

ごあいさつ

コスメトロジー研究振興財団として、このほど16冊目の研究報告書をお届けできることになりました。当財団は創設以来、18年間にわたって活動を続けてきておりますが、優れた研究に対する助成活動や、研究報告書の発行を滞りなく行ってこられましたのも、多くの関係者の皆様のご理解ご協力によるものと、改めて感謝申し上げる次第でございます。

今回の報告書では平成17～18年度に助成を受けられた方の中から20名の方の研究成果を掲載いたしました。

ご一読いただければわかりますように、研究テーマは非常に幅広い分野にまたがっております。それだけ、化粧品に関連するコスメトロジーの研究が注目を集めるようになってきたといえることができると思いますが、当財団の活動もその一助となっているものと考えております。

化粧品等への応用が期待される素材分野では、老化防止や健康増進をキーワードとする研究が多く、バイオミメティック素材や乳化制御など注目に値する基盤研究をご報告することができました。

皮膚研究や安全性研究に関しては、生体組織や細胞、遺伝子など多様な観点からの独創的な研究が多く、再生医療や動物代替、老化メカニズム等の基礎研究レベルで国際間の協調が盛んになりつつあるだけに、本報告書の果たす役割も大きいのではないかと考えております。

また、神経生理や免疫機能等、生体活動と心理、行動を追求した「こころ」と「からだ」の関係からアプローチした研究もあるなど多岐にわたっておりますが、当財団は分野の枠や研究機関の属性などにとらわれることなく、化粧品学のさらなる発展のために、優れた研究に対して積極的に助成を行っていきたいと考えております。

今後とも、皆さまのますますのご協力とご支援をお願い申し上げます。

平成20年7月

財団法人 コスメトロジー研究振興財団
理事長 小林 禮次郎

目次

■ごあいさつ

■研究報告

I. 素材、物性に関する分野

- ・メラニン生合成阻害作用を有する環状ジアリルヘプタノイド類の美白効果に関する研究 2
星薬科大学薬学部 森田 博史
- ・ヒト由来の生体材料を用いたテーラーメイド型化粧品基材の創出
－ヒト毛髪タンパク質とキトサンから成る複合フィルムの作製と性質－ 6
信州大学繊維学部 藤井 敏弘
- ・安定分散かつ耐熱性を併せ持つ酵素担保ナノ粒子の設計 10
筑波大学大学院数理物質科学研究科 長崎 幸夫
- ・好熱菌由来カロテノイド化合物の生体膜安定化効果の研究 18
大阪府立大学大学院理学系研究科生物科学専攻 原 正之
- ・圧電材料基板上のマイクロ流路を用いた単分散多相エマルション生成法の開発 25
東京工業大学精密工学研究所 西迫 貴志

II. 生体作用、安全性に関する分野

- ・プロスタグランジン D2 受容体を標的とした皮膚アレルギー炎症治療法開発 32
東京医科歯科大学大学院皮膚科学分野 佐藤 貴浩
- ・ヒト汗に存在する核酸分解酵素を含有させた化粧品や医薬品軟膏が有する生理作用や薬理作用の推定 38
島根大学医学部法医学 竹下 治男
- ・脂質を中心とした非蛋白抗原に対する皮膚免疫応答機構の解明とその制御法の確立 41
京都大学ウイルス研究所 杉田 昌彦
- ・Apollon による細胞老化の制御機構 45
東京大学分子細胞生物学研究所 内藤 幹彦
- ・骨髄由来表皮細胞の分化ならびに遊走機序の解明 49
北海道大学大学院医学研究科皮膚科 阿部 理一郎
- ・白皮症の病因遺伝子の解明とその遺伝子産物のメラニン色素生成における機能解析 54
山形大学医学部皮膚科学分野 鈴木 民夫
- ・真皮幹細胞を利用した皮膚の若返り治療 59
京都大学大学院医学研究科形成外科 内藤 素子
- ・紫外線誘発メラニン合成へのスフィンゴシン 1-ホスフェートの抑制効果の検討 62
神戸大学大学院医学系研究科応用分子医学講座皮膚科学 錦織 千佳子
- ・黄色ブドウ球菌における病原性遺伝子の多様化メカニズム：
同一種内多数ゲノム比較によるゲノム進化解析 65
東京大学新領域創成科学研究科および東京大学医科学研究所 小林 一三

- ・メラノサイト由来リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素が関与する皮膚組織の恒常性維持機構 … 71
東北大学大学院医学系研究科細胞生物学講座分子生物学分野 柴原 茂樹

Ⅲ. 精神、文化に関する分野

- ・化粧やネイルケアが高齢者のライフスタイルや QOL と免疫能の向上に及ぼす影響 …… 76
早稲田大学大学院人間科学研究科健康福祉科学研究領域 町田 和彦
- ・化粧・美容意識についての日仏文化比較研究 ―日仏大学生へのアンケート調査の結果から― …… 87
大阪大学言語学博士、ナント大学言語科学科博士課程 石丸 久美子
- ・「聞香」による香りの言語化プロセスと脳内情報構造化機能の解明 …… 95
理化学研究所脳科学総合研究センター象徴概念発達研究チーム 椎名 さやか
- ・中高年者の化粧行動の変動様態と前頭葉認知機能との関連に関する神経心理学的研究 …… 100
関西福祉科学大学健康福祉学部 八田 武志
- ・人前化粧における意識 …… 105
岡山大学大学院社会文化科学研究科 塩田 真友子

■記念講演

- 平成 19 年度記念講演 『顔の美の基準と科学的理論』 …… 113
クリニック宇津木流 宇津木 龍一

■コスメトロジー研究雑感 …… 121

■付 録

- 平成 19 年度事業報告 …… 135
- 役員一覧 …… 138

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

メラニン生合成阻害作用を有する環状ジアリルヘプタノイド類の美白効果に関する研究

星薬科大学薬学部

森田 博史

Cyclic diarylheptanoids with a biphenyl ether linkage such as a series of acerogenins have been isolated from the bark of *Acer nikoense* (Aceraceae), a Japanese folk medicine for hepatic disorders and eye diseases. A series of acerogenins exhibited a range of biological activities such as anti-inflammatory, antihepatotoxic, antibacterial, and inhibitory activity on nitric oxide production. There are well-known natural biphenyl ethers such as glycopeptide vancomycin, cyclic peptides from *Rubia cordifolia*, and macrocyclic bisether marchantin A from the liverwort *Marchantia* species. These structurally interesting cyclic diarylheptanoids continue to be of interest from biological points of view as well as providing challenging targets for total synthesis.

Our interest has been focused on inhibition of tyrosinase enzyme by a series of cyclic diarylheptanoids, acerogenins and the other biological activities. Fractions and acerogenins prepared from *Acer nikoense* showed inhibition of tyrosinase enzyme and melanin biosynthesis, and also showed vasorelaxant activity on rat aorta.

1. 緒言

我々は植物をはじめとする生物資源の調査と同時に、化粧品素材の原点となる有用物質を未利用植物資源に求めてきた。植物成分のなかでもアルブチン、コウジ酸のようなフェノール性化合物のなかにはメラニン生合成阻害活性を示す化合物群が知られている。一方、既存のタイプにとらわれることなく、新たな骨格をもつ天然有機化合物は、しばしば重要な医薬品発見の糸口となるばかりでなく、新たな化粧品素材としての可能性も期待される。このような観点から、メラニンの過剰生成による色素沈着（シミなど）の予防および抑制効果を有する化粧品の開発を目的とし、さまざまな薬用植物および未利用植物などの天然資源からメラニン生成抑制物質のスクリーニングを行ってきた。その結果、これまでに和漢薬などに含まれる環状ペプチド類が、B16 マウスメラノーマ細胞培養系でメラニン生成を抑制することを報告してきた。

チロシナーゼは色素細胞に特異的に発現している酵素でメラニン産生において最初の反応を触媒する働きを持っている。一方、過剰な紫外線刺激による人皮膚の黒化やシミ・ソバカスなどの生成は、一般に人皮膚細胞中の色素細胞（メラノサイト）内のメラノソームで、酵素チロシナーゼが、アミノ酸の一種であるチロシンあるいはドーパを酸化して生成した黒色のメラニンによることが知られている。さらに人皮膚の美白用皮膚外用剤としてハイドロキノン、

コウジ酸、アルブチンあるいはビタミンCなどのチロシナーゼ活性阻害剤がよく知られている。しかし、これらのチロシナーゼ活性阻害剤においては、それぞれ安定性、安全性、効果等において一長一短が指摘されており、依然改良の余地が残されている。

今回、薬用植物および未利用植物などの天然資源から得られた抽出エキスに対して、チロシナーゼ阻害活性のスクリーニングを行った結果、カエデ科メグスリノキ由来の抽出エキスに本酵素の阻害活性を見出したので、チロシナーゼ阻害活性を指標として分離精製を各種カラムクロマトグラフィーを用いて行い活性物質の単離および分画フラクションの諸性質に関する検討を試みた。

一方、我々は、美白効果、抗酸化効果、発がん予防効果、血管平滑筋弛緩作用等の複数の機能を同時に合わせ持つ新しい化粧品素材の開発をも狙っており、今回、メグスリノキの抽出エキスより分画した各種フラクションおよびアセロゲニンを用いて血管平滑筋に対する作用も検討した。

2. 実験

2.1 カエデ科メグスリノキ (*Acer nikoense*)

メグスリノキは、一名チョウジャノキともいうが、宮城県以南の本州、四国、九州の山地に自生する落葉高木であり、三出複数をもち、若枝、葉柄、葉の下面に密に灰白色の開出粗毛が存在することを特徴とする。民間では、その樹皮を煎じて洗眼に用いたことから、目薬の木という名がついたと言われている。メグスリノキの成分としては、現在までに環状ジアリルヘプタノイドの他、トリテルペノイド、フラボノイド、クマリンなどが単離されている¹⁾。今回、群馬県で採集し風乾した樹皮を研究材料として用いた。

2.2 メグスリノキ (*Acer nikoense*) の抽出および分画

永井らの方法に従い¹⁾、メグスリノキの樹皮を粉碎後、

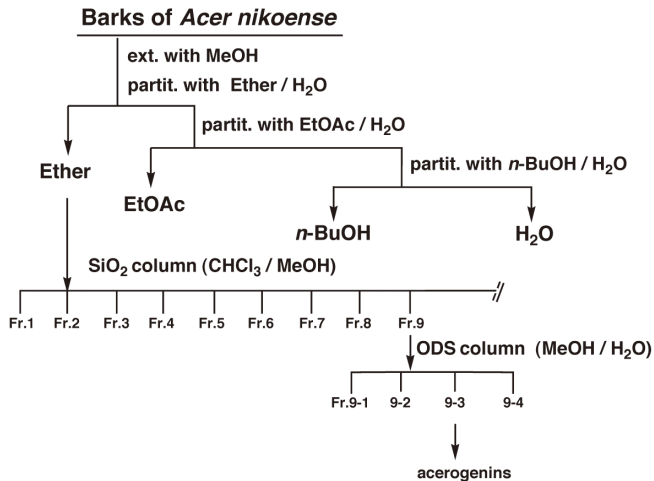


Inhibition of Melanin Biosynthesis of Cyclic Diarylheptanoids from *Acer nikoense*

Hiroshi Morita

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hoshi University

メタノールで抽出し、濃縮して得たエキスをチャートに示すようにエーテル、酢酸エチルで順次、分配して、それぞれの可溶性画分を調製した。次に、チロシナーゼ阻害活性のみられたエーテル抽出画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび ODS カラムクロマトグラフィーに付し、数種の活性フラクションを得た。



2.3 チロシナーゼ阻害活性の測定法

文献記載の方法に従い、mushroom tyrosinase を用いたドーパクロム法で測定した。試料は、全てエタノールに溶解 (2000 $\mu\text{g} / \text{ml}$) し、不溶物はメンブランフィルターでろ過して除去した。

2.4 メラニン生成抑制活性

B16 マウスメラノーマ細胞を、10% FCS、ペニシリン、ストレプトマイシン、アンホテリシン B、炭酸水素ナトリウムを添加した D-MEM で 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。24 時間後にサンプルの DMSO 溶液を含む培地に交換し、3 日間培養した。メラニン生成抑制活性は、細胞中のメラニン量と培地中のメラニン量 (吸光度より算出) から求めた。また、細胞に対する毒性は、細胞溶解液のタンパク量から評価した。

2.5 血管平滑筋に対する作用³⁾

Wistar 系雄性ラットより胸部大動脈を摘出しリング標本を作成し、その張力変化を等尺性に記録した。この張力変化はオルガンバス中に懸垂した血管標本を張力トランジューサーに接続して測定した。分画フラクションの作用は、標本のノルエピネフリン収縮に対する弛緩作用を指標にスクリーニングを行った。ついで血管内皮の有無の影響、KCl、endothelin 等の収縮薬や各種リガンド存在下の血管収縮を観測し、作用機序の推定を行った。

3. 結果

3.1 メグスリノキの粗抽出物の有機溶媒可溶性画分のチロシナーゼ阻害活性およびシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画

メグスリノキのメタノール抽出物およびエーテル可溶性画分にチロシナーゼ阻害活性が認められた (Fig. 1)。また、エーテル可溶性画分のシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分画 (CHCl₃ ~ MeOH) によって得られた Fraction 9 の画分には、より強いチロシナーゼ阻害活性が認められた。

3.2 活性画分の ODS カラムクロマトグラフィーによる分画

シリカゲルカラムで分離した後に強い活性が認められた画分を ODS カラムクロマトグラフィー (H₂O ~ MeOH) でさらに分画し、得られた各画分の活性を測定したところ、チロシナーゼ阻害活性を有するフラクション (Fr.9-3) を得られ、アセロゲニン類が含有されることが分かった。これらの画分の活性には、コウジ酸、アルブチンと同様に、用量依存性が確認された (Fig. 2)。

3.3 メラニン生成抑制活性と細胞毒性

アセロゲニンの B16 マウスメラノーマ細胞培養系での細胞毒性とメラニン生成抑制活性を検討した結果、アセロゲニンは 0.5mM 以下で増殖を阻害せず、1 mM でわずかに増殖を阻害し、0.5mM で有意にメラニン生成を抑制した。このとき、アルブチンは、0.1mM 以下で増殖を阻害せず、0.5mM 以上で増殖を阻害し、0.1mM で有意にメラニン生成を抑制した。

3.4 活性画分の血管平滑筋弛緩作用

各抽出画分をラットより摘出したリング標本を用いて、ノルエピネフリン収縮に対する弛緩作用をその張力変化で測定した。その結果、各画分に血管平滑筋弛緩作用が観察された (Fig. 3)。

3.5 アセロゲニンの血管平滑筋弛緩作用

活性画分より単離したアセロゲニンをラットより摘出したリング標本を用いて、ノルエピネフリン収縮に対する弛緩作用をその張力変化で測定した。その結果、アセロゲニンは、ラット胸部大動脈由来の血管平滑筋のノルエピネフリンの収縮に対して内皮非依存性の弛緩作用を示した (Fig. 4)。また、アセロゲニンは、高濃度カリウムによる脱分極の収縮を阻害した (Fig. 5)。このことから、アセロゲニンの弛緩作用は、主に電位依存性カルシウムチャネルによる細胞外カルシウムの流入の阻害によるものと考えられた。

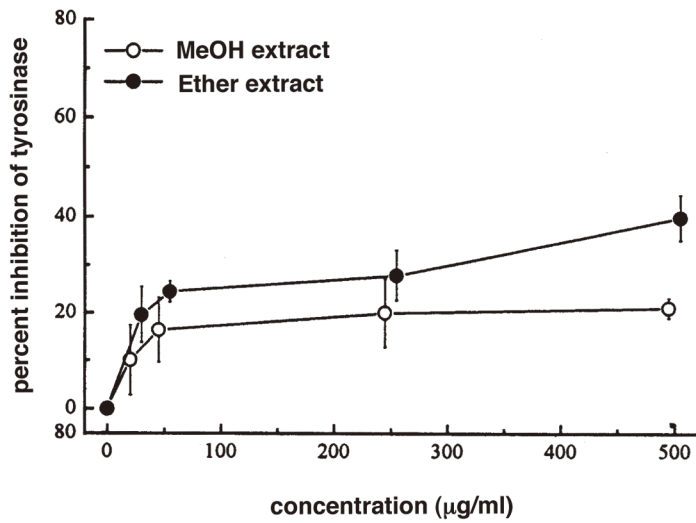


Figure 1 Inhibition of Tyrosinase by MeOH and Ether Extracts

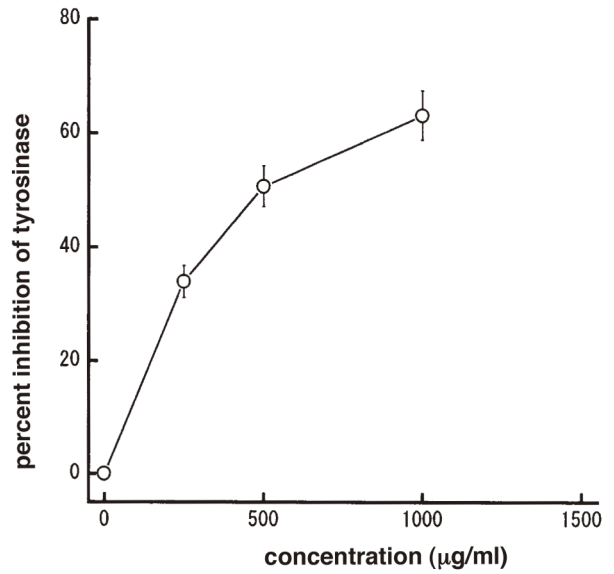


Figure 2 Inhibition of Tyrosinase by Acerogenins

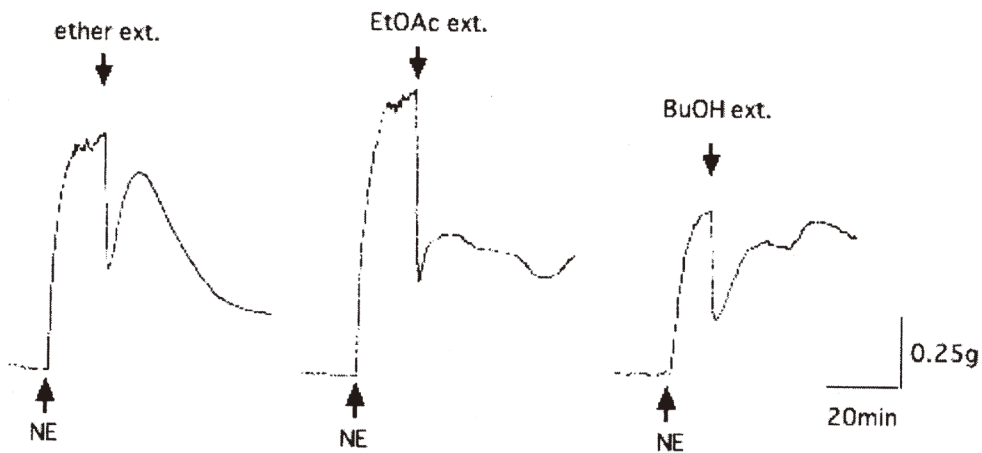


Figure 3 Typical Effects of Each Extract on the Aortic Rings Precontracted with 3×10^{-7} M Norepinephrine (NE).

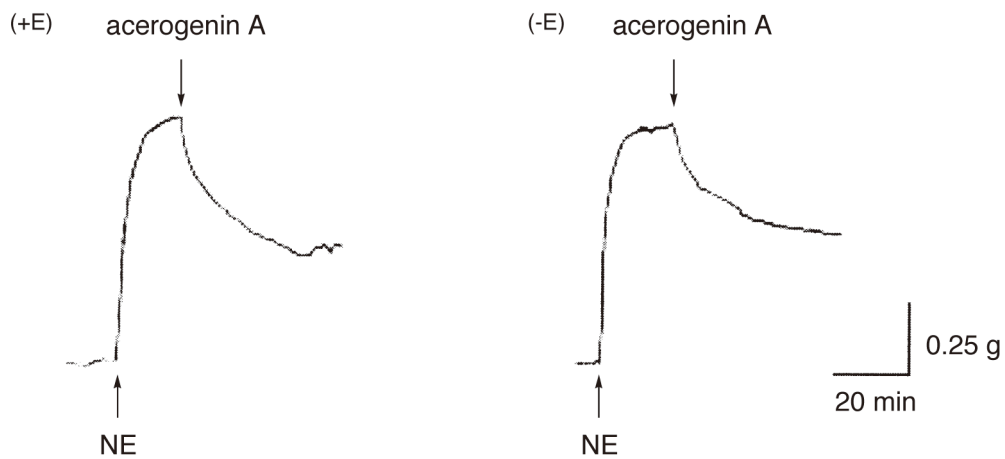


Figure 4 Relaxation responses induced by acerogenin A (3×10^{-7} M) on aortic rings with endothelium (+E) and without endothelium (-E) precontracted with 3×10^{-7} M norepinephrine (NE).

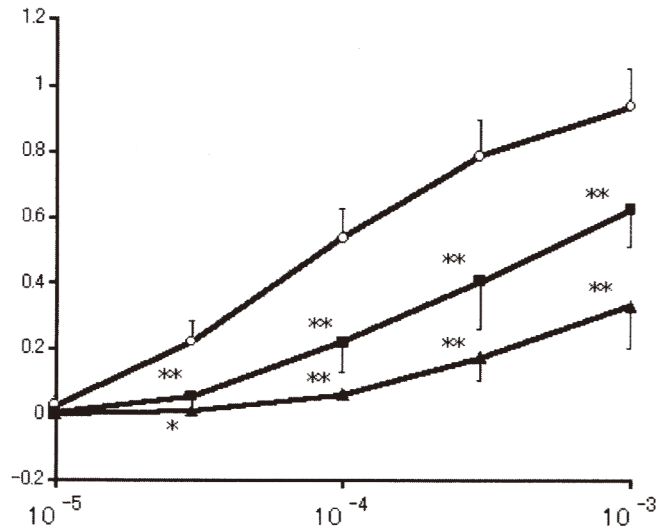


Figure 5 Concentration-Response Relationship for Contractile Responses of the Aortic Rings to Ca^{2+} in a Ca^{2+} -Free Medium Preincubated with High Potassium (60mM) ; Symbols : - ○ - : control, - ■ - : acerogenin A (10^{-5}M), - ▲ - : acerogenin A ($3 \times 10^{-5}\text{M}$), Values are the mean \pm S.E. (n = 4) . * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

4. 考 察

メグスリノキは、カエデ科の *Acer nikoense* の樹皮を乾燥したもので、日本で民間薬として強壯あるいは目に有効な薬として服用されている。永井らにより、メグスリノキの樹皮より、特異な環状ジアリルヘプタノイド類をはじめとする様々な成分が明らかにされている¹⁾。また、近年、これらに環状ジアリルヘプタノイド類に、抗炎症、発ガンプロモータ抑制活性、NO 産生抑制活性などのさまざまな生物活性が報告されている²⁾。

今回、メグスリノキ由来のメタノール抽出物のエーテル可溶性画分およびこの画分のシリカゲルおよび ODS カラムクロマトグラフィーによる分画で得られた数種の画分にチロシナーゼ阻害活性が認められた。今回測定した画分のなかで最も活性が高かった画分は、アルブチンと同程度の活性を有することが分かった。これらの画分の TLC には、複数のスポットが検出され、アセロゲニン類が含有されることが分かった。

単離したアセロゲニンは、チロシナーゼ阻害活性を示し、アルブチンと同様に用量依存性が確認された。アセロゲニンの B16 マウスメラノーマ細胞培養系での細胞毒性とメラニン生成抑制活性を検討した結果、アセロゲニンはアルブチンより弱いながらメラニン生成を抑制した。また、このとき細胞毒性は示さなかった。

さらに、アセロゲニンの血管平滑筋弛緩作用をラットよ

り摘出したリング標本を用いて測定した。その結果、アセロゲニンは、ラット胸部大動脈由来の血管平滑筋のノルエピネフリンの収縮に対して内皮非依存性の弛緩作用を示した。

今後、高い活性が認められた画分よりアセロゲニンをはじめとする関連化合物の単離、同定を行い、得られた活性物質の構造を解明していく予定である。また、得られた活性物質の物性および各種誘導体を作成し、構造とチロシナーゼ阻害活性、血管平滑筋弛緩作用との関係についても検討していきたい。一方、メグスリノキの粗抽出エキスの細胞培養系での効果、安全性、安定性などを調べ、化粧品の素材としての可能性と応用性についても検討していく予定である。

(引用文献)

- 1) Nagai, M.; Kubo, M.; Fujita, M.; Inoue, T.; Matsuo, M. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1976**, 338-339; Inoue, T.; Ishidate, Y.; Fujita, M.; Kubo, M.; Fukushima, M.; Nagai, M. *Yakugaku Zasshi* **1978**, *98*, 41-46; Kubo, M.; Inoue, T.; Nagai, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, *28*, 1300-1303.
- 2) Morikawa, T.; Tao, J.; Toguchida, I.; Matsuda, H.; Yoshikawa, M. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 86-91.
- 3) Nagai, M.; Noguchi, M.; Iizuka, T.; Otani, K.; Kamata, K. *Biol. Pharm. Bull.* **1996**, *19*, 228-232.

ヒト由来の生体材料を用いたテーラーメイド型化粧品基材の創出 —ヒト毛髪タンパク質とキトサンから成る複合フィルムの作製と性質—

信州大学繊維学部

藤井 敏弘

The technology of film production is important in the cosmetics and biomedical fields. We have developed convenient procedures for preparing human hair protein films and particles mainly consisting of hard keratins. Chitosan, a polysaccharide composed of D-glucosamine and N-acetyl-D-glucosamine, can form a film and is commercially used in various fields. Thus, we prepared the composite films consisting of human hair proteins and chitosan. The composite films were translucent and formed a micro phase separation structure, which has each crystal of two components. The films consisting of 70-95% hair proteins exhibited higher UV/VIS-absorption around 260-400 nm wavelength over the values that were obtained by summation of each component. The values of water content and contact angle decreased with increasing the content of hair proteins. The heat stability of hair protein was improved by the addition of chitosan. These results suggest that a simple mixing with chitosan can control the properties of the hair protein film including UV-absorption, water content, and contact angle. The composite film can be customized for individuals and will be a promising material with biocompatibility.

1. 緒言

私たちは、“セルフリサイクル”という理念を提唱している。これは、動物や他人由来ではなく自己由来で廃棄されているが再生可能な組織を原材料として有用加工品を作製する技術確立して、本人のために使用していただくという考え方である。この理由としては、自己由来の原料からできたモノを本人が使用するため、安全・安心な製品となることが期待できる。

セルフリサイクル製品の原料として、毛髪を第一に考えている。髪の毛は一生にわたり合成され、余分な毛髪は切られ不要物質として廃棄されている生体材料である。このため、血液などと比べ採取の負担が少なく、ある程度まとまった量を集めることが可能である。毛髪の70-80%は、ケラチンを主成分とするタンパク質で構成された硬組織である。ここからタンパク質を簡便に抽出する方法を見出して、信大法と名付けた¹⁻³⁾。次に、毛髪タンパク質フィルムを形成する方法を開発した^{4, 5)}。しかし、このタンパク質フィルムの力学的な強度が低いため適用範囲が狭い。フィルムは機械的な刺激を受けることにより、容易に粒子状態とすることができた。この作製と性質は本研究財団研究業績の中間報告集などで報告している^{6, 7)}。

キチンはエビやカニの甲殻から分離、精製される複合多糖の1種で、これを脱アセチル化することでキトサンは得

られる。キチンが多くの溶媒に対して不溶性なのに対し、キトサンは多種類の薄い有機酸に可溶で、加工しやすい利点をもつ。また、生体とのなじみが良く、生分解性、免疫効果、抗菌作用があるため化粧品や医用材料として使用されている⁸⁾。

本研究では、ヒト毛髪タンパク質粒子とキトサンが混合したフィルムを作り、両者の特性を有する複合フィルムの作製を試みた。

2. 実験

2.1 毛髪タンパク質粒子とキトサン溶液の調製と複合フィルムの作製

複数のボランティアから採取した毛髪を用い、エタノール洗浄を行った後に使用した。ヒト毛髪を信大法溶液（5 M 尿素, 2.6 M チオ尿素, 5 % 2-メルカプトエタノール, 25 mM Tris-HCl, pH8.5）に浸し、50℃下で3日間抽出を行った。ろ過と遠心操作により毛髪残渣を取り除き、毛髪タンパク質溶液（60-70 mg/ml）を得た³⁾。フィルム形成は、100 mM 酢酸緩衝液（pH4.0）を満たしたシャーレにタンパク質溶液を静かにキャストして行った。十分に洗浄後、回収したフィルムは超音波操作により粒子とした。キトサンは、その粉末を150 mM 酢酸水溶液に溶解した後蒸留水に対して透析を行い、約15 mg/mlのキトサン溶液を得た。

毛髪タンパク質粒子の懸濁液とキトサン溶液の混合溶液をテフロン板またはシャーレ上にフィルム重量1-3 mg/cm²となるようにキャストし、室温で一晩自然乾燥させることにより、厚さ15-50 μmの複合フィルムを作製した。



Creation of tailor-made type cosmetic materials using human bio-materials
—Preparation and properties of composite film consisting of human hair proteins and chitosan—

Toshihiro Fujii

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University

2. 2 吸収スペクトル測定

石英板上に約 1 mg/cm²となるようにキャストリングしてフィルムを作製した。吸収スペクトル (260–400nm) は分光光度計にて測定した。測定に使用したフィルムは、毛髪タンパク質粒子とキトサン溶液の混合溶液を、室温にて 3–5 時間自然乾燥させたものを使用した。フィルムの厚さは 15–20 μm であった。

2. 3 フーリエ変換赤外吸収スペクトル測定 (FT-IR)

赤外吸収スペクトル測定は FTIR-8400 (Shimadzu 製) を使用し行った。凍結粉碎したフィルムを臭化カリウムと混合し、タブレットに成型したものを使用した。測定範囲は 400 – 4600 cm⁻¹ で積算回数は 50 回とした。

2. 4 熱重量損失測定 (TG)

熱に対する挙動を調べるため、Thermo plus TG-8120 を使用し熱重量損失測定を行った。フィルムを細かく砕いたものを使用し、昇温速度は 10℃/min で 100℃ から 500℃ まで温度を上昇させ、窒素中でフィルム重量を測定した。

2. 5 膨潤率測定

膨潤率は厚さ 40–50 μm のフィルム片 5–10 mg を使用し、37℃ で 2 時間蒸留水に浸すことで増加するフィルムの重量 (膨潤重量) を測定した。測定は 5 回行い、その平均値を算出した。

$$\text{膨潤率 (\%)} = (\text{膨潤重量 (g)} - \text{乾燥重量 (g)}) / \text{乾燥重量 (g)} \times 100$$

2. 6 接触角測定

接触角は FACE Measurement and Analysis System FAMAS を使用して測定した。フィルムは約 2 時間蒸留水で膨潤させた後、測定は 10 カ所で行い、その平均値を算出した。

3. 結果と考察

3. 1 フィルムの形態

ヒト毛髪タンパク質とキトサンを合計した質量を一定として、その質量比を変えた複合フィルムを作製した (Fig. 1)。毛髪タンパク質フィルムは薄茶色を帯び半透明である。一方、キトサンフィルムは透明なフィルムであった。複合フィルムにおいては、キトサン含量が 5–20% の複合フィルムは白味を帯びているが、20–80% のものではほぼ透明であった。SEM 観察において特別な構造は見られなかった。

3. 2 吸収スペクトル測定

フィルムの 260–400nm における吸光度を Fig. 2 に示した。複合フィルムはキトサンフィルムおよび毛髪タンパク質フィルムに比べて吸光度が増大し、毛髪タンパク質含量 80–90% の複合フィルムで特に高くなった。これは毛髪タンパク質含量 80–90% の複合フィルムが光を通しにくいフィルムであることを示しており、肉視によるフィルム観察の結果と一致していた。また 280nm 付近の波長において、キトサンフィルムにはピークが見られなかったが、

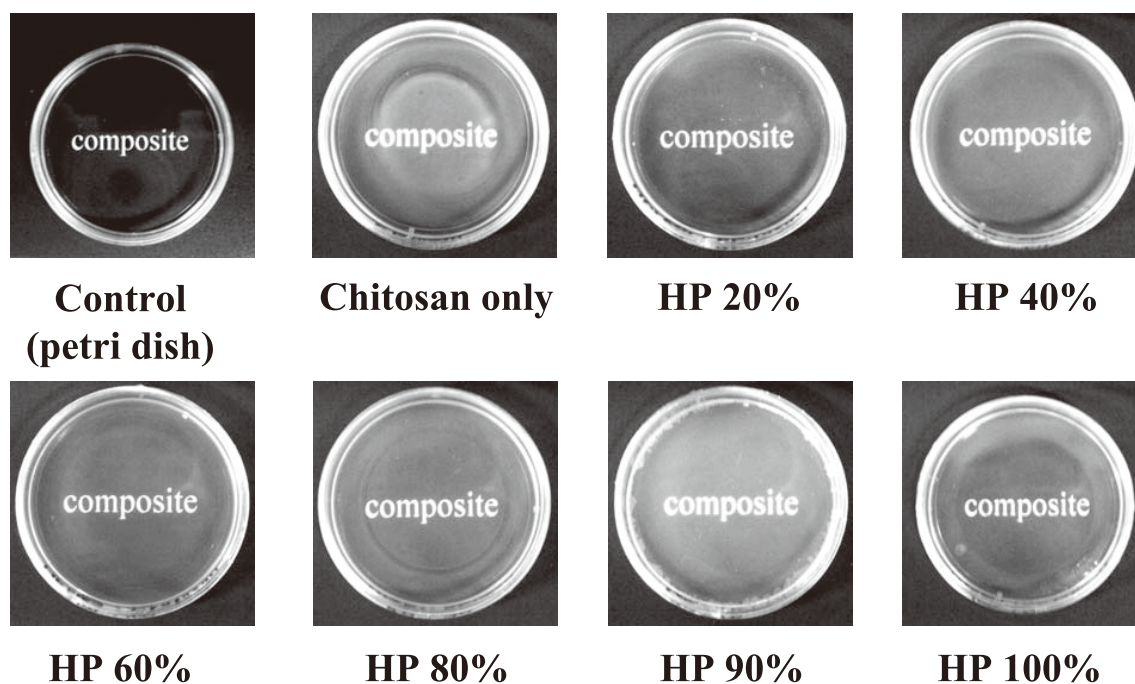


Fig. 1 Photographs of the composite films consisting of hair proteins (HP) and chitosan

毛髪タンパク質が加えられた複合フィルムでは吸収が見られた。これは主成分のケラチンを構成しているに芳香族のアミノ酸などに依っているものと思われる。特に、UV-B (290 - 320nm) と UV-C (200 - 290nm) の紫外線を吸収するため、UV 吸収および反射型のフィルムとなることが期待される。

3. 3 赤外吸収スペクトル測定 (FT-IR)

各フィルムの 400 - 4600 cm^{-1} における赤外吸収スペクトルを Fig. 3 に示した。複合フィルムの波形は、毛髪タンパク質フィルムとキトサンフィルムの波形を加算した波形を示した。仮に毛髪タンパク質とキトサン分子が互いに結合しポリイオンコンプレックスなどを形成すれば、新たな分子状態を示すピークが複合フィルムには生まれると考えられるが、今回作製したフィルムにおいては新たな分子状態の変化を示唆するピークは確認できなかった。このことから、タンパク質分子とキトサン分子がフィルム内で独立的に存在しているミクロ相分離の構造である可能性が高いものと思われた。

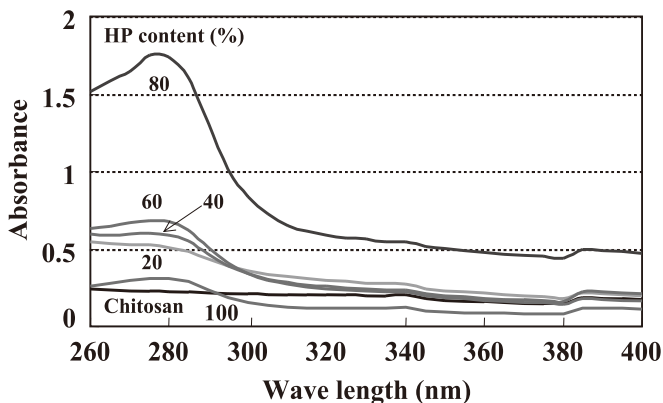


Fig. 2 Spectrometry of the composite films

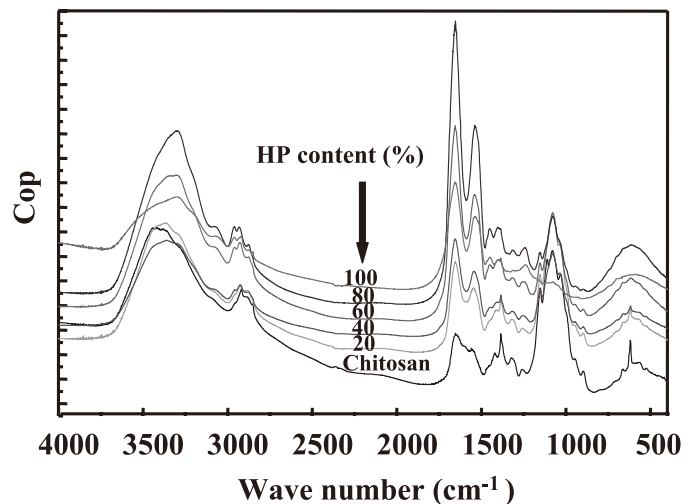


Fig. 3 FT-IR spectra of the composite films

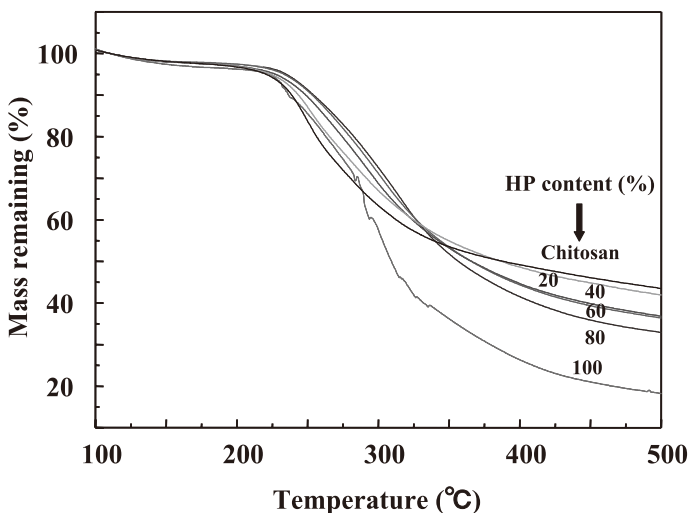


Fig. 4 Thermogravimetric curves of the composite films

3. 4 熱重量損失測定 (TG)

フィルムの熱重量損失測定 (TG) の結果を Fig. 4 に示した。フィルムは 250°C 付近から分解が始まり、徐々に重量を損失していった。500°C においては、毛髪タンパク質フィルムが重量の約 80% を損失しているのに対し、キトサンフィルムでは約 60% に留まっていた。複合フィルムにおいては毛髪タンパク質含量が少ないフィルムほど重量の損失は少なかった。したがって、キトサンを含むことにより、複合フィルムは毛髪タンパク質フィルムよりも熱に対する安定性が增大することが示された。

3. 5 膨潤率

フィルムを 2 時間蒸留水に浸したときの膨潤率を Fig. 5 に示した。最も重量が増加したキトサンフィルムにおいては、乾燥時の約 2.5 倍の水分重量を含んだ。毛髪タンパク質含量が増加するにしたがって膨潤率は減少し、毛髪タンパク質フィルムでは乾燥時の重量とほぼ同量の水分を含んだ。

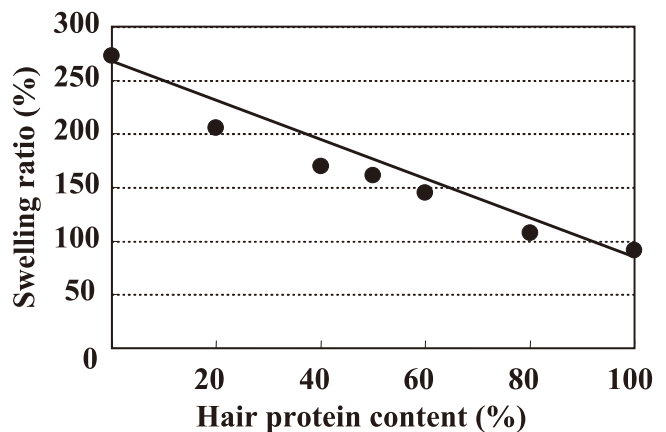


Fig. 5 Water content of the composite films

ていた。キトサンは親水性ゲルを形成するといわれているため、両者の比率によりフィルムの膨潤率は調節が可能となる。

フィルムを24時間蒸留水に浸しその溶出率を調べたところ、いずれのフィルムにおいても10%以下であった。また70%エタノール処理をしたフィルムにおいても同様な結果が得られた (data not shown)。

3.6 接触角測定

蒸留水中でのフィルムの接触角を Fig. 6 に示した。接触角はキトサンフィルムが約40°で最も高く、毛髪タンパク質含量が増加するにしたがって減少する傾向を示した。毛髪タンパク質フィルムにおいて約35°であった。接触角は濡れ特性を評価するための指標のひとつで、一般的に高いほど撥水性が高いと考えられている。毛髪タンパク質フィルムはキトサンとの混合化によりその接触角を微妙に調節することが可能であることが明らかとなった。

4. 結 語

中間報告などでヒト毛髪タンパク質フィルムから機械的な刺激により微粒子への変換とその形態と性質について報告した^{6, 7)}。今回は、毛髪タンパク質微粒子を利用してキトサンと混合したフィルムを作製し、その形態と物理化学的な性質に重点をおいて調べた。この結果、両者は相分離しているフィルムであるが、キトサンが毛髪タンパク質フィルムに混合されることにより機械的な強度の改善が見られた。また、キトサンが5～20%添加されることにより白濁化が生じることと、キトサンの添加量に依存した複合フィルムの膨潤率の増大と接触角の微増が認められた。

キトサンが衛生関連の商品に利用されている一因として、抗菌作用を示すことに依っている。今後、フィルムの抗菌性についての評価を行い、コスメトロジー分野における個人対応型新規素材としての可能性を検討する。

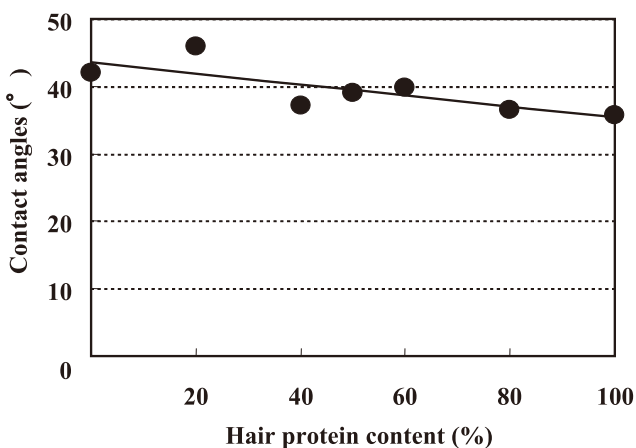


Fig. 6 Contact angles of the composite films

謝辞

本研究にご助成頂きました財団法人コスメトロジー研究振興財団に深謝申し上げます。また、本研究の遂行にあたり、共同研究者の野田裕人君に厚く御礼申し上げます。

(参考文献)

- 1) 藤井敏弘：セルフメディケーションに向けたヒト毛髪蛋白質フィルムの創製と販売, バイオインダストリー, 19(12), 22-27, 2002.
- 2) 藤井敏弘, 小林俊一：セルフ-リサイクルに向けたヒト毛髪タンパク質からの個人対応材料の開発, 日本化粧品学会誌, 30(1), 5-9, 2006.
- 3) Nakamura, A., Arimoto, M., Takeuchi, K., and Fujii, T.: A rapid extraction procedure of human hair proteins and identification of phosphorylated species, *Biol. Pharm. Bull.*, 25, 569-572, 2002.
- 4) Fujii, T., Ogiwara, D., and Arimoto, M.: Convenient procedures for human hair protein films and properties of alkaline phosphatase incorporated in the film. *Biol. Pharm. Bull.*, 27, 89-93, 2004.
- 5) Fujii, T. and Ide Y.: Preparation of translucent and flexible human hair protein films and their properties, *Biol. Pharm. Bull.*, 27, 1433-1436, 2004.
- 6) Kobayashi, S., Morikawa, H., Ishii, S., and Fujii, T.: Development of blood analog fluids using human hair protein particles. *JSME Int. J. Ser. C*, 48, 494-498, 2005.
- 7) 藤井敏弘：Preparation and properties of protein particles from human hair, コスメトロジー研究振興財団 研究業績中間報告集, 16, 25-31, 2007.
- 8) 戸倉清一：物性・機能と用途, 矢吹稔編, :最後のバイオマスキチン、キトサン, 技報堂出版, 1995, 51-86頁.

安定分散かつ耐熱性を併せ持つ酵素担保ナノ粒子の設計

筑波大学大学院数理工学物質科学研究科

原 暁 非、長 崎 幸 夫

Glucose dehydrogenase (PQQ-GDH) and α -methoxy-poly(ethyleneglycol)-*b*-poly[2-(*N*, *N*-dimethylamino) ethyl methacrylate] (PEG-PAMA) were dropped into gold sol (pH=9.0) to formulate enzyme/polymer/gold hybridizes called nanozymes. Size growth and red-shift in the surface plasmon resonance (SPR) of the gold nanoparticles (GNPs), observed in dynamic light scattering (DLS) and ultra-visible (UV) spectroscopy analysis, respectively, suggested the adsorption of the PQQ-GDH and PEG-PAMA on the surface of the GNPs. Transmission electron microscopy analysis (TEM) showed that the nanozyme mainly composed of single GNP, on the surface of which the PQQ-GDH and/or the PEG-PAMA were loaded. ζ -Potential of the nanozymes evidenced the presence of the PEG-PAMA layer around the GNP. The nanozyme thus obtained was highly dispersible even though under physiological saline condition for one week by the protection of the peripheral hydrophilic PEG shell. It also kept its architecture in fact spanning broad pH regions from 9.0 to 2.5, providing a desirable, convenient approach to generate nanozymes at various pH regions, retaining high dispersion stability of the GNPs. It is interesting to note that apparent enzymatic activity decreased ca. 40% when the PQQ-GDH adsorbed on bare GNP surface, while co-immobilization with the PEG-PAMA gave 1.4 times higher activity than that of free enzyme, associated with notable improvement of the poor thermostability of the PQQ-GDH at pH=9.0, 25°C. These results significantly indicated the responsibility of the PEG-PAMA not only for the structure stability of the nanozyme, but also its enzymatic activity.

1. 緒 言

酵素の利用は、酵素という概念が現れるかなり前からも行われており、ほぼ人類の歴史と共に始まったと言われている。これは、酵素が卓越した触媒機能（高効性・特異性）を有することに強く起因している。近年、生化学の発達による酵素の作用機構の解明や、新しい酵素源（細菌、微生物など）の開発、特に多様な設備及び技術（分離、精製、分析）の顕著な進歩などは、酵素の研究を著しく促進し、酵素の応用は各領域まで広く浸透している。現在、醸造・発酵工業をはじめとして、繊維工業、皮革工業、食品工業、医薬品工業など広い分野にわたっている。我々の日常生活には欠かせないものになってきている。

一方、よく知られているように、酵素は、生体触媒で、もっとも代表的な機能性タンパク質である。ネイティブな立体構造を形成してはじめて触媒機能を発揮する。逆にいうと、変性した酵素には触媒機能はない。よって、酵素はタンパク質と同様に、周囲環境（温度、酸、アルカリ、有機溶媒など）に対し、非常に敏感である。この変性しやすい特徴は、酵素の応用を大幅に制限している。この問題を解決するために、今まで様々な方法が報告されてきた。例

えば、蛋白質工学の方法により、酵素活性にあまり影響しない程度に、静電相互作用や疎水性相互作用、化学結合など様々な力で酵素分子の構造を固定する。この方法は良い結果が得られるものの、複雑、専門知識が要するという欠点がある。従って、簡単かつ有効な方法が必要である。

固定化酵素、特にナノ粒子に固定された酵素の研究は、近年非常に注目を集めている。固定化酵素の作成は、物理あるいは化学吸着方法により酵素を簡単にナノ粒子へ固定することである。このように作った固定化酵素は、例えば、工業用の反応触媒として、反応系からの分離・回収・再利用が元のフリー酵素より簡単・便利になり、経済面の有利さは明らかである。また、固定化により酵素安定性の改善は、注目されるもう一つの重要な原因である。

我々は、この固定化酵素の方法を利用し、モデル酵素として油脂分解酵素リパーゼを金ナノ粒子やシリカ粒子の表面へ吸着させ、リパーゼの固定化酵素（ここは、酵素複合体と呼ぶ）を作成した。この作り方は、酵素と粒子を混合させるだけで非常に簡単である。また、ナノ粒子は低毒性、不活性、良い生体適合性、低コスト（シリカ粒子）、特別の光学活性（金粒子）など多様な利点を有するため、このような酵素/ナノ粒子複合体の応用範囲は広いと考えられる。予想通りに、酵素複合体の耐熱安定性が著しく向上することを見出した¹⁾。特に、酵素と共に親水性のPEGを共固定することにより、極めて高い分散安定性を示すことを見つけている。これは、粒子への固定化が酵素構造の変化を抑制し、更にPEG密生層が粒子の凝集を抑えらるとともに酵素リフォルディング能を示した結果と考えられる。

以上の概念を基にして、本研究では、より実用性が高



Design of enzyme-loading nanoparticles with both high thermostability and high dispersability

Yukio Nagasaki

Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba Research Center for Interdisciplinary Materials Science (TIMS)

い酵素の複合体の研究を行うことを目的とした。グルコース酸化酵素 glucose oxidase (GOD) は、昔からよく研究され、現在血糖値の測定やグルコースセンサーに広く応用されている。しかしながら、グルコースの酸化には、酵素が不可欠であり、サンプル中の酵素濃度により測定値は大きく変わるため、これは致命的な欠点であった。一方、pyrroloquinoline quinone (PQQ)を含む Glucose dehydrogenase (PQQ-GDH) は、GOD と比べて、反応性が高いことと酵素から影響を受けないことが魅力的な利点である。また、グルコース以外の糖類とも反応し、人工電子受容体も沢山あるため、GOD より簡単にグルコースセンサーを作ることが可能である。しかしながら、PQQ-GDH は熱に対して不安定であり、これが実用化を妨げている²⁻⁴⁾。従って、本研究で提案する酵素/金粒子の酵素複合体により PQQ-GDH の耐熱安定性が改善できれば、グルコースセンサーの研究・応用に大きく貢献することが期待できる。

2. 実験

2.1 酵素複合体の作成

グルコース酸化酵素 PGG-GDH (pH=9, 0.1 ml) と pH=9 に調整された市販品金ナノ粒子 (GNPs, 粒径 10nm, 0.9 ml) のトリス緩衝溶液 (Tris-HCl, 20mM, pH=9) を混ぜることにより、PQQ-GDH を GNPs の表面へ固定させた。25℃で 10 分間静置した後、更に、正電性のセグメントを有する親水性ポリマー PEG/ ポリアミン α -methoxy-poly (ethylene glycol) -*b*-poly [2- (N, N-dimethylamino) ethyl methacrylate] (PEG-PAMA) の Tris-HCl 緩衝液 0.05 ml を添加し、PQQ-GDH/ 金粒子 /PEG (E/Au/PEG) 酵素複合体を調整した。

2.2 酵素複合体の構造分析

Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) を利用して、動的散乱 (DLS) と表面電位の測定により酵素と PEG-PAMA の吸着によって起こる金ナノ粒子のサイズおよび表面電位の変化を確認した。紫外・可視分光分析 (UV, PL-2500, 島津) により、酵素と PEG-PAMA の吸着によって起こる金ナノ粒子の表面プラズマ (SPR) 吸収波長の変化を確認した。透過型電子顕微鏡 (JEM-100CX, JEOL) を使用し、TEM 測定により形成された E/Au/PEG 酵素複合体の金ナノ粒子の構成を確認した。

2.3 素複合体の分散安定性

塩濃度 150mM になるように E/Au/PEG 酵素複合体に NaCl を加えた。酵素複合体の粒径変化 (30 分間以内) 及び金粒子の SPR 吸収波長の変化 (30 分後) を 25℃で測定した。その後、酵素複合体を 4℃で保存して、粒径変化を

1 週間行った。

E/Au/PEG 酵素複合体に各濃度の塩酸溶液を加え、複合体溶液の pH 値を酸性に調整した。上の実験と同様に、酵素複合体の粒径変化 (30 分間から 1 週間以内) 及び金粒子の SPR 吸収波長の変化 (30 分後) を評価した。

2.4 酵素複合体の活性

Tris-HCl 緩衝溶液 (20mM, pH=9) 0.75 ml に、0.1 ml グルコースの Tris-HCl 溶液 (1 mM) と 0.05 ml 2,6-dichlorophenolindophenol (DCIP) 水溶液 (0.08mM) を入れた。そして、0.1 ml の酵素複合体溶液を添加し、良く混ぜた後、600nm において DCIP の UV 吸収減少速度を酵素反応速度として測定した。

酵素複合体を 25℃で 5 時間静置し、1 時間ごと酵素複合体の活性を前と同様に測定し、活性の安定性を評価した。

3. 結果と考察

3.1 酵素複合体の構造分析

図 1a に示すように、GNP 溶液に PQQ-GDH を添加すると、その量の増加に伴い、GNPs の表面プラズモン (SPR) 吸収は徐々に長波長側に移動し、吸収強度も強くなった。DLS の測定結果により、この SPR 変化と共に、複合体のサイズも増大した (図 1b)。酵素と金ナノ粒子の個数比 (E/Au) が 4 以上になると、複合体のサイズが異常に大きくなると共に、サイズの再現性も悪くなった。4℃で一週間保存した後、低い E/Au 比の複合体よりこのサイズが顕著に増大した。大量の酵素の金粒子表面への吸着により弱くなった GNPs 間の静電斥力が、複合体の凝集を促進したためと考えられる。一方、E/Au 比一定 (E/Au=2) の複合体へ、更に PEG-PAMA を加えると、同様の変化傾向を示した (図 2)。PEG-PAMA と金ナノ粒子の個数比 ($PPg = \text{PEG-PAMA}/\text{Au}$) が 240 倍以上では、E/Au/PEG 複合体の粒径と SPR 吸収波長がほぼ安定になった。物質が GNPs 表面に吸着すると GNPs の表面屈折率が変わるため、SPR 吸収が変化する⁵⁾。従って、PQQ-GDH と PEG-PAMA が金表面へ固定されたことが SPR と DLS の実験結果により証明された。

以上の結果により、E/Au=2 と PEG-PAMA/Au=480 の酵素複合体 (それぞれ NZ-2-0 と NZ-2-480 で表示) を酵素複合体のモデルとして用い、各特性の検討を行った。

GNPs (10 nm)、フリー酵素 (DLS 測定結果: 8-10nm)、及び酵素複合体 (NZ-2-0 と NZ-2-480) のサイズ (DLS 測定結果) と PEG セグメントの水中鎖長 (5nm) を比較したところ、NZ-2-0 と NZ-2-480 がそれぞれ主に一つの金ナノ粒子から構成されたと考えられる。これは、TEM 写真 (図 3a と 3b) により確認された。また、DLS 測定結果により、酵素複合体のサイズ分布は多少多分散であり (図

1b と 2b)、数個 GNPs の凝集体が少量存在することが確認された。これも TEM 写真と一致する。更に、図 3c と 3e を比べて、酵素複合体の場合は、金ナノ粒子の表面に酵素のような球状なものが吸着していることは明らかになった。従って、本研究で作成した酵素複合体は、主に一つの金ナノ粒子へ酵素と PEG ポリマーの共固定により構成された。酵素複合体の形成過程は、図 4 のようにイメージできる。

3. 2 酵素複合体の分散安定性

NaCl 濃度 150mM になった後 30 分以内で、NZ-2-0 のサイズが 20 倍ぐらい上昇したことに對して、NZ-2-480 は、4℃ で一週間静置したことに係わらず、サイズの変化が全く観察されなかった。(図 5) PEG-PAMA の代わりに等量 (PEG-PAMA/Au=480) および二倍量の PEG-OH をそれぞれ NZ-2-0 の中に加えて調製した酵素複合体 (control-480 と control-960) は、control-960 では、このサイズ変化は多少抑制されたが、control-480 にはまったく抑制効果がなかった。従って、生理塩濃度に対する分散安定性は、NZ-2-480 自身の特性で、フリー PEG-PAMA (使用した酵素複合体は精製してないため) の分散剤効果 (PEG-OH と類似する) に由来したものとは考えられない。NZ-2-0 の表面電位は約 -35mV (図 6) であるため、粒子間の静電斥力により分散しているが、塩の添加によりこの静電斥力が弱くなって、粒子が凝集した。NZ-2-480 の表面電位は零に近いので (図 6)、親水性の PEG により分散している。この PEG 層が粒子の凝集を阻害するため、NZ-2-480 の分散安定性に対して大きく寄与していると考えられる。

酵素複合体溶液の pH を 9 から酸性まで調整した後 30 分以内のサイズ変化は図 7 に示している。溶液の酸性は強くなればなるほど、NZ-2-0 サイズの増大は速くなった。同時に、SPR 吸収波長は長波長側に移動した。酸性環境において、NZ-2-0 は不安定で、凝集した。これに対して、NZ-2-480 のサイズ及び SPR 吸収波長はほぼ変化せず、非常に安定であった。酸性環境下では、酵素が正電性になって (PQQ-GDH の等電点は 9.5 である)、負電性の金ナノ粒子と静電相互作用により NZ-2-0 粒子の凝集を促進したと考えられる。しかしながら、NZ-2-480 は、PEG ポリマーの共固定により金ナノ粒子の表面電荷がほぼゼロ (表面電位の結果) になったと共に、親水性 PEG 層がこのような凝集 (もしあれば) を障害するため、粒子の凝集は発生しなかった。よって、酸性環境においても、NZ-2-480 酵素複合体の PEG 層の外れはなく、酵素複合体は安定に分散できることが見出された。

3. 3 酵素複合体の活性

図 8 に示すように、PQQ-GDH は金ナノ粒子へ固定された後、活性がフリー酵素より 6 割程度に減少した。その上に PEG-PAMA で修飾すると、フリー酵素に比べて活性が若干大きくなった。K_m 及び最大反応速度を評価した結果は、NZ-2-0 複合体とフリー酵素は、最大反応速度と K_{m, glucose} 値 (酵素とグルコース反応する K_m 値) がほぼ一致し、金表面への固定により酵素の失活がないことを確認した。しかし、フリー酵素より NZ-2-0 複合体の K_{m, DCIP} 値 (酵素と DCIP 反応する K_m 値) は倍ぐらい増大した。NZ-2-480 複合体とフリー酵素は、この三つの値が実験誤差範囲内では一致であった。(表 1) よって、酵素は金ナノ粒子に固定された後、周囲環境が疎水性に変化したため、酵素と DCIP 基質の接触が悪くなったと考えられる。親水性の PEG-PAMA と共固定の場合、酵素の親水性の周囲環境は維持されたため、K_m 及び最大反応速度はフリー酵素と比べて変化してなかった。

25℃ で 5 時間静置すると、フリー酵素の活性は速やかに低下した。これに対して、酵素複合体の活性変化は遅くなった。特に NZ-2-480 複合体の場合、5 時間後の酵素活性がフリー酵素の初期活性と一致した。酵素複合体は、フリー酵素より活性安定性が顕著に改善された。

4. 総括

固定化酵素は注目されている現在でも、固定化酵素自身の構造に関する詳しい情報はほぼ報告されていなかった。本研究では提案する PEG/酵素共固定系はこれまでの“単なる”固定化酵素と比べて、飛躍的な特性の向上が期待できるだけでなく、その構造と性質の関連を解明することは、このようなナノ粒子上の PEG/酵素二元系の特徴を抽出し、一般化することで実用化につなげる極めて重要なプロセスである。従って、本研究では、酵素複合体の構造を明らかにさせるため、構造と各性質 (分散安定性や酵素活性) の関連、更に固定化酵素の性質コントロール・設計にとっても、非常に興味深い研究であると考えられる。タンパク質工学の方法を利用し、PQQ-GDH の安定性を向上させようとする試みは多く、その一部は有用であるものの、すべての酵素化学に適用するためには難がある。本研究のように簡単、便利、短時間で調製できる、かつ有効な方法は、他にはない。

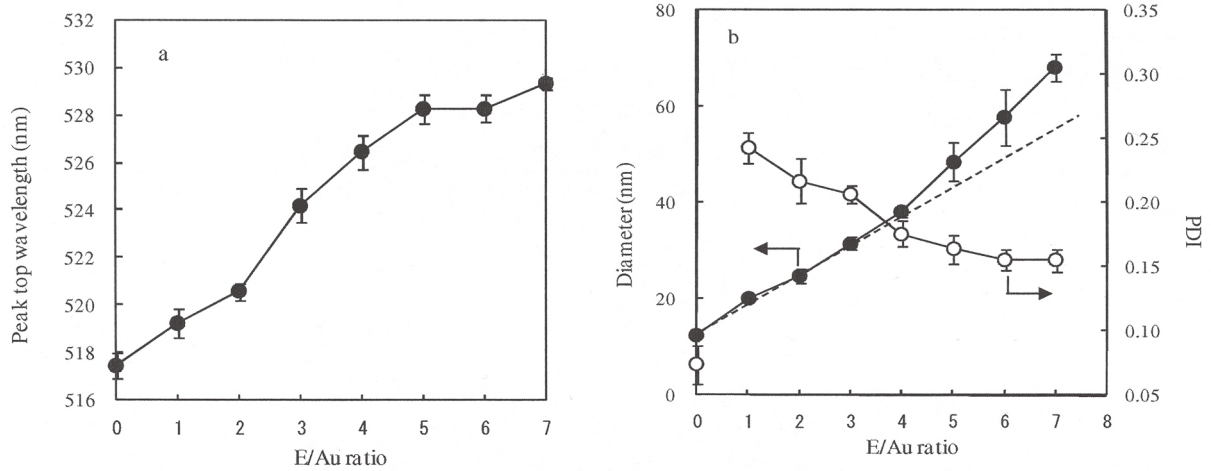


Figure 1 (a) E/Au-dependent peak top wavelengths of the SPR bands of NZ-*m*-0; (b) variations in the diameter and polydispersity index of NZ-*m*-0 as the E/Au ratio increases from 0 to 7. (*m* denotes the molar ratio of enzyme to GNP(E/Au) and 0 denotes the ratio of PEG-PAMA to GNP (PEG-PAMM/Au)).

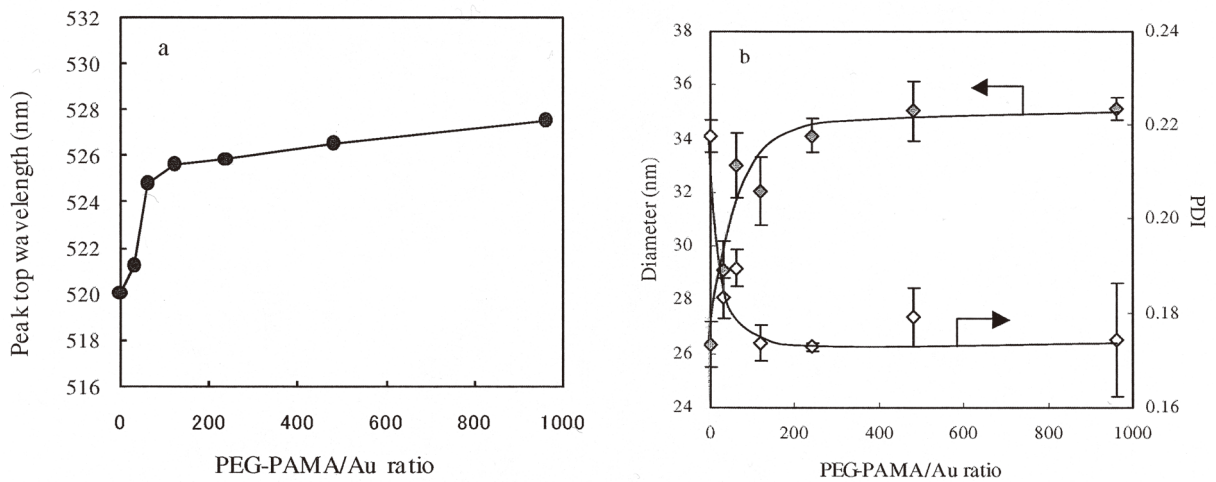


Figure 2 (a) *PPg*-dependent peak top wavelengths of the SPR bands of NZ-2-*PPg*; (b) variations in the diameter and polydispersity index of NZ-2-*PPg* as the *PPg* value rises from 0 to 960. (*PPg* denotes the ratio of PEG-PAMA to GNP (PEG-PAMA/Au)).

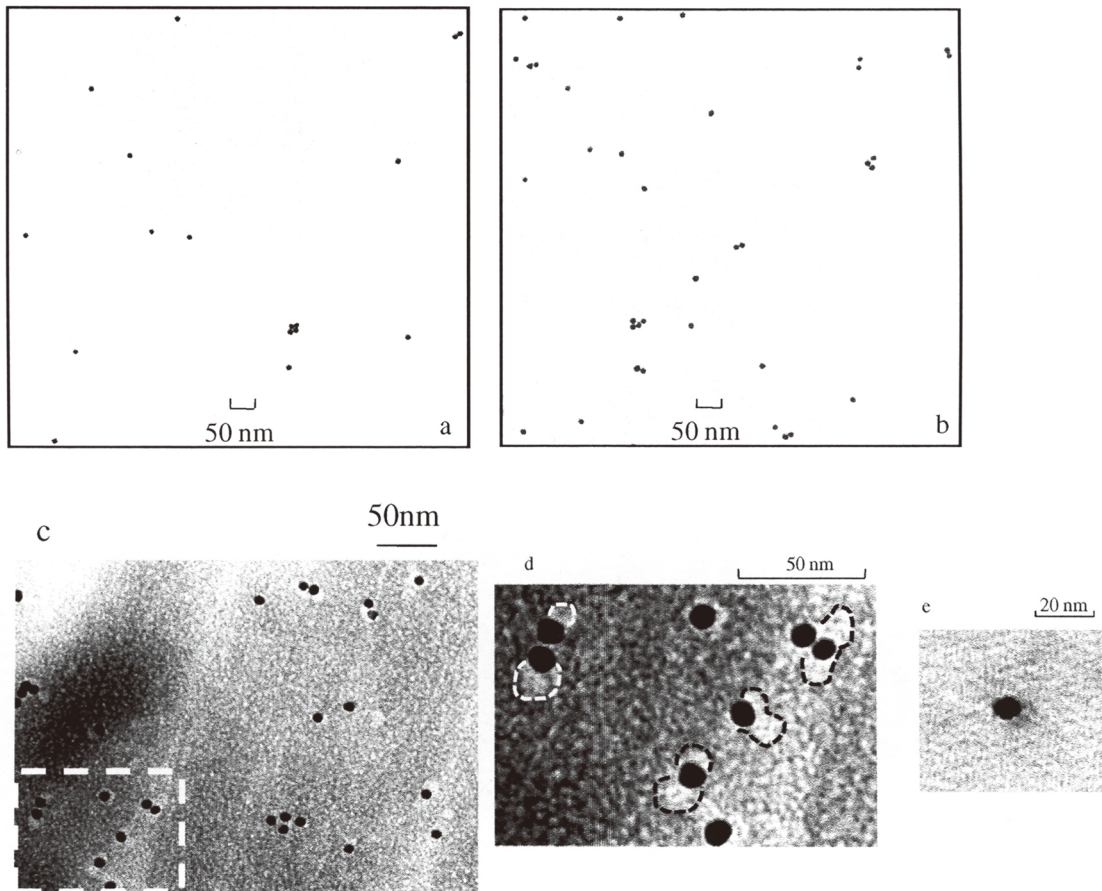


Figure 3 (a) and (b) are TEM pictures of NZ-2-0 and NZ-2-480, respectively; (c) and (e) are TEM pictures of NZ-2-480 and GNPs, both dyed using silicotungstic acid aqueous solution. (d) is an amplified TEM picture of a part of (c) for better viewing.

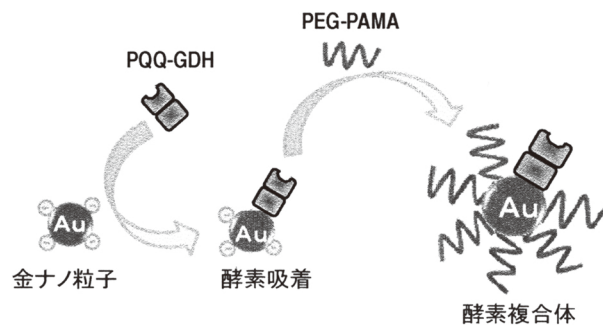


Figure 4 酵素複合体の作成イメージ図

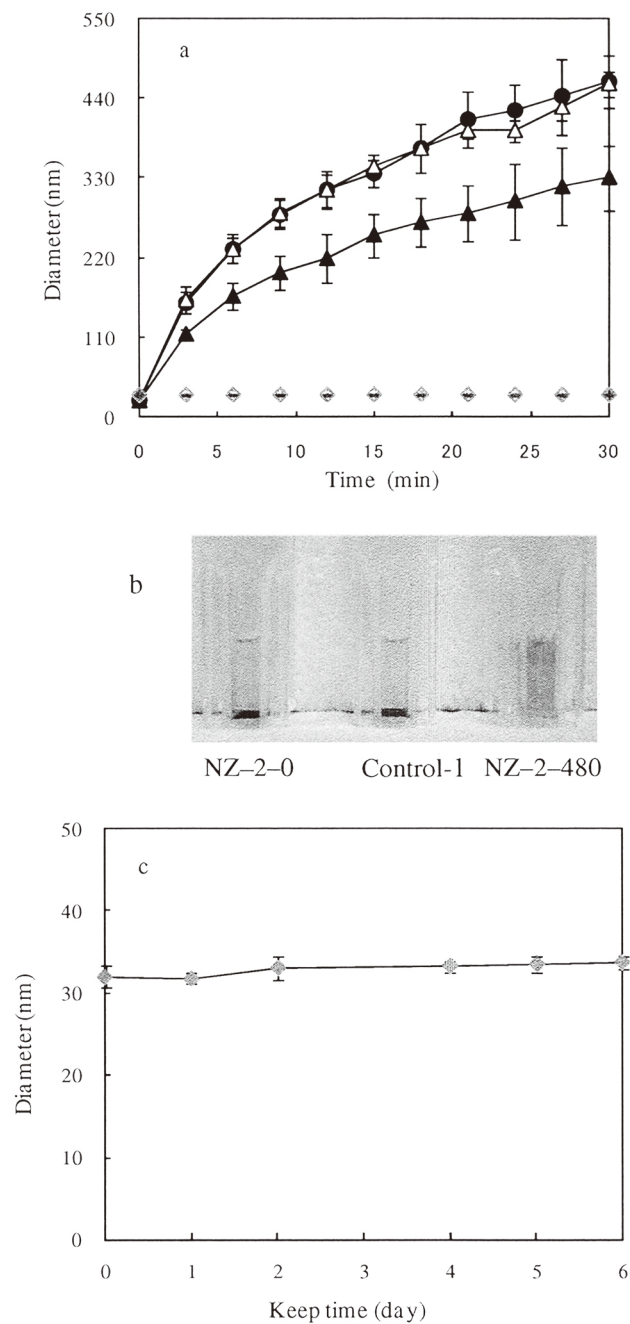


Figure 5 (a) Physiological saline-induced variations in the size of NZ-2-0 (closed circle), NZ-2-480(closed diamond), control-1 (PEG-OH/Au=480; open triangle), and control-2 particles(PEG-OH/Au=960; closed triangle), during the first 30 minutes after salt addition. (b) Pictures of NZ-2-0, control-1 and NZ-2-480 particles in 150 mM NaCl after being kept at 4°C for one week. (C) Time – dependent variations in the size of NZ-2-480 particles in 150 mM NaCl 4°C .

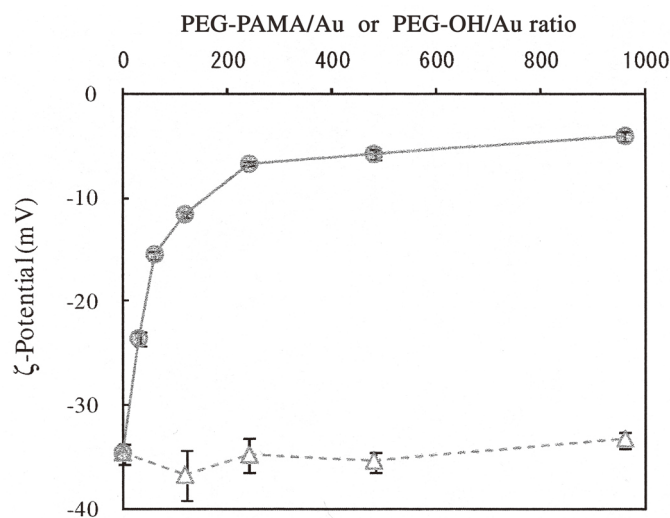


Figure 6 Variations in the ζ -potential of freshly prepared nanozymes particles as a function of the PEG-PAMA/Au ratio (solid line) and the PEG-OH/Au ratio (dashed line).

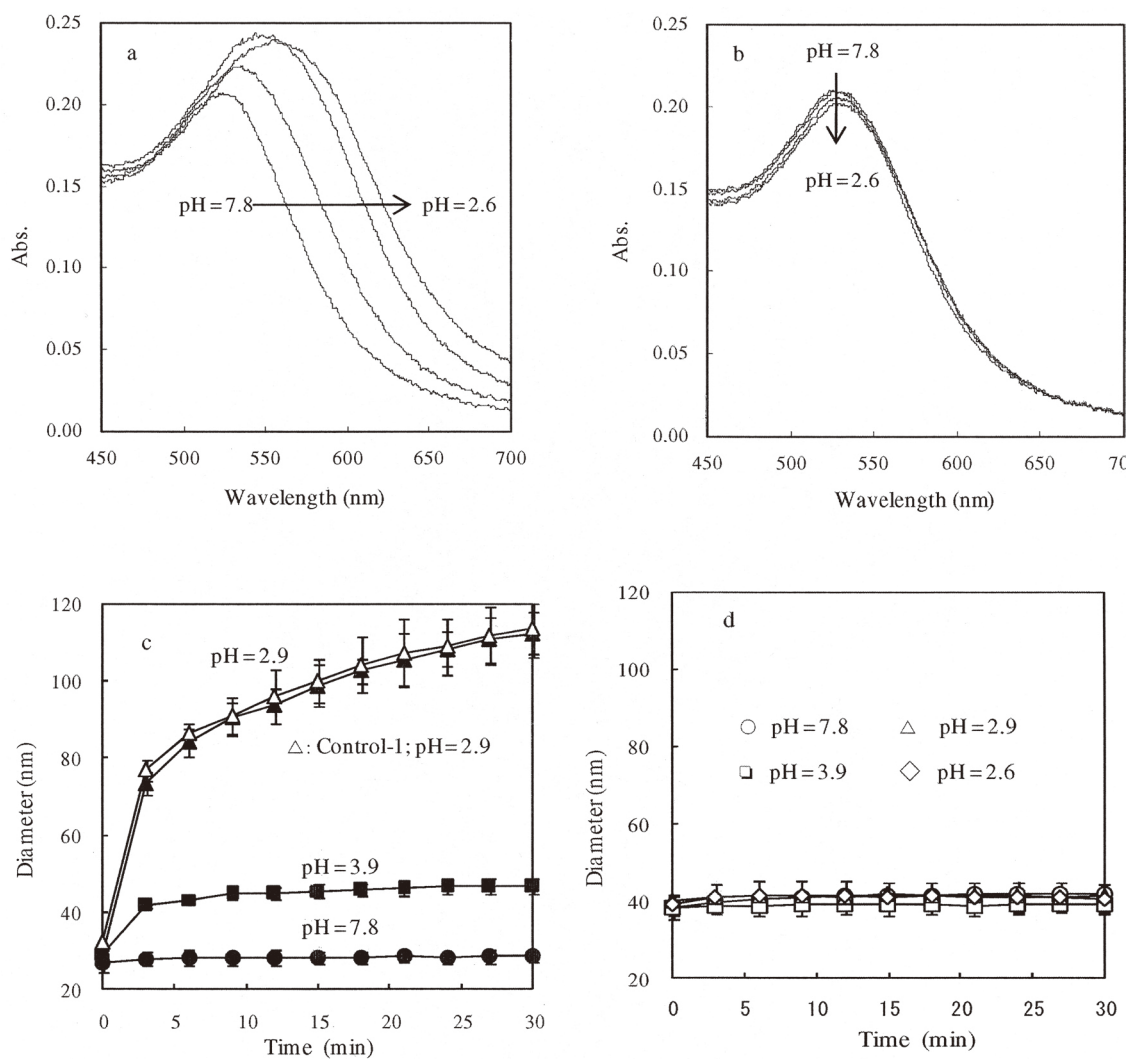


Figure 7 pH-induced variations in the SPR spectra (a, b; during the first 30 minutes after the addition of HCl of various concentrations) and size (c, d; during the first 30 minutes after the addition of HCl of various concentrations) of NZ-2-0 (a, c) and NZ-2-180 (b, d).

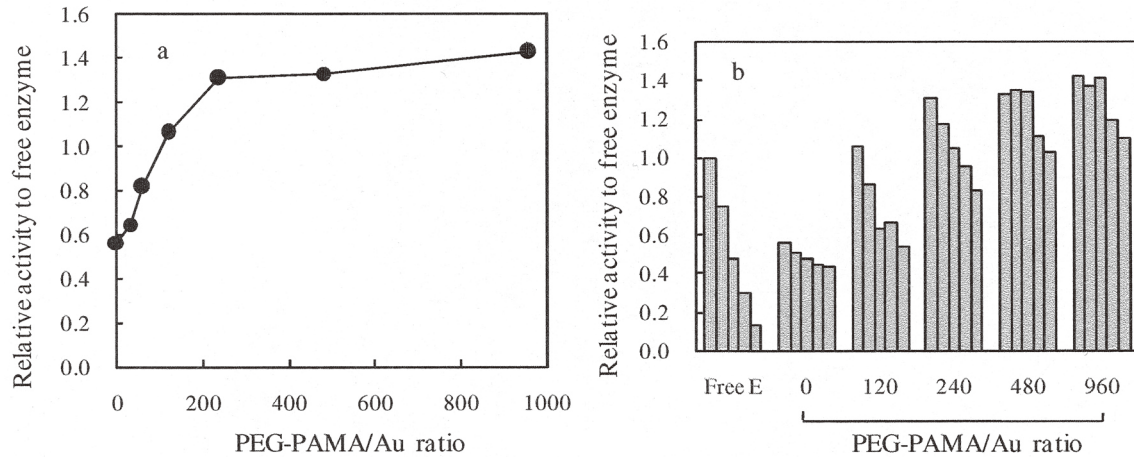


Figure 8 (a) Influence of the *PPg* value on the normalized apparent enzymatic activity of the NZ-2-*PPg* nanozymes; (b) time-dependent normalized apparent enzymatic activity of NZ-2-*PPg* and free enzyme at 25°C. (From left to right: 0, 1, 2, 3 and 4 hours, for each group.)

Table 1 Kinetic parameters of PQQ-GDH in free enzyme, NZ-2-0, and NZ-2-480

	$K_{m, \text{glucose}} (10^{-3} \text{ M})$	$K_{m, \text{DCIP}} (10^{-4} \text{ M})$	$V_{\text{max}} (\mu\text{mol}/\text{min})$
Free E	0.36	2.31	1.52
NZ-2-0	0.31	5.01	1.49
NZ-2-480	0.38	2.28	1.57

(参考文献)

- 1) Nagasaki Y, Yoshinaga K, Kurokawa K, et al. : Thermal and Dispersion Stable Lipase-installed Gold Colloid, - PEGylation of Enzyme-installed Gold Colloid-, *Colloid Polym. Sci.* 285, 563-567, 2007.
- 2) Geiger O, Gorisch H, : Reversible thermal inactivation of the quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*, *Biochem. J.* 261, 415-421, 1989.
- 3) Sode K, Ootera T, Shirahane M, et al. : Increasing the thermal stability of the water-soluble pyrroloquinoline quinine glucose dehydrogenase by single amino acid replacement, *Enz. Microbiol. Technol.* 26, 491-496, 2000.
- 4) Igafashi S, Okuda J, Ikebukuro K, et al. : Molecular engineering of PQQGDH and its applications, *Arch. Biochem. Biophys.* 428, 52-63, 2004.
- 5) Aoki S, Zhou H. S, Honma I, et al. : Observation of Cytochrome b-562 Adsorption on Gold-Particle Surface by Optical Absorption Measurement, *Surface Rev. and Let.*, 3, 1137-1141, 1996.

好熱菌由来カロテノイド化合物の生体膜安定化効果の研究

大阪府立大学大学院理学系研究科生物科学専攻

原 正 之

Polar carotenoids are known to stabilize lipid bilayer membranes. We investigated the membrane-stabilizing effect of three synthesized polar carotenoids, thermozeaxanthin (TZ), zeaxanthin-glucoside (ZG) and zeaxanthin (Z), using the fluorescent calcein-leakage measurement from the calcein-entrapped liposomes composed of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC). The addition of TZ stabilized the liposomal membranes composed of DPPC at pH values ranging from 4.0 to 10.0. The addition of three carotenoids, TZ, ZG and Z, stabilized the membrane at acidic and neutral pH values ranging from 4.0 to 7.5. The values of leakage were lower at 30 °C and highest at 40 °C and subsequently, gradually decreased at the higher temperature. The addition of TZ and Z stabilized the membranes, whereas, ZG destabilized the membranes at a temperature higher than 50 °C. In addition, the membrane-stabilizing effect of the carotenoids with the calcein-entrapped liposomes composed of lipids extracted from *Thermus thermophilus* were investigated. The addition of TZ resulted in stabilization of the membrane at all ranges of pH values. However, the addition of Z and ZG destabilized the membrane.

1. 緒 言

1・1 好熱菌 *Thermus thermophilus*

温泉等の高温水域に生育する好熱性の細菌類が、常温性のそれらに較べて、なぜ高い耐熱能を持つのかについては、これまでに多くの研究者が興味を持ち、核酸、蛋白質、脂質などの生体分子の熱安定化機構が研究されてきた。*Thermus thermophilus* は 50℃ から 82℃（至適温度は 70℃ から 75℃）で生育する代表的な好熱性細菌であり、グラム陰性・好気性の細菌である。この菌は古細菌または始原菌（archaea）と呼ばれるグループではなく真性細菌（eubacteria）に属している。生育温度だけを較べるならば、さらに高温で生育可能な菌も他に多く存在するが、*T. thermophilus* の利点としては、その発見以来、我が国や米国を中心として多くの研究者が微生物自体やその生産する蛋白質の耐熱性機構を研究するためのモデルとして用いてきたため、すでに多くの学問的知見が蓄積していることが上げられる。遺伝子操作を行うためのベクター系もすでに開発されているので、物質生産に適した組み替え体を作るなど、代謝工学的な研究にも極めて適した細菌であると言える。

1・2 好熱菌とカロテノイド

常温で生育する多くの真性細菌がリン脂質を多く含むの



Studies about the effect of carotenoids from thermophilic bacteria on the stability of biological membranes

Masayuki Hara

Department of Biological Science, Graduate School of Science, Osaka Prefecture University

に対して、*Thermus thermophilus* の脂質組成の特徴としては分岐脂肪酸を含む糖脂質等を含むことや^{1, 2, 3)}、膜中に黄色から橙色のカロテノイド類を含有していることが知られている^{4, 5)}。また、これらの糖脂質やカロテノイド類の含有量が菌の培養温度に依存して変わることなども報告されていることなどから、これらの脂質組成と菌の生体膜の耐熱性との関与が考えられてきた。

一般に長く伸びた共役二重結合を有するカロテノイド類は抗酸化剤として知られており、ラジカル補足剤（radical scavenger）としての働きを持つ場合が多いので、高温域で早く増殖する好熱菌において呼吸などの代謝活動に伴って生じる活性酸素を消去するのに、カロテノイド類が役立っているのではないかという可能性も考えられる。しかし、1995年に Yokoyama 等により本菌から図1に示すような、糖と脂肪酸を結合した特徴的な構造を持つ極性カロテノイドである thermozeaxanthin (TZ) が発見されたことにより、膜貫通型脂質として生体膜の熱安定化に寄与しているのではないかというモデルが提唱され、注目を集めるようになった^{6, 7)}。また、これに先立ち、TZ以外にも幾つかの極性カロテノイドが、膜貫通型脂質としてリベットの様にリン脂質膜に挿入され、細胞膜を安定する効果があるという説が Nakatani 等により提唱されていた⁸⁾。

1・3 カロテノイドの膜安定化効果

我々はこれまでに、様々なリン脂質2分子膜小胞 (liposome) を作製してその性質を明らかにし、さらにはこれらをそのまま、またはハイドロゲルなどを組み合わせて薬剤の徐放に生体材料 (biomaterial) として利用するための技術についての基礎的な研究を行ってきた。以前に、水溶性の蛍光色素 calcein を封入した liposome からの色素の漏出により脂質膜の安定性を評価する実験系を用いて、*T.*

thermophilus の菌体より抽出した TZ が脂質膜を安定化することを、実験的に証明した⁹⁾。TZ の研究を始めた当初は、Hoshino 等が遺伝子工学的に作製した *T. thermophilus* のカロテノイド大量生産株を 70°C 程度の温度で振とう培養し、生産するカロテノイドを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 等で精製、分取して実験に用いていた。しかし、この場合には脂肪酸の鎖長の揃った標品を大量に得ることが難しく、有る程度鎖長のばらついた混合物になりがちであった。今回の実験では脂肪酸の鎖長の揃った TZ¹⁰⁾ を用いて研究を行った¹¹⁾。

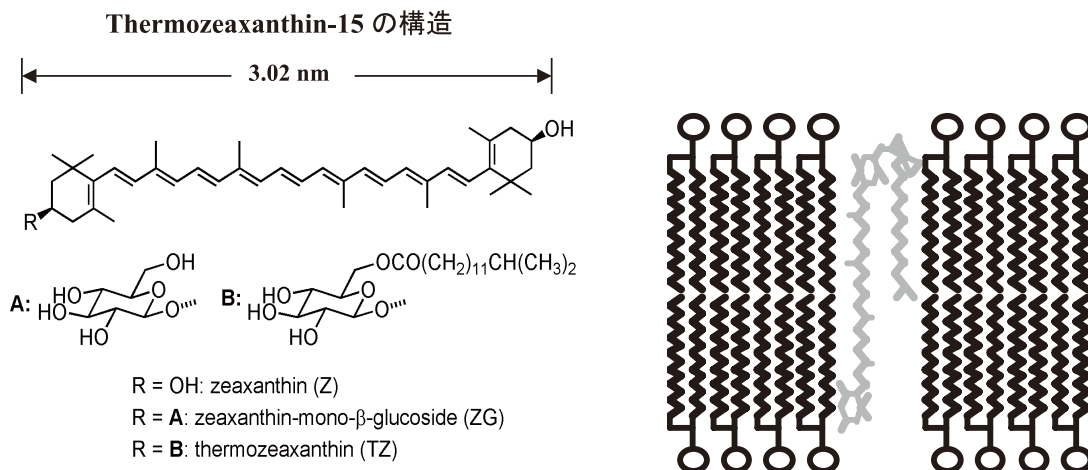
2. 実験

2・1 liposome の調製方法

Yamano 等が有機化学的に合成した thermozeaxanthin (TZ) およびその合成中間体である zeaxanthin (Z)、zeaxanthin-β-glucoside (ZG) を提供頂いて以後の実験に用いた¹⁰⁾。

liposome の調製方法は、以前に報告したものとほぼ同じである⁹⁾。脂質としては dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) を用い、100 mM calcein (pH7.5) を含む liposome の調製を行った。まず水和法と凍結融解操作にて多重膜 liposome (MLV) を作製した後、孔径 100 nm の膜を用いた限外濾過により一枚膜 liposome とし、Sephacryl S-300 column ゲル濾過により外液の calcein を除去して 50 mM Tris HCl (pH7.5) に懸濁された一枚膜 (LUV) の calcein 封入 liposome 溶液を得た。

この方法で得られた一枚膜 liposome の粒径を動的光散乱測定法 (DLS-6000 AS, Othuka Electronics, Japan) で測定した。それぞれ control/liposome : 90.0±33.8 nm、Z/liposome: 1012.4±38.2 nm、ZG/liposome: 127.8±29.8 nm、TZ/liposome : 93.9 + 31.1 となっており、実験試料により多少のばらつきがあるものの、概ね 100 nm 前後の粒径を持っている事が確認された。



発見と構造決定: A. Yokoyama et al., *Tetrahedron Lett.* 36 (1995) 4901-4904.

有機化学合成: Y. Yamano et al., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (2002) 2006-2013.

図1 実験に用いた3種のカロテノイドとTZのリン脂質2分子膜への挿入モデル

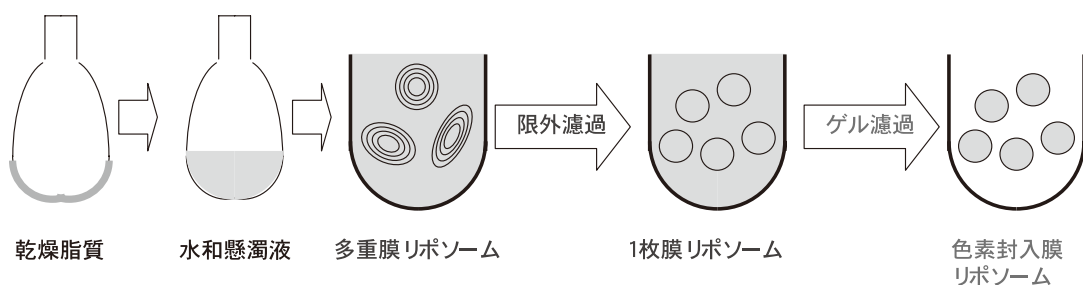


図2 Calcein 封入 DPPC-liposome の調製方法

TZ:DPPC = 1:100 に混合した脂質をナス型フラスコにて減圧乾燥し、100 mM calcein (pH 7.5) 水溶液に懸濁して 10 mg lipid/ml とした。この懸濁液の凍結融解を 5 回行い、フィルター (孔径 100 nm) で限外濾過して粒径を揃えた後 Sephacryl S300 カラムでゲル濾過を行ってリポソーム外液のカルセインを除き、50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 緩衝液に懸濁された Calcein 封入 DPPC-liposome を得た。

2・2 蛍光色素を用いた膜安定性評価

Calcein は本来強力な蛍光 (Ex 488nm, Em 517nm) を発する蛍光色素であるが、高濃度では自己消光して蛍光を発しない。Calcein が liposome の外部に漏出して希釈された場合にのみ蛍光を発するので、Calcein 封入 liposome 懸濁液の蛍光を測定することで liposome 膜を横切る Calcein の漏出量を測定することが可能で、これが膜安定性の指標となる。懸濁液の蛍光強度の初期値を F_0 、ある条件での蛍光強度値を F' 、0.03% (w/v) Triton X-100 を溶液に添加して全ての liposome が溶解した後の封入 calcein 全量に基づく蛍光強度値を F_t とすると、以下の関係式により漏出量を計算できる。

$$\text{漏出量 (\%)} = (F' - F_0) / (F_t - F_0)$$

漏出量の数値が高いほど、liposome 膜が不安定化して色素の漏出が促進されていると解釈できる。Liposome 調製時に TZ をあらかじめ DPPC に対してモル比で 1% 添加しておく、TZ 添加 liposome となるので、非添加の場合と比較して TZ の膜安定化効果を調べることができる。

2・3 好熱菌の脂質

DPPC ではなく *T. thermophilus* 由来の脂質を用いた Calcein 封入 liposome を作製する場合には、Hoshino 等により作製されたカロテノイド欠損株である *T. thermophilus* HB27Crt2 株を 70℃ にて振とう培養し、菌体をリゾチーム処理した後に抽出した粗脂質を用いて、先述の方法と同様に Calcein 封入 liposome を作製した。

3. 結果

3・1 DPPC-liposome

Calcein 封入 DPPC-liposome を用いて様々な pH 条件での calcein 漏出を測定した (図 4 (A) - (E))。図 3 に示

された測定原理によると、漏出した calcein による蛍光強度の経時的な増加のみで、現象は起きないはずであるが、実際には図 4 の (B), (D), (E) 等に見られるように、バックグラウンドレベルの漸次的な減少が起きる場合がある。この原因として、漏出した calcein が希釈された状態では経時的に退色するのではないかと考え、その程度を確認するために calcein 水溶液の蛍光強度の時間経過を測定した (図 4 (F))。

一般に DPPC-liposome 膜の安定性は pH に依存しており、酸性および塩基性 pH では、やや縦軸の数値が大きくなる傾向がみられた。これは脂質の荷電の変化などによる違いと思われる。図 4 の時間経過のグラフでは、測定値の点が control より下にあれば、膜が安定化されていると解釈できることになる。

Z, ZG, TZ の 3 種類のカロテノイドの添加による DPPC-liposome 膜安定化効果の程度を、図 4 の時間経過のグラフより 10 分 (概ね、calcein 漏出の初期速度を表すと考えられる)、および 200 分 (概ね、calcein 漏出の到達定常値を表すと考えられる) における蛍光強度の数値について纏めた結果を表 1 に示す。表 1 では不等号または等号により膜安定化効果の強さの順序を表示してある。これらの結果より、TZ は pH4.0-10.0 の比較的広い pH 領域において膜を安定化し、Z および ZG も少なくとも pH4.0-7.5 の pH 領域では膜安定化効果を示すことが明らかとなった。

次に、Calcein 封入 DPPC-liposome を用いて様々な温度での膜安定化効果を調べた。各温度で 30 分間インキュベーションし、calcein 漏出量を調べた結果を図 5 に示す。DPPC の相転移温度を超えると急に calcein 漏出量が増えること、相転移温度以上ではほぼ同程度であることが判る。これは相転移により脂質の膜の流動性が大きく変化する為と思われる。

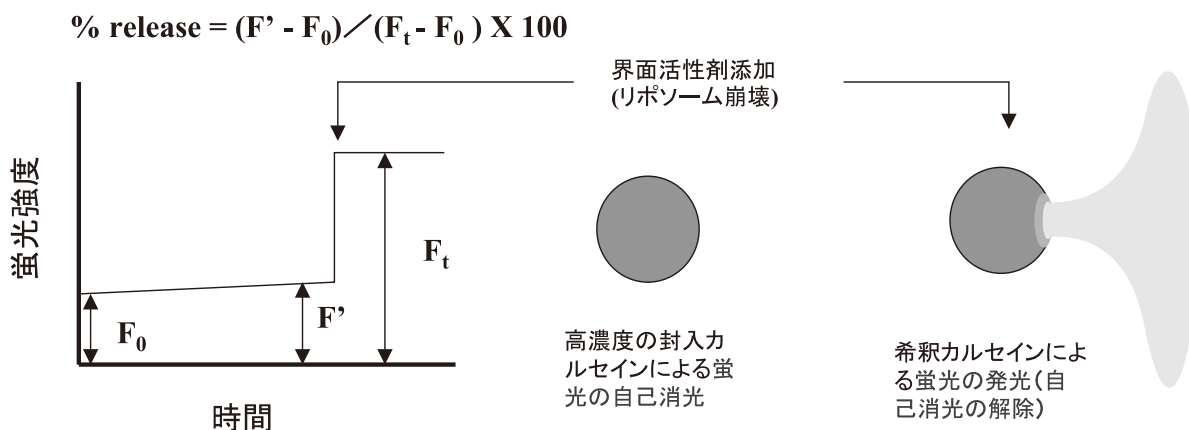


図 3 Calcein 封入 liposome を用いた膜安定性の評価方法の原理

カルセイン封入リポソームを上記の緩衝液に希釈して各種の条件にてインキュベーションした後、カルセインの漏出を蛍光の自己消光解除により測定した (励起波長 488nm 発光波長 517nm)。各試料ごとの封入カルセイン量の違いを補正するために、界面活性剤を添加してリポソームを完全に崩壊させた場合のカルセイン放出量を 100% として放出の程度を表示した。

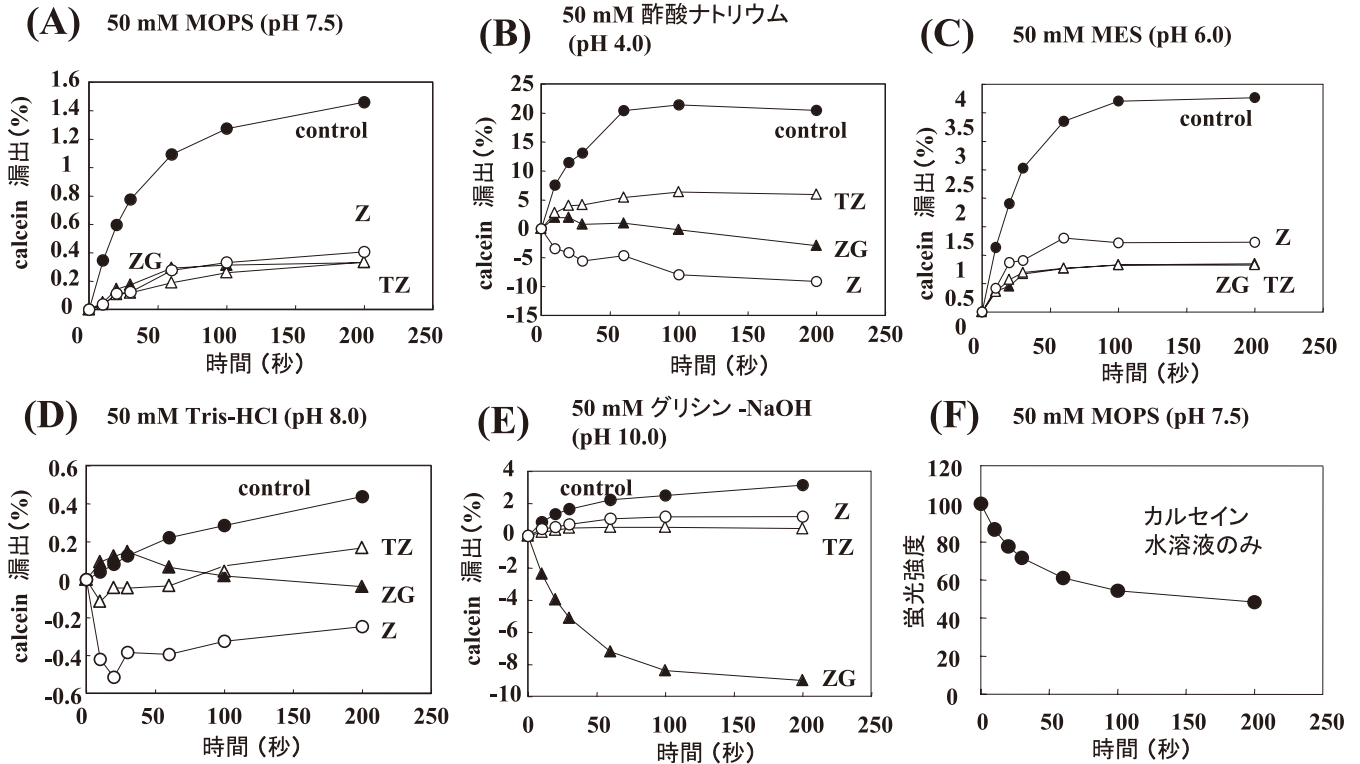


図4 Calcein 封入 DPPC liposome を用いた膜安定性の評価試験の時間経過 (A)-(E)、および希釈後の calcein 自体の蛍光強度の経時変化 (F)。カロテノイドを添加しない control (●)、DPPC に対して Z (○)、ZG (▲)、TZ (△) をそれぞれモル比で 1% 添加した liposome を、25°C で上記の各緩衝液中でインキュベーションし、calcein 漏出を測定した。control に較べて漏出量が少ないほど、膜が安定化されたと推測される。

表1 カロテノイドによる DPPC-liposome 膜安定化効果のまとめ

	50 mM Na-acetate (pH 4.0)	50 mM MES (pH 6.0)
カルセイン漏出量の 順番 (10分後の値)	Z>ZG>TZ>C	TZ>ZG>Z>C
カルセイン漏出量の 順番 (200分後の値)	Z>ZG>TZ>C	TZ>ZG>Z>C
	50 mM Tris-HCl (pH 8.0)	50 mM Glycine/NaOH (pH 10.0)
カルセイン漏出量の 順番 (10分後の値)	Z>TZ>C>ZG	ZG>TZ>Z>C
カルセイン漏出量の 順番 (200分後の値)	Z>ZG>TZ>C	ZG>TZ>Z>C
	50 mM MOPS (pH 7.5)	50 mM Tris-HCl (pH 7.5)
カルセイン漏出量の 順番 (10分後の値)	TZ=Z>ZG>C	TZ>ZG>Z=C
カルセイン漏出量の 順番 (200分後の値)	ZG>TZ>Z>C	TZ>ZG>Z>C

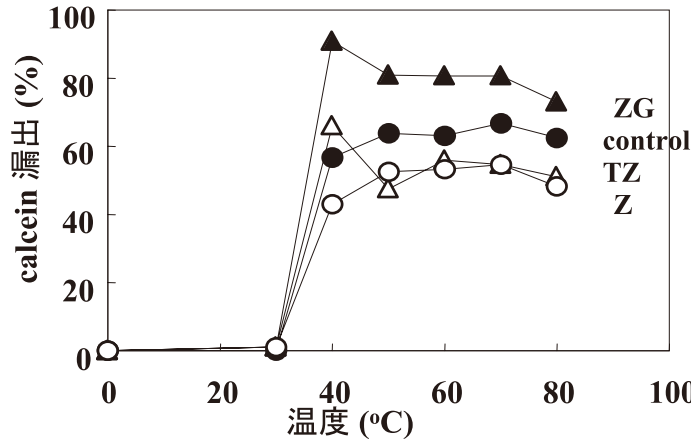


図5 Calcein 封入 DPPC liposome を用いた膜安定性の温度依存性。
 カロテノイドを添加しないcontrol (●)、DPPCに対してZ (○)、ZG (▲)、TZ (△) をそれぞれモル比で1%添加した liposome を、各温度で30分間インキュベーションし、calcein 漏出を測定した。control に較べて漏出量が少ないほど、膜が安定化されたと推測される。DPPCの相転移温度を超えると著しく膜が不安定になる。高温でもTZ = Z > Control > ZGの順番で安定化効果あり。

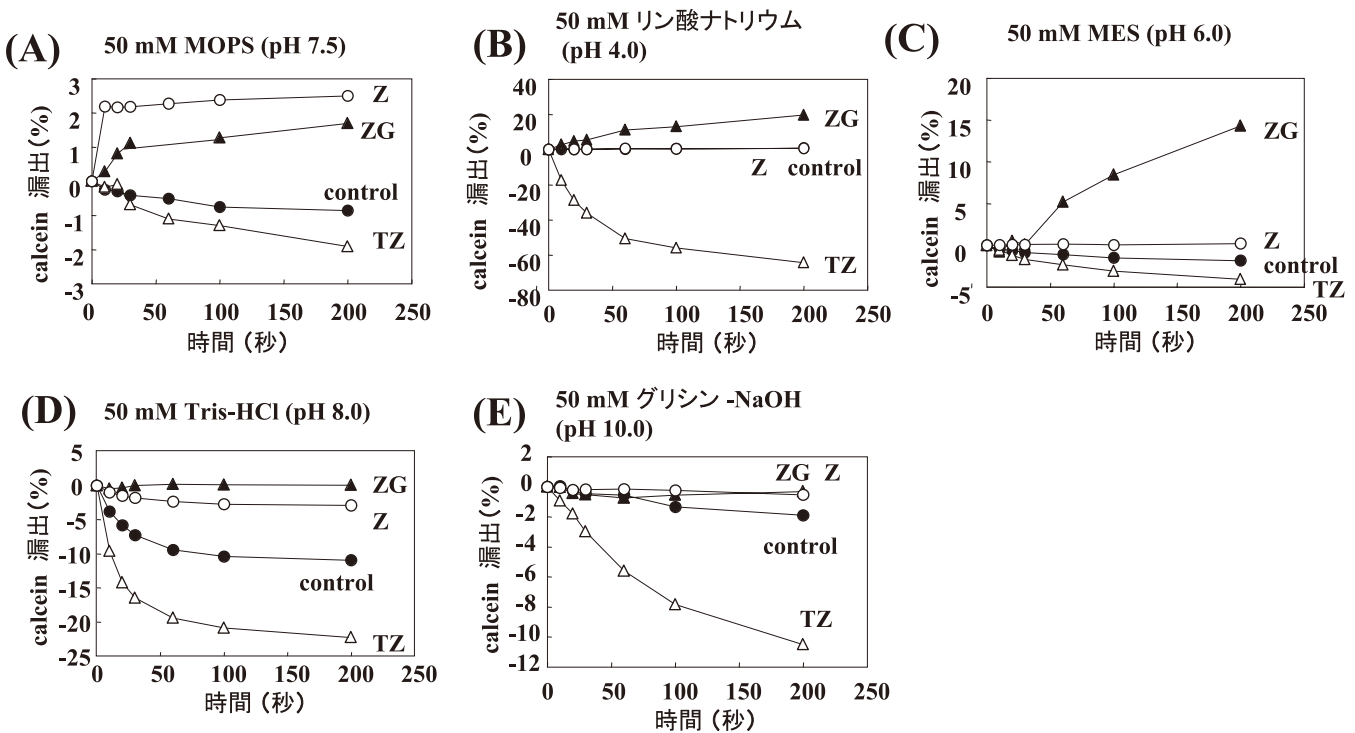


図6 Calcein 封入 *Thermus thermophilus* 脂質 liposome を用いた膜安定性の時間経過 (A)-(E)。
 カロテノイドを添加しないcontrol (●)、脂質に対してZ (○)、ZG (▲)、TZ (△) をそれぞれ概算モル比で1%添加した liposome を、25°Cで上記の各緩衝液中でインキュベーションし、calcein 漏出を測定した。control に較べて漏出量が少ないほど、膜が安定化されたと推測される。膜安定化効果は概ねTZ > Control > Z > ZGの順で、TZは膜を安定化するがZおよびZGは逆に不安定化する傾向が見られた。

3・2 *T. thermophilus* 由来脂質 -liposome

以上の実験は全てDPPC-liposomeを用いて行ったが、*T. thermophilus*は糖脂質などを含むことがすでに報告されているため、同菌の細胞(菌体)から抽出した脂質を用いてTZ等の膜安定化効果を検証しないと本来の役割を検証

したことになるのではないかと批判を受ける可能性もある。このため、*T. thermophilus*から抽出した粗脂質を用いてCalcein封入liposomeを作製し、同様の膜安定性評価を行った結果を図6に示す。DPPC-liposomeの場合とは異なり、TZの添加は全てのpH領域でliposome膜

安定化効果を示すが、ZやZGはその添加により、しばしば逆に膜を不安定化させる傾向が認められた。

4. 考 察

4・1 実験結果の考察

カロテノイド主骨格の両端部にOH基を有する zeaxanthin (Z) 等の極性カロテノイドが膜貫通型脂質として、リン脂質膜の安定化に寄与することは、Nakatani 等により報告されている⁸⁾。また、カロテノイド以外の膜貫通型脂質としては、古細菌(始原菌)由来の脂質が報告された例もある¹²⁾。我々は以前に *T. thermophilus* から抽出した TZ がリン脂質膜を安定化させる効果を持つことを、calcein 封入 liposome を用いて初めて実験的に示したのであるが、今回の研究はさらに膜安定化効果の分子メカニズムを詳細に検討するため TZ だけでなく、Z および ZG の合成標品を用いて実験を行った。

一般にリン脂質からなる liposome 膜の安定性は DPPC 等のような単一組成の脂質よりも大豆、卵黄、大腸菌など天然物から抽出・精製した脂質を用いた liposome の方が高いことが多い⁹⁾。おそらく様々な鎖長の脂肪酸を含む膜の方が、熱的な揺らぎに対して安定なのではないかと思われる。今回の実験では化学合成した TZ に対して脂肪酸の鎖長の揃った DPPC を先ず実験に用いた。天然の PC を用いて calcein 封入 liposome を作成した場合には、カロテノイドを添加しない liposome でも、室温(25℃)で、200分程度の時間ではほとんど calcein の漏出が起らないため、同様の膜安定化試験を行うことが困難であった。

今回の研究で、TZ は DPPC-liposome においても *T. thermophilus* 由来脂質 liposome においても、良好な膜安定化効果を示したが、ZG 等は膜の安定化に効果のある場合と、逆に不安定化させる効果のある場合が明らかになった。この結果はどちらかと言うと意外なものであったが、図1に示した構造式からも判るように、ZG はそもそも疎水性のカロテノイド主骨格の片側の末端にグルコースが付いた構造を持っているので、界面活性剤として作用してもおかしくない構造を有している。このため、脂質膜に対しては界面活性剤として作用し不安定化する場合もあるのかも知れない。

今回の実験では DPPC に対するモル比で1%程度の極めて少量の TZ を脂質に加えただけであるにも関わらず、顕著な liposome 膜安定化効果を示しているため、TZ は図1のモデルに示されたような膜貫通型の脂質として強力な安定化効果を発揮しているものと結論できる。

4・2 TZ の産業への利用の可能性

Liposome は、生体膜を構成する脂質や膜蛋白質の機能や物理化学的な性質を研究するための実験系として生物科

学、生物物理学的研究分野で用いられるほか、患部に必要な薬剤を効率よく投与するための選択的薬物送達系(DDS: drug delivery system)や、薬剤の血液中の滞留時間を延長するための徐放技術(CR: controlled release)の担体として、すでに細胞への遺伝子導入系(非ウイルスベクター)、医薬品(抗ガン剤等)、化粧品(各種の生理活性物質)、などに利用されている。

今回の calcein 封入 liposome のように、水溶性の薬剤を内部に封入して用いることもあるが、水に不溶性の疎水性の薬剤を懸濁させる素材として用いる場合もある。どちらにしても、liposome の安定性は薬剤の患部への到達効率や放出速度を決めるものなので、膜の安定性を制御することは重要な課題である。liposome の安定化技術は、これまでも研究されてきた。天然の脂質を用いて安定な liposome を調整できる脂質を選択するだけでなく、分子設計に基づく特殊な脂質の合成、脂質分子間の化学架橋や、liposome の膜表面に高分子を付加して被覆する安定化方法など、様々な技法が発明されてきている。これらの方法は確かに膜の安定化技術として有効であるが、化合物の安全性については未確認のものも多い。我々が研究対象とした TZ はこれまでも食品に添加されてきた天然のカロテノイド色素と類似の構造を一部持った化合物であり、今後、DDS や CR の素材として医薬品や食品への利用が期待される化合物である。今回の実験では、有機化学的に合成された TZ を実験に用いたが、Hoshino 等により遺伝子組み替え技術を用いた TZ 大量生産株もすでに作られているので、将来的には微生物を用いた大量生産も可能と思われる^{4, 5)}。

5. 総 括

我々は、TZ がその存在菌である *T. thermophilus* 由来脂質 liposome においても、良好な膜安定化効果を示すことを実験的に示した。TZ が天然物由来の安全な膜安定化剤として、各種の liposome に添加され、DDS などに利用されることを期待している。

謝 辞

本研究ならびに関連の研究を遂行するにあたり、財団法人コスメトロジー研究振興財団より研究助成を賜りましたこと、ならびに山野由美子(神戸薬大)、伊藤允好(神戸薬大)、苑輝卿(山東医科大)、三宅淳(産総研)、星野貴行(筑波大)、横山昭裕(東ソー)の各先生を含めた共同研究者の皆様へ御協力頂いたことを、感謝の意を込めて付記させていただきます。

(参考文献)

- 1) Pask-Hughes R.A., Shaw N.: Glycolipids from some extreme thermophilic bacteria belonging to the genus

- Thermus, J. Bacteriol., 149, 54-58, 1982.
- 2) Oshima M., Yamakawa T. : Chemical structure of a novel glycolipid from an extreme thermophilic, *Flavobacterium thermophilum*, Biochemistry, 13, 1140-1146, 1974.
 - 3) Ray P.H., White D.C., Brock T.D. : Effect of growth temperature on the lipid composition of *Thermus aquaticus*, J. Bacteriol., 108, 227-235, 1971.
 - 4) Hoshino T., Yoshino Y., Guevarra E.D., Ishida S., Hiura T., Fujii R., Nakahara T. : Isolation and partial characterization of carotenoid underproducing and overproducing mutants from an extremely thermophilic *Thermus thermophilus* HB27, J. Ferment. Bioeng., 77, 131-136, 1994.
 - 5) Hoshino T., Fujii R., Nakahara T. : Overproduction of carotenoid in *Thermus thermophilus*, J. Ferment. Bioeng. 77, 423-424, 1994.
 - 6) Yokoyama A., Sandmann G., Hoshino T., Adachi K., Sakai M., Shizuri Y. : Thermozeaxanthins, new carotenoid-glycoside-esters from thermophilic eubacterium *Thermus thermophilus*, Tetrahedron Lett. 36, 4901-4904, 1995.
 - 7) Yokoyama A., Shizuri Y., Hoshino T., Sandmann G. : Thermocryptoxanthins: novel intermediates in the carotenoid biosynthetic pathway of *Thermus thermophilus*, Arch. Microbiol. 165, 342-345, 1996.
 - 8) Lazrak, T., Milon A., Wolff G., Albrecht A.M., Mische M., Ourisson G., Nakatani Y. : Comparison of the effects of inserted C40- and C50-terminally dihydroxylated carotenoid on the mechanical properties of various phospholipid vesicles, Biochim. Biophys. Acta 903 (1987) 132 - 141.
 - 9) Hara M., Yuan H., Yang Q., Hoshino T., Yokoyama A., Miyake J. : Stabilization of liposomal membranes by thermozeaxanthins: carotenoid-glucoside esters, Biochim Biophys Acta 1461, 147-154, 1999.
 - 10) Yamano Y., Sakai Y., Hara M., Ito M. : Carotenoids and related polyenes. Part 9.1 Total synthesis of thermozeaxanthin and thermocryptoxanthin and the stabilizing effect of thermozeaxanthin on liposomes, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 2006-2013, 2002.
 - 11) Hara M., Yamano Y., Sakai Y., Kodama E., Hoshino T., Itoh M., Miyake J. : Stabilization of liposomal membranes by carotenoids: Zeaxanthin, xeaxanthin glucoside and thermozeaxanthin, Materials Science and Engineering C 28, 274-279, 2008.
 - 12) Elferink M.G.L., del Wit, J.G., Driessen, A.J.M., Konings, W.N. : Stability and proton-permeability of liposomes composed of archaeal tetraether lipids, 1994, Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes 1193 (2), pp. 247-254

圧電材料基板上のマイクロ流路を用いた 単分散多相エマルジョン生成法の開発

東京工業大学精密工学研究所

西 迫 貴 志

Monodisperse double emulsions (also referred to as multiple emulsions) have numerous potential applications in various fields, such as cosmetics, pharmaceuticals, food, and colloid science. In conventional two-step mixing technique, however, it is difficult to produce monodisperse double emulsions. Here, we propose a novel microfluidic technique to produce monodisperse double emulsions by applying surface acoustic wave (SAW) streaming. The microfluidic device consists of two planar substrates: a piezoelectric substrate with interdigital transducers (IDTs), and a polymethyl methacrylate (PMMA) plate with microfabricated grooves. The IDTs were fabricated on a planar piezoelectric (LiNbO_3) substrate by conventional lithographical technique. The microgrooves on the PMMA substrate were fabricated by mechanical machining. The microchannel geometry consists of a Y-shaped junction to infuse aqueous and organic phases and to generate a water-in-oil (W/O) emulsion by SAW, and a sheath-flow geometry to form water-in-oil-in-water (W/O/W) double emulsions by shear-rupturing mechanism. First, by generating SAW, we could produce polydisperse W/O emulsion droplets of 1-10 μm in diameter at the Y-junction. Then, at the sheath-flow junction, organic droplets encapsulating fine aqueous droplets (i.e., W/O/W emulsion droplets) could be reproducibly formed in the external aqueous stream. The breakup rate was approximately 200 drops / s^{-1} . The produced W/O/W droplets were highly monodisperse, with a mean diameter of 150 μm and a coefficient of variation (CV) below 5%.

1. 緒 言

これまで、コスメトロジーに関する分野¹⁻⁵⁾に限らず、医学、薬学、食品科学、コロイド科学等を含めた幅広い分野において、多相エマルジョン(図1)の潜在的応用事例について数多くの研究が成されてきた。にもかかわらず、実際に実用化された事例は数少ないと言える。こうした現状の背景としては、従来技術(二段階攪拌法、図2)では、液滴サイズや内包率が高精度に制御された多相エマルジョンを簡便に調製できなかったという事情が挙げられる。特に、サイズのばらつき(多分散性)に由来する多相エマルジョンの不安定性は、実用化における最も大きな障害であると考えられる。

一方、筆者は近年、マイクロ流路の二段階分岐構造を用いた単分散多相エマルジョン生成法を開発した^{6, 7)}。この手法は、外部液滴と内部液滴をともに単分散状に調製できるほか、内包液滴数を精密に制御できるという長所を有する。しかし本手法には、(a) 流路壁面の局所的な化学修飾が必要であるため装置作製が難しい、(b) 流路の目詰まりや圧力損失の増大といった制限から、1~数 μm の内包滴の生成が困難、といった課題があった。

そこで本研究では、弾性表面波(Surface Acoustic Wave, SAW)の機械振動とマイクロ流路の分岐構造を組み合わせることで単分散多相エマルジョンを生成する手法を提案する。弾性表面波とは基板表面を伝播する超音波振動のひとつであり、圧電材料基板上に配置した櫛型電極(interdigital transducer, IDT)に高周波電圧を印加することで発生させることができる。現在、弾性表面波デバイスは通信用の電子回路素子として広く普及しているが、その一方で、霧化⁸⁻¹⁰⁾、微小液滴や微小物体の搬送¹¹⁻¹⁵⁾、液相の混合^{16, 17)}等、微小液体のハンドリング方法に関する数多くの研究事例が近年報告されている。図3に、water-in-oil-in-water (W/O/W)型の多相エマルジョンを例として、本研究で提案する技術の概要を示す。本技術における多相エマルジョン生成手順は、以下の(1)~(4)から構成される：

- (1) IDTを配置した圧電基板とマイクロ流路基板を図3のように貼り合わせる。
- (2) Y字路に内水相と有機相を導入し、低レイノルズ数($\text{Re} \ll 1$)の二相流を形成する。
- (3) IDTへ高周波電圧を印加してSAWを放射させて二相流に作用させ、W/Oエマルジョンを得る。
- (4) 下流部の分岐路で外水相を合流させて分散相をせん断し、単分散W/O/W液滴を連続的に得る。

本研究課題では、上記の手法により、内包滴の平均径が1-10 μm 程度であり、且つ外部液滴径の変動係数(=標準偏差÷平均径, CV値)が5%以下である、単分散多相エマルジョンの調製を目標とした。



Preparation of monodisperse double emulsions in microfluidic channels on a piezoelectric substrate

Takasi Nisisako

Precision and Intelligence Laboratory,
Tokyo Institute of Technology

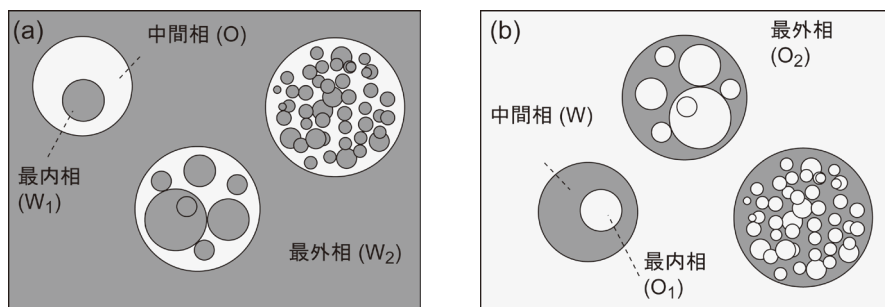


図1 多相エマルション概念図. (a) water-in-oil-in-water (W/O/W) 型. (b) oil-in-water-in-oil (O/W/O) 型.

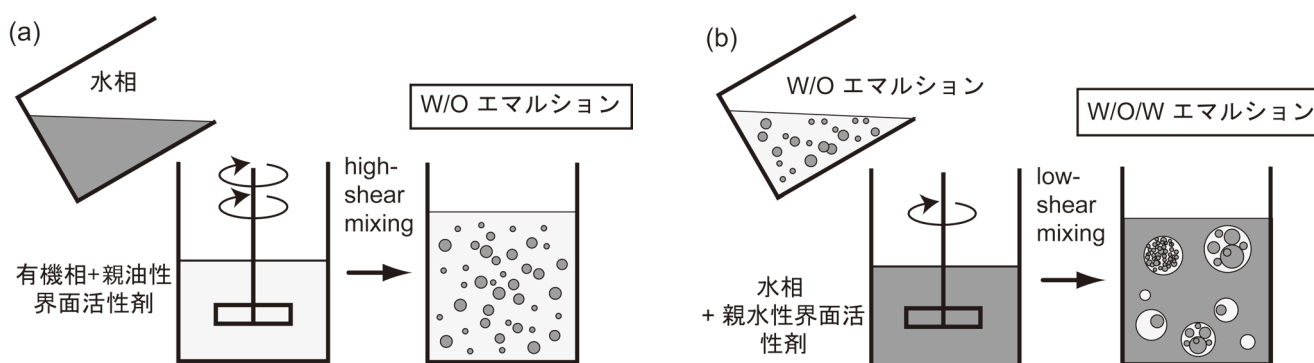


図2 二段階攪拌による多相エマルション生成法の概念図.

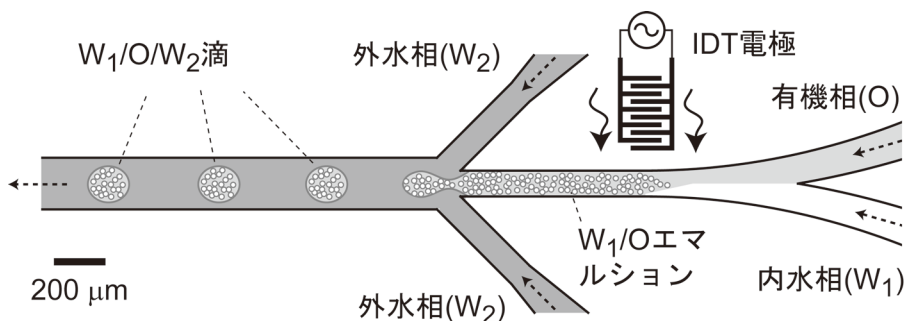


図3 弾性表面波 (SAW) を用いた多相エマルション生成法の概念図.

2. 実験

2・1 IDT 電極の作成

圧電材料基板として 128° Y カットのニオブ酸リチウム (LiNbO_3) (伝播方向: X 軸方向, 厚さ 1.0 mm, 山寿セラミックス) 基板を用い, 表面にフォトリソグラフィにより 10 対の IDT を作成した (図 4). この IDT に交流電圧を印加することにより, 基板表面に弾性表面波の一種であるレイリー波を励振, 電波させることができる. 電極サイズは, 電極幅 0.2 mm, 電極間距離 0.2 mm, 電極交差幅 4 mm とした. 電極はスパッタリングにて Ti を 100 nm, Au を 100 nm を順に堆積させることで作製した.

2・2 マイクロ流路加工

アクリル樹脂 (PMMA) 基板上に, エンドミル (刃径: 100 μm) を用いた機械加工によってマイクロ流路の分岐構造を作成した. 加工溝の断面は矩形状であり, 流路の幅は最小部で 100 μm , 深さは一様に 100 μm とした. 加工溝の密封は透明粘着テープによって行い, IDT 電極を作成した圧電基板と互いに貼り合せた状態で使用した.

2・3 材料

W/O/W エマルションの内水相としてイオン交換水 (18.0 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$), 中間相としてデカン (和光純薬工業) に脂溶性界面活性剤 (CR-310, 阪本薬品工業) を 1.0 wt%

添加したものを、外水相として超純水にポリビニルアルコール (PVA) を 2.0 wt% 添加したものをを用いた。

2・4 その他の機材

IDT への高周波電圧の印加には、RF 発生源であるアマチュア無線機 (IC-703, アイコム) を使用した。スペクトラムアナライザ (U3751, アドバンテスト) を用いて SAW 基板の周波数特性を測定し、その結果から駆動周波数として主に 50MHz を選択した。

マイクロ流路内の観察は、光学式顕微鏡 (BX-51, オリパス) に高速度ビデオカメラ (フォトロン, Fastcam-1024PCI) を組み合わせて行った。流路内への各液体の送液および流量制御にはシリンジポンプ (KDS200, KD Scientific) およびガラスシリンジ (Hamilton) を組み合わせて用いた。生成液滴径の測定は、デジタルデータの画像処理によって行った。

3. 結果

3・1 W/O/W 多相エマルションの生成

図 5 に、SAW による二液混合とマイクロ流路分岐構造での液滴生成を組み合わせた W/O/W エマルション生成の様子を示す。まず印加電圧を 25V_{pp} にし、内水相と中間相の流量をともに 0.5mL h⁻¹ としたところ、Y 字路近傍で内水相と中間相が粗く混合し、直径 10–150μm 程度でばらつきの大きい水滴が有機相中に生成される様子が観察された。この状態で 2つの外水相流の流量をともに 4.0mL h⁻¹ としたところ、合流箇所にて、水滴を内包した有機相滴が外

水相流中に高速で連続生成される様子が観察された (図 5a)。高速度ビデオカメラによる映像で確認したところ、液滴生成周期は毎秒 200 個程度であった。ただし内水相液滴サイズのばらつきが大きく、且つ分岐路への供給が不規則に行われたため、内包液滴個数にも大きなばらつきがあった。

印加電圧を 35V_{pp} とした際の W/O/W 液滴生成の様子を図 5b に示す。印加電圧を上昇させることでより強力な SAW を発生させ、より径の小さい 1–10μm 程度の W/O エマルション滴が生成される様子を確認することができた。ただし、SAW によるミキシングは連続的ではなく間欠的に生じたため、W/O エマルションに密な部分と疎な部分が生じる様子が観察された。下流部の液滴生成地点では外水相流中に毎秒 200 個程度の速度で W/O/W エマルション滴が連続生成される様子を確認することができた。ただし、生成される W/O/W 液滴には、内包率のばらつきが観察された。

3・2 生成された W/O/W エマルション滴

図 6a に生成された W/O/W 多相エマルションの顕微鏡写真を示す。外部液滴サイズのほぼ均一な W/O/W 液滴が得られていることがわかる。外部液滴の平均径は約 149 μm, CV 値は 4.2% であった (図 6b)。一方、内包されている水滴のサイズは直径 1 μm 以下から 10 μm 程度の間でばらついており、多分散状であった。さらに、内水相と中間相の比率が 1:1 になるように流量条件を設定したものの、外部液滴によっては水滴をあまり含まず明らかに内水



図 4 作成した IDT 電極の顕微鏡写真。

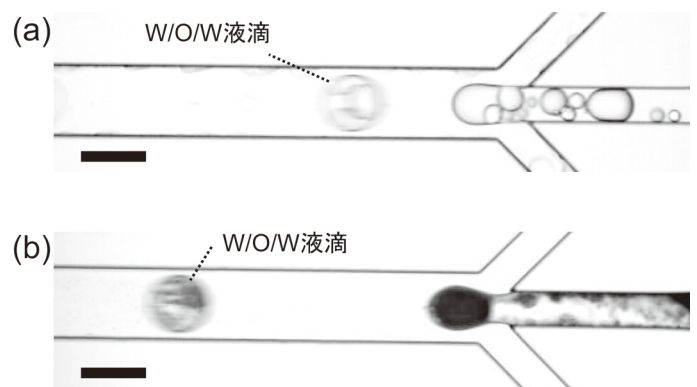


図 5 W/O/W エマルション生成の様子. (a) 印加電圧 25V_{pp} の場合. (b) 印加電圧 35V_{pp} の場合. 流量条件は、内水相と中間相がともに 0.5 mL h⁻¹, 外水相が 8.0 mL h⁻¹ (4.0 mL h⁻¹ × 2). スケールバーは 200μm.

相の体積分率が50%を下回るものも観察され、各外部液滴の水滴内包率には大きなばらつきがあった。なお、生成したエマルションを1時間程度放置して後に観察したところ、合一による多分散化は確認されず、単分散性を保っていた。

4. 考 察

印加電圧が小さい場合、サイズおよびばらつきの大きいW/Oエマルションが生成されたが、印加電圧を上昇させることで、これを改善することが可能であった。しかし印加電圧を上昇させるとIDT電極周囲の温度上昇につながり、これによるマイクロ流路の変形、破損や液体材料成分の変性等が懸念される。この問題を解決するためには、SAW励振のための入力波を単純なサイン波ではなく、高周波と低周波の2つを組み合わせたものにする（パースト駆動）こと、およびペルチェ素子等の冷却機構を装置に組み込むことが有効であると予想される。また、印加電圧を上昇させた場合においてもW/Oエマルションに疎、密な部分が生じたが、これはSAWによるミキシングが連続的ではなく間欠的で不安定であったためと考えられる。これを改善するには、SAW励振の入力波の条件検討とともに、マイクロ流路内にPassiveな混合を行える構造を設けることも有効と考えられる。

W/O/Wエマルションの外部液滴に関しては、CV値4%程度の液滴径分布を確認することができた。このCV値は、既存の多相エマルション生成法による値（数十%）に比べると格段に良い値であり、生成物は十分に単分散であ

ると言える。しかしながら一方では、マイクロ流路分岐構造を用いた液滴生成法で一般的なCV値（1 - 3%）に比べると、やや大きな値となっている。これは、SAWによって生成されてマイクロ流路分岐に供給されるW/Oエマルションの濃度が流れの中で一様ではなく、そのため流れに見かけ上の粘度のむらが生じ、外部液滴の生成をやや不安定にしたためと考えられる。

5. 総 括

以上のように、弾性表面波による二液体の混合技術と、マイクロ流路の分岐構造を用いた液滴生成法を組み合わせ、単分散多相エマルションの生成が可能であることを明らかにした。本研究の手法では、マイクロ流路の二段分岐構造を用いた単分散多相エマルション生成法に比べ、容易に内包液滴を著しく小さくすることができ、また流路内の表面処理も要さないという長所がある。また、本手法により生成される多相エマルションは単分散性に優れるため、従来手法による多分散の生成物に比べて、経時安定性の大幅な改善が見込まれる。また本手法では、外部液滴サイズ、内部液滴サイズ、および内包率を容易且つ高精度に制御できるため、不安定薬剤の安定化、内包成分の徐放特性、経時安定性やレオロジー特性等を評価するためのモデル系の調製手段としても有効と考えられる。

今後、諸条件の検討により、SAW発生における発熱や安定性の問題を解決することで、より簡便な多相エマルション生成法として本技術が利用可能になることが期待される。また、現状の装置では1流路素子での生産量は最大で

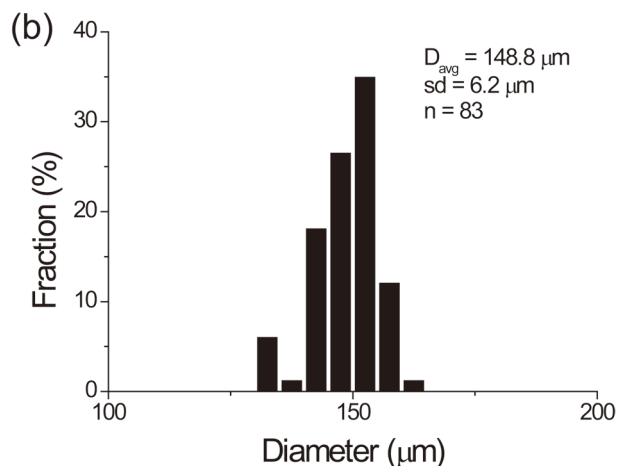
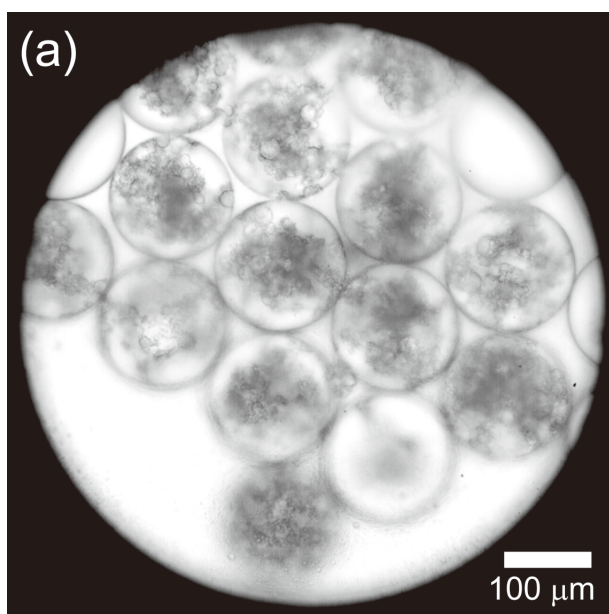


図6 生成されたW/O/W多相エマルション滴と液滴径分布。(a)W/O/Wエマルション滴の顕微鏡写真。生成流量条件は内水相と中間相がともに 0.5 mL h^{-1} 、外水相が 8.0 mL h^{-1} ($4.0 \text{ mL h}^{-1} \times 2$)。(b)外部液滴径分布。平均径 $149 \mu\text{m}$ 、CV値4.2%。

1 g/h 程度にすぎないため、産業界における大量生産の要望に応えるためには生産量の大幅なスケールアップが求められる。これには、リソグラフィ技術の利用による、流路および電極の集積化が有効であると考えられる。たとえば 100 - 1000 本の流路の集積化により数百 g/h ~ 数 kg/h の生産量が見込まれるが、この生産量は数~数十トン/年の生産量に相当し、パイロットプラント用装置として十分なスループットであると考えられる。なお現時点で、流路の集積化によるエマルション生成のスケールアップに関しては実証済みである¹⁸⁾。今後、電極を集積化した圧電基板への 100 - 200 流路の配置により、上記の生産量を達成することが可能と考えられる。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、ご支援をいただきました財団法人コスメトロジー研究振興財団に深く感謝いたします。

(引用文献)

- 1) Bonina F, Bader S, Montenegro L, et al., : Three phase emulsions for controlled delivery in the cosmetic field, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 14, 65-74, 1992.
- 2) Yoshida K, Sekine T, Matsuzaki F, et al., : Stability of vitamin A in oil-in-water-in-oil-type multiple emulsions, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76, 195-200, 1999.
- 3) Sekine T, Yoshida K, Matsuzaki F, et al., : A novel method for preparing oil-in-water-in-oil type multiple emulsions using organophilic montmorillonite clay mineral, *J. Surfactants Deterg.*, 2, 309-315, 1999.
- 4) Miyazawa K, Yajima I, Kaneda I, Yanaki T., : Preparation of a new soft capsule for cosmetics, *J. Cosmet. Sci.*, 51, 239-252, 2000.
- 5) 関根知子, : 第3章 マルチプルエマルションの調製法と特徴, 角田光雄監修: 機能性エマルションの技術と評価, シーエムシー出版, 東京, 34-45, 2002.
- 6) Okushima S, Nisisako T, Torii T, Higuchi T, : Controlled production of monodisperse double emulsions by two-step droplet breakup in microfluidic devices, *Langmuir*, 20, 9905-9908, 2004.
- 7) Nisisako T, Okushima S, Torii T, : Controlled formation of monodisperse double emulsions in a multiple-phase microfluidic system, *Soft Matter*, 1, 23-27, 2005.
- 8) Kurosawa M, Watanabe T, Futami A, Higuchi T, : Surface acoustic wave atomizer, *Sens. Actuator A-Phys.*, 50, 69-74, 1995.
- 9) Chono K, Shimizu N, Matsui Y, et al., : Development of novel atomization system based on SAW streaming, *Jpn J. Appl. Phys.*, 43, 2987-2991, 2004.
- 10) Kim JW, Yamagata Y, Takasaki M, et al., : A device for fabricating protein chips by using a surface acoustic wave atomizer and electrostatic deposition, *Sens. Actuator B-Chem.*, 107, 535-545, 2005.
- 11) Wixforth A, Strobl CJ, Gauer C, et al., Acoustic manipulation of small droplets, *Anal. Bioanal. Chem.*, 379, 982-991, 2004.
- 12) Guttenberg Z, Müller H, Habermüller H, et al., : Planar chip device for PCR and hybridization with surface acoustic wave pump, *Lab Chip*, 5, 308-317, 2005.
- 13) Yamamoto A, Nishimura M, Ooishi Y, et al., : Atomization and stirring of droplets using surface acoustic wave for integrated droplet manipulation, *J. Robotics Mechatronics*, 18, 146-152, 2006.
- 14) Renaudin A, Tabourier P, Zhang V, et al., : SAW nanopump for handling droplets in view of biological applications, *Sens. Actuators B-Chem.*, 113, 389-397, 2006.
- 15) Smorodin T, Beierlein U, Ebbecke J, Wixforth A, : Surface-acoustic-wave-enhanced alignment of thiolated carbon nanotubes on gold electrodes, *Small*, 1, 1188-1190, 2005.
- 16) Sritharan K, Strobl CJ, Schneider MF, et al., : Acoustic mixing at low Reynold' s numbers, *Appl. Phys. Lett.*, 88, 054102, 2006.
- 17) Guttenberg Z, Rathgeber A, Keller S, et al., : Flow profiling of a surface-acoustic-wave nanopump, *Phys. Rev. E*, 70, 056311, 2004.
- 18) Nisisako T, Torii T, : Microfluidic large-scale integration on a chip for mass production of monodisperse droplets and particles, *Lab Chip*, 7, 287-293, 2008.

II. 生体作用、安全性に関する分野

プロスタグランジンD2受容体を標的とした 皮膚アレルギー炎症治療法開発

東京医科歯科大学大学院皮膚科学分野

佐藤 貴浩

Biological activities of prostaglandin D2 (PGD2) are thought to be mediated by the classical DP receptor and CRTH2 (chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells). In the present study, to examine the role of PGD2-CRTH2 interaction in development of allergic inflammation, we generated mice that contain a targeted disruption of the CRTH2 gene. We used these mice to characterize chronic cutaneous inflammatory processes, including IgE-mediated very-late-phase responses and chronic contact hypersensitivity induced by repeated hapten application. The present findings indicate that IgE-mediated cutaneous responses are dependent on PGD2. Ear swelling responses were suppressed by administration of HQL-79, which is a PGD synthase inhibitor. CRTH2-deficient mice failed to develop IgE-induced very-late-phase cutaneous responses, which are histologically characterized by a decrease in infiltrative lymphocytes, eosinophils and basophils, associated with inhibited production of MDC and RANTES. However, local production of IL-4 and IFN γ was not affected by lack of CRTH2. In chronic contact hypersensitivity models, CRTH2 deficiency also resulted in diminished skin responses and serum IgE production. These findings indicate that PGD2 signaling via the CRTH2 receptor plays important roles in IgE-mediated cutaneous responses and chronic contact hypersensitivity reactions. CRTH2 may represent a novel therapeutic target for the treatment of chronic allergic skin inflammation, such as atopic dermatitis.

1. 緒言

PGD2は主に肥満細胞から分泌され、血管拡張作用や気管支収縮作用などの生理活性をもつ物質として知られる。またかねてより炎症反応においても何らかの役割を果たす可能性のあることが示唆されてきていた。最近になりPGD合成酵素を恒常的に発現するマウスにおいて気管支喘息反応の増強や好酸球浸潤など、いわゆるTh2型反応の亢進のみられることがわかり¹⁾、アレルギー性炎症におけるPGD2の役割があらためて大きな注目を集めるようになってきている。

PGD2の受容体として古くからDP受容体が知られている。そしてDP受容体の欠損マウスでは気管支喘息反応が弱まるとされる²⁾。一方最近になってもう一つ受容体としてCRTH2 (chemoattractant receptor homologous molecule expressed on Th2 cells) が知られるようになった。これは当初、Th2細胞に特異的に発現される分子としてクローニングされたものであるが、その後、好酸球や好塩基球などの表面にも発現していることがわかり、さらにPGD2の受容体として機能し、細胞の遊走や活性化に関わることが明らかにされた³⁾。今回の研究は、PGD2またはそれらの受容体の慢性アレルギー性皮膚反応における

役割を解析し、これらを標的とした治療法を開発、検討することを主な目的としている。

アレルギー性皮膚炎として知られる代表的な皮膚疾患はアトピー性皮膚炎である。そこで今回はマウスモデルとしてIgE依存性皮膚反応とハプテン繰り返し塗布による慢性接触過敏反応を選び検討を加えた。

2. 実験

2. 1 CRTH2欠損マウスの作成

CRTH2欠損マウスは図1に示す方法で作成した。その後BALB/cマウスと10代以上交配して用いた。

2. 2 IgE依存性皮膚反応の誘導

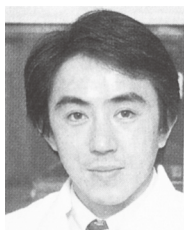
マウス耳介皮下に抗dinitrophenyl (DNP) 特異IgE抗体を投与 (1.25 μ g)。その翌日に0.5%のジニトロフルオロベンゼン (DNFB) を塗布 (20 μ l/耳介) して、その後経時的に耳介腫脹を測定した。

2. 3 慢性接触過敏反応の誘導

マウス剃毛腹部に5%トリニトロクロロベンゼン (TNCB) を塗布して感作した。そして5日後に1% TNCBを耳介に塗布して惹起を行った。その後惹起を2日ごとに繰り返し25日目までおこなった。

2. 4 浸潤細胞数の測定

耳介皮膚の浸潤細胞は組織切片をギムザ染色し、光学顕微鏡下においてカウントした。また好塩基球の測定は皮膚組織をcollagenase IIIで処理後、浸潤細胞を回収。FITC標識抗Fc ϵ R1抗体、R-PE標識抗c-kit抗体、PE-Cy5.5標



Therapeutic approach for allergic skin diseases via blocking prostaglandin D2 receptors

Takahiro Satoh

Department of Dermatology Graduate School, Tokyo Medical and Dental University

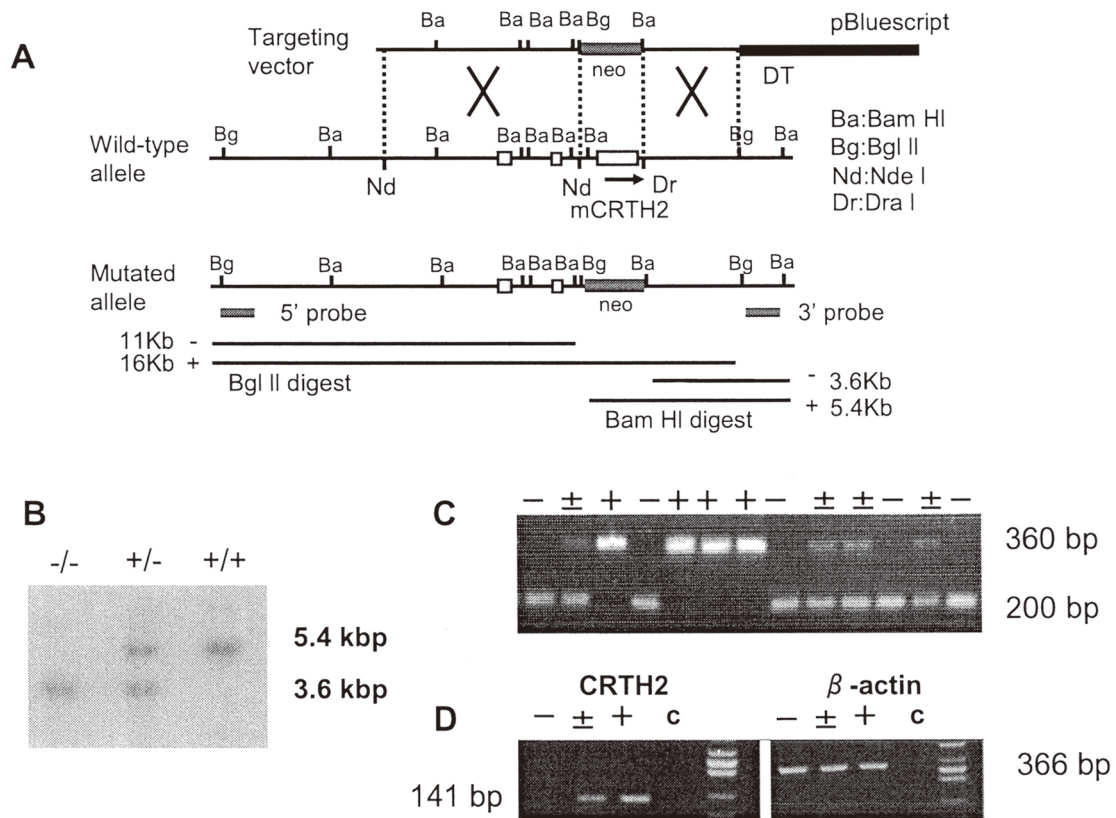


図 1

識抗 Gr-1 抗体にて染色してフローサイトメトリーにて観察。FcεRI (+), c-kit (-), Gr-1 (-) 細胞を好塩基球としてカウントした。

2. 5 サイトカイン・ケモカインの測定

耳介皮膚を 0.1% Tween 20 含有 PBS を用いて粉碎しホモゲネートを作成。15,000g で 10 分遠心後に上清を回収。それぞれにおけるサイトカイン・ケモカインを ELISA 法にて測定した。

3 結果

3. 1 CRTH2 欠損マウスにおける IgE 依存性皮膚反応

まず、CRTH2 の *in vivo* における役割を IgE 依存性皮膚反応を用いて検討した。その結果、皮膚反応の顕著な減弱が確認された (図 2 A,B)。また浸潤細胞の変化を検討したところリンパ球、好中球、好酸球、肥満細胞のいずれもが CRTH2 の欠損により減少した (図 2 C)。さらに興味深いことに IgE 依存性の第 III 相反応の成立に必須とされる好塩基球⁴⁾ の浸潤も減少していた (図 2 D)。

次に局所におけるサイトカイン・ケモカインの産生量を測定した。その結果、CRTH2 欠損マウスにおいては MDC, RANTES, TARC の産生が少ないことがわかった。

その一方、IL-4, IFN- γ , eotaxin は CRTH2 欠損の影響を受けなかった (図 3)。

3. 2 血球型 PGD 合成酵素 (H-PGDS) 抑制薬の効果

CRTH2 欠損において IgE 依存性皮膚反応が減弱していたことから、PGD2 の合成にかかわる酵素 (H-PGDS) の抑制薬 (HQL-79) がこの反応に対して治療効果をもたらすか否かを検討した。その結果 IgE 依存性皮膚反応は HQL-79 の経口投与により著明に抑制された (図 4 A)。

3. 3 CRTH2 拮抗薬の効果の検討

PGDS 抑制薬の効果が CRTH2 受容体を介したものであることを確認するため、CRTH2 拮抗薬であるラマトロバンの投与効果を観察した。その結果、IgE 依存性皮膚反応は CRTH2 欠損マウスにおいてみられたように減弱していた (図 4 B)。

3. 4 CRTH2 欠損マウスにおける慢性接触過敏反応

アトピー性皮膚炎にみられる慢性皮膚反応のもう一つのモデルである慢性接触過敏反応の変化を CRTH2 欠損マウスを用いて観察した。慢性接触過敏反応は 5% TNCB にて感作後、1% TNCB による惹起を隔日で繰り返すことに

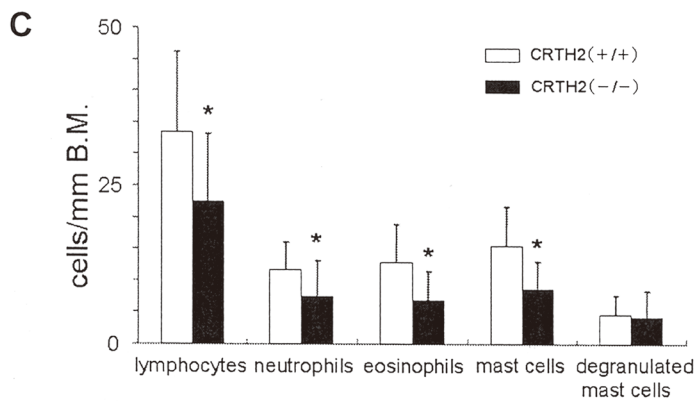
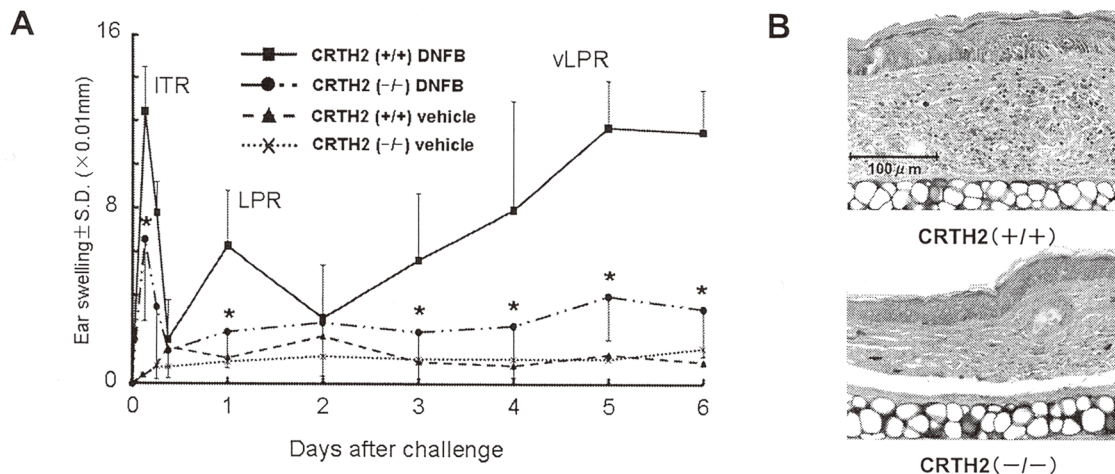
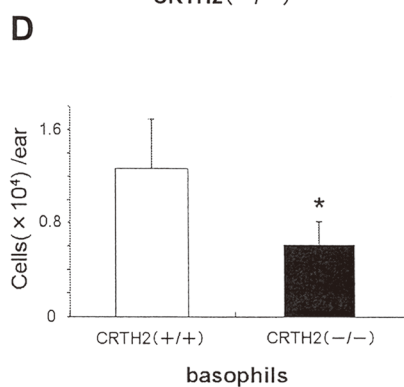


図 2



□ CRTH2 (+/+)
 ■ CRTH2 (-/-)

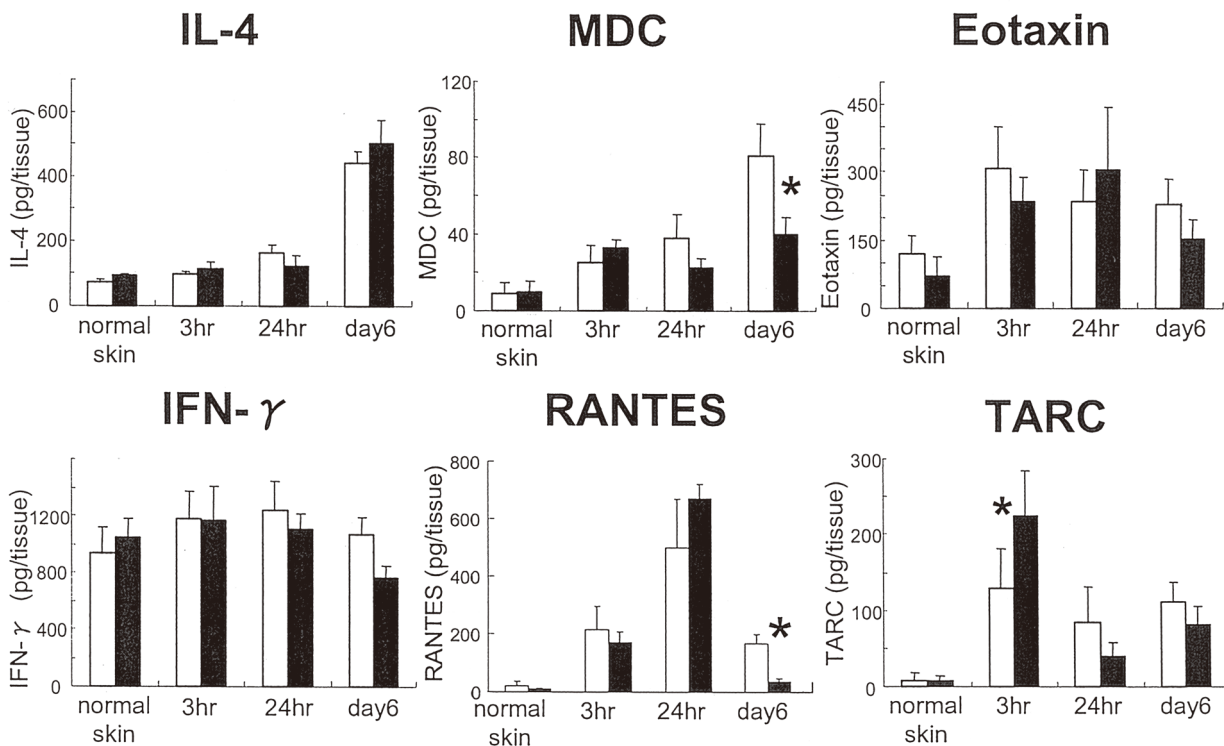


図 3

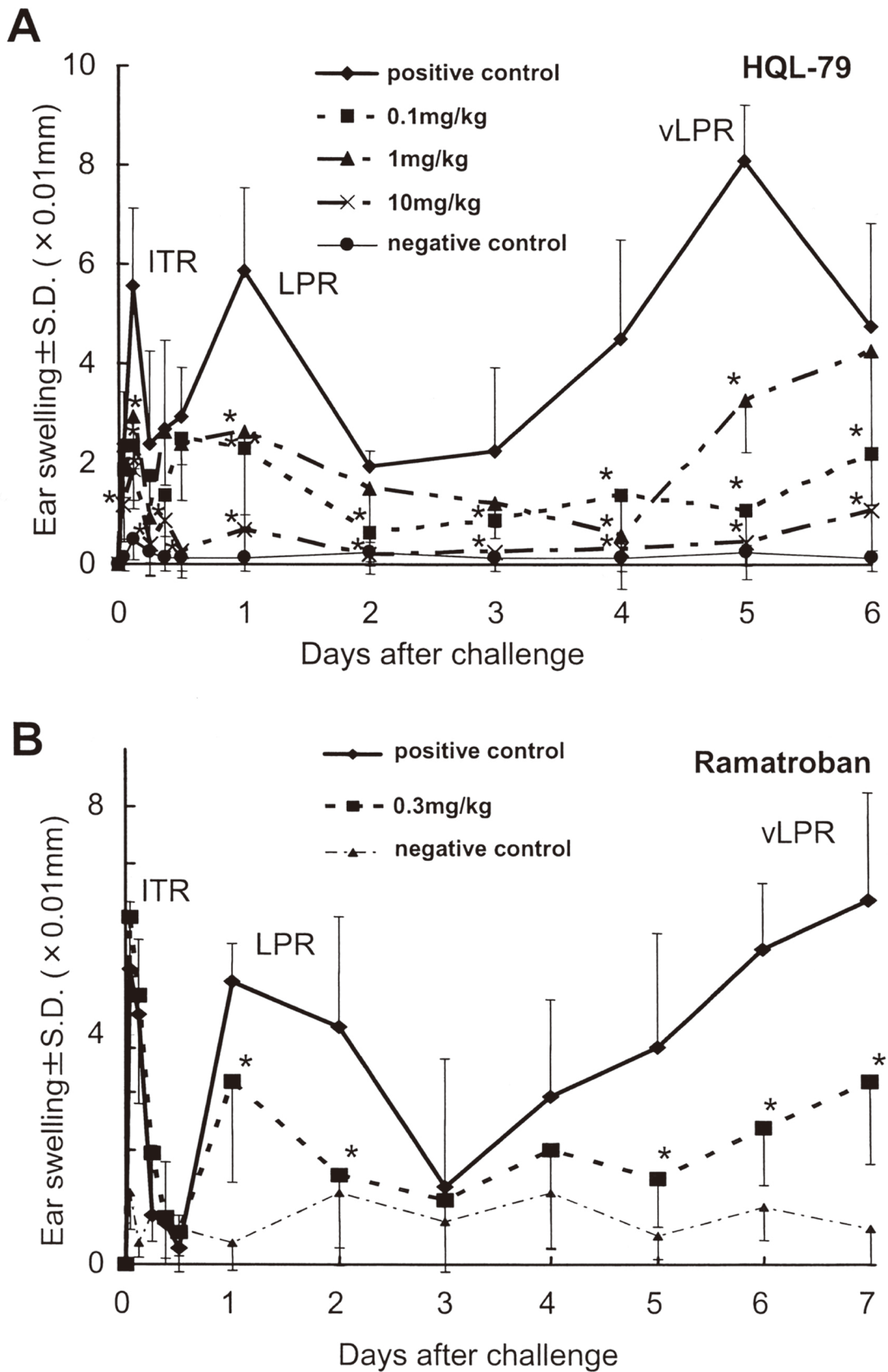


図4

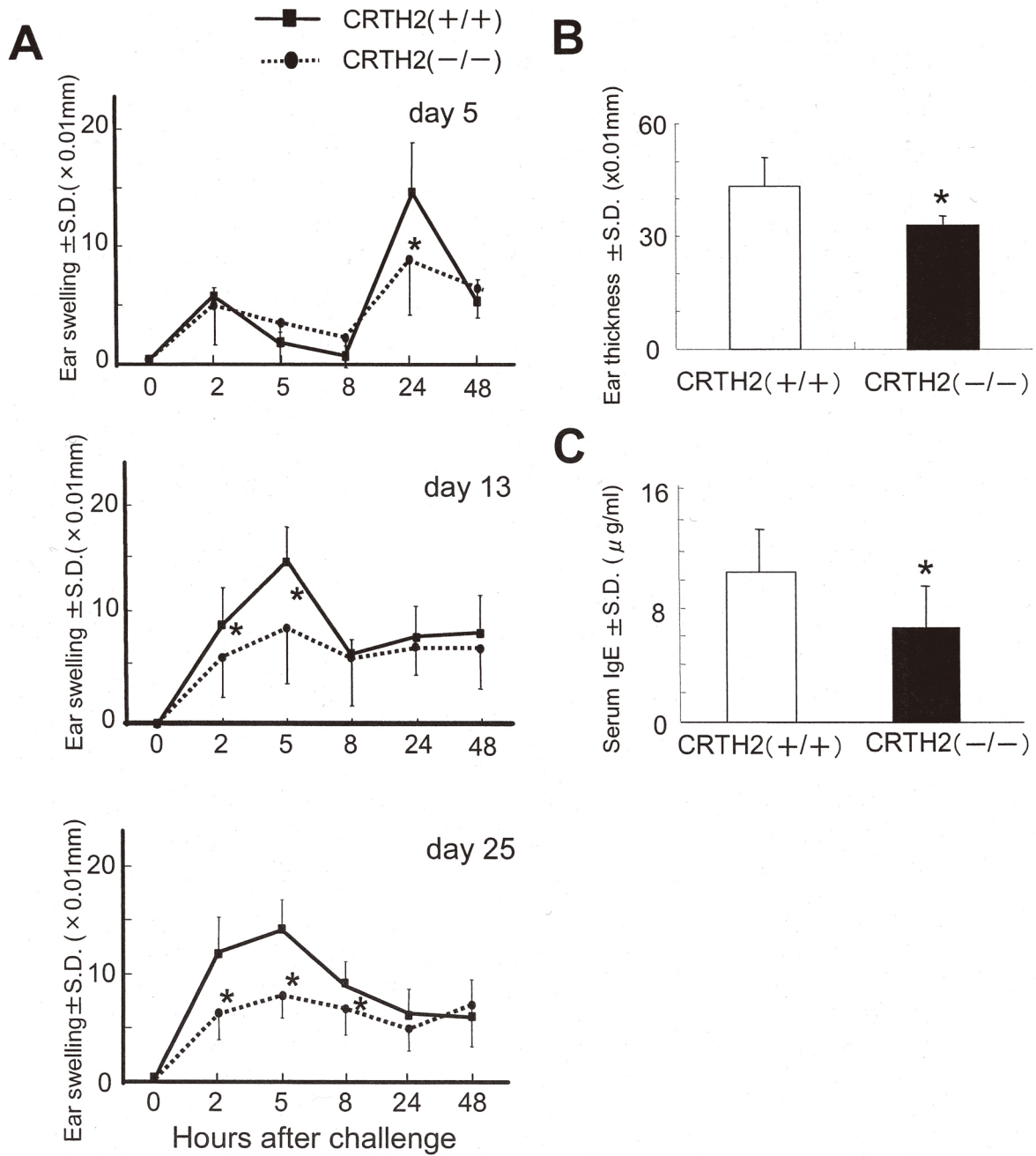


図 5

より誘導した。図5 Aにみるように皮膚反応は5日目では24時間後にピークがみられるが、惹起を繰り返すごとに早まり25日目には2から5時間目にピークをむかえるようになる。CRTH2欠損マウスでは反応ピークの移動はみられるものの、その強さは惹起を繰り返すごとに wild type マウスに比して減弱しその差が明瞭になっていくことがわかった。さらに27日目での耳介皮膚全体の厚さも wild type マウスより薄く(図5 B)、また血清IgEの産生も少なかった(図5 C)。

4 考 察

今回の研究においてPGD2受容体の一つであるCRTH2がIgE依存性皮膚反応の成立において重要であることがCRTH2欠損マウスを用いた実験によって初めて明らかとなった。さらにH-PGDS抑制薬であるHQL-79やCRTH2拮抗薬のラマトロバンが治療効果をもたらすことも見出された。CRTH2の重要性は慢性接触過敏反応においても確認された。以上のことからPGD2またはCRTH2受容体を標的とした治療法はアトピー性皮膚炎を含めて一部のアレルギー性皮膚疾患において有用である可能性があると思われる。

IgE依存性皮膚反応の抑制機序についてはまだ十分には解明できていないが、おそらくCRTH2を介したPGD2に対する炎症細胞の遊走が抑制されたためと推測される。またIgE依存性第III相反応に必須とされる好塩基球の浸潤が抑制されたために、その後に生じる種々の炎症カスケードが影響を受けたためとも考えられる。

CRTH2はヒトのリンパ球においてはTh2細胞に発現されているが、CRTH2欠損マウスでの局所サイトカインプロファイルは必ずしもTh1, Th2のいずれへの偏りもみられなかった(図3)。これはマウスにおいてはCRTH2が

Th1細胞にも発現されていることに起因すると考えられる⁵⁾。

今回はCRTH2受容体を中心に慢性皮膚アレルギー性反応における役割を解析してきた。今後、もう一つの受容体DPについても同様の解析を行い、さらに他のハプテンに対する反応を含めて種々の皮膚炎症反応にけるCRTH2, DP, PGD2の重要性を検討したい。そして疾患ごとの治療の標的と治療の選択につき検討を進めたい。

(引用文献)

- 1) Fujitani Y, Kanaoka Y, Aritake K, et al.: Pronounced eosinophilic lung inflammation and Th2 cytokine release in human lipocalin-type prostaglandin D synthase transgenic mice. *J. Immunol.*, 168, 443-449, 2002.
- 2) Matsuoka T, Hirata M, Tanaka H, et al.: Prostaglandin D2 as a mediator of allergic asthma. *Science*. 287, 2013-2017, 2000.
- 3) Hirai H, Tanaka K, Yoshie O, et al.: Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper 2 type cells, eosinophils and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J. Exp. Med.*, 193, 255-262, 2001.
- 4) Mukai K, Matsuoka K, Taya C, et al.: Basophils play a critical role in the development of IgE-mediated chronic allergic inflammation independently of T cells and mast cells. *Immunity*, 23, 191-202, 2005.
- 5) Abe H, Takeshita T, Nagata K. et al.: Molecular cloning, chromosome mapping and characterization of the mouse CRTH2 gene, a putative member of the leukocyte chemoattractant receptor family. *Gene*, 227, 71-77, 1999.

ヒト汗に存在する核酸分解酵素を含有させた化粧品や医薬品軟膏が有する生理作用や薬理作用の推定

島根大学医学部法医学

竹下 治男

Human and porcine recombinant deoxyribonucleases I (DNases I) were expressed in COS-7 cells, and purified by a single-step procedure. Since affinities for concanavalin A (Con A) and wheatgerm agglutinin (WGA) were strong in these recombinant DNases I, purification using Con A-WGA mixture-agarose column was performed. By this method, the enzymes in culture medium could quickly be isolated to apparent homogeneity in approximately ten minutes. From 1 ml of culture medium, about 20-30 µg of purified DNase I with a specific activity ranging from 22000 to 41000 units/mg were obtained. The purified DNases I were subjected to enzymatic deglycosylation by either Peptide N-glycosidase F (PNGase F) or endoglycosidase H (Endo H). The recombinant enzyme was cleaved by PNGase F, not by Endo H, indicating that the recombinant enzymes are modified by N-linked complex-type carbohydrate moieties. In the human recombinant DNase I, activity was decreased by PNGase F-treatment, while that of the porcine DNase I remained unaffected. The thermal stability of the human enzyme was extremely susceptible to heat following PNGase F-treatment, as was the porcine enzyme to a lesser extent. This study suggests that N-linked complex-type carbohydrate moieties may contribute to the enzymatic activity and/or thermal stability of recombinant DNases I. Moreover, we developed a method for the simultaneous genotyping of SNP (A2317G) and 56-bp VNTR polymorphism within DNase I gene, and using this method, we determined the allele frequencies of both polymorphisms in Ovambo, Turk, Mongolian, Korean and Japanese populations and revealed wide differences between these ethnic groups.

1. 緒言

我々はヒトの核酸分解酵素である、デオキシリボ核酸分解 (DNase) およびリボ核酸分解酵素 (RNase) の生化学、酵素学、化学、人類遺伝学、分子生物学などに関する研究に従事してきた。両酵素は遺伝的多型形質であり、またヒト汗中には極めて活性の高い両酵素が存在することから、我々は、微量な汗からでも実施可能な個人識別法を確立して法医鑑識の実際に応用している。しかし、汗に含まれる高活性な核酸分解酵素の生理学および薬理学的作用は不明である。この研究では、汗に含まれる高活性な核酸分解酵素の生理学および薬理学的な役割や意義を解明したい。これによって、ヒト核酸分解酵素を含有させた医薬品軟膏 (化粧品等を含む) が有する生理作用や薬理作用を推定することができる。核酸分解酵素は、単なる消化酵素と考えられてきたので、多くの研究者の興味の対象ではなかった。しかし、最近になって、1) アポトーシスへの関与、2) 全身性エリテマトーデスとの関連性、3) 難治疾患の治療薬、4) 心筋梗塞の早期診断マーカー、5) 遺伝的多型の存在などが解明され脚光を浴びてきつつある。我々は、現在、ヒト核酸分解酵素 DNase および RNase の国際的な

標準定量法となっている、single radial enzyme diffusion (SRED) 法を開発した。この方法は極めて感度の高い微量定量法であり、各種臓器及び体液中の核酸分解酵素の活性測定が可能になり、この途上において、汗中に当該酵素が存在することを見出しえた。最近、発生や老化に深く関与しているアポトーシスの生化学的マーカーであるヌクレオソーム断裂化に DNase や RNase が関与するという報告が目立つが、皮膚組織の損傷再生機構等にも当該酵素が関わっているのではないかと考えられる。さて、哺乳類 DNase I は 3 型に分類され、膵臓型は、耳下腺型及び膵臓・耳下腺 (混合) 型に比して酸性下で不安定である。今回、耳下腺と膵臓の抽出物及び DNase I cDNA を哺乳類細胞に導入・発現させた組み換え型酵素のレクチン親和性精査を行い、これら試料より DNase I のワンステップ精製を行った。さらに、DNase I を含有させた化粧品や医薬品軟膏が有する生理作用や薬理作用の個人感受性差異の調査を併せて行い、5 民族の血痕由来 DNA から、等電点電気泳動に基づく蛋白多型検出ではなく、新たな同時 PCR 法に基づく DNA 多型同時検出法を開発し、従来からある DNase I (*DNASE1*) 多型および最近新たに DNase I 遺伝子内に見い出された DNase I (*HumDNI*) 多型の頻度分布調査を行い、データベースの構築に着手した。

2. 実験

2・1 組み換え型酵素のレクチン親和性精査および DNase I のワンステップ精製

ラットの耳下腺・下顎腺、ウサギの耳下腺・膵臓及びブタの膵臓を用いた。さらに、ヒトおよびブタ DNase I



Fundamental study of the function on endonuclease (DNase I) in human sweat

Haruo Takeshita, M.D. Ph.D

Department of Legal Medicine, Faculty of Medicine, Shimane University

cDNA を発現ベクターに挿入し、得られた construct をリポフェクション法により、COS-7 細胞に導入・発現させた培養上清を用いた。親和性精査には、レクチンカラム 4 種 (Con A LCA RCA 120 WGA) を用い、DNase I のワンステップ精製には、Con A-WGA 混合カラムを用いて行った。

Recombinant peptide N-glycosidase F (PNGase F) と endoglycosidase (endo H) による脱グリコシル化について、各試料に希釈した PNGase F あるいは endo H を等量添加後 37°C で酵素反応を行い、DNA-casting PAGE により分析した。さらに、脱グリコシル化後の DNase I の安定性について精査した。

2・2 DNase I 多型データベースの構築

島根県の日本人 114 名、ブサンの韓国人 379 名およびウランバートルのモンゴル人 220 名の血液、ナミビアのオバンボス人 176 名およびトルコ北部アダナ地方のトルコ人 136 名の血痕から DNA を抽出した。DNASE1 多型について、1 型～4 型の検出は既法に従った。5 型の検出は、ARMS (amplification refractory mutation system) 法に拠り、6 型の判定は mismatched PCR-RFLP 法に拠った。今回調査した DNASE1 多型において、最初の検索からいずれのサンプルからも 3 型 - 6 型のマイナーアレルは検出されなかったため、DNASE1 多型の主要対立遺伝子 (*DNASE1*1* および *DNASE1*2*) と *HumDNI* 多型の同時検出を試みた。両多型を同一のゲル上で同時検出するため、次のような塩基配列の *DNASE1* プライマーを用いた。forward (5'-ATCGTGGTTGCAGGGATGCTGCCTC-3') および reverse (5'-AGTTCAACAGGTGTGGGGAG-3')。他方 *HumDNI* プライマーには、forward (5'-GAGCGCTACCTGTTCTGTACAG-3') および reverse (5'-CACCGCAGACACCTGGTCAGGC-3') を用いた。上記の PCR 産物は XhoI による制限酵素処理を行った。各サンプルを 8% ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離し、銀染色によりバンドを検出した。

3. 結果と考察

3・1 レクチンカラム親和性

ラットとウサギの耳下腺、ラットの下顎腺では Con A、WGA 両方に強い親和性がみられた。一方、膵臓では、ウサギ、ブタともに Con A に親和性が認められたが、WGA 親和性は非常に低かった。これらから、唾液腺酵素と膵臓酵素の性状の相違はレクチンの認識する糖鎖構造に関連があるのではないかと考えられた。膵臓型酵素の親和性の低さはレクチンカラムを用いた精製に支障を来たす可能性が考えられた。そこで、ブタ及びヒト組み換え体酵素において親和性を精査したところ、native 酵素に比して、Con A、

WGA により強固な親和性が認められ、膵臓型酵素の精製には、組み換え体の利用が有用であると考えられた。

3・2 ワンステップ精製

ConA-WGA 混合カラムによりラットとウサギの耳下腺、ラットの下顎腺、ブタの膵臓の精製を行ったところ、いずれからも電気泳動上単一なバンドが得られた。また、ブタおよびヒトの組み換え体酵素は天然酵素と同一な移動度を示し、単一のバンドを形成する活性酵素が得られた。これら酵素の分子量、金属イオン要求性などは、既報の精製 DNase I のものと一致した。

3・3 脱グリコシル化を受けた DNase I の活性染色による検出

PNGase F はアスパラギン結合型糖鎖のうち、高マンノース鎖、混成型糖鎖、複合型糖鎖のアスパラギン残基と最も近い GlcNAc の間を切断し、Endo H は、アスパラギン結合型糖鎖の高マンノース鎖、混成型糖鎖の一部を切断する。すべての native 試料で PNGase F 処理により対照と比べて低分子の位置に一本のバンドがみられた。一方、Endo H 処理では、native 酵素において二つのパターンを示した。すなわち、ラットとウサギの耳下腺、ラットの下顎腺およびブタの膵臓では二本バンドが見られ (対照の位置と PNGase F のバンドより高分子の位置)、またラットの下顎腺、ウサギの膵臓では PNGase F 処理と同じ位置に一本のバンドがみられた。組み換え体酵素では、ブタ及びヒトともに PNGase F 処理により、脱グリコシル化を受けたが、Endo H 処理では脱グリコシル化は認められなかった。これらの結果から、DNase I には臓器特異的な糖鎖付加の相違が認められるとともに、native 酵素と組み換え体酵素においても糖鎖付加の相違が示唆された。

3・4 脱グリコシル化が DNase I 活性に及ぼす影響

活性染色像に強弱が認められたため、酵素による脱グリコシル化処理時間と DNase I 活性の関係を調べた。脱グリコシル化処理により、12 時間で、native 及び組み換え体のブタの膵臓では酵素の失活がみられ、ラットの下顎腺では約 60% 酵素活性が減少した。種/臓器特異的な DNase I の性状が示唆された。また、脱グリコシル化によってブタ膵臓に脆弱性が認められることから、脱グリコシル化を受けたブタ及びヒト組み換え体酵素において、熱安定性を調べたところ、やはり、ヒトに比してブタでは極めて高度の熱不耐性が認められた。レクチンカラムにより、哺乳類 DNase I の精製が初めてワンステップで可能となった。本法は、生体試料および培養上清中の組み換え体酵素の両方から、迅速・簡便に多量の酵素を得られる有用なものである。哺乳類 DNase I のレクチン親和性精査および

び脱グリコシル化の結果から、局在の異なる DNase I の性状の差異には糖鎖付加が関係しているのではないかと考えられた。

3・5 DNase I 多型データベースの構築

今回 DNASE1 および HumDNI 多型同時検出法を新たに構築した。DNASE1 に関して、これまでの日本人集団の調査では、9つの表現型が報告されているが、今回調査された5集団においては、いずれも主要表現型の1、1-2および2型のみが観察された。HumDNI 多型に関して、反復数が2回から6回に相当するアレル2からアレル6までが検出された。両多型とも、トルコ人集団では、DNASE1*2、HumDNI*4 および HumDNI*5 の出現頻度は他集団に比べ有意に高かった。アフリカオバンボス人集団では、DNASE1*1 および HumDNI*3 の出現頻度が他集団に比して有意に高かった。アジア人3集団においては、両多型とも類似した集団データを示した。DNase I 遺伝子に存在する DNASE1 多型と HumDNI 多型との間の相関について解析したところ、両多型の間に連鎖不平衡が認められた。いずれの集団においても、HumDNI*3 は DNASE1*1 と、HumDNI*4 および HumDNI*5 は DNASE1*2 と有意に相関していた。

今回得られた DNase I 組み換え型酵素のレクチン親和性精査、DNase I のワンステップ精製、DNase I 型検出法および DNase I 多型データベースを基に、今後さらに酵素活性データを包含させ、ヒト汗に存在する核酸分解酵素を含有させた化粧品や医薬品軟膏が有する生理作用や薬理作用の推定の一助にしたいと考えている。

(参考文献)

この研究を遂行するにあたり、ご援助いただきました貴財団に深謝致します。また、貴財団からのご援助により本研究に関連した以下の成果を達成しました。この事実を以下の文献に記載して謝意を表明しました。

1) Fujihara J, Okui I, Takeshita H ほか: Single-step purification by lectin affinity and deglycosylation

analysis of recombinant human and porcine deoxyribonuclease I expressed in COS-7 cells. *Biotechnology Letters*, 28, 215-221, 2006

2) Fujihara J, Yasuda T, Takeshita H ほか: Frequency of a single nucleotide (A2317G) and 56-bp variable number of tandem repeat polymorphisms within the deoxyribonuclease I gene in five ethnic populations. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 44, 1188-1191, 2006

3) Takatsuka H, Fujihara J, Takeshita H ほか: Analysis of genetic polymorphism of deoxyribonuclease I in Japanese from Shimane prefecture using genotyping method. *Shimane Journal of Medical Science*, 23, 1-6, 2006

4) Fujihara J, Yasuda T, Takeshita H ほか: Variation of *interleukin 8* -251 A > T polymorphism in worldwide populations and intra-ethnic differences in Japanese populations. *Clinica Chimica Acta*, 377, 79-82, 2007

5) Fujihara J, Xue Y, Takeshita H ほか: *CYP1A2* polymorphism (C>A at position-163) in Ovambos, Koreans and Mongolians. *Cell Biochemistry and Function*, 25, 491-494, 2007

6) Fujihara J, Takatsuka H, Takeshita H ほか: Two deoxyribonuclease I gene polymorphisms and correlation between genotype and its activity in Japanese population. *Legal Medicine*, 9, 233-236, 2007

7) Fujihara J, Kunito T, Takeshita H ほか: Frequency of two human glutathione-S-transferase omega-1 polymorphisms (E155 deletion and E208K) in Ovanbo and Japanese populations using the PCR-based genotyping method. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 45, 621-624, 2007

8) Takeshita H, Fujihara J, Soejima M ほか: Extremely high prevalence of DNASE1*1 allele in African populations. *Cell Biochemistry and Function*, 26, 151-153, 2008

脂質を中心とした非蛋白抗原に対する皮膚免疫応答機構の解明とその制御法の確立

京都大学ウイルス研究所

杉田 昌彦

Human group 1 CD1 molecules (CD1a, CD1b, CD1c) are expressed prominently in dendritic cells, and mediate presentation of non-protein lipid antigens to T cells. Langerhans cells are epidermis-resident dendritic cells that play a pivotal role in skin immunity. These cells are unique in their abundant expression of the CD1a protein, but its role in skin immunity remains to be determined. The principal investigator of this project previously isolated Langerhans cells from the human skin, and observed their striking ability to activate microbial lipid-specific T cells. To extend this finding further, this project has aimed to address whether CD1a-positive Langerhans cells mediate lipid-specific immune responses in vivo. To accomplish this, we have attempted to reconstitute by a transgenic technology CD1a-dependent immunity in mice that have deleted genes for CD1a. Generation of mice carrying the human *CD1A* genome has been completed, and we found that the human CD1a protein was expressed specifically in epidermal Langerhans cells. In addition, microbial lipid-specific, CD1a-restricted T cell responses were readily detected in these mice, suggesting that the positive selection for CD1a-restricted T cells indeed occurred as in humans. Therefore, these mice provide a valuable opportunity for our evaluating CD1a function in vivo.

1. 緒言

主要組織適合抗原 (MHC 分子) が、蛋白断片であるペプチド抗原を結合し、T細胞に抗原提示する現象は、近代免疫学が確立した中心的パラダイムのひとつである。感染免疫や癌免疫、アレルギーや自己免疫疾患の病態がこのパラダイムに基づいて説明されてきた。これに対して、研究代表者らの最近の解析から、脂質に対して特異的に応答する免疫経路の存在が明らかとなりつつある。ヒト CD1 分子 (CD1a, CD1b, CD1c) は、脂質抗原を結合し、T細胞に抗原提示する新しいタイプの抗原提示分子である^{1) 2) 3) 4)}。これらの CD1 分子は樹状細胞に発現して、脂質抗原特異的な T細胞応答を惹起する役割を担う。

ヒト表皮には、ランゲルハンス細胞と呼ばれる樹状細胞が分布し、皮膚免疫応答において中心的な役割を担う細胞として知られている。この表皮ランゲルハンス細胞は、CD1a 分子を多量に発現した生体内でも稀な樹状細胞である。そのため、CD1a 分子はランゲルハンス細胞のマーカーとして長らく注目されてきたが、その機能は不明であった。研究代表者は、ヒト CD1 分子の基礎解析成果を基に、CD1a 陽性ヒトランゲルハンス細胞は皮膚における脂質特異的な免疫応答を惹起する細胞であるとの作業仮説を立て、その検証を試みてきた。

これまでに研究代表者は、比重遠心法を用いてヒトランゲルハンス細胞を単離する技術を確立し、それを用いたインビトロでの機能解析を行ってきた^{5) 6)}。その結果、ヒト表皮より単離したランゲルハンス細胞は、CD1a 分子を介して細菌脂質を T細胞に提示することにより、脂質特異的な CD1a 拘束性 T細胞を活性化する能力を有することが初めて実証された。

一方、これらのインビトロでの解析とは別に、脂質特異的な皮膚免疫応答を生体レベルで実証するにはそれに適した実験動物が必要である。研究代表者はこれまでモルモットがヒト脂質免疫応答の解析に適した実験動物であることを示し、抗酸菌感染モルモットにおける脂質免疫応答を実証してきた⁷⁾。しかしモルモットの免疫解析手法は限られていることから、細胞レベル、分子レベルでの詳細な解析は困難である。免疫研究に多用されるマウスやラットは、ヒト CD1a に相当する分子を欠如している。したがって、マウスにヒト *CD1A* 遺伝子を導入することにより、CD1a 依存的免疫応答をマウスに再構築すれば、CD1a 分子を介した皮膚免疫応答の生体レベルでの解析が可能になると考えられる。

このような学術的背景と考察を基に、本研究課題において、ヒト *CD1A* 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの作製を試みた。その結果、ランゲルハンス細胞に特異的に CD1a 分子を発現したマウス系統の樹立に成功した。

2. 実験

2・1 CD1a トランスジェニックマウスの樹立

すべてのエクソンを含むヒト *CD1A* ゲノム遺伝子を単離し、エクソン部分については核酸変異がないことを確認した。得られた遺伝子断片をマウス (C57BL/6) 受精卵前



Pathways for skin immunity directed against lipids and other non-protein antigens

Masahiko Sugita

Institute for Virus Research, Kyoto University

核中に注入し、仮親の卵管内へ移植を行ってマウスを誕生させた。得られたマウスの尾よりゲノム DNA を抽出し、これを鋳型とした PCR 法により *CD1A* 遺伝子のマウスゲノムへの挿入を確認した。

2・2 骨髄樹状細胞の単離と解析

得られたトランスジェニックマウスより骨髄細胞を採取し、マウスリコンビナント GM-CSF の存在下で 10 日間培養することにより、骨髄由来樹状細胞を得た。細胞は抗ヒト CD1a 抗体と蛍光色素で標識した抗マウス IgG 抗体を用いてラベルし、フローサイトメトリおよび蛍光顕微鏡による解析を行った。

2・3 表皮ランゲルハンス細胞の解析

マウス耳介より皮膚を採取し、0.5 M チオシアン酸アンモニウム処理を行ったのち、表皮と真皮を分離した。表皮を冷アセトン固定し、ピオチン化ヒト CD1a 抗体および horseradish peroxidase 標識ストレプトアビジンを用いて蛍光染色を行った。染色組織を封入したのち、蛍光顕微鏡下での観察を行った。

表皮細胞のフローサイトメトリによる解析には、dispass 処理を行った皮膚より表皮を剥離し、EDTA 処理を施して single cell suspension を得た。細胞の染色は 2・2 に記載した方法で行った。

2・4 ELISPOT 法

Mycobacterium avium complex (MAC) 感染 CD1a トランスジェニックマウスより脾臓細胞を回収し、MAC 菌体より抽出した脂質抗原の存在下に骨髄樹状細胞と混合培養した。活性化に伴いインターフェロンガンマ産生する細胞を市販の ELISPOT キットにより検出した。

3. 結果

産まれてきた 17 匹のマウス (オス 10 匹、メス 7 匹) について、PCR 法による genotyping を施行したところ、メス 2 匹が陽性であった (図 1、#3 と #7)。このうち 1 匹について骨髄樹状細胞を採取しフローサトメトリ解析を行ったところ、ヒト CD1a 分子の発現が確認できた (図 2)。さらにサポニン処理した骨髄樹状細胞を抗 CD1a 抗体とテキサスレッド標識二次抗体でラベルし、蛍光顕微鏡下で観

察すると、細胞表面および細胞内の小胞に CD1a 分子の発現が観察された (図 3)。この発現分布のパターンは、研究代表者がこれまでにを行ったヒト樹状細胞の解析結果とよく符合していた²⁾。

さらに交配を重ねて得られた CD1a トランスジェニックマウスについて、表皮ランゲルハンス細胞における CD1a 分子の発現を検討した。表皮シートを抗 CD1a 抗体を用いて染色すると、樹状細胞様の形態を保持した細胞において、特異的なシグナルが検出された (図 4A)。表皮より single cell suspension を得て、抗 CD1a 抗体と抗 MHC クラス 2 抗体を用いた二重染色をし、フローサイトメトリ測定を行ったところ、MHC クラス 2 陽性細胞が CD1a 分子を発現していることがわかった (図 4B)。以上のことから、この CD1a トランスジェニックマウスにおいて、表皮ランゲルハンス細胞が特異的に CD1a 分子を発現していることが確認された。

このマウスにおいて、CD1a 拘束性 T 細胞のポジティブセレクションが起きていることを検証する目的で、MAC 感染後の脾臓における MAC 脂質特異的 T 細胞の存在をインターフェロンガンマ ELISPOT 法を用いて調べた。その結果、CD1a 陽性骨髄樹状細胞の存在下で脂質抗原特異的な応答が観察され、その応答は抗 CD1a 抗体により阻止された。このことは、この CD1a トランスジェニックマウスにおいて、CD1a 拘束性の T 細胞が生成されていることを示唆している。

4. 考察

脂質特異的免疫応答の解析には、主としてモルモットが使用されてきた。しかしその機序の詳細な解析や、蛋白特異的免疫応答との差異を明確にするためには、遺伝子操作が容易なマウス実験系の樹立が必須である。本研究で樹立された CD1a トランスジェニックマウスの解析をさらに進めることにより、ランゲルハンス細胞の新しい機能が明らかにされることが期待される。接触性皮膚炎を惹起する原因分子の多くは非蛋白抗原であり、ウルシオールなど脂溶性の性質を持ったものも見られる。これらの脂質に対する応答には CD1a 分子が関与している可能性が高く、その実証は病態の理解だけでなく新たな制御法の開拓にも結びつくことが考えられる。

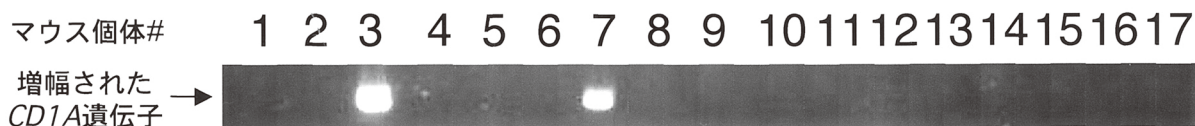


図 1 CD1a トランスジェニックマウスの genotyping 結果 (本文参照)

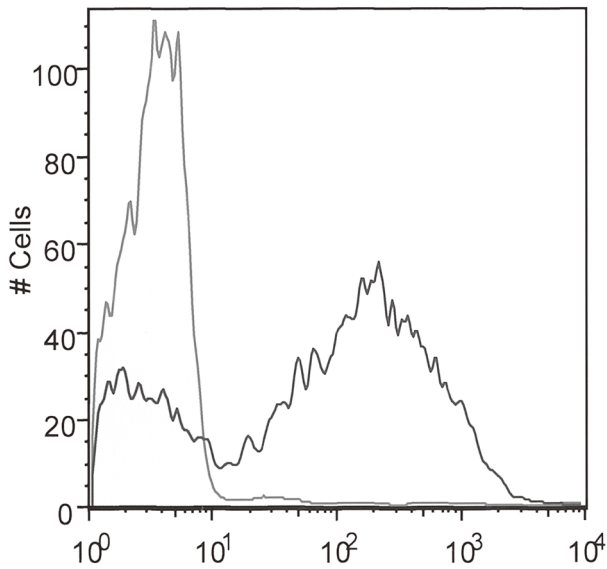


図2 CD1aトランスジェニックマウスより得られた骨髄樹状細胞のフローサイトメトリ解析結果
抗CD1a抗体(青線)およびネガティブコントロール抗体(赤地)の染色パターンを示した。樹状細胞の細胞表面に顕著なCD1a分子の発現が認められた。

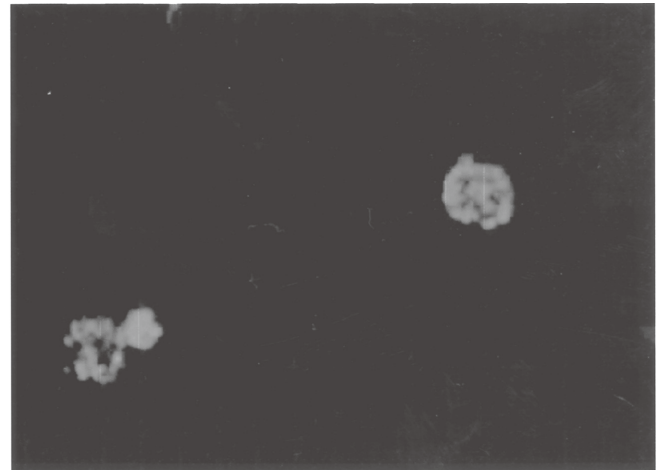


図3 CD1aトランスジェニックマウスより得られた骨髄樹状細胞の蛍光顕微鏡解析結果(本文参照)

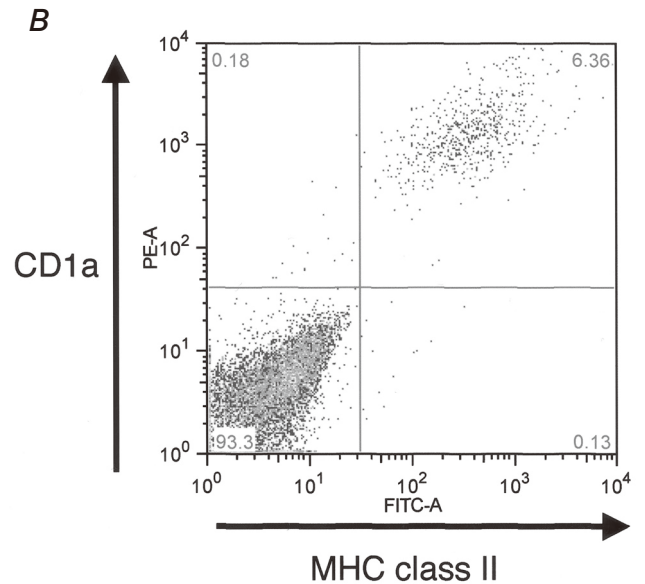
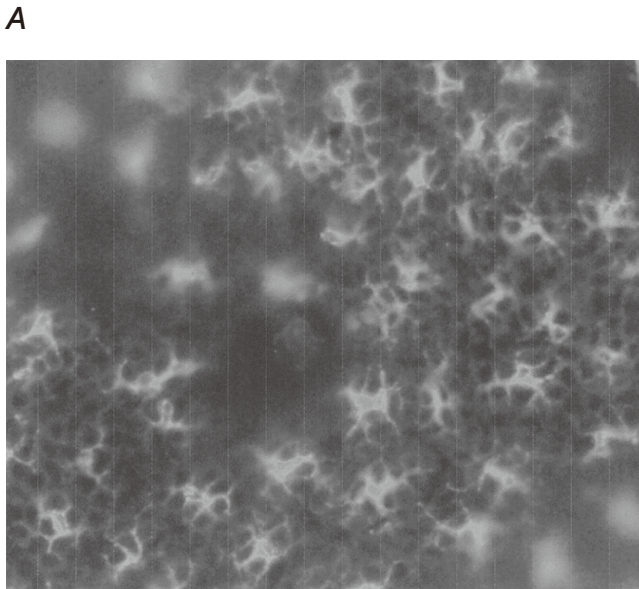


図4 CD1aトランスジェニックマウス表皮ランゲルハンス細胞におけるCD1a分子の発現
(A) 表皮シートを抗CD1a抗体を用いて蛍光染色した。(B) 表皮より得た細胞を抗CD1a抗体と抗MHCクラス2抗体を用いて二重染色し、フローサイトメトリにより解析した。

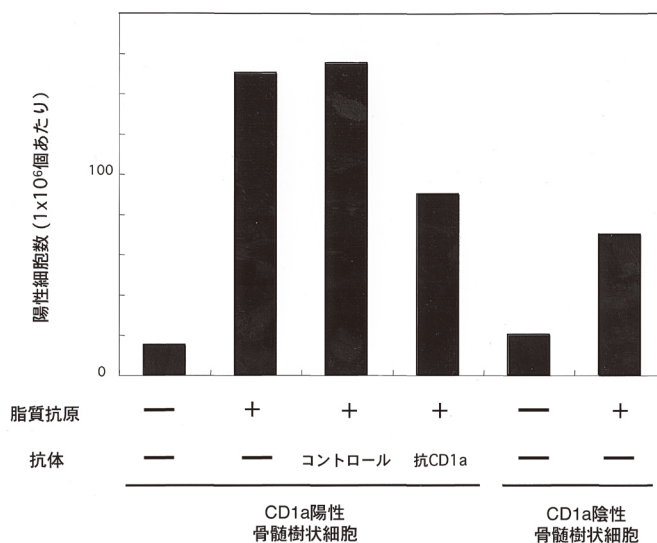


図5 CD1aトランスジェニックマウスにおける、CD1a拘束性T細胞の存在証明
 MAC感染マウス脾臓よりT細胞を単離し、CD1a陽性あるいはCD1a陰性樹状細胞の存在下で、MAC由来脂質抗原による刺激を行った。一部は阻害抗体を加える条件で行った。活性化を受けインターフェロンガンマを産生したT細胞の数を、ELISPOT法により測定した。

(引用文献)

- 1) Sugita M, Jackman RM, van Donselaar E, et al.: Cytoplasmic tail-dependent localization of CD1b antigen-presenting molecules to MHCs. *Science*, 273, 349-352, 1996.
- 2) Sugita M, Grant EP, van Donselaar E, et al.: Separate pathways for antigen presentation by CD1 molecules. *Immunity*, 11, 743-752, 1999.
- 3) Sugita M, van der Wel N, Rogers RA, et al.: CD1c molecules broadly survey the endocytic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 8445-8450, 2000.
- 4) Sugita M, Cao X, Watts GF, et al.: Failure of trafficking and antigen presentation by CD1 in AP-3-deficient cells. *Immunity*, 16, 697-706, 2002.
- 5) Pena-Cruz V, Ito S, Oukka M, et al.: Extraction of human Langerhans cells: a method for isolation of epidermis-resident dendritic cells. *J. Immunol. Methods*, 255, 83-91, 2001.
- 6) Pena-Cruz V, Ito S, Dascher CC, et al.: Epidermal Langerhans cells efficiently mediate CD1a-dependent presentation of microbial lipid antigens to T cells. *J. Invest. Dermatol.* 121, 517-521, 2003.
- 7) Watanabe Y, Watari E, Matsunaga I, et al.: BCG vaccine elicits both T-cell mediated and humoral immune responses directed against mycobacterial lipid components. *Vaccine*, 24, 5700-5707, 2006.

Apollon による細胞老化の制御機構

東京大学分子細胞生物学研究所

内藤 幹彦

Apollon is a large protein containing baculoviral-IAP-repeat and ubiquitin-conjugating enzyme domains at the amino- and carboxy termini, respectively. Apollon inhibits apoptosis by facilitating proteasomal degradation of caspase-9 and SMAC. Homozygous disruption of apollon gene in mice results in embryonic lethality, and the mutant embryos showed polymorphic phenotype including growth retardation and defects in vasculogenesis. Here we show that embryonic fibroblasts from apollon-deficient mice showed earlier replicative senescence and over-duplication of centrosome. The time required for completion of mitosis was extended in the apollon-deficient cells compared with wild-type cells. Thus, cell cycle regulation is affected in the apollon-deficient cells, which may be involved in the earlier replicative senescence.

1. 緒言

IAP (inhibitors of apoptosis) ファミリーの1つである Apollon は N 末端側に BIR (baculovirus IAP repeat) ドメインを、C 末端側に UBC (ubiquitin-conjugating enzyme) ドメインを有する分子量 530 K の巨大なタンパク質である。これまでの研究で、Apollon は BIR、UBC ドメインを介して Caspase 9 や SMAC をユビキチン化し、プロテアソームによる分解を促進することによりアポトーシスを阻害することが明らかとなっている¹⁾。しかし、BIR、UBC ドメイン以外の広大な領域の機能は未知であり、また、当研究室で作成した Apollon 欠失マウスは胎生致死であることから、Apollon には細胞死制御以外も様々な機能があると推測される。

本研究では、主に Apollon 遺伝子を欠損したマウス胎児繊維芽細胞 (MEF) を解析し、Apollon 欠損 MEF が早期に増殖を停止し老化した表現型を示すこと、M 期の進行が遅延していること、中心体が過剰複製されていることを見出した。

2. 実験

2・1 MEF の初代培養と Genotyping

耐性 14.5 日のマウス胎児を摘出し、ハサミで細かく切り刻んでから、一部を genotyping 用に分ける。トリプシンを加え室温で 40 分間振倒した後、DMEM を加えて遠心 (1000rpm、5 分) し、上清を除く。沈殿を DMEM に

サスペンドして 10 cm ディッシュにまき、炭酸ガス培養器で培養する。

genotyping 用にとった胎仔の 1 部に 60uL の Lysis Buffer 加え、55℃、1 時間処理する。95℃で 20 分処理後、15000 rpm、10 分間遠心し、上清 1 ul に genotyping 用プライマー、PCR Buffer、dNTPmix、polymerase、を加え、PCR にかける。反応産物を 2% agarose gel (エチジウムブロミド入り) で泳動し、バンドを観察する。

2・2 細胞老化の観察

2・2・1 累積の細胞増殖曲線

MEF の初代培養を始めた日を 0 日とし、2 日後から 3 日毎に細胞数を計測し、MEF (+/+) は 5×10^5 cells/10 cm dish で、MEF (-/-) は 7×10^5 cells/10 cm dish でまき続けた。

2・2・2 senescence β -galactosidase 染色

MEF の初代培養を始めた日を 0 日とし、初代培養開始後、さまざまな時間に細胞を固定し、senescence β -galactosidase staining kit (Cell Signalling) の protocol に従い、染色を行った。

2・3 免疫染色

細胞を PBS で洗った後、4% パラホルムアルデヒドで固定する。PBS で 3 回洗浄した後、0.1% TritonX-100 および 3% BSA 入りの PBS で浸透化とブロッキングをする。Blocking Buffer に 1 次抗体を希釈し、室温で 2 時間処理する。PBS で 10 分 \times 3 回洗った後、蛍光標識 2 次抗体と、hoechst も同様に希釈し、遮光して室温で 1 時間処理する。再び PBS で 10 分 \times 3 回洗浄し、Poly-Mount 液とカバーガラスを用いて封入する。



Regulation of replicative senescence by apollon

Mikihiko Naito

Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo

2・4 Time-lapse microscopy

MEFは顕微鏡下、37℃、25mM HEPES-KOH (pH7.3) 含有 DMEM で培養し、3分毎に撮影を行った。

3. 結果

3・1 Apollon 欠損 MEF の初代培養

Apollon (+/-) マウスを交配して得られた胎児の細胞を初代培養して、野生型 MEF、及び Apollon 欠損 MEF を樹立した。PCR により Genotype を解析し、Apollon 欠損 MEF は Apollon タンパク質を発現していないことを確認した (Fig. 1)。XIAP 遺伝子破壊マウスでは、cIAP-1、cIAP-2 が発現上昇していることが報告されている²⁾。そこで、Apollon の欠失マウスで他の IAP の発現を検討したが、野生型 MEF との差は見られなかった (Fig. 1)。

3・2 MEF の老化

ヒトやマウス線維芽細胞を培養すると、細胞は一定期間増殖後、扁平な形態となり、不可逆的に増殖を停止し長期間生存し続ける。このような状態を細胞の老化と呼び、老化した細胞は対数増殖期の細胞とは異なる特徴を示すことが知られている。野生型 MEF は約 30 日間増殖した後細胞分裂を停止したが、Apollon 欠損 MEF は約 10 日で増殖を停止した (Fig. 2A)。そこで Apollon 欠損 MEF は早

期に老化するのか検討した。正常細胞は分裂回数を重ねるごとに CDK インヒビターの p16、p21 タンパクの発現が増加し、p21 は完全に老化すると減少することが知られている。初代培養を開始後経時的に MEF の lysate を調製し Western blot で解析した結果、野生型 MEF と比較して、Apollon 欠損 MEF では p16、p21 ともに早期に発現が増加していることが明らかになった (Fig. 2B)。また、老化マーカーとして知られる酸性 β -galactosidase 染色³⁾ にお

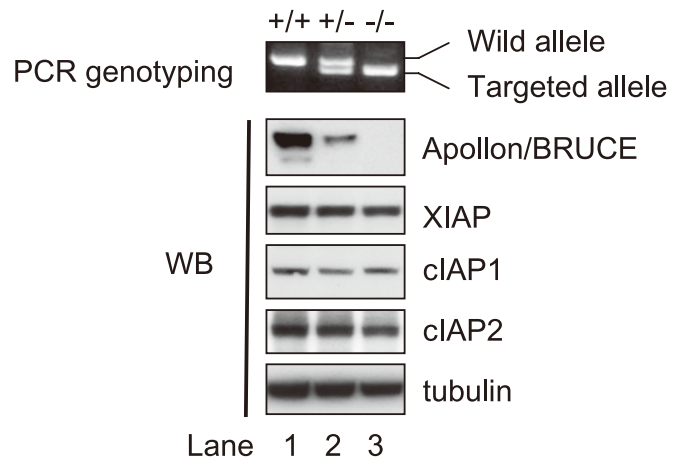


Fig.1 MEF の genotyping と IAP の発現

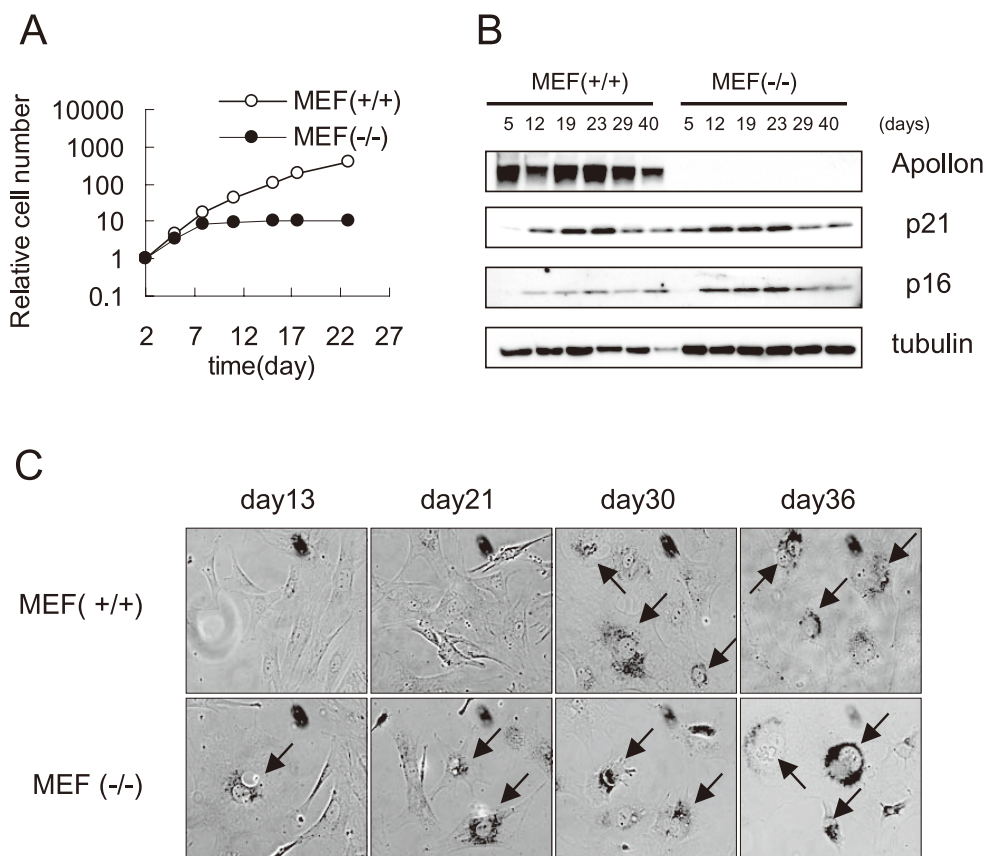


Fig.2 Apollon 欠損 MEF に見られる細胞老化

いても、野生型 MEF と比較して、Apollon 欠損 MEF では早期に強陽性を示す細胞が出現した。(Fig.2C)。これらの結果から、Apollon 欠損 MEF は早期に老化することが明らかになった。

3・3 Apollon 欠損 MEF に見られる細胞分裂の異常

老化した MEF の培養を長期間維持することにより、自然に形質転換を起こして不死化した野生型 MEF 及び Apollon 欠損 MEF を樹立した。これらの不死化した MEF の細胞分裂の様子をビデオに撮影して観察した (Fig.3A)。

その結果、Apollon 欠損 MEF では野生型 MEF と比べて分裂期の開始から終了までの時間が約 1.5 倍に延長していた (Fig.3B)。1 回の細胞周期に要する時間は、ほとんど同じであったことから、Apollon 欠損 MEF では細胞周期の M 期の進行が特異的に遅れていることが示唆された。これらの結果から、Apollon は細胞周期、特に G2/M 期の制御に関与することが考えられた。

3・4 Apollon 欠損 MEF に見られる中心体過剰複製

ビデオの観察から、M 期が遅延していることに加えて、

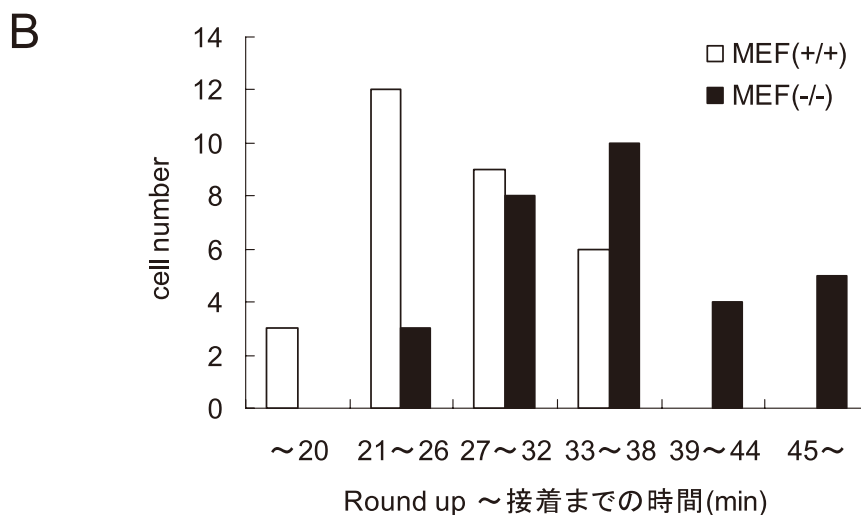
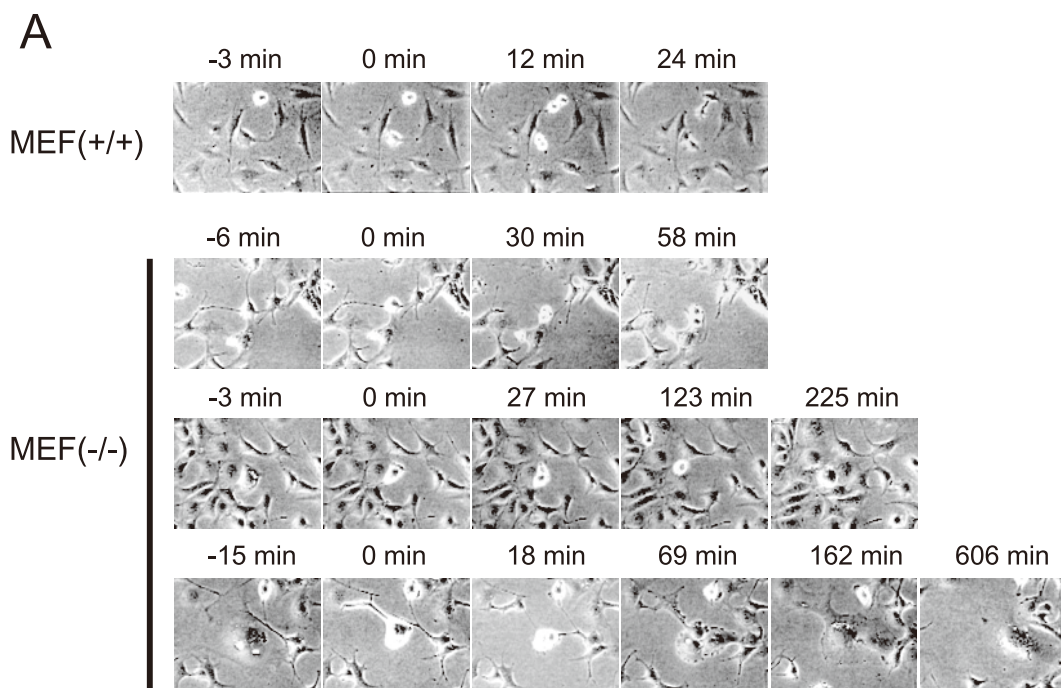


Fig.3 Apollon 欠損 MEF に見られる M 期の延長

Apollon 欠損 MEF では2つに分裂できない細胞や、1度3つに分裂した後1つに融合してしまう細胞等、細胞分裂に異常を示す細胞も多数観察された (Fig.3A)。細胞分裂の過程で、凝縮した染色体は分裂中期において赤道面上に並び、対極に位置する2つの中心体から紡錘糸が伸びてきて染色体を均等に分配する。しかし、中心体が過剰に存在すると染色体が不均一に分配され、3つ以上に分裂することがある。そこで、Apollon 欠損 MEF で中心体が過剰に存在するかどうか、 γ -tubulin の免疫染色により検討した (Fig.4A)。野生型 MEF の中心体はほぼすべての細胞が2個以下であったのに対し、Apollon 欠損 MEF では約20%の細胞で中心体が過剰複製していた (Fig.4B)。

4. 考 察

Apollon 欠損 MEF の解析から、Apollon が細胞周期 (特にM期) の制御や中心体複製の制御に重要な機能を持つことが示唆された。Apollon 欠損によるこれらの制御異常が、初代培養 Apollon 欠損 MEF に見られた早期老化の原因となっている可能性が考えられる。Apollon は UBC ドメインを持ち、Caspase 9 や SMAC のユビキチンリガーゼと

して機能することが知られている。今後、Apollon によってユビキチン化などの制御を受ける細胞周期制御因子を明らかにすることにより、Apollon による細胞老化の制御機構を解析していく予定である。

(文 献)

- 1) Hao, Y., Sekine, K., Kawabata, A., Nakamura, H., Ishioka, T., Ohata, H., Katayama, R., Hashimoto, C., Zhang, X., Noda, T., Tsuruo, T., and Naito, M.: Apollon ubiquitinates SMAC and caspase-9, and has an essential cytoprotection function. *Nat Cell Biol*, 6 (9), 849-860, 2004.
- 2) Harlin, H., Reffey, S. B., Duckett, C. S., Lindsten, T., and Thompson, C. B.: Characterization of XIAP-deficient mice. *Mol Cell Biol*, 21 (10), 3604-3608, 2001.
- 3) Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., and et al.: A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (20), 9363-9367, 1995.

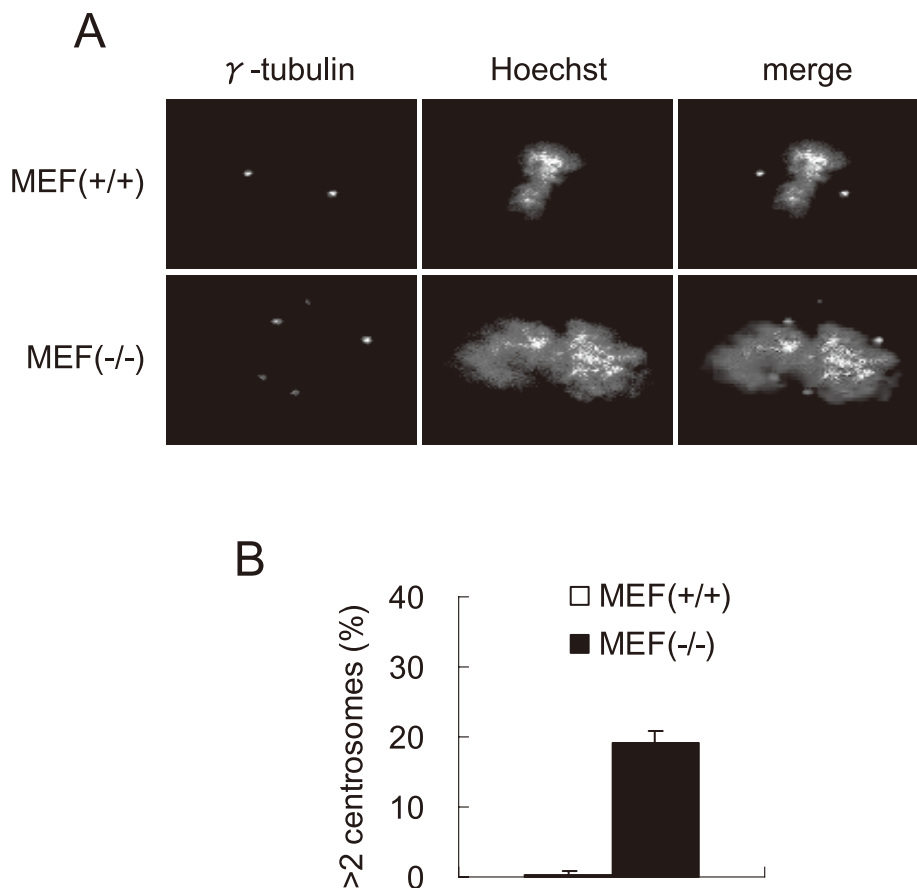


Fig.4 Apollon 欠損 MEF に見られる中心体過剰

骨髄由来表皮細胞の分化ならびに遊走機序の解明

北海道大学大学院医学研究科皮膚科

阿部 理一郎

Recent studies have suggested that bone marrow (BM) cells transdifferentiate to regenerate a variety of cellular lineages. Due to the relatively small population of BM-derived cells in each organ, it is still controversial whether these BM-derived cells are really present in sufficient numbers, for effective function. Conversely, it is speculated that chemokine/chemokine receptor interactions mediate this migration of the tissue specific precursor cells from BM into the target tissue.

Here we show that cutaneous T-cell attracting chemokine (CTACK) /CCL27 is the major regulator involved in the migration of keratinocyte precursor cells from BM into skin. By screening various chemokine expression patterns, we demonstrated that CTACK is constitutively expressed in normal skin and upregulated in wounds and that approximately 20% of CD34+ BM cells expressed CCR10 the ligand for CTACK.

These results provide direct evidence that recruitment of BM keratinocyte precursor cells to the skin is regulated by specific chemokine/chemokine receptor interactions, which makes possible the development of new regenerative therapeutic strategies.

1. 緒言

これまで再生医学領域の研究により、種々の体細胞成分が骨髄幹細胞から分化可能であることが明らかとなった。骨髄幹細胞から表皮細胞への分化の可能性も示唆されているが、なお確定はえられていない。一方先天性酵素欠損症 (Hunter 症候群など) は同種骨髄移植によりドナー由来細胞から欠損酵素を供給する治療が試みられ臨床的にも有用であることが証明されている。しかしながら同種骨髄移植を用いた、構造タンパク欠損症に対する治療法の研究はなされていない。

構造タンパク欠損症である表皮水疱症に対する根本的治療法は、主に病因である欠損タンパクを遺伝子導入することで産生させる、遺伝子治療が検討されている。しかしながら現在遺伝子治療に関しては技術的問題、安全性の問題などで、一般的な臨床応用までにはなお時間がかかると予想される。先天性酵素欠損症 (Hunter 症候群など) は同種骨髄移植によりドナー由来細胞から欠損酵素を供給する治療が試みられ臨床的にも有用である。しかしながら同種骨髄移植を用いた、構造タンパク欠損症に対する治療法の研究は皆無である。

一方、構造タンパク欠損症と先天性酵素欠損症の相違は、産生させるタンパクが産生されるのみならず、機能的な構

造を形成し、かつ適切な部位に留まらなければならないことである。よって、骨髄移植で、標的の臓器 (皮膚) に骨髄由来表皮細胞が遊走し、かつ欠損タンパクを産生し、機能的に働くかは全く不明である。

また、組織幹細胞を用いた再生医療は、胚性幹細胞 (ES 細胞) と比較し、倫理的にも ES 細胞が胎児由来であるのに対し、骨髄幹細胞は本人由来である。加えて採取が格段に容易という画期的利点があり、臨床適応が切望されている。しかしながら、現在骨髄幹細胞を用いた再生医療への応用の実現化において、乗り越えるべき大きな課題がある。これまでの検討で、各臓器において骨髄幹細胞由来の分化した臓器細胞が存在することは確認できているが、その頻度は非常に低く、生物学的機能を有しうるか疑問視されている。一方、特異的細胞遊走はケモカイン、ケモカインレセプターの相互作用により起こることが知られており、他臓器細胞に分化する骨髄幹細胞においても同様の機序が予想される。我々は遊走能の観点から、すでに骨髄由来線維芽細胞の創傷部位への遊走はケモカイン (SLC) ケモカインレセプター (CCR7) interaction により起こることを明らかにしている。以上から、ケモカイン、ケモカインレセプターの相互作用を用いることで、骨髄由来の表皮細胞の頻度を増加させることができ、より生物学的機能を発揮させる可能性があると考えられる¹⁾。

本研究課題において、創傷部皮膚において発現されるケモカインの同定、および骨髄細胞中のケモカインレセプター発現細胞の検索を行った。

2. 実験

2.1 骨髄細胞からの表皮細胞への分化の同定

正常マウスに対し、GFP トランスジェニックマウス (全



Transdifferentiation and migration of bone marrow-derived keratinocytes

Riichiro Abe

Department of Dermatology, Hokkaido University Graduate School of Medicine

身の細胞が GFP 産生し緑色に蛍光を発する) から骨髄移植を行う。骨髄由来細胞が置換された移植マウス (レシピエントマウス) に皮膚創傷を作成し経時的に創傷部皮膚を採取し、レシピエントマウスにおいてドナー骨髄幹細胞由来表皮細胞が分化しているか確認する。

2.2 骨髄細胞由来表皮細胞の表皮への効率的遊走機序の検討

効率的な骨髄幹細胞の皮膚への遊走を促すため、骨髄移植の際のドナー、レシピエントの条件の検討を行う。あわせて、皮膚発現のケモカイン中で特異的に骨髄由来表皮細胞の表皮への遊走を促進するケモカイン、またその候補ケモカインに対するケモカインレセプターの骨髄幹細胞における発現を検討する。具体的には、皮膚再生が強力に誘導される創傷部において、骨髄由来表皮細胞の表皮遊走誘導ケモカインの発現が亢進すると予想されるので、創傷部位におけるケモカイン発現を検討する。次に候補となるケモカインを用い、in vitro における骨髄幹細胞遊走能の検討、in vivo における骨髄由来表皮細胞誘導能の検討を行い、骨髄由来表皮細胞特異的ケモカインを同定する。

3. 結果

3.1 ドナー骨髄幹細胞由来表皮細胞の分化

GFP トランスジェニックマウス骨髄を移植した正常マウスを解析した。表皮のなかに GFP 陽性の骨髄由来細胞があり、この細胞は表皮細胞のマーカーであるケラチン

14 もともに陽性であったため、骨髄由来表皮細胞を確認できた (Fig. 1A)。またこの細胞は血球マーカーである CD45 やランゲルハンス細胞のマーカーである CD11c は陰性であった。加えてこの細胞の多くは基底層に存在し、毛包のバルジ領域に存在するものほとんど認めなかった。

創傷部の全表皮細胞中における骨髄由来表皮細胞の割合は 0.025% ±0.009% であり、基底細胞中の割合は 0.1% 程度であった。

3.2 骨髄細胞由来表皮細胞の表皮への効率的遊走機序の検討

再生の場である皮膚創傷における骨髄由来表皮細胞の集積は、再生現象が生じている時期にのみ特異的に起こると予想される。よって皮膚創傷部には組織特異的なケモカインが発現し、それに対するケモカインレセプターを持つ骨髄由来表皮細胞が遊走してくると思われる。

最初に創傷部におけるケモカインの発現を RT-PCR、Western blot、免疫染色で検討したところ示すように SDF-1 α 、SLC、CTACK の発現が特異的にみられた (Fig. 1)。

次にこれらのケモカインに対するケモカインレセプターの発現を、骨髄幹細胞 (CD34 陽性細胞) において FACS を用いて検討を行った。それぞれのケモカインに対するレセプターの発現を確認できた (SDF-1 α :CXCR4、SLC:CCR7、CTACK:CCR10) (Fig. 2A)。

さらにこのレセプターが機能的に発現しているか、in vitro migration assay を用いて検討した。それぞれのケモ

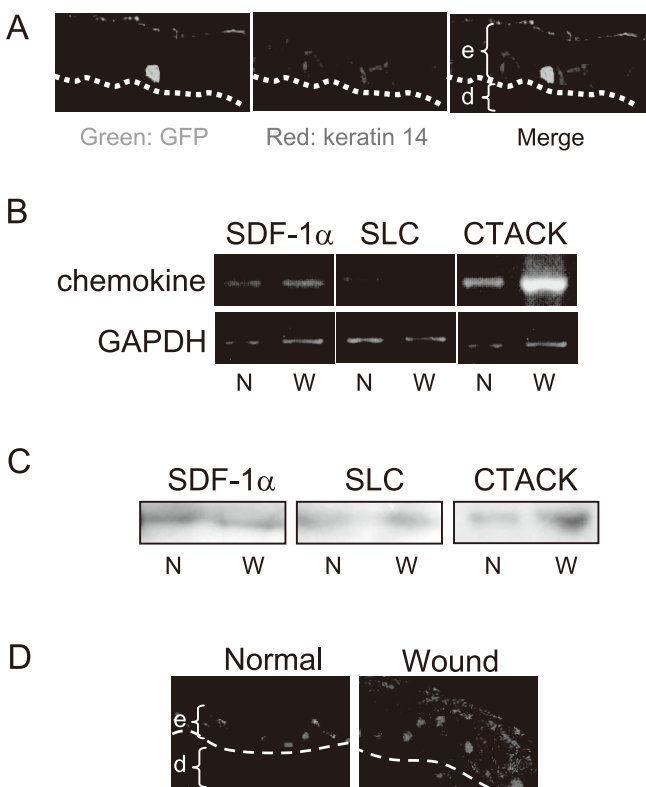


FIGURE 1

Bone marrow (BM) derived keratinocytes (BMDK) were identified and CTACK was expressed in wounded skin.

(A) Engrafted BMDK in wounded skin expressed both GFP, as a marker of bone marrow origin (green), and keratin14, as a marker of basal keratinocyte (red), (arrows) (e: epidermis, d: dermis).

(B-D) Normal (N) or wounded (W) skin tissue samples were collected and analyzed for chemokine expression as shown in Table 1. The expressions of SDF-1 α , SLC and CTACK were detected by RT-PCR (B) and Western blot analysis (C) in normal skin and also in skin 24 hours after wounding. These experiments of RT-PCR and Western blot analyses were performed in triplicate. Immunofluorescence staining in the wound edge 3 days after wounding, particularly CTACK expression was upregulated (green) (D). SDF-1 α and SLC were weakly expressed (data not shown). Nuclei were counterstained with propidium iodide (red) (e: epidermis, d: dermis).

カインによって、ある程度の CD34 陽性の骨髓幹細胞は遊走することが示された (Fig. 2B, C)。

3.3 創傷皮膚における特異的骨髓由来表皮細胞の遊走能

次に創傷皮膚において特異的骨髓由来表皮細胞についてそれぞれのケモカインを創傷辺縁に局所投与することにより検討した。SDF-1 α 、SLC、CTACK それぞれ投与し、治癒した表皮における骨髓由来表皮細胞数をカウントしたところ、CTACK のみが有意に増加させた (Fig. 3A)。また中和抗体局所投与により有意に減少した (Fig. 3B)。以上から CTACK が生体内において骨髓由来表皮細胞の遊

走を特異的に誘導することが明らかになった。

さらに、二つの系を用いて骨髓幹細胞を増加させたところ (G-CSF 投与、または CD34 陽性細胞静注)、骨髓由来表皮細胞の数は有意に増加したが、同時に CTACK を投与するとさらに増加した (Fig. 3A)。

3.4 CTACK は骨髓由来表皮細胞を増加させることにより創傷治癒を促進させる

CTACK による骨髓由来表皮細胞増加の創傷治癒に対する影響に関して検討を行った。創傷辺縁に CTACK を局所投与すると、有意に創傷治癒が促進された (Fig. 4A,B)。また CTACK 投与により血管新生は促進されず (Fig. 4C)、

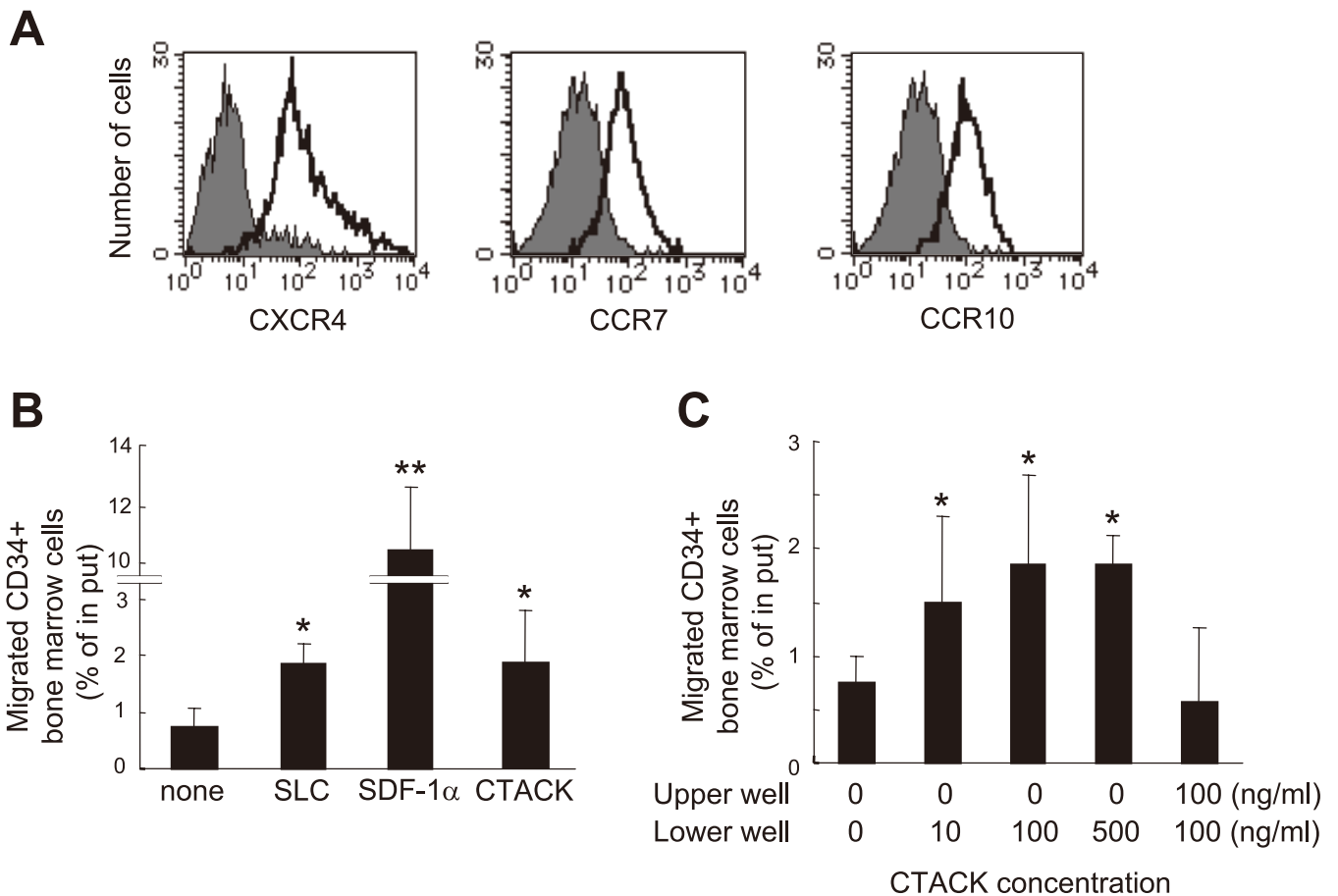


FIGURE 2

CCR10, a receptor for CTACK, was expressed in CD34+ BM cells and these CD34+ BM cells migrated in response to CTACK in vitro.

(A) CXCR4, a receptor for SDF-1 α , CCR7, a receptor for SLC, and CCR10 expression on CD34+ BM cells were analyzed by flow cytometry. The staining with a specific antibody for each chemokine receptor (solid line) and the background staining with the non-specific Ig antibody (negative isotype matched control; shaded profile) by the gated CD34-positive population. CD34+ BM cells expressed CXCR4 (97.4%), CCR7 (12.9%), and CCR10 (19.1%).

(B, C) Chemotaxis assays were undertaken in vitro. Isolated CD34+ BM cells purified by FACS were added to the upper well of a 3- μ m pore Transwell. Recombinant SLC, SDF-1 α or CTACK was added to the upper and/or lower plate. CD34+ BM cell migration rates increased in response to media containing recombinant SLC, SDF-1 α or CTACK (100ng/ml) (*P < 0.05, **P < 0.001) versus media alone (n=4) (B). CTACK (0-500ng/ml) induced CD34+ BM cell migration was in dose-dependent manner (n=4) (*P < 0.05) (C). SDF-1 α and SLC were also induced it in dose-dependent manner (data not shown).

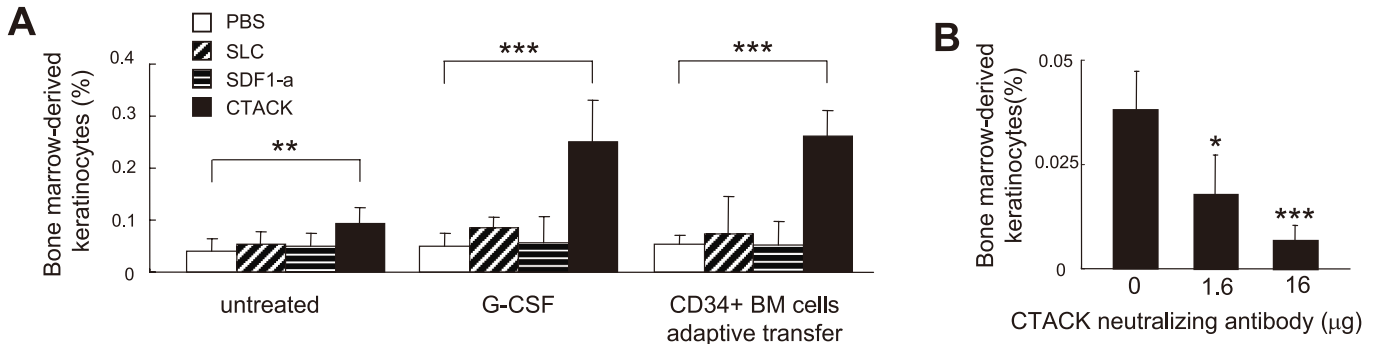


FIGURE 3

CTACK specifically accumulated BMDK in wounded skin.

(A) The number of BMDK was quantified as a percentage of the total number of keratinocytes in wounded skin from untreated mice or those treated with G-CSF for cytokine mobilization or those that received CD34+ BM cells adoptive transfer. SLC, SDF-1 α or CTACK (1 μ g in 30 μ l) were intradermally injected into the periphery of wounded skin (5 mice in each group). CTACK significantly accumulated large numbers of BMDK as compared with SLC, SDF-1 α and PBS (**P < 0.01). Furthermore, the number of BMDK increased in mice treated with G-CSF for cytokine mobilization or those that received CD34+ BM cells adoptive transfer (**P < 0.005).

(B) CTACK neutralizing antibody (0-16 μ g in 120 μ l) was injected to the periphery of wounded skin. The numbers of BMDK were decreased by CTACK neutralizing antibody in dose-dependent manner (5 mice) (*P < 0.05, ***P < 0.005).

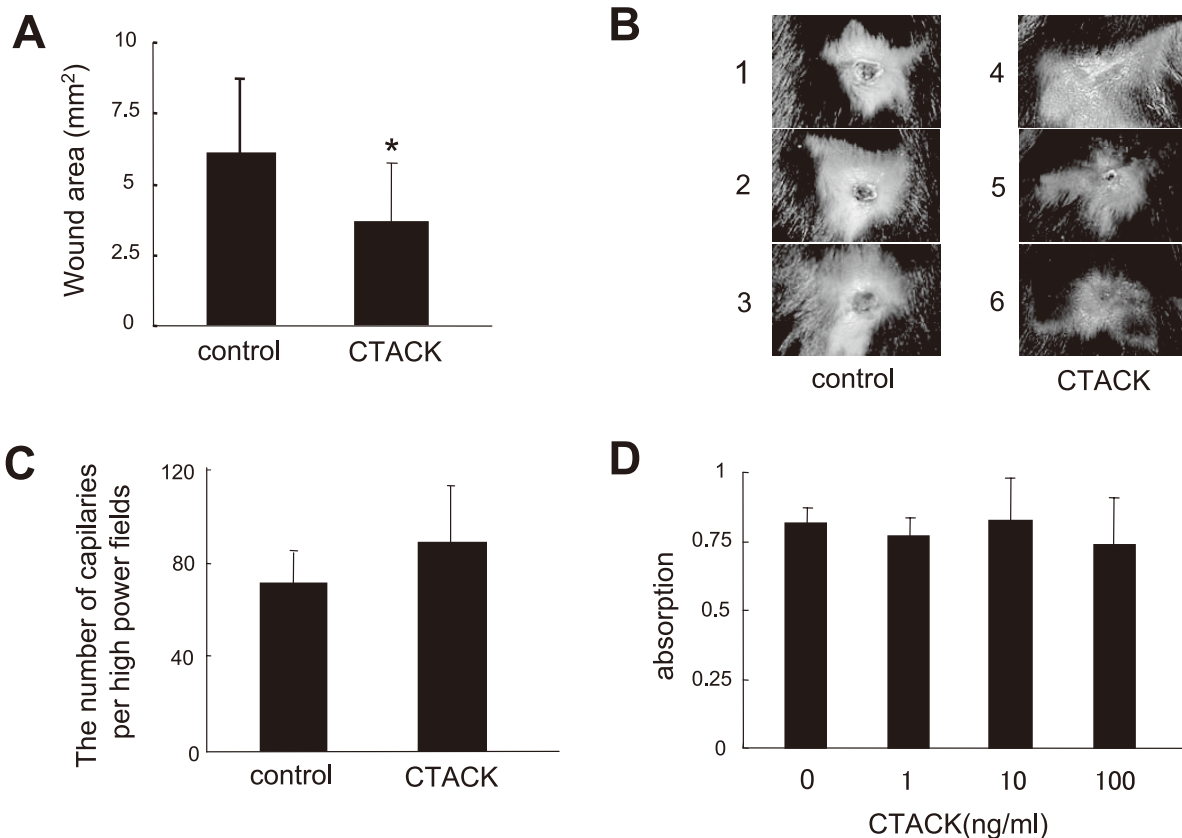


FIGURE 4

Increased BMDK by CTACK accelerated wound closure without angiogenesis or keratinocyte proliferation.

(A, B) Wound size was measured at 10 days after wounding and subsequent CTACK treatment (total 3 μ g in 100 μ l) or PBS (100 μ l), as control (6 mice in each group). Full-thickness cutaneous wounds were made and subsequently monitored daily. Intradermal injection of CTACK significantly accelerated wound closure (*P < 0.05) (A). Representative photographs of PBS, as control (mouse 1-3), or CTACK (mouse 4-6) treated wound appearance at 10 days after wounding (B).

(C) The numbers of capillaries in the dermis treated by CTACK (1 μ g in 30 μ l) or PBS (30 μ l) as control vehicle at 3 days after wounding were quantified. There was no statistical difference between CTACK and control (2 sections at each 5 mice).

(D) Keratinocytes were cultured with or without CTACK (0-100ng/ml) for 72h and viable cells were determined by proliferation assay. There was no statistical difference in proliferation of keratinocytes between the two treatment groups (9 mice).

CTACK は表皮細胞の増殖を促進しないことから (Fig. 4D)、CTACK の創傷治癒促進効果は主に骨髄由来表皮細胞誘導により惹起された。

4. 考 察

本研究課題により、骨髄由来表皮細胞の皮膚遊走機序の詳細が解明された。特定された特異的骨髄由来表皮細胞遊走因子：CTACK を用いた新たな再生医療の可能性があると考える。またこの本研究の手法および成果は、多くの組織細胞においても応用可能なものであり、本研究結果がブレークスルーとなり、他臓器についても解明されると予想される。さらに構造タンパク欠損を同種骨髄移植で補えることが示されれば、根本治療の全くない重症表皮水疱症への画期的治療に結びつくと思われる。あわせて、他臓器の多種の構造タンパク欠損症に対しても治癒の可能性を示すと考える。

また最近我々は間葉系幹細胞 (MSC) も同様に、特異的ケモカイン、ケモカインレセプターにより創傷皮膚に遊走することを見出した²⁾。幹細胞を用いる再生医療においてケモカイン、ケモカインレセプターを用いた治療の可能性が開かれたと期待する。

(引用文献)

- 1) Inokuma D, Abe R, Fujita Y, et al.: CTACK/CCL27 accelerates skin regeneration via accumulation of bone marrow derived-keratinocytes. *Stem Cells* 24, 2810-2816, 2006.
- 2) Sasaki M, Abe R, Fujita Y, et al.: Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol* 180, 2581-2587, 2008.

白皮症の病因遺伝子の解明とその遺伝子産物のメラニン色素生成における機能解析

山形大学医学部皮膚科学分野

鈴木 民夫

Oculocutaneous albinism (OCA) is a group of autosomal recessive disorders characterized by reduced or absent biosynthesis of melanin in melanocytes of the skin, hair, and eye. OCA is caused by mutations in the genes associated with melanin synthesis. So far, 16 genes have been reported to be involved in OCA. We have investigated the mechanism of melanogenesis. Here, we describe the analysis of the OCA genes in Japanese OCA patients and the identification of ten these patients, one OCA1, one OCA2, and eight OCA4. Ten novel mutations (c.445delTA in *TYR* gene for OCA1, p.792V in *P* gene for OCA2, and p.Y49C, p.G89R, p.C229Y, p.T437A, p.T440A, p.G473A in *SLC45A2* gene for OCA4) were detected. Furthermore, we analyzed an OCA patient who was a Moroccan origin Belgian boy with type 4 oculocutaneous albinism (homozygous p.H38R mutation in the *SLC45A2* gene). Functional analysis by transfection of the mutant OCA4 cDNA, p.D157N, or p.G188V which had been reported as high frequent mutations in Japanese OCA4 into *uvu*-mutant melanocytes established from OCA4 model mice showed that these missense substitutions are pathologic, resulting in these variant being unable to produce melanin. The p.H38R mutation was also investigated for the function in melanogenesis, and revealed to have no activity for melanogenesis. This is the first report on patient with OCA4 identified among African origin ethnic groups.

1. 緒言

ヒトの色素として、ヘモグロビン、カロチノイド、フラボノイド、メラニンなどが知られているが、最も重要な役割を担っているのはメラニンである。メラニンは複雑な組成を持つ高分子化合物であり、生体高分子化合物の中でも際立った特異性を有している。つまり、溶媒に不溶性であり、構造が不規則であり、加水分解により単量体に分解するのも困難である。このような特異的で複雑な構造ゆえに、メラニンは光の吸収と発散、フリー・ラジカル補足、熱の保持などの多様な機能を持つことが知られている。このメラニンは、皮膚においては紫外線障害を防御している。メラニン合成に関わる研究は、近年急速な発展を遂げている。ここ15年間にメラニン合成に関わる分子が次々に明らかにされ、その数は100種類以上といわれている。メラニンはメラノサイトのメラノソーム内で合成される。メラノソームはメラニンを合成、保持する唯一の細胞内小器官であり、最終的にはメラニンごと近隣のケラチノサイトに受け渡される。このメラノソーム内でメラニン合成に直接関わっている分子をはじめ、メラノサイトの細胞質やエンドソームに局在し膜輸送を介してメラノソームの生合成、あるいは成熟に必須とされる分子、さらにはメラノサイトの発生、分化に特異的に関与する分子が明らかにされ

てきた。これらの分子の異常は、結果としてメラニン合成の低下、あるいは消失をもたらし、臨床的には眼皮膚白皮症 (oculocutaneous albinism, OCA)、あるいはOCAに加えて出血傾向や間質性肺炎を合併する Hermansky-Pudlak 症候群 (HPS) などの症候群付随型白皮症を引き起こす¹⁾。

我々は皮膚科医として、これまでに臨床的には白皮症を呈する患者に対してその遺伝子診断による確定診断を行い、その診断をもとに日常生活における紫外線対策などの生活指導などを行ってきた。一方で、基礎研究を通じて白皮症の病因、病態、つまり、メラニン合成およびメラノソームの生合成およびその制御機構を明らかにしてきた。今回、臨床的アプローチとして、日本各地からの日本人白皮症症例に加え、モロッコ系ベルギー人症例の検体を解析する機会を得たので、その結果を報告する。さらに基礎的アプローチとして、*in vitro* 培養メラノサイトを使用した解析により、1) 日本人OCA 4型白皮症患者で見つかった変異OCA 4遺伝子産物の機能解析を行い、遺伝子異常によるメラニン合成能の変化を検討し、さらに2) モロッコ系ベルギー人にて明らかになったOCA4原因遺伝子SLC症例の遺伝子変異について1)と同様に機能解析を行った。

2. 実験

2.1 臨床的アプローチ

白皮症を呈する症例の原因遺伝子変異スクリーニングは、PCR-SSCP (polymerase chain reaction- single stranded conformation polymorphism) 法にて行なった。患者末梢血2~10mlより genomic DNA を抽出し、それを鋳型に用いて各OCA原因遺伝子増幅用のPCRプライマーにて、原因遺伝子のエクソンをその近傍を含め200~300bpごとに増幅した。次に、これらのPCR産物をSSCPにてス



Investigation and functional analysis on the responsible genes for oculocutaneous albinism

Suzuki Tamio

Department of Dermatology, Yamagata University School of Medicine

クリーニングを行い、異常バンドを検出した場合は、そのバンドの塩基配列を direct sequencing 法にて変異を同定した。

2. 2 基礎的アプローチ

正常ヒト OCA4cDNA をヒト培養メラノーマ細胞である MNT-1 cell cDNA library よりクローニングした。次に、その正常型 OCA4cDNA に p.D157N、p.G188V と p.D153N の変異をそれぞれ導入し、これらの cDNA を CMV プロモーター下のハイグロマイシン耐性ベクター (pIRESHyg3) に移し、OCA4 のモデルマウスである *underwhite* マウスより樹立された培養メラノサイト (uw cell) に導入した。その後、ハイグロマイシンで選択し、stable transformant を樹立した。なお、コントロールとして OCA4cDNA を組み込んでいない空のハイグロマイシン耐性ベクターを導入し、同様にそれぞれ独立クローンの stable transformant を 6 個以上、樹立した。こうして得られた stable transformant のメラニン含有量とタンパク量を測定した。

3. 結果

3. 1 臨床的アプローチ

3. 1. 1 日本人白皮症症例

日本各地よりの白皮症 (OCA) 患者の集積に努め、その遺伝子診断による分類を行なったところ、OCA1 と OCA2 を各 1 例ずつ²⁾、確定診断した (図 1 および 2)。これらの症例は、それぞれ各 1 種類の新規遺伝子変異を伴っていることが判明した。また、8 症例の OCA4 患者を同様に遺伝子診断した³⁾。これら 8 症例では、合計 6 種類の新規遺伝子変異が見つかった (図 3 および 4、表 1)。

3. 1. 2 モロッコ系ベルギー人症例

ベルギー・アントワープ大学の Storm 博士より依頼のあった白皮症患者を遺伝子変異スクリーニングした。症例は 5 歳、男児。生下時より、全身の白色皮膚、白色頭髪、青色虹彩、眼振陽性。メラニン色素沈着低下による症状以外の異常所見は認めなかった (図 5)。血液検査、血液凝集検査では特に異常を認めない。両親はモロッコ系移民でいとこ婚。1 歳の弟は皮膚色については健常。白皮症の原因遺伝子検索目的で当科にコンサルトされた。1~4 型眼皮膚白皮症の全ての原因遺伝子の変異スクリーニングを行なった。その結果、*SLC45A2* 遺伝子に p.H38R 変異を認めた。データベースの検索では、調べ得たすべての哺乳類、魚類、鳥類、両生類で 38 番目のアミノ酸であるヒスチジンは保存されていた。また、27 人のモロッコ系ベルギー人健常コントロールでは p.H38R は全く認めなかったことより、H38 は *SLC45A2* タンパク質の機能上、重要なアミ

ノ酸と考えられた。

3. 2 基礎的アプローチ (変異タンパク質の機能解析)

3. 2. 1 日本人症例で見られた変異

我々がこれまでに報告した 18 例の日本人白皮症 4 型患者⁴⁾ でみられた *SLC45A2* 遺伝子変異のうち、最も高頻度に見られた p.D157N と p.G188V の 2 種類のアミノ酸置換を伴う変異について検討した。また同時に、OCA4 型のモデルマウスである *underwhite* マウスで既に同定され報告されている p.D153N 変異もあわせて検討した。ヒト変異 OCA4cDNA 導入 *uw-melanocyte stable transformant* のメラニン合成能を調べる目的で、メラニン含有量を測定した。

その結果、図 6 に示すように、正常型 OCA4cDNA を導入したメラノサイトは、control ベクターを導入した Mock に比べ、有意な差をもってメラニン合成能が上昇した ($P < 0.005$)。このことは、ヒト正常型 OCA4cDNA は、マウス由来の *uw-melanocyte* においてメラニン合成について代償機能があることを示すものである。そこで、次に変異 cDNA を導入した stable transformant のメラニン含有量を調べたところ、変異 cDNA を導入した stable transformant ではいずれもメラニン含有量は少なく、control ベクターを導入した Mock に比べ合成能の上昇が見られなかった。つまり、control ベクターを導入した Mock に比べ、メラニン量について有意差はなかった。このことより、変異型 OCA4cDNA はメラニン合成活性が欠損、あるいは極めて低いことが推定された。

3. 2. 2 モロッコ系ベルギー人症例で見られた変異

p.H38R 変異を導入した *SLC45A2* cDNA を同様にして培養メラノサイトに導入してメラニン合成活性を正常型 cDNA 導入クローンと比較検討したところ、変異 cDNA を導入したクローンは有意な差を持ってメラニン合成能が少なかった (図 7)。以上の結果より、p.H38R はメラニン色素合成能が低下した病的変異である事が確認された。

4. 考察

OCA は、日本人では 4 万人に 1 人の頻度で見られる比較的稀な常染色体劣性遺伝性疾患である。今回、臨床的アプローチとして積極的に OCA 患者の集積に努め、遺伝子診断したところ、1 種類ずつの新規遺伝子変異を伴う OCA1 型 1 例、2 型 1 例、6 種類の新規遺伝子変異を伴う OCA4 型 8 例を新たに確定診断することができた。OCA4 型は、世界的にはこれまでに報告数が少ない稀なタイプと言われている⁵⁾。しかし、日本人では主要病型の 1 つであり、日本人白皮症の約 25% を占めると報告されている⁴⁾ が、実際にはさらに頻度が高く 30% 程度は OCA4 型が占める事が予想される。



図1 8ヶ月日本人女児。OCA 1型の原因遺伝子であるチロシナーゼ遺伝子 (TRY) に2種類の遺伝子変異 (c.445_445delTA and c.929insC) が明らかになりOCA1A型と遺伝子診断した。眼振、白髪、白色皮膚、そして蒙古班の欠如など、典型的な1A型の症状を呈した。



図2 4ヶ月日本人男児。双生児の一方。OCA 2型の原因遺伝子であるP遺伝子 (P) に2種類の遺伝子変異 (c.2373_2375delCGT and p.A481T) が明らかになりOCA 2型と遺伝子診断した。金髪、クリーム色の皮膚、褐色の虹彩を呈する比較的軽症の症状を示す。双子のもう一方も同様な白皮症症状を呈する。同様に白皮症を呈する。



図3 6歳日本男児 (表1、患者1)。OCA 4型の原因遺伝子である SLC45A2 遺伝子に2種類の遺伝子変異 (p.D157N and p.T440A) が明らかになりOCA4型と遺伝子診断した。褐色の頭髮、赤褐色の虹彩、眼振なし。軽症型。

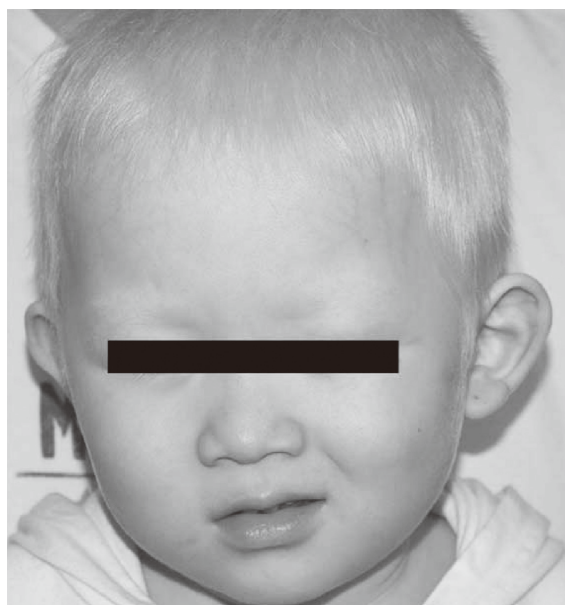


図4 8歳日本男児 (表1、患者8)。OCA 4型の原因遺伝子である SLC45A2 遺伝子に2種類の遺伝子変異 (p.G89R and p.G188V) が明らかになりOCA4型と遺伝子診断した。白色の頭髮、青い虹彩、眼振陽性。重症型。同じOCA4型であっても、図3の症例に比べ明らかに色素沈着が少ない。

表 1 8人の日本人 OCA4 症例の SLC45A2 遺伝子変異形と臨床症状

Patient			Mutations		Clinical phenotype		
No.	Age	Sex	Maternal	Paternal	Hair color	Iris color	Nystagmus
1	6 years	M	p.D157N	p. T440A	Brown	Red-brown	Negative
2	5 months	M	p.G188V	p. T440A	Brown	Hazel	Negative
3	8 months	F	p. T440A	p. G89R	Blond	Brown	Negative
4	11 months	F	p. T437A	p.D157N	Blond	Hazel	Negative
5	3 months	M	p. G473D	p.D157N	Light brown	Blue	Positive
6	1 year	M	(p. Y49C p.D157N) ^a		Blond	Blue	Positive
7	4 years	F	p. C229Y	p.D157N	Blond	Gray	Positive
8	2 years	M	p. G89R	p.G188V	White	Blue	Positive

新規遺伝子変異は太字で示した。

^a 両親どちら由来かを確定できなかった。



図5 5歳、男児。生下時より、全身の白色皮膚、白色頭髪、青色虹彩、眼振陽性。メラニン色素沈着低下による症状以外の異常所見は認めず。血液検査、血液凝集検査特に異常なし。両親はモロッコ系移民でいとこ婚。1歳の弟は正常。

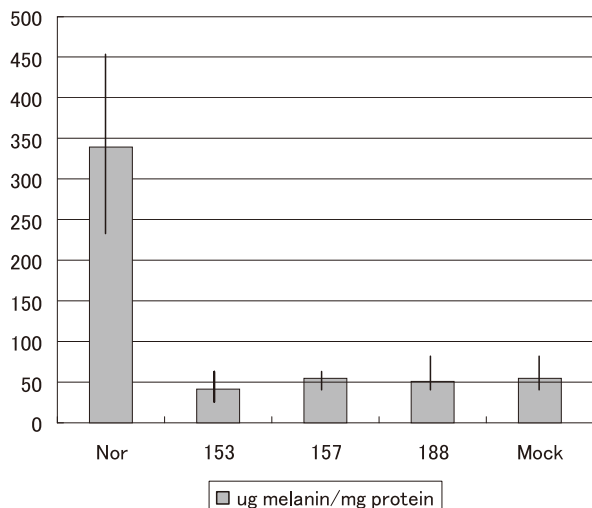


図6 日本人 OCA4 症例で見られた *SLC45A2* 変異の機能解析結果。変異を導入した培養細胞は、正常 *SLC45A2* を導入した細胞に比べ、有意な差を持ってメラニン合成能が低く、陰性コントロールとほぼ同程度である。Nor：正常ヒト *SLC45A2* cDNA 導入 stable transformant, 153：p.D153N 変異導入 stable transformant, 157：p.D157N 変異導入 stable transformant, 188：p.G188V 変異導入 stable transformant, Mock：control stable transformant, *： $P < 0.005$

in vitro 培養メラノサイトをつかったアミノ酸置換変異によるメラニン合成能回復試験の解析で、今回解析した D157N と G188V 変異については、確かに正常型 cDNA を導入した細胞に比べメラニン合成能が低下しており、この 2 種類の変異が確かに病的変異であることが証明された。このような *in vitro* での変異遺伝子解析報告はこれまでにない新しい手法の確立であり、今後の新しい変異に対しても応用が可能である。

今回、アフリカ系人種であるモロッコ系ベルギー人白皮症症例の遺伝子診断する機会を得た。白皮症 1～4 型原因遺伝子全てを調べたところ、OCA4 型原因遺伝子である *SLC45A2* にアミノ酸置換変異（ミスセンス変異）を認めた。この変異は、調べ得た限り他の種で保存されている重要なアミノ酸に生じていること、また、入手可能であった同民族の健常人 27 人において同じ変異を認めなかったことより、病的変異の可能性が高いと考えられた。そこでさらに、OCA4 モデルマウスより樹立した培養メラノサイトを使用した *in vitro* のシステムを用いてメラニン合成活性を調べたところ、ほとんどメラニン合成活性がないことが示され、p.H38R 変異は明らかに病的変異である事が示された。これまでにアフリカ系人種で OCA4 症例の報告がなく、本症例が OCA4 と診断された初めての症例である。

今回の研究により、明らかに眼皮膚白皮症 4 型の研究が推進されたと考える。

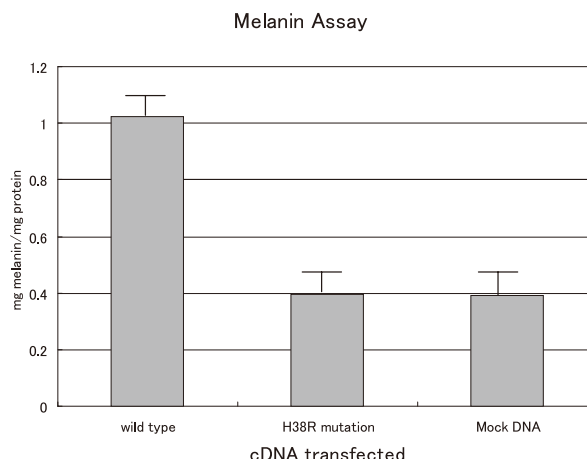


図7 モロッコ系ベルギー人 OCA4 症例で見られた *SLC45A2* 変異の機能解析結果。変異を導入した培養細胞は、正常 *SLC45A2* を導入した細胞に比べ、有意な差 ($P < 0.01$) を持ってメラニン合成能が低く、陰性コントロールとほぼ同程度である。

(文献)

- 1) Tomita Y, and Suzuki T: Genetics of Pigmentary Disorders. (review) *Am J Med Genet* 131C: 75-81 (2004)
- 2) Ito S, Suzuki T, Inagaki K, Suzuki N, Kono M, Iwamoto T, Mochizuki S, Tomita Y: Two novel mutations detected in Japanese patients with oculocutaneous albinism. *J Dermatol Sci* 44: 116-118 (2006)
- 3) Inagaki K, Suzuki T, Ito S, Suzuki N, Adachi K, Okuyama T, Nakata Y, Shimizu H, Matsuura H, Oono T, Iwamatsu H, Kono M, Tomita Y: Oculocutaneous albinism type 4: six novel mutations in the membrane-associated transporter protein gene (*SLC45A2*) and their phenotype. *Pigment Cell Res* 19:451-453 (2006)
- 4) Inagaki K, Suzuki T, Shimizu H, Ishii N, Umezawa Y, Tada J, Kikuchi N, Takata M, Takamori K, Kishibe M, Tanaka M, Miyamura Y, Ito S, Tomita Y: Oculocutaneous albinism type 4 is one of the most common types of albinism in Japan. *Am J Hum Genet* 74: 466-471 (2004)
- 5) Newton JM, Cohen-Barak O, Hagiwara N, Gardner JM, Davison MT, King RA, Brilliant MH: Mutations in the human orthologue of the mouse underwhite gene (*uw*) underlie a new form of oculocutaneous albinism, OCA4. *Am J Hum Genet* 69: 981-988 (2001)

真皮幹細胞を利用した皮膚の若返り治療

京都大学大学院医学研究科形成外科

内藤 素子

Intrinsic aging and photodamage of the face result in dull and lax skin with clear and deep wrinkles at rest. The “aged face” is characterized by poorly organized dermal extracellular matrix, including collagens and elastic fibers. Many young peoples also have skin troubles, such as acne scar. Although ablative and nonablative therapies of skin resurfacing and rejuvenation are performed against these skin damages, these methods do not achieve complete remission. Recently, dermal multipotent cells (DMCs) were isolated from the mammalian dermis. These cells are able to differentiate into many cell types including osteocytes, chondrocytes, adipocytes and neuros, and are thus suggested to play important roles in wound healing process as an origin of reproduced dermal tissues. This research project aims to determine whether DMCs have a potency to contribute to skin resurfacing and rejuvenation by differentiating into dermal fibroblastic cells that synthesize de novo matrix. As a first step of the project, we determine the most effective method to obtain DMCs from adult aged human dermis and check their proliferation and abilities to produce matrix proteins. Next, we examine whether DMCs grafted with keratinocytes can differentiate into dermal fibroblast at skin wound in nude-mice and stimulate wound healing process by reproduction of extracellular matrix. These experiments will contribute to the establishment of new complete therapy of damaged skin.

1. 緒言

近年、皮膚の老化に伴うたるみやしわをとり、皮膚を若返らせる、という治療は国民の関心を集めている。また、ニキビ痕などの顔面皮膚表面の凹凸に対する種々のレーザー照射による治療も改良が重ねられ、注目を集めている。しわ、たるみに対するコラーゲンやヒアルロン酸の注入、神経毒素の注入などの局所注入療法や、ピーリング、レーザー療法、Face-Lifting手術などが行われている。これらの治療を行う施設は、ここ数年急激に増加しており、女性誌を開けば、必ずといってよいほどこのような治療に関する広告が掲載されており、女性の関心をいかに集めているかがわかる。しかし、いずれも、効果の程度や持続期間が必ずしも一定ではなく、持続的効果を期待するためには、定期的に処置を受けることが必要である場合が多い。ピーリングは、しわやたるみ、瘢痕による凹凸をとる、ということに関して少ない施術回数で確実な効果を期待するのは難しい。手術療法は、侵襲が大きく、術後の管理も必要となり、患者の負担も大きい。最近、自己血液より採取した血小板分画を濃縮し、注入することにより、皮膚の若返りを図る試みがなされているが、効果の確実性や持続性などが一定しない点があり、個体差もある。あるいは、自己皮

膚より採取した線維芽細胞を皮膚のたるみやしわの部分、にきび痕陥凹部に注入することが一部の施設で行われている。しかし、たとえ注入細胞が生着しても、時間とともにその数は減り、またマトリックスの産生も減少してしまうことが予想される。申請者らが形成外科診療において行う「真皮移植」術においてさえ、移植片は時間の経過とともに吸収されてしまう。このことは、「真皮移植」という極めて新鮮な状態で、自己の真皮線維芽細胞と細胞外マトリックスを移植しても、そのみでは術直後の状態を維持することが困難なことを意味する。そこで我々は、移植された場所で、自己複製し、マトリックスを産生し続ける能力のある細胞を用いることが肝要であると考え、その候補として真皮幹細胞は最適であると予想した。

真皮幹細胞は、2001年にToma¹⁾らによって初めて報告されて (Toma. et al., *Nat. Cell. Biol.* 3: 778-784, 2001) 以降、数報の発表^{2), 3), 4)}がある。マウス真皮幹細胞を分化させ、神経系の細胞を誘導して臨床治療に役立てる方向で研究がなされている。我々は、この真皮幹細胞を皮膚の若返り、あるいは皮膚再生に用いるとことを目的に、研究を開始した。

2. 実験

2・1 成人ヒト皮膚由来真皮幹細胞の効率的採取方法の検討：

成人ヒト真皮幹細胞は数が少なく、従来の sphere 法では効率的に採取することが困難である。Joannidesら⁴⁾ (*Lancet*, 364, 172-178, 2004) の報告をもとに、さらに効率よく真皮幹細胞を採取、培養する方法について検討し、得られた細胞の性質も解析した。



Skin rejuvenation and resurfacing with dermal multipotent cells

Motoko Naitoh

Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University

2・2 真皮幹細胞が創傷治癒、真皮性状、癬痕化に与える影響の調査：

真皮幹細胞を血清入り培地にて増殖させて得た細胞 (SDM cell とよぶ) が、創傷治癒、癬痕化にどのような影響を与えるかを調べた。ヌードマウス背部に直径 1 cm の皮膚全層欠損層を作製し、同部に SDM cell を表皮角化細胞とともに移植して経過を観察した。比較対象として、成人ヒト皮膚由来線維芽細胞と表皮角化細胞を移植した。創が縮むことにより治癒する影響を防ぐため、創周囲にシリコンリングをおき、6-0 ナイロン糸で筋層まで糸を通して縫合固定した。

3. 結果および考察

3・1

ヒト成人皮膚を細切後、デイスパーゼ処理により表皮を除去した後、得られた真皮を 2 mm 角程度に細切し、コラーゲナーゼ処理、ストレーナーを通して、non-coated dish に播種した。培養液は、Toma らの方法に順じ、DMEM/F12(1:1) に B27、bFGF、EGF を含有した培地を用いた。約 1 週間後に、図 1-A に示すごとく真皮幹細胞 = sphere が形成されてくる。この sphere を取り出し、細胞培養用 coated dish に入れ、血清添加間葉系細胞用培地で培養すると、約 2～3 日で sphere は dish 底面にはり付き、そこから細胞が増殖し始める (図 1-B)。これを我々は SDM cell と呼んでいる。sphere と異なり、SDM cell は容易に継代が可能である。Joannides ら⁴⁾ の報告では添加血清は 20% となっているが、我々の系では 10% で十分であると考えられる。また、培地中に試薬 A を添加した場合は、少なくとも 14 週間までは増殖率が衰えることなく継代が可能である。次に、この培養液から、血清をふくまない sphere 用培地へ交換すると、dish 底面にはり付いていた細胞は浮遊し始め、1 週間程度でもとの球状の sphere に戻り (図 1-C)、分化能でも可塑性を示す。また、SDM cell のマトリックス産生能をみるため、マイクロアレイにてエラスチン、フィブリリン 1、I 型コラーゲン、の mRNA 発現量を同一人物の同部位から培養した線維芽細胞と比較したところ、それぞれ 2.2 倍、1.35 倍、1.7 倍、SDM cell のほうが産生量が

多いことが判明した (図 2)。

3・2

ヌードマウス背部に作製した直径 1 cm の皮膚全層欠損層に、各細胞を移植して 6 日目で移植部を含むマウス背部皮膚を採取した。図 3-B に示すように線維芽細胞を移植した創は、上皮化していない範囲が広いのに対して、SDM cell を移植したほう (図 3-A) は、すでに上皮化が完了している。皮膚質感も周囲皮膚とかわらずしなやかで拘縮は認められない。SDM cell は表皮角化細胞によるすみやかな上皮化を促し、癬痕化を伴わない真皮再生に影響を与える可能性が示唆された。さらに、長期経過観察を行い、7 ヶ月後の組織所見を比較したところ、SDM cell 移植部位では、真皮内には周囲マウス真皮層よりも太く密なコラーゲン線維束が観察され、十分な厚さの真皮様組織が形成されていた (図 3-C)。一方、線維芽細胞移植部 (図 3-D) ではコラーゲン線維も細く、成熟癬痕様組織であり、厚みも SDM cell 移植部と比較して半分以下であった。以上のことから、ヒト真皮由来幹細胞は良好な増殖能とマトリックス産生能を持ち、皮膚再生や皮膚若返りに有用である可能性が示唆された。

(参考文献)

- 1) Toma JG, Akhavan M, Fernades KJL, et al.: Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat. Cell. Biol.*, 3, 778-784, 2001.
- 2) Kawazoe Y, Yanagi Y, Takato T, et al.: Characterization of multipotent adult stem cells from the skin: transforming growth factor- β (TGF- β) facilitates cell growth. *Exp. Cell. Res.*, 295, 194-203, 2004
- 3) Fernandes KJL, McKenney IA, Mill P, et al.: A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat. Cell. Biol.*, 6, 1082-1093, 2004.
- 4) Joannides A, Gaughwin P, Schwiening C, et al.: Efficient generation of neural precursors from adult human skin: astrocytes promote neurogenesis from skin-derived stem cells. *Lancet*, 364, 172-178, 2004.

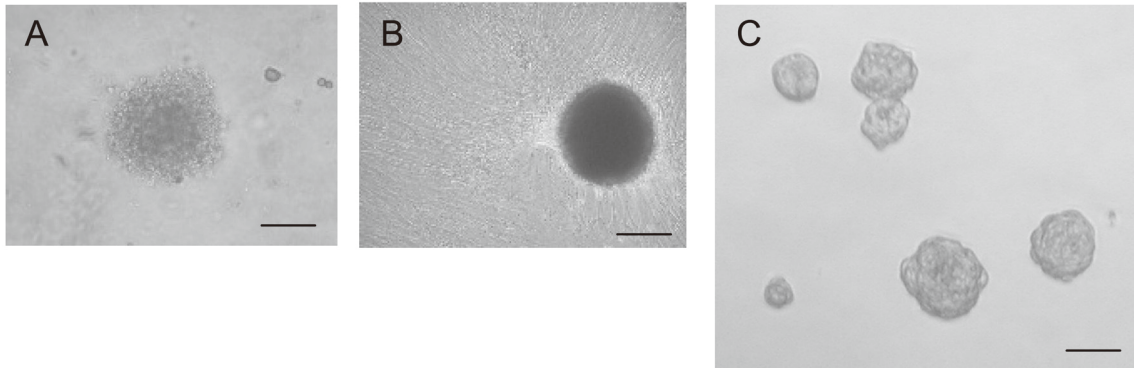


図1 A. sphere法を用いて74歳女性の皮膚より得られた真皮幹細胞。B. sphereを細胞培養用coated dishで10%血清入り培地を用いて培養すると、底面にはりつき増殖する。C. 培地を初代sphere用培地に転換すると、はりついていた細胞は浮遊し始めsphereに戻る。Bar=100 μ m

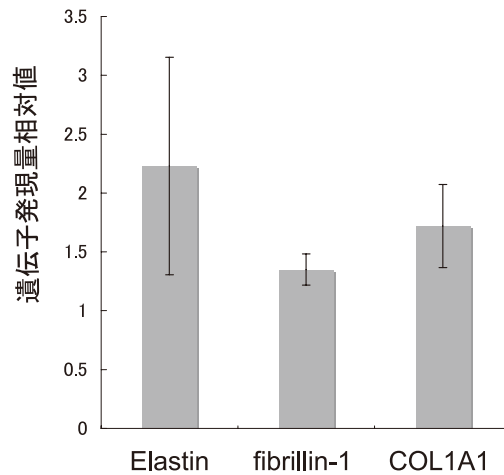


図2 Elastin, fibrillin-1, コラーゲン α 1(1) 遺伝子の発現量の相対値。線維芽細胞における各遺伝子の発現量を1としたときの、SDM cellにおける発現量を数値化した。n=3

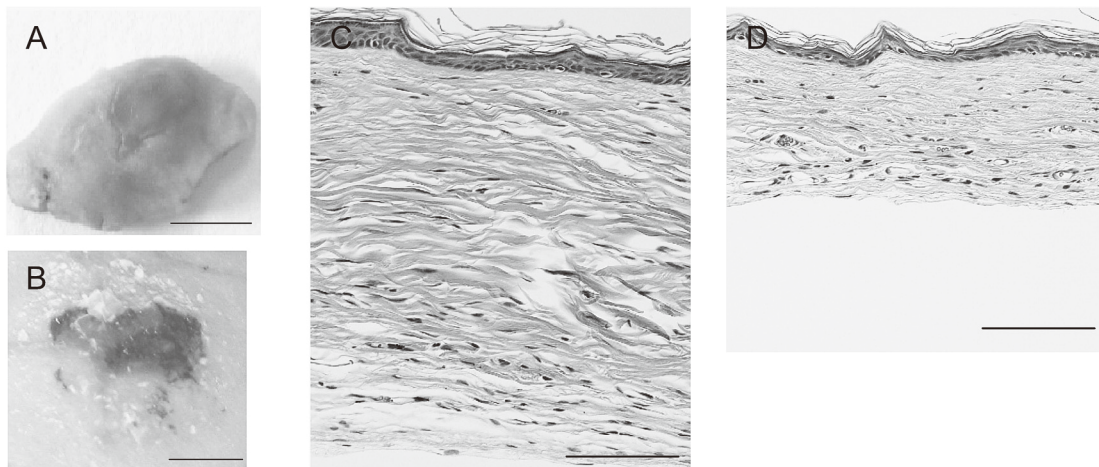


図3 A. ノードマウス背部に作製した皮膚全層欠損層にSDM cellと表皮角化細胞を移植して6日後の状態。創は上皮化が完了し、質感も周囲皮膚と大差なく良好な状態である。B. 線維芽細胞と表皮角化細胞を移植したものでは、まだ上皮化が完了していない。Bar=5 mm C. SDM cellと表皮角化細胞移植後7ヶ月後、HE染色像。D. 線維芽細胞と表皮角化移植後7ヶ月の結果HE染色像。Bar=C,D, とも100 μ m。

紫外線誘発メラニン合成への スフィンゴシン 1-ホスフェートの抑制効果の検討

神戸大学大学院医学系研究科応用分子医学講座皮膚科学

錦 織 千佳子

Melanin content in pigment cells is regulated by multiple mechanisms. We have previously shown that melanogenesis in mouse B16 melanoma cells is inhibited by activation of phospholipase D through ubiquitin proteasome-mediated degradation of tyrosinase. Further, we have recently found that sphingosine 1-phosphate, a lipid messenger that is implicated in the regulation of a wide variety of important cellular events acting through intracellular as well as extracellular mechanisms, suppresses melanin content in B16 cells. In this study, the involvement of phospholipase D and sphingosine kinase, a key regulator of intracellular sphingosine 1-phosphate level, in ultraviolet B-induced skin pigmentation and sphingosine 1-phosphate-induced suppression of melanin content in B16 cells was examined. Neither phospholipase D activity nor sphingosine kinase activity in B16 cells was affected by ultraviolet B, suggesting that these enzymes are not involved in ultraviolet B-induced pigmentation. We next investigated the involvement of phospholipase D and sphingosine kinase in the sphingosine 1-phosphate-induced suppression of melanin content. sphingosine 1-phosphate did not activate phospholipase D in B16 cells, indicating that phospholipase D activation is not involved in the sphingosine 1-phosphate-induced suppression of melanin content. However, treatment of B16 cells with the sphingosine kinase inhibitor dimethylsphingosine resulted in an increase in melanin content without affecting tyrosinase activity. Melanosomes were highly aggregated in the cells treated with dimethylsphingosine. Furthermore, sphingosine kinase colocalized with the aggregated melanosomes. These results suggest that sphingosine 1-phosphate, that is derived from sphingosine in the melanosome membrane through the catalytic activation of sphingosine kinase, regulates melanin content through melanosome distribution.

1. 緒 言

哺乳動物のメラニン、色素細胞に存在する特殊な細胞内小器官であるメラノソーム内で合成される。メラノソームにおいて、メラニン合成はチロシナーゼによるチロシンの酸化反応を始めとする多段階のステップを経て遂行される。メラニンはこのステップの中で生じた色素を有する様々な生体高分子の混合物である。メラニンで満たされたメラノソームは色素細胞の樹状突起内を突起端まで運ばれ、色素細胞の周囲に存在する角化細胞に移送され、紫外線からの皮膚の防御、種々の毒物・化学物質の吸収、肌色の違いの原因等に重要な役割を果たしている。

我々は色素細胞内メラニン量調節機構の研究過程で、マウス黒色腫由来 B16 細胞をスフィンゴシン 1-ホスフェート (S1P) 処理した際、細胞内メラニン量が減少することを見い出した。S1P は生体膜スフィンゴ脂質由来の代謝産物で、細胞内セカンドメッセンジャーとして、あるいは細胞膜表面レセプターを介するリガンドとして働く新規の情報伝達脂質として注目されている¹⁾。細胞内 S1P レベル

は大部分スフィンゴシンキナーゼ (SPHK) によるスフィンゴシン代謝により制御されている。SPHK には SPHK1、SPHK2 の 2 つの分子種が存在する。一方、我々は細胞膜情報変換酵素であるホスホリパーゼ D (PLD) 活性化が同じく B16 細胞においてチロシナーゼのユビキチン-プロテアソーム系分解を促進した結果、メラニン生成抑制を起こすことを見い出し報告している²⁾。ある種の細胞では S1P により細胞内 PLD が活性化されることが報告されている^{3,4)}。

本研究において我々は、皮膚の色素沈着を起こす紫外線および色素細胞内メラニン量を減少させる S1P それぞれの作用への SPHK、PLD 活性化の関与を検討した。

2. 実 験

1) 細胞

マウス黒色腫由来 B16 細胞を使用し、継代および実験には 10%FCS を含む Eagle's minimal essential medium を用いた。

2) SPHK アッセイ

SPHK アッセイは、細胞溶解液とスフィンゴシンを ³²P で標識された ATP 存在下で反応させ、生成した S1P を薄層クロマトグラフィーにより分離し、S1P 中に含まれる ³²P をバイオイメージング分析器 (BAS2000, Fuji Photo Film) により測定することにより行った。

3) PLD アッセイ

PLD 活性は、¹⁴C で標識されたリゾホスファチジルコリ



Role of sphingosine 1-phosphate in ultraviolet-induced melanogenesis

Chikako Nishigori

Kobe University Graduate School of Medicine, Department of Clinical Molecular Medicine, Division of Dermatology

ンで標識した細胞をエタノール存在下で S1P で 30 分刺激したあと、ホスファチジル基転移反応によって生成されたホスファチジルエタノール中の ^{14}C 放射能が脂質中に取り込まれた全放射能に占める割合で表した。

4) メラニン定量およびチロシナーゼアッセイ

これまでに我々が用いた方法²⁾で行った。

5) 免疫染色及び観察

細胞の固定は 3% パラホルムアルデヒド/PBS で 20 分行った。0.2% Triton X-100 処理および BSA によるブロッキング後、抗メラノソーム抗体 (HMB45) および抗 SPHK1 抗体にて反応させ、2 次抗体にて発色後、共焦点顕微鏡にて観察した。

3. 結果

3.1 紫外線が SPHK、PLD 活性に及ぼす影響

B16 細胞に紫外線 B を 5、10、30mJ/cm² 照射したときの PLD、SPHK 活性を測定したが、どの照射量の場合も SPHK、PLD 活性には影響を与えなかった (データ省略)。

3.2 S1P が細胞内のメラニン量、PLD 活性に及ぼす影響

B16 細胞を 10 μM S1P で処理すると 72 時間後には細胞内のメラニン量はコントロールに比べて減少していた (図 1A)。しかし、10 μM S1P 処理により B16 細胞内の PLD は活性化されなかった (図 1B)。

3.3 SPHK 阻害剤が細胞内のメラニン量、メラノソームの局在に及ぼす影響

B16 細胞には S1P レセプターが発現していることは示

されている⁵⁾が、S1P による B16 細胞内メラニン量減少は、細胞膜 S1P レセプターを刺激するのに用いられる S1P 濃度に比べて高い濃度を要するため、S1P は細胞内に直接入って効果を現わしている可能性を考え、細胞内の S1P レベルを制御する SPHK の関与について検討することにした。B16 細胞を SPHK 阻害剤である dimethylsphingosine (DMS) (3 μM) で処理したところ、72 時間後にはコントロールに比べて細胞内メラニン量は増加していた (図 2A)。しかし、チロシナーゼ活性は DMS 処理細胞とコントロール細胞で差がなかった (図 2B)。DMS 処理した B16 細胞内における SPHK1 の局在をメラノソームの局在と比較したところ、DMS 処理によりメラノソームは凝集し (図 3)、このときメラノソームと SPHK1 の局在はよく一致していた (図 4)。

4. 考察

紫外線 B は PLD、SPHK 活性には影響を与えなかったため、紫外線による皮膚色素沈着機序への PLD、SPHK 活性変化の関与は否定的と考えられた。次に我々は、S1P による B16 細胞内メラニン量減少機序への PLD、SPHK 活性の関与を調べた。まず、S1P が B16 細胞表面のレセプターを介して PLD 活性化を起こし、その結果我々が以前報告した機序¹⁾、すなわちチロシナーゼのユビキチン-プロテアソーム系分解促進により細胞内メラニン量が減少する可能性を考え、B16 細胞内のメラニン量を減少させる濃度の S1P による PLD 活性化は起こらず、この S1P が PLD 活性化を介してメラニン量を減少させる可能性を否定した。次に、S1P が細胞内に入って効果を発揮する可能性を考え、細胞内の S1P 量を制御する SPHK の阻害剤

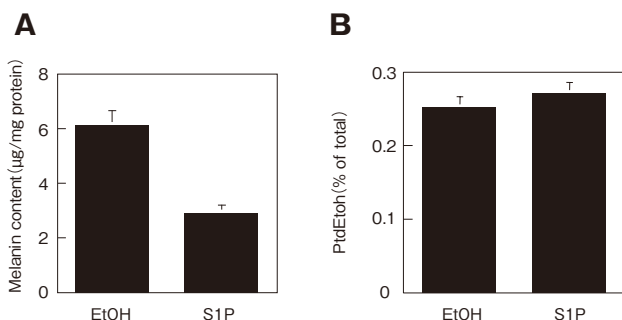


図 1 (A) S1P 処理による B16 黒色腫細胞内メラニン量の変化 B16 細胞を 10 μM S1P 処理し、72 時間後のメラニン量をコントロール (0.1% エタノール: EtOH) 細胞とともに測定した。(B) S1P 処理による B16 黒色腫細胞内 PLD 活性変化: B16 細胞に ^{14}C で標識されたリゾホスファチジルコリンを取り込ませ、エタノール存在下で 10 μM S1P で 30 分刺激し、PLD 活性をコントロール (0.1% エタノール: EtOH) 細胞とともに測定した。PLD 活性は、ホスファチジル基転移反応によって生成されたホスファチジルエタノール (PtdEtOH) 中の ^{14}C 放射能が、脂質中に取り込まれた全放射能に占める割合で表した。

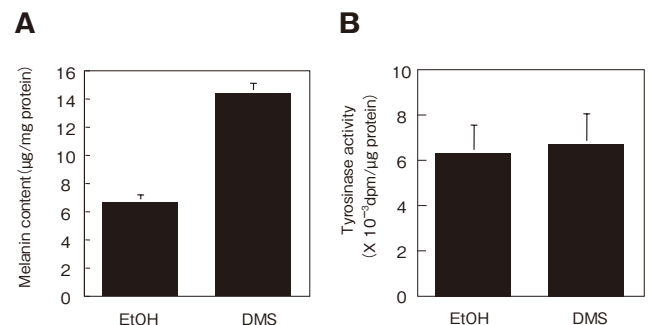


図 2 (A) DMS 処理による B16 黒色腫細胞内メラニン量の変化 B16 細胞を 3 μM DMS 処理し、72 時間後のメラニン量をコントロール (0.1% エタノール: EtOH) 細胞とともに測定した。(B) DMS 処理による B16 黒色腫細胞内チロシナーゼ活性変化: B16 細胞を 3 μM DMS 処理し、72 時間後のチロシナーゼ活性をコントロール (0.1% エタノール: EtOH) 細胞とともに測定した。

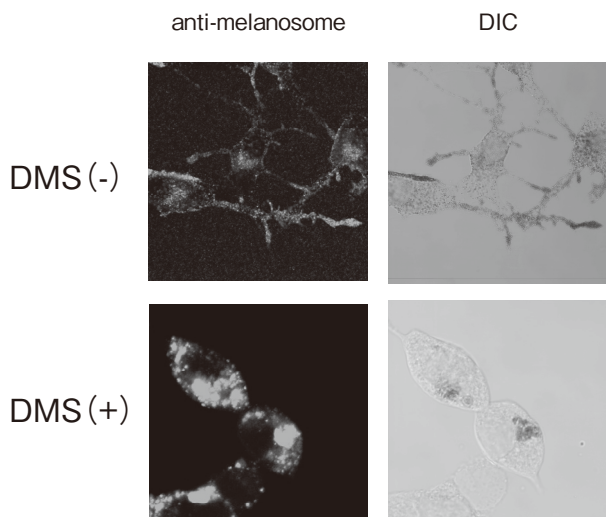


図3 DMS 処理による B16 黒色腫細胞内のメラノソーム局在の変化

B16 細胞を 3 μ M DMS 処理し (DMS (+))、72 時間後、DMS 処理を行わなかった細胞 (DMS (-)) とともに抗メラノソーム抗体 (anti-melanosome) を用いて免疫染色を行い共焦点顕微鏡にて観察した。

である DMS で細胞を処理したところ、B16 細胞のメラニン量は増加した。よって SPHK 活性化によって生じる細胞内 S1P はメラニン量制御因子として働く可能性が示唆された。DMS によるメラニン量増加はチロシナーゼ活性増加を伴わないことから、S1P はメラニン生成を促進するという機序以外の機構により細胞内のメラニン量を制御すると推定した。そこで DMS 処理した細胞を顕微鏡で観察したところ、メラノソームの著明な凝集が起っていた。この結果より、SPHK により産生された S1P はメラノソームの凝集・拡散を制御していると考えられ、DMS によるメラニン量増加はメラノソームの凝集過多の結果、拡散して細胞外に分泌されるメラノソームが減少した結果であると推定した。さらに、メラノソームと SPHK1 は局在がよく一致したことから、SPHK1 はメラノソーム膜のスフィンゴシンからの S1P 産生を制御することによりメラノソームの凝集・拡散を調節していると推定した。細胞内で生じた S1P がどのような機序でメラノソームの凝集・拡散を制御しているかは現時点では不明であるが、その機序の解明は色素細胞のメラニン量制御機構およびメラニン分泌機構の理解に大きく役立つと期待される。

謝 辞

本研究は、神戸大学大学院医学系研究科分子生物学講座生化学 中村俊一教授との共同研究である。

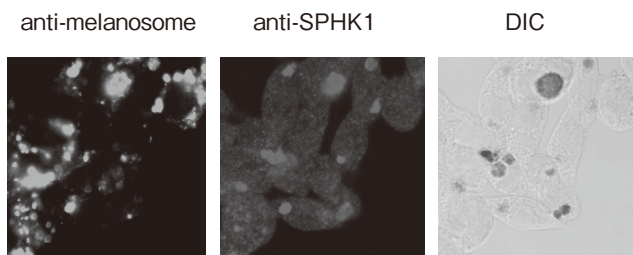


図4 (A)DMS 処理した B16 黒色腫細胞内のメラノソームと SPHK1 の局在

B16 細胞を 3 μ M DMS 処理し、72 時間後、抗メラノソーム抗体 (anti-melanosome) および抗 SPHK1 抗体 (anti-SPHK1) で免疫染色を行い共焦点顕微鏡にて観察した。

(文献)

- 1) Taha TA, Hannun YA, and Obeid LM, : Sphingosine kinase: Biochemical and cellular regulation and role in disease. *J. Biochem. Mol. Biol.* 39, 113-131, 2006.
- 2) Kageyama A, Oka M, Okada T, *et al.* : Down-regulation of melanogenesis by phospholipase D2 through ubiquitin proteasome-mediated degradation of tyrosinase. *J. Biol. Chem.* 279, 27774-27780, 2004.
- 3) Cummings RJ, Parinandi NL, Zaiman A, *et al.* : Phospholipase D activation by sphingosine 1-phosphate regulates interleukin-8 secretion in human bronchial epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 277, 30227-30235, 2002.
- 4) Banno Y, Takuwa Y, Akao Y, *et al.* : Involvement of phospholipase D in sphingosine 1-phosphate-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt in Chinese hamster ovary cells overexpressing EDG3. *J. Biol. Chem.* 276, 35622-35628, 2001.
- 5) Arikawa K, Takuwa N, Yamaguchi H, *et al.* : Ligand-dependent inhibition of B16 melanoma cell migration and invasion via endogenous S₁P₂ G protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* 278, 32841-32851, 2003.

黄色ブドウ球菌における病原性遺伝子の多様化メカニズム： 同一種内多数ゲノム比較によるゲノム進化解析

東京大学新領域創成科学研究科および東京大学医科学研究所

小林 一三

Staphylococci are normal inhabitants on skin and mucous membrane of humans and can become pathogenic. Especially, *Staphylococcus aureus* can cause severe inflammation in various tissues including skin which sometimes results in serious disorder. In addition, this bacterium has developed resistance to practically all types of antibiotics. Due to its clinical importance, whole genome sequences of multiple *S. aureus* strains have been decoded. To date, complete genome was sequenced for more than ten strains and has become publicly available. In their genome, several tandem clusters of paralogous genes, likely pathogenicity-related, have been found in genomic islands. Intergenomic comparison with respect to these clusters revealed polymorphisms in them. In the case of *lpl* gene cluster, encoding lipoprotein homologues, the variation was very extensive. Our multiple sequence alignment revealed presence of a region highly conserved not only at the amino acid sequence level but also at the nucleotide sequence level and regions to its 5' and 3' sides, which are more variable. The highly conserved nucleotide sequences are likely to have provided a site for homologous recombination generating the variation of this region. Comparison of phylogenies of the 5'-variable region and the 3'-variable region revealed significant incongruence within the same ORF. By contrast, pairs of 3'-variable region of an ORF and 5'-variable region of its downstream ORF gave more congruent phylogenies with groups of conserved pairs, which suggested their linkage. An intergenic region sandwiched by such a pair of variable regions seemed to have co-evolved with it. These lines of observations supports our hypothesis that homologous recombination at the central conserved region have played a major role in generating variations in this cluster. This model explains not only formation of various types of rearrangements through multiple crossing-over events but also generation of a novel ORF with different sets of two variable regions. The crossing-over events caused extensive shuffling of the two variable regions in one ORF, but maintained a conserved unit comprising 3'-variable region, intergenic region, and 5'-variable region spanning adjacent ORFs. This characteristic mode of tandem paralogue diversification, maintaining 3'-part of a gene, intergenic region, and 5'-part of its downstream gene as a unit of evolution, is unique among previously studied paralogue rearrangements, in which an ORF tended to have been considered as the unit of evolution.

1. 緒文

ブドウ球菌属細菌 *Staphylococcus* はヒトの皮膚や粘膜に常在する細菌として重要である。この中で特に病原性が問題となるのは黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* で、ニキビや吹き出物等の傷口から皮膚に侵入し化膿性疾患を引き起こす。とびひ等の深刻な皮膚疾患の原因菌でもあるほか、時に血管やリンパ管を介して感染が拡大すると更に重篤な疾患をも引き起こす。黄色ブドウ球菌はまた、MRSA、VRSA 等、抗生物質が効かない系統の病院内感染・市中感染が社会的な問題ともなっている。

こうした臨床上の重要性から、黄色ブドウ球菌は本稿執筆時点で 10 を超える菌株の全ゲノム配列が解読され、公開されている (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genomes/>)。これらのゲノムには、抗生物質耐性に関わる遺伝子群、種々

の毒素遺伝子群、宿主細胞への接着や抗原抗体反応に関わる因子の遺伝子群、加水分解酵素の遺伝子群など、多様な病原性因子が見出されてきた¹⁻⁷⁾。また、既に病原性に関わることが知られていた遺伝子に加えて、これらのホモログである病原性関連の候補遺伝子も見つかってきている。こうした病原性遺伝子の多くは、「動く遺伝子単位」であるファージやゲノミック・アイランド上に存在し、これらに乗って染色体に組み込まれていることが明らかになった⁸⁾。

著者らはこれまでに、黄色ブドウ球菌のゲノム解読に参加し、抗生物質耐性やその他の病原性因子を乗せたゲノミック・アイランド上に、「動く遺伝子」の侵入・維持を制御する制限酵素の遺伝子が存在することに注目してきた¹⁾。また、やはりゲノミック・アイランド上でよく似た病原性関連遺伝子が縦につながってクラスターを形成している、タンDEM・パラログ・クラスターを複数株で比較し、その再編の分子機構を推定した⁹⁾。

本研究では、黄色ブドウ球菌のゲノムが造り替えられ、多様な病原性が獲得されていく機構を解明すべく、以下の2つの解析を行った。(1) ゲノミック・アイランド上の制限酵素遺伝子の活性の有無を実験的に検討する。(2) 著者らの先行研究⁹⁾で著しい再編が示唆された、ゲノミック・アイランド vSaα 上の病原性関連遺伝子 *lpl* のタンDEM・



A mechanism to generate variation in pathogenicity-related tandem paralogues of *Staphylococcus aureus*

Ichizo Kobayashi

Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo & Institute of Medical Science, University of Tokyo

パラログ・クラスターについて、多数のゲノムで比較を行い、ゲノム再編の機構を明らかにすること。(1)については、ファージアッセイによって制限酵素活性を検討した(H. Yuzawa & I. Kobayashi, unpublished)。本稿では(2)について、以下に詳細な結果を報告する。

2. 解析

2.1 配列抽出

NCBI ゲノム配列データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genomes/>) に2007年8月末の時点で登録されていた黄色ブドウ球菌9株のゲノム配列において、ゲノミック・アイランド ν Sa α 上に存在するリポプロテイン様遺伝子 *lpl* のホモログを、BLASTP および TBLASTX (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) を用いた相溶性検索によって同定した。

2.2 配列解析に使用したプログラム

マルチプルアラインメントの作成には ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>) を用いた。Similarity plot は PLOTCON (<http://emboss.sourceforge.net/>) により作成した。系統樹は近隣接合法を用いて MEGA4.0 (<http://www.megasoftware.net/>) により作成した。

3. 結果

3.1 *lpl* 遺伝子の構造

9株 (N315, Mu50, MW2, COL, MRSA252, MSSA476, NCTC8325, USA300, RF122) のゲノム配列から同定した *lpl* 遺伝子全ホモログに対して、塩基配列およびアミノ酸配列を用いてマルチプルアラインメントを作成した。塩基配列レベルおよびアミノ酸配列レベルの similarity をプロットした結果を Fig. 1 に示す。なお、N315株と Mu50株、MW2株と MSSA476株では、該当する遺伝子および遺伝子間領域が完全に一致しており、本解析では N315株、MW2株の配列のみを用いた。ORF の内部において、132 bp (44 a. a.) で gap を含まず、アミノ酸配列レベルでも塩基配列レベルでもよく保存された配列が見出され、この領域を central conserved region と定義した。そして、この領域の5'-側および3'-側の可変領域をそれぞれ、5'-variable region、3'-variable region と定義した。2つの可変領域は塩基長や配列組成に多様性が見られた。リポプロテイン共通の、脂質修飾を受けるシステイン残基と、そのN末側のシグナルペプチドモチーフは、5'-variable region に含まれていた (Fig. 1)。

一般に、相同組換えは組換えを行う配列間に十分な長さで高い identity を要求する^{10,11)}。この過程について詳細な解析が行われている近縁の枯草菌では、最小の長さは70bpと報告されている¹²⁾。塩基配列レベルでも高い

identity を保っている central conserved region は相同組換えを引き起こしてきたと考えられた。

3.2 可変領域の系統樹比較

仮に ORF 中央の central conserved region を介した相同組換えが繰り返されてきたとすると、ある ORF の5'-variable region と3'-variable region は交叉 crossing-over によってその組み合わせを変えてきたと考えられる。一方、ある ORF の3'-variable region とその下流の ORF の5'-variable region とでは、この過程において組み合わせが保存されてきたことが予想される。

そこで、二つの可変領域の塩基配列系統樹の比較を試みた (Fig. 2)。1つの ORF を構成する5'-variable region と3'-variable region のペアで線を結んだ場合 (Fig. 2 (A))、系統樹間をつなぐ線は頻繁に交差し、予想通りこの組み合わせは進化の過程でシャッフルを起こしてきたことが示唆された。一方で、ある ORF の3'-variable region とその下流の ORF の5'-variable region というペアで線を結んだ場合 (Fig. 2 (B))、系統樹間をつなぐ線はほと

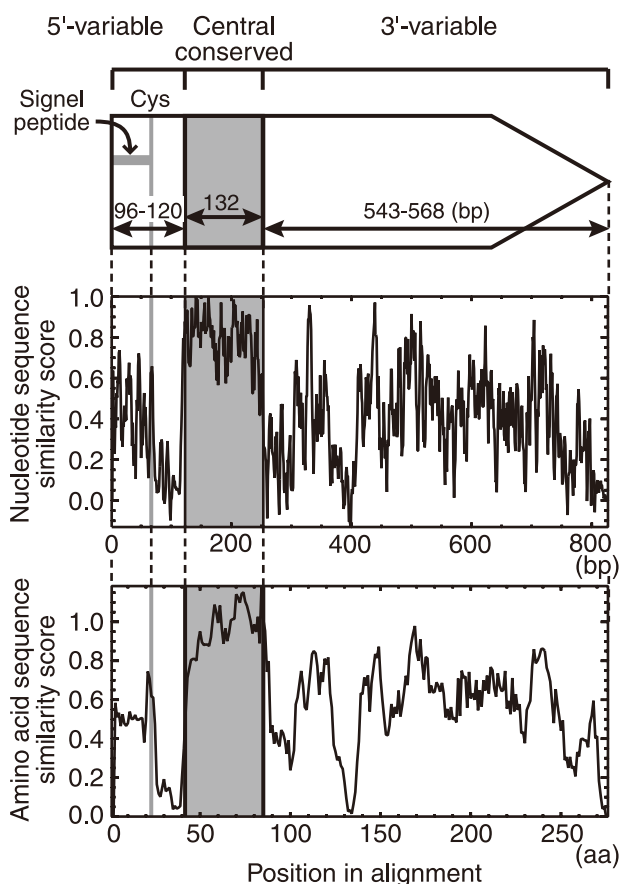


Fig. 1 *lpl* 遺伝子の構造 (上)、塩基配列に基づく similarity plot (中) およびアミノ酸配列に基づく similarity plot (下)。ORF 中央の保存領域を灰色で示す。(Tsuru & Kobayashi, unpublished)

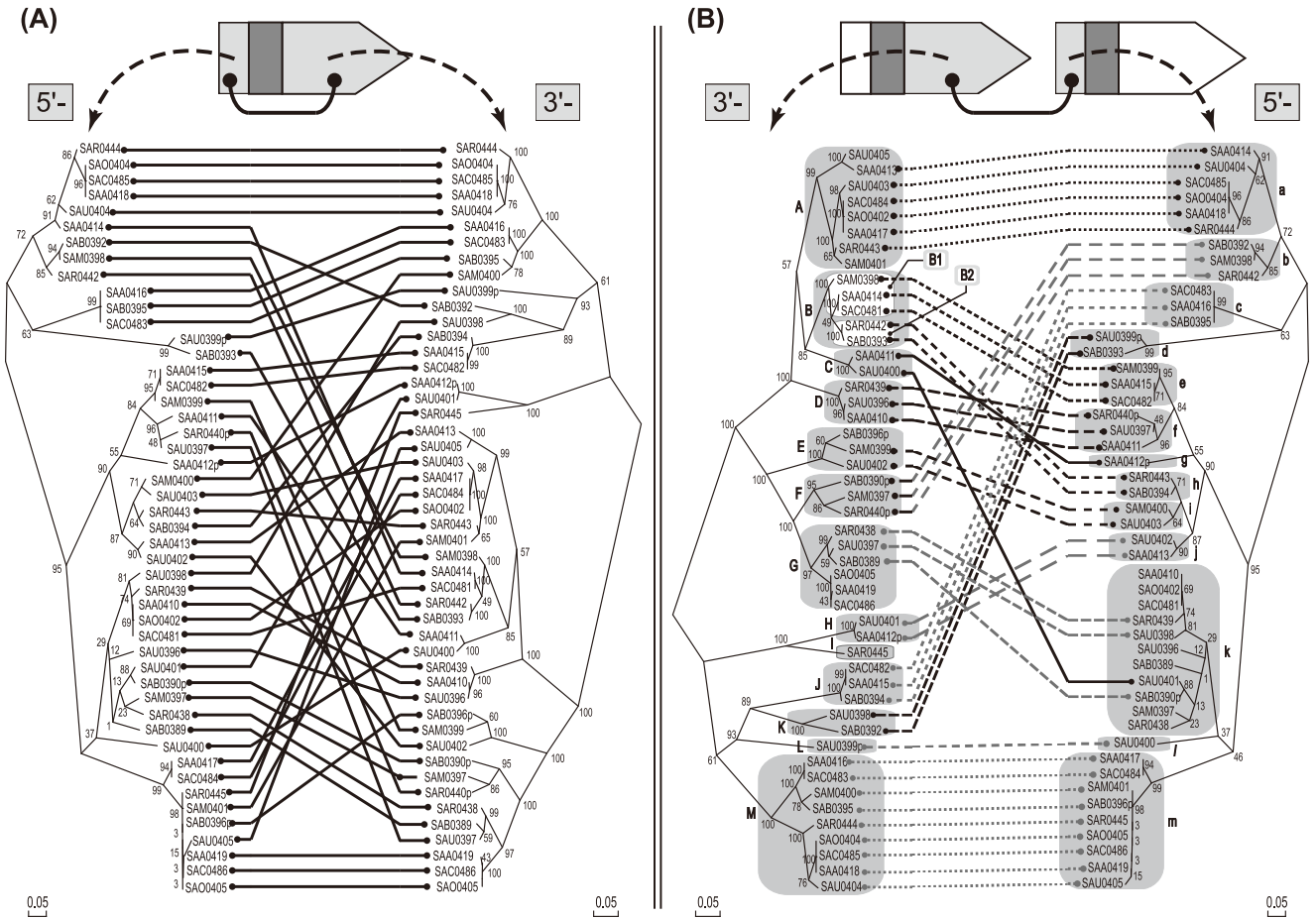


Fig. 2 5'-variable region と 3'-variable region の系統樹比較。塩基配列を用いて近隣接合法により作成したそれぞれの系統樹を、一つの ORF の 5' 側と 3' 側という組み合わせ (A)、およびある ORF の 3' 側とその下流の ORF の 5' 側という組み合わせ (B) で比較したものを示す。(B) では、配列が保存されたペアー同士の種類が、それぞれ異なる破線のパターンで示されている。このペアーの分類に対応する、各系統樹での単系統群・側系統群の分類が、長方形で囲ってある。(Tsuru & Kobayashi, unpublished)

んどの場合、互いに平行な線でつながれるグループに分類できることが見出された。加えて、この平行な線のグループは、それぞれの可変領域の系統樹における internal branch の短い単系統群ないしは側系統をつなぐように形成されていた。これは、お互いに配列が保存されたペアの存在を示しており、やはり予想と一致する結果であった。

3・3 遺伝子間領域の比較

Fig. 2 (B) において保存されていることが示された、「ある ORF の 3'-variable region とその下流の ORF の 5'-variable region」という組み合わせのペアについて、それらの間に挟まれた遺伝子間領域の配列を比較すると、遺伝子間領域でも配列が保存されていることが明らかとなった。従って、このタンDEM・パラログ・クラスターでは、隣り合う 2 つの ORF をまたいで、「3'-variable region、遺伝子間領域、5'-variable region」を一つの単位とする、保存された配列のグループが存在することが示された。

3・4 ゲノム間比較とゲノム再編素過程の再構築

二つの可変領域にたいする分類を各ゲノムの Map 上に表示したものを Fig. 3 (A) に示す。ゲノム間を比較すると、遺伝子の順序は保存しておらず、またどの分類の配列セットを持つかがゲノムごとに異なっており、この領域が激しく再編成を起してきてきたことが示唆された。その中で、ORF を単位としてみると、1 つの ORF の中では 5'-variable region と 3'-variable region との組み合わせがシャッフルされており、多様なホモログが存在している。他方、「ある ORF の 3'-variable region とその下流の ORF の 5'-variable region」という組み合わせの保存されたペアは、このような再編成を経た中でも維持されてきた様子が見取れる。

Pairwise のゲノム間比較において、次のような再編成の素過程を見出すことが出来た。(1) 挿入 / 欠失が USA300 株 (k-D-f-C-g-H-j-A-a-B1-) と COL 株 (k-B1-) の間に見られた。(2) 転位が N315/Mu50 株 (-D-f-G-k-) と MSSA252

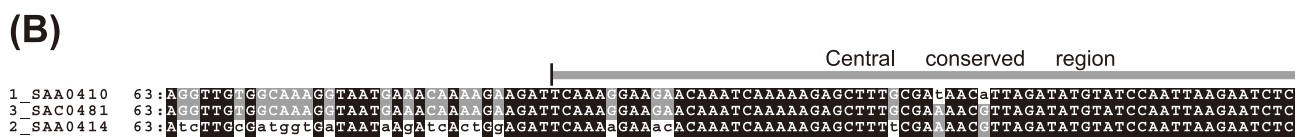
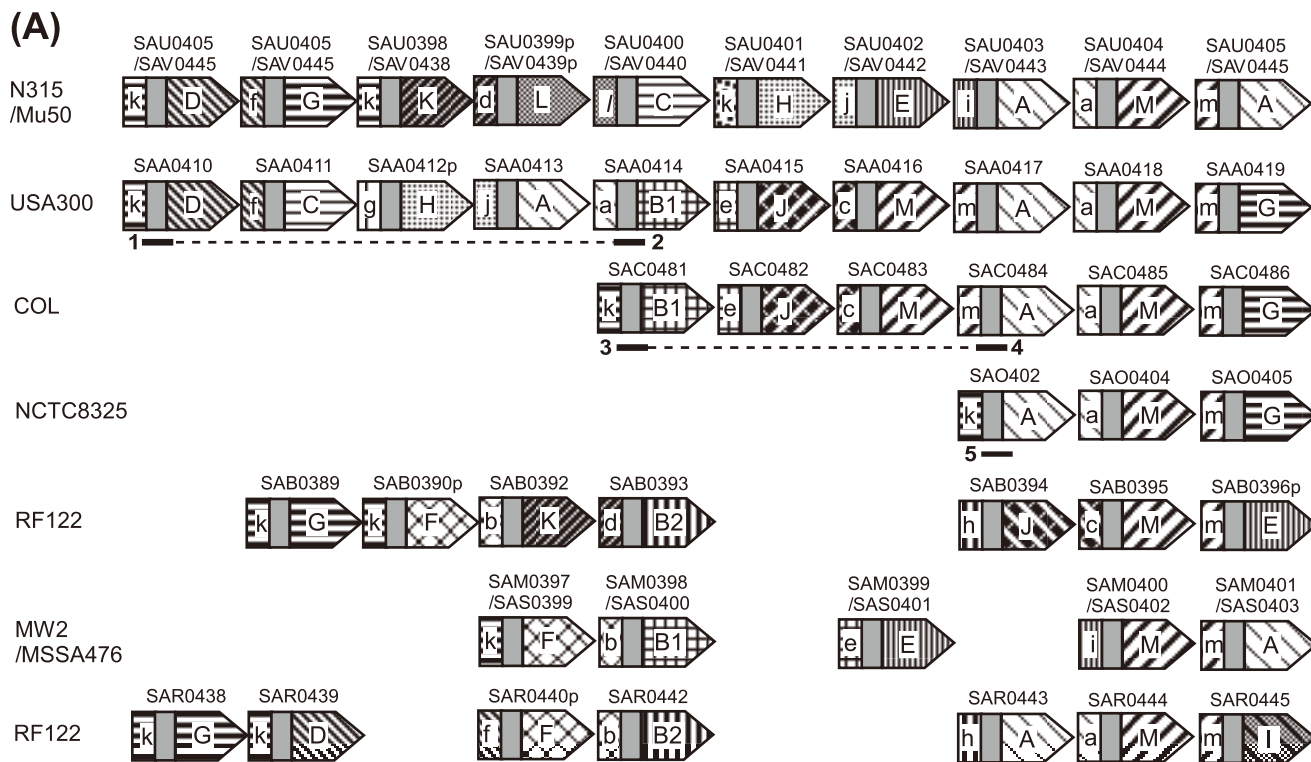


Fig. 3 (A) 各株における *lpl* タンデム・パラログ・クラスターの map。アルファベットで示した 5'-variable region (小文字) および 3'-variable region (大文字) に対する分類は、Fig. 2 (B) での分類に基づく。USA300 株・COL 株間および COL 株・NCTC8325 株間の挿入 / 欠失について想定される欠失イベントについて、欠失領域を破線で、その境界領域を 1 から 5 の太線で示す。(B) USA300 株・COL 株間で想定される欠失イベントでの、境界領域のアラインメント。境界領域 3 は、境界領域 1 と境界領域 2 の間の組換えによって生じたことが示唆される。Central conserved region をアラインメントの上に表示した。(C) COL 株・NCTC8325 株間で想定される欠失イベントでの、境界領域のアラインメント。(B) と同様。こちらでは、境界領域 5 が境界領域 3 と境界領域 4 の組換えによって生じたことが示唆される。(Tsuru & Kobayashi, unpublished)

株 (-G-k-D-f) 間で見られた。(3) 置換は RF122 株 (-b-K-d-B2-h-J-c-M-) と MW2/MSSA476 株 (-b-B1-e-E-i-M-) の間で見られた。また、(4) USA300 株に存在する離れた二つの A-a は遺伝子変換 gene conversion を示唆している。

このタンデムパラログクラスターで見られる多様性は、これらの再編素過程の繰り返しによって生成されてきたと考えられる。USA300 株・COL 株間および COL 株・NCTC8325 株

間の挿入/欠失について想定される、欠失イベントの境界のアラインメントを Fig. 3 (B), (C) に示す。ここでは、3本の配列のうち中央の配列が上流で1番目の配列と完全一致（3本目とは部分一致）していたものが、下流では3番目の配列と完全一致（1本目とは部分一致）するようになる、という変遷がみられる。組換え点と推定されるこの領域は、central conserved region によく一致していた。この結果は、これらのイベントの分子機構が central conserved region での相同組換えであった可能性を支持している。次節のモデルで示すように、その他の再編素過程も、同様に central conserved region での相同組換えという分子機構によって生じてきたとして説明できる。

3・5 Central conserved region での相同組み換えによる再編・多様化モデル

Fig. 4 に、今回の解析に基づくタンデムパラログ遺伝子の再編・多様化モデルを示す。配列レベルの多様性が生じる過程において、ORF 内部の central conserved region が特異的に保存され、この部分が二つの可変領域に挟

まれるような構造が形成されたと考えられる。Central conserved region は相同組換えの足場となり、更なる再編を生じてきたのだろう。すなわち、交叉を通じ ORF 内で2つの可変領域の組み合わせを交換し、ORF という遺伝子発現の単位での多様性の創出に寄与してきた。この過程で、隣接する ORF をまたいで、「上流 ORF の 3'-variable region、遺伝子間領域、下流 ORF の 5'-variable region」という単位は保存されてきたと考えられる (Fig. 4 (A))。

交叉の繰り返しはまた、Fig. 4 (B) で示したように、Fig. 3 (A) で観察されたような様々な再編の素過程を生じうる。現在のゲノムのこの領域に見られる著しい多型の生成はこれらの再編素過程の積み重ねによって生じたと考えられる。

4. 考 察

今回のモデルにおいては ORF 内部の配列を介した相同組み換えによって、2つの可変領域の交換による ORF レベルの多様性の創出と、ゲノム間のパラログ・クラスター比較で見られる遺伝子順序やホモログ・セットの多様性の

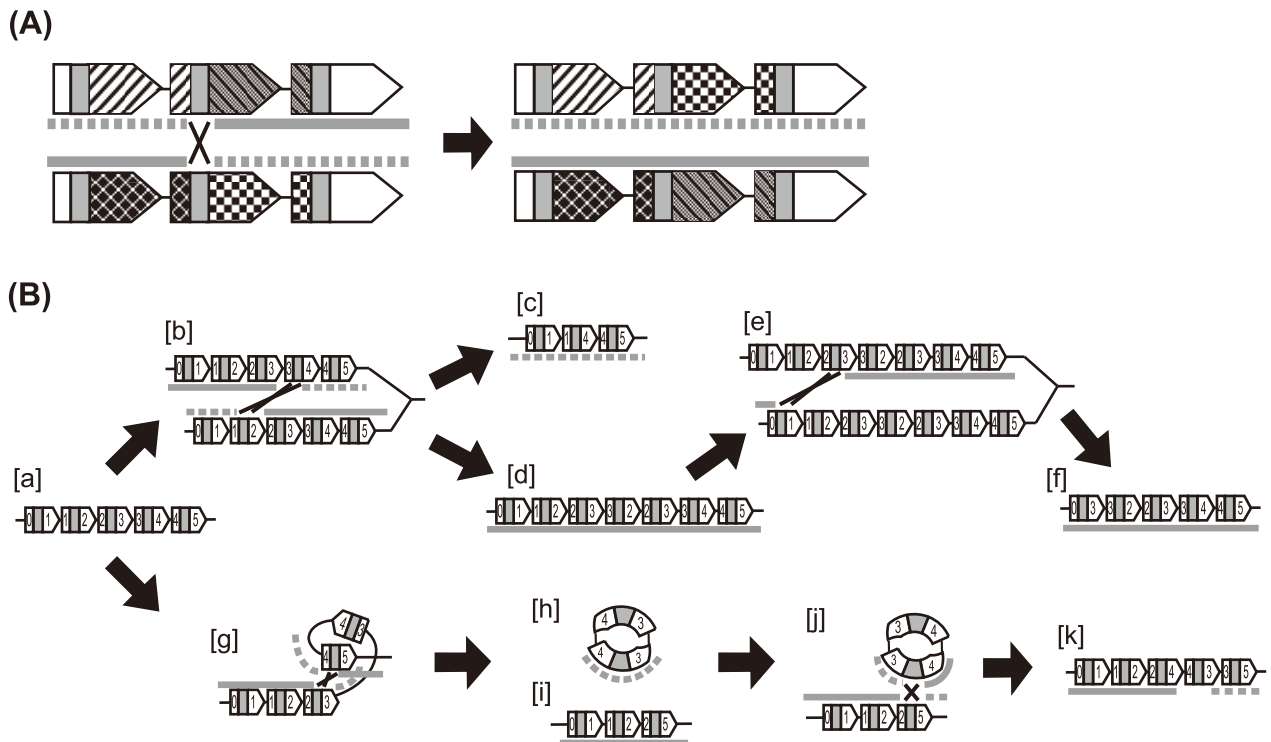


Fig. 4 ORF 内部の保存配列を介した相同組換えによる多様化モデル。(A) 相同組換えに伴う交叉によって、一つの ORF の 5'-variable region と 3'-variable region の組み合わせが交換されるが、ある ORF の 3'-variable region と隣接する下流の ORF の 5'-variable region の組み合わせは保存される。(B) このような交叉の繰り返しによって様々な再編が生じうる。姉妹染色体間の不等交叉 [b] により、欠失 ([a] から [c]) と重複 ([a] から [d]) が生じる。さらに不等交叉 [e] が繰り返されると、遺伝子変換 ([a] から [f]) が生じうる。染色体内の不等交叉 [g] は、環状 DNA [h] の切り出しと欠失 ([a] から [i]) を生じる。環状 DNA が再挿入される [j] と、転位 ([a] から [k]) が生じる。二通りの欠失 ([a] から [c]、[a] から [i]) によって、置換 ([c] と [i]) が生じうる。

創出の両方を説明することができた。この多様性の基となる、(異なるグループの間で見られる) 配列レベルの多様性は、今回のモデルとは異なる進化的次元で形成されてきたと考えられる。lpl 遺伝子ホモログを載せたゲノミック・アイランド vSa α は、ブドウ球菌属細菌の中で黄色ブドウ球菌に種特異的に見られる。従って多様な配列を有するホモログ・セットは vSa α が黄色ブドウ球菌の祖先型に挿入される前に既に存在し、その後、本モデルの機構によって種内での多様性を更に蓄積してきたのかもしれない。

多くの細菌では、様々な環境にตอบสนองして DNA レベルの再編成を引き起こし、表現型を変化させて生存を計る、相変異 phase variation と呼ばれる過程が知られている¹³⁾。宿主の免疫系の抗原となる分子の多様性を生み出す場合は特に抗原変異 antigenic variation と呼ばれる¹³⁾。時にそれらは細菌の病原性にも関与する。これらの過程にパラログ群が関わる例が多く知られている¹⁴⁾。Lpl 遺伝子産物がどのような生理学的な意義を担っているのか、相変異や抗原変異に関わる因子なのかについては不明である。しかし、もし他の細菌で見られるような抗原変異に関わるリポタンパク質なのであれば、なぜこのような多様な配列を持つ遺伝子がいくつも維持されているのか、なぜ central conserved region が塩基配列レベルで非常に高い identity で保存されているのかを説明することができよう。今後の実験的研究の進展が待たれる。

「隣接する ORF をまたいだ配列を再編成の単位として遺伝子レベルの多様化を創出する」という本研究のモデルは、ORF という単位に基づいていたこれまでのパラログ研究・多重遺伝子族研究にない、新たな視点の導入である。

謝 辞

本研究に対して終始ご支援いただいたコスメトロジー財団に感謝いたします。本報告書の中の進化解析は、東京大学大学院博士課程学生の鶴剛史君が中心になって進めました。

(参考文献)

- 1) Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, et al., :Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Lancet, 357, 1225-1240, 2001.
- 2) Baba T, Takeuchi F, Kuroda M, et al., :Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA, Lancet, 359, 1819-1827, 2002.
- 3) Ohta T, Hirakawa H, Morikawa K, et al., :Nucleotide substitutions in *Staphylococcus aureus* strains, Mu50, Mu3, and N315, DNA Res., 11, 51-56, 2004.
- 4) Holden MT, Feil EJ, Lindsay JA, et al., :Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 101, 9786-9791, 2004.
- 5) Gill SR, Fouts DE, Archer GL, et al., :Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain, J. Bacteriol., 187, 2426-2438, 2005.
- 6) Diep BA, Gill SR, Chang RF, et al., :Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Lancet, 367, 731-739, 2006.
- 7) Herron-Olson L, Fitzgerald JR, Musser JM, et al., :Molecular Correlates of Host Specialization in *Staphylococcus aureus*, PLoS ONE, 2, e1120, 2007.
- 8) Lindsay JA, Holden MT, :*Staphylococcus aureus*: superbug, super genome?, Trends Microbiol., 12, 378-385, 2004.
- 9) Tsuru T, Kawai M, Mizutani-Ui Y, et al., :Evolution of paralogous genes: reconstruction of genome rearrangements through comparison of multiple genomes within *Staphylococcus aureus*, Mol. Biol. Evol., 23, 1269-1285, 2006.
- 10) Fujitani Y, Yamamoto K, Kobayashi I, :Dependence of frequency of homologous recombination on the homology length, Genetics, 140, 797-809, 1995.
- 11) Fujitani Y, Kobayashi I, :Effect of DNA sequence divergence on homologous recombination as analyzed by a random-walk model, Genetics, 153, 1973-1988, 1999.
- 12) Khasanov FK, Zvingila DJ, Zainullin AA, et al., :Homologous recombination between plasmid and chromosomal DNA in *Bacillus subtilis* requires approximately 70 bp of homology, Mol. Gen. Genet., 234, 494-497, 1992.
- 13) Villemur R, Deziel E, :Phase variation and antigenic variation, Mullany P (ed) :The Dynamic Bacterial Genome, Cambridge University Press, New York, 2005, 277-322.
- 14) Hughes D, Norstrom T, :Biological consequences for bacteria of homologous recombination, Mullany P (ed) :The Dynamic Bacterial Genome, Cambridge University Press, New York, 2005, 351-384.

メラノサイト由来リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素が関与する皮膚組織の恒常性維持機構

東北大学大学院医学系研究科細胞生物学講座分子生物学分野

柴原 茂樹

Microphthalmia-associated transcription factor (Mitf) is responsible for differentiation of melanocytes. The Mitf gene contains many promoters that generate multiple Mitf isoforms with distinct amino-termini, such as a melanocyte-specific Mitf-M. We have been interested in a Mitf mutant mouse, *black-eyed white (bw)*, which is characterized by the white coat color and inner ear deafness due to the lack of melanocytes and by normally pigmented eyes. By cDNA microarray analysis between wild type and bw mouse skin, we have identified lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS) as a new melanocyte marker. L-PGDS is a unique bifunctional protein; it functions as an enzyme that catalyzes the conversion of prostaglandin H₂ (PGH₂) to prostaglandin D₂ (PGD₂) and as an extra-cellular carrier protein that specifically binds small lipophilic molecules, such as retinoic acid and bilirubin. Mitf appears to be involved in transcription of the L-PGDS gene in melanocytes. Importantly, L-PGDS is expressed in normal human epidermal melanocytes, but not in human melanoma cell lines, as judged by northern blot and RT-PCR analyses. We also showed the inhibitory effect of PGD₂ on the growth of human melanocytes and melanoma cell lines, HMV-II, SK-MEL-28, 624mel, and G361. These results suggest that L-PGDS may modulate the growth potential of melanocytes through PGD₂, thereby maintaining the skin homeostasis.

1. 緒言

小眼球症関連転写因子 (MITF) は塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス-ロイシンジッパー (bHLH-LZ) 構造を持つ転写因子であり、神経堤由来のメラノサイトと脳由来の網膜色素上皮細胞 (RPE) の分化制御因子である^{1, 2)}。小眼球症関連転写因子 MITF の変異マウス (*black-eyed white, bw*) は、メラノサイトを欠損するため白毛と難聴を呈するが、正常な網膜を有する (白毛黒眼)³⁾。興味深いことに、*bw* マウスは低酸素あるいは高炭酸ガス吸入刺激に対して過剰な換気応答を呈するため、中枢性の化学受容機構も障害されていると考えられる⁴⁾。我々は *bw* マウス皮膚で欠損する分子を探索した結果、リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素 (L-PGDS) がメラノサイトマーカーであることを発見した⁵⁾。すなわち、L-PGDS はメラノサイトで特異的に発現されている。L-PGDS によって合成されるプロスタグランジン D₂ (PGD₂) は睡眠、痛覚、そして免疫の調節に関わる⁶⁾。また L-PGDS は酵素であると同時に分泌タンパクでもあり、皮膚の再生に重要なレチノイン酸などのレチノイド、抗酸化作用の強いビリルビンの結合タンパクとしても機能する (図1)。このように L-PGDS は多様な機能を担う分子であるが、メラノサイトにおける L-PGDS の役割は不明である。さらに、L-PGDS の発現が

ヒトメラノーマにおいて消失することを発見した⁵⁾。この事実は、L-PGDS がメラノサイトの増殖を負に制御すること、さらに、癌抑制遺伝子として機能する可能性を示唆する。

従来、皮膚組織における PGD₂ の産生は、皮膚に局在する免疫系細胞 (マスト細胞やランゲルハンス細胞) 由来とされてきた⁷⁾。事実、それらの免疫系細胞は、L-PGDS と異なる遺伝子産物である血球型プロスタグランジン D 合成酵素 (H-PGDS) により PGD₂ を産生し、皮膚における炎症反応に関わる (図1)。したがって皮膚の炎症に関わる PGD₂ 研究は、主にマスト細胞やランゲルハンス細胞においてなされてきた。事実、マスト細胞では MITF が H-PGDS 遺伝子の転写を促進することが報告された⁸⁾。

そこで、L-PGDS がメラノサイト、及び皮膚組織の恒常性維持に関わると考え、L-PGDS 及び PGD₂ の未知の生理機能とその発現調節機構の一端を明らかにした。

2. 実験

2・1 正常ヒト表皮メラノサイトおよびメラノーマ細胞における PGD₂ の生理作用の解析

HMV-II, 624mel, G361, SK-MEL-28 の4系統のヒトメラノーマ細胞を用いた。PGD₂、及びその代謝産物である PGJ₂ が細胞増殖に及ぼす効果を検討した (各 10 μM, 72 時間培養)。なお、PGJ₂ は核内受容体 PPAR-gamma の ligand でもある。さらに、PGD₂ 受容体である DP1 と DP2 のアゴニスト、PPAR-gamma のアンタゴニスト (GW9662) の効果を調べた。

2・2 ヒトメラノーマ細胞における L-PGDS の生理機能の解析

L-PGDS cDNA を恒常的に発現するメラノーマ細胞株を

Melanocyte-derived lipocalin-type prostaglandin D synthase as a regulator for skin homeostasis

Shigeki Shibahara

Department of Molecular Biology and Applied Physiology, Tohoku University School of Medicine



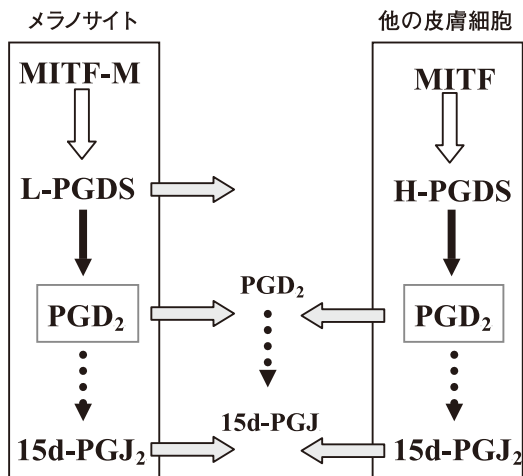


図1 MITFは皮膚におけるPGD2産生を制御する
メラノサイトでは、MITF-MがL-PGDS遺伝子の転写を制御する。一方、マスト細胞では、MITF-EなどがH-PGDS遺伝子の転写を調節する。細胞外へ分泌されたL-PGDSは、レチノイン酸、ビリルビンなどの脂溶性分子と結合する。PGD2の一部は非酵素的にPGJ2に代謝される。
図は文献7から一部改変して使用。

樹立した。

2・3 L-PGDS 遺伝子の発現制御機構の解析

ヒトメラノーマ細胞を低酸素下（1% O₂）で培養し、L-PGDS 遺伝子の発現への影響を検討した。一方、低酸素（10% O₂）曝露マウスを用い、心筋におけるL-PGDS mRNAの発現変化を解析した。

2・4 ヒトRPEにおけるPGD2の役割

ヒトRPE細胞をPGD2と培養し、ヘムオキシゲナーゼ1の発現への影響を調べた。ヘムオキシゲナーゼ1はヘム分解系の律速酵素であり、ヘムを酸化的に開裂し、ビリベルジン、鉄、一酸化炭素を生成する。ビリベルジンは直ちにビリルビンに還元される。ヘムオキシゲナーゼ1は酸化ストレスに対する防御に重要な酵素として知られる。

3. 結果

3・1 正常ヒト表皮メラノサイトおよびメラノーマ細胞におけるPGD2の生理作用

PGD2（10μM）と72時間培養はヒトメラノサイトおよびメラノーマ細胞（4系統すべて）の増殖を有意に抑制した。特に、メラノサイトに対する抑制効果はDP2受容体を介する作用であることが示唆された。一方、メラノーマ細胞の増殖抑制作用は、各アゴニスト処理では検出できなかった。事実、RT-PCR解析では、メラノーマ細胞（4系統すべて）におけるDP1とDP2受容体mRNAの発現を検出できなかった。よって、PGD2によるメラノーマ細胞の増殖抑制作用は未知の作用機序によることが示唆された。

さらに、PGJ2はヒトメラノサイトおよびメラノーマ細胞の増殖を有意に抑制した。その抑制効果はPPAR-gammaのアンタゴニスト添加により解除された。よって、PGJ2によるヒトメラノサイトおよびメラノーマ細胞の増殖抑制作用はPPAR-gammaを介すると考えられた。（以上、論文投稿準備中）

3・2 正常ヒトメラノサイトとヒトメラノーマ細胞におけるL-PGDSの生理機能

L-PGDS cDNAを恒常的に発現するメラノーマ細胞株を樹立した。今後、細胞増殖などに対する影響を検討する。

3・3 L-PGDS 遺伝子の発現制御機構の解析

ヒトメラノーマ細胞を低酸素下（1% O₂）で培養したが、L-PGDS mRNAの発現レベルに有意な変化は見られなかった。一方、低酸素曝露マウスの心臓では、心筋におけるL-PGDS mRNAの発現誘導を観察した。なお、心筋におけるMitfの発現が報告されており、今後、心筋におけるL-PGDS 遺伝子の転写調節機構を明らかにする。

3・4 RPEにおけるPGD2の役割

RPEは脱落・生成を繰り返す杆体細胞外節片を絶えず貪食・処理するのみならず、ロドプシンの構成成分である11-シス-レチナールを再生し視細胞に供給する。このように、RPEは視細胞の機能維持に必須である。また、RPEは体内の最も過酷な環境で機能する細胞でもある。PGD2との培養により、濃度依存的、時間依存的にヘムオキシゲナーゼ1の発現を誘導した⁹⁾。PGD2がヘム分解に関与することが初めて明らかになった。

4. 考察

皮膚におけるL-PGDS及びPGD2に着目する本研究は、メラニン産生、メラノサイトの増殖、皮膚の炎症反応など皮膚の恒常性維持機構の解明に貢献する。皮膚の恒常性維持の破綻を如何に防ぐかはコスメトロジーにとっても重要な課題であり、本研究成果は色素沈着（シミ）を予防できるような化粧品・薬剤の開発に寄与する。事実、L-PGDSの産物であるPGD2はメラノサイトの増殖を制御する物質である可能性が高い。よって、今後、増加傾向にあるメラノーマに対する新規治療法の開発への貢献も期待される。

一方、Mitf変異マウスであるbwマウスが低酸素あるいは高炭酸ガス吸入刺激に対して過剰な換気応答を呈することは興味深い⁴⁾。すなわち、メラノサイト、あるいはMitfの未知の標的遺伝子が中枢性の化学受容機構に関与している可能性が考えられる⁴⁾。よって、本研究はコスメトロジーが支援する「精神、文化に関する分野」とも密接に関連する。睡眠の調節に関与するL-PGDSが、皮膚ではメラノ

サイトに限局して存在する事実は重要である。メラノサイト由来 L-PGDS の未知の生理機能が示唆される。本研究は美肌の維持には良好な睡眠が重要という経験則に科学的な根拠を与えるものである。高齢化が進む我が国においては、快適に眠り、美しく老いるという願望は、すべての国民の願いであり、本研究成果は良好な QOL の達成にも貢献する。

(文 献)

- 1) Hodgkinson, C.A., Moore, K.J., Nakayama, A., et al. (1993) Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell* 74, 395-404.
- 2) Hughes, M.J., Lingrel, J.B., Krakowsky, J.M., et al. (1993) A helix-loop-helix transcription factor-like gene is located at the mi locus. *J. Biol. Chem.* 268, 20687-20690.
- 3) Yajima, I., Sato, S., Kimura, T., et al. (1999) An L1 element intronic insertion in the black-eyed white (*Mitf^{mi-bw}*) gene: the loss of a single *Mitf* isoform responsible for the pigmentary defect and inner ear deafness. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1431-1441.
- 4) Takeda, K., Adachi, T., Han, F., et al. (2007) Augmented chemosensitivity in black-eyed white *Mitf^{mi-bw}* mice, lacking melanocytes. *J. Biochem. (Tokyo)* 141, 327-333.
- 5) Takeda, K., Yokoyama, S., Aburatani, H., et al. (2006) Lipocalin-type prostaglandin D synthase as a melanocyte marker regulated by MITF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339, 1098-1106.
- 6) Urade, Y., Hayaishi, O. (2000) Biochemical, structural, genetic, physiological, and pathophysiological features of lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1482**, 259-271.
- 7) Takeda, K., Takahashi, N.-H., Shibahara, S. (2007) Neuroendocrine functions of melanocytes: Beyond the skin-deep melanin maker. *Tohoku J. Exp. Med.* 211, 201-221.
- 8) Morii, E., Oboki, K. (2004) MITF is necessary for generation of prostaglandin D2 in mouse mast cells. *J. Biol. Chem.*, **279**, 48923-48929.
- 9) Kuesap J., Li, B., Satarug, S., et al. (2008) Prostaglandin D2 induces heme oxygenase-1 in human retinal pigment epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367, 413-419.

Ⅲ. 精神、文化に関する分野

化粧やネイルケアが高齢者のライフスタイルや QOL と免疫能の向上に及ぼす影響

早稲田大学大学院人間科学研究科健康福祉科学研究領域

堤谷めぐみ、小川奈美子、若林 紋、加瀬裕子、川名はつ子、辻内琢也、町田和彦

To study the effects of nail care on bio-defense function of elderly people in a Japanese nursing home, twenty-three women were divided into the intervention group of mean age of 88.5±10.5 years and the control group of age of 83.5±14.5 years. To the invention group, nail-care were conducted for two months.

All subjects were asked the answer to the questionnaire tests of WHO QOL, Stress and PGC moral scale pre and after the intervention term. In addition, the capacity of circulating neutropils to ingest bacteria (phagocytosis) and to produce superoxide (by nitroblue tetrazolium reduction method) were measured also.

The present analyses revealed that the results of all questionnaires and neutrophils function were significantly higher in the intervention group than in the control group. These results showed that the performance of nail-care gave a big satisfaction to elderly people.

1 緒言

高齢者施設は介護の場であると同時に高齢者の生活の場である。現在の高齢者施設では従来の集団的処遇の高齢者施設を見直し、小規模で家庭的雰囲気の「自宅でない在宅」を目指して制度および居住環境が大きく変わりつつある。そのような現状の中で、よりよい環境を提供するためには、多くの課題があると言えよう。老人ホームでの生活に対して満足しているかどうかという調査においては、「満足している」が28.7%にとどまり、「おおむね満足している」が39.3%という結果になっている³⁵⁾。このように高齢者が住み慣れた地域や家を離れ、施設で生活を送ることはそれ自体がストレスになり、結果的にそのことが彼らの生活の質 (Quality of Life; 以下 QOL とする) を低下させている。QOL はいろいろな角度から人間の生命や生活の質を表そうとしたものであり、それは疾病にかかった人々が感じる幸福感・満足感などの主観的要素を重視して構成されている。近年、この高齢社会への移行に伴い医療の現場で QOL が注目されている。特に、介護保険時代になり、介護老人福祉施設及び介護老人保健施設や医療機関における高齢者ケアの質を引き上げることの大切さが問われるようになった。施設ケアの中心を QOL に置く施設も増加し、QOL への関心はさらに高まっている。

高齢者施設の持つ課題は、高齢者の (1) QOL の向上と (2) 市民としての社会参加 (Citizenship) にあるだろう。「受

益者としての高齢者」から「社会で積極的な役割を果たす高齢者」へと高齢者観も変わろうとしている。そして、これらの2つの課題に応えるには「おしゃれな生き方」がキーワードになるのではないかと考え、美容という視点からシニアのおしゃれな生き方を提案したいと思った。人は誰でもおしゃれをすると積極的に外出したくなり、周りの人に「きれいだね!」「かっこいいね!」と言われることで、何より気分が高揚し、自然に表情が明るくなる。当然、外へ目を向けることにもなり、色々なものを見たり、触れたりすることで、精神面が充足し心のリハビリテーションへとつながり、よりよい環境で過ごせるようになると思われる。

「本研究では、都内某所の特別養護老人ホーム M の入居者にとって「美容」をテーマにした人とのふれあいや働きかけが、免疫機能、心理面、QOL にどのような影響を与えるかについて検討し、明らかにした。さらに、この結果を踏まえ、高齢者施設入居者に対してよりよい高齢者ケアを提供できるように報告・提案することを本研究の目的とした。

2 研究方法

2-1 調査対象

本調査の対象者は、都内某所の特別養護老人ホーム M に入居している、著しく介護度が高くなく、本人または家族の同意が得られた 65 歳以上の高齢者の女性 23 名である。

そのうち 12 名を介入群 (88.5±10.5 歳、認知度なし 4 名・認知度軽度 4 名・認知度中度 4 名)、11 名 (83.5±14.5 歳、認知度なし 3 名・認知度軽度 4 名・認知度中度 4 名) を対照群とした。

2-2 介入調査内容・方法・期間

介入内容は週三回で 8 週間の 24 回、対象者にネイルケ



Effects of nailcare on bio-defense function of elderly people in a Japanese nursing home

Megumi Tsutsumitani, Namiko Ogawa, Aya Wakabayashi, Yuko Kase, Hatsuko Kawana, Takuya Tsujiuti, Kazuhiko Machida*

Area of health Science and Social Welfare, Graduate School of Human Sciences, Waseda University

ア介入を行い、対面式個別面接調査法で介入前後のアンケート調査を行った。また、2006年10月と2007年10月の健康診断の際に採血したものより、NBT還元試験を行い、介入前後で比較した。介入期間は、2007年8月から2007年10月の健康診断日にかけて実施した。採血後の各種血液・血清の処理および測定は早稲田大学側で行った。いずれの試料も匿名化し冷凍庫に保管した。なお本研究は早稲田大学人間科学部倫理委員会にて承認されている。

2-1-3 ネイルケア

美容を狭義に捉えた上で、先行研究が少ない「音楽」・「インテリア」・「ネイルケア」のうちアンケートで一番ニーズのあったネイルケアを行った。

I 定義

日本ネイル・マニキュア普及会によると本来なら、①爪の形を整える ②キューティクルリムーバーにより甘皮を押し上げる ③オイルまたはハンドクリームを馴染ませながらマッサージ ④パUFFER仕上げ ⑤よくふき取りマニキュアを塗る、という過程が一般的であるが、今回、対象者が高齢者ということもあり、安全の為、内容をオイルによるマッサージとマニキュアとした。またこの際、施術者は被験者と会話を積極的に行った。

II マッサージ

アロママッサージの効果は多くで確かめられているが、マッサージの方法は様々である。今回、ネイルを中心としたケアということから班目健夫医師により提唱されている爪もみを行った⁵⁾。加齢と共に爪が硬くなる為爪の手入れがおっくうになり易いが、爪もみでこまめに手入れをする事で指先の運動に繋がり、硬くなった爪周辺の血管をほぐす事になり指先の冷感を改善する事も出来る。加えて、ストレスの解消やリラックス効果があるのではないとも言われている。また、日々の生活で爪が歪んでしまう事があるが、爪と指自身を揉み解す事で少しずつ修正することも出来る。この時、オイルやハンドクリームを使う事で爪の保湿成分をはかり、マッサージ効果を高める事ができ、アロマセラピーを織り交ぜたものを使用するとリラックスの相乗効果をもたらす事ができると言われている。

〈マッサージの方法〉

- ①マッサージの施術部位は、手の指の爪の生えぎわの両方の角。
- ②両手の親指、人さし指、中指、小指の4本の指を施術する。この時、薬指は交感神経を刺激してしまうので使わない。
- ③刺激するときは親指と人さし指で爪の生えぎわを両側

からつまんで、そのまま押して施術する。

- ④1本の指を10秒ずつ施術する。両手の親指、人さし指、中指、小指をひとつおとり刺激するのを、1日に2から3度行う。
- ⑤刺激するときは、指の先端で痛いくらいに押して施術する。軽い刺激では効果がない。あまり強すぎてもいけないが、少し痛いというくらいにもむのが効果的。

III 使用材料

ラベンダーオイル（1%濃度でホホバオイルにラベンダー精油をブレンドしたもの）、透明マニキュア、除光液、コットン

IV ラベンダーオイル

ラベンダーはアロマセラピーのなかで最もよく使われている。古代から薬用植物として知られ、沐浴をしたり、ラベンダーの小枝を焚いて流行病を防いでいた。

精神面では神経の緊張、不安をやわらげる効果、安眠作用がある。肉体面では頭痛、特に鋭い痛みにも効果があり、殺菌力が強く、鎮痛作用もあるので、風邪に効き、予防にもなる。虫刺され（蚊、蜂、ブヨなど）の毒の中和、火傷、切り傷に精油を直接塗ると殺菌効果によって効果がある。美容の面ではニキビ、吹き出物、ブツブツなどのトラブル肌の場合高い殺菌力が効果的であり、細胞の成長を刺激し、肌を若返らせる効果が期待できる^{16) 33) 34)}。

今回、オイルマッサージの中でもラベンダーオイルを使ったのはマッサージの効果の先行研究が最も多く、様々な結果がでていたためラベンダーを選択した。

V マニキュア

日によって気分が変わる高齢者にあわせて、本人が希望した日のみ施術、除去を行ったが、少なくとも1人あたり週1回行った。（平均1.2回/週）

2-3 アンケート内容と評価方法

質問紙項目は、(1) WHO QOL-26、(2) 桂らによって開発されたストレス度 (SCL-S) に関する項目、(3) PGC モラル・スケールに関する項目、(4) 状態不安尺度 (STAI-1) 特性不安尺度 (STAI-2) に関する項目を対面式個別面接調査法で行った。

(1) WHO QOL-26

A 身体的領域7項目 (Q3、4、8、10、15、16、17、18)、B 心理的領域6項目 (Q5、6、7、11、19、26)、C 社会的関係3項目 (Q20、21、22)、D 環境8項目 (Q9、12、13、14、23、24、25)、E 全般的な生活の質2項目 (Q1、2) の24項目それぞれについてQ1が(1)まったく悪い

(2) 悪い (3) ふつう (4) 良い (5) 非常に良い、Q2が(1)まったく不満 (2) 不満 (3) ふつう (4) 満足 (5) 非常に満足、Q3～26が(1)まったくない (2) 少しだけ (3) 多少は (4) かなり (5) 非常にそれぞれ答えてもらった。判定方法は5件法を用い、点数が高いほどQOLが高いということにした。

A 身体的領域

日常生活動作：日常生活（身だしなみから資産の管理などの毎日行う行為）ができるのかを問う質問。他人に頼るのか頼らないのかの程度はQOLに影響を及ぼすと思われる。

医療品と医療への依存：身体・心理の両面において良好な状態を維持するために、どのくらい医療品や医療を使用しているかを問う質問。医療品は副作用によって生活の質を下げてもあるものの、一般的にはQOLを高める効果がある。また、この質問には医薬品以外にも理学療法的手段（人工肛門、ペースメーカーや義足など）も含まれる。しかし、医薬品の種類そのものの詳細を問うものではない。

活力と疲労：余暇活動などの選択的な活動と同じく、日常生活のなかで必要な元気さ、情熱、あるいは忍耐があるかどうかを問う質問。これに支障をきたすほどの疲れから、適度な元気さのレベル、あるいは生きているという実感のレベルまで、さまざまなことを考えることができる。疲労は抑うつや消耗などの神経の病気や問題をはじめとしてさまざまな原因からもたらされることがある。

移動能力：ある場所から目的地に移動する、家の周囲を散策する、仕事場や交通機関に到達するなどの能力を問う質問で、周囲からの援助や手助けなしに移動できるか否かが生活の質に影響を及ぼすと考えるのは当然である。これは何らかの移動手段を利用する、しないに関わらず行きたいと思うところに誰の助けも借りずに行くというときの一般的な能力を示す。どこに行くにも他人に頼らなければならないのは、QOLに悪い影響を及ぼすと予想される。また、人の移動能力における変化がいきなりあらわれて出たのか、あるいは少しずつあらわれたのかは、QOLにかなりの影響を及ぼすと思われるがここではそれにはこだわらないことにした。機能欠損があるからといって、移動能力が必ずしも影響されるとは限らない。例えば、車椅子や杖を使用して生活している人々にとって適切に改良された家屋や職場であると、十分に満足できる移動性が得られるはずである。

痛みと不快：人が経験する身体的感覚で、苦痛を伴い、生活の妨げになる程度の不快感を扱う質問である。い

かに痛みを和らげるか、いかにコントロールするかも含まれる。痛みを逃れるのに簡単な手段ができるほど、痛みに対する恐怖は少なく、QOLへの影響も変わってくるはずである。また、痛みの強さが変化していくのは痛みそのものよりつらいのかもしれない。痛みを感じなくなっているのに痛み止めを服用したり、その痛みが現れたり消えたりするものであると、痛みの恐怖に絶えずさらされているということでQOLに影響するであろう。人は痛みに対しての反応はさまざまであるし、痛みへの寛容さや受容度はQOLに影響を及ぼすと思われる。これは、凝り・疼き・痒みなどの身体的な不快感も含まれる。人が痛みを感じると言った場合、それを説明できる医学的な根拠の有無に関係なく、「痛みがある」とみなす。

睡眠と休養：十分な睡眠・休養が取れている、あるいは取れないことでの人のQOLがどのように影響されるか問う質問。睡眠障害は、眠りにつくのが困難であったり、夜中に目が覚めてしまい眠りに戻れなかったり、すっきりした目覚めがない等を含む。ここでは個人的または環境的要因はあるかもしれないが、どのような理由であっても、とにかく睡眠が妨げられたかどうかを聞いている。睡眠によって十分に休息を取り、英気を養って、睡眠を妨げられたことからくる不快感がなく、毎日の生活を支障なく行えるかが焦点となっている。

仕事の能力：仕事に対するエネルギーの使い方を問う質問。この場合の仕事とは、人が従事している活動のことである。主な活動には、報酬が発生する仕事、無報酬の仕事、地域のボランティア活動、家事労働、学生・生徒の学業などが含まれる。どのような仕事をしているかではなく、仕事を遂行する能力の有無に焦点をあてている。

B 心理的領域

ボディイメージ（容姿・外見）：人が持つ自分自身の身体についての見解を問う質問。つまり、自分の容姿・外見に対してポジティブまたはネガティブに感じているかどうかである。自分の容姿・外見に満足しているかどうか、またそれが自分にどのように影響しているかが焦点となっている。これには、欠損認識や事実として身体欠損があったにしてもそれを修正できる場合（化粧・洋服・義足など）が含まれている。周囲の人が、その人の容姿にどのように対応するかも、ボディイメージにかなり影響する。

否定的感情：どのくらいネガティブ（落胆・悲しみ・悲嘆・絶望・喜びの欠如・不安・罪悪感・神経過敏など）な感情を体験しているかを問う質問。ストレスやネガ

ティブな感情が、機能にいかに関与するかを考慮している。ここでは、うつ病、気分障害、恐怖症などの心理的に障害を受けている人も含むよう配慮されている。

肯定的感覚：人生においてどれだけポジティブ（満足・幸福・希望・喜び・楽しみなど）な感情を体験するかを問う質問。人々が自分自身の将来をどのように展望し、どのように感じているかというのは QOL にとって非常に重要な項目であり、この項目は QOL と同義語とみなされる。

自己評価：自分自身についてどのように感じているかを問う質問。自分自身について、否定的（ネガティブ）な感情を抱いたり、肯定的（ポジティブ）な感情を抱いたりという風に幅があると思われる。自己の能力や制御能力、満足感に対する自己評価がここでの焦点となる。質問にはさまざまな側面での自分自身の感情（他人とのつきあい、自分の教育、特殊な作業や行動を達成する能力、家族関係、威厳、自己受容性など）が含まれる。人によって自己評価は、職場・家庭での自分の役割、他人からの自分の扱われ方の認識に大きく関わっていたりする。

精神性・宗教・信条：人の信念がいかに関与するか調べるものである。信念によって人は人生の困難から救われたり、経験を構造化したり、自己の問題に精神的な意味合いを見いだすなど、良好な状況を手にするための感覚を与えられたりするであろう。多くの人にとって宗教、信条、精神性は快適、良好、安定などというプラスの方向に働くが、人によってはマイナスな影響を与えることもある。

思考・学習・記憶・集中：意思決定をする際の思考、学習、記憶、集中に関する見解を問う質問。一般的に、思考の速さ、明晰さ、創造性、意思決定能力などが含まれている。認知度が高い人は自分の分析が不十分なために他の代替りの人の評価が必要となることもある。

C 社会的関係

人間関係：日常生活の中で、親密な人間関係のうえに形成される感情である友情、愛情、援助をどのようにかかっているのかを問う質問。これは、愛し愛されるという他人と親密になる機会、またはその能力にも焦点があてられる。どういった感情であっても理解しあえるほどお互い愛情があるということに加えて、身体的側面としての人間関係は性行為を含めた、接触するという親密さも含まれる。ネガティブな体験、ポジティブな体験の両方含まれる。

社会的支え：家族や友人から得られる支援、実際あてにできる援助があるかないかを問う質問。自分に関する問題を解決するのに家族や友人がどれほど共に動き、

分かち合い、聞きに際して援助してくれるかなどに焦点をあてている。

性的活動：性に対する願望、衝動、またそれを適切なかたちで表現できるか否かに関する質問。ここでは性に関する価値判断は含んでいない。また、性の嗜好性・実践は重要ではなく、性への願望、表現、性行為の機会、満足度などがこの項目の焦点である。性的活動について文化圏によってはタブー視する傾向にある地域もあり、こうした質問に対して保守的なところがあるという認識ももっておくべきである。男女・性別・年齢によって答えが変わるとも考えられる。

D 環境

金銭関係：経済状況が健康で快適なライフスタイルを送るための必要性に叶っているかどうかを問う質問。自分の収入で手に入れられるものについて、満足か不満か、金銭的状况に依存しているか自立しているか、十分か不足かなどの感覚も含まれる。

自由・安全と治安：身体的な危害がある場合に人が感じる安全や治安にたいしての感覚について聞く質問。あらゆる場面において安全に対する脅威は生じうるし、日常生活している場所や状況もさまざまであるので、それらを広くカバーできるように作られている。また、この項目は自然災害の被害者、ホームレス、危険が予想される職業、犯罪者と関連のある人、性的虐待を受けた人などにとって特に重要である。

健康と社会的ケア（利用しやすさとサービスの質）：周辺にある保健医療サービスについての見解を問う質問。保健医療サービスをどのように見ているのかに焦点をあてている。

居住環境：人が住み生活する場所、その生活への影響を調べる質問。居住環境の質は、快適性を基本にして評価され、スペースの広さ、清潔さ、プライバシーの確保、電気水道などの設備、建物の構造などもその評価に含まれる。家の周辺環境の質も QOL にとってとても重要な要素である。

新しい情報と技術の獲得の機会の有無：新しい技術を学んだり、知識を獲得したり、現在何が進行しているかを適切に知ることができる機会や願望について問う質問。これは教育プログラムや成人教室、余暇活動など個人的なものから公的なものまで、通じてなされるだろう。地域や国のニュース、国際的なニュースを知ることができる状態、その他の情報が満たされる機会、知識の必要性が満たされる機会があるかどうかにも焦点があてられている。

余暇活動の参加と機会：余暇や暇つぶしなどののんびりすることに参加する機会や能力、傾向を問う質問。個

人の余暇活動や暇つぶし、また友人と会う、スポーツをする、読書をする、テレビを見る、団らんするなど、のんびり過ごすことへの能力、その機会、楽しみ方という3つの側面に焦点が当てられている。

生活圏の環境：自分の置かれている環境についての見解を問う質問。騒音、公害、天候または一般的な景観などがQOLを改善するのか、悪影響を及ぼすのかが含まれる。

交通手段：外出する際に交通手段が利用できて、それがどれだけ使いやすいかについて問う質問。利用可能な交通手段（自転車、乗用車、バスなど）が使用できるために、好きな活動が保証されている、また日々の必要な活動ができる交通手段がどれくらいあるかに焦点を当てている。

E 全般的な生活の質

(2) ストレス度 (SCL-S)

SCL-Sは桂らによって開発されたものである。「ストレスチェックリスト」は20項目、80点満点で、判定基準は、その得点が高いほど、その個人のストレス度は高く、低ければストレス度が低いこととなっている。

(SCL-S)：最近1ヶ月くらいの間にもどのような症状があったか、(1) はい (2) いいえ で30項目の質問に答えてもらった。

(3) PGC モラール・スケール

モラールの概念は、老化のプロセスの研究や福祉サービスの効果測定のために用いられる社会老年学の主要な概念の1つである。「モラールが高い」ということの意味は、Lawton, M.P.によれば次の3点に要約される⁷⁾。

- ①自分自身について基本的な満足感をもっていること－生涯を通して何かを達成してきたという感じ、自分が有用な人物であるという感じをもっていること、あるいは自分が相当な (adequate) 人物であると考えていられること。
- ②環境の中に自分の居場所があるという感じをもっていること－彼が出会う他者や事物が彼に何らかの満足を与え、彼の欲求と環境からの所与とが一致していること。
- ③努力しても動かし難いような事実－たとえば自分の年齢－は事実として、何らかの形で受容できていること。

Lawton は、このような「モラール」を多次元のものとして定義し、老年後期の人々にも適用でき、しかも信頼性を保ちながら同時に被験者を疲れさせることのない適切な長さ（短さ）のスケールの開発を目指した。彼は「モラール」に関連すると思われる50項目の質問を用意し、これを300名の被験者に実施した結果によって、PGCモラール・

スケールを作成したのである。PGCモラール・スケールは、当初22項目から成る測定尺度で6つの主成分を含むとされていたが、その後Lawton自身の改訂によって17項目に削減され、3つの主成分Ⅰ「心理的動揺」、Ⅱ「老いに対する態度」、Ⅲ「孤独感」から成るものとされた。これが今回調査で用いた改訂PGCモラール・スケールである。

Ⅰ「心理的動揺」に関する項目(4, 7, 12, 13, 16, 17)、Ⅱ「老いに対する態度」に関する項目(1, 2, 6, 8, 10)、Ⅲ「孤独感」に関する項目(3, 5, 9, 11, 14, 15)の17項目の質問に対して、1, 6は(1) そう思う (2) そうは思わない、2, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17は(1) はい (2) いいえ、3は(1) ない (2) あまりない (3) 時々感じる (4) 感じる、5は(1) 満足している (2) もっと会いたい、7は(1) ある (2) ない、8は(1) 良い (2) 同じ (3) 悪い、9は(1) ある (2) あまりない (3) ない、で答えてもらった。

判定方法は質問項目のそれぞれについて、肯定的な選択肢（質問用紙の中で下線を付した選択肢）が選ばれた場合に1点、その他の選択肢が選ばれた場合には0点を与え、単純に加算して合計得点を出す。最高得点は17点である。点数が低いほどよい状態を表す。改訂PGCモラール・スケールの得点は、幸福な老いの程度あるいは「主観的QOL」の指標であり、被験者の相対的な位置を示すものであるにすぎない。「幸福な人」や「不幸な人」の弁別を行なうものではない。

(4) 状態不安尺度 (STAI-1) 特性不安尺度 (STAI-2)

原著者スピルバーガー（サウスフロリダ大学）を共同研究者に迎え、英語版『STAI-Y』に改良を重ね、日本の文化的要因を考慮して開発した日本語最新版の「状態 - 特性不安検査」である。日本人特有の情緒（感情）を考慮することで、状態不安の密度の測定と人格構成としての特性不安における個人差の測定をより正確なものにしている。『新版STAI (STAI-JYZ)』の項目は、英語版『STAI (Form Y)』の項目を慎重に翻訳したものと、状態不安、特性不安についての日本の文化に見合う新しい項目を加え、精巧な統計的プロセスを用いて因子構造を検討し、さらに状態、特性それぞれの尺度について心理測定の特性の視点から、不安存在および不安不在の下位尺度となりうる最も適切な項目を選択し、不安存在および不安不在の項目数を等しくした点で『STAI-JYZ』は概念的にも、方法の上でも、『STAI (Form Y)』より進んだものである。

不安存在と関連したネガティブな感情と不安不在を示すポジティブな感情を測定する下位尺度を独立に作成したことにより、不安における重要な2つの構成要素を識別することができ、このことによって、『新版STAI』は状態不安と特性不安について慎重な測定を可能にした。加えて、

それぞれの尺度における不安の存在と不在を示す感情を測定する下位尺度を備えているものである。

STAI-1: たった今どう感じているかを (1) 全くない (2) いくらかある (3) かなりある (4) はっきりある で答えてもらった。

STAI-2: ふだんどう感じているかを (1) ほとんどない (2) 時々ある (3) しばしばある (4) いつもある で答えてもらった。

判定方法は STAI-1 の (1) 全くない (2) いくらかある (3) かなりある (4) はっきりある、STAI-2 の (1) ほとんどない (2) 時々ある (3) しばしばある (4) いつもある をそれぞれ 1 点、2 点、3 点 4 点とし、最高得点 80 点とし、点数が高いほど不安の状態が高いといえる。

2-4 NBT 還元試験

生体防御機能検査として好中球の貪食・殺菌能検査を松田の毛細管法を改良して、マイクロチューブを用いた NBT 還元試験により実地した。NBT 還元試験は、食細胞が生成する活性酸素が NBT を還元することにより、細胞内に有色の凝固物（フォルマザン）を形成する反応を利用したものである。NBT 還元試験には刺激試験（スタヒロ）と非刺激試験（レスト）があり、スタヒロでは、食細胞の活性酸素生成を促進させるための刺激物質を添加した。刺激物質として、本実験では黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus* 209p) を用いた。結果は 1 検体について 2 種類の試験を行い、塗末標本を作製しそれぞれ好中球 100 個を観察し、朝長の組織学的判定量化法に準じて、好中球の生成したフォルマザンをスコア化した。また刺激試験では同時に好中球の細菌貪食率についても貪食能として測定し、殺菌・貪食の同時観察を試みた。

2-5 解析方法

解析は統計ソフト SPSS14.0 を用い相関係数を算出し、T 検定を行った。

3 結果

3-1 属性

対象者の属性を表 1 に示す。

表 1 対象者の属性

群	人数	性別	年齢 ± 標準偏差
介入群	12 人	女	88.5 ± 10.5 歳
対照群	11 人	女	83.5 ± 14.5 歳

3-2 QOL-26 (図 1、図 2 は巻末)

QOL-26 では全体的に見ると介入前後で介入群において有意に増加が見られ、対照群では有意には至らなかったが減少する傾向が見られた (図 1)。領域別に見ると、介入

前後で介入群において、身体的領域、心理的領域、社会的領域、全般的な生活の質は有意に増加が見られた。環境領域においては、有意差は見られなかった。対照群において心理的領域では有意に減少が見られ、身体的領域、社会的領域、全般的な生活の質、環境領域では有意差は見られなかった (図 2)。介入前の介入群と対照群での有意差、介入後の介入群と対照群での有意差はともになかった。またそれぞれの領域においての介入前の介入群と対照群での有意差、介入後の介入群と対照群での有意差も見られなかった。

3-3 ストレス度 (SCL-S) (図 3 は巻末)

ストレス度では介入前後で介入群において得点が有意に減少する傾向が見られた。対照群では有意に増加する傾向が見られた (図 3)。介入前の介入群と対照群での有意差はなかったが、介入後の介入群と対照群間では有意に増加する傾向が見られた。

3-4 PGC モラール・スケール (図 4 は巻末)

PGC モラール・スケールでは介入前後で心理的動揺の項目において介入群で有意に減少が見られ、対照群では有意差は見られなかった (図 4)。その他の項目では有意差は見られなかった。また、介入前の介入群と対照群での有意差、介入後の介入群と対照群での有意差はともになかった。

3-5 状態不安尺度 (STAI-1) 特性不安尺度 (STAI-2) (図 5 は巻末)

STAI-1 は一過性の不安状態を表し、STAI-2 は個人の特性に基づく不安状態を表すものである。STAI-1 では介入前後で介入群において有意に減少が見られ、対照群において有意差は見られなかった。STAI-2 では介入前後で介入群、対照群ともに有意差は見られなかった (図 5)。また、介入前の介入群と対照群での有意差、介入後の介入群と対照群での有意差も STAI-1、STAI-2、ともになかった。

3-6 NBT 還元試験 (図 6 は巻末)

3-6-1

介入前である 2006 年の介入群との比較有意差は見られなかった。

3-6-2

介入後である 2007 年の介入群と対照群の比較刺激時の NBT スコアにおいて、介入群の方で有意に増加が見られ、非刺激時の NBT 還元率において、介入群の方で有意には至らなかったが減少する傾向が見られた。

3-6-3

介入群において2006年と2007年での比較非刺激時のNBT還元率において介入後の2007年の方で有意には至らなかったが減少する傾向が見られた。

3-6-4

コントロール群において2006年と2007年での比較刺激時のNBT還元率において介入後の2007年の方で有意には至らなかったが減少する傾向が見られた(図6)。

4 考察

要介護者が利用する施設には、老人保健施設、特別養護老人ホームなどがあるが、老人保健施設利用者は、身体機能の維持回復、痛みの軽減、リハビリテーションに対するニーズを強くもっており、特別養護老人ホーム利用者は、終の住処として、生活を楽しみたいとするニーズを高く認識している傾向が示されている⁷⁾。これにより、美容という視点からシニアの新しいライフスタイルを築くには、特別養護老人ホーム利用者の方がより適すと考えられる。今回、これに基づき、都内某所の特別養護老人ホームにご協力を頂き、本研究を進めた。

本研究では、対照群に比べて介入群では、QOLが向上した。領域別に見ると、介入群では、環境領域以外の身体的領域、心理的領域、社会的領域、全般的な生活の質のQOLが向上するという結果となった。また、コントロール群においては心理的領域でQOLが減少する結果となった。介入群の環境領域において、介入前後ともに同施設で過ごしているため影響がでないのは当然の結果であると考えられる。また、介入群において、身体的領域、心理的領域、社会的領域、全般的な生活の質のQOLが向上したことについては、今回の介入によって美容に身近に触れることで、被験者は活力が湧き、ポジティブ思考になるという、いい影響を与えうることを示した。今回のネイルケア介入の中に含まれる爪もみのマッサージによるQOLの改善の効果は報告されており⁵⁾、この結果と一致するものとなった。また、アロママッサージ(ラベンダーオイルも含めた数種類のオイルの中から被験者が希望する香りのオイルを使用した場合)によるQOLの向上の報告^{10) 11)}、ラベンダーオイルを使用したアロママッサージによるQOLの向上の報告¹²⁾がなされている。

今回のネイルケアに含まれるマニキュアの塗布は爪への化粧行為と捉えることができるだろう。そのことを踏まえると化粧によるQOLの改善の報告^{13) 14) 15)}にも一致する結果となった。今回の結果とこれらの文献を比較すると、文献5)の爪もみの報告は今回の対象者よりも対象者年齢が若かったのが特徴である。文献10) 11)のアロママッサージ(ラベンダーオイルも含めた数種類のオイルの中から被験者が希望する香りのオイルを使用した場合)による

QOLの向上の報告は両文献とも対象者が疾患を持つ患者で年齢幅もあり、しかも施術部位が全身であるという違いがあった。文献12)のラベンダーオイルを使用したアロママッサージによるQOLの向上の報告は対象者や対象者年齢にも大差はないが、マッサージ療法とともにローズマリー・ラベンダー・カモミールの三種類同時の芳香療法を組み合わせており、ともに今回の介入と完全に照らし合わせることはできない。文献13) 14) 15)の化粧療法の3つの報告のうち、今回の介入の対象者と年齢・対象者の属性・方法で近似しているものは1文献のみであった。これらの文献と今回の介入を総合的に考えると、今回のネイルケアの介入によるQOLの向上の結果はネイルケアに含まれる、ラベンダーアロマオイルを使用したマッサージの効果とは断定しがたく、むしろマニキュアの効果であるとは考えられる。コントロール群において心理的領域でQOLが減少する結果となったことに関しては、季節の変化の影響や身近な人の死や病気が原因である可能性も否定できない。

次に、対照群に比べて介入群では、自覚的ストレスが減少し、さらに、食食能と活性酸素産生能間での相関が強まるという結果になった。このことは、「自覚的ストレスの増加は免疫能の一つである好中球の食食能と活性酸素産生能のアンバランスを引き起こし、好中球機能の低下を誘導すると考えられる」という報告⁹⁾に一致する。

自覚的ストレスにおいては、アロママッサージ(ラベンダーオイルも含めた数種類のオイルの中から被験者が希望する香りのオイルを使用した場合)による自覚的ストレスの減少の報告^{11) 16)}、ラベンダーの香りによる自覚的ストレスの減少の報告^{17) 18) 19) 20)}、化粧による自覚的ストレスの減少の報告²¹⁾がなされている。

今回の結果とこれらの文献を比較すると、文献11) 16)のアロママッサージ(ラベンダーオイルも含めた数種類のオイルの中から被験者が希望する香りのオイルを使用した場合)による自覚的ストレスの減少の報告は両文献とも対象者が重い疾患を持つ患者で年齢幅もあり、しかも施術部位も全身と両前腕であるという違いがあった。文献17) 18) 19) 20)のラベンダーの香りによる自覚的ストレスの減少の報告については年齢が若い女性であるため、ともに今回の介入と完全に照らし合わせることはできない。文献21)の化粧療法の報告は、今回の介入の対象者と年齢・対象者の属性・方法で近似しているため、今回のネイルケアの介入による自覚的ストレスの減少は、QOLと同じく、ネイルケアに含まれるラベンダーアロマオイルを使用したマッサージの効果とは断定しがたく、むしろマニキュアの効果であるとは考えられる。これにより、化粧療法の免疫機能への効果が認められた報告はまだあまり存在していないが、今回の介入により、その効果も十分ありうるという

可能性も示唆された。コントロール群において自覚的ストレスが増加する結果となったことに関しては、QOL と同じく、季節の変化の影響や身近な人の死や病気が原因である可能性も否定できないと考えられる。

STAI においては、コントロール群に比べて介入群は状態不安が減少し、特性不安の変化はともに見られなかった。STAI-1 については、アロママッサージ（ラベンダーオイルも含めた数種類のオイルの中から被験者が希望する香りのオイルを使用した場合）、アロマオイルを含まないオイルマッサージとともに同程度、状態不安が減少するという報告²²⁾、ラベンダーオイルを使用したアロママッサージによる状態不安の減少の報告^{12) 23)}、オイル未使用マッサージによる状態不安の減少の報告^{24) 25)}、ラベンダーの香りによる状態不安の減少の報告^{26) 27)}、化粧による状態不安の減少の報告^{13) 15)}がある。文献 22) のアロママッサージ（ラベンダーオイルも含めた数種類のオイルの中から被験者が希望する香りのオイルを使用した場合）、アロマオイルを含まないオイルマッサージとともに同程度、状態不安が減少するという報告と文献 24) 25) のオイル未使用マッサージによる状態不安の減少の報告は、今回の対象者よりも年齢が若いうえで施術が全身であるというのが特徴である。文献 12) 23) のラベンダーオイルを使用したアロママッサージによる状態不安の減少の報告は今回の介入の対象者と対象者の属性や対象者年齢にも大差はないが、文献 12) においては、マッサージ療法とともにローズマリー・ラベンダー・カモミールの三種類同時の芳香療法を組み合わせられており、また、文献 23) においては今回の対象者に比べると年齢が若いうえで、施術が全身であるという違いがあった。文献 26) 27) のラベンダーの香りによる状態不安の減少の報告のうち文献 26) が今回の介入の対象者と年齢的にも近似しており、手術前の不安変化を見ているが重疾患の患者ではないことから、状態不安の効果を計るものとしては参考にすることは可能だと考えられる。文献 13) 15) の化粧による状態不安の減少の報告も今回の介入の対象者と年齢・対象者の属性・方法で近似しているものがあり、これらの文献と今回のネイルケア介入を総合して考えると、今回のネイルケアの介入による状態不安の減少は、鎮静作用があると言われるラベンダーの香りの効果と、マニキュアの効果ではないかと考えられる。

今回の結果同様に、STAI-2 が有意に変化した報告はなかった。これは、STAI-1 は一過性の不安状態を表すため、効果がすぐに反映しうが、STAI-2 は個人の特性に基づく不安状態を表すため、効果が現れにくい事による違いであると考えられる。

次に、コントロール群に比べて介入群は PGC モラルの心理的動揺項目が有意に改善していると示された。このことについては、化粧による PGC モラルの増加の報告^{15) 21)}が

ある。また、ラベンダーオイルを使用したアロママッサージによる PGC モラルの心理的動揺項目の改善の報告^{28) 29) 31)}、ラベンダーの香りによる PGC モラルの心理的動揺項目の改善は見られなかったという報告³²⁾がある。これらの報告は、今回の介入の対象者の年齢・対象者の属性・方法で近似しているため、今回のネイルケアの介入による心理的動揺項目の改善はアロマオイルの皮膚からの吸収の単体の効果か、マッサージの単体の効果か、もしくはその両方の複合効果か断定はできないが、いずれにしてもマニキュアの効果があつたとは考えられる。

最後に、他に報告は見られないが、爪もみがストレス・不安・心理的動揺・免疫機能へ何らかの形で関係している可能性も考えられるだろう。さらに、ネイルケアの際に行った施術者との会話も同様に心理的・免疫的に影響を与えているということは否定できない。

今回行ったネイルケア介入には結果を左右させる要因が五つ含まれる。①ネイルケアの際に使用したアロマオイルの皮膚吸収の影響、②ラベンダーの香りの影響、③ネイルケアの際に行った施術者との会話の影響、④爪もみマッサージの効果、⑤マニキュアを塗ることによる化粧効果、の五つである。今回の結果はこれらの効果が総合された結果であるが、このネイルケアが施設入居高齢者の生体防御機能や心理面に大きな役割を果たしていることが示唆されたものと思われる。今後、これらの効果 1 つ 1 つが何から影響されたかを解明していくこともこれからのよりよい環境の施設作りへ向けて必要であるだろう。

謝 辞

本稿を作成するにあたり、本調査にご協力頂きました都内の M 特別養護老人ホームの皆様方に深謝いたします。また、本調査にご協力頂きました宮本真氏ほか早稲田大学院人間科学研究科 町田研究室の皆さんにお礼を申し上げます。

(引用文献)

- 1) 総務省「国勢調査」
- 2) 国立社会保障・人口問題研究所「日本の将来推計人口（平成 18 年 12 月推計）」の出生中位・死亡中位仮定による推計結果
- 3) 厚生労働省「完全生命表」
- 4) 平成 19 年版 高齢社会白書
- 5) 班目健夫 川嶋朗 爪もみ健康法の実験的検討 治療 Vol.89 No.3,579-582 2007.03.01
- 6) 手塚千史 高齢者の心身機能を高めるマッサージとしてドイツの歴史的ロマケア 月刊 GPNet Vol.54 No.2 39-44
- 7) 小沼真理子 北川慶子 鐘ヶ江寿美子 林ちづる 高齢者

- (施設利用)の身体機能と QOL 滋賀医科大学紀要 第 19 号 2000 105-112
- 8) 古谷野 亘 1981 10 生きがいの測定 - 改訂版モラル・スケールの分析 - 老年社会学 2 83 - 95
- 9) 町田和彦 メカニズムをさぐるⅢ 好中球 臨床スポーツ医学 19 卷 11 号
- 10) 小川俊枝, 田島雅之, 斉藤早苗, 小坂橋喜久代, 柳奈津子 超重症心身障害児(者)に対するアロママッサージの効果に関する研究 日本重症心身障害会, Vol.32 No.1 Page.129-135 (2007.04.01)
- 11) 梅田久美子, 安藤洋子 乳癌術後のアロママッサージ効果の一考察 - 唾液中のアミラーゼ濃度測定 - 日本看護学会論文集 看護総合 Vol.37th Page.185-187 (2006.12.19)
- 12) 松延佳須美, 膳所佳子, 阿河礼子, 御手洗裕子, 増田貴美子 老人性痴呆疾患治療病棟におけるはいかい患者へのアプローチ - 不安・焦燥感を呈する痴呆患者に対するアロマセラピーの効果 - 日本看護学会論文集 精神看護 Vol.35th Page.97-99 (2004.12.10)
- 13) 有川順子, 川島真, 羽柴早由里, 大城喜美子 メイクアップがアトピー性皮膚炎女性患者の QOL に与える影響について The effects of make-up on QOL of female patients with atopic dermatitis. 臨床皮膚科 Vol.57 No.3 Page.224-230 (2003.03.01)
- 14) Yoshinori Sagehashi Therapy makeup improves the Quality of Life of patients with skin diseases-Covering foundations created by integration of medical care and beauty care for severe skin color problems. Forager J Vol.35 No.1 Page.90-92 (2007.01.15)
- 15) 吉田寿美子, 荒川冴子, 中幡美絵, 土屋慶子, 作山美智子, 石津憲一郎, 安保英勇, 上埜高志 化粧療法による被介護者と介護ボランティアの精神的活性化 コスメトロジー研究報告 Vol.15 Page.106-114 (2007.09.01)
- 16) 中村水穂, 大谷真穂, 益田しのぶ, 奥村志津子, 井上愛子 ターミナル期にある患者のストレスに対するアロマセラピーの有効性の検討 日本看護学会論文集 看護総合 Vol.36th Page.103-105 (2005.11.24)
- 17) 古谷島裕子, 山崎陽子, 落合啓子, 山名敏子, 鈴木悦子 アロマセラピーによる看護婦のストレスの軽減 日本看護学会論文集 看護管理 Vol.29th Page.203-205 (1998)
- 18) 小林絵里子 ストレス - 最近の事情とその対処法 アロマセラピーの及ぼすリラクゼーション効果 Aromatopia Vol.14 No.2 Page.18-22 (2005.03.25)
- 19) 佐久間研司, 浦上克哉 勝占智子, 深田美香, 甲斐太, 中島健二 ストレス負荷に対してラベンダーの香りが及ぼす影響 米子医学雑誌 Vol.55 No.4 Page.203-209 (2004.07.05)
- 20) 元永千穂, 河野斉治, 原田健, 渡辺英綱, 國枝里美, 櫻井和俊 精油の抗肥満効果 - 肥満と心の関係に着目したアプローチ AromaRes Vol.8 No.2 Page.164-167 (2007.05.28)
- 21) 作山美智子, 石津憲一郎, 上埜高志, 安保秀勇, 上埜高志, 安保秀勇, 吉田寿美子, 荒川冴子, 中幡美絵 化粧療法の健康増進に与える影響に関する研究 月刊総合ケア Vol.17 No.5 Page.82-85 (2007.05.15)
- 22) Hiroko Kuriyama, Satoko Watanabe, Takaaki Nakaya, Ichiro Shigemori, Masakazu Kita. Immunological and Psychological Benefits of Aromatherapy Massage. eCAM 2005;2 (2)179-184
- 23) 山田久美子, 森本俊子, 岩城都子 フル・ボディ・トリートメントによるアロマセラピーの心理的効果 - 性格特性を考慮した検討 アロマセラピー学雑誌 Vol.3 No.1 Page.11-18 (2003.03.31)
- 24) KURIYAMA Hiroko, WATANABE Satoko, FUKUI Kenji, IMANISHI Jiro, TADAI Toshiaki, SHIRAHATA Isao The Effects of Massage Therapy on the Immune, Hematological and Psychological State of Adult Subjects 日本補完代替医療学会誌 Vol.2 No.1 Page.59-65 (2005.02.01)
- 25) Effects of Shiatsu Massage on Relief of Anxiety and Side Effect Symptoms of Patients Receiving Cancer Chemotherapy. IIDA M, KANDA, K, CHIBA A, YOSHIDA Y, SHIMIZU K, Kitakanto Med J Vol.50 No.3 Page.227-232 (2000.05.01)
- 26) 小野美千子, 佐々木恵美子, 工藤千奈美, 三上淳子, 酒井珠美, 小野善昭, 村田加代子 意識下手術におけるアロマセラピーの効果 - 老人性白内障手術の不安ととう痛について -, 日本看護学会論文集 老年看護 Vol.33rd Page.53-54 (2002)
- 27) 米沢優子, 芹沢直美, 櫻山ひろみ, 岡里美, 植田百合子 術前不安に対するアロマセラピーを用いた術前療法の効果 日本看護学会論文集 成人看護 Vol.28th No. Pt 1 Page.97-99 (1997.09)
- 28) Ballard CG, Obrian JT, Reichelt K, Perry EK. Aromatherapy as a safe and effective treatment for the management of agitation in severe dementia; The results of a double-blind, placebo-controlled trial with Melissa. J Clin Psychiatry 2002;63:553-558.
- 29) Brooker DJ, Snape M, Johnson E, Ward D, Payne M. Single. Case evaluation of the effects of aromatherapy and massage on disturbed behaviour in severe dementia. Br J Clin Psychol 1997;36(Pt2):287-296.
- 30) Buchbauer G, Jirovetz L, Jager W, Dietrich H, Plank C, Dietrich, H. Fragrance compounds and essential oils with sedative effects upon inhalation. J Pharm Sci 1993

; 82 : 660-664

- 31) Smallwood J, Brown R, Coulter F, Irvine E, Copland C. Aromatherapy and behaviour disturbances in dementia : A randomized controlled trial. *Int J Geriatr Psychiatry* 2001;16:1010-1013.
- 32) A.LYNN SNOW, Ph.D., LINDA HOVANEK, R. N., M.Ed., JASON BRANDT, Ph. D., A. B. P. P. A Controlled Trial of Aromatherapy for Agitation in Nursing Home Patients with Dementia. *THE JOURNAL OF ALTERNATIVE*

AND COMPLEMENTARY MEDICINE, 2004 ; 10 (3) 431-437

- 33) 陽川昌範 ハーブの科学 9 農業および園芸, Vol.70 No.9 Page.1036-1040 (1995.09)
- 34) 鳥居鎮夫 アロマテラピーにおける香りの役割, Re No.143 Page.34-37 (2004.07.01)
- 35) 入内島一崇、峯島孝雄 施設高齢者の認知的社会関係と QOL の関係 *東保学誌* 1999 Vol.2 No.2

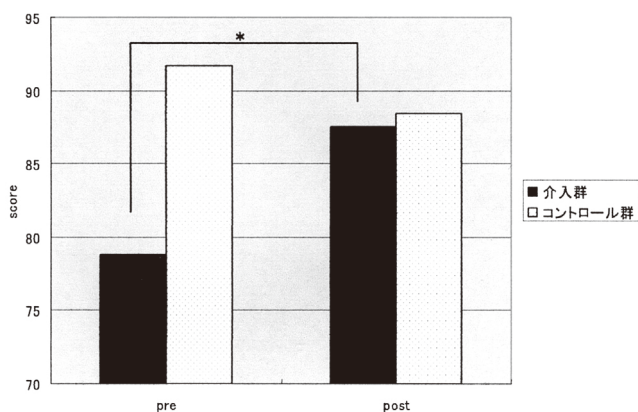


図1 QOL-26の総合得点変化

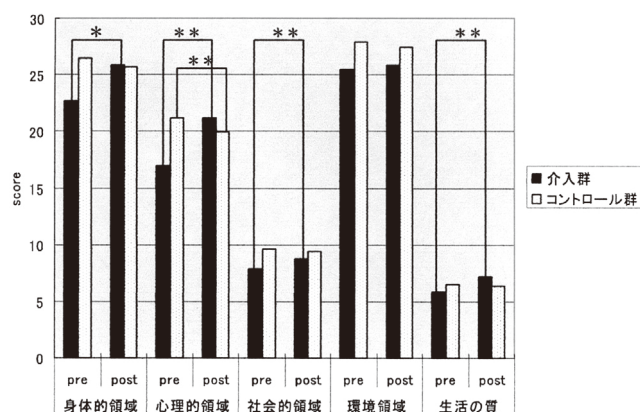


図2 QOL-26の領域別得点変化 * : $p < 0.01$, ** $p < 0.05$

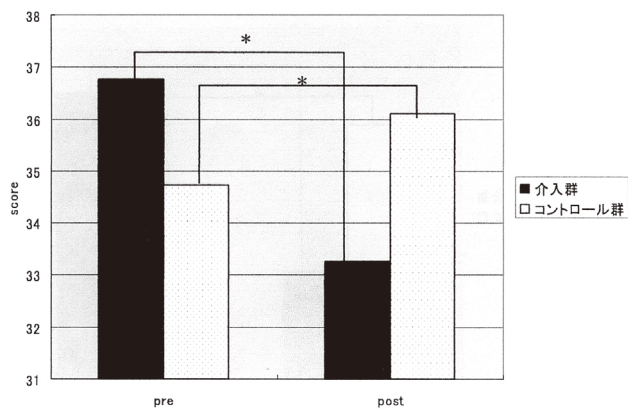


図3 ストレス度の得点変化 * $p < 0.01$

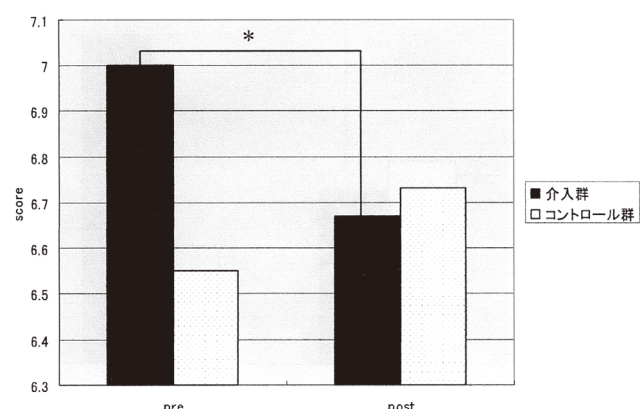


図4 PCGモラル・スケールの心理的動揺の項目における得点変化

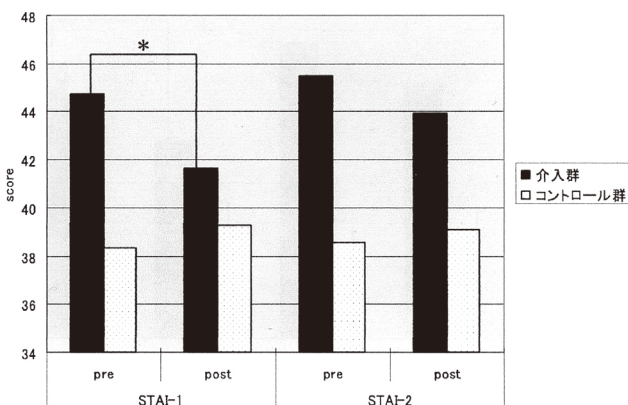


図5 STAI-1, STAI2 における得点変化

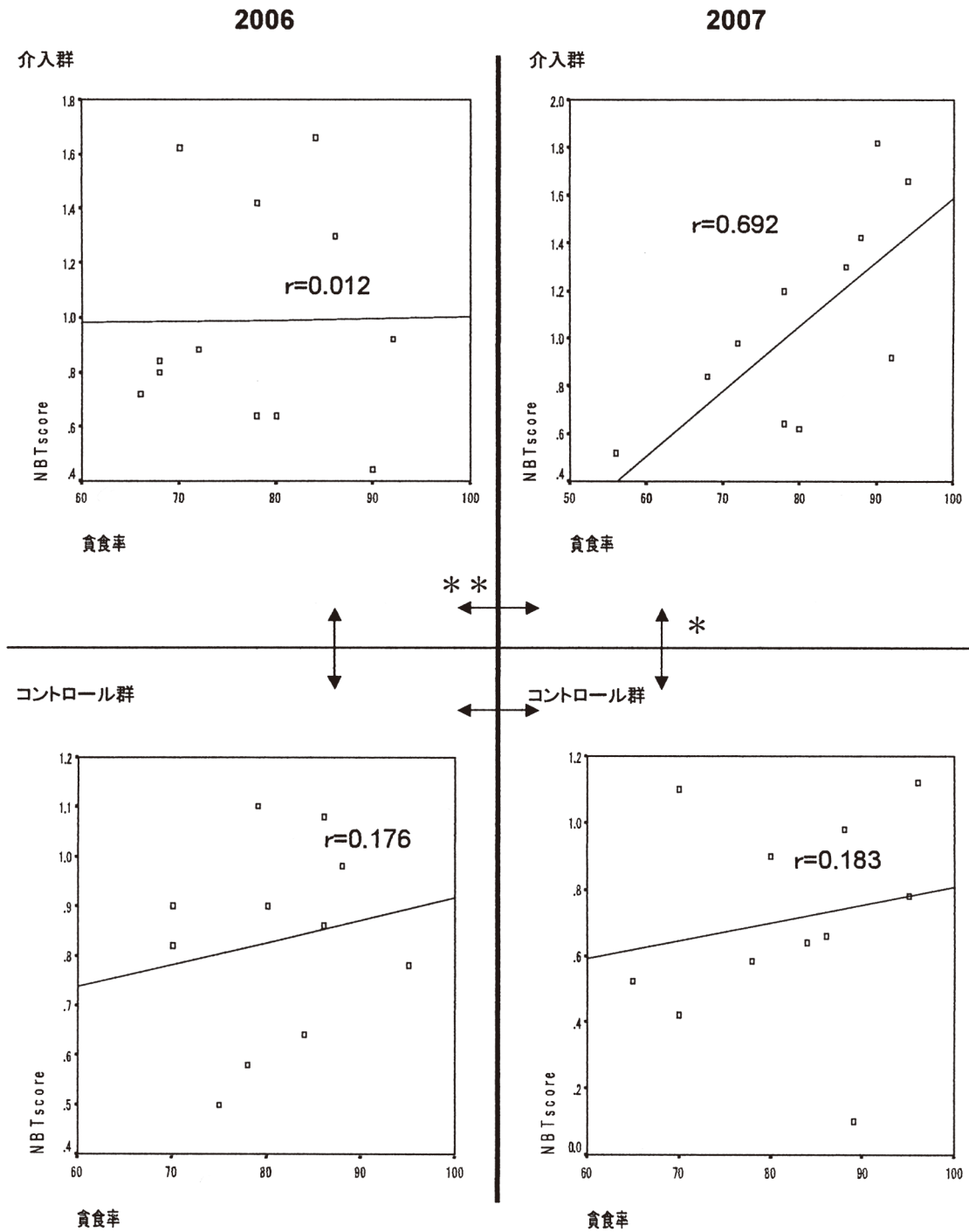


図6 NBT 還元試験におけるネイルケアし施術の効果の相関図と t 検定の比較図
 * $p < 0.05$ (刺激時の NBT 還元率の有意差)、
 ** $p < 0.05$ (NBT と食食率の相関)

化粧・美容意識についての日仏文化比較研究 —日仏大学生へのアンケート調査の結果から—

大阪大学言語学博士、ナント大学言語科学科博士課程

石丸 久美子

The aim of this study is to analyze the difference between French and Japanese university students regarding beauty consciousness.

A survey on makeup, skincare practices, and beauty consciousness was conducted in France in January 2007, and again in Japan from June to July 2007.

The subject group consisted of 126 French (18-22 years old, Average: 19.3 years old) and 123 Japanese (18-24 years old, Average: 19.1 years old) female university students.

Quite unexpectedly, some common denominators were found for the two countries: The most important makeup item for them is mascara. Other kinds of eye makeup are also important for both. French and Japanese students admire many of the same cosmetics brands, and their expenditure on cosmetics is approximately the same.

However, there were also differences between answers of two countries. 70% of French students like getting a tan and 90% of Japanese students dislike it. The cosmetics they use the most on a daily basis are perfume for French students and mascara for Japanese students. Among skincare products, moisturizing products (lip balm, cream) are important for French students, but cleansing products are more important for Japanese students. The French students' predominant criteria for cosmetic selection are quality and effect, and for Japanese are ease-of-use and packaging or colour. Concerning advertising copy aimed at a certain country's women (e.g., "This product is made for Japanese women"), most French students were unfavorable toward it (e.g., "strange", "ridiculous", "discriminatory", "unpleasant"), and the majority of Japanese students were positive about it (e.g., "good", "safe", "happy").

1. 緒言

近年、化粧文化研究が本格的な学問分野の対象となり、いくつもの研究が出てきているが、研究内容としては、その史的考察を行ったものが多く、化粧観や美意識についての研究はいまだに少ないと言わざるを得ない。特に、これらを実地調査した研究は、村澤、大坊、趙 (2005)¹⁾等の他には殆ど無いと言えるだろう。

筆者は、今まで、日仏の化粧品広告言説 (ディスクール) を考察し、その内部に構築された、理想の「女性美」や化粧・美容意識を分析してきた²⁾。フランスは、日本と同様に、大手化粧品メーカー/ブランドを多く持つ、化粧品大国である。ゆえに、本研究では、化粧・美容についての意識が国によってどう異なるのかということの問題提起とし、社会・文化が大きく異なる、日本とフランスという二国における化粧・美容意識を比較考察することを目指したい。特に、これまで、日仏の学生の化粧・美容意識を現状調査した研究は見られないことから意義のある調査だと考える。

また同時に、筆者の化粧品広告言説に関する先行研究結

果と、今回、実際に日本とフランスで行った実地調査の結果がいかに関連しているかについても考察したい。

2. アンケート調査

2.1 研究目的

日仏の女子大学生を対象として、アンケート調査を行い、両国の学生の化粧・美容意識の共通・相違点を見ていく。

2.2 調査方法

自らの化粧習慣、意識についての調査項目と共に、日仏両国間での相互印象に関する調査項目を作成し、選択式、自由記述式併用で回答をしてもらった。

アンケートは、フランス (ナント市) では、2007年1月に、日本 (京都市) では2007年6~7月に、質問用紙を配布、回収し、実施した。

2.3 調査対象者

フランス人女子学生 ナント大学、オデンシア経営高等専門学校 (グランゼコール)、テュノン国際学校 (観光・ホテル学)、ヨーロッパ商業高等専門学校 (グランゼコール) 126名 (年齢: 18-22歳、平均19.3歳)

日本人女子学生 京都外国語大学 123名 (年齢: 18-24歳、平均19.1歳)

2.4 質問項目

質問事項は以下の通りである。



A Comparative Study on Beauty Consciousness of Japanese and French University Students

Kumiko ISHIMARU

Ph.D. (Language and Culture), Osaka University, Postgraduate, Faculty of Language Sciences, Nantes University

年齢：.....歳

学年（分野を詳しく教えてください）：.....

（フランス人学生に対して）日本滞在 / （日本人学生に対して）フランス滞在経験はありますか。 ある ない

滞在日数：.....

1. 美容について

1. 日焼けは好きですか。以下から選択してください。

大変好き。 どちらかといえば好き。 どちらでもない。 どちらかといえば嫌い。 全く好きではない。嫌い。

2. 化粧品について

1. 普段の化粧品には、どの化粧品を使いますか（複数回答可）。

ファンデーション パウダー アイシャドー アイライナー

マスカラ アイブローペンシル・パウダー チーク 口紅 グロス マニキュア 香水 その他（ ）

2. あなたにとって、最も重要な化粧品は何ですか。一つだけ選んでください。

ファンデーション パウダー アイシャドー アイライナー

マスカラ アイブローペンシル・パウダー チーク 口紅 グロス マニキュア 香水 その他（ ）

3. 普段、顔のお手入れに、どの基礎化粧品を使いますか（複数回答可）。

石鹸 化粧落とし、洗顔料 化粧水 乳液 クリーム ゴマージュ / ピーリング（角質対策用品） パック / マスク

保湿リップ その他（ ）

4. 夜はどのように、どんな化粧品を使って洗顔しますか。

5. 朝はどうですか。

6. 好きな化粧品メーカー / ブランド名を挙げてください（複数回答可）。またその理由を述べてください。

メーカー / ブランド名：

理由：

7. 憧れの化粧品メーカー / ブランド名を挙げてください（複数回答可）。またその理由を述べてください。

メーカー / ブランド名：

理由：

8. 化粧品購入に、月に、また年にいくら出費しますか。

月に 円 年に 円

9. （フランス人学生に対して）日本女性の美容と化粧品について、どのような印象を持っていますか。また、日本メーカー / ブランドの化粧品についてはどうですか。

日本女性について：

日本メーカー / ブランドの化粧品について：

（日本人学生に対して）フランス女性の美容と化粧品について、どのような印象を持っていますか。また、フランスメーカー / ブランドの化粧品についてはどうですか。

フランス女性について：

フランスメーカー / ブランドの化粧品について：

10. （フランス人学生に対して）日本の化粧品広告には、製品が日本女性のために作られたという、次のような表現がよくあります。「この製品は、日本女性の肌に合わせたテストをしています。」（Dior）、「日本とアジアの消費者の肌ニーズに合わせて処方・開発」（LANCÔME PARIS）もし、このような表現がフランス人女性に向けにあったら、どのように思いますか。

（日本人学生に対して）次の文は化粧品広告からの抜粋です。「この製品は、日本女性の肌に合わせたテストをしています。」（Dior）、「日本とアジアの消費者の肌ニーズに合わせて処方・開発」（LANCÔME PARIS）これらについてどう思いますか。

3. 結果と考察

3.1 日焼けについて (Fig.1)

日焼けについては、筆者の先行研究³⁾によると、日仏化粧品広告で大きな違いが見られ、フランス広告では、日

焼け止めを使いつつも日光浴をすることを勧めるのに対し、日本広告では日光浴を勧める言説は皆無であった。この文化的差異を証明するように、日焼けの好き嫌いについての質問では、フランス人学生が、「どちらかといえば好き。」49 回答、「大変好き。」41 回答で、約 7 割が好きと答えた

のに対し、日本人学生は、「まったく好きではない。嫌い。」82 回答、「どちらかといえば嫌い。」29 回答で、約 9 割が好きではない、嫌いと回答した。

3.2 普段の化粧について (Fig. 2)

「普段の化粧には、どの化粧品を使いますか。」という質問については、フランス人学生の回答で一番多かったのが、「香水」であったのに対し、日本人学生の回答は、「マスカラ」であった。これは、昨今のマスカラ人気⁴⁾を証明するものといえる。香水がフランスでは重要な位置を占める化粧品であるというのは、筆者の先行研究⁵⁾の調査で、フランスでは香水の広告数が第1位であったということに一致している。「マスカラ」と「アイライナー」は二国共々で3位以内に入っており、日仏両国でアイメイクが重要視されていること、さらに、日本では「アイシャドー」もフランス以上に多く用いられていることが分かった。フランスにおけるアイシャドーの使用が日本より少ないのは、フランス人は一般的に日本人よりも彫りの深い顔で、必要性を感じないためかもしれない。日仏での違いとしては、「マニキュア」がフランスでは第4位に多かったのに対し、日本では、第10位であった。また、「ファンデーション」が日本では第3位だったのが、フランスでは、第5位、「アイブローペンシル・パウダー」が日本では第5位だったが、フランスでは、最下位の第12位であった。また、チークも日本でより多く用いられていた。つまり、フランスでは、香水、爪の化粧、お手入れが日本より重視されており、日本では、ファンデーションを使うこと、アイブローを使い、眉を整えること、チークを入れることがフランスより重視されていることが分かる。そして全体として日本の学生の方が、多くの化粧品を使い、フルメイクをしていることがグラフから読み取れる。

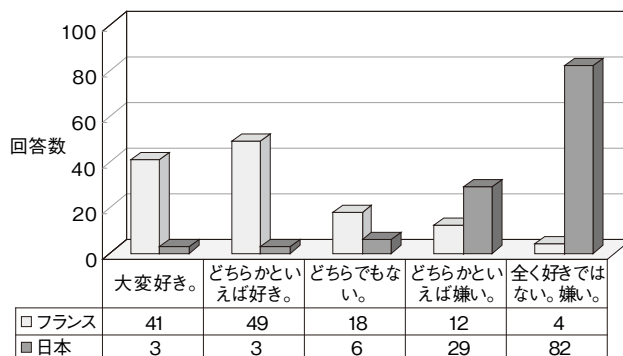


Fig. 1 日焼けについて

3.3 最も重要な化粧品 (Fig. 3)

では、日仏各国の学生にとって、最も重要な化粧品とは何であろうか。「あなたにとって、最も重要な化粧品は何ですか。」という質問に答えてもらった。その結果、日仏両国で、「マスカラ」が第1位に選ばれた。次に興味深いことは、第2位に、フランスでは、前章で最も使われる化粧品という結果だった、「香水」が挙げたのに対して、日本では前章で第2位だった「アイライナー」を抜いて、第2位「ファンデーション」、第3位「アイブロー」という結果になったことであろう。香水は日本では第5位であり、香水を付けることが、日本人とは比較にならないほど、フランス人にとっては重要な行為であることが証明され、日本では、フランス以上に、ファンデーションを塗ることが重要と考えられていることが明らかになった。

3.4 普段使う基礎化粧品 (Fig. 4)

では、普段の顔のお手入れには、どのような基礎化粧品が多く用いられ、重要と考えられているのだろうか。回答としては、第1位がフランスでは「保湿リップ」で、日本

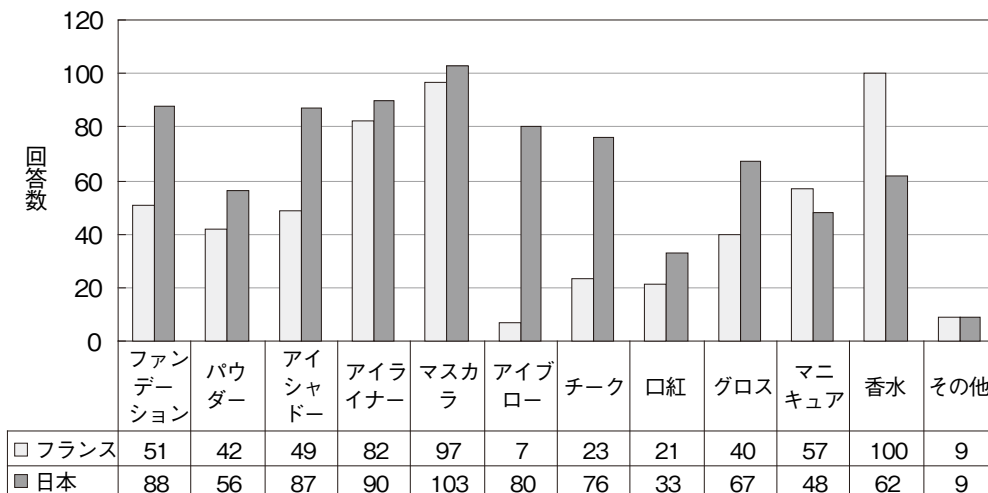


Fig. 2 普段の化粧に使う化粧品

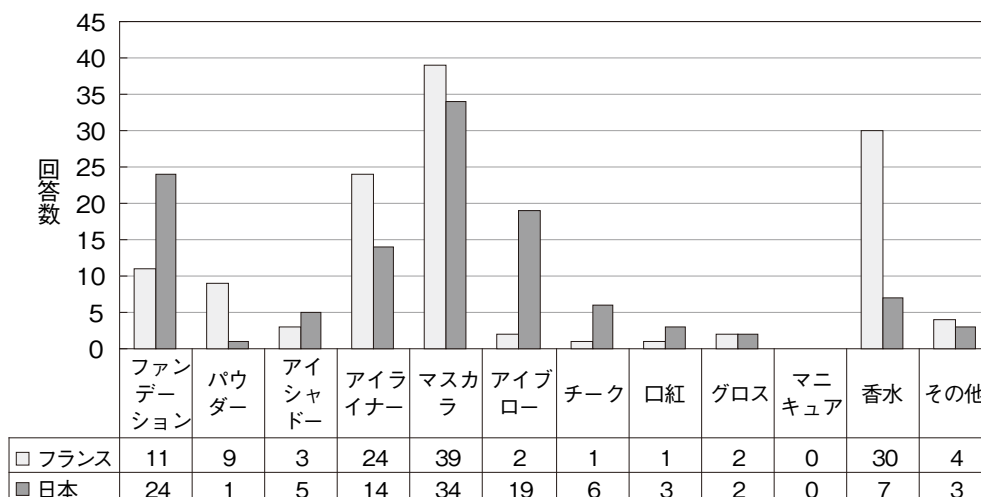


Fig. 3 最も重要な化粧品

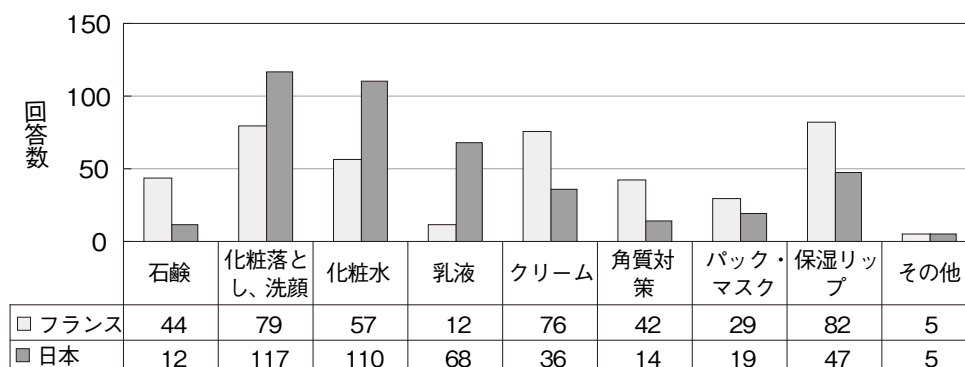


Fig. 4 普段使う基礎化粧品

では「化粧落とし、洗顔料」であった。また、フランスでは第3位だった「クリーム」が日本では第5位であり、日本では第3位だった「乳液」がフランスでは第8位という結果からも、フランスでは日本よりも保湿ケアがより重要と考えられていることが分かる。これは、やはり、フランスの方が乾燥した気候であることによるであろう。そして、日本では、「洗顔」、「化粧水」、「乳液」が基礎化粧品セットとして使用されていることが分かる。その他としては、「ゴマージュ/ピーリング(角質対策用品)」がフランスでより多く用いられていた。「化粧落とし、洗顔料」を使う人の割合が日本の方が多く、「石鹸」を使うのがフランスの方が多いのは、上記で触れたように、日本人学生の方がファンデーションを使う人が多いことによるのではなかろうか。

3.5 夜のお手入れ

夜はどのような化粧品を使って洗顔をするか質問をした所、「化粧落とし、クレンジングを使う」と答えた人は日仏共ほぼ同数であったが、「洗顔料を使う」と答えたのは、日本の方が多かった。「ローション、化粧水を使って」という回答は、フランスの方が多かったが、これは、フラン

スでは、日本に多い保湿タイプの化粧水よりも、クレンジングの役割をしたり、汚れを落としたりするタイプの化粧水が大変人気であり、それを使っている人が多いことによる。「乳液をつける」と述べたのが日本で12回答だったのに対して、フランスではわずか1回答であり、「クリームを使う」と答えた人がフランスでは日本の3倍近くになった。この結果も上記で述べた通り、フランス人学生は、より高い保湿力を好むことからであろう。また、フランスに特徴的なこととして、gantと呼ばれる、(顔や体を洗うための) タオル地の袋状のグローブを使うという2回答があった。

3.6 朝のお手入れ

朝のお手入れも傾向としては夜とほぼ同じであった。しかし、水、ぬるま湯で洗うという回答が日本の方がフランスの倍近くであった。逆にローション、化粧水を使う人がフランスで多かったが、これも前章で述べたような、汚れ落としをする化粧水を使う人が多いためであろう。また、フランスではグローブを使って洗うという回答がやはり4回答、シャワージェルでというのが1回答あったが、これは、朝、お風呂に入るか、シャワーを浴びる人が多いこと

によると思われる。

3.7 好きな化粧品

「好きな化粧品メーカー/ブランド名を挙げてください。またその理由を述べてください。」という質問に対しての結果は、全体として、フランスでは、スーパーで買える手軽な価格のメーカー/ブランドが多く、日本では逆に百貨店で買うようなより高価なメーカー/ブランドが多く挙げられていた。

フランスでは、第3位までのすべてがスーパーで売っているものであった。(日本では決して安くはないフランス大手メーカー L'Oréal もスーパーで売っている。価格も自国のものであるからか、日本より随分と安価である。)そして、第4位は、薬局で売っているブランド Avène、第5位は、フランス中に独立店舗を持ち、非常に手頃な価格で自社製品を売っている、Yves Rocher であった。このように、フランスでは、上位は、割と手頃な価格のメーカー/ブランドであり、高価なブランドとしては、やっと第6位で Lancôme が挙がった。これに対して、日本では、KATE、マジョリカ・マジョルカやメイベリン等は手頃な価格帯のブランドであるが、それ以外は高いブランドが多く挙がっていた。

フランスでは、上で述べた Avène の他、La Roche Posay、Neutrogena という薬局ブランドも挙がっていたのが特徴的である。

フランス

NIVEA* 44 (回答)、L'Oréal* 27、Gemey-Maybelline* 19、Avène+ 14、Yves Rocher 13、Lancôme 9、La Roche Posay+ 8、Evian* 7、Dior 6、Mixa* 6、Neutrogena+ 6、Sephora 6、特になし 5、Garnier* 5、Agnès b 5、Bourjois* 5、Chanel 4、Clarins 4、Guerlain 4... [以下省略]
*スーパーで販売 + 薬局で販売

日本

資生堂 29、特になし 13、KATE 11、アナスイ 9、マジョリカ・マジョルカ 8、メイベリン 8、ランコム 8、マキアージュ 7、RMK 6、REVUE 5、Chanel 5、Dior 5、KOSE 4、PAUL & JOE 4、MAC 4...

次に、以上のようなメーカー/ブランドを選んだ理由としては、フランス人学生の回答では、第1に「品質が良い」、第2に「価格」、第3が「効果」となっていた。これに対し、日本人学生は、第1に「価格」、第2に「使いやすい」、第3に「色がきれい」と述べていた。このように、フランスでは、品質・効果といった質的なことに価値が置かれているのに対して、日本ではむしろ、使い易さと見た目の美しさ(第3位「色がきれい」、第4位「パッケージ、見た目、デザインが好き」、第5位「かわいい」)といった実用・利便性や美に価値が重かれていることが明らかになった。

フランス

品質が良い 34 (回答)、価格 (高すぎない、安い、手頃) 28、効果、保湿力、肌が美しくなる 22、よい製品、ブランドだから 8、安心、信頼、信用、安全 5、肌に合っているから 5、品質と価格が見合っている 5...

日本

価格 (高くない、手ごろ、安い) 17、使いやすい 10、色がきれい 9、肌に合う 8、パッケージ、見た目、デザインが好き 8、かわいい 7、発色がいい、きれい 5、ファンデがいい 5...

3.8 憧れの化粧品

前章で実際に使っていると思われる、好きな化粧品について述べてもらったが、次の質問としては、「憧れの化粧品メーカー/ブランド名を挙げてください。またその理由を述べてください。」として、実際には使っていないとも憧れを持っているメーカー/ブランド名とその理由を挙げてもらった。結果としては、日仏共、第1、2位は同じ結果で、フランスのブランド、Chanel と Dior であった。日本では第3位でようやく国産の資生堂、マキアージュが挙げられていた。

理由としては、日仏共、「高価」、「高級」ということが上位に挙がっていた。しかし、フランス人が「質が良いから」を第1位に挙げ、重視しているのに対し、日本人は、「かわいい」、「見た目、パッケージ」、「色がきれい」と見た目を重視した回答をしていたのが興味深い。この回答は前章の調査項目の答えと共通しており、日本人とフランス人の化粧品に対する評価基準が異なることが証明されたといえよう。

フランス

Chanel 40 (回答)、Dior 35、特になし 12、Lancôme 10、Yves Saint Laurent 8、Guerlain 5、L'Oréal 5、Clarins 4、Shiseido 4...

日本

シャネル 31、ディオール 17、マキアージュ 7、特になし 9、ランコム 8、アナスイ 6、RMK 5、Yves Saint Laurent 4...

理由:

フランス

質が良い 21 (回答)、豪華さ 15、高価 11、有名、評判 9、高級ブランド、高級品 9、効果、肌に良い 5、美しい広告、広告の影響 4、美、美しい 4、良い香り 2、良い製品 2、美を象徴するから 2...

日本

高価 10、かわいい 10、高級感 5、見た目、パッケージ 5、色がきれい 4、何となく 3、品質 3、大人な感じ、大人っぽい 3、かっこいい 2、きれい 2、よさそう 2、使いやすい、使いやすい 2、好きだから、好み 2、広告、CMの女優さんがキレイ 2...

3.9 化粧品購入費

日仏の学生は、それぞれ化粧品購入にどれほどの出費をしているのかという疑問から、これについての調査項目を設けた。

結果は、1か月の出費は、日本人学生の方が概して多く、フランス人学生の倍近くを化粧品に使うことを示していたが、1年での出費額を比較すると、日仏でほぼ同じであること、学生によって出費に大きな違いがあり、2～4倍あるいはそれ以上の差があることが分かった。

フランス：月に
5ユーロ（約800円）18（回答）、10ユーロ（約1,600円）15、20ユーロ（約3,200円）11、15ユーロ（約2,400円）9、30ユーロ（約4,800円）7、40ユーロ（約6,400円）5...

最低0ユーロ（0円）3、最高60ユーロ（約9,600円）3

日本：月に
3,000円17、2,000円13、5,000円10、1,000円9、10,000円7、20,000円3...

最低0円4、最高70,000円1

フランス：年に
50ユーロ（約8,000円）13、100ユーロ（約16,000円）9、120ユーロ（約19,200円）7、200ユーロ（約32,000円）7、30ユーロ（約4,800円）6、150ユーロ（約24,000円）5...

最低0ユーロ（0円）1、最高700ユーロ（約112,000円）2

日本：年に
10,000円11、30,000円9、5,000円8、20,000円8、15,000円5...

最低3,000円1、最高150,000円1、すごい額1

注：1ユーロ=160円で計算した。また、例えば5,000～10,000円というように幅があった回答は、最低金額5,000円と最高金額10,000円の両方を回答として集計した。

3.10 日仏の美容と化粧に関する相互印象

ところで、日仏の学生は、互いの国の女性の化粧や美容について、どのような印象を持っているのであろうか。また、化粧品メーカー/ブランドについてはどうであろうか。

3.10.1 日本女性、日本の化粧品についての印象

フランス人学生の回答は、矛盾していると同時に、伝統的なステレオタイプであった。まず、「ナチュラル、地味」が第1位でありながら、第2に「濃い化粧」と挙げられていたのは、普通の日本人女性は化粧が薄いのに対し、芸妓や「コギャル」、「ギャル」等の濃い化粧を想像することによると思われる。「芸者」の「伝統的な化粧」、つまり、「白い肌」に「赤い口紅」と「アイライナー」というステレオタイプが見事に挙げられている。同時に、現代女性のイメージとしては、「念入りにお手入れしている」、「白く」見

えることを好む」、「化粧（品）が好き」、「西洋人に似ようとする」と鋭い指摘といえる回答があった。

日本の化粧品については、無回答も多く、「Shiseido」という答えがあったものの、大半が「知らない」という回答であった。また、「どれが日本製か知らない。」という回答があったのも興味深い。

日本女性の美容と化粧について：

ナチュラル、地味、シンプル、薄化粧 29（回答）、濃い化粧、地味でない、派手 19、白い肌、パウダー 22、赤い口紅 16、アイライナー、目の上を黒くする 14、念入りにお手入れしている、お風呂場で長時間過ごす、沢山の化粧品を使う 12、美しい、お洒落 12、頬紅 7、清らか、端正、ピュア 7、肌を明るくみせようとする、「白く」見えることを好む 6、芸者 6、伝統的な化粧、美 5、化粧品、化粧が好き 5、美しい、綺麗な、すべすべな肌 5、西洋人に似ようとする、西洋的にしようとする 4...

日本の化粧品メーカー/ブランドについて：

知らない 49、Shiseido 10、良い、質が良い、信頼 5、どれが日本製か知らない 2...

3.10.2 フランス女性、フランスの化粧品についての印象

本章では、日本人学生のフランス女性、化粧品に対するイメージについて言及したい。学生らがフランス人女性に持っている印象は、第1位が「美しい、綺麗、カワイイ」で、その次に、「薄化粧」あるいは「ノーメイク」であることが分かった。

フランスの化粧品については、好きな化粧品にフランスのメーカー/ブランドのものを挙げている人が多かったにもかかわらず、意外にも「分からない、知らない」という回答が第1位であった。次に、「高価、高そう」、「高級」とあり、第4位に「香り、匂いがきつい」とあったことは注目に値するであろう。

フランス人女性の美容と化粧について：

美しい、綺麗、素敵、美人、カワイイ 27（回答）、薄化粧、ナチュラル、自然 24、ノーメイク、すっぴん、何もしなそう 9、特にない、分からない 8、お洒落（に敏感）6、アイメイク 4、顔がはっきりしていそう、顔が濃い 3、化粧に興味がないさそう 3、濃い化粧 3、おしゃれに厳しそう、手を抜かない、こだわりがありそう 3、肌が白い 3、美容対策していそう、気をつけていそう 3、自分にあった化粧の仕方をしていそう 3...

フランスメーカー/ブランドの化粧品について：

分からない、知らない 16、高価、高そう 10、高級 9、香り、匂いがきつい 7、おしゃれ 5、良い匂い 3、ランコム 3、良さそう、良い 3、美しい、きれい 3、濃い 3、Dior 3...

3.11 日本人向け化粧品広告言説について

筆者の先行研究⁶⁾によると、日本広告には、「日本女性の肌」、「日本の素肌」、「日本の」、「日本」、「日本人の女性」といった表現が用いられ、その化粧品が日本女性のために製造されたこと、その化粧品メーカーが日本女性の肌に特化した研究を行なっていることを示す言説(ディスクール)が多く見られた。この種の言説はフランスの広告には皆無であった。そこで、これらの言説について、どのような意見、印象を持つのかを日仏学生に質問した。フランス人学生に対しては、もしこのような言説がフランス人女性向けにあったらどのように思うかという質問を設定した。集計にあたっては、肯定・否定、賛成(あるいは理解する)・反対(あるいは疑問視する)のどちらの意見かという点に着目した。

3.11.1 フランス人学生の回答

フランス人学生においては、否定的に受け取るという意見が49回答で大半を占めていた。その理由として述べられていたのは、「変、滑稽」というものが最も多かった。次に、「差別的表現である、差別されているように感じる」というものがあり、そして、「不快、不愉快、いらだたせる、侮辱されたように感じる、被害を受けたように感じる」という意見が続いた。また、「驚きだ」、「偏狭な印象」、「すべての人の肌は異なり、それは出身地や文化によらない。どの国の人も同じ肌!むしろ、年齢によって違いがある。」という意見も見られた。肯定的意見は、計8回答で、その理由は、「品質により高い信用・信頼がおける、良い商品を買うのだと確信できる。」というものや、「面白い」、「良いアイデア」、「興味を引かれるかもしれない。」というものがあり、また、黒人学生2人が、「良いと思う。民族カテゴリーに合わせているのが興味を引く。」、「効果的」と答えていたのが興味深い。

賛成・反対意見としても、やはり、反対、疑問を感じるという意見が多く、28回答で、その大半が「フランス人女性の肌は多様だ。」という理由からであった。これは、フランス人は、多様なルーツを持った国民であり、肌の色も人により異なるということだろう。その他は、「フランス人女性の肌が他の国の人の肌と違うとは思わないから。」というものがあつた。そして、賛成、あるいは理解できるとした回答は11回答あり、その殆どが、「確かに、皆、肌が違うのは事実。」という内容のものであつた。

3.11.2 日本人学生の回答

フランス人学生の回答と日本人学生の回答は、非常に対照的であり、日本では、肯定的、好意的に受け取るという答えが45回答で多数であった。その理由としては、「良いと思う」というのが一番多く、次に、「安心感がある」と

いう答えがあつた。そして、次に、フランス人学生と正反対の捉えられ方がなされている、「日本人、アジア人のために作ってくれてうれしい。ありがとう。」という意見があつたのが特徴的であつた。その他には、「買って、使ってみたい。」、「国籍、人種、肌の色によって違うと思うから。日本人とフランス人は肌質が違うから。」、「外資系は肌があれやすい/きつい/合わなかったから。」という意見が続いた。また、「何も思わない。別に。」という意見が日本人学生では7回答あつた。このような答えはフランス人学生では、唯一、「分からない。」という1回答があつた。日本でも否定的に受け取るという回答も少数だが、4回答あつた。これらは、「「テスト」と言われると若干不安。」、「どれだけ肌に悪いものを使っているのか。」という理由からであつた。

賛成か、反対かについては、反対、疑問を感じるというのが12回答で、「本当かどうか分からない。信用性が無い。」というものが多く、次に、「それよりも日本メーカーの方が信用できる。」という答えが続いたのも印象的であつた。そして、賛成は7回答で、「ヨーロッパとアジアではやはり違うのだな。」と思ったという意見、「日本人女性が美容に関心を持っていることを良く分かっている。」、「欲しくなりそう。」、「是非(日本向け処方・開発を)してほしい。」、「もっと日本人にあつたのを作って欲しい。」という、更なる期待をするような感想が見られ、これはフランスとは全く違う現象であつた。

4. 総括

以上、日仏の女子大学生に対するアンケート調査の結果から、日仏における化粧・美容意識の共通・相違点を分析し、また、互いの国の化粧についてのイメージという異文化間考察を行った。日仏という大きく社会・文化の違う二国で調査したことにより、互いの国の特性がよりはっきりと浮かび上がってきたと思われる。

結果としては、日仏で意外にも共通点があることが明らかになった(「マスカラ」、アイメークの重要性。憧れの化粧品。化粧品への出費)。また逆に、それぞれの社会・文化的差異、化粧・美容に対する意識、考え方の違いも顕著に現れていた(日焼けの好き嫌い:仏・約7割は好き、日・約9割は嫌い。普段使う化粧品第1位:仏・香水、日・マスカラ。基礎化粧品:仏・保湿ケア重視、日・化粧落としと洗顔重視。化粧品評価基準:仏・品質、効果、日・実用性、見た目の美しさ。日本人向け広告言説について:仏・否定的、日・肯定的)。

また、今回の調査によって、筆者の先行研究である化粧品広告言説(ディスクール)の研究結果をさらに裏付けることができたと思う。

今回の調査を踏まえ、今後も、異文化比較を通じた化粧文

化研究をより多角的視点から行っていければと考えている。

謝 辞

本研究を行うにあたって、アンケート調査実施にご協力頂きました、ナント大学、田中丈史助教授、同大学院生 / 日本語講師三枝大修氏、中津匡哉氏、同大学院生 / スペイン語講師 Ana-María Guerrero 氏、京都外国語大学、中山智子講師に厚く御礼を申し上げます。また、本研究に対して助成を頂きました財団法人コスメトロジー研究振興財団に深く感謝致します。

(参考文献)

1) 村澤博人、大坊郁夫、趙鏞珍、「日本人と韓国人の化粧観の国際比較研究—男女学生のアンケート調査から」、『コスメトロジー研究報告』Vol. 13、財団法人コスメト

ロジー研究振興財団、2005。

2) 石丸久美子、『日仏化粧品広告の比較研究—ディスコース分析の観点から』、大阪大学大学院言語文化研究科博士学位論文、関西学院大学出版会、学位論文オンデマンド出版、2007a。石丸久美子、「化粧・美容意識についての日仏比較研究—日仏化粧品広告ディスコース分析」、『研究業績中間報告集』第16号、財団法人コスメトロジー研究振興財団、2007b。

3) 同上、2007b。

4) SHIMIZU, Kaho, “The eyes have it but will mascara boom continue?”, The Japan Times, Tuesday, March 1, 2005. <http://search.japantimes.co.jp/cgi-bin/n20050301f1.html> (2008年1月現在。)

5) 前出、2007b。

6) 同上。

「聞香」による香りの言語化プロセスと脳内情報構造化機能の解明

理化学研究所脳科学総合研究センター象徴概念発達研究チーム

椎名(日原) さやか、藤井 直敬、入来 篤史

Real world contains enormous environmental information. We receive very diverse information though each sensory organs or receptors and send to central nervous system, recognizing external environment. The human brain seems to be sorting complex information implicitly into simple but structured abstract form. Prefrontal cortex is known to be a place where abstract information is manipulated. We recorded brain activity by NIRS in PFC from Koh-Do experts and beginners during Koh-Boku (premium incense) discrimination task. Experts were well trained sorting subtle and complex koh-boku fragrance into koh-boku names. We found clear difference between two groups. Experts showed highly organized response pattern in PFC but beginners didn't. We found that PFC can organize and implement attentive abstract discrimination process, acquired on demand by interacting with automatic covert processes, which fits to subject's exact dynamic thinking traces.

1. 緒言

思考とは、私達が過去の記憶や経験をもとにして新たな結論を作り出す過程と定義され、脳が取り扱っている高次認知機能の一つであり、プランニング、推論、概念形成、判断などの要素から成り立っている。普段、私達は何気なく推論を通し意思を決定しているが、この際、脳は1)過去の経験を通して得られた知識を参照する、2)多くの仮説を検証する、3)どの結論が現実の世界を一番合理的に解釈できるのか選択する、という作業を行っている。さらに、私達は外部環境から様々な刺激を常に受けているので、脳は絶えず視覚、聴覚、触覚、嗅覚、味覚などの感覚情報を分析し、必要に応じてこれらの情報も仮説に反映させていかなければならない。

思考に関する研究は、機能的核磁気共鳴画像 (fMRI)、ポジトロン・エミッション・トモグラフィ (PET)、近赤外線分光法 (NIRS) などの非侵襲的脳機能測定法と呼ばれるイメージング技術の開発に伴い飛躍的に進み、健常者が実際に思考している最中の脳活動を計測することが出来るようになった。そして、推論を始めとする多くの高次認知機能に“前頭前野”が関連していることが判明してきた (1. Fuster, 2. Mah)。しかしながら、従来の研究で用いられた課題は、見本合わせ課題のような刺激-反応が比較的単純な課題が多く、その一方で私達が日常生活で直面している問題というのは、複雑かつ重層的であり、より現実

的な状況下で行っている意思決定の神経メカニズムの解明を目指すとなると、新たな実験課題の設定が要求される。

そこで我々は推論の神経メカニズムを解明するため今回の実験では、“香道”という芸道を導入した。香道は日本文化において嗅覚を入り口とする伝統芸能で、1000年以上もの歴史を持ち皇族や貴族により伝承されてきたものである (3. Morita)。香道では6種の香木の香りを“聞く”ことを楽しみ、さらにそれを分類し言語化することが求められる。この能力は稽古を積むことで習得していく。初心者は香りを聞くことは出来ても、それを分類、言語化することは非常に困難であるが、熟練者は香りを聞く能力が高いのは当然の事ながら、それを分類し、評価軸のせ、言語的表現をすることが可能になる。つまり、後天的学習により嗅覚刺激を過去の記憶と照合しながら分析・分類し、言語表現をしてゆくのである。この過程は正に推論の過程なのである。

香木の香りは、微弱かつ似通っており、聞香は非常に難しい課題である。例えて言うならば、りんごとみかんを弁別するという簡単なものではなく、香りからりんごの品種を弁別するようなものである。香道がアロマセラピーやソムリエの行うテイスティング (4. Castriota Scanderbeg) と異なるのは、言語表現軸が定まっている点である。言語評価は、“苦、甘、塩辛い、辛、酸”の5つの五味と呼ばれる、通常使う味覚の意味とは全く異なる単語を定量的に組み合わせて行う。この言語的表現法を用いることにより熟練者間で香木の香りを共有することができるのである。このように感覚情報をもとにした推論プロセスの神経メカニズムの研究に、香道は適した実験課題であると言える。

そこで本研究では、二つのグループ、すなわち、香道の熟練者と初心者において、“聞香”中の香りを分類し言語化する過程の局所的脳血流量変化を、抽象的操作を制御していると考えられている前頭前野 (5. Fujii, 2003) をター



Labeling Process during odor discrimination task, “Listening Koh-boku”, in Human prefrontal cortex with near-infrared spectroscopy

Sayaka Shiina-Hihara*, Naotaka Fujii, Atsushi Iriki

Laboratory for Symbolic Cognitive Development, RIKEN Brain Science Institute

ゲットに近赤外線分光法 (NIRS) (6. Watanabe E, 1996, 7. Koizumi H, 2001) を用いて計測・比較することで、従来の研究で知りえることの出来なかった言語を含む、脳の嗅覚情報および高次脳内情報の処理機構の解明を目指した。

2. 方法

2.1 被験者

右利き健常者を被験者とし、香道歴 10-40 年からの熟

練者 (30-65 歳、女性 10 人)、初心者各 10 人 (24-48 歳、男性 3 人、女性 7 人) に実験に参加してもらった。近赤外線分光法 (NIRS、日立 ETG-100) を用い、被験者の頭部に照射プローブ、検出プローブ各 10 本 (図 1 A,B) を両側の前頭前野皮質へ対称に装着し、計 20 チャンネルからの NIRS 信号 (酸化ヘモグロビン量、還元ヘモグロビン量) を非侵襲的に計測した。計測中、被験者には実験課題と対照課題を行ってもらった。

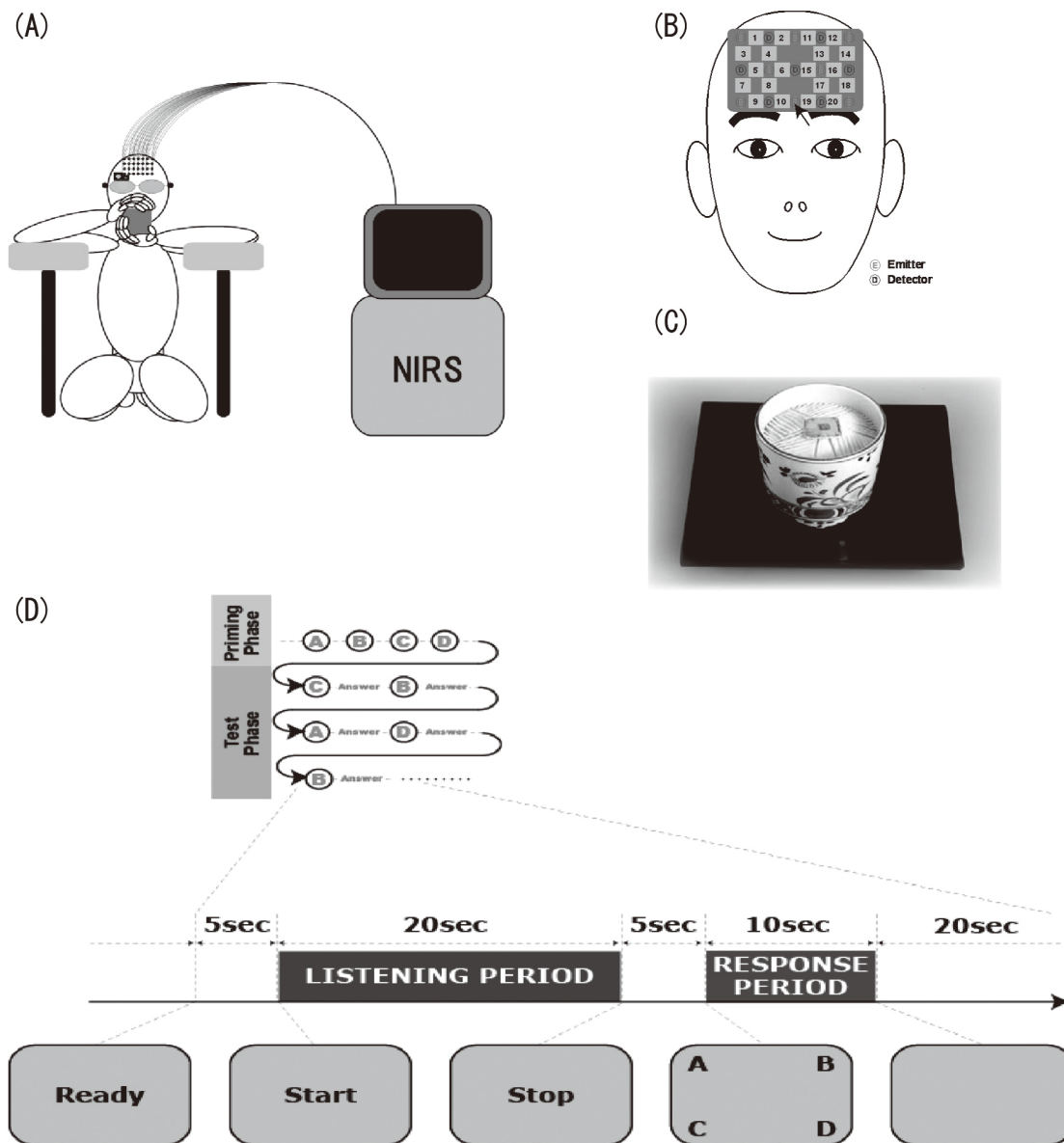


図 1
 A: 実験の模式図……被験者は肘を肘掛に置き NIRS プローブを装着された状態で、香炉を持ち聞香する。
 B: 各 10 本の照射プローブ、検出プローブの配置……番号は記録チャンネル (20 個) を示している。1-10 チャンネルは右前頭葉を、11-20 チャンネルは左前頭葉からの NIRS 信号を計測している。
 C: 香炉……香炉に灰と熾した炭団を入れ、その上に板 (雲母) を乗せ、数ミリ角に切った香木を熱し香りを発散させる。
 D: 実験課題スケジュール……4 種類の香りを聞きそれを記憶する「プライミング期」とプライミング期間中に聞いた香りと現在聞いている香りを比較する「テスト期」から構成される (上段)。被験者にはテスト期は、A-D までの刺激がランダムに渡され、プライミング期中に記憶した香りと、今聞いている香りを比較し、A-D までのどれに該当するかを聞香期 (Listening Period; 20 秒) に考える。反応期 (Response Period; 10 秒) にはその答えをモニタ上に提示された文字 (A-D) を選択・注視することで解答する。被験者は目前に置かれたモニタに提示される指示に従って課題を遂行していく (下段)。

2.2 解析

課題遂行中の酸化ヘモグロビン量 (oxy-HB)、還元ヘモグロビン量 (deoxy-HB) を 10Hz で計測し、血流動態の指標は総ヘモグロビン量 (oxy-HB と deoxy-HB の和) とした。総ヘモグロビン量は、1 試行につき (課題前後も含め)、60 秒間 (600samples/ch) 計測し、多項式適合法、移動平均によるノイズ除去、標準化を行った後、16 試行 × 20 チャンネル × 600sample のマトリックスの画像化・解析を行った。

被験者ごとに各試行、各チャンネルの標準偏差 (SDt ; n=16, SDc ; n=20) とこれらの平均値を求め、閾値を平均値 -2SD と設定し、この閾値以下の値を示した試行、チャンネルをそれぞれ bands in trails (BT)、bands in channels (BC) とした。

2.3 実験課題

嗅覚 (香木) 弁別課題: 嗅覚刺激は 3 種類の香木 (A-C) と 1 種類のコントロール刺激 (D) を用いた。それぞれの刺激は香炉に灰と熾した炭団を入れ、その上に板 (雲母) を乗せ、数ミリ角に切った香木を熱し香りを発散させた (図 1 C)。課題は、この 4 種類の香りを聞き、それを記憶する “プライミング期 - Priming Phase” とプライミング中に聞いた香りと現在聞いている香りを比較する “テスト期 - Test Phase” から構成される (図 1 D)。被験者は目前に置かれたモニタに提示される指示に従い課題を遂行していく。

まず、“プライミング期” (4 試行) では、A-D の 4 種類の香炉を順番に聞いていく。被験者は香炉を手渡され (準備期)、スタートシグナル後 20 秒間香を聞く (聞香期)。反応期には刺激と対応したモニタ上のアルファベット (A-D) を注視する。20 秒の待機期後、次の香が手渡される。被験者は同様の手続きで各試行を遂行し、A-D の 4 種類の香りを記憶する。

次の “テスト期” (12 試行) では、A-D までの刺激がランダムに選ばれ、被験者へ渡される。被験者は渡された香りを聞き、プライミング中に記憶した香りと、今聞いている香りを比較し、A-D までのどれに該当するかを聞香期に考える。反応期にはその答えをモニタ上に提示された文字 (A-D) を選択・注視することで解答する。待機期後、再び別の香炉が提示され、被験者は同様に香木の種類を答えていく。

2.4 対照課題

味覚 (お茶) 弁別課題: 対照課題としてお茶の弁別課題を (香道熟練者 4 人、初心者 3 人) 実験課題終了後に、実験課題と同様の手順で行った。味覚刺激には 3 種類のお茶を使用し、プライミング期に 3 試行、テスト期に 6 試行行

った。

なお、この実験の成果は 8) Fujii et al. で発表されている。

3. 結果と考察

図 2 A は、初心者 (上段)、熟練者 (下段) における課題遂行中の 5 つのポイントにおける総ヘモグロビン量の信号強度を示している。両群において課題遂行時にヘモグロビン量が経時的に変化していることがわかる。さらに課題中のあるポイントで、同系色で構成される縦軸方向もしくは横軸方向のバンドが観察された (図 2 A 縦、横矢印)。これはある試行中もしくは、あるチャンネルにおいて信号強度の差異が小さいことを意味している。つまり、縦軸方向のバンド (bands in trails, BT) は、ある試行中に記録チャンネル全体がほぼ同じレベルで活動したことを示し、また横軸方向のバンド (bands in channels, BC) は全試行中において同一チャンネルが局所的にほぼ同じレベルで活動しているということを示している。

次に、課題遂行中の上記のバンド (BT、BC) 数を初心者、熟練者ごと算出し、その分布を見た (図 2 B a - 熟練者, c - 初心者、BT ; 黒、BC ; グレー)。その結果、熟練者では聞香期と反応期に BC が多く現れ、BT はほとんど現れなかった。さらに、BC の数を半球ごとにプロットすると (図 2 B -e、黒 : 左半球、点線 : 右半球)、BC は聞香中期から試行終了まで右前頭前野で顕著に増加していた。一方、初心者において BT は課題中全般、BC は聞香中に現れた。課題の正答率は熟練者 (68%)、初心者 (58%) であり、正答率に大差はなかった。BC は BT と異なり、局所的な脳活動を示す指標である。従って、これらの結果は、初心者は課題中前頭前野全体的に使用しているのに対し、熟練者においては右前頭前野を組織的の様式で使っていることを示唆している。

なぜこのような反応差が 2 群の間で生じたのであろうか? 初心者の嗅覚刺激物質に関する知識、経験の少なさが影響しているのだろうか? この問いに答えるため、対照実験として味覚 (お茶) 弁別課題を行った。お茶を弁別刺激として利用した理由は、日本人はお茶を日常的に飲んでいるので、お茶に対する経験・判別能力は被験者間で差異が少ないと考えたからである。刺激の特徴を抽象的に操作するという点に関しては、味覚の弁別過程も香木の弁別過程とほとんど変わらないはずである。

実験課題と同様に、対照課題遂行中のバンド (BT、BC) 数を算出しその分布を図 2 B に示す (b - 熟練者, d - 初心者、BT ; 黒、BC ; グレー)。両群とも BC が出現するのにに対し、BT はほとんど現れなかった。また、我々の予測通り、課題の正答率は両群ともに 100% だった。この結果は、刺激の感覚種に依存せず、過去の経験、知識をもとにした推論過程において前頭前野の活動は NIRs 信号

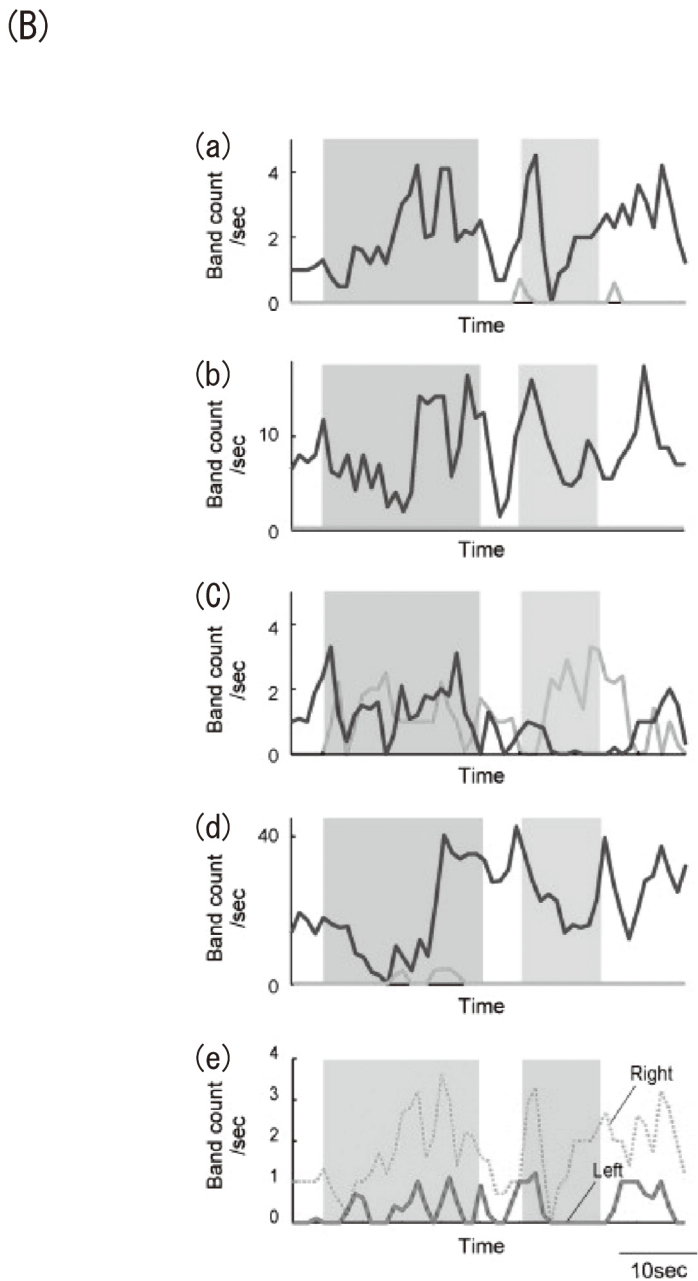
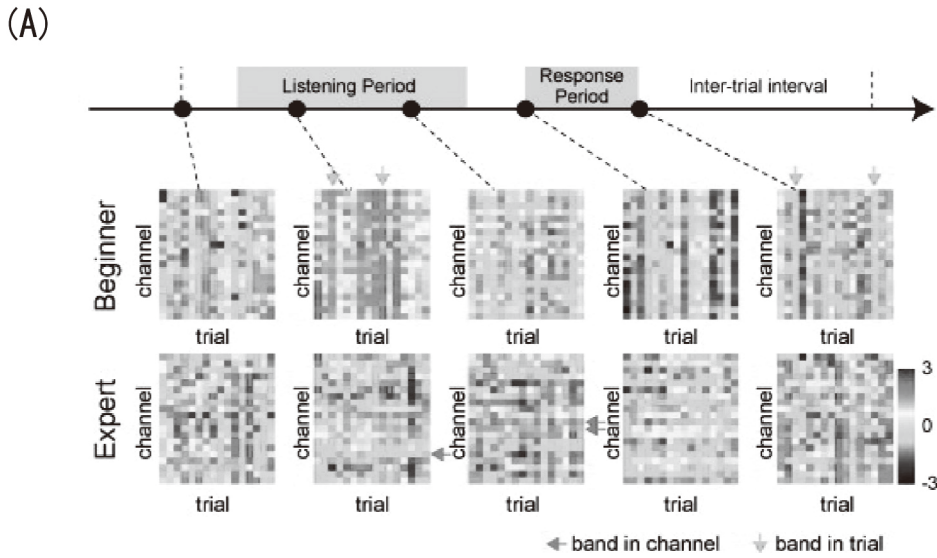


図 2

A : 課題実行中の5つのポイントにおける総ヘモグロビン量のマッピング
 それぞれのチャンネルの総ヘモグロビン量の信号強度がピクセルの色によって示されている。上段が初心者、下段は熟練者である。横軸はトライアル、縦軸はチャンネルを示す。矢印は同色の色で構成されたバンドを示している。

B : BC、BT の分布

横軸は時間、縦軸は1秒間のバンドのカウンタ数である。ダークグレー、ライトグレーの陰影はそれぞれ聞香期、反応期を示している。(a,c) : 課題中のバンドカウンタ、a:熟練者、c:初心者 (b,d) 対照課題中のバンドカウンタ b:熟練者、d:初心者。(e) 熟練者における左右半球ごとの課題中のバンドカウンタ

として検出できるということを示している。

4. 総括

推論は最も基本的な認知的脳機能の一つであり、私達は現実世界における意思決定のほとんどを推論を通して行っている。従来、推論過程の神経機構の解明は非常に難しいとされてきたが、今回私達は香道を利用し、適切な課題設定を作り出すことができた。その結果、“聞香—嗅覚弁別課題”に前頭前野皮質が香道の初心者、熟練者ともに活動しているだけでなく、初心者では課題遂行中全般に前頭前野皮質全体で、熟練者では一過性かつ局所的に右前頭前野で嗅覚情報の推論処理を行っていることが示唆された。また、熟練者の前頭前野のみが、聞香中にダイナミックな修飾を受けていることから、この活動様式は仮説的推論過程の神経活動を反映しているものと考えられる。

謝辞

香道に関し技術的なご指導、ご協力を頂いた山田氏、亀山氏、渡辺氏に深謝致します。また、本研究を遂行するに当たり、御支援頂きました(財)コスメトロジー研究振興財団及び共同研究者に感謝いたします。

(参考文献)

1) Fuster, J. M. Executive frontal functions. *Exp Brain*

Res, 133 (1), 66-70, 2000.

2) Mah, L., Arnold, M. C., & Grafman, J. Impairment of social perception associated with lesions of the prefrontal cortex. *Am J Psychiatry*, 161 (7), 1247-1255, 2004.

3) Morita K. *The Book of Incense: Enjoying the Traditional Art of Japanese Scents*. Kodansha International, TOKYO, 1992.

4) Castriota-Scanderbeg et al. The appreciation of wine by sommeliers: a functional magnetic resonance study of sensory integration. *Neuroimage*. 25 (2) :570-8, 2005.

5) Fujii, N., Graybiel AM. Representation of action sequence boundaries by macaque prefrontal cortical neurons. *Science*, 301 (5637) :1246-9, 2003.

6) Watanabe E, Yamashita Y, Maki A, Ito Y, Koizumi H (1996) Non-invasive functional mapping with multi-channel near infra-red spectroscopic topography in humans. *Neurosci Lett*. 205: 41-44, 1996.

7) Koizumi H, Maki A, Yamamoto T. Noninvasive higher-order brain-function imaging by near-infrared spectroscopy. *Rinsho Shinkeigaku* 41: 1201-1206, 2001.

8) Fujii et al. Prefrontal activity during koh-do incense discrimination. *Neuroscience Research* 59: 257-264, 2007.

中高年者の化粧行動の変動様態と 前頭葉認知機能との関連に関する神経心理学的研究

関西福祉科学大学健康福祉学部

八田 武志

The purpose of this study was to address the relationship between cosmetic behavior and higher brain function of middle and aged female people in order to examine the validity of Hatta's aging model (2007). Participants were 181 community dwellers in rural town (their age ranged from 39 to 91 years old). They had a cognitive test battery as a part of medical checkup. The used cognitive test was Nagoya University Cognitive Assessment Battery (NU-CAB) that mainly consisted of items for the examination of prefrontal brain function. Results of habitual cosmetic behavior with aging suggested middle and old women quitted the makeup behavior in the first stage and then the care cosmetic behavior such as skin care in the second stage. Results of cognitive function showed that the participants habitually having the care cosmetic behavior were higher than the participants habitually did not in several cognitive tests. These results seem to support Hatta's aging model and suggest strong relationship between sustaining of cosmetic behavior and decline of higher brain function in the aged people.

1. 緒言

本研究の目的は、中高年者の化粧行動と前頭葉認知機能との関連を検討することである。この検討は筆者が提唱する加齢と認知に関するモデルの検証として位置づけられるもので、筆者らは26年目を迎える北海道Y町の住民検診に7年前から心理学班として加わり、毎年約500名を対象に前頭葉機能の評価を実施してきた。このコホート研究には、内科、整形外科、泌尿器科、眼科、耳鼻科が参加する大規模なものであり、心理学班が参加している点に特徴を有している。これまでの研究からは、生活習慣と前頭葉機能との関連や前頭葉機能と筋・運動系機能評価との関係が明らかとなっている。Illinois大学のWilsonらが「高齢者の認知活動と脳機能保存モデル (Stern,2007)」を提唱する以前から、筆者らはコホート研究での様々な分野の資料を総合評価する過程で、①「発達段階の遅い時期に獲得した行動から機能低下が始まる」、②「遅い段階に獲得した行動を維持すると加齢に伴う機能低下は鈍化する」という加齢モデル(休耕田モデル)を提唱してきた。言語関連機能では短歌や俳句、文章を書く高齢者は前頭葉機能や筋・運動系機能は保存される傾向が認められたからである。ここで報告する研究は中高年者の化粧行動を対象に筆者の加齢モデルの妥当性を検証することを目指したものである。これまでの中高年者(40歳～89歳)を対象に前頭葉機能検査を実施した経験から、一般に、化粧行動を維持してい

る中高年者に前頭葉機能が優れる印象を強く感じてきた。化粧行動は発達の比較的遅い時期に獲得する行動であり、このことが科学的手続きで確認できると、筆者の提唱する加齢モデルに合致しモデルを強化できることになる。

女性が化粧行動を獲得する過程について、1989年に15～64歳の女性4,903名を対象に実施された調査では、女性が最初に使用した化粧品として最も回答が多いのは化粧水で、次いで乳液、口紅、クリーム類、リップクリームであった(霜田,1993)。つまり、女性の多くはまず、化粧水や乳液などケアに相当する化粧行動を身に付け、そのあとで口紅やマスカラなどメーキャップに相当する化粧行動を獲得する。それゆえ、休耕田モデルに従って予測すると、女性は年を取るにつれて化粧をしなくなるが、メーキャップ、ケアの順にやめていくと考えられる。

以上のことから、本研究では、年齢と化粧行動の関係について、加齢に伴い化粧をやめていく過程において、女性はケアよりもメーキャップを先にやめることが推定できる。そこで、高齢者を対象にした本調査では習慣的にケアを施す女性はメーキャップを施す女性よりも多いと予想する(仮説1)。さらに、高次脳機能の衰退は、習慣的にメーキャップを施す女性の方がそうでない女性よりも少なく、ケアを施す女性のほうがそうでない女性よりも少ないと予想する(仮説2)。これらの仮説を以下に記述する調査研究によって検証した。

2. 方法

2.1 参加者

対象者は北海道Y町が主催する住民検診(2006年度)において、高次脳機能検査を受診した者のうち、本調査への参加に同意した女性181名であった。対象者の年齢は39～91歳で、平均年齢は63.13($SD=11.08$)歳であった。対象者は麻痺および運動機能に関する神経心理学的障害は



Neuropsychological study on the relation between cosmetic behavior and frontal lobe cognitive function in the middle and upper-middle age Japanese women.

Takeshi Hatta

Kansai University of Welfare Science,
Department of Health Science, School of
Health Welfare

有しておらず、注意機能、記憶機能、見当識検査により認知症の疑いはないと判定された人々であった。

2.2 手続き

本調査では、2006年7月10日から27日までの期間に住民検診の希望者に対して調査票を郵送し、参加に同意できる者について、検診当日に記入した調査票を持参するよう求めた。検診当日、調査への参加に同意した住民検診参加者は住民検診の一環としての高次脳機能検査を受診した。

2.3 質問項目

調査票において測定した項目は化粧行動に関する項目で、「特別な用事がないとき」「買い物へ出かけるとき」「友達に会うとき」「法事や結婚式のとき」の各状況において、洗顔・化粧水・乳液による基礎化粧とファンデーション・白粉による下地化粧、口紅・頬紅・眉墨による仕上げ化粧を「する」と「しない」の2件法で回答を求めた。基礎化粧は「ケア」に相当し、下地化粧と仕上げ化粧は「メーキャップ」に相当する。ただし、本研究では習慣的な化粧行動の効果について検討するため、「特別な用事がないとき」の化粧行動に関する項目のみを分析の対象とした。

2.4 課題

これまで多くの神経心理学的認知検査は注意機能、言語機能、記憶機能、空間能力、および実行系機能に関する検査を含むものが多い。今回の住民検診で用いた認知機能検査バッテリー（名古屋大学認知機能スクリーニング検査：NU-CAB）も同様の構成で、これらの機能を検査するためにさまざまな課題が含まれている（八田，2004）。本研究で検討した検査課題はNU-CABの中から選択した、散文記憶課題、Money 道路図検査、Stroop 検査、言語流暢性検査、D-CAT である。

記憶機能を検査するため、Wechsler 記憶検査の論理記憶項目にある散文記憶課題を用いた。この課題では、25の文節からなる短文を検査者が2回読み上げた後、参加者はそれを再生する。通常、この再生は直後と遅延条件の両方で実施されるが、過去に行われたこの住民検診において、直後再生と遅延再生条件の成績がかなり高い相関関係（ $r = 0.92$ ）にあることから（八田・永原・岩原・伊藤，2005）、直後再生のみを実施し、0～25点の得点を割り当てた。

空間機能検査項目として、Butters, Soeldner and Fedio (1972) による Money 道路図検査を用いた。この検査課題では、練習試行と本試行からなり、それぞれ2cm幅の線分が描かれており、練習試行では4箇所曲がり角、本試行では12箇所曲がり角が左右ランダムに存在する。検査者は、被検査者にこの線分を道路とみなし、左右どちらに曲がるかを報告するよう求め、正解を1点とし、0～12

点の得点を割り当てた。

注意機能と実行機能を検査するための項目として Stroop 課題を用いた。この課題では、赤・青・黄・緑で塗りつぶされた直径2.5cmの円が印刷されたドット図版のあと、ひらがなで「あか」「あお」「き」「みどり」の文字がそれと一致しない色で印刷された Stroop 図版を用いて、それぞれ印刷の色をできるだけ早く、かつ正確に回答するよう求め、時間とエラー数を測定した。

言語機能を検査するため、言語流暢性課題を用いた。この課題は文字流暢性と意味流暢性からなり、文字流暢性の場合「あ」か「か」のいずれかを個人に割り当て、割り当てられた文字で始まる普通名詞をできるだけ多く挙げるよう求めた。意味流暢性の場合「動物」か「スポーツ」のいずれかを個人に割り当て、そのカテゴリーに相当する名詞をできるだけ多く挙げるように求める。いずれの課題においても一度挙げた名詞は挙げないよう教示し、重複した分を除く正答数を得点とした。

注意機能と実行機能を検査するための項目として D-CAT を用いた（八田・伊藤・吉崎，2001，2006）。この課題では、ランダムに並んだ数字の列のなかから指定された数字をそれぞれ1分間にできるだけ早く、かつ見落とさなく抹消することが求められる。課題は3試行からなり、第1試行では1つの数字、第2試行では2つの数字、第3試行では3つの数字が抹消の対象となる。この課題では、各試行において検索した数字の個数を作業量として測定した。さらに、検索した数字のうち、抹消できていない対象の個数を抹消対象となる数字の個数で割った者を見落とし率として測定した。

3. 結果

3.1 化粧行動

習慣的にケアとメーキャップを実施している人数の割合について検討するため、参加者のうち各化粧行動のすべてについて回答した人を分析の対象とし、コクランのQ検定を行った。分析の結果、化粧行動の効果が有意であった。つぎに各化粧行動間の比較を行うため、マクニマー検定を行った。その結果、基礎化粧をすると回答した人数は下地化粧、仕上げ化粧をすると回答した人数よりも有意に多かった（ $ps < .01$ ）。下地化粧をすると回答した人数と仕上げ化粧をすると回答した人数に有意差はなかった。

3.2 年齢と化粧行動

年齢と化粧行動の関係について調べるため、参加者のうち各化粧行動の項目のいずれかひとつでも回答した人を分析対象とした。化粧行動ごとに「する」と回答した人を化粧する群、「しない」と回答した人を化粧しない群とし、基礎化粧要因と下地化粧要因、仕上げ化粧要因を設けた。

表1 化粧行動ごとの各群のサンプル数

	する	しない	合計
基礎化粧	144	15	159
下地化粧	78	66	144
仕上げ化粧	63	77	140

表1は各群のサンプル数を示したものである。各化粧要因を独立変数とし、年齢を従属変数として分散分析を行ったところ、下地化粧と仕上げ化粧要因の効果が有意で、これらの化粧行動をすると回答した人はそうでない人より年齢が高かった ($F(1, 143) = 5.43, p < .05$; $F(1, 139) = 8.49, p < .01$)。基礎化粧要因の効果は有意でなかった。

3.3 年齢と高次脳機能

年齢と高次脳機能との関連について検討するため、本調査への参加者181名を対象に、年齢と散文記憶課題、Money 道路図検査、言語流暢性課題における得点、Stroop 課題における時間とエラー数を要因として相関分析を行ったところ、各課題の得点は年齢と負の相関関係にあり、Stroop 課題における時間とエラー数は年齢と正の相関関係にあることが示された (表2)。

D-CAT に各試行の作業量と見落とし率、年齢を要因として相関分析を行ったところ、年齢は作業量と負の相関関係にあり、見落とし率と正の相関関係にあることが示された (表3)。これらの結果は、年齢が高いほど高次脳機能検査における得点が低く、作業に時間を要し、エラー数も多いことを示している。

3.4 高次脳機能差と化粧行動

高次脳機能における化粧行動の効果を検討するため、表1で示したように化粧行動ごとに「する」と回答した人を化粧する群、「しない」と回答した人を化粧しない群とし、基礎化粧要因と下地化粧要因、仕上げ化粧要因を設けた。各化粧要因を独立変数とし、高次機能検査におけるさまざまな課題得点について分散分析を行った。

散文記憶課題の得点を従属変数として分散分析を行ったところ、基礎化粧要因の効果が有意傾向であった ($F(1, 158) = 2.85, p = .09$)。基礎化粧をすると回答した人はそうでない人よりも散文記憶課題の得点が高かった (図1)。また、Money 道路図検査における得点を従属変数として分散分析を行ったところ、基礎化粧要因の効果が有意であった ($F(1, 158) = 5.56, p < .05$)。

図1に示したように、基礎化粧をすると回答した人はそうでない人よりも Money 道路図検査課題の得点が高かった。言語流暢性課題における得点を従属変数として分散分析を行ったところ、文字流暢性課題において基礎化粧要因の効果が有意で ($F(1, 158) = 14.42, p < .01$)、意味流暢性課題において有意傾向であった ($F(1, 158) = 2.82, p = .09$)。基礎化粧をすると回答した人はそうでない人よりも文字流暢性と意味流暢性課題の得点が高かった (図1)。

さらに、Stroop 課題における時間とエラー数を従属変数として分散分析を行ったところ、ドット図版と Stroop 図版の時間に関して基礎化粧要因の効果が有意であった。基礎化粧をすると回答した人はそうでない人よりも課題に要する時間が短かった (図2)。ドット図版のエラー数

表2 年齢と散文記憶課題、Money 道路図検査、Stroop 課題、言語流暢性課題の成績との相関関係

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. 年齢								
2. 散文記憶	-.422**							
3. Money道路図	-.391**	.421**						
4. 文字流暢性	-.212**	.278**	.214**					
5. 意味流暢性	-.441**	.490**	.355**	.357**				
6. ドット図版・時間	.521**	-.498**	-.373**	-.255**	-.543**			
7. ドット図版・エラー	.090	-.144	-.136	-.047	-.173*	.287**		
8. Stroop図版・時間	.535**	-.481**	-.359**	-.262**	-.481**	-.649**	.121	
9. Stroop図版・エラー	.323**	-.361**	-.314**	-.117	-.239**	-.382**	.125	.724**

**p<.01. *p<.05.

表3 年齢とD-CAT課題の成績との相関関係

	1	2	3	4	5	6
1. 年齢						
2. 作業量 (第1試行)	-.629**					
3. 見落とし率 (第1試行)	.356**	-.198**				
4. 作業量 (第2試行)	-.609**	.839**	-.235**			
5. 見落とし率 (第2試行)	.279**	-.325**	.226**	-.170*		
6. 作業量 (第3試行)	-.565**	.747**	-.249**	.881**	-.140	
7. 見落とし率 (第3試行)	.376**	-.423**	.281**	-.316**	.609**	-.234**

**p<.01. *p<.05.

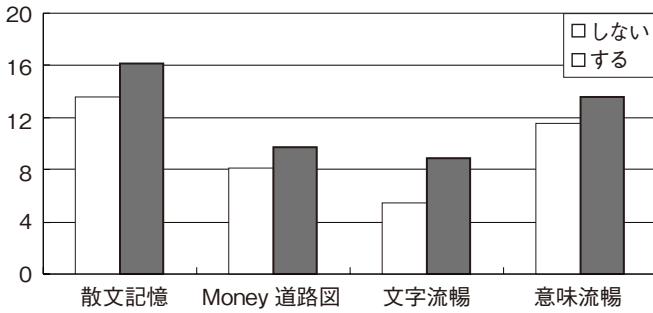


図1 散文記憶、マネー道路図、言語流暢性課題における基礎化粧の効果

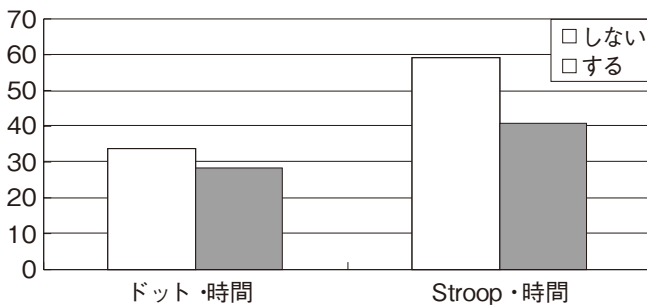


図2 Stroop 課題の時間における基礎化粧の効果

について下地化粧要因と仕上げ化粧要因の効果が有意であった ($F(1, 143) = 6.714, p < .01$; $F(1, 139) = 4.80, p < .05$)。下地化粧と仕上げ化粧をすると回答した人はしないと回答した人よりもエラー数が多かった。

D-CAT における第1～3試行のそれぞれの作業量と見落とし率についても従属変数として分散分析を行った。分析の結果、全試行の作業量について基礎化粧要因の効果が有意であった ($F(1, 158) = 6.12, p < .05$; $F(1, 158) = 7.92, p < .01$; $F(1, 158) = 7.79, p < .01$)。

図3に示したように、基礎化粧をすると回答した人はしないと回答した人よりも作業量が多かった。第1試行と第3試行の見落とし率について、基礎化粧要因の効果が有意であった ($F(1, 158) = 11.33, p < .01$; $F(1, 158) = 11.15, p < .01$)。表4は化粧行動ごとの各試行における見落とし率である。基礎化粧をすると回答した人はしないと回答した人よりも見落とし率が低かった。さらに、第2試行の見落とし率について下地化粧要因と仕上げ化粧要因の効果が有意で ($F(1, 143) = 4.13, p < .05$; $F(1, 139) = 4.69, p < .05$)、第3試行において下地化粧の効果が有意傾向であった ($F(1, 143) = 3.13, p = .08$)。下地化粧や仕上げ化粧をすると回答した人はしないと回答した人より見落とし率が高かった。

4. 考察

本研究の目的は、第一に加齢に伴う化粧行動について明らかにし、第二に、化粧行動が認知機能に及ぼす長期的な影響を検討することであった。第一の目的について、本研究の結果は、習慣的に下地化粧や仕上げ化粧を施す女性が

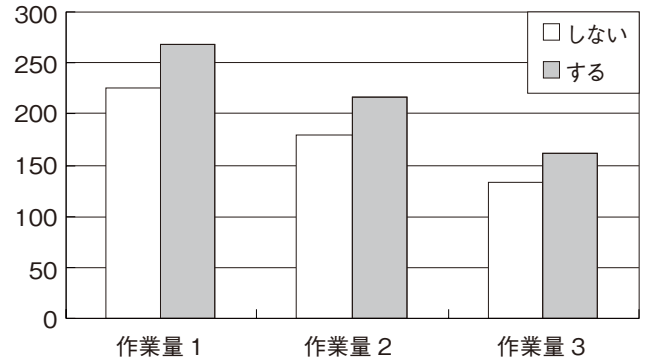


図3 作業量における基礎化粧の効果

基礎化粧を施す女性よりも少ないことを示している (仮説1を支持)。このことから、女性は年を取るにつれてメイクアップをしなくなるが、ケアは継続されやすいと思われる。また、本研究において、下地化粧と仕上げ化粧をすると回答した人はしないと回答した人よりも高齢であった。このことは習慣的にメイクアップをしている人の年齢がしていない人よりも高いことを意味し、現在、高齢である女性ほど化粧行動は習慣化していると思われる。

第二の目的について検討する前に、まず、年齢と高次脳機能の関係について調べた。本研究の結果は、年齢が高い人ほど Money 道路図課題、言語流暢性課題に関する得点が低く、Stroop 課題において時間を要し、エラー数も多く、D-CAT 課題において作業量が少なく、見落とし率も高いことを示しており、加齢に伴い高次脳機能は低下することを示している。

つぎに、基礎、下地、仕上げの各化粧行動が高次脳機能の低下を抑制することについて検討した。本研究の結果は、これらの化粧行動のうち、おもに基礎化粧行動の効果が顕著であることを示した。具体的には、①基礎化粧をする女性はそれをしない女性よりも散文記憶課題、Money 道路図課題、文字・意味流暢性の両言語流暢性課題における得点が高かった。また、② Stroop 課題においても、基礎化粧をする女性はそれをしない女性よりも課題遂行に要する時間が少なかった。さらに、③基礎化粧をする女性は D-CAT 課題における作業量が多く、見落とし率も低かった。これらのことから、基礎化粧を習慣的に行う女性は高次脳機能に関する検査課題の成績が総じて良好であるといえる (仮説2を支持)。

本研究では、加齢に伴い脳機能は低下することや基礎化粧をする群とそうでない群に年齢差が見られないことが示されていることから、基礎化粧を行うことは高次脳機能の低下を遅延させると思料できる。

八田 (2008) は、加齢に伴う認知機能の変遷を説明する休耕田モデルにおいて、獲得が遅い認知機能や行動様式ほど早くに衰退することを指摘しており、さらに、そうした衰退は前頭葉機能の活動様態によって遅延されると論じて

いるが、本研究の結果は、基礎化粧行動について資料の分析でもこのモデルを支持するものであった。化粧行動は後天的に獲得される行動であり、それは基礎化粧に相当するケア、下地化粧や仕上げ化粧にあたるメーキャップの順に獲得される。また、化粧行動は前頭葉による高次脳機能が大きく関与する行動であり、こうした行動が習慣化されることは、日々、前頭葉機能を活動させる機会が生まれることを意味する。地方農漁村に在住する高齢者女性を対象とした本研究の結果は、習慣的にメーキャップはしないが、ケアをする人が多く、ケアをする人はそうでない人よりも高次脳機能が低下していないことを示しており、加齢に伴い女性はメーキャップ、ケアの順に化粧行動をやめ、習慣的に化粧行動を行う人は前頭葉機能の低下が遅延されると解釈できる。

ただし、化粧行動が高次脳機能の低下を遅延させるという影響は基礎化粧行動に限定されたもので、下地化粧や仕上げ化粧行動が高次脳機能に及ぼす影響はほとんど示されなかった。むしろ、下地化粧や仕上げ化粧をする人はそれをしない人よりも Stroop 課題のドット図版におけるエラー率が高く、D-CAT 課題にける見落とし率が高かった。しかし、本研究において、下地化粧や仕上げ化粧をする群はそれをしない群に比べて年齢が有意に低かった。それゆえ、本研究で示された下地化粧や仕上げ化粧による効果は年齢の効果とも推察されるので、今後の詳細な検討が必要である。また、基礎化粧をする群としない群におけるサンプル数に偏りがあった。このことは、本研究において示された化粧行動の効果に直結する問題であり、サンプル数を増やして再度検討する必要があるだろう。また、本研究の対象者は、住民検診という公の場に自発的に参加している人々であり、こうした人々は基本的には認知的機能も高いカテゴリーに属すると思われる。今後の課題は、こうした場に現れない人々を含む一般的な高齢女性を対象に化粧行動の効果を検討することである。

本研究は、加齢に伴い、女性がメーキャップ、ケアの順に化粧行動をやめていく傾向にあることと、女性がケアを習慣的に行うことは高次脳機能の低下を遅延させることを示しており、アンチ・エイジングの観点から化粧行動は認知機能にとって有効な手段であるといえる。また、加齢と認知機能の関係を説明するうえで、八田の休耕田モデルは妥当であることが示唆された。

謝 辞

本研究を実施するにあたりご支援をいただいた(財)コスメトロジー研究振興財団に感謝いたします。本研究で用いた資料の一部は北海道 Y 町保健福祉課と名古屋大学との間で

交わされた協定に基づく名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得た住民検診事業によるものであり、代表者である浜島信之教授および検診チームの皆さんと保健福祉課職員、参加住民の皆さんの協力に深謝します。

(引用文献)

- 1) 阿部恒之 化粧の心理学 *Fragrance Journal*, **20**, 55-61, 1992.
- 2) 阿部恒之 スキンケアへの期待の変遷と心理学的効果 大坊郁夫 (編) *化粧行動の社会心理学：化粧する人間のこころと行動* シリーズ 21 世紀の社会心理学 **9** 北大路書房 Pp.148-157, 2001.
- 3) Butters, N., Soeldner, C., and Fedio, P.. Comparison of parietal and frontal lobe spatial deficits in man: Extrapersonal vs personal (egocentric) space. *Perceptual and Motor Skills*, **34**, 27-34, 1972.
- 4) 藤井紀男 高次脳機能障害支援モデル事業の現状と課題 リハビリテーション研究, 116,7-12, 2003.
- 5) 八田武志 脳のはたらきと行動のしくみ 医歯薬出版, 2003.
- 6) 八田武志 住民検診を対象とした認知機能検査バッテリー (NU-CAB) 作成の試み 人間環境学研究, **2**, 15-20, 2004.
- 7) 八田武志 「記憶のはたらき・注意する力・言葉を操る」機能を維持するために。唐沢・八田 (編) 幸せな高齢者としての生活、ナカニシヤ出版 (印刷中), 2008.
- 8) 八田武志・伊藤保弘・吉崎一人 D-CAT：注意機能スクリーニング検査 改訂版 (株) FIS, 2006.
- 9) 八田武志・永原直子・岩原昭彦・伊藤恵美 中高年者を対象とする単語記憶・散文記憶の基準値について 人間環境学研究, **3**, 7-12, 2005.
- 10) 浜治世・浅井泉 メーキャップの臨床心理学への適用 資生堂ビューティーサイエンス研究所 (編) *化粧心理学* フレグランスジャーナル社 Pp.346-358, 1993.
- 11) 伊波和恵・浜治世 高齢女性と化粧 - 化粧の臨床心理学的適用の方法および実践 - *繊維機械学会誌*, **53** (6), 222-228, 2000.
- 12) 永尾松夫 女性における化粧意識 *化粧文化*, **8**, 133-144, 1983.
- 13) 霜田道子 化粧水の使い心地 資生堂ビューティーサイエンス研究所 (編) *化粧心理学* フレグランスジャーナル社 Pp.59-65, 1993.
- 14) Stern, Y. Cognitive reserve: *Theory and applications*. New York: Tylor and Francis, 2007.

人前化粧における意識

岡山大学大学院社会文化科学研究科

塩田 真友子

To makeup in public places has become common recently in Japan. In this study, the consciousness both the doer and the viewer of such behavior were investigated. In Study 1, the correlation between the behavior to makeup in public places or not several psychological scales were investigated. As a result, such behavior was significantly correlated with public self-consciousness, public other-consciousness, and the frequency of makeup in daily life. In short, those who are highly concerned with self and other's appearance, and those who makeup in daily life frequently tend to makeup in public places. Interestingly, Study 1 found that to value public manner and shame weren't correlated to such behavior. In Study 2, the difference of the viewer's consciousness by generation of the doer and by degree of makeup was investigated. As a consequence, participants rated more negatively to makeup heavily than lightly. And, participants rated more permissively to same generation than different generation. Within different generation, they rated more permissively to lower generation than to older generation. This study suggests that to makeup in public places isn't correlated with moral and shame. And consideration on the factor of youth will be needed.

1. 緒言

化粧とは、一般に女性にとって日常のかつ重要な行為である。村澤（2001）は、化粧を「ある集団＝社会がもつ美意識に基づいて顔やからだに意図的に手を加えて、外見的にも内面的にもそれまでの自分とは異なる自分になろうとするための行為」としている¹⁾。ここで言及されているように、化粧は対人的な作用だけではなく対自的作用をも持つ行為である。このことを示す研究はいくつかみられる（e.g. 松井・山本・岩男, 1983²⁾；岩男・菅原・松井, 1985³⁾；松井・岩男・菅原, 1985⁴⁾；菅原・岩男・松井, 1985⁵⁾；宇山・鈴木・互, 1990⁶⁾）。それらによると、化粧行動は「外見的評価の上昇」や「自己顕示欲求の充足」、「社会的役割への適合」（松井・山本・岩男, 1983）、「積極性上昇」（宇山・鈴木・互, 1990）といった対人的効果と、「自己愛撫の快感」や「変身願望の充足」等の「化粧行為自体がもつ満足感」（松井・山本・岩男, 1983）や「リラクゼーション」、「気分の高揚」（宇山・鈴木・互, 1990）といった対自的效果を有することが報告されている。松井・山本・岩男（1983）はそれら2つに加えて、「積極的な自己表現や対人行動」、「自信や自己充足感」といった心の健康に作用する要因を示している。

このように、化粧行動は主に対人的効果、対自的效果という2つの効用を有するとされている。岩男（1993）は、

化粧によって得られる満足感には化粧中に得られるものと化粧後に得られるものがあり、前者が対自的、後者が対人的なものであると述べている⁷⁾。対自的效果は私的空間において、対人的効果は公的空間において得られるものであると考えられる。化粧をする人にとっては、化粧前の顔、つまり素顔は私的なもの、化粧後の顔は公的なものと捉えられている。素顔から化粧後の顔へ変化することによって、変身願望の充足や気分の高揚などの対自的效果が得られる一方、化粧後の顔を他者に提示することによって自己顕示欲求の充足や積極性の上昇などの対人的効果が得られると考えることができる。菅原（2001）は、化粧が私的空間と公的空間を明確に区別し、両空間を往来する際のスイッチングの役割を果たしている⁸⁾。

しかし近年、この理論にあてはまらない行動が見られるようになった。電車やバスの中といった公的空間での化粧行動である。前述のように、本来化粧過程は私的空間において見られるものであったが、公的空間においてそれを露呈させるという行動が盛んに行なわれるようになった。この行動がマナー違反であると取り沙汰されるようになり、それに関する調査も行われるようになった。中央調査社（2001）が電車内のマナーに関する意識調査を行なったところ、電車内での化粧について調査対象者の66.0%が「腹立たしい」、「気になる」と回答していた⁹⁾。平松（2006）は、このような公衆場面での化粧行動の許容の構造を検討した結果、公衆場面での化粧行動の許容には、外的他者意識、公的自意識や私的自意識が影響することを見出した¹⁰⁾。

では、公衆場面における化粧行動の行為者の意識はどのようなものなのであろうか。これについて、心理学的に統制した調査を行った研究は少ない。そこで本研究では、大学生を対象として幾つかの心理尺度を用い、公衆場面での化粧行動を規定する要因を検討する（研究1）。具体的には、



Consciousness of makeup in public places.

Mayuko Shiota

Okayama University Graduate School of Humanities and Social Sciences

仮想的有能感（速水，2006）¹¹⁾，行動基準（菅原・永房・佐々木・藤澤・薊理，2006）¹²⁾，恥意識（永房，2000）¹³⁾，公的自意識（菅原，1984）¹⁴⁾，他者意識（辻，1993）¹⁵⁾，対人的志向性（斉藤・中村，1987）¹⁶⁾の6つの尺度を用いる。人前での行動には公共マナーを重視する規範意識や，それに違反した際に生じる恥意識なども関連すると考えられるため，行動基準（菅原他，2006），恥意識（永房，2000）を採用した。公的自意識（菅原，1984），他者意識（辻，1993）については先行研究を鑑み，さらに他者に対する関心を測定する対人志向性（斉藤・中村，1987）のうち，対人的関心・反応性尺度と個人主義傾向尺度を採用した。そして，社会的迷惑行為を行う者は自分に直接関係のない人間を軽視している（速水，2006）という可能性が考えられるため，仮想的有能感（速水，2006）を採用した。

2. 調査

2・1 研究1

2・1・1 方法

調査協力者 19歳～29歳 ($M=19.65$ 歳, $SD=1.30$)の大学生144名(女性130名, 男性14名)。

調査内容 質問紙は以下の内容で構成された。①仮想的有能感（速水，2006）11項目，②行動基準（菅原ほか，2006）5因子20項目，③恥意識（永房，2000）4因子17項目，④公的自意識（菅原，1984）11項目，⑤他者意識（辻，1993）2因子11項目，⑥対人志向性（斉藤・中村，1987）より対人的関心・反応性，個人主義傾向の2因子8項目，⑦化粧への興味・関心を尋ねる1項目，⑧流行への関心を尋ねる1項目，⑨公共の乗り物での化粧行動，⑩公共の乗り物での化粧を自分一人でもするのか，誰かと一緒にしなければならないのか，⑪普段の化粧頻度，⑫公共の乗り物での化粧行動についてどう思うか（自由記述）を尋ねた。①～⑧については，「1：全くあてはまらない」から「5：よくあてはまる」の5段階評定を求めた。⑨については，「よくする，たまにする，全くしない」，⑩については，「ほぼ毎日，たまに，めったにしない」の3段階で評定を求め，それぞれ頻度の高い方から3-1点を得点化した。

調査時期 2007年1月

手続き 個別記入式の質問紙により，大学の講義時間中に配布し，その場で回答を求め回答後回収した。回収率は72%であった。

2・1・2 結果

調査内容を考慮し，調査協力者のうち女性でかつ回答に不備のない113名を分析対象とした。

公衆場面における化粧行動の関連要因を検討するため，公共の乗り物での化粧と他の変数間の相関係数を算出した

表1 公共の乗り物での化粧行動と他の変数との相関係数

公共の乗り物での化粧行動	
化粧への興味・関心	.181
流行への関心	.152
仮想的有能感	.019
行動基準	
地域的セケン	-.101
仲間的セケン	.087
自分本位	.156
他者配慮	.075
公共利益	-.012
恥意識	.
自己内省	-.026
同調不全	.118
社会規律違反	-.038
視線感知	-.079
公的自己意識	.234*
他者意識	
内的他者意識	.080
外的他者意識	.190*
対人志向性	
対人的関心・反応性	.091
個人主義傾向	.008
普段の化粧頻度	.243**

* $n < .05$ ** $n < .01$

(表1)。その結果，公共の乗物での化粧行動と公的自己意識 ($r=.234, p<.05$)，外的他者意識 ($r=.190, p<.05$)，普段の化粧頻度 ($r=.243, p<.01$)との間に弱い正の相関が見られた。この結果より，公的自意識が高い，つまり自己の外見や言動に向ける注意が高い人，外的他者意識が高い，つまり他者の外見に対する関心が高い人，普段の化粧頻度が高い人ほど公衆場面において化粧行動をすることが示された。

しかし，本研究で設定した仮想的有能感や行動基準，恥意識と公共の乗物での化粧行動との相関は見られなかった。この結果より，大学生においては人前で化粧をすることと，公共マナーを重視することや恥ずかしいという意識，無条件に他者を軽視する意識とは関係がないということが示された。

2・2 研究2

研究1では，公衆場面での化粧行動の行為者の意識について検討したが，研究2においてはそのような行為の観察者の意識について検討する。平松（2006）は，当該行為の許容を規定する観察者の個人差要因を見出したが，本研究では行為者の属性に着目する。具体的には，行為者の世代，化粧の程度を設定した。行為者の世代については，調査対象者である大学生より下の世代である高校生，同世代である大学生，上の世代である30代の3条件を，程度については簡単な化粧直し，フルメイクの2条件を設定した。つまり，6場面を想定しそれぞれについて評定を求め，行為者の世代，化粧の程度による観察者の意識の差異を検討した。

2・2・1 方法

調査対象者 18歳～30歳 ($M=20.7$, $SD=1.64$) の大学生 146名 (女性 94名, 男性 50名, 2名については無記述であった)。

質問紙 質問紙は世代3 (下世代, 同世代, 上世代) × 化粧の程度2 (化粧直し, フルメイク) の6場面を想定したものである。実際の場面想定文は以下の通りである。

- ①「あなたが電車に乗っている時, あなたより年下である女子高校生が鏡を見ながら油とり紙を使ったり, リップを塗るといった簡単な化粧直しをしているのを目にしました。」②「あなたが電車に乗っている時, あなたより年下である女子高校生が鏡を見ながらアイメイクをし, 頬紅, 口紅を塗るといったフルメイクをしているのを目にしました。」③「あなたが電車に乗っている時, あなたと同世代の女子大学生が鏡を見ながら油とり紙を使ったり, リップを塗るといった簡単な化粧直しをしているのを目にしました。」④「あなたが電車に乗っている時, あなたと同世代の女子大学生が鏡を見ながらアイメイクをし, 頬紅, 口紅を塗るといったフルメイクをしているのを目にしました。」⑤「あなたが電車に乗っている時, あなたより年上である30歳前後の女性が鏡を見ながら油とり紙を使ったり, リップを塗るといった簡単な化粧直しをしているのを目にしました。」⑥「あなたが電車に乗っている時, あなたより年上である30歳前後の女性が鏡を見ながらアイメイクをし, 頬紅, 口紅を塗るといったフルメイクをしているのを目にしました。」これら6場面それぞれに関して, 「不愉快な気分になる」, 「よい感じがしない」, 「マナーが悪いと思う」, 「恥ずかしいことだと思う」, 「面白いと思う」, 「あまり気にしない」の6つの質問項目について「1:全くあてはまらない」から「5:よくあてはまる」の5段階評定を求め, それぞれ1-5点を得点化した。なお, この6つの質問項目

は, 研究1における「あなたは, あなた自身, あるいは他人が電車やバスの中などで化粧をすることについてどう思いますか」という質問に対する自由記述での回答をKJ法により分類し, 作成したものである。

最後に, 自分自身は電車の中のような公衆場で化粧をするかしないか (女性に対してのみ回答を求めた), 性別, 学年, 年齢, 出身都道府県を尋ねた。

調査時期 2007年6月～7月。

手続き 質問紙1枚につき, 1場面とそれに対する6つの質問項目を記載した。場面の順序による効果を相殺するため, 6場面の順序は1部ごとにランダムとした。個別記入式の質問紙により, 大学の講義時間中に配布し, その場で回答を求め, 回答後回収した。回収率は88.6%であった。

2・2・2 結果

調査内容を考慮し, 調査対象者のうち年齢が25歳以下であり, かつ回答に不備のない139名 (女性90名, 男性49名) を分析対象とした。

行為者の世代, 化粧の程度による観察者の意識の差異を見るため, 6つの質問項目それぞれの得点について, 世代3 (下世代, 同世代, 上世代) × 化粧の程度2 (化粧直し, フルメイク) の2要因実験参加者内分散分析を行った (表2)。その結果, 「面白いと思う」を除く全ての質問項目について世代の主効果が有意であった。また, 全ての質問項目について化粧の程度の主効果が有意であった。このうち, 交互作用が得られたのは「よい感じがしない」, 「あまり気にしない」の2つの項目であった。

これらの2つの質問項目について, 交互作用が認められたので, 単純主効果検定を行なった。まず, 「よい感じがしない」について, 全ての化粧の程度における世代の単純主効果が有意であった (化粧直し: $F(2, 552) = 14.55$,

表2 各質問に対する行為者の世代・化粧の程度別の平均得点 (SD)

	化粧直し			フルメイク			F (df)		
	下世代	同世代	上世代	下世代	同世代	上世代	世代	化粧の程度	交互作用
不愉快	2.48 (1.13)	2.33 (1.10)	2.75 (1.14)	3.64 (1.16)	3.4 (1.20)	3.73 (1.17)	18.87** (2, 276)	202.07** (1, 138)	1.93 (2, 276)
よい感じがしない	2.77 (1.20)	2.72 (1.25)	3.07 (1.23)	4.07 (1.05)	3.89 (1.14)	4.15 (1.02)	14.88** (2, 276)	188.94** (1, 138)	3.34* (2, 276)
マナーが悪い	2.81 (1.22)	2.71 (1.17)	3.06 (1.23)	4.17 (0.92)	4.00 (1.00)	4.22 (0.95)	15.62** (2, 276)	185.04** (1, 138)	2.42 (2, 276)
恥ずかしい	2.60 (1.21)	2.58 (1.16)	3.00 (1.22)	3.96 (0.97)	3.89 (1.06)	4.23 (0.90)	27.10** (2, 276)	214.96** (1, 138)	1.08 (2, 276)
面白い	1.79 (0.93)	1.75 (0.98)	1.92 (1.14)	2.39 (1.32)	2.22 (1.22)	2.32 (1.35)	2.64 (2, 276)	51.85** (1, 138)	2.16 (2, 276)
気にしない	3.51 (1.19)	3.71 (1.24)	3.20 (1.27)	2.32 (1.21)	2.42 (1.19)	2.18 (1.11)	16.48** (2, 276)	174.58** (1, 138)	3.69* (2, 276)

* $p < .05$ ** $p < .01$

$p < .01$, フルメイク: $F(2, 552) = 7.27, p < .01$)。5%水準のライアン法 ($Mse = .33$) による多重比較の結果, 化粧直し条件において, 同世代 (2.72 ($SD = 1.25$)), 下世代 (2.77 ($SD = 1.20$)) < 上世代 (3.07 ($SD = 1.23$)) となり, フルメイク条件においては同世代 (3.89 ($SD = 1.14$)) < 下世代 (4.07 ($SD = 1.05$)), 上世代 (4.15 ($SD = 1.02$)) となった。この結果より, 化粧直し条件においては行為者が同世代である場合と下世代である場合に評価の違いは無く, 上世代に対しては否定的な評価をしているが, フルメイク条件においては行為者が自分と同世代である場合に最も寛容な評価をしていることが示された。また, 全ての世代における化粧の程度の単純主効果が有意であり (下世代: $F(1, 414) = 174.28, p < .01$, 同世代: $F(1, 414) = 142.91, p < .01$, 上世代: $F(1, 414) = 122.64, p < .01$), いずれの世代においても化粧直し条件よりもフルメイク条件の方が有意に得点が高かった。すなわち, 行為者の世代に関わらず, 化粧直しよりもフルメイクのほうがより否定的に評価されていることが明らかとなった。

次に, 「あまり気にしない」について, 全ての化粧の程度における世代の単純主効果が有意であった (化粧直し: $F(2, 552) = 19.28, p < .01$, フルメイク: $F(2, 552) = 4.24, p < .05$)。5%水準のライアン法 ($Mse = .47$) による多重比較の結果, 化粧直し条件において, 上世代 (3.02 ($SD = 1.27$)) < 下世代 (3.51 ($SD = 1.19$)) < 同世代 (3.71 ($SD = 1.24$)) となり, フルメイク条件においては上世代 (2.18 ($SD = 1.11$)) < 同世代 (2.42 ($SD = 1.19$)) となった。この結果は, 化粧直し条件では行為者が自分と同世代である場合はあまり気にならないが, 異なる世代である場合は気になるといことを示している。フルメイク条件においても, 自分と同世代または下世代が行なっているよりも, 上世代の方が気になるといことを示唆している。また, 全ての世代における化粧の程度の単純主効果が有意であり (下世代: $F(1, 414) = 128.40, p < .01$, 同世代: $F(1, 414) = 149.30, p < .01$, 上世代: $F(1, 414) = 93.96, p < .01$), いずれの世代においても化粧直し条件よりもフルメイク条件の方が有意に得点が低かった。すなわち, 行為者の世代に関わらず, 化粧直しよりもフルメイクを行なっているのを見た時の方がより気になるといことが明らかとなった。

化粧の程度については, 一貫して化粧直しよりもフルメイクの方が否定的に評価されていた。世代については, 自分と異なる世代よりも同世代の行為者に対して評価が寛容であること, 自分と異なる世代においては, 下世代よりも上世代に対してより否定的な評価がなされるという傾向が見られた。

3. 考察

本研究では, 電車の中という公衆場面における化粧行動に関する大学生の意識を明らかにすることを目的とした調査を行った。研究1では, 公衆場面での化粧行動を規定する要因を検討し, 研究2ではそのような行動を目撃した観察者の意識について検討した。研究1の結果より, 自己の外見や言動に向ける注意が高い人, 他者の外見に対する関心が高い人, 普段の化粧頻度が高い人ほど公衆場面において化粧行動をするが, 公共マナーを重視することや恥ずかしいという意識, 無条件に他者を軽視する意識は人前での化粧行動を決定づける要因であるとは言えないということが示された。研究2では, 公衆場面において他者の化粧行動を目撃した際, その化粧の程度が軽い場合 (化粧直し) よりも重い場合 (フルメイク) の方が否定的評価が強いこと, またその行為者が自分と同世代の人物である場合の方が異なる世代の人物である場合よりも寛容な評価を下し, さらに, 異なる世代である場合, 自分より下の世代の人物よりも上の世代の人物に対してより否定的な評価を下すことが示された。

化粧の程度が軽い方が許容度が高いという結果に関しては, 平松 (2006) の知見と一致する。行為者の世代に関してであるが, 菅原 (2005) によると, “若者たちが恥ずかしいと感じるのは, “若者らしくない姿や行動”である”という。電車の中で化粧をするという行動が “若者らしい行動” と捉えられているならば, 本研究の結果は妥当であると考えることができる。すなわち “若者らしい行動” をするべきではないと感じた上世代の行為者に否定的な評価を下したと考えられる。研究1についても, 行為者にとっては当該の行動は “若者らしい行動” であるため恥ずかしいとは感じなかったと考えることができる。

菅原 (2005), 澤口・南 (2004)¹⁷⁾ は, 現代人はセケン・仲間と認識する範囲が狭いこと, その中のメンバーからの評価は非常に気にするが, それ以外の人間からはどのように評価されるかは気にしないことなどを主張している。故に, 電車の中といった公共の場に居合わせる人々に関心がないため, 化粧や地面に座り込むなどの行動をするのだと述べている。本研究では, 調査対象者に観察者としての評定を求めたが, 自分が行為者であると想定し他者からどのような評価を受けるかについての回答を求めるといった調査を行えば, そのような主張について心理学的に検証することが可能であろう。

謝辞

本研究を助成いただいたコスメトロジー研究振興財団に厚く御礼申し上げます。

また, 本研究における調査にご協力いただいた就実大学

原奈津子先生，松山東雲大学林幹也先生，岡山大学東條光彦先生，長谷川芳典先生，堀内孝先生に深く感謝いたします。

(引用文献)

- 1) 村澤博人，：化粧の文化誌，大坊郁夫編，：化粧行動の社会心理学，北大路書房，京都，2001，48-63頁。
- 2) 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。
- 3) 岩男寿美子・菅原健介・松井豊，：化粧の心理的効用(Ⅳ)－化粧行動と化粧意識－，日本社会心理学会第26回大会発表論文集，102-103，1985。
- 4) 松井豊・岩男寿美子・菅原健介，：化粧の心理的効用(Ⅳ)－生きがい・充実感との関係から－，日本社会心理学会第26回大会発表論文集，104-105，1985。
- 5) 菅原健介・岩男寿美子・松井豊，：化粧の心理的効用(Ⅳ)－自己呈示としての化粧行動－，日本社会心理学会第26回大会発表論文集，106-107，1985。
- 6) 宇山侑男・鈴木ゆかり・互惠子，：メーキャップの心理的有効性，日本化粧品科学会誌，14，163-168，1990。
- 7) 岩男寿美子，：化粧する理由に関する一考察，資生堂ビューティーサイエンス研究所編，：化粧心理学 化粧と心のサイエンス，フレグランスジャーナル社，東京，1993，264-267頁。
- 8) 菅原健介，：化粧による自己表現，大坊郁夫編，：化粧行動の社会心理学，北大路書房，京都，2001，102-113頁。
- 9) 中央調査社，：車内マナーに関する意識調査，中央調査報，522，1-3，2001。
- 10) 平松隆円，：化粧行動許容に関わる公衆場面の構造解明とそれを規定する個人差要因，繊維製品消費科学，47，12-21，2006。
- 11) 速水敏彦，：他人を見下す若者たち，講談社，東京，2006，133頁。
- 12) 菅原健介・永房典之・佐々木淳ほか2名，：青少年の迷惑行為と羞恥心－公共場面における5つの行動基準との関連性－，聖心女子大学論叢，107，57-77，2006。
- 13) 永房典之，：日本の若者における恥意識の特徴－道徳性と自己意識からの検討－，東洋大学大学院紀要，37，17-38，2000。
- 14) 菅原健介，：自己意識尺度(self-consciousness)日本語版作成の試み，心理学研究，55，184-188，1984。
- 15) 辻平治郎，：自己意識と他者意識，北大路書房，東京，1993。
- 16) 齊藤和志・中村雅彦，：対人的志向性尺度作成の試み，名古屋大学教育学部紀要(教育心理学科)，34，91-109，1987。
- 17) 澤口俊之・南伸坊，：平然と車内で化粧する脳，扶桑社，2004。

記念講演

●
平成19年度記念講演 宇津木 龍一
●

顔の美の基準と科学的理論

クリニック 宇津木流

宇津木 龍一

場所：日本薬学会 長井記念館ホール
日時：平成19年11月20日（火）

私は、美容形成外科医です。美容外科というのは顔の美を追究する医学ですから、はじめて美容外科を習いはじめたときに、ある程度科学的に顔の美の理論が解明されているだろうと期待して、いろいろな先生に聞いてみました。しかし、みんな異口同音に顔の美なんていうものは理屈じゃ語れないものだから、勘とセンスを磨くしかない、というようなことを言われました。顔の美の基準については、歴史的にいろいろな理論が考えられていますが、形がいくら美の基準に近づいても、かならずしも魅力的な美しい顔になる訳ではないということです。

私は医学として美容外科をやる以上、できるだけ科学的な理論に基づいて手術をすべきだと考えました。患者さんの希望する手術は、やる方がよくなるのか、やらないほうがよいのか？どこを治せばどのぐらいよくなるのかというようなことを手術前にわかるようになりたいと思っていたところ、アメリカで研究をする機会に恵まれました。そのときに、私なりにまとめた顔の美の科学的理論について一部ご紹介したいと思います。

* *

美容外科というのは患者さんのシンデレラ願望を満たす科です。手術をした翌日からは別人のように美しくなった私になることを手助けする科です。私の専門は、単に二重にするとか、胸を大きくする手術ではなく、より美しく若返らせる再建美容外科ともいべき分野をやっております。特に、しみ、しわ、たるみといった美容的アンチエイジング治療が専門です。もともとは、形成外科で顔面奇形と顔面変形の治療をやっておりました。

* *

魅力的な美しい顔の作り方を考えてみますと、美しい顔がどのようなものかを説明するよりも、美しくない顔を説明するほうがはるかに簡単です。例えば美しくない顔をつくりたいければ、前歯が1本ない笑顔だけで、美しさや品位

というのはすぐに損なわれてしまいます。マイケルジャクソンのように極端に細い鼻がついているだけで、全く不自然な顔になり、とても美しいとは言えなくなってしまいます。また、一般的には顔の美というとパーツ間の形、比率、大きさなどについて語られます。また、顔の美というものを別の角度からみてみますと、例えば、エチオピアのムルシ族は、口唇に入れる皿が大きいほど美人ですが、これはもちろん最初から、唇に大きな皿をつけた顔が美しかったわけではなく、異常な形をしていると、昔は奴隷刈りに連れていかれず、子供を育てあげることができる安全性がだんだん美しいと認識されるようになってきたのではないかと考えられます。

つまり元来醜い、異常な顔だったはずなのに、それがその種族にとっては美に変換されており、これは教育、すり込み、洗脳の結果で、このようなタイプの美もあるわけです。

顔の美や魅力というのは、時代や人種、習慣とか地域などによって異なりますけれども、それでも尚、すべてに共通した美の基準というものもあるはずで、実際、これまでいろいろな人が様々な美の基準を考案してきました。比較的最近議論されたものが、平均的な顔は美しいという理論で、今から100年ぐらい前に、Natureに発表されました。たくさん人の写真を重ね焼きしてできた顔が一番美しくなるという説ですが、15年ほど前に、やはりNatureに平均顔はかならずしも美しいとはいえないと、100年前の説を否定する論文が掲載されました。結局、科学的に考えると顔の美しさは、やはり一言では語りだすことができないということにおちついているといえます。

美容外科手術の目的は美の追求ですが、顔の美の基準は千差万別で、客観的に診断、評価することはできないといわれています。千差万別であるにもかかわらず、患者さんとのコミュニケーションをとることすら難しく、患者さんの希望を医者が正確に把握することができないという危険性もあります。そこで、私は手術前にコンピューター上で、患者さんの写真を使って、患者さんの希望する通りの手術を行えば、本当に患者さんは満足してくれるのかを調べています。例えば、患者さんが、ある女優に似た顔になるために手術を希望したとします。患者さんは、目や、口だけでも、この女優の顔のように治してくださいと言ってくるわけです。そこで、写真上で女優のパーツを患者のもの



Ryuichi Utsugi, M.D.
Clinic UTSUGIryu

のと入れかえて、本当に満足するか確認するわけです。

実際それをやってみますと、ほとんどの患者さんは、その結果に満足しません。それが美容外科の問題点なわけです。たとえ患者のパーツを全部めざす女優の形に変えても、期待するイメージにはならないのです。そこに患者の錯覚があるわけです。メイキャップアーティストのもとにも、ある女優に似た化粧をしてくださいと希望する人が来ると思いますが、希望をかなえることは単純ではなく、大変に難しいと思います。

次に、ふたつの顔の皮膚を画像処理して白くすると、両者同じ顔であることが明らかになります。画像処理する前の顔の違いでわかる様に、皮膚の部分が違うだけで、たとえば眉、目・鼻・口などのパーツの形が一緒であるにもかかわらず、顔の印象は全く違ってしまいます。

顔の印象や美醜の違いは、パーツの形ではなく、皮膚にあることはこれで明らかになりました。皮膚の美しさこそ顔の美しさ要因であることは、美容形成外科医としては大きな驚きでした。そこで、顔の美醜を決定する皮膚の要因について検討してみました。輪郭の違いでしょうか？輪郭をそろえてみます。それでも、やはり右と左の顔の美しさというのは違います。左右の写真をさらに光の反射している部分 (highlight) と影の部分 (shadow) とに分けてみると、光の反射している部分 (highlight) だけの顔のほうが、shadow の部分だけよりも顔の美しさが判断し易いことがわかります。shadow だけを見てみると、どっちがきれいだか一見わからない。人は shadow の部分ではなく、highlight の部分を見て、きれいかどうかを判断しています。

shadow の部分だけをピックアップして表現してみますと、顔のしみ、にきび跡、その他点状斑状の shadow を取り除くと明らかに美しく見えるようになることから、それらの shadow が顔の美を妨げていることがわかります。特に、目の下や口の周りの shadow を消すと、顔は劇的に美しくなります。これは私にとって非常におもしろい発見でした。これによって私は皮膚をきれいにすることに大変興味を持つようになりました。

顔の美や、顔の魅力というのは、パーツの形プラス、ファンデーションの領域、つまり皮膚の美しさが合わさって初めて生まれるものです。顔にできる影は美を損ねるので、化粧で白塗りをして影を隠すことで美しくなる。顔の shadow というのは、肌表面のでこぼこ、大小の凹凸です。また、肌の色むら、しみ、発赤、赤ら顔、皮膚の萎縮でキメが消えてつるつるした部分など、ほんのわずかな影が顔の美を損ねています。

写真の撮り方によって、別人のような写真に写ることがありますが、それはたいてい影のでき方の違いです。これまで目の形、位置、口の形、などパーツが顔の美の要素で、それについてしか語られていません。私はアンチエイジン

グが専門の美容外科医ですから、私は影の治療をしています。まず色むらを治療します。色黒か色白かは問題ではありません。黒くても白くてもどっちでもいいですから、とにかく均一な色の肌を目指します。

次に、しみ、くすみ、発赤がない顔。それから、しわ、でこぼこ、たるみがないことが若くて美しい顔になるためには重要です。

顔をコンピュータで二値化処理すると、光の反射のつよい領域が highlight area として表されます。highlight area は、顔の立体的構造に応じて、卵形、クローバーリーフ型、逆三角形に分けることができます。昔の日本人の美人は、卵形、アフリカンなどのエスニックタイプの美人はクローバーリーフ型、美人女優のほとんどは逆三角形です。

この highlight area の形や辺縁の線が乱れてぎざぎざが入ってしまうと、たちどころに顔はきれいには見えなくなってしまうのです。

つまり highlight area の形をきれいに整えるというのは、卵に目鼻のようにスムーズな肌の局面、凹凸がない、ざらざらがないということです。肌に凹凸だとかざらざらだとかができる、それが陰となり、顔はたちどころに醜くなるわけです。

通常、図1の左の人が例えばきれいな顔になりたいと思った時に何を考えるかという、目の形を変えよう、鼻を高くしよう、あごを削ろうか、などと形を変えることを考えていたわけです。

ところが、図1の右のように皮膚をきれいにすれば、形は同じでも、劇的に美しくなれるということが、美容外科医としてわかってきたわけです。老化というのは、このハイライトが乱れて、余計な影がたくさん増えるというのが特徴です。若いときはきれいに整ったハイライトをしてい



図1 左右の写真は、皮膚以外の眉目鼻口、輪郭は全て同じであるにもかかわらず、顔の印象はまったく別人である。皮膚が顔の美にいかに重要であるかがわかる。これまでは、顔の美は形態の問題と考えられてきたが、今後は皮膚の重要性がますます認識されると思われる。

たのが、次第に崩れて、ハイライトの形が崩れてきて変形してしまう。このハイライトの乱れを私はきれいに整える仕事をしているわけです。

この場合、目・鼻・口、の形はそれほど問題ではありません。highlightの形によって、アジア人になったり白人になったりするというぐらい、私はhighlightの形態は重要なものだと考えています。

きれいなhighlightを作る基本は健康な肌です。それには日々のスキンケアや定期的な肌診断、そして適切な治療が必要です。

スキンケアと治療について考えてみます。

例えば皮膚を切りますと、皮膚の色というのは、ごく表面の30ミクロンから50ミクロンぐらいの浅い表皮層にだけあるのが普通です。真皮は真っ白です。表皮の色素をよく見ると、くすみの部分は肌がさびたようになっていきます。メラニンの沈着や血管新生や拡張を治療するということが、影のない均一なきれいな肌を作る基本になります。

肌の治療は病院で短時間でやることもできるでしょうし、化粧品を使って長時間かけて治していくという方法もあるかもしれません。例えば、萎縮をしてみとくすみだらけという肌は現代女性の典型です。このような肌の表面を顕微鏡で見ますと、きめの全くない状態です。つまり萎縮して代謝の悪い状態だからしみができるわけです。乾燥を治し、新陳代謝を促進してきめを作り、くすみとしみを治療することになります。

理想の女優などの写真をもって、似た顔になりたいという場合、目・鼻・口を同じにただけでは、似た顔にはなりません。そこで、理想の顔から自分の現在の顔へ、モルフィングソフトを使って段階的に少しずつ画像を融合変化させた写真を作ります。今まで100人以上やりましたけれども、最初は理想の顔になりたい、今の自分の顔は絶対嫌だと言っていた人でも、98%以上が中間の顔を選びます。つまり自分の顔の個性を残した美を人間は求めている事がわかります。顔の魅力というのは、個性(individuality)、その人らしさがものすごく重要だということです。それと同時に、目・鼻・口などのパーツの形と、highlight、shadowのファンデーション部分、このふたつのハーモニーが非常に重要だということです。

このハーモニーを考えれば100%理想の顔になることは無理でも、50%くらい似ている顔なら手術で何とかかなりそうとか、30%くらい似た顔なら化粧品でどうにかなりそうだということが予測できます。

似た顔を目指すには、目指す顔と元の顔の差を計測することも重要です。また、私は患者さんに求められればhighlight areaの形をきれいに出すためのファンデーションの塗り分け法のインストラクションをコンピュータで作ってあげることもあります。

* * *

最近の美容医療についてのトピックスについても話をしてほしいということなので、触れておきます。新しいことではないのですがコラーゲン注射やヒアルロン酸注射を受ける患者さんが世界的に急増しています。私も最近10年位患者さんに勧めている医療です。

老化現象というのは、素材としての皮膚そのものが老化してくるということが1つ。形が崩れてくるという問題が1つ。それから、この2つが合併しています。形が変わってしまったものは手術でないと治せません。しかし、顔の形は素材である皮膚にはりがあるってしっかりしていれば、なかなか崩れません。

その皮膚がなぜ崩れてくるかということ、皮膚の中にあるコラーゲンが抜けていくからです。

顔のコラーゲン量をもとに戻す方法や、減らさない2つの方法があります。1つはやけどをさせることです。やけどの治療力を使ってコラーゲンを作らせる方法、これがレーザー治療法です。それともう一つは、コラーゲンを組織の中に直接注射する方法です。注射したコラーゲンは半年から1年でアミノ酸に分解されて消えていくわけですがけれども、そのアミノ酸を線維芽細胞が取り込んで自分のコラーゲンをつくる良い肥やしになります。

コラーゲン注射にはヒト由来、牛由来、豚由来などがあります。私は医者になり立てのころに、ウシのコラーゲン注射を見て気持ちが悪いと思いました。こんなものを注射して、将来どうなるかわからないので絶対やりたくないと思っていました。ところが注射を定期的に打ち続けている患者さんの肌が本当にみるみる明らかに若返っていくのを10年間見て、しかも、コラーゲンの安全性は25年以上にわたり、世界で確認されていることを考えて、私も10年ほど前から積極的に使っております。コラーゲン注射は、深い法令線(鼻唇溝)、目の下のクマ、口角の線などに、即席で劇的に効果を発揮します。例えば63歳の方ですけれども(図2)、4~6ヶ月毎にコラーゲン注射をして3年後の状態です。肌は明らかに若返っています。次に67歳の細かいしわが多くて、ファンデーションが塗れないというので治療をすることになった患者さんですが、少しづ



図2 コラーゲン注射をして、皮膚が若返った例
方法はケミカルピーリングおよびレーザーピーリング治療後の皮膚表面をデジタルマイクロスコープを使って診断し、効果に対する患者自身の評価と比較検討した。

つ皮膚に注射して、2年後の状態です（図3）。1年間に3回から4回注射しました。

48歳の目の下が気になる患者さんです。目の下にコラーゲン注射をして2年後ですけれども、肌のはりが戻ればこんなに若返り、毛穴の開きも小さくなります。額は、まゆ毛が上下運動をしてできるしわですから、ボトックスで前頭筋を弛緩させて上下運動を止めれば写真のようにしわは消えてしまいます。

このまゆ毛の上下運動というのは、顔の上半分を急速に老化させるものだということがわかってきました。つまりまばたきは、1日1万回から3万回行われますが、45歳頃から少しずつ目をあける筋肉がゆるんで目が開きにくくなりはじめ、50歳を過ぎると誰でも開きにくくなります。そのためにまゆ毛を上げて、努力して目を開けるようになります。これが眼瞼下垂症という症状で、目があきにくい、まぶたが垂れてくる。まゆ毛を挙げるので額にしわが出る。最近、額にしわが増えてきたと思っている人は、皮膚がたるんできたわけではありません。まゆ毛を上げるようになってきたということです。つまり目を開ける筋肉が緩んで、ふだん努力をして目を開けているという証拠です。こうなると、目はもちろんのこと、全身的に非常に疲れやすく、根気がなくなり、最後は鬱病になります。まゆ毛を上げるということは、例えば皆さんが運転をしていて眠くなると、自分を覚醒させようとして、まゆ毛を必ず上げるはずで、眉上げは無意識に交感神経を刺激して覚醒しようとしている現象でみられます。交感神経の刺激スイッチを常にオンの状態にするということは、自律神経系が疲れて破綻してしまうということです。眼瞼下垂が、自律神経の破綻を引き起こし、頭痛、肩こり、不眠、眼精疲労、ドライアイそして鬱病などを引き起こすことが最近わかっています。

額にしわが深くなり、眉毛があがり、まぶたのたるみが気になるようになったら、目を開ける筋肉のゆるみを治す簡単な手術をする必要があります。大体片目で30分ぐらいの簡単な手術によって昔のように目が楽に開くようになり目を開ける努力が必要なくなるので、大変元気になります。眼瞼下垂手術で頭痛、肩こり、鬱病などの不定愁訴が



図3 コラーゲン注射で皮膚のちりめんじわを治療した例
方法はケミカルピーリングおよびレーザーピーリング治療後の皮膚表面をデジタルマイクロスコープを使って診断し、効果に対する患者自身の評価と比較検討した。

治るということは、医師でもまだ知らない人が多いのですが、形成外科学会では、大きなトピックスとして知られています。あまりほかの科の先生は知らない人も多いのですが、信州大学形成外科の松尾清教授が発見して以来、形成外科学会では大きなトピックスとして知られるようになりました。私もこの手術を、10年前から専門的に行ってききましたが、どこにいて調べても原因がわからなかった頭痛や肩こりなどの治療効果はすばらしいものがあります。

* *

例えばこの方はこの額、つるつるになります。ボトックスの治療はいろいろなところに使えますし、それから汗も少なくするので多汗症だとか、最近は頭痛にもよく効くと言われています。つまり眉間のところにしわを寄せているということは、三叉神経の第一枝がこの眉間のところから出てきます。あまり眉間にしわばかり寄せていると、その第三枝をずっと刺激していることになるので頭が痛くなってくる。それを眉間にしわを寄せなくなると頭痛が治るとのことなんです。

* *

実は、私も4年前、50歳の時に、後輩に頼んでその手術を受けましたが、全く痛みもなく、目が開き易くなりました。私の場合は、眼精疲労と夕方以降の疲れ易さが劇的に改善しました。私の周囲の形成外科医たちも、数多くこの手術をうけています。

* *

図4は67歳の女性で頭痛持ちでしたが、手術後それが改善して元気になってタレントさんになったという人です。今は本当に生き生きと働いています。手術前は目を努力して開けていて、神経をすり減らしていたわけです。また、



図4 眼瞼下垂の術前術後
患者さんの左顔面の術前鏡像と術後写真を合わせて作った写真。術前と術後の違いがよくわかる。
写真上、患者さんの左顔面が眼瞼下垂術前、右顔面が同側術後3年の状態。
術後目が開けやすくなり、同時に眉毛の上下運動が減って著しく若返っている。
術後にスキンケアも行った。

まゆ毛の上下運動で皮膚には1日数百回の伸縮のストレスがかかる。そのために皮膚が老化していました。手術をしてから3年後の写真と比較すると、本当に顔が生き生きとして、皮膚も若々しくなっています。写真は左顔面が術前の顔。右顔面が術後の同側の顔を鏡像にしてひとつにした写真です。

手術をした後は、まゆ毛を上げて努力して目を開けている必要がなくなるのでまゆ毛が下がってくる、リラックスする。だから、元気になる。頭痛も治るし肩こりも少なくなる。頭痛は80%以上、肩こりは40%から60%ぐらいの治癒率です。

眼瞼下垂の症状は、額しわ、目の上のくぼみ、二重の幅が広がって乱れてくる、それから、目の下が膨らんでくる。この目の下の膨らみも、こちらの目の上の脂肪が中に引き込まれるために下が出てくるということです。

写真を見ておわかりのとおり、術後に目が開き易くなると、まゆ毛を挙げる必要がなくなるので、眉毛が下がり、額のしわもなくなるし、肌も若返る。つまり老化というのはまぶたからくるわけです。

しかし、眼瞼下垂を放置しておくと、まゆ毛を止めている靭帯が緩み、目をぱっちり開ける手術をしてもまゆ毛が下がり過ぎるようになります。このために早く手術をしないと、表情がかわってしまったり、怖い顔になる。まゆ毛を上げていれば明るい表情ですけど、まゆ毛が下がってしまうと不機嫌な怒ったような感じになるからです。まゆ毛が緩んであまり下に落ちてこないうちに手術したほうが自然な表情に仕上がります。まゆ毛があまり下がると邪魔ですから、さらにまゆ毛を上げて頑張るって目を開けなくてはいいなくなるので、眉毛を挙げる手術も必要になります。

私は、50歳以降に快適な生活を送るためには、この手術が絶対に必要だと確信しています。

* * *

顔の美は、形の問題ではなく、皮膚の質が重要であることがわかってきました。また、アンチエイジングの美容医療は最近20年ほどの間に、急速に進歩しました。いまや、しみ、しわ、たるみは、外観だけの問題ではなく、健康と生活の質に直結した問題であることが明確になり、顔の老化程度はある程度自分で選べる時代でもあると思います。

コスメトロジー研究雑感

平成 17 年度 研究助成

コスメトロジーと植物

森田 博史

人間と薬とのつながりは長い歴史をもっており、より安全な薬を求め続けてきた。日本でも、漢方薬の保険適用が認められて以来、薬用植物を中心とする天然物が見直されてきた。もちろん、薬になるものは植物に限らず、動物、鉱物も沢山あるが、全体的にみると、70 - 80%が植物である。

コスメトロジーと植物との関係も深いものがある。最近、植物性の機能性物質のなかでも、ポリフェノールは、抗菌活性、抗酸化活性、ラジカル消去活性など有し、制がん作用や抗ウィルス作用などの様々な機能を示すことから、化粧品素材として注目されている。化粧品素材としての機能といっても、皮膚の保湿・細胞賦活、血行促進、消炎作用、創傷治癒効果、抗酸化作用、フリーラジカル消去、

コラーゲン生成の促進、皮膚柔軟性、シミ・そばかすの防止、メラニン色素の生成を抑えるなど様々である。

単一な植物成分でも、いろいろな活性を合わせ持つ場合があるが、植物エキスを使う場合は、膨大な成分を含んでいるために緩衝剂的な面も見られ、ファジー的な要素の高い素材である。天然薬物の類は、過去の長い歴史もあるし、その間に実際の臨床経験をもって取捨選択されてきたものなので、用法を間違えなければ、副作用で大事を起こすことはすくない。

このような経験的に使われてきた植物のなかから、コスメトロジー的に有用な素材が生まれることを期待している。
(星薬科大学生薬学教室)

平成 17 年度 研究助成

自己素材の文化事業とコスメトロジー

藤井 敏弘

助教授時代の大学院生から人の毛髪の子診断の話があり、タンパク質の分析であることもあり、あまり考えずに研究をスタートさせた。ケラチンを主成分としており、細胞骨格をバックグラウンドにしている私にとっては身近に考えられた。タンパク質の子診断のため、分解させないような抽出方法を必要とした。これを検討する中で、いくつかの変性剤を組み合わせた信大法を見出して確立した。信大法を使用したタンパク質の抽出効果が高いため、分離した大部分のタンパク質を廃棄することがしばしばであった。元来のケチ根性で「もったいない」という気持ちから、何かへと変換すれば、新規の基材になることを思いついた。努力といたいだが、偶然と共同研究者に恵まれ、フィルム、ファイバー、微粒子への変換技術を開発してきている。

繊維学部の所属であることからファイバーについて紹介すると、天然高分子多糖の組み合わせに毛髪タンパク質を導入したファイバーの紡糸に *in vitro* の系で成功した。新しいタイプのファイバーであるため、この宣伝に有名人の髪の毛を考えた。2002 ~ 2003 年頃、「長野県に関係し

ている有名人は誰？」と聞くと、多くの人は田中康夫 知事(当時)との返答であるため、コンタクトをとり協力を依頼した。田中知事の髪の毛タンパク質入りのファイバーの写真は、地元の信濃毎日新聞(2003年11月17日)に掲載していただいた。また、「シルクの光沢をもつ、しなやかなファイバー」のキャッチフレーズもつくった。

毛髪、爪は、容易に採取できる素材で、保管も簡便にできる。個人単位での利用を行えば、生体適合性に優れた材料となることが想定できる。これらを「セルフ-リサイクル」の概念として提唱してきている。コロンブスの卵と同じような当たり前の提案であるが、バイオあるいは材料関連の新たな概念とテクノロジーとして育て上げたい。この具現化のため、2007年に(株)バイオメモリアル研究所を大学発のベンチャー企業として設立した。特に、コスメトロジー領域はセルフ-リサイクル製品の最大のターゲットになると考えている。また、私ごとですが、2008年4月から学部改組により感性工学科から応用生物学系バイオエンジニアリング課程へ移籍した。(信州大学繊維学部)

コスメトロジーとナノバイオマテリアル

長崎 幸夫

薬物キャリアを目標とし、高分子化学を基盤として材料設計を進めてきた筆者が金や半導体、シリカやガラスなどの様々なナノ粒子に適用範囲を広げ、その生体環境下での利用を目的として研究を進めてきた。ナノバイオマテリアルと総称するこの様な生体環境適合性コロイドが様々な応用用途があるかと思っはいたが、実際には手が廻らずにしていた。幸いなことに最近、筆者の研究室では卒業研究生を含む学生の数が増え、様々な研究を展開できるようになってきた。例えば pH に応答して薬物を放出するコアシェル型のナノゲルは疎水性の有機アニオンを効率的に取り込むため、高い胆汁酸吸着性を示し、これは高脂血漿薬の代替として期待できるだけでなく、ダイエット食品や飲料としての可能性も期待できる。同様に電子スピン共鳴を利用してバイオイメージング用に用いる安定ラジカルを取

り込んだナノ粒子は活性酸素を効率的に消去するナノ粒子として生体内外で利用することが可能であろう。生体環境下で高度に分散安定化したシリカにキノン誘導体を封入しメラミン色素分解などの実験も出来るようになってきた。

この様にバイオナノ粒子に要求される性能として、生体環境下で高度に分散安定であり、生体に対して親和性が高いことが常に要求されるバイオナノ粒子はコスメトロジー分野にそのまま適用可能であるだけでなく、さらに高次の機能を付与することが期待できるため、この領域への展開を強く意識した研究を進めていきたいと思ひます。

我々の研究に対してご助成頂きました(財)コスメトロジー研究振興財団に心から感謝申し上げます。

(筑波大学大学院数理物質科学研究科)

コスメトロジーとバイオマテリアル

原 正之

だいぶ前の話になるが、バイオマテリアルの研究で高名なある先生が若い人の結婚披露宴のスピーチをされた際に、「インプラント（体内埋め込み型の医療用具）というのは、人間の体（免疫機能を持った生物）と医療用材料（異物）との接する場所である。年月を重ねる途中でつなぎ目が緩んだり、割れたりということでは困るので、そういうことの無いようにするためにはいろいろな工夫が必要であり、研究開発が行われている。家庭というものもまた、かくあるべし。」というような話をされたのを聞いたことがある。

私は、大学の講義で「生体材料（バイオマテリアル）」とは何か？という話をする時に、「医療用具などに使われ、人体に接して用いられる生体適合性の材料」であると説明し、生物の体を構成する「生体物質」（蛋白質、核酸、糖質、脂質）とは違う概念であることを強調するようにしている。化粧品の素材もまた、その多くが生体材料に含まれるように思う。私自身が研究材料としている脂質の膜から

なる小胞（リポソーム）、コラーゲン蛋白質などは医療用具にも化粧品にも利用されている。細胞の接着や、薬剤の徐放、保湿効果など目的とする機能を果たすことに加えて、生体適合性が良いことが、絶対的に必要な条件となるからである。

日頃は化粧品についてあまり縁の無い門外漢なりに考えてみると、医薬品や医療用具などが身体的（physical）な効果を主目的とするのに対して、化粧品はこれに加えて、明らかに精神的（mental）あるいは社会的（social）な効果のウエイトが大きいように思われる。材料と生体との適合性が必要なことは言うまでも無いが、化粧品は、衣服などと同じく、それを利用するヒトの外観や印象を変化させ、ヒト個人の間の人間関係にも影響を与え得るからであり、その意味では医薬品と衣服の間に位置するものとも考えることも出来るかもしれない。

(大阪府立大学大学院理学系研究科)

平成 18 年度 研究助成

親と子のコスメトロジー

西迫 貴志

子供の頃から現在に至るまで、化粧品はもちろん整髪料さえもほとんど使用したことがない私は、「コスメトロジー＝化粧品」であり、関係があるのはほとんど女性に限られる、と勝手に思い込んでいた。しかし今回の助成をいただくにあたって、コスメトロジーという概念がバイオ分野から精神・文化に関する分野まで広範に及ぶことを知った。自身の不知を恥じるとともに、視野を広げるまたとない機会を得られたことを感謝している。さらに贈呈式でのかづきれいこ先生の「リハビリメイク[®]」に関する記念講演でも、コスメトロジーが実に幅広く、多くの人に希望を与えるものであることに新鮮な驚きを感じた。

そんな私にもコスメトロジーの恩恵を直接実感する出来事があった。贈呈式から約2週間後、待望の第1子が誕生したのであるが、冬場の乾燥した空気のせいか、産後の数週間ほど、顔や手の肌がひどく荒れてしまっている時期が続いた。赤ん坊の泣き叫ぶ姿は見た目に痛々しく、なんと

かならないかと内心ハラハラしていたが、妻が知人から教えてもらったローションを塗り始めたところ、数日で顔や手の肌が見る見るきれいになっていくのがわかった。父親としても次第に気持ちが楽になっていき、ふと、「なるほど、これもコスメトロジーの恩恵だ。親子ともに心身両面でお世話になったわけだな」と変に感心した次第である。

さて、私のここ数年の研究は、マイクロ流路構造を用いた均一サイズの各種エマルジョンの生成とその応用に関するものである。特に、従来手法では生成が難しかった均一サイズの多層構造のエマルジョン（ダブルエマルジョン）は、有効物質のカプセル化、放出制御を容易に行えるため、コスメトロジーを含めた多分野への応用を模索中である。自身の子供達、そのまた子供たちが恩恵を少しでも実感できる、そんな研究成果を世に残すことができれば研究者冥利に尽きる、などと考える今日この頃である。

(東京工業大学精密工学研究所)

平成 17 年度 研究助成

スキンケアとプロスタグランジン D2

佐藤 貴浩

皮膚は日常的に紫外線や機械的刺激を含めた物理的刺激を受けています。また乾燥の危険にもたえずさらされています。しかし表面の角層を含めた巧妙な構築と組成により皮膚はこれらの危険から生体を守っています。そしてその機能を補うことがスキンケアの重要な意義の一つです。プロスタグランジン D2 とスキンケアとは全く関係のないもの同士という印象があるかもしれません。たしかにプロスタグランジン D2 とといえば最近では“アレルギー”というイメージが先行しています。今回の研究でも主に慢性アレルギー性炎症という面からプロスタグランジン D2 の関与を解析しました。しかしどうやら皮膚はキズをつけるなどのダメージをうけるだけで瞬時にプロスタグランジン D2

を産生、放出するようです。また慢性的に炎症を繰り返している皮膚はバリア機能が障害されやすく、よって種々の刺激因子に対してダメージを受けやすくなっています。このような状態の皮膚は機械的刺激に対して容易にプロスタグランジン D2 を容易に産生し、その結果炎症がさらに増悪してしまうかもしれません。もちろんプロスタグランジン D2 は炎症を一方向的に悪化させるだけでなく、逆の作用をもっている可能性もあります。そして今後は皮膚の機能維持とプロスタグランジン D2 との関係についても目をむける必要性がありそうです。

(東京医科歯科大学大学院皮膚科学分野)

コスメトロジー雑感

竹下 治男

我々は、ヒト汗中に極めて活性の高いデオキシリボ核酸分解酵素 (DNase I) 酵素が存在し、しかも遺伝的多型形質であることから、微量な汗からでも実施可能な個人識別法を確立して法医鑑識の実際に応用している。しかし、汗に含まれる高活性な核酸分解酵素の生理学および薬理学的作用は不明である。ヒトの DNA 分解酵素のひとつであるデオキシリボヌクレアーゼ I (DNase I) に遺伝的多型の存在を発見し、有用な遺伝マーカーのひとつとして確立した。この発見に端を発し、この酵素の cDNA 構造、遺伝子構造、染色体座位及び遺伝的多型性の分子論的基盤などの分子遺伝学的側面を解明した。次いで、DNase I は外来性の DNA を消化・分解する“単なる消化酵素”と考えられてきたが、これら酵素の新規な生物学的機能を解明するため哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類及び魚類由来の DNase I に関する生化学的、免疫学および分子生物学的解析を継続している。その結果、これら DNase I は

それぞれの生物種において十分な酵素活性が発揮できるよう分子進化してきたことが判明した。特に、各種脊椎動物 DNase I の比較・検討から、わずかにアミノ酸の置換や挿入・欠失が、酸安定性、熱安定性、最適 pH 及びアクチン結合能のような生化学的性状を左右していることが解明され、DNase I から見た脊椎動物の多様性と分子進化に関する新たな知見が最近得られている。さらに臨床医学的な側面からも DNase I の 2 型は胃癌、大腸癌、肝疾患などに罹患しやすく、1-2 型は消化器疾患に罹患しがたいことを見出ししている。また、最近、胸痛発作後 3 時間以内に観察される血清酵素活性値の一過性上昇は、急性心筋梗塞の特異的超早期診断マーカーであることを見出した。

このように DNase I 研究を広く深く遂行することにより、コスメトロジーに関する方面でも貢献できるものと考えている。
(島根大学医学部法医学)

表皮ランゲルハンス細胞の新機能の解明とコスメトロジーの発展

杉田 昌彦

皮膚恒常性の維持機構ならびに外界刺激に対する免疫反応の理解は、臨床的にもまたコスメトロジーの観点からもきわめて重要である。その鍵となる細胞の一つが表皮に存在する樹状細胞、すなわちランゲルハンス細胞である。敷石状に配置されたケラチノサイトの間隙に網目状に突起を伸ばしたランゲルハンス細胞は、さまざまなアンテナ(受容体)を用いて皮膚環境をモニターし、制御している。したがって、ランゲルハンス細胞に特有の働きを解明していくことは、つねに外界と接したユニークな臓器である皮膚の生理機能の理解に不可欠である。

古くから表皮ランゲルハンス細胞のマーカータンパク質として、CD1a 分子が用いられてきた。実際、未熟胸腺 T 細胞を除くと、生体内で CD1a 分子を発現した細胞はランゲルハンス細胞のみであると言っても過言ではない。しかもその発現量が尋常ではない。培養液中で人為的に誘導した樹状細胞の 10 倍以上の CD1a 分子をランゲルハンス細胞は発現している。また、ランゲルハンス細胞の細胞内

には、バーベック顆粒というランゲルハンス細胞に特徴的な構造物が存在する。実は CD1a 分子は、細胞表面とともに、このバーベック顆粒に多量に発現している。このような事実を総合すると、CD1a 分子は、ランゲルハンス細胞の機能と密接に関連した分子であることが容易に推察できる。

これまでランゲルハンス細胞に発現した CD1a 分子の働きは、まったく不明であった。しかし最近になって、CD1a 分子が脂質を結合し、T 細胞に抗原提示する新しいタイプの抗原提示分子として働くことが明らかとなってきた。実際、ヒト皮膚より単離したランゲルハンス細胞は、細菌脂質を特異的に認識する T 細胞を活性化することができる。また、脂質に対する皮膚遅延型アレルギー反応も実証されている。ランゲルハンス細胞が、CD1a 分子を介して、脂質特異的な皮膚免疫応答を制御していることは、間違いのない事実であろう。

これまで皮膚における T 細胞活性化の研究は、主として

タンパク質抗原を標的とした免疫応答に限られてきた。しかし、皮膚常在菌は特有の脂質を産生する。皮膚炎を惹起するウルシオールは脂質である。化粧品かぶれを起こす物質の多くは、非タンパク質分子であるという話も聞く。CD1a分子を介した脂質特異的皮膚免疫応答の解明は、これまで必ずしも明確でなかったさまざまな皮膚炎の発生機序の理解につながり、ひいてはその治療や予防にも役立っていくであろう。

免疫研究に極めて有用で、さまざまな皮膚免疫病態の解明に貢献してきたマウスは、実はCD1a分子をコードする遺伝子を欠如している。したがって、この新領域の研究を展開、発展させていくためには、新たな小動物モデルの開

拓が必須であった。そこで、ヒトCD1a分子をコードする遺伝子を導入した「CD1aトランスジェニックマウス」の樹立を試みた。ヒトと同様のCD1a分子の機能発現をマウスにおいて再構築する試みにおいて、多くの困難に直面したが、最終的には表皮ランゲルハンス細胞と未熟胸腺T細胞に特異的にCD1a分子を機能発現したマウスを樹立することができた。

このマウスを用いた研究の進展により、これまで知られていなかった新しい皮膚免疫の基礎が確立され、コスメトロジーの発展に大きく貢献できれば大変喜ばしいことである。
(京都大学ウイルス研究所)

平成 17 年度 研究助成

メカニズム vs 効果の実感

内藤 幹彦

最近体を動かした後に膝など関節が痛むことがある。コラーゲンやヒアルロン酸など軟骨の潤滑成分が不足してきたせいだろうか。新聞などでこのような成分を謳った健康食品の広告を見ると、試してみようかという気にもなる。最近少し治まったようだが、母が一頃山のように健康食品を買い込んで毎食後に飲んでいたので思い出す。自分もそんなことを気にする年になったということか。

コラーゲンやヒアルロン酸などの高分子を摂取しても、消化管から吸収されてそのまま膝に行くとは考えにくい。だからビタミン剤などは別として、健康食品など食べても無駄ではないかと思っていた。しかしメカニズムはどうであれ、実感として健康食品の効果を感じる事もあると母は言う。その中にはプラセボ効果も含まれるだろうが、この実感が一般の消費者にとって大切な要素なのだろう。

老化や細胞死のような生命現象を観察していると、どうしてもメカニズムを解明するという方向に関心が向いていく。例えば、皮膚の老化メカニズムを理解した上で老化を

制御する方法を開発し、これを実生活に役立てるとするのは、実用的な研究開発のひとつの理想像であろう。しかし細胞の営みは大変複雑であり、メカニズムの全体像を明らかにすることは一大事業である。また細胞レベルの現象と皮膚組織の生理現象の間にもギャップがある。研究は奥が深く難しい。

厳密なメカニズムは脇に置いておいても、皮膚を若々しく保つ方法が確立されれば多くの人にとって朗報であろう。考えてみれば基礎化粧品はまさにこのようなものであり、効果の実感があるからこそこれまで多くの女性達に支持されてきたのだろう。極論すれば、メカニズムなどわからなくても効果があれば商品は売れるし、作用機序はわからなくても病気を治す薬は社会に役に立つのである。詳細なメカニズム研究も学問的にはおもしろいが、視野が狭くなって自己満足の研究に陥らないよう気をつけたい。

(東京大学分子細胞生物学研究所)

平成 17 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

鈴木 民夫

日本の古くからの言い伝えである「色の白いは七難隠す」にもありますように、古来より色白は「美」の概念の中心

的要素の一つであります。(この言葉はよく考えてみますと、美白の価値はかなりすごいことであることがわかりま

す。ただ皮膚の色が白いだけで、性格悪い、頭悪い、体形悪い、さらにあと4つも付加される難点をキャンセルさせてしまうというのです。何の根拠もなくここまですごい事だと言っているのですから、やはり一種の信仰と言ったほうがいいのかも知れません。)つまり、「美白」は、コスメトロジーの原点、出発点であると言っています。この「美白」への願望は、言い換えれば皮膚におけるメラニン合成のコントロールへの願望であります。私は1998年の米国コロラド大学留学を境にして、色素細胞の研究に携わるようになりました。他に特に専門らしき分野のない私は、それ以来、色素細胞の研究者と名乗ることにしております。そんな私にとっては、まだまだ未知の領域が多いメラニン合成機構とその調節メカニズムの解明というテーマは、美

白信仰における「美白」願望への想いとかなりの部分をオーバーラップいたします。今回、コスメトロジー財団より研究費をいただくことができ、二重の意味でうれしく思いました。ひとつはもちろん経済的意味ですが、もう一つは、最近、皮膚科領域ではすっかりマイナー領域になってしまった色素異常症に関する研究課題に対して助成をいただいたからです。この領域にはまだまだ解明すべき課題がたくさんあり、また、多くの患者様が治らないまま悩んでいる疾患がたくさんあり、よい治療法の開発が期待されております。微力ながら、そんな期待に沿えるような研究を目指しております。今後とも、色素細胞の研究を通じて、コスメトロジーの発展に微力ながら寄与したいと思っております。(山形大学医学部皮膚科学分野)

平成 17 年度 研究助成

私とコスメトロジー 内藤 素子

私は、以前救急部に3年間勤務したことから、熱傷や外傷の患者さんを多く担当して参りました。その経験から、創傷治癒ならびに皮膚再生に興味を持ち、ケロイドや肥厚性瘢痕の治療、研究に従事して参りました。これらの研究を進めるうち、皮膚の中に存在する体性幹細胞にも興味を持ち、この細胞を創傷治癒・皮膚再生に応用するべく研究を進めてまいりました。このような私の研究生活の過程で、正直申し上げまして、これまであまり「コスメトロジー」を意識したことがありませんでした。しかし、数年ほど前から、光治療等に接する機会を得て、いわゆる「皮膚若返り」について考えるようになりました。そういったしますと、「皮膚若返り」というのは、私が以前から従事してまいりました「皮膚再生」に含まれるのではないかと思う

ようになりました。なんらかの原因により、皮膚組織が劣化、あるいは障害を受けている状態を再生するということを目標に、これまでずっと研究を続けて参りましたが、それはすなわち、皮膚を健康でいきいきとした状態に戻す事にほかなりません。このように考えますと、私がこれまで従事してきた研究もコスメトロジーという領域に随分と通じる点があるように思い、本助成事業に応募させていただきました。有り難いことに助成していただけることとなり、「コスメトロジーという」新たな観点から研究を發展させる機会に恵まれましたこと、深く感謝申し上げます。今後も、皮膚に存在する幹細胞をコスメトロジー分野にも応用することを念頭におきながら、研究を進めたいと考えております。(京都大学大学院医学研究科形成外科)

平成 17 年度 研究助成

コスメトロジーの観点からみた本研究 錦織 千佳子

今回の研究で私が意外だったのは、スフィンゴシンキナーゼ阻害剤 DMS による B16 細胞内メラニン量と細胞培地中のメラニン量の相関である。はじめは DMS による B16 細胞内メラニン量増加は、メラニン産生系の亢進であろうと考えたが、実験の結果は否定的であった。そこで研究は

すこし行き詰まったが、あるとき通常は気にしない培養液の色が DMS 添加群と非添加群で異なることに気づき、DMS の細胞内メラニン量制御作用はメラノソームの凝集・拡散および細胞外への分泌調節によるものと推定するに至った。調べてみると培養色素細胞の培地中へのメラニン

分泌の研究は案外少なく、さらに培地中の黒色物質の同定も行われていないことがわかった。メラニン分泌機序や培地中の黒色物質について国内のメラニン研究者に尋ねてもみたが、やはりほとんど研究されていないということで、メラニン分泌現象において研究すべきことがまだまだ多く残されていると思われた。今後、本研究で得られた仮説、すなわち「スフィンゴシンキナーゼはメラノソーム膜のスフィンゴシンからのスフィンゴシン 1-ホスフェート産生を制御することによりメラノソームの凝集・拡散・細胞外

への分泌を調節する」ことを検証する過程で、メラニン分泌現象に関する知見を集積させたいと考えている。さらに、本研究の延長として、色素細胞から周囲の角化細胞へのメラニンの受け渡しの調節機序にスフィンゴシンキナーゼの関与が証明されれば、これを利用した全く新しい観点からの皮膚色調節に関するコスメトロジーのツール誕生も夢ではないと考えている。

(神戸大学大学院医学系研究科応用分子医学講座皮膚科学)

平成 18 年度 研究助成

「きれい好き」の体を覆う、薬が効かない細菌たち

小林 一三

病原性大腸菌に端を発して、狂牛病、炭疽菌、SARS、鳥インフルエンザ、はしか等のトピックが続いたことで、感染症の脅威が広く再認識されるようになってきた。実際、細菌感染は我が国の死因の大きな部分を占めている。高齢者の最期は、細菌感染による肺炎という場合が多い。年に数万の死亡者を出す胃がんも、その原因はピロリ菌らしい。

「細菌は抗生物質で退治できる」というかつての楽観は、抗生物質が効かない耐性菌の世界中での蔓延で吹っ飛んでしまった。皮膚や鼻の中を覆っているブドウ球菌も、今では多くが薬剤耐性菌である。以前は「病院で耐性菌に感染されてしまう」ことが問題になっていたが、今では病院外でも頻繁に耐性菌が見つかる。

薬剤耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) のゲノム解析に参加した時、「毒素のデパート」ともいうべきたくさんの病原因子群、そして薬剤耐性遺伝子が、「動く遺伝子の塊」に乗っている事が印象に残った。今では 13 株の黄色ブドウ球菌の全ゲノム配列が解読されていて、それらを比べると、病原遺伝子と薬剤耐性遺伝子がどのようにして細菌に入り込んだか、進化していったかを追跡できる。PNAS 誌最新号 (2008 年 1 月 29 日) によると、アメリカ中から市中感染型 MRSA の 10 株を集めてゲノムを解読したとこ

ろ、同じ祖先から最近多様化した一族とわかったという。

薬剤耐性菌が増えた原因が薬剤の濫用である事について、ほとんどの研究者の考えは一致している。いったんできた薬剤耐性変異型遺伝子は、様々なルートで別の細菌に動いていく。その薬剤にさらされると、この変異型遺伝子を持った細菌だけが生き残ってくる。どんな薬剤でも、濫用すれば、その薬剤の耐性菌を増やす事になる。そのような事態を避けるには、「効く事が確かな時だけ薬を使う」ようにするしかない。そこで、教室では「細菌の薬剤感受性を調べてから抗生物質を処方せよ」と教えられるわけだが、臨床の現場ではほとんど徹底されていない。

病院よりもっと深刻な問題は、日常生活にあふれる抗菌グッズにあるかもしれない。石鹸、肌着、靴下から、家電、文房具に至るまで、「抗菌」が氾濫している。ある種の抗菌剤は、異物排出ポンプを活性化する変異を持つ細菌を選択する。細菌がこの変異型遺伝子を獲得していると、色々な抗生物質で攻めても、どれもたちまち排出されてしまう事になる。清潔好きを自認して抗菌剤漬けの環境を作り、自分の肌を薬剤耐性菌だらけにしている人は、いざ切り傷などでそれらの細菌に感染された時、どうすればいいのだろうか？

(東京大学新領域創成科学研究科および東京大学医科学研究所)

色素細胞研究の多様性を支援するコスメトロジー

柴原 茂樹

色素細胞研究は、美白、日焼け、毛包の維持（白髪、脱毛）、網膜変性疾患（先進国における最も多い成人失明の原因）、老人性難聴などの身近な問題から悪性黒色腫の治療など幅広い領域を包含する。高齢化社会を迎え、色素細胞研究は今後益々重要になると考えている。

メラノサイトの分化に重要な転写因子 *Mitf* の変異マウスである *bw* マウスは、全身のメラノサイトを欠損するため、白毛、難聴、黒眼（ほぼ正常な網膜）を呈する。我々は *bw* マウスが低酸素、及び高炭酸ガス吸入刺激に対して過剰な換気応答を呈することを発見した。特に、睡眠時の呼吸の維持には血液炭酸ガス分圧が重要であり、高炭酸ガス吸入刺激に対する *bw* マウスの換気異常は驚きであった。これまで、このような換気応答異常を呈するマウスの報告は皆無である。すなわち、メラノサイト、あるいは *Mitf* の未知の標的遺伝子が中枢性の化学受容機構に関与している可能性が考えられた。よって、我々の *Mitf* 研究はコス

メトロジーが支援する「精神、文化に関する分野」とも密接に関連する。さらに、睡眠の調節に関与するリポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素（L-PGDS）が、皮膚ではメラノサイトに限局して存在する事実は重要である。メラノサイト由来の L-PGDS に未知の生理機能が示唆される。これらの知見は美肌の維持には良好な睡眠が重要という経験則に科学的な根拠を与えるものである。高齢化が進む我が国においては、快適に眠り、美しく老いるという願望は、すべての国民の願いであり、本研究成果は良好な QOL の達成にも貢献する。

Mitf の換気応答への関与という予想外の成果を得ることができた。このように、一見異分野の研究を支援していただいたコスメトロジー研究振興財団に深く感謝すると共に、貴財団のさらなる発展を祈念する。
(東北大学大学院医学系研究科細胞生物学講座分子生物学分野)

コスメトロジー研究の難しさ

町田 和彦

20 年前の早稲田大学赴任時より適度の運動習慣やストレスによる好中球のプロドウ球菌貪食能と活性酸素産生能や NK 細胞の変化などによる非特異免疫能の変化を当初は動物実験で、後には高齢者の健康増進運動で明らかにしてきた。しかし、介護保険制度の始まりは本来目指した在宅介護の推進とは逆に施設介護に殺到する結果となった。そこで、最近介護施設入所者に対する心身の健康増進という立場からの介入研究を始めております。

ちょうど本研究助成を頂いた時でしたので、初めは中国でのクリームを用いたハンドマッサージを計画し、かなり苦勞して実施したのですが、言葉の行き違いや測定上の問

題などなどがあり、思うような結果が出ませんでした。そこで日本の特別養護老人ホームのご協力をいただき、今回の結果を出すことになりました。この研究はネイルケアの女性入居者に与える影響を見たのですが、施術者の研究者らしからぬ服装や言葉遣いが施設の従業員や利用者逆に良い印象を与え、その結果われわれも想像しなかったほどの良い結果になった気がします。考えて見ますとお化粧というのかなり心理的要素も加味された影響であるような気がしますので、この結果は妥当なものだと思っております。

(早稲田大学大学院人間科学系研究科健康福祉科学研究領域)

平成 17 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

石丸 久美子

私が化粧品に関する研究を本格的に始めたのは、フランスの大学院に留学していた頃である。今考えれば、その時に日仏の化粧を研究対象にしようと思ったのは、やはり、留学中に体験し、感じた様々な文化的違い、驚きが影響しているのだと思う。まず大学に通い始めて気付いたのは、フランス人学生は皆とても薄化粧ということだった。そしてアイライナーだけは濃い学生が多かった。私も日本式にファンデーションを塗って行くと不自然な気がして、段々と薄化粧になっていった。その他、大学で驚いたのは、春先や秋でも急に暖かい日があると、学生達は芝生にノースリーブで寝転がって日向ぼっこ、日焼けを始める。家の近所の公園では、夏には、水着になって日焼けをしている人がいて驚かされた。フランス人の日光に対する執念はこれ程までにすごいのだ。

フランスの美容院も衝撃だった。タオルを顔に掛けるといふ配慮などなく、ざぶざぶと洗い、お湯（いや、冬でも水で冷たいこともあった。）が耳に入るのも気にしない。日本の美容院の丁寧さが身に沁みだ。ある時は、「はい、立ち上がって。」と言われて驚いたこともあった。長髪だと立ち上がった方が切りやすいというのだ。

私は大学で日本語の非常勤講師をしていたが、授業をしながら、学生の化粧、ファッションを観察するのも面白かった。何故なら、日本語を学びたい学生には漫画や日本の若者文化好きの学生が多く、ゴシック風の化粧、服装をしている学生が数名いたからだ。また、いつも痛そうだなと思ったのは、眉の上や舌にピアスをしているフランス人学生が結構いたことであつた。フランスでは、刺青もファッションとして驚くほど流行している。でも、テレビ番組では、流行に乗って入れたものの、後になって後悔する人が増えているというルポルタージュをやっていた（入れるのは安い、消すのには多額の費用が必要だという。結婚したカップルの約半数が離婚する国なのに、彼女の名前を刺青する人がいる不思議。）。今でも時々、偶然町で見かけた、肩に「猪」（フランスは今、空前の漢字ブームなのだ。）という刺青を入れていた、ずいぶん太めの女性が、今頃後悔していないだろうかと思出す。

今後、このような異文化間の衝撃を感じた当初の心を忘れずに、学術的な比較文化研究を続けていきたい。（大阪大学言語文化学博士、ナント大学言語科学科博士課程）

平成 17 年度 研究助成

コスメトロジー雑感 ～香道への誘い～

椎名 さやか

まず、私達の研究課題に対し助成頂いたことをお礼申し上げます。民間研究助成金の申請は今回が初めてのことでしたので、採択のご連絡を頂いた時には、共同研究者と共に喜びまた驚いたことを今でも鮮明に覚えています。さて、私達の研究では、“香道”という日本独自に発展してきた古典的伝統芸道を実験課題に用いましたが、私自身この実験を共同研究者から持ちかけられるまで、実は香道というものの存在すら知りませんでした。日本には“道”という文字の付く長い年月の修練により会得する芸道がいくつかあります。みなさんも柔道、茶道は学生時代に体育の授業や部活動で一度は経験したことがあることと思います。しかし、香道は他の芸道と違い日本人でもなじみが薄いものだと思います。そこでこの場をお借りして香

道について少しご紹介したいと思います。

香道は一定の作法に基づき香木を焚き、その香りを日常から離れた静寂の世界で楽しむもので、6世紀に日本へ渡来し、室町時代に体系化されたとされています。香木は、単純に香りを持った木というわけではなく、熱帯雨林で倒木にバクテリアが付着し長い時間をかけて樹脂化されたものです。「香の十徳」と呼ばれる、“癒し”をもたらす精神的・肉体的作用が昔から伝えられているようで、現在では初心者を対象とした一日体験教室も実施されており、（実験を始めるにあたり私も参加してきました）、香席の独特な雰囲気や簡単に体感することができます。私は組香と呼ばれる香席に参加しました。組香はまず数種類の香り（試香）を聞きその香りを覚えた後、再度香木を聞き（本香）

その香りが試香時のどの香木と同じかを答えるという少しゲーム感覚のあるものでした。香席はただ香木を聞くというだけではなく、詩歌が詠まれたり、硯を磨り筆で文字を書く場面もあったりと、他の芸道も取り入れられています。所要時間2時間弱の短い香席でしたが、ピリッとした緊張感の中にゆったりとした時を感じ、またかすかな香木の香

りに集中し嗅覚を研ぎ澄ます、このような経験は日常でなかなかできるものではありません。みなさんも機会がございましたら是非一度体験してみてください。

最後になりましたが、今後益々のコスメトロジー財団の発展をお祈りいたします。

(理化学研究所脳科学総合研究センター)

平成 18 年度 研究助成

雑感

八田 武志

今回の助成の対象課題である高齢者の化粧行動に関心を抱くようになったきっかけは、Y町の住民検診に参加するようになった初年度のことである。北海道でおいしいものが食べられるとの勧誘に乗った5名の院生を連れて参加し、各人が記憶検査、注意検査という具合に担当を決めて対象者に巡回してもらう方式で実施した。ところが、Y町の住民検診には1日で400人が参加する規模という予想以上の大がかりなもので、高次脳機能検査と銘打ったブースには、希望者のみとしたにもかかわらず長蛇の列が生まれるという事態になってしまった。住民の受診希望者に検査項目を巡回してもらう、人間ドックなどで採用されている検診方式の採用には問題があったのである。一つの検査で長引く人がいると、その次の検査に移れないために長い順番待ちが出来てしまったのである。順番待ちの列が長くなると待っている住民のイライラも検査者に伝わり出すという具合で、検査者の院生は昼飯も十分にとれない、ストレスフル

な状態となってしまった。当然、院生からの評判は悪かった。次年度からは各検査者が検査バッテリーの項目を一通りやる方式に変更し、それ以後検査の効率は上がり、検査者である院生の評判も改善したため、その後院生の参加者は増加したという経緯がある。初年度の方式ではすべての検診対象者に出会うが、翌年度以降のやり方では一部の受診者にしか出会わないという違いがある。

前置きが長くなったが、初年度にすべての受診者に出会ったお蔭で、高齢者の化粧行動に関心を抱くようになったのである。80歳を超えて化粧をきちんとして香水の香りが漂う女性は化粧気のない女性よりも検査結果の成績が優れる印象を持ち、この直観が今回の研究課題につながった。

言わば効率の良くなかった検査方式が研究のアイデアを生んだわけで、何事にも効率だけを追求することは考えものであることを改めて思い知った次第である。

(関西福祉科学大学健康福祉学部)

平成 18 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

塩田 真友子

本研究助成において、電車の中といった人前での化粧行動に関する大学生の意識について調査・検討を行なった。このような行為は、電車の中で大きな声で話したり、通路に座り込んだりするという行為とは異なり、実害は殆ど無い。にも関わらず、周囲にあまり良い印象を与えるものではない。「何となく目につく」、「何となく嫌な感じがする」と感じる方が多いのではないだろうか。しかし、行為者本人はその行為をどのように捉えているのだろうか。勿論、時間が無かったため仕方なく、という場合もあるだろう。

これはあくまで私の個人的経験・感想に過ぎないが、電車の中で友達同士で騒ぎながら化粧をしている高校生グループを見た時、彼女達の真の目的は化粧することそのものではなく、それがコミュニケーションの手段としての役割を果たしているように見えた。同じ行為を共有することによりグループ内のコミュニケーションを円滑にしているように見えたのである。

今回は大学生のみを調査対象者としたが、高校生や年配の世代を対象に調査を行うことができれば、より興味深い

結果が見出されるかもしれない。また、今回は質問紙による調査を行ったため、設定した内容についてのみの検討しか行えないという限界があった。面接法などの他の手法によるアプローチを行えば、新たな見解が得られるかもしれ

ない。

最後になりましたが、本研究を採択していただき助成を賜りましたコスメトロジー研究振興財団に心より感謝申し上げます。（岡山大学大学院社会文化科学研究科）

平成 18 年度 国際交流援助

海外交流コスメトロジーとの結び付きに関する雑感文

大野 泰雄／小島 肇

去る平成 19 年 8 月 21～25 日にかけて、第 6 回国際動物実験代替法会議（6th World Congress on Alternative & Animal Use in the Life Science）がホテルイースト 21 東京（東京都江東区）にて開催された。34 カ国、1 地域から 1000 名を超える参加者が東京に集い、過去最大の盛況な会議となった。参加者は 47 に及ぶシンポジウムや市民公開講座などの多彩な科学プログラムで研鑽を積み一方、ウエルカムパーティに先立ち企画された動物慰霊祭、夏祭りを想定した親睦会などで日本や東京の夏を満喫した。また、アジアで初めて開催された会議ということもあり、中国、韓国、京都でもサテライトシンポジウムが開催され、総勢 300 名以上が集った。本会議では、「動物実験代替法の促進、3Rs（replacement（代替法の利用）、reduction（動物利用数の削減）、refinement（苦痛の軽減）

のグローバリゼーション並びに科学者と動物福祉活動者との対話」をメインテーマに、化粧品のための EU 域内での動物実験が原則禁止される 2009 年に向けての「代替法のバリデーション・行政の受け入れ」に関する新たな研究開発等についての討論等が行われた。

国際協調、動物実験とコスメトロジーの 3 つのキーワードを結ぶ海外交流は、もはや留めきれない潮流になりつつある。動物実験の禁止は EU 域内の問題であり、本来は国際問題ではない。しかし、経済や文化のグローバル化、国際協調、相互交流を考慮すれば、日本だけ（医薬部外品）規制があるからという理由で動物実験を継続することはできない。今回の会議は日本の動物実験代替に対する前向きな姿勢を示し、欧米の研究者や愛護団体関係者がそれぞれ評価したと考えている。

付 録

●
事業報告書（平成19年度）

役 員



事業報告書

(自平成19年4月1日 至平成20年3月31日)

《研究助成等の選考関連》

2007	5	7	公募開始	全国265ヶ所の大学・病院・研究機関等、関係学術雑誌8誌、当財団HP他2HPに掲載
	7	2	公募締切り	応募数86件
	9	4	選考委員会(分科会1)	素材、物性に関する分野の選考
	9	11	選考委員会(分科会2)	生体作用、安全性に関する分野の選考
	9	6	選考委員会(分科会3)	精神、文化に関する分野の選考
	9	21	本選考委員会	各分科会の結果を総合的に判断して研究助成23課題、国際交流援助2課題を選考
	11	20	表彰贈呈式	記念講演:「顔の美の基準と科学的理論」 クリニック宇津木流 院長 宇津木 龍一 先生
	11	20~	助成課題の公表	当財団HP他関係学術雑誌に掲載
2008	2	中旬	持ち回り企画委員会	平成20年度の研究助成課題選考に関して

《理事会関連》

2007	6	18	通常理事会	平成18年度事業報告ならびに収支決算報告、会計処理規則の改定、株主としての議決権行使について、報告事項
	11	20	通常理事会	平成19年度(第18回)研究助成者等の承認、平成20年度事業計画及び予算案の承認

《評議員会関連》

2007	6	18	通常評議員会	平成18年度事業報告及び収支決算報告、報告事項
	11	20	通常評議員会	平成19年度(第18回)研究助成者等の承認、平成20年度事業計画及び予算案の承認

《その他》

2007	3	末	財団活動の情報更新	当財団HPへ平成19年度事業計画を記載
	6	末		当財団HPへ平成18年度事業報告を掲載
	12		コスメトロジー研究報告	「コスメトロジー研究報告」15号の概要を当財団HPに記載

第 18 回 研究助成を受けられたかたがた

(J：一般研究助成、H：国際交流援助)

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
J-07-01	ビタミンEの高機能化とさらなる有効利用を目的とした新規化粧品素材の酵素・化学複合的分子創製	酵素化学 合成化学 生物工程学	大分大学准教授 下田 恵
J-07-02	皮膚の炎症反応・炎症後組織修復における血小板の役割の解明と血小板機能制御による治療法の開発	皮膚科学 皮膚免疫学 薬理学	京都府立医科大学大学院 医学研究科皮膚科学准教授 加藤 則人
J-07-03	紫外線の皮膚慢性毒性に対するサンスクリーン剤の防御効果を高速・高感度に評価する方法の開発	皮膚科学 紫外線生物影響	東北大学大学院 医学系研究科助教 池畑 広伸
J-07-04	新しい生体親和性材料としてのペプチド性人工コラーゲングル	ペプチド・蛋白質化学 高分子化学 細胞生物学	早稲田大学理工学術院 教授 小出 隆規
J-07-05	低分子量G蛋白質Rab27Aによるメラノソーム輸送制御メカニズムの解明	メラノソーム輸送に関する分子の同定・解析	東北大学大学院 生命科学研究所助教 伊藤 敬
J-07-06	触動作の特徴抽出による化粧品の使用感評価	バイオメカニクス 感性工学 サイコロロジー	大阪大学大学院工学研究科 環境・エネルギー工学専攻助教 秋山 庸子
J-07-07	化粧品素材としての生体安定性を有する発色ナノ粒子含有液の開発	材料工学 光電子工学 反応化学、分析化学	東京電気大学教授 平栗 健二
J-07-08	遺伝子改変マウスを用いたヒスタミンの接触性皮膚炎に与える影響の研究	分子生物学 薬理学 薬学	東北大学大学院 工学研究科教授 大津 浩
J-07-09	非線形光学現象を利用した真皮コラーゲン分布 <i>in vivo</i> 可視化法の開発	生体計測学 レーザー応用光学 皮膚組織学	大阪大学大学院 基礎工学研究科教授 荒木 勉
J-07-10	全断眠または連続した部分断眠によるストレスマーカーの変動と血流量／血液量／血流速度の変化との関連について	睡眠科学	大阪大学保健センター 特任研究員 菅沼 伸盛
J-07-11	樹状細胞分子SHPS-1による皮膚免疫制御とその皮膚アレルギーへの治療的応用	免疫学 皮膚科学 生化学	群馬大学 生体調節研究所教授 的崎 尚
J-07-12	リン脂質代謝酵素ホスホリパーゼA2群の皮膚における発現・機能と脂質メタボロミクス	基礎生物学 生化学 分子生物学	（助）東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所副参事研究員 村上 誠
J-07-13	経済開放政策以降のインドにおける中間層の増加と化粧品の消費動向の変化に関する研究	化粧と文化	東北大学大学院文学研究科 専門研究員 岡光 信子
J-07-14	ミルクタンパク質からなる無機有機ハイブリッドナノスフェアの創製	高分子化学 天然高分子 無機有機ハイブリッド ナノ粒子	慶應義塾大学理工学部応用化学科 准教授 藤本 啓二
J-07-15	皮膚表皮形成に関わるタンパク質架橋接着反応の分子基盤	タンパク質に関する 細胞生物学 生化学	名古屋大学大学院 生命農学研究科准教授 人見 清隆

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
J-07-16	両親媒性物質との分子複合体及びイオン交換体形成を利用する新規機能性ケミカルピーリング剤の開発	製剤学 化粧品科学	新潟薬科大学薬学部 製剤学研究室講師 飯村 菜穂子
J-07-17	正常肌およびバリア機能異常肌における角層コルネオデスモゾーム分解過程の研究	表皮各層の細胞 接着機構の形態 的生化的解析	国立大学法人旭川医科大学准教授 山本 明美
J-07-18	オリブ二次代謝産物の微生物変換によって得られる新規抗酸化物質の物性解析	天然物有機化学 応用酵素化学 応用微生物学	岡山大学大学院 自然科学研究科教授 神崎 浩
J-07-19	細胞内シグナルPTEN/PI3キナーゼ経路による白髪化の制御	分子生物学 生化学	秋田大学教授 鈴木 聡
J-07-20	Wntシグナルを標的とした育毛促進作用をもつ天然成分の探索	天然物化学	千葉大学大学院 薬学研究院助教 大槻 崇
J-07-21	アジア人の「化粧」にみられる身体観、身体表象とその変容についての研究 ー身体装飾のアジア的伝統と〈化粧のグローバル化〉のはざまでー	化粧と文化 (化粧や身体装飾と 精神文化構造の連関)	東北大学大学院 国際文化研究科教授 山下 博司
J-07-22	香りが記憶や情動と結びつく際の脳内神経機構に関する研究	神経生理学	独立行政法人産業技術総合研究所 研究員 梶原 利一
J-07-23	化粧品の防腐剤低含有率化を目指した除菌材料の開発	生体高分子化学 ペプチド科学 生物化学	九州共立大学講師 栞原 順子
H-07-01	動物実験代替法の開発促進と動物福祉の向上	Federal Institute for Risk Assessment (ドイツ) Director and Professor at the BfR Horst Spielmann 受入責任者 国立医薬品食品衛生研究所副所長 大野 泰雄	
H-07-02	C. elegansを指標とした長寿命化作用をもつ化合物の検索と作用機構の解析	ペラデニア大学、医学部講師 Senarath B. P. Athauda 受入責任者 東京薬科大学大学院生命科学研究科教授 井上 英史	

(敬称略・受付順)

※第1回、17回の研究助成課題は、それぞれ、(1)「化粧と文化」(山下博司)と(2)「動物実験代替法の開発促進と動物福祉の向上」(大野泰雄)である。

役員

平成 20 年 3 月 31 日現在

理事長	小林禮次郎	(株)コーセー取締役相談役
専務理事(常勤)	有本 亨	
理 事	磯邊 律男	(株)博報堂相談役
	宇佐美昭次	早稲田大学名誉教授
	内山 充	有限責任中間法人薬剤師認定制度認証機構理事長
	小林 保清	(株)コーセー代表取締役会長
	新村 嘉也	高砂香料工業(株)取締役相談役
	高橋 久	帝京大学名誉教授
	西川 武二	慶応義塾大学名誉教授
	花輪 隆昭	昭和館館長
	廣部 雅昭	静岡県学術教育政策顧問
	牧野 利孝	日本化粧品工業連合会専務理事
監 事	小田倉正典	公認会計士
	黒田 節哉	弁護士
評議員	石倉 伸治	(株)コーセー常務取締役
	上野 芳夫	元東京理科大学薬学部教授
	緒方 宏泰	明治薬科大学教授
	北原 文雄	東京理科大学名誉教授
	近藤 保	東京理科大学名誉教授
	齊藤 勲	(財)日本食品化学研究振興財団専務理事
	多島 新吾	防衛医科大学校教授
	長野 哲雄	東京大学大学院薬学系研究科教授
	西岡 清	横浜赤十字病院院長
	野呂 影勇	早稲田大学名誉教授
	溝口 昌子	聖マリアンナ医科大学名誉教授
	宮崎 榮三	東京工業大学名誉教授
	山崎 幹夫	新潟薬科大学学長

(専務理事以外は全員非常勤)

*本財団についてのお問い合わせは下記に
お願いいたします。

財団法人 コスメトロジー研究振興財団

〒104-0032 東京都中央区八丁堀一丁目9番9号
電話 03 (3206) 7721

コスメトロジー研究報告 Vol.16/2008

非売品

2008年9月1日発行

編集責任者	有本 亨
発行	財団法人 コスメトロジー研究振興財団 〒104-0032 東京都中央区八丁堀一丁目9番9号 電話 03 (3206) 7721
制作	エイエム企画 〒170-0013 東京都豊島区東池袋三丁目15番2号 電話 03 (3590) 5375
印刷	太陽印刷工業

表紙デザイン監修：(株)コーサー 商品デザイン部デザイン室