

## ごあいさつ

化粧品学（コスメトロジー）の確立と発展を活動の目的として設立されました当財団も7年目を迎えることになりました。この間に6回の研究助成等を行うとともに、今回4号目の研究報告を発行できる運びとなりました。これもひとえに、多くの皆様からいただいた暖かいご支援ご協力の賜であると心から感謝申し上げる次第でございます。

なお昨年7月22日、当財団の設立者であり理事長でありました小林孝三郎氏が脳梗塞のために、満98歳で逝去されました。氏は明治45年、わずか14歳の若さで化粧品業界に身をおいて以来、98歳まで現役として化粧品ひとすじに歩んで来ただけに、誰よりもコスメトロジーの進展を気にかけておりました。当財団の活動をさらに充実させていくことが、個人の遺志に報いることだと考えております。

今回、本誌に発表させていただきます20題の研究報告も、素材・物性分野から生体作用・安全性分野、精神・文化分野までコスメトロジーの課題の広がりや深さが感じられる、いずれも素晴らしい研究成果でございます。また、惜しくも選に漏れた課題も膨大な数であり、その中にもたくさんの優れたテーマと研究成果がありました。

このことは、当財団の活動が多くの手研究者の方々から高い関心を寄せられている証左であろうと存じます。これからも、皆様のご協力を仰ぎまして、小林孝三郎氏が夢に描いておりました化粧品学（コスメトロジー）のさらなる発展、進歩のために着実な研究振興活動を推進してまいり所存でございます。

今後とも当財団の活動をご支援くださいますよう心からお願い申し上げます。

平成8年9月

財団法人 コスメトロジー研究振興財団  
理事長 小林 禮次郎

## 目次

ごあいさつ

### ■ 研究報告

#### I. 素材, 物性に関する分野

- 亜鉛スルホフタロシアニンを利用した光化学治療 ..... 2  
東京工業大学生命理工学部 大倉 一郎
- ヒト血清アルブミン加水分解物由来のテトラペプチドによる  
ビタミンEの抗酸化能の向上 ..... 9  
水産大学校 幡手 英雄
- 層状鉱物を用いたホスト-ゲスト反応による有機色素のカプセル化 ..... 15  
早稲田大学理工学部 菅原 義之
- ハーダー腺の分泌するアルキルジアシルグリセロールの  
物性解明とその素材としての応用開発 ..... 21  
東京大学医学部 脊山 洋右
- 植物培養細胞・組織による活性成分の生産と薬用植物の育種に関する研究  
—特にForskolin原料植物 *Coleus forskohlii* について— ..... 28  
九州大学薬学部 正山 征洋
- 弾性線維蛋白質エラスチンの自己組織化集合体の構造、物性、機能に関する研究 ..... 37  
九州大学理学部 甲斐原 梢
- バイオシグナル分子を固定化した細胞成長促進ハイブリッド材料の合成 ..... 45  
京都大学工学部 伊藤 嘉浩
- 遺伝子工学的手法を用いた必須脂肪酸 $\gamma$ -リノレン酸の  
高等植物における多量生産 ..... 50  
九州大学理学部 射場 厚

#### II. 生体作用, 安全性に関する分野

- 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基礎的研究 ..... 58  
国立公衆衛生院労働衛生学部 市川 勇
- 還元型ネオプテリン(NPH4)の紫外線照射皮膚傷害に対する効果 ..... 66  
東京理科大学生命科学研究所 小島 周二
- 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 ..... 77  
九州大学理学部 野村 一也
- 皮膚生理機能賦活物質の合理的吸収促進法の開発 ..... 84  
京都大学薬学部 橋田 充
- リポソーム封入薬物の皮膚吸収過程の解析と皮膚内ラジカル消去への応用 ..... 94  
九州大学薬学部 内海 英雄

・表皮細胞の細胞接着と角化制御に関するシグナル伝達： 天疱瘡IgG誘導表皮細胞間接着離開とカルシウムシグナル伝達 .....	103
岐阜大学医学部 北島 康雄	
・微生物に由来する多糖分解酵素のコスメトロジーへの応用 .....	109
東京工業大学生命理工学部 中村 聡	
・皮膚発現型レチノイン酸受容体のドミナントネガティブ トランスジェニックマウスを用いた皮膚の成熟過程の検討 .....	118
京都大学医学部 田中 俊宏	
・化粧が高温環境下の発汗反応及び選択的脳冷却機構に及ぼす影響 .....	122
金沢大学医学部 田辺 実	
・サンスクリーン剤の光ハプテンとしての性格 .....	130
浜松医科大学 戸倉 新樹	

### Ⅲ. 精神，文化に関する分野

・色彩の心理学的意味空間の研究 .....	136
金沢大学文学部 岡本 安晴	
・化粧の個人的効果と对人的効果に関する実証的研究 .....	145
福島大学教育学部 飛田 操	

### ■ 記念講演

平成7年度記念講演 化粧とコミュニケーション .....	161
北星学園大学文学部 大坊 郁夫	

■ コスメトロジー研究雑感 .....	173
---------------------	-----

### ■ 付 録

平成7年度事業報告 .....	187
役員一覧 .....	196
研究助成課題一覧 .....	197

# 研究報告

---



- I 素材、物性に関する分野
- II 生体作用、安全性に関する分野
- III 精神、文化に関する分野



## I. 素材, 物性に関する分野

# 亜鉛スルホフタロシアンを利用した光化学治療

東京工業大学 生命理工学部

大 倉 一 郎

Water-soluble zinc phthalocyanines substituted with different number of sulfonic acid groups were synthesized. ZnSPC<sub>mix</sub> was readily incorporated in HeLa cells. Irradiation of HeLa cells with ZnSPC<sub>mix</sub> resulted in cell damaged.

The cellular morphological changes due to irradiation were observed using SEM.

## 1 緒 言

腫瘍集積性光増感剤を、あらかじめ癌患者に投与し、その後レーザー光照射により癌を治療する、いわゆる光化学療法においては、副作用の少ない光増感剤の開発が切望されている。光化学療法用光増感剤としては、次の要素を備えていることが必要である。

- 1) 光化学的に安定である。
- 2) 腫瘍選択性が高い。
- 3) 光を照射しなければ細胞に無害である。
- 4) 組織透過性のよい長波長領域 (600~800nm) の吸光係数が大きい。
- 5) 励起三重項状態の寿命が長い。

現在、光化学療法用光増感剤の内、ヘマトポルフィリン誘導体が、臨床的に使用されている。しかし、この化合物は組織透過性のよい長波長領域の吸光係数が小さい。合併症として日光過敏症になりやすいなどいくつかの問題点がある。

フタロシアンは化学構造的にはポルフィリンと類似しているが組織透過性のよい長波長領域の

吸光係数が大きい。一例として亜鉛テトラスルホフタロシアンの吸収スペクトルを図1に示す。図には比較のためHpDの吸収スペクトルも点線で示してある。図のようにフタロシアンはポルフィリンと異なり長波長領域における吸光係数が大きく、深部の癌に対して有用であることが期待される。さらに腫瘍組織への集積性もよく<sup>1)</sup>、光照射に対して安定であることから、光化学治療用の新しい感光色素としての期待は大きい。

フタロシアンは中心金属や側鎖を変えることにより様々な種類のフタロシアンが合成されている<sup>2-7)</sup>。とくに、アルミニウムや亜鉛を中心金

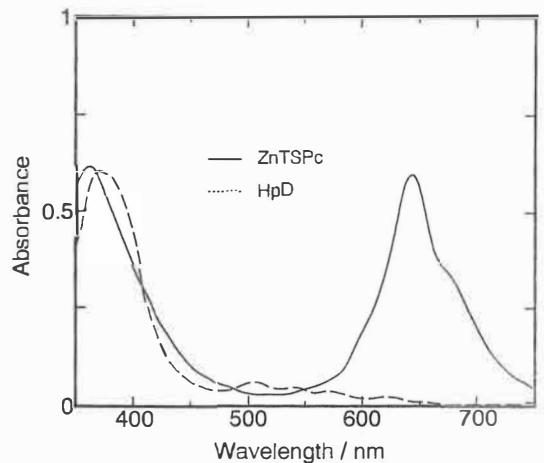


図 1 亜鉛テトラスルホフタロシアン (構造を図2に示す。ZnTSPc) と HpDの吸収スペクトル

Photodynamic Therapy by Sulfonated Zinc Phthalocyanines

Ichiro Okura

Faculty of Bioscience and Biotechnology

Tokyo Institute of Technology



属とするフタロシアニンは光照射に対して安定であり、光励起三重項寿命が、他のフタロシアニンに比べて長いことから、これらのフタロシアニンが有効であると考えられている。フタロシアニンを水溶性にするには側鎖をスルホン化するか、カルボキシル化することが行われる。とくにスルホ基の結合したフタロシアニンは抗腫瘍活性が高いといわれている<sup>8)</sup>。

そこで本研究では、中心金属として亜鉛を、側鎖としてスルホ基数が異なるフタロシアニンを合成し、その光化学的性質を調べるとともに光化学治療における効果を検討した。

## 2 実験

### 2.1 試薬

亜鉛スルホフタロシアニンは、Weberらの方法を改良して合成した<sup>9, 10)</sup>。構造を図2に示す。スルホ基数の異なる亜鉛フタロシアニンは原料化合物のモル比を変えることにより調製した。

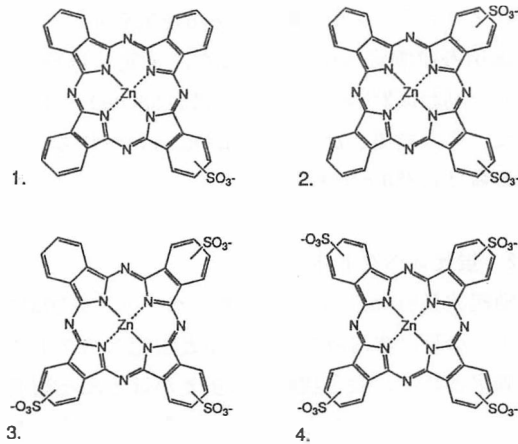


図 2 亜鉛フタロシアニンの構造

- 1: 亜鉛モノスルホフタロシアニン
  - 2: 亜鉛ジスルホフタロシアニン
  - 3: 亜鉛トリスルホフタロシアニン
  - 4: 亜鉛テトラスルホフタロシアニン (ZnTSPc)
- ZnSPC<sub>mix</sub>は1, 2, 3の混合物

HPLCによりこれらスルホ基数の異なる化合物の完全分離を試みたが、完全には単独物質が得られなかったので、亜鉛テトラスルホフタロシアニン(スルホ基数4個の化合物、ZnTSPcと略記する)とそれ以外の化合物(スルホ基数1~3の混合物で平均スルホ基数2.3のものをZnTSPC<sub>mix</sub>と略記する)とに分離し、それぞれについて光化学的挙動と光化学的治療効果とを比較検討した。

細胞は、MH134細胞をマウス腹腔中にて継代培養したもの、及び対数増殖期にあるHeLa細胞を用いた。培地はGIBCO社製F-10培地をそのまま用いた。

### 2.2 フタロシアニンの細胞への取り込み

フタロシアニンの細胞への取り込みにはHeLa細胞を用いた。フタロシアニンを濃度 $4 \times 10^{-6}$ Mとなるように培地に溶解し、この溶液をHeLa細胞と30分間接触させた。培地で細胞を洗浄した後、アルカリ水溶液で細胞を破壊し、蛍光の励起スペクトルを測定することにより取り込み量を求めた。図3は、殺細胞効果に関する実験方法を示したフローチャートである。まずHeLa細胞をシャーレで培養し、その後シャーレより培地を抜き取り、所定の濃度に調整したフタロシアニンの入った培地と交換する。30分間インキュベートすることにより、フタロシアニンをHeLa細胞に取り込ませた。その後、培地で洗浄し、レーザー光照射を行った。レーザー光照射には、アルゴンレーザー励起DCM色素レーザーを用いた。波長は680nm、出力は $100 \text{ mW/cm}^2$ である。殺細胞効果の判定には、光照射後4時間経過したところでトリパンブルー染色を用いて行った。また、細胞の形態変化は、走査電子顕微鏡を用いて観察した。

固形腫瘍としてはC3H/He系マウスの側腹部皮下に肝癌由来のMH134細胞を移植し、大きさが直径約10mmになった固形腫瘍を用いた。腫瘍が各臓器(肺、腎、脾、肝)におけるZnTSPc濃度の経時変化を測定するために、 $15 \text{ mg/kg}$ のZnTSPcをマウス腹腔内に投与した。ZnTSPc投与2, 4, 6, 12, 24、

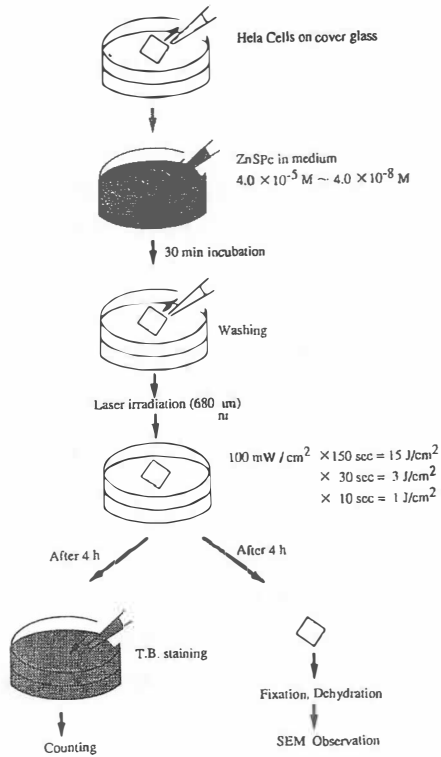


図 3 殺細胞効果に関する実験方法のフローチャート

48時間後に屠殺し、ホモジネイト後腫瘍および各臓器の蛍光強度を測定した。

### 3 結果および考察

#### 3.1 吸収スペクトルおよび励起三重項寿命

ZnTSPcの吸収スペクトルは図4に示すように636nm付近に極大吸収を有する。これは、フタロシアニンの会合体の吸収スペクトルであり、ZnTSPcは水溶液中で会合体になっていることを示している。この会合体は光励起寿命が短く、光化学治療には不適当である。この水溶液に、中性の界面活性剤であるトリトンX-100を添加すると、吸収スペクトルは2~4の様に変化し、トリトンX-100濃度が10%のときに、5の吸収スペクトルとなった。界面活性剤の濃度を増大させるに従い、636nmの吸収強度が減少し、678nmの吸収強度が増加した。これは、界面活性剤の添加により会合体

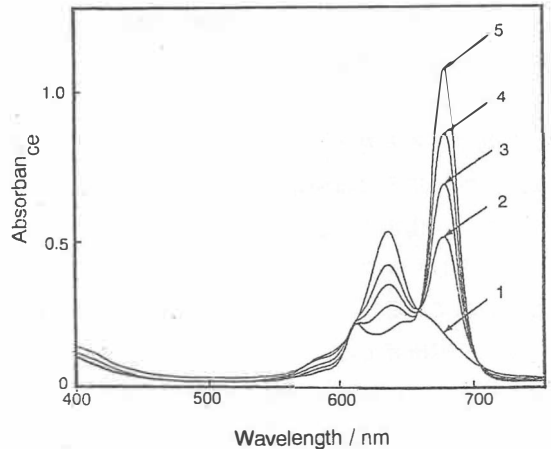


図 4 ZnTSPcの吸収スペクトル

ZnTSPc濃度:  $2.8 \times 10^{-2} \cdot \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$   
 トリトン×100、なし(1)、1(2)、  
 2(3)、4(4)、10(5)

が解離して単量体になったためと考えられる。後述するように細胞に取り込まれたフタロシアニンは単量体で存在し、細胞は界面活性剤の添加と同様の効果を示す。

励起三重項寿命の測定は次の様に行った。界面活性剤を含む生理食塩水(TritonX-100; 10%)にフタロシアニンを溶解し、凍結脱気を5回行い、三重項寿命測定用の試料とした。測定にはYAGレーザー励起DCM色素レーザー(波長680nm)を使用した。その結果、ZnTSPc、ZnSPc<sub>mix</sub>いずれも三重項寿命は約250μsであった。

#### 3.2 蛍光スペクトル

励起波長610nmにおける蛍光スペクトルを図5に示す。ZnTSPc水溶液ではほとんど蛍光スペクトルが測定されず、会合状態では蛍光がほとんど観測されないことがわかる。トリトンX-100を添加すると、690nm付近に強い蛍光が観測され、ZnTSPcが単量体として存在すると強い蛍光が得られることがわかる。また、図5-BはMH134細胞にZnTSPcを取り込ませた前後における蛍光の差スペクトルである。図5-Aと比較すると、ZnTSPcは細胞内では単量体として存在していることが分かる。

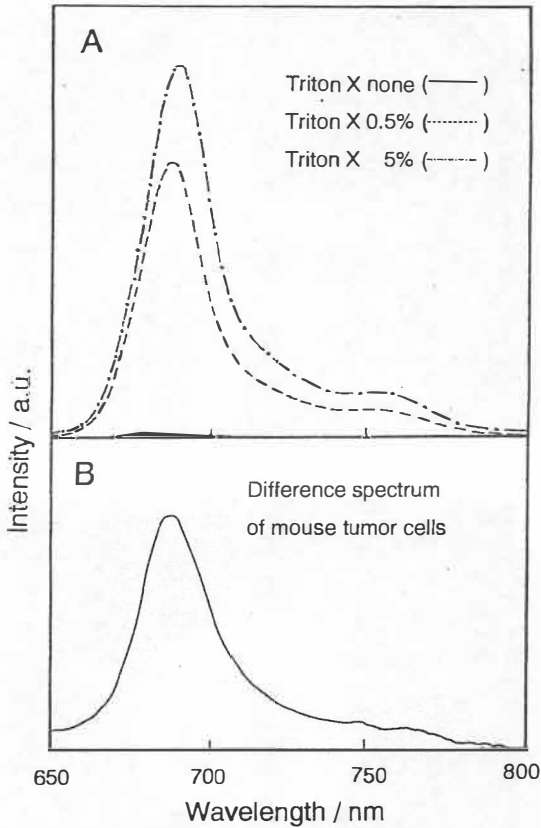


図 5 ZnTSPcの蛍光(A)およびマウスMH134細胞に ZnTSPcを取り込ませた前後における 蛍光スペクトル(B)

### 3.3 細胞への取り込み

細胞へのフタロシアニンの取り込みはフタロシアニンの励起スペクトルを測定することにより行った。結果を図6に示す。実線はZnSPc<sub>mix</sub>、破線はZnTSPcの場合である。両者を比較するとZnSPc<sub>mix</sub>がZnTSPcに比べ、はるかに細胞によく取り込まれていることが分かる。

固形腫瘍を用いた場合、マウス腫瘍の蛍光強度は投与12時間後に最大となり、これ以降24時間までの間は各臓器より高い値を保った。図7にZnTSPc投与12時間後の腫瘍および各臓器の蛍光スペクトルを、図8に経時的な蛍光強度の変化を示す。固形腫瘍および各臓器におけるZnTSPcの取り込みの測定において、腫瘍を含むすべての臓器は

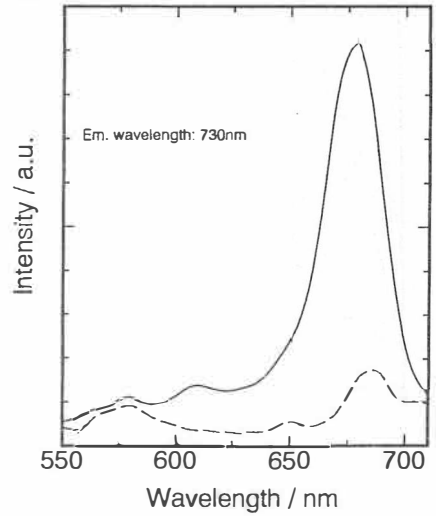


図 6 フタロシアニンの励起スペクトルによる HeLa細胞への取込み量の比較 ZnSPc<sub>mix</sub>:実線 ZnTSPc:破線

投与12時間後で蛍光強度が最高値を示した。また腫瘍は10~24時間の間、各臓器よりも高値であった。ZnTSPcの排泄はきわめて早く、投与30分後には尿中に認められている。この様にZnTSPcは、腫瘍集積性が高く、腫瘍集積に要する時間が非常に短い。ヒトへのZnTSPc応用においてもこの状況が当てはまるなら、感光剤投与から治療開始までの時間短縮に大いに貢献するものと思われる。

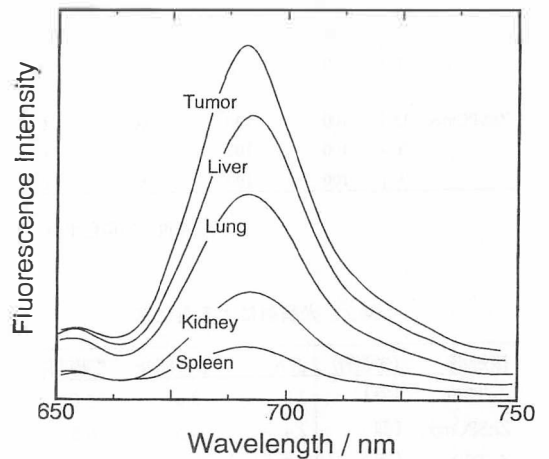


図 7 C3Hマウス各細胞におけるZnTSPcの 蛍光スペクトルZnTSPc取込み12時間後に測定

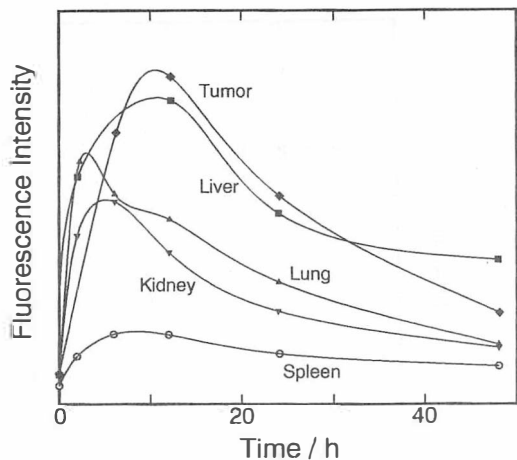


図 8 C3Hマウス各組織におけるZnTSPcの蛍光強度

### 3.4 殺細胞効果

表1に、殺細胞効果に対する照射エネルギー依存性およびフタロシアニンの濃度依存性を示す。表中の数字はトリパンブルーの被染色率を表し、数字が大きいほどよく死滅していることを示している。ZnTSPcでは、 $4.0 \times 10^{-5} \text{M}$ の濃度のとき、照射エネルギーが減少するに伴い、殺細胞効果が減

表 1 PDT後のトリパンブルー染色

照射エネルギー $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$		濃度 / M			
		$4.0 \times 10^{-5}$	$4.0 \times 10^{-6}$	$4.0 \times 10^{-7}$	$4.0 \times 10^{-8}$
ZnTSPc	15	100	0	0	-
	3	91	0	0	-
	1	30	0	0	-
ZnSPCmix	15	100	100	100	0
	3	100	100	100	0
	1	100	100	90	0

単位：被染色率/%

表 2 光照射による溶血率

接触液	(光照射)	直後	1時間後	5時間後
ZnTSPc	(無)	2.3	3.6	5.0
ZnSPCmix	(無)	2.4	4.5	6.5
ZnTSPc	(有)	2.7	6.5	10
ZnSPCmix	(有)	8.2	90	95<

(単位%)

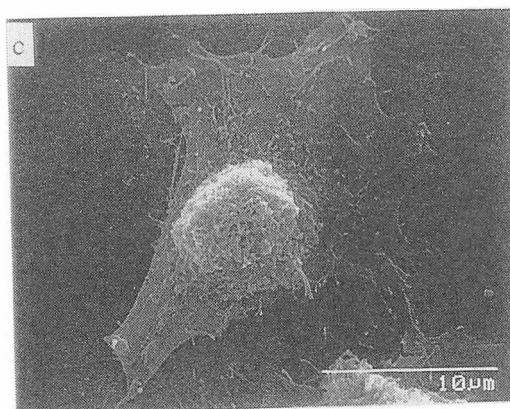
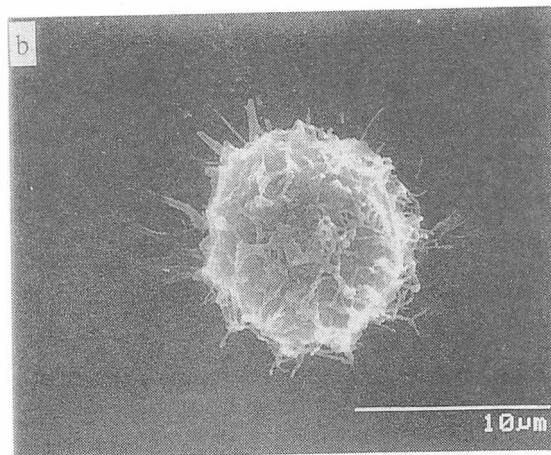
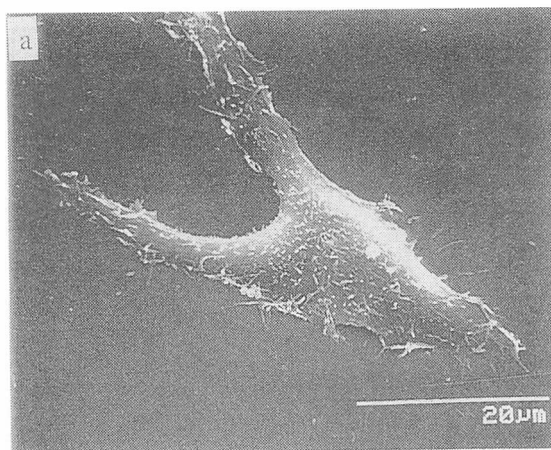


図 9 SEMによるHeLa細胞の形態観察

a: 光照射前のHeLa細胞

b: ZnTSPcを用い光照射後のHeLa細胞

c: ZnSPCmixを用い光照射後のHeLa細胞

少している。また、 $4.0 \times 10^{-6} \text{M}$ 以下の濃度では、殺細胞効果が認められなかった。これに対し、 $\text{ZnSPc}_{\text{mix}}$ を用いた場合には $4.0 \times 10^{-7} \text{M}$ の濃度までは照射エネルギーに関係なく、強い殺細胞効果を示すことがわかった。これは、 $\text{ZnSPc}_{\text{mix}}$ の方がより細胞に取り込まれやすいためと思われる。

以上により、 $\text{ZnTSPc}$ と $\text{ZnSPc}_{\text{mix}}$ との比較では $\text{ZnSPc}_{\text{mix}}$ の方がより低い濃度、および、より低いエネルギーでも、優れた殺細胞効果を示すことが判明した。

### 3.5 光溶血反応

細胞膜のモデルとしてヒト赤血球を用いた光照射の実験を行った。この実験で赤血球が溶血を起こせば、細胞膜が破壊されていることが示唆される。実験は、赤血球浮遊液と、生理食塩水に溶解したフタロシアニンとを接触させ、洗浄した後、再懸濁させて光照射を行った。照射光として、アルゴンレーザー励起DCM色素レーザーを用い（波長は680nmである）。所定時間経過後、遠心分離を行い、上澄みの吸光度を測定した。観測は長は415nmである。

結果を表2に示す。表中の数字は、完全に溶血したときの吸光度を100%とした割合で示してある。この結果より、赤血球は、 $\text{ZnSPc}_{\text{mix}}$ と接触させ、光照射を行った場合にのみ1時間後に90%、5時間後には95%以上の溶血を起こすことが判明した。

## 4 総括

本研究では、スルホ基数の異なる亜鉛フタロシアニンを合成し、光化学療法における有用性を検討した。蛍光分析の結果から、フタロシアニンは細胞内では単量体として存在し、 $\text{ZnSPc}_{\text{mix}}$ の方が $\text{ZnTSPc}$ よりも効果的に細胞に取り込まれていることが判明した。

殺細胞効果の比較では、 $\text{ZnSPc}_{\text{mix}}$ の方が、より

低い濃度、より低いエネルギーにおいても、優れた殺細胞効果を示すことがわかった。電子顕微鏡による細胞の致死過程の形態学的観察（図9）、および溶血実験の結果から、 $\text{ZnSPc}_{\text{mix}}$ のおもな作用部位は細胞膜であり、光照射により細胞膜が大きなダメージを受けるものと思われる。

## 文献

- 1) 西坂 剛 他：水溶性亜鉛フタロシアニンを利用した光化学療法の研究（IV） $\text{ZnTSPc}$ の臓器集積性について、日本レーザー医学会誌 997-99 1989
- 2) J. E. van Lier, N. Brasseur, B. Paquette, J. R. Wagner, H. Ali, R. Langlois and J. Rousseau: Phthalocyanines as Sensitizers for Photodynamic Therapy of Cancer. *NATO ASI. Ser.* H15435-444 1988
- 3) J. R. Wagner, H. Ali, R. Langlois, N. Brasseur and J. E. van Lier: Biological Activities of Phthalocyanines-IV. Photooxidation of L-Tryptophan by Selectively Sulfonated Gallium Phthalocyanine: Singlet Oxygen Yields and Effect of Aggregation. *Photochem. Photobiol.* 45587-594 1987
- 4) N. Brasseur, H. Ali, R. Langlois and J. E. van Lier: Biological Activities of Phthalocyanines-VII. Photoinactivation of V-79 Chinese Hamster cells by Selectively Sulfonated Gallium Phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.* 46739-744 1987
- 5) B. Paquette, H. Ali, R. Langlois and J. E. van Lier: Biological Activities of Phthalocyanines-VIII, Cellular Distribution in V-79 Chinese Hamster Cells and Photo-toxicity of Selectively Sulfonated Aluminium Phthalocyanines, *Photochem. Photobiol.* 47215-220 1988
- 6) N. Brasseur, H. Ali, R. Langlois and J.

- E. van Lier : Biological Activities of Phthalocyanines-VI. Photosensitization of V-79 Chinese Hamster Cells and EMT-6 Mouse Mammary Tumor by Selectively Sulfonated Zinc Phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.* 47705-711 1988
- 7) H. Ali, R. Langlois, J. R. Wagner, N. Brasseur, B. Paquette and J.E. van Lier: Biological Activities of Phthalocyanines-X. Syntheses and Analyses of Sulfonated Phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.* 47 713-717 1988
- 8) C.C. Leznoff, S. Vigh, P. I. Svirskaya, S. Greenberg, D. M. Drew, E. Ben Hur and I. Rosenthal : Synthesis and Photocytotoxicity of Some New Substituted Phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.* 49 279-284 1989
- 9) J. H. Weber and D. H. Busch : Complexes Derived from Strong Field Ligands. XVI. Magnetic Properties of Transition Metal Derivatives of 4, 4', 4'', 4'''-Tetra-sulfo phthalocyanine, *Inorg. Chem* 4 469-471 1965
- 10) T. Nishisaka, H. Nanasawa, Y. Sakuma and I. Okura : Photodynamic Therapy by Zinc phthalocyanine as Tumor Localizer, *日本レーザー医学会誌*, 1311-15 1992

# ヒト血清アルブミン加水分解物由来のテトラペプチドによる ビタミンEの抗酸化能の向上

水産大学校

幡 手 英 雄

Antioxidative substances play an important role in depression of undesirable oxidation in biological systems as well as in food processing. Although synthetic antioxidants such as butylated hydroxytoluene are effective for preventing lipid peroxidation, their safety has been questioned. Therefore, many researchers have been screening for useful antioxidants from various natural materials. At present, vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) is widely used as a safe natural antioxidant. Furthermore, it has been demonstrated that peptides from various proteins, such as soybean protein, sardine myofibril protein, and bovine serum albumin, enhanced the antioxidative activity of  $\alpha$ -tocopherol (Toc). These results suggest that peptides, which are produced metabolically and incorporated dietetically, will serve as an effective synergist in biological systems. Namely, these peptides are supposed to protect *in vivo* lipid peroxidation in cooperation with antioxidants such as tocopherols. Nevertheless, the investigation on the synergisms of peptides originated from human serum albumin (HSA) is not made yet.

In the present study, S-carboxymethylated HSA (CM-HSA) was employed for the preparation of synergistic peptide, instead of the intact HSA, because the disulfide bridges in the HSA molecule seemed to prevent the proteolytic digestion. The CM-HSA treated with pepsin showed strong synergistic effect towards Toc. From the resulting hydrolysates a peptide, having a strong synergism, was successfully separated by chromatography on a Sephadex G-25 column, and then high-performance liquid chromatography on an ODS column. This peptide, designated as HSA-H-5, was again hydrolyzed with a lysyl endopeptidase to give two peptide fragments. Each fragment thus isolated was tested for its synergistic effect with Toc, and it was found that one fragment had a potent synergism comparable to the original peptide, HSA-H-5, but the other one had little effect. The structure of that active fragment was confirmed as the tetrapeptide, Leu-Gln-His-Lys, by amino acid analysis and sequence determination. In addition, HSA-H-5 and the active fragment corresponded to the amino acid residues 103 to 112 and 103 to 106 of HSA, respectively. Although the role of that active fragment in the HSA was not apparent, it composed of only five amino acid residues. Therefore, it will be advantageous not only for the application as a useful synergist but also for the elucidation of unknown synergistic mechanism of peptide synergists.

## 1 緒 言

過酸化脂質は食品の品質劣化を引き起こすだけでなく、様々な疾病、老化あるいは発癌などにも関与している。コスメトロジー分野においても紫外線による活性酸素（フリーラジカル）の発生と

老化色素さらには皮膚癌との関連が指摘され、重要な問題になっている。一方、脂質酸化の防止に使用されてきた合成抗酸化剤に関して、発癌作用など人体に対する悪影響が報告され、一部の合成抗酸化剤の使用が禁止されたり、使用量が制限される傾向にある。このような状況から、様々な分野でこれら過酸化脂質の生成を抑制できる抗酸化性物質の開発が期待されている。しかし、新たに開発された抗酸化性物質の多くは毒性や有効性の点で不十分なものが多く、現在もビタミンE（ $\alpha$ -トコフェロール；Toc）が抗酸化剤として汎用されているのが実状である。したがって、新規抗酸化剤の探索と同様に、既存の抗酸化剤の能力を高める物質、すなわちシナジストの開発は重要



Enhancement of Antioxidative Activity of Vitamin E using Tetrapeptide Derived from Human Serum Albumin Hydrolysates

Hideo Hatate

National Fisheries University

な研究課題である。シナージストは様々な物質に存在しており、各種タンパク質の加水分解物も抗酸化剤と強い相乗効果をもつことが報告されている<sup>1-6)</sup>。筆者は、人体の基本的構成成分であり生体に受け入れやすいヒト血清アルブミン (HSA) を原料とし、毒性のない有効なペプチドシナージストの開発を試みた。その結果、HSAのプロテアーゼ処理によって生成された各種の加水分解物 (HSA-H) は、予想どおりTocに対して強い相乗効果を発現した。しかし、生成されたペプチドの分子サイズが大きく、しかも多種類であったために有効なペプチドシナージストの構造解明にはいたらなかった。そこで、本研究ではHSAのS-S結合をあらかじめ切断して酵素分解を受け易くした還元カルボキシルメチル化HSA (CM-HSA) を原料タンパク質とした。その結果、Tocと強い相乗効果をもつテトラペプチドが分離されたので以下に報告する。

## 2 実験

### 2.1 薬品

リノール酸 (和光純薬製)、HSA (シグマ社製)、ペプシン (ブタ胃粘膜、シグマ社製)、リシルエンドペプチダーゼ (LEP、和光純薬製)、Toc (和光純薬製)、2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム塩2水和物 (TNBS、和光純薬製)、ジチオトレイトール (和光純薬製)。その他、高純度の市販試薬をそのまま使用した。

### 2.2 CM-HSAの調製

0.5M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5) に 0.5% (w/v) となるようにHSAを溶解した。この0.5% HSA溶液1mlあたりにジチオトレイトール3mgを加え、容器内の空気を窒素で置換して室温で2時間還元した。還元後、このHSA溶液1mlあたり、ヨード酢酸7.5mgを加え暗所で30分間反応させた。反応終了後、暗所で脱イオン水に対して十分に透析した。透析内液を凍結乾燥してCM-HSAを調製し

た。

### 2.3 CM-HSAの加水分解物の調製

CM-HSAを0.02M HClに0.5% (w/v) となるように溶解し、沸騰水浴中で5分間加熱処理した。この0.5%CM-HSA溶液にペプシンを100:1 (HSA:酵素、w/w) の割合で添加し、37°Cで9時間酵素反応させた。反応終了後、沸騰水浴中で5分間加熱し、酵素を失活させてCM-HSAの加水分解物 (CM-HSA-H) を調製した。

### 2.4 CM-HSA-HのセファデックスG-25による分離

CM-HSA-Hを遠心分離した後、この上澄液を $1 \times 10^{-3}$ M HClを溶出剤としてセファデックスG-25 (Super fine) カラム (2.2cm×111.5 cm) で分画した (流速0.3ml/min)。

なお、本研究ではペプチド量は、254nmの吸光度あるいはTNBS法<sup>7)</sup>で定量したアミノ基量で評価した。

### 2.5 CM-HSA-Hの高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分離

各種ペプチドは Wakosil 5C18-200T カラム (4.6mm×250mm、和光純薬製) またはTSKgel ODS-80Ts (4.6mm×250mm、東ソー製) を用いてHPLC分析した (検出波長220nm)。溶出剤としては0.1%トリフルオロ酢酸を含む水とアセトニトリルの混合液を使用した (流速 0.5 ml/min)。

### 2.6 ペプチドのLEPによる断片化

HPLCで分離した有効なペプチドを、LEPで0.1M Tris-HCl緩衝溶液 (pH9.0) 中で、37°C、3時間加水分解処理して断片化した。

### 2.7 各種ペプチドとTocとの相乗効果の測定

リノール酸の最終濃度が $2.0 \times 10^{-3}$ Mになるように、エタノール2ml、0.05Mリン酸緩衝液 (pH7.0) 2ml、蒸留水 1mlの混合液を酸化モデル系として設定した。Toc (50 μg) との相乗効果を

判定するときは、各種ペプチド溶液の添加量に応じてこの酸化モデル系から蒸留水の量を減じ、全量は常に5mlとした。これをネジ付試験管(20mm×125mm)で密栓し、60°Cの暗所で自動酸化させた。リノール酸の酸化の程度は、チオシアン酸鉄法<sup>3, 4)</sup>で経日的に測定し、過酸化物質価が100meq/kgに達するのに要する日数(誘導期)でTocとの相乗効果の強さを評価した。

## 2.8 ペプチドのアミノ酸分析およびその配列決定

常法により、ペプチドを6N HClで110°C、24時間加水分解し、アミノ酸自動分析計でアミノ酸組成を調べた。また、ペプチドのアミノ酸配列をEdman分解法を用いた自動分析装置で決定した。

## 3 結果

### 3.1 CM-HSA-HのセファデックスG-25による分離および各画分とTocとの相乗効果

ペプシンで37°C、9時間加水分解して調製されたCM-HSA-HをセファデックスG-25で分離し、各画分0.1mlのTocとの相乗効果を検討した。Fig. 1に示すように、試験管番号23から42の範囲で相乗効果が認められた。その画分中で相対的に少ないペプチドの溶出量であるにもかかわらず、強い相乗効果をもつ一群のペプチド(画分A)が認められ

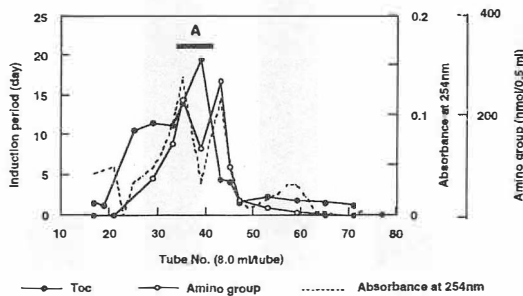


Fig. 1 Separation of CM-HSA-H by chromatography on a Sephadex G-25 column, and synergistic effect of fractions with Toc.

た。このCM-HSA-Hの分離パターンは、還元処理されていないHSAをペプシン処理して同様に調製した加水分解物の分離パターンとは多少異なっていた。しかしながら、強い相乗効果をもつペプチド(画分A)は両者ともほぼ同じ位置に溶出されており、CM-HSA-HとHSA-Hに存在する有用なペプチドシナージストが同様あるいは類似の物質であることが示唆された。

### 3.2 CM-HSA-Hからのペプチドシナージストの分離

Fig. 1に示した強い相乗効果をもつ画分Aを回収し、凍結乾燥して濃縮した。画分A中に存在するTocと強い相乗効果をもつペプチドを単離するために逆相カラムによるHPLC分析を行った。

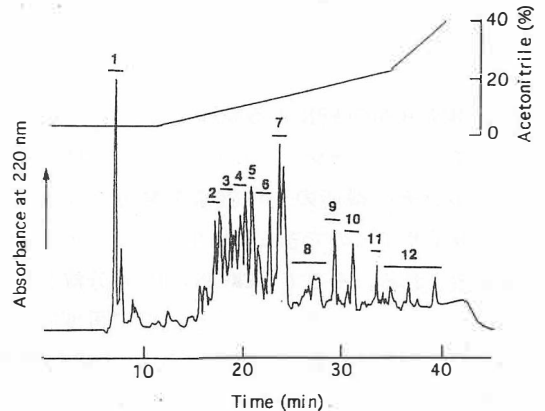


Fig. 2 HPLC of fraction A\* obtained from CM-HSA-H Column, Wakosil 5C18-200T; Flow rate, 0.5ml/min. \*Refer to Fig. 1

Fig. 2に示すように、画分Aには多数のペプチドが混在していた。これらをピークごとに回収し、各画分15nmolのTocとの相乗効果を測定した。すなわち、各画分を凍結乾燥した後、少量の0.001M HClに再溶解し、ペプチドの濃度をTNBS法で測定して各画分の酸化モデル系への添加量を15nmolに調整した。その結果、ピーク1, 5 および9がTocと強い相乗効果を示した (Fig. 3)。ピーク1および

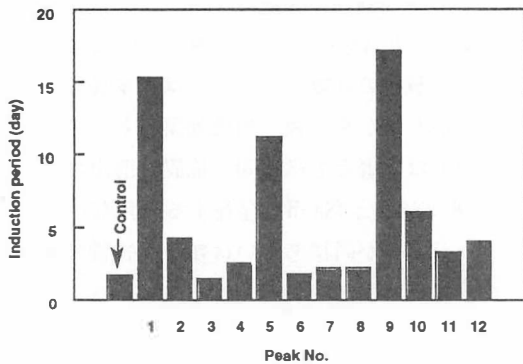


Fig. 3 Synergistic effect of fractions\* with Toc. \*Refer to Fig. 2

9からは現在のところ有効なペプチドシナージストは単離されていないが、ピーク5からは強い相乗効果をもつペプチドシナージストが、明瞭な単一ピークとして分離された。以後このペプチドシナージストをHSA-H-5と呼称する。

### 3.3 HSA-H-5のLEPによる断片化

ペプチドシナージストの実用化あるいは不明な点の多いその機能の発現機構を解明するうえでは、分子サイズのできるだけ小さいペプチドの作製が望まれる。そこで、CM-HSA-Hから分離されたペプチドシナージストHSA-H-5をLEPで再度加水分解した。Fig. 4に示してあるように、LEPを3時間程度作用させると、HSA-H-5はほぼ完全に酵素分解され、新たに2つのピーク（フラグメント5-aおよび5-b）を生じた。このことは、HSA-H-5が少なくとも2つのフラグメントから構成されていることを示唆した。Fig. 5にHSA-H-5、フラグメント5-aおよび5-bのTocとの相乗効果を示してある。フラグメント5-aはHSA-H-5と同程度の強い相乗効果を発現し、LEP処理により断片化（低分子化）されても依然として強い相乗効果を保持していた。一方、フラグメント5-bは無効であった。このことは、HSA-H-5の機能発現部位が、フラグメント5-bではなく、フラグメント5-aにあることを明示した。

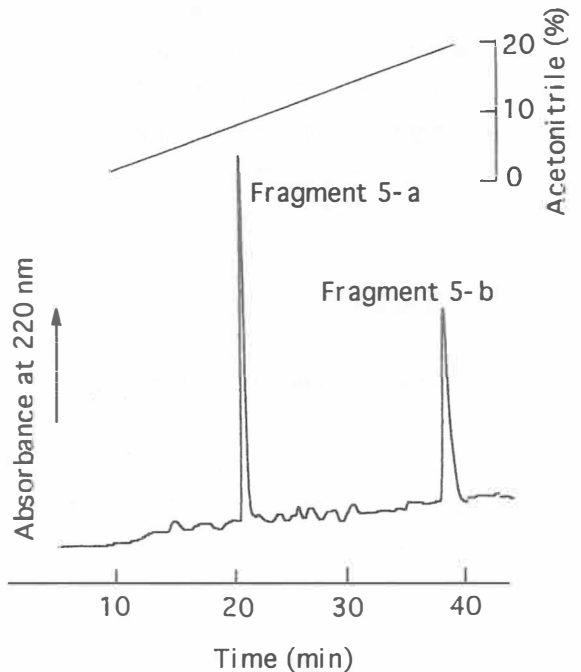


Fig. 4 HPLC of HSA-H-5\*after treatment with lysyl endopeptidase at 37°C for 3h. Column, TSK gel ODS-80Ts; Flow rate, 0.5 ml/min. \*HSA-H-5 corresponded to peak 5 in Figs. 2 and 3

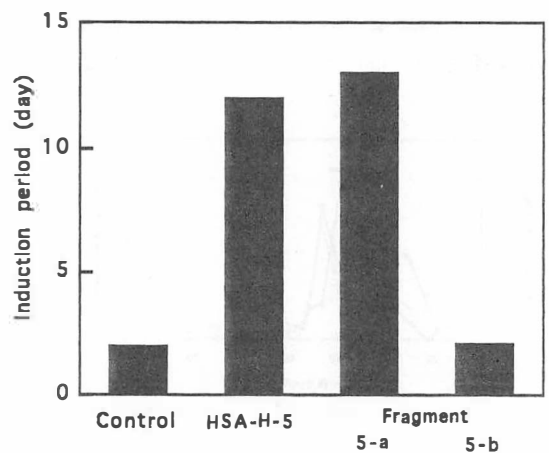


Fig. 5 Synergistic effect of HSA-H-5 and its fragments 5-a and 5-b with Toc.

### 3.4 ペプチドシナージストの構造解析

Table 1にHSA-H-5、フラグメント5-aおよび5-bのアミノ酸組成を示してある。HSA-H-5は10個のアミノ酸残基から構成されていること、さらに、アミノ酸残基数やその種類の一致からHSA-H-5は4個および6個のアミノ酸残基からなるフラグメント5-aおよび5-bのみを構成成分とすることが推察された。この組成と既報<sup>8)</sup>のHSA-Hの一次

Table 1 Amino acid compositions of HSA-H-5, and its fragments 5-a and 5-b

	HSA-H-5	Fragment 5-a	Fragment 5-b
Asp	3.8* (4) <sup>b</sup>	0.2* (0)	3.6* (4)
Ser	0.2 (0)	0.1 (0)	0.1 (0)
Pro	1.0 (1)		1.1 (1)
Glu	1.1 (1)	1.0 (1)	
Gly	0.2 (0)	0.2 (0)	0.2 (0)
Ala	0.2 (0)	0.3 (0)	
Val	0.1 (0)	0.2 (0)	
Leu	2.3 (2)	1.2 (1)	1.0 (1)
Tyr	0.3 (0)		
Lys	1.0 (1)	1.0 (1)	
His	0.9 (1)	0.8 (1)	
Total	10	4	6

\*Mole ratio to 1 mole of Lys

<sup>b</sup>Number in parenthesis indicates an approximate integer.

<sup>c</sup>Mole ratio to 1 mole of Leu

構造とを比較したところ、HSA-H-5はHSAのアミノ酸配列でアミノ酸残基103から112までの10個のアミノ酸残基に一致した (Fig. 6)。また、フラグメント5-aはアミノ酸残基103から106の4個に、フラグメント5-bは107-112の6個のアミノ酸残基にそれぞれ相当した (Fig. 6)。HSA-H-5の断片化に使用した酵素LEPは各種のポリペプチドに対してLysのカルボキシル基の関与するペプチド結合のみを選択的に加水分解するという基質特異性をもっている<sup>9)</sup>。すなわち、LEPによりHSA-H-5のアミノ酸残基106と107との間のペプチド結合が切断され、Lys残基をC末端とするフラグメント5-aを生じたものと推察される (Fig. 6)。さらに、低分子サイズでTocに対して強い相乗効果を示したフラグメント5-aのアミノ酸配列を分析し、予想されたテトラペプチドLeu-Gln-His-Lysであることが確認された。

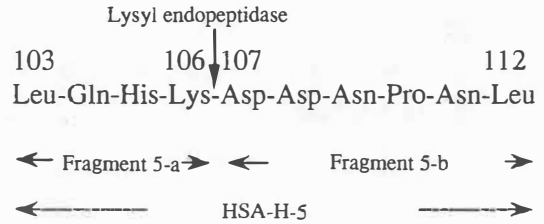


Fig. 6 Amino acid sequence of HSA-H-5 and its fragments 5-a and 5-b. Amino acid sequence of HSA-H-5 coincided with HSA residues 103-112.

Lysyl endopeptidase hydrolyzed HSA-H-5 at the peptide bond indicated by the vertical arrow.

## 4 考 察

各種タンパク質やペプチドが抗酸化剤に対して相乗効果を発現することが報告されており、本研究で解明されたテトラペプチドLeu-Gln-His-Lys構造のみがそれらすべてにとって機能発現に不可欠とは考えにくい。さらに、この構造が最小単位のペプチドであるか、あるいはHSA分子内におけるその役割なども現在のところ不明である。しかしながら、このテトラペプチドは、Tocの抗酸化性を著しく向上し、しかも従来のペプチドシナージスト<sup>6)</sup>にくらべて低分子サイズである。現在でも不明な点の多いタンパク質やペプチドの相乗効果の発現機構やそれらの生体内における役割を明らかにするうえでは優れた研究対象になりうるものと思われる。抗酸化剤やシナージストの効力は、使用した実験系や対象とした試料などにより異なることが多く、本研究で得られたペプチドシナージストについても各種のモデル実験系で再検討する必要がある。しかし、HSAを原料としたこのペプチドは人体に対して高い安全性が保証され、今後の研究の進展にとまってさまざまな分野での応用が期待される。

## 文 献

- 1) 満田久輝、安本教博、岩見公和：栄養と食糧、19 210 1966
- 2) 山口直彦、横尾良夫、藤巻正夫：日食工誌、22 431 1974
- 3) 山庄司志朗、吉田弘美、梶本五郎：油化学、26 28 1977
- 4) 幡手英雄、永田吉充、河内正通：油化学、39 42 1990
- 5) H. Hatate, Y. Numata, and M. Kochi, : *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56 1011 1990
- 6) H. Hatate, K. Kusunoki, and M. Kochi, : *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (YUKAGAKU)*, 42 168 1993
- 7) T. Okuyama and K. Satake, : *J. Biochem.*, 47 454 1960
- 8) B. Meloun, L. Moravak, and Y. Kostka : *FEBS Lett.*, 58 134 1975
- 9) T. Masaki, K. Nakamura, M. Isono, and M. Soejima, : *Agric. Biol. Chem.*, 42 1443 1978

# 層状鉱物を用いたホスト-ゲスト反応による 有機色素のカプセル化

早稲田大学 理工学部

菅原 義之

In order to develop intercalation reactions as encapsulation methods of organic dyes, dyes containing the azobenzene groups were incorporated into inorganic layered materials. As host materials, montmorillonite and magadiite were used, and different synthetic strategies were attempted. Homoionic montmorillonite-*p*-aminoazobenzene intercalation compounds were prepared by solid-state reactions. When interlayer cations were metallic ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , and  $\text{Ni}^{2+}$ ), IR spectroscopy revealed that the amino groups interacted with interlayer cations, indicating the intercalation of *p*-aminoazobenzene. The adsorption maxima of *p*-aminoazobenzene shifted considerably from that of *p*-aminoazobenzene in solvents, and the color of the products depended on the interlayer cations. When *n*-dodecylammonium(DA)-montmorillonite was used as a host, the basal spacing increased by the reaction with *p*-aminoazobenzene, indicating the intercalation of *p*-aminoazobenzene. The color and adsorption maximum were consistent with those of *p*-aminoazobenzene. The irradiation of UV light led to reversible cis-trans photoisomerization in the interlayer space of montmorillonite. For magadiite, the grafting reaction was attempted to immobilize the azobenzene group covalently on the interlayer surface. Sodium ions in the interlayer space of magadiite were exchanged with dodecyltrimethylammonium (DTMA) ions to form DTMA-magadiite. Then aminopropyltriethoxysilane was reacted with DTMA-magadiite. IR and solid-state NMR spectroscopy revealed that the aminopropylsilyl (APS) groups were present in the interlayer space of magadiite and DTMA ions were released, suggesting successful silylation. When 4-phenylazobenzoyl chloride was reacted with APS-magadiite, the basal spacing slightly decreased, and the absorption due to the azobenzene groups were observed in the UV-Vis spectrum of the product, implying the possible immobilization of azobenzene groups by amido-formation in the interlayer space of magadiite.

## 1 緒言

粉末化粧品では、有機顔料とともに無機材料である体質顔料が主成分となる。有機顔料としては、数多くのものが知られているが、粉末化粧品は直接皮膚や粘膜に触れる事から、ごく限られた有機顔料だけが使用されている。これに対し、体質顔料としては、その優れた使用感触と光学特性から、粘土鉱物が広く用いられている。現在までのところ、天然鉱物が主に用いられているが、合

成粘土鉱物や他の層状酸化物を用いるなど、新しい研究が展開されている。

代表的体質顔料である粘土鉱物の多くは、ケイ酸を主成分とする層状ケイ酸塩である<sup>1)</sup>。その構造は、ケイ素と4つの酸素からなる  $(\text{SiO}_4)^{4-}$ 四面体から構成される四面体シートとアルミニウムやマグネシウムが6つの酸素により八面体型に配位されている八面体シートから構成されている。1:1型粘土鉱物では、層が1つの四面体シートと1つの八面体シートから構成され、2:1型粘土鉱物では、2つの四面体シートが八面体シートを上下から挟み込むことにより層が形成されている。一方、 $(\text{SiO}_4)^{4-}$ 四面体のみからなる層状構造を持つものに、層状ポリケイ酸塩がある<sup>2)</sup>。層状ポリケイ酸塩には、いくつかのものが知られているが、それらの構造の詳細については、ほとんど解明されていない。

Encapsulation of Organic Dyes in Layered Minerals by Host-Guest Reactions

Yoshiyuki Sugahara

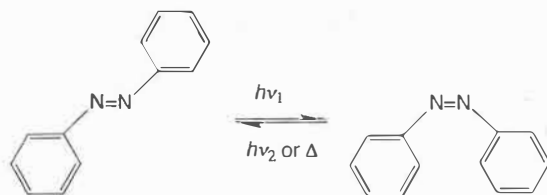
Department of Applied Chemistry  
Waseda University



層状構造を持つ無機化合物の中には、様々な有機分子やイオン（ゲスト）を層間に取り込むものが知られており、この反応をインターカレーション、得られる無機-有機複合材料を層間化合物と呼ぶ。この反応は、有機化合物のカプセル化反応として捉えることが可能であり、有機化合物を溶出しないように固定化することができる。従って、この手法を用いることにより新しい体質顔料の開発が可能であり、さらには従来は使用できなかった有機顔料の使用の可能性が期待される。インターカレーションのホストとして最も知られている粘土鉱物はモンモリロナイト等のスメクタイトであり、その構造は2:1型構造である。層は負に帯電しており、それを補うために層間に交換性陽イオンが存在する。一般には層間の陽イオンはナトリウム等であり、これらは通常水分子で水和されている。層間の陽イオンは様々な陽イオンで交換することが可能である。また、電荷を持たない極性分子も、水分子を置換することで層間に侵入することが可能である<sup>2)</sup>。一方、層状ポリケイ酸塩もスメクタイト類似の反応機構でインターカレーション反応が起こる。これに加え、表面に存在するシラノール基(≡SiOH)の反応性を活かし、シリル化剤(XSiR<sub>3</sub>; X=Cl, OR)との反応により、層表面にゲストを共有結合させることも可能である。



本研究は、ホストとして粘土鉱物であるスメクタイト、層状ポリケイ酸塩としては多層構造をもつマガディアイト(Na<sub>2</sub>Si<sub>14</sub>O<sub>20</sub> · xH<sub>2</sub>O)を用い、これらへの色素分子の取込みについて、基礎的検討を行った。ゲストとしては、代表的有機色素であるアゾベンゼンを用いた。アゾベンゼンは、次のスキームに示す通り紫外光により異性化し、この反応は代表的なフォトクロミック反応として知られている<sup>3)</sup>。スメクタイトでは、層間のイオンと色素との相互作用を用いて層間へのインターカレーションを行った。一方マガディアイトでは層表面に色素を共有結合により固定することを目標



スキーム1 アゾベンゼンの異性化反応

とし、カップリング剤によるシリル化を経てのアゾベンゼンの修飾を行った。

## 2 実験

### 2.1 原料

モンモリロナイトには、クニミネ工業(株)社製“クニピアF”(山形県左沢産)を用いた。層間の陽イオンをイオン交換反応することにより、単一イオン型モンモリロナイト(Na<sup>-</sup>、Ca<sup>-</sup>、Ni<sup>-</sup>、n-ドデシルアンモニウム(DA)<sup>-</sup>)を調製した。これはそれぞれの塩化物水溶液中にモンモリロナイトを分散し、遠心分離して回収する操作を3回繰り返し、洗浄することにより得た。パラアミノアゾベンゼンは東京化成工業(株)社製のものを用いた。マガディアイトは小菅らの方法<sup>4)</sup>に従い、SiO<sub>2</sub>:NaOH:H<sub>2</sub>O=1:0.23:18.5(モル比)からなる懸濁液をテフロン内筒型密閉容器(耐圧ガラス工業製TAF-SR-300)中で150℃、48時間水熱反応させ、得られた白色沈澱を純水洗浄、乾燥して得た。

### 2.2 合成

モンモリロナイトへのインターカレーションでは固-固反応(固体間反応)を利用した。単一イオンモンモリロナイトとパラアミノアゾベンゼンを乳鉢で混合し、n-ヘキサンで洗浄して生成物とした。

Magadiite層表面へのアゾベンゼンの固定は、以下の手順でおこなった。まず、ドデシルトリメチルアンモニウム(DTMA)イオンを層間ヘイオン

交換で導入し、得られたDTMA型マガディアイトを中間体として、dryトルエン中、アミノプロピルトリエトキシシラン (APTS) (チッソ) を加え、窒素雰囲気下で24時間還流した。同様の操作を再度行い、APS-マガディアイトを得た。さらに、層間へアゾベンゼンカルボン酸塩化物を導入し、アミド結合を形成させることでアゾベンゼンの固定化を試みた。APS-マガディアイトをdryトルエンに分散させて窒素雰囲気下で1時間攪拌し、ピリジンを加えた後、4-phenylazobenzoyl chloride (東京化成工業) を加えて、窒素雰囲気下のまま暗中で60°C、24時間攪拌を行った。反応終了後、遠心分離、洗浄、風乾を経て試料とした。

### 2.3 分析

生成物はX線回折分析 (XRD)、赤外吸光分光分析 (IR)、固体高分解能核磁気共鳴分光分析 (NMR) 等で分析した。

## 3 結果と考察

### 3.1 Na-, Ca-, Ni-型モンモリロナイトへのパラアミノアゾベンゼンのインターカレーション

Fig. 1にNa型モンモリロナイト及びNa型モンモリロナイト-パラアミノアゾベンゼン層間化合物

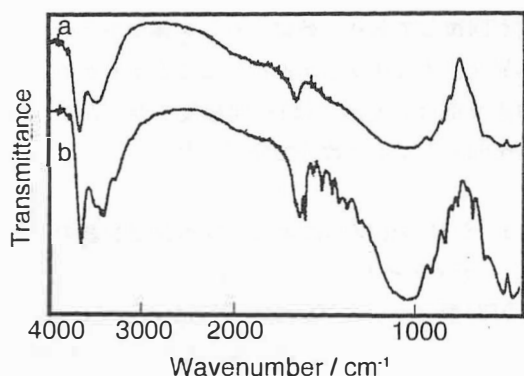


Fig. 1 生成物の赤外吸収スペクトル:  
(a) Na型モンモリロナイト、  
(b) Na型モンモリロナイト-  
パラアミノアゾベンゼン  
層間化合物。

のIRスペクトルを示す。Na型モンモリロナイト-パラアミノアゾベンゼン層間化合物のIRスペクトルでは、パラアミノアゾベンゼンに帰属可能な吸収帯が観察された。Ca型モンモリロナイト、Ni型モンモリロナイトでも、反応後は同様なスペクトルが得られた。Table. 1にいくつかの吸収帯の波数と帰属ををまとめて示す<sup>5)</sup>。N-H伸縮振動や変角振動の吸収帯の位置は、層間の陽イオンの種類により変化している。層間陽イオンの分極能 ( $Z/R$ ;  $Z$ は電荷、 $R$ はイオン半径) とN-H変角振動の波数をプロットすると直線関係が得られる。また、ベンゼン環の振動 (約690 $\text{cm}^{-1}$ ) はほとんど変化しないのに対し、 $\rho$ 位を置換したベンゼン環の振動 (約830 $\text{cm}^{-1}$ ) は陽イオンにより変化している。以上のことから、陽イオンと $\text{NH}_2$ 基とがイオン-双極子相互作用していることが明らかとなり、この相互作用がインターカレーション反応の駆動力と考えられる。

生成物の色は、層間陽イオンにより異なり、オレンジ色から赤色を示した。パラアミノアゾベンゼンは、エタノールに溶解させると377nmに吸収極大を示すことが知られているが<sup>6)</sup>、生成物の拡散反射スペクトルは、大体550nm付近にピークを示し、先の値から大きくシフトした。これは、恐らくは先に示したイオン-双極子相互作用によるものと推定している。この非常に大きいシフトにより、生成物中の異性体の同定は不可能である。

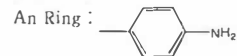
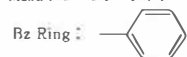
### 3.2 有機ベントナイトへのパラアミノアゾベンゼンのインターカレーション

有機ベントナイトとは、モンモリロナイトの層間陽イオンを脂肪族アンモニウムイオンや第四級アンモニウムイオンでイオン交換したものであり、交換前と異なり、特に非極性溶媒に膨潤する<sup>2)</sup>。(膨潤とは、溶媒が層間に侵入して層間距離が非常に拡大して体積が増大する現象をさす: 交換前のモンモリロナイトは親水性であり水で膨潤する) そこで、固体間反応による層間へのパラアミノアゾベンゼンのインターカレーションを行っ

Table. 1 IR吸収帯の波数と帰属

波数 / $\text{cm}^{-1}$				帰属
p-Az (in KBr)	Na-Mont-p-Az	Ca-Mont-p-Az	Ni-Mont-p-Az	
1617	1628	1634	1636	N-H def.
1598	1600	1601	1601	C=C Str. (Bz Ring)
833	839	840	843	C-H def. (An Ring)
689	689	687	689	C-H def. (Bz Ring)

p-Az : パラアミノアゾベンゼン  
Mont. : モンモリロナイト



た。XRD分析の結果、層間隔が1.8nmから3.0nmへ増大し、層間へパラアミノアゾベンゼンが侵入したことが明らかとなった。生成物のIRスペクトルは、パラアミノアゾベンゼン単体と同様の吸収帯を示した。この反応における駆動力は、層間のアルキル鎖とパラアミノアゾベンゼンとの疎水-疎水相互作用と考えている。

生成物の色はパラアミノアゾベンゼン単体と非常に類似していた。生成物の吸収スペクトルを測定してみると、395nmに吸収ピークを示し、非極性溶媒であるベンゼンにパラアミノアゾベンゼンを溶解した値(377nm)<sup>6)</sup>とほぼ一致している。また、このことは、生成物がトランス体であることを示している。以上の結果より、Na-、Ca-、Ni-型モンモリロナイト-パラアミノアゾベンゼン系では層間陽イオンとパラアミノアゾベンゼンとの間に強い相互作用があったのに対し、DA型モンモリロナイト-パラアミノアゾベンゼン系ではホスト-ゲスト間の相互作用は比較的弱いことが推定される。

DA型モンモリロナイト層間でのパラアミノアゾベンゼンの光異性化反応について検討するために、紫外光照射前後で吸収スペクトルを測定した。(Fig. 2) 暗所で1日保存したサンプルのスペクトル (Fig. 2-a) は、トランス体による吸収のみが見られる。これに対し、紫外光を5分間照射した直後のスペクトルでは (Fig. 2-b)、トラン

ス体の吸収ピークの強度が大きく減少しており、紫外光照射によりトランス体の一部がシス体へ異性化したことがわかる。紫外光を5分間照射後、暗所に5分間保存し再度スペクトルを測定すると (Fig. 2-c)、トランス体による吸収ピークの強

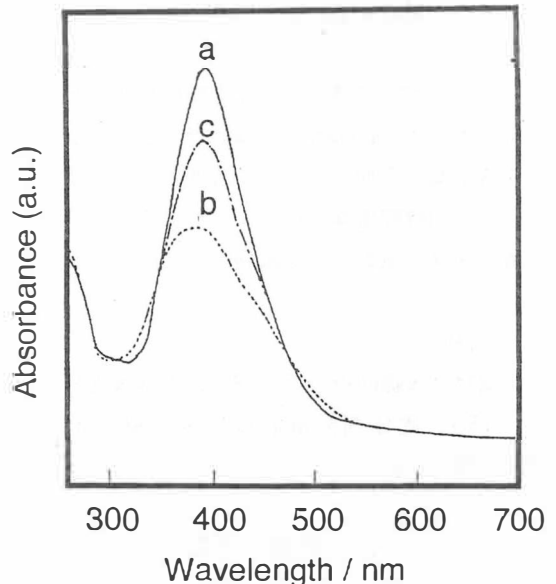


Fig. 2 ドデシルトリメチルアンモニウム型モンモリロナイト-パラアミノアゾベンゼン層間化合物の吸収スペクトル:  
(a) 暗所1日貯蔵後、(b) 紫外光5分照射後、  
(c) 紫外光5分照射後さらに暗所5分貯蔵後、

度が回復しており、熱によりシス体がトランス体へ異性化する逆反応が進行したことがわかる。この逆反応は、室温では1時間程度を要したが、温度を60℃とすると数分で完了した。

### 3.3 シリル化反応によるアゾベンゼン基のマガディアイト層間への固定化

DTMA型マガディアイトとAPTSとの反応をXRDにより検討したところ、層間隔が2.85nm (DTMA型マガディアイト) から1.75nmへ減少した。この値はH型マガディアイトの無水物の層間隔(1.12nm)<sup>7)</sup>と比べて0.63nm大きいものであり、APS基(最大距離約0.64nm)が存在するには十分な空間がある

と考えられる。一方、IR分析からはAPTSとの反応後にDTMAイオンによる吸収帯の減少や $1545\text{cm}^{-1}$ 付近におけるAPS基の $\text{-NH}_2$ 変角によるものと思われる新たな吸収帯の出現などが観測された。さらに、 $^{29}\text{Si}$  MAS NMR分析を行ったところ、反応により $\text{Q}^3$ ユニット ( $(\text{SiO})_3\text{SiO}^-$ ) によるピークが相対的に減少し、新たに $-56\text{ppm}$ から $-70\text{ppm}$ の範囲にTユニット ( $(\text{SiO})_{3-x}(\text{O}^-)_x\text{SiC}-$ ;  $x=0.1$ ) によるピークが出現した。以上より、APS基の固定化が示された。しかしながら、APTSとの反応後もDTMAイオンが残存することが $^{13}\text{C}$  CP-MAS NMRスペクトルから示唆された。

アゾベンゼンカルボン酸塩化物との反応後、生成物は黄土色を呈していた。反応前後のXRDパターンおよびUV-VisスペクトルをそれぞれFig. 3と

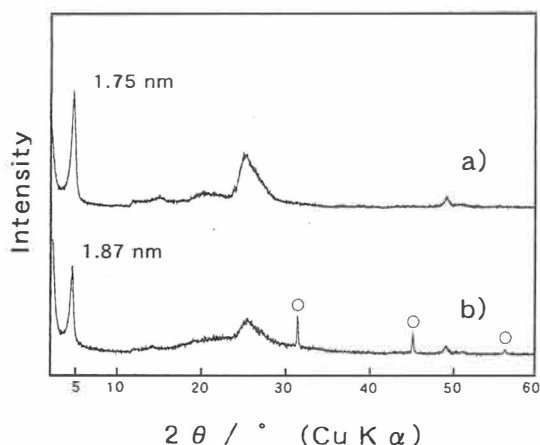


Fig. 3 生成物のX線析図:  
(a) APS-マガディアイト,  
(b) 4-phenylazobenzoyl  
chloride処理後. (○: NaCl)

Fig. 4に示す。XRDパターンから反応により層間隔が $0.12\text{nm}$ だけ増加したことがわかる。また、NaClによる新たな回折ピーク(○)が観測された。

一方、UV-Visスペクトルでは、生成物において $319\text{nm}$ に吸収極大が確認された。アゾベンゼンカルボン酸塩化物のトルエン溶液においては $327\text{nm}$ にtrans体による $\pi-\pi^*$ の吸収極大をもつことから、生成物中におけるアゾベンゼン基の存在が示

される。なお、 $426\text{nm}$ の吸収ピークはcis体による $n-\pi^*$ 遷移による吸収極大と思われる。

cis体は通常室温では不安定であることから、生成物においてcis体はかなり安定化されていることが示される。以上より、層間にアゾベンゼンが固定化された可能性が示唆されたが、 $^{13}\text{C}$  CP-MAS NMR分析によると、アゾベンゼンによる共鳴線の出現は認められず、明確な確証は得られなかった。

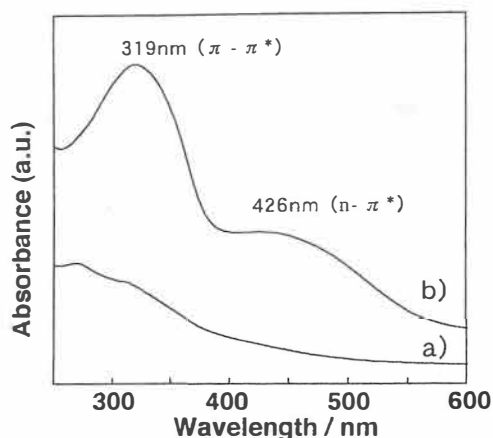


Fig. 4 生成物のUV-Visスペクトル:  
(a) APS-マガディアイト,  
(b) 4-phenylazobenzoyl  
chloride処理後.

#### 4 総括

層状粘土鉱物であるモンモリロナイトと層状ポリケイ酸塩であるマガディアイトを用い、異なる手法によりアゾベンゼンの層間への固定を試みた。モンモリロナイト層間を用いパラアミノアゾベンゼンを層間に導入した場合には、層間陽イオンが金属イオンの場合は、色調は陽イオンの種類により変化した。一方、ドデシルトリメチルアンモニウム型モンモリロナイト層間へは、色調は単体とほぼ同様のままインターカレーションした。マガディアイトを用いた場合は、層間へのAPS基の固定には成功したが、アゾベンゼンカルボン酸塩化物との反応による固定化の確証は得られな

かった。以上より、色素のカプセル化手法として、インターカレーション反応は有用な手法であることが明らかとなった。

#### 参考文献

- 1) 須藤俊男, “粘土鉱物学”, 岩波書店 (1974)
- 2) 加藤忠蔵, 黒田一幸編著, “層間化合物の開発と応用”, CMC (1985)
- 3) 堀江一之, 牛木秀治著, “光機能分子の科学”, 講談社サイエンティフィク (1992)
- 4) 小菅勝典, 山崎淳司, 綱島群, 大塚良平, 日本セラミックス協会学術論文誌, 100 326-331 1992
- 5) K. Ueno, *J. Am. Chem. Soc.*, 79 3205-3208 1957
- 6) W. R. Brode, J. H. Gould, and G. M. Wyman, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 4641-4646 1952
- 7) G. Lagaly, K. Beneke, and A. Weiss, *Am. Mineral.*, 60 650-658 1975

# ハーダー腺の分泌するアルキルジアシルグリセロールの 物性解明とその素材としての応用開発

東京大学 医学部

脊山 洋 右

Fatty acid and alkyl compositions of 1-alkyl-2,3-diacylglycerols (ADG) in the Harderian gland of golden hamster were determined. Fatty acids of male ADG consisted of straight chain saturated acids. Both even- and odd-numbered acids were observed, indicating that acetyl- and propionyl-CoAs were equally used as primers in the fatty acid synthesis. In female ADG a large amount of iso- and anteiso-branched fatty acids were detected. Odd-numbered acids contained iso- together with anteiso-branchings, and even-numbered acids contained iso-branchings. These findings suggested that isobutyryl-, isovaleryl-, and 2-methylbutyryl-CoAs were used as primers in addition to acetyl- and propionyl-CoAs in fatty acid synthesis in the female gland. Such unusual primers are catabolic intermediates of valine, leucine, and isoleucine, respectively. Treatment with testosterone in female led to the disappearance of such branched chain fatty acids. Castration led to the appearance of iso- and anteiso-branched chain fatty acids. We conclude from these observations that the production of branched chain fatty acids in the Harderian gland of golden hamster is inhibited by testosterone at the step of isovaleryl-CoA dehydrogenase and 2-methyl branched chain acyl-CoA dehydrogenase. Thus androgens are essential to the control of the composition of ADGs in the golden hamster Harderian gland. This organ is a suitable model in the study of androgen receptor, and the application of such a unique ADG, bioactive lipid, will be the subject of a further communication.

## 1 緒 言

ハーダー腺は齧歯類の眼窩内に発達した外分泌腺で、脂質を分泌することで知られている<sup>1)</sup>。湿重量の20%以上を脂質が占めている。この脂質はアルキルジアシルグリセロール (ADG) であることが多いが、動物種によりその脂肪酸及びアルキル残基の組成は異なっている。

本研究の対象となったゴールデンハムスターではこの外分泌脂質に雌雄差があることが知られていた。その違いについて、これまでは雄では直鎖の飽和脂肪酸から成るのに対し、雌では不飽和脂

肪酸が含まれているという報告があつて<sup>2)</sup>、不飽和結合の有無が雌雄差となって現れたものと考えられてきた。

ところが、本研究で改めてこの脂質を分析したところ、雌のADGには不飽和脂肪酸は存在せず、むしろイソ型およびアンテイソ型の分枝鎖脂肪酸が多量に含まれていることが明らかになった<sup>3)</sup>。

このことは、雌雄差の本態が脂肪酸生成におけるプライマーの違いにあることを意味している。acetyl-CoAがプライマーとして使われると偶数鎖の脂肪酸が合成されるのに対して、isovaleryl-CoA, isobutyryl-CoA, 2-methylbutyryl-CoAがプライマーとして使われるとイソ型、アンテイソ型分枝鎖が合成されることがわかっているので、これらのCoA誘導体を生成する分枝鎖アミノ酸の代謝調節が雌雄によって異なっていることが浮かび上がってきた。

分泌脂質の性差をもたらすべく性ホルモンによって調節されているのは、従来考えられていた

Characterization of alkyldiacyl-glycerols from the Harderian gland

Yousuke Seyama

Faculty of Medicine,  
University of Tokyo



ような脂肪酸不飽和化酵素 (desaturase) ではなく、分枝鎖アミノ酸の分解過程の酵素であることが明らかになったといえよう<sup>4)</sup>。

血小板活性化因子 (PAF) がアルキルリン脂質であるように、ADGのようなアルキル脂質は生理活性脂質でもある。本研究はこの脂質に見られる雌雄差の本態を明らかにすることによって、その特性を生かした脂質の応用開発の基礎を与えようというものである<sup>5)</sup>。

## 2 実験

### 2.1 試料調製および分析方法

ゴールデンハムスターのハーダー腺から脂質をクロロホルム/メタノール溶液で抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーでADGを単離精製した。ADGをメタノリシスして得られた脂肪酸メチルエステル、およびイソプロピリデン誘導体化したアルキル残基はそれぞれガスクロマトグラフィー質量分析機 (GC/MS) にて同定し、ガスクロマトグラフィー (GLC) にて定量した。ADGおよび脂肪酸メチルエステル、アルキルグリセロールは $C^{13}$ および $H^1$ -NMRによっても分析した<sup>3)</sup>。

### 2.2 雄に対する去勢と雌に対するテストステロン投与

雄のゴールデンハムスターを去勢し、8週間飼育した後ハーダー腺を摘出してそのADGの分析を行った。雌にはテストステロン錠剤を頸部皮下に埋め込み、8週間飼育後にハーダー腺のADG分析を行った<sup>4)</sup>。

## 3 結果

### 3.1 薄層クロマトグラフィーにみるADGの雌雄差

シリカゲルプレートにより中性脂質を分離した薄層クロマトグラフィーでは、雌のADGが2つのスポット (F1、F2) に分かれるのに対して、雄のADGは3つのスポット (M1、M2、M3) に分離される

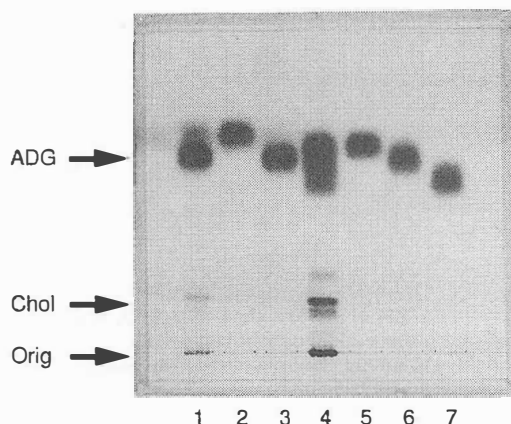


図1 ゴールデンハムスターハーダー腺脂質の薄層クロマトグラム

1: 雌の粗脂質; 2: 雌ADG (F1);  
3: 雌ADG (F2); 4: 雌の粗脂質  
5: 雄ADG (M1); 6: 雄ADG (M2);  
7: 雄ADG (M3)

ADG: 1-alkyl-2, 3-diacylglycerol;

Chol: cholesterol; Orig: origin

プレート: silica gel 60 (Merck, Darmstadt)

展開溶媒: hexane-diethylether-acetic acid  
(80:20:1, v/v)

検出: 20%硫酸噴霧後に120℃に加熱

### 3.2 NMRによる分枝鎖の証明

雌のADGをNMRで分析したところグリセロールの3位にイソバレリアン酸が存在すること、および2位にはイソ型、アンテイソ型分枝鎖脂肪酸が多量に含まれていることが示された。さらに、単離したアルキルグリセロールの分析から雌のアルキル残基にもこの型の分枝鎖が存在することが明らかになった。

一方、雄のADGには脂肪酸、アルキル残基ともに、このような分枝鎖は認められず、直鎖の成分から構成されていることが示された。

### 3.3 ADGの脂肪酸組成

雄のADGの脂肪酸組成は単純で、直鎖の脂肪酸から成り、最も多いのは15:0という奇数酸であった。偶数酸だけではなく奇数酸も存在することが特徴である。

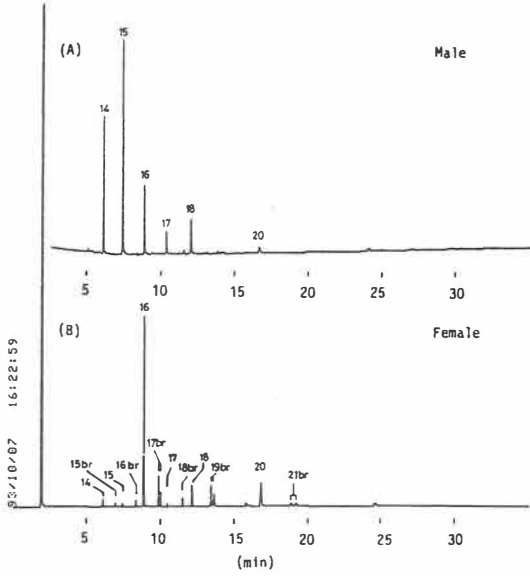


図2 ハーダー腺ADGの脂肪酸メチルエステルのガスクロマトグラム

(A) 雄; (B) 雌

図中の数字(14-21)は炭素鎖長を示す。  
"br"は分枝鎖脂肪酸を意味する。

カラム: OV-1キャピラリーカラム (0.28mmx25m)  
流速: 1 ml/min  
温度: 180℃に1分保った後, 5℃/minで250℃まで昇温

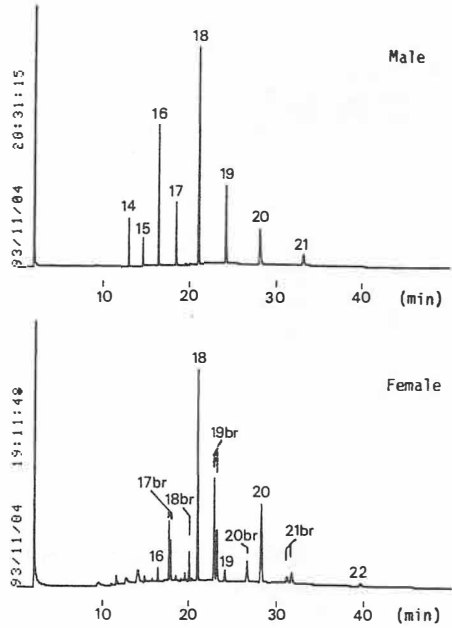


図3 ADGに由来するalkylglycerolのisopropylidene誘導体のガスクロマトグラム

Male 雄; Female 雌

図中の数字(14-22)は炭素鎖長を示す。  
"br"は分枝鎖脂肪酸を意味する。

カラム: OV-1キャピラリーカラム (0.28mmx 25m)  
流速: 1 ml/min  
温度: 180℃に1分保った後, 5℃/minで250℃まで昇温

これに対して雌のADGでは多量の分枝鎖脂肪酸が含まれており、しかもその分枝の形がイソ型及びアンテイソ型であった。炭素数が奇数のものではイソ及びアンテイソ型、炭素数が偶数のものではイソ型の分枝鎖脂肪酸であった。脂肪酸鎖の中央部分には分枝は存在しない点がいずれも以前に報告したモルモットのハーダー腺脂質とは異なっている<sup>6)</sup>。

### 3.4 ADGのアルキル残基の組成

ADGのアルキル残基の組成にも脂肪酸と対応した雌雄差が見られた。

すなわち、雄のADGでは18:0を主成分として直鎖のものから構成され、偶数成分と共に奇数の成分も存在していた(図3)。

一方、雌のADGでは多量のイソ型およびアンテイソ型分枝鎖の成分が検出された。偶数鎖ではイソ型、奇数鎖ではイソ型およびアンテイソ型の分枝であった。

### 3.5 テストステロンの効果

雄のゴールデンハムスターを去勢すると、ハーダー腺のADGは薄層クロマトグラフィー上で3つのスポットからなる雄型から2つのスポットの雌型に変わった(図4)。

一方、テストステロンを投与した雌では逆に2つのスポットから成る雌型から3つのスポットの雄型に変わったことが示された。

そこで、去勢した雄のハーダー腺のADGの脂肪酸組成をGLCおよびGC/MSで分析したところ、イ

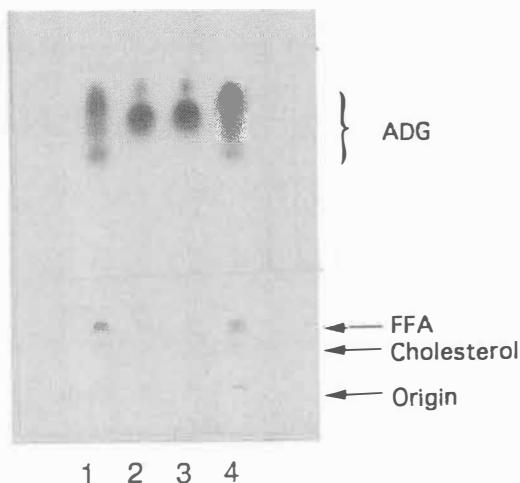


図4 ゴールデンハムスターハダ腺脂質に対するテストステロンの効果

1: 雄; 2: 去勢した雄; 3: 雌;  
4: テストステロンを投与した雌

ADG: 1-alkyl-2,3-diacylglycerol; FFA: free fatty acid

プレート: silica gel 60 (Merck, Darmstadt)

展開溶媒: hexane-diethylether-acetic acid (80:20:1, v/v)

検出: 20%硫酸噴霧後に120℃に加熱

ソ型およびアンテイス型分枝鎖脂肪酸が多量に検出され、雌に見られる特徴を有していた。アルキル残基組成も47%がイソ型およびアンテイス型分枝鎖を有するものになっていた。

一方、テストステロンを投与した雌のADGは直鎖脂肪酸のみから構成され、アルキル残基も直鎖であるという雄のADGのパターンに変わっていた。

## 4 考察

### 4.1 ゴールデンハムスターのADGにおける性差

ゴールデンハムスターのハダ腺が分泌する脂質であるADGに雌雄差があることは15年以前から知られていたが、雌に不飽和脂肪酸が存在することが違の本質であるかのように考えられていた。今回の研究により雌のADGに存在したのは不飽和結合ではなくイソ型およびアンテイス型の分枝鎖であることが明らかになった。以前の報告は

ガスクロマトグラフィーの同定を誤った結果である。

アルキル残基は脂肪酸から合成されるので、雌のADGのアルキル残基にもイソ型およびアンテイス型分枝鎖が多量に存在していた。

### 4.2 ゴールデンハムスターのハダ腺における脂肪酸合成のプライマー

雄のゴールデンハムスターのハダ腺では偶数鎖及び奇数鎖の脂肪酸が合成されるので、acetyl-CoAとpropionyl-CoAがプライマーとして使われていることになる。

これに対して雌の場合にはイソ型及びアンテイス型分枝鎖脂肪酸が合成されるのでisobutyryl-CoA, isovaleryl-CoA, 2-methylbutyryl-CoAがプライマーとして使われていることを意味している。これらはそれぞれvaline, leucine, isoleucineという分枝鎖アミノ酸の代謝中間体であることから、雌では分枝鎖アミノ酸がacetyl-CoAとpropionyl-CoAにまで代謝されることなく、これらの中間体の段階で蓄積し、脂肪酸合成のプライマーとして使われたことを意味している。

### 4.4 ADG組成に雌雄差をもたらす酵素

ゴールデンハムスターのハダ腺では雄ではacetyl-CoAとpropionyl-CoAが脂肪酸合成におけるプライマーとして使われ、雌ではisobutyryl-CoA, isovaleryl-CoA, 2-methylbutyryl-CoAがプライマーになる。このことは、valine, leucine, isoleucineという分枝鎖アミノ酸の代謝過程における2種類の酵素である2-methyl-branched-chain acyl-CoA dehydrogenaseとisovaleryl-CoA dehydrogenaseが雄では活性発現しているのに対し、雌では活性がないことを示唆している(図5)。

即ち、ゴールデンハムスターの分泌脂質に見られた雌雄差は分枝鎖アミノ酸の代謝過程が性ホルモンの調節を受けた結果であることが判明したといえよう。

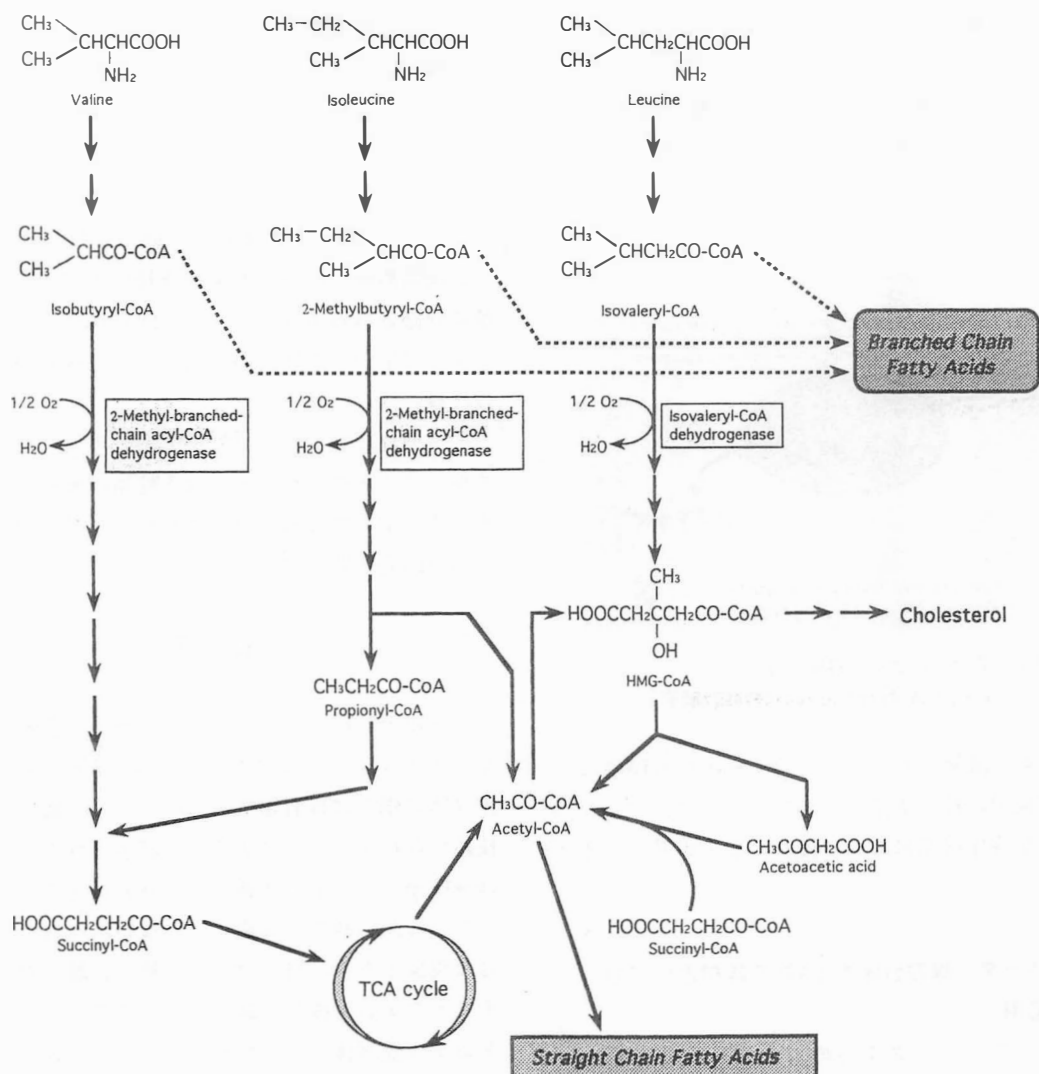


図 5 分枝鎖アミノ酸 (valine, leucine, isoleucine) の代謝

#### 4.5 テストステロンによる酵素の発現調節

ゴールデンハムスターの雄を去勢し、雌に対してはテストステロン投与を行うという実験を行った結果、ハーダー腺のADGが雄は雌型に、雌は雄型に変わることが示されて、前述の2種類の酵素の発現を介して脂肪酸組成が変化することが実証された。即ち、テストステロンが存在する状態ではこれらの酵素が働いてvaline、leucine、isoleucineという分枝鎖アミノ酸はacetyl-CoAとpropionyl-CoAにまで代謝されるが、テストステ

ロンが存在しないと中間体のisobutyryl-CoA、isovaleryl-CoA、2-methylbutyryl-CoAが蓄積してイソ型およびアンティソ型の分枝鎖脂肪酸が合成される。

#### 4.6 アンドロゲン受容体の役割

テストステロンは核内に存在するアンドロゲン受容体を介して染色体上の特定の遺伝子部位を活性化し、mRNAの発現、タンパク質の合成をもたらすものと考えられている。ゴールデンハムスター

のハーダー腺はまさにこの系を解析する上で格好のモデルであり、テストステロンがアンドロゲン受容体を介して働いた結果を分泌脂質であるADGの組成変化としてモニターすることが可能である(図6)。

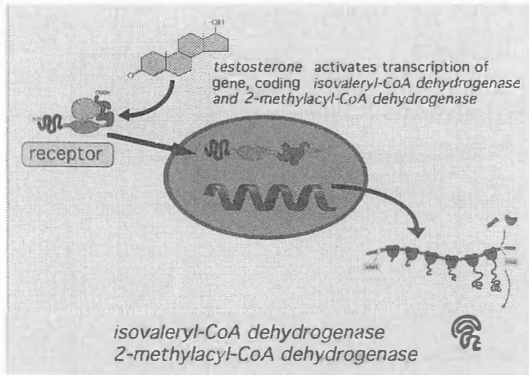


図6 アンドロゲン受容体を介したacyl-CoA dehydrogenaseの発現調節

しかも、薄層クロマトグラフィーという簡便な方法で鋭敏に検出することができるので、アンドロゲン受容体研究において優れたモデル系といえよう。

#### 4.7 ハーダー腺の分泌するADGの素材としての応用

ゴールデンハムスターのハーダー腺の脂質はADGであるが、不飽和結合を全く含んでいないという特徴がある。その代謝の本質は今回の研究で明らかになったが、イソ型及びアンテイソ型分枝鎖の存在はこの脂質の素材としての応用を考える上で示唆に富んでいる。

即ち、ADGが直鎖の飽和脂肪酸及びアルキル残基から成っていると、そのままでは融点が高くヒトの体温では流動性が乏しいが、イソ型及びアンテイソ型の分枝鎖が導入されることによって融点が下がり、適度な流動性を確保することが可能になる。因みに、これらの分枝鎖成分を含まない雄では奇数鎖の導入およびC2やC3という極端に短い脂肪酸をグリセロールの3位に導入することに

よって融点を調節していることが判明した。

不飽和結合は空気中で不安定で、異臭の原因にもなるが、イソ型及びアンテイソ型分枝鎖脂肪酸は安定で扱いやすいという利点を有している。ゴールデンハムスターのハーダー腺が分泌するADGの果たす生理的役割は未だに推定の域を出ないが、創傷治癒に關与する細胞成長因子や<sup>7, 8)</sup>、多量に分泌されるポルフィリン、或いはフェロモンのような生理活性物質の溶剤としての機能が考えられる。

イソ型及びアンテイソ型分枝鎖を導入したアルキルジアシルグリセロールは化粧品の素材として適しているのではないかとわれ、今後この方面の応用開発が期待される。

## 5 総括

ゴールデンハムスターのハーダー腺の脂質であるアルキルジアシルグリセロール(ADG)の雌雄差は雄の場合には直鎖であるのに対し、雌では分枝鎖が存在することによることが示された。これは分枝鎖アミノ酸の代謝過程の酵素が雄では発現しているが、雌では発現していない為にもたらされた現象である。雄に対する去勢と、雌に対するテストステロン投与実験により、このことはアンドロゲン受容体を介したテストステロンの効果であることが判明した。

本研究の意義は、ADGの性差の本態をあきらかにして、アンドロゲン受容体研究のモデル系を樹立したことと、イソ型及びアンテイソ型分枝鎖を有するADGの素材としての有効性を提唱した点にある。

## 引用文献

- 1) Seyama Y, Kasama T, Yasugi E, et al., : Lipids in Harderian glands and their significance, In : Webb SM, Hoffman RA, Puig Domingo ML, Reiter RJ (eds) : Harderian glands, Springer-Verlag,

- Berlin, 195-217 1992
- 2) Lin WL, Nadakavukaren MJ, : Harderian glandlipids of male and female golden hamsters, *Comp. Biochem. Physiol.*, 70B, 627-630 1981
  - 3) Seyama Y, Otsuka H, Ohashi K, et al., : Sexual dimorphism of lipids in Harderian glands of golden hamsters, *J. Biochem.*, 117 661-670 1995
  - 4) Seyama Y, Hida A, Hayashi S, et al., : Androgenic control of 1-alkyl-2, 3-diacylglycerol in the Harderian gland of the golden hamster, *Mesocricetus auratus*, *J. Biochem.*, 119 in press, 1996
  - 5) Seyama Y, Otsuka H, Ohashi K, et al., : Sexual diversity of the lipid metabolism in the Harderian gland of golden hamster, *Microscopy Res. Technol.*, in press, 1996
  - 6) Yamazaki T, Seyama Y, Otsuka H, et al., : Identification of alkyldiacylglycerols containing saturated methyl branched chains in the Harderian gland of guinea pig, *J. Biochem.*, 683-691 1981
  - 7) Yokoyama Y, Kano K, Kaji K, et al., : Purification and characterization of a growth factor from the guinea pig Harderian gland, *J. Biol. Chem.*, 17058-17063 1989
  - 8) Yokoyama Y, Kano K, Matsuda Y, et al., : Effect of Harderian gland derived growth factor on the growth of corneal stromal cells, *Cornea*, 11 380-385 1992

# 植物培養細胞・組織による活性成分の生産と薬用植物の育種に関する研究 —特にForskolin原料植物*Coleus forskohlii*について—

九州大学 薬学部

正山 征洋

The effective range of the competitive ELISA for detection of forskolin content in clonally propagated plant organs of *Coleus forskohlii* using monoclonal antibodies extends from 5ng/ml to 5 $\mu$ g/ml.

Shoot tips of *C. forskohlii* were cultured repeatedly on the MS medium supplemented with NAA(0.5mg/l) and BAP(0.5mg/l) at 25°C under the 16hr irradiation for 1 month to form multiple shoot complex. A correlation between the forskolin accumulation and the growth rate was investigated using the clonally propagated shoots. An increase of forskolin content was noted, beginning at week 6. Flowers, rachises, leaves, stem, tuberous roots and roots were analyzed. Tuberous root and the stem base contained a higher amounts of forskolin than other organs. The forskolin content in the stem decreased gradually towards the top of the shoot. Quantitative determination of forskolin content in the plants cultivated in different temperature was investigated by ELISA. The temperature clearly affected the production of forskolin, demonstrating that the contents of forskolin was highest at 20°C than at 15°C and 30°C.

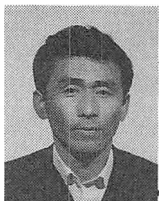
An immunoaffinity column chromatography using anti-forskolin monoclonal antibodies appears to be far superior to previously published separations based on crystallization and chromatography. The capacity of the column is 9 $\mu$ g/ml of gels. Forskolin has been isolated directly from the crude extractives of tuberous roots and the callus culture of *C. forskohlii*.

## 1 緒言

生薬の90%以上を輸入に依存し、その内の約80%は自生種により賄われているという。この現実は何を意味するのであろうか。一つには資源の枯渇が浮上してきている。それと同時に医薬品であるが故に品質に大きな差が生じ、製剤の力価に影響を及ぼす事が容易に想像出来る。我々は漢方処方に繁用される半夏、地黄、附子、朮類、人參類や竜胆、淫羊、当薬等の原植物に付いて、上記2点をクリアすべく、バイオテクノロジーの手法により、ウイルスフリー品種の育成、均質な品

種の作出等の育種研究を行ってきた。これら研究の延長線上には各種耐性品種、例えば耐病性品種の育成がターゲットとなり、この目的を遂行するために溶菌酵素遺伝子の導入実験等を行っている。一方有効成分の高含有品種の育成も重要である。高含有品種の育成を達成するためには、簡便で高感度かつ再現性に優れたアッセイシステムの構築が要となることは周知の事で、このため種々の有用成分に対するモノクローナル抗体(MAb)の作成とそれを用いるEnzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)を確立すべく研究を行っている。

Forskolinはインド地方に自生する*Coleus forskohlii*(シソ科)の根茎に含有されるラブダン型ジテルペンである。本植物はアユルベダにも収載され、心臓病、呼吸器疾患、不眠症等に適用されてきた。近年活性成分としてforskolinが単離された<sup>1)</sup>。Forskolinはadenyl cyclaseを強力に活性化しcAMPを増加する作用メカニズムが明らかとなり<sup>2)</sup>、医薬品素材として注目されるに



Production of bioactive compound and breeding of medicinal plants by plant tissue-cell culture—Study on *Coleus forskohlii* that produces forskolin

Yukihiro Shoyama

Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
Kyushu University

至っている。また、forskolinの著しい色素細胞化現象が知られているが、この現象をコスメトロジーに応用しようとする試みは皆無である。

Forskolinは分子内にアシメ炭素を8ヶ有する事から光学活性体を合成することは極めて困難と考えられる。このため天然資源から抽出単離を行っている現状である。また、*C. forskohlii* の培養細胞からforskolinを生産する研究が行われているが、その含量の点から現状のままでは実用化の可能性は極めて小さいと目されている。かかる現状からforskolin高含有 *C. forskohlii* 品種育成を目的としたforskolinのアッセイ系を構築するための抗forskolin MAbの作成が必須となろう。本研究では抗forskolin MAbの作製とそれを用いたforskolinの高感度なアッセイ系としてELISAを確立した。また一方では *C. forskohlii* の培養系を検討し、高含有株選抜の手法を確立した。更に抗forskolin MAbを用いた抗体カラムを作製し、栽培株や培養細胞の粗エキスからforskolinをダイレクトに精製出来る方法を開発した。

## 2 実験

### 1. 抗forskolin MAbの作成<sup>3, 4)</sup>

Forskolinは、免疫源とするためにsuccinateをリンカーとして牛血清アルブミン (BSA) と結合した。マウスに免疫後、常法により脾臓細胞とマ

ウスミエローマ細胞のハイブリドーマを調製した。ハイブリドーマのコロニーが成長した段階で培養上清について、forskolin-ヒト血清アルブミン (HSA) を用いてELISAを行い、陽性コロニーを選抜し、タイプとサブタイプを決定した (Table. 1)。ハイブリドーマ1A9をスケールアップしproteineAアフィニティーカラムで精製し、MAbを得た。

### 2. ELISAの確立

96穴のイムノプレートに100ng/mlのforskolin HSAを100  $\mu$ lずつ添加し、インキュベート後、geratin-PBSでブロッキングした。本プレートに各種濃度のforskolin溶液100  $\mu$ lとMAb溶液 (0.7  $\mu$ g/ml) 50  $\mu$ lを加えてインキュベートした。洗浄後peroxidaseでラベルした抗マウス二次抗体の千倍希釈液を添加し、1時間インキュベートした。洗浄後基質を添加し15分後に発色をプレートリーダーで測定した。

### 3. アフィニティーカラムの作製

精製したMAb (10mg) のPBS溶液を活性化CNBr-Sephrose 4B (600mg) ゲルに加え、室温下2時間反応した。反応後未反応基をグリシンでブロッキングし、NaHCO<sub>3</sub>-NaCl溶液で洗浄した。遠心してゲルを集めPBSで洗浄後カラムに充填し、アジトナトリウム溶液を加え保存した。

### 4. アフィニティーカラムによる粗抽出エキスからforskolinの単離

根茎、培養カルの乾燥粉末 (10mg) をジエチルエーテルで5回抽出。溶媒を留去後メタノールに溶解し、PBSで16倍に希釈した。溶液をろ過後、アフィニティーカラムに添加し、4℃で90分放置後、洗浄液で繰り返し洗浄した。過剰のforskolinが流出しなくなったら溶出液 (45%メタノール含有PBS) でforskolinを溶出した。

Table. 1 List of monoclonal antibodies against forskolin.

MAbs	Isotype	Light chain
1A9	G1	$\kappa$
4G12	G2b	$\kappa$
9D12	M	$\kappa$
9E12	M	$\kappa$
11A9	M	$\kappa$
12F9	M	$\kappa$

### 5. *C. forskohlii* の培養

*C. forskohlii* の成長点を無菌的に摘出し、NAA, BAP (0.5mg/l) 添加MS培地へ置床し、25℃, 16時間日長、1か月培養した。増殖したシュート切片を同一条件下で繰り返し培養した。増殖シュートをホルモン無添加MS培地で同一条件にて培養し発根させてクローン植物を得た。

### 6. *C. forskohlii* の栽培

上記のクローン植物をバイオトロン各温度室 (15、20、30℃) と圃場にて栽培した。

## 3 結果

1. Forskolin-BSAコンジュゲートをMALDIマスペクトルで分析したのがFig.1である。この結果、従来は間接的な測定手段でのみ確認されてきたハプテン-蛋白コンジュゲートであるforskolinとBSAの結合が極めてクリアにされ、結合モル数を算定することが可能となった。

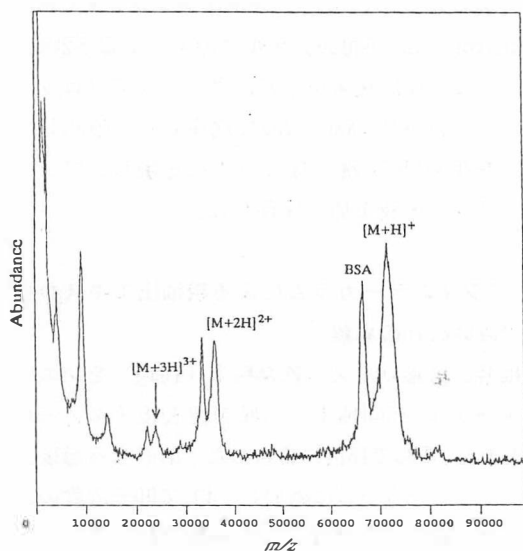


Fig.1 MALDI co-mass spectrum of forskolin BSA conjugate and BSA

### 2. 抗forskolin MAbの作成

直接ELISAでスクリーニングしたところ、ハイブリードーマ1A9が感度の点で最も優れている事が判明したのでスケールアップしproteineAアフィ

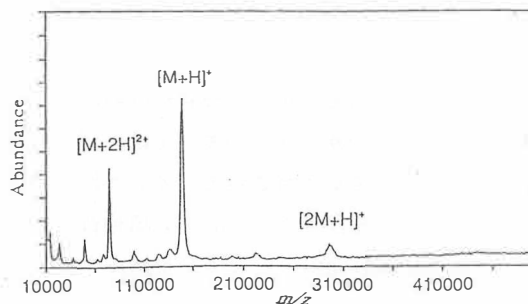


Fig.2 MALDI mass spectrum of monoclonal antibody against forskolin

ニティーカラムで精製した。Fig.2は精製したIgG (MAb) のMALDIマスで、ほぼ純粋な蛋白であることが窺える。

### 3. ELISAの確立<sup>4, 5)</sup>

精製したIgGを用いて競合によるELISAから検量線を作成したのがFig.3である。5ng/ml-5μg/ml

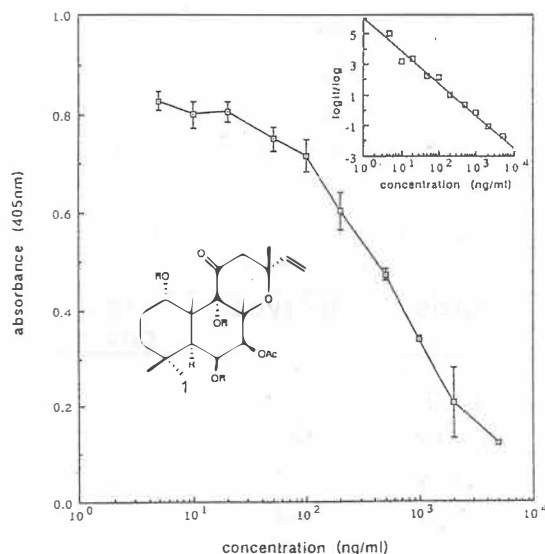


Fig.3 Calibration curve of forskolin

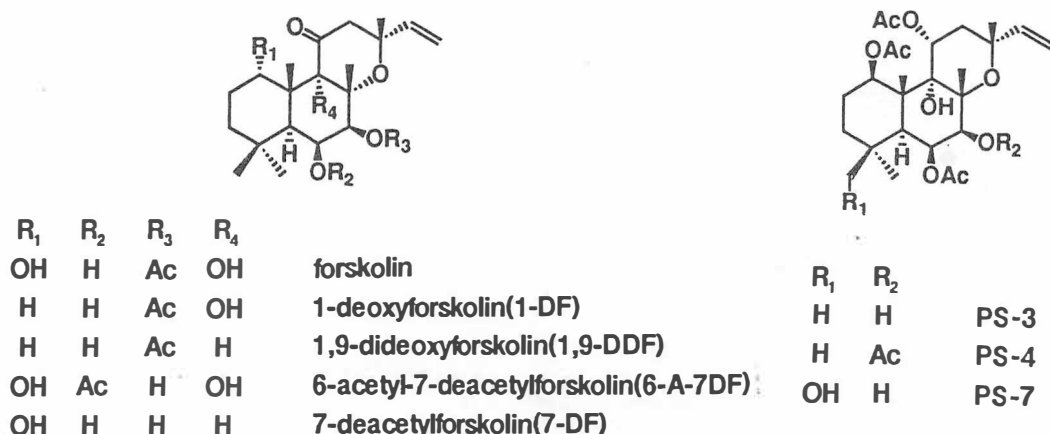


Fig.4 Structures of forskolin and related diterpenoids

の範囲内で良好な直線性が得られ十分に定量が可能である事が明らかとなった。Fig. 4にforskolinの類似化合物の構造とTable. 2にcrossreactionを示している。この結果7-deacetyl forskolinのcross-reactionが5.6%である他は殆ど問題にな

Table.2 Cross reactivities determined using forskolin analogs.

Analog	Cross reactivity(%)
1-DF	0.63
1,9-DDF	1.30
6-A-7-DF	1.13
7-DF	5.57
PS-3	0
PS-4	0
PS-7	0

らない程度低かった。このことから本ELISAはforskolinに特異的かつ高感度な定量法である事が判明した。

以上確立したELISAを用いて *C. forskohlii* におけるforskolinの挙動を詳細に検討した。

#### 4. 成長過程におけるforskolinの消長

培養により得られたクローン植物を土壌に移植、栽培し、forskolin含量をELISAにより追跡した結

果をFig. 5に示す。2週目からforskolinが生合成されるが5週目までは0.01  $\mu$ g/mg dr. wt. 以下と、非常に低い値であった。根の成長が盛んとなる6週目から含量が暫時増加し、茎が急速に成長を始める11週から含量増加が著しく forskolin含量が0.5g/mg dr. wt. となり、12週では0.7g/mg dr. wt.

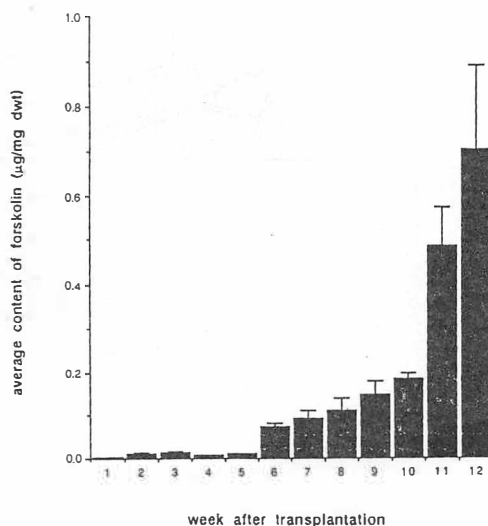


Fig.5 Average content of forskolin in the clonally propagated *Coleus forskohlii* plant according to growth stage

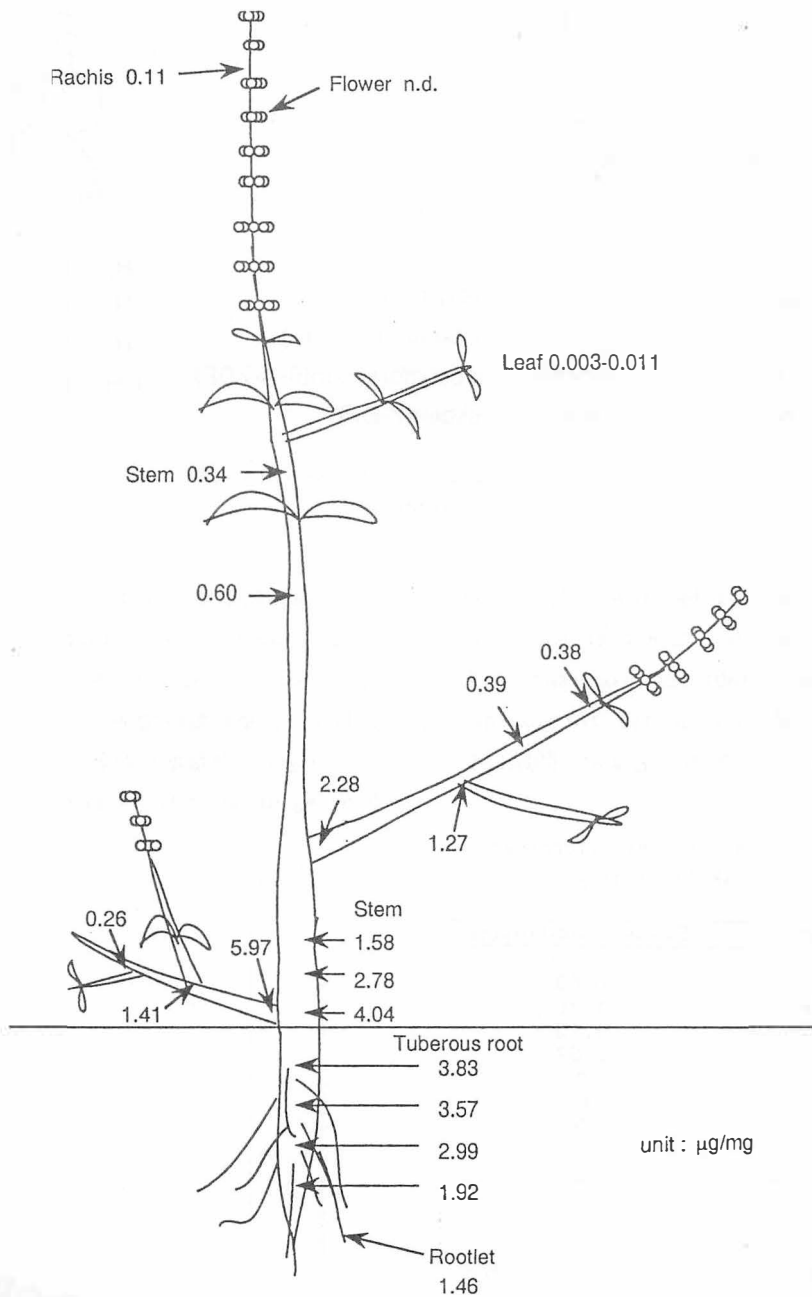


Fig. 6 Distribution of forskolin in one-year-old *Coleus forskohlii*

に達した。なお葉には forskolin を含有しないことが明らかとなった。

#### 5. 部位による forskolin 含量の変動

20°C 室でクローン植物を1年間栽培し、Fig. 6に

示す通りの各部位別にサンプリングし、凍結乾燥したものをELISAによりアッセイした。この結果花、花柄等には殆ど forskolinは含まれないことが明らかとなった。茎には0.3-4  $\mu\text{g}/\text{mg}$  dr. wt. のマイクロ変動が認められた。茎においては根茎との境目が最も含量が高く、上部程低含量であった。一方根茎においては茎との境界部位が含量高く、下方程低下することが明らかとなった。また、枝についても同様に大きな変異が認められた。

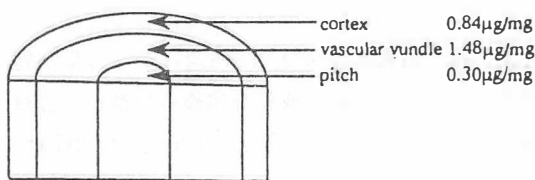


Fig. 7 Distribution of forskolin in tissues

茎を皮部、維管束部、柔組織に分けそれぞれに付いてアッセイしたのがFig. 7である。維管束部、皮部、柔組織の順に含量が低下している。

### 6. 生育環境と forskolin 含量<sup>6)</sup>

バイオトロンにおいて、15、20、30℃各温度室

Table 3 Distribution pattern of forskolin in different tuberous root segment in clonally propagated *coleus forskohlii*<sup>1)</sup>.

Temp.	Tuberous root section <sup>1)</sup>	A <sub>v</sub> . contents ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ dw) <sup>2)</sup>	Shape of tuberous root <sup>4)</sup>
15±1℃	1	2.83±0.28	
	2	1.36±0.39	
	3	1.24±0.23	
	4	1.15±0.16	
20±1℃	1	7.87±0.35	
	2	6.24±0.49	
	3	6.55±1.25	
	4	5.73±0.61	
	5	4.49±0.49	
	6	5.49±0.34	
	7	5.06±0.65	
30±1℃	1	3.83±0.38	
	2	3.57±0.24	
	3	2.99±0.30	
	4	1.92±0.42	

1) Single clonally propagated plant as indicated in Table 1 was used for analysis.  
 2) The main tuberous roots cultivated at 15 and 30℃ were sectioned into pieces (10 mm each), and those at 20℃ were cut into pieces as indicated in the shape, respectively. Section No. 1 shows the base of tuberous root.  
 3) A single plant was tested individually, and the content was expressed by the average of 3 measurements.  
 4) Standardized tuberous root was selected and used for analysis.

で栽培し、成長度を調査し、また個体の根茎を Table 3に示す如く切断し、乾燥後 forskolin 含量をアッセイした結果が Table. 3である。

この結果、特に根茎の生育は20℃が最も良好で、30℃区がこれに続いている。Forskolin 含量についても20℃区が最も高く、30、15℃の順であった。

### 7. アフィニティーカラムの作製とその応用<sup>7)</sup>

Forskolinは殆ど水に不溶なのでアフィニティーカラムに付す場合、有機溶媒の添加が不可欠である。そこでアフィニティーカラムのタンパク部分にダメージが少ないメタノールを選び、適切なメタノール含量を設定したのがFig. 8である。Fig. 8から45%メタノール含有PBSにて forskolin が完全に溶出することが判明した。

次にアフィニティーカラムを用いて粗エキスから forskolin を直接精製することを検討した。

Fig. 9に示すように大過剰の forskolin が洗浄溶媒により流出してくる。充分洗浄し forskolin の溶出が認められなくなった後に、上記の溶出溶媒を添加すると吸着していた forskolin が溶出し、シャープなピークを示した。この溶出パターンを

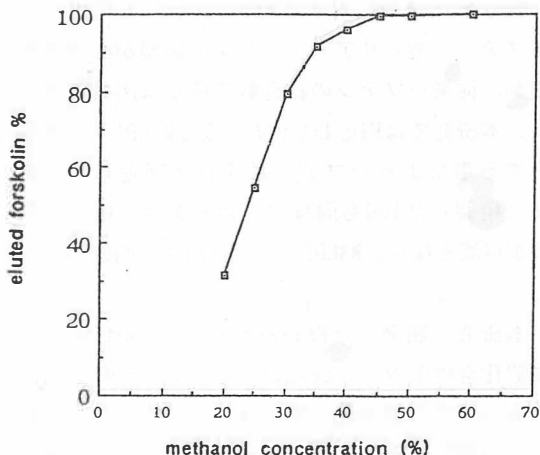


Fig. 8 Elution of forskolin by methanol solution

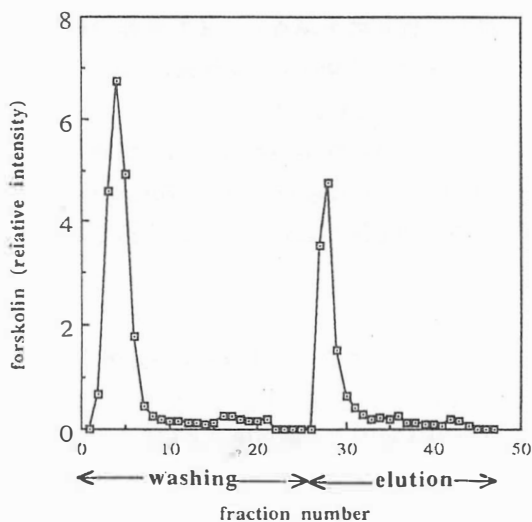


Fig. 9 Elution profile of forskolin

TLCにより検討したのがFig. 10である。この結果、大過剰のforskolinが洗浄溶媒で溶出すると共に関連ジテルペン類や未同定の化合物等が吸着することなく溶出していることが明らかとなった。

完全に洗浄後、溶出溶媒を添加することでforskolinが溶出していることが判明した。なお、微量の7-deacetylforskolinの溶出も認められた。

#### 4 考察

低分子化合物に対するMABを作製するに当たりハプテン-キャリアータンパクの調製が必須であるが、従来ハプテンの結合数の確定は困難であった。本研究ではFig. 1に示すようなMALDIマスを測定する事によりハプテン数を10と確定した。また、精製したIgGも同様にその精製度を認める事が可能となり、MALDIマスの有用性が明確となった。

本研究で開発したELISAのcross-reactivityは類似化合物の内、7-deacetylforskolinが5, 6%であるのみで、他の化合物に対しては感作しておらず、特異性の高いアッセイ系である。また、測定感度も高く、再現性も高い優れたアッセイ系と言える。

培養系を用いて高含有株を作出する場合、選抜方法の選定は最も基本的な重要要件である。生薬の内、附子のアコニチン系アルカロイドは採取時期や栽培温度により大きく変動することを明らかにしてきたが、多くの植物において生育時期や生育環境、また植物の部位等により有効成分が大きく変動する事は容易に想像出来る。このため*C. forskohlii*に付いても育種研究をスタートするにあたり、かかる基礎的な研究が必須となる。本植物をインビトロの系でマイクロプロパゲーションし育成した株を生育時期を追って定量した結果、根の成長が盛んとなる6週目から含量が暫時増加し、茎が急速に成長を始める11週から含量増加が著しくforskolin含量が0.5  $\mu\text{g}/\text{mg}$  dr. wt. となることが明らかとなったので、培養系で変異源を投与し、少なくとも11週間栽培し、ELISAでアッセイして、優良株を選抜するマニュアルを確立することが出来た。本プロトコールに沿って現在優良株の選抜を実施中である。

次にバイオトロンにて栽培した株に付きELISAで詳細な検討を行った結果、従来はforskolinは根茎に最も多量に含有すると信じられていたが、本研究結果から茎にも多量含有され、その量は根茎との接点辺りが最も高含量であることを明確にした。反対に根茎は上部程含量高く、茎との接点部位が最も含量が高いという新知見を得た。これらの発見は実用栽培において原料部位を拡大し、収量アップにつながる有益な知見と考える。

アフィニティーカラムは極めて特異性が高いため、粗エキスから目的の化合物を一回のカラムで単離することが可能と考えられる。*C. forskohlii*の根茎や培養細胞・組織の抽出粗エキスを本アフィニティーカラムに付す事により、forskolinを得る事が出来た。

しかし、本MABが7-deacetylforskolinに対して約5%のcross-reactivityを持つ事から本化合物がforskolin画分に微量共存して溶出された。そこでこの混合物を4℃、ピリジン中無水酢酸と反応させることにより7-deacetylforskolinを

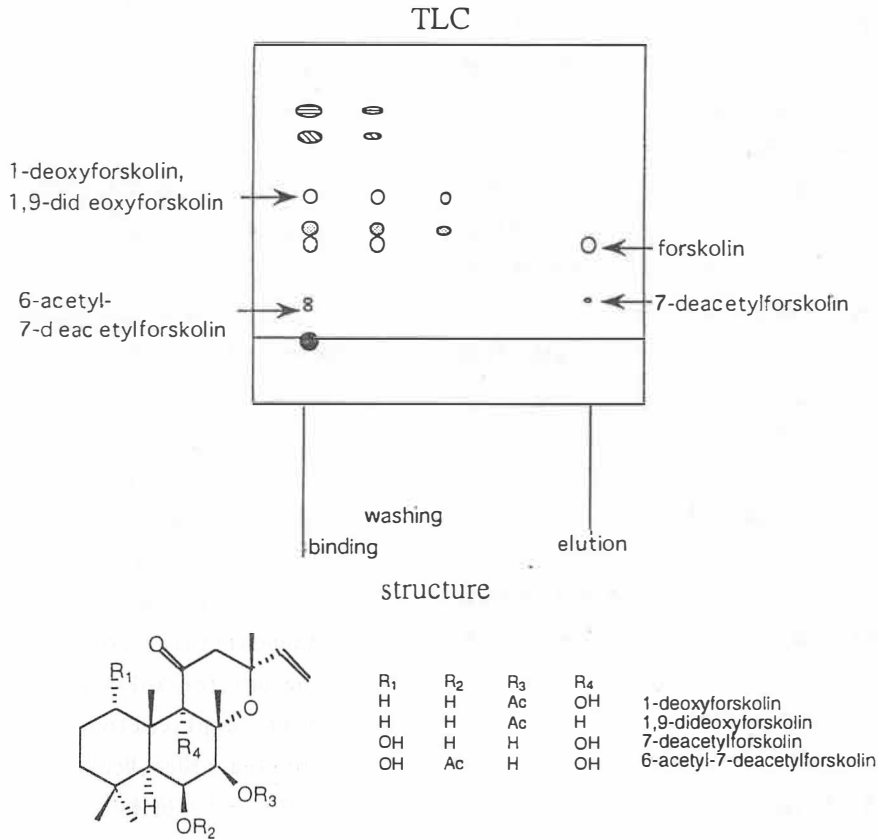


Fig. 10 Identification of forskolin and its derivatives

forskolinへと変換し、純粋なforskolinを得る事が出来た。本法はforskolinの吸着容量 $9\mu\text{g}/\text{ml}$ ゲルで、回収率85%であった。キャパシターは大きくないが、純粋なforskolinを必要とする場合、通常のカラムクロマトではかなりの回数繰り返し精製する必要があるが、本法を応用すれば一度のカラムで達成される。

また、forskolinは分子内にアシメ炭素を8個有する事から、光学活性体の合成は極めて困難と目されている。このため本アフィニティーカラムによる光学分割の応用も考えられ、この応用面も進行中である。

Forskolinはアデニールシクラーゼを活性化し、cAMPを増加することによりその生理作用は多岐にわたっており、医薬品開発のターゲットとなつて

いる事は自明である。しかし色素細胞化現象を促進する作用に付いては余り知られておらず、本研究の目的の一つがこの点にあることを述べた。この分野の研究に付いてもforskolinが比較的容易に得られる環境が出来たので、今後精力的に遂行し、コスメトロジーの領域に応用したいと念じている。

## 5 総括

植物組織・細胞培養技術を応用してforskolin高含有 *C. forskohlii* の育種研究を展開中である。本研究では選抜の基本となる高感度で特異的、再現性良好な、また、簡便なアッセイ法として、MAbを用いたELISAを開発した。これを基にミュー

タントの選抜タイミング等を明確にした。また、マイクロプロパゲーションで得られたクローン植物を栽培し、または培養細胞の抽出粗エキスから forskolin を極めて簡便に単離する方法を確立したことから、forskolin の応用研究への道が開かれたと考えている。また、本研究結果から MAb が有用で多方面に应用が可能なことを認識する事が出来た。現在アヘンアルカロイド<sup>8)</sup>、ステロイドアルカロイド<sup>9)</sup>、大麻成分<sup>10)</sup>等の MAb の作製へと進展中である。また、MAb の可変部分の cDNA をクローニング中で、この方面も進展中である。

## 謝 辞

本研究がコスメトロジー研究振興財団の助成金により成された事を記し、厚くお礼申し上げます。

## 引用文献

- 1) Bhat SV, Bajwa BS, Dornauer H, et al. : Structures and stereochemistry of new labdane diterpenoids from *Coleus forskohlii* Briq., *Tetrahedron Lett.*, 19 1669-1672 1977.
- 2) Seamon KB, Kenneth B, Seamon HB, et al. : Forskolin : unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 3363-3367 1981.
- 3) Shoyama Y, Sakata R, Isobe R et al. : Direct determination of forskolin-bovine serum albumin conjugate by matrix assisted laser desorption ionization, *Org. Mass Spectr.*, 28 987-988 1993
- 4) Sakata R, Shoyama Y, Murakami H. : Production of monoclonal antibodies and enzyme immunoassay for typical adenylate cyclase activator, forskolin, *Cytotechnology*, 16 101-108 1994
- 5) Yanagihara H, Sakata R, Shoyama Y et al. : Rapid analysis of small samples containing forskolin using monoclonal antibodies, *Planta Med.*,
- 6) Yanagihara H, Sakata R, Shoyama Y et al. : Relationship between the content of forskolin and growth environments in clonally propagated *Coleus forskohlii* Briq.; *Biotronics*, 24 1-6 1995
- 7) Yanagihara H, Sakata R, Shoyama Y et al. : Immunoaffinity column chromatography using antiforskolin monoclonal antibody and its application, *Anal. Chim. Acta* submitted. : 柳原、坂田、正山ら : 抗forskolin モノクローナル抗体のアフィニティーカラムへの応用、日本薬学会大115年会講演要旨集、p. 252 1995
- 8) Shoyama Y, Fukada T, Murakami H : Production of monoclonal antibodies Anal. Chim. Acta and ELISA for thebaine and codeine, *Cytotechnology*; in press, 1996
- 9) Tanaka H, Goto Y, Shoyama Y, monoclonal antibodies based enzyme immunoassay for Marihuana (Cannaloinoid) compounds, *J. Immunoassay*; in press, 1996
- 10) Ishiyama M, Shoyama Y, Murakami H, et al : Production of monoclonal antibodies and development of an ELISA for solow-argine *Cytotechnology*, 18 153-158 1996

# 弾性線維蛋白質エラスチンの自己組織化集合体の 構造、物性、機能に関する研究

九州大学 理学部

甲斐原 梢

Extracellular self-assembly process of tropoelastin, as a key step of the elastogenesis, can be mimicked by the temperature-dependent coacervation of elastin-related polypeptides such as tropoelastin,  $\alpha$ -elastin, and block copolymeric model peptide, (Val-Pro-Gly-Val-Gly)<sub>n</sub>. Homogeneous aqueous solutions of these polypeptides in low temperature become turbid with elevating temperature by the formations of coacervate droplets. Critical behaviors of the liquid-liquid phase separation of bovine neck ligamental  $\alpha$ -elastin-water system were observed by the laser light scattering photometry. The critical point was determined to be near 0.11mg/ml and 21.5°C. In the critical region, the estimated hydrodynamic radius was decreased gradually with elevating temperature probably due to the hydrophobic interactions excluding water molecules from the polypeptide assemblies. Then, the hydrodynamic radius increased sharply to induce liquid-liquid phase separation. On the contrary at the region far from the critical point, gradual decrease in hydrodynamic radius followed by the additional decrease to induce the phase separation. The temperature-dependent coacervation of elastin-related polypeptides are characterized by these two types of dynamic behaviors. The same modes of molecular assembly process were also observed by the rotary viscometric measurements for the critical and off-critical regions. The reduced viscosity of bovine neck ligamental  $\alpha$ -elastin solution was increased with elevating temperature in the region near critical point until the liquid-liquid phase separation was induced. While in the region far from the critical point, the reduced viscosity of aqueous  $\alpha$ -elastin solution was suppressed to constant levels with elevating temperature. Selective and specific interactions of calcium ions and copper ions were employed as a tool to survey structure and function of the elastin coacervate. Low diffusion coefficient and high concentration of calcium ions, seven times higher than that of magnesium ions, within coacervate phase were based on the selective binding to the electrically neutral backbone Val carbonyl groups. These selective interactions of calcium ions are tightly correlated with arteriosclerosis induced by the calcium deposition on the arterial wall elastin. Novel interactions of copper ions with elastin coacervate stabilized the microcoacervate droplet and the macroscopic phase separation to form coacervate layer and upper layered equilibrium solution phase. Unique effects of copper ions seem to present a key to clarify the molecular structural bases of elastomeric mechanisms.

## 1 緒言

細胞外マトリックスとしての弾性線維蛋白質エラスチンは、コラーゲンに次ぐ量が生体に存在しており、皮膚、動脈壁、項靱帯等、持続的な弾性が要求される組織に於て、弾性機能発現を支配し

ている。特に、大動脈壁を構成している血管平滑筋細胞、エラスチン、コラーゲンの中で、正常血圧の発生、維持に寄与しているのはエラスチンのみであり、低い圧力では平滑筋細胞が優先的に機能し、一方、高い圧力ではコラーゲンが優先的に機能して血管壁の剛性が増すと共に弾性が低下し、いわゆる動脈硬化と呼ばれる状態になる事が知られている。即ち、動脈硬化は、エラスチンの質的、量的な変化として捉える事が出来る。又、胎児期に既に機能している大動脈のエラスチンには、加齢と共にカルシウムやコレステロール等の脂質の沈着が進行して弾性機能が低下し、寿命を決定する重要な因子となっている。

Studies on Structure, Mechanism, and  
Function of Self-Assemblies  
of Elastomeric Protein

Kozue Kaibara

Department of Chemistry, Faculty  
of Science Kyushu University



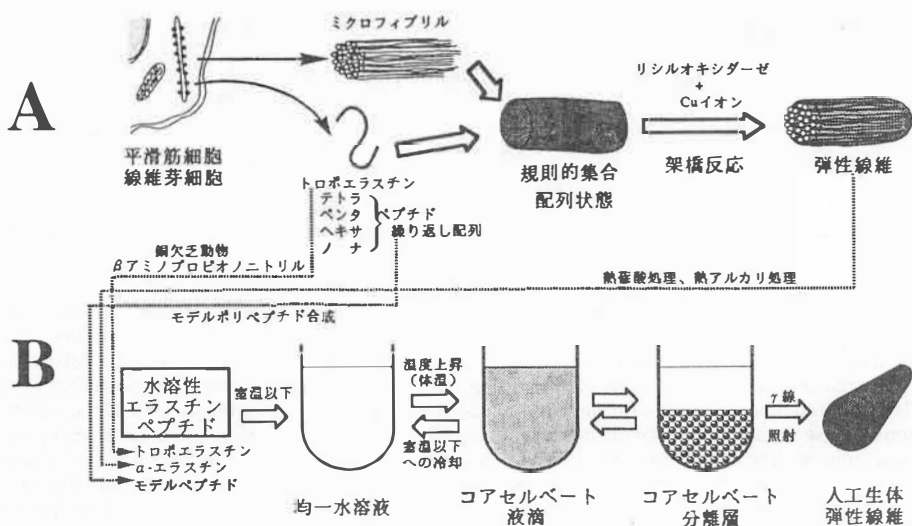


図1. 細胞外間隙での弾性線維蛋白質エラスチンの  
生合成過程 (A) と温度依存性コアセルベ  
ーション (B) の対応

この様に、弾性線維の主要構成成分として重要な機能を果たしているにも拘わらず、構造、物性、機能の何れの面に於ても、エラスチンの特性の多くが未解明のままに残されている。その最大の理由は、エラスチンが弾性組織のアルカリ処理残渣として分離抽出される程に、極度に溶解性が低い事にある。エラスチン生合成過程は、図1Aに模式的に示されるが、平滑筋細胞や線維芽細胞内で合成された前駆蛋白質トロポエラスチンがエクソサイトシスにより細胞外に送出され、規則的集合配列状態をとった後、銅イオンを補因子とするリシルオキシダーゼによる分子内、分子間架橋反応を経てエラスチンとなり、糖蛋白質であるミクロフィブリルと共に弾性線維を構成する。本研究の基礎は、生合成過程のキーステップであるトロポエラスチンの自己集合組織化過程が、図1Bに示すエラスチン関連水溶性ポリペプチド-水系の温度依存性コアセルベーションとして再現可能な事にある<sup>1)</sup>。コアセルベーションが観察されるペプチドとしては、銅欠乏動物より抽出したトロポエラスチン(アミノ酸残基数~700個)、トロポエラスチン相当の分子量を有するエラスチンの熱燻酸処理可溶化断片である $\alpha$ -エラスチン、エラスチ

ン特有な繰り返しペプチド配列に基づくブロック共重合型モデルポリペプチドであるポリペンタペプチド(Val-Pro-Gly-Val-Gly)<sub>n</sub>等がある。即ち、これらのポリペプチドの水溶液は、室温以下の低い温度では均一な水溶液であるが、温度上昇と共に、コアセルベート液滴を形成して白濁し、更に、ペプチドが高度に濃縮されたコアセルベート下層とペプチド濃度の低い平衡液上層に分離する。

細胞外マトリックスとしてのエラスチンの弾性、細胞遊走性等の多様な機能は、生体内自己組織化過程で確立される分子集合体の構造特性に依っている。従って、エラスチン関連水溶性ポリペプチド-水系のコアセルベーション、即ち、液-液2相分離特性を種々の手法により明らかにする事から、弾性線維蛋白質エラスチンの自己組織化集合体の構造、物性、機能に関する知見を得る事が可能である。

## 2 実験

ウシ項靱帯由来 $\alpha$ -エラスチン及びポリペンタモデルペプチド、(Val-Pro-Gly-Val-Gly)<sub>n</sub>を用

い、種々の測定に供した。モデルペプチドについては、九州工業大学情報工学部岡元研究室、佐賀大学理工学部近藤研究室より提供して頂いた。試料溶液は水温下で調製し、冷蔵庫内に数時間静置して均一な水溶液とした。何れの測定においても、温度を一定速度で連続的に、あるいは、段階的に注意深く温度を上昇させながら、液-液2相分離に伴う物性変化を観測した。

実験は、通常の濁度測定等の分光学的手法による集合体形成過程の追跡を行った他、コーン・プレート型回転粘度計による測定を行った。相分離過程の解析に威力を発揮するレーザー光散乱測定については、福岡大学理学部宮川研究室の御協力を得た。液-液2相分離初期過程に対しては粘度及び光散乱測定が有効であるが、濁度増加やコアセルベート液滴形成を伴う相分離が進行した段階では適用不可能となるため、今回は結果については

述べないが、ビデオ記録装置を備えた位相差顕微鏡による粒径分布変化の観察等が、相分離後期過程の解析に有効である事を確認した。

### 3 結果と考察

#### 3.1 相分離挙動の光散乱法による観察と解析

図2Aにウシ項韌帯由来 $\alpha$ -エラスチンについて、蛍光分光光度計により波長400nmでの90度散乱光強度の温度及び濃度変化を示す。温度及び $\alpha$ -エラスチン濃度増加に伴い、散乱光強度が増加するが、濃度により二相性の変化が見られる。図2Bに示す様に、測定で得られた曲線aをbとcに分解して見ると、曲線bの立ち上がり温度は吸光光度計で求めた同一波長での濁度増加の開始温度と一致する。これらの結果は、液-液2相分離を伴うエラスチンペプチドの集合組織化過程で、少なくとも二つの分子過程が進行している事を示していると考えられる。その詳細について調べ、生体内自己組織化過程に関する知見を得るために、波長514.5nmのアルゴンレーザーを用いた光散乱測定を行った<sup>2)</sup>。

散乱強度Iの角度依存性の測定結果より、次式を用いて相分離過程の臨界挙動に関する知見が得られる<sup>3)</sup>。

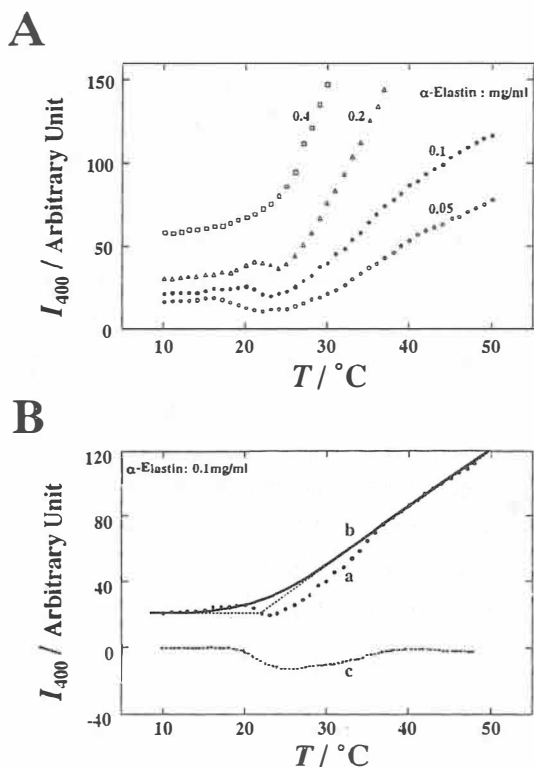


図2. ウシ項韌帯由来 $\alpha$ -エラスチン水溶液の90°散乱光強度の濃度及び温度依存性 (詳細は本文参照)

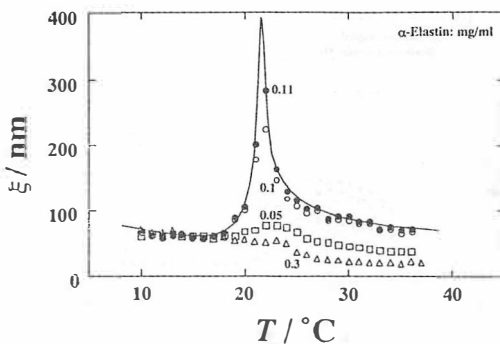


図3. ウシ項韌帯由来 $\alpha$ -エラスチン水溶液に於ける濃度揺らぎの相関距離 $\xi$ の濃度及び温度依存性

$$I(q) = I(0) / (1 + \xi^2 q^2) \quad (1)$$

ここで $q$ は、 $q = (4\pi n / \lambda) \sin(\theta/2)$  ( $n$ 、 $\lambda$ 、 $\theta$ は各々、屈折率、波長、散乱角)で表わされる散乱ベクトルである。 $I(0)$ は前方散乱光強度と呼ばれ浸透圧縮率に比例する量である。 $\xi$ は濃度揺らぎの相関距離である。図3に種々の $\alpha$ -エラスチン濃度に於ける $\xi$ の温度変化の様子を示す。濃度0.11mg/ml、温度21.5°C付近で $\xi$ の値が発散傾向を示しており、濃度揺らぎが系全体に拡がり相分離へ向かう現象が示されている。この濃度から離れるに従い、 $\xi$ の値は急激に減少し、濃度揺らぎの範囲が局所的である状態へと移行していく事を示している。ウシ項靱帯由来 $\alpha$ -エラスチン-水系の温度依存性コアセルベーションが、濃度0.11mg/ml、温度21.5°C付近に臨界点を有する液-液2相分離過程である事は、図6Aに示す様に、濃度0.11mg/mlに於いて、前方散乱光強度の逆数が温度21.5°C付近で0に漸近することからも確認できる。種々の濃度に於いて、濁度測定より二相共存温度、前方散乱強度よりスピノーダル温度を求め、最終的にウシ項靱帯由来 $\alpha$ -エラスチン-水系の相図が決定される。

次に、動的散乱測定により得られた相関関数 $g(\tau)$ をキュムラント展開し、相分離過程と分子集合体の特性を表わす諸量を求めた。

$$g(\tau) = \exp[-\Gamma \tau + (\mu_2/2!) \tau^2] \quad (2)$$

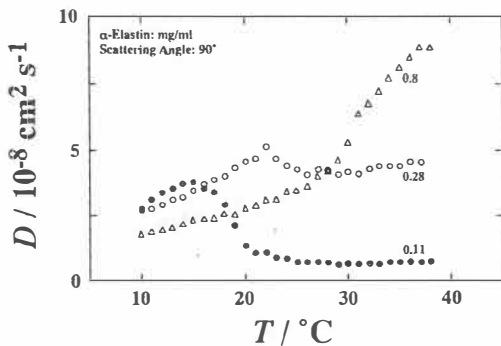


図4. 動的散乱測定により求めた拡散係数の $\alpha$ -エラスチン濃度及び温度依存性 (臨界点近傍と臨界点から十分に離れた点での拡散係数の温度依存性の相違に注意)

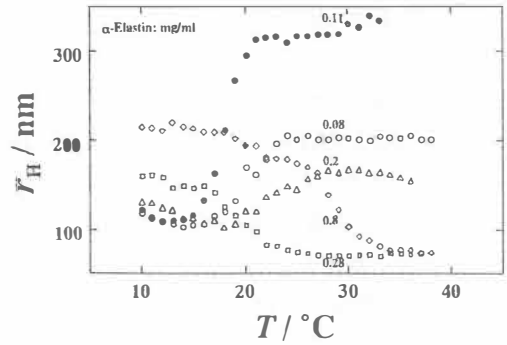


図5. 動的散乱測定より求めた流体力学的半径の $\alpha$ -エラスチン濃度及び温度依存性 (臨界濃度とその他の濃度での温度依存性の違いに注意)

ここで、 $\Gamma$ は平均緩和速度、 $\tau$ は緩和時間であり、 $\mu_2/\Gamma^2$ は分散指数と呼ばれる。散乱粒子の拡散係数 $D$ 、及び、流体力学的半径 $r$ は、以下の式で算出される。

$$D = \Gamma / q^2 \quad (3)$$

$$r = kT / 6\pi\eta D \quad (4)$$

ここで $k$ 、 $T$ 、 $\eta$ はボルツマン定数、温度、溶媒の粘度である。図4に拡散係数、図5に流体力学的半径の値を、臨界点近傍、臨界点から十分に離れた点、更に両者の中間の点について得られた結果を示す。臨界点近傍では、拡散係数は温度上昇と共に緩やかに増加した後、急激に減少して相分離に至り、ほぼ一定値を保持する。一方、臨界点から十分に離れた点では、緩やかに増加する拡散係数は、更に増加の割合を増して相分離に至る。従って、臨界点近傍での流体力学的半径の変化は、おそらくポリペプチド分子間の疎水性相互作用に基づく水分子排除による減少を経て、急激に進行する分子集合による増加を伴って相分離に至ると考えられる。臨界点から十分に離れた点での流体力学的半径の変化は、拡散係数の変化に対応した二段階の持続的な減少となっている。中間点に於ける拡散係数あるいは流体力学的半径の変化は、上に述べた二種類の分子集合挙動の組み合わせとして捉える事が出来る。図6には、臨界点近傍での種々の数値が示す特性をまとめて示した。

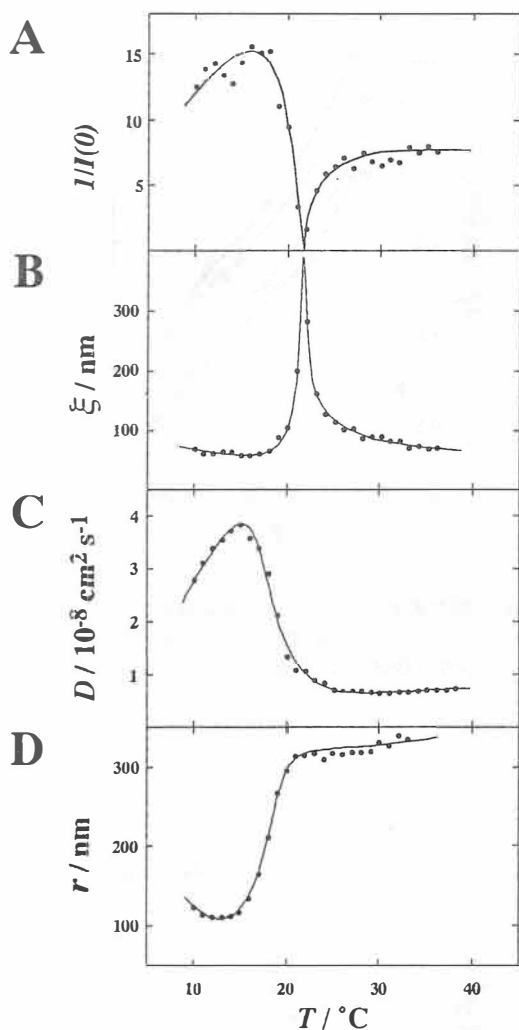


図6. 臨界点近傍での相分離挙動を表わす諸量の温度依存性  
(縦軸の諸量については本文参照)

### 3.2 粘度測定による分子集合挙動の解析

溶液内での分子集合挙動を調べる手段としては、粘度測定も有効である。少量の試料溶液で測定可能な事、剪断応力を変化させた測定等、微細な細胞外間隙で進行する生体内自己集合組織化との対応が可能な事等を考慮し、コーン・プレート型回転粘度計による粘度測定を行った。種々の濃度のウシ項靱帯由来 $\alpha$ -エラスチン水溶液について、一定速度でコーンを回転させながら、温度を段階的に1~3°Cづつ上昇させながら粘度の定常値

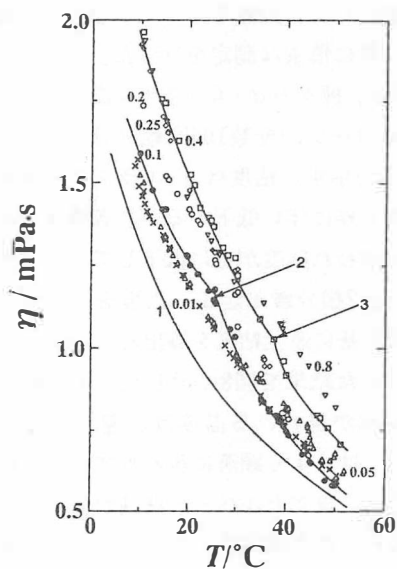


図7. ウシ項靱帯由来 $\alpha$ -エラスチン水溶液の粘度の濃度及び温度依存性  
(曲線1は純粋の粘度、矢印2、3は各々濃度0.1、0.4mg/mlに於ける相分離温度25.3、37.3°Cを表わす)

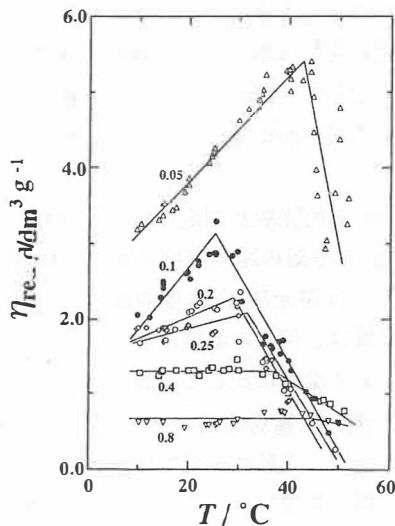


図8. ウシ項靱帯由来 $\alpha$ -エラスチン水溶液の還元粘度の濃度及び温度依存性  
(グラフ内の数値は $\alpha$ -エラスチン濃度を表わす)

を測定した。相分離を起こすと思われる温度付近では、特に慎重な測定を行った。

図7は、種々の $\alpha$ -エラスチン濃度での、温度に対するコーン回転数100回転/分での粘度の変化の様子を示す。粘度は $\alpha$ -エラスチン濃度減少及び温度上昇に伴い低下するが、各濃度で特有な屈曲点が現われ粘度が更に低下しており、その温度で液-液2相分離が起こった事を示している。この結果を基に還元粘度を算出し、温度に対してプロットした結果を図8に示した。相分離に伴う粘度の変化が現われる温度は、還元粘度-温度プロットでは、より顕著に現われている。相分離以後の系は、コアセルバート液滴が分散した不均一系であり、粘度測定の結果から分子集合挙動に関する知見を得る事は困難である。図8は、臨界点から十分に離れた点では、還元粘度の値は温度に無関係に一定の値をとり液-液2相分離に至るのに対して、臨界点に近づくに連れて、還元粘度が温度上昇に対して増加する過程を経て相分離に至る事を示している。温度上昇に伴う還元粘度増加は、臨界点付近に於いて、最も顕著である。これらの結果は、前節で述べた動的光散乱測定の結果から導かれた、臨界点付近では分子集合体の流体力学的半径が急激な増加をする過程を経て相分離に至るのに対して、臨界点から十分に離れた点では粒径は寧ろ緩やかに減少するとの結果と良く対応している。

粘度測定と動的光散乱測定の結果の間の不一致は、液-液2相分離の開始温度にある。粘度-温度曲線あるいは還元粘度-温度曲線の屈曲点が示す相分離温度は、何れの濃度に於いても、動的光散乱測定が示す温度に比して、高温側へ移行している。例えば、臨界点付近の $\alpha$ -エラスチン濃度0.11mg/mlでは、光散乱測定では21.5°Cであるのに対して、粘度測定では、25.5°Cへと相分離開始温度が上昇した。その原因は、測定時に試料溶液にかかる剪断応力の有無にあると考えられる。そこで、回転粘度計コーンの回転数を変化させる事により、異なる剪断応力場中での粘度測定から相

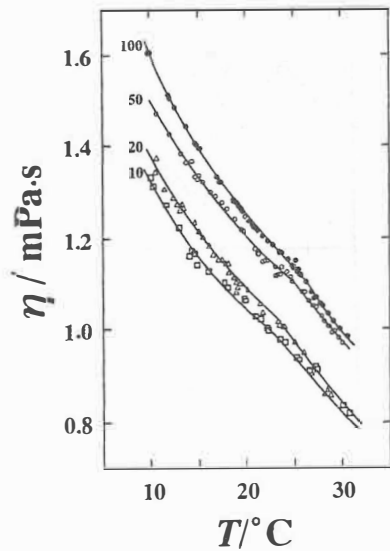


図9. 臨界濃度近傍でのウシ項韌由来 $\alpha$ -エラスチン水溶液粘度のコーン回転数依存性 (数値はコーン回転数/分をあらわす)

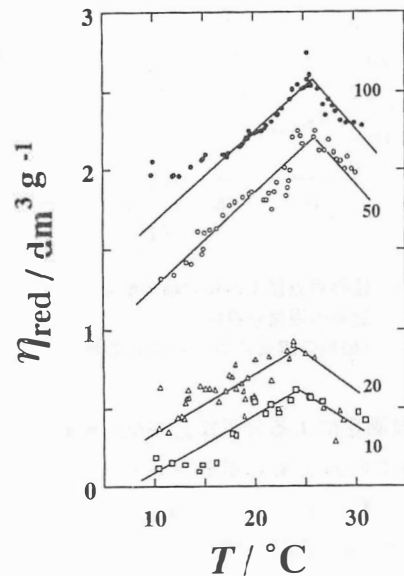


図10. 臨界濃度近傍に於けるウシ項韌由来 $\alpha$ -エラスチン水溶液の還元粘度のコーン回転数依存性

分離開始温度の変化を観察した結果を、図9と図10に示した。コーン回転数を100、50、20、10

回転/分と変化させるに連れて、粘度の減少と共に、液-液2相分離開始温度が低下する事が示されている。剪断応力場中での相分離、いわゆる流動誘起相分離については、種々の測定法の検討が行われ、解析法についても未だ確立されるに至っていないが、弾性線維蛋白質エラスチンの自己組織化集合体の構造、物性、機能に関する研究に於いても、又、生体内自己集合組織化過程の詳細を知るためにも重要であり、現在、粘弾性顕微鏡を用いた研究を始めている。粘弾性顕微鏡は、倒立型顕微鏡のステージ上に、透明なコーン・プレートアタッチメント付回転粘度計を装着した装置であり、細胞外空間の特殊な環境を、ある程度再現し得ると考えている。

### 3.3 エラスチンコアセルベートの特異な挙動

生体中に最も多量に存在する蛋白質はコラーゲンであり、ゲル形成を始め、種々の生化学的、物理化学的特性が活発に研究されて来た。一方、エラスチンは動脈硬化に深く関わる蛋白質である事から、病理学等、基礎医学的な研究は精力的に行われてきたが、基礎科学的な研究は、エラスチンの最も重要な弾性機能発現の分子機構についても確定的な結論が得られていない程であり、多くの課題が残されている。前駆蛋白質トロポエラスチンやモデルポリペプチドを用いた架橋重合実験の結果より、単純な重合過程ではなく、液-液2相分離を伴う分子集合過程、即ち、温度依存性コアセルベーションを経た場合のみが、弾性機能を有する線維様生体高分子が得られる事が報告されている。従って、エラスチンコアセルベートの構造と物性は、弾性線維蛋白質としての多様な機能の基礎となる構造と物性に対応していると考えられる。我々は、種々の金属イオンが相分離挙動やエラスチンコアセルベートの物性に与える影響について各種の測定を行い、各種金属イオンとの相互作用の解明から、弾性発現の基礎となっているエラスチンコアセルベートの構造に関する検討を行っている<sup>4)</sup>。特に、以下に述べる様な、エラス

チンコアセルベートと選択特異的な相互作用をする金属イオンは、分子構造解明の有用なプローブとなる。

カルシウムイオンは、動脈壁エラスチンへの沈着が動脈硬化の素因となっている事からも、エラスチンコアセルベートとの相互作用の詳細を明らかにする事が重要である。エラスチンコアセルベート中の輸送現象について、ナトリウム、マグネシウムイオンとの比較を行うと、カルシウムイオンは、拡散係数が小さく、生理的イオン濃度条件下に於けるコアセルベート内の濃度は、マグネシウムの7倍に達した。このようなカルシウムのエラスチンへの結合は、C-13ラベルを施したモデルポリペプチド (Val<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Gly<sup>3</sup>-Val<sup>4</sup>-Gly<sup>5</sup>)<sub>n</sub>を用いたNMR測定の結果から、選択特異的に3位と5位のグリシンのカルボニル基を介している事が示された。即ち、カルシウムイオンは、ペプチド骨格鎖の電気的に中性なカルボニル基に強固に結合していると考えられる。動脈壁エラスチンへのカルシウム沈着による弾性低下機構解明は、弾性発現分子機構自身を解明するための有力な手掛かりを含んでいるはずであり、更に検討を続けている。

弾性線維蛋白質-水系の液-液2相分離に対して、一般的に、アルカリ金属及びアルカリ土類金属イオンは促進効果を示すのに対して、遷移金属イオンは抑制効果を示すが、中でも、銅イオンは相分離温度を数10°C以上も上昇させる顕著な作用を示した。更に、銅イオンの最も特徴的な効果は、液-液2相分離過程で、コアセルベート液滴状態を安定化させ、コアセルベート下層と平衡液上層への分離を阻止する作用にある。ESR測定の結果、エラスチンコアセルベートはマンガンイオンとは配位結合をしないのに対して、銅イオンとは四面体型の配位構造をとる事、上に述べたC-13ラベルモデルポリペプチドを用いたNMR測定で、銅イオンの磁性によりカルボニル炭素のケミカルシフトが消失していく中で、2位のプロリンのシグナルのみが保持される事が、明らかとなっ

た。このような銅イオンの特異な作用は、エラスチンコアセルバートの構造に関する何らかの情報を与えており、又、架橋酵素リシルオキシダーゼの補因子としての銅イオンは、前駆蛋白質トロポエラスチンの自己集合組織化の重要な役割を果たしている可能性もあると考えている。

#### 参考文献

- 1) K. Kaibara, K. Okamoto, and K. Miyakawa, in "New Functionality Materials, Volume B : Synthesis and Function Control of Biofunctionality Materials" (T. Tsuruta, M. Doyama, M. Seno Editors), Elsevier Science Publisher B. V., 281 1993
- 2) K. Miyakawa and K. Kaibara, *J. Phys. Soc. Jpn.*, **60** 1468 1991 ; K. Miyakawa, K. Ito, and K. Kaibara, *J. Phys. Soc. Jpn.*, **62** 2511 1993 ; K. Miyakawa, M. Totoki, and K. Kaibara, *Biopolymers*, **35** 85 1995
- 3) H. E. Stanley, "Introduction to Phase Transitions and Critical Phenomena", Oxford Univ. Press, London, 1971.
- 4) K. Kaibara, K. Sakai, K. Okamoto, Y. Uemura, K. Miyakawa, and M. Kondo, *Biopolymers*, **32**, 1173 1992 ; K. Kaibara, Y. Akinari, K. Okamoto, Y. Uemura, S. Yamamoto, H. Kodama, and M. Kondo, *Biopolymers*, **39** in the press. (1995)

# バイオシグナル分子を固定化した 細胞成長促進ハイブリッド材料の合成

京都大学 工学部

伊藤 嘉浩

Insulin or epidermal growth factor (EGF) was conjugated with synthetic polymers. One was coupling with water-soluble polymer, poly(acrylic acid), another immobilized on water-insoluble polymer, poly(acrylic acid)-grated polystyrene film or surface-hydrolyzed poly(methyl methacrylate) film. While conjugation with poly(acrylic acid) slightly altered the mitogenic activity of the polypeptides, immobilization on films significantly enhanced the effect. Small amounts of immobilized insulin and EGF (1 to 10% of the required amount of native insulin and EGF) were sufficient to stimulate growth of mouse fibroblast STO cells and Chinese hamster ovary cells overexpressing EGF receptors, respectively.

## 1 緒言

多細胞生物は、細胞間、コラーゲンのような細胞間基質、及びホルモン・サイトカイン・成長因子などのバイオシグナル分子の3つの様式で制御され、細胞社会（組織）を形成している（Fig.1）。このなかで、最後のバイオシグナル分子による制御だけが溶解状態で行われる<sup>1)</sup>。はたして固体状態でもこの情報は伝達されるのであろうか。

本研究では、バイオシグナル分子としてインシュリンと上皮細胞成長因子(Epidermal growth factor, EGF)を選び、これらを、種々の合成高分子とハイブリッド化し、その細胞成長促進活性を検討した。

## 2 実験

### 2.1 インシュリン・ハイブリッド材料の合成

Fig. 2に示すような二種類のハイブリッド体を

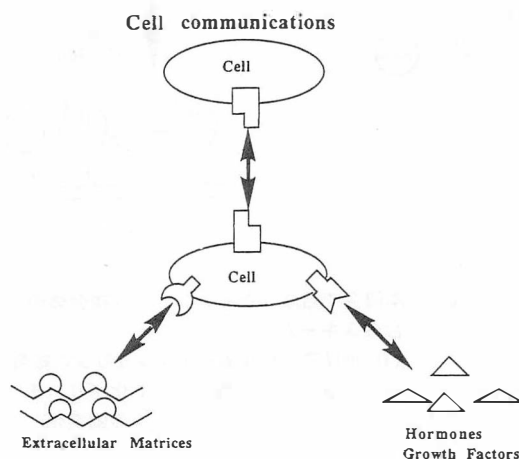


Fig.1 細胞機能  
細胞間、細胞間基質、そして溶解状態のバイオシグナル分子とのコミュニケーションで制御される。

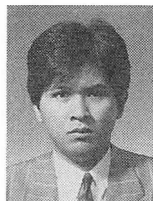
合成した。インシュリン、ポリアクリル酸（分子量、15,000）、ポリスチレン、アクリル酸モノマーは、シグマ、シグマ、和光純薬、ナカライ・テスクから各々購入した。

インシュリンとポリアクリル酸とのカップリング反応は以下に示すように行った（Fig. 2a）。まず、ポリアクリル酸の水溶液（200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）に水溶性カルボジイミド（1  $\text{mg}/\text{ml}$ ）を加え、4°Cで24時間反応させた。過剰のカルボジイミドは限外濾過で除去した。このように活性化したポリアク

Design and Synthesis of Biomaterials  
Hybridized with Biosignal Molecules  
to Enhance Cell Growth

Yoshihiro Ito

Faculty of Engineering,  
Kyoto University



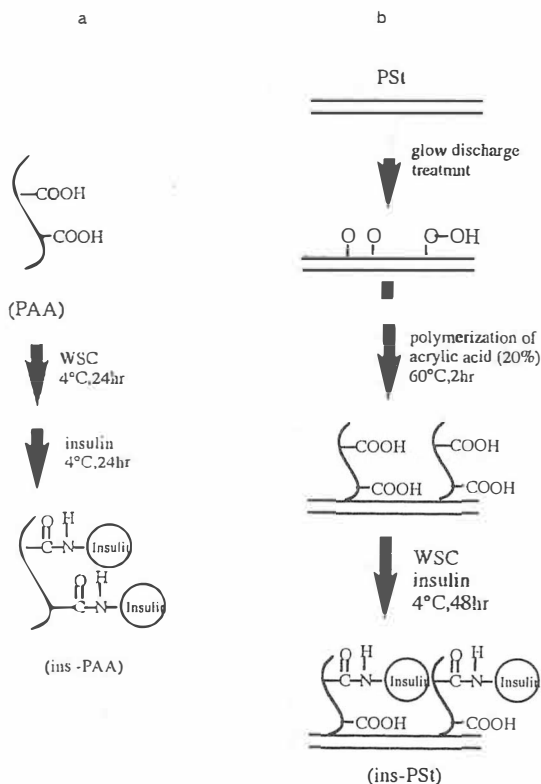


Fig. 2 本研究で合成したインシュリン複合体の合成スキーム  
 (a) ポリアクリル酸とインシュリンの結合、  
 (b) ポリアクリル酸グラフト化ポリスチレン上へのインシュリンの固定化。

リル酸水溶液にインシュリン (2mg/ml) を加え、4°Cでさらに24時間反応させた。さらに活性化カルボキシル基を除くためにグリシン (10mg/ml) を加え、4°Cで6時間反応させた。合成したハイブリッド体は限外濾過により精製した。

インシュリンの膜への固定化は以下に示すように行った (Fig/2b)。まず、ポリスチレン膜を室温、0.05Torrの減圧下で、200wの電力でグロー放電処理を行った。グロー放電処理した膜を、予め精製し、水溶液にしたアクリル酸モノマー (20wt%) に浸せし、脱気し、窒素置換して封管した。これを60°Cで2時間加熱することにより、グラフト重合を行った。反応後、モノマーの溶出がなくなるまで (pH変化が観測されなくなるま

で) 洗浄した。洗浄したポリアクリル酸グラフト化ポリスチレン膜を水溶性カルボジイミド (1mg/ml) を含む種々の濃度のインシュリン水溶液中に4°Cで48時間浸せし、固定化を行った。反応後、インシュリンの放出がなくなるまで洗浄した。固定化量の定量、洗浄の確認は<sup>125</sup>Iラベル化インシュリンを用いて行った。

## 2.2 EGFハイブリッド材料の合成

Fig. 3に示すような二種類のハイブリッド体を合成した。EGF、ポリアクリル酸(分子量、15,000)ポリメチルメタクリレートは、東洋紡、シグマ、アルドリッチから各々購入した。Fig. 3 EGFとポリアクリル酸のカップリングは以下に示すように行った (Fig. 3a)。ポリアクリル酸 (250 μg/ml) と水溶性カルボジイミド (5mg/mlを混合し、室温で30分間反応させた。限外濾過で未反応のカルボジイミドを除去した後、EGF (300 μg/ml) と4°Cで24時間反応させた。生成物は限外濾過で精製した。

EGFの表面加水分解ポリメチルメタクリレート膜へ固定化は以下に示すように行った (Fig. 3b)。まず、ポリメチルメタクリレート膜は、トルエン

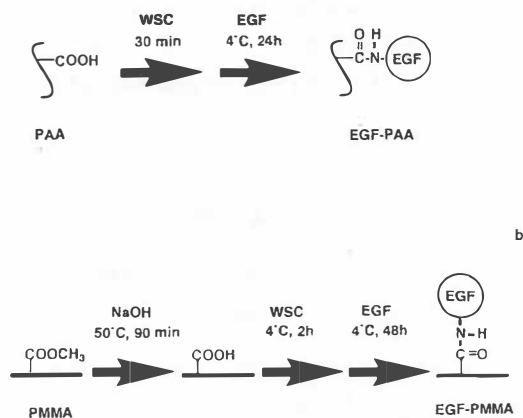


Fig. 3 本研究で合成した EGF複合体の合成スキーム  
 (a) ポリアクリル酸とEGFの結合、  
 (b) 表面加水分解ポリメチルメタクリレートへのEGFの固定化。

からキャストして得た。膜は4MNaOH水溶液中に50°Cで90分間浸せきすることにより表面加水分解を行った。10wt%クエン酸水溶液中で中和した後、pH変化がなくなるまで十分に洗浄し、固定化反応に供した。膜を水溶性カルボジミド(5mg/ml)水溶液に4°Cで2時間浸せきし、続いて種々の濃度のEGF水溶液中に4°Cで48時間浸せきした。固定化後、非固定化EGFがなくなるまで洗浄した。固定化量、洗浄の確認は<sup>125</sup>Iラベル化EGFを用いて行った。

### 2.3 細胞成長促進活性の測定

インシュリン・ハイブリッド材料の細胞成長促進活性は、マウス繊維芽細胞STOを用い、EGFハイブリッド材料は、EGFレセプター過剰発現CHO細胞を用い測定した。各々の細胞は、無血清のダルベッコ変法イーグル最少必修培地あるいはHam F-12培地で37°C、5%炭酸ガス雰囲気下、90%湿度のもとで培養された。培養後、細胞内のDNA量を4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドールで染色し、蛍光法により定量した。

## 3 結果

### 3.1 ハイブリッド材料の合成

ポリアクリル酸がカップリングした複合体の

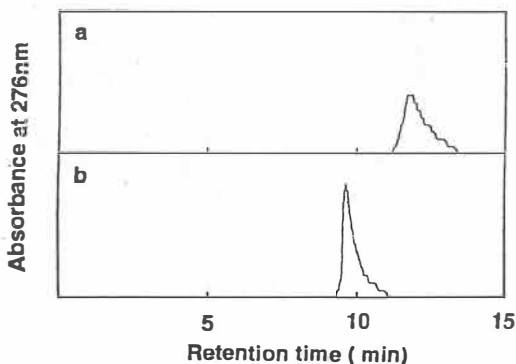


Fig. 4 ポリアクリル酸と結合したインシュリンのHPLC溶出パターン  
(a) 生来のインシュリン、  
(b) ポリアクリル酸結合インシュリン。

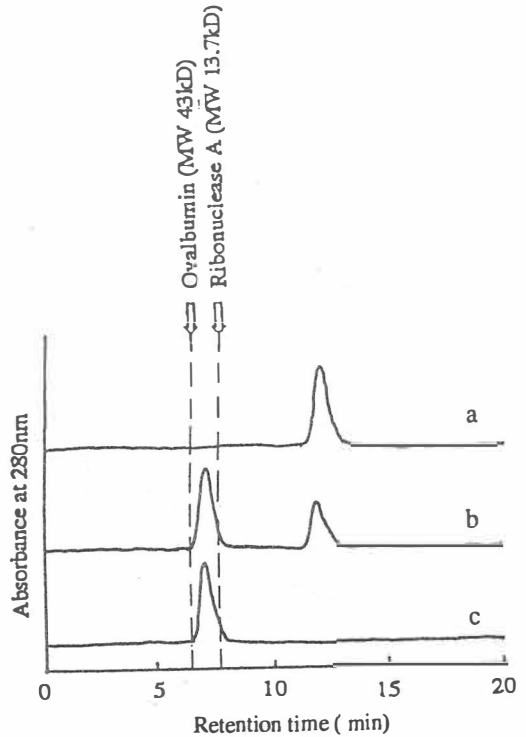


Fig. 5 ポリアクリル酸と結合したEGF(b)のHPLC溶出パターン  
(a) 生来のEGF、(b) 未精製、  
(c) 精製ポリアクリル酸結合EGF。  
矢印は標準に用いたタンパク質のピーク位置を示す。

HPLC測定の結果をFig. 4、5に示す。溶出パターンから、インシュリンとEGFのハイブリッド体の分子量は各々約4万と2万と見積もられた。

約4分子のインシュリンが1分子のポリアクリル酸と、約1分子のEGFが1分子のポリアクリル酸と結合していることがわかった。ハイブリッド体の結合比が異なるのは、仕込み比が異なるためと考えられる。

Fig. 6には仕込み量と、膜への固定化量の関係を示す。インシュリン、EGFともに仕込量の増加に伴い、固定化量も増加した。

### 3.2 ハイブリッド体の細胞成長促進活性

修飾成長因子存在下での細胞成長を調べた結果

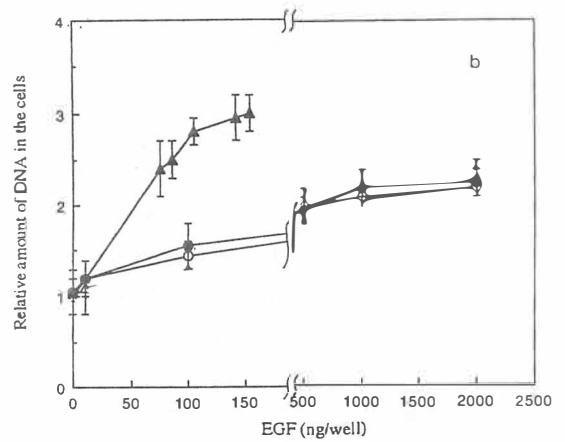
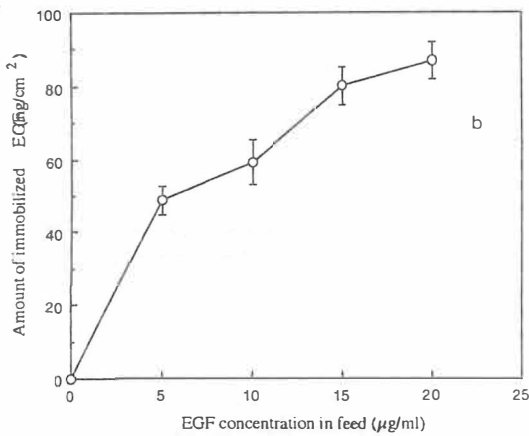
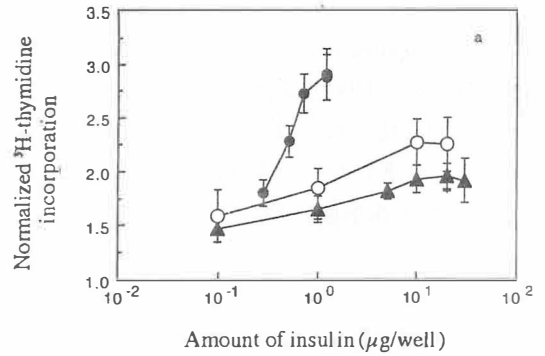
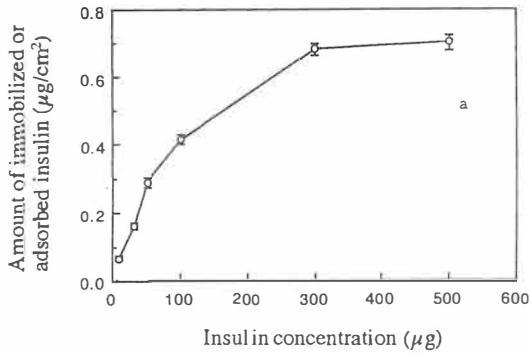


Fig. 6 インシュリン(a) とEGF (b) の仕込み濃度と固定化量の関係  
 インシュリンはポリアクリル酸グラフト化ポリスチレン膜上に、EGFは表面加水分解ポリメチルメタクリレート膜上に水溶性カルボジイミドをカップリング剤として固定化された。

Fig. 7 ハイブリッド化インシュリン(a)とEGF(b)の細胞成長促進活性  
 (a) : 生来のインシュリン (▲)、ポリアクリル酸結合インシュリン (○)、固定化インシュリン (●)。(b) : 生来のEGF (●)、ポリアクリル酸結合EGF (○)、固定化EGF (▲)。インシュリン存在下ではマウス繊維芽細胞STOをEGF存在下ではEGFレセプター過剰発現チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞を48時間培養し、それぞれ表面加水分解ポリメチルメタクリレート膜、ポリアクリル酸グラフト化ポリスチレン膜上での細胞数を1として相対値として表した。

をFig. 7に示す。インシュリン-ポリアクリル酸ハイブリッド体は生来のインシュリンより若干高い細胞成長促進活性を有した (Fig. 7a)。そして固定化インシュリンは1/10から1/100の濃度で生来のインシュリンあるいはそれ以上の生理活性を有するようになった (Fig. 7b)。EGFの場合は、ポリアクリル酸が結合することにより若干活性は低下したが、固定化によりインシュリンの場合と同様の効果がみられた (Fig. 7b)。

#### 4 考察

インシュリン、EGFともに固定化により細胞成長促進活性は飛躍的に増大した。非常に低濃度で高い成長促進活性を有するのは、膜表面の局所濃度が高く、細胞と有効に相互作用する濃度が高く

なるためと考えられる。

また低濃度で有効なばかりでなく、最大の促進効果も固定化バイオフィグナル分子の方が高くなった。これは、固定化により、レセプターのダウンレギュレーションが抑制されるためと考えられる<sup>2)</sup>。この際、インシュリン固定化よりEGF固定化の方が細胞成長に対する効果が大きかったのは、後者の細胞はEGFレセプターを過剰発現しており、EGFの影響を受けやすいためと考えられる。

インシュリンとポリアクリル酸のハイブリッド体の活性が生来のインシュリンより高くなったのは、EGF複合体の場合と異なり、ポリアクリル酸1分子がインシュリンを複数分子有する多価リガンドとなって、レセプター凝集を促進して活性化を誘起しやすかったためと考えられる。

バイオフィグナル分子と合成高分子とのハイブ

リッド化は、これまで非常に多くの研究がなされてきたが、その作用機構や効果について統一的な研究はなかった。本研究は、バイオフィグナル分子をどのような形態の合成高分子とハイブリッド化するかによって大きく活性が異なってくることを明確に示した。本研究の知見は、今後のハイブリッド生体高分子の設計に有意義であろう。

## 引用文献

- 1) 伊藤嘉浩、：細胞増殖因子固定化材料による無血清細胞培養、組織培養、19 520-524 1993
- 2) Ito Y, Zheng J, Imanishi Y, Yonezawa K, Kasuga M, : Protein-free cell culture on an artificial substrata with covalently immobilized insulin, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 93 3598-3601 1996

# 遺伝子工学的手法を用いた必須脂肪酸 $\gamma$ -リノレン酸の 高等植物における多量生産

九州大学 理学部

射 場 厚

Vegetative oils are of economic importance as human and animal foods and in many industrial applications. As the fatty acid compositions of most vegetative oils are not optimal for these uses, there is a broad interest in controlling the fatty acid compositions of higher plants.  $\omega$ -3 fatty acid desaturase, which catalyzes the conversion of linoleic acid (18:2) to linolenic acid (18:3) in lipids, are located in the microsomes and plastid membranes. Transgenic tobacco plants were produced that express the transcripts of a tobacco microsomal  $\omega$ -3 fatty acid desaturase gene (*NTFAD3*) in antisense and sense orientations under the control of the califlower mosaic virus 35S promoter. The antisense construct has the 0.5-kb fragment of the *NTFAD3* cDNA containing a 3'-flanking region and a part of the coding region in antisense orientation. The antisense-transformant lines showed decreases of the steady-state *NTFAD3* mRNA level to 30% of the control plants. In these lines, the 18:3 content decreased to about 80% in root tissues and to about 70-80% in leaf tissues when compared with the control plants. The sense construct has the 1.4-kb full-length cDNA of *NTFAD3*. In one of the sense-transformants lines, the 18:3 content increased by about 1.5-fold in root tissues and by about 1.1-fold in leaf tissues. These results indicate that the up- and down-regulation of the transcript level in the microsomal  $\omega$ -3 fatty acid desaturase gene is useful to modify the 18:3 content in the vegetative tissues of higher plants.

## 1 緒 言

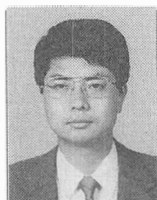
$\gamma$ -リノレン酸は必須脂肪酸（ビタミンF）の一種として知られており、植物中に主として存在しているリノール酸がプロスタグランジン（PG）に転換する中間物質である。したがって、 $\gamma$ -リノレン酸は必須脂肪酸としての生理機能とともに、PG合成の前駆物質としてPGの持つさまざまな生理作用に関与している。一方、糖尿病、ガン、ウイルス感染、老化などは、プロスタグランジン前駆体の生合成経路において、その律速段階であるリノール酸から $\gamma$ -リノレン酸に変える不飽和化酵素（ $\Delta 6$ 脂肪酸不飽和化酵素）の活性を弱め、その結果、PG合成が抑制され、さらに健康障害が助

長されると考えられている<sup>1, 2)</sup>。 $\gamma$ -リノレン酸の直接摂取は、このような状況の予防に役立つことが期待されるが、通常の植物から摂取される機会はほとんどない。現在、 $\gamma$ -リノレン酸は月見草種子から抽出された油脂として市販されているが、品種改良されて作られた月見草種子は海外の一部企業に独占され、生産量も少なく価格も高い。また、最近微生物（糸状菌）による $\gamma$ -リノレン酸の生産も行われているが、グルコースなどの炭素源に対する油脂生産の収率（対糖収率）は高だか30%で、1キログラムの油脂を作るのに3キログラムの原料が必要である。それゆえ、現在の糖質価格では、糖質からの油脂生産は大豆などの植物油にコスト面で太刀打ちできないのが現状である。本研究においては、高等植物における $\gamma$ -リノレン酸生成のキーエンザイムである $\Delta 6$ 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子をクローニングするための研究技法の開発を行った。また、遺伝子工学的手法を用いて、脂肪酸不飽和化酵素遺伝子を高等植物に導入し、不飽和脂肪酸組成改変の可能性について検討した。

Modification of fatty acid composition by over and antisense-expression of a microsomal  $\omega$ -3 fatty acid desaturase gene in transgenic tobacco

Koh Iba

Faculty of Science  
Kyushu University



## 2 実験

### 2.1 形質転換タバコの作製

*Nicotiana tabacum* cv. SR-1株をTi-プラスミドバイナリーベクターを持つ *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 を用いて、リーフディスク法により形質転換した<sup>3)</sup>。Ti-プラスミドバイナリーベクターは、コントロールとして pBI121、また図1に示すように、pBI121のT-DNA領域におけるカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターの下流にタバコ小胞体局在型 $\omega$ -3脂肪酸不飽和化酵素遺伝子 (*NTFAD3*) をセンス、アンチセンスの向きに挿入したコンストラクト (それぞれ、pTF1S、pTF1AS500) を用いた。再生したシュートから形質転換個体をカナマイシンにより選抜した。Primary transformants (R0) を自家受粉させ得られたR1種子を26°Cにおいて連続光照射下 (3000lux) MS培地により発芽させた。

### 2.2 脂質脂肪酸の解析とノーザン解析

R1植物の葉組織に含まれる不飽和脂肪酸はガスクロマトグラフィー法により分析した<sup>4)</sup>。

ノーザン解析用のRNA (トータルRNA) は、26°Cで30日間生育させた幼苗から調製した。

### 2.3 ペプチド特異抗体の作製とウエスタンブロットによる解析

ペプチドシンセサイザーを用いて合成した人工ペプチドを、架橋剤N-( $\epsilon$ -maleimidocaproyloxy)succinimideを用いてヘモシアニンに結合させた。ペプチドが結合したヘモシアニンは、セファデックスG-25を担体に用いたゲルクロマトグラフィーによって精製・濃縮した。この抗原にアジュバントを加え、ウサギ (ニュージーランドホワイト・オス・3kg) に注射した。抗原の接種後、2週間おきに3回続けてアジュバントを加えた抗原をさらに接種した。初回の接種後、1週間目から採血を行い、1晩室温で保存した血液を遠心分離によって血清を取り出し、フィルター滅菌の後、等量の

グリセロールを加え-80°Cで保存した。植物体に存在する脂肪酸不飽和化酵素タンパクと類似の構造を持つペプチドは、上記特異抗体を用いてウエスタンブロット法により解析した。

## 3 結果と考察

### 3.1 $\omega$ -3脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の導入による高等植物における $\alpha$ -リノレン酸含量の制御

$\omega$ -3脂肪酸不飽和化酵素遺伝子は、小胞体膜と葉緑体膜にそれぞれ局在し、リノレン酸などのジエン脂肪酸から $\alpha$ -リノレン酸などのトリエン脂肪酸へ直接不飽和化する酵素である。一般に、高等植物においては、小胞体局在型酵素を *FAD3* 遺伝子、葉緑体局在型を *FAD7* および *FAD8* 遺伝子がそれぞれコードしている<sup>5)</sup>。Tiプラスミドバイナリーベクター (pBI121) のT-DNA領域におけるカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターの下流にタバコ小胞体局在型 $\omega$ -3脂肪酸不飽和化酵素遺伝子 (*NTFAD3*) をセンス、アンチセンスの向きに挿入したコンストラクト (それぞれ、pTF1S、pTF1AS500) を作製し (Fig. 1)、実験の項で述べたようにアグロバクテリウムを介したリーフディスク法にタバコに導入した。pTF1AS500 (アンチセンス) を導入した形質転換植物は26系統得られ、それぞれの脂肪酸組成を調べた結果、3系統 (AS5、AS9、AS18) においてトリエン脂肪酸の著しい減少が観察された (Fig. 2)。特に、AS5系統においては、18:3含量は根組織で6%、葉組織で14%の減少がみられた。一方、pTF1S (センス) を導入した形質転換植物は7系統得られ、そのうち4系統 (S1、S7、S10、S14) において、トリエン脂肪酸の増加が観察された (Fig. 3)。特に、S10系統においては、18:3含量は根組織において10%以上の増加が確認された。

これらのトリエン脂肪酸含量の変動と、導入された遺伝子の発現量との関係を調べるためにノーザン解析を行った (Fig. 4)。センス形質転換植物

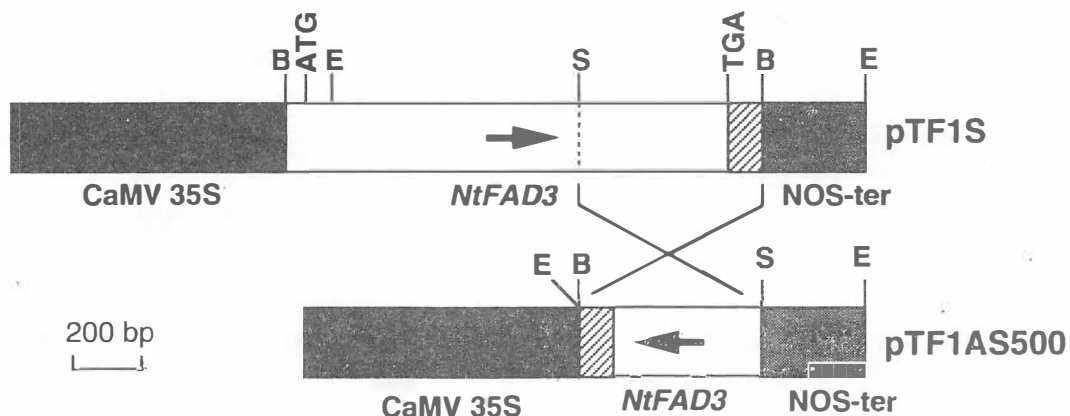


Fig.1 Structure of chimaeric genes for expression of *NtFAD3* in sense and antisense orientations. The sense construct, pTF1S, contains a full-length cDNA of *NtFAD3*. The antisense construct, pTF1AS500, contains a 0.5-kb fragment of the *NtFAD3* cDNA in antisense orientation behind the CaMV 35S promoter. The translation initiation codon (ATG) of the *NtFAD3* cDNA are shown, and the 3'-flanking regions are indicated by cross-hatching. Restriction sites shown are for BamHI (B), EcoRI (E) and SacII (S). NOS-ter indicates the terminator from the nopaline synthase gene.

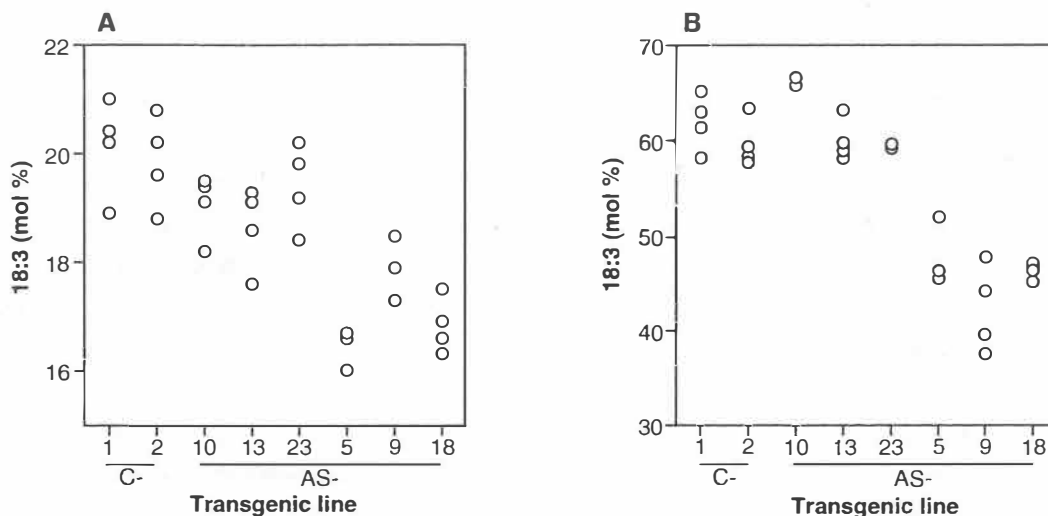


Fig.2 Contents of 18:3 in antisense transgenic plants with pTF1AS500. Contents of 18:3 in molar percentage of total fatty acids in whole roots (A) and in whole fourth leaves (B) of 30-day-old kanamycinresistant R1 seedlings of the antisense transgenic plants. Each open circle represents the 18:3 content of a single transformant (n=3 or 4). Control transformants with pBI121 (C1 and C2) are included for comparison.

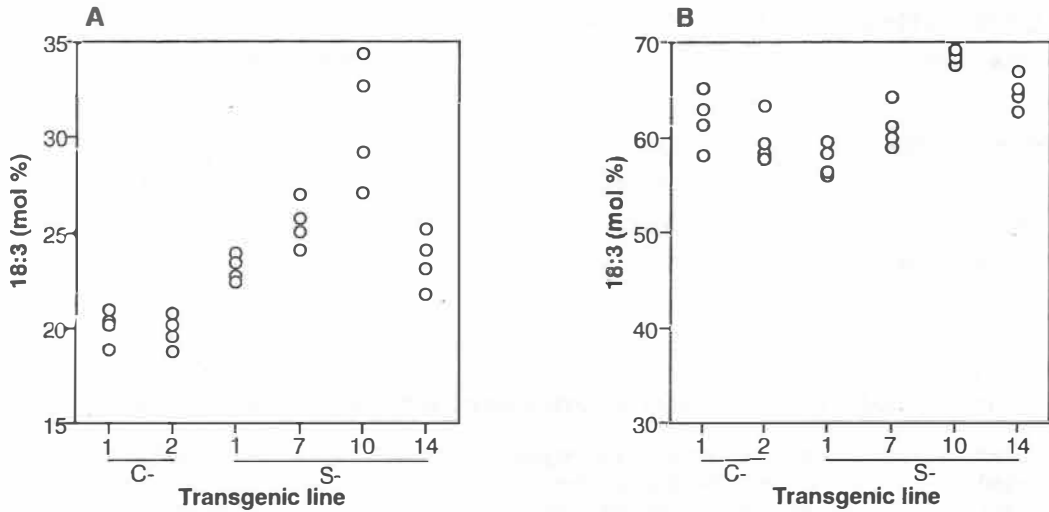


Fig. 3. Contents of 18:3 in sense transgenic plants with pRF1S. Contents of 18:3 in molar percentage of total fatty acids in whole roots (A) and in whole fourth leaves (B) of 30-day-old kanamycin-resistant R1 seedlings of the sense transgenic plants. Each open circle represents of the 18:3 content of a single transformant (n=3 or 4). Control transformants with pBI 121 (C1 and C2) are included for comparison.

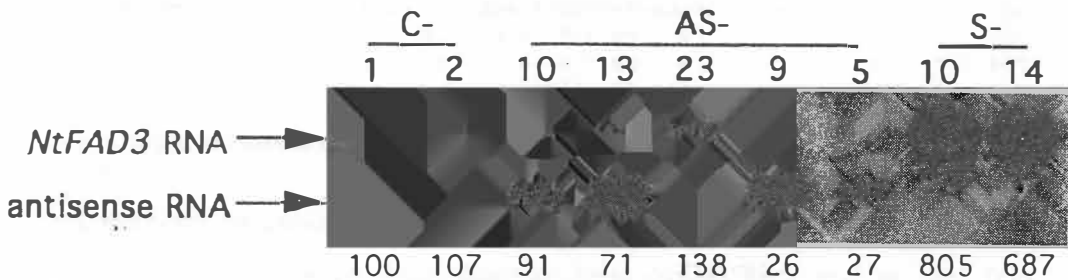


Fig. 4. RNA gel blot analysis of the *NtFAD3* cDNA. The transgenic line is shown above each lane. The steady-state level of the *NtFAD3* mRNA is given as a percentage of that in the control plant C1 below each lane.

体 (S10とS14) においては、*NtFAD3* の mRNA レベルは、コントロール植物体と比べおよそ7-8倍の増加が見られた。一方、アンチセンス形質転換植物体で、特にトリエン脂肪酸含量の低下が著しい系統 (AS5, AS9) においては、*NtFAD3* の mRNA の

蓄積は殆ど見られなかった。これらの知見は、形質転換タバコにおけるトリエン脂肪酸レベルの増減を、内在性あるいは導入したω-3脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の発現量を調節させることによって人為的に制御可能であることを示している。

### 3.2 脂肪酸不飽和化酵素に対するペプチド特異抗体の作製

シロイヌナズナからクローニングされた $\omega$ -3脂肪酸不飽和化酵素遺伝子 (*FAD3*, *FAD7*, *FAD8*) およびラン藻からクローニングされた $\Delta$ 12脂肪酸不飽和化酵素遺伝子 (*DESA*) のDNA配列から推定されたアミノ酸配列を比較した結果、13アミノ酸残基中11アミノ酸が一致する領域を見出した

(Fig. 5)<sup>6)</sup>。この配列は他の植物種からクローニングされた脂肪酸不飽和化酵素遺伝子においても保存されていた。このため、植物から原核生物であるラン藻まで多種の生物種にわたって、脂肪酸不飽和化酵素の機能に必須な共通領域であることが推定された。筆者らはこの領域において、N端側から10番目までのアミノ酸配列 (FVLGHDCGHG) に対するペプチドをペプチドシンセサイザーを用

<b>FAD7.</b>	<b>1</b>	<b>HANLVLSECGIRPLPRIYTTTPRSNFLSNNNKFRPSLSSSSYKTSSSPLSFGLNSRDGFTR</b>	<b>60</b>
<b>FAD7.</b>	<b>61</b>	<b>NWALNVSTPLTPIFEESPLEEDNKQRFDPGAPPPNLA DIRAAIPKHCWKNPWKLSLY</b>	<b>120</b>
<b>FAD3.</b>	<b>1</b>	<b>MVVAMDQRSNVNGDSGARKEG...S·Q...KIG.....S·LR·M...</b>	<b>55</b>
<b>ARG1.</b>	<b>1</b>	<b>MIQAQTLQHFNGAREGDQSY.....KI.....E·STLR...</b>	<b>54</b>
<b>DESA.</b>	<b>1</b>	<b>MTATIP...TPTVTPSNPDRPIADLK·Q·IKTL·E·FE·KAS·AWAS</b>	<b>48</b>
<b>FAD7.</b>	<b>121</b>	<b>VVRDVAIVFALAAGAAYLNNWIVWPLYWLAQGTMFVAIFVLGHDCGHGSEFNDPKLNSVV</b>	<b>180</b>
<b>FAD3.</b>	<b>56</b>	<b>·T·I·F·A·A·MA·V·FDS·FL...V...L...I.....DI·L.....</b>	<b>115</b>
<b>ARG1.</b>	<b>55</b>	<b>·L...LV·T...S·ISF·S·FF...P.....SS...F...</b>	<b>114</b>
<b>DESA.</b>	<b>49</b>	<b>·LITLGAIVGYL·II...-P·YCL·IT·IWT·ALTGA...V...R...AKRRWV·DL·</b>	<b>107</b>
<b>FAD7.</b>	<b>181</b>	<b>GELLESSLVPHYHWRISERTHQBHGVEVNDSESWHPMSEKIYNTLDRKPTRFYRPTLPLV</b>	<b>240</b>
<b>FAD3.</b>	<b>116</b>	<b>·I...F.....V·LP·L·KN·PES·ML·Y·V·P</b>	<b>175</b>
<b>ARG1.</b>	<b>115</b>	<b>·I...L...N.....K...V·LT·V·KN·DM·ML·YSF·FP</b>	<b>174</b>
<b>DESA.</b>	<b>108</b>	<b>·IAFAPLIY·F·S·LL·DE·LHTNKI·V·NA·D·W·VEAPQASPAIV·L·YRAIRGP</b>	<b>167</b>
<b>FAD7.</b>	<b>241</b>	<b>M-LAYPFYLWARS PGKKGSHYHPDSDLFLPKERKDVLTSTACWTAMAALLVCLNFTIGP-</b>	<b>298</b>
<b>FAD3.</b>	<b>176</b>	<b>·-...I...Y...E...FN·Y·S·A·S...LIA...T·SI·L·T·Y·S·LVD-</b>	<b>233</b>
<b>ARG1.</b>	<b>175</b>	<b>I-F...N...E...FN·Y·N·S·G...G·V...L·GIVLSV·LY·SL...</b>	<b>232</b>
<b>DESA.</b>	<b>168</b>	<b>FWWTGSIFH-----SLM·FK--LSN·AQRD·NK·KL·I·V·VFLF·AIAFPALI·TTG</b>	<b>218</b>
<b>FAD7.</b>	<b>299</b>	<b>I-QMLKLYGIPYWINVMWLD FVTTYLBBHGHEDKLPWYRGKESYL RGG-L-TTLDRDYGLI</b>	<b>356</b>
<b>FAD3.</b>	<b>234</b>	<b>V-TV·V·V·I·F...A.....DE.....I...IF</b>	<b>291</b>
<b>ARG1.</b>	<b>233</b>	<b>·-F...V·L·F.....YTH.....Q.....V...W...</b>	<b>290</b>
<b>DESA.</b>	<b>219</b>	<b>VWGFV·FWLM·WLVYHF·MSTF·IV·TIP·IRF-R-PAAD·AAEAQ·NG·VHC·PRW</b>	<b>276</b>
<b>FAD7.</b>	<b>357</b>	<b>NNIH-HDIGTHEVHLLFPQIPHYHLVEATEAAKPVLGKYYREPDRSGPLPLHLEILAKS</b>	<b>415</b>
<b>FAD3.</b>	<b>292</b>	<b>.....D·R...H...R...KT·AI·I·V·S·VA</b>	<b>350</b>
<b>ARG1.</b>	<b>291</b>	<b>·V.....KS·S.....Q.....F...KY·LQ</b>	<b>349</b>
<b>DESA.</b>	<b>277</b>	<b>VEVLC...NV·IP...SVA·S·N·RL·HGSL·ENW·PFLY·RTFNWQ·MQQISGQCHLY</b>	<b>336</b>
<b>FAD7.</b>	<b>416</b>	<b>IKEDHYVSDGEVYVKADPNLYGEV KVRAD</b>	<b>446</b>
<b>FAD3.</b>	<b>351</b>	<b>·K.....T·DI·F·ET·D·VYASDKSKIN</b>	<b>383</b>
<b>ARG1.</b>	<b>350</b>	<b>·SQ·F...T·DI...QT·K·HQDSWTKSK</b>	<b>380</b>
<b>DESA.</b>	<b>337</b>	<b>DP·HG·RTFGSLKKV</b>	<b>351</b>

Fig. 5 Comparison of the deduced amino acid sequence of the protein encoded by *FAD* gene and related gene products. Identical amino acid residues are indicated by a dot, and spaces introduced to facilitate alignments are indicated by a dash. The *DESA* sequence encodes a  $\Delta$ 12 desaturase from *Synechocystis* PCC 6803. The ARG1 sequence is from an anonymous cDNA from mung bean. A region of very high sequence identity among all four proteins is boxed.

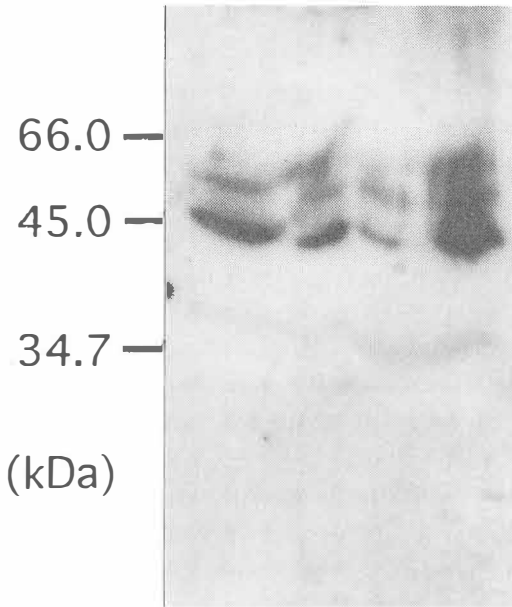


Fig. 6 Identification of the  $\omega$ -3 fatty acid desaturase and its homologues in extracts of leaf tissues. Blots of total proteins from tobacco (left) and Arabidopsis (right) were probed with the peptide (GHDCGH) specific antibody.

いて作製し、実験の項に述べた方法によってペプチド特異抗体を作製した。シロイヌナズナ、タバコにおいて、ウエスタンブロットィング法によって、 $\omega$ -3脂肪酸不飽和化酵素あるいはその類似ペプチドの存在を調べた (Fig. 6)。その結果、これらの植物種において、同酵素に対応すると思われる50キロダルトンのペプチドの他に、およそ50~60キロダルトンの領域において複数のペプチドがこの特異抗体によって認識されることが分かった。現在、これらのペプチドの性質などについて、二次元電気泳動法などを用いて解析を行っているが、内在する他の脂肪酸不飽和化酵素に対応するペプチドを認識しているものと思われる。

## 5 総括

本研究において、脂肪酸不飽和化酵素遺伝子の

導入によって、形質転換植物におけるトリエン脂肪酸含量の増加が可能であることが明かにされた。また、脂肪酸不飽和化酵素のアミノ酸共通配列をもとに作製したペプチド特異抗体によって、植物に存在する複数の脂肪酸不飽和化酵素蛋白質を同定することが可能であることが示された。今後、月見草やボラージ草など、 $\Delta 6$ 脂肪酸不飽和化酵素を持つと思われる植物種のcDNAライブラリーを作製し、ペプチド特異抗体を用いたスクリーニングによって、同酵素遺伝子のクローニングを試みたい。もし、この遺伝子がクローニングされれば、他の植物種への導入によって $\gamma$ -リノレン酸の低コスト多量生産が実現すると思われる。

## 引用文献

- 1) 後藤浩樹：特定保健用食品素材としての $\gamma$ -リノレン酸、*ジャパンフードサイエンス*、1993-11, 60-65 1993
- 2) 長谷川昌康： $\gamma$ -リノレン酸とその効用、*New Food Industry*、35 1-5 1993
- 3) Horsch R. B., Fly J. E., Hoffman N. L., Eichholtz D., Rogers S. G., Fraley R. T.: A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227 1229-1231 1985
- 4) Lemieux B., Miquel M., Somerville C., Browse J.: Mutants of Arabidopsis with alterations in seed lipid fatty acid composition. *Theor. Appl. Genet.* 80 234-240 1990
- 5) Somerville C., Browse J.: Plant lipid: metabolism, mutants, and membranes. *Science* 252 1071-1079 1982
- 6) Iba k., Gibson S. Nishiuchi T., Fuse T., Nishimura M., Arondel V., Hugly S., Somerville C.: A gene encoding a chloroplast omega-3 fatty acid desaturase complements alterations in fatty acid desaturation and chloroplast copy number

of the *fad7* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 268 24099-24105  
1993.

## II. 生体作用, 安全性に関する分野

# 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基礎的研究

国立公衆衛生院 労働衛生学部 栄養生化学部

市川 勇・近藤 雅雄

Basic experimental studies on production of active oxygens from porphyrin compounds by UV irradiation in relation to aging of the skins were carried out.

Detailed conditions in analytical methods with electron spin resonance(ESR) for species and intensity of the active oxygens were examined. Production of hydroxyl radical was observed from only uroporphyrins at pH7.8. Singlet oxygen was produced more from coproporphyrins than others at the same pH. Production of superoxide anion was shown from uroporphyrins and coproporphyrin III after 120 s. of the UV irradiation.

It was shown clearly with two UV-cut filters that hydroxyl radical from uro- and coproporphyrins and singlet oxygen from coproporphyrins were produced by UV-A from a xenon lamp having a similar spectrum from sunlight.

In blood of rats administrated orally with griseofluvin for one week, which is an inducer of protoporphyria, the concentration of protoporphyrin IX was increased twice, but any active oxygens from this porphyrin were not detected.

## 1 緒言

皮膚の老化現象は、長期間日光、特に紫外線による被曝と血液中の因子により皮膚細胞の増殖が抑制され、また壊死が生じるなど多くの加齢段階を経た結果であると考えられる。本研究では、皮膚と光との関連性において血液因子としてのポルフィリンの代謝異常およびそれに伴う活性酸素種の発生に注目し、老化機構の一部分について解明を行うことを目的とした。

ポルフィリン類は、ヘム合成の中間代謝物あるいは副生成物として骨髄、肝臓、皮膚等多くの組織、細胞内に存在し、ヘモグロビン、ミオグロビ

ン、チトクロームP-450、カタラーゼ、ペルオキシダーゼ等多くの蛋白や酵素の補欠分子族として重要な役割を果たしている<sup>1)</sup>。また、光増感作用を有するが、この作用が強いヘマトポルフィリン誘導体等を投与後、集積し易い癌細胞に光照射することにより生成する活性酸素がその細胞を酸化壊死に到らしめる光化学療法が行われている<sup>2-4)</sup>。その際発生する活性酸素種は、一重項酸素( $^1O_2$ )だけでなく、スーパーオキシドラジカル( $O_2^-$ )やヒドロキシルラジカル( $\cdot OH$ )も報告されている<sup>5)</sup>。

一方、ポルフィリン類は、光等外因性刺激および種々の内因性刺激に対して微妙に変化して、皮膚および造血組織に多くの障害を引き起こすことも知られている。光照射による障害は、ポルフィリンから発生した $^1O_2$ や $\cdot OH$ が生体成分に作用し、生体膜脂質過酸化等を経て種々の炎症を引き起こすことによると考えられているが<sup>6)</sup>、詳細な機序に関する研究報告はまだ少ない。また、健康な皮膚に対して紫外線を照射し、電子スピン共鳴(electron spin resonance, ESR)による測定を



Relationship between Production of Active Oxygens from Porphyrins and Aging of Skin

Isamu Ichikawa

Department of Industrial Health  
The Institute of Public Health

行った結果、 $^1O_2$ 、 $O_2^-$ 、 $\cdot OH$ の発生を検出している<sup>7)</sup>が、ポルフィリンとの関連性の検討はされていない。

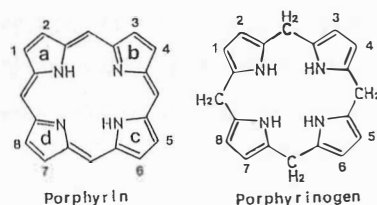
ポルフィリン患者では、ポルフィリンが皮膚や血液中に蓄積されるばかりでなく、尿中に多量排泄される。患者の皮膚を光に曝すと、発疹、水疱、腫瘍ができ、その程度は、蓄積するポルフィリンの構造に依存すると言われている<sup>8, 9)</sup>。ヒトのポルフィリン症は比較的希な疾患であるので、その研究を行う場合には動物に実験的ポルフィリン症を起こさせる必要がある<sup>10)</sup>。代表的なものとして抗微生物剤であるgriseofulvin (GF)を経口的に投与することで、骨髄性プロトポルフィリン症を誘発出来ることが報告されている<sup>11)</sup>。

本研究では、5種類のポルフィリン化合物、uroporphyrin I及びIII (UP-I及びIII), coproporphyrin I及びIII (CP-I及びIII)及びprotoporphyrin IX (PP-IX) に対して紫外線 (ultraviolet, UV) を照射し、発生する活性酸素の種類及び量を電子スピン共鳴 (electron spin resonance, ESR) 装置を用いて、スピン捕捉剤などの試薬の濃度並びにpH等の測定条件について検討した。更に、波長の違いに基づくUVの種類 (UV-A, B, C) による活性酸素種の発生に関して検討を行った。また、ラットにGFを経口投与して、実験的ポルフィリン症の誘発を試みたので報告する。

## 2 実験

### 2.1 化合物

ポルフィリン化合物 (UP-I 及び III、並びに CP-I 及び III の二塩酸塩、PP-IX) は、PORPHYRIN PRODUCTS社 (USA) から購入した。その構造式を図1に示した。スピン捕捉剤の5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) は同仁化学研究所から、また2,2,6,6-tetra-methyl piperidone (TMPD)一塩酸塩及び安定化剤のdiethylene-triaminepentaacetic acid (DETAPAC) はシグマ社 (USA) から、またdimethyl sulfoxide (DMSO)



Porphyrin	a		b		c		d	
	1	2	3	4	5	6	7	8
Uroporphyrin I (UP-I)	A	P	A	P	A	P	A	P
Uroporphyrin III (UP-III)	A	P	A	P	A	P	P	P
Coproporphyrin I (CP-I)	H	P	M	P	H	P	H	P
Coproporphyrin III (CP-III)	H	P	M	P	H	P	P	H
Protoporphyrin IX (PP-IX)	H	V	M	V	H	P	P	H

A = -CH<sub>2</sub>COOH, P = -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH, H = -CH<sub>3</sub>, V = -CH=CH<sub>2</sub>

図1 使用したポルフィリン化合物の構造式

は和光純薬工業から購入した。 $O_2^-$ 発生用の酵素基質hypoxanthine (6-hydroxy-purine, HPX) はシグマ社から、またキサンチンオキシダーゼ (XOD、牛ミルク由来) はベーリンガーマンハイム社 (ドイツ) から購入した。和光純薬工業から購入したりん酸ニナトリウム一水素・12水和物及びりん酸一ナトリウム二水素・2水和物によりpH7.8のりん酸緩衝液を、またクエン酸ナトリウム・2水和物及びりん酸ニナトリウム一水素・12水和物によりpH3.0のクエン酸りん酸緩衝液を調製した。

### 2.2 装置

ESR装置は、日本電子のJES-FR80型を使用した。測定条件は、マイクロ波出力及び共鳴マイクロ波周波数8mW及び9.41GHz、中心磁場及び磁場掃引幅335.1±5.0mT、掃引時間2分、変調周波数及び磁場変調100kHz及び0.1mT、増幅2×100、応答時間0.1秒、測定温度は室温であった。

UV照射装置はES-UXL10 (ランプ: ULX-1000D-0キセノン、ウシオ電機) を使用した。発生したUVの試料に対する照度の実測値は、感度波長域が200-320nmであるUIT-110 (受光器UVD-254P、ウシオ電機) により5.5 (直読式) 及び6.5 (算出式) mW/cm<sup>2</sup>であった。紫外線透過フィルターは、東芝硝子社のUV-35 (315nm以上)、また紫外線透過可

視光線吸収フィルターとしてUV-D3S(230-440nm)を使用した。実際に透過した紫外線の量は、それぞれのフィルター使用で3.57及び5.49mW/cm<sup>2</sup>(算出式)であった。

### 2.3 活性酸素測定<sup>5)</sup>

ポルフィリン化合物それぞれを蒸留水に溶解し、pH6-7に水酸化ナトリウム溶液で調整し、最終濃度を1mMとした。

#### 2.3.1 ・OHの測定

pHの影響は、2% (18mM) DMPO水溶液50μlに20mMのクエン酸・りん酸緩衝液pH3.0またはりん酸緩衝液pH7.8を100μl、ポルフィリン溶液50μlを加え攪拌混合して検討した。次に、pH7.8における・OH発生量の検討は、3種類の反応液を用いて行った。即ち、ポルフィリン溶液50μlに9.2mM-DMPO溶液15μl、5.5mM-DETAPAC溶液35μl、りん酸緩衝液100μlを加えて(a)反応液とし、DMPOとDETAPAC溶液に2mM-HPX溶液50μlを加えた場合は、りん酸緩衝液を50μlを加えて(b)反応液とした。また、DMPO、DETAPAC、HPX溶液に50%DMSO溶液及びりん酸緩衝液25μlずつ加えて(c)反応液とした。

#### 2.3.2 O<sub>2</sub><sup>-</sup>の測定

pHの影響は、ポルフィリン溶液に2%DMPO溶液、50%DMSO溶液、クエン酸りん酸緩衝液またはりん酸緩衝液をそれぞれ50μl加え攪拌混合して検討した。また、pH7.8におけるO<sub>2</sub><sup>-</sup>発生量の検討は、ポルフィリン溶液50μl、9.2mM-DMPO溶液15μl、5.5mM-DETAPAC溶液35μl、2mM-HPX溶液50μl、50%DMSO溶液25μlにりん酸緩衝液25μlを加えた後、攪拌して行った。

#### 2.3.3 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>の測定

ポルフィリン溶液に50mM-TMPD溶液、50%DMSO溶液、りん酸緩衝液をそれぞれ50μlずつ加え攪拌混合して発生量を測定した。

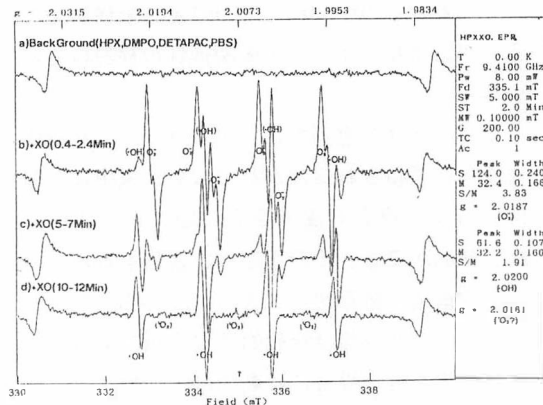


図2 ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ反応によるスーパーオキシドアニオン及びヒドロキシルラジカル発生に関するDMPO付加体のESRスペクトルにおける経時的変化

以上の反応混合液を、ESR用偏平セル(200μl容量、有効測定部160μl、ラボテック社)に採り、ESR装置の空洞共振器(キャビティ)部分に挿入設定し、反応液を混合してから40秒後に測定を開始した。図2にO<sub>2</sub><sup>-</sup>及び・OHの経時的発生状態をDMPOのスピン付加体スペクトルとして示した。また、図3に<sup>1</sup>O<sub>2</sub>の発生をTMPDの付加体スペクトルとして示した。

それぞれのラジカルの強さ(量)は、最初に現れる(共鳴位置g値:・OH 2.0200、O<sub>2</sub><sup>-</sup> 2.0187、<sup>1</sup>O<sub>2</sub> 2.0161)スペクトルの高さをラジカルの強さ(radical intensity, RI)とし、キャビティ内に設定したESRマーカーとしてのMn0の左端のスペ

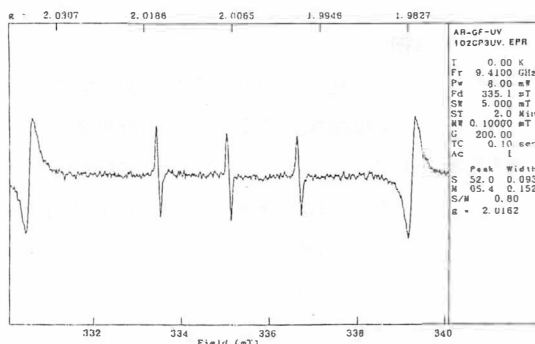


図3 コプロポルフィンから紫外線照射により発生する一重項酸素のTMPD付加体のESRスペクトル

クトルの高さとの比の値(試料のRI/MnOのRI)で表わした。なお、ESRのデータ処理は、ESR DATA ANALYZER SYSTEM(ラボテック社)により行われた。

## 2.4 実験的ポルフィリン症誘発

Jcl:Sprague-Dowley系雄ラットにgriseofulvin(GF、和光純薬工業)の生理食塩水懸濁液を50mg/ml/kg体重で1日おきに経口ゾンデにより投与を行った。1週間後にラットをネブタール麻酔下、右腋窩静脈切断によりヘパリン加採血した。全血について前述のESR法により発生する活性酸素の種類及び量を測定した。また、近藤等の方法<sup>12)</sup>で、高速液体クロマトグラフィ(HPLC)によりポルフィリンの種類と量を測定した。即ち、ポンプ、イジェクター及びプログラムはTRIRO-TAR SR 2HPLCシステム、検出器はFP-110D蛍光検出器(励起波長404nm、蛍光波長620nm)、脱気装置DG-3510を用いた(以上日本分光工業社)。溶離液はアセトニトリル-酢酸-水(80:7:13, v/v/v、50mM酢酸アンモニウムを含む)を用いた。カラムはODS-H-1151(4.6φx50mm、センシウ科学)に0.45μmメンブランフィルターをプレフィルターキット(医理化機器社)に装着した。流速は1.0ml/min、温度25°Cで行った。

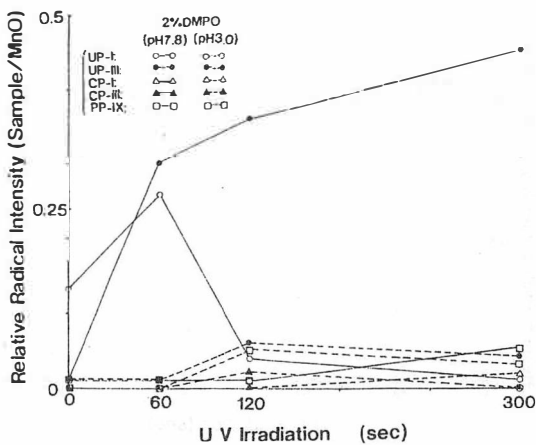


図4 紫外線照射によるポルフィリン化合物からのヒドロキシルラジカル発生に及ぼすpHの影響

## 3 結果及び考察

### 3.1 ポルフィリンからのUV照射による・OH発生

#### 3.1.1 pHの影響

図4に示した様に、スピン捕捉剤2%DMPO及びpH3.0またはpH7.8の緩衝液存在下、それぞれのポルフィリン化合物にUV照射を行うと、pH3.0ではいずれの化合物からでも・OHの発生は殆ど見られなかった。pH7.8ではウロポルフィリン(UP)類のみに・OHの発生が見られた。UP-IはUV照射時間60秒を最高に減少してしましたが、UP-IIIではそれ以降も増加を続けた。

生理的環境の中性下で、ポルフィリン代謝の初期の産物であるUP類のみから、特にヘム合成に関与するUP-IIIから多くの・OHが発生したことは興味深いことである。

生理的環境の中性下で、ポルフィリン代謝の初期の産物であるUP類のみから、特にヘム合成に関与するUP-IIIから多くの・OHが発生したことは興味深いことである。

#### 3.1.2 中性下での発生条件の検討

9.2M-DMPOにDETAPAC存在下、ポルフィリンにUV照射を行うと、UP類のみから照射30秒後に最高値を示した(図5-a)。この反応液(a)にHPXを加えてUV照射を行うと、UP類からの・OH発生は照

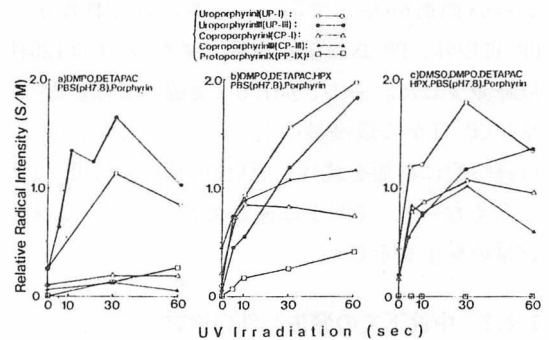


図5 中性における紫外線照射によるポルフィリン化合物からのヒドロキシルラジカル発生に関する測定条件の検討

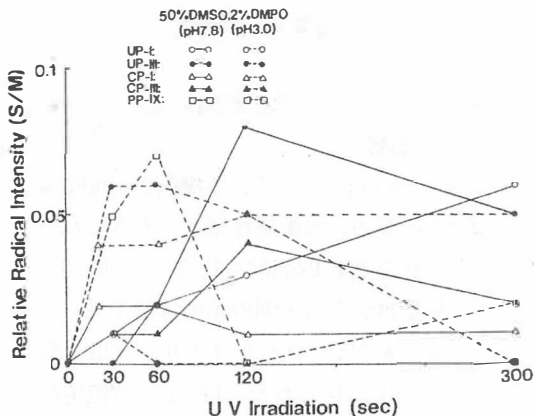


図6 紫外線照射によるポルフィリン化合物からのスーパーオキシドアニオン発生に及ぼすpHの影響

射後60秒後も増加を続け、CP類からも照射10秒後はUP類の約半分量の $\cdot\text{OH}$ が、またPP-IXからも徐々に発生の増加が見られた(図5-b)。更に、 $\cdot\text{OH}$ の消去作用を持つDMSOを加えると、PP-IXからの $\cdot\text{OH}$ の発生は見られず、他のポルフィリン化合物からの発生も60秒後には抑制された(図5-c)。

### 3.2 ポルフィリンからのUV照射による $\text{O}_2^-$ 発生

#### 3.2.1 pHの影響

図6に示した様に、2%DMPOに $\text{O}_2^-$ 経路の $\cdot\text{OH}$ を消去する50%DMSOを加え、pH3.0またはpH7.8の緩衝液存在下、それぞれのポルフィリンにUV照射を行うと、pH3.0(破線)ではUP-III、CP-I、PP-IXからUV照射60秒まで $\text{O}_2^-$ の発生が見られたが、UP-III以外、PP-IXは60秒以降、またCP-Iは120秒以降減少した。一方、pH7.8(実線)では、UP-III及びCP-IIIから最高量の $\text{O}_2^-$ が発生したが、UP-Iは経時的に増加を続け、照射300秒後にはUP-IIIより多くなった。CP-Iは僅かであったが、ほぼ一定量の発生を示した。

#### 3.2.2 中性下での発生条件の検討

$\text{O}_2^-$ の測定では、 $\cdot\text{OH}$ 測定用反応液(c)と同じものを用いたが、短い照射時間で発生を示した(図7)。即ちPP-IXはUV照射5秒後、CP-IIIは30秒

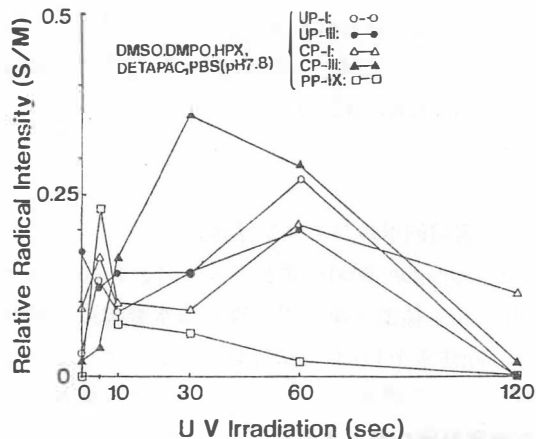


図7 中性における紫外線照射によるポルフィリン化合物からのスーパーオキシドアニオンの発生

後、UP類及びCP-Iは60秒後に最高値を示したが、UP-IとCP-Iは照射5秒後、またUP-IIIでは照射開始時に小さなピークがある二相性を示した。

### 3.3 ポルフィリンからのUV照射による $^1\text{O}_2$ 発生

スピン捕捉剤TMPDに $\cdot\text{OH}$ 消去剤DMSOを加え、中性条件下でUV照射を行うと、ポルフィリンではCP類のみから $^1\text{O}_2$ 発生が多く、UP類からは僅かな発生しか観察されなかった(図8)。なお、pH3.0ではいずれのポルフィリンからも $^1\text{O}_2$ は検出できなかった(図8の300秒時点に表示)。

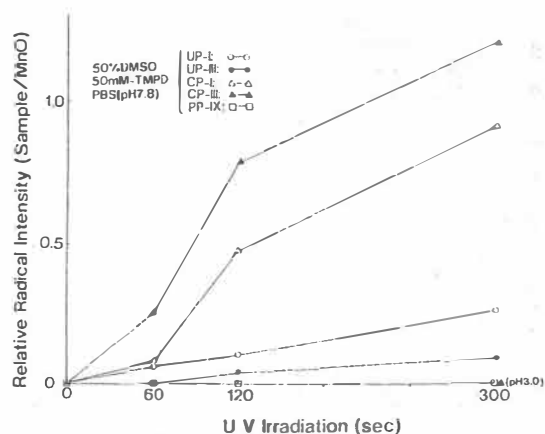


図8 紫外線照射によるポルフィリン化合物からの一重項酸素の発生

### 3.4 UV照射によるポルフィリンから発生する活性酸素の測定に関する考察

中性条件下では、検出された・OH量が3.1.1で行った実験より約4倍多かったのは、使用したDMP0の濃度も50倍高かったためと思われる。また、加えたHPXは、図2に示した様に $O_2^-$ を発生するXODの基質であり、この $O_2^-$ は更に・OHに移行するので、UV照射によりポルフィリンから発生した $O_2^-$ 経由での・OHを捕捉している可能性も考えられる。

UV照射によるポルフィリン類からの $O_2^-$ 発生は、用いた化合物の構造式との関係を明確に説明出来ない部分も示されたので、今後他の誘導体を用いて実験を重ねる必要がある。

以上の試験管内実験で、UV照射によりポルフィリン化合物から活性酸素種の発生が観察されたが、酸性域よりも生理的条件の中性域でラジカル発生量が多いことは、皮膚組織にそれら化合物が多く存在している場合にUV照射があると、影響も大きいことが推測できる。

試験管内の単純系反応（図5-a、6、8）では、いずれもポルフィリンのⅢ型がⅠ型よりやや多目に発生していたことは、Ⅲ型がヘム代謝では主経路であるので、UV照射によるヘム代謝に対する影響も大きい可能性を示唆している。また、使用したポルフィリン化合物は図1に示した様に酸化型であり、UV照射は生体内で還元型の化合物に対し

てより多くのラジカルを発生させ易いと考えられるので、ここで得られた結果より一層明瞭な変動が予想される。

### 3.5 ポルフィリンからの活性酸素発生に関わるUVの波長

キセノンランプによるUV照射は、270nm以上の波長スペクトラムとして示され（図9、実線）、地上の日光（破線）と類似している。UVの種類を波長により分類すると、400-315nmはUV-A、315-280nmはUV-B及び280-200nmはUV-Cであり、面積比からそれぞれ76.5、20.7、2.8%となる。キセノンランプによる照度（UV照度計UIT-110、受光器UVD-254P）は、平均値5.63mW/cm<sup>2</sup>であり、またフィルタ-UV-35（- - -）及びUV-D33S（- · - · -）を使用してUV照射した場合のそれぞれの照度は、3.57及び5.49mW/cm<sup>2</sup>を示した。

ESR装置のキャビテイ部分に設定した偏平セル内のポルフィリン溶液にUV照射を行い、発生した活性酸素の種類と量を測定した。図10に示した様に、UP類とCP類からの・OH及びCP類からの $^1O_2$ の発生が多いことが明らかであるが、2種類のフィルターを用いた場合、活性酸素発生にはUV-Aが主たる要因になっていることが示された。

### 3.6 実験的ポルフィリン症誘発

GFを1日おきに1週間経口投与したラットから採

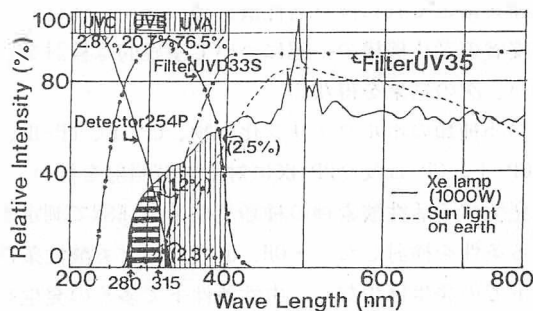


図9 キセノンランプによる照射紫外線波長スペクトルとUVカットフィルター及び検出器の有効領域

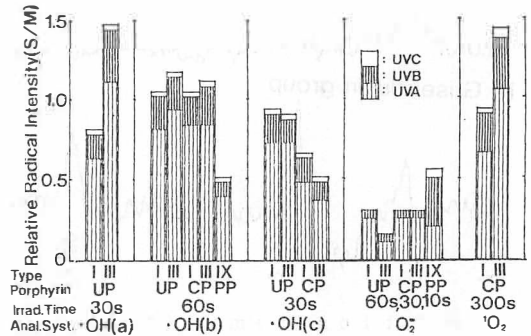


図10 UVカットフィルターによるポルフィリン化合物からの活性酸素種発生に関わる紫外線波長領域

取した血液について、HPLCによりポルフィリン類の種類及び量を測定したクロマトグラムを図11に示す。既知濃度の標準物質CP、亜鉛PP (ZPP) 及びPPにより、溶出位置 (A、B、C) から順次CP、ZPP、PPである種類を確定した。また、それぞれのピークの面積から量を算出したが、対照群 (a) のそれぞれの濃度 (2.33、98.6、11.3  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) に比較して、GF投与群 (b) は2.09、103.9、22.1  $\mu\text{g}/\text{dl}$ であり、PPのみが2倍に増加していた。

更に、これらの血清中にUVを照射した場合、含まれるポルフィリン化合物から発生する活性酸素の種類と量をESRを用いて調べ、その結果を図12に示した。GF投与により発生量が増加した活性酸素種としては、UV30秒照射による $\cdot\text{OH}$  (a反応系) 及び60秒照射による $\text{O}_2^-$ であり、それぞれUP類及びUP類とCP類からのものであることが示唆された。

従って、ここでラットを用いて行った短期間の実験において、PP-IXの増加がクロマトグラフィにより確認されたので、ポルフィリン症が誘発された可能性が示唆された。しかしながら、発生増加した活性酸素種からはPPの関与が示されなかったことから、ポルフィリン症を実験的に十分誘発

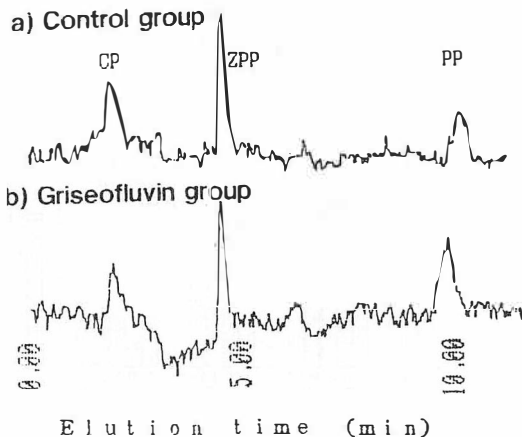


図11 グリセオフルビン投与ラット血液中ポルフィリンの高速度液体クロマトグラム

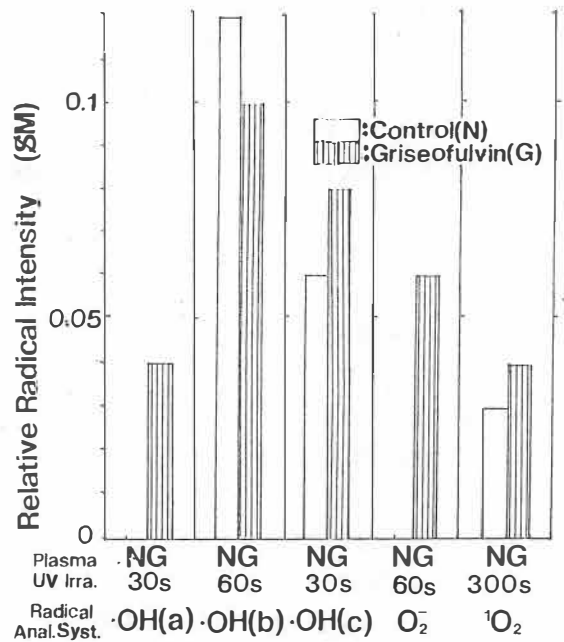


図12 グリセオフルビン1週間経口投与ラット血漿ポルフィリンからの紫外線照射による発生活性酸素種

したとは言えず、今後、GFの投与期間を延長することが必要であると考えられる。実験的ポルフィリン症が誘発された後、UV照射による皮膚の障害を防止するための抗酸化作用物質等を用いての実験を行う予定である。

#### 4 総括

皮膚と光との関連性においてポルフィリンの代謝異常とそれに伴う活性酸素種の発生に注目し、皮膚の老化機構の一部について基礎的な検討を行い、次の結果を得た。

1) 5種類のポルフィリン化合物、UP-I、UP-III、CP-I、CP-III及びPP-IXに対してUV照射を行い、発生する活性酸素種の種類及び量をESRで測定する条件を検討した。 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2^-$ 、 $^1\text{O}_2$ とも酸性条件下での発生は少なく、中性条件下で多くの発生を示した。

2) 中性下、 $\cdot\text{OH}$ はUV照射30秒でUP類から多く発生し、HPXが存在すると60秒照射でCP類からも発生

が見られた。 $O_2^-$ は5秒の照射によりPP-IXやCPとUPのI型から、また、60秒後にはCP類やUP類から発生が見られた。 $^1O_2$ はCP類から照射が120秒以後多く発生し始め、300秒後でも増え続けた。これらの結果を基に、それぞれの活性酸素種の適切な測定条件を選んだ。

3) 太陽光線の波長パターンに類似し、UV-A (315-400 nm) が全UVの約77%を占めるキセノンランプによるUV照射時、UV-A及びUV-A+UV-Bの波長領域を透過させる2種類のフィルターを使用した場合、CP類とUP類からの $\cdot OH$ 及びCP類からの $^1O_2$ の発生が観察された。

4) GF投与による実験的ポルフィリン症をラットに試みたが、1週間程度の投与ではPP-IXの量が2倍に増加しても、UV照射ではPP-IXから発生する特徴的な活性酸素種が検出出来なかったことから、投与期間を更に延長する必要性が提示された。

## 文 献

- 1) 近藤雅雄、青木洋祐：ポルフィリン代謝に関する最近の知見. 医学のあゆみ 155 859-863 1990
- 2) 中島 進、林 秀雄、竹村 健、阪田 功、：ポルフィリン誘導体腫瘍組織集積性のメカニズムと新しい癌診断、治療法への応用. ポルフィリン 1 223-228 1992
- 3) 阪田 功、丸山 泉、高田弘之、池内昌子、乾 裕史、中島 進、竹村 健、小清水弘一、：ポルフィリン関連化合物と腫瘍組織親和性に関する研究(Ⅲ)光線力学的治療 (PDT) のための光増感剤の簡単な評価法. 同上誌 1 235-242 1992
- 4) A. Ando, M. Omote, I. Kumadaki, : Synthesis of fluorine analogs of porphyrins potentially useful for diagnosis and therapy of tumors. 同上誌 1 243-248 1992
- 5) 石原聖也、沼田道一、三好憲雄、岡本博明、新井達郎、徳丸克己、市村厚一、小林孝嘉、光田慶一、山田真砂子、河野雅弘、福田優、：光励起により生成する種々の光増感剤からの活性酸素系検出. 小倉良平、吉川敏一編集、磁気共鳴と医学 3 86-90 日本医学館、東京、1992
- 6) 上出良一、ポルフィリンによる光線過敏の発生機序. 今村貞夫、田上八朗、西川武二、吉川邦彦 編、現代皮膚科体系、年刊版、89-A, pp229-234, 中山書店、東京、1989
- 7) 小倉良平、山正康、紫外線と活性酸素・フリーラジカル. 活性酸素・フリーラジカル 3 270-277 1992
- 8) 野中薫雄、大神太郎、村山史男：代謝異常と皮膚-ポルフィリン. 皮膚科MOOK 10 153-160 1987
- 9) 市橋正光：光線過敏症分類、佐藤吉昭編、光線過敏症、pp40-41, 金原出版、東京、1991
- 10) 野中薫雄、大神太郎：実験的ポルフィリン症、同上誌 pp129-136 1991
- 11) 野中薫雄、下山時生、本多哲三、広渡徳治、堀 貞、野北通夫：実験的ポルフィリン症マウスの光線過敏症-グリセオフルビン投与时におけるポルフィリンの動態と実験的ポルフィリン症マウスに対する光照射時における皮膚老化. 日皮会誌 87 585-598 1977
- 12) 近藤雅雄、広沢実一：高速液体クロマトグラフィーによる赤血球ポルフィリンの高感度迅速定量法. 臨床化学 17 36-39 1988

# 還元型ネオプテリン(NPH4)の紫外線照射皮膚傷害に対する効果

東京理科大学 生命科学研究所

小島 周二

Effect of the reduced form of neopterin (NPH4) on human fibroblast cell and mouse melanoma (B-16) cell injuries induced by long-wave length ultraviolet light (UV-A) irradiation was examined.

The reduced form of neopterin, NPH4, didn't inhibit the incorporation of  $^3\text{H}$ -proline into collagen of human fibroblast cells induced by UV-A irradiation, but dose-dependently did the lowering of  $^3\text{H}$ -thymidine ( $^3\text{H}$ -TdR) incorporation into DNA fraction of the B-16 cell injury. On the other hand, the oxidized form of neopterin, NP, drastically elevated the reduction of both precursors induced by UV-A irradiation at a high concentration. Radical oxygen species (ROS) which induced the cell injuries in B-16 cell. Among various kinds of ROS, scavengers, only catalase, a scavenger for hydrogen peroxid, protected the cells from the injury, suggesting that hydrogen peroxide may involve in the cell injury induced by UV-A irradiation. In the in vitro analysis of chemiluminescence induced by hydrogen peroxide, NPH4 reduced the signal intensity in dose-dependent manner, while NP dramatically enhanced the signal intensity at a high concentration. In hydrogen peroxide-induced B-16 cell injury model, almost the same data were obtained as well as in UV-A irradiation. These results suggest that neopterin would be applicable to protecting skin from ultraviolet-induced injury and skin cancer therapy.

## 1 緒言

ネオプテリンは分子量253の2-アミノ-4-ヒドロキシプテリジン誘導体の1つで、核酸(GTP)由来の補酵素(ビオプテリン)の前駆体であり、食細胞の1つであるマクロファージより、インターフェロンの刺激により遊離されることが明らかとなっている。ネオプテリンの生理活性については、いまだ解明されていないが、これまで、AIDSをはじめとする種々の感染症、悪性腫瘍、自己免疫疾患、異種臓器移植の拒絶反応、川崎病、糖尿病等の患者血中および尿中に顕著に増加することことから、これら疾患の診断に用いる試みがなされている。

一方、近年、心筋梗塞、動脈硬化、糖尿病、アルツハイマー病、癌、自己免疫疾患等の成人病・難病の発症に生体内で産生される活性酸素種(ROS)が関与していることが明らかとなってきた。これらの多くは、先に述べたネオプテリン高値を示す疾患であり、かつ、同一細胞より両物質が遊離されることから、ネオプテリンが食細胞での活性酸素の産生・遊離の制御に関与している可能性が示唆された。すなわち、我々は本物質を食細胞での活性酸素の産生および遊離活性酸素に対するスカベンジャー(抗酸化剤)と推定した。この仮定の下で、ネオプテリンの抗酸化能を種々の系で測定したところ、本物質の還元体である5、6、7、8-テトラヒドロネオプテリン(NPH4)に極めて強い活性があることを見いだした<sup>1-3)</sup>。また、酸化型ネオプテリン(NP)もマクロファージの活性酸素産生過程に作用し、この発生を抑制することを既に明らかにしている<sup>4)</sup>。これらの結果は、過剰生産されたROS、あるいは、これらに対する生体の防御系の低下・欠損等による正常細胞の傷害、いわゆる「活性酸素ストレス」に対する

Effect of the reduced form of neopterin (NPH4) on the skin injury induced by ultraviolet light

Shuji Kojima

Research Institute for Biosciences,  
Science University of Tokyo



生体の持つ「巧みな防御機構」の発見につながるばかりでなく、先に記載した活性酸素関連疾患に対する治療薬への応用も大いに期待される。

ところで、紫外線暴露による皮膚の炎症あるいは皮膚癌等の発生についても、その詳細については明らかではないが、紫外線照射により発生するROSの関与が示唆されている<sup>5-7)</sup>。そこで、本研究では紫外線による皮膚傷害に対するネオプテリンの効果を抗酸化活性と関連付け、ヒト線維芽細胞およびマウス・メラノーマ(B-16)細胞を用い検討した。

## 2 実験

### 2.1 ESRによるネオプテリンの抗酸化活性の解析

スピントラップ剤としては5,5-dimethyl-pyrroline-1-oxide (DMPO)を用い、日本電子製 RADICAL Bio-SENSOR (JES-FR80)にて解析した。スーパーオキシドアニオンはヒポキサンチン(HPX)(0.5mM)とキサンチンオキシダーゼ(XOD)(0.25V/ml)の反応にて生成させた。ヒドロキシルラジカルは、予め、硫酸第一鉄と金属キレートであるDiethylenetriaminepentaacetic acid (DETAPAC)を等モル(1mM)反応させておいた水溶液(Fe-DETAPAC)と過酸化水素の反応で生成させた。

### 2.2 細胞の培養

マウスメラノーマ細胞を理研細胞バンクより入手し、イーゲルMEM(10%FCS含有)培地を用い、37°CのCO<sub>2</sub>インキュベータ(5%CO<sub>2</sub>/95%Air)中で、コンフルエントあるいはセミコンフルエント、になるまで培養した。つぎに、0.25%トリプシン/0.02% EDTA溶液を用い細胞を回収し、PBS(-)で3回洗浄後、2×10<sup>6</sup> cells/ml MEM細胞懸濁液を調製し、1mlを24穴プレートにまく。さらに、12時間培養したのみに、ネオプテリンを加え、紫外線(UV-A)を照射した。

### 2.3 紫外線の照射

UV-A(東芝、FL-20S、BL/DMR)の照射はカバープレートを付けた状態で、2.0mW/cm<sup>2</sup>の線量率で所定の時間照射した。

### 2.4 ヒト線維芽細胞の紫外線照射によるコラーゲン生成量の測定

ヒト真皮線維芽細胞(森永乳業製)を、ハムF12(10% FCS含有)培地に懸濁し、24ウェルに2×10<sup>4</sup>個ずつまき、37°CのCO<sub>2</sub>インキュベータ(5%CO<sub>2</sub>/95%Air)中で、4~5日コンフルエントになるまで培養する。UV-A照射(0、80、160、および240分)後、培地を除き、PBSで3回洗浄、<sup>3</sup>H-プロリン(0.2μCi/ml)を各ウェルに入れ、さらに24時間培養する。培地を除去し、PBSで細胞を3回洗浄後、50μg/mlプロテアーゼK(含0.25%N-ラウリルザルコシン・25mM EDTA)を各ウェルに100μl加える。細胞が完全に溶解した後、ピペettingし、100μlを液体シンチレーションカウンター用バイアルに取り、シンチレータ(10ml)を入れ、放射能を測定した。つぎに、本合成を約30%抑制する照射線量(29J/cm<sup>2</sup>=240分照射)にて、NPH4およびNPのコラーゲン合成に対する作用を検討した。

### 2.5 細胞傷害の測定

細胞傷害の程度は、照射細胞をPBS(-)で3回洗浄後、<sup>3</sup>H-チミジン(<sup>3</sup>H-TdR)のDNA画分への取込活性から評価した。すなわち、UV-A照射後の洗浄B-16細胞に<sup>3</sup>H-TdRを各ウェルに18.5KBq/mlになるように加え、1時間CO<sub>2</sub>インキュベータで培養する。ハンクス液で2回洗浄した後、0.25%トリプシン/0.02%EDTA溶液50μlを各ウェルに加え、1~2分インキュベータ内に放置し、1mlのハンクス液を加え、細胞をガラスチューブに回収する。各チューブに10% TCA 1mlを加え、30分間氷上に放置する。ガラスフィルター(Whatman、GF/C)をセットした濾過器で、TCA不溶画分を回収し、5%TCA、エタノール/エーテル(1:1)およびエ

ーテルの順で各々2回ずつ洗浄する。フィルターを室温で放置し、十分乾燥後、バイアルビンに移し、トルエンシンチレータ10mlを加え、放射能を測定する。なお、各々の活性はDNAに取り込まれた放射能 (CPM/well)あるいは、非照射群に対する割合 (%)として表示した。

## 2.6 抗酸化酵素・酸化剤の細胞傷害活性に対する作用

B-16細胞でのUV-A傷害および酸化型ネオプテリン (NP) によるこの促進効果に関与するROSを同定する為、SOD (1000U/ml)、カタラーゼ (CAT、200U/ml)、 $\alpha$ -フェニール-N-t-ブチルニトロソ (PBN、100  $\mu$ M)およびマニトール (MAN、100  $\mu$ M)を培地に添加した細胞について、UV-Aを2.0mW/cm<sup>2</sup>の線量率で、10分間照射し、傷害活性を比較した。

## 2.7 過酸化水素によるB-16細胞傷害に対するネオプテリンの作用

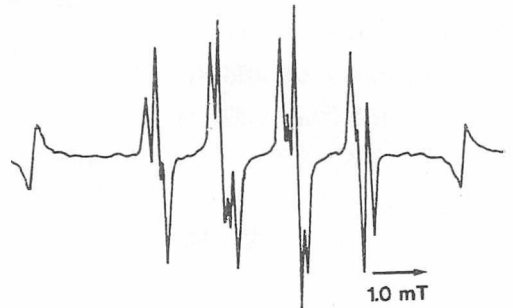
1、10、および100  $\mu$ Mの過酸化水素を含むMEM培地を調製し、B-16細胞を10分間過酸化水素に暴露させた後、PBS (-)で十分洗浄、<sup>3</sup>H-TdRを含む培地を各ウエルに加え、1時間CO<sub>2</sub>インキュベータで培養する。その後の操作は2.5に従い、過酸化水素によるB-16細胞に対する傷害を検討した。さらに、過酸化水素濃度を10  $\mu$ Mに固定し、先に述べたUV-A照射と同様の方法でNPの作用を検討した。

## 2.8 ケミルミネッセンスによる過酸化水素の反応性の検討

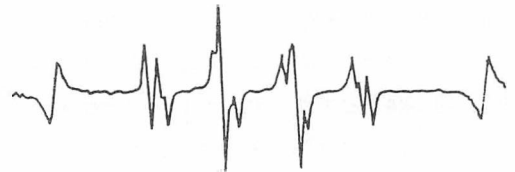
Weissらの方法<sup>8)</sup>に従い、濃度のことなるNPH4およびNPを0.1M PBS (pH7.5)にとかし調製した。蛍光体として、10mM 5-アミノ-2,3-ジヒドロ-1,4-フタラジンジオンをDMSOに溶かしたものをストック溶液とし、用時、PBSで40  $\mu$ Mに希釈したものをを用いた。650  $\mu$ lのPBS、150  $\mu$ lの蛍光体溶液およびネオプテリンを含む反応溶液に100  $\mu$ lの

1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を加え反応を開始した。蛍光体からの蛍光をルミネッセンスリーダ (Aloka BLR102)で連続的に記録した。

### (A) Control



### (B) NPH4 (0.5 mM)



### (C) NPH4 (1.0 mM)



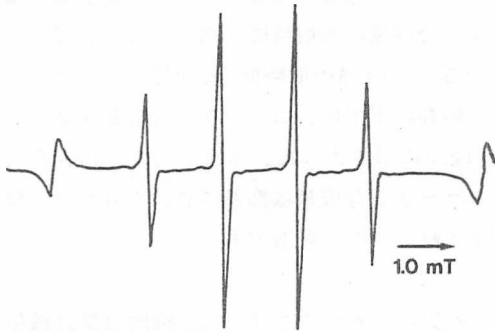
Fig.1[A]. ESR spectra of DMPO spin adducts formed in a hypoxanthine/xanthine oxidase (HPX/XOD) system without (A) or with NPH4 of 0.5mM (B) and 1.0mM (C).

Each spectrum was obtained at 60 sec after adding XOD.

Signals appearing both at high and low field are due to Mn(II) installed in the cavity as a reference.

the main species present include DMPO-OOH and DMPO-OH.

(A) Control



(B) NPH4 (0.5 mM)



(C) NPH4 (1.0 mM)



Fig.1[B]. ESR spectra of DMPO spin adducts formed in the Fenton reaction without (A) or with NPH4 of 0.5mM (B) and 1.0mM (C). Each spectrum was obtained at 60 sec after adding hydroperoxide. Signals appearing both at high and low field are due to Mn (II) installed in the cavity as a reference. the main species present is DMPO-OH.

2.9 ネオプテリンのUV-Aに対する安定性

NPを100ng/ml PBSに調製、2.0mW/cm<sup>2</sup>の線量率でUV-Aを時間を変えて照射した。残存NP量は

Neopterin Kit (INCSTAR) を用い定量した。残存NP量は照射前のNP量を100とした際の割合(%)で表示した。

2.10 チロシナーゼ活性の測定

50mM PBS(pH6.8) 0.8ml、チロシナーゼ(Sigma社製、750μg/ml) 0.5ml、ネオプテリン0.5mlをガラス製セルに入れ、2分間プリインキュベートする。この反応液に0.05%L-DOPA 0.5mlを添加し、反応を開始する。反応開始後、37°Cでインキュベートしながら475nmの吸光度の変化を2分間記録し、初速度より活性を求めた。

3 結果

3.1 ESRによるネオプテリンの抗酸化活性の解析

HPX/XOD反応系及びFe-DETAPAC/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>反応系により、それぞれ、O<sub>2</sub><sup>-</sup>ラジカルおよび・OHラジカ

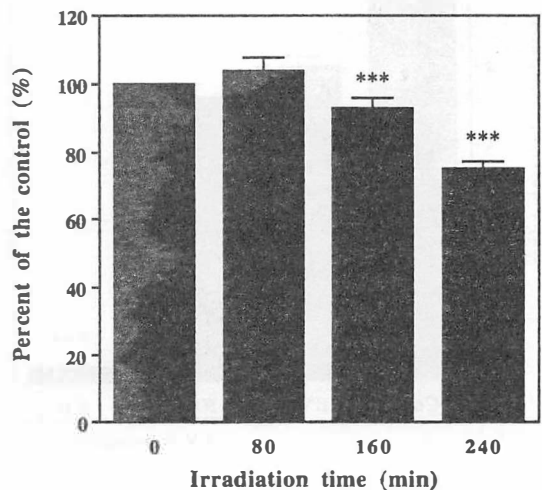


Fig.2. Effect of UV-A irradiation times on the incorporation of <sup>3</sup>H-prolin into human fibroblast cell. Results were expressed as relative percent of UV-A-irradiated cells to the onirradiated cells.

\*\*\*Statistically significant difference from the nonirradiated group (p<0.001, Student, t-test).

るを発生させ、還元型ネオプテリン (NPH4) との反応性をESRにて検討した。この結果、Fig.1に示すように、NPH4は、いずれのラジカルに対しても、極めて高い反応性を示し、濃度依存的にDMPO-OOH (Fig.1[A]) およびDMPO-OH (Fig.1[B]) のピークを低下させた。一方、酸化型ネオプテリンには、これらラジカルとの反応性は認められなかった。

### 3.2 ヒト線維芽細胞のUV-A照射によるコラーゲン生成量の変化

コラーゲンは、主としてプロリンとヒドロキシプロリンからなるアミノ酸配列の規則的な繰り返しから構成されている。そこで、 $^3\text{H}$ 標識プロリンの細胞内取り込みにより、UV-Aによるコラーゲンの生合成の変化を測定した。この結果、Fig.2に示

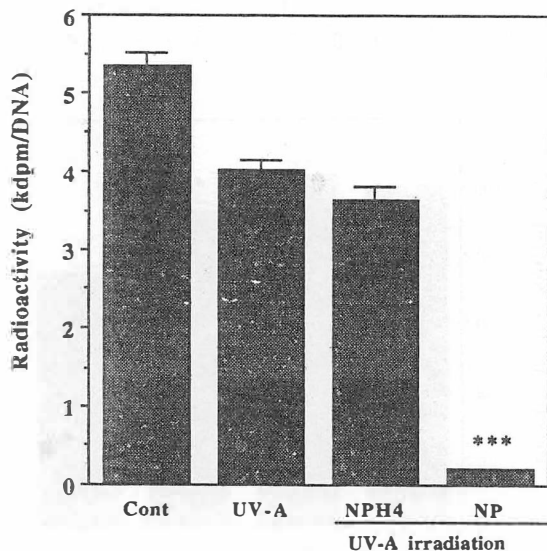


Fig. 3. Effects of the reduced and the oxidized form of neopterin on the  $^3\text{H}$ -proline incorporation into human fibroblast cell irradiated with UV-A. The cells were exposed for 240 min in the presence of NPH4 and NP at  $300\ \mu\text{M}$  by UV-A. \*\*\*Statistically significant difference from the non-irradiated control group ( $p < 0.001$ , Student, t-test).

すように、ヒト線維芽細胞にUV-Aを照射するとコラーゲン合成量は照射時間の増加と共に、減少した。つぎに、UV-A照射時間を240分とし、ネオプテリンの存在下での、コラーゲン合成量を測定した。Fig.3に示すように、ネオプテリンの存在によりコラーゲン合成量は抑制され、とりわけ、酸化型ネオプテリンに顕著であった。

### 3.3 マウス・メラノマ (B-16) 細胞の紫外線傷害に対するネオプテリンの作用

つぎに、細胞を紫外線に対しより感受性の高いマウス・メラノマ (B-16) 細胞にかえ、UV-Aの細胞傷害に対するネオプテリンの作用を検討した。Fig.4に示すように、 $2.0\ \text{mW}/\text{cm}^2$ の線量率で5分以上照射すると、非照射群と比較し、有意 ( $p < 0.05$ ) な $^3\text{H}$ -Tdrの取り込み活性の抑制がみ

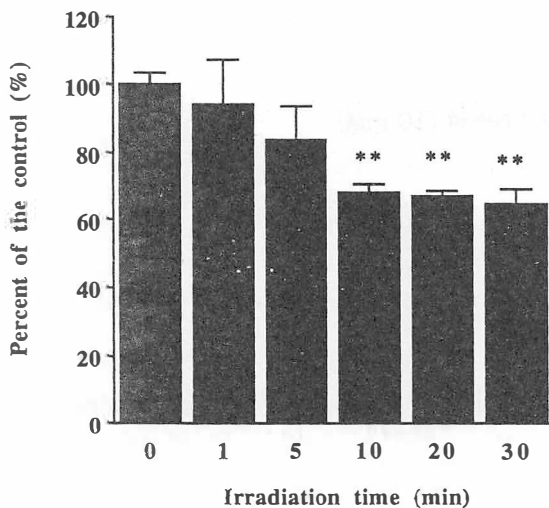


Fig. 4. Effect of UV-A irradiation times on the mouse melanoma (B-16) cell injury. The cell damages were evaluated *in vitro* by measuring  $^3\text{H}$ -thymidine ( $^3\text{H}$ -Tdr) incorporation into cellular DNA of the cells. Results were expressed as relative percent of UV-A-irradiated cells to the nonirradiated cells. \*\*Statistically significant difference from the nonirradiated control group ( $p < 0.01$ , Student, t-test).

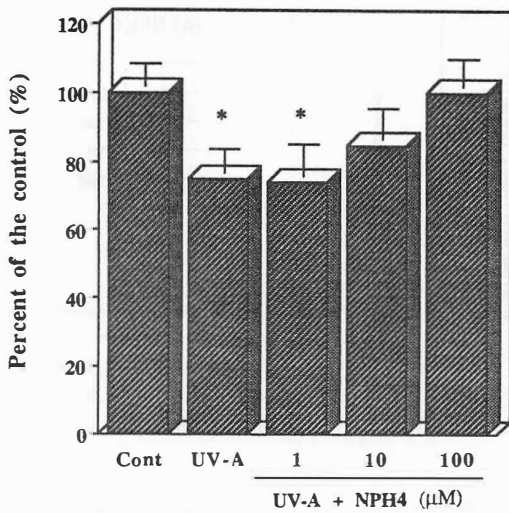


Fig. 5. Effect of doses of the reduced form of neopterin (NPH4) on the UV-A-induced B-16 cell injury. The cell damages were evaluated in vitro by measuring  $^3\text{H}$ -thymidine ( $^3\text{H}$ -TdR) incorporation into cellular DNA of the cells. Results were expressed as relative percent of UV-A-irradiated cells with or without NP to the nonirradiated cells. \*Statistically significant difference from the nonirradiated control group ( $p < 0.05$ , Student, t-test).

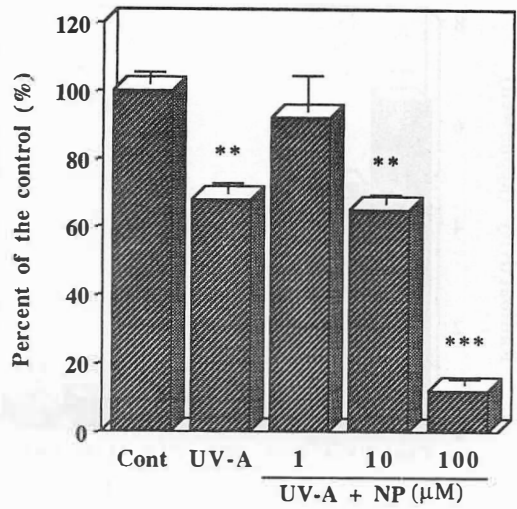


Fig. 6. Effect of doses of the oxidized form of neopterin (NP) on the UV-A-induced B-16 cell injury. The cell damages were evaluated in vitro by measuring  $^3\text{H}$ -thymidine ( $^3\text{H}$ -TdR) incorporation into cellular DNA of the cells. Results were expressed as relative percent of UV-A-irradiated cells with or without NP to the nonirradiated cells. \*\*Statistically significant difference from the nonirradiated control group ( $p < 0.01$ , Student, t-test). \*\*\*Statistically significant difference from the nonirradiated group ( $p < 0.001$ , Student, t-test).

られ、10~30分の照射で非照射群の約70%の値を示した。次に、照射時間を10分 ( $1.2\text{J}/\text{cm}^2$ ) に固定し、この細胞傷害に対するNPH4およびNPの作用を、検討した。Fig. 5に示すように、還元型ネオプテソンであるNPH4は濃度依存的にこの細胞傷害を抑制した。一方、酸化型ネオプテリンは、 $10\mu\text{M}$ までは顕著な作用を示さないものの、 $100\mu\text{M}$ では、この傷害を顕著に促進した(Fig. 6)。還元型ネオプテリンの抗酸化活性については、すでに、明らかにしたように、極めて強い抗酸化活性があること、および本実験にて明らかとなったように、NPH4がUV-Aによる細胞障害を抑制することより、この障害の発生に活性酸素の関与が推定された。そこで、酸化型ネオプテリンによる細胞

傷害を促進する結果について、種々のラジカル・スカベンジャーを用い、さらに検討を加えた。この結果、Fig. 7に示すように、それぞれ、 $^1\text{O}_2$ 、 $\text{O}_2^-$ および $\cdot\text{OH}$ に対するスカベンジャーであるPBN、SOD、およびMANには細胞傷害の抑制は全く見られず、過酸化水素に対するスカベンジャーであるCATにのみ顕著な傷害活性の解除がみられた。この結果、このUV-AによるB-16細胞傷害の発生には、紫外線照射により発生するROSのうち、主として、過酸化水素が関与することが示唆された。

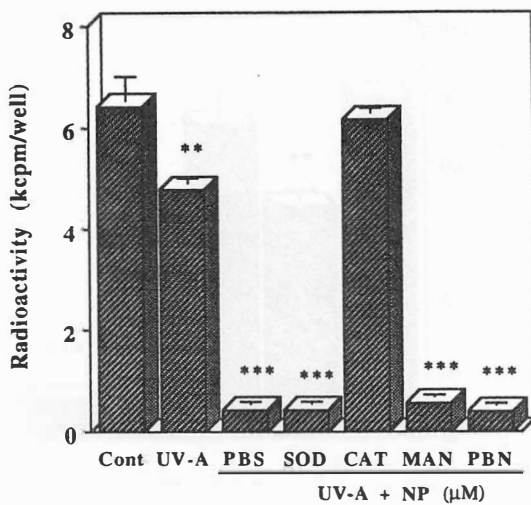


Fig. 7. Effect of radical scavengers on the UV-A-induced B-16 cell injury. The cell damages were evaluated in vitro by measuring  $^3\text{H}$ -thymidine ( $^3\text{H}$ -TdR) incorporation into cellular DNA of the cells.

Results were expressed as radioactivity (cpm) incorporated into the cell/well. PBS, PBS(-); SOD, superoxide dismutase (1000U/ml); CAT, catalase (200U/ml); MAN, mannitol (100  $\mu\text{M}$ ); PBN,  $\alpha$ -phenyl-N-t-butylnitron (100  $\mu\text{M}$ ),

\*\*Statistically significant difference from the nonirradiated control group ( $p < 0.01$ , Student, t-test).

\*\*\*Statistically significant difference from the nonirradiated control group ( $p < 0.001$ , Student, t-test).

### 3.4 ネオプテリンの過酸化水素の反応性に対する作用

UV-A照射によるB-16細胞傷害の発生に過酸化水素の関与が示唆され、酸化型ネオプテリンによる傷害の増強が過酸化水素の細胞傷害活性の促進を介する事が推定された。そこで、過酸化水素の反応性に対するネオプテリンの作用をケミルミネセンス法により検討した。この結果、Fig. 8に示すように、NPH4が過酸化水素によるシグナル強度を濃度依存的に抑制するのに対し、NPは0.1~10  $\mu\text{M}$ の濃度範囲では顕著な作用を示さないもの

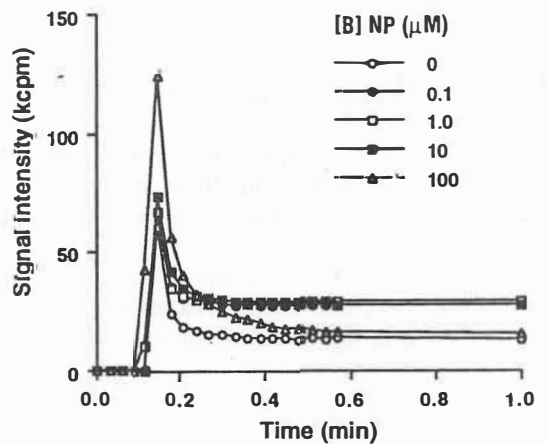
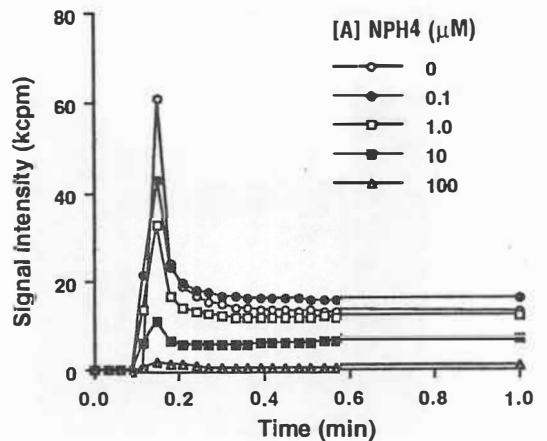


Fig. 8. Effect of neopterin on the signal intensity induced by hydrogen peroxide.

The signal intensity was measured by luminol-dependent chemiluminescence. The light output after addition of hydrogen peroxide containing luminol with or without neopterin was continuously recorded for 1 min.

The signal intensity was expressed as counts per minute (cpm) at each time interval.

[A]NPH4, reduced form of neopterin; [B]NP, the oxidized form of neopterin.

の、100  $\mu\text{M}$ では、著しくこのシグナル強度を高めた。この結果は、先に示したUV-A照射による細胞傷害に対するNPの傷害促進効果の発現結果と良く一致した。

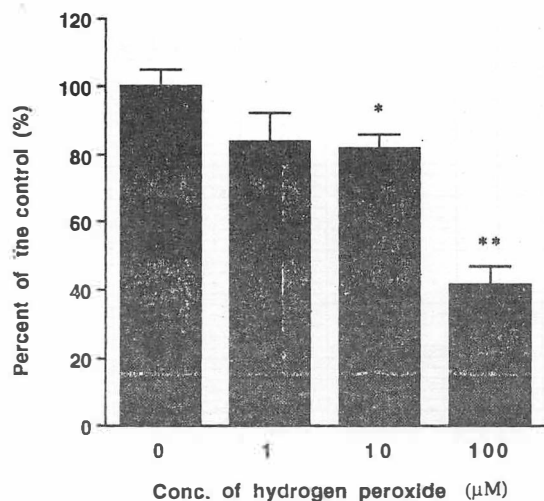


Fig. 9. Effect of doses of hydrogen peroxide on B-16 cell injury.

The cell damages were evaluated in vitro by measuring  $^3\text{H}$ -thymidine ( $^3\text{H}$ -TdR) incorporation into cellular DNA of the cells.

Results were expressed as relative percent of hydrogen peroxide-treated cells to the untreated cells.

\*Statistically significant difference from the untreated group ( $p < 0.05$ , Student, t-test).

\*\*Statistically significant difference from the untreated group ( $p < 0.01$ , Student, t-test).

### 3.5 過酸化水素によるB-16細胞傷害とネオプテリンの作用

これまでの結果より、UV-A照射によるB-16細胞傷害の発生に過酸化水素が関与し、NPH4はこの反応性を抑制、一方、NPはこれを増強することにより、それぞれ、UV-A傷害の抑制及び促進をする事が示唆された。これらの仮定を確認する目的で、本実験では、過酸化水素による細胞傷害を作成し、この傷害に対するNPH4及びNPの作用を検討した。Fig. 9に示すように、 $10 \mu\text{M}$ 以上の過酸化水素により有意な細胞傷害が惹起された ( $p < 0.05$ )。つぎに、過酸化水素の濃度を $10 \mu\text{M}$ とし、NP ( $< 100 \mu\text{M}$ )およびCAT (200U/ml)の作用を検討した。この結果、Fig. 10より明らかなように、過酸

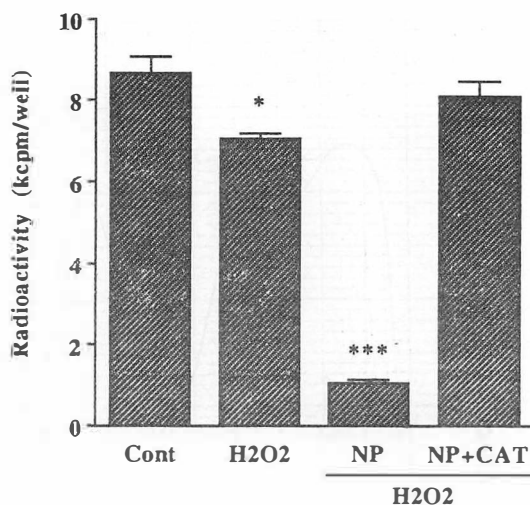


Fig. 10. Effect of doses of hydrogen peroxide-induced B-16 cell injury by the oxidized form of neopterin and its abolishment by catalase.

The cell damages were evaluated in vitro by measuring  $^3\text{H}$ -thymidine ( $^3\text{H}$ -TdR) incorporation into cellular DNA of the cells.

The cells were treated with  $10 \mu\text{M}$  hydrogen peroxide 10 min with or without NP. Results were expressed as radioactivity (cpm) incorporated into the cells/well. Catalase (CAT, 200U/ml) was added to  $10 \mu\text{M}$  hydrogen peroxide-treated cells with NP,

\*Statistically significant difference from the untreated group ( $p < 0.05$ , Student, t-test).

\*\*Statistically significant difference from the untreated group ( $p < 0.01$ , Student, t-test).

化水素によるB-16細胞傷害はUV-Aによる細胞傷害と同様、NPにより促進され、当然の事ながら、この促進効果はCATにより完全に解除された。

### 3.6 ネオプテリンの吸収スペクトルと紫外線に対する安定性

還元型ネオプテリン (NPH4) が、ヒト線維芽細胞での紫外線によるコラーゲン合成の抑制に対しては促進的に、メラノーマ細胞でのDNA合成の抑

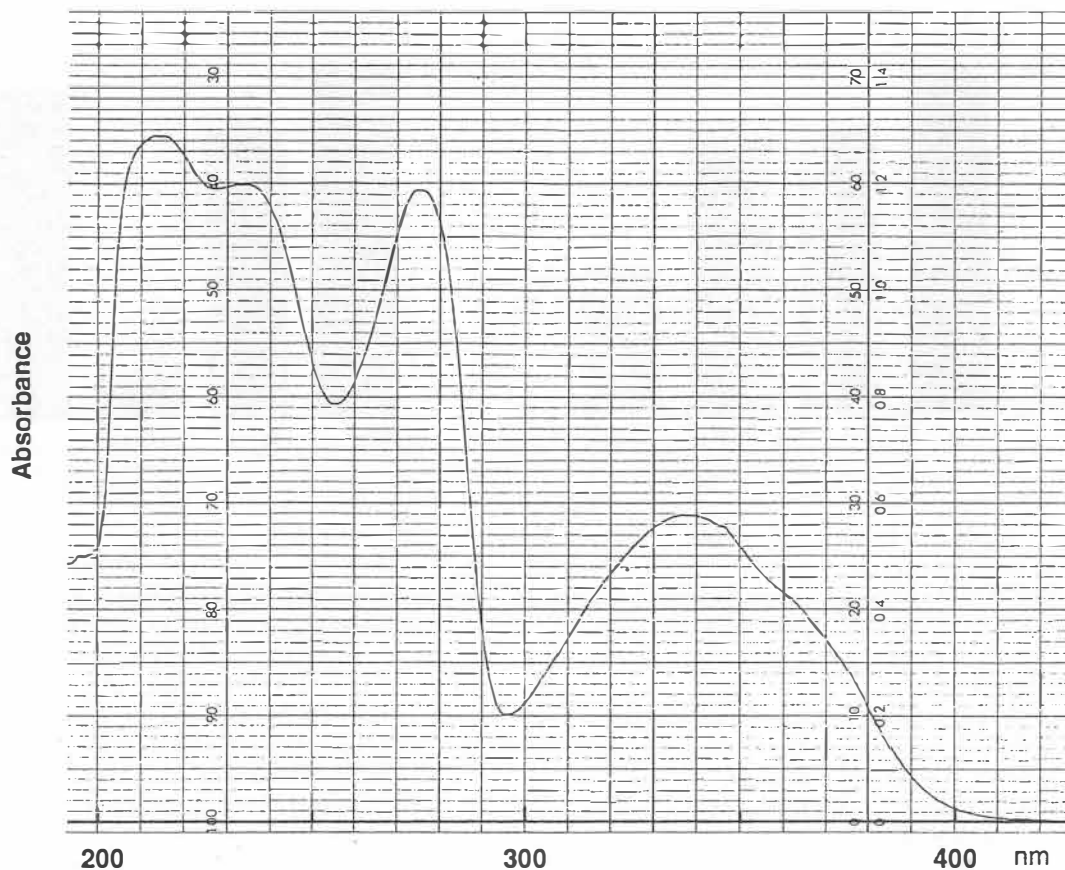


Fig.11 Absorption spectrum of the reduced form of neopterin

制に対しては防衛的に作用すると言う、矛盾した結果を示した。紫外線の傷害活性が活性酸素に起因することから、線維芽細胞での紫外線によるコラーゲン合成の抑制に対しても、当然、NPH4が防衛的に作用することが期待された。この実験では、紫外線のメラノーマ細胞でのDNA合成抑制作用と比較し、コラーゲン合成に対し紫外線が抑制作用を示すのに、大線量の照射を要することから、NPH4が照射中に酸化型ネオプテリン (NP) に変化した、あるいは紫外線を吸収し、コラーゲン合成に対し抑制作用を有する他の化合物に変化したことが考えられる。そこで、本実験では、NPH4の吸収スペクトルおよび紫外線に対する安定性を検討した。Fig.11より明らかなように、紫外

部 (300~400nm) に吸収波長を有するスペクトルを示した。また、Fig.12に示すように、UV-A照射に対するNPの安定性は極めて低く、 $2.0\text{mW}/\text{cm}^2$ の線量率で10分間の照射により、大部分のNPは分解消失した。また、NPH4についてもUV-Aに対し、極めて不安定であった。なお、分解産物については不明である。

### 3.7 ネオプテリンのチロシナーゼ活性に対する作用

ネオプテリンのチロシナーゼ活性に対する作用を検討したところ、酸化型および還元型ネオプテリン、いずれも $1.0\sim 1000\ \mu\text{M}$ の濃度範囲では、本活性には何ら作用しなかった。

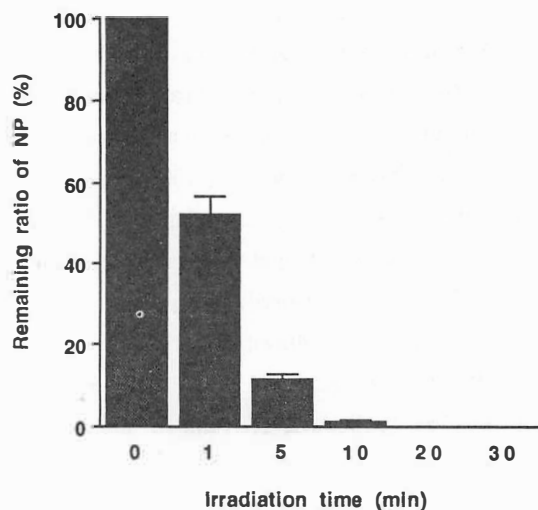


Fig. 12. Decomposition of the oxidized form of neopterin by UV-A irradiation as a function of time. One  $\mu\text{M}$  of the oxidized form of NP was irradiated for different times by UV-A at a dose of  $2.0\text{mW}/\text{cm}^2$ . Remaining NP at each time interval was assayed by Neopterin RIA kit. Each point was expressed as relative percent (%) of UV-A-irradiated sample to the non-irradiated sample and the mean  $\pm$  S.E.M. for 3 independent assays.

#### 4 考 察

これまで、紫外線による皮膚の炎症をはじめ、皮膚癌の誘発・増悪等に、照射後、皮膚内に発生する種々のROSが関与することが報告されている。すなわち、細胞に紫外線が照射されることにより細胞内の水分子は励起され、この後に続く連鎖反応により、種々のROSを生成、細胞膜の脂質過酸化等を介し、先に述べた種々の皮膚障害を発生するものと考えられている<sup>5-7)</sup>。

一方、ネオプテリンの抗酸化活性については、これまで私共が報告してきた通りである<sup>1-4)</sup>。そこで本研究では、紫外線の中でも、比較的、細胞に対する傷害活性が低い長波長紫外線(UV-A)を用い、ヒト線維芽細胞でのコラーゲン合成および

マウス・メラノマ(B-16)細胞でのDNA合成抑制に対するネオプテリン(NPH4およびNP)の作用を検討した。

ヒト線維芽細胞でのコラーゲン合成は大線量( $29\text{J}/\text{cm}^2$ )の紫外線照射により、非照射群に対し約30%の抑制がみられた。この抑制は還元型および酸化型ネオプテリンの、いずれによっても解除されず、むしろ増強された。一方、B-16細胞でのDNA合成は、 $1.2\text{J}/\text{cm}^2$  ( $2.0\text{mW}/\text{cm}^2$ で10分間照射)と極めて少線量の紫外線で非照射群に対し約30%の抑制が得られた。この紫外線傷害に対し、還元型ネオプテリンであるNPH4は用量依存的に抑制作用を示した。一方、酸化型ネオプテリンであるNPは低濃度領域では顕著な作用を示さないものの、高濃度( $100\mu\text{M}$ )では、その傷害をさらに一層促進した。紫外線の傷害活性が活性酸素に起因することから、線維芽細胞での紫外線によるコラーゲン合成の抑制に対しても、当然、NPH4が防御的に作用することが期待されたが、本実験では、反対にコラーゲン合成の抑制をさらに増強した。この理由としては、紫外線のメラノーマ細胞でのDNA合成抑制作用と比較し、コラーゲン合成に対する紫外線の抑制実験では、照射線量が $29\text{J}/\text{cm}^2$ と大線量の紫外線を用いるため、NPH4が照射中に酸化型ネオプテリン(NP)に変化した、あるいは紫外線を吸収し、コラーゲン合成に対し抑制作用を有する他の化合物に変化したことに起因すると考えられる。NPH4が極めて強い抗酸化剤であること、および、NPが活性酸素種を介した細胞毒性を高めると言うこれまでの報告<sup>8)</sup>から、本紫外線傷害モデルにおいても、これまでの報告のように、この傷害の発生にROSの関与が示唆された。そこで、B-16細胞での紫外線傷害に対する種々のラジカル・スカベンジャーの抑制作用を検討し、本傷害に関与するROSを推定した。この結果、過酸化水素に対するスカベンジャーであるカタラーゼのみに本傷害に対する回復作用がみられ、過酸化水素を介した細胞傷害が示唆された。この仮定は、紫外線に代えて、過酸化水素により惹起した

細胞傷害に対しても、ほぼ同様な結果を示したことから支持されると思われる。さらに、酸化型ネオプテリンの紫外線細胞傷害促進の機序としては、NPが紫外線照射により発生した過酸化水素の細胞傷害活性を上昇させた結果によると考えられる。

紫外線の細胞傷害に対するNPH4の抑制作用、およびNPの細胞傷害促進作用が明らかとなり、それぞれ紫外線暴露による皮膚炎症に対する防護剤、及び皮膚癌に対する紫外線治療の際には、その安定性が問題となる。そこで、ネオプテリンの紫外線に対する安定性を検討した。この結果、ネオプテリンはUV-Aの発光スペクトル領域である320～400nmに吸収スペクトルを有し、かつ本紫外線に対し極めて不安定であり、照射後、直ちに分解あるいは他の化合物に変化する事が明らかとなった。

以上、還元型ネオプテリンが紫外線傷害を抑制すること、一方、酸化型ネオプテリンがその傷害を促進することが明らかとなった。これらの作用は、それぞれ、皮膚の紫外線によるsunburnあるいはsuntan等の急性傷害に対する防護剤として、またNPを紫外線と組み合わせることにより、皮膚癌等の局所疾患の治療へ応用することが可能と思われる。

## 謝 辞

コスメトロジー研究振興財団より研究支援頂き、基礎研究を進める機会が与えられましたことを厚く御礼申し上げます。お蔭様で、当初の研究予定内容以外に、新たな結果を見出す事ができました。今後も、皆様方の御指摘ならびに、なお一層の御支援頂ければ幸いです。

## 引用文献

1) Kojima S, Icho T, Kajiwar Y, and Kubota K: Neopterin as an endogenous antioxidant. *FEBS letters* 304 163-166 1992.

- 2) Kojima S, Icho T, Hayashi M, Kajiwar Y, Kitabatake K, and Kubota K: Inhibitory effect of 5, 6, 7, 8-tetrahydroneopterin on adriamycin-induced cardiotoxicity. *J Exp Pharmacol Ther* 226 1699-1704 1993.
- 3) Icho T, Kojima S, Shinohara N, Kajiwar Y, Kitabatake K and Kubota K: Protective effect of tetrahydroneopterin against free radical-induced injury. *Biochem Pharmacol* 45 1953-1958 1993.
- 4) Kojima S, Nomura T, Icho T, Kajiwar Y, Kitabatake K and Kubota K: Inhibitory effect of neopterin on NADPH-dependent-superoxide generating oxidase of rat macrophages. *FEBS letters* 329 125-128 1993.
- 5) Ogura R, Sugiyama M, Sakanoshita T, and Hidaka T: Role of oxygen in lipid peroxide of skin exposed ultraviolet light. In: Hayashi O, Imamura S and Hiyachi Y (eds). *The Biological Role of Reactive Oxygen Species in Skin*, University of Tokyo Press, Tokyo, 1988, pp 495-471.
- 6) Ogura R and Sugiyama H: Cellular membrane damage and lipid peroxide following exposure of the skin to ultraviolet rays. In: Kligman AM and Takase Y (eds). *Cutaneous Aging*, University of Tokyo Press, Tokyo, 1988, pp 495-471.
- 7) Schellreuter KU and Wood JM: Free radical reduction in the human epidermis. *Free Rad Biol Med* 6 519-532 1989
- 8) Weiss G, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER, Werner-Fellmayer G, Semenitz E, Dierich H and Wachter H: Neopterin modulates toxicity mediated by reactive oxygen and chloride species. *FEBS letters* 321 89-92 1993.

# 哺乳類皮膚細胞のアポトーシスと 細胞接着をつかさどるセラミドの研究

九州大学 理学部

野村 一也

In this study, we showed that antibodies against human blood group B trisaccharides block  $Ca^{2+}$  dependent cell-cell adhesion of frog (*Xenopus laevis*) embryonic cells. We isolated several different novel pentaglycosylceramides with blood group B activity. The structure is novel in that it lacks N-acetylhexosamine in its core carbohydrate structure. By using two dimensional electrophoresis followed by western blot analysis, we identified two series of acidic proteins in 30-60 kDa range. We showed that one series of protein spots represents proteins with glycosyl phosphatidylinositol anchor (GPI-anchor). The effect of phosphatidylinositol specific phospholipase C on  $Ca^{2+}$  dependent cell-cell adhesion was tested and the enzyme treatment inhibited  $Ca^{2+}$  dependent adhesion of embryonic cells completely. From these experiments, we concluded the presence of novel GPI-anchored cell-cell adhesion molecules with human blood group B antigens. Blood group B active glycosylceramides were also detected in the nematode *Caenorhabditis elegans*. In the nematode and in frog cells, the blood group B active glycoconjugates colocalized with cadherins. The colocalization is observed in nematode nervous cells and in frog embryonic cells and in skin cells. The cadherins and blood group B active glycoconjugates seem to be forming supramolecular complex on cell surface. On the basis of our findings, it now seems possible to isolate homologous glycoconjugates (especially GPI-anchored glycoproteins) from mammalian skin cells. Isolation of mammalian homologues of these novel GPI-anchored glycoproteins and glycosylceramides of frog cells will certainly shed light on the mechanism of skin cell adhesion, thus deepening our understanding of the dynamic nature of homeostasis of skin cells through differentiation and apoptosis. The possible interaction of signaling pathways through ceramide, cadherin and diacylglycerol is also discussed.

## 1 緒言

私達はアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の初期胚 (卵母細胞から胞胚まで) におけるカルシウムに依存した細胞接着が、ヒトのABO式血液型物質の一つであるB型物質に対する抗体で完全に阻害されることを明らかにした。

カルシウムを除いて細胞一個一個がバラバラになるように解離したカエルの胚細胞はカルシウムを加えてやると15分から1時間程度で接着を始め大きな凝集塊を形成する。この実験でカル

シウムの他にヒトB型血液型物質に対する抗体を加えておくといくら待っても細胞は凝集塊を形成せず、バラバラのままである。この後抗体を洗い流してやると細胞は急速に接着をするようになり大きな凝集塊を形成する。抗体の代わりにヒトB型血液型糖鎖自体を加えると拮抗阻害により同様に細胞の接着は破壊された。これらの実験により従来機能が無いと考えられていたヒトB型血液型糖鎖は非常に意外なことにカエルでは細胞接着分子として機能していることが確実となった<sup>1)</sup>。

ではこのB型血液型糖鎖はいったいどのような分子上に存在しているのだろうか？ヒト血液型B型物質は主としてアフリカツメガエルの初期胚の膜上に存在する糖蛋白質と糖脂質上に存在しており、その中の糖脂質について構造決定を行ったところ、全く新しい構造を有する5糖の中性糖脂質であることが判明した (Fig.1)<sup>1)</sup>。このグリコシルセラミドはどのようにして細胞接着に機能し

Study on novel glycosylceramides mediating cell-cell adhesion of mammalian skin cells-their possible involvement in apoptosis  
Kazuya Nomura  
Department of Biology, Faculty of Science, Kyushu University



**Gal $\alpha$ 1-3**

**Gal $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1'Cer**

**Fuc $\alpha$ 1-2**

Fig. 1 Novel glycosylceramides found in frog (*Xenopus* leaves) embryonic cells

ているのだろうか？またB型糖鎖を含有している糖蛋白質はどのようなものでどのように細胞接着に関与しているのだろうか？代表的なカルシウム依存性細胞接着分子であるカドヘリンとは一体どのような関係にあるのだろうか？

アフリカツメガエル初期胚でみつかったB型糖鎖含有グリコシルセラミドとB型糖鎖含有糖蛋白質はツメガエルの皮膚細胞にも存在しておりその機能が皮膚細胞の分化と恒常性の維持に重要な役割を果たしていると考えられる。本研究ではカエルの細胞接着に重要な役割を果たしているこれらB型糖鎖含有複合糖質の研究を通じて哺乳類の皮膚細胞における相同分子の手がかりを求め、これら分子の細胞接着とアポトーシスへの寄与の可能性を追求した。

## 2 実験

### 2.1 モノクローナル抗体の作成

P3U1ミエローマ細胞と免疫感作したBalb/cマウスの脾臓細胞をポリエチレングリコール4000（メルク・ガスクロマトグラフィーグレード）によって融合させることでハイブリドーマを得た。融合は文献<sup>2)</sup>に正確に従った。目的とするクローンをスクリーニングの後、限外希釈法でクローニングしハイブリドーマを得た。抗原としてヒトB型糖鎖に対するモノクローナル抗体の作成にはヒトB型赤血球・豚B型ムコ多糖・アフリカツメガエル胎胚膜フラクションを用いた。カエルのXBカドヘリンに対するモノクローナル抗体の作成にはクローニングしたXBカドヘリンの遺伝子をマウスの皮

膚由来線維芽細胞L929細胞にトランスフェクトした細胞を用いた。スクリーニングの方法としてはB型糖鎖の場合は96穴それぞれの培養上清をELISAプレートに100 $\mu$ l入れこれに1 $\times$ 10<sup>5</sup>ヶのB型ヒト赤血球を加え直ちにプレートごと遠心する。赤血球に対する抗体含む上清を加えた穴では赤血球の凝集が遠心終了直後からはっきりと観察できる。この迅速スクリーニング法を採用してからは百発百中で候補を見つけることが出来るようになった。また候補がB型物質に特異的であるかどうかはO型赤血球やA型赤血球を凝集しないことで確認しさらにB型糖脂質との反応性で最終的確認を行った。XBカドヘリンに対するモノクローナル抗体のスクリーニングには培養上清を96穴培養皿にいれ同時にEDTAで解離した1 $\times$ 10<sup>5</sup>ヶ程度のXBカドヘリンを発現させたマウス皮膚由来L929細胞を同時にまきこんだ。1日培養した後細胞と細胞の接着が阻害されている穴を選び同様の実験を再度くりかえすとともに抗体の産生の有無をチェックした。さらに候補の穴で産生される抗体を使いウエスタンブロッティングして確認した。

### 2.2 糖脂質と糖蛋白質の分析

得られた抗体や本研究で用いた抗体がどのような抗原を認識しているかをさまざまな方法で調べた。糖脂質についてはFolch分配法で抽出分離した後、薄層クロマトグラフィー法で展開した<sup>1)</sup>。この薄層プレートに抗体液を重層して一晩放置したうえでよく洗い流し、つぎにアルカリフォスファターゼ標識の二次抗体をかけて数時間以上放置し、この二次抗体をよく洗い流した後BCIP/NBTの発色剤で発色して観察した。

蛍光抗体法には3%パラホルムアルデヒドで固定した胎胚のクライオスタット切片を作成し、抗体と数時間インキュベートした後よく洗いFITC標識の二次抗体をかけて更に数時間インキュベートした。この切片をよく洗った後レーザー共焦点顕微鏡（Zeiss LSM410）で観察した。またウエスタンブロッティング法は通常の7.5%ゲルに

よるSDS電気泳動の後、セミドライのプロットティング装置でニトロセルロース膜に転写するという方法で行った。転写の効率のモニターは色素染色済みの分子量マーカをつかうとともにボンソーSによる膜の可逆的染色法により行った。二次元電気泳動にはPharmacia Biotech社製のMultiphor IIシステムを使い、一次元目の等電点電気泳動にはImmobiline Dry strip (PI 3.0-10)、二次元目のSDS電気泳動にはExcel Gel SDS precast gradient gelを利用した。プロットティングはフィルムリムーバーでゲルをはがした後、ATTO社製のセミドライプロットティング装置で行った。

### 3 結果

#### 3.1 B型糖鎖に対するモノクローナル抗体の作製

B型糖鎖に対する市販のモノクローナル抗体はカエルのカルシウム依存性細胞接着を完全に阻害する。しかし市販品の利用は抗体のアフィニティークロマトグラフィーなどへの利用などを考えると経済的ではない。そこで自前で強力な抗B型血液型物質に対するモノクローナル抗体を作成した。こうして得られた抗体はB型ヒト赤血球を特異的に凝集する他、胞胚解離細胞のカルシウム依存性細胞接着を完全に阻害し、さらに胞胚のクライオスタット切片をそめてみると見事に膜表面を染色した。また数種類のB型糖鎖含有糖蛋白質に対して特異性の違う抗体が得られた。さらに面白いことにヒトB型糖鎖の抗体を作製するには、カエルの膜フラクションがもっとも抗原性の点から適していることもわかった。

#### 3.2 ヒト血液型B型糖鎖を含む複合糖質の同定

カエルの初期胚に存在するB型糖鎖含有複合糖質は糖蛋白質と糖脂質からなる。それぞれどのような分子がB型糖鎖を付加されておりどのように細胞接着に関与しているのだろうか？これを調べるため糖脂質と糖蛋白質の分析を行った。糖脂質の方の主要分子としてはFig. 1に示した中性のグ

リコシルセラミドがある。セラミドの部分の脂肪酸の組成にのみ違いのある2種類の中性糖脂質、および糖鎖の数の多いもう1種合計3種類の主要なB型糖鎖含有中性糖脂質が存在することが判明した。膜表面に存在するこれらのB型糖鎖含有糖脂質はかなり大量に存在する糖脂質でありその存在量の多さは重要な機能の存在をうかがわせる。A型糖鎖含有複合糖脂質もごくわずかながら存在するがB型糖鎖含有糖脂質に比べると0.1%以下しか存在せず、またB型糖鎖を含む極微量のガングリオシドも検出したがあまりにも微量のためにその構造解析は不可能であった。

次にB型糖鎖を含有する糖蛋白質については二次元電気泳動法と抗B型糖鎖モノクローナル抗体を利用したウエスタンプロットティングで解析した。

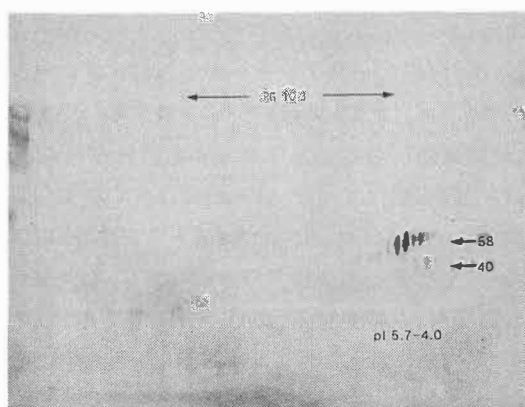


Fig. 2 Novel blood group B active proteins separated by two-dimensional electrophoresis

Fig. 2に示すように分子量30-60kDaにわたる複数種の蛋白質がアフリカツメガエルの膜フラクションに存在していることがわかった。これらはfucosidaseやgalactosidaseなどB型糖鎖を消化する酵素で抗原性が失われるのでB型糖鎖を含有していることが確認できた。またこれらの蛋白質はカエルの皮膚細胞にも存在することが分かった。このようにB型糖鎖を有する数種類の分子が存在するわけだがこれらはいったいどのような性質を

もった分子なのだろうか？

### 3.3 B型糖鎖含有糖蛋白質の性質の解明

アフリカツメガエルの膜を脱脂質するとB型糖鎖に対する抗体による蛍光染色性がかなり弱まることがわかった。これはグリコシルセラミドが膜から失われることによると当初は考えた。確かにグリコシルセラミドは脂質をぬく操作(クロロホルム、メタノール、水による抽出<sup>1)</sup>)をすると失われるが、念のために蛋白質もこの操作で抽出されないかどうか調べてみた。すると面白いことに二次元電気泳動で検出されるFig. 2の膜タンパク質群の中で分子量の高い方の一群の糖蛋白質が消えてしまうことが判明したのである。脂質と同じような操作で抽出される蛋白質としてはGPI(glycosylphosphatidylinositol)アンカー型蛋白質が考えられる。そこでさっそくこれら抽出される蛋白質が、GPIアンカー型蛋白質かどうかを調べてみた。結果は明確で、GPIアンカー型蛋白質を特異的に二相分配できる界面活性剤Triton X114で膜を抽出すると、B型糖鎖を含む糖蛋白質はTriton X114がわに分配され、さらに膜をGPIアンカーを特異的に切断する酵素であるphosphatidylinositol特異的phospholipase C (PI PLCと略)で処理するとこれらは水層側に分配されることが判明した。この酵素は蛋白分解酵素活性はなく、かつ極めて特異的であるのでB型糖鎖含有糖蛋白質の分子量高い一群はGPIアンカー型糖蛋白質であると結論された。

### 3.4 GPIアンカー型B型糖鎖含有糖蛋白質は細胞接着に関与している

このGPIアンカー型B型糖鎖含有糖蛋白質は細胞接着に関与しているのだろうか？幸いなことにPI PLCは中性付近のpHで活性が保たれており、かつカルシウム存在下でその活性があまり阻害されない。そこでカルシウムを除いて胞胚を単一細胞にまで解離し、これにカルシウムを加えて再凝集させる実験系(緒言参照)にこの酵素を加

えて接着活性に対する効果のみてみた。その結果は劇的で酵素処理した割球は全くカルシウムがあっても接着せず、カルシウム依存性細胞接着性は完全に酵素処理で失われてしまった。また酵素を除いてよく洗い2時間程度回復させると接着能は回復した。この実験からアフリカツメガエルの初期胚の細胞接着にはB型糖鎖を付加されたGPIアンカー型蛋白質が接着分子として働いていることがわかった。現在この分子の部分的アミノ酸配列の決定を試みようとしているところである。

### 3.5 B型糖鎖とカドヘリンは相互作用している可能性が高い

カドヘリンはカエルでは120-140kDa程度の大きな分子量をもつ膜一回貫通型蛋白質でB型糖鎖は付加されていない。しかしカルシウム依存性細胞接着の主要分子と考えられており私達の発見したB型糖鎖含有複合糖質はこのカドヘリンと相互作用している可能性が高い。そこでこの可能性の追求のためにまずカエルの胞胚型カドヘリンに対するモノクローナル抗体を作製した。方法としては哺乳類皮膚細胞としてマウスの皮膚由来の線維芽細胞であるL929細胞をえらび、これに熊本大学の但馬達哉助手と私たちの共同研究の結果えられたアフリカツメガエルの初期胚型カドヘリン(XBカドヘリン)の完全長遺伝子をリポフェクチンを利用してL929細胞に導入(京都大学医学部永淵昭良先生のプロトコルによる導入ベクターを用いた。)し、カルシウム依存性細胞接着能を有しかつ約119kDaのXBカドヘリンを発現している細胞株をクローニングした。この細胞を用いてマウスを免疫感作しカエルのXBカドヘリンに対するモノクローナル抗体11Dを得た。B型糖鎖に対するモノクローナル抗体とカドヘリンに対するモノクローナル抗体で二重染色するとアフリカツメガエルの胞胚や皮膚細胞ではカドヘリンとB型糖鎖が同一の細胞接着部位に存在していることが分かった。

この実験からカドヘリンとB型糖鎖が皮膚細胞や胎胚細胞で局在性を同じにして相互作用している可能性が強く示唆されたわけである。私達はB型糖鎖はカドヘリンと細胞膜上で超分子複合体を形成しているものと考え現在弱い相互作用を検出できる量子プラズモン共鳴を用いたバイオセンサー（BIAcore）を利用し、B型糖鎖とカドヘリンの結合定数の決定を行っているところである。

### 3.6 哺乳類皮膚細胞での細胞接着分子とアポトーシスの関係の解明に向けて

アフリカツメガエルを用いて得られた以上の結果は胎胚の細胞や皮膚の細胞においてGPIアンカー型のB型糖鎖含有糖蛋白質が存在しておりカドヘリンと超分子複合体を形成しながら、細胞接着に機能していることを強く示唆している。現在までのところカドヘリンと相互作用する分子としては両生類や哺乳類・鳥類などすべての脊椎動物で細胞質側で結合するカテニン類が知られている。私達が発見したようにグリコシルセラミドやGPIアンカー型蛋白質が、皮膚の細胞を含む多細胞生物の細胞において、カドヘリンと相互作用していることはまったく知られていなかったのである。この研究の遅れの原因の一つはグリコシルセラミドの研究者でカドヘリンとの関連を追及する研究者が私達以外皆無であったこと、もうひとつはGPIアンカー型蛋白質やグリコシルセラミドのカドヘリンとの相互作用が、糖鎖-蛋白質の相互作用であるため比較的弱く、通常の免疫沈降反応では複合体として落ちてこなかったことによると思われる。ツメガエルの細胞接着機構は哺乳類の皮膚細胞の接着機構とカドヘリンに関する限り完全に同一であり互換性を有することが知られている。本研究の結果、カドヘリンと相互作用すると考えられる新しいグリコシルセラミドとGPIアンカー型糖蛋白質が同定できた訳で、これらの分子の相同分子を哺乳類皮膚細胞で検索同定できる可能性は極めて高い。

カドヘリンが相互作用する相手のB型糖鎖含有

糖蛋白質がGPIアンカー型糖蛋白質であることは細胞接着にPhospholipaseCやdiacylglycerolを介した信号伝達系が関与していることをうかがわせる。カドヘリンを介する信号伝達系としてはショウジョウバエのwingless相同分子からカテニンへの信号の流れが詳しく解明されており、さらに成長因子であるEGFのリセプターがカドヘリンと膜上で会合している可能性が指摘されている<sup>3)</sup>。そこでEGFをカエルの細胞にかけてみた。

B型糖鎖の発現量は細胞周期に依存しており通常は全細胞集団の20%程度でG1初期とG2、M期にのみ発現している。だがこの成長因子をかけると24時間で発現量は100%に増加した。この事実はB型糖鎖の発現がEGFからの信号伝達とうまく共役していることを示唆している。この信号伝達系はGPIアンカーと共役しているのだろうか？二次元電気泳動を利用して判明したGPIアンカーでない高分子量側の分子群がEGFリセプター自体である可能性も検討中である。phospholipase Cやdiacylglycerolを介した信号伝達系の細胞接着への関与の可能性は細胞接着における信号伝達系のクロストークの観点から極めて興味深い。また成長因子を培養液から除去した際に生ずるアポトーシスにおいてカドヘリンの機能はどう変化するのか、またこのアポトーシスにおいてB型糖鎖を有するグリコシルセラミドがどのような変化をみせるのかなどを詳細に調べることで、哺乳類皮膚細胞とカエル皮膚細胞・カエル胚細胞に共通した細胞接着とアポトーシスの実態が解明できるものと期待される。

### 3.7 グリコシルセラミドとカドヘリンの関係の線虫を用いた解析

線虫（*C. elegans*）は現在最も遺伝子レベルで解析の進んでいる生物である。その全ゲノムDNAの塩基配列決定計画はヒトゲノムプロジェクトをリードするかたちで進んでおり数年以内には確実に全ゲノムの塩基配列が決定されるはずだし、体を構成する細胞1000個あまりがどのように分裂し

て発生するかという細胞系譜が完全に判明している。また神経細胞（といっても300個ほどしかない）の配線図がほぼできあがっていることも他の生物の研究の追隨を許さない。さらに突然変異の系統の蓄積・遺伝解析の進歩も他に類をみない利点である。この生物は下等とはいえ、さまざまな哺乳動物と共通の遺伝子を機能させている。最近では癌遺伝子rasへの信号伝達系路の解明に大きく貢献したことは記憶に新しい<sup>4)</sup>。この線虫にもカドヘリンやグリコシルセラミドはあるのだろうか？もしこの生物にグリコシルセラミドがあり、またあわよくばB型糖鎖を持つグリコシルセラミドがあればグリコシルセラミドの合成系路の研究や遺伝子発現の制御機構の研究がゲノムプロジェクトやミュータントの蓄積を利用して飛躍的に進むと予想できる。その結果はほとんどの場合ただちに哺乳類にフィードバックできるであろう。この期待のもとに線虫のグリコシルセラミドの研究を開始したところ大変期待できる結果が得られた。

線虫を大量培養したうえで超音波破碎して脂質をFolch分配<sup>5)</sup>により抽出した。薄層クロマトグラフィーで脂質を展開し糖を染色するオルシノール試薬で発色すると各種の糖脂質が存在することが判明した。さらに薄層クロマトグラフィープレート上での抗体染色法によって検討した結果酸性糖脂質分画ではなく中性糖脂質分画にさまざまなB型糖鎖含有糖脂質が存在することが判明した。これらの脂質がB型糖鎖構造をもつことはこれらの脂質を $\alpha$ ガラクトシダーゼや $\alpha$ ガラクトシダーゼで処理して染色性が失われることで確認した。ヒト血液型B型糖鎖が線虫*C. elegans*に存在すること（しかしA型糖鎖やO型糖鎖も確認できなかった。）はB型血液型糖鎖が非常に基本的な役割を果たしていることを強く示唆している。さらに面白いのは、古典的カドヘリンとよばれるカドヘリン一般に対する抗体が咽頭の神経を染色しさらにその神経細胞にB型糖鎖が局在しているという結果である。このことはカエルで確認したカドヘリン

とB型糖鎖の相互作用という事実がさらに一般的に成立することを強く示唆している。線虫はアポトーシスの研究がもっとも進んでいる生物であり、アポトーシスの抑制遺伝子ced-9やアポトーシスを引き起こす遺伝子ced-3のホモログとしてそれぞれ、ヒトのアポトーシスにかかわるbcl-2やinterleukin 1 $\beta$  converting enzyme (ICE)などが解明されてきている<sup>6)</sup>。これらのアポトーシスの研究の蓄積を利用してグリコシルセラミドとカドヘリンのアポトーシスへの関係を解明し哺乳類皮膚細胞のグリコシルセラミドとアポトーシス、そして細胞接着の関連の解明を行いたいと考えている。

#### 4 考 察

カエルと線虫は哺乳類とは一見かけ離れた研究材料であるが、意外に哺乳類の研究に役立つものである。皮膚細胞の細胞接着とアポトーシスを媒介するであろうグリコシルセラミドやセラミドの研究の過程で、私達は細胞接着分子であるカドヘリンと相互作用している新しいグリコシルセラミドとGPIアンカー型糖蛋白質の存在を明らかにした。これらがカエルのみならず哺乳類細胞にも存在することはほぼ確実であると考えられ今後GPIアンカー型糖蛋白質の部分的アミノ酸配列の決定による遺伝子の単離をおこない、その遺伝子を利用して哺乳類皮膚細胞での相同分子を同定する計画である。またカエルと線虫での研究をさらにすすめて哺乳類におけるアポトーシスと細胞接着におけるGPIアンカー型糖蛋白質の機能の解明を行い、カドヘリンを介した細胞接着とそれに関わる信号伝達系のネットワークを解明したいと考えている。

#### 謝 辞

本研究を多方面にわたり支援していただきましたコスメトロジー研究振興財団に心から感謝いた

します。またこの研究のあらゆる局面で相談にのっていただきました理化学研究所国際フロンティア・糖細胞情報のチームリーダー平林義雄先生、九州大学農学部伊東信先生、京都大学農学部山本憲二先生、その他私たちのすべての共同研究者の方々に感謝いたします。また当時ケンブリッジ大学におられたChris Wylie教授とJanet Heasman博士、Adrian Turner博士には筆者の目を糖鎖生物学に向けさせていただいたことについて心からの感謝を捧げます。

### 引用文献

- 1) K. Nomura et. al. *Biochemical J.*, 306 821-827 1995
- 2) 細胞免疫実験操作法、川口進・原田孝之訳理工学社 第17章
- 3) H. Hoschuetzky et. al. *J. Cell Biol.*, 127 1375-1380 1994
- 4) 形態形成にかかわる遺伝子群(蛋白質・核酸・酵素 増刊)、西田育巧 他編、共立出版、178-190.
- 5) R. L. Schnaar and L.K. Needham, *Methods in Enzymology*, Vol.230, p371. Academic Press, New York, 1994.
- 6) アポトーシス実験プロトコール、田沼靖一監修、細胞工学別冊、秀潤社

# 皮膚生理機能賦活物質の合理的吸収促進法の開発

京都大学 薬学部

橋 田 充

Effectiveness of prodrug-enhancer combination for enhancement of skin penetration of drugs is proposed and confirmed in this study. Based on a skin diffusion model, we hypothesized that skin permeation of drug could be the most effectively enhanced by derivatizing into a prodrug with the optimal lipophilicity for the enhancer, when its action mechanism is elucidated in the same model. Employing acyclovir as a model drug, the hypothesis was proved by synthesizing seven types of its prodrugs and evaluating their *in vitro* permeation in rat skin, pretreated with 1-geranylazacycloheptan-2-one (GACH), a penetration enhancer. Among seven prodrugs, those with higher lipophilicities (propionate, butyrate, valerate, and hexanoate isovalerate, pivate prodrugs) showed larger enhancement in their skin penetration than those of hydrophilic ones (acetate and acyclovir), when administrated in combination of GACH. In this approach, prodrugs applied topically were metabolized through the skin, since skin was metabolically active tissues. We have proposed that a two-layer skin diffusion model with polar and nonpolar route in the stratum corneum, which included metabolic process in the viable epidermis and dermis, could comprehensively account for skin permeation of acyclovir prodrugs. Concerning the effect of GACH, the estimated partition parameters of prodrugs in the nonpolar route increased with an increase in pretreatment dose of GACH, but their diffusivities were little affected being in good agreement with the theoretical prediction. In addition, GACH was significantly decreased the enzymatic hydrolysis rate constants of all prodrugs in the skin. These experiments have been studied with an *in vitro* condition, and a goal of *in vitro* studies is the prediction of *in vivo* absorption behavior. We previously demonstrated quantitative *in vitro/in vivo* differences in skin penetration in terms of diffusion and partition parameters. However it has not been established these differences concerning metabolic process. So we demonstrated to quantitate *in vitro/in vivo* differences in skin penetration and bioconversion of acyclovir prodrugs. In order to confirm the possibility of this combination approach with an *in vivo* condition, penetration profiles was evaluated by a deconvolution method which enabled to estimate first-pass metabolism. Next we analyzed *in vivo* skin urinary excretion profile based on a diffusion/bioconversion model, and diffusion, partition and metabolic parameters were compared between *in vitro* and *in vivo* condition.

In conclusion, skin permeation of prodrugs applied with an enhancer can be predicted and optimized based on a model analysis. This combined approach would be applicable to a wide range of drugs, since extreme alteration of physicochemical properties of drugs is not necessary as is the case of single prodrug application.

## 1 緒 言

近年、皮膚の老化防止などスキンケアを目的とした生理機能賦活物質に対する期待が高まる中で、これら物質に対する皮膚浸透性の改善が重要

な課題となってきた。しかしながら、吸収促進法を利用した処方設計は試行錯誤的に進められているために促進効果も不十分であり、現在、吸収とその促進を総合的に議論することができる合理的設計理論の確立が強く望まれている。我々はこれまでに皮膚の生理学的、解剖学的特性に基づいて構築した皮膚拡散モデルを用いて薬物物性と経皮吸収動態および経皮吸収促進剤の作用機構を統一的に解析することに成功している<sup>1, 2)</sup>。

こうした数学的基盤に基づきAzone類似体の中から最も優れた促進作用を示した吸収促進剤、1-geranylazacycloheptan-1-one (GACH) が0.5程

Development of Theoretical Design  
for Skin Penetration Enhancement of  
Drugs

Mitsuru Hashida

Faculty of Pharmaceutical Sciences  
Kyoto University



## 2 実験

度のオクタノール/水分係数を有する薬物（生理活性賦活物質）に対して最も有効であることを明らかにした<sup>1, 2)</sup>。しかしながら、実用的側面から見た場合、多様な物理化学的特性を有する薬物に対し普遍的に適用可能な吸収促進のアプローチの確立が望まれる。そこで、そのままでは促進剤の効果が期待できない物性を有する薬物に対しても、プロドラッグ化修飾を施し適当な物性を付与することにより促進剤の効果を最大限に発揮することが可能になると考えた。こうした薬物（生理活性賦活物質）分子の理論的設計による新規吸収促進法の最適化について検証するために、臨床上のニーズが大きい抗ウイルス剤のacyclovirをモデル薬物として脂溶性の異なる6種類のプロドラッグを合成し、実際にラット腹部除毛皮膚を用いて *in vitro* 皮膚透過実験を行なった<sup>3, 4)</sup>。

次に皮膚は薬物透過に対するバリアーとしての機能に加えて、高い薬物代謝能も備えていることから、実際にプロドラッグとして投与した場合には、皮膚内代謝を考慮した総合的評価が必要であると考えられる。そこで代謝過程を考慮した皮膚拡散モデルを構築し、プロドラッグの経皮吸収動態およびGACHの促進メカニズムについて代謝過程を含めて検討し機構面からも本設計理論の妥当性を検証した<sup>5)</sup>。さらに、こうした *in vitro* 皮膚透過実験の最終目的は *in vivo* における吸収の予測にあると考えられるが、未だ代謝を伴う薬物の *in vivo* 経皮吸収動態の評価に関する報告は少なく、代謝過程を考慮した両実験系の違いを定量的に把握することが必要であると考えられる<sup>6)</sup>。そこで、*in vivo* 条件下でのプロドラッグから親薬物への変換過程を考慮した総合的な検討を行なうことを目的として、プロドラッグのような皮膚中で代謝される薬物に対しても適用可能な deconvolution法を開発し<sup>7)</sup>、吸収の各過程のレベルでそれぞれの薬物について動態を分離評価を行ない本設計理論の *in vivo* での有用性を検討した。

### 2.1 試薬

acyclovir(AC) は日本ウエルカム株式会社より供与されたものを用いた。<sup>3</sup>H]ACは第一化学薬品より購入した。1-geranylazacycloheptan-1-one (GACH) は株式会社クラレより供与されたものを用いた。4-dimethylaminopyridineおよび炭素数の異なるacyl chlorideは、ナカライテスク株式会社より購入した。その他溶媒、試薬は特級品を用いた。

### 2.2 プロドラッグ設計のシミュレーション

促進剤無処理および処理条件における、薬物自身の物性と皮膚透過量との関係を、皮膚拡散モデルに基づいた理論式と従来の解析結果のパラメータを用いてシミュレーションした。薬物は水溶液の形で投与した場合を想定し、促進剤は角質層非極性経路への薬物の分配を増加させると仮定した。

### 2.3 ACプロドラッグの合成とオクタノール/水分係数の測定

溶媒にN, N-dimethylformamide 10mlを用い、4-dimethylaminopyridineを塩基としてAC 1 mmolと3等量の炭素数の異なる直鎖のacyl chlorideを48hr室温で反応させた。溶媒を減圧留去後、NaOH溶液(pH9.0±0.2) 15mlを加え沈殿をろ取する。得られた粗結晶をNaOH溶液で洗浄後、エタノール溶液中で再結晶した<sup>3, 4)</sup>。過剰量のプロドラッグを37°Cで48hr攪拌し、水およびオクタノールに対する溶解度を測定した。オクタノール/水分係数はそれらの比から計算した。

### 2.4 *In Vitro* 皮膚透過実験

Wistar系雄性ラット(体重約200g)をpentobarbital(40mg/kg, i. p.)で麻酔下、その腹部を除毛し、ラットを屠殺後皮膚を摘出し、皮下脂肪を取り除いた後、flow-through型拡散セルに装着した

3-6)。ドナー側をGACHのエタノール溶液で6hr前処理後、各薬物懸濁液1mlを投与した。レセプター側は常に6ml/hrでpH7.4リン酸塩緩衝生理食塩水を灌流し、60分毎に12時間レセプター側流出液をサンプリングした。

## 2.5 *In Vivo* 皮膚透過実験

*in vitro* 経皮吸収実験は基本的に *in vitro* 吸収実験と対応した形で行なった<sup>6)</sup>。プロドラッグとしては valerate およびその構造異性体である isovalerate、pivate を用いた。Wistar 系雄性ラット (体重約200g) を urethane (1g/kg, i. p.) で麻酔下、その腹部をバリカンで除毛後、円筒状のガラスセル (有効表面積 3.14cm<sup>2</sup>) をアロンアルファA (三共株式会社) を用いて除毛部位に固定し、膀胱にビニールチューブ (i. d. 0.50mm, o. d. 0.90 mm; Dual社) を挿入した。促進剤のエタノール溶液で6hr前処理後、ドナー側に薬物水溶液1ml (0.018MBq) を投与し、ACおよびプロドラッグの尿中排泄量を経時的に測定した。尿のサンプリングはサンプリング時間の前に生理食塩水0.2mlをカニューレを介して1回注入し、膀胱内を洗浄することにより行なった。

## 2.6 静脈内急速投与実験

Wistar系雄性ラット (体重約200g) を urethane (1g/kg, i. p.) で麻酔下、*in vivo* 経皮吸収実験と同様膀胱カニューレを施し、ACおよびプロドラッグの生理食塩水溶液0.2mlを大腿静脈より急速投与した後、ACおよびプロドラッグの尿中排泄量を経時的に測定した。

## 2.7 deconvolution法

経皮投与されたプロドラッグが、尿中に排泄されるまでの過程をFig.1に示した。まずプロドラッグを経皮投与した時のプロドラッグの尿中排泄速度を、プロドラッグ静注後のプロドラッグ尿中排泄速度  $G_p(t)$  を用いて deconvolution を行ないプロドラッグ自身の皮膚透過量を算出する。次にこのプロドラッグの経皮吸収速度  $F_p(t)$  をプロドラッグ静注後のAC尿中排泄速度  $G_{p,d}(t)$  を用いて convolution を行ないプロドラッグとして皮膚を透過後、体内で代謝されたACの尿中排泄速度を算出する。最後に実験により求めたプロドラッグを経皮投与した時のACの尿中排泄速度から convolution により求めたACの尿中排泄速度を引くことにより、皮膚中で代謝されそのまま尿中に排泄さ

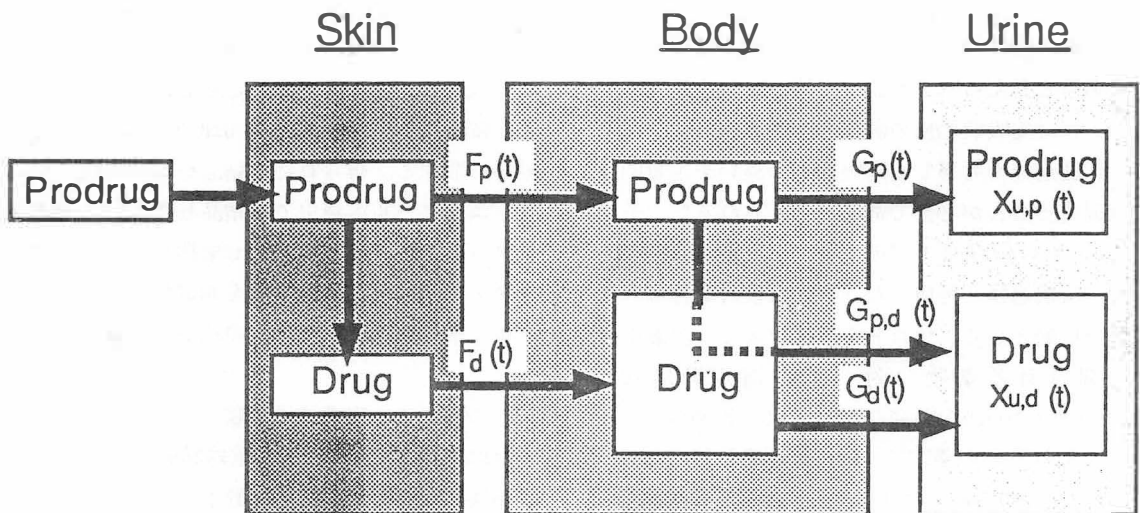


Fig.1 Pharmacokinetic Model to Estimate Prodrug Penetration through the skin after *in Vivo* Percutaneous Application Using Deconvolution Method

れたACの尿中排泄速度を算出し、この値に対してACを静注後のACの尿中排泄速度 $G_d(t)$ を用いてdeconvolutionを行ないプロドラッグ投与後のACの皮膚透過量を算出した。

## 2.8 モデル解析

角質層に極性経路と非極性経路を考え、角質層以下の層で酵素による親薬物への1次速度式で表される変換過程を仮定した1枚膜皮膚拡散モデルを構築してFickの拡散式を解き、ラプラス次元での累積透過量の式を誘導した。さらにこれらの式を高速ラプラス逆変換アルゴリズム (FILT) を利用した非線形最小二乗法プログラムMULTI (FILT) を用いて累積透過曲線に当てはめ、各パラメータを算出した<sup>1, 5)</sup>。

## 3 結果・考察

### 3.1 プロドラッグ設計のシミュレーション (4)

Fig. 1は、解析結果に基づくシミュレーションにより予測されるfinite投与条件下における対象薬物の透過量と脂溶性の関係を整理したもので正常皮膚において、水/オクタノール間分配係数の対数値が約2となる薬物が最も高い皮膚透過量を与えることが示されている。一方GACHによる皮膚の前処理は、この曲線を左に大きくシフトさせることによって、極性の比較的高い薬物の皮膚透過を大きく促進することが示されている。しかしながら、極性が非常に大きいacyclovirに対しては、GACHの効果は依然不十分であることも本図は示しており、そこで我々はGACH処理に加えてacyclovirをプロドラッグ化し、両者の組み合わせで吸収促進を実現することを試みた。Fig. 1に示すようにacyclovirの吸収改善を化学構造の修飾のみで実現するためには、脂溶性を分配係数の対数値で-2付近から2付近まで1万倍も上げる必要があるのに対して、このアプローチでは、物性の変更を最小限にとどめることが可能であるため、皮膚透過性に重要な分子サイズ等の制限を受ける

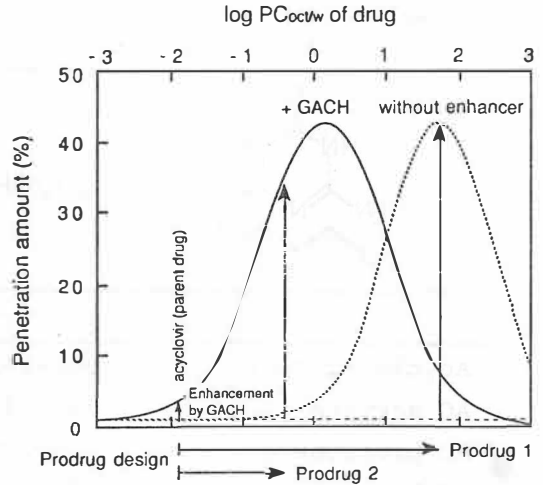


Fig. 2 Relationship between octanol/water partition coefficient of drugs and skin penetration with or without GACH calculated with penetration parameters reported previously (1). Dotted and solid lines represent skin penetration without and with GACH, respectively. Skin penetration is expressed as the amount of drug penetrating within 24 hr in the finite dose system. The following parameters were used in this simulation:  $D_p/Ls^2=40$  ( $hr^{-1}$ );  $D_{np}/Ls^2=1.5$  ( $hr^{-1}$ );  $D_d/Ld^2=0.06$  ( $hr^{-1}$ );  $KpVp=0.000015$  ( $cm^3$ );  $KdVd=0.7$  ( $cm^3$ );  $\log KnpVnp$  ( $cm^3$ ) =  $1.3 \cdot \log PC_{oct/w} - 3.0$  (without enhancer);  $\log KnpVnp$  ( $cm^3$ ) =  $1.1 \cdot \log PC_{oct/w} / 0.9$  (with GACH  $25.5 \mu mol$ )

ことなく幅広い薬物に対しても適用が可能になると考えられる。

### 3.2 ACプロドラッグの合成とオクタノール/水分配係数の測定

合成されたacyclovirプロドラッグの純度は、すべて95%以上であることをHPLCを用いて確認した。Table. IにはACおよびプロドラッグの構造式と物理化学的性質をまとめた。水への溶解度はButyrateまではACのほぼ2分の1なのに対し、それ以上の炭素数を持つプロドラッグでは急激な低下が見られた。さらにオクタノール/水分配係数は、

Table. I Chemical Structures and physicochemical properties of synthesized Acyclovir prodrugs

	n	m.p. (°C)	Solubility (mM) <sup>a)</sup>	PCoet/w <sup>b)</sup>
Acyclovir (AC)		260~262	11.9	0.0123
AC acetate	0	242~245	4.89	0.0578
AC propionate	1	218~220	5.73	0.212
AC butyrate	2	220~222	4.64	0.402
AC valerate	3	206~208	2.50	0.702
AC hexanoate	4	213~215	0.741	3.352

a) Drug solubility in water was determined at 37°C.

b) n-Octanol/water partition coefficient (PCoet/w) was calculated as a ratio of solubilities in water and n-octanol at 37°C.

炭素数の増加と共に有意な上昇が見られた。

### 3.3 *In Vitro* 皮膚透過実験

このようにして、GACHを様々な濃度で作用させた皮膚を用い、ACとそのプロドラッグの透過を測定した (Fig. 3)。ここでは、GACHによる促進効果を、AC投与時と比較するために、プロドラッグの形で投与した場合の透過量を、レセプター側にそのまま Intact な形で現われたプロドラッグと、その代謝物である acyclovir との和として表した。GACH適用により acyclovir および Acetate の場合にはそれほど透過が促進されなかったのに対し、適当な親油性を有する Propionate と Butyrate の場合には、顕著な皮膚透過性の改善が見られた。またレセプター側に現われた未変化体プロドラッグと代謝物である AC との割合はプロドラッグの置換基の構造により大きく異なり、さらに GACH 適用量依存的に全透過量に対する未変化体プロドラッグの割合が増加することが明らかとなった。Fig. 4 にはコントロール条件および GACH 適用条件におけ

る、透過係数の比から促進効果を計算し、先のシミュレーション結果より予測し得るラット皮膚での促進効果の理論曲線の上にプロットした。

Fig. 4 (a) のコントロール条件においても、実測値が、理論曲線と良く一致したが、最も親油性を上げた Hexanoate の場合でさえ透過係数の変化は acyclovir に比べ約 2 倍程度であったことから、この程度の脂溶性の変化では顕著な吸収改善につながらないことが明らかとなった。またプロドラッグ化と GACH 適用とを組み合わせた場合には、Fig. 4 (b) 示すように、プロドラッグの物性と促進効果との間にはベル型の関係が認められ、さらに実測値が我々が予測した理論曲線と良く一致したことより、こうした吸収促進法の理論的設計が可能であることが示された。また、代謝過程を組み込んだ皮膚拡散モデルを用いて透過曲線を解析した結果を Table. II にまとめた。GACH は主として角質層非極性経路に対して作用し、プロドラッグの拡散パラメータをほとんど変化させないのに対し、分配パラメータを用量依存的に増大させるこ

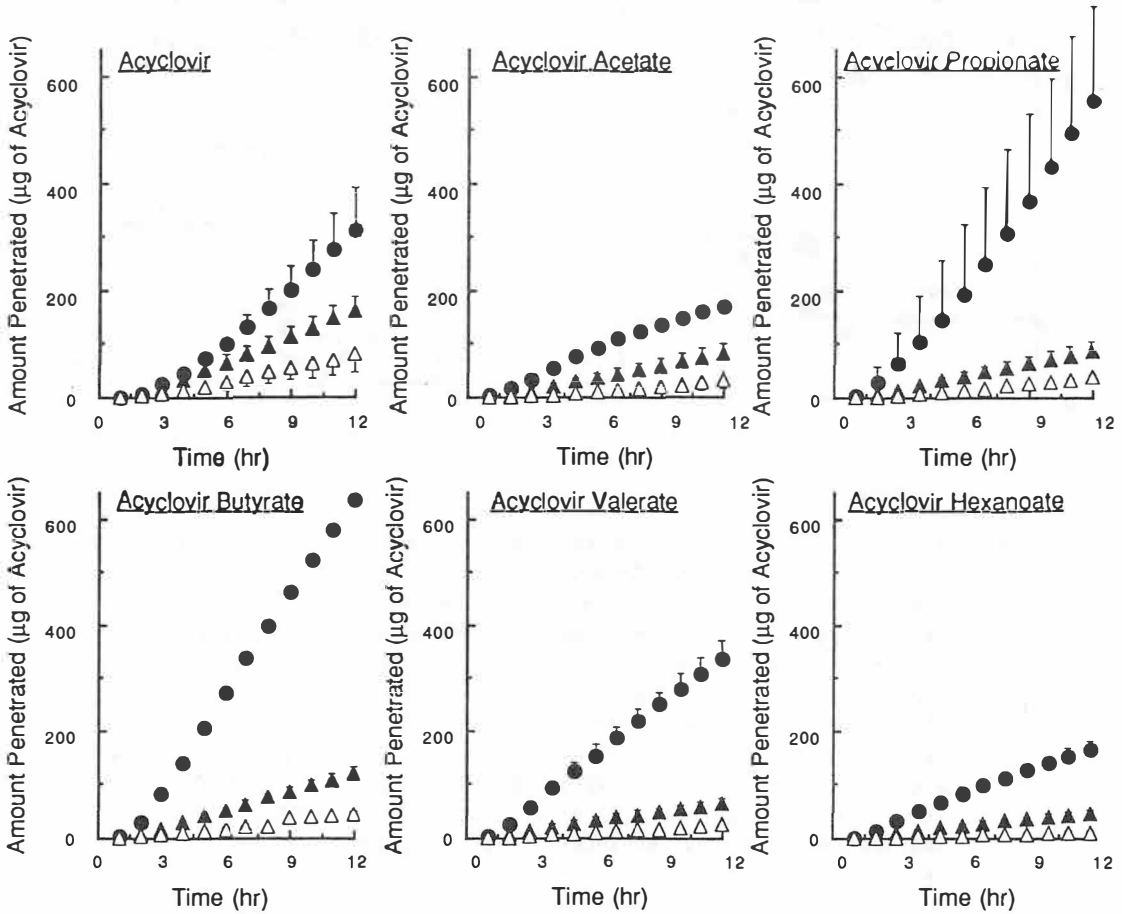


Fig. 3 Time courses of total acyclovir amount penetrating through the rat skin pretreated with ethanolic solution of 0( $\Delta$ ), 6.4( $\blacktriangle$ ), and 25.5  $\mu\text{mol}$  ( $\bullet$ ) of GACH. Acyclovir and its prodrugs were applied insuspension. in the case of the prodrug application, the sum of acyclovir and prodrugs appearing in the receptor is shown. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. value of at least three experiments.

とが明らかとなった。これは、従来のモデル薬物に対する促進効果の解析結果と一致し、本設計理論の妥当性が促進機構の面からも証明された。

### 3.4 *In Vivo* 皮膚透過実験

GACHを作用させた皮膚に対し、acyclovirあるいはプロドラッグの形で投与された薬物の、尿中への累積排泄—時間曲線をFig. 5に示した。プロドラッグの形で投与した場合の排泄量は、尿中そのまま未変化体の形で現われたプロドラッグ

と、その代謝物であるACの和として表している。AC投与に比べプロドラッグの形で投与した場合には、GACHと組み合わせることにより有意に尿中排泄量は増加した。*in vitro*条件でのGACHの促進効果は最大12倍程度だったのに対し、*in vivo*条件では、プロドラッグに対して30倍以上の促進効果が認められた。両実験系における促進効果の違いは、角質層nonpolar routeに作用するGACHの効果が、水和により角質層のpolar routeが充進している*in vitro*条件に比べ、*in vivo*条件の方

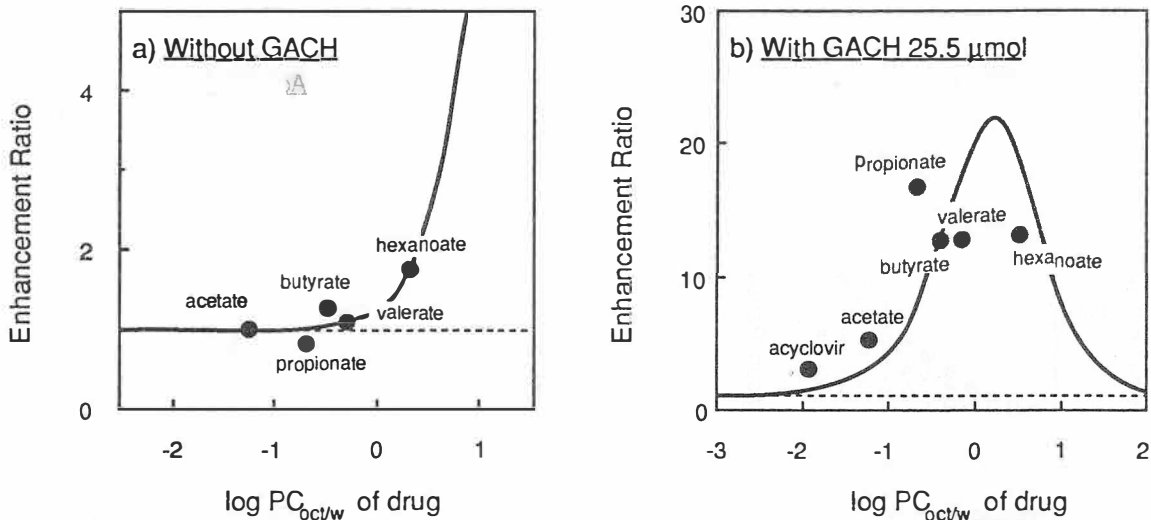


Fig. 4 Relationship between octano/water partition coefficient of drug and enhancement effect of GACH under different conditions. In the finite dose system the enhancement effect is defined as the amount of drug penetrating within 24 hr with GACH divided by that without GACH, while in the infinite dose system it is defined as the ratio of permeability coefficient of drug with GACH to that without GACH treatment (control). The following parameters were used in this simulation:  $D_p/L_s^2=40$  (guinea pig) or  $60$  (rat) ( $\text{hr}^{-1}$ );  $D_{np}/L_s^2=1.5$  ( $\text{hr}^{-1}$ );  $D_d/L_d^2=0.06$  (guinea pig) or  $0.08$  (rat) ( $\text{hr}^{-1}$ );  $K_p V_p=0.000015$  (guinea pig) or  $0.00007$  (rat) ( $\text{cm}^3$ );  $K_d V_d=0.7$  (guinea pig) or  $3.5$  (rat) ( $\text{cm}^3$ );  $\log K_{np} V_{np} (\text{cm}^3)=1.3 \cdot \log PC_{oct/w} + 3.0$  (without enhancer);  $\log K_{np} V_{np} (\text{cm}^3)=1.1 \cdot \log PC_{oct/w} - 0.9$  (with GACH  $25.5 \mu\text{mol}$ )

がより顕著に現われるためと考えられる。しかしながら、*in vivo* 実験における薬物の尿中排泄量は、薬物の吸収のみでなく、吸収後の体内での分布・代謝・排泄過程をすべて含んだものと考えられる (Fig. 1)。吸収後の体内動態は薬物間で大きく異なるため、*in vivo* におけるプロドラッグの経皮吸収動態およびGACHの促進効果について正確に評価するためには、吸収過程のレベルで議論することが必要であると考えられる。そこで体内で代謝を受ける薬物に対しても適用可能なdeconvolution法を開発し<sup>7)</sup>、プロドラッグを静脈内急速投与実験の結果をもとにdeconvolutionを行ない経皮吸収パターンを得た (Fig. 6)。コントロール条件で、各プロドラッグを経皮投与した時のプロドラッグと代謝されたacyclovirの尿中排泄パターンをFig. 6 (a) に、deconvolutionにより求め

た経皮吸収パターンをFig. 6 (b) に示した。isovalerateとpivarateについて、それぞれの尿中排泄パターンと経皮吸収パターンは大きく異なり、特に酵素的に安定なpivarateは6割程度が代謝されたacyclovirとして尿中に排泄されたが、皮膚中ではほとんど代謝を受けないことが明らかとなった。また、すべてのプロドラッグにおいてコントロール条件に比べGACH処理により全透過量に対する代謝されたacyclovirの割合が有意に減少したことより、*in vitro* 実験系の場合と同様 *in vivo* 実験系においてもGACHは皮膚中の酵素活性を低下させることが明らかとなった。

isovalerateとpivarateの尿中排泄曲線に対し、代謝過程を組み込んだ皮膚拡散モデルを用いて解析した結果、角質層nonpolar routeの分配や拡散は同じモデル解析から得られた *in vitro* の結果

Table. II Estimated penetration parameters for Drug penetration through the Skin pretreated with various Doses of GACB

Drug	GACH dose ( $\mu\text{mol}$ )	Stratum Corneum				Enzymatic Hydrolysis Rate Constant k ( $\text{hr}^{-1}$ )
		Polar route		Nonpolar route		
		Dp' <sup>a)</sup> ( $\text{hr}^{-1}$ )	Kp' <sup>b)</sup> ( $\times 10^5 \text{cm}^3$ )	Dnp' <sup>c)</sup> ( $\text{hr}^{-1}$ )	KnP' <sup>c)</sup> ( $\text{cm}^3$ )	
acyclovir	0	84.7	2.05	10.4	0.000102	--
	6.4	85.5	3.86	10.7	0.000261	--
	25.5	88.5	4.34	10.6	0.000690	--
	stripping	Dd'=0.365 ( $\text{hr}^{-1}$ ) <sup>d)</sup>		Kd'=0.177 ( $\text{cm}^3$ ) <sup>d)</sup>		
acetate	0	80.0	2.05	8.35	0.000102	1.10
	6.4	80.8	3.86	8.91	0.000487	0.590
	25.5	83.6	4.34	9.03	0.00639	0.734
	stripping	Dd'=0.437 ( $\text{hr}^{-1}$ ) <sup>d)</sup>		Kd'=0.182 ( $\text{cm}^3$ ) <sup>d)</sup>		
propionate	0	78.7	2.05	8.12	0.000138	0.900
	6.4	79.4	3.86	8.01	0.000516	0.569
	25.5	82.2	4.34	8.43	0.00778	0.298
	stripping	Dd'=0.256 ( $\text{hr}^{-1}$ ) <sup>d)</sup>		Kd'=0.259 ( $\text{cm}^3$ ) <sup>d)</sup>		
butyrate	0	77.4	2.05	9.16	0.000273	2.44
	6.4	78.2	3.86	8.40	0.00111	1.20
	25.5	80.8	4.34	8.34	0.0109	0.700
	stripping	Dd'=0.200 ( $\text{hr}^{-1}$ ) <sup>d)</sup>		Kd'=0.485 ( $\text{cm}^3$ ) <sup>d)</sup>		
valerate	0	76.2	2.05	7.22	0.000378	3.28
	6.4	77.0	3.86	7.49	0.00130	0.992
	25.5	79.6	4.34	7.67	0.0170	0.756
	stripping	Dd'=0.314 ( $\text{hr}^{-1}$ ) <sup>d)</sup>		Kd'=0.216 ( $\text{cm}^3$ ) <sup>d)</sup>		
hexanoate	0	75.1	2.05	7.24	0.000663	4.04
	6.4	75.8	3.86	7.64	0.00391	1.51
	25.5	78.4	4.34	7.20	0.0417	1.14
	stripping	Dd'=0.314 ( $\text{hr}^{-1}$ ) <sup>d)</sup>		Kd'=0.247 ( $\text{cm}^3$ ) <sup>d)</sup>		
isovalerate	0	76.2	2.05	7.91	0.000373	0.156
	25.5	79.6	4.34	7.22	0.0107	0.0685
	stripping	Dd'=0.173 ( $\text{hr}^{-1}$ ) <sup>d)</sup>		Kd'=0.371 ( $\text{cm}^3$ ) <sup>d)</sup>		
pivrate	0	76.2	2.05	8.48	0.000446	0.0269
	25.5	79.6	4.34	7.62	0.0164	0.0111
	stripping	Dd'=0.207 ( $\text{hr}^{-1}$ ) <sup>d)</sup>		Kd'=0.223 ( $\text{cm}^3$ ) <sup>d)</sup>		
mannitol	0	90.9	2.05	--	--	--
	6.4	91.8	3.86	--	--	--
	25.5	95.0	4.34	--	--	--
	stripping	Dd'=0.287 ( $\text{hr}^{-1}$ ) <sup>d)</sup>		Kd'=0.216 ( $\text{cm}^3$ ) <sup>d)</sup>		

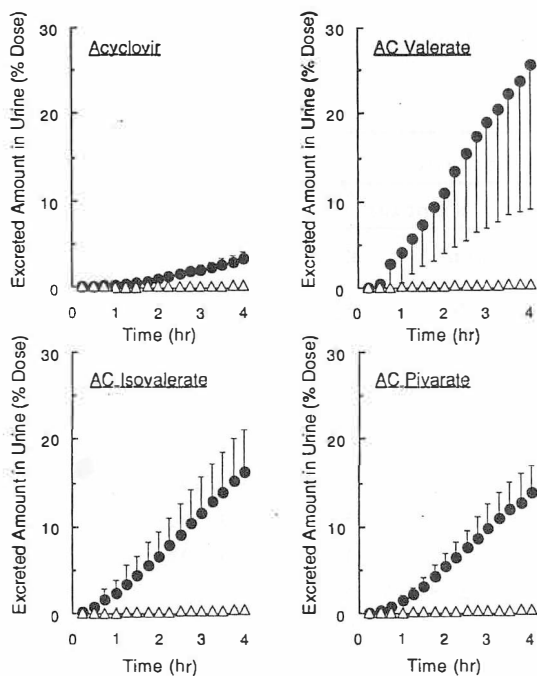


Fig.5 Time courses of total acyclovir amount excreted in the urine pretreated with ethanolic solution of 0( $\Delta$ ) and 25.5  $\mu$ mol( $\bullet$ ) of GACH. in the case of the prodrug application. the sum of acyclovir and prodrugs appearing in the receptor is shown. each point represents the mean  $\pm$  S.D. value of at least three experiments.

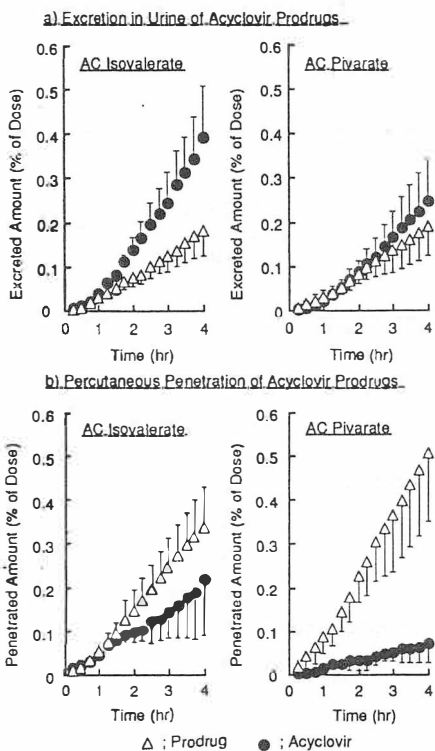


Fig.6 Excretion in urine and percutaneous penetration profiles estimated by de convolution method of acyclovir prodrugs through In Vivo Rat Skin

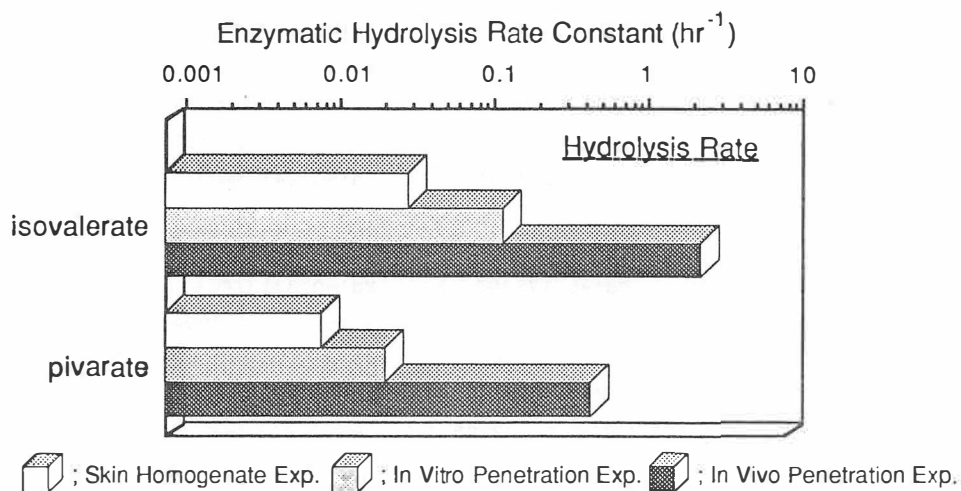


Fig.7 Comparison of Enzymatic Hydrolysis Rate constants between In Vivo and In Vitro.

とほぼ同様の値が得られたが、*in vivo*の代謝速度定数に関しては*in vitro*の結果より約20倍大きな値が得られた (Fig. 7)。つまり両実験系の生理的条件の違いから*in vivo*での酵素活性は*in vitro*に比べ有意に高いことが示され、皮膚ホモジネート実験や*in vitro*透過実験から、*in vivo*条件下での正確な酵素活性を評価することは容易でないことが示唆された。

#### 4 総括

モデル解析に基づき理論的にプロドラッグ化と吸収促進剤適用との組み合わせにより有効な皮膚透過を得ることが可能であり、また実際に理論的に設計したプロドラッグの物性による吸収動態を予測することも可能であったことから、モデル解析が吸収メカニズムの解明のみでなく、演繹的に経皮吸収促進法の最適設計に対し応用可能であることが明らかになった。*in vivo*条件において、代謝を伴う薬物に対しても適用可能なdeconvolution法を開発したことより吸収過程のレベルでプロドラッグの動態を把握することが可能となり、本アプローチの*in vivo*におけるより高い有用性が示された。さらに代謝過程を組み入れた皮膚拡散モデルを用いて薬物の吸収動態を解析することで、両者のアプローチが皮膚透過に及ぼす影響を代謝過程を含めて総合的に議論することが可能であるばかりでなく、代謝を伴う薬物の吸収動態に関する*in vivo/in vitro*相関について定量的に評価することが可能となることが明らかとなった。

#### 引用文献

- 1) F. Yamashita, T. Yoshioka, Y. Koyama, H. Okamoto, H. Sezaki, and M. Hashida., : Analysis of skin penetration enhancement based on a twolayer skin diffusion model with polar and nonpolar routes in the stratum corneum: Dose-dependent effect of 1-geranylazacycloheptan-1-one on drugs with different lipophilicities. *Biol. Pharm. Bull.* 16 690-697 1993
- 2) 山下富義、小山靖夫、坂東博人、高倉喜信、橋田 充：機構論に基づく吸収促進剤適用の最適化の試み、*Drug Delivery System.* 8 143-150 (1993)
- 3) H. Bando, F. Yamashita, Y. Takakura, and M. Hashida., : Skin penetration enhancement of aclovir by prodrug-enhancer combination. *Biol. Pharm. Bull.* 17 1141-1143 1994
- 4) H. Bando, T. Takagi, F. Yamashita, Y. Takakura, and M. Hashida., : Theoretical Design of Prodrug-Enhancer Combination Based on a Skin Diffusion Model: Prediction of Permeation of Acyclovir Prodrugs Treated with 1-Geranylazacycloheptan-1-one. *Pharm. Res.* 13 417-431 1996
- 5) H. Bando, M. Sahashi, T. Takagi, F. Yamashita, Y. Takakura, and M. Hashida., : Analysis of In Vitro Skin Penetration of Acyclovir Prodrugs Based on a Diffusion Model with a Metabolic Process. *Int. J. Pharm.* 135 91-102 1996
- 6) F. Yamashita, H. Bando, Y. Koyama, S. Kitagawa, Y. Takakura, and M. Hashida., : In vivo and in vitro analysis of skin penetration enhancement based on a twolayer diffusion model with polar and nonpolar routes in the stratum corneum. *Pharm. Res.* 11 185-191 1994
- 7) F. Yamashita, H. Bando, Y. Takakura, and M. Hashida., : A Deconvolution Method for Estimating the First-Pass Metabolism of Orally Administered Drugs. *Biol. Pharm. Bull.* 18 1787-1789 1995

# リポソーム封入薬物の皮膚吸収過程の解析と 皮膚内ラジカル消去への応用

九州大学 薬学部

内海 英雄

Transdermal absorption of drugs entrapped in liposomes and radical scavenging effects of antioxidants in skin were investigated with ESR spectroscopy. Spectral-spatial and spatial-spatial 2-D imaging system were developed for this purpose.

Spin-labeled compound entrapped in liposomes was applied on stripped hair-less mouse skin and release of the compound from liposomes was imaged by using spectral-spatial 2-D analysis system. Liposomes injected intravenously to mouse was measured non-invasively with a L-band ESR, but it was impossible to measure liposomes applied on skin of live mouse because of less sensitivity.

Anthralin radical was produced on hair-less mouse skin by treatment of anthralin and UV-irradiation. High resolution spectral-spatial imaging showed that anthralin radical was generated near skin surface. Intravenous administration of antioxidants prevented the generation of the radical. Ascorbic acid and glutathione decreased the generation of anthralin radical independent of irradiation period, but Trolox showed less effect during first 5 h irradiation. Action mechanism of these antioxidants seems to be different.

## 1 緒言

近年、化粧品分野においてリポソームは、保湿効果並びに経皮吸収の向上効果を狙って積極的に用いられるようになった。しかし、リポソームを薬剤の吸収担体として用いた場合、皮膚における薬物の吸収過程についての詳細はまだ分かっていないのが現状である。それは、リポソーム製剤の吸収評価を行うには、薬物のリポソームからの放出と組織での吸収という2つの過程を解析しなければならず、皮膚におけるリポソーム封入薬物のこれらの過程を同時に解析するための適切な手段がまだ存在しないからに他ならない。

リポソームからの薬物の放出・吸収過程を解析するためには、皮膚におけるリポソーム内薬物の挙動を遊離薬物のものと区別して解析する必要がある。スピン標識化合物は、溶液中に高濃度に存在するときには1本のブロードな電子スピン共鳴(ESR)スペクトルを与えるが、希釈されるとシャープな3本線へと変化する。従って、リポソームに高濃度に封入しておけばそのESRスペクトルの変化から薬物のモデルとしてリポソームからの放出を解析することが可能である。また、ESRは試料を破壊せずにスペクトルを得ることが可能であるため、皮膚表面におけるリポソーム封入薬物の変化を経時的に調べることができる。皮膚におけるリポソームからの放出・吸収過程を同時に解析するためには、更に皮膚のどの部分のスピン標識化合物が如何なるスペクトルを与えるかを $\mu\text{m}$ の空間分解能で知ることが必要となる。そのため、本研究では高分解能スペクトル-空間画像化解析法を開発する。スペクトル-空間画像化解析は、Maltempoら<sup>1-3)</sup>、Herlingら<sup>4, 5)</sup>により既に行われているが、本研究ではこれを皮膚におけるリポ



Imaging analysis of transdermal absorption of liposome-entrapped drugs and application to radical scavenging in skins

Hideo Utsumi

Faculty of Pharmaceutical Sciences  
Kyushu University

ソームの解析に適応できるように改良を加えた。また、近年生体計測用に開発されL-バンドESRにより、リポソーム製剤の挙動の無侵襲解析についても検討した。

一方、皮膚では紫外線によりメラニン色素沈着、アレルギー誘発、皮膚癌生成などが起こることが知られている。これらの成因には紫外線が皮膚で生成する活性酸素やフリーラジカルが係わっていることが示唆されているが、それを *in vivo* で証明した例やフリーラジカルの抗酸化剤による消去を *in vivo* で解析した例は未だない。本研究では、上記リポソーム製剤の放出・吸収過程の解析に加え、紫外線照射により生成するラジカルの皮膚内存在位置を高分解能スペクトルー空間画像化法を用いて調べた。また更に、皮膚のラジカル生成におよぼす抗酸化剤の *in vivo* における効果を調べた。

## 2 実験

### 2.1 実験材料

ヘアレスマウス (HR-1, 5週齢, 雌性) は、星野試験動物飼育所より、マウス (ddY, 3週齢, 雌性) は成和実験動物研究所よりそれぞれ購入した。プレソームC-1は、日本精化より恵与されたものを用いた。4-trimethylammonium-2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidine-N-oxyl iodide (CAT-1) は Molecular Probes, Inc. より購入した。アンスラリンはSigma Chemical. Co. より購入した。

### 2.2 リポソームの調製

プレソームC-1 (水素添加卵黄レシチン/コレステロール(1:1)) 50mgに150mM CAT-1水溶液 500 $\mu$ lを加え、水和させたのち、凍結融解を5回繰り返し、ポリカーボネート膜 (ポアサイズ 400nm, 2枚重ね) を10回通過させた。リポソームに取り込まれなかったCAT-1を遠心分離 (100,000 $\times$ g, 60分, 20 $^{\circ}$ C) により除き、リポソームの沈澱を脂質濃度が70-80mMになるように生

理食塩水で懸濁した。

### 2.3 皮膚におけるアンスラリンラジカルの生成

ヘアレスマウスに50mMアンスラリンのアセトン溶液500 $\mu$ lを塗布後、紫外線ランプによりUV-AあるいはUV-Cを照射した。

### 2.4 ESR測定

X-バンドESRはJEOL JES RE-1Xにより測定した。L-バンドESRはL-バンドマイクロ波ユニットとループギャップ共振器 (幅5mm, 内径33mm) を装備したJEOL JES PE-1Xにより測定した。

### 2.5 ESR画像

磁場勾配  $G = \tan(\theta) \cdot \Delta H / \Delta L$  ( $\Delta H$ ,  $\Delta L$  はそれぞれ得ようとするスペクトルー空間画像のスペクトル軸, 空間軸の大きさ) で投影角度  $\theta$  の射影スペクトルを得、filtered-backprojection法により画像を再構成した。ミッシングアングル (磁場勾配装置の限界から射影スペクトルを得ることのできない正負の限界投影角度から90 $^{\circ}$ までの角度) に由来する画像のアーティファクトは代数的再構成法により取り除いた。

## 3 結果および考察

### 3.1 スペクトルー空間2次元画像化システムの開発

#### 3.1.1 高分解能スペクトルー空間2次元画像化システムの開発

皮膚においてスペクトルー空間画像を得るためには $\mu$ mオーダーでスペクトルを空間分離することが必要である。このために非常に強力な磁場勾配コイルと専用キャビティを制作メーカーに依頼し、用いた結果、数百 $\mu$ mの解像度を持つ高分解能スペクトルー空間2次元画像化システムの構築に成功した。

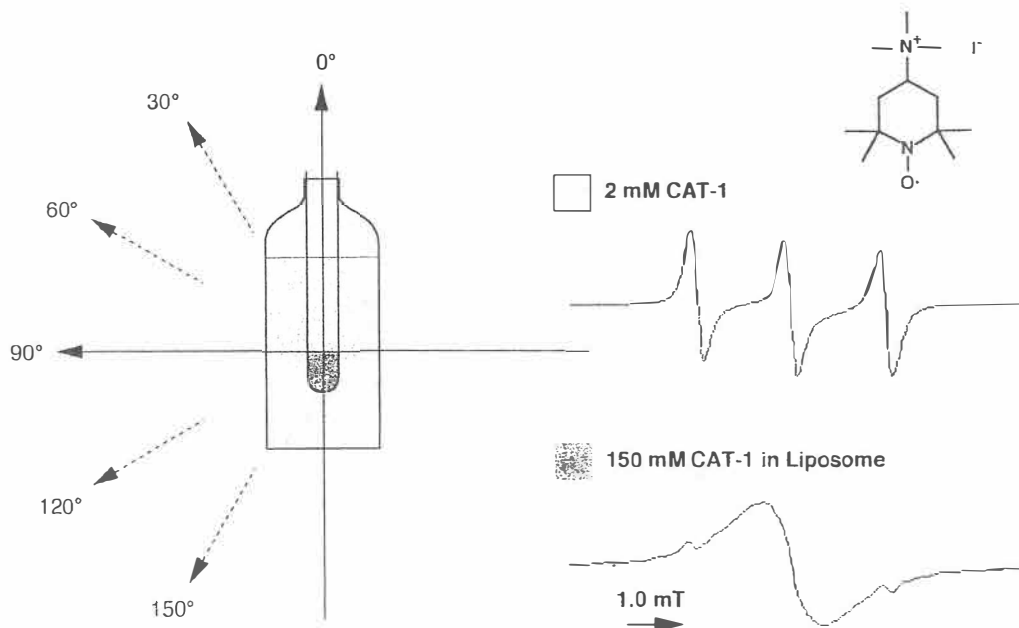


図1 リポソーム封入CAT-1と遊離CAT-1とからなるファントム  
 2mM CAT-1水溶液（シャープな3本線スペクトル）と150mM CAT-1 を封入したリポソーム（ブロードな1本線スペクトル）をそれぞれ内径1.6cmのバイアルびんと内径0.5cmの試験管に入れ、左図のファントムを作成した。図中に示す6方向はスペクトル-空間画像の空間軸の方向を示す。

### 3.1.2 異種スペクトルを与えるラジカルの2次元空間画像化システムの開発

異種スペクトルを与えるラジカルの分布が1次元空間に限定される場合にはスペクトル-空間2次元画像化法によりスペクトル分布が解析できる。しかし、分布が2次元へと広がった場合にはスペクトル情報をのせた2次元空間画像を得る必要がある。そこで、スペクトル-空間2次元画像から異種スペクトルの空間情報を抽出して、異なるスペクトルを与えるラジカル種の2次元空間画像を得る方法を開発した。図1に示すようにスピン標識化合物CAT-1を封入したリポソームと遊離のCAT-1とからなるファントムを作成し、図中に示す6方向を空間軸として6つのスペクトル-空間2次元画像を得た。得られた画像は、図2に示すように2種のスペクトルが分離されている部分と混在している部分が存在する。この画像から2種スペクトルの位置情報を得るために、まず空間軸上

の各位値でスペクトルの積分値を求め、全CAT-1の空間分布を得た。遊離CAT-1の空間分布は3本線のうちベースライン補正した低磁場側ピークの積分値より得、全CAT-1の空間分布からこの寄与を差し引いて、リポソーム封入CAT-1の空間分布とした。6方向のスペクトル-空間画像より得た2種スペクトルの空間情報をそれぞれ別々に再構成し、リポソーム封入CAT-1、遊離CAT-1の2次元空間画像を得ることができた(図3)。

### 3.2 リポソーム製剤の放出・吸収過程の解析

#### 3.2.1 リポソーム製剤の *in vivo* 無侵襲解析

皮膚に塗布したリポソームを *in vivo* 無侵襲測定する前段階として、まず、リポソームの体内動態を *in vivo* で無侵襲解析できるか否かを検討した。

スピン標識化合物CAT-1を封入したリポソームをマウスに尾静脈内投与し、頭部から下腹部まで

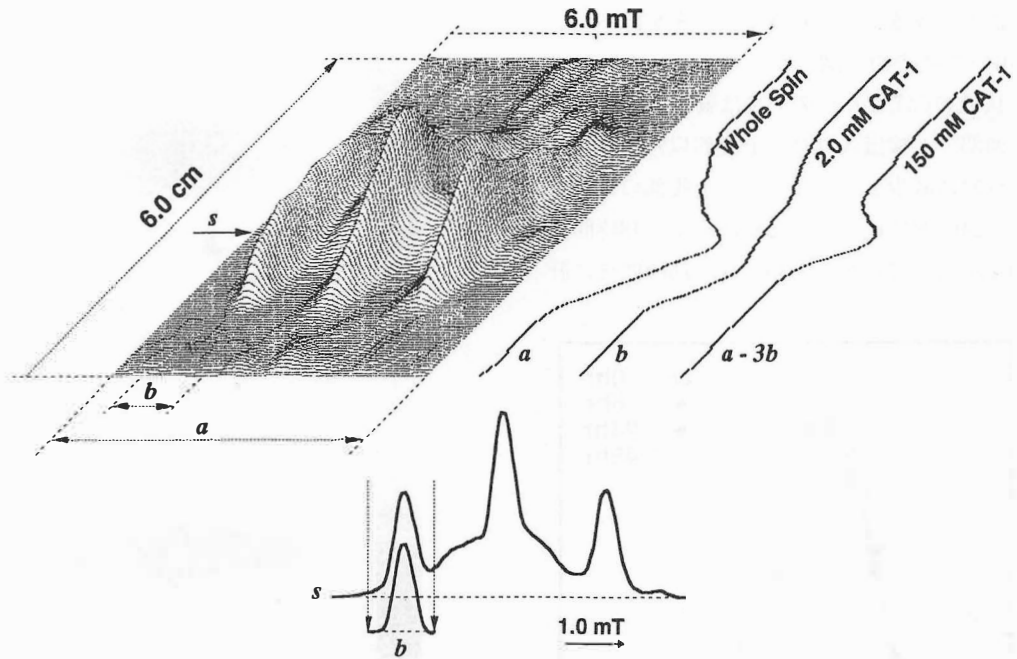
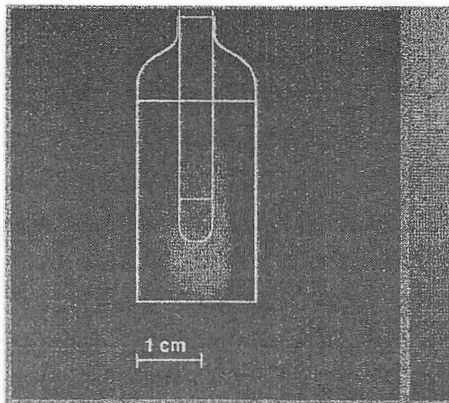


図2 リポソーム封入CAT-1と遊離CAT-1とからなるファントムより得たスペクトル-空間画像と2つのスペクトル成分の空間分布の抽出  
 図1の0°方向を空間軸としたスペクトル-空間画像(左上)の空間軸上の各ポイントでスペクトルの積分値を得、0°方向の全CAT-1の分布とした(右上a)。下に示すように、スペクトルの低磁場側のシャープなピークのベースライン補正をし、その積分値の空間分布を0°方向の2mM CAT-1の分布とした(右上b)。全CAT-1の分布から2mM CAT-1の分布の寄与を差し引いて150mM CAT-1の0°方向の分布とした(右上a-3b)。

Free Spin Probes



Liposomal Spin Probes

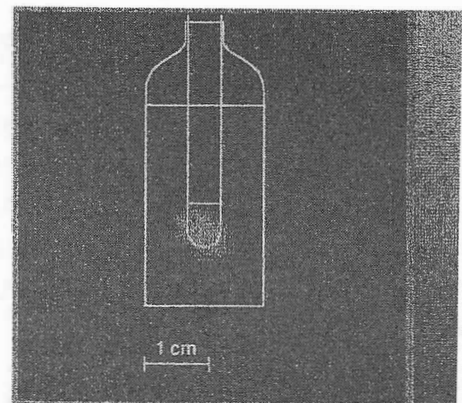


図3 リポソーム封入CAT-1と遊離CAT-1の分離2次元分布画像  
 図2に示す方法で6方向のスペクトル-空間画像からリポソーム封入と遊離のCAT-1の6方向の空間分布を得、それぞれ別々に2次元空間画像を再構成した。

の各部位におけるシグナル強度の分布をL-バンド ESRを用いて経時的に調べた。リボソームに封入された状態のCAT-1のシグナルは胸部、上腹部で高く、頭部でも検出された。上腹部以外のシグナルが経時的に減少したのに対し、上腹部のシグナル強度は24時間ではほとんど変わらず、48時間後でも70%が残っていた(図4)。投与6時間後に肝

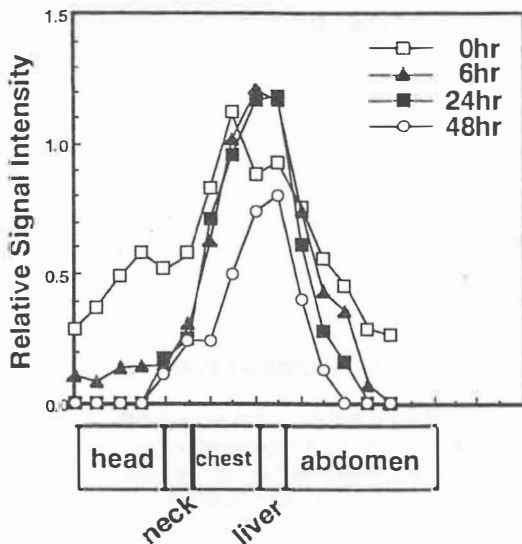


図4 L-バンドESRにより非侵襲的に測定したマウス静脈内投与リボソームの体内分布の経時変化 CAT-1封入リボソームをマウスに尾静脈内投与し、幅5mmの共振器を5mm間隔にずらしてリボソーム封入CAT-1のシグナル強度を経時的に求めた。

臓、肺、心臓、胃を摘出し、ESR測定したところ、シグナルは肝臓のみに検出され、このリボソームが肝臓に長期滞留することが示された。以上のように、L-バンドESRを用いることによりリボソームの体内動態を無侵襲で解析することに成功したが、皮膚に塗布したリボソームの *in vivo* 検出は塗布量が限られているため現在のところ成功していない。

### 3.2.2 剥離皮膚表面におけるリボソーム崩壊

皮膚塗布リボソームの *in vivo* 検出ができなかったため、剥離皮膚を用いてリボソーム崩壊を解析した。図5は、ヘアレスマウス皮膚切片表面

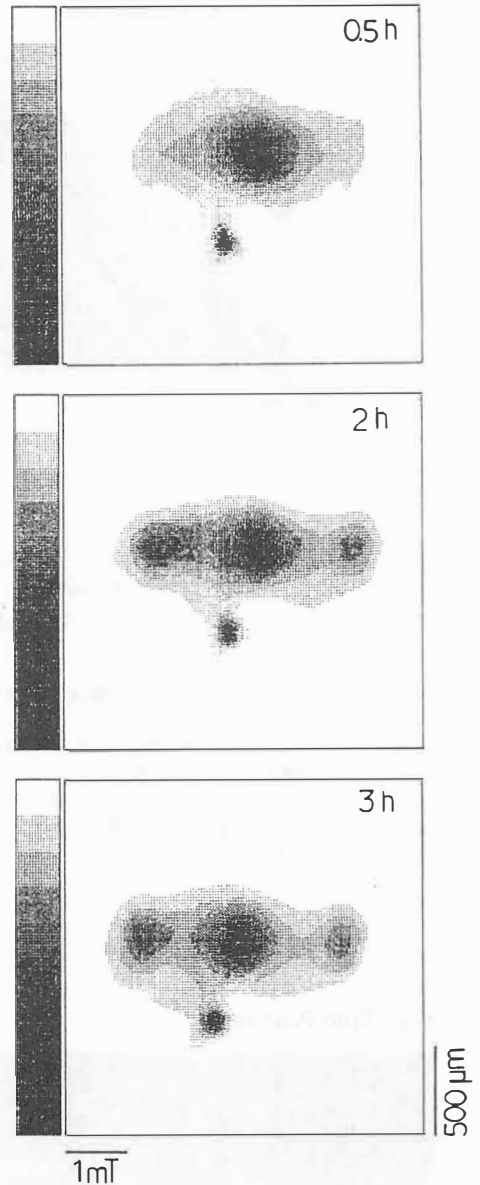


図5 皮膚表面におけるリボソーム崩壊の高分解能スペクトル-空間画像  
ヘアレスマウスの剥離皮膚に綿糸に染み込ませたCAT-1封入リボソーム懸濁液を置き、皮膚の深さ方向を空間軸として高分解能スペクトル-空間画像を経時的に得た。リボソーム添加0.5時間後にブロードな1本線であったスペクトルが時間の経過と共にシャープな3本線へと変化した。中央下の小さなシグナルは皮膚切片の皮下組織側に皮着させた標準物質(DPPH)のものである。

に綿糸に染み込ませたCAT-1封入リボソームを密着させ、そのシグナルの変化を高分解能スペクトル-空間2次元画像化システムにより経時的に調べた結果である。CAT-1のシグナル下側の小さなシグナルは皮膚の皮下組織側に付着させたDPPHのものである。リボソーム添加直後にCAT-1のシグナルはブロードな単一ピークとして検出されたが、時間が経過するに従いシャープな3本線ピークへと変化していく様子が確認された。これは、CAT-1を封入したリボソームが皮膚表面で崩壊していくことを意味する。しかし、CAT-1が皮膚へ浸透していく様子を示す空間軸に沿ったDPPH方向への広がりには残念ながら確認できなかった。

### 3.3 皮膚生成ラジカルと抗酸化剤

#### 3.3.1 皮膚におけるアンスラリンラジカルの生成

アンスラリンは抗尋常性幹せん治療薬として古くから用いられているが、一方、光増感作用があり炎症や発癌等を引き起こすことも知られている。皮膚にアンスラリンを塗布したヘアレスマウスを紫外線照射し、その皮膚切片をX-バンドESRで測定するとg値が2.003の単一ピークのシグナルが検出された。このシグナルは、Packerら<sup>6)</sup>により報告されているアンスラリンラジカルのものと一致した。アンスラリンラジカルのシグナル強度は紫外線照射時間の延長に伴い増加した(図6)。また、シグナル強度はUV-A照射時に比べUV-C照射時の方が大きかった(図6)。

図7は、高分解能スペクトル-空間2次元画像化システムを用いて、アンスラリンラジカルの皮膚における生成位置解析を行った結果である。ヘアレスマウスにアンスラリンを塗布したのち紫外線照射し、剥離した皮膚切片をテフロン支持体に付着させて皮膚の深さ方向のスペクトル-空間画像を得た。表皮を支持体側にして皮膚切片を付着させるとアンスラリンラジカルのピークは支持体側に接近した。このことより、アンスラリンラジカルが皮膚の表面付近で発生していることが確認さ

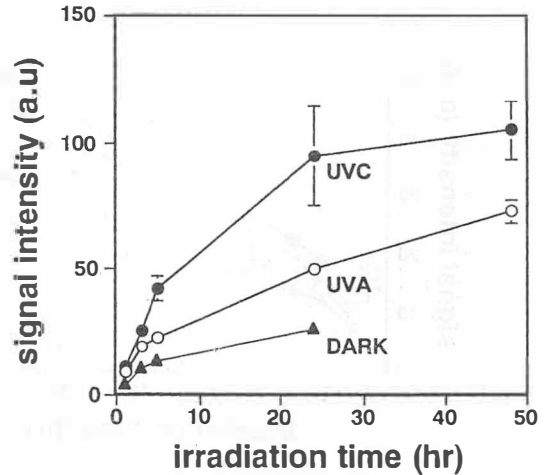


図6 皮膚におけるアンスラリンラジカル生成に及ぼす紫外線照射の影響  
アンスラリンのアセトン溶液を塗布したヘアレスマウスをUV-A照射下(○)、UV-C照射下(●)あるいは暗所(▲)で飼育し、経時的に剥離皮膚をESR測定した。

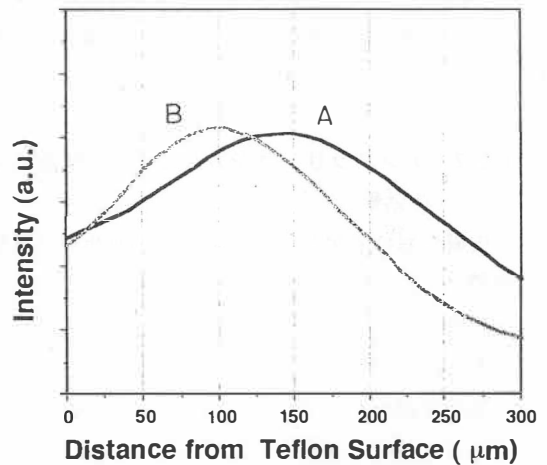


図7 スペクトル-空間画像より得たアンスラリンラジカルの皮膚内分布  
アンスラリンを塗布し紫外線照射したヘアレスマウスの剥離皮膚を皮下組織側(A)あるいは表皮側(B)をテフロン支持体に付着させ、皮膚の深さ方向を空間軸としてスペクトル-空間画像を得、アンスラリンラジカルのシグナルの積分値よりその空間分布を得た。

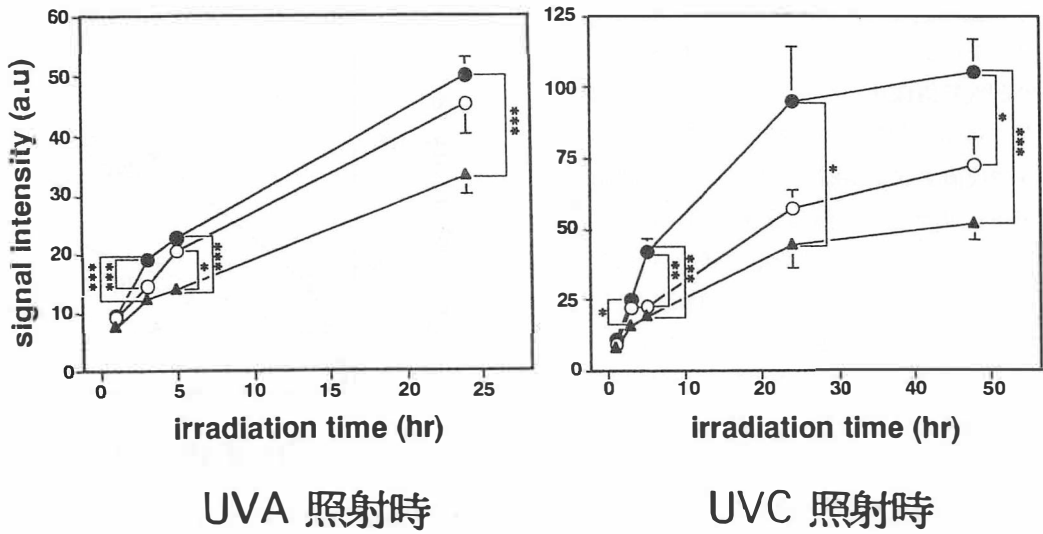


図8 アンスラリンラジカル生成に及ぼすアスコルビン酸静脈内投与の影響  
 アンスラリン塗布マウスに紫外線照射5分前に0mmol/kg (●)、0.2mmol/kg (○)あるいは2mmol/kg (▲)のアスコルビン酸を尾静脈内投与し、紫外線照射して、経時的に剥離皮膚をESR測定した。  
 \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.005

れた。本システムでは数百 $\mu\text{m}$ の解像度を得ることができたが、シグナルの線幅の寄与を取り除くことができないためこれ以上の詳細な解析は困難であった。

### 3.3.2 アンスラリンラジカルに及ぼす抗酸化剤の効果

皮膚におけるアンスラリンラジカル生成に抗酸化剤が*in vivo*で如何に働くかを調べる目的で、マウスにアンスラリンを塗布する前に種々の抗酸化剤を投与し、アンスラリンラジカル生成に及ぼす効果を調べた。アンスラリン塗布5分前にアスコルビン酸を静脈内投与しておくこと、投与量依存的にアンスラリンラジカル生成が抑制された(図8)。この抑制効果は照射した紫外線の種類によらず見られた。同様な抑制効果はグルタチオン(0.2mmol/kg体重)の静脈内投与でも見られた。皮膚におけるラジカル生成に及ぼす抗酸化剤の効果を*in vivo*で評価できたのはこれが初めてである。

抗酸化剤としてビタミンEの水溶性アナログで

あるTroloxを用い同様に実験を行った結果を図9に示す。アスコルビン酸やグルタチオンが短時間照射(5時間以内)において長時間(24時間)と同様に有効にラジカル生成を抑えていたのに対し、Troloxでは短時間照射ではあまり効果が現れず、長時間でアンスラリンラジカルの生成を抑制した。

アンスラリンは光酸化あるいは自動酸化で9-anthron-10-ylラジカルやアンスラリンダイマーとなりこれがアンスラリン・ブラウンラジカルへと変化するとされているが<sup>7, 8)</sup>、皮膚でのアンスラリンラジカルの生成過程は不明の部分が多い。今回生体に投与した抗酸化剤でラジカル生成が抑えられたことより、アンスラリンラジカル生成過程にこれら抗酸化剤により消去される活性種が係わっていることが示唆される。Troloxは、脂質のラウリル硫酸ナトリウムミセル中でペロキシラジカルを効果的に消去することが報告されている<sup>9)</sup>。一方、アスコルビン酸やグルタチオンは種々の水溶性酸化物を還元するほか活性酸素種を直接消去したり、グルタチオン-アスコルビン酸-

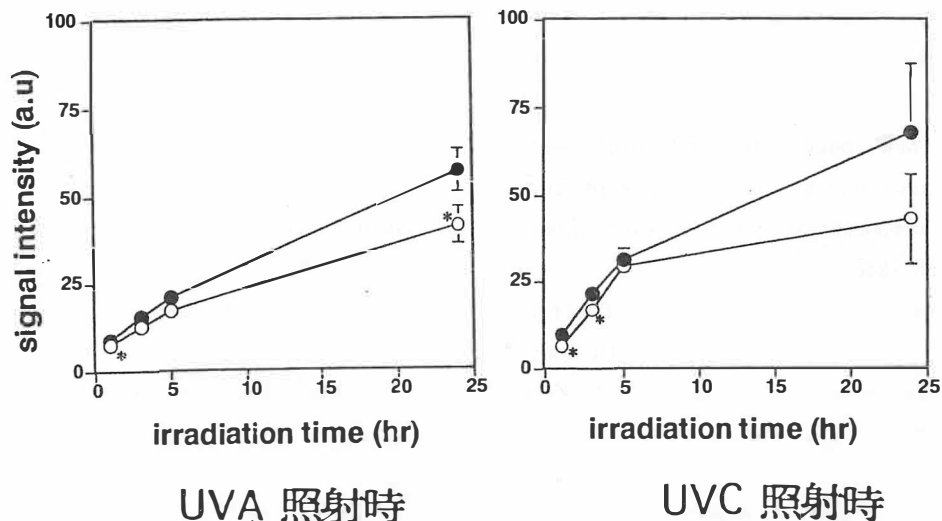


図9 アンスラリンラジカル生成に及ぼすTrolox静脈内投与の影響  
 アンスラリン塗布マウスに紫外線照射5分前に0mmol/kg (●)あるいは0.2mmol/kg (○)のTroloxを尾静脈内投与し、紫外線照射して、経時的に剥離皮膚をESR測定した。 \*p<0.05

ビタミンEドックス鎖を通して油相のペロキシラジカルの消去に係わっていることが知られている。Troloxの効果を発揮するまでの時間がアスコルビン酸やグルタチオンと異なった理由として、これら抗酸化剤により消去される活性種の違い、これら抗酸化剤がアンスラリンラジカル生成部位へ到達するまでの時間の違い、といったことが考えられる。これらのどちらによるかは、生体に投与した抗酸化剤のアンスラリンラジカル生成抑制機構と共に今後の課題である。

#### 4 総括

ESRをリボソーム製剤の皮膚吸収過程並びに皮膚生成ラジカルの解析に応用するにあたり、数百μmの空間分解能を持つスペクトル空間画像化システムの開発に成功した。また、スペクトル情報に基づく2次元空間画像化法の開発にも成功した。高分解能スペクトル空間画像化システムを用いて皮膚切片表面におけるリボソームの崩壊を解析することができた。リボソーム製剤の挙動をLバンドESRにより*in vivo*で解析することを試

みたところ、静脈内投与したりボソームの挙動の解析には成功したが、皮膚に塗布したりボソームの検出は感度の制約からできなかった。皮膚表面における*in vivo*測定は、今後のLバンドESRの感度の向上あるいは共振器の改良に委ねなければならない。

皮膚で紫外線照射により生成したアンスラリンラジカルの生成部位をスペクトル空間画像化システムにより調べることができた。このラジカルの生成における抗酸化剤の効果を*in vivo*で検討した結果、抗酸化剤の種類により効果が現れるまでの時間が異なることが分かった。この抗酸化剤のラジカル生成抑制機構については今後の研究課題としたい。

#### 引用文献

- 1) Maltempo MM, :Differentiation of spectral and spatial components in EPR imaging using 2-D image reconstruction algorithms, *J. Magn. Reson.* 69 156-161 1986
- 2) Maltempo MM, Eaton SS, Eaton GR, :Spectral-spatial two dimensional EPR imaging,

*J. Magn. Reson.* 72 449-455 1987

- 3) Maltempo MM, Eaton SS, Eaton GR, :Reconstruction of spectralspatial two dimensional EPR images from incomplete sets of projections without prior knowledge of the component spectra, *J. Magn. Reson.* 77 75-83 1988
- 4) Herrling T, Klimes N, Karthe W, Ewert U, Ebert B, :EPR zeugmatography with modulated magnetic field gradient, *J. Magn. Reson.* 49 203-211 1982
- 5) Fuchs J, Groth N, Herrling T, Milbradt R, Zimmer G, Packer L, : Electron paramagnetic resonance (ESR) imaging in skin. Biophysical and biochemical microscopy, *J. Invest. Dermatol.*, 98 713-719 1992
- 6) Fuchs J, Packer L, : Investigations of anthralin free radicals in model systems and skin of hairless mice, *J. Invest.*

*Dermatol.*, 92 677-682 1989

- 7) Se E Malo T, Dubertret L, Prognon P, Gond A, Mahuzier G, Santus R, : Physicochemical properties and stability of anthralin in model systems and human skin, *J. Invest. Dermatol.*, 80 1-6 1983
- 8) Reichert U, Jacques Y, Grangeret M, Schmidt R, : Antirespiratory and antiproliferative activity of anthralin in cultured human keratinocyte, *J. Invest. Dermatol.*, 84 130-134 1985
- 9) Castle L, Perkins MJ, : Inhibition kinetics of chain-breaking phenolic antioxidants in SDS micelles. Evidence that intermicellar diffusion rates may be ratelimiting for hydrophobic inhibitors such as  $\alpha$ -tocopherol, *J. Am. Chem. Soc.*, 108 6381-6382 1986

# 表皮細胞の細胞接着と角化制御に関するシグナル伝達： 天疱瘡IgG 誘導表皮細胞間接着離開とカルシウムシグナル伝達

岐阜大学 医学部

北島 康雄・清島 真理子

The signal transduction involved in the regulation of cell-cell contacts is supposed to play an important role in keratinocyte differentiation. To elucidate signaling mechanisms to regulate keratinocyte functions, we employed pemphigus vulgaris (PV), which is a bullous disease caused by disruption of desmosomes (a cell-cell junction), as a model. In this disease, autoantibodies bind to the desmosomal junctional proteins, so that cell-cell detachment is induced. However, no precise mechanism for this phenomenon after the antibodies bind to the antigen has been known. In this study, the effects of PV-IgG on the intracellular concentrations of  $Ca^{++}$  and inositol 1,4,5-tris-phosphate and secretion of plasminogen activator (PA) were studied in cultured keratinocytes. PV-IgG caused increases in these second messengers and PA secretion, which were inhibited with phospholipase C (PLC) inhibitor; U73122. These results may suggest that PLC and  $Ca^{++}$  signaling pathway is involved in cell-cell detachment in PV.

## 要 約

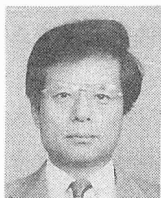
天疱瘡および類天疱瘡において抗体が表皮細胞表面に結合後にどのような過程を経て水疱形成に至るかについては、最終段階でプラスミノゲンアクチベータが分泌され、プラスミンが活性化され、これによる細胞間接着の消化に関与するということが推察されているものの不明な点が多い。本研究では、抗体結合後の細胞内シグナル伝達を解析した。培養表皮細胞の培地に天疱瘡IgGを添加し、細胞内カルシウム、イノシトール1, 4, 5-三リン酸 ( $IP_3$ ) の濃度、プラスミノゲンアクチベータの分泌の変化を検討した。その結果、天疱瘡IgGでは8例中7例で20秒をピークとする一過

性の細胞内カルシウムの増加が観察された。この反応は、EGTA前処理により細胞外のカルシウムをキレートしても変化はなかった。したがって、細胞内プールよりのカルシウムの動員によって、細胞内カルシウムの一過性の増加を引き起こすことが示唆された。

一方、類天疱瘡IgG 8例中7例、健常人IgG 14例中12例では細胞内カルシウムは変化しなかった。さらに、この天疱瘡IgGは添加後20秒をピークとする $IP_3$ の産生を誘導した。この反応は類天疱瘡、正常IgGでは見られなかった。また、天疱瘡IgGによって誘導される細胞内カルシウム濃度の上昇、 $IP_3$ 産生の増加およびプラスミノゲンアクチベータの分泌増加がホスリパーゼC (PLC) 阻害剤であるU73122によって抑制された。このことから、天疱瘡IgGにより誘導されるシグナル伝達系にPLCが関与していることが示唆された。

以上から、自己抗体結合後の天疱瘡水疱形成メカニズムには、カルシウムを介したシグナル伝達系が関与している可能性が示唆された。また、天疱瘡と類天疱瘡の発症過程において明らかな差異があると考えられた。

Signal transduction involved in the regulation of cell-cell junction and differentiation in keratinocytes  
: Involvement of calcium signaling in pemphigus IgG induced acantholysis  
Yasuo Kitajima  
Department of Dermatology  
Gifu University School of Medicine



## はじめに

天疱瘡の水疱形成には抗デスモゾーム抗体が原因と考えられており、尋常性天疱瘡 (PV) では抗デスモグレイン III 抗体が、葉状天疱瘡 (PF) では抗デスモグレイン I 抗体がその発症に大きな役割を果たすことが知られている<sup>1-3)</sup>。しかし、これらの抗体が表皮細胞表面に結合した後に、如何なる機序によって、天疱瘡に特有な表皮の棘融解が生じるかについては不明な点が多い<sup>3)</sup>。ところで最近、Cキナーゼの阻害剤であるH7が、天疱瘡抗体による棘融解形成を抑制したという報告<sup>4)</sup>があり、天疱瘡の棘融解形成において、カルシウム-Cキナーゼを中心としたシグナル伝達メカニズムが関与することが示唆されている。そこで、われわれは天疱瘡抗体結合後の表皮細胞において細胞内カルシウムが変化するか否かについて検討した。

## 材料と方法

### IgG の精製

尋常性天疱瘡 (PV) 5例、葉状天疱瘡 (PF) 3例、水疱性類天疱瘡 (BP) 8例および健康人 (N) 14例の血清より、ハイトラップープロテインA-アフィニティーカラム (ファルマシア社) を用いてIgG画分を得た。IgGの精度については免疫電気泳動で確認した。なお、天疱瘡および類天疱瘡の診断は、臨床症状、病理組織、直接および間接免疫蛍光法、さらに、ヒト表皮細胞あるいはDJM-1細胞を基質としたウエスタンブロット法によって行われた (表1)。

### 細胞内カルシウム濃度の測定<sup>5)</sup>

ヒト表皮細胞およびDJM-1細胞を継代した後2日間、1.0mMカルシウム入りイーグル培養液で培養し、subconfluentな状態で測定を行った。5 $\mu$ Mフラ2/AM (同仁化学) を37 $^{\circ}$ Cで1時間加えることにより、フラ2を細胞内に取り込ませ、洗浄後、精

表 1 Effects of IgGs from PV, PF, BP and normal sera on [Ca<sup>2+</sup>]

	Age	Sex	IF	IB	Ca <sup>2+</sup> Res		Age	Sex	Ca <sup>2+</sup> Res		
PV	1	34	F	>40x	130KD	+	Nor	1	37	F	-
	2	U	F	>40x	130KD	-		2	60	M	+
	3	65	M	>40x	130KD	+		3	57	F	-
PF	1	41	F	>640x	150KD	+		4	46	F	-
	2	55	M	ND	-	+		5	51	F	-
	3	57	F	>40x	150KD	+		6	33	F	-
BP	1	30	M	>40x	180KD	-		7	42	M	-
	2	U	F	>40x	180KD	+		8	45	M	-
	3	U	F	640x	230KD	-		9	30	F	+
	4	69	F	640x	230KD	-		10	35	F	-
	5	60	F	ND	180KD	-		11	43	M	-
	6	43	F	ND	180, 230KD	-		12	63	M	-
	7	75	M	ND	180, 230KD	-		13	69	M	-
	8	65	M	ND	180KD	-		14	70	F	-

製したIgG (1mg/ml) を培養液に添加し、アーガス100-イメージング蛍光顕微鏡および画像解析装置 (浜松ホトニクス) を用いて細胞内カルシウム濃度の変化を検討した。

### イノシトール、1、4、5三リン酸の測定<sup>6)</sup>

1.8mMカルシウムを含有するイーグル培養液で培養したヒト表皮細胞の培養液にIgGを加え、一定時間後に10%過塩素酸により反応を停止した。IP<sub>3</sub>の定量はIP<sub>3</sub>特異的結合蛋白質を含むIP<sub>3</sub>アッセイキット (アマシャム) を用いて行った。

### プラスミノゲン・アクチベーター活性の測定

DJM-1細胞の培養液にIgGおよびU73122 (10<sup>-4</sup>-10<sup>-5</sup>M) を添加した。コントロールとしてU73122の不活性アナログであるU73343 (10<sup>-5</sup>M) を添加した。その9, 15, 24および36時間後に培養液を採取し、液中に含まれるプラスミノゲン・アクチベーター (PA) 活性をtwo-step amidolytic assay<sup>7, 8)</sup>を用いて測定した。

## 結 果

### 天疱瘡および類天疱瘡IgGによる細胞内カルシウム濃度の変化

無刺激時の細胞内カルシウム濃度は98.8 $\pm$ 20.2nM (n=85) であった。IgG添加後の変化をみるとPVIgG 5例中4例、PF 3例全例でヒト表皮細

胞、DJM-1細胞ともに20秒をピークとする、一過性のカルシウム濃度の上昇とその後のゆっくりとした下降が観察され、4~5分後には無刺激時の値に復した。PVIgG 1例では、両細胞ともカルシウム濃度は5分後まで変化しなかった。BPIgG添加後には8例中7例でカルシウム濃度に変化はみられなかった。1例ではPVあるいはPFIgG添加時と同様の変化が観察された。正常(N) IgGを添加した際には14例中12例でヒト表皮細胞、DJM-1細胞ともに反応はみられなかった。しかし、2例では一過性に細胞内カルシウムが増加した(図1)。

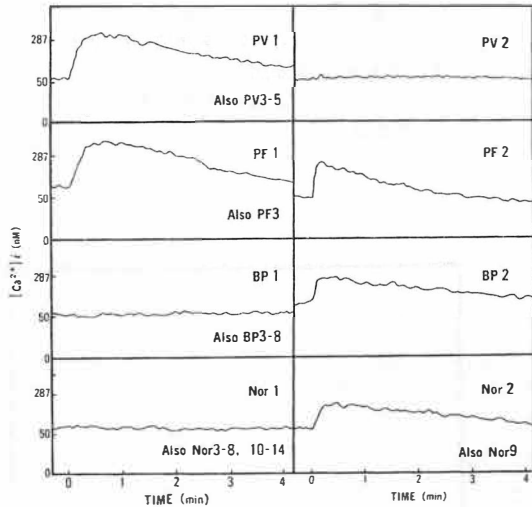


図1. 各種IgG添加後の細胞内Ca<sup>2+</sup>の変動、  
PV: 尋常性天疱瘡IgG、  
PF: 落葉上天疱瘡IgG、  
BP: 類天疱瘡IgG、  
Nor: 正常ヒトIgG、数字は症例番号

このような細胞内カルシウム濃度の変化を数量的に表すために、ピーク時におけるカルシウム濃度の増加量およびピークのみられない例ではIgG添加20秒後の増加量の平均を求めた。その結果、天疱瘡IgGでは99.9±63.9nM (n=8)、類天疱瘡では15.0±42.4nM (n=8)、健康人IgGでは15.1±36.8nM (n=14)であり、天疱瘡IgGは健康人および類天疱瘡IgGと比較して有意に細胞内カルシウム濃度を上昇させる (P<0.001) ことが明らかに

なった。このような天疱瘡IgGによる細胞内カルシウムの一過性の増加が細胞外からのカルシウムの流入によるのかという点について検討した。0.1mMEGTAを含む、すなわち細胞外カルシウムをキレートした培養液で5分間前処理した後に天疱瘡IgGを加えたところ、1.8mMの場合と同様の変化を示した(図2)。

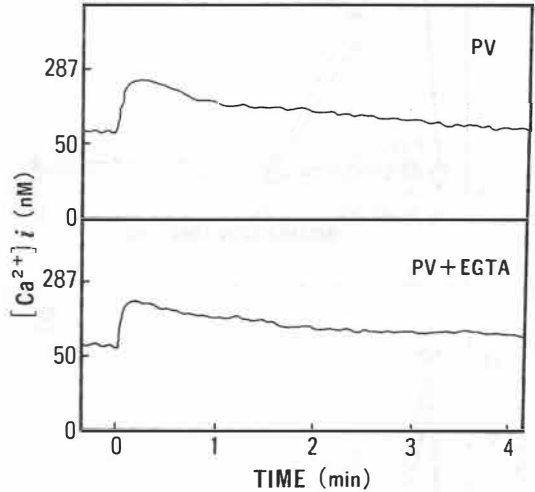


図2. PVIgG添加後の細胞内Ca<sup>2+</sup>の動員に対する細胞外Ca<sup>2+</sup>除去の影響  
PV: 尋常性天疱瘡IgGのみ添加、  
PV+EGTA: EGTAを添加したのちに尋常性天疱瘡IgGを添加

### 天疱瘡IgGによるIP<sub>3</sub>量の変化

PV, PF, BPおよび正常(N) IgGの各々症例1、2について、添加後のDJM-1細胞内IP<sub>3</sub>量の変化を検討したところ、細胞内カルシウムが増加反応を示した症例であるPVI、PF1、BP2、N2のIgGを添加した際には、IP<sub>3</sub>は20秒をピークとして一過性の上昇を示し、その後2分後には添加前の値に戻った。一方、細胞内カルシウムの変化を引き起こさなかったPV症例2、PF2、BP1およびN1のIgGを添加した場合にはIP<sub>3</sub>量は変化しなかった(図3A、B)。

### 天疱瘡IgGによる細胞内カルシウム濃度およびIP<sub>3</sub>産生増加に対するU73122の影響

天疱瘡IgGによる細胞内カルシウム濃度の一過

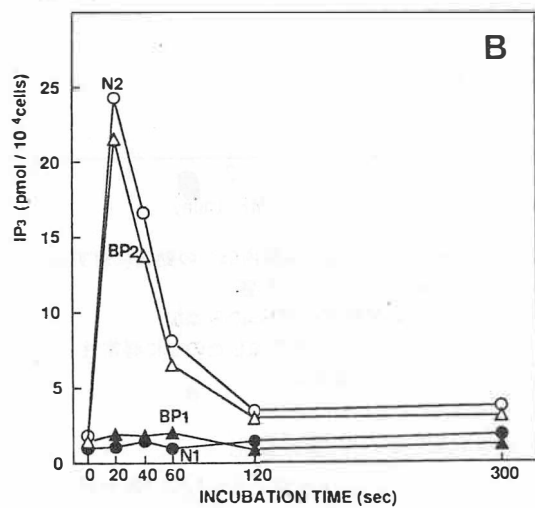
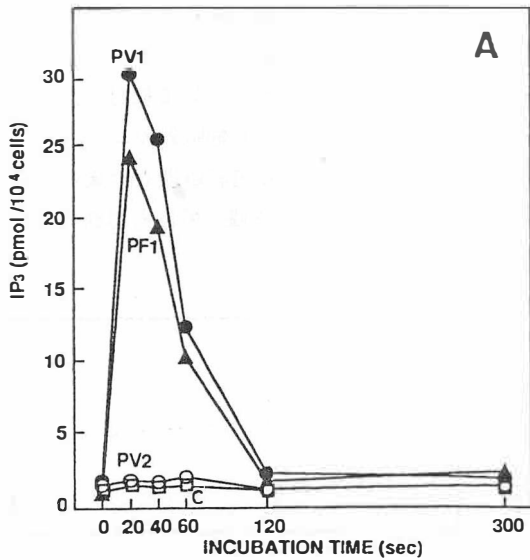


図3A. PV及びPF1 IgG添加後の細胞内IP<sub>3</sub>の変動  
 PV: 尋常性天疱瘡IgG、  
 PF: 落葉上天疱瘡IgG、数字は症例番号  
 3B. 一過性細胞内カルシウム上昇を来したBP  
 及びNor IgG添加後の細胞内IP<sub>3</sub>の変動  
 BP: 類天疱瘡IgG、正常ヒトIgG、  
 数字は症例番号

性の上昇(図4a, b)は1 μM(c)あるいは10 μM(d) U73122を30分前処理することにより抑制された。また、5分間前処理によっても抑制された(e)。しかし、10 μM U73343では抑制されなかった(f)。さらに、天疱瘡IgG添加後のIP<sub>3</sub>産生増加も

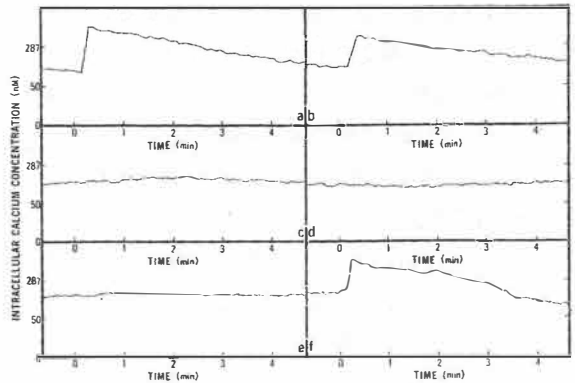


図4. PV IgG誘導による細胞内Ca<sup>2+</sup>増加に対するU73122の影響 a: MEM, b: 0.01%DMSO, c: 1 μM U73122, d: 10 μM U73122, f: 10 μM U73343, 各々を添加した30分後に天疱瘡IgGを添加, e: 10 μM U73122を添加5分後に天疱瘡IgGを添加

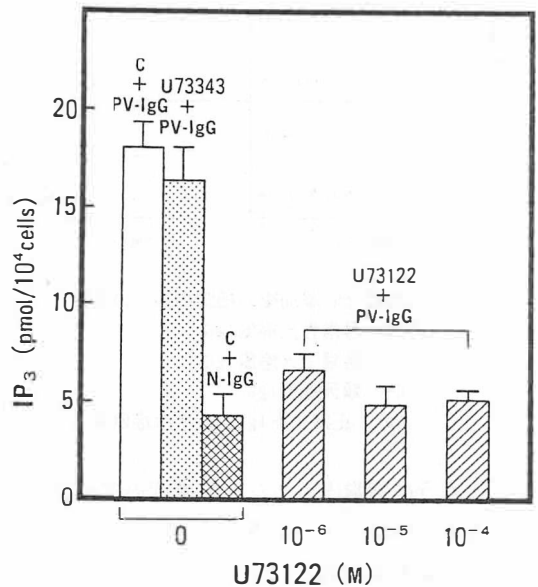


図5. U73122による、天疱瘡IgG誘導性IP<sub>3</sub>産生の抑制  
 C+PV-IgG: 0.01%DMSO+天疱瘡IgG、  
 U73343+PV-IgG: 10 μM U73343+天疱瘡IgG、  
 C+N-IgG: 0.01%DMSO+正常ヒトIgG、  
 U73122+PV-IgG: 各濃度のU73122+天疱瘡IgG、  
 各々IgG添加20秒後のIP<sub>3</sub>量を表す。

U73122 ( $10^{-6}$ – $10^{-4}$  M) 30分前処理により抑制された。しかし、U73343 ( $10^{-5}$  M) では抑制されなかった (図5)。

#### 天疱瘡IgGによるプラスミノゲン・アクチベーター (PA) 分泌増加に対するU73122の影響

天疱瘡IgGは類天疱瘡IgG および正常ヒトIgGと比較して、24および48時間後に有意にPA分泌を増加させた ( $p < 0.005$ )。この増加はU73122 ( $10^{-4}$ – $10^{-5}$  M) により抑制された ( $P < 0.005$ ) が、U73343では抑制されなかった (図6)。

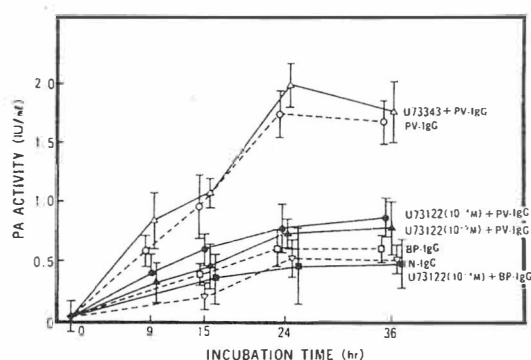


図 6、天疱瘡IgGによるプラスミノゲンアクチベーター分泌に対するU73122の影響

PV-IgG: 天疱瘡IgG、  
BP-IgG: 類天疱瘡IgG  
N-IgG: 正常ヒトIgG

## 考案

今回の研究結果から、天疱瘡IgGはヒト表皮細胞内においてカルシウムの急速な一過性の上昇を引き起こすことが明らかになった。ところで、一般に細胞内カルシウムの上昇は細胞外からの流入と小胞体などの細胞内プールからの動員<sup>9)</sup>が考えられており、また、小胞体よりのカルシウムの動員はIP<sub>3</sub>によって誘導されることがすでに明らかになっている<sup>9)</sup>。天疱瘡IgGによる場合にはIP<sub>3</sub>量が一過性に増加していること、細胞外カルシウムをキレートした際にも細胞内カルシウムは天疱瘡IgGにより上昇がみられたことから、天疱瘡IgGによって誘導される細胞内カルシウムの一過性の増

加は、細胞内プールからの動員であると考えられた。天疱瘡8例中1例ではこのような反応がみられなかったが、その原因については不明であり、今後検討したい。

類天疱瘡8例中7例のIgGでは細胞内カルシウム濃度の変化はみられなかった。したがって、天疱瘡と類天疱瘡では、デスマゾームとヘミデスマゾームという抗体の標的となる構造が異なるのみならず、各々の抗体が細胞表面に付着後から水疱形成に至る過程に差異のあることが示唆された<sup>10)</sup>。しかし、類天疱瘡の1例 (症例2)、健康人の2例においても天疱瘡と同様な細胞内カルシウム増加がみられた。IgG分画には抗デスマゾーム抗体以外にも多数の種類抗体が存在する可能性があり、これらの抗体に対して反応した可能性は否定できない。しかし、ニトロセルロース膜上の類天疱瘡抗原によって、BP症例2IgGから類天疱瘡抗体を吸収し、そのIgGを添加した際には、細胞内カルシウムは変化しなかった。したがって、一部の類天疱瘡においては、水疱形成の過程で細胞内カルシウムの変化が関与している可能性が考えられた。

さらに、ホスホリパーゼC (PLC) の阻害剤であるU73122を用いて、天疱瘡IgGが表皮細胞表面に結合後に起こるカルシウムを中心としたシグナル伝達系にPLCが関与していることを示した。

このように本研究は、天疱瘡においては抗体が細胞表面に付着した後に、PLCの活性化およびIP<sub>3</sub>産生を介して細胞内プールよりカルシウムの動員がおり、細胞内でカルシウムが一過性に増加することを示した<sup>11, 12)</sup>が、PLCによってIP<sub>3</sub>と同時に産生される1,2ジアシルグリセロールの量的変化あるいはCキナーゼの活性化、さらにはリン酸化される蛋白質があるのかなど未解決の点を多く残している。今後これらの点について検討したい。

## 文献

- 1) 北島康雄: 皮膚臨床、35 1177-1186 1993
- 2) 北島康雄: 医学のあゆみ、174 95-99 1995

- 3) 北島康雄 : 皮膚病診療、17 1024-1028 1995
- 4) Kowalewski C et al : *Eur J Dermatol*, 4 238-242 1994
- 5) Seishima M et al : *Arch Dermatol Res*, 285 397-401 1993
- 6) Seishima M et al : *Biochem Biophys Res Commun*, 156 1077-1082 1988
- 7) Leytus SP et al : *Biochemistry*, 20 4307-4314 1981
- 8) Cramer FM et al : *Exp Dermatol*, 2 239-246 1993
- 9) Nishizuka Y : *Science*, 258 607-612 1992
- 10) Kitajima Y et al : *Dermatology*, 189 46-49 1994
- 11) Seishima M et al : *J Invest Dermatol*, 104 33-37 1995
- 12) Kitazima Y : *Eur J Dermatol*. 6 1996 in press

# 微生物に由来する多糖分解酵素の コスメトロジーへの応用

東京工業大学 生命理工学部

中 村 聡

$\beta$ -1,4-Xylans, major components of plant hemicelluloses, are heterogeneous polysaccharides that have a backbone of  $\beta$ -1,4-linked xylopyranose units. Xylanases (1,4- $\beta$ -D-xylan xylanohydrolase; EC3.2.1.8) catalyze the hydrolysis of xylan to xylooligosaccharides and xylose. Recently, we have isolated alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M-1 from soil. Strain 41M-1 secreted multiple xylanases and one major form of them, termed xylanase J, had an alkaline pH optimum. In this study, we describe cloning, sequencing and specific mutagenesis of the gene encoding xylanase J from strain 41M-1.

A genomic library of strain 41M-1 was screened for xylanase activity to obtain a 2.2-kb Eco RI-Sph I fragment containing the xylanase J gene. Then, the nucleotide sequence of the 2.2-kb fragment was determined. The putative xylanase J gene contained an open reading frame of 1,062 bp and encoded a 27-aa leader peptide followed by a 327-aa mature enzyme. The promoter-like sequence and typical Shine-Dalgarno sequence were observed upstream from the possible TTG start codon. A perfect 14-bp inverted repeat, corresponding to a transcriptional terminator, occurred downstream from the TAG stop codon.

The xylanase J gene was expressed in *Escherichia coli*. More than 90% of xylanase activity was located in the periplasmic space. Characteristics of the *E. coli*-produced xylanase J were quite equal to those of the enzyme from strain 41M-1. The deduced amino acid sequence of xylanase J was compared with the sequences of other bacterial xylanases. The potential catalytic domain of xylanase J was located at the N-terminus and had strong similarity to family G xylanases, suggesting that the enzyme also belonged to the family G hydrolases. A linker sequence rich in Ser, Thr and Pro occurred between the catalytic domain and an additional domain at the C-terminus. This C-terminal domain of unknown function showed no significant similarity to any other proteins.

Two Glu residues, previously identified as essential for catalytic activity in the family G xylanase from *Bacillus pumilus*, are conserved in xylanase J at positions 93 and 183. These two Glu residues were targeted for mutational analysis. Substitution of Glu-93 or Glu-183 by Gln (mutants E93Q and E183Q, respectively) drastically reduced xylanase activity. The carboxylic residues of these two Glu would probably act by general acid catalysis as has been shown for other hydrolytic enzymes such as lysozyme. The enzyme activity of xylanase J was inhibited by N-bromosuccinimide, suggesting that Trp and/or Tyr was involved in catalysis. Some of Trp and Tyr in xylanase J were replaced by Phe. The large decrease in activity were observed with the mutant enzymes W18F, W86F, Y84F and Y95F. These results suggest that Trp-18, Trp-86, Tyr-84 and Tyr-95 play important roles in binding of the substrate.

## 1 緒 言

通常の生物が生育できないような極限環境に棲息する微生物（極限微生物）の存在が知られてい

る<sup>1)</sup>。これらの極限微生物が生産する酵素は極限条件においても機能するものが多く、その応用性に着目した研究が広く行われてきた。しかしながら、極限微生物由来の酵素がどのようにして極限環境に適応しているかについては、不明な点が多く残されている。わずかに好熱性微生物に由来する酵素について、その耐熱性機構の解明をめざした研究が進められているものの、例えば好アルカリ性微生物由来の酵素のアルカリ性への適応機構に関する研究は、ほとんど行われていないのが現状である。

Application of Microbial Polysaccharide-degrading enzymes to Cosmetology

Satoshi Nakamura

Faculty of Bioscience and Biotechnology,

Tokyo Institute of Technology



$\beta$ -1,4-キシランは陸上植物の細胞壁中に多く含まれる多糖であり、D-キシロースが $\beta$ -1,4結合を介して連なった主構造をとる。キシランの $\beta$ -1,4結合を加水分解する酵素がキシラナーゼ(1,4- $\beta$ -D-xylan xylanohydrolase; EC3.2.1.8)である。近年、綿実穀・トウモロコシなどから抽出した多糖類をキシラナーゼ処理して生産したキシロオリゴ糖が、皮膚保湿成分として化粧品に配合され、市販されるに至っている。一般に、キシランなどの多糖類はアルカリ性で水に溶けやすくなることから、植物多糖の分解によるキシロオリゴ糖生産を目的とした場合、アルカリ性条件下で高活性を有するキシラナーゼが有利であることは論を待たない。

キシラナーゼは、多くの細菌や糸状菌などによって生産される<sup>2, 3)</sup>。現在までに報告されている微生物由来のキシラナーゼのほとんどは、反応の至適pHを酸性から中性領域に有するものであった。一方、好アルカリ性微生物や耐アルカリ性微生物の生産するキシラナーゼも報告されている<sup>4)</sup>。これらのキシラナーゼの中には広い作用pH範囲をもつものもあるが、アルカリ性側に反応の至適を有する酵素はこれまで知られていなかった。以前我々は、キシラナーゼ生産菌である好アルカリ性バシラス属細菌41M-1株の分離に成功している<sup>5)</sup>。41M-1株が生産するキシラナーゼの1つ、キシラナーゼJの精製を行い、その諸性質

を検討した。その結果、キシラナーゼJはpH9.0のアルカリ性領域に反応の至適を有する新規な酵素であることが明らかとなった (Table. 1)<sup>6, 7)</sup>。

本研究では、アルカリ性条件下で高活性を示すことからキシロオリゴ糖生産用の酵素としての利用が期待されるキシラナーゼJを例にとり、その触媒機構や好アルカリ性機構を分子レベルで解明することを目的とした。すなわち、キシラナーゼJをコードする遺伝子のクローニングと大腸菌における発現を行った。さらに、他酵素とのアミノ酸配列比較による機能領域の推定を行い、タンパク質工学による活性アミノ酸残基の特定を試みた。

## 2 実験

### 2.1 菌株、プラスミドおよび培地

好アルカリ性バシラス属細菌41M-1株<sup>5)</sup>はキシラナーゼ生産菌である。宿主としては大腸菌HB101株(クローニング)、MV1184株(遺伝子発現)、CJ236株およびBMH71-18mutS株(部位特異的変異)を使用した。大腸菌用ベクターにはプラスミドpUC119を用いた。

41M-1株の培養にはアルカリ性天然培地<sup>5)</sup>を、そして大腸菌の培養にはL培地<sup>8)</sup>を用いた。必要に応じ、キシランやアンピシリンを添加して使用した。

### 2.2 クローニング技術

遺伝子クローニングおよび塩基配列決定はSambrookら<sup>9)</sup>のマニュアルに従って実施した。部位特異的変異はKunkel法<sup>9)</sup>で行った。

### 2.3 キシラナーゼ活性の評価

大腸菌の培養物を菌体外・ペリプラズム・菌体内画分に分離<sup>10)</sup>した。各画分に含まれるキシラナーゼの活性測定は、既報<sup>5)</sup>に従って実施した。反応はpH9.0、37°Cで10分間行い、基質キシランの濃度は1.2%とした。

Table. 1 Properties of xylanase J

Molecular mass	36.0 kDa
pI	pH 5.3
Optimum pH	pH 9.0 (at 37°C)
Optimum temperature	50°C (at pH 9.0)
Temperature stability	≤55°C (at pH 9.0)
Inhibited by	HgCl <sub>2</sub> , N-bromosuccinimide
Main products	≥X <sub>2</sub>
K <sub>m</sub> value	3.3 mg/ml
V <sub>max</sub> value	1,100 μmol/min-mg

各種変異型キシラナーゼJの活性評価には、ペリプラズム画分を用いた。各ペリプラズム標品に含まれる野生型あるいは変異型酵素の定量は、野生型キシラナーゼJに対するウサギ抗血清を用いた抗原ELISA法にて行った。活性測定とELISA法によるタンパク質定量の結果から、比活性を算出した。

### 3 結果と考察

#### 3.1 キシラナーゼJ遺伝子のクローニング

好アルカリ性バシラス属細菌41M-1株の染色体DNAライブラリーを作製した。キシランを含む寒天培地上でのハローの形成を指標として、キシラナーゼJ遺伝子を含む陽性クローンを選抜した。サブクローン解析の結果、キシラナーゼJ遺伝子は約2.2kbのEcoRI-SphI断片中にコードされていることがわかった。このキシラナーゼJ遺伝子断片を含む組換えプラスミドpAXJ3Rの制限酵素地図をFig.1に示す。

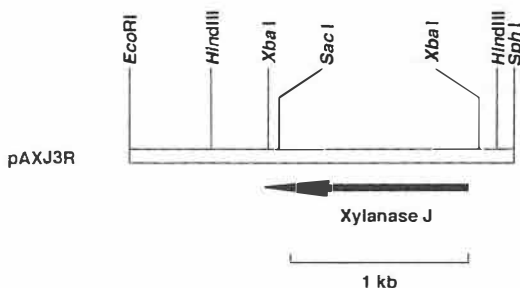


Fig.1 Restriction map of the plasmid pAXJ3R. The double line represents the chromosomal DNA fragment from strain 41M-1. The arrow shows the position of the xylanase J gene.

キシラナーゼJ遺伝子を含むDNA断片の塩基配列を決定したところ、1,062塩基からなる、354アミノ酸をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)が見出された(Fig.2)。このORFは翻訳開始コドンとしてTTGを使用しているが、キシラナ

ーゼJ遺伝子の5'上流域に部位特異的変異で塩基置換を導入した実験から、その妥当性が確認されている(データ示さず)。ORFの上流には、細菌において機能しうるプロモーター様配列(-35領域および-10領域)およびShine-Dalgarno配列が認められた。そして終止コドンTAGの49塩基下流には、ターミネーターとして機能しうる逆向き反復配列(14塩基x2)が見出された。

キシラナーゼJタンパク質のアミノ末端(N末端)アミノ酸配列<sup>7)</sup>との比較により、成熟型酵素はアラニンから始まる327アミノ酸から構成されることがわかった。成熟型酵素の上流に存在する27アミノ酸は、分泌に関与するシグナルペプチドと考えられた。

#### 3.2 キシラナーゼJ遺伝子の大腸菌における発現

プラスミドpAXJ3Rを有する大腸菌の培養を行い、菌体外・ペリプラズム・菌体内画分に分画した後、各画分に含まれるキシラナーゼ活性を調べた。その結果、41M-1株由来のプロモーターの働きでキシラナーゼJ遺伝子の大腸菌における発現が起こり、90.3%の活性がペリプラズム画分に局在することがわかった(Table.2)。ペリプラズム画分に含まれるキシラナーゼを精製し、その性質を調べたところ、大腸菌が産生した組換え型キシラナーゼJも41M-1株由来の酵素と同様な性質を有していた(データ示さず)。組換え型キシラナーゼJのN末端アミノ酸配列も41M-1株由来の酵素と同一であり、キシラナーゼJのシグナルペプチドがペリプラズムへの分泌に際して機能したものと考えられた。

#### 3.3 キシラナーゼJおよび他酵素のアミノ酸配列比較

遺伝子配列より類推されるキシラナーゼJのアミノ酸配列を、他のキシラナーゼのものと比較した。その結果、キシラナーゼJのN末端側2/3の領域は、*Bacillus pumilus*に由来するキシラナ

ATCTATACTTGTAAAGTGATATTGGGAAAAGAGTTTGATAACATTTAAATGTAAGCGTTTACAAATATTGACTAAAGGAGGTATTCTAG  
 -35 -10

AATTTTCGTTATGATCCAAACCGTAAAAAATTATAGGAGGTATGCCGTTTGAACAAGTAAAAATCATGTTTTTAATGACGATGTTTTTA  
 SD M K Q V K I M F L M T M F L

GGAATTGGTTTGTATTTTCTCTGAAAAATGCAGAGGCAGCTATTACTTCTAATAGATTGGCACACATGACGGATATGACTATGAATTT  
 G I G L L F F S E N A E A A I T S N E I G T H D G Y D Y E F

TGGAAGGACAGCGGTGGTTCTGGAAGTATGACATTAATAGTGGAGGCACATTTAGTGCTCAATGGAGTAATGTGAACAACATTTTATTC  
W K D S G G S G S M T L N S G G T F S A Q W S N V N N I L F

CGTAAAGGAAAAAGTTGATGAGACAAACTCATCAACAAATGGAAATATGTCCATTAACATGTTGCCACTTACAATCCTAATGGA  
R K G K K F D E T Q T H Q Q I G N M S I N Y G A T Y N P N G

AACTCCTATTTAACTGTATATGGTTGGACAGTAGATCCCTTAGTAGAATTTTATATTGTTGATAGCTGGGAAACGTGGCGTCCGCCAGT  
 N S Y L T V Y G W T V D P L V E F Y I V D S W G T W R P P G

GGAACACCGAAAGGAACGATTAATGTAGATGGTGAACCTATCAAATATATGAAACCACACGCTATAACCAACCATCTATAAAGGAAC  
 G T P K G T I N V D G G T Y Q I Y E T T R Y N Q P S I K G T

GCAACTTTTCAGCAACTACTGGAGCGTAAGAACCCTCAAACCTACAAGTGAACGATTTCTGTGAGCGGAGCACTTTAGAGCTTGGGAAAGT  
 A T F Q Q Y W S V R T S K R T S G T I S V S E H F R A W E S

TTAGGTATGAATATGGGAAATATGTACGAGGTTGCTTTAACGGTCGAGGGCTACCAAAGTAGCGGGAGCGCAAATGTTTATAGCAATACC  
 L G M N M G N M Y E V A L T V E G Y Q S S G S A N V Y S N T

TTAATATAGGAGGACAATCTGGTGGTGGAGCAAGCAACTAGAGTAGAAGCAGAAAGTATGACAAAGGTTGGACCTTACACCTCTAATATT  
 L T I G G Q S G G E Q A T R V E A E S M T K G G P Y T S N I

ACTTCTCCTTTAACGGGATGCTTTATATGCAAAATGGTGATAATGTGAGCTTTAATCATTCAACCAAGCAACAGTAGTTTTTCA  
 T S P F N G V A L Y A N G D N V S F N H S F T K A N S S F S

TTACGGGAGCCTCCAATAACTCAACATGGCTAGAGTTGATCTGAGGATAGGTGGTCAAATAGGGGAACCTTTTACTTTGGAGATCAA  
 L R G A S N N S N M A R V D L R I G G Q N R G T F Y F G D Q

TATCCGGCTGTCTATAACCATTAATAACATCAACCATGGAATAGGGAAATCAATAGTTCGAGCTCATTGTAACAGCTGATGACGGAACATGG  
 Y P A V Y T I N N I N H G I G N Q L V E L I V T A D D G T W

GATGCTTATTAGACTATCTAGAATAAGGTAGATTATAAGTAAACCTTAAAGACTGTTACAGAATAAATCTCTGATTTAAAAGGTGAA  
 D A Y L D Y L E I R

ATGGAAAAATTCATTTACCTTATCTATTTTCTAGGTTGACTGTTAAAGCAGTAGAATCAACTGTTTGTCTCTGTTTTTAATTTAA  
 ← →

Fig. 2 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence for the xylanase J gene. The location of the possible promoter (-35 and -10 sites) and Shine-Dalgarno sequences are shown overlined. A terminator-like, inverted repeat sequence is indicated by arrows facing each other. The boxed region denotes the N-terminal amino acid sequence as determined from xylanase J from strain 41M-1.

ゼ<sup>11)</sup>と71%の相同性を有していることが明らかとなった。セルラーゼおよびキシラナーゼは、その触媒ドメインのアミノ酸配列に基づき、11のファミリーに分類されている<sup>12)</sup>。現在までに全塩基配列が決定されているキシラナーゼは、すべてファミリーFまたはGに分類されている。上述の*B. pumilus* キシラナーゼはファミリーGに属することが知られている。キシラナーゼJのN末端側の2/3は他のファミリーGキシラナーゼとも36~69%の高い相同性を示したことより (Fig. 3)、本酵素もファミリーGに属するものと考えられた。

N末端側のファミリーG触媒ドメインのさらにカルボキシル末端(C末端)側には、約100残基からなるポリペプチド鎖が結合している。このC末端側1/3に相当する領域について相同性検索を行ったところ、既知タンパク質との間にアミノ酸配列の相同性は認められず、その機能は不明であった。

キシラナーゼJのN末端側の触媒ドメインとC末端側の機能未知領域との間には、セリン・スレオニン・プロリンに富む領域が認められた。この領域は、ドメイン間に存在し、連結機能を果たす

ンカー配列と考えられた。以上の解析結果に基づくキシラナーゼJのドメイン構成を Fig. 4に示した。

3.4 触媒活性に関与するアミノ酸残基の特定

キシラナーゼJの触媒活性に関与するアミノ酸残基を特定する目的で、その触媒ドメインにアミ

Table.2 Subcellular distribution of xylanase activity in E. coli carrying pAXJ3R

Fraction	Activity (U/ml-culture) [%]	
Extracellular	0.495	[9.1]
Periplasmic	4.90	[90.3]
Cytoplasmic	0.0300	[0.6]

Table.3 Specific activity of xylanase mutants

Enzyme	Activity (U/ml-culture)	Protein (mg/ml-culture)	Specific activity (U/mg)
Wild type	4.3	0.033	130
E93Q	0.20	0.10	2.0
E183Q	<0.001	0.069	<0.014
W18F	1.4	0.072	20
W86F	0.98	0.030	32
W100F	5.6	0.039	140
W103F	2.1	0.013	160
W144F	5.2	0.030	170
W165F	7.6	0.081	94
Y80F	8.9	0.066	140
Y84F	0.005	0.048	0.11
Y95F	0.006	0.048	0.13
Y121F	0.95	0.0051	190
Y185F	4.4	0.017	260

```

1  AITSNEIGTHDGYDFWKDSGGSGSMTLNSGGTFSAQWSNVNINILFRKGGKFDDETQTHQQIGNMSINYGATYNPNGNSYLTIVYGWTVDP 90
   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
91  LVEFYIVDSWGTWRPPGGTTPKGTINVDGGTYQIYETTRYNQPSIKGTATFQQYWSVRTSKRTSGTISVSEHFRAWESLGMNMGMYEVAL 180
   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
181  TVEYQSSGSANVYSNTLTIGGQSGGEQATRVEAESMTKGGPYTNSITSPFNQVALYANGDNVSNFHSFTKANSSFSLRGASNNSNMARV 270
   * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
271  DLRIGGQNRGTFYFGDQYPAVYTINNINHGIGNQLVELIVTADDGTWDAYLDYLEIR 327
    
```

Fig.3 Amino acid sequence of xylanase J. Amino acids that are conserved at least 70% of known family G xylanase sequences are shown by asterisks. Putative catalytic residues are boxed.

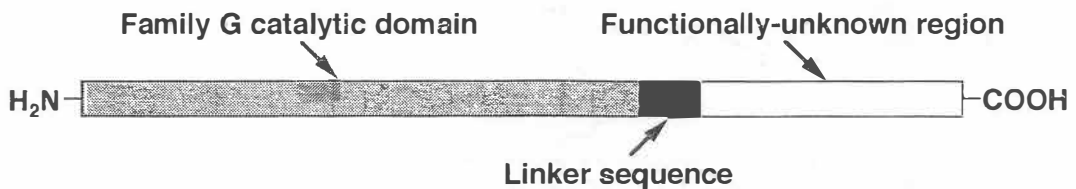


Fig.4 Structural feature of xylanase J.

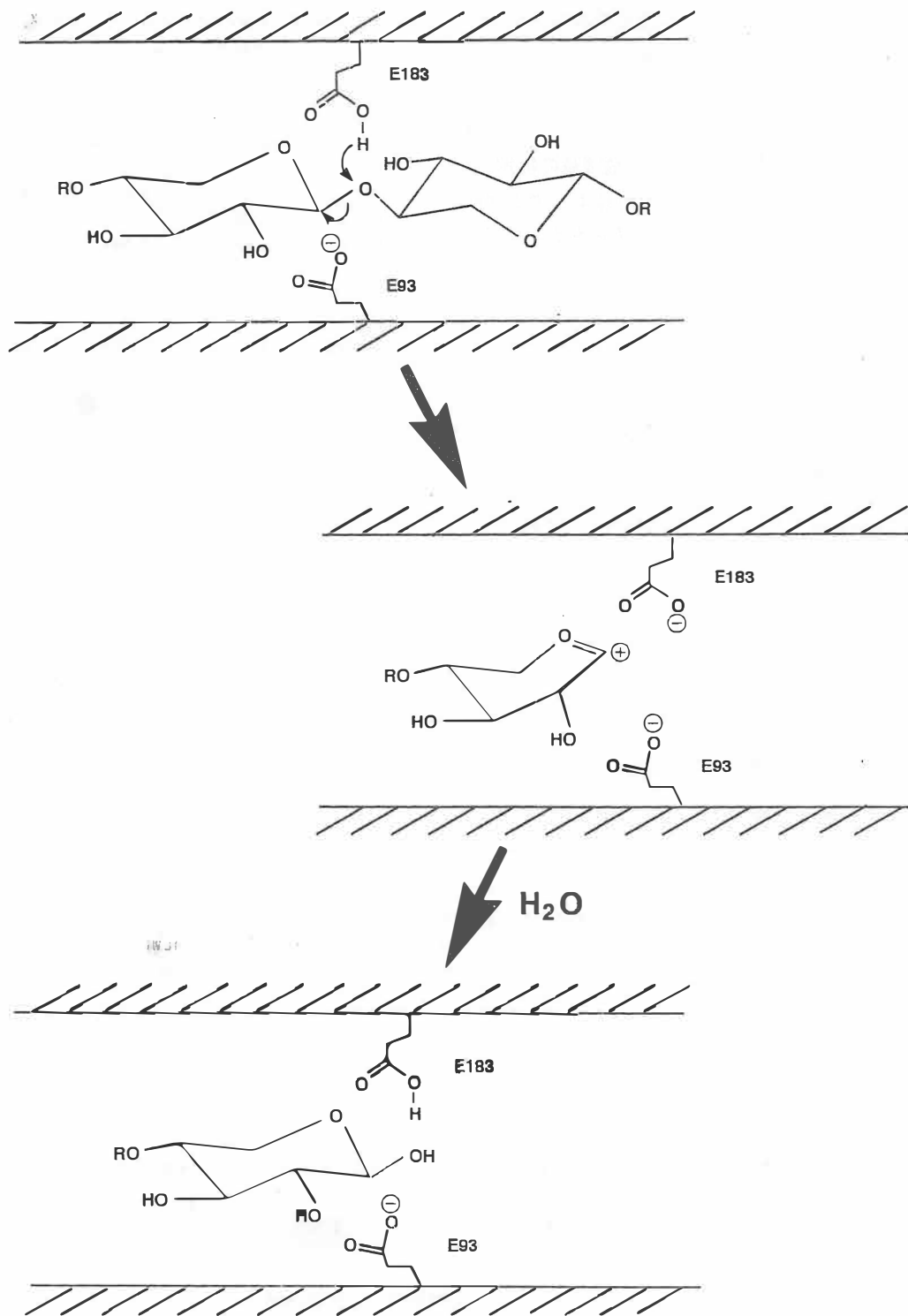


Fig. 5 Putative reaction mechanism of xylanase J.

ノ酸置換を施した変異型酵素を調製し、野生型酵素との活性比較を行った。本酵素と相同性の高い *B. pumilus* キシラナーゼにおいては、触媒活性に関与する2つのグルタミン酸残基が既に同定されている<sup>13)</sup>。これらのグルタミン酸残基は他のすべてのファミリーGキシラナーゼにおいても保存されており、キシラナーゼJにおいてはGlu93およびGlu183が対応している。これら2つのグルタミン酸のグルタミンへの置換（それぞれ、変異体E93QおよびE183Q）により活性は大きく低下した

ことから (Table. 3)、本酵素においてもGlu93およびGlu183が触媒残基として機能していると考えられた<sup>14)</sup>。細菌細胞壁分解酵素のリゾチームに関しては既に詳細な研究がなされており、2つのカルボキシル基が関与する触媒機構が明らかにされている<sup>15)</sup>。*B. pumilus* キシラナーゼについてもリゾチームになぞらえた触媒機構が提唱されており、キシラナーゼJにおいても同様な触媒機構が考えられた (Fig. 5)。

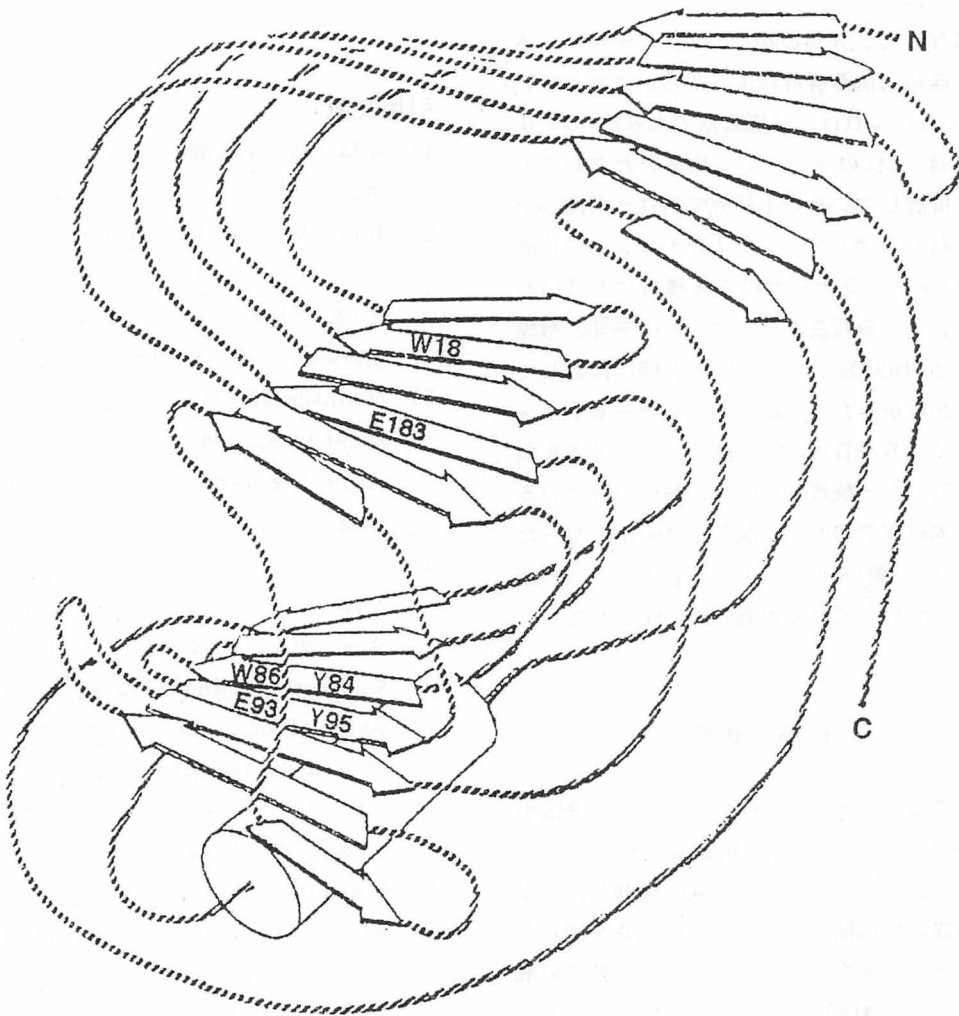


Fig. 6 Tertiary structure of *B. pumilus* xylanase. E93, E183, W18, W86, Y84 and Y95 indicate the corresponding position of Glu-93, Glu-183, Trp-18, Trp-86, Tyr-84 and Tyr-95 in xylanase J, respectively.

キシラナーゼJの活性はN-ブロモコハク酸イミドによる阻害を受け、トリプトファンやチロシンなどのアミノ酸残基の活性への関与が示唆されていた<sup>7)</sup>。そこで、本酵素の触媒ドメイン中に存在するトリプトファン・チロシンのうち、11カ所にアミノ酸置換(フェニルアラニンへ置換)を施した。その結果、Trp18, Trp86, Tyr84およびTyr95の活性へ関与への関与が示唆された(Table. 3)<sup>14)</sup>。キシラナーゼ活性に関与するトリプトファン残基はこれまで特定されておらず、本研究が初めての例である。

最近になって、*B. pumilus* キシラナーゼの立体構造がX線結晶構造解析により明らかにされている<sup>16)</sup>。それによれば、触媒残基である2つのグルタミン酸は、2枚のβシートに挟まれたクレフトの内部に位置している。本研究で活性への関与が示唆されたトリプトファンおよびチロシンの位置を*B. pumilus* キシラナーゼの立体構造にあてはめてみると、全ての残基がクレフトの中央部、触媒残基であるGlu93およびGlu183の近傍に位置していることがわかった(Fig. 6)。セルラーゼやキシラナーゼによる基質の認識に際しては、芳香族側鎖を有するアミノ酸残基の関与が報じられている<sup>17, 18)</sup>。本研究で活性への関与が明らかとなったトリプトファンやチロシンも、基質キシランの認識と結合に関与している可能性が示唆された。

#### 4 総括と展望

本研究ではキシラナーゼJをコードする遺伝子をクローニングし、その機能領域の推定を行った。さらに、タンパク質工学的検討を通じて、本酵素の触媒活性に関与するアミノ酸残基を明らかにすることができた。しかしながら、本酵素の触媒機構が完全に解明されたわけではなく、C末端側に存在するポリペプチド領域の機能も依然として不明である。今後は、触媒ドメインにアミノ酸置換を導入した各種変異型酵素の性質を詳細に調

べると共に、C末端側領域の機能解析を行い、本酵素の触媒機構と好アルカリ性機構を解明していきたい。

最近我々が分離した好熱好アルカリ性バシラス属細菌TAR-1株は、pH9.0というアルカリ性条件において70°Cに反応の至適を有する好熱性アルカリキシラナーゼを生産する<sup>19-21)</sup>。本研究で実施したようなタンパク質工学的検討を、自然界からのスクリーニングと併用することによって、より高温・高アルカリ性条件下で機能するようなキシラナーゼの取得が可能になるものと確信している。

#### 引用文献

- 1) 掘越弘毅：極限微生物：新しい遺伝子資源，講談社サイエンティフィック，東京，1988。
- 2) Wong KKY, Tan LUL, Sadler JN: Multiplicity of  $\beta$ -1, 4-xylanase in microorganisms: functions and applications, *Microbiol. Rev.*, 52 305-317 1988
- 3) Bastawde KB: Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 8 353-368 1992
- 4) 中村 聡：キシラナーゼ，掘越弘毅，秋葉暁彦編：好アルカリ性微生物，学会出版センター，東京，1993，216-213 頁。
- 5) Nakamura S, Wakabayashi K, Nakai R, *et al.*: Production of alkaline xylanase by a newly isolated alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M-1, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 9 221-224 1993
- 6) Nakamura S, Wakabayashi K, Horikoshi K, *et al.*: Alkaline xylanase Produced by newly isolated alkaliphilic *Bacillus* sp., In: Visser J, Beldman G, Kustervan Someren MA, *et al.* (eds): Xylans and xylanases, Elsevier Science, Amsterdam, 1992 443-446
- 7) Nakamura S, Wakabayashi K, Nakai R, *et al.*

- :Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M-1, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59 2311-2316 1993
- 8) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T :Molecular cloning : a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- 9) Kunkel TA, Robert JD, Zakour RA : Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phentypic selection, *Methods Enzymol.*, 154 367-382 1987
- 10) Nakamura S, Masegi T, Kitai K, *et al.* : Extracellular production of human tumor necrosis factor- $\alpha$  by *Escherichia coli* using chemically-synthesized gene, *Agric. Biol. Chem.*, 54 3241-3250 1990
- 11) Fukusaki E, Panbangred W, Shinmyo A, *et al.* : The complete nucleotide sequence of the xylanase gene (xyn A) of *Bacillus pumilus*, *FEBS Lett.*, 171 197-201 1984
- 12) Henrissat B, Bairoch A: New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, *Biochem. J.*, 293 781-788 1993
- 13) Ko EP, Akatsuka H, Moriyama H, *et al.* :Site-directed mutagenesis at aspartate and glutamate residues of xylanase from *Bacillus pumilus*, *Biochem. J.*, 288 117-121 1992
- 14) Nakamura S, Nakai R, Namba K, *et al.* :Structure-function relationship of the xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M-1, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 34 99-100 1995
- 15) Kirby AJ:Mechanism and stereoelectronic effects in the lysozyme reaction, *Crit. Rev. Biochem.*, 22 283-315 1987
- 16) 岡田弘輔 :キシラナーゼの構造と機能、山田秀明、別府輝彦、深沢俊夫編: 微生物の機能開発 : バイオ研究の最前線、学会出版センター、東京、1992 253-265 頁.
- 17) Juy M, Amit AG, Alazri PM, *et al.* : Threedimensional structure of a thermostable cellulase, *Nature*, 357 89-91 1992
- 18) Wakarchuk WW, Campbell RL, Sung WL, *et al.* : Mutational and crystallographic analyses of the active site residues of the *Bacillus circulans* xylanase, *Protein Sci.*, 3 467-475 1994
- 19) Nakamura S, Nakai R, Wakabayashi K, *et al.* : Thermophilic alkaline xylanase from newly isolated alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp. strain TAR-1, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58 78-81 1994
- 20) Nakamura S, Nakai R, Ishiguro Y, *et al.* :Production and partial characterization of a thermophilic alkaline xylanase from thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. strain TAR-1, In:Shimada K, Hoshino S, Ohmiya K, *et al.* (eds) :Genetics, biochemistry and ecology of lignocellulose degradation, Uni Publishers, Tokyo, 334-342 1993
- 21) Nakamura S, Ishiguro Y, Nakai R, *et al.* :Purification and characterization of a thermophilic alkaline xylanase from thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. strain TAR-1, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 1 7-15 1995

# 皮膚発現型レチノイン酸受容体のドミナントーネガティブ トランスジェニックマウスを用いた皮膚の成熟過程の検討

京都大学 医学部

田 中 俊 宏

Retinoic acid plays an important role in the development of the organs, including skin. We constructed a cDNA functioning as a dominant-negative styled retinoic acid receptor and introduced it into mice. The resultant transgenic mice skin revealed a marked reduction of skin maturation. Macroscopic examination and microscopic examination of these transgenic mice showed thinning of the epidermis with the loss of primary wickels and rete ridge formation of dermo-epidermo junction. These findings indicate that the retinoic acid act as a strong physiological maturation factor of the skin. Keratins and filaggrin were analyzed as differentiation marker. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified keratin revealed normal amount of keratin 1, 10, 5, 14 were expressed both controls and transgenic mice skin. Ectopic expression of keratin 6 and 16 were detected in transgenic mice skin. Although, the expression of keratin occurs in transgenic mice, the expression pattern of these keratin were completely different to those of control mice as detected by immunofluorescence study. A complete depletion of fillagrin was observed with this technique. All these data indicate that retinoic acid plays an important role in the epidermal layer formation in fetal skin development.

## 緒 言

レチノイン酸は完成した皮膚に対して種々の薬理作用を持つことは既に知られている。例えば本物質の過剰はhyper vitamine A syndromeをひきおこし、また、欠乏は、成人皮膚に過角化を生じさせる。培養表皮細胞を用いた実験でも本物質の過剰または欠乏が、種々の遺伝子発現に影響を与え、特に分化マーカーであるケラチンの遺伝子発現に大きな作用を持つことが知られている。しかし、本物質の生理作用については、これが真に生理作用をもち機能しているか否かを含めて、不明のままであった。生理作用を検定する最も確実な

実験は、欠損状態を人為的に作製することであるが、レチノイン酸は生体にとって必須の物質であることから、皮膚以外の臓器に影響を及ぼさずに皮膚にレチノイン酸それ自体の欠乏状態を作り出すことはできない。われわれはこの問題を解決するために、皮膚のみで特異的に発現するプロモーターを用いて、レチノイン酸受容体のドミナントーネガティブの形質をもつ点突然変異体のレチノイン酸受容体をトランスジェニックマウスに導入することを試みた。

## 実 験

図1にトランスジェニックマウス作成に用いたDNAのコンストラクトを示す。プロモーターは皮膚基底細胞層に特異的な発現を示すK14プロモーターを用いた。これにたいしてベクターガラクトシダーゼ、正常なレチノイン酸受容体、点突然変異を持つレチノイン酸受容体をそれぞれコードするcDNAをつなげた。ベクターガラクトシダーゼは発現が正しく行なわれていることを確認する目的



Study of fetal skin maturation with dominantnegative retinoic acid receptor transgenic mice.

Toshihiro Tanaka  
Faculty of Medicine  
Kyoto University

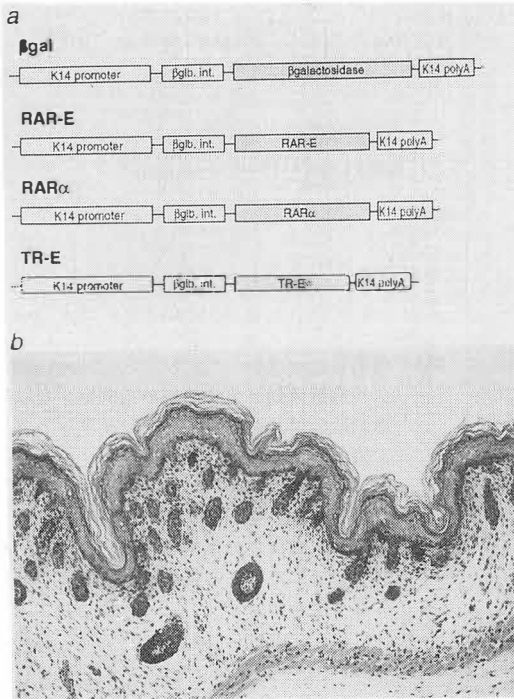


図1. トランスジェニックマウス作成に為のcDNAコンストラクトとコントロールのベータガラクトシダーゼの発現。  
 A: コンストラクト。ケラチン14プロモータにたいして、ベータガラクトシダーゼ、点突然変異体レチノイン酸受容体、正常なレチノイン酸受容体および点突然変異体をもつ甲状腺ホルモン受容体をそれぞれコードするcDNAをつなげた。  
 B: コントロールのベータガラクトシダーゼの発現をトランスジェニックマウスで観察したもの。基底細胞層のみが染色されている。

で、正常なレチノイン酸受容体は過剰発現による影響がないことを確認するために用いた。これらのcDNAに続いてK14遺伝子由来のポリAシグナルを導入した。トランスジェニックマウスの作成は常法通りに行なった<sup>1)</sup>。生まれたトランスジェニックマウスはサザン法にて導入した外来遺伝子の挿入を確認した。マウスの形質の観察は、肉眼的所見およびヘマトキシリン-エオジン染色による光顕所見によった。トランスジェニックマウス表皮に発現されているケラチンは加熱により表皮を真皮

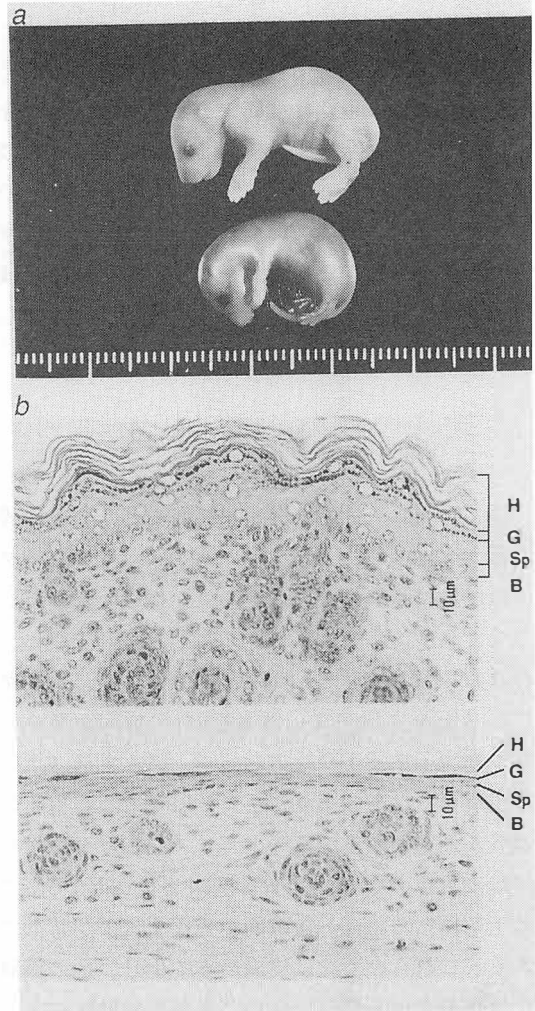


図2. トランスジェニックマウスのマクロ、ミクロの所見。

A: マクロの所見。上段はコントロールマウス。健康な皮膚をもつ。下段は点突然変異体レチノイン酸受容体を導入したトランスジェニックマウス。皮溝は消失し、真皮の血管が透けてみえる。  
 B: ヘマトキシリン-エオジン染色によるミクロの所見。上段はコントロールマウスの皮膚。下段はトランスジェニック。皮膚は著明に薄くなっている。一次皮溝は消退しレーテリッジは平坦となっている。

から剥離した後Steinertらの方法に準じて精製し、10%SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動後クマシーブリリアントブルーにて染色した<sup>2)</sup>。各

ケラチンの同定は、おのおのにたいして特異的に反応する抗体を用いて、前述の方法で得たケラチンを免疫ブロット法にて同定した。ケラチンの分布はトランスジェニックマウス皮膚をFuchsらの方法に準じてカルモイ固定を行った。その後おのおのにたいして特異的に反応する抗体を第一抗体とし、さらにFITC標識された抗マウス抗体または抗ウサギ抗体にて染色し、蛍光顕微鏡にて観察した。

## 結 果

図1下段にベータガラクトシダーゼの発現様式を示す。これまでの報告どおりにK14プロモーターは皮膚に特異的な発現を示す。作成したトランスジェニックマウスのマクロの所見を図2上段に、ミクロの所見を図2下段に示す。コントロールマウス(上)に比べて、外来性DNAの挿入があり、かつ発現のあるトランスジェニックマウス(下)の皮膚は、ひ薄であり、かつ危弱である。真皮の血管が透過される。このトランスジェニックマウスは皮膚より急速に水分を失い生後(E19.5にて帝王切開にて出産)数時間で死亡するのが特徴である。これらの変化は皮膚のみで生じ、他の臓器には特筆すべき変化はない。顕微鏡所見ではコントロール(上)に比べてトランスジェニックマウス(下)は、1) 一次皮溝の消失、2) マルピギー層の著名な減少、3) 顆粒層の減少、4) 表皮-真皮間のレーテリッジの消失が特徴としてあげられる。なお正常レチノイン酸受容体を導入したトランスジェニックマウスの皮膚には変化はない。

図3にトランスジェニックマウス表皮より精製したケラチンのSDS-PAGEの結果を示す。左がクマシーブリリアントブルー染色である。発現されているケラチンはコントロールでは主としてK1/K10、K5/K14であるが、トランスジェニックマウスでは、K1/K10、K5/K14に加えてK6/K16が発現している。これらのケラチンは分子量から明らかであるが、各々について特異的に反応する抗体を用

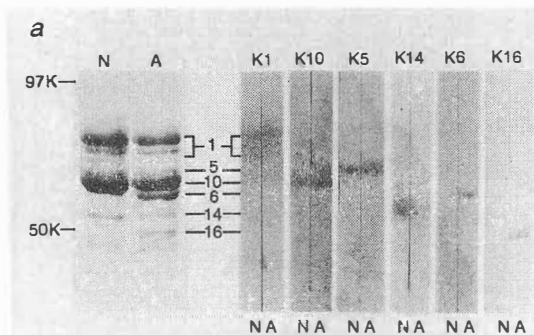


図3. 精製したケラチンのSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動と抗体を用いた同定。左は電気泳動後のゲルをクマシーブリリアントブルーで染色したもの。  
N: コントロールマウス皮膚由来のケラチン。  
A: トランスジェニックマウス皮膚由来のケラチン。右は左の蛋白をそれぞれ上段にあるケラチンにたいする抗体で免疫ブロットをおこなったもの。

いて免疫ブロット法を行ったのが上の図である。これより各々のケラチンは免疫学的にも同定された。これらのケラチンのうちK1/K10、K5/K14はともにコントロールマウスでもトランスジェニックマウスでも発現しているが、それらが表皮細胞のterminal differentiationをつうじて正しい位置で発現しているかどうかを、これらケラチンの局在を調べることを通じて検討したのが図4である。図4は左が正常コントロールマウス皮膚を基質としたもの右がトランスジェニックマウス皮膚である。免疫ブロットの結果に対応して、K6/K16はコントロールマウスでは検出されない。一方ケラチンの分析ではコントロール、トランスジェニックともに発現されているK1/K10、K5/K14は発現の局在が変化していることが示された。すなわちトランスジェニックマウス皮膚では、K1/K10はコントロールよりおくらせて発現を開始しK5/K14はコントロールより遅れて消失することが明らかとなった。

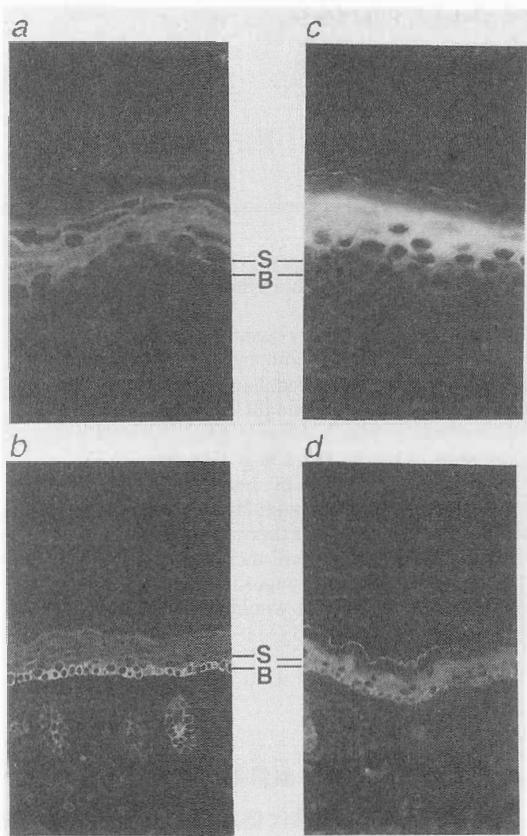


図4. 蛍光抗体所見。

- a: コントロールマウス皮膚をK10にたいする抗体で検出。
- b: コントロールマウス皮膚をK14にたいする抗体で検出。
- c: トランスジェニックマウス皮膚をK10にたいする抗体で検出。
- d: トランスジェニックマウス皮膚をK14にたいする抗体で検出。

## 考 察

われわれの用いたドミナント-ネガティブ法によりレチノイン酸とその受容体の相互作用が失われることにより皮膚の発生にあきらかな異常が生じることが明らかとなった。レチノイン酸受容体はDNAに直接働きかけて遺伝子発現を制御する核

内のトランスクリプションファクターである。培養細胞を用いた実験からこの受容体はケラチン遺伝子に直接働きその発現を制御することが知られている。我々の作成したトランスジェニックマウス表皮では免疫プロット法で見る限りケラチン1、10、5、14は正しく発現しているように見える。しかし蛍光抗体法でその発現局在を検討するとノントランスジェニックマウスと比較して明らかに発現のタイミングが異なっていることが分かった。同時に分化のマーカであるフィラギリンの発現が全く見られなくなっていることがあきらかとなった。すなわち発生過程における分化をつかさどる一群の調節機構に変化が生じると考えられる結果である。肉眼的所見ではこのマウスは皮膚の菲薄化と脆弱性を示す。光学顕微鏡を用いた観察でも、このトランスジェニックマウスは表皮の菲薄化を示す。すなわち、ヘマトキシン-エオジン染色標本の観察では、マルピギー層の著明な減少と一次皮溝の消失およびレーテリッジの消失が観察される。これらの変化は、胎生16から17にかけて見られる形態学的特徴と一致しており、この観点からは胎児期の皮膚分化の阻害と考えられる。フィラグリンの発現も胎生16でいどに始まるとされており分化マーカーからも成熟化の遅延がうかがわれる。これらの観察よりレチノイン酸は皮膚の発生に生理的に重要な役割を演じておりかつそれは胎生皮膚発生での皮膚の成熟化を司ると考えられた。

## 文 献

- 1) Gordon jw in guide to techniques in mouse development (eds Wassarman PM & DePamphilis ML) 747-771 (Academic Press, San Diego 1993)
- 2) Steinert. P et al, *Biochemical J.* 149 39-48 1975

# 化粧が高温環境下の発汗反応及び 選択的脳冷却機構に及ぼす影響

金沢大学 医学部

田辺 実・永坂 鉄夫

Six healthy males were subjected to the following two experiments in a climatic chamber at ambient temperature of 28 °C.

Experiment 1) To confirm whether the makeup of the face suppresses sweating responses during exercise at 1.5, 2.5 and 3.5 kp. The frequency of sweat expulsion ( $F_{sw}$ ) and sweat rate ( $M_{sw}$ ) on the forehead of right (makeup) and left (non-makeup) sides were measured.  $F_{sw}$  on the makeup side always synchronized with  $F_{sw}$  on the non-makeup side. There was no difference of  $M_{sw}$  between both sides.

Experiment 2) To investigate whether this suppression of evaporative heat loss from the head hinders the selective brain cooling during hyperthermia induced by head-out sauna. Tympanic ( $T_{ty}$ ) and esophageal ( $T_{es}$ ) temperatures and blood flow in the angularis oculi vein ( $Q_{ov}$ ) were measured. When a hood was applied over the head of subjects after thermal equilibrium was obtained,  $T_{ty}$  became to be higher than that of  $T_{es}$ , even with a gradual increase of  $Q_{ov}$ .

These results suggest that cosmetics on the face do not suppress evaporative heat loss from the face during exercise. When the whole head is covered, however, it would be dangerous for the brain cooling.

## 1 緒言

脳は代謝の高い臓器であると同時に、熱に極めて弱く脳温が39.5~40.5°Cに達するとその機能障害が発生し、意識喪失、血圧低下などのショック状態を起こす。これを防ぐ機構として、生体には高体温時に脳温だけを選択的に低く保つ機構が発達している(選択的脳冷却機構)。偶蹄類<sup>1-2)</sup>などではパンティングにより多量の静脈血が鼻粘膜で冷却され、頭蓋底の静脈叢に流れ込む。頸動脈は網状にこの静脈叢を貫通しており、脳に向かう動脈血は静脈叢を通過する際に冷やされ、次い

で、低温の動脈血が脳組織を冷却する。ヒト<sup>3-4)</sup>の選択的脳冷却機構は偶蹄類のそれとはやや異なっている。高体温時、ヒトは頭部や顔面に多量の汗をかく。汗の蒸発に伴い、頭皮や顔面、および同部皮下の静脈血が冷却される。低温の静脈血は眼角静脈や導出静脈を経由して頭蓋底の静脈叢(海綿静脈洞)に流入し、その結果、頸動脈血温が低下し、脳温は低く保たれる(図1)。

通常、化粧に用いられるいわゆるファンデーションなどは皮膚に比較的厚く塗られるため高体温時の顔面の汗の蒸発を阻害すると共に、その成分によっては顔の皮膚と外気との熱絶縁層となり、顔面からの熱放散の減弱、ひいては導出静脈血流による脳の冷却効率を弱める可能性がある。しかし、ヒトの選択的脳冷却効率が化粧によってどの程度影響されるのかを温熱生理学的立場から詳細に検討した報告はない。

本研究では、化粧の有無が暑熱負荷時の体温上昇に伴う前額部の発汗反応、眼角静脈の血流動態及び脳冷却効率にいかん影響するか検討した。

Effect of cosmetics on sweating and selective brain cooling in hyperthermic humans

Minoru Tanabe

Faculty of Medicine,  
Kanazawa University



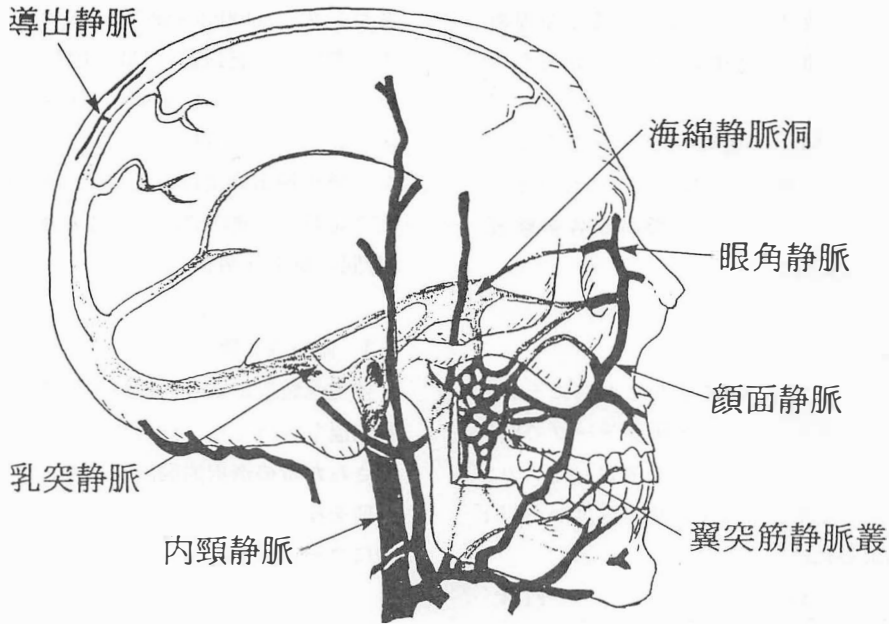


図1 頭蓋内外の静脈の走行

## 2 実験

本研究はすべて環境温 $28.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $40 \pm 3\%$ に調節した人工気象室(TBS-6-S、Tabai-ESPEC、Osaka)にて行った。

### 2.1 被験者

本実験の被験者は、健康な成人男子6名であった。著しい肥満、痩身者は被験者から除いた。被験者には、実験の主旨、手順を十分に説明した上で、実験に際して危険性がないことを理解してもらい、実験に協力してもらった。実験に際して食事性熱産生の影響を取り除くため実験開始前3時間は絶食とした。

### 2.2 運動実験

自転車エルゴメーター運動により被験者の深部体温を体内から段階的に上昇させた。この体温上昇に伴う発汗反応(発汗拍出頻度、発汗量)が化粧の有無によりいかに影響されるか検討した。

### 2.2.1 実験手順

被験者は毎回定められた時刻にショーツのみを着用した裸体で人工気象室に入室した。下記の化粧の手順に従って被験者の顔面の右半面に化粧を行った。その後、自転車エルゴメーターのサドルに座り少なくとも30分以上の安静を得た。この間に前額の左右に発汗カプセルを両面テープで貼付した。温度平衡が得られた後、毎分50回転のリズムで自転車エルゴメーター運動を30分間行った。運動強度は10分毎に段階的に1.5kp、2.5kp、3.5kpと増加させた。

### 2.2.2 化粧の手順

- 2.2.2.1 化粧用コットンに約2mlの柔軟化粧水を含ませ、顔面皮膚を十分に拭く。
- 2.2.2.2 化粧用コットンに約2mlの乳液を含ませ、顔面の右半面につける。
- 2.2.2.3 収れん化粧水をコットンに約2ml含ませ、軽く叩くようにしながら顔面の右半面につける。

- 2.2.2.4 その後ファンデーションをやや厚めに顔面の右半面にのぼしながらつける。
- 2.2.2.5 パフに十分量のパウダーをとり、顔面皮膚全体に叩くようにつける。
- 2.2.2.6 以上の化粧は同一験者が各被験者に行った。

### 2.2.3 測定項目

発汗量 ( $\dot{m}_{s.w}$ ): 前額の中心から左右にそれぞれ4cmの部位に発汗カプセルを両面テープで貼付し、換気カプセル法により $\dot{m}_{s.w}$ を測定した。カプセル内の空気の絶対湿度はその相対湿度から以下の式にて算出した。

$$D = \frac{H}{100} \cdot \frac{804}{1 + 0.00366t} \cdot \frac{Es}{Po} \cdot \frac{Flow}{area}$$

但し、D: 絶対湿度 ( $g/m^3$ )=( $mg/l$ )

H: 相対湿度 (%)

t: 環境温度 ( $^{\circ}C$ )

Es:  $t^{\circ}C$ における飽和水蒸気圧 ( $mmHg$ )

Po: 標準気圧 ( $mmHg$ )

Flow: カプセル内の気流量 (0.5l)

area: カプセルの面積 ( $0.785cm^2$ )

圧縮 $N_2$ ガスから減圧弁を介してカプセル内に流入する気流量はマスフローコントローラー(SEC-400MK3、エステック、京都)により毎分500±2mlに調節した。カプセル内空気の相対湿度は湿

度センサー (HMP36ASPF、バイサラ社、東京)により測定し、記録器 (INR-6041、TOA、東京)にチャートスピード6cm/minの速さで記録し、同時にフロッピーに10Hzのサンプリング周期で収録した。発汗拍出頻度は左右の2ヶ所の相対湿度の変化で同期した発汗波について各運動強度の終了前1分間の値を計測した。

### 2.3 体加温実験

体加温装置によりに被験者の深部体温を体外より加温し維持した。汗の蒸発に伴う熱放散量が抑制された時の選択的脳冷却効率と眼角静脈の血流動態を検討する目的で、被験者の頭部全体を一時的にフードで覆った。

#### 2.3.1 実験手順 (図2)

人工気象室内に設置した市販の体加温装置 (スエット、MA-800、ファミリー社) 内に、被験者はショートパンツのみを着用し、頭部のみを露出した状態で座位にて30分以上の安静を得た。その後、顔面に送風をしつつ体加温装置内の温度を50 $^{\circ}C$ まで上昇させ全身を40分間加温した。その後深部体温が一定になるように加温装置を調節した。深部体温、発汗量が平衡状態に達した後、10分間一時的に被験者の頭部全体をビニール製のフードで覆い顔面・頭皮からの汗の蒸発を抑制した。

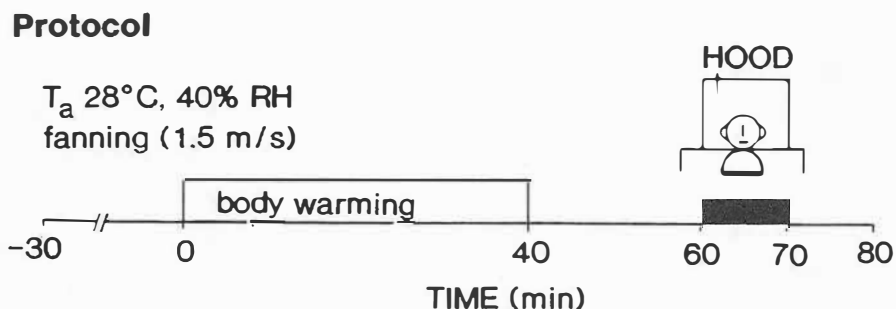


図2 体加温実験の手順

## 2.3.2 測定項目

食道温 ( $T_{es}$ ): 躯幹部の深部体温の指標として  $T_{es}$  を用いた。鼻孔から42cm挿入し食道内の右心房位で最も高い温度を示す位置に留置した  $T_{es}$  測定素子 (PZL-74、Technol Seven、横浜) で測定した。

鼓膜温 ( $T_{ty}$ ): 脳温の指標として  $T_{ty}$  を用いた<sup>5)</sup>。耳鏡により鼓膜の位置を確認した後、 $T_{ty}$  測定素子 (PZL-74、Technol Seven、横浜) の先端が鼓膜光錐部にあったことを確認してから、外耳道を脱脂綿で塞いでリード線を固定し、断熱の目的で四角く切った脱脂綿で耳介部全体を覆った。

皮膚温 ( $T_{sk}$ ): サーミスター温度素子により、全身7ヶ所 (前額、前腕、手、胸、大腿、下腿、足) の皮膚で測定した。サーミスターは、先端部分を皮膚に接触させてその上からサージカルテープを一重にして皮膚に貼付した。これら  $T_{sk}$  は、サーミスター温度データ収録装置 (K923、タカラ

工業、横浜) に収録し、サーモ分析システム (サーモスキャナープログラム、金沢コントロール機器、金沢) を介し、30秒毎にコンピューター (PC-9801VX、日本電気、東京) に入力した。

平均皮膚温 ( $T_{sk}$ ): 上記の全身7ヶ所で測定した  $T_{sk}$  にそれぞれの部位の面積比を乗じ、以下の式より算出した。

$$T_{sk} = 0.07T_1 + 0.14T_2 + 0.05T_3 + 0.35T_4 + 0.19T_5 + 0.13T_6 + 0.07T_7$$

(但し、 $T_1$ は前額、 $T_2$ は前腕、 $T_3$ は手、 $T_4$ は胸、 $T_5$ は大腿、 $T_6$ は下腿、 $T_7$ は足の各  $T_{sk}$ )

眼角静脈血流 ( $Q_{ov}$ ):  $Q_{ov}$  の方向と速度は超音波ドップラー血流計 (Model 909、Parks、Oregon) により連続測定した。測定プローブは、8MHzの静脈血流用のダイレクトモードに合わせ、眼角静脈上の皮膚に対して垂直に近い角度をもって接触させて固定した。内側をスポンジで覆ったアルミニウム製のヘッドバンド (幅3cm) で素子を固定した。

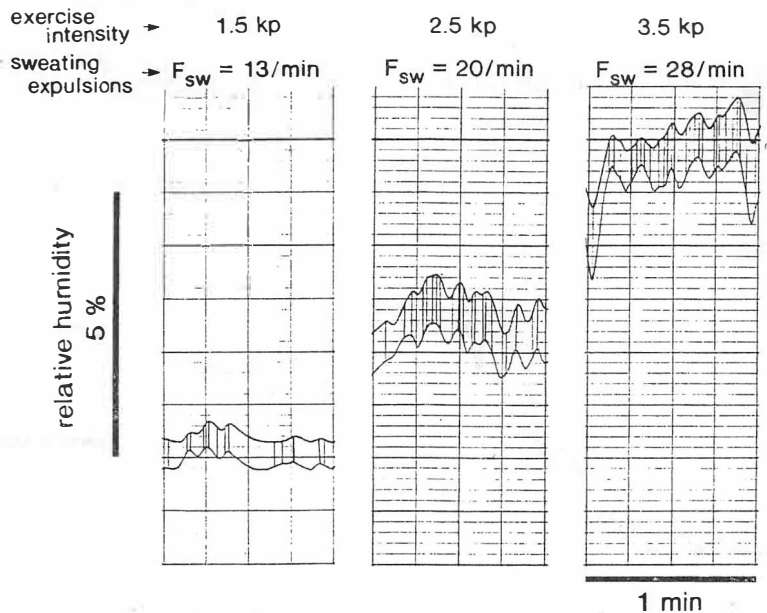


図3 前額の発汗カプセル内の相対湿度の変化。

上線：化粧なし (左顔半面)、  
下線：化粧あり (右顔半面)、  
運動強度：1.5kp、2.5kp、3.5kp、  
 $F_{sw}$ ：発汗拍出頻度

## 2.4 統計処理

各変量の時間経過に伴う変化は、one-way ANOVAで検定し、有意性が認められた時、paired Student's t-testを行った。変量は全てmean±SEとして求め、統計的有意水準は5%とした。

## 3 結果

### 3.1 運動実験

図3は前額に貼付したカプセル内の相対湿度の変化について、各運動強度の終了前1分間の左(化粧なし)と右(化粧あり)の前額の2ヶ所で同期した発汗波を線で結んで示した。発汗拍出頻度は運動強度1.5kpで13/min、2.5kpで20/min、3.5kpで28/minであった。発汗拍出は化粧なしの部位と化粧ありの部位で同期し、この同期は運動強度が増加しても常に一致した(図2)。

図4は前額の発汗量の経時変化を1分毎に6名の平均値で示した。運動時の発汗潜時は化粧なしで415±30秒、化粧ありで415±30秒であった。各被験者において発汗潜時にはばらつきがあるが、同一被験者において発汗潜時は化粧の有無に関係なく一致した。発汗量は化粧ありの方が化粧なしより若干少ない傾向にあるが有意差はなかった。

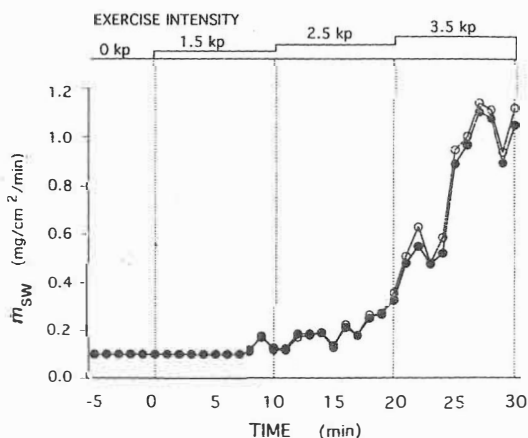


図4 前額発汗量 ( $\dot{m}_{sw}$ ) の経時変化。

- : 化粧なし (左顔半面)、
- : 化粧あり (右顔半面)

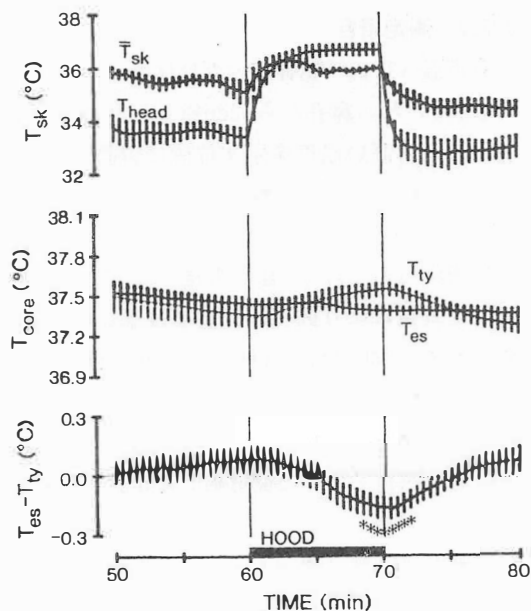


図5 フードで頭部全体を覆った時の平均皮膚温 ( $T_{sk}$ )、前額皮膚温 ( $T_{head}$ )、鼓膜温 ( $T_{ty}$ )、食道温 ( $T_{es}$ )、 $T_{es}-T_{ty}$  の経時変化。

HOOD : フードで頭部全体を覆った10分間

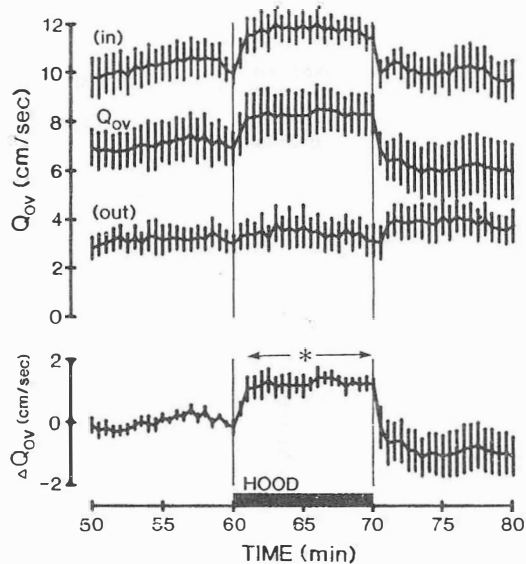


図6 フードで頭部全体を覆った時の眼角静脈血流 ( $Q_{ov}$ ) の経時変化。  $Q_{ov}$  はプラス側が顔面側から頭蓋内への流入を、マイナス側が頭蓋内から顔面側への流出を示す。

- in :  $Q_{ov}$  の頭蓋内への流入成分、
- out :  $Q_{ov}$  の頭蓋外への流出成分、
- $\Delta Q_{ov}$  :  $Q_{ov}$  のフード装着前10分間に対する変化分

### 3.2 体加温実験

図5は $T_{sk}$ 、前額皮膚温、 $T_{ty}$ 、 $T_{es}$ 及び $T_{es}$ から $T_{ty}$ の値を差し引いた値についてフードで頭部全体を覆う前、中、後の経時的变化を6名の平均値と標準誤差で示した。頭部全体をフードで覆った時、前額皮膚温は $33.44 \pm 0.37^\circ\text{C}$ から $36.65 \pm 0.22^\circ\text{C}$ に急激に上昇した。フードで頭部全体を覆っている10分間に、 $T_{es}$ はほとんど変化しなかったが、 $T_{ty}$ は $37.36 \pm 0.09^\circ\text{C}$ から $37.54 \pm 0.05^\circ\text{C}$ へと $0.18^\circ\text{C}$ 上昇し $T_{es}$ より高くなった。 $T_{es}$ から $T_{ty}$ を差し引いた値は $+0.09^\circ\text{C}$ から $-0.16^\circ\text{C}$ へと有意に下降した。

図6は眼角静脈の血流動態についてフードで頭部全体を覆う前、中、後の経時的变化を6名の平均値と標準誤差で示した。眼角静脈の頭蓋内の海綿静脈洞への流入成分(in)はフードで頭部全体を覆った10分間に $10.05 \pm 0.49\text{cm/sec}$ から $11.33 \pm 0.55\text{cm/sec}$ に増加した。眼角静脈の頭蓋内から顔

面皮膚側への流出成分(out)はフードで頭部全体を覆った時ほとんど変化せず( $3.08 \pm 0.45\text{cm/sec}$ から $3.11 \pm 0.68\text{cm/sec}$ )、流入成分(in)よりも小さかった。眼角静脈を經由して頭蓋内の海綿静脈洞へ流れる血流はフードで頭部全体を覆った10分間に $6.97 \pm 0.76\text{cm/sec}$ から $8.23 \pm 0.81\text{cm/sec}$ に約18%増加し、その変化分は有意であった。

図7は安静時より約 $0.6^\circ\text{C}$ 高い $T_{es}$ の状態で維持し、フード装着後に失神直前の症状を起こした被験者についてのデータである。フードで頭部全体を覆った間、この被験者の $T_{ty}$ は常に $T_{es}$ よりも低く保たれた。この被験者の $Q_{ov}$ はフードで頭部全体を覆った時、海綿静脈洞への流入成分が徐々に増加する傾向を示した(図8)。

## 4 考察

### 4.1 運動実験

前額部の発汗の拍出は化粧なしの部位と化粧ありの部位で同期し、その頻度は運動強度に依存して増加した(図3)。Sugenoyaら<sup>6)</sup>はmicroneurographyによる皮膚交感神経活動と発汗拍出頻度との関係について、発汗の拍出は皮膚交感神経の発射と常に一致し、発汗中枢機構の活動を示すこと

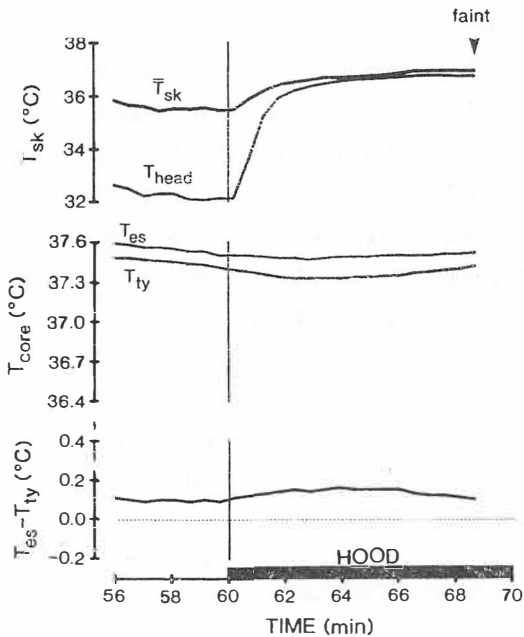


図7 フード装着実験で失神を起こした被験者の平均皮膚温( $T_{sk}$ )、前額皮膚温( $T_{head}$ )、鼓膜温( $T_{ty}$ )、食道温( $T_{es}$ )、 $T_{es}-T_{ty}$ の経時的变化。矢印：被験者が失神し実験を中断した。記号は図5に準じる。

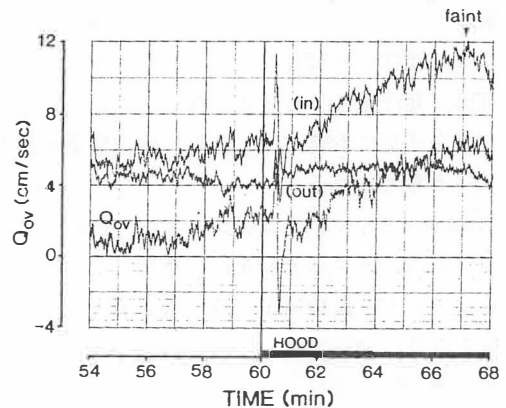


図8 フード装着で失神を起こした被験者の眼角静脈血流( $Q_{ov}$ )の経時的变化。矢印：被験者が失神し実験を中断した。記号は図6に準じる。

を報告した。小川<sup>7)</sup>は発汗拍出頻度が発汗遠心路における干渉が汗の拍出頻度や同期性には影響せず、拍出波の大きさにのみ影響すること、たとえば一側側胸部の圧迫により、同側上半身の発汗量は減少するが、その際対側の発汗と比べ拍出の同期性は失われず、拍出波の波高が低下していることを報告した。本研究で前額部の発汗拍出が化粧ありの部位と化粧なしの部位でまったく同期していることから、少なくとも発汗遠心路においては化粧の有無による影響はないと考えられる。

前額部で化粧ありの部位の発汗量は化粧なしの部位に比べて僅かに少ないことが観察された(図4)。多量発汗または高湿環境下で発汗を続けると、発汗量が次第に減少する。これは表皮の湿潤に関連した局所的な現象とみなされ、発汗漸減 hidromeiosis と呼ばれている。発汗漸減は水の浸透によって角質層が膨張し、汗腺導管の汗口部の狭窄ないし閉塞が起こるためと考えられる<sup>8-9)</sup>。発汗漸減の速度は最高発汗時の無効発汗量が多いほど速いこと、発汗漸減により無効発汗量(dropping)のみが減少し有効発汗量(皮膚からの蒸発量)は変化しないこと、発汗漸減は無効発汗量がなくなるまで進行し、その後は発汗量は減少しなくなることが知られている<sup>10-11)</sup>。このことから、化粧をした部位の発汗量の僅かな減少は皮膚と化粧の間における湿潤が発汗漸減現象を起こした可能性が示唆される。しかしながら、化粧の有無で発汗量には有意差がないことから、化粧は有効発汗量に影響せず、蒸散性熱放散量を抑制しないと考えられる。

CabanacとCaputa<sup>12)</sup>は暖かい環境で被験者に自転車エルゴメーター運動を行わせた。この自転車エルゴメーターは被験者自身が最も漕ぎやすい負荷量を自分で調節できるような装置であった。被験者には一回はプラスチックのフードを被って頭部に風が当たらないようにし、他の一回は顔に小型扇風機で風を送ったが、フードを着用した被験者は自転車を漕ぎはじめて間もなくペダルの負荷量を軽減した。 $T_{re}$ は顔に風が当たっている被験

者に比べてフードのある方で有意に高くなった。この結果は汗の蒸発効率が悪いと脳温が下がらず運動能力が減退することを示唆する。本被験者の内省報告では化粧の有無による頭部の温度感覚、湿度感覚の違いが得られなかった。このことから、運動時の化粧は発汗効率を抑制させず、運動パフォーマンス、精神的疲労度に影響しないと推察される。

#### 4.2 体加温実験

頭部全体をフードで覆い汗の蒸発による熱放散を抑制した時、前額 $T_{sk}$ が急激に36.65℃に上昇した(図5)。皮下深層の静脈血の温度はこれよりもさらに高いと考えられる。フードで頭部全体を覆っている間、高体温で眼角静脈を経由して頭蓋内の海綿静脈洞へ流入する血流はさらに増加した(図6)。この時の $T_{sk}$ はほとんど変化しなかったが、 $T_{re}$ は徐々に上昇し $T_{sk}$ よりも高いレベルに達し、 $T_{sk}$ から $T_{re}$ を差し引いた値(選択的脳冷却の効率)はプラスからマイナスに転じた(図5)。導出静脈には静脈弁がなく血流は頭蓋骨を挟んで内外のどちらの方向にも流れる。偶蹄類では眼角静脈の血流の方向が中枢神経により調節されたものであること、この眼角静脈の血流の方向の転換は高体温で顔面静脈の平滑筋が強く収縮し眼角静脈が拡張して、鼻粘膜からの静脈血が総て眼角静脈経由で頭蓋底の静脈叢に至るようになること<sup>1-2)</sup>、ラクダでは顔面静脈の組織温度が上昇しその部の平滑筋の収縮が起きることが報告されている。ヒトでは、眼角静脈の機械的閉塞で脳温が著しく上昇すること<sup>3)</sup>、眼角静脈から頭蓋内の海綿静脈洞への血流の流入は、末梢皮膚からの温度入力に関係なく、深部体温がある温度レベルに達すると決まって急激に始まる<sup>4)</sup>。今回の結果から、高体温で眼角静脈の流入の方向が頭蓋内へ転換した後、顔面、頭皮の静脈血が十分に冷却されず高い値を保つ時には、眼角静脈血流の流入が増加して脳温をさらに上昇させる危険性のあることが推察される。

フードで頭部全体を覆った時に失神を起こした被験者の眼角静脈は徐々に増加したが、 $T_{ey}$ は常に $T_{es}$ よりも低く保たれていた(図8)。この被験者で失神を惹起させた誘因の一つとして、眼角静脈を経由した血流の頭蓋内への流入増加で頭蓋内圧が上昇し脳を圧迫する可能性が考えられる。この点についてはさらに検討が必要であり、高温環境下での脳障害や熱中症の発生の機序を解明していく上で今後極めて重要な課題といえる。

## 5 謝 辞

ご援助いただきましたコスメトロジー研究振興財団、本実験の被験者諸氏に深謝します。

## 引用文献

- 1) Johnsen HK, : Nasal heat exchange, an experimental study of effector mechanisms associated with respiratory heat loss in Norwegian reindeer (*Rangifer tarandus*), *Univ. of Tromso, Norway*, 72-87 1988
- 2) Elkward AO, Al-Zaid NS and Bou-Resli MN, : Facial vessels of desert camel (*Camelus dromedarius*): role in brain cooling, *Am. J. Physiol.*, 258 R602-R607 1990
- 3) Nagasaka T, Hirashita M, Tanabe M, Sakurada S and Brinnel H: Role of the veins of the face in brain cooling during body warming in human subjects, *Jpn. J. Biometeor.*, 27 113-120 1990
- 4) Hirashita M, Shido O and Tanabe M, : Blood flow through the ophthalmic veins during exercise in humans, *Eur. J. Appl. Physiol.*, 64 92-97 1991
- 5) Brinnel H and Cabanac M, : Tympanic temperature is a core temperature in man, *J. Therm. Physiol.*, 14 47-53 1989
- 6) Sugenoja J, Iwase S, Mano T and Ogawa T, : Identification of sudomotor activity in cutaneous sympathetic nerves using sweat expulsion as the effector response, *Eur. J. Appl. Physiol.*, 61 302-308 1990
- 7) 小川徳雄, : 発汗活動に影響する中枢性および末梢性要因, *日本生理誌*, 48 1-13 1986
- 8) Sarkany L, Shuster S and Stammers M, : Occlusion of the sweat pore by hydration, *Brit. J. Dermatol.*, 77 101-104 1965
- 9) Kerslake DMck, : The stress of hot environments, Cambridge University Press, London, 1972
- 10) Candas V, Libert JP and Vogt JJ, : Sweating and sweat decline of resting men in hot humid environments, *Eur. J. Appl. Physiol.*, 50 223-234 1983
- 11) Ogawa T, Asayama M, Sugenoja J, Fujimatsu H, Miyagawa T and Terai Y, : Temperature regulation in hot-humid environments, with special reference to the significance of hidoromeiosis, *J. Therm. Biol.*, 9 121-125 1984
- 12) Cabanac M and Caputa M, : Open loop increase in trunk temperature produced by face cooling in working humans, *J. Physiol.*, 289 163-174 1979

# サンスクリーン剤の光ハプテンとしての性格

浜松医科大学

戸倉新樹

Sunscreen agents are widely used for photoprotection of patients with photosensitivity as well as normal individuals receiving intense sun exposure. However, some of these agents are also known to induce photoallergic contact dermatitis as an adverse effect. To evaluate the photoallergenicity of sunscreens, including benzophenone-3, Parsol 1789, p-aminobenzoic acid, and 2-ethyl-hexyl-p-methoxycinnamate, we examined the ability of epidermal cells photomodified with these sunscreen agents to evoke delayed-type hypersensitivity in mice. For preparation of sunscreen-photomodified epidermal cells, murine epidermal cells were suspended in aqueous solutions of these sunscreens and irradiated with ultraviolet A. Mice were sensitized with subcutaneous injection of the sunscreen-photomodified epidermal cells and challenged with the photomodified epidermal cells into hind pad. The footpad swelling was measured 24 h after injection of the photomodified cells. Benzophenone-3-photomodified epidermal cells successfully immunized and elicited delayed-type hypersensitivity in mice, whereas no significant footpad swelling was induced by the other three sunscreen agents. This suggests that some of sunscreen agents have a potential to induce photoallergic contact sensitivity and that the present method is useful to estimate the photoallergic potency of sunscreens.

## 1 緒言

光線過敏症は日光などの照射を受けた皮膚に生じる皮膚炎の総称であり、原因的には、1) 内因性の光感受性物質生成（ポルフィリン症）、2) 外因性光感受性物質投与（薬剤性光線過敏症、光接触皮膚炎）、3) DNA修復機序の異常（色素性乾皮症）、4) その他原因不明のもの（日光蕁麻疹、種痘様水疱症、多形日光疹、慢性光線性皮膚炎）などに分けられる<sup>1)</sup>。光接触皮膚炎はある物質が皮膚に塗布され、同部位に光が照射されて生ずる皮膚炎である<sup>2)</sup>。近年、光接触皮膚炎をおこす物質の種類は新しい化粧品や薬の登場とともに増加し、新製品開発の段階で光線過敏症をおこすポテンシャルがあるか否かの検討は重要となってきている<sup>3, 4)</sup>。光接触皮膚炎には光毒性機序でおこる

場合と、より顕著な皮膚炎をおこす光アレルギー性機序でおこる場合とがある<sup>3, 4)</sup>。光毒性は様々な *in vitro* の方法で検討しうることが知られているが、光アレルギー性を人体を使わず調べる方法は確立したものがなく重要な課題とされてきた。サンスクリーン製剤はそれ自体、日光照射を前提として使用されるため、その光線過敏性、特に光アレルギー能は検討されるべき課題である。事実、サンスクリーン剤によって生じた光接触皮膚炎の症例はかなり報告されており、臨床的に非常に注意を払うべき点となっている<sup>5-7)</sup>。今回我々はマウスの遅延型過敏症を用いてサンスクリーン剤の光アレルギー能を評価することを試みた。

## 2 実験

### 2.1 被験物質とその溶液の調整

サンスクリーン剤として、長波長紫外線（UVA）の吸収剤である 2-hydroxy-4-methoxy-benzophenone（benzophenone-3, oxybenzone, 和光純薬）、4-tertiary-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane（Parsol 1789, 和光純薬）、中波長紫外線（UVB）の吸収剤である p-aminobenzoic acid（PABA,

Photohaptenic properties of sunscreen agents



Yoshiki Tokura

Department of Dermatology,  
Hamamatsu University School  
of Medicine

東京化成)、2-ethyl-hexyl-p-methoxycinnamate (2-EHMC, 和光純薬)を用いた<sup>8)</sup>。陽性コントロールとしてすでに光アレルギー性物質であることが明らかとなっている3, 4, 4', 5-tetrachlorosalicylanilide(TCSA)<sup>9)</sup>, afloqualone(AQ)<sup>10)</sup>、ニューキノロン系薬剤であるlomefloxacin(LFLX), ciprofloxacin (CPF), norfloxacin (NFLX), ofloxacin (OFLX), levofloxacin (LVFX), fleroxacin (FLRX), enoxacin(ENX), sparfloxacin (SPFX)を用い<sup>3, 11)</sup>、陰性コントロールとしてnaproxen(NPX)を使用した。各製剤(0.4mM)をリン酸緩衝液(PBS, pH7.4)にて溶解した。

### 2.2 被験物質と表皮細胞との光結合

7-8週齢BALB/cマウス耳翼よりトリプシン処理にて作製した表皮細胞<sup>12)</sup>を各被験物質(0.4mM)のPBS溶液に $5 \times 10^6$ /mlで浮遊させた。これをプラスチックディッシュに移し、UVAを $1.5 \text{ J/cm}^2$ 照射した。その後PBSで3回洗浄して薬剤光修飾表皮細胞として用いた。

### 2.3 被験物質光修飾表皮細胞による遅延型過敏症の感作と惹起

BALB/cマウス左下背部に被験物質光修飾表皮細胞( $10^7$ /0.2ml PBS/マウス)を皮下投与し感作後、5日目に同光修飾表皮細胞( $4 \times 10^6$ /0.02ml PBS/マウス)を足蹠に皮内投与し惹起した。24時間後に足蹠腫脹を計測し遅延型過敏症の程度とした<sup>13)</sup>。

## 3 結果

### 3.1 被験物質と表皮細胞とのUVA光結合

マウス耳翼より作製した表皮細胞を各被験物質のPBS溶液に浮遊させ、これにUVAを照射した。一部の被験物質は紫外線照射下で蛍光を発するため、蛍光顕微鏡下で物質が表皮細胞に結合することを確認できた<sup>11, 14)</sup>。TCSA, AQ, LFLX, CPF, NFLX, OFLX, LVFX, FLRX, ENX では光修飾表皮細胞

は強い蛍光が認められた。典型的な光ハプテンである TCSA は同時に強い光毒性を有しているため、TCSA光修飾細胞のviabilityは著しく低い<sup>15)</sup>、Benzophenone-3, Parsol 1789, PABA, 2-EHMC, AQ, LFLX, CPF, NFLX, OFLX, LVFX, FLRX, ENX, SPFXはUVA照射でも高いviabilityを示した(表1)。

表1. 各被験物質光修飾表皮細胞のviability  
\*トリパンブルー色素排除による

被験物質	Viability (%)*
Benzophenone-3	73
Parsol 1789	75
PABA	78
2-EHMC	81
TCSA	<1
AQ	71
NPX	87
LFLX	74
CPF	85
NFLX	71
OFLX	71
LVFX	72
FLRX	71
ENX	63
SPFX	53

### 3.2 被験物質光修飾表皮細胞による遅延型過敏症(delayed-type hypersensitivity, DTH)の誘導

各被験物質光修飾表皮細胞を皮下投与することによりマウスを感作、惹起し<sup>11, 14)</sup>、誘導されたDTH反応の程度を調べた。アレルギー性光感作物質として知られるAQ, ニューキノロン系薬剤8種は有意な(p<0.05)DTH反応を誘導した(図1)。AQ, TCSAにおいて交叉反応があるか否かを検討したところ、感作と惹起の両方において同じ薬剤光修飾表皮細胞を用いた場合のみ有意なDTH反応がみられ、抗原特異的な反応であることが確認された。

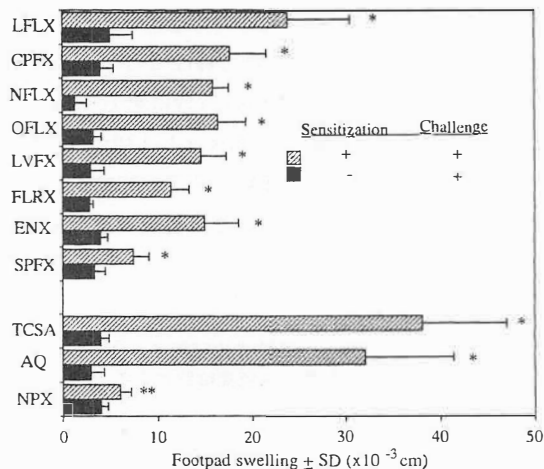


図1. TCSA, AQ, ニューキノロン剤の光修飾細胞によるDTH反応  
\* $p < 0.05$ , \*\* $p > 0.1$ , 惹起のみのグループと比較して。

以上の陽性コントロールにおいてマウスを被験物質修飾表皮細胞にて感作、惹起できることが明らかになったため、4種のサンスクリーン剤の光修飾細胞のDTH反応感作能を検討した。

図2に示すように、benzophenone-3はマウスを感作可能であったが、他の3種類のサンスクリーン剤を用いた場合には、有意なDTH反応は認められなかった。

## 考察

単純化学物質の光アレルギー性は、同剤が光ハプテンとしての性格、すなわち紫外線照射下で近傍の蛋白と共有結合し完全抗原となるという性質を持っているために起こると考えられる<sup>2)</sup>。代表的な例としてAQは297nmに吸収波長のピークを持つが、UVAを照射するとそのピークは長波長側に移動する。このAQ由来の吸収波長は牛血清アルブミン (BSA) と光結合したAQ-BSA複合体でもみられ、280nmにおいてはBSAとAQ-BSA複合体を、320nmにおいてはAQ-BSA複合体のみを検出することができる。スペクトロフォトメータを用いて Sephadex LH-20クロマトグラフィで分けた各溶出

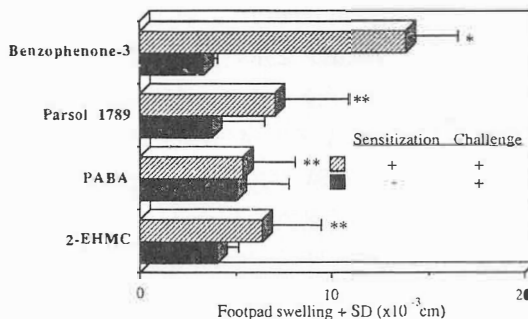


図2. サンスクリーン剤の光修飾細胞によるDTH反応 \* $p < 0.05$ , \*\* $p > 0.1$ , 惹起のみのグループと比較して。

分画を、280nm、320nmの吸光度でモニタリングすると、UVAを照射したときのみAQはBSAとともに高分子フラクションに溶出され、UVAによりAQとBSAが光共有結合することを確認しうる<sup>10)</sup>。AQ以外にもニューキノロンをはじめとする光線過敏性薬剤はUVA照射により蛋白と共有結合し、薬剤-蛋白複合体を形成することが明らかとなっている<sup>3, 11)</sup>。この性格はアレルギー性光線過敏性物質のかなりの部分に共通の特性と考えられる。この特質のため被験物質溶液中に浮遊させた表皮細胞にUVAを照射すると、同剤は表皮細胞の細胞膜、細胞質の蛋白に共有結合し、当該物質光修飾細胞を作ることができる。

光アレルギー性物質を光修飾した表皮細胞を同系マウスに皮下投与し感作後、同修飾細胞を足蹠に注入することにより、遅延型過敏症を誘導することができた。このことは同光修飾表皮細胞が高い抗原性を有していることを表しており、実際の光線過敏性皮膚炎でも光修飾表皮細胞上に、光アレルギー性物質がその一部を担う抗原が存在することを示唆する。光修飾細胞が抗原性を持つということは、代表的な光ハプテンであるTCSAの場合と同じであり<sup>2, 9)</sup>、こうした物質が光ハプテンとしての性質を備えていることを示している。LFLX, CPFX, NFLXにおいて、それぞれの薬剤の光修飾表皮細胞で感作したマウスより得たリンパ節細胞をresponderとし、stimulatorとして対応す

るニューキノロン光修飾ランゲルハンス細胞を用い *in vitro* で培養すると、responderである感作リンパ球の増殖反応が得られる<sup>3, 11)</sup>。このことは光修飾細胞が *in vitro* においても高い抗原性、すなわち光アレルギー反応を引き起こす性質を持っていることを示している。TCSAは光アレルギー性ととも強い光毒性を有しているためTCSA光修飾表皮細胞のviabilityは1%以下となり、他の生きた抗原提示細胞に新たにプロセッシング、プリゼンテーションされないと responder T細胞を刺激できない<sup>15)</sup>。一方LFLX, CPFX, NFLXの光修飾表皮細胞のviabilityは高くTCSAに比べ細胞毒性は弱い。従って他の抗原提示細胞を添加しなくても *in vitro* での増殖反応を誘導することができると考えられる。

こうしたマウスDTHの実験系を用いた結果、サンスクリーン剤のあるものは光アレルギー能を有することが明らかとなった。今回の4種の検討ではbenzophenone-3が最も強い光ハプテンとしての性格を持っていた。このサンスクリーン剤はすでに臨床的にもアレルギー性光接触皮膚炎をおこすことが報告されており<sup>4-7)</sup>、今回のマウスを用いた検討と符号する。サンスクリーン剤は日光が照射される皮膚に用いられることが前提であり、その使用には注意が必要となる。

マウスの遅延型過敏症を利用したこの実験系は、ある物質が光アレルギー能を有するか否かを人体を用いずに調べることを示している。また当該物質による光線過敏症が、光ハプテンとしての性格を持っているために起こっているか否かも検討可能である。さらには感作リンパ球を用いて *in vitro* の実験系でも可能であり今後有用な方法と考えられる。

## 文 献

1. 戸倉新樹：光線過敏症： *medicina* 32 606-607 1995
2. Tokura Y, Takigawa M : Immunological mechanism of contact photosensitivity. *Eur. J. Dermatol.* 3 87-91 1993
3. 戸倉新樹：ニューキノロンによる光線過敏症。 *臨皮* 49 17-21 1995
4. Thompson G, Maibach H, Epstein J : Allergic contact dermatitis from sunscreen preparations complicating photo-dermatitis. *Arch. Dermatol.* 113 1252-1253 1977
5. Holzle E, Plewig G : Photoallergische kontaktdermatitis durch benzophenonhaltige Sonnenschutzpreparate. *Hautarzt* 33 391-393 1982
6. Knobler E, Almeida L, Ruzkowski AM, Held J, Harber L, DeLeo V : Photoallergy to benzophenone. *Arch. Dermatol.* 125 801-804 1989
7. Deleo VA, Suarez SM, Maso MJ : Photoallergic contact dermatitis. *Arch. Dermatol.* 128 1513-1518 1992
8. 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
9. 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.* 9 4471-476 1990
10. Tokura Y, Ogai M, Yagi H, Takigawa M : Afloqualone photosensitivity : Immunogenicity of afloqualone-photomodified epidermal cells. *Photochem. Photobiol.* 60 262-267 1994
11. 戸倉新樹、西島貴史、八木宏明、滝川雅浩：薬剤の光アレルギー能：マウス遅延型過敏症による評価。 *臨床薬理* 26 219-220 1995
12. Tokura Y, Satoh T, Yamada M, Takigawa M

- : Genetic control of contact photosensitivity to tetrachlorosalicylanilide. II. Igh complex controls the sensitivity induced by photohaptten-modified spleen cells but not epidermal cells. *Cell. Immunol.* 135 195-207 1991
13. Tokura Y, Yagi, 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
14. Tokura Y, Takigawa M, Yamada M : Induction of contact photosensitivity to TCSA using photohapttenmodified syngeneic spleen cells. *Arch. Dermatol. Res.* 280 207-213 1988
15. Tokura Y, Satoh T, Yamada M, Takigawa M : In vitro activation of immune lymph node cell proliferation by photohapttenmodified cells in murine contact photosensitivity. *Arch. Dermatol. Res.* 283 203-209 1991

### III. 精神，文化に関する分野

# 色彩の心理学的意味空間の研究

金沢大学 文学部

岡本 安晴

Unfolding methods to analyze semantic space were introduced and applied to color symbolism data. One of the unfolding methods uses the criterion of the fourth quantification method by Hayashi, and the other a penalty function. Color symbolism data were collected individually from subjects, who sat in front of a CRT display and were shown stimulus pairs to be rated one by one. The experiment consisted of two sessions, session 1, where color-word pairs were presented, and session 2, where color-color pairs presented. Subjects rated fitness of color for a word of color-word pairs and similarity of colors of color-color pairs. Unfolding analysis of the data from session 1, using the penalty function, produced successful configuration of colors and words. Color configuration formed a circle, like one in color science, and words configuration was reasonable. Modified Spearman rank correlation coefficient of the data and the distances estimated by the model was perfect. Applicability of unfolding methods to individual differences in preference was also noted.

## 1 緒言

素肌の美しさ・健康を保つ、さらにより良い状態になるように努めることは化粧の基本の一つであろう。それと共に、与えられた素肌の状態をもとに自分をどのように見せるかということがあるが、自己の演出としての化粧においてはこの後者の問題の方が主要な問題となりうる。化粧の自己演出としての効果は複数の要因の複合によって惹き起こされるものとして理解されなければならないが、研究の出発点においては個々の要因について個別に行うのも1つの方法である。化粧の効果に係わる要因としては、人間の五感からみた場合、日本人においてはまず視覚、そして嗅覚に関するものがあげられよう。本研究では、視覚に関係するものうち色をとりあげ、色彩の主観的意味構造を調べる。

意味空間を調べる方法としてはsemantic differential (SD) 法があるが、岡本<sup>1, 2, 3, 4, 5, 6)</sup>はSD法を更に発展させて展開法による分析法を提案している。これらの新しい分析法の可能性を探ることも本研究の目的の1つである。展開法による分析の場合は、概念の評定に用いるものは形容詞対以外のものでもよい。本研究では、色彩の意味空間を象徴語との関連においてとらえることとする。色彩と象徴語の関係を調べているものとして大山<sup>6)</sup>のものがあるので、まずそのデータを数量化4類の基準による展開法によって分析してみる。その分析結果に基づいて本実験で用いる刺激の選定を行う。本実験では、色と象徴語との適合度の評定データの収集を行い、展開法による分析を試みる。

## 2 準備

### 2.1 数量化4類の基準による展開法

対象間の(非)類似度データから対象の空間内の大まかな布置を求めるものとして数量化4類<sup>7)</sup>がある。数量化法の細かい問題点は種々指摘されている<sup>8, 9)</sup>が、データの示す傾向を大づかみに捉える<sup>10)</sup>ものとしての実用性は研究の出発点にお

A study on semantic space of color



Yasuharu Okamoto

Faculty of Arts  
Kanazawa University

いて極めて有効である。数量化4類は各対象間の類似度データを分析の対象とするが、対象が2つのグループに分かれていて異なるグループに属する対象間の類似度データのみが与えられているときは欠損値を含むデータの特別な場合であり展開法と呼ばれる分析法となる。展開法に数量化の考え方を適用すると次のようになる<sup>11, 12)</sup>。

対象*i*と対象*j*の類似度 $e_{ij}$ が与えられているとき、次の目的関数 $Q$ を設定する。

$$Q = - \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^N e_{ij} \cdot \{x(i) - y(j)\}^2$$

ここで、 $x(i)$ と $y(j)$ は対象*i*と対象*j*の座標であり、対象*i*の属するグループには*M*個のものがあ、対象*j*の属するグループには*N*個のものがあるとす。

対象*i*と対象*j*の布置は $Q$ を最大にする $x(i)$ と $y(j)$ の値として与えられるが、さらに数量化4類における考え方<sup>7)</sup>に倣ったスケーリングが行われる<sup>12)</sup>。

## 2.2 Penalty基準による展開法

2点*i*と*j*の類似度データ $e_{ij}$ と分析モデルの空間内における隔たり $d_{ij}^2 = \{x(i) - y(j)\}^2$ との関係が数量化4類の基準(目的関数)では内積として表わされている。多次元尺度構成法においては $e_{ij}$ と $d_{ij}$ との単調関係を直接扱う方法として非計量(nonmetric)変換がある<sup>13, 14)</sup>が、この方法を展開法に適用した場合には退化(degeneration)の問題の生じることがよく知られている。 $e_{ij}$ と $d_{ij}$ との単調関係を扱う方法としては非計量変換の他にpenaltyによるものがある<sup>5, 9, 15)</sup>。ここではこのpenaltyを用いた展開法として次の形のもの<sup>5)</sup>を用いる。

2点*i*と*j*の類似度を $e_{ij}$ 、*i*と*j*の座標値 $\{x_{ii}\}$ と $\{y_{jj}\}$ から算出される距離を $d_{ij}$ で表わし

$$d_{ij}^2 = \sum_i (x_{ii} - y_{jj})^2$$

とおく。

このときpenalty  $P$ を次式で与える。

$$P = \sum \phi((e_{i_1, j_1} - e_{i_2, j_2}) \cdot (d_{i_1, j_1}^2 - d_{i_2, j_2}^2) / \sum d_{i, j}^2)$$

ここで

$$\phi(z) = 1 / (1 + \exp(-c \cdot z))$$

である。

$P$ を与える式の右辺において、 $\phi$ の左隣の $\sum$ は $(i_1, j_1)$ と $(i_2, j_2)$ のすべての組み合わせにわたり、同じく右辺の $\sum d_{i, j}^2$ は*i*と*j*の組み合わせ全体に対して和がとられる。

$\phi(z)$ の定義式における定数*c*は近い値同士のみ $e_{ij}$ あるいは $d_{ij}$ の順位関係に対するpenaltyの厳しさの程度を与えるものであり、*c*の値が大きいほど厳しいものとなる。

座標値 $\{x_{ii}\}$ 、 $\{y_{jj}\}$ は*P*の最小化によって求められる。

## 2.3 Individual Difference Scaling (INDSCAL)

刺激間の(非)類似度の知覚における個人差を扱う多次元尺度構成法としてINDSCAL<sup>16)</sup>がある。

ここでは次の形で用いる。

刺激*j*の座標値を $(x_{jt})$ 、被験者*i*の第*t*次元に対する重みを $w_{it}^2$ で表わし、被験者*i*における刺激*j*と*k*の距離 $d_{j,k}^{(i)}$ を次式で与える。

$$d_{j,k}^{(i)} = \left\{ \sum w_{it}^2 (x_{jt} - x_{kt})^2 \right\}^{1/2}$$

Nonmetric INDSCALでは非類似度データ $\delta_{j,k}^{(i)}$ に対応するようにnonmetric変換された値 $\hat{d}_{j,k}^{(i)}$ と $d_{j,k}^{(i)}$ の値の差の2乗和が最小になるように布置 $(x_{jt})$ と重み $(w_{it}^2)$ が求められる。モデルの当てはまり具合は次のStress  $S$ によって表わされる。

$$S = \sqrt{\frac{\sum_i \sum_{j < k} (\hat{d}_{j,k}^{(i)} - d_{j,k}^{(i)})^2}{\sum_i \sum_{j < k} (d_{j,k}^{(i)})^2}}$$

CarrollとWish<sup>16)</sup>は色知覚のデータをINDSCALによって分析したものを紹介しているが、被験者の色覚異常がその重み $w_{it}^2$ の値の偏りとして表わされている。

## 2.4 大山 (1964) のデータの分析

本研究の目的の1つは色の情緒的意味空間を展開法を用いて調べることであるが、そのために用いる刺激の選定を行う。大山<sup>6)</sup>の象徴語に対する色紙の選択傾向を調べたデータの分析を2.1の数量化4類の基準による展開法によって行い、その結果に基づいて使用する色と語を決める。大山のデータは、14語の象徴語それぞれについて16枚の色紙からもっとも適したものを選ばせるということを145名の被験者に対して行われたものであるが、その選択度数を類似度として分析すると図1、図2の布置が得られる。円内の記号が表わす象徴語と色はそれぞれの図の下に示す通りである。図1と図2を重ねれば色と象徴語の同時分布(同じ空間内における布置)が得られる。

図1に表わされている色の布置において、「白」、「中灰」、「黒」の無彩色は他の「赤」などの有彩色の集まりから離れた位置にある。本研究においては展開法による分析が行われるが、そ

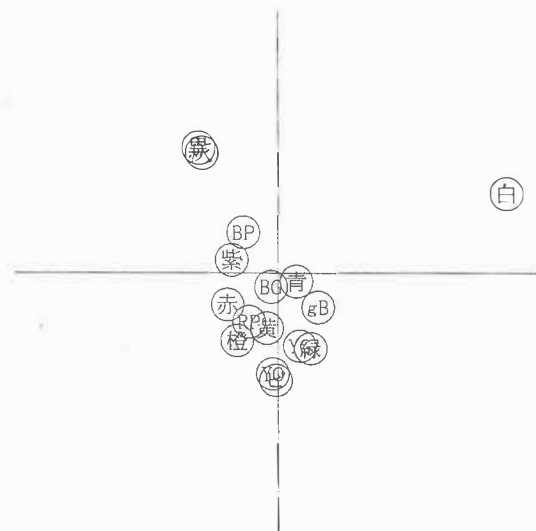


図1. 色の布置。円内の文字は次のものを表わす。  
 黒→黒；灰→中灰；白→白；ピ→ピンク  
 赤→赤；橙→橙；Y0→黄橙；黄→黄  
 YG→黄緑；緑→緑；gB→緑味青；青→青  
 BP→青紫；紫→紫；BG→青緑；RP→赤紫

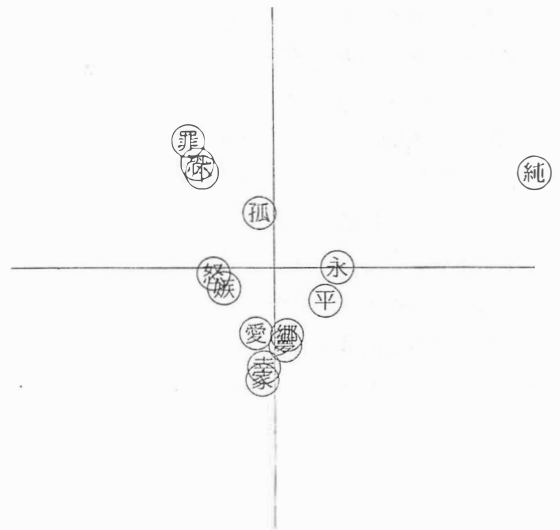


図2. 象徴語の布置。円内の文字は次のものを表わす。  
 怒→怒り；嫉→嫉妬；罪→罪；永→永遠  
 幸→幸福；孤→孤独；平→平静；郷→郷愁  
 家→家庭；愛→愛；純→純潔；夢→夢  
 不→不安；恐→恐怖。

の分析が成功するためには刺激の布置がなるべく一様であることが望ましい。又、無彩色、特に「白」は刺激の提示されるCRTディスプレイのバックグラウンドの色も白であるので不適切である。以上のことから、「白」、「中灰」、「黒」の無彩色は本研究では用いないことにする。有彩色の方はそれぞれの色相に応じてバランスよく布置が与えられている(図1)。本研究の刺激としてはCRTディスプレイに提示する関係から「赤」、「黄」、「緑」、「シアン」、「青」、「マゼンタ」の6色<sup>17)</sup>を用いる。

象徴語の方は、除かれた無彩色に近接した位置にあるもの「純潔」、「恐怖」、「罪」、「不安」の4語を除いた残り10語を用いる(図2)。

## 3 実験

2.4の分析結果に基づいて選定された色と象徴語の適合度評定データを個別実験により収集した。この適合度評定実験を第1セッションとし、それに続けて、12色に増やされた色について色同

士の類似度評定データ収集の実験を第2セッションとして行った。

被験者：

大学生13名（男子4名、女子9名）。

装置：

実験はパーソナルコンピュータ（PC-9821 Ap2, NEC）による制御の下で行われ、刺激はパーソナルコンピュータ用ディスプレイ（PC-KM172, NEC）上に提示された。実験の制御プログラムはTurbo-Pascal for Windows（Borland）によって作成された。

方法：

刺激として用いた色はWindows API関数RGBによって指定された。API関数RGBでは、赤(R)、緑(G)、青(B)の輝度を0から255の範囲の値で指定することにより色が決められる。赤、緑、青の指定値がv1、v2、v3であることを(v1/R, v2/G, v3/B)で表わせば、本実験の第1セッションで用いた6色の指定は次のようになる：赤(255/R, 0/G, 0/B)、黄(255/R, 255/G, 0/B)、緑(0/R, 255/G, 0/B)、シアン(0/R, 255/G, 255/B)、青(0/R, 0/G, 255/B)、マゼンタ(255/R, 0/G, 255/B)。

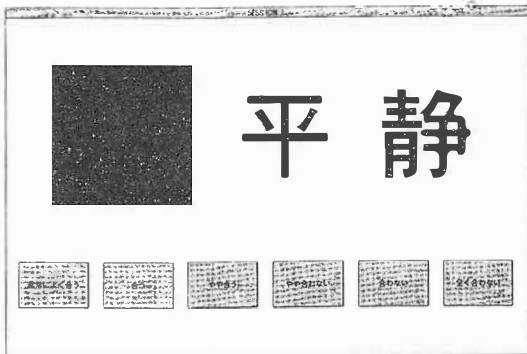


図3. 第1セッションでの刺激提示画面。左側の黒い正方形は評定用の色で塗り潰され、右側の象徴語は黒で表示された。バックグラウンドは白(255/R, 255/G, 255/B)であった。この刺激提示用ウインドウは17インチディスプレイ上に最大サイズで表示された。

第1セッションでは最大の大きさのウインドウ画面において、左側に6色のうちの1色によって塗り潰された正方形が提示され、その右側に象徴語が表示された(図3)。画面の下部には6つのボタンが横に並べられ、左から「非常によく合う」、「合う」、「やや合う」、「やや合わない」、「合わない」、「全く合わない」のそれぞれの評定語がボタン内に記入されていた。被験者はボタンの上に並べられている色と語の組み合わせに対して最も適した評定語のボタンをマウスの左ボタンでクリックするという方法で評定を行うことが求められた。6色と10語の組み合わせは60通りであるが、60対の組み合わせをランダムに並べ換えたものを20セット作成し、その中から同じ色または語ができるだけ3つ以上続かないもの、先頭あるいは末尾の10対に6色がなるべく均等に現れるものを1つ選んだ。第1セッションでの提示順序はこの選ばれた1セットとその逆順のものいずれかが用いられた。各提示順序において、その末尾の10対と同じものがそのままの順序で先頭の前に付け加えられ練習用とされた。それらに対する評定データは分析には用いなかった。

第2セッションにおいては色同士の類似度の評定データがとられた。よく似た色を増やすため第1セッションでの6色にさらに6色を加えて12色が用いられた。色名あるいは記号を付けて以下に示す。red(255/R, 0/G, 0/B)、r\_y(255/R, 128/G, 0/B)、yellow(255/R, 255/G, 0/B)、y\_g(128/R, 255/G, 0/B)、green(0/R, 255/G, 0/B)、g\_c(0/R, 255/G, 128/B)、cyan(0/R, 255/G, 255/B)、c\_b(0/R, 128/G, 255/B)、blue(0/R, 0/G, 255/B)、b\_m(128/R, 0/G, 255/B)、magenta(255/R, 0/G, 255/B)、m\_r(255/R, 0/G, 128/B)。12色から2色を選びそれぞれの色で塗り潰した正方形が最大サイズのウインドウ画面の上部に2つ並べて提示され、その下側に6つのボタンが横に並べて表示された(図4)。各ボタンには左のものから順に「同じ」、「似ている」、「やや似ている」、「やや異なる」、「異なる」、「全く異なる」の評定語が記入され

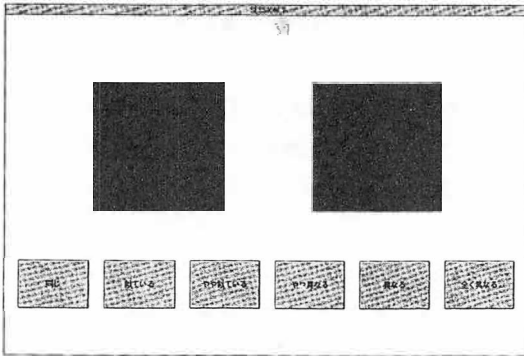


図4. 第2セッションでの刺激提示画面。  
左右の黒い正方形はそれぞれ評定用の色で塗り潰されていた。バックグラウンドは白(255/R, 255/G, 255/B)であった。この刺激提示用ウィンドウは17インチディスプレイ上に最大サイズで表示された。

ていた。被験者は上部に提示されている2つの正方形の色の関係について6つのボタンの評定語から最も適切なものを選んでそのボタンをマウスでクリックすることが求められた。12色から作られる対の提示順序は、Ross<sup>18)</sup>の方法によって決められたものの間に、同じ色同士の対を同色の提示が対間において続かないように挿入して作成された78対よりなる系列とこれを逆の順序にしたものの2系列が用意された。各系列の先頭にはred、green、blueの3色から作られる3組の対と同じ色同士の対3組の計6組の対よりなる系列が付け加えられていたが、これらの6対に対するデータは練習用のものとして分析には用いなかった。

第2セッションは第1セッション終了後に続いて行われた。

## 4 結果

被験者個人個人の色覚の特徴を調べるため、第2セッションの男女13名のデータが非計量INDSCALによって分析された。「同じ」から「全く異なる」までの6つの評定に0から5までの整数値を対応させた。次元数とStressの関係が表1に示さ

表1. 第2セッションにおける男女13名による色の類似度評定データを非計量INDSCALによって分析したときの各次元数に対するStressの値。

次元数	Stress
1	0.3556
2	0.1144
3	0.0857
4	0.0659
5	0.0511
6	0.0410

れている。表1における次元数の増加に伴うStressの値の変化の割合から判断すると次元数が3のモデルが適当であると思われる。次元数3のと

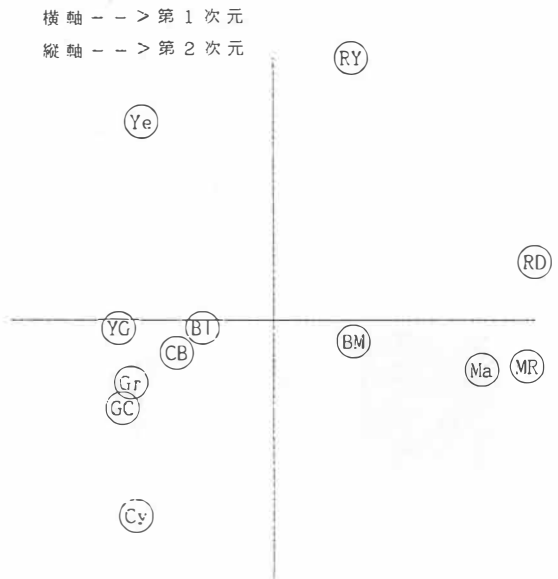


図5. 第1次元と第2次元による色の布置NDSCAL) 図中の記号の表わす色は次の通りである ; RD (255/R, 0/G, 0/B), RY (255/R, 128/G, 0/B), Ye (255/R, 255/G, 0/B) YG (128/R, 255/G, 0/B), Gr (0/R, 255/G, 0/B), GC (0/R, 255/G, 128/B), Cy (0/R, 255/G, 255/B), CB (0/R, 128/G, 255/B), BI (0/R, 0/G, 255/B), BM (128/R, 0/G, 255/B), Ma (255/R, 0/G, 255/B), MR (255/R, 0/G, 128/B),

横軸 --> 第1次元  
縦軸 --> 第2次元

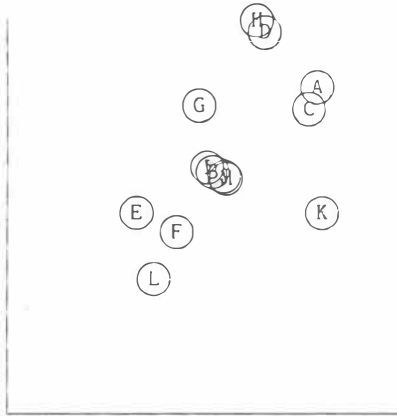


図6. NDSICAL解による各被験者の重み。  
左下隅が(0,0)である。記号A~Iは女子、J~Mは男子のものを表わす。

きの布置を第1次元と第2次元に対して図示したものが図5である。横軸が赤-緑の次元、縦軸が青-黄の次元に対応していることが分かる。同じ第1次元、第2次元に対する各被験者の重みを図示したものが図6である。左下隅が(0,0)を表わす。図6の重みの分布から特に色覚に問題のある被験者は含まれていなかったことが分かる。

次に、第1セッションのデータの分析を行う。データは女性被験者のものを用いる。「非常によく合う」から「全く合わない」までの6つの選択

表2. 色と象徴語の適合度評定データ(女性)。「非常によく合う」から「全く合わない」までの6つの評定語に6から1までの整数値を順に対応させ、女性被験者9人の中央値を求めたもの。

色	象徴語									
	永遠	平静	慈悲	夢	家庭	幸福	愛	厳格	怒り	孤独
赤	4	1	3	4	5	5	6	5	6	2
黄	5	2	4	5	5	6	3	5	4	2
緑	4	4	4	4	4	4	3	2	3	3
シアン	5	6	4	4	4	3	3	3	2	5
青	5	5	4	4	3	3	2	4	4	6
マジェンタ	3	3	4	3	2	3	3	5	4	4

肢に6から1までの整数を対応させたときの女子9名による評定の中央値を表2に示す。

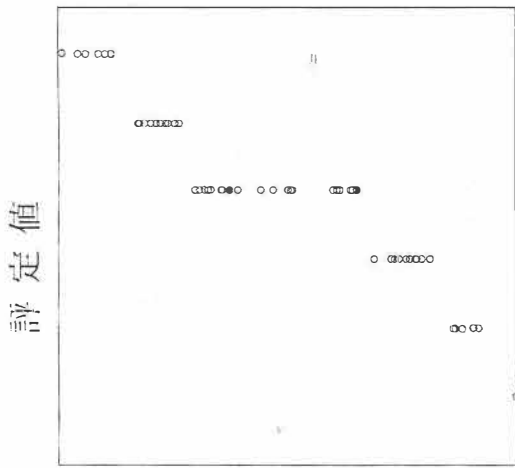
表2のデータを2.2のpenalty Pを目的関数とする展開法により分析する。c = 1558.44のときの各次元数に対するP、及び評定データとモデルによる距離のSpearman順位相関係数を表3に示す。但し、順位相関係数の算出における順位付けは、一方のスコアがtieであっても他方のスコアがtieでない場合はそのtieでない方のスコアによって順位付けを行った。この修正された順位付けによる相関係数を用いる方がモデルのデータに対する適合状況がよく分かる。

表3. Penalty関数による展開法によって表2のデータを分析<sup>\*)</sup>したときの各次元数に対するPと順位相関係数<sup>\*\*)</sup>。

<sup>\*)</sup> c = 1558.44 <sup>\*\*)</sup> 順位付けにおいて一方のスコアがtieであっても他方がtieでない場合はそのtieでない方の順位が用いられた。

次元数	P	順位相関係数 <sup>**)</sup>
1	390.81	-0.900
2	231.91	-0.993
3	195.64	-1.000

表3によれば表2の適合度評定値の順序関係と次元数3のときにモデルから算出される距離の順序関係に矛盾が全く無くなることが分かる。次元数3のときの距離と評定値の関係を図7に示す。又、このときの色と象徴語の分布をそれぞれ図8、9と図10、11に示す。ユークリッド距離が用いられているので布置の解釈が容易なように回転を行うことが出来るが、図8~11では回転を行わずに布置が示されている。色と象徴語は同一空間内にあるが、図8と10、あるいは図9と11を重ねることによって色と象徴語の同時分布(joint map)が得られる。



距離の2乗

図7. 次元数3のときの距離と評定値の関係

横軸 - - > 第1次元  
縦軸 - - > 第3次元

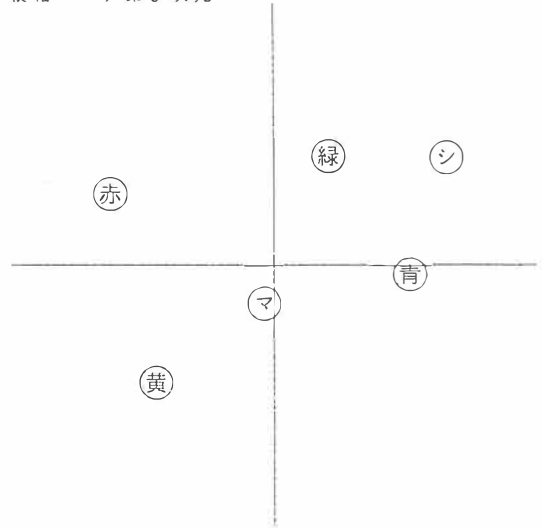


図9. 色の布置(展開法)

横軸 - - > 第1次元  
縦軸 - - > 第2次元

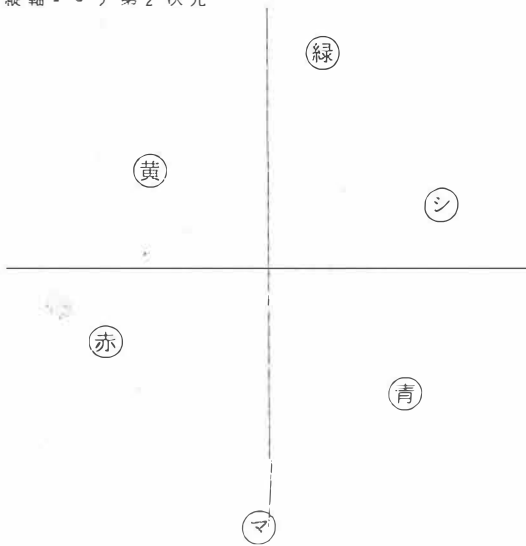


図8. 色の布置(展開法)

横軸 - - > 第1次元  
縦軸 - - > 第2次元

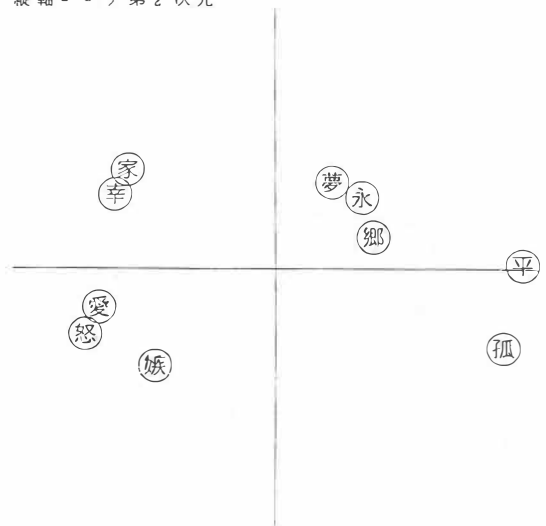


図10. 象徴語の布置(展開法)

横軸 - - > 第1次元  
縦軸 - - > 第3次元

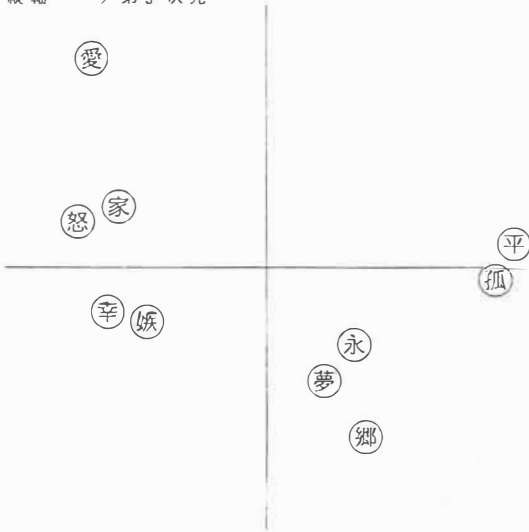


図11. 象徴語の布置(展開法)

## 5 考察

4. 結果に示されているように、大山<sup>9)</sup>のデータを数量化4類の基準による展開法によって分析したものに基づいて刺激を選ぶという方法は成功したといえる。

Carroll & Wish<sup>10)</sup>におけるINDSCALによる分析結果では色覚の異常が重みの偏りとして表わされている。本研究でも被験者個人個人の色覚のチェックのため、第2セッションの色の類似度データがINDSCALによって分析された。特に問題のある被験者は含まれていなかった。

第1セッションの女性9名による色と象徴後の適合度評定の中央値がpenalty関数を目的関数とする展開法によって分析されたが、表3に示されているように次元数3のときにデータの順序関係と距離の順序関係の間に全く矛盾の無い解が得られた。これは展開法においてpenaltyを目的関数とすることの有効性を示すものである。

次元数3のときの色の布置を見てみると、第1次元(横軸)と第2次元(縦軸)の関係を表わす図8において正の対角線方向が赤-緑の次元に、

負の対角線方向が青-黄の次元に対応していることが分かる。図8にみられる「赤」から「マゼンタ」に至る円環構造は色彩科学<sup>19)</sup>で説明されているものに合うものである。

第3次元を縦軸とする図9からは第3次元はValdez & Mehrabian<sup>20)</sup>のpleasure水準に対応しているようである。しかし、この第3次元がpleasure水準に関係しているという解釈は図9に対応する図11における象徴語の分布の様子とは合わない。

色と象徴語の関係は図8と10、図9と11を重ねて得られる色と象徴語の同時分布から視覚的に読み取ることができる。「赤」は「愛」、「怒り」、嫉妬」に近く激しい色であることが分かる。「青」は「孤独」と近い。「緑」と「シアン」は「夢」、「永遠」、「郷愁」といった語に比較的近い。「黄」は「幸福」に近く、「家庭」にも比較的近い色である。

このように、展開法による分析によって、色の布置と象徴語の布置のそれぞれに対する解釈と、両者の布置を重ねて得られる同時分布における色と象徴語の関係の解釈を視覚的に行うことが可能となる。

本研究では展開法が意味空間の分析のために用いられたが、展開法はもともと主として選好データの個人差の分析法として提案されたものである<sup>21)</sup>。従って、本研究で用いられた数量化4類の基準による展開法、及びpenalty関数による展開法は、消費者別の商品に対する選択パターンの分析にも用いることができる。

## 引用文献

- 1) 岡本安晴(1992)SD法への展開法の適用について. 日本心理学会第56回大会発表論文集.
- 2) 岡本安晴(1992)確率的展開法のSD法への適用について. 日本行動計量学会第20回大会発表論文抄録集.
- 3) 岡本安晴(1994)色彩と象徴語の関係の展開法的分析. 日本基礎心理学会第13回大会発表.

- 4) 岡本安晴 (1994) 展開法の重み付き確率モデルについて. 日本行動計量学会第22回大会発表論文抄録集.
- 5) 岡本安晴 (1994) 色彩空間の展開法的分析. 日本心理学会第58回大会発表論文集.
- 6) 大山 正: 色彩象徴に関する一研究. 色彩研究, 11 55-59 1964
- 7) 岩坪秀一 (1987) 数量化法の基礎. 朝倉書店.
- 8) 丘本 正・戸田 準: 数量化理論4類と主座標分析法. 日本統計学会誌, 3 41-53 1973
- 9) Saito, T., : Contributions to euclidean type quantification and a new method of multidimensional scaling. *Behavior-metrika*, 12 63-83 1982
- 10) 林 知己夫・鮑戸 弘 (共編) (1976) 多次元尺度解析法—その有効性と問題点—. サイエンス社.
- 11) 岡本安晴 (1991) 数量化4類の基準による展開法. 日本行動計量学会第19回大会発表論文抄録集.
- 12) 岡本安晴: 数量化4類の基準による展開法における制約条件について. 金沢大学文学部論集・行動科学科篇, 13 35-54 1993
- 13) Kruskal, J.B. : Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a non-metric hypothesis. *Psychometrika*, 29 1-27 1964
- 14) Kruskal, J.B. : Nonmetric multidimensional scaling: A numerical method. *Psychometrika*, 29 115-129 1964
- 15) 北條 弘 (1993) 順位づけ反応モデルに基づく多次元展開法. 日本心理学会第57回大会発表論文集.
- 16) Carroll, J. D. & Wish, M. (1974) Models and methods for three-way multidimensional scaling. In D. H. Krantz, R. C. Atkinson, R. D. Luce & P. Suppes (Eds.) *Contemporary developments in mathematical psychology*, Vol. II: Measurement, psychophysics, and neural information processing. San Francisco: W. H. Freeman and Company, 57-105.
- 17) Murch, G. (1986) Color displays and color science. In H. J. Durrett (Ed.), *Color and the computer*. Boston: Academic Press.
- 18) Ross, R. T. : Optimum orders for the presentation of pairs in the method of paired comparisons. *Journal of Educational Psychology*, 25 375-382 1934
- 19) Wyszecski, G. & Stiles, W. S. (1982) *Color science: Concepts and methods, quantitative data and formulae* (2nd ed.). New York: John Wiley & Sons.
- 20) Valdez, P. & Mehrabian, A. : Effects of color on emotions. *Journal of Experimental Psychology: General*, 123 394-409 1994
- 21) Coombs, G. H. (1964) *A theory of data*. New York: John Wiley & Sons.

# 化粧の個人的効果と対人的効果に関する実証的研究

福島大学 教育学部

飛田 操

The purpose of this study was to examine the intrapersonal effects and interpersonal effect of use of cosmetics. In study 1, twenty hundred and forty-one undergraduates completed a questionnaire that was composed of questions about everyday usage of cosmetics, reasons of using of cosmetics. In study 2, effects of wearing lipstick on self-image were examined. Twenty-nine female undergraduates participated the experiment, and wear lipstick. And they rated impression about themselves. As the result of experiment, wearing lipstick influenced the rating of self-images. In study 3, 20 male and 20 female rated the effects of lipsticks use upon likability. Results indicated the positive effects of lipsticks use were varied with the rater's sex. Also, there were few correspondence between the rated likability and self-rating likability. In study 4, effects of full makeups on self-image were examined.

## 1 緒言

これまで、化粧行動に関しては、「化粧品消費行動や化粧行動の動機・理由に関する研究」のほか、「化粧による主観的な状態の変化や自己イメージの変化に焦点をあてた研究」、「化粧による第三者からみた対人印象や対人魅力の変化に焦点をあてた研究」など、さまざまな側面からの心理学的な研究がなされてきたといえよう（鈴木（1）、岩男・菅原・松井（2）、松井・山本・岩男（3）、山本・加藤（4））。本研究は、これらのうち、特に、化粧行動の動機・理由の構造を解明し、化粧による自己イメージの変化と他者からの評価とのあいだの対応を検討することを目的としている。

## 2 第一研究

### 2.1 目的

本研究の目的は、（1）大学生女子の化粧品使用の実態を明らかにし、（2）女性が化粧をする理由、あるいは、化粧をしない理由をどのようにとらえているのか、その構造を分析し、あわせて、（3）男性は「女性が化粧をする理由」をどのように認知しているか、その構造を分析することにある。

### 2.2 方法

【調査対象者と調査方法】本研究は、質問紙法調査による。質問紙は、東北地方の国立大学で心理学関連の授業を受講する教育学部の大学2・3・4年生に対して、授業中一斉に施行された。ここでは、男性105名、女性136名の計241名（平均年齢：20.55才）の有効回答を分析の対象とした。

【調査内容】質問紙は、年齢、性別等を問うフェイス・シートの他、「化粧品使用の実態（女性のみ）」、「化粧をしない理由（化粧をしない女性のみ）」、「化粧をする理由（化粧をする女性のみ）」、「女性が化粧をする理由についての

An empirical study of intrapersonal effect and interpersonal effects of use of cosmetics.



Misao Hida

Faculty of Education  
Fukushima University

表1 化粧品使用者の割合

	ふだんの時			デートなどの時		
	時々		つかわ ない	時々		つかわ ない
	つかう	つかう		つかう	つかう	
リップ・クリーム	48.5	35.3	16.2	48.9	31.1	20.0
口紅	47.8	31.6	20.6	59.3	28.1	12.6
ファンデーション	52.2	25.7	22.1	63.7	22.2	14.1
香水、オーデコロン	10.3	35.3	54.4	14.1	40.7	45.2
マニキュア	7.4	36.8	55.9	8.9	34.8	56.3
アイシャドー	13.2	18.4	68.4	20.7	23.0	56.3
眉墨	14.7	9.6	75.7	18.5	7.4	74.1
マスカラ	2.2	10.3	87.5	5.2	8.9	85.9
頬紅	2.9	5.9	91.2	5.2	4.4	90.4
アイライナー	1.5	3.7	94.9	2.2	5.9	91.9
ペディキュア	0.7	10.3	89.0	2.2	9.6	88.1
つけまつげ	0	0	100	0	0	100

推測（男性のみ）」から構成されている。また、今回は報告しないが、「自己の顔や身体に対するイメージ（全員）」、「パーソナリティ特性として「自尊心と外向性評定（全員）」が含まれている。「化粧品使用の実態」は、表1に示した12種の化粧品のそれぞれについて、その使用頻度を「つかう」、「時々つかう」、「つかわない」の3つの回答肢からひとつを選んで回答させるものである。ここでは、状況や目的のちがいによる化粧品使用のちがいを検討するために、回答者の「ふだん」時の化粧品使用と、「デートや合コン」時の化粧品使用のふたつの場面のそれぞれに回答させている。

「化粧をしない理由」に関しては、化粧をしない女性に、その理由を表2に示した19項目のそれぞれに対して「全くあてはまらない」から「非常にあてはまる」までの5段階尺度上に評定させるものである。また、「化粧をする理由」に関しては、化粧をする女性に対して、その理由を表3に示した20項目のそれぞれに対して「全くあてはまらない」から「非常にあてはまる」までの5段階尺度上に評定させるものである。この項目の作成

にあたり、岡崎<sup>5)</sup>を参照した。さらに、「女性が化粧をする理由についての推測」に関しては、表3と同じ20項目のそれぞれに対して、「どうして女性はお化粧をするのか、その理由として最もあてはまると思われるところを「全くあてはまらない」から「非常にあてはまる」までの5段階尺度上に男性にチェックさせるものである。

### 2.3 結果

【化粧品利用について】表1に、136名の女性に対しての化粧品を使用する割合を14種の化粧品のそれぞれについて、日常時での使用割合と、デートや合コン場面での使用割合ごとに示した。

【化粧をしない理由について】化粧をしない理由に関する因子分析の結果、あまり明白ではないが固有値1以上で5因子が抽出された（表2）。第一因子は、「化粧をしたときの女性の反応が気になるから」「化粧をしたときの男性の反応が気になるから」「化粧をすると自分自身が意識過剰になってしまうから」などの項目に高い負荷を示している。この因子は他者からの評価や反応に対する評価懸念や意識に関わる因子と考えられ、ここ

表2 化粧をしない理由の因子分析の結果

項目	因子						h2
7 化粧をしたときの女性の反応が気になるから	.93	-.05	.09	.08	-.15	.90	
6 化粧をしたときの男性の反応が気になるから	.86	-.03	.06	.17	-.00	.77	
5 化粧をすると自分自身が意識過剰になってしまうから	.57	-.06	-.09	.04	.15	.36	
3 化粧品が高いから	.53	.48	-.01	.09	.15	.54	
2 化粧のやり方がよくわからないから	.52	.33	.24	-.01	.08	.45	
14 化粧をしても、見せる相手がいないから	.44	.11	.44	-.11	.03	.41	
12 学生のうちは化粧などすべきでないと考えているから	.33	.15	.32	.09	.19	.28	
1 化粧するのが面倒だから	.06	.72	.19	.06	-.02	.56	
19 ただなんとなく	.05	.71	-.05	-.12	-.10	.53	
17 化粧をおとすのが面倒だから	.30	.60	.06	.09	.40	.63	
8 親や友人から化粧をすることに反対されているから	.23	-.40	.05	.07	-.14	.23	
11 周りや友だちがあまり化粧をしないから	-.12	-.01	.97	.08	-.02	.97	
15 化粧をしている人を見ると嫌な気分になるから	.17	-.00	.26	.17	.13	.14	
18 スポーツや運動などですぐ化粧がおちてしまうから	.13	-.03	.10	.84	-.20	.77	
9 化粧をしていないときの方が、気持ちがいいから	-.11	.25	-.17	.51	.35	.49	
4 化粧をしても効果がないから	.14	-.16	.12	.43	.16	.27	
16 化粧をすると息苦しい感じになるから	.03	.13	.05	.11	.65	.46	
13 化粧により肌荒れや炎症をおこしたことがあるから	.09	-.25	.14	-.21	.61	.51	
10 自分の素肌に自信があるから	.03	.27	-.01	.20	.36	.24	

ではこれを「評価懸念」の因子と呼ぶことにする。第二因子は、「化粧をするのが面倒だから」「ただ何となく」「化粧を落とすのが面倒だから」といった化粧をすることや化粧を落とすことにかかわる心理的コストに焦点があてられており、「心理的コスト」の因子と呼ぶことにする。第三因子は、「周りや友だちがあまり化粧をしていないから」だけに高い負荷を示している。周囲からの影響性に関わる因子と考えられるが、1項目だけであり、この因子の解釈は保留したい。第四因子は、「スポーツや運動などですぐ化粧がおちてしまうから」「化粧をしていないときの方が、気持ちがいいから」「化粧をしても効果がないから」の3項目に高い負荷を示しており、化粧の効果性についての認知や評価を示していると考えられる。ここではこれを「効果のなさ」の因子と呼ぶことにする。第五因子は、「化粧をすると息苦しい感じになるから」「化粧により肌荒れや炎症を

おこしたことがあるから」に高い負荷を示している。「化粧のマイナス効果」に関する因子と考えられよう。

【化粧する理由について】化粧をする理由に対する因子分析の結果、固有値1以上で4因子が抽出された(表3)。第一因子は、「異性の人から注目されたいから」「同性の人から注目されたいから」「男性から魅力的だと思われたいから」「他の同性の人に見劣りしたくないから」「きれいになりたいから」に高い正の負荷を示しており「自己顕示と魅力性」に関わるものであるといえよう。第二因子は、「化粧をすると積極的な気分になれるから」「化粧をすると自信を持って外を歩けるから」「化粧をすると自分のストレスが解消できるから」「化粧には自分の顔を創造する楽しさがあるから」「素顔の自分とは違う自分になりたいから」に高い負荷を示しており、「積極性や自信の獲得」に関わる因子であると考えられる。第三因

表3 化粧する理由の因子分析の結果

項目	因子				h2
	I	II	III	IV	
15 異性の人から注目されたいから	.89	.21	-.12	.07	.86
16 同性の人から注目されたいから	.81	.24	-.17	.05	.75
4 男性から魅力的だと思われたいから	.79	.19	-.01	-.20	.70
14 他の同性の人に見劣りしたくないから	.71	.30	-.10	.05	.60
1 周りの人からきれいだと思われたいから	.71	.17	.02	-.27	.66
2 きれいになりたいから	.55	.14	-.02	-.57	.65
7 化粧をすると積極的な気分になれるから	.14	.79	-.12	.10	.67
8 化粧をすると自信を持って外を歩けるから	.32	.67	.09	-.14	.57
9 化粧をすると自分のストレスが解消できるから	.08	.66	-.23	.01	.50
6 化粧には自分の顔を創造する楽しさがあるから	.22	.64	-.18	-.27	.56
20 化粧をすると気分転換になるから	.03	.56	-.30	-.37	.54
5 素顔のじぶんとは違う自分になりたいから	.36	.47	-.09	-.17	.38
19 化粧は女性のみだしなみだから	.04	.21	-.76	-.19	.67
11 女性は美しく装い、女らしくふるまうものだから	.24	.16	-.65	-.08	.51
18 化粧をすると自分の気持ちが引き締まるから	-.07	.42	-.53	-.24	.52
13 仕事や立場上、化粧が必要だから	.34	.06	-.43	.30	.39
17 化粧によって自分の肌を守るため	-.02	-.07	-.24	-.44	.26
10 化粧で肌の色やくすみなどの欠点がカバーできるから	.09	.20	.02	-.37	.18
12 周りや友人がみんな化粧をしているから	.38	-.08	.22	-.01	.20
3 自分の顔や肌を触っていると気持ちがいいから	.14	.25	-.21	.07	.13

子は、「化粧は女性のみだしなみだから」「女性は美しく装い、女らしくふるまうものだから」「化粧をすると自分の気持ちが引き締まるから」に高い負荷を示しており、「伝統的性役割観」を示していると考えられる。さらに、第四因子は、「化粧によって自分の肌を守るため」「化粧で肌の色やくすみなどの欠点がカバーできるから」にやや高い負荷を示し「肌の保護と欠点のカバー」に関する因子であるといえよう。

【男性が推定した「女性が化粧する理由」について】

男性が評定した「女性が化粧する理由」に関する因子分析の結果、固有値1以上で4因子が抽出された(表4)。第一因子は、「周りの人からきれいだと思われたいから」「男性から魅力的だと思わ

れたいから」「きれいになりたいから」「化粧で肌の色やくすみなどの欠点がカバーできるから」「異性の人から注目されたいから」に高い正の負荷を示している。これらは、美しくまた魅力的に評価されたいとする欲求に関連する因子であると考えられよう。第二因子は、「化粧をすると積極的な気分になれるから」「化粧には自分の顔を想像する楽しさがあるから」「素顔の自分とは違う自分になりたいから」「化粧をすると自分のストレスが解消できるから」に高い正の負荷を示しており、ポジティブな方向への気分の変化に関する因子であると考えられる。ここでは、これを「気分変化」の因子と呼ぶ。第三因子は、「女性は美しく装い、女らしくふるまうものだから」「他の同性の人に見劣りしたくないから」「化粧をすると自

表4 男性が評定した「女性が化粧する理由」の因子分析の結果

項目	因子					h <sup>2</sup>
1 周りの人からきれいだと思われたいから	.89	.10	.15	.03	.82	
4 男性から魅力的だと思われたいから	.83	.02	.19	.08	.73	
2 きれいになりたいから	.74	.11	.02	-.08	.57	
10 化粧で肌の色やくすみなどの欠点がカバーできるから	.64	.08	.19	.35	.57	
15 異性の人から注目されたいから	.58	.01	.40	-.06	.50	
7 化粧をすると積極的な気分になれるから	.20	.71	.04	.13	.57	
6 化粧には自分の顔を創造する楽しさがあるから	.09	.69	-.01	.15	.51	
5 素顔のじぶんとは違う自分になりたいから	.24	.63	-.00	.14	.47	
9 化粧をすると自分のストレスが解消できるから	-.30	.62	.39	.11	.64	
3 自分の顔や肌を触っていると気持ちがいいから	-.08	.37	.04	-.22	.19	
11 女性は美しく装い、女らしくふるまうものだから	.19	-.04	.64	.18	.47	
14 他の同性の人に見劣りしたくないから	.40	.11	.58	.02	.51	
8 化粧をすると自信を持って外を歩けるから	.17	.43	.56	-.10	.54	
12 周りや友人がみんな化粧をしているから	.15	-.07	.52	.16	.32	
19 化粧は女性のみだしなみだから	.04	-.03	.49	.43	.43	
20 化粧をすると気分転換になるから	-.16	.14	.44	.34	.35	
16 同性の人から注目されたいから	.11	.14	.39	.03	.18	
17 化粧によって自分の肌を守るため	.07	.01	.04	.67	.45	
18 化粧をすると自分の気持ちが引き締まるから	-.09	.49	.25	.60	.67	
13 仕事や立場上、化粧が必要だから	.08	.21	.27	.45	.33	

信を持って外を歩けるから」「周りや友人がみんな化粧をしているから」「化粧は女性のみだしなみだから」に高い正の負荷を示しており、伝統的女性役割の追従や周囲への同調傾向を示していると考えられ、これを「同調」因子と呼ぶことにする。そして、第四因子は、「化粧によって自分の肌を守るため」「化粧をすると自分の気持ちが引き締まるから」に高い正の負荷を示しているが、「保護」に関わる因子と考えられるが、解釈は不可能である。

#### 2.4 考察

Cashら(6)は、ファンデーション、マスカラ、口紅といった15種の化粧品の使用頻度が、「授業に出席する」、「同性の友人と買い物に行く」

「ディナーでのデート」などの12の状況や場面で異なるかどうかを検討している。本研究では、「ふだんの」時よりも「デートや合コン」時に化粧品を使用するものの割合が増加するとはいえないことが示された。また、「ときどき使う」を合わせると8割近くの女性が、「リップ・クリーム」「口紅」「ファンデーション」の3種を使用していること、さらに、「香水、オーデコロン」と「マニキュア」は「ときどき使う」と回答するものの割合が多く、状況やその時の気分などの要因によって使用に変動がある可能性があることがそれぞれ示されているといえよう。

本研究では、これまで比較的研究の関心がもたれていなかった「化粧しない理由」の構造を分析した。「化粧しない理由」には、他者からの評価

を懸念することや、化粧にともなうコストやマイナスの効果が存在することが示された。さらに、女性が評定した「化粧する理由」と、男性が評定した「女性が化粧する理由」の構造をそれぞれ分析し、このふたつに若干異なる構造が存在することが示された。この問題については、今後さらに検討する必要がある。

### 3 第二研究

#### 3.1 目的

Cox & Glick (7) は、メイクアップした女性の写真は、していないときの写真よりも、より魅力的で、女性的で、そして、セクシーであると第三者により評定されていたことを示している。

また、Miller & Cox (8) は、公的自己意識 (Public Self-Consciousness : PSC) と化粧品使用との関連を検討し、公的自己意識の高い女性は、低い女性と比べてメイクアップをよくしており、また、メイクアップによって自分の容姿の魅力が上昇するとみなしていること、そして、実際に第三者からも公的自己意識の高い女性の方が低い女性よりも魅力的であると評定される傾向があることを示している。

一方で、Cashら (9) は、自己評価に関しては、化粧により自分の顔や全体的な容姿に対する満足度が上昇するとみなしてはいるが、ただし、第三者からの評定に関しては、男性は、同一の女性が化粧をしていないときよりも化粧をしているときにより魅力的であると評定したが、女性が評定すると、化粧しているときと化粧をしていないときの魅力に違いがみられないこと、すなわち、第三者からの評定には性差が存在することを示している。さらに、Hamid<sup>(10)</sup> も、口紅、アイシャドーなどのメイクアップをしているときとしていないときの対象人物の女性に対する魅力を検討するなかで、同性である女性は、メイクアップしているかしていないかにかかわらず対象人物の女性の魅力を一定に評価しているのに対して、男性は、メイ

クアップしていないときよりもメイクアップしているときの方がその女性は魅力的であるとみなす傾向があることを示している。

このように、化粧により、自己評価や自己イメージは変化すること、ただし、第三者が評定した化粧による魅力の向上効果は、男性だけにみられ、女性においてはみられない可能性の存在が示唆されているといえよう。

第二研究においては、化粧による自己イメージの変化を検討する。第一研究の結果では、「リップ・クリーム」、「ファンデーション」、「口紅」が本調査対象者たちの基礎的な化粧品であることが示された。ここでは、これらのうち、特にその使用による印象の変化が大きいと考えられる「口紅」に焦点をあて、「口紅」使用が、自己の印象やイメージ評価に及ぼす効果を検討すること。

#### 3.2 方法

【実験参加者】 国立F大学の女子学生29名が個別に本実験に参加した。ただし、欠損値があるため、分析によっては人数が異なることがある。

【実験手続き】 実験参加者を個別に実験室に入室させた後、「女性に特徴的と思われる心理学的行動である「化粧」のなかから、特に口紅に焦点をあて、その口紅の効果を検討するものである」と説明した。次に、年齢等を問うフェイス・シートへの記入を求めた後、口紅をしていない状態で、着席した実験参加者の顔のアップをビデオ・カメラで撮影した。ビデオ・カメラから椅子の中心までの距離は、2メートル50センチであった。このとき、なるべく緊張していない自然な状態での顔や表情を撮影するため、日常的な会話が実験者とのあいだで行われた。撮影時間は、実験参加者によって異なり、ほぼ1分半から3分であった。

次に、撮影したビデオを、着席した実験参加者から2メートル10センチの距離から29インチ・モニターに再生し、実験参加者は、この録画された自分の顔や表情をみながら、その印象を「全くあてはまらない」から「非常にあてはまる」までの

5段階尺度上に評定した。この時、「なるべく客観的に印象を評定して欲しい。考えすぎるとわからなくなるので、直感的に評定して欲しい」旨の指示を行った。

この後、実験者参加者は口紅をつけて、上と同様の手続きを繰り返した。口紅は2種類あり、K社の中価格帯ブランドに属するオレンジ1色とピンク系1色であった（以下、それぞれをオレンジとピンクと略記）。順序効果を相殺するため、実験参加者のうち半数はオレンジ→ピンクの順に口紅をつけ、半数はピンク→オレンジの順に口紅をつけた。

### 3.3 結果

表5に示した16項目の形容詞それぞれの印象評定の平均に対して、一要因分散分析を行った。「好ましい」、「理性的な」「冷たい」「感情的な」「知的な」「おちついた」の6項目に対しては、有意な主効果は認められず、自己の印象評定に及ぼす口紅使用の効果は認められなかった。これに対し、「情熱的な」「美しい」「派手な」「激しい」「穏やかな」「地味な」「醜い」「暖かい」「やさしい」「洗

表5 口紅の使用による印象（平均）

	口紅無し	オレンジ	ピンク	F
好ましい	2.93	3.04	2.86	0.25
理性的な	2.41	2.70	2.67	1.90
情熱的な	2.17	3.03	3.34	14.29****
美しい	2.07	2.69	2.76	11.18****
冷たい	2.44	2.24	2.10	1.40
派手な	1.93	3.13	3.31	22.98****
感情的な	3.14	3.24	3.24	0.15
激しい	2.21	2.79	3.00	4.24*
穏やかな	3.55	2.62	2.66	11.96****
地味な	3.07	2.14	2.21	13.59****
醜い	3.17	2.86	2.83	3.40*
知的な	2.41	2.69	2.79	2.30
暖かい	3.55	3.24	2.90	4.79*
やさしい	3.41	2.93	2.97	3.23*
おちついた	2.56	2.55	2.66	0.09
洗練された	2.14	2.62	2.72	5.02**

\* p<.05; \*\* p<.01; \*\*\*\* p<.001

練された」の10項目に対しては有意な主効果が認められている。Newman-Kuels法による多重比較の結果は、これらの効果は、いずれも「口紅無し」条件といずれか一方あるいは双方の「口紅使用」条件とのあいだに有意差が存在すること、二種類の口紅のあいだの効果には有意差が認められないことをそれぞれ示している。

### 3.4 考察

口紅の使用により、自己イメージが変化する側面と、自己イメージの変化がもたらされない側面が、ともに存在することが示された。特に、口紅使用により、「暖かさ」や「やさしさ」は減少するが、「洗練された」「激しさ」「情熱的な」「美しさ」が上昇するという結果は興味深い。今後、自己イメージの変化と第三者からの印象や魅力の変化と対応するのかどうかについての検討が必要であろう。

## 4 第三研究

### 4.1 目的

第二研究により、口紅の使用による自己イメージの変化の特徴が明らかになった。そして、自己イメージの変化と第三者からの印象や魅力の変化とが対応するのかどうかについての検討が必要なが示された。

第三研究の目的は、口紅使用の有無による第三者からの印象や魅力の変化を明らかにし、口紅の使用による自己イメージの変化が、これら第三者からの印象や魅力の評定と対応するのかどうかを明らかにすることにある。

### 4.2 方法

【刺激人物】 刺激人物は、第二研究に参加した実験参加者のうちの5名の「口紅無し」「オレンジ口紅条件」「ピンク口紅条件」の3種類のビデオについて、それぞれ30秒ずつに編集したものである。刺激人物（5名）×口紅条件（無し、オレン

表6 Aさんについての自己評定と第三者評定

	口紅無し			ピンク			オレンジ		
	自己	男性	女性	自己	男性	女性	自己	男性	女性
好ましい	2	3.30	3.55	2	3.20	3.45	4	3.30	3.40
理性的な	3	3.45	3.25	2	3.50	3.45	3	3.25	3.55
情熱的な	1	2.60	2.70	2	3.25	3.25	4	3.20	3.05
美しい	2	3.25	3.40	2	3.60	3.50	3	3.50	3.60
かわいらしい	-	3.00	3.20	-	3.15	2.80	-	3.15	2.80
冷たい	4	3.10	2.85	2	2.70	2.90	2	3.15	2.85
派手な	2	2.60	2.20	2	3.25	3.05	2	3.10	2.45
感情的な	2	3.00	2.50	2	3.20	3.30	2	3.30	2.60
激しい	1	2.85	2.50	2	2.85	3.05	1	3.15	2.35
穏やかな	4	3.10	3.30	2	3.10	2.90	4	2.90	3.00
地味な	3	2.90	3.05	2	2.30	2.55	2	2.30	2.75
知的な	1	3.30	3.95	2	3.60	3.80	2	3.55	3.90
暖かい	4	2.85	3.30	4	3.20	3.25	4	3.00	3.40
優しい	4	3.15	3.35	3	3.10	3.15	4	3.20	3.30
清楚な	-	3.15	3.65	-	3.15	3.15	-	3.25	3.35
大人っぽい	-	3.30	3.45	-	3.70	4.05	-	3.95	3.70
子どもっぽい	-	2.55	2.50	-	2.40	2.20	-	2.05	2.35
洗練された	1	2.65	2.90	3	3.20	3.60	2	3.25	3.50
落ち着いた	4	3.25	3.70	4	3.40	3.50	4	3.40	3.60

ジ、ピンクの3種類)の計15のビデオのリストが、口紅の使用による順序効果を相殺するようなかたちで作成された。

【実験参加者】 国立F大学、および、同大学院の学生40名(男20名・女20名)。いずれも刺激人物と未知、もしくは、キャンパスで顔を見たことがあるという程度の関係にある。

【実験手続き】 実験参加者は、実験室に入室後、「第一印象の実験であること、素直に評定してほしいこと」等の教示を受け、ビデオに映った刺激人物の印象や魅力について、19項目の形容詞上で評定した。評定は、「非常にあてはまる」から「全くあてはまらない」の5段階評定とし、「非常にあてはまる」を5点とし、「全くあてはまらない」を1点として得点化した。ここで用いられた形容詞は、「好ましい」「理性的な」「情熱的な」「美しい」「かわいらしい」「冷たい」「派手な」「感情的な」「激しい」「穏やかな」「地味な」「知的な」

「暖かい」「優しい」「清楚な」「大人っぽい」「子どもっぽい」「洗練された」「落ち着いた」であった。

#### 4.3 結果

表6~10に第二研究において得られた自己評定の値と、第三研究において得られた第三者による評定の平均を男女別に示した。ここでは、特に、好ましさと美しさの評定に関する結果に焦点をあてて記述する。

刺激人物Aに関しては(表6)、本人は、オレンジの口紅の使用により好ましさと美しさが上昇したとみなしている。第三者の評定においても男女とも口紅の使用は美しさの向上をもたらしたとみなしているが、口紅の種類による違いは認められていない。好ましさに関しては、第三者による口紅使用の有無による評定には有意な違いは認められていない。

表7 Bさんについての自己評定と第三者評定

	口紅無し			ピンク			オレンジ		
	自己	男性	女性	自己	男性	女性	自己	男性	女性
好ましい	4	3.70	4.00	2	3.15	3.65	3	3.30	3.65
理性的な	3	3.15	2.90	3	2.95	2.75	3	2.90	2.85
情熱的な	3	3.00	2.50	3	2.70	2.80	4	2.80	3.05
美しい	3	2.95	2.85	3	2.85	2.95	3	3.00	2.90
かわいらしい	-	4.20	4.20	-	3.85	4.20	-	4.00	4.20
冷たい	2	1.60	1.70	3	1.65	1.90	2	1.60	1.85
派手な	2	1.65	1.75	3	2.40	2.50	4	2.55	2.25
感情的な	4	2.65	2.35	3	2.85	2.75	4	2.60	2.45
激しい	3	2.05	1.85	3	2.15	2.45	3	2.10	2.45
穏やかな	4	4.10	4.05	4	3.90	3.60	3	4.00	3.70
地味な	3	3.40	3.30	5	2.95	2.75	3	3.00	2.85
知的な	2	3.35	3.10	3	2.95	3.00	2	3.10	3.00
暖かい	4	4.45	4.15	4	3.85	4.10	4	4.05	4.10
優しい	4	4.45	4.20	4	3.95	4.10	3	4.15	3.95
清楚な	-	3.75	3.70	-	3.20	3.55	-	3.50	3.45
大人っぽい	-	1.90	2.05	-	1.85	2.25	-	1.85	2.15
子どもっぽい	-	4.40	4.00	-	4.20	3.75	-	4.30	3.70
洗練された	2	2.75	2.65	3	2.70	2.70	3	2.80	2.75
落ち着いた	2	3.15	3.55	3	2.60	3.10	2	3.10	2.90

表8 Cさんについての自己評定と第三者評定

	口紅無し			ピンク			オレンジ		
	自己	男性	女性	自己	男性	女性	自己	男性	女性
好ましい	4	2.60	3.05	4	3.00	2.70	5	2.75	3.35
理性的な	3	3.05	3.05	4	3.30	2.70	3	3.15	2.95
情熱的な	4	3.15	3.20	4	3.50	3.70	4	3.60	3.55
美しい	3	2.90	2.95	4	3.10	3.05	4	3.05	3.35
かわいらしい	-	2.65	2.70	-	2.50	2.70	-	2.65	2.85
冷たい	1	2.60	2.85	1	2.85	2.95	1	2.90	2.75
派手な	2	3.00	2.35	4	3.30	3.65	3	3.75	3.45
感情的な	4	3.35	3.00	4	3.40	3.50	5	3.50	3.50
激しい	2	3.10	3.05	4	3.20	3.35	4	3.25	3.30
穏やかな	5	2.45	2.60	3	2.65	2.45	4	2.60	2.70
地味な	3	2.55	2.60	3	2.10	2.30	1	2.25	2.40
知的な	3	2.90	3.15	4	3.15	3.10	4	3.05	3.55
暖かい	4	2.80	3.00	4	2.95	2.90	4	3.10	3.05
優しい	4	3.20	3.00	4	3.20	2.80	4	3.10	3.00
清楚な	-	2.95	2.85	-	2.80	2.65	-	2.80	3.10
大人っぽい	-	3.70	3.45	-	4.00	3.40	-	4.05	3.85
子どもっぽい	-	2.45	2.55	-	2.00	2.15	-	1.90	2.15
洗練された	3	2.75	2.85	4	3.00	2.45	2	3.00	3.15
落ち着いた	4	2.90	3.15	2	3.15	2.55	3	2.85	3.05

表9 Dさんについての自己評定と第三者評定

	口紅無し			ピンク			オレンジ		
	自己	男性	女性	自己	男性	女性	自己	男性	女性
好ましい	3	3.65	3.95	4	4.00	3.95	2	3.95	4.35
理性的な	2	3.45	3.50	1	3.50	3.50	2	3.35	3.65
情熱的な	3	2.65	2.65	4	3.10	2.95	2	3.15	2.60
美しい	2	3.15	3.35	2	3.65	3.55	3	3.80	3.45
かわいらしい	-	3.80	3.95	-	3.70	4.00	-	3.75	4.05
冷たい	2	1.80	1.70	1	1.65	1.65	1	1.80	1.60
派手な	1	2.10	1.95	4	2.55	2.25	3	2.40	1.95
感情的な	3	2.60	2.30	4	2.95	2.50	4	2.80	2.15
激しい	1	2.05	1.90	3	2.20	2.20	3	2.40	1.65
穏やかな	3	4.00	4.10	2	3.90	3.60	4	3.95	4.15
地味な	4	3.30	2.95	2	2.55	2.45	2	2.75	2.80
知的な	2	3.30	3.35	2	3.40	3.65	2	3.50	3.90
暖かい	2	4.15	4.30	2	4.25	4.20	4	4.20	4.30
優しい	2	4.15	4.30	2	4.30	4.25	3	4.40	4.30
清楚な	-	3.45	4.05	-	3.60	3.65	-	3.60	4.15
大人っぽい	-	2.95	2.80	-	3.30	3.45	-	3.30	3.30
子どもっぽい	-	3.25	3.40	-	2.65	2.75	-	3.00	2.80
洗練された	1	2.90	3.25	3	3.40	3.70	3	3.20	3.40
落ち着いた	1	3.05	3.80	2	3.40	3.85	2	3.45	3.75

表10 Eさんについての自己評定と第三者評定

	口紅無し			ピンク			オレンジ		
	自己	男性	女性	自己	男性	女性	自己	男性	女性
好ましい	3	3.20	3.65	2	2.75	3.40	2	3.15	3.60
理性的な	3	3.20	3.05	2	2.95	3.25	2	3.05	3.20
情熱的な	3	3.05	2.85	3	3.05	3.10	3	2.55	2.95
美しい	2	2.75	2.90	2	2.75	2.85	2	2.90	2.70
かわいらしい	-	3.55	3.40	-	3.15	3.15	-	3.35	3.45
冷たい	2	1.85	1.75	4	2.00	1.95	3	1.95	1.90
派手な	2	2.00	1.80	4	2.95	2.75	3	2.25	2.25
感情的な	2	2.60	2.25	3	3.25	2.85	2	2.60	2.40
激しい	2	2.35	1.85	4	2.80	2.65	3	2.05	2.10
穏やかな	4	3.85	3.80	3	3.10	3.35	3	4.10	3.70
地味な	3	3.45	3.35	2	2.65	2.60	2	3.45	3.00
知的な	2	3.00	3.35	2	2.70	3.10	2	2.95	3.30
暖かい	3	3.85	3.85	3	3.65	3.70	3	4.00	3.90
優しい	3	3.90	3.95	3	3.60	3.40	3	4.20	3.95
清楚な	-	3.15	3.10	-	2.60	2.80	-	3.20	3.05
大人っぽい	-	2.65	2.95	-	2.95	2.90	-	2.75	2.90
子どもっぽい	-	3.65	2.95	-	3.10	2.80	-	3.40	2.90
洗練された	3	2.85	2.75	2	2.55	2.75	2	2.70	2.95
落ち着いた	4	3.65	3.65	2	2.95	3.45	3	3.85	3.85

刺激人物Bに関しては（表7）、本人は、口紅の使用により好ましさが低下したとみなしており、特に、ピンクにおいてこの傾向が強い。第三者の評定においても口紅の使用による好ましさの低下が認められているが、口紅の種類による違いは示されていない。美しさに関しての自己評定には変化がなく、また、第三者による評定においても口紅の有無による美しさの違いは認められていない。刺激人物Cは（表8）、オレンジの使用により好ましさが上昇したとみなしている。第三者による評定においては、男性はピンクの使用により好ましさが上昇したとしているのに対し、女性は、オレンジの使用により好ましさが上昇したとみなしているというように、第三者の性によって口紅のもたらす向上効果が異なることが示されている。美しさに関しては、自己評価では、美しさの向上効果が認められているが、第三者による評定では、有意に近い向上効果しか示されていない。

刺激人物Dに関しては（表9）、本人はピンクにより好ましさが上昇し、オレンジにより低下したとみなしている。ただし、第三者による評定では、ピンクでは好ましさの向上は認められず、オレンジによる好ましさの向上効果が示されている。美しさに関しては、本人は、オレンジの使用により向上したとみなしている。第三者評定で

は、女性は、口紅の使用による違いを示していないが、男性は、口紅の使用により美しさが向上したとみなしている。

刺激人物Eに関しては（表10）、本人は、口紅の使用により好ましさが低下したとみなしていることが示されており、第三者による評定においてもピンクの使用により好ましさが低下したことが示されている。また、好ましさの評定に男女差が認められており、男性よりも女性が好ましさを高く評定していることが示されている。美しさにおいては、自己評価においても第三者評価においても口紅の使用による印象の変化がみられていない。

#### 4.4 考察

口紅の使用により、第三者からの好ましさや美しさの評定が上昇する女性と、上昇しない女性とがともに存在することが示された。また、この魅力の向上効果は、評定する性によっても異なる可能性があること、そして、第三者が評定した魅力の変化は本人の自己評価の変化とが必ずしも対応するとは限らないことがそれぞれ明らかになったといえよう。これらの結果は、「似合う」「似合わない」という評価基準とも関連するものと思われる。さらに検討が必要であろう。

表11 実験で使用した化粧品

実験参加者			
	X	Y	Z
ファンデーション	ブラウン系	オークル系	オークル系
フェイス・カラー	ピーチ系	オーキッド系	オーキッド系
アイ・カラー	ブラウン系	ブラウン系	イエロー系
	イエロー系	イエロー系	ブラック系
	—	—	ピンク系
マスカラ	マルーン	モレル	アクア
アイ・ライナー	ブラウン系	ブラウン系	ブラック系
口紅	オレンジ系	レッド系	ローズ系

## 5 第四研究

### 5.1 目的

第二研究において、口紅の使用により自己イメージが変化すること、そして、第三研究により、この自己イメージの変化と第三者からの印象の評定とが必ずしも対応するとは限らないことが示された。ただし、この二つの研究は、口紅の使用だけに焦点をあてていた。そこで、第四研究においては、フル・メイクアップによる自己イメージの変化について検討する。

### 5.2 方法

【実験参加者】 日頃は、ほとんど化粧をしていないと回答した国立F大学の女子学生1年生3名が実験に参加した。

【実験手続き】 実験室に入室後、個別に、日頃の化粧品使用の頻度、ふつうの自分の顔のイメー

ジを評定させた。次に、アマチュアの大学院生女子の指導のもとで、化粧をし、正面からはぼ1分間ビデオで撮影した。次に、再生されたビデオをみながら、自分の顔のイメージを評定した。

### 5.3 結果

【実験参加者について】 実験参加者Xは、19才で、ふだんの生活においては、リップ・クリーム、口紅、ファンデーション、アイシャドーをときどき使用している。実験参加者Yは、19才でありふだん、リップ・クリーム、口紅、マニキュア、オーデコロンを使用している。そして、実験参加者Zは、19才であり、ふだん時においては、リップ・クリームだけの使用である。

【メイク・アップによる自己イメージの変化について】 表11に使用した化粧品を、表12に化粧による自己評定の変化を示した。3名ともフル・メイクアップにより「大人っぽい」「情熱的な」

表12 フル・メイク・アップによる印象評定の変化

	実験参加者X		実験参加者Y		実験参加者Z	
	化粧前	化粧後	化粧前	化粧後	化粧前	化粧後
好ましい	2	3	3	3	4	3
理性的な	2	3	2	3	3	3
情熱的な	1	3	2	3	4	5
美しい	1	3	3	3	2	3
かわいらしい	1	2	3	4	3	2
冷たい	3	3	1	1	2	3
派手な	1	4	1	4	4	5
感情的な	1	3	2	1	4	4
激しい	1	3	1	2	3	4
穏やかな	4	2	3	3	2	2
地味な	3	2	2	3	2	1
知的な	3	2	1	2	3	3
暖かい	3	3	4	4	4	2
優しい	3	3	3	3	3	2
清楚な	3	2	3	2	3	2
大人っぽい	2	4	1	4	2	4
子どもっぽい	4	2	2	1	4	2
洗練された	2	2	2	3	3	4
落ちついた	5	3	3	4	3	3

「派手な」「激しい」の評定が増加し、「子どもっぽい」の評定が低減している。

XとZは、ともに、化粧により「美しさ」は上昇しているとみなしている。ただし、「好ましき」に関しては、Xは上昇したと、Zは低下したとそれぞれみなしている。Yは、化粧により「かわいらしさ」や「知的さ」が上昇したとみなしているが、「美しさ」や「好ましき」の変化ないとみなしている。

#### 5.4 考察

フル・メイクアップによる自己イメージの変化を検討したところ、化粧が、「大人っぽさ」の上昇と「子どもっぽさ」の減少をもたらしたとみなしていることが明らかになった。ただし、化粧による好ましきや美しさの向上効果は、参加者によって異なることが示されており、今後、この参加者による効果の違いを明らかにするための検討が必要であろう。

#### 引用文献

- 1) 鈴木ゆかり：顔の形態と印象の関係化粧心理学、フレグランス・ジャーナル、124-133 1993
- 2) 岩男寿美子・菅原健介・松井豊：化粧の心理的効用（IV）日本社会心理学会第26回大会発表論文集、102-103 1985
- 3) 松井豊・山本真理子・岩男寿美子：化粧の心理的効用、マーケティング・リサーチ、21 30-41 1983
- 4) 山本純子・加藤雪枝：化粧に対する意識と被服行動、椋山女学園大学研究論集、22 251-

264 1991

- 5) 岡崎晶子：化粧の心理的効用と購買行動、日本社会心理学会第34回大会発表論文集、254-255 1993
- 6) Cash, T. F., Rissi, J., & Chapman, R. 1985 Not just another pretty face: Sex roles, locus of control, and cosmetics use. *Personality and Social Psychology Bulletin*, 11 246-257 1985
- 7) Cox, C. L., & Glick, W. H. Resume evaluations and cosmetics use: When more is not better. *Sex Roles*, 14 51-58 1986
- 8) Miller, L. C., & Cox, C. L. For appearances' sake: Public self-consciousness and make-up use. *Personality and Social Psychology Bulletin*, 8 748-751 1982
- 9) Cash, T. F., Dawson, K., Davis, P., Bowen, M., & Galumbeck, C. Effects of cosmetics use on the physical attractiveness and body image of American college woman. *Journal of Social Psychology*, 129 349-355 1989
- 10) Hamid, P. N. Some effects of dress cues on observational accuracy, a perceptual estimate, and impression formation. *The Journal of Social Psychology*, 56 279-289 1972

【付記】 本研究の遂行にあたり、櫻庭恵理、佐藤いずみ、飛田瑞穂、片岡由佳、酒井千晶、岡崎晶子、坂下雪音、武藤はる佳の各氏の協力を得ました。記して感謝いたします。

# 記念講演



平成7年度記念講演 大坊郁夫



## 化粧とコミュニケーション

大 坊 郁 夫

北星学園大学 文学部 教授

場所 薬学会館長井記念館

日時 平成7年11月13日(月)

### はじめに

ご紹介を頂きました大坊でございます。本日は「化粧とコミュニケーション」ということでお話しをさせていただきます。私は、昨年この会で研究助成金を頂きまして、化粧に関する実験を現在進行させています。全体としてはまだ纏まっておりませんが、本日はこれに関連するお話しをいたします。ご紹介にもありましたが、私は今、社会心理学、対人関係、特にコミュニケーション、対人魅力を専門にしている者でございます。本日は OHPを中心にお話させていただきます。お手元のレジメをご参照下さい。

一般に人との関係において「魅力」は大変重要です。公的な「役割」のある関係であれ、プライベートな関係であれ、その相手に魅力を感じなければ、何事も円滑に進まないわけであります。言葉を変えますと、いかにして自分を伝え、どの様に相手を理解するかという連関的な関係が存在しています。本日は、基本的には対人関係を円滑にするコミュニケーションあるいは魅力あるコミュニケーションに関して、特に、化粧が持つ伝達性、機能についてお話させていただきます。

### 化粧と顔

私は、魅力という観点から、外見、特に顔を扱ってきております。「化粧」はもちろん顔だけが対象のことで無く、もっとトータルなものでありますが、ここでは顔を中心にお話いたします。顔はその人らしさを優先的に示すものであります。個性が反映されます。誰もが認識するように自分の看板なのです。これが総べてではありませんが我々は他者との関係を進めていくに際し、まず外見的な情報を受け取ります。内面的な情報は相手との具体的なやり取りがあってから分かってきます。ですから、外見的な手掛かりに魅力を感じるかどうかは大いに重要です。魅力を感じなければその後の展開はありません。親しくはならないわけです。引き付けるものがあれば積極的に結び付きを作ろうとし、その後の可能性が出てきます。このように顔は看板であり、第一の手掛かりとなるわけです。顔の造作は生まれ持ったものです。もちろん、多少の手入れは可能ですが、構造的には無理です。元来持っている顔の特徴に如何に工夫を加え、他者との関係で自分をアピールしていくかは大切なことであり、ここで「化粧」が重要な意味を持つてくるのです。

Make up and Communication



Ikuo Daibo

Department of Psychology  
Hokusei Gakuen University

### 化粧の成立

化粧がなぜ生まれてきたかについては、化粧文化史に関する著述の中に記載されています。ひとつには医療行為が挙げられています。もともとは

呪術的なものとミックスしていたと思われます。魔よけ的な意味合い、病気を払うなど、積極的には顔料を顔に塗ることによって疾患を治療あるいは予防する意味があります。健康への関心が化粧のベースにあります。もうひとつを社会的なアピールで括ってみました。自分らしい特徴を魅力的に演出して相手にいかにアピールするかです。それから、農楽や田楽に見られるのですが、普段とは違う自分を演出することによって、超日常的な姿を作っていく行為があります。更に、霊界の神々とのコミュニケーションの手段として顔に施しをします。これは、場合によっては個々人の顔を離れ、定型化された仮面、彩色されたお面として残っています。自分らしさのアピールは、言ってみれば、相手との関係において自分の役割をどのようにこなすのかを表現し、相手との親しい関係を作っていくためであり、魅力が重要になります。結局、対人関係を如何に円滑に保つかというコミュニケーションの手段として、化粧が生まれたということが出来るわけです。

### 化粧の例とお面

呪術的な意味合いのもの、日常的な魅力作りの例、「演ずる」場合の化粧、など、化粧は紀元前の昔から使われてきた古い歴史をもっています。このことは多くの方が承知している事だと思えます。演じ分けることに関連して、一人の人にさまざまなメイクアップを施し、同時に髪型、服装も変えたトータルな形で、その人の印象を変えることができます。魅力のうちの基本的要素として、性的なディスプレイがあります。配偶者選択の目的、異性を引き付ける意味合いです。例えば、女性の赤く彩色された唇は、疑似的な性的信号を送っていると、人類学的には考えられています。マンドリルの雄の鼻の部分は男性性器の特徴をそのまま反映しています。そのほかにある種のヒヒの仲間では、発情期になると雌の胸に性器と同じ模様が出ます。交尾可能だというサインを出すわ

けです。もともとの身体に備わっている性的ディスプレイが化粧の意味合いを持っている例です。数年来、村澤博人先生（ポーラ文化研究所）と共同で、日本と韓国女性の美意識の比較研究をしています。韓国人の美意識は多彩です。実に多くの彩色されたお面が昔から用いられています。パリエーションが豊富で、多くは面には化粧が施されています。これは若い女性の例です（写真1）。

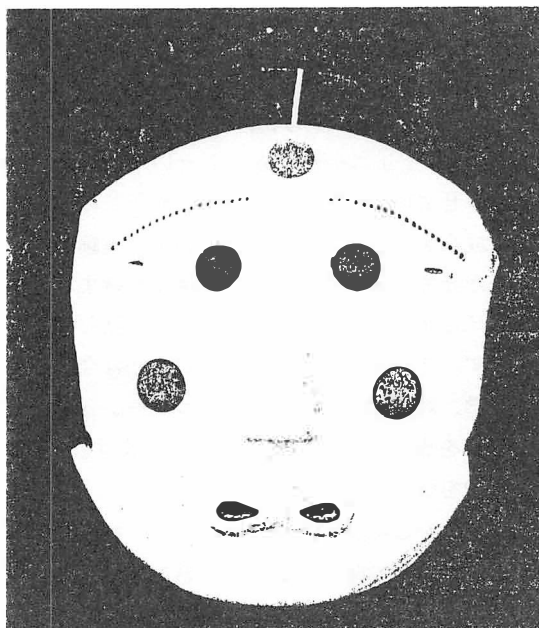


写真1 韓国のお面の例－化粧した遊女役（ウエジャンニョオ）のお面－

額、丸くデフォルメされた唇、口唇、額、頬、そして目尻のところには赤が入っています。全体は白塗りの化粧になっています。他に、かなり戯画化されたもの、化粧がパターン化されたものがあります。西域地方の壁画（8世紀初めの作品）にも、頬、額を赤くする化粧のはっきりした例が示されています。

### 化粧の意味

化粧の意味は、基本的には二つに分類されます。第一は「変身する」です。日常の自分ではな

表1 化粧の意味  
自己の変身と手入れの粧いはそれぞれに  
化粧の別のスタイル

変身	ハレ	日常からの解放	
容貌特徴の改変			
自己変革			→ メイクアップ化粧
手入れ	自己改善		
容貌特徴の魅力強化			
日常的印象管理			→ 基礎化粧

いものを目指す行為です。言ってみれば、日常の生活で演じている役に飽き足りないで、別なあり方を目指そうとしています。「祭り」、ハレの場であり、自分からの解放です。この流れにあるのが一種のメイクアップ化粧です。もっと極端になれば、整形行為、お面の様な超日常的な流れになります。第二は自分らしさの手入れ、あるいは自分のウィークポイントの手直し、一種の「自己改善」です。これは日常の管理であって、基本的には自分らしさの維持であり基礎化粧の流れです。趣旨の異なる二つの流れがあるです。

山崎(1955)は、「化粧のコスト」の程度から分類しています。「塗ること」、これは化粧として日常的で、「飾ること」、ここにはアクセサリなどが含まれます。自分の体を傷つける「クトゥー」(入れ墨)です。それから「整形手術」の順になっています。更に「内面の美」があり、これが一番コストが大きいとされています。つまり化粧は、立場にもよりますが段階的に考えられます。山崎先生はコストの概念からこのような指摘をしています。

## 化粧プロセス

今までの話から推察できる様に、化粧に対する

関心と態度、及び実際にどのように化粧するかという実践行動は別枠で考えた方がいいと思います。数年前に、女子学生を対象として、化粧への態度と関心を調べてみました(大坊・小西1991)。因子分析の結果、「メイクアップ重視、実践」と「化粧、美容への関心」は別な因子として抽出されました。個人の特性との関連で見ると、「人にどの様に見られるか」を懸念する傾向(公的自己意識)の強い人は後者の因子「化粧、美容への関心」と密接に関係しています。「メイクアップ重視、実践」因子は、これとは異なり、如何に自分を外に表すかという、自己の表現力の豊かさ(ACT:大坊 1991)と高い相関を示します。つまり、2つの因子は次元が異なると同時に段階的であると考えられます。「人にどの様に見られるか」を気にする人は化粧への関心は高いが、化粧の実践には結び付かず、そこに段階的な違いが認められます。今述べた実験の数年前に調査表を用いた別の研究を行いました(大坊 1990)。いくつかの項目の中から、化粧に関する因子として、別角度の因子が二つ抽出されました。「先端的・高感度因子」と「抑制的・中性化因子」です。前者は、「相手に応じて化粧を変える」とか、「先端的なものにすぐ反応して受け入れる」などの質問項目がまとまって出てきた因子です。これに対して後者の方は、「香水やメイクを、他者との関係で濃くしすぎない様に」しながら、それと同時に自分らしさを工夫する意味合いのものです。このように、化粧は、自己主張の因子と他者との調和、配慮因子という、2重のスキル内容を持っていると考えられます。

これまでのことを、「化粧プロセス」の形に纏めてみました(図1)。今まで触れてきました、化粧への関心、化粧の実践、他者への関心・懸念、化粧意識・態度などの概念の関係を表しています。まず、化粧への関心が必要です。化粧行為の前提あるいは準備性に当たるものとして、他者との関係において自己をどのように表現するか、があります。これが化粧の実践に結びついていく

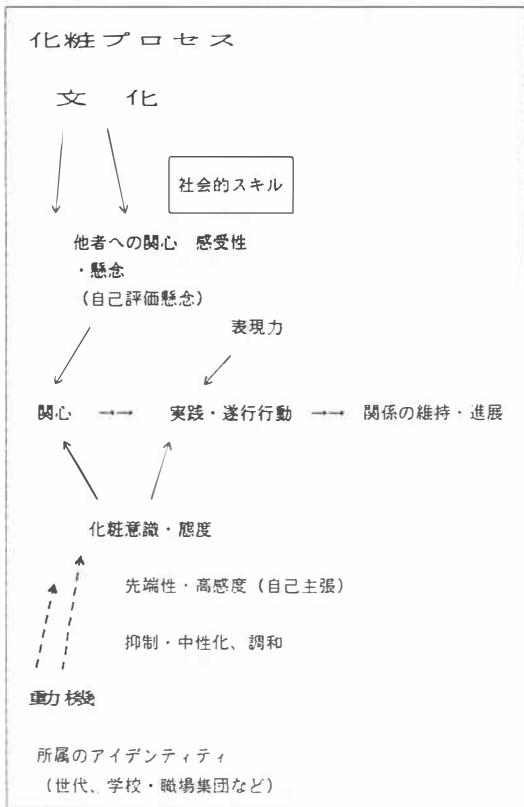


図1 化粧のプロセスにおける関心と遂行行動の構造。  
化粧は、背景にある文化の影響を受けながら、  
化粧への意識・関心、実践行動が形成される。  
関心と実践は必ずしも直結するのではなく、  
むしろ前提としての化粧意識がある。

心理的な流れであります。このプロセス全体はその時代、状況における文化の影響下にあります。文化的な背景の下で所属のアイデンティティ、つまり自分が学生であるか、OLであるのか、どの世代であるか、などが化粧意識・態度に結びつきます。

他者との関係を円滑する上での社会的スキルはもっと一般的な形で文化的に規定されます。これに直結するのが、他者への関心・懸念、他者に対する感受性と自分をどれだけ表したいのかという動機です。そして前者が化粧に対する関心へ、後者が化粧の実践に向かっていきます。つまり、「化粧においては、背景にある文化の影響を受けながら、化粧への意識・関心が形成される。また、関

心と実践とは必ずしも直結するのではなく、むしろ前提としての化粧意識がある」となります。以上が「化粧プロセス」の心理構造についてです。ここまで考察を進めますと、関心がどのように実践に結びついていくのが大きな課題となります。現象的に見ても、多くのステップが予想されます。どのような要因が化粧を具体化させるのが興味を引きます。基礎とメイクアップ化粧に大別される数多くの化粧品が使われています。これらの化粧品をどう使うかについては心理的に見ても、かなり多くの要因で細分化されるものと思われる。

### 化粧行動と自己意識

昨年来、私の研究室で女子学生を対象として、実際に化粧を施す実験を行っています。その一部分をご紹介します。まだ纏まっているわけではありませんので、予備的な研究データとお考え下さい。この実験ではまず、化粧が自分自身にどのような影響を及ぼすか、次に、対人的な影響、効用が測定されます。この段階では被験者一律に、ナチュラルメイクとヘビーメイクを施し、ノーメイクを含めた3通りで比較しています。その上で、鏡を見て自己診断し、評定尺度に回答してもらいます。その他に、心理的な変化を、「状態不安得点」の高低で測ってみました。かなり多くの差が出ました。図2の縦軸は「状態不安」(落ち着きの無さ)です。ノーメイクで最も不安が高

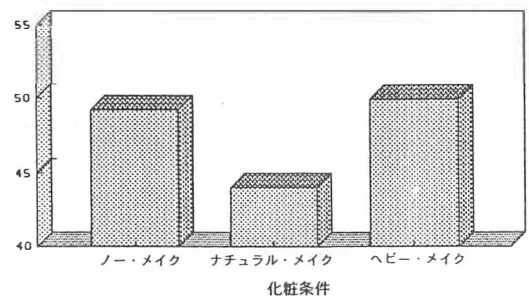


図2 化粧後の状態不安得点の比較

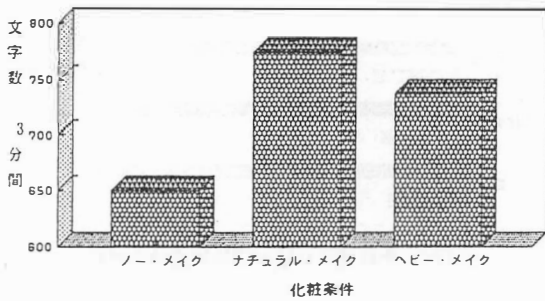


図3 化粧条件間での発話文字数の比較

い。ヘビーメイクでも高い。ナチュラルメイクが一番安定しています。次に話題リストを用意しまして、それに基づいて意見を述べてもらい、一定時間にどの程度話したか(発話量、文字数など)を測定しました。実験では他にもいくつかの指標をとりました。「発話の文字数」を比べると(図3)、ナチュラルメイクの場合、一番発言が活発でした。つまり、自分の意見を出しているわけです。ヘビーメイクがその次です。ノーメイクの場合、明らかに発言は少ないのです。化粧をすれば自己表現が活発になるといえます。そして、学生であるという、自分たちの状況に似合っているナチュラルメイクの場合、最も積極的になっています。この結果に基づき、現在では、被験者個人個人が持っている基本的化粧パターンを考慮した上で、化粧の内容を変えた実験を行っています。化粧が自身に与える効用としては、メイクアップ・アーティストが行うにしろ、自分で行うにしろ、肌に触れることにより、「自分自身への関心」が増大します。これが前提になりまして、化粧した姿に自信が出て、行動が積極化してきます。先程の実験にも、これが表れています。

次に、「社会性の促進」が挙げられます。他者との接触に当たり、臆しなくなり、行動が活発になり、自己呈示の手だてを化粧を通じて獲得することになります。化粧をすることによって、他者から見られている自分のイメージがはっきりと出てきます。これも、化粧者の社会性を促進すると同時に、緊張を付加する要因になります。緊張すればそれだけ自律的になります。

## 化粧の自分への効用

更に興味深い研究例があります。慶応大学の岩男先生らの個人差を課題にした研究(1985)です。他人からの評価を気にする人、つまり、人からどう見られるかを気にする傾向の人は、化粧をすれば、華やかになる、セクシーになる、大人っぽい・成熟した・社会性のある状態になるなどと、捉えています。これに対して、内省的な傾向の強い人(私的自己意識における評点の高い人)は、化粧することを、知的なこと、洗練されたことと捉えています。自尊心と、社会的に自分がどう見られるかの自覚に関連して、分岐します。宇山先生ら(1990)の仕事は、メイクアップしたときの気持ちを年代比較しています。まず、調査結果の因子分析によって、積極性が上昇する因子、落ち着くという因子、他者に向けての気分が高揚する因子、自分自身に対する気分が高揚する因子、それと安心の因子を見出しています。これらを年代比較したところ、20代の人では「積極性の上昇」が高くなります。50代の方では、化粧の基本的意味合いが「リラクゼーション」にあります。化粧目的が年齢によって変化していきます。年を経るにしたがって、積極性から、内向的な・自慰的な方向に変化していきます。化粧が本人に及ぼす効用の中で、積極的にハンデを克服すること、皮膚疾患を含めた社会的不適応な部分、障害を化粧で積極的に改善して行くことは、特に重要な点であると思っています。場合によってはこのような化粧操作で飛躍的に心理的な改善が得られます。例えば、癲疾患患者について、かなり長期的な研究を、重松先生ら(1982)が行っています。長期的な経過においても化粧によって、持続的な安定と積極性が維持されています。同志社大学の浜先生(1992)のところでは、老人性痴呆であるとか、うつ病患者にコスメティックセラピーを行っております。浜先生のところでは情動活性化という概念を用いています。うつ病患者さんに適用していますが、かなり長期間、何週間、何か月単

位で、化粧を続けていきますと、鬱症状が消退していきます。この例ではもっぱら顔に対するメイクです。化粧方法の指導から始めて、自分で化粧して行くように仕向けていっています。最近では老人性痴呆症の患者さんにも施しています。施設でお年寄りに化粧をすること自体が大きな刺激になります。縁遠くなった、普段したことの無い化粧をすることで非常にいきいきとなり、夜の徘徊も少なくなり、他者に対しても発言が多くなり、他者の働きかけに対する反応も良くなるなどのはっきりした効果が認められています。これらがコスメティックセラピーの事例ですが、更に最近では、病棟に香りを流すことによる効果、アロマの効果も積極的に導入されているようであります。

これらの学問的取組はごく最近のことなのですが、珍しいことに地方行政の対応が早く、北海道は、いくつかの施設を指定いたしまして、化粧療法に補助、助成をする措置を取っています。他の都道府県の状況は分かりませんが、各自自治体レベルにこの動きが広がっていくと予想されます。高齢化社会、あるいはすでに入っている高齢社会における大きな化粧の効用、貢献であろうと思っております。

### 化粧の対人的効用

化粧が持っている対人的な効用の基本は、化粧の内容にもよりますが、他者の感じる魅力を増し、他者を引き付ける点にあります。しかし、世の中にはこれと一致しない見方があります。例えば、WorkmanとJohnson(1991)は、化粧は魅力を高めるが、化粧の仕方によってその魅力がどのように変化するかを検討しています。大まかに言うと、私の場合と同じく、ノーメイク、ナチュラルメイクとヘビーメイクの3条件を設定しています。「他者にとっての魅力度」はこの順で高くなります。「女性性」もほとんど平行して上昇します。ところが「道徳性」は逆に下がります(図4)。

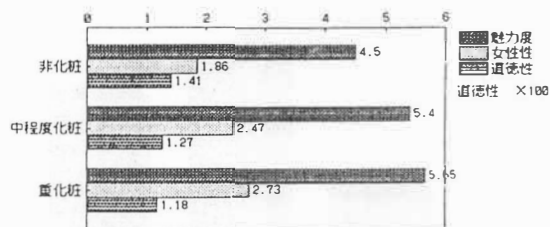


図4 化粧度に応じた認知評定値の比較  
(Workman & Johnson, 1991)

心理学的な尺度を当てはめてみますと、はるかに明確な違いがあるのです。外見の魅力と内面性の関連性でいえば、必ずしも一致していないわけです。つまり、見る側の問題として、人の魅力を判断するに際し、どうも、ステレオタイプな見方が存在しています。化粧すると美しく、魅力的になるが、それと反比例して、内面的にはその魅力にそぐわないものがあるとする見方です。これは西ではないかと思えます。日本の歴史において、外見を飾るべきではない、外見に惑わされてはいけないとする、抑制的な態度が続いてきました。美的なもの、美しいもの、に対する関心は誰れにでもあります。これを抑えてきた文化があります。この傾向は日本において強く、化粧だけではなく、顔そのものの魅力に関しても当てはまるということが我々の研究で明らかにされています。

化粧した顔の人がどういう職種に向くかを調査した研究があります(CoxとGlick, 1986)。この研究でも外見の魅力と、内面性はクロスした関係にあります。一般職になら、化粧した人を採用とする結果です。単純化していえば、化粧することによって外見的魅力を高める様な人は一般職止りであって、総合職的な、管理的な立場になりうる職種に関してはむしろ採用されにくいという結果です。これは実際の統計ではなく、あくまでも実験的データで、シミュレーション的なものがあります。採用において、外見的魅力を高めることはそれなりに意味があるが、管理的な能力が期待される場合はまったく別次元になります。管理能力こそが重要であり、外見を飾ることは、本来管理能力に関係ないはずなのに、むしろ負の関係

で見られています。外見を飾るような人は仕事の能力の面では低いのではないかと考えようとする傾向があります。世の中に広くはびこっているステレオタイプ的な見方です。才色兼備の人はそんなにはいないのだという考え方にに基づき、外面と内面を補完的に扱う一種の偏見です。

### 化粧の効用は循環的

化粧には多くの効用があります。ネガティブな面については今言いました様に、見る側の態度に依存します。極端には言い切れませんが、ステレオタイプ的な見方によります。それはともかく、自分自身にとっての有効な役割があります。ひとつには化粧行為により自分を整える点があります。背景的には基礎化粧品を含みますが、自分にとっての効用として重要です。一方で、我々は社会的な存在です。他者とのさまざまなつながりがあります。家族においても、職場においても然りです。他者との関係においていろいろな役割を担っています。そこで、いかに自分をうまく伝えて、いかに円滑な関係を作っていくかが重要です。魅力をどのように作っていくか、いかに魅力ある存在になっていくか、これは、いかに社会性を構築するかに他なりません。ここで意味を持つのがメイクアップ化粧であります。

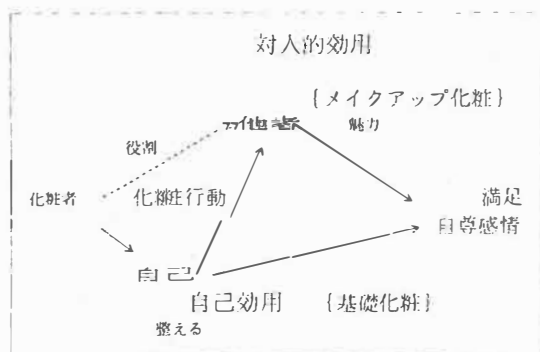


図5 化粧の「効用」－満足度の過程

化粧することはまず自分の欠点をカバーし、自信を得る。他人に対してはその関係に応じた役割として粧い、関係の強化と社会的な承認を得て満足して行く

自己効用と対人効用は共に必要です(図5)。自分だけのための化粧ではあまりに限られたものになってしまいます。他者だけに向けての化粧では、その日毎にお面をつけ替えるようなもので自分がどこかに行ってしまいます。結局、対人効用は自分の自尊心(自尊感情)を高めることに関係して初めて、満足をもたらします。つまり、両方とも不可欠であり、また、別々のものではなく、相互に柔軟に関係しています。基礎化粧をベースとし、メイクアップがあり、これはむしろ他者との緊張を強いるものであります。他者との緊張がなければ大きな自尊心が得られません。結局は自分のところにつながります。自尊心を高めるには、化粧によるコミュニケーションを使い分ける柔軟性が重要な課題です。化粧のほかにもいろいろな自己表現の手段があります。それらとの関連性を含めていかに柔軟にウェイトを置き換えながら、化粧を使っていくかがテーマとなります。

### 化粧研究の今後

以上、早口でお話を続けて参りましたが、今後の方向について触れてみます。魅力あるコミュニケーションを進めていくために、心理学の立場から、化粧というものに言及しますと次の5つに整理されます。即ち、1. 時系列の把握(自己効用と対人効用の循環)、2. マッチング～情報の統合、3. 対人関係段階に応じた外見特徴の把握、4. 健康維持、回復、促進のメカニズム、5. 文化・サブカルチャーとの対応(文化の理解)、の5点です。

ここに自己効用と対人効用の循環と記しました。今まで説明しました様にこれらは車の両輪です。ところが日本における化粧に関する心理学的研究では、自己効用に関する研究例が豊富で、対人効用についても多少の例がありますが、この二つが相互に連動、関係しあっていることに関する仕事はわずかです。自己効用と対人効用の流れを考慮した研究がなされるべきです。

2番目に状況マッチングの課題があります。ある人の外見上の手がかりとして、顔というベースがあって、被服があります。もちろん内面的には、その人のパーソナリティとか、個人的能力というものがあります。それぞれが鏡に向かい合う時には、自分らしさの化粧ということを考えて、化粧を施し、身なりを整えていると思います。しかしながら、現実には更に、他者とのつながりを考え、もっとトータルなコーディネーションが課題となっています。人は他者に無数の情報を発信しています。その中でも、外見の情報は重要です。それらの情報を相手との関係、場面によってどのように統合していくのか、どのように使い分けていくのか、に当たって、化粧が果たす役割の研究が必要です。化粧がほかの外見情報との関係でどのように運用されるべきか、等のウェイト付けの研究です。つまり印象情報統合の研究が今後重要になってきます。コストがかかる研究で、今までは十分に手がついていなかったのではないかと思います。個々の情報を切り離した単一的な研究だけではなく、全体的な関連性を意図研究が、より現実に即した検討の為に必要です。

3番目に対人関係における段階との関係です。日常生活ではいろいろな関係が重層的に成り立っています。職場の関係、友達の関係、アフター・ウェアの場面での関係などがあります。化粧によるコミュニケーションの意味はこれらの関係に深く影響されます。あるところでは、あるタイプの化粧がフィットします。別の場所ではその化粧の意味合いはまるで違ってきます。対人関係の深さと相手を感じるであろう印象管理の仕分け方によって、一律ではあり得ません。いってみれば化粧は自己の簡便な変身なわけです。変身性については個人の特徴と同時に、他者とのつながりの中で考えていく必要があります。次に、健康の維持、適応を推進していく効果についてです。治療的な意味での化粧に当たります。例えば、最近、コミュニケーションの一環としてアロマセラピーが喧伝されています。一種の精神治療的な効果と

して、日常生活における香りの重要性が指摘されている例です。

別の観点から、ある雑誌と共同企画で香りを心理学的に取り上げてみました。男性に女性の写真をスライドで見せ、魅力評定をさせる実験を行いました。心理学では良く用いられる手法です。この時に、香りを2種類用意いたしまして回答用紙に塗り込みました。「香りなし」を含めて3条件の実験です。「イランイラン」と「マジュラム」を用いた実験の結果全体では、それほど大きな香りの影響が認められませんでした。次にスライドの女性をタイプ分けした上で分析を行いました。一方は成熟した身体的特徴を持っているグループと他方を理知的なグループにしたところ、魅力評定に明らかな差が認められました。なぜであるかは良くわからないのですが、イランイランは男性の女性に対する関心を高め、興奮させる作用があると言われています。この香りの下では前者のグループに属する女性の魅力評定は高くなります。ところが、後者のグループの人、清楚な感じの人の魅力評定は、鎮静効果があると言われていたマジュラムの条件で高くなります。香りの影響は決して一律では無いことが分かります。この場合は香りを調査票に塗り込んで条件操作して、結果を導いています。香りの感じ方は主観性が強く、研究しにくい分野ではありますが、もっともっと進展してもよいテーマであると考えます。

最後に、「文化の理解」が挙げられます。単純に見ても、国・民族によって化粧の仕方は大きく違います。同じアジアの中でも違います。例えば、日本と韓国とを比較すると、韓国であれば、外見美が推奨されています。「心の美しい人は顔も美しい」と見なされます。整形手術も盛んです。入念な化粧、ヘビーメイクが施されます。そのままのメイクでは日本では突出してしまうでしょう。日本は抑制の文化を持っています。トータルな顔文化として、化粧を捉えることで、その背景にある文化を理解することができます。文化の種々層では無意識的に侵している相手に対する

誤解が数多くあります。化粧を、あるいは顔文化の研究を進めることで、これらの誤解を解く切り口が発見できるのではないかと、最近では期待しています。広がりのある研究分野です。他者との

関係を如何に豊かにしていくかを念頭に置きながら、この種の研究を続けていく所存です。

ご清聴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

## コスメトロジーと 本研究とのつながり

大倉 一郎

(平成6年度)

コスメトロジー研究振興財団の研究助成に応募した経緯を述べる。筆者は現在生命理工学部生物工学科に所属しているが、もともとの出身は化学工学科であり、得意な分野はどちらかというと物理化学である。研究内容は「太陽エネルギーの化学エネルギーへの変換」や「種瘍親和性光増感剤の開発および反応機構の解明」といった分野で、分光学的、反応速度論的な物理化学的な研究手段を取ることが多い。上の2つの研究テーマは全く別々の分野のテーマに見えるが、実は可視領域の光を有効に使うという点で密接な関係がある。両者共に切望されている光増感剤は、光化学的に安定で、光励起三重項寿命が長い光増感剤である。そこで、各種光増感剤の開発や光増感反応の反応機構解明を目指した基礎研究を行ってきた。

このような研究はコスメトロジーとは無縁なものと考えていた。しかし、このような可視光による光増感反応の機構はコスメトロジーに関係が深いことが分かった。顔の皮膚のように常に太陽光線に晒される機会の多い部分は光による光増感反応が起きる可能性が多い。ポルフィリンを始めとする色素は生体中にも存在するが、皮膚の表面に外部から吸着したり、付着したバクテリアによって生産されたりもする。また、化粧品にも光増感反応を起こす成分が含まれている場合がある。このように我々が気付かなかつた分野でも我々の基礎研究が役立つ可能性があることを知ったわけです。コスメトロジー研究振興財団の研究助成に応

募する機会を与えていただき感謝しております。

(東京工業大学)

## コスメトロジーと水産大学校

幡手 英雄

(平成6年度)

私の勤務している水産大学校は農林水産省所管で、当然のことですが水産にかかわる教育や研究を行っています。このようにコスメトロジーとは関連のないと思われる環境にいるものが、なぜコスメトロジーと多少なりとも関係した研究を行ったか、その要因を考えてみました。本校には漁業学科、機関学科、製造学科、増殖学科の4学科と教養学科があり、1学年の定員は180名、4年制と修士課程相当コースを併設した単科大学です（なお、平成9年度入学者から学科改組にともなって学科名、定員が変更される予定）。水産のもつイメージは、よくいえば海、男らしさ、逆のイメージはキツイ、キタナイ、キケンいわゆる3Kだと思います。事実、十数年前までは、ほとんどが遅しい（むさくるしい？）男子学生で、女子学生をキャンパスで見かけることはほとんどありませんでした。しかし、原因はあきらかではありませんが、ここ数年、女子学生が増えてきており、私の所属する製造学科では、現在その割合は20%にも達しております。このような喜ばしい（？）変化は、男子学生と女子学生それぞれのコスメトロジー思考に興味ある変化をもたらしました。女子学生が極めて少数であったとき、入学した時にはそれなりのスタイル（化粧）をしていた女子学生が短期間で男子学生風に変貌しました。つまり、ス

マイルに無頓着になる傾向がみうけられました。ところが、女子学生の割合がふえてくるにつれて、男性（私達教職員も含めて）はしだいにカッコウを気にするようになり、女子学生もより美しくなるためのさまざまな努力が見受けられるようになってきました。このような学内でのコスメトロジー思考の変化が水産大学校（水産学）の将来にとって望ましいことか否かを現時点では判断できません。しかし、水産学にこだわってきた私の教育、研究に対する姿勢には有効に作用したことは確かで、この変化がコスメトロジーにかかわる本研究に着手させた一つの要因ではなかろうかと思えます。最後に、本研究を遂行するうえで、多大なるご支援をいただいたコスメトロジー研究振興財団に厚く御礼申し上げます。

（水産大学校）

## コスメトロジーと無機材料

菅原 義之

（平成6年度）

私たちの研究室では、無機材料や無機-有機ハイブリッド材料の合成・構造・性質を広く研究しています。科学技術の発展において材料の果たす役割の重要性は非常に大きく、少しでも社会に役立つ研究を目標に研究を行ってきました。

無機材料と化粧品のかかわりは意外と深く、体質顔料として粘土鉱物が古くから用いられてきました。また、紫外光を遮断するためにチタニア等の酸化物が使われていることも、広く知られています。代表的な化粧品用無機材料である粘土鉱物の使用量は、化粧品業界全体で1000 tを越えるそうです。粘土鉱物等の層状化合物の特徴は非常に薄い層が積み重なった構造にあります。私たちは、この層状構造に着目し、その層間に様々な化合物を挿入する反応（反応をインターカレーション、生成物を層間化合物と呼びます）について検

討してきました。粘土鉱物の中では、スメクタイト等が優れたホストですが、人工鉱物にもまた優れたホストとなりうる層状化合物があります。色調を考えると、不純物のない人工鉱物にも利点があると思われます。

この研究は、インターカレーション反応を無機・有機複合化技術としてとらえ、従来にない化粧品構成材料の合成手法を提案するものでした。この研究の立案にあたり、私たちの研究をコスメトロジーの視点から見直し、新しい切り口を見出すことができたと考えています。特に、応用に近い視点で合成手法の開発に取り組めたことは、どちらかといえば基礎ヘシフトしていた私たちの研究に新たな視点を与えてくれました。我々の研究成果がコスメトロジーの発展に少しでも寄与できれば、これにまさるよろこびはありません。

（早稲田大学）

## コスメトロジーにおける脂質の役割

香山 洋右

（平成6年度）

脂質はコスメトロジーにおいて有効成分を溶かす溶剤であり、素材でもある。肌に直接つけて、しかも長時間にわたって蓄まるところから、備えなければ成らない幾つかの要件がある。一つは体温、ことに皮膚温において適度の流動性を持たなければならないし、細胞にとって刺激性があってもならない。また、空気に触れても酸化されることなく、安定性は欠かすことのできない条件である。

今回、私どもが研究対象としたゴールデンハムスターのハーダー腺が分泌する脂質、アルキルジアシルグリセロールはこれらの条件をすべて満たした格好の素材といえよう。血小板活性化因子（PAF）に象徴されるように、アルキル脂質は生理活性脂質であることが多いが、ゴールデンハ

ムスターの場合には不飽和脂肪酸を全く含まないので、酸化されることもなく、至って安定な物質であり、皮膚温での流動性を維持するためにイソ型、アンテイソ型の分枝鎖脂肪酸を構成成分として成り立っている。しかも、雌雄差がはっきりして、雄ではこれらの分枝鎖脂肪酸のかわりに、短鎖の飽和脂肪酸を導入することによって流動性を維持するという巧みな代謝が行われている。

この1年間の研究ではアルキルジアシルグリセロールの構造を明らかにすると共に、雄と雌における代謝の違いがアンドロゲン受容体を介して分枝鎖アミノ酸の分解過程で調節されていることを明らかにすることができたが、今後、この分枝鎖脂肪酸を含むアルキルジアシルグリセロールを化粧品品の素材として応用していく上で大切な情報をもたらしたものと考えている。ゴールデンハムスターのハーダー腺という天然の組織が目的を持って合成し、分泌している脂質に学び、化学合成によって大量に得られれば、実用化の途が開けるであろう。(東京大学)

## コスメトロジー雑感

正山 征洋

(平成6年度)

お酒を飲むのが好きなのでよく巷の行き着けの飲み屋に出かける。数時間カウンター越しに美女の顔を眺める事になる。話が弾む時の顔には艶が感じとれ、お化粧の具合も程良く感じる。反対にも途れ途切れとなる日もある。この様な日のお化粧は乗りの悪さが一目瞭然である。お化粧が合わないと嘆く。しかしお化粧のせいでは決して無い事は本人が一番良く知るところであろう。

通勤にJRを使っているので、毎日多くの美女達と会う。お化粧もフィットしており、絶世の美女とも思える女性の顔をちらちらと見る事になる。その美女が隣の友人と話を始めた途端に幻滅を感じる。話の内容が実に下らない、たわいなく、ま

た、えげつない内容なのである。

薬学部に勤めている関係上、教室にも女子学生が少なくない。彼女達がお化粧をしているのか否かは定かでないが、彼女達の研究が軌道にのり、一生懸命頑張っている時は顔の表情にも張りがあり、心に響くものがある。僅かなお化粧で充分魅了するものを感じる。

高齢化時代に入りお年寄りのお化粧にも興味を持つ。洗練された会話と体全体からほとぼしる品格。それらの調和は美しい。お年寄りのお化粧は素顔が窺える程度の、精神の熟成度が計り取れる様な薄化粧が心地よい。

女性の事ばかり言っておれないのである。男性のお化粧が確実に増えつつあり、今後益々増加する傾向にあるであろう。自分の顔に責任を持つべき年齢にさしかかり、身体と精神を磨き生活環境を整え、来るべき男性のコスメトロジーを先取りしなくてはと考える昨今である。(九州大学)

## コスメトロジーとエラスチン

甲斐原 梢

(平成6年度)

エラスチンと呼ばれる蛋白質と、物性化学の立場から付き合い始めたのは昭和から平成へと代る頃であった。なかなかの難物で、専門の異なる同期生と束になって懸かっていても正体を微かに垣間見せる程度であり、又、国内では医学分野を除けば極めて研究者数が限られている事もあり、些か疲れが出た感があったところに、コスメトロジー研究振興財団よりエラスチン研究に興味を寄せて頂きたい事で、再度、態勢を立て直し走り続けているところである。エラスチンとは、皮膚、動脈壁、肺胞等の組織で持続的な弾性機能を支配している弾性線維蛋白質であり、動脈硬化は動脈壁でのエラスチンの質的、量的変化そのものである。エラスチンは原始蛋白質的なアミノ酸組成をもち、胎生初期から機能を発揮しているが、既にカ

ルシュウムの沈着が始まっており、加齢に伴うコレステロール沈着も加わって、血管壁弾性機能を低下させる事で確実に寿命を決めているとされている。しかも、エラスチンは正常血圧領域でのみ機能し、低血圧では血管平滑筋細胞に、一方、高血圧ではコラーゲンにさっさと役目を渡して血管壁の剛性を高め、動脈硬化に導く我儘者である。エラスチンとカルシウムイオンが選択特異的な相互作用に基づき結合するのは、我々の様々な実験手法の全てで確認する事が出来た。当初は冷静に眺めていた動脈硬化の進行した大動脈の病理標本や組織写真も、段々と他人事ではなくなっていくのを実感する実験結果と時間の経過である。エラスチンの特異な弾性機能を再現、代替する生体機能性材料は未だ現われておらず、エラスチンのターンオーバーは50年を超えるとの報告もあり、まさに寿命を決めている蛋白質と言う事になる。大動脈エラスチンに手を触れて寿命を支配するのは畏れ多いとしても、せめて皮膚の弾性低下を阻止して、もう一花咲かせる手立ては等と考えても、カルシウムイオンの選択特異的結合により弾性低下をもたらす分子構造が、諸刃の剣としてエラスチンの巧妙な持続的弾性発現の起源となっている事は確実である。自分の研究結果はともかく、動脈硬化を防ぐ食物、生活法、アンタイエージングサプリメントなる男性化粧品等、妙に気になるこの頃である。(九州大学)

## コストロジーと本研究

伊藤 嘉浩

(平成6年度)

コストロジーという言葉は本研究の申請をすることになってから初めて知った。しかしながら、全く認識がなかったわけではない。以前、日本化学会の会誌「化学と工業」で化粧品と化学という特集が組まれた。その中で印象に残っているのが、長年化粧をしてきた日本人中年女性とそう

でない外国の中年女性の写真の対比である。かたや皺のない滑らかな肌で、かたや深く年輪が刻まれた肌であった。もちろん、生活環境や遺伝的性質が異なる女性の写真から、化粧品を簡単に評価できるものではないが、少なからず化粧品をみる目がかわった。このようなことが頭にあったのでコストロジー研究の意義はすぐに理解できた。新しい細胞賦活剤を合成しようとする本研究はコストロジーとは以下の二点で深く関わるものとする。まずは、化粧品との関係である。効果については賛否両論あるだろうが、化粧品の中にコラーゲンのようなタンパク質が添加されるようになって久しい。私が研究材料に用いているのは、これらコラーゲンを代表とする細胞間基質タンパク質や、細胞賦活剤であるサイトカインや成長因子である。これらタンパク質を混合したり、結合させたりした新しい材料は、細胞をより活性化することを見いだしてきている。これらは将来、育毛効果からはじまり、肌の活性化にも有効と考えられる。

第二は、人工皮膚の研究との研究である。健康のためではなく医療としてのコストロジーである。火傷治療のために人工皮膚は重要である。本研究で得られるような新しい材料は皮膚細胞の成長を助け、足場となる。

しかしながら、このような自然科学研究のみならず、「顔学」のように人文・社会科学も総合した、潤いのある、より快適な生活をめざしたコストロジーが進展することを期待したい。研究生活にも潤いが現れるに違いない。(京都大学)

## コストロジーにおける 本研究の意義

射 場 厚

(平成6年度)

$\gamma$ -リノレン酸は必須脂肪酸(ビタミンF)の一種として知られており、植物中に主として存在しているリノール酸が生体に摂取された後プロスタ

グランジン (PG) に転換する中間物質である。したがって、 $\gamma$ -リノレン酸は必須脂肪酸としての生理機能とともに、PG合成の前駆物質としてPGの持つさまざまな生理作用に関与している。一方、糖尿病、ガン、ウイルス感染などはプロスタグランジン前駆体の生合成過程において、その律速段階であるリノール酸から $\gamma$ -リノレン酸に変える不飽和化酵素 ( $\Delta 6$ 脂肪酸不飽和化酵素) の活性を弱め、その結果PG合成が抑制され、さらに健康障害が助長されると考えられている。 $\gamma$ -リノレン酸の直接摂取はこのような状況の予防に役立つことが期待されるが、生体の老化プロセスの遅延にも効果があるという報告もされており、その点においてコスメトロジーと密接に関係していると思われる。高等植物は一般に $\gamma$ -リノレン酸の前駆体であるリノール酸産生能力は極めて高いが、リノール酸のほとんど全てが植物細胞を構成する膜脂質の主要脂肪酸である $\alpha$ -リノレン酸へと交換されてしまう。本研究は、遺伝子工学的手法を用いて、 $\Delta 6$ 脂肪酸不飽和化酵素遺伝子という一つの遺伝子を生産性の高い栽培植物に導入し、 $\gamma$ -リノレン酸の生産能力を飛躍的に向上させるための基礎研究である。近い将来、このような栽培植物が開発されれば、 $\gamma$ -リノレン酸の生産が極めて低コストで実現可能となり、 $\gamma$ -リノレン酸含有食品を日常摂取することによって、ごく自然に上記症状の予防、治療ならびに老化現象の緩和がなされるものと考えらる。(九州大学)

## コスメトロジーと抗酸化剤

小島 周二

(平成6年度)

今から約35億年前、地球上に初めて酸素分子が誕生し、多くの生物の発生、増殖あるいは進化等に「善玉」として貢献し、つい最近まで「悪玉」としての酸素分子の存在には気がつかなかった。

しかしながら、近年、酸素分子より誘導される反応物質の中には、我々の健康や生命を脅かす原因となるものが存在することが明らかとなってきた。すなわち、老化、糖尿病、アルツハイマーあるいは癌等の多くの成人病・難病の成因に生体内で発生する活性酸素が関与するということである。我々の生体内での活性酸素産生源としては、白血球あるいはマクロファージ等の食細胞が良く知られている。これら食細胞は生体が細菌あるいはウイルス等の感染を受けた際には、多量の活性酸素を遊離し、殺傷することにより、自己を外敵から守る。活性酸素は、生体にとっては「毒」であり、過剰生産された場合には先に述べた種々の疾患の発症あるいは進展に関与すると考えられている。当然、生体内には活性酸素に対する防御系(消去系)が存在し、過剰な活性酸素を「無毒化」する。従って、我々の健康は活性酸素と消去系のバランスの上に成り立っているとと言っても過言では無いかも知れない。

皮膚表面が紫外線に暴露することにより、容易にサンバーンあるいはサンターンと言った種々の炎症、またある場合には皮膚癌が誘発されることがある。これらの成因にも活性酸素の関与が考えられており、古くからビタミンC等の抗酸化剤が防護剤として用いられてきたのは周知の通りであるが、今日なお、より優れた抗酸化剤が求められているのがコスメトロジー分野での現状のようである。また、近年、フロンガス等の環境汚染物質によるオゾン層の破壊により、地球上への紫外線の到達量が増加していると言う事実から、「紫外線から標的組織である皮膚を如何に守るか?」と言う事が重要課題となろう。

抗酸化剤に関する研究が、皮膚疾患はもち論のこと、多くの成人疾患の予防あるいは治療に役立つことを期待したいものである。(東京理科大学)

## カエルの研究とコスメトロジー

野村 一也

(平成6年度)

アフリカツメガエルの受精卵は上半分が黒っぽい動物極と、下半分の白っぽい植物極からなる直径1.2mmくらいの小さな卵です。この卵の動物極はなにもしないと皮膚などになりますが、中胚葉誘導因子といわれる成長因子が働くことと筋肉や血液、神経や心臓など多種多彩な組織器官ができてきます。いまでは動物極の部分を取り出して培養し、培養液に適当な成長因子を加えることで自由に神経や心臓、あるいは目などを試験管のなかで作りに出せるようになってきました。動物極の未分化な組織が何もしなければ皮膚になり、成長因子をいろいろの濃度でくわえれば体をつくりあげるといった組織器官にも分化するというのですから、皮膚やその他の組織・器官を作り上げる分子の検索や同定の研究をするのにこれほど適当なものはないでしょう。実際アメリカではこのシステムを洗練して特許を申請し、製薬会社と発生学者との共同研究をじゃんじゃんすすめているということです。私達もこれに遅れないようにしたいと思っています。今回の研究ではカエル皮膚に存在している糖脂質や糖蛋白質が皮膚の細胞の接着やアポトーシスにどのように働いているかを明らかにしようと試みました。たいへん面白いことに新しい接着分子やグリコシルセラミドが同定できましたので、蛋白質の遺伝子を決めてそのホモロジーを利用して哺乳類相同分子の検索をしようと考えています。上で述べました試験管の中でカエルの皮膚をつくりあげさせる研究システムをあわせて利用すれば、カエルの研究をもとにして、人間の皮膚の老化や皮膚細胞の生成死滅のメカニズムがあきらかになり、女性や男性の膚の健康に大きく寄与することができるかと期待しています。何の役にたつのか一見わからないように思える発生生物学の

研究ですが、今後ますますコスメトロジーの研究開発に役だっていくものと確信しています。

(九州大学)

## 薬学とコスメトロジー

橋田 充

(平成6年度)

薬剤学を研究している立場の我々の分野では、コントロールドリリース型DDSである経皮治療システム(TTS)への評価の高まりと共に、多くの難吸収性薬物の吸収促進を目的として、吸収促進剤の利用やプロドラッグ修飾法の開発などのアプローチが活発に進められている。近年、コスメトロジーの立場からもスキンケアシステムに対する認識が高まり、数多くの新規化粧品素材(皮膚生理機能賦活物質)の開発が活発に進められている。医薬品の場合は皮膚表面に投与した薬物の局所的あるいは全身的な薬理効果を発揮させる必要があるのに対し、化粧品はその成分が皮膚表面に留まり皮膚に穏やかに働く必要がある。どちらの場合も、こうした素材を有効かつ安全に使用するためには、如何に望ましい量あるいは速度でその物質を皮膚に浸透させるかが鍵となり、皮膚透過促進法の開発および皮膚中濃度の評価と予測は必要不可欠な条件となっている。現在、経皮吸収型製剤に比べはるかに多く流通している化粧品の素材の多様化および複雑化がめざましく進んでいる状況にある。こうした背景において、皮膚透過挙動を予測し合理的に処方設計を行なうための理論確立が望まれている。本研究は、薬剤学を研究している立場から、まずプロドラッグ化と吸収促進剤の組み合わせと言う新しいアイデアを導入し、目的物質の皮膚透過性を効率的に改善するアプローチを試みた。次に皮膚透過を物理化学を基本として理論体系化し、さらに実用化を通じてその有用性を実証しようと考えた。研究分野は異なるが、我々のこうした試みは、化粧品素材の分子設

計および化粧品処方最適化に対しても大きく貢献するものと思われる。(京都大学)

## コスメトロジーと フリーラジカル

内海 英雄

(平成6年度)

今から20数年前に卒業研究で「ビタミンCとヒドロラジンから産生されるフリーラジカルの構造解析」を行った。それ以来、今日に至るまで私はフリーラジカル並びにその測定手段であるESR(電子スピン共鳴法)と縁の切れない研究を行ってきた。

最近、皮膚科学の分野においてもフリーラジカルの研究に関心が持たれている。その理由として皮膚の老化や発癌などに活性酸素の産生やフリーラジカル反応の先進が関係することが挙げられる。事実、コスメトロジーの世界でもラジカル反応抑制を謳った商品が市販されていると聞く。ところが、皮膚でのラジカル反応の実態に関しては学問的には不明の点が多い。皮膚の置かれている環境や皮膚の構造は内臓等の他の組織とは非常に異なることからそのフリーラジカル反応は特異的な面があるものと思われる。どのようなラジカル種が皮膚のどの部位で産生しているか、抗酸化剤を含めたラジカル反応カスケードはどのようになっているか、あるいは皮膚障害をもたらすラジカル側の因子は何かなどは未解決の問題である。

ESRはフリーラジカルを直接検出できる測定機器である。我々は十年程前に生体計測ESR-CTシステムを開発し、生理現象や病態発現と生体ラジカル反応との関係を研究してきた。コスメトロジーの関連では、皮膚でのラジカル生成を実際にESRを用いて直接検出し、塗布ないし経口投与、静脈内投与した抗酸化剤がラジカル生成を顕著に抑制することを見いだした。また、ラジカルの生成部位に関してもESR-CTの手法を応用して皮膚の表皮

部位であることを示すことが出来た。この方法を発展させると抗酸化剤投与経路作用部位間の関係を明らかにすることも可能である。今後、コスメトロジー研究の分野でも皮膚内フリーラジカル反応の解析が一層重要になるものと考えられるが、我々が行っている生体計測ESRによるラジカル計測が少しでもお役に立てることが出来れば大変幸甚に思う。(九州大学)

## 私のコスメトロジー雑感

北島 康雄

(平成6年度)

私がコスメトロジーという分野に興味を持ったのは、1990年第16回日本化粧品学会のシンポジウム「角層は生きている」において、シンポジストとして依頼され時である。そのとき、「角層の動的形態とフリーズフラクチャー電顕」というタイトルで、美しい皮膚表面を保つには角層の接着と自然剥離の健全なバランスが重要で、それがどのような機序で制御されているかを講演した。これをきっかけに日本化粧品学会に入会し、翌年にも教育講演で「皮膚研究の最近の進歩」について企業をはじめ各種研究所や大学の研究者と若干の皮膚科医で構成されている会員に講演をさせていただき、いよいよコスメトロジーに関心を持つようになったわけである。それまではコスメトロジーの本質は皮膚を美しく見せるための「カバー」の開発であろうと思っていた。その目的も皮膚そのものは正常であろうと、病的であろう、皮膚のために相性のよい化粧品、刺激や抗原性のない化粧品の開発であると、極論的には病的皮膚なら病的状態はそのままでもただそれをカバーし、美しく見せることであると考えていた。多分、一昔前まではそうであったと思うし、現在もそれはコスメトロジーの一部であると思う。

しかし、ここ数年コスメトロジーに目を開いて

みると、例えば、角層の脂質成分を分析し、美しい皮膚の角質成分により近くなるように、欠乏している脂質成分（例えばセラミドのような脂質）を補うという、「カバー」ではなく、皮膚そのものの健康状態を維持（スキんケア？）あるいは回復を期待する研究、すなわち、美しい皮膚のメカニズムの解明からアプローチするというような方向の研究が主流であることを知った。

さらに、表皮角層、表皮ケラチノサイトにおける細胞間接着や細胞骨格とシグナル伝達（私の専門分野）、真皮の膠原線維、弾性線維や脈管系、神経系といよように、コスメトロジーの中央に皮膚科学が、疾患という面だけでなく皮膚の分子生物学という面で参画するように要求されていることを知ることになった。私自身もこのようなコスメトロジーを念頭において皮膚科学にますます貢献できたらと思う。（岐阜大学）

## 生命理工学とコスメトロジー

中 村 聡

（平成6年度）

今世紀後半における生命科学の飛躍的進歩を受け、生物の優れた機能を工学的に利用する学問分野が進展した。このような状況を背景として、理工学を基盤として生命科学を体系化する新しい学際分野「生命理工学」が提唱された。筆者が所属する生命理工学部は、わが国で初めての学部として平成2年に東京工業大学に創設され、その後、大学院生命理工学研究科も設置されている。生命科学の発展のためには広範囲な学問領域の相互作用が必須であり、本学部教員の出身学部も理学・工学・薬学・医学・農学など、多岐にわたっている。研究に広範囲なバックグラウンドが要求されるという点、コスメトロジーと相通じるところがあろう。

筆者は生物工学科遺伝子工学講座に席をおいて

いる。講座の名称に謳っているように、筆者の専門は遺伝子工学であり、遺伝子工学・タンパク質工学技術による有用タンパク質の人工構築をめざした研究に携わっている。現在は、極限環境に生育する微生物（極限微生物）の検索を行い、極限微生物が生産するタンパク質の構造と機能の解析を通してタンパク質の分子設計のための方策を模索している。本研究を継続することにより、高温・高アルカリ性条件下で機能する多糖分解酵素が取得できたならば、化粧品原料としてのオリゴ糖の高効率生産への道が拓けるものと期待される。また、これからの化粧品原料の開発にあたっては、エネルギー問題や環境に対する影響も考慮する必要がある。植物由来の天然多糖類を酵素で処理するという本研究の方法は、このような観点からも優れているものと考えられる。今後のコスメトロジー研究における生命理工学の貢献に、乞うご期待。（東京工業大学）

## コスメトロジーと皮膚科

田中 俊宏

（平成6年度）

コスメトロジーが受け持つ持つ範囲を、化粧品つまり今あるものをさらに美しく見せるみせる領域に限定すれば、美容を目的とする物質、例えばアザをうまく隠すような製品、が主たる研究対象になるであろう。しかし最近のスキんケアの考え方は、例えばサンスクリーンの開発のようにむしろ予防医学の立場に近づくように思える。事実、外来でフォローしている色素性乾皮症の患者さんにとっては、サンスクリーンの性能は将来の悪性腫瘍の発生をどれだけ防げるかのキイとなる。この点から考えると、こんごあるべきコスメトロジーの研究領域には皮膚の解剖的、生理的構造と機能とは何かを正しく把握し、それらを維持または増進する立場が盛り込まれるかと考

えられる。もちろん化粧品は医薬品と異なることは薬事法で規定されており、健康な人が対象となる分野ではあるが、さきのサンスクリーン剤の例の様に健康な皮膚を健康であり続けさせるような分野、それには健康とはどのような状態をさすのかを正しく理解する生理的研究が含まれるが、にむけて今後の Cosmetology が向かっていくのではないかと思われる。私達皮膚科の医者と Cosmetology の接点は、したがって、非常に地味なことであるが、皮膚の健康な状態の把握からはじまるのではないかと考えられる。(京都大学)

## 選択的脳冷却と化粧学

田 辺 実

(平成6年度)

ヒトでも動物でも、脳を含めた核心部の体温が上昇すると、それを視床下部の温度センサーが感受し、末梢からの温度上昇と併せて分析し、熱放散反応として皮膚血管の拡張、発汗、動物ではバンティングなどを引き起こす。同時に代謝も抑制され、体温が元のレベルまで戻される。しかし、強い熱負荷が長く続いたり、負荷としての環境温度が高すぎると、視床下部などの体温調節中枢自体に機能障害が生じ、高体温でありながら皮膚血管は収縮し、発汗が停止し、悪寒戦慄までもが起る。

脳の機能を正常に維持できる上限温度は39.5℃から40.5℃といわれる。核心温は同じでない。偶蹄類のガゼルを暑熱下で疾走させて測定した脳温は駆幹部の体温より3℃以上も低くなる。ヒトでも同様に脳温が低くなる(選択的脳冷却)。

ヒトを含めた高等な類人猿の顔には毛がなく、毛のある部位に比べ汗をよくかく。同じ男性同士でも、禿げて毛のない頭からは毛のある頭からよりも多くの汗をかくので、それだけ脳冷却の効率が良いはずである。男性と女性で頭の同じ部位を

比較すると男性の方が女性より多く汗をかく。したがって、男性の方が女性より脳の冷却能力が大きいはずである。しかし、真偽のほどはわからない。

女性は化粧をする機会が多く、暑熱下での化粧が選択的脳冷却の効率を抑制するか否か今回明らかにした。暑熱下では、積極的に熱放散を促進させ、しかも外界からの熱の流入を遮断する成分で化粧することが暑熱下の化粧による女性のための賢い選択的脳冷却といえる。(金沢大学)

## 私の Cosmetology との つきあい方

戸倉 新樹

(平成6年度)

私は皮膚科医を生業としていますが、その職業に相応しい Cosmetology の知識と興味を常に吸収、維持、発展している者とは言えません。ですからコスメティクスが原因あるいは誘因で発症した皮膚炎で来院される患者さんに対して、他人の受け売りのな指導しかしてきませんでした。ある時、顔面の一次刺激性の湿疹と思われる患者さんに対して、化粧品はしばらく止めるように言いましたところ、「女性は化粧なくして、社会的生活はおくれぬ」と私の指導を窘められました。この言い回しに魅力を感じた私は、それ以後、同様の患者さんに対し、逆にこの表現を用いて指導するようになり、むやみに化粧を中止することは言わないようになりました。このことは Cosmetology に関して、私が如何にいい加減な皮膚科医であるかということの証拠を提供するだけでなく、コスメティクスを Ology のレベルに昇華するのは少なくとも現場においては未だ容易ではないことを表していると思われます。私の興味ある学問分野のひとつに光生物学があります。これは、光量子が如何に細胞に影響を与えるかという純粋科学的な問題から、もっと軟派な紫外線と皮膚の

関わりを扱う分野まで包含する領域です。一層臨床的には、光皮膚科学と呼ばれる細分野もあり、この領域への帰属をアイデンティティとして、私は生活しているとも言えます。今回の研究テーマは、光から皮膚を守るという使命を負ったサンスクリーン剤が、逆に光と結託して皮膚炎を起こす場合があるという裏切りの行為を検証するものです。このことは専門家の間ではよく知られたことですが、必ずしも学問的に解明されておりません。多少なりとも研究的戦略を持ち合わせいる者として、この Cosmetology の分野を意欲を持ってこれからも研究していきたいと懺悔しております。

(浜松医科大学)

## 心理学とコスメトロジー

岡本 安晴

(平成6年度)

化粧の「人に見せるもの」としての側面に注目するとき、みる人に与える印象を心理学的に研究することが必要になってきます。もちろん、化粧とその化粧をする人自身との関係の心理学的研究が豊かな精神生活の探求において重要な役割を担うことを忘れてはなりません。化粧の第1の側面としてまず思い浮かぶことが「人にどのような印象を与えるか」という見せる側面だということです。このための基礎として、色、形、香りなどがどのような心的効果をもつのかという研究が考えられます。研究方法はいろいろありますが、量的、客観的にそれらの効果を調べるものとして計量心理学的方法が使えますし、分析結果をビジュアルに表現するものとして多次元尺度法などの利用が考えられます。

第4回の研究助成の1つとして採用して頂いた私の研究はそのような方法の可能性を探るものですが、展開法に分類される尺度法で(情緒的)意味空間を調べようとするものです。展開法による研究

によって色や香りなどの種々の刺激特性のもつ情緒的意味が客観的、量的に求められた空間布置としてビジュアルに表わされれば、それに基づいた消費者のニーズの開発が期待されます。又、展開法は、個人の好みの違いを商品などの選択されたものとの関係によって調べようとするときにも使えますので、消費者のニーズに合った商品の開発にも有効なものです。消費者のニーズの開発、あるいはニーズに合う商品の開発ということは生活を豊かにすることに繋がることでもあると思います。いずれにせよ、Cosmetology の1分野としての心理学的的方法による化粧の心的側面の研究が私達の生活を豊かにするために今後ますます盛んになればと思っています。

(金沢大学)

## 化粧研究の不思議な効果

飛田 操

(平成6年度)

人と人との関係においては、特に、それが異性とのあいだの関係の場合には、相手の容姿の美しさの程度がさまざまな影響をもたらしています。相手が男性の場合にも容姿の美しさの効果はあるのですが、相手が女性の場合には、よりいっそうその効果は顕著になります。

美しい女性の方がより好まれるというのはもちろんなのですが、たとえ全く同じ内容のレポートを提出しても、美しくない女性よりも美しい女性の方が良い成績であると評価されたり、全く同じ犯罪を犯したとしてもその罪を軽く評価されることさえあるのです。

何故、容姿の美しさが対人関係にさまざまな影響を及ぼしているのでしょうか？「顔じゃないよ。心だよ。」という言葉は、本当なのでしょう？このような問題を解くための多くの手がかりが、「化粧行動」の中にあるはずです。

ただ、化粧行動の心理についていろいろ考察し

てみますと、上述したような、相手に与えるさまざまな影響という意味での対人的効果が化粧に存在するだけでなく、「本当の自分を演出する」とか「自分をいたわる」といった言葉に示されるように、自分自身に対する効果、つまり個人的効果も同時に存在しているようなのです。

このふたつの効果を同時に検討するような研究ができないだろうか、という問題意識で化粧行動の効果に関する研究に取り組んでみました。すると、思いがけずうれしいことに、研究室のゼミの学生や周囲の人たちが、男女を問わず、それぞれの立場から経験談を話してくださったり、いろいろなアドバイスをしてくださったりしたのです。つまり、多くの人にとって、それだけ「化粧行動の心理」についての関心が高いのです。今回の研究で、多くのことがわかりました。でも、明らかにできなかったこともまだまだたくさんあります。今後も、たくさんの人たちの協力を得ながら、化粧行動の不思議な効果について検討していければと思っていますところ。 （福島大学）

# 付 録

---



事業報告書(平成7年度)

役 員

研究助成課題一覧



# 事業報告書

(自 平成7年4月1日 至 平成8年3月31日)

## I. 6年度事業 (平成7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7年5月8日より募集を開始し同7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180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、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7年9月20日(水)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13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6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、功労金100万円、研究助成金2,600万円、国際交流援助金50万円が交付されました。

功労表彰 (小林孝三郎賞)	1件
研究助成	16件
国際交流援助	1件

## IV. 会議等

### 理事会

#### 第1回通常理事会

開催日時 平成7年6月15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 10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6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、全員一致の賛同を得、可決承認された。

第二号議案 選考委員の選任に関する件  
事務局より選考委員1名の追加選任が提案された。理事会は慎重審議の結果、追加を認め全会一致で宿崎幸一氏を選出した。

### 報告事項

平成7年度の研究助成課題の公募について  
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、理事会全員でその趣旨を認めた。

### その他

研究業績中間報告集第4号が披露され、近く研究報告集第3号(収載論文17編)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・場所は理事会に同じ。

評議員総数 14名 本人出席 9名 委任状出席 4名(賛成)

上記理事会の決議を全員一致で確認した。

## 第2回通常理事会

開催日時 平成7年11月13日（月）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 11名 本人出席 11名  
監事 2名 出席 2名

### 審議事項

#### 第一号議案 理事長の選任について

理事長のご逝去に伴い現在空席となっている理事長について、寄附行為の定めるところに従い、理事の互選により選出する運びとなった。互選の結果、理事、小林禮次郎氏が理事全員の賛同により理事長に選出された。

#### 第二号議案 第6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として、東京慈恵会医科大学名誉教授、皮膚科医、土肥淳一郎氏が提案された。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。

#### 第三号議案 平成8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、全員一致の賛同を得た。

#### 第四号議案 株式遺贈申し入れを承認する件

事務局より、故小林孝三郎氏からコーセーの株式、305,801株遺贈の申し出を受けている旨の報告があり、これを受け入れ、基本財産とする提案がなされた。財団事業の維持発展のため、必要不可決の資産である点が確認され、原案は書面表決者を含め全員一致の賛同を得た。

### 報告事項

#### 選考委員長に関する件

現在委員長である井上選考委員が今期を目処に辞任したい旨の申し出があり、選考委員会において、互選により次期の委員長に北原選考委員が選任された旨の報告があった。

理事会はこれを確認した。

## 第2回通常評議員会

開催日時・場所は理事会に同じ。

評議員総数 14名 本人出席 6名 委任状出席 5名（賛成）  
前記理事会の決議を全員一致で確認した。

## 臨時理事会

開催日時 平成8年2月22日（木）午前11時30分

開催場所 東京都千代田区大手町1-5-1

大手町ファーストスクエア23階、宴「銀河」

理事総数 11名 本人出席 8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 評議員選任の件

任期満了に伴い、配布された資料に基づき、再任8名、新任6名の提案があり、書面表決者を含めた全員が賛同した。なお、被選任者は即時、就任を承諾した。

### 第二号議案 選考委員の選任について

配布された資料に基づき、退任3名、留任10名、新任4名の提案があり、書面表決者を含めた全員の賛同を得た。

### 動議 専務理事の選任について

花輪理事により、佐藤専務理事からの伝言が披瀝された。任期満了時点で辞任するので後任を選出して欲しいとの意向であり、これを受けて花輪理事が専務理事の選任を提案した。複数の賛同があり、正式の議題であると確認された。慎重な審議の結果、互選により宮澤理事が第4期（平成8年4月以降）専務理事に選任された。

## 報告事項

事務局より平成8年度の年間スケジュールが発表され、通常理事会の日程が確認された。

## 臨時評議員会

開催日時・場所は理事会に同じ。

評議員総数 14名 本人出席 9名 委任状出席 3名（賛成）

## 審議事項

第一号議案 理事の選任について

第3期任期満了に伴い、配布された資料に基づき、再任8名、新任5名の提案があり、書面表決者を含めた全員が賛同した。ついで、被選任者は即時、就任を承諾した。

## 報告事項

事務局より平成8年度の年間スケジュールが発表され、通常評議員会の日程が確認された。

## 選考委員会

### 分科会Ⅰ

開催日時 平成7年9月18日（月）午後6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、物性に関する分野の選考

### 分科会Ⅱ

開催日時 平成7年9月8日（金）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 生体作用、安全性に関する分野の選考

### 分科会Ⅲ

開催日時 平成7年9月14日（木）午後6時30分  
開催場所 東京都新宿区西新宿2-2-1 京王プラザホテル会議室  
審議事項 精神、文化に関する分野の選考

## 本選考委員会

開催日時 平成7年9月20日（水）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 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7年11月13日（月）午後4時  
開催場所 東京都渋谷区渋谷2-12-15 日本薬学会会長井記念ホール

以上

## 第6回 研究助成を受けられたかたがた

(K—功勞表彰 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	研究課題	分野	代表研究者
K-95-01	軟膏の経皮吸収理論と化粧品への適用	皮膚科学	東京慈恵会医科大学名誉教授 土肥淳一郎
JA-95-01	材料表面—生体分子間相互作用の直接解析に基づく生体適合性の発現機構の解明	高分子化学	九州大学工学部 助教授 高原淳
JA-95-02	脂質皮膚モデルを利用した化粧品及び水の浸透と安全性に関する基礎的研究	生物物理化学 高分子物性	東京工業大学工学部 助教授 谷岡明彦
JA-95-03	小分子化学物質によるアトピー性皮膚炎の発症と予防についての基礎研究	免疫薬理学	岐阜薬科大学 教授 永井博弐
JA-95-04	ヒト皮膚移植SCIDマウスを用いた新しいコスメトロジー研究	実験病理学	大阪大学医学部 教授 野村大成
JA-95-05	化粧皿を通じた古代ヘレニズム世界における化粧文化の研究	装飾文化 デザイン	神戸芸術工科大学 助教授 服部等作
JA-95-06	生体膜構造をもつ高分子中の水の構造解析と生体反応の解明に関する研究	高分子化学 生体材料学	東京医科歯科大学 医用器材研究所 助教授 石原一彦
JA-95-07	オリゴ糖による皮膚の耐乾燥保護の分子メカニズムに関する基礎的研究	生体分子工学	東京工業大学 生命理工学部 教授 井上義夫
JA-95-08	接触皮膚炎におけるマスト細胞活性化反応の解析	生化学	昭和大学薬学部 教授 工藤一郎

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
JA-95-09	放射線照射あるいは制癌剤投与による脱毛の抑制	生化学 放射線生物学	星薬科大学 講師 太田 節子
JA-95-10	両親媒性分子が構築する超分子の構造と機能性に関する研究	超分子物性化学 高分子物性	名古屋大学理学部 助教授 今 栄 東洋子
JB-95-01	皮膚表皮細胞におけるリポドバイオフィクターの機能発現機構	生化学 分子生物学	新潟大学医学部 助教授 藤 井 博
JB-95-02	光学活性化合物合成を目的とする新規不斉触媒及び新規不斉触媒サイクルの開発研究	有機合成化学	早稲田大学理工学部 助教授 中 田 雅 久
JB-95-03	炎症後色素沈着におけるエイコサノイドによるメラノサイト活性化機構の解明	皮膚科学 生化学	京都大学医学部 助教授 井 階 幸 一
JB-95-04	細胞内小器官ペルオキシソーム：エーテルリン脂質の生合成と酸素ラジカルスカベンジャー機能及び欠損症	細胞生化学 分子生物学	九州大学理学部 教授 藤 木 幸 夫
JB-95-05	化粧品の表示に関する研究－ことに警告表現について－	社会心理学	筑波大学社会工学系 講師 吉 川 肇 子
JB-95-06	多成分油性皮膚浸透促進システムの有効性及び作用機構に関する研究	製剤学	城西大学薬学部 助教授 杉 林 堅 次
H-95-01	化粧品及びその基礎素材の物性測定法の研究	化粧品科学 製剤学	ChiangMai大学薬学部 準教授 Pimporn Leelapornpisid 受入責任者 東京理科大学薬学部 近 藤 保

(敬称略 受付順)

平成8年3月31日現在

役員

理事長	小林 禮次郎	(株)コーセー代表取締役社長
専務理事	佐藤 大正	
理事	磯邊 律男	(株)博報堂代表取締役会長
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	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	社会福祉法人 福利厚生センター理事長
理事	宮澤 香	元日本化粧品工業連合会専務理事
監事	小田倉 正典	公認会計士
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	学校法人 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	東京理科大学名誉教授
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
J 90-03	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
J 90-06	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
J 90-07	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
J 90-15	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
J 90-16	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
J 91-02	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
J 91-05	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
J 91-06	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
J 91-08	化粧品素材としての竹節人参並びに甘草の組織培養による物質生産並びに大量増殖に関する研究	生薬 薬用生物学	広島大学医学部 助教授 神田 博史
J 91-10	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
J 91-11	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
J 91-20	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

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
J 92-01	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
J 92-03	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 界面化学	明星大学理工学部 教授 日 高 久 夫
J 92-04	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	薬剤学	昭和薬科大学薬学部 講師 藤 井 まき子
J 92-05	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	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
JA-94-01	ハーダー腺の分泌するアルキルジアシルグリセロールの物性解明とその素材としての応用開発	生化学 脂質生化学	東京大学医学部 教授 脊 山 洋 右
JA-94-02	植物組織培養法を用いたクチナシ植物からの橙黄色色素Crocin及び青色色素イリドイド配糖体の生成に関する研究	植物細胞工学	東京理科大学 総合研究所 助教授 生 田 安 喜 良

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
JA-94-04	植物培養細胞・組織による化粧品素材としての活性成分の生産と育種に関する研究	生薬学 植物細胞・ 組織培養	九州大学薬学部 教授 正山 征洋
JA-94-07	遺伝子工学的手法を用いた必須脂肪酸 $\gamma$ -リノレン酸の高等植物における多量生産	植物生理学 植物細胞工学	九州大学理学部 助教授 射場 厚
JA-94-10	遠赤外線の水の構造と物性に及ぼす影響及び遠赤水の保湿効果に関する研究	物理化学 (薬学・医学系)	静岡県立大学薬学部 助教授 片山 誠二
JB-94-05	弾性線維蛋白質エラスチンの自己組織化集合体の構造、物性、機能に関する研究	物理化学 生体物性学	九州大学理学部 助手 甲斐原 梢
JB-94-06	バイオシグナル分子を固定化した細胞成長促進タンパク質ハイブリッド材料の合成	生体材料化学 高分子化学	京都大学工学部 助手 伊藤 嘉浩
JA-95-01	材料表面-生体分子間相互作用の直接解析に基づく生体適合性の発現機構の解明	高分子化学	九州大学工学部 助教授 高原 淳
JA-95-06	生体膜構造をもつ高分子中の水の構造解析と生体反応の解明に関する研究	高分子化学 生体材料学	東京医科歯科大学 医用器材研究所 助教授 石原 一彦
JA-95-07	オリゴ糖による皮膚の耐乾燥保護の分子メカニズムに関する基礎的研究	生体分子工学	東京工業大学 生命理工学部 教授 井上 義夫
JA-95-10	両親媒性分子が構築する超分子の構造と機能性に関する研究	超分子物性化学 高分子物性	名古屋大学理学部 助教授 今栄 東洋子
JB-95-02	光学活性化化合物合成を目的とする新規不斉触媒及び新規不斉触媒サイクルの開発研究	有機合成化学	早稲田大学理工学部助教授 中田 雅久

## 生体作用、安全性に関する分野

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
J 90-01	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
J 90-02	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
J 90-05	胆汁酸生合成のメカニズムに関する研究	生物有機化学	東京工業大学理学部 助教授 藤本善徳
J 90-08	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
J 90-09	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
J 90-10	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
J 90-11	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
J 90-12	表皮糖脂質の生化学的、形態学的並びに臨床的研究（エピデルモシド）	皮膚科学 生化学	山口労災病院皮膚科 部長 浜中すみ子
J 90-13	生体の酸化的障害に対する防御機構の生化学的研究ービタミンEの活性発現機構の解析ー	生化学	東京大学薬学部 助手 新井洋由
J 90-14	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
J 91-01	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
J 91-03	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

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
J 91-04	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
J 91-07	皮膚過敏症に対するマスト細胞の役割 —マスト細胞欠損動物を用いた検定法の開発—	実験病理学	大阪大学医学部 教授 北村 幸彦
J 91-09	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	北里大学医学部 講師 亀山 孝一郎
J 91-12	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
J 91-14	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
J 91-16	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
J 91-17	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
J 91-18	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
J 91-19	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
J 91-22	フリーラジカルとホ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
J 92-02	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	分析化学	東京大学工学部 教授 澤田 嗣郎
J 92-06	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

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
J 92-07	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
J 92-08	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
J 92-09	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
J 92-10	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
J 92-11	アスコルビン酸2-グルコシドの生物学的有用性研究－経皮吸収によるビタミンC活性発現の評価－	免疫薬理学	岡山大学薬学部 教授 山本格
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-93-09	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

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
JA-94-03	表皮ケラチノサイトにおけるヒト細胞老化因子の研究	皮膚科学	大阪大学医学部 助教授 橋本公二
JA-94-06	皮膚生理機能賦活物質の合理的吸収促進法の開発	薬剤学	京都大学薬学部 教授 橋田 充
JA-94-08	リポソーム封入薬剤の皮膚吸収過程の解析と皮膚内ラジカル除去への応用	生体物理化学 生体医用化学	九州大学薬学部 教授 内海 英雄
JA-94-09	表皮細胞の細胞接着と角化制御に関するシグナル伝達	皮膚科学 細胞生物学	岐阜大学医学部 教授 北島 康雄
JA-94-11	微生物に由来する多糖分解酵素のコスメトロジーへの応用	遺伝子工学 生化学	東京工業大学 生命理工学部 助教授 中村 聡
JB-94-01	皮膚発現型レチノイン酸受容体のドミナントネガティブ・トランスジェニックマウスを用いた皮膚の成熟過程の検討	皮膚科学 遺伝子工学	京都大学医学部 助手 田中 俊宏
JB-94-02	化粧品が高温環境下の発汗反応及び選択的脳冷却機構に及ぼす影響	環境生理学 温熱生理学	金沢大学医学部 助手 田辺 実
JB-94-03	サンスクリーン剤の光ハブテンとしての性格	皮膚科学	浜松医科大学医学部 講師 戸倉 新樹
JA-95-02	脂質皮膚モデルを利用した化粧品及び水の浸透と安全性に関する基礎的研究	生物物理化学 高分子物性	東京工業大学工学部 助教授 谷岡 明彦
JA-95-03	小分子化学物質によるアトピー性皮膚炎の発症と予防についての基礎研究	免疫薬理学	岐阜薬科大学 教授 永井 博弼
JA-95-04	ヒト皮膚移植SCIDマウスを用いた新しいコスメトロジー研究	実験病理学	大阪大学医学部 教授 野村 大成
JA-95-08	接触皮膚炎におけるマスト細胞活性化反応の解析	生化学	昭和大学薬学部 教授 工藤 一郎

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
JA-95-09	放射線照射あるいは制癌剤投与による脱毛の抑制	生化学 放射線生物学	星薬科大学 講師 太田 節子
JB-95-01	皮膚表皮細胞におけるリポドバイオフィクターの機能発現機構	生化学 分子生物学	新潟大学医学部 助教授 藤井 博
JB-95-03	炎症後色素沈着におけるエイコサノイドによるメラノサイト活性化機構の解明	皮膚科学 生化学	京都大学医学部 助教授 井階 幸一
JB-95-04	細胞内小器官ペルオキシソーム：エーテルリン脂質の生合成と酸素ラジカルスカベンジャー機能及び欠損症	細胞生化学 分子生物学	九州大学理学部 教授 藤木 幸夫
JB-95-06	多成分油性皮膚浸透促進システムの有効性及び作用機構に関する研究	製剤学	城西大学薬学部 助教授 杉林 堅次

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
J 90-04	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
J 91-13	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
J 91-15	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
J 91-21	「色白」の嗜好構造に関する一考察	心理学 色彩心理学 造形心理学	早稲田大学 人間総合研究センター 齋 藤 美 穂
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
JA-94-05	化粧と痴呆老人に関する基礎的研究	脳神経外科学 心理学	産業医科大学 名誉教授 松 岡 成 明
JB-94-04	対人魅力の形成にかかわる顔の構造的特徴と化粧行動の影響の研究	社会心理学 対人魅力	北星学園大学文学部 教授 大 坊 郁 夫
JA-95-05	化粧皿を通じた古代ヘレニズム世界における化粧文化の研究	装飾文化 デザイン	神戸芸術工科大学 助教授 服 部 等 作
JB-95-05	化粧品に表示に関する研究－ことに警告表現について－	社会心理学	筑波大学社会工学系 講師 吉 川 肇 子

\*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.4/'96

非売品

1996年9月28日発行

編者 宮澤 香, 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 データ 八十二

〒104 東京都中央区新富一丁目17番8号

電話 東京 03 (3551) 3726 (代表)

印刷 宮崎印刷

---

©1996

不許複製 禁無断転載