# ごあいさつ

この度コスメトロジー研究振興財団として、21 冊目の研究報告書を刊行いたしました。

設立以来 20 年以上に亘って、化粧品科学及び関連分野に貢献する研究テーマに対し助成活動を滞りなく継続できたことは、多くの関係者の皆様のご理解ご協力によるものと、改めて感謝申し上げる次第でございます。

当財団の助成領域につきましては、医学、化学、薬学、生理学、心理学、文学、社会学など多岐に渡る分野の研究者のお力添えにより、コスメトロジーという分野が発展してきたといっても過言ではありません。助成させていただいた研究テーマは、新素材設計、ライフサイエンス、化粧心理、文化論など多種多様であり、化粧品学の発展に有用な貢献ができたと考えております。また当財団の活動がその社会貢献の一助になっていることを幸いに思っております。

今回の報告書では、平成 22 ～ 23 年度に助成を受けられた方の中から26 名の方の研究成果を掲載いたしました。

素材、物性に関する分野では、素材の独創性に加え、有用性を解明したテーマが顕著であると思われます。

生体作用、安全性に関する分野では、老化関連研究、安全性に関する基礎研究などユーザー視点の研究が多くみられました。

精神、文化に関する分野の研究につきましては、心理学、文化研究の観点から化粧の本質に回帰する示唆的な内容であったと考えています。

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、皆様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 25 年 7 月

公益財団法人 コスメトロジー研究振興財団

理事長　小林　保清

# 目　次

■ごあいさつ

■研究報告

Ⅰ．素材、物性に関する分野

・加齢臭成分のバイオマーカーとしての応用研究 …… 4
名古屋大学大学院生命農学研究科　内田　浩二

・肌の透明感を評価する測定手法および測定システムの開発 …… 9
木更津工業高等専門学校機械工学科　小田　功

・体液中グルコースがトリガーとなり創傷部位を被覆･修復する新規モイストヒーリング剤の開発 …… 14
大阪大学基礎工学研究科　境　慎司

・毛包器官培養法を用いた育毛促進作用を持つ天然成分の探索 …… 19
秋田大学大学院医学系研究科分子機能学・代謝機能学講座　杉山　俊博

・米タンパク質由来チロシナーゼ阻害ペプチドの精製と同定およびその美白効果 …… 24
新潟大学工学部機能材料工学科　谷口　正之

・ウィントシグナルを制御する天然由来化粧品素材，有効成分の探索 …… 31
千葉大学大学院薬学研究院　當銘　一文

・食用きのこ成分のメラノーマ細胞活性に及ぼす影響 …… 36
東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科食品生産科学科部門　長阪　玲子

・新規紫外線障害防護剤の開発･評価 …… 40
九州大学大学院薬学研究院　山田　健一

･励起状態近接効果を利用した新規UVA－UVBハイブリッド型サンスクリーンの開発 …… 45
群馬大学大学院工学研究科応用化学・生物化学専攻　吉原　利忠

・両親媒性多糖デンドリマーを保護剤とした金・白金ナノコロイドによる活性酸素消去活性 …… 50
奈良女子大学大学院人間文化研究科　吉村　倫一

Ⅱ．生体作用、安全性に関する分野

・皮膚 ABC 膜輸送体に及ぼす化粧品添加物の影響 …… 56
金沢大学医薬保健研究域薬学系分子薬物治療学研究室　加藤　将夫

・新たな皮膚タイトジャンクションバリア・角質層バリア機能評価方法の開発 …… 61
慶應義塾大学医学部皮膚科学教室・総合医科学研究センター　久保　亮治

・皮膚マトリクスメタロプロテアーゼ（matrix metalloproteinase：MMP）-9 遺伝子
過剰発現マウスの作成とその解析 …… 65
帝京大学医学部ちば総合医療センター皮膚科　小林　孝志

・角層細胞間脂質の組成制御による膜透過性ペプチドの経皮吸収に関する研究 …… 71
千葉科学大学薬学部生命薬科学科　坂本　一民

・オリゴアルギニン固定化高分子と生体膜との相互作用の科学的検証 …… 81
摂南大学薬学部薬剤学研究室　佐久間　信至

・脂質を標的とした新しい皮膚遅延型アレルギー応答の機序解明と制御 …… 89
京都大学ウイルス研究所　杉 田　昌 彦

・カイコを用いた化学物質の毒性評価方法の確立 …… 92
東京大学大学院薬学系研究科微生物薬品化学教室　関 水　和 久

・新規ライブイメージング法を用いたメラニン色素輸送の解析 …… 100
京都大学理学研究科生物科学専攻動物学系　田 所　竜 介

・色素系化合物の光毒性を抑制する新たな手法の開発 …… 103
東京大学大学院薬学系研究科　寺 井　琢 也

・デコイ・メラノソームを用いたメラノサイトからケラチノサイトへのメラニン移送阻害の研究 …… 109
名古屋市立大学大学院薬学研究科　平 嶋　尚 英

・皮膚に存在する環境センサー TRPV チャネルを介した保湿関連物質の分泌制御機構の解明 …… 114
愛知学院大学薬学部薬効解析学講座　村 木　克 彦

**Ⅲ．精神、文化に関する分野**

・分子の物理化学的特徴に基づく複合臭の快適性の予測 …… 118
東京大学先端科学技術研究センター　神 崎　亮 平

・自己顔に対する意識に関する研究 …… 122
北海道大学病院咬合系歯科矯正歯科　日下部　豊寿

・近代日本コスメトロジーの普及と展開をめぐる一考察　～美容家・藤波芙蓉の分析を通じて …… 128
奈良女子大学生活環境学部　鈴 木　則 子

・仮想呈示と塗布流動解析により化粧品使用感を解析するバーチャルサイコレオメトリーとその応用 … 132
首都大学東京　水 沼　　博

・健康成人女性の化粧行動における生理心理学的研究 ―ストレスホルモン系、性ホルモン系への影響― … 138
京都府立医科大学大学院医学研究科免疫学　渡 邉　映 理

**■記念講演**

・第 23 回表彰・贈呈式記念講演
「グローバル化の中の日本的強み ―『日本的なモノ』から『日本的であること』へ―」 …… 147
明治大学国際日本学部教授　小笠原　　泰

**■コスメトロジー研究雑感** …… 167

**■付　録**

**事業報告書** …… 183
**第 23 回研究助成を受けられた方々** …… 184
**役員一覧** …… 186

# 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

# 加齢臭成分のバイオマーカーとしての応用研究

名古屋大学大学院生命農学研究科
内田　浩二

*Trans*-2-nonenal is an unsaturated aldehyde with an unpleasant greasy and grassy odor endogenously generated during the peroxidation of polyunsaturated fatty acids. 2-Nonenal covalently modified human serum albumin through a reaction in which the aldehyde preferentially reacted with the lysine residues. Using high performance liquid chromatography with on-line electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC/ESI/MS/MS), we established a highly sensitive method for detection of a 2-nonenal-histidine adduct and confirmed that the adduct was indeed formed during the lipid peroxidation-mediated modification of protein *in vitro*.

## 1．緒　言

脂質過酸化反応により、多岐にわたるアルデヒド類が生成することが、これまでによく研究されている。脂質過酸化の初期産物である脂質ヒドロペルオキシドは、遷移金属存在下においてアルコキシラジカルを経て炭素－炭素結合開裂を起こす。その結果、エステル化されていない主に炭素数３－９の脂質アルデヒドと、末端がエステル化されたアルデヒドが生成される。脂質アルデヒドには、ケトアルデヒド、n-アルカナール、2-アルケナール、4-ヒドロキシ-2-アルケナールのような脂質アルデヒドが含まれ、それらは生体内のタンパク質の修飾に関する重要な活性種であると認識されている。これらの脂質アルデヒドは、細胞機能を担う生体分子やDNAへの変異導入により細胞ダメージを蓄積させるものと考えられている。また、LDL中のapo Bへのアルデヒドの付加は、粥状動脈硬化症を引き起こすメカニズムであるマクロファージの泡沫細胞への変化を誘導する。

揮発性のアルデヒド化合物である2-ノネナール（Fig. 1）は特有の芳香性を持ち、中年期以降のヒトにおいてその生成が加速されることから“加齢臭”として知られている[1)]。2-ノネナールは多価不飽和脂肪酸から脂質過酸化反応を介して生成されることが報告されており、ヒトの体臭としての 2-ノネナールも脂質過酸化反応を介して脂肪酸（パルミトレイン酸）から生成されるものと推定されている。また、2-ノネナールは品質劣化したビールや長時間加熱したリノール酸を豊富に含む食用油からも検出されている。一方、2-ノネナールはα,β-不飽和アルデヒド構造を有することから、タンパク質などの生体成分と反応性を有する。これまでに、グリセルアルデヒド3-リン酸脱水素酵素やチロシン脱リン酸化酵素類の酵素活性低下などのタンパク質との反応性に関する報告もなされているが、その化学作用の詳細は不明である。本研究課題では、加齢臭2-ノネナールがどのような脂肪酸を起源として生成されるのかを解明し、その生成抑制に至る技術方法の開発を目的に、2-ノネナールのタンパク質との反応性を詳細に検討するとともに、2-ノネナール修飾タンパク質を高感度に検出する測定系の開発を目的として開始された。初年度では、加齢臭成分の一つである2-ヘキセナールについて、その修飾タンパク質に対するモノクローナル抗体の開発を行い、抗体が認識する2-ヘキセナール-ヒスチジン付加体の化学構造を解明し、それらの付加体のバイオマーカーとしての有用性について検討した。最終年度では、より高感度に定量を行うことが可能な液体クロマトグラフィー－タンデム型質量分析装置（LC-MS/MS）を用い、2-ノネナール修飾タンパク質の加齢臭マーカーとしての意義を見いだすことを目的に、2-ノネナール-ヒスチジン付加体（Fig. 2）の高感度検出法の開発を行った。

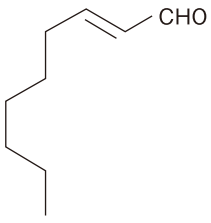



Fig. 1　2-ノネナールの化学構造



Study on senescent product as a biomarker
Koji Uchida
Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University

## 2．方　法

### 2.1　2-ノネナールとヒスチジンの反応

⑴　2-ノネナール（10mM）とヒスチジン（10mM）をリン酸バッファー中（pH7.4）で37℃、24時間反応させた。

⑵　反応後、１Ｎの NaOH 水溶液を反応液の10分の１量加

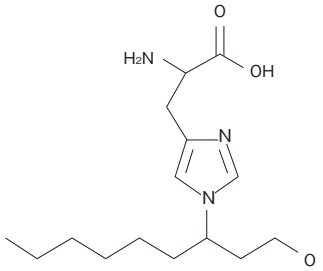



Fig. 2　2-ノネナール-ヒスチジン付加体の化学構造

え、塩基性とした後に2-ノネナールに対して大過剰の$NaBH_4$を加え、室温で3時間還元処理を行った。

(3)　還元処理後、1NのHClを加え、中和した後HPLC分析を行った。不溶性の塩が析出していた場合、フィルター濾過した後に分析を行った。

(4)　逆相 HPLC分析条件

Column：Develosil C30-UG-5（8 $\phi$ 100mm）

Flow rate：2.0 ml/min

Detection：200 − 650nm

Eluent：A，$H_2O$/0.1%TFA；B，acetonitrile/0.1% TFA

Gradient：

| Time（min） | 0 | 40 |
|---|---|---|
| A（%） | 100 | 34 |
| B（%） | 0 | 66 |

## 2.2　酸加水分解

(1)　ミクロチューブにサンプルを加え、遠心エバポレーターにより乾固した。

(2)　加水分解用チューブに6N HCl を少量注ぎ、サンプル入りミクロチューブを入れた後、真空ポンプにより減圧条件とした。

(3)　110 ℃の乾熱器に入れ、24 時間加水分解した。

(4)　加水分解終了後、ミクロチューブ内に残ったHClをデシケーターにより留去した。

## 2.3　LC-MS/MS解析

(1)　加水分解後サンプルをMiliQに溶解し、LC-MS/MS用サンプルとした。

(2)　Retention time、fragmentationを確認した後、Cone potentialおよびCollision energyの最適化を行った。

(3)　LC-MS/MS分析条件

Injection：10µl

Cone potential：35 eV

Collision energy：25 eV

Ion mode：$ESP^+$

Monitored ion：*m/z* 298 → 110

Column：Develosil C30-UG-5（2.0/100）

Flow rate：0.3 ml/min

Solvent A：$H_2O$/0.1% HCOOH

Solvent B：acetonitrile/0.1% HCOOH

Gradient：

| Time（min） | 0 | 2 | 6 |
|---|---|---|---|
| A（%） | 98 | 98 | 5 |

## 2.4　タンパク質と2-ノネナールの反応

(1)　BSA（1.0mg/ml）をリン酸バッファー（pH 7.4）中で37℃で2-ノネナールと反応させた。時間依存的な測定では1mM 2-ノネナールと0−24 時間反応させ、2-ノネナール濃度依存的な測定では0−10mMの2-ノネナールと24時間反応させた。

(2)　反応後、0.2N NaOHを反応液の10分の1量加え、塩基性とした後に 2-ノネナールに対して大過剰の$NaBH_4$を用いて未反応2-ノネナールおよび2-ノネナール-ヒスチジン付加体を3 時間還元し、反応を停止した。

(3)　0.2N HClを用いて反応液の中和を行った。なお、熱が発生するのでこの操作は氷上で行った。

## 2.5　2-ノネナール修飾タンパク質中の2-ノネナール-ヒスチジン付加体の定量

(1)　反応液と等量の20%TCA水溶液を加え（最終濃度10%）、軽くボルテクスした後に氷上で1時間静置し、タンパク質を不溶化した。

(2)　7,000 ×g（10,000 rpm, 6cm）、4℃で15分遠心してタンパク質を沈殿させ、沈殿を乱さぬように上清を除いた。

(3)　200mlの氷冷アセトンを加えて軽く撹拌した後、同様に遠心して上清を除いた。

(4)　内部標準物質として2-ノネナール-$^{15}$N-ヒスチジンを一定量加えた後、前述の条件で酸加水分解を行い、LC-MS/MS（UPLC-ESI/MS, Acquity TQD tandem quadrupole mass spectrometer）による解析を行った。添加した内部標準物質の量と比較し、検量線と照らし合わせてサンプル中の2-ノネナール-ヒスチジン付加体の濃度を測定した。

# 3．結　果

2-ノネナールとタンパク質との反応において、タンパク質中のリジン残基およびヒスチジン残基の減少が顕著であった。当研究室において既に、リジン1分子に対して2-ノネナールが2分子付加した付加体である2-ノネナール-リジン付加体を同定しており[2)]、この付加体のLC-MS/MSを用いた定量法を確立している。しかしヒスチジンについては、2-ノネナールをはじめとする不飽和アルデヒド類と反応性を有することが知られているものの、2-ノネナール

とヒスチジンの付加体は未だ同定されていない。そこで今回はヒスチジンについて、2-ノネナール付加体のNMRによる構造解析およびLC-MS/MSを用いた検出系の確立を試みることにした。2-ノネナールとヒスチジンをリン酸バッファー中で37℃、24 h反応させ、HPLC分析を行ったところ、新たに生成するピークが確認された。このピークを分取し、NMRによる構造解析を行ったところ、ヒスチジンに対し、2-ノネナールが1 分子マイケル付加した2-ノネナール-ヒスチジン付加体（Fig. 2）であった。続いてこの付加体の酸加水分解に対する安定性を評価することとした。酸加水分解は、タンパク質中のペプチド結合を切断し、アミノ酸レベルまで完全分解する操作であり、この操作によりタンパク質中に生成したアミノ酸のアルデヒド付加体をLC-MS/MSにより検出・定量することが可能になる。得られた付加体の安定性を高めるために水素化ホウ素ナトリウムによりアルデヒド基をヒドロキシ基に還元した後に酸加水分解を行い、付加体の安定性をLC-MS/MSにより確認した。その結果、この付加体は酸加水分解に対して安定であることが認められ、さらに定量限界がおよそ50 fmolであったことから、タンパク質中から付加体を高感度に検出・定量することが可能であると示唆された。より正確な定量を行うために、安定同位体標識された2-ノネナール-ヒスチジン付加体を内部標準物質とした安定同位体希釈法により、定量を行うこととした。ヒスチジン中の窒素原子が安定同位体に置換された安定同位体ヒスチジンを用いて、上述の方法で内部標準2-ノネナール-ヒスチジン付加体を作成した。安定同位体標識されたヒスチジンは、ヒスチジンと質量数が3異なり、LC-MS/MS解析では異なる物質として検出されるが、ヒスチジンと物性は同じであり、化学操作における挙動だけでなく、LC-MS/MS解析におけるイオン化効率、検出感度、フラグメンテーション全てにおいてヒスチジンと一致するため、内部標準物質として最適であると考えられた（Fig. 3）。得られた内部標準を一定量とそれに対し任意の割合の2-ノネナール-ヒスチジン付加体を混合した後LC-MS/MS解析を行い、得られたピーク面積比から、2-ノネナール-ヒスチジン付加体の濃度に対するピーク面積比の検量線を作成した。2-ノネナール-ヒスチジン付加体の濃度未知試料に対しては、内部標準物質を加えた後LC-MS/MS解析を行い、得られたピーク面積比を検量線と照らし合わせることで2-ノネナール-ヒスチジン付加体の正確な濃度を求めることが出来る。

この方法を用いて、実際に2-ノネナール修飾タンパク質中から2-ノネナール-ヒスチジン付加体を定量することとした。BSA（1.0 mg/ml）に2-ノネナールを最大10 mMの濃度で、37℃で24 h反応させた後、還元処理および酸加水分解を行い、LC-MS/MSを用いて2-ノネナール-ヒスチ

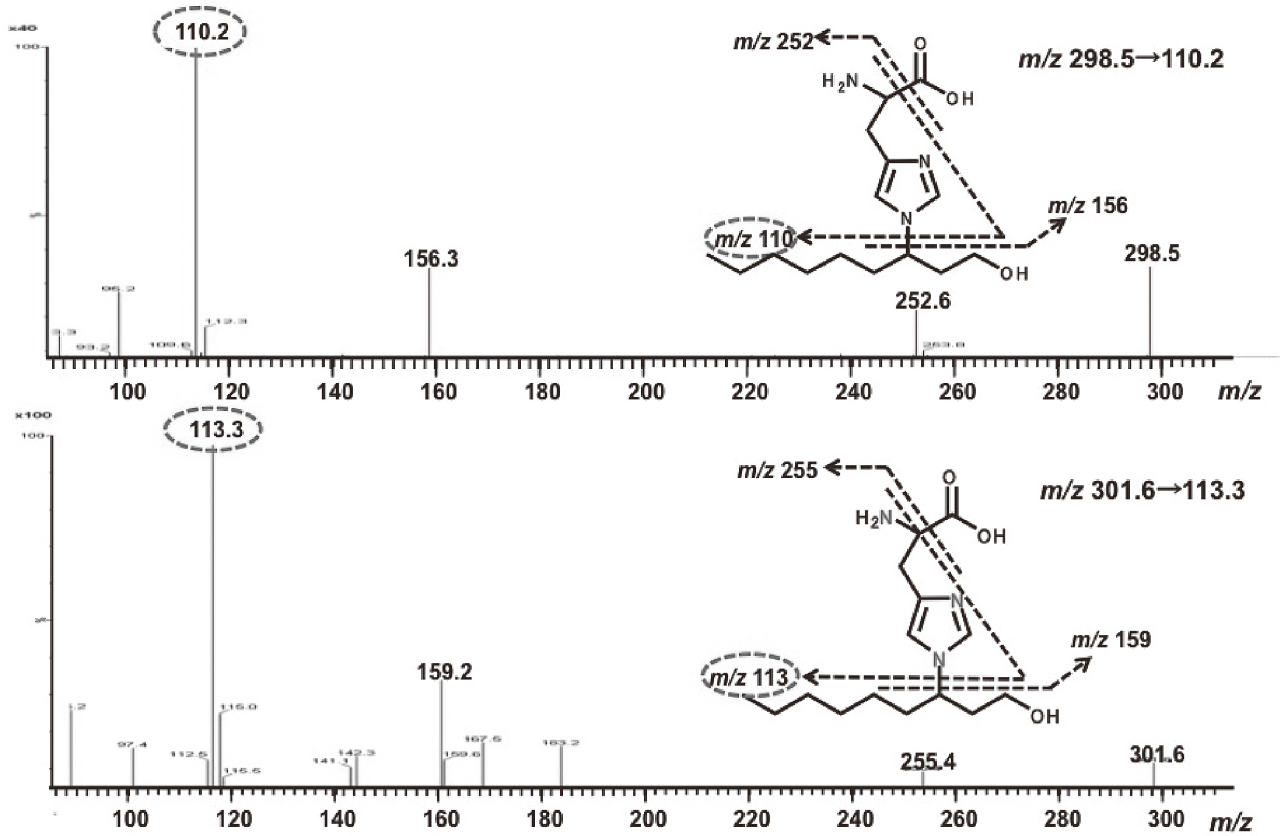



Fig. 3　2- ノネナール - ヒスチジン付加体の LC-MS/MS 解析

ジン付加体を定量した。その結果、2-ノネナールの濃度依存的に2-ノネナール-ヒスチジン付加体の生成量の増加が確認され、10mMの2-ノネナールにおいて最大となった。その生成量はBSA 1molあたり、2.8molであった（Fig. 4）。BSA 1mol中にヒスチジン残基は17残基存在するため、この条件での2-ノネナールによるヒスチジンの修飾効率はおよそ16.5%であった。続いて、2-ノネナールとタンパク質の反応による2-ノネナール-ヒスチジン付加体の生成量の経時的な変化を解析することとした。BSA（1.0mg/ml）を1mMの2-ノネナールと37℃で最大48h反応させた後、同様に還元処理および酸加水分解を行い、2-ノネナール-ヒスチジン付加体を定量した（Fig. 5）。その結果、反応時間依存的に2-ノネナール-ヒスチジン付加体の生成量が増加し、24hにおいて最大となった。その生成量はBSA 1molあたり、2.1molであった。この条件での2-ノネナールによるヒスチジンの修飾効率はおよそ12.4%であった。

## 4．考　察

2-ノネナールは不飽和脂肪酸から脂質過酸化反応を介して生成されることが報告されており、α, β-不飽和アルデヒド構造を有するためタンパク質などの生体分子と高い反応性を有している。また、近年、2-ノネナールは加齢臭の主要な成分として同定され、中年期のヒトの表皮に存在することが明らかとなってきた。しかしながら、2-ノネナールによるタンパク質修飾反応に関する詳細な研究はこれまでほとんど行われていないのが現状であった。本年度の研究課題では、LC-MS/MSを用いたタンパク質中の2-ノネナール-ヒスチジン付加体の検出法の確立を行った。LC-

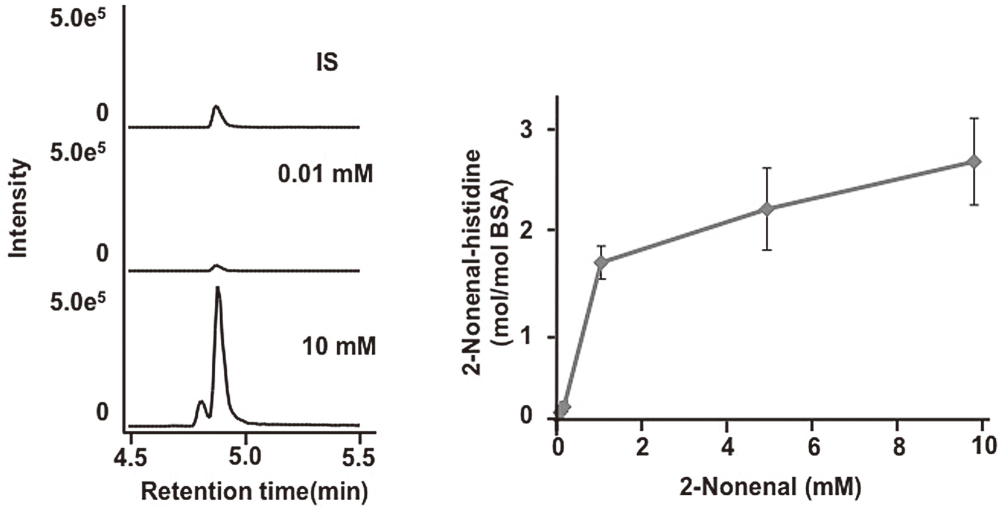



Fig. 4　2-ノネナール-ヒスチジン付加体のLC-MS/MS解析：2-ノネナール濃度に依存したヒスチジン付加体の生成

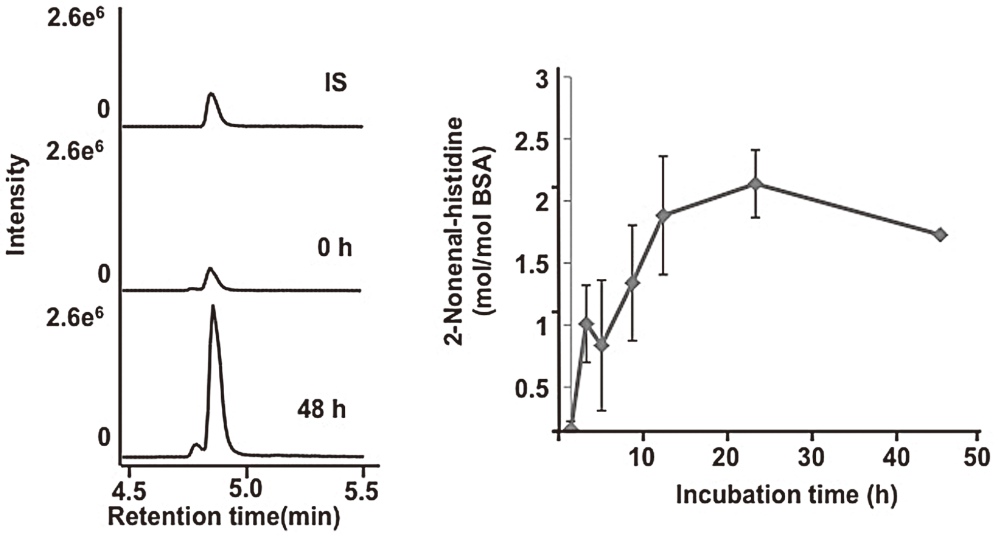



Fig. 5　2-ノネナール-ヒスチジン付加体のLC-MS/MS解析：反応時間に依存したヒスチジン付加体の生成

MS/MSは高速液体クロマトグラフ（HPLC）と質量分析計（MS）を結合させた装置であり、試料中成分の固定相（カラム）と移動相に対する保持力の差、プリカーサーイオン、プロダクトイオンの三点により、試料成分を分析できる。また、一度に複数の成分を分析でき、安定同位体を内部標準に用いることで、精製による回収率の差や測定間の誤差を補正できるため、高感度で選択的な定量を行うことが可能である。本研究では、安定同位体希釈法を用い、2-ノネナール修飾タンパク質中から2-ノネナール-ヒスチジン付加体を実際に検出可能であることを確かめた。0.01～10 mMの2-ノネナールをBSAと反応させたものから2-ノネナール-ヒスチジン付加体を検出したところ、どちらについても、2-ノネナール濃度依存的な生成量の増加がみられた。この他、脂肪酸過酸化によるタンパク質修飾、および酸化LDLなどにおける2-ノネナール-ヒスチジン付加体も確認されており、加齢臭2-ノネナールが脂質過酸化反応を介して普遍的に生成されうることを確認した。このように、本研究課題においてLC-MS/MS を用いた2-ノネナール-ヒスチジン付加体の高感度定量が可能になったことから、今後生体試料などを用いた加齢臭研究への応用が見込まれる。

**（引用文献）**

1）Haze, S., Gozu, Y., Nakamura, S., Kohno, Y., Sawano, K., Ohta, H., and Yamazaki, K. (2001) 2-Nonenal newly found in human body odor tends to increase with aging. *J. Invest. Dermatol.* **116**, 520-524.

2）Ishino, K., Wakita, C., Shibata, T., Toyokuni, S., Machida, S., Matsuda, S., Matsuda, T., and Uchida, K. (2010) Lipid peroxidation generates a body odor component trans-2-nonenal covalently bound to protein in vivo. *J. Biol. Chem.* **285**, 15302-15313.

# 肌の透明感を評価する測定手法および測定システムの開発

木更津工業高等専門学校　機械工学科
小田　功

Youthfulness of a human appearance is considerably affected by youthfulness of skin. Now, youthfulness of skin is mainly evaluated by measurement of the skin age. Skin age is measured by a water quantity of skin, a smoothness of skin, an elasticity of skin, and so on. However, an appearance of skin may be able to be evaluated by the index that is different from the skin age. We paid attention to a translucency of skin as the element which affected the appearance of skin. It seems that beauty of skin have some relation to translucency of skin, because there is expression of "transparent white skin" from old days. However, a measurement method and an evaluation method of translucency of human skin are not established yet. In this report, we suggest one method for evaluation of skin translucency. In this method, we project a stripe pattern to an object and measure its contrast. We measured the contrast of stripe pattern to acrylic plates. As a result of the experiment, it was shown that the evaluation of translucency of an object was possible by our method.

## 1．緒　言

人間の見た目を左右する重要な要素として，肌の若々しさが挙げられる．現在，肌の若々しさは，主に肌年齢を測定することで評価されている．肌年齢は，肌の水分量，きめの細かさ，弾力などから算出されている．ところが，肌年齢以外の指標を用いて，肌の見た目を評価することができる可能性もある．我々は，肌の見た目を左右する要素として，肌の透明度に着目した．肌の透明度と肌の美しさとの関係は，昔から“透き通るような白い肌”という表現があることからも，何らかの関係があると考えたからである．ところで，一般に樹脂成型品に代表される半透明体の透明度は，樹脂内部からの光の拡散率を測定する変角光度計を使用して測定している．しかしながら変角光度計では，拡散率を計算する際に光の透過側で透過光を検出する必要があるため，測定物の種類や大きさに制約がある．その他の方法には，樹脂成型品の側面からハロゲンランプの光を照射し，光の透過率が低い箇所，すなわち光が散乱しやすい箇所が明るく見えることから，透明度を測定する方法[1]がある．この方法では，端面が現れてない形状の半透明体に対しては測定ができないという問題がある．

樹脂成型品以外の透明度測定装置としては，液体を対象としたものが一般的である．例えば，縞模様を描いた計測板を，液体を通して撮影し，縞模様のコントラストから液体の透明度を測定する方法[2]がある．この原理を半透明体の透明度測定に応用しようとすると，撮影側の反対側に計測板を設置する必要があるため，測定可能な半透明体は，比較的，透明度が高いものでなければならない．さらに，測定結果は半透明体の厚さの影響を受けるという問題も生じる．

我々は半透明体に着目し，縞パターンを半透明体に投影したときのコントラストを測定することで，半透明体の透明度を評価する手法を提案している．透明度の異なる半透明樹脂試料を測定したところ，本手法は試料の厚さに依存せずに透明度を測定できることが確認できた．さらに市販のヘーズメータでの測定結果と比較したところ，透明度の低い試料に対しては，本手法の方がより有用であった．また，提案する手法を用いて肌の透明度を測定することが可能であったので，報告する．

## 2．測定の方法

人間の肌は，血管が透けて見えることから分かるように半透明である．これと同様に，一般的な樹脂やいわゆる曇りガラスも半透明である．このことは，樹脂や曇りガラスに光を照射したとき，裏面から観察すると光が透けて見えることからも想像できる．表面が充分に平滑な透明体と半透明体に，縞パターンを投影する場合を考える．透明体であれば，物体内部で光が散乱しないのであるから，縞パターンの影は現れない．これに対して半透明体では，物体内部に存在している微粒子による光の散乱度が増すほど影が明瞭に現れると考えられる．このことから縞パターンのコントラストにより透明度の測定が可能ではないかと考えた．

測定の概要を図１に示す．大きさ25×25mm，空間周波数50本ペア/インチの振幅型格子（Edmund Optics，ロンキールーリング）に，光源である出力150Wのハロゲンライト（STOCKER&YALE, IMAGELITE#20）からの光を照射し，焦点距離50mmの投影レンズ（EBCフジノン



Developments of an evaluation method and a measurement system for an appearance of human skin
Isao Oda
Department of Mechanical Engineering, Kisarazu National College of Technology

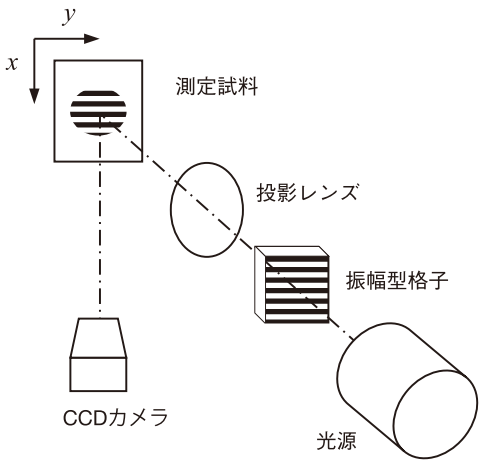



図１　測定の概要

EX，1：2.8）を用いて縞パターンを測定試料に投影する．ここで格子と投影レンズは，それらの光軸が測定試料面の法線方向と平行になるように配置する．こうすることで，格子像を測定試料面に対して斜めから投影しているにもかかわらず，投影された縞パターンのピッチが測定試料面内において一定になる．なお図１における測定試料面への光の入射角は，45度とした．

測定試料は，ホルダを用いて自立させている．測定試料に現れた縞パターンを正面から８ビットモノクロCCDカメラ（ソニー，XC-ST70）で撮影する．CCDカメラの有効画素数は768×494画素であり，焦点距離50mmの撮影レンズに厚さ20mmの接写リングを取り付けて使用している．なお実際の測定時には，測定試料の背景の影響を受けないよう，試料背後に遮光板をCCDカメラの方向に光が反射しない角度で設置している．CCDカメラで撮影した縞パターン画像は，アナログモノクロカメラ用画像ボードを介してパソコンに取り込む．この画像をビットマップ形式で保存し，縞パターンのコントラストを解析する．

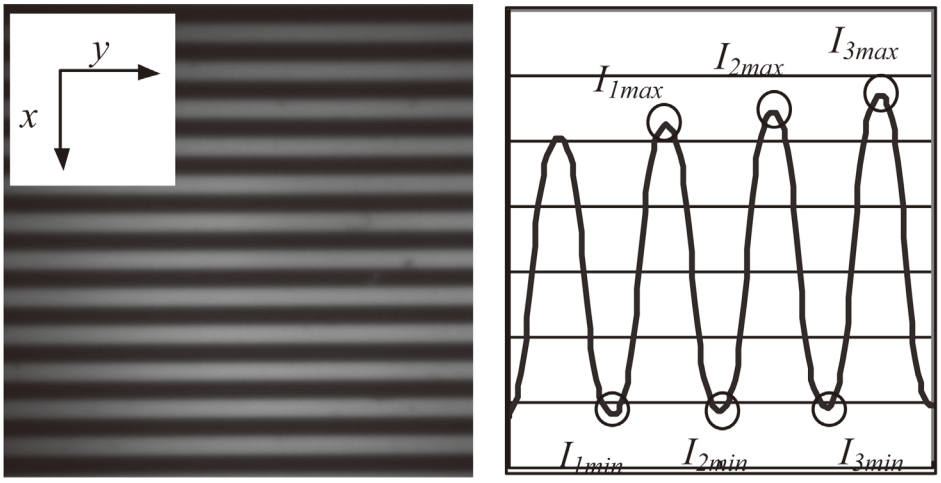
この手法の大きな特徴は，光を用いているので軟質な測定試料でも非接触での測定が可能なことである．さらに，振幅型格子の影を測定試料に投影し，その影を正面から撮影するだけなので，非侵襲であり測定の危険性もない．これらの点から，本手法は人間の肌の測定に好都合である．

図２(a)は乳白色アクリル板に格子像を投影したときの縞パターンの中央付近，128×128画素分の画像である．図２(b)は(a)における，$x$方向の光強度変化の一部を表した図である．コントラストを定量的に測定するために，光強度変調の大きさを次のように定義する．図２(b)に示すように，縞パターンの明るい部分（$I_{1max}$, $I_{2max}$, $I_{3max}$, …）と，暗い部分（$I_{1min}$, $I_{2min}$, $I_{3min}$, …）の光強度の値を数個取り出し，隣り合うもの同士の差を求める．さらにそれぞれの差の平均を求め，その値をコントラスト値$C$とする．光強度を取り出す測定点は，格子パターンの明るい部分と暗い部分，それぞれ５点ずつ設けることにした．

## ３．半透明樹脂試料の測定

測定に用いた半透明樹脂試料はポリプロピレン（日本ポリプロ，ノバテックPP）製で，その大きさは109×109×3mmである．ポリプロピレンに添加する顔料（溝和科学，93-11-6737乳白）の含有量を変えることで，透明度を変えた試料を作製した．

使用したポリプロピレンはZN系汎用ポリプロピレンであり，工業部品から日用品，食品，医療衛生分野などで幅広く使用されているものである．ポリプロピレンには透明度や光沢，機械的性質などの違いにより，いくつかのグレ




（a）縞パターン画像　　（b）光強度変化

図２　乳白色アクリル板への格子パターンの投影

表１　各資料の顔料含有量

| 試料名 | 顔料含有量 [wt% ] |
|---|---|
| Sample０ | ０% |
| Sample２ | ２% |
| Sample４ | ４% |

ードがあるが，試料に使用したグレードはMG03Bである．これはポリプロピレンの中でも透明度と平滑度が高いものである．ポリプロピレンに添加する顔料の量が増すに連れて試料は徐々に透明度が減少し，見た目の色も乳白色から不透明白色に近づく．

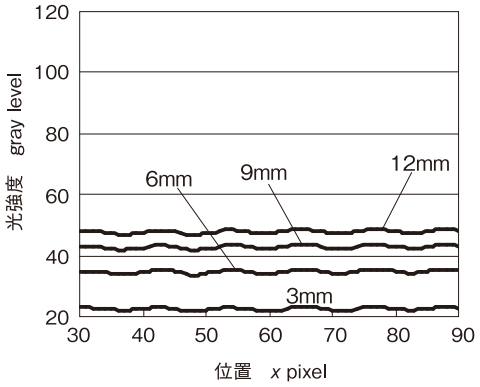
本研究で使用した試料の種類を表１に示す．顔料を添加していないSample０の他に，顔料の質量パーセント濃度が２%のSample２，および４%試料Sample４の計３種類の透明度の試料を作製した．また各々４枚ずつ試料を作製し，同じ透明度の試料を重ね合わせて使用することで試料の見た目の厚さを変化させることにした．このようにすれば，試料の見た目の厚さを３mmから12mmまで３mm刻みで変化させることが可能になる．なお顔料が未添加のSample０であっても，素材のポリプロピレン自体に濁りがあるため，完全な透明体というわけではない．

本手法の特徴は，測定試料の厚さによらず透明度の測定が可能なことである．そこで，これを確認するための実験を行った．

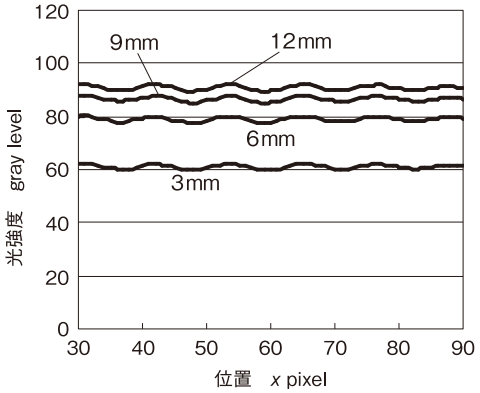
同一の測定試料に対して，１枚から４枚まで重ねることで，厚さ３mm，６mm，９mm，12mmの試料を作製した．同一の試料を重ね合わせたのであるから，厚さは異なっていても単位厚さあたりの透明度は全て等しいと考えて良い．このようにして表１の３種類の測定試料に対して，厚さの異なる測定試料を作製した．そしてそれぞれの場合において，格子像を投影して縞パターン画像を取り込んだ．なお試料表面は平滑であるため，光の散乱は主に試料内部で発生していると考えた．

各々の試料の場合において，厚さを変化させたときの縞パターン画像の光強度の変化を調べた．図３は，図２(a)の$y$方向128画素全体の光強度の平均値を，$x$方向の画素に対して表したものである．図３より３種類の試料全てにおいて，厚さが増大するにしたがい画像が一様に明るくなっていくことが分かる．ところがコントラスト成分は，厚さが変化しても変化していないように見える．また試料に添加している顔料が増加するにしたがい画像が一様に明るくなっており，これは顔料の添加量が増すに連れて試料が白濁して見えることからも明らかな現象である．

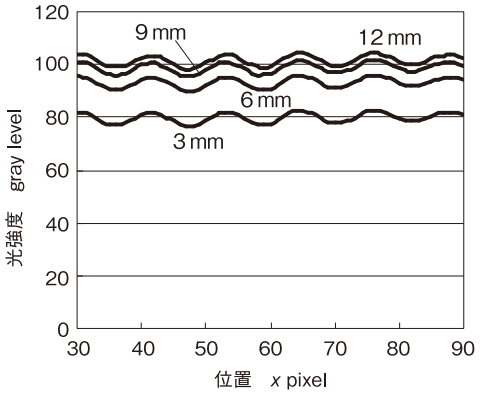
第２章で提案した手法を用いて，図３からコントラスト値$C$を算出した．算出したコントラスト値$C$を試料の厚さ




(a) Sample 0




(b) Sample 2




(c) Sample 4

図３　各試料において試料厚さを変えたときの縞パターン投影像の光強度

に対してプロットしたものを図４に示す．試料の厚さが増大し画像全体が明るくなっても，図４から同一の種類の試料であればコントラスト値$C$の差異は１階調以下であることが分かる．この実験結果より，本手法は測定試料の厚さの影響を受けずに単位厚さあたりの透明度の測定が可能であることが確認できた．

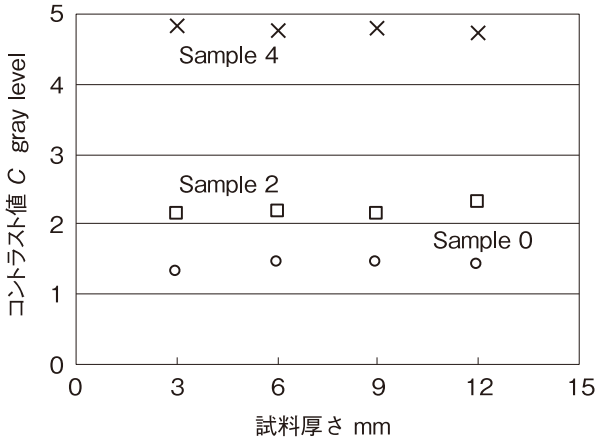



図４　試料厚さを変えたときの縞パターンのコントラスト値 $C$ の比較

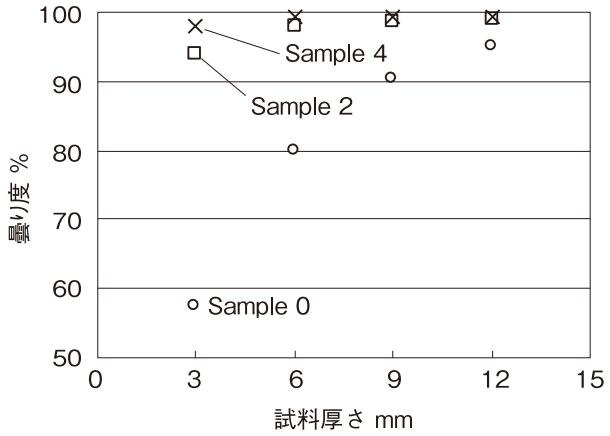



図５　市販の濁度計による測定結果

## ４．市販のヘーズメータによる測定

我々の提案する透明度測定法が有用な手法であることを確認するために，市販のヘーズメータ（日本電色工業，NDH5000）でも同一の試料を測定した．

市販のヘーズメータでは，曇り度（ヘーズ）を規格[3]に基づき測定している．曇り度の定義は，全光線透過光に対する拡散透過光の割合である．試料を透過した光を測定して曇り度を求めているので，曇り度は試料の厚さの影響を受けてしまう．このため曇り度は，我々の提案する手法で測定している単位厚さ当たりの透明度とは，異なったものとなる．

図５に市販のヘーズメータによる測定結果を示す．Sample0では，試料厚さが増大するにしたがい曇り度も増大している．この結果より，曇り度と透明度は異なる概念であり，市販のヘーズメータでは試料の厚さに依存してしまい，単位厚さあたりの透明度が測定できないことが分かる．またSample2とSample4では，試料が厚くなると曇り度がほぼ100％と測定されている．これは市販のヘーズメータでは，これ以上に濁った試料は測定できないことを示している．このことより，我々の提案する手法は，透明度の低い試料の測定に対してより有用であるといえる．

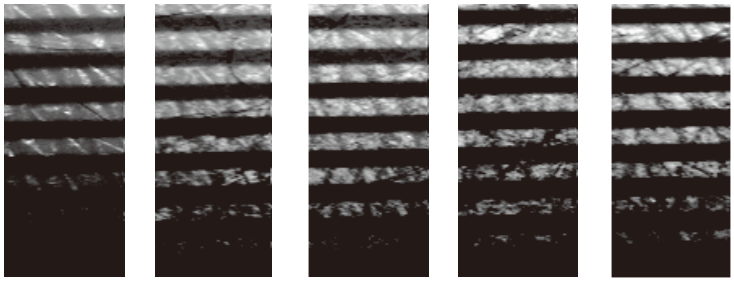
## ５．肌の透明度の測定

これまでの実験結果から，本測定法は透明度の低い物体の透明度を厚さに依存せずに測定できることが確認できた．そこで本手法を用いて，実際に人間の肌の透明度を測定してみた．

測定試料は，成人男性の手の甲である．肌の透明度を変化させるために，パウダーファウンデーションを塗布し，その濃さを変化させることにした．ファウンデーションを濃く塗布するほど，肌の表面にファウンデーションが厚く付着し，透明度が低くなると考えたからである．肌に何も塗布していない０回から，パフに付けたファウンデーションを，１回塗布するごとに縞パターンを投影し，画像を撮影した．最終的にファウンデーションは，15回まで塗布した．

縞パターンを投影したときの代表的な画像の比較を図６に示す．ファウンデーションを塗布していない(a)から最も濃い(e)まで，徐々にコントラストが高くなっているようである．しかし(a)～(e)の画像の比較からだけでは，各々のコントラストの差異を定量的に比較することはできない．

そこで図６の各画像からコントラスト値$C$を算出した．この結果を図７に示す．図７から，ファウンデーションの



(a) ０回　(b) ３回　(c) ６回　(d) 12回　(e) 15回

図６　手の甲への縞パターンの投影像

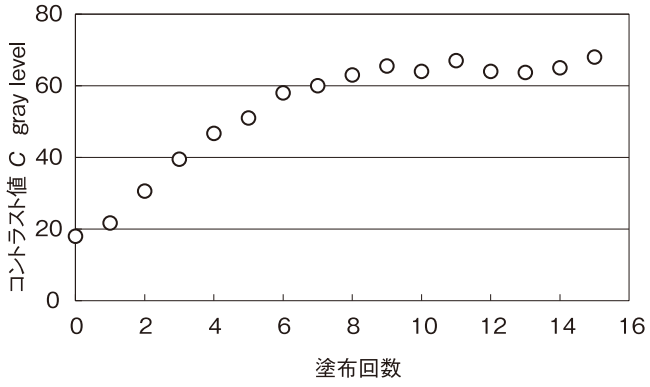



図７　肌の透明度とコントラストとの関係

塗布回数が少ない場合は，塗布回数が増す，すなわち肌の透明度が低くなるにしたがって，投影された縞パターンのコントラストが向上していることが分かる．しかし塗布回数が７回あたりから，回数を増やしてもコントラストの向上は見られない．これはファウンデーションの厚さが充分に厚くなったため，肌が透けなくなってしまったからだと考えられる．以上の実験結果から，本手法を用いて見た目では判断が難しい肌の透明度の差異が，測定できることが示されたといえる．

## ６．結　言

本報告では，人間の肌の透明度を評価する手法として，肌に縞パターンを投影し，そのコントラストを測定することを提案した．半透明樹脂板および人間の肌を測定試料として用い，縞パターンを投影したときのコントラストを測定する実験をおこなった結果，以下のことが明らかとなった．

⑴　本手法による透明度測定は，測定試料の厚さの影響を受けないこと．

⑵　本手法を用いると，市販のヘーズメータでは測定できないような透明度の低い試料の透明度が測定できること．

⑶　見た目では判断が難しい肌の透明度の差異が判定できること．

今後の課題は，人間の肌の透明度と透明感との関係を，定量的に評価する方法を模索し，新たな評価方法の確立を目指すことである．その上で，肌の透明感を容易に測定することが可能な，新規的な測定システムを装置化したいと考えている．

**（参考文献）**

１）三井東圧化学株式会社：「透明樹脂成形物の白濁度測定方法及び装置」，特開平7-333161号，1995-12-22.

２）日立造船株式会社：「水の濁度測定方法および濁度測定装置」，特開平7-280792号，1995-10-27.

３）日本工業規格：「プラスチック－透明材料のヘーズの求め方」，JIS K 7136，2000.

# 体液中グルコースがトリガーとなり創傷部位を被覆・修復する新規モイストヒーリング剤の開発

大阪大学基礎工学研究科
境　慎司

Moist wound healing is an approach to wound care under moistened condition given by dressings. The approach is effective for rapid healing with reduced scarring. The motivation of our project is to develop a novel wound dressing for moist wound healing. Our strategies to use the molecules contained in exudate as a trigger of in situ hydrogelation for covering wounds for giving moistened condition. In this report we investigated the feasibility of a horseradish peroxidase (HRP)-catalyzed hydrogelation system for aqueous solutions of polymers using an alginate derivative bearing phenolic hydroxyl moieties (Alg-Ph). We tried to supply the $H_2O_2$ necessary for the HRP-catalyzed reaction through glucose oxidase (GOx)-catalyzed oxidation of glucose contained in serum. The possibility of the system was demonstrated by the hydrogelation of the mixture solution of Alg-Ph, HRP, GOx on the nonwoven mats containing human serum. The time required for gelation of the Alg-Ph solution containing HRP and GOx was variable within 1 min by changing the contents of enzymes at 4.6 mM glucose. In addition, the resultant hydrogel had an antimicrobial property. These results indicate the great potential of the glucose-triggered hydrogelation system for moist wound healing.

## 1．緒　言

けがやヤケドにより生じる創傷部位が傷跡として残ると、部位によっては常に他人の視線を気にする必要がでるなど、社会生活において患者は精神的負担を背負うこととなる。そのような患者を減らすために、創傷部位の傷跡を残りにくくするさまざまな治療法の開発が進められている。

近年、創傷部位の修復を促進し傷跡をより残りにくくする治療法として、モイストヒーリングの有効性が広く認知されるようになっている[1)]。モイストヒーリングとは、傷口に滲出してくる体液を乾かさずに保持して組織の再生を早める方法であり、傷跡が残りにくかったり、患部の乾燥に起因する痛みが少なかったりといった利点も有している。そのための創傷被覆材としてはニチバン㈱のビューゲルや東洋化学㈱のハイドロヘルプなどがフィルム状の製品としてすでに市販されている。また、医療現場ではハイドロジェル・ドレッシング材として数種が使用されている。これらは創傷部位の修復に有効であることが実証されている一方で、使用時にはすでに整形されているため、広範囲の傷には適用が難しいことや、複雑な形状の創傷部位では傷の深い部分と接触できない部分が生じるなどの欠点がある。例えば、褥瘡（床ずれ）や糖尿病に由来する皮膚潰瘍のような比較的広範囲かつ3次元的にも複雑な形状をしている創傷部位を良好に被覆することは難しい。

このように使用時に既に成形されているドレッシング材に対して、溶液状態で創傷部位に塗布し、その後患部でゲルを形成させるハイドロジェル・ドレッシング材の検討・開発も行われている。このタイプのドレッシング材は複雑な形状の創傷部位にもフィットさせることが可能であり、さらに広い面積の創傷部位にも容易に適用可能であるといった利点を有している。これまでに、光架橋性の官能基を導入したキトサン水溶液を患部に塗布した後に紫外光を照射してゲルを形成させる方法[2)]や、酸化アルギン酸水溶液とゼラチン水溶液を患部に塗布する直前に混合し、患部でゲルを形成させる方法[3)]などが報告されている。

本研究課題では、生体適合性の高いアルギン酸やヒアルロン酸、ゼラチン、ポリビニルアルコールなどの誘導体溶液を患部に塗布し、体液から供給されるグルコースをトリガーとしてゲル化を進行させることで創傷部位を被覆するハイドロジェル・ドレッシング材の開発を試みた。この反応に必要な多糖誘導体は、フェノール性水酸基（Ph基）を導入したものであり、過酸化水素を消費して進行する西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ（HRP）の酵素反応により架橋される。グルコースをトリガーとする仕組みとして、グルコースオキシダーゼ（GOx）をHRPならびに多糖誘導体と同一系内に仕込むことで、グルコースから過酸化水素を発生させることを試みた（図1）。

本稿では、GOxとHRPの酵素反応を経て得られるゲルのゲル化所用時間の制御ならびにGOxの酵素反応を介さない過酸化水素を直接反応系に添加して得られるゲルとのゲル化特性の比較、得られるゲルの有する抗菌性に関する検討結果を報告する。



Development of dressings for moist wound healing in situ gellable through the reaction triggered by plasma glucose
Shinji Sakai
Department of Materials Science and Engineering, Osaka University

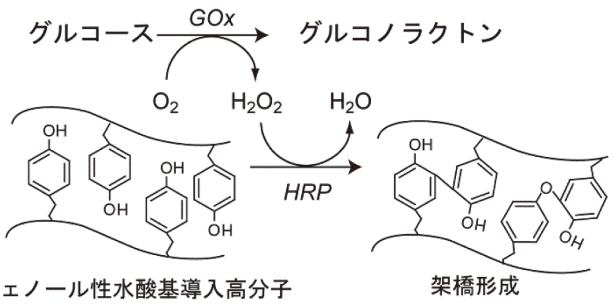



図1　GOx と HRP の酵素反応を経るフェノール性水酸基導入分子間の架橋形成反応模式図 .

## 2．実　験

### 2.1　Ph基導入アルギン酸の合成

Ph基導入アルギン酸（Alg-Ph）は、以下に示す既報の方法[4]によりアルギン酸ナトリウムとチラミン塩酸塩をpH6.0の50mM 2-モルホリノエタンスルホン酸緩衝液中で、水溶性カルボジイミドと*N*-ヒドロキシスルホスクシンイミドを用いて縮合させて作製した。なお、本研究で使用したアルギン酸誘導対中のPh基の含有量はアルギン酸中のウロン酸100ユニットあたり2個であった。また同様の方法によりPh基を導入したポリビニルアルコール誘導体（PVA-Ph）も作製した。

### 2.2　GOxとHRPの反応を経るゲル形成の確認

図1に示したGOxとHRPの酵素反応を経るフェノール性水酸基の架橋によるゲル形成の可否を確認するために、0.75%（w/v）のAlg-Ph水溶液にグルコースを4.6mMとなるようにガラス瓶に注いだ。この溶液に、GOx（0.8 mL/mL）とHRP（15U/mL）を片方もしくは両方添加し、10分後に瓶の上下を逆さまにすることでゲル化の確認を行った。

### 2.3　体液との接触によるゲル形成評価

ヒト血清中に含まれるグルコースによってゲル化可能であるかを評価するために、折りたたんだ実験用不織布シート（0.28g）に5mLのヒト血清（Sigma社より入手）を含ませ37℃に保温した。この不織布シート上にAlg-Ph、GOx、HRPをそれぞれ3%（w/v）、100U/mL、100U/mLで含む水溶液に微量のメチレンブルーを添加したものを滴下し、10分後にゲル化確認を行った。

血液と接触することによるゲル化の可否を評価するために、マウス（雄，6週齢）の静脈を傷つけ出血させた。この患部に上記と同様の組成のAlg-Ph溶液を滴下し、ゲル化の確認を行った。なお、本実験は、大阪大学動物実験委員会の承認のもと、動物実験に関わるガイドラインを遵守して実施した。

### 2.4　ジチラミン結合形成の測定

Ph基間の架橋形成反応の進行度合いを評価するために、Ph基間の結合の形成によって生じるジチラミン結合の蛍光測定を行った（excitation315nm，emission410nm）。この測定では、1.5%（w/v）のAlg-Phを溶解するリン酸緩衝液（pH7.4）を500μLずつプラスチックチューブに入れ、ここに111μLずつのHRPとGOx水溶液を添加した後、56μLのグルコース水溶液を添加して反応を開始した。撹拌後すぐに、96ウェルのブラックウェルプレートに200μL注ぎ、蛍光の経時変化を測定した。

### 2.5　ゲル化所要時間の測定

Alg-Ph溶液のゲル化所要時間は、以下に示す既報の方法[5]にしたがって測定した。1.1%（w/v）のAlg-Phを溶解するリン酸緩衝液（pH7.4）を24ウェルプレートに各ウェル450μLずつ分注し、そこに100μLのHRPとGOx混合水溶液100μLを添加するとともに、マグネチックスターラーを用いて撹拌した。次いで撹拌下、50μLのグルコース水溶液を添加し、溶液表面が盛り上がり、明らかに溶液状態と異なる挙動を示した時間までをゲル化に要した時間とした。

### 2.6　ゲルの力学的特性測定

1.5%（w/v）のAlg-Ph水溶液を24ウェルプレートの各ウェルに1.5mLずつ分注した。0.32mLのGOxとHRPの混合溶液を添加した後、0.16mLのグルコース溶液を添加して10秒間撹拌した。ゲル化する前に撹拌子を取り出し、37℃の条件下で1時間もしくは24時間静置した。ゲルの圧縮－反発力の測定は卓上型材料試験装置（EZ-test, 島津製）を用いて行った。

### 2.7　ゲルの抗菌性測定

GOxの作用によりグルコースより過酸化水素が発生する。このため、発生する過酸化水素の作用により形成したゲルが抗菌性を有することが期待される。これを確かめるために、7%（w/w）PVA-Ph、HRP0.5U/mL HRP、25U/mL GOxを含む水溶液に4.6mMとなるようにグルコースを添加してゲルを作製した。このゲルを雑木林から採取した腐葉土に水を加えて得られた上澄み液を塗布したポリペプトン、イーストエクストラクト、グルコースを含むPYG寒天培地上に置き、25℃に保温することで抗菌性の評価を行った。コントロールとしてGOxを用いずに過酸化水素の添加によって得られるゲルを用いた。

## 3．結　果

### 3.1　GOxとHRPの反応を経るゲル形成

グルコースを溶解させたAlg-Ph水溶液にGOxとHRPの

いずれか一方を溶解させただけでは、溶液はゲル化することはなかった（図２）。一方で、GOxとHRPを両方添加した場合にはゲルが形成した。この結果は、GOxの反応により生成した$H_2O_2$を消費するHRPの反応によりフェノール性水酸基同士の架橋とそれによるゲル化が可能であることを示している。

ヒトの体液と接触することでゲルを形成可能であるかどうかを評価するために、ヒトの血清（血糖値6.1mM）を含ませた不織布にAlg-Ph、GOx、HRPの混合溶液を塗布した。塗布後、約30秒で図３に示すようにピンセットで持ち上げられる強度を有するゲルが形成した。さらに、血液と接触することでゲル化が可能かどうかを確認するために、マウスの出血部位に溶液を塗布したところ、Alg-Ph溶液単独ではゲルが形成しなかったが、GOxとHRPを混合した溶液ではゲルが形成した（図４）。

### ３.２　ジチラミン結合の形成評価とゲル化所要時間の測定

図５にヒトの正常血糖値とほぼ同じとなるようにグルコース濃度を4.6mM一定としてGOxとHRPの濃度を変化させた場合の、3成分混合直後から2分間のジチラミン形成に起因する蛍光の強度増加速度変化を示した。GOxの濃度が0.8U/mLの条件では、HRPの濃度を1から15U/mLまで増加させてもジチラミン形成初速度に変化は無かった。一方で、GOxの濃度を0.8から8.3U/mLへ増加させるとジチラミンの結合形成速度も約10倍向上した。

図６にゲル化所要時間に与える各成分濃度の影響を示した。グルコース濃度が4.6mMよりも高い範囲では、ゲル化所要時間に対するHRP濃度の明確な影響は確認されなかった。しかし、1.4mMにおいては1U/mLでゲル化に約400秒要したのに対し、15U/mLでは約150秒に短縮された(a)。また、ジチラミン結合形成評価の結果と同じく、GOxの濃度の増加と共にゲル化所要時間は減少し、8.3U/mLでは14秒でゲル化した(b)。

### ３.３　ゲルの力学的特性評価

図７に4.6mMのグルコースからGOxの反応により生成する過酸化水素を消費して得られたゲルおよび、直接4.6mMとなるように過酸化水素を添加して得られたゲルを圧縮した際の反発力を測定した結果を示した。反応開始

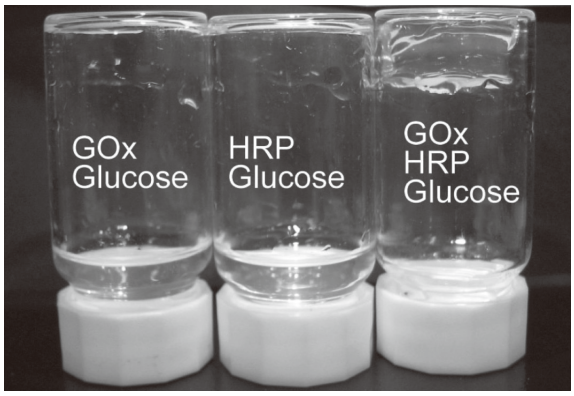



図２　グルコース含有 Alg-Ph 水溶液が HRP と GOx の存在下でのみ形成したゲル（右端）.

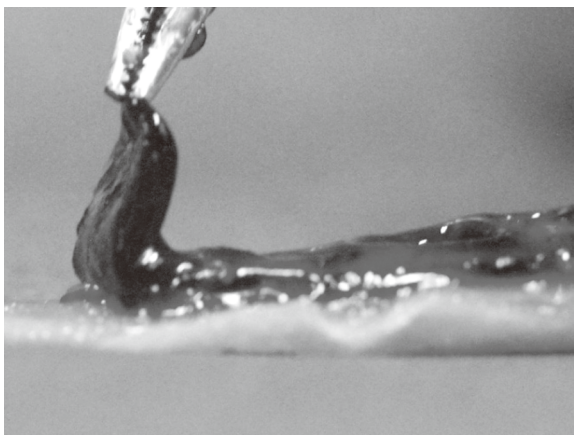


図３　ヒト血清を染みこませた不織布上で GOx と HRP の酵素反応を経て形成したゲル .



図４　マウスの出血部位で GOx と HRP の酵素反応を経て形成したゲル .

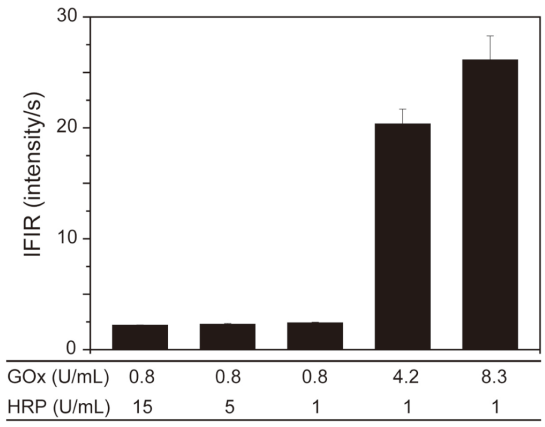



図５　GOx と HRP の濃度とジチラミンの形成初速度（IFIR）の相関．グルコース濃度 : 4.6 mM に固定 .

1時間後においては、ゲル間に顕著な差はなかった。24時間後にはGOxの反応により過酸化水素を供給して得られたゲルの2mm圧縮時の応力が1時間後に測定した値の約10倍に達した。これに対して、過酸化水素を直接添加して得られたゲルは24時間後も1時間後とほぼ同じ挙動を示した。

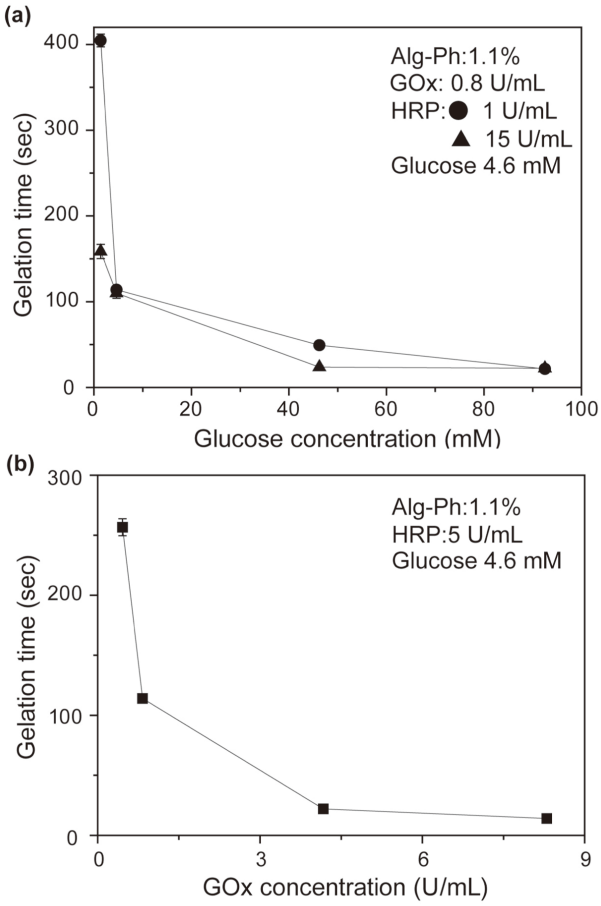



図6　(a)グルコース，(a) HRP と(b) GOx 濃度とゲル化所要時間の相関 .

### 3．4　ゲルの抗菌性評価

図8に腐葉土と混ぜた水の上澄みを塗布した寒天培地の経時変化の様子を示す。PVA-Phゲルを形成させていない寒天培地は菌体・微生物の増殖により全体的に白くなった。一方で、GOxとグルコースから過酸化水素を発生させて得られたゲルの表面には白くならない領域が115時間経過後も存在していた。これに対して、GOxによらず直接過酸化水素を添加してゲルを形成させたものでは、培養開始16時間後まではGOxを含むゲルと同じ程度の白くならない領域が存在したものの、その大きさは時間経過と共に減少し、40時間後にはなくなった。

## 4．考　察

本研究課題では、体液と接触すると患部でヒドロゲルを形成し、さらに創傷治癒を促進する新しいモイストヒーリ

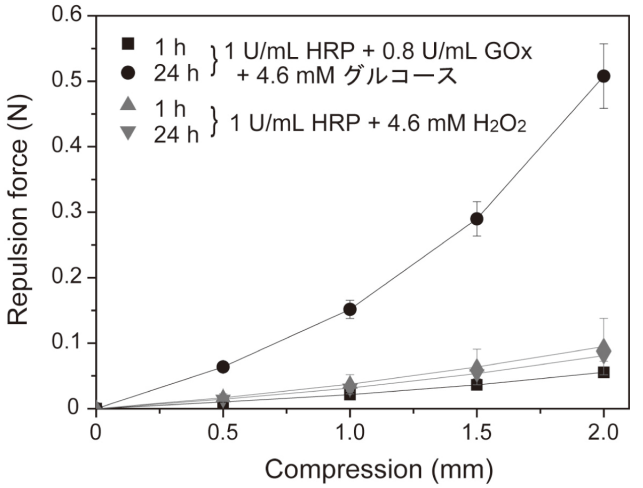



図7　GOx と HRP の酵素反応を経て得られたゲルおよび $H_2O_2$ を直接添加して得られたゲルの圧縮－反発力特性の経時変化 .

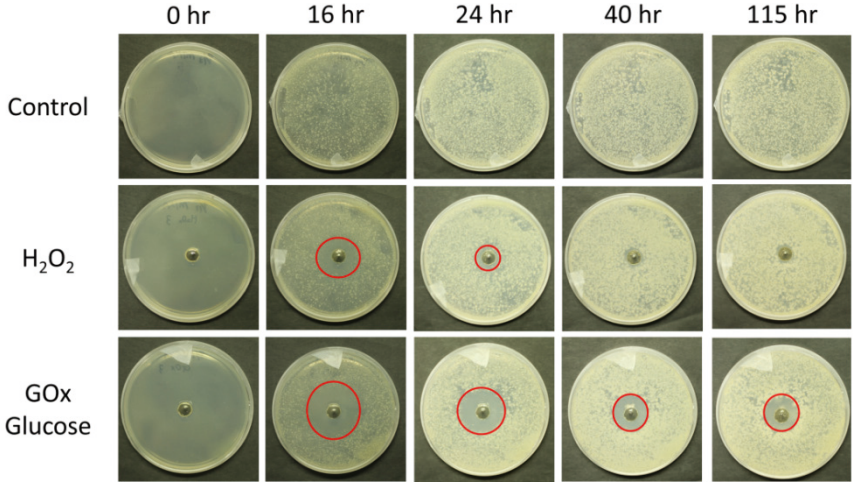



図8　PYG 寒天培地上に腐葉土抽出水溶液を塗布し、過酸化水素の直接添加および GOx の反応によりグルコースより過酸化水素を生成させて形成させたゲルを留置した後の経時変化.

ング剤の開発を目的としている。これまで著者らが取り組んできたのは、フェノール性水酸基を導入した高分子の水溶液にHRPを溶解させ、そこに過酸化水素を直接添加することでゲルを形成させるものであった。これに対して、本研究においてグルコースから過酸化水素を生成するGOxの酵素反応を用いると、体液中に存在するグルコースをトリガーとしてヒドロゲルを形成させることが可能であることが明らかになった（図３，４）。また、GOxやHRPの濃度を制御することによってゲル化に要する時間を制御することができ、数十秒でゲル化できるような条件を見出すこともできた。

図５に示したジチラミン結合の形成に関する検討において、グルコース濃度4.6mM、GOx濃度0.8U/mLの場合に、HRP濃度を変化させても結合形成初速度に差が生じなかった結果は、図１に示した反応経路においてGOxの反応が律速段階になっていたことを示している。ゲル化時間を測定した図６に示した結果において、4.6mM以上のグルコース濃度ではHRP濃度が1U/mLと15U/mLの場合においてゲル化時間に差が生なく一方で、グルコース濃度1.4mMの場合にはHRP濃度15U/mLの条件で明らかにゲル化所要時間が短かった結果も、GOx反応が律速であったことを示している。

ゲルの力学的特性評価において、GOxの反応を介して過酸化水素を供給した系で反応開始1時間目から24時間目までに圧縮に対する反発力が大きく向上した理由は、1時間経過時点でもまだ未反応のグルコースが存在し、その後も徐々に過酸化水素が生成した結果、徐々にHRPによるフェノール性水酸基同士の架橋が進行していったためと考えられる。なお、GOxの反応において1分子のグルコースから1分子の過酸化水素が生成するため、系内のグルコースが完全に過酸化水素に変換された場合には、4.6mMの過酸化水素が発生する。これと同量の過酸化水素を同じHRP濃度下で添加したにも関わらずGOxを用いて得られたゲルの反発力が過酸化水素を直接添加して得られたゲルよりも著しく大きな値を示した理由は、ゆっくりと反応が進行したために、ゲル内の分子構造がより均質なものとなったためと考えられる。ゲル化機構は異なるものの、Vielaらは大豆蛋白抽出物とジェランガムの混合溶液をカルシウムイオンでゲル化させたところ、ゲル化が早いほど不均質なゲルが形成したことを報告している[6)]。

ゲルの抗菌性評価において、過酸化水素を直接添加して得られたゲルの周囲では作製後しばらくしか周囲での菌体・微生物の増殖が抑制されなかった。一方でGOxを用いてゲル化させたゲルの周囲ではより長期間にわたり増殖が抑制された（図８）。この違いは、ゲル形成後もGOxが活性を有しており寒天培地に含まれるグルコースを消費して徐々に過酸化水素を生成しているためだと考えられる。創傷面に適用した場合にも、細菌の感染を防がなくてはならない創面から体液が滲出している状況では、体液中のグルコースを消費しながら持続的に過酸化水素を生成し、抗菌機能を発揮することが期待される。なお、抗菌性のみでなく過酸化水素の細胞毒性により、治癒が遅れるのではないかとの懸念がされるところであるが、これまでにラットを用いて市販のモイストヒーリング材と全層・分層欠損創傷治癒に要する期間を比較したところ、ほぼ同じ期間で治癒することを確認しており（データ未掲載）、その影響はないものと考えられる。おそらく、発生している過酸化水素の量が微量であることと、生体組織側に放出された過酸化水素は、生体に存在するカタラーゼの作用により迅速に分解されているためと考えられる。

本検討で得られた結果は、溶液状態で患部に塗布すると、患部に存在する体液と反応してゲル化し、創面を覆うことで創傷治癒を促進する新しいモイストヒーリング剤ができる可能性を示している。今後、より詳細に実験動物を用いた治癒に関する検討を行い、新しいモイストヒーリング剤としての実用化の可能性を評価していきたい。

**（引用文献）**


1）Sibbald RG, Goodman L, Woo KY, Krasner DL, Smart H, Tariq G, Ayello EA, Burrell RE, Keast DH, Mayer D, Norton L, Salcido RS,: Special considerations in wound bed preparation 2011: an update, Adv. Skin Wound Care, 24, 415-436, 2011.

2）Lu G, Ling K, Zhao P, Xu Z, Deng C, Zheng H, Huang J, Chen J,: A novel in situ-formed hydrogel wound dressing by the photocross-linking of a chitosan derivative. Wound Repair Regen., 18, 70-79, 2010.

3）Balakrishnan B, Mohanty M, Umashankar PR, Jayakrishnan A,: Evaluation of an in situ forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin. Biomaterials 26, 6335-6342, 2005.

4）Sakai S, Kawakami K,: Synthesis and characterization of both ionically and enzymatically crosslinkable alginate. Acta Biomater., 3, 495-501, 2007.

5）Sakai S, Hirose K, Taguchi K, Ogushi Y, Kawakami K,: An injectable, in situ enzymatically gellable, gelatin derivative for drug delivery and tissue engineering. Biomaterials 30, 3371-3377, 2009.

6）Viela JAP, Cavallieri ÂLF, Cunha RL,: The influence of gelation rate on the physical properties/structure of salt-induced gels of soy protein isolate-gellan gum. Food. Hydrocolloid, 25, 1710-1708, 2011.

# 毛包器官培養法を用いた育毛促進作用を持つ天然成分の探索

秋田大学大学院医学系研究科分子機能学・代謝機能学講座

杉山　俊博

The *glechoma hederacea* subsp. *grandis* (*G. grandis*) is used as a herbal medicine and is supposed that the extract at the time of the bloom shade-drying is effective against a child's convulsion. Moreover, it may be considered as reduction of blood sugar level. In this study, the clinical test of the hair growth facilitatory effect of the *G. grandis* extract in people during one to three years was found remarkable improvement and a little improvement by evaluation at 95% (41 persons among 43 persons). In a mouse, the sex difference was seen. With the mouse, the tendency for hair growth was promoted compared with a control (physiological saline). Furthermore, we used the hair follicle organ culture system for the hair growth promoting substance from *G. grandis extract*. As a result, *G. grandis* in the growth phase after the bloom was remarkable growth effect, and found out having the remarkable hair growth effect in a fraction of aqueous phase from the extract especially. This aims at the establishment of the hair regenerative technology which utilizes the natural plant, *G. grandis*. It is possible to apply to the baldness and the alopecia caused by various causes, and the depilation prevention action, trichogenous, and the hair restoration action improve synergistic and it is effective as the external application medicine for the head with high safety compared with the scalp.

## 1．緒　言

カキドオシとは、シソ科カキドオシ属の植物であって、別名カントリソウ、生薬名連銭草とも呼ばれている。本研究の原料となるカキドオシは古くから生薬・薬草として利用され、開花時に採取したものを日陰干しにして、それを煎じて飲むことで生薬・薬草の効果を得ていた。本研究は、ツルの成長が著しくなる開花後の成長期にあたるカキドオシを原料とするエキスから著しい発毛効果を持つことを見出した。

発毛等を促進する頭髪用剤としては、各種のものが知られている。国内での育毛剤・発毛剤の状況は次のようにまとめられる。

1）花王・ポーラ・資生堂・住友電工などでは毛をつくる細胞を直接刺激する物質を使う新タイプの育毛剤の開発をねらっている。エピモルフィン・FGF-5S・DHA・IL-1・TGF-β・βカテニンやリポ酸などが知られている。

2）武田薬品と藤沢薬品は、加齢による肥満・脱毛・性的不全向けの生活改善薬を共同開発している。市場規模１千億円といわれる第二の「バイアグラ」「リアップ」をねらったものである。

3）協和発酵はリンゴに含まれるポリフェノールの一種「プロアントシアニジン」は毛母細胞を増殖させて活性化する働きを持つことを発見した。

4）育毛剤として、循環改善剤（ミノキシジル）・飲むタイプ育毛剤「プロペシア（フィナステリド）」ホルモン・DHA、IL-1・ハーブエキスなど合成化合物から天然抽出物まで種々である。大手３社が国内出荷総額350億円の３分の２以上を占めている。

本研究では、天然由来のカキドオシから得られたカキドオシ・エキスが非常に優れた発毛作用があることが判明した。本研究は、ツルの成長が著しくなる開花後の成長期にあたるカキドオシを原料とするエキスから有機相と水相に分画し、なかでも水相画分の分子量３kDa未満に著しい発毛効果を持つことを見出した。



Search of a natural substance with the hair growth using a hair follicle organ culture Department of Biochemistry-Metabolic Science

Toshihiro Sugiyama

Akita University Graduate School of Medicine

## 2．実　験

### 2.1　カキドオシ・エキスの製法

自宅で栽培しているカキドオシを開花後の成長期に、その茎葉を刈り取り、軽く水洗いし、包丁等で約5cmの長さに切り揃え、その切断したカキドオシの茎葉の約300gを市販のジューサーミキサーに入れ、そこに30mlの蒸留水を加えてカキドオシの形が見分けられなくなり、どろどろした液状になるまでカキドオシの粉砕及びカキドオシ・エキスの抽出を行う。その後、どろどろした液体からカキドオシ・エキスをガーゼ4枚でビーカーに濾し取る。最後に、遠心機を用い8,600×gで30分間の遠心分離を行った。遠心分離後の上清を天然成分のカキドオシ・エキスとして使用に供した。

### 2.2　カキドオシ・エキス成分の分離調整法

脂溶性成分は、カキドオシ・エキスを、水飽和酢酸エチルで2回抽出し、抽出した酢酸エチル相を減圧下で除去し、

得られた固体を、少量のメタノール、エタノールで溶解した。さらに水を加えて、抽出に使用したカキドオシ・エキスと同量に調整した。

水溶性成分は、水飽和酢酸エチル抽出後の水相画分を凍結乾燥させて水を除き、もう一度カキドオシ・エキスと同量の水に溶解させた。

### 2．3　ヒトにおけるカキドオシ・エキスの発毛促進効果の臨床試験

ヒト頭髪塗布治験については、「秋田大学研究倫理規定」に基づいた申請をし、許可を得て行った。被験者はボランティア43名で行った。

**実施方法**：脱毛症に悩む被検者に、カキドオシ・エキスを朝、晩のいずれか一日１回、頭頂部の脱毛部をお湯に浸したタオルで軽くふき取った後にカキドオシ・エキスを軽く地肌にすり込むようにして塗布した。１ヶ月につき約１瓶（150ml）を使用した。そして、１ヶ月ごとに発毛状態を経過観察した。この試験は平成16年３月から平成19年２月にかけて行い、それぞれの被験者の実施期間は約１～２年間であった。

発毛の有用性を判定するために検査項目として①「自覚症状」、②「他覚症状」、および③「頭髪撮影」を行った。治験終了後、効果についてアンケートを実施した。

### 2．4　毛包器官培養系での発毛促進効果試験

#### 2．4．1　マウス頬髭毛包の採取

C3H/HeNマウスの頬部分の皮膚を切り取り、頬髭の根元から上部を切り除き、皮膚の裏側から毛包を周囲の組織を付着させたまま切り離し採取する。図１に毛包器官培養の実例を示す。

#### 2．4．2　毛包の器官培養

6well plateにMillicell-HA培養プレートインサートをセットし、メンブレンを下面から２mlの培地で湿潤させた。PBSに浸した毛包を、各群髭毛包20本を無作為に選び、ピンセットを用いてメンブレン上に移した。乾燥を避けるため、毛包組織が薄い液体皮膜で被われている事を確認し、37℃，５%$CO_2$インキュベータ内で培養した。培養開始後、定期的に実体顕微鏡で写真を撮影した。それぞれの頬髯伸長度に対する伸長本数の割合を示した。

## 3．結　果

### 3．1　ヒトにおけるカキドオシ・エキスの発毛促進効果の臨床試験

アンケートの結果を図２に示した。被験者の約３分の２の被験者が「塗布前に比較して髪の毛が太くなった。抜け毛が少なくなった。」という実感をもった（図２）。全員が何らかの効果が見られ、そのうち２人は１年間の使用で約40%回復した。安全性上の問題は全く見られなかった。

### 3．2　毛包器官培養系でのカキドオシ・エキスの発毛促進効果試験

#### 3．2．1　カキドオシの収穫時期の違いによる毛包伸長度

髭が1.0mm以上伸長した毛包の数は成長期のカキドオシ・エキスの方は13本に対して開花期のそれは５本で、2.6倍多くなった。この結果、開花期よりは成長期のカキ

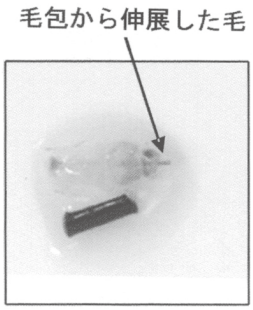



図１　毛包器官培養の一例

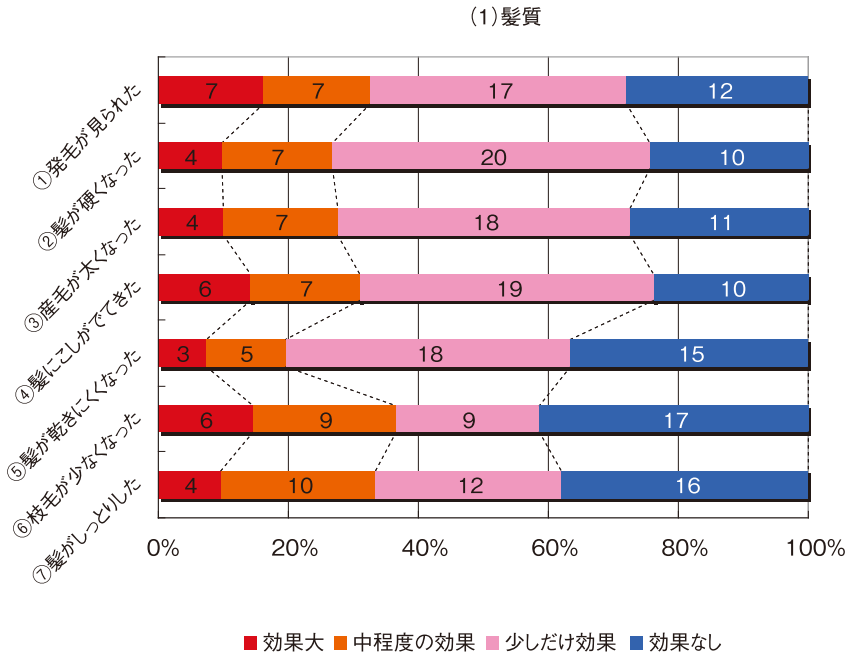



図２　ヒトでのカキドオシ・エキス塗布による髪質の変化

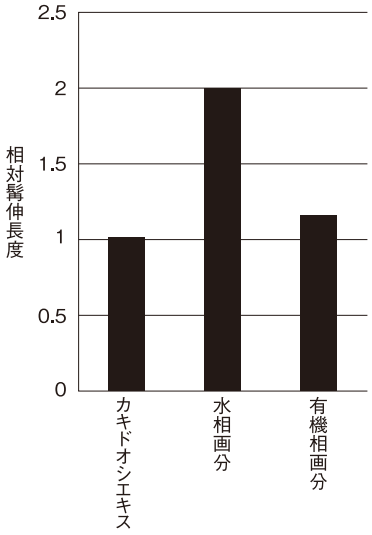



図３　有機相画分と水相画分におけるマウス発毛効果

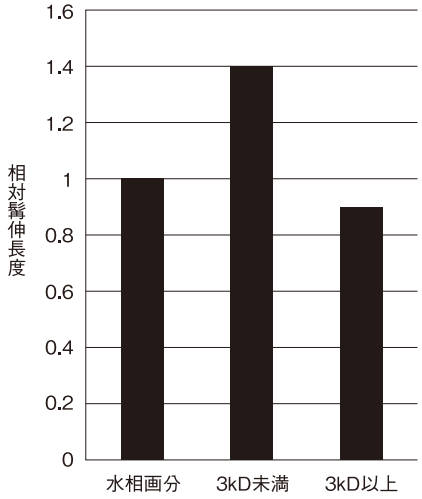



図４　水相画分における有効成分の分子量検定

ドオシ・エキスの方が強い発毛効果があることが分かった。

### ３．２．２　有機相画分と水相画分における発毛効果

髭が1.0mm以上伸長した毛包の数は有機相画分６本(14％）に対して､水相画分10本（25％）であった。水相画分は、カキドオシ・エキス又は有機相画分に対して約２倍の伸長効果が観察された。この結果、発毛促進成分は水相画分に多く存在することが判明した。髭を1mm以上伸長させる効果については、カキドオシ・エキスを1とした時、水溶性成分は２倍の効果があった（図３）。

### ３．２．３　水相画分における有効成分の分子量検定

先に見いだした水相画分をさらに限外濾過法により有効成分を分析した。スピンカラムにより分子量３kDa以上と３kDa未満の２分画を得た。マウス頬髯器官培養法を用いて、分子量３kDa以上と３kDa未満の２分画の毛包伸長度を測定した。髭が1.0mm以上伸長した毛包の数は分子量３kDa未満の画分では14本に対して分子量３kDa以上の画分のそれは９本で、1.6倍多くなった。この結果、発毛促進成分は分子量３kDa未満の水溶性画分に多く存在することが判明した（図４）。

さらに、水抽出かつ３kDa以上の分子量のカキドオシ成分はカキドオシ・エキスに対して0.9倍に減少していたが、３kDa以下のカキドオシ成分には1.4倍の効果があった。カキドオシの３kDa以上の画分には、髭伸長作用を抑制することから有害な副作用成分が含まれている可能性がある。従来知られている発毛効果のある化合物は、非極性のものが多く、カキドオシの有効成分は異なる物質である可能性がある。

## ４．考　察

有効成分に関する研究に関して、メタノールにて溶出される分画をさらにシリカゲルクロマトグラフィー、HPLCにて精製した発表[1,2]や、カキドオシ（連銭草）全草から水製エキス、メタノールエキス及びカキドオシ全草メタノールエキスから抽出成分を分析し新規な配糖体を同定した[3,4]発表があった。いずれの報告も最初の抽出にメタノールを使用していることから、本研究の水相からの３kDaの有効成分とは明らかに異なる。また、これらの発表は、糖尿病に有効な成分であり、育毛効果については記載がない。さらに、連銭草はカキドオシの花期の全草を乾燥したもので、成長期の生のカキドオシとは全く異なるものである。本研究では、開花した後に落花し、ツルが伸びて繁茂し始めるときから葉が枯れ始める成長期に育毛効果が最も高いことを明らかにし、特許を取得した[5]。

カキドオシによるメラニン合成抑制効果について著者らは、カキドオシ・エキスおよび分子量３kDa画分にはメラノーマのメラニン合成を阻害することを明らかにし、特許出願と論文発表を行った[6,7]。すなわち、メラニン合成量はカキドオシ・エキスの濃度依存的に細胞内で抑制された。カキドオシはビチリゴマウスの白髪防止効果（メラニン量の増加）があると主張する文献[8]の内容とは反対の結果となった。

カキドオシの作用因子に関する研究はこれまで多数報告されている。カキドオシの効能に関する研究は、23種の植物について、それぞれ、毛包内で発現が知られている増殖因子に対する個別の影響を検討した結果、白髪予防改善剤に含有される植物成分の中の１つにカキドオシが述べられている[8]。カキドオシの抽出物（エキスに該当）が毛乳

頭の増殖因子の発現を増加させる作用を奏することが記載されている。23種の植物について、それぞれ、毛包内で発現が知られている増殖因子に対する個別の影響が検討されている。解析に供した23種の植物のうち、カキドオシに着目すると、SCF（Stem cell factor）にのみ影響し、その他の因子には影響していない。23種の植物が列挙されている中の１つとして、カキドオシが記載されているにすぎず、さらに、in vitroでの解析の対象となっている増殖因子のうち、SCFのみに影響していることが示されているだけである。

毛乳頭が、上皮細胞との相互作用により、発毛を促進させることが文献9-10に記載されている。ほ乳類の皮膚においては、毛嚢の上皮系の細胞群が毛乳頭との相互作用を介して増殖、分化し最終的に毛を形成する[10]。また、休止期の毛包における毛芽を、毛乳頭との相互作用による活発な分裂増殖により毛母細胞に分化させ、新しい毛髪を生む段階に至らせる作用が認められることになる[11]と記載しているが、実験例では当該薬剤をマウスに塗布して皮膚の黒化により発毛効果を観察したもので、決して細胞培養系で細胞間の相互作用を証明したものではない。これはあくまで仮説であって科学的に証明されたものではない。毛根由来細胞にカツラの抽出物を添加して毛根由来細胞の増殖を促進したという結果に過ぎず、決して発毛形成を証明していない。

著者らは、カキドオシから得たエキスが、優れた発毛効果を有することを初めて見出した。さらに、カキドオシの抽出物が、有機溶媒により分離後水相画分に含まれる分子量３kDa未満の抽出物であることを明らかにした。

これまでの知見から毛幹細胞は単独では毛髪形成を行うことが出来ず、真皮系細胞である毛乳頭細胞と協調的に働くことで毛髪の発生・再生を行う事が明らかとなっている。我々は、毛髪再生のためには毛幹細胞分離培養技術の確立と同時に、毛髪誘導活性を持った毛乳頭細胞株の樹立が重要であると考え、同細胞株の樹立を行ってきた（平成11～12年度中小企業創造基盤技術研究事業）。その成果として、毛包細胞に対する特異的モノクローナル抗体の作製に成功した[12]。また、毛組織には毛幹細胞が存在することを証明した[13]。

毛髪の発生・成長・再生をコントロールしている因子については長い間不明であったが、ニワトリの羽毛形成過程や遺伝子改変マウスの解析から、Shh・Wnt・骨形成因子（bone morphogenetic protein；BMP）・上皮増殖因子（epidermal growth factor；EGF）、線維芽細胞増殖因子（fibroblast growth factor；FGF）など多くの細胞成長因子群が関与することが明らかとなってきた[14]。これらの因子を介した表皮と間充織の相互作用が毛髪の発生や毛周期の進行を制御していると考えられる。カキドオシ・エキスの３kDaの分子量を持つ有効成分がこれらのシグナル伝達系のいずれかの部位に関与している可能性は高い。一方、これらの因子を用いた毛髪再生の試みも報告されてきた[15,16]。今後は毛幹細胞・毛乳頭細胞，細胞成長因子などを組み合わせた毛髪再生医工学の発展が期待される。

## ５．総　括

成長期のカキドオシの葉、茎、根から得たエキスが、優れた発毛効果を有することを初めて見出した。人におけるカキドオシ・エキスの発毛促進効果の臨床試験において、１～３年間以内に顕著改善～やや改善が95％（35人中33人）、つまり外観での評価に改善が見られた。さらに、ネズミ髭の毛包の器官培養系を用いてカキドオシの発毛促進効果について、カキドオシの抽出物が、有機溶媒により分離後の水相画分に含まれる分子量３kDa未満の抽出物であることを明らかにした。以上示した通り、本研究のカキドオシ・エキスを含有する発毛剤は、このように、極めて優れた発毛効果を示した。本研究によれば、カキドオシ・エキス水相画分が毛根細胞ないし毛母細胞に作用してそれらを活性化するため、優れた発毛効果を得ることができる。男性型脱毛症の他、種々の原因により生じる薄毛や脱毛症に適用可能で、脱毛防止作用及び発毛，育毛作用が相乗的に向上し、且つ頭皮に対し安全性の高い頭部用外用剤を提供することができる。

**（参考文献）**


１）山崎 律 他：連銭草の成分研究①.日本生薬学会年会講演要旨集.55，71，2008.

２）野原穏弘他：連銭草の成分研究②.日本生薬学会年会講演要旨集.55，72，2008.

３）角田利枝他：カキドオシの化学成分（第3報）フェノール配糖体の化学構造について.日本薬学今年会要旨集128（N0.2），97，2008.

４）Yamauchi H, Kakuda R, Yaoita Y, Machida K, Kikuti M :Two new glycosides from the whole plants of *Glechoma hederacea* L. *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 346-347, 2007.

５）出願者：杉山俊博、発明者：杉山俊博、永井繁春、夏井美幸「カキドオシを主原料とする頭髪用剤」特願2011-56753、特許登録：2012年11月6日、特許第5146789号

６）Qiao Z, Koizumi Y, Zhang M, Natsui M, Flores JM, Gao L, Yusa K, Koyota S, Sugiyama T :Anti-melanogenesis effect of *Glechoma hederacea* L. extract on B16 murine melanoma cells. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **76**, 1877-1883, 2012.

７）出願人：秋田大学、株式会社ドウシシャ、発明者：杉山俊博、小泉幸央、夏井美幸、佐野之康「メラニン生成

抑制剤及びこれを含有する皮膚外用剤」特願2012-121636、出願日：2012年5月29日

8）出願人：ライオン株式会社、発明者：栗田 啓、西戸真紀「白髪予防改善剤及び毛髪有効成分のスクリーニング方法」特開2003-171240号、出願日：2003年6月17日

9) Hachiya A, Sriwiriyanont P, Kobayashi T, Nagasawa A, Yoshida H, Ohuchi A, Kitahara T, Visscher MO, Takema Y, Tsuboi R, Boissy RE :Stem cell factor-KIT signalling plays a pivotal role in regulating pigmentation in mammalian hair. *J. Pathol*., **21**, 30-39, 2009.

10) Randall VA, Jenner TJ, Hibberts NA, De Oliveira IO, Vafaee T, Stem cell factor/c-Kit signalling in normal and androgenetic alopecia hair follicles. *J. Endocrinol*., **197**,11-23, 2008.

11）出願人：株式会社資生堂、発明者：森 浩、鈴木良治、金山敏司「毛髪の成長期誘導効果の検出方法」特開2003-149230号、出願日：2001年11月7日

12) Hatakeyama, S., Ma, Y.-Z., Miura, N., Abe, S., Kameda, T., Sakamoto, K., and Sugiyama, T. (2003) Production of monoclonal antibodies recognizing human hair follicle keratinocytes. *Hybrid Hybridomics*, **22**, 127-130.

13) Kameda T, Hatakeyama S, Ma YZ, Kawarada Y, Kawamata M, Terada K Sugiyama T, :Targeted elimination of the follicular label-retaining cells by photo-induced cell killing caused a defect on follicular renewal on mice. *Genes Cells*, **7**, 923-931, 2002.

14) Paus R Cotsarelis G, :The biology of hair follicles. *N Engl J Med*., **341**,491-497, 1999.

15) Sato N, Leopold PL Crysta1 RG, :Induction of the hair growth phase in postnatal mice by localized transient expression of Sonic hedgehog. *Clin. Invest*., **104**,855-864, 1999.

16) Kishimoto J, Burgeson RE, Morgan BA, :Wnt signaling maintains the hair-inducing activity of the dermal papilla. *Genes Dev*., **14**, 1181-1185, 2000.

# 米タンパク質由来チロシナーゼ阻害ペプチドの精製と同定およびその美白効果

新潟大学工学部機能材料工学科
谷口　正之

Rice bran, which is the residue from brown rice in the production of white rice, is one of the most abundant agricultural by-products in Japan. After squeezing rice oil, the residual defatted rice bran powder contains a lot of proteinaceous fractions as well as starchy and cellulosic polysaccharides. In this study, we investigated the purification and identification of tyrosinase-inhibitory peptides obtained by hydrolyzing enzymatically the protein of rice bran. The tyrosinase-inhibitory peptides were purified from the enzymatic hydrolyzate by size-exclusion and hydrophobic chromatography. Three kinds of tyrosinase-inhibitory peptide were identified by MALDI TOF-MS analysis. The peptides showed the same monophenolase-inhibitory activity as that of arbutin as a control. In future, the tyrosinase-inhibitory peptides obtained from rice bran are expected to be utilized as a cosmetic material.

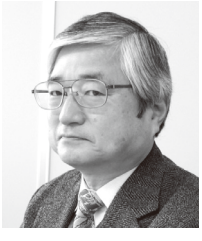
## 1．緒　言

大豆、小麦などの穀類のタンパク質やその分解物中には、タンパク質分解酵素阻害作用、アンジオテンシン変換酵素阻害作用（血圧降下作用）、コレステロール低下作用、抗菌作用などの生理活性成分が存在することが報告されている。精白米や米糠のタンパク質中には、タンパク質分解酵素阻害作用を示すオリザシスタチンが存在することが報告されているが、一般的な酵素やアンジオテンシン変換酵素阻害剤以外の生理活性を示すタンパク質やペプチドに関する報告はほとんどない。

一方、チロシナーゼは、メラニン合成経路における律速酵素であり、L-チロシンからL-ドーパ、さらにはL-ドーパキノンへの２段階の反応を触媒する。メラニンの過剰生産は色素増加症を招くため、チロシナーゼ阻害剤は美白効果をもたらす化粧品などに利用されている。既存のチロシナーゼ阻害剤として、ハイドロキノン、コウジ酸、アルブチン、グルタチオンなどが一部実用化されている。これらの低分子化合物は、顕著なチロシナーゼ阻害活性を示すが、それらが有する強い細胞毒性や水分存在下での酸化による活性低下に起因する問題点が指摘されている。近年、天然物である植物、真菌、海藻由来の低分子有機化合物やペプチドがチロシナーゼ阻害活性を有することが、国内外において報告されている[1－6]。これらの新しい化合物は、上記の多くの問題点を解決する候補として期待されているが、研究段階であり、さらに、細胞毒性の有無と程度およびメラニン形成阻害機構に関する研究を継続する必要がある。

我々は最近、米糠タンパク質の酵素加水分解物から得たペプチドに、チロシナーゼ阻害活性を見出した。本阻害成分は、鎖長10残基程度のペプチドと推定され、粗精製物のサンプルはタンパク質量として2μg当たり約10 %のチロシナーゼ活性を阻害した。一般によく利用されるチロシナーゼ阻害剤であるコウジ酸は、1μg当たり10 %のチロシナーゼ活性を阻害する。したがって、米糠タンパク質由来のチロシナーゼ阻害ペプチドは、現段階の粗精製物でも十分に商品化が可能な活性を有していると考えられる。

そこで本研究では、米糠タンパク質由来チロシナーゼ阻害ペプチドを化粧品素材として実用化することを目指した基礎研究として、次の２点についてさらに検討した[7－9]。すなわち、１）本チロシナーゼ阻害ペプチドの精製法を実験室規模で確立した。より効率的な手法を確立するために、特に、プロテアーゼを用いた加水分解反応条件を最適化した。また、チロシナーゼを阻害するペプチドを精製し、質量分析計（MALDI TOF-MS）を用いて同定した。２）本チロシナーゼ阻害ペプチドのチロシナーゼ阻害活性を明らかにした。また、本チロシナーゼ阻害ペプチドをマウス由来メラニン形成細胞（B16およびB16F10）などに添加し、細胞毒性とメラニン形成量について検討した。



Purification and Identification of Tyrosinase-inhibitory Peptides from Rice Proteins and Their Whitening Effects

Masayuki Taniguchi

Department of Materials Science and Technology, Faculty of Engineering, Niigata University

## 2．実　験

### 2.1　米タンパク質の酵素加水分解

酵素を用いた米糠タンパク質の加水分解条件を、酵素の種類と濃度、反応時間、可溶化･分解の程度などについて検討した。

### 2.2　チロシナーゼ阻害ペプチドの精製とその同定

米糠タンパク質を、図１に示すようにキモトリプシンとトリプシンを用いて加水分解した後、遠心分離によって上澄液を得た。この上澄液を凍結乾燥して得られたサンプル

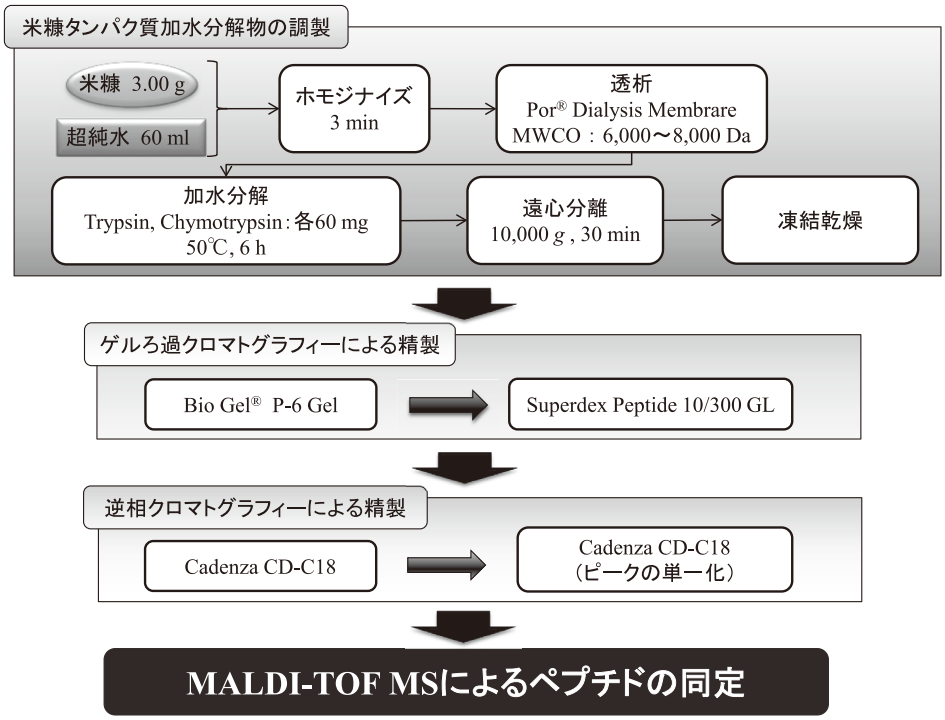



図１　米糠タンパク質の酵素加水分解とペプチドの精製の方法

を米糠タンパク質酵素加水分解物とした。

次に、米糠タンパク質酵素加水分解物からチロシナーゼ阻害ペプチドを、図１に示すように精製した。最初に酵素加水分解物をBioGel P-6 Gelカラムと Superdex Peptide 10／300GLカラムを用いたサイズ排除（ゲル濾過）クロマトグラフィーによって粗精製し、次にCazenda CD-C18カラムを用いた逆相クロマトグラフィーによって精密に精製した。逆相クロマトグラフィーによって得られた各ピークを分取し、同一のカラムを用いて再度精製し、それぞれほぼ単一のピークを得た。各ピークに含まれる阻害ペプチドを、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析（MALDI TOF-MS）を用いて同定した。

## ２.３　チロシナーゼ阻害活性の測定

モノフェノラーゼ活性は、酵素としてマッシュルームチロシナーゼ、基質としてL-チロシンを用いて、次のようにして測定した。図２に示す反応溶液を調製し、チロシナーゼ溶液を最後に添加することによって酵素反応を開始した。反応開始後、L-ドーパキノンが形成し475nmにおける吸光度が図２のように上昇するが、モノフェノラーゼが阻害された場合には、吸光度の上昇が遅れた。この遅延時間をラグタイムとして図２に示すように求めた。阻害剤を添加しない場合のラグタイムの逆数をモノフェノラーゼ活性として定義し、阻害剤のモノフェノラーゼ活性に及ぼす影響を、図２中の式で示す残存活性として表した。

次にジフェノラーゼ活性は、モノフェノラーゼの場合と同じように、酵素としてマッシュルームチロシナーゼ、基質としてL-ドーパを用いて、次のようにして測定した。図３に示す反応溶液を調製し、チロシナーゼ溶液を最後に添加することによって酵素反応を開始した。反応開始後、L-ドーバキノンが生成するに伴って475nmにおける吸光度が、図３に示すようにほぼ直線的に上昇した。この際に得られる直線の傾きをジフェノラーゼ活性と定義した。また、阻害剤のジフェノラーゼ活性に及ぼす影響は、図３中の式で示すように残存活性として表した。

## ２.４　メラニン形成抑制効果の評価

メラニン形成細胞（B16およびB16F10）への細胞毒性とそのメラニン形成量に及ぼすチロシナーゼ阻害ペプチドの影響を評価した。細胞毒性を検討するために、最初にメラノーマ細胞を96ウェルプレートに$1.0 \times 10^4$cells/wellとなるように播種した。培養には10％のFBSを加えたDMEM培地を用いた。培養は、メラニン含量の測定の場合と同じように行い、72時間目にcell counting kit-8を用いて、450nmにおける吸光度を測定することによって生細胞数を測定した。メラニン含量の測定では、最初にメラノーマ細胞を12ウェルプレートに$1.0 \times 10^4$cells/wellとなるように播種した。培養には10％のFBSと2μMのα-Melanocyte stimulation hormone（α-MSH）を加えたDMEM培地を用いた。24時間、培養を行った後に培地交換し、サンプルを添加した。さらに72時間培養した後、細胞を回収してNaOHで細胞を溶解し、405nmにおける

吸光度を測定することによってメラニン含量を測定した。

## 3．結　果

### 3.1　米タンパク質加水分解物の調製

各種プロテアーゼを用いて米糠タンパク質を加水分解した結果、サーモライシン単独およびキモトリプシンとトリプシンを組み合わせた場合に、チロシナーゼ阻害活性が高い加水分解物が得られた。本研究では、図１に示すように各60mgのキモトリプシンとトリプシンを組み合わせて3.0ｇの米糠タンパク質を50℃で6時間加水分解したサンプルを調製し、以下の実験に用いた。

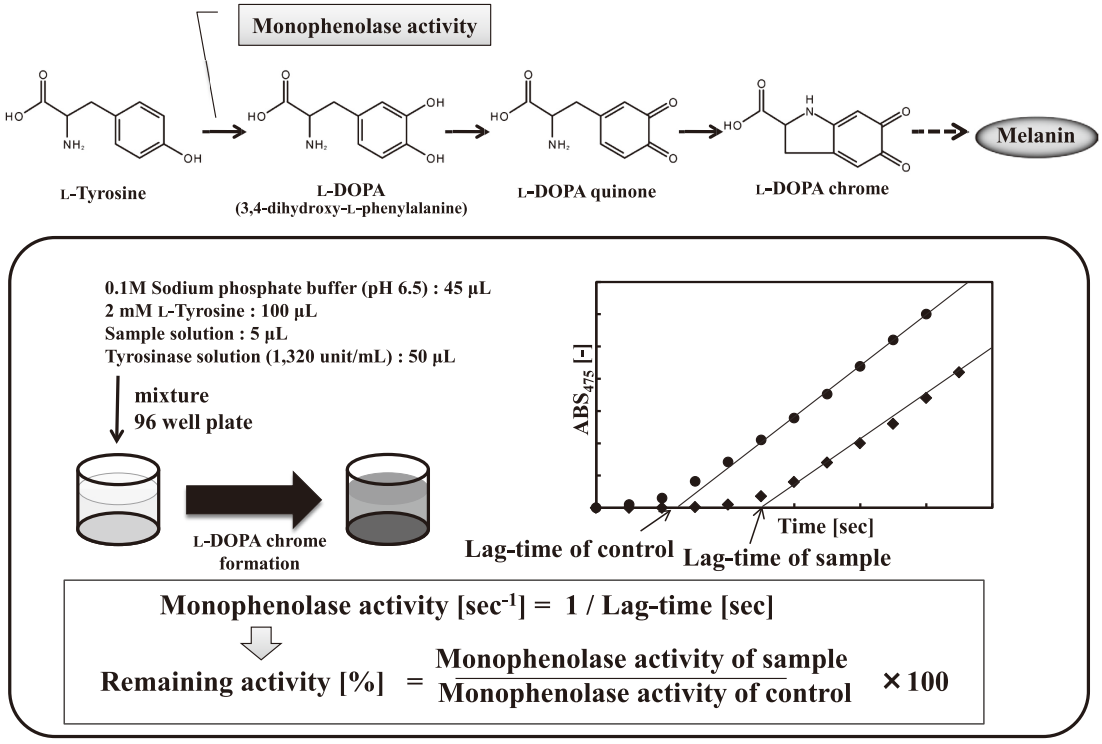



図２　モノフェノラーゼ阻害活性の測定方法

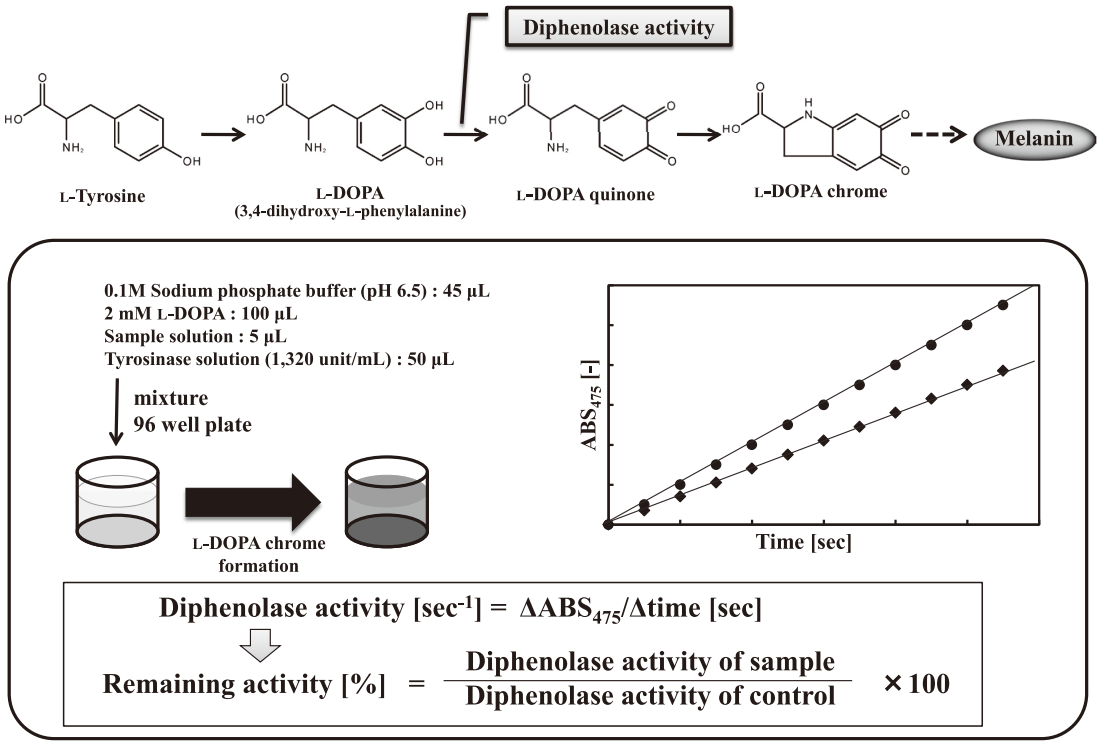



図３　ジフェノラーゼ阻害活性の測定方法

### 3.2　チロシナーゼ阻害ペプチドの精製と同定

BioGel P-6 Gelカラムを用いたサイズ排除クロマトグラフィーによって、米糠タンパク質　加水分解物を精製した結果を図４に示す。得られたNo.60からNo.100の画分のチロシナーゼ阻害活性をモノフェノラーゼとジフェノラーゼ阻害活性に分けて測定した。その結果、各画分にモノフェノラーゼ阻害活性が検出されたが、No.72からNo.83の画分に比較的強いジフェノラーゼ阻害活性が検出できた。そこで、No.72からNo.83の画分をプールして、次のSuperdex Peptide 10／300 GLカラムを用いたサイズ排除クロマトグラフィーによって、さらに精製した結果を図５に示す。得られた各ピークを11の画分に分け、それぞれの

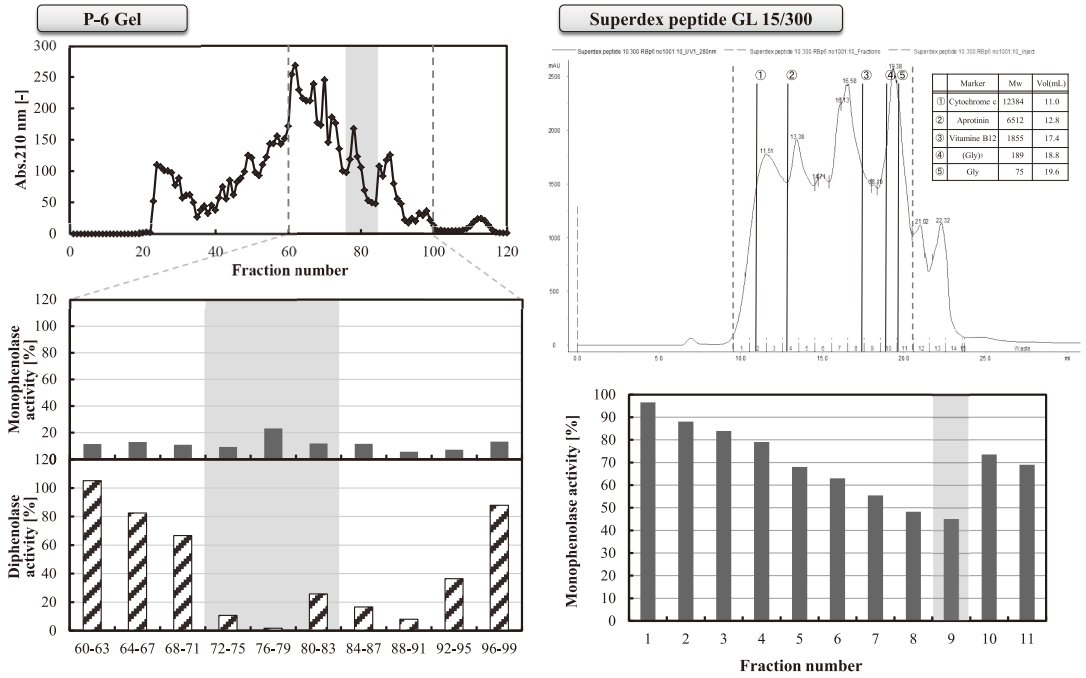



図４　サイズ排除クロマトグラフィーによるペプチドの精製

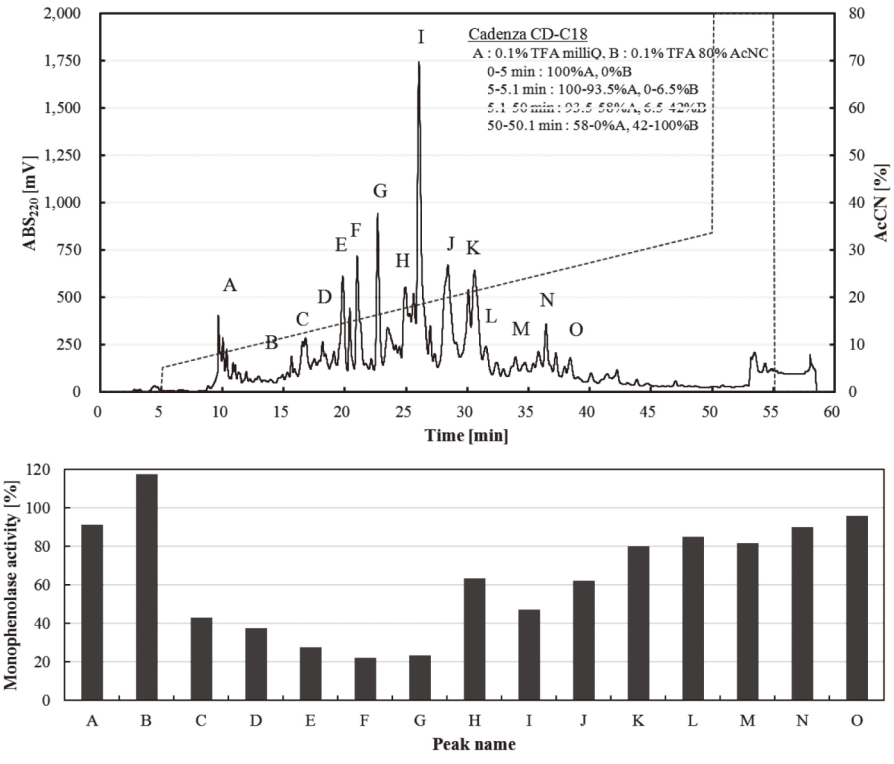


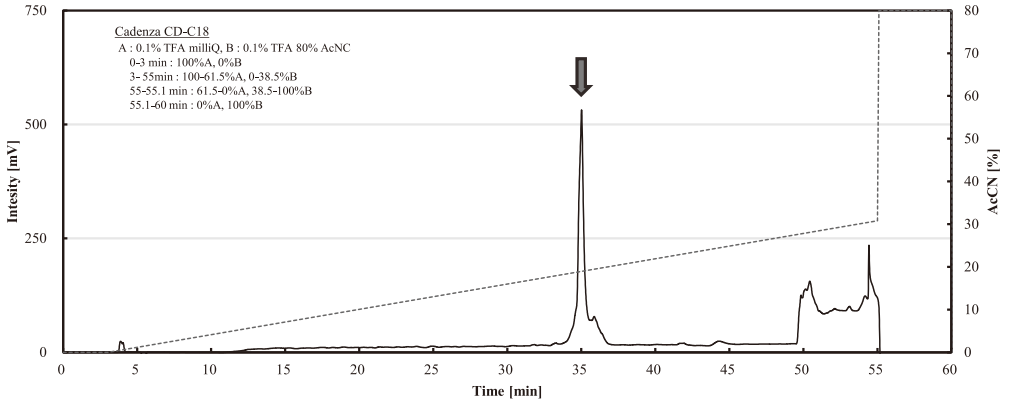

図５　疎水性クロマトグラフィーによるペプチドの精製

画分のモノフェノラーゼ阻害活性を測定した結果、No.9の画分に強い阻害活性が検出された。この画分は、分子量マーカーであるビタミン$B_{12}$（MW 1855Da）とグリシン三量体（MW189Da）の溶出位置から、おおよその分子量が200－2000Daであると推定された。

次に、Cazenda CD-C18カラムを用いた逆相クロマトグラフィーによって、得られたNo.9の画分を精密に精製した結果を図5に示す。この逆相クロマトグラフィーにおいて、AからOまでの15のピークが得られた。そこで、各ピーク画分のモノフェノラーゼ阻害活性を測定した結果、E、F、G、H、およびJの画分に強い阻害活性が検出された。それぞれのピーク画分を分取して、再度Cazenda CD-C18カラムを用いた逆相クロマトグラフィーによって精製した。図6と図7はそれぞれピークEとFの精製結果の例を示す。それぞれの画分がほぼ単一ピークになったことがわかった。そこで、各単一ピークに含まれる阻害ペプチドを、MALDI TOF-MSを用いて同定した結果、6種類のペプチド（E、F、G、H1、H2およびJ）を同定することができた。それぞれのペプチドは7～9残基のアミノ酸から構成されるペプチドであった。

### 3.3　米糠由来ペプチドのチロシナーゼ活性

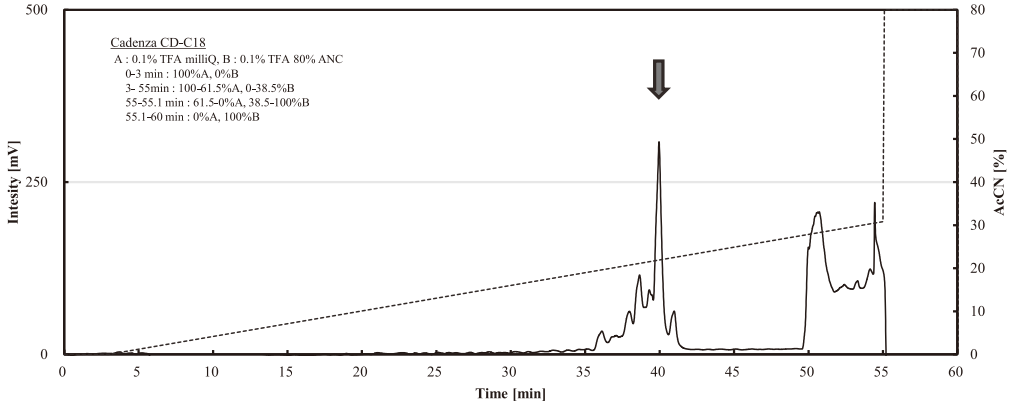
同定した6種類のペプチドを化学合成し、チロシナーゼ阻害活性を測定した。コントロールとしてチロシナーゼ活性を阻害することが既に報告されているコウジ酸、アルブチン、およびTH10を用い、それらの阻害活性と比較した。我々が報告したTH10は、Abu Ubeidらによって報告された10残基のアミノ酸から構成されるペプチド




Match to: **Os03t0793700-01**　　Score: 44
RmlC-like jelly roll fold domain containing protein.

Peptide E　(7 amino acid residues)

図6　画分Eの疎水性クロマトグラフィーによる精製




Match to: **Os03t0793700-01**　　Score: 60
RmlC-like jelly roll fold domain containing protein.

Peptide G　(9 amino acid residues)

図7　画分Gの疎水性クロマトグラフィーによる精製

P4（YRSRKYSSWY）[1]と7残基が同一であるチロシナーゼ阻害ペプチドである。各成分のモノフェノラーゼとジフェノラーゼに対する阻害活性を、比較した結果を図８に示す。コウジ酸は、低濃度でモノフェノラーゼとジフェノラーゼ活性を阻害した。アルブチンは、モノフェノラーゼ活性を阻害したが、ジフェノラーゼ活性を阻害しなかった。TH10は、モノフェノラーゼ活性をアルブチンと同程度に阻害し、ジフェノラーゼ活性も阻害した。一方、ペプチドE、G、およびH1は、モノフェノラーゼ活性を阻害したが、その阻害活性は、アルブチンやTH10に比べて低かった。また、ペプチドE、G、およびH1は、ジフェノラーゼ活性をアルブチンと同様に阻害しなかった。

### ３．４　米由来ペプチドのメラニン形成阻害活性

チロシナーゼ活性を阻害することが既に報告されているコウジ酸、アルブチン、およびTH10の細胞毒性を比較した。100μM濃度で添加した場合には、コウジ酸によって細胞は、約40％増殖を阻害されたが、アルブチンやTH10は、ほとんど細胞毒性を示さなかった。ペプチドE、G、およびH1のメラニン形成細胞に対する細胞毒性とそのメラニン形成量に及ぼす影響は、現在検討中である。

## ４．考　察

米糠は、精米中に派生する資源であり、食用油やイノシトール、オリザノール、フィチン酸などの生理活性物質の生産のための原料として利用されているが、大部分は有効に利用されていない。本研究では、米糠タンパク質の有効利用を最終目的として、その酵素加水分解物からチロシナーゼ阻害ペプチドを探索した。

チロシナーゼは、L-チロシンからL-ドーパ、さらにはL-ドーパキノンへの２段階の反応を触媒するメラニン合成経路における律速酵素である。このメラニンの過剰生産は色素増加症を招くため、ハイドロキノン、コウジ酸、アルブチン、グルタチオンなどのチロシナーゼ阻害剤は美白効果をもたらす化粧品素材として利用されている。これらの低分子化合物は、顕著なチロシナーゼ阻害活性を示すが、それらが有する強い細胞毒性や酸化による活性低下などの問題点が指摘されている。そこで、国内外において、新しいチロシナーゼ阻害成分が、天然物である植物、真菌、海藻などから探索されており、いくつかの低分子有機化合物やペプチドがチロシナーゼ阻害活性を有することが報告されている[1－6]。

本研究では、米糠タンパク質由来チロシナーゼ阻害ペプチドを化粧品素材として実用化することを目指した基礎研究として、本チロシナーゼ阻害ペプチドの調製法を実験室規模で確立した。また、チロシナーゼを阻害するペプチドをクロマトグラフィーなどの手法を用いて精製し、MALDI TOF-MSを用いて同定した。同定したアミノ酸配

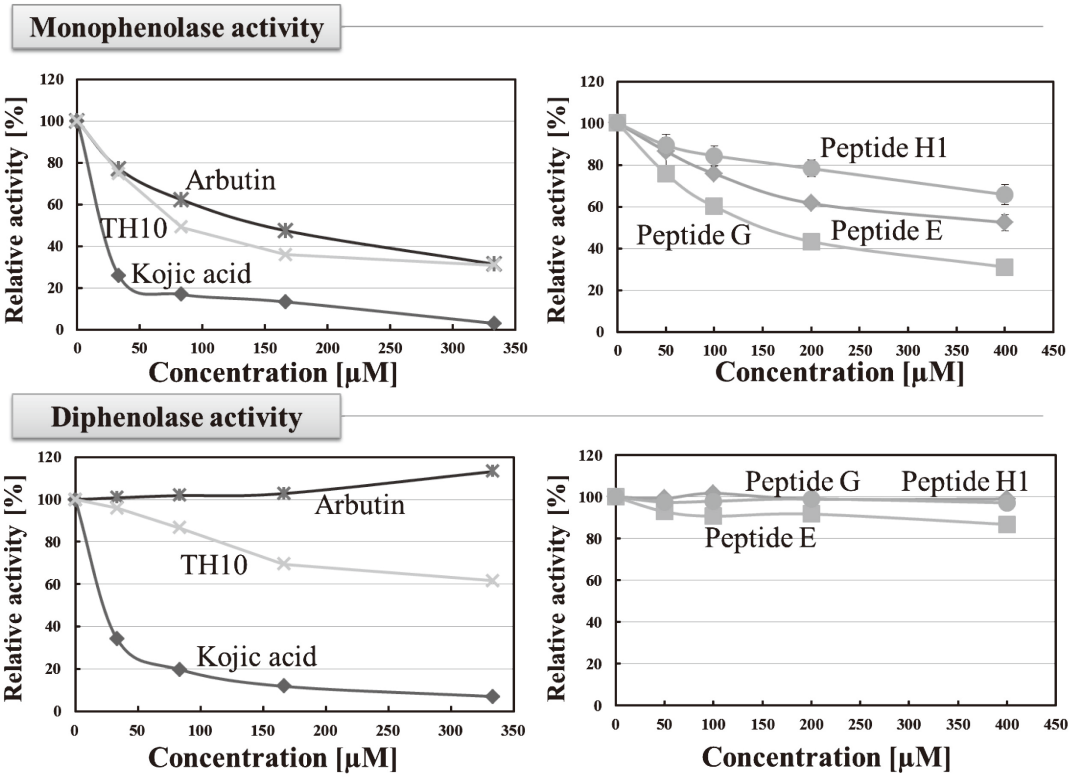



図８　米糠タンパク質由来ペプチドのチロシナーゼ阻害活性

列に基づいて化学合成によって６種類のペプチドサンプルを調製し、それらのチロシナーゼ阻害活性を測定した。その結果、３種類のペプチドがアルブチンやTH10とほぼ同じ程度にモノフェノラーゼを阻害することが明らかになった[7-9]。本チロシナーゼ阻害ペプチドのマウス由来メラニン形成細胞（B16およびB16F10）に対する細胞毒性とメラニン形成阻害効果については現在検討中である。

本研究によって、米糠タンパク質由来チロシナーゼ阻害ペプチドが調製できることが示された。今後、これまでの結果を踏まえて、収率を考慮したペプチドの効率的な調製法や簡便な粗精製法を確立する必要がある。また、チロシナーゼ阻害ペプチドとして、現時点では３種類が同定できているが、これまでに得られた結果から、さらに多くのペプチドが同定できる可能性が高い。米糠タンパク質由来チロシナーゼ阻害ペプチドを網羅的に同定し、それらのチロシナーゼ阻害活性を測定することによって、アミノ酸配列とチロシナーゼ阻害活性の関係を解明できる可能性も高い。これらのチロシナーゼ阻害ペプチドのメラニン形成細胞に対する細胞毒性とメラニン形成阻害効果を明らかにできれば、化粧品素材として有望な候補になると考えられる。

**（引用文献）**


1）Abu Ubeid, A., Wang, Y., Zhao, L., and Hantash, B. M.: Short-sequence oligopeptides with inhibitory activity against mushroom and human tyrosinase. *J. Invest. Dermatol.*, 129, 2242-2249 (2009).

2）Yoon, N. Y., Eom, T. K., Kim, M. M., and Kim, S. W.: Inhibitory effect of phlorotannins isolated from Ecklonia cava on mushroom tyrosinase activity and melanin formation in mouse B16F10 melanoma cells. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 4124-4129 (2009).

3）Lien, T.-F., Hsu, Y.-L., Lo, D.-Y. and Chiou, R. Y.-Y.: Identification of an alkylhydroquinone from Rhus succedanea as an inhibitor of tyrosinase and melanogenesis. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 2200-2205 (2009).

4）Shirasugi, I., Kamada, M., Matsui, T., Sakakibara, Y., Liu, M-C, and Suiko, M.: Sulforaphane inhibited melanin synthesis by regulating tyrosinase gene expression in B16 mouse melanoma cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*,74, 579-582 (2010).

5）Kim, J.-M., Ko, R.-K., Jung, D.-S., Kim, S.-S., Lee, N. H.: Tyrosinase inhibitory constituents from the stems of *Maackia fauriei*. *Phytother. Res.*, 24, 70-75 (2010).

6）Liang, C.-H., Chou, T.-H., and Ding, H.-Y.: Inhibition of melanogensis by a novel origanoside from *Origanum vulgare*. *J. Dematol. Sci.*, 57, 170-177 (2010).

7）富谷倫之，池田沙誉子，阿部貴子，落合秋人，田中孝明，谷口正之：米タンパク質加水分解物からの酵素阻害成分の精製とその構造解析．平成22年度日本食品工学会（東京），講演要旨集p.113（2010）.

8）吉田久志，富谷倫之，落合秋人，田中孝明，谷口正之：米由来ペプチドによるチロシナーゼ活性の阻害とメラニン形成の抑制．平成23年度日本生物工学会（東京），講演要旨集p.148（2011）.

9）田中聖也，吉田久志，落合秋人，田中孝明，谷口正之：米糠タンパク質酵素加水分解物中のチロシナーゼ阻害ペプチドの精製と同定．2012年度日本生物工学会（神戸），講演要旨集p.168（2012）.

# ウィントシグナルを制御する天然由来化粧品素材，有効成分の探索

千葉大学大学院 薬学研究院
當銘 一文

Wnt signaling is conserved in various species, and implicated in numerous aspects of development, cell biology, and physiology. Particularly, it is involved in melanogenesis and hair inducing process including regeneration of hair follicle. Thus, compounds that regulate Wnt signaling could be effective cosmetic agents for whitening or hair restoration. We screened the plants and actinomycetes extracts from our natural resource library for Wnt signaling regulating natural compounds. Activity-guided fractionation led to the isolation of new limonoid from *Xylocarpus granatum* and six cardenolides from *Calotropis gigantea* as active compounds. Also, several active compounds such as macrolactams were obtained from the fermented actinomycetes sampled from Chiba prefecture. These active compounds would be helpful and evidence-based cosmetic agents.

## 1．緒　言

ウィントシグナルは，動物の発生過程，その後の種々の組織・器官形成に至るまで多彩な役割を演じている．また，がん，神経疾患などの疾患に加え，体内時計，再生医療においても重要な役割を担っている[1]．このようにさまざまな生命現象に関わるウィントシグナル経路であるが，そのシグナル経路を制御する化合物の化粧品分野への応用を考えると，以下の理由から美白，育毛分野があげられる．

**美白**：肌の色は，表皮基底層に存在するメラノサイト（色素細胞）などにより産生されるメラニン量や性状により決められる．メラニンは，メラノサイト内に存在するメラノソームにおいてチロシナーゼによる酸化反応により生成することが知られており，チロシナーゼの阻害はメラニン生成を抑制することができる．最近の研究により，ウィントシグナルを阻害することで，チロシナーゼが抑制されることが知られている[2]．従ってウィント阻害作用を示す化合物には，美白作用が期待される．

**育毛**：最近では脱毛の発症メカニズムについても分子レベルで解明されつつある．毛髪の退縮に向かう機構については，アポトーシスによるものであることが明確になってきたが，休止していた毛包の発毛段階へのスイッチングに関しては，以前から指摘されていた男性ホルモン（アンドロゲン）の関与に加え，最近では，毛包上皮幹細胞の存在と，この幹細胞へシグナルを伝達する毛乳頭細胞の重要性，さらにこれら二種の細胞間に作用する分泌性のシグナル因子が大きく関与することがトランスジェニックマウスやコンディショナルノックアウトマウスを用いた研究で明らかになりつつある[3, 4]．毛包においてウィントシグナル伝達分子が発現していることが知られており，皮膚が毛包へと分化する際，ウィントシグナルの発現が重要な役割を果たすとの報告があり，毛包形成，毛髪生成に重要な役割を果たしていることが明らかにされている．従ってウィント亢進作用をもつ化合物には，育毛作用が期待される．

当研究室では，独自に構築した天然資源抽出物ライブラリー（熱帯産植物や放線菌などの抽出物）を対象として，ウィントシグナル制御に関するスクリーニングを行ってきた．その結果，ウィントシグナルを阻害，または亢進する抽出物を複数見出しており，それらから美白，または育毛作用を有する有効成分を見出し，その作用メカニズムを解析することで，エビデンスに基づく化粧品素材を創製することを目的としている．



Exploration of natural cosmetic agents that regulate Wnt signaling pathway
Kazufumi Toume
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

## 2．実　験

### 2．1　TCF/β-catenin転写活性試験

TCF/β-catenin転写活性をウィントシグナルの指標とし，TCF/LEF結合領域を有するルシフェラーゼレポーター遺伝子（SuperTOPFlash）が安定発現したSTF/293細胞株を用いた．対数増殖期にあるSTF/293細胞[5]を96穴白色平底マイクロプレートに各ウェル中200μLあたり3×$10^4$ cellsの密度で細胞を播種し，10%FBS含有D-MEM培地中で24時間培養した．培地の除去後，種々の濃度の試料（植物エキス，分画後の画分，単離した化合物）を含有する200μLの培地を添加し24時間培養した．その後培地を取り除き，PBSで細胞を1回洗浄後，細胞溶解剤Cell Culture Lysis Reagent（プロメガ）を20μL加え30分間振

とうした．その後プレートと発光基質液（プロメガ）をマイクロプレートルミノメーター（サーモ社製ルミノスキャンアセント）へセットしルシフェラーゼ活性を測定した．なお，試料添加時のルシフェラーゼ遺伝子の発現量（化学発光量）を指標として，TCF/β-catenin転写活性すなわちウィントシグナル制御作用を評価した（図１）．STF/293細胞は，John Hopkins大学のJeremy Nathans教授よりご恵与頂いた．

### ２．２　スクリーニング試験

スクリーニングは，上記のTCF/β-catenin転写活性を指標に当研究室で独自に採集，構築したタイ，インドネシア，バングラデシュ産の植物エキスおよび当研究室で独自に分離培養を行い構築した放線菌エキスからなるライブラリーを対象とした．なお本スクリーニング研究で用いた放線菌は千葉県を中心に全国各地の土壌，海水，海泥などから分離したものである．

### ２．３　成分の分画，構造解析

上記スクリーニング試験において，顕著なウィントシグナル制御作用を示した抽出物を選別し，活性を指標に溶媒分配，各種カラムクロマトグラフィー（Diaion HP-20，シリカゲル，ODS，Sephadex LH-20，ODS HPLC等）により活性成分の分画・精製を行った．構造は，核磁気共鳴（NMR）や質量分析（MS）等のスペクトル解析にて解析を行った．

## ３．結果及び考察

### ３．１　*Xylocarpus granatum* から得られたウィント阻害成分

スクリーニング試験においてウィント阻害作用を示したバングラデシュ産センダン科植物*X. granatum*の葉部メタノール抽出物について活性を指標に分離精製を進めたところ，4種のリモノイド類（**1**－**3**等）を単離した．スペクトルデータに基づく構造解析の結果，化合物**1**，**2**は新規化合物であることが判明し，それぞれxylogranin A（**1**）およびB（**2**）と命名した．このうち化合物**2**，**3**は強いウィントシグナル阻害作用を示し，その$IC_{50}$値はそれぞれ48.9，54.2nMであった．一方化合物**1**は活性を示さなかった．化合物**2**，**3**はオルトエステル基が存在するが，**1**にはない．DFT計算の解析の結果，活性を示す化合物**2**，**3**と，**1**は異なる安定構造を示し，この構造の違いが活性へ影響しているものと示唆された．

強力な作用を示した**2**について本シグナルの亢進が知られているヒト大腸がん細胞（SW480細胞）における以下の解析を行った．本シグナルにおける転写活性化因子である

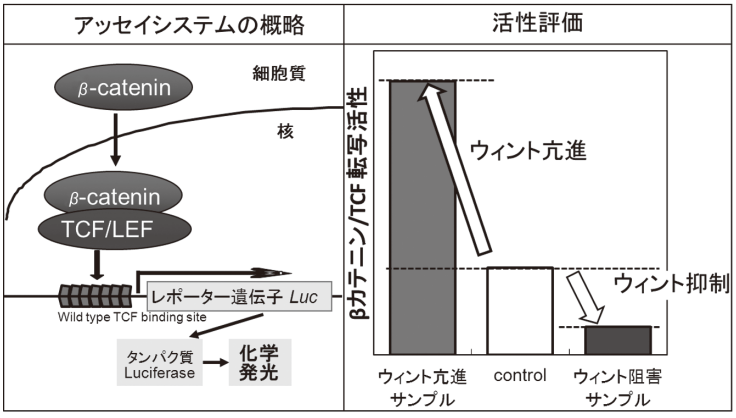



図１　スクリーニングアッセイシステムおよび活性評価の概略

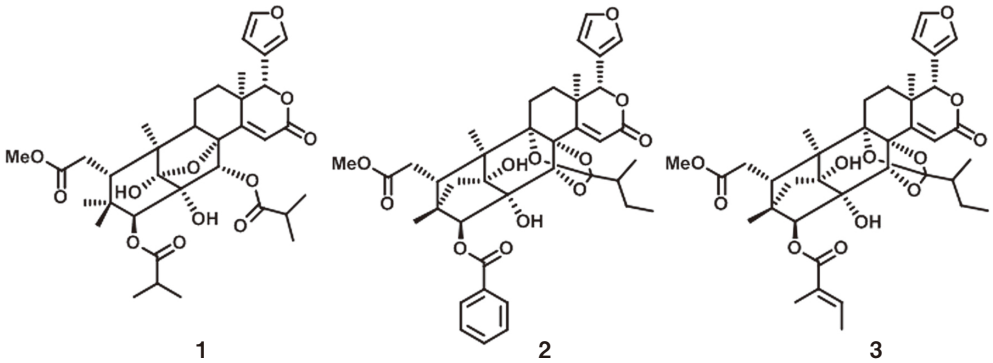



図２　*X. granatum* から単離したリモノイド化合物

β-cateninのタンパク質発現量を検討したところ，細胞全体，細胞質では顕著な変化は認められなかったが，核内においては濃度依存的な減少が認められた（図３A）．また，免疫染色法によるβ-cateninの局在について解析を行ったところ，対照群では核内に存在していたβ-cateninが，**2**の添加により核内から消失する傾向が認められた（図３B）．以上のことから**2**は，核内のβ-cateninを減少させることによりウィントシグナルを阻害するものと示唆された．

さらにウィントシグナルの標的遺伝子である*c-myc*，*PPARδ*の発現量への**2**の影響を検討した．まず，ウエスタンブロット法により，標的遺伝子産物の発現量を検討したところ，200 nMの濃度で*c-myc*は細胞全体，核内において，*PPARδ*は核内において減少がみられた．また，mRNAの発現量をリアルタイムPCR法により検討したところ，*c-myc*は化合物添加により低濃度では上昇したが，200 nMの濃度では減少し，また，*PPARδ*も200 nMの濃度で減少した．したがって，**2**はウィントシグナルの標的遺伝子の発現をmRNAレベルで抑制することが示された．

### ３．２　*Calotropis gigantea* から得られたウィントシグナル阻害成分

バングラデシュ産ガガイモ科植物*C. gigantea*の滲出液抽出物にも強力なウィントシグナル阻害作用が認められ，その活性成分について探索を行った．本植物抽出物を溶媒分配し，活性が認められた酢酸エチル可溶部について活性試験を指標として，シリカゲル，ODSカラムによる分画を行った．その結果，6種のカルデノライド類（**4**－**9**）を単離し，NMR及びMSスペクトルデータの解析および文献値との比較によりそれぞれの構造を決定した．これら6種の化合物は強力なウィントシグナル阻害作用を示し，その$IC_{50}$値は0.7－3.8 nMであった．これら化合物のウィントシグナルへの作用は知られておらず，本研究により初めて明らかとなった．

またこれらの化合物のうち，calotropin（**7**）について３種のヒト大腸がん細胞（DLD1，HCT116，SW480）および非がん細胞（293，293T）に対する毒性試験を行った．その結果，**7**はとくに大腸がん細胞に対して顕著な細胞毒性を示すことがわかった．次に，SW480細胞において，活性化合物**7**がウィントシグナルの転写活性化因子であるβ-cateninと標的遺伝子であるc-mycのタンパク質の発現量へ及ぼす影響を検討した．その結果，**7**によりβ-cateninのタンパク質量は細胞全体，核，細胞質で濃度依存的に減少することが認められた（図５A）．また，標的遺伝子であるc-mycの減少も確認された．しかし，**7**とプロテアソーム阻害剤であるMG-132とを併用すると，β-cateninの減少は認められなかった．さらに**7**の添加によりβ-cateninの分解シグナルであるCK1αおよびGSK3βによるβ-cateninのリン酸化の促進が認められ，**7**は，β-cateninの

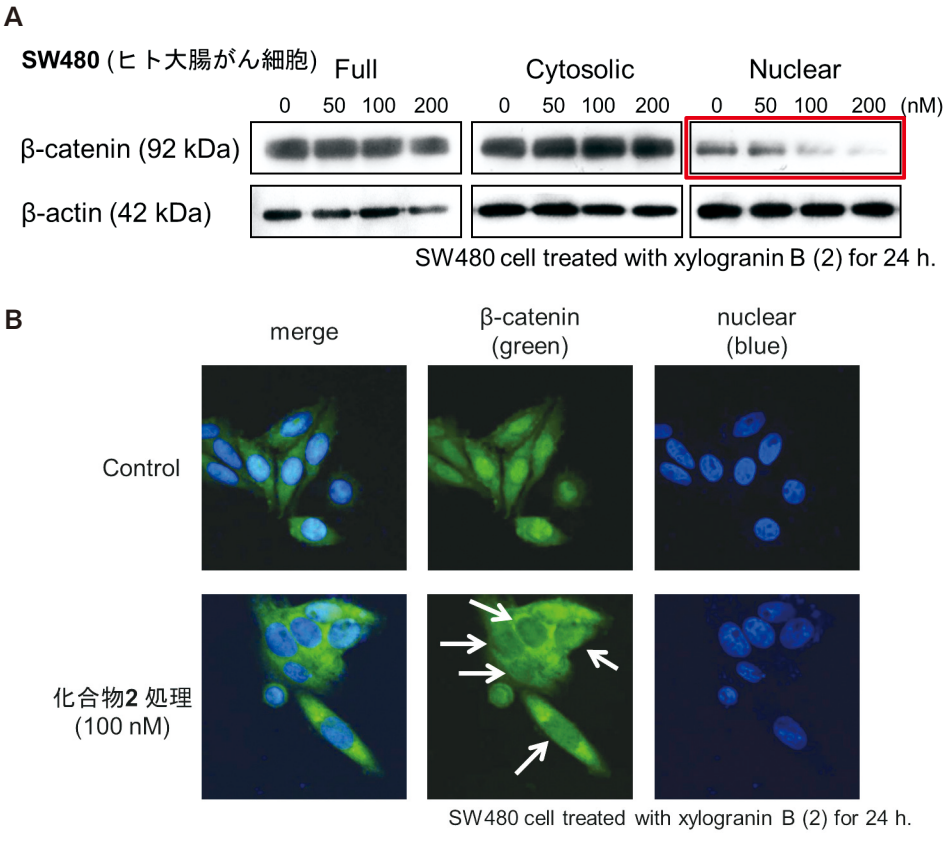



図３　xylogranin B（2）による*β*-cateninの核内局在の阻害

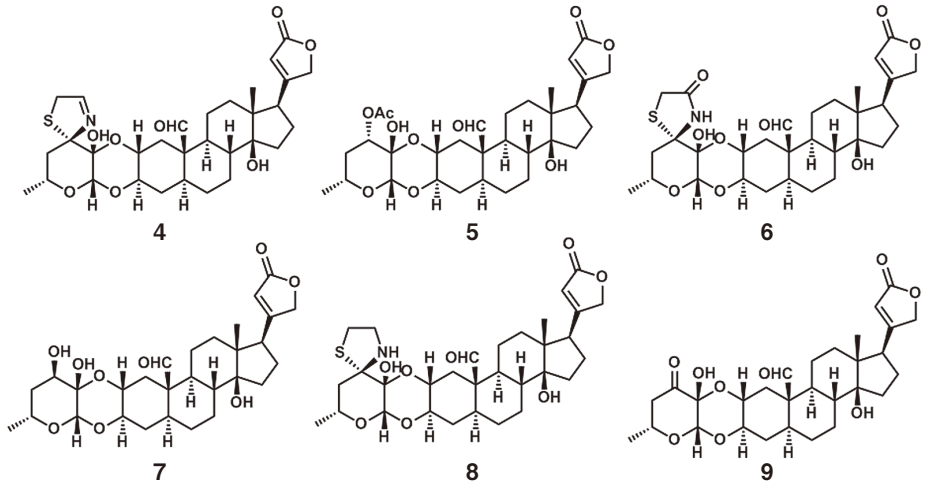



図４　*C. gigantea* から単離したカルデノライド類

リン酸化を促進することにより，その分解を促進することが示唆された．**7**により促進されたGSK3βによるβ-cateninのリン酸化はGSK3β阻害剤であるLiClの処理により抑制されたが，CK1αによるリン酸化は抑制されなかった．また，促進されたCK1αとGSK3βによるβ-cateninのリン酸化は、CK1α阻害剤であるCKI-7の添加により抑制された．またCKIαRNAiによりβ-cateninの分解も抑制された．このことから**7**のウィントシグナル阻害のメカニズムとして，**7**がCK1αのタンパク量の増加を誘導することにより，β-cateninのリン酸化を誘導し，続くプロテアソーム系での分解を促進することによるものと示唆された（図５B）．

### ３．３　放線菌から得られたウィントシグナル阻害成分

２種の放線菌株について各々ウィントシグナル阻害作用をもつ活性成分の探索を行った．まず，九十九里町産海水サンプルより分離した放線菌株CKK748からは

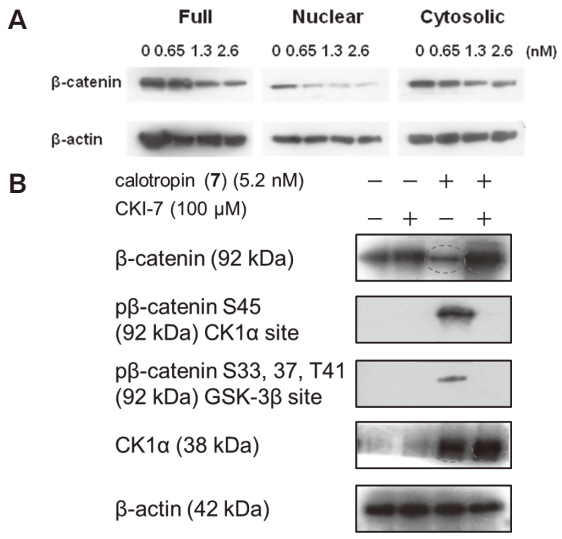



図５　ウェスタンブロットによるSW480細胞における calotropin（**7**）の影響の解析

griseoviridin（**10**），千葉市産土壌由来の放線菌株CKK784からはbiscaberin（**11**）を始めとする数種のマクロラクタム類および*N*-formylantimycic acid methyl ester（**15**）を単離，同定した．これらのうち，**10**および**11**は濃度依存的にTCF転写阻害活性を示した．

### ３．４　ウィントシグナル促進成分

前述のスクリーニングの結果，数種の植物抽出物にはウィントシグナルを更新する作用が認められた．そのうちバングラデシュ産ミカン科植物*Zanthoxylum rhetsa*について活性を指標に分画を進めた結果，活性成分としてケルシトリン（**16**）を得た．本植物の分画物にはほかにも活性画分があり，現在それらの活性成分について成分探索を進めている．

## ４．総　括

ウィントシグナル伝達機構を対象とした研究はきわめて熾烈な競争の最中にある[7, 8]．特にメラニン生成とウィントシグナルに関しては，ウィントシグナルを制御する因子であるGSK-3βを抑制することで，メラニン生成が抑制されることなどが報告されている[9]．また，ウィントシグナルと薄毛に関しては，毛乳頭細胞死抑制にウィントシグナル経路が関与することや[10]，成体における毛包形成とウィントシグナル経路の関与が報告されている[11]．

一方，ウィントシグナルを制御する低分子を美白，育毛につなげる研究例は比較的少ない．最近の美白への応用例としては，ショウガ科植物より得られたカルダモニンが報告されている[2]．また，ウィントシグナルに作用して育毛作用を示す化合物に関しては，放線菌由来のラディシコールなどがあげられる[12]．天然からウィントシグナル伝達経路を介して美白・育毛作用を示す成分が見出されれば，その利用価値はきわめて高いことが期待される．

本研究では，上記の知見をもとに，有用な美白・育毛作用を示す化合物の発見をめざし，当研究室保有の天然資源

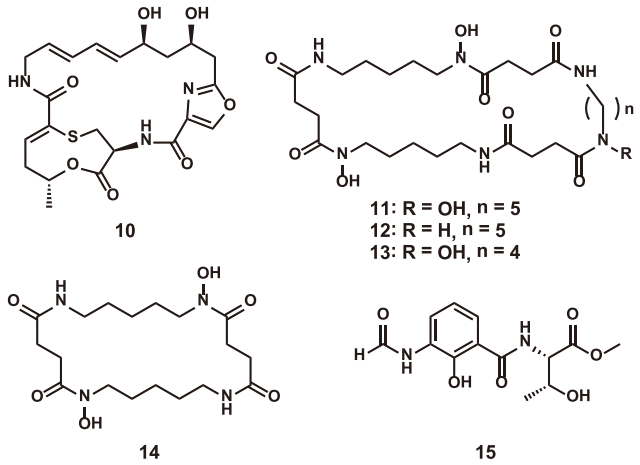



図６　ウィントシグナルに関するスクリーニングにより放線菌から単離した化合物

抽出物ライブラリーについてTCF/β-catenin転写活性を指標としたスクリーニングを行った．その結果，バングラデシュ産植物より，ウィントシグナルを阻害，または促進する化合物を，千葉県の海水および土壌より分離培養した放線菌からは，ウィントシグナルを阻害する天然化合物の発見に成功した．そのうち，化合物**2**，**7**については，そのウィントシグナル阻害作用について解析を行い，それぞれβカテニンを減少させることが判明したが，**2**については核内においてのみβカテニンを減少させること，**7**については，CK1αのタンパク質発現を増加させることで細胞全体のβカテニンを減少させることを明らかにした．

今後，さらなるウィントシグナル制御作用をもつ天然化合物の探索とそれらの作用機構の詳細な解析を進め，分子レベルでのエビデンスに基づく新たな香粧品素材の開発へ貢献したい．

**謝　辞**

本研究はコスメトロジー研究振興財団の研究助成により行われました．心より感謝申し上げます．また研究の遂行にあたりまして，ご指導・ご協力いただきました千葉大学大学院 薬学研究院の石橋正己教授，荒井緑准教授，大槻崇博士をはじめ共同研究者の皆様に感謝申し上げます．

**（引用文献）**

1）Luo, J.; Chen, J.; Deng, Z. L.; Luo, X.; Song, W. X.; Sharff, K. A.; Tang, N.; Haydon, R. C.; Luu, H. H.; He, T. C. Wnt signaling and human diseases: what are the therapeutic implications? *Lab. Invest.* **2007**, *87*, 97-103.

2）Cho, M.; Ryu, M.; Jeong, Y.; Chung, Y. H.; Kim, D. E.; Cho, H. S.; Kang, S.; Han, J. S.; Chang, M. Y.; Lee, C. K.; Jin, M.; Kim, H. J.; Oh, S. Cardamonin suppresses melanogenesis by inhibition of Wnt/β-catenin signaling, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *390*, 500-505

3）岸本治郎，*日本農芸化学会誌* **2003**，*77*，566-569.

4）岸本治郎，*実験医学* **2000**，*18*，1817-1820.

5）Xu, Q.; Wang, Y.; Dabdoub, A.; Smallwood, P. M.; Williams, J.; Woods, C.; Kelley, M. W.; Jiang, L.; Tasman, W.; Zhang, K.; Nathans, J. Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell* **2004**, *116*, 883-895.

6）Tamai, Y.; Toume, K.; Arai, M. A.; Ishibashi, M. Griseoviridin and cyclic hydroxamates found in a screening program for Wnt signal inhibitor. *Heterocycles* **2012**, *86*, 1517-1524.

7）Espada, J.; Calvo, M. B.; Díaz-Prado, S.; Medina, V. Wnt signalling and cancer stem cells. *Clin. Transl. Oncol.* **2009**, *11*, 411-427.

8）Reya, R.; Clevers, H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* **2005**, *434*, 843-850

9）Bellei, B.; Flori, E.; Izzo, E.; Maresca, V.; Picardo, M. GSK3 $\beta$ inhibition promotes melanogenesis in mouse B16 melanoma cells and normal human melanocytes. *Cell Signal.* **2008**, *20*, 1750-1761

10）鳥居，西沢ら，Wnt5aの毛乳頭細胞死抑制作用とそのメカニズム．*フレグランスジャーナル* **2009**，*37*，54-60

11）Ito, M.; Yang, Z.; Andl, T.; Cui, C.; Kim, N.; Millar, S. E.; Cotsarelis, G. Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. *Nature* **2007**, *447*, 316-320

12）Shinonaga, H.; Noguchi, T.; Ikeda, A.; Aoki, M.; Fujimoto, N.; Kawashima, A. Synthesis and structure-activity relationships of radicicol derivatives and WNT-5A expression inhibitory activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 4622-4635

# 食用きのこ成分のメラノーマ細胞活性に及ぼす影響

東京海洋大学大学院 海洋科学技術研究科 食品生産科学科部門
長阪　玲子

Commercial mushrooms processing can produce about 100 kg of trimmings waste in Japan daily. Make use of such materials for applications could alleviate concerns on agricultural waste disposal. We already revealed that edible mushroom (*Flammulina velutipes*) extract inhibited melanosis in commercially raw fish, shellfish, and meat. We conducted to find the whitening activity compounds in edible mushrooms used for skin-whitening purpose and considered their mechanisms in melanin biosynthesis. In humans, skin pigmentation results from the synthesis and distribution of melanin, besides tyrosinase is a key enzyme for melanin biosynthesis. These days many cosmetics of skin-whitening are popular among women. This study demonstrated that melanin synthesis and tyrosinase content of B16/BL6 melanoma cells suppressed by mushroom extract. These results suggested that mushroom extract could be considered an alternative therapeutic agent for treating hyperpigmentation and an effective component in whitening cosmetics.

## 1．緒　言

我が国の食用きのこ生産量は約48万トンであり，平成20年の林業総産出額4,449億円の内2,324億円，52.5％を占めている．中でもエノキタケは古くから食習慣がある上，年間10数トン規模の生産があり，安価で大量に手に入れることが出来る．これまでに共同研究者である大島らによって，エノキタケを始めとする食用きのこにおいて子実体や菌糸体並びに廃棄菌床中に抗酸化性を持つ成分が多く含まれることを見出した．この成分は抗酸化成分として知られるビタミンＥの約7,000倍の抗酸化能を有することを明らかにした．また，エノキタケなど数種の食用キノコ可食部およびその栽培に用いられる水溶性抽出物は，抗酸化物質やポリフェノールオキシダーゼ（PPO）前駆体のタンパク質発現抑制作用をもち，この作用によってカニやエビなどの褐変防止作用を発揮することが明らかになっている[1－3]．

PPO活性の抑制はメラニン色素の生産を抑制することが知られ，PPO活性阻害作用を有する化粧品は美白作用を有する．また，メラニン原因症予防治療剤としても有効であることが知られている．従来から市場にある美白化粧品の多くは，表皮メラニン細胞においてメラニンの生成に働くPPOの活性を阻害するなどの働きを持つ．PPO阻害活性のある物質としては，コウジ酸[4]やアルブチン[5]がよく知られている．このほかにも，トウモロコシふすま[6]や小麦ふすま[7]の成分にチロシナーゼ阻害活性，B16メラノーマ細胞でのメラニン生成阻害活性が報告されている．また，ベニバナ種子から分離された成分によるB16メラノーマ細胞でのメラニン生成阻害活性も報告されている[8]．このように近年食物由来のPPO活性抑制作用を持つ成分について注目が集まっており，国内だけでなく海外においても安全な成分による美白作用のある化粧品が切望されていると言える．しかし，PPO活性抑制作用を持つ物質は高価なものが多く，それ故に美白作用のある化粧品は比較的高価な傾向にある．

図１に示すように生体内のメラニンの生成は，血中から供給されたチロシンがPPOによって酸化されることから始まる（図１）．チロシンは酸化されL-DOPA（L-3,4-dihydroxyphenylalanine）となり，さらにDOPAキノンへと代謝される．PPOの一種の酵素であるチロシナーゼは

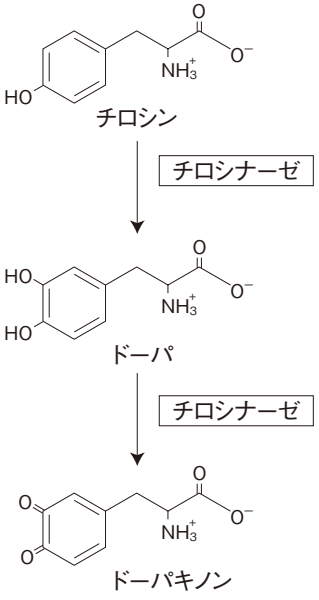



図１



Effect of edible mushroom on melanoma cells
Reiko Nagasaka
Food Chemistry and Functional Nutrition, Department of Food Science and Technology, Graduate School of Marine Science and Technology

この2つの反応を触媒する酵素である．DOPAキノンはその後自動的に酸化しユーメラニンやフェオメラニンが合成される．これらが代謝される時に活性酸素種が生成されるが，キノコ抽出物に抗酸化性があることから，キノコ抽出物中がこの代謝経路そのものを制御する可能性がある．したがってキノコ抽出物のメラニン産生への抑制効果およびそのメカニズムを検討することとした．特に，エノキタケ子実体抽出液がPPO活性抑制効果やPPOの前駆タンパク質の発現抑制効果を持つことから，メラニン産生に与える影響を検討することで，将来的に美白化粧品といった製品への応用のための知見を蓄積することを目的とした．本研究によりエノキタケ抽出物による美白作用およびそのメカニズムを明らかにし，安価でより効果的な安全性の高い美白化粧品の開発を目指した．

## 2．実　験

### 2．1　B16/BL6 マウスメラノーマ細胞の細胞活性に及ぼす食用キノコ抽出成分の影響

#### 2．1．1　エノキタケ抽出物の調製

細胞活性に及ぼす影響を検討するために，まずエノキタケ抽出物の調製を行った．エノキタケの部位による差異を検討するために，食用で用いられる子実体部分，廃菌床部分それぞれについて検討した．エノキタケ100gに蒸留水200gを加え，90℃にて30分間熱した後，4℃，5000rpmの条件下で15分間遠心分離を行った．得られた上清に蒸留水を加え，それぞれ1mlあたりエノキタケ500mg含有するように調製した．

#### 2．1．2　細胞毒性試験

96wellマイクロプレートにB16/BL6マウスメラノーマ細胞を$2.5\times10^3$cell/wellになるよう播種し，インキュベート後，2．1．1で調製したそれぞれの抽出物を種々の濃度になるよう培地に添加した．72時間培養後，Cell Counting Kit-8（CCK-8；同仁化学研究所）を用いて細胞増殖測定を行った．具体的にはCCK-8溶液を各ウェルに10μlずつ添加後，2時間インキュベートし呈色反応を行った．マイクロプレートリーダーで450nmの吸光度を測定し，得られた数値により各抽出物の細胞増殖への影響について評価した．また同時に細胞形態を観察した．

### 2．2　B16/BL6 マウスメラノーマ細胞のメラニン産生量に及ぼす食用キノコ抽出成分の影響

24wellマイクロプレートにB16/BL6マウスメラノーマ細胞を播種し，インキュベート後，2．1．1で調製した子実体抽出液を終濃度エノキタケ湿潤重量0，12.5，25，50（mg/ml）となるよう培地に添加し24時間培養後，アルカリ条件下でメラニンを抽出した．

### 2．3　食用キノコ抽出成分が B16/BL6 マウスメラノーマ細胞のチロシナーゼ活性に及ぼす影響

#### 2．3．1　分光光度計を用いた評価

チロシナーゼは，チロシンとDOPAを基質にすることが分かっているが，本研究ではL-DOPAを基質とし，チロシナーゼDOPAオキシダーゼとしての活性を調べた．2．2と同様の条件でB16/BL6マウスメラノーマ細胞を培養した．細胞を集めた後1% Triton-X100および1mM PMSFを加えて4℃で30分インキュベートしたのちホモジナイズし，遠心分離により上清を得た．酵素試料として用いる上清のタンパク定量をLowry法[9]を用いて行った．5mMのL-DOPA溶液にタンパク量として100μgの酵素試料を加え，37℃で60分インキュベートしたのち，分光光度計をもちいて492nmの吸光度を測定した．

#### 2．3．2　酵素電気泳動法による評価

酵素電気泳動法によりチロシナーゼ活性を測定した．具体的には前述の酵素試料を10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し，5mMのL-DOPAにより染色し，37℃で15分間インキュベートを行った．得られたバンドをImage J（National Institute of Health）にて取り込み，数値化した．

#### 2．3．3　ウェスタンブロッティングによる評価

2．3．2同様10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で酵素試料を分離したのち，セミドライブロッティング装置を用いてメンブレン（MILLPORE Immobilon P$^{sq}$）に転写した．メンブレンは3%BSA溶液でブロッキングを行い，60分のインキュベート後0.5%のTween20を含んだTBSで洗浄した．1次抗体はTyrosinase（H-109）：sc-15341（SANTA CRUZ Biotechnology，INC.）を用いた．2次抗体はAnti-IgG（H+L），Rabbit，Alexa680を用い，Oddessy（LI-COR）で目的タンパク質の検出を行った．

## 3．結　果

### 3．1　B16/BL6 マウスメラノーマ細胞の細胞活性に及ぼす食用キノコ抽出成分の影響

エノキタケ子実体部分抽出物，廃菌床部分抽出物それぞれのB16/BL6マウスメラノーマ細胞に対する細胞毒性試験を行った．その結果，子実体部分抽出物では若干の細胞数の増減はみられるものの（図2），細胞に対する毒性はほぼ見られなかった．しかし，図3に示すように，廃菌床部分抽出物において，高濃度で有意に細胞増殖が抑えられた．また，子実体部分抽出物の投与による細胞形態への影響は見られなかったが，廃菌床部分抽出物の投与により細胞が膨らみ，先端が枝状になるなど細胞形態が変化した．

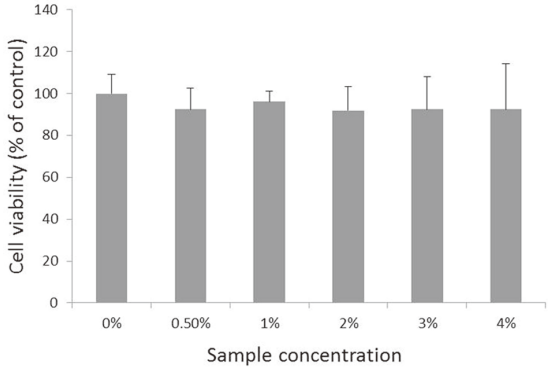



図２　エノキタケ子実体部分における細胞毒性試験

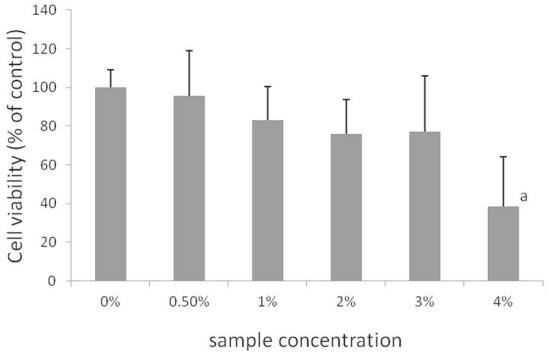



図３　エノキタケ廃菌床部分における細胞毒性試験

### ３．２　B16/BL6 マウスメラノーマ細胞のメラニン産生量に及ぼす食用キノコ抽出成分の影響

B16/BL6マウスメラノーマ細胞に子実体部分抽出物を異なる濃度で投与した際の細胞の様子を図４に示す．また，メラニン産生量を図５に示す．図５に示した通り，メラニン産生量は子実体部分抽出物の濃度依存的に減少した．

### ３．３　食用キノコ抽出成分が B16/BL6 マウスメラノーマ細胞のチロシナーゼ活性に及ぼす影響

#### ３．３．１　分光光度計を用いた評価

L-DOPAを基質としたときのB16/BL6マウスメラノーマ細胞のチロシナーゼ活性を測定した結果を図６に示した．図６に示す通り，子実体部分抽出物の濃度に依存してチロシナーゼ活性が低下したことが分かった．

#### ３．３．２　酵素電気泳動法による評価

酵素電気泳動法により，B16/BL6マウスメラノーマ細胞におけるチロシナーゼ活性を調べたところ，３．３．１同様に子実体部分抽出物の投与によりチロシナーゼ活性が低下することが明らかになった（図７）．Image Jにて得られたバンドを数値化したところ，子実体部分抽出物の濃度に依存してチロシナーゼ活性が有意に抑制されることが明らかになった（図８）．

#### ３．３．３　ウェスタンブロッティングによる評価

チロシナーゼタンパク発現量を測定したところ，チロシナーゼ発現量は有意ではなかったものの，子実体抽出物の濃度に依存して減少する傾向が見られた．

## ４．考　察

美白は女性にとって最も興味のある美容だというだけでなく，近年のオゾン濃度の低下による紫外線照射量の増加による皮膚がんのリスク問題にとっても重要な役割を示すと言える．紫外線から守る働きを持つ褐色色素のメラニンであるが，過剰なメラニン色素の沈着は肌の老化を促進し，

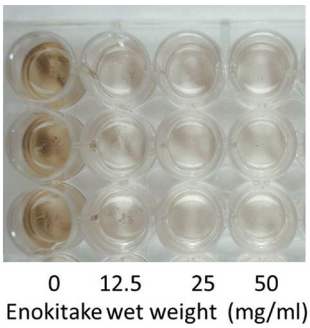



図４　B16/BL6 マウスメラノーマ細胞にエノキタケ子実体部分抽出物を種々の濃度で投与した際の細胞の様子

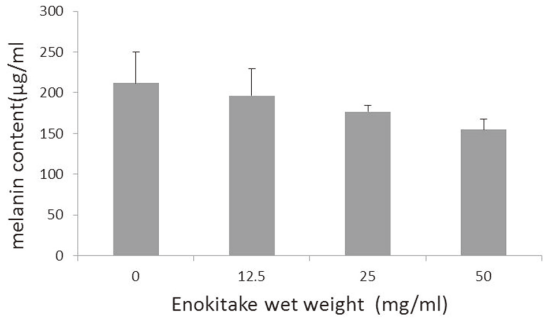



図５　B16/BL6 マウスメラノーマ細胞にエノキタケ子実体部分抽出物を種々の濃度で投与した際のメラニン産生量

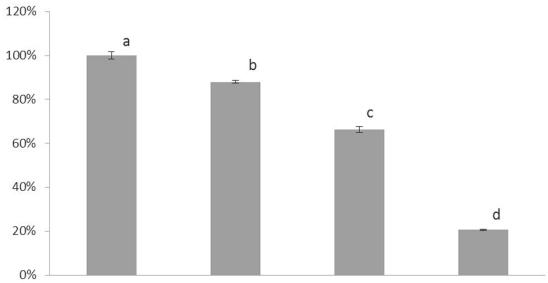



図６　L-DOPA を基質とした B16/BL6 マウスメラノーマ細胞のチロシナーゼ活性




図７　酵素電気泳動法による，子実体抽出物の B16/BL6 マウスメラノーマ細胞におけるチロシナーゼ活性への影響

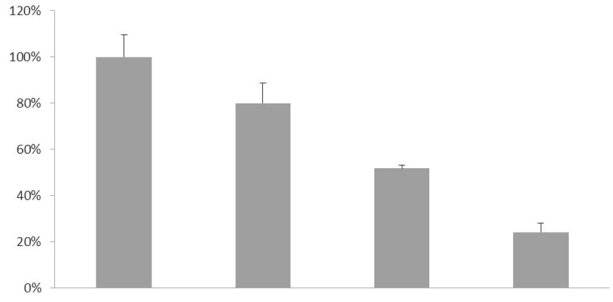



図８　酵素電気泳動法による，子実体抽出物の B16/BL6 マウスメラノーマ細胞におけるチロシナーゼ活性

過剰紫外線による細胞の損傷は皮膚がんの主因ともなっている．本研究では食用キノコ抽出物にメラニン産生を抑える働きがあり，さらにB16/BL6マウスメラノーマ細胞のチロシナーゼ活性を抑制する効果があることを明らかにした．

エノキタケ子実体部分抽出物は細胞毒性がない（図２）が，図３に示すようにエノキタケ廃菌床部分には高濃度帯で細胞毒性が見られた．また細胞形態の観察からも廃菌床部分抽出物には細胞毒性がある可能性が示唆された．したがってエノキタケ廃菌床部分は直接肌に塗布する可能性のある化粧品への展開は適していないと考えられる．しかし，エノキタケ廃菌床部分も多くの廃棄物となりうることから，エノキタケ廃菌床部分の有効利用は今後の課題であるともいえる．今後はエノキタケ廃菌床部分の効果的な利用も展望に入れて研究を進める必要がある．

また，子実体部分抽出物においてメラニン産生抑制作用があることが明らかになった．エノキタケにはPPO活性抑制作用があることを明らかにしていることから，エノキタケ中の成分がPPO活性を阻害し，その結果としてメラニン産生を抑制したと考えられる，また，皮膚における色素沈着の原因となるメラニン色素の合成は紫外線やストレスといった様々な刺激により促進されるといわれている．活性酸素がメラニン産生を促進することが知られていることから，子実体抽出部分におけるメラニン産生抑制効果はエノキタケのもつ抗酸化成分による可能性がある．今後は抗酸化評価試験などと組み合わせてメラニン産生抑制効果の詳細なメカニズムについて検討する必要がある．

チロシナーゼ活性についてはタンパク質発現量で有意な差異は見られなかったものの，L-DOPAを基質とした酵素活性および酵素電気泳動法での検討では子実体抽出部分によってチロシナーゼ活性が有意に低下することが明らかになった．今後はメラニン産生抑制およびチロシナーゼ活性に対するエノキタケ子実体抽出部分の作用機序の詳細な解析とともにPPO前駆タンパク質抑制効果などと併せて作用機序を検討していく予定である．

本研究はPPO抑制作用を食品であるキノコ抽出物から見出すものであり，さらなる検討により美白作用やそのメカニズムが解明され，安全・安心な化粧品が提供できる可能性が広がっていくだろう．美白効果のある安全な化粧品を安価で提供出来ることは，美しく豊かな人間生活の実現に寄与することが出来ると期待している．美容だけでなく，本研究成果により皮膚がんのリスクを減少させることは我が国の保健衛生の向上に貢献できると考えられる．

**（引用文献）**

1）Encarnacion AB, Fagutao F, Hirayama J, et al. Edible Mushroom (*Flammulina velutipes*) Extract Inhibits Melanosis in Kuruma Shrimp (*Marsupenaeus japonicus*). J. Food Sci., 76(1), C52-C58, 2011.

2）Bao HND, Ochiai Y, Ohshima T, Antioxidative activities of hydrophilic extract prepared from solid waste medium of mushroom (*Flammulina velutipes*) cultivation. Biores. Technol., 101, 6248-6255, 2010.

3）Jang MS, Sanada A, Ushio H, et al. Inhibitory effects of Enokitake mushroom extracts on polyphenol oxidase and prevention of apple browning. LWT-Food Sci. Technol., 35:697-709, 2002.

4）Montero P, Lopez-Caballero ME, Perez-Mateos M. The effect of inhibitors and high pressure treatment to prevent melanosis and microbial growth on chilled prawns (*Penaeus japonicus*). J. Food Sci., 66, 1201–1206, 2001.

5）Sugimoto K, Nishimura T, Nomura K, et al. Syntheses of arbutin-α-glycosides and a comparison of their inhibitory effects with those of α-arbutin and arbutin on human tyrosinase, Chem. Pharm. Bull. 51, 798-801, 2003.

6）Choi SP, Kang MY, Koh HJ, et al. Antiallergic activities of pigmented rice bran extracts in cell assays. J. Food Sci. 72, S719–S726, 2007.

7）樋口誠一，高橋学，山路明俊，小麦由来機能性成分の新規利用技術の開発，埼玉県産業技術総合センター研究報告，5，71-75，2007.

8）Roh JS, Han JY, Kim JH, et al. Inhibitory Effects of active compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius L.*) seeds for melanogenesis. Biol. Pharma. Bull. 27, 1976-1978, 2004.

9）Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275, 1951.

# 新規紫外線障害防護剤の開発・評価

九州大学大学院薬学研究院
山田　健一

Lipid-derived radicals and peroxides are involved in the pathogenesis of oxidative stress diseases, although lipid peroxide production is a required reaction between a lipid radical and molecular oxygen, a useful lipid radical detection method has remained tentative. In this study, the focus was on nitroxide reactivity, which allows spin trapping with carbon-centered radicals via radical-radical reactions and fluorophore quenching through interactions with nitroxide's unpaired electron. Thus, the aim here was to demonstrate a useful detection method for lipid-derived radicals as well as to clarify the effects of ketoprrofen induced skin damage using nitroxide. This compound reacted with lipid-derived radicals, resulting in fluorescence due to alkoxyamine formation, and lipid peroxide concentrations decreased in the reaction system. Furthermore, nitroxide inhibited lipid peroxide production and skin damage in mouse induced by ketoprofen adition and UV irradiation. These results suggested that the novel application of profluorescent nitroxide could directly and sensitively detect lipid-derived radicals and inhibited the skin damage.

## 1．緒　言

紫外線は、フリーラジカルを産生し、皮膚のシミ・シワや、老化などを引き起こす原因のひとつである。オゾン層の破壊により、紫外線量の増大が進む現代、その防御は喫緊の課題である。紫外線により皮膚内で産生したフリーラジカルは、連鎖反応により、持続的な皮膚障害をもたらす。一方、ニトロキシド化合物（＞N-O化合物）は、フリーラジカルと鋭敏に反応することから、抗酸化剤や、プラスティックの劣化防止剤として広く用いられている。この作用メカニズムは、ラジカル－ラジカル反応を介した連鎖反応の停止であり、このことは紫外線障害に対しても利用可能と考えられる。

一方、近年、蛍光法を用いた検出手法の開発が精力的に進められ、蛍光プローブは基礎研究に必要不可欠なツールとして高感度、かつリアルタイムな測定を可能としている。蛍光団は不対電子が存在すると電子移動やスピン交換により消光するために、蛍光をほとんど発しない（Fig.1A）。例えば蛍光団を分子内に持つニトロキシド化合物は、蛍光団を励起したときにニトロキシドと蛍光団との間で電子の移動が生じ、蛍光が観察されなくなる。しかしニトロキシドは、フリーラジカルとラジカル－ラジカル反応にて共有結合する。その結果、蛍光原子団が消光状態から開放され、炭素中心ラジカルの検出が可能になる。



Development and Evaluation of Protective Agent for UV Irradiation
Ken-ichi Yamada
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

そこで本研究では、疾患の原因のひとつとされる脂質由来ラジカルの検出手法を開発した。さらに、ケトプロフェン由来ラジカル中間体の検出とその抑制による疾患の軽減効果を、光過敏症障害モデルを用いて検討した。

## 2．実　験

### 2．1　蛍光ニトロキシドプローブおよび X-band ESR・蛍光測定

Dansyl Chlorideをリード化合物として、TEMPO系蛍光ニトロキシド化合物を合成した。ニトロキシドプローブ（100μM）をリノール酸（800μM）、リポキシゲナーゼ（0.1mg/ml）と混合し、経時的にESR測定を行った。また、蛍光光度計を用い、励起波長、蛍光波長及び蛍光強度を測定した。

### 2．2　LC/MS による反応生成物の解析

ニトロキシドプローブとリノール酸、リポキシゲナーゼを混合10分間後、2倍量の冷アセトニトリルを加え、30秒間ボルテックスにて混和した。10,000g、4℃にて5分間遠心分離し、上清を測定した。また、加熱による変化を検討するために、反応後ヒートブロックを用いて100℃で5分間加熱し、サンプルを作製した。検出器はUV（240nm）、イオン化法はPositive及びNegativeモード、移動相は0.05％ギ酸を含むアセトニトリル、流速は0.2ml/minとした。

### 2．3　ケトプロフェン水溶液中で生成されるフリーラジカルの検出

ケトプロフェンは0.1N NaOHに溶解し0.1Mとし、0.1M phosphate buffer（PB）containing 100μM DTPAを用いて希釈した。ケトプロフェンの光照射時に生成するラジカルの検出は、ケトプロフェン（3mM）、スピント

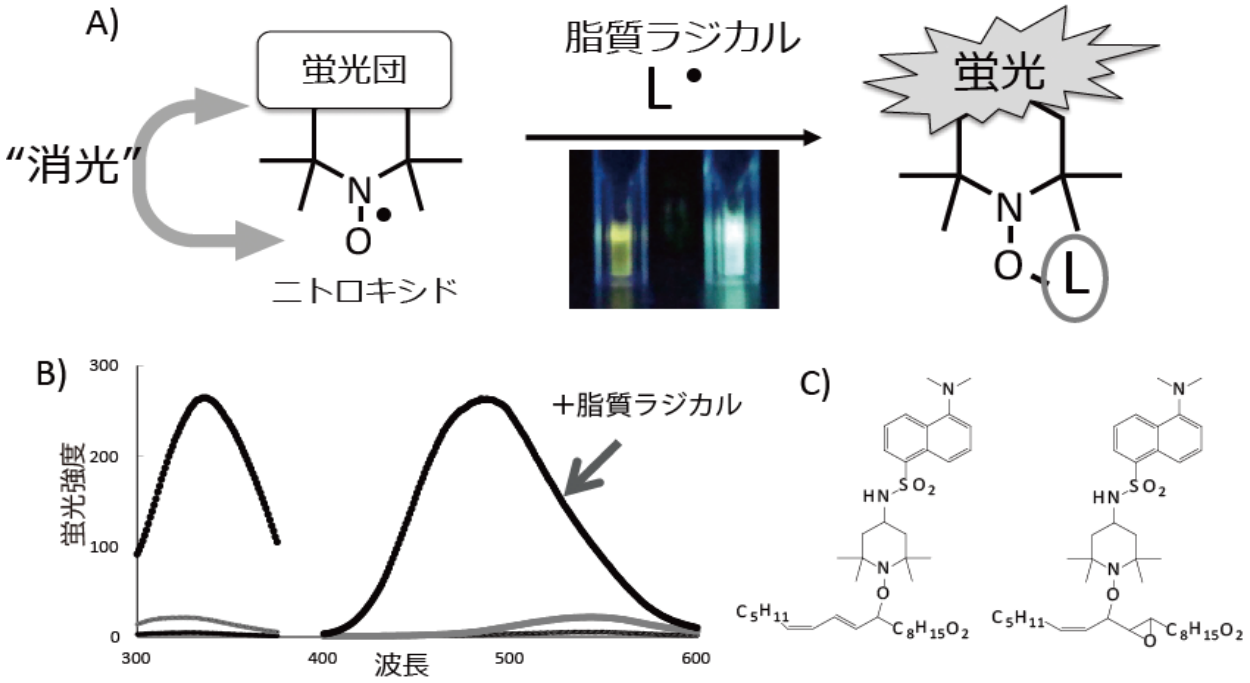



Fig. 1　蛍光ニトロキシドを用いた脂質ラジカルの検出
A）ニトロキシドのラジカルの存在有無により蛍光の OFF-ON が制御可能 .
B）蛍光ニトロキシドと脂質ラジカルとの反応後の蛍光強度変化 .
C）リノール酸由来ラジカルとの反応後の推定構造 .

ラップ剤POBNあるいはニトロキシドを混合後、X-band ESR（JES-RE1X，JEOL）にて測定した。紫外線照射は超高圧水銀灯（USHIO Optical Modulex，250W）を用いて、ESRキャビティー内を直接照射した。照射される光は、シャープカットフィルター（WG305，駿河精機）を透過させ、305nm以下の短波長の光はカットした。

### 2.4　ケトプロフェン塗布および光照射

イソフルラン麻酔下でBALB/cマウスの背部の毛をバリカンで刈り、4%ケトプロフェン溶液を200μl塗布した。ケトプロフェンを皮膚に浸透させるためにマウスを暗所で1時間放置した後に、紫外線照射を行った。紫外線照射にはブラックライト（TOSHIBA，FL15BLB，最大波長352nm）を三連にして使用した。ライトからの照射光は、3mm厚のガラスを通過させることにより、320nm以下の波長は除去した。紫外線照射量は約40J/㎠とした。紫外線照射24時間後、マウスは安楽死させた後、背中皮膚を切除し液体窒素で急速凍結した後に以下の実験に使用した。

### 2.5　脂質過酸化物測定（TBARs）

過酸化脂質量の指標として、Ohkawaらの方法[1)]に従いTBARs値を測定した。皮膚懸濁液0.2mlに8.1% SDS 0.2ml、20% acetic acid（pH3.5）1.5ml、0.8%2-Thiobarbituric acid 1.5ml、蒸留水0.6mlを添加し100℃の水浴中で60分間加熱した。加熱終了後、直ちに試験管を氷浴につけ反応溶液を冷却し、蒸留水1.0ml、n-butanol/pyridine（15:1）5.0mlを加え撹拌後、2,000rpmで25分間、遠心分離を行った。遠心分離後、その上清を532nmにて吸光度を測定した。

### 2.6　タンパク質含量の測定

タンパク質含量はBio-Rad Protein Assay kitを用いBradford法により測定した。反応で生じた青色溶液の595nmにおける吸光度を測定した。標準物質としてBovine Serum Albuminを用いた。

### 2.7　組織染色

紫外線照射24時間後にマウス背中皮膚を切除し、10%ホルマリンで固定後パラフィン包埋し、H.E.染色を行った。

## 3．結果、考察

### 3.1　炭素中心ラジカルの検出

蛍光ニトロキシドプローブと炭素中心ラジカルとの反応は、ラジカル消失および蛍光強度変化にて解析した。エマルジョン化させたリノール酸にDansyl-TEMPOを加え、リポキシゲナーゼ添加30秒後からESRならびに蛍光強度

を経時的に測定した。その結果Dansyl-TEMPOは、未反応の状態では蛍光をほとんど発しないのに対し、リポキシゲナーゼ添加後からESRシグナル強度が減衰し、蛍光強度は上昇した。未反応のプローブ、還元体ではEx 325 nm、Em 545 nmを示したのに対し、炭素中心ラジカルとの反応後Ex 335 nm、Em 487 nmへと波長がシフトした（Fig. 1B）。これは炭素中心ラジカルとの反応により蛍光原子団が疎水環境に置かれることで短波長シフトしたものと考えられる。シフト後の波長にて測定を行うことで、還元体等の影響を低減でき、より炭素中心ラジカルに特異的な解析が可能となる。さらに、LC/MS測定により炭素中心ラジカルとDansyl-TEMPOの反応産物を検出できたことから（Fig. 1C）、本手法が炭素中心ラジカルの測定に適していることがわかった。

リノール酸/リポキシゲナーゼ系では、リノール酸の11位のメチレンからプロトンが引き抜かれ、ペンタジエチルラジカルが生成する。その後、ラジカル連鎖反応により反応は進行し、最終的には13-ヒドロペルオキシオクタデカジエン酸（13-HPODE）を主とするヒドロペルオキシド体を生成する。本測定では、リノール酸からプロトンが引き抜かれた炭素中心ラジカルあるいはエポキシ化されたラジカルをDansyl-TEMPOが捕捉し、付加生成物が形成されたと考えられる。一方で、炭素中心ラジカルは酸素とも反応し、13-HPODEや二量体、エポキシド体などの脂質過酸化生成物を生成する。炭素中心ラジカルが酸素と反応し、ペルオキシルラジカルを生成する反応速度定数は非常に大きく、メチルラジカルでは$1.6 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$である[2]。また、ニトロキシドと炭素中心ラジカルの反応速度定数は$7.5 \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$であり[3]、フルオレスカミン誘導体蛍光ニトロキシドでは$7.8 \times 10^8 M^{-1}s^{-1}$との報告[2]がある。一方、ペルオキシルラジカルとの反応における速度定数は$5.4 \times 10^5$～$5.1 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$と上記と比較してその値は小さい[3]。加えて、ニトロキシドはペルオキシルラジカルや$\bullet NO_2$および$CO_3\bullet$とは安定なアダクトを形成せず、転位と脱離によりアルコキシルアミン体を生成し、捕捉したラジカルの構造を維持できない[2,4,5]。そのため、Dansyl-TEMPOはペルオキシルラジカルとは反応しにくく、反応してもその安定性の問題から構造を特定、検出できなかったと考えられる。以上の結果より、ニトロキシドは炭素中心ラジカルを鋭敏に捕らえ安定化し、質量分析装置を用いることでその構造推定も可能であることが示された。

### 3.2　ケトプロフェンラジカル中間体の検出と光線過敏症に対するニトロキシドの抑制効果

ケトプロフェンはNSAIDsの一種であり、経皮製剤として関節炎や腰痛などの鎮痛、消炎に広く使用されている薬剤である。しかし、ケトプロフェン経皮製剤は効果が高い反面、光増感剤として知られるベンゾフェノン骨格を有しており、副作用として光線過敏症が報告されている[6]。これまでにケトプロフェン光分解経路には、中間体としてケトプロフェン由来のフリーラジカルが存在することが推測されている。実際に、フェニル酢酸[7]や、ケトプロフェンと類似した構造を持つフェニルプロピオン酸誘導体のNSAIDsであるナプロキセン[8]が光分解する過程でラジカル中間体が生成する。一方、ケトプロフェンにおいてもメタノール中でmethylviologenのような電子受容体が存在すると電子移動が起こること[9]、ラジカルスカベンジャー（BHAやGSH）の添加によりケトプロフェン分解産物の生成速度が減少すること[9]から、ラジカル中間体の存在が示唆されている。

そこで、ケトプロフェン光分解経路で生成する炭素中心ラジカルを検出することを目的とし、スピントラップ剤を用いてX-band ESR測定を行った。ケトプロフェン溶液にPOBNを加え1分間紫外線を照射したところ、スピンアダクトが検出され、シミュレーション解析の結果、2種類のラジカル由来のESRスペクトルであることがわかった。また、それぞれの超微細結合定数は、$\alpha_N$=15.39 G、$\alpha\beta_H$=1.957 G（POBN-$R_1$, 72 %）および、$\alpha_N$=16.26 G、$\alpha\beta_H$=2.447 G（POBN-$R_2$, 28 %）であった（data not shown）。

さらに、質量分析装置を用いて、ケトプロフェンラジカル中間体とニトロキシドあるいはスピントラップ剤が結合した安定化合物の構造推定を行った。その結果、2種類のケトプロフェンラジカル中間体が生成していることがわかった。さらにこの系にリノール酸を添加するとリノール酸由来脂質ラジカルが生成し、ニトロキシドと安定に結合することもわかった。一方ケトプロフェンを添加しない場合は、リノール酸由来ラジカルは検出できなかった。以上の結果より、光照射によりケトプロフェンラジカル中間体が生成し、脂質分子と反応し脂質ラジカルが生じることがわかった。

そこで、実際にケトプロフェン塗布、紫外線照射によりマウス背中皮膚で過酸化脂質量が増加するか否かについて、紫外線照射24時間後における皮膚内TBARs値を測定した。その結果、ケトプロフェン塗布・紫外線照射処置群においてのみ、皮膚内TBARs値は有意に亢進した。脂質過酸化反応は、活性酸素種やフリーラジカルが不飽和脂肪酸から水素を引き抜くことで開始され、その後連鎖的に反応が進行する。紫外線照射のみを長時間行うと、マウス皮膚内の過酸化脂質量が増加するとされているが、本条件ではTBARs値は上昇しなかった。そこで、炭素中心ラジカルと反応するニトロキシドおよびスピントラップ剤の皮膚内過酸化脂質量に与える影響について検討した。その結果、紫外線照射24時間後における皮膚内TBARs値は有意

に抑制された（Fig. 2）。一方、ヒドロキシルラジカルスカベンジャーは、亢進したTBARs値を抑制しなかった（data not shown）。

紫外線照射24時間後にマウスの背中皮膚を切除し組織染色を行った結果、ケトプロフェン塗布・紫外線照射群で、角質層の不全角化、表皮の肥厚、細胞間浮腫、液状変性、さらに表皮内でアポトーシス細胞が認められた（Fig. 3）。また、紫外線照射を行っていない群では、これらの所見は確認されなかった。紫外線照射vehicle塗布群において一部、軽度の不全角化や表皮肥厚が生じており、紫外線照射単独でも障害を受けている可能性がある。実際に、高い障害性を有するUVBだけではなく、UVAでも大量に照射されると、紅斑、浮腫、サンバーン細胞の生成などを起こすことが報告されている。しかしながら、前述したように本研究の実験条件では、vehicle群に紫外線を照射しても皮膚内の脂質過酸化反応亢進、浮腫形成はおこらなかった。さらに、ニトロキシドあるいはスピントラップ剤をケトプロフェンと同時に塗布し紫外線照射すると、照射24時間後の皮膚障害は有意に抑制された。

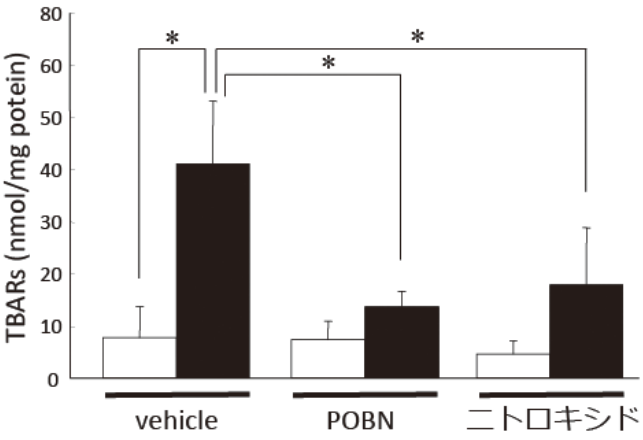



Fig. 2　ケトプロフェン塗布マウス背部での脂質過酸化測定
光照射により有意に脂質過酸化量が亢進し、POBN やニトロキシドの塗布により抑制された .

以上の結果から、ケトプロフェン塗布マウスに紫外線を照射するとケトプロフェンの光増感作用による皮膚障害が誘発されること、この酸化障害発現は皮膚内で生成されるフリーラジカル、特にケトプロフェン由来のアルキルラジカルや脂質ラジカルが関与することが明らかとなった。さらにニトロキシドやスピントラップ剤がケトプロフェン光増感作用による皮膚障害を抑制したことから、光線過敏症を抑制あるいは軽減するのに有用であることが示唆された。

## 4．総　括

本研究では、蛍光ニトロキシドプローブが炭素中心ラジカルと反応することで、蛍光のOFF/ONを制御できることを示した。同時にプローブとの反応生成物の同定を行うことで、炭素中心ラジカルなどの反応中間体の検出が可能であることを示した。一方で、ケトプロフェン紫外線照射時に、ケトプロフェンラジカル中間体が生成し、その後脂質ラジカルを産生することを見出し、またこれらラジカル体の構造推定にも成功した。さらにケトプロフェンをマウスに塗布すると、脂質過酸化、ならびに組織障害が亢進するが、これをニトロキシドの添加により有意に抑制するこ

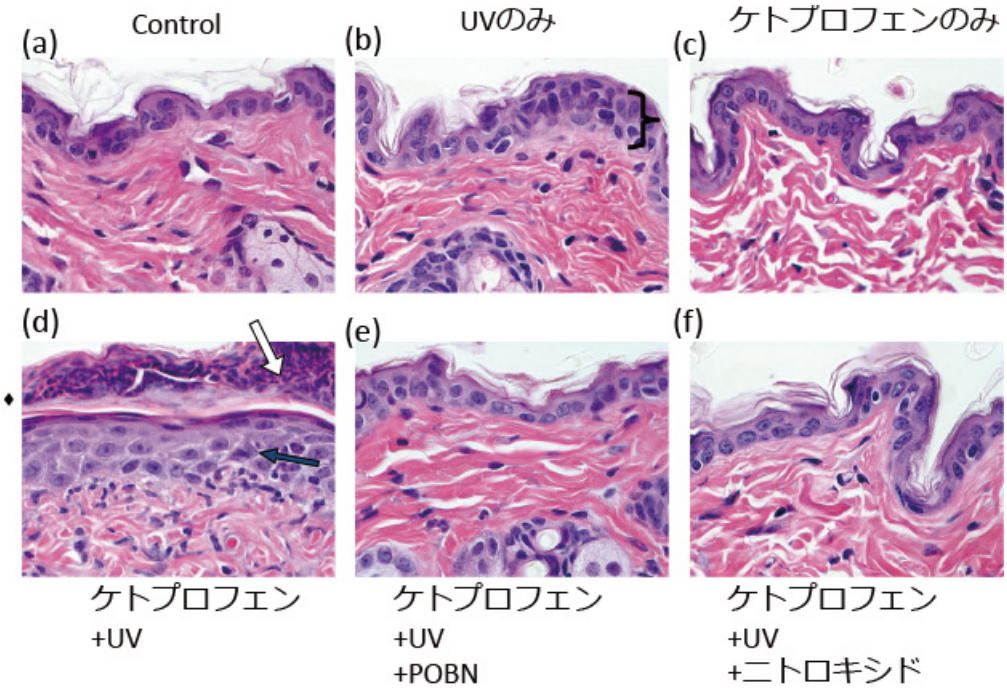



Fig. 3　ケトプロフェン塗布マウス背部での組織染色画像

とを示した。以上の結果より、ニトロキシドを用いることで皮膚疾患に関わるラジカル中間体を安定に検出でき、またラジカル中間体による連鎖反応を抑制し、その後の皮膚障害を軽減できることを見出した。今後、プローブの最適化を行うことで、皮膚疾患に関与する炭素中心ラジカルの検出およびラジカル連鎖反応抑制剤として、新たな化合物が見出せるものと期待している。

**謝　辞**

本研究の遂行にあたりコスメトロジー研究振興財団よりご援助頂きましたことを深く感謝申し上げます。

**（引用文献）**

1）Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K, : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem, 95(2), 351-358, 1979.

2）Herbelin SE, Blough NV, : Intramolecular quenching of excited singlet states in a series of fluorescamine-derivatized nitroxides. J Phys Chem B, 102(42), 8170-8176, 1998.

3）Goldstein S, Samuni A, : Kinetics and mechanism of peroxyl radical reactions with nitroxides. J Phys Chem A, 111(6), 1066-1072, 2007.

4）Goldstein S, et al., : Structure-activity relationship of cyclic nitroxides as SOD mimics and scavengers of nitrogen dioxide and carbonate radicals. J Phys Chem A, 110(10), 3679-3685, 2006.

5）Goldstein S, Samuni A, Russo A, : Reaction of cyclic nitroxides with nitrogen dioxide: the intermediacy of the oxoammonium cations. J Am Chem Soc, 125(27), 8364-8370, 2003.

6）Bosca F, Miranda MA, : Photosensitizing drugs containing the benzophenone chromophore. J Photochem Photobiol B, 43(1), 1-26, 1998.

7）Epling GA, Lopes A, : Fragmentation Pathways in Photolysis of Phenylacetic Acid. J Am Chem Soc, 99(8), 2700-2704, 1977.

8）Moore DE, Chappuis PP, : A Comparative-Study of the Photochemistry of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs, Naproxen, Benoxaprofen and Indomethacin. Photochem Photobiol, 47(2), 173-180, 1988.

9）Costanzo LL, De Guidi G, Condorelli G, Cambria A, Fama M, : Molecular mechanism of drug photosensitization--II. Photohemolysis sensitized by ketoprofen. Photochem Photobiol, 50(3), 359-65, 1989.

# 励起状態近接効果を利用した新規UVA−UVB ハイブリッド型サンスクリーンの開発

群馬大学大学院工学研究科応用化学・生物化学専攻

吉原　利忠

The synthesis and photophysical properties of *N*-hydroxyethyl-*o*-aminoactophenone (HEAAP), and UVA-UVB hybrid compound (MBCE-HEAAP, MNCE-HEAAP) based on HEAAP and UVB absorbers have been studied by using fluorescence and time-resolved photoacoustic method. The absorption band of HEAAP in solution is observed at UVA region. The fluorescence quantum yield ($\Phi_f$) of HEAAP depends on the nature of the solvent. In *n*-hexane, HEAAP gives very small $\Phi_f$ value ($\Phi_f = 4.5 \times 10^{-4}$), suggesting the presence of very fast nonradiative deactivation processes. The measurement of the quantum yield of the intersystem crossing of HEAAP based on the photoacoustic method clearly shows that the fast radiationless processes in *n*-hexane are due to internal conversion. This efficient $S_1 \rightarrow S_0$ internal conversion arises from vibronic interaction between close-lying $^1(\pi,\pi^*)$ and $^1(n,\pi^*)$ states (the proximity effect). For MBCE-HEAAP and MNCE-HEAAP, these absorption bands are observed at UVB and UVA region. The fluorescence intensity of MBCE or MNCE decreases extremely showing that effective energy transfer from MBCE or MNCE unit to HEAAP moiety occurs. The photostability of MBCE-HEAAP in *n*-hexane is higher than that of methoxycinnamic acid ethyl ester which is typical UVB sunscreen. These results suggest that UVA-UVB hybrid compound has a high potential for the sunscreen.

## 1．緒　言

光は生命維持活動において必要不可欠な要素であるとともに，時として，生命活動に対して危機的に作用することもある。特に，太陽光に含まれる紫外線が人体の皮膚に暴露された場合，サンバーンおよびサンタンなどの日焼けだけでなく，光老化や皮膚がんを誘発することが知られている。これらは，UVB（290−320nm）領域の中波紫外線が主な原因とされてきたが，近年の研究から真皮深くまで到達する長波紫外線（320−400nm）の影響も無視できないことが指摘されている。UVAは太陽光線中にUVBと比較して20倍以上含まれており，DNA損傷を引き起こし，光発がんをもたらすことも報告されている。現在，UVA領域に適した有機系サンスクリーンは，ヒドロキシフェニルベンゾトリアゾール誘導体[1]，ジベンゾイルメタン誘導体[2]のみである。これらの化合物は，光化学反応や励起状態での分子の構造変化を利用して，吸収した光エネルギーを熱エネルギーに変換している。このため，副反応によって効果が低下することが指摘されており，UVA領域の紫外線を吸収する新しい有機系サンスクリーンの開発が望まれている。

本研究課題では，励起状態近接効果[3]を利用して，光エネルギーを効率的に熱エネルギーに変換する分子を用いた新しいUVAサンスクリーンの開発を行う。また，開発したUVAサンスクリーンとUVB領域に吸収を示す化合物を連結させ，吸収したUVBをUVAにエネルギー移動させるUVA-UVBハイブリッド型サンスクリーンの開発を行う。



Development of Novel UVA-UVB Hybrid Sunscreen Based on Proximity Effect

Toshitada Yoshihara

Department of Chemistry and Chemical Biology, Graduate School of Engineering, Gunma University

## 2．実　験

### 2．1　試料，溶媒

*o*-アミノアセトフェノン（*o*-AAP，東京化成）は，シリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開剤：クロロホルム：酢酸エチル（4:1v/v））で精製して用いた。*n*-ヘキサン（*n*-Hex，関東化学），アセトニトリル（MeCN，関東化学），メタノール（MeOH，関東化学）は蛍光分析用を用いた。

### 2．2　測定方法

#### 2．2．1　吸収，蛍光スペクトル

吸収スペクトルは紫外可視分光光度計（日本分光，Ubest-V550），蛍光スペクトルは分光蛍光光度計（日立，F-7000）を用いて測定した。蛍光スペクトル補正は，標準試料から求めた補正曲線を用いて行った。

#### 2．2．2　蛍光量子収率

蛍光量子収率（$\Phi_f$）は，絶対蛍光量子収率測定装置[4]（浜松ホトニクス，C9920-01）で測定した*o*-AAPのMeCN中における蛍光量子収率の値（$\Phi_f$=0.020）を標準値として相対法を用いて決定した。

#### 2．2．3　時間分解光音響分光測定[5]

光音響信号測定のための励起光源は，$Nd^{3+}$：YAGレーザー（スペクトラフィジクス，GCR-130，パルス幅：6ns）の第三高調波（355nm）を用いた。試料溶液からの光音響

信号は，シリコングリースをカップリング剤としてセル面に圧着させた圧電素子（Panametrics，V103，1MHz）を用いて検出し，その信号をプリアンプ（Panametrics，5676，50MHz，40dB，入力インピーダンス：100kΩ）で増幅し，デジタルオシロスコープ（テクトロニクス，TDS-540）に取り込んだ。試料溶液に対する励起レーザー光の強度は，NDフィルターを用いて可変させ，その強度をレーザーパワーメーター（Laser Precision, RJ-7610）で測定した。

## 3．結　果

### 3．1　*N*-ヒドロキシエチル-*o*-アミノアセトフェノン（HEAAP）の合成

HEAAPは，ジメチルホルミアミド（DMF）を溶媒，炭酸カリウム（$K_2CO_3$）を塩基として用いて，*o*-AAPとヨードエタノールを100℃で4時間撹拌することで得た（図1）。粗生成物の精製は，シリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開剤：ヘキサン：酢酸エチル（1:1v/v））およびGPC（展開剤：クロロホルム）を用いて行った。化合物の同定は，$^1$H-NMRで行った。

### 3．2　HEAAPの励起状態緩和過程

#### 3．2．1　HEAAPの吸収，蛍光スペクトル

図2にHEAAPの*n*-Hex，MeCN，MeOH中における吸収・蛍光スペクトルを示す。また，表1にそれぞれの極大波長（$\lambda_{abs}$，$\lambda_{flu}$）を示す。

#### 3．2．2　HEAAPの蛍光，項間交差，内部変換の量子収率（$\Phi_f$，$\Phi_{isc}$，$\Phi_{ic}$）

表1に*o*-AAPのMeCN中における$\Phi_f$値（0.020）を基準に相対法によって決定したHEAAPの$\Phi_f$値を示す。

HEAAPの$\Phi_{isc}$値は時間分解光音響分光法によって決定した。図3(a)にHEAAPの*n*-Hex中で観測された音響信号，(b)に参照化合物である2-ヒドロキシベンゾフェノン（2-HBP）の音響信号を示す。観測された音響信号の振幅（*H*）は，それぞれ(1)式および(2)式で示される。

$$H^S = K\alpha E_0^S (1-10^{-AS}) \quad (1)$$

$$HR = KE_0^R (1-10^{-AR}) \quad (2)$$

ここで，*K*は装置定数，$E_0^S$，$E_0^R$はそれぞれHEAAP，

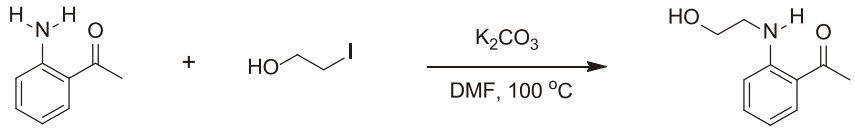



図1　HEAAP の合成スキーム

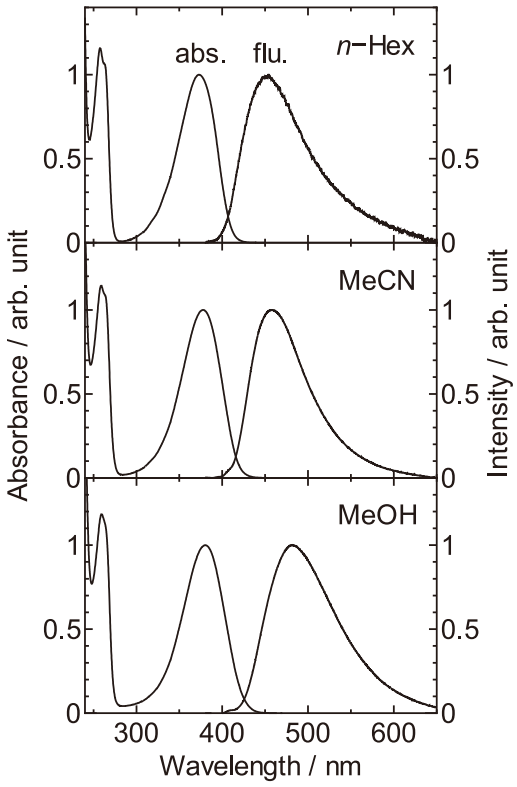



図2　HEAAP の吸収・蛍光スペクトル

表1　HEAAP の光物理パラメーター

| 溶媒 | $\lambda_{abs}$/nm | $\lambda_{flu}$/nm | $\Phi_f$ | $\Phi_{isc}$ | $\Phi_{ic}$ |
|---|---|---|---|---|---|
| *n*-Hex | 373 | 452 | 0.00045 | <0.01 | >0.99 |
| MeCN | 378 | 458 | 0.0071 | 0.06 | 0.93 |
| MeOH | 380 | 482 | 0.015 | 0.09 | 0.90 |

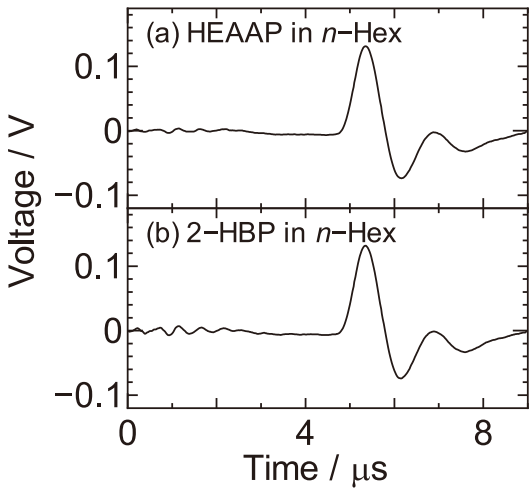



図3　HEAAP および 2-HBP の *n*-Hex 中における光音響信号

2-HBPを励起するためのレーザー光強度，$A^S$，$A^R$はそれぞれHEAAP，2-HBPの励起波長（355nm）での吸光度である。αは試料の熱変換効率であり，2-HBPではα=1である。(1)式，(2)式からαは(3)式で示される。

$$\alpha=((H^S E_0{}^R(1-10^{-AR}))/((H_R E_0{}^S(1-10^{-AS})) \quad (3)$$

α値は，NDフィルターで変化させたレーザー光強度に対して，それぞれの音響信号の振幅をプロット（図４）し，最小二乗法解析により導出した傾きを用いて決定した。

分子の励起三重項状態の寿命が他の緩和過程より十分に長い場合，分子に与えた光エネルギーは(4)式で示される。

$$E_\lambda=\Phi_f<E_S>+\Phi_{isc}E_T+\alpha E_\lambda \quad (4)$$

ここでEλは励起エネルギー，$<E_S>$は分子の蛍光平均エネルギー，$E_T$は分子の三重項エネルギーである。(3)式および(4)式を用いることにより，各溶媒中におけるHEAAPの$\Phi_{isc}$値を決定し表１にまとめた。

HEAAPの$\Phi_{ic}$値は，励起一重項状態からの緩和過程が，蛍光，項間交差，内部変換であると仮定して(5)式より決定し表１にまとめた。

$$\Phi_{ic}=1-\Phi_f-\Phi_{isc} \quad (5)$$

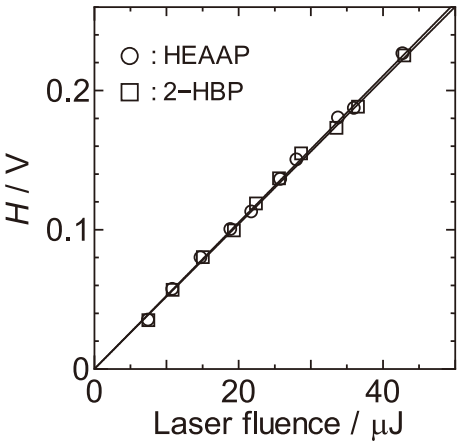



図４　レーザー光強度に対する音響信号の振幅のプロット

### ３．３　MBCE-HEAAP，MNCE-HEAAPの合成

MBCE-HEAAP，MNCE-HEAAPは，DMFを溶媒，EDC塩酸塩を縮合剤，*N,N*-ジメチルアミノピリジン（DMAP）を添加剤として用いて，HEAAPと4’-メトキシビフェニル-4-カルボン酸，あるいは6-メトキシナフタレン-2-カルボン酸を室温にて20時間撹拌することで得た（図５）。粗生成物の精製は，シリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開剤：クロロホルム）およびGPC（展開剤：クロロホルム）を用いて行った。化合物の同定は，$^1$H-NMRで行った。

### ３．４　MBCE-HEAAP，MNCE-HEAAP の励起状態緩和過程

図６にMBCE-HEAAP(a)，MNCE-HEAAP(b)の*n*-Hex中における吸収・蛍光（励起波長：285nm）・蛍光励起（観測波長：480nm）スペクトルを示す。また，図７(a)にMBCE-HEAAPおよび4’-メトキシビフェニル-4-カルボン酸エチルエステル（MBCE），(b)にMNCE-HEAAPおよび6-メトキシナフタレン-2-カルボン酸エチルエステル（MNCE）の*n*-Hex中における蛍光スペクトルを示す。ここで，MBCE-HEAAPあるいはMNCE-HEAAPおよびMBCEの励起波長（280nm）における吸光度はそれぞれ等しくして測定を行った。

### ３．５　MBCE-HEAAP の光安定性の評価

図８(a)にMBCE-HEAAP，(b)に4-メトキシけい皮酸エチルエステル（MCEE）の*n*-Hex中，超高圧水銀灯照射（λ>290nm）における吸収スペクトル変化，図９に295nmでのそれぞれの化合物の吸光度の相対変化（$A_{295}{}^t/A_{295}{}^0$）を示す。

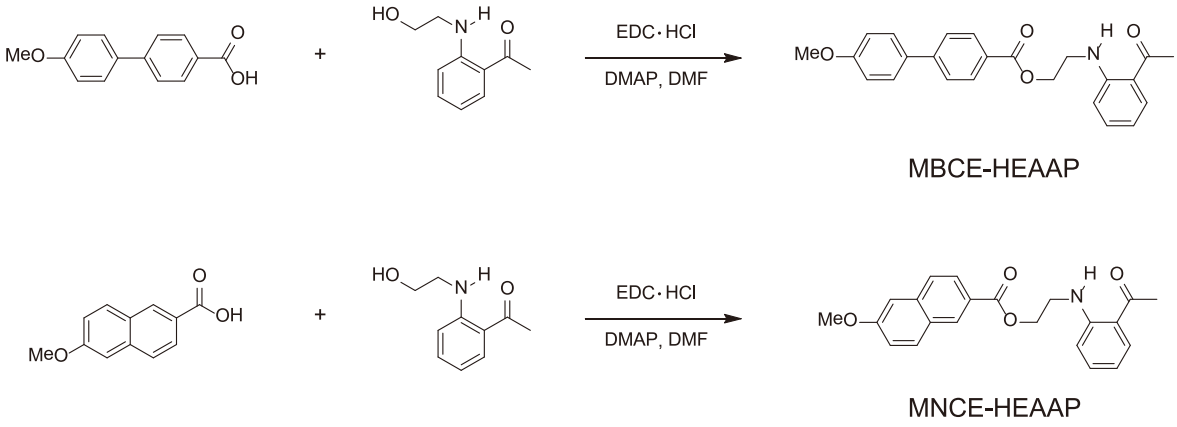



図５　MBCE-HEAAP，MNCE-HEAAP の合成スキーム

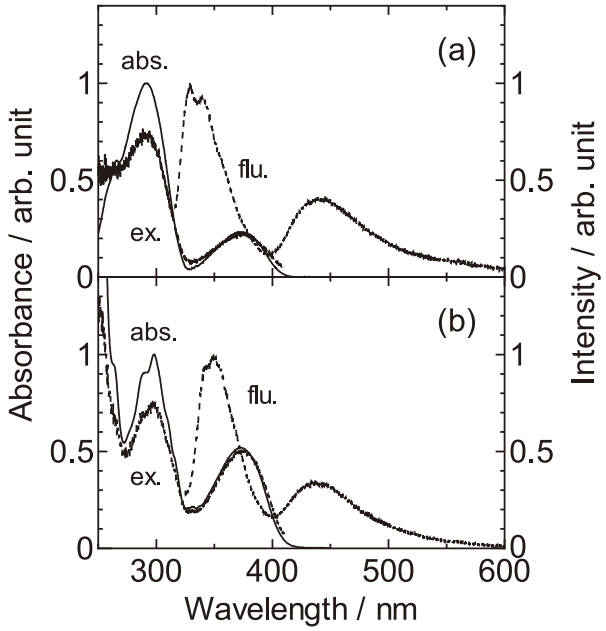



図６　MBCE-HEAAP (a)，MNCE-HEAAP (b) の *n*-Hex 中における吸収（abs.）・蛍光（flu.）・蛍光励起スペクトル（ex.）

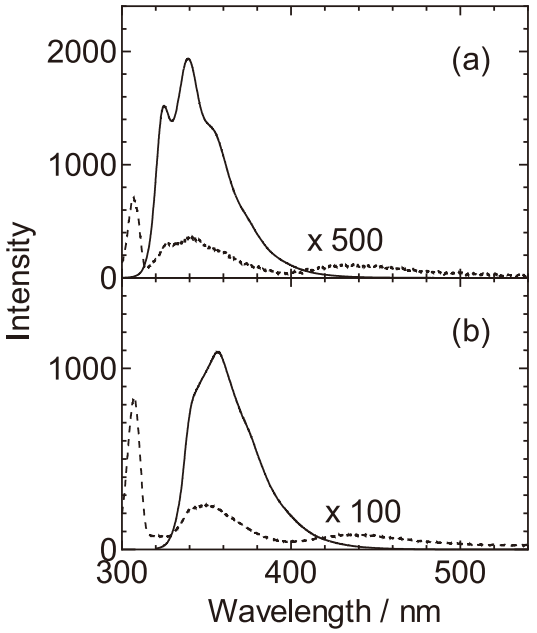



図７　(a) MBCE-HEAAP（破線）および MBCE（実線），(b) MNCE-HEAAP（破線）および MNCE（実線）の *n*-Hex 中における蛍光スペクトル

## ４．考　察

合成したHEAAPはすべての溶媒中においてUVA領域に吸収を示した。蛍光極大波長は，*n*-Hex中と比較して極性溶媒であるMeCN中やプロトン性溶媒であるMeOH中において長波長シフトした。これは励起状態においてアミノ基側からアセチル基側に電荷移動が起こり，励起分子とMeCNやMeOHとのクーロン相互作用が増加し，励起状態エネルギーが安定化するためである。蛍光量子収率（$\Phi_f$）はすべての溶媒中において0.02未満であり，特に*n*-Hex中では非常に小さな値である。$\Phi_f$値は，*n*-Hex中と比較してMeCN中で大きな値を示し，MeOH中においてさらに大きな値を示している。これは，*o*-AAPや*o-N*-メチルAAPと同様な傾向[6),7)]であり，HEAAPにおいても$S_1(\pi,\pi)^*$状態と$S_2(n,\pi)^*$状態が*n*-Hex中で近接しており，効率的な無放射緩和過程が誘起される（Proximity effect）。一方，MeCN中やMeOH中においては$S_1(\pi,\pi)^*$状態が安定化，$S_2(n,\pi)^*$状態が不安定化することにより，エネルギー差が増加するため，無放射緩和過程が減少し，$\Phi_f$値が増加すると考えられる。

時間分解光音響分光測定からHEAAPの項間交差量子

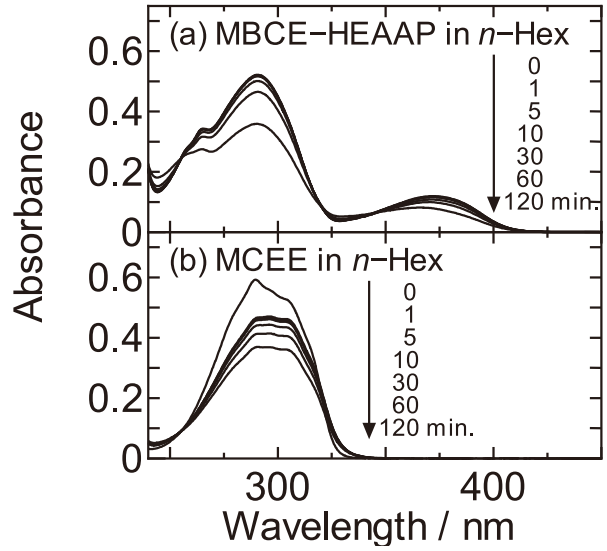



図８　MBCE-HEAAP および MCEE の *n*-Hex 中，超高圧水銀灯照射（$\lambda > 290$nm）における吸収スペクトル変化

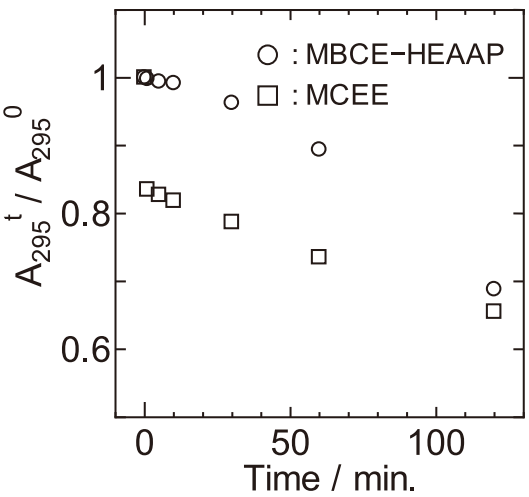



図９　295nm における吸光度の相対変化（$A_{295}^t/A_{295}^0$）

収率（$\Phi_{isc}$）は，0.1未満（*n*-Hex中では0.01未満）であり，励起三重項状態の生成は少ないことがわかる。これはサンスクリーンとして非常に重要な特性である。励起三重項状態にある分子は，酸素が衝突することにより，エネルギー移動反応や電子移動反応により一重項酸素やスーパーオキシドアニオンラジカルなどの活性酸素を生成する。これら活性酸素は，近傍の生体分子と反応することにより光毒性として作用する。HEAAPの内部変換量子収率（$\Phi_{ic}$）は，0.9以上（*n*-Hex中では0.99以上）であり，光エネルギーを高効率で熱エネルギーに変換し，励起状態から基底状態に緩和していることがわかる。これまでのUVAサンスクリーンは，分子内プロトン移動や分子内構造変化によって光熱変換を実施しており，本研究課題で開発したHEAAPは新しいタイプの光熱変換分子である。

サンスクリーンの特性として蛍光を示さないことは重要である。一般にUVB領域に吸収を示す化合物の蛍光はUVA領域に観測される。つまり，UVBサンスクリーンがUVA領域に蛍光を示した場合，UVAに暴露されたのと同じことになる。このため，UVBサンスクリーンとして使用できる化合物は，蛍光量子収率が低いことが必要とされる。本研究課題では，UVB領域に吸収を示し，UVA領域から可視光領域に強い蛍光を示す化合物（MBCE, MNCE）をHEAAPと連結させることにより，吸収したUVB領域の光エネルギーをHEAAPにエネルギー移動させ，蛍光を減少させることを試みた。

合成したMBCE-HEAAPはUVB領域にMBCE，UVA領域にHEAAPに帰属できる吸収が観測された。*n*-Hex中において285nmを励起波長としてMBCEに選択的に光励起したところ，MBCEの蛍光はほとんど観測されずHEAAPの蛍光がわずかに観測された。480nmを観測波長として蛍光励起スペクトルを測定したところ，HEAAPの吸収に加えてMBCEの吸収と一致するスペクトルが観測された。これより，光励起されたMBCEからHEAAPにエネルギー移動が起こることが明らかとなった。エネルギー移動効率は，MBCEの蛍光が約1000倍減少していることから考えると99%以上である。同様な結果は，MNCE-HEAAPにおいても得られた。これにより蛍光性化合物をHEAAPに連結させることにより，ほぼ無蛍光性状態にすることが可能であることが分かった。MBCE-HEAAPの光安定性を，現在使用されているけい皮酸化合物と比較したところ，それを上回る安定性を示しておりUVA-UVBハイブリッド型サンスクリーンの有用性が明らかとなった。

## 5．総　括

本研究課題では，励起状態近接効果を利用した新しいタイプのサンスクリーンの候補化合物（HEAAP）を開発した。さらに，UVA-UVBハイブリッド型化合物の開発を行い，UVBサンスクリーンとして使用可能な化合物の範囲を大幅に広げることに成功した。今後の課題は，化合物の溶剤への溶解性などの化学的評価や生体毒性などの生物的評価が必要とされる。

**（引用文献）**


1）Wiechmann M, Port H, Frey W, Laermer F, Elsaesser, : Time-resolved spectroscopy on ultrafast proton transfer in 2-(2'-hydroxy-5'-methylphenyl) benzotriazole in liquid and polymer environments, J. Phys. Chem., 95, 1918-1923, 1991.

2）Cantrell A, McGarvey DJ, : Photochemical studies of 4-*tert*-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane (BM-DBM), J. Photochem. Photobiol., B: Biol, 64, 117-122, 2001.

3）Lim EC, : Proximity effect in molecular photophysics: dynamical consequences of pseudo-Jahn-Teller interaction, J. Phys. Chem., 90, 6770-6777, 1986.

4）Suzuki K, Kobayashi A, Kaneko S, 他6名, : Reevaluation of absolute luminescence quantum yields of standard solutions using a spectrometer with an integrating sphere and a back-thinned CCD detector, Phys. Chem. Chem. Phys., 11, 9850-9860, 2009.

5）Oshima J, Shiobara S, Naoumi H, 他4名, Extreme fluorescence sensitivity of some aniline derivatives to aqueous and nonaqueous environments: Mechanistic study and its implication as a fluorescent probe, J. Phys. Chem. A, 4629-4637, 110, 2006.

6）Yoshihara T, Shimada H, Shizuka H, Tobita S, : Internal conversion of *o*-aminoacetophenone in solution, Phys. Chem. Chem. Phys., 3, 4972-4978, 2001.

7）Shimada H, Nakamura A, Yoshihara T, Tobita S, : Intramolecular and intermolecular hydrogen-bonding effects on photophysical properties of 2'-aminoacetophenone and its derivatives in solution, Photochem. Photobiol. Sci., 4, 367-375, 2005.

# 両親媒性多糖デンドリマーを保護剤とした金・白金ナノコロイドによる活性酸素消去活性

奈良女子大学大学院人間文化研究科
吉村　倫一

Tadpole-type amphiphilic dendrimers with poly(amidoamine) (PAMAM) dendrons and a single alkyl chain (alkyl chain length = 16, generation number = 1–5) were designed and synthesized, and investigated their adsorption and aggregation properties using surface tension, fluorescence of pyrene, dynamic light scattering (DLS), and small-angle neutron scattering (SAXS). The amphiphilic dendrimers exhibit low critical micelle concentration and high efficiency in lowering the surface tension of water, indicating that the dendron-head moieties were more efficiently packed at the air-water interface and in solution. The DLS and SANS show that the amphiphilic dendrimers form small micelles in aqueous solution regardless of the generation and the concentration. Gold and platinum nanoparticles were prepared by chemical reduction protected by tadpole type amphiphilic dendrimers, and their catalytic activities for reduction reaction of *p*-nitrophenol and DPPH radical scavenging reaction were investigated. It was found that the catalytic activities for reduction reaction were significantly influenced by the dendrimer generation and the size of nanoparticles.

## 1．緒　言

近年，活性酸素の健康などへの影響が一般的に知られ注目を集めている。活性酸素は体中で発生して細胞を攻撃し，動脈硬化，がん，アルツハイマー，脳梗塞など200種類以上の病気や老化の原因となっている[1)−3)]。人間の体内には活性酸素を消去してくれる強力な酵素をもっているが，20代をピークにその働きは衰えていく。これを補うためには，ビタミンCやポリフェノールなどの抗酸化物質を体外から摂取する必要があるが，現代の食生活でこれらを効果的に摂取することは非常に難しい。これまでに我々は，ヒアルロン酸，フコイダン，キトサン，デンドリマーなどの水溶性高分子存在下で金ナノ粒子を調製し，そのヒドロキシルラジカルの活性酸素消去活性および1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル（DPPH）ラジカルの消去活性について調べた結果，いずれも高い活性が認められることを見出した[4)−9)]。ここで用いたデンドリマーは，従来の高分子と異なり分子形状やサイズが制御された規則的な多分岐構造を有し，水溶液中では自己会合せず単分子ミセルで存在する。また，近年，我々はデンドリマーを自己集合させるために，デンドリマー骨格に１本の炭化水素鎖を導入したTadpole型（おたまじゃくし型）の両親媒性デンドリマーを分子設計・合成し，これらは気／液界面に効率よく吸着・配向し，水中で数10 ～ 100 nmの会合体を形成することを明らかにした。

本研究では，これらの両親媒性デンドリマーや末端官能基を糖鎖で修飾した多糖デンドリマーを保護剤とした金および白金ナノ粒子を合成し，*p* - ニトロフェノールの還元反応，DPPHラジカルおよびヒドロキシルラジカルの消去反応に対するナノ粒子の触媒活性を評価することを目的とする。会合体のナノ構造と細胞認識をもつ糖鎖を用いることで，人体や環境に配慮した粒径のそろった安定なナノ粒子と高い触媒活性が得られると確信する。



Active Oxygen Scavenging of Gold and Platinum Nano-Colloids Protected by Amphiphilic Dendrimers with Multi-Sugars

Tomokazu Yoshimura

Graduate School of Humanities and Sciences, Nara Women's University

## 2．実　験

### 2.1　合　成

#### 2.1.1　Tadpole 型両親媒性デンドリマー（2デンドロン骨格）の合成

メタノールに溶解させたヘキサデシルアミンを40 ºC付近まで昇温させた後，アクリル酸メチルを約1時間かけて加え，約94時間，40 ºCで加熱撹拌した。反応終了後，未反応のアクリル酸メチルを除去するために，メタノールによる共沸で減圧蒸留を行い，メチルエステル末端基を有する世代0.5のTadpole型両親媒性デンドリマー（$C_{16}$-2denG0.5）を少し粘性のある透明液体で得た。収率は100 %であった。構造は，$^1$H NMRおよびESI–MSにより確認した。

次に，メタノールに溶解させた$C_{16}$-2denG0.5を40 ºC付近まで昇温させた後，エチレンジアミンを約1.5時間かけて滴下し，約80時間，40 ºCで加熱撹拌した。反応終了後，未反応のエチレンジアミンを除去するために，トルエン，エタノール，メタノールの順による共沸で減圧蒸留を行い，白色粘体を得た。この粘体をヘキサンで洗浄し，真空デシケーターで十分に乾燥させることにより，アミノ末端基を有する世代１のTadpole型両親媒性デンドリマー（$C_{16}$-2denG1）を白色固体で得た。収率は93 %であった。構造は，$^1$H NMRおよびESI–MSにより確認した。

上と同様の方法により，アクリル酸メチルおよびエチレン

ジアミンの反応を繰り返すことによって，2つのデンドロン骨格を有する世代5までのTadpole型両親媒性デンドリマー（$C_{16}$-2denG*n*；*n*は世代で1～5）を収率よく合成した。

### 2.1.2　Tadpole 型両親媒性デンドリマー（3デンドロン骨格）の合成

2.1.1でヘキサデシルアミンの代わりに，*N*-ヘキサデシルエチレンジアミンを用いて同様に，3つのデンドロン骨格を有する世代1～5のTadpole型両親媒性デンドリマー（$C_{16}$-3denG*n*；*n*は世代で1～5）を合成した。構造をFig.1に示す。

### 2.1.3　糖鎖の導入

メタノールに溶解させたTadpole型両親媒性デンドリマーに，大過剰量のラクトビオン酸を加え，窒素雰囲気，還流下，100時間加熱撹拌した。反応終了後，メタノールを減圧留去して，透析を数日間行い未反応の糖を除去した。構造は，$^{1}$H NMR，ESI–MSおよび元素分析により確認した。

## 2.2　界面化学的特性

合成したTadpole型両親媒性デンドリマーの表面張力を，自動表面張力計Kruss K122を用いてウイルヘルミー法により25℃で測定した。各濃度での平衡表面張力を得るために，表面張力値の変化が毎9分で0.05mN $m^{-1}$以下となるまで測定を行なった。cmcとcmcにおける表面張力は，表面張力と濃度の対数曲線の屈曲点から決定した。

Tadpole型両親媒性デンドリマーが形成する会合体の大きさは，Uniphase社製He–Neレーザー（出力：35mW，波長：632.8nm–垂直偏光）を光源とする独国ALV社製のALV-5000Eを用いて測定した。すべての溶液は，測定前にセルロースエステル製の0.2μmフィルターでろ過して用いた。解析はヒストグラム法により拡散係数を決定し，Stokes-Einsteinの式を用いて流体力学的直径を算出した。

界面活性剤水溶液の蛍光測定は，日立650−10S蛍光分光光度計によりプローブにピレンを用いて測定した。スペクトルは335nmの励起波長，360～400nmで記録し，ピレンの濃度は$1 \times 10^{-5}$mol $dm^{-3}$とした。ピレン蛍光スペクトルの振動バンドの低波長側から数えて1番目と3番目の強度比（$I_1/I_3$）より，水溶液中の会合体の疎水的環境を評価した。

中性子小角散乱（SANS）の測定は，Tadpole型両親媒性デンドリマーを溶解した重水（$D_2O$）中で重塩酸（DCl）または重水酸化ナトリウム（NaOD）の添加によりpHを調整した試料を用いて行った。

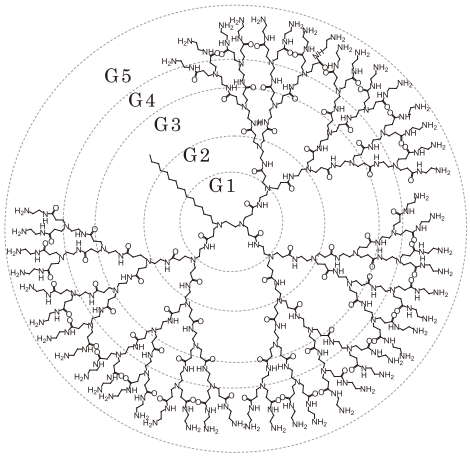



Fig. 1　Structure of $C_{16}$-3denG*n*.

## 2.3　金および白金ナノ粒子の合成

Tadpole型両親媒性デンドリマー（$C_{16}$-3denG*n*；*n* = 1～5）と塩化金酸の濃度比が1：1または4：1になるように，塩化金酸水溶液を$C_{16}$-*m*denG*n*水溶液に加え，30分間よく撹拌した。この混合溶液に氷冷した水素化ホウ素ナトリウムを加えて，30分間撹拌を続けることで還元を行い，金ナノ粒子を調製した。

また，白金ナノ粒子の調製は，金ナノ粒子の場合と同様に，塩化金酸を塩化白金酸に変えて同条件で行った。Tadpole型両親媒性デンドリマー（C16-3denG*n*；*n* = 1～5）と塩化白金酸の濃度比は1：1または4：1になるように調製した。

## 2.4　*p*-ニトロフェノールの還元反応

石英セルに，金または白金ナノ粒子，*p*-ニトロフェノール，超純水を加えて，撹拌した。この混合溶液に，氷冷した水素化ホウ素ナトリウムを素早く加え，可視紫外吸光分光計にセットし，時間に伴う400nmの吸光度を測定した。

## 2.5　金および白金ナノ粒子の DPPH ラジカル消去能

石英セルに，金または白金ナノ粒子とDPPHラジカル溶液を加え，撹拌した。この混合溶液を可視紫外吸光分光計にセットし，時間に伴う517nmの吸光度を測定した。

# 3．結果及び考察

## 3.1　合　成

Tadpole型両親媒性デンドリマー（$C_{16}$-*m*denG*n*，*m*はデンドロンの数で2，3，*n*は世代で1～5）は，コアにヘキサデシルアミンまたは*N*-ヘキサデシルエチレンジアミンを用いて，アクリル酸メチルによるMichael付加反応と生成したメチルエステルとエチレンジアミンの反応を繰り返すDivergent法に従い収率よく合成することができた。

## 3.2　界面化学的特性

pH2の水溶液における$C_{16}$-*m*denG*n*の表面張力は，いずれも濃度の増加とともに減少し，臨界ミセル濃度（cmc）

を示す明瞭な屈曲点が見られほぼ一定となった（Fig.2）。世代１～３のcmcは世代の増加すなわちデンドリマーの親水性の増大とともに増加したが，世代４，５になるとcmcの大きな増加は認められず，cmcは逆に小さくなるか，あるいはほとんど変わらなかった。気/液界面での吸着・配向状態は，cmcにおける表面張力（$\gamma_{cmc}$）およびGibbs式から求めた分子占有面積（$A_{cmc}$）を用いて評価することができる。$C_{16}$-*m*denG*n*の $\gamma_{cmc}$は36～47mN $m^{-1}$，$A_{cmc}$は0.53～0.86nm$^2$となり，嵩高い構造のデンドロン骨格を有しているにもかかわらず，従来の界面活性剤と同様に気/液界面に効率よく吸着・配向していることがわかった。これは，世代およびデンドロン骨格が増加すると，デンドロンのアミド基間の水素結合が増加して密にパッキングできるためと考えられる。$C_{16}$-*m*denG*n*のミセル形成の標準自由エネルギーの絶対値$|\Delta G^0_{mic}|$は，世代が１から２に増加すると小さくなるものの，世代２～５ではほぼ同じ値であり，$|\Delta G^0_{mic}|$および吸着の標準自由エネルギーの絶対値$|\Delta G^0_{ads}|$とも，デンドロンの骨格数に大きな違いは見られなかった。また，いずれの世代でも$|\Delta G^0_{mic}|$は$|\Delta G^0_{ads}|$よりも小さくなり，ミセル形成よりも気/液界面への吸着の方が優れることがわかった。ピレンの蛍光スペクトルの373nmと384nmの強度比$I_1/I_3$および静的光散乱から得られた散乱強度は，世代１および２では表面張力曲線から求めたcmc付近の濃度からそれぞれ減少，増大したが，世代３以上になるとcmc以下の濃度から変化が見られた。これは世代が高くなると，気/液界面への吸着と同時に水溶液中で会合体を形成していることを示唆する。

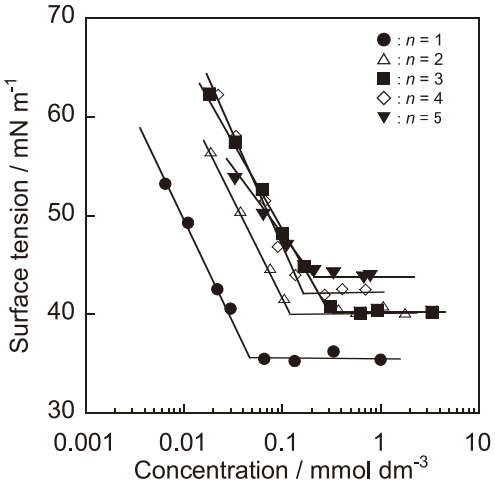



Fig. 2　Surface tension for $C_{16}$-3denG*n*.

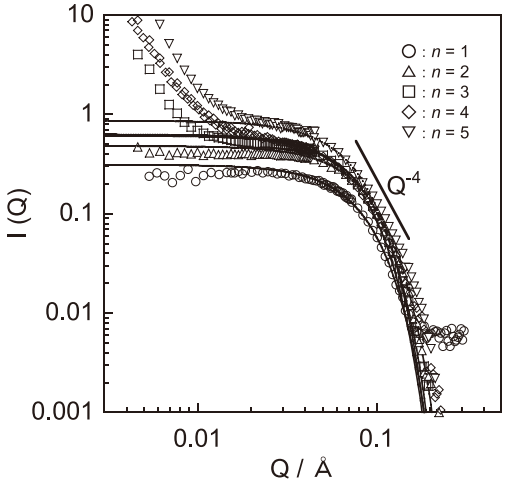



Fig. 3　SANS curves for $C_{16}$-3denG*n* at pH9.

### ３．３　水溶液中でのミセル特性

デンドリマーの末端アミノ基の一部がプロトン化されるpH９の低濃度（5mmol $dm^{-3}$）溶液における$C_{16}$-3denG*n*（*n* = １～５）のSANS曲線（Fig. ３）は，散乱ベクトル$Q$ > 0.07Å$^{-1}$において$Q^{-4}$に従う散乱が観測されていることから，会合体の構造は球状であることが示唆される。Guinierの式を用いて得られた回転半径は，世代には依存せず2.0～2.4nmであった。また，低$Q$領域（$Q$ < 0.005Å$^{-1}$）では，デンドリマーの世代によって散乱曲線が異なり，$C_{16}$-2denG*n*（*n* = 4，5）および$C_{16}$-3denG*n*（*n*=３～５）では低世代と異なり立ち上がりが見られた。これは，世代１～３の$C_{16}$-2denG*n* および世代１，２の$C_{16}$-3denG*n* では水溶液中で球状ミセルとして存在するのに対し，世代が増加するとミセル同士が集まって大きな凝集体を形成していることを示唆する。一方，pH２の溶液では，デンドリマーのアミノ基がすべてプロトン化されるため，SANS曲線は$Q$ =0.06～0.09Å$^{-1}$付近にミセル間の静電的反発に起因するブロードなピークプロファイルが観測された。このピーク位置は濃度の増加とともに高$Q$側にシフトし，ミセル間の距離が近づいたことがわかった。また，pH２の溶液でもpH９で見られた低$Q$領域での立ち上がりが同様に観測された。世代２では，５～25mmol $dm^{-3}$の低濃度で立ち上がりが見られなかったが，濃度が100mmol $dm^{-3}$に増加すると立ち上がりが観測され，ミセルの凝集体が示唆された。これは動的光散乱から求めた見かけの流体力学的直径の大きさとほぼ一致した。すなわち，低濃度では数nmの粒径のミセルが得られたのに対し，100mmol $dm^{-3}$では72～85nmの大きな会合体が認められた。また，世代３～５では，世代２と異なり低濃度から凝集体の形成が確認された。pH２の溶液における$C_{16}$-3denG３（100mmol $dm^{-3}$）のcryo-TEM写真（Fig. ４）から100～600nmの球状および内部が空洞になったドーナツ状の凝集体が確認された。この大きな凝集体の存在が，SANS曲線の低$Q$領域の立ち上がりに起因していると結論づけられる。さらに，コントラスト変化法を用いて見積もった会合体中の１分子あたりの体積は，いずれの世代でも計算値よりも小さくなり，その差は世代の増加とともに大きくなった。これは高世代になるほど会合体中で分子が密にパッキングされていることを示唆する。

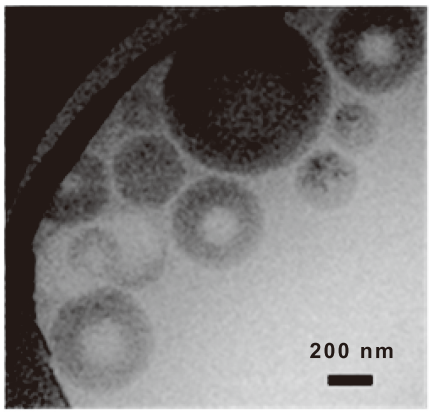



Fig. 4　Cryo-TEM images of $C_{16}$-3denG3 at pH2.

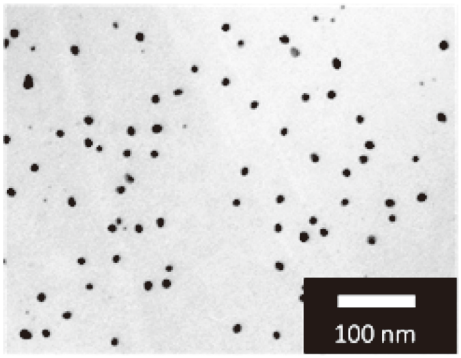



Fig. 5　TEM image of gold nanoparticles.

この傾向は気/液界面での吸着と同様に，世代の増加とともにデンドリマーのアミド基間の水素結合が増加するためと考えられる。また，SANS曲線は，溶液の温度を25℃から63℃に上昇させても違いが見られなかったことから，ミセルおよびミセル同士が集まった凝集体は温度に対して極めて安定であることがわかった。

### 3．4　金・白金ナノ粒子の調製と触媒活性およびDPPHラジカル消去能

$C_{16}$-3denG*n*を保護剤とした金および白金ナノ粒子は，$C_{16}$-3denG*n*と塩化金酸または塩化白金酸の混合溶液を化学還元することで調製した。$C_{16}$-3denG*n*と塩化金酸または塩化白金酸の濃度比が4：1では，金の場合，直径4nm以下の単分散なナノ粒子が得られたが，白金の場合，大きな粒径のナノ粒子が得られ，金属とデンドリマーのアミノ基の相互作用は金よりも白金の方が弱いことがわかった。$C_{16}$-3denG*n*で保護した金および白金ナノ粒子を用いた*p*-ニトロフェノールの還元反応における触媒活性は，世代3の金ナノ粒子を用いたときに最も高い活性が認められ，これまでに報告されたPAMAMおよびPPIデンドリマーを保護剤として用いたナノ粒子よりも高いことがわかった。一方，1,1-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル（DPPH）ラジカルの消去反応に対しては，$C_{16}$-3denG*n*で保護したナノ粒子は高い触媒活性を示さなかった。

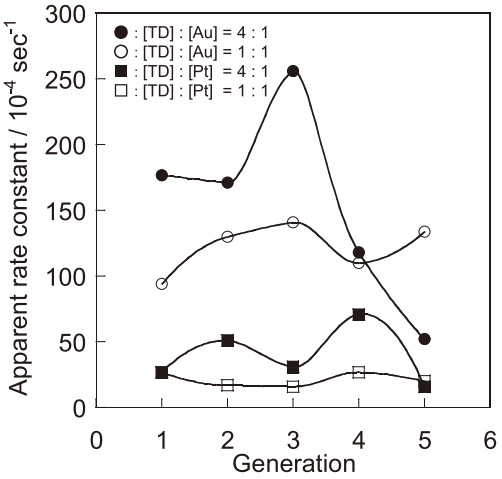



Fig. 6　Apparent rate constant and generation for $C_{16}$-3denG*n*.

## 4．総　括

高性能化ならびに高機能化の発現を目指して分子設計・合成したTadpole型両親媒性デンドリマーは，高世代で親水部のデンドロン骨格がかなり嵩高いにもかかわらず，デンドロン間の相互作用が働いて高い界面活性を有することがわかった。この両親媒性デンドリマーを保護剤として金または白金ナノ粒子を調製でき，*p*-ニトロフェノールの還元反応やDPPHラジカルの消去反応における触媒活性を示すこともわかった。今後，金属ナノ粒子を用いたヒドロキシルラジカルやその他の活性酸素種の消去作用について詳しく検討していく予定である。

**（引用文献）**

1）Miyake Y, Shimoi K, Kumazawa S, Yamamoto K, Kinae N, Osawa T, *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3217, 2000.
2）Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F, *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3396, 2000.
3）Gyamfi M A, Yonamine M, Aniya Y, *Gen. Pharmacol.* **32**, 661, 1999.
4）Esumi K, Takei N, Yoshimura T, *Colloids Surf. B* **32**, 117, 2003.
5）Esumi K, Houdatsu H, Yoshimura T, *Langmuir* **20**, 2536, 2004.
6）Isono R, Yoshimura T, Esumi K, *J. Colloid Interface Sci.* **288**, 177, 2005.
7）Akiyama S, Yoshimura T, Esumi K, *J. Jpn. Soc. Colour Mater.* **78**, 112, 2005.
8）Akiyama S, Yoshimura Torigoe K, T, Esumi K, *J. Jpn. Soc. Colour Mater.* **78**, 409, 2005.
9）Endo T, Fukunaga T, Yoshimura T, Esumi K, *J. Colloid Interface Sci.* **302**, 516, 2006.

# Ⅱ． 生体作用、安全性に関する分野

# 皮膚ABC膜輸送体に及ぼす化粧品添加物の影響

金沢大学　医薬保健研究域薬学系　分子薬物治療学研究室

加藤　将夫

The skin represents physical and biochemical barrier between the body and the environment, serving to exclude xenobiotics and microorganisms and to prevent unregulated water loss from the body into the atmosphere. The physical barrier is mainly localized in stratum corneum (SC) whereas a biochemical barrier also exists in skin epithelial cells beneath the SC. The biochemical barrier includes metabolic enzymes and transporters that mediate detoxification and efflux of xenobiotics. This barrier has an important influence on absorption of xenobiotics, though the mechanisms of its effects on the absorption generally remain to be fully established. We have recently clarified the role of two ATP binding cassette (ABC) transporters, P-glycoprotein (P-gp) and breast cancer resistance protein (BCRP), in transdermal absorption of a typical substrate *in vivo*. This finding may imply the possible interaction of these ABC transporters with cosmetic/pharmaceutical excipients, leading to the change in transdermal permeation of constituents/drugs. Therefore, the purpose of the present study was to clarify the inhibition potential of several cosmetic excipients on P-gp and BCRP. The inhibitory effect was assessed by the uptake study of a typical BCRP substrate Hoechst33342 in MDCKI cells stably transfected with *BCRP* gene (MDCKI/BCRP). In the presence of several excipients, uptake of Hoechst33342 in MDCKI/BCRP cells was higher than that in their absence, suggesting that BCRP is inhibited by those excipients. Such inhibition profile was found to be concentration-dependent for the excipients. The inhibition was further demonstrated by the transcellular transport study of Hoechst33342 in MDCKI/BCRP cells in the presence or absence of those excipients. It was found that the inhibition potential is partially correlated with a certain physicochemical parameter. Thus, our findings suggest that some of cosmetic excipients inhibit the function of BCRP. Further studies are required to clarify the relevance of such inhibition with the change in transdermal permeation of cosmetic constituents and pharmaceutical drugs.

## 1．緒　言

皮膚は表皮、真皮及び皮下組織から構成され、毛嚢、汗腺、脂腺などの付属器官が表皮から真皮を貫通する（図１）。皮膚は外界から体内への外因性物質の侵入を防ぐバリアと考えられている。表皮の中で最も外層の角質層は脂質とケラチンで満たされており、外因性物質の経皮吸収に対して最も高いバリア能を有する。角質層は、有害物質の侵入や物理的外傷、感染症から生体内の環境を守る働きがある[1, 2]。

脂溶性の高い外因性物質は角質層に一部が分配（partition）し、分配した物質の一部はさらに単純拡散（passive diffusion）により血液方向へ移行しうる（図１）。角質層が物理的バリアであるのに対し、角質層より下層は生きた皮膚組織であり、生物的バリアとして働くと考えられている。生物的バリアには、皮膚に発現する代謝酵素や膜輸送体が挙げられる。実際、皮膚にはcytochrome P450などの代謝酵素が機能的に発現する[3]。一方で膜輸送体については皮膚における発現の報告が散見されるものの、その皮膚内での機能は永らく不明であった。



Effect of Cosmetic Excipients on ABC transporters in the skin

Yukio Kato

Department of Molecular Pharmacotherapeutics, Faculty of Pharmacy, Kanazawa University

我々は皮膚に膜輸送体が存在し、ある種薬物の表皮側から血液中への吸収や、血液中から皮膚への分布に関与することを示してきた[4−7]。中でもP-glycoprotein（P-gp）とbreast cancer resistance protein（BCRP）は、ともにATPの加水分解で生じるエネルギーを駆動力として多種多様な物質を細胞内から細胞外へ排出するATP binding cassette（ABC膜輸送体）である。P-gpはマウス[6, 7]およびヒト[8]で真皮に存在し、マウスにおいては真皮の血管内皮に存在する[7]。一方、BCRPはマウスにおいて真皮の血管内皮に、ヒトでは表皮の基底層や真皮の血管内皮に局在する[7]。

興味深いことに、これらP-gpとBCRPはともに基質を表皮側から真皮側へ輸送する（図１）[8]。このことは、基質である蛍光物質rhodamine 123（R-123）を経皮投与した際に、皮膚内あるいは血液中へのR-123の透過が、P-gp欠損マウスあるいはP-gpとBCRP両方の欠損マウス（*mdr1a/1b/bcrp*$^{-/-}$）において顕著に低下したことからも示される[6, 7]（図２のcontrol）。P-gpとBCRPはともに皮膚のみならず、小腸や腎臓の刷子縁膜、脳血管内皮細胞の血液側膜、肝臓の胆管側膜等に発現し、多くの薬物の排泄（小腸や脳においては吸収、分布の障壁）に働くことが示されている。従って、皮膚においてもこれら膜輸送体が、角質層に分配し表皮に到達した外因性物質の真皮・血液方向への移行に関与する可能性がある（図１）。

化粧品や医薬品には数千種類以上におよぶ添加物原料が用いられる。これらがP-gpやBCRPに影響した場合、結

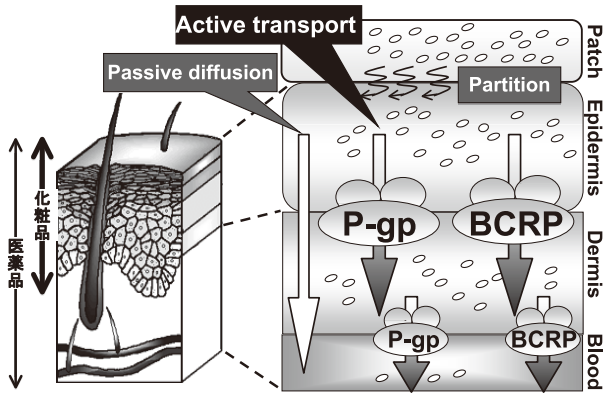



図１　皮膚における物質透過の概念図

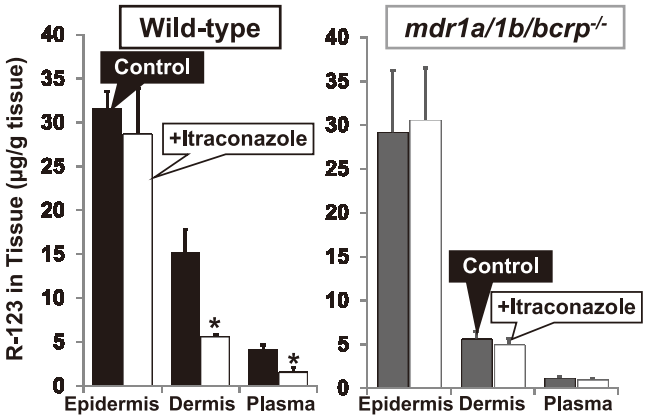



図２　P-gp と BCRP 阻害剤 Itraconazole による表皮から真皮への R-123 移行阻害

果として経皮からの外因性物質の吸収や化粧品自身に含まれる成分の皮膚内動態に影響を及ぼす可能性がある。P-gpやBCRPが幅広い構造を認識する膜輸送体であることを考えると、この可能性は十分に考えられる。しかしこれまで、添加物が皮膚に発現するP-gpやBCRPにどのような影響を及ぼすかについて検討された例はほとんどない。本研究は、化粧品添加物の安全性の担保を目的として、P-gpとBCRPに及ぼす添加物の影響を解析した。

## 2．実　験

### 2.1　試薬および実験動物

R-123、Hoechst 33342（H-33342）及びKo143はSigma Chemical Co. Ltd.（St. Louis, MO）より、itraconazoleはLKT Laboratories Inc.（St. Paul, MN）より購入した。FVBマウス（FVB/NJcl、雄性、7～8週齢）は日本クレア（Tokyo, Japan）、*mdr1a/1b/bcrp*$^{-/-}$（FVB系統雄性、7～8週齢）はTaconic Farms Inc.（Germantown, NY）より購入した。動物はすべて標準食で飼育され、水及び食餌は自由に与えられた。すべての動物実験は金沢大学動物実験指針に従って行った。

#### In vivo 経皮投与実験（図3）

実験に用いたマウスは全て、実験を開始する72時間前に除毛を施した（図３）。ペントバルビタールを皮下投与して麻酔をかけ、動物用バリカンで胴体の毛を剃った後、除毛クリームを適量塗り、37℃の温水で丁寧に洗い流した。除毛72時間後、エチルエーテル吸入麻酔下で、セロテープを用いてマウス腹部皮膚の角質層を剥離した（図３）。その後、投与液100μLを均一に染み込ませたパッチを腹部に貼付し、パッチの上からエラストポアを巻き付けた。投与液はR-123またはR-123とitraconazoleをdimethyl sulfoxideに溶かし、さらにHBSSで希釈して調製した。投与後6時間に尾静脈から血液を採取し屠殺後、すばやく70%エタノールを含ませたティッシュで腹部皮膚を拭き

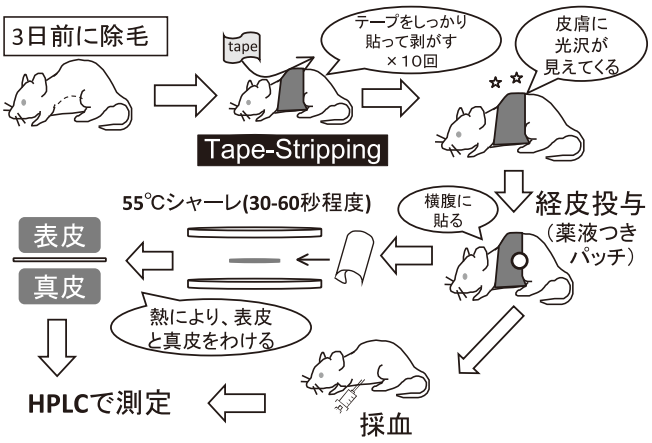



図３　In vivo 経皮吸収実験の概念図

取り皮膚を採取した。採取した皮膚をアルミで包み、ガラスシャーレに挟み1分間55℃で温めた。その後18 Gの針で表皮側をこそぎとった（図３）。

#### R-123の定量

皮膚サンプルはホモジネート後遠心分離し、上清を移動相で除タンパクした。血漿サンプルは酢酸エチルを用い液々抽出した。これらサンプル中R-123濃度はHPLCを用いて定量した[7]。

#### BCRP安定発現MDCKI細胞による取り込み実験（Dish法）

BCRPないし空ベクター安定発現MDCKI細胞（MDCKI/BCRP、MDCKI/mock）を4well plateに培養した。5分間のpreincubation後、種々の濃度の添加物を含む5μM H-33342溶液を添加し、20分後に蛍光観察した。画像解析ソフトImage Jを用い、蛍光の強さを10回繰り返して測定し、これを3preparationで行い数値化した。

## 3．結　果

### 3.1　膜輸送体阻害剤の in vivo での効果

添加物が皮膚の膜輸送体に影響するかを検討する前に、膜輸送体に対し阻害活性を有することが分かっている阻害剤itraconazoleを用い、in vivoにおいて阻害剤による膜輸送体機能制御の有無を検討した。膜輸送体の機能を評価しやすい系として、角質層を剥離した系を用いた。R-123のみを経皮投与後の表皮への分布は、wild-type（野生型）と*mdr1a/1b/bcrp*$^{-/-}$で同程度であった一方、真皮と血漿中へのR-123の移行は*mdr1a/1b/bcrp*$^{-/-}$で低下した（図２）。一方、itraconazolを同時投与したところ、R-123の皮膚分布と吸収は、表皮、真皮、血漿いずれもwild-typeと*mdr1a/1b/bcrp*$^{-/-}$で同程度であった（図２）。*mdr1a/1b/bcrp*$^{-/-}$では、itraconazoleの影響がほとんど見られなかった（図２）。

角質層を剥離しない系でもR-123とitraconazoleを併用投与し、6時間後での皮膚中濃度を測定した。R-123の皮膚への分布量は角質層を剥離した系の1/10程度であったが、角質層を剥離した系、しなかった系ともに、itraconazole併用によりR-123の皮膚への分布はcontrolの半分程度にまで低下した。

### 3.2　膜輸送体に及ぼす添加物の影響

添加物自身の皮膚への浸透性を考慮するため、膜透過性が良いと思われる電気的中性の物質、皮膚表面の電荷と比較的強く相互作用すると思われる極性物質など、幅広い極性を有する構造類似体を検討対象に加えた。これまでに16種類（ベンジルアルコール、フェノキシエタノール、1.3ブチレングリコール、サリチル酸エチレングリコール、オレイルアルコール、ポリエチレングリコール400、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、ブチルパラベン、イソステアリン酸、安息香酸、セバシン酸ジエチル、炭酸プロピレン、トリアセチン、アジピン酸ジイソプロピル）について阻害効果を検討した。

多数の添加物の膜輸送体への作用を、感度良く評価することを目的に、BCRPについてそのスクリーニング系を構築した。BCRPの典型的基質としてH-33342を用いた。MDCKI/BCRP細胞にH-33342を添加するとBCRPによって効率良く細胞外へ排出されるため、蛍光顕微鏡で観察してもH-33342の蛍光はわずかしか検出されない（図４左、control）。一方、BCRP阻害剤であるKo143を同時に添加すると、BCRPの活性が低下するためH-33342が細胞内に検出される（図４右）。一方、BCRPを発現していないMDCKI/mock細胞を用いて同様の解析を行うと、control条件下でも高い蛍光が細胞内に観察され、Ko143同時添加による影響は見えなかった。以上より得られる画像を定量化することにより、BCRPの活性変化を可視的に解析することが可能となった。

次に、各添加物を種々の濃度でH-33342とともにMDCKI/BCRP細胞に添加し、同様な解析から添加物濃度依存的な蛍光強度の上昇を観察し、各添加物のBCRPに対する阻害定数（Ki；50％阻害を与えるのに必要な濃度）を求めた。図５には、阻害効果を示した各添加物のKi値と物理化学的パラメータとの相関を示した。ここで、xlogPはオクタノール／水分配の計算値であり、http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/より入手した。また、α値は有機概念図を利用して得られる極性の尺度（有機性と無機性のバランス）である。その結果、阻害定数は分子量、α値とは明確な相関がなかった一方、xlogPとはやや相関

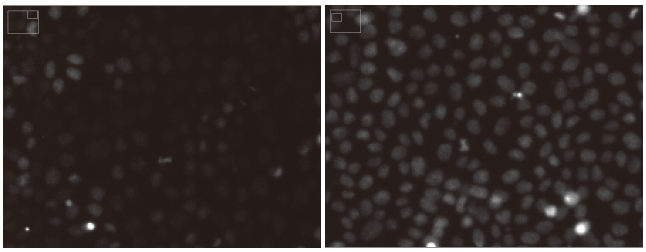



図４　Image J を用いた BCRP 阻害解析

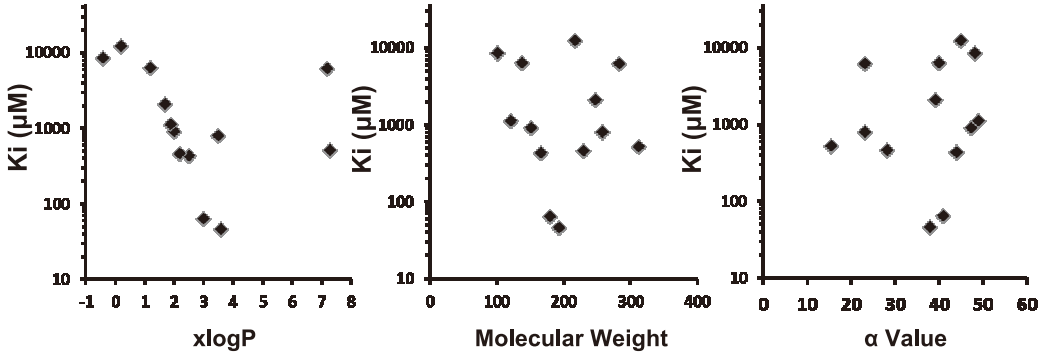



図５　添加剤の物理化学的パラメータと BCRP に対する阻害定数（Ki）との関係

関係が認められ、xlogPが3～4付近で最も強い阻害効果（低いKi）が得られる傾向にあった（図５）。

続いて、BCRPに対する阻害効果をより明確に示す目的で、BCRPによるH-33342の経細胞輸送を評価し、添加物の効果を検討した。取り込み試験において阻害効果の認められた添加物を、H-33342とともにMDCKI/BCRP細胞のbasalもしくはapical側に添加後、反対側に出現したH-33342を測定したところ、controlにおいてはBCRPによる排出を反映してbasalからapical方向（BL-to-AP）が逆方向（AP-to-BL）よりも高かったのに対して、添加物共存下ではそのような方向性が低下した。同様な実験をMDCKI/mock細胞でも行い、efflux ratio-1（BCRPを介した膜透過に比例する値）を算出したところ、controlで4.27、添加物存在下で1.75となり、半分弱にまで低下が認められた。以上より、経細胞輸送の系でも、添加物がBCRPを阻害することが示された。

現在、P-gpに及ぼすこれら添加物の影響についても、典型的基質であるR-123の細胞内への取り込みと経細胞輸送に対して評価しており、結果は現在執筆準備中の投稿論文に掲載予定である。

## ４．考　察

本研究で得られた興味深い知見の一つは、いくつかの添加物がBCRPを阻害したことである。これら添加物が、仮に表皮組織内へKi値に近い濃度で分配した場合には、皮膚のBCRPを阻害しうることが示唆される。実際に皮膚に発現するBCRPを、添加物が阻害できるか否かについては、今回得られたKi値と、添加物自身の角質層への分配、表皮への拡散などの要因も影響するため、今回の結果からただちに皮膚BCRPの阻害が見られると結論づけることはできない。しかしながら、図２に示すように、少なくともP-gpやBCRPの阻害剤であるitraconazoleについては、角質層の有無に関わらず、P-gp基質の皮膚透過をin vivoで抑制する。従って、添加物についても今後さらに詳細な検討を進め、皮膚の膜輸送体をどの程度阻害しうるかを解明する必要がある。

化粧品添加物がBCRPを阻害することが実際、生体にどのような影響を与えるかについても、さらに検討が必要である。BCRPは皮膚においては基質の吸収方向への輸送に関与するため、もしBCRPが全身作用を狙った外用剤に含まれる薬物の吸収に関与しているとすれば、添加物は当該薬物の効果に負の影響を与えうる。また、BCRPの遺伝子変異は抗悪性腫瘍薬スニチニブによる皮膚毒性と関係するとの報告がある[9]。従って、BCRPへの阻害作用は同様な副作用とも関連する可能性がある。一方で、化粧品は一般に、角質層や表皮への作用が期待され、真皮や血漿中への成分の移行は望ましくない。その点、P-gpやBCRPを阻害することは、表皮から真皮への物質移行を妨げることにつながり、化粧品自身の安全性の観点からは、阻害作用がむしろbeneficialかもしれない。今後さらなる検討を行うことで、皮膚組織内での添加物の影響を解明し、化粧品の安全性向上に発展できればと考える。

## ５．総　括

皮膚に発現するABC膜輸送体の一部が、添加物によって阻害されることが示唆された。一方で皮膚組織中での添加物の作用については、さらなる検討が必要である。添加物と膜輸送体との相互作用は、化粧品の安全性を考える上で今後さらに解明する必要がある。

**謝　辞**

研究助成を賜りました公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に心より御礼申し上げます。

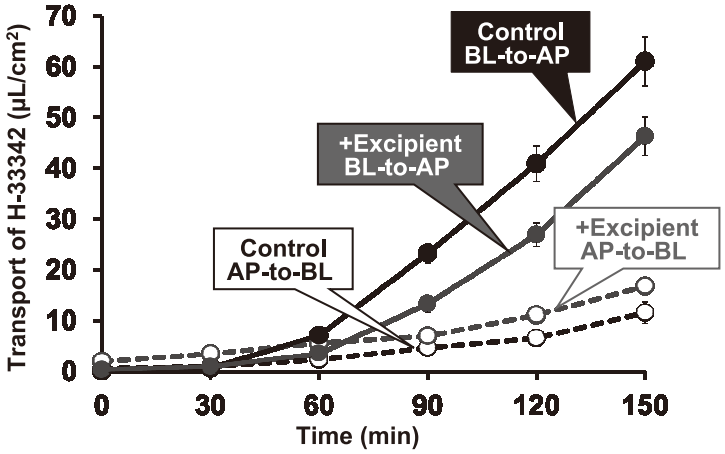



図６　BCRP による H-33342 経細胞輸送に及ぼす添加物の阻害効果

**(引用文献)**

1) Meguro S, : Relationship between covalently bound ceramides and transepidermal water loss (TEWL), Arch. Dermatol. Res., 292, 463-468, 2000.
2) Cartlidge P. : The epidermal barrier, Semin. Neonatal., 5, 273-280, 2000.
3) Ahmad N, : Cytochrome p450: a target for drug development for skin diseases, J. Invest. Dermatol., 123, 417-425, 2004.
4) Li Q, : Characterization of the transdermal transport of flurbiprofen and indomethacin, J. Control. Rel., 110, 542-556, 2006.
5) Ito K, : Involvement of organic anion transport system in transdermal absorption of flurbiprofen, J. Control. Rel., 124, 60-68, 2007.
6) Ito K, : P-Glycoprotein (Abcb1) is involved in absorptive drug transport in skin, J. Control. Rel., 131, 198-204, 2008.
7) Hashimoto N, : ATP binding cassette transporters in two distinct compartments of skin contribute to transdermal absorption of a typical substrate, J. Control. Rel., 165, 54-61, 2013.
8) C. Skazik, : P-glycoprotein (ABCB1) expression in human skin is mainly restricted to dermal components, Exp. Dermatol., 20, 450-452, 2011.
9) van Erp NP, Pharmacogenetic pathway analysis for determination of sunitinib-induced toxicity, J. Clin. Oncol., 27, 4406-4412, 2009.

# 新たな皮膚タイトジャンクションバリア・角質層バリア機能評価方法の開発

慶應義塾大学医学部皮膚科学教室・総合医科学研究センター
久保　亮治

Skin is the structure that covers our body and protects it from not only the entry of pathogens or allergens but also from the leakage of water, solutes or nutrients. These outside-in and inside-out skin barrier functions are dependent on the epidermis, a stratified epithelial cellular sheet. Terminally differentiated cornified cellular sheets called stratum corneum (SC) constitute the outermost epidermal barrier in mammals. Beneath the SC, apical paracellular spaces of epidermal cells are sealed with tight junctions (TJs) that might limit paracellular leakage of water and electrolytes to maintain fluid homeostasis. Here we analyzed the barrier functions of the SC and TJs.

## 緒　言

皮膚は、我々の身体の外表を覆う構造物である。その最も重要な機能が、外界と生体の境界をなすバリアとしての機能である。外界からの刺激・侵略に対するバリアとして、物理的な外的刺激によるダメージを防ぎ、紫外線によるダメージを防ぎ、病原微生物の繁殖・侵入を防ぎ、アレルゲンの侵入を防ぐ。侵入者に対しては、自然免疫のシステムにより対抗するとともに、抗原提示細胞が侵入者を捕捉して獲得免疫のシステムに抗原提示を行う。また１つは、身体内部のホメオスターシスを保つためのバリアでもある。水・イオン・蛋白の漏出を防ぎ、熱を保持するかまたは余分な熱を放出し、体内のホメオスターシスを保つ。皮膚の構造を詳細に調べていくことで、これらのバリア機能を実現するために進化してきたメカニズムが徐々に明らかとなってきている。

陸生脊椎動物において、皮膚の基本構造はほぼ共通している。皮膚はまず、表皮・真皮・皮下組織の３つに大きく分けられる（図１）。皮下組織は脂肪織によるクッションの役割と熱保持、栄養保持に関わる。真皮は頑丈なコラーゲンからなる層で、物理的な刺激から身体を守るとともに、その内部には毛嚢・脂腺・汗腺・血管・リンパ管など様々な構造を含有している。また、真皮樹状細胞と呼ばれる抗原取得細胞が真皮には存在している。最外層の表皮はケラチノサイト（表皮細胞）により構成される重層上皮組織であり、表面から順に、角質層・顆粒層・有棘層・基底層に分けられている。最も表面の角質層は、角化脱核した角質細胞（corneocyte）とその細胞間を埋める角質細胞間脂質によって構成されるバリア構造である。全身を覆う角質層を持つのは、両生類の成体・爬虫類・鳥類・哺乳類であり、すなわち陸上の空気環境に生きる脊椎動物である[1)]。角質バリアは空気環境と液性環境の間を隔てるバリアであり、内側の細胞を乾燥や外力による障害から守っている。

角質層の内側の顆粒層は、非常に扁平化したケラチノサイトが複数積み重なってできた層である。顆粒層の細胞を表面から順にSG1, SG2, SG3細胞とそれぞれ名付けると、SG2細胞の細胞間にのみタイトジャンクションが存在して細胞間を通る物質移動を制限するバリアを形成しており、表皮の細胞外液性環境をタイトジャンクションバリアの外側（角質層とタイトジャンクションバリアに挟まれたSG1細胞を取り囲む細胞外液性環境）と内側（SG2細胞以下の顆粒層、有棘層、基底層の細胞を取り囲む細胞外環境）の２つのコンパートメントに分割している[2-4)]。顆粒層の下の有棘層は、デスモソームの発達したケラチノサイトが重層する層であり、ランゲルハンス細胞と呼ばれる表皮内樹状細胞がこの有棘層に散在している。最後の基底層は、基底膜直上に存在する一層の細胞層であり、哺乳類の表皮においては唯一細胞分裂が観察される層である。基底膜から外れた細胞は、細胞分裂を停止して分化を続け、有棘層、顆粒層を経て、最終的に角質細胞へと分化する（図１）。以上のように、我々の皮膚には、角質層とタイトジャンクションという２つのバリアが存在している。

表皮タイトジャンクションバリアの存在は長年にわたって見逃されてきた。申請者は哺乳類表皮タイトジャンクションバリアを世界で初めて３次元可視化することに成功し、表皮内抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞が表皮タイトジャンクションバリアを保ったままタイトジャンクションバリア外の抗原を取得する機能を持つことを発見した[3)]。すなわち、角層層という静的な構造物によるバリアが破れても、タイトジャンクションという動的なバリアにより外来物質の侵入を防ぎ、同時にランゲルハンス細胞が外来物質を能動的に取り込み免疫系に提示していると考えられる（図１）。しかし、表皮タイトジャンクションバリア機能の



Development of new methods to analyze stratum corneum barrier and tight junction barrier in the epidermis
Akiharu Kubo
Department of Dermatology, Keio University School of Medicine Center for Integrated Medical Research, Keio University School of Medicine

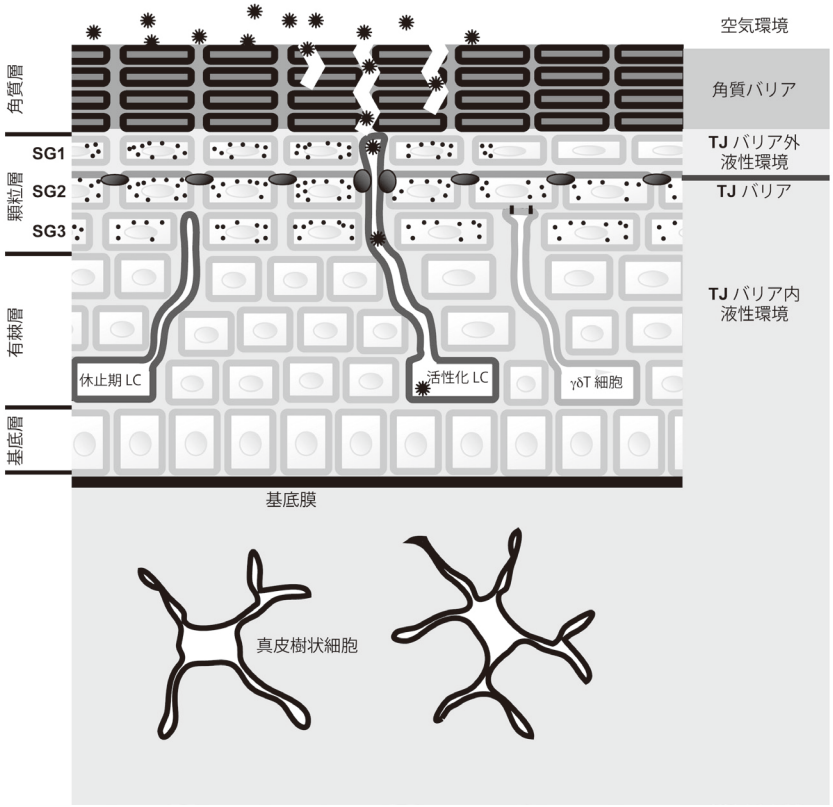



図１　皮膚表皮が持つバリア機構

詳細は、未だ不明な点が数多く残されている。本研究は、これまで曖昧に「皮膚のバリア」として捉えられてきた外来物質侵入阻止機構を、角質層とタイトジャンクションという２つのバリアとランゲルハンス細胞によって構成されるシステムとして捉えなおし、新しい表皮タイトジャンクションバリアの透過性評価方法、および角質層バリアの評価方法を開発することで、２つのバリアの性質の違いを明らかにし、皮膚バリア機構への理解を深めることを目的とした。

## 実　験

### １．角質バリアの評価

角質への物質浸透を正確に可視化する方法の開発をおこない、同方法を用いて、野生型マウス皮膚とフィラグリン欠損マウス皮膚において、角質への物質透過性に変化がないかを調べた。

角質への物質浸透性を切片上で可視化する時に最も問題となるのは、透過性評価に用いた物質が拡散により本来存在する場所から移動してしまうことである。蛋白質と反応して共有結合を生じるような物質を透過性評価に用いる場合は問題ないが、通常の水溶性物質を透過性評価に用いた場合、たとえ皮膚をホルマリン固定したとしても、アルデヒド結合を生じる残基が物質中に含まれていなければ、その物質は皮膚中にフリーの状態で存在することとなる。すると、切片作成・染色・切片封入の各段階において、その物質は洗い流されて大部分は消失し、残ったものも拡散によって大きくその存在位置を変えていると考えられる。しかし、従来の研究では、この問題はほとんど無視されており、おそらくは残存しているごく一部の分子の局在を持って、角質への透過性を評価しているものと考えられた。

今回われわれは、この問題を解決するために、皮膚切片作成に川本法を導入した。本方法は鶴見大学歯学部RI研究センターの川本忠文博士が開発した、切片支持用粘着フィルムを用いた切片作成方法で、水溶性物質の組織内分布を保持したまま切片を作成することができる方法である[5)]。カルセイン(Bis [N, Nbis (carboxymethyl) aminomethyl] fluorescein ; Sigma-Aldrich) 飽和水溶液、またはリポソーム (Presome CSII-101 (Nippon Fine Chemical, Osaka, Japan)) に封入したカルセイン溶液を、６－８週の野生型マウスおよびフィラグリン欠損マウスの尻尾皮膚に３時間塗布した後、尻尾を切りだして凍結し、専用の凍結包埋剤 (SCEM) を用いて包埋、凍結した。切片支持用粘着フィルム (Cryofilm type 2C (9)) を用いてクライオスタットにて切片を作成してそのままフリーズドライした後、紫外線照射により急速に硬化する切片封入剤 (SCMM-R1) を用いてスライドガラス/フィルム間に切片を封入し、蛍光顕微鏡により浸透度を観察した。

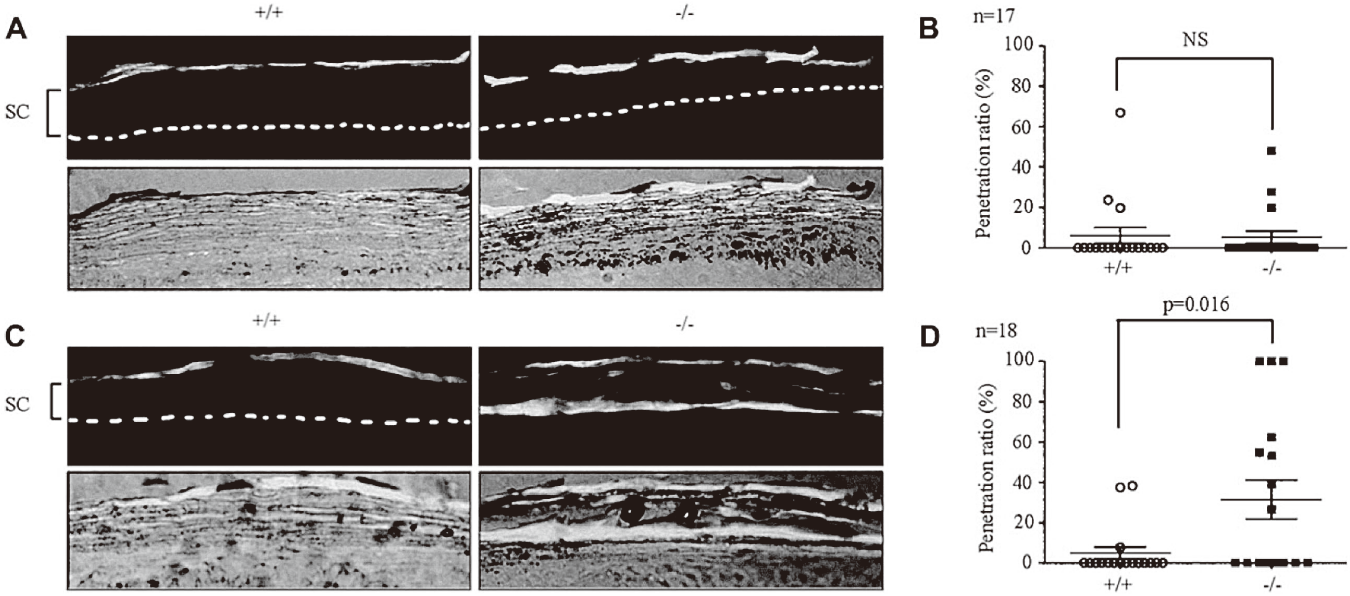



図２　野生型マウス（+/+）とフィラグリンノックアウトマウス（-/-）における角質透過性試験。（A）カルセイン水溶液塗布後３時間の角質浸透度。（C）リポソーム封入カルセイン溶液塗布後３時間の角質浸透度。（B, D）各顕微鏡視野において、角質の50%以上の深さまでトレーサーが浸透している部分の、角質全体に占める割合。（Kawasaki et al., JACI 2012[7] より引用）

### ２．タイトジャンクションバリアの評価

In vivoにおける皮膚タイトジャンクションバリアの透過性を評価する方法としては、ランタン（分子量138 Da）の細胞間への浸透を電子顕微鏡により観察する方法と、蛋白質ビオチン化試薬（sulfo-NHS-LC-biotin（分子量556 Da））の浸透性を蛍光抗体染色法にて観察する方法の２つがあった。今回我々は、ケラチノサイトの表面抗原の１つであるデスモグレイン１に対するsingle-chain variable fragment（scFv：分子量約32 kDa）[6]をトレーサーとして用いて、タイトジャンクションバリア機能を評価した。

## 結　果

### １．角質バリア

川本法にて作成した皮膚切片上では、従来の方法で作成した皮膚切片に比べて、カルセインの蛍光が著明に強かった。これは、サンプル作成中に拡散によってカルセインが洗い流されることがなかったためと考えられた。カルセイン水溶液を用いた透過性試験では、野生型マウス、フィラグリン欠損マウスともに、角質の上層でカルセインの浸透は止まっており、２つのマウス間で明らかな差は認められなかった（図２ A, B）。一方、リポソームに封入したカルセインを用いた透過性試験では、野生型マウスではカルセイン水溶液と同様に角層の上層で浸透が堰き止められていたのに対し、フィラグリン欠損マウスでは角質の下層まで浸透している像が認められた（図２ C, D）。これは、脂溶性物質に対する角層のバリア機能が、フィラグリン欠損マウス皮膚において減弱していることを示唆している[7]。

### ２．タイトジャンクションバリア

ケラチノサイトの表面抗原の１つであるデスモグレイン１に対するsingle-chain variable fragment（scFv）をトレーサーとして用いた。本scFvはヒトデスモグレイン１の細胞外ドメインと特異的に結合することが確認されている[6]。まず、ヒト皮膚切片を用いてscFvを一次抗体として用いた免疫染色を行ったところ、デスモグレイン１の発現はタイトジャンクションバリアの内側の細胞にも、外側の細胞（顆粒層の最上層の細胞）にも認められた。次にscFvをヒト皮膚サンプルにex vivoで皮下注したのち組織培養し、scFvの拡散を観察した。24時間後までの観察において、scFvのシグナルは、ヒト皮膚のタイトジャンクションバリアの内側のケラチノサイト表面からは検出されたが、タイトジャンクションバリアの外側のケラチノサイト表面からは検出されなかった。すなわち、scFvは表皮タイトジャンクションバリアを通過できないと考えられた。

## 考　察

### １．角質バリア

角質への物質浸透を正確に可視化する方法の開発をおこない、同方法を用いて、野生型マウス皮膚とフィラグリン欠損マウス皮膚において、角質への物質透過性に変化がないかを調べた。川本法を用いた切片作成により、従来の方法よりも正確に、水溶性物質の角質への浸透を可視化することが可能となった。また、本方法を用いることで、フィラグリン欠損マウスの角質バリア機能が低下していることを示すことができた。サンプル作成中の物質移動を最小限

に留めることができる本方法を用いることで、水溶性物質の角質透過性試験を正確に行うことが可能になると考えられた。

## 2．タイトジャンクションバリア

これまで、in vivoでのタイトジャンクションの透過性評価方法は、分子量500程度の小さな分子に対する閉鎖結合能の測定によっていた。本手法を用いることで、表皮タイトジャンクションバリアの、低分子に対するバリア機能と高分子に対するバリア機能を別々に、in vivoにおいて測定することが可能になると考えられた。

### (引用文献)

1）Schempp C, Emde M, Wölfle U: J Dtsch Dermatol Ges 7, 750-757, 2009
2）Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S: J Cell Biol 156, 1099-1111, 2002
3）Kubo A, Nagao K, Yokouchi M, Sasaki H, Amagai M: J Exp Med 206, 2937-2946, 2009
4）Kubo A, Nagao K, Amagai M: J Clin Invest 122, 440-447, 2012
5）Kawamoto T: Arch Histol Cytol 66, 123-143, 2003
6）Ishii K, Lin C, Siegel DL, Stanley JR: J Invest Dermatol 128, 939-948, 2008
7）Kawasaki H, Nagao K, Kubo A, Hata T, Shimizu A, Mizuno H, Yamada T, Amagai M: J Allergy Clin Immunol 129, 1538-1546.e1536, 2012
8）Yoshida K, Yokouchi M, Nagao K, Ishii K, Amagai M, Kubo A: J Dermatol Sci, in press

# 皮膚マトリクスメタロプロテアーゼ（matrix metalloproteinase：MMP）-9遺伝子過剰発現マウスの作成とその解析

帝京大学医学部ちば総合医療センター皮膚科

小林　孝志

The skin surrounding the whole body maintains the homeostasis by the tissue metabolism both in the normal status and in the inflammatory conditions. Among many species of matrix metalloproteinase (MMP), two kinds of gelatinase, MMP-2 and MMP-9 are known to cleave not only denatured collagen, named as gelatin, but also other not a few matrix components such as fibronectin, elastin, and type IV and VII collagens and pro-form of cytokines including tumor necrosis factor (TNF)-α and transforming growth factor (TGF)-β to be activated. In comparison with MMP-2, MMP-9 is known to be induced in the case of inflammatory stimuli and plays important roles for such tissue metabolism including tumor invasion, blister formation, dermatitis, apoptosis by ultraviolet irradiation, and keratinization. For example, MMP-9 null mice reportedly show no blister formation on the experimental model of bullous pemphigoid and they also manifest very low level of keratinization on the squamous cell carcinoma. This study was aimed to determine the effects of overexpression of MMP-9 in the skin.

## 1．緒　言

生体で働く組織代謝酵素には様々なものがあり、細胞外マトリクス（extracellular matrix：ECM）代謝に関与するものも多く存在する。これらには、架橋を司るlysyl oxidaseなどECM成分を合成しいわゆる同化作用を有する酵素群、一方、ECM成分を専ら分解することに働き異化作用を有する酵素群、に大別される[1-3]。後者の代表的なものが、matrix metalloproteinase（MMP）群の酵素である[1-3]。

MMP群の酵素は、脊椎動物では、1960年代、おたまじゃくしが尻尾を自己消化して蛙になる際の尻尾から発見された酵素、collagenase に端を発し[1-4]、現在まで20種類以上の酵素が報告されている[1-3]。これらはすべて別々の遺伝子によりコードされたアミノ酸による蛋白質であるが、相同性を持っている[2]。なかでもMMP-2とMMP-9はgelatinaseとして知られ、元々は変性コラーゲンであるgelatinを分解する酵素として発見、命名された[1-3]。

しかし1980年代後半に、基底膜に特異的に存在するIV型コラーゲンやVII型コラーゲンを含め、ファイブロネクチンやエラスチンなど他の複数のECM蛋白を分解すること[5, 6]、また最近は、tumor necrosis factor（TNF）-αなどのサイトカインの前駆体分子を分解して活性化するなど様々な基質が報告されており[7]、MMP-2とMMP-9は組織代謝で重要な役割りを果たすことが示唆されるに至っている[1-3]。

皮膚では、真皮の線維芽細胞は専らMMP-2を、表皮角化細胞はMMP-2とMMP-9を分泌することが解明されているが[1-3, 8]、これら両酵素により、前駆体が分解されたあと、TNF-αなどのサイトカインの刺激でさらに特にMMP-9発現が亢進することが知られている[9, 10]。実際、皮膚の炎症疾患の代表的な湿疹・皮膚炎皮膚でのMMP-9の発現亢進を確認している[11]。このようにMMP-9は発現誘導されやすい酵素であり、これはMMP-9遺伝子プロモーターにMMP-2にはないTATA boxが存在するなど、様々な発現調節領域が存在することによって裏付けられている[1, 12, 13]。

これまで、遺伝子改変によるMMP-9発現制御についての動物モデルを用いた検討では、MMP-9欠失マウスを用い、骨髄細胞由来MMP-9が水疱の形成に関わる炎症に関与するという報告[14, 15]などがある。しかし、表皮角化細胞由来MMP-9を過剰発現させた報告はなく、本研究は、その検討を行うために企画された。

## 2．実　験

### 2.1　遺伝子改変マウスMMP-9発現ベクターの取得

米国Genecopoeia社のEX-Mm03900-M02を使用し、また以下の8種のPCR primer、

ATG-F：ATGAGTCCCTGGCAGCCCCTGC
cdna-R1：TGTTCGAATGGCCTTTAGTG
cdna-F1：GCTGGCAGAGGCATACTTGT
cdna-F2：CGTCGTGATCCCCACTTACTA
cdna-F3：GTCTTCCTGGGCAAGCAGTA
cdna-F4：CTATACCTCCCACGGCCTAT



Generation and analyses of transgenic mice for the overexpressed matrix metalloproteinase (MMP)-9 in the skin

Takashi Kobayashi

Department of Dermatology, Teikyo University Chiba Medical Center

cdna-F5：TGTGGGTGTACACAGGCAAG
mu-PF：GGCCCAGACGTGGGTCGATT
を用いて、polymerase chain reaction（PCR）法や制限酵素切断、ライゲーションなどの一般的な遺伝子操作法により、*Kpn* Iと*Not* IでマウスMMP-9 cDNAを挿入したベクターに、さらに開始コドンから305番目の塩基をTからGに置換することから、102番目のアミノ酸をバリンからグリシンに置換する遺伝子改変MMP-9発現ベクター（pCMV-cDNA（V102G））を得て、その塩基配列を確認した。

次に、遺伝子改変マウスMMP-9について、蛋白発現とgelatinase活性を検討するために、培養293T細胞にRoche社のFugene 6 試薬を用いて遺伝子導入を行い、培養上清を回収、gelatin-zymograph法を用いて[16] gelatinase活性を持つ遺伝子改変MMP-9発現を確認した。

### 2.2　K14 プロモーターを用いた遺伝子改変 MMP-9 発現ベクターの取得

米国ATCC株より分譲して得た、pG3-K14 cassette（pG3Z-K14）を用い、上述と同様にPCR法や制限酵素切断、ライゲーションなどの一般的な遺伝子操作法により、ウサギβ-globin second intron を挿入、さらに*Bgl* IIで、上述の遺伝子改変MMP-9 cDNA（V102G）を挿入、ヒトK14プロモーター、ウサギβ-globin second intron、Kozak配列、遺伝子改変MMP-9 cDNA（V102G）、及びヒトK14 polyadenylation signalを直列に連結したものを含む皮膚MMP-9過剰発現トランスジェニックマウス作成用ベクター（phK14-cDNA（V102G））を得た。

### 2.3　皮膚 MMP-9 過剰発現トランスジェニックマウスの作製と表現型の観察

皮膚MMP-9過剰発現トランスジェニックマウスの作製採卵用のC57BL/6系統雌マウスに卵胞刺激ホルモン（妊馬血清性性腺刺激ホルモン；PMSG）及び黄体形成ホルモン（ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン；hCG）をそれぞれ個体あたり約5単位、48時間間隔で腹腔内投与して過剰排卵させ、C57BL/6系統雄マウスと交配させた。膣栓確認後、交配後1日目の卵管からマウス受精卵（初期胚）を採取し、上記で得られたphK14-cDNA（V102G））のDNA溶液を、該受精卵の雄性前核に2plずつマイクロインジェクションした。これを2細胞期までWhitten'sの培地中にて37℃で培養し、偽妊娠の雌ICR系マウスの輸卵管に戻して個体を発生させ、帝王切開により仔マウスを取り出した。得られた仔マウスは、すぐに仮親につけて離乳期まで育てた。

上記で作製したトランスジェニックマウスについて、PCR法を用いてスクリーニングを行った。作製されたトランスジェニックマウスは、出生後3週経過したところで、9個体の尾の先を切り取って、高分子DNA抽出法によりゲノムDNAを抽出し、各DNA 60 ngを鋳型として、プライマーは、GT-hk14pro-F3:CAGGTAACTAGGTTTAAGGTGCAG、AGT-hk14pA-R1：TTATGCAACTCAGATAATGAAGCTG、35サイクルの条件で3353 bpの増幅を行った。その後、アガロースゲル電気泳動法を用いて解析、陽性の3個体のすべて雄ファウンダーマウス（F0-005，F0-006，F0-007）を得た。

次に、サザンブロット法を用いて陽性ファウンダーマウスのトランスジェニック遺伝子を定量した。分析用プローブを調製するために、PCR法を用いて、プライマーは、GT-hk14pro-F1：GATATACACACCTCCAAAGCAGGAC、AGT-hk14pA-R3:TCTGCACCTTAAACCTAGTTACCTGにより938 bpを増幅し、得られたDNA断片をアガロースゲル電気泳動法により分離した。泳動後のゲルから目的のバンドを切り出し、Sephaglas Band Prep Kit（Pharmacia社製）を用いて精製して、これをランダムプライマー法（Random Primer DNA Labeling Kit Ver.2；宝酒造社製）により$^{32}$P-標識して分析用プローブとした。調製した分析用プローブを用いて挿入DNAの内側で一ヶ所のみ切断する制限酵素（BspHI）によりサザンブロットを行った。

得られた皮膚MMP-9過剰発現トランスジェニックマウスを同週齢の雄マウスと比較した。

## 3．結　果

### 3.1　遺伝子改変マウス MMP-9 発現ベクターの取得

開始コドンから305番目の塩基をTからGに置換することから、102番目のアミノ酸をバリンからグリシンに置換する遺伝子改変MMP-9発現ベクター（pCMV-cDNA（V102G））を得て、その塩基配列を確認した（図1）。

またこの遺伝子改変マウスMMP-9について、gelatin-

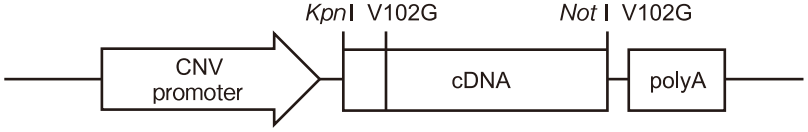



図1　遺伝子改変 MMP-9 発現ベクター（pCMV-cDNA（V102G））の構築を表す。矢印はサイトメガロウイルスプロモーター配列、cDNA は制限酵素 KpnI と NotI 切断部に挿入されたマウス MMP-9 の、102 番目のアミノ酸をバリンからグリシンに置換する遺伝子改変の cDNA 配列、polyA は、polyA tail 配列を示す。



図２　遺伝子改変MMP-9発現ベクター（pCMV-cDNA（V102G））を用いて培養細胞に遺伝子導入した培養液のgelatin-zymograph法の結果を示す。gelatinase活性を持つMMP-9のバンドについて、潜在型（矢印）、活性型（矢尻）として発現を確認した。

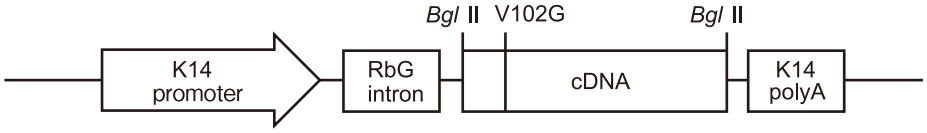



図３　皮膚MMP-9過剰発現トランスジェニックマウス作成用ベクター（phK14-c DNA（V102G））の構築を表す。矢印はヒトK14プロモーター、RbG intronはウサギβ-globin second intron、cDNAは制限酵素BglII切断部に挿入されたマウスMMP-9の、102番目のアミノ酸をバリンからグリシンに置換する遺伝子改変のcDNA配列、K14 polyAは、ヒトK14遺伝子のpolyA tail配列を示す。

zymograph法を用いてgelatinase活性を持つ遺伝子改変MMP-9発現について、非活性型と、活性型のバンドを確認した（図２）。

### ３．２　K14プロモーターを用いた遺伝子改変MMP-9発現ベクターの取得

ヒトK14プロモーター、ウサギβ-globin second intron、Kozak配列、遺伝子改変MMP-9 cDNA（V102G）、及びヒトK14 polyadenylation signalを直列に連結したものを含む皮膚MMP-9過剰発現トランスジェニックマウス作成用ベクター（phK14-cDNA（V102G））を得た（図３）。

### ３．３　皮膚MMP-9過剰発現トランスジェニックマウスの作製と表現型の観察

マウス受精卵（初期胚）297個に、上記で得られたphK14-cDNA（V102G））のDNA溶液を、該受精卵の雄性前核に2plずつマイクロインジェクションした。うち生存246個について9体のレシピエントを使用し、7体に妊娠あり、帝王切開により仔マウスを取り出した。産仔の出生数は15体であったが、その後の生存数の関係で9個体の尻尾をPCR法を用いて解析、陽性の3個体のすべて雄ファウンダーマウス（F0-005，F0-006，F0-007）を得た（図４A）。またサザンブロット法を行った結果、F0-005、F0-006、F0-007でbandを確認し、特にF0-006で強いトランスジェニック遺伝子の発現を認めた（図４B）。

得られた皮膚MMP-9過剰発現トランスジェニックマウスを同週齢の雄マウス と比較した結果、高発現のトランスジェニック遺伝子を確認したF0-006マウスで、生後3週頃より、炎症時一般に伴う異常角化を尻尾や耳に、脱毛を背部に認めた（図５）。

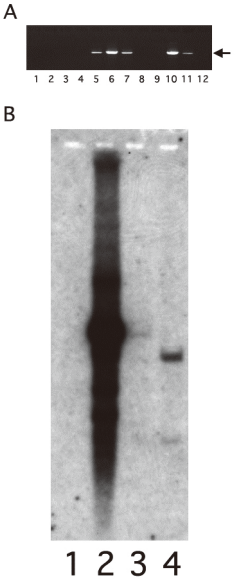



図４　受精卵にマイクロインジェクションを行った後、生まれたマウスについてのトランスジェニック遺伝子発現を解析した（A）PCR法、（B）サザンブロット法の結果を示す。（A）Lane 1から9は各々、順にF0-001からF0-009までのマウス由来genome DNAを表し、lane 10、11、12は各々、野生型genome 1μgに加えてトランスジェニック遺伝子を100pg、100fg、0gを加えたコントロールを表す。矢印に増幅された陽性バンドを示す。F0-005, 006, 007の３種のファウンダーマウスを得た。（B）Lane 1は、野生型genome、lane 2は、F0-006、lane 3はF0-005、lane 4はF0-007を示す。３種類のファウンダーマウスのうち、F0-006に強い遺伝子導入を認めた。

## ４．考　察

最近の遺伝子改変動物を用いた研究から、様々な蛋白質について各々の生体内での実際の機能が解明されてきた。皮膚科領域でMMP-9に関するものでは、欠失マウスの解析から、特に多型核白血球由来のMMP-9が、水疱症の水疱形成[14, 15]、炎症を伴った癌の浸潤と転移[17, 18]に関わることが解析されている。

しかしながらMMP-9は、皮膚の表皮角化細胞が分泌することが示されている[1-3, 6, 8-10, 12, 13, 16]。今回の研究は表皮角化細胞由来MMP-9過剰発現動物モデルを作成することでその働きを解明することを主たる目的に企画された。

マウスMMP-9は、ヒトMMP-9と同様にN-末端側のア

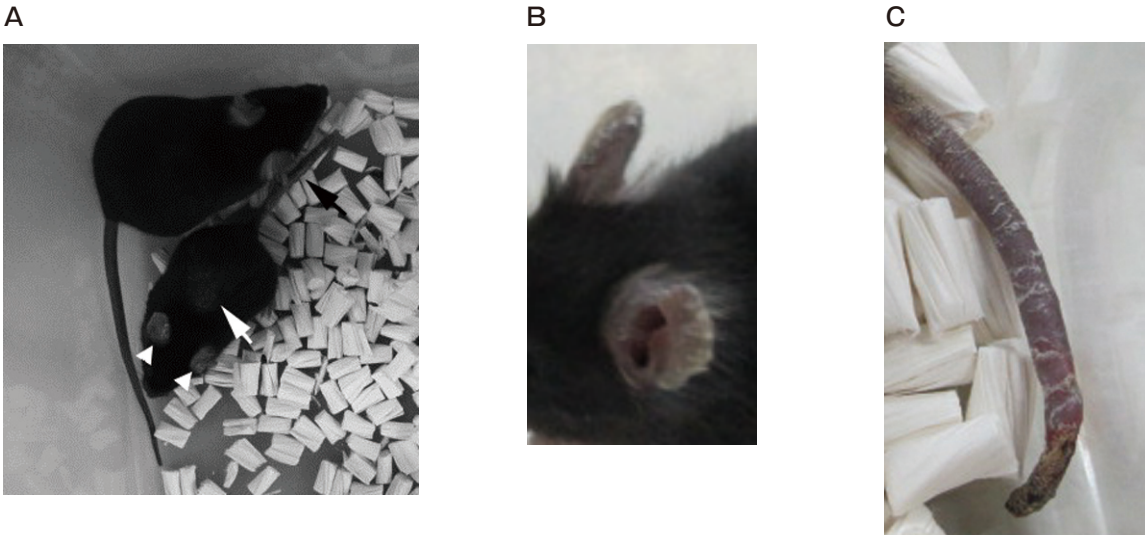



図５　野生型と F0-006 の皮膚 MMP-9 過剰発現トランスジェニックマウス（MMP-9TG）との表現型の比較を表す。（A）生後 10 週間で、野生型（上）と比較して F0-006（下）では炎症一般に伴う異常角化を尻尾や耳（白矢尻）に、脱毛を背部（白矢印）に認めた。（B）F0-006 の耳の拡大、（C）F0-006 の尻尾の拡大をそれぞれ示す。

ミノ酸が分解されることにより活性化を受けて生体内で働くことが知られている[19, 20]。他のMMPに関してもこの活性化を受けるアミノ酸配列は相同性が高く保持されており、活性化を受けるアミノ酸の置換が別のMMPに関しての同様の研究でも行われていることから[19, 20]、今回の研究でも、この活性化が起こりやすいように活性化に関わるアミノ酸に変異を加え、その変化を発現ベクターの細胞へのトランスフェクションによる培養上清の分子量で確認した。

ヒトK14のプロモーターは表皮基底層の角化細胞に特異的に蛋白を発現させるための遺伝子領域として知られており[19, 21, 22]、今回もこれを用いた。他に同様の局在発現させるK5のプロモーターを用いる方法が報告されており[20]、また分化した角化細胞のみに発現するK1やK10などを使用することも今後試みられる余地がある。

今回、特にMMP-9過剰発現が認められたマウスで、野生型と比較して脱毛、耳や尻尾の過角化を認めた。これらは、MMP-9発現亢進を確認した皮膚の代表的な炎症疾患である湿疹・皮膚炎で認められる所見であるが[11]、別に、本研究者のこれまでの検討結果により、MMP-9はヒトの皮膚組織で、悪性や良性の異常角化組織、過角化組織での発現を認めている[23-25]。また培養表皮角化細胞では、高カルシウムの濃度やtransforming growth factor（TGF）-βを添加した分化刺激、ultraviolet（UV）B照射やTNF-αおよびinterleukin（IL）-1α添加による炎症惹起刺激で、MMP-2と比較してMMP-9が選択的に発現亢進することを解明している[1, 8-10, 26]。さらに最近、本研究者により、この際に起こるMMP-9発現亢進を司るMMP-9プロモーターと分化のマーカーとして知られるインボルクリンのプロモーターとに共通に結合して発現量を抑制する蛋白がpoly（ADP-ribose）polymerase-1（PARP-1）であり、このPARP-1が、炎症やアポトーシスに関わるカスペースの働きで分解されることで両者の発現が亢進することを検証した[27]。もともと分化刺激は炎症時の過角化を含めた角化、表皮角化細胞に運命づけられたプログラムされた細胞死の刺激であり、一種のアポトーシスと考えられる[1]。また炎症惹起もアポトーシスを起こす刺激として捉えることができる[1]。今後、交配をしながらさらに表現型を検討する必要があるが、今回の皮膚の変化はこれらアポトーシスに関わるMMP-9の役割を裏付けるものと考えられる。加えてMMPは老化において過剰発現することも示唆されており[1]、今回の結果は、皮膚の老化とMMP-9との関わりも想定され興味深い。

別に、本マウスを用いることで、皮膚、特に表皮でのMMP-9過剰発現モデルとして、新たな、あるいは既存の抗炎症薬や保湿薬の効果を検証するのに有用であると思われる。

また、毒ガスとして知られるサルファマスタードやナイトロジェンマスタードへの暴露により、MMP-9発現が亢進することが知られており[28]、これらの化学兵器への暴露動物モデルとしての利用も期待される。

さらに、K14プロモーターに成長ホルモンを発現する過剰発現マウスではマウスの成長そのものに影響を与えることも判明しており[22]、今後、ホモマウス作成などの際にMMP-9過剰による全身他臓器の表現型検討も必要と考えられる。

なお本研究は、上述したような観点から前職で防衛省の職務発明として認定され、特許出願することとなった（特願：2013-041950）。

**（参考文献）**


1）Kobayashi T: Gelatinases in the skin. In: Oshiro N, Miyagi E eds: Matrix Metalloproteinases: Biology, Functions and Clinical Implications. Nova Science Publishers, 2012, 99-125.

2）小林孝志：真皮結合組織代謝異常　線維成分異常：玉置邦彦編：最新皮膚科学大系　第10巻「内分泌・代謝異常症　脂肪組織疾患　形成異常症　異物沈着症」、中山書店、2003、2-13.

3）小林孝志：天然分解酵素：田畑泰彦編：遺伝子医学MOOK1 再生医療へのブレイクスルー　その技術革新と今後の方向性、メディカル ドゥ、2004、82-87

4）Gross J, Nagai Y: Specific degradation of the collagen molecule by tadpole collagenolytic enzyme, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 54, 1197-1204, 1965.

5）Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Seltzer JL, Kronberger A, He C, Bauer EA, Goldberg GI: H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen, J. Biol. Chem., 263, 6579-6587, 1988.

6）Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI: SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages, J. Biol. Chem., 264, 17213-17221, 1989.

7）McCawley LJ, Matrisian LM.: Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! Curr. Opin. Cell Biol., 13, 534-540, 2001.

8）Kobayashi T, Hattori S, Shinkai H: Matrix metalloproteinases-2 and -9 are secreted from human fibroblasts, Acta Derm. Venereol., 83, 105-107, 2003.

9）小林孝志：皮膚の炎症性疾患におけるmatrix metalloproteinase-9の役割―Leptomycin B投与による治療の可能性について、炎症・再生, 24, 578-583, 2004.

10）Kobayashi T, Shinkai H: Leptomycin B reduces matrix metalloproteinase 9 expression and suppresses cutaneous inflammation, J. Invest. Dermatol., 124, 331-337, 2005.

11）Kobayashi T: Is matrix metalloproteinase (MMP)-9 a culprit involved in dermatitis? Increased expression of gelatinolytic activity in allergic contact dermatitis, Contact Dermatitis, 64, 171-172, 2011.

12）Kobayashi T, Kishimoto J, Ge Y, Jin W, Hudson DL, Ouahes N, Ehama R, Shinkai H, Burgeson RE: A novel mechanism of matrix metalloproteinase-9 gene expression implies a role for keratinization, EMBO Rep, 2, 604-608, 2001.

13）Kobayashi T, Kishimoto J, Hattori S, Wachi H, Shinkai H, Burgeson RE. Matrix metalloproteinase 9 expression is coordinately modulated by the KRE-M9 and 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate responsive elements, J. Invest. Dermatol., 122, 278-285, 2004.

14）Liu Z, Zhou X, Shapiro SD, Shipley JM, Twining SS, Diaz LA, Senior RM, Werb Z: The serpin α1-proteinase inhibitor is a critical substrate for gelatinase B/MMP-9 in vivo, Cell, 102, 647-655, 2000.

15）小林孝志：水ぶくれをつくる酵素は?―好中球由来酵素の水疱形成に果たす役割、蛋白質・核酸・酵素, 46, 263-264, 2001.

16）Kobayashi T: MMP-9 and TIMP-1 assays in keratinocyte cultures. In: Turksen K ed. Epidermal Cells: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology vol 289, Humana Press, 2005, 201-208.

17）Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z: MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis, Cell, 103, 481-490, 2000.

18）小林孝志：癌の発生を促す酵素はどこからくるのか? 蛋白質・核酸・酵素, 46, 757-758, 2001.

19）Krampert M, Bloch W, Sasaki T, Bugnon P, Rülicke T, Wolf E, Aumailley M, Parks WC, Werner S: Activities of the matrix metalloproteinase stromelysin-2 (MMP-10) in matrix degradation and keratinocyte organization in wounded skin, Mol. Biol. Cell, 15, 5252-5254, 2004.

20）McCawley LJ, Wright J, LaFleur BJ, Crawford HC, Matrisian LM: Keratinocyte expression of MMP3 enhances differentiation and prevents tumor establishment, Am. J. Pathol., 173, 1528-1539, 2008.

21）Vassar R, Rosenberg M, Ross S, Tyner A, Fuchs E: Tissue-specific and differentiation-specific expression of a human K14 keratin gene in transgenic mice, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 1563-1567, 1989.

22）Wang X, Zinkel S, Polonsky K, Fuchs E: Transgenic studies with a keratin promoter-driven growth hormone transgene: prospects for gene therapy, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 219-226, 1997.

23）Kobayashi T, Onoda N, Takagi T, Hori H, Hattori S, Nagai Y, Tajima S, Nishikawa T: Immunolocalizations of human gelatinase (type IV collagenase, MMP-9) and TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) in normal epidermis and some epidermal tumors, Arch. Dermatol. Res., 288, 239-244, 1996.

24) Kobayashi T, Sakuraoka K, Takagi T, Hori H, Hattori S, Nagai Y, Tajima S, Nishikawa T: Immunolocalizations of human gelatinase (type IV collagenase, MMP-9) and TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) in Hailey-Hailey and Darier's diseases, Dermatology, 193, 110-114, 1996.

25) Kobayashi T, Sakuraoka K: A case of angiokeratoma circumscriptum: Immunolocalization of matrix metalloproteinase (MMP)-9, J. Dermatol., 25, 391- 394, 1998.

26) Onoue S, Kobayashi T, Takemoto Y, Sasaki I, Shinkai H: Induction of matrix metalloproteinase-9 secretion from human keratinocytes in culture by ultraviolet B irradiation, J. Dermatol. Sci., 33, 105-111, 2003.

27) Kobayashi T: Suppression of matrix metalloproteinase-9 expression in undifferentiated, non-apoptotic keratinocytes is abrogated by the cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase-1, Apoptosis, 16, 1205-1216, 2011.

28) Wormser U, Brodsky B, Reich R: Topical treatment with povidone iodine reduces nitrogen mustard-induced skin collagenolytic activity, Arch. Toxicol., 76, 119-121, 2002.

# 角層細胞間脂質の組成制御による膜透過性ペプチドの経皮吸収に関する研究

千葉科学大学薬学部生命薬科学科

坂本　一民

Skin is the largest organ in the body as a barrier to protect life from environment. Key element of the skin barrier function relies on the structure and function of Stratum Corneum Intercellular Lipids (SCLP). Impairment of SCLP in composition or structure and function causes malfunction of skin or even diseases such as Atopic dermatitis. On the other hand, controlled temporal perturbation of skin barrier function could lead desirable Trans Dermal Drug Delivery System (TDDS).

The objective of this study is to establish a novel method for the Percutaneous Absorption of Cell Penetrating Peptide (or Protein Transduction Domain : PTD) in Relation to the SCLP as an ideal TDDS. Key feature of this TDDS is the combination of SCLP composition and PTD's ability of non invasive membrane penetration. Based on the altered ratio of sphingosine (So) and sphinganine (Sa), which increases from normal to atopic skin condition, model SCLP mixtures are composed and evaluated in terms of barrier function and physicochemical properties.

Atopic Skin (AS) model showed impaired barrier function for the release of Rhodamine- B (RhoB) encapsulated in the SCLP liposome, though there are no differences on the physicochemical properties between AS and Normal Skin (NS) or 3M (Basic SCLP composition without Sphingo lipids). This result, caused by the scares changes of structure and function of SCLP as a whole, indicates the possibility to control barrier function by means of changing SCLP composition.

PTD is a good candidate to combine SCLP composition with its non-harmful spontaneous penetration through the cell membrane. But little is known for its spontaneous translocation mechanism. We have investigated the effect of surface curvature of cell membrane by means of changing outer osmotic pressure. As a result, positive curvature change by decreasing Osmotic Pressure stimulated PTD penetration. Our proposition of the mechanism that PTD introduces local and temporal dynamic transformation of the membrane structure to mesh phase is thus confirmed. Combination of SCLP composition change and PTD application would lead us to create a novel and ideal TDDS.

## 1．緒　言

皮膚は身体最大の臓器であり、外部環境との境界を成している事から、経皮吸収型薬剤投与の有用性は十分認知されている。しかしながら、皮膚が生体と外界を隔て正常な生体機能を保護・維持する防御機関であるがゆえに、その構造と機能を損なわずに経皮的に薬剤を投与することは容易ではない。皮膚は、表面から表皮、真皮、皮下組織の三層からなり、表皮の最外相には角層と称される死んだ細胞の累積層が存在する。角層の細胞間隙にはセラミド、コレステロール、脂肪酸などの脂質を構成成分とした角層細胞間脂質膜（SCLP；Stratum Corneum Intercellular Lipids 図１）が存在し、多重ラメラ層を形成することによって皮膚の主たるバリア機能を担っている。一般にSCLPを通るルートが薬物透過における主な経皮吸収経路と言われており、薬物はバリア壁として存在しているSCLPを透過しなければならない。このような堅固なSCLPを透過するために、通常イオントフォレシスやソノフォレシス、マイクロニードルといった物理的な構造破壊手段を用いて薬物の吸収促進が行われている[1)]。これらの手法は、化粧品のように皮膚への作用が緩和である事を前提に万人が使用する製品では、頻回塗布（使用）に対する安全性の保証やハンドリングの簡便性が実用上の難点である。

一方、バリア疾患病と言われるアトピー性皮膚炎（Atopic Dermatitis：AD）の発症要因解析から角層の脂質組成がバリア機能の重要な因子であることが判明しつつあり、SCLPの組成とその構造及び機能の関係を知ることは、バリア性欠陥に起因する皮膚疾患の治癒のための薬剤開発および健常性維持のための化粧品の製剤化において意義ある課題と考えられる。そこで、本研究はまず角層細胞間脂質膜（SCLP）[2)]のモデル組成リポソームを構築し、その自己組織体としての相挙動と形態変化を物理化学的手法で解析し、バリア性との関係を明らかにする事を試みた、次にその知見を基に膜透過性ペプチド（PTD）[3)]を薬剤担体とし、生体に不快な負荷を与えず部位選択的かつ放出制御下に薬効成分を経皮的に投与する、新たな経皮DDSシステム（TDDS）を構築する事を目的に実施した[4)]（図１）。

ADは湿疹の発生や皮膚の異常乾燥といった角層バリアの機能欠陥による皮膚疾患であるが、近年生命科学的視点からのAD患者及び健常者の比較研究で、SCLPにおけるセラミドの組成や種類が大きく関与している事が明らかに



Percutaneous Absorption of Cell Penetrating Peptide in Relation to the Lipid Composition of Stratum Corneum Intercellular Lipids

Kazutami Sakamoto

Faculty of Pharmacy, Chiba Institute of Science

されてきた。内田らはADモデルマウスの角層中のセラミドおよびスフィンゴ脂質含有量を分析した結果、セラミドの代謝物であるスフィンゴ脂質組成が健常マウスと異なることを明らかにし、ADにおけるバリア機能低下と関連するとの仮説を立てた[5)]。ここで明らかになった脂質全体のわずか4－6 mol ％ を構成するスフィンゴ脂質の組成変化とバリア機能に注目してモデルリポソームを構築し、SDSの作用による内包された蛍光標識物質の透過性を検討した結果、微量構成成分であるスフィンゴ脂質の組成がADにおけるバリア機能低下と相関する事を見出した[5)]。本研究はこれらの結果を踏まえ、スフィンゴ脂質の組成の違いが膜物性に影響を与えていると考え、これを透過機序解明に繋げることを目的にモデル組成の脂質膜に関する物理化学的な視点による解析を行った（図１）。

一方、人体における角層の役割と同様に細胞における生命維持の基本は細胞質（Cytosol）が細胞膜によって外界と隔てられ、物質の膜内外への移動の制御と細胞内での代謝が恒常的に調節されている事にある。ところが、近年チャネルやレセプターなどの関与なしに直接細胞内に透過する物質として、種々の膜透過性ペプチドドメイン（PTD）が見出されてきた。これは、生体膜のバリア機能を超越する現象で、新たなDDSキャリアとしての期待から多くの研究がなされている。PTDは塩基性アミノ酸に富むペプチドでHIVウイルス由来のTATペプチド[6, 7)]やそのモデル物質としてのArgの８量体（R8）[8)]など多種の存在が知られている。PTDはそれ自身のみならず、タンパク質や種々の薬物さらにはリポソームなどを結合させても、さまざまな細胞膜を透過することが実証されているが、その機構についてはいまだに定説がない。PTDの膜透過方式には小胞体として内包化されるタイプの種々のEndocytosis（E透過）と、膜を越えて直接細胞質に移行するCytosolysis（C透過）が知られ（図２）、E透過では細胞内部でさらに細胞質（Cytosol）への移行を必要とする[9)]。一方、C透過は直接的な透過故にDDSキャリアとしてより有効である。

このような背景の下、筆者らは数年来経皮デリバリーに関わる研究を推進してきた[2, 10, 11)]。本報ではこれらの研究を物理化学（界面科学）的視点から統合してSCLPの脂質組成による構造と機能の変化を理論的に解析・実証し、SCLPに対するPTDの透過性を随意に制御できるインテリジェント経皮薬物送達システム（DDS）開発の研究基盤

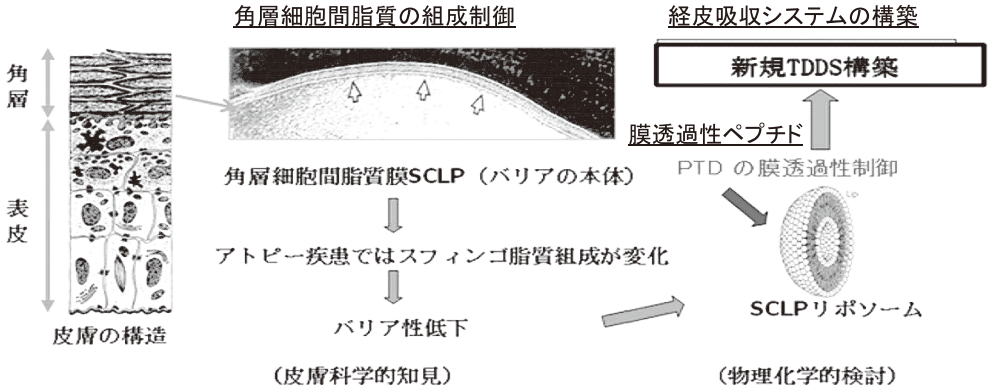



図１　角層細胞間脂質（SCLP）の組成制御による膜透過性ペプチド（PTD）の経皮吸収システムの構築

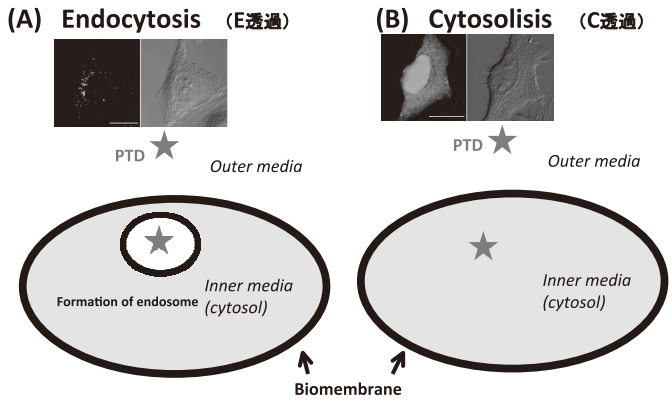



図２　PTD の膜透過機構
（A）：Endocytosis および（B）：Cytosolisis　R8-Alexa to Hella Cell
Futaki et al, PNAS , ACS Chem. Biol. 1（5），299-303（2006）[9)]

確立を目指す（図１）。なお、本報告ではPTDについてはSCLPへの適用の前段階として、通常の生体膜成分であるリン脂質（PC）を用いた巨大リポソーム（GUV）に対する膜透過機構解明を行い、その理論を応用したPTDのSCLPへの適用は今後の課題とした。

## ２．実　験

### ２.１　SCLP の脂質組成による構造と機能の変化

試薬として角層細胞間脂質の主要成分であるセラミド2（Cer 2：Matrava製）、パルミチン酸（PA：東京化成）、コレステロール（Chol：和光純薬）、またセラミドの代謝関連物質であるスフィンガニン（Sa、D-erythro-dihydrosphingosine：Matrava）、スフィンゴシン（So、D-erythro-sphingosine：Matrava）を用いた[2, 5]（図３）。本研究では内田らが明らかにした脂質組成を用いたモデルリポソームを調製した（表１）。リポソームは各脂質をクロロホルムに溶解させ混合、$N_2$ガスにより乾燥させた後、溶媒完全留去のため遮光下で１日減圧乾燥を行い、PIPES緩衝液を加え80℃湯浴中でボルテックス撹拌と超音波照射により調製した。評価は偏光顕微鏡（PM）、示差走査熱量計（DSC）、小角X線散乱（SAXS）、全反射フーリエ変換赤外分光法（ATR-FTIR）、蛍光異方性測定を用いて行った（図４）。

### ２.２　PTD の PC のリポソーム膜（GUV）透過性

リン脂質として卵黄レシチン（E-PC）を用いた。膜透過ペプチド（PTD）はアルギニン８個のオリゴマーである$R_8$

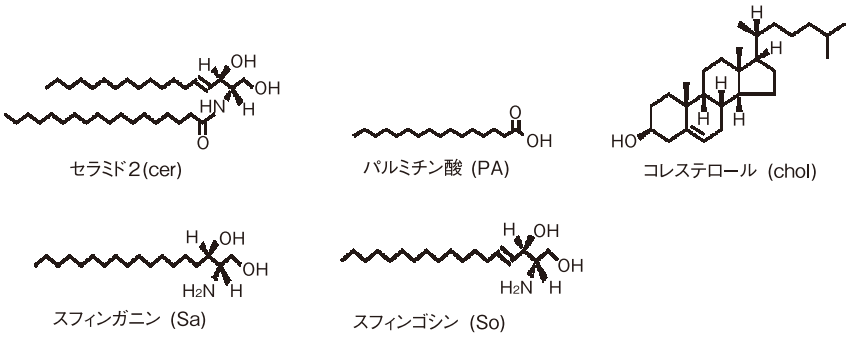



図３　モデル SCLP 構成に用いた試薬

表１　SCLP 混合モデルの脂質組成

| | 脂質組成（モル比） | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Cer 2 | Chol | PA | So | Sa | So/Sa |
| NS（Normal skin model） | 11.9 | 33.0 | 50.6 | 3.80 | 0.700 | 5.43 |
| AS（Abnormal skin model） | 11.7 | 32.4 | 49.8 | 5.70 | 0.400 | 14.3 |
| 3M（3 components） | 12.5 | 34.5 | 53.0 | − | − | − |

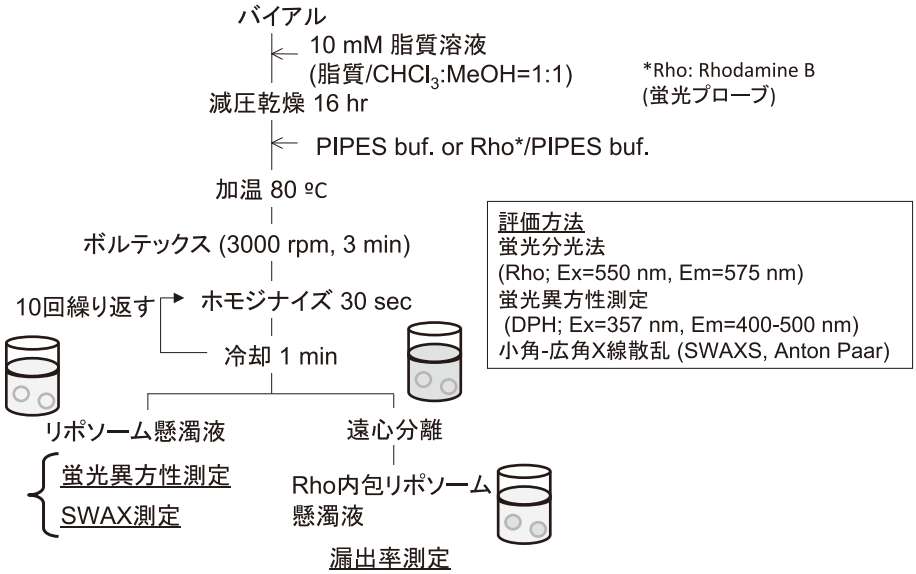



図４　モデル SCLP リポソームの調製法とその評価法

に、蛍光標識としてフルオレセインイソチオシアナート（FITC）を付加したFITC-$R_8$を用いた（図５）。GUVは定法で調製し（図６）、外相水の浸透圧はリン酸緩衝液（PBS）濃度で調製した（表２）。透過量測定にあたり、超遠心によって沈殿させたリポソームのGUV膜を破壊して、内包していた蛍光物質を漏出させるためにTriton X-100を用いた（図７）。また、PTDのGUVへの透過性実験の際のE-PC膜の安定性は、予めGUVに内包させたローダミンB（RhoB）の漏出から判定した。

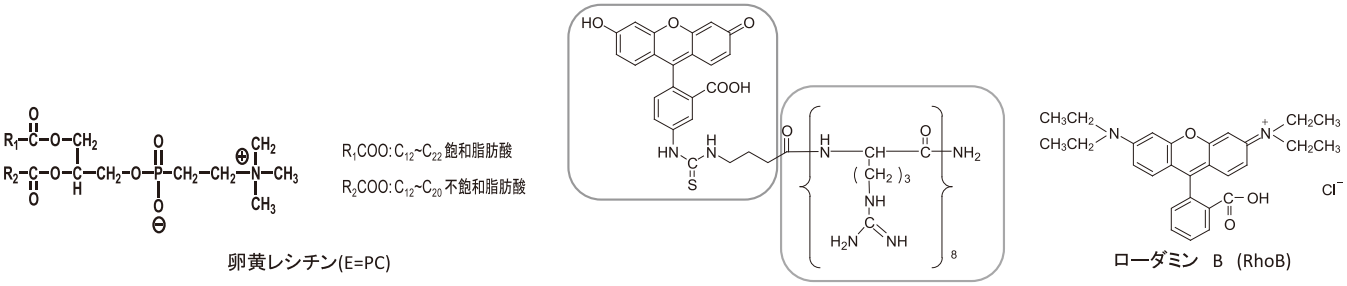



図５　PTD の膜透過機構解明に用いた試薬

表２　PTD 透過性試験における PBS 濃度と浸透圧

| PBS濃度 (%) | 5 | 10 | 20 | 30 | 40 |
|---|---|---|---|---|---|
| 浸透圧 (mOsm) | 14 | 28 | 56 | 84 | 112 |

低張液　等張液　高張液

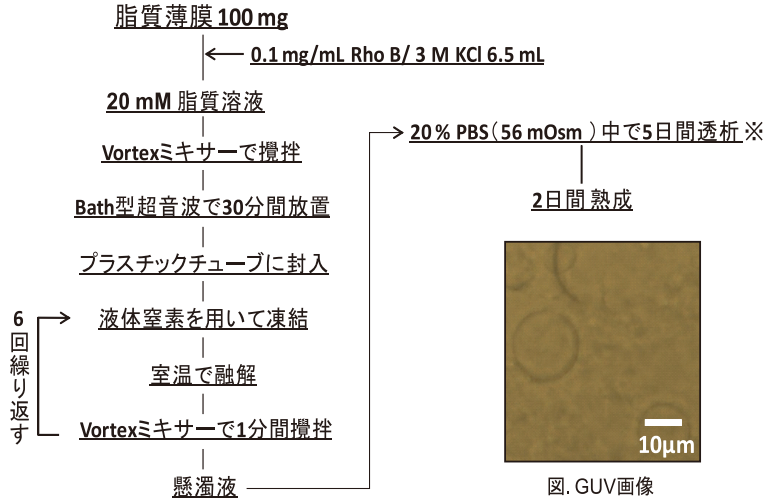



図６　GUV の調製法

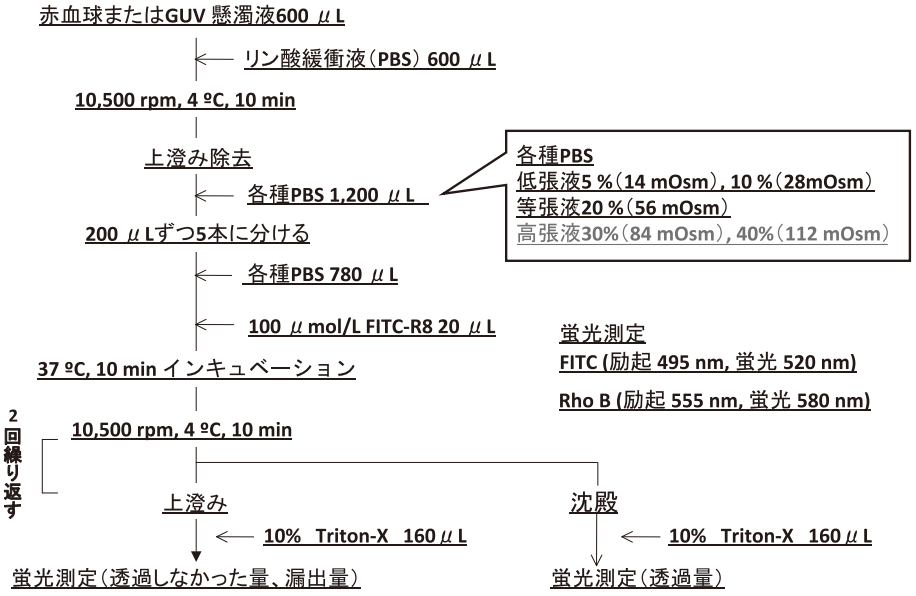



図７　PTD の膜透過性試験法

## 3．結果と考察

### 3.1　微量スフィンゴ脂質の組成による SCLP の構造と機能の変化

表１に示す各組成のモデル脂質混合物（3M, NS, AS）から生成したリポソームのFF-TEM像およびこれらのリポソームに内包させたRho Bの漏出性を図８に示した。図８から明らかのように、3MおよびNS（正常）に比べ、ADモデルマウスの脂質分析結果に基づくASは顕著な漏出が認められ、内田らのSDSを用いた結果と一致する微小なスフィンゴ脂質比に起因するバリア性の低下が確認された。

次にこれらモデル組成の物理化学的性質を調べた[2)]。３つのSCLPモデル組成の結果を代表するNSの偏光顕微鏡（PM）観察結果を図９に、DSC測定結果を図10に示す。これらの測定は１℃ /min、25℃～120℃の温度プログラムで実施した。パルミチン酸由来と示唆される昇温におけるDSCの吸熱ピーク前後の温度領域では固体から液晶及び液体の共存状態への変化が見られ、降温における二つの発熱ピーク間の温度領域では液体状態のサンプル中にマルターゼクロスの形成が見られた。これらの結果より偏光顕微鏡画像とDSCとの相関が確認され、脂質混合物は局所相分離を引き起こしていることが明らかとなった。また昇温過程においてスフィンゴ脂質添加系のNS、ASでは3Mと異なる局所液晶組織像発現を確認したが、組成の相違に基づく明確な液晶発現温度や構造の違いは確認されなかった。

３つの組成に関するSAXS測定結果を図11に、NSにおけるSAXS測定の温度依存性を図12に示す。図11よりSAXS測定において、スフィンゴ脂質添加系であるNS、ASのプロファイルはほぼ一致した。各サンプルの小角領域にラメラ相形成を示すピークが確認されたが、3Mではラメラ相の1次ピークにスフィンゴ脂質添加系との違いが認められた。広角領域では各サンプルにおいて、ヘキサゴナル側方充填を示す$q$=17 nm$^{-1}$（○）のピークと、斜方晶側方充填を示す$q$=17 nm$^{-1}$（○）及び15 nm$^{-1}$（●）のピーク[2)]が認められた。

また、各サンプルとも温度上昇に伴うラメラ相を示すピークの位置及び形状変化が認められ、温度上昇により脂質の充填が緩み液晶状態となったことが示唆された（NSのみ図12に表示、AS、3Mは省略）。これは偏光顕微鏡観察の結果（図９）と相関するものである。ATR - FTIR測定からアシル鎖のメチレン基に由来するCH$_2$伸縮振動によって側方充填のコンホメーションの秩序を知ることができる。また、CH$_2$はさみ振動によりヘキサゴナル側方充填な

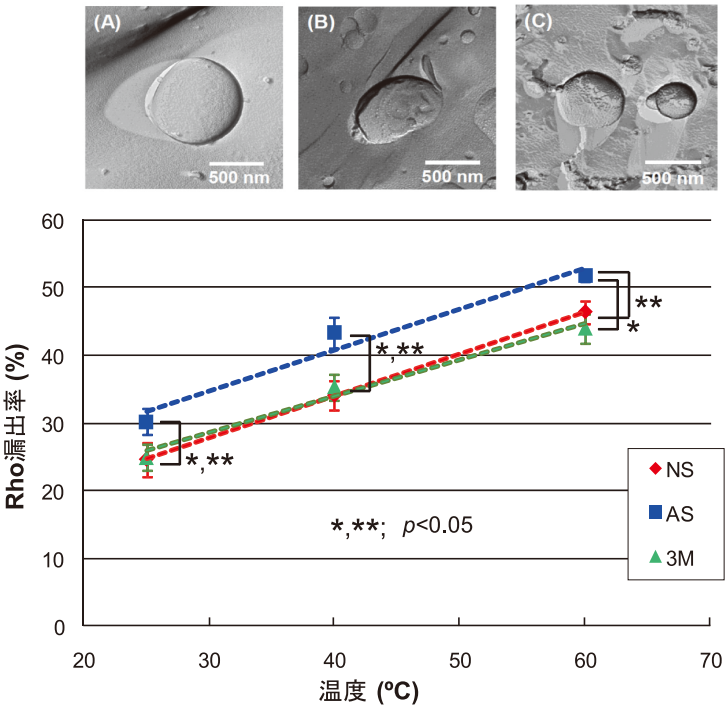



図８　各モデルリポソームの FF-TEM 像
（A）：NS、（B）：AS、（C）：3M およびリポソームからの RhoB 漏出率（３時間後）

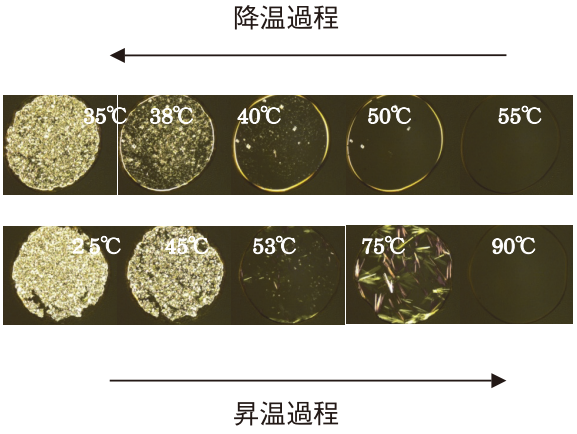



図９　SCLP 混合物の偏光顕微鏡 (PM) 観察結果
（NS モデル組成）

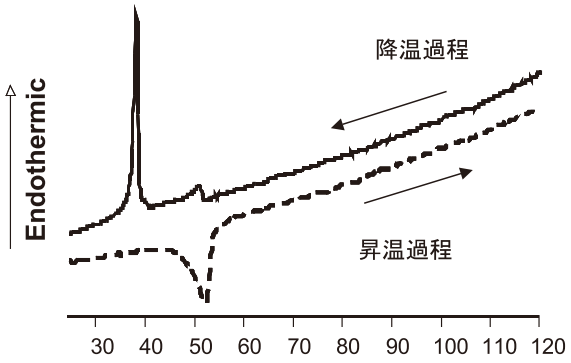



図 10　SCLP 混合物の DSC 測定結果（NS モデル組成）

らシングレット、斜方晶側方充填ならダブレットとなることも知られている。しかしながら各組成ともこれらのピークの強度や形に差異は認められなかった。（データ省略）

３つの組成に関する蛍光異方性測定結果を（図13）に示す。DPHを蛍光プローブとして用いた蛍光異方性の温度依存性を各組成サンプルについて比較検討した。その結果、図13に示すように３組成とも同様の温度依存性を示した。

以上の結果、リポソームからの溶出試験ではADにおけるスフィンゴ脂質の微小組成変化に対応するモデルでバリア性低下を再現したが、物理化学的手法での構造及び機能解析では３つのモデル間に差異を認めることはできなかった。これは系全体を平均化して測定判別するDSCやSAXSでは組成間の顕著な相違は見られない、すなわち脂質組成により脂質膜全体の構造変化は起こらないが、PM観察で

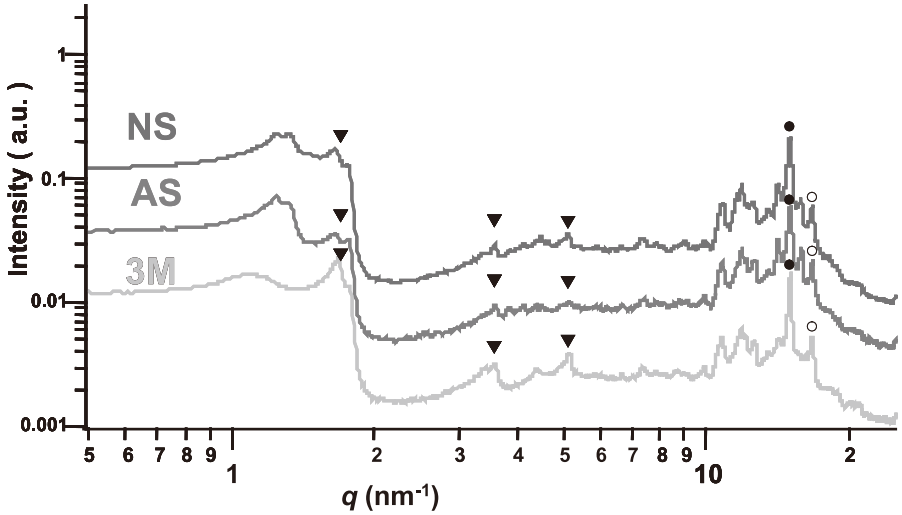



図 11　SCLP モデル組成の SAXS 測定における組成依存性（25℃）

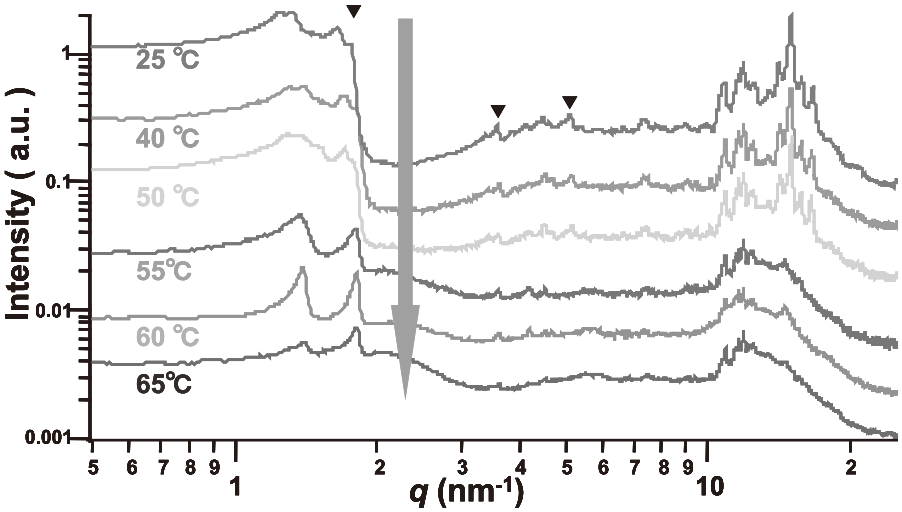



図 12　SCLP モデル組成の SAXS 測定における温度依存性（NS モデル組成）

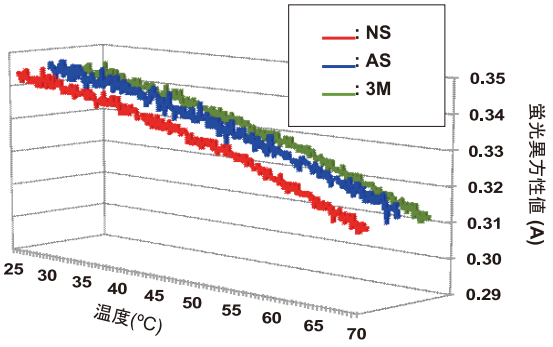



図 13　蛍光異方性測定結果（蛍光プローブ；DPH）

示唆されたように局所的な充填密度の不均一さといった微小領域での膜物性変化が生じ、これによりADにおけるバリア性低下が生じているものと推定される。

以上の結果をもとに、現在表1のスフィンゴ脂質の組成比（So/Sa）を一定に保ちながら全体に占める割合を表1の約5％から段階的に増加することによるバリア性および物理化学的性質への影響を継続検討している。その結果、スフィンゴ脂質の増加に伴っていずれの組成においてもリポソームのバリア性低下が観測され、さらにSAXSや蛍光異方性において温度に依存した構造と機能変化（温度の上昇で脂質の配向性・運動性が顕著に変化する）も認められている。これはバリア性低下の原因である表1のモデル組成における局所的不均一性（ミクロドメイン生成）が、スフィンゴ脂質の添加量増加で系全体に影響を示した為と考えられる。他方で、筆者らは角層細胞間脂質膜（SCLP）の配向構造と運動性がバリア性の鍵である事を電子スピン共鳴法（ESR）で明らかにしている[10, 11]。これらの知見を集積し解析することによって、スフィンゴ脂質の役割更にはその組成と添加量を変えることによるSCLPのバリア性の制御あるいは改善の可能性を示唆するものと期待される。

### 3.2　リポソーム膜（GUV）を生体膜モデルとしたPTDの透過機構の検討

緒言で述べた通り、PTDの膜透過方式には膜を越えて直接細胞質に移行するCytosolysis（C透過）と、小胞体として内包化される種々のEndocytosis（E透過）とが知られ（図14）、E透過では細胞内部でさらに細胞質（Cytosol）への移行を必要とするため、直接的な透過であるC透過がDDSキャリアとしてより有効である。E透過については種々の機構が提唱され、PTDの透過にも温度変化や受容体の影響が確認されているが、C透過を説明する機構は確立されていない。

我々は先にPTDをリン脂質系ラメラ液晶に添加すると平衡状態での液晶構造が添加量増加とともに臨界充填因子（CPP：Crytical Packing Parameter）[12]が減少する結果、界面の曲率が増大する方向、すなわちラメラ液晶（Lα相）

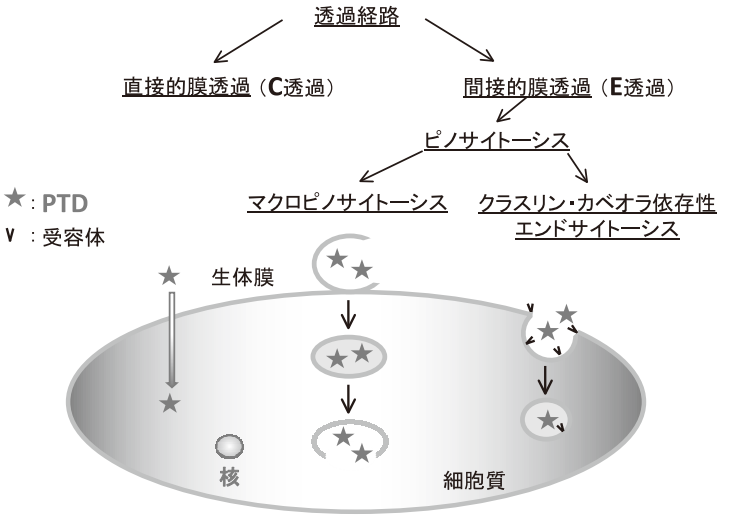



図14　PTDの透過機構

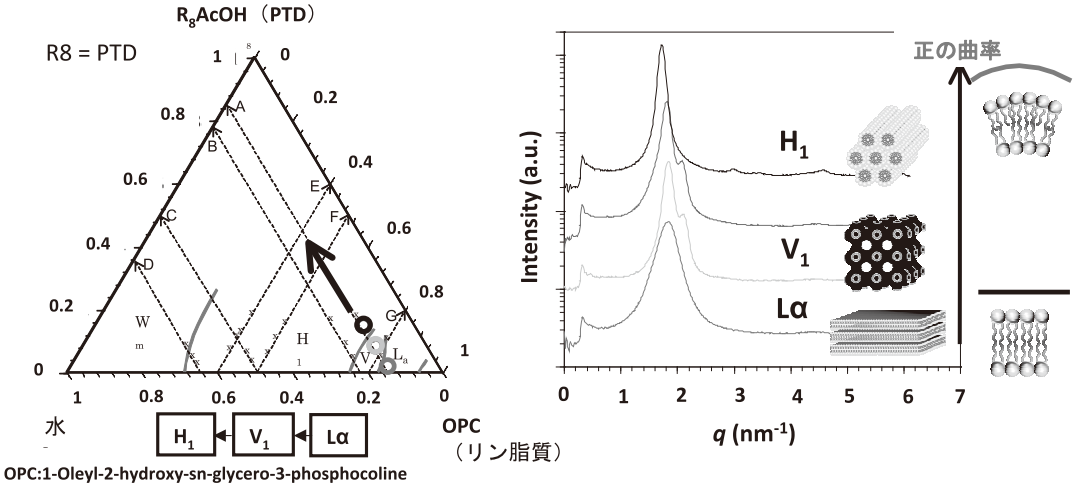



図15　平衡系でのリン脂質が形成する自己組織体のPTD（$R_8$AcOH）添加による構造転移

から両連続液晶（$V_1$相）次いでヘキサゴナル液晶（$H_1$相）へと変化する事を示した（図15）。$L_\alpha$相と$V_1$相の間にはメッシュ液晶（$M_1$相）の存在が知られており[13]、$L_\alpha$相から$M_1$相への転移エネルギーは極めて少ない事から、生体膜表面とPTDの相互作用によって局所的かつ一時的な動的変化として界面曲率の増大により$M_1$相が生じればC透過が起こりうると考え、界面曲率の調整によるPTDの透過性制御法を提案した[14]（図16）。すなわち強いカチオンであるPTD（R8）がバルクから生体膜を構成するPCのリン酸基との相互作用で膜表面に吸着し、その結果液晶状態にあって流動性を持ち、配向性にゆらぎのあるPC分子が局所的・非平衡的にメッシュ相を形成し内相へと移動する。透過したPTDは細胞質（Cytosol）に溶解した状態すなわちC透過が実現する。一方細胞質内のPTDは内相のPC表面に吸着しても曲率が負の方向である為、逆向きのプロセスでの外相への漏出は抑制されるので、効率的・効果的なC透過が達成されDDSとして有用なキャリアとして期待できる。

そこで、本研究ではこの仮説を証明する為に、赤血球およびGUVを用い、外相の浸透圧調整によってその界面曲率を変化させた時のPTDの透過性変化を調べた。赤血球を例に外相の浸透圧変化による形状および膜の曲率変化を図17に示した。この曲率制御にあわせてPTDの透過性を調べたところ、図18に示すように、いずれの場合も外相の浸透圧を下げ、膜の界面曲率を増大させると、PTDが脂質との相互作用により局所的非平衡的に$L_\alpha$相から$M_1$相

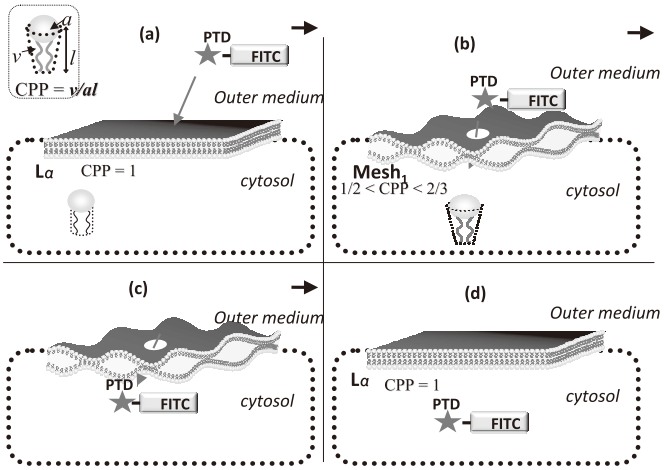



図 16　PTD の膜透過機構
(a) PTD の膜表面吸着、(b) 細孔形成（メッシュ構造への転移）、(c) PTD の膜透過、(d) PTD の膜（リポソーム）内移行（$R_8$AcOH）添加による構造転移

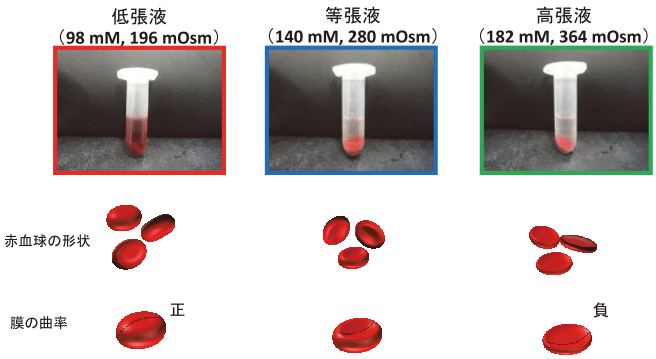



図 17　外層浸透圧と赤血球の形状変化

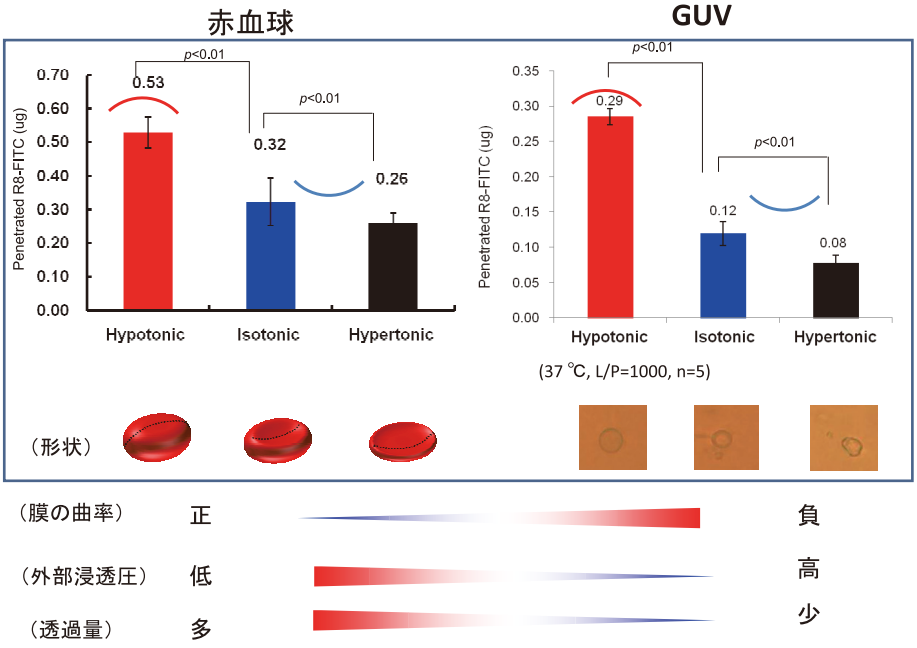



図 18　PTD の膜透過性における外層浸透圧の影響

への相転移を起こしてC透過しやすくなる事を示した。これに対し、外相の浸透圧を上げ膜曲率を減少させると、PTDが透過するにはこれに抗して局所の膜曲率を増大させねばならない為、C透過が抑制された。GUVを用いたPTDの透過実験において、図19に示すようにPTDキャリアであるR8(アルギニンオリゴマー)の無い蛍光団(FITC)のみでは浸透圧によらず透過しない事、および予めGUVに内包させたRhoBは同じく浸透圧、更には外相のPTDの存在によらず漏出しない事から、この透過実験の過程において、GUVを構成するE-PCからなる二分子膜のバリア性は維持されていた事実も上記の仮説をサポートする結果である。以上より、PTDがラメラ液晶状態(Lα相)にある生体膜を直接透過する機構を明らかにした[15)]。

## 4．まとめ

生体二分子膜の構造制御に基づくTDDS設計の新たな試みとして、PTDによる生体膜への直接膜透過(C透過)と言う生命にとっては本来抑制すべき現象(生体膜のバリア機能喪失)が起こる原因を、コロイド界面科学の観点からせまる学際的アプローチで検討した。その特徴は熱力学的に安定な平衡系では界面活性剤の幾何学構造(CPP)が自己組織体の曲率と全体構造を規定するとの考えを、生体膜とPTDとの相互作用による膜透過現象にあてはめた点にある。すなわち、現象論の吟味とその応用が主なために見過ごされてきたPTDの膜透過が「何故おこるか」を、PTDと生体膜の相互作用による動的・局所的な自己組織体の構造変化の現象と捉えることで、生体膜の構造と機能の本質の探索を目指すことが可能になる。さらに、この成果に基づきC透過およびE透過の選択およびそれぞれの透過性を制御する方法の開発に着手し、TDDSへの発展につなげる。すなわち、SCLPの流動性に関する知見から経皮吸収を目的とした製剤には、膜の流動性を誘発する材料選定の必要性が認知されている。しかしながら、膜の流動性を誘起する物質は、一時的ではなく半永久的(平衡状態)に構造を変化させてしまう可能性がある。これはADのようなバリア疾患をもたらす原因ともなり、当然ながら皮膚のバリア機能にとって好ましい状態ではない。“一時的”というキーワードがこの点で重要と思われる。ここで、第二ステップであるPTDの一過的現象に着目する。PTDは膜の揺動(perturbation)を引き起こすが、それ自身膜に留まらず、内部へ浸透していく。プロドラッグとしてPTDに標的薬物を積載すれば、表皮ないし真皮、さらには皮下組織への薬物送達を達成できることが期待される。このようにPTDの曲率変化に基づいた経皮デリバリーシステムは皮膚本来のホメオスタシスを損なわず、薬物を皮内に届ける理想のデリバリーシステムと言える。

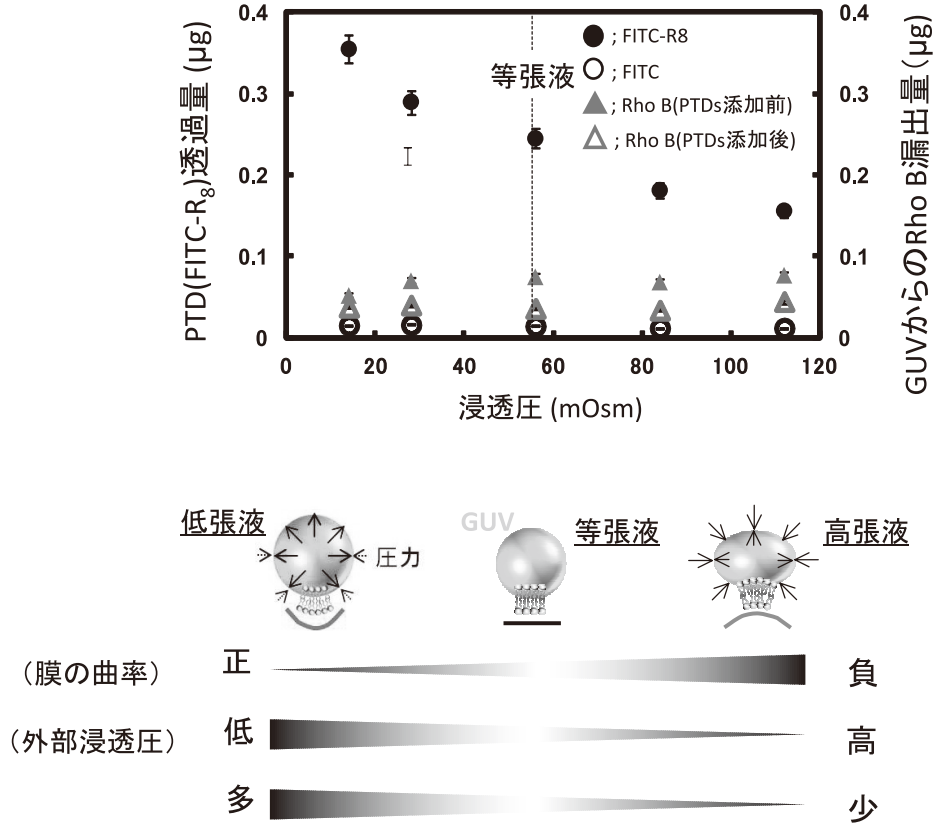



図19　Rho B内包GUVへのPTDの透過の浸透圧依存性

**謝　辞**

本研究は公益財団法人コスメトロジー研究振興財団の研究助成により達成できたものであり、特に千葉科学大学薬学部における製剤/化粧品科学研究室の実働体制確立の初期活動に大きな支えとなった事を報告し深謝申し上げます。また、本研究のデータは東京理科大学理工学部阿部酒井研究室吉野佐江子修士および森下卓学士の研究によるもので、両氏ならびにその直接指導者である、油井研一博士に心より御礼申し上げます。

**(引用文献)**

1）P. M. Elias, *et al*., *Semin. Dermatol.* **11**, 176（1992）
2）K. Aburai, *et al*., *J. Oleo Sci.* **60**, 197（2011）
3）膜透過性ペプチド（PTD）：Cell Penetrating Peptide からCPPと略称されることもあるが、本研究では界面活性物質の臨界充填因子Critical Packing ParameterをCPPとして議論するので、別名称であるProtein Transduction Domainの略（PTD）を用いた。
4）山下裕司、坂本一民、千葉科学大学紀要、**6**, 105（2013）
5）Loiseau, N. ; Moradian, S. ; Elias, P.M. ; Holleran W.M. and Uchida, Y. *J. Invest. Dermatol.* **129**, S68（2009）
6）A.D.Frankel, *et al*., *Cell* **55**, 1189（1988）
7）M.Green, *et al*., *Cell* **55**, 1179（1988）
8）S. Futaki, *Adv Rev Drug Deliv*. **57**, 547（2005）
9）Futaki *et al*, PNAS , *ACS Chem.Biol.* **1**(5), 299(2006)
10）J. Nakagawa, *et al*., *Spectrochimica. Acta. Part A*. **63**, 816（2006）
11）E. Yagi, *et al., J. Invest. Dermatol.* **127**, 895（2007）
12）J.N. Israelachivili, *et al., J. Chem. Soc., Faraday Trans. II* **72**, 1525（1976）
13）S. Hyde, *et al*., "*The Language of Shape*（*Chapter4*）" pp.141-176, Elsevier, Amsterdam（1997）
14）特開2005－154413、K. Sakamoto, *et al*., ICAMN2011 Keynote 講演 Oct.23, '11
15）K. Sakamoto, *et al*., *Chem. Lett*., **41**, 1078（2012）

# オリゴアルギニン固定化高分子と生体膜との相互作用の科学的検証

摂南大学薬学部薬剤学研究室
佐久間　信 至

We have been investigating cell-penetrating peptide-linked polymers as a new class of penetration enhancers. Cell-penetrating peptides are cationic oligopeptides such as oligoarginine and penetratin and they are internalized into cells via macropinocytosis. We designed a novel polymer: poly (N-vinylacetamide-co-acrylic acid) (PNVA-co-AA) modified with oligoarginine, with the expectation that the polymers would enable poorly membrane-permeable molecules physically mixed with them to effectively penetrate cell membranes without their concomitant cellular uptake. Here, we evaluated the performance of D-octaarginine-linked PNVA-co-AA on cell membranes. When cultured Caco-2 cells were incubated with 5(6)-carboxyfluorescein (CF), about 0.1% of applied CF was internalized into the cells during a 30-min experiment. This poor membrane permeability was dramatically enhanced by the D-octaarginine-linked polymers. A similar enhancement was observed when anionic CF was substituted with cationic atenolol and nonionic FITC-dextran. None of the individual components had any influence on CF uptake, demonstrating that only D-octaarginine anchored chemically to the polymeric platform enhanced the membrane permeation of CF. The polymer-enhanced CF uptake was consistently high even when the incubation time was extended to 120 min. Confocal laser scanning microphotographs of cells incubated with D-octaarginine-linked polymers bearing rhodamine red demonstrated that the cell outline was stained with red fluorescence. The polymer-enhanced CF uptake was significantly suppressed by 5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride, which is an inhibitor of macropinocytosis. Results indicated that D-octaarginine-linked polymers remained on the cell membrane and poorly membrane-permeable molecules were continuously internalized into cells mainly via macropinocytosis repeated for the individual peptidyl branches in the polymer backbone without the concomitant cellular uptake of the polymers.

## 1．緒　言

薬物は、さまざまな経路を介して生体に投与される[1)]。経口、経鼻などの非侵襲的ルートを介して生体に投与された薬物は、膜透過過程を経て全身循環血へ移行し、作用部位へ運ばれた後、治療効果を発揮する。しかし、生体膜は不必要な分子の侵入を防ぐ障壁であり、生体にとって異物である薬物の膜透過性は概して低い。

膜透過促進は、コントロールドリリース、ターゲティングと並ぶDDS研究の主課題である[2)]。低膜透過性分子の細胞膜透過性を改善して細胞内へ効率的にデリバリーするDDS的手法は、脂溶性の改善やトランスポーターによる認識などを利用したプロドラッグ、吸収促進剤などを用いて共存する低膜透過性分子の膜透過性を改善する物理混合物に大別される[3−4)]。現状、実質的な選択肢は前者であり、後者については、膜透過促進剤としてカプリン酸ナトリウムを処方したアンピシリン及びセフチゾキシムの坐剤が上市されているのみである[5)]。一方、前者についても、技術の普遍性を欠く限定的なものであり、膜透過促進技術の開発は困難を極めている。



Performance of oligoarginine-linked polymers physically mixed with poorly membrane-permeable molecules on cell membranes

Shinji Sakuma

Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University

このような中、現状を打破する可能性を秘めたDDSキャリアとして、HIVウイルスの感染機構の研究中に見出された細胞膜を容易に透過するタンパク質をベースに開発された膜透過ペプチドが精力的に研究されている[6)]。膜透過ペプチドは塩基性アミノ酸を多く含む10残基程度のカチオン性オリゴペプチドであり、代表的なものとしてオリゴアルギニン、ペネトラチンなどが知られている。これらのペプチドは、主にマクロピノサイトーシスにより細胞内に取り込まれる[7)]。マクロピノサイトーシスとは、細胞が本来備えている貪食作用の1つであり、負電荷の細胞膜表面との静電的相互作用により膜表面に濃縮された正電荷の分子が細胞内に取り込まれる現象をいう（Fig. 1）。

膜透過ペプチドを用いた細胞膜透過促進手法に関して、低膜透過性分子を膜透過ペプチドに化学結合させたプロドラッグが広く研究されている[8)]。この手法の場合、細胞膜を透過しない核酸も細胞内にデリバリーできることが報告されている。一方、細胞内でプロドラッグからペアレントドラッグが放出されなければ薬効は発現せず、この点が本手法の解決すべき課題となっている。負電荷の低膜透過性分子と正電荷の膜透過ペプチドを静電的に相互作用させた物理混合物も研究されている[9)]。調製方法は簡便であるが、膜透過促進作用を獲得するためには静電的相互作用が不可欠であり、負電荷の低膜透過性分子に限定された手法である。さらに、膜透過ペプチドが低膜透過性分子とともに細胞内に取り込まれた時点で膜透過促進作用が消滅するため、同分子の持続的な取り込みが期待できない。膜透過ペプチドを表面に固定化した微粒子に低膜透過性分子を内包させ

たキャリアも研究されている[10]。ウイルスベクターに代わる安全な遺伝子デリバリーキャリアとして期待されているが、導入効率の向上が解決すべき課題となっている。

このような現況下、我々は、オリゴアルギニンなどを側鎖に化学結合させたカチオン性オリゴペプチド固定化高分子を設計・合成し、『低膜透過性分子と混合して生体膜上に適用するだけで、膜上に留まる同高分子により繰り返し誘導されるマクロピノサイトーシスを介して、共存する低膜透過性分子のみの膜透過が促進される』ユニークな機構に基づく膜透過促進剤として同高分子の開発を進めている[11-13]。具体的には、N-vinylacetamide（NVA）とacrylic acid（AA）のランダム共重合体で、生体適合性の優れるpoly（N-vinylacetamide-co-acrylic acid）（PNVA-co-AA）をプラットフォームとして用いたオリゴアルギニン固定化高分子（Fig. 2）を合成し、研究を進めている。既に我々は、マウスを用いたin vivo経鼻吸収実験及びin vitro細胞取り込み実験を通して、オリゴアルギニン固定化高分子がインスリンの経鼻吸収を促進して血糖降下作用を増強すること、同高分子がFITC-デキストランのCaco-2細胞内への取り込みを促進することを証明している[11]。また、粘膜投与型ワクチンの抗原キャリアとしてのオリゴアルギニン固定化高分子の可能性を検証し、同高分子とタンパク抗原をマウス鼻腔内に複数回投与することにより、抗原特異的な血清中のIgGに加え、鼻腔内の分泌型IgAも誘導されることを明らかにしている[13]。

オリゴアルギニン固定化高分子のオリゴアルギニン鎖は、Fig. 3に示す機構（作業仮説）に基づき、細胞が本来備えている貪食作用の1つのマクロピノサイトーシスを誘導する。低膜透過性分子を同高分子と混合して生体膜上に適用すると、ペプチド鎖の近くに存在する低膜透過性分子は偶発的に細胞内に取り込まれる。オリゴアルギニン固定化高分子に対するマクロピノサイトーシスは他点で同時に起こるため、同高分子自体は細胞内に取り込まれず、膜透過促進作用は持続する。比較的少量の促進剤の添加で、安全かつ効率的に薬物の膜透過を促進するアイディアである。本項では、現状で最も強い膜透過促進作用が確認されているD-オクタアルギニン固定化高分子と生体膜との相互作用の検証を通して、同高分子の膜透過促進機能を定量化するとともに、同高分子の膜透過促進機構の解明を試みた結果を報告する。

## 2．実　験

### 2.1　D-オクタアルギニン固定化高分子の合成

PNVA-co-AAへのD-オクタアルギニンの固定化方法をFig. 4に示す。PNVA-co-AAの脱塩後、N, N'-dicyclohexylcarbodiimide（DCC）を用いてPNVA-co-AAのカルボキシル基を活性化し、N-hydroxysuccinimideと反応させ、PNVA-co-AA N-hydroxysuccinimide esterとした。次に、N-oxysuccinimide基と置換することによって、PNVA-co-AAのカルボキシル基にD-オクタアルギニンのアミノ基を結合させた。また、共焦点レーザー顕微鏡を用いた実験に用いるため、D-オクタアルギニン固定化高分子に蛍光色素のローダミンレッドを導入した高分子も合成した。本研究で用いられたD-オクタアルギニン固定化高分子の物性をTable 1にまとめる。

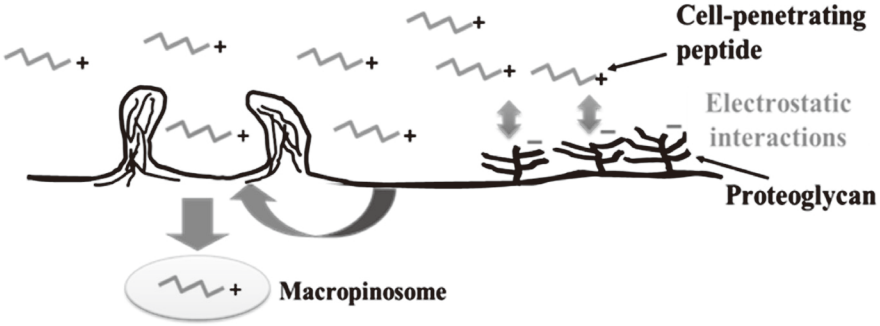



Fig. 1　Schematic representation of macropinocytosis.

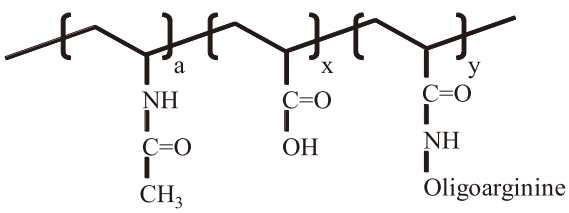



Fig. 2　Chemical structure of oligoarginine-linked poly（N-vinylacetamide-co-acrylic acid）（PNVA-co-AA）.

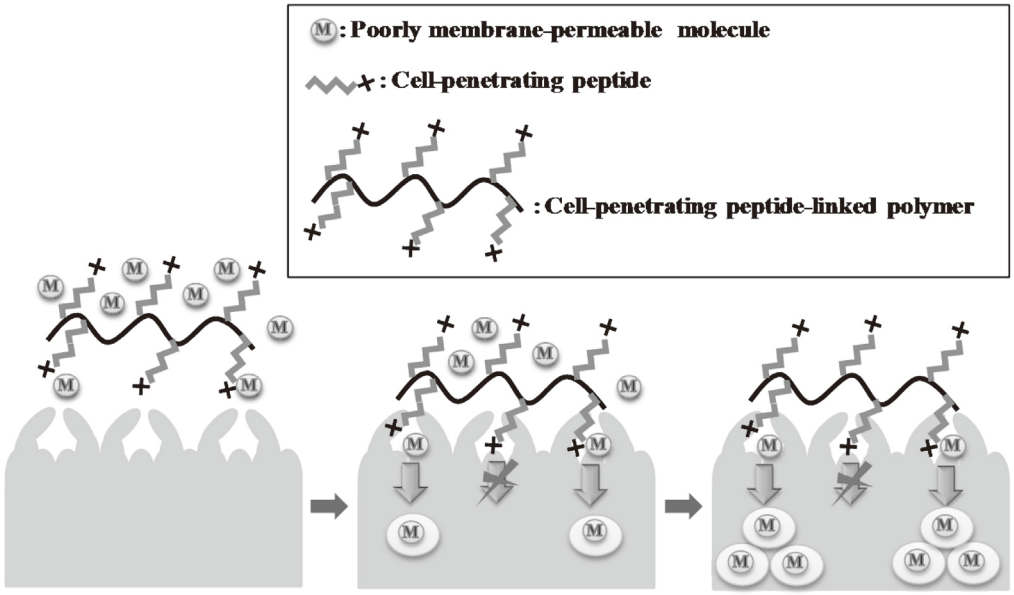



Fig. 3　Schematic representation of the cellular uptake of poorly membrane-permeable molecules physically mixed with oligoarginine-linked polymers.

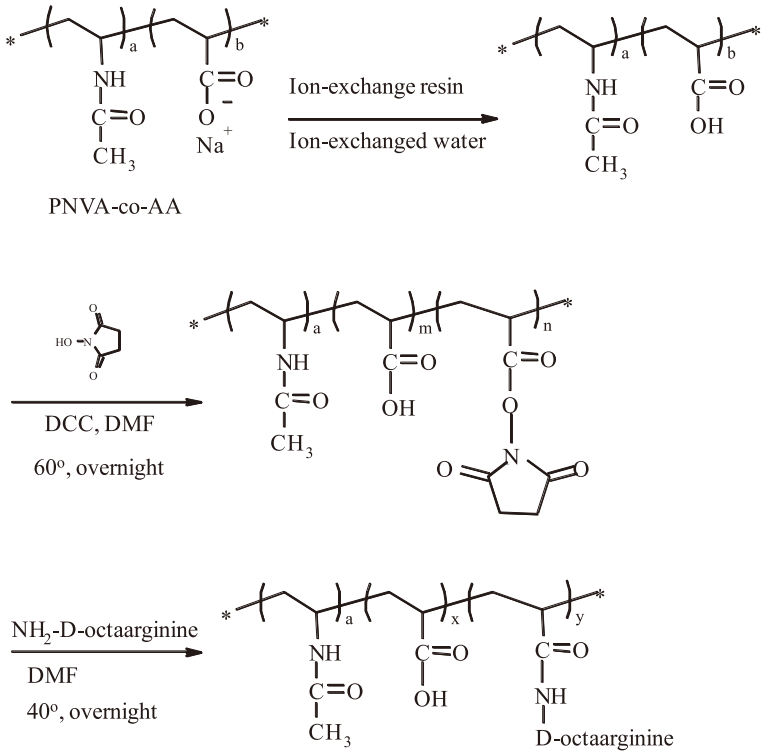



Fig. 4　Synthesis of D-octaarginine-linked PNVA-co-AA.

Table 1　Characterization of D-octaarginine-linked PNVA-co-AA used in this study.

| Polymers | Content of the respective units[a] | | | Mw (kDa)[c] |
|---|---|---|---|---|
| | NVA | AA | D-Octaarginine[b] | |
| D-Octaarginine-linked PNVA-co-AA | 70 | 19 | 11 | 1600 |
| D-Octaarginine-linked PNVA-co-AA bearing rhodamine red | 70 | 9 | 21 | 1600 |

[a]Percentage of the number of the respective monomer units to the total number of monomer units

[b]The monomer units of acrylic acid grafting D-octaarginine

[c]Weight-average molecular weight of original PNVA-co-AA

### 2．2　In vitro細胞実験

#### 2．2．1　Caco-2細胞の培養及び細胞懸濁液の調製

Dulbecco's Modified Eagle's Medium（D-MEN）溶液にfetal bovine serum（FBS）を10%、antibiotic-antimycotic mixture（penicillin-streptomycin）を0.5%、non-essential amino acidsを1%となるように加え、培養液を調製した。

Caco-2細胞を$6 \times 10^4$cells/mLの濃度でflaskに播種し、37℃、95% $O_2$/5% $CO_2$の条件下で培養した。0.25% trypsin-EDTAを用いて細胞をflaskから剥離させた後、$1 \times 10^6$cells/0.30mLの濃度で培養液に懸濁させた。遠心分離後、沈殿した細胞をPBS210μL中に懸濁させた。

#### 2．2．2　In vitro細胞内取り込み実験

低膜透過性のモデル化合物として、アニオン性の5(6)-carboxyfluorescein（CF）、カチオン性のatenolol及びノニオン性の分子量4000のFITC-dextran（FD-4）を用いた。PBSを溶媒として用いて、CF水溶液（0.1－5mM）、atenolol水溶液（2.5mM）、FD-4水溶液（2mM）、膜透過促進剤（D-オクタアルギニン固定化高分子あるいはその構成成分、0.1－2mg/mL）を含む水溶液、阻害剤（5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride（EIPA、1mM）、chlorpromazine（CPZ、1mM）あるいはmethyl-β-cyclodextrin（MβCD、20 mM））を含む水溶液を別々に調製した。2．2．1の細胞懸濁液210μLにモデル化合物水溶液、膜透過促進剤水溶液、阻害剤水溶液を30μLずつ添加した（コントロール実験で一部の水溶液を添加しないときは、代わりにPBSを同量添加）。37℃、95% $O_2$/5% $CO_2$の条件下で30－120分間インキュベートした後、遠心分離により細胞を分取した。PBSで数回洗浄することにより細胞内に取り込まれていないフリーのモデル化合物を除いた後、細胞をPBS200μLに分散させた。細胞を破砕し、モデル化合物を抽出した後、その濃度をHPLCにより求め、細胞内に取り込まれたモデル化合物の割合（細胞内に取り込まれたモデル化合物の量/細胞にアプライしたモデル化合物の量）を算出した。

#### 2．2．3　D-オクタアルギニン固定化高分子と細胞との相互作用

ローダミンレッドを導入したD-オクタアルギニン固定化高分子をPBSに溶解させ、2mg/mLとした。2．2．1の細胞懸濁液210μLに蛍光性高分子水溶液30μL及びPBS60μLを添加した。37℃、95% $O_2$/5% $CO_2$の条件下で30分間インキュベートした後、遠心分離により細胞を分取した。PBSで数回洗浄することにより細胞に付着していないフリーの蛍光性高分子を除いた後、細胞をPBS200μLに分散させた。PBSを10v/v%ホルムアルデヒド水溶液に置換し、細胞を固定化した後、共焦点レーザー顕微鏡で細胞を観察した。

## 3．結果と考察

### 3．1　D-オクタアルギニン固定化高分子の膜透過促進機能の定量化

CFは分子内にカルボキシル基を持つ分子量376.3の蛍光物質である。高水溶性であることから膜透過性は極めて低く、主に細胞間隙を透過して細胞内にわずかに取り込まれる程度である。まず、D-オクタアルギニン非存在下、CF濃度を変えて、Caco-2細胞とCFを30分間インキュベートした後に細胞内に取り込まれたCFの量を求めた。その結果、CF濃度に関係なく、添加したCFの約0.1%が細胞内に取り込まれることが確認された（データ省略）。本実験ではCaco-2細胞を浮遊状態で用いており、細胞間隙ルートは関与しないことから、ごくわずかのCFが受動拡散により細胞内に取り込まれたと考えられた。D-オクタアルギニン固定化高分子の添加により細胞内に取り込まれるCF量が増加することが予想されることから、細胞懸濁液中のCF濃度を低濃度の0.01 mMに固定し、以後の実験を行った。

Zaroらは、オリゴアルギニンの細胞内取り込みに要する時間は15分以下であることを報告している[14]。高分子に固定化されたオリゴアルギニンは細胞内に取り込まれないと我々は考えていることから、インキュベーション時間を30分に固定し、CFの細胞内取り込みに及ぼすD-オクタアルギニン固定化高分子の濃度の影響を検討した。その結果、Fig. 5に示すように、濃度依存的に膜透過促進作用は明らかに強くなった。細胞懸濁液中のD-オクタアルギニン固定化高分子の濃度が0.2mg/mLになるように調製したときのCFの細胞内取り込み量は、同高分子未添加時の20倍以上であった。一方、D-オクタアルギニン固定化高分子の濃度を0.01mg/mLまで低下させると、CFの細胞内取り込み促進効果は消失した。以上の結果から、D-オクタアルギニン固定化高分子の濃度を0.2mg/mLに固定し、実験を継続した。

インキュベーション時間を30分とし、D-オクタアルギニン固定化高分子の構成成分であるD-オクタアルギニン、PNVA-co-AA、両者の物理混合物によるCFの細胞内取り込み促進効果を検討した。結果をFig. 6に示す。膜透過促進剤を添加せずにCFをCaco-2細胞と30分間インキュベートしたとき、アプライしたCFの約0.1%が細胞内に取り込まれた。D-オクタアルギニン固定化高分子の添加により、CFの細胞内取り込みは再現性よく促進され、30分間にアプライしたCFの約2.0%が取り込まれた。一方、D-オクタアルギニン固定化高分子の構成成分を同濃度で添加した場合、いずれの条件においてもCFの細胞内取り込みはまったく促進されなかった。以上の結果から、高分子に固定化されたD-オクタアルギニンのみが膜透過促進

効果を示すことが明らかとなった。

次に、アニオン性のCF、カチオン性のatenolol及びノニオン性のFD-4を用いて、D-オクタアルギニン固定化高分子の膜透過促進作用に及ぼす低膜透過性分子の電荷の影響を検討した。後二者は正に帯電したD-オクタアルギニン固定化高分子と静電的に相互作用しないと考えられる。Table 2に示すように、低膜透過性分子の電荷に関わらず、D-オクタアルギニン固定化高分子は共存する低膜透過性分子の膜透過を促進することが確認された。このことから、低膜透過性分子とD-オクタアルギニン固定化高分子との間の静電的相互作用は、本システムにおいて必要条件でないことが示された。

### 3.2 D-オクタアルギニン固定化高分子の膜透過促進機構の解明

我々の期待に反してD-オクタアルギニン固定化高分子が細胞内に取り込まれるのであれば、同高分子が低膜透過性化合物とともに細胞内に取り込まれた時点で膜透過促進作用が終結し、継続的な取り込みが観察されないと考えられる。そこで、インキュベーション時間を120分まで延長し、細胞内に取り込まれるCFの量の経時変化を観察した。仮に、30分間にD-オクタアルギニン固定化高分子のほとんどが細胞内に取り込まれるならば、それ以降のCFの細胞内取り込みの増加量は、同高分子の非存在下同様、受動拡散のみに依存する。Fig. 7から明らかなように、D-オク

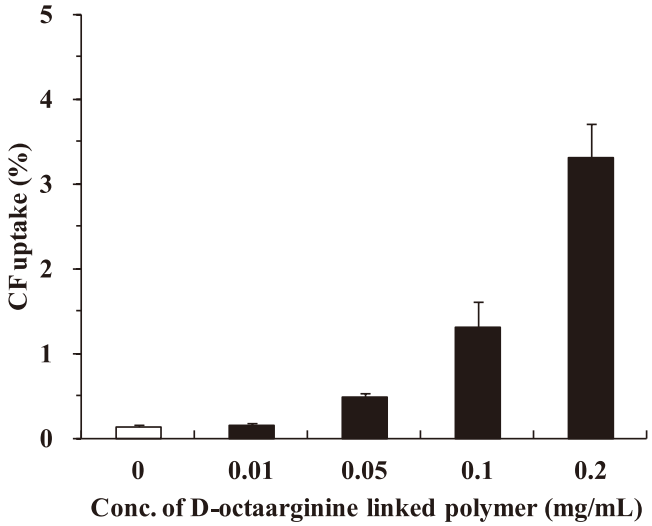



Fig. 5 Cellular uptake of CF in the absence（□）and presence of D-octaarginine-linked PNVA-co-AA（■）at different concentrations. Caco-2 cells were incubated with CF（0.01 mM）and the polymer（0.01－0.2 mg/mL）in PBS at 37℃ for 30 min. After incubation, CF that had associated with cells was assayed by HPLC. Data are expressed as the percentage of the amount of CF taken up into the cells to that added to the medium（mean ± s.d., n = 3）.

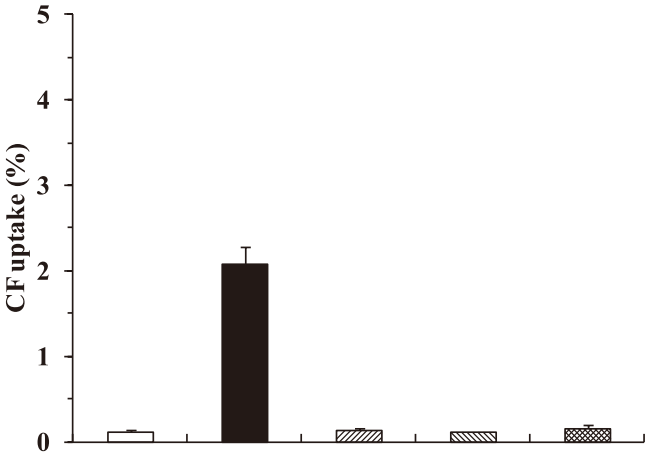



Fig. 6 Cellular uptake of CF in the absence（□）and presence of D-octaarginine-linked PNVA-co-AA（■）and its individual components（▨: D-octaarginine, ▧: PNVA-co-AA, ▩: a physical mixture of D-octaarginine and PNVA-co-AA）. Caco-2 cells were incubated with CF (0.01mM) and each substance (0.2mg/mL) in PBS at 37 ℃ for 30 min. When the physical mixture was used, the respective concentrations of D-octaarginine and PNVA-co-AA were adjusted to 0.2mg/mL. After incubation, CF that had associated with cells was assayed by HPLC. Data are expressed as the percentage of the amount of CF taken up into the cells to that added to the medium（mean ± s.d., n = 3）.

Table 2 Effect of charges on the penetration enhancement of poorly membrane-permeable molecules in the absence and presence of D-octaarginine-linked PNVA-co-AA.

| Molecules | Charge | Concentration[a] (mM) | Cellular uptake (%[b]) | |
|---|---|---|---|---|
| | | | In the absence of D-octaarginine-linked PNVA-co-AA | In the presence of D-octaarginine-linked PNVA-co-AA |
| CF | Anionic | 0.01 | 0.145 ± 0.035 | 2.37 ± 0.48 |
| Atenolol | Cationic | 0.25 | 0.313 ± 0.021 | 1.05 ± 0.12 |
| FD-4 | Neutral | 0.2 | 0.141 ± 0.0065 | 3.37 ± 0.23 |

[a]Concetration of each molecule in cell suspension

[b]The percentage of the amount of each molecule taken up into Caco-2 cells to that added to the medium (mean ± s.d., n = 3)

タアルギニン固定化高分子存在下、CFは継続的に細胞内に取り込まれ、減弱する傾向は観察されなかった。この結果は、D-オクタアルギニン固定化高分子が細胞外で機能し続けていることを示唆しており、低膜透過性分子と混合して生体膜上に適用するだけで、それ自体は細胞内に取り込まれずに共存する同分子のみの膜透過を促進するD-オクタアルギニン固定化高分子の機能を支持するものと判断された。

引き続いて、ローダミンレッドで蛍光ラベルしたD-オクタアルギニン固定化高分子とインキュベートした後のCaco-2細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、Fig. 8に示すように、ローダミンレッドに由来する赤色蛍光は、細胞の輪郭に沿うように観察された。このデータのみでは、D-オクタアルギニン固定化高分子の細胞内取り込みがまったく起こっていないと断言できないが、大部分のD-オクタアルギニン固定化高分子は細胞膜上に滞留していると考えられた。

我々は、オリゴアルギニン固定化高分子の存在下における低膜透過性分子の膜透過促進機構として、「①1本の高

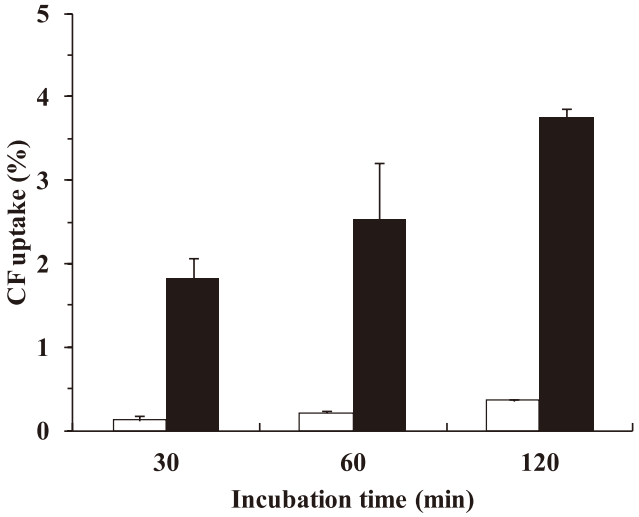



Fig. 7　Cellular uptake of CF in the absence（□）and presence（■）of D-octaarginine-linked PNVA-co-AA. The incubation time was set at 30, 60, or 120 min. Caco-2 cells were incubated with CF (0.01mM) and the polymer (0.2 mg/mL) in PBS at 37 ℃. After incubation, CF that had associated with cells was assayed by HPLC. Data are expressed as the percentage of the amount of CF taken up into the cells to that added to the medium (mean ± s.d., n = 3).

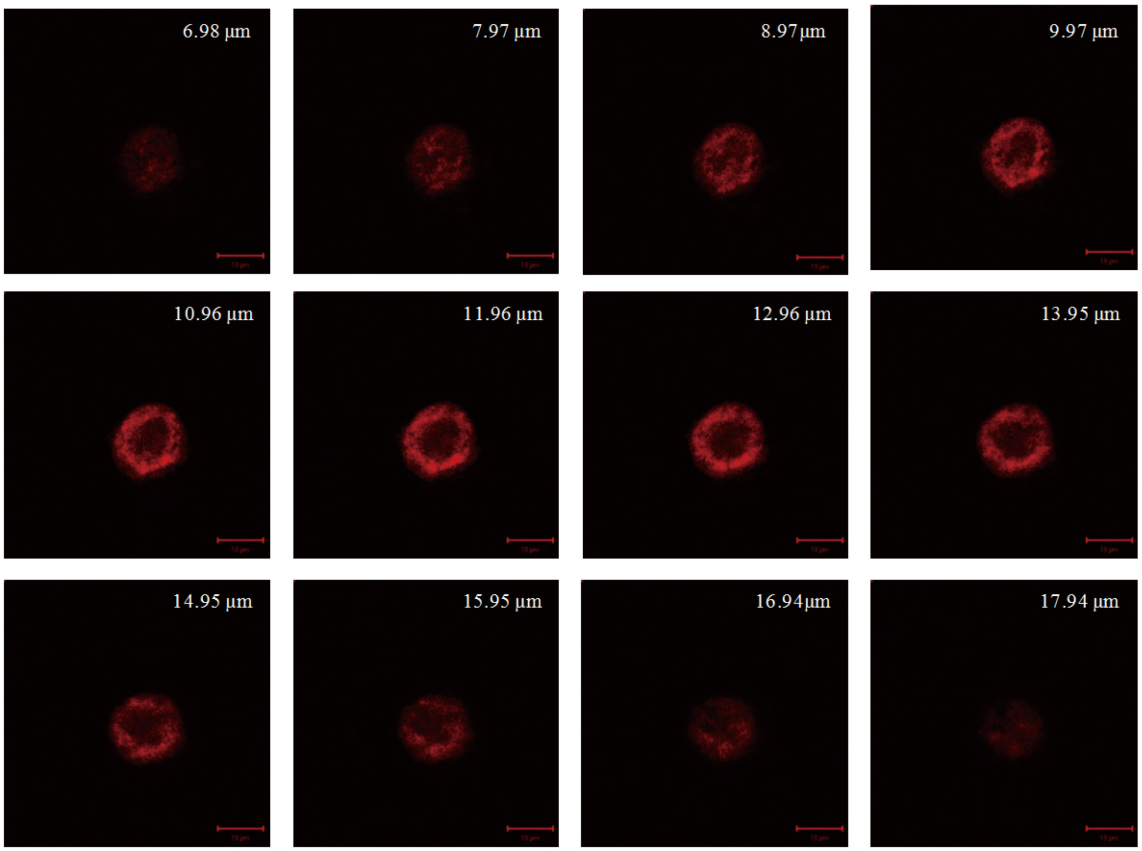



Fig. 8　Consecutive images of a Caco-2 cell captured with a confocal laser scanning microscope equipped with a helium-neon laser (543nm) (red bar: 10µm). Caco-2 cells were incubated with D-octaarginine-linked PNVA-co-AA bearing rhodamine red in PBS at 37℃ for 30 min, and were fixed with formaldehyde after the removal of free fluorescent polymer. The laser was used with a primary dichroic beam-splitter. Emissions above 560 nm were detected to observe the cellular distribution of D-octaarginine-linked PNVA-co-AA bearing rhodamine red. Optical sections were gathered at 1-µm intervals perpendicular to the z-axis. The dimensions of the image displayed on the monitor were set as 512 × 512 pixels.

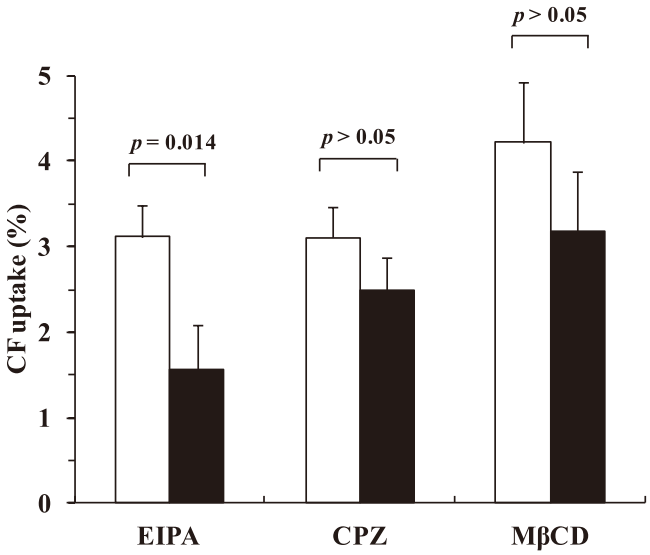



Fig. 9　Effect of inhibitors on the cellular uptake of CF in the presence of D-octaarginine-linked PNVA-co-AA. Caco-2 cells were incubated with CF（0.01 mM）and the polymer（0.2 mg/mL）in the absence（□）and presence（■）of each inhibitor（EIPA: 0.1 mM, CPZ: 0.1 mM, MβCD: 2 mM）in PBS at 37℃ for 30 min. After incubation, CF that had associated with cells was assayed by HPLC. Data are expressed as the percentage of the amount of CF taken up into the cells to that added to the medium（mean ± s.d., n = 3）.

分子鎖に固定化された多数のオリゴアルギニンに対するマクロピノサイトーシスが多点で同時に進行する。②マクロピノサイトーシス間の競合が起こるため、細胞は高分子を取り込むことができないものの、オリゴアルギニン鎖近くに存在する低膜透過性分子のみが偶発的に細胞内に取り込まれる。③細胞膜上に留まるオリゴアルギニン固定化高分子によりマクロピノサイトーシスが繰り返し誘導され、低膜透過性分子の細胞内取り込みが著しく促進される。」を提唱している。EIPAは、マクロピノソームを形成するための$Na^+/H^+$逆輸送を阻害することによりマクロピノサイトーシスを阻害する。Fig. 9に示すように、D-オクタアルギニン固定化高分子によるCFの細胞内取り込みは、EIPAにより有意に抑制された。このことから、マクロピノサイトーシスは、D-オクタアルギニン固定化高分子存在下の低膜透過性分子の膜透過促進に明らかに関与していると判断された。さらに、代表的なエンドサイトーシスであるクラスリン介在性エンドサイトーシス及び脂質ラフト介在性エンドサイトーシスがD-オクタアルギニン固定化高分子の膜透過促進機構に関与している可能性について、それぞれの阻害剤であるCPZ及びMβCDを用いて検討した。いずれも統計学的な有意差はなかったが、MβCD存在下におけるCFの細胞内取り込み量は約20％減少していた。二木らの研究グループは、脂質ラフト介在性エンドサイトーシスがオクタアルギニンの細胞内取り込みに寄与することを報告し、脂質ラフト介在性マクロピノサイトーシスの存在の可能性を提唱している[15]。前述の結果は、D-オクタアルギニン固定化高分子の膜透過促進機構にも脂質ラフト介在性エンドサイトーシスが関与していることを示しているのかもしれない。

## 4．総　括

カチオン性オリゴペプチド固定化高分子は、「それ自体は細胞内に取り込まれることなく、細胞が本来備えている貪食作用の1つのマクロピノサイトーシスを繰り返し誘導し、共存する低膜透過性分子のみの細胞膜透過を飛躍的に促進すること」を期待して設計された新規の膜透過促進剤である。同高分子の膜透過促進剤としての可能性を見出すことに成功した我々は、現在、D-オクタアルギニン固定化高分子をシーズとして、カチオン性オリゴペプチド固定化高分子の実用化を目指したトランスレーショナルリサーチを強力に推進している。単に混合して生体膜上に適用するだけで共存する低膜透過性分子を効率的に細胞内にデリバリーするだけでなく、優れた安全性及び薬物を限定しない優れた汎用性の観点からも、カチオン性オリゴペプチド固定化高分子を用いた細胞膜透過促進手法は、ライフサイエンス分野で広く受け入れられることが期待される。

**（引用文献）**

1）橋田充：DDSとは何か―医薬品の投与経路と生体内運命―，橋田充監修，高倉喜信編集：図解で学ぶDDS，じほう，2010年8月15日，pp.4-5.
2）橋田充：DDSとは何か―DDSの方法論―，橋田充監修，高倉喜信編集：図解で学ぶDDS，じほう，2010年8月15日，pp.6-10.

3）Tamai I, Tsuji A: Carrier-mediated approaches for oral drug delivery, Adv. Drug Deliv. Rev., 20, 5-32, 1996.
4）Sakuma S, Hayashi M, Akashi M: Design of nanoparticles composed of graft copolymers for oral peptide delivery, Adv. Drug Deliv. Rev., 47, 21-37, 2001.
5）山本昌：DDSの目的と技術―薬物の吸収とその制御―, 橋田充監修, 高倉喜信編集:図解で学ぶDDS, じほう, 2010年8月15日, pp.24-27.
6）Nakase I, Takeuchi T, Tanaka G, Futaki S: Methodological and cellular aspects that govern the internalization mechanisms of arginine-rich cell-penetrating peptides, Adv. Drug Deliv. Rev., 60, 598-607, 2008.
7）Jones AT: Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and a role in the uptake of cell penetrating peptides, J. Cell Mol. Med., 11, 670-684, 2007.
8）Futaki S: Membrane-permeable arginine-rich peptides and the translocation mechanisms, Adv. Drug Deliv. Rev., 57, 547-558, 2005.
9）Morishita M, Kamei N, Ehara J, Isowa K, Takayama K: A novel approach using functional peptides for efficient intestinal absorption of insulin, J. Control. Release, 118, 177-184, 2007.
10）Kogure K, Akita H, Yamada Y, Harashima H: Multifunctional envelope-type nano device (MEND) as a non-viral gene delivery system, Adv. Drug Deliv. Rev., 60, 559-571, 2008.
11）Sakuma S, Suita M, Masaoka Y et al.: Oligoarginine-linked polymers as a new class of penetration enhancers, J. Control. Release, 148, 187-196, 2010.
12）Sakuma S, Suita M, Yamamoto T et al.: Performance of cell-penetrating peptide-linked polymers physically mixed with poorly membrane-permeable molecules on cell membranes, Eur. J. Pharm. Biopharm., 81, 64-73, 2012.
13）Sakuma S, Suita M, Inoue S et al.: Cell-penetrating peptide-linked polymers as carriers for mucosal vaccine delivery, Mol. Pharmaceutics, 9, 2933-2941, 2012.
14）Zaro JL, Shen WC: Evidence that membrane transduction of oligoarginine does not require vesicle formation, Exp. Cell Res., 307, 164-173, 2005.
15）Noguchi H, Matsumoto S, Okitsu T et al.: PDX-1 Protein Is Internalized by Lipid Raft-Dependent Macropinocytosis, Cell Transplant., 14, 637-645, 2005.

# 脂質を標的とした新しい皮膚遅延型アレルギー応答の機序解明と制御

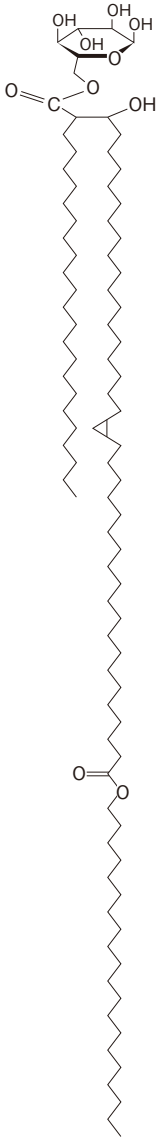
京都大学ウイルス研究所
杉田　昌彦

The delayed-type hypersensitivity (DTH), or type IV allergy, is critical for many aspects of skin diseases, including contact dermatitis. It has been established that DTH occurs in response to protein-based allergens, but our recent study suggested that lipid components were able to elicit DTH responses in sensitized guinea pigs. Therefore, it is important to determine how DTH to lipids may differ from DTH to proteins and whether it may also occur in primates. Here, we show that a mycobacteria-derived glycolipid, glucose monomycolate (GMM), elicits DTH responses in bacillus Calmette-Guerin (BCG)-vaccinated guinea pigs. The GMM-elicited hypersensitivity was comparable with the classical DTH to purified protein derivative (PPD) in that the skin reaction was associated with local infiltration by mononuclear cells with a peak response at about 2 days. Nevertheless, the GMM-elicited DTH was dependent on CD1 function and highly skewed to the TH1-type cytokine response. Furthermore, a similar response was observed also in BCG-vaccinated rhesus macaque monkeys. Thus, these observations detect a novel pathway of DTH directed against lipid allergens.

## 1．緒　言

MHC分子がタンパク質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。皮膚アレルギーをはじめ、感染免疫やがん免疫、自己免疫病など多くの免疫病態が、このパラダイムに基づいて考察され、診断法や治療法が開拓されてきた。しかしながら、たとえばギランバレー症候群では糖脂質に対する自己抗体が検出され、全身性エリテマトーデスでは核酸に対する自己抗体が産生される。すなわち、獲得免疫系が認識する抗原はタンパク質だけではないことを、これらの疾患は示唆している。実際、多様な脂質抗原をT細胞に提示する新しい抗原提示分子「グループ1CD 1分子（CD1a、CD1b、CD1c）」の存在が知られているが、実験動物として有用なマウスやラットがこの免疫システムを欠如することから、本領域の研究は立ち遅れている。皮膚においても表皮ランゲルハンス細胞は特異的にグループ1CD 1分子を発現するが、その意義はほとんど不明である[1)]。

このような背景から、研究代表者の杉田は、モルモットやアカゲザルを用いた脂質免疫の研究を進めてきた。モルモットは、ヒトと類似したグループ1CD1システムを有し、またヒトと同様の結核病態を示すことから、主としてBCG接種モルモットをモデルとした解析研究を行っている[2)]。後述のように、BCGワクチン投与モルモットに、結核菌細胞壁糖脂質であるグルコースモノミコール酸（GMM）（右図）を皮内接種すると、2日をピークとし、単核球の浸潤を主体としたアレルギー応答が観察されることを見いだした。このことは、ツベルクリン反応に代表されるタンパク質を標的にした遅延型アレルギー応答（delayed-type hypersensitivity; DTH）とは機序の異なるDTHが存在することを示唆する。



そこで本研究において、GMMを標的とした新しいタイプの皮膚DTHについて、モルモットおよびアカゲザルを用いて詳細に検討することにより、タンパク質を標的とした古典的DTHとの違いを明らかにすることを目的とする。

## 2．実　験

### 2.1　GMM の大量精製

*Mycobacterium avium*（serovar 4）あるいは*M. bovis* bacillus Calmette-Guerin（BCG）より脂質の生成を行った。菌を7H9培地（ミドルブルックADC、0.05% Tween-80、5%グルコース添加）にて37℃で震盪培養し、ログフェーズの段階（OD600が1～1.5）で菌を回収したのち、常法により総脂質をクロロホルム／メタノール（C/M）にて抽出した[3)]。得られた総脂質をC/M（2：1）1mlに溶解し、さらに30mlの氷冷アセトンを加え、氷中で20分静置した。遠心にて不溶画分を沈殿させ、ペレットを氷冷アセトンで



A novel pathway for the delayed-type hypersensitivity directed against lipids
Masahiko Sugita
Institute for Virus Research, Kyoto University

洗浄した後、1mlのC/Mに溶解した。これをC/M/アセトン/酢酸（90：10：10：1）を展開溶媒とした薄層クロマトグラフィー（TLC）にて展開し、GMMに相当するスポットを掻き出して脂質を抽出した。夾雑物がなくなるまでこの操作を2～3回繰り返した後、脂質を乾固し、メタノール洗浄を行った。最終精製物をマススペクトロメトリーで解析し、GMMに対応したマススペクトラムが得られることを確認した。

### 2.2　GMMリポソームの作製

クロロホルムに溶解した精製GMMとホスファチジルコリン、コレステロール、ステアリン酸付加オクタアルギニンを混和し、減圧乾固することにより脂質フィルムを形成させた。ここに滅菌水を加え、超音波処理を施すことによりリポソーム形成を促進した。

### 2.3　モルモット免疫および皮内テスト

生後3週のメスHartleyモルモットを、SPF環境で飼育して実験に供した。2%グルコース存在下で培養したBCG東京172株（$5\times10^7$ cfu）をモルモット皮下に接種し、6週後に剃毛を施した大腿部において皮内テストを行った。5μgのGMMを含んだリポソームおよび相当量の空リポソームを100μlのPBSに溶解して接種するとともに、PPD（0.5mg）の接種を行った。抗原のチャレンジ後、経時的に皮膚硬結の長径を測定した。

### 2.4　リンパ節細胞の遺伝子発現解析

BCG接種モルモットの所属リンパ節より細胞を単離し、in vitroでGMMリポソーム（1μg/ml）あるいはPPD（0.5μg/ml）の刺激を行った。一部の実験においては、抗モルモットpan-CD1抗体であるCD1F2/6B5を10μg/mlの濃度で加えた。18時間後に細胞を回収し、全RNAを抽出して、常法によりRT-PCRを行った。

### 2.5　アカゲザル免疫および皮内テスト

アカゲザル一頭あたり、$1\times10^8$ cfuのBCGを皮内接種した。またGMMリポソームの皮内接種には、50μgを用いた。すべての動物実験は当該機関の承認を得て行った。

### 2.6　リアルタイムPCR

リポソームを接種した皮膚を切り出し、破砕したのち、全RNAの抽出を行った。逆転写酵素反応により1本鎖DNAを合成し、それを鋳型としたリアルタイムPCRを行うことにより、各遺伝子のmRNA発現量を定量した。変性処理（95℃、60秒）ののち、変性（95℃、15秒）、伸長（60℃、35秒）の2ステップPCR（40サイクル）を行った（Applied Biosystems 7500）。用いた各プライマーの配列は下記の通りである。IFN-γ：GAC ATC TTG AGG AAT TGG AAA G（sense），TTT GGA TCC TCT GGT CAT CTT（antisense）；IL-4：AGC TGA TCC GAT TCC TGA AA（sense），GCT GGC TTC CTT CAC AGG AC（antisense）：IL-10：TGC CTT CAG CAG AGT GAA GA（sense），GCA ACC CAG GTA ACC CTT AAA（antisense）；eotaxin 1：GGG CTC ACT GGG CCA GAT TC（sense），TCT CCA GTC GCT GAA GGG GT（antisense）；granulysin：TCG ACT GCA AGA TCT GTC TGA G（sense），ACT TCA CCA TCC TAC ACA CAC G（antisense）；perforin：GAG TGC CGC TTC TAC AGT TAC CA（sense），CAG CCC GGA TGA AGT GGG TG（antisense）；GAPDH：GAA GCC CCA TCA CCA TCT TCC AGG（sense），GAG CCC CAG CCT TCT CCG TG（antisense）。

## 3．結　果

### 3.1　モルモットの解析

BCG投与を行ったモルモットにPPDを皮内接種すると、2日をピークとした典型的なDTH応答が観察されたこと、およびナイーブモルモットでは観察されなかったことから、BCGの感作は成立したと判断した。BCG非感作、感作を問わず、空リポソーム接種のよる皮膚変化を認めなかったことから、リポソーム自体により炎症惹起はないと判断した。一方、GMMリポソーム接種により、BCG非感作モルモットに対しては皮膚応答を認めなかったが、感作モルモットに対して1.5～2日をピークとした遅延型応答を認めた。組織学的には、単核球の浸潤を主体とするものであった。したがって、1）応答の成立には、事前の感作が必要、2）遅延型を示すこと、3）単核球の浸潤を顕著に認めること、以上の3点からGMMによって誘起される応答はDTHの基準を満たすものであり、DTHの標的抗原として糖脂質が存在することが初めて明らかになった。

一方、BCG接種の所属リンパ節細胞をGMMリポソームで刺激するとインターフェロンγ（IFN-γ）の顕著な遺伝子発現誘導を認めたが、このサイトカイン応答は抗CD1抗体の存在下で完全に阻害された。したがって、GMMによって誘起されるDTHはMHCを拘束因子とする古典的DTHと異なり、CD1分子によって制御されていることが明らかとなった。またTH1サイトカイン（IFN-γ、TNF-α）およびTH2サイトカイン（IL-5、IL-10）の発現を検討したところ、PPD刺激では両者が誘導されたのに対し、GMMリポソーム刺激ではTH1サイトカインのみが誘導され、TH2サイトカインは誘導されなかった。したがって、GMMによって誘起されるDTHは、極度にTH1型サイトカイン産生にシフトした応答であることが分かった。

### 3.2　アカゲザルの解析

2頭のアカゲザルにBCGの感作を行い、GMMリポソームならびに空リポソームの皮内接種を行ったところ、GMMリポソームにおいてのみ、皮膚の硬結を観察した。組織学的には単核球の顕著な浸潤を伴うものであった。

皮膚組織より全RNAを抽出し、それを鋳型としたリアルタイムPCRを行った結果、IFN-γの著明な発現亢進を認めた。一方、TH2サイトカインであるIL-4やIL-10の発現は非接種組織と比較してむしろ低下していた。また、細胞傷害性T細胞あるいはNK細胞因子であるperforinやgranulysinの発現上昇を認めた。

## 4．考　察

本研究から、糖脂質を標的としたCD1依存的な皮膚DTH応答が実証された。旧来、たとえばウルシオールやダニ由来アカリジアルのような脂質成分が皮膚DTHを誘起することが知られている[4]が、ハプテンとしてタンパク質を修飾することによりMHC依存的T細胞応答が誘起されると考えられる。この点、本研究で明らかとなったDTHとは異質である。

皮膚DTHを担うCD1陽性抗原提示細胞は同定できていない。GMMの提示は主としてCD1b分子が担うと考えられているが、アカゲザルにおいてはCD1c分子の関与が認められている[5]。表皮ランゲルハンス細胞はCD1aを高度に発現し、CD1cを中等度に発現するが、CD1bの発現をほとんど欠如している。一方、真皮には少数ながらCD1b陽性樹状細胞が存在する[1]。また、一部のマクロファージは本来CD1分子を発現しないが、炎症刺激によりCD1分子の発現を獲得することから、活性化マクロファージの関与も考えられる。

遺伝子操作が容易で免疫解析の手法も確立しているマウスにおいては、グループ1CD 1遺伝子が欠落しており、本研究で見られた皮膚DTHは存在しない。しかし、研究代表者は最近、ヒト*CD1A*ゲノム遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを樹立し、表皮ランゲルハンス細胞での特異的なCD1a発現を確認している[6]。同様の手法でヒトCD1bトランスジェニックマウスやサルCD1cトランスジェニックマウスが得られれば、GMMに対する皮膚DTHがマウスにおいて再構築できる可能性が高い。

## 5．総　括

本研究により、霊長類における脂質特異的DTHの存在が明らかとなった。治療に難渋し再発を繰り返す接触皮膚炎において、CD1分子を介した皮膚DTHが関与しているとすれば、抗CD1抗体の局所投与などが治療効果を発揮するかもしれない。新たなDTH応答の発見は、これまで未知であった皮膚病態の解明に結実し、皮膚医学の発展に貢献するものと考えられる。

**(引用文献)**


1）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.

2）Otsuka A, Matsunaga I, Komori T, et al.: Trehalose dimycolate elicits eosinopilic skin hypersensitivity in mycobacteria-infected guinea pigs. J. Immunol. 181, 8528-8533, 2008.

3）Matsunaga I, Naka T, Talekar RS, et al.: Mycolyltransferase-mediated glycolipid exchange in Mycobacteria. J. Biol. Chem. 283, 28835-28841, 2008.

4）Sasai T, Hirano Y, Maeda S, et al.: Induction of allergic contact dermatitis by astigmatid mite-derived monoterpene, alpha-acaridial. Biochem. Biophys. Res. Commun. 375, 336-340, 2008.

5）Morita D, Hattori Y, Nakamura T, et al.: Major T cell response to a mycolyl glycolipid is mediated by CD1c molecules in rhesus macaques. Infect. Immun. 81, 311-316, 2013.

6）Kobayashi C, Shiina T, Tokioka A, et al.: GM-CSF-independent CD1a expression in epidermal Langerhans cells: evidence from human CD1A genome-transgenic mice. J. Invest. DErmatol. 132, 241-244, 2012.

# カイコを用いた化学物質の毒性評価方法の確立

東京大学大学院薬学系研究科　微生物薬品化学教室

関水　和久

Silkworm is less ethical and low cost animal model compared to mammals. We found metabolic pathway in silkworm is equivalent in mammals and $LD_{50}$ values of several compounds in silkworm is also similar that in mammals. It is suggesting silkworm would be good alternative model for toxicity evaluation of chemicals. In this study, we analyzed cytochrome P450 function, which is important factor on drug metabolisms, and established human metabolism mimic model by transgenic technique. Furthermore, massive toxicity evaluation was performed in silkworm model.

## 1．緒　言

動物愛護の視点から、動物実験を規制する動きが国際的に強まっており、3Rと呼ばれる動物実験の規制についての国際基準化がなされるようになった[1)]。化粧品へ添加する化合物の開発について、哺乳動物を犠牲にする実験についての法律による規制が欧米各国で進んでいる。従来の代替モデルとしては、細胞を利用した毒性試験が行われているが、このモデルでは代謝経路を有さないため、実際の個体における毒性を評価することができない。従って、個体でも倫理的な問題がない非脊椎動物を利用した毒性評価方法が必要と考えられる。そこで我々は、倫理的な問題がない昆虫であるカイコに着目した。カイコは、養蚕業から購入でき、飼育も容易で、ほどよい大きさがあるため注射も簡便である[1, 2)]。この特長を活かして、我々は、カイコを感染症のモデル動物として利用し、細菌の病原性の評価や、抗生物質の評価系として利用している[3, 4)]。このカイコ細菌感染モデルにおいて、臨床で使用されている抗生物質は、体重あたりに換算したとき、哺乳動物と同様な用量で治療効果を示した。さらに、我々はこの治療効果を指標とした探索を行い、新規抗生物質カイコシンの発見に成功している。また、カイコの薬物動態についても解析を行い、モデル化合物であるエトキシクマリンはヒトと同様なシトクロームP450による第一相反応による代謝に続く、第二相の抱合反応を受け排泄されることを見いだしている[5)]。さらに、カイコでの典型的な細胞毒性を示すいくつかの化合物の個体の半数を殺傷するのに必要な用量（$LD_{50}$値）が、哺乳動物と一致することを見いだしている[5)]。そこで、我々はカイコを化合物の毒性評価系として利用できるのはないかと考え、本研究において、カイコにおける薬物の体内動態、及びシトクロームP450反応の詳細な解析、及びさらに多数の化合物の毒性評価を実施した。



Establishment of the toxic evaluation method of the chemical substance using the silkworm model

Kazuhisa Sekimizu

Laboratory of Microbiology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo.

## 2．実　験

### 2.1　薬物の体内動態の解析

Hu・Yo×Tukuba・Ne系統のカイコの卵を愛媛蚕種から購入し、5齢幼虫まで抗生物質含有人工飼料（片倉工業）を与えて飼育した。薬液をその5齢幼虫（1.8–2.0g）に注射し、一定時間後に腹肢を切断し体液を採取した。50%アセトンにて薬剤の抽出を行い、HPLC（PEGASIL ODS SP100（4.5φ250mm），流量1mL/min）にて解析した。HPLCのクロマトグラムのピーク面積から検量線を作成し、サンプル中の化合物を定量した。移動相はバンコマイシン（アセトニトリル：20mMリン酸二水素ナトリウム＝92：8)、テトラサイクリン（メタノール：5mMEDTA＝30：70)、クロラムフェニコール（メタノール：20mMリン酸カリウム緩衝液＝45：55)、フルコナゾール（アセトニトリル：25mM酢酸緩衝液＝1：4)、リファンピシン（40%アセトニトリル0.05%ギ酸)、ミカファンギン（40%アセトニトリル0.1%トリフルオロ酢酸)、ケトコナゾール（30%アセトニトリル0.05%ギ酸)、クロトリマゾール（40%アセトニトリルリン酸溶液pH3）のアイソクラティックで行った。

### 2.2　シトクロームP450反応の解析

#### 代謝の場の検討

5齢4日目以降のカイコを緩衝液（10mM HEPES 0.9% NaCl pH7.9）中で解剖し、各組織を摘出した。摘出組織は、10%牛血清を含有するTC-100昆虫細胞培養用培地を2ml中で培養し、7-ethoxycoumarinを終濃度6μMとなるように加え、27℃で震盪培養した。経時的に培地及び臓器を回収し、ホモジナイズ後、50%アセトン抽出し蒸発乾固した。この試料を50mM酢酸ナトリウム緩衝液pH=6.0

に再溶解し、抱合反応により負荷されたグルコースをβ-gulcosidase処理により除去後、緩衝液（1.6M glycine/NaOH pH10.5）と1：15で混合し、7-エトキシクマリンからシトクロームP450反応によって生じたヒドロキシクマリン量を蛍光測定（Ex=380nm/Em=460nm）によって定量した。

シトクロームP450反応の検討

カイコ腸管を用いて上記と同じ手法によって器官培養した。基質を培地に加え培養後、腸管及び培地をホモジナイズし50%アセトン抽出し、蒸発乾固した。蒸発乾固した試料を50%メタノールに再溶解し、HPLC分析試料とした。Luciferin誘導体については、培地サンプルをDetection reagentと混合してルミノメーターにより定量した。

シトクロームP450の発現解析

5齢のカイコをHEPES/NaCl緩衝液中で解剖し、腸管・脂肪体・マルピーギ管を摘出し、mRNAを抽出した。得られたmRNAから逆転写酵素によってcDNAを調製し、それを鋳型にしてシトクロームP450用プライマーとカイコアクチンBmA3用プライマー[6]でPCRによって増幅した。PCR産物を1.5%アガロースゲルに供して100Vで1時間通電した。4mg/ml エチジウムブロマイドによって染色し、UV照射下でバンドの有無を確認した。カイコゲノム情報データベースKAIKObase（http://sgp.dna.affrc.go.jp/KAIKObase/）[7]においてシトクロームP450と分類されている遺伝子を81種類選抜した。これらの遺伝子を対象遺伝子とした。

### 2.3　ヒト型シトクロームP450発現カイコの樹立

農業生物資源研究所の瀬筒らのグループとの共同研究により、カイコw1-PND系統を用いて、ヒト型シトクロームP450 1A2遺伝子発現系統を樹立した。シトクロームP450 1A2遺伝子はUASプロモーターの下流に接続されており、GAL4遺伝子発現系等と交配することによって、その遺伝子発現が起こるように設計されている[8]。

### 2.4　ヒト型シトクロームP450発現カイコの解析

ヒト型シトクロームP450 1A2の発現は、それぞれの系統のカイコの脂肪体を摘出し、タンパク質を調製した後、抗ヒトシトクロームP450 1A2抗体（abcam）によりウェスタンブロッティング法により解析した。検出はWestern Lightning ECL Plus（PerkinElmer）を用いた。カフェインの血中濃度は、5齢の2gのシトクロームP450 1A2トランスジェニックカイコに1mMのカフェイン溶液を50μl注射し、経時的に血液を採取し、50%アセトン抽出した物をHPLCにて解析した。固相をPEGASIL ODS SP100カラム（センシュー科学）を用い、移動相は0.05%ギ酸を含む10%アセトニトリルで分析を行った。また、カフェインの毒性試験は、5齢1日のトランスジェニックカイコを体重測定後、50mMのカフェイン溶液を50μl注射し餌を与えて飼育し、経時的に体重測定を行った。

### 2.5　カイコを用いた毒性試験

5齢1日目、もしくは2日目のカイコに、それぞれの化合物を腸管内、もしくは体液内に注射した。注射2日後のカイコの生存数を測定し、その生存曲線から50%のカイコの殺傷に必要な化合物の体重あたりの投与量（$LD_{50}$値）を求めた。

## 3．結　果

### 3.1　カイコにおける薬物の体内動態の解析

すでに我々は、抗生物質のカイコ感染モデルにおける治療に必要な用量（$ED_{50}$値）が哺乳類感染モデルでの値と一致することを報告している[3]。この結果は、薬物のカイコにおける体内動態が哺乳類と共通していることを示唆している。この点をさらに検証するために、本研究で我々は、薬物のカイコにおける血中濃度推移を、哺乳類での既存の報告と比較した。その結果、カイコ血液中における抗生物質の濃度推移は哺乳類の血液内におけるそれと同様にα層及びβ層の二相性を示すことが判った（図1）。さらに、種々の体内動態パラメーターを算出したところ（表1）、薬物が血液以外のコンパートメントに分布する割合の指標となるVdss値はカイコと哺乳類で、0.4～9倍の範囲内であった。また、抗生物質の体内からの消失速度を示すCltot値は、カイコと哺乳類の間で0.1～16倍の範囲であり、テトラサイクリンが最も低く、リファンピシンが最も高い値を示した。それら以外の薬物についてはカイコと哺乳類で一致が見られた。従って、カイコにおける化合物の薬物動態は、哺乳動物の場合とよく一致していると考えられる。

### 3.2　カイコにおけるシトクロームP450の解析

カイコにおけるシトクロームP450反応の場がどこであるかを明らかにするため、カイコ摘出組織を用いて器官培養での7-エトキシクマリンの代謝を検討した。7-エトキシクマリンはヒトにおいてシトクロームP450によって脱エチル化されることが知られている化合物であり、すでにカイコ体内において代謝されることを見いだしている[5]。実験の結果、脂肪体、マルピーギ管、絹糸腺においてはほとんど代謝物が検出されず、腸管において最も強い活性が見出された（図2）。さらに、カイコ腸管培養系における7-ethoxycoumarinの脱エチル化反応はシトクロームP450の阻害剤であるシメチジン[9]の添加によって用量依存的に抑制を受けた。この結果から、腸管がシトクロームP450

の反応の場になっていると考えられる。次に、カイコの腸管においてシトクロームP450遺伝子が発現しているかをRT-PCRによって解析した結果、ゲノム上に存在するシトクロームP450と推定される81種類の候補遺伝子のうち、28種類の遺伝子の発現が確認された（表２）。これらの腸管で発現が確認された遺伝子について、脂肪体及びマルピーギ管における発現を同様に検討し、腸管特異的に発現しているシトクロームP450が５つ見いだされた。従って、カイコ腸管において、シトクロームP450遺伝子が発現し、その薬物代謝活性を担っていると考えられる。

そこで、実際にヒトシトクロームP450の基質をカイコ腸管培養系に加え、それらが代謝されるか否か検討した。

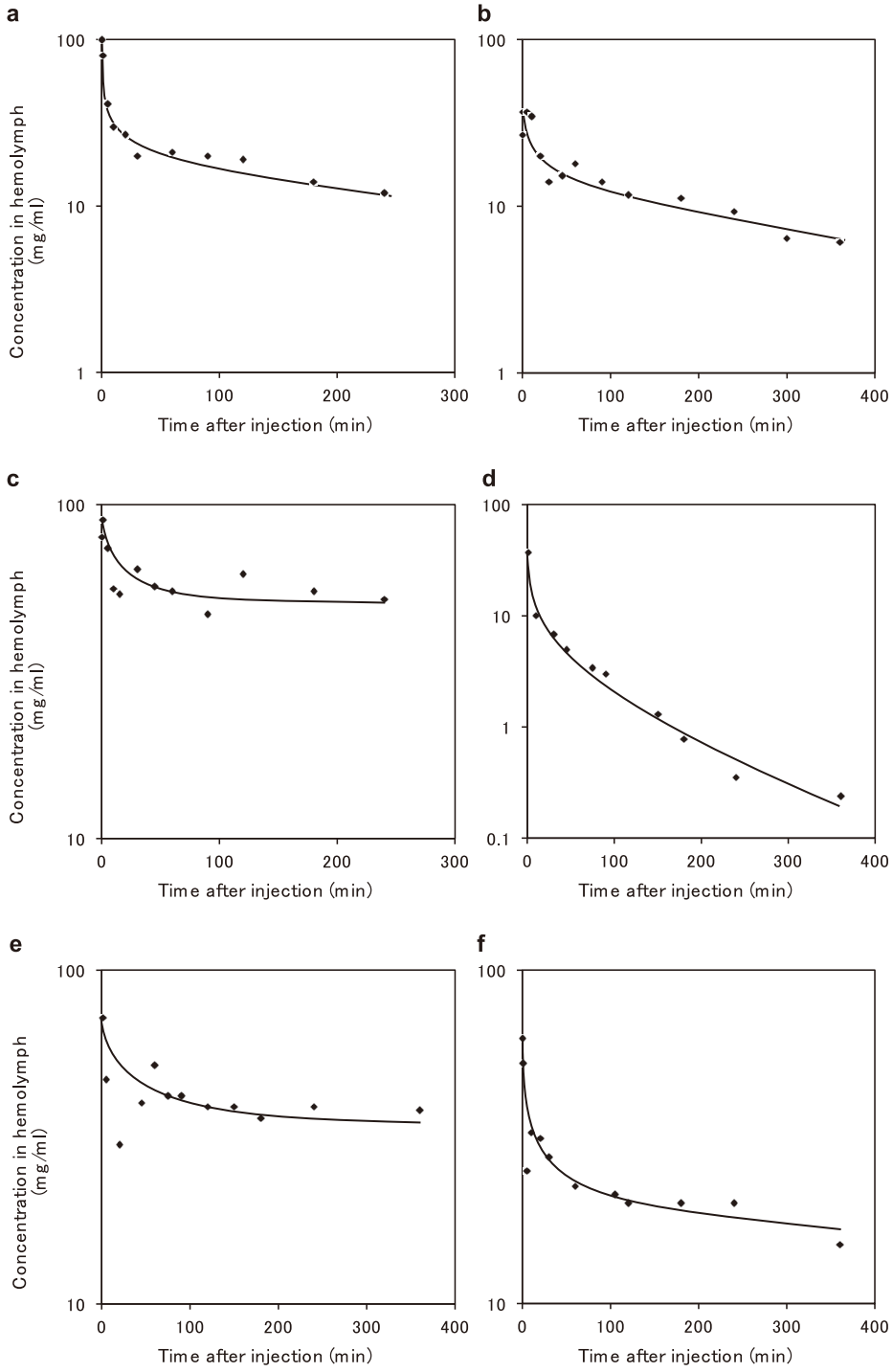



図１　カイコにおける化合物の体内動態

カイコ５齢幼虫に各抗生物質量を血中内投与した後に、経時的に血液を採取し抗生物質濃度をHPLCによって定量した。a.chloramphenicol, b.tetracycline, c.vancomycin, d. rifampicin, e.micafungin, f. flucomazole.

表１　カイコと哺乳類における抗生物質の体内動態パラメーターの比較

各抗生物質のカイコ血液内における濃度推移のデータ（図１）から、全身クリアランス (CLtot), 定常状態における分布容積（Vdss），消失過程における分布容積（$t_{1/2}$）を算出し、哺乳類における値と比較した。chloramphenicol，vancomycin はヒト[10, 11]、tetracycline はウサギ[12]、rifampicin はヒツジ[13]、micafangin はラット[14]、fluconazole はイヌ[15] のデータを引用した。

| Antibiotics | Silkworm | | | | Mammal | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Dose (mg/g) | Cltot (ml/g•h) | Vdss (ml/g) | $t_{1/2}$ (h) | Dose (mg/g) | Cltot (ml/g•h) | Vdss (ml/g) | $t_{1/2}$ (h) |
| chloramphenicol | 50 | 0.15 | 1.3 | 6.0 | 10 | 0.24 | 0.9 | 2.3 |
| tetracycline | 10 | 0.07 | 0.6 | 5.5 | 10 | 0.35 | 1.0 | 2.0 |
| vancomycin | 25 | 0.03 | 0.4 | 13.0 | 8 | 0.08 | 0.6 | 2.6 |
| rifampicin | 25 | 2.11 | 3.1 | 1.0 | 10 | 0.31 | 1.3 | 2.9 |
| micafangin | 25 | 0.03 | 0.5 | 12.0 | 1 | 0.07 | 0.4 | 5.0 |
| fluconazole | 25 | 0.02 | 0.4 | 12.0 | 10 | 0.04 | 0.7 | 13.0 |

表２　カイコ腸管において発現が確認された遺伝子

カイコ腸管から mRNA を調製し、カイコゲノム情報中のシトクローム P450 候補遺伝子について RT-PCR によって発現を確認した。相同性は BLAST 検索を用いて行った。

| gene name | similar gene |
|---|---|
| BGIBMGA001162 | *Bombyx mori* cytochrome P450 CYP4G25 (Cyp4g25) |
| BGIBMGA001276 | *Zygaena filipendulae* cytochrome P450 CYP333B8 mRNA |
| BGIBMGA001419 | *Bombyx mandarina* cytochrome P450 Cyp6b29 mRNA |
| BGIBMGA001573 | *Bombyx mori* cytochrome P450 Cyp6AU1 (Cyp6au1) |
| BGIBMGA002085 | *Acyrthosiphon pisum* similar to cytochrome P450 |
| BGIBMGA003683 | *Bombyx mori* cytochrome P450 monooxygenase Cyp4M5 (Cyp4m5) |
| BGIBMGA003943 | *Bombyx mori* strain Dazao cytochrome P450 CYP9A19 mRNA |
| BGIBMGA003944 | *Bombyx mori* cytochrome P450 (Cyp9a19) |
| BGIBMGA003945 | *Bombyx mori* cytochrome P450 9a20 (Cyp9a20) |
| BGIBMGA003957 | *Bombyx mori* cytochrome P450 (CYP9A22) mRNA |
| BGIBMGA004721 | *Papilio xuthus* CYP341A2 gene for cytochrome P450 |
| BGIBMGA005356 | *Zygaena filipendulae* cytochrome P450 CYP333B8 mRNA |
| BGIBMGA005496 | *Bombyx mori* cytochrome P450 (Cyp315a1) |
| BGIBMGA006785 | *Bombyx mori* strain Dazao cytochrome P450 mRNA |
| BGIBMGA006915 | *Drosophila melanogaster* phm gene for cytochrome P450 Cyp306a1 |
| BGIBMGA006916 | *Bombyx mori* cytochrome P450 18a1 (Cyp18a1) |
| BGIBMGA006936 | *Bombyx mori* cytochrome P450 monooxygenase (Cyp306a1) |
| BGIBMGA007195 | *Spodoptera litura* cytochrome P450 (CYP4S9v1) |
| BGIBMGA009522 | *Drosophila melanogaster* Cyp301a1 (Cyp301a1) |
| BGIBMGA011708 | *Bombyx mori* cytochrome P450 (P450)  similar to CYP305a1 of Drosophila melanogaster |
| BGIBMGA012089 | *Bombyx mori* cytochrome P450 (Cyp6ab5) |
| BGIBMGA012385 | *Bombyx mori* cyp6AB4 mRNA for cytochrome 6AB4 |
| BGIBMGA012386 | *Bombyx mandarina* CYP6AB4 mRNA |
| BGIBMGA013236 | *Bombyx mori* cytochrome P450 Cyp6ae21 |
| BGIBMGA013237 | *Bombyx mori* cytochrome P450 6ae2 (Cyp6ae2) |
| BGIBMGA013238 | *Bombyx mori* cytochrome P450 CYP6AE7 (Cyp6ae7) |
| BGIBMGA013240 | *Bombyx mori* cytochrome P450 CYP6AE7 (Cyp6ae7) |
| BGIBMGA013241 | *Bombyx mori* cytochrome P450 CYP6AE7 (Cyp6ae7) |

その結果、検討した14種の化合物のうち、大部分の13種が代謝されることが分かった（表３）。ヒトシトクロームP450 1A2で代謝されるカフェインについては、カイコ腸管培養系で代謝が認められなかった。

### ３．２　ヒト型シトクロームP450発現カイコの樹立と解析

樹立したUAS-hCYP450 1A2遺伝子を染色体上に有するカイコと、エンハンサートランプ系統であるBmA3-gal4遺伝子を染色体上に有するカイコを交配し、スクリーニングを行ったところUAS-hCYP450 1A2 / BmA3-gal4、UAS-hCYP450 1A2、BmA3-gal4を有する個体、および両方持たない個体がおよそ1:1:1:1の割合で発生した。この結果はそれぞれの遺伝子が染色体上に単独で導入されていることを示唆している。さらにそれぞれの個体について組織脂肪体のミクロソーム画分を調製し、ウエスタンブロットに供したところ、UAS-hCYP450 1A2/BmA3-gal4特異的にシトクロームP450 1A2タンパク質の発現が確認された（図4A）。以上の結果からシトクロームP450 1A2トランスジェニックカイコが作出されたと判断した。次に、カイコにおけるカフェインの血中濃度推移を測定した。その結果、12時間後の血液内濃度は野生型に比べシトクロームP450 1A2トランスジェニックカイコにおいて有意に低い濃度であった（図４B）。また、半減期は野生型で50時間以上だったのに対しシトクロームP450 1A2トランスジェニックカイコにおいては16時間であった。従って、カイコにおいてヒト型シトクロームP450が発現し、

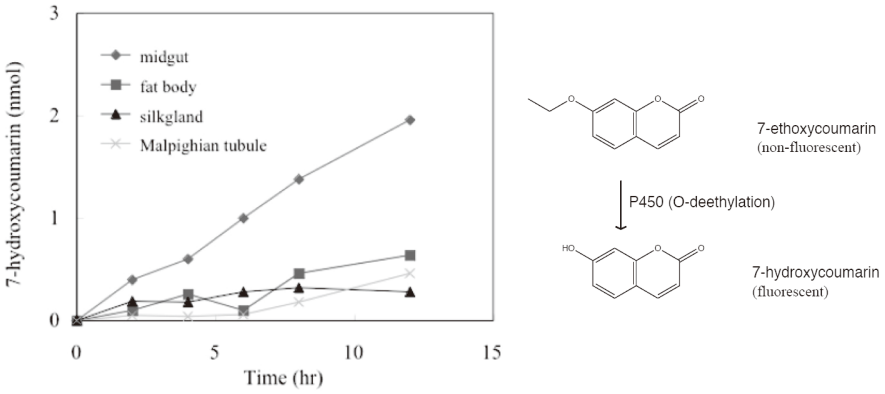



図２　カイコ組織培養系における 7- エトキシクマリンの脱エチル化反応
カイコから各組織を摘出し、in vitro の器官培養系を構築した。7- エトキシクマリンを基質として反応を行い、代謝物である 7- エトキシクマリンの量を蛍光光度計によって定量した。

表３　カイコ腸管培養系におけるヒトシトクローム P450 基質の代謝反応の有無
カイコ腸管培養系にそれぞれの基質を加え、20 分後の薬剤量の減少、もしくは Luciferin の生成による発光量の増大により、代謝の有無を検討した。

| 薬物 | 代謝に関わる P450 種（ヒト） | カイコでの代謝 |
|---|---|---|
| フェナセチン | 1A2 | あり |
| ジクロフェナク | 2C9 | あり |
| オメプラゾール | 2C19 | あり |
| アミノピリン | 2C | あり |
| デキストロメトルファン | 2D6 | あり |
| 7-エトキシクマリン | 2E1 | あり |
| テストステロン | 3A4 | あり |
| リファンピシン | 3A4 | あり |
| Luciferin-CEE | 1A1 | あり |
| Luciferin-ME | 2C8 | あり |
| Luciferin-IPA | 3A4 | あり |
| Luciferin-PFBE | 3A4 | あり |
| Luciferin-BE | 3A7 | あり |
| カフェイン | 1A2 | なし |

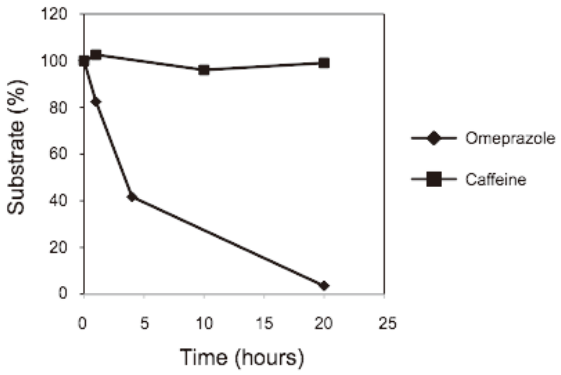



図３　カイコ腸管培養系においてカフェインの代謝
カイコ腸管培養系にカフェイン及びオメプラゾールを加えて培養し、経時的に基質量を HPLC によって定量した。オメプラゾールはカイコ腸管培養系において代謝を受けるポジティブコントロールとして用いた。

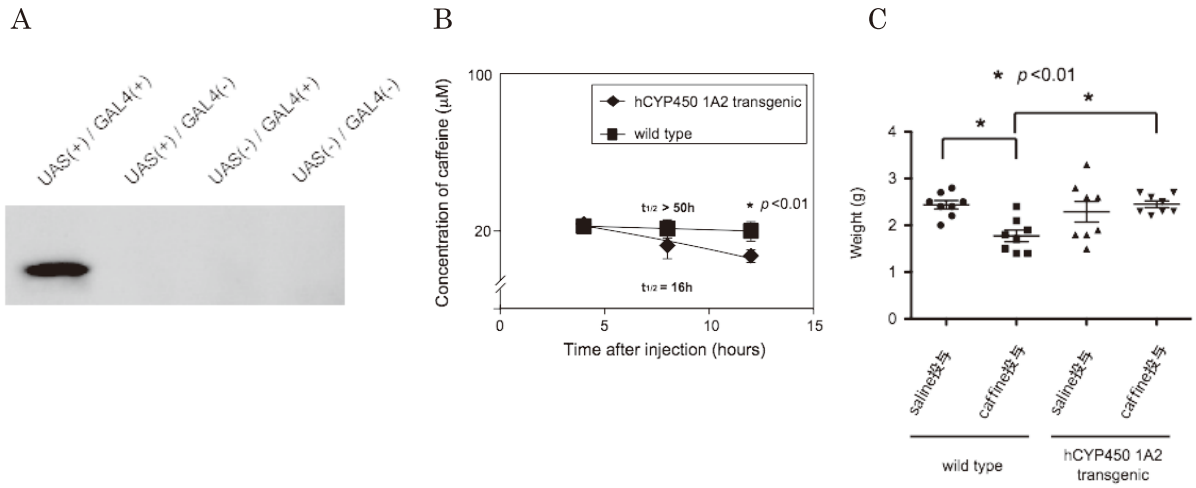



図４　ヒト型シトクローム P450 1A2 トランスジェニックカイコのカフェイン代謝能の獲得
A）カイコ脂肪体における導入したヒト型シトクローム P450 1A2 の発現
B）トランスジェニックカイコにおけるカフェインの血中濃度推移
C）トランスジェニックカイコにおけるカフェインの過剰投与による毒性の軽減

表４　カイコにおける毒性試験

腸管内投与（*i.m.*：intra midgut）は哺乳動物における経口投与（*p.o.*）と対応しており、体液内投与（*i.h.*：intra hemolymph）は哺乳動物における血液内投与（*i.v.*）、腹腔内投与（*i.p.*）、及び皮下投与（*s.c.*）に対応している。

| 毒物 | LD50 (mg/kg・animal) | | | | | 比 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | カイコ | 投与経路 | 哺乳動物 | 投与経路 | 動物 | （カイコ/動物） |
| ピペラジン | 620 | *i.h.* | 1300 | *i.v.* | rat | 0.5 |
| 四塩化炭素 | 2000 | *i.h.* | 5800 | *i.v.* | rabbit | 0.3 |
| クレゾール | 710 | *i.m.* | 2000 | *p.o.* | rat | 0.4 |
| 硫酸鉄 | 410 | *i.m.* | 1500 | *p.o.* | rat | 0.3 |
| 硫酸銅 | 430 | *i.m.* | 960 | *p.o.* | rat | 0.4 |
| ベンゼン | 2600 | *i.h.* | 340 | *i.p.* | mouse | 8 |
| ホルムアルデヒド | 280 | *i.h.* | 87 | *i.p.* | rat | 3 |
| アセトン | 5200 | *i.h.* | 1300 | *i.p.* | mouse | 4 |
| 水酸化ナトリウム | 270 | *i.h.* | 40 | *i.p.* | mouse | 7 |
| トリクロル酢酸 | 1100 | *i.h.* | 270 | *s.c.* | mouse | 4 |
| 1,4-ビス(sec-ブチルアミノ)ベンゼン | 350 | *i.h.* | 50 | *i.p.* | mouse | 7 |
| スチレン | 2100 | *i.h.* | 90 | *i.v.* | mouse | 23 |
| フタル酸-n-ブチル | 5900 | *i.h.* | 720 | *i.v.* | mouse | 8.2 |
| ブロモホルム | 2000 | *i.h.* | 400 | *i.p.* | rat | 5 |
| ロテノン | 6 | *i.h.* | 2.5 | *i.p.* | mouse | 2.5 |
| 4-クロロアニリン | 830 | *i.h.* | 420 | *i.p.* | rat | 2 |
| DMSO | 27000 | *i.h.* | 12000 | *i.p.* | rat | 2.2 |
| DMF | 15000 | *i.m.* | 2800 | *p.o.* | rat | 5.4 |
| フェノール | 630 | *i.h.* | 310 | *i.p.* | mouse | 2 |
| 塩化ナトリウム | 8900 | *i.h.* | 4000 | *i.p.* | mouse | 2.2 |
| アジ化ナトリウム | 273 | *i.m.* | 45 | *i.p.* | rat | 6.1 |
| 青酸カリウム | 97 | *i.h.* | 8.7 | *s.c.* | mouse | 11 |
| エタノール | 8800 | *i.m.* | 10000 | *p.o.* | mouse | 0.9 |
| メタノール | 2100 | *i.h.* | 2100 | *i.v.* | rat | 1 |
| アクリルニトリル | 60 | *i.h.* | 69 | *i.p.* | rabbit | 0.9 |
| エチレングリコール | 32000 | *i.m.* | 7200 | *p.o.* | rat | 4.4 |
| クエン酸 | 8500 | *i.m.* | 6500 | *p.o.* | rat | 1.3 |
| 乳酸 | 5000 | *i.m.* | 3600 | *p.o.* | rat | 1.4 |
| グリセリン | >50000 | *i.m.* | 20000 | *p.o.* | rat | >2.5 |

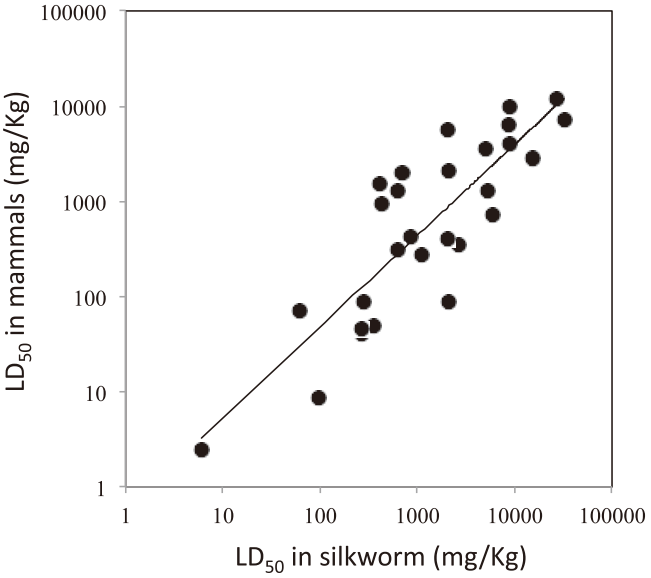



図５　化合物の $LD_{50}$ 値のカイコモデルと哺乳動物モデルにおける相関
毒性が低く、カイコにおける $LD_{50}$ 値を算出できなかったグリセリンを除いた化合物についてプロットした。

機能していると考えられる。さらに、カフェインの毒性が軽減されるか否かについて検討した。野生型のカイコに高濃度のカフェインを投与し飼育するカイコの体重増加が抑制される（図４C）。しかしながら、ヒト型シトクロームP450 1A2発現カイコの場合は、その体重増加の抑制がほとんど起こらず、カフェインの毒性が軽減されていることが分かった（図４C）。以上の結果は、ヒト型シトクロームP450 1A2トランスジェニックカイコにおいて、シトクロームP450 1A2タンパク質が機能し、その代謝活性を評価可能であることを示している。

### ３．３　カイコを用いた毒性試験

様々な化合物について、カイコに投与し、その $LD_{50}$ 値を求めた。その結果、スチレンと青酸カリウムを除き、ラットにおける結果と比較し10倍以内であった（表４）。スチレンは中枢神経に対する作用があることが知られており、神経系の受容体が哺乳動物と異なるカイコでは毒性が低い可能性が考えられる。カイコと哺乳動物でのそれぞれの化合物 $LD_{50}$ 値をプロットし相関係数を求めたところ、$R^2$=0.72であり良好な相関を示すと考えられる（図５）。

## ４．考　察

本研究より、カイコにおける薬物の分布容積や排泄速度は、ほぼ哺乳動物における値と一致していた。また、ヒトにおいてシトクロームP450によって代謝される大部分の化合物は、カイコにおいても同様に代謝されることが明らかになった。そのシトクロームP450による外来化合物の代謝の場は、カイコにおいては腸管であると考えられた。これは、開放血管系であるカイコにおいて、腸管から透過した化合物は、直ちに臓器が接触している体液に移行するため、外界との唯一のバリアになっている腸管で化合物が代謝されることは理に適っていると考えられる。さらに、カイコではできなかったカフェインの代謝が、ヒト型シトクロームP450遺伝子の導入によって可能となった。このように、ヒト型のシトクロームP450遺伝子を導入したトランスジェニックカイコを利用することによって、ヒトを模擬した薬物動態の評価が可能になると考えられる。

さらに、本研究においてカイコを毒性評価の実験動物代替モデルとして利用可能であるか検討した。その結果、すでに浜本らの論文[5]において述べたように、神経毒性が主たる毒性の作用を示す化合物を除けば、$LD_{50}$ 値はカイコと哺乳動物モデルとで一致することが改めて示された。また、相関係数も良好であった。以上の結果から、カイコは薬物動態を反映した毒性試験の実験動物代替モデルとして利用できると期待される。カイコを用いた化合物の毒性試験方法は、3RのうちのReplacementに適合するものである。近年の動物愛護の高まりから、その重要性は、我が国を含めたアジア諸国においても、今後益々強まると予想される。

**（引用文献）**

1）Sekimizu, N., Paudel, A. & Hamamoto, H. Animal welfare and use of silkworm as a model animal. *Drug Discov Ther* **6**, 226-229 (2012).
2）Hamamoto, H. & Sekimizu, K. Evaluation of the therapeutic effects of antibiotics using silkworm as an animal model. *Res Adv in Antimicrob Agents Chemother* **5**, 1-23 (2005).
3）Hamamoto, H. *et al.* Quantitative evaluation of the therapeutic effects of antibiotics using silkworms infected with human pathogenic microorganisms. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 774-779 (2004).
4）Kaito, C. *et al.* Silkworm pathogenic bacteria infection model for identification of novel virulence genes. *Molecular microbiology* **56**, 934-944 (2005).
5）Hamamoto, H., Tonoike, A., Narushima, K., Horie, R. & Sekimizu, K. Silkworm as a model animal to evaluate drug candidate toxicity and metabolism. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **149**, 334-339 (2009).
6）Kawaoka, S. *et al.* Functional analysis of four Gloverin-like genes in the silkworm, Bombyx mori. *Arch Insect Biochem Physiol* **67**, 87-96 (2008).
7）Shimomura, M. *et al.* KAIKObase: an integrated

silkworm genome database and data mining tool. *BMC genomics* **10**, 486 (2009).

8）Imamura, M. *et al*. Targeted gene expression using the GAL4/UAS system in the silkworm Bombyx mori. *Genetics* **165**, 1329-1340 (2003).

9）Ruffalo, R.L., Thompson, J.F. & Segal, J.L. Diazepam-cimetidine drug interaction: a clinically significant effect. *Southern medical journal* **74**, 1075-1078 (1981).

10）Koup, J.R., Lau, A.H., Brodsky, B. & Slaughter, R.L. Chloramphenicol pharmacokinetics in hospitalized patients. *Antimicrob Agents Chemother* **15**, 651-657 (1979).

11）Brown, N. *et al*. Effects of hepatic function on vancomycin clinical pharmacology. *Antimicrob Agents Chemother* **23**, 603-609 (1983).

12）Percy, D.H. & Black, W.D. Pharmacokinetics of tetracycline in the domestic rabbit following intravenous or oral administration. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire* **52**, 5-11 (1988).

13）Sweeney, R.W., Divers, T.J., Benson, C. & Collatos, C. Pharmacokinetics of rifampin in calves and adult sheep. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* **11**, 413-416 (1988).

14）Niwa, T. *et al*. Tissue distribution after intravenous dosing of micafungin, an antifungal drug, to rats. *Biol Pharm Bull* **27**, 1154-1156 (2004).

15）Humphrey, M.J., Jevons, S. & Tarbit, M.H. Pharmacokinetic evaluation of UK-49,858, a metabolically stable triazole antifungal drug, in animals and humans. *Antimicrob Agents Chemother* **28**, 648-653 (1985).

# 新規ライブイメージング法を用いたメラニン色素輸送の解析

京都大学理学研究科生物科学専攻動物学系
田所　竜介

Our skin and hair have various colors, which are established by melanin pigment. Melanin pigmentation in the skin is physiologically important to protect our body from UV irradiation. Melanocytes are known as melanin-producing cells in which melanin is synthesized in melanosomes. In the tanning processes, melanocytes extend numerous dendrites that are attached to surrounding keratinocyes, and subsequently melanin granules are transferred through melanocyte dendrites to keratinocytes. Although several different models for intercellar melanin-transfer have been proposed by *in vitro* experiments and electron microscopic observations, the mechanisms of melanin-transfer *in vivo* remain controversial[1,2,3,4,5,6,7,8]. So far, we developed an imaging technique, and visualized behavior of melanocyte during skin pigmentation in chicken embryo. We found that melanocytes release vesicles. In this study, first, we statistically showed the difference of vesicle size between the tissues. Second, to analyze molecular mechanism underlying the difference, we established a gene transfer technique to manipulate melanocytes and keratinocytes by other genes respectively *in vivo*.

## 1．緒　言

ヒトの皮膚や毛髪は、白色から黒褐色といった様々な色のバリエーションをもっている。この体の色を作り出しているのがメラニン色素であり、有害な紫外線から身を守るという重要な役割を担っている。この一方で、メラニン色素はシミやソバカスなど美容上の問題を引き起こす厄介者として嫌遠される。また、白斑などの色素疾患が社会生活上の心の負担を招くなど、メラニン色素は生活の質（QOL）と密接に関係している。メラニン色素は、表皮や毛組織に散在する色素細胞によって合成され、のちに表皮や毛のケラチノサイトに輸送されることで、表皮と毛を着色して紫外線防御などの生理機能を発揮する。つまり、メラニン色素の細胞間輸送を理解することは、色素生物学の本質的な課題の一つであり、美容分野および臨床においても極めて重要な課題である。我々は、これまでに自身が確立したトリ胚の表皮および毛の培養法と、色素細胞への蛍光標識法を組み合わせることで、メラニン輸送期における色素細胞の振る舞いを観察してきた。また、これらの観察から色素細胞が異なるサイズの小胞を放出する可能性を見出した。本研究は、この過程を包括的に理解することを目指すものである。



Live-imaging technique to visualize behavior of melanocytes in the skin of chicken embryo

Ryosuke Tadokoro
Department of Zoology, Graduate School of Science, Kyoto University

## 2．実　験

### 実験1　表皮と毛組織において小胞放出機構が異なるのか？

前述の通り我々は、色素輸送期の表皮および毛組織において、色素細胞が小胞を放出することを見出しつつある。小胞の大きさにはバリエーションがあり、1μm程度の小型小胞と2−5μm程度の大型の膜小胞に大別できる。また、小型と大型の膜小胞はそれぞれ含有しているメラニン顆粒の量が異なる。興味深いことに、大型の膜小胞は色素輸送が盛んな毛組織において多く見られるという可能性も見出した。これらの結果を受けて我々は「要求される色素の量に応じて輸送法が使い分けられる」という仮説を立てるに至った。本研究では、この仮説を検証するにあたり、のちの遺伝子解析などを見据えて正常表皮および毛組織における膜小胞の大きさを測定して統計的な評価基準の作製を行った。

### 実験2　輸送法の違いを生み出す分子機構の解明を目指した表皮遺伝子操作法の確立

本研究により膜小胞は大型と小型の2サイズに大別されることを見出した。これまでの細胞生物学的な知見から、膜小胞には小型小胞（100nm以下）と大型小胞（0.2〜1.5μm）が報告されており、これらの生成過程は全く異なることが明らかにされている（参）。つまり、膜小胞のサイズは膜小胞を分類する上で最も重要な指標の一つとされている。我々がみいだした大型の膜小胞（2〜5μm）は細胞生物学的には稀なサイズの膜小胞であり、通常の膜小胞（0.2〜1.5μm）とは異なる過程を経て形成されることも見出した。本研究において、この膜小胞の生成過程の違いを生み出す分子メカニズムを調べるにあたり、色素細胞およ

び周囲の表皮細胞を遺伝子操作する必要がある。そこで、本研究では生体内において表皮遺伝子操作法を確立することにした。

## 3．結　果

### 3．1　表皮と毛組織においてメラニン色素輸送法が異なるのか

色素細胞由来の膜小胞を可視化するため、胚発生期において色素細胞の前駆細胞にGFP遺伝子を導入し色素細胞の蛍光標識をおこなった。胚発生を進め、色素輸送が活発になる時期に胚を単離し、表皮組織および毛組織の観察を行った。観察にはニコン社製共焦点レーザー顕微鏡A1Rを用いた。それぞれの組織において、画像解析ソフト（NIS-elementsおよびImageJ）を用いて膜小胞の数と直径を測定した結果を図1のグラフにまとめた（図1）。表皮組織においては、膜小胞の直径がおよそ1μm以下（小型膜小胞）のものが多く、それ以上のサイズの膜小胞は全体の1割にみたない（図1）。これに対して、毛組織内の膜小胞は表皮において見られる膜小胞と同程度のサイズも認められるものの、2μm以上の巨大な膜小胞（大型膜小胞）の存在が顕著である（図1）。これら膜小胞の全体数における大型膜小胞の存在比率を調べたところ、表皮が8％そして毛組織においては43％であった。この評価基準を設定することにより、色素沈着が過剰な系統とそうでない系統間の比較により、例えば色素沈着の過剰な系統（ウコッケイ）において大型膜小胞の存在比率が高くなるなど、色素輸送法と輸送量の関係を調べることが可能になった。

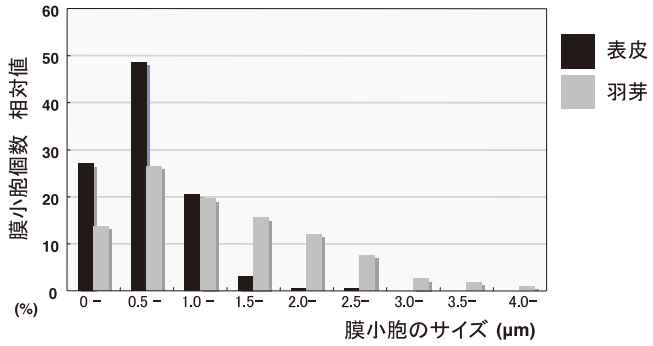



図1　表皮と毛における小胞の大きさ比較

### 3．2　輸送法の違いを生み出す分子機構の解明を目指した表皮遺伝子操作法の確立

表皮細胞に遺伝子導入を行うにあたり電気穿孔法、化学的手法およびウイルスによる導入を試みた。化学的手法においては、およそ6種類の試薬を用いたが表皮における試薬の拡散が激しくほとんど遺伝子が導入されず、電気穿孔法においては遺伝子導入されるものの導入効率が低く、導入される部位も限定されることが明らかになった。そこで、ウイルスによる遺伝子導入の条件検討を行った。具体的には、ウイルスに感染しやすいトリ系統を探索するにあたり、ヒペコ種をはじめとして数種類のトリ系統についてウイルス感染効率を測定した。その結果、白色レグホンにおいて写真に示す通り、表皮への遺伝子導入が可能となった。加えて、表皮細胞のみならず色素細胞にもウイルスが感染することが危惧されたが、幸いなことに本実験においては色素細胞へのウイルス感染はほとんど観察されない。次に、表皮細胞を遺伝子操作した状態で色素細胞から放出される膜小胞を観察するために、表皮細胞へ遺伝子導入した胚の色素細胞に対して、電気穿孔法を用いて遺伝子導入を試みた（図2）。これら両手法を同一個体に施すことで死亡率が上がるが、電気穿孔法に用いる電圧を6V程度に抑えることにより全体の約半数が生き残ることを見出した。以上、本研究により表皮細胞および色素細胞を別々の遺伝子により操作する方法を確立した（図2）。

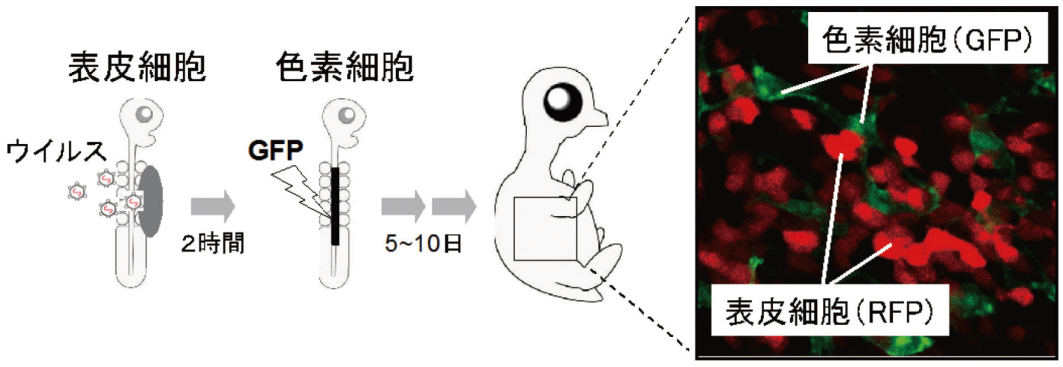



図2　表皮と色素細胞の遺伝子操作

## 4．考察・総括

メラニン色素輸送の研究はこれまで主に*in vitro*共培養や組織の電子顕微鏡観察により解析され、多くの研究者が異なる解析系を用いて様々な説を提唱してきた[1,2,3,4,5,6,7,8]。現在、実際の組織においてどの輸送法が使われているのかという問いが長らく続いているが未だ決定的な結論に到達していない。我々の研究結果は、実際の組織内においてメラニン色素が２者択一的な方法ではなく、複数の方法により表皮に輸送されることを示唆する。また組織などシチュエーションの違いにより輸送方法に違いがあることが想像される。この結果を踏まえて、著者は「どの輸送モデルが正しいのか」という排他的な問いでなく、これまで報告された複数の色素輸送モデルが生体内のどのようなシチュエーションにおいて用いられるのかを正しく理解することが重要であると考えるに至った。現在、本研究の趣旨である色素輸送法がどのように使い分けられるのか、そしてその違いがどのような分子メカニズムにより生じるのかという深淵な疑問に答えることはできない。しかしながら、本研究はこれまで困難とされてきた“組織内における色素輸送を高解像度で可視化する手法”に加えて“個体内において色素細胞および表皮細胞を別々に遺伝子操作する方法”を確立するに至った。これらの手法を用いて、近い将来、色素輸送の謎を解き明かせると信じてやまない。

**（参考文献）**


1）Swift JA. Transfer of melanin granules from melanocytes to the cortical cells of human hair. *Nature*, 203:976–977（1964）

2）Yamamoto O, Bhawan J. Three modes of melanosome transfers in Caucasian facial skin: hypothesis based on an ultrastructural study. *Pigment Cell Res.*, 7:158–169（1994）

3）Virador VM, Muller J, Wu X, Abdel-Malek ZA, Yu ZX, Ferrans VJ, Kobayashi N, Wakamatsu K, Ito S, Hammer JA, Hearing VJ. Influence of alpha-melanocyte stimulating-hormone and ultraviolet radiation on the transfer of melanosomes to keratinocytes., *Faseb J.*, 16; 105-107（2002）

4）Scott G, Leopardi S, Printup S, Madden BC. Filopodia are conduits for melanosome transfer to keratinocytes. *J. Cell Sci.*, 115:1441–1451（2002）

5）Bhawan J. Ultrastructure of melanocyte–keratinocyte interactions in pigmented basal cell carcinoma. *Pigment Cell Res.*, 5:38–47（1979）

6）Garcia RI, Flynn E, Szabo G. Ultrastructure of melanocyte–keratinocyte interactions. *Pigment Cell Res.*, 4; 299–307（1979）

7）Cerdan D, Redziniak G, Bourgeois CA, Monsigny M, Kieda C. C32 human melanoma cell endogenous lectins: characterization and implication in vesicle-mediated melanin transfer to keratinocytes. *Exp Cell. Res.*, 203; 164–173（1992）

8）Aspengren S, Hedberg D, Wallin M. Studies of pigment transfer between Xenopus laevis melanophores and fibroblasts in vitro and in vivo. *Pigment Cell Res.*, 19;136–145（2006）

# 色素系化合物の光毒性を抑制する新たな手法の開発

東京大学大学院薬学系研究科
寺井　琢也

When dye molecules are excited by UV or visible light, singlet oxygen ($^1O_2$) is generated via energy transfer from excited triplet state of the molecules. Because the photo-generated $^1O_2$ is known to cause damage to cells, it is important to establish methods to decrease the amount of generated $^1O_2$, or to erase $^1O_2$ by chemical reaction. We believe such methods will be useful not only in bioimaging but also in cosmetology. Hence, in this research, we studied on the singlet oxygen eliminating effect of lanthanide ions that are co-existent in the system. The idea was that when lanthanide ions that could accept energy from the excited dyes were present nearby, the ions would work as surrogate acceptors in place of molecular oxygen, whereby decreasing the efficiency of $^1O_2$ generation. In order to verify this hypothesis, we firstly synthesized several fluorescent compounds and their lanthanide complexes, and measured characteristic luminescence of $^1O_2$ at 1270 nm. The results indicated that $^1O_2$ generation is attenuated when the compounds chelate a specific kind of lanthanide ions, supporting our hypothesis. Also, we have demonstrated that some lanthanide ions are capable of decreasing the amount of generated $^1O_2$ through intermolecular interactions. As far as we are concerned, these findings are unprecedented, and worth further investigation.

## 1．緒　言

太陽光などに含まれる紫外線は、細胞内の生体分子（DNA、タンパク質など）を光励起して活性酸素の一種である一重項酸素（$^1O_2$）を発生させ、生体に対して皮膚の老化を初めとする悪影響を及ぼすことが知られている。従って、アスタキサンチンに代表されるように一重項酸素消去能を持つ化合物を配合した化粧品が近年上市され、効果を発揮している。

一方、蛍光色素を用いた細胞や動物個体の光イメージングは、生体内での目的分子の挙動をリアルタイムで解析するための強力な研究手法であり、今日の生命科学研究において不可欠な役割を担っている[1), 2)]。しかしながら、多くの蛍光色素は光励起に伴い生体分子と同様に一重項酸素（$^1O_2$）を産生する（光増感反応）。先にも述べたとおり、一重項酸素は細胞に対して酸化ストレスを与えて細胞死を導いたり[3)]、近傍のタンパク質と反応してその活性を消失させたりする性質（光毒性）を有しており[4)]、そうした悪影響を抑えることは蛍光イメージングにおいても重要な課題の一つである。

一般に、一重項酸素消去能を有する化合物は、その還元力により一重項酸素と量論的に反応することでこれを消去する。しかしこの機構を用いる限り、添加した化合物の量以上の一重項酸素を消去することはできない。更に、これらの還元剤は化学的に不安定であることが多く、取り扱いも容易ではない。従って我々は、化粧品への応用や蛍光イメージング技術への貢献を念頭に、①安定な構造を持ち、②一重項酸素と化学的に反応することがない、新たな消去手法の開発を目指し研究を開始した。

ところで一重項酸素は、色素（あるいは蛍光分子）の光励起に引き続く項間交差によって励起三重項状態が生じ、この状態から分子酸素へのエネルギー移動が起こることで生成するとされる。そこで我々は、生じた励起三重項状態を酸素との反応以外の失活経路によって速やかに消失させることにより一重項酸素の発生自体を抑制する、という新しい発想（Fig. 1）で上記の課題を解決することを着想した。具体的には、光増感反応と競合する失活経路として、色素の励起三重項状態より低い位置に励起状態を有する化合物、特に$Nd^{3+}$や$Yb^{3+}$といった希土類イオン（$Ln^{3+}$）に対するエネルギー移動を考えた。これらのイオンは一重項酸素とほぼ同じ低い位置に励起状態が存在するため、一旦（酸素分子ではなく）希土類イオンへのエネルギー移動が生じると、そこからの光増感反応はほとんど起こらないことが予想される。即ち、分子内もしくは分子間にこれらのイオンを配置して、色素の励起三重項状態からイオンへのエネルギー移動が優先的に起こるようにすれば、光が色素に当たっても一重項酸素が産生されず、毒性が抑えられると考えた。

この方法では、励起された希土類イオンは発光もしくは熱失活過程によりエネルギーを失うため[5), 6)]、一重項酸素のように生体分子と反応して酸化修飾を引き起こすことは考えにくい。また、３価の希土類イオンは化学的にも安定であるため、従来の不可逆的な還元剤とは異なりこの消去



Development of a novel methodology to suppress phototoxicity of colored compounds
Takuya Terai
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

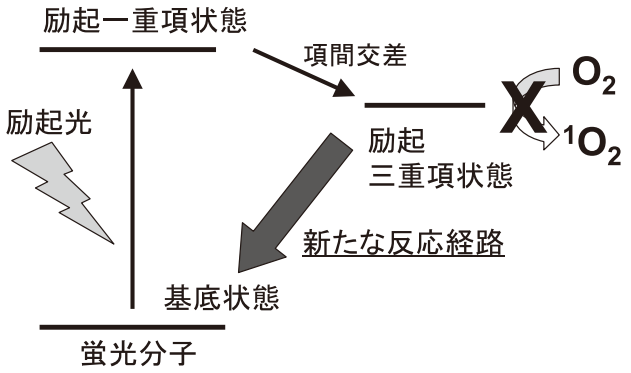



Fig. 1　研究の概念図

過程を何度も繰り返すことが可能と期待される。

本研究では初期検討として、まずはFig. 1の系が実際に機能するのかについて、代表的な色素分子を用いた溶液中の実験で検討した。

## 2．実　験

### 2.1　試薬

市販されている試薬類については、和光純薬、東京化成工業、もしくはSIGMA-ALDRICH社から購入し、特に明示しない限り更なる精製はせずに用いた。2',7'-dichlorocalcein (**2**)、2OMe-BODIPY (**4**)、2OMe-BODIPY-DTPA (**5**)、並びにそれらの金属錯体は文献を参考に合成を行った[7), 8)]。合成した化合物についてはNMRおよびESI-MSにて構造の確認を行い、HPLCにより純度を確認した。なお、本報告に登場する化合物の構造をFig. 2にまとめて示す。

### 2.2　測定装置

吸光測定には島津UV-1800を用いた。蛍光測定には日立F4500もしくは堀場Jobin Yvon Fluorolog-3を用いた。一重項酸素生成能の評価（赤外発光測定）には堀場Jobin Yvon Fluorolog-3（InGaAs検出器）を用いた。また、単一光照射には分光計器UB-25を用いた。波長により多少の違いはあるものの、光量は約3 mW/㎠であった。

### 2.3　実験方法

吸光・蛍光・発光測定においては、測定対象化合物のストック溶液（1～10mM in DMSO or DMF）を用意し、別途明示する溶媒で希釈することで、吸光・蛍光測定の場合には約1μM、DPBFを用いた吸光測定もしくは$^1O_2$の発光測定の場合には約10μMの溶液を調製した。測定は20～25℃で行い、特に明示しない限り脱気等の操作は行わなかった。各種スペクトルは、別途測定した溶媒のみのスペクトルを差し引いて示した。一重項酸素生成能（発光）については、バックグラウンドシグナルの傾きを考慮して1270nmのピーク高さを算出し、励起波長における吸光度で補正することで比較した[9)]。DPBFを用いた$^1O_2$の定量については、メタノール溶媒中における410nmの吸光度の減少から見積った[10)]。

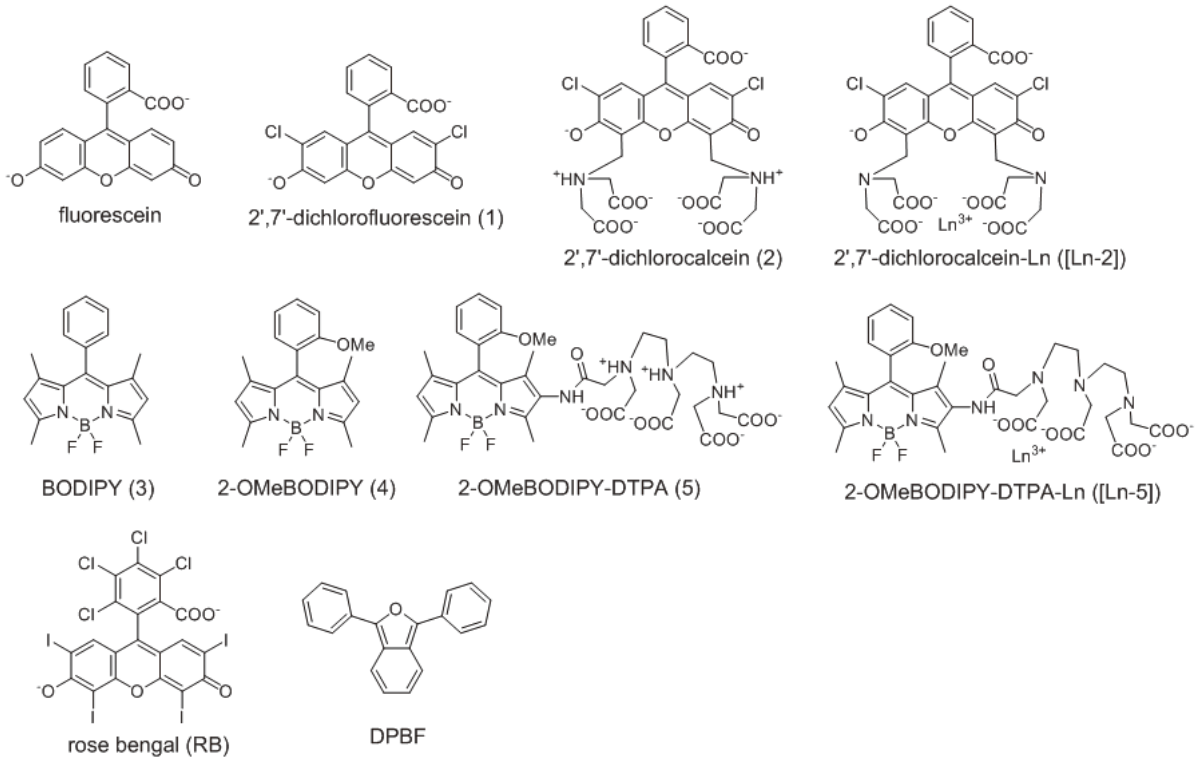



Fig. 2　化合物の構造

## 3．結　果

### 3．1　Fluorescein誘導体における分子内消光

Fluoresceinは最も代表的な有機蛍光分子の一つであり、様々な蛍光プローブの基本骨格として利用されている[2)]。その一方で、fluorescein誘導体は一定の増感能を有することが知られており、強い光を当てることで$^1O_2$を産生し細胞にダメージを与える場合がある[11)]。そこで我々はまず、分子内に希土類イオンを導入したfluorescein誘導体［**Ln-2**］が、母化合物である**1**および配位子**2**と比較して低い増感能を持つかどうかについて検討を行った。

各化合物の吸収スペクトルと近赤外発光スペクトルをFig. 3に示した。スペクトル測定は、$^1O_2$の寿命が通常の水よりも長い重水（$D_2O$）中で行った。吸収スペクトルにはほとんど変化が見られなかったのに対し、1270nm付近の発光強度は**1**>**2**>>［**Yb-2**］の順となり、化合物間で大きな差異が見られた。化合物を加えない場合にはこの位置にピークを有する発光は全く見られないことから、これは各化合物の励起状態からエネルギー移動を介して生成する$^1O_2$に由来するものと判断される。なお、［**Yb-2**］の発光スペクトルが短波長側で大きく増大する形状になるのはcalceinの励起状態を介する$Yb^{3+}$の発光に由来するものであり[7)]、$^1O_2$とは無関係であることを別途確認している。

この結果から、［**Yb-2**］の$^1O_2$生成量は**1**や**2**と比較して小さくなっており、希土類イオンを色素の近傍に配置することで元の化合物より増感能が低下することが示唆された。

### 3．2　BODIPY誘導体における分子内消光

BODIPY（化合物**3**）はfluoresceinと並ぶ代表的な可視光蛍光団の一つであり、蛍光プローブの基本骨格としても汎用されている[12)]。そこで我々は、BODIPYについてもfluoresceinの場合と同様に、希土類イオンの導入によって$^1O_2$生成能が変化するかどうかを調べた。具体的には、化合物**4**，**5**、および［**Yb-5**］について吸収スペクトルおよび近赤外発光スペクトルを測定した。

その結果をFig. 4に示す。測定は、BODIPYの溶解性を考慮してメタノール中で実施した。化合物**4**のみ吸光度が大きいのは、濃度が他の2つより高いからである（注：励起波長における吸光度の値がほぼ一定になるように濃度調整を行った）。発光スペクトルに関しては、ベースラインの傾きを考慮し、更に励起波長である500nmの吸光度で補正すると、**5**>［**Yb-5**］>**4**であることが示唆された。金属を含まない化合物**5**と比較すると、$Yb^{3+}$錯体の増感能の低下が認められたものの、前項の実験とは異なりその差が大きいものではないため更なる検討が必要と考えられる。

### 3．3　Rose bengalにおける分子間消光

Fluoresceinに重原子を導入した化合物であるrose bengal（RB）は、非常に高い$^1O_2$産生能を有する代表的な光増感剤である[13)]。3．1、3．2の検討においては色素分子（蛍光団）が直接希土類イオンに配位している場合を想定したが、実際の応用においてはそのような場合は稀と考えられる。そこで本項では、溶媒内に分子間で存在する$Ln^{3+}$によりRBの増感能が制御されるか否かについて調べた。具体的には、メタノールにRBと$LnCl_3$をそれぞれ2μM、100μMとなるよう溶解させ、530nmの光照射により産生される$^1O_2$の発光スペクトルを測定した。

吸収スペクトルと合わせた測定結果をFig. 5に示す。化合物の吸収スペクトルは希土類イオン添加の有無によりわ

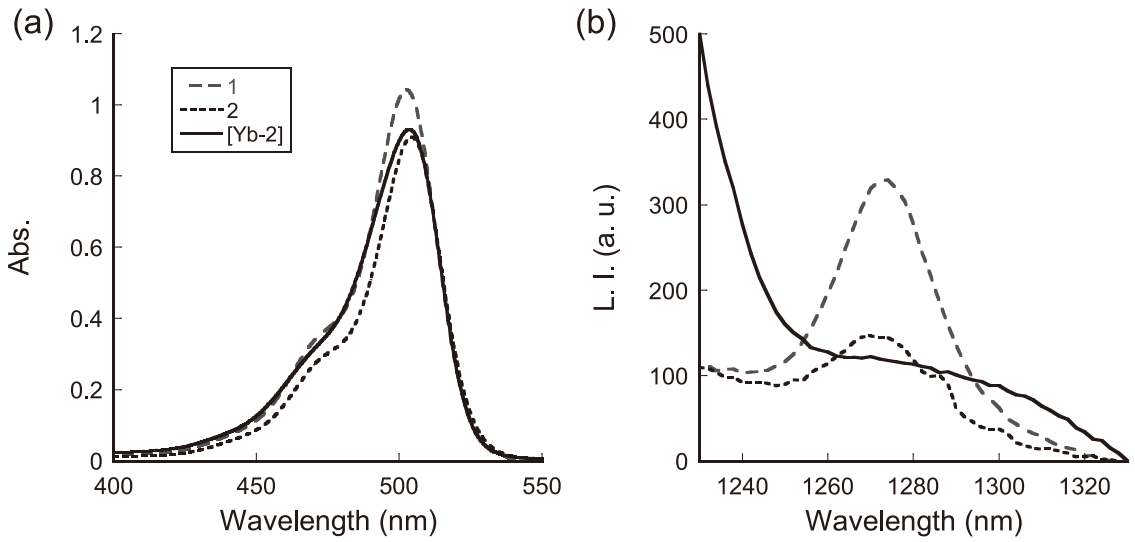



Fig. 3　化合物 1, 2 および [Yb-2] の(a)吸収スペクトル、および(b)近赤外発光スペクトル。測定は重水（10mM HEPES 緩衝液）中で行った。励起波長：500nm。

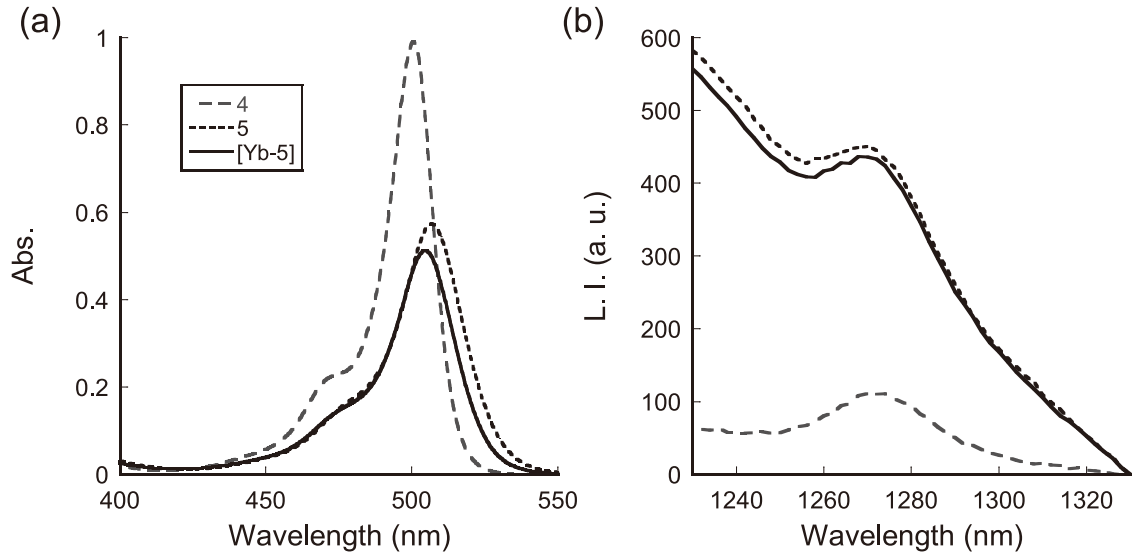



Fig. 4　化合物 **4**, **5** および［**Yb-5**］の(a)吸収スペクトル、および(b)近赤外発光スペクトル。測定はメタノール中で行った。励起波長：500nm。

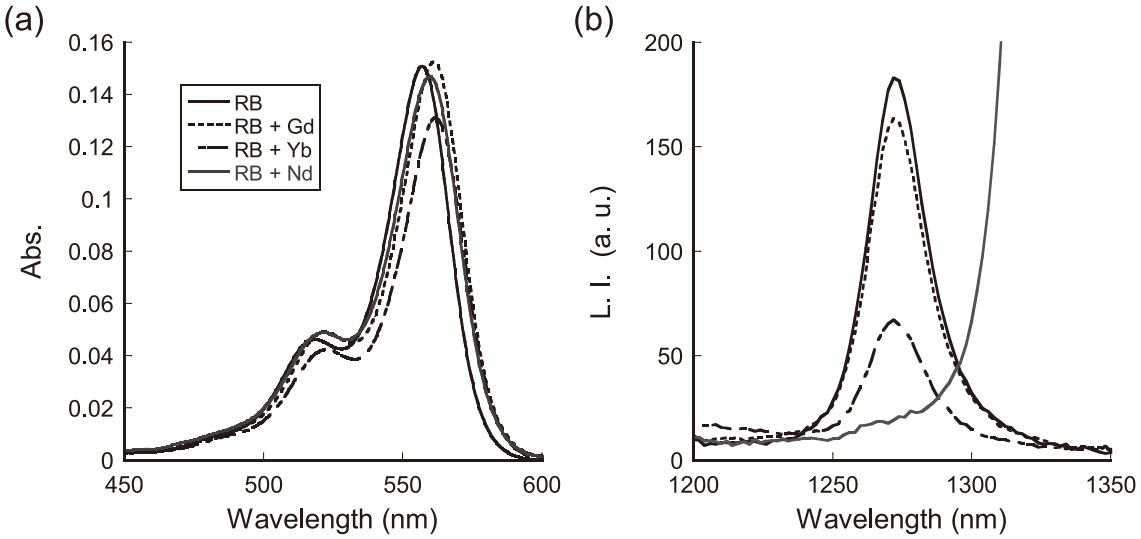



Fig. 5　RB、RB+$GdCl_3$、RB+$YbCl_3$、および RB+$NdCl_3$ の(a)吸収スペクトル、および(b)近赤外発光スペクトル。励起波長：530nm。

ずかに長波長シフトを示したものの、形状や強度の変化はほとんど見られなかった。一方、近赤外発光スペクトルにおいては$Yb^{3+}$および$Nd^{3+}$を添加したサンプルのみ有意に強度の低下が観察された。一方、同じ希土類イオンでも$Gd^{3+}$を同量添加したサンプルはRB自体とほとんど変わらない増感能を示した。これは、$Gd^{3+}$の励起状態が比較的高い位置にあるためRBからのエネルギー移動（Fig. 1参照）が生じえないためと説明できる。なお、Fig. 5bにおいて$Nd^{3+}$添加サンプルの1300nm以上の発光強度（これは$Nd^{3+}$からの発光である）が大きく上昇していることも、RBから$Nd^{3+}$へのエネルギー移動を支持するデータである。

続いて、同様に調製したサンプルについて、1270nm発光測定とは異なる$^1O_2$の定量方法である1,3-diphenylisobenzofuran（DPBF）を用いた光増感能の評価を行った[10]。本法は$^1O_2$発光測定と比べて間接的ではあるものの、感度には優れている。

具体的には、RB（10μM）と$LnCl_3$（100μM）のメタノール溶液に対して50μMのDPBFを添加し、500nmの光照射に伴う410nmの吸光度の減少をモニターした。その結果をFig. 6に示す。Fig. 5の結果を裏付けるように、無添加と比較して$Yb^{3+}$添加では生成する$^1O_2$が半分以下に低下することが示唆された。また、$Nd^{3+}$添加サンプルではバックグラウンドとほぼ同程度まで吸光度変化が抑制された。一方、$Gd^{3+}$添加サンプルにおいては10％程度の低下しか観察されず、これもFig. 5の結果と整合するものであった。

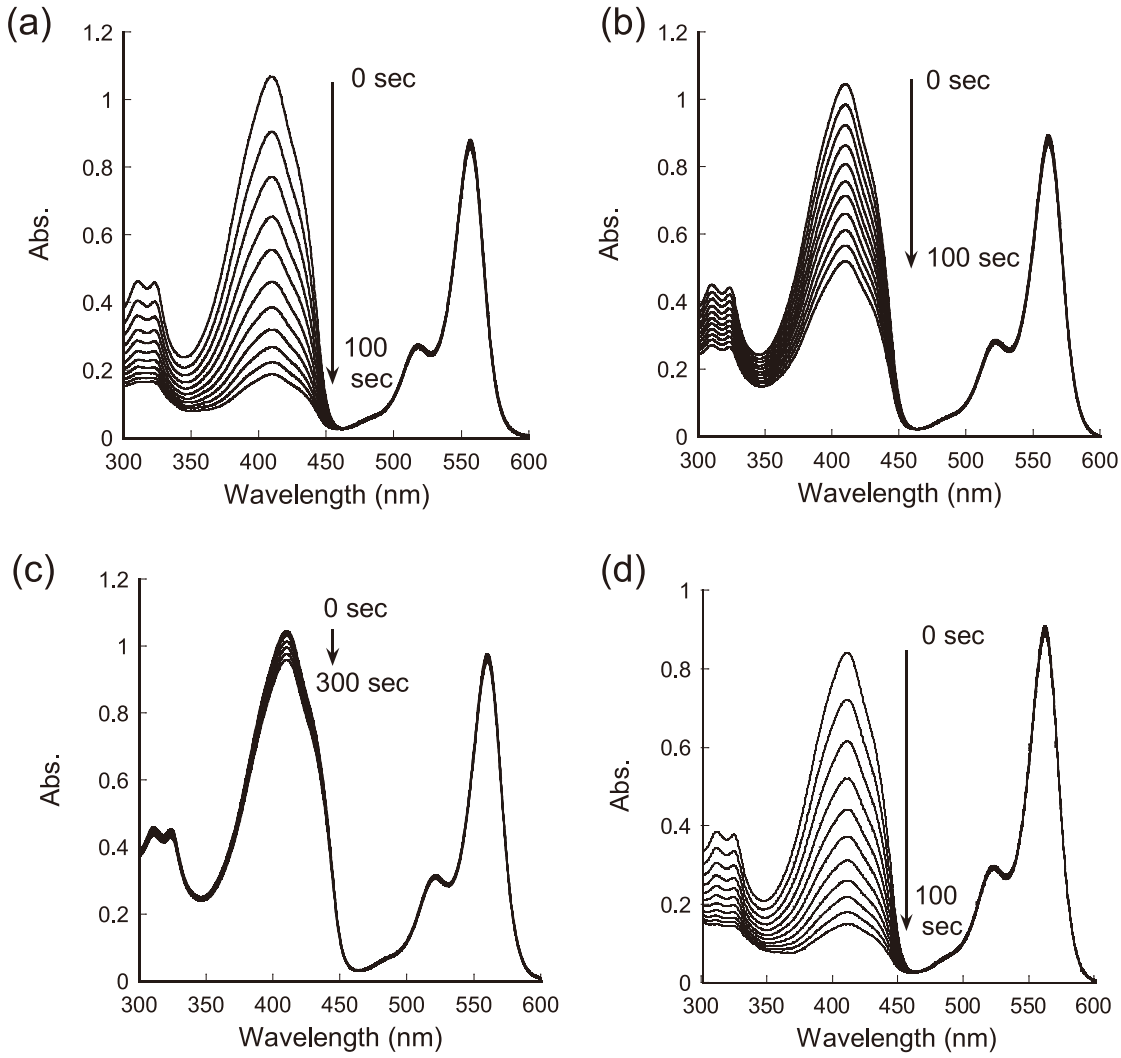



Fig. 6　DPBF を用いた増感能の評価。(a) RB のみ、(b) RB+$YbCl_3$、(c) RB+$NdCl_3$、および (b) RB+$GdCl_3$ の吸収スペクトルの時間変化　グラフ中の数字は 500nm の光照射を行った時間（秒）を表す。

### 3．4　BODIPY 誘導体における分子間消光

3．3 の結果を受け、BODIPY 誘導体についても希土類イオンの分子間添加によって $^1O_2$ の生成量に変化が見られるかを検討した。実験には Fig. 6 と同様に DPBF を用いた評価系を用いた。

その結果を Fig. 7 に示す。化合物 **4** は RB と比べて増感能が低いため、吸光度変化が全体的に小さくなっているが、(a) と (b) を比較すると $Nd^{3+}$ 添加による $^1O_2$ 産生の抑制が認められる。しかしながら、その効果は RB の場合（Fig. 6）よりもかなり小さいことが示唆された。

## 4．考　察

本研究では、色素化合物の光励起によって放出される有害分子である $^1O_2$ の生成量を制御する手法として、近赤外領域に発光を持つ希土類イオンに対するエネルギー移動という新たな概念を提唱し、その仮説を検証するための初期検討を行った。

その結果、複数の fluorescein 誘導体（化合物 **2**，RB）において、分子間、分子内に拘わらずある種の希土類イオン添加による大幅な増感能の低下が観察された。この結果は我々が提案する仮説を支持するものであり、化学的にも興味深い現象である。一方、BODIPY 誘導体（化合物 **4**，**5**）を用いた場合には、希土類イオンの添加により一定の増感能低下は認められたものの、その効果は fluorescein 誘導体の場合よりも小さかった。

この原因については更なる研究が必要ではあるが、現時点で考えられることとして、①化合物によって励起三重項状態から酸素分子へのエネルギー移動速度が異なる、②化合物によって励起三重項状態から希土類イオンへのエネルギー移動速度が異なる、③色素と希土類イオンとの静的相互作用（複合体形成など）が生じる、が挙げられる。

今後は本研究で提案した手法の一般性と適用限界について明らかにすべく、UV 領域に吸収を有する化合物を用いた検討や固体試料における評価を進めていく計画である。

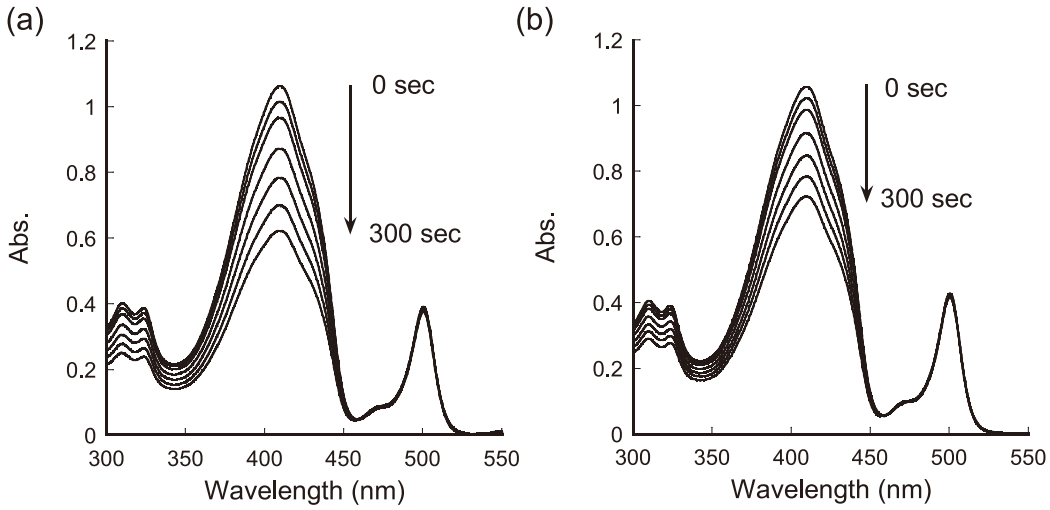



Fig. 7　DPBF を用いた増感能の評価。(a) 4 のみ、および (b) 4+$NdCl_3$ の吸収スペクトルの時間変化
グラフ中の数字は 500nm の光照射を行った時間（秒）を表す。

**（参考文献）**


1）Lakowicz JR: Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd Ed., Springer-Verlag, New York, 2006.

2）Terai T, Nagano T: Fluorescent probes for bioimaging applications, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 12, 515-521, 2008.

3）Koide Y, Urano Y, Yatsushige A, Hanaoka K, Terai T, Nagano T: Design and Development of Enzymatically Activatable Photosensitizer Based on Unique Characteristics of Thiazole Orange, *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 6058-6059, 2009.

4）Yogo T, Urano Y, Mizushima A, Sunahara H, Inoue T, Hirose K, Iino M, Kikuchi K, Nagano T: Selective photoinactivation of protein function through environment-sensitive switching of singlet oxygen generation by photosensitizer, *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, 105, 28-32, 2008.

5）Hänninen P, Härmä H (eds): Lanthanide Luminescence - Photophysical, Analytical and Biological Aspects, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2011.

6）Terai T, Kikuchi K, Iwasawa S, Kawabe T, Hirata Y, Urano Y, Nagano T: Modulation of Luminescence Intensity of Lanthanide Complexes by Photoinduced Electron Transfer and Its Application to a Long-Lived Protease Probe, *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 6938-6946, 2006.

7）Terai T, Urano Y, Izumi S, Kojima H, Nagano T: A practical strategy to create near-infrared luminescent probes: conversion from fluorescein-based sensors, *Chem. Commun.*, 48, 2840-2842, 2012.

8）Sunahara H, Urano Y, Kojima H, Nagano T: Design and Synthesis of a Library of BODIPY-Based Environmental Polarity Sensors Utilizing Photoinduced Electron-Transfer-Controlled Fluorescence ON/OFF Switching, *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 5597-5604, 2007.

9）Yamakoshi Y, Umezawa N, Ryu A, Arakane K, Miyata N, Goda Y, Masumizu T, Nagano T: Active Oxygen Species Generated from Photoexcited Fullerene ($C_{60}$) as Potential Medicines: $O_2^{-\bullet}$ versus $^1O_2$, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 12803-12809, 2003.

10）Gorman AA, Hamblett I, Lambert C, Spencer B, Standen MC: Identification of Both Preequilibrium and Diffusion Limits for Reaction of Singlet Oxygen, $O_2$ ($^1\Delta_g$), with Both Physical and Chemical Quenchers: Variable-Temperature, Time-Resolved Infrared Luminescence Studies, *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 8053-8059, 1988.

11）Keppler A, Ellenberg J: Chromophore-Assisted Laser Inactivation of α- and γ-Tubulin SNAP-tag Fusion Proteins inside Living Cells, *ACS Chem. Biol.*, 4, 127-138, 2009.

12）Komatsu T, Urano Y, Fujikawa Y, Kobayashi T, Kojima H, Terai T, Hanaoka K, Nagano T: Development of 2,6-carboxy-substituted boron dipyrromethene (BODIPY) as a novel scaffold of ratiometric fluorescent probes for live cell imaging, *Chem. Commun.*, 7015-7017, 2009.

13）Lessing HE, Richardt D, von Jena A: Quantitative triplet photophysics by picosecond photometry, *J. Mol. Struct.*, 84, 281-292, 1982.

# デコイ・メラノソームを用いたメラノサイトから ケラチノサイトへのメラニン移送阻害の研究

名古屋市立大学大学院薬学研究科
平嶋　尚英

To inhibit melanin transfer from melanocytes to keratinocytes, we attempted to use nano-particles that mimic melanosomes. We found that negatively charged polystyrene particles are up-taken by melancytes. To investigate the effects of particles on melanin transfer, we constructed 3D-coculture system of melanocytes and keratinocytes. However, no significant effects of particles on melanin transfer. Further improvements such as higher uptake of particles and surface modification by melanosomal proteins are required.

## 1．緒　言

色素細胞であるメラノサイトは、メラニンを産生し、さらにそれを周囲のケラチノサイトへ引き渡し、皮膚の色素沈着をコントロールしている。この色素沈着を抑制することで美白効果をもたらすことができるため、化粧品開発において、メラニンの産生から色素沈着にいたるまでの過程を研究することは極めて重要である。

メラニンは脂質二重膜で囲まれたメラノソームと呼ばれる小胞中で産生され、さらにメラノサイトの突起先端まで輸送され、ケラチノサイトへ移行する。この移行機構については、おおまかに次の４つの仮説がある[1)]。①メラノソーム内のメラニン顆粒がエクソサイトーシス（開口放出）によって、細胞外に放出され、それをケラチノサイトが貪食する。②メラノサイトの突起先端に集まってきたメラノソームを突起ごとケラチノサイトが貪食する。③メラノサイトからフィロポディア様の突起が伸び、その先端がケラチノサイトの細胞膜と融合し、形成されたチューブ状の構造の中をメラノソームが輸送される。④メラノサイトの細胞膜で囲まれ、内部に数個のメラノソームを含む小胞（エクソソーム）として細胞外に放出され、それがケラチサイトと膜融合するか、あるいはケラチノサイトによる貪食によって、ケラチノサイトにとりこまれる。いずれにしても、ケラチノサイトへのメラニンの移行過程は色素沈着の上で極めて重要な過程である。

我々は代表的な分泌細胞であるマスト細胞の分泌顆粒の細胞内輸送やエクソサイトーシスについて研究を行ってきたが、マスト細胞の分泌顆粒はメラノソームと同じくリソゾーム関連顆粒であり、その細胞内輸送やエクソサイトーシスの機構が類似している[2-5)]。一方で、我々はリポソームやポリ乳酸・グリコール（PLGA）粒子のようなマイクロ・ナノ粒子を用いた高効率遺伝子導入法の研究を行ってきた[6-8)]。これらの研究の過程で、細胞をマイクロ・ナノ粒子とともに培養すると、これらの粒子が細胞内に取り込まれ、さらに細胞内で分泌顆粒用の挙動をとり、エクソサイトーシスによって放出されることを見出した[9)]。取り込まれた粒子がリソゾーム関連の顆粒と同様の挙動をとることは、細胞内に取り込まれたマイクロ・ナノ粒子がメラノソームと同様の挙動を示すことを示唆する。

そこで、本研究では、このメラノソームを模倣したマイクロ粒子を作製、デコイ（おとり）メラノソームとし、それをメラノサイトやケラチノサイトにとりこませ、メラノサイトが本来もつメラノソームの代わりにデコイメラノソームがケラチノサイトに移行することで、美白作用を発揮する可能性を検証する。

## 2．実　験

### 2.1　細胞

#### 2.1.1　マウスメラノサイト株melan-a細胞およびマウスケラチノサイト細胞株SP-1の培養

マウスメラノサイト株であるmelan-aは、Dorothy Bennett博士(St. George's University of London, London, UK）より御提供いただいた。細胞は、10%FBSを含むRPMI-1640培地（WAKO Pure Chemicals, Japan）で、$CO_2$濃度10%下、37℃にて培養した。また、マウスケラチノサイト細胞株SP-1はStuart H. Yuspa博士（National Cancer Institute, Bethesda, USA）より御提供いただいた。細胞培養は、SMEM培地にL-glutamine（0.29mg/ml）、$CaCl_2$（0.05mM）、Penicillin（20U/L）、Streptomycin（20mg/L）を混合し、Chelex-100でキレート処理した8% FBSを添加したものを用い、10% $CO_2$存在下37℃で培養した。



Inhibition of melanin transfer from melanocyte to keratinocyte by decoy-melanosomes
Naohide Hirashima
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University

### 2．2　RT-PCR

$10^7$個のmelan-a細胞からPoly(A)+RNAを得た後、逆転写酵素SuperScript Ⅲ RTを用いてcDNAを合成した。得られたcDNAを鋳型にして、メラノソームに発現している可能性のある膜蛋白質について、特異的プライマーを用いPCRを行った。得られたPCR産物は、DNAシークエンサーを用いて配列を決定した。

### 2．3　メラノソーム精製

メラノソームの精製はWatabeらの方法を参考に行った[10]。Melan-aのホモジネートを1000xg、4℃で10分間遠心後、ペレットを10mLのCell homogenization mediumに再懸濁させ、細胞を氷上でホモジナイズ後、1000xg、4℃で10分間遠心し、上清をスクロース勾配（1.0M、1.4M、1.6M、1.8M、2.0M）に重層し、100000xg、4℃で1時間遠心した。1.8Mと2.0Mとの界面層を回収し、メラノソームを得た。

### 2．4　Western Blotting

ライセートに2×sample bufferを加えてSDS-PAGEを行いPVDF膜（Bio Rad）に転写した。5%スキムミルクでブロッキング後、一次抗体で16時間処理した。さらにhorseradish peroxidase標識した二次抗体で処理後、ECL（Amersham Bioscience）で検出した。

### 2．5　蛍光顕微鏡観察

蛍光標識したナノ粒子は、直径200nmの蛍光ポリスチレン粒子（ex. 505nm/em. 515nm）をMolecular Probesより購入した。蛍光粒子を2mg/mlになるようにPBSで希釈し、使用する前に30秒間超音波処理をしてから用いた。蛍光標識ナノ粒子を細胞とともに培養し、8時間後に細胞と蛍光ナノ粒子を共焦点レーザー顕微鏡LSM510（Zeiss）を用いて観察した。

### 2．6　メラノサイトからケラチノサイトへのメラニン移行活性の定量化

#### 2．6．1　メラノサイトとケラチノサイトの共培養系

メラノサイトからケラチノサイトへのメラニン移行活性の定量化には、Kasraee Bらの方法に従った[11]。ポアサイズ1μmのメンブレンフィルター（Cell culture insert, FALCON、6-well 1.0μM pore size）の片面に、ケラチノサイトを定着させ、1日後に反対面にメラノサイトを定着させ、メンブレンフィルターの上下それぞれにメラノサイトとケラチノサイトを共培養した。培地はSP-1培養用のSMEM培地を用い、10% $CO_2$存在下37℃で培養した。

#### 2．6．2　共培養系を用いたケラチノサイトへのメラニン移行の定量化

上述の共培養系を用いて3日間共養したメラノサイトとケラチノサイトを別々にトリプシン処理することで、各細胞懸濁液を作成し、試料とした。メラノソームに特異的な抗体を用いて各細胞内のメラニンを定量し、メラノサイトからケラチノサイトへのメラニンの移行率を評価した。

## 3．結　果

### 3．1　melan-a 細胞のメラノソーム膜に発現するタンパク質の同定

本研究では、メラノソームを模倣したマイクロ粒子を作製し、デコイ（おとり）メラノソームとし、それをメラノサイトやケラチノサイトにとりこませる。そこで、メラノソーム表面に発現している蛋白質でマイクロ粒子をコートする。そのために、まずメラノソームに発現している蛋白質の同定を試みた。

メラノソームは、マスト細胞の分泌顆粒と同様リソゾーム関連顆粒である。そこで、マスト細胞の分泌顆粒にも発現している膜蛋白質としてVAMP（vesicle associated membrane protein）の発現をRT-PCRで調べた。その結果、VAMP-2、VAMP-7、VAMP-8が発現していることが明らかとなった（図1A）。このことは、単離メラノソームのウエスタンブロッティングによっても確認された（図1B）。

### 3．2　melan-a 細胞へのナノ粒子の取り込み

本研究では、マイクロ粒子をデコイメラノソームとしてメラノサイトに取り込ませる。そこで、効率的にメラノサイトにマイクロ粒子をとりこませるために、マイクロ粒子の物性と取り込み効率について検討を行った。マイクロ粒子としては、将来的にはリポソームやポリ乳酸・グリコール（PLGA）粒子のような生分解性のものを導入する予定であるが、まずは、ポリスチレン粒子を用いて基本的な検討を行った。

粒子径としては200nmのもの、表面電荷としては、表面をカルボキシル基で修飾した負電荷をもつ粒子と、アミノ基で修飾した正電荷をもつ粒子について調べた。

正電荷をもつ粒子は、図2に示すように、多数の粒子がmelan-a細胞の表面に吸着するのが見られた。しかしながら細胞内に取り込まれる粒子はそれほど多くはなかった。一方、図3に示すように、負電荷をもった粒子は、細胞に吸着する数は少ないもの、ある程度は細胞内に取り込まれることが明らかとなった。また、正電荷の粒子と培養した場合は、図4に示すように、細胞の形が紡錘形ではなく、丸くなり、正常なメラノサイトとは異なる形状を示すものが多く、正電荷粒子による毒性が現れていることが示唆された。

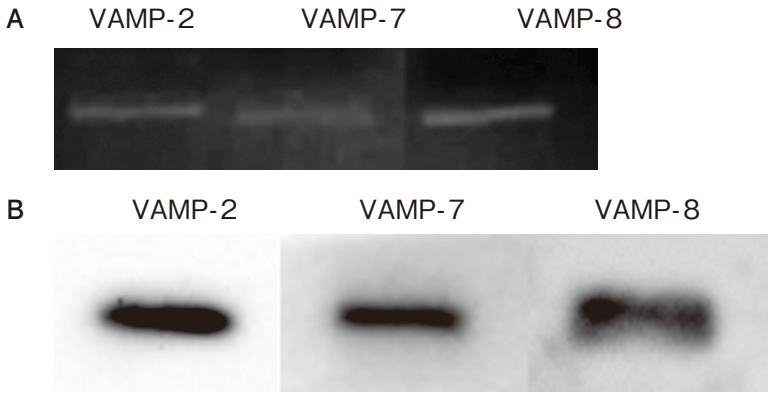



図１　メラノサイトにおける v-SNARE の発現
A　RT-PCR に v-SNARE
B　単離メラノソームのウエスタンブロットによる v-SNARE の発現

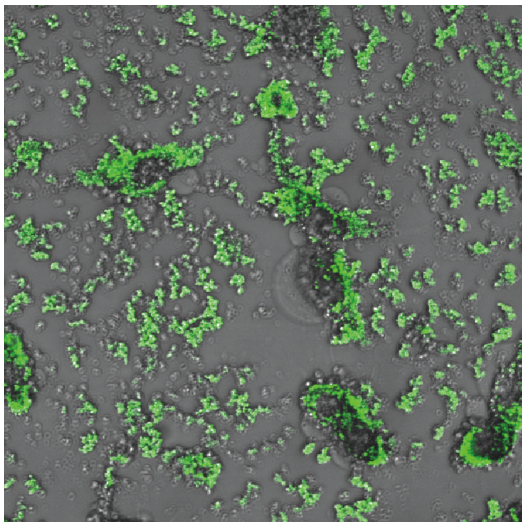


図２　正電荷蛍光粒子とメラノサイトの共培養
正電荷をもつ粒子は洗浄後も多数細胞に吸着したが、細胞内への取込みはさほど多くなかった。

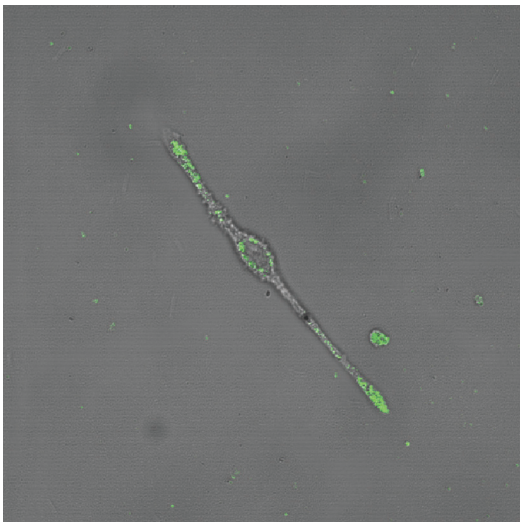


図３　負電荷蛍光粒子とメラノサイトの共培養
負電荷をもつ粒子は、洗浄後細胞への吸着はほとんど見られないが、細胞内への取込みが見られた。

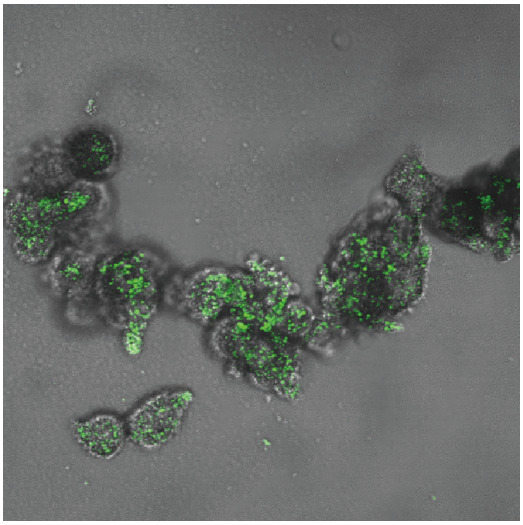


図４　正電荷蛍光粒子の細胞毒性
正電荷をもつ粒子は多数細胞に吸着し、細胞が変形して正常な場合の形態とは異なるものが多かった。

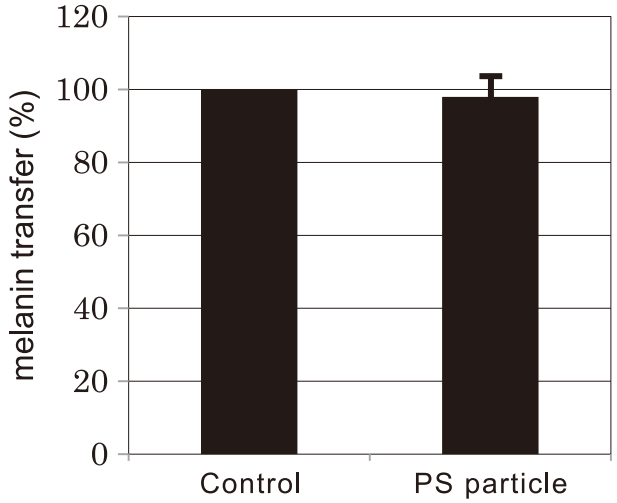



図５　メラニン移行に対する微粒子の影響
メラノサイトからケラチノサイトへのメラニン顆粒の移行は、メラノサイトを負電荷ポリスチレン粒子存在下で培養することによって、有意の影響を受けなかった（mean±SD, n ＝ 4）。

### ３．３　ケラチノサイトへのメラニン移行に対するナノ粒子の影響

負電荷をもつ粒子が、細胞内への取込みが見られたので、この粒子のケラチノサイトへのメラニン移行に対する影響を調べた。ポアサイズ１μmのメンブレンをもつセルカルチャーインサートの片面にケラチノサイトを培養し、さらに反対面に、メラノサイトを負電荷をもった200nmのポリスチレン粒子とともに培養した。メラノサイトから移行したメラニン顆粒を定量し、ポリスチレン粒子の影響を調べた。その結果、図５のようになり、ポリスチレン粒子の存在により、有意な影響は認められなかった。

## ４．考　察

今回の研究によって、メラノサイトには分泌顆粒蛋白質であるVAMPのうち、VAMP-2、VAMP-7、VAMP-8が発現していることが明らかとなった（図１）。したがって、マイクロ粒子の表面をこれらのタンパク質（あるいは、その一部分のペプチド）で修飾することによって、メラノソームを模倣し、かつメラノソームの移行にも関与すると思われるVAMPによって、メラノソームの移行と競合できるような粒子を作成することができる。

一方、作成した粒子をデコイメラノソームとして機能させるためには、なるだけたくさんのマイクロ粒子を細胞内に取り込ませる必要がある。今回の研究によって、負電荷をもつ粒子がメラノサイト内へよく取り込まれた。細胞表面は負に帯電しているので、静電相互作用を考慮すると、正の粒子がよく取り込まれると考えられる。実際、正電荷をもつ粒子が細胞表面に多く結合した（図２）。一方、負電荷をもつ粒子は細胞表面への吸着は少なかったが、メラノサイト内には負電荷粒子の方がよくとりこまれた（図３）。多数の粒子が吸着しながら、細胞内に取り込まれる粒子が少ない理由はよくわからないが、正電荷の粒子によって細胞の形状が変化したことは（図４）、正電荷粒子の細胞毒性を示唆し、その結果、正電荷粒子の取り込みが阻害されたと考えられる。

そこで、細胞への毒性がなく、細胞内に取り込まれた負電荷粒子について、メラノサイトからケラチノサイトへのメラニンの移行への影響を調べたところ、特に有意な影響は見られなかった（図５）。原因としては、今回用いたポリスチレンビーズは、VAMP等で表面修飾をしていないため、本来メラノサイトがもつメラノソームを模倣するに十分でないことやポリスチレン粒子の取り込みが少ないこと、があげられる。一方、最近、メラニン顆粒のケラチノサイトへの移行が、エクソサイトーシスではなく、メラノサイトの細胞膜で囲まれた数個のメラノソームがエクソソームとして細胞外に放出され、それがケラチノサイトによって貪食されることを示す結果が報告された[12)]。このエクソソームによるメラノソームの移行が、全体のメラニン顆粒の移行においてどの程度寄与しているか不明であるが、エクソサイトーシスによる寄与が低いために、微粒子を取り込ませ、それをエクソサイトーシスで放出させても、メラニン顆粒の阻害がみられなかった可能性も考えられる。

我々は予備的な研究で、VAMPがメラニン顆粒の移行に関与していることを示唆する結果を得ており、エクソサイトーシスによる移行以外のメラニン移行の機構にVAMPが関与している可能性がある。もしエクソソームによる機構が主たる移行機構であるとすると、エクソソーム内に取り込まれるような修飾を微粒子に施すことによって、デコイメラノソームによるメラニン移行阻害が可能になる可能性があり、メラノソームのエクソソーム内への取り込み機構の解明を進める必要がある。

**謝　辞**

本研究の遂行にあたり、コスメトロジー研究振興財団より研究助成をいただきました。ここに感謝いたします。

**（引用文献）**

１）Van Den Bosche, K., Naeyaert, J.-M., Lambert, J. The quest for the mechanism of melanin transfer Traffic, **7**, 769-778 (2006)

２）Hibi, T., Hirashima, N., and Nakanishi, M. Rat basophilic leukemia cells express syntaxin-3 and VAMP-7 in granule membranes. Biochem. Biophys. Res. Commun., **271**, 36-41 (2000)

３）Tadokoro, S., Mamoru Nakanishi and Naohide

Hirashima Complexin II facilitates exocytotic release in mast cells by enhancing $Ca^{2+}$ sensitivity of the fusion process J. Cell Sci., 118 2239-2246 (2005).

4）Tadokoro, S., Kurimoto, T., Nakanishi, M. and Hirashima, N. Munc18-2 regulates exocytotic membrane fusion positively interacting with syntaxin 3 in RBL-2H3 cells Mol. Immunol. **44**, 3427-3433 (2007)

5）Tadokoro, S., Nakanishi, M., and Hirashima, N. Complexin II regulates degranulation by interacting with SNARE complex containing syntaxin-3 in RBL-2H3 cells Cell. Immunol., **261**, 51-56 (2010)

6）Tahara, K., Sakai, T., Yamamoto, H., Takeuchi, H., Hirashima, N. and Kawashima, Y. Improved cellular uptake of chitosan-modified PLGA nanospheres by A549 cells Int. J. Pharmaceut., **382**, 198-204 (2009)

7）Tahara, K., Sakai, T., Yamamoto, H., Takeuchi, H., Hirashima, N. and Kawashima, Y. Chitosan modified poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres for improving siRNA delivery and gene silencing effects Eur. J. Pharmaceut. Biopharmaceut. **74**, 421-426 (2010)

8）Tahara, K., Sakai, T., Yamamoto, H., Takeuchi, H., Hirashima, N. and Kawashima, Y. Improvements in transfection efficiency with chitosan modified PLGA nanospheres prepared by the emulsion solvent diffusion method, for gene delivery Chem. Pharm. Bull. **59**, 298-301 (2011)

9）Tahara, K., Tadokoro, S., T., Yamamoto, H., Kawashima, Y. and Hirashima, N. The suppression of IgE-mediated histamine release from mast cells following exocytic exclusion of biodegradable polymeric nanoparticles Biomaterials **33**, 343-351 (2012)

10）Watabe, H., Kushimoto, T., Valencia, J.C., Hearing, V.J. Isolation of melanosomes Curr. Protoc. Cell Biol. Chapter 3:Unit 3.14.(2005)

11）Kasraee, B., Pataky, M., Nikolic, D.S., Carraux, P., Piguet, V., Salomon, D., Sorg, O., Saurat, J.H. A new spectrophotometric method for simple quantification of melanosomal transfer from melanocytes to keratinocytes. Exp. Dermatol. **20**, 938-942 (2011)

12）Ando H, Niki Y, Yoshida M, Ito M, Akiyama K, Kim JH, Yoon TJ, Matsui MS, Yarosh DB, Ichihashi M. Involvement of pigment globules containing multiple melanosomes in the transfer of melanosomes from melanocytes to keratinocytes. Cell Logist. **1**, 12-20 (2011)

# 皮膚に存在する環境センサーTRPVチャネルを介した保湿関連物質の分泌制御機構の解明

愛知学院大学　薬学部　薬効解析学講座

村木　克彦

Recent studies demonstrate that TRPV3, TRPV4, and TRPA1 channels could be useful targets in skin health and cosmetology fields because of their highly expressions in human keratinocytes. Here we examined $Ca^{2+}$ response of HEK293 cells transfected with wild-type TRPV4 (HEK-wTRPV4) and a novel variant of TRPV4 (HEK-vTRPV4) to TRPV4 agonists to determine molecular targets of these agonists on TRPV4. When 4α-phorbol 12,13-didecanoate, an well-known standard TRPV4 agonist, was cumulatively applied to HEK-wTRPV4 and HEK-vTRPV4, intracellular $Ca^{2+}$ concentration was increased in both TRPV4 transfectants in a similar manner. In contrast, a novel and potent TRPV4 agonist, GSK, induced a small $Ca^{2+}$ response in HEK-vTRPV4, while highly effective on HEK-wTRPV4. Moreover, activation of TRPV4 potentiated cell-proliferation, hence suggesting that amino acids mutated in vTRPV4 are putative binding sites of GSK and the activation of TRPV4 by its potent agonists may change the barrier function.

## 1．緒　言

正常な皮膚機能の維持において、皮膚の保湿は極めて重要であり、保湿作用を有する機能性香粧品の開発が精力的に進められ、実用化されてきた。またアトピー性皮膚炎や皮膚乾皮症などの治療補助薬としても、皮膚保湿薬は重要な位置を占め、とくに近年、急増するアレルギー性のアトピー症候群への治療補助薬として、より効果的で作用持続時間の長い保湿薬の開発が求められている。またこうした皮膚疾患では炎症も重なることが多く、炎症と保湿との関連も注目されている。しかしこれまでの保湿薬は、皮膚表面からの水分消失防御が主であり、皮膚での水分、コラーゲン、脂質成分の分泌を制御することで保湿を実現した例はほとんどない。

Ca透過性のバニロイド型TRPカチオンチャネル（TRPVチャネル）は温度変化や圧力、浸透圧変化を感知する環境センサーであり、皮膚をはじめ全身の組織に分布する[1]。最近、TRPVチャネルの一種であるTRPV3チャネルやTRPV4チャネルが、皮膚組織に発現し、皮膚の水分透過性を制御していることが明らかとなってきた[2, 3]。そこで本研究では、ヒト表皮角化細胞におけるTRPV3チャネルおよびTRPV4チャネルを介したコラーゲンや脂質成分などの保湿関連物質の分泌機構および水分保湿との関連を明らかにすることを目指し、ヒト表皮角化細胞におけるTRPVチャネル遺伝子発現の検討やTRPV4チャネル刺激薬開発の際に鍵となる刺激薬のチャネル結合部位の同定を試みた。さらにTRPV4の活性化が細胞増殖に与える影響に関しても検討した[4]。

またTRPV4と同様にヒト表皮角化細胞に高発現するTRPA1チャネル[5]と炎症刺激の関係や臨床応用薬物のTRPA1チャネルに対する効果についても検討したので併せて報告する[6, 7]。



Secretion of skin moisture-related substances mediated by environmental sensor TRPV channels in keratinocyte

Katsuhiko Muraki

Laboratory of Cellular Pharmacology, School of Pharmacy, Aichi-Gakuin University

## 2．実　験

### 2.1　細胞培養

ヒト胎児腎由来細胞株（HEK293細胞）はヒューマンサイエンス研究資源バンクより入手した。ヒト表皮角化細胞、ヒト滑膜細胞、ヒト脳毛細血管内皮細胞はCell Applicationsより入手した。HEK293細胞及びヒト表皮角化細胞はDMEMに100U/mlペニシリンG、100μg/mlストレプトマイシン及び10％非働化FBSを加えて、5％ $CO_2$ 存在下37℃で培養した。ヒト滑膜細胞[6]およびヒト脳毛細血管内皮細胞[4]については、専用培地で培養した。

### 2.2　発現プラスミド調製

HEK293細胞にLipofectamine™2000（invitrogen）を用いて、pIRES-TRPV4WT（野生型ヒトTRPV4）およびpIRES-TRPV4VT（変異型ヒトTRPV4）、pIRES-TRPA1（TRPA1）を標準のプロトコールによりトランスフェクションし、24時間から48時間以内に実験に供した。

### 2.3　細胞内Ca濃度測定

細胞内カルシウム濃度（$[Ca^{2+}]_i$）測定には、蛍光指示薬としてfura-2 acetoxymethyl ester（fura-2AM）を用いた[8]。細胞内色素を340nm及び380nmの励起光で励起し、放出された510nmの各々の蛍光を高感度カメラで取得した後、その蛍光強度比を算出した。細胞内Ca濃度測定実験では

以下の細胞外液を使用した（mM）。正常HEPES溶液（mM）：NaCl 137，KCl 5.9，$CaCl_2$ 2.2，$MgCl_2$ 1.2，glucose 14，HEPES 10（pH7.4 with NaOH）。実験はすべて室温（25±1℃）で行った。

### 2．4　RNA抽出と逆転写酵素反応

AGPC法によりヒト表皮角化細胞からtotal RNA を抽出し（0.2μg/μlに調製）、標準のプロトコール（Applied Biosystems社）により逆転写反応を行った。PCR法による遺伝子の増幅には文献中のプライマー（human）を使用した[7]。

### 2．5　DNA合成反応の定量

5-bromo-2'-deoxyuridine（BrdU）のDNAへの取り込みを標準プロトコールにより測定した[4]。

## 3．結　果

### 3．1　ヒト表皮角化細胞におけるTRPVチャネルの発現

ヒト表皮角化細胞におけるTRPVチャネルの遺伝子発現を検討したところ、報告されているようにTRPV4チャネルが高発現していた。またカプサイシン感受性のTRPV1チャネルも高発現していた。一方、発現が報告されているTRPV3チャネルについては、その発現レベルは低かった（図示せず。中間報告図1で発表済み）。

### 3．2　野生型TRPV4チャネルおよび変異型TRPV4チャネルに対するTRPV4チャネル刺激薬の効果

次にヒト表皮角化細胞に高発現するTRPV4チャネルの新規刺激薬の開発を目指し、既存のTRPV4チャネル刺激薬のチャネル作用部位の同定を試みた。野生型および変異型TRPV4チャネル遺伝子をHEK293細胞に強制発現し、細胞内Ca濃度測定法によりTRPV4チャネルの活性変化を検討した。TRPV4チャネル刺激薬4α-phorbol 12,13-didecanoate（4αPDD）を0.03μMから3μMまで野生型および変異型TRPV4チャネルを発現させたHEK293細胞に投与したところ、濃度依存的な細胞内Ca濃度の上昇が観察され、その50％有効濃度は野生型および変異型TRPV4チャネルとも約0.3μM程度であった（図示せず。中間報告図2で発表済み）。このことから4αPDDは野生型および変異型TRPV4チャネルに同等に作用すると考えられる。

一方、強力なTRPV4刺激薬のGSKを3nM投与したところ、野生型TRPV4チャネル発現細胞では大きな細胞内Ca濃度の上昇が観察されたが、変異型TRPV4チャネル発現細胞では、その細胞内Ca濃度上昇効果は小さかった（図示せず。中間報告図3，4で発表済み）。このことから、変異部位はGSKの作用に極めて重要なアミノ酸部位と推定される（論文準備中）。

### 3．3　TRPV4チャネルの活性化による細胞増殖作用

最近、TRPV4チャネルが皮膚組織に発現し、皮膚の水分透過性を制御していることが報告されている[2, 3]。そこで皮膚と同じく物質の透過性制御に重要な役割を果たすヒト脳毛細血管内皮細胞を用いて、TRPV4チャネル活性が細胞増殖に与える影響について検討した。BrdUのDNAへの取り込みを指標にDNA合成を検討したところ、対照に比べ0.3μMおよび1μM 4αPDD処理で、それぞれ約30％および約40％ DNA合成が促進した（表1[4]）。また4αPDD処理で細胞数も有意に増加した[4]。TRPV4チャネルの活性化は、細胞増殖を促すことで、ヒト脳毛細血管内皮細胞の細胞間接着を増強する可能性がある。

### 3．4　炎症刺激によるTRPA1チャネルの発現増加

炎症反応においてサイトカイン類は中心的な役割を担う。皮膚組織の炎症時にもインターロイキンIβ（IL-1β）や腫瘍壊死因子α（TNF-α）などが炎症反応のメディエーターとして関与することが知られている。そこでIL1やTNF-αなどの炎症性サイトカイン刺激を受けたとき、TRPV4チャネルやTRPA1チャネルの発現が変化するか検討した。その結果、ヒト滑膜細胞をIL1αやTNF-αで24時間刺激すると、TRPA1チャネルの遺伝子発現は数百倍増加した[6]。また炎症時には発現増加したTRPA1チャネルが自律的に活性化され、炎症刺激で増加したIL-6やIL-8の産生を抑制していることが明らかとなった[6]。

### 3．5　臨床応用薬物によるTRPA1チャネルの活性化

皮膚組織を構成する細胞にTRPV4チャネルやTRPA1チャネルが高発現していることから、臨床応用されている薬物がこれらのイオンチャネルを活性化することで薬効あるいは副作用を引き起こしている可能性がある。リウマチの治療薬として臨床応用されているオーラノフィン（AUR）は0.1～5％の患者で皮膚掻痒感や発疹を引き起こすことが知られている。そこでTRPV4およびTRPA1チャネルに対するAURの作用について検討した。その結

表1　ヒト脳毛細血管内皮細胞におけるTRPV刺激薬（4αPDD）誘発の細胞増殖促進作用

細胞増殖作用をBrdUのDNAへの取り込みとして評価した。対照（薬物非投与群）を100として、薬物投与群の変化を％表示した。

| | |
|---|---|
| 対照 | 100 |
| 0.3μm 4αPDD | 127±4 |
| 1μm 4αPDD | 140±6 |

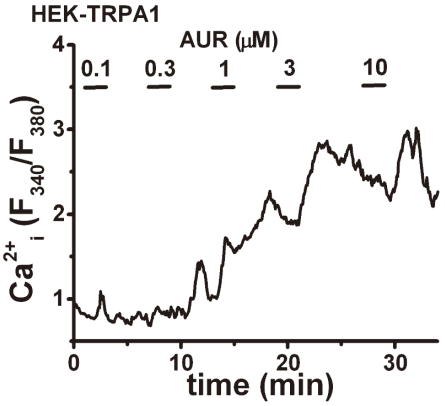



図１　HEK-TRPA1 細胞における AUR 誘発の細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度上昇効果
細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度（$Ca^{2+}_i$（F340/F380））を測定下、AUR を 0.1μM から 10μM まで段階的に投与した。代表的な変化を示す。

果、図１に示すようにTRPA１チャネル発現細胞（HEK-TRPA１）にAURを投与したところ、TRPA１チャネルの活性化による濃度依存的な細胞内Ca濃度の増加が観察された[7]。AURの血中濃度は約20μMと報告されていることから、皮膚組織に存在するTRPA１チャネルがAURにより活性化され、掻痒感を引き起こしている可能性が示唆された。一方、AURはTRPV４チャネルには無効であった[7]。

## ４．考　察

皮膚組織に発現するTRPV３チャネルやTRPV４チャネルは、皮膚の水分透過性の制御に関わることが報告されている[2, 3]。皮膚の保湿は正常な皮膚機能の維持に極めて重要であることから、TRPV３チャネルやTRPV４チャネルを標的とした新規の保湿薬や皮膚機能改善薬の開発が進むと考えられる。本研究で報告した変異型TRPV４チャネルは、現在知られている最強のTRPV４活性薬GSKの作用部位が変異したことで、GSKに低感受性となったと考えられ、今後、このアミノ酸を標的とするさらに高い活性と特異性をもつTRPV４チャネル活性薬が開発できると期待される。

またTRPV４チャネルの活性化は細胞増殖を促進した。細胞増殖の亢進は細胞間隙の減少、すなわち細胞間隙を介する物質透過を減少させる可能性がある。ヒト毛細血管内皮細胞で観察されたこの現象が、皮膚組織でも観察されるか、今後検討する必要がある。

一方、炎症刺激によりTRPA１チャネルの発現が劇的に増加した。TRPチャネルの発現変化と炎症反応がリンクすることを明確に示した結果であり、今後、さらにこの病態生理学的意義を解明する必要がある。一方、臨床応用されているオーラノフィンがその適用濃度範囲内で、強力にTRPA１チャネルを活性化することを見出した。多くの薬剤でその副作用として、掻痒感や発疹の発生が報告されている。皮膚組織に発現したTRPV４チャネルやTRPA１チャネルがその標的となっている可能性もあり、副作用発現率の高い薬剤については、こうしたチャネルへの作用を早急に検討すべきである。

**謝　辞**

本研究はおもに愛知学院大学 薬学部 薬効解析学講座 波多野紀行博士、鈴木裕可博士との共同研究として実施したものである。支援を頂きましたコスメトロジー研究振興財団に深謝致します。

**（引用文献）**

１）M.J. Gunthorpe, C.D. Benham, A. Randall, J.B. : Davis, The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels, Trends Pharmacol.Sci., 23, 183-191, 2002.
２）M. Denda, T. Sokabe, T. Fukumi-Tominaga, M. Tominaga, : Effects of skin surface temperature on epidermal permeability barrier homeostasis, J.Invest. Dermatol., 127, 654-659, 2007.
３）S. Mandadi, T. Sokabe, K. Shibasaki, K. Katanosaka, A. Mizuno, A. Moqrich, A. Patapoutian, T. Fukumi-Tominaga, K. Mizumura, M. Tominaga, : TRPV３ in keratinocytes transmits temperature information to sensory neurons via ATP, Pflugers Archiv: E.J.Physiol., 458, 1093-1102, 2009.
４）N. Hatano, H. Suzuki, Y. Itoh, K. Muraki, TRPV４ partially participates in proliferation of human brain capillary endothelial cells, Life Sci., 92, 317-324, 2013.
５）R. Atoyan, D. Shander, N.V. Botchkareva, Non-neuronal expression of transient receptor potential type A１ (TRPA１) in human skin, J.Invest.Dermatol., 129, 2312-2315, 2009.
６）N. Hatano, Y. Itoh, H. Suzuki, Y. Muraki, H. Hayashi, K. Onozaki, I.C. Wood, D.J. Beech, K. Muraki, Hypoxia-inducible Factor-１alpha (HIF１alpha) Switches on Transient Receptor Potential Ankyrin Repeat １ (TRPA１) Gene Expression via a Hypoxia Response Element-like Motif to Modulate Cytokine Release, J.Biol.Chem., 287, 31962-31972, 2012.
７）N. Hatano, H. Suzuki, Y. Muraki, K. Muraki, Stimulation of human TRPA１ channels by clinical concentrations of the anti-rheumatic drug, auranofin, Am.J.Physiol., Cell Physiol., 304, C354-C361, 2013.
８）Y. Itoh, N. Hatano, H. Hayashi, K. Onozaki, K. Miyazawa, K. Muraki, An environmental sensor, TRPV４ is a novel regulator of intracellular $Ca^{2+}$ in human synoviocytes, Am.J.Physiol., Cell Physiol., 297, C1082-1090, 2009.

# Ⅲ． 精神、文化に関する分野

# 分子の物理化学的特徴に基づく複合臭の快適性の予測

東京大学先端科学技術研究センター
神崎　亮平，並木　重宏

We propose several approaches to quantify olfactory perception. First we investigated the difference in physicochemical properties between general odors and odors used for fragrance. This enables us to predict whether untested odor is suitable as a component of fragrance to some extent. Second, we established a method to predict the response of olfactory receptors by use of physicochemical property. Third we investigated the relationship between mixture perception and component variability and found that the perception for mixture being composed of the similar odors show low dependency to concentration change. These data may contribute further understanding for the perception to multicomponent odors.

## 1. 緒　言

嗅覚は物理量から知覚を予測することができない唯一の感覚である．視覚における光の波長や聴覚における音の振動数などと異なり，一般に匂いを説明する単一の物理量はない．ヒトでは三百種類以上の嗅覚受容体によって，匂い物質のさまざまな特徴が捉えられ，化学信号は電気信号に変換され脳へ伝達され，処理をされて匂いとして知覚される．これまでに生物学や心理学において，嗅覚を予測するさまざまな試みがなされれ，分子量，官能基，炭素鎖長，親和性などの分子の物理化学的特徴と匂いの知覚がある程度対応することが報告されている[1−5]．単一の物理化学的特性に着目し，匂い知覚の予測が試みられたものの，いずれも多様な匂い物質の全てに適用可能なルールの発見には至らず，未知の匂い物質に対する知覚を予測する方法はこれまでに確立されていなかった．

最近，特定の物理化学的特性に着目するのではなく，体系的に記述された物理化学的特性を縮約した値を用いた匂い知覚の予測が試みられている．Noam Sobelらは，匂いの快適性の官能評価は，嗅覚研究者・調香師が評価し100種類の匂いの心理学的記述子を多変量解析によって縮約した値と相関することを報告した[6]．さらにこの値が，約1,500個の物理化学的特性を縮約した値と相関し，この測定基準を用いることで，匂いの快適性を従来よりも高い精度で予測可能であることを示した．つまり，匂い物質の物理化学的特性を最もよく説明する官能評価値は匂いの快適性であると主張した．さらにこの測定基準を用いることで，人間の匂いの知覚だけでなく，動物の匂いへの嗜好性，嗅覚受容体の応答特性が説明可能であることも報告されている[7, 8]．このように物理化学的特性に基づく生体応答の予測は有用である．実世界では匂いは基本的に複合臭として存在するが，この方法論に基づき，複合臭の匂いの知覚を予測する試みは行われていない．

申請研究においては，複合臭に対する快適性の値を，物理化学的特性を用いて予測する方法論が妥当であるかどうか，特に快適性の濃度変化に対する安定性に着目して問題を設定し，検討した（3．3項）．インドールなどの匂いは，濃度が薄いとよい芳香であるが，濃度が高いと一般に悪臭である．また，コーヒーの香りは濃度が大きく変化してもやはりコーヒーの匂いとして知覚することができる．複合臭の快適性を予測する最初のステップとして，解析の比較的容易な濃度に対する安定性と，構成成分の数，その多様性との関係を検討した．また関連する項目として，分子記述子に基づく香料成分の分類（3．1項），分子記述子に基づく嗅覚受容体応答の予測についても報告する（3．2項）．

## 2. 実　験

### 2．1　分子記述子による香料の分類

一般の匂い物質と，香料成分に用いられている物質を分子の構造から，これらを判別可能であるか否かを検証した．それぞれの匂い物質に対しては，米国国立衛生研究所（National Institute of Health, NIH）の国立生物工学情報センター（National Center for Biotechnology Information, NCBI）管理のPubChemなどの化学物質データベースより分子構造を得，分子計算ソフトウェアDRAGON（Talete, Germany）[9]を用いて分子記述子を求めた．主成分分析を行い，累積寄与率が80％を超える第10主成分までを用いて線形判別分析を行った．主成分分析は，複数の変数間の相関を少数の合成変数で説明する手法であり，共分散行列の固有値問題の解として得ることができる．それぞれの次元は無相関となる．主成分分析は複雑な多次元データの解釈に用いられる．



*
Predicting odor pleasantness for olfactory mixture based on physicochemical property
Ryohei Kanzaki*, Shigehiro Namiki
Research Center for Advanced Science and Technology, The University of Tokyo

### 2．2　ニューラルネットワークによる嗅覚受容体応答の予測

動物の中で嗅覚受容体の性質が最もよく分析されているショウジョウバエのデータを利用し[10]，分子記述子から嗅覚受容体の応答が予測できるか否かを検証した．3層のニューラルネットを用い，入力に分子情報，出力に受容体の応答パターンを用いて誤差逆伝搬法による学習を行った．受容体の応答に強く影響する分子情報の抽出を行なうため，出力に対する入力の影響度を感度解析[11]により計算を行った．入力が微小量だけ変化したときの出力の変化分に着目し，感度係数の絶対値がある一定値（閾値）以上である分子情報のみを学習器の入力とした場合と，全ての分子情報を入力した場合との予測の精度を比較した．

### 2．3　匂いの官能評価

匂いの快適性を調査するために官能評価実験を行った．心理学実験は東京大学ライフサイエンス委員会倫理審査委員会判定報告（11-59）の許可を得て行われた．快適性に着目した理由は，様々なニオイを複数の形容詞や記述語で，ニオイの評価の専門家ではない人々に評価させたものを多変量解析した研究から，快不快に関する評価軸が第一に抽出されると報告されており[6]，快適性がニオイの官能値の中で最も予測しやすいと先行研究で指摘されているためである．匂い袋の中に試薬を注入し，充分な時間をおいて気化させた．順に希釈することによって異なる濃度を用意した．試験前に匂い袋の嗅ぎ方について練習を行った．刺激の順序はランダムとし，被験者のビジュアルアナログ尺度を測定した．匂いに対する順応を防ぐため，試料提示の間に1分間の間隔を設けた．匂い物質は，単一の化合物を含む場合と，5種類の異なる化合物を含む複合臭を5点，10種類の異なる化合物を含む複合臭を1点，精油を1点用意した．各試料につき4段階の異なる濃度で試験し，官能評価値の不安定性の尺度としてレンジを使用した．レンジが大きいほど，評価値が不安定であり，小さいほど安定であると考えられる．

## 3．結　果

### 3．1　分子記述子による香料の識別

匂い物質の物性によって，匂いの知覚に影響があるかどうかを検証した．このため香料として使用されている匂い物質と，一般的な匂い物質の比較を行った．一般的な匂い物質として，ショウジョウバエの嗅覚生理学の実験において用いられた108種類の匂い物質を用いた[12]．線形判別分析を用いて，一般の匂い物質と香料成分を判別する関数を求めた．分子記述子に基づいて，両者を判別可能であった（誤判別率14.4%，図1）．このことは，香料成分として用いられている匂い物質が，一般的な匂い物質とは異なる物理化学的特徴を有することを示唆する．実際に判別に寄与する因子は多く存在し，分子量や極性などの記述子を含む．また，感度係数の絶対値が閾値以上となる分子記述子の数について調べた．

### 3．2　嗅覚受容体応答の予測

ニューラルネットワークを用いて，分子記述子を入力とし，嗅覚受容体応答の予測を行った（図2）．作成したニューラルネットワークの出力を予測値として，データベース上の実測値とのピアソン積率相関係数を求め，予測精度の指標とした．さらに個別に除いた場合の予測精度の変化によって，分子記述子の選別を行い，予測精度の高い分子記述子の組み合わせを決定した．

### 3．3　匂いの安定性と複合臭構成成分の多様性

単一成分に対する匂いの快適性の濃度に対する不安定性は，複合臭と比較して有意に高かった（$1.10 \pm 0.30$ [$n=5$], $0.60 \pm 0.41$ [$n=7$] for single odor & odor mixture; $P<0.05$, Mann-Whitney $U$ test）．複合臭では濃度変化に対して知覚がより安定であることが示唆された．続いて3．1で得られた嗅覚受容体応答の予測器を用い，複合臭を構成する要素臭の多様性を，物理化学的特徴でなく，予測される嗅覚受容体応答によって評価した．すなわち，嗅覚受容体を活性化させるパターンが似ている場合や，多様である場合を単一の尺度で評価することを試みた．実際には応答パ

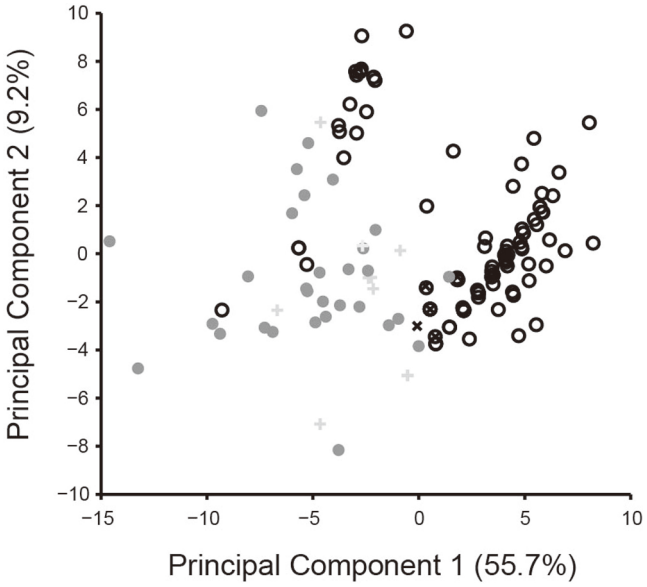



図1　分子記述子に基づく一般的な匂い物質および香料成分の判別

一般臭および香料成分が正しく判別された例（○，●），誤って判別された例（×，＋）を示す．236個の分子記述子に基づき主成分分析を行った．縦軸・横軸は各匂い物質の第一主成分・第二主成分を表し，それぞれの寄与率は55.7%および9.2%であった．誤判別率は14.4%であった．

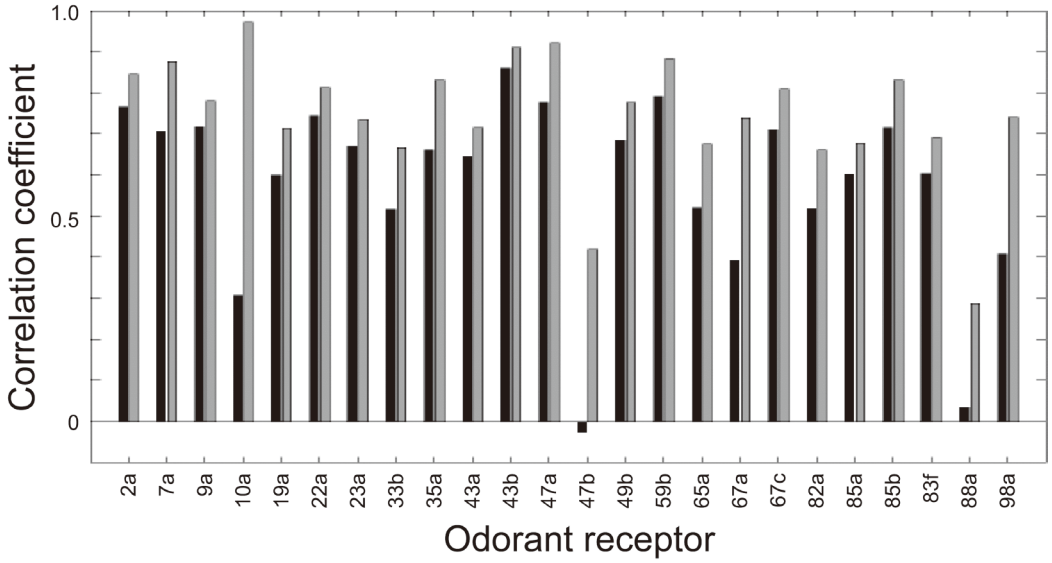



図２　分子記述子に基づく嗅覚受容体応答の予測

黒色は全ての分子情報を利用した場合，灰色は感度解析によって選抜した分子情報を使用した場合の予測値と実測値の相関係数の値を示す．

ターンを，各受容体応答を要素とするベクトルとし，ベクトル間の平均距離を尺度として用いた．嗅覚受容体応答が類似の場合であるほど安定であり，多様な要素臭を含む場合では，濃度に対する知覚の変化が大きいことが分かった（図３）．

## 4. 考　察

３．１においては，香料成分が一般的な匂い物質とは異なる物理化学的特徴を持つことを示した．今回作成した識別器を用いることで，未知の匂い物質に対しても香料成分としての適性を評価できる可能性がある．

３．２においては，嗅覚受容体の応答の予測を行った．これまでにも物理化学的特徴に基づく受容体応答の予測は行われていたが，本研究ではニューラルネットワークの感度解析を用いることにより，予測精度を概ね向上させた．Or47b, Or88aなどの一部の受容体では，感度解析によっても予測精度が改善されなかった．先行研究では，これらの嗅覚受容体を強く活性化させる匂い物質が発見されておらず[12]，未知のリガンドのデータが取得されれば，予測精度が改善されると考えられる．将来的に嗅覚バイオセンサが実用化された場合に，この予測器を用いて事前に応答性を予測することで，設計を効率化することが期待される．

３．３においては，複合臭の構成要素の多様性と匂い知覚の安定性について検証した．その結果匂いの快適性は，複合臭では，単一成分臭に比べて匂いの濃度変化に対して安定であること，この安定性は，複合臭を構成する要素臭の組み合わせで決まる可能性があることを示唆した．分子記述子に基づいた予測では，嗅覚受容体への応答性に影響を与えるか否かが考慮されないために，ノイズを含んでいる可能性があるが，嗅覚受容体の応答性に基づくことでより精度の高い予測を行うことができる可能性がある．

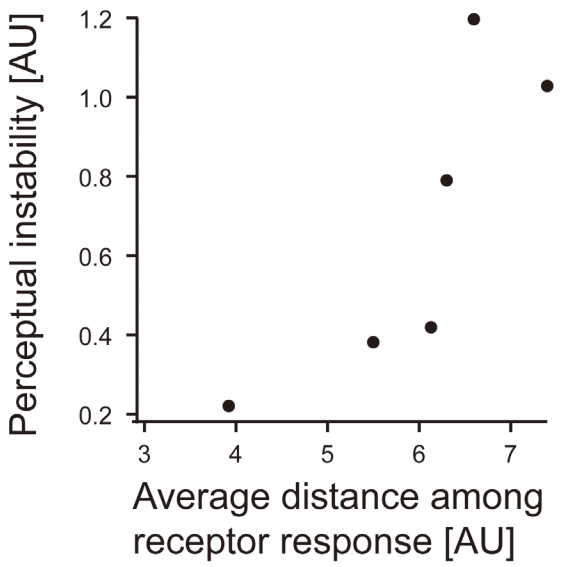



図３　嗅覚受容体応答と官能評価値の不安定性の関係

複合臭を構成する要素臭に対して予測される嗅覚受容体の応答を求めてベクトルとし，ベクトル間の距離を平均した値を横軸に，対応する匂いの不安定性を縦軸にとった．$r = 0.82$, $P < 0.05$.

今回の結果は，匂いの快適性に注目したものである．快適性は匂い物質の多様性を最もよく説明する心理学的な尺度であるが，複合臭における知覚の安定性の獲得が一般的

であるか否かは，その他の心理学的記述子についても同様の試験を要する．

**（引用文献）**


1）Amoore JE: Stereochemical and vibrational theories of odour. Nature 233(5317):270-271, 1971.

2）Wright RH: Odor and molecular vibration: neural coding of olfactory information. J Theor Biol 64(3):473-502, 1977.

3）Ohloff G: Chemistry of odor stimuli. Experientia 42(3):271-279, 1986.

4）Aranda RC, Kini AD, Firestein S: The molecular receptive range of an odorant receptor. Nat Neurosci 3(12): 1248-1255, 2000.

5）Zarzo M: Psychologic dimensions in the perception of everyday odors: pleasantness and edibility. J Sens Stud 23(3): 354-376, 2008.

6）Khan RM, Luk CH, Flinker A, et al: Predicting odor pleasantness from odorant structure: pleasantness as a reflection of the physical world. J Neurosci, 27(37):10015-10023, 2007.

7）Haddad R, Khan R, Takahashi Y, Mori K et al: A metric for odorant comparison. Nat Methods, 5(5): 425-429, 2008.

8）Saito H, Chi Q, Zhuang H, Matsunami H, Mainland JD: Odor coding by a mammalian receptor repertoire. Sci Signal 2: ra9, 2009.

9）Tetko IV, Gasteiger J, Todeschini R, Mauri A et al: Virtual computational chemistry laboratory—design and descriptioin. J Comput Aided Mol Des 19(6):453-463, 2005.

10）Galizia CG, Munch D, Strauch M, Nissler A, Ma S: Integrating heterogeneous odor response data into a common response model: A DoOR to the complete olfactome. Chem Senses, 35(7):551-563, 2010.

11）Aoyama T, Ichikawa H: Obtaining the correlation indices between drug activity and structural parameters using a neural network. Chem Phamaceut Bull 39(2):372-378, 1991.

12）Hallem EA, Carlson JR: Coding of odors by a receptor repertoire. Cell, 125(1):143-160, 2006.

# 自己顔に対する意識に関する研究

北海道大学病院咬合系歯科矯正歯科
日下部　豊 寿

There are many orthodontic patients who are expecting an improvement of esthetic facial appearance with a focus on their mouth. But the preference of the face is various, and the estimation of facial aesthetics is highly dependent on personal preference. Then it will be very important to know how the orthodontic patients are aware of their own facial appearance. The purpose of the present study was to investigate how laypersons are aware of their own faces via a questionnaire.

The selected subjects were 25 females aged from 20 to 27 years old, who are 3rd and 4th –year dental students in Hokkaido University. All subjects are asked to fill out a questionnaire about awareness of their own facial appearance describing focusing on the visual impression of 25 points of their faces, the subjects are asked to select one from 5 degree criteria of satisfaction (1: satisfied, 2: somewhat satisfied, 3: neither satisfied nor dissatisfied, 4: somewhat dissatisfied, 5: dissatisfied). The distance between upper / lower lips and E-plane were measured from the lateral facial photographs of the subjects. After that, the subjects are asked to choose the most favourite facial one from 8 silhouettes of face they have lips anteriorly / posteriorly positioned every 2mm from the average profile in Japanese.

(1) The degree of dissatisfaction was a little higher in the point of “Overall impression of the profile”, “Outline of the profile” and “Nose” and so on. (2) The average upper and lower lip positions are 1.09mm and 0.15mm anterior to the E-plane, respectively. (3) Laypersons prefer the silhouette which has posterior lips position to the E-plane.

Laypersons felt a little dissatisfaction for their own profile. And they preferred posterior lips position regardless their own facial appearance.

## 1．緒　言

近年、日本人の歯科矯正治療（きれいな歯並びとしっかり噛めるかみ合わせを作る治療）に対する意識が向上し、虫歯の治療だけではなく凸凹になった歯並びや三次元的に顎の位置がずれているかみ合わせを治す歯科矯正治療を希望する患者が増加している。特に、成人になってから矯正治療を希望する患者数は大きく増加している[1)]。歯科矯正治療のゴールは「きれいな歯並びを獲得する」という目的のみならず、正しい口腔機能を達成するための「正しいかみ合わせ（個性正常咬合）」を確立するという目的がある。また、近年ではかみ合わせの善し悪しが健康長寿に深く関連するとも考えられていることから、医科からも注目を集める部分である。一方、歯科矯正治療は歯並びやかみ合わせの改善と同時に歯と口唇との相互位置も変化することから、口元を中心とした顔貌の改善を主訴として治療を期待する患者も少なくない。口元は側貌の美しさを決める上で重要な意味を持つと考えられており、歯科矯正治療ではTweedが「顔面線（横顔）の調和」を治療目標の1つに掲げるなど、実際の治療ゴールを考える上では側貌（横顔）形態が歯科矯正学においては重要な位置づけにある。この側貌形態の計測には、Tweed分析[2)]や一般的にも有名なRickettsのEsthetic line（E-line）[3)]などの軟組織分析がある。顔面は頭蓋骨や顔面骨さらには顎骨などの骨組織の上に多種多様の筋肉や脂肪がのっており、この上に皮膚組織がのって軟組織を形成している。さらに、上下顎骨にある歯槽骨には歯が植立しており、この位置が口唇の状態を決める大きな要因となる。このため、側貌を考える時にはこれら歯や骨組織や筋肉、さらには皮膚や脂肪組織なども大きく影響することを踏まえる必要があることは言うまでもない。これを背景に、歯科矯正治療では側面のレントゲン写真（セファログラム）から硬軟組織に関わる各種解析を行い、いわゆる「美しい横顔」を一つのゴールとして提案している。しかし、(1) 日本人はそもそも横顔に対する認識が強くないという報告[4)]、(2) 各種メディアの普及により美しさに対する認識がボーダーレスになってきている可能性があること、(3) 顔面軟組織形態は骨格に大きく左右されること、(4) ほうれい線の問題などagingに対する認識が強くなっていること、など、従来からある古典的な手法のみで美しさを判断、提案するには不十分と言わざるを得ない環境に直面している。これまでの研究手法では「術者が」あるいは「一般人が」他人の側貌に関してどのような印象を持つかというものが主体であったが、そもそも自分自身が自分の顔をどのように感じているのか、という視点に欠けるものであった。このようなことを背景に今回、術者サイドからのretrospectiveな研究ではなく、「一般人や矯正患者が自分自身の自己顔に対してどのような意識を



Investigation of Consciousness for Own Facial Appearance
Toyohisa Kusakabe
Clinic of Orthodontics, Oral Rehabilitation, Hokkaido University Hospital

もっているのか、また、これが本人の顔面軟組織形態とどのような関連にあるのか、さらにこれらの個々人がどのような顔貌を好むのか、を明らかにすること」とした。

## 2．実　験

### (1) 対　象

本研究は北海道大学病院倫理委員会の審査を経て行うものである。研究対象は本研究への同意がえられた18歳以上の女性で、北海道大学歯学部３年生と４年生の女性25人（20歳から27歳）を対象とした。

### (2) 顔面写真撮影方法

被験者顔貌写真を規格化して撮影した。すなわち、頭部固定を左右のイヤーロッドにておこない、被写体、カメラ間距離を1.5mとして撮影を行った。カメラはNikon社製D40にて焦点距離55ミリのレンズを用いた。さらにパソコン上での計測のため、ルーラーを同じ画面に写すこととした。顔面規格写真の撮影は正面、45度斜位、側面の方向から行った。撮影条件としては、噛んだ状態（最大咬頭嵌合位）で上下口唇を軽く触れる状態、および歯をみせる笑顔でも行った。

### (3) 資　料

撮影した画像データから等倍に印刷した側面の顔貌写真（以下側貌写真）を作成し資料とした。次に、側貌写真上で各対象のE-lineを設定し上下口唇との距離を計測した。なお、E-lineの設定は鼻尖とオトガイを結ぶ接線とした（Fig. 1）。また、計測に際しては、E-lineより前方に口唇がある場合を「+」、後方にある場合を「－」とした。

### (4) アンケート調査

被験者に対して、以下の自己顔に対する意識に関するアンケート[5]調査を行った（Table 1）。アンケートは24項目からなるが、内訳は（1）正面顔、横顔、斜め顔の印象、ア

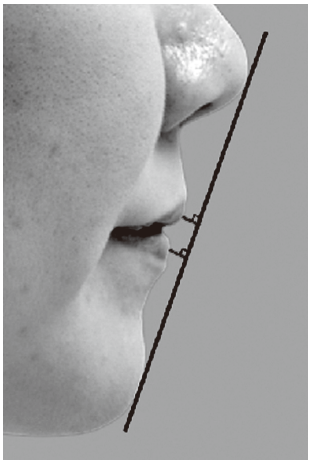


Fig. 1　E-plane

Table 1　Questionnaire

**1** 満足　**2** どちらかというと満足　**3** どちらともいえない　**4** どちらかというと不満　**5** 不満

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 正面顔全体の印象 | ( | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | ) |
| 斜め顔全体の印象 | ( | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | ) |
| 横顔全体の印象 | ( | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | ) |
| 顔の輪郭（正面） | ( | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | ) |
| 顔の輪郭（側面） | ( | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | ) |
| 顔の各部分のバランス | ( | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | ) |
| 顔の左右のバランス | ( | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | ) |
| 口元全体の印象 | ( | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | ) |
| 唇全体の印象 | ( | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | ) |
| まゆ | ( | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | ) |
| まぶた | ( | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | ) |
| 目 | ( | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | ) |
| ひたい（おでこ） | ( | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | ) |
| 鼻 | ( | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | ) |
| 耳 | ( | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | ) |
| ほほ | ( | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | ) |
| 上唇 | ( | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | ) |
| 下唇 | ( | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | ) |
| あご | ( | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | ) |
| えら | ( | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | ) |
| 歯 | ( | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | ) |
| 歯並び | ( | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | ) |
| 自分の*横顔*は好きですか？ | ( | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | ) |
| 自分の*笑顔*は好きですか？ | ( | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | ) |

ウトラインの印象、など顔全体に関する印象からなる９項目、ならびに (2) 目、鼻、口、口元、かみ合わせ、歯、唇、あご、えら、などの個々のパーツからなる15項目、とした。これらのアンケートは満足から不満までの５段階評価の尺度順位の形式をとるものである。さらに本アンケートに加えて、(3) 我々が所蔵する日本人側貌の平均シルエットを基準にE-lineをもとに上下口唇部を一塊にして前後に２mmずつ移動させて作製した８枚のシルエットと、同様にオトガイ部を前後に２mmずつ移動させて作製した８枚からなる２種類のシルエットシリーズを作製し、それぞれで「最も好ましいもの」を抽出させた (Fig. 2)。また、(4) 今までに自分の横顔を写真やビデオ等で意識してみたことがあるか、化粧の時 (髪ではなく)、横顔を意識して見たことがあるか、一日に何度くらい鏡をのぞくか、化粧の時に特に注意する点はどこか、などの日常生活に関するアンケートを行った。一方、これらのアンケートの後に先に撮影した本人の顔貌の画像データをタブレットPC (iPad 2, Apple社) 上に描出し、(5) アンケート (1), (2) 上で自己顔に対して「満足」もしくは「不満」という点数を与えた項目についての具体的内容に関しての聞きとり調査を行った。

## ３．結　果

Table 2 に各被験者のE-lineと上下口唇間距離のデータを示す。これより、全被験者のE-lineから上口唇までの距離は平均－1.1mm、同じく下口唇までの距離は－0.2mmで、各々 E-lineより後方に位置していた。

Table 3 にアンケート24項目のデータの一部を示す。これより、自己顔については「側面の全体印象」、「側面の輪郭」や「鼻」「オトガイ」などの項目で不満の程度がやや高かった。なお、これら不満の程度の高かったものとE-line からの距離との関連性を検討したが、関連性は認められなかった。

Fig. 3-1と-2に最も好ましいものとして選ばれたシルエットの度数分布表を示す。これより、口元を動かしたシリーズでは、日本人の平均顔のシルエットよりやや口唇が後方位のものが多く認められた (Fig. 3-1)。また、オトガイを動かしたシリーズでは、引っ込んだ (小さい) オトガイを好む傾向が認められた (Fig. 3-2 )。

Table 4 に、「自分の横顔を意識してみることがあるか」「化粧の時 (髪ではなく)、横顔を意識して見たことがある

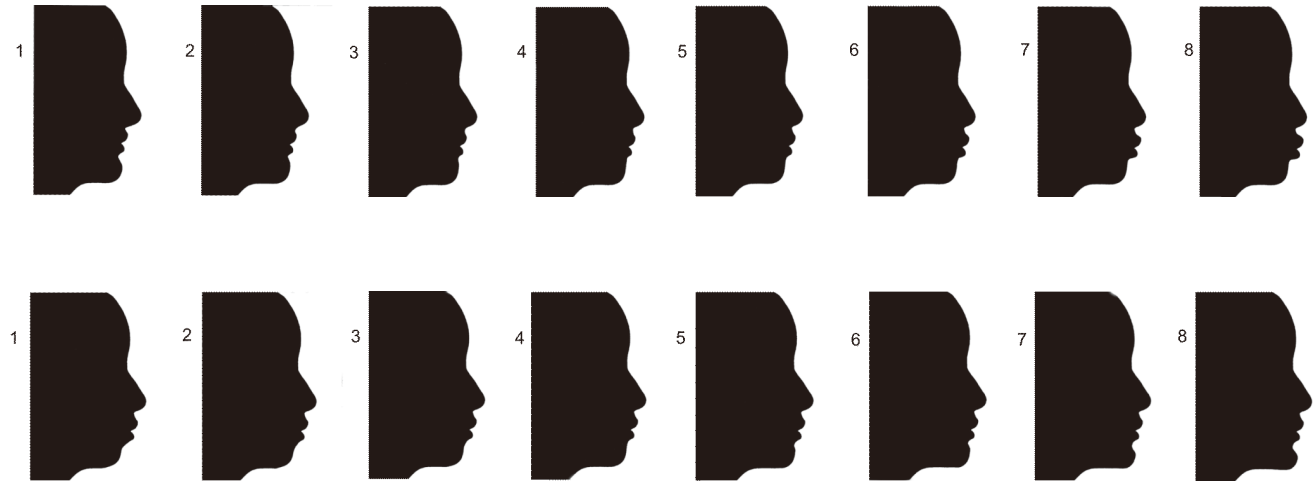



Fig. 2　Silhouettes of profile
above: upper/lower lips changing series
below: chin changing series
Silhouettes of no.5 (above) and no.4 (below) described the Japanese average one

Table 2　Distance from E-plane to upper and lower lip

| | Ave | Median | S.D. |
|---|---|---|---|
| E-plane to upper Lip | － 1.09 | － 1.2 | 1.60 |
| E-plane to Lower Lip | － 0.15 | － 0.4 | 1.87 |

Table 3　Items with over 3.0 average

| | Ave | S.D. |
|---|---|---|
| Overall Impression of the Profile | 3.52 | 0.82 |
| Outline of the Profile | 3.44 | 0.82 |
| Mouth and Its surrounding | 3.24 | 1.09 |
| Nose | 3.72 | 1.02 |
| Chin | 3.12 | 1.24 |
| Dentition | 3.28 | 1.49 |
| Bite (Anterior) | 3.2 | 1.47 |

か」という横顔の意識に関するアンケート結果を示す。これより、被験者においては自分の横顔については、あまり意識してみてはいないという傾向が示された。

## 4．考　察

近代歯科矯正学の歴史は、アメリカのAngleらが1890年代に体系を築き現在に至る。わずか100年強の歴史であるが、このなかで「歯並びやかみ合わせを治すために小臼歯を抜去し、そのスペースを利用して歯を排列するべきかどうか」という議論がおこった。もちろんできれば歯を抜去せずに並べることが望ましいことは言うまでもないが、このような場合には歯を抜去して並べる場合に比べ、概ね前歯を少し前（外側）に排列することになるため、口元の突出感が強くなったり、上下口唇の閉鎖が困難になったりという問題を生じる場合がある。このようなことを背景に口元を中心とした側貌の研究が1950年代頃から盛んに行われるようになってきた。このなかでTweed[2)]は歯科矯正治療の目的の第一に軟組織側貌の美しさをあげたため、歯科矯正治療においては咬合機能と同時にセファログラムを用いた硬軟組織形態の評価や歯と側貌とのバランスも同時に重視される傾向が強くなり、近年ではアメリカのみならず世界的にこれらの研究が多数行われるに至った。さらに、口腔内においても、歯と歯肉、口角、口唇との位置関係についても、患者からの審美的な要求は近年ますます強くなり、いわゆる「審美」に関わる部分は歯科矯正学においても大きな研究分野の一つとなっている。

これまでの研究は一般集団の個々人や歯科矯正治療を受ける患者がどのように自己顔を認識しているのか、という基本的な観点については全く検討しておらず、一般的に「美しい横顔」あるいは「矯正歯科医師が美しいと判断した横顔」といった概念に偏在しているという大きな欠点がある。このような展開は、各個人がもつ顔面形態とこれに対する意識、さらにはagingに対する顔貌の変化とこれに対する意識の変化といった人間がもつ根源的なものを網羅できない危険性を有すると考えられる。

本研究ではこれらの点を十分に考慮することで、「各個人が自分の顔を（おそらくは社会に存在するひとりの人間として）どのようにとらえているのか」を導き出すことを目的とするものであり、個々人の認識の上にいわゆる「歯科矯正治療におけるオーダーメード治療」の展開の可能性があるという認識である。

軟組織に関わる評価はいわゆる「attractiveness」や「preference」といったキーワードに深く関連づけられるため、評価そのものが困難であり、人種や文化のバックグラウンドを考慮する必要もあることから、一般的に研究対象の抽出には難しい面を有する。これに対してわれわれはこれまでにも、「自己顔」に対する「attractiveness」という観点から軟組織側貌を検討した実績を有し、この部分の研究の有用性と重要性を示唆している[5−7)]。さらにわれわれは軟組織の形態は「美しさ」という点のみならず、口唇閉鎖が可能かどうかというきわめて機能的な側面と密接に関連することを示唆しており[8, 9)]、「機能的な形は優れた形

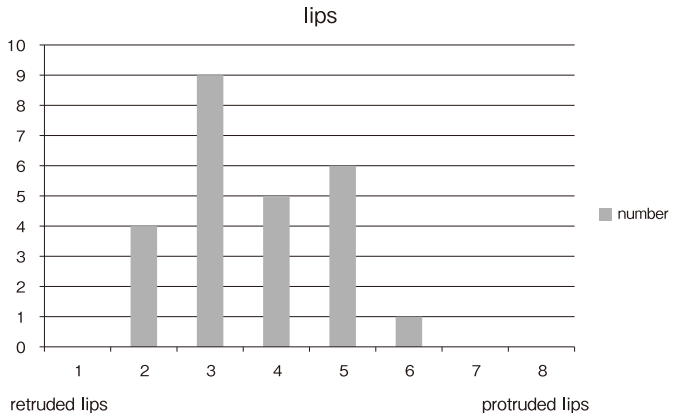



Fig. 3-1　Selected silhouette among lips changing series

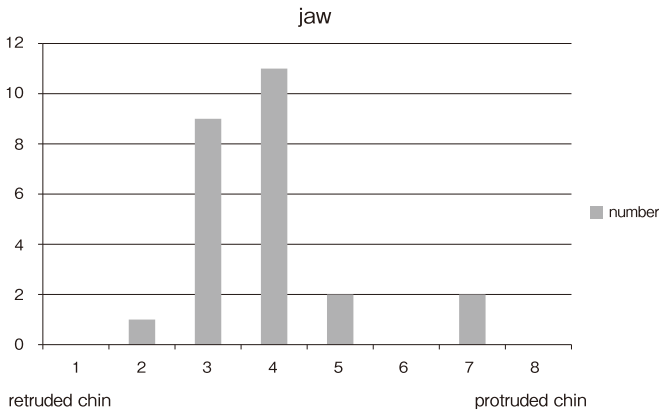



Fig. 3-2　Selected silhouette among chin changing series

Table 4　Daily consciousness to their own profile

| | Ave | S.D. |
|---|---|---|
| 今までに自分の横顔を写真やビデオ等で意識してみたことがありますか | 3.16 | 1.34 |
| 化粧の時（髪ではなく）、横顔を意識して見たことがありますか | 3.84 | 1.28 |

態美をも有する」ことは人間においても両立しうるというのが着想の発端である。

結果より、今回用いた被験者のE-lineからの平均的な口元の位置は、Ricketts の言う好ましいシルエットに近似していた。この値は過去の日本人の報告に比べややE-lineに対して後方に位置するものである。一方、自己顔の“横顔の全体印象”や“横顔の輪郭”、“口や口元周囲”、“鼻”そして“オトガイ”など横顔の印象は、やや不満に感じていた。これらの項目は概ね「横顔」に関するものであることは注視すべき点である。一般集団を用いて行ったわれわれの研究[5]ではE-lineに対する上下口唇の位置は今回の被験者よりもやや前方にあり一般的な「attractiveness」とはやや乖離していたために不満の程度が強いとも考えられた。しかし、今回の被験者は少なくともE-lineに対する上下口唇の位置はRicketts の言う好ましいシルエットに近似していたにも関わらず不満の程度が強かった。このことは、推察の域をでないものではあるが、日本人は横顔そのものへの抵抗（嫌悪）があるという見方をすることもできると考えられる。これらの被験者においては、そもそも「横顔を意識してみることがあるか」「化粧の時（髪ではなく）、横顔を意識して見たことがあるか」の問いに対しては「あまり意識していない」という回答を示す傾向がみられた。これらより、日本人にとっては、横顔の概念が非日常の概念につながり、若干の抵抗感を示すものとも考えられる。

一方、シルエットに関する好みは「口唇がE-lineよりやや後退している」「オトガイがややひっこんでいる（小さい）」ものを選択する傾向がみられた。シリーズのシルエットはE-lineを基準に作成しているが、「口唇がE-lineよりやや後退している」ことは、逆にみると鼻やオトガイが相対的に突出することになる。一方、「オトガイがややひっこんでいる（小さい）」ことは、E-lineを設定する上では口唇に近づきやすくなることから、この両者は本来同時には生じにくい。少なくとも小さいオトガイを好みながらも口元がE-lineよりも後退するためには、鼻が高い必要がある。本研究でもっとも興味深かった所見はこの点にある。自己顔という観点ではオトガイは比較的大きい集団であったが、求める顔は「オトガイが小さく、口元も引っ込んでいる」という状況と言うことになる。はたしてこのような顔貌は可能であろうか。これに対する回答として近代日本画において鏑木清方や上村松園などが得意とする「美人画」があるとわれわれは考えている。これらの「美人画」ではまさに小さなオトガイと引っ込んだ口元を有していることがわかっている。このようなことを踏まえると、現代の日本人も、日本人固有の美しさと文化的に培われてきたものへのあこがれが深層にあると考える事も可能かもしれない。なお、これら美人画ではもちろんセファログラムは有していない。このことからわれわれは別にセファログラムをもつ平均的な咬合を有する被験者から軟組織を予測する方法を確立した[10]。これらから美人画の側貌から骨格を算出すると日本人の平均的な値よりもややオトガイが引っ込んでいる（小さい）という興味深い所見が得られている。

現在、われわれは、歯科矯正治療を希望する患者と一般集団という異なる２つの集団で自己顔への意識の調査を、形態学的な観点を踏まえて行っている。これら２群は美に対する意識が異なり、矯正患者の方で意識が高いという仮説を立てている。今回用いたアンケートは、これら矯正患者が自己顔についてどのように認識し、良い点や悪い点をどのように認識しているか、あるいはそれに対してどのような「執着」をもって対応しているかがわかるものになっている。これらの集計から、自己顔に対する満足の程度の高い部分や不満の程度の高い部分が抽出されると予想している。今回は抽出できなかったが、いわゆるほうれい線については、メディアなどでも露出頻度は高い。しかしながら、形態学的な裏付けや個人の好みまで含めた検討は皆無である。これまで我々はMidofacial Line（横顔における頬の張り出し）の検討を行ってきた[7]。矯正治療を希望する患者においてはセファログラムを撮影することから、今後はさらにほうれい線に関する調査が可能になると考えられる。

以上より、本研究がコスメトロジーに及ぼす影響は下記の様に考えている。

(1) 現時点では日本人女性は必ずしも「横顔」に対する認識は強くはない。しかしながら世界的にはprofileが強調されたコスメの広告などが多くみられる。この間にある乖離を踏まえた広告宣伝の可能性が示されたと考える。
(2) 一般集団の顔貌形態とその意識から、マーケティングにおけるターゲッティングの一助となると考える。
(3) 本研究で用いたアンケートをフィードバックすることで、オーダーメードコスメが形態学の観点から実現できると考える。具体的には今後さらなる「オーダーメードコスメ」の発展が期待されるが、これにたいする解答の一部になると考える。

## ５．統　括

日本人の自己顔に関する認識においては、全般に不満の程度が強かったが、特に横顔については一般的に美しいと言われる横顔を持ちながらも不満足な印象が強い傾向を示した。一方、好みの横顔については「口元が引っ込んだもの」「オトガイが引っ込んだもの（小さいもの）」を求める傾向が強かった。

**謝　辞**

本研究を実施するにあたりご支援いただきました公益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[11, 12]。

また、本研究の遂行にあたり多大なご教授を賜りました北海道大学大学院歯学研究科口腔機能学講座歯科矯正学教室 准教授 佐藤嘉晃先生に心より御礼申し上げます。

**（引用文献）**

1）金澤成美、山本隆昭、高田賢二、藤井元太郎、石橋抄織、佐藤嘉晃、原口直子、今井徹、中村進治：北海道大学歯学部附属病院を受診した矯正患者の過去15年間の変遷．日矯歯誌 57（2）：92-102（1998）

2）Tweed, CH : Evolutionary trends in orthodontics, past, present, and future. Am J Orthod 39 : 81-108, 1953.

3）Ricketts, RM : Planning treatment on the basis of the facial pattern and an estimate of its growth. Angle Orthod 27 : 14-37(1957)

4）村澤博人 顔と美　繊消誌37:558-564(1996)

5）佐藤嘉晃、井上則子、大滝尚子　他：顔貌に関する意識調査　北矯歯誌26（1）：21-30(1998)

6）日下部豊寿, 佐藤嘉晃, 岡本　亨，他 「骨格性下顎前突症患者の側貌の変化－下顎枝矢状分割術と矯正治療との比較―」日顎変形誌, 16(1):1-7 (2006)

7）大滝尚子，佐藤嘉晃，梶井貴史 他：CR画像側面頭部X線規格写真によるMidfacial lineの研究　道矯誌, 30(1):40-45（2002）

8）Handa K, Sato Y, Kaneko T, Yamamoto T, and Iida J : A new method to evaluate lip sealing and its clinical application, Part 2 : Lip sealing during the daytime and sleep. Hokkaido J Dent Sci 26 : 83-93, 2005.

9）Leonardo SE, Sato Y, Kaneko T, et al : Differences in dento-facial morphology in lip competence and lip incompetence. Orthodontic Waves 68 : 12-19, 2009.

10）佐藤嘉晃，角野晃大，小原三郎，他 「軟組織プロファイルから硬組織の上下顎前後的位置関係を予測する」道矯誌，38(1):10-16（2010）

（本助成金による業績）

11）日下部豊寿，佐藤嘉晃，菅原由紀，福島久夢，大塚麻衣，飯田順一郎：顔貌の意識に関する研究，第71回日本矯正歯科学会大会，2012年9月26日－28日，盛岡

12）Toyohisa KUSAKABE, Yoshiaki SATO, Kumu FUKUSHIMA, Mai OTSUKA, Junichiro IIDA：Are Japanese laypersons happy with their facial appearances?, 45th Annual Scientific Congress Korean Association of Orthodontics, 4th Joint Symposium of KAO and JOS, November 1-3rd, 2012, Seoul (Korea)

# 近代日本コスメトロジーの普及と展開をめぐる一考察
## ～美容家・藤波芙蓉の分析を通じて

奈良女子大学生活環境学部
鈴木　則子

Fuyo Fujinami (1872-1952) was a male cosmetician who was an active newspaper and magazine writer and contributed to filmmaking from the late Meiji (1868-1912) to early Showa (1926-1989) eras, which corresponded to the period of great growth in the Japanese cosmetics industry.

Fujinami was not a doctor, pharmacist or beautician, and moreover he was a man. Despite this, he came to be called the "authority on beauty." What was it in Fujinami's values, aesthetic sense, knowledge of chemistry, and make-up techniques with regard to cosmetics that attracted so many women of the time? Clarification of these issues will lead to verification of the process of formation and development of modern Japanese cosmetology.

In this study, his books and magazines and newspaper articles on Fujinami's background from birth until his achievements in the final years of the Meiji era, when he started his activities as a cosmetician, were collected and his descendants were interviewed. From examination of these materials, it was confirmed that the foundation for his later activities as a cosmetician was formed by the various social issues he encountered during the time he studied under a female Christian missionary in his youth in Sendai and his period as a journalist for the *Miyako Shimbun* newspaper after coming to Tokyo, as well as the network of personal connections he formed among politicians, businessmen, and scholars.

### 1．緒　言

藤波芙蓉（明治5～昭和27年（1872～1952））は、明治末から昭和初期にかけて活躍した男性美容家である。彼は明治43年1月刊の『新式化粧法』（『家庭百科全書』第25編、博文館発行）をかわぎりに、計4冊の美容書を刊行するとともに[1]、明治44年からは『女子文壇』[2]・『婦人画報』[3]・『読売新聞』[4]などに、美容相談記事を連載していく。

また、婦人雑誌とタイアップして雑誌を窓口に、自分が開発した化粧品の通信販売をおこなったり[5]、映画の化粧を担当したり[6]と活動の幅を広げ、大正期には「美粧の権威者」[7]と呼ばれるようになっている。

藤波芙蓉が美容家としてメディアに登場しはじめた明治40年代は、日本が日露戦争後の経済成長を遂げ、自国の文化に強い自負心を持つようになった時期である。江戸時代の伝統的化粧法を封建的・非文明として否定し、欧米の化粧風俗を手本としつつも、西洋人とは人種を異にする日本人にふさわしい化粧法・化粧品料を模索した時代だった。

時代が求める新しい化粧情報は、新聞や明治時代後半に続々と創刊された婦人雑誌という近代的メディアを通じて、医者や美容師・理髪師など様々な肩書を持つライターによって発信されていく。中でも女性達に熱い支持を得たのが、この頃から登場する、当時「化粧家」[8]と呼ばれた種類の人びとで、芙蓉はその一人だったのである。

だが、ほぼ同時期に美容家として活躍した遠藤波津子（文久2～昭和8年（1862～1933））や北原十三男の事跡が、子孫らによる美容院やエスティティックサロン事業の継承とともに現在も伝承されているのに対し、芙蓉の業績については、その履歴も含めて今ではほとんど伝わっていない。

芙蓉を取り上げた先行研究は、富澤洋子「女性雑誌に見る近代の美容研究家「藤波芙蓉」」[9]が唯一のものである。富澤は雑誌『女子文壇』と『婦人画報』からうかがえる芙蓉の事跡を紹介し、彼を「江戸時代以来の伝統的な化粧から近代的な化粧へ、日本化粧史の転換点のキーパーソンであることは確かだろう」と評価するものの、史料的制約もあって、彼が美容研究家として立つまでの経歴については「今後の調査課題」としている。

医者でも薬学者でも美容師でもなく、しかも男性の芙蓉が、いかにして「美粧の権威者」となっていったのだろうか。当時多くの女性を魅了した、芙蓉の化粧をめぐる価値観・美意識・化学知識・化粧技術をはぐくんだものは何だったのか。これらの問題を明らかにすることは、日本近代コスメトロジーの形成と展開過程を検証することにつながる。

そこで本研究は、芙蓉の著書や雑誌・新聞連載記事を収集するとともに、藤波芙蓉の子孫への聞き取り調査を行い、その生い立ちから美容家として活躍を開始する明治40年代までの足跡について考察を加えた。

### 2．第二高等中学校時代

藤波芙蓉はその戸籍によると、明治5（1872）年5月28日、



Study of the spread and development of cosmetology in modern Japan through an analysis of cosmetician Fuyo Fujinami
Noriko Suzuki
Nara Women's University Department of Culture and Humanities

たばこ屋を営む鹿野太美治・ゑんの子として、仙台市に誕生した[10]。本名は恒吉である。

芙蓉が西洋の化粧術に興味を持ったのは、「高等中学校」時代のことであった、と自身で記している[11]。明治20年4月、芙蓉が15歳になる春に仙台に第二高等中学校（「本科」は尋常中学校卒業生を入学対象とした）が設置されており、芙蓉はここで学んだと推測される[12]。第二高等中学校のカリキュラムは、第一語学の他に第二語学もあり、また文系・理系に渡って広く授業科目が設置された。高等中学校の深く広い教養教育は、のちの芙蓉の新聞記者、作家、美容研究家という多彩な活躍の基礎となる教養を形成したと考えられる。

芙蓉は高等中学校時代、米国人女性宣教師「ブラウン嬢」のもとに寄宿して英語とともにキリスト教についても学んだ。ある朝、芙蓉は化粧する前の彼女の素顔を偶然見かけ、化粧した美しい顔との落差に驚嘆する。当時の日本の化粧は肌を真っ白に塗り、真っ赤な紅をさすのが一般的であったのに、西洋式の化粧は「素顔に見えて素顔より数倍美しい」。彼は、これこそが「化粧美の極致」であると悟ったという。

「ブラウン嬢」とは、ハリエット・M・ブラウンのことである。アメリカ西部婦人バプテスト外国伝道教会宣教師として、日本へ明治19年12月に派遣され、仙台に着任する。新伝馬町東３番丁に居を構え、積極的な布教活動を展開したが、特に聖書を普及させる活動を担う婦人伝道者「バイブル・ウーマン」の養成に力を入れた。同時に、この家を毎日曜夕方には青年達のために開放、毎週25～45名の大部分がノンクリスチャンの青年達が集まって、賛美歌・祈り・聖書を学んだ。やがて明治23年10月、彼女は山口県長府での布教活動に従事するため、仙台を去る[13]。

彼女は化粧室で、1日2回化粧をしていたと芙蓉は記している。彼女の写真を現時点では見つけられていないが、彼女の前後に仙台に着任した女性宣教師達の写真のなかには、美しく着飾った姿も見られる。若き米国人女性宣教師の麗姿が、思春期の芙蓉の美意識に大きな影響を与えたのは間違いない。

芙蓉は著書『新式化粧法』のなかで、化粧室のしつらえについても細かに指示しているが、それはブラウンの化粧室の影響でもあった。

また、ブラウンから学んだキリスト教知識の片鱗は、『新式化粧法』の序文にある「斯道（化粧道、筆者注）におけるパフテスマのヨハネたるを得て、幾何なりとも該術研究者の参考となり、他をして新たに指を此研究に染むる動機ともなることが出来れば」という文章からもうかがえる。

やがて明治32年頃、芙蓉は藤波たけ（弘化2（1845）年～？）の養女志摩（明治14～昭和12年（1881～1937））の婿として、藤波家に養子に入る。結婚当時、たけ・志摩・芙蓉の三人で写真館にて撮った写真が、『女子文壇』に掲載されている[14]。ネクタイを締め、体にぴったりあった上着を着用した洋服姿の芙蓉は、いかにもハイカラな青年である。

明治33年7月から大正9年にかけて、志摩との間に五男五女をもうけた。御子孫の話では、愛妻家であり、また子供達をかわいがる良き家庭人であったという。後に子供達をミッションスクールに進学させており、洗礼こそ受けていないが、芙蓉とキリスト教との縁は続いたようである。

## 3．『都新聞』時代

### 3.1　『東京市養育院月報』と『都新聞』

やがて芙蓉は仙台を出て、上京する。その時期は不明だが、明治38年9月の『東京市養育院月報』に「ナイチンゲール嬢の話」という翻訳を「藤波芙蓉」の名で執筆しているので[15]、遅くともこの時には東京に在住し、「芙蓉」というペンネームで執筆活動を開始していたことは確認してよい。

東京市養育院は、明治5年に路上生活者を収容するために設立された施設で、やがて生活困窮者や病人だけでなく、棄児・孤児なども収容するようになる。渋沢栄一が、明治14年から昭和6年（1931）に死去するまで院長を務めた。『東京市養育院月報』はその機関誌として、明治34年の日清戦争後、「如今我邦の急務は軍備の拡張・財政の整理のみに非ずして、其最なるものは即ち慈善事業の振興にありとす」という「発刊の辞」とともに刊行された。芙蓉は本誌に海外ジャーナルの翻訳や小説を発表するほか、貧困や孤児問題について、論説文を寄稿している[16]。

後年、芙蓉は『女子文壇』に渋沢栄一の車に乗せてもらったことがあると記しているが[17]、芙蓉の美容活動は政財界、宮家・華族の夫人達とも深く結びついて展開する。こういった人脈形成の背景には、東京市養育院を通じた慈善活動も関係しているのだろう。

また、『東京市養育院月報』には『都新聞』主筆・田川大吉郎も寄稿している[18]。就職時期は明確でないが、芙蓉は明治41年まで『都新聞』記者として働いており、ここにも東京市養育院の人脈の影響がみえてくる。

『都新聞』はその前身を、明治17年に夕刊紙として東京の毎夕社から発行された『今日新聞』とする。小西義敬・仮名垣魯文・野崎左文らを中心に、芝居だよりや花柳界の記事と読み物を売り物にしていた。20年に朝刊紙となり、22年には紙名・社名ともに『都新聞』へ変更する。25年から編集はすべて田川大吉郎が任され、芸能・流行・文学に特色をもつ新聞として定着する。

田川大吉郎はいったん明治27年に退社後、38年に再入社して再び主筆となる。彼は社会問題に多く発言し、民本主義の潮流の一翼を担っていた。都市問題にも関心が深く、

明治41年5月には参議院議員に初当選し、同年9月に東京市助役となっている（就任期間；明治41年9月～大正３年10月）。のちにキリスト教徒として､明治学院総理も務めた。

芙蓉は田川が助役就任のために『都新聞』を退社した際、一緒に退社したと『女子文壇』に自ら書いているので[19]、明治41年8月ころの退社と考えられる。おそらく芙蓉の入社そのものにも、田川が何らかの形で関わっていたのだろう。田川は38年の再入社後、中里介山・恒藤恭をはじめとする、後に政治・文学・アカデミズムなど様々な領域で活躍することになる若い記者たちを、一存で採用している[20]。

### ３.２　美容記事の展開

芙蓉は、『都新聞』では「相談の相談」欄の担当記者として、美容関係の質問に答えていたと『女子文壇』および『新式化粧法』に書いている[21]。本欄は明治39年に主筆田川大吉郎が開設し、従来は田川が回答も担当したとみられていたが[22]、少なくとも美容に関する質問については、芙蓉が任されていた可能性が高い。

『都新聞』は女性や花柳界にも多く読者を持ち、風俗関係の記事も常時掲載された。芙蓉が在籍していたと思われる時期と重なる明治39年11月6日からは、「衛生叢話」欄に「化粧のはなし」というタイトルのシリーズが掲載される。化粧を衛生問題として位置づけ、有害化粧品に関する情報を積極的に発信しているが、担当は芙蓉ではなく山口竹庵記者である。山口は「化粧のはなし」を書く前には家庭医学について連載記事を書いており、新たに化粧品をとりあげるにあたって、化粧品に詳しい読者に情報提供を求めている。連載開始時点では、山口は特別化粧品に造詣が深いというわけではなかったようだ。

山口は、日本の旧来の化粧品や化粧法をそのまま踏襲することを否定すると同時に、盲目的な西洋化粧追随傾向をも批判している。日本と欧州とでは人種・皮膚の色が異なるので、舶来化粧品が年々増加するが、日本人は日本人の体質と肌の色にあった化粧品を用いるべきであるという。連載の中では、白粉・白色薬・石鹸・香水・香油・化粧水などをとりあげて、市販品の品質や自分で作る時の調合法を説明している。

なかでも注目すべきは39年11月20日から連載した、白粉の鉛毒に関する記事である。山口によれば、東京市中だけでも200種以上の白粉が出回っていて、そのうち150種余を試験した結果、輸入品も「東洋向け」は鉛・水銀を含有し、国産の粉白粉については、御園白粉以外はたいてい鉛を原料としているという。パッケージに「無鉛」「衛生無害」とあっても､「無鉛」の意味ではないというのである。

また、当時の白粉市場は舶来品の偽造品が氾濫し、京阪では御園白粉の7割が偽造品で、それら偽造品には大量の鉛分が含まれているという。

12月3日付記事によると、鉛白粉に関するレポートは女性読者・化粧品業者の注目を集め、11月末ごろから東京では有鉛白粉使用者が減少するとともに、業者による化粧品改良が進み、無鉛白粉7，8種が登場したとある。

悪質な商品は白粉にとどまらなかった。当時普及し始めていた石鹸も、増量のために澱粉や土を混ぜることがあり、やはり舶来品の粗悪な模造品が出回っていた。石鹸の模造品は、化粧品以上に多いという。

白粉や石鹸が日本製より輸入品のほうが高く評価されたのに対し、髪油については日本製の椿油が推奨されている。西洋人と日本人の肌・髪は異なるが、特に髪油は鉱物性のものを使うと髪が赤くなるので、艶やかな黒髪を愛でる日本人には椿油が最良であること、ただし椿油と書いてあっても、たいてい他の原料が混ざっているので注意するよう呼び掛けている。

この連載は好評だったため記事を改訂増補したものが、明治40年12月に山口竹庵著『男女と化粧』として単行本化された。『都新聞』に掲載された広告によると､本書は｢化粧品其他二百余種の善悪並に選定し、其使用法をも懇切に記述」した「男女化粧法の案内」である[23]。山口竹庵による衛生を重視した化粧情報記事のスタンスは、後の藤波芙蓉の最初の化粧書『新式化粧法』と同一である[24]。時代は｢衛生｣をキーワードとする美容情報を求めていたのである。

## ４.『都新聞』退社後

既述のように、芙蓉は田川の退社と同時期に『都新聞』を去ったとすると、芙蓉の退社時期は明治41年8月頃となる。芙蓉は藤波芙蓉の名前で『都新聞』に明治41年10月8日から同年12月31日まで､81回にわたって新聞小説「舜天丸」を連載しているが、社員として執筆したのか、退社後に執筆したのかは未詳である。

藤波芙蓉が美容の世界に姿を現すのは、現在確認できている範囲では明治43年1月、前掲『新式化粧法』が最初であるが、本書刊行前から美容家としての活動実績を持っていたようだ。｢序」には､本書が「或る倶楽部の招請により、同志十二人の御婦人方に講演した其研究者の一人たる鈴木絹子嬢が筆記に訂正を加へて成った」とあり、上流夫人の小規模なサロンに化粧の講師として招かれていることがわかる。元原稿がこのサロンでの講義録だとすると、総頁数280頁近い本書のボリュームからして、相当の回数にわたって定期的に勉強会を重ねていたと考えてよいだろう。

また、第一章「序説」ではかつて「ブラウン嬢」の化粧術に感銘を受けたことをきっかけに、「以来芙蓉（わたくし）は非常な興味を以て此美術の研究実験に学余の時間を費せること幾多年、始めは芙蓉（わたくし）の妹等の顔を実験板に、漸や会得する所あるに及んで二三の某婦人、一人は人並より黒く、一人は頬骨の高い、一人はお高額（でこ）な婦人を特に選出して研究を積

み、爾来五六の令嬢貴婦人に口述伝授し、昨今現に教へて居る人、習ひに来る人、七人ある」とのべる。高等中学校以来化粧の研究を続けた結果、序説が執筆された明治42年当時、7人の女性に化粧を教えていたというのである。

## 5．総　括

芙蓉は最初の著書『新式化粧法』の冒頭で、自身の化粧観を披瀝している。広い意味での化粧は人びとの生活に不可欠であり、また生活を豊かにする「芸術（アート）」であるのに、なぜ女性だけのものとみなされたり、良家の妻女が化粧に熱心であったら識者から批判されるのか。芙蓉は、それは現今の日本の化粧が不自然で、かつ芸娼妓を手本とするものだからであると述べ、これを「旧式化粧術」と呼ぶ。そして個々人の「自然美」を、人工的に手を加えて遺憾なく発揚させる化粧を「新式化粧法」と名づけた。「新式化粧法」の研究には、芸術としての化粧を解する高い美意識とともに、「本草学や薬物学や、それに化学は勿論、光線学・色彩美学等種々なる科学的知識を要するもの」と述べる。

芙蓉が考えるところの化粧研究とは、誰もが手軽にできるはずのものではなかったのである。それは芙蓉のように、教養主義の第二高等中学校レベルの教育を受け、豊かな語学力をもち、キリスト教文化（欧米文化）を理解し、『都新聞』記者として活躍しうるくらいに社会問題や文化の動向に対して鋭敏であることが必要だった。少なくとも彼はそのように確信している。

芙蓉は美容師や理容師、医師といった、いわば技術者としての美容家たちと自らとを明確に区別し、しばしば彼らの経済活動や化粧に対する見識について、雑誌や著書のなかで名指しで手厳しい批判も行っている[25]。そういった行為もまた、この信念に基づく。

芙蓉は『新式化粧法』のなかで「化粧道」という言葉を使用し、以後もこの言葉にこだわった。彼にとって化粧とは、近代日本にふさわしい新しい文化的・人間的豊かさの身体表現様式を作り出すことであり、茶道や華道などと同様に、技術と知性・精神性を兼ね備えた「道」を究めることであった。その意味で藤波芙蓉とは、日本が国家として近代化を成し遂げることに全力を傾けた明治という時代に、化粧という側面から日本の近代化に取り組んだ、“啓蒙的美容家”だったのである。

**（参考文献）**


1）『あわせ鏡』（実業之日本社、明治44年）、『新美装法』（『家庭文庫』所収、婦人文庫刊行会、大正5年）、『美粧』（東京社、大正5年）。

2）『女子文壇』は明治38年1月から大正2年8月まで発行された女性文芸投稿雑誌。芙蓉は「化粧問答」を明治44年3月から大正2年8月迄連載している。『女子文壇』が大正2年8月に廃刊後は継続誌『処女』に連載を開始するが、終了年月は未詳。

3）『婦人画報』は明治38年、国木田独歩らによって創刊された婦人雑誌。芙蓉は「化粧問答」を大正2年5月から昭和8年にかけて連載。

4）『読売新聞』に「美容問答」を大正5年から14年間連載、『日本』に「化粧の話」を連載。

5）『女子文壇』では明治44年11月から、『婦人画報』では大正2年11月から、化粧品の誌上通信販売を開始している。また短期間だったらしいが、男子向け文芸誌『秀才文壇』誌上でも明治44年からニキビの薬を販売した。

6）映画会社M・パテー商会の仕事をしていた。M・パテー商会は明治39年7月4日創立、大正元年9月に合併して日活となる。

7）『読売新聞』大正13年6月29日付。

8）『女子文壇』大正2年4月号。

9）『マキエ』No.27、ポーラ文化研究所、2007年6月。

10）『女子文壇』では明治9年生まれと芙蓉自身が記しているが、戸籍には明治5年とある。

11）『新式化粧法』10頁、および『女子文壇』8巻5号（明治45年5月）。

12）宮城県教育委員会編『宮城県教育百年史』第1巻明治編、ぎょうせい、1976年。

13）宍戸朗大『バプテスト波の初期伝道師　東北伝道とバイブル・ウーマンの活動』耕風社、1995年。

14）『女子文壇』8巻3号、明治35年3月。

15）『東京市養育院月報』第55号、明治38年9月25日。

16）例えば94号（明治41年12月）「論説　平和と幸福」など。

17）『女子文壇』大正2年4月号。

18）「三面記事を読みて」（其一、其二）第90号（明治41年8月25日）および第92号（明治41年10月25日）。

19）『女子文壇』7巻11号、明治44年9月。

20）土方正巳『都新聞史』日本図書センター、1991年。

21）『女子文壇』7巻11号（明治44年9月）および前掲『新式化粧法』247頁。

22）前掲『都新聞史』。

23）『都新聞』明治40年12月31日付。

24）『新式化粧法』の特徴については『研究業績中間報告集』第21号掲載の拙稿参照のこと。

25）例えば「皆様方は北原先生も私も同じ化粧家として御認でしょうが、其内容少くとも北原先生は商売人、化粧品や脱毛術を売物にして生活して居る人、私は一種の道楽に研究して居る」（『女子文壇』大正2年1月号）と述べている。


**（謝辞）**

本研究を進めるにあたり、藤波亜由子氏、羽鳥彰子氏のご協力をいただいた。記して謝意を表する。

# 仮想呈示と塗布流動解析により化粧品使用感を解析する バーチャルサイコレオメトリーとその応用

首都大学東京
水沼　博

When a cosmetic base oil was applied, oscillatory friction of 50 Hz appeared. This oscillation was produced by not only a moving plunger at the friction test but also finger application. It was confirmed that this oscillation gave preferable feeing to the application. The mechanism of this oscillation was discussed based on a theoretical stick-slip model, and a reasonable agreement was obtained between the experiments and the numerical results. These results suggested that an introduction of stick-slip condition into a cosmetic base oil might improve its sensory characteristic in the application.

## 1．緒　言

化粧品の使用感とレオロジー特性の関係は、調整されたレオロジー特性の試料を複数のパネラーが使用し、その使用感とレオロジー特性の相関として調べられている。しかし、指先で塗り広げられる化粧品の流動の複雑さにより、その流動の解析はこれまでほとんど省略され、ブラックボックス化されてきた。このため、化粧品のレオロジー特性と官能特性の因果関係のメカニズムは理解されておらず、この点が課題として残されている。著者は液体の塗布流動特性と官能評価との相関を調べ、仮想現実感を用いてその結果を検証することで、塗布感を評価する新たな方法（バーチャルサイコレオメトリー、Virtual Psycho-Rheometry）[1]を提案した。本研究ではこの方法をもとに上記課題の解決をめざす。バーチャルサイコレオメトリーを利用する研究は次の手順でその研究を進める。

1．液体を塗布するとき指先に働く力を、図１に示すように塗布面に対して平行と垂直な成分$F_p$と$F_n$に分けて測定する。
2．$F_p$と塗布距離$x$の関係（$F_p - x$曲線）を液体のレオロジー特性量と$F_n$の関数として実験的に定式化する。本研究ではレオロジー特性として粘度$\eta$を対象とする。
3．図２のスライダーを指で動かし、同時に測定する$F_n$と装置に設定するレオロジー特性量からスライダーに上記２で得られる$F_p - x$曲線に対応する仮想反力$F_p$を与える。このように指に仮想的な塗布感を与え、$F_p - x$曲線を検証する。
4．化粧品の塗り広げを解析し、その解析から$F_p$, $F_n - x$曲線を検証する。$F_p$, $F_n - x$曲線を理論的に検討し、レオロジー特性と官能特性の因果関係のメカニズムを解明する。



Virtual psycho-rheometry and its application (Sensory study on application of cosmetic base oil using virtual reality and flow analysis)

Hiroshi Mizunuma
Tokyo Metropolitan University

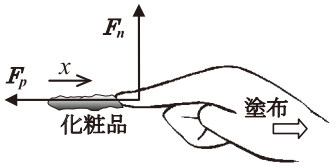



図１　指に働く力の成分の測定

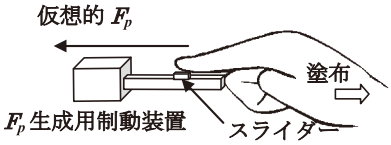



図２　仮想呈示装置による測定の検証

本研究ではこのようなバーチャルサイコレオメトリーの方法を確立するとともに、その応用としてある種の化粧品用油剤を塗布した時に生ずる50Hz程度の微細な摩擦振動現象に着目し、この振動現象がなぜ生ずるのか、そしてその振動現象が使用感、特にすっきり感に及ぼす影響のメカニズムを明らかにすることを研究目的としている。

## 2．実　験

### 2.1　油剤

本研究で使用した試料は化粧品の原材料として用いられている油剤であり、表１のイソノナン酸イソノニル（試料Ⅰ）、グリセリン脂肪酸エステル（試料G）、スクワラン（試料S）、トリオクタノイン（試料O）、イソステアリン酸ポリグリセリル－２（試料P）、トリイソステアリン（試料T）の６種類の油剤（日清オイリオグループ）である。表１の粘度は文献[2]に示されている値である。これら油剤以外に比較のため水も用いた。油剤の表面張力はWilhelmyプレート法（全自動表面張力計CBVP-Z, 協和界面科学）により測定した。表１に示すように、どの油剤の表面張力も23から30N/mの範囲にあり、大きな違いはみられなかった。

油剤の濡れ性を調べるため、その接触角をポリエチレン平板上に0.5μlの液滴を滴下し、その液滴輪郭から接触法により測定した。表１に示すように、試料Iが最も小さい接触角となった。

## ２.２　摩擦実験

摩擦係数を測定する装置を図３に示す。指を模擬した半円筒状の測定端子表面と平面状摺動面との間に油剤を挟み、測定端子を摺動面に沿って平行にリニアモーターで移動させる。このときに測定端子に働く摩擦力$F_p$を測定し、クーロンの摩擦則$F_p=\mu W$から摩擦係数$\mu$を測定した。$W$は摺動面に働く垂直力で、本研究では分銅を載せることにより一定になるよう調整し、$W=3.0\sim3.4$Nとした。測定端子が摺動面に及ぼす垂直力$W$と水平力$F_p$は摺動面の下に取り付けたロードセル（CB17600G11, ミネベア）により測定した。一部の試料で水平力の振動が生ずることを考慮し、摩擦係数は時間平均摩擦係数$\mu_m$とその標準偏差$\sigma_\mu$について調べた。

油剤液量は５μlとし、測定端子の速度は20mm/sとした。摩擦実験の半円筒状測定端子表面は、加工樹脂そのままの場合とバイオスキン（ビューラックス）で覆った場合について測定した。塗布面はアクリル板に貼り付けた人工皮膚（サプラーレ，出光テクノファイン）の面とした。摩擦実験時に測定端子がどのように油剤を摺動面に塗布していくか調べるため、その塗布をハイスピードビデオカメラ（MEMRECAMci，NAC）により撮影した。撮影速度は毎秒500フレームとした。

## ２.３　塗布感の仮想呈示装置の試作

緒言で述べたように、油剤塗布時の指にかかる摩擦力を仮想的に再現する装置を図４に示すように試作した。指を置く指置き台は，直線レールの上を自由にスライドする。指置き台とともにスライドする薄板を電磁石（LY2DC12, オムロン）で挟むことにより、液体を塗布したときに指に働く水平方向の抵抗を仮想的に作る。この抵抗は、想定する液体の粘度、レール上の指の位置そして指が台を押す垂直力に基づいて計算される。指の位置はレーザ変位センサー（ZX-LD100，オムロン）により測定され、指が台を押す垂直力はロードセル（CB17600G11，ミネベア）により測定される。

ある種の液体を塗布するときに生ずる微細なスティック・スリップのような振動を仮想的に発生させるため、指

表１　実験試料

| 略称 | 試料名 | 性　状 | 用　途 |
|---|---|---|---|
| － | 水 | 無色透明 | |
| I | イソノナン酸イソノニル | 低粘性液状油、無色透明 | ライトクリーム、ローション、バスオイル |
| G | グリセリン脂肪酸エステル | 液状油、無色～淡黄色透明 | |
| S | スクワラン | 液状油、無色透明 | |
| O | トリオクタノイン | 液状油、無色透明 | ほとんど全ての化粧品 |
| P | イソステアリン酸<br>ポリグリセリル－２ | 高粘性液状油、淡黄色～黄色透明 | W/Oクリーム、ヘアケア製品 |
| T | トリイソステアリン | 高粘性液状油、淡黄色 | 口紅、リップグロス |

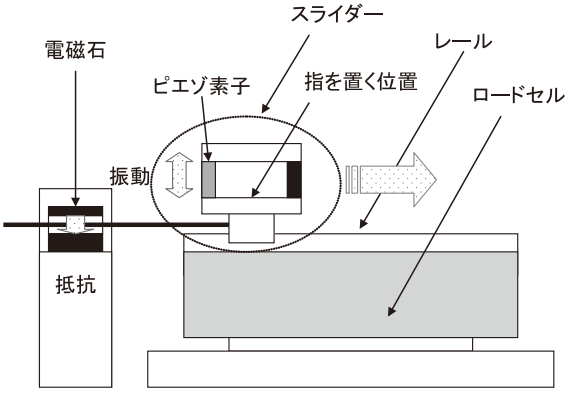



図４　塗布感の仮想呈示装置

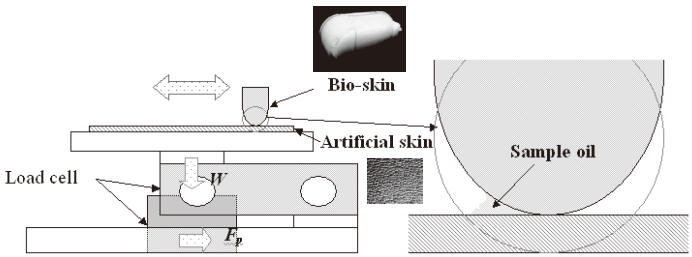



図３　塗布摩擦の測定装置

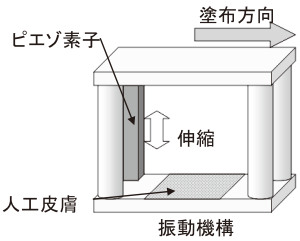



図５　塗布時の振動を仮想的に呈示する装置

置き台に図５のようなピエゾ素子（AE0203D44H40F, NEC Tokin）を取り付けた。ピエゾ素子に正弦波、三角波、矩形波の電圧を印可することにより、ピエゾ素子が伸縮振動し、その振動を指に伝える。仮想呈示装置の制御はマイクロコンピュータ（Arduino MEGA）により行われる。

## ３．結　果

### ３.１　摩擦係数の測定

実験結果の一例を図６に示す。図からわかるように、各油剤が塗布開始から終了までの間に示す摩擦係数の時間的変化は次の３つのパターンに分類できる。

①摩擦係数の値が大きく変動し、その変動の大きさを示す標準偏差 $\sigma_\mu$ の値が非常に大きくなる。試料Ｉがこれに該当する。

②塗布開始直後の高い摩擦係数の後、塗布とともに一定の値まで単調に減少していく。固体壁間に生ずる静止摩擦から動摩擦への変化と似た変化である。

③上記②と同様に摩擦係数は塗布開始後に一定の値まで減少するものの、その後再び増加する。この時間的変化は主に高粘度の油剤で観察される。

このように試料Ｉは摩擦の変動現象により大きな $\sigma_\mu$ の値を示す。試料Ｉは表２に示すように粘度が低く、かつ接触角が小さい。このような振動現象が生ずる条件を調べるため、摩擦測定端子の表面をバイオスキンで覆わない、粗面の樹脂端子、および表面をなめらかに研磨した樹脂端子についても摩擦係数の測定を行った。その結果、粗面の樹脂測定端子を用いた場合、試料Ｉだけでなく試料Ｓと試料Ｏも摩擦の変動現象を示し、$\sigma_\mu$ の値が大きくなった。試料Ｓと試料Ｏは表２に示すように比較的粘度が低く、接触角が小さい。これらの条件が振動をもたらす上で重要と考えられる一方、この変動現象は油剤固有の物性の問題だけでなく、油剤物性、測定端子表面及び塗布面の各条件と関連して生ずると考えられる。なお、機械でなく指による塗布の場合にも図７に示すように同様の摩擦の変動が測定された。図７は試料Ｉと試料Ｇを指で往復して塗布した場合の水平力の時間的変化を示しており、試料Ｉの場合には塗

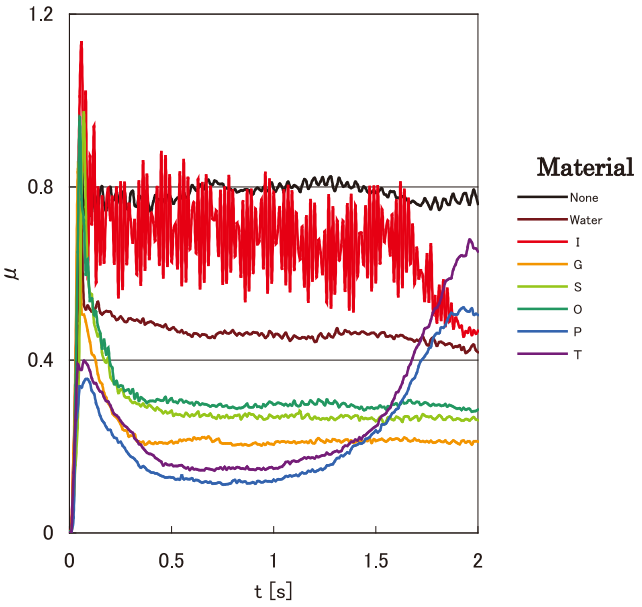



図６　塗布時の摩擦係数の時間的変化（図３の測定装置）

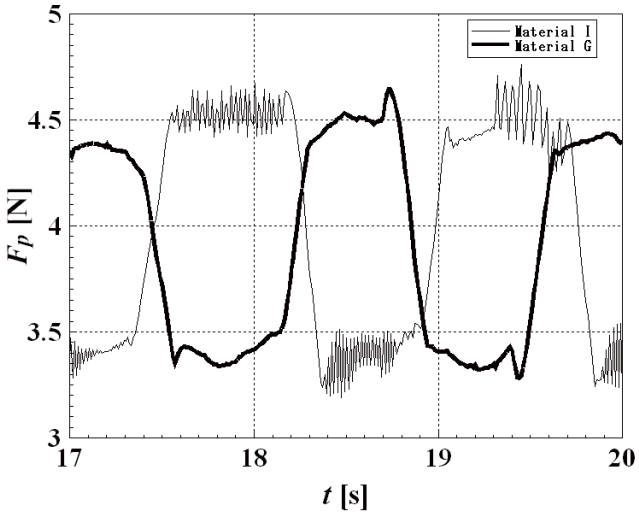



図７　人の指による塗布時の摩擦係数の時間的変化
（図３の測定装置を用い、測定端子ではなく人の指で塗布）

表２　試料物性値（20℃）

| 略称 | 試料名 | 比重 s | 粘度 η [mPa·s] | 表面張力 [mN/m] | 接触角 θ [°] |
|---|---|---|---|---|---|
| － | 水 | 1 | 1 | 70.7 | 92.3 |
| I | イソノナン酸イソノニル | 0.856 | 6 | 25.4 | 6.19 |
| G | グリセリン脂肪酸エステル | 0.997 | 196 | 29.6 | 14.3 |
| S | スクワラン | 0.812 | 36 | 28.6 | 10.4 |
| O | トリオクタノイン | 0.953 | 30 | 28.6 | 7.63 |
| P | イソステアリン酸ポリグリセリル－２ | 0.987 | 6540 | 29.4 | 24.0 |
| T | トリイソステアリン | 0.905 | 14500 | 23.5 | 27.0 |

布時に微細な振動が重畳して発生しているのに対し、試料Gの場合にはそのような振動は観察されない。

試料Ⅰ、試料G、試料Tの３つの試料に対し、摩擦実験時の測定端子が油剤を塗布する運動をハイスピードビデオカメラにより撮影した。３つの試料のうち、摩擦の変動を示した試料Iの場合にのみ、撮影画像上で端子と塗布面の間に振動現象が観察された。この振動現象の周波数は約55.6Hzであった。一方、摩擦実験で観察された摩擦水平力の変動周波数は約50Hzであった。したがって、摩擦力の変動と撮影された振動現象とは同一のものであるといえる。

摩擦の振動現象としては、スティック・スリップがよく知られている。黒板にチョークを立てて滑らしたときやガラスに爪を立てて滑らせたときなどに生ずる。機械システムにおいても生ずることがあり、固体壁間のスティック・スリップ[3]は比較的よく研究されている。ビデオの観察結果も、観察された振動がスティック・スリップの一種であることを示した。しかしながら、本研究で観察された振動現象は油剤を介しての振動現象であり、このような摩擦の振動現象はほとんど研究されていない。得られた結果をまとめると、振動の生じやすい条件は、①低粘度、②小さな接触角、③粗面、といえる。また、測定端子表面と塗布面の接触面外に形成されるくさび状の空間は、その進行方向側に油剤が蓄えられ、その油剤は接触面へと供給される。このくさび空間に蓄えられる油剤量は、ビデオ観察では振動を発生させる試料Ⅰの場合に最も少なかった。

### 3. 2　塗布感の官能試験と仮想呈示装置による塗布感の検証試験

評価する官能特性の項目を、「伸びの軽さ」、「なじみやすさ」、「みずみずしさ」、「あぶらっぽさ」、「べたつき」の５項目とした。皮膚健常者の被験者12名が、各油剤ごとにそれらの評価項目を段階評定尺度法によって－２～２の５段階で評価した。塗布部は前腕内側とし、滴下量は5μLとした。塗り心地を感覚的に捉えやすくするため、被験者全員が全項目について水の尺度を0として評価した。試験結果を図８に示す。「あぶらっぽさ」や「べたつき」など、人が嫌う傾向にある項目では試料Iの値が小さい。これは他の試料に比べて試料Ⅰの塗り心地が良いことを示すものであり、$\sigma_\mu$の値と塗布感の良さとの相関を示唆する。

この$\sigma_\mu$の値と塗布感の良さとの関係を検証するため、2.3で述べた塗布感の仮装提示装置を用いて官能試験を行った。電磁石の負荷により与える水平方向の抵抗は、試料Ⅰの粘度の液体を塗布したときと同じになるように設定した。指に与える振動は周波数50Hzの振動をピエゾ振動子により与え、正弦波、三角波、矩形波の各振動を与えた。皮膚健常者である被験者７名により、各変動波形を段階評定尺度法によって－１～１の３段階で評価した。ただし、被験者全員が振動なしの尺度を0とした。試験の結果は表３に示すように、摩擦実験の振動波形と同様の50Hzの三角波振動を仮想的塗布動作に加えたときに塗布感が良いという評価を得た。これらの結果はスティック・スリップ状の振動が好ましい官能特性をもたらすことを示唆する。なお、矩形波の場合は共振のような振動を図５の指置き台に発生させ、官能特性も悪い結果となってしまった。

## 4．考　察

ある特定の油剤を塗布する時に約50Hzの摩擦の変動が生ずることを摩擦係数の測定と塗布時のハイスピードビデオ観察から確認した。ビデオ観察から考えるかぎり、この塗布時の振動現象は一般にしばしば観察されるスティック・スリップであり、静止摩擦と動摩擦のように、塗布抵抗の大きくなるときと小さくなるときの２つの状態が交互に生ずる結果と考えられる。このスティック・スリップが生じやすい条件は塗布面が粗面で、油剤の粘度が低くかつ接触角が小さい場合である。このような条件の下では、油剤の粘度は低く、塗布面を容易におおうことができる。いっぽう、接触角は小さいため、油剤は塗布面の周囲に逃げやすく、塗布面との間に固体壁間の摩擦が生じやすい。このように粘度が低いことと接触角が小さいことは互いに異なる二つの状態を導きやすく、これによりスティック・ス

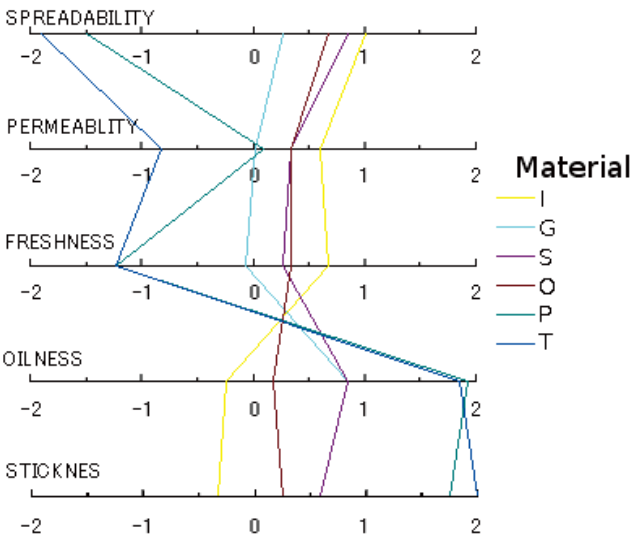



図８　塗布感の官能評価結果

表３　仮想呈示装置による塗布感の検証試験

| | 正弦波 | 三角波 | 矩形波 |
|---|---|---|---|
| １（良い） | 5 | 6 | 2 |
| ０（変化なし） | 6 | 5 | 5 |
| －１（悪い） | 1 | 1 | 6 |

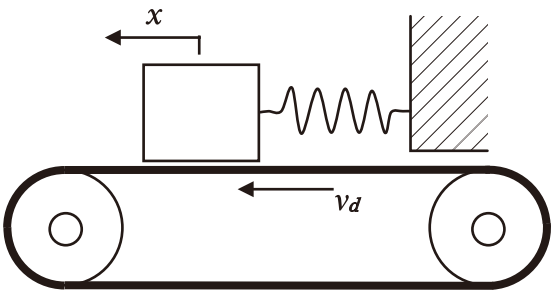



図９　stick-slip の力学モデル

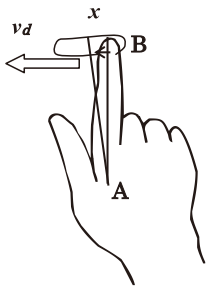



図 10　指の stick-slip
指の付け根Ａが空間に固定され、塗布面が一定速度 $v_d$ で移動

リップが生ずるのではないかと推測される。スティック・スリップを発生させる油剤は官能試験で好ましい塗布感覚を与えた。塗布感の仮想呈示装置にピエゾ振動子による振動を再現できるよう改造し、官能試験を行った結果でも、このスティック・スリップ状の振動は好ましい塗布感を与えた。このようなスティック・スリップ状の振動の機構について次に考察する。

stick-slip を発生させる力学モデルの例を図９に示す。質量 $m$ の物体が一定速度 $v_d$ で移動するベルトの上に乗っており、この物体は固定壁とバネで結合されている。物体にはベルトからの力 $f$ とバネからの力 $kx$（$k$ はバネ定数、$x$ はバネの伸び）が働き、物体の運動方程式は次式で表される。

$$m\ddot{x} + kx = f \tag{1}$$

この系はある条件の下で stick-slip を示すことが知られている。物体がベルト上をすべる slip では、ベルトから受ける力 $f$ はすべり摩擦 $f_{\mathrm{fric}}$ に等しく、

$$\mathrm{Slip:}\quad f = f_{\mathrm{fric}} \tag{2}$$

すべり摩擦 $f_{\mathrm{fric}}$ は次式で表される。

$$f_{\mathrm{fric}} = -\frac{F_s\,\mathrm{sgn}(v_r)}{1+\delta|v_r|} \tag{3}$$

ここで、$v_r$ はベルトに対する物体の相対速度で、$v_r = \dot{x} - v_d$ の関係にあり、$\delta$ は定数、$F_s$ は物体が動き始めるときの静止摩擦である。一方、物体がベルトとともに移動する stick では、バネの伸びが小さく $f_{\mathrm{fric}} > kx$ のときはベルトから力 $f = kx$ を受けながらベルトとともに移動する。しかし、バネの伸びが大きくなり $f_{\mathrm{fric}} < kx$ となるとベルトからの力は $f = f_{\mathrm{fric}}$ へ切り替わる。したがって、

$$\mathrm{Stick:}\quad f = \min(|kx|, F_s)\,\mathrm{sgn}(x) \tag{4}$$

以上のように、$f$ は

$$\mathrm{Stick}\ (v_r = 0):\ f = \min(|kx|, F_s)\,\mathrm{sgn}(x) \tag{5}$$

$$\mathrm{Slip}\ (v_r \neq 0):\quad f = -\frac{F_s\,\mathrm{sgn}(v_r)}{1+\delta|v_r|} \tag{6}$$

と不連続に変化する。このような不連続関数は運動方程式の数値積分を難しくするが、Leine ら[4] は $f$ に対する次式のような連続関数が良い近似を与えることを示している。

$$f(v_r) = -F_s\frac{2}{\pi}\frac{\arctan(\varepsilon v_r)}{1+\delta|v_r|} \tag{7}$$

ここで、$\delta$ と $\varepsilon$ はすべりの摩擦力を定義する定数である。

次に油剤塗布時の振動現象を上記 stick-slip モデルと対比して考える。図10の指の付け根Ａは腕とともに一定の塗布速度で右方向に移動するが、ここでは図９の物体と図10の指の運動が同じになるように、点Ａが空間に固定され、塗布面が一定速度 $v_d$ で移動する場合を考える。指先Ｂは塗布による摩擦により $x$ だけたわむ。このたわみは点Ａで固定された片持ちはり（指）のたわみと考えることができる。したがって、図９のバネの伸縮を図10の指のたわみと考え、図９の物体とベルト間の摩擦は指先で油剤を塗布するときの摩擦と考える。油剤の粘度が非常に低い場合、運動方程式 (1) において、指のたわみ $x$ に対する弾性力が右辺の摩擦力に比べ大きい。式 (1) の両辺を $k$ で除し、$k \to \infty$ とすれば、$x = 0$、すなわち塗布面に対する指先Ｂの相対速度 $v_r = -v_d$ と一定になり stick-slip は生じない。stick-slip は塗布液の粘度が比較的高く、式 (1) 右辺の摩擦力が、左辺の指先のたわみによる弾性力と同等かもしくは弾性力を上回る大きさになるときに生ずる現象と考えることができる。

運動方程式 (1) は下記の無次元変数を用いて表すこととする。

$$\begin{aligned} &x^* \equiv kx/F_s,\ t^* \equiv \sqrt{k/m}\cdot t, \\ &v_r^* \equiv \sqrt{mk}\cdot v_r/F_s,\ v_d^* \equiv \sqrt{mk}\cdot v_d/F_s \end{aligned} \tag{8}$$

式 (1) はこれら無次元数を用い

$$\frac{d^2x^*}{dt^{*2}} + x^* = \frac{2}{\pi}\frac{\arctan(\varepsilon^* v_r^*)}{1+\delta^*|v_r^*|} \tag{9}$$

ここで、$\varepsilon^*$ と $\delta^*$ は、

$$\varepsilon^* \equiv \varepsilon F_s/\sqrt{mk},\ \delta^* \equiv \delta F_s/\sqrt{mk} \tag{10}$$

また、

$$v_r^* = \frac{dx^*}{dt^*} - v_d^* \tag{11}$$

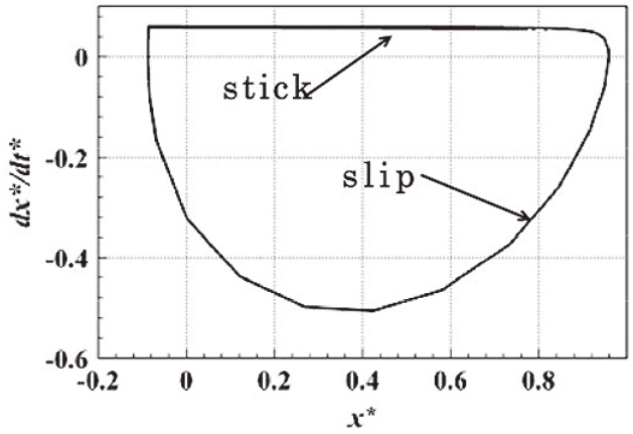



図 11　位相図

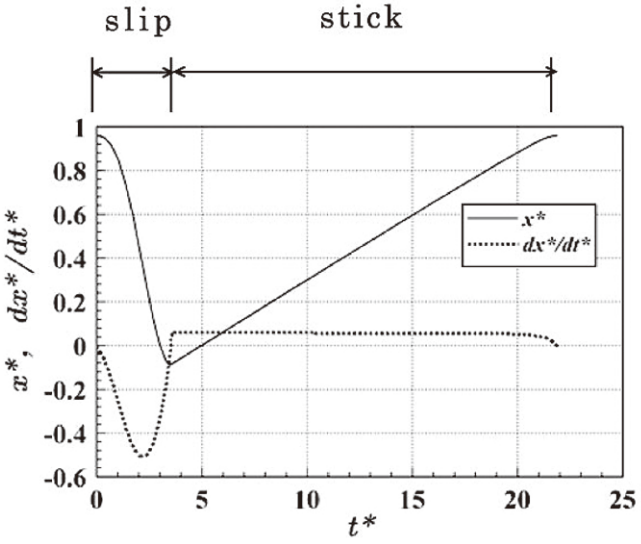



図 12　変位 $x^*$ と速度 $dx^*/dt^*$ の時間的変化

指の付け根の速度（塗速度布）$v_d$ と力学的パラメーター $F_s$、$m$、そして $k$ が与えられれば、式 (9) と (10) から指の運動が計算される。塗布時に振動が観察された例として試料Ⅰを選び、摩擦力 $F_s = 0.77$N、指先質量 $m = 10^{-3}$Kg、指の付け根の速度（塗速度布）$v_d = 0.06$m/s とする。また、指先に力 $F_s$ を加えたときの変位 $x$ の測定から、指のバネ定数を $k = 600$N/m とした。また、Leine ら[4] が用いた値と同じく $\delta$ は 3、そして $\varepsilon$ は $10^3$ とした。このときの式 (1) に対する変位 $x$ の周期解を Lein ら[4] の shooting 法により求めた。図11は得られた周期解の $x^*$ と $dx^*/dt^*$ の関係を示す位相図であり、図12は $x^*$ と $dx^*/dt^*$ を $t^*$ の関数として示した。$x^*$ は約 −0.1 から 0.9 の間で変化し、$x$（$= x^*F_s/k$）は約1mmの振幅となる。一方、$t^* = 21.9$ となり、振動周期 $t$（$= t^*\sqrt{m/k}$）は約20msとなる。周波数では約50Hzであり、この周波数は実験で観察された周波数とほぼ等しい。

ここで提案した指先の振動に対する stick-slip モデルは、油剤塗布時の振動現象を比較的良く説明することができた。すなわち、観察された stick-slip は指先を動かすときに指先に働く油剤の塗布摩擦と指の弾性的なたわみがもたらす振動現象といえる。この微小な振動現象は好ましい塗布感を与えるので、油剤の粘度等をこの現象の生ずる条件に調整することにより、油剤の塗布感を向上させることも可能になると期待できる。

**（引用文献）**

1）Mizunuma H, Nishizawa K, Hirose S, Segawa T,: Virtual Psychorheometry: Concept and Application, Int. Congress on Rheology, AIP 1027, 1390-1392(2008).
2）化粧品原材料品カタログ、日清オイリオグループ株式会社
3）Feeny B, Guran A, Hinrichs N, Popp K,: A Historical Review on Dry Friction and Stick-Slip Phenomena, Appl. Mech. Rev., 51-5, 321-341(1998).
4）Leine RI, Campen DHV, Kraker AD, Steen LVD,: Stick-Slip Vibrations Induced by Alternate Friction Models, Nonlinear Dynamics 16, 41-54, 1998.

# 健康成人女性の化粧行動における生理心理学的研究
## ―ストレスホルモン系、性ホルモン系への影響―

京都府立医科大学大学院医学研究科免疫学
渡邉　映理

The present cross-over randomized control study aims to obtain basic data concerning changes in the psychophysiological parameters of women due to their facial cosmetic behaviors. Sixty female university students (average age 21.22 ± 1.1 // range 20-24) without health concerns, who exhibited similar live styles and reported to use facial makeup every day, were recruited for the trial. After their informed consent to the procedures, all participants made up their faces using their own cosmetic tools for 30 min (makeup time) or imitated the use of makeup with placebo items for 30 min (control time). All study participants filled out mood questionnaires before and after both “makeup time” and “control time”. Simultaneously, saliva samples were collected and subsequently analyzed via ELISA. The parameters of “makeup time” were compared with those of “control time” using the paired t-test. Salivary cortisol levels measured after “makeup time” were significantly higher than after “control time” (t=-1.86, p=0.068). Scores of “depression” (p<0.001), “anger-hostility” (p=0.002) “fatigue” (p=0.002) and “confusion-bewilderment” (p<0.001) as evaluated from the questionnaires were significantly lower after “makeup time” than after placebo activity. In contrast, the score of “vigor-activity” (p<0.001) was significantly higher after the use of real makeup than after “control time”. The presented data suggest a pronounced psychophysiological influence of facial cosmetic behaviors on young women in their twenties.

### 1．緒　言

古代ギリシャでは既に化粧行動がなされており、化粧品は、皮膚や目や髪を美しく施すものであった。しかし、現代のように、外見を整えることが主な目的ではなかった。この古代文明において、化粧は、第一に人々を邪悪な霊から守ることが目的であり、第二に感染症などの眼病や、皮膚病から身体を守るという医学的な目的のために施された。そして第三の目的として、若さ、美しさ、社会的な権力といった、外見的な印象を強めるために使われた[1)]。また、日本でも古代より、歯を守り飾るためのお歯黒、白粉による化粧が行われてきた[2)]。

現代では、基礎化粧品を除く顔のメイクアップ製品に限っても、様々な化粧品会社から多種多様な形状のファンデーション･アイライナー ･アイシャドウ･アイブロウ・チーク･リップカラー ･リップグロスなどが売り出され[3)]、成人女性で化粧行動をしない者を見つけるほうが難しいほどだ。

化粧は主に「自分を良く見せるため」「身だしなみ」を目的に行われている。健康な者が自分で化粧をする際は、特に心身の健康維持を目的にして行っているわけではないと考えられる。しかし、例えばQuality of lifeの向上など[4)]、過去に行われた研究から、化粧行動は、化粧をした者の心身に大きな影響を与えているのではないかと推測される。化粧による心理的影響を調べた報告はいくつかあるが[5, 6)]、化粧行動による基本的な生理学的影響を調べた報告は殆どなく、サンプルサイズも十分ではない。また、リハビリ目的や、高齢者の生きがいに関する研究は見受けられるが[7, 8)]、若年層の健康成人女性を対象にした実験的な研究は見あたらなかった。

そこで今回、本研究の実施を考えた。我々は、今まで行ってきたリラクセーション研究の結果と、心理指標で測定された先行研究から、メイクアップは女性の心理状態に多大な影響を与えており、それによって生理学的機能、さらに健康状態にも反映するのではないかと考えた。特に、メイクアップ行動は「女性の美」と直接関連する行為なので、ストレスホルモン系や女性ホルモン系に影響しているのではないかと予測される。

国内では、2007年の北川ら[9)]が女子学生30名を対象に、メーキャップをしない（コントロール）、口紅着用、口紅着用・称賛の3つの条件で介入を行い、メーキャップが心身に与える影響について心電図、脳波、自己記入式質問紙で検討した。コントロールと比較して、口紅着用、口紅着用・称賛により、「緊張－不安」･「抑うつ－落ち込み」･「疲労」･「混乱」の有意な減少、「活気」が上昇し、「怒り－敵意」が有意に減少した。また、「人に会いたい」･「表情が明るくなった」･「晴れ晴れする」の感情が上昇し、口紅着用･称賛によって「安心する」が上昇したが、心拍数、高周波成分（HF）、低周波成分/HF比、脳波についてなどの生理学的指標に関しては、口紅着用、口紅着用・称賛後の有意な変化はなかった。2008年の堤谷らの報告[10)]では、特別養護老人ホームの女性23名のうち12名にネイルケア介入



Psychophysiological Effects of Cosmetic Behavior in Healthy Women
Eri Watanabe
Department of Immunology, Kyoto Prefectural University of Medicine

を行なった結果、ネイルケア介入群ではQOLと免疫機能が向上、ストレス・不安度が低下した一方、対照群ではどの評価項目にも変化はみられなかった。作山らは2007年に高齢者において、化粧が身体や心理に与える影響について、高齢者施設利用者を対象として検討し、NK細胞活性は6例が上昇した[11]。同じく2007年に行われた豊増らの報告[12]も50歳以上65歳以下の中高年期の女性23名を対象にし、メイクアップ後には、POMSの「緊張－不安」「怒り－敵意」が減少し、「活気」が増加した、という結果を得ている。全体的に国内のメイクアップ行動に関する報告は、リハビリを目的にしたメイクの研究や、老年層の生きがい・QOLに関する研究が多く、心理指標による評価が中心で、ストレス関連ホルモンや性ホルモンの変化について測定した研究は見当たらなかった。

海外では、clinical trialまたはrandomized controlled trialの研究デザインでの実験的研究では、アトピー、皮膚がんなど特定の疾患に対する研究が多く、また、添加物の影響やクリーム、日焼け止めの効果、オーラルケア、香りなど化粧品の成分を調べた報告が多かった。また、香りやリラクセーションについてのストレスホルモン系への生理心理学的研究は多く見られたが、化粧行動自体についての生理心理学的研究、特にストレスホルモン系、性ホルモン系への影響を調べた研究は殆どなかった。

本研究では、健康成人女性を対象にした顔へのメイクアップ行動による生理学的（ストレス指標としての唾液中コルチゾール、女性ホルモンの一種である唾液中エストロジェン）・心理学的指標の変化について、無作為化群別試験により対象者の条件を統制した上で、一定のサンプルサイズで基礎的なデータを得ることを目的とした。もし、一般的な健康成人女性で、メイクアップ行動により、短時間でのストレスホルモン系、性ホルモン系に変化が得られ、心理学的指標との関連が見られれば、メイクアップ行動が女性の生理学的状態や健康に何らかの影響を及ぼしていることが示唆され、メイクアップ行動が健康成人女性にとって、単なる趣味的な行動や身だしなみ以上の、心身への健康増進的な意味も持つことが推測でき、様々な研究に応用できると考えられる。

## 2．実　験

### 2.1　試験デザイン、対象者と試験スケジュール

本研究は、ランダム化クロスオーバーデザインで実施し、実験室内で対象者にメイクアップ行動を実施させ、生理心理学的な指標を測定した。まず、生活習慣・年齢が比較的似ており、健康であり、普段、日常生活で化粧を行なっている20歳以上25歳未満の女子大学生・大学院生を60名募集した（平均21.22 ± 1.1歳、最小20、最大24歳）。コルチゾール及びエストラジオールに影響するような薬剤を服用している者はいなかった。

対象者には予め、京都府立医科大学医学倫理委員会のガイドラインに沿って本研究に対するインフォームド・コンセントを行い、同意が得られた者のみ、実験に参加した。実験当日は、対象者は、食事による心理、コルチゾール濃度への影響を避けるため、試験開始90分前から試験終了までは水以外の飲食を避けるように指示した。また、試験前に、化粧をしている者はこちらで用意したクレンジング剤で落とすように指示した。

#### 2．1．1　メイクアップ行動

対象者はいすに座り、各自が普段使っている化粧品を持参して、こちらで設置した三面鏡で自分の顔を見ながら、30分間、自由に化粧行動を行った（①メイクアップ行動）。普段の化粧に時間がかからない対象者については、30分間を全部使って、色々な化粧を試してもらうように指示した。その後、10分間安静にして鏡を見ながら自分の顔を良く眺めてもらうように指示し、終了後、チューブに唾液を採取し、自記式質問票への記入を行った（表１）。

#### 2．1．2　コントロール行動

次に、対象者は1回目と全く同じ条件下で30分間、化粧品を手に持ち、化粧の動作のまねのみ（実際には化粧品を顔に塗らない）を行ってもらった（②コントロール行動）。この条件も、与えられた時間を全部使って、化粧のまねをするように指示した。メイクアップ行動と同じ内容の質問票に記入を行った後、同様に、10分間安静にしながら鏡

表１　試験スケジュール

| min | 予定 | 内容 |
|---|---|---|
| | 13:00 | 試験の説明<br>インフォームドコンセント<br>健康度チェック |
| 10 | | |
| 5 | 13:10 | 化粧を落とす |
| 50 | 13:15 | 心理検査・化粧に対する意識調査（生活習慣） |
| 2 | 14:05 | 唾液採集 baseline (Cor,Est) |
| 15 | 14:07 | 心理検査(0)POMS・STAI・疲労度など |
| 30 | 14:22 | ①makeup　or　②control(化粧動作のみ) |
| 2 | 14:52 | 唾液採集(直後) (Cor) |
| 10 | 14:54 | 鏡を見て安静 |
| 2 | 15:04 | 唾液採集(15分後) (Cor,Est) |
| 20 | 15:06 | 心理検査(1)POMS・STAI・疲労度など |
| 10 | 15:26 | rest(化粧を落とす) |
| 30 | 15:36 | ①makeup　or　②control(化粧動作のみ) |
| 2 | 16:06 | 唾液採集(直後) (Cor) |
| 10 | 16:08 | 鏡を見て安静 |
| 2 | 16:18 | 唾液採集(15分後) (Cor,Est) |
| 20 | 16:20 | 心理検査(2)POMS・STAI・疲労度など |
| 5 | 16:40 | 手続き |
| 225 | 16:45 | 終了 |
| 3.8　h | | |

で自分の顔を眺めてもらった。なお、「①メイクアップ行動」「②コントロール行動」の動作の順序は対象者によってランダムに変更し、①、②の順序で試験を行う者が30名、②、①の順序で試験を行う者が30名になるようにした。

本臨床試験で1人の対象者を測定するのは1日だけであり、試験は生理学的指標が比較的安定する午後2：00に開始し、4時間半程度で終了した。開始時間・内容を全く同一にし、1日5名ずつ、12日間、臨床試験を行った。実験室内の環境は加湿器等を用いて、気温20℃、湿度50％を維持するようにした。

### 2．2　心理質問票

まず、対象者の普段の状態を知る目的で、日常的な心理状態や生活習慣に関する質問紙、こちらで作成した日常の化粧行動に関するアンケートを15分～20分で実施した。この質問票実施には実験室に慣れてもらう意味も含んでいた。心理質問紙終了後、10分安静にしてもらい、その場での気分・感情・不安・リラックス度などを測定した。使用した質問票は以下の通りである。

#### 2．2．1　多面的感情状態尺度（MMS）[13)]

抑うつ･不安、敵意、倦怠、活動的快、非活動的快、親和、集中、驚愕の８つの因子を測定する質問票であり、本試験では一時的な気分・感情を評価した。対象者は、40の質問項目に、全く感じていない、あまり感じていない、少し感じている、はっきり感じている、の4点尺度で答えた。

#### 2．2．2　Profile Of Mood States（POMS）[14)]

5つの否定的な感情指標、「緊張－不安（T-A）」、「抑うつ（D）」、「怒り－敵意（A-H）」、「疲労（F）」、「混乱（C）」と1つの肯定的感情「活気（V）」の6因子で構成される。対象者は、65の質問項目にまったくない、すこしある、まあまあある、かなりある、非常に多くある、の5点尺度で答えた。

#### 2．2．3　State-Trate Anxiety Inventory（STAI）[15)]

20項目、4点尺度で本試験ではその場での不安「状態不安」を測定した。

#### 2．2．4　Smith Relaxation States Inventory（SRSI）[16)]

30項目、4点尺度でリラックス度を測定する質問票で、点数が多いほどリラックスしていることを表す。3項目のストレス得点と25項目のリラックス得点を測定し、それぞれ合計した。

#### 2．2．5　疲労度チェックリスト[17)]

精神的疲労10項目、肉体的疲労10項目、計20項目を用いて疲労度を評価した。

#### 2．2．6　VAS（100mm visual analog scale）

簡易心理質問紙作成に使用した。簡易心理質問票の内容は、①現在の気分について：快適さを感じる、やる気・元気が出る、目覚める・集中できる、くつろぐ・ほっとする、の4項目、②現在の自分の状態について：肩や目がこっている、精神的に疲れた、リラックス感がある、はりつめた・緊張した、不安な・うつ、いらいらした、だるい、無気力、混乱・うろたえた、元気・活気に満ちた、ゆったり、のんびり、うっとりとした、の11項目[6]について、100mmVAS法を用いて、その時点での感情の程度を調べた。

### 2．3　コルチゾール、エストラジオール解析

唾液はこちらの指示で90秒間測定し、測定時間の間、対象者5名が一斉にチューブに唾液を入れ続けた（passive drawing法）。唾液は採取後回収され、すぐ－20℃で凍結保存された。サンプルは37℃で解凍後、3000rpm、15分で遠心分離を行い、ムチン、不純物を取り除いた後、Salivary EIA Kitを用いてELISA法で唾液中コルチゾール解析及びエストラジオール解析を行った。

副腎皮質ホルモンの１つであるコルチゾールは、炭水化物、脂肪、およびタンパク代謝を制御し、生体にとって必須のホルモンであるが、精神的ストレスを感じると放出されることが知られている。ストレスを感じると数分で上昇し、数分～数時間で元のレベルまで戻るという反応を示すという報告がある。遊離コルチゾールは血液から数秒～数分で唾液、尿に移行し、血中の濃度と9割以上相関することが知られている。最近では血液採集よりも対象者への苦痛が少なく、何度でも採集可能な唾液中コルチゾール測定がストレス研究に使われることが多い。コルチゾールの濃度をベースラインと比較することによって、精神的にどのくらいストレスを感じているか測定することが可能とされている。

エストラジオールは女性ホルモンであるエストロゲンの中でも生理活性が高い。ストレス・性ホルモン系指標に影響を与える、食事時間や体の動きは、臨床試験の際に制限を行った。

### 2．4　統計学的検定

唾液中コルチゾール、エストラジオールの値、心理質問票の得点を、化粧条件、コントロール条件（化粧の動作のみ）の2条件において、対応のあるt検定で比較した。また、時間経過については反復測定の分散分析で検定を行った。統計学的検定は統計解析用ソフトPASW Statistics（Ver17.0 for Windows）を用いて行った。

## 3．結　果

### 3.1　メイクアップ行動後の唾液中コルチゾール値、エストラジオール値

唾液中コルチゾールは、試験開始前のベースライン、メイクアップ行動・コントロール行動の直後、メイクアップ行動・コントロール行動の10分後、コントロール行動後の直後、コントロール行動の10分後の5回、唾液を採取し、解析を行なった。ベースラインとの比較、及びメイクアップ行動とコントロール行動の直後、メイクアップ行動・コントロール行動の10分安静後の60名の値の比較を対応のあるt検定で行った。その結果、メイクアップ行動とコントロール行動の直後のコルチゾール値はメイクアップ行動時のほうが有意に高い傾向が見られた（t=－1.86, p=0.068、図1）。

唾液中エストラジオールは、試験開始前のベースライン、メイクアップ行動・コントロール行動の10分後の3回について唾液解析を行った。ベースラインとの比較、メイクアップ行動・コントロール行動の10分安静後の60名の値の比較を対応のあるt検定で行ったが、有意差は見られなかった（図2）。

### 3.2　メイクアップ行動後の心理学的変化

メイクアップ行動後、コントロール行動後の心理尺度を対応のあるt検定で比較した。

MMS得点は、コントロール行動後よりメイクアップ行動後の方が、抑うつ・不安（p<0.001）、敵意（p=0.009）、倦怠（p=0.001）といった感情得点が有意に低くなり、活動的快（p<0.001）、親和（p<0.001）という感情得点が有意に高くなった（図3-1）。

POMS得点も同様に、コントロール行動後よりメイクアップ行動後の方が、抑うつ（p<0.001）、怒り－敵意（p＝0.002）、疲労（p=0.001）、混乱（p<0.001）といった感情得点が有意に低くなり、活気（p<0.001）という感情得点が有意に高くなった（図3-2）。また、STAIもメイクアップ行動後ではコントロールよりも有意に得点が低くなり、不安感情（p=0.007）が低いことが分かった（図3-3）。

SRSIでは、メイクアップ行動後ではコントロール行動後と比較して、リラックス度を表すbasic-R-scalesが有意に高く（p=0.015）、ストレス度を表すstress scalesが有意に低かった（p=0.016）（図3-4）。疲労度は、肉体疲労、精神疲労ともに、メイクアップ行動後のほうがコントロール行動後よりも得点が低かった（p=0.030, p=0.048）（図3-5）。

また、100mmVASでコントロール行動後とメイクアップ行動後で様々な主観的な感情を比較してみると（図3-6）、メイクアップ行動後では特に「快適さを感じる」

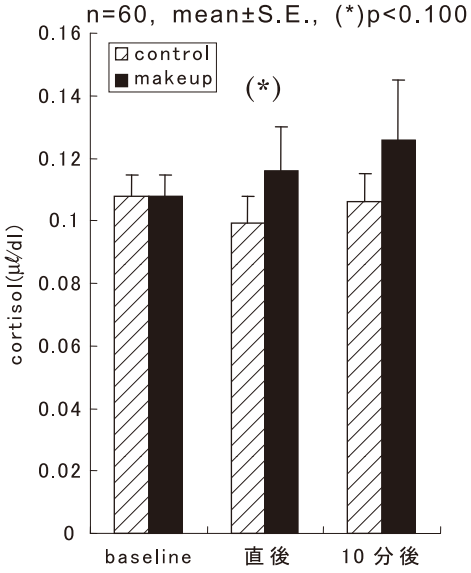



図1　メイクアップ行動後の唾液中コルチゾール値

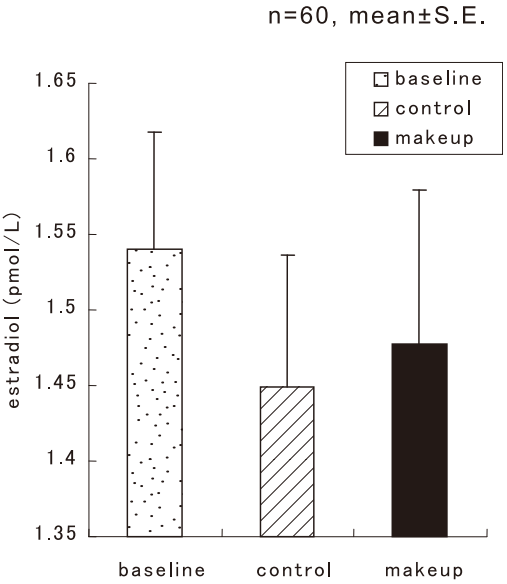



図2　メイクアップ行動後の唾液中エストラジオール値

（p<0.001）「やる気、元気が出る」（p<0.001）「目覚める、集中する」（p<0.001）「元気、活気に満ちた」（p<0.001）「うっとりとした」（p<0.001）という項目で特に有意に得点が高かった。

## 4．考　察

60名の健康な女性で臨床試験を行った結果、コントロール行動後と比較して、メイクアップ行動後に、唾液中コルチゾール値が高くなる傾向が見られた。コルチゾール値は、メイクアップの後、自分の顔を眺めながら安静にすると、平均値がより高くなる傾向が見られたが、有意差はな

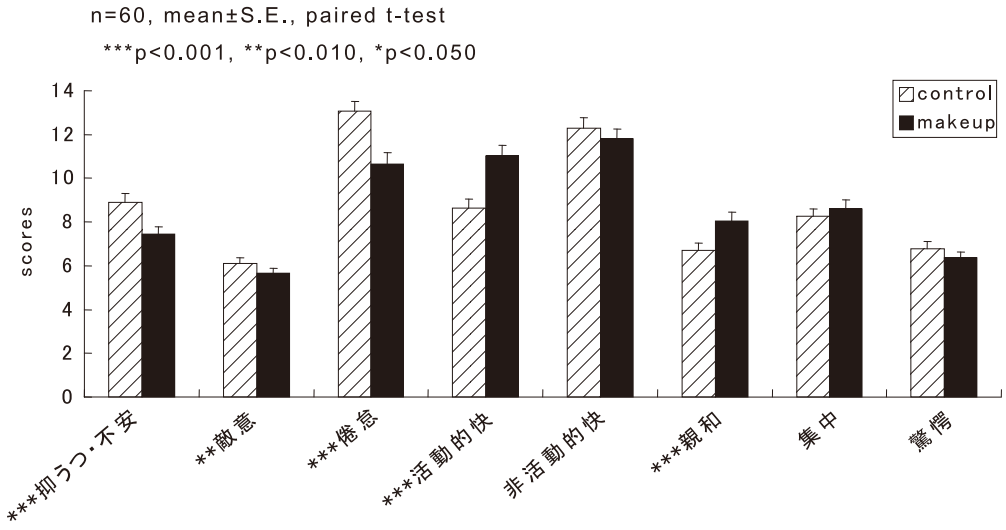



図3-1　メイクアップ行動後の MMS 得点

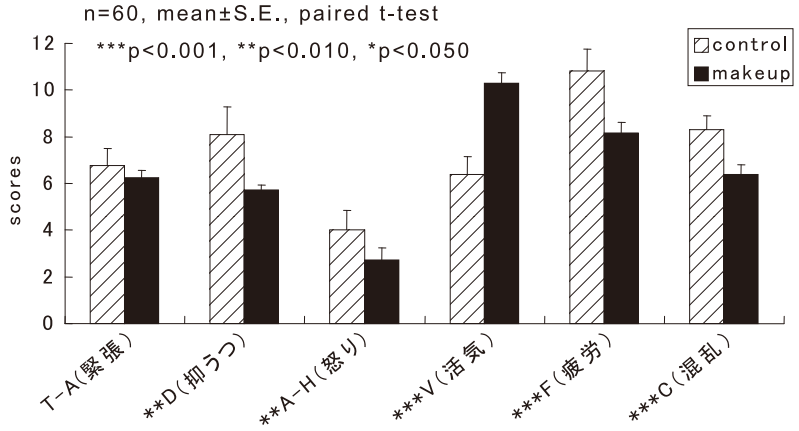



図3-2　メイクアップ行動後の POMS 得点

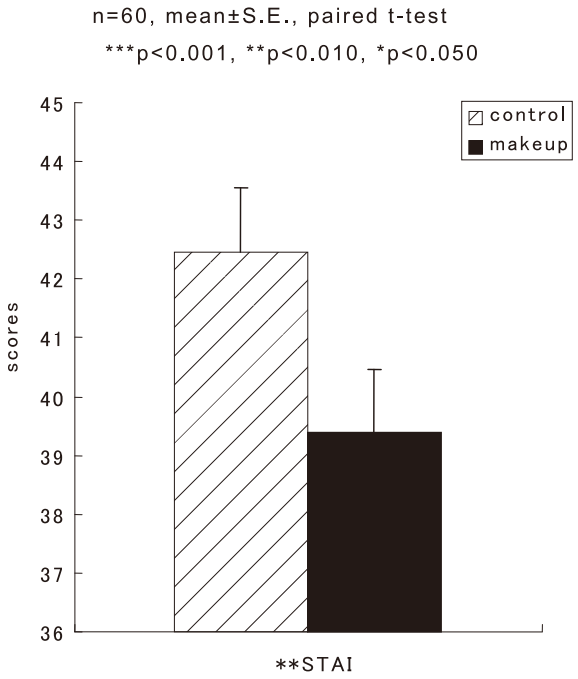



図3-3　メイクアップ行動後の STAI 得点

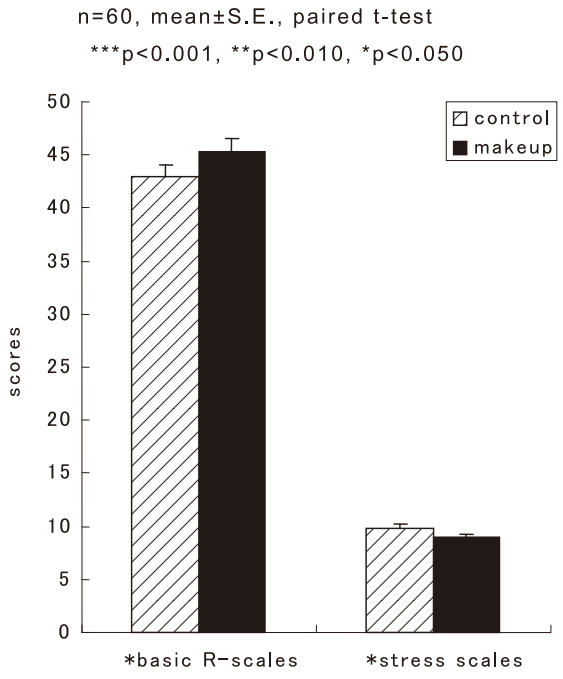



図3-4　メイクアップ行動後の SRSI 得点

かった。また、唾液中エストラジオール値は、メイクアップ行動後と、コントロール行動後で、有意差は見られなかった。

心理状態は、メイクアップ行動後では、コントロール行動後と比較すると改善傾向が見られたが、特に差が見られたのは、抑うつ、不安、疲労、倦怠感の減少や、活気、親和といった気分の増加であった。

我々は、今までリラクセーションに関する研究を行う機会が多かったが[18, 19]、メイクアップ後の心理状態はリラクセーションの際に得られる心理状態とは異なるようで、メイクアップ行動によりリラックスや疲労の項目も改善するが、それほど顕著な変化は見られなかった。特に100mmVASの結果にそのことが示され、「快適さを感じる」、「やる気・元気が出る」、「目覚める・集中できる」、「元気・活気に満ちた」、「うっとりとした」、といった項目の得点が顕著に上昇し、メイクアップによって、感情が鼓舞するような前向きの状態になることが示唆された。一方、「くつろぐ・ほっとする」、「リラックス感がある」、「ゆったり・のんびり」、といった項目には有意差は見られなかった。

唾液中コルチゾールの結果もそれを裏付けている。リラックス状態になるときは通常、唾液中コルチゾールの値が低下する現象が見られるが、本研究ではいすに座って安静にしているにもかかわらず、メイクアップ時にコルチゾール値が上昇する傾向が見られ、リラックス状態とは逆になった。コントロール行動もメイクアップのときと全く同じように手の動作を行っているので、このコルチゾール値の上昇傾向は運動効果ではなく、何か心理的な要因によるものではないかと考えられる。メイクアップによって、感情が鼓舞する状態、興奮状態になるのではないかということが推測される。

一方、エストラジオール値は参加者60名の結果を一斉に検定したところ有意差が見られなかったが、これは特に月経周期が結果に大きく影響していることが考えられる。今後は、これらの個人的な要因を含めた、生理心理学的因子の統計解析を行うことを予定している。

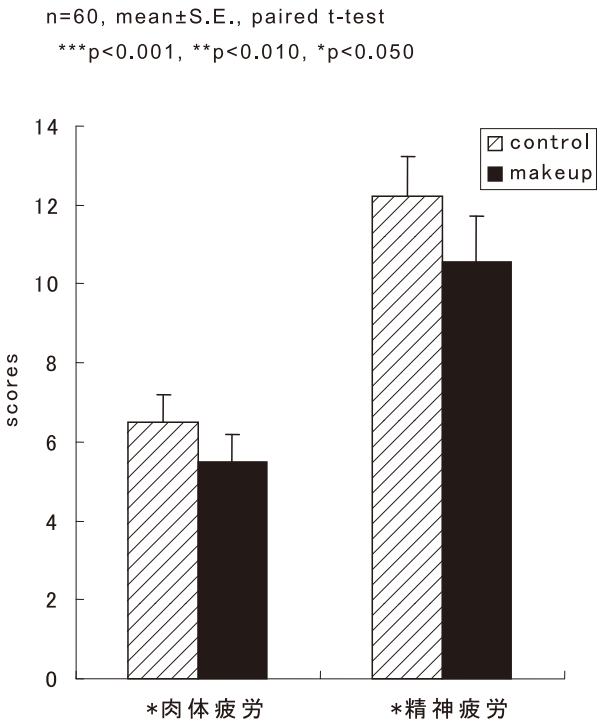



図3-5　メイクアップ行動後のSTAI得点

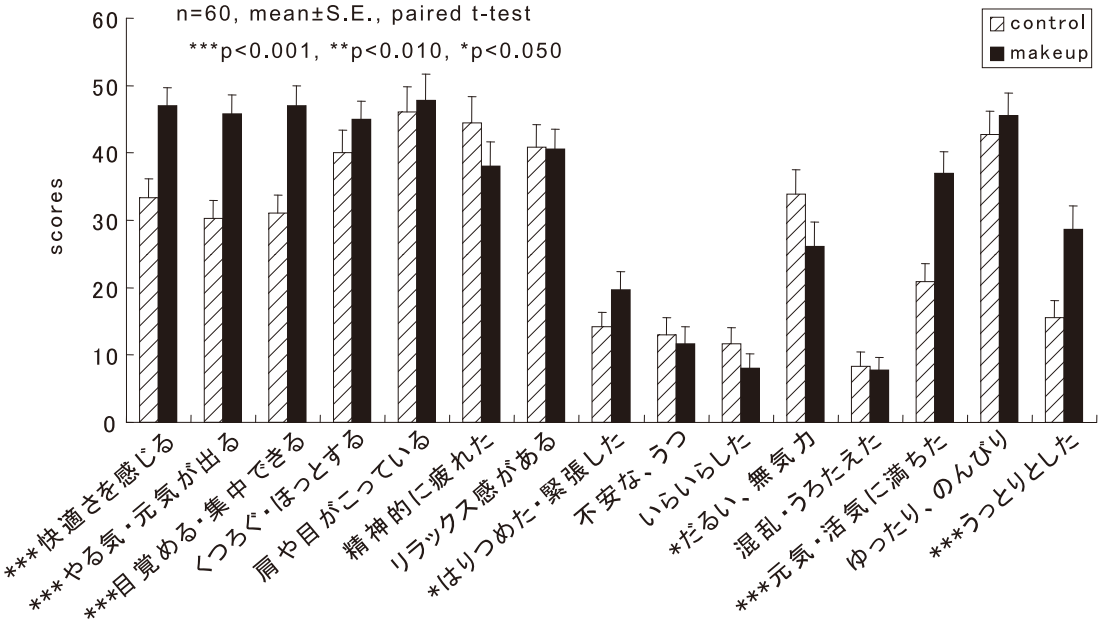



図3-6　メイクアップ行動後のVisual Analog Scale

## 5．総　括

今までのメイクアップに関連する研究より、他のリラクセーション技法等とメイクアップ行動を比較して確実に異なるのは､メイクアップ行動により女性の「やる気」「自信」が引き出されるという点であるが、本研究により、メイクアップ行動を行うと、リラックス状態とは異なり、感情が前向きになり、興奮状態になることが示唆された。

統計解析を進め、さらにこれらの感情と生理学的指標の関連を調べると、より科学的根拠に裏打ちされたメイクアップの効果が発見されるかもしれない。メイクアップ行動は殆どの女性が毎日行なっていると考えられるので、これらの行動に健康増進的価値が付与されていることが分かれば、コスメトロジーに及ぼす影響は大きいと考えられる。

メイクアップ行動に付与した健康増進的価値を調査した研究はあまり多くないが、メイクアップ行動は多くの女性が行っている日常的な行為なので、健康に関する効果が発見された場合は、多くの者が少しの工夫で健康増進的行動を実施しやすいだろうと予測される。

もしメイクアップが女性の心理・身体的健康と関係しているという科学的証拠が見つかれば、メイクアップが持つ価値が今まで以上に大きく広がるのではないかと示唆される。

**（文献）**


1）Murube J.: Ocular cosmetics in ancient times. The ocular surface, 11, 2-7, 2013.

2）杉山茂．お歯黒の歴史．薬史学雑誌，42，28-33，2007.

3）本郷嘉人．【メイクアップ化粧品の研究開発の進歩の歴史と将来展望】メイクアップ製品の研究開発の進歩と最新動向　ファンデーションの研究開発の進歩と最新動向　紫外線防御・保湿・心理的有用性．FRAGRANCE JOURNAL, 57-63, 2009.

4）Beresniak A., De Linares Y., Krueger G. G., Talarico S., Tsutani K., Duru G., Berger G.: Validation of a New International Quality-of-Life Instrument Specific to Cosmetics and Physical Appearance: BeautyQoL Questionnaire. Archives of dermatology, 148, 1275-1282, 2012.

5）吉冨由望，牧正興．化粧行動に関する臨床心理学的研究．福岡女学院大学大学院紀要：臨床心理学，57-63，2010.

6）有澤久子，竹崎真希子，藤岡由美，川村真理子，入院中の化粧行動に対する女性患者の意識．日本看護学会論文集：看護総合，291-293，2007.

7）荒矢史絵，岡本桃子，玉置望，中軽米恵，藤田ナツキ，畑瀬智恵美，工藤慶太，八幡剛浩．老人保健施設入所者にお８）稲田範子，川村真理，斎藤奈月，坂井春香，舞台のぞみ，森本麻衣，畑瀬智恵美，工藤慶太，寺山和幸，八幡剛浩．介護老人保健施設入所者における化粧の効果　精神的効果と免疫力への影響．日本看護学会論文集：老年看護，117-119，2008.

9）北川かほる，人見裕江，井上仁，石原千絵子，花木啓一．メーキャップによる生理・心理的反応．米子医学雑誌，58，121-128，2007.

10）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．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．コスメトロジー研究報告，16，76-86，2008.

11）作山美智子，吉田寿美子，荒川冴子，中幡美絵，石津憲一郎，上埜高志，安保秀勇．化粧療法の健康増進に与える影響に関する研究．総合ケア，17，82-85，2007.

12）豊増功次，原田悟史．中高年期女性の精神面に及ぼすリラクセーションプログラムを用いた「ハート美人養成講座」の効果．久留米大学健康・スポーツ科学センター研究紀要，15，27-33，2007.

13）寺崎正治，岸本陽一，古賀愛人．多面的感情尺度の作成．心理学研究，62，350－356，1992.

14）横山和仁，荒記俊一，川上憲人，他．POMS（感情プロフイール検査）日本語版の作成と信頼性および妥当性の検討．日本公衆衛生雑誌，37，913-918，1990.

15）中里克治，水口公信．新しい不安尺度 STAI 日本語版の作成．心身医学，22，1982.

16）Smith Jonathan C.: Advances in ABC: Relaxation Application and Inventories. UK, Springer Publishing Company, 2001.

17）下光輝一．職業性ストレス簡易調査票及び労働者疲労蓄積度自己診断チェックリストの職種に応じた活用法に関する研究．厚生労働科学研究費補助金（労働安全衛生総合研究事業）総合研究報告書，2008.

18）Watanabe E., Fukuda S., Hara H., Maeda Y., Ohira H., Shirakawa T.: Differences in relaxation by means of guided imagery in a healthy community sample. Alternative therapies in health and medicine, 12, 60-66, 2006.

19）渡邉映理，木村真理，今西二郎．5種類の精油による芳香浴がコンピュータ作業に及ぼす効果．アロマテラピー学雑誌，10，33-45，2010.

# 記念講演

第 23 回表彰・贈呈式記念講演　小笠原　泰

（日本薬学会長井記念ホール・平成24年11月30日㈮）

# グローバル化の中の日本的強み

## ―『日本的なモノ』から『日本的であること』へ ―



明治大学国際日本学部　教授

**小笠原　泰**

おがさわら・やすし
東京大学文学部卒業後、米国シカゴ大学社会科学大学院国際政治経済学修士、同大学院経営学修士を修了、マッキンゼー＆カンパニーを経て、米国カーギル社ミネアポリス本社に入社、米国および同社オランダ、イギリス法人に勤務後、株式会社NTTデータ経営研究所に入社、同社パートナーを経て、2009年4月より現職。
・主な著書：『日本型イノベーションのすすめ』『なんとなく、日本人』『2050 老人大国の現実』等々
・その他：NHK「白熱教室ジャパン」などのテレビ出演。

ただいまご紹介にあずかりました小笠原です。よろしくお願いします。

当初予定していた演題は「神話から現実」です。このままでもよかったのですが、「モノ」と「こと」という概念でお話ししたほうが分かりやすいのではないかと思い変更しました。後で詳しくご説明しますが、認識論的に、「モノ」と「こと」は非常に異なる概念なので、そのあたりのところも含めてお話しさせていただければと思います。

今日は、このスライドに示したアジェンダで進めようと思っています。まずは、イノベーションとは何かという話です。イノベーションという言葉はよく見聞きしますが、言葉の意味がきちんと定義されないままに使われることが多々あるので、改めて考えてみたいと思います。それから欧米的思想とその限界と、日本の組織と人の特性。続いて、今、日本が直面している環境変化についての話をしようと思います。

グローバル化などの環境変化への適応を進歩ととらえるべきか、進化ととらえるべきかは大きな問題です。後でもご説明しますが、日本語は非常にあいまいな言葉で、抽象度はあまり高くありません。特に大和言葉といわれるもともとの日本語は、極めて抽象度の低い言葉なので、進歩と進化についても厳密な使い分けがなされていません。少し余談になりますが、概念的に相反するにもかかわらず、ほとんど区別なく使われている日本語は、非常に多くあります。たとえば安全と安心は、全く相反する概念なので欧米的な感覚では絶対に併記しませんが、日本人は政治家からお役所、新聞までが、「安心・安全」と併記しても気持ち悪くないようです。同様に、皆さんは理系の方なので、そうではないと思うのですが、日本人の多くは、進歩と進化を全く混同して使います。

最後に、この大きな環境変化のなかで、国を前提にすることなく、あくまで企業や個人にとってのコア・アイデンティティを考えるとはどういうことかというお話をさせていただこうと思っています。

### 1．そもそもイノベーションとは

まずイノベーションの話です。これも釈迦に説法ですが、「ユニーク」「クリエーティブ」「イノベーティブ」の違いはなんでしょうか。概念的に一番大きい集合は「ユニーク」です。要するに、何か他と違っているということを示しているだけです。コトラーの古典的なマーケティングの理論で言えば、紫色の歯磨き粉のようなものです。紫色というだけではUP（Unique Proposition）なだけであり、アクアフレッシュのように三層構造で、虫歯予防で息に良いというようなUSP（Unique Selling Proposition）とは、異なります。このUSPは、クリエーティブに近いものがあります。

それでは、「クリエーティブ」とは、どのように定義できるのでしょうか。まず、ユニークであること、それに加えて、価値評価が必要です。しかし、その価値が金銭的かどうかは問われないし、かつ、みんながその価値を認める必要があるわけでもありません。ごく一部の人でも価値を認めればクリエーティブということになります。

「イノベーティブ」になると、クリエーティブに加えて、基本的に社会の大多数の人が認める価値が必要となります。大多数が価値を認める結果、既存のパラダイムを覆すのがイノベーティブなのです。スマホの登場により、ガラケーがなくなり、かつノートPCもだんだんなくなっていきます。若い方はお分かりかもしれませんが、スマホは子どもたちにとっては、最早電話ではありません。われわれは電話と思っていますが、ガラケーとスマホは全く違うものです。そういう意味で言うと、スマホがイノベーティブであることは間違いありません。これまでの価値観をひっくり返すわけですから。ご存じのように、スマホは技術的にはそれほど高度なものではなく、要は非常にうまくパッケージングしているだけですが、イノベーションは、発明とは異なり、新たな組み合わせによってもたらされることもあります。イノベーションとは、難しい言い方をすれば、より効率的な何らかのものが旧来のものを代替えしてしまうことです。それは社会通念かもしれませんし、パラダイム

という言い方のほうがしっくりくるかもしれません。

そう考えると、国のレベルでイノベーションを起こすことはとても大変です。企業であればできると思います。アップルがそのよい例で、アップルによるスマホというイノベーションによりHPは衰退していくのだろうし、ゲームメーカーもハードメーカーとしては、衰退していくかもしれません。ところが国の観点で言えば、新しいパラダイムの導入による経済成長が見いだせなければイノベーションの意味がない、つまり、新しいより効率的な産業の経済規模のほうが、代替えされる旧来の産業規模よりも大きく、そのことによる正の経済効果が、代替えされた産業の雇用者の減少や賃金の減少による負の経済効果を上回ることができなければ、国にとってのイノベーションであるというわけにはいきません。このようなことが起こることは、非常に期待し難く、かつ、そもそも、不可逆のグローバル化が進行する中で、イノベーションを国という境界に閉じて議論すること自体に意味がありません。その割に政治家は簡単に「日本のイノベーション」と言って、「日の丸、日の丸」と言っていますが、国レベルのイノベーションを、そんなに簡単に掲げていいのかという気がします。明らかに無責任であると思います。政治家の仕事は、シンボル操作（国民の受け狙い）と権益の調整（利権の分配）であると言えば、無責任なのは、驚くにはあたらないのですが。

企業ごとのイノベーションは当然ありえますが、アップルのイノベーションにより代替えされていく産業全体の経済規模よりも、彼らが作り出した産業の経済規模のほうが本当に大きいということを検証しない限り、アップルのイノベーションがGDPという観点で国家レベルのイノベーションに寄与するかどうかは、問えないわけです。そういうことで、国家と企業のイノベーションは、分けて考える必要があります。

## 2．欧米的思想の限界

次は、少しややこしい話になりますが、欧米の思想についてです。小泉さんのころから「市場原理」主義か「市場」原理主義か、つまり、原理主義ととらえるか、市場原理ととらえるかという議論があるわけですが、新古典派の考え方は「市場」という原理主義であって、「市場原理」主義ではありません。少し補足をすると、原理主義というのは、本来の原理に徹底的に忠実であれという姿勢、ファンダメンタリズムです。イスラム原理主義を想像していただくとわかりやすいかもしれません。そこで「市場」原理主義の考え方だと、市場は万能という話になるわけですが、これが欧米的（特に、アングロサクソン）思想の大きな前提です。

欧米（特に、アングロサクソン）の思想の根幹をなす大前提があります。それが、「近代化」です。この考え方によれば、近代化を進めるほどに「予見性」は高まるということになります。未来は開いていて、無限に拡大していくという考え方です。日本人には、この考えは、あまりピンとこないかもしれませんが、この「近代化」思想は果たして今後も通用するのかという問題が、現在、欧米では結構深刻に議論されています。

というのも、欧米における近代化の前提は、個人の超越的主体性ですので、近代化への疑いは、個人の超越的主体性への懐疑につながるからです。この話をしはじめるとすごく長くなってしまうのですが、自我（個の主体性）という概念は、近代以降に欧米で生じた概念で、その形成過程は、簡単に言うと、中世には、個人の内を支配する存在であった神を最終的に個人が代替する過程ですから、個の主体性というのは非常に超越的です。日本人は、難しい言葉でいうと、個別化されない私的間主観性が根源的自発性をもつ、つまり個の主体性がそれほど強くないので、個人の主体性が脅かされることへの恐怖感を理解し難いかもしれませんが、欧米では、1000年以上の歴史をかけて、フランス革命を通して獲得してきたものですから、それだけで今日の演題になってしまうぐらいの重いテーマなのです。

近代化の前提は、個人の主体性と主体の超越性と、もう一つは、意図によるコントロールです。個という超越的な主体が客体をコントロールする、言いかえれば、対象を設計の中に閉じ込めるという観点が非常に強いということです。設計されたものには再現性（法則性）が認められ、再現性がなければ科学は進歩しないという意味では、理系の考え方は基本的に設計志向なので、この点は容易に理解していただけると思います。

さらに認識しておくべきことは、近代化の確信です。ひつとめは、近代というのは未来に開いていて、近代化が進めば必ず予見性は向上し、予見性の高まりに伴いリスクが減る、という確信です。もう一つは、「富」「自由」「正義」は無限である、という確信です。近代化を一番明確に表すのは、トルーマン以来使ってきたディベロップメントという言葉で、われわれにも馴染み深い言葉ですね。アンダーディベロップメントとも言いますが、近代化の要素を全部凝縮したディベロップメントという言葉を用いたトルーマン・ドクトリンは、すごいのかもしれません。これ以前には、われわれはディベロップメントやアンダーディベロップメントという言葉は使いませんでしたから。欧米では、これらは非常に重要な合意事項です。

ところが、先ほども申しあげたように、ポストモダンと言われて久しいですが、こうした欧米的思考の前提や確信が、欧米において、揺らぎ始めているということです。「市場」原理主義から「市場原理」主義へということで、今後も市場を無視することは多分できませんが、ただ、「市場」原理主義では恐らくないのです。それが、リーマンショックから学んだことだと思います。そして、「無限」と「予

見性」の高まりは最早保証されません。無限や予見性の高まりという確信は、個という超越的主体による「客体」のコントロールという「モノ」的思考の産物ですが、これが本当にどこまでできるのかという問題です。皆さんは理系なので自己言及性については多分お分かりですよね。自己言及してしまう世界では、客観的な観察はほとんど不可能であり、客観者という存在はあり得ません。欧米の基本的な考え方では、主体は超越的なので、ある種、神のポジションに近いのですが、自己言及の世界では、そうした近代主義の万能性は認められないということです。それを社会学的に言うと、再帰性という表現をします。物理学では戦前から既に言われていることなので、別に目新しいことでは恐らくないのでしょうけれども、ただ、これが社会の中で認識されてきていることは、すごく重要なことなのかもしれません。

欧米で2000年の少し前ぐらいに、ベック（Ulrich Beck）の『リスク・ソサエティー（危険社会）』という本がすごく評判になりました。これは、まさに近代化が保証するリスク軽減は進まないということがどれだけ大きな問題であるかということを欧米人が理解したからで、それであんなに堅い本がたくさん売れたのでしょう。でも、日本ではほとんど無視されて売れていませんでした。

## 3．日本的組織の特性

今度は日本について考えてみます。基本的に、日本と欧米の考え方はかなり対極のところに存在しているので、そのあたりのことをお話ししようと思います。今後の不可逆なグローバル化の中で、『日本的な』特性というものを理解しておくことは重要であると思います。

### 3.1 「目的遂行型」組織と「目標達成型」組織

まず、日本の組織は、果たして「目的遂行型」か「目標達成型」か、という問題です。目的と目標の違いはお分かりになりますか。英語で考えるとわかりやすいのですが、purposeとobjectiveの違いです。日本では、両者を区別せず、objectiveを目的と目標の両方に訳すことが多いので気持ち悪いのですが、objectiveは目標であり、目的ではありません。決定的な違いは何でしょうか。目的は、基本的には0か100です。目的は完遂したかしないかでしかありません。一方、目標というのは、達成の程度で測れます。目標に対して90％達成、80％達成と言いますね。「目的を80％達成した」と言っているときは、多分、限りなく目標の意味で目的と言っているのだと思います。人事評価手法であるMBOはManagement By Objectivesであって、決してManagement By Purposeとは言いません。ここに決定的な違いがあります。要するに数量管理をできるか、できないかの違いです。理系の考え方は間違いなく目標達成型です。では、日本の組織はどちらでしょうか。

具体例として、IBMとトヨタの比較をしてみます。IBMの今のCEOはロメッティですが、ガースナーの後を取った前CEOのパルミサーノの時代に作られた、GIE（Globally Integrated Enterprise）というIBMのコンセプトがあります。これは簡単に言うと、ベストプラクティスの発想です。世界に展開するIBMのオペレーションの中で、一番良いものを集めて機能的にモデリングしようということです。完ぺきな設計思想です。欧米人は設計思想が強いとはいえ、ここまで明確に言ってのけるのは、なかなか、大したものかもしれません。

実は、IBMのなかでも日本IBMはずっと特別な存在でした。北城さん、椎名さんの時代まではそうでした。ところがその後、大歳さんのあたりから少し、方向転換したように思いますし、今回に至って、社長はドイツ人になり、日本IBMはIBMのなかの一つであり、特別な存在ではなくなりました。

一方、トヨタを代表する「カイゼン」「JIT」「自働化」「なぜを５回」は、設計思想ではなく、いわばプロセス重視の思想の産物です。なぜならば、カイゼンというのは、ここまでやれば終わりというものではなく進捗の数値管理ができないので目標にはなり得ず、あくまで、目的という方向性の共有であるからです。同時に、方向性を共有していればこそ、永続的なプロセス改善が可能となり、日本の高品質を実現できたわけです。有名なゼロ・ディフェクトも同様に、目標ではなく目的です。ところで、「Six σ」という言葉をお聞きになったことのある方はいらっしゃいますか。日本のゼロ・ディフェクトの欧米版で、フォードが始めたものです。統計で言うσの6、つまり100万分の2.3回のエラーまでは許容されるという考え方です。これであれば論理的に到達可能であり進捗の数値管理も可能なので目標になりえ、欧米人にも受け入れられます。そもそも、ゼロ・ディフェクトの概念は、もともとアメリカの軍事産業から来たのですが、エラーがゼロというのは絶対に達成できず、いうなれば精神論ですから、目標にはなりません。故に、アメリカでは浸透しなかったのですが、日本では最初にNECが導入し、日本の企業社会に受け入れられることになります。

話が飛んでしまうのですが、日本人のこのプロセス志向の強さは、浮世絵、特に錦絵に特徴的です。「全体最適」と「部分最適」の話にも関連しますが、エッチングというヨーロッパの版画では、書く人、彫る人、摺る人は同じ人です。このような版画家は日本でも棟方志功がいますが、非常に特異ですね。ところが、日本の浮世絵は、ご存じのように絵師がいて、彫り師がいて、バレン師がいてというように、三つの役割が別々です。これを工場手工業的な全体最適で考えれば、一番摺りやすいものを彫り、彫りやす

いものを描くのが合理的です。しかし、それでは日本の浮世絵はこれほど有名にはならなかったでしょう。日本は分業してどうなったかというと、部分最適をしたわけです。絵師は好きなように、およそ彫りやすいなど考えることもなく、絵を描き、彫り師は「こんなものを彫るのですか」と言いつつ彫りあげ、それをバレン師は、「え、これを摺るのですか」とか言いながら何とか摺る。浮世絵、特に、錦絵は多重摺りなので、摺るのは非常に大変です。

この部分最適があってこそ、浮世絵の価値が存在するのです。つまり、全体最適を全然考えず、部分最適を追求した結果が浮世絵なのです。加えて、浮世は二束三文で、高いものではありませんから、これはすごいことです。貴族のお抱え職人ではありませんから、日本人の傾向・癖といっても良いかもしれません。

話を元に戻しましょう。一般的に、部分最適はよくないと言われますが、果たしてそうでしょうか。たしかに全体最適を重視する欧米的な設計思想においては、予め想定した最善のアウトプットが確実に安定的に出されることが重要です。したがって、結果の再現性が担保できなくなるという意味において、たとえ想定外の良い結果がもたらされたとしても、それは設計の失敗ですので、プロセスが進歩されてはむしろ困ります。ですので、部分最適は結果に関わらず、認めがたいのです。しかし、日本人の場合は、そもそも、全体最適を志向する設計思想の持ち主ではなく、むしろ、プロセス自体を改善していくことが重要であるので部分最適であっても、よいわけです。このような部分最適を排除せずプロセス改善を容認するという、再現性を前提に置かない日本的なアプローチにおいては、意図しない良い結果を生む土壌をもっているともいえると思います。

別にどちらかが優位なわけではありません。IBMにみられる設計志向は、俗に言う負のフィードバックです。負のフィードバックとは、たとえばエアコンの温度設定において、５℃高ければ下げる、低ければ上げるというようなフィードバックで、コントロールが可能なものです。これは欧米的とも工学的な考え方と言えます。一方、日本の場合は正のフィードバックと言えると思います。正のフィードバックとは過剰反応を意味するので、アウト・オブ・コントロールになる可能性があります。これは、欧米人には、受け入れがたいところがあります。

要するに、欧米と日本ではフィードバックの考え方が全く違うわけで、設計精度の向上による再現性の向上を図ることで目標の達成に近づくことを考えるか、目的（思い）の共有化をベースに終わりのないプロセス遂行を考えるか、の違いとも言えます。日本的なプロセス遂行志向の場合、プロセスが進歩するので、再現性は担保されず、基本、一回性であると考えて良いと思います。つまり、再現性に重きを置く気がないと言えます。欧米の設計志向の場合、『イノベーションのジレンマ』の著者であるクリステンセン（Clayton M. Christensen）も言っていますが、再現性が前提にあるので、プロセスが進歩してはいけないのです。プロセスは、基本固定的です。そうでないと、インプットとアウトプットの関係が崩れます。それが、目的遂行型の日本組織と目標達成型の欧米組織の、大きな違いだと言えます。

### 3．2 「日本型イノベーション」とは

さて、日本型イノベーションを特徴づけるものはなにかを考えてみましょう。欧米の場合は、今申し上げたように設計志向が非常に強いですから、何か新しいことをするためには入り口から壊す、つまり、非連続を意図する必要があります。ですから、彼らは破壊的なイノベーションという表現を好んで使います。日本ではその逆で、プロセスを改善（進歩）させる結果として非連続になり得ますから、入り口での否定をあえて強調し、行う必要はありません。要するにプロセス遂行を終わることなく行い、プロセスを進歩（改善･刷新）させることで、結果として、予期しない、これまでとは非連続的な何か価値のあるものが出てくるというのが日本の型であると言えると思います。

重要になるのは、再現性を担保するかしないかの考え方の違いでしょう。皆さんは理系の方なので、根本的には、多分、再現性を前提とする設計思考の持ち主のはずです。ところが、日本人の深層心理的に言うと、再現性ではなくて一回性に軸足があると思います。

この意味で言うと､日本型のイノベーションとは､「こと」の概念に立脚していると言えるのではないでしょうか。日本人は、主体と客体を分けられない、かつ、時間性も排除しない「こと」という概念の影響が非常に強いので、そこから「終わることのないプロセス遂行」を通して想定外の新たなことができてしまう､「結果的に非連続」という形を取ることを受け入れるとお考えいただいたら良いのかもしれません。この「こと」という概念は、非常に日本的な概念で、欧米の言語に訳すことは難しいと言えます。つまり､「モノ」を基底に置く欧米社会的には､「こと」を基底におく日本的なイノベーションを理解することは非常に難しいのではないかと思います。シュンペーターは「馬車を４台つなげても汽車にはならない」と言っていますが、日本の場合はひょっとすると馬車を4台つなげて、想定外のなにかを生み出すことが出来てしまうのかもしれません。

「こと」と「モノ」の違いについて覚えておいていただきたいのですが、簡単にいうと､「『モノ』とは、主観を排除し時間的推移変動の概念を含まない安定的かつ客観的な対象である名詞的概念」と定義されるように、客観的で、非常に堅い概念です。欧米社会の基底は､基本的に「モノ」的です。一方､「『こと』とは、対象と主体を分離すること

なく（主観を排除できない）抱合し、時間的に進行する（主観が対象を通して経験する）不安定な事象である述語（動詞）的概念」と定義されるように、主観的で、非常に緩い概念です。要するに、主体と客体を分けず、一緒に時間的に変動するのだから、これはどう見ても再現性はありません。不思議なことに、日本でも、学校教育では「モノ」を教えるのですが、日本語を話している限りは基本的に「こと」の概念のもとにいるのです。

例えば、リンゴが木から落ちる。ニュートンはそれを「モノ」と見たから万有引力を見つけたわけで、清少納言は「こと」と見たから「いとをかし」になるわけです。そのとらえ方の違いです。これを、脳学者の茂木さんあたりがクオリア（質感）と言っています。最近、経済産業省が、「感性マーケティング」などと何だかよく分からないことを言っていますが、それも「こと」の概念に近いのかもしれません。

日本人が好んで表記する「安心」と「安全」ですが、これも、「こと」と「モノ」と関係があります。まず、「安全」とはリスクテイクです。ベネフィットとリスクの対比です。リスクを対象化し、それを最小化して、ベネフィットのほうが大きければ、安全と考え、リスクテイクするわけです。まさに、「モノ」的概念です。ですので、原発は100％安全ですというのは大うそです。99.9％であればあるかもしれませんが100％の安全はあり得るはずがありません。100％安全は原理的にあり得ません。しかし、面白いことに、日本人は100％安全があると思っているふしがあります。それが、日本に特有と言える「安心」という概念に繋がります。「安心」というのは、リスクを対象化することも、ベネフィットと対比することもなく、リスクがないと思える状況を求めているので、極めて主観的です。まさに、「こと」的概念と言えます。ですから、「安全と言ってくれ。そうすれば安心するから」というジョークになるわけです。安心は、基本的にリスク排除（risk averse）ですから、概念的に水と油の関係である「安心」と「安全」を併記することは、個人的には非常に気持ちが悪いのですが、日本人の多くは、全然気にならないようです。おそらく、気にならないのは、リスクテイク、つまりリスクを対象化してコントロールする「安全」の概念が、もともと弱いからなのであろうと思います。

日本人が「こと」的世界観を基底においていることを確認したところで、イノベーションの技法について、少し、考えてみたいと思います。よく言われることかもしれませんが、日本人の得意技ということでは「手」が極めて重要です。中国と言う高度な文明を有する大国の周辺に存在した、日本のような国には、概念よりも物が先に到来するので、物をまず手に取ることになります。日本は、このような周辺環境にある国のなかで、特に、「手」というものを重視したと思います。事実、「手になじむ」「手に余る」というように、「手」という言葉を多用し、非常にそれに執着します。これは、とても面白いですね。故に、日本人は爾来、手の中に収まるという意味で、小型化にエネルギーを注ぎます。古くは、うちわから扇子を作ったのも日本人であるし、折りたたみ傘を作ったのも日本人ですし、なんでも詰め込む弁当を作るのも日本人です（笑）。小型化と枠を決めて、どう詰め込むかを考えるのが、大好きなようです。

次に、内向な役割の精緻化ということがあります。日本的組織では、職務定義書（job description）は書けませんよね。これは、最初に職務（独立的機能的業務）があるのではなく、周りとの関係性を重視し、自分の役割遂行を通じて関係性の構築を進めるからです。したがって、言われたこと以上に仕事をする傾向が強いといえます。しかし、こだわりがあるので、他人からみるとあまり意味のなさそうな作業をつくったり、必要以上の複雑化・精緻化をしたりします。故に、基本は例外がなく職務が明確であるはずの経理の仕事であっても、引き継ぎが難しいという状況が起こるわけです。この強い役割ナルシズム的意識と行動は、不確実性が低い環境下でないとうまく機能しないということを理解しておく必要があります。

それから、思いの共有化という文脈で縛るということをします。思いの共有化は、コンセンサスとは全く違います。コンセンサスというのは、論理的な合意事項という部分集合です。従って、「総論賛成、各論反対」ということは、決してコンセンサス後に起こるはずがないのです。ただ、日本の場合は文脈で縛っているだけなので、各人の考えがオーバーラップ（部分集合化）していなくても良いのです。ですから、時間の経過などにより、思いによる全体の文脈支配が弱くなると、一挙に「総論賛成、各論反対」が起こるわけです。ですから、どれだけ強く文脈支配（強い思いの共有化）を維持できるかが、日本の組織の場合重要です。先ほどのゼロ・ディフェクトのように、論理的にはあり得ないレベルの精度に向かって力を集結するというようなことも、思いの共有化があればこそ可能であると言えます。

もう一つは、バブル以降の日本では弱くなってきている気がしますが、従来日本人が得意としたのは、絶えざる新奇性の取り込みです。日本人はずっと昔から、外から新しいものを取ってくるということをしていましたが、それをバブル以来しなくなりました。外部新奇性を取り込み、無化して、日本化するというのが、これまでの日本の特徴の一つであったと言えると思います。以上が、日本型のイノベーションの特徴ではないかと思います。

ここで、一つとりあげたいのは、破壊的イノベーションとも呼ばれる欧米的な入り口からの非連続を志向するイノベーションを喧伝する学者やマスコミが多いのですが、以

上のような特徴をもつ日本人は、果たして、ルールブレーカー（破壊的イノベーションには必須の存在です）を社会的に認めることができるのかということです。実は、日本社会はあまりルールブレーカーを認めません。私からすると、ライブドアのホリエモンと村上ファンドの村上さんも、別にあそこまで、潰さなくても良いのではないかと思うわけです。すこし、歴史を振り返ってみましょう。これを言うと義経の人気が落ちるかもしれませんが、義経はルールブレーカーであることはご存じですか。あの時代は、戦争のルールとしては、まず、騎乗で「やあやあ、われこそは」と双方名乗ったうえで相手を狙うのがルールであって、決して馬を撃ってはいけなかったのですが、義経の兵隊は馬を撃ちました。また、常識的に考えて、鞍馬寺にいて、多分、船をまともに操ったことのない義経が、なぜ水軍（海賊）を背景にもつ平家に勝てるのか不思議ではありませんか。それは、義経軍がこぎ手を撃ったからです。当時の戦争のルールでは、こぎ手を撃ってはいけなかったのですが、彼はルールを破ったのです。頼朝が義経を嫌った理由は、このあたりにあるのではないでしょうか。頼朝と義経は、異母兄弟です。今の感覚では兄弟だと思いますが、頼朝は多分兄弟であるとは思っていなかったのではないでしょうか。頼朝は尾張に下った公家の娘が母親（一方、義経の母は常盤御前ですが、近衛天皇の中宮の雑仕女であり、出自は不明です）ですから、彼の感覚は、多分、平氏に近いのだと思います。半分貴族化しているので、いくら平家を滅ぼすと言っても、彼の属する社会のルールを破るという行為は許せないのではないでしょうか。ですから、義経とは合わないし、多分「何だ、こいつは」と思っていたのではないかと思います。これはあまり言われませんが、調べていただければわかりますが、歴史的な事実です。判官贔屓の日本人ですが、義経がルールブレーカーであることを知っても、義経人気は落ちないでしょうか。日本には、ルールブレーカーを否定していくところがすごくありますので、実は義経人気も、この事実を知れば、怪しいのかもしれません。

ウォークマンとiPodも、ルールブレークを認めるか否かに関係しています。アップルに負けたソニーのことを悪く言いますが、ソニーは、作る気になれば、簡単にiPodをつくれたはずです。ただ、iPodは著作権法違反ですから、日本では役所に呼ばれて、つぶされます。ご存じのようにiPodは著作権を無視しています。DRMというデジタル著作権管理のシステムは導入していますが、ライムワイヤーという著作権に抵触するサイトからのダウンロードを認めています。いくら、技術的にMP3の問題で難しいと言っても、ダウンロードが面倒くさい仕掛けを作ればできたはずですが、それをしませんでした。向こうの人は大多数が、ライムワイヤーなどのP2Pソフトの違法サイトからダウンロードをしていますから、著作権法違反です。アップルストアから忠実に買っていたのは日本人ぐらいですかね（笑）。同じことをSONYがやれば絶対に日本の役所に呼ばれて、指導でしょうね。

コンプガチャも一緒です。私からするとコンプガチャを海外でやれば結構面白かったと思います。もともとおかしいのは、子どもが親のクレジットカードを持っていて、かつ、その番号を知っていることです。親の監督不行届きでしょう。私からすると、コンビニで万引きをしたと娘がお巡りさんに連れてこられたときに、親が「うちの娘が盗むような魅力的な商品を置いているコンビニが悪い」と言っているようなものです。お役所と日本の庶民感情なるものが、たくさんの新しいビジネスの芽をつぶすのです。一方、つぶしておいた上で「これからはイノベーションだ」と言ってのける永田町や霞ヶ関は、面白いと思います。片やつぶしまくってそういうことを言うのですから。ホリエモンと村上さんに対しても、いろいろ言いますが基本的には、根源は同じだと思います。

このように考えてみると、基本的に、欧米型のイノベーションは入り口での非連続であるのに対し、日本型のイノベーションは出口、つまり結果としての非連続になるのだと思います。日本型のイノベーションの成否には、やはり、プロセスをどれだけきちんと回しているか（改善しているか）が非常に重要です。その意味で、日本型イノベーションの発生確率を高めるためには、車のハンドルで言う「遊び」が大切なのですが、この点で、今流行の内部統制やセキュリティというのが一番厄介です。日本の企業の強さを殺すのに一番簡単な方法です。設計思想が強いアメリカに代表される欧米型企業にとって、セキュリティも含めた内部統制はもともと自然な流れなので良いのですが、日本型企業にとっては、片っぱしから遊びがつぶされ、遊びをゼロにされることの痛手は非常に大きいと思います。最近、日本の企業が「へたっている」理由がすごくよく分かる気がします。無駄というのは結果的には矛盾を生み、矛盾が活性化を生むことは、理屈としてもお分かりいただけると思います。ただし、無駄・矛盾・活性化というこの流れは、欧米社会のように、何事もコントロールを重要視する限り、結果がコントロールできないので、受け入れるのは難しく、偶然性を許容する日本型の社会でないと、受け入れは難しいと言えると思います。

組織マネジメントの観点から考えると、マージナリティー（周辺性）をどう考えるかということも重要です。日本の企業もばかではないので、８人飛ばしで社長を抜擢することも珍しくなくなりました。バイリンガルと言われるソニーの平井社長もゲーム部門と言えるSCEからの若手抜擢の例であると思います。ご存じのように中心部というのは硬直化しますし、中心から新しいものは出てきません。ソ

ニー（ストリンガー会長）は、平井社長に、かなりドラスティックなことを期待しているのではないでしょうか。

### 3.3 「日本的リーダーシップ」とは

日本的リーダーシップの話をします。よく冗談で言うのですが、日本人の学生だけを集めてリーダーを選べと言うと、じゃんけんで選んだりします。これを欧米人が見ると何をやっているのだ？となります。欧米人は「おれがやる、おれがやる」と言います。これは、もともと日本人にとってリーダーとは何なのかという話であり、要するに、日本と欧米では、リーダーに求められるものが同じではないということです。

日本的組織では、リーダーとして組織の上に行くほど、権威とコントロールを併せ持つか、それともコントロールより権威が強くなるか、というお話です。多分、日本の組織にいらっしゃれば、上に行けば行くほど権威が強くなるという実感をお持ちだと思います。オーナー企業は別です。柳井さんは両方持っているでしょう。引退しているので別かもしれませんが、稲盛さんもそれに近いかもしれません。

権力（パワー）はもともと、実質的に支配していること（コントロール）と、jurisdictionといわれる制度上の支配権（権威）の二つから成り立っています。この二つを併せ持つことによって何でもできる、これが欧米的リーダーです。アメリカの大統領はこれを持っています。しかし、日本の総理大臣は、実は、コントロールがないのではないかと思います。これは、総理大臣のリーダーシップが弱いということでは必ずしもなく、日本では、両方をもつことが許容されないのだと思います。権威とコントロールを併せ持つパワー（権力）を有するオーナー社長が何かすると、「オーナー社長の専横だ」と新聞や雑誌が書くのですが、それは別に専横ではなく欧米でいう普通のリーダーの振る舞いであると思うのですが、これが日本では受け入れられませんね。

日本は歴史的に、権威とコントロールを分離してきました。両方を併せもつ権力者（リーダー）の存在は、役割構造を脅かすので、社会の知恵として両者の分離をしてきたのだと思います。すごくさかのぼりますが、歴史的にわかりやすい例としては、平安時代の藤原冬嗣と嵯峨天皇でしょうか。嵯峨天皇は平城天皇の兄弟です。平城天皇はすごく政治欲が強かったらしく、強硬に長岡京に遷都しようとし、薬子の乱がおきて、譲位します。嵯峨天皇は三筆でも有名ですから、政治に興味がなかったのでしょう。有能な能吏である藤原冬嗣とは、うまくカップリングして、彼以降、藤原氏（藤原北家）が政治を見て、天皇は権威として基本的には上にいるという、権威とコントロールを綺麗に分離した形になりました。

欧米社会においては、権威とコントロールを1人の人間が持つことで、パワー（権力）を有し、リーダーとして機能します。パワーは、職位が下がるほどに小さくはなりますが、上司は部下に対して、常に権威を有し、コントロール（実行支配）することができます。マネジャーでも部下に対しては強いパワーを有するので、「おまえはクビだ」と言うことができます。

日本では、組織の一番上に行くと権威しかないし、一番下に行くとコントロールしかありません。その現場のトップにいるのが係長かもしれません。日本的な組織では、組織のトップとボトムの間では、上に対してはコントロールをし、下に対しては権威を持つという形で、これが入れ子構造になって続きます。野中（郁次郎）さんがミドルアップと言ったのは、これを指しているのかもしれません。江戸時代では、将軍と老中と大老、幕府と大名、藩主と家臣という形態もよく見るとこういう構造をしていますから、結構、昔から日本にある形態なのかもしれませんが、世界ではちょっと珍しいものであると思います。

余談ですが、日本では、平安時代に作った官位がそのまま長らく変わりませんでした。中国では、易姓革命を認めるので、天下を奪い取って、平定した人は、元の身分が百姓であろうが奴隷であろうが、天が認めたれっきとした皇帝です。前の王朝の皇帝との関係は、皇帝と認める上で問題ではありません。官位制度も、自分で作り変えます。日本では、天智天皇は、易姓革命論者であったといわれ、それを否定したのが、天武天皇であると言われています。中国と違い、日本の官位制度が千年以上も変わらない背景がそこにあります。

このコントロールと権威の分離は、役割構造の重要性という話に関係していると思います。日本人にとって、役割はとても重要（相互協調的自己の根幹かもしれません）なので、役割を担保する役割構造を壊されることに対して非常に強い危機感と抵抗があります。上からの指示に対して、どうすればできるかではなく、まずできない理由を100言う理由はここにあります。なぜなら、どうすればできるかは、既存の役割構造の変更を意味することが多いはずだからです。また、役割を精緻化する理由も同じで、役割を精緻化すると、外から役割構造を変えることがなかなかできなくなるからです。ですから、日本では、人事異動となってもなかなか引継ぎができません。比較的、企業間で差がなく標準化されている経理という仕事でも、各人で仕事の作りこみ・精緻化をしますから、ワークシェアリングは難しいと思います。ワークシェアリングを導入しようとすると、多分、「おまえに給料の３分の１をあげる。でも、仕事はおれが全部やるからおまえはやらなくていいよ」と言うのではないでしょうか。オランダのように二人で同じ仕事をスプリットすることは多分できないと思います。そのせいかどうかわかりませんが、最近はもうワークシェアリングの話はしないですよね。この仕事のない今こそ、マス

コミ的にはワークシェアリングを喧伝すべきのような気がするのですが。

ということで、突出をよしとしない、出る杭をたたくというのも、出る杭をたたかないと構造が壊れるからです。その代わり沈む杭も拾っていたのが日本の組織です。出る杭だけをよく言いますが、出る杭と沈む杭の両方を見るのが日本の形です。つまり、役割構造を維持するためには、突出する行為を忌避するわけです。これが、成功しそうなルールブレーカーをマスコミと為政者と国民が一緒になって、たたく理由です。

このように役割構造の変更を嫌う日本的組織の場合、制度的な変更が難しいので、結局柔軟な解釈論で対応します。懐かしい行政指導などがそうです。法律ではなく、運用でしのぐのです。環境変化には基本的に運用で対応するという非常に面白いやり方をします。律令制でも、検非違使などの令外官を置いています。摂政・関白も令外官ですが、日本はそれが定常化します。多くの令外官が存続します。企業でプロジェクトチームが目的を変えても存続するのと同じですね。日本的組織は、本当に運用を重視します。

当然のことながら、運用のノウハウは企業ごとに違います。ですから、Aという会社の上にいる人は、その企業独特の運用のことはよく知っていますが、Aという会社がつぶれて違う会社に行くと、その会社では別の運用ノウハウで動いていますから、A社での経験が役にたちません。例えば、大和証券にいた人が野村證券へ行くと、同じ証券という業態でも社内の運用方法が全く違うわけです。アメリカはそういうことがないので、ゴールドサックスからモルガンスタンレーに行こうが問題ないのです。この違いは大きいと思います。

この権威とコントロールの関係からみたリーダーシップに関する欧米と日本の違いは、畢竟、組織の得意とするところが、意思決定かインプリメンテーションかの違いに行きつきます。日本的組織では、意思決定が難しいのでインプリメンテーションに重心をおきます。要するに、日本が強いのはインプリメンテーションの精度とスピードなのです。外的環境が非常に安定している状況下では、意思決定よりもインプリメンテーションが重要となりますから、日本企業は、一般的に安定的な環境では強いです。加えて、不確実性への耐性が弱い日本人には、安定的環境は有利に働きます。逆に、外部環境の変化が激しいときには、右に行くか、左に行くかという意思決定が必要で、インプリメンテーションの精度とスピードの問題ではなくなります。そうなるとアメリカ企業のほうが強いのです。石油ショック以降、ずっとこういうサイクルでやっていたのですが、最近日本は沈みっぱなしです。それは、どうも事業環境の変化の問題ではないでしょうか。不可逆なグローバリゼーションは、事業環境の絶対的不確実性を上げることはあれ、下げることはないと思います。

ということで、日本的組織のリーダーは、不確実性の低いときにはその強さを最大化し、不確実性の高いときにはその弱さを最小化すべきでしょう。最近は、不確実性がより高くなってきているので、弱さの最小化に力点を置く傾向にあるのかもしれません。ただ、不確実性は相対化が可能であり、慣れれば耐性も強くなりますから、必ずしも、絶対的不確実性の問題だけではありません。日本的組織のリーダーは、このような認識をもち、組織をマネジメントすればいいのではないかということです。

以上をまとめると、日本的組織においては、コントロールと権威の分離、不確実性の相対的低減、明示的な役割構造の維持の三つが重要視されかつ実際に重要であるということです。

## 4．日本的個人特性

### 4.1　相互協調的自己構造

われわれは、自己構造を太陽系のような形で教わっています。英語で言うとmutual independent self（相互独立的自己）です。自分は太陽系の太陽で、自分以外は全部、自分の周りを回っている惑星です。ところが、90年代のマーカス＆北山という２人の共同研究では、アジア系の人の自己構造は、それとは少し違って、mature interdependent self（相互協調的自己）であり、相互に依存している自己構造であるという研究結果をだしています。相互協調的（相対的）自己構造は、星で言うと同一軌道に二つの星が回る連星のようなものでしょうか。相手と自分の位置関係が相手次第で、相対的に変わる。だから日本語には「私」「僕」「おれ」「拙者」など、一人称がたくさんあります。ご存知のように、欧米の言語でも漢語では、一人称は一つしかありません。例えば、漢語の一人称は「我」一つしかありません。一人称が複数あるのは恐らく韓国とベトナムですが、一人称の数は、日本語が最も多いと思います。

先週、大阪へ行って同じような話をしてきたのですが、私の前に英語で落語をされている落語家の方が話されていたことで面白かったのは、日本語は「拙者」「あちき」「われ」という言葉づかいで、その人が誰であるかが分かります。たとえば「拙者は」と言えば武士ですが、英語ではみんな「Ｉ」となります。これが困ると言っていました。日本語の一人称は非常に相対的になっています。

さらにすごいのは、「先生は」とか「お母さんはね」というように、役割まで主語にしてしまうことです。こうした役割名称は、韓国でもあまり使わないそうです。冷静に考えると、お母さんはいつでもお母さんではありませんから、相対的な役割名称を一人称として使うというのも、すごく興味深い現象です。

「考える・主張する・選ぶ」と、「思う・共感する・合わ

せる」では、皆さんはどちらがしっくりくるでしょうか。理系の方が多いので、「考える・主張する・選ぶ」と答える方が多いかもしれませんが、一般的には、日本人は、「思う・共感する・合わせる」です。両者の違いは簡単です。極端に言うと、「考える・主張する・選ぶ」は、相手を必要としない自動詞で、「思う・共感する・合わせる」は相手を必要とする他動詞です。他動詞は、必ず何か対象物がないと成り立ちません。「○○を思う」ので、「○○に共感する」し、「○○に合わせる」のです。これに対して「考える・主張する・選ぶ」は、自分が考えているだけ、主張するだけ、選ぶだけです。「think」の日本語訳は「考える」ですが、実態は「考える」ではなく「思う」ではないでしょうか。これだけ見てもわかるように、日本語は、必ず他者を想定している言葉なのです。自分は一人で成り立っていないのです。

ところで、中国語の「人間」の意味をご存じですか。人のことではありません。中国語では社会のことです。日本語では、社会を意味する場合は、「にんげん」ではなくて「じんかん」という読み方をします。オリジナルは漢語ですから、もともとは社会という意味で入ってきたはずです。それをいつの間にか日本人は人という意味にしてしまいました。それはなぜかというと、日本人にとって「間」という意味合いが非常に重要だからです。他者との間には必ず間があるわけで、「間が悪い」とか「間を取る」というように、「間」をすごく重要にしますね。つまり、人間は、人と人の間で成り立っているというわけです。ですから、オリジナルの意味が変容していったのだと思います。

また、２人で話しているところに３人目が入ってくると、しゃべり方が変わるのも日本特有です。外国人からみると「日本人のselfはmovableだ」と映るようです。目上の人が来ると言葉遣いも変わる。「Self is constantly shifting」、要するに自己の位置が動いてしまう。相互独立的自己である欧米では、本来selfというのはstableでなければいけないのです。相互協調的自己というのは、彼らにとって、かなりの衝撃のようです。

### 4.2　思考メカニズム

思考メカニズムに関して、先ほど役割が重要であると申し上げましたが、役割設定のためには、バウンダリー（境界）をまず決めて、組織内での自分の居場所を定める必要があります。このようなプロセスでは、外の枠（境界）は前提となり、そこから中を見て自分の役割を考えていくのです。ですから、思考は、内向きとなり、精緻化に向かいます。日本語の「の」という助詞は、「○○の、○○の、○○の」というように、続けて使われます。英語で「of」を3回以上続けて使うことはまずありません。フランス語は少し多いですが、日本語ほどではありません。日本語の「の」というのは、どんどん内を向いて細かくなっていくわけで韓国語にもなく確かに面白い助詞です。

分類の三原則をご存じですか。全体性、排他性、非超越性です。全体性というのは全体の枠であり、集合的外集合がないことです。つまり、漏れがない。英語で言うとCollective Exhaustiveということです。もう一つは分類上、排他的でなければいけない。オーバーラップがあってはいけない。英語では、Mutually Exclusive、相互排他的です。最後は、非超越性です。これは、抽象度の階（かい）を変えてはいけないということです。例えば、犬と猫はいいのですが、猫とチワワはいけないわけです。欧米人には当たり前のことですが、日本人はこれがとても弱いです。私はマッキンゼーの出身なのでMECE（ミッシー）という言葉をよく使いますが、直訳は「漏れなく、ダブりなく」と言うことです。３番目の非超越性の原則について言及していないのは、欧米人には当たり前すぎるからなのですが、日本人にとっては当たり前ではないので、見落としがちです。寡聞ながら、この違いに言及している論理思考の本が日本にないことが、日本における欧米的な論理思考の習得におけるそもそもの問題ではないかと思います。

### 4.3　組織への帰属意識

帰属意識の話に移ります。「Team」と「チーム」の意味は、実は違います。辞書を引くと「Team」はチームで、「チーム」はTeamと出てきてしまい、これでは意味がないのですが、就社か就職かという話も同様に、実は、参加と帰属という違いがあります。欧米の場合、何かの目的があって、自分がそれに貢献できる機能（スキル）なりを持っているので、参加して目的を達成したら解散する、それが「Team」です。日本ではそうではなくて、まず集まってチームに帰属し、そこから何をするか考えます。帰属が重要ですから、組織の存続が前提となり、従って、いったんチームを作ると、第三者には当初の役割を終えたように思われても解散しないで生き延びようとします。お役所の外郭団体でも同じです。法律を読むと「目的を達成したら解散すること」と書いてあるのですが、絶対に解散しませんね。本来の目的と全然違うことをやって生き延びています。おかしいだろうと思うのですが、日本の組織はそうなってしまうのです。お役所がこれをやると、まさしく税金の無駄遣いです。日本には世界の７割ぐらいの老舗企業があり、世界一です。次がドイツだそうですが、日本がダントツです。老舗企業が多いのも、こうしたことが原因だと思います。

何とか生き延びてしまうのは、富士フイルムとコダックを考えるとわかりやすいと思います。富士フイルムは、銀塩フィルムの時代が終わると、お金はたくさんあるので富山化学工業を買収してみたり、富士ゼロックスの株を25％

買い増したりと、かなりドラスティックな業容転換で生き延びようとしています。一方、コダックは、あれだけの強盛を誇り、お金もありましたがChapter 11で破産してしまいました。また、米国のBUNCHを覚えていらっしゃいますか。バローズ、ユニバック、NCR、コントロール・データ、ハネウェルという当時の名だたるコンピュータメーカですが、今は一つも生き残っていません。一方、当時のコンピュータメーカであったFNH（富士通・NEC・日立）は、最早コンピュータメーカではないですが、３社とも立派に生き残っていますね。また、ご存じのようにテイジンは、もともとは帝国人絹で大正時代に人工で絹を作っていたのですが、今は全く人絹の会社ではありませんね。このように、日本企業の業容は変わってきているのです。アメリカの場合、例えば、コダックが破産しGoogleのような会社が生まれて、産業構造の活性化を図るわけです。日本の場合は、生き残る意志の強い企業の中で業容を変えていくことで、ひいては、産業構造を変えていく。しかし、これには時間がかかりますし、まったくの非連続というのは、富士フイルムのケースが初めてではないでしょうか。富士電機から富士通、富士通からファナックという例もありますが、これも極めてまれなケースと言えます。問題は、このアプローチがこれまでのように今後も通じるかどうかですが、これは保証の限りではありません。

帰属意識の観点で重要なこととして、もう一つ、「プロセス遂行」という役割付与の視点があります。ポジションは、ポストとも言い換えられますが、これは、目標達成のために必要な機能設計により論理的に導出されるもので、メンバの属性は所与ではありません。これに対して役割は、必ず人が前提となります。自分と相手との関係性のなかで双方の役割が相対的に規定されるのであって、固定的ではありません。そして、役割遂行のプロセスを通して、役割が精緻化されていきます。

ゆえに日本では、Job Description（職務記述書）が書けないのです。アメリカでは、こういうポジションが必要である、それにはこういう能力（competence）が必要であるからこれだけの給料を払うという設計的発想をしますから職務記述書があるのが当たり前です。ところが日本の役割は、時間の経過やメンバ構成によって変容していきますから書けません。ポジションは代替性が高いのに対し、役割は相互補完的であり代替性が低いです。

四角がタスクだとすると、欧米は四角い部屋を丸く掃きます。これをつなげていくことで仕事が構成されますので、そうするとERPなどのコンピュータ・システムはすごく入りやすいわけです。オーバーラップしないのでコンピュータ化しやすいのです。しかし、日本社会では言われたことだけをすると怒られます。ということは、四角の外側まで掃くのです。これをつなげてください。必ずオーバーラップします。オーバラップするごとに、個別に対応することになります。それではなかなかうまくコンピュータ・システムは導入できません。日本の製造業のラインや営業にERPが入らないのはまさに、これが理由です。業務が比較的標準化されている経理などは大丈夫でしょうが、日本の組織では、経理でさえも難しいところがあるかもしれません。

ということで、日本ではJob Descriptionに全てを記載できないし、マニュアル化ができないと言っていますが、もともとマニュアル化する気がないのです。ちょっとした火の加減が違うことにこだわりますし、それを一つひとつ書いていたらマニュアルがこんなに分厚くなって意味がありません。これも精緻化と再現性を求めない日本人の特性の現れといえるかもしれません。

## 5．環境変化…「進歩」から「進化」へ

### 5.1 「日本的な」根源的強さとは

次は、環境変化に対する「日本的な」の根源的強さについてお話しします。まず、その最たるものは、先ほどお話しした外部新奇性の取り込みではないかと思います。これは「ものづくり」の文脈でよくいわれることです。安定的役割構造を前提として、絶え間なく新奇性を取り込んで、役割の精緻化を行いながらものづくりの極め・究めをしてきたのが日本的な強みであると言えます。

別の言い方をすると「持続性」を持った「変容性」です。これは矛盾するような言い方なのですが、終わりのないプロセス遂行ゆえの持続性であり、再現性を重視しない一回性ゆえに変わっていくのです。言ってみれば「いつも変わる・変わらない私」というのが実は、日本人的であったりするのかもしれません。これが日本人の本質ですから、私からすると、日本人は保守的であるというのは的外れという気がします。逆に、日本人が伝統だのと保守的なことを言い出す時は、日本が問題を抱えていることを意味すると思います。その意味で最近、伝統回帰の傾向が強くなっているのは、問題であると思います。

日本人の場合、絶えず外部新奇性を取り入れることに象徴されるように、持続性と変容性の二つが対立しないのです。なぜかというと、日本人はイデオロギーに興味がないからです。本居宣長が「神随（かんなが）ら」と言っていますが、彼は、漢心（からごころ）というのは私心を立てるので良くないと言い、大和心は私心を立てないところにその価値があるとしたわけです。私心を立てないとは、要はイデオロギー（に興味）がないと言っているのです。この無関心ゆえに、新奇なものを何でも外から持ってきて、役割構造に基づく内向な精緻化を通して、無化（脱イデオロギー化）し、日本化してしまうということができるわけです。

しかし、これには悪い面も当然あります。その最たるも

のは、たとえば日本の年金制度です。本来、制度設計には、実はイデオロギーというか思想が必要なのですが、それをきちんと詰めていないので日本の年金制度はおかしくなっているわけです。年金制度には、賦課方式と積立方式という、相反する大きな二つの考え方があり、両者の基本的な設計思想は全然違うのに、それを安易にくっ付けて「日本の年金制度は、修正積立方式と言う賦課方式だ」と言っている。この結果、日本の年金制度の設計思想は、自己責任なのか支えあいなのか、何だかもう訳が分からなくて、ぐちゃぐちゃです。高齢者にしてみれば、当然、自分が積み立ててきたわけだから「積立分は自分のものだ」と言ってのけ、かつ「前の世代はおれたちが支えたのだから、後の世代が支える（賦課方式）のは当然だろう」と言って開き直るわけです。受益と負担をどうバランスさせるかの基本思想が曖昧なわけで、だから年金改革は進まない。年金制度を作る時に議論をして、どちらにするのかはっきりしておけということです。

二つ目は、高文脈であると思います。高文脈というのは、先ほども申し上げたように、相手の存在が必ず前提となるということです。この相手というのが、人間でなくてもなんでも良いというのが、日本人の凄いところかもしれません。日常的に日本は本当にハイコンテクスト（高文脈）な国です。子どもたちが最近「KY」と言うけれど、あれも「場を外す」というのと同じで、言い方が違うだけで意味は同じです。

三つ目は、役割ナルシズムともいえる自己の役割設定の強い欲求と役割と自己の同一性の強さです。役割遂行が自己の再確認と強化につながりますから、役割を与えると本当に日本人はよく頑張ります。外国人にとって日本人を使うのは非常に楽なようです。「君、これをやってね」と言えば、本当に徹底的にやりますから。ただ、日本人は、問題をすべて自分でどうにかしようとして、最後の最後、どうしようもなくなってから「困りました」といって報告に来るので、アメリカ人のボスは嫌がります。「warningだけは、もっと早くに出してくれ」と言うのが、彼らの本音ではないかと思います。潜在的問題も把握し、部下をコントロールするのがボスの仕事なので、このようにブラックボックス化されるとアンダーコントロール（掌握）することができませんから、困るわけです。このあたりは、外国からみた日本人の善し悪しですが、いずれにしても、役割を徹底的に掘り下げてプロセスを改善する、深めるというのは日本人の得意とするところです。

四つ目は、プロセスを通した終わることのない精緻化と究めといえる極度の深化であると思います。

要は、日本型のイノベーションとは、革新という俗に言われる「入り口の非連続」ではなくて、「結果としての非連続」つまり、絶え間のない刷新と言ったほうが良いのかもしれません。

### 5．2 「グローバル・パラドックス」…日の丸（国家）の意味

Globalizationは不可避です。これを今さら止められると思われる方は、非常に少数ではないかと思います。中国も止められるとは思っていないと思います。昔のソ連や中国とは異なり、経済活動の相互依存が強いので、最早アウタルキー（国境に閉じた自給自足経済）はできません、その意味で、グローバル化を止めることは非常に難しいと思います。もし、止めれば中国経済も死んでしまうし、アメリカでは、売るものもがなくなってしまいます。

大きな問題は、このGlobalizationに対する対応を、進歩と認識するか進化と認識するかです。進歩と進化の違いはお分かりになりますか。進歩には、われわれに選択権があります。進化には、われわれに選択権はありません。賢いとか愚かとかという問題ではなくて、適応できたかできていないかだけです。われわれは、耳がなくなるのは嫌だと言っても、無音の世界になれば耳はなくなります。それは進化です。その意味で言うと、私はどちらかというとGlobalizationは避けがたい進化だと思っていて、今後は、進化という認識をベースでお話をしていきます。

ネイスビッツ（John Naisbitt）が80年代に書いた『グローバル・パラドックス』によると世界経済のインテグレーションが進めば進むほど、最も小さいプレーヤーが力を持つようになります。Globalizationによりhomogenization（同質化）とheterogenization（異質化）が両方とも進むということです。これが俗にグローバル・パラドックスといわれるものですが、これは何を意味しているかというと、今のサイズの国民国家の専権性は低下して、国民国家の上方統合と下方分散が始まるということです。国民国家は、グローバルな課題に対応するには小さすぎます。しかし、今と同じ国民国家の形態がEUの頭に来ることは誰も欲しないので、EUのポリティカルなインテグレーションは進みません。国民国家の上方統合は、国民国家にかわる国家形態の模索を必要とします。また、国民国家は、ローカルのことをするには大きすぎます。今のサイズの国民国家では駄目なので分散します。だから、チェコスロバキアもチェコとスロバキアに分かれましたし、ベルギーも早晩、オランダ語圏とフランス語圏で分かれるかもしれません。スペインも事実上、バスクはバスクでいくし、カタロニアはカタロニアです。要するに、想像としての国民というアイデンティティを基礎に置く人工的な国民国家という存在とその規模が非常に中途半端になっているのです。加えて、かつて個人と企業の動きと情報をそのコントロール下に置き、財源をすべてコントロールしていた国民国家ですが、Globalizationが進む中で、個人と企業の国境を越えた動きと情報を最早コントロールすることができなくなっています。

これは簡単に言うと、すべてをコントロールして、お金も好きなようにコントロール下におき、それを所得再分配するという社会福祉国家装置の終焉を意味しています。グローバル化の進展により、国家が企業と人の動きをコントロールできなくなっていますから、富裕な企業や個人がいつまでも自国にとどまる保証はありません。そうなると、税収という財源が枯渇しますから、分配機能はうまく機能しません。つまり、社会福祉国家を標榜する国民国家の力は落ちます。国民国家のできることは、シンガポールのように「お金持ちの人、来てください」という、個人や企業にどう選択されるかを考える方向に向かいます。

一方、企業の自由度は増すはずです。ギリシャで一番大きいコカ・コーラのボトリングの会社は、ギリシャにいると当然法人税が高くなるリスクがあるのでスイスに本社を移してしまいました。三菱商事もメタル事業本部の本社をシンガポールに移しましたね。ユニクロも日本からいなくなるかもしれません。そういうことが徐々に既に始まっています。実は船会社などは、かなりの機能を海外に移しています。この手の企業は、もう日本の会社でなくなっても多分やっていけるでしょう。ただ、国はいろいろと意地悪をするでしょうけれど、グローバル化を避けられない企業が適応の結果、日本から離れていくということは、今後も起こってくると思います。そもそも、日本の名だたる大企業の株主構成をみれば、果たして日本の企業と言えるのかは疑問です。

最近、国が率先して「日の丸、日の丸」と言うのも、こうした国家の専権性の低下を危惧する表れだと思います。私は、たとえば日本の中小企業の技術を海外の企業が買ってくれるのなら、それでも別に良いではないかと思います。国別対抗（これも最近怪しいですが）のオリンピックではあるまいし、ビジネスをしているのですから、なぜ企業や個人の経済活動がオールジャパンでなければいけないのかと思います。先ほど申し上げたように、日本の国に閉じてイノベーションをするなどということはほとんど不可能なことなのです。

しかし、何事も「国家＝オール日本」というマスコミ操作を最近すごく感じます。マイコンを強みとするルネサスでもそんなにすごいのなら、なぜ赤字になるのか。日本の家電技術の肝なんですよね。国のみの支援で、エルピーダで失敗したから、企業に無理やり声を掛けて「金を出せ」と言うような感じですね。これでは、国家主導の民間を巻き込んだ、昔の一揆の「一味神水」と一緒です。あれでどうにかなるとは到底思えないのですが、ただ、何事もそういう方向に向かっている気がします。ということで、国家の悪あがきとは言いませんが、国家の専権性の低下に対する危機意識が背景にあると思います。

国家と企業と個人の三位一体という関係は、もはや機能しないと思ったほうがよいと思います。今まではこういう前提で動いていたし、そういう教育がされていたわけですが、これからは意味がなくなっていくのではないでしょうか。企業は企業だし、個人は個人ということで、国家の思惑とは別個に意思決定をして行動していくことが今後求められると思います。

### 5．3 「ICT（情報通信技術）」が引き起こすハードからソフトへの機能シフト

ICTの話ですが、皆さんご存じのように今、日本のデジタル家電はエッジを失いましたね。皆さんにお伺いしたいのですが、今、ソニーの製品で買いたいものはありますか。液晶テレビ、ブルーレイのレコーダ、ウォークマン、デジカメ、VAIO（ノートPC）、PS、何かありますか。これといってないのではないでしょうか。ということは、個人的な見解ですが、ソニーは早晩、ハード事業に見切りをつけるのではないでしょうか。こう言うと申し訳ないですが、多分、ブルーレイを買ったのはほとんど団塊の世代です。結構厄介なのは、ブルーレイでダウンロードしたものは普通の環境では見られないし、PCで見るのにも特別なソフトが要ります。とても厄介で、あれは単なる地デジ対応のコピーライト保護のデジタル10（10回までのコピーが可能）を導入したかっただけだろうと怒っている人もいるのではないでしょうか。

日本企業がデジタル家電の競争力を失った理由は何でしょう。日本企業のデジタル部門の部品は、もともと内部用を想定していたわけです。それを、突如、部門ごとに「君たちもきちんと収益責任をとりなさい。つまり、プロフィットセンターだからね」と言って、外販を促したわけです。ところが、自社部品の外販化をした時点で、自社のデジタル製品は差別化が難しくなります。俗に言うモジュール化です。こうして、自分で自分の首を絞めてしまったわけです。それでも、日本の製造業はインテグラル型だなどとも言っていますが、インテグラルが有効なのは車など、ごく限られたものになるのではないでしょうか。

「日本人の手先は器用」と言いますが、ご存じのように今はもう半導体から何から、人間が作っているものはありません。シャープがサムスンに負けた理由は単純で、今は機械が機械を作るので、差別化が難しいわけです。機械による差別化のためにはすごい設備投資が要るわけです。そして、その投資をする体力はというと、国が後ろにいるサムスンには、シャープはもともと勝てません。最初から見えていたと思います。

もう一つの問題は、品質至上主義と機能追加主義であると思います。これらを付加価値といって追求してきたのですが、実は消費者は、そんな付加価値は要らないという話になってきているわけです。これから先はインターネット

テレビにどんどんなります。インターネットテレビを買おうと思えば100ドルでしょう。誰もシャープの高性能のものは買いません。コンピュータももう買いません。例えば、VAIOや旧NECのレノボが「高付加価値の一番高いものは日本に戻ってきて作っている」と新聞が書きますが、あれはそんなものを向こうで作っても誰も買わないからです。VAIOの最先端のものを買うのなら、MacBook Airを２年に１回買い換えたほうがいいのではないかという状況になってしまっています。つまり、価値がハードからソフトに移行しているわけです。日本が強く主張している高付加価値化は、多分、ミラーレスの一眼レフなど本当に限られたところでしか機能しません。たとえば、スマホは、ご存じのように技術的には何もとがったものはありませんから。日本人は、職人肌と言いますが、職人は本来、依頼人のために自分のもつ技能を十二分につかって求めに応じたモノを作ります。一方、芸術家は、己の美学のために好きなものを作ります。いまの日本人は、職人といっても、品質を追究する芸術家きどりになってしまったのかもしれません。

製造の機械化も大きなインパクトですが、その中でも3Dプリンターはかなり大きな影響をもたらすかもしれません。ご存じかどうか分かりませんが、小さいものであれば自分に合ったものがテーラーメイドでできます。靴などは、すでに市販されています。製造工程が日本の極みと言っていましたが、個人で自由にできてしまうかもしれません。

ソニーの製品で買いたいものはないという話で、早晩、ソニーはハードに見切りをつけて、ソフト（＋金融と保険）だけの会社になってアメリカに行ってしまうかもしれませんね。皆さんはあまりゲームをされないかもしれませんが、あの手のゲーム機はもう多分要りませんね。みんなスマホに入ってしまうのではないでしょうか。高度なゲームには高度機が要るので、すごく高度なものは別かもしれませんが、任天堂のDSやSCE（ソニー・コンピュータエンタテインメント）のプレステというハードが生き残るのは、結構つらいのではないでしょうか。価値がハードからソフトに行ってしまうわけです。インターネットテレビも今、主戦場になっているのは、実はコントローラーであり、コントローラーの覇権を競っているのは当然のことながらアップルとグーグルとマイクロソフトです。アップルとグーグルは音声認識、マイクロソフトは、動作認識のキネクトで戦います。どこがインターネットテレビのコントローラーを取るかというのが大きな問題なのです。なぜかというと、ハードには価値がないからです。アメリカに行けば非常に大きなテレビがとても安く買えます。あんなものは作るのは簡単ですから。コンピュータに慣れていると、テレビが必要かと言われると、多分、子どもたちはもう高品質のテレビを求めていないのです。インターネットを筆頭に、プラットホームがどんどんできています。フェースブックなどもそうですが、プラットホームというのは、国との関係はどんどん薄くなります。

ソクラテスの時代は、実は文字を使うか使わないかが議論された時代です。ソクラテスは文字を使わない人で、アリストテレスは書く人、プラトンは中間で困ってしまった人ですね（笑）。結局は時代は、文字使用を取ります。つまり、アリストテレスが勝ったわけです。次はトマス・アキナスの確立した神学ですが、ここでは文字というよりも、どれだけ頭に記憶するかでした。いまの記憶教育の元祖かもしれません。神学論争をご存じですか。全部の教典の何ページに何が書いてあるということを徹底的に覚えています。かつ、キリスト教の神学化（理論化）により、実はキリスト教を近代化し、ひいては個人のなかで自己が神にとって代わっていく道筋をつけた人です。原始キリスト教を近代的なものに変えた人です。グーテンベルクは、活版印刷をすることにより、記憶ではなく皆さんで安く読みましょうという形にしました。そして、サー・バーナーズ＝リーはインターネット、WWW（ワールドワイドウェブ）を発明します。個人はそれまで発信ツールを持ったことがありませんでした。その一方で、不可逆なグローバリゼーションが進み、ネイスビッツ（John Naisbitt）が予測したグローバルパラドックスが起こります。こういう流れの中において、国家と企業と個人の関係の変化は、国民国家の意味合いも含めて、かなり大きな変化をもたらすのではないでしょうか。

### 5.4 「日本型イノベーション」と「日本の現場」は万能か?

日本の競争力が落ちています。市場としての日本もアジアの中で、最早特別ではなくなりました。実際、日本市場は今までずっと特別扱いでしたが、日本IBMも特別ではなくなり、グローバルなIBMの一部になってしまいました。それから、皆さんはご存じないと思いますが、マッキンゼーの日本オフィスマネジャーは、ここ２代続けてフランス人です。もう先端のプラクティースをするオフィスではありません。これが、今の日本の状況です。もう「日本だけは特別」は通用しないということです。

日本の大手企業を見てみても、パイオニアの場合、もう社員の70％は日本人以外です。パナソニックも半分が外国人です。トヨタグループのデンソーでさえ、社員の日本人比率は半分です。株主をみても、外国人株主の比率は３分の１を超えている日本の大企業は多くあります。これで、日の丸日本という、日本人のための日本の会社と言う意識で良いのでしょうか。それは、違うのではないかと思います。昔のように日本で生み出したものを海外に売る、同じものを安く海外で作るわけではなくて、これからは、海外の現地市場を見て、そこで価値を生み出すわけです。そう

であるとすれば外国人社員と日本人社員との間に、給料など待遇の差を大きく付けることはできないはずです。給与のみならず、グローバルな人事制度を導入せざるを得ないと思います。ですから、グローバルに展開する日本の企業は、日本という国家や日本人だけを見ているわけにはいかないのです。この傾向は、一層加速するとことでしょう。

一つお考えいただきたいことは、東南アジアのエリートの人たちは、英語を話すということです。支配階層とよばれる人々の多くは、ヨーロッパやアメリカへ留学している人ですし、彼らの子弟は、ほぼ欧米に留学します。日本だけが、どういうわけだか、この手の人たちでも日本語しかしゃべらないのです。政治家も日本語しかしゃべらない。面白いですね。それがよいという人もいますので、いいか悪いかはここでは議論しませんが、東南アジアではプロトコルが欧米化しているのは当たり前の話です。

日本のモノづくりの主唱者である藤本隆宏教授は、依然、日本の製造現場の強みを絶対視しています。その気持ちも分かるのですが、この議論は、昔の「日本の軍隊は戦場では最強だが、大本営はバカだ、無能だ」と言った議論と似ていませんか。要するに、現場はすごい。ただ、軽率に現場を海外に出す経営者があほだという感覚です。最近の藤本さんは特にそれが強いように思います。確かにプロセスが強いのは認めましょう。ただ、その強度のプロセス依存の現場が、万能かどうかは、真剣に考える時であると思います。

日本的組織の現場は、川を下る船頭集団のようなものです。川を下るときに岩にぶつからない、岸にぶつからない、水位や流れの速さが違えば、それに柔軟に対応できる。瞬時の対応です。これは確かにすごいと思います。船頭集団ではなく、船長のもとでのクルー集団であるアメリカ型組織には、多分できないでしょう。しかし、今のグローバルの環境は、実は、海なのです。海に船頭がいてどうするのか。海では、やり方が違うでしょうということです。藤本さんの議論は、川に残りたいと言っているのか、海に行っても依然船頭が機能すると言っているのか、どちらだか私にはよく分かりません。

しかし、間違いなく海に比すことができるグローバル環境に出て行くときには、組織は船長がすべてをコントロールするクルー集団である必要があるのではないでしょうか。船長は、船において絶対（パワーを有します）です。その代わり、船長は乗客を置いて逃げてはいけない。最後まで残らねばなりません。先に逃げれば犯罪です。そして、船長の決定は最終決定で絶対です。これが、船長の下でのクルー集団です。これは、船頭型組織とは大きく違います。日本の企業は、この違いを認識してグローバル化を進めるか否かの判断をすることが求められます。

つまり、日本の特徴を強みとして生かせる領域が減っていくということです。国民は、これを現実として認識する必要があります。そのうえで、企業と個人は、何をすべきか真剣に考えるべきであり、政治家や新聞のように安易に日の丸と成長を連呼しても意味はありません。問題の先送りをするだけです。先ほどのカメラの話でいえば、ミラーレス一眼レフは、多分、日本の企業にしかできないでしょう。でも、これだけで日本という国の経済は維持できません。フェラーリが売れるからといって、フェラーリが千社をやっても仕方ありません。フェラーリは2000億円しかありません、トヨタは20兆円です。

これまでのお話を要約すれば、これだけの環境変化が激しい時代には、日本人の特徴が強みとして必ずしも生かされなくなるので、我々一人ひとりが「変える意志と変わる勇気」を持つ必要があるということです。そうしないと、もう競争には勝ち残るのは難しいのではないでしょうか。

歴史を見れば、日本の企業は、組織を存続させる強い意志で頑張ってきました。テイジンなど繊維企業の多くがいまも存続しているのは驚きです。また、1980年代のキヤノンを筆頭に日本企業のResource-Based Managementが海外で高く評価されました。要するにコアコンピタンスと呼ばれたものです。成功しても失敗してもビジネスを通して獲得してきた要素的技術を組み合わせて新たなビジネスを生み出していくというものです。キヤノンではコピーや複合機のビジネスに当たります。これによって日本の企業はビジネスの環境変化に対応し生き延びてきました。しかし現在のグローバリゼーションとICTの進歩がもたらす変化の速さと程度の大きさを考えると、恐らく、強い組織存続の意志やコアコンピタンスというこれまでの日本企業のアプローチでは、事業環境の変化に対応していくことは難しいのではないかと思います。やはり、個人が変わらなければ無理なのだろうという気がします。

現地化を追求する限り、日本人を特別扱いすることは言うまでもなく、日本的組織マネジメントの作法を維持するのもすごく難しいということは、十分にご理解いただけると思います。

## 6．コア・アイデンティティの確立

### 6.1　歴史主義の限界を知る

歴史主義の限界についてお話します。イギリスのエリート教育の根幹であったと思うのですが、現在の教育では、過去を知る者は未来をコントロールできると教えています。過去の延長線上に未来が語れると教えています。ところが、ICTを基盤に置くグローバル化（全球化）の不可逆の進展（ICTによる地球の論理ＮＷ化＝一体化が、地球の物理ＮＷ化＝一体化を凌駕する）によって、実は、歴史主義がだんだん通用しなくなってきているのです。これには欧米は、すごく苦労していると思います。もっとも日本は、自国の

歴史を選択科目にするくらい歴史の意味をまったく理解していない国と国民ですから、この苦労を理解はしないかもしれません。

### 6.2 選ばれる存在としての国家

もう一つ考えるべきなのは、国家というのは、基本的には選ばれる存在になるということです。つまり、「国民国家」という概念は、果たして絶対的に正しく、永遠不滅なのかという話です。ヨーロッパではそれが問われています。これは、EUのポリティカル・インテグレーションがどういう形態になるのかという問題に集約されますが、興味深い問題です。

また、主権国家が有する個人、企業、情報をコントロールする専権性は、最早盤石ではありません。先ほど申し上げたように情報はもうコントロールできません。それをしようとしてもジャスミン革命のようにできないわけです。国家というのはすでに選ばれる対象になっていますから、優秀な人材をいかに維持するか、引き付けるかということを考えないといけないのですが、今の日本を見ていると優秀な人間を引き付けるのではなくて、優秀な人間をむしろ外に出してしまっているのではないかという気がします。むしろ、出ていく優秀な個人を非国民呼ばわりする時代錯誤そのものという有様です。

### 6.3 企業に求められるのは

企業には、企業ごとのコア・アイデンティティの再構築が求められています。隣を見ても意味がない。昔のように、私はこの業界の２番手です、３番手ですというのは、多分意味がなくなるのではないでしょうか。固定的な業界という定義そのものの意味がなくなると思います。

例えば、ニッサンとトヨタは、昔はクルマ屋の１位、２位でしたが、トヨタは恐らく日本というよりは（日本ではなく）三河のクルマ屋になるのだろうと思います。トヨタがあそこの土地から出ていくことはないでしょう。しかし、ニッサンはもはや日本のクルマ屋ではありません。あの虫のようなデザインの車は、日本人にはあまり受けませんね。かつ、ニッサンも、日本のマーケットにそれほど興味はないように見えますね。しかし、グローバル企業として、ニッサンのパフォーマンスは良いですね。ホンダはクルマ屋を超えて車以外のことをやるかもしれません。日本にいなくなるかもしれません。いずれにせよ、昔のように車屋の１位、２位、３位を争う状況では、もはやありません。いろいろな変化が急速に起こっています。

このような大きな環境変化に日本企業が適応するパターンは三つあります。最初が、オープンなグローバル企業です。ここでは、本当にグローバル化する以外は生き残れないと思います。日本企業だったところに、たまたま日本人が勤めているだけです。日本人が特別扱いされることはないと思います。日本企業では、「われわれの会社」とか「うちの会社」という表現を好みますが、恐らくそれは意味をなさなくなると思います。ユニクロの柳井さんが残業を禁止するのは、別に従業員のことを考えているわけではなくて、中国の人はサービス残業をしないので、グローバルな展開を考えたら残業を念頭に置かないモデルを作る必要があるわけです。人事考課は、資生堂もユニクロもそうですが、グローバル人事制度に統一していくことになると思います。野村證券もマネジメントの上の人たちの給料は全部ドルです。グローバル展開に存亡をかける日本企業では、このようなことが、粛々と進んでいるわけです。

二つ目は、クローズドなグローバル企業です。それは、何か１点すごくグローバルニッチのようなものを持っている企業でしょうか。たとえばクラレなど、それぞれ携帯、スマホ用の部品等のコア技術を持っている企業です。

あと、ガラスもそうですね。日本でしか訴求していないかもしれませんが、最近はすごく薄いガラスがあります。通称「うすはり」というのを作っているのは、松徳硝子と木村硝子の二社で、もともと電球を作っていたところです。電球のガラスは薄いので、その技術を使って、グラスを作るのです。しかし、これに対してグローバルな需要があるかというと、こんな軽いワイングラスをつくっても、ヨーロッパの人はそれではワインを飲んだ気がしないので、ワイングラスは、バカラであろうと言われて、爆発的には売れないと思いますが、それなりの需要はあるのではないでしょうか。あと白鳳堂の化粧筆は、グローバルニッチ商品ですね。ヤナギヤはご存じないと思いますが、今、かにかまぼこは、日本では世界の１割ぐらいしか作っていませんが、この会社は世界の７～８割ぐらいのかにかま製造機のシェアを持っています。こういう企業は日本で製造して、海外に売ればいいのです。あと、人工水晶のエプソントヨコムは今エプソンになってしまいましたが、液晶の心臓部を作っていて、これもすごく強いです。これらはグローバル企業と言ってもクローズのほうの企業です。ここでは、日本的なマネジメントの作法と日本人中心の経営が続けられるかもしれません。

３番目は、日本の中で完結する企業です。これは、優れて日本的であっても良いのだと思います。

スライド写真の左がヤマメで、右がサクラマスですが違いはご存じでしょうか。ヤマメが海に下って帰ってくるとサクラマスになります。10倍ぐらい大きいです。今までの説明では、生存競争で勝ったオスが川に残り、負けたオスが海に下るということでしたが、これは実は間違いらしいです。遺伝子上、違うらしいのですが、ただ、昔の言説で言えば、勝って残った魚が成長せず小さいままで、逆に負けて外に出た魚が大きく成長するということです。サクラ

マスになるには淡水から海水対応への体質転換が求められます。ドコモは多分ヤマメで、恐らくソフトバンクはいちかばちか海に下るのでしょう。体質を変えなければいけないのは、淡水と海水では全然違うからで、普通は、川の魚は海にでれば死んでしまいます。オープンなグローバル企業になるには、この体質転換が求められるのであり、この転換を企業としてどこまでやるのか、やれるのかは、真剣に考えるべきでしょう。

### 6.4　個人に求められるのは

視点を変えてとか、視点を高く、などとよく言いますが、一般的に視点といっているのは、実は、視座と視野と視点の三つです。自分がどこのポジションにいて（視座）、そこからどんな視野があって、そのなかのどこに視点を置くか、ということです。視野の中にない視点は見られるわけがありませんし、視座を問わない視点の話は、糸の切れた風船のようで意味がないわけです。この三つがすごく重要ですが、特に視座をどこに置くかがとても重要だと思います。恐らく、日本人の間では視座がずっといつも共有化されていたので、改めて確認する必要がなかったのでしょう。もしくは、必要がないと思っていたのだと思います。高文脈の社会ではありがちなことだと思います。

これもよく言われることですが、日本は島国という発言です。しかし、この地図を見て日本は島国に見えますか。朝鮮半島から見れば、日本海は内海のようなものです。だから昔、朝鮮半島と九州でたくさんの人が行き来したのは当たり前です。しかし、日本はずっと島国だと言い張っています。それも視座の固定です。それから、江戸時代は百姓しかいないというのも、視座の固定です。江戸時代は農本主義なので、農民しか資料に出てこないだけの話で、実際は農民ではない人がたくさんいたわけです。むしろ裕福な海民も、たくさんいたわけです。

なぜこのような話をするかというと、我々は、ビジネス社会における生存率を上げることを真剣に考えないといけないからです。ICT（情報通信技術）の発展は、今後もさらにデータの精度をどんどん向上させます。今回のアメリカの選挙のときに、ネイト・シルバーが、普通に入手できるデータから推理モデルを用いて分析し、投票結果をほぼ完ぺきに当てました。これにより、選挙屋は要らなくなり、30人ぐらいが失職するのではないかと言われていました。精度を上げた良い例であると思います。人は、この精度の競争に勝てません。あと、複雑系ではないですが、コンマ10桁までみていくと、これまで見えなかった関係が見えます。これもコンピュータには、なかなか、かないません。これらは、いずれも膨大なデータをベースにしたシミュレーションといえます。この領域は、企業の経営において重要ですが、一部の人を除いて、個人がここで価値を出していくのは難しくなっていくと思います。そういう状況が出てくると、データ収集力やシミュレーション力での差別化は難しくなるわけですから、同じ情報から、どれだけユニークでかつ価値のある解釈を見出すかという力を磨いていかないと、個人は生きていくすべがないのかもしれません。これは、当然極論ですが、大きくは外れていないと思います。

つまり「脱学習」がより必要になるということですね。今まで学んできたものを自らの意志で捨て去るわけです。英語では、Un-learnといいます。メンタルモデルにこだわることなく、脱学習を積極的に行っていかなければいけません。「変える意志」と「変わる勇気」という言い方をしますが、生き残れるかどうかは、これができるかできないかに、多分、尽きるのではなかろうかと思っています。

## 7．おわりに

まとめると、この社会の混迷をチャンスととらえるか悲惨ととらえるかですが、個人と企業にとっては間違いなくチャンスだと思います。国家にとっては本当に悲惨なことなのだと思います。個人にとって「変える意志」と「変わる勇気」をどれだけ持つかということが重要ですが、「変わらない選択」と「変えない忍耐」というのも実はあり得ます。どちらが良いということではありませんが、ただ、これを決めないでいると結構不幸になるかもしれません。どちらかに自己決定する必要があるということです。

ということで、「日本的というモノ」への執着は捨てるべきであろうと思います。日本人はかくあるべきであり、日本というのはこうだというモノ的な考えをすると、すごく排他的になり、適応が遅れます。それに合わないものは排除していくことになります。我々は日本語をしゃべり、日本で育ってきているので、国家を置いておいても、どこまでいっても日本人であることに変わりありませんが、それを「日本人というモノ」として執着するのではなく、「日本人であること」として実践していくことが重要であろうと思います。個人個人が「日本人であること」を追求することは、その姿は千差万別かもしれませんが、相互に矛盾するわけではありません。国はどうしても「モノ」にこだわりますし、これからもっと日本的なモノを、国家は声高に言うでしょう。そうしないと彼らの存在意義がなくなってしまうからです。しかし、それは恐らく今の時代に合っているものではまったくないと思います。

別の言い方をすれば、「Made in Japan」でも「Made by Japan」でもなく、「Produced by a Japanese」という視座が重要なのではないでしょうか。この視座で、自分のフィールドは「グローバル」、方法論は「日本人であること」とお考えいただいても良いかと思います。

最後に、「同じことを繰り返しておきながら異なる結果

を期待することは、きっと頭がどうかなっているのだろう」というアインシュタインの言葉をお伝えしておきます。今の政治情勢を見ると、まさにこれかなと思います。為政者のみならず日本の国民も、実は、やっていることは一緒なのだけれども、何となく何か違うことが起きないかと思っているように見えて仕方ありません。こういうことを、100年程前に、アインシュタインが言っているということは、しっかり頭にとどめておくべきであろうと思います。

ご清聴ありがとうございました。

# コスメトロジー研究雑感

平成 22 年度　研究助成

# コスメトロジー雑感

内田　浩二

2-ノネナールは、脂質の過酸化反応により産生される揮発性アルデヒドであり、特に皮膚上で生じる「加齢臭」として一般にも広く認知されるようになっている。某化粧品メーカーの研究から生まれた「加齢臭」は、オヤジ臭とも言い換えられ、この言葉に対する嫌悪感は絶大なものがあり、世の中の中高年の世代に健康や身だしなみを意識させるうえで大きく貢献している。また、近年は、中高年男性のみならず、節電意識の高まりから、エアコンの使用を控え、暑さによる臭いやエチケットの対策として制汗剤を利用している女性が増えていると言われており、これまで以上に加齢臭の予防・抑制が注目されるものと思われる。

絶えず生成されている膨大な脂質過酸化反応生成物の一つに過ぎない2-ノネナールのみを抑制することが、本当の意味で健康につながるのかどうかは疑問であり、根本的な解決のためには脂質過酸化反応が生じないようにすることが先決であろうが、コスメトロジーにおける脂質過酸化反応の重要性は誰もが認めるところであろう。今回、液体クロマトグラフィー－タンデム型質量分析装置（LC-MS/MS）を用いて、加齢臭マーカーである2-ノネナール-ヒスチジン付加体を高感度に検出できるようになったことから、今後、生体試料などを用いた加齢臭の応用研究への展開が可能になった。機能性化粧品の開発や、ひいては中高年の悩みの軽減につながることを期待している。

脂質過酸化反応を研究対象にする研究者が少なくなっている昨今、解決への糸口が見つかるかどうか心許ないが、今回、この研究分野の充実のために研究助成をいただいたコスメトロジー研究振興財団に深謝するとともに、本研究がコスメトロジー分野の発展に貢献することを願うばかりである。

（名古屋大学大学院生命農学研究科）

平成 22 年度　研究助成

# 見えない物を感性で感じ取る

小田　功

透過度，透明度，透明感，これらの用語の意味の違いをここで改めて整理しておく．まず透過度とは，物体に入射した光が物体から出射する割合である．したがって入射した光と出射した光の強度を測定すれば，正確に求めることができる．次に透明度とは，物体を通してある種のパターンを観察したとき，その見えやすさのことである．見えやすさは，人間が「見た目」で判定しているため，その正確性という点では疑問が残る．そして透明感であるが，これはもう人間の感性によるものなので，単純に数値化することは難しい．

透明感は物体の見た目を評価する重要な指標となっている．例としてコスメトロジーの分野でいえば，肌の透明感を高めるような化粧品の開発がある．それ以外の分野でも，樹脂製の工業製品の外装では，樹脂の質感を高めるための加飾技術が使われている．また塗装の分野においても何層にも塗装を施すことで深み感を出しており，塗料は透明性があることから深み感は透明感と密接に関係があると考えられる．変わったところでは，魚介類の鮮度は魚肉の透明感でも評価しているということである．

ところで，透明感はいわば視覚の世界の話であるが，聴覚の世界にも興味深い話がある．人間の耳の可聴帯域は一般に20Hzから20kHzといわれている．しかし20kHzで周波数特性をカットしたオーディオの再生音と高域を100kHzまで広げたオーディオの再生音とでは，明らかにその違いが感じられるそうである．そしてこの現象のメカニズムは，まだ解明されていないということである．

人間の視覚にも聴覚と同様な現象が起きている可能性がないとはいえない．すなわち人間は，近赤外領域の光も含めて波長の長い光をより敏感に感じているのではないだろうか．物体に一度，入り込んで内部で散乱して再び外に出て来る光は，波長が長いと考えられる．なぜなら波長の長い光は，物体表面で散乱しにくく，内部に入り込みやすいからである．このような光を人間は感性で感じ取り，透明感として認識しているのかも知れない．

（木更津工業高等専門学校）

平成 22 年度　研究助成

# コスメトロジー雑感

境　慎司

コスメトロジー研究振興財団の研究助成に採択して頂いたのは、研究の場を九州大学から大阪大学に移して新しい研究を立ち上げた時期でした。この時期に、自分の研究に使える研究資金を手に入れられたことはとても大きなことでした。そして、研究資金を手に入れられたことだけでなく、考えて応募したアイデアが助成対象として採択されたということは、新しく立ち上げた研究の方向性が少なくとも間違っていなかったという自信にもつながりました。そのことは、研究の進度を上げることにつながり、そこから得られた成果をもとに、企業と組んで科学技術振興機構からそれなりの研究資金を調達することもできました。今はいくつかの研究を順調に進めていますが、あの時期に助成対象に選んで頂いていなければ、大阪大学での研究生活は大変なことになっていたのではないかとさえ思っています。

今回助成頂いた研究内容は、傷口を覆い治癒を促進するための新しい創傷被覆材の開発に関するものであり、主に材料側からのアプローチを進めました。もちろん、今後もそれに関する研究は進めていき、実用化にまで至れればと考えていますが、コスメトロジーを意識して2年間研究を進めてきたなかで、もっと肌をきれいにする、肌を再生するということに細胞側から関わる研究を行いたいという新たな欲求も湧いてきています。研究というのは何がきっかけで次の研究テーマが生まれてくるのかわからないところが面白いところですが、貴財団にはそのようなきっかけも与えて頂いたと思っています。

最後になりますが、貴財団より助成を頂き、研究をご支援頂きましたことに心から感謝申し上げます。

（大阪大学基礎工学研究科）

平成 22 年度　研究助成

# 秋田美人とコスメトロジー

杉山　俊博

秋田県は、全国の方々が「秋田」に目を向けるきっかけとなる、新たなキャッチコピーとロゴマーク、ポスターを制作しました。平成24年３月19日㈪から25日㈰まで、首都圏のJR駅36駅に４つのポスターを掲示しました。その一つに「秋田美人」のポスターがありましたが、ご覧になった方も多いかと思います。小説家の谷崎潤一郎は「素人の女までが、凡（すべ）て美人国の名に負（そむ）かぬあでやかさ」と秋田美人を評しています。「秋田美人」とは色白できめこまかい肌をもち、顔はうりざね型でやや面長、目は細く切れ長で口は小さく鼻すじが通っているのが特徴です。湯沢市の医師杉本元祐博士の研究によると、数千人に及ぶ女子高生を調査した結果、皮膚色調の白色度が、日本人の平均が約22％なのに対して秋田県では約30％であり、西欧白色人種の約40％に近い結果が出ています。また、ある化粧品会社が行った調査でも、「L値」とよばれる白さの明度が、秋田県は全国で一番という結果が出ています。秋田県の年平均日照時間は約1,600時間と全国で最も少ない県であり、紫外線量が少ないことは色白できめ細かい肌を保つ要因の一つと言えるでしょう。人類学的な仮説としては、東北北部から北海道全域に「コーカソイド（白人）起源」のウィルスとアセトアルデヒド分解酵素（酒に強い）を持つ人が分布しているという調査結果から、氷河時代に白人系の遺伝子を持つ人々が日本の北部に移住したのではないかという説もあるようです。東京大学の山川民夫名誉教授の研究によると、犬の赤血球糖脂質は、Nグリコルノイラミン酸（NeuGc型）とNアセチルノイラミン酸（NeuAc型）があり、日本犬の多くとアジア犬はNeuGc型ですが、ヨーロッパ系の犬は例外なくNeuAc型で、渋谷のハチ公で有名な「秋田犬」もNeuAc型の血液型しか持たないそうです。そこで、山川先生は、遥か昔犬と同時にヨーロッパ系民族が東北地方にやって来た可能性があると語っておられます。秋田に美人が多い理由が科学的に解明される日も近いことでしょう。

私たちの研究室では、古くから生薬・薬草として利用されている天然植物カキドオシが発毛・美白効果を持つことを発見し、その作用機序を研究しています。今後、カキドオシをコスメとロジー分野に展開しようと考えています。

（秋田大学大学院医学系研究科）

平成 22 年度　研究助成

# ペプチドの多様性とその魅力

谷口　正之

米タンパク質由来の機能性ペプチドの研究を本格的に開始してから３年が過ぎました。チロシナーゼやプロテアーゼなどの酵素の阻害ペプチドからスタートして、現在は、抗菌ペプチド、抗炎症ペプチドとその対象を広げてきました。アミノ酸は20種類存在しますので、ジペプチドは400種類、トリペプチドは8,000種類、テトラペプチドは16万種類が存在する可能性があります。10残基のアミノ酸から構成されるデカペプチドは、実に102兆4千億種類が存在する可能性があります。この多様性の魅力に取り憑かれてしまいました。

現在は、12および18残基のアミノ酸からなるペプチドを主な研究対象にしておりますが、種類の多さだけではなく、１つのペプチドがいくつかの作用を示すことを発見しました。これは、ペプチドの第一の魅力です。例えば、米の酵素Cyanate lyaseの部分配列である12残基のアミノ酸残基から構成されるペプチドは、プロテアーゼ阻害活性、歯周病菌に対する抗菌活性、リポ多糖（LPS）で刺激したヒト大動脈内皮細胞による炎症性サイトカイン（IL-6）産生の抑制作用、リポ多糖（LPS）で刺激したマクロファージによる一酸化窒素（炎症の指標成分）産生の抑制作用などを兼ね備えています。このペプチドは、生体防御に関して多機能性を示すことがわかりつつあります。また、ペプチドの各活性や機能に対する構成するアミノ酸の寄与を解明するために、Ｎ末端やＣ末端のアミノ酸を欠失したペプチドや特定のアミノ酸を性質の異なる別のアミノ酸に置換したペプチドを合成することができます。例えば、リジンをアラニンに置換したペプチドを合成した結果、病原菌に対する抗菌活性が約10倍向上することを見出しました。これは、ペプチドのもう一つの魅力です。

今後、米タンパク質由来の機能性ペプチドの研究をさらに展開して、皆さんの健康に役立つペプチド素材を開発したいと考えております。将来、これらのペプチド素材が化粧品、医薬品、食品などの多方面の分野で利用されることを期待しています。

（新潟大学工学部機能材料工学科）

平成 23 年度　研究助成

# コスメトロジー研究と天然物

當銘　一文

人間は古くから身近に存在する天然由来の草根皮木などを有効に活用し生活を豊かにしてきました．それら知識の結集として現代の医薬品や化粧品があるものと考えられます．昨今の化粧品の広告などをみますと，様々な天然成分が有効成分として化粧品に配合されていることがわかります．肌および頭髪に関する悩みの多くが，しみ，しわ，白髪や薄毛ですが，最近の研究でメラニン生成および，毛髪生成にはウィントシグナル経路が関わることが明らかとなっており，我々の得意とする天然物研究を応用し，本シグナルを制御する天然由来成分を発見することができれば，しみ，白髪，薄毛などの改善が期待できる有用な化粧品素材の開発に貢献できるのではと考えました．

今回の研究助成により，植物および放線菌の抽出物からウィントシグナルを制御する天然成分を見出すことに成功し，それらの一部についてはウィントシグナル阻害作用メカニズムに関しても知見を得ることができました．本研究成果がコスメトロジー研究の発展に何らかの貢献ができればと考えております．また，本研究で用いた手法を用いて，過去に知られている化粧品素材についてウィントシグナルに関する評価を行うことにより，新たな作用の発見やエビデンスに基づく素材としてその魅力を高めることにつながるのではないかと考えています．

ウィントシグナルは幹細胞の制御に関わることが知られています．最近では美容分野においても幹細胞を応用したアンチエイジング技術に関する研究が盛んになりつつあると聞いています．本研究の成果が幹細胞を応用した美容分野においても貢献できればと期待しています．今後も，本研究を継続して発展させ，ウィントシグナルを制御する新たな化合物の発見とその作用メカニズムの解明に取り組んでいきたいと考えております．本研究をご支援いただきましたコスメトロジー研究振興財団に心から御礼申し上げます．

（千葉大学大学院薬学研究院）

平成 23 年度　研究助成

# コスメトロジー雑感

長阪　玲子

東京海洋大学と聞いて，コスメトロジー研究をしているところ，という考えに直結する方はなかなかいらっしゃらないかと思います．我々は食品の機能性や水産食品の栄養性・酸化などについて研究を行っておりますが，そんな中で食用キノコにメラニン色素の産生を抑える可能性のある成分がある，ということを見出しました．これがきっかけでコスメトロジーの研究に携わることになりました．そんな折，コスメトロジー研究振興財団からの研究助成をいただき，まだまだ基礎研究段階ではありますが，安心・安全な化粧品を提供できる新たな可能性を見出すことが出来ました．心より御礼申し上げます．

女性はもちろんのこと，最近では男性も美容や健康に興味のある方が多いと伺っています．基礎化粧品や日用品を含めた種々の化粧品は，老若男女問わず様々な人達が手にされているのではないでしょうか．地球環境の変動や，日々のストレス，老化など皮膚環境に及ぼす影響は計り知れないものがあります．しかし，さらにコスメトロジー研究が進むことによって，美しく豊かな人間生活の実現が可能であると考えております．

今回の成果をもとに，更なる探求をし，新たな化粧品材料として本研究成果が利用され，人類の保健衛生の向上に役立つことを願っております．

（東京海洋大学大学院海洋科学技術研究所）

平成 22 年度　研究助成

# コスメトロジー雑感

山田　健一

この度は本研究の遂行にあたりコスメトロジー研究振興財団よりご援助頂きましたことを深く感謝申し上げます。私が研究対象としているのは、「脂質ラジカル」であります。脂質ラジカルは、生体内で非常に反応性が高いためにこれまで研究対象としては難しく、安定産物である過酸化脂質やその代謝産物の研究が活発に行われてきました。しかし脂質ラジカルは、ラジカル反応では最上流位に位置し連鎖反応の中心であることから、活発な部位であるほど産生していると考えられる。では、これをいかに捕まえるか。そこで注目したのが、ニトロキシドである。この化合物は、プラスチックの劣化防止剤としてHALSという名で使われている。HALSは、紫外線により劣化したプラスチック内の高分子から生成するラジカルを捕まえるものであり、ニトロキシド部位でラジカル－ラジカル反応により安定化する。この反応を生体に応用できないかと考えたのが、本研究である。実際に、脂質ラジカルや光過敏症の原因となるケトプロフェン由来の炭素中心ラジカルを捕まえることができた。

さらに、この連鎖反応を止めるとその後の脂質過酸化物や皮膚障害も抑制できた。考えてみればその通りであるが、プラスチックの劣化も皮膚での障害も分子種が異なるが紫外線照射による最初の原因は同じなのかもしれない。そうであれば、我々が探しているものが別の分野では当然のように使われているかもしれない。今後は、いろんな分野に眼を向けながらも、創薬研究や化粧品開発に役立つ成果を挙げることを夢見ながら、一緒に研究を進めてくれる学生とともに日々がんばっていきたいと考えている。

（九州大学大学院薬学研究院）

平成 22 年度　研究助成

# 本研究がコスメトロジーに及ぼす影響

吉原　利忠

私が小学生の頃は，なるべく外で遊び太陽光を多く浴びることが推奨されていた。そのため，私を含めて多くの友達が夏休み明けには，真っ黒に日焼けをしていた。私の記憶では，日焼け止めを塗る友達や大人はほとんどいなかった。しかしながら，フロンガスによるオゾン層の破壊のため，人体に紫外線があたることにより誘発される皮膚がんが社会的に問題視されるようになると，多くの人々が，紫外線の暴露に対して敏感になった。初期の研究では，DNAを破壊するUVCが主に皮膚がんにつながると考えられていたが，近年では，UVBやUVAも皮膚がんを引き起こす原因となることが明らかにされている。また，UVAは皮膚に‘しわ’や‘しみ’をもたらすことも指摘されており，紫外線への関心は女性だけでなく男性にも広がりを見せている。そのため，多くの化粧品メーカーは，自社製品の中にサンスクリーンを配合しており，その特性を商品価値の１つにしている。しかしながら，現在使用されているサンスクリーンは，UVB用，UVA用を合わせて10種類に満たない。これは，光エネルギーを効率的に熱エネルギーに変換する物質が少ないこと，また，光化学的に有効であっても安全性が確立できないため，サンスクリーンとして認可されないためである。さらに安全性試験では莫大な資金が必要なため，大学，企業においても積極的に研究がされていない。本研究では，高い光熱変換効率を示すUVAサンスクリーンの開発を行い，それとUVB吸収団を結合させることにより，光熱変換効率の低いUVB吸収団も新しいサンスクリーンの候補に成り得ることを示した。研究を進めるにあたり，これまでの光化学者としての経験と知識が活かされたと考えている。今後は，最近始めた細胞培養と両立することにより，サンスクリーンの簡単な毒性試験も実施し，新しいサンスクリーンの開発を行っていきたい。最後になりましたが，本研究を進めるにあたりコスメトロジー研究振興財団からの助成に深く感謝いたします。（群馬大学大学院工学研究科応用化学・生物化学専攻）

平成 22 年度　研究助成

# 機能性両親媒性化合物とコスメトロジー

吉村　倫一

私の研究は，高性能および高機能性化を目指した新規両親媒性化合物を開発することである。これまでに，分子内に２本のアルキル鎖と２つの親水基をもつジェミニ型界面活性剤やその延長上の構造の多疎水鎖多親水基型界面活性剤，モノマーと連鎖移動剤から成る低重合度の両親媒性オリゴマー，樹状高分子であるデンドリマーにアルキル鎖を導入した両親媒性デンドリマーなど，多種多様な構造の新規両親媒性化合物を次々に分子設計・合成してきた。さらに，これらの両親媒性化合物の性質やミセルの構造を小角散乱などの手法を用いて詳細に調べてきた。一般に界面活性剤は，水表面や水と油の界面などに吸着して配向し，水溶液中ではミセルのような会合体を形成して，その結果，乳化や洗浄などの効果を発揮している。ジェミニ型界面活性剤は，通常の界面活性剤を２量体にした構造であるために，臨界ミセル濃度が通常型と比べて１～３桁低いことが知られている。そのため，化粧品など界面活性剤が使用されている分野にこのジェミニ型界面活性剤を用いることで，使用量やコストを削減でき，さらに環境負荷の低減につながると考えられる。しかし，現実は厳しく，ジェミニ型界面活性剤の製造コストが高いなどを理由に実用化された例はほとんどない。また，両親媒性デンドリマーは界面活性剤の性質とデンドリマーの性質の両方を併せもつユニークな分子設計であり，これらの特性を生かして幅広い分野での利用が期待される。

将来的に，私たちの開発した両親媒性化合物が，化粧品などの分野に使用されることを期待しながら研究を進めているが，自ら分子設計した化合物が実用化され，少しでも世の中に貢献できたら研究もさらにやりがいのあるものとなるであろう。　（奈良女子大学大学院人間文化研究科）

平成 23 年度　研究助成

# 皮膚の膜輸送体と化粧品

加藤　将夫

膜輸送体には、本来生体内には存在しない物質（外因性物質）を幅広く認識するものがあります。外因性物質を輸送する膜輸送体は、肝臓、腎臓、小腸、脳などに存在し、物質の体外への排除に働くと考えられています。本研究で焦点をあてた膜輸送体P-gp、BCRPはその代表例です。しかし、これら臓器と同じく外界と接する臓器である皮膚において、これら膜輸送体の役割は未だほとんど解明されていません。我々の研究から、これらの膜輸送体は物質を表皮から血液方向へ輸送します。このことは、これら膜輸送体が生体を外因性物質から守る働きをすると考えてきたこれまでの常識とは相反するものです。この謎を解明する一つの突破口として、本研究では添加物との相互作用解明を行いました。残念ながら皮膚での実際の働きを解明するところまでは、報告書執筆時期までには間に合わなかったものの、多くの添加物がこれら膜輸送体に影響することが分かったことは驚きでした。添加物は化粧品に高い濃度で用いられているものも多く、しかも直接皮膚に接します。従って、表皮に存在する膜輸送体近傍にも、高い濃度で暴露される可能性があり、そのことが化粧品成分の皮膚での挙動を制御しているかもしれません。このような考えは従来、全く想定されていなかったことです。一方で、皮膚は多層の細胞から構成される点で、これまで膜輸送体の働きが知られる他の臓器とは大きく異なります。角質層近傍で高い濃度の添加物も、表皮深層部まで到達する濃度がどの程度であるのかは、現時点では分かりません。今後、添加物自身の皮膚内への浸透も含め、膜輸送体との相互作用をさらに検討したいと思います。末尾になりましたが、第22回研究助成を賜りました公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に心より御礼申し上げますとともに、財団のますますのご発展をお祈り致します。

（金沢大学医薬保健研究域薬学系分子薬物治療学研究室）

平成 22 年度　研究助成

# コスメトロジー雑感

久保　亮治

アトピー性皮膚炎の発症因子として、フィラグリンの変異が報告されたのが2006年。それからわずか６年の間に、皮膚バリア不全はアトピー性皮膚炎の発症因子としてだけでなく、様々なアレルギー疾患の発症因子としても広く知られるようになりつつある。１つの発見が大きく世の中の認識を変えた稀有な例の１つと言える。

一方、では皮膚のバリア不全とはいったい何がどうおかしくなっているの？と詳しく調べていくと、一口に皮膚バリアといってもそこには、物理的なバリアと免疫的なバリアが組み合わさった、素晴らしく精緻な仕組みが存在しているらしいことが、徐々に明らかになりつつある。考えてみればそれも道理で、生命にとって外界と自己を区切るバリアを持つことは生きていく上で必須のことであり、長い進化の歴史の中で（それは様々なウイルス・細菌・真菌との攻防戦の歴史でもある）、皮膚のバリアシステムは洗練・淘汰され続けてきたに違いない。本研究を通じて、少しでも皮膚バリアシステムの奥義に迫ることができていれば幸いである。

コスメティックに美しく見栄えの整った皮膚はより良いバリア機能を保持している皮膚であり、おそらく逆もまた真であろう。皮膚のバリア機能にダメージを与えてしまうような化粧品は今後淘汰されていくに違いない。皮膚バリアのダメージを隠す化粧品ではなく、バリアを保つ化粧品、バリアのダメージを治しうる化粧品が求められる時代が来ていると感じている。

（慶應義塾大学医学部皮膚科学教室・総合医科学研究センター）

平成 22 年度　研究助成

# 肌の健康とマトリクスメタロプロテアーゼ-9 発現

小林　孝志

健全な肌を維持するためには、皮膚の健康を保ち、炎症を和らげることが必要です。この際、新陳代謝が必要な一方で、炎症により惹起された過剰な組織代謝を抑える必要性も生じます。これら組織代謝を司る様々な酵素の一つとして、マトリクスメタロプロテアーゼ（matrix metalloproteinase：MMP）-9が重要な因子であることが示唆されてきています。MMP-9欠失マウスではこれまで、特に炎症を惹起しない場合の皮膚の明らかな表現型が報告されていません。今回助成して頂いたマウス皮膚の系について、今後のさらなる検討が必要であり、MMP-9過剰発現の状態について探求する必要はありますが、もともと紫外線や多くの炎症性疾患で発現が誘導されるこのMMP-9が多過ぎると、炎症の惹起をさらに起こすなど、余分な新陳代謝により、皮膚の健康を損ない、最終的には皮膚老化を来すことが想定されます。では、同じgelatinaseとしてほぼ同じ基質特異性を持つMMP-2との関係はどうなのでしょうか。このMMP-2は比較的恒常的に発現していることから、非炎症時でも一定の組織代謝に関わっていると考えられますが、やはり欠失マウスについての明らかな皮膚の表現型は報告されていません。他のMMP同士などと補い合って足りない分は補填されているのかも知れませんが、さらに、これら両gelatinaseを含めたMMPの生体阻害因子であるtissue inhibitor of metalloproteinaseの過剰発現や欠失との組み合わせの系ではどうなのかなど、興味は尽きません。いずれにしても今後、皮膚、特に表皮由来MMP-9が関わる生理機能を解明し、香粧品の使用や紫外線防御など皮膚ケアの正当性の検証を行うこと、これに関連してMMP-9のモニタリングにより、既存の皮膚ケアの手法の再評価をすること、あるいは新たな皮膚ケアの手法の開発や導入に繋げること、ができれば、若々しい肌を保つめの、コスメトロジーの発展に寄与するものと僭越乍ら、考えています。

（帝京大学医学部ちば総合医療センター皮膚科）

平成 22 年度　研究助成

# コスメトロジー雑感

坂本　一民

千葉科学大学薬学部に新設された製剤／化粧品科学研究室の運営を担う事になり銚子に赴任したのは平成22年4月の事でした。当時、新設校の新設研究室を立ち上げる困難をすべて経験しつつ、ゼロからの出発にもがき戸惑う事ばかりでした。そんな中、コスメトロジー研究振興財団の研究助成を頂ける事が決まり、以来３年にしてようやく自前の研究を経験した初の４年生が卒業するところまで進んで来ました。お陰様で、頂いた研究助成を活用して研究活動をより充実したものとすべく試行錯誤を繰り返しながら現在に至っております。

化粧品コース第１期生が今春卒業を迎えるのを期して、公開での卒業研究発表会を開催することになりました。入れものはできたけれど中身の充実はまだまだですが、皆様に支えられての報告の証としてあえて公開での発表会と致しました。何年か先の事ですが、研究室の来し方を１期生と振り返りそれぞれの成長の軌跡をたどり、さらに先へと踏み出す未来への夢を語り合うのを楽しみにしております。その際きっと本助成によってすべてが始まったと感ずるであろうと思う次第です。

研究室開設に際してお世話になった学内外の皆さまの温かいご支援に改めて御礼を申し上げます。

（千葉科学大学薬学部生命薬科学科）

平成 22 年度　研究助成

# 私の中のコスメトロジー

佐久間　信至

私は今でこそ大学で研究活動を行っているが、大学院博士前期課程修了後、製薬企業に就職し、39歳のときに大学に転職している。大学研究者としてのこれまでの９年間、日々、研究資金の獲得に努めているが、いつになっても容易なことではない。そのような中、コスメトロジー研究振興財団の研究助成を頂き、心より感謝申し上げたい。

私にとってコスメトロジーは縁深いものかもしれない。私は東京理科大学薬学部薬品物理化学研究室の出身であり、師事した近藤保教授の専門は界面化学であった。私は製薬企業の製剤研究部門の研究職の道を選んだが、化粧品企業に就職してコスメトロジーを実践している先輩や後輩も多い。また、日本化学会コロイドおよび界面化学部会の企画委員会の委員を拝命して10年が経つが、同委員会でも化粧品企業の方々と親交を持っている。

今回の研究は、新規の膜透過促進剤としてのカチオン性オリゴペプチド固定化高分子に関するものであり、貴財団の研究助成を受けて、研究を大きく前進させることができた。同研究に対する初めての外部研究資金であり、貴財団による採択は、資金面はもとより、精神面でも大いに励まされた。膜透過促進に関する研究は、企業時代からライフワークのように行っており、足掛け20年近くになる。その中で、膜透過ペプチド固定化高分子のアイディアは非常に気に入っており、現在、同高分子の多面的な応用展開を図っている。その中で、コスメトロジー分野におけるカチオン性オリゴペプチド固定化高分子の価値も計り知れないと私は考えている。最も注目しているのはアンチエイジングであり、皮膚の老化に伴うシミ、シワ、たるみに対して、外用で適用された薬の膜透過を促進し、飛躍的に症状を改善するかもしれない。また、潤いを与える成分とともに乾燥皮膚に適用すれば、それらの成分の膜透過を促進し、長期間に渡って適用部位に潤いを与えることができるかもしれない。

カチオン性オリゴペプチド固定化高分子は、今後の医療やコスメトロジー分野において、限りない可能性を秘めた材料であると私は確信している。その確信を現実のものとすることが、貴財団の研究助成に対する恩返しであり、これからも精力的に研究に励んでいきたい。

（摂南大学薬学部薬剤学研究室）

平成 22 年度　研究助成

# 脂質と皮膚免疫

杉田　昌彦

皮膚における代表的な免疫細胞は、表皮ランゲルハンス細胞である。皮膚表層の全域にわたって、広く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を駆使して外的因子を感知し、適切な免疫応答を誘導する。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免疫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、生体内でCD1a分子を極めて高いレベルで発現した細胞はランゲルハンス細胞のみである。したがって、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。

驚くべきことに、CD1aなどのいわゆるグループ1CD1分子は、脂質特異的免疫応答を誘導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。アカゲザルを用いた私たちの研究により初めて実証された脂質に対する皮膚遅延型アレルギー反応は、まさしく脂質を標的にした皮膚免疫応答が霊長類において存在することを示している。脂質への暴露が誘因となる皮膚炎が実際に存在する。この新しい皮膚免疫経路の解明が、皮膚科学ならびにコスメトロジーの発展に僅かながらも貢献することがあれば、大変うれしく思う。

（京都大学ウイルス研究所）

平成 23 年度　研究助成

# カイコモデルとコスメトロジー

関水　和久

「なぜ微生物の研究室がカイコの研究をやっているのですか」、と問われることがある。細菌は純粋培養が可能で細菌の中で起こるイベントを、培地の中だけで完結させ分析することが可能なのが一般的なイメージだからだろう。しかしながら、微生物は、多種多様な生物との相互作用の中で、各々の生存戦略を確立し、進化していることは明らかであり、個体を用いた解析は必須である。その動物モデルとしては、いろいろな種類の動物が用いられているが、微生物の視点から網羅的解析が可能な動物として利用できるものはカイコをおいて他にはいない。そのカイコを用いて、私たちの研究室では、病原性の理解や、抗生物質の評価系を確立してきた。その研究の中で、カイコの薬物動態がヒトと共通している点が多いこと、さらに、実際にカイコ細菌感染モデルを利用して、治療効果を指標とした探索を行い、マウスでも治療効果を示す新規抗生物質カイコシンを発見できた。そこで、実験動物代替モデルとしてのカイコの重要性に気づき、カイコモデルの他の病態モデルや薬効評価モデルとして利用する研究の開始に至る。本コスメトロジー研究振興財団の助成により、カイコモデルは薬物代謝や薬物動態を反映させた毒性評価が可能であることができたと考えられる。化粧品に使用する新規の化合物の安全性試験において、マウスなどの哺乳動物を使用することはできなくなってきており、その問題に対してカイコを用いた動物実験代替モデルは貢献できるのではないかと期待している。本研究を契機に、さらに研究を進め、動物実験代替モデルとしての標準化について努力していきたい。

（東京大学大学院薬学系研究科）

平成 22 年度　研究助成

# コスメトロジー雑感

田所　竜介

私が色素研究と出会ったのはコスメトロジー研究振興財団の助成金を頂く約１年前のことである。それまでミミズの再生という全く異なる畑にいた私だが、職の移動に伴いトリ胚を用いて新たなテーマを探索することとなった。末梢神経形成や血管形成などを中心として、ライブイメージング法を立ち上げ胚発生中の細胞の振る舞いを観察するなか、ひときわ長い突起を伸ばしてダイナミックに動く色素細胞に目を奪われた。またそれにも増して細胞内を動くメラノソームを見たときは驚きの一言で、そう時間がかからず色素研究のビッグプロブレムの一つ“色素の細胞間輸送”に突き当たった。色素はある意味もっとも目に付く表現系のため遺伝学的な情報は多々あるし、細胞レベルの解析は培養系を用いた実験により行われている。しかしながら、とりわけ輸送に関しては“培養系と個体”という、似て非なる実験系の狭間に取り残される謎や疑問が常に付いてまわる。意外なまでに個体における表現系・細胞・分子の3者を同時に解析できる系は少ない。そういう意味では、我々の手法は細胞の膜動態レベルの振る舞いから個体レベルでの色素沈着、そして色素輸送の２大役者である色素細胞と表皮細胞の両方を遺伝子操作できるという、成体内における解析としてはかゆい所に手の届く解析系である。志がある一方、なかなか思うように研究が進まないのが現状ではあるが、これまでに立ち上げたトリ胚を用いた手法をさらに発展させ、近い将来、パワフルな学生たちと色素輸送の謎を解き明かすつもりだ。

（京都大学理学研究科生物科学専攻動物学）

平成 22 年度　研究助成

# コスメトロジー研究によせて

寺井　琢也

我々、薬学部で研究・教育活動を行っているもの（特に男性）にとって、化粧品学（コスメトロジー）というのは近いようで遠い存在である。医薬品も化粧品も人体に有益な作用を及ぼすことを意図して作られる化学物質であることに変わりなく、製品開発の要素となる学問・技術分野にも重なりが大きいはずだが、自分が学生時代の授業を振り返っても、化粧品を正面から取り上げた講義というのは全く受けた記憶が無い（注：単純に覚えていない、または講義をサボっていたという可能性もゼロではない）。研究生活を始めた後も学会で化粧品関係の発表を聞く機会は少なく、恥ずかしながら現在のコスメトロジー研究の最先端がどうなっていて、何がホットな話題なのかという知識がほとんど無い門外漢の私にとって、今回コスメトロジー研究振興財団から研究助成を頂けたのは望外の幸いであった。申請内容としては、自分が以前から研究していた希土類金属錯体を上手く使うことで紫外線由来の一重項酸素を消去できないか、という単純なアイデアであり、画期的な化粧品開発に繋がる可能性が高いとは言い難いものだったと思うが、それでも温かいご支援を頂戴することができたのは様々なご縁によるものだろう。この場を借りて、関係各位に深く感謝申し上げたい。

さて、資料として頂いた過去のコスメトロジー研究報告を拝読すると、非常に多彩な研究が助成対象となっていることに驚かされる。一言で化学系といっても有機化学・天然物化学から材料化学、高分子化学まで幅広く、生物系、人文系の研究も含めれば実に多様な研究内容がこの小冊子に収められている。見方を変えれば、コスメトロジーという新しい視点から身近な研究を眺めることで、これまで気付かなかった新しい応用が生まれる可能性は十分にあり得るのではないだろうか。残念ながら助成期間はこれで終了するが、今後もコスメトロジーについてアンテナを張り続けていたいと思う。

（東京大学大学院薬学系研究科）

平成 22 年度　研究助成

# アレルギー研究からコスメトロジー研究へ

平嶋　尚英

私はアレルギーにおいて中心的な役割をはたすマスト細胞について研究を行ってきた。私自身花粉症に悩まされているが、これは花粉から溶けだした抗原がマスト細胞を刺激し、マスト細胞からヒスタミンという物質が放出されることによっておこる。病院で処方される抗アレルギー薬やドラッグストアなどで売られているアレルギーの薬の多くは、このヒスタミンがヒスタミン受容体に結合できないようにするものである。我々の研究室では、このヒスタミンがマスト細胞から出ていかないようにするために、ヒスタミンの放出機構を研究している。ヒスタミンは分泌顆粒という小さな小胞に蓄えられているが、皮膚でメラニン色素を合成するメラノサイトにもメラノソームという小胞がある。実は、マスト細胞の分泌顆粒とメラノソームは、同じく「リソゾーム関連オルガネラ」と呼ばれ、互いによく似た細胞内小器官である。従って、アレルギー担当細胞であるマスト細胞の研究を通して得られた知見や実験技術をメラノソームの研究に展開することは実は自然で、可能なのである。とはいうものの、アレルギーの研究者がコスメトロジーの研究に自然に入っていくかというと、ふつうはそうはならないのではないだろうか。あるとすると、化粧品によってアレルギーが引き起こされるのではないか、という観点からであろう。私の場合は、化粧品あるいはコスメトロジーのことなど実は頭になかったというのが正直なところである。たまたま、やはりコスメトロジーとは縁のなさそうな有機化学者の知人が、コスメトロジー研究振興財団の助成を受けていることを知り、興味をもった次第である。ある研究領域に、異分野の研究者が参入することで、その研究領域が活性化することはよくあることであるが、研究助成財団がこういったコミュニケーションの活発化にも一役買っていることを強く認識した次第である。

（名古屋市立大学大学院薬学研究科）

平成 22 年度　研究助成

# コスメトロジー雑感

村木　克彦

この冬（2012年年末），イタリアのフィレンツェにある世界最古といわれる薬局（サンタ・マリア・ノヴェッラ薬局）を訪れた。1221年に修道院の一部として設立されたが、現在では改修され、とくにその内部は、高級ホテルのように品があり、天井の高さやきらびやかな装飾の壁が印象的であった。今では多くの観光客が訪れるフィレンツェの名所の一つになっており、白衣姿のスタッフを除けばとても薬局という雰囲気はない。修道僧らが薬草をもとに香油や軟膏などの調合を行っていたらしいが、現在もその製法にこだわり、各種ケア製品を製造・販売している。しかし伝統を受け継ぐだけでなく、新しい時代に対応するようメンズケアあるいは子供向け製品の開発にも力を入れている。「伝統・歴史」と「先端」の融合の好例といえるかもしれない。

香粧品も含め薬剤のなかには、いまだその作用機序に明確なエビデンス（理屈）がないものの臨床効果が認められ使用されているもの、あるいは理解不能な副作用を引き起こすものが存在する。最近は兎角、結果（治療実績）に目が行きがちであるが、プロセス（研究者にとっては理屈、患者にとっては生活の質（QOL））も大事にしたい。容易ではないが、サンタ・マリア・ノヴェッラで見た「伝統・歴史」と「先端」の融合がヒントなのかもしれない。

内装が豪華な薬局ではあるが、サンタ・マリア・ノヴェッラ教会の中庭からその外観の全体像を見ることができる。800年の歴史を彷彿とさせるその外観と窓に映る近代的な室内は、互いに拮抗することなく周りの風景ともども溶け合っている。

（愛知学院大学薬学部薬効解析学講座）

平成 23 年度　研究助成

# 香りの感じ方を予測する

神崎　亮平

香料成分は，他の匂いとは区別される特別なものなのか．人が心地よいと感じる匂いにはなんらかの共通の特徴があるのだろうか．未知の物質がどのような香りとして知覚されるかを予測できるのだろうか．

感覚の予測は，光であればその波長から，音であればその周波数から，どのような色彩として，またどのような音色として知覚されるかを予測するこができる．一方，匂いに関しても分子量，官能基，炭素鎖数，親和性などの物理化学的性質と匂いの知覚にはある程度の対応があるといわれるものの，多様な匂いに広く適用できるルールはわかっていない．ましてや多数の物質が混合された複合臭ではその予測は及びもつかない．

一方で，被災地でがれきの下敷きになった人を匂いを手がかりに探しだすことは工学的な機器では未だに実現されず，警察犬に頼ることになる．これは生物の能力に匹敵する優れた匂いセンサがないことにもよるが，光のRGB，音の周波数のような基準となる物理量が匂いでは明瞭でないことも大きな一因である．

しかし，最近，生物の匂い受容の基準となる嗅覚細胞の受容体の遺伝子や，匂い情報を処理する脳機構の解明が飛躍的に進み，匂いの受容や識別のしくみが徐々にあきらかになってきた．このような匂いに関する生物学的知見と，より体系的に記述された物理化学的特性（分子記述子），さらには工学的な機械学習による判別手法を組み合わせることにより，香料成分と他の匂いの判別や，複合臭の感じ方をその快適性を基準として予測することが可能になりつつある．また，遺伝子操作により作り出された嗅覚受容体を使った匂いセンサも登場してきた．

近い将来これらの科学技術が統合されることにより，人工的な匂いセンサを用いて，匂いを識別し，また人の官能試験にかわる新しい香りの評価や合成手法が開発され，さらには犬にかわって被災地で人命を救助するしくみも作り上げられるだろう．（東京大学先端科学技術研究センター）

平成 23 年度　研究助成

# コスメトロジー雑感

日下部　豊寿

日常臨床を行っていて、患者様と歯科医師の間に、目標のズレを感じることがしばしばある。患者様の多くは、見えている部分がきれいになると目標を達成され、いつ治療が終了するか気になる。しかし、歯科医師は見た目だけではなく機能としての咬むことの重要性を把握しているため、見えにくい部分である臼歯までしっかり咬ませるよう治療を行っている。このようなケースは、患者様の治療目標の延長上に我々の目標があるため、方向性としては一致している部分が大きい。そのため、このような通過点などの問題は、歯科医師が持つ目標の大切さを患者様に話すことにより容易に解決することが出来る。しかし、目標が全く違うところにある場合はどうであろうか。今回の研究の発端はそこにある。一方で、口元を中心とした顔貌の改善を主訴として期待する患者様も多い。口元は側貌の美しさを決める上で重要な意味を持つため、軟組織分析を排除しては考えられないものである。これを背景に、歯科矯正治療では側面のレントゲン写真（セファログラム）から軟組織に関わる各種解析を行い、いわゆる「美しい横顔」を一つのゴールとして提案している。この分析を行う際は、横顔の平均値を用いてそれに近づけるように治療目標を設定する。しかし、この治療目標はあくまでも平均値を用いているが、美しいとされる横顔の平均値ではない。そして患者様は、自分と逆のものを望む傾向にあるように思われる。今回の研究では、やはり美しいとされる横顔を患者様は望まれていることがわかった。

今回の研究は、歯科医師サイドだけでなく患者サイドにも興味深い研究内容である。国が研究助成している科学研究費は、基礎研究が中心となった研究費であるが、臨床に直結した研究をさせていただける支えを公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に支援していただき、興味ある研究を行うことができとても感謝している。同時に、患者様の本心を垣間見ることが出来た。また、今までの研究生活で、気にはなっていたものの後ろ盾がなく研究を遂行する事ができなかったが、頭の中にあったもやもやが取り除かれ充実感をいただきました。

最後に今後の展望について話したい。今回の研究は、留学時代に知り合った韓国の先生にも協力を得て行っていただいている。韓国人は日本人に一番近いと言われているため、韓国人と違いがあるのかどうなのかとても興味深い所である。近いうちに、結果が出る予定である。将来は、先の韓国を始めとした東アジアは元より、同じ人種であるアジア地域全体での比較を計画している。そのため、自分が持っている海外の友人とのネットワークを活用し行うことを計画中である。これからこの研究を継続して行う可能性が高い地域として、中国、マレーシアそしてタイの友人に声をかけている最中である。再び研究助成がかなえば、すぐにでも研究をスタートする予定である。一方、当外来でも研究を継続する予定である。さらに被験者数を少しずつ増やし、今回の学生のグループだけでは無く、矯正治療前の患者、矯正治療後の患者、男性患者等々、まだまだ研究をする範囲は夢が膨らみます。この研究の楽しみを、後輩にもそして海外の歯科医師達に伝達し、さらなる発展を試みたい。

（北海道大学病院咬合系歯科矯正歯科）

平成 22 年度　研究助成

# 私と藤波芙蓉との出会い

鈴木　則子

私が今回の助成研究でとりあげた藤波芙蓉とは、明治末期から昭和初期にかけて活躍した男性美容研究家である。私が彼について研究を始めたのは、大学の事務室にかかってきた１本の電話がきっかけだった。

藤波芙蓉の子孫、と名のるその女性は、曾祖父の事跡について調べていたところ、本学のHP上で、私のゼミの卒論題目の中に芙蓉の名前を見つけたという。私は驚いた。10年以上も前の卒業生が書いたその卒論では、藤波芙蓉とは女性のはずだったからだ。明治時代に、男性美容研究家？しかも、学生が調べていたときには素性の手がかりすらつかめなかったのに、こうして芙蓉の写真をもった御子孫まで現れるとは。

藤波芙蓉とは何者だったのか。江戸時代の医学史研究者であるはずの私が、まるで芙蓉に導かれるようにして研究に着手して２年。史料の中に彼が散りばめておいてくれた些細な情報を、一つ一つ丹念に追跡していくと、美容家という枠を越えた、思いもかけない新しい芙蓉像が少しずつ見えてくる。

小説家、社会評論家、新聞記者、翻訳家…。明治という時代に欧米の最新のジャーナルを読みこなし、グローバルな視野に立ってマルチに活躍した藤波芙蓉。彼が最終的に選んだのが化粧研究という道。彼にとって、白塗りの伝統的日本化粧をナチュラルメイクに転換させること、そして近代科学に基づいた「衛生的」化粧料を開発することは、「日本の近代化」という大きな国家的プロジェクトの一翼を担うことを意味した。

私は今、調べれば調べるほど出てくる芙蓉の多彩かつ膨大な著作物の山に圧倒されそうになりながらも、明治時代の女性たちと同じように、すっかり彼の虜になってしまっている。

（奈良女子大学生活環境学部）

平成 22 年度　研究助成

# 仮想現実感とスティック・スリップ

水沼　博

実施させていただいた研究は仮想現実感とスティック・スリップ運動に関するものです。これらはいずれも私の専門分野である流体工学とは無縁で、化粧品とも私は私生活では無縁な生活をしています。しかしながらこのような機会を与えていただき、結果としては非常に楽しみながら研究をさせていただいたので、ここでこのような研究を始めた経緯についてお話しします。

まず仮想現実感ですが、10年くらい前に筑波の産総研を訪れ、そこでたくさんのプロジェクターが配置された一室に液晶シャッターのついた眼鏡をかけてはいり、横浜の町中をドライブして港までたどり着く仮想体験をしました。人によっては乗り物酔いする人もいるとのことでしたが、酔うというより初めて経験した仮想現実感にいたく感激しました。何とかこの新しいツールを自分の研究に応用できないかとあれこれ考えた末、サイコレオロジーとの組み合わせを考えるにいたりました。どのように、というとそれも結構説明が難しく、この研究を立ち上げたときの修士の学生は、某大手企業の最終社長面接で３分間で修論を説明するよう求められ、３分では説明できないと断ったため、決まりかけていた就職がダメになってしまいました。決まっていたら原子力関係の仕事に就くことになっていたので、今思うと複雑な気分ですが。

次のスティック・スリップですが、これは化粧品用の油剤を生産している企業の研究者の方から、摩擦係数を測定すると振動するものがあり、その油剤は塗布感も良い、と伺ったことがきっかけでした。研究を始めた頃、油剤粘度が高くなると塗布感も悪くなる、というもっともな結果で意外性がなく、何かおもしろみがなく思っていたところなので、早速その振動を塗布の仮想体験装置に取り込みました。スティック・スリップも調べてみると結構うまく説明できることがわかりました。

自分の専門外の人々との出会いからそれまで想像できなかったような研究を展開することができ、楽しむことができました。それらの方々と財団に感謝しています。

（首都大学東京）

平成 22 年度　研究助成

# 化粧をする意味

渡邉　映理

インターネットで話題になっている投稿動画がある。おそらく本人が撮影したものであろう。どちらかというと地味な顔立ちの若い女性が、化粧によって、驚くほどの美女に変身していくのだ。ビデオカメラは、その変身の一部始終をずっと映している。目の大きさなども、スッピンと化粧の後では、全然違っている。「すげぇ！」「こりゃ、だまされるわ」と男性からの書き込みもなされている。

今回の研究で、対象者である60名の女子学生たちが鏡

に向かって化粧をする様を見てきた。真剣だ。周りの物は一切目に入らない。実験に参加しているから、というわけではなさそうだ。昔立ち寄った、六本木駅の化粧室はもっと凄まじかった。そこでは10名ほどの女性が竹の子のようにぎゅうぎゅうに鏡の前に並び、化粧をしていた。まるで、これから戦いにでも行くかのように。

化粧をする女性たちを見ると、家で飼っていた、熱帯魚を思い出す。グッピーの場合は人間とは逆で、オスのほうが煌びやかである。オスは、ひらひらした尾びれや、綺麗な色を身にまとい、メスの前で精一杯格好をつけて、気を引こうとする。綺麗なオスが競争に勝ち、生殖に成功して、稚魚が誕生する。

人間の作戦はより巧妙であり、人為的な手段で、それをやってのける。これが、化粧であろう。元々、異性をひきつける力が弱い（と自ら思っている）個体も、顔面にひらひら（つけまつげ）や、色を施すことにより、異性を魅了する力を得ることができる。これが、人間が化粧をする意味の、根幹を成す部分ではないか。今回、研究を進めながら、そんなことを考えていた。

人間が、自分の子孫を残そうとする本能は、おそらく非常に強いものである。それゆえ、今回、研究結果として示唆されたように、その本能に関連した行為「化粧行動」をすることによって、感情が上向きになり、ストレスホルモンの変化が起こるのは、ごく自然なことなのかもしれない。

この度は、「化粧行動」について研究をする貴重な機会を与えてくださいました、財団法人コスメトロジー研究振興財団に、心より感謝を申し上げます。

（京都府立医科大学大学院医学研究科免疫学）

平成 24 年度　国際交流助成

# 雑　感

出口　茂

スウェーデン、ルント大学のBjörn Lindman教授を、平成24年5月13日−18日に、仙台国際センターで開催されたInternational Association of Colloid and Interface Scientists, Conference（IACIS2012）へ招聘するにあたり、貴財団の平成24年度外国人招聘助成によって援助頂いた。IACISとは、コロイドおよび界面科学に関連する分野の研究者の世界的な集まりで、1979年に活動を開始した非営利団体である。IACISの活動目標は、1）コロイド・界面科学研究者間の国際協力を推進する、2）コロイド・界面科学分野の発展と理解を促進する、の２点であり、その一環として1982年より３年に一度の割合で、関連分野の研究者が一堂に会する国際会議を各国で開催してきた。今年の仙台は、1988年の箱根以来、24年ぶりの日本での開催であった。

東日本大震災の影響で海外からの参加者数に関する懸念もあったが、Lindman教授を含むIACIS関係者から開催に向けた力強いサポートが得られたこともあり、最終的には34の国から計1,032名の参加者（国外319名、国内713名）を迎え、当初の予定通り無事に開催することができた。学会初日のOpening Ceremonyには、天皇皇后両陛下のご臨席を賜る栄誉にも浴した。また会期中に開かれたIACIS General Assemblyにおいて、本大会の実行委員長であった栗原和枝教授（東北大学）が次期会長に選出された。

学会会期中に行われた「Cellulose dissolution and coagulation. Role of hydrophobic interactions」と題したLindman教授のキーノート講演は、セルロースの水への溶解挙動に関するものであった。グルコースが直鎖状につながった多糖であるセルロースが水に溶解しないのは、セルロース分子間に強い水素結合が働いているためであるというのが定説である。Lindman教授の講演は、「水は大変優れたhydrogen-bond breakerであり、その考え方はおかしいのではないか？」という問題提起から始まり、多角的かつ深い考察をもとに、最終的にはセルロースが持つ両親媒性こそが、水に溶けない本当の原因だという仮説を提唱された。現在、学術誌上で議論が続いているようであるが、70歳近くでもまだ現役で、新しい問題に取組もうとされている同教授の研究に対する姿勢に強い感銘を受けた。

（独立行政法人海洋研究開発機構　海洋・極限環境生物圏領域）

# 付　　録

事業報告（平成 24 年度）
役　　員

# 事 業 報 告 書

（自平成 24 年 4 月 1 日　　至平成 25 年 3 月 31 日）

## 《研究助成関連》

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 2012 | 5 | 7 | 公募開始 | 全国 430 の大学、病院、研究機関等へ公募要領及び推薦書を送付、関連学術雑誌７誌、当財団 HP 他３機関 HP に掲載 |
| | 7 | 9 | 公募締切り | 応募数110件 |
| | 7/17 ～ 8/24 | | | 各選考委員による個別審査 |
| | 9 | 5 | 選考委員会(第３分科会) | 精神、文化に関する分野の選考 |
| | 9 | 6 | 選考委員会(第２分科会) | 生体作用、安全性に関する分野の選考 |
| | 9 | 11 | 選考委員会(第１分科会) | 素材、物性に関する分野の選考 |
| | 9 | 26 | 本選考委員会 | 各分科会の結果を総合的に判断して研究助成29課題を選考 |
| | 11 | 30 | 理事会 | 本選考委員会より答申、助成課題決定 |
| | | | 第23回 表彰・贈呈式 | 研究助成対象29課題の代表者へ、表彰状、助成金目録等を授与 |
| | | | 記念講演 | 演題：グローバル化の中での日本的強み<br>～「日本的なモノ」から「日本的であること」へ～<br>演者：明治大学国際日本学部 教授　小笠原 泰 先生 |
| | 12 | 3～ | 助成課題の公表 | 採択課題の代表者名、及びテーマ名を当財団HPに公表 |
| | 12 | 17 | 助成金交付 | 採択課題に対し研究助成金を交付　総額2,800万円 |

## 《国際交流助成関連》

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 2012 | 4 | 12 | 審査 | 応募課題の審査 |
| | 4 | 25 | 助成金交付 | 国際交流助成金の交付　50万円 |

## 《理事会関連》

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 2012 | 5 | 30 | 第一回通常理事会 | 平成23年度事業報告及び収支決算報告の承認、選考委員の選任、株主としての議決権行使、財団諸規程の追加制定、選考委員会規則の改正、任期満了に伴う理事候補者の選出、報告事項 |
| | 6 | 22 | 臨時（書面）理事会 | 代表理事（理事長及び副理事長）及び業務執行理事（専務理事）の互選、事務局長の選任、常勤役員の報酬、常勤役員の退職手当 |
| | 11 | 30 | 第二回通常理事会 | 平成24年度（第23回）研究助成者等の承認、研究助成引当資産の一部取崩しの承認及びそれに伴う臨時書面評議員会開催の承認、平成25年度の事業計画及び予算案の承認、報告事項 |
| 2013 | 3 | 12 | 臨時（書面）理事会 | 平成25年度収支予算書（事業別区分経理）の承認 |

## 《評議員会関連》

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 2012 | 6 | 15 | 第一回定時評議員会 | 平成23年度事業報告及び収支決算報告の承認、任期満了に伴う理事の選任、報告事項 |
| | 12 | 10 | 臨時（書面）評議員会 | 研究助成引当資産の一部取崩しの承認、報告事項 |

## 《その他》

１）報告書発行

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 2012 | 5 | 1 | 中間報告集 | 研究業績　中間報告集 第22号 |
| | 9 | 1 | 完了報告書集 | コスメトロジー研究報告 2102 vol.20 |

２）情報公開（当財団HP）

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 2012 | 4 | 1 | 事業計画及び収支予算 | 平成24年度事業計画及び収支予算書 |
| | 4 | 12 | 公募要領 | 2013年「コスメトロジー研究」公募要領 |
| | 6 | 26 | 事業報告及び収支決算 | 平成23年度事業報告書及び収支決算報告書 |
| | 10 | 19 | 研究報告の要旨 | コスメトロジー研究報告 2012 vol.20 掲載課題の要旨 |
| | 12 | 3 | 研究助成者及び課題名 | 平成24年度研究助成者名及び研究課題名 |

# 平成 24 年度 助成を受けられた方々

1）研究助成（29 課題）

第 1 分野：素材、物性に関する分野（11 課題）

| 氏　名 | 所　属 | 研究課題 |
|---|---|---|
| 足立　亨介 | 高知大学農学部 | 深海生物由来コラーゲンを活用した化粧品基材への応用研究 |
| 伊藤　大知 | 東京大学大学院<br>医学系研究科 | 金属イオン配位子修飾ヒアルロン酸の開発と組織浸透性に関する研究 |
| 大矢根 綾子 | 独）産業技術総合研究所<br>ナノシステム研究部門 | 皮膚組織再生を促進するリン酸カルシウム真球粒子の創製 |
| 岡田　友彦 | 信州大学工学部<br>物質工学科 | 球状シリカマイクロ粒子とスメクタイト微結晶の複合技術開発 |
| 神鳥　和彦 | 大阪教育大学教育学部<br>理科教育講座 | 加熱加水分解法を用いた紫外線吸収能を有するカルシウムヒドロキシアパタイト粒子の新規調整法の開発とそのキャラクタリゼイション |
| 茂里　　康 | 独）産業技術総合研究所<br>健康工学研究部門 | 両生類皮膚由来機能性生体分子の網羅的探索 |
| 通阪　栄一 | 山口大学大学院<br>理工学研究科<br>環境共生系専攻 | 膜透過性ナノ集合体を封入した固体エマルションの開発 |
| 野口　範子 | 同志社大学<br>生命医科学部 | 神経細胞が分泌する酸化ストレスに対する保護因子の同定 |
| 藤井　敏弘 | 信州大学繊維学部<br>応用生物学系 | 環境応答型スマート材料としてのケラチンゲルの創出 |
| 村上　　良 | 甲南大学理工学部<br>機能分子化学科 | パウダーエマルションおよびパウダーフォームの安定化要因の解明 |
| 吉冨　　徹 | 筑波大学大学院<br>数理物質系 | 高機能スキンケアを目指したレドックスナノ粒子の設計と評価 |

第 2 分野：生体作用、安全性に関する分野（14 課題）

| 氏　名 | 所　属 | 研究課題 |
|---|---|---|
| 今井　浩孝 | 北里大学薬学部<br>衛生化学 | 脂質ヒドロペルオキシドによる発毛阻害のメカニズムの解析と保護化合物のin vivo評価系の構築 |
| 加藤　昌志 | 中部大学生命健康科学部<br>生命医科学科 | 白髪予防・治療剤の選別に有効な加齢性白髪を自然発症するモデル動物の開発 |
| 川戸　佳 | 東京大学大学院<br>総合文化研究科<br>広域科学専攻 | 皮膚細胞は独自に女性ホルモンを合成し、それが皮膚細胞の活動を制御している |
| 柴　弘太 | 独）物質・材料研究機構<br>国際ナノアーキテクトニクス<br>研究拠点（MANA） | ナノ粒子曝露が真皮中の繊維芽細胞に与える影響の定量的リアルタイム解析 |

| | | |
|---|---|---|
| 竹馬　真理子 | 京都大学大学院医学研究科<br>次世代免疫制御を目指す創薬医学融合拠点 | 炎症性皮膚疾患におけるアクアポリン９の機能解明 |
| 花岡　健二郎 | 東京大学大学院<br>薬学系研究科 | 皮膚の生理機能解明を目指したカルシウムイオン蛍光プローブの開発とその応用 |
| 平澤　典保 | 東北大学大学院<br>薬学研究科 | 天然由来石鹸に含まれる脂肪酸によるTSLP産生とアレルギー誘発作用 |
| 藤井　順逸 | 山形大学大学院<br>医学系研究科 | 小胞体における蛋白質の酸化的折畳み異常によるコラーゲン形成障害機構の解明 |
| 藤田　靖幸 | 北海道大学病院皮膚科 | iPS細胞の造血幹細胞への分化能を応用した先天性皮膚疾患の治療 |
| 道上　宏之 | 岡山大学大学院<br>医歯薬学総合研究科<br>細胞生理学教室 | 新規経皮導入法による美白ペプチドを用いた高浸透化粧品の開発 |
| 室田　浩之 | 大阪大学大学院<br>情報統合医学講座<br>皮膚科学教室 | 発汗能を制御し皮膚恒常性保持能力を回復させる試み |
| 八木　孝司 | 大阪府立大学大学院<br>理学系研究科 | 化粧品用無機ナノ材料の遺伝毒性作用の解明 |
| 善本　隆之 | 東京医科大学<br>医学総合研究所<br>免疫制御研究部門 | サイトカインによる接触性皮膚炎誘導の制御に関する基盤研究 |
| 渡邊　利雄 | 奈良女子大学研究院<br>自然科学系 | クラスリン集合因子*CALM*欠損マウスに見られる、毛や組織の色の薄さの解析　―細胞内物質輸送と体色との関連を探る― |

第３分野：精神、文化に関する分野（４課題）

| 氏　名 | 所　属 | 研究課題 |
|---|---|---|
| 神崎　晶 | 慶應義塾大学医学部 | 嗅覚（芳香）刺激量が与える自律神経機能の経時的変化 |
| 木戸　彩恵 | 立命館大学衣笠総合研究機構<br>生存学研究センター | 心理・社会的発達と化粧行為の関連の検討　―ライフ・ステージによる化粧意識の相違と老年期の化粧 |
| 中村　暢彦 | 京都薬科大学<br>臨床薬学教育研究センター | 抗がん剤による皮膚障害とスキンケアに関する研究 |
| 茅　暁陽 | 山梨大学大学院<br>医学工学総合研究部 | 統計的学習による「似合う」への計算論的アプローチの確立　―個人に似合う髪型の自動提示技術の開発を通して |

２）国際交流助成（１課題）

外国人招聘（１課題）

| 氏　名 | 所　属 | 内容及び招聘者 |
|---|---|---|
| 出口　茂 | 独立行政法人<br>海洋研究開発機構 | 「コロイド、界面化学分野に関する国際協調」「IACIS（国際コロイド界面会議）2012」Björn Lindman氏（Lund Univ. Sweden）招聘 |

# 役　　員

平成 25 年 7 月 1 日現在

| | | |
|---|---|---|
| 理事長 | 小林　保清 | 株式会社コーセー　取締役会長 |
| 副理事長 | 小林　一俊 | 株式会社コーセー　代表取締役社長 |
| 専務理事 | 土子　利明 | 元株式会社コーセー　常勤監査役 |
| 理　事 | 宇佐美昭次 | 早稲田大学　名誉教授 |
| 理　事 | 新村　嘉也 | 高砂香料工業株式会社　相談役 |
| 理　事 | 二木　鋭雄 | 東京大学　名誉教授 |
| 理　事 | 西川　武二 | 慶應義塾大学　名誉教授 |
| 理　事 | 廣部　雅昭 | 東京大学　名誉教授 |
| 理　事 | 野呂　影勇 | 早稲田大学　名誉教授 |
| 理　事 | 山﨑　幹夫 | 元新潟薬科大学　学長 |
| 監　事 | 小田倉正典 | 公認会計士 |
| 監　事 | 黒田　節哉 | 弁護士 |
| 評議員会長 | 長野　哲雄 | 東京大学　創薬オープンイノベーションセンター　特任教授 |
| 評議員 | 上野　芳夫 | 元東京理科大学薬学部　教授 |
| 評議員 | 齊藤　　勲 | 公益財団法人日本食品化学研究振興財団　特別顧問 |
| 評議員 | 内藤　　昇 | 株式会社コーセー　取締役 |
| 評議員 | 西岡　　清 | 東京医科歯科大学　名誉教授 |
| 評議員 | 花輪　隆昭 | 元昭和館　館長 |
| 評議員 | 原田　敬之 | 東京女子医科大学　名誉教授 |
| 評議員 | 宮﨑　榮三 | 東京工業大学　名誉教授 |

＊本財団についてのお問い合わせは下記に
お願いいたします。

公益財団法人 コスメトロジー研究振興財団

〒104−0032　東京都中央区八丁堀三丁目11番８号
ニチト八丁堀ビル五階

電話 03（3206）7721

**コスメトロジー研究報告　Vol.21／2013**　　**非売品**

2013年９月１日発行

編集責任者　土子 利明
発　　行　公益財団法人 コスメトロジー研究振興財団
〒104－0032　東京都中央区八丁堀三丁目11番８号
電話　03（3206）7721
制　　作　エイエム企画
〒170－0013　東京都豊島区東池袋三丁目15番２号
電話　03（3590）5375
印　　刷　太陽印刷工業

表紙デザイン監修：株式会社コーセー　商品デザイン部デザイン１課

©2013　　不許複製　禁無断転載