明らかとなった。この遮断効果は光ハプテンが表皮細胞に光結合するステップを抑えることによって起こされる。TCSA は蛋白と光結合することが明らかとなっており、恐らく接触光過敏症の initial step はTCSA が表皮ケラチノサイトの膜あるいは細胞質の蛋白に光結合することによって生じると考えられる<sup>8)</sup>。サンスクリーンはUVAを吸収することにより、このstepを抑制するといえる<sup>7)</sup>。サンスクリーンによるUVAの遮断は、臨床的にUVAを作用波長とする皮膚疾患が多いこと、UVAが色素沈着の原因波長となることなどより注目を集めている。この意味において、本系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。

## 文 献

- 1) Takigawa M, Miyachi Y : Mechanisms of contact photosensitivity in mice. I. T cell regulation of contact photosensitivity to tetrachlorosalicylanilide under the genetic restrictions of the major histocompatibility complex. *J Invest Dermatol* 79 : 108-115, 1982.
- 2) Tokura Y, Takigawa M : Immunological Mechanisms of contact photosensitivity. *Eur J Dermatol* 3 : 87-91, 1993.
- 3) Tokura Y, Takigawa M, Yamada M : Induction of contact photosensitivity to TCSA using photohapten-modified syngeneic spleen cells. *Arch Dermatol Res* 280 : 207-213, 1988.
- 4) Tokura Y, Satoh T, Takigawa M, Yamada M : Genetic control of contact photosensitivity to tetrachlorosalicylanilide. I. Preferential activation of suppressor T cells in low responder H-2k mice. *J Invest Dermatol* 94 : 471-476, 1990.
- 5) Takigawa M, Miyachi Y, Toda K, Yoshikoka A : Mechanisms of contact photosensitivity in mice. IV. Antigen-specific suppressor T cells induced by preirradiation of photosensitizing site to UVB. *J Immunol* 132 : 1124-1129, 1984.
- 6) Miyachi Y, Takigawa M : Mechanisms of contact photosensitivity in mice. III. Predictive testing of chemicals with photoallergenic potential in mice. *Arch Dermatol* 111 : 736-739, 1983.
- 7) Tokura Y, Yagi H, Ihda H, Takigawa M : Evaluation of ultraviolet-A protection by sunscreen agents using a mouse model of contact photoallergy. *J Dermatol Sci* 7:39-44, 1994.
- 8) Tokura Y, Yagi H, Satoh T, Takigawa M : Inhibitory effect of melanin pigment on sensitization and elicitation of murine contact photosensitivity : Mechanism of low responsiveness in C57BL/10 background mice. *J Invest Dermatol* 101 : 673-678, 1993.

# 人工皮膚を用いた皮膚の形成機構に関する研究

広島大学理学部

吉 里 勝 利

The mechanism of formation of skin was studied using a reconstituted skin model. The dermal model was made by culturing fibroblasts in three dimensional lattices of collagen (collagen gel culture). It was found in this model that cells recognize and bind collagen fibrils utilizing their cell surface protein, cellular fibronectin (cFN). Collagen fibrils induced the synthesis and phosphorylation of specific proteins in cells. To develop a technique to grow hair follicles in the skin model, dermal papilla cells were successfully immortalized by transfecting them with SV40 viruses. These cell lines should be useful for identifying a hair-inducing factor.

## 1. 緒 言

動物の器官や組織は細胞と細胞外基質 (Extracellular Matrix, 以下ECM) を構成要素としてこれらが複雑な様式で結合し、有機的複合体として特異的形態をとり種々の機能を果たしている。最近の細胞生物学や生化学の進歩により、これらの構成要素を純粋な形で分離することが可能となった。本研究では、皮膚の構造と機能をより深く理解するために、皮膚から構成要素を分離した後、これらを用いて、皮膚を再構築して人工皮膚を作ることを試みた。皮膚の主要構成要素の分離およびそれらの性質に関しては、これまでに多くの研究がなされてきた。しかしながら、これら構成要素を用いて生体皮膚に類似の構造と機能を持つ人工皮膚を再構築することに成功した研究例はない。

本研究は次の目的をもって行われた。① 生体皮膚に近似の構造と機能をもつ人工皮膚を表皮細

胞、真皮線維芽細胞およびECM (主としてコラーゲンとフィブロネクチン) を用いて人工的に再構築する。この再構築体を用いて表皮細胞と真皮線維芽細胞の相互作用に関する研究を行う。② 皮膚付属器官としての毛をも有する人工皮膚を構築することを目指す。③ 人工皮膚を用いて皮膚の形成機構を、特に細胞とECMの結合様式を中心に解析する。④ 皮膚細胞に対するECMの作用を生化学的に調べる。

## 2. 実験材料および方法

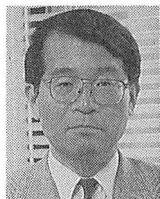
細胞は正常ヒトまたはラット (Fisher系) の皮膚から得られた真皮線維芽細胞または表皮細胞を用いた。これらの細胞の分離と培養は既に公表した方法に従った<sup>1, 2)</sup>。人工真皮 (線維芽細胞のコラーゲンゲル培養) は既報の方法に従って作製した<sup>3)</sup>。

## 3. 結 果

### 3.1 人工真皮における線維芽細胞とコラーゲンの結合様式

線維芽細胞をコラーゲンゲルの中で三次元的に培養するとゲルが収縮し、生体真皮に類似した形態を示す<sup>4)</sup>。ゲルの収縮は線維芽細胞とコラー

The study on the mechanism of formation of the skin utilizing a reconstituted skin model



Katsutoshi Yoshizato

Faculty of Science  
Hiroshima University

ゲンが結合すること、およびその後の細胞の運動などによって引き起こされる。従ってゲルの収縮過程を調べることによって真皮形成過程における線維芽細胞とコラーゲンの結合・認識機構を明らかにすることが出来るものと思われる。

私達は既にこのゲル収縮を特異的に阻害するモノクローナル抗体 A3A5 を得ることに成功した<sup>5)</sup>。A3A5 が認識する抗原は細胞性フィブロネクチン (cFN) である。cFN が確かにゲル収縮過程で重要な働きをしているかどうか検討した。細胞を充分量の cFN で処理した後コラーゲンゲル培養を行ったところ収縮の促進がみられた。逆にコラーゲンを cFN であらかじめ処理した後ゲル培養を行うと収縮は抑制された。これらの事実はゲル収縮過程で cFN が重要な働きをしていることを示唆している。

cFN 分子上の A3A5 に対するエピトープを決定することは、cFN とコラーゲンの結合様式を知る上で重要である。FN を V8 プロテアーゼやトリプシンで消化して断片化した。得られた断片のうちで A3A5 と反応する最小分子量を持つもののアミノ酸シーケンスを決定することでこの問題を解決しようとしている。現在の段階ではまだ結論が得られていない。

### 3.2 線維芽細胞に対するコラーゲンの作用

皮膚形成の過程で ECM は細胞と結合し、種々の影響を細胞に与えているものと考えられる。ヒト真皮由来の線維芽細胞をコラーゲンを基質としてこの上で培養し、細胞にどのような変化が表れるか検討した。コントロール基質としてプラスチック上およびゼラチン上で細胞を培養して、コラーゲン上のもものと比較した。細胞を <sup>35</sup>S-メチオニンで標識し、二次元電気泳動を O' Farrell の方法に従って行った。360 から 420 個のタンパク質スポットを得ることができた。ゼラチンとプラスチック上の細胞の二次元パターンはよく似ていた。ところがコラーゲン上で培養された細胞のタンパク質パターンはそれらと比べるとかなり異

なっていた。コラーゲン上では 364 個のスポットを確認できたが、そのうち 26% はコラーゲン上でのみ合成されており、前二者では合成されていなかった。残りのスポットはプラスチック上の細胞でも合成されているものであったが、このうち 26% はコラーゲンによってその合成が up-regulation されており、23% は逆に down-regulation されていた。残りはプラスチック上のものと同じ合成率であった。以上の結果は細胞によるタンパク質の合成パターンは基質依存的であり、コラーゲンは細胞のタンパク質合成の質と量のいずれにおいても多大な影響を及ぼすことを示している<sup>7)</sup>。

コラーゲンと細胞の接触が刺激となって細胞のタンパク質合成の量的および質的变化を引き起こしているものと考えられる。この刺激の細胞内伝達の仕組みの一端を知る目的で細胞内タンパク質のリン酸化のパターンを調べた。この時以下の理由で EGF の刺激伝達に対するコラーゲンの影響を見るという方法でこの問題にアプローチすることとした。コラーゲンの細胞に対する効果のうちで顕著なもの一つは分裂抑制である<sup>8)</sup>。コラーゲンの濃度依存的に細胞の DNA 合成は顕著に抑制される<sup>3, 9)</sup>。一方 EGF は線維芽細胞の mitogen の一つである。そこで EGF による DNA 合成の活性化の過程にコラーゲンはどのような影響を示すか調べることによってコラーゲンによって引き起こされる変化を追跡することにした。

低血清濃度 (3%) 培養液で線維芽細胞を培養して EGF を 3ng/ml の濃度で添加すると DNA 合成が高まる。この時、タンパク質のリン酸化のパターンを調べた。細胞を <sup>32</sup>P の無機リン酸で標識してタンパク質を可溶化して既述の方法で二次元電気泳動を行った。この時細胞はプラスチックあるいはコラーゲン上で培養した。リン酸化タンパク質の二次元電気泳動パターンを両者で比較した。パターンはほとんど同じであったが、分子量 27,000 のタンパク質の挙動に興味を持たれた<sup>10)</sup>。

このタンパク質には等電点の異なる2つのスポットが存在していた。一つは等電点 (pI) が5.3で pp27a、他は pI5.5で pp27b とそれぞれ名付けた。後者はコラーゲン上、プラスチック上あるいはEGFの有無に関係なくリン酸化タンパク質として出現するが pp27a は特異的な挙動を示した。EGF添加後、直線的にリン酸化され15分で最高値になり、その後リン酸化の程度は減衰した。pp27aのリン酸化をプラスチック上とコラーゲン上で比較するとコラーゲン上では著しく抑制されることがわかった。最高値レベルで比較すると約1/4に抑えられていた。pp27aのリン酸化はH7 (プロテインキナーゼC阻害剤) で抑制される。またジェニステイン (チロシンキナーゼの阻害剤) でも70%のリン酸化抑制がみられた。これらの結果は pp27a タンパク質のリン酸がコラーゲン線維上では抑制され、そのことが細胞のEGF反応性を鈍くしている可能性を強く示唆している。

### 3.3 皮膚再構築体の中での表皮細胞と線維芽細胞の相互作用

3.1の項で述べた方法によってヒト真皮由来の線維芽細胞をコラーゲン線維の三次元的立体格子の中に埋め込んで培養することによって真皮様構造を構築する。この構築体の上面に別途調製した表皮細胞を播取し、皮膚様構造を構築する。これはBell等によって開発された人工的に作られた皮膚等価物である<sup>11)</sup>。

この皮膚等価物をラット (Fisher) の皮膚細胞を用いて構築したところ次のような現象を見いだした<sup>12)</sup>。表皮細胞や線維芽細胞をそれぞれ単独にコラーゲン上 (表皮細胞の場合) であるいはコラーゲンゲル中 (線維芽細胞の場合) で培養してもゲルの溶解現象はみられない。ところが皮膚等価物では、ゲルの溶解が起こる。この溶解現象を詳しく調べたところ、次のようなことがわかっている。表皮細胞は分子量48,000のタンパク質を分泌しているが、このタンパク質は線維芽細胞によるコラーゲナーゼ合成促進作用をもっている。

しかも興味あることにこの因子はプラスチック上に培養された線維芽細胞に対しては効果を示さずに、コラーゲンゲル中の線維芽細胞に効果を持つことである。

この分子量48,000を持つタンパク質の本体に興味をもたれたので、本研究で次の実験を行った。表皮細胞による conditioned medium を調製し、これを抗原としてマウスを免疫した。脾細胞とミエローマを常法に従って融合させハイブリドーマを作製した。このハイブリドーマの中にコラーゲンゲル溶解を阻害するクローンがあるかどうかを検討したところ、いくつかのクローンが得られた。この中でも最も阻害効果の高いクローンに注目し、このモノクローナル抗体に結合するタンパク質の分析を現在行っているところである。

### 3.4 人工皮膚に毛を導入するための基礎的研究

現在までに種々の細胞組み込み型の人工皮膚を開発する試みがなされてきた。毛細胞は表皮細胞が分化したものである。この分化過程で毛乳頭細胞 (真皮毛乳頭細胞の一種) が重要な働きをしており、この細胞の影響下で表皮細胞が毛母細胞へ分化する<sup>13)</sup>。毛乳頭細胞が合成する特殊な成長因子がこの作用をもっているのではないかと考えられているが、その実体は不明である。人工皮膚に毛を導入する技術を開発するに当たって、この因子の実体解明が必要と考えられるのでこのための基礎研究を行った。因子解明の障害となっているものの一つは毛乳頭細胞の増殖力である。毛乳頭細胞を *in vitro* で培養することは可能であるが増殖力が弱く、因子を解明するのに必要な数の細胞を得ることが困難であった。そこで次の試みを行った。ラット (Fisher) の頬髭を抜き取り、毛乳頭を顕微鏡下にて分取した。直ちに explant culture を行い細胞を増殖させ primary culture を得た。この細胞にSV40ウイルス遺伝子を常法に従って感染させたところ、増殖クローンを7つ得た。このクローンには確かにウイルス遺伝子が組み込まれていることを Large T 抗原に対する

特異抗体によって免疫染色することによって確認した。このうちの1つのクローンについて次の実験を行った。まず頬髭毛胞を別途調製し下半分を切除し上半分のみとした後、さらに毛幹を抜き取った。この毛胞の切断面に毛乳頭を挿入しこれを positive control とした。この実験の negative control は無挿入の毛胞である。実験群はSV40によって形質転換した細胞（およそ $10^3$ 個）を挿入したものである。これら毛胞をラット腎臓の皮膜下に植え込んだ。20日後に開腹し毛胞の変化を調べたところ、positive control と実験群では白い毛幹の伸長がみられたが、negative control ではそのようなことはみられなかった。この実験は形質転換して無限増殖能をもった毛乳頭細胞が毛の誘導能を保持していることを示している。今後、毛誘導因子の実体解明にこの形質転換細胞は大変有用であると考えている。

#### 4. 考 察

本研究は人工皮膚をモデル実験の対象として扱い、皮膚の性質を明らかにしようとして行われた。皮膚は体の表面を覆っており、美容や外傷などの問題を考えるとき第一に考慮に入れる必要のある臓器である。その意味で皮膚の人工モデルを作ることは重要である。これまでいくつかの試みが報告されている。言うまでもなく本物に近いモデルが理想であるが現状ではほど遠い。

この中でもBellらによって開発された人工皮膚は注目に値する。この人工皮膚は全て生体由来の材料で作られているからである。3項でも述べたごとく、このモデルはコラーゲン、表皮細胞、真皮線維芽細胞によって作られている。非常に単純なモデルではあるが、現実の生体皮膚の性質を *in vitro* で再現することができる。勿論全ての性質の再現には至っていないが重要ないくつかの性質の研究には優れたモデルであることは間違いない。

本研究はこのモデルを利用して次の研究を行った。① 線維芽細胞とコラーゲン線維の結合様式、

② コラーゲン線維による細胞のタンパク質合成の量的および質的制御、③ コラーゲンタンパク質のリン酸化の変化および、④ 人工皮膚への毛の導入に関する基礎研究。これらの研究は皮膚の正常な機能と構造を可能にしている仕組みを理解する上で役に立つものと期待している。

#### 5. 総 括

本研究は予定の課題に向かって比較的順調に展開できたと思っている。本研究は4つの項目に分けて実施された。それぞれの項目について最終目標に達するまでには今後の研究が必要である。これからもこれら項目について研究を継続して理想的皮膚モデルに一步でも近づきたいと考えている。

#### 引用文献

- 1) K. Yoshizato, S. Kikuyama and N. Shioya, *Biochim. Biophys. Acta*, 67, 23 (1980).
- 2) K. Yoshizato, A. Nishikawa and T. Taira, *J. Cell Sci.*, 91, 491 (1988).
- 3) K. Yoshizato, T. Taira and N. Yamamoto, *Biomed. Res.*, 6, 61 (1985).
- 4) E. Bell, B. Ivarsson and C. Merrill, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 76, 1274 (1979).
- 5) H. Asaga, S. Kikuchi and K. Yoshizato, *Exp. Cell. Res.*, 193, 167 (1991).
- 6) P. H. O'Farrell, *J. Biol. Chem.*, 250, 4007 (1975).
- 7) N. Koseki and K. Yoshizato, *Cell Adhesion and Communication*, 1, 355 (1994).
- 8) R. Sarber, B. Hull, C. Merrill, T. Soranno and E. Bell, *Mech. Age. Dev.* 17, 107 (1981).
- 9) K. Yoshizato, A. Makino and K. Nagayoshi, *Biomed. Res.* 9, 33 (1988).
- 10) N. Koseki and K. Yoshizato, in preparation (1994).
- 11) E. Bell, H. P. Ehrlich, D. J. Buttle and T. Nakatsuji, *Science* 211, 1052 (1981).

12) K. S. Nishikawa and K. Yoshizato, Biomed.  
Res. 11, 231 (1990).

13) C. A. B. Jahoda, K. Horne and R. F. Oliver,  
Nature 311, 560 (1984).

# 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

浜松医科大学

古川 福実

UVB is well known to induce anti-ENA antibody binding on the surface of human cultured keratinocytes. In SLE-prone MRL/lpr mice, UVB irradiation accelerates the onset of skin lesions and augments the cytotoxicity of cultured cells. Based on our previous reports, we examined the preventive effects of sun screen on UVB-induced changes *in vitro* and *in vivo*.

Normal human cultured keratinocytes were purchased from Clonetics (EPI-PACK, San Diego). MRL/l mice were maintained in our laboratory. As the sun screen, di-(p-methoxycinnamoyloxy)-mono-(2'-ethylhexanolyloxy) propane was dissolved in acetone for *in vitro* test and in the base cream for the *in vivo* test.

*In vitro* MTT assay revealed the 1~2% sun screen solution in acetone blocked completely the UVB-induced cytotoxicity of EPI-PACK cells, mouse keratinocytes and mouse fibroblasts in culture. Anti-ENA antibody binding to cultured human keratinocytes was markedly suppressed by sun screen. Long-term exposure to 500mJ/cm<sup>2</sup> UVB light accelerated the development of skin lesions in MRL/l mice painted with base cream. In contrast, 2 or 4% sun screen painting blocked the early onset of skin lesions.

These results suggested the usefulness of sun screen in the prevention of photocytotoxicity in human and murine lupus dermatoses.

## 1. 緒言

近年、日光特に紫外線による皮膚障害が、有棘細胞癌や基底細胞癌などの悪性新生物、加齢および一部の自己免疫疾患の発症あるいは修飾因子として注目されている。主たる原因は皮膚を構成する表皮細胞や線維芽細胞の中波長紫外線（UVB、波長280-320nm）に対する細胞障害性や易感受性にある。このような紫外線による皮膚障害を防止する目的で多種のサンスクリーン剤が用いられ一定の効果をあげている。しかし、サンスクリーン剤の組織障害性に対する防御作用については、

未だ十分に解明されているとは言い難い面があるのも事実である。

紫外線の細胞障害性や易感受性の研究においては従来、地表に到達しない短波長紫外線（UVC、波長280nm以下）を用いた研究が主であった。しかし、実際の日常生活においては、UVBやUVA（長波長紫外線、波長320nm以上）の細胞障害性や易感受性が問題となる。この点については、国内外の研究成果は十分ではなく、易感受性の検索方法については確立した方法さえもないのが現状である。そこで、我々は今回下記の点を、主に免疫学ならびに生物学的手法により明らかにするために研究を行った。

Immunological Effects of Sun Screen on Human and Murine Keratinocytes Irradiated with UltraViolet B Light



Fukumi Furukawa  
Hamamatsu University  
School of Medicine

- 1) UVB照射に対する培養細胞の易感受性の検討
- 2) サンスクリーン剤の紫外線（特にUVB）による細胞毒性防御能は均一であるか否か。すなわち、各個人別の培養表皮細胞を得ることにより、その均一性の有無を検討する。

3) サンスクリーン剤の自己免疫疾患とくにエリテマトーデスにおける光線過敏性(易感受性)への有効性が指摘されている。紫外線に対する易感受性に対するサンスクリーン剤の有用性の解析を行う。

## 2. 実験と結果

### 2.1 細胞毒性への効果

培養細胞株として、マウス由来の Pam212、HSC-1 (人由来皮膚 squamous cell carcinoma) を用いた(京都大学医学部皮膚科井階幸一先生より分与)。また、成人あるいはマウスの表皮あるいは真皮線維芽細胞の培養を行った。

ヒト表皮培養細胞は、新生児包皮より得た皮膚組織を0.25%トリプシンで4℃20時間処理した後、表皮と真皮を剥離した。表皮細胞浮遊液は、MCDB153培地を基本とするKGM培地で無血清の条件下で型のごとく(37℃、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内)行った。真皮組織はコラゲナーゼ処理で線維芽細胞浮遊液を得た後、10%FCSを含んだM199培地で培養した。また、正常人や光線過敏性を示す代表的疾患であるループスエリテマトーデス(LE)の患者の表皮細胞培養は、我々が開発した人工表皮水疱作製器<sup>1, 2)</sup>と培養方法<sup>3)</sup>を用いて行った。

マウスの表皮細胞と真皮線維芽細胞の培養も、基本的には上記の方法によった<sup>4)</sup>。

サンスクリーン剤として、di-(p-methoxycinnamoyloxy)-mono-(2'-ethylhexanoyloxy) propane (サンガードB、以下SB)を用いた。実験によっては、SBのコントロールとしてbase cream (oil 13%, moisture 7%, UV absorbent 8%, P-25 3%, water 69%)を用いた。

線源として、Toshiba FL-20SE30 サンランプを用いた。同ランプは305nmの波長にピークを有し、UVR-305/365による測定で15cmの距離で2.4mW/cm<sup>2</sup>のenergy outputを示す。

細胞毒性の検定には既報<sup>4)</sup>のごとく、96穴ブ

レートを用いた発色法によるMTT法あるいは蛍光顕微鏡を用いたAO/EB法を用いた。詳細は、コスメトロジー研究振興財団研究業績中間報告集第2号p63-79, 1993に記載済みである。

Pam、HSCあるいはMRL/1マウスの線維芽細胞に対するUVB 50mJ/cm<sup>2</sup>の単照射において、2%SB(プラスチック皿にSB溶解液を入れ、皿越しに照射。照射線量は、溶解液を入れた皿越しに培養細胞面での測定値。)は、完全に細胞障害性を阻止した(表1)。HSCや線維芽細胞では、線量依存性の傾向が伺えた。

表1 Percent inhibition of UVB-induced cytotoxicity by sunguard B

Cell	Concentration of Sunguard B			
	0	0.5%	1.0%	2.0%
Pam 212	0%	0%	100%	100%
HSC-1	0	60 ± 11	100	100
MRL1 fibroblasts	0	43 ± 7	49 ± 21	100

Results are expressed as the mean (±1SD) of three experiments.

1) Sunguard B was dissolved in acetone.

2) A single 50mJ/cm<sup>2</sup> UVB light irradiation was performed.

ヒト培養表皮細胞へのUVB照射による細胞障害性は、包皮由来あるいは成人由来においても線量依存性に認められた。図1は、正常人(Control)と光線過敏性を有するLEの培養表皮細胞を用いた結果を示している。正常人はLE患者に比して高い細胞障害性を示し、新生児包皮の値<sup>3)</sup>より高値を示した。また、培養細胞の条件が安定すれば、個人差(細胞障害性)は新生児包皮の場合とほぼ同様であった。そして、2%SBによって、UVBによる包皮あるいは成人培養表皮細胞の障害性は阻止された。

自己免疫マウスのMRL/1では、我々はすでにコントロールのMRL/nマウスに比べてUVBに対する細胞障害性が高いことを報告した<sup>4)</sup>。今回の実験においては、例えば培養表皮細胞の場合、著明な抑制効果があることがMTT法を用いて明

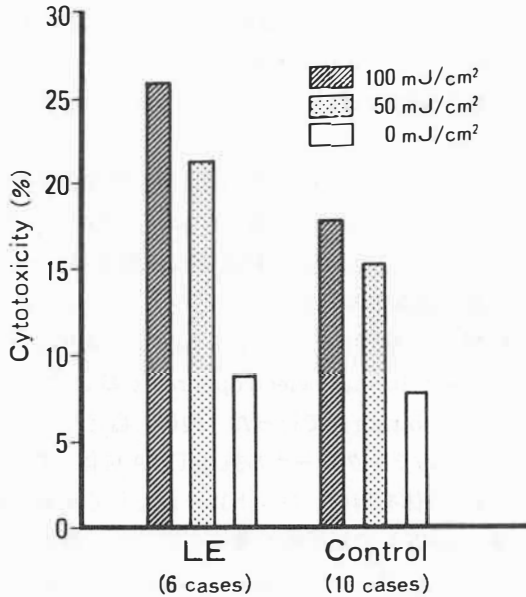


図1 Cytotoxicity of Cultured Keratinocytes to UVB

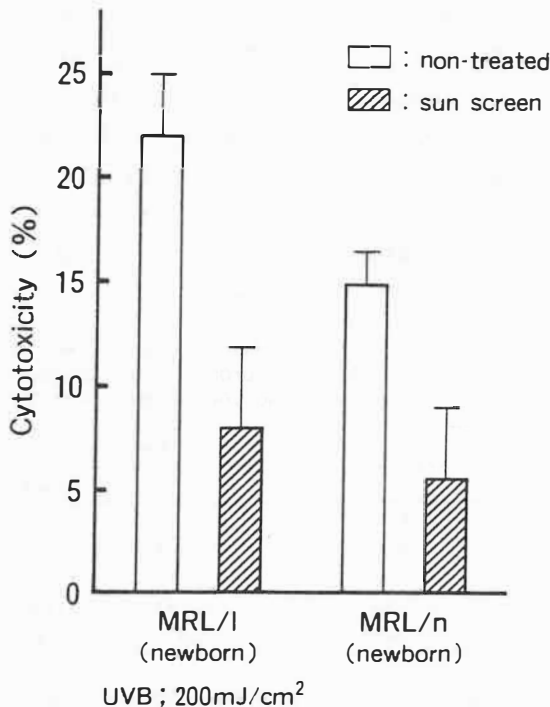


図2 Effects of sun screen on UVB-induced cytotoxicity of cultured keratinocytes

らかとなったが、抑制の程度には、両マウス間に有意な差は見られなかった。図2は、第2代培養表皮細胞にUVB 200mJ/cm<sup>2</sup>を照射したときの細胞毒性の結果を示している。

## 2.2 自己免疫現象に対する効果

### 2.2.1 MRL/lマウスの場合

MRL/lマウスは代表的な自己免疫マウスで、4-5ヶ月齢にみられる皮疹はヒトLEの皮疹モデルである<sup>5)</sup>。このマウスを用いて、図3の実験計画に沿って照射を二日ごとに総計28回行った。我々の従来の研究結果<sup>6)</sup>よりUVB 500mJ/cm<sup>2</sup> (図3のC)照射群で有意な肉眼的所見が得られることが判明していたので、今回の照射量を500 mJ/cm<sup>2</sup>と設定した。処置群として1) 4%SB、2) 2%SB、3) base cream、4) 無処置の4つを設定した。肉眼的所見において、1) 2)群で著明な皮疹誘発抑制効果が見られるものの、他の免疫学的所見において差が見られないのは既報のごとくであった。そこで今回の実験では、表皮内の免疫担当細胞であるランゲルハンス細胞の動態を検索してみた。その結果、表2に示すようにSBはランゲルハンス細胞の減少を抑制すること

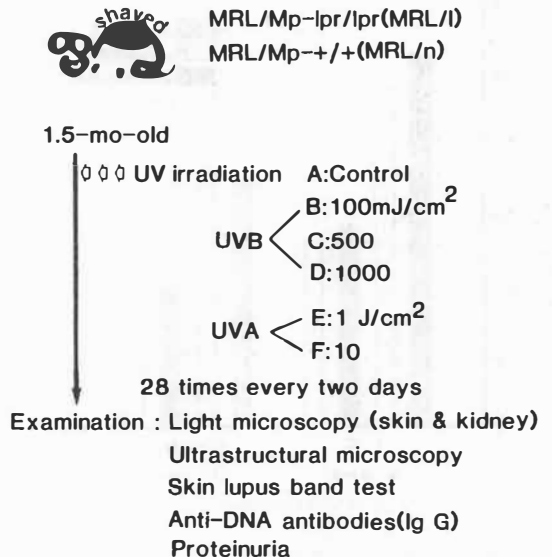


図3 In vivo UV light irradiation

表2 Ia<sup>+</sup>-Langerhans cells in the epidermis of MRL/l mice irradiated with UVB

Treatment	Number/mm
4% Sunguard B	37.5 ± 7.1
2% Sunguard B	34.7 ± 3.9
Base cream	31.7 ± 5.2
Non	23.9 ± 5.2
Non-irradiated control	33.7 ± 5.9

Results were expressed as the mean (± 1SD) of 5 examined mice.

が判明した。しかし、このような傾向はbase cream群でも見られたことからSB特異的と言えるか否か問題点として残っている。

### 2.2.2 抗ENA抗体結合誘導能

#### -UVB 易感受性モデルとして-

UVB照射によって、正常人培養表皮細胞表面にENA (extractable nuclear antigens) が発現されることを従来より認めてきた<sup>7-9)</sup>。光線過敏性を示すL.E.患者の表皮細胞では、コントロールに比べて高い発現性を示す(図4)。従っ

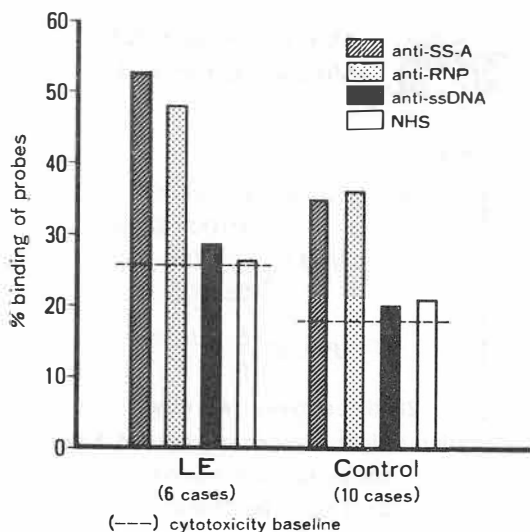


図4 Antibodies binding to cultured keratinocytes irradiated with UVB (100mJ/cm<sup>2</sup>)

て、この現象は、UVBに対する表皮細胞の易感受性のマーカーとして用いられ得る。この減少に対してSBがはたして、抑制的に働くか否かを検討した。

新生児包皮より得た第2継代目の培養表皮細胞を用いた。抗体として用いたSS-A/Ro, SS-B/La, RNP, Sm抗原に特異的な抗血清は、SLE患者の血清をスクリーニングすることにより得た。特異性の検索は、double immunodiffusion, counter immunoelectrophoresis および immunoblotting法で行った。他に、自己免疫マウス由来のモノクローナル抗dsDNA抗体と抗ssDNA抗体を用い、コントロールとして正常人血清(NHS)や無活性培養液を用いた。測定方法は、Lab-Tek chamber slideあるいは60mm培養用ディッシュに細胞を培養し、70~80%コンフルエンスに達した時、サンスクリーン処置を行った後50mJ/cm<sup>2</sup>のUVB照射し、さらに24時間後に免疫組織学的に検索に供した。

抗ENA抗体の培養表皮細胞への結合は、既報<sup>7)</sup>のごとく、Lab-Tek chamber slide用には、acetoneで、flow cytometry用には、2%パラホルムアルデヒドで後固定した細胞を用いて検討した。二次抗体としては、FITC抗ヒトIgGを用いた。表3に示すとおり、FACS解析にて明らかな抑制効果が認められた。また、通常の蛍光抗体法においても同様の結果を得た。

表3 Effects of sun screen on UVB induced binding of antibody probes on the surface of cultured keratinocytes by flow cytometry

Antibody specificities	% positive cells	
	Control	Sun screen
SS-A/Ro	23.5 ± 6.9	5.3 ± 1.2
SS-B/La	20.7 ± 6.6	3.7 ± 3.6
U <sub>1</sub> RNP	24.6 ± 8.7	4.1 ± 5.1
Sm	14.2 ± 9.7	5.4 ± 4.9
NHS*	<1%	<1%

Results represent the mean (± 1SD) of at least three experiments. Cells were irradiated with a single UVB dose of 50mJ/cm<sup>2</sup>.

\*NHS; normal human serum

### 3. 考 察

培養表皮細胞を用いて紫外線、特にUVB照射による細胞障害性や易感受性を検討した。特に、UVB照射によって本来細胞内あるいは核内にあるU<sub>1</sub>RNPやSS-A/Ro抗原が細胞表面に移動する現象は、UVBに対する細胞の易感受性を検出する方法として有用なものではないかと推察された。

そして、本研究は、このような*in vitro*系においてサンスクリーン剤がUVB照射による表皮細胞障害性あるいは易感受性に対してもまた皮膚を場とする自己免疫的現象に対しても抑制的あるいは予防的に働くことを示している。また、MRLマウスを用いた実験より本剤の予防的あるいは治療的有用性が明らかとなった。今後は、*in vitro*のUVBに対する易感受性の検索方法が、真に細胞表面であるか否か、あるいは*in vitro*のサンスクリーン剤の溶解性の問題等が解決されなければならない。前者においては、すでにconfocal蛍光顕微鏡によって、細胞表面の局在を確認したところである。このような問題点が、明らかになれば、サンスクリーン剤のさらに詳細な分子的作用機序をも知ることができるようになろう。

### 謝 辞

本研究に対するコスメトロジー財団の援助に感謝します。また、本研究は、京都大学医学部皮膚科今村貞夫教授をはじめ、同大学の多くの先生方のご協力により可能となったことを付記します。

### 文 献

- 1) 古川福実他：京大式人工表皮水疱作製器の紹介  
I. 基本設計とその試作。皮紀要 84 : 5-9, 1989
- 2) 古川福実他：京大式人工表皮水疱作製器の紹介  
II. 水疱表皮の組織学的検討。皮紀要 84 : 11-14, 1989
- 3) Furukawa F et al : Serum-free serial culture of adult human keratinocytes from suction-blister roof epidermis. J Invest Dermatol 89 : 460-463, 1989
- 4) Furukawa F et al : Susceptible cytotoxicity to ultraviolet B light in fibroblasts and keratinocytes cultured from autoimmune-prone MRL/Mp-lpr/lpr mice. Clin Immunol Immunopathol 52 : 460-472, 1989
- 5) Furukawa F et al : Dermatopathological studies on skin lesions of MRL mice. Arch Dermatol Res 276 : 186-194, 1984
- 6) Horiguchi Y, Furukawa F et al : Effects of ultraviolet light irradiation on the skin of MRL/l mice. Arch Dermatol Res 279 : 478-483, 1987
- 7) Furukawa F et al : Estradiol enhances binding to cultured human keratinocytes of antibodies specific for SS-A/Ro and SS-B/La. J Immunol 141 : 1480-1488, 1988
- 8) Furukawa F et al : Binding of antibodies to the extractable nuclear antigens SS-A/Ro and SS-B/La is induced on the surface of human keratinocytes by ultraviolet light (UVL). J Invest Dermatol 94 : 77-85, 1991
- 9) Furukawa F et al : Relationship between heat shock protein induction and the binding of antibodies to the ENA on cultured human keratinocytes. J Invest Dermatol 101 : 191-195, 1993

# 皮溝と加齢の関係

— Direct Skin Sensorを用いた検討 —

慶應義塾大学医学部

本 間 聡 起

The skin surface patterns of the three locations in 126 healthy Japanese men aged 25–83 years old, were assessed by using the image of the video camera (DSS and VMS-1210). Correlations between age and furrow density of the three locations were as follows, volar arm;  $-0.34$ , arm;  $-0.34$ , palm of a hand;  $-0.19$ . The area of furrows were also correlated with age in volar arm ( $-0.39$ ). The step-wise multiple regression analysis revealed that results of % area of furrows, the degree of anisotropy of thickness and the line density in volar arm were independently correlated with age. Assessing the skin surface patterns using the image of the video macro-scope are convenient for the evaluations of progression in skin aging.

## 1. 緒 言

老年者および老化の研究のなかで、老化の指標をどこに求めるのかは重要な課題である。皮膚に現れるシワは、体表面から容易に、しかも非侵襲的に観察できる老化の指標として有望視されるものである。Kligmanは、シワをその発生部位、成因を基に4分類したが、このうちcrinkle（縮緬ジワ）は、高齢者の非照射部位にみられる表面の細かいヒダを指しており、内因的な加齢変化に基づくものとしている<sup>1)</sup>。皮膚表面には、肉眼的に観察されるシワのほかに、さらに細かい模様があり、このうちルーペで観察されるレベルのものに皮溝・皮丘がある。この皮溝・皮丘は身体部位によってその様相はかなり異なっているが、腹部や前腕屈側部など、日光非照射部位では内因的

な加齢変化が認められるとされている<sup>2)</sup>。しかし、これまでの皮溝・皮丘の研究では、かなり特殊な機器と技術を必要とするものが多かった<sup>3)</sup>。今回は、接触式光源付き拡大スコープを用いることによって皮溝の状態を観察し、加齢の及ぼす影響を定量的、定性的評価法を交えて検討をした。

## 2. 実 験

### 2.1 対 象

慶應健康相談センターの人間ドックに受診した25歳から83歳の健康成人男子126名を対象とした。観察は、9月から11月の秋期に行った。

### 2.2 方 法

2.2.1 皮溝の観察には、DSS (Direct Skin Sensor) (フジミック) と、ビデオマクロスコープ (VMS-1210) (日本光電) を用いた。ともに、光源とつながれた接触端子を被検部位に直接あてて、同部位を前者は約7倍に拡大するもので、後者は接触端子内の替えレンズを10倍用として観察を行った。DSSは、接続された熱写プリンタに、VMS-1210はビデオ端子より接続したビデオレコーダー (ビクターHRV1) に記

### Aging and Skin Furrows



Satoki Homma

School of Medicine,  
KEIO University.



2.2.5 各症例から、観察当日に行った人間ドックでの理学所見、検査所見のデータを抽出した。

2.2.6 得られた結果は、PC-9801パーソナルコンピュータにより、統計解析ソフト（マルチ統計、社会情報サービス）を用いて解析を行った。

### 3. 結果

#### 3.1 DSSとVMS-1210の画像（図3）の比較

2つの機種で観察した結果、DSSの方が皮溝皮丘の判別が明確であり、皮溝の形態学的特徴を観察するにも適していると考えられたことから、DSSから得られた映像を基に分析を行った。

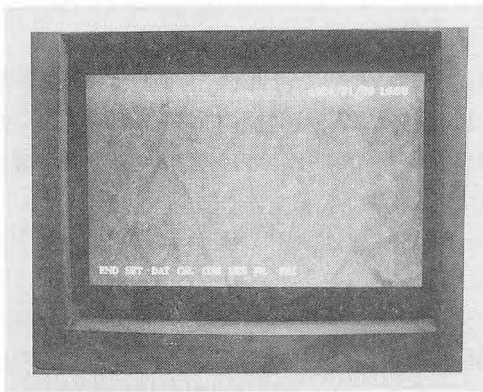


図3 VMS-1210で観察した皮溝・皮丘

#### 3.2 定性的評価項目

7つの評価項目の各々について、3回ずつ評価を行い、2回以上同じ判定が下されたものを採用した。一致率は、80～90%であった。肘関節近傍で観察された7項目について、それぞれの判定レベルの症例における平均年齢を図4、5に示した。皮溝の太さ、皮溝辺縁の明瞭度、皮溝の太さの均一性の3項目に年齢差が認められた。各皮溝1本1本における太さの均一性については、断裂の認められるような症例は高齢者で多くなる傾向であったが、均一性と判定されたものは少数で

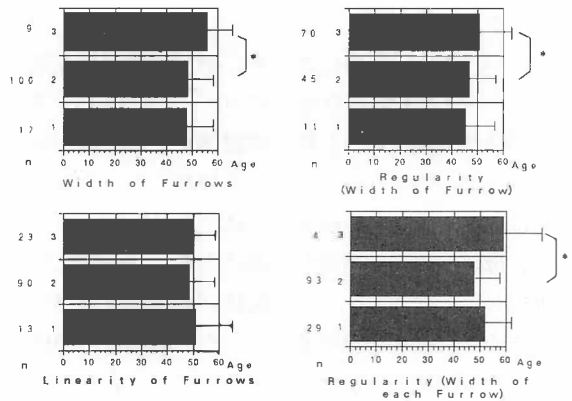


図4 定性的評価項目、各判定レベルの平均年齢、その1  
皮溝の太さ（右上）、皮溝の直線性（右下）  
観察視野での皮溝の太さの均一性（左上）  
それぞれの皮溝の太さの均一性（左下）  
\*:  $p < 0.05$

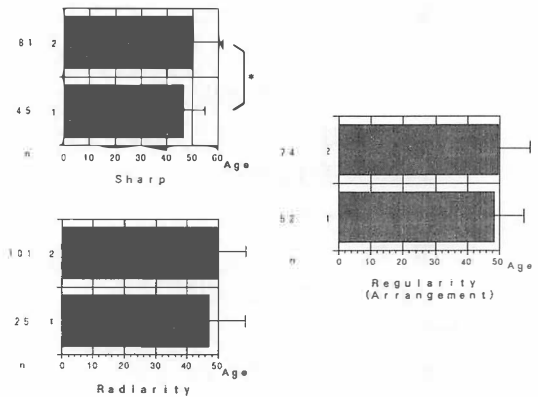


図5 定性的評価項目、各判定レベルの平均年齢、その2  
皮溝辺縁のシャープさ（右上）  
皮溝の放射度（右下）  
皮溝の配列の規則性  
\*:  $p < 0.05$

あったことから、年齢の判別に有効なものとは考えられない。

#### 3.3 定量的評価項目

皮溝密度（Fd）および皮溝部の面積率（%Fa）の測定値のDSS画像上の測定部位による誤差を検討したところ、Fd、Faともに7%以内であった。図6は、肘関節近傍でのFd、%Faについて、10歳毎の年齢階層別に経年変化をみたも

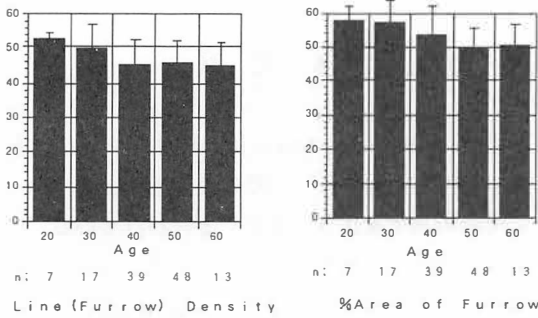


図6 Fd (皮溝密度) および%Fa (皮溝の面積率) と年齢との関係、10歳毎の年齢階層別

のである。Fd、%Faについては、中年期にかけて明確に減少する傾向にあり、1度プラトー状態となるが、高齢になるにしたがって徐々に減少している。図7に、同じく肘関節近傍でのFdとFaの年齢との相関を散布図で示したが、それぞれ相関係数は、Fd-年齢が0.34、%Fa-年齢が0.39であった。

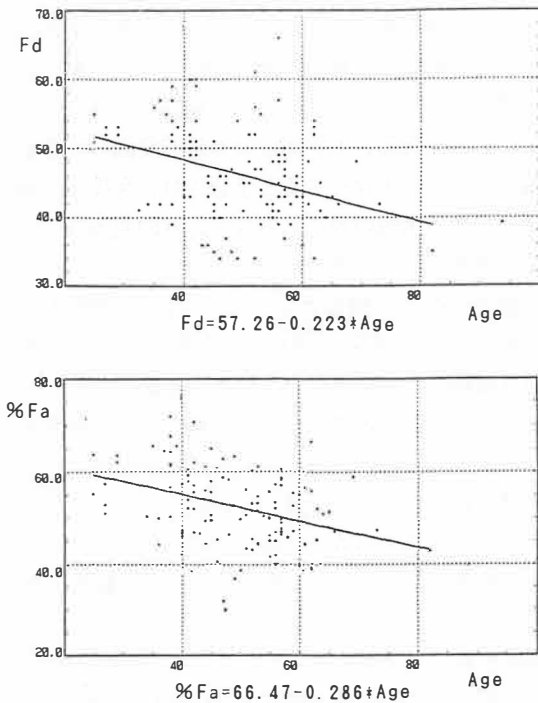


図7 年齢とFd (皮溝密度) および%Fa (皮溝の面積率) との関係、前腕屈側部で観察したもの

図8に上腕屈側と手背部で観察されたFd値と年齢との相関を示した。上腕屈側では、0.34と肘関節近傍部と同等であったが、手背部では0.19であり、年齢以外の要因の関与が大きいことが考えられた。

以上より、皮溝・皮丘の加齢変化は、皮溝密度の減少とその面積率の低下であり、年齢とともに、皮溝の太さは拡大する傾向があるものの、その太さは多様化し、皮溝辺縁の非明瞭化も加齢に伴う変化と考えられる。

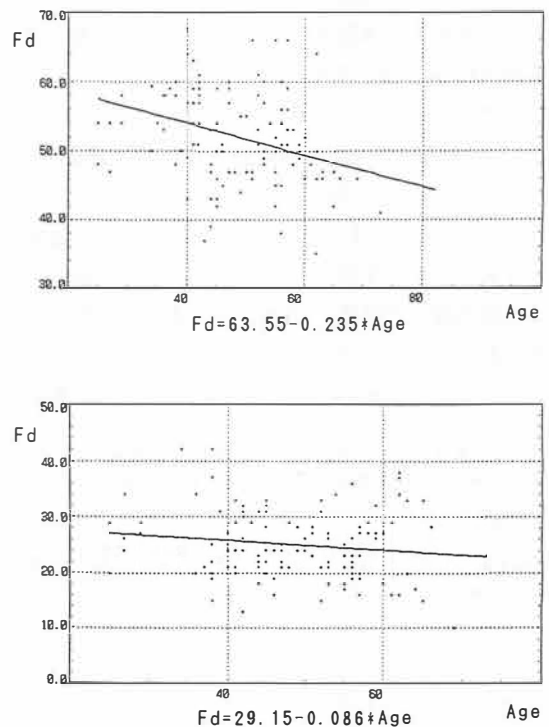


図8 年齢とFd (皮溝密度) との関係、上が上腕屈側部、下が手背部で観察したもの

### 3.4 年齢を目的変数とした多変量解析

次に、これらの定量的、定性的評価項目の組合せによって、この皮溝・皮丘の観察結果から、どれだけ年齢を予測し得るのか検討した。Fd、%Faと定性評価7項目についてはダミー変数を設定して、観察された計9項目を説明変数とする重回帰分析を行った(表1)。解析は変数増減法に

表1 年齢を目的変量とした重回帰分析  
変数増減法 (F=2.0)

説明変量	偏回帰係数	標準回帰係数	F値
皮溝の面積率(%Fa)	-0.386	-0.291	11.01
皮溝の太さの均一性	3.565	0.227	7.11
皮溝密度(Fd)	-0.307	-0.200	5.11
個々の皮溝の太さの均一性	-3.302	-0.152	3.26

重相関係数R=0.49、決定係数R<sup>2</sup>=0.24

より、F値2.0以下の因子を棄却して行った。その結果Fa値、観察視野全体での皮溝の太さの均一性、Fd値、各皮溝1本1本における太さの均一性の4因子が選択され、この重回帰式の重回帰係数は0.49、決定係数は0.24であった。

### 3.5 身体所見・臨床検査値との対応(表2)

Fd、%Faと、臨床所見との関係を検討した。表2は、Fd、%Faをそれぞれ目的変数、臨床データとして、年齢、一日アルコール摂取量、一日喫煙本数、肥満度、収縮期血圧値、拡張期血圧値、総コレステロール値、中性脂肪値、HDL-コレステロール値の9項目を説明因子とした重回

表2 Fd、%Faと臨床所見との関係  
(Fd、%Fa値を目的変量とした重回帰式)

説明変量	Fd			%Fa		
	偏回帰係数	標準回帰係数	F値	偏回帰係数	標準回帰係数	F値
年齢	-0.215	-0.327	12.41	-0.284	-0.375	17.78
1日アルコール摂取量 (合/日)	-0.271	-0.047	0.22	-0.707	-0.106	1.22
1日喫煙量(本/日)	0.003	0.007	0.01	-0.015	-0.032	0.13
肥満度(%)	0.038	0.078	0.45	0.038	0.068	0.37
収縮期血圧	0.029	0.060	0.12	-0.063	-0.113	0.47
拡張期血圧	0.034	0.049	0.08	0.065	0.081	0.23
血清総コレステロール値	-0.030	-0.157	1.91	-0.014	-0.064	0.35
血清中性脂肪値	0.003	0.043	0.12	0.001	0.019	0.02
血清HDL- コレステロール値	0.023	0.098	0.14	-0.148	-0.215	4.72

R = 0.38、R<sup>2</sup> = 0.14

R = 0.46、R<sup>2</sup> = 0.22

帰分析を行った。その結果、Fd、%Faともに年齢の関与が大きく、%Faに対してHDL-コレステロール値の関与が認められる他は、特に有意因子は検出されなかった。

## 4. 考 察

皮溝(Skin Furrow)は、胎生4ヶ月には発生していると言われ<sup>4)</sup>、その後加齢とともに徐々にその形態を変化させていくと言われている。いわゆる肉眼的に観察されるシワ(Wrinkle)と異なり、生下時より既に存在し、徐々に変化していく特徴がある。シワ同様、紫外線(日光)暴露や筋肉の収縮、機械的刺激によっても大きな影響を受けると考えられることから<sup>5, 6)</sup>、加齢変化を観察するためには、できるだけ外的要因を排除できる部位が選択されている。このことから前腕屈側や腹部で多く検討されてきたが、今回は、さらに日光照射の影響を受けにくい上腕屈側でも観察し、ここでの年齢との相関係数は、前腕屈側でのものと同様であった。しかし、前腕部に比べると筋肉の収縮の影響を受けやすく、自然肢位をとるまでにかなり時間を要するケースもみられた。手背部は、外的要因の影響が顕著な部位だが、予測された通りに年齢との相関は小さい傾向がみられた。しかし、前腕部、上腕部位でも外的要因による影響は少なからず存在すると予想され、今後は、職業、または余暇の過ごし方など、外的要因についての情報を詳細に聴取する必要があると思われる。

観察のための機器としては、今回はDSSを主に用いた。VMS-1210のような多目的用の光源付き接触式拡大鏡を用いた場合、光線の向きや強さの関係で皮膚表皮のような透過性の高い検体では、表面の細かい凹凸を描出するのが困難であり、皮溝の観察のためには適していなかった。しかし、今回検討を加えなかったが、VMS-1210ではカラー画像が得られることから、皮丘部の観察、例えば滑らかさ、脂っぽさ、湿り気といった項目を観察するには有利と考えられる。

加齢との関係では、検討したいずれの指標でも単独で年齢を十分に説明し得るものはなかった。今回検討した対象は、人間ドックを受診した健康者であったため、年齢が40~50歳代に集中して

おり、全体として年齢との相関が過小評価されたことも考えられる。しかし、定性評価項目も交えて検討すると、年齢を目的変数とした重回帰式の相関係数は0.49であった。従って、評価法の検討次第では、これらの複数の説明要因の組合せが年齢の評価に有効であることが確認された。定性評価では、皮溝の太さ、皮溝辺縁の明瞭度、皮溝の太さの均一性の3項目に年齢差が認められたが、年齢を目的変数とした重回帰式では、Fd、%Faの他に皮溝の太さの均一性が有意な説明因子として検出された。以上から今回観察された皮溝・皮丘の基本的な加齢変化は、皮溝の密度の減少とその面積率の低下であり、年齢とともに、皮溝は太くなる傾向があるものの、その太さは多様化し、また皮溝の辺縁の不明瞭化も加齢に伴う変化と考えられる。Coreuffらの研究でも<sup>2)</sup>、加齢に伴う基本的な変化として皮溝密度の減少、皮丘部分の増加を指摘しており、ほぼ同様の結果となっているが、これらの変化が著明に出現する年代については、今回の結果と多少の違いが認められる。また、この他に皮溝の深度の増加も加齢現象の一つとして挙げている。

皮溝の生理学的な意義としては、皮膚組織にかかる進展に対する予備としての役割が考えられている。高齢者の皮膚組織の変化として、真皮乳頭の扁平化が挙げられる。これにはコラーゲン線維の減少と弾性線維網の変性・減少も関与し<sup>1)</sup>、その結果、表皮と真皮の結合が脆弱となることから、高齢者の様々な皮膚障害の発生の原因となる。皮溝の変化は、これらの真皮層の変化を反映したものと考えられている<sup>7)</sup>。従って、皮溝密度の減少・その面積率の低下は、真皮との結合力の低下、進展というストレスに対する抵抗力・復元力の低下といった加齢変化を反映していると考えられる。

臨床所見との関連では、%FaとHDL-コレステロール値との間に負の相関が認められたが、この意義については不明である。顔面のシワと喫煙量との間に、年齢、日光照射歴を考慮にいれても

有意な相関があるとする報告が成されているが<sup>8)</sup>、今回の検討からは、皮溝との関係は認められなかった。先の皮溝と真皮層の関連から考えると、局所の物理的刺激を除けば、皮溝は、全身の組織の中で比較的純粋に加齢による影響が見られる部位であると考えられる。

## 5. 総括

5.1 DSSを用いた前腕屈側部位の皮溝の観察を、25～83歳の健常男性で行った。

5.2 観察した項目の中で、定性的評価項目では、皮溝の太さ、皮溝辺縁の明瞭度、皮溝の太さの均一性の3項目に、定量的評価項目では、皮溝密度(Fd)、皮溝面積率(%Fa)に年齢との相関が認められた。

5.3 上記の定性的・定量的評価項目の組合せによって、年齢との相関係数は上昇し、年齢を目的変数とした重回帰式では、0.49の相関係数であった。

5.4 以上より、皮溝の基本的な加齢変化は、皮溝の密度の減少とその面積率の低下であり、加齢により皮溝は太くなる傾向があるものの、その太さは多様化し、また皮溝の辺縁の非明瞭化もみられた。

5.5 前腕屈側以外に、上腕屈側、手背部でも観察した。上腕屈側では、前腕部と同等の年齢との相関が得られたが、手背では相関は弱く、外的要因の影響が大きいと考えられた。

5.6 今後の課題としては、外的要因の影響をさらに詳しく被検者より聴取すること、観察する指標の客観性を上昇させるため、自動画像解析装置の応用を考える、などが挙げられる。

## 文 献

- 1) Kligman, A. M., Zheng, P., Lavker, R. M. :  
The anatomy and pathogenesis of wrinkles.  
Br J Derm 113 : 37-42, 1985.
- 2) Corcuff, P., De Rigal, J., Leveque, J. L.,  
Makki, S. and Agache, P. : Skin relief and ag-  
ing. J Soc Cosmet Chem. 34 : 177-190, 1983.
- 3) Xie, Y., Mignot, J. : Measurement of skin re-  
lief by two- and three- dimensional pro-  
filometry. In Aging Skin. Marcel Dekker, Inc.  
133-197, 1993.
- 4) Hale, A. R. : Morphogenesis of volar skin in  
the human fetus. Am J Anat 91 : 147-181,  
1952.
- 5) Lavker, R. M. : Structural alterations in ex-  
posed and unexposed skin. J Invest Derm 73 ;  
59-66, 1969.
- 6) Corcuff, P. : Steleology of the skin surface : a  
comparison between ageing and UV-induced  
injury. Cosmet Dermatol 1 ; 157-163, 1986.
- 7) Rochefort, A., Makki, S. Agache, P. :  
Anatomical location of human skin furrows.  
Clin Exp Dermatol, 11 : 445-449, 1986.
- 8) Kadunce, D. P. et al : Cigarette smoking: Risk  
factor for premature facial wrinkling. Ann In-  
tern Med. 114 ; 840-844, 1991.

# 開放型セルを用いたレーザー光音響法による経皮吸収測定

東京大学工学部

澤田 嗣 郎

The feasibility of percutaneous absorptiometry technique utilizing an open-ended Photoacoustic (PA) cell are reported. This PA system is capable of measuring percutaneous absorption *in vivo* with both high sensitivity and accuracy. In addition, it provides the means for very simple measurement, compared with conventional methods such as radioisotopes.

An *in vitro* percutaneous absorptiometry was attempted using 1% indomethacin (IDM) ointment applied to an extracted hairless mouse skin. By this experiment, both the decrease in the amount of IDM on the donor side by the PA signal and the increase in the concentration of IDM in the receiver side by UV absorbance were observed along with penetration of IDM through the skin.

An *in vivo* percutaneous absorptiometry was attempted using the 1% IDM ointment applied to a hairless mouse. The diffusion coefficient of IDM through the skin *in vivo* obtained by this PA method was calculated to be  $6.7 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{min}$ . This was in good agreement with the results obtained by the conventional *in vitro* method using a longitudinal diffusion cell.

Based upon the results shown above, it was concluded that the laser PA method using an open-ended cell was applicable to percutaneous absorption.

## 1. はじめに

近年、経皮吸収促進剤や基剤の開発など、外用剤の経皮吸収に関する基礎的な研究から開発研究まで盛んに行われている。これは内服剤と比較して外用剤は、効果の持続時間が長いことや副作用が小さいことなどの利点を有するからである。しかしながら最大の課題は、外的環境に対してバリア機能を有する皮膚(角層)にいかにして薬剤を吸収させるかである。医薬品や化粧品などの外用剤を開発する際にも、ドラッグデリバリーシステム(DDS)という言葉が盛んに使われている。このDDS研究において、薬剤の経皮吸収評価は

重要な鍵である。そのため、拡散セルやラジオアイソトープ(RI)などの様々な方法が開発されているが、簡便にかつ正しく物質の経皮吸収性を評価可能な測定法は定まっていない。特に *in vivo* 測定においては *in vitro* 法よりさらに定まっていないのが現状である。 *in vivo* 法においては一般的にRIが用いられているが、対象薬剤に放射性物質をマーカーとして施す必要性があり、測定も極めて困難なため、スクリーニング法としては不適当と思われる。さらに当然のことながらヒト(*in vivo*)には適用できない。簡便にかつ正しく *in vivo* 測定の可能な評価法が望まれている。

我々はこれまでに、簡便かつ高感度に経皮吸収評価の可能な開放型セルを用いた光音響(PA)法を開発し、*in vitro*、*in vivo* 経皮吸収測定への適用を行ってきた<sup>1)・2)</sup>。さらにより測定対象物質を拡大するため、UVレーザー光源を用いた高感度で高精度に適用可能な開放型セルを用いたUVレーザーPA法を新規に開発した<sup>3)</sup>。そして、本法によるヘアレスマウスの *in vitro*、*in vivo*

Percutaneous Absorptiometry by Laser Photoacoustic Method Using an Open-ended Cell.



Tsuguo Sawada

Faculty of Engineering,  
The University of Tokyo

経皮吸収測定を行い、対象薬物の皮膚中拡散速度を求めた。本論文において本法の経皮吸収測定法としての有効性を報告する。

## 2. 実験

図1にライトガイドと一体型の開放型PAセルを用いた *in vivo* 経皮吸収測定システムを示す。

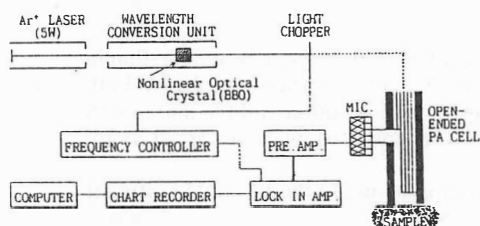


図1. UV-PAS法を用いた簡便かつ高精度な経皮吸収測定システム

光源として257nmのUV光を用いた。UV光は、5W（マルチ）のアルゴンレーザー（Spectra Physics, Model-2020）に非線形光学結晶（ $\beta$ -BaB<sub>2</sub>O<sub>4</sub> : BBO）を備えた光学微調整の可能なUV発振ユニット（Ascal Corp., UVA-4）を取り付けることで得られた。レーザービームをPAセルの共鳴周波数である2.2kHzにライトチョッパ（NF Corp.）によって変調し、UVライトガイド（Asahi Glass Corp., 5mm in diameter × 1m）と一体型の開放型PAセルに導いた。このPAセルは、ライトガイドの末端をセルの試料室とし、最適化の図られた90°に折れ曲がった音響パイプをその末端に取り付けることで作成した。このデザインによってセルのデッドボリュームは小さくなり、測定もより簡便となった。また、S/Nをさらに向上させるため、脈拍や環境ノイズの影響を受けにくい周波数（kHz）で共鳴を起こすようにPAセルの構造をデザインした。この共鳴周波数は音響パイプの長さを変えることで調整可能であった。試料から発生する音波をこのPAセルを用いて高感度に検出し、ロックインアンプで解析することでPA信号を得た。

モデル試料として、257nm光を吸収するイン

ドメタシン（IDM；C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>ClNO<sub>4</sub>, Wako Pure Chemical, Reagent class ; for biochemistry）を、ポリエチレングリコールと混合させた1.0% IDM軟膏を作成した。尚、一般的にIDMは消炎剤として用いられている。

## 3. 結果と考察

### 3.1 PAS-吸光度同時測定によるIDMの *in vitro* 経皮吸収測定

脂肪部を除去したヘアレスマウスの摘出皮膚に1.0%のIDM軟膏を10mg塗布し、拡散セルには生理食塩水を用い、PAS-吸光度同時測定を行った。このシステムは皮膚上のIDMの残存量をPA法で、皮膚透過したIDM量を吸光度で、連続かつ同時に測定可能なシステムである。図2に示した結果のように、PA信号の減少に伴い吸光度の増加が確認された。PA信号の変化と比較して吸光度は8時間程のラグタイムが存在するが、これはIDMが皮膚の真皮層内に保持されやすいことによるものと思われる。

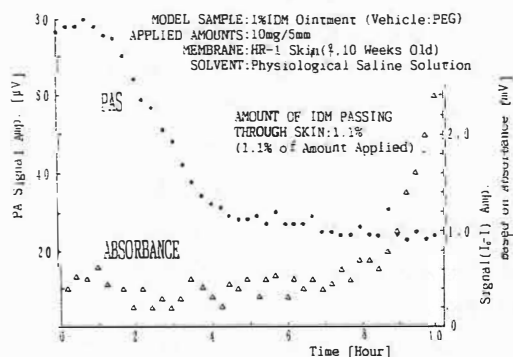


図2. UV-PAS・吸光度同時測定法によるIDMの *in vitro* 経皮吸収測定

### 3.2 UVレーザーPAS法による *in vivo* 経皮吸収測定と皮膚中拡散係数の算出

1%のIDM軟膏を実使用量（6mg/10mmφ）、ヘアレスマウスの背部に塗布し *in vivo* 経皮吸収測定を行った。この時、UVレーザー光の温熱に

よる経皮吸収促進の影響を防ぐため5分ごとに測定を行い、ロックインアンプなどの微小信号器の機能を考慮して1回の測定にかかる時間を15秒とした。優れたS/N（40以上）で得られた*in vivo*測定の結果を図3に示す。基剤のみ塗布し同条件

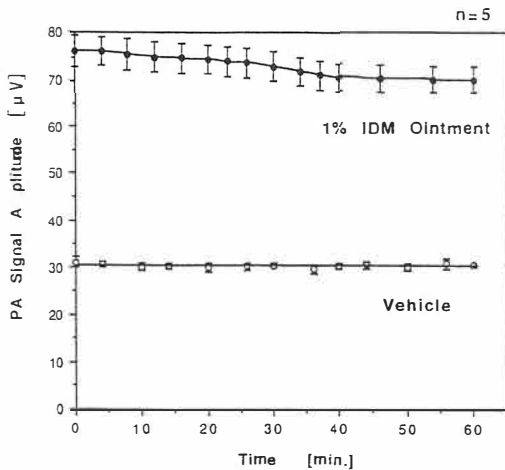


図3. UV-PAS法によるIDMの*in vivo*経皮吸収測定 (対象:ヘアレスマウス)

で測定を行った参照信号とIDM軟膏を塗布した場合を比較すると、前者は時間に対してほぼ一定であるが後者は60分後に初期PA信号に対して5%の信号の減少が認められた。UVレーザー照射によるIDMの破壊や光変化は認められず、このPA信号の減少はIDMの経皮吸収に伴うものと考えられた。そこで、IDMのヘアレスマウスの*in vivo*皮膚における皮膚中拡散係数を、得られたPA信号から求めることを試みた。これは、PA信号の経時変化から時定数を定めることで求めることができる<sup>4)</sup>。皮膚上の物質の濃度の減少変化は基本的に指数関数で表されるので、時定数はPA信号を対数でプロットすることで得られる。また、膜中の物質の拡散理論より、時定数 $\tau$ は次の式で記述される。

$$\tau = 4L^2 / \pi^2 D$$

(L:膜厚、D:物質の膜中拡散係数)

この原理を得られたPA信号 (Fig.2) に適用すると、図4に示したようには $\tau$  (607分) は相関係数0.948で得られ、これより拡散係数は $6.7 \times$

$10^{-6} \text{ cm}^2/\text{min.}$ となった。(ヘアレスマウスの皮膚厚(L)=0.1cm) この値は、従来の*in vitro*拡散セル法により得られた値 ( $3.5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{min.}$ ) とオーダーで一致した。この結果より、本法の経皮吸収評価法としての妥当性が得られた。

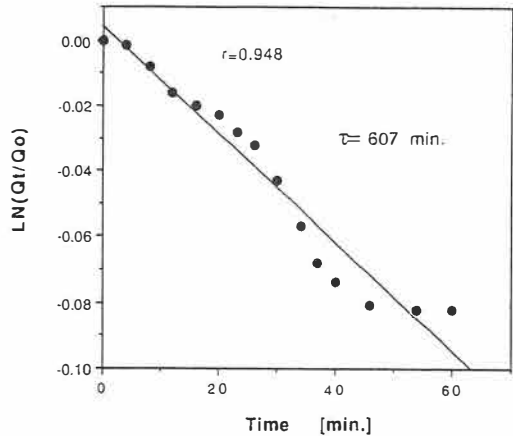


図4. 経皮吸収理論に基づいた対数法による時定数の決定 (IDMの皮膚中拡散係数の算出)

#### 4. まとめと今後の課題

開放型セルを用いたレーザーPA法は、高感度かつ高精度に*in vivo*経皮吸収測定が可能であり、RIなどの従来法と比較して極めて測定が簡便である。さらに、本法を用いれば、経皮吸収に関する新たな情報を得られる可能性があり、測定法としての有効性も示された。また、本報告においては光源としてレーザー光を用いているが、高出力のキセノンランプあるいは重水素ランプなどを用いればより多くの物質に本法を適用できる。

現在、本法のヒト*in vivo*皮膚への適用を検討中である。この際の唯一の課題は、UV光の皮膚の安全性についてである。可視光を光源とする場合は、皮膚に対する波長と照射エネルギーの最大許容値がわかっているので問題はほとんどない。しかしながら、波長が300nm以下のUV光の場合には、実験例が少ないことやこれらの光が地表に到達していないこともあって、最大許容値は明

確に定められていない。従って、光強度を可能な限り小さくし、十分安全性を検討した上で適用することが必要である。

## 引用文献

- 1) Takamoto, R. ; Namba, R. ; Nakata, O. ; Sawada, T. Anal. Chem. 1990, 62, 674-677.
- 2) Takamoto, R. ; Namba, R. ; Matsuoka, M. ; Sawada, T. Anal. Chem. 1992, 64, 2661-2663.
- 3) Takamoto, R. ; Yamamoto, S. ; Namba, R. ; Takamatsu, T. ; Matsuoka, M. ; Sawada, T. Anal. Chem. 1994, ( in press ).
- 4) Steven, D. C. ; Sinclair, S. Y. ; Martin, A. A. IEEE Transactions on Biomedical Engineering 1976, BME-26 ( 4 ), 220-227.

# 神経ペプチドによる皮膚炎症反応の成立機序とその特異的制御

千葉大学医学部

岩本逸夫

Substance P(SP), a potent proinflammatory peptide which is present in sensory neurons, causes granulocyte (neutrophil and eosinophil) infiltration in mouse skin by inducing mast cell degranulation. Therefore, we determined which mediator from cutaneous mast cells mediates SP-induced granulocyte infiltration in the skin by the use of mediator antagonists. Subcutaneous injection of SP ( $10^{-7}$ – $10^{-5}$ M) caused granulocyte infiltration in the skin of BALB/c mice in a time- and concentration-dependent fashion. Pretreatment with the LTB<sub>4</sub> antagonist decreased SP-induced neutrophil and eosinophil infiltration in mouse skin at 6h to the same extent that an inhibitor of mast cell degranulation disodium cromoglycate decrease those responses. However, pretreatment with the PAF antagonist affected neither SP-induced neutrophil nor eosinophil infiltration at 6h. A LTC<sub>4</sub>/D<sub>4</sub> antagonist and a histamine H<sub>1</sub> antagonist chlorpheniramine had no effect on the granulocyte infiltration, either. The LTB<sub>4</sub> antagonist also decreased SP-induced neutrophil, but not eosinophil, infiltration in mouse skin at 24h. Second, we determined whether SP increases the expression of an adhesion molecule ICAM-1 on human vascular endothelial cells. The amount of ICAM-1 on human umbilical vein-derived endothelial cells (HUVEC) was measured by a cell ELISA assay using an anti-ICAM-1 monoclonal antibody. SP ( $10^{-8}$ M) increased ICAM-1 expression on HUVEC in a time-dependent fashion, reaching a maximum at 16h. The amount of ICAM-1 on HUVEC was increased by 2.2-fold in the presence of SP ( $10^{-8}$ M), the potency of which was the same as that of IL-1 $\beta$  (10ng/ml). The C-terminal peptide SP<sub>6-11</sub> also increased ICAM-1 expression on HUVEC, whereas the N-terminal peptide SP<sub>1-5</sub> was inactive. Cycloheximide (0.5mM) inhibited the increase in SP-induced ICAM-1 expression, indicating that SP induces the synthesis of ICAM-1 molecule. In addition, HUVEC were found to have high affinity SP binding sites (Kd=0.69nM, Bmax=1.6  $\times 10^4$  sites/cell). We conclude that LTB<sub>4</sub> is a major mast cell-derived chemotactic mediator for initiating SP-induced neutrophil and eosinophil infiltration in mouse skin and that SP increases the expression of ICAM-1 on human vascular endothelial cells.

## 1. 緒言

各種炎症性皮膚疾患の成立には免疫学的機作の関与が示されている。最近神経ペプチドが免疫反応の増幅・調節および炎症反応の惹起に深く関与していることが明らかにされてきた。とくにサブ

スタンスPをはじめとする感覚神経ペプチドは強い炎症惹起作用を有し、種々の物理的あるいは化学的刺激により神経終末から遊離すると、皮膚の血管透過性亢進および顆粒球浸潤を惹起する。したがって、神経性炎症の成立機序およびその特異的制御機構を明らかにすることは、各種炎症性皮膚疾患の成因と治療の解明に重要と考えられる。すなわち、本研究の目的は、

- 1) 神経ペプチドによるマウス皮膚炎症反応とくに顆粒球浸潤の機序を明らかにする。とくに、顆粒球遊走に関与する肥満細胞由来のケミカルメディエーターの同定と血管内皮細胞活性化の関与の有無を明らかにする。

Role of neuropeptides in neurogenic inflammation and its regulation



Itsuo Iwamoto

School of Medicine  
Chiba University

2) 神経ペプチドによる血管内皮細胞活性化の機序を明らかにする。とくに、神経ペプチドが血管内皮細胞上の接着分子の発現に関与しているか否かを明らかにする。また神経ペプチドの血管内皮細胞に対する増殖作用の有無を検討する。以上から皮膚における神経ペプチドによる炎症反応の機序およびその制御機構を明らかにする。

## 2. 実験

### 2.1 マウス皮膚における神経性炎症モデルの解析

2.1.1 神経ペプチドによる顆粒球浸潤の機序  
皮膚における神経性炎症の実験モデルとして、マウス皮膚のサブスタンスP (SP) による顆粒球浸潤をLawmanらの方法を用い解析した<sup>1)</sup>。すなわち、まずBALB/Cマウス左側腹部に0.9 mlのairを皮下注してair blebを作製し、SP ( $10^{-5}$ M) 0.1 mlを皮下注した。対照としてはPBS 0.1 mlを皮下注した。6あるいは24時間後にマウスを致死させ、air blebの部分を切り出してスライドグラスの上に標本作製し、Wright-Giemsa染色を行った。400倍にて鏡検し、任意の5視野の好中球および好酸球の総数を求めた。SPによる顆粒球浸潤における皮膚肥満細胞および血管内皮細胞の役割を明らかにするため、SPのN末端ペプチドとC末端ペプチドを用い顆粒球浸潤、肥満細胞脱顆粒および血管透過性亢進を検討した。

#### 2.1.2 各種メディエーター拮抗剤の効果

SPによるマウス皮膚顆粒球浸潤が肥満細胞依存性か否かを調べるため、肥満細胞脱顆粒抑制薬disodium cromoglycate (DSCG)<sup>2)</sup>の効果を検討した。すなわち、DSCG ( $100\mu\text{g}/\text{ml}$ ) あるいはPBSをSP ( $10^{-5}$ M) とともにマウスに皮下投与し(総量0.1 ml) 6時間後および24時間後の皮膚顆粒球浸潤を調べた。

SPによるマウス皮膚顆粒球浸潤の惹起に $\text{LTB}_4$ が関与しているか否かを調べるため、 $\text{LTB}_4$ 特異

的拮抗剤ONO-4057<sup>3)</sup>の効果を検討した。

ONO-4057 ( $20\mu\text{g}/\text{g}$ ) はSP ( $10^{-5}$ M) 皮下投与30分前にマウス腹腔内に前投与し、SP皮下投与6時間後の顆粒球浸潤を調べた。またONO-4057 ( $20\mu\text{g}/\text{g}$ ) をSP皮下投与30分前および12時間後の2回腹腔内投与し、SP皮下投与24時間後の顆粒球浸潤を調べた。

### 2.2 皮膚神経性炎症における血管内皮細胞活性化の役割

SPによる血管内皮細胞活性化の機序をヒト培養内皮細胞を用い検討した。

- 1) 血管内皮細胞上のSP受容体の性状およびサブタイプを3H-SPによる結合実験により検討した。
- 2) SPがICAM-1をはじめとする血管内皮細胞上の接着分子の発現を誘導するか否かをモノクローナル抗体を用いた免疫細胞学的方法により検討した。
- 3) SPが血管内皮細胞の増殖因子であるか否かを3H-TdRの取り込みにより検討した。

## 3. 結果

### 3.1 サブスタンスPによるマウス皮膚顆粒球浸潤の機序

SP ( $10^{-8}$ – $10^{-5}$ M) 皮下投与は $10^{-7}$ Mより用量依存性に好中球および好酸球浸潤を惹起した。(好中球;  $7.2 \pm 2.6$  vs  $37.3 \pm 5.0/5$ 視野、PBS vs SP $10^{-7}$ M、平均 $\pm$ SD. 好酸球;  $4.1 \pm 2.0$  vs  $10.4 \pm 2.4/5$ 視野、PBS vs SP  $10^{-7}$ M、 $P < 0.005$ 、 $n=$ 各5匹)。その際SP  $10^{-7}$ Mより用量依存性の肥満細胞の脱顆粒が認められた (Fig. 1)。

次にマウス皮膚における顆粒球浸潤がSPのN末端ペプチドまたはC末端ペプチドのどちらによって惹起されているか調べるため、N末端ペプチド $\text{SP}_{1-4}$ と $\text{SP}_{1-9}$ およびC末端ペプチド $\text{SP}_{4-11}$ と $\text{SP}_{6-11}$ 各々を皮下投与して顆粒球浸潤

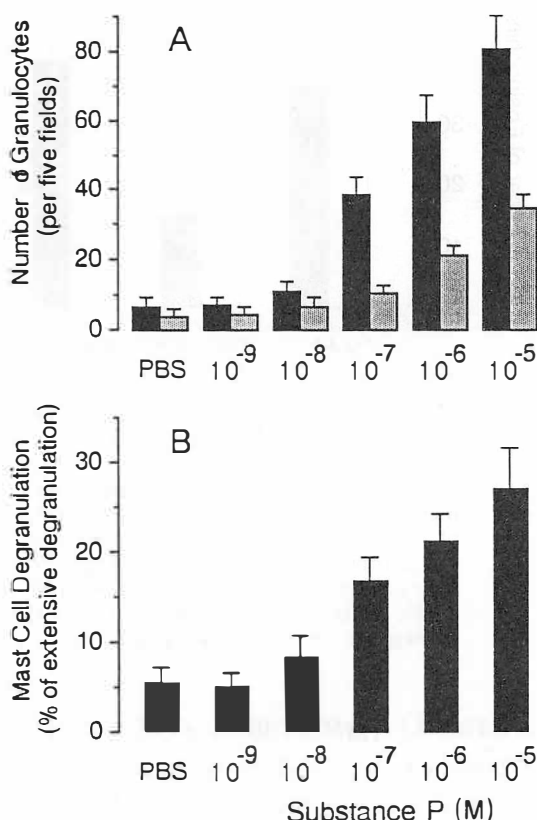


Fig. 1. Concentration-dependent substance P-induced granulocyte infiltration (A) and mast cell degranulation (B) in mouse skin.

The granulocyte infiltration (neutrophils; solid columns and eosinophils; stippled columns) and mast cell degranulation were examined at 6h after the subcutaneous injections of substance P ( $10^{-9}$ – $10^{-5}$  M). Data are means  $\pm$  SD for 5 to 8 mice at each concentration.

の有無を検討した。N末端ペプチドSP<sub>1-4</sub> ( $10^{-6}$ – $10^{-4}$  M) は $10^{-4}$  Mまでで有意な顆粒球浸潤を惹起しなかった (n=5)。しかしSP<sub>1-9</sub> ( $10^{-6}$ – $10^{-4}$  M) は $10^{-5}$  Mより有意な好中球浸潤を惹起した (6.9  $\pm$  3.3 vs 26.0  $\pm$  3.5と38.3  $\pm$  3.3/5視野、PBS vs SP<sub>1-9</sub>  $10^{-5}$  Mと $10^{-4}$  M、P < 0.001、n = 5)。SP<sub>1-9</sub> は $10^{-5}$  Mより好酸球浸潤も惹起した (3.1  $\pm$  1.5 vs 9.0  $\pm$  1.9と14.0  $\pm$  2.3/5視野、PBS vs SP<sub>1-9</sub>  $10^{-5}$  Mと $10^{-4}$  M、P < 0.005、n = 5)。C末端ペプチドSP<sub>4-11</sub> ( $10^{-6}$ – $10^{-4}$  M)

とSP<sub>6-11</sub> ( $10^{-6}$ – $10^{-4}$  M) はいずれも $10^{-4}$  Mまで有意な顆粒球浸潤を引き起こさなかった (n=5)。肥満細胞脱顆粒惹起物質である compound 48/80 (0.5–50  $\mu$ g/ml) の皮下投与は用量依存性に好中球および好酸球浸潤を惹起した (n=5)。

SPフラグメント皮下投与によるマウス皮膚肥満細胞の脱顆粒を比較検討すると、N末端ペプチドのSP<sub>1-4</sub>は有意の肥満細胞脱顆粒を引き起こさなかったが、SP<sub>1-9</sub> ( $10^{-5}$ – $10^{-4}$  M) は用量依存性に肥満細胞脱顆粒を引き起こした。しかし、C末端ペプチドSP<sub>4-11</sub>とSP<sub>6-11</sub> いずれも有意の肥満細胞脱顆粒を惹起しなかった。Compound 48/80 (0.5–50  $\mu$ g/ml) は用量依存性に肥満細胞脱顆粒を惹起した。

LTB<sub>4</sub>拮抗剤ONO-4057はSP皮下投与6時間後のマウス皮膚好中球および好酸球浸潤を抑制した。まず肥満細胞脱顆粒抑制薬DSCG (10  $\mu$ g) 投与はSP ( $10^{-5}$  M) 皮下投与6時間後の好中球浸潤を85.7%抑制した (74.8  $\pm$  7.7 vs 16.1  $\pm$  3.5個/5視野、SP vs SP + DSCG、P < 0.001、n=6匹) (Tab.1)。ONO-4057前投与 (20  $\mu$ g/g) はSP ( $10^{-5}$  M) 皮下投与6時間後の好中球浸潤を74.1%抑制した (75.4  $\pm$  7.3 vs 24.6  $\pm$  3.6個/5視野、SP vs SP + ONO-4057、P < 0.001、n=6) (Fig.2)。

同様にDSCG (10  $\mu$ g) 投与はSP ( $10^{-5}$  M) 皮下投与による6時間後のマウス皮膚好酸球

Table 1 Effect of Disodium Cromoglycate on Substance P-induced Granulocyte Infiltration in Mouse Skin

Subcutaneous Injections	Number of Granulocytes (per five fields) <sup>a</sup>	
	Neutrophils	Eosinophils
PBS	6.3 $\pm$ 2.8	4.4 $\pm$ 1.8
Substance P	74.8 $\pm$ 7.7	41.3 $\pm$ 4.5
Substance P + DSCG	16.1 $\pm$ 3.5*	13.6 $\pm$ 1.8*

<sup>a</sup> The number of granulocytes infiltrating into the skin of BALE/c mice was counted at a magnification of x400 at 6 h after the subcutaneous injections of substance P ( $10^{-5}$  M) in the absence or presence of disodium cromoglycate (DSCG; 100  $\mu$ g/ml).

Data are mean  $\pm$  SD for six mice.

\* significantly different from the corresponding mean value of substance P alone, p<0.001.

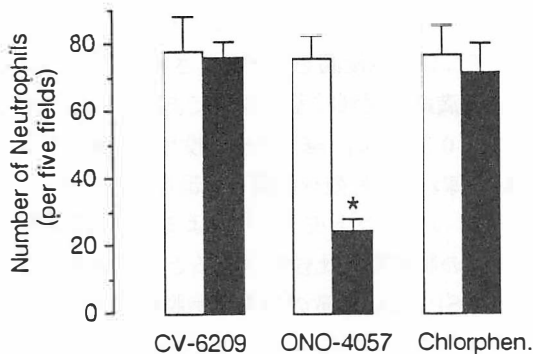


Fig.2. Effect of mediator antagonists on substance P-induced neutrophil infiltration in mouse skin.

Mice were preinjected intraperitoneally with a mediator antagonist (solid columns) or its vehicle (open columns), and the neutrophil infiltration was examined at 6h after the subcutaneous injection of substance P ( $10^{-5}$  M). CV-6209; a PAF antagonist, ONO-4057; a  $LTB_4$  antagonist, and Chlorphen.; a histamine  $H_1$  antagonist. Data are means  $\pm$  SD for 5 to 6 mice. \* significantly different from the mean value of the corresponding vehicle, \* $p < 0.001$ .

浸潤を75.1%抑制した ( $41.3 \pm 4.5$  vs  $13.6 \pm 1.8$  個/5視野、SP vs SP + DSCG、 $P < 0.001$ 、 $n = 6$ ) (Tab.1)。ONO-4057前投与 ( $20 \mu\text{g/g}$ ) は同好酸球浸潤を71.3%抑制した ( $4.1 \pm 4.6$  vs  $15.1 \pm 2.1$  個/5視野、SP vs SP + ONO-4057、 $P < 0.001$ 、 $n = 6$ ) (Fig.3)。

さらにDSCG ( $10 \mu\text{g}$ ) とONO-4057 ( $20 \mu\text{g/g}$ 、2回) はSP ( $10^{-5}$  M) 皮下投与24時間後の好中球浸潤を各々40.1%と34.4%抑制した ( $P < 0.001$  と  $P < 0.002$ 、 $n = 4$ ) (Fig.4)。DSCG ( $10 \mu\text{g}$ ) は同好酸球浸潤を34.4%抑制したが、( $P < 0.001$ 、 $n = 4$ )、ONO-4057 ( $20 \mu\text{g/g}$ 、2回) は有意には抑制しなかった (Fig.4)。

### 3.2 サブスタンスPによる血管内皮細胞の接着分子の発現と増殖

次にSPが血管内皮細胞上の接着分子の発現を調節しているか否かをヒト培養血管内皮細胞を用いて検討した。すなわち顆粒球が組織へ浸潤する

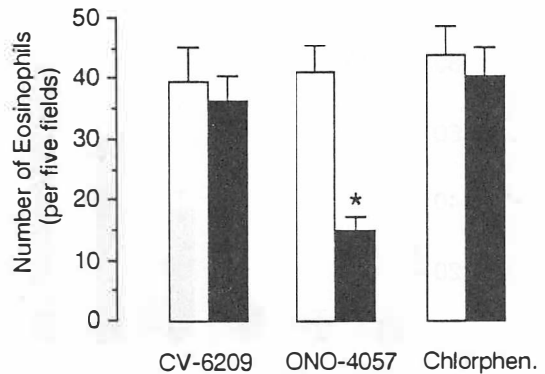


Fig.3. Effect of mediator antagonists on substance P-induced eosinophil infiltration in mouse skin.

The eosinophil infiltration was examined at 6h after the subcutaneous injection of substance P. Experimental protocols and symbols are the same as in Fig.3. Data are means  $\pm$  SD for 5 to 6 mice. \* significantly different from the mean value of the corresponding vehicle, \* $p < 0.001$ .

には好中球と好酸球上の接着分子とそれに対応する血管内皮細胞上の接着分子間の特異的結合を介しており、好中球浸潤ではICAM-1/LFA-1・Mac-1が、好酸球浸潤ではそれに加えてVCAM/VLA-4が重要と考えられる。

そこでSPによるヒト培養血管内皮細胞 (HUVEC) 上のICAM-1の発現を新しく開発

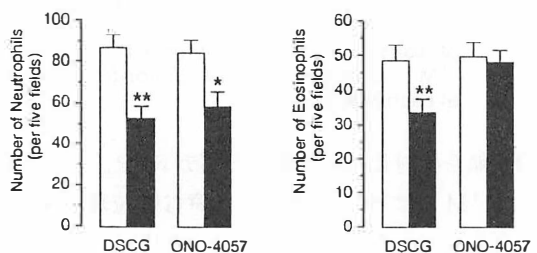


Fig.4. Effect of disodium cromoglycate and of a  $LTB_4$  antagonist ONO-4057 on substance P-induced granulocyte infiltration in mouse skin at 24h.

The granulocyte infiltration was examined at 24h after the subcutaneous injection of substance P ( $10^{-5}$  M). Data are means  $\pm$  SD for 4 mice. \*\* significantly different from the mean value of the corresponding vehicle, \* $p < 0.002$ , \*\* $p < 0.001$ .

した抗ICAM-1モノクローナル抗体を用いた cell ELISA 法にて行った (Fig.5)。まず HUVEC 上の ICAM-1 は無刺激でも中等度発現していた。SP 添加後の HUVEC 上の ICAM-1 量を経時的に調べると、4 時間後より増加し 16 時間で降はばプラトーとなった (Fig.6)<sup>5)</sup>。また SP  $10^{-9}$  M の低濃度から ICAM-1 発現を増加させ、SP  $10^{-8}$  -  $10^{-7}$  M で最大となった (Fig.7)<sup>5)</sup>。さらに SP の C 末端ペプチドと N 末端ペプチドで ICAM-1 発現への効果を検討すると、C 末端ペプチドに活性があり N 末端ペプチドは効果がなかった<sup>5)</sup>。またこの SP による HUVEC 上の ICAM-1 発現増加が新たな蛋白合成によるものか否かを検討したところ、この ICAM-1 の発現増加はシクロヘキシミドにより完全に抑制された<sup>5)</sup>。以上から SP は血管内皮細胞を直接刺激し、ICAM-1 合成を増加させることを示している。しかし SP は HUVEC 上の VCAM-1 の発現は誘導しなかった。

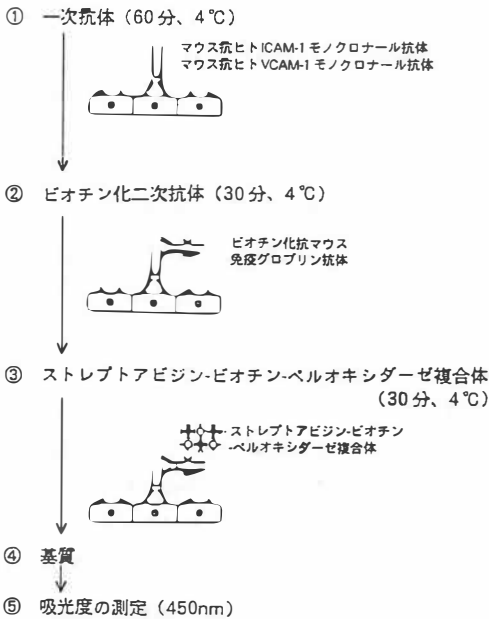


Fig.5. Measurement of ICAM-1 on human umbilical vein-derived endothelial cells (HUVEC) by a cell ELISA assay using an anti-ICAM-1 monoclonal antibody

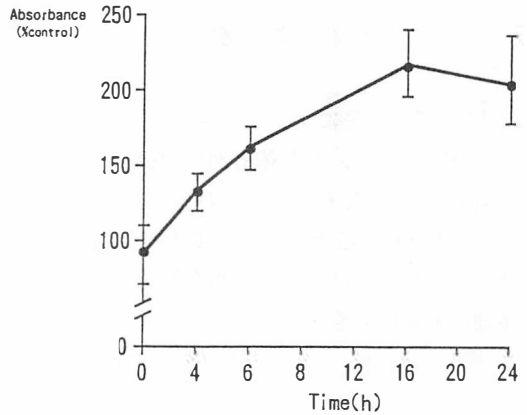


Fig.6. Time course of substance P-induced ICAM-1 expression on HUVEC. HUVEC were stimulated with SP ( $10^{-8}$  M) at  $37^{\circ}\text{C}$  for 4 to 24h. The amount of ICAM-1 on HUVEC was measured by a cell ELISA and was expressed as % of the absorbance in unstimulated HUVEC.

さらに 3H-SP を使った結合実験から HUVEC 上には NK-1 型の高親和性 SP 受容体が存在することが判明した ( $K_d=0.69\text{nM}$ 、 $B_{\text{max}}=1.6 \times 10^4/\text{細胞}$ )。また SP ( $10^{-9}$  -  $10^{-6}$  M) を添加して HUVEC を培養すると、非添加群に比し 2 ~ 2.5 倍細胞数が増加した。

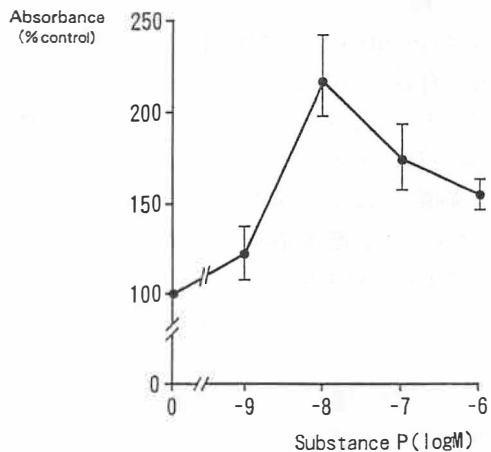


Fig.7. Dose-response curve of substance P-induced ICAM-1 expression on HUVEC. HUVEC were stimulated with SP ( $10^{-9}$  -  $10^{-5}$  M) at  $37^{\circ}\text{C}$  for 16h.

#### 4. 考 案

今回の研究でSPによるマウス皮膚顆粒球浸潤はそのN末端ペプチド依存性に惹起されると考えられた。すなわち、SPのN末端ペプチドSP<sub>1-9</sub>のBALB/Cマウスへの皮下投与は用量依存性に好中球および好酸球浸潤を惹起し、同時に肥満細胞脱顆粒も惹起した。しかし、C末端ペプチドSP<sub>4-11</sub>とSP<sub>6-11</sub>の皮下投与は有意な顆粒球浸潤を惹起せず、また肥満細胞脱顆粒も認められなかった。

SP皮下投与によるマウス皮膚顆粒球浸潤は、肥満細胞欠損マウスでは有意の顆粒球浸潤が起こらないことから、肥満細胞依存性であることが示されている<sup>6,7)</sup>。今回の結果であるN末端ペプチドSP<sub>1-9</sub>がマウス皮膚の顆粒球浸潤と肥満細胞脱顆粒を引き起こすことは、*in vitro*の実験系でN末端ペプチドがラットなどの肥満細胞の脱顆粒を惹起すること<sup>8,9)</sup>と一致する。またC末端ペプチドSP<sub>4-11</sub>とSP<sub>6-11</sub>が有意な顆粒球浸潤を惹起しなかったことは、これらが*in vitro*で肥満細胞脱顆粒を引き起こさないこと<sup>8,9)</sup>と一致する。なお、同じSPのN末端ペプチドでもSP<sub>1-4</sub>が顆粒球浸潤を惹起しなかったことはSP<sub>1-4</sub>が*in vitro*で肥満細胞脱顆粒惹起作用をほとんど有さないこと<sup>8)</sup>と矛盾しない。今回N末端ペプチドとしてSP<sub>1-9</sub>を用いた主な理由は、C末端の2個のアミノ酸を欠くことによりSPの作用を発揮するのに必要なNK-1受容体との結合能力がないことと肥満細胞との反応性を有していることによる。C末端ペプチドとしてSP<sub>6-11</sub>を用いたのは、NK-1受容体を刺激しうる最小のC末端ペプチドであることによる。

SPによる顆粒球浸潤を同じ程度の肥満細胞脱顆粒を惹起する濃度で比較した場合、SPはSP<sub>1-9</sub>あるいはcompound 48/80に比し、より強く顆粒球浸潤を惹起した。SPがより強く顆粒球浸潤を惹起する機序として、SPそのものはC末

端ペプチドおよびN末端ペプチド両者の活性を有しているので、N末端ペプチドにより肥満細胞の脱顆粒が惹起されると同時にC末端ペプチドがその他の細胞に効果を発揮して顆粒球浸潤を増強している可能性が考えられる。その可能性の1つとして、SPがそのC末端ペプチドを介して直接血管内皮細胞に作用し、血管透過性亢進などを惹起することが考えられる<sup>10)</sup>。それによりSPの場合は血管透過性亢進により肥満細胞からの走化性メディエーターの作用増強や血管内皮細胞上の接着分子の発現増強などを介して、顆粒球浸潤が増強される可能性がある。事実SPは培養ヒト血管内皮細胞上のICAM-1の発現を増加させる。これに対しSP<sub>1-9</sub>とcompound 48/80は血管内皮細胞に対する作用はなく血管透過性亢進作用を有さない。

本研究により、LTB<sub>4</sub>がSPによるマウス皮膚好中球および好酸球浸潤の主要な肥満細胞由来走化性メディエーターであると考えられる。すなわち、LTB<sub>4</sub>拮抗剤ONO-4057<sup>3)</sup>前投与によりSP皮下投与6時間後の好中球と好酸球浸潤は抑制され、その抑制の程度はDSCGのそれと同程度であった。さらにONO-4057はSP皮下投与24時間後の好中球浸潤をDSCGによるそれと同程度抑制した。しかしONO-4057はSP皮下投与24時間後の好酸球浸潤は有意には抑制しなかった。

LTB<sub>4</sub>は好中球と好酸球に対する強力な走化性メディエーターである<sup>11-13)</sup>。しかしごく最近までLTB<sub>4</sub>特異的拮抗剤がなかったため、*in vivo*の実際の炎症反応におけるLTB<sub>4</sub>の役割は解析できなかった。今回我々は新しく開発されたLTB<sub>4</sub>拮抗剤ONO-4057<sup>3)</sup>を用い、肥満細胞由来のLTB<sub>4</sub>がSPによるマウス皮膚顆粒球浸潤に関与していることを示した。本拮抗剤は〔<sup>3</sup>H〕LTB<sub>4</sub>の各種動物好中球に対する結合を競合的に疎外し、その特異性もleukotriene C<sub>4</sub>とD<sub>4</sub>、種々prostaglandins、血小板活性化因子などとの交叉性がないことが示されている<sup>3)</sup>。

最後に本研究により、皮膚における神経ペプチ

ドによる炎症反応の成立機序の一端が解明された。この研究成果は皮膚炎症反応の抑制と修復の秩序ある促進に有用な知見と考えられ、コスメトロジーの分野に貢献すると考えられる。すなわち、化粧品を含め種々外来異物は皮膚感覚神経を直接的あるいはアレルギー反応を介して間接的に刺激して、神経ペプチドを遊離させる。遊離した神経ペプチドは、皮膚肥満細胞、顆粒球、血管内皮細胞など多くの細胞を活性化し炎症反応を惹起させると考えられる。まず第一に、コスメトロジーの原因的治療の観点からすると、化粧品の開発は感覚神経のサブスタンスPなどの神経ペプチドを遊離させないことが大切で、化粧品の安全性の指標として考慮されるべきであろう。次に、遊離した神経ペプチドによる炎症反応の特異的抑制にはSP拮抗剤をはじめとする神経ペプチドの特異的拮抗剤の皮膚局所投与で有効性が期待できる。さらにLTB<sub>4</sub>拮抗剤やICAM-1拮抗剤が有効であることが示唆される。

以上から、本研究の成果は化粧品による直接的あるいはアレルギー反応を介した間接的な皮膚神経性炎症に対する効果的な治療法の理論的根拠を与えると考えられる。

## REFERENCES

- 1) Lawman, M.J.P., Boyle, M.D.P., Gee, A.P. and Young, M.: A rapid technique for measuring leukocyte chemotaxis in vivo. *J. Immunol. Methods* 69:197-206, 1984.
- 2) Garland, L.G.: Effect of cromoglycate on anaphylactic histamine release from rat peritoneal mast cells. *Br. J. Pharmacol.* 49:128-130, 1973.
- 3) Kishikawa, K., Matsunaga, N., Maruyama, T., Seo, R., Toda, M., Miyamoto, T. and Kawasaki, A.: ONO-LB-457: A novel and orally active leukotriene B<sub>4</sub> receptor antagonist. *Adv. Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Res.* 21:407-410, 1990.
- 4) Iwamoto, I., Tomoe, S., Tomioka, H. and Yoshida, S.: Leukotriene B<sub>4</sub> mediates substance P-induced granulocyte infiltration in mouse skin. Comparison with antigen-induced granulocyte infiltration. *J. Immunol.* 151:2116-2123, 1993.
- 5) Nakagawa, N., Iwamoto, I., and Yoshida, S.: Effect of substance P on the expression of an adhesion molecule ICAM-1 in human vascular endothelial cells. *Regul. Peptide* 46:223-225, 1993.
- 6) Matsuda, H., Kawakita, K., Kiso, Y., Nakano, T. and Kitamura, Y.: Substance P induces granulocyte infiltration through degranulation of mast cells. *J. Immunol.* 142:927-931, 1989.
- 7) Yano, H., Wershil, B.K., Arizono, N. and Galli, S.J.: Substance P-induced augmentation of cutaneous vascular permeability and granulocyte infiltration in mice is mast cell dependent. *J. Clin. Invest.* 84:1276-1286, 1989.
- 8) Fewtrell, C.M.S., Foreman, J.C., Jordan, C.C., Oehme, P., Renner, H. and Stewart, J.M.: The effects of substance P on histamine and 5-hydroxytryptamine release in the rat. *J. Physiol.* 330:393-411, 1982.
- 9) Lowman, M.A., Benyon, R.C. and Church, M.K.: Characterization of neuropeptide-induced histamine released from human dispersed skin mast cells. *Br. J. Pharmacol.* 95:121-130, 1988.
- 10) Iwamoto, I. and Nadel, J.A.: Tachykinin receptor subtype that mediates the increase in vascular permeability in guinea pig skin. *Life Sci.* 44:1089-1095, 1989.
- 11) Palmblad, J., Malmsten, C.L., Uden, A., Radmark, O., Engstedt, L. and Samuelsson, B.: Leukotriene B<sub>4</sub> is a potent and stereo-

- specific stimulator of neutrophil chemotaxis and adherence. *Blood* 58 : 658-662, 1981.
- 12) Nagy, L., Lee, T.H., Goetzl, E.J., Pickett, W. C. and Kay, A.B.: Complement receptor enhancement and chemotaxis of human neutrophils and eosinophils by leukotrienes and other lipoxygenase products. *Clin. Exp. Immunol.* 47 : 541-547, 1982.
- 13) Soter, N.A., Lewis, R.A., Corey, E.J. and Austen, K.F.: Local effects of synthetic leukotrienes (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub> and LTB<sub>4</sub>) in human skin. *J. Invest. Dermatol.* 80 : 115-119, 1983.

# 皮膚の機能と脂質代謝に関する基礎的研究

新潟大学医学部

小野輝夫

A novel skin-type fatty acid-binding protein, termed cutaneous(C)-FABP was purified to homogeneity from rat skin cytosol by DEAE-cellulose chromatography, followed by chromatography on Mono S and Superdex 75 gel filtration. Although the partial amino acid sequence of C-FABP was homologous to those of known rat FABP family, especially heart FABP, C-FABP was distinct from them with respect to the immunological properties and an apparent molecular mass.

## 1. 緒言

一般に各種動物組織のサイトゾールにはその細胞種に特異的な分子量約15kDaの低分子で、脂肪酸を特異的にリガンドにする脂肪酸結合蛋白(FABP)のスーパーファミリー蛋白が発現されている。これらのFABPは細胞の機能発現、脂肪酸転送、代謝上重要な働きを演じていると考えられるが、これまで肝臓、心臓、骨格筋、脂肪細胞、腸組織、ミエリン鞘などから一次構造の異なる肝型、心筋型、脂肪細胞型、腸型、シュワン細胞型が同定されている<sup>1,2)</sup>。この蛋白ファミリーは脂肪酸の他細胞内に見出される低分子のレチノール、レチノール酸結合蛋白をも包含するミエリンP<sub>2</sub>蛋白スーパーファミリーと呼ばれている。この他にもリガンドを既知の脂肪酸やレチノールなどと同定出来ないが、明らかにこのファミリーに属するI-15P蛋白も我々の研究室で見出され報告されているが<sup>3)</sup>、皮膚組織でのFABPに関する報告はこれまで少なく一次構造は不明である。

最近Razaら<sup>4)</sup>はネズミ皮膚のエピデルマルサイトゾールに分子量14~15kDaのFABPが存在することを示唆している他、Schurerら<sup>5)</sup>はヒトの培養ケラチノサイトで66kDaおよび38kDaの高分子FABPの存在を示唆したほかMadsen<sup>6)</sup>も乾癬と関連したFABP様蛋白が活発に増殖している乾癬真皮で高度に発現されていることを報告しているが、FABPファミリーとの関係は明確でない。我々は皮膚組織を構成する各種細胞が活発なターンオーバーを行っていることから、脂肪酸も活発に代謝されていると推定し、FABP分子種の検索をネズミ皮膚について行った。

## 2. 実験

### 2.1 ネズミ皮膚サイトゾールの調製

体重300gスプラグ・ダウリーネズミ(6匹)の背部皮膚5cm平方を電気カミソリで剃毛後切り出し、出来るだけ皮下脂肪組織を除いた後、水冷生理的食塩水に浸し細片して30mMトリス塩酸緩衝液pH7.3(5mMEDTA、2mMPMSF、1mMDTTを含む)内でポリトロンホモゲナイザーを用いてホモゲナイズした。得られたホモゲネートは30分10000×gで遠心後さらに125000×gで90分超遠心してサイトゾールを調製した。

Basic Studies on lipid metabolism of skin: Identification of Fatty Acid-Binding Protein



Teruo Ono

School of Medicine  
Niigata University

## 2.2 C-FABPとH-FABPの純化

ネズミ皮膚サイトゾールを30mM トリス塩酸緩衝液 pH8.0(5mM EDTA、2mM PMSF、1mM DTTを含む)で透析後、上記緩衝液であらかじめ平衡化したDE-52(2.5cm × 15cm)の陰イオン交換樹脂カラムに適応した。50mM 2-メルフォリンエタン硫酸緩衝液 pH5.5で溶出させた時の非吸着画分を集めて透析後、同じ緩衝液であらかじめ平衡化させたベツトボリュウム1mlのMono Sカラムにかけ、同じ緩衝液で洗浄後、各緩衝液60mlを用い0~0.5M NaClのリニアグラジエントで溶出した。180~190mM NaClに相当する画分をプールし50mM 磷酸カリウム緩衝液 pH7.0であらかじめ平衡化したHiload 26/60スーパーデックス75カラム(2.6cm × 62cm)に適応した。C-FABPはSDS PAGE上単一な分子量約15kDaの蛋白として精製された。心筋型のH-FABPは既に報告した方法でネズミ心筋より精製した<sup>7)</sup>。

## 2.3 アミノ酸配列の決定

精製したC-FABPをリジルエンドペプチダーゼ(*Achromacter lyticus*)で酵素/基質蛋白比1:20(重量比)で80mM トリス塩酸緩衝液 pH8.5中で25°C 8時間消化を行った。得られたリジルエンドペプチダーゼペプチドは高速液体クロマトのC<sub>8</sub> Capcell packカラム(0.46 × 15cm)で分画した。容量で0.1% TFA中にアセトニトリルのリニアグラジエントで溶出させた。ペプチドの溶出は214nmの吸光度で追跡した。アミノ酸配列の分析は120A フェニルヒダントイン分析計を備えたアプライドバイオシステムの470A ガス相配列分析装置で行った。

## 2.4 脂肪酸結合能の測定

Lipidex 1000および[1-<sup>14</sup>C]ステアリン酸はシグマおよびアマーシャムから購入した。FABP蛋白からの脱脂およびC-FABPとH-FABPに対する脂肪酸の結合は教室の人見の方

法<sup>8)</sup>により測定した。先ずエタノールに溶解した放射性脂肪酸とC-FABPあるいはH-FABPを10mM 磷酸カリウム緩衝液 pH7.4で37°C 1時間培養した。培養の最終容量は500μlで各構成成分の最終濃度はC-FABPあるいはH-FABPは0.3μM、エタノールは容量比で1%、脂肪酸0.2~20μM(比活性12000dpm/nmol)を用いた。10分間水冷後反応混液に水冷50% Lipidex 懸濁液75μlを添加し4°C 10分間培養した。Lipidexは15000 × g 5分遠心で除き上清の200μlを液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 分子的性状

ネズミ皮膚より調製した各精製段階でのC-FABP標品のトリシンSDS PAGEパターンを図1に示した。ネズミ皮膚のサイトゾール試料に混在した血清アルブミンは陰イオン交換樹脂に吸着して除かれたが、C-FABPは非吸着画分として回収され、陽イオン交換樹脂に吸着することからC-FABPの等電点は塩基性かそれに近い値を持つと推定された。純化したC-FABPのSDS PAGE上の移動度は純化したH-FABPよりもやや遅かった。6匹のネズミ皮膚(各5cm × 5cm)より1.0~1.2mgのC-FABPを得たがこれは総サイトゾール蛋白の約1%に相当した。従ってC-FABPは他のFABP分子種と同様に正常なネズミ皮膚サイトゾール中に豊富に存在する蛋白の一つといえよう。

### 3.2 部分一次構造

精製したC-FABPは既知の一次構造を異にするFABP分子種である、H-FBAP、L-FABP、I-FABP、aP<sub>2</sub>、I-15Pに対するポリクロナル抗体を用いたウエスタンブロット分析で全く検出されず、免疫学的に明らかに識別され、新しいファミリー蛋白である可能性が示唆された。他のネズミFABP分子種と一次構造を比

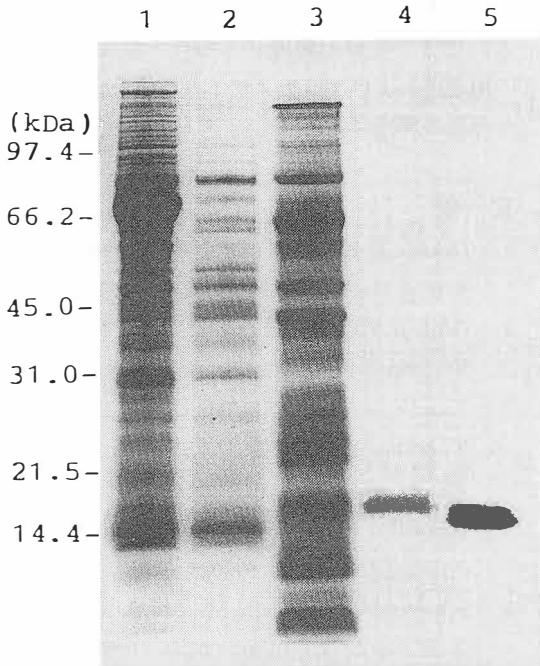


Fig.1 Tricine/SDS/PAGE of rat cutaneous FABP at various stages of purification. The gel was stained with Coomassie brilliant blue. Lane 1, rat skin high speed supernatant (25 $\mu$ g of protein); lane 2, DE 52 flow through (10 $\mu$ g of protein); lane 3, Mono S fraction (18 $\mu$ g of protein); lane 4, purified cutaneous FABP (0.6 $\mu$ g of protein); lane 5, purified heart FABP (2 $\mu$ g of protein).

較するためにC-FABPの部分アミノ酸配列を決定した。C-FABPのリジルエンドペプチダーゼ消化とそのペプチドを高速液体クロマトグラフィーで分画して得られたペプチドマップの主要な5つのピークについてアミノ酸配列を決定した。図2にはネズミC-FABPの決定した部分アミノ酸配列の分析結果を示す。リジルエンドペプチダーゼ処理C-FABPから遊離された5つのペプチドの配列分析は、完全配列の約45%を含むと推定された。C-FABPのN端は他のFABP分子種同様おそらくアセチル化によりブロックされていると推定され決定出来なかったが、C-FABPのN端近傍の配列は他のFABP分子種と極めて高い相同性を示した。一方C-FABPのC

	1	19 21	29 31	38
L-FABP	MNFSGKYOVOSOENFEPFM	AMGI.PFDLI	KGKDIRGV	
I-FABP	MAFDGTWKVYRNENYEKFM	KMGINVVKR	LGAIHDNLK	
H-FABP	ADAFVGTWKLVDSKNFDDYM	SLGVGFATR	VASMTKPT	
C-FABP	<b>WRLVESHGFEDYM</b>	<b>ELCVGLALR</b>	<b>MGAMAKPD</b>	
	67	79 109	127	
L-FABP	EECELE <sup>T</sup> MTGEKV	I <sup>T</sup> NTMTLGDIVYKRVSKRI		
I-FABP	VDFAYSLADGTEL	L <sup>I</sup> QTYTYEGVFAKRI <sup>F</sup> FKKE		
H-FABP	VEFDEV <sup>T</sup> ADDRKV	L <sup>I</sup> LTLTHGNVSTR <sup>T</sup> YEKEA		
C-FABP	TE <sup>X</sup> FX <sup>T</sup> FLDGLAV	DV <sup>V</sup> EXVMNNAIXTRVYE		

Fig.2 Partial amino acid sequences of rat FABPs. Numbering is based on the primary structure of L-FABP. Identical amino acid residues of C-FABP with other FABPs are indicated by bold faced types. Unidentified amino acid residue is indicated as X. L-FABP, liver FABP; I-FABP, intestine FABP; H-FABP, heart FABP; C-FABP, cutaneous FABP.

端近傍でも部分的相同性を示したが、N端近傍に比しややホモロジーは低かった。これらの結果は既知のFABP分子種の構造的特徴を備えており<sup>9)</sup>、C-FABPがFABP分子種のメンバーであることを強く示唆する。また興味深いことにFABP分子種の中でもC-FABPはH-FABPと同一ではないが進化的に極めて近縁の関係にあることが示された。さらに極く最近報告されたヒト乾癬と関連するFABPと高度の相同性を示した<sup>6)</sup>。しかしヒトの乾癬と関連したFABPはノーザンプロットでは正常のヒトケラチノサイトでは乾癬時のケラチノサイトに比べ極めて発現量は低く、我々が今回正常ネズミ皮膚より得たC-FABPは豊富な蛋白であり、ヒトの乾癬時に増加するFABPとの同一性が今後明らかにされねばならないと思われる。少なくとも乾癬化障害の病理はFABPと密接に結び付いていると考えられ、ケラチノサイトの増殖分化に果たすFABPの役割が今後の研究対象となろう。

### 3.3 脂肪酸結合能

純化したC-FABPとH-FABPの放射性ステアリン酸結合能を図3に示す。双方の蛋白ともステアリン酸結合能を示すが、H-FABPに比若干C-FABPは親和性は低かった。ステアリン酸以外にパルミチン酸、オレイン酸、リノール酸、

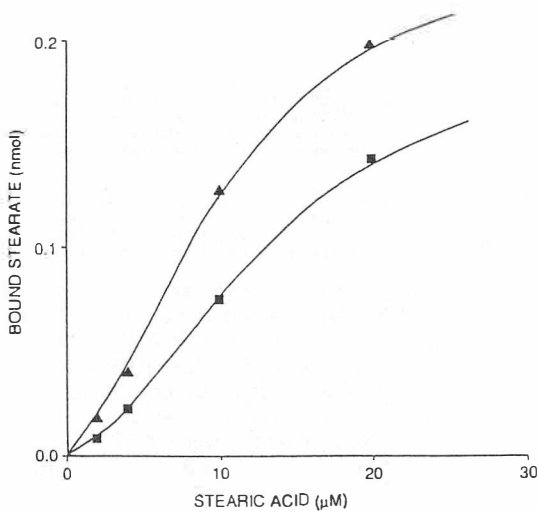


Fig.3 Binding assay of radiolabeled stearic acid with the purified rat cutaneous FABP (■) and heart FABP (▲). [ $^{14}\text{C}$ ] Stearic acid was incubated with 150 pmol FABP at 37°C for 1h. Unbound fatty acid was separated from bound fatty acid by Lipidex 1000.

アラキドン酸でも同様な結果が得られた。C-FABPは脂肪酸をリガンドできるが、未知のリガンドの関与も否定できない。

#### 4. 総括

我々はネズミ皮膚より低分子のFABPを精製し、免疫学的性質、部分アミノ酸配列、脂肪酸の結合能を基盤にFABPファミリーに属する完全に新しいメンバーの蛋白であることを明らかにした。目下アミノ酸の部分配列を基にC-FABPの

cDNAのクローニングを行っており、今後cDNAの構造、エクソン構成について合わせ報告する。ヒトの乾癬と関連して報告されたFABPとの相違点およびケラチノサイト増殖分化での役割が今後の課題である。

#### 文献

- 1) Ockner, R.K., Manning, J.A., Poppenhausen, R.B. & Ho, W.K.L. (1972) *Science*, 177, 56-58.
- 2) Glatz, J.F.C. & Veerkamp, J.H. (1985) *Int. J. Biochem.*, 17, 13-22.
- 3) Kanda, T., Odani, S., Tomoi, M., Matsubara, Y. & Ono, T. (1991) *Eur. J. Biochem.*, 197, 759-768.
- 4) Raza, H., Chung, W.L. & Mukhtar, H. (1991) *J. Invest. Dermatol.*, 97, 323-326.
- 5) Schurer, N.Y., Bass, N.M., Jin, S., Manning, J.A., Pillai, S. & Williams, M.L. (1993) *J. Invest. Dermatol.*, 100, 82-86.
- 6) Madsen, P., Rasmussen, H.H., Leffers, H., Horne, B. & Celis, J.E. (1992) *J. Invest. Dermatol.*, 99, 299-305.
- 7) Kimura, H., Odani, S., Koide, T., Arakawa, M. & Ono, T. (1989) *Biochem. J.*, 260, 303-306.
- 8) Hitomi, M., Odani, S. & Ono, T. (1990) *Eur. J. Biochem.*, 187, 713-719.
- 9) Veerkamp, J.H., Peeters, R.A. & Maatman, R.G.H.J. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, 1081, 1-24.

# 転移因子を用いたアントシアニン色素生合成遺伝子と その発現調節因子遺伝子の解析

東京理科大学基礎工学部

飯田 滋

Although transposable controlling elements are believed to exist in virtually every organism, they have been isolated from only a few plants and have been characterized at genetic and molecular level in only two plants, maize (*Zea mays*) and snapdragon (*Antirrhinum majus*). Their ability to transpose, affect gene expression and promote DNA rearrangements causes genetic instability. We have identified and isolated a new transposable controlling element, *Tpn1* (Transposon *Pharbitis nil* one), from a line of Japanese morning glory (*Pharbitis nil*) bearing variegated flowers. The 6.4 kb transposable element was inserted in the gene for dehydroflavonol-4-reductase (DFR), one of the genes involving anthocyanin pigment biosynthesis. Its terminal inverted repeats and the number of target duplications indicate that it belongs to the family of the maize transposable element *Suppressor-mutator/Enhancer* (*Spm/En*). Cosegregation data of the variegated flower phenotype and the *DFR* gene carrying *Tpn1* indicate that the mutable phenotype is due to excision of *Tpn1* from the *DFR* gene. Sequences homologous to *Tpn1* are present in multiple copies in the genome of Japanese morning glory.

## 1. 緒言

キメラとは本来、頭が獅子、胴が山羊、尾が龍のギリシャ神話の怪獣で、生物学上は複数の遺伝的に異なる細胞群よりなる個体のことである。植物キメラは種々の原因により生ずるが、トランスポゾンの転移に伴う体細胞変異によっても生じる。トランスポゾンとは染色体上を転移し得る一定の塩基配列をもつ遺伝的因子で、挿入・転移・脱離・欠失など種々のDNA再編成を引き起こし、また遺伝子発現の調節に様々な影響を与え、遺伝的不安定性の一因となっている因子でもある。トランスポゾンの存在は最初トウモロコシの穀粒で発

現するアントシアニン色素生合成系遺伝子などの発現を調節して絞り模様(キメラ斑)を生じさせる因子として見出され、その後、種々の生物種のゲノム上に散在されていることが明らかにされた。トランスポゾンによる花の絞り模様形成に関する分子遺伝学的研究はそのほとんどがキンギョソウで行われているだけである。我々は平賀源内が記述した絞りアサガオのアントシアニン色素生合成系遺伝子中より6.4kbのトランスポゾン*Tpn1*を単離し、この*Tpn1*が花卉の器官形成時に転移することが絞り模様の形成に直接関与していることを明らかにしたので<sup>1, 2)</sup>、その結果をここで述べる。

## 2. 実験

絞り花アサガオ  $\alpha$ -3' の系統として“時雨絞り” KK/SSB-3 と KK/SSB-4 を、野生型“全色花”アサガオとして KK/ZSk-2 を用いた。

植物ゲノムDNAはCTAB法<sup>3)</sup>により分離し、制限酵素による解鎖、DNA断片のλファージベ

Molecular analysis of a transposable controlling element affecting expression of a gene for anthocyanin biosynthesis.



Shigeru Iida

Department of Biological Science and Technology, Science University of Tokyo

クターおよびプラスミドベクターへのクローン化、DNA塩基配列の決定などは既存の方法<sup>4, 5)</sup>に準じて行った。また、DNAプローブとして用いたアントシアニン色素合成系の遺伝子は1.5kbのペチュニア*DFR-A*遺伝子のcDNA<sup>6)</sup>、1.3kbのキンギョソウの*Candi*遺伝子cDNA<sup>7)</sup>および2.2kbのトモロコシ*Bz1*遺伝子のゲノミックDNA断片<sup>8)</sup>である。

### 3. 結果

図1の白色地に有色の絞り模様のアサガオは、遺伝学的には“雀斑(そばかす/*flecked*)”、園芸上は絞り模様により“時雨絞り”もしくは“染め分け”と呼ばれる系統で、平賀源内の『物類品隲』(1762)の牽牛子・和名アサガホの項の黑白江南花・和名シボリアサガホに記載されているアサガオと同じ系統と考えられている。この雀斑系統のアサガオに関しては、1930年代に今井に

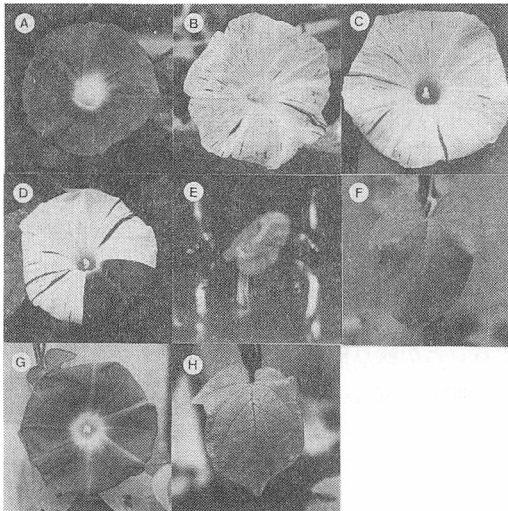


Fig.1 Pigmentation Phenotypes of *Pharbitis* Lines.  
 (A), Fully pigmented line KK/ZSK-2.  
 (B), (E) and (F), Variegated line KK/SSB-3.  
 (C) and (D), Variegated line KK/SSB-4.  
 (G) and (H), Germinal revertant derived from KK/SSB-3.

より古典遺伝学的解析が行われている<sup>9, 10)</sup>。すなわち、アントシアニン色素合成に関与する遺伝子の*A-3*に変異が起こったために、花卉細胞中で色素が生成されなくなり白色となるはずが、花卉形成時に体細胞復帰変異を起して、色素が生成されるようになり、花卉の一群の細胞が有色となったことが白色地に有色の絞り模様の形成機構である。白色の細胞群と有色の細胞群は体細胞変異により遺伝的に異なるので、このような絞り模様はキメラ斑とも呼ばれる。花卉形成の早い時期に変異により白色から有色となった細胞はより多く細胞分裂するので有色の細胞群の数も多くなり、当然有色セクターも大きくなる。それ故、絞り花の有色のセクターの大きさは体細胞変異の時期を、またセクターの数は体細胞変異の頻度を表す。“時雨絞り”のように小さな有色スポットがたくさんある絞り花は花卉形成の後期に高頻度で変異が起こり、“染め分け”のような小数の大きなセクターのある花は低頻度の変異が早い時期に起こったためと考えられる。

この体細胞変異の起こる茎頂や花茎頂の分裂組織はアサガオなど双子葉植物の場合は、L I・L II・L IIIの3層に分けられる<sup>11)</sup>。花の中にはL I由来の表皮細胞でのみ色素発現が見られるものも多いが、アサガオの場合はL I・L II・L III由来のいずれの細胞においてもアントシアニン色素が生成される。そこで今井は雀斑アサガオを用いて表皮下のL II由来細胞が変異により有色となった花を自殖すると3対1の割合で有色花と絞り花の次世代アサガオが生ずることなどから生殖細胞はL II由来であることを明らかにした<sup>10)</sup>。なお、アントシアニン色素の発現による絞り模様は雀斑系統のアサガオでは花ばかりでなく、葉や茎でも観察され(図1)、アサガオの場合、茎の色素発現はL II由来の細胞でのみ起こることも知られている。この雀斑の絞り模様を司るアントシアニン色素合成系の易変性(*mutable*)遺伝子*a-3'*は連鎖地図の第V染色体上にマップされている。この易変性遺伝子*a-3'*は野生型(有色

花)の遺伝子A-3に対し、劣性で、しかもa-3'からA-3になった生殖細胞復帰変異体が2-5%位の頻度で得られることも知られている<sup>9, 10)</sup>。

図1のような白色地に有色のキメラ斑は図2に示したアントシアニン色素生成経路のアントシアニジン-3-グルコシドまでの段階の生合成に関与する遺伝子か、もしくは、その転写調節因子遺伝子が易変性になっている場合が多い<sup>12)</sup>。そこでこの絞り花の白色地部分の色素分析をしたところ、フラボノールが検出できたのでフラボノールの段階までは生合成されていると考えられた。すなわち、図2のCHS、CHI、およびF3H遺伝子

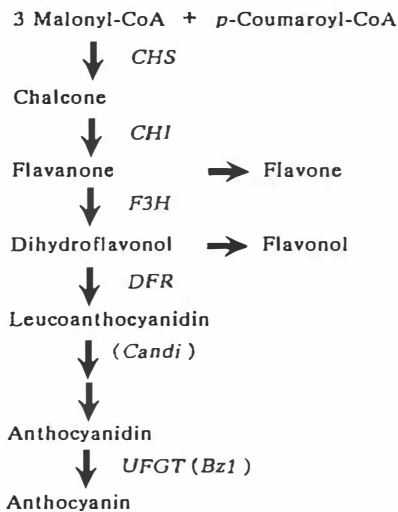


Fig.2 A Simplified Pathway for Anthocyanin Biosynthesis.

やこれらの発現を制御する転写調節因子遺伝子は正常であって絞り模様の形成には関与していないと思われる。そこでその先のDFR、AS、UFGTの遺伝子が未知のトランスポゾンの挿入により易変性となっているか否かを検討するために、図1の絞り花と野生型有色花アサガオより各々ゲノムDNAを抽出し、各遺伝子構造を、既に単離されているペチュニアDFR-A遺伝子cDNA、キンギョソウのAS遺伝子であるCandi遺伝子のcDNA、およびトウモロコシのUFGT遺伝子であるBz1遺伝子のコード領域をプローブ

としてサザン法により検討した(図3)。その結果、絞り花アサガオDFR遺伝子領域中には6.4kbのDNA配列が挿入されていることが明らかとなった。このDFR遺伝子領域を、全色花と絞り花アサガオの各ゲノムよりクローニングして、そのDNA配列の挿入領域の構造解析を行ったところ、絞り花アサガオDFRの第3エクソンの約10bp上流のイントロン内に6.4kbのDNA配列が挿入されていた。その末端繰り返し配列やDFR遺伝子内の挿入部位で認められた3bpの標的重複などの構造上の特徴から、トウモロコシSpm/

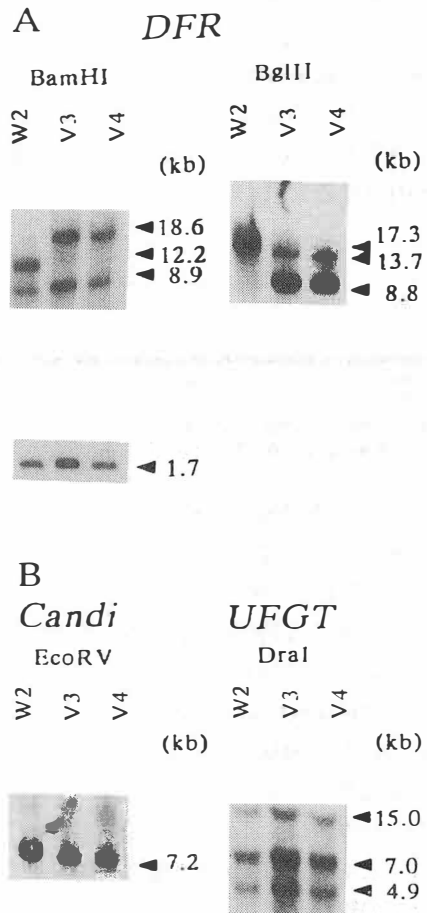


Fig.3 DNA Gel Blot Analysis of the *Pharbitis* DFR Region in A-3 and a-3' Lines. V4 indicates the variegated line KK/SSB-4; V3, the variegated line KK/SSB-3; W2, the wild type KK/ZSK-2.

*En*<sup>1, 3, 14)</sup> 類縁の新しいトランスポゾンであることが明らかとなったので、アサガオ (*P. nil*) より最初に分離されたトランスポゾンということで *Tpn1* (Transposon *Pharbitis nil* One) と命名した<sup>1, 2)</sup>。

この新たに単離された転移因子 *Tpn1* について、その構造と機能の解析を行うために全塩基配列の決定を行った。この *Tpn1* は 6412bp で、両末端には 28bp の逆繰り返し配列を、また、両末端近傍領域の各々 0.8kb および 1.0kb にわたり、*Spm/En* 類縁因子に見られる、転移酵素の結合部位と考えられる構造を有していた。これは今まで知られている *Spm/En* ファミリーのトランスポゾンの中で最も複雑な構造であった。

アサガオゲノム中にはペチュニアの *DFR* 遺伝子<sup>6)</sup> と相同性のある *DFR-A*, *B*, *C* の 3 種類の遺伝子が存在する (図 4)。そこで、*Tpn1* の挿入し

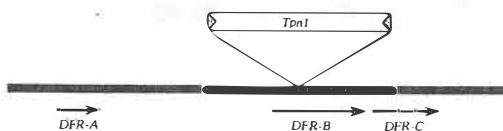


Fig. 4 The Structures of the *DFR* Region in the *Pharbitis A-3* and *a-3'* Lines.

ていた *DFR-B* 遺伝子が絞り模様を形成させる易変性遺伝子の *a-3'* の本体であり、その野生型である *A-3* 遺伝子が花弁や葉、茎などの色素合成に関与する *DFR* 遺伝子であるか否かを検討するために、*a-3'* の生殖細胞復帰変異体を得てさらにその自殖後代における有色花と絞り花アサガオの *DFR-B* 遺伝子内に *Tpn1* が挿入されているか否かをサザン法により検討した。その結果、有色花アサガオは全て 2 対の *DFR-B* 遺伝子のうち少なくとも一方は *Tpn1* が転移・脱離していたが、全ての絞り花アサガオの 2 対の *DFR-B* 遺伝子はともに *Tpn1* の挿入されたホモの状態であった (図 5)。それ故、*Tpn1* の挿入された *DFR-B* 遺伝子が易変性遺伝子 *a-3'* の本体であり、*Tpn1* の挿入した *DFR-B* 遺伝子は不活性化され

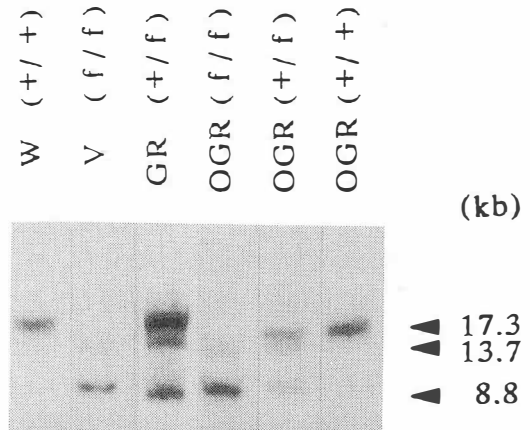


Fig. 5 DNA Gel Blot Analysis of the *DFR* Gene in the *a-3'* Lines and their Germinal Revertants.

Genomic DNAs were cleaved with *Bgl* II and hybridized with the petunia *DFR* cDNA probe. W (+/+) indicates the wild type line (homozygous); V (f/f), the variegated line (homozygous); GR (+/f), a germinal revertant (heterozygous); OGR (f/f), a variegated offspring (homozygous) of a germinal revertant; OGR (+/f), a solidly colored offspring (heterozygous) of a germinal revertant; OGR (+/+), a solidly colored offspring (homozygous) of a germinal revertant.

ていて発現されないが、花弁形成中に *Tpn1* が *DFR* 遺伝子より転移・脱離する体細胞変異によって、*DFR* 遺伝子が再活性化されることが絞り花 (キメラ斑) 形成の分子機構であることが明らかとなった。なお、*Tpn1* の挿入による *DFR-B* 遺伝子不活性化の分子機構としては、*Tpn1* 内のターミネーターにより転写が終結することやスプライシングが正常に起こらないことなどが考えられる。また、この花弁などで機能しているアサガオ *DFR-B* 遺伝子は 6 つのエキソンと 5 つのイントロンから構成されていることも明らかとなった。

なお、アサガオゲノム上には *Tpn1* に相同性の配列が多コピー存在する。図 6 から明らかなように、野生型の全色花アサガオに比べて雀斑系統の絞り花アサガオゲノム中には *Tpn1* 類縁の配列が

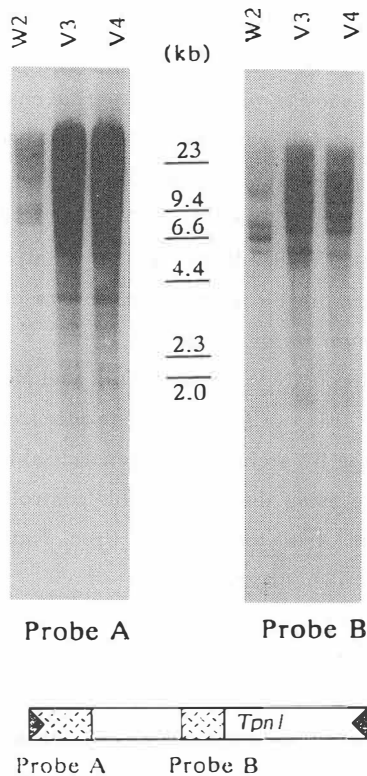


Fig.6 Presence of *Tpn1*-related Elements in the *Pharbitis* Genome  
The genomic DNAs were cleaved with *Bgl* II and hybridized with the probes A or B as indicated. V4 indicates the variegated line KK/SSB-4; V3, the variegated line KK/SSB-3; W2, the wild type KK/ZSK-2.

より多く存在する。

また、他の植物のトランスポゾンの場合と同様に、各々のアサガオゲノム中には *Tpn1* の末端領域に相同性のある配列の方が内部領域の配列よりもよりコピー数が多いことも明らかとなった。

#### 4. 考 察

トランスポゾンは遺伝子発現を制御する調節因子として最初にトウモロコシで見い出された<sup>13, 14)</sup>。高等植物ゲノムには脱離と再挿入により転移するDNA型トランスポゾンと、転移中間体として生じたRNAが逆転写酵素により

cDNAとなって転移するレトロトランスポゾンが存在する。これらのうち、主に前者が転移に伴うDNA再編成などによって植物遺伝子の発現を調節し、キメラ斑を形成させることが知られている。高等植物のトランスポゾンによる遺伝子発現の調節機構の分子遺伝学的解析は、そのほとんどがトウモロコシとキンギョソウで行われており、DNA型トランスポゾンにより調節される遺伝子としてアントシアニン色素生成系遺伝子群がよく研究されている。事実、図2のアントシアニン色素生成系遺伝子やその転写調節因子遺伝子の中にはトランスポゾンを用いた遺伝子タッキング法により同定・単離されたものも多い。トランスポゾンの中で転移に必要な活性な転移酵素の遺伝子を持ち自ら転移できる因子を自律性因子、内部欠失変異体などで転移酵素遺伝子に欠損があり、自律性因子より活性な転移酵素が供給されたときのみ転移できる因子を非自律性因子という。我々は平賀源内が記述した絞りアサガオのアントシアニン色素生成系の *DFR-B* 遺伝子中より、*Spm/En* 類縁の6.4kbのトランスポゾン *Tpn1* を単離し、この *Tpn1* が花卉の器官形成時に転移することが絞り模様の形成に直接関与していることを明らかにした。この *Tpn1* は6412bpであって、その構造上の特徴から考えて、自律性因子であるよりも自律性因子の内部欠損型の非自律性因子である可能性が高い。もしもそうであるならば、アサガオゲノム中に存在する自律性因子の作用により、*Tpn1* は *DFR-B* 遺伝子より転移・脱離すると考えられる。

高等植物のトランスポゾンは転移因子としての側面から転移に伴う遺伝的組換え機構の解明や調節因子として植物遺伝子の発現調節機構の解明に貢献してきたのみならず、トランスポゾンタッキングによる有用遺伝子の単離やトランスポゾンベクターによる有用遺伝子の導入、さらには遺伝子発現制御のための生物学的スイッチなど植物バイオテクノロジーにも利用され始めた。ここに述べたアサガオのトランスポゾン *Tpn1* やその類縁因

子の解析も遺伝子発現機構の解析のみならず、植物バイオテクノロジーにも貢献できる可能性もあろう。事実、アサガオには20種以上の花色、葉色、さらには花や葉の形態に関して、トランスポゾンが関与すると考えられる易変性 (mutable) 変異体が知られている。これらの中には *Tpn1* 類縁因子の関与するものもあると思われ、トランスポゾンタグgingにより未知の有用遺伝子をアサガオから単離することもできそうである。

## 文 献

- 1) 飯田 滋 (1994). 絞り花アサガオから分離されたトランスポゾンによる遺伝子発現の調節. *ファルマシア* 30, 481-455.
- 2) Inagaki, Y., Hisatomi, Y., Suzuki, T., Kasahara, K. and Iida, S. (1994). Isolation of an *Suppressor-mutator/Enhancer*-like transposable element, *Tpn1*, from Japanese morning glory bearing variegated flowers. *Plant Cell*, 6, 375-383.
- 3) Murray, M.G. and Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.*, 8, 4321-4325.
- 4) Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- 5) Shimamoto, K., Miyazaki, C., Hashimoto, H., Izawa, T., Itoh, K., Terada, R., Inagaki, Y. and Iida, S. (1993). *Trans*-activation and stable integration of the maize transposable element *Ds* cotransfected with the *Ac* transposase gene in transgenic rice plants. *Mol. Gen. Genet.*, 239, 354-360.
- 6) Beld, M., Martin, C., Huits, H., Stuitje, A.R. and Gerats, A.G.M. (1989). Flavonoid synthesis in *Petunia hybrida*: partial characterization of dihydroflavonol-4-reductase genes. *Plant Mol. Biol.*, 13, 491-502.
- 7) Martin, C., Prescott, A., Mackay, S. Bartlett, J. and Vrijlandt, E. (1991). Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus*. *Plant J.*, 1, 37-49.
- 8) Fedoroff, N.V., Frutek, D.B. and Nelson, O. E. (1984). Cloning of the *bronze* locus in the maize by a simple and generalizable procedure using the transposable controlling element *Activator (Ac)*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 3825-3829.
- 9) Imai, Y. (1931). Analysis of flower colour in *Pharbitis nil*. *J. Genet.*, 24, 203-224.
- 10) Imai, Y. (1934). On the mutable genes of *Pharbitis*, with special reference to their bearing on the mechanism of bud-variation. *J. Coll. Agric. Imp. Univ. Tokyo*, 12, 479-523.
- 11) Tilney-Bassett, R. A. E. (1986). *Plant chimeras* (London: Edward Arnold).
- 12) Dooner, H. K., Robbins, T.P. and Jorgensen, R.A. (1991). Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.*, 25, 173-199.
- 13) Fedoroff, N.V. (1989). Maize Transposable Elements. In *Mobile DNA*, D.E. Berg and M. M. Howe, eds (Washington, DC: American Society for Microbiology), pp. 375-411.
- 14) Gierl, A. and Saedler, H. (1992). Plant-transposable elements and gene tagging. *Plant Mol. Biol.*, 19, 39-49.

# 皮膚の老化における染色体構造の 変化と遺伝子修復機構に関する研究

理化学研究所

花岡文雄

Our previous experiments suggest that the length of the linker DNA which connects nucleosomal core particles becomes to be heterogeneous by aging, both *in vivo* and *in vitro* in human skin fibroblasts. In order to get some insight on the relation between growth capacity and the regularity of nucleosome structure, we examined the structural change of lymphocyte chromatin upon growth stimulation with PHA. When chromatin of lymphocytes from peripheral blood was digested with the nuclease, unclear pattern of electrophoresis was observed. However, discrete ladders of nucleosomal DNA were detected in the case of lymphocytes stimulated with PHA for 48h and 96h. Their digestion patterns were similar to those of lymphoma cell lines. These results indicate that the regularity of chromatin structure is closely related to the activity of cell proliferation.

As for the UV damage on the skin, we are investigating the mechanism of nucleotide excision repair. We have purified to homogeneity a repair complex by *in vitro* complementation of the XP-C defect in a cell-free repair system containing UV-damaged SV 40 minichromosomes. The complex has a high affinity for ssDNA and consists of two tightly associated proteins of 125 and 58kd. Subsequent cDNA cloning revealed that the 125kd subunit is a N-terminally extended version of previously reported XPCC gene product which is thought to represent the human homolog of the *S. cerevisiae* repair gene *RAD4*. The 58kd species turned out to be a human homolog of yeast *RAD23*. The 58kd species and yeast *RAD23* share a ubiquitin-like N-terminus. The nature of the XP-C defect implies that the complex exerts a unique function in the genome overall repair pathway which is important for prevention of skin cancer.

## 1. 緒言

われわれ人間の体全体を覆っている皮膚は体の中で一番大きな器官であり、個体の維持に重要な役割を果たしている。すなわち、外界からの情報に敏感に反応し、体内の環境を一定に維持するための一種のセンサーの役割を果たすと同時に、外界からの物理的・化学的刺激に対して体内を保護

するバリアーとしても働いている。

この皮膚は、上皮組織としての表皮と、結合組織としての真皮からなる。表皮は、その大部分を占める表皮細胞と、そこで作られて、上述のバリアーとしての機能を果たす角質層（ケラチン層）、それに体表から日々剥離していく角質層を補うために、常に細胞分裂を繰り返している表皮最深部の基底細胞とから成り立っている。真皮は膠原繊維を中心とする繊維性結合組織で、ほかに弾性繊維、血管、神経、平滑筋繊維などを含んでいる。

既にわれわれはヒトの皮膚繊維芽細胞が老化に伴って、その細胞機能の中核である染色体構造に変化をきたすことを観察している<sup>1)</sup>。本研究では、その原因が細胞の増殖能と関係しているかどうかを、ヒト末梢血リンパ球を用いて調べる。同時に紫外線などによる遺伝子の損傷に対し、皮膚

Studies on the Changes in Chromatin Structure during Aging of Human Skin Fibroblasts and the Mechanism of DNA Repair



Fumio Hanaoka

Riken Institute of Physical and Chemical Research

の細胞がどのような修復機構で対処しているかを分子レベルで明らかにするための一つのアプローチとして、われわれの確立した無細胞クロマチン修復系<sup>2, 3)</sup>の応用を試みる。

## 2. 実験

### 2.1 ヌクレオソーム構造の規則性の解析

細胞を界面活性剤を含む等張緩衝液中でホモジナイズすることにより核を調整した。そこにマイクロコッカルヌクレアーゼを加え、37°Cで一定時間保温した。反応後、DNAを抽出・精製しアガロースゲル電気泳動法により分析した。

### 2.2 無細胞DNA修復系による修復能の検出

SV40のウイルス粒子を弱アルカリ処理することによって得られるミニ染色体に紫外線を照射し、ピリミジン二量体を主とするDNA塩基損傷を導入した。これを、ATPおよび $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTPを含むデオキシヌクレオチド基質等の存在下、種々の細胞粗抽出液と反応させた。この時、反応液中には紫外線未照射のプラスミドpUC19を共存させ、内部標準とした。ヌクレオチド除去修復によって損傷が修復されれば、その部分に短いDNA合成が起こり、放射標識されたヌクレオチドが取り込まれることになる。この反応液からDNAを抽出し、制限酵素で直鎖状にした後、アガロースゲル電気泳動でSV40 DNAとpUC19を分離し、オートラジオグラフィを行った。ウイルスDNAへの放射活性の取り込みを、イメージアナライザーによって定量化した。

### 2.3 XP-C群を相補する蛋白質の精製

上記の無細胞系にXP-C群患者細胞の抽出液を適用し、HeLa細胞の核抽出液を出発材料としてXP-C群の修復欠損を相補する因子を精製した。ホスホセルロース、変性DNAセルロース、CMコスモゲルとMono Qの4段階のカラムクロマトグラフィにより、分子量125Kと58Kの二

種類のポリペプチドを含む画分が得られた。p125/p58複合体をグアニジンによる変性条件下、ゲル濾過HPLCによって分離し、それぞれのポリペプチドをCNBrで分解した後、逆相HPLCによって展開した。p125については一ヶ所、p58については二ヶ所の部分アミノ酸配列を決定した。

### 2.4 XP-C群を相補する蛋白質のcDNAクローニング

決定されたアミノ酸配列をもとに、p125については2組のオリゴヌクレオチド混合物を合成し、それらを用いたRT-PCRによってDNAプローブを作成した。またp58については複数のオリゴヌクレオチドを合成し、プローブとした。以上のプローブを用い、HeLa細胞のcDNAライブラリーをスクリーニングし、ポジティブなクローンのなかでインサートの最も長いものについて塩基配列を決定した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 細胞増殖とヌクレオソーム構造の規則性

正常ヒト末梢血リンパ球、T細胞由来CEM細胞、B細胞由来WILL II細胞についてクロマチン構造を比較した。CEM細胞、WILL II細胞の両がん細胞ではヌクレオソームの単量体から6、7量体までの明瞭な階段状のバンドが検出された。一方、正常リンパ球では3、4量体までのヌクレオソームDNAは確認できるものの、全体にバックグラウンドが上がり、不均一な分解様式を示した。正常リンパ球をPHA存在下、48時間、96時間と培養したところ、バンドの位置は変わらず、それぞれのピークの高さが増した(図1)。このことは、増殖能の低い細胞ではヌクレオソームの規則性が低下し、リンカーDNAの長さにバラつきが多くなるが、細胞分裂を繰り返すと、その間にヌクレオソーム間の長さがそろってくることを示している。したがって正常皮膚繊維芽細胞にお

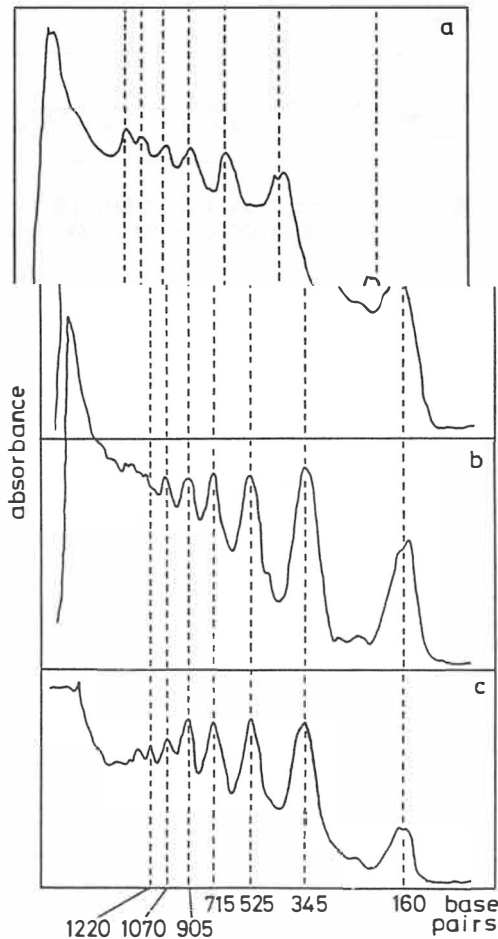


図1 ヒト正常リンパ球の増殖とヌクレオソームの規則性  
無処理のヒト正常リンパ球 (a)、同じくPHA処理、48時間 (b) および96時間 (c) のサンプルについて、「実験」の項で述べた方法によりヌクレオソームの規則性を解析した。

いて観察された、老化細胞クロマチンのヌクレオソーム配列の不規則性は、細胞の増殖能の低下によって結果的に引き起こされたものと考えられる。

### 3.2 無細胞系を用いたXP-C群相補因子の精製

紫外線照射したSV40ミニ染色体を鋳型として用いる無細胞DNA修復系において、ヌクレオチド除去修復機構に欠陥を有するヒト遺伝病、色素性乾皮症 (XP) のAからGまでの七つの相補

性群の細胞抽出液いずれもが、修復正常なヒト293細胞抽出液に比べて低い活性しか示さなかった。また、異なる群のXP細胞抽出液を適当な割合で混合すると相互の欠損が相補され、修復合成活性の回復が見られた<sup>3)</sup>。そこで遺伝子、蛋白質の両方とも解析の遅れていたXP-C群について、相補因子の生化学的な同定を試みた。

修復正常なヒト細胞の核抽出液を出発材料として、4段階のカラムクロマトグラフィーにより得た精製標品は、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動上、分子量125Kと58Kの二種類のポリペプチドを含んでいた。この二つのポリペプチドは、ゲル濾過およびグリセロール密度勾配遠心において活性と挙動を共にしたことから、物理的な複合体を形成しているものと考えられる。この因子はXP-C群の細胞抽出液の修復欠損を特異的に相補し、C群以外のXP細胞抽出液による修復合成には全く影響を与えなかった。このことから、本因子がXP-C群の原因因子である可能性が非常に高いと思われた。

### 3.3 XP-C群相補蛋白質のcDNAクローニング

我々の研究とは独立に、米国テキサス大学のグループがcDNA発現ライブラリーをXP-C群細胞に導入することにより、C群の修復欠損を相補する遺伝子XPCCを単離した<sup>4)</sup>。その塩基配列から予想される遺伝子産物は823個のアミノ酸からなる推定分子量93Kの蛋白質で、我々が生化学的に同定した125K、58Kのどちらとも合致しなかった。そこでXPCC遺伝子産物と我々のp125/p58との関係を明らかにするために、cDNAクローニングを行った。

スクリーニングの結果、p125について長さ3.6 kbのcDNAクローンが得られた。その塩基配列を決定したところ、XPCC遺伝子の配列とほぼ一致した。しかしながらp125のcDNAは、既に発表されているXPCCのcDNAよりもN末端が長く、我々が蛋白質レベルで決定したN末端の

アミノ酸配列がXPCCには含まれていなかった。p125のORFはXPCCよりも117個多い940個のアミノ酸からなり、推定分子量は106Kと計算された。

XPCC遺伝子とは出芽酵母のRAD4遺伝子と部分的な相同性を示すことが報告されているが、新たに同定されたN末端部分については既知の蛋白質との相同性は特に見い出されなかった。推定アミノ酸配列より、p125は極めて親水性に富み、またカゼインキナーゼII、Cキナーゼを初めとするプロテインキナーゼによってリン酸化を受ける可能性のある配列を非常に多く含むことが予想された(図2)。

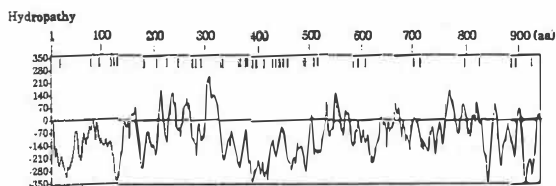


図2 p125の疎水性プロットとリン酸化可能部位  
アミノ酸残基数の下のバーはリン酸化可能部位を示す。

一方、p58について2.9kbのcDNAクローンが得られた。その全塩基配列を決定したところ、アミノ酸数409からなる推定分子量43Kの未知の蛋白質をコードしていた。ホモロジー検索の結果、この蛋白質は出芽酵母の第V染色体上のSYGP2遺伝子のORF29と比較的高い相同性を示したが、これが実はDNA修復に関係した遺伝子、RAD23、であることが判明した<sup>5)</sup>。p58も酵母のRAD23も、N末端部分がユビキチンと似た配列をしており、その部分の機能に特に興味を持たれる。p125同様、p58についてもカゼインキナーゼII、およびCキナーゼでリン酸化されるアミノ酸配列が数ヶ所見い出された(図3)。そこで精製したXP-C群相補蛋白質を、アガロースビーズに固定したアルカリ性ホスファターゼで処理したところ、相補活性が失われた。このことから、本蛋白質の活性がリン酸化による制御を受け

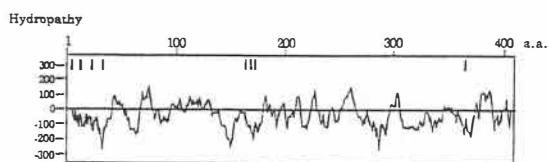


図3 p58の疎水性プロットとリン酸化可能部位  
アミノ酸残基数の下のバーはリン酸化可能部位を示す。

ていることが示唆された。

本研究の結果、無細胞DNA修復系を用いて精製されたXP-C群の修復欠損を相補する蛋白質が、遺伝学的に同定されたXPCC遺伝子産物と一致することが分かった。このことは、我々の無細胞系が細胞内のヌクレオチド除去修復反応を忠実に反映していることを改めて示したものである。さらに、XP-C群相補蛋白質のnativeな形を明らかにできたこと、XPCCと新たな蛋白質との相互作用が見い出されたことは、無細胞系を利用することの有用性を証明した。今後、組み換え蛋白質の大量発現、および抗体の作成によって、ヌクレオチド除去修復におけるp125/p58の機能を明らかにしていく予定である。特にXP-C群の細胞は転写とカップルした修復に関しては正常で、転写と無関係に起こる修復に欠陥があることが分かっている。その分子レベルでの解析に興味を持たれる。また上述の脱リン酸化の効果がどちらのコンポーネントによるものなのかを明らかにできるはずである。さらに、この無細胞系を用いることによって、他のXP相補因子を初めとするDNA修復因子を同定することが可能であろう。

## 文 献

- 1) Ishimi, Y., Kojima, M., Takeuchi, F., Miyamoto, T., Yamada, M. and Hanaoka, F., *Exp. Cell Res.*, 169, 458-467 (1987).
- 2) Sugawara, K., Masutani, C. and Hanaoka, F., *J. Biol. Chem.*, 268, 9098-9104 (1993).
- 3) Masutani, C., Sugawara, K., Asahina, H., Takai, K. and Hanaoka, F., *J. Biol. Chem.*,

268, 9105-9109 (1993).

4) Legerski, R. and Peterson, C., Nature, 359, 70  
-73 (1992).

5) Melnick, L. and Sherman, F., J. Mol. Biol.,  
233, 372-388 (1993).

# 記念講演

---



平成 5 年度記念講演 廣部 雅昭



## 酸素分子の二重性格性について

廣部 雅 昭

東京大学薬学部 薬品代謝化学 教授

場所 薬学会館長井記念館  
日時 平成5年11月19日(金)

ただいまご紹介にあずかりました廣部でございます。本日の栄えある表彰・贈呈式に先立ちまして講演の機会を与えて頂きましたことを大変光栄に存じております。私は財団の評議員であります。が、まず、本日助成金を授与されることになられた皆さんに心よりお祝いを申し上げます。

記念講演という晴れがましい形で私どもの研究をご紹介させて頂くのはいかにも面映ゆい次第でございますが、依頼されるにつましましてはいろいろ経緯がございました。まずは難しい話はするな、難しい話は分かりやすくやれ、できたらおもしろくやれ、それからこの場にふさわしい内容にせよと、いろいろ難しい注文がついております。研究者というのは得てして難しい話をできるだけ難しくする傾向がございまして、私もその例に漏れないわけでございますけれども、そういうことですので、今日はできるだけ日頃とは趣を変えます。あるいは多少脱線をするかも知れませんがご容赦をいただきたいと思えます。注文が多い依頼ですので、テーマをどのように選ぼうかといろいろ考えました。悩んだ末、結局のところ、日頃、私どもがやっておりますいろいろな研究の中でコスメ

トロジーとも関係の深いという意味で「酸素分子の二重性格性について」を本日のテーマに選んだ次第でございます。

皆様、酸素、空気でもよろしいのですが、この言葉を聞いた時にどのようなイメージをお持ちになれるでしょうか？ 私事で恐縮でございますが、私は酸素というものに非常な恩恵を感じております。いいイメージしか持っていません。私は山の奥の生まれでございますが、小さいころ川で泳いでいる時に深みにはまっておぼれ死にそうになって、一命を取り止めたことがあります。その時の苦しみ、窒息の苦しみというのはもう本当に耐え難いものであります。私にもし死に対する恐怖があるとしたら、その時に息苦しいのではないかとこの危惧でありまして、それは非常に恐ろしいと思っています。従いまして、私は泳ぎません。「泳げない、泳がない」でなくて「泳がない、泳げない」です。私は水を見ますと非常な恐怖に陥ります。おぼれた時の苦しみが無意識に頭の中をよぎるのだと思います。最近ゴルフを始めたのですが池越えは絶対にだめです。水を見たときたんにくちくちくにスコアが崩れます。スコアが纏まらないのは池があるから、水があるからと思っています。

よく「人はパンのみにて生きるにあらず」と言います。精神的な面を強調した言葉でありまして、「食べてただ生きてるだけ」ではだめだということの例えだと思えますが、しかし物質的には食べ物が生きてのための当然の前提となっております。

### Two Faces of Molecular Oxygen



Masaaki Hirobe

Faculty of Pharmaceutical  
Science  
The University of Tokyo

また、人はパンが無くても水だけあれば十数日は生きていられるだろうと思います。食わず、飲まずでもやっていけると粹がる向きもありますがその場合でも酸素という、空気という言葉は出てきません。人間は空気がなかったら絶対に数分といえども生きてはいられません。空気と云いましたが当然ながらその中に含まれている酸素を意味しています。このように生と死を分け隔てる最も基本的な物質、しかも分子量36という小さな酸素という物質がなぜ生きるために必要なのかは良く判っているはずですが、通常、必ずしも人々の意識に上って来るわけではありません。

一般には酸素のもつイメージは常に良いかと思えます。しかし一度これが怒り出しますと生体に対して非常なダメージを与えます。最近では酸素の怖さが注目されてきて、いろいろな研究がなされております。このように酸素分子には良い面と悪い面があり、コスメトロジーにも極めて密接な関係があります。そのような訳で今日は「酸素分子の二重性格性」ということに焦点を合わせまして、私どもで行っております研究の一端をご紹介させて頂きたいと思えます。前置きはこれぐらいに致しまして早速本論に入らせていただきます。

これはある新聞が私どもの仕事を紹介した記事であります。「酸素分子はジキルとハイド」、すなわちこちらが仏様、こちらが悪魔と二つの顔を有しております。このように酸素分子は生体にとって諸刃の刃である。つまり二重人格的な性質があるということの意味しております。「発ガン関与究明」「制ガン剤開発の一助に」の見出しは新聞社の方が勝手につけたものでありまして、私どもはそんな高尚なことを常時やっているわけではございません。酸素分子の二面性を漫画でお示すために新聞記事を紹介させて頂いたわけです。

酸素は地球上に無限にあるように見えます。ところがこの地球に生物が住みだすようになった何10億年前にはほとんどありませんでした。その頃には嫌気性、つまり酸素のいらぬ生物がいた

わけです。それが20億か30億年前、藻類という植物が生まれて光合成を行う様になりました。光合成というのは皆様ご承知のように光の働きで水と炭酸ガスから炭水化物を作り同時に酸素を作るという営みであり、クロロフィルを持っている植物は皆そのような働きをします。そうしますと藻類の出す酸素というものは嫌気性生物にとってはいわば光合成工場からの排ガスで環境汚染物質に相当します。そのため酸素を必要としない、あるいは酸素を嫌う生物はそういった環境汚染物質の中では棲息できなくなって来ました。太古の生物は生きるために二つの中のひとつを選択しました。ひとつの群は酸素の無い地下とか、海底に逃げてしまった。現在でも嫌気性生物は細々と生存してはいますが当然ながら世の中から見捨てられているわけでありまして。一方は酸素毒性を克服して酸素と共存できるように自らの体質を改善して環境に順応して来まして。これについては後ほど更に説明します。そういうことで酸素を呼吸する生物が出てきましたが、逆に酸素呼吸によって非常に効率的にエネルギーを利用できることになり、生物はますます高度化、進化して参りました。これがいわゆる我々人間を含めた好気性生物であります。好気性生物は呼吸をしては排気ガスとして炭酸ガスを出していますが、植物は今度はその排気ガスを吸いまして、植物の排気ガスである酸素を出します。このように酸素、炭酸ガスの循環が行われるようになったわけです。酸素というものは生きるために必須であると同時に酸素毒性があるということ、そして生物はその毒性を克服できるような体質を備えているのだということを前提にこれからのお話をさせて頂きます。

地球上の酸素が植物のお陰でどんどん増えて来ますとオゾン層ができ、太陽からの紫外線を吸収し地上に届くのをかなり防ぐようになって来まして。紫外線というのも生物にとって有害なものです。酸素が出たことでオゾン層ができた。オゾン層ができたことで紫外線が地上に到達する力が弱くなって来まして。そこで今まで海の底で紫外線から

逃げてきた生物が陸上に上ってくるができるようになりました。これが両生類の出現でありその後、人類へと進化してきたわけであります。現在オゾンホールができて地上に強い紫外線が当たるということで問題になっております。もしかすると昔に戻っていく危険性があるということかも知れません。この紫外線障害はコスメトロジーと極めて密接な関係があります。

ところで生物は酸素の増大と共に酸素毒性に耐えられる体質を徐々に備えてきたのですが、もし空気が突然全部酸素になってしまったとすると人間を含めた哺乳類は50日から100日で死んでしまうと言われております。酸素百パーセントならこんな良いことはないだろうと思うかもしれませんがそうはいきません。つまりある濃度以上では人間は死んでしまう。まさに酸素毒性によるものであります。生物は酸素からの攻撃に備えつつ平和的なつき合いをしている訳です。どこかで聞いた国際平和と軍備の充実の問題に何となく対応しているように思えます。

地球の大気酸素濃度の変遷を見てみますと現在1気圧の大気のなかに約0.2気圧、5分の1の酸素が含まれています。これを1と致しますと30億、40億年前ではちょうど現在の1万分の1の酸素しかありませんでした。この頃藻類が現れてきまして光合成が行われるようになり、酸素がどんどん増えてくるようになりました。だいたい6億年前になりますと現在の約百分の1になってきたのです。3億年前頃に現在より酸素が多かった時代があったような記録がありますが本当かどうかは良くわかりません。将来大気中の酸素濃度がどうなっていくかはわかりませんが酸素濃度の増大に対応して紫外線の地表に到達する強さが弱くなってきていることが実際に示されております。

さてこのような良いイメージの酸素分子が突然豹変します。「君子も豹変する」は酸素分子の活性化に対応いたします。豹変の仕方のその1、餌を与えられた時に豹変する。餌とは電子のことですが、還元的活性化に当たります。その2、酸素

というものは光と色に弱い。刺激を受けますと興奮して毒性を示す活性酸素ができます。これは励起一重項酸素と言います。いったん豹変した酸素分子はそれ自身でさらにさまざまに変化をいたします。豹変した酸素は生体にさまざまな危害を加えます。これが酸素毒性と言われるものです。これに対し、生物がどういった対応をするかといいますと、その1として豹変酸素を安全なものに分解します。そういった分解酵素があります。一方で生贄を出して自らを守ります。抗酸化剤、ビタミンEなどの酸化され易いものを生贄にだしてこれを酸化させてわが身を守る対応の仕方です。また、豹変した酸素を旨く利用して使うこともあります。酸素添加酵素とか私どものやっている薬物代謝とか、あるいは抗ガン剤のデザインに使うやり方です。酸素分子の二重性格性を逆に利用する方法です。

次に酸素分子の活性化と言うことについて分かりやすくご説明したいと思います。通常空気中に存在している酸素は三重項酸素と言います。ここに反結合性の分子軌道を意味するシーソーの様な板があり、それをバネが支えていると致します。通常の酸素分子では二つの酸素原子の間に1.5オングストローム程の距離があり、電子が二個入っています。バランス良く同じ向きに2個の電子が入っていますがここには4個まで乗ることができます。ひとつ乗りますと還元的活性化、つまり餌を与えたとはいいましたが、電子を与えますと3個になります。ところがバランスが崩れて不安定になりますので、蹴り落として二つになるか、もうひとつ貰って4つになるかして安定化します。3個の状態、つまり1電子還元をされたものはスーパーオキシドと言いまして、酸素毒性の元凶と言われるものです。更に電子が入ってきますとO-O結合が伸びて来て、あるところでバネが切断されます。切れた時に最も活性なヒドロオキシラジカル、つまり生体に最も強い障害を与えるラジカルが生じます。酸素分子は活性化する時電子が1個入ってスーパーオキシド、2個入って

パーオキシドとなり、三電子還元されると切れちゃうんですね。もうひとつの活性化方式があります。色と光で興奮すると言ったのはこのことでありまして、電子が他から入るのではなく、隣にいた電子がシーソーの一方に移りますと不安定になり、空いた場所には電子が欲しいと言う意味で求電子的な活性が生じます。このように電子の動きによって酸素分子は活性化される訳です。

今申し上げたことをまとめますと酸素分子は一電子還元でスーパーオキシド、二電子還元でパーオキシドとなります。これは過酸化水素、オキシドールと呼ばれて消毒剤に使われているものです。更に還元されますとO-O結合が開裂してヒドロキシラジカルになります。ここにもうひとつ電子が入りますと最も安定な水になります。つまり、安定な酸素分子と安定な水に間に四電子還元が行われます。そして酸素分子には還元を受ければ受けるほど、更に電子を取り易くなるというおもしろい性質があります。一方生体の中にはオキシデースといわれる酸化酵素があります。例えばシトクロームオキシターゼと呼ばれる酵素は酸素を途中で活性酸素種を生成させずに一気に四電子還元して、水にまで持ってきてしまう非常に安全な酵素なんですね。ところで途中でこのような活性酸素種を出すような酵素もあります。また先程申し上げました植物の光合成と言うのは四電子還元された最も高い還元状態にある水を四電子酸化し、酸素に一気に持っていく反応に相当します。

通常世の中に存在している酸素分子と言うものは紫外線が当たるとか、そのほかオキシデースなどによって活性酸素種に変換する性質があり、それらは生体の中で常時出来る可能性があります。出来てはいるが生体はそれを防御する機構を持っています。つまり進化の過程でそういった体質に改善されて来たということで生体内にはそのような活性酸素を消去する酵素があり安全な通常の酸素や水に変化させてしまう機構があるわけです。ところが消去し切れなかった場合には活性酸素が標

的分子への攻撃を開始するわけです。攻撃されますと生体は抗酸化剤などで一生懸命防御しようとしては、生体が負けますと活性酸素が細胞に対して障害を与えることになります。一方では酸素添加酵素や、ペルキシデースと言われるのはこういった活性酸素を基質にして、有効に生体の中の代謝などを行っていきます。そういった意味で活性酸素を上手に使う機構もあるわけです。

このように生体の中では常時活性酸素の生成と消去が酵素的あるいは化学的に行われておりますが生体がどのような消去酵素を持っているかその典型的な例を示します。最近最も注目されているものにスーパーオキシドディスムターゼ、(SOD)というものがあります。SODはスーパーオキシドを過酸化水素と酸素に分解する酵素です。ところが過酸化水素もまだ活性酸素でありますから生体に対して障害を与える可能性があります。生体はこれをカタラーゼとかペルオキシターゼといった酵素で安定な水に分解します。こういった反応の組み合わせで活性酸素を安全なものに分解することが可能なのです。ただ、ヒドロキシラジカルは非常に活性が高くて、これを抑えきれないため生体が障害を受けるケースがたくさん見受けられます。今日の最後の方のメインテーマとなります一重項酸素はカロチノイドのような色素が消去すると言われております。一方活性酸素種によって脂肪酸などがヒドロパーオキシドになる反応は脂質の過酸化と呼ばれますが、出来た過酸化脂質は更にまた活性酸素を誘導します。これをグルタチオンペルキシデースとかトコフェロールといった抗酸化剤が消去します。

活性酸素の関与が示唆されている病態、疾患については、最近活性酸素の研究が盛んに行われて来たことで、非常に多くのものが関係していると言われております。個々について活性酸素がどこに、どのように関与しているかは私自身良くわかりません。放射線障害とか紫外線障害また炎症などは理解出来ますね。あと、老化、パーキンソン病、糖尿病……等々、とにかく、いろいろな病気

が酸素が豹変してできた活性酸素によって起こされるといわれております。

蛋白、核酸あるいは、脂質のような生体を構成している物質が活性酸素によって酸化的障害を受け秩序が乱されていくことで病変につながって行くことが考えられますが、この場合、大体においてヒドロキシラジカルが元凶というか、直接的な働きをしていると言われております。また、これを生じさせるものがスーパーオキシドであるということが分りその研究が盛んに行われるようになったともいえます。

スーパーオキシドはどうして発生するのか？

スーパーオキシドがほかの活性酸素種に変身する仕方などが研究対象となっております。スーパーオキシドそれ自体には大した活性はありませんが助剤、エフェクター分子の存在で格段に活性化する性質があります。生体の中には、スーパーオキシドに対抗するためにこれを分解する酵素、SODがあることは先程申し上げましたがそれ自身を医薬品として用いるにはいろいろな制約があります。治療に使う場合にはより広範な用途に応じて使えるようなSOD機能をもった人工物質をデザインしようという動きがあり、こういった方面の研究も行われています。

世の中にはいろいろな活性酸素増産剤が知られていますが、たとえば殺草効果のある農薬として知られるパラコートは生体の中でNADPHなどから電子を1個もらいますと、中間にまずアニオンラジカルを生成します。そして次に酸素に電子を渡して、スーパーオキシドを作ります。スーパーオキシドは、それ自身あるいは他の活性酸素に変化して細胞に障害を与える訳ですが、これをSODがプロテクトいたします。一般に電子を与え易い分子が存在しますと酸素分子からスーパーオキシドができます。これを自動酸化といっています。

私は田舎の本当に文化の遅れたところで中学校時代を過ごしました。化学が好きだったので実験をやろうと思い、化学実験室から古いベンズアル

デヒドのびんを持ち出したことがあります。その当時私はベンズアルデヒドは結晶だと思っていました。びんの栓の回りに綺麗な結晶がついていたんですね。だから結晶と思ったのですが実はベンズアルデヒドは液体なんです。還元性があって酸化され易いため空気に触れると酸化されて安息香酸になります。結晶はこの安息香酸だったんです。このように還元性の高い物質は空気に触れると自動酸化します。考えてみればこの時スーパーオキシドが発生していたことになるだろうと思えます。

前に御話したようにスーパーオキシド自身は電子を取って安定化するか、電子を蹴飛ばして元に戻って安定化します。つまり酸化と還元両方の性質を持っているので、二つのスーパーオキシドが互いに反応して安定な酸素分子と過酸化水素になります。これを不均化反応（ディスミューテーション）と言います。これを触媒するのがSODです。SODは過酸化水素を発生しますが、これとスーパーオキシドが反応しますとより毒性の強い三電子還元体ヒドロキシラジカルを生成することが知られております。したがって残っている過酸化水素を徹底的にやっつけないと更に活性なものになってしまうわけですね。これはハーバーバイス反応といわれ鉄などの金属イオンが触媒いたします。ここでできる酸素が一重項ではないかと言われた時代があります。最近では否定的になってはいますが、そもそも一重項酸素をきちんと証明する方法が無かったためにはっきりしません。私はこれが一重項ならおもしろいと思っていますのでいずれ証明してみたいと思っています。

スーパーオキシド自身は活性が弱いと言われてはいますが、別の化合物、さっき言いました助剤分子が関与致しますと一段と活性が高まってくることが私どもの実験で明らかになって来ました。特にハロゲン化分子、炭酸ガス、リン酸などがスーパーオキシドと反応しますとパーオキシ型中間体を経て極めて強い酸化能を持つようになる

ことが明らかになりました。大腸菌と人間を一緒にしてくれるなどおっしゃる方が居られるかも知れませんが、私どもは大腸菌の成育とその成育阻害を指標として酸素毒性を調べることをしております。大腸菌ではいろいろな効果が早く現れるので便利で良く使われる実験系です。5時間から23時間大腸菌を成育する過程に農薬に使われるパラコートを加えますとスーパーオキシドを発生するのでこれが大腸菌の成育を阻害します。クロロホルムとか四塩化炭素、プロモトリクロルメタンなどのトリハロゲン化物を加えますと活性が著しく増大し、成育が完全に阻害されるようになって来ます。どういうわけかメチレンクロライドだけはまったく影響を及ぼしません。これらは有機化学をやっている人達がいつも使っている溶媒であり、洗濯屋さんがドライクリーニングに使うものもこういった類であります。

次にこれも私どもがやった実験であります。核酸は塩基、糖とリン酸基から構成されています。リン酸基がスーパーオキシドを著しく活性化することを以前に明らかにしましたが、これをヌクレオチドに適用してみました所、塩基を選択的に切り出すことが明らかになりました。スーパーオキシドのケミカルなソースとして $\text{KO}_2$ をよく使いますが $30^\circ\text{C}$ で非常に高い効率でヌクレオチドから塩基が切り出されます。出てくることを喜んでいられるばかりには参りません。これは核酸障害のメカニズムとしての意味を持つからです。つまりスーパーオキシドができた時、核酸を構成しているリン酸基によりその活性が高まり、核酸障害が引き起こされることを私どもは示唆したことになります。

スーパーオキシドは活性酸素の元凶であり、生体はSODによってこれを防御していることを先程申し上げました。SODは大変複雑な構造を持っておりまして、中心に鉄やマンガンあるいは銅や亜鉛等の金属を含んでいます。

SODの役割は不安定なスーパーオキシドから電子をもう一つ別のスーパーオキシドに移り

易くするための階段に相当することをこのように漫画化して説明しています。

いろいろな病巣、炎症部位ではスーパーオキシドの濃度が高いと言われております。そうであれば消炎剤としてこのSOD自身を使えるのではないかと今、薬としての試みがいろいろと行われております。SODは酵素そのものでありますので水には良く溶けますが、脂溶性が要求される細胞の奥にはなかなか入っていきません。SODと同程度の活性を持った脂溶性の高いしかも合成ができるような簡単な構造の物質は無いだろうかと私どもは長野助教授を中心に活発な研究を行っておりますが、すでに鉄を中心に持ちピリジン環を配位子とする簡単な錯体がSOD活性を示すことを明らかにしております。

すなわち通常の成育状態にある大腸菌の培養系にパラコートを加えますとその成育が完全に阻害されます。これに私どもの合成した鉄TPP、TPAなどの人工のSODを加えますと成育の阻害度が用量依存的に減ってきます。つまりSODミミックとして働き得ることを証明したわけあります。

次からは今日の後半のテーマになります。一重項酸素は還元的に活性されたものとは異なる活性酸素種です。さっき申し上げましたように光と色で活性化されたものです。一重項酸素になりますと有機分子との反応性が著しく高まります。化学的にはスピン禁制といわれる言葉で説明されます。通常酸素分子は三重項であり、生体物質や通常の有機物は一重項であります。三重項と一重項は反応しにくいので我々は通常酸素分子のなかで生きていられるわけです。一重項酸素になるとスピン禁制が無くなるので、反応し易くなります。したがって生体に障害を与える可能性が出てきます。従来一重項酸素を消去する有効な酵素等は知られておりませんので、ある種の現象が一重項酸素による障害か否かを明らかにすることはなかなか難しい課題であります。一重項酸素の検出方法から考えていかなくはなりません。またどんな

色、色素がこの反応を促進するかが問題となります。

皮膚はいつも光、紫外線に晒されています。もしこのような色素が皮膚にあれば、皮膚は常に空気に触れているわけですから一重項酸素ができる可能性があります。そうしますと皮膚の障害が起こり、皮膚の老化につながります。紫外線障害とは本質的にこのような現象ではないかということにもなります。そうしますと皮膚を酸素障害から守るにはどうしたら良いかということになり、まさに活性酸素とコスメロジーとの接点になるわけでありす。

一重項酸素研究の問題点のひとつは先程申し上げましたように生体中での生成を確認する方法が今まで無かったことであります。またその生体への作用はどの程度かという点も明らかにする必要があります。

従来から一重項酸素は光増感剤すなわち色素と光で生成することが知られています。有機化学反応にもしばしば使われる方法です。光が無くとも過酸化水素とNaOClあるいは燐オゾニドといった系で一重項酸素を生成することが証明されております。証明方法はもっぱらある種の反応生成物の構造からの推定によります。私どもは、光が無くとも生体の中で一重項酸素を生成する新しい系としてナフタレンエンドパーオキシドというものを新たにデザイン致しました。これは生理的条件下で熱的に一重項酸素を発生させるのでいろいろな判定に使えます。このエンドパーオキシドはナフタレン誘導体に別途の方法で作った一重項酸素を反応させて合成いたします。これが熱的に分解致しますと一重項酸素を発生して自身はもとのナフタレンに戻るという系です。この化合物を生体の中に入れ、分解してできる一重項酸素による障害を見ようというものです。

ここでもまた大腸菌を利用します。エンドパーオキシドを加えて行きますと用量依存的に成育阻害を受けます。つまり一重項酸素でも大腸菌成育が阻害されたことを示しています。37℃とい

う生理的条件下より低い温度では阻害度が低下しますが、これはエンドパーオキシドからの一重項酸素生成速度の低下に対応します。

ここに示したのは日刊工業新聞昨年2月の記事です。“女性の敵をチェック”、“肌の老化研究に役”、“一重項酸素を高感度検出”、“コーセー研究所と東大”、と出ています。私どもの教室出身の研究員がコーセー研究所の中で頑張っていますが、その縁で共同研究をやっております。この種の研究では先程申し上げましたように生体の中から一重項酸素を特異的に感度良く検出する方法が無いと何も議論ができません。一重項酸素は光と色素でできるわけですが、励起一重項状態から基底状態の酸素に戻る時に1268nmに相当する光を出します。それを選択して増幅する装置がコーセー研究所で開発されました。溶液中に増感剤を加え、レーザー光を照射すると一重項酸素が発生しますがこれに消去剤を加えると減少するのが一目で解ります。メラニン色素やコラーゲンと一重項酸素の相互作用はコーセーが一生命やっている研究であります。その流れの中でこの装置が開発されたわけです。現在のところこの装置は日本に一台しか無いはずで、これを使用する研究はコーセーの研究所に行ってもやらせてもらうしかありません。私どもも始終行っては使わせてもらっています。コーセーは肌の衰えを隠すのではなく、老化を抑える、女性の夢をかなえる化粧品開発を目ざして研究を行っているとのこと。そういうことで女性の敵と言うのは一重項酸素であります。つまり光が当たって色素があると皮膚の周りで一重項酸素ができ、それが皮膚の老化に繋がる可能性があるという訳です。従ってこの装置は有効な化粧品の創製には欠かせない武器になると思われます。

どんな色素が光の働きで一重項酸素を出すのでしょうか？いろいろ言われている中でコプロポリフィリン、プロトポリフィリン、ヘマトポリフィリンのようなポリフィリン骨格を持ったものがあります。生体はこれらを産生します。プロトボル

フィリンというのは実は血液の赤い色素ヘモグロビンの本体であり、中心に鉄が入っています。生体は細胞の隅々にまで呼吸で取り入れた酸素をこれに乗せて供給しています。つまりこれは酸素のキャリアーです。また私どもが研究している薬物代謝酵素であるチトクロム P450 といわれるものも全部このポルフィリンに鉄のはいった形です。そのほか微生物が産生することも知られています。これらは多くの  $\pi$  電子が共役している色素のひとつです。それからよく有機合成で一重項酸素を発生させる時に使うローズベンガルもそのような色素です。エオシンもそうです。これは最近に使わなくなりましたが赤インクの中の赤色素です。これは実際にやった人のいる実験の話ですが、蟻が集まってくるので困ってしまいこれを退治するために甘い水の中に赤インクをたらして光の当たるところに置いておきました。すると案の定蟻の群れ来てこれをなめ、すべて死んでしまいました。この系では一重項酸素ができてこれをなめた蟻が死んだと説明されています。このように一重項酸素を与える色素はいろいろと知られているわけです。

コーセーで開発した一重項酸素の高感度選択的検出系で、例えばヘマトポルフィリンにレーザー光を照射しますと一重項酸素に基づく 1268nm の選択的な発光を見ることが出来ます。色素量に対応して発光が増えており、一重項酸素の生成と対応しています。

一重項酸素生成能を比較してみますと、有機合成に良く使われるローズベンガルに比べ、ポルフィリン系は圧倒的にたくさんの一重項酸素を出すことが分かります。

さあ、これは何でしょうか？ これはコーセー研究所から借りたスライドです。先程からの数枚もそうです。健康の人を暗室の中に入れ、紫外線を当てた時の写真です。このように光ります。顔を洗えばきれいに取れて光らなくなるのでしょうか？ この辺は聞いてみないと良くわかりません。皮膚には皮膚の恒常性を保つことに関係するいろいろな微生物がいることが知られています。その

うちで最も多くいるアクネ菌は代謝でポルフィリンを産生します。それが皮脂腺から分泌しまして、鼻とか顎に出てきます。それが分かるんですね。健康人ということですがいったい誰なんでしょう？ とにかくこれ位ポルフィリン類が顔の皮膚にあるということです。

ある方法で肌から取ったこのポルフィンを集めて例の装置にかけてみますと 1268nm に発光が認められます。標品であるアクネ菌、肌から取ったアクネ菌のポルフィリン、コプロポルフィリンのデータなどを解析してみますと吸光度との対応などから、皮脂と一緒に分泌され皮膚に存在しているのは結局コプロポルフィリンであり、これは光に当たると一重項酸素をしっかりと出していることがわかりました。つまり光に晒されている皮膚の上では一重項酸素が生成しているわけです。したがって今後は一重項酸素による障害がどの程度であるかということの研究していく必要があるし、また、消去するものを与えるかあるいは紫外線が当たらないような工夫などかつ重要な問題となってくるわけです。

ここで一重項酸素と関連して最近話題になっている、夢の新物質、 $C_{60}$  についてお話いたします。最近のサッカーブームは大変なものでありますが、この物質の形はサッカーボールそのものであります。勘定してもらえばすぐ分かりますがサッカーボール表面の頂点は 60 あります。この物質は炭素だけでできておりますので  $C_{60}$  と呼ばれます。同様にダイヤモンドも炭素の同素体でありますし、すす、黒煙みたいなあいう汚らしいものもそうです。 $C_{60}$  の存在は理論的にずっと前から予想されていましたが実際に証明されたのは極最近であります。すすの中に存在することが分かって以来世界的な規模で爆発的に研究されるようになりました。例えばこの中に金属を入れたらどうなるだろうか？ 超電導物質としての可能性はどうだろうか？ いろいろ興味が尽きません。最近ではエイズに効くのでは無いかなどの話も出て参りました。そういう訳でこの研究を文部省が重点研究

に指定しました。これはすすの中に有ると言うことですから体の中に入る可能性があります。これを使った化学反応を扱う研究者にとっては有害かどうかは大問題であります。我々はC<sub>60</sub>の生体への影響、生物機能と云うものを調べようと云うことで一つの研究班を組織致しました。私はその代表になっておりますのでこの物質を扱うことが多くなっております。

C<sub>60</sub>をベンゼンに溶かしますと炭素だけの化合物にも拘らずこのようにきれいな紫色を示します。構造上から云いますと炭素だけでサッカーボールになるためにはこのように二重結合が共役しないといけません。まさに共役 $\pi$ 電子系の固まりのようなものです。したがって色素と云えます。それでは光を当てれば一重項酸素を出すのではないかという疑問が生じます。

またもやコーサーの開発した装置で測定しますとこのように1268nmにピークを持つきれいなスペクトルが得られました。サッカーボールは光を受けて一重項酸素を出しているわけです。

「転ばぬ先のベーターカロチン」とコマーシャルに出ているベーターカロチン、これは一重項酸素を消去するものです。光と色素でできる一重項酸素を色素が消去する皮肉な仕組みになっているわけです。

ベーターカロチンの量が多くなれば明らかに一重項酸素の生成は減ってきます。

ある病巣、例えばガン腫瘍にこのC<sub>60</sub>を選択的に集まるように細工をしてからレーザーなどを使って局所的に光を当てることができればそこで一重項酸素が発生し、その毒性がガン細胞をやっつけることとなり、ガンが治る可能性が考えられます。このような考え方をフォトダイナミックセラピーと云います。活性酸素を出すような物質がある病巣に運び、酸素毒性を利用して治療する方法であり、毒を逆に利用する人間の知恵が働いています。

これは私が自分の家でやった実験です。私はよく人からお菓子をいただきます。甘いものが好き

なので喜んでいただきますが、お菓子の袋にはしばしば腐敗防止のためにエージレスという脱酸素剤が入っています。ある時大きなお菓子のパックを頂いた際その中かなり大きなエージレスが入っていました。開けてしばらくしてこのエージレスが発熱しているのに気が付きました。これはホカロンつまり携帯用懐炉に使えるなと思いました。発熱はパックの中の酸素を吸収したエージレスにまだ余力が残っているために新しい酸素に触れて発熱反応を起こしたことを意味しています。この時私はあることを思いつきました。つまり私は最近五十肩ですので冷えないように携帯用懐炉、ホカロンをよく使っていますが、これは酸素を吸って非常に多くの熱を出すものです。それならばこれをエージレスの代わりに使ってみようと思いました。ビニール袋の中にパンを入れ、一方はそのまま、他方にはホカロンをもんでから一緒に入れ、封をしたわけです。この程度の酸素では発熱しません。一週間経ちますとホカロンを入れなかった方のパンは黴びましたがホカロン入りはこのように全くカビが生えていません。黴は微生物ですので、生きるためには酸素、水、温度が必要です。我々は経験上このことを無意識に知っております。冷蔵庫に入れて冷やすのは微生物の成育に必要な適当な温度を与えないと云うことであります。また例えばお餅を乾燥すると云うのは十分な水を与えないことであります。もうひとつの方法は酸素を絶つことです。好気性に進化した生物は酸素が無いと生きられません。この実験ではカビの生育に必要な酸素を吸収して与えないこととなります。一方密閉系でホカロンが空気中の5分の1のガスすなわち酸素を吸って止まると云う事も実験で確かめました。ホカロンは酸素を吸って熱を出す懐炉になりますが、こういった使い方でずと脱酸素剤となり、ものの保存に使えることとなります。ただしこの保存方法が完璧であると信じて使用されると私の信用にかかわります。何故なら効果がどこまでもつかを私は確かめて見ました。その結果何週間かの後、一方が腐敗してべた

べたになった時点で、ホカロン入りの方も程度は低いのですがわずかに黴びが生じました。これはどうしてでしょうか？ 酸素が完璧に取れなかったのかあるいはもともとすでに黴があったのか？ この辺は良くわかりませんが今後検討して見たいと思っています。スーパー等で売っている真空パックの食品はまさに酸素を抜いてある状態ですが真空にできないようなものには安価なホカロンを使いますとかなりの程度の防腐効果が有るということをごっそりお教えいたしたいと思います。

以上、酸素分子の功罪と申しますか、その二重性格性について述べてまいりました。人はよく「空気のような存在」と云います。これは身近な物事の恩恵がとかく忘れられがちである事のたとえでありまして、そういったものが無くなった時

に初めてそのありがたみが分かったと云った意味です。夫婦の間柄などが良くそのように云われますが、相手を怒らせたなら大変怖いものです。一方薬学の立場で申し上げるとすれば、これは薬と毒の關係に良く似ています。薬の価値が忘れられて副作用が特に取りざたされている傾向がありますが、正しい使い方をしなければ薬だって怒りますよと私はいつも云っております。最近のMRSA問題も薬の使い過ぎによります。薬を安易に使ってその恩恵に慣れ切っていたためにこのような面が出てきたのだと私も思っています。酸素の二重性格性は実は薬の二重性格性に非常に良く似ている点を申し上げて本日の締めくくりとさせていただきます。ご静聴どうもありがとうございました。

# コスメトロジー研究雑感

# 研究雑感

## 本研究とコスメトロジー

渡辺 晋一

(平成2年度)

古くより皮膚科の分野では学問的興味から pigment biology の研究が行われていた。しかし色素異常症は、生命的に問題となるようなことがないため、医学的な強い関心がもたれず、治療の面では、いわば見捨てられてきた疾患であった。しかし近年、医学の分野においても quality of life が叫ばれるようになり、生命的には問題となる疾患でなくても、その疾患で悩んでいるヒトの苦痛をいかに取り除くことができるかが重要な課題となってきた。コスメトロジーはまさにこのような今まで有効な治療法がなかった色素異常症に対し、患者さんの quality of life を高めるために多大な貢献をしてきた。しかし、近年のレーザー医学の進歩により、ある種の色素異常症をなら癒痕を残すことなく治療することが可能になった。特に、太田母斑は我が国では1000人に6人の割合で存在すると報告されており、顔面という目立つ部位に生じ、しかも女性に多いことから、太田母斑は美容的にも、精神的にも深刻な問題であった。今回の研究の目的は、このような患者さんの悩みを軽減することであり、まさにコスメトロジーの目指すものと同じである。元来医学、特に皮膚科学は、コスメトロジーと表裏一体の関係に在り、皮膚科学でカバーできない疾患に対し、患者の quality of life を満足させる一つの手段として、コスメトロジーが大きな役割をはたしてきた。今回の研究は、医学とコスメトロジーがクリアー

カットに分けることができるものではなく、医学が古典的コスメトロジーの領域に踏み込むことができることを象徴的にあらわしている。今後本研究が、医学とコスメトロジーが融合した新たなコスメトロジーを創造するきっかけとなり、さらなるコスメトロジーの発展につながることを期待している。(帝京大学)

## 本研究とコスメトロジーとの関わり

新井 洋由

(平成2年度)

皮膚は絶えず外気に曝されており、からだの中でも、いわゆる酸素による傷害を最も受けやすい部分である。私はこれまで、生体成分、特に脂質成分の酸化とそれに対する生体の防御機構について研究を行ってきた。特に、脂質酸化を防ぐ作用のあるビタミンEに注目している。ビタミンEは、その生理作用や抗酸化作用の化学的メカニズムに関してこれまでも膨大な研究があるが、この疎水性の物質が生体内あるいは細胞内でいかに必要な部位に必要な量だけ供給されているかという点に関しては殆ど研究されてこなかった。私は、細胞内のビタミンE輸送に関わると考えられる特異的結合蛋白質を同定しており、本蛋白質が、恐らくは皮膚組織にも存在し、この蛋白質の増減が皮膚の酸素ストレスに対する抵抗性を規定する一つの因子であると想定し、この蛋白質を通して「コスメトロジー」を考えてみようと思った。しかし、研究を進めていくうちに、このビタミンE特異的結合蛋白質は、実は生体内で肝臓にしか存在しない蛋白質であることが分かってきて、生体内のビ

タミンEの循環に非常に重要な役割を果たしていると考えられるものの、皮膚との関係は余りないことが明らかになってきた。そのようなわけで、「コスメトロジー」から研究費をいただいたけれど、多少の後ろめたさを感じていたわけである。ところがである。我々がこの蛋白質に関する研究成果を論文に発表したところ、ドイツのある化粧品メーカー（ニベアをつくっている会社らしい）から、このビタミンE輸送蛋白質を化粧品中に入れて、ビタミンEの皮膚への吸収をよくすることを考えているので、サンプルを送ってこないか、という問い合わせがきたのである。そのようなことがうまくいくかどうかは分からないが、現在では、遺伝子工学の技術を使えばこのような蛋白質の大量生産も不可能ではないし、本来は肝臓にしか無い蛋白質を多少遺伝子的に改変して、皮膚でも作用し、しかも長持ちするような蛋白質を人工的につくることも可能である。だから、この蛋白質入りの化粧品が、「ビタミンEの効果を有効に利用する化粧品」として市場に出回ることもあるがち夢ではないかもしれない。（東京大学）

## 私のコスメトロジー考

森 陽

（平成3年度）

最近のコラーゲンとかヒアルロン酸といった専門用語がテレビコマーシャルを通じて茶の間でよく聞かれるようになった。コラーゲンの誘導体やヒアルロン酸が化粧品に添加使用されているのはこれらの生体高分子がもつ保水性という物理的性質を利用しているものであるが、あたかも生体成分が補給されるような錯覚を視聴者に与えている。

皮膚ヒアルロン酸は加齢と共に減少し皮膚のみずみずしさが失われる一つの原因であるが真皮のヒアルロン酸と表皮のヒアルロン酸は別々にコントロールされているようである。ヒトでは明確な

証拠はないが、エストロゲンによってヒアルロン酸合成酵素の誘導が起こるが、肝心のヒアルロン酸の減少している老化した皮膚ではそのレセプターも少なくなっている。したがってエストロゲンを投与してもヒアルロン酸の増加は期待できそうにない。一方、表皮はレチノイン酸の投与によってヒアルロン酸が増加するがレチノイン酸は皮膚に炎症反応を示すので化粧品に使用することはできない。もし経皮的に吸収され得る低分子化合物によって内因性ヒアルロン酸合成が促進できれば有用な方法となる可能性がある。

最近では表皮細胞と皮膚線維芽細胞による細胞間相互作用によって種々のサイトカインの産生や今回の私共の報告にも見られるようなマトリックスメタロプロテアーゼの産生の増大が見いだされている。今後は単一細胞による実験よりもこのようなより生体に近い実験系を用いて検討する必要があると考えられる。化粧品の世界でも皮膚化学の地道な研究によって生体反応から説明でき得るようなよい製品の生まれることが期待される。

（東京薬科大学）

## 本研究のコスメトロジーに及ぼす影響

早川 律子

（平成3年度）

人間は紀元前にすでに目の回りを彩り、頬や口唇に色をつけ、黄土（yellow ocher）を顔に塗ったと報告されている。古代エジプトにおける化粧は、太陽の光による皮膚の障害や結膜炎を防止することが目的であった。現代におけるメイクアップの意義は顔の欠点を隠し、肌色を整え目鼻立ちをハッキリさせて美しく見せることによる心理的効果と紫外線から皮膚を防御することにある。一方、皮膚の洗浄と保護を目的とするスキンケアに用いる化粧品は使用者の年齢、性などの個人的な条件と気温や湿度、風の強さなどの環境条件を

考えて選択する必要がある。皮表脂質量は男性では同年齢の女性より多く、思春期では多く、高齢者では低下している。皮膚の洗浄に用いる石鹼や洗顔料は、思春期の皮脂分泌の旺盛な人には脱脂力の強い製品が適しており、中年以降の皮脂分泌低下を来した人では脱脂力の弱い製品が適している。洗顔後の皮膚の保護に用いる製品も、皮膚表面の状態によって異なる。皮膚表面の状態をよく観察し痤瘡や乾燥の有無、環境条件により、適切な製品が異なる。このようなメイキャップやスキンケアに用いる化粧品は、その製造過程で皮膚安全性を確保する努力がなされているが、配合成分が経皮感作を起こす可能性をゼロにすることはできない。化粧品を使用して皮膚トラブルを生じた患者に、安全に使用できる化粧品を選択し適切なメイキャップやスキンケアを指導するためには、その原因物質を同定し、安全な化粧品を選択することが必要となる。この場合にパッチテスト検査が施行されるが、至適濃度と適切な方法でパッチテストが施行されないと判定を誤り、適切な指導が行えない。本研究により、日本接触皮膚炎学会の共同研究が推進され、より多くの化粧品配合成分のパッチテスト至適濃度と基剤が決定されることは、コスメトロジーの分野に大きな貢献を果たすものと期待される。(名古屋大学)

## 本研究成果のコスメトロジー に及ぼす影響

北村 幸彦

(平成3年度)

化粧品はその性格上、医薬品以上の安全性が要求される。また化粧品を使用する人口が膨大であるために、化粧品に対する過敏症の発生を根絶することは困難である。皮膚はヒトの組織の中ではマスト細胞の存在密度の最も高い器官の一つであり、化粧品過敏症の中にはその発生にマスト細胞が関与している場合がかなりあると思われる。化

粧品過敏症の発生には種々の機構が考えられるが、このうちマスト細胞が関与するものを *in vivo* でしらべるための実験システムを作製することが、本研究の当初の目的であった。しかしこの分野の研究の世界的な流れの中で、実験に使用することを予定していたマスト細胞欠損動物が、なぜマスト細胞を欠損するのか、その機構を分子レベルで解明することが、当初予定していた実験を開始するに先立って必要となったために、この報告書に記載した研究は、マスト細胞欠損動物で異常がみられる *c-kit* 遺伝子の分子レベルの解析が中心となった。

幸にして、我国で発見されたマスト細胞欠損動物である *W<sub>s</sub>/W<sub>s</sub>* ラットの分子レベル、細胞レベル、個体レベルの特性がかなり明らかになったので、今後この *W<sub>s</sub>/W<sub>s</sub>* ラットを使用する皮膚過敏症の研究を改めて行える状況にある。近い将来 *W<sub>s</sub>/W<sub>s</sub>* ラットはマスト細胞の関与が疑われる皮膚過敏症の検査や研究に必須の実験動物になると考える。

最後に本研究の遂行を可能にいただいたコスメトロジー研究振興財団に深い感謝の意を表します。(大阪大学)

## 本研究成果のコスメトロジー に及ぼす影響

荒殿 誠

(平成3年度)

水-油-界面活性剤からなる多相系についての本研究は、エマルジョンの安定性、相分離後の各相の組成、相量などについての基礎情報を与える。これらは、化粧品、香料の洗浄、起泡、吸湿作用などの品質や安全性に直接関連した重要な要素であり、材料の機能、物性等の基礎研究として本研究は大きな意味をもつ。また本研究の成果は、油/水界面での非イオン性界面活性剤の吸着現象を正しく理解し、界面での吸着膜の構造、物性など

を知るうえで重要であることはすでに報告したとおりである。さらに本研究は油/水界面での界面活性剤相の濡れの研究へと進展している。

界面での現象や溶液物性がコスメトロジーの科学の重要な一部であることを考えると、長期的に見て本研究成果のコスメトロジーへの影響は大きいと思う。 (九州大学)

## コスメトロジー雑感

滝川 雅治

(平成3年度)

「Forever young」(日本題は忘れた)という映画を飛行機内上演してみた。米国映画で、第二次世界大戦前に、フィアンセが交通事故で意識不明になり絶望した空軍パイロットが(実は彼女は命をとりとめたのだが)、軍機密の冷凍装置で実験モデルとして冷凍人間となる。戦後、彼が冷凍保存されていることは忘れ去られるが、基地に侵入した少年のいたずらで現代の世界に再生する。彼はかつてのフィアンセが生きていることを知り、そこへ飛行機を駆って飛んで行き、ハッピーエンドとなる。再生してから再会までの数週間の間に、彼はどんどん老化して老人になっていくわけであるが、これがメーキャップで上手に表現されている。

映画、演劇などでは化粧・メーキャップをうまく利用して、臨場感を出している。これなどは化粧の目的が極めてはっきりしているわけである。しかし、日常生活ではどうであろうか。「人は何故化粧するのか」という問に答えることは容易でない。古代世界や現代未開地では、自然からの身体保護あるいはそれ以上に宗教的な意味が化粧に賦与されていることはちがいない。現代社会においては、大きく2つの目的に分けられよう。一つは、実際の、身体保護のため。例えば、サンスクリーンを用いて皮膚の光老化を防止する、コラー

ゲンなど種々の保湿剤の入った化粧品を用いてしわとりにはげむなどがこの例であろう。もう一つは、自己を美しく魅力あるものに表現すること。ただ、最初の目的もつまるところ皮膚を美しく保つことにある。

男性、女性という点から考えてみれば、身体保護のための化粧には性差がないといえる。しかし、第2の目的については、ごく一部の男性のためとは言え、主に女性のものであろう。しかし、女性についてみても、年齢、状況に応じて化粧する目的は微妙に変わるわけで、「何故化粧をするのか」という問には、本人にも答えられないのではないだろうか。 (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

吉里 勝利

(平成3年度)

コスメトロジーの研究内容の一つには“美しくあるための技術”の開発があると思う。何が“美しい”か。美の基準は何か。などと質問すると客観的な答えはないに違いない。ただ次の答えは誰にも受け入れてもらえると思う。“自然なままで健康な状態はそれだけで美しい”。“自然なまま”が美であるとする“自然なままにする技術”がコスメトロジーの目指すものの一つとなっ  
てしまい自己矛盾に陥りそうである。

この場合“自然のまま”に“健康な”ということが加わって個人によっていろいろな技術が必要になってくるのかもしれない。人によっては“健康な”が“若々しい青春”になる場合もあるであろう。

自然なままにする技術を開発するためにも自然の状態をモデル化して人為的操作を加えて分析・解析しなくてはならない。また、皮膚は人間の自然美を議論する時、最も関心をよぶ器官でもある。本研究が目指す理想的皮膚モデルの開発とそのモ

デルを利用した基礎研究は Cosmetology の発展に大きな貢献をすと思う。(広島大学)

## コスメトロジー雑感

古川 福実

(平成3年度)

オロジーと名が付く分野を耳にするあるいは目にする時、一般に我々は何かしら近寄り難いものを感じる。自分の分野である皮膚科学即ち Dermatology にしても、その門をたたこうとするといささか緊張する。しかし、Cosmetology に関しては、そのような緊張感は余りない。何故だろうと考えるに、その答は単純ではない。

1つは、比較的新しい分野であって、オロジーにつきもののあらかじめ設定されたハードルがないことが原因かもしれない。逆に言えば、そのハードルがないあるいは意識されないことが Cosmetology の最大の利点なのかもしれない。研究は、自由闊達にしかも紳士的に全力で立ち向う所に醍醐味がある。無意識に設定してしまうバリアの無い分野に新の研究が生まれる可能性を感じる。

他の理由は、私自身の Cosmetology に対する無知からくるものかもしれない。多分、本学間に今迄蓄積された“知”は膨大なものであろう。幸か不幸か、私自身はその膨大さを知らない。無知なれば、無知なりに自由な発想が可能となり、既存のオロジーでは自己規制していた方法が実現性を帯びてくる。

今回の研究テーマとしてサンスクリーンの効用を細胞障害性という従来の思考様式と易感受性といういささか非科学的な思考様式から取り上げた。その成果には、いささか自信がないが、今後も、自由闊達に発想を拡げて行こうと思う。研究を比較的自由に楽しむことができたのも、自らのイメージとしての Cosmetology のおかげである。

(浜松医科大学)

## 長寿とコスメトロジー

本間 聡起

(平成3年度)

私たちの研究室では、長寿の要因を多角的に検討するために、東京都内の100歳老人の訪問調査を行っている。普段、病院では内科系の診療に当たっているのに、痴呆の程度の判定のほかは、診察や超音波などの検査、血液の検査が中心だが、その前後に交わされる何気ない会話や行動の中からも、いくつか長寿の秘訣をうかがい知ることができる。100歳老人は、約4倍女性の方が多いのだが、彼女らは、なかなかの“おしゃれ”である。新宿区のKおばあちゃんは、記念撮影と言ったら、「髪をとかしてから」と言って、正直言ってあまりとかす髪もないのでは？という髪を一生懸命なでてから写真に収まった。今は既に亡くなった自分の亭主と区別がつかなくなっている息子さんに隣の部屋から櫛を持ってきてもらって…。渋谷区のSおばあちゃんは、最後に記念撮影をしましょうと言うと、「私は昔は美人だったから」と言って、とうとう写真は撮らせてもらえなかった。70歳と言われても信じてしまうぐらいなのに…。彼女は信州の山荘にでかけて山を見るのが大好きだったが、99歳の誕生日を迎えるころから急に耳が遠くなり、それと同時に行動半径が狭くなった。もちろん、ただ長寿であると言うだけならば、あまり百寿者に学ぶことはないが、彼らは一様に90歳を越える超高齢になるまで、日常生活の活動レベルが高く、またその頃の写真をみても20歳は若く見える、健やかに長寿を達成している人達である。人間を見て年齢を想像する時には、様々な要因を瞬時に総合的に見ているはずだが、外見の中で皮膚の状態というのは、おそらく大きなウェイトを占めているのだろう。若返りは難しくても、皮膚の老化を少しでも防止し、若い外観

を保つことは、単なる長寿ではなく、質の高い長寿を達成するのに重要な方策となる。その方策を探るためにも、皮膚の老化に関する客観的で、そして簡便な評価法が、臨床の場でも研究の場でも望まれる。長寿社会の到来とともに、コスメトロジーは、もはや若い人のものばかりでなく、“老年学”にとっても重要な関心事となるからである。

(慶應義塾大学)

## 長寿社会でのコスメトロジー

鈴木 克周

(平成4年度)

日本人の平均寿命が80歳となっている。生活、経済、環境が著しく悪化しなければ、いずれ90歳近くまで伸びる可能性がある。長く生きるということは、経験を蓄積するだけでなく、傷害を蓄積することでもある。現在癌が主要な死因となった所以もここにある。

皮膚を清潔で美しく保つことは、これまでは比較的若い世代の人の関心事であったが、熟年を楽しく健康で生きるために広い世代でますます重要な課題となってきている。皮膚は、微生物や温湿度の変化、化学物質、光線と対峙する上に、視線にもさらされるわけであるから、もっとも多機能な部位であるともいえる。長く生きるためにこの身近な器官とうまく接してゆきたい。

個体の外環境への接点である皮膚を科学することは、私のような門外漢にも魅力的な分野である。蛋白質の分泌を専門としてきたので、蛋白質の機能を用いてコスメトロジーに積極的に寄与したいと考えていた。高齢者の皮膚はいろいろな成分に不足がでてくるので、その機能を保つために補うとすれば、細胞が作っているのと同じ物がよい。50年間以上も継続して皮膚に補うとすると、副作用の少ない安全な物でなければならない。筆者らがこれまで研究対象として扱ってきたリゾチー

ムは、バクテリアを退治する機能と抗炎症作用を併せもつ蛋白質である。しかも、一般に不安定と言われる酵素蛋白質の中で、大変に安定な性質であるだけでなく、人間の体内で作られて涙の成分になっている安全な物質である。元々顔と馴染みの物質であるから、このような蛋白質を多量に生産すれば、他のコスメトロジー素材の細菌による劣化を防ぐとともに皮膚の炎症を抑えて安定化し、皮膚に侵入する有害バクテリアを溶解して有用な素材となろうと発想したわけである。リゾチームの分子としての大きさは、酵素蛋白質としては最も小さい部類にはいる。大きさが小さいので遺伝子工学・蛋白質工学という手法を用いる改良も行われている。小さい分子ではあるがますます高機能化しつつある。これを効率良くたくさん作る原理を探るのが本研究課題である。(広島大学)

## 皮膚と私

澤田 嗣郎

(平成4年度)

私は化学計測を専門としているので、目にするものは何でもこれはどのように計測すれば良いかなどとすぐに考えてしまう。いわゆる職業病というやつである。難しそうな対象程いつまでも気になって、いわゆる夜眠れそうにないってことになるのである。

今般貴助成金を頂くことになった皮膚計測もその中の一つであった。私が光熱変換分光法に興味をいだきはじめて、しばらくしてすぐに本法により皮膚への薬物の浸透や外的刺激に対する皮膚の反応を計測してやろうと考えた。10年前当時、そのような分光計測は皆無といってよく、ちょっと試しにやけどの薬の皮膚への浸透具合を調べて興味深い結果を得ても適切なコメントや相談相手をして下さる皮膚科学の専門家は近くには居られなかったと思う。当時私共の研究が新聞で紹介さ

れたとき、真っ先に反応したのは、冷凍マグロの鮮度を解凍せずにわからないかというところの魚おろし問屋のおやじからの問い合わせであった。半年間程そのおやじの相談にのってやったが、何となくそのままやむやみになってしまった。

私は皮膚計測に関心を持っていても、所詮皮膚科学がなんたるものか皆目わからないのがほんとのところである。皮膚は生体防御膜であり、生体を制御する調製膜位の知識しかないのであるから、昨今では皮膚を通して薬物を投与したり、必要な養分を供給したりすると様々な目的の研究があることを知り、改めて私共の研究もまんざら捨てたものではないと思ったりしている。大して痛い思いもすることなく、体の悪いところを早期に発見したり、古くなった体の部品を簡単に交換でき、体を痛めずに治療できればどんなに良いことかと思いつつ、その夢に本研究が少しでも役立てばと考える次第である。

(東京大学)

## コスメトロジーは Interface Science

日高 久夫

(平成4年度)

コスメトロジーは有機化学、生化学、医学、生化学、コロイドおよび界面化学、光化学、油化学など広範囲にまたがる学際領域の学問 (Interface Science) である。自然科学ばかりでなく、社会科学 (心理学なども含めて) とも深いつながりがある。広い意味で、コスメトロジーは人間が健康で快適な生活を送るための科学と言えよう。環境化学とは一見関係なさそうだが、大気汚染の悪化に伴う紫外線の増加は皮膚ガンの発生や免疫機能低下などを引き起こすことが指摘されている。これらの問題を解決するためには、いろいろな専門分野の研究者が違った立場 (角度) から検討し、新しい独創的な方法を見つける必要がある。分子会合状態や相互作用に関する分子レベルでの基

礎的研究を行うことが重要である。具体的な例を上げると、化粧品の中には白色顔料として酸化チタンが多量に含有している。これは紫外線を散乱して、UVカットの役割をしていると言われていたが、実際はミクロ的に電荷分離が起こり、光酸化反応が進行している (その程度は、酸化チタンの種類によって異なる)。このように酸化チタン存在下において、界面活性剤や高級脂肪酸などの化粧品素材はOHラジカルなどの活性酸素種の攻撃により、光酸化を起している。生体系において、より短波長の紫外線は細胞核中の遺伝子を傷つけると言われているので、DNA、RNAなど生体高分子 (遺伝子) の酸化チタン中での光劣化を調べることは必要である。特に、タンパク質を構成しているアミノ酸が光分解され、アンモニウムイオンや硝酸イオン、炭酸ガスを生成するメカニズムを解明することは重要な課題であろう。このような研究から皮膚保護作用力があり、人体に安全性の高い化粧品が開発されるであろう。

コスメトロジーが、いろいろな学問体系を結びつけるInterfaceの役割を果たし、これらの成果からさらに新しい境界分野が生まれることが期待される。

(明星大学)

## コスメトロジーと皮膚脂質

小野 輝夫

(平成4年度)

皮膚を構成している細胞がかなりの速度でターンオーバーしていることは、角化をはじめとする細胞の落屑、皮膚表面の油性の潤いの変化からも容易に想像されるが、脂質の直接的な関与はこれまで不明であった。最近我々が長いこと関心を持ちながらその機能を明らかにできなかった細胞内サイトゾールの脂肪酸結合蛋白 (FABP) ファミリーの新しい分子種の可能性が高い蛋白がヒトの皮膚から単離され、且つこの蛋白が既知の分子

種と明らかに一次構造を異にするが、ファミリーのメンバーであり、ヒトの乾癬発症と密接に共役して発現されているらしいことが報告され、ケラチノサイトの増殖分化にFABPが関連しているのではないかとのFABP機能を解析する研究上の突破口が見出されそうである。細胞機能とセルサイクルを理解する上で皮膚の脂肪酸研究の比重は重いと考えられる。我々が関心を持つもう1つの脂質にコレステロールがある。皮膚の皮脂腺は不ケン化物を分泌して皮膚の潤いと光沢、湿度を保っているが、不ケン化物の中にはスクアレンと呼ばれるコレステロール生合成の中間体でもある炭化水素が多量含まれている。このことは皮脂腺でのコレステロール合成系が肝臓などの合成系と異なりスクアレン・エポキシダーゼの発現が極めて弱い、あるいは酵素に対する阻害作用を持つ蛋白の存在などを推定させ何らかの阻害機構があると推定される。動物でもサメの肝臓は他と異なり例外的に大量のスクアレンを含んでいるので、皮膚の皮脂腺との比較がコレステロール生合成の面で大変興味深い。コレステロール生合成の律速段階は、既知のHMG-CoA還元酵素以外にスクアレン・エポキシダーゼも有力で、細胞の増殖分化、細胞内情報伝達に役立つプレニル化蛋白(rasやG結合蛋白)がスクアレン・エポキシダーゼ段階以前の生成物を利用している点は細胞周期上極めて興味深い。(新潟大学)

## 高等植物の天然色素

### アントシアニン

飯田 滋

(平成4年度)

天然色素は人類が化粧を始めたときから化粧品として最も重要な物質であったことは疑い無であろう。我々が日常目にする天然色素の中で植物色素、特に花の色素の占める割合の大きさは、最近の花卉に対する関心の高さをみれば明らかであ

ろう。植物色素としてはカロチノイド、ベタレイン、フラボノイドなどがあげられるが、それら主要色素の中で最も多彩な色を構成している色素はフラボノイド系のアントシアニン色素であろう。アントシアニン系の色素は人類が花より“色水”を得たときから常に最も身近に合った色素であったと考えられるにもかかわらず、その化学構造の複雑さや安定性などからその利用度は合成色素に比べて今に到るまで極端に低い。しかしながら、植物のアントシアニン系色素は天然物由来の落ち着いた色調や、消費者の嗜好品として的高级化粧品天然物嗜好、さらにはフラボノイド系のアントシアニン色素は植物においては紫外線によるDNA障害に対する防御物質であって、紫外線に照射された植物体内で発現生成されることなどを考え合わせると、今後は化粧品用の色素としても最も注目される色素のように思われる。

数年前“バイオの口紅”ということで植物の組織培養により産生した天然色素を含んだ口紅が、折からの天然嗜好とも相まって大いに話題となったことがあった。このバイオの口紅に用いられた色素は数多くあるバイオテクノロジーの諸技術のうち細胞(組織)培養技術を用いたものであって、色素生合成系の遺伝子そのものを操作して天然色素の産生を高めるものではなかった。

アントシアニン系色素など多くの植物天然色素は二次代謝産物であって、その産生には数多くの遺伝子が関与している。これらアントシアニン色素生合成系の遺伝子群に関する分子遺伝学的研究は、そのほとんどがトウモロコシ、キンギョソウおよびペチュニアで行われているだけだと言っても過言ではないであろう。我々は、誰でも一度は栽培したことのあるアサガオの一系統で、江戸時代に分離され平賀源内も記載している“漢名黑白江南花、和名シボリアサガオ(絞り朝顔)”のアントシアニン色素の生合成系遺伝子の発現を調節して絞り模様を形成させる易変性遺伝子の本体を明らかにし、その発現調節機構を解明した。この

ような色素生成系遺伝子の発現調節機構の解明が、二次代謝産物系の多くの遺伝子を操作した天然色素の生産に役立ち、いつか、最も身近な色素であるアントシアニン類が、化粧品にも用いられる日がくることを夢見ている。(東京理科大学)

## コスメトロジーと私の研究

花岡 文雄

(平成4年度)

DNA修復研究の先駆者の一人であるディック・セトロウ博士によれば、通常の生活をしている人間の細胞に引き起こされる遺伝子の傷の90%以上は、太陽光線に含まれる紫外線によるピリミジン・ダイマーであるという。ピリミジン・ダイマーを含むDNAを鋳型として、DNA複製を行わせると、娘DNA分子に高頻度に突然変異を生ずる。その結果は、ご存知のように細胞のがん化へとつながっていくのである。したがってピリミジン・ダイマーの修復は非常に重要である。幸い大腸菌からヒトまで、ほとんどすべての生物はこの傷を修復するメカニズムを有しているため、少々の紫外線に当たったからといって、すぐにが

んになるわけではない。ところが私の研究で扱っている遺伝病、色素性乾皮症の患者さんの場合には、ほんの少し日光を浴びただけで、皮膚がんになってしまう。もちろん正常なヒトでも日光を浴び過ぎると、シミやシワといった美容の大敵を通り越して、やはり皮膚がんに罹る危険性が非常に高くなる。

最近、オゾン層の減少で地表に到達する紫外線の量が増加し、世界的な問題になっている。もともと皮膚がんの率が世界で最も高いオーストラリアでは、海岸に行くときだけでなく、外出には必ず日焼け止めをするようにとの呼びかけが、皮膚がん財団によりなされている。また日光浴の盛んな英国では、今夏から、気象情報の中に「がん予報」なるものを取り入れ、たとえば「明日は、30分以内の日光浴でも日焼けし過ぎるので気を付けましょう」といった予報を出すという。小麦色の肌というと健康美の象徴ではあるが、医学的見地からすると、皮膚がんになる確率の高い人ということになるかもしれない。ビタミンDの合成に必要な紫外線は、一日に数分間で充分と言われており、日光浴はほどほどに、そして紫外線防止用の化粧品は頻繁に、をお奨めする。

(理化学研究所)

# 付 録

---



事業報告書(平成5年度)

役 員

研究助成課題一覧表



# 事業報告書

(自 平成5年4月1日 至 平成6年3月31日)

## I. 4年度事業(平成5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200万円及び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)

## II. 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5年5月6日より募集を開始し同5年7月20日をもって締切りました。研究助成事業は本年度も一般公募を原則とし全国140ヶ所の大学・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9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、選考委員会の中に3分科会を設けそれぞれにおいて予備選考を行い平成5年9月14日(火)ルビーホー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19日に理事長・理事・評議員の諒承を得て受賞者を最終決定しました。

## III. 第4回功労賞・研究助成等の結果

以下のとおり合計18件が決定され研究助成金2,400万円、国際交流援助金130万円が交付されました。

功労表彰(小林孝三郎賞)	0件
研究助成	15件
国際交流援助	※ 3件

※国際交流援助については11月以降1件の追加がなされて合計3件になった。

## IV. 会議等

### 理事会

#### 第1回通常理事会

開催日時 平成5年6月10日(木)午後5時  
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  
理事総数 12名 本人出席 11名 委任状出席 1名(賛成)  
監事 2名 出席 2名

#### 審議事項

第一号議案 事業報告ならびに収支決算報告について  
平成5年度の事業内容が事務局より詳細に説明された。続いて収支計算、財産内容などが詳しく説明された。次に小田倉監事より上記内容が適正適法である旨の監査結果が表明された。質疑応答、審議の後、本議案は書面表決者を含め全員一致で賛同を得、可決承認された。

第二号議案 選考委員の選任について  
事務局より、西沢選考委員の退任及び後任選考委員として岸田修一氏の推薦が提案され、提案主旨について詳細な説明がなされた。理事会は全員一致でこれを承認した。

#### 報告事項

平成5年度の助成表彰の公募方法について  
研究助成事業の方式について、昨年との相違点を主とした詳細な説明がなされた。理事会及び評議員会は全員でその趣旨を認めた。

#### その他

研究業績中間報告集第2号が披露され、近く研究報告集第1号が発刊される予定であることが報告された。

### 評議員会

#### 第1回通常評議員会

開催日時・場所・議案ともに理事会に同じ。  
評議員総数 14名 本人出席 9名 委任状出席 4名(賛成)  
欠席 1名  
各議案とも全員一致で承認された。

## 第2回通常理事会

開催日時 平成5年11月19日(金)午後2時30分  
開催場所 東京都渋谷区渋谷2-12-15 日本薬学会館会議室  
理事総数 12名 本人出席 11名 欠席 1名

### 審議事項

第一号議案 第4回表彰・贈呈者の決定について  
表彰・贈呈の候補者について、選考枠、選考経過などに及ぶ詳細な説明の後、分野別の応募状況の確認などを含めた活発な意見が交換された。なお今回は功労表彰対象者が推薦されなかったため、該当者なしが提案された。しかるのち本議案は書面表決者を含め全員一致で原案通り可決された。

第二号議案 平成6年度事業計画案及び予算案について  
配布された資料に基づき、事業計画、予算案について新規事業、金利動向などにもふれた詳細な説明があり、前年の事業規模を維持、継承した提案がなされた。原案は書面表決者を含め、全員一致で賛同を得た。

### 報告事項

#### 運用財産について

(株)コーセーより、運用財産として2000万円の寄付(前年度分は1000万円)を受けた旨の報告があり、理事、評議員全員でその意義を確認し、二号議案採決の際の参考とした。

## 第2回通常評議員会

開催日時・場所・議案ともに理事会に同じ。

評議員総数 14名 本人出席 6名 委任状出席 7名(賛成)  
欠席 1名

各議案とも全員一致で承認された。

## 選考委員会

### 分科会Ⅰ

開催日時 平成5年9月1日(水) 午後4時  
開催場所 東京都港区虎の門1-8-7 富田屋会議室  
審議事項 素材・物性にかかわる分野の選考

### 分科会Ⅱ

開催日時 平成5年9月7日(火) 午後6時  
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  
審議事項 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5年9月10日(金) 午後3時  
開催場所 所沢市三ヶ島2-579-15 早稲田大学人間科学部  
審議事項 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5年9月14日(火) 午後5時  
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  
審議事項 各分科会の結果を総合的に判断して助成候補者が決定された。

### 表彰贈呈式

開催日時 平成5年11月19日(金) 午後4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

以上

## 第4回 研究助成を受けられたかたがた

(JA—一般研究助成 A, JB—一般研究助成 B, H—国際交流援助)

管理番号	研究題目	分野	代表研究者
JA-93-01	還元型ネオプテリン (NPH-4) の紫外線照射皮膚障害に対する効果	放射化学 薬理学 生化学	東京理科大学生命科学研究所講師  小島周二
JA-93-02	化粧品による光老化の抗酸化制御に関する細胞生物学的及び生化学的研究	皮膚科学  紫外線生物学	群馬大学医学部教授  宮地良樹
JA-93-03	太陽光紫外線で、ヒトDNA中に誘発される損傷と、その修復に関する研究	放射線生物学  細胞生物学	金沢大学薬学部教授  二階堂修
JA-93-04	色彩の心理学的意味空間の研究	計量心理学 認知心理学 行動計量学	金沢大学文学部助教授  岡本安晴
JA-93-05	細胞膜の脂質の物性と機能の基礎的な研究—リン脂質物性のコスメトロジーへの応用—	生体物性学 細胞生物 物理学	東北大学理学部教授  大木和夫
JA-93-06	化粧品基本素材金属酸化物の酸性大気汚染物質との相互作用	物理化学  固体界面化学	千葉大学理学部教授  金子克美
JA-93-07	色素化合物の光照射下での反応の解析	生物物理化学 光化学治療 光増感化学	東京工業大学生命理工学部教授  大倉一郎
JA-93-08	新規な構造を有するヒアルロン酸類似多糖の開発	糖鎖工学  高分子化学	東京工業大学生命理工学部助教授  畑中研一
JA-93-09	いわゆる”しみ”(肝斑など)の発症機構とその増悪因子に関する研究	皮膚科学	東北大学医学部講師  富田靖

管理番号	研究題目	分野	代表研究者
JB-93-01	ペプチドシナージストによるビタミンEの抗酸化能の向上ーヒト血清アルブミン由来のペプチドシナージストの開発ー	脂質生化学 食品化学	水産大学校講師 幡手 英雄
JB-93-02	層状鉱物を用いたホストーゲスト反応による有機色素のカプセル化	無機材料化学 粘土科学	早稲田大学理工学部助教授 菅原 義之
JB-93-03	化粧の個人的効果と对人的効果に関する実証的研究	社会心理学	福島大学教育学部助教授 飛田 操
JB-93-04	尋常性痤瘡の発症機序の解明のための皮膚の保湿機能と脂質代謝に関する研究	皮膚科学	新潟大学医学部助教授 山本 綾子
JB-93-05	哺乳類皮膚細胞のアポトーシスと細胞接着をつかさどるセラミドの研究	糖生物学 発生生物学 生化学	九州大学理学部助教授 野村 一也
JB-93-06	不飽和脂肪酸とその過酸化生成物の皮膚角質層への作用に関する研究	製剤学	大阪薬科大学薬学部助教授 森本 一洋
H-93-01	化粧品に関わるコロイド次元分子集合体の高次構造の分光学的解明	界面科学	チェンマイ大学薬学部助教授 Aranya Manosroi 受入責任者 東京理科大学理工学部 阿部 正彦
H-93-02	化粧分野への仮想現実感 (Virtual Reality) の応用研究	視覚工学 映像システム	神奈川工科大学助手 井上 哲理
H-93-03	日本の化粧品規制及び製造技術の現状把握	化粧品 行政	中国環境衛生部環境衛生処処長 高 国強 受入責任者 日本化粧品工業連合会 有 本 亨

(敬称略 受付順)

平成6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)代表取締役会長
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
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

## 素材、物性に関する分野

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
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
J90-06	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 西出宏之
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
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
J91-05	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
J91-08	化粧品素材としての竹節人參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
J91-10	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
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
J91-20	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
J92-01	ヒトリゾチームタンパク質を高分泌する酵母突然変異体を用いた素材生産の効率化研究	分子生物学 遺伝学	広島大学理学部助手 鈴木克周

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
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及び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機能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
JA-93-05	細胞膜の脂質の物性と機能の基礎的な研究ーリン脂質物性のコスメトロジーへの応用ー	生体物性学 細胞生物 物理学	東北大学理学部教授 大木和夫
JA-93-06	化粧品基本素材金属酸化物の酸性大気汚染物質との相互作用	物理化学 固体界面化学	千葉大学理学部教授 金子克美
JA-93-07	色素化合物の光照射下での反応の解析	生物物理化学 光化学治療 光増感化学	東京工業大学生命理工学部教授 大倉一郎
JA-93-08	新規な構造を有するヒアルロン酸類似多糖の開発	糖鎖工学 高分子化学	東京工業大学生命理工学部助教授 畑中研一
JB-93-01	ペプチドシナージストによるビタミンEの抗酸化能の向上ーヒト血清アルブミン由来のペプチドシナージストの開発ー	脂質生化学 食品化学	水産大学校講師 幡手英雄
JB-93-02	層状鉱物を用いたホストーゲスト反応による有機色素のカプセル化	無機材料化学 粘土科学	早稲田大学工学部助教授 菅原義之

## 生体、安全性に関する分野

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
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秦野研究所 中尾美津男
J90-02	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ー	組織培養学	理化学研究所副主任研究員 大野忠夫
J90-05	胆汁酸生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
J90-08	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
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（エビデルモンド）	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
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
J91-03	活性酸素、フリーラジカルによる生体膜障害の防止に関する研究	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

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
J91-07	皮膚過敏症に対するマスト細胞の役割 ーマスト細胞欠損動物を用いた 検定法の開発ー	実験病理学	大阪大学医学部教授 北村 幸彦
J91-09	マウス悪性黒色腫を用いたチロシナーゼ抑制 因子の精製と応用	皮膚科学 メラニン色素	北里大学医学部講師 亀山 孝一郎
J91-12	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 ンスクリーンの効果の評価	光生物学 皮膚免疫	浜松医科大学教授 滝川 雅浩
J91-14	メラニン生合成の調節	分子生物学	東北大学医学部教授 柴原 茂樹
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 皮溝と加齢の関係	老年病学 動脈硬化	慶應義塾大学医学部助手 本間 聡起
J91-22	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
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
J92-06	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生合成 遺伝子とその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	研究課題	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	皮膚の老化における染色体構造の変化と遺伝子修復機構に関する研究	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-グリコシドの生物学的有用性研究-経皮吸収によるビタミンC活性発現の評価-	免疫薬理学	岡山大学薬学部教授 山本 格
JA-93-01	還元型ネオプテリン(NPH-4)の紫外線照射皮膚障害に対する効果	放射化学 薬理学 生化学	東京理科大学生命科学研究所講師 小島 周二
JA-93-02	化粧品による光老化の抗酸化的制御に関する細胞生物学的及び生化学的研究	皮膚科学 紫外線生物学	群馬大学医学部教授 宮地 良樹
JA-93-03	太陽光紫外線でヒトDNA中に誘発される損傷とその修復に関する研究	放射線生物学 細胞生物学	金沢大学薬学部教授 二階堂 修
JA-93-09	いわゆる”しみ”(肝斑など)の発症機構とその増悪因子に関する研究	皮膚科学	東北大学医学部講師 富田 靖
JB-93-04	尋常性痤瘡の発症機序の解明のための皮膚の保湿機能と脂質代謝に関する研究	皮膚科学	新潟大学医学部助教授 山本 綾子
JB-93-05	哺乳類皮膚細胞のアポトーシスと細胞接着をつかさどるセラミドの研究	糖生物学 発生物理学 生化学	九州大学理学部助教授 野村 一也
JB-93-06	不飽和脂肪酸とその過酸化生成物の皮膚角質層への作用に関する研究	製剤学	大阪薬科大学薬学部助教授 森本 一洋

## 精神、文化に関する分野

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
J90-04	化粧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
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
J91-15	アルツハイマー型老年痴呆症者と、いわゆる”ぼけ”症状を呈する人々への化粧による情動活性化の研究	感情心理学 臨床心理学	同志社大学文学部教授 浜 治世子
J91-21	「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 斎藤 美穂
Js-92-01	病院看護における化粧に関する研究	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
JA-93-04	色彩の心理学的意味空間の研究	計量心理学 認知心理学 行動計量学	金沢大学文学部助教授 岡本 安晴
JB-93-03	化粧の個人的効果と対人的効果に関する実証的研究	社会心理学	福島大学教育学部助教授 飛田 操

\*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.2 '94

非売品

1994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 宮崎印刷

©1994

不許複製 禁無断転載