

ごあいさつ

この度コスメトロジー研究振興財団として、22冊目の研究報告書を刊行いたしました。

設立以来20年以上にわたって、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ます。

当財団の助成領域は医学、化学、薬学、生理学、心理学、文学、社会学など多岐にわたり、それぞれの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、化粧品心理、文化論など多種多様であり、化粧品学の発展に少なからぬ貢献ができたものと考えております。また、当財団の活動が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23～24年度に助成を受けられた方の中から32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、素材の有用性、機能設計に注目した応用性の高いテーマ、香りや匂いに着目した解析研究が特徴的であったと思われます。

生体作用、安全性に関する分野では、メカニズムとエビデンス、評価系を多面的に捉えた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、感覚生理学の観点から化粧の本質を解明する独創的な内容であったと考えています。精神、文化に関して、応募・採用件数が他分野に比べて少なかったことは否めませんが、人々が心の豊かさをより一層強く求める傾向がみられることから、今後は本分野の重要性も高まり、質量ともに充実することが期待されます。

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今後も積極的に助成を行っていきたいと考えております。

今後とも、皆さまのますますのご協力とご支援をお願い申し上げます。

平成26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

- ・ 光学的無機ナノ粒子と金属錯体の紫外線カットと多機能複合化 4
東京理科大学理学部第二部化学科 秋津 貴城
- ・ 固相マイクロ抽出法に基づく体臭成分の高感度分析法の開発と化粧品・食品摂取やストレスによる体臭変化の解析 9
就実大学薬学部 片岡 洋行
- ・ ジンチョウゲ科植物の細胞内情報伝達系の改変によるフレグランス構成成分生合成活性の誘導 15
富山大学大学院医学薬学研究部 黒崎 文也
- ・ 紫外線遮光ナノ材料の UVB - UVC 光特性評価法の開発 21
大阪大学大学院工学研究科 齊藤 結花
- ・ 乳化剤フリー油中水滴型 (W/O) エマルションの分散安定化機構の解明と分散安定化技術の開発 26
信州大学工学部物質工学科 酒井 俊郎
- ・ 環境応答型スマート材料としてのケラチンゲルの創出 32
信州大学繊維学部 藤井 敏弘
- ・ 芍薬に含まれるコラーゲンの AGEs 化を阻害する化合物の探索とその皮膚老化改善作用の検討 37
熊本大学大学院生命科学研究部細胞病理学分野 藤原 章雄
- ・ 表面が制御された徐放性ナノチューブカプセルの化粧品への応用 44
産業技術総合研究所・ナノシステム研究部門・形態機能ナノシステムグループ 増田 光俊
- ・ 界面活性剤吸着膜の相転移で安定化する「温度応答性エマルション」の研究 49
九州大学大学院理学研究院化学部門 松原 弘樹
- ・ 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 55
甲南大学理工学部機能分子化学科 村上 良
- ・ 環境応答性レドックスナノ粒子を用いた高機能性スキンケア化粧品の創製 62
筑波大学大学院数理工学物質科学研究科 吉富 徹

II. 生体作用、安全性に関する分野

- ・ セマフォリン 3A トランスジェニックマウスにおける毛組織や皮膚の免疫環境でのセマフォリン 3A の役割の解明と皮膚炎症に対する新規治療軸の開発 68
浜松医科大学皮膚科学講座 伊藤 泰介
- ・ 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 72
北里大学薬学部衛生化学 今井 浩孝
- ・ 口腔粘膜歯肉由来 iPS 細胞を用いた口腔化粧品の安全性評価の確立 78
東北大学大学院歯学研究科分子・再生歯科補綴学分野 江草 宏
- ・ ヒト iPS 細胞を用いた *in vitro* 毛包誘導モデルの開発 84
慶應義塾大学医学部皮膚科学教室 大山 学
- ・ 皮膚の天然保湿因子 (NMF) の形成における転写因子 MafB の役割 90
横浜市立大学生命医科学研究科 片岡 浩介
- ・ スキン伝達物質 ATP と皮膚のアンチエイジングに関する研究 95
山梨大学医学部薬理学 小泉 修一
- ・ コラーゲンの線維形成を調節するプラチナ錯体に関する研究 99
早稲田大学理工学術院 小出 隆規

・ ナノ粒子曝露が真皮中の線維芽細胞に与える影響の定量的リアルタイム解析	106
物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点 柴 弘 太	
・ 接触抑制シグナルによるケラチノサイトのホメオスタシスとその破綻病態	112
九州大学生体防御医学研究所ゲノム腫瘍学 鈴 木 聡	
・ 皮膚表皮保湿成分セラミドの脂質シグナリング分子としての作用メカニズムの解明	118
九州大学大学院理学研究院化学部門 谷 元 洋	
・ 皮膚老化における 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 の役割	123
大阪大学大学院医学系研究科皮膚科学講座 寺 尾 美 香	
・ 創傷治癒における細胞外マトリックスの一つであるパーシカンの関与、RNAi による検討	130
長崎大学病院皮膚科アレルギー科 富 田 元	
・ 放射線療法後の皮膚障害ケアに関する基礎的検討	134
独立行政法人放射線医学総合研究所重粒子医科学センター 中 山 文 明	
・ 加齢に伴う皮膚 17 型コラーゲン切断動態の解析	139
北海道大学病院皮膚科 西 江 渉	
・ 皮膚組織において紫外線傷害を制御するユビキチン化システムの解析	143
北海道大学大学院医学研究科生化学講座 畠 山 鎮 次	
・ 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	147
東京大学大学院薬学系研究科 花 岡 健 二 郎	
・ 天然由来石鹼に含まれる脂肪酸による TSLP 産生とアレルギー誘発作用	152
東北大学大学院薬学研究科生活習慣病治療薬学分野 平 澤 典 保	
・ 化粧品向けナノ粒子の安全性評価を目的とした <i>in vitro</i> スクリーニングシステムの構築	158
—物理・化学的性状と安全性との関連—	
産業医科大学産業生態科学研究所 堀 江 祐 範	
・ 発汗能を制御し皮膚恒常性保持能力を回復させる試み	168
大阪大学大学院医学研究科情報統合医学皮膚科学教室 室 田 浩 之	

Ⅲ. 精神、文化に関する分野

・ 交通渋滞中のドライバーの精神的ストレスおよび肉体的ストレスに対する芳香物質の影響	174
—パイロットスタディー—	
東京農工大学大学院工学府機械システム工学専攻 佐 藤 桂	
・ 女性の化粧顔の認知に関わる神経機構と顔の部分的化粧の影響について	180
—機能的磁気共鳴画像法を用いた検討—	
東北福祉大学感性福祉研究所 藤 井 俊 勝	

■ 記念講演

・ 第 24 回表彰・贈呈式記念講演	189
「角層を科学する」	
慶應義塾大学医学部皮膚科教授 天 谷 雅 行	

■ コスメトロジー研究雑感 195

■ 付 録

事業報告書	215
平成 25 年度 研究助成を受けられた方々	216
役員一覧	218

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

光学的無機ナノ粒子と金属錯体の紫外線カットと多機能複合化

東京理科大学理学部第二部化学科

秋津 貴城

In order to develop UV filtering optical materials for cosmetology applications, we have prepared several multifunctional hybrid materials composed of titanium (IV) oxide particles (typical photo-catalyst) and optically active L-amino acid Schiff base copper (II) complexes. By photo-induced reactions between organic/inorganic hybrid dyes of copper (II) complexes and typical face powder materials, absorption of additional UV light could be observed successfully.

1. 緒言

化粧品にも古くから使用されている酸化チタンなどの無機ナノ粒子は、光学的には光の散乱ならびに紫外部の光の吸収が顕著である。セレン化カドミウムのようにナノ粒子の粒径を調整することによって、吸収および発光する光の波長を制御することも可能である。物質・材料面からのコスメロジーの基礎的分野の研究として、皮膚の損傷の原因となる紫外線をカットする素材や諸条件の探索が広く行われてきた。従来の研究は、無機酸化物では、ナノ粒子の均一な合成法や紫外線の吸収や、化学的な安定度（すなわち、還元すると活性酸素など皮膚に有害な化学種を生じないこと）などに重点が置かれたといえる。一方、金属錯体は、紫外部の光を強く可視部の光を弱く吸収する特性を容易に調整できる。さらに有機色素としての性質に関しては、無機酸化物では吸収が困難な波長領域の光の吸収（換言すれば、皮膚への有害光遮蔽剤として、あるいは色彩を与える化粧品として）が期待されている。加えて生物・医学面からのアプローチとの融合領域では、蛋白質（ポリペプチドやアミノ酸）との適合性・不適合性（疎水性・親水性）や、遺伝情報を担う核酸などの生体分子との反応性（化学的安定性）など人体への無害性が着眼点の一つと言えよう。

ところで、近年のグリーン・ケミストリーや生物無機化学・光化学等の融合分野を目指した我々の基礎研究の成果では、いくつかのL-アミノ酸成分をもつ適切な Schiff 塩基銅(II) 錯体を酸化チタンと複合化させたとき、紫外光を余計に吸収する光誘起電子移動反応を示すことを見いだした^{1), 2)}。

そこで、本研究では、酸化チタンと適切な金属錯体が出

会うことで初めて起こる光誘起電子移動反応を、金属錯体の分子設計などから詳細に検討して、コスメロジーに応用可能な知見（紫外線カットや多機能複合化）を得るための探索を目的とする。新たにアミノ酸にバリンを用い、サリチルアルデヒドの置換基を変えた、いくつかの新規キラル Schiff 塩基アミノ酸銅(II) 錯体を合成し、銅(II) 錯体と TiO₂ 複合系において紫外光の照射による銅(II) 錯体の還元反応について分光測定や電気化学等の評価を行うことによって比較、検討した。

2. 実験

2.1 合成と同定

我々は、4つのイミダゾール配位子を有するバリン残基の新たな銅(II) 錯体を合成した。

図1に示すキラル Schiff 塩基銅(II) 錯体は、メタノール溶液中で置換基を変えたサリチルアルデヒド類 (salicylaldehyde, 5-chlorosalicylaldehyde, 5-bromosalicylaldehyde, 5-methoxysalicylic acid) の脱水縮合反応で配位子を合成し、酢酸銅(II) を添加し3時間反応させた。さらにエタノールおよびイミダゾールを添加し、2時間反応させた後、エバポレーションと濾過により、緑がかった生成物を得た。この粗結晶を再結晶により精製した。化合物の同定は、収率、元素分析、IR、ESR、UV-Vis、CD スペクトル、X線結晶構造解析等で行った。

2.2 サイクリックボルタンメトリー(CV) 測定

RRDE-3A 回転リングディスク電極装置を用いた RRDE 法により、測定を行った。測定方法は、GC 電極にサンプ



UV filtering and multifunctional hybridization of optical inorganic nanoparticles and metal complexes

Takashiro Akitsu

Department of Chemistry, Faculty of Science, Tokyo University of Science

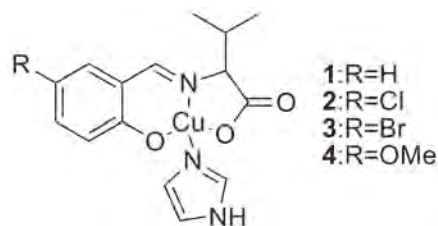


図1 アミノ酸 Schiff 塩基銅(II) 錯体

ルを 1.5×10^{-8} mol 塗布し、更にナフィオン膜を塗布し固定した。電解液にはクエン酸ナトリウム緩衝溶液 (pH5) を用い、測定範囲は $-0.2 \sim 0.5$ V vs. Ag|AgCl|NaCl (3M) とした。

2.3 ZINDO 計算

構造最適化計算は Gaussian 09 W software Revision A.02 (Gaussian, Inc.) の PM6 を用いて行った。垂直励起エネルギーを一重項基底状態の幾何学的形状に基づいて、ZINDO 法を用いて計算した。

2.4 錯体単一系と酸化チタンとの複合系の紫外光照射による UV-Vis スペクトル変化

まず、合成した銅(II)錯体単一系をメタノール溶液中で、ある一定時間での紫外光照射による UV-Vis スペクトルの変化を測定した。さらに、アナターゼ型酸化チタンとの複合系を調整し、同様にして UV-Vis スペクトル変化を測定した。

2.5 六配位八面体型キラルシッフ塩基銅(II)錯体

分子の配位子による修飾だけでなく、分子構造に着目して研究を進めるため、我々は新たに六配位八面体型キラルシッフ塩基銅(II)錯体の合成を行った。カリウム塩として析出させるために、アミノ酸には極性アミノ酸であるアスパラギンを選択した。

合成方法としては、まずメタノールに溶かした salicylaldehyde と、水に溶かしたアスパラギンの脱水縮合反応で配位子を合成した。常温に戻し、カリウムを加え 1 時間攪拌した後、塩化銅(II)を添加し更に 2 時間加熱反応させた。エバポレーションと濾過により、緑がかった生成物を得た。化合物の同定は、収率、元素分析、IR、ESR、UV-Vis、CD スペクトル等で行った。

また、錯体単一系と酸化チタンとの複合系による紫外光照射による UV-Vis スペクトル変化を測定した。

3. 結果

3.1 合成と同定

合成した錯体の同定結果は以下のとおりである。

- Yield : 50.5%. Anal.Found: C, 51.35; H, 4.88; N, 11.98%. Calc for $C_{15}H_{17}CuN_3O_3$: C, 51.50; H, 4.61; N, 12.01%. IR: 1615 cm^{-1} (C=N). ESR $g=2.007$.
- Yield: 55.5%. Anal.Found: C, 46.76; H, 4.19; N, 11.03%. Calc for $C_{15}H_{16}ClCuN_3O_3$: C, 46.93; H, 4.07; N, 10.82%. IR: 1623 cm^{-1} (C=N). ESR $g=2.034$.
- Yield: 42.2%. Anal.Found: C, 41.99; H, 3.44; N, 9.05%. Calc for $C_{15}H_{16}BrCuN_3O_3$: C, 41.92; H, 3.75; N, 9.78%. IR: 1630 cm^{-1} (C=N) $g=2.028$.
- Yield : 44.8%. Anal.Found: C, 50.56; H, 4.88; N, 10.92%. Calc for $C_{16}H_{19}CuN_3O_4$: C, 50.45; H, 5.03; N, 11.03%. IR: 1621 cm^{-1} (C=N). ESR $g=2.033$.

また、結晶構造解析の結果を表 1 に示す。3 の錯体に関しては、結晶を得ることが出来なかった。

3.2 サイクリックボルタンメトリー (CV) 測定

RRDE 法を用いたサイクリックボルタンメトリーの測定結果を表 2 に示す。

3.3 UV-Vis・CD スペクトル及び ZINDO 計算

錯体単一系の UV-Vis と CD スペクトル測定結果を図 2 に、ZINDO 計算結果を図 3 に示す。

3.4 銅(II)錯体単一系と酸化チタンとの複合系の UV-Vis スペクトル変化

錯体単一系の紫外光照射による UV-Vis スペクトル変化を図 4 に、酸化チタンとの複合系における UV-Vis スペクトル変化を図 5 に示す。この時、錯体+酸化チタン複合系は懸濁液であった。

表 1 結晶構造解析 (1. 2. 4)

Empirical formula	$C_{15}H_{17}CuN_3O_3$	Empirical formula	$C_{15}H_{16}ClCuN_3O_3$	Empirical formula	$C_{15}H_{16}BrCuN_3O_3$
Formula weight	350.87	Formula weight	350.87	Formula weight	380.88
Crystal system	Monoclinic	Crystal system	Orthorhombic	Crystal system	Monoclinic
Space group	$P2_1(\#4)$	Space group	$P2_12_12_1(\#19)$	Space group	$P2_1(\#4)$
Unit cell dimensions	a=5.3136(7) Å b=8.8313(11) Å c=16.190(2) Å 759.70(17) / Å ³	Unit cell dimensions	a=5.2964(16) Å b=8.759(3) Å c=34.915(10) Å 1619.8(8) / Å ³	Unit cell dimensions	a=5.3758(5) Å b=8.8811(8) Å c=17.2731(15) Å 824.67(13) / Å ³
Volume	2	Volume	4	Volume	2
Z	1.534 g / m ³	Z	1.580 g / m ³	Z	1.534 g / m ³
Density(calculated)	362	Density(calculated)	788	Density(calculated)	394
F(000)	0.28×0.21×0.19 mm ³	F(000)	0.14×0.13×0.09 mm ³	F(000)	0.18×0.15×0.12 mm ³
Crystal size	3514	Crystal size	3287	Crystal size	4439
Reflections collected	R1= 0.0221	Reflections collected	R1= 0.0292	Reflections collected	R1= 0.0216
R indices	wR2= 0.0530	R indices	wR2= 0.0909	R indices	wR2= 0.0547
Flack parameter	0.020(10)	Flack parameter	0.028(13)	Flack parameter	0.006(9)
Bond lengths (Å)		Bond lengths (Å)		Bond lengths (Å)	
Cu1-N1 1.9585(18)	O3-Cu-N2 94.11(7)	Cu1-N1 1.931(2)	O1-Cu1-N1 94.00(8)	Cu1-N1 1.9587(18)	O1-Cu1-N2 93.94(6)
Cu1-N2 1.9244(17)	O1-Cu1-N1 91.61(7)	Cu1-N2 1.958(2)	O1-Cu1-N2 91.61(9)	Cu1-N2 1.9286(17)	O1-Cu1-N1 92.00(7)
Cu1-O1 1.9167(14)	N2-Cu1-N1 172.37(7)	Cu1-O1 1.916(2)	N1-Cu1-N2 172.65(10)	Cu1-O1 1.9157(15)	N2-Cu1-N1 171.36(7)
Cu1-O2 1.9755(14)	O1-Cu1-O2 171.27(7)	Cu1-O2 1.9705(19)	O1-Cu1-O2 170.94(9)	Cu1-O2 1.9814(14)	O1-Cu1-O2 172.24(6)
	N2-Cu1-O2 83.32(6)		N1-Cu1-O2 83.45(8)		N2-Cu1-O2 83.11(6)
	N1-Cu1-O2 90.28(6)		N2-Cu1-O2 90.28(6)		N1-Cu1-O2 90.20(6)
Bond angles (°)		Bond angles (°)		Bond angles (°)	

表2 CV測定による酸化還元電位 vs Ag | AgCl | KCl (sat., aq)

1	0.078V
2	0.014V
3	0.011V
4	-0.001V

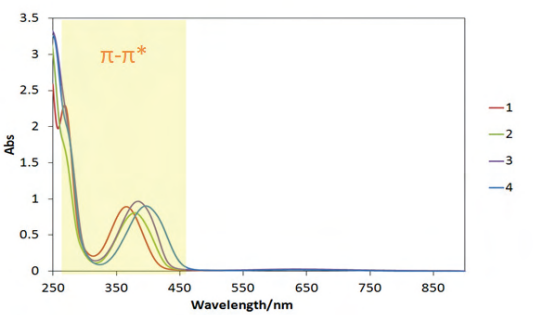
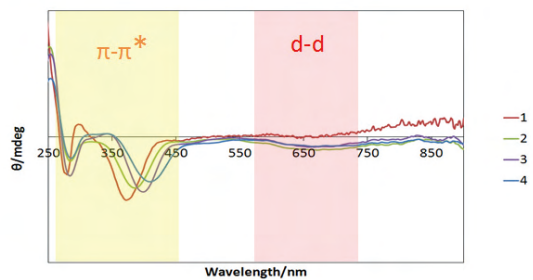


図2 UV-Vis, CD スペクトル比較

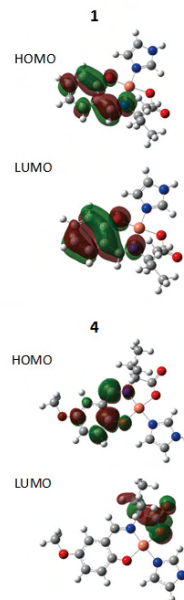
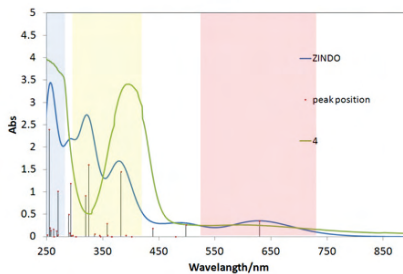
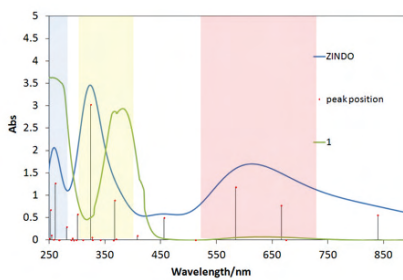


図3 ZINDO 計算

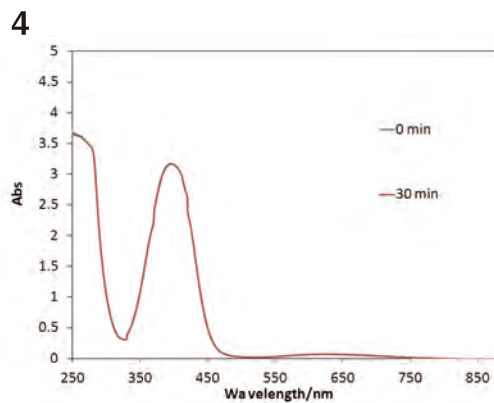
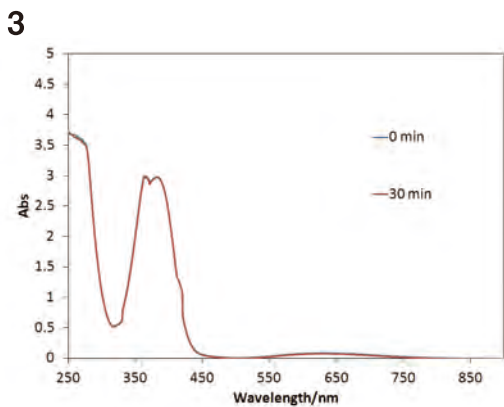
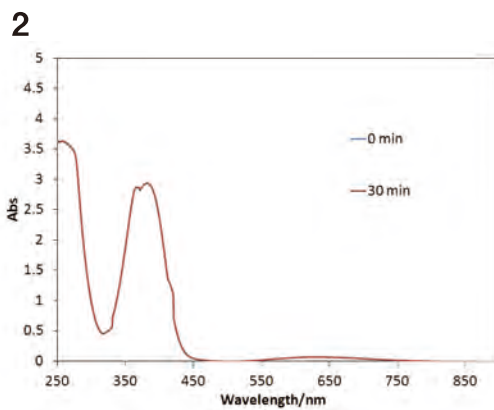
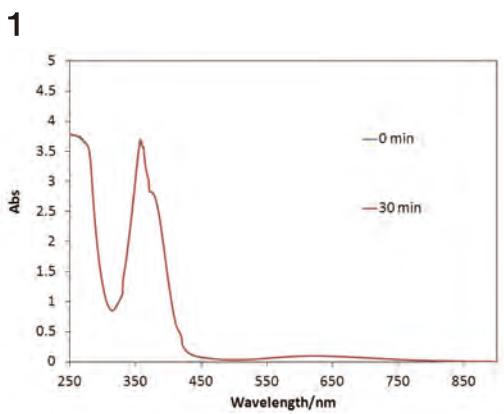


図4 錯体単一系のスペクトル変化

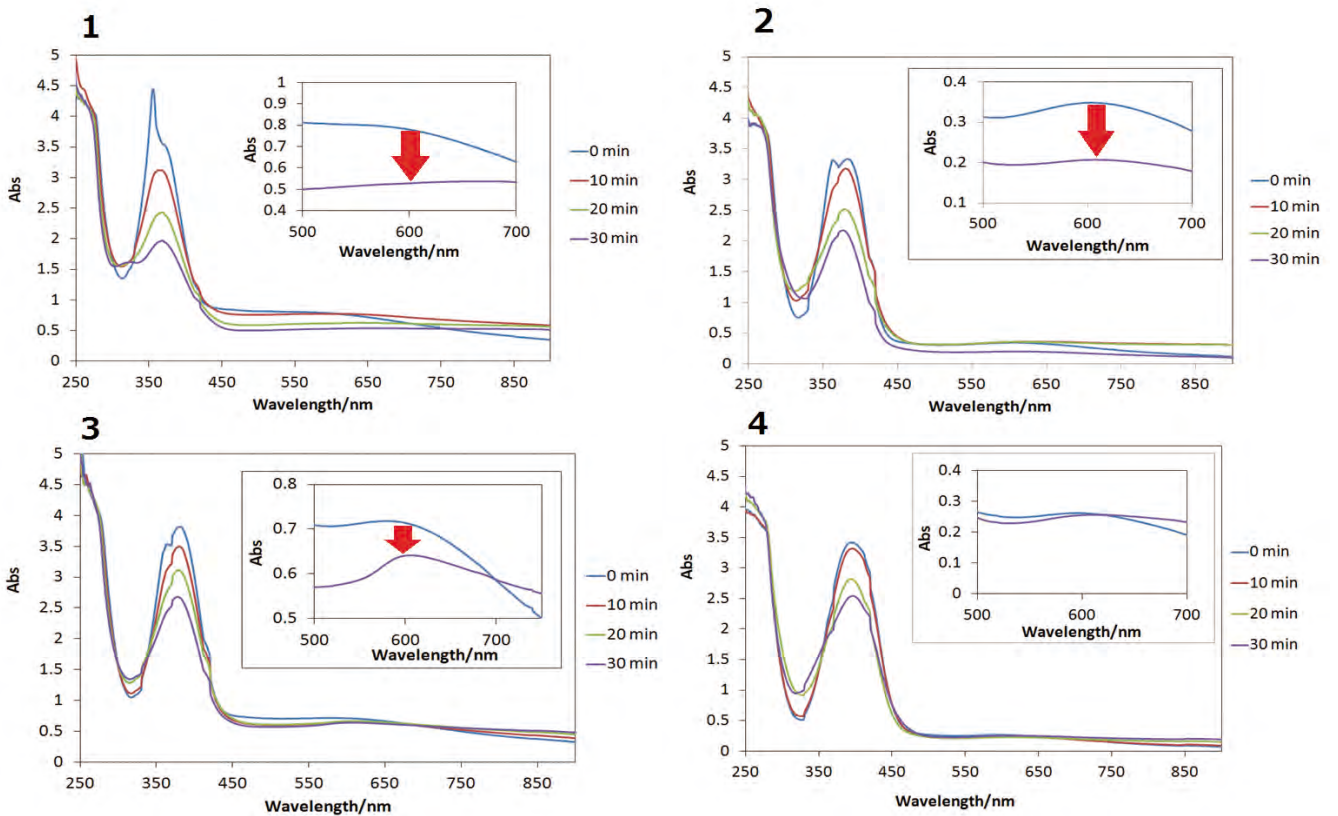


図5 錯体+酸化チタン複合系のスペクトル変化

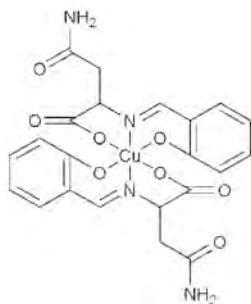


図6 六配位八面体型キラル Schiff 塩基銅(II)錯体

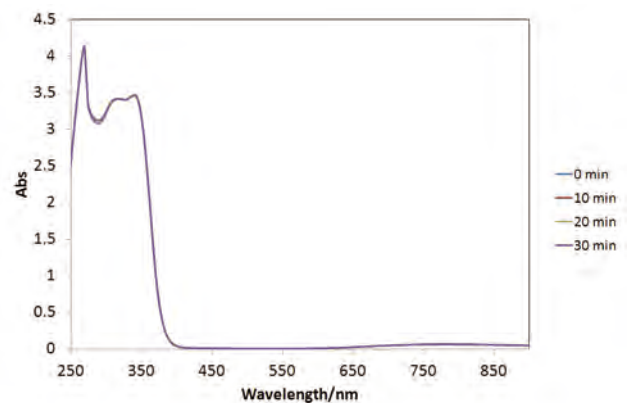


図7 錯体単一系のスペクトル変化

3.5 六配位八面体型キラル Schiff 塩基銅(II)錯体

合成した錯体はカリウム塩として析出した(図6)。同定結果は以下のとおりである。

Yield: 30.5%. Anal. Found: C, 43.22; H, 3.19; N, 9.09%. Calc for $C_{22}H_{20}CuK_2N_4O_8$: C, 43.11; H, 3.30; N, 9.18%. IR: 1623cm^{-1} (C=N). ESR $g=2.057$.

四配位平面型錯体と同様に、錯体単一系の紫外光照射によるUV-Visスペクトル変化を図7に、酸化チタンとの複合系におけるUV-Visスペクトル変化を図8に示す。この時、錯体+酸化チタン複合系は懸濁液であった。

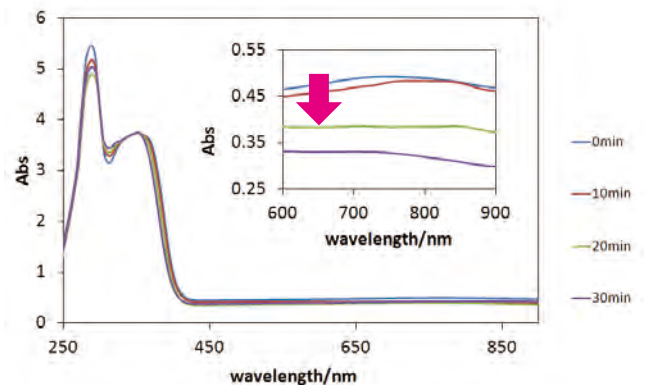


図8 錯体+酸化チタン複合系のスペクトル変化

4. 考察

4.1 UV-vis・CDスペクトル及びZINDO計算

ZINDO計算により算出された**1**, **4**のUV-visスペクトルは実験で得られた結果と定性的に一致した(図3)。導入した電子供与基であるメトキシ基は π - π^* バンドの長波長シフトと酸化還元電位の負のシフトをもたらしていることが示唆される。また、バンドは計算結果に基づいて割り当てられている。

4.2 銅(II)錯体単一系と酸化チタンとの複合系のUV-Visスペクトル変化

錯体単一系に紫外光を照射したところ、スペクトル変化は見られなかった(図4)。しかし、酸化チタンとの複合系に紫外光を照射した場合には配位子によって変化が見られた(図5)。**1**・**2**・**3**の錯体については、 π - π^* バンドとd-dバンドの強度減少を示しており、銅(II)が銅(I)へ還元されていることが示唆された。しかし、**4**の錯体については π - π^* バンドの強度減少がみられたものの、d-dバンドの強度については変化が見られなかった。

4の錯体は電子供与基であるメトキシ基を有し、酸化還元電位は負の値を示している(表2)。このことから、配位子による錯体の酸化還元電位が、光誘起電子移動反応による錯体の還元反応に影響を及ぼしていることが示唆される。

4.3 六配位八面体型キラル Schiff塩基銅(II)錯体

1~**3**の錯体と同様に、紫外光照射によるUV-Visスペクトルにおいてd-dバンドの強度減少が見られた。しかし、 π - π^* バンドの吸収強度の変化がほぼ見られないことから、配位子の劣化が抑えられていることが示唆された。

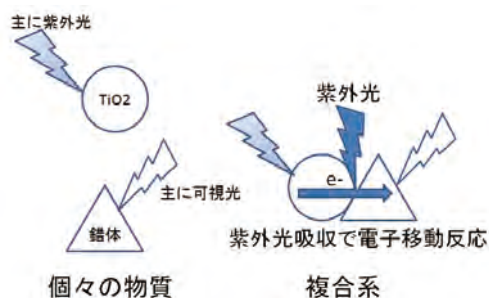


図9 光誘起電子移動反応(概念図)

5. 総括

我々は酸化チタンと適切な金属錯体とを複合化してはじめて紫外光を余計に吸収する電子移動反応が起こる場合を見いだした(図9)。その光誘起電子移動反応は、僅かな分子修飾により制御されることが明らかとなった。また、分子設計の再検討により、より機能性を有する(紫外線カット・色彩変化・化学種の安定性等)材料への応用が期待される。

(参考文献)

- 1) Kurata M, Yoshida N, Fukunaga S, and Akitsu T: Proposed mechanism of photo-induced reactions of chiral threonine Schiff base Cu(II) complexes with imidazole by TiO₂, *Contemporary Engineering Sciences*, 6, 255-260, 2013.
- 2) Yoshida N, Akitsu T: Reaction of Hybrid Systems Composed of Cu(II) Complexes Having Chiral Schiff Base Amino-Acid Ester Derivatives and TiO₂, In *Integrating Approach to Photofunctional Hybrid Materials for Energy and the Environment*, Nova Science Publishers, Inc. (NY, USA), 2013, chapter 5, 111-124, and references therein.

固相マイクロ抽出法に基づく体臭成分の高感度分析法の開発と 化粧品・食品摂取やストレスによる体臭変化の解析

就実大学薬学部

片岡 洋行

Since the odors and emanations released from human body can include essential information about the state of health and diseases, chemical analysis of their components is attracting attention as an objective quantitative evaluation. In this study, we developed a non-invasive analytical method for the determination of 2-nonenal as a body odor component by headspace solid-phase microextraction/gas chromatography-mass spectrometry (SPME/ GC-MS). 2-Nonenal in skin emissions and secretions collected by gauze wiping were easily extracted onto the SPME fiber, and then analyzed sensitively by GC-MS. Using this method, we analyzed body odor changes by use of cosmetics, food intake, cigarette smoking and stress load.

1. 緒言

近年、清潔志向が高まり、口臭や体臭、加齢臭を気にする体臭恐怖症(自臭症)が増加しており、消臭化粧品やデオドラント関連製品が開発されている。また、体臭は健康状態を示すバロメーターであり、ストレスや生活習慣病のサインとも言われ、心身症とも関連して社会生活の障害となっている¹⁾。しかし、体臭は周囲の指摘が困難で判断基準も曖昧であることから、体臭の客観的な定量評価法が開発が望まれている。体臭にはスパイシー臭、脂肪酸臭、硫黄臭などがあり、汗腺や皮脂腺などの分泌物が皮膚細菌によって分解された揮発成分や体外から摂取された化合物成分に由来すると考えられている。特に、皮脂腺から分泌される9-Hexadecenic acidが酸化・分解されて生成する2-Nonenalなどの不飽和アルデヒド類が加齢臭の原因の一つとなっている(図1)²⁾。しかし、体臭成分分析の鍵となるサンプリング器材や分析手法が確立されてないため、それらの発生の実態や動態については、十分解明されていない¹⁻⁴⁾。特に、皮膚表面から発生する“におい”は複雑で極微量であるため、官能的に感知できても分析機器で検出困難な場合があり、成分を分離同定・定量するためには、サンプリングや前処理を効率化した高感度分析法の開発が重要な課題となっている。従来、皮膚ガスサンプリング法として、手のひらをPVFバッグに入れて採取する方法が報告されているが、気密性や定量性に問題がある。また、体臭成分の分析法として、ヘッドスペースサンプリングや溶媒抽出後、GC分析する方法が報告されているが、感度

や定量性に問題がある。そこで、我々がこれまでに開発してきた固相マイクロ抽出(SPME)法⁵⁻⁷⁾を用いれば、簡単な器具でサンプリングと同時に抽出濃縮ができることから、皮膚ガス及び皮膚滲出液中の体臭成分を生体から直接サンプリングして定量評価できると考えられる。

本研究では、サンプリング・前処理の重要性に着目し、ファイバー SPME法を用いて皮膚ガス・皮膚滲出液中の揮発成分を非侵襲的かつ簡便迅速にサンプリング、抽出濃縮し、ガスクロマトグラフ-質量分析(GC-MS)法との連結により高感度分析する方法を開発した。また、本法を用いて、体臭成分の一つである2-Nonenalをバイオマーカーとした皮膚ガス・滲出液サンプリング分析法を検討し、さらに化粧品使用や食品摂取、ストレスや喫煙など内的、外的要因による体臭への影響を解析した。初年度は不飽和アルデヒド類のSPME/GC-MS法の開発、最終年度は2-Nonenalに的を絞って体臭分析を行った。

2. 実験

2.1 試薬

体臭関連の分析対象標準物質として、2-Nonenal(ナカライテスク製)を用い、LC-MS用メタノールに溶かして1 mg/mLとし、密栓して冷蔵(4℃)保存した。これを用時、LC-MS蒸留水で希釈して用いた。

2.2 装置及び測定条件

GC-MS分析は、島津QP-2010 GC-MS装置を用い、SPME/GC-MS法により、SIMモード(2-Nonenal:m/z=55, 83, 111)で分析した。GC分離は、DB-1(60m×0.25mm i.d.)キャピラリーカラムを用い、190℃(2分間保持)から230℃まで5℃/minの昇温で行った。

2.3 ファイバー SPME 操作法

SUPELCO社製のSPMEホルダー及びファイバーアッセンブリーからなるSPMEユニットを使用した。ファイバ



Development of sensitive analytical method of body odor components using solid-phase microextraction, and analysis of their changes by use of cosmetics, food intake and stress load

Hiroyuki Kataoka
School of Pharmacy, Shujitsu University

ーアッセンブリーとして、次の異なる固定相を固定化した7種のファイバーを使用した。

<吸収型>

- ① PDMS (Polydimethylsiloxane、膜厚100μm)
- ② Polyacrylate (膜厚85μm)

<吸着型>

- ③ Stable Flex PDMS/DVB (PDMS/divinylbenzene、膜厚65μm)
- ④ CAR/PDMS (Carboxen/PDMS、膜厚75μm)
- ⑤ Stable Flex CAR/PDMS (膜厚85μm)
- ⑥ CW/DVB (Carbowax/DVB、膜厚65μm)
- ⑦ DVB/CAR/PDMS (膜厚50/30μm)

<操作手順>

試料溶液をホットプレートスターラーに乗せ、試料を加熱する。この時の加熱温度を「抽出温度」と表記する。次にバイアルのセプタムにSPME針を貫通させ、続いてファイバーをヘッドスペース (HS) 中に露出し、加熱により気化した物質を吸着させる。この時のファイバー露出時間

を「抽出時間」と表記する。一定時間放置後、ファイバーを収納して針を抜き、GC-MSの試料気化室に導入し、抽出された化合物を加熱により脱離する(図2)。SPMEによる抽出条件は本研究により最適化した。

2.4 皮膚ガス及び皮膚滲出液のサンプリング法

皮膚ガス及び皮膚滲出液のサンプリング方法として、図3に示す4つの方法を比較検討した。皮膚を石鹸で洗浄して3時間後にサンプリングを行った。

2.5 拭き取り法または貼り付け法による体臭分析

本学研究倫理安全委員会の承認のもと、20歳代から50歳代の男女4名の被験者に対して、実験の趣旨を説明し、同意を得て皮膚ガス・皮膚滲出液をサンプリングした。図3の③または④の方法に従い、0.1gの乾燥ガーゼを用いて、額、腕、耳裏、腋は拭き取り法、胸部、背中からは貼り付け法によりサンプリングし、2-NonenalをHS-SPME/GC-MS分析した。

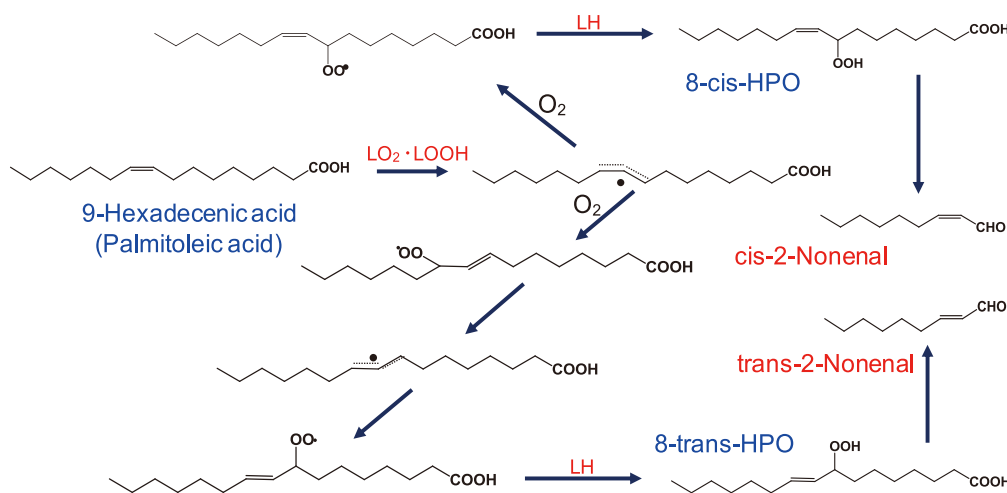


図1 脂質過酸化反応による2-Nonenalの推定生成機構²⁾

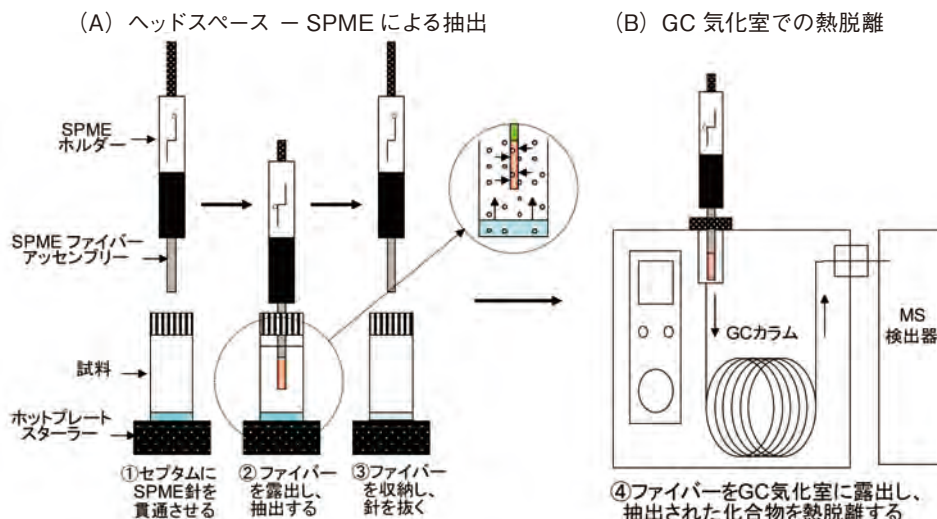


図2 ヘッドスペースファイバー SPME/GC-MS法の概要

また、化粧品の使用、食品摂取、喫煙やストレスなどによる体臭変化を解析するために、これらの事前・事後における皮膚ガス・皮膚滲出液を上記の方法によりサンプリングし、2-NonenalをHS-SPME/GC-MS分析した。

3. 結果

3.1 GC-MS分析法の確立

スキャンモード (m/z : 30-150) GC-MS法により、2-Nonenal (分子量140) 標準溶液のマスペクトルを分析した結果、図4に示すように分子イオンは検出されなかつ

たが、特徴的なフラグメントイオンとして、 $m/z=55$ 、83、111が検出されたことから、これらを選択してSIMモードで測定を行うこととした。また、図5に示すように同濃度の溶液をヘッドスペース法による直接注入 (MeOH溶液, 1 μ L) と、ファイバー SPME法を用いて比較したところ、SPME法により効率よく濃縮できることがわかった。

3.2 HS-SPME条件の最適化

SPME法は分配係数に従った化合物の移動による抽出法であるため、迅速かつ高い抽出率をあげるためには化合物

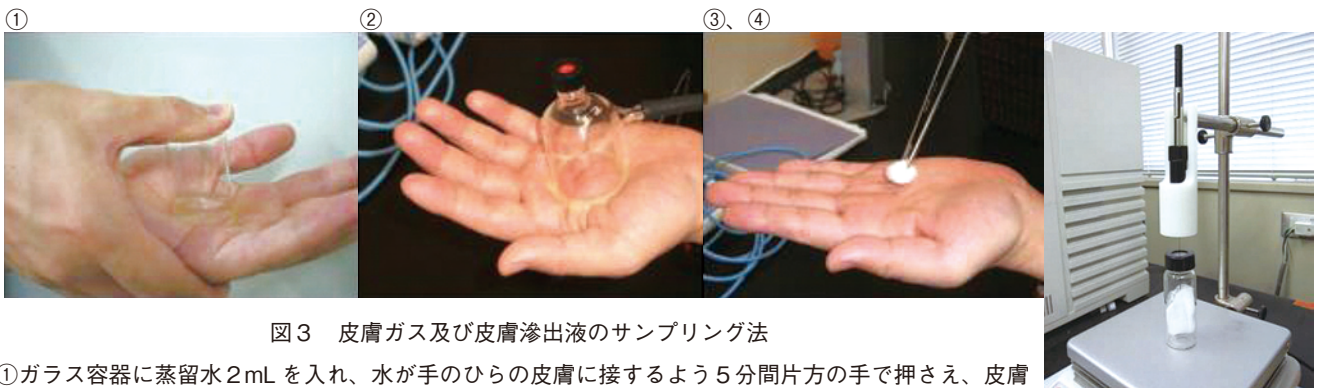


図3 皮膚ガス及び皮膚滲出液のサンプリング法

- ①ガラス容器に蒸留水2 mLを入れ、水が手のひらの皮膚に接するよう5分間片方の手で押さえ、皮膚滲出液を蒸留水中に抽出し、この溶液をバイアルに入れてHS-SPME抽出する。
- ②吸引カップを用いて、セプタムを通してSPMEファイバーを手のひらの上部に挿入し、直接HS-SPME法で5分間抽出する。
- ③脱脂綿またはガーゼ0.1 gで手のひら2 cm角の範囲を1分間拭き取り、バイアルに入れて、直接HS-SPME抽出する。(拭き取り法)
- ④脱脂綿またはガーゼ0.1 gを手のひらにテープで貼り付け、3時間後にバイアルに入れて、直接HS-SPME抽出する。(貼り付け法)

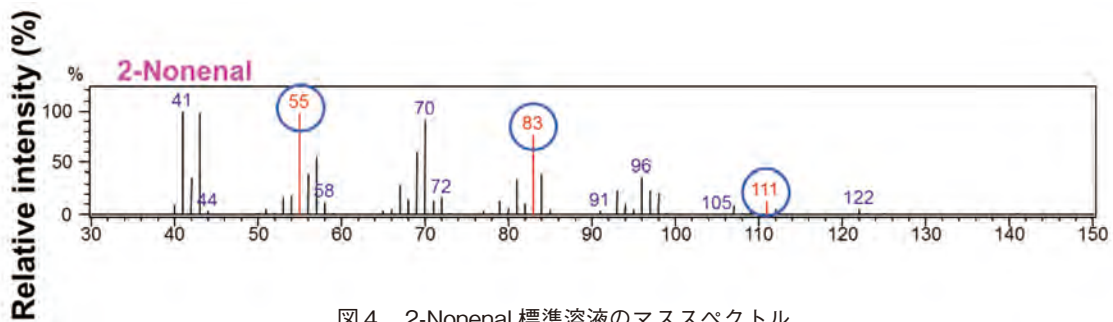


図4 2-Nonenal 標準溶液のマスペクトル

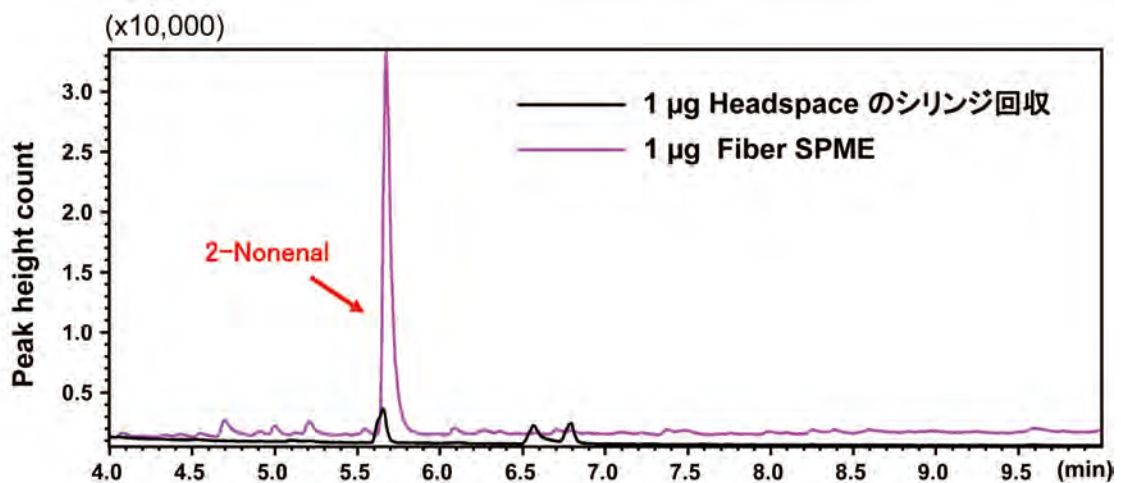


図5 ヘッドスペース法とSPME法により得られたクロマトグラム

のファイバー固定相への分配率を上げることが重要である。そこで、7種のファイバーを検討したところ、65 μ m Stable Flex PDMS/DVBファイバーを用いるとき、2-Nonenalを効率よく抽出できることから、以後の実験ではこのファイバーを用いることにした。

また、ガーゼ0.1gに5ngの2-Nonenalを染みこませて、40mLバイアル中で65 μ m Stable Flex PDMS/DVBファイバーを用いてHS-SPME抽出条件を最適化したところ、抽出温度50 $^{\circ}$ Cで45分間ファイバーをヘッドスペース中に曝露することにより、効率よく抽出濃縮できることがわかった。

3.3 皮膚ガス及び皮膚滲出液のサンプリング法の検討

図3の①～④の方法に従い、0.1gの脱脂綿またはガーゼを用いて、手のひらから皮膚ガス・皮膚滲出液をサンプリングし、HS-SPME/GC-MS分析したところ、図6に示すように、拭き取り法が最も効率よく2-Nonenalを回収できることがわかった。そこで、拭き取りに用いる脱脂綿とガーゼからの2-Nonenalの回収を比較するために、脱脂綿またはガーゼ0.1gをバイアル瓶に入れ、2-Nonenalを5ng添加して、経時的にこれらの素材からの2-Nonenal

の回収量を測定した。図7に示すように、脱脂綿では回収にばらつきが見られ、ガーゼを使用することにより安定して回収できることから、拭き取り法及び貼り付け法ではガーゼを使用することにした。

ガーゼを用いた拭き取り法による2-Nonenalの回収率を求めるために、5ngの2-Nonenalをシャーレにとり、ガーゼ0.1gで拭き取ってバイアルに入れ、HS-SPME/GC-MS分析した。直接5ngの2-Nonenalをバイアルに入れて測定した場合と比較して、約60%の2-Nonenalが回収できることがわかった。

また、ガーゼでサンプリングした皮膚ガス・皮膚滲出液中の2-Nonenalの安定性を調べるために、2-Nonenal 1 μ g/mL標準溶液を40mLバイアルに入れて、密栓して室温、冷蔵、冷凍で保存し、24時間後に2-Nonenalの抽出、測定を行った。図8に示すように、冷凍保存することにより2-Nonenalの減少率は低かったことから、ガーゼでサンプリングした後、直ちにセプタム付バイアル瓶に入れて凍結保存すれば、2-Nonenalの分解を防ぎ安定した結果が得られることがわかった。

そこで、ガーゼを用いた拭き取り法による2-Nonenalの検量線、検出限界及び再現性について検討した。ガーゼ

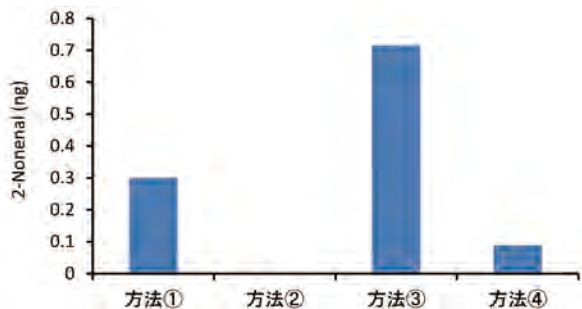


図6 皮膚ガス及び皮膚滲出液のサンプリング法の比較

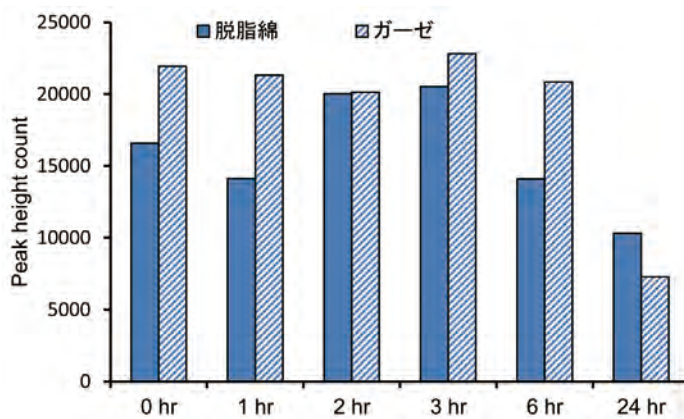


図7 サンプリング素材の比較

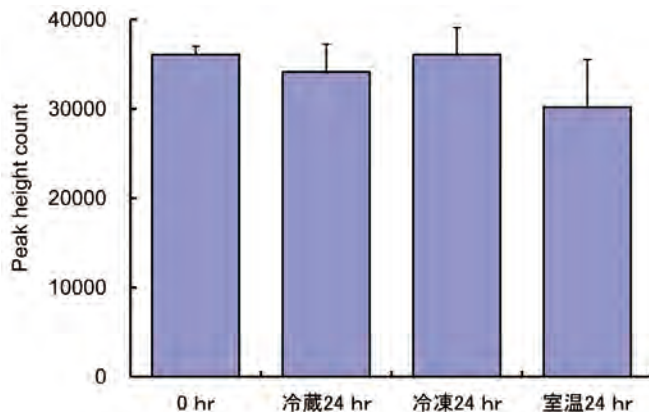


図8 サンプリング後のガーゼの保存条件の検討

0.1 g に 1 ~ 50 ng の 2-Nonenal を滴下し、HS-SPME/GC-MS 分析した結果、表 1 に示すように、相関係数は 0.991 と良好な直線性を示し、検出限界は 171 pg (S/N=3) と高感度に検出できることがわかった。また、日内及び日差変動における相対標準偏差 RSD は、それぞれ 9.6% 及び 3.6% と再現性良く定量できることがわかった。

3.4 体の各部位からの 2-Nonenal 分泌量と日内変化

被験者 3 名 (A: 20 代女性, B: 20 代男性, C: 30 代男性) について、体を石鹸で洗浄後、6 時間の通常の生活において分泌される 2-Nonenal を、額、腕、耳裏、腋からガーゼ拭き取り法 (0.1 g) により採取し、また、胸部、背中、枕からはガーゼ貼り付け法 (0.1 g) により採取し、HS-SPME/GC-MS 分析した。図 9 に示すように、個人差はあるものの、2-Nonenal は額、腕、耳裏から比較的多く分泌されていることがわかった。

そこで、洗浄した額 (2 cm × 2 cm 四方) の 4 箇所について、3 時間毎にガーゼ拭き取り法 (0.1 g) により皮膚ガス・皮膚滲出液を採取し、HS-SPME/GC-MS 分析したところ、2-Nonenal は 13 ~ 16 時の午後の時間帯に比較的多く分泌されていることがわかった。

3.5 化粧品使用、食品摂取、ストレスや喫煙などによる体臭への影響

体臭成分の一つである 2-Nonenal は、緒言に述べたよう

に、脂肪酸と過酸化脂質の反応によって生成すると言われており、脂肪や脂肪酸を多く含む食品の摂取や、脂質過酸化に関与する活性酸素の発生が大きな要因となっている。従って、飲酒や喫煙、ストレスなども体臭変化に影響すると考えられる。また、化粧品や体臭を消すと言われている消臭石鹸の使用も体臭変化に影響すると考えられる。そこで、本研究で開発した方法を用い、2-Nonenal をバイオマーカーとして化粧品使用や食品摂取、ストレスや喫煙など内的、外的要因による体臭への影響を解析した。

表 2 に示すように、低脂肪食 (肉を含まない) と高脂肪食 (牛焼肉 500 g) の後、12 時間後にガーゼ拭き取り法により額からサンプリングし、HS-SPME/GC-MS 分析したところ、高脂肪食で有意に 2-Nonenal が増加することがわかった。また、化粧水使用の有無や喫煙の前後においては、若干の 2-Nonenal の増加が認められたが有意な差ではなかった。ストレス負荷として、会議の前後 (精神的ストレス) や運動前後 (肉体的ストレス) においては、有意に 2-Nonenal が増加し、特に運動後は大量の 2-Nonenal が発生していることがわかった。これは、運動による発汗で皮脂腺から脂肪酸や過酸化脂質の分泌が増加し、体表中の常在細菌によって 2-Nonenal への酸化分解が促進されたものと思われる。

一方、最近デオドラント製品として市販されている柿渋石鹸による消臭効果を 50 歳代男性で調べた。普通の石けん水 (無添加) 及び柿渋石鹸 (柿タンニン配合) でそれぞれ

表 1 ガーゼ拭き取り法によるファイバー SPME/GC-MS 法のバリデーション

化合物	検量線			検出限界 (pg) ²⁾	日内変動 RSD(%) ³⁾	日差変動 RSD(%) ³⁾
	傾き	切片	相関係数			
2-Nonenal	6548.1	-19428	0.991	171	9.6	3.6

1) Calibration range: 1 ~ 50 ng, 7 point (n=21)

2) S/N=3

3) n=3

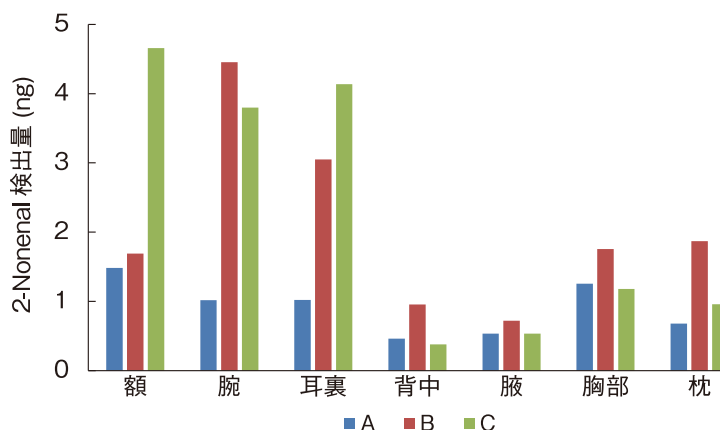


図 9 体表の各部位における 2-Nonenal 検出量の比較

表2 様々な生活習慣による体臭変化の解析

生体側の 状態	サンプリング			2-Nonenal 含量 (ng)	T-test
	体表部位	採取方法	時間	平均値±SD (n=3)	P 値
低脂肪食	額	拭き取り	12	0.487±0.096	
高脂肪食	額	拭き取り	12	0.697±0.088	0.0243
化粧なし	額	拭き取り	6	0.228±0.039	
化粧あり	額	拭き取り	6	0.263±0.077	0.2617
喫煙前	額	拭き取り	2	0.268±0.081	
喫煙後	額	拭き取り	2	0.373±0.097	0.1131
会議前	額	拭き取り	6	0.228±0.039	
会議後	額	拭き取り	6	0.353±0.093	0.0499
運動前	背中	貼り付け	6	0.045*	
運動後	背中	貼り付け	6	4.573*	↑
普通石鹸	胸部	貼り付け	7	0.433**	
柿渋石鹸	胸部	貼り付け	7	0.000**	↓
普通石鹸	首	貼り付け	7	0.886**	
柿渋石鹸	首	貼り付け	7	0.033**	↓

*含量は2回の測定の平均値、**含量は1回の測定結果である。

体を洗浄後、ガーゼ貼り付け法により、胸部及び首にガーゼを貼り、一晚睡眠後、起床時にガーゼを回収し、HS-SPME/GC-MS分析したところ、柿渋石鹸使用により、2-Nonenalの発生がほとんど認められなかった。これは、柿渋エキスによる殺菌効果によるものと思われる。

4. 考 察

本研究により、体臭成分の一つである2-NonenalをHS-SPME/GC-MSにより簡便かつ高感度に分析できることがわかった。皮膚ガス及び皮膚滲出液のサンプリング法については、ガーゼ拭き取り法が効果的ではあるが、拭き取り方を一定にする必要があり、回収率や定量性に関してもまだ検討の余地がある。また、体臭は複合臭であり、2-Nonenalだけでなく他の体臭成分との相互作用や、前駆物質である9-Hexadecenic acidの動態についても解析する必要がある。今後、さらに効率的かつ簡便なサンプリング手法に改良し、2-Nonenalや他の体臭成分の生成及び分解のメカニズムを明らかにして、食習慣や生活習慣の改善による効果的な体臭対策法を検討していく予定である。

(謝 辞)

本研究を行うにあたり、多大なるご援助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深く感謝いたします。

(引用文献)

- 1) Kataoka H., Saito K., Kato H., Masuda K., Non-invasive analysis of volatile biomarkers in human emanations for health and early disease diagnosis. (Review) *Bioanalysis*, 5 (11), 1443 – 1459, 2013.
- 2) Haze S., Gozu Y., Nakamura S., Kohno Y., Sawano K., Ohta H., Yamazaki K., 2-Nonenal newly found in human body odor tends to increase with aging. *J. Invest. Dermatol.*, 116, 520 – 524, 2001.
- 3) Pandey S.K., Kim K.-H., Human body-odor components and their determination. *Trends Anal. Chem.*, 30, 784 – 796, 2011.
- 4) Jiang R., Cudjoe E., Bojko B., Abaffy T., Pawliszyn J., A non-invasive method for in vivo skin volatile compounds sampling. *Anal. Chim. Acta*, 804, 113 – 119, 2013.
- 5) Kataoka H., Recent developments and applications of microextraction techniques in drug analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 339 – 364, 2010.
- 6) Kataoka H., Saito K. Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54, 926 – 950, 2011.
- 7) Kataoka H., Solid-phase Microextraction: Biomedical Applications. in *Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Edited by Jan Reedijk (Elsevier, Academic Press: Oxford, UK), 2014, in press.

ジンチョウゲ科植物の細胞内情報伝達系の改変による フレグランス構成成分生合成活性の誘導

富山大学大学院医学薬学研究部

黒崎 文也

Several lines of evidence suggested that Rac/Rop GTPases in *Aquilaria microcarpa* play roles in jasmonates-induced activation of sesquiterpene biosynthesis in the plant cells. The expression of farnesyl diphosphate synthase gene of *A. microcarpa* was markedly increased even in the absence of methyl jasmonate in the cells over-expressing a calmodulin gene and a Rac/Rop GTPase gene. These findings suggest that calmodulin and Rac/Rop GTPase proteins should function as a key mediator in jasmonate-signaling in higher plant cells.

1. 緒言

Jasmonic acid (JA) 及びそのメチルエステル体である methyl jasmonate (MJ) は「jasmonate」と称される植物ホルモン的一种で、植物の成長、発達ならびに乾燥、傷害、微生物の感染等の多彩な外的ストレスに対する防御応答において重要な役割を担うメッセンジャー分子である¹⁾。また、jasmonateを細胞外から人為的に添加することによって、様々な二次代謝産物の生合成が活性化することが良く知られている²⁾。最近の研究によれば、JAは植物細胞内に取り込まれた後 isoleucine と接合体を形成し、SCF ubiquitin E3 ligaseの構成成分であるCOI1タンパクに認識される。その後、転写抑制因子であるJAZがユビキチン化され、次いでプロテアソームによる分解を引き金としてカスケードに関わる様々な因子の転写が開始されることが示されている³⁾。しかしながら、その後、どのような機構によって多様な細胞の反応が誘導されるかについては殆んど知見が無い。我々のグループはこれまでの研究でMJをはじめとする外部刺激に呼応した二次代謝産物生合成能活性化にはCa²⁺カスケードの活性化が必須であり、更に、これらのプロセスにはCa²⁺結合タンパクであるcalmodulin (CAM) やmonomer型GTP結合タンパクの一種であるRac/Rop GTPaseなどの機能分子が関与することを報告している⁴⁾。また、これらの現象が、植物種や化合物種に依存せず幅広く保存されていることに着目して、情報伝達関連因子の遺伝子を植物に導入・発現させ、細胞内情報伝達機構を人為的に操作することで、二次代謝能を活性化させる可能性を提案している⁴⁾。

今回の研究の材料として用いたのは東南アジア原産のジンチョウゲ科木本植物である *Aquilaria microcarpa* で、機械的傷害や微生物の感染といったストレスにさらされることにより、幹の内部に芳香性セスキテルペンを多く含む樹脂状の「沈香」を形成する。通常の状態ではマスクされている *Aquilaria* 植物のセスキテルペン生合成能を発現させるために様々な試みがなされているが、最近Okudera等⁵⁾によってMJ刺激を与えることでセスキテルペン群の生合成が誘導されることが示された。本研究では、jasmonateを引き金とする *A. microcarpa* のセスキテルペン生合成発現に関わる細胞内情報伝達機構を解明し、その応用として、*Aquilaria*細胞内に潜在的に存在している二次代謝能を顕在化させるための方法論を開発することを目的とした。

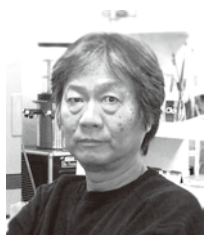
2. 実験

2.1 RACE法によるFaPS並びにAm-racのクローニング

*A. microcarpa*のカルスからRNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) によってtotal RNAを抽出し、次いで逆転写反応によってcDNAを合成した。3'-RACEのためのcDNAについてはGeneRacer Kit (Invitrogen)、また、5'-RACEのためのcDNAは5'/3' RACE Kit 2nd Generation (Roche)をそれぞれ用いて作製した。データベースを検索して設計したプライマーを組み合わせてPCRを行い、増幅されたDNA断片を精製した後にpGEM-T Easy Vector (Promega)に組み込んだ。その後、One Shot Top10 Chemically Competent Cell (Invitrogen)を形質転換して、目的の遺伝子の存在が確認できたプラスミドの塩基配列を決定した。

2.2 RT-PCRによる発現解析

Murashige-Skoog (MS) 寒天培地上に *A. microcarpa* のカルス (100 mg) をとり、yeast extract (Difco, 1 mg/mL)、MJ (和光純薬、100 µM)、Ca²⁺-ionophore A 23187 (和光純薬、10 µM) の溶液 (100 µL) を滴下することで刺激を加え、25°C、暗所でインキュベートした。外部刺激を与えた後、経時的にカルスを回収し、前述の方法でtotal RNAを調製



Induction of biosynthetic activity of sesquiterpene compounds by artificial modification of signal-transduction processes of *Aquilaria* plant cells

Fumiya Kurosaki

Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences for Research University of Toyama

した。得られたRNAを逆転写し、次いで、目的遺伝子の翻訳領域及び3'側非翻訳領域に対応するプライマーでPCRを行い、生成物を電気泳動で分析して発現量を解析した。コントロールにはtotal RNAあるいは恒常的に発現することが確認されている*Am-cam2*を用いた。

2.3 阻害剤存在下でのMJ刺激に対する*Am-FaPS1*の発現解析

プロテアソーム阻害剤であるMG-132 (Calbiochem, 10 or 2.5 μ M)、rac阻害剤であるNSC 23766 (Calbiochem, 100 or 25 μ M)、Ca²⁺チャネル阻害剤であるverapamil hydrochloride (Sigma, 100 or 25 μ M)、また、CAM阻害剤であるN-(6-aminoethyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide (W-7, BIOML Res. Lab., 100 or 25 μ M)をそれぞれ含んだ2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 3 μ M、N⁶-benzyladenine 3 μ M入りのMS寒天培地を作製し、その上に*A. microcarpa*のカルス（100mg）を静置して、25 $^{\circ}$ C、暗所で4日間プレインキュベーションを行った。次いでMJ（100 μ M）100 μ Lを滴下し6時間インキュベーションを行い、total RNAの逆転写によって得たcDNAを鋳型としてPCRを行った。また、コントロールには*Am-cam2*を用いた。

2.4 *Am-rac2*への変異の導入

Am-rac2 (GenBank accession no. JF922915)を用いて、植物に恒常的活性型、恒常的不活性型の*Am-rac2*タンパクを発現させるために*Am-rac2*のORFに1塩基置換を行った。

2.4.1 恒常的活性型*Am-rac2*の作製

*Am-rac2*のGTPの加水分解を担う領域にあるG15をVに置換するためのプライマーを設計し、Quick Change II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)を用いてプロトコールに従い反応を行った。得られた恒常的活性型*Am-rac2*を*CArac2*とした。

2.4.2 恒常的不活性型*Am-rac2*の作製

*Am-rac2*のGDP/GTP結合領域であるD121をAに置換するためのプライマーを設計し、*CArac2*と同様の手法で恒常的不活性型*Am-rac2*を得て、これを*DNrac2*とした。

2.5 形質転換植物体の作成

*A. microcarpa*より単離したCAM遺伝子*Am-cam1*、並びに、*Am-rac2*、*CArac2*、*DNrac2*を発現させた形質転換植物を作るにあたり、CMV35Sプロモーター支配下にそれぞれの目的遺伝子を配置したpBI-OX-GW (GFP selective) (Inplanta Innovations)を構築した。コントロールとしては*GFP*のみを発現するものを用いた。エンターベクター内のORF部分をLR clonase (Invitrogen)を用いてpBI-OX-GWに組み入れ、これを、37 $^{\circ}$ C、5分間の

凍結融解法によって*Agrobacterium tumefaciens* 4404 (Invitrogen)に導入した。

植物への遺伝子導入にあたっては形質転換した*A. tumefaciens*菌液にカルスを3分間浸漬し、次いで菌液を濾紙に吸収させた後、2,4-dichlorophenoxyacetic acid 3 μ M、N⁶-benzyladenine 3 μ Mを含むMS寒天培地上に静置した。これらを25 $^{\circ}$ C、暗所で3日間共培養した後、cefotaxime (和光純薬、500 μ g/mL)、kanamycin (和光純薬、50 μ g/mL)、2,4-dichlorophenoxyacetic acid 3 μ M、N⁶-benzyladenine 3 μ Mを含むMS培地上に25 $^{\circ}$ C暗所で4日間静置することで殺菌を行った。*GFP*、*Am-cam1*、*Am-rac2*、*CArac2*、*DNrac2*を組み込んだ*A. microcarpa*のカルス（100mg）から前述の手法でtotal RNAを抽出し、逆転写によってcDNAを得てPCRを行い、生成物の電気泳動によって発現量を解析した。定量的評価にあたっては、Image Jを用いてバンドの濃度を数値化し相対値として表した。

3. 結果

3.1 *FaPS*のクローニングと諸性質の解析

3.1.1 *FaPS*のクローニング

*A. microcarpa*のセスキテルペン生合成活性を評価するにあたり、まず前駆物質であるファルネシル二リン酸生合成酵素、*FaPS*、をコードする遺伝子を単離することを試みた。これまでに報告されている*FaPS*遺伝子配列中でよく保存されている領域からプライマーを設計し、RACE法によりクローニングを行った。縮重プライマーにより、まずコア構造を得た後に3'側および5'側の配列をそれぞれ決定した。得られた配列をデータベースに報告されている配列と比較検討してところ、既知の*FaPS*遺伝子配列と高い相同性を示し、新規の*FaPS*遺伝子であることを確認した。*Am-FaPS1*と名付けた遺伝子 (GenBank accession no. HM067872) は全長1310塩基であり、342アミノ酸をコードしていた。

3.1.2 アミノ酸配列の特徴と比較

*Am-FaPS1*と他の植物の*FaPS*のコードするアミノ酸配列を比較したところ、いずれの対象に対しても高い相同性を示し、*FaPS*として機能するために必要とされている鎖長決定領域や活性部位覆部領域、Mg²⁺結合部位も確認された。アミノ酸配列の系統樹解析ではいずれの*FaPS*も高い相同性を示し、*Am-FaPS1*は特にトウダイグサ科のタカトウダイ (*E. pekinensis*)と最も高い相同性を示した (Fig. 1)。

3.1.3 RT-PCRによる発現解析

外部刺激に対する*Am-FaPS1*の発現応答についての知見を得るために、*A. microcarpa*のカルスを様々な試薬で処理し、発現変化をRT-PCRを用いて経時的に観察した。本実験で用いた試薬の中でMJがもっとも顕著な転写活性

の活性化を誘導し、処理後3時間から発現の上昇が観察され高いレベルに維持されていた (Fig. 2)。Yeast extract は植物の防御応答に関連する二次代謝産物の生合成を誘導することが知られているが、処理後3時間からMJと同様に転写活性の上昇が観察された。Ca²⁺-ionophore A23187 処理では転写活性の上昇は見られたものの、処理後6時間をピークとして24時間には処理前と同程度にまで減少した⁶⁾。

3.2 MJ誘導性 *Am-FaPS1* の発現に及ぼす様々な情報伝達阻害剤の効果

今回のこれまでの実験で、MJが *A. microcarpa* における *Am-FaPS1* の発現を顕著に活性化させることが明らかとなった。我々のグループはゴマノハグサ科植物である

Scoparia dulcis のジテルペン化合物の生合成をモデルとして、MJ添加による植物二次代謝能活性化の細胞内情報伝達機構についての提案を行なっている。しかしながら、MJによる *S. dulcis* のジテルペン生合成活性化は、いわば「既存の生合成活性の上昇」というべきものであるが、本研究の対象とした *A. microcarpa* のセスキテルペン生合成の誘導は「高等植物が潜在的に保有している二次代謝活性の顕在化」であり、*S. dulcis* の場合とは区別すべきものと考えられる。この「潜在的な生合成能の顕在化」においても、我々が既に提案した機構と類似する細胞内イベントが関与するか否かを検討するために、様々な情報伝達関連因子阻害剤の存在下で *A. microcarpa* のカルスにMJ外部刺激を与え、*Am-FaPS1* の発現変化をRT-PCRによって観察した (Fig. 3)。その結果、Rac/Rop GTPase、Ca²⁺-チャンネル

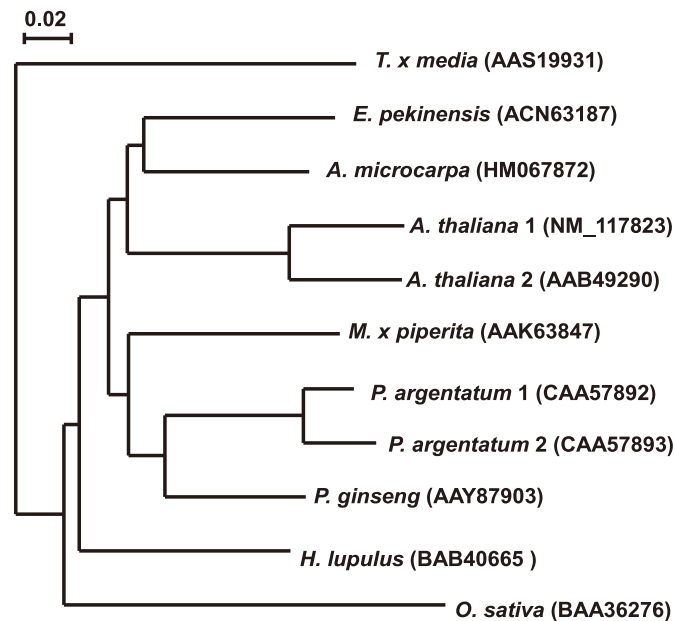


Fig. 1 *FaPS* アミノ酸配列の系統樹による比較。カッコ内は GenBank accession number を示す。

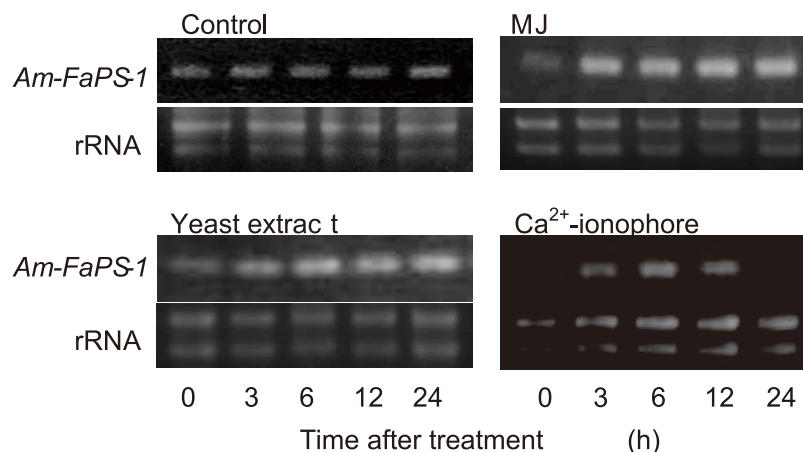


Fig. 2 RT-PCR による *Am-FaPS1* の発現解析。MJ、yeast extract、Ca²⁺-ionophore 処理による発現量の変化。Control は H₂O による処理。

ル、CAM、ユビキチン-プロテアソームの阻害剤で処理を行なったいずれの場合においても、これらの試薬の濃度に依存して、MJ添加による *Am-FaPS1* 発現が阻害されることが明らかとなった⁷⁾。

3.3 *Am-rac* のクローニングと諸性質の解析

3.3.1 *Am-rac* のクローニング

MJ刺激にตอบสนองした植物細胞の二次代謝物産生に到るシグナル伝達経路の中でRac/Rop型GTPaseが重要な因子として機能している可能性が示唆されたことから、情報伝達にこれをコードする遺伝子を *A. microcarpa* より単離することを試みた。縮重プライマーによってコア構造を得た後に、3'側および5'側の配列をそれぞれ決定して2つのクローンを単離した。*Am-rac1* と名づけた遺伝子(GenBank accession no. JF 922914) は全長1235塩基であり210アミノ酸をコードし、*Am-rac2* (GenBank accession no. JF 922915) は全長1124塩基であり198アミノ酸をコードしていた。

3.3.2 アミノ酸配列の特徴と比較

Am-rac1 及び *2* がコードするタンパクと他の植物のRac/Rop Gタンパクのアミノ配列を比較したところ、ほとんどの対象に対して非常に高い相同性を示し、またGタンパクとして機能するために必須とされている4つのGTP結合部位やエフェクター結合領域も確認された。一般にsmall GTPaseは、原形質膜への移行・局在のためのプレニル化を受けるコンセンサス配列であるC-X-X-LをC末端に持つとされている。*Am-rac* 翻訳産物のアミノ酸配列を見ると、*Am-rac2* にはプレニル基との結合のためのコンセンサスモチーフが含まれているのに対し、*Am-rac1* にはこれが含まれていないことが明らかとなった。したがって *Am-rac1* がコードするタンパクは、他のRac/Rop GTPaseとは異なる活性化機構をもつ可能性が示唆された。

3.3.3 RT-PCRによる発現解析

A23187、yeast extract、MJで *A. microcarpa* を刺激した際の *Am-rac* 遺伝子の発現活性をRT-PCRで確認したところ、A23187では発現に変化がなく、yeast extractの添

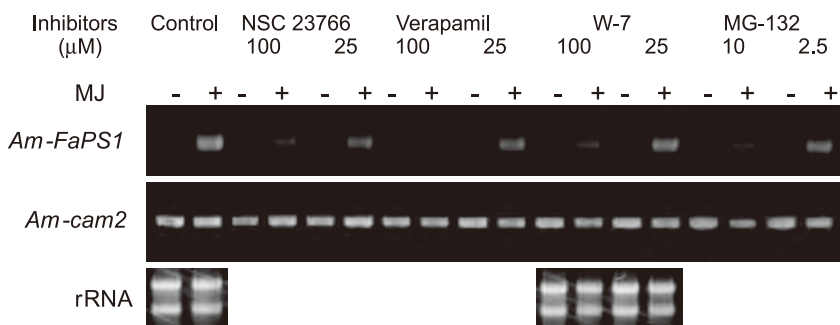


Fig. 3 MJ誘導性 *Am-FaPS1* 発現に対する様々な阻害剤の添加効果。NSC 23766 (rac阻害剤)、verapamil (Ca²⁺チャンネル阻害剤)、W-7 (CAM阻害剤)、MG-132 (プロテアソーム阻害剤) の存在下で MJ 刺激を与えた際の *Am-FaPS1* の発現変化。

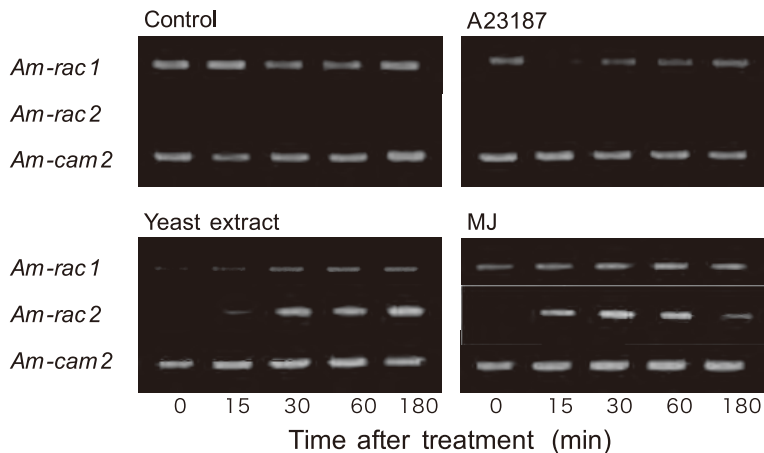


Fig. 4 RT-PCRによる *Am-rac1*、*Am-rac2* の発現解析。MJ、yeast extract、Ca²⁺-ionophore 処理による発現量の変化。Control は H₂O による処理。

加においては3時間にわたって発現が緩やかに上昇した。また、MJ処理の場合は、30-60分で発現レベルが最大となり、その後低下することが確認された (Fig. 4)。

3.4 組換え *A. microcarpa* における *Am-FaPS1* の発現解析

次に、MJ応答性CAM遺伝子である *Am-cam1*、同じくMJ応答性Rac/Rop GTPase遺伝子である *Am-rac2* を *A. microcarpa* で過剰発現させることにより、*Am-FaPS1* の発現レベルを高く維持できる可能性を検討した。また、Rac/Rop GTPaseは1アミノ酸を置換することにより恒常活性型 (CA)、及び、恒常不活性型 (DN) のRac/Rop GTPaseを作製することが可能であるとされているが、今回の実験ではCA型とDN型のRac/Rop GTPaseの導入による効果についても検討した (Fig. 5)。その結果、*Am-cam1* を導入した組換え体ではMJ非存在下においても *Am-FaPS1* 転写活性の顕著な上昇が見られ、CAM遺伝子とその翻訳産物がMJ刺激によるセスキテルペン生合成誘導のシグナル伝達のなかで大きく寄与していることが示唆された。また、*Am-rac2* を過剰発現させた組換え体ではcontrolと比べて *Am-FaPS1* の転写活性の上昇は見られたものの、CAMの組換え体ほど顕著な活性化は観察されなかった。更に、CA型 *Am-rac2* を導入した組換え体においても、変異を導入していない *Am-rac2* と比較して大きな差は認められなかった。また、DN型 *Am-rac2* 組換え体では *Am-FaPS1* 転写活性がやや抑制されることが見出された⁷⁾。

4. 考察

沈香の基源植物の一つである *A. microcarpa* のセスキテルペン生合成に寄与する *FaPS* をコードした遺伝子 *Am-FaPS1* をクローニングし、外部刺激に対する発現応答をRT-PCRによって検討した。その結果、MJで刺激することにより *Am-FaPS1* の強い転写活性の誘導・上昇が見られ、セスキテルペン生合成の活性化が強く示唆された (Fig. 2)。また、植物の防御応答に関わる二次代謝産物の生合成を誘導することが知られている yeast extract で処理した場合も同様に *Am-FaPS1* の発現が顕著に上昇することが明らかとなった。MJのシグナル伝達に関わっている因子について更なる知見を得るために、以前の研究で関与が示唆された様々な情報伝達関連因子の阻害剤を用いて、MJ刺激に対する *Am-FaPS1* の発現量の変化を観察した。その結果、ユビキチン-プロテアソーム、Rac/Rop GTPase、 Ca^{2+} -チャンネル、CAMの阻害剤を用いたいずれの実験系においても *Am-FaPS1* の発現量はcontrolと比べて用量依存的に減少していた (Fig. 3)。これらのことから、MJの細胞内シグナル伝達には上記の諸因子が関与しており、*Am-FaPS1* の転写活性の活性化にはユビキチン-プロテアソームとRac/Rop GTPaseが関与する Ca^{2+} の細胞内流入、更にはCAMの活性化が不可欠であることが示唆された。

植物二次代謝能の誘導あるいは活性化におけるこれらの因子を物質生産に応用することを目的として、*Am-cam1*

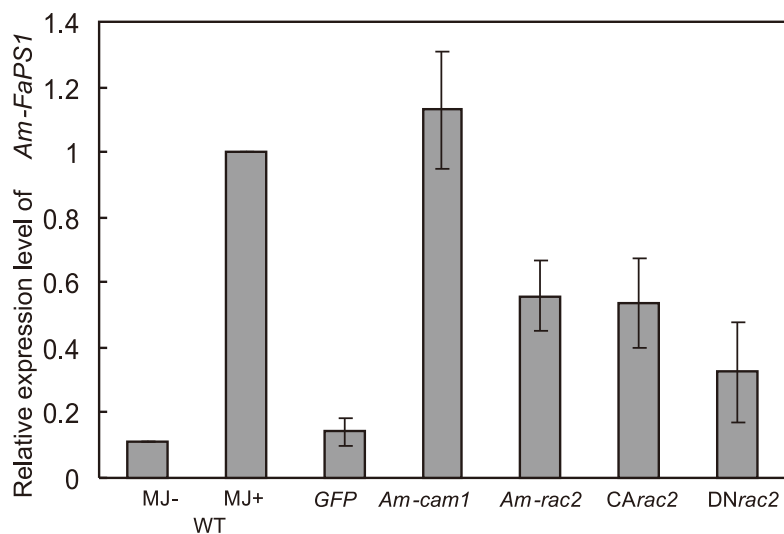


Fig. 5 4つの組換え体につき、それぞれ *Am-FaPS1* の発現量の平均値と標準偏差を求め、MJ (+) を 1.0 とした相対値で表した。

遺伝子、*Am-rac2* 遺伝子、*CArac2*、*DNrac2* 遺伝子を *A. microcarpa* のカルスに組み込み、*Am-FaPS1* の発現の変化を RT-PCR により解析した (Fig. 5)。その結果、*Am-FaPS1* の発現量は *Am-cam1* を導入・過剰発現させた mutant で最も大きくなり、MJ 刺激を与えた場合と同等あるいはそれ以上の転写活性の上昇が認められた。一方、*Am-rac2*、*CArac2* の mutants では MJ (-) と比べて発現量は上昇しているものの MJ (+) や CAM 遺伝子を導入したもののほどではないことが認められた。これより、MJ によるシグナル伝達経路には Rac/Rop GTPase 関与の機構以外にも複数の経路が存在し、これら別の転写制御機構と Rac/Rop GTPase 系とが複雑に相互作用して *Am-rac* 導入変異体での *Am-FaPS1* の発現に影響を与えた可能性が考えられる。

(引用文献)

- 1) Shan X, Yan J, Xie D.: Comparison of phytohormone signaling mechanisms, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 15, 84-91, 2012.
- 2) Gundlach H, Muller MJ, Kutchan TM, Zenk MH.: Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures, *Pro. Nat. Acad. Sci. USA*, 89, 2389-2393, 1992.
- 3) Creelman RA, Mullet ME.: Biosynthesis and action of jasmonates in plants, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48, 355-381, 1997.
- 4) Asano K, Lee JB, Yamamura Y, Kurosaki F.: Enhanced accumulation of atropine in *Atropa belladonna* transformed by Rac GTPase gene isolated from *Scoparia dulcis*, *Transgenic Res.*, DOI. 10.1007/s11248-013-9733-4.
- 5) Okudera Y, Ito M.: Production of agarwood fragrant constituents in *Aquilaria* calli and suspension cultures, *Plant Biotechnol.*, 26, 307-315, 2009.
- 6) Kenmotsu Y, Ogita S, Katoh Y, Yamamura Y, Takao Y, Tatsuo Y, Fujino H, Kadota S, Kurosaki F.: Methyl jasmonate-induced enhancement of expression activity of *Am-FaPS-1*, a putative farnesyl diphosphate synthase gene from *Aquilaria microcarpa*, *J. Nat. Med.*, 65, 194-197, 2011.
- 7) Kenmotsu Y, Asano K, Yamamura Y, Kurosaki F.: Cloning and expression of putative Rac/Rop GTPase genes, *Am-rac1* and *Am-rac2*, involved in methyl jasmonate-induced transcriptional activation of farnesyl diphosphate synthase in cell cultures of *Aquilaria microcarpa*, *Plant Mol. Biol. Rep.*, 31, 539-546, 2013.

紫外線遮光ナノ材料のUVB – UVC光特性評価法の開発

大阪大学大学院工学研究科

齊藤 結花

In this research, we have established the microscopic system capable to measure the UVB to UVC white light extinction spectra. The colors in UV lights can be visualized through the spectroscopic techniques. As an example of the UV sensitive materials, aluminum nanostructures, which has been considered as a new candidate of plasmonics, were evaluated by our microscopic system. This microscope provide us with a versatile knowledge for UV functionalized nanomaterials.

Recently, the field of “plasmonics” have been the focus of intense interest as a new method to design UV functionalized nanomaterials. In plasmonics light couples with metal free electrons in nanometric structures, exhibiting a localization and enhancement effect. One of the fascination applications of plasmonics in UV is to help to enhance the photocatalyst which is used for sterilization in organic solar cells. Another example is to increase the sensitivity of spectroscopic signal in UV region especially in protein or DNA detection which is essential for bioscience. The plasmonic nanoparticles can also be used for cosmetics e.g. sunglasses or sunscreens. The optical-electric properties of plasmonic nanostructures and nanoparticles are often evaluated by white light extinction spectroscopy under dark field microscope. The nanoparticles can be seen in variety of colors due to the different electric properties caused by the shape effect. However, in spite of the strong needs, the microscopic evaluation of these small structures are limited in visible region because the standard microscope is applicable only to the wavelength longer than 350 nm.

We have developed the spectroscopic measurement for quantitative measurements and analysis of the refractive index from UVB to UVC region to assign colors in this wavelength range. The system has been designed for better understanding of the relationship between the local structures and the optical properties through the microscopic technique. In this research, we will present the analysis of plasmonic nanoparticles made of aluminum by our microscopic system, which can work best in the wavelength range from 250 to 350 nm. Our newly established microscopic methods holds promise for the investigation of plasmonic nanoparticles and will contribute to develop the new type of UV-sensitive materials for semiconductor industry, biosciences, as well as cosmetics.

1. 緒言

本提案では、顕微鏡下において紫外光に敏感なナノ材料のUVB–UVC域の光学特性を評価することのできる顕微鏡を開発した。ここで作製した紫外顕微分光システムを用いて、紫外プラズモニクス材料として注目されているアルミニウムナノ構造を対象に実際にUVB–UVC域で分光分析を行った結果を報告する。

誘電率は材料の電子物性と深い関係にあるため、高い感度で定量性をもって誘電率を測定することが材料開発において最も簡便かつ本質的な手法となる。光源として紫外光を用いると、可視光に比べて格段に高い感度で誘電率イメージングを実現することができる。光学顕微鏡を用いて細胞やポリマーなどを可視光で観察すると、多くの試料は透き通って見える。もしここで紫外光を照射すると、ブラックライトを照射したときのように紫外発光材が含まれていれば含有箇所が明るく光って観測される。発光しないと

しても、材料の基本的な光学特性である誘電率は、UVBからUVC域で敏感に波長依存性を示すので¹⁾、これらの光源を用いると急激な誘電率変化を示す試料の箇所は、周囲に対して高いコントラストを持って観測される。しかし単純にコントラストをつけただけでは、測定対象のモノクロ画像を得るにすぎない。白色散乱分光法により誘電率波長依存性の定量的な評価を行うことで初めて、紫外光を用いて観察した画像に可視光と同様の段階的な“色”情報をのせることができる。ここで開発した技術を基礎研究から発展させることで、医薬化粧品をはじめ、ワイドギャップ半導体やポリマー等の新規材料探索に、これまでにない新しい分析ツールを提供することができる。

顕微分光システムの開発と平行して、紫外域のUVB–UVC光に感度を持つプラズモニク・ナノ粒子を作製した。金属のナノスケールの構造物に光をあてると、光と金属表面の自由電子の固有振動が結合して、光電場を増強したり局在化させたりすることができる²⁾。この現象は局在プラズモン共鳴 (Localized Surface Plasmon Resonance LSPR) と呼ばれ、LSPRの原理を利用して化学センサー³⁾や光触媒⁴⁾、分光分析ツール⁵⁾などの幅広い応用が実現している。近年プラズモニクスの研究は可視から紫外光へ拡張しており、金や銀にかわり紫外光に感度を持つ物質がプラズモニクス媒体として検討されている⁶⁾。プラズモニクスのみならず、紫外光を積極的に利用しようという試みは



Characterization of UVB-UVC sensitive nanomaterials

Yuika Saito

Graduate school of engineering, Osaka University

近年広くなされており、医薬化粧品の分野でも紫外線に対する遮光材あるいは有益な機能を発現する物質が開発されている。ここでは紫外プラズモニクス材料として注目されているアルミニウムのナノ構造を中心に、開発した紫外顕微分光システムを用いて評価を行った。

2. 実験

2.1 UVB—UVC域の光学特性を評価する顕微分光システム

図1は本研究で作製した装置のレイアウトである。光学系は暗視野顕微鏡と散乱光分光システムから構成されている。可視から200nm付近まで良好なスペクトル分布を持つLaser-Driven Light Source (LDLS Ushio Electric Co.)光源を光ファイバーに導入して倒立型顕微鏡上にセットした試料に暗視野照明を実現する浅い角度で入射する。入射光を除いた散乱光を、反射対物レンズで回収する。信号光はアクロマートレンズ一枚を介して最短の光路で分光器スリットまで導入する。ブロードバンド白色光散乱による分光測定を実現するために、分光器は紫外特殊撮影レンズを組み込み紫外光200nmから400nmまで収差をおさえてCCD検出器上に結像するように設計した。

照射系は広帯域照射になっているので、試料上の特定位置における分光情報を取り出す目的で、分光器入り口にはステップモーターにより位置制御が可能な稼働xyスリットを付属した。さらに、回折格子を介さずにスリット像を検出用CCDカメラ上に投影する機構を設けた。この方法により、分光CCDピクセル位置が光学画像のどの位置に対応しているかを、明確に捉えることができるようになっている。広視野での光学像を取得した後、分光器のスリットを開閉し、試料上の狙った一点で白色散乱光スペクトルを測定することができる。

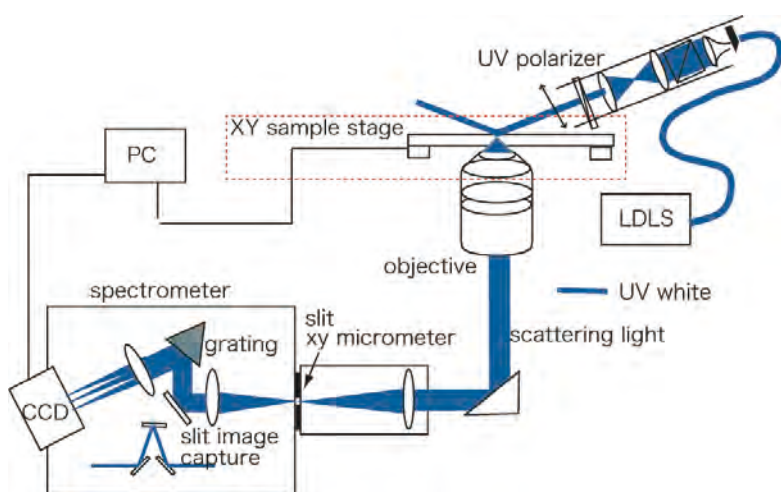


図1 UVB-UVC域紫外顕微分光システム。LDLS光源から暗視野広帯域照明で紫外白色光を導入、対物レンズで散乱光を集光して、紫外顕微鏡へ導入する。分光器はスリット像を回折格子を経ずに分光CCD上で観察する機能を有する。

2.2 UVB-UVCに感度を持つプラズモニク・ナノ構造の作製と評価

紫外光に感度を持つナノ材料として、プラズモニクな特性を有するアルミニウムナノ構造を作製した。紫外域の光を金属自由電子とカップリングさせるためには、波数ベクトルの整合の要請から数十ナノメートルという微細な構造物を形成する必要がある⁷⁾。材料として、紫外域で金属性を有するアルミニウムを用いることが有効である^{1,6,7)}。アルミニウムはナノ粒子を化学合成することが困難であるため、ナノ粒子リソグラフィ法 (NSL法) を用いて微細加工を行う方法を採用した。図2に示すようにNSL法はサイズの揃ったポリスチレン・ナノ粒子をテンプレートとして基盤上に自己集積化させて、空隙に金属を蒸着した後、空隙に金属を蒸着した後にテンプレートを取り除くという方法で、安価に大面積にナノスケールのパターンを作製することができる。NSL法においてテンプレートとして用いられるポリスチレン球のサイズは300nm程度が限界とされ球のサイズが小さくなるとサイズのばらつきが大きくなり自己集積能力が低くなっていく。申請者はポリスチレン球のサイズを変えずに溶媒で膨張させることによって、より小さい構造を作製した。本手法では、加熱処理を行う時間によってテンプレートのサイズをコントロールすることができる。加熱時間が長いものほど空隙のサイズは小さくなり、やがて完全に塞がってしまう。テンプレートであるポリスチレン球の空隙のサイズがコントロールされたことで、アルミニウムの構造の制御が可能となった。本成果の詳細は論文⁷⁾に報告した。ここで作製したアルミニウムナノ構造を対象に、新規に開発した紫外顕微分光システムで評価を行った。

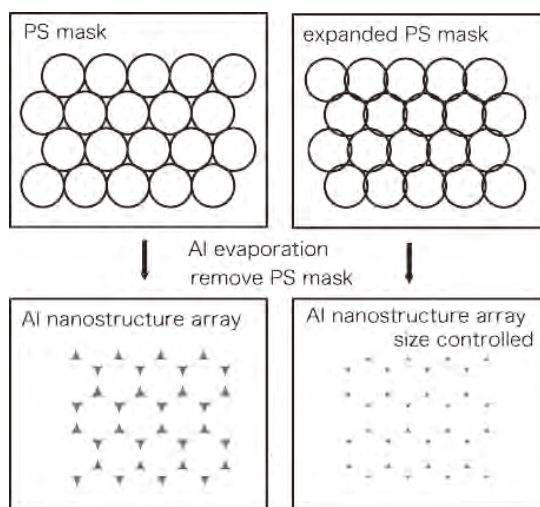


図2 ナノ粒子リソグラフィ法の概要：自己集積したポリスチレン球の空隙に金属を蒸着して、後にこのテンプレートをはがす。右図ではテンプレートを加熱してふくらませている。

3. 結果

図 3(a)は、2章で述べたアルミニウムナノ構造体の UVB-UVC 光散乱スペクトルである。視野を単一ナノ粒子に絞り、申請者が試作したシステムで観測した。散乱強度は紫外域における誘電率を反映しており、ミクロスコピックにはアルミニウム表面の自由電子の固有振動が紫外光と結合する様子を表している。各散乱スペクトル A-D は図 3(b)-(e)の原子間力顕微鏡 (AFM) 像に示したアルミニウムナノ粒子から得られた。スペクトル A では単一の散乱ピークが 350 nm 付近に得られた。対応する AFM 画像図 3(b)には、球形のナノ構造が確認された。球形の粒子は高い対称性により単一のプラズモン共鳴ピークを示すことから、散乱スペクトルの形状を説明することができる。スペクトル B では、350 nm 付近のピークの分裂が確認できる。対応する AFM 画像図 3(c)では非対称な粒子が確認された。これは対称性の低下により、プラズモンモードが分裂していると説明することができる。スペクトル C では 320 nm と 420 nm 付近に顕著なモードが現れている。AFM 画像図 3(d)では鋭角を持つ三角形の構造が観測された。三角形の粒子は球形の粒子とは異なり複数のプラズモンモードを持つことが知られており^{6,8)}、これらの3つのピークは三角形を仮定した場合のプラズマ振動に対応していると考えられる。最後にスペクトル D において、320 nm と 360 nm に顕著な2つのピークが観測された。AFM 像図 3(e)より、楕円形の粒子が確認された。従ってこれら2つのプラズモンピークは、楕円粒子の長軸と短軸のプラズモン共鳴に対応すると考えられる⁹⁾。

4. 考察

4.1 ナノ材料と光学特性

ナノ材料の物性を議論するうえで、構造の評価は欠かすことのできない重要なファクターである。3章で示したとおり、実験結果の図3のナノ粒子はすべてアルミニウムで構成されているが、形状のちがいで異なる光学的性質をもっている。集合的な粒子の情報は、既存の紫外可視吸収スペクトルから得ることができるが、個々の粒子の個性を見ることは本研究で開発した顕微鏡でのみ観測することができる。ここで観測したスペクトル情報は、可視域で言うところの“色”に対応しており、これらの各粒子が異なる色をもっていることがわかった。

近年、プラチナや金など、プラズモニクスを利用した金属ナノ粒子がコスメトロジーの分野で利用されはじめている。ナノ材料は皮膚への浸透性が良く、かつ吸収や散乱効率がバルクとは全く異なる場合があり、研究対象として興味深い。このようなナノ材料を利用する際には、粒子形状によって光学特性が異なることに注意を払う必要がある。既存の材料においても、クラックや厚みなどの構造のパラメータを変えながらの光散乱スペクトル測定を行い、物性と構造との関係についての基礎データを取得すると、これまで集合体としてのみ測定されてきた材料の個々の微小構造について、構造と電子状態の関係について系統的にデータを取得することができて、材料設計に新たな切り口が生まれる。

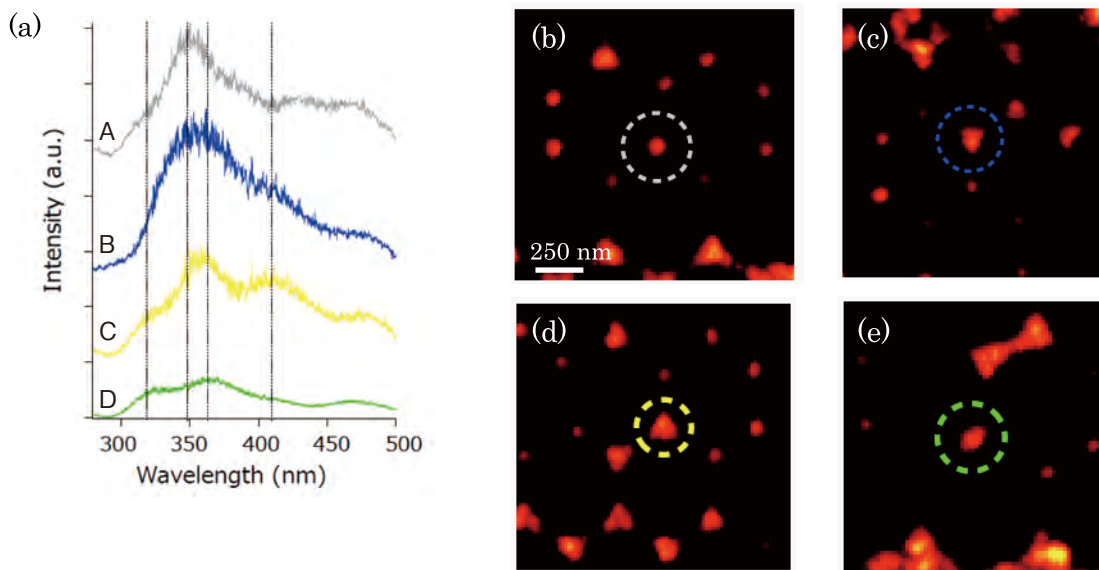


図3 アルミニウムナノ構造の UVB-UVC 領域の光散乱スペクトル (a) と対応する AFM 画像、(b) スペクトル A に対応するナノ粒子、(c) スペクトル B、(d) スペクトル C、(e) スペクトル D

4.2 紫外プラズモニクスとコスメトロジー

本研究では、測定対象としてUVB-UVC域でプラズモニック効果を有するアルミニウムナノ粒子を用いた。プラズモニクスは近年まで、可視光の波長域に限定されており、紫外光を用いたプラズモニクスは未開拓であった。その理由として、可視光域において安定で良好な金属性を示していた自由電子金属（主に金または銀）が紫外光に対して金属性を示さないため、用いる材料を再考する必要があることが挙げられる。アルミニウムは、化学的に安定で300nm以下の深紫外域で良好な金属製を示すため¹⁾、金や銀にかわって紫外プラズモニクスの材料として用いることができる。近年いくつかの研究グループにより、アルミニウムのLSPR特性についての研究が行われており、これまで報告されている共鳴波長ピークは可視域から~240nm程度となっている⁸⁻¹¹⁾。LSPRにおいて自由電子媒体である金属の構造を変化させると、結合効率と周波数が変化するため、結合させたい光の波長に共鳴する構造を設計することが求められている。波数ベクトル整合の条件から、媒体となる金属構造は光の波長よりも十分に小さいことが要求されるため、深紫外域においては100nmを下回る金属ナノ構造を作製することが必要である。サイズのみならず構造の対称性によってもLSPRは変調を受ける。例えばアスペクト比を変化させればLSPRの波長変換を行うことができる。ナノ構造の幅を一定にして高さを変化させると、LSPR波長が顕著に青色シフトすることが著者らによって観測されている⁸⁾。このように、構造を変化させるだけで光の吸収や散乱を制御できるアルミニウムは、紫外機能性材料として期待されている。ここで作製したアルミニウムナノ構造で構成されたフィルムは、可視光で観察するとほぼ透明な薄膜である。紫外光と相互作用する物質は非常に多く存在するが、可視域で透明性を保持したまま紫外光を吸収する物質は限られている。可視における透明性と紫外光との強い相互作用という特性は、有効な紫外遮光材料としてサングラスや日焼け止め等への利用が見込まれる。表面物性に限らず、紫外光の吸収域には、DNAやタンパク質等の生体を構成する分子が含まれるため、紫外線が生物に有害な影響を与えることが知られているが皮膚表面における紫外線の影響を測定するためには、顕微鏡によるミクロスコピックな観察が有効である。今後は皮膚表面を対象にした観察に、本顕微鏡を応用したい。

5. 総括

誘電率測定を簡便に行う市販の装置として、220nm付近から近赤外領域までをカバーする紫外可視吸光度計が存在する。しかしこの装置は、大凡1cm四方の領域に広く光を照射するために、試料の空間的な分布を測定することができない。一般的に均質であるとされる試料において

も、高い空間分解能で観察すると不均一な構造が存在し、これらの微細構造が物性と深く関係していることが明らかになる場合がある。誘電率の空間分布を測定するために、暗視野顕微鏡下で散乱分光測定が行われている。この測定法は可視域では大きな成功を納めた。しかしこれらの暗視野顕微鏡システムが許容する波長は350nm以上の可視域に限られており、紫外光には対応していない。紫外光を導入することのできる顕微鏡システムは実験室レベルで存在するが、色収差等の問題からこれまでの用途は単色光源であるレーザー分光に限られ、白色光源を用いた分光測定は行われていない。従って紫外光に対応しながら、顕微鏡下で誘電率分布測定を行うことのできる装置ははまだ未開拓であった。本研究では、紫外可視吸光度計に空間分解能を持たせ、簡便に微小領域の分光を実現する装置を作製した。本装置は、紫外域の白色光源を顕微鏡に導入して分光測定する挑戦的な試みで、材料の誘電率に立脚した感度の高い測定と、レーザー分光に比べてランプ光源によるダメージの小さい測定を実現した。また紫外光に固有の電子状態に関するユニークな情報を得ることができるのが特徴である。

作製した装置を用いて、紫外プラズモニクス材料として期待されているアルミニウムを対象にUVB-UVC領域の光学特性を観測した。作製したナノ粒子はすべてアルミニウムという同じ素材で構成されているが、形状のちがいによって異なる光学的性質をもっていることがわかった。集合的な粒子の情報は、既存の紫外可視吸収スペクトルから得ることができるが、個々の粒子の個性を見ることは本研究で開発した顕微鏡で初めて明らかにすることができた。本顕微鏡の開発は、紫外光遮光材料としてのプラズモニクスの可能性を広げ、コスメトロジーへの応用を拓くと考えることができる。

(参考文献)

- 1) Palik E. D.: Handbook of Optical Constants of Solids: Academic Press, San Diego (1991).
- 2) Kawata S.: Near-field Optics and Surface Plasmon Polaritons, Topics in Applied Physics 81, Springer, Berlin (2001).
- 3) Stewart M. E., Anderton C. R., Thompson L. B., Maria J., Gray S. K., Roger J. A., Nuzzo R. : Nanostructured Plasmonic Sensors., Chem. Rev., 108, 494-521 (2008).
- 4) Zhang X., Chen Y. L., Liu R. S., Tsai D. P. : Plasmonic photocatalysis, Rep. Prog. Phys. 76, 046401 (2013).
- 5) Saito Y., Verma P. : Imaging and spectroscopy through plasmonic nano-probe, Eur. Phys. J. Appl. Phys. 46, 20101 (2009).

- 6) Chan G. H., Zhao J., Schatz G. C., Van Duyne R. P. : Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy of Triangular Aluminum Nanoparticles, *J. Phys. Chem. C*, 112, 13958-13963 (2008).
- 7) Taguchi A., Saito Y., Watanabe K., Song Y., Kawata S. : Tailoring plasmon resonances in the deep-ultraviolet by size-tunable fabrication of aluminum nanostructures, *Appl. Phys. Lett.* 101, 081110, (2012).
- 8) 齊藤結花, 本田光裕, 渡邊晃一, 田口敦清, 宋怡健, 河田聡 : 深紫外光増感作用を目的としたアルミニウムナノ構造のデザイン~高さ制御によるプラズモン共鳴の短波長シフトの観察, *本金属学会誌* 77, 27-31 (2013).
- 9) Jha S. K., Ahmed Z., Agio M., Ekinici Y., Löffler J. F. : Deep-UV surface-enhanced resonance Raman scattering of adenine on aluminum nanoparticle arrays, *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 1966 - 1969 (2012).
- 10) Ekinici Y., Solak H. H., Löffler J.F. : Plasmon resonances of aluminum nanoparticles and nanorods, *J. Appl. Phys.* 104, 083107, (2008).
- 11) Honda M., Kumamoto Y., Taguchi A., Saito Y., Kawata S. : Plasmon-enhanced UV photocatalysis, *Appl. Phys. Lett.* in press

乳化剤フリー油中水滴型 (W/O) エマルションの分散安定化機構の解明と分散安定化技術の開発

信州大学工学部物質工学科

酒井 俊郎

Colloidal stability of emulsifier-free water-in-oil (EF-W/O) emulsions prepared by ultrasonication was examined to evaluate the mechanism on the colloidal stabilization of water droplets dispersed in organic media. We found that the colloidal stability of paraffin-based EF-W/O emulsions became higher with longer hydrocarbon chain of paraffin. Furthermore, we revealed that the vegetable oil-based EF-W/O emulsions were much more stable than the paraffin-based EF-W/O emulsions.

1. 緒言

油と水が過渡的に混合したエマルションは、液滴の浮上・沈降、凝集・合一、オストワルドライプニングなどを経て2相に分離する。このエマルションの不安定化機構・液滴の成長過程の本質を理解するため、筆者らは、乳化剤を使用しない (Emulsifier-free; EF) 水中油滴型 (O/W) エマルション (以下、EF-O/Wエマルションと略す) 中の油滴の成長過程・分散安定性・界面特性について検討してきた¹⁻²¹⁾。その結果、超音波を用いて直鎖炭化水素 (油) を水中に分散した場合、炭化水素鎖が長い油ほど水中分散油滴の分散安定性が高いことが分かった。また、短鎖炭化水素からなるエマルションでは凝集・合一過程が優先的に、長鎖炭化水素からなるエマルションではオストワルドライプニングが優先的に起こることを明らかとした。さらに、短鎖炭化水素 (ベンゼンなど) に少量の長鎖炭化水素 (ヘキサデカン、スクワラン) を混合すると、乳化剤を一切使用しなくても1年間以上もの長期間、油滴分散状態を維持できることを明らかとした。また、超音波のタンデム照射によって、EF-O/Wエマルションの長期分散安定化に成功した。そこで、本研究では、これまでとは逆相となる油中水滴型 (W/O) エマルションの分散安定化機構や油中分散水滴の界面化学的特性を解明し、EF-W/Oエマルションの長期分散安定化技術の確立を目指す。

2. 実験

油に少量の超純水 (18.2MΩ cm at 25°C, Millipore-filtered water) を混合して、超音波 (28 kHz, 300 W) を5分間照射することにより油中水滴型 (W/O) エマルション

は調製された。パラフィン油としてヘキサン、オクタン、デカン、ドデカン、テトラデカン、ヘキサデカンを使用した。また、植物油として大豆油、コーン油、オリーブ油を使用した。使用した油の物性値を Table 1 にまとめる。調製されたEF-W/Oエマルション中の水滴径は、粒度分布測定装置 (LA-950, HORIBA) により測定された。また、EF-W/Oエマルションの分散安定性は、波長700 nmにおけるエマルションの透過率 ($T@700\text{nm}$) を紫外可視分光光度計 (V-630, JASCO) を用いて測定することにより評価された。

3. 結果および考察

3.1 パラフィン油を分散媒としたEF-W/Oエマルションの分散安定性

まず、超音波洗浄機を用いて調製されたEF-W/Oエマルションの経時変化を目視により観察した (Fig.1)。EF-W/Oエマルションの濁度は分散媒がヘキサン<オクタン<デカン<ドデカン<テトラデカン<ヘキサデカンの順に増していることが観察される。また、そのEF-W/Oエマルションの濁度は時間経過とともに低下していく様子も観察される。分散媒がヘキサン、オクタン、デカンのEF-W/Oエマルションは、調製後3~4時間程度で透明となったが、ドデカン、テトラデカン、ヘキサデカンを分散媒としたEF-W/Oエマルションは、調製後24時間経過した後も乳濁状態を維持していた。この変化はEF-W/Oエマルションの透過率変化からも確認できる (Fig.2)。EF-W/Oエマルションの $T@700\text{nm}$ は時間経過と共に上昇した。EF-W/Oエマルションの $T@700\text{nm}$ の上昇はエマルションの濁度の低下を意味している。調製後6時間のEF-W/Oエマルションの透過率 ($T@6\text{h}$) は、分散媒がヘキサン>オクタン>デカン>ドデカン>テトラデカン>ヘキサデカンの順に低くなった (Fig.3)。すなわち、分散媒がヘキサン<オクタン<デカン<ドデカン<テトラデカン<ヘキサデカンの順にEF-W/Oエマルションの分散安定性は高くなることが明らかとなった。



Mechanism on Colloidal Stabilization of Emulsifier-free Water-in-Oil Emulsions

Toshio Sakai

Department of Chemistry and Material Engineering, Faculty of Engineering, Shinshu University

Table 1 Properties of water and oils that we used in this experiment

	Molecular formula	Molecular weight (g mol ⁻¹)	Density (g cm ⁻³)	Viscosity (mPas)	Surface tension (mN m ⁻¹)	Solubility, oil in water (mol m ⁻³)	Solubility, water in oil (mol m ⁻³)
Water	H ₂ O	18.02	0.99705	0.7973	71.96	—	—
Hexane	C ₆ H ₁₄	86.18	0.6603	0.290	17.9	1.1 × 10 ⁻¹	3.273
Octane	C ₈ H ₁₈	114.29	0.7026	0.480	21.14	5.8 × 10 ⁻³	3.703
Decane	C ₁₀ H ₂₂	142.29	0.7300	0.835	23.37	3.6 × 10 ⁻⁴	2.916
Dodecane	C ₁₂ H ₂₆	170.34	0.7511	1.257	24.91	2.4 × 10 ⁻⁶	2.709
Tetradecane	C ₁₄ H ₃₀	198.39	0.7624	1.783	26.13	1.4 × 10 ⁻⁶	15.55
Hexadecane	C ₁₆ H ₃₄	226.45	0.7734	2.571	27.05	9.8 × 10 ⁻⁸	2.317
Soybean	—	—	0.916	43.6	27.22	—	—
Corn	—	—	0.912	46.3	34.8	—	—
Olive	—	—	0.669	55.6	32	—	—

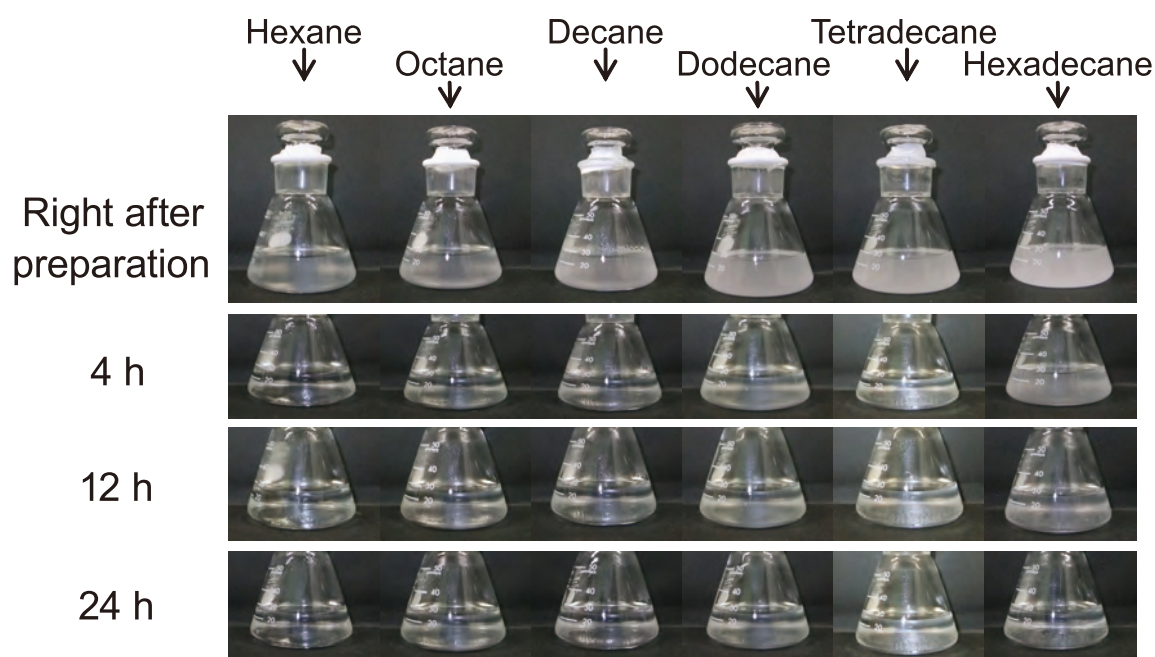
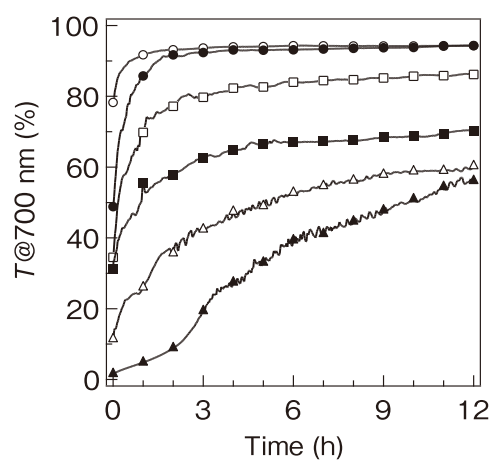
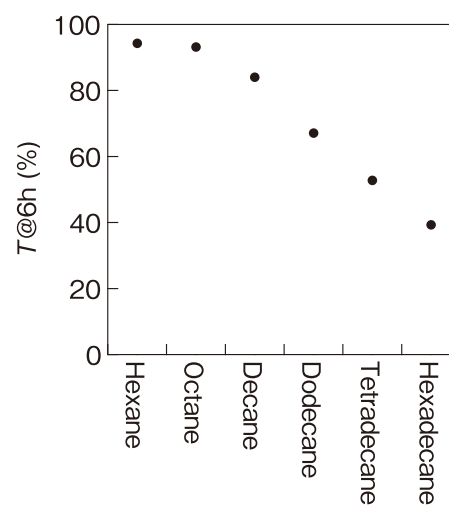


Fig. 1 Paraffin-based EF-W/O emulsions prepared with an ultrasonic cleaner.


 Fig. 2 Time course changes in transmittance at 700 nm ($T@700\text{nm}$) of EF-W/O emulsions. (○) Water/hexane, (●) water/octane, (□) water/decane, (■) water/dodecane, (△) water/tetradecane and (▲) water/hexadecane emulsions.

 Fig. 3 Transmittance at 700nm of EF-W/O emulsions measured at 6h ($T@6\text{h}$) after preparation.

3.2 EF-W/Oエマルションの分散安定化機構

前述したように、EF-W/Oエマルションの分散安定性は長鎖炭化水素からなるパラフィン油を分散媒として使用した場合に高くなることが明らかとなった。そこで、EF-W/Oエマルションの不安定化(解乳化)機構についてStokesの式(式1)を用いて検証した。Stokesの式は媒体中に分散している粒子(液滴)の浮上・沈降速度(v)を表した式であり、以下のように与えられる。

$$v = \frac{2a^2(\rho_0 - \rho)g}{9\eta} \quad (1)$$

a は液滴半径、 $\rho_0 - \rho$ は分散媒と分散質の密度差、 η は分散媒の粘度、 g は重力加速度である。まず、EF-W/Oエマルションの分散安定性に及ぼす分散媒(パラフィン油)と水との密度差($\rho_0 - \rho$)の影響を検証した。 $T@6h$ をパラフィン油と水との密度差($\rho_0 - \rho$)に対してプロットしてみると、密度差(負の値)が小さくなるとEF-W/Oエマルションの分散安定性が向上($T@6h$ が低下)することが分かった(Fig. 4)。これは、Stokesの式からも分かるように、分散媒(パラフィン油)と水との密度差が小さくなると、EF-W/Oエマルション中の水滴の沈降速度が低下して、EF-W/Oエマルションの分散安定性が向上したものと考えられる。

また、EF-W/Oエマルションの分散安定性に及ぼす分散媒(パラフィン油)の粘度の影響を検証した。 $T@6h$ をパラフィン油の粘度に対してプロットしてみると、粘度が大きくなるとEF-W/Oエマルションの分散安定性が向上($T@6h$ が低下)することが分かる(Fig.5)。これも、Stokesの式からも分かるように、分散媒(パラフィン油)

の粘度が大きくなると、EF-W/Oエマルション中の水滴の沈降速度が低下して、EF-W/Oエマルションの分散安定性が向上したものと考えられる。また、高粘度の分散媒(パラフィン油)は分散している水滴の凝集・合一を抑制しているものと考えられる。Smoluchowskiの式(式2)によれば、凝集・合一の速度は分散媒の粘度に反比例する。Smoluchowskiの式(式2)は油滴の衝突頻度をもとに見積もられる油滴の凝集・合一速度であり、油滴サイズの時間変化(dr^3/dt)は、

$$\frac{dr^3}{dt} = \frac{4kT}{3\eta} Nv \quad (2)$$

と表わされる。 r, t, k, T, η, N, v は、それぞれ油滴半径(m)、時間(s)、ボルツマン定数($J K^{-1}$)、絶対温度(K)、分散媒(水)の粘度(Pa s)、油滴の数(m^{-3})、油滴一個の体積(m^3)である。このことから、分散媒の粘度の増加は水滴の沈降を抑制すると同時に、凝集・合一を抑制していることが示唆された。

一方で、EF-W/Oエマルションの分散安定性と水滴径との関係を見てみると、水滴径が大きいほどEF-W/Oエマルションの分散安定性が向上している(Fig.6)。Stokesの式によれば、水滴の沈降速度は水滴径の2乗に比例するため、EF-W/Oエマルションの分散安定性は水滴径が大きいほど低下するはずである。しかし、本実験で得られたEF-W/Oエマルションの分散安定性は反対の傾向を示している。これらのことから、EF-W/Oエマルションの分散安定性は、分散媒と水との密度差や分散媒の粘度などの分散媒の物性に強く依存していることが示唆された。

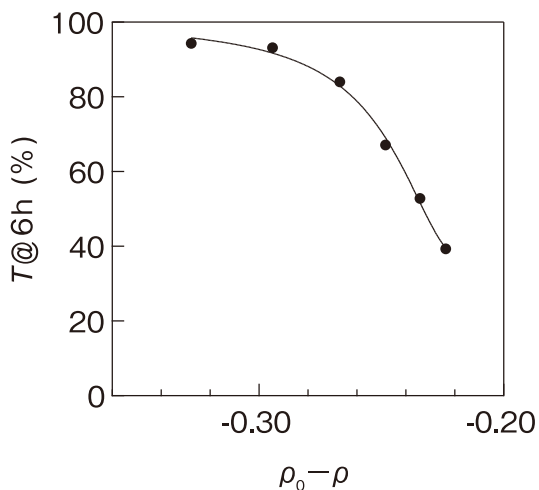


Fig. 4 Transmittance at 700nm of EF-W/O emulsions measured at 6h ($T@6h$) after preparation plotted as a function of density difference ($\rho_0 - \rho$) of alkane.

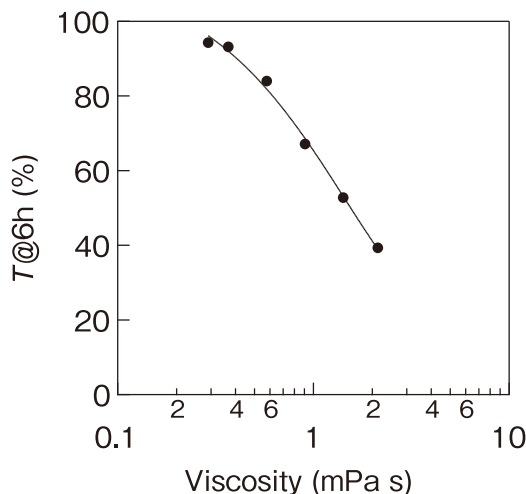


Fig. 5 Transmittance at 700nm of EF-W/O emulsions measured at 6h ($T@6h$) after preparation plotted as a function of viscosity of alkane.

3.3 植物油を分散媒としたEF-W/Oエマルションの分散安定性

これまで、パラフィン油を分散媒としたEF-W/Oエマルションの分散安定性と分散媒の物性との相関性について検討してきた。その結果、特に、分散媒と水との密度差が小さく、分散媒の粘度が大きな油を分散媒として使用した場合に、EF-W/Oエマルションの分散安定性が向上することが明らかとなった。これは、分散媒と水との密度差が小さく、分散媒の粘度が大きな油を分散媒として使用することにより、分散安定性の高いEF-W/Oエマルションが調製できることを意味している。そこで、分散媒と水との密

度差が小さく、分散媒の粘度が大きな植物油（大豆油、コーン油、オリーブ油）（Table 1参照）を分散媒として調製されたEF-W/Oエマルションの分散安定性を評価した。その結果、調製後24時間を経過してもエマルションの乳濁状態はほとんど変化せず、維持されることが明らかとなった（Fig. 7）。 $T@700\text{nm}$ の値も調製24時間後においてもほぼゼロであり、EF-W/Oエマルションは極めて安定であることが確認された（Fig. 8）。以上のことから、植物油を分散媒としたEF-W/Oエマルションは、パラフィン油を分散媒としたEF-W/Oエマルションに比べて分散安定性が高いことが明らかとなった（Fig. 9）。

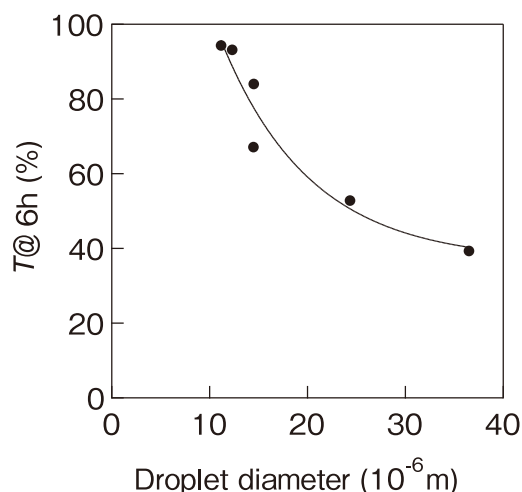


Fig.6 Transmittance at 700nm of EF-W/O emulsions measured at 6h ($T@6\text{h}$) after preparation plotted as a function of droplet diameter.

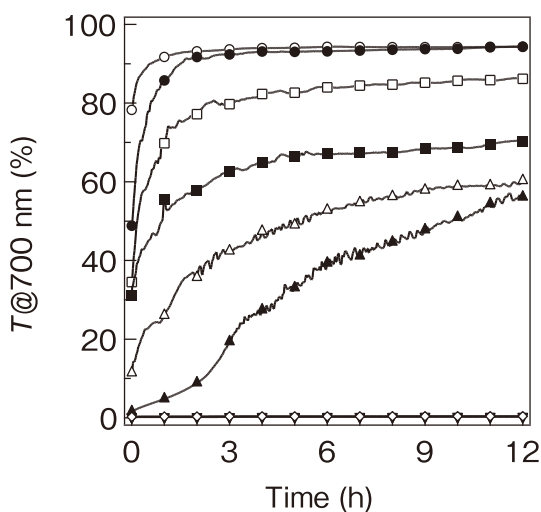


Fig.8 Time course changes in transmittance at 700 nm ($T@700\text{nm}$) of EF-W/O emulsions. (○) Water/hexane, (●) water/octane, (□) water/decane, (■) water/dodecane, (△) water/tetradecane and (▲) water/hexadecane, (▽) water/soybean oil, (▼) water/corn oil and (◇) water/olive oil emulsions.

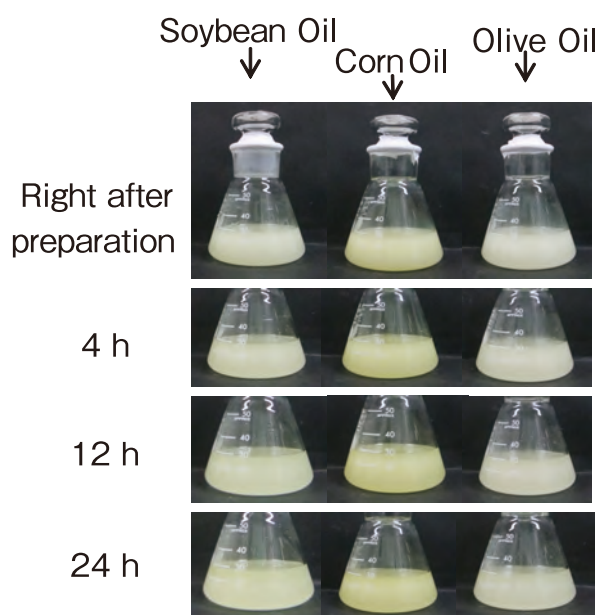


Fig.7 Vegetable oil-based EF-W/O emulsions prepared with an ultrasonic cleaner.

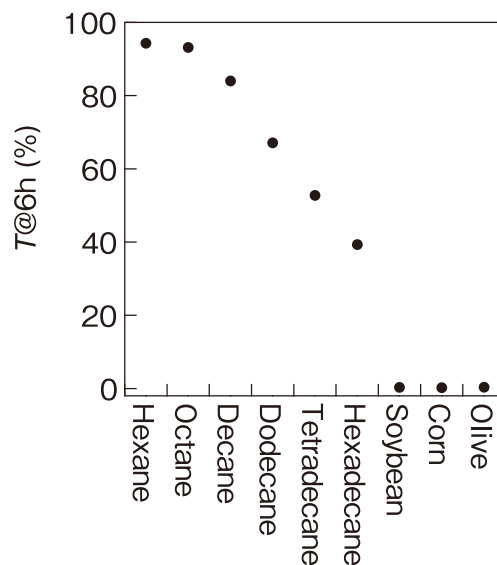


Fig.9 Transmittance at 700 nm of EF-W/O emulsions measured at 6h ($T@6\text{h}$) after preparation.

4. まとめ

本研究では、パラフィン油、植物油を分散媒とした乳化剤フリー油中水滴型 (EF-W/O) エマルションの分散安定性について検討した。パラフィン油を分散媒とした EF-W/O エマルションの分散安定性は、分散媒がヘキサン < オクタン < デカン < ドデカン < テトラデカン < ヘキサデカンの順に向上することが分かった。さらに、植物油 (大豆油、コーン油、オリーブ油) を分散媒とした EF-W/O エマルションは極めて分散安定性が高いことが明らかとなった。この分散安定性の違いは、分散媒である油の物性に強く依存していることが分かった。特に、分散媒 (油) と分散質 (水) との密度差および分散媒 (油) の粘度に強く依存していることが明らかとなった。このように乳化剤を使用しなくても W/O エマルションを調製することが可能であり、分散媒の物性により分散安定性も制御可能であることが示された。また、植物油を分散媒とした EF-W/O エマルションは高い分散安定性を有していることから、化粧品、食品などへの応用の可能性が示唆された。今後、さらに EF-W/O エマルション中の水滴の凝集・合一、オストワルドライピングについても検討を進め、EF-W/O エマルションの不安定化機構の本質に迫っていきたい。

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支援いただきましたことを深く感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Kamogawa K., Sakai T., Momozawa N., Shimazaki M., Enomura M., Sakai H., Abe M.: Evolution and Growth of Oil Droplets in Emulsifier-Free, Metastable Aqueous Solutions: A Light Scattering and Conductive Probe Study, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, 47, 159-170, 1998.
- 2) Kamogawa K., Matsumoto M., Kobayashi T., Sakai T., Sakai H., Abe M.: Dispersion and Stabilizing Effects of n-Hexadecane on Tetralin and Benzene Metastable Droplets in Surfactant-Free Conditions, *Langmuir*, 15, 1913-1917, 1999.
- 3) Sakai T., Kamogawa K., Harusawa F., Momozawa N., Sakai H., Abe M.: Direct Observation of Flocculation/Coalescence of Metastable Oil Droplets in Surfactant-free Oil/Water Emulsion by Freeze-Fracture Electron Microscopy, *Langmuir*, 17, 255-259, 2001.
- 4) Kamogawa K., Akatsuka H., Matsumoto M., Yokoyama S., Sakai T., Sakai H., Abe M.: Surfactant-Free O/W Emulsion Formation of Oleic Acid and its Esters with Ultrasonic Dispersion, *Colloids Surf. A*, 180, 41-53, 2001.
- 5) 酒井俊郎, 加茂川恵司, 酒井秀樹, 阿部正彦: 界面活性剤無添加系エマルションの新しい展開, *オレオサイエンス*, 1, 33-46, 2001.
- 6) 阿部正彦, 酒井俊郎: 疎水性物質の添加によるサーファクタントフリーエマルションの分散安定化, *FRAGRANCE JOURNAL*, 29, 21-29, 2001.
- 7) Sakai T., Sakai H., Abe M.: Dimpled Polymer Particles Prepared by a Single-Step Method in an Acoustic Field, *Langmuir*, 18, 3763-3766, 2002.
- 8) Sakai T., Kamogawa K., Nishiyama K., Sakai H., Abe M.: Molecular Diffusion of Oil/Water Emulsions in Surfactant-Free Conditions, *Langmuir*, 18, 1985-1990, 2002.
- 9) Sakai T., Kamogawa K., Kwon K. O., Sakai H., Abe M.: Pyrene Fluorescence Measurements of Metastable Oil Droplets in Surfactant-Free Oil-in-Water Emulsions, *Colloid Polym. Sci.*, 280, 99-106, 2002.
- 10) Sakai T., Takeda Y., Mafune F., Abe M., Kondow T.: Dye Transfer between Surfactant-Free Nanodroplets Dispersed in Water, *J. Phys. Chem. B*, 106, 5017-5021, 2002.
- 11) Sakai T., Takeda Y., Mafune F., Abe M., Kondow T.: Monitoring Growth of Surfactant-Free Nanodroplets Dispersed in Water by Single-Droplet Detection, *J. Phys. Chem. B*, 107, 2921-2926, 2003.
- 12) Kamogawa K., Kuwayama N., Katagiri T., Akatsuka H., Sakai T., Sakai H., Abe M.: Dispersion and Stabilization in Water of Droplets of Hydrophobic Organic Liquids with the Addition of Hydrophobic Polymers, *Langmuir*, 19, 4063-4069, 2003.
- 13) Okudaira G., Kamogawa K., Sakai T., Sakai H., Abe M.: Suspension Polymerization of Styrene Monomer without Emulsifier and Initiator, *J. Oleo Sci.*, 52, 167-170, 2003.
- 14) Sakai T., Abe M., Momozawa N.: An Analysis of Multi-Step-Growth of Oil Droplets Dispersed in Water, *J. Oleo Sci.*, 52, 681-684, 2003.
- 15) Kamogawa K., Okudaira G., Matsumoto M., Sakai T., Sakai H., Abe M.: Preparation of Oleic Acid/Water Emulsions in Surfactant-Free Condition by Sequential Processing Using Midsonic-Megasonic Waves, *Langmuir*, 20, 2043-2047, 2004.
- 16) Sakai T., Takeda Y., Mafune F., Kondow T.: Surface Properties of Surfactant-Free Oil Droplets Dispersed in Water Studied by Confocal Fluorescence Microscopy, *J. Phys. Chem. B*, 108, 6359-6364, 2004.

- 17) Akatsuka H., Seto T., Hayashi M., Sakai T., Sakai H., Abe M.: A Study on Droplet Growth in and Stabilization of Surfactant-Free Emulsions, *Mater. Tech.*, 26, 22-31, 2008.
- 18) Sakai T.: Surfactant-Free Emulsions, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 13, 228-235, 2008.
- 19) 赤塚秀貴, 瀬戸匡人, 林真理子, 酒井俊郎, 酒井秀樹, 阿部正彦: 界面活性剤無添加水溶液中におけるオレイン酸滴の粒子径に及ぼす長鎖脂肪族アルコールの添加効果, *J. Jpn. Soc. Colour Mater.*, 81, 111-116, 2008.
- 20) 酒井俊郎: サーフアクタントフリーエマルションの分散安定化機構の解明と分散安定化技術の開発, *オレオサイエンス*, 8, 17-25, 2008.
- 21) 酒井俊郎: 高純度オレイン酸を油としたサーFACTANTフリーエマルション, *FRAGRANCE JOURNAL*, 37, 46-53, 2009.

環境応答型スマート材料としてのケラチンゲルの創出

信州大学繊維学部

藤井 敏弘

Human hair is mainly composed of cysteine-rich proteins such as keratin and keratin-associated proteins (KAPs). When a keratin solution was incubated with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC), the zero-length cross linker between amino and carboxyl groups, the solution changed to opaque white/light beige color gel in appearance. The gel was formed according to the EDC and protein concentrations. Electrophoresis showed that the cross-linked proteins were free of KAPs and composed of keratin only. Thus, the gel was named "keratin gel". The keratin gel could both retain various proteins and release some of them. Ovalbumin (MW=45 kDa; pI=5.2) incorporated into EDC/keratin gel was continuously released for 24 h. This time-release was suppressed when the incorporated gel was treated with oxidative treatment such as H₂O₂, while the release was slightly increased after reductive treatment of the gel. The keratin gels will be available for the controlled-release of macromolecules corresponding to oxidation-reduction environment.

1. 緒言

光、温度、pHなどの変化に反応する環境応答型ゲルは、次世代の高機能性マテリアルとして注目されている。医学から工学までの広い分野で利用が想定されており、生体親和性や環境低負荷性が求められている。

私たちは2002年から“セルフリサイクル”の概念を提唱して、これを実証する研究・開発を進めている。これから生まれてくる製品を“セルフリサイクル製品”と名付け、「動物や他者の生体組織・材料を使わず、本人由来の生体物質を原料として、本人が使用するための品」と定義した^{1,2)}。この生体物質として毛髪組織に注目した。この理由として、血液と比べて、毛髪は採取する負担が小さく、大量に入手が可能で、フィルム、ゲルなどへと加工する技術を開発すれば、安全・安心なマテリアルとなるものと考えている。硬ケラチンを抗原としてマウスに投与して免疫原性を調べたところ、マウス体毛ケラチンはヒト毛髪および爪ケラチンと比べて、100~200倍も免疫応答性が低いことを報告している³⁾。またヒト毛髪タンパク質フィルムはプロテアーゼにより分解を受けることや、ヒト毛髪および爪タンパク質とそれらのフィルムはラット腹腔由来の肥満細胞を刺激しないことを私たちは見出している^{4,5)}。また、羊毛およびヒト由来の硬ケラチンフィルムやスポンジは細胞培養の足場として期待されており、線維芽細胞などの接着性、生存、増殖などにおいて問題がなく、コラーゲンに匹敵する

スキヤホールド機能を有していることが報告されている^{6,7)}。これらのことは、毛髪タンパク質は生体適合性に優れたバイオマテリアルであることを示唆している。

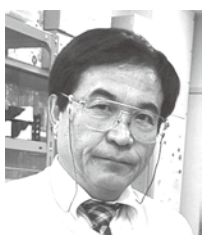
再生医療を含めた自然科学の最近の最大トピックスとして、人工多機能性幹細胞(iPS)の樹立とその応用があげられる。これは「自分由来の細胞で、自分を治療する技術」であるため、移植医療に代わる再生医療として注目され多額の予算が投入されている。これは、新しい産業創出にも繋がるため、国民の期待は高い。一方では、「国民医療費」は40兆円におよぶと報道されており、毎年1兆円もの増加となっている。この要因としては高齢化が進んだことに加えて、CT、MRI、内視鏡などの診断や治療に使用している「高度医療技術」が挙げられてきている。iPS細胞から作られるセルシートや組織などが治療に利用できるようになれば移植医療にとっては福音となるが、さらなる高額な医療費を国民に負担させることになる。このため、今後、低コストで品質の高い医療用の材料と診断・治療技術を社会が求めてくることを確信している。

私たちは、ケラチンを原材料としたフィルムへの加工技術を開発しているが、ゲルへの加工技術は未だ確立していない。本研究では、簡便な技術を組み合わせ、スマート材料でかつ生体適合性にも優れたケラチンゲルを開発することを目的とする。

2. 実験

2.1 毛髪タンパク質溶液の調製とケラチンゲルの作製

化学処理が施されていないボランティアから提供された頭髮を用いた。毛髪を信大法溶液(5M尿素, 2.6Mチオ尿素, 5% 2-メルカプトエタノール, 25mM Tris-HCl, pH 8.5)に浸し、50℃で3日間抽出を行った。ろ過と遠心操作により毛髪残渣を取り除き、タンパク質溶液を得た⁸⁾。この溶液は蒸留水に透析後、不溶物を遠心で取り除き使用



Creation of the keratin gel: an environmental response type smart material

Toshihiro Fujii

Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University

した。タンパク質濃度は牛血清アルブミンを標準として Bradford 法で測定した⁹⁾。

ゲル形成は小試験管中の毛髪タンパク質溶液にゼロ距離化学架橋剤 (EDC ; 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride) を加えてインキュベートし、一定時間後に倒立試験により確認した。ゲルの還元処理はチオグリコール酸、酸化処理は過酸化水素を用いた。

2.2 電気泳動

倒立試験の1/10のスケールでタンパク質と試薬を加えて反応させ、可溶化成分を Tricine/SDS-ポリアクリルアミドゲルの電気泳動 (トリシン/SDS-PAGE) によって分析した。泳動後のゲルは、0.1% クマシーブリアントブルー R-250、10% 酢酸、40% エタノールで2時間染色後、10% 酢酸溶液で脱色処理を行った¹⁰⁾。

2.3 遊離(放出)試験

ゲルへの高分子量成分の保持と遊離は、6種のタンパク質のブレンドを毛髪タンパク質に混ぜ、100 mM EDCを加えてゲル化した。ゲル化されなかったものを0.5×PBSにより洗浄後、0.5×PBSを加え37℃下で遊離してくるタンパク質量と成分を Bradford 法と電気泳動で分析した。

3. 結果

3.1 EDC濃度がゲルの形成に与える影響

EDCによる架橋は近距離のアミノ基とカルボキシル基の間にペプチド結合を作り、副産物は尿素で未反応EDCとともに水洗により除去ができる。このため生体適合性の保持が期待できる。EDCはタンパク質間の相互作用を調べるために多用されている。ケラチンと同類の筋肉に含まれている中間径フィラメントであるデスミンがカルボニンなどの細胞骨格タンパク質とEDCにより架橋することを報告している¹¹⁾。

可溶化した毛髪タンパク質溶液 (10mg/ml) に0-100mMまでEDC濃度を変えて加えた。37℃、30分間インキュベーション後に小試験管を倒立させたところ、0-5 mM EDCにおいてはタンパク質溶液の操作直後に落下することが観察されたが、20mM以上のEDC濃度では試験管の底にゲル状の凝集体が形成され、これらは倒立しても落下せずに底部に保持されていた (Fig.1A)。中間の7-10mM EDCにおいては試験管の底から壁に半固体の物質が残存していることから、倒立試験に耐えられるまでのゲルとなっていないことが示された。これらの結果、毛髪タンパク質はEDCにより架橋が生じゲル凝集体が形成す

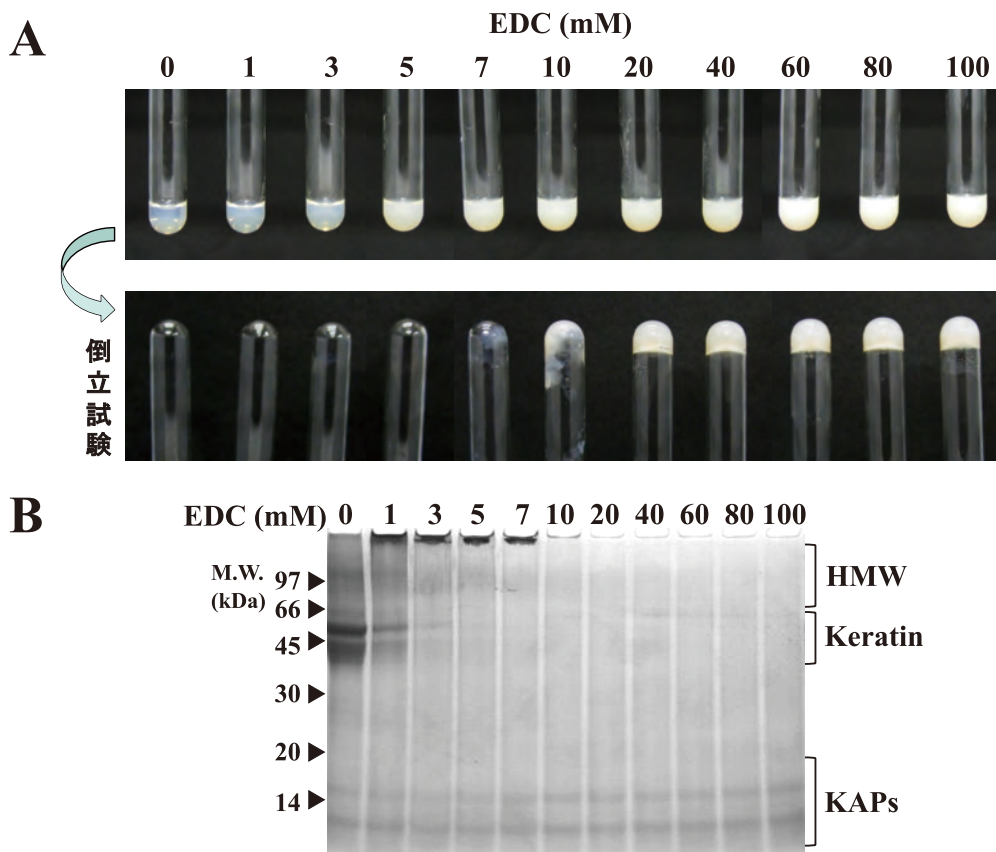


Fig. 1 ケラチンゲル形成における EDC の影響

ることが示された。また半透明なタンパク質溶液は、ゲル化により不透明で白色～淡ベージュ色を呈していた。

上記した条件を1/10のスケールでおこない、可溶性タンパク質をトリシン/SDS-PAGEで分析した (Fig.1B)。毛髪タンパク質溶液は高分子量成分 (>90kDa)、ケラチン (40 - 65kDa)、ケラチン結合タンパク質 (KAPs; 6 - 20kDa) から構成されていた。1 mM EDCの添加によりケラチンバンドが減少し、スタッキングゲルの上部が強く染色されることから、超高分子量成分が形成されたことが示された。EDC濃度が10mM以上となると、ケラチン、高分子量成分、超高分子量成分のバンドは見かけ上ほぼ完全に消失していた。このことは、架橋がさらに進み、スタッキングゲルにすら入らないぐらいまでの高分子となっていることが示唆された。一方、低分子量タンパク質のKAPsは100mM EDCの添加条件下でも残存していることから、ほとんど架橋されないことが示された。この結果、EDC誘導の毛髪タンパク質ゲルはケラチンを主成分としているため、ケラチンゲルと呼ぶことにした。

3.2 EDC依存性ゲル形成の諸性質

EDC/ケラチンゲルの形成はタンパク質濃度に依存していた。これは毛髪タンパク質溶液のロットあるいは保存期間により変動した。ここでは、5 mM EDC添加時におけるケラチンゲル形成について、処理時間、温度、pHの影響を倒立法で調べた (Table 1)。処理温度が37℃において、60分以上のインキュベーションでゲル形成が見られた。このため、60分間の処理時間で温度変化を調べたところ、35℃以下ではゲル形成は見られないが、40 - 50℃ではゲル形成が観察された。50℃においては、30分以内でもゲルが生じていた。反応溶液のpHの影響を調べたところ、

Table 1 各種条件がケラチンゲル形成に与える影響

Factors and conditions		Gel formation
Time (min)	30	×
	60	○
	90	○
	120	○
Temperature (°C)	25	×
	30	×
	35	×
	40	○
	45	○
	50	○
pH	6	○
	7	×
	8	×
	9	×

○, formed ×, not formed

pHが6の時のみにゲルが形成していた。ケラチンの等電点はtype Iが4.8 - 6、type IIが5.9 - 7.8であることから、等電点に近い条件下では凝集性が高まりゲル化しやすいことが考えられる。

3.3 タンパク質のケラチンゲルへの保持と放出

ケラチンゲルへのタンパク質の保持と放出性を調べるため、phosphorylase b (97kDa), bovine serum albumin (66kDa), ovalbumin (45kDa), carbonic anhydrase (30kDa), trypsin inhibitor (20kDa), α-lactalbumin(14kDa) からなるタンパク質カクテル (LMW-ST) を用いた。

ケラチンゲルの形成は外部タンパク質の添加により抑制されるため、ここでは毛髪タンパク質の1/10濃度のタンパク質カクテルと100mM EDCを加え、37℃、60分間放置してゲルを作製した。形成したゲルは簡単に洗浄した後、37℃、0.5×PBS溶液にインキュベーションして24時間までの放出試験を行った (Fig.2A)。2時間ぐらいまでは放出タンパク質は見られないが、3時間後から経時的な放出が検出できた。24時間後においては、加えたタンパク質の約30%が外液中に回収された。一方、カクテルを加えてないケラチンゲルからの放出はほとんど見られなかった。

次に、外液に放出されたタンパク質の成分を電気泳動で調べたところ、bovine serum albumin, ovalbumin, carbonic

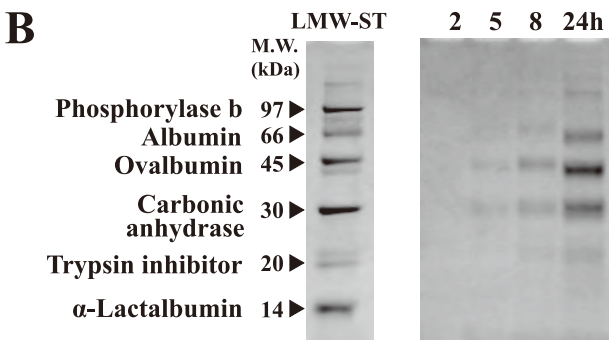
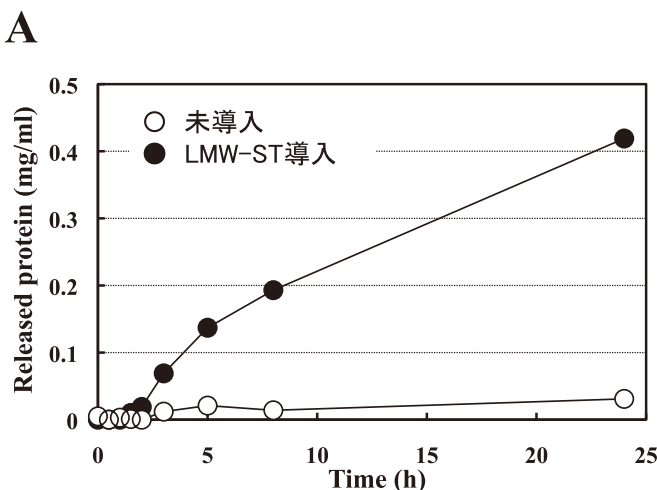


Fig. 2 ケラチンゲルからのタンパク質の放出

anhydraseは有意に、trypsin inhibitorは僅かに検出ができた。一方、phosphorylase bと α -lactalbuminは24時間後の外液中にも検出できなかったことから、有意に放出がなされないことが明らかとなった (Fig.2B)。

タンパク質カクテルを構成している6種類のタンパク質の分子量、等電点、システイン含量をTable 2に示す。このカクテル自体とカクテルに毛髪タンパク質溶液を加えた条件でEDC処理したところ、trypsin inhibitorは見かけ上減少するが、他のタンパク質のバンドには影響を与えないため化学的に結合は生じていないことが示された。これらの結果は、ケラチンゲルからのタンパク質の放出は分子量だけに依存しているのではないことが明らかとなった。また、平均的な電荷状態をあらわす等電点においては、放出されない α -lactalbuminがケラチンの等電点に近いことから関連することが推測できるが、例数を増やす必要がある。

3.4 還元-酸化処理が放出反応へ与える影響

毛髪ケラチン分子の特徴として、システインを多く含むことであり、これから作られる-SS-結合は髪の毛がもつしなやかさと硬さを作り出す基本と考えられている。還元剤存在下で抽出された毛髪タンパク質はシステインの状態であると考えられる。そこで、ケラチンゲルをパーマ施術で多用されている還元剤のチオグリコール酸と酸化剤の過酸化水素を用いて処理した後、放出試験を行った。これらの処理は、肉視レベルにおいて影響を与えなかった。100mMチオグリコール酸で処理をしたケラチンゲルは未処理ゲルと比べて、放出量の増加が見られるのに対して、過酸化水素で処理したケラチンゲルは放出量の顕著な減少が見られた。還元と酸化処理がゲルに与える違いは、保水量においても見ることができた。

4. 考察

毛髪の主成分のケラチンは細胞骨格タンパク質の中間径フィラメントに分類されており、デスミン、ビメンチンなどと同じく、ケラチン単量体は自己集合し、直径10nmの枝分かれがないフィラメントとなる。私たちは、平滑筋のデスミンがカルボニンとEDCにより架橋されることを以前に報告している¹¹⁾。ケラチンを含む中間径フィラメントの分子間相互作用の解明に化学架橋剤は有効なツールであることを示している。EDCはコラーゲンを高分子化するのに使用されており、この方法で作製したコラーゲンゲルの生体適合性は高いことが知られている¹²⁾。本研究において、毛髪ケラチンはEDCにより架橋されてゲル化することが明らかとなった。毛髪組織の構築は、ケラチンフィラメントからなるマイクロフィブリルがマトリックスと呼ばれるKAPsを介して長軸に整列し、マクロフィブリルを形成する。このマクロフィブリルは、細胞膜複合体により長

Table 2 封入タンパク質の性質と放出性

Protein	M.W. (kDa)	pI	Release from EDC-gel
Phosphorylase b	97	6.8	×
Albumin	66	5.6	○
Ovalbumin	45	5.2	○
Carbonic anhydrase	30	6.4	○
Trypsin inhibitor	20	4.6	△/×
α -Lactalbumin	14	4.8	×

軸に整列してコルテックス部位を作り上げている¹³⁾。しかしながら、ケラチンとKAPs間のEDC-複合体は形成されなかった (Fig. 1)。

私たちは、ヒト毛髪から効率の高いタンパク質の抽出方法 (信大法) と、この溶液に含まれているケラチンの自己集合を誘発させてフィルム形成をする技術を独自に開発してきている^{8, 14)}。このフィルムは淡パーフェクト色を帯びた不透明なフィルムであるが、チオグリコール酸などの還元剤の処理により、半透明なフィルムに変化する。半透明フィルムは臭素酸などによる酸化剤で処理すると、元の不透明なフィルムに戻る。還元-酸化状態に伴い、フィルムの微細構造もダイナミックに変化が生じていることを見出している。不透明-半透明-不透明の変化は数回繰り返すことが可能である。つまり、還元、酸化といった環境状態においてケラチンフィルムおよびその素材であるケラチンは環境応答性をもつタンパク質であることが示された^{15, 16)}。

毛髪ケラチンは約9%ものシステインを含み、ジスルフィド結合により高強度を示し、階層的な構造体と合わせて、毛髪のしなやかな物性を生み出している。一方、KAPsのシステイン含量は20%以上もあり、両者間のジスルフィド結合を利用すれば、新しいタイプのゲルの作製が可能であると思われる。EDC-ケラチンゲルを還元剤および酸化剤で処理すると、ゲル内に封入したタンパク質の放出量が増えるため、ケラチンネットワークの網目密度が増えることが示された (Fig.3)。このことは、ケラチンゲルがEDCにより架橋されてゲル形成した場合においても、酸化および還元状態で性能が変化する環境応答型のスマート材料であることが示された。さらに、①化学架橋剤を使用しない条件下でのゲルの形成、②ケラチン単独ではなく、KAPsを含んだケラチンゲルの形成、③網目構造を変化させ、強度などの物性や分子ふるい効果が調整できるゲルの形成、の可能性が示された。

美容師や理容師は他人の髪と長時間接触するにも関わらず、これが原因とする職業病の発生は知られていない。頭髪は1日150-300mg合成され、その質量の70-80%はタンパク質である。毛髪同様に再生される血液やリンパ液

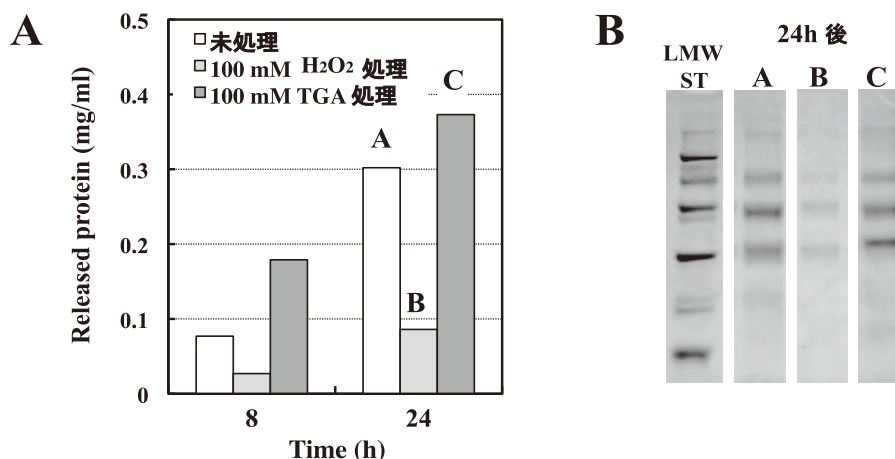


Fig. 3 酸化 / 還元がタンパク質放出に与える影響

は、生体に不可欠で多様な生体成分と多様な細胞を含んでいる長所をもつ。しかしながら、血液やリンパ液を原料とした場合と比べ、毛髪は安全面、保存面、採取負担などにおいて優れている。特に、本人由来の毛髪組織を使用して化粧品・医用材料などに適用できるようになれば、私たちにとっては安全・安心な生体資源となる。

謝 辞

本研究にご助成頂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謝申し上げます。また、本研究の遂行にあたり、共同研究者の伊藤弓子さんに厚く御礼申し上げます。

(参考文献)

- 1) 藤井敏弘, :セルフメディケーションに向けたヒト毛髪蛋白質フィルムの創製と販売, バイオインダストリー, 19, 22-27, 2002.
- 2) 藤井敏弘, 小林俊一, :セルフ-リサイクルに向けたヒト毛髪タンパク質からの個人対応材料の開発, 日本化粧品学会誌, 30, 5-9, 2006.
- 3) 井出裕介, 藤井敏弘, :硬ケラチンを含有する毛髪タンパク質の免疫原性, 繊維学会誌, 60, 276-279, 2004.
- 4) 井出裕介, 藤井敏弘, :ヒト毛髪タンパク質およびフィルムのプロテアーゼによる分解, 高分子論文集, 61, 153-156, 2004.
- 5) Fujii, T, Murai, S, Ohkawa, K, Hirai, T, :Effects of human hair and nail proteins and their films on rat mast cells, J. Mater. Sci.: Mater. Med., 19, 2335-2342, 2008.
- 6) Katoh, K, Tanabe, T, Yamauchi, K, :Novel approach to fabricate keratin sponge scaffolds with controlled pore size and porosity, *Biomaterials*, 25, 4255-4262, 2004
- 7) Verma, V, Verma, P, Ray, P, Ray, AR, :Preparation

- of scaffolds from human hair proteins for tissue-engineering applications, *Biomed Mater* 3, 1-12, 2008.
- 8) Nakamura, A, Arimoto, M, Takeuchi, K, Fujii, T, :A rapid extraction procedure of human hair proteins and identification of phosphorylated species, *Biol. Pharm. Bull.*, 25, 569-572, 2002.
- 9) Bradford, MM, :A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254, 1976.
- 10) Schagger, H, von Jagow, G, :Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, 166: 368-379, 1987.
- 11) Fujii, T, Takagi, H, Arimoto, M, Ootani, H, Ueeda, T, :Bundle formation of smooth muscle desmin intermediate filaments by calponin and its binding site on the desmin molecule. *J. Biochem.*, 127, 457-465, 2000.
- 12) 井原慶児, 永井展裕, 柚木俊二, 森一生, :鮭皮コラーゲンのバイオマテリアル化技術の開発と商品化, 生物工学会誌, 85, 126-131, 2007.
- 13) 松崎貴, 新井幸三, 上甲恭平, 細川 稔, 中村浩一, :最新の毛髪科学, フレグランスジャーナル社, 2003.
- 14) Fujii T, Ogiwara D, Arimoto M, :Convenient procedures for human hair protein films and properties of alkaline phosphatase incorporated in the film, *Biol. Pharm. Bull.*, 27, 89-93, 2004.
- 15) Kawasoe T, Takayama S, Ito Y, Fujii T, :Effects of reductive and/or oxidative treatment during permanent wave procedure on human hair keratin films, *J. Jpn. Cosmet. Sci. Soc.*, 35, 306-311, 2011.
- 16) 藤井敏弘, :毛髪ケラチンフィルムによるパーマ処理損傷評価, *Fragrance J.*, 39, 46-52, 2011.

芍薬に含まれるコラーゲンのAGEs化を阻害する化合物の探索とその皮膚老化改善作用の検討

熊本大学大学院生命科学研究部細胞病理学分野

藤原 章雄

Advanced glycation end-products (AGEs), were known as major hydrolysate of glycated collagen. Subsequently, AGEs was also detected in human serum, and its level in patients with diabetes was found to be higher than in normal subjects. Furthermore, it is known that AGEs-collagen induces apoptosis in fibroblasts through activation of reactive oxygen species and MAP kinases. Therefore, treatment with AGEs inhibitors may be a potential strategy for the prevention of clinical diabetic complications and skin aging. In the present study, we investigated the inhibitory effect of *Syakuyaku* extract and compounds contained in *Syakuyaku* on N^ε-(carboxymethyl) arginine (CMA) formation to discover the candidate agents for the new AGEs inhibitor. As a result, *Syakuyaku* extract and pentagalloylglucose isolated from *Syakuyaku* extract showed significant inhibitory effect on CML and CMA formation during incubation of collagen with ribose, thus *Syakuyaku* and pentagalloylglucose may be candidate agents for the new AGEs inhibitors.

1. 緒言

我々は、健康維持や疾病予防に有効な「機能性天然薬物」の探索研究を行っており、これまでに抗動脈硬化作用を有する天然化合物やマクロファージの活性化制御作用を有することでガン免疫療法に有効な天然化合物を発見してきた¹⁻⁶⁾。

さらに近年、この研究の一環として、糖尿病合併症や動脈硬化症、皮膚老化などの老化性疾患の発症や進展に関与する advanced glycation end-products (AGEs) の生成を阻害する天然化合物の探索を行なっている。AGEsとは還元糖とタンパク質の非酵素的な反応であるメイラード反応によって生じる最終生成物の総称であり、このメイラード反応はグルコースなどの還元糖とタンパク質のアミノ基が反応してアマドリ転位物を形成する前期反応と、アマドリ転位物が酸化、脱水、縮合、転位などの反応を経てAGEs構造体へと変化する後期反応からなる。現在、様々なAGEs構造体が知られており、その中でも、様々なタンパクで生成する主要なAGEs構造体であるN^ε-(carboxymethyl) lysine (CML)は、糖尿病合併症の病変部位や動脈硬化症のみならず、肺線維症の肺胞マクロファージなどでも蓄積することが知られている⁷⁾。また、コラーゲンに特異的に生成するAGEsとしてはN^ω-(carboxymethyl) arginine (CMA)が知られている⁸⁾。さらに、コラーゲンに生成するAGEsと病態との関連についても、様々な報告がなされ

ており、例えば、AGEs化コラーゲンは骨を形成する骨芽細胞のアポトーシスを誘導することで骨形成を阻害し、この現象は骨粗鬆症の原因の一つであると考えられている⁹⁾。また、コラーゲンのAGEs化は、表皮に存在するケラチノサイト(角化細胞)の遊走やコラーゲンへの接着能を低下させることから、糖尿病患者の創傷治癒の遅延にはコラーゲンのAGEs化が関与していることが示唆されている¹⁰⁾。

コラーゲンは、皮膚の真皮において線維芽細胞から産生され、真皮の70%以上を構成するタンパク質であり、このコラーゲンが線維芽細胞に引っ張られることで肌の張りが保たれている。しかし、コラーゲンがAGEs化すると、AGEsコラーゲンによるRAGE (receptor for AGE)を介したsignalingにより線維芽細胞のアポトーシスが引き起こされ^{9, 11)}、その結果、肌の張りの低下といった皮膚老化が促進すると考えられている。

そこで、本研究では、皮膚老化予防に対する新たなターゲット分子としてAGEsに注目し、生薬「芍薬」のAGEs生成阻害作用の検討および芍薬に含まれるAGEs生成阻害化合物の探索を行なった。

2. 実験

2.1 試験サンプル

本研究で用いた生薬抽出エキスは、各種生薬をMeOHで24時間温浸することで調製した。また、試験化合物は生薬「芍薬」から各種クロマトグラフィーにて単離・精製したものをを用いた。

2.2 AGEs生成阻害試験

リボース (30mM) とゼラチン (2mg/ml) もしくは、I型コラーゲン (1.5mg/ml) の混合溶液を37℃で7日間インキュベートすることで、AGEsであるCMLとCMAが生成する条件下に、DMSOで溶解した試験サンプルを添加



Identification of compounds inhibiting AGEs formation in *Syakuyaku*

Yukio Fujiwara

Department of Cell Pathology, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University

し、CML生成およびCMA生成に対する阻害作用を、抗CML抗体ならびに抗CMA抗体を用いたELISA法にて評価した。

2.3 ELISA

ELISAによるCMLおよびCMA含量の評価は、Nagaiらの方法に準じて行った¹²⁾。リボース-ゼラチン混合液(10 μ g/ml)を96穴プレートにコーティングし、0.05% Tween 20を含むPBS (washing buffer) で3回洗浄後、0.5%ゼラチンにてブロッキングを行った。各wellをwashing bufferにて洗浄し、抗CML抗体もしくは抗CMA抗体を添加後、1時間インキュベートした。各wellをwashing bufferにて洗浄後、HRP標識抗マウスIgG抗体にて1時間インキュベートし、最後にOPDにて発色反応後、1 M硫酸にて反応を停止した。各wellの450nmにおける吸光度をmicro-ELISA plate readerにより測定した。

2.4 線維芽細胞の3次元培養

ヒト真皮線維芽細胞は、JCRB細胞バンクより購入した。ヒト真皮線維芽細胞(4.0 \times 10⁵ cell/well)を培地で懸濁させた溶液に、I型コラーゲン溶液を加え、培養チャンバー内で培養することで、I型コラーゲンマトリックスに線維芽細胞を包埋した。2日後に凝固したマトリックスを培養チャンバーより剥離し、8日間培養することで、正常に収縮するマトリックスを形成させた。

2.5 ウェスタンブロット法

ウェスタンブロットによるMAPキナーゼの活性化の評価は、これまでの報告に準じて行った¹¹⁾。37 $^{\circ}$ Cで7日間インキュベートした各種コラーゲン溶液(I型コラーゲン溶液、リボース-I型コラーゲン溶液、天然化合物を添加したりボース-I型コラーゲン溶液)にて、3時間刺激したヒト真皮線維芽細胞を回収し、lysis bufferを用いて細胞を溶解させた。電気泳動には、10%ポリアクリルアミドゲルを用いた。また、1次抗体は、Rabbit monoclonal anti-Phospho-p38 antibody, Rabbit polyclonal anti-Phospho-(JNK1+JNK2) antibody, Mouse monoclonal anti- β -actin antibodyを用いて行った。

2.6 免疫組織化学染色

37 $^{\circ}$ Cで7日間インキュベートした各種コラーゲン溶液(I型コラーゲン溶液、リボース-I型コラーゲン溶液、天然化合物を添加したりボース-I型コラーゲン溶液)にて刺激したヒト真皮線維芽細胞を4%パラホルムアルデヒドにて固定後、パラフィンにて包埋した。続いて、パラフィン切片を作成後、定法により抗CML抗体、抗CMA抗体およびRabbit polyclonal anti-cleaved caspase-3 antibody

を用いた免疫染色を行った。

3. 結果

3.1 芍薬エキスおよび芍薬抽出画分のAGEs生成阻害作用

芍薬のAGEs生成阻害作用を評価するために、芍薬のMeOH抽出エキスを調製し、まずは、コラーゲンに特異的に生成するAGEsであるCMAに対する阻害作用を評価した。その結果、Fig.1Aに示すようにMeOH抽出エキスはCMAの生成を有意に抑制した。また、MeOH抽出エキスをDiaion HP-20カラムにて分画した画分を用いて評価を行なったところ、50% MeOH溶出画分にのみ顕著な

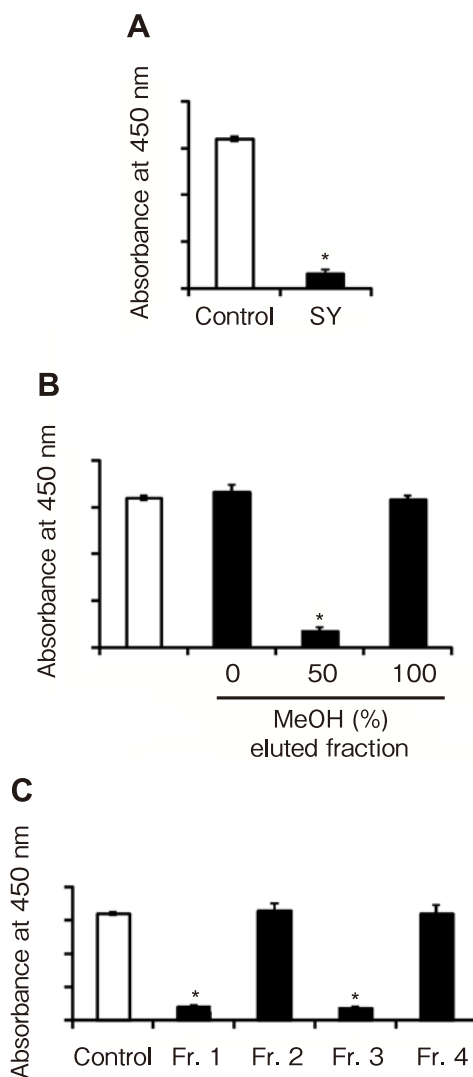


Fig.1 Inhibitory effect of Syakuyaku (SY) on CMA formation. Gelatin and ribose were incubated with 50 μ g/ml Syakuyaku (SY) extract (A), 50 μ g/ml fractions isolated by Diaion HP-20 column (B) and 10 μ g/ml fractions isolated from 50%MeOH eluted fraction by Wako gel column (C) in phosphate buffer for 7 days followed by determination of CMA by noncompetitive ELISA as described under Material and Methods. Data are presented as the mean \pm SD. *, P <0.01 versus control.

CMA 阻害作用が認められた (Fig.1B)。続いて、阻害効果の認められた 50% MeOH 溶出画分を Wako gel カラムを用いて分画し、得られた 4 つの画分の阻害作用を評価したところ、Fraction 1 ならびに Fraction 3 に顕著な CMA 阻害作用が認められた (Fig.1C)。ゆえに、これらフラクションに活性本体が含まれていることが示唆された。

3.2 芍薬抽出画分からの化合物の単離

Fig.1C で顕著な CMA 生成阻害作用が認められた fraction 1 および fraction 3 を各種クロマトグラフィー (シリカゲルカラム、逆相シリカゲルカラム、HPLC) により分離精製を行なった。単離した化合物を核磁気共鳴 (NMR) および質量分析により構造解析を行なったところ、Fig.2 に構造を示す化合物 (Methylgallate, Galloylpaeoniflorin, Trigalloylglucose, Tetragalloylglucose, Pentagalloylglucose) を同定した。

3.3 芍薬由来化合物の AGEs 生成阻害作用

AGEs 生成を阻害する芍薬の活性本体を同定する目的で、まず、リボースとゼラチン (可溶性コラーゲン) を用いた

AGEs 生成阻害試験系にて、単離した化合物の阻害作用を評価した。その結果、すべての化合物に有意な CMA の生成阻害作用が認められ、GP を除く、すべての化合物に CML の生成阻害作用が認められた (Fig.3A)。次に、リボースと I 型コラーゲンを用いた AGEs 生成阻害試験系にて同様に評価を行った。その結果、すべての化合物に有意な CMA の生成阻害作用が認められ、TRGG, TEGG, PGG に有意な CML の生成阻害作用が認められた (Fig.3B)。また、これら化合物は CML よりも CMA の生成をより強く抑制することが明らかとなった (Fig.3)。

3.4 線維芽細胞の三次元培養を用いた AGEs 阻害作用を有する芍薬由来化合物の評価の検討

肌の張りは、真皮中に存在する線維芽細胞がコラーゲンを引っ張ることで保たれている。通常、正常なコラーゲンマトリックス中で線維芽細胞を培養すると、線維芽細胞が I 型コラーゲンを引っ張り引き締めることで弾力のある真皮類似構造を形成し、マトリックスの収縮が観察されるが、AGEs 化コラーゲンマトリックス中では、その収縮率が低下する。そこで、CMA 生成阻害作用の認められた

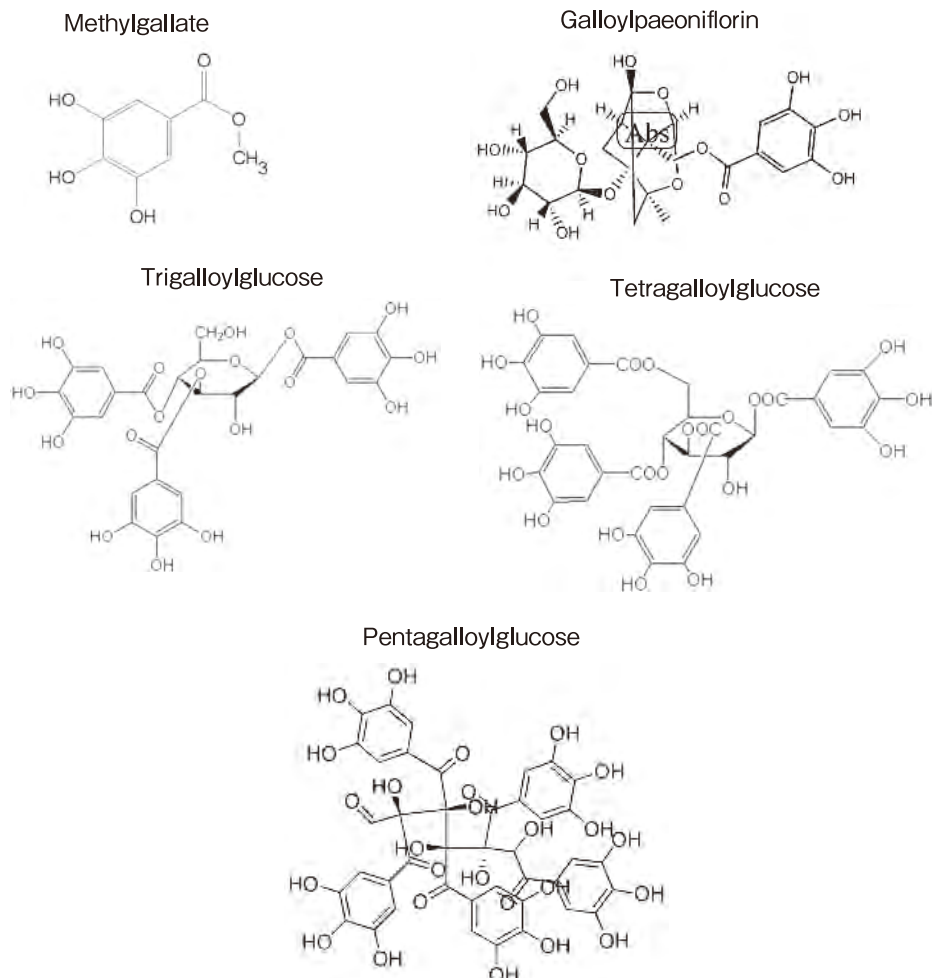


Fig.2 Chemical structure of compounds isolated from fractions possessing inhibitory effect on CMA formation.

Pentagalloylglucose (PGG) を添加したコラーゲンをを用いて、マトリックスの収縮に対する効果を検討した。方法としては、ヒト線維芽細胞を培地で懸濁させた溶液に、native-collagen 溶液、AGEs-collagen 溶液 (ribose と native-collagen の混合液を7日間インキュベートしたもの) もしくは、PGG を添加した collagen 溶液 (AGEs-collagen 溶液を調製する際に PGG を添加したもの) を加え、培養チャンバー内で培養することで、コラーゲンマトリックスに線維芽細胞を包埋した。2日後、凝固したマトリックスを培養チャンバーより剥離し、8日間培養後にマトリックスの収縮を観察した。その結果、AGEs-collagen を用いたマトリックスでは native-collagen を用いた場合に比べて、その収縮率が低下

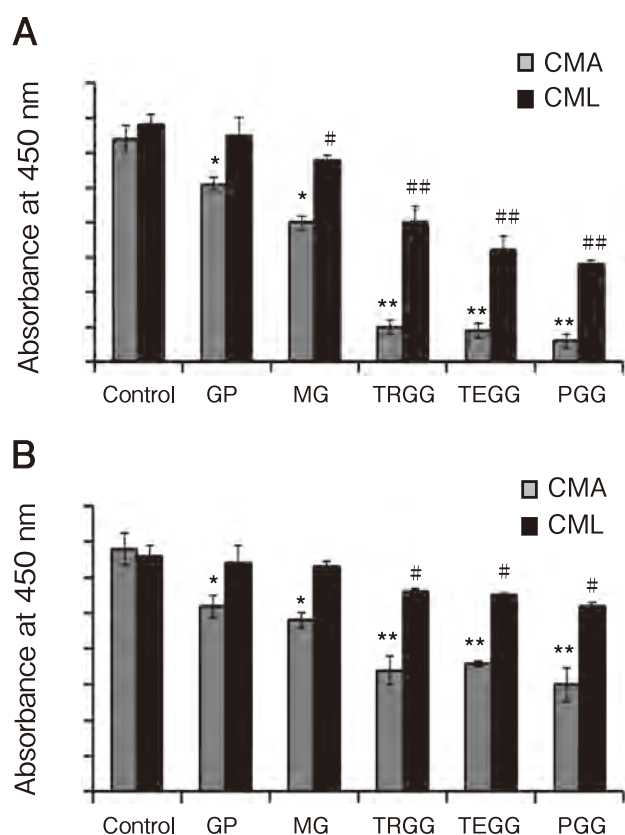


Fig.3 Inhibitory effect of compounds isolated from *Syakuyaku* on AGEs formation.

Gelatin and ribose were incubated with indicated concentration of compounds (GP; Galloylpaeniflorin, MG; Methylgallate, TRGG; Trigalloylglucose, TEGG; Tetragalloylglucose, PGG; Pentagalloylglucose) in phosphate buffer for 7 days followed by determination of CMA and CML by noncompetitive ELISA as described under Material and Methods (A). Type-I collagen and ribose were incubated with indicated concentration of compounds (GP; Galloylpaeniflorin, MG; Methylgallate, TRGG; Trigalloylglucose, TEGG; Tetragalloylglucose, PGG; Pentagalloylglucose) in phosphate buffer for 7 days followed by determination of CMA by noncompetitive ELISA as described under Material and Methods (B). Data are presented as the mean \pm SD. *, $P < 0.01$; **, $P < 0.005$; #, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$ versus control.

し、その収縮率の低下は PGG により改善した (Fig. 4)。

前述したように、PGG は、コラーゲンの CMA 化により低下したマトリックスの収縮率を改善したため、その改善作用が CMA 生成阻害作用によるものであるかを確認するために、マトリックス中の CMA 含量を、抗 CMA 抗体を用いた免疫染色により評価した。その結果、マトリックスの収縮率が低下したコントロールでは CMA の蓄積が確認でき、その蓄積は PGG の添加により抑制された (Fig.5A)。ゆえに、PGG によるマトリックス収縮改善作用は、これら化合物の CMA 生成阻害作用によることが示唆された。また、マトリックス中の線維芽細胞の形態を、HE 染色により確認したところ、CMA 化コラーゲン中では、線維芽細胞の形態が丸くなり Native collagen と比較して、明らかに細胞死が誘導されていた (Fig.5B)。一方、CMA 生成阻害化合物である PGG を添加したマトリックス中の線維芽細胞は、Native collagen と比較して、変化のない正常な形態であった (Fig.5B)。さらに、カスパーゼ3の活性化を免疫染色により評価したところ、CMA-collagen では、カスパーゼ3の活性化が認められ、その活性化は PGG により抑制された (Fig.5C)。ゆえに、CMA 生成阻害化合物である PGG によるマトリックスの収縮率の改善は、PGG がコラーゲンの CMA 化を阻害したことによる線維芽細胞のアポトーシスの抑制であることが示唆された。

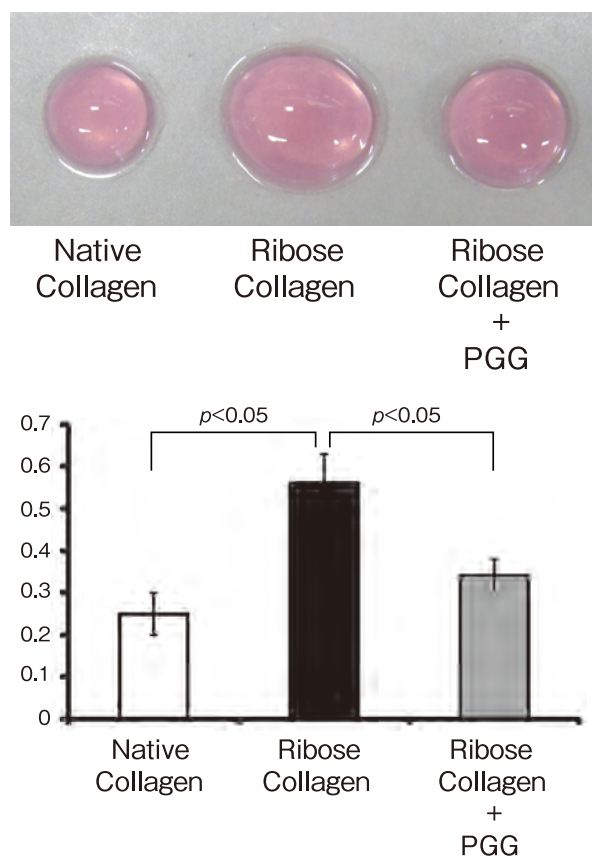


Fig.4 Effect of PGG on contraction of collagen matrix.

3.5 CMA 生成阻害化合物による線維芽細胞のアポトーシス抑制メカニズム

次に、CMA 阻害化合物である PGG が線維芽細胞のアポトーシスを抑制するメカニズムを解明することにした。これまでに、CMA の類似構造を有する AGEs 構造体である CML 化したタンパクは、RAGE を介して JNK や p38 などの MAP kinase を活性化させることで、細胞をアポトーシスに導くことが報告されている^{9, 11)}。そこで、本研究では CMA 化コラーゲンによる JNK や p38 の活性化ならびに PGG の JNK や p38 の活性化に対する作用を検討した。方法としては、ヒト線維芽細胞に CMA 化コラーゲンまたは PGG で処理したコラーゲンを 3 時間添加後の phosphorylated-p38 および phosphorylated-JNK の発現量をウエスタンブロット法にて評価した。その結果、PGG

は CMA 化コラーゲンによる p38 および JNK の活性化を顕著に抑制した (Fig. 6)。ゆえに、CMA 生成阻害化合物は、コラーゲンの CMA 化を抑制することで、CMA 化コラーゲンによる p38 および JNK の活性化を抑制し、結果的に線維芽細胞のアポトーシスを抑制することで、三次元培養におけるマトリックスの収縮率の低下を改善したものと考えられた。

4. 考 察

本研究により芍薬の AGEs 生成阻害作用が明らかとなり、その活性本体は化学構造中にガロイル基を有する Methylgallate, Galloylpaeoniflorin, Trigalloylglucose, Tetragalloylglucose, Pentagalloylglucose であることが明らかとなった。また、構造活性相関として、ガロイル基を

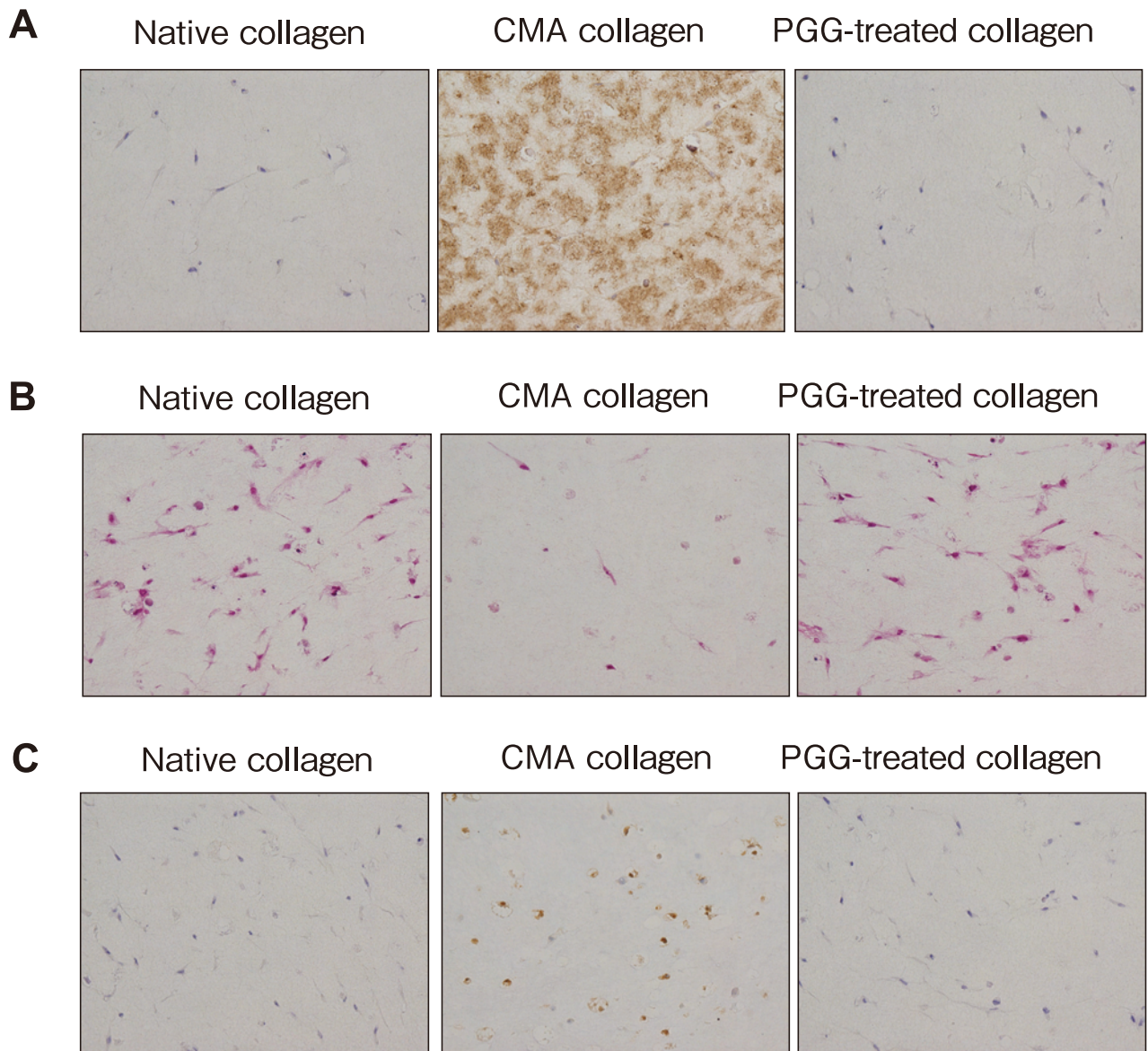


Fig.5 Effect of PGG on CMA Accumulation and Cell Viability in Collagen Matrix. CMA accumulation (A). HE staining of Fibroblast (B). Caspase-3 activation (C).

多くもつPentagalloylglucose (PGG) が最も阻害活性が強く、ガロイル基の数が減少していくにつれ活性が低下する傾向が認められたことから、ガロイル基の数がCMAの阻害活性に参与する可能性が示唆された。また、PGGは線維芽細胞の三次元培養において、コラーゲンのCMA化に伴うコラーゲンマトリックスの収縮率の低下を改善した。この収縮率改善メカニズムは、CMA生成阻害化合物がコラーゲンのCMA化を抑制することで、結果的にCMAコラーゲンにより誘導されるアポトーシスシグナルの一つであるMAP kinase (JNK, p38) シグナルの抑制を介した線維芽細胞のアポトーシス抑制によるものであることが明らかとなった。本研究にて、生薬「芍薬」および、芍薬に含まれる成分の皮膚老化改善作用および、その作用メカニズムを解明したことで、CMAが皮膚老化改善作用における新たなターゲット分子として重要であることが示された。本研究ではCMAコラーゲンが引き起こすと考えられる病態や老化症状のうち、特に皮膚老化に注目して研究を行ったがCMAコラーゲンは皮膚老化のみならず骨粗鬆症や糖尿病合併症の原因物質であることも考えられているため、今後さらにCMAの生体に及ぼす影響が明らかになることで、CMA阻害剤の重要性が高まり、本研究で得られた知見やCMA阻害化合物の社会的利用価値が高まることが期待される。

謝 辞

当該研究テーマおよび関連テーマの実施に際して、グラントサポート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深謝します。

(引用文献)

- 1) Fujiwara Y, Kiyota N, Hori M, Matsushita S, Iijima Y, Aoki K, Shibata D, Takeya M, Ikeda T, Nohara T, Nagai R, : Esculeogenin A, a new tomato sapogenol, ameliorates hyperlipidemia and atherosclerosis in ApoE-deficient mice by inhibiting ACAT., *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **27**, 2400-2406, 2007.
- 2) Fujiwara Y, Hayashida A, Tsurushima K, Nagai R, Yoshitomi M, Daiguji N, Sakashita N, Takeya M Tsukamoto S, Ikeda T, : Triterpenoids Isolated from Zizyphus jujuba Inhibit Foam Cell Formation in Macrophages. *J Agric Food Chem*, **59**, 4544-4552, 2011.
- 3) Fujiwara Y, Kiyota N, Tsurushima K, Yoshitomi M, Horlad H, Ikeda T, Nohara T, Takeya M, Nagai R, : Tomatidine, a tomato sapogenol, ameliorates hyperlipidemia and atherosclerosis in apoE-deficient mice by inhibiting ACAT. *J Agric Food Chem*. **60**, 2472-2479, 2012.

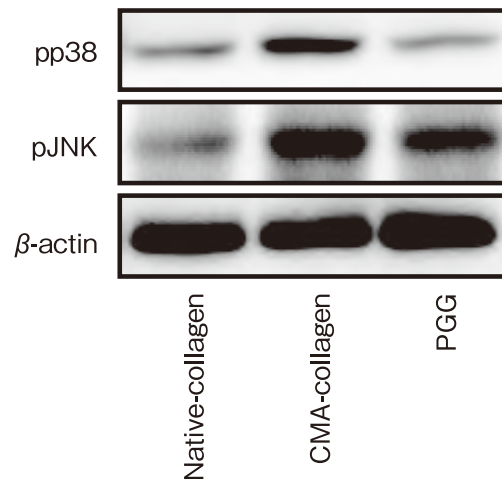


Fig.6 Effect of PGG on MAP Kinase (p38 and JNK) Activation.

Human dermal fibroblasts were incubated for 3 hours with 400µg/ml CMA-collagen, native collagen or PGG (30µM) -treated collagen. The phosphorylation of p38 and JNK were analyzed by western blotting analysis.

- 4) Fujiwara Y, Komohara Y, Ikeda T, Takeya M, : Corosolic acid Inhibits Glioblastoma Cell Proliferation by Suppressing the Activation of STAT3 and NF-κ B in Tumor Cells and Tumor-associated Macrophages., *Cancer Sci*. **102**, 206-211, 2011.
- 5) Fujiwara Y, Komohara Y, Kudo R, Tsurushima K, Ohnishi K, Ikeda T, Takeya M, : Oleonic acid inhibits macrophage differentiation into the M2 phenotype and glioblastoma cell proliferation by suppressing the activation of STAT3. *Oncol Rep*, **26**, 1533-1537, 2011.
- 6) Horlad H, Fujiwara Y, Takemura K, Ohnishi K, Ikeda T, Tsukamoto H, Mizuta H, Nishimura Y, Takeya M, Komohara Y : Corosolic acid impairs tumor development and lung metastasis by inhibiting the immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells. *Mol Nutr Food Res*. in press.
- 7) Matsuse T, Ohga E, Teramoto S, Fukayama M, Nagai R, Horiuchi S, Ouchi Y, : Immunohistochemical localisation of advanced glycation end products in pulmonary fibrosis. *J Clin Pathol*. **51**, 515-519, 1998.
- 8) Shimasaki S, Kubota M, Yoshitomi M, Takagi K, Suda K, Mera K, Fujiwara Y, Nagai R, : N^w-(carboxymethyl) arginine Accumulates in Glycated Collagen and Klotho-deficient Mouse Skin. *Anti-Aging Medicine*, **8**, 82-87, 2011.
- 9) Alikhani Z, Alikhani M, Boyd CM, Nagao K, Trackman PC, Graves DT, : Advanced glycation end products enhance expression of pro-apoptotic genes

- and stimulate fibroblast apoptosis through cytoplasmic and mitochondrial pathways. *J Biol Chem*, **280**, 12087-12095, 2004.
- 10) Morita K, Urabe K, Moroi Y, Koga T, Nagai R, Horiuchi S, Furue M, : Migration of keratinocytes is impaired on glycated collagen I. *Wound Repair Regen*. **13**, 93-101. 2005.
- 11) Alikhani M, Maclellan CM, Raptis M, Vora S, Trackman PC, Graves DT, : Advanced glycation end products induce apoptosis in fibroblasts through activation of ROS, MAP kinases, and the FOXO1 transcription factor. *Am J Physiol Cell Physiol*. **292**, C850-856. 2007.
- 12) Nagai R, Ikeda K, Higashi T et al, Hydroxy radical mediates N epsilon-(carboxymethyl) lysine formation from amadori product. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 234 : 167-172.

表面が制御された徐放性ナノチューブカプセルの化粧品への応用

産業技術総合研究所・ナノシステム研究部門・形態機能ナノシステムグループ

増田 光俊

We reported encapsulation of synthetic perfumes (eugenol and *d*-limonene) into cylindrical nanospace of organic nanotubes, so called "ONTs". ONTs are self-assembled from tube forming glycolipids, their hydrophobized analogues, and these mixtures. As results, we prepared ONTs with both -COOH, -COOMe, and hydrophobic carbobenzoxy groups localized on cylindrical nanochannels. The ONTs are able to capture the perfumes in their hollow cylinders by capillary force upon addition of ethanolic perfume solutions. The ONT having inner surface covered with -COOH or with -COOMe exhibited high encapsulation efficiency for eugenol. On the other hand, the ONT showed moderate encapsulation efficacy for limonene. These results indicated the efficiency should be relevant to hydrogen bond formation between -OH groups of eugenol and oxygen atoms of the -COOMe on inner surface. The release of eugenol from the ONT was accelerated by hydrophilic inner surface of the nanochannels and also by high humidity of atmosphere, indicating suitable for functional release of perfumes. All these results showed that ONTs with optimized inner surface are promising nanocapsules for cosmetic applications.

1. 緒言

化粧品をはじめ医療、製薬、食品、農薬、畜産などの幅広い産業分野において、有効成分を必要な場所で必要に応じて放出する技術の重要性が注目されはじめており、このための機能性ナノカプセルやマイクロカプセルなどが数多く報告されてきた¹⁾。このようなカプセルの多くは球状の微粒子やミセル、そして中空のリボソームなどであった。一方、我々は脂質が自己集合してチューブ状ナノ構造（有機ナノチューブ、Organic nanotube、以降「ONT」と記述）を形成することに着目した研究を行っている²⁻⁴⁾。このONTはナノカプセルとして理想的な中空ナノ空間と開端部を持つため、薬物の包接や放出に優れていると考えられ、これまでに以下の点について明らかにしている。

- ①水に良分散で長期安定性に優れる。
- ②外表面が異なる官能基で被覆された非対称なチューブ構造では、内径（約6～80nm）、長さ（約100nm～数 μ m）、内外表面の電荷（正負）や疎水性を制御できる。
- ③薬物、タンパク質、DNA等のゲストを混合するだけで静電相互作用などにより効率的にカプセル化し、これらを安定化する。
- ④上記③のカプセル化物において外部刺激等に応じてゲストを放出できる。

これらの特性は、香料等の化粧品有効成分のための機能

性ナノカプセルとしての利用にも期待できるものである。

本研究ではONTの化粧品用ナノカプセルへの用途の可能性を探るため、まずは香料成分のカプセル化特性を検討した。次に得られた香料／ONTカプセル体からの香料放出挙動について、ONT内表面の親水／疎水性、また放出雰囲気湿度とともに評価した（図1）。

従来のナノカプセルの代表例として界面活性剤が形成するミセルや大環状分子のシクロデキストリン（CD）が挙げられる。ミセルは流動的な集合体であり、化合物によっては低温で結晶化・沈殿するなどの課題がある。また厳密には中空構造を持たない。一方、CDは安定な空孔を持つが、そのサイズが1nm以下であるため、カプセル化される分子に限界があった。ONTは固体状のカプセルで、CDの約10倍以上のサイズを持つ。また用いる分子の構造によってチューブ口径やチューブ内表面も制御できるため、疎水性で水に難分散性の化粧品有効成分のカプセル化にも最適であると考えられる。

2. 実験

カプセル化する香料成分として*d*-リモネン（LN）、オイゲノール（EL）を用いた。またカプセル化に用いる有機ナノチューブ（ONT）として、チューブ形成脂質**1**、**2**、および**1**と**3**の混合物（モル比=10/2）の自己集合によってそれぞれONT-1、ONT-2、ONT-1/3を得た。用いた脂質は既報より合成した^{5,6)}。これらの脂質をジメチルスルホキシド（DMSO）に加熱溶解後、冷却することで自己集合によってONTを形成させた。得られた分散液を透析してDMSOを除去し、その後の凍結乾燥によってONTを単離し以降の実験に用いた。

香料カプセル化

香料成分のカプセル化はONTへの毛細管現象によって



Cosmetic application of sustained-release nanotubes capsules via surface control

Mitsutoshi Masuda

Morphofunctional Nanosystem Group,
Nanosystem Research Institute (NRI),
National Institute of Advanced Industrial
Science and Technology (AIST)

行った⁷⁾。すなわち凍結乾燥したONT (0.03mmol) にLNあるいはELのエタノール溶液 (20 mmol/EtOH 0.3mL) を加え30℃で20時間、あるいは72時間放置した。遠心分離により過剰のエタノール溶液を除去し、残渣を真空乾燥しながらその重量をモニターした。この乾燥はEL (沸点254℃) の場合80℃で、LN (沸点176℃) は23℃ (室温) で行った。最終的に得られた香料/ONTカプセル体について、核磁気共鳴スペクトル測定によりそのカプセル化量を求めた。すなわち脂質分子と香料のプロトンシグナルの積分より両成分のモル比を求め、カプセル化量とした。なお測定時 (60℃、重DMSO中、5mg/mL) にONTが完全に溶解することを確認している。また上記カプセル化後の有機ナノチューブについて、走査型電子顕微鏡 (日立S-4800) を用いて形態観察した。つまりTEM用カーボングリッドにナノチューブを滴下乾燥後、pH5に調製したリタングステン酸 (2%) を滴下することでネガティブ染色し、透過像 (Scanning transmission electron microscopic image, STEM image) によってチューブ形態とその内空間などの微細構造を可視化した。

香料放出実験

香料としてELをモデル化合物として用いた。それぞれのONT (15 mg) にELのエタノール溶液 (5mmol EL/0.75 mL EtOH) を加え、室温で3日間放置しカプセル化を行った。その後、100nm孔のPC濾過膜上でろ過、エタノールを用

いてONTをよく洗浄し、外表面のELを除去した。これを22℃で湿度8%、55%に制御したデシケーターに入れ、一定時間毎にONTを取り出し、EtOHに分散し遠心分離によってONTを分離後、UVにより残存するELを定量した。以上により放出量を求めた。なおデシケーター内の相対湿度はそれぞれNaOH飽和水溶液と55% Ca(NO₃)₂水溶液によって制御した。

3. 結果

チューブ形成脂質 **1**、**2**、および **1** と **3** の混合物 (モル比=10/2) より、それぞれONT-1、ONT-2、ONT-1/3を得た (図1)。チューブ外表面はいずれも親水性の1-グルコサミド残基で被覆されている。チューブ内表面はONT-1ではカルボキシル基 (-COOH基)、ONT-2ではメチルエステル基 (-COOMe)、ONT-1/3では-COOH基とカルボベンゾキシ基 (-Cbz基) で被覆されていることが既報を参考にして明らかにした⁵⁾。

単離後のONT-1の走査型電子顕微鏡像を図2に示す。いずれのONTでも内空間が染色剤によって黒いコントラストを与え、既報通り内径約8nm、外径約12~15nm、壁厚約3~4nm、長さ約100nm~1μm程度のチューブ構造を形成することを確認した。また上記の壁厚が伸びきった脂質分子の長さに対応していることから、ONTは1枚の単分子膜で形成されていることが判った。

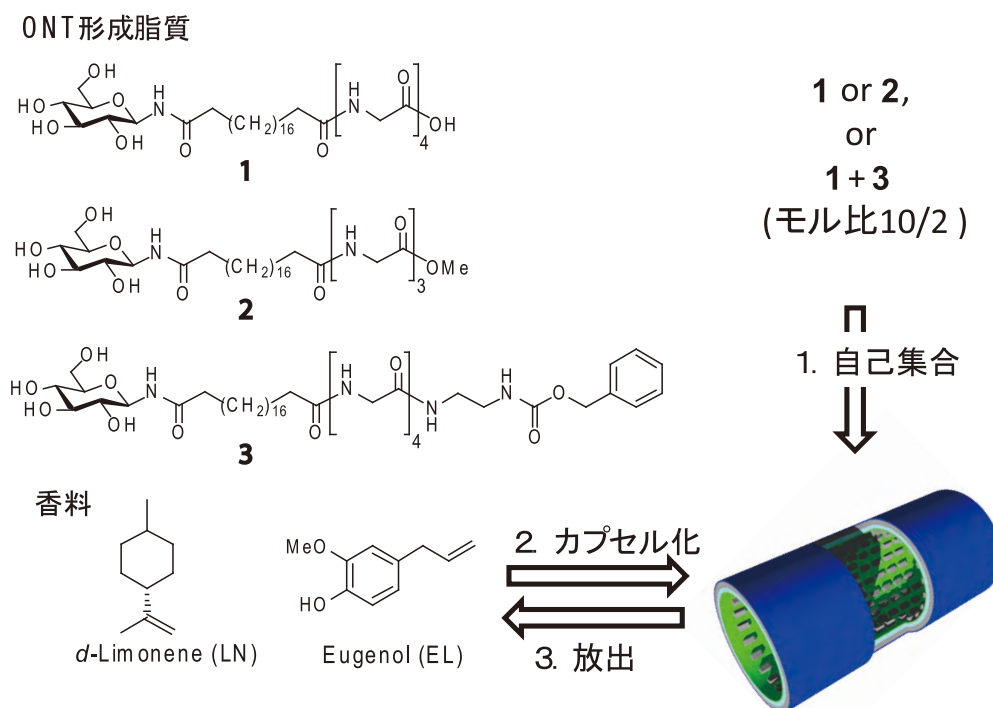


図1 左図：自己集合により内表面がカルボン酸性の有機ナノチューブを形成する脂質 **1**、内表面が疎水性のONTを形成する **2**、および **1** と混合して自己集合することで内表面を部分的に疎水性に変換する誘導体 **3**。右図：自己集合によるONT合成とカプセル化や放出に用いた *d*-リモネン (LN) とオイゲノール (EL)。

香料のカプセル化

毛細管現象を利用した香料成分のONTへのカプセル化を検討した。20時間のカプセル化工程によって香料成分導入後、真空下での重量減少特性を図3に示す。乾燥温度(LNは23℃、ELは80℃での真空乾燥)が異なるため比較は困難ではあるが、カプセル化量が比較的多いEL(図3右図。カプセル化の結果は表1)では、LNに較べてONTからの揮発による重量減少が遅いことがわかる。これはEL分子中の水酸基とONT内表面の-COOH基、-COOMe基とが水素結合を形成するためと考えられる。加

えてONT-1/3では、ELの芳香環とチューブ内壁のCbz基間の π - π 相互作用も寄与している可能性もある。

上述の減圧乾燥において重量がほぼ一定になった時点のカプセル化された香料として定量した。すなわち核磁気共鳴スペクトル測定により、それぞれのONTへのカプセル化量をチューブ形成脂質に対するLNとELのモル比やそれらを重量比に換算した値を表1に示した。いずれのONTでもELのカプセル化量が多い。特に内表面が疎水性の-COOMe基で被覆されたONT-2では、最大のカプセル化量(約1.4モル等量)を示した。一方、親水性のONT-1

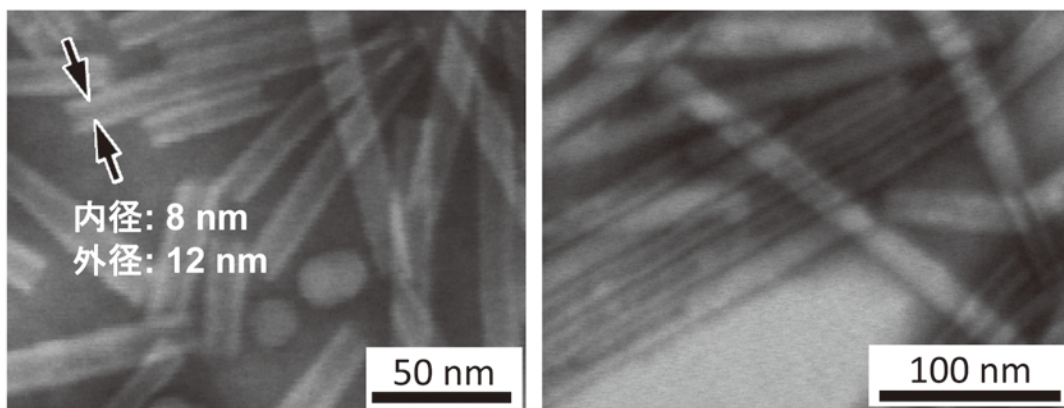


図2 左図:調製したONT-1(左図)およびELカプセル化後のONT-1/3の走査型透過電子顕微鏡像(右図)。いずれもネガティブ染色後の形態。

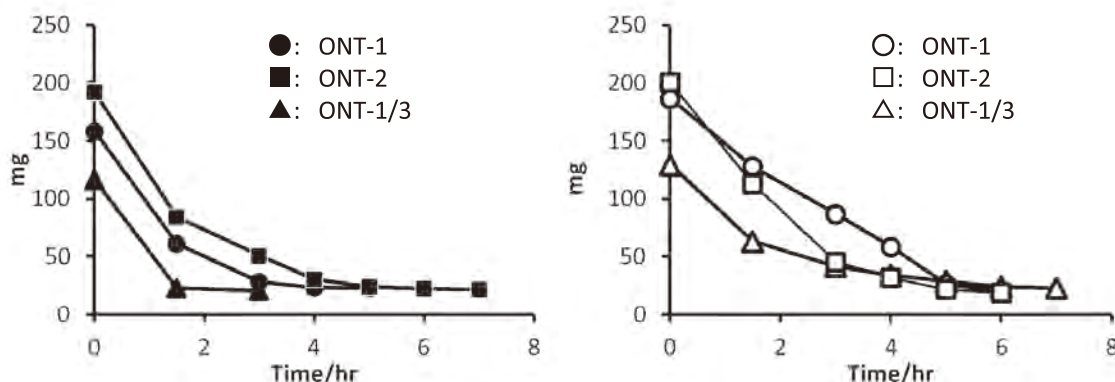


図3 リモネン(LN、左図)およびオイゲノール(EL、右図)の真空乾燥時の重量減少特性。LNは室温(23℃)、ELは80℃での乾燥。

表1 ONTにカプセル化されたLN、ELの量

ONT その脂質の分子量	ONT-1 731.4 g/mol		ONT-2 688.9 g/mol		ONT-1/3 760.8g/mol ^a	
香料	LN	EL	LN	EL	LN	EL
脂質に対する香料のモル比	0.37	0.83 (2.0)	0.18	1.39 (2.2)	0.10	1.10
ONTに対する香料の重量比	0.069	0.19 (0.46) ^b	0.036	0.33 (0.51) ^b	0.018	0.24

^a脂質1と3(907.5 g/mol)の混合モル比(10/2)より

^b括弧内の値は、カプセル化時間を72時間に変えた時のカプセル化率

(内表面が-COOH基)と部分的に疎水性のONT-1/3(内表面が-COOH基とCbz基)を較べると、後者のカプセル化が若干多いが、それでもチューブを形成している脂質分子に対し1.1モル等量、すなわち内表面に約1分子程度が吸着した量であった。なおカプセル化の前後での重量変化からカプセル化量を求めた場合も、上述のNMR法と良く一致していることを確認している。

またONT-1やONT-2について、カプセル化時間を20時間から、72時間にするとそのカプセル化量がさらに多くなった(表1、括弧内の値)。この様にカプセル化には、かなり長い時間を要することがわかる。

香料/ONTカプセル化体の形態についてSTEMによる観察を行ったところ、全ての場合においてカプセル化後もチューブ構造を保持していることが判った(図2、右図)。

オイゲノールの徐放

内表面が親水性のONT-1および疎水性のONT-2を用いてELの放出特性を異なる相対湿度下(5%、55%)で検討した(図4)。その結果、外部の相対湿度が低いほど、また内表面が疎水性であるほどその放出量が抑制されることがわかった。放出が一番早い親水性内表面のONT-1でも1週間で約90%のELを放出した。一方、徐放性に最も優れた疎水性内表面のONT-2では1週間後でも約50%、湿度が低い場合では約40%程度にまで放出が抑制されていた。

4. 考 察

香料カプセル化ではエタノール溶液を凍結乾燥したONTに毛細管現象で導入することにより、特にELでは20時間のカプセル化でチューブ形成脂質に対し等モル量程度、さらにカプセル化時間を72時間にすると2モル等量程度までの封入が可能であった。これを質量比に換算す

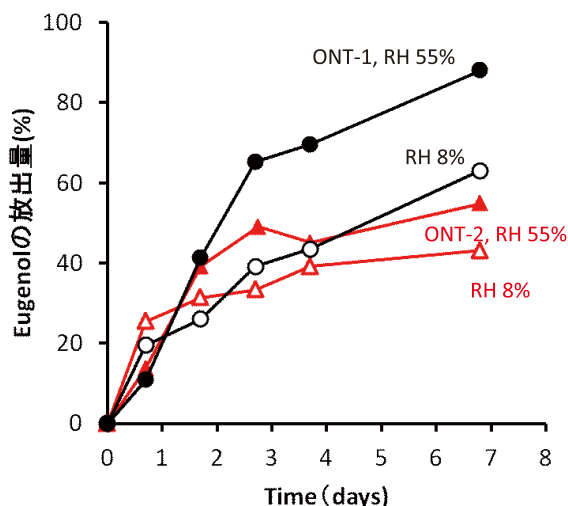


図4 ONT-1とONT-2からのELの放出特性の湿度依存性

ると、ONTに対してそれぞれ約33wt%、51wt%のELを保持できることになる。別途得られる類縁体の結晶構造から得た分子の充填パラメーターやSTEM像から得たチューブ径を基に、大まかな空孔率を求めると、1gの脂質からONTが形成できる内空孔の体積は0.3~0.5mLであった。もし脂質とELのモル体積(したがって密度)がほぼ同じであると仮定すれば、72時間のカプセル化ではほぼ全ての内空間をELで充填出来ていることが推測できる。また今回は固体として単離後のカプセル化量を求めたが、化粧品への用途を考えると水溶液中でのカプセル化量や保持能力の検討も今後必要であろう。

同様の検討例として吉井らは β -および γ -シクロデキストリン(β -および γ -CD)によるLNの包接で得られるカプセル化粉末において、1gのCDが保持できるLNは0.078g、0.126gであることを報告している⁸⁾。表1のONTに対するLNの重量比と比較すると、ONT-1が β -CDとほぼ同等(0.069g)であることが判る。一方、阿部らはドデシル硫酸ナトリウム(SDS)からなるミセル水溶液への香料の可溶化を検討している⁹⁾。その結果、1モルのSDS水溶液に可溶化されるLNのモル量(本報告のモル等量と同義)は0.11(ONT-1では0.37モル量)、ELでは1.9(ONT-2では2.2モル量)となり、ONTが若干多い。しかし阿部らの可溶化は水溶液中であり、ONT系も同様な条件で検討するべきである。

一方、ONTからのELの放出はチューブ内表面を疎水性から親水性に変化させることによって放出速度を抑制することが出来た。また内表面が親水性のONT-1では外部雰囲気相対湿度の上昇と共にELの放出速度が加速されることがわかった。これはONT-1が毛管現象で雰囲気中の水分を取り込む結果、内包していたELを放出し易くなることに起因している可能性が考えられる。この特性は発汗時の香料の加速的放出につながるため、化粧品ナノカプセルとしても適している。

5. 総 括

本研究ではONTの包接化を評価するため、毛細管現象によるオイゲノールやリモネンのカプセル化を検討し、効率的な香料のカプセル化を達成した。しかしその効率性はゲスト化合物や用いるONTの種類、またカプセル化条件によって大きく変化するため、他の化合物についても最適化を含めた検討が必要である。これら香料の放出では、発汗時を想定した高湿度下での香料の放出加速が出来た。今後は、使用前の香料保持技術が必要となるであろう。また今回はゲストカプセル化によるその安定化効果が未検討であり、これらの点も今後の課題である。

今回の研究では、ONTが香料をカプセル化し、その放出制御も出来ることを明らかにしてきた。化粧品への本格的

な実用化には、上述の保持技術に加え、安全性、安定性、コストなどの多くの課題を克服する必要がある。我々が開発してきた表面の特性やその内径サイズが異なる様々なONTの一部について、現在、試薬会社を通じた研究用試薬としての販売に加え、試料提供も行っている。これらと呼び水とした共同研究によって、化粧品分野への実用化を加速していきたい。

(文 献)

- 1) マイクロ/ナノ系カプセル・微粒子の応用展開. シーエムシー出版: 2003.
- 2) Kameta, N.; Minamikawa, H.; Masuda, M., Supramolecular organic nanotubes: how to functionalize the inner nanospace and the outer space. *Soft Matter* **2011**, 7, 4539-4561.
- 3) 亀田直弘; 増田光俊; 清水敏美, *高分子論文集* **2010**, 67, 560-573.
- 4) 亀田直弘; 増田光俊, 「第三章脂質ナノチューブの合成と応用、非対称型内外表面をもつ脂質ナノチューブと包接機能」、*有機・無機・金属ナノチューブ～非カーボンナノチューブ系の最新技術と応用展開～*, 清水敏美; 木島剛編, フロンティア出版: 東京, 2008.
- 5) Ding, W.; Kameta, N.; Minamikawa, H.; Wada, M.; Shimizu, T.; Masuda, M., Hybrid organic nanotubes with dual functionalities localized on cylindrical nanochannels control the release of doxorubicin. *Adv. Healthcare Mater.* **2012**, 1, 699-706.
- 6) Kameta, N.; Ding, W.; Masuda, M.; Minamikawa, H.; Wada, M.; Shimizu, T. PCT/JP2012/058724, 「内表面疎水化有機ナノチューブ、および同ナノチューブを用いた薬剤カプセル化物」.
- 7) Yui, H.; Shimizu, Y.; Kamiya, S.; Yamasita, I.; Masuda, M.; Ito, K.; Shimizu, T., Encapsulation of Ferritin within a Hollow Cylinder of Glycolipid Nanotubes. *Chem. Lett.* **2005**, 34, 232-233.
- 8) Ysohii, H.; Kometani, T.; Furuta, T.; Watanabe, Y.; Linko, Y.-Y.; Linko, P., Formation of inclusion complex of cyclodextrin with ethanol under anhydrous conditions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1998**, 62, 2166-2170.
- 9) 徳岡由一; 阿部正彦, 香料を水に溶かすには. *表面* **1995**, 33, 397-404.

界面活性剤吸着膜の相転移で安定化する 「温度応答性エマルション」の研究

九州大学大学院理学研究院化学部門

松原 弘樹

In this study, we demonstrated that the adsorbed film of hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) shows a novel first-order phase transition between expanded and condensed films at the oil-water interface by using interfacial tensiometry and ellipsometry. The analysis of obtained experimental data indicated that the penetration of alkane molecules into the CTAB adsorbed film realized the condensed film formation of cationic surfactant due to the enhancement of dispersion interaction of hydrophobic chains without increasing electric repulsion between hydrophilic groups. Furthermore, it was also revealed that the condensed film formation was accompanied with the strong preferential adsorption of longer chain alkanes if the oil phase was composed of the mixture of alkanes. We extended these findings to control the stability of the oil-in-water (O/W) emulsions and found that the volume of the O/W emulsion was reduced to about 1/4 at the temperature very close to the expanded-condensed phase transition point, indicating that the condensed film formation remarkably unstabilized the O/W emulsions.

1. 緒言

九州大学 界面物理化学研究室では、独自の熱力学的手法を用いた界面吸着膜の研究をおよそ30年に渡って積み上げてきました。近年は、熱力学で得られた知見をもとに、①分光学的な研究手法を取り入れて分子レベルで吸着膜の描像を明らかにする、②吸着膜の状態制御を積極的に利用してコロイド化学の様々な分野で新しいアプローチを試みる方向へも研究を展開しています。今回、コスメトロジー研究助成に提案させていただいた、界面活性剤吸着膜の相転移で安定化する「温度応答性エマルション」の研究もそのような取り組みの一つです。

吸着膜相転移とは、温度、圧力、界面活性剤濃度などを変数として、吸着膜の物性が大きく変化することをいいます¹⁾。吸着膜の状態には、大きく分けると3次元の気体、液体、固体に対応する気体膜、膨張膜、凝縮膜の3つの状態が存在することが分かっています。不溶性単分子膜の相転移はこれまでも沢山の研究例がありますが、“可溶性”界面活性剤の吸着膜相転移を用いるメリットは、温度などの実験条件をわずかに変えるだけで転移的に界面の状態を制御できる点にあります。これは乳化系の安定性をコントロールするという目的には大変魅力的だと思われます。

しかし一方で、吸着膜のデメリットとして、一般に乳化に用いられる水(油)への溶解性が高い界面活性剤は、その高い溶解性のために界面に吸着しにくく凝縮膜を形成し

にくいということが挙げられます。乳化への応用を考える場合、吸着膜の密度はある程度高くないといけないので、相転移を安定性のスイッチとするには膨張膜と凝縮膜を研究の対象にできなければいけません。

今回の研究のアイデアは、陽イオン性界面活性剤を長鎖アルカンと一緒に界面に吸着させ、吸着膜をアルカンと界面活性剤の混合吸着膜と考えるというものです²⁻⁴⁾。つまり、界面活性剤の吸着量としては膨張膜程度の密度しかない場合でも、アルカン分子が疎水性相互作用によって吸着膜にうまく取り込まれれば、全体の炭化水素鎖密度は凝縮膜に近い状態を実現できるのではないかと考えたのです。結論から述べると、この方法は鎖長の異なるアルカンが混合して油相を形成している場合に特に有効であることが分かりました。また、混合吸着膜の相転移の前後で可溶化量に大きな変化が現れることも分かってきました。以下、これらの実験の詳細についてご紹介したいと思います。

2. 実験

陽イオン界面活性剤には臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム(鎖長16、以下CTABと略記)を用いました。これは炭化水素鎖がある程度長い方が疎水性相互作用でアルカンを吸着膜に取り込むという目的に合っているだろうという期待からです。長鎖アルカンとしては、ドデカン(鎖長12)、テトラデカン(14)、ヘキサデカン(16)を用いました。CTABはアセトンとエタノールの混合溶媒から再結晶し、アルカンは減圧蒸留しました。純度はそれぞれ界面張力測定とガスクロマトグラフィーで確認しました。

具体的な実験は次のように行いました。

まず初めに、それぞれのアルカンと水の界面にCTABを吸着させ、CTAB濃度 m を一定にして界面張力 γ を温度の関数として測定しました。界面活性剤の吸着挙動を研究する場合、温度(と圧力)を一定にして界面活性剤の濃



Condensed film formation of cationic surfactant at the oil-water interfaces and its application to emulsion stability

Hiroki Matsubara

Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Kyushu University

度を変えるのが一般的です。これは

$$\Gamma^H = -\frac{m}{2RT} \left(\frac{\partial \gamma}{\partial m} \right)_{T,p} \dots (1)$$

の関係から界面活性剤の吸着量 Γ^H を求めるのが主な目的ですが、界面活性剤とアルカンの混合吸着膜の相転移では、アルカンが吸着膜に侵入することによって凝縮膜が形成されると予想しているため、実際に相転移が起こったとしてもCTAB自身の吸着量にはほとんど変化が現れない可能性が考えられます。そこで今回は吸着膜状態の変化は、吸着にともなうエントロピー変化

$$\Delta S^H = -\left(\frac{\partial \gamma}{\partial T} \right)_{p,m} \dots (2)$$

から確認する方がよいと判断しました⁵⁾。

また、アルカンと界面活性剤を合わせた吸着量について大まかな見積もりを得るためにアルカン/水界面での位相変調エリプソメトリーも行いました。この手法は、アルカン/水界面に位相に変調をかけながらp偏光を入射し、反射光の強度を測ります。これをブリュースター角で行うと、エリプティシティーという実験量が求まります⁶⁾。

$$\bar{\rho} = \frac{\pi}{\lambda} \frac{\sqrt{\varepsilon_1 + \varepsilon_2}}{\varepsilon_1 - \varepsilon_2} \eta \dots (3)$$

ここで ε_1 と ε_2 は溶媒の誘電率で、 λ はレーザーの波長です。エリプソメトリーでは η に吸着膜の密度(厚み)に関する情報が含まれます。もし吸着膜が誘電率 ε 、厚さ d の等方的な膜だとすれば、これは

$$\eta = \frac{(\varepsilon - \varepsilon_1)(\varepsilon - \varepsilon_2)}{\varepsilon} d \dots (4)$$

となります。この仮定は吸着膜が膨張膜の状態にあるときに良く成り立ちます。一方、凝縮膜のように界面垂直方向と水平方向で誘電率に違いが生じるような場合には、誘電率の異方性を考慮して

$$\eta = \left\{ \frac{(\varepsilon_e - \varepsilon_1)(\varepsilon_e - \varepsilon_2)}{\varepsilon_e} - (\varepsilon_0 - \varepsilon_e) \right\} d \dots (5)$$

という式を用います⁷⁾。(4)、(5) いずれの場合でも、吸着膜の誘電率に主に寄与しているのは界面活性剤とアルカンの炭化水素鎖部分であると仮定すれば、 d が吸着膜内の炭化水素鎖の総量を反映していると考えられます(より正確に $\bar{\rho}$ の内容を検討したい場合には、親水基や対イオンの層について別個に ε と d を定め、これを差し引くこともできます)。

二成分のアルカンを混合して油相に用いた実験では、油相でのアルカン組成 x_2 を新たに変数として設定しました。

このとき第二成分は混合したアルカンの内、鎖長の長いものを取っています。実験の操作はアルカンを単独で用いた場合と同じですが、アルカン混合系では

$$\Gamma_{2,r}^H = -\frac{x_1 x_2}{RT} \left(\frac{\partial \gamma}{\partial x_2} \right)_{T,p,m} \dots (6)$$

という関係式を使うことができます⁸⁾。これは相対吸着量と呼ばれ混合した二種類の溶媒成分の内、どちらが優先的(相対的)に界面領域に分布しているかを測る指標です。ただしこの式は溶媒成分の活量を考慮しない形になっていることに加え、熱力学で求まる吸着量が過剰量という性質を持っているため、必ず $x_2=0$ と 1 では $\Gamma_{2,r}^H=0$ とならなければならないという制約があり、溶媒の吸着量の定量的な評価には使えません。

最後に、アルカン単独系、アルカン混合系における吸着膜相転移のデータをもとにして、膨張膜領域と凝縮膜領域、それぞれの温度で作成したエマルションにどのような違いがあるのかを調べました。この実験は、同じ体積のアルカンとCTAB水溶液をある決められた温度に設定した恒温槽に浸けて1時間放置し、ボルテックスミキサーで1分間攪拌、恒温槽に戻して乳化相(層)の体積が時間とともにどう変わっていくかを観察するという方法で行っています。この実験ではCTABの濃度は臨界ミセル濃度(1 mmol kg⁻¹)のおよそ3倍としました。

3. 結果と考察

図1はアルカン単独系の界面張力とエリプティシティーの測定結果を示しています。CTABの濃度はいずれも0.6 mmol kg⁻¹です。これをみると、ドデカン/水界面では2.7℃、テトラデカン/水界面では10.7℃で界面張力—温度曲線に明確な折れ曲がりが見られ、ほぼこれに対応する温度でエリプティシティーが不連続に減少することが分かります。界面張力—温度曲線の傾きに(2)式を適用すると、高温側で ~ -0.1 、低温側では $-0.9 \text{ kJ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ という値が得られます。吸着にともなうエントロピー変化は、界面活性剤が吸着膜にある場合と水溶液中にある場合の部分モルエントロピーの差に相当しますので、低温側でこの値がより大きな負の値であることは、折れ曲がり点を境にして秩序性の高い吸着膜が形成されたことを示唆しています。これらの値を以前に得られた文献値と比較すると、確かに前者は膨張膜、後者は凝縮膜に対応していることが確認できます^{2,4)}。

(3) ~ (5) 式を使ってエリプティシティーの値を解釈するには、吸着膜の誘電率や厚みとしてどのような値を採用するかという点で任意性が生じます。特に混合膨張膜の場合、バルクのアルカン相と吸着膜の炭化水素層の誘電率はかなり近い値であると予想されますので、説得力のある説

明をするのは難しいと思われます。しかし、(4) 式と (5) 式の第 1 項がキャンセルすると考えれば、混合膨張膜と混合凝縮膜のエリプティシティーの差 $\Delta\eta$ に関してはある程度正確な見積もりができます。例えば、固体のアルカンのデータを使って ε_0 と ε_d を決め、実験で得られた $\Delta\eta$ を与えるように d を決めると、これがオールトランス配向のドデカンとヘキサデカンの長さの範囲にきちんと収まります。

以上の実験データから、長鎖アルカンと陽イオン界面活性剤水溶液の界面では予想した通り、アルカンと界面活性剤の混合凝縮膜が出来ることが明らかとなりました。相転移温度がドデカン系よりもテトラデカン系で 8°C 程度高くなることは、CTAB との炭化水素鎖長のマッチングが良

くなることによって吸着膜内での分子間相互作用が強くなっていることを示しています。これに則って考えるとヘキサデカン系が最も凝縮膜形成に有利であるはずなのですが、この場合は吸着膜が相転移を起こす前にヘキサデカンの融点 ($\sim 17^\circ\text{C}$) に到達してしまうために、ヘキサデカン単独系では相転移を観測することができません。

図 2 にはテトラデカンとヘキサデカンの混合物を溶媒に用いた場合の、吸着膜の相転移温度と混合物の融点をプロットしています。二つの曲線は $x_2=0.8$ で交わっており、この組成まではヘキサデカンを加えることで単調に相転移温度が上昇しています。これを踏まえるとやはり界面活性剤とアルカンの炭化水素鎖長が等しい場合が最も凝縮膜形

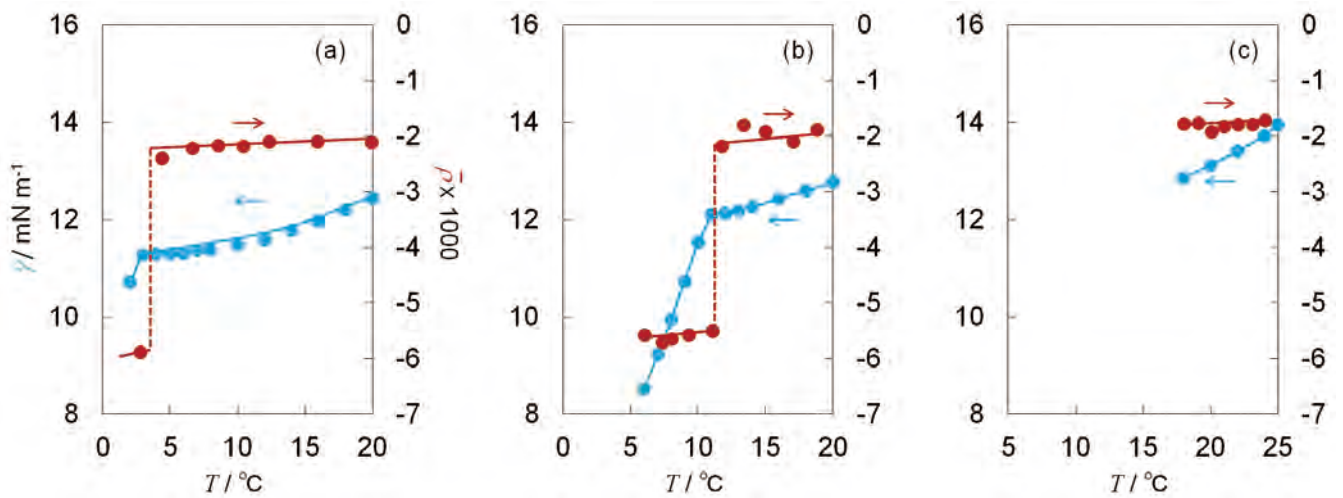


図 1 アルカン / CTAB 水溶液界面での界面張力とエリプティシティーの温度変化。(a), (b), (c) はそれぞれ C12, C14, C16 をアルカン相に用いた場合の結果を示している。

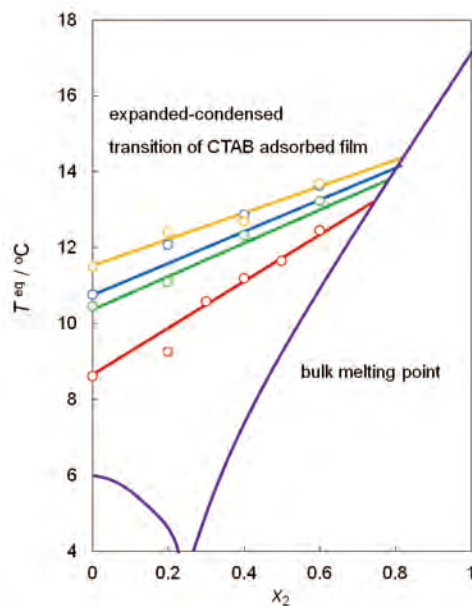


図 2 C14 - C16 混合系における CTAB 吸着膜の相転移温度を油相中の C16 の組成に対してプロットしたもの。CTAB 濃度は下から上に行く順番に 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mmol kg^{-1} 。一番下の曲線は油相の融点曲線を示す。

成には有利であると言えます。

そこで次に、アルカン混合物を溶媒に用いた場合には、混合凝縮膜はどのような組成で構成されるのか？という疑問が生じることとなります。図3はCTAB濃度を0.6 mmol kg⁻¹で一定とし、アルカンの混合組成を変えて界面張力を測定した結果です。この図を使って、ほぼ全てのアルカン組成で吸着膜が混合膨張膜の状態である18℃と、混合凝縮膜である2℃（テトラデカンとヘキサデカンの組合せの場合は10℃）の界面張力について、(6) 式の関係を用いたものが図4です。図4をみると、2種類のアルカンの吸着膜内での分布には、混合膨張膜の状態ではほとんど偏りが見られませんが、混合凝縮膜の状態では鎖長が長い方の成分に大きく偏っていることがわかります。また、単成分で用いたときには混合凝縮膜を作らなかったヘキサ

デカンは、ドデカンと混合した場合、およびテトラデカンと混合した場合の両方で、凝縮膜には優先的に取り込まれています。やはり、界面活性剤と鎖長が等しいアルカンが凝縮膜形成に有利であると言えます。アルカン混合系で一方のアルカンが優先的に界面活性剤と混合凝縮膜を形成する傾向は、界面活性剤との鎖長の差が最も大きくなるドデカンとヘキサデカンの混合系で最も大きくなります（図4中央）。

ただし、実験でも述べたように、相対吸着量はアルカンの吸着量の大小関係に関する定性的な情報しか与えません。そこでここではこの問題をエリプティシティーが炭化水素鎖の全量を表すことから考えてみたいと思います。図5がアルカン混合系のエリプソメトリーの結果です。ここでは例としてテトラデカン—ヘキサデカン混合系の結果だけ

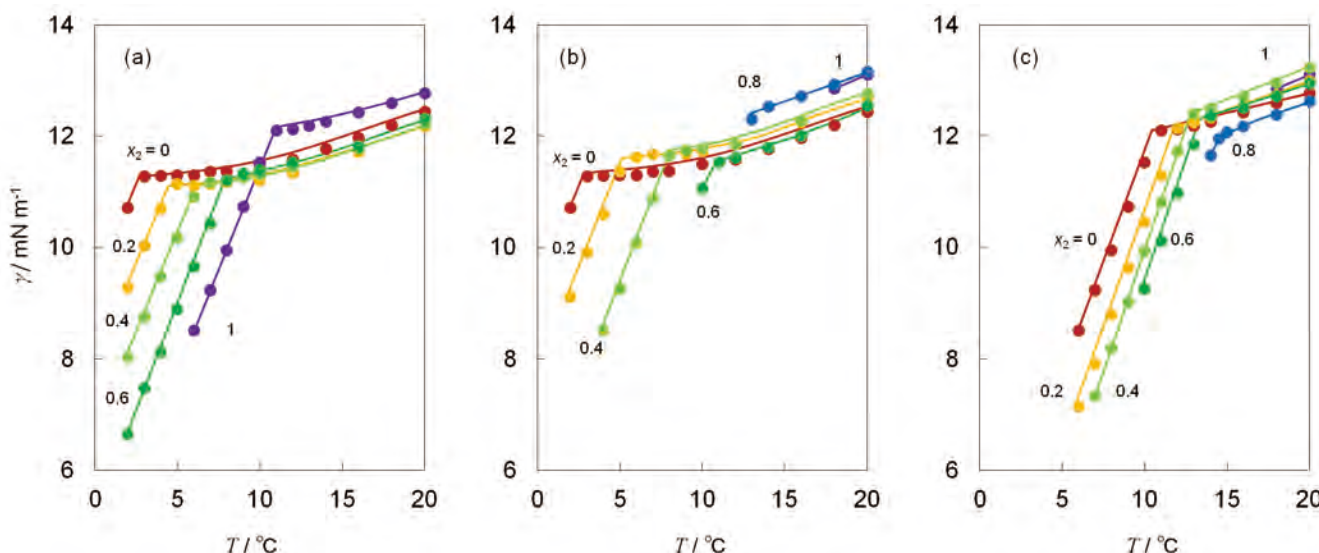


図3 界面張力のアルカン組成依存性。(a), (b), (c) はそれぞれ C12 - C14、C12 - C16、C14 - C16 混合系を示す。

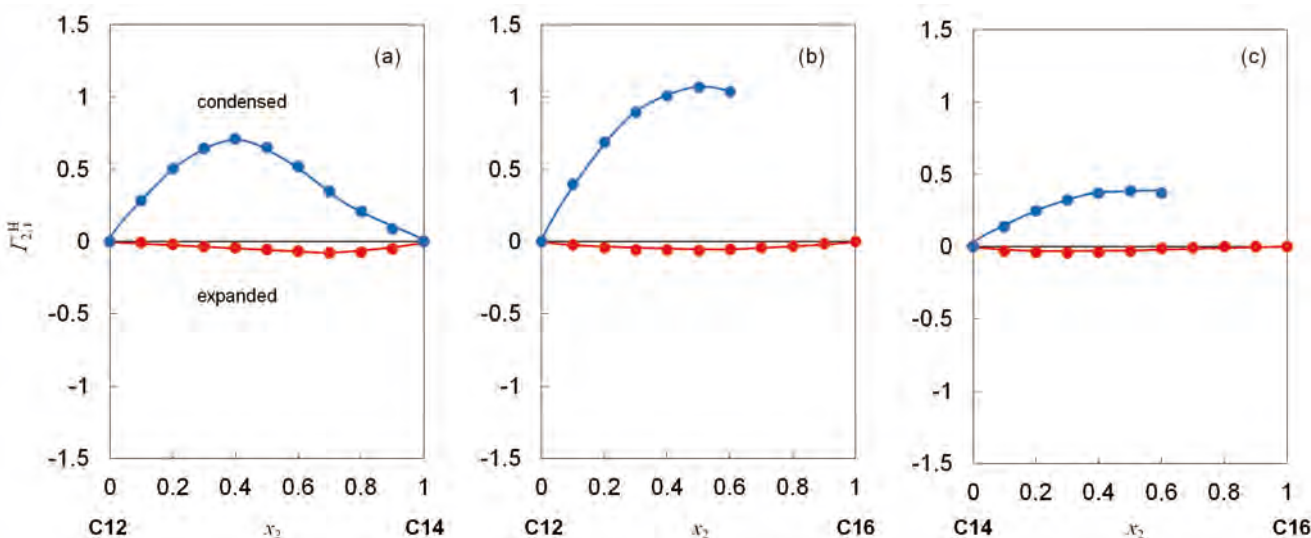


図4 C12 - C14、C12 - C16、C14 - C16 混合系の相対吸着量。

を示していますが、他の組合せでも定性的には同じ結果が得られています。アルカン単独系の結果は図1で見た通りです。重要な点はアルカン混合系の凝縮膜状態でのエリプティシティーが、 $x_2=0$ から0.2の間で大きく減少し、それ以降はアルカン組成によらずほとんど一定になっていることです。凝縮膜は炭化水素鎖がほぼ細密に充填された状態で、その炭化水素鎖密度はおおよそ $8\mu\text{mol m}^{-2}$ です。この値はオオルトランス配座をとったときの炭化水素鎖の断面積で決まるので、界面活性剤やアルカンの鎖長にはほとんど依存しません。したがって、 $x_2=0$ から0.2の間で観察されたエリプティシティーの減少は、炭化水素鎖長の長いアルカンが吸着膜に取り込まれたか、CTABの吸着量がこの組成を境に大きく増加したか、そのいずれかで説明されるはずですが。

ここではデータを示していませんが 18°C と 2°C で(1)式を使って見積もったCTABの吸着量は $0.2\mu\text{mol m}^{-2}$ しか変わりませんでした。つまり、ここでのエリプティシティーの減少は、炭化水素鎖長の長いアルカンが凝縮膜に優先して吸着することが原因であると結論できます。しかも、エリプティシティーの値が $x_2=0.2$ 以降はほとんど変わらないという事実は、バルク中に界面活性剤と鎖長のマッチングのよいアルカンが少量含まれているだけでも凝縮膜が形成できるということを示しています。

そこで最後に、ここで見てきた陽イオン界面活性剤の凝縮膜形成は現実的にコロイド分散系、ここでは水中油滴型

(O/W)エマルション、の物性に影響を与えるのか?という問題を考えたいと思います。図6はテトラデカンと 3mmol kg^{-1} のCTAB水溶液、それぞれ5mlを試験管に入れ、ボルテックスミキサーで1分間攪拌した後、恒温槽に静置したときの乳化相の体積(高さ)の時間変化を表しています。O/Wエマルションは 25°C では膨張膜、 10°C では凝縮膜によって表面が覆われていると考えることができます。図6からは、膨張膜状態では乳化相の体積が24時間後まではほぼ一定であるのに対し、凝縮膜状態では連続的に乳化相の体積が減少し、24時間後には25%程度になっていることが分かります。

O/Wエマルションの安定性の変化と相転移温度との対応関係をより正確に確かめるために、いくつかの x_2 を選んで、 $1\sim 2^\circ\text{C}$ の刻みで静置する温度を変え、調整から24時間後の乳化相の体積を調べたものが図7です。図中の矢印はそれぞれの条件での相転移温度を表しています。いずれの条件でもほぼ矢印と対応する温度で乳化相の体積に大きな変化が表れています。以上を総合すると、O/Wエマルションを覆っている膜が膨張膜から凝縮膜に相転移すると、O/Wエマルションは大きく不安定化するといえます。

今回の研究結果は、従来の陽イオン界面活性剤は膨張膜しか作らないという常識を、界面活性剤がアルカンと混合吸着膜を作るという発想で克服した点に大きな意義があります。また、凝縮膜形成がO/Wエマルションを不安定化する大きな要因にもなりえるという事実は、O/Wエマル

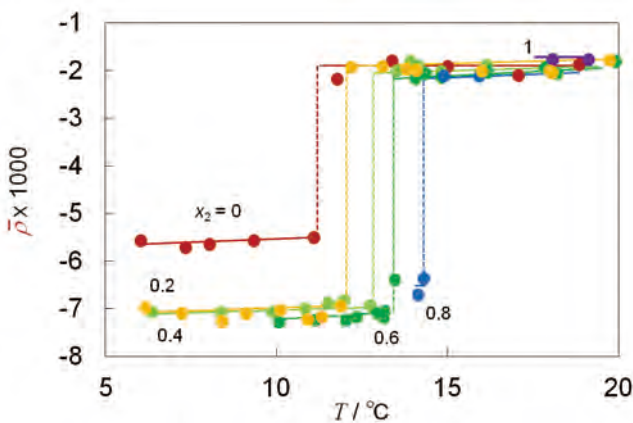


図5 C14 - C16 混合系のエリプティシティーのアルカン組成依存性。

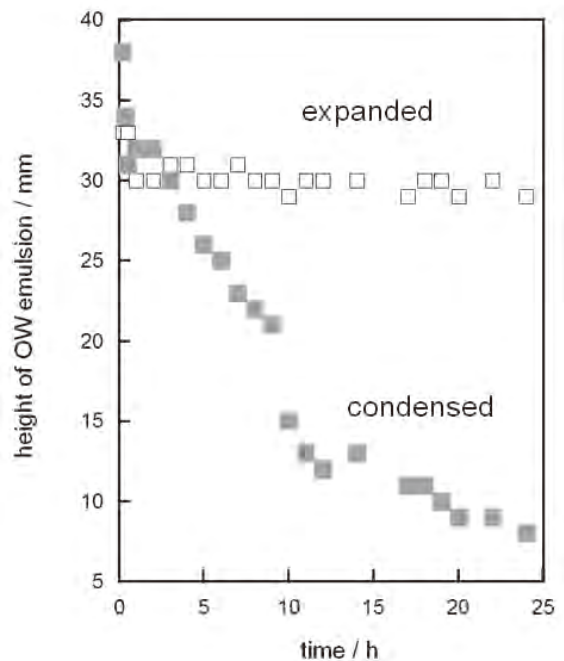


図6 乳化相の体積(高さ)の時間変化。油相にはC14を用いた。仕込みの水溶液相と油相の体積は共に5ml、CTAB濃度は 3mmol kg^{-1} 。攪拌前の液体全体の高さは約45mm。

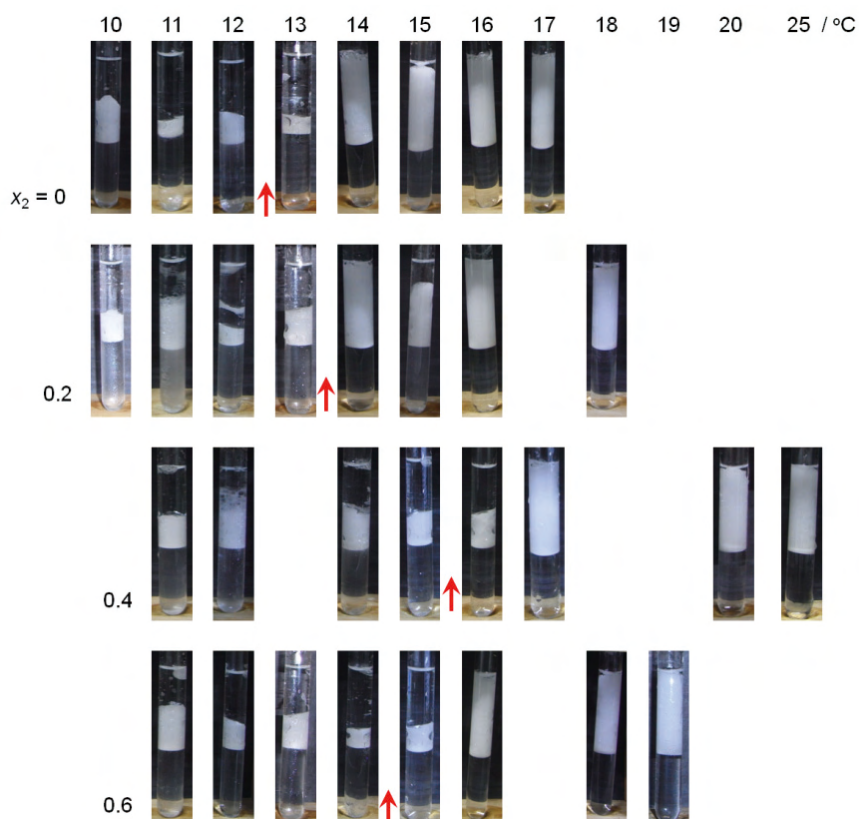


図7 温度と油相の組成を変数として調整から24時間後の乳化相の体積を記録したものの。CTAB濃度は 3 mmol kg^{-1} 。図中の矢印はCTAB吸着膜の相転移温度。

ションの安定性を考える上でこれまで気づいていなかった視点として重要かもしれません。特に混合溶媒系で、界面活性剤と鎖長のマッチングがよいアルカンが含まれている場合には凝縮膜形成を疑ってみる価値はあるのではないかと思います。現在は、①界面活性剤の種類を変える、②界面活性剤が2成分混合した系で凝縮膜形成が起こるとき界面活性剤自身の優先吸着は凝縮膜形成にどのような影響を及ぼすのかなどの点について研究を進めています。

(参考文献)

1) Matsubayasi N: Motomura K: Aratono M: Matuura R, Thermodynamic Study on the Adsorption of 1-Octadecanol at Hexane/Water Interface, Bull. Chem. Soc. Jpn., 1978, 51, 2800.
 2) Ohtomi E: Takiue T: Aratono M.: Matsubara H, Freezing transition of wetting film of tetradecane on tetradecyltrimethylammonium bromide solutions, Colloid Polym. Sci., 2010, 288, 1333-1339.
 3) Ohtomi E: Ikeda N: Tokiwa Y: Watanabe I: Tanida

H: Takiue T: Aratono M: Matsubara H, Thin-Thick Transition of Foam Film Driven by Phase Transition of Surfactant-Alkane Mixed Adsorbed Film, Chem. Lett., 2012, 41, 1300.

4) Lei Q: Bain CD, Surfactant-induced surface freezing at the alkane-water interface, Phys. Rev. Lett., 2004, 92, 176103.
 5) 荒殿 誠: 界面吸着、日本化学会編: コロイド化学II. 会合コロイドと薄膜、東京化学同人、1995, 10 - 47頁
 6) Drude, P: The Theory of Optics; Dover: New York, 1959; p 292.
 7) Casson BD: Bain CD, Determination of the Optical Properties of Monolayers on Water, Langmuir, 1997, 13, 5465.
 8) Motomura K: Iyota H: Ikeda N: Aratono M, Thermodynamic Study on Adsorption at Interfaces. VI. Interface between Cyclohexane-Benzene Mixture and Water, J. Colloid Interface Sci., 1988, 126, 26.

パウダーエマルジョンおよびパウダーフォームの安定化要因の解明

甲南大学理工学部機能分子化学科

村上 良

Colloidal particles can be irreversibly adsorbed at fluid interfaces, such as oil-water and air-water interfaces. The particle adsorption leads to stabilization of dispersed systems of two immiscible fluids and particle-stabilized, that is, Pickering-type emulsions and foams can be prepared. These materials show some unique properties as a result of adsorption of the particles at the fluid interface. One of the striking phenomena is that liquid drops can be dispersed in air with the liquid-air surfaces coated by liquid-repellent particles. When the liquid is water, a water-in-air material, named dry water, is produced by aerating water in the presence of extremely hydrophobic silica particles. The dry water is a free-flowing powder which can contain significant quantities of water as micron-sized drops. A powdered oil-in-water (o/w) emulsion, that is, oil-in-water-in-air (o/w/a) material is a dispersed system in which the continuous phase of a particle-stabilized o/w emulsion is dispersed in air by encapsulating the water globules with hydrophobic particles. During their preparation, oil droplets in water globules are forced to move due to high-shear mixing, leading to creaming of the oil droplets and possible wetting of the oil droplets on the hydrophobic particles which induces destabilization. In order to prepare powdered o/w emulsions efficiently, the extent of creaming of the oil droplets has to be suppressed. We describe how to achieve this by mixing two oils of different density and prepare powdered o/w emulsions from oil mixtures exhibiting a decreasing density difference with water. As the extent of creaming is reduced, enhanced stabilization of the powdered emulsions occurs. By applying the strategy used to stabilize the powdered o/w emulsions, a powdered aqueous foam, that is, air-in-water-in-air (a/w/a) material can be prepared.

1. 緒言

ナノ・マイクロサイズの微粒子は、界面活性剤と同様に油/水や空気/水界面などの流体界面に吸着し、エマルジョンや泡などの分散系の安定化剤として働くことが知られている¹⁻³⁾。微粒子で安定化された分散系において重要な因子は、微粒子の流体界面に対する濡れ性である。例えば、油と水を乳化する際に、比較的親水的な微粒子を乳化剤として用いた場合、oil-in-water (o/w) エマルジョンが形成され、比較的疎水的な微粒子を用いた場合は water-in-oil (w/o) エマルジョンが形成されることが知られている (Fig. 1 上段)¹⁻⁴⁾。一方、微粒子の存在下で水を空気と攪拌混合する際においても、比較的親水的な微粒子が用いられた場合は、air-in-water (a/w) 型の分散系 (すなわち泡) が、比較的疎水的な微粒子が用いられた場合は、water-in-air (w/a) 型の分散系が形成されることも示されている (Fig. 1 下段)²⁻⁵⁾。w/a 分散系はドライウォーターに代表され、流動性の高い粉体として振る舞うが (Fig. 2a)、多量の水を数 μm から数百 μm の水滴として含む分散系である (Fig. 2b)。さらに、液体が油の場合でも同様の原理が成り立つことが示されている⁶⁾。

純水中に有用物質を溶解させることにより、ドライウォーターを化粧品や医薬品において使用することが可能である⁷⁾。しかし、油溶性の有用物質を溶解させるためには、ドライウォーター中に疎水的な場を構築する必要がある。一方、水相を連続相とする o/w エマルジョンを疎水的な微粒子の存在下で空気と攪拌混合を行った場合に、oil-in-water-in-air (o/w/a) 型の分散系が形成されることが期待

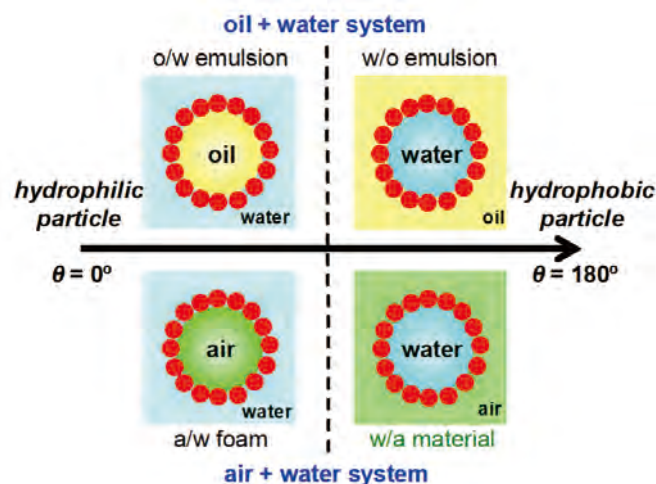


Figure 1 Dispersed systems prepared from fluid mixtures and colloidal particles. For oil-water mixtures (upper), emulsion drops of oil in water or water in oil are stabilized with hydrophilic or hydrophobic particles respectively. For air-water mixtures (lower), air-in-water foams or water-in-air powders can be likewise stabilized, as demonstrated here. The particle wettability is described by the contact angle θ the particle makes with the interface, measured through water. Reprinted from Ref. 4.



Studies on stabilization mechanisms of powdered emulsions and foams

Ryo Murakami

Department of Chemistry of Functional Molecules, Faculty of Science and Engineering, Konan University

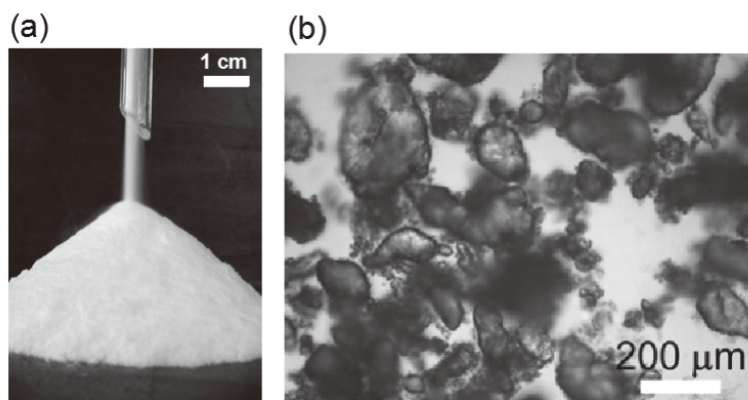


Figure 2 (a) Digital photograph of dry water. (b) Optical micrograph of dry water. Reprinted from Ref. 4.

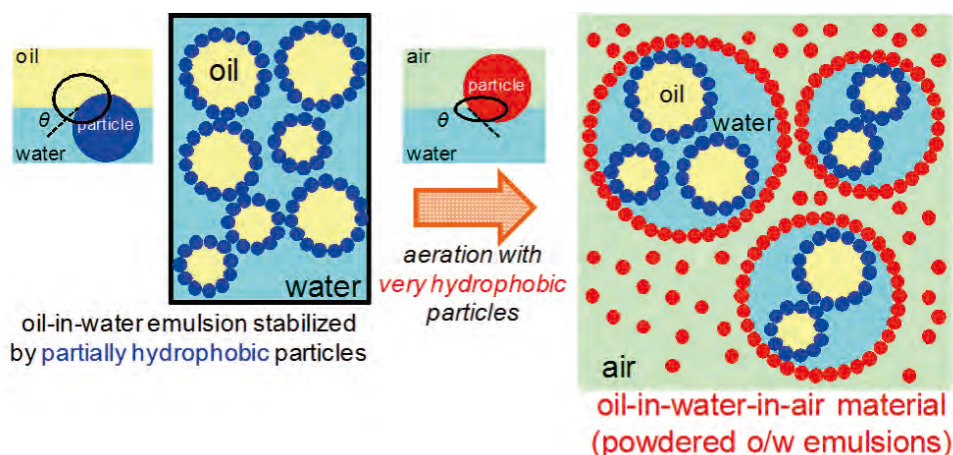


Figure 3 Preparation of oil-in-water-in-air materials. An oil-in-water emulsion stabilized by partially hydrophobic particles (blue) can be aerated by mixing with very hydrophobic particles (red). Oil-in-water-in-air materials consist of oil drops dispersed in water globules themselves dispersed in air, with very hydrophobic particles adsorbing at the air-water surfaces. Excess particles that are not adsorbed retain their powdery nature. Reprinted from Ref. 8.

される。Fig.3にo/w/a分散系の作製プロトコールを示す。o/w/a分散系の作製における問題点として、攪拌時に生じる遠心力によりo/wエマルジョン液滴中の油滴間の合一および油滴とエマルジョン滴の表面(空気/水表面)との合一が生じる可能性が挙げられる。したがって、エマルジョン液滴中の油滴の移動を抑制することが、o/w/a分散系の安定化における決定的因子であることが予想される。遠心力場(g)での水相中での油滴の移動速度(v)は、Stokesの式、 $v = d^2 \Delta\rho g / (18\eta)$ で見積もることが可能である。ここで、 d 、 η 、 $\Delta\rho$ は、それぞれ油滴の直径、水相の粘度、油と水の密度差を表す。我々は、 g および d の減少、また η の増加に伴う v の減少により、o/w/a分散系がより効果的に安定化されることを示した⁸⁾。o/w/a分散系は、10~20 μm の油滴を含む疎水性微粒子に覆われた数百 μm の水滴から成るが、流動性の高い粉体として振る舞うためパウ

ダーエマルジョンと呼んでいる。

本研究では、o/w/a分散系の安定化における決定的な因子が、作製時における油滴の移動の抑制であることを実証するために、未検討の因子である油と水の密度差 $\Delta\rho$ のo/w/a分散系の安定化に及ぼす効果について検討を行う。 $\Delta\rho$ を調節するために、相溶性があるが密度の異なる2種類の油を混合し、エマルジョンおよびo/w/a分散系を作製する。さらに、air-in-water-in-air (a/w/a)分散系(パウダーフォーム)の安定化に対して同様の研究を行うことにより、エマルジョンや泡の粉体化についての基礎原理の一般性を検討することを本研究の目的とする。

2. 実験

2.1 試薬

微粒子として、3種類の疎水性の異なるWACKER社の

ヒュームドシリカ (HDK N20 シリカおよび HDK H18 シリカ (Wacker 社より購入)、37% SiOH シリカ (Wacker 社 試供品)) を使用した。HDK N20 の一次粒子直径は約 20nm であるが、一次粒子が凝集し、融着した数百 nm の凝集物がこの微粒子としての最小単位である。比表面積は約 $200\text{m}^2\text{g}^{-1}$ である。HDK N20 は、微粒子表面の SiOH 基に由来して水に容易に分散することから、非常に親水的なシリカ粒子である。HDK N20 をアルキルシランで疎水処理を行ったヒュームドシリカが、HDK H18 である。疎水化されていない製造されたままのシリカ粒子の単位表面積当たりの表面 SiOH 基の数を基準として、疎水化されたシリカ粒子に残存している単位表面積当たりの表面 SiOH 基の数の比は、% SiOH として表される。HDK N20 は 100% SiOH を示すヒュームシリカ粒子であり、HDK H18 は約 25% SiOH を示すヒュームシリカ粒子である。HDK H18 シリカは、o/w エマルジョン滴をカプセル化するために用いられた。HDK N20 は、a/w/a 分散系を作製する際に、前駆体の泡に加えられ、水相の粘度を増加させるために用いられた。37% SiOH シリカは、アルキルシランで HDK N20 の表面の疎水化処理が行われた適度に疎水的なヒュームドシリカ粒子であり、油と水を乳化し、o/w エマルジョンの安定化を行う際に用いられた。

密度が異なるが相溶性のある油として、*n*-ドデカン、100cst のシリコンオイルを用いた。*n*-ドデカンは、塩基性アルミナが充填されたカラムに二回通されることにより精製された。シリコンオイルは精製せずそのまま用いた。Fig. 4 に振動管式密度計により測定された *n*-ドデカンとシリコンオイルの混合油の密度と純水の密度の差 ($\Delta\rho$) を、シリコンオイルの体積分率の関数として示す。シリコンオイルの体積分率の増加に伴い、 $\Delta\rho$ の値は、 0.248g cm^{-3} (純粋な *n*-ドデカン) から 0.033g cm^{-3} (純粋なシリコンオイル) に減少する。

2.2 実験方法

2.2.1 o/w/a 分散系の作製

16mL のガラスバイアル瓶に、粒子濃度が 1 wt% である 37% SiOH シリカ粒子水分散液を 5 mL 加えた。さらに、様々な混合比のドデカンとシリコンオイルの混合油を 5 mL を加え、全体積を 10 mL とした。この混合物を、ホモジナイザー (ULTRA-TRRAX T25 digital, IKA 社) を用いて 24000rpm で 2 分間の攪拌を行うことにより o/w エマルジョンを調製した。10mL の o/w エマルジョンに純水を 15mL 加え、全量を 25mL にした。この希釈された o/w エマルジョンを攪拌装置 (Labo Milser LM-PLUS, 大阪ケミカル社) のガラス容器に入れた。さらに疎水的なヒュームドシリカ (HDK H18) を 3.0g 加えた後、6000rpm の攪拌速度で攪拌・曝気を 15 秒間行った。

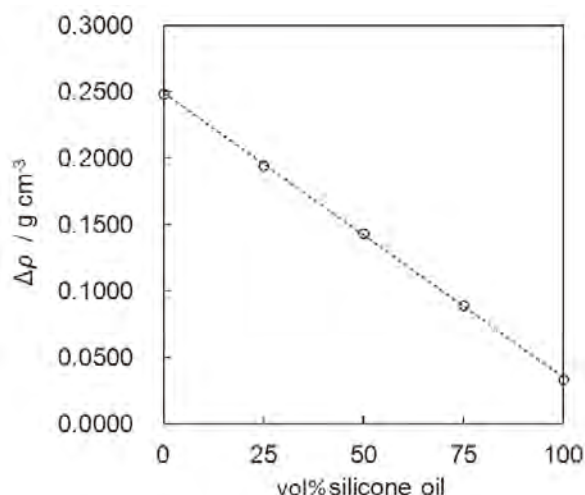


Figure 4 Density difference between water and oil mixtures ($\Delta\rho$) as a function of volume percent of silicone oil in mixtures with dodecane measured at 25°C. Reprinted from Ref. 10.

2.2.2 a/w/a 分散系の作製

攪拌装置 (ワーリング J-SPEC ブレンダー 7010BUJ タイマー, 大阪ケミカル社) の容積に対しての水の体積分率が 60% になるように水を加え、疎水的なヒュームドシリカ (HDK H18) を 0.408g 加えた。その後、攪拌速度 22500rpm で 3 分間連続で攪拌混合を行うと、catastrophic 転相に基づき泡が形成された。泡を 300mL のプラスチック製ボトルに入れた後、親水的なヒュームドシリカ (HDK N20) を水と粒子の総量に対して 0~8 wt% となるように加え、水相の粘度を調節した。泡を親水的な粒子の量を考慮した上で 25mL 測り取り、攪拌装置 (Labo Milser LM-PLUS, 大阪ケミカル社) のガラス容器に入れ、疎水的なヒュームドシリカ (HDK H18) を 3.0g 加えた後、攪拌速度 6000rpm で攪拌・曝気を 15 秒間行った。

2.2.3 o/w/a 分散系および a/w/a 分散系のキャラクターゼーション

攪拌・曝気により調製された試料をスライドガラスに載せ、油 (*n*-ドデカン) を加え、光学顕微鏡 (BX51, オリンパス社) より観察した。o/w/a 分散系および a/w/a 分散系に油を加えた場合、連続相が空気から油に置き換えられることが予想される。したがって、油の添加により、o/w/a 分散系が形成される場合は、oil-in-water-in-oil (o/w/o) 型のマルチプルエマルジョンが形成され、a/w/a 分散系が形成される場合は、air-in-water-in-oil (a/w/o) 型のマルチプルエマルジョンが形成されることが期待される。この手法により、もとの分散系の構造を推定した。また、光学顕微鏡による観察に基づき、平均油滴直径や平均水滴直径ならびに変動係数 (C.V. / %) を求めた。o/w/a 分散系に対しては、粉体の流動性の尺度となる安息角を測定した。

3. 結果および考察

3.1 密度差調節によるo/w/a分散系の安定化

光学顕微鏡写真から求められたo/wエマルションの油滴径とその変動係数の値をFig. 5に示す。 $\Delta\rho$ を調節し、エマルションを作製した場合、形成されるo/wエマルションの油滴径に差が生じないことが確認された。o/wエマルションの油滴径が $\Delta\rho$ に依存しないことは、シリコンオイルとドデカンの表面張力が同程度であるために、乳化剤である37% SiOHシリカ粒子が油/水界面で成す接触角が、両方の油について同程度であるために生じることが予想される。実際、油相の中に置かれた疎水化されたガラス上に静置された水滴が成す接触角は、油がドデカンおよびシリコンオイルの場合、ほぼ等しいことが示されている⁹⁾。

o/wエマルションのクリーミングの程度を目視観察により求めた。完全にクリーミングしたときの水層の溶出量を基準とし、その基準値に比べ50%および80%の水層の溶出が起こるために要する時間を算出した(Fig. 6)。 $\Delta\rho$ の減少に伴い、同程度のクリーミングが生じるための時間は増加する。Stokesの式から予想されるように、 $\Delta\rho$ の減少に伴いo/wエマルション中の油滴の移動速度が減少することが、この現象の原因と考えられる。

混合油を用いて作製されたo/wエマルションを、疎水性な粒子の存在下で攪拌・曝気を行った。すべての $\Delta\rho$ の値に対して、ドライウォーターと同様な粉体状の物質が形成された。この粉末状の物質を油(*n*-ドデカン)に分散させると、数百 μm 程度の水滴中に数十 μm 程度の油滴が観察されたことから、これらの粉末状物質はo/w/a分散系(パウダーエマルション)であると示唆された(Fig. 7)。

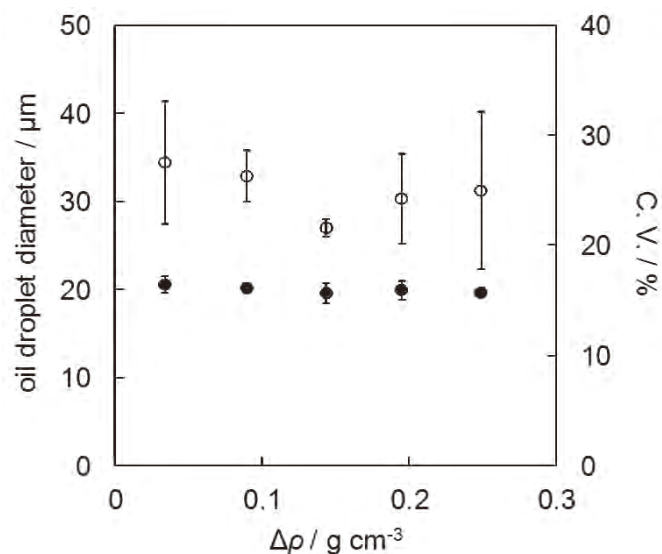


Figure 5 Dependence of average diameter (filled points) and average C.V. (open points) for oil droplets in o/w emulsions on $\Delta\rho$. Reprinted from Ref. 10.

Fig. 7に示される光学顕微鏡写真は、 $\Delta\rho$ の減少に伴い、o/w/a分散系内の水滴中の油滴の数が増加する傾向を示している。この光学顕微鏡写真から油滴径および変動係数を測定した(Fig. 8)。 $\Delta\rho$ の減少に伴い、o/w/a分散系の油滴径がもとのo/wエマルションの油滴径に近づくことから、 $\Delta\rho$ の減少に伴いo/w/a分散系がより効果的に安定化されることが示唆される。

o/w/a分散系を漏斗から落下させ、安息角を測定した。安息角を測定する際に用いた写真をFig. 9aおよびbに示す。これらの写真から測定された安息角は、 $\Delta\rho$ の減少に伴い減少した(Fig. 9c)。 $\Delta\rho$ の減少に伴い、油滴の移動速度が減少し、o/w/a分散系中の疎水性な粒子と油滴の接触が抑制されることが示唆される。

以上の油滴径と安息角の測定結果から、 $\Delta\rho$ の減少に伴い、油滴の移動速度が減少し、o/w/a分散系内の油滴間および油滴と水滴表面の合一が抑制されることが示唆された。したがって、本研究と先行研究⁸⁾により、攪拌速度および油滴の直径の減少、水相の粘度の増加、油と水の密度差の減少に伴うエマルション液滴中の油滴(分散相)の移動の抑制が、o/w/a分散系の安定化における決定的因子であることが明らかにされた。

3.2 泡の粉体化(a/w/a分散系)と基礎原理の一般性についての検討

泡はo/wエマルションと同様に水相が連続相であるので、疎水性微粒子の存在下で泡を空気と攪拌混合を行う場合、a/w/a分散系が得られることが期待される。しかし、空気と水の密度差は非常に大きい($\Delta\rho = 0.997 \text{ g cm}^{-3}$)。そのため、攪拌時の遠心力場で気泡は油滴と比べて高速で

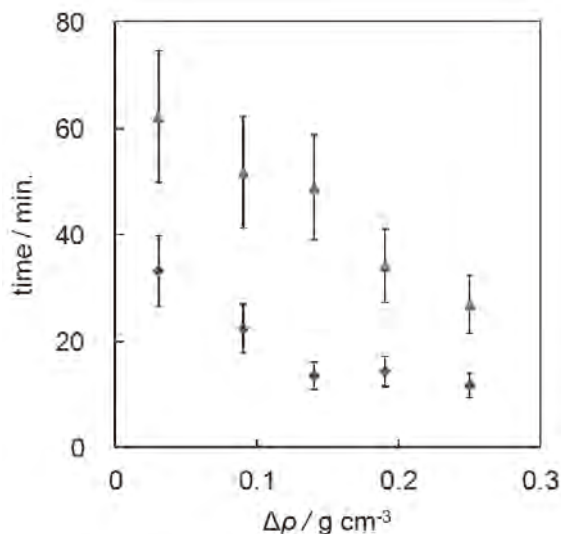


Figure 6 Time required for 50% (diamonds) and 80% (triangles) of creaming relative to maximum creaming for o/w emulsions versus $\Delta\rho$. Reprinted from Ref. 10.

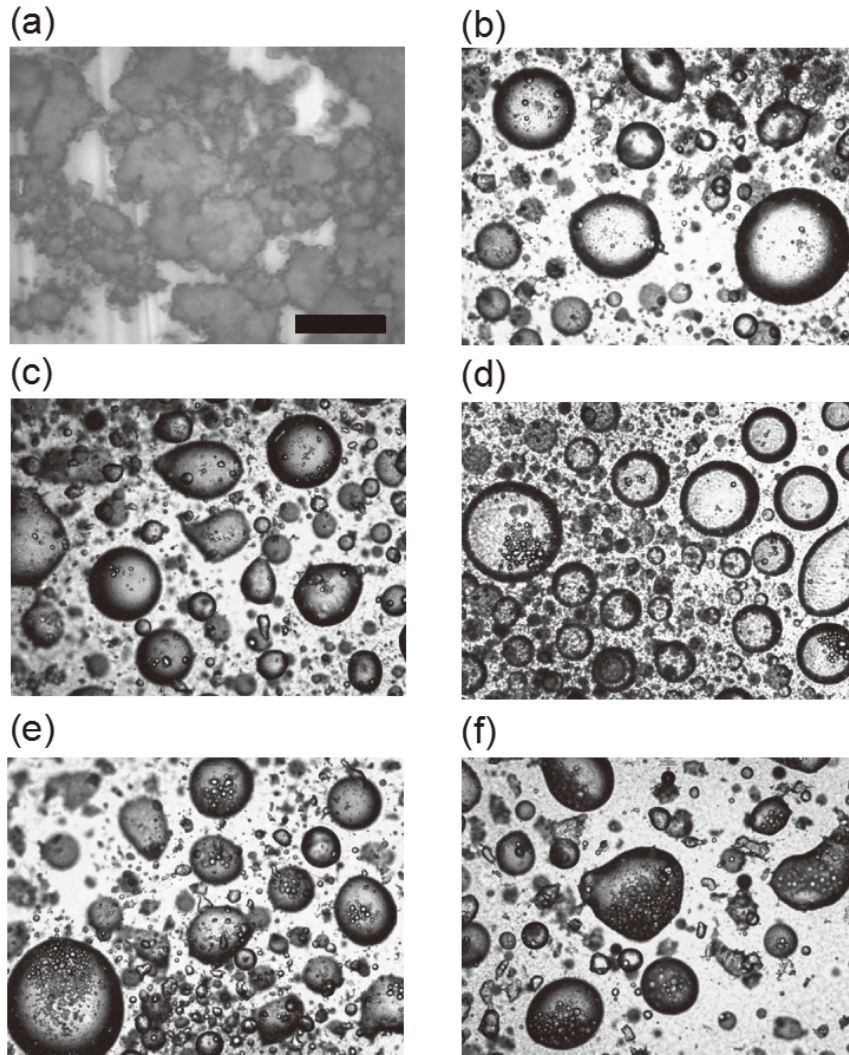


Figure 7 Optical micrographs of powdered o/w emulsions prepared using oil mixtures of different density. (a) Powdered o/w emulsion as is with $\Delta\rho = 0.033\text{ g cm}^{-3}$. (b) – (f) Powdered o/w emulsions dispersed in dodecane for $\Delta\rho =$ (b) 0.248, (c) 0.194, (d) 0.143, (e) 0.089 and (f) 0.033 g cm^{-3} . Scale bar refers to 500 μm on each. Reprinted from Ref. 10.

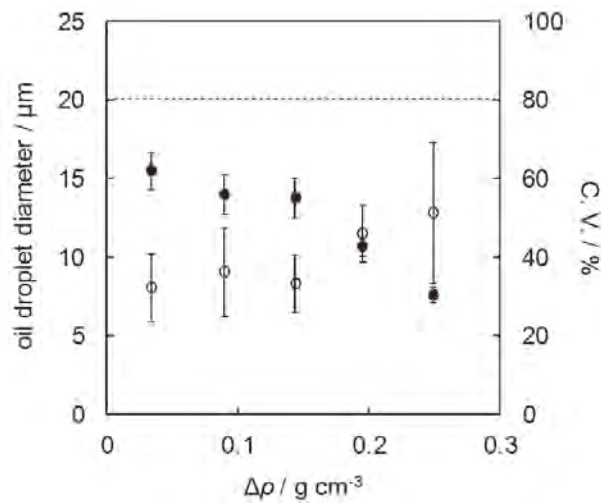


Figure 8 Dependence of average diameter (filled points) and average C.V. (open points) for oil droplets in water globules in powdered o/w emulsions on $\Delta\rho$. The dotted line represents the average oil droplet diameter in precursor o/w emulsions. Reprinted from Ref. 10.

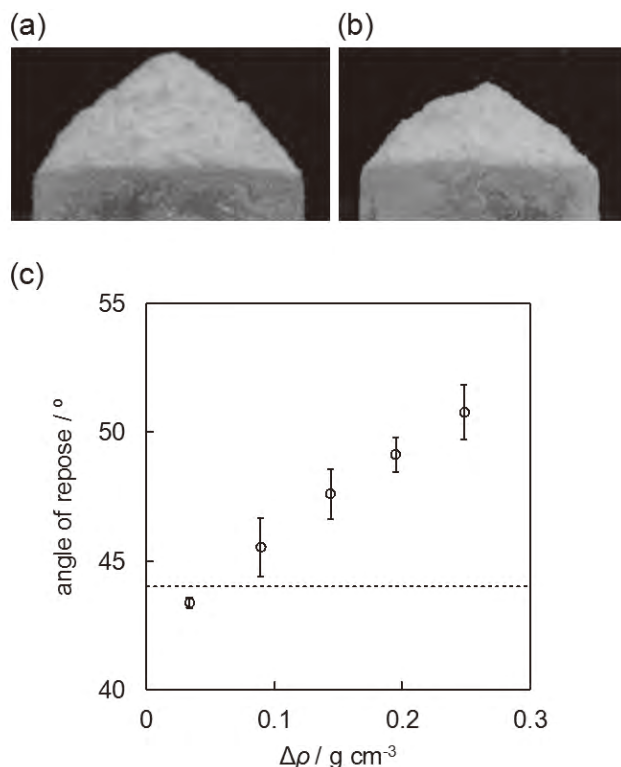


Figure 9 Digital photographs of powdered o/w emulsions prepared using o/w emulsions with $\Delta\rho =$ (a) 0.248 and (b) 0.033 g cm^{-3} , which were piled on a cylindrical base showing different angles of repose. Diameter of cylindrical base is 45 mm. (c) Angle of repose of powdered emulsions as a function of $\Delta\rho$. The dotted line shows the angle of repose for dry water (no oil). Reprinted from Ref. 10.

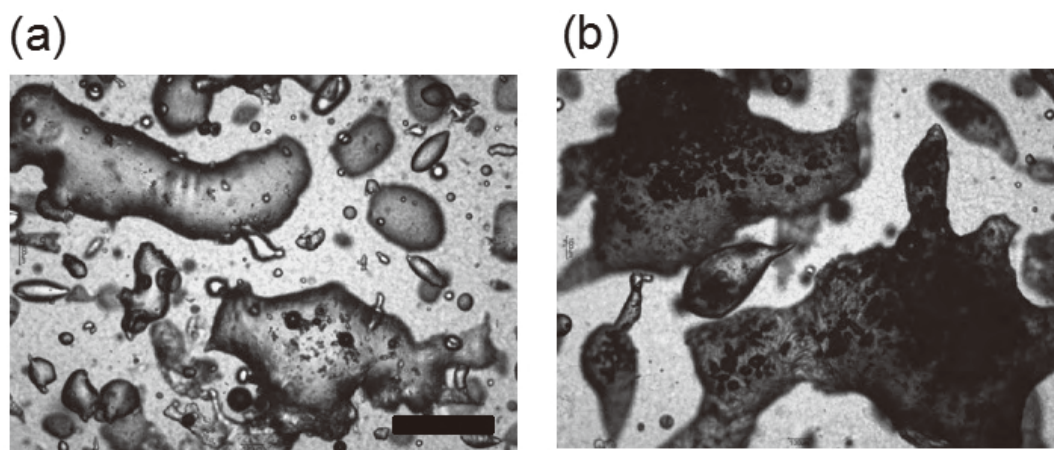


Figure 10 Optical micrographs of a/w/a materials prepared using aqueous foams with different water phase viscosity: $W_{100\% \text{ SiOH}} / \text{wt}\% =$ (a) 0, (b) 8.0. Scale bar refers to 500 μm on each.

移動し、気泡間での合一ならびに疎水性微粒子で覆われた水滴（泡）表面と合一を起こし、気泡が消失することが予想される。本研究では、泡を作製後、空気/水表面に対して非吸着性の非常に親水的なシリカ粒子（HDK N20シリカ）を添加することにより水相の粘度を増加させ、攪拌中の気泡の移動速度の抑制することにより a/w/a 分散系の安定化を試みた。

泡に親水的なシリカ粒子（HDK N20）を加え、疎水的な

シリカ粒子（HDK H18）とともに攪拌・曝気したところ、ドライウォーターと同様な粉体状の物質が形成された。この粉末状の物質を油（ドデカン）に分散させると数百 μm 程度の水滴中に数十 μm 程度の気泡と思われる物体が観察されたことから、これらの粉末状物質は a/w/a 分散系（パウダーフォーム）であることが示唆された（Fig. 10）。また、水相の粘度の増加（水相に添加する HDK N20 シリカの濃度 $W_{100\% \text{ SiOH}}$ の増加）に伴い、a/w/a 分散系内の水滴中の気

泡の量は増加した。したがって、a/w/a分散系においても水滴中の分散相（気泡）の移動速度の抑制が、安定化の決定的因子であることが示唆され、基礎原理の一般性が示された。

謝 辞

公益財団法人コスメトロジー研究振興財団のご援助により、本研究の一部の内容が、アメリカ化学会の学会誌に掲載されました（引用文献10）。ご援助いただきましたことを心より感謝いたします。

(引用文献)

- 1) B. P. Binks, T. S. Horozov, in *Colloidal Particles at Liquid Interfaces*, Eds: B. P. Binks, T. S. Horozov, Cambridge University Press, Cambridge, U.K. **2006**, Ch. 1.
- 2) 村上 良: 微粒子による空気-液体分散系の安定化, *オレオサイエンス* 10, 9-14 (2010).
- 3) 村上 良: ドライリキッド/リキッドマーブルの形成挙動, 微粒子安定化エマルジョンおよびフォーム (野々村美宗監修), 情報機構 (2012).
- 4) Binks, B. P., Murakami, R.: "Phase inversion of particle-stabilized materials from foams to dry water, *Nature Materials* 11, 865-869, 2006.
- 5) Binks, B. P., Duncumb, B., Murakami, R.: Effects of pH and salt concentration on materials derived from air-water-silica particles, *Langmuir* 23, 9143-9146, 2007.
- 6) Murakami, R., Bismarck, A.: Particle-stabilized materials: dry oils and (polymerized) non-aqueous foams. *Advanced Functional Materials* 20, 732-737, 2010.
- 7) 五十嵐啓二, 相良圭祐, 江川淳一郎: W/P構造を有するパウダー製剤の開発とその有用性, *粧技誌*, 42, 313-318, 2008.
- 8) Murakami, R., Moriyama, H., Yamamoto, M. Binks, B. P., Rocher, A.: Particlestabilization of oil-in-water-in-air materials: powdered emulsions, *Advanced Materials*, 24, 767-771, 2012.
- 9) Binks, B. P., Lumsdon, S. O.: Effects of oil type and aqueous phase composition on oil-water mixtures containing particles of intermediate hydrophobicity, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2, 2959-2967, 2000.
- 10) Murakami, R., Moriyama, H., Noguchi, T., Yamamoto, M. Binks, B. P.: Effects of the density difference between water and oil on stabilization of powdered oil-in-water emulsions, *Langmuir*, 30, 496-500, 2014

環境応答性レドックスナノ粒子を用いた高機能性スキンケア薬粧品の創製

筑波大学大学院数理工学物質科学研究科

吉 富 徹

In this study, a redox nanoparticle (RNP), which consists of polymeric micelle containing nitroxide radicals, was developed as nano-sized ROS scavenger for treatment of ultraviolet (UV)-induced skin damage. When RNP was applied to the skin by iontophoresis, UV-induced damage and melanin production in the skin were prevented. In addition, a redox injectable hydrogel (RIG) with prolonged drug retention time in the skin was developed for enhancing the ROS scavenging efficacy, using a redox polyion complex flower micelle containing nitroxide radicals. Both RNP and RIG are anticipated as high performance ROS scavengers for treatment of UV-induced skin damage.

1. 緒 言

紫外線によって多量に発生する活性酸素種 (ROS) は、皮膚を絶えず攻撃している。この過剰な ROS 産生によって、メラニン生成、皮膚癌や炎症などが引き起こされる。この皮膚近傍に産生される ROS の除去は、まさにコスメトロジーの大きな課題の一つである。そこで、効果の高い抗酸化ストレス作用を示すためには、材料を創り込み、最適な素材を提供していくことが非常に重要となる。これまで各種ビタミンやコエンザイム Q10 などの抗酸化剤を含んだ薬粧品が市販されている。しかしながら、ROS と反応した後、抗酸化能が弱まってしまい、効力が長続きしないという問題があった。また近年、触媒的に ROS を消去する白金ナノ粒子・フラーレンなどの抗酸化ナノ粒子が注目を集めている。しかしながら、これらの粒子も特有の着色や汗による皮膚からの脱離などの問題を有している。そこで、我々は、高機能性スキンケア薬粧品を開発するために、触媒的に ROS を消去するニトロキシラジカル (2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシド: TEMPO) が結合したレドックスポリマーを新規に合成した (図 1)。このレドックスポリマーは、生体適合性を有するポリエチレングリコール (PEG) と TEMPO が結合した疎水性セグメントから成る両親媒性ポリマー (PEG-b-PMNT) であり、水中で自己組織化し、レドックスナノ粒子 (RNP) を形成する。この RNP は、疎水性コアにアミノ基が導入されているため、癌や炎症組織のような低 pH 環境で崩壊し、ROS を効果的に消去することができる。これまでに、我々は、脳および腎臓虚血再灌流障害や脳出血などの様々な酸

化ストレス疾患に対する RNP の治療・保護効果を明らかにしてきた¹⁻⁹⁾。そこで、これらの成果をベースに RNP によるスキンケアの効果に着目した。興味深いことに、肌の角質層の pH は、酸性 (pH 4.5-7.0) であることが知られているため、この RNP を角質層に導入することができれば、ナノ粒子が崩壊し、抗酸化能が向上することが期待できる。本研究では、荷電性ナノ粒子の経皮投与方法として注目を集めているイオントフォレシスを用いて RNP を皮下に導入し、紫外線により惹起されるメラニン生成に対する RNP の保護効果を検証した。

さらに、我々は、次世代のスキンケア素材として、レドックスインジェクタブルゲルを考案した。ナノ粒子の皮下投与は、低分子化合物に比べ長い滞留性を示す。しかしながら、粒子径が約 40 nm であるため、最終的にはリンパ系へと移行してしまう。治療などを考えた場合には、一度の処置で、治療効果が数週間持続することが好ましい。そこで本研究では、皮下で長期に滞留し、機能する ROS 消去剤を開発するため、ニトロキシドラジカル含有ポリイオンコンプレックス (PIC) フラワーミセルを作製し、生体内環境に反応してゲル化するレドックスインジェクタブルゲル (RIG) を開発した (図 2)。

2. 実 験

2.1 紫外線誘発性メラニン生成に対する RNP の効果

本実験では、メラニン生成を惹起するため、メラニン保有ヘアレスマウス (HOS: HRM2, ♂, 4 週齢) に UV 照射 (1-5 日目に 260 mJ/cm², 5-10 日目に 450 mJ/cm²) を行った。照射後、皮膚切片を作成してマッソン・フォンタナ染色 (核: 赤色、メラニン保有細胞: 黒色) を行い、メラニンの生成を観察した。また、回収した皮膚を 2M の水酸化ナトリウムを用いて細胞融解し、450 nm におけるメラニン由来の吸収を測定することによりメラニンを定量した。1, 4, 7 日目に、イオントフォレシスによって RNP を経皮投与し、メラニン生成に対する RNP の効果を観察した。



Development of skin care medicine using environmental-sensitive redox nanoparticles

Toru Yoshitomi

Department of Materials Sciences, Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba

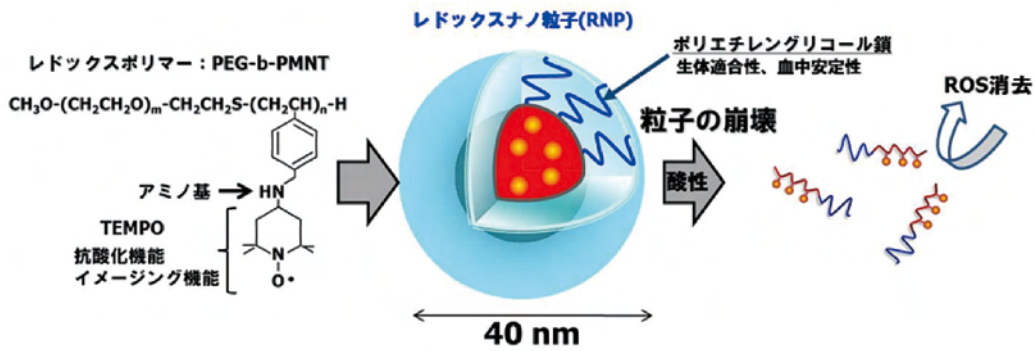


図1 pH低下に伴い崩壊するレドックスナノ粒子 (RNP)

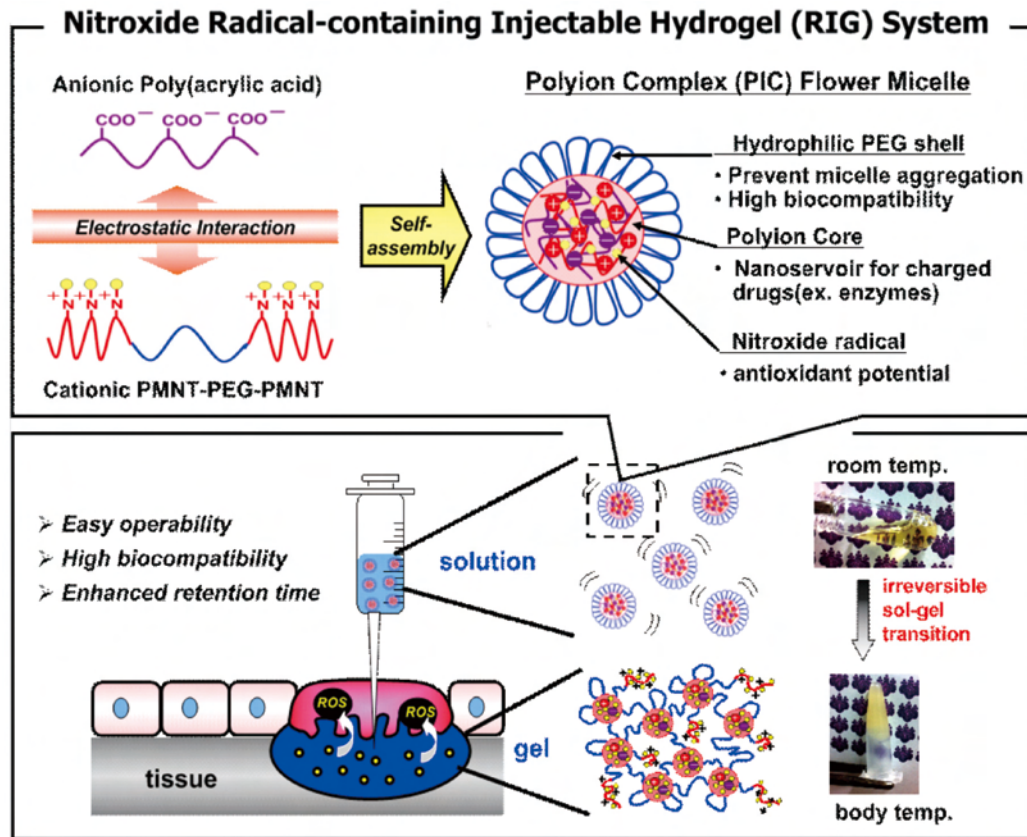


図2 皮下投与後ゲル化するレドックスインジェクタブルゲル (RIG)

2.2 新規RIGの開発と皮下炎症に対する効果の検証

まずはじめに、両末端にメルカプト基を有するポリエチレングリコールをテロゲンとして用いたクロロメチルスチレンのラジカルテロメリゼーションにより、両末端に反応性ポリクロロメチルスチレン (PCMS) を有するトリブロックポリマーの合成を行った (PCMS-PEG-PCMS)。次に、4-アミノ-TEMPOを用いてクロロメチル基のアミノ化反応を行い、疎水性PCMSセグメントに2級アミンを介してTEMPOを導入した (PMNT-PEG-PMNT)。得られたPMNT-PEG-PMNTをプロトン化し、アニオン性ポリアクリル酸 (PAA) 水溶液と混合することによりフラワーミセルを得た。得られたフラワーミセル溶液の濃度を

60mg/ml (イオン強度150mM) に調整し、37℃の水浴中で加熱を行い、ゲル化時間を試験管反転法により測定した。皮下におけるゲルの滞留性は電子スピン共鳴法 (ESR) を用いて測定した。また、皮下炎症モデルとしてカラギーナン誘発性炎症をマウスの足底に作製し、RIGの抗炎症効果を痛覚過敏試験、ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性及び炎症性サイトカイン量を測定した。

3. 結果及び考察

3.1 紫外線誘発性メラニン生成に対するRNPの効果

はじめに、UV照射によるメラニン生成を確認した。図3aに示すように、UV照射によって基底層を中心とした表

皮膚の肥厚化が確認された。またメラニン量はUV照射により増加し、メラニン生成関連遺伝子であるチロシナーゼは約4倍に増加した(図3bおよびc)。これらの結果により、本実験で用いたUV照射条件によって、マウス皮下にメラニンが生成することが確認された。ここで、RNPを角質層に導入するため、イオントフォレシスを用いた。イオントフォレシスは、電気力で荷電性ナノ粒子を皮内に導入することができるため、疎水性コアにアミノ基が導入されており正電荷を帯びているRNPを角質層へ導入することができる。そこで、RNPをイオントフォレシスにより投与し、RNPの効果を観察したところ、コントロールとして用いた正電荷リポソームに比べ、RNPを投与した皮膚ではメラニンの沈着が抑制される傾向が観察された(図4a)。また、メラニンの生成量を定量したところ、同様に、RNPがメラニンの生成を抑制していることが明らかとなった(図4b)。

皮膚に強い紫外線に当たると、ROSが発生し、表皮細胞がインターロイキンなどのメラニン生成・放出の情報伝達物質を生成することが知られている。この情報伝達物質がメラノサイトというメラニンを発生させる場所に届くと、必須アミノ酸の一つであるチロシンが酸化され、チロシンがドーパーに変化し、次いで、ドーパーがキノン、キノンはインドールへと反応し、このインドールが重合してシミ、ソバカスのメラニン色素へと変化する。この反応はすべて酸化反応であり、ROSが存在すると、酵素チロシナーゼ

が活性化されて、急速に重合が進行する。本研究で得られた結果は、イオントフォレシスによって経皮投与されたRNPが、この皮膚内でROSを効率的に消去したことにより、メラニン生成を抑制したものと考えられる。

3.2 新規RIGの開発と皮下炎症に対する効果の検証

新規PMNT-PEG-PMNTトリブロックコポリマーの合成は、ゲル濾過クロマトグラフィーと¹H NMRの結果により確認された。表1に示すように、モル比1:1で調製した粒子の粒子径およびゼータ電位は、それぞれ79nmおよび-0.119mVであった。これは、カチオン性PMNT-PEG-PMNTとアニオン性PAAとの間に静電相互作用が働き、ポリイオンコンプレックスコアを有するPICフラワーミセルが形成されたことを示す。このミセルはPEGの高い運動性によりミセル同士の凝集を防ぐため、沈殿が生じない。よって、高濃度でも体内に注射可能である。得られたフラワーミセルをモル比1:1、濃度60mg/mL、pH6、イオン強度150mMの条件下で37℃に加温したところ、ミセルが2分間以内に不可逆的にゲル化することが明らかとなった(図5)。この結果は、温度の上昇によりミセルがエントロピー的に不安定となり崩壊し、ゲルを形成したと考えられる。そこで、このミセル溶液をマウス皮下に注射したところ、同様にゲル化することが確認された。RIGは、ESRで検出可能な安定ニトロキシドラジカルを有している。よって、体内のRIG濃度をESRを用いて調べるこ

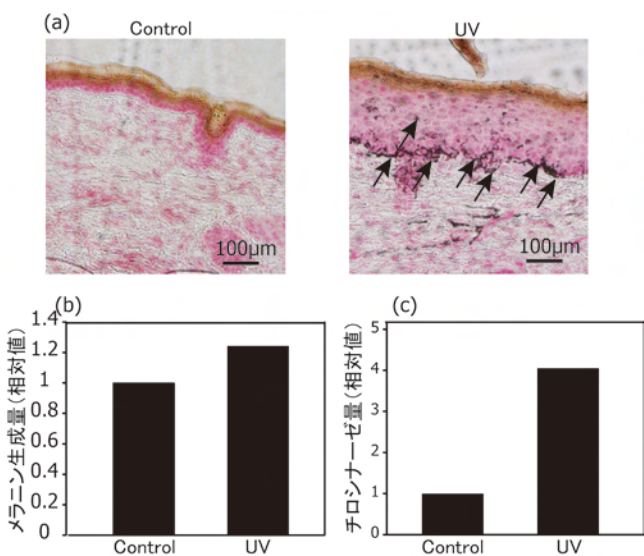


図3 UV照射によるメラニン生成

- (a) マッソン・フォンタナ染色
(核: 赤色、メラニン保有細胞: 黒色) 矢印はメラニン保有細胞を示す。
- (b) メラニン生成量
- (c) チロシナーゼ量

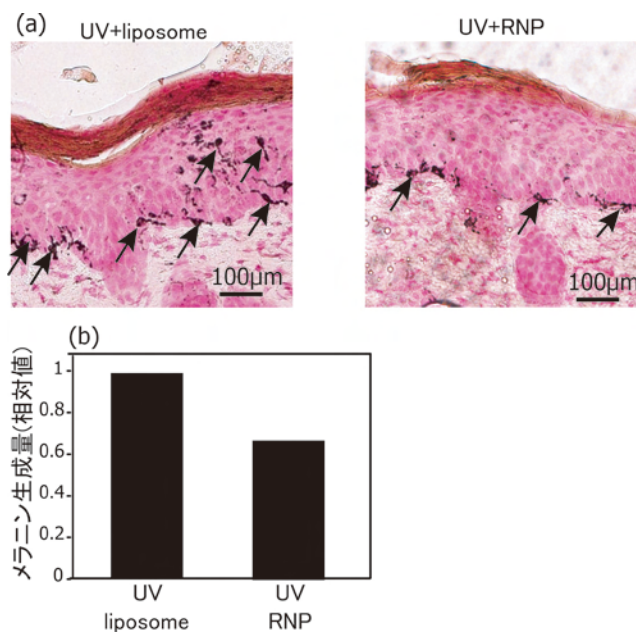


図4 イオントフォレシスによるRNPの経皮投与後のメラニン生成

- (a) マッソン・フォンタナ染色
(核: 赤色、メラニン保有細胞: 黒色) 矢印はメラニン保有細胞を示す。
- (b) メラニン生成量

ができる。低分子化合物 (4-アミノ-TEMPO) またはRNP では、それぞれ1時間と12時間以内に投与部位から消失したのに対し、RIGは72時間後にも40%残存していることが明らかとなった (図6、上図)。また、ニトロキシドラジカルはESRイメージングやMRIを用いて画像化することができるため、図6 (下図) に示すようにRIGの経時変化を非侵襲的に観察することもできる。この結果は、本研究で開発したRIGの高い滞留性を示す。そこで、カラギーナン誘発性炎症モデルマウスを用いてRIGの抗炎症効果を評価した。まず、ニトロキシドラジカルを含有しないフラワーミセル溶液を皮下投与しROS消去能がないゲル (ノンレドックスインジェクタブルゲル: nRIG) を形成させたところ、好中球の浸潤の指標であるMPOの活性化が確認された。一方で、RIGは、その活性化を有意に抑制した (図7)。こ

れらの結果は、RIG自身が炎症惹起を引き起こすことなく、安全であることを示している。さらに、RIGは、カラギーナン投与により誘発される炎症も、有意に抑制することが確認された。また、RIGは、炎症性サイトカインであるTNF- α とIL-1 β の発生も有意に抑制し、カラギーナン誘発性痛覚過敏を効果的に予防した。この結果は、RIG中のニトロキシドラジカルが好中球やマクロファージの産生するROSを効果的に消去していることを示している。

4. 総括

本研究では、高機能性スキンケア薬粧品の開発を目指し、紫外線誘発性メラニン生成に対するRNPの効果の検証を行った。RNPをイオンフォレシスによって経皮投与することにより、紫外線照射によって生じるメラニン生成を

表1 ニトロキシドラジカル含有ポリイオンコンプレックス (PIC) フラワーミセルの粒子径と表面電荷 (モル比r=PAAのカルボキシル基のモル量:PMNT-PEG-PMNTのアミノ基のモル量)

Molar ratio r	kcps	Pdl	Size /nm	Zeta potential /mV
4 : 1	207	0.25	48	-3.73
2 : 1	274	0.25	55	-2.24
1 : 1	685	0.23	79	-0.119
1 : 2	724	0.25	89	+1.43

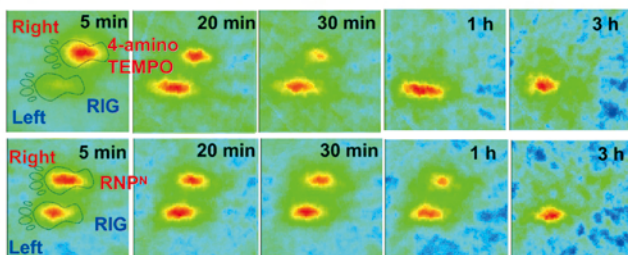
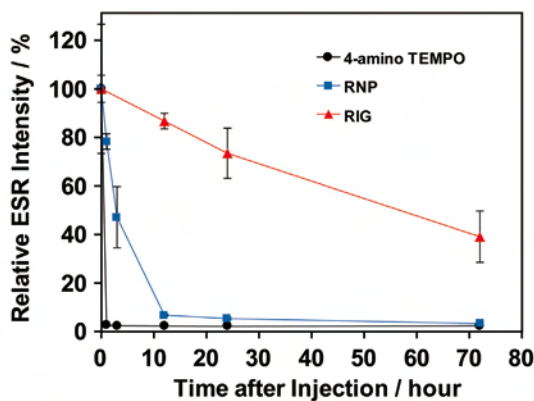


図6 (上図)皮下投与後のニトロキシドラジカル残存量(下図)皮下投与後の非侵襲的ESRイメージング画像。低分子量の4-アミノ-TEMPO, RNPとRIG残存量をESRイメージング装置を用いて評価した。

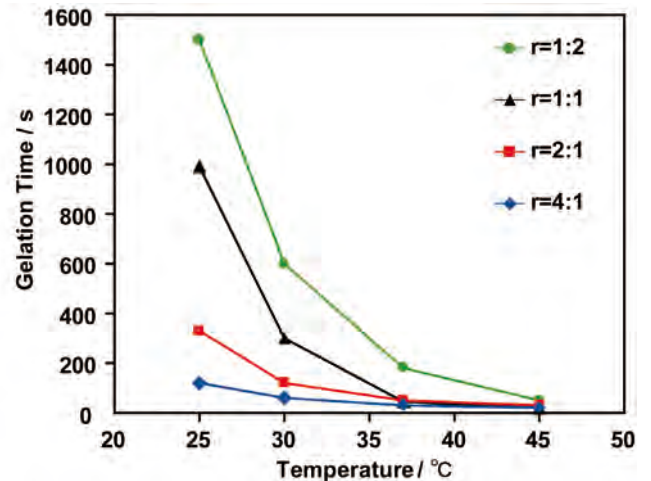


図5 ニトロキシドラジカル含有ポリイオンコンプレックス (PIC) フラワーミセルのゲル化時間 (60mg/ml, イオン強度150mM, r=1:2, 1:1, 2:1, 4:1)

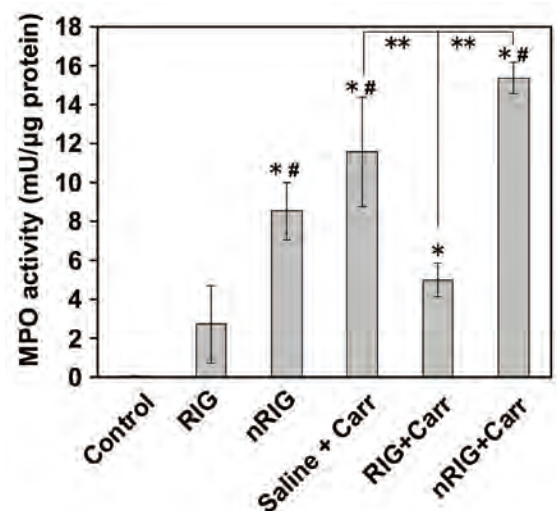


図7 皮下投与した後のRIGの炎症抑制能試験。MPOの活性を測定した。Carrは、カラギーナン投与を示す。

抑制することが明らかとなった。さらに、長期皮下滞留性を有するRIGの開発に成功した。低分子化合物やナノ粒子に比べ、RIGは高い局所滞留性を有し、炎症モデルに対して高い効果を示すことが明らかとなった。これは次世代の皮下のROSを長期間消去するスキンケア薬粧品として期待される。

謝 辞

本研究は、筑波大学数理物質科学研究科 長崎幸夫教授の御指導のもと、研究を行った成果である。イオントフォレシスによるRNPの経皮投与およびメラニン生成の実験に関しては、京都薬科大学 小暮健太郎教授、塩田佳菜子氏らとともに行った結果であり、またRIGの実験に関しては、筑波大学数理物質科学研究科 博士前期課程2年ブアミンリー氏とともに行った結果である。ここに深く感謝致します。

(参考文献)

- 1) Yoshitomi T, Miyamoto D, Nagasaki Y.: Design of Core-shell-type Nanoparticles Carrying Stable Radicals in the Core, *Biomacromolecules*, 10, 596-601, 2009.
- 2) Yoshitomi T, Nagasaki Y.: Nitroxyl radical-containing nanoparticles for novel nanomedicine against oxidative stress injury, *Nanomedicine*, 6, 3, 509-518, 2011.
- 3) Yoshitomi T, Suzuki R, Mamiya T, Matsui H, Hirayama A, Nagasaki Y.: pH-Sensitive Radical-Containing-Nanoparticle (RNP) for the L-Band-EPR Imaging of Low pH Circumstances, *Bioconjugate Chemistry*, 20, 1792-1798, 2009.
- 4) Marushima A, Suzuki K, Nagasaki Y, Yoshitomi T, Toh K, Tsurushima H, Hirayama A, Matsumura A.: Newly Synthesized Radical-Containing Nanoparticles (RNP) Enhance Neuroprotection After Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury, *Neurosurgery*, 68, 1418-1425, 2011.
- 5) Yoshitomi T, Hirayama A, Nagasaki Y.: The ROS scavenging and renal protective effects of pH-responsive nitroxide radical-containing nanoparticles, *Biomaterials*, 32, 8021-8028, 2011.
- 6) Vong LB, Tomita T, Yoshitomi T, Matsui H, Nagasaki Y.: An Orally Administered Redox Nanoparticle that Accumulates in the Colonic Mucosa and Reduces Colitis in Mice, *Gastroenterology*, 143, 1027-1036, 2012.
- 7) Chonpathompikunlert P, Fan CH, Ozaki Y, Yoshitomi T, Yeh CK, Nagasaki Y.: Redox Nanoparticle Treatment Protects Against Neurological Deficit in Focused Ultrasound-Induced Intracerebral Hemorrhage, *Nanomedicine*, 7, 1029-1043, 2012.
- 8) Chonpathompikunlert P, Yoshitomi T, Han J, Toh K, Isoda H, Nagasaki Y.: Chemical nanotherapy: Nitroxyl radical-containing nanoparticle (RNP) protects neuroblastoma SH-SY5Y cells from a β -induced oxidative stress, *Ther. Deliv*, 2, 585-597, 2011.
- 9) Chonpathompikunlert P, Yoshitomi T, Han J, Isoda H, Nagasaki Y.: The use of nitroxide radical-containing nanoparticles coupled with piperine to protect neuroblastoma SH-SY5Y cells from a β -induced oxidative stress, *Biomaterials*, 32, 8605-8612, 2011.

Ⅱ． 生体作用、安全性に関する分野

セマフォリン3Aトランスジェニックマウスにおける毛組織や皮膚の免疫環境でのセマフォリン3Aの役割の解明と皮膚炎症に対する新規治療軸の開発

浜松医科大学皮膚科学講座

伊藤 泰介

Semaphorin 3A (Sema3A) is originally found the nerve guidance molecule. Sema3A can induce growth cone collapse and axon repulsion through interaction with a neuropilin-1/plexin-A receptor complex. In AD patients, Sema3A expression is decreased in epidermis that allows higher skin innervation. In addition to the role of nerve guidance, recent studies indicate sema3A as the immunomodulator in several immune reactions.

In this study, we found the novel role of sema3A in trichoimmunology via mast cell stimulation. We established B6-Tg(pK14-Sema3a)/UOEH mouse that express excess Sema3A in epidermis under K14 promotor. Interestingly, this mouse show hair loss lesion mainly on back skin. Histological analysis revealed a large number of mast cells in dermis and around hair follicles of hair loss lesions compared to healthy control and non hair loss lesion. Non hair loss lesion also shows significant infiltration of mast cells in dermis and around hair follicles compared to healthy control. On the other hand, MCP-1+ basophils are rarely found in dermis and around hair follicles. Next, we generate murine bone-marrow (BM) derived mast cells. The presence of Neuropilin-1/Plexin A1 expression was analyzed on FACScan. Furthermore, histamine releasing was studied in BM derived mast cells cultured with sema3A or PBS by ELISA. Sema3A was injected into the back skin after the induction of depilation induced murine hair cycle in order to know the affect of sema3A on murine hair cycle. In wild type C57BL/6 mice, sema3A is strongly expressed on Day8 in the depilation murine hair cycle that indicates the catagen induction by sema3A. In conclusion, sema3A may induce increasing and activation of mast cells with releasing of histamine that result in alopecic lesions in B6-Tg(pK14-Sema3a)/UOEH mouse. This study shows unique face of sema3A in trichoimmunology and skin immune systems, especially to mast cell.

1. 緒言

セマフォリンはもともと中枢神経の発達に関わる神経のアクソンのガイドをする因子として報告されてきた¹⁾。それだけでなく、細胞走化性、細胞増殖やアポトーシス、心臓や腎組織、眼組織の形態形成に関与することが報告されている。セマフォリン分子群は、膜型と分泌型があり、各群で共通の構造である細胞外領域のSemaドメインがあり、それに続くC末端領域の構造上の特徴によって8つのサブクラスに分類されている。I、II型セマフォリンは無脊椎動物に、VIII型はウイルスにコードされ、ほ乳類はIIIからVII型のセマフォリンが同定されている。分泌型はII型、III型、VIII型セマフォリンであり、それ以外は1回膜貫通型蛋白である。

セマフォリンの主な受容体は、plexinファミリーとNeuropilin (Nrp) ファミリーが知られている。plexinファミリーは、plexin-AからDまでの4つのサブクラスに分かれ、細胞外にセマドメインを有している。セマフォリンの多くはSemaドメインを介してplexinと結合するが、III型セマフォリンの多くはNrp/plexin受容体複合体を介し

てシグナルを伝達する。しかしセマフォリンと受容体の結合は複雑であり、様々な結合が考えられている。plexinが細胞や組織によって様々な結合し、受容体と受容体複合体を形成することで心臓の発生過程における心臓形成、弁形成に関与している²⁾。また骨代謝において破骨細胞の分化に関与する³⁾。

アトピー性皮膚炎では、Sema3Aの発現量が、健常人と比較して表皮内において低下しており、その結果、表皮内に末梢神経が延長しているため、神経密度が健常人と比較して有意に高いとされる⁴⁾。そのため、かゆみ過敏や搔爬によるサブスタンスPなどの神経伝達物質の分泌がされやすい。よってSema3Aはアトピー性皮膚炎の新たな治療薬の候補として考えられている。

しかしながら、Sema3Aの皮膚における詳細な働きは未だ不明な点が多い。よって我々は、Sema3Aを過剰発現しているB6-Tg (pK14-Sema3a) /UOEHを用いて皮膚の毛髪免疫に対するSema3Aの影響を検討することとした。

2. 実験

2.1 マウス：Sema3A過剰発現マウスB6-Tg (pK14-Sema3a) /UOEHの樹立

K14 promoterとmouse Sema3A cDNAを含むtrancegeneをC58BL/6マウスのFIの受精卵の前核に注射した。

2.2 皮膚組織

B6-Tg (pK14-Sema3a) /UOEHの背部皮膚病変より皮



Analysis of the role of Semaphorin 3A in the skin and hair follicle immune systems of Sema3A transgenic mouse and exploration of novel treatments with Semaphorin 3A

Taisuke Ito

Department of Dermatology, Hamamatsu University School of Medicine

皮膚組織を採取し、HE 染色、免疫染色に供出した。

2.3 IL-3、SCF 産生量

mRNA レベルでの産生量を Realtime PCR 法にて検討した。

2.4 フローサイトメトリー

肥満細胞における Neuropilin 1 発現をフローサイトメトリーにて検討した。

2.5 マウス毛周期誘導

C57BL/6 週齢マウスを外科用アロンアルファにて強制抜毛することで毛周期を誘導した。

2.6 ギムザ染色

肥満細胞を検討するため、ギムザ染色、MCP-3 染色を行い、浸潤する肥満細胞数、好塩基球数を検討した。また好塩基球の浸潤を MCP-3 染色にて検討した。

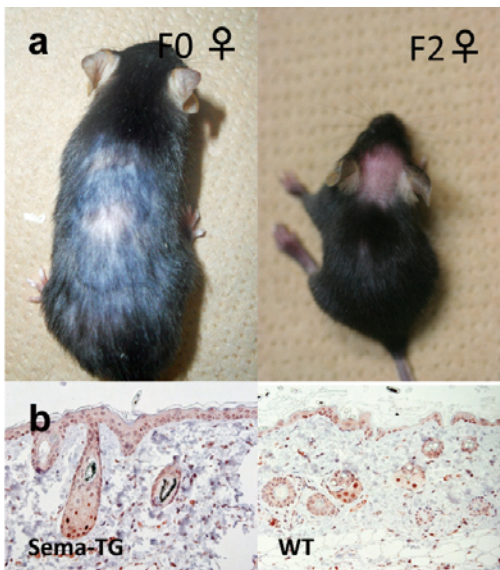


図1 a. TG マウスの背部に観察される脱毛症状、
b. Sema3A 発現

3. 結果

3.1 B6-Tg (pK14-Sema3a) /UOEH における皮膚症状

背部や後頸部に脱毛斑を観察した (図1a)。また同部位における Sema3A 発現は減弱していた (図1b)。

3.2 肥満細胞浸潤の検討

脱毛病変部の組織検討では毛組織は萎縮し、その周囲に肥満細胞浸潤を観察した。ギムザ染色にて脱顆粒や大型の肥満細胞を観察した (図2)。

3.3 IL-3、SCF 発現の検討

Wild type の C57BL/6 マウスと比較して B6-Tg (pK14-Sema3a) /UOEH では有意に発現が亢進していた (図3)。

3.4 表皮細胞における Nrp1 発現の検討

フローサイトメトリーによって肥満細胞は Nrp1 発現をみた。よって Sema3A のリガンドである Nrp1 は肥満細胞上に発現していることから、Sema3A が肥満細胞に何等かの影響を与えていることが示唆された (図4)。

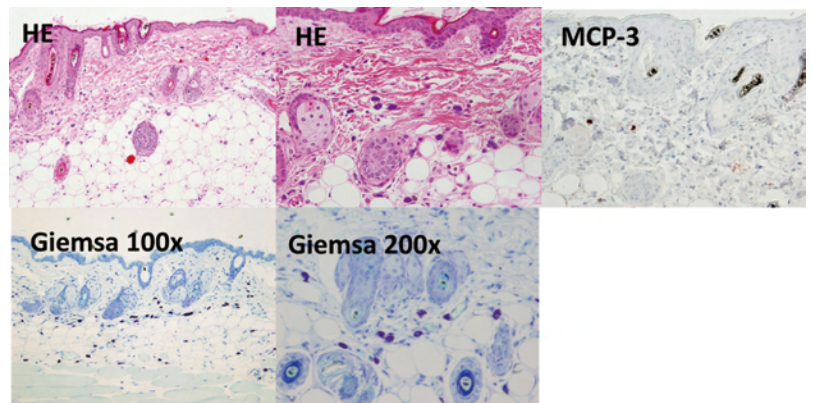


図2 脱毛病変部への肥満細胞の浸潤

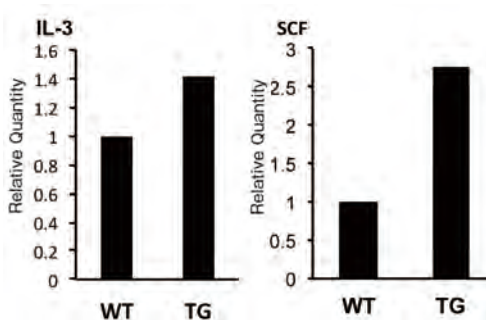


図3 Realtime PCR 法

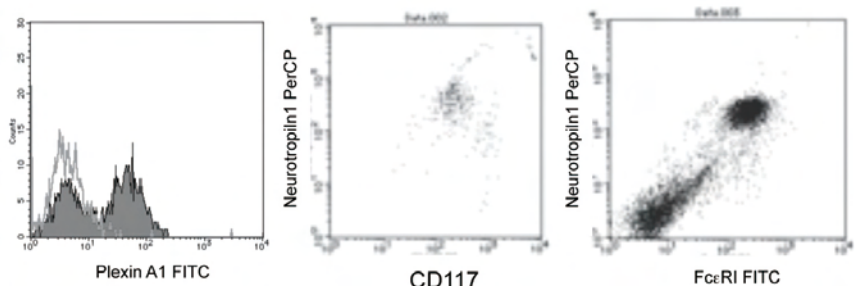


図4 Neuropilin 1 expression on normal murine keratinocytes and mast cells

3.5 マウス毛周期におけるSema3A発現の検討

健常C57BL/6マウスにおけるSema3A発現の組織における検討では、成長期においてその発現が減弱していた。一方、休止期ではその発現が亢進していた(図5)。

3.6 毛周期における肥満細胞の変化とSema3Aの影響

強制抜毛による毛周期において、肥満細胞は成長期ではその浸潤数が減弱するが(図6a)、そこにSema3Aを投与するとその減弱が阻止された(図6b)。

3.7 肥満細胞のSema3Aによる増殖誘導

マウス骨髄由来の肥満細胞に対してSema3Aを投与すると、その増殖数は有意に上昇した(図7)。

4. 考察

我々の実験から、Sema3Aが過剰発現することによって毛周期が乱れることが示唆された。その原因として肥満細胞の増殖による影響が考えられた。

つまり、Sema3Aが過剰発現することによって、Nrp1発現をしている肥満細胞に影響を与え増殖することがわかった。その理由として、直接的な増殖誘導とともに、表皮細胞からのStem cell factorなど肥満細胞増殖因子が影響を与えていると考えられた。

実際、強制誘導した毛周期においても成長期にはSema3A発現が減弱していることから想定される。またSema3Aを投与することによっても肥満細胞の成長期

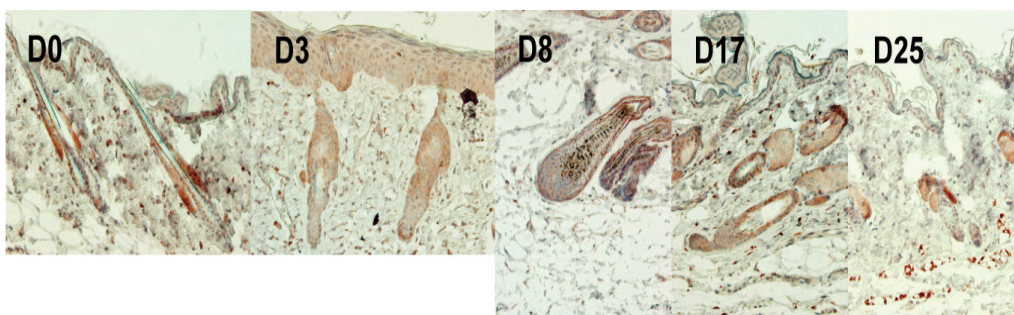


図5 Immunohistochemical staining revealed that sema3A immunoreactivity was reduced in hair matrix at D3 and D8

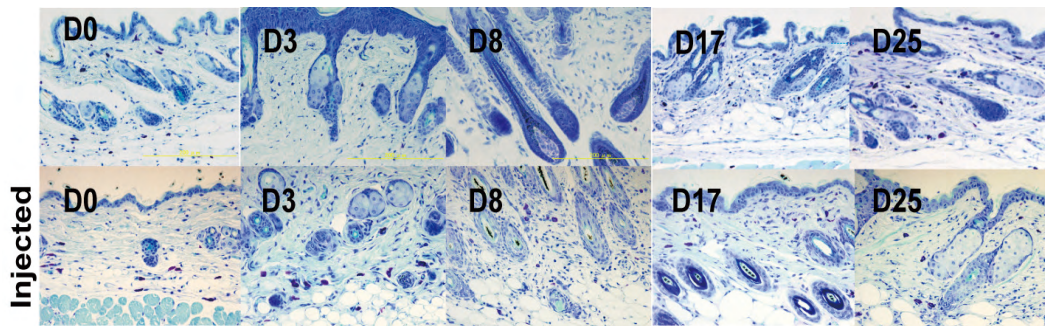


図6a

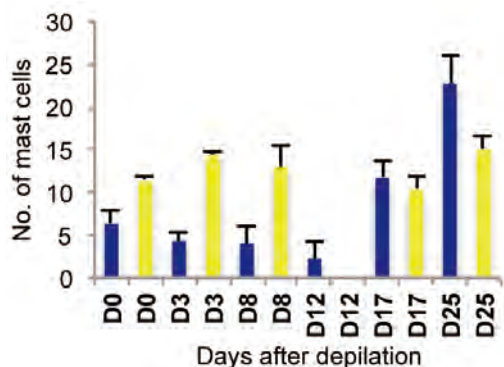


図6b 抜毛による毛周期と肥満細胞数の変化 (黄色バー: Sema3A投与群)

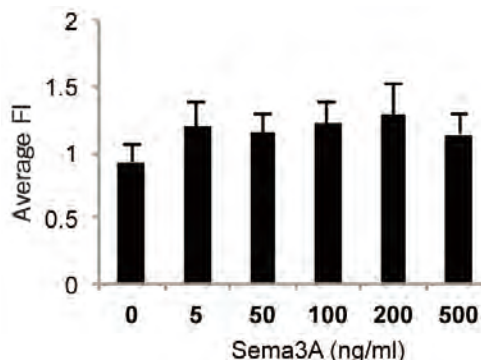


図7 Sema3Aによる肥満細胞の増殖効果

における減数が阻止されることも合わせてそれを示唆している。

以上から、皮膚疾患においてはアトピー性皮膚炎のみならず、脱毛症においても Sema3A が深く関与していることが大いに示唆された。

ヒトにおいては、アトピー性皮膚炎と円形脱毛症の合併が知られているが、Sema3A 発現が表皮において減弱しているアトピー性皮膚炎との整合性が問われる所であるが、表皮のみに限って減弱しているとすれば、真皮での Sema3A の動態は異なるものと理解される。

(文 献)

1) Luo Y, Raible D, Raper JA. Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of

neuronal growth cones. *Cell* 1993; 75: 217-227.

2) Toyofuku T, Zhang H, Kumanogoh A, et al. Dual roles of Sema6D in cardiac morphogenesis through region-specific association of its receptor, Plexin-A1, with off-track and vascular endothelial growth factor receptor type 2. *Genes Dev.* 2004; 18: 435-447.

3) Takegahara N, Takamatsu H, Toyofuku T, et al. Plexin-A1 and its interaction with DAP12 in immune responses and bone homeostasis. *Nat Cell Biol* 2006; 8: 615-622.

4) Tominaga M, Ogawa H, Takamori K. Decreased production of semaphorin 3A in the lesional skin of atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 2008; 158: 842-844.

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

北里大学薬学部衛生化学

今井 浩 孝

Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) is an important antioxidant enzyme that could directly reduce phospholipid hydroperoxide in biomembrane induced by oxidative stress. In this study we found that disruption of PHGPx by treatment of tamoxifen in skin of tamoxifen-inducible PHGPx KO mice could induce loss of hair follicle morphogenesis without damage of skin tissue. And co-treatment of vitamin E with tamoxifen could suppress the delay of hair follicle morphogenesis, indicating that generation of phospholipid hydroperoxide in skin might affect the hair follicle formation in adult mice.

1. 緒 言

リン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ (PHGPx) は、酸化ストレスなどによる活性酸素により酸化された生体膜リン脂質の1次生成物であるリン脂質ヒドロペルオキシドをグルタチオン依存的に直接還元できる主要な抗酸化酵素である¹⁾。申請者はこれまでPHGPxの個体及び細胞レベルでの機能の解析を一貫して行っており、全ノックアウトマウスが初期発生過程で致死となること²⁾、精巣特異的及び網膜特異的PHGPx欠損マウスが不妊及び失明となること^{3,4)}、肝臓特異的PHGPx欠損マウスは肝細胞死をひきおこし出生直後死となること、ビタミンEの餌への投与により個体死がレスキューできること⁵⁾などを明らかにしてきた。またMEF細胞でもPHGPxを欠損させると約3日後に細胞死が誘導され、その細胞死のメカニズムはこれまで報告のある細胞死とは異なることを見出している⁶⁾。このMEF細胞死もビタミンEの添加により抑制される⁷⁾。このように様々な細胞においてPHGPxを欠損させると内在性にリン脂質ヒドロペルオキシドが蓄積し細胞死が誘導される。

皮膚は紫外線などにより最も脂質酸化が起きる組織のひとつであるが、PHGPxの皮膚組織での発現部位やその機能についてはほとんど明らかになっていなかった。PHGPxは活性中心に微量元素セレンを含むセレノシステインを有するが、ヒトの遺伝病でこのセレノシステインを導入できなくなった患者では、PHGPxを含む25種類のセレン蛋白質の発現量が減少し、紫外線に対する感受性が増大することが報告されている⁸⁾。



Analysis of mechanism of inhibition of hair growth by depletion of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in mice and rescue effects of vitamin E.

Hiroataka Imai

School of pharmaceutical Sciences, Kitasato University

我々は最近、全身性タモキシフェン誘導型PHGPx欠損マウス(図1)の作製に成功し、時間及び部位特異的にPHGPxを欠損させられるマウスを得た。このマウスを用いて剃毛後、皮膚に直接タモキシフェンを塗布し、皮膚でPHGPxの遺伝子を破壊した際、どの様なフェノタイプが出るのかを検討したところ、外見上、皮膚細胞に異常はみられなかったが、発毛に異常が見られることを見いだした。このことは内在性に生じる脂質ヒドロペルオキシドが毛包細胞等に作用し、発毛を阻害していると考えられた。そこで本研究では、このPHGPx欠損による内在性に生じた脂質酸化による発毛阻害の詳細を明らかにすることを目的に研究を行った。また脂質の酸化を抑えるビタミンEがこの発毛の阻害に対して効果を有するのかについて、*In vivo*で検証することにより、*In vivo*における脂質ヒドロペルオキシドによる発毛阻害保護作用のある化合物のスクリーニング系の構築を目指した。

2. 実 験

2.1 全身性タモキシフェン誘導型PHGPx欠損マウスの交配と産出

図1に示す様に、全身性タモキシフェン誘導型PHGPx欠損マウス(Cre TG KOマウス; Cre+/-:TG+/-:PHGPx-/-)は、申請者が作成した内在性PHGPx欠損マウス(PHGPx-/-)が胚発生致死となるところ¹⁾、LoxP遺伝子で挟んだマウスPHGPxトランスジェニックTG遺伝子(PHGPx-F-Lox)によりトランスジェニックレスキュー法によって作成したコントロールマウス(TG+/+, PHGPx-/-)^{3,7)}とβアクチンプロモーターによって制御されたCreER遺伝子がトランスジェニックされたマウス(Cre+/-, PHGPx+/+)とPHGPxヘテロマウス(PHGPx+/-)を交配して得られたW-Creヘテロマウス(Cre+/+, PHGPx+/-)を交配することで得られた。この交配で生まれてくる子供のジェノタイプは、CRE TG KO (Cre+/-:TG+/-:PHGPx-/-)、CRE TGヘテロ (Cre+/-:TG+/-:PHGPx+/-)の2種類である。CRE TGヘテロマウスは内在性のPHGPx

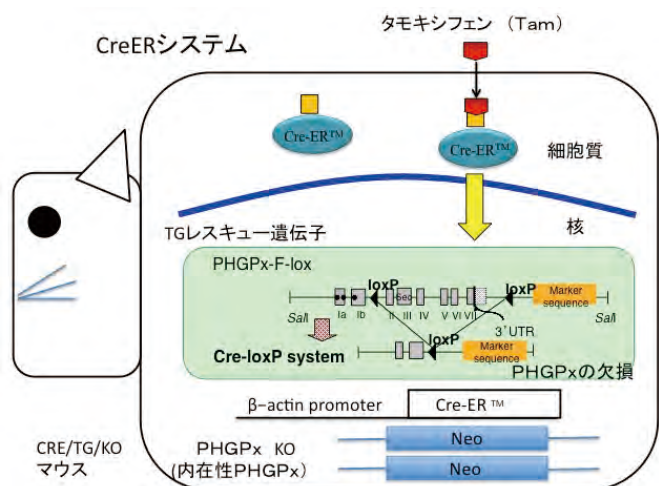


図1 全身性タモキシフェン誘導型 PHGPx 欠損マウス (CRE/TG/KO) におけるタモキシフェン添加による PHGPx 欠損のしくみ

ゲノム遺伝子を1本持つため、タモキシフェン投与により PHGPx は欠損されない。本実験では、CRE TGヘテロマウスをコントロールマウスとして用いた。

2.2 マウスのジェノタイプの判定

離乳時期 (3~4 週齢) のマウスの尾 0.5~1 cm を切断し、1.5 mL チューブに入れ 50 mM NaOH 180 μ l 加え、95 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートした。その後、1 M Tris-HCl (pH 8.0) を 20 μ l 加え、12000 rpm、10 分間、室温で遠心した。上清をサンプル DNA とし KOD-FX DNA Polymerase (TOYOBO) を用いて PCR を行った。Cre 遺伝子、内在性 PHGPx 遺伝子の WT は WT 用プライマーセットを用い 1.4 kbp のバンドが増幅される。KO は KO 用プライマーセットを用い 1.6 kbp のバンドが増幅される。TG 遺伝子は内在性の PHGPx と内部配列は全く同じなので、3' 側のマーカ配列を利用して TG 用プライマーセットを用いて増幅し、1.7 kbp のバンドで判定した。Cre 遺伝子は Cre 用プライマーセットを用いて約 600 bp のバンドを増幅した。論文³⁾を参照。

2.3 タモキシフェンの調製と皮膚への塗布方法の検討

タモキシフェン 10 mg を 99.5% エタノール 10 mL に完全に溶解し、軟膏 10 g と混ぜ合わせ作成した。タモキシフェン 5 mg/g 軟膏を 1 回に 0.01 g 相当を塗布した。コーン油の場合では直接タモキシフェンを 1 mg/ml となるように溶かして 50 μ l 相当を塗布した。マウスはメスの全身性タモキシフェン誘導型 PHGPx 欠損マウス、Cre/TG/KO (Cre^{+/+}-TG^{+/+}-PHGPx^{-/-}) とコントロールマウス、CreTGヘテロ (Cre^{+/+}-TG^{+/+}-PHGPx^{+/-}) を用意した。マウスにジエチルエーテルを用いて麻酔をかけ、バリカン

によって毛を刈り取り、次にシェービングクリームとシェーバーを用いて皮膚を傷つけないように剃毛した。完全に剃ったのち、翌日完全に剃毛した皮膚に右 2ヶ所左 2ヶ所の計 4ヶ所ずつ塗布した。塗布の回数の検討としては、3日連続 (上) あるいは 1日のみ (下) 1回軟膏を塗布した。毎日マウスを麻酔し、写真を撮影した。ビタミン E の添加の条件としてはビタミン E (VE) 500 μ M (mol/w) + 5 mg タモキシフェン/g 軟膏となるように調整し、タモキシフェンと同条件で塗布した。

2.4 HE 染色、抗体組織染色、TUNEL 染色

タモキシフェンを塗布した初日を 1 日目とし、3 日後、4 日後と 14 日後にマウスを解剖し皮膚を凍結切片にし、各染色を行った。マウスを頸椎脱臼した後、脱血後、皮膚のみをはぎ取った。はぎ取った皮膚を、PBS に 30 分浸したのち、PBS でよく洗い流し、10 mL チューブの中に 4% PFA を満たし、その中に切片を入れ 24 時間 4 $^{\circ}$ C で保存した。翌日 15% スクロース溶液に浸し、さらに翌日 15% スクロース溶液に再度浸し、4 $^{\circ}$ C で保存した。置換が終了した切片を OTC コンパウンドに浸し、30 分程度なじませたのち、ドライアイスの上で凍結させた。この凍結させた皮膚を 10 μ m の厚さで切片とした。抗体染色は切片のスライドガラスを室温で 1~2 時間風乾させた後、次の操作を行った。T-PBS (0.3% TritonX-100/PBS) で 3 回洗浄を行ったあと、ブロッキング液を加え室温で 1 時間反応させた。次に目的の 1 次抗体 (PHGPx 6F10 500 倍希釈⁹⁾, HNE : 4 倍希釈, AIF : 100 倍希釈) を室温で 4 時間反応させた。次に T-PBS で洗浄し、2 次抗体 (FLUORESCWIN 200 倍希釈, Cy3 200 倍希釈) をつけ、アルミホイルで遮光しながら室温で 3 時間反応させた。プレパレートはオールインワンの蛍光顕微鏡にて撮影した。HE 染色、TUNEL 染色は常法に従って行った。

3. 結果

3.1 PHGPx 欠損によって毛包が減少し発毛が遅延する

図 1 に示した様に、全身性タモキシフェン誘導型 PHGPx 欠損マウス (CRE/TG/KO) マウスでは、タモキシフェンをマウスに塗布あるいは投与するとタモキシフェンを取りこんだ細胞ではタモキシフェンがエストロゲン受容体 (ER 部分) に結合し、核移行シグナルが露出することにより、細胞質にあった CreER が核に移行し、PHGPx-F-Lox 遺伝子を破壊することにより、PHGPx 遺伝子が欠損する。コントロールマウス (CRE/TG/ヘテロ) では内在性 PHGPx ゲノム遺伝子が 1 本残っているため PHGPx-F-Lox 遺伝子が破壊されても PHGPx は欠損しない。この 2 つのマウスの背中を剃毛した後、翌日に皮膚にタモキシフェンを塗布することにより、どのようなフェノタイプ

がみられるのかについて、毎日観察した。本実験では、図2に示すようにタモキシフェンの塗布の方法および回数についても同時に検討した。背中右側には軟膏に溶かしたタモキシフェンを塗布した。一方、左側にはコーン油に溶かしたタモキシフェン (Tam) を塗布した。コーン油は液体状であるため非常に塗布しにくいことがわかり、本実験以降は軟膏に溶かしたタモキシフェンを用いることとした。図2に示す様に、6日目まではコントロールマウスもKOマウスも剃毛した部分に変化はみられなかった(コントロールマウスの背中の一部はすでに発毛がはじまっているのでこの部分は除外している)。10日目頃からコントロールマウスの背中では皮下が黒くなり13日目ではすでに発毛の回復状態が見られた。また16日後にはコントロールマウ

スではほぼ正常に戻った。一方、KOマウスではタモキシフェンを塗布した場合、13日目ぐらまでは発毛が見られず、15、16日後に皮下が黒くなり、以後22日以降ではほぼ正常に戻った。タモキシフェンの塗布回数は3日連続塗布と1日のみの塗布では特に違いがみられなかった。またコーン油と軟膏入りのタモキシフェンでもどちらでも効果はみられたが、コーン油は液体であるために塗布時に表面から流れるなどするために均一性、再現性には適していないと考えられたため、以後は軟膏に溶かしたタモキシフェンで塗布実験を行った。

次にタモキシフェン塗布後、3日目と14日目の皮膚組織のHE染色像を比較した。図3に示すように、タモキシフェン塗布後3日目では、コントロールマウスとPHGPx

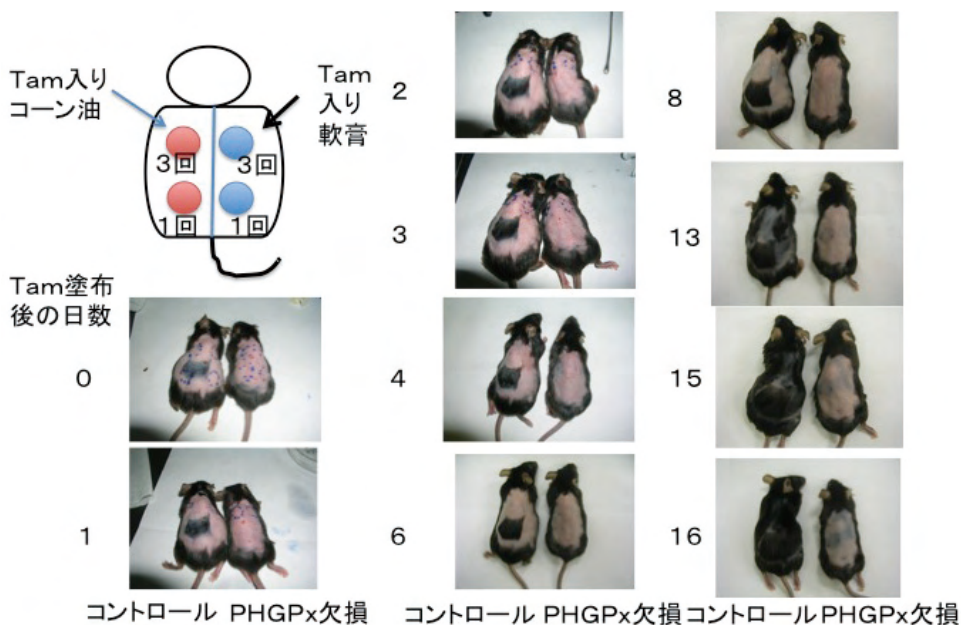


図2 Tam を塗布後の CRE/TG/ヘテロ (コントロール)、CRE/TG/KO (PHGPx 欠損) マウスの発毛への影響

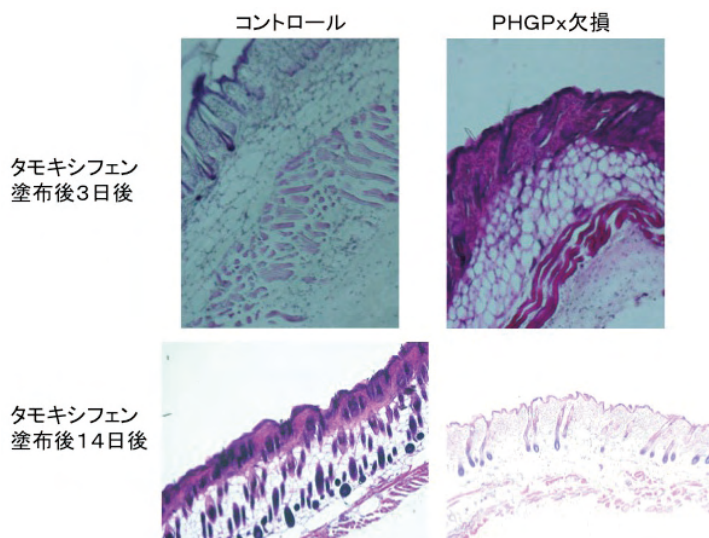


図3 タモキシフェン塗布後の毛包形成の変化 (HE 染色)

欠損マウスでは大きな違いは見られなかったが、14日目では、PHGPx欠損マウスにおいて、コントロールマウスに比べ著しい毛包細胞の数の減少が見られることが明らかとなった。このことから、皮膚へのタモキシフェンの塗布によるPHGPxの発現低下は毛包形成に異常をひきおこし、発毛が遅れると考えられた。

3.2 PHGPxの減少により毛包での内在性脂質酸化が亢進する

次に抗PHGPx抗体を用いて皮膚の組織染色を行った。図4に示すようにコントロールマウスの皮膚では毛包の部位にPHGPxの比較的強い染色がみられたが、タモキシフェン塗布4日後のPHGPx欠損マウスでは毛包でのPHGPxの発現がみられなくなっていた。PHGPxは生体膜脂質の酸化により生成したリン脂質ヒドロペルオキシドを還元する。

そこで、PHGPx欠損により酸化脂質の蓄積がみられるのかについて、酸化脂肪酸の分解物である4-ヒドロキシノネナール(4-HNE)に対する抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、図5に示すようにタモキシフェン添加により、コントロールマウスの皮膚に比べ、PHGPx欠損マウスの皮膚組織における4-HNEの染色強度の増加が観察された。特に毛包において強いシグナルが観察された。このことからPHGPx欠損により内在性の脂質酸化反応が亢進していることが示された。一方、TUNEL染色ではPHGPx欠損マウスにおいて細かいドット状の染色像の増加が観察された。毛包組織部位にも観察されたが、コントロールマウスの毛包組織にもみられたため、この染色像の特異性については明らかとはならなかった。以上の結果から、毛包におけるPHGPxの欠損により生じるリン脂質の酸化が毛包形成阻害のひとつの要因であると考えられた。

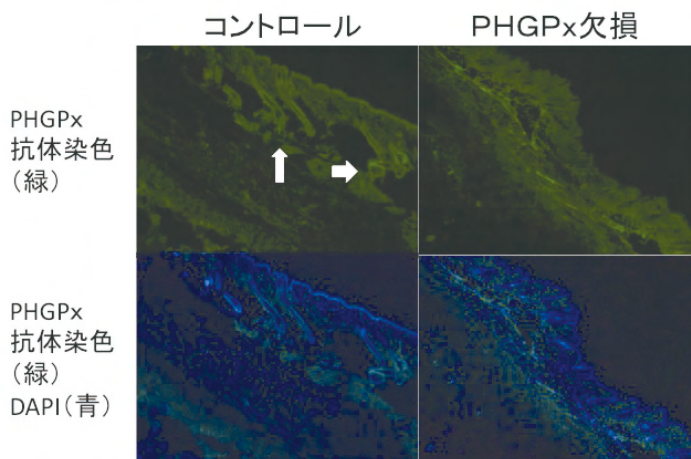


図4 タモキシフェン塗布4日後の毛包でのPHGPxの発現変化(抗体染色)

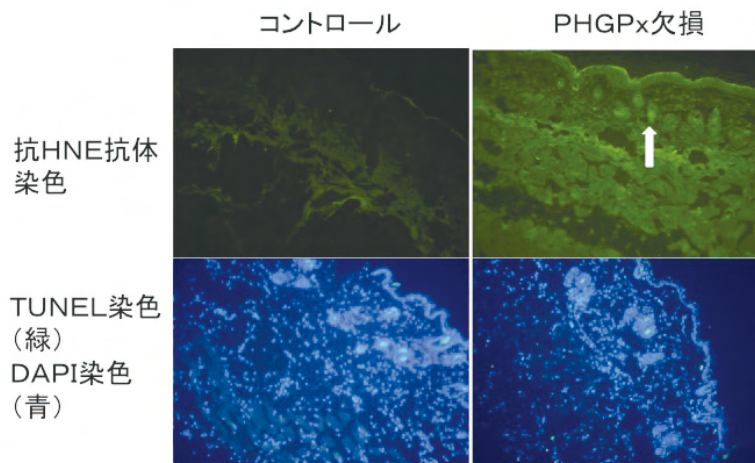


図5 タモキシフェン塗布後4日後の毛包皮膚組織における抗HNE抗体染色およびTUNEL染色

3.3 ビタミンE添加はPHGPx欠損による発毛の遅延を回復する

そこで次に、脂質ヒドロペルオキシドの生成を抑制できると考えられるビタミンEをタモキシフェンを塗布する際に軟膏に同時に混入し、PHGPx欠損による発毛遅延を抑制できるのかについて検討を行った。図6に示した様に、ビタミンEを加えたタモキシフェンでは投与回数に関わらず、12日目には皮下に発毛がみられ16日目には正常に戻り、図1のコントロールマウスと同様な時期に発毛がみられた。このことからビタミンEはタモキシフェン添加によるPHGPx欠損による内在性の脂質ヒドロペルオキシド由来の発毛阻害を抑制出来ることが明らかとなった。

本方法は、今後*In vivo*における脂質ヒドロペルオキシド依存的な発毛阻害を抑制する化合物のスクリーニング系として有効であると考えられた。

4. 考察

本研究では、全身性タモキシフェン誘導型PHGPx欠損マウスを用いて、酸化リン脂質の還元酵素であるPHGPxを欠損させることによりおきる発毛阻害のメカニズムについて解析した。これまでに我々はMEF細胞を用いてPHGPx欠損による細胞死のメカニズムについて詳細に検討してきた。PHGPxをMEF細胞で欠損させると内在性のリン脂質ヒドロペルオキシドが24時間後に生成し、2日後から3日後にカスパーゼ非依存的な新規細胞死を誘導することを見出している。本実験においてもタモキシフェン塗布後4日目の皮膚組織において酸化脂質の生成を4-HNE抗体を用いて検出できた。データは示していない

が、活性化カスパーゼ抗体を用いた組織染色ではコントロールマウスとPHGPx欠損マウスでは違いが見られなかった。このことから毛包細胞においてもカスパーゼ非依存的な細胞死が起きていると考えられた。MEF細胞ではドット状のTUNEL染色像が得られたが、毛包ではタモキシフェンを塗布しなくても染色像が観察されたことから非特異的な染色像をみている可能性が考えられた。この点については今後の課題である。ビタミンE添加によりPHGPx欠損による発毛の遅延を抑制できたことから、この発毛遅延が脂質ヒドロペルオキシド依存的事であることを強く示唆している。今回、LC-ESI-MS/MSによる酸化脂質の解析はできなかったが、毛包をマイクロダイジェクション法により抽出してどのような酸化脂質が蓄積しているかの解析を行うことが重要であろう。最近、ケラチノサイト特異的PHGPx欠損マウス¹⁰⁾が報告され、興味深いことに、出生後3週齢までは毛包形成が遅延するがその後は回復することが報告された。本実験においては、胎児ではなく大人のマウスで起きる現象をみている。タモキシフェン塗布による成体でのPHGPx欠損による毛包形成遅延がケラチノサイトを介したものなのか、それとも直接的な毛包障害によるものなのかは今後慎重に検討する必要があると考えられる。しかしながら、我々のマウスではケラチノサイトを含む皮膚の細胞の大きなダメージはみられていない。なぜ皮膚の細胞はPHGPxが欠損しても細胞死が誘導されないのか、また毛包細胞が特に内在性で生じる脂質ヒドロペルオキシドに弱いのかを解明できれば、新たな脱毛のメカニズムを明らかにできる可能性も秘めていると考えている。

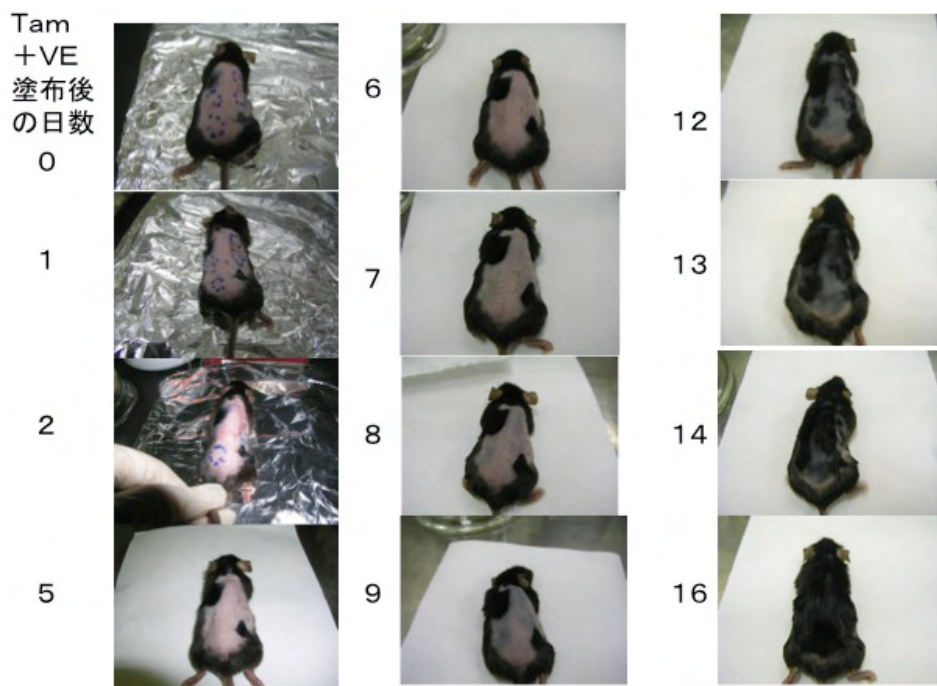


図6 ビタミンE添加によるPHGPx欠損マウスにおける発毛阻害の抑制効果

5. 総括

本研究では成体の皮膚および毛包での内在性の脂質ヒドロペルオキシド生成が毛包形成に遅延を引き起こすこと、ビタミンEは強い抑制効果を示すことを明らかにした。また本実験系は、*In vivo*における新たな治療薬のスクリーニング系にも利用できると思われる。

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いただきましたことを深く感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Imai H, Nakagawa Y, : Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells, *Free Radic Biol Med.*, 34 (2), 145-169, 2003.
- 2) Imai H, Hirao F, Sakamoto T, Sekine K, Mizukura Y, Saito M, Kitamoto T, Hayasaka K, Nakagawa Y, : Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 305 (2), 278-286, 2003.
- 3) Imai H, Hakkaku N, Iwamoto R, Suzuki T, Tajima Y, Konishi K, Minami S, Ichinose S, Ishizaka K, Shioda S, Arata S, Nishimura M, Naito S, Nakagawa Y, : Depletion of selenoprotein GPx4 in spermatogenesis causes male infertility in mice, *J. Biol. Chem.*, 284, 32522-32532, 2009.
- 4) Ueta T, Inoue T, Furukawa T, Tamaki Y, Nakagawa Y, Imai H, Yanagi Y, : Glutathione peroxidase 4 is required for maturation of photoreceptor cells, *J. Biol. Chem.*, 287, 7675-7682, 2012.
- 5) 今井浩孝, 松岡正城, 中西広樹, 田口良, 石田規子, 七里元督, 吉田康一, 二木悦雄, 清水孝彦, 新井洋由, 中川靖一, : ビタミンEは肝臓特異的PHGPx欠損マウスの出生直後死をレスキューする, ビタミンE研究の進歩, XV, 68-72, 2012.
- 6) 今井浩孝, : 生体膜脂質酸化ホメオスタシスの破綻による新規細胞死と疾患, *オレオサイエンス*, 11, 15-23, 2011.
- 7) Imai H, : New strategy of functional analysis of PHGPx knockout mice model using transgenic rescue method and Cre-loxP system., *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 46, 1-13, 2010.
- 8) Schoenmakers E, Agostini M, Mitchell C, Schoenmakers N, Papp L, Rajanayagam O, Padidela R, Ceron-Gutierrez L, Doffinger R, Prevosto C, Luan J, Montano S, Lu J, Castanet M, Clemons N, Groeneveld M, Castets P, Karbaschi M, Aitken S, Dixon A, Williams J, Campi I, Blount M, Burton H, Muntoni F, O'Donovan D, Dean A, Warren A, Brierley C, Baguley D, Guicheney P, Fitzgerald R, Coles A, Gaston H, Todd P, Holmgren A, Khanna KK, Cooke M, Semple R, Halsall D, Wareham N, Schwabe J, Grasso L, Beck-Peccoz P, Ogunko A, Dattani M, Gurnell M, Chatterjee K.: Mutations in the selenocystein insertion sequence-binding protein 2 gene lead to a multisystem selenoprotein deficiency disorder in humans, *J. Clin. Invest.*, 120, 4220-4235, 2010.
- 9) Imai H, Suzuki K, Ishizaka K, Ichinose S, Oshima H, Okayasu I, Emoto K, Umeda M, Nakagawa Y, : Failure of the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) in the spermatozoa of human infertile males, *Biol. Reprod.*, 64, 674-683, 2001.
- 10) Sengupta A, Lichti UF, Carlson BA, Cataisson C, Ryscavage AO, Mikulec C, Conrad M, Fischer SM, Hatfield DL, Yuspa SH, : Targeted disruption of glutathione peroxidase 4 in mouse skin epithelial cells impairs postnatal hair follicle morphogenesis that is partially rescued through inhibition of COX-2., *J Invest Dermatol*, 133(7), 1731-1741, 2013.

口腔粘膜歯肉由来 iPS 細胞を用いた口腔化粧品の安全性評価の確立

東北大学大学院歯学研究科分子・再生歯科補綴学分野

江 草 宏

The aim of this project is to develop bioengineered safety evaluation tools for oral care reagents using patient-derived stem cells, which mimics structure and function of oral mucosa and tongue in vitro. We first generated iPS cells from human gingival fibroblasts via transduction of Oct3/4, Sox2, Klf4 without using c-Myc oncogene. By this method, gingival fibroblasts demonstrated a higher reprogramming efficiency than the skin fibroblasts, which have been conventionally used for the generation of iPS cells. We also generated dendritic cells from mouse iPS cells which showed antigen-presenting cell function. To fabricate tongue structure in vitro, we applied cyclic strain to mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. We found that application of cyclic strain greatly enhances the skeletal myogenesis of these stem cells with an aligned structure. These findings would be important step toward the further application of these methods to apply development of safety evaluation tools for oral care reagents.

1. 緒 言

近年、国民の歯や口腔内への関心の高まりに伴い、雑誌やインターネット上では口臭予防や歯を白くする効能を謳った歯磨材やデンタルリンス（洗口液）などの商品が数多く販売されている。これら商品の多くは、植物エキスなどを配合して他の商品と差別化を図っているが、薬事法のもと医薬部外品の承認を得るには時間とコストがかかるため、“口腔化粧品”として販売されている実態がある。このような状況下、口腔内に用いる化粧品や医薬品材料の安全性を、動物や健常者由来の細胞を用いるだけでなく、アレルギーなどの疾患を有している患者の細胞を用いて確実に評価する技術の開発は重要な課題である。

口腔粘膜は免疫応答が活発に起こる軟組織である。そのため、本来ならば口腔化粧品の安全性評価は、個人に由来する口腔粘膜細胞を用いることが望ましい。口腔粘膜は、粘膜の最表層を覆う上皮層および線維芽細胞や樹状細胞、T細胞などを含む粘膜固有層から構成されており、これらの細胞が外来刺激に対する免疫応答を担当している。したがって、試験管内で口腔化粧品に対する口腔粘膜の応答を再現するためには、患者由来の上皮細胞、線維芽細胞あるいは樹状細胞などの免疫を制御する細胞を用意する必要がある。特に、患者個人の細胞から抗原提示細胞として機能する樹状細胞を作製する技術は、口腔化粧品などの材料に対する粘膜の免疫応答の個人差に重要な知見を導く可能性

がある。

また、味覚器である舌は口腔内で外来刺激を繊細に感じとる。特に口腔乾燥症（ドライマウス）の患者では、一般的な洗口液であってもこれに含まれるアルコール等の刺激によって舌痛症を引き起こすため、舌に対する口腔化粧品の刺激を試験管内で評価するシステムは有用と思われる。しかしながら、舌を構成している主な細胞は、細胞増殖能力が乏しい骨格筋細胞や味蕾細胞であるため、必要な数の細胞を用意することは困難である。

これに 대응べく、近年では生物の巧妙な機能と構造を基にして工業技術を創り出す生物工学（Bioengineering）の研究が急速に進展している。また、複雑な構造をもつ粘膜や舌を試験管内で構築するためには、iPS細胞や間葉系幹細胞のように発生学的により未分化な幹細胞を用いることが有用である¹⁾。iPS細胞は、体細胞に数個の遺伝子を導入することでその記憶を初期化した人工多能性幹細胞であり、将来的な組織工学の幹細胞源として大いに期待されている。我々は、歯科治療の過程で切除される機会の多い組織である、口腔粘膜歯肉の細胞を用いることで容易にiPS細胞が樹立可能であることを見出しており²⁾、この細胞が歯科医学研究や歯科医療技術に有用なツールになり得るものと期待している³⁾。

一方、骨髄由来間葉系幹細胞（BMSC）は、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、筋細胞、神経細胞等様々な組織細胞に分化することが可能である。BMSCは、患者の骨髄液から比較的容易に採取でき、患者への侵襲も少ないため、現実的な組織再生の幹細胞源として期待されている⁴⁾。しかしながら、通常の培養条件では幹細胞を成熟した組織細胞に分化誘導することは容易ではないため、近年では、成長因子や足場の要素に加えて、細胞配向や外的刺激などの生体内における擬似環境を用いて、幹細胞を目的の組織細胞に確実に誘導する技術が注目されている^{5,6)}。



Development of safety evaluation tools for oral care reagents using gingiva-derived iPS cells

Hiroshi Egusa

Division of Molecular and Regenerative Prosthodontics, Tohoku University Graduate School of Dentistry

これらを背景に、本研究課題では、歯肉から採取した線維芽細胞から作製したiPS細胞を、口腔粘膜を構成する細胞（上皮細胞、線維芽細胞、樹状細胞など）に分化誘導できれば、個人由来の培養口腔粘膜として口腔化粧品などの安全性評価に用いることが可能ではないかと考えた。また、BMSCから舌組織の細胞を誘導するために、骨格筋の特異な細胞配向を試験管内で再現する方法に着目した。本研究の目的は、歯肉由来iPS細胞あるいはBMSCを用いて試験管内で口腔粘膜あるいは舌を構成する細胞を作り出し、患者個人の体質を反映した細胞培養システムを構築し、口腔化粧品が口腔粘膜や舌に及ぼし得る為害作用を評価する技術に繋げることである。

2. 実験

2.1 患者歯肉を用いたiPS細胞の樹立

これまでに我々は、山中4因子（Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc）⁷⁾を用いた初期化効率、マウス歯肉線維芽細胞の方が皮膚線維芽細胞よりも7倍以上高いことを明らかにしている²⁾。ただし、これら初期化因子に含まれるc-Mycは癌遺伝子であるため、これを用いずにiPS細胞を作製することが望ましい⁸⁾。そこで、本研究課題ではヒト歯肉組織を用い、山中4因子からc-Mycを除いた3因子を導入することでiPS細胞の樹立を試みた。

歯科治療の過程で切除された患者歯肉由来の線維芽細胞に、pMXsレトロウイルスベクターを用いてOct3/4, Sox2, Klf4遺伝子を導入し、mitomycin Cで処理したSNLフィーダー細胞上に播種した。形成された胚性幹細胞（ES細胞）様コロニーをクローニングし、そのES細胞様の性質を、RT-PCR解析およびテラトーマ形成実験にて評価した。また、ヒト皮膚線維芽細胞を用いて同様の初期化誘導を行い、歯肉線維芽細胞の初期化効率と比較検討した。初期化効率の評価では、初期化誘導50～60日目に未分化iPS細胞のマーカーのひとつであるアルカリフォスファターゼ（ALP）について染色を行い、ALP陽性のES細胞様コロニーの数から初期化効率を算出した。

2.2 歯肉由来iPS細胞から樹状細胞への分化誘導

マウスES細胞から樹状細胞に分化誘導した報告^{9,10)}を参考に、iPS細胞から樹状細胞への分化誘導を試みた。実験には、我々がこれまでに、マウス歯肉線維芽細胞から癌遺伝子c-Mycを用いずに樹立したiPS細胞²⁾を用いた。誘導実験では、iPS細胞をOP9細胞フィーダーと共培養し、CM-CSFを加えた。また、より成熟した樹状細胞様細胞を得るために、TNF- α 、IL-4およびanti CD40を加えた。

歯肉由来iPS細胞から得られた樹状細胞様細胞が抗原提示能を示すか否かを検討する目的で、iPS細胞由来樹状細胞様細胞に卵白アルブミン（OVA）を添加して一晩培養し

た後、培地を交換しOVAを除去した。その後、樹状細胞様細胞をOVA特異的なOT-IIマウス由来のCD4⁺T細胞（FACS AriaTMにて分離）と共に3日間培養し、細胞増殖を評価した。

さらに、作製したiPS細胞由来樹状細胞様細胞による抗原特異的な抗体産生の誘導を評価するため、iPS細胞由来樹状細胞様細胞を雄性C57BL/6マウスの腹腔内に1週間毎に3回注射した。さらに1週間後にOVAを経鼻投与し、その2週間後に血清および唾液中の抗体価を測定した。

2.3 BMSCを用いた骨格筋細胞への分化誘導技術の開発

C57BL/6マウスの大腿骨内腔より取り出した骨髄細胞からBMSCを分離培養し、単一細胞株を樹立する目的で長期継代培養による自然不死化を誘導した。この不死化細胞からシリンドー法および限界希釈法を用いた細胞クローニングによって単一細胞株を作製した。これらの細胞株の中で、著明な骨、軟骨および脂肪細胞への分化能が確認された多分化能細胞株を実験に使用した。BMSCの骨格筋分化誘導には、Mugurumaら¹¹⁾の報告にある培地を用いた。

細胞に反復伸展刺激を与えるための細胞伸展装置を、カスタムメイドで作製した。この細胞伸展装置では、細胞培地中に設置されたシリコンシートの両端がクランプで挟まれている。片方のクランプは固定され、もう一方のクランプが付属のモーターによって一軸方向に牽引を繰り返すことにより、シリコンシート上に播種した細胞に対して周期的伸展刺激が加えられる構造になっている。シリコンシート上にBMSCを播種し、骨格筋分化誘導培地中にて10%、0.17 Hz（10回/1分）の周期的伸展刺激を与え、骨格筋分化を骨格筋細胞分化に特異的な遺伝子発現（RT-PCR法）および蛋白質発現（免疫染色法）について検討した。

3. 結果

3.1 c-Myc癌遺伝子の導入を伴わないヒト歯肉由来iPS細胞の樹立

患者歯肉から樹立したヒト歯肉線維芽細胞を、Oct3/4, Sox2, Klf4の3因子の導入によって初期化を誘導した結果、誘導50日後にES細胞様のコロニーが出現した（図1-A）。これらのコロニーから樹立した3つのiPS細胞クローン株は、いずれもES細胞のマーカー遺伝子である、NANOG, OCT3/4, REX1, SOX2, TERTをES細胞と同程度に発現していた（図1-B）。テラトーマ形成実験の結果、樹立したiPS細胞株はマウス精巣に移植した10週間後に著明な腫瘍形成を示し、腫瘍内部には神経組織（外胚葉由来）、軟骨、筋肉、脂肪組織（中胚葉由来）および腸管上皮様組織（内胚葉由来）の存在を認めた。以上の結果から、樹立したiPS細胞は三胚葉由来する様々な細胞組織に分化することが可能な多能性幹細胞であることが示された（図1-C）。

また、3名の患者から採取したヒト歯肉線維芽細胞およびヒト皮膚線維芽細胞を用いて初期化効率の検討を行った結果、ヒト歯肉線維芽細胞はOct3/4, Sox2, Klf4の3因子を導入した60日後に約0.02-0.07%の初期化効率を示したのに対して、ヒト皮膚線維芽細胞はES細胞様のコロニーを形成しなかった(図1-A)。

3.2 iPS細胞から樹状細胞への分化誘導

iPS細胞をOP9細胞フィーダーと共培養し、CM-CSFを加えた結果、位相差顕微鏡にて多くの樹状細胞特有の形態を示す細胞を認めた。また、FACS解析の結果、これらのiPS細胞由来樹状細胞様細胞には、樹状細胞に特異的な細胞表面マーカー(CD11c陽性)の発現を認めた(図2-A)。

iPS細胞由来樹状細胞様細胞にOVAを添加した共培養

群は、OVA非添加群(コントロール群)と比較して、OVA特異的T細胞受容体遺伝子導入マウスとして知られているOT-IIマウス由来のCD4⁺T細胞の数を増加させた(図2-B)。さらに、OVAを添加したiPS細胞由来樹状細胞様細胞をマウス腹腔内に投与することで、血清および唾液中における抗原特異的な抗体産生が著明に亢進した。

3.3 反復伸展刺激がBMSCの骨格筋細胞分化に及ぼす影響

3.3.1 細胞配向

カスタムメイドの細胞伸展装置(図3-A)を用いて周期的伸展環境下でマウスBMSCを48時間培養した結果、細胞および細胞骨格であるアクチン線維は伸展方向に対して並行に一樣に配向した(図3-B)。一方、静的培養細胞では、

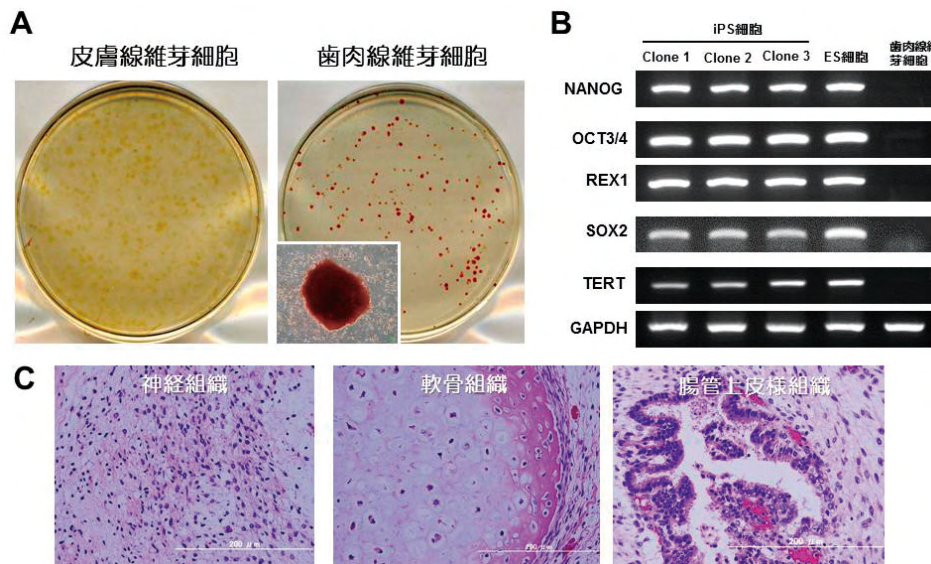


図1 c-Myc導入を伴わないヒト歯肉線維芽細胞由来iPS細胞の樹立
 A: 初期化誘導60日後のALP染色像
 B: RT-PCR解析(GAPDG: 内性コントロール)
 C: テラトーマ形成実験(HE染色像)

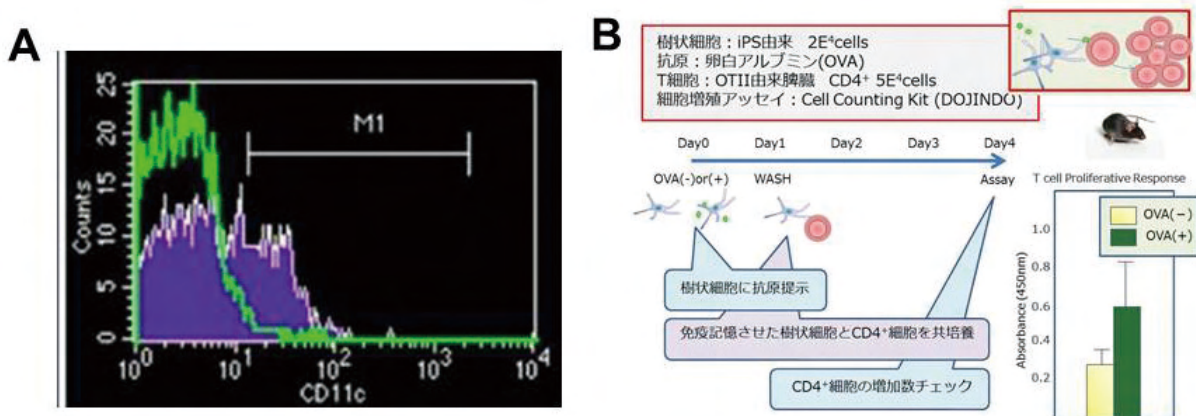


図2 iPS細胞から樹状細胞への分化誘導
 A: 樹状細胞マーカー(CD11c)陽性細胞の検出(FACS解析)
 B: 抗原(OVA)提示後のiPS細胞由来樹状細胞によるOVA特異的CD4⁺T細胞の増殖

細胞およびアクチン線維の配向は観察されなかった。また、周期的伸展刺激はBMSCを配向させる一方でその増殖を抑制し、骨格筋細胞が成熟する過程の細胞融合に必要な細胞同士の緊密な接触を促した。

3.3.2 骨格筋分化

RT-PCR解析の結果、周期的伸展刺激は骨格筋細胞分化に特異的な遺伝子であるMyf5, myogenin, MRF4の発現を促進した。周期的伸展を与えて培養したBMSCは、平滑筋に特異的な遺伝子であるmyocardinは発現しなかった。また、他の平滑筋マーカー遺伝子である α smooth muscle actin (α -SMA)の発現は、周期的伸展培養によって低下した。一方、周期的伸展刺激はTension-induced / inhibited proteins-1 (TIP1) 遺伝子の発現を促進し、TIP3遺伝子の発現を抑制した。また、周期的伸展刺激は

小胞体ストレスに関連するGlucose-regulated protein 78 (BIP/GRP78)の遺伝子発現を経時的に促進した(図4-A)。リアルタイムRT-PCRの結果、周期的伸展を与えて培養した5および7日後におけるMyf5およびMRF4の遺伝子発現は、静的培養の場合と比較して有意に増加していることが確認された(図4-B)。

また、周期的伸展刺激を5日間与えて培養したBMSCは、細胞が融合した多核の骨格筋細胞様の像を示した(図4-C)。静的および周期的伸展培養5日後の細胞を、骨格筋関連タンパク質myogeninおよびmyosinで免疫蛍光染色した結果、周期的伸展を与えた細胞は、静的に培養した細胞と比較して、これらのタンパク質を強く発現している像が観察された(図4-D)。

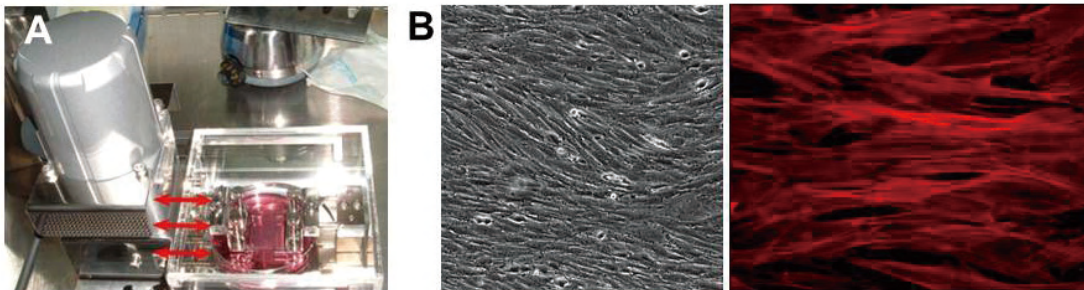


図3 反復伸展刺激がBMSCの細胞配向に及ぼす影響¹²⁾

A: 細胞伸展装置
B: 伸展刺激48時間後のBMSC (左図: 位相差顕微鏡像, 右図: ファロイジン染色像)

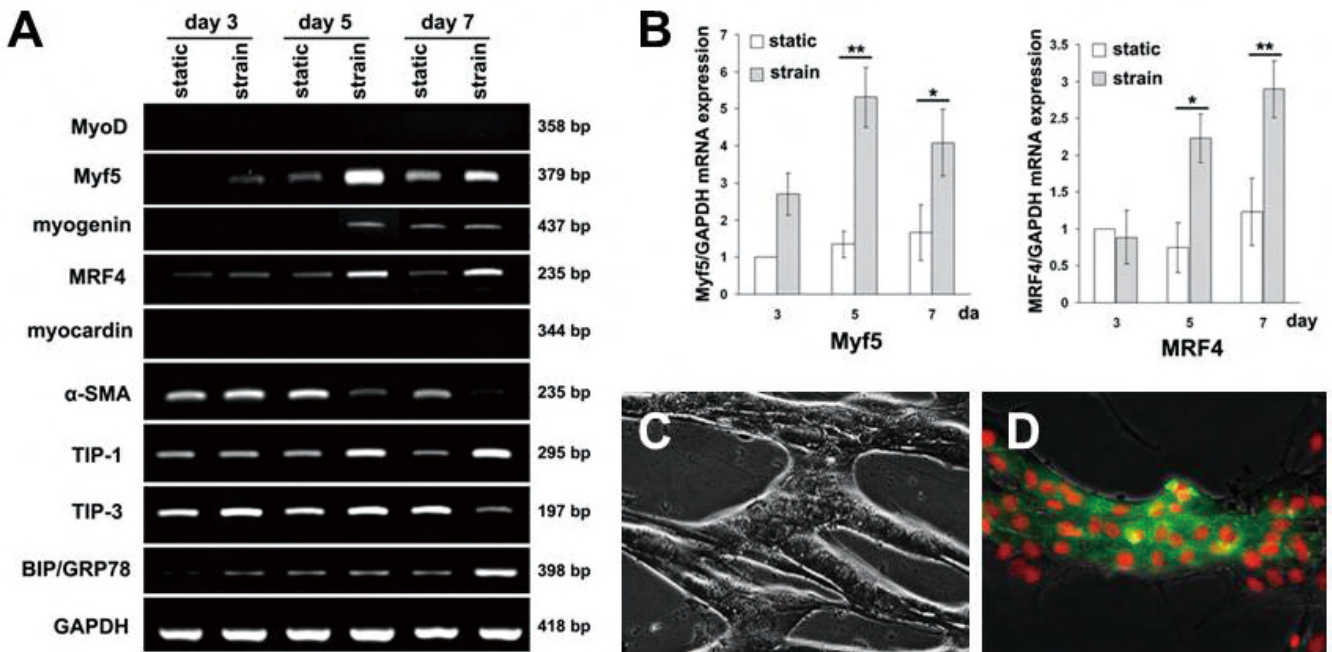


図4 反復伸展刺激がBMSCの骨格筋細胞分化に及ぼす影響¹²⁾

A: RT-PCR解析 (static: 静的培養, strain: 伸展刺激培養)
B: リアルタイムRT-PCR解析 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: ANOVA)
C: 伸展刺激5日後 (位相差顕微鏡像)
D: 伸展刺激5日後 (myosin免疫蛍光染色像)

4. 考 察

iPS細胞を口腔化粧品品の安全性評価ツールに応用するためには、iPS細胞の資源となる組織の採取が容易で、患者にとって安全・低侵襲でなければならない。また、iPS細胞を効率よく作製するためには、その資源となる組織の細胞は初期化されやすい性質を有していることが望ましい。歯肉は歯科治療の過程で切除される機会の多い組織であり、切除による創傷は良好な治癒経過をたどる。本研究によって、従来iPS細胞作製に用いられている皮膚線維芽細胞ではOct3/4, Sox2, Klf4のみによる初期化誘導は困難であるが、ヒト歯肉線維芽細胞を用いることで癌遺伝子c-Mycを用いなくてもiPS細胞の樹立が可能であることが示唆された。歯肉線維芽細胞は皮膚線維芽細胞と比較してテロメラーゼ活性に関与するTert遺伝子を高発現している²⁾。したがって、歯肉線維芽細胞が初期化されやすい一因として、内在性のTertの発現が関与している可能性が考えられる。臨床現場で日常的に切除して捨てられている歯肉は、優れたiPS細胞の資源であり、将来の医療や薬剤の安全性評価に利用される可能性のある魅力的な組織と言えるであろう。

樹状細胞は、口腔粘膜を含む様々な組織に常在する白血球の一種であり、抗原タンパク質をT細胞に提示する機能をもつ細胞である。樹状細胞は、外来抗原に対する獲得免疫応答を開始させるだけでなく、自己に対する免疫応答を抑制する免疫学的自己寛容の維持、あるいは過剰な免疫応答を抑制する上でも重要な役割を果たしていると考えられている¹⁰⁾。したがって、口腔粘膜に存在する樹状細胞が、口腔化粧品などに対するアレルギー反応に関与している可能性は否定できないため、患者由来の樹状細胞を用いて口腔化粧品に対する応答を評価することには意義があると思われる。しかしながら、成熟した樹状細胞は増殖能をもたないため、患者から十分な数の樹状細胞を得ることは困難である。iPS細胞は自己複製能を有するため、多能性を保ったまま無限に増殖させることが可能である。したがって、無限に増殖できるiPS細胞を材料として樹状細胞を作製することが可能になれば、必要な数の患者由来の樹状細胞を作製できるようになる。本研究において、マウス歯肉由来iPS細胞から抗原提示能を有する樹状細胞を誘導できることが明らかとなった。今後、抗原提示細胞として機能する樹状細胞を患者由来iPS細胞から作製することで、口腔化粧品などに対する患者特有の免疫応答の評価に重要な知見が導かれることが期待される。

多分化能を有するBMSCを、舌を構成する骨格筋細胞に効率的に分化誘導する技術はいまだ確立されていない。生体内の骨格筋組織は伸展、弛緩を繰り返しており、組織内の細胞はそれによる力を受けている。本研究では、試験管内における周期的伸展刺激が骨格筋細胞への分化誘導に応

用できる可能性に着目し、周期的伸展刺激がBMSCに及ぼす影響を検討した。その結果、10%、0.17Hzの周期的伸展刺激は、マウスBMSCを伸展方向に配向し、骨格筋特異的遺伝子およびタンパク質の発現を促すことにより骨格筋分化を促進することが明らかとなった。また、周期的伸展刺激によるBMSCの骨格筋分化促進作用には、細胞配向による細胞間の緊密な接触および機械的刺激に誘発されたTIP1/3あるいは小胞体ストレス関連遺伝子などが関与している可能性が示唆された¹²⁾。本研究で明らかとなった周期的伸展刺激の骨格筋分化誘導作用は、これまで困難であったBMSCの効率的な骨格筋分化誘導を可能とする新たな技術として、組織工学に貢献することが期待される。

5. 総 括

この度のコスメトロジー研究の成果として、ヒト歯肉線維芽細胞を用いることで、癌遺伝子c-Mycを用いずにiPS細胞を容易に樹立することが可能であることを明らかにした。今後、この技術を基盤にして患者由来iPS細胞を用いた口腔粘膜および舌の構築を目指す予定である。また、マウス歯肉由来iPS細胞から抗原提示能を有する樹状細胞を誘導することに成功した。今後は、ヒトiPS細胞を用いて同様の樹状細胞を作製し、口腔化粧品品の生体安全性評価に応用したいと考えている。さらに、周期的伸展刺激を用いて生体内の環境を模倣することにより、BMSCから効率的に骨格筋細胞を作製することが可能であることを明らかにした¹²⁾。今後は、この技術を用いて、三次元的な骨格筋配向細胞の積層化を試みると共に、患者由来iPS細胞を用いても同様の誘導が可能か否かを検討したい。本研究成果が、将来的には患者個人から作製した培養口腔粘膜、樹状細胞あるいは舌組織を用いて、口腔化粧品などに対する患者個人の寛容性を評価するシステムの構築に繋がり、コスメトロジー研究の発展の一助となることを期待する。

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いただきましたことを深く感謝申し上げます。また、共同研究者として多大なる御協力を頂いた大阪大学大学院歯学研究科・予防歯科学教室の関根伸一先生に深甚の謝意を表します。

(引用文献)

- 1) Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K.; Stem cells in dentistry- Part I: Stem cell sources, *J. Prosthodont. Res.*, 56, 151-165, 2012.
- 2) Egusa H, Okita K, Kayashima H, Yu G, Fukuyasu S, Saeki M, Matsumoto T, Yamanaka S, Yatani H.; Gingival fibroblasts as a promising source of induced

- pluripotent stem cells, PLoS One, 5, e12743, 2010.
- 3) Egusa H.; iPS cells in dentistry, Clin. Calcium, 22, 67-73, 2012.
- 4) Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K.; Stem cells in dentistry- Part II: Clinical application, J. Prosthodont. Res., 56, 229-248, 2012.
- 5) Martin I, Wendt D, Heberer M.; The role of bioreactors in tissue engineering, Trends Biotechnol., 22, 80-86, 2004.
- 6) Matsumoto T, Sasaki J, Alsberg E, Egusa H, Yatani H, Sohmura T.; Three-dimensional cell and tissue patterning in a strained fibrin gel system, PLoS One, 2, e1211, 2007.
- 7) Takahashi K, Yamanaka S.; Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, Cell, 126, 663-676, 2006.
- 8) Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S.; Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts, Nat. Biotechnol., 26, 101-106, 2008.
- 9) Senju S, Haruta M, Matsunaga Y, Fukushima S, Ikeda T, Takahashi K, Okita K, Yamanaka S, Nishimura Y.; Characterization of dendritic cells and macrophages generated by directed differentiation from mouse induced pluripotent stem cells, Stem Cells, 27, 1021-1031, 2009.
- 10) Senju S, Hirata S, Matsuyoshi H, Masuda M, Uemura Y, Araki K, Yamamura K, Nishimura Y.; Generation and genetic modification of dendritic cells derived from mouse embryonic stem cells, Blood, 101, 3501-3508, 2003.
- 11) Muguruma Y, Reyes M, Nakamura Y, Sato T, Matsuzawa H, Miyatake H, Akatsuka A, Itoh J, Yahata T, Ando K, Kato S, Hotta T.; In vivo and in vitro differentiation of myocytes from human bone marrow-derived multipotent progenitor cells, Exp. Hematol., 31, 1323-1330, 2003.
- 12) Egusa H, Kobayashi M, Matsumoto T, Sasaki J, Uruguchi S, Yatani H.; Application of cyclic strain for accelerated skeletal myogenic differentiation of mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells with cell alignment, Tissue Eng. Part A, 19, 770-782, 2013.

ヒトiPS細胞を用いた*in vitro*毛包誘導モデルの開発

慶應義塾大学医学部皮膚科学教室

大山 学

In the present study, we successfully established a protocol to induce human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) into keratinocyte precursor cells, expressing keratin 18 and 14. By co-culturing hiPSC-derived keratinocyte precursor cells with human dermal papilla cells, we were able to, at least partially, recapitulate bidirectional crosstalk between hair matrix cells and the dermal papilla in the hair follicle, which may provide a valuable tool for future investigation.

1. 緒言

毛髪とそのスタイルは個人の印象を左右し、時として職業までも連想させるなど我々の社会生活に影響を与える。そのため、毛髪の維持、発育に関わる物質に対する社会的ニーズは大きい。従って毛包細胞に対し生理活性を示す分子を効率よくスクリーニングする方法の確立はコスメトロジーにおいて重要な意味をもつ。

本研究の目的は、ヒト induced pluripotent stem cell (hiPSC) を用いた *in vitro* 毛包誘導モデルの開発である。毛包自体の発生、毛幹(毛髪)の形成・伸長には毛母細胞(毛幹形成に特化した毛球部のケラチノサイト)と毛乳頭細胞間の上皮-間葉系相互作用が重要である。毛包の維持、発育促進に関与する因子を効率よく選択するには、この相互作用を再現するモデルを開発する必要がある。特に *in vitro* の系はスクリーニングなどに有用であり、これまでも確立が試みられてきた^{1,2)}。

従来のヒト細胞を用いたモデルは、ヒト細胞の供給の限界の点から相互作用を実現する能力が低い成人由来の分化したケラチノサイトと継代数が高く特性を失いつつある毛乳頭細胞を組み合わせる方法をとらざるを得なかった¹⁾。これまでのヒト細胞を用いた毛包再構成実験で、成人ケラチノサイトよりも新生児由来のケラチノサイトの方が毛乳頭細胞とクロストークし毛包を再現する効率が高いことが知られており^{3,4)}、幼若なケラチノサイトを用いれば毛包での上皮-間葉系相互作用を再現できる可能性はより高くなることが予想される。そこで、本研究ではhiPSCからケラチノサイトへ誘導する過程で得られる幼若な分化段階のhiPSC由来ケラチノサイトとヒト毛乳頭細胞の共培養に基

づく *in vitro* 毛包誘導モデルの開発を試みることにした。

計画初年度となる昨年度はhiPSCからケラチノサイトへの分化誘導と分化度調節のための条件確立を試みた。その結果、1) 上皮系への分化には胚様体形成をした後、レチノイン酸(RA)を添加した条件で培養する必要がある 2) コラーゲンでコートした培養ディッシュとケラチノサイト無血清培地を使用してhiPSCを培養した時のみケラチン14、18の発現がみられる 3) 効率よくケラチノサイトへの分化を誘導するためにはBMP4の添加が必要であることが判った。また、分化誘導に適したRAとBMP4の濃度はそれぞれ1 μ M RA、25ng/ml BMP4であろうと結論された。また、hiPSCのラインごとに試薬に対する反応性が異なることも示唆された。

計画最終年度となる本年度は昨年度評価した山中4因子を導入した201B7、WD39の二つのhiPSCラインに加え4因子のうちMYCを導入していないWDT2を加えた3つのラインについてケラチノサイト前駆細胞への誘導を試みるとともに、得られた細胞をヒト毛乳頭細胞と共培養し *in vitro* 毛包誘導モデルの確立を目指した。

2. 実験

2.1 細胞と試薬

本研究においてはヒト真皮線維芽細胞にレトロウイルスを用いて山中3または4因子(*POU5F1*、*SOX2*、*KLF4*、*MYC*+/-)を導入して確立した3つのhiPSCライン(201B7⁵⁾、WD39⁶⁾、WDT2 [3因子のライン]⁷⁾)を使用した。前年度の報告で記載した如く、hiSP細胞はマイトマイシン処理したマウス胎児線維芽細胞(MEF)をフィーダーとして使用し、ヒトiPS細胞培地(20% Knockout Serum Replacement (Life technologies)、2mM L-glutamine (Sigma)、 1×10^{-4} M nonessential amino acids (Sigma)、 1×10^{-4} M 2-mercaptoethanol (Sigma)、4ng/ml FGF2 (Wako, Osaka, Japan)、0.5% penicillin and streptomycin (Life technologies) 含有 DMEM/Ham's F12培地)で継代培養した。

共培養で使用するヒト毛乳頭細胞は慶應義塾大学倫理申請2005-0075に従って同意の上で採取された頭部良性腫瘍の



Development of *in vitro* hair follicle induction model using human induced pluripotent stem cells

Manabu Ohyama

Department of Dermatology, Keio University School of Medicine

周辺部の頭皮サンプルから実体顕微鏡下でマイクロダイセクションによって得た毛乳頭を Amniomax-C100 Complete medium (Life Technologies) にて培養したものを使用した。

2.2 前年度の検討で決定した条件を用いた3つの異なる hiPSC ラインを用いたケラチノサイト前駆細胞への分化誘導

前年度決定した RA および BMP4 の濃度を用いて hiPSC をケラチノサイト前駆細胞へ分化誘導した。hiPSC をフィーダーから遊離させ胚様体形成を行い、2日追加培養した後、1 μM RA (Sigma) および 25 ng/ml BMP4 (R&D Systems) を培地に追加、3日間培養の後、ゼラチンコートディッシュを用いてケラチノサイト培地 defined-KC serum free medium (DKSM, Life technologies) にて付着培養し合計11日間培養し hiPSC 由来ケラチノサイト前駆細胞を得た。

2.3 ケラチノサイト前駆細胞のケラチノサイトマーカー発現の解析

2.2の段階で得られた hiPSC 由来ケラチノサイト前駆細胞について、遺伝子発現レベル、タンパク発現レベルのそれぞれについてケラチノサイトマーカーの発現を解析した。

前年度同様に遺伝子発現レベルの解析にはリアルタイム PCR 解析を用いた。具体的には RNeasy Mini または Micro キット (Qiagen) を用いて解析対象となる細胞から totalRNA を分離。Superscript III First Strand Synthesis SuperMix (Life Technologies) を用いて cDNA を合成した後、Primer Express software (Life Technologies) を用いて作成したプライマーを使用し、Power SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies) と Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR system (Life Technologies) を用いて解析した。PCR の条件は、95℃ 10分、95℃ 15秒、60℃ 60秒を40サイクル行った。得られ

た値 (ΔCT値) は glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の ΔCT 値を基準に標準化し比較検討した。

タンパクレベルでの解析は解析対象となるケラチノサイト前駆細胞をコラーゲンコートしたカバースリップに4% paraformaldehyde を用いて固定し、一次抗体として mouse anti-human monoclonal keratin 18 (KRT18) (1:100, ab668, Abcam, Cambridge, UK), mouse monoclonal anti-human tumor protein p63 (P63) (1:100, ab735, Abcam) or mouse monoclonal anti-human keratin 14 (KRT14) (1:100, ab7800, Abcam) を 4℃ 一昼夜反応させた後、PBS にて洗浄して30分間 Goat anti-mouse IgG Alexa 488 (1:200, Life Technologies) と反応させ観察した。

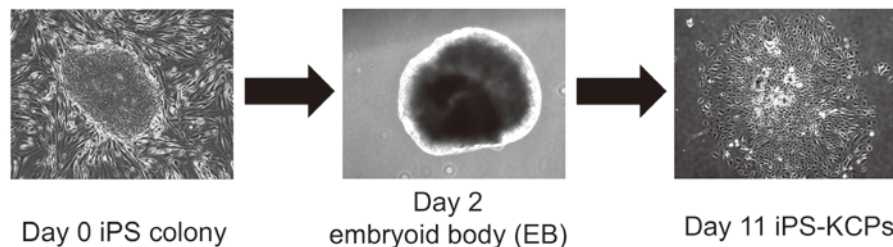
2.4 hiPSC 由来ケラチノサイト前駆細胞とヒト毛乳頭細胞の共培養系

hiPSC 由来ケラチノサイト前駆細胞または、コントロールとしてのヒトケラチノサイトとヒト毛乳頭細胞の共培養は、Inuiらの方法¹⁾を改変して用いた。2.5 × 10⁵個の hiPSC 由来ケラチノサイト前駆細胞または、コントロールとしてのヒトケラチノサイトを透過性のあるメンブレンが底に張られたトランスウェルインサート (Corning, Corning, NY) にまき、80% コンフルエントに到達した2継代目のヒト毛乳頭細胞を培養中のディッシュに培養液を共有するように重ねた。共培養の培養液として DMEM と F12 を 3 : 1 の比率で混合したものを用いた。共培養開始後2日目に totalRNA を回収し遺伝子発現解析を行った。

3. 結果

3.1 胚様体形成させ RA と BMP4 を作用させた hiPSC はラインを問わずケラチノサイト系への分化を示す形態をとる

前年度確立したプロトコール (図1)⁸⁾を用いて201B7、



Day	0	2	5	11
Medium	iPS medium (-FGF)		Defined KC serum free medium	
Factors		Retinoic acid BMP4		
Culture	Floating		Collagen I coated dishes	

図1 本研究で確立された hiPSC からケラチノサイト前駆細胞を得るためのプロトコール (文献⁸⁾より改変)

WD39、WDT2の全てのhiPSCラインの分化誘導を試みたところ、全てのラインで分化誘導開始後11日後にはケラチノサイトに類似した上皮系の形態を有する細胞に変化していることが明らかになった。

3.2 分化誘導されたhiPSC由来細胞は幼若ケラチノサイトに類似したマーカー発現パターンを示す

上記のプロトコールによって分化誘導されたhiPSC由来ケラチノサイト前駆細胞をケラチノサイト系統のマーカー(ケラチン14、18、p63)に対するモノクローナル抗体を用いて蛍光染色した。ケラチン18は主として単層上皮に発現するケラチンで比較的幼若なケラチノサイトで発現しており、ケラチン14は分化したケラチノサイト(特に基底膜)で発現しているケラチンである。図2に示すように、どのラインから誘導したものでも、ケラチン18、p63を強く発現し、コロニーの周囲ではケラチン14が発現していた⁸⁾。これは幼若な分化段階のケラチノサイトでみられるパターンであり、目的とするケラチノサイト前駆細胞をhiPSCから誘導することができたことを示す所見である。

3.3 ヒトケラチノサイトと毛乳頭細胞を用いた共培養系の確立

*in vitro*で毛球部における上皮-間葉系相互作用を再現

するため、共培養システムの確立を試みた(図3、文献¹⁾を参考)。まず、このシステムにおいてコントロールとして正常ケラチノサイトが毛乳頭細胞と相互作用することを確認した。

2日間の共培養の後、ケラチノサイトにおける毛包関連遺伝子の発現を評価したところ、共培養しない場合と比較して発現が有意($p < 0.05$)に上昇しており(図4)、この系が上皮-間葉系相互作用の評価に有用であることが示された。

3.4 hiPSC由来ケラチノサイト前駆細胞と毛乳頭細胞を用いた共培養系の確立

次いで前述のプロトコールで分化誘導したhiPSCが共培養系でヒト毛乳頭細胞と相互作用しヒトケラチノサイトと同様に毛包関連遺伝子発現を増強するかどうかについて検討した。

興味深いことにヒト毛乳頭細胞と共培養すると201B7hiPSC由来のケラチノサイト前駆細胞は正常ケラチノサイトより毛包関連遺伝子を強く発現した(図5)。毛球部における上皮-間葉系相互作用は双方向である。そこで、hiPSC由来ケラチノサイト前駆細胞が共培養した毛乳頭細胞に影響を与えるか否かを検討した。

すると201B7由来ケラチノサイト前駆細胞は正常ケラ

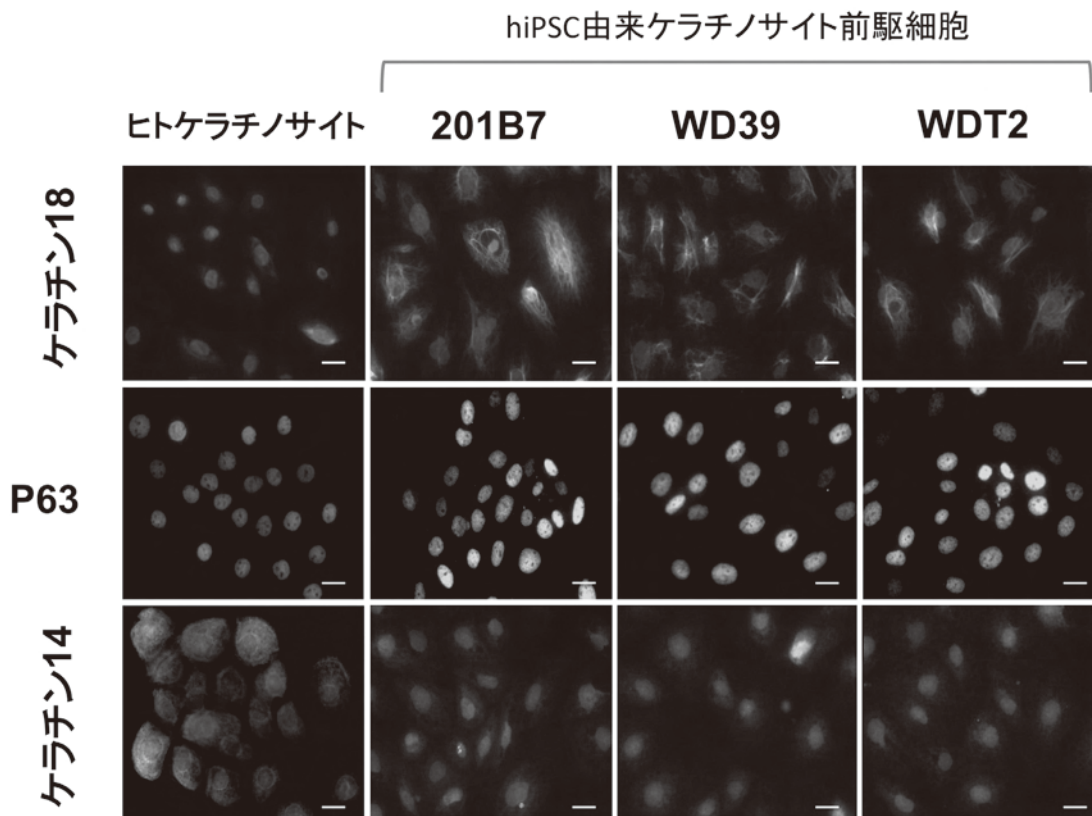
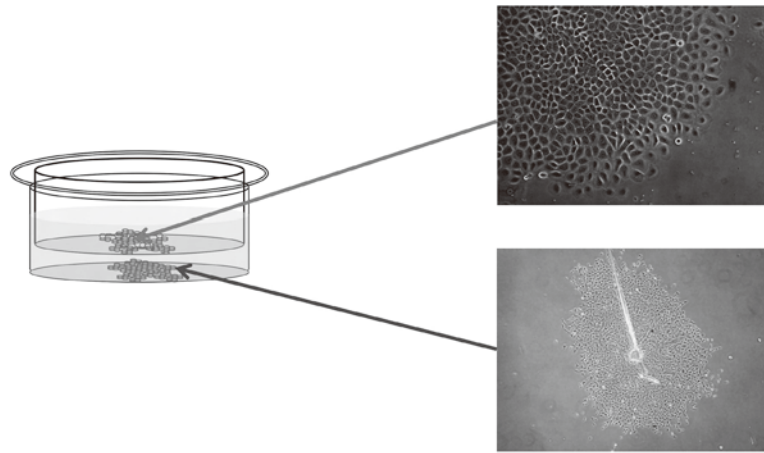


図2 3つの異なるhiPSCラインから得たケラチノサイト前駆細胞はケラチン18、p63陽性、ケラチン14弱陽性を示す(文献⁸⁾より改変)

正常ヒトケラチノサイト
またはhiPCS由来ケラチノサイト前駆細胞



ヒト毛乳頭細胞

図3 本研究で用いられた *in vitro* でヒト毛球部の上皮-間葉系相互作用を評価する共培養モデル (*in vitro* 毛誘導モデル)

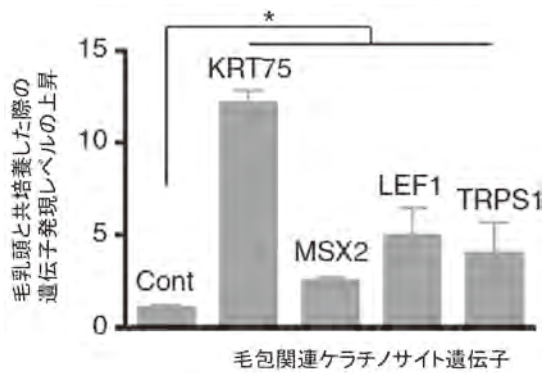


図4 共培養システムにおける正常ケラチノサイトでの毛包関連遺伝子の発現増強 (文献⁸⁾より改変)

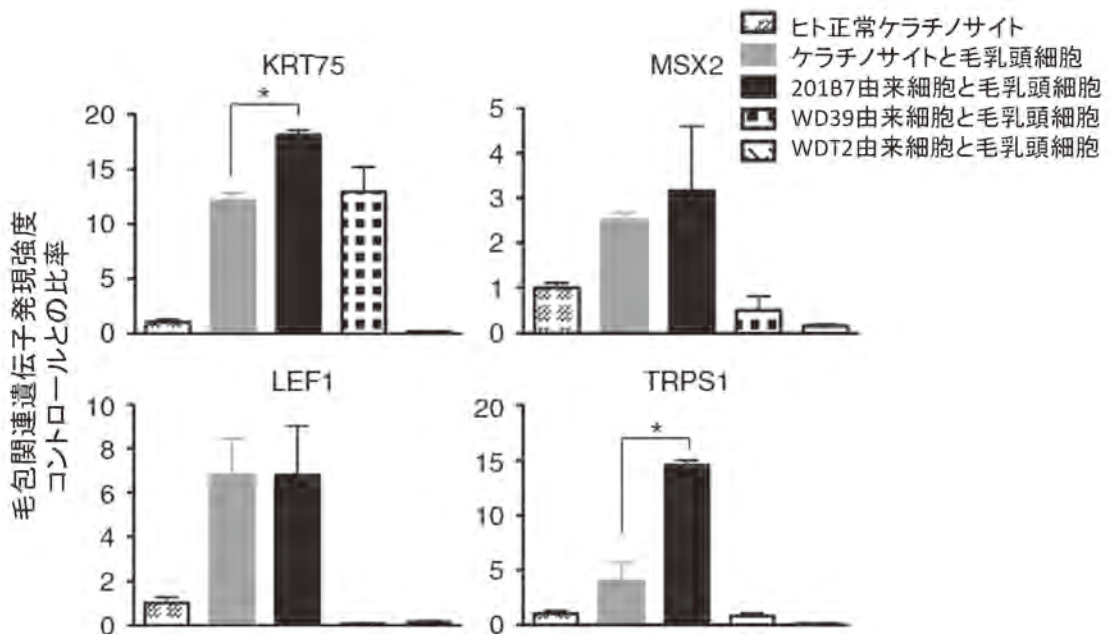


図5 共培養系による hiPSC 由来ケラチノサイト前駆細胞における毛包関連遺伝子の発現の増強 (文献⁸⁾より改変)

チノサイトよりも強くヒト毛乳頭細胞に働きかけ毛乳頭細胞のバイオマーカーであるALPL、BMP4、LEF1の発現を増強することが明らかになった(図6)。つまり、201B7hiPSC由来ケラチノサイト前駆細胞と毛乳頭細胞からなる共培養の系は、毛球部で起きている上皮-間葉系細胞間相互作用の少なくとも一部を再現しており、本研究で目指した*in vitro*毛包誘導モデルとして使用することができる可能性があることが示された。

4. 考察

検討した3種類のhiPSCラインの全てがほとんど同じケラチノサイト分化マーカーの発現を示していたにもかかわらず、共培養の系では201B7由来の細胞のみがコントロールとして使用したヒト正常ケラチノサイトと比較して毛乳頭細胞からのシグナルに対して優れた反応性を示した。少なくとも本研究の開始時に予測した「幼若な性質を示すケラチノサイトは毛乳頭からの毛誘導シグナルに対する反応性が高い」という仮説は部分的には支持されたことになる。

201B7hiPSCラインがその他のラインと比較して有意な差をもって優れた反応性を示した理由としては、1) 初期化の程度が他のラインより優れていた 2) デフォルトで上皮系に分化しやすい などの理由があると思われる今後さらなる比較検討が必要と考えられた。また、今回の結果から、hiPSCのラインごと特性が大きく異なり、使用目的に合うラインを決定するために、応用ごとに数種のラインを比較検討する必要があることも明らかになった。

今回の検討では、hiPSCからケラチノサイトへの分化誘導の程度が均一ではなく、ヘテロな細胞集団を使用したため、どの分化段階の細胞が良好な反応を示したのか判断しにくい。今後はケラチノサイトの表面マーカーなどを用いて事前にソーティングすることにより、より効率のよいシステムの構築が可能になることが期待される。

本研究で確立されたシステムに関しては、どの程度毛球部の生物学的イベントを再現しているのか十分に検討できていない。今後はマイクロアレイなどを用いた網羅的遺伝子解析を行うなどしてさらに厳密にシステムを定義していくことが必要であると考えられる。

様々な改善点が考えられるものの、本研究はhiPSCの活用法の一つの方向性を示唆するものであり、今後さらなる改良により、毛包に作用する薬剤のスクリーニングシステムなどへの発展が期待できると思われる。

5. 総括

hiPSCから幼若なケラチノサイトの特性をもつケラチノサイト前駆細胞を作成するプロトコルを確立するとともに、ヒト毛乳頭細胞との共培養することにより*in vitro*毛包誘導モデルのプロトタイプを作成した。(本研究は文献⁸⁾の一部として行われた)

(引用文献)

- 1) Inui S, Fukuzato Y, Nakajima T, Yoshikawa K, Itami S. Androgen-inducibile TGF-beta1 from balding dermal papilla cells inhibits epithelial cell growth: a clue to

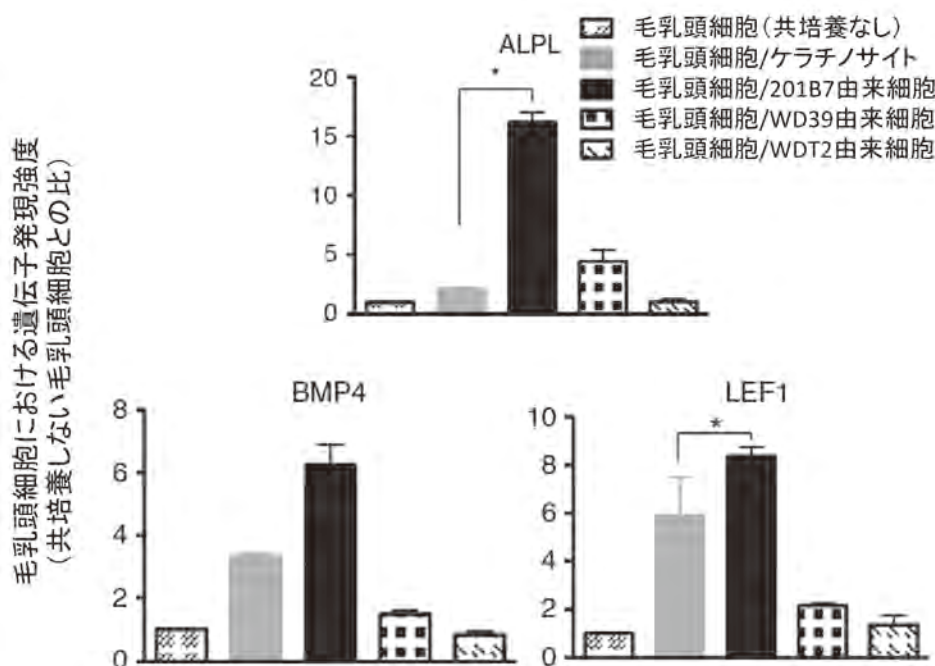


図6 共培養系による毛乳頭細胞におけるバイオマーカーの発現の増強 (文献⁸⁾より改変)

- understand paradoxical effects of androgen on human hair growth. *FASEB J* 2002; **16**: 1967-1969.
- 2) Ohyama M, Veraitch O. Strategies to enhance epithelial-mesenchymal interactions for human hair follicle bioengineering. *J Dermatol Sci* 2013; **70**: 78-87.
- 3) Ehama R, Ishimatsu-Tsuji Y, Iriyama S, et al. Hair follicle regeneration using grafted rodent and human cells. *J Invest Dermatol* 2007; **127**: 2106-2115.
- 4) Thangapazham RL, Klover P, Wang JA, et al. Dissociated Human Dermal Papilla Cells Induce Hair Follicle Neogenesis in Grafted Dermal-Epidermal Composites. *J Invest Dermatol* 2013.
- 5) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; **131**: 861-872.
- 6) Ohta S, Imaizumi Y, Okada Y, et al. Generation of human melanocytes from induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 2011; **6**: e16182.
- 7) Imaizumi Y, Okada Y, Akamatsu W, et al. Mitochondrial dysfunction associated with increased oxidative stress and alpha-synuclein accumulation in PARK2 iPSC-derived neurons and postmortem brain tissue. *Mol Brain* 2012; **5**: 35.
- 8) Veraitch O, Kobayashi T, Imaizumi Y, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived ectodermal precursor cells contribute to hair follicle morphogenesis in vivo. *J Invest Dermatol* 2013; **133**: 1479-1488.

皮膚の天然保湿因子(NMF)の形成における転写因子MafBの役割

横浜市立大学生命医科学研究科

片岡 浩介

Natural Moisturizing Factor (NMF) in the skin epidermis is a complex mixture of water-soluble compounds such as amino acids. Filaggrin protein is one of the major components of NMF and is digested to amino acids through multi-step processing and modifications. In this study, we focused on the transcriptional regulation of the *filaggrin* gene expression during skin epidermal development. We identified an enhancer element upstream of the *filaggrin* gene and found that a transcription factor MafB activates it. Further elucidation of the mechanism of the *filaggrin* expression may help to understand how NMF are formed and maintained in skin epidermis.

1. 緒言

皮膚において水分保持の機能を担っているのは、主として天然保湿因子 (Natural Moisturizing Factor : NMF) と呼ばれる、いわゆる「うるおい成分」である。NMFは、フィラグリンなどのタンパク質の分解生成物から複雑な過程を経て形成されることが近年明らかになってきた。NMFの主たる成分であるフィラグリンタンパク質は、繰り返し構造を持った巨大なポリペプチド鎖 (プロフィラグリン) として合成されたのちに、その繰り返し構造の単位へと切り離され、さらにアミノ酸へと分解されてNMFを構成する。NMFは保湿だけでなく皮膚のバリア機能・恒常性維持にも必須であり、例えばフィラグリン遺伝子の変異によって皮外界からの異物・細菌の侵入の防御能が低下して、アトピー性皮膚炎の発症リスクが増大することもわかっている¹⁾。

フィラグリンタンパク質のプロセシングの過程には、各種の切断酵素 (プロテアーゼ) が関与しており、さらに、フィラグリンタンパク質のリン酸化やシトルリン化などの修飾も必要とされるなど、複雑で精妙に制御されている。これまでに、内外の精力的な研究によって、プロセシングに関わる酵素 (プロテアーゼ) などが同定されて、少しずつその過程の分子機構があきらかになりつつあるが²⁾、まだ全容の理解には至っていない。特に、フィラグリンの合成過程 (遺伝子発現) の制御機構については、普遍的な転写因子 Activator Protein 1 (AP-1) の関与³⁾ が知られている他には、あまりよく分かっていないのが現状であり、皮膚を構成する角化細胞でのみ特異的に発現する仕組みは全

く不明である。

そこで本研究では、フィラグリンの転写制御やプロセシング調節の分子機構を探ることによって、皮膚の水分保持機能の調節機構の一端を明らかにすることを目的とする。

2. 実験

2.1 MafB欠損マウスの皮膚におけるフィラグリンタンパク質の異常

皮膚の角化細胞で発現する転写因子 MafB を欠損するマウスの皮膚を組織学的に解析し、またフィラグリンに注目してその発現レベルやプロセシングを調べた。

2.2 MafB過剰発現マウスの作製と解析

転写因子 MafB が皮膚の形成とフィラグリンタンパク質の発現に及ぼす影響をさらに調べる目的で、MafB を過剰発現するマウスを作製し、その表現型を解析した。

2.3 MafB欠損マウスにおける遺伝子発現解析

野生型および MafB 欠損マウス (胎生 18.5 日) の皮膚角化細胞より RNA を抽出し、フィラグリン遺伝子 mRNA の発現レベルを、定量 PCR 法を用いて検討した。また、網羅的に遺伝子発現の変化を調べる目的で、野生型および MafB 欠損マウス (胎生 18.5 日) の皮膚角化細胞から抽出した mRNA を用いて、マイクロアレイ解析を行った。

2.4 フィラグリン遺伝子座周辺の *in silico* 解析と ECR の同定

フィラグリン遺伝子座周辺の *in silico* 解析を行い、発現調節に関わるエンハンサーとして機能する可能性が高い領域 (Evolutionally conserved non-coding region; ECR) の同定を試みた。

2.5 フィラグリン遺伝子 ECR を介した MafB による転写の活性化

同定された ECR を含む DNA 領域をヒト・ゲノム中から



Roles of transcription factor MafB in the formation of natural moisturizing factor (NMF) of skin epidermis

Kohsuke Kataoka

Graduate School of Medical Life Science
Yokohama City University

クローニングし、ルシフェラーゼ遺伝子を持つレポーター・プラスミドに組み込んで、このレポーター・プラスミドと MafB 発現ベクターを培養細胞 BHK 21 (ハムスター腎繊維芽細胞由来) に共発現させ、ルシフェラーゼ活性を測定することによって、MafB が ECR 配列を介して転写を活性化しうるかどうかを検討した。

3. 結果

3.1 MafB 欠損マウスの皮膚におけるフィラグリタンパク質の異常

私たちはこれまでに、bZip タイプの転写調節因子 MafB が皮膚の角化細胞で発現していることを見出していた。MafB は、マクロファージ⁴⁾ や副甲状腺⁵⁾ などの組織・細胞の分化を司ることがこれまでに明らかにされていたので、角化細胞の分化にも深く関与している可能性が考えられたため、MafB 遺伝子を欠損するマウスの皮膚を解析することにした。

組織学的な解析から、MafB 欠損マウスの皮膚では、角質層の減少と層板顆粒の減少が見られたことから、フィラグリタンパク質の量が低下している可能性が予想された。抗フィラグリタン抗体を用いた免疫組織染色により、実際にフィラグリタンパク質の発現レベルと分布の異常が起きていることがわかった。そこで、マウス皮膚よりタンパク質を抽出し、Western blot 法により解析したところ、MafB 欠損マウスの皮膚ではフィラグリタンパク質の発現量とプロセッシングが明らかに低下していることが判明した。このことは、MafB がフィラグリタンから NMF を形成する複数のステップを制御する重要な役割を担っていることを示唆している。

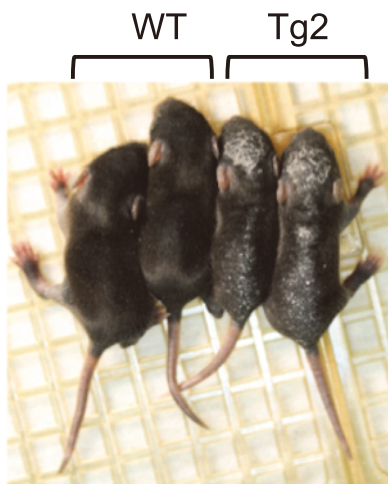


図1 MafB 過剰発現マウスの作製と解析

ケラチン 14 遺伝子プロモーター支配下で MafB を発現するトランスジェニック・マウスを作製した。得られた 3 系統のうちの 1 つ (Tg 2) の外観を野生型 (WT) と比較した。

3.2 MafB 過剰発現マウスの作製と、その皮膚の解析

転写因子 MafB が皮膚の形成とフィラグリタンパク質の発現に及ぼす影響をさらに調べる目的で、MafB を過剰発現するマウスを作製することにした。皮膚角化細胞の基底層で発現するケラチン 14 遺伝子のプロモーター支配下で MafB を過剰発現するトランスジェニック・マウスを作製し、3 系統を得ることができた。そのうちの 1 系統 (Tg2) の 8 日齢の外観を示す (図 1)。これらの過剰発現マウスでは、皮膚の過剰な角化が観察され、組織学的な解析からも、角質層が過剰に生成されていることがわかった。ただし、この表現型は週齢が上がり成体になると次第に消失し、野生型マウスと変わらない外観となった。その一方で、成体においてはおよそ半分の頻度でパピローマの形成が見られ、それらのパピローマではフィラグリタンパク質が過剰に産生されていた。

これらの MafB 欠損および過剰発現マウスの皮膚の解析から、MafB は皮膚の角化細胞の分化を正に制御することが示唆された。

3.3 MafB 欠損マウスにおける遺伝子の発現レベルの解析

次に、フィラグリタンパク質の発現低下が、転写調節のレベルで生じているかどうかを調べるため、野生型および MafB 欠損マウス (胎生 18.5 日) の皮膚角化細胞より RNA を抽出し、それぞれにおけるフィラグリタン遺伝子 mRNA の発現レベルを、定量 PCR 法を用いて検討したところ、野生型マウスのおよそ 5 分の 1 にまで低下していた (図 2)。フィラグリタン遺伝子以外のさまざまな皮膚の角化過程に関与する遺伝子について、インヴォルクリン、ロリクリンなどの構造タンパク質を中心に調べたが、これらの遺伝子の発現レベルに変化はなかった。

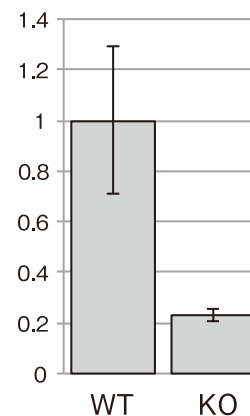


図2 MafB 欠損マウスの皮膚角化細胞における定量 PCR 解析
フィラグリタン遺伝子の発現量を、コントロールとした *gapdh* 遺伝子の発現量によって補正し、野生型マウス (WT) における発現レベルを 1 とした場合の MafB 欠損マウス (KO) における発現量をグラフ化した。

さらに網羅的に遺伝子発現の変化を調べる目的で、野生型およびMafB欠損マウス（胎生18.5日）の皮膚角化細胞から抽出したmRNAを用いて、マイクロアレイ解析を行った（図3）。用いたアレイにはフィラグリン遺伝子は含まれていないが、フィラグリン以外にもレペチン（フィラグリンタンパク質と構造的に類似している）などの角化に関与する構造タンパク質をコードする遺伝子のいくつかの発現がMafB欠損マウスでは低下していることがわかった。また、意外なことに脂質代謝に関連する酵素などをコードする遺伝子の発現が上昇していることも判明した。MafBは転写制御因子として脂質代謝系遺伝子の発現を負に制御する活性も併せ持つ可能性が考えられた。

3.4 フィラグリン遺伝子座周辺の*in silico*解析とECRの同定

次に、フィラグリン遺伝子の発現制御機構を解明する手がかりを得るため、フィラグリン遺伝子座周辺の*in silico*解析を行うことにより、進化的に保存度の高い非コード領域

（Evolutionally conserved non-coding region; ECR）の同定を試みた。このような保存領域は、近傍の遺伝子（この場合フィラグリン遺伝子）の発現調節に関わるエンハンサーとして機能する可能性が高いからである。

図4に示すように、フィラグリンタンパク質はこれまでに指摘されている通りに動物種間の相同性は低いため、エクソン領域での相同性はほとんど見られない。一方で、遺伝子の5'上流領域には進化的な保存性の高い領域が3カ所ほど見いだされた。このことは、フィラグリン遺伝子の発現調節機構が哺乳類の皮膚形成において重要な役割を担っているため、進化を通じて保たれてきたことを示唆している。私たちはこれらの保存領域を、プロモーター近傍側からECR1～3と命名した。

3.5 フィラグリン遺伝子ECRを介したMafBによる転写の活性化

ECR1、ECR2、ECR3はそれぞれエンハンサー活性を担っている可能性が高いので、これらの領域をヒト・ゲノム

microarray analysis (KO v.s. WT)

Down-regulated (< x -2.0) 58 genes

GO:1533	cornified envelope	(P=4.2 x 10 ⁻⁵)
GO:31424	keratinization	(P=0.0066)
GO:5856	cytoskeleton	(P=0.0067)
GO:9993	epidermal cell differentiation	(P=0.0078)

Up-regulated (> x 2.0) 109 genes

GO:6629	lipid metabolism	(P=0.0316)
GO:5792	microsome	(P=0.0456)

図3 MafB 欠損マウスの皮膚角化細胞のマイクロアレイ解析
MafB 欠損マウス (KO) における mRNA の発現量を野生型マウス (WT) と比較し、Gene Ontology (GO) 解析を行った。

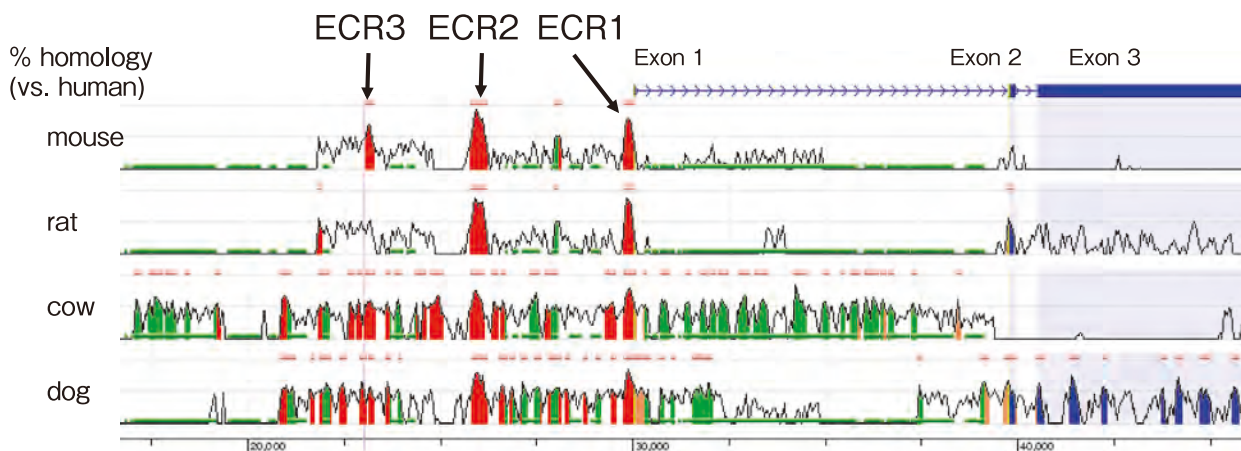


図4 フィラグリン遺伝子上流領域の動物種（哺乳類）間での保存性の*in silico*検索
ヒトのフィラグリン遺伝子座（exon1～3）とその上流領域（約13kb）を、マウス、ラット、ウシ、イヌの相同な領域と ECR ブラウザ (<http://ecrbrowser.dcode.org/>) を利用して比較した。保存性の高い領域を、転写開始点の近傍側から順に ECR1～3 とした。

中からクローニングし、ルシフェラーゼ遺伝子を持つレポーター・プラスミドに組み込んだ。このレポーター・プラスミドと MafB 発現ベクターを培養細胞 BHK21 (ハムスター腎繊維芽細胞由来) に共発現させ、ルシフェラーゼ活性を測定することによって、MafB が ECR 配列を介して転写を活性化しうるかどうかを検討した (図 5)。ECR1 (フィラグリン遺伝子プロモーター領域近傍) のみでは、MafB による活性化はほとんど見られなかったが、ECR1 と 2 を連結すると、MafB による顕著な活性化が観察された。ECR1 と 3 の組み合わせではそのような活性化は見られなかった。したがって、MafB は ECR2 を介してフィラグリン遺伝子の発現を促進すると考えられた。

さらに、MafB が直接結合する DNA 配列を同定するため、MafB 結合配列に類似した DNA 配列を ECR 中から検索すると、MafB が結合する可能性のありそうな配列 (MARE 類似配列) が 3 つ見つかった。そこで、これらの配列に塩基置換を導入したレポーター・プラスミドを作成し、同様にルシフェラーゼ・アッセイによって MafB による活性化を検討した。すると、3 つの MARE 類似配列のうちの 1 つ (MARE-like-1) を変異させた場合に MafB による活性化が低下した。したがって、MafB は ECR2 内の MARE-like-1 配列に結合することによってフィラグリン遺伝子を活性化すると考えられた。

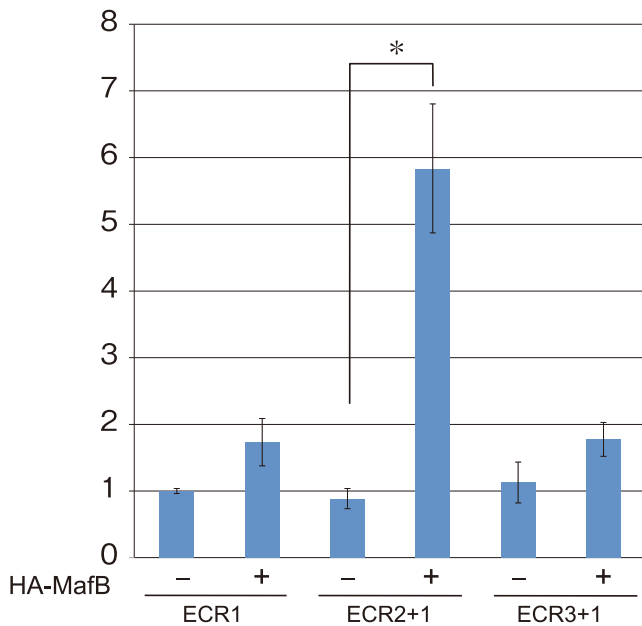


図 5 MafB によるフィラグリン遺伝子 ECR の活性化

図中に示す ECR を含むルシフェラーゼ発現プラスミドを、MafB 発現プラスミドと共に培養細胞 BHK21 にトランスフェクションにより導入し、ルシフェラーゼ・アッセイを行った。ECR1 のみを含むプラスミドを導入した場合のルシフェラーゼ活性を 1 とした相対値を示す。*; $p < 0.01$

4. 考察

以上の解析より、転写因子 MafB は、フィラグリン遺伝子上流に同定した ECR2 領域中の MARE-like-1 配列に結合することによって、フィラグリン遺伝子の発現を活性化することが推測される。MafB は、皮膚においては角化細胞のうちの有棘細胞に特異的に発現しており、これはフィラグリン遺伝子の発現が開始する領域であって、フィラグリンと MafB の発現パターンは一致している。このことと併せて、MafB 欠損マウスの皮膚ではフィラグリン遺伝子の発現が顕著に低下していることから、MafB がフィラグリン遺伝子の転写を直接活性化することが示唆される。MafB が生体内で直接フィラグリン遺伝子上流に結合するかどうかを、今後クロマチン免疫沈降法などを用いて調べる必要がある。

また、MafB がフィラグリン以外の遺伝子の発現も制御しているかどうかを調べることも、今後検討すべき重要なポイントのひとつである。興味深いことに、マイクロアレイ解析から、MafB は脂質代謝系の酵素をコードする遺伝子群の発現を負に制御することが示唆された。脂質代謝は、フィラグリンをはじめとする NMF 成分とともに皮膚の保湿やバリア機能にとって重要であることを考えると、NMF と脂質がバランスよく供給されるような仕組みが存在することが予見され、今後新しい研究分野となりうるだろう。

本研究では、フィラグリン遺伝子の発現に重要だと思われるエンハンサー領域として ECR2 を同定したが、ECR2 内には MafB が結合する配列のみならず、皮膚の形成に重要な役割を担っていると考えられるいくつかの転写制御因子が結合しうる配列も見出された。組織特異的な遺伝子の発現は、いくつかの転写因子が組み合わせることによって協調的に活性化されることがしばしば見出されるので、フィラグリンの発現制御においても、MafB がこれらの転写因子群と協調して機能している可能性が十分に考えられる。このようなエンハンサー解析から、NMF の形成や皮膚バリア機能の獲得を担う新規因子 (特に転写制御因子) が特定される可能性が見えてきた。近年、フィラグリンの発現を遺伝子レベルで亢進させるような薬剤が発見され、アトピー性皮膚炎の治療薬として期待されていることから⁶⁾、フィラグリンを含めた皮膚 NMF 関連因子の転写制御機構の解明は今後ますます重要になると考えられる。

(引用文献)

- Palmer CNA, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Goudie DR, Sandilands A, Campbell LE, Smith FJD, O' Regan GM, Watson RM, Cecil JE, Bale SJ, Compton JG, DiGiovanna JJ,

- Fleckman P, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Sergeant A, Munro CS, Houate BE, McElreavey K, Halkjaer LB, Bisgaard H, Mukhopadhyay S, and McLean WHI. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat. Genet.*, 38, 441-446, 2006.
- 2) Matsui T, Miyamoto K, Kubo A, Kawasaki H, Ebihara T, Hata K, Tanahashi S, Ichinose S, Imoto I, Inazawa J, Kudoh J, and Amagai M. SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing. *EMBO Mol. Med.*, 3, 320-333. 2011.
- 3) Jang S-I, Steinert PM, and Markova NG. Activator protein 1 activity is involved in the regulation of the cell type-specific expression from the proximal promoter of the human profilaggrin gene. *J. Biol. Chem.*, 271, 24105-24114, 1996.
- 4) Moriguchi T, Hamada M, Morito N, Terunuma T, Hasegawa K, Zhang C, Yokomizo T, Esaki R, Kuroda E, Yoh K, Kudo T, Nagata M, Greaves DR, Engel JD, Yamamoto M, and Takahashi S. MafB is essential for renal development and F4/80 expression in macrophages. *Mol. Cell. Biol.*, 26, 5715-5727, 2006.
- 5) Kamitani-Kawamoto A, Hamada M, Moriguchi T, Miyai M, Saji F, Hatamura I, Nishikawa K, Takayanagi H, Hitoshi S, Ikenaka K, Hosoya T, Hotta Y, Takahashi S, and Kataoka K. MafB interacts with Gcm2 and regulates parathyroid hormone expression and parathyroid development. *J. Bone Miner. Res.*, 26, 2463-2472, 2011.
- 6) Otsuka A, Doi H, Egawa G, Maekawa A, Fujita T, Nakamizo S, Nakashima C, Nakajima S, Watanabe T, Miyachi Y, Narumiya S, and Kabashima K. Possible new therapeutic strategy to regulate atopic dermatitis through upregulating filaggrin expression. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 133, 139-146, 2014.

スキン伝達物質 ATP と皮膚のアンチエイジングに関する研究

山梨大学医学部薬理学

小泉 修一

Skin cells release ATP that affects a big variety of functions of adjacent cells. However, the mechanisms underlying its release remain largely unclear. Here, focusing on VNUT (vesicular nucleotide transporter), we show that skins release ATP by a mechanism of Ca^{2+} -dependent exocytosis in normal human epidermal keratinocytes.

1. 緒言

老化は避けられない問題であるが、適切な処置で老化を遅らせる所謂「抗老化（アンチエイジング）」により、生活の質（QOL）を格段に高めることができる。皮膚は体を覆う最も大きな臓器であり、体内、細胞内を外界から守る重要な役割を果たすが、最外層に位置することから美容の側面からも、その老化は重要な問題となる。皮膚は老化により、表皮の代謝回転、角質層の機能不全によるバリア機能及び水分保持機能が低下し、さらに皮脂の分泌が減少する。こうした皮膚の質的な変化等により皮膚の乾燥、シミ、シワ及びたるみが生じる。現在、アンチエイジング効果を呈するとして頻用される外用剤に、レチノイドがある。レチノイドによるアンチエイジング効果の分子メカニズムには不明な点が多く、また、レチノイドによる、色素沈着、炎症等の負の作用も少なからず報告されている。申請者はこれまでに、細胞外 ATP 及びその受容体である P2 受容体が表皮ケラチノサイト間の情報連絡で最も重要な因子の一つであること、さらに、ATP/P2Y2 受容体シグナルが各種刺激及び炎症時に劇的に亢進すること、レチノイドが P2Y2 受容体の発現を亢進させることをこれまでに明らかとしてきた。レチノイドの副作用に、ATP/P2Y2 受容体シグナルの亢進が示唆されているが、これらのシグナルと皮膚の機能、老化にどのような影響を与えるかについては、殆ど解っていない。また、ATP シグナルの引き金となる ATP 放出のメカニズムは全く明らかとされていない。本研究では、皮膚から放出される「スキン伝達物質」である ATP 放出の分子メカニズム、さらに皮膚 ATP/P2Y2 受容体活性化が表皮ケラチノサイトの生理機能に与える影響及びその分子機序を精査することにより、新しい皮膚のア

ンチエイジング効果を有する薬物の開発に直接結びつく基礎データを提示することを目的とする。

2. 実験

2.1 細胞培養

ヒト正常表皮ケラチノサイト（NHEK）の培養は既報に従った^{1,2)}。ATP 放出は、既報によるルシフェリルシフェラーゼ法³⁾により行った。また、ATP 開口放出は、蛍光 ATP（MANT-ATP）及び quinacrine をプローブとして用い、それぞれ共焦点レーザー顕微鏡及び全反射蛍光顕微鏡（TIRF）解析により可視化した。

3. 結果及び考察

3.1 スキン伝達物質 ATP 放出の分子メカニズムの解明

申請者らは既に、NHEK を用いた研究から、NHEK は各種刺激に応じて ATP を細胞外に放出することを明らかとした（Koizumi et al. 2004）。そこで、先ず Ca^{2+} イオノフォア（ionomycin）により惹起される NHEK からの ATP 放出を luciferine-luciferase 法により観察した。図 1 のように、NHEK は ionomycin の濃度依存的に、細胞外に ATP を放出した。この放出は、細胞内 ATP キレート剤である BAPTA-AM により消失し、小胞型 H^+ ATPase の阻害剤 bafilomycin A1 によっても有意に抑制された（図 2）。これらは、NHEK からの ATP 放出が Ca^{2+} 依存的であること、酸性小胞依存的であることを意味し、ATP 放出が開口放出であることを強く示唆する。そこで、開口放出に関係する SNARE 蛋白質をボツリヌス毒素により切断したところ、やはり ATP の放出は有意に抑制された（データは示さず）。従って、NHEK は開口放出のメカニズムにより ATP を細胞外に放出していることが明らかとなった。

3.2 スキン伝達物質 ATP 開口放出の可視化

次に、NHEK における ATP 含有小胞の有無、またこの ATP 小胞が開口放出により放出される様子を可視化し、皮膚における ATP の開口放出の存在を直接明らかとした。NHEK を蛍光 ATP アナログである MANT-ATP と 8 時間インキュベートし、共焦点レーザー顕微鏡（ex. 405nm）



Anti-aging of skin mediated by skin-transmitter ATP

Schuichi Koizumi

Department of Neuropharmacology, Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, University of Yamanashi

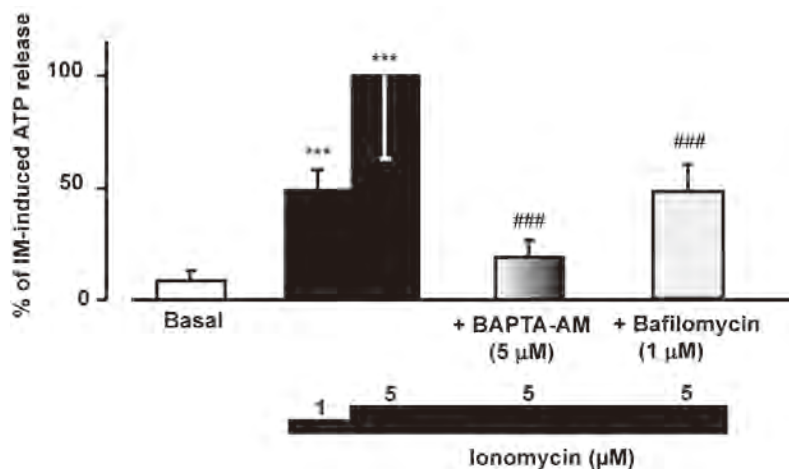
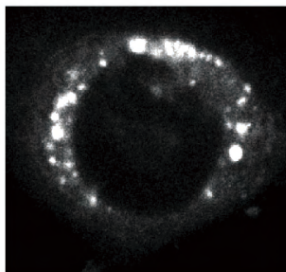


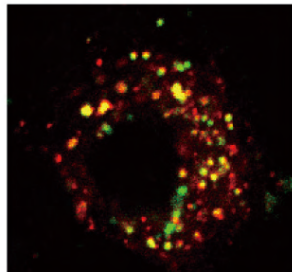
Figure 1 The effects of BAPTA-AM and bafilomycin A1 on ionomycin (IM)-induced release of ATP from NHEKs

ionomycin evoked an increase in extracellular ATP in a concentration-dependent manner. The ionomycin (5μM) -evoked release of ATP was significantly decreased by BAPTA-AM, an intracellular Ca²⁺ chelator or bafilomycin A1, an inhibitor of vesicular H⁺-ATPase. ***P<0.001 vs. Basal; ###P<0.001 vs. ionomycin (5μM).

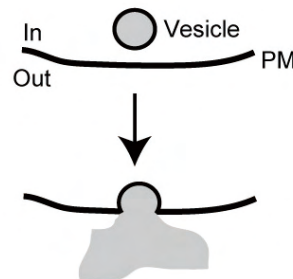
A. MANT-ATP



B. Quinacrine



C. Cartoon of exocytosis



D. De-staining of fluorescent signals of individual quinacrine vesicles

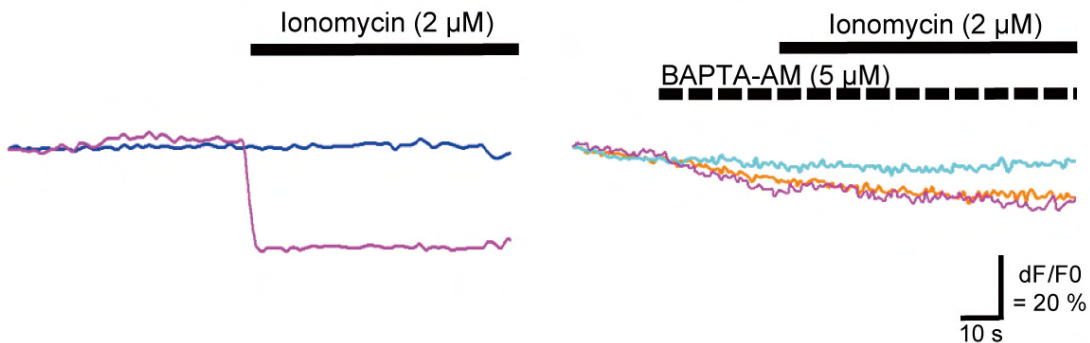


Figure 2 Visualization of exocytosis of ATP

ATP vesicles were visualized by the fluorescent ATP analogue MANT-ATP (A) and quinacrine (B) in NHEKs. MANT-ATP and quinacrine signals were obtained from confocal laser microscopy and TIRF microscopy, respectively. (C) Schematic cartoon of exocytosis of quinacrine-positive vesicles. (D) The time course of the de-staining of quinacrine-fluorescence by ionomycin in single-vesicles in the absence (left) and presence of BAPTA-AM (right).

を用い、蛍光ATPのシグナルを観察した。図2Aのように、蛍光ATPは小胞状の形態を呈し、細胞膜近傍に多く観察された。次に、このキネティックスを解析するため、NHEKをよりキネティックス解析に適したquinacrineと15分間インキュベートし、全反射顕微鏡 (TIRF) にてその挙動を観察した。図2Bのように、quinacrineシグナルも小胞状の形態を呈した。もし開口放出が惹起される場合には、図2Cにしめすように、このquinacrine蛍光が、細胞膜 (PM) に移動・ドッキング・開口することにより細胞外に出て行くため、quinacrine蛍光の消失が惹起されるはずである。Ionomycinを添加すると、quinacrine蛍光は、小胞毎にことなるキネティックスで消失し、これはBAPTA-AMによりほぼ消失した (図2D)。以上、NHEKはATPを放出すること、その放出メカニズムは開口放出であること、さらにその開口放出を可視化することが可能となった。

3.3 スキン伝達物質ATP開口放出の責任分子同定

ATPが開口放出されるためには、細胞内で細胞質のATPを小胞に取り込む小胞型ATPトランスポーターの存在が必要である。2008年、森山らのグループは、このトランスポーターとして*SLC17A9*を見出し、VNUT (vesicular nucleotide transporter) と命名した⁴⁾。まず、我々は皮膚にVNUTが存在するか否かを確認した。VNUT抗体を用いた免疫染色法により皮膚切片 (図3a) 及びNHEK (図3b) にVNUT陽性シグナルを見出し、またこれはWestern blottingによっても特異的バンドとして確認できた (図3c)。このVNUTをRNA干渉法 (VNUT siRNA) によりノックダウンすると (図4a)、NHEKからのATP放出は有意に抑制された (図4b)⁵⁾。従って、VNUTが上述した皮膚のATP開口放出の責任分子であることが明らかとなった。

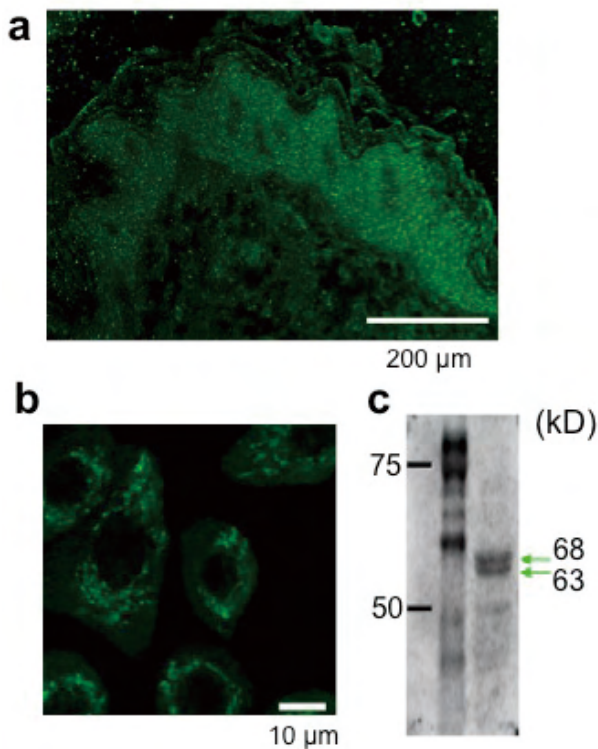


Figure 3 Expression of VNUT in the human epidermis and epidermal keratinocytes. Immunohistochemical and immunocytochemical staining of frozen section of human skin (a) and NHEK (b), respectively, with an anti-VNUT antibody. For western blot analysis, total cell lysates were prepared and separated by SDS-PAGE. The antibody that specifically recognizes VNUT protein detected major bands at 65 kDa and 68 kDa (c).

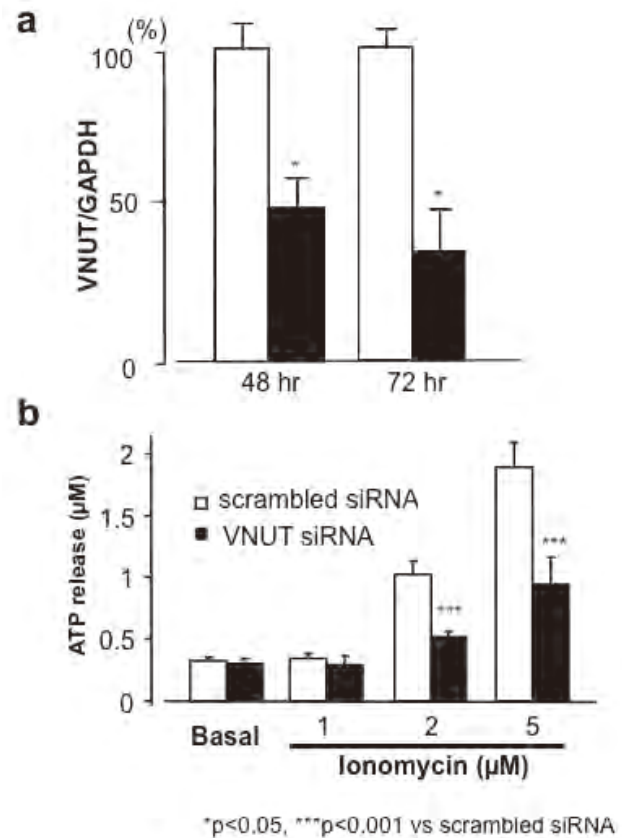


Figure 4 Inhibition of ionomycin-induced ATP release by VNUT siRNA. (a) VNUT mRNA was significantly reduced in a time-dependent manner in cells transfected with VNUT siRNA (n=3, black bar). (b) Transfection with VNUT siRNA for 72 hr (n= 3, black bar) significantly decreased ionomycin-evoked ATP release versus scrambled RNA-transfection at concentrations of 2 and 5µM of ionomycin. *p<0.05, ***p<0.001 vs. scrambled siRNA.

細胞外ATPが種々の疾患と関連すること³⁾、シワやシミの治療に用いられるレチノイン酸がATP受容体発現に影響すること⁶⁾等、これまでATP/P2受容体シグナルと皮膚の機能制御に重要な役割を果たすことを示してきた。今回、このATPが放出されるメカニズムの一端を明らかにすることが出来た。また、このATP放出の責任分子VNUTは、これまでの我々の脳における研究により、種々の炎症時に発現が著しく亢進することが明らかとなっている⁷⁾。今後、VNUTを切り口としてスキン伝達物質ATPが、老化や疾患とどのように関連性を明らかにする予定である。

謝 辞

本研究遂行にあたり、御助成頂いた公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に心から感謝申し上げます。また、山梨大学医学部薬理学講座、井上かおり、小松龍平、柴田圭輔、藤下加代子の各氏に感謝致します。

本研究の一部は、すでに以下の様に公表した。

Inoue, K., Komatsu, R., Imura, Y., Fujishita, K., Shibata, K., Moriyama, Y. and Koizumi, S. (2014) Mechanisms underlying ATP release in human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, in press.

(参考文献)

- 1) Koizumi S, Fujishita K, Inoue K, *et al.*: Ca²⁺ waves in keratinocytes are transmitted to sensory neurons: the involvement of extracellular ATP and P2Y2 receptor activation. *Biochem J.*2004; 380: 329-338.
- 2) Inoue K, Denda M, Tozaki H, *et al.*: Characterization of multiple P2X receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.*2005; 124: 756-763.
- 3) Kawamura T, Ogawa Y, Nakamura Y, *et al.*: Severe dermatitis with loss of epidermal Langerhans cells in human and mouse zinc deficiency. *J Clin Invest.*2012; 122: 722-732.
- 4) Sawada K, Echigo N, Juge N, *et al.*: Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.*2008; 105: 5683-5686.
- 5) Inoue K, Komatsu R, Imura Y, *et al.*: Mechanism Underlying ATP Release in Human Epidermal Keratinocytes. *J Invest Dermatol.*2014; in press:
- 6) Fujishita K, Koizumi S & Inoue K: Upregulation of P2Y2 receptors by retinoids in normal human epidermal keratinocytes. *Purinergic Signal.*2006; 2: 491-498.
- 7) Imura Y, Morizawa Y, Komatsu R, *et al.*: Microglia release ATP by exocytosis. *Glia.*2013; 61: 1320-1330.

コラーゲンの線維形成を調節するプラチナ錯体に関する研究

早稲田大学理工学術院

小出 隆規

Excessive deposition of collagen fibers in tissues causes various fibrotic diseases. Inhibition of the collagen fibril-formation is thus regarded as a promising mechanism for the development of antifibrotic drugs. A cisplatin-DMSO complex, which was obtained as a potential inhibitor of the *in vitro* collagen fibril-formation, was revealed to interact with specific sites on the collagen triple helix. Collagen fibril-deposition in a cell culture system was inhibited by the treatment with the cisplatin-DMSO complex. The cisplatin-DMSO complex was revealed to be less toxic to cultured cells than cisplatin.

1. 緒言

コラーゲンは生体内で最も多量に存在する、3重らせん構造を持つ細胞外マトリックスタンパク質である。コラーゲンには28種類の異なる型が存在し、高次構造により複数のサブファミリーに分類される。その中でも全コラーゲンの9割を占めるI型コラーゲンに代表される、線維形成型コラーゲンに着目する。線維形成コラーゲンの3重らせん分子は、長軸方向に約4分の1ずつずれながら自己集合し、細線維を形成する。細線維はさらに集合してコラーゲン線維を形成する。コラーゲンの規則正しい自己集合において、コラーゲン分子が全て同じ方向を向いていること、コラーゲンのNおよびC末端に存在する非3重らせん領域(テロペプチド)のアミノ酸配列の重要性などが報告されているが、その詳細なメカニズムは未だ解明されていない¹⁻⁴⁾。

コラーゲン線維は組織や臓器の強度を維持するだけでなく、細胞の接着・移動・分化などの制御など生体維持にも重要な機能を発揮している。しかし、コラーゲン線維が過剰に生成されると、肝硬変、肺線維症、強皮症などの線維化疾患を引き起こす。これまでに、コラーゲンの線維形成を阻害する戦略として、(1)コラーゲンの生成を促進する因子を阻害する⁵⁻⁷⁾、(2)コラーゲンの合成を阻害する⁸⁾、(3)コラーゲン分子間のクロスリンクを阻害する⁹⁾など、いくつかのメカニズムが提示されている。本研究では、コラーゲン分子に直接働いてその細線維形成を阻害する方法に着目した。

これまでに、コラーゲンの分子間の自己集合を阻害する物質として、II型コラーゲンに対する抗体が報告されてい

る。この抗体は*in vitro*でII型コラーゲンの細線維形成を阻害するが、I型コラーゲンに対する阻害能は有していなかった¹⁰⁾。また、テロペプチドのアミノ酸配列を模した合成ペプチドもコラーゲン細線維形成を阻害することが報告されている。この実験では、I型コラーゲンのC末端のテロペプチドを模したペプチドがI型コラーゲンの細線維形成を阻害することが示されている^{1,4)}。

本研究の目的は、低分子量のコラーゲン細線維形成阻害物質を探索し、得られた化合物を線維化疾患治療薬のリードとして応用することである。我々は、以前報告したハイスループットスクリーニングシステム¹¹⁾を用いて探索を行い、コラーゲンの細線維形成を阻害する化合物として、抗がん剤である、cis-diamminedichloroplatinum (II) (cisplatin)を見出した。しかし、コラーゲン細線維形成阻害効果を有しているのは、cisplatinそのものではなく、溶媒であるジメチルスルフォキシド(DMSO)と反応して生成したcisplatin誘導体であることが示唆された。

本報告では、cisplatin誘導体のコラーゲン細線維形成阻害効果の解析、cisplatin誘導体とコラーゲン間の相互作用、他のプラチナ系抗がん剤を用いた構造活性相関、cisplatin誘導体の活性本体の推定、および培養細胞系を用いた検討についてその結果を述べる。なお、以下ではcisplatinとDMSOを混合して生じた活性物をcisplatin (DMSO)と表記する。

2. 実験

2.1 コラーゲン細線維の走査型電子顕微鏡(SEM)観察

I型コラーゲン溶液20 μ lをカバーガラスにコートし、自然乾燥させた。コラーゲンをコートしたカバーガラスを、buffer (20mM sodium phosphate (pH 7.4)、100mM NaCl、10 μ M cisplatin (DMSO)) 2mlに入れて、37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした。室温で2%グルタルアルデヒド水溶液にて1時間固定した後に、濃度の異なるエタノールで段階的に脱水した。次にt-ブタノール溶液にて置換し、凍結乾燥した。白金を約3nm蒸着した後にSEM(HITACHI



A platinum complex that inhibits the collagen fibril-formation

Takaki Koide

Faculty of Science and Engineering,
Waseda University

S-3000N) 装置を用いて加速電圧15kVにて観察した。

2.2 コラーゲン細線維化阻害アッセイ

アッセイは、Okano-Kosugiらの論文に従って実施した¹¹⁾。吸光度測定にはGreiner 384 well UV-star plateを用いた。プレート上で、コラーゲン溶液を含む反応溶液の調製を行い、プレートリーダーを用いて、37℃で2.5時間、5分ごとに313nmにおける吸光度を測定した。

細線維化阻害能評価は、コラーゲンのみの場合の最終測定点(145分)における313nmの吸光度の値を線維形成100%とし、サンプル存在下での吸光度を線維形成(%)で表すことにより評価した。

$$\text{線維形成 (\%)} = A \times 100 / \Delta$$

(A: サンプル存在下の吸光度変化、 Δ : コラーゲンのみの吸光度変化)

特に記述がない場合、濃度はすべて仕込み終濃度とした。

2.3 ペプチド合成

ペプチド鎖の合成は、Rink amide resinを担体として通常のFmoc固相法により行った。ペプチドの脱保護及び固相担体からの切り出しは、水:m-クレゾール:チオアニソール:エタンジチオール:TFA(2:2:2:1:33, v/v, 5 ml)中で1時間(Argがペプチド鎖に含まれている場合は4時間)振とうすることにより行った。ペプチドの精製および純度の確認は逆相HPLCを用いを行い、MALDI-TOF型質量分析により目的物であることを確認した。

2.4 細胞が分泌したコラーゲンの共焦点顕微鏡観察

ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)をEGM-2培地を用いてガラスベースディッシュ上でコンフルエントになるまで培養を行った後に、100 μ M cisplatin (DMSO)、0.1% DMSO、0.2mM L-アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム塩n水和物となるようにサンプルを加え、37℃で3日間培養した(毎日培地交換とサンプルの添加を行った)。この際、cisplatin (DMSO)なしで0.1% DMSO、0.2mM L-アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム塩n水和物のみを加えたものをコントロールとした。培養後、PBS(+)(1.0mM CaCl₂、0.5mM MgCl₂)で細胞を洗浄し、4%ホルムアルデヒド/PBSにて4℃で15分間固定した。PBS(+)で洗浄した後に10% FBS、5% スキムミルク/PBSにて室温で30分間ブロッキング処理を行った。PBS(+)で洗浄後、1/100 anti-collagen type I, rabbit polyclonal antibody/10% FBS、5% BSA/PBSを添加し、室温で1時間静置した。PBS(+)で洗浄後、1/20 FITC-goat anti-rabbit IgG antibody/10% FBS、5% BSA/PBSを添加し室温で1時間静置した。PBS(+)で洗浄後、共焦点顕微鏡にて観察を行った。

2.5 HUVECのタンパク質産生におけるcisplatin (DMSO)の影響(Western Blotting)

HUVECをEGM-2培地中100 μ M cisplatin (DMSO)、0.1% DMSO、0.2mM L-アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム塩n水和物となるようにサンプルを加え、37℃で3日間培養した(毎日培地交換とサンプルの添加を行い、回収した培地は4℃で保存した)。この際、cisplatin (DMSO)なしで0.1% DMSO、0.2mM L-アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム塩n水和物のみとなるようにサンプルを加えたものをコントロールとして作製した。インキュベート後、PBSで細胞を洗浄し、抽出バッファー(50mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、5.0mM EDTA、1% NP-40、2.0mM *N*-ethymaleimide、2.0mM 4-(2-aminoethyl) benzensulfonyl fluoride、1 μ g/ml leupeptin、1 μ g/ml pepstatin)を1ml加えて4℃で15分間放置した。細胞を剥離回収し、1.5ml tubeに溶液を移して遠心分離を行い(13,000 min⁻¹、4℃、15分間)、上清(コントロール、cisplatin (DMSO) 添加サンプル共に1.45ml)と沈殿に分けた。以下、(i)上清、(ii)沈殿、(iii)保存していた培地のSDS-PAGEのサンプル作製法を示す。

(i)上清: 上清の全量(1.45ml)に2% デオキシコール酸ナトリウム10.3 μ l、100% トリクロロ酢酸124.7 μ lを加えて、4℃で30分間放置した後に遠心分離(13,000 min⁻¹、4℃、5分間)を行い上清と沈殿に分けた。沈殿をアセトンで3回洗浄した後に、デシケーターで乾燥させた。乾燥した沈殿を145 μ lの1 \times SDS-サンプルバッファーに溶解し、SDS-サンプルとした。

(ii)沈殿: 沈殿を145 μ lの1 \times SDS-サンプルbufferに溶解し、SDS-サンプルとした。

(iii)培地: 回収した培地10mlに2% デオキシコール酸ナトリウム71 μ l、100% トリクロロ酢酸860 μ lを加えて、4℃で30分間放置した後に遠心分離(13,000 min⁻¹、4℃、5分間)を行い上清と沈殿に分けた。沈殿をアセトンで3回洗浄した後に、乾燥させた。乾燥した沈殿を500 μ lの1 \times SDS-サンプルバッファーに溶解し、電気泳動用サンプルとした。

(i)、(ii)、(iii)で作成したSDS-サンプルを5%ゲルにて電気泳動し、PVDFに3時間トランスファーを行った。トランスファー後、メンブレンを5% スキムミルク/TBSに浸け、終夜4℃でブロッキングを行った。メンブレンをTBS-T(1% Tween 20)で洗浄した後に、1/1000 anti-collagen type I, rabbit polyclonal antibody/1% スキムミルク/TBSを5mlメンブレンに乗せて室温で50分間静置した。TBS-Tで洗浄した後に、1/2000 goat anti-rabbit IgG-AP antibody/1% スキムミルク/TBSを5mlメンブレンに乗せて室温で30分間静置した。TBS-Tで洗浄した後に、alkaline phosphatase conjugate kit (BIO RAD)を

用いて、バンドを可視化した。

2.6 Cisplatin (DMSO) の細胞毒性の検討

HeLa細胞を96穴マイクロプレートに無血清培地HFDM-1を用いて100 μ lずつ播種し(3000 cells/well)、37 $^{\circ}$ Cで24時間培養した。培地を新しいものに交換した後に、各濃度のcisplatin (DMSO) (あるいはcisplatin (saline))、1% DMSO (salineに溶解したサンプルの場合は0% DMSO) となるようにサンプルを加え、37 $^{\circ}$ Cで48時間培養した。その後、cell counting kit-8を10 μ l加え37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートして生細胞を呈色し、450nmにおける吸光度を測定することにより生細胞数を定量した(n=3)。

3. 結果と考察

3.1 Cisplatin (DMSO) 存在下で形成したコラーゲン細線維の形態

Cisplatin (DMSO) 存在下でコラーゲンの細線維を形成させ、それをSEMにて観察した。その結果、正常なコラーゲン細線維 (Fig. 1A) と比較して、cisplatin (DMSO)

存在下で形成したコラーゲン細線維 (Fig. 1B) は線維の直径が小さく、また線維の全体量が減少していることがわかった。この結果より、cisplatin (DMSO) はコラーゲンの集合を阻害し、細線維の形成を抑制していることがわかった。

3.2 Cisplatin (DMSO) がコラーゲン3重らせん構造に与える影響

Cisplatin (DMSO) と反応させたコラーゲンの円偏光二色性 (CD) スペクトルを測定した。その結果、3重らせん構造に特有の225nm付近の正のコットン効果が観察された (Fig. 2)。算出した R_{dn} 値 (CD極小絶対値と極大絶対値の比) は0.11であり、天然のコラーゲン (0.13) と同程度の値であった¹²⁾。このことから、cisplatin (DMSO) を作用させたコラーゲンは、元の3重らせん構造をほぼ保持していることがわかった。これにより、cisplatin (DMSO) のコラーゲン細線維形成阻害効果は、コラーゲンの3重らせん構造を変性させることによるものでないことが強く示唆された。

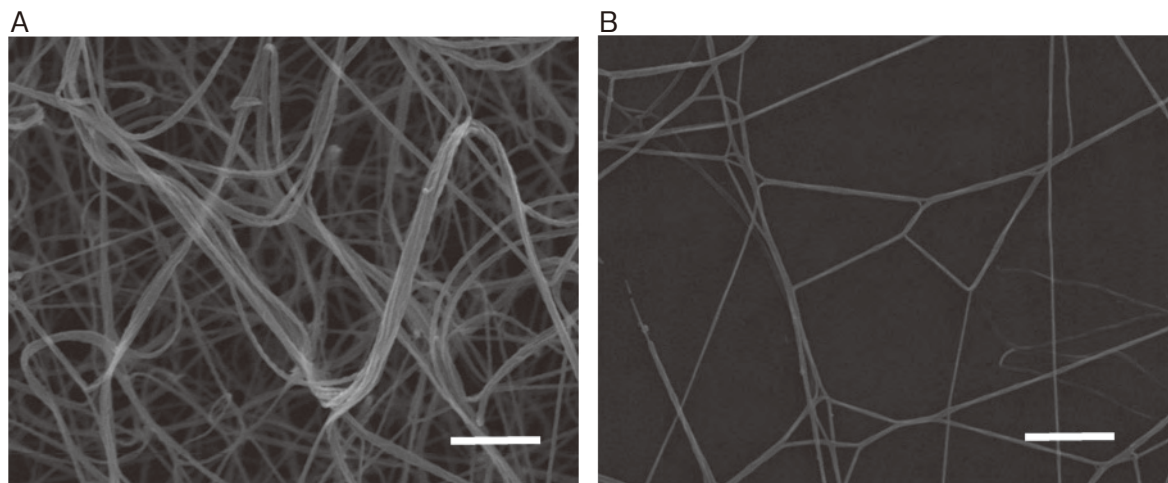


Fig. 1 SEM images of the collagen fibrils. A, Type I collagen only; B, Type I collagen plus cisplatin (DMSO). Scale bar = 2 μ m.

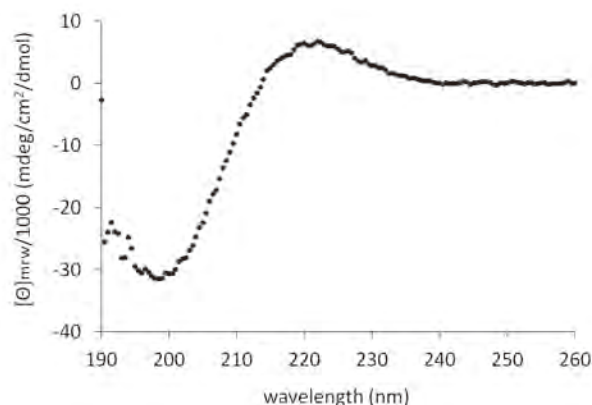


Fig. 2 CD spectrum of cisplatin (DMSO)-bound type I collagen.

3.3 コラーゲンと cisplatin (DMSO) との結合の stoichiometry

コラーゲン 1 分子に結合する cisplatin (= Pt) の数を定量した。I 型コラーゲンと cisplatin (DMSO) を溶液内で相互作用させ、限外濾過により遊離の cisplatin を分離した。遊離の cisplatin を原子吸光測定により定量し、仕込んだ cisplatin 量から差し引くことにより、コラーゲンに結合している cisplatin の数を見積もった。その結果、未変性コラーゲン 1 分子に対して cisplatin は約 3 ~ 4 個結合しうるものと見積もられた (Fig. 3)。一方、熱変性させたコラーゲン (ゼラチン) を用いた場合には、明確な結合飽和曲線を描かず、非特異的吸着が示唆された。これにより、コラーゲンが 3 重らせん構造を取ることによって特異的な結合部位がコラーゲン上に生じ、そこに cisplatin (DMSO) が結合するものと考えられた。

3.4 コラーゲン上における cisplatin (DMSO) 結合部位の推定

次に、cisplatin のコラーゲン上の特定結合部位を推定す

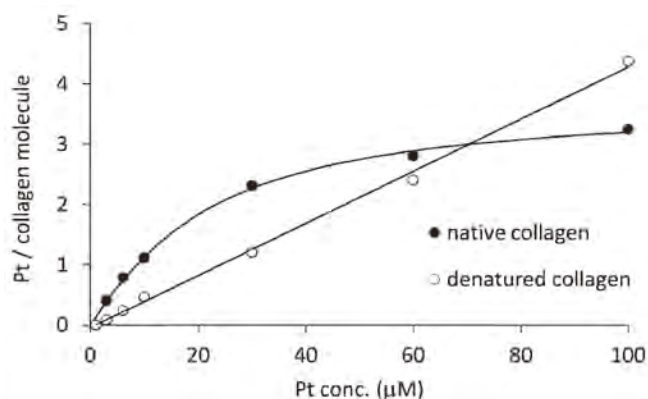


Fig. 3 Binding of platinum to native and denatured type I collagen.

るために cisplatin (DMSO) と相互作用するアミノ酸を調べた。そのために用いるツールとして、コラーゲン様 3 重らせんペプチドを合成した (Table 1)。合成したペプチドが 3 重らせん構造を保持できるように、Gly-Pro-Hyp (Hyp=4-hydroxyproline) 繰り返しをホスト配列として用い、プラチナ原子に対して配位能を有する側鎖を持つアミノ酸 (Met, His, Ser, Thr, Glu, Asp, Lys, Arg) をそれぞれホスト配列ではさんだ。これらペプチドが 37°C で、3 重らせん構造をとっていることは CD スペクトル測定により確認した。

ペプチドと cisplatin (DMSO) を中性バッファー内でプレインキュベートした後にコラーゲン溶液と混合し、cisplatin (DMSO) のコラーゲン細線維形成阻害効果を実験 2.2 に示した方法によって調べた。このアッセイで、合成したペプチド自身がコラーゲンの細線維形成に影響を及ぼさないことは別途確認した。Fig.4 に示すように、Met 及び His を含んだペプチド pep-H、pep-M の共存によって、cisplatin (DMSO) の線維形成阻害効果が減弱することがわかった。これは、cisplatin (DMSO) が 3 重らせんペプ

Table 1 Collagen-like peptides tested for the cisplatin (DMSO) - binding.

Peptide	Sequence
Pep-M	(POG) ₃ PMG(POG) ₄ P-amide
Pep-H	(POG) ₄ PHG(POG) ₄ P-amide
Pep-T	(POG) ₄ PTG(POG) ₄ P-amide
Pep-S	(POG) ₄ PSG(POG) ₄ P-amide
Pep-E	(POG) ₃ PEG(POG) ₄ Pamide
Pep-D	(POG) ₄ PDG(POG) ₄ P-amide
Pep-K	(POG) ₄ PKG(POG) ₄ P-amide
Pep-R	(POG) ₃ PRG(POG) ₄ P-amide

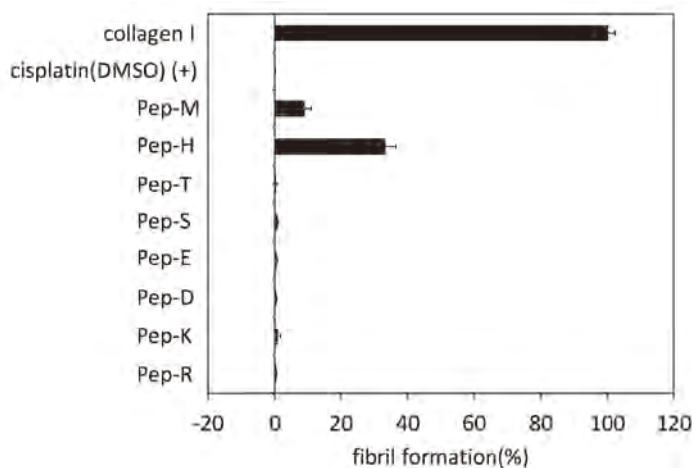


Fig. 4 Identification of amino acids responsible for the cisplatin (DMSO) - binding.

チド上のペプチドに含まれたMet及びHisに結合し、コラーゲンと結合することができなくなったためであると考えられる。この結果から、コラーゲン上の cisplatin (DMSO) 結合部位にはMetあるいはHis残基が含まれるものと推定された。

3.5 Cisplatin (DMSO) に含まれる活性本体の推定

CisplatinとDMSOとの反応による生成物を調べるために、cisplatin (DMSO) をESI-TOF MSによって分析した。その結果、 $m/z = 257, 288, 307, 343, 367, 403$ の6つのピークが検出された (Fig. 5)。解析の結果、 $m/z = 288, 307, 343, 367, 403$ それぞれのピークは、 $[\text{Pt}(\text{NH}_3)(\text{DMSO})]$, $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{DMSO})]$, $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{Cl})(\text{DMSO})]^+$, $[\text{Pt}(\text{NH}_3)(\text{DMSO})_2]$, $[\text{Pt}(\text{NH}_3)(\text{Cl})(\text{DMSO})_2]^+$ に相当した。今回得られたMSの結果は以前報告されたものと同様であった¹³⁾。これにより、cisplatinはDMSOと反応すると少なくとも、 Cl^- がDMSOに置換した1置換錯体と、 Cl^- と

NH_3 の2つがDMSOに置換した2置換体錯体が生成することがわかった。

Cisplatinの構造異性体である transplatin、そして cisplatinと同様にプラチナ系抗がん剤である carboplatinと oxaliplatin (Fig. 6) のDMSO溶液および水溶液についてもコラーゲン細線維形成阻害効果を有するかを、同様の方法によって調べた。その結果、transplatinのDMSO溶液のみが、cisplatin (DMSO)と同程度の阻害効果を有することがわかった (Table 2)。次に cisplatinと同様に、化合物のDMSO溶液をESI-MSにより分析した。その結果、Fig. 5に示した構造と推定されるピークが検出された (data not shown)。この結果より、阻害能を持つ cisplatinと transplatinのDMSO溶液には共通して Cl^- の1つがDMSOに置換した錯体が検出された。この結果より、DMSOの1置換体である $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{Cl})(\text{DMSO})]^+$ が活性本体の候補として考えられた。

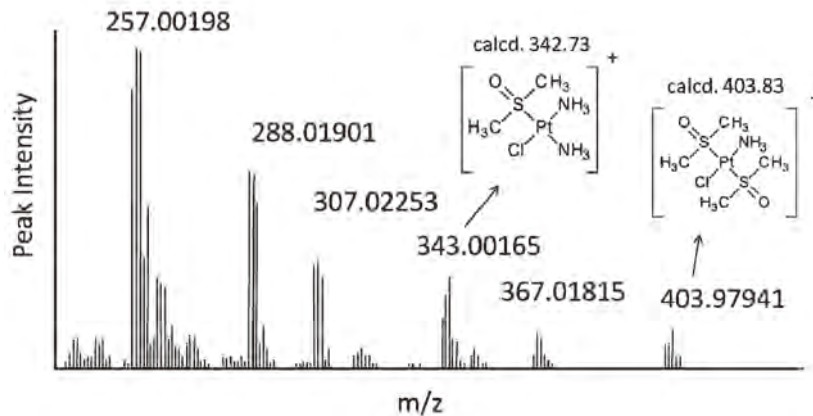


Fig. 5 ESI-MS analysis of cisplatin after incubation in DMSO.

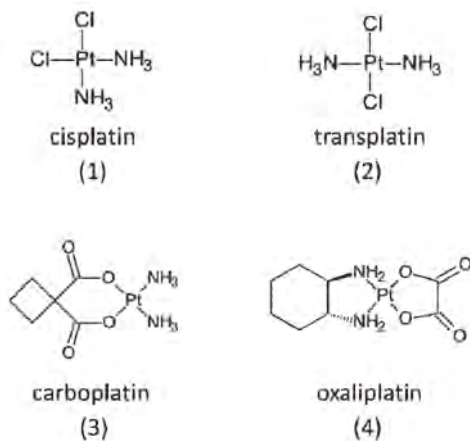


Fig. 6 Structures of platinum-containing anticancer drugs.

Table 2 Inhibitory activity of platinum-containing cancer drugs against collagen-fibril formation.

Compound	Collagen fibril formation IC ₅₀ (μM)	
	water solution	DMSO solution
1	>100	2.3
2	not determined	6.0
3	>100	>100
4	>100	>100

3.6 HUVECが分泌するコラーゲン細線維に対する cisplatin (DMSO) の影響

培養細胞が分泌するコラーゲンに対する cisplatin (DMSO) の細線維形成阻害効果の作用を評価した。Cisplatin (DMSO) を含んだ培地でHUVECを培養し、細胞外のコラーゲンを免疫染色した後に共焦点顕微鏡にて観察を行った。その結果、層状に蓄積したコラーゲン線維が染色されているコントロール (Fig. 7A) と比較して、cisplatin (DMSO) を作用させた場合、細胞付近に細い線維が凝集し、ドット型の染色が見られた (Fig. 7B)。つまり細胞が分泌したコラーゲン分子に cisplatin (DMSO) が作用することで、正常なコラーゲン細線維形成が阻害されたと考えられる。

3.7 培養細胞のタンパク質産生に対する cisplatin (DMSO) の影響

3.6で示した cisplatin (DMSO) による細線維形成阻害効果が細胞によるコラーゲン産生阻害によるものかどうか

を知るために、cisplatin (DMSO) が含まれた培地でHUVECを3日間培養し、cell layerの可溶性画分、不溶性画分および培地の3種類に関してWestern Blottingを行い、コラーゲンの含有量を評価した (Fig. 8)。その結果、cisplatin (DMSO) を添加した場合と添加していない場合における cell layerの可溶性画分、不溶性画分および培地に含まれるコラーゲン量はほぼ変わらないことが示された。したがって、cisplatin (DMSO) のコラーゲン細線維形成阻害効果は、細胞のコラーゲン産生阻害によるものではなく、分泌後の細線維形成阻害によることが明らかになった。

3.8 Cisplatin (DMSO) の細胞毒性

Cisplatin (DMSO) の細胞毒性を調べるために、HeLa細胞を cisplatin (DMSO) および生理食塩水に溶解した cisplatin を含んだ培地で48時間培養し、細胞の生存率を測定した。その結果、cisplatin (saline) に見られる濃度依存的な細胞毒性が、cisplatin (DMSO) では大幅に低くなっていることが示された (Fig. 9)。CisplatinのDMSO溶液

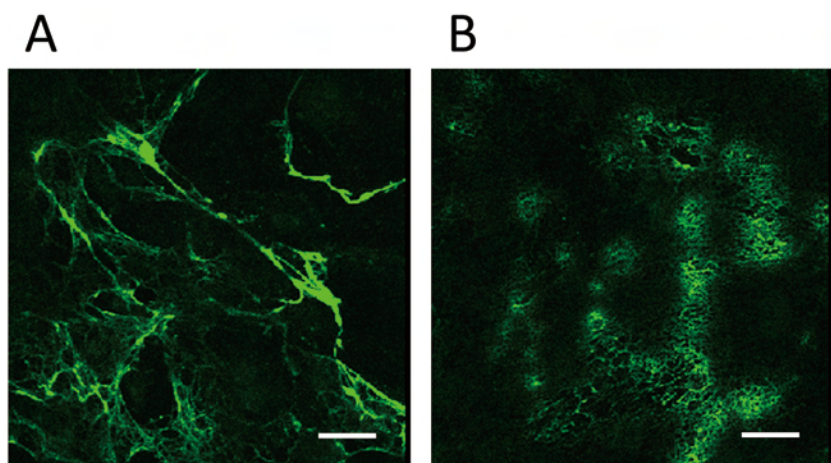


Fig. 7 Confocal microscopic images of collagen fibrils secreted by HUVEC. A, control; B, treated with 100 μM cisplatin (DMSO). Scale bar = 30 μm

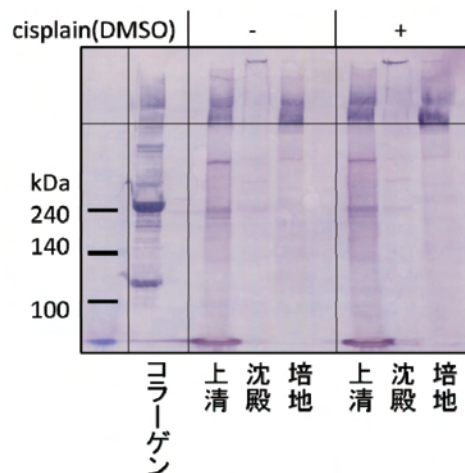


Fig. 8 Collagen production by HUVEC is not inhibited by the treatment with cisplatin (DMSO).

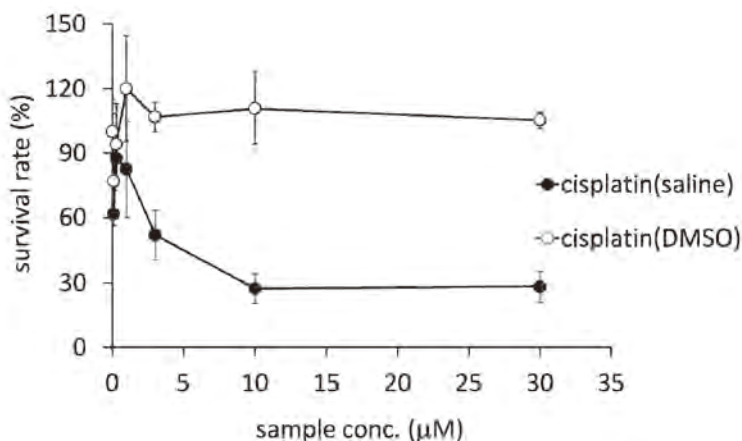


Fig. 9 Cytotoxicity of cisplatin (saline) and cisplatin (DMSO) to HeLa cells.

の細胞毒性が減少する例は以前に報告されているが¹³⁻¹⁵⁾、本実験では無血清培地を用いることにより、血清に含まれるアルブミン等のタンパク質への cisplatin の非特異的な結合の可能性を排除した条件で行ったため、より正確な cisplatin (DMSO) の細胞毒性についての結果を得ることができたものと考えられる。以上の実験結果より、cisplatin は DMSO に溶解することで DMSO と反応し、低毒性の cisplatin 誘導体を生成することが推定された。

4. 総括

*In vitro*でのランダムスクリーニングから得られた cisplatin (DMSO) は、コラーゲンの細線維化を培養細胞レベルで抑制することが明らかになった。その活性発現には DMSO がプラチナ原子に配位していることが必須であった。また、この誘導体化によって cisplatin の細胞毒性がほとんど消失した。データは示さなかったが、cisplatin (DMSO) は、コラーゲンだけでなく他のタンパク質にも作用するとの知見を得ており、このままのかたちで個体に応用することは困難であると予想される。一方、cisplatin (DMSO) がコラーゲン 3 重らせん上の特異なアミノ酸配列部位に結合することから、本プラチナ錯体は、コラーゲン細線維化過程における分子間での相互認識の機構を研究する上で有用なツールになるものと考えられる。

謝辞

本研究に協力いただいた全田未悠氏、大石真也博士、安井裕之博士に感謝します。

(引用文献)

- 1) Fertala A, Prockop DJ.: Inhibition of the self-assembly of collagen I into fibrils with synthetic peptides, *J.Biol. Chem.*, 273, 15598-15604, 1998.
- 2) Orgel JPRO, Irving TC, Miller A, Wess TJ.: Microfibrillar structure of type I collagen in situ, *Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 103, 9001-9005, 2006.
- 3) Chung HJ, Steplewski A, Chung KY, Uitto J, Fertala A.: Collagen Fibril Formation, *J.Biol.Chem.*, 283, 25879-25886, 2008.
- 4) Kunii S, Morimoto K, Nagai K, Saito T, Sato K, Tonomura B.: Actinidain-hydrolyzed type I collagen reveals a crucial amino acid sequence in fibril formation, *J.Biol.Chem.*, 285, 17465-17470, 2010.
- 5) Shah M, Foreman DM, Ferguson MW.: Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring,

J.Cell Sci., 108, 985-1002, 1995.

- 6) Serra R, Crowley MR.: Mouse models of transforming growth factor beta impact in breast development and cancer, *Endocr.Relat.Cancer*, 12, 749-760, 2005.
- 7) Rhett JM, Ghatnekar GS, Palatinus JA, O'Quinn M, Yost MJ, Gourdie RG.: Novel therapies for scar reduction and regenerative healing of skin wounds, *Trends Biotechnol.*, 26, 173-180, 2008.
- 8) Riley DJ, Berg RA, Edelman NH, Prockop DJ.: Prevention of collagen deposition following pulmonary oxygen toxicity in the rat by cis-4-hydroxy-L-proline, *J.Clin.Invest.*, 65, 643-651, 1980.
- 9) Chang K, Uitto J, Rowold EA, Grant GA, Kilo C, Williamson JR.: Increased collagen cross-linkages in experimental diabetes: reversal by beta-aminopropionitrile and D-penicillamine, *Diabetes*, 29, 778-781, 1980.
- 10) Gray RE, Seng N, Mackay IR, Rowley MJ.: Mesurement of antibodies to collagen II by inhibition of collagen fibril formation in vitro, *J. Immunological Methods*, 285, 55-61, 2004.
- 11) Okano-Kosugi H, Matsushita O, Asada S, Herr AB, Kitagawa K, Koide T.: Development of a high-throughput screening system for the compounds that inhibit collagen-protein interactions, *Analytical Biochemistry*, 394, 125-131, 2009.
- 12) Feng Y, Melacini G, Taulane JP, Goodman M.: Acetyl-terminated and template-assembled collagen-based polypeptides composed of Gly-Pro-Hyp sequences. 2. *J.Am.Chem.Soc.*, 118, 10351-10358, 1996.
- 13) Fischer SJ, Benson LM, Fauq A, Naylor S, Windebank AJ.: Cisplatin and dimethyl sulfoxide react to form an adducted compound with reduced cytotoxicity and neurotoxicity, *Neurotoxicology*, 29, 444-452, 2008.
- 14) Garrone O, Rosso R, Dini D.: Topical dimethylsulfoxide for the prevention of soft tissue injury after extravasation of vesicant cytotoxic drug : A prospective clinical study. *J. Clinical Oncology* 13:2851-2855, 1995.
- 15) Dernel WS, Straw RC, Withrow SJ, Powers BE, Fujita SM, Yewey GS, Joseph KF, Dunn RL, Whitman SL, Southard GL.: Apparent interaction of dimethylsulfoxide with cisplatin released from polymer delivery devices injected subcutaneously in dogs. *J. Drug Targeting* 5:391-396, 1998.

ナノ粒子曝露が真皮中の線維芽細胞に与える影響の 定量的リアルタイム解析

物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクトゥクス研究拠点

柴 弘 太

Recently, the effect of nanoparticles on living things has attracted much attention because of the increasing opportunities to use the nanoparticles in such areas as environmental purification, biology, medicine, cosmetology, and so on. As nanotechnology advances, the nanoparticles with desired properties have become available. On the other hand, nanoparticle-induced toxicity has been reported. Therefore, it is important to quantitatively understand risks of the nanoparticles before using them, though the effect of the nanoparticles, especially in the case of an uptake through skins, is still not yet unclear. In this study, we synthesize monodispersed titania-based nanoparticles with controlled size (70-500 nm) as a model material to investigate the nanoparticle effect. In addition, a characterization system for such effect is developed using a membrane-type surface stress sensor (MSS), which can detect surface stress applying on its surface with high sensitivity and in real-time. Taking advantage of the photoactivatable cell-culturing substrate reported before (J. Nakanish *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 6694-6695 (2007).), we demonstrate that cell-culturing only on top of the MSS is possible.

1. 緒 言

近年、トイレットリー・化粧品分野において、例えば「白金ナノコロイド」などの名称で、ナノ粒子の利用が一般に認知される機会が増加している。PM2.5問題の深刻化を一つのきっかけに、ナノ粒子が生体に及ぼす影響にも関心が集まりつつあることから、ナノ粒子が引き起こす効果の定量的な評価と、摂取可能量に関する指標確立は喫緊の課題と言える。現在のところ、経口や経鼻によるナノ粒子摂取に関する研究が着実な進展を見せる一方、経皮に着目した研究は少ないのが現状である¹⁻³⁾。

そこで本研究では、経皮によるナノ粒子曝露の影響を定量評価するための第一歩として、モデル粒子の合成に加え、これら粒子が真皮中の線維芽細胞に与える影響を調べるための測定系を構築した。検出部として、表面に生じる応力をリアルタイムに精密測定可能な、膜型表面応力センサー(MSS)を用い⁴⁾、この表面上での細胞培養を試みた。MSSの検出限界はおよそ0.2mN/mであり、細胞が膜表面で集成的に振動した場合に生じる応力がおよそ2mN/mであることから⁵⁾、検出は原理的に可能であると考えられる。細胞の挙動をMSSにより確実に検出するため、膜表面に位置選択的に細胞を培養するための条件も検討した。

2. 実 験

2.1 試薬

モデル粒子として、チタニアをベースとしたハイブリッド粒子を合成するため、チタニウムテトライソプロポキシド(TTIP)、イソプロピルアルコール(IPA)、オクタデシルアミン(ODA)を用いた。

2.2 モデル粒子の合成

サイズの揃ったチタニア-ODAハイブリッド粒子の作製には、マイクロリアクタを組み込んだフロー式の合成系を利用した(図1)⁶⁻⁸⁾。

粒子合成手順の一例を以下に示す。TTIP (0.595 mL) のIPA (12.26 g) 溶液(溶液A)と、IPA (12.65 g) 水(0.100 mL)

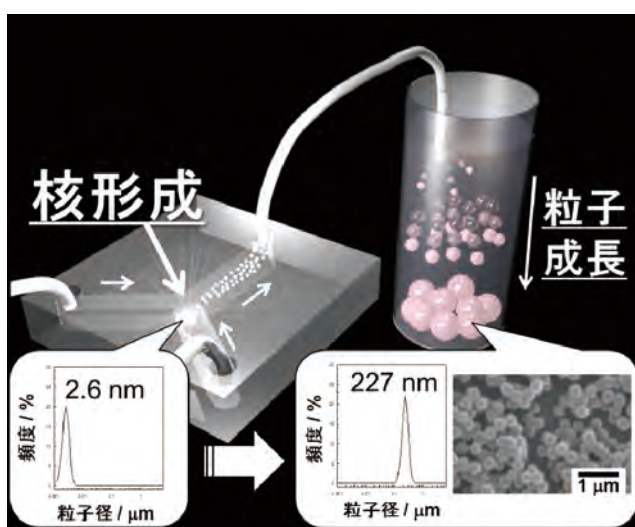
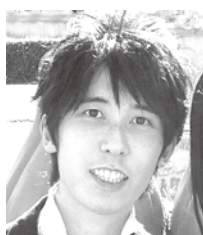


図1 マイクロリアクタを利用した核形成・粒子成長分離型合成システムの概要。マイクロリアクタチップ内で核形成が起こり、形成した核が別の原料溶液中へ吐出され、そこで粒子成長が起こる。動的光散乱測定の結果、マイクロリアクタ内での核形成が示唆された



Real-time and quantitative analysis of the effect of nanoparticles on fibroblasts in the dermis

Kota Shiba

WPI Center for Materials Nanoarchitectonics (MANA), National Institute for Materials Science (NIMS)

溶液 (溶液B) を、シリンジポンプを用いて流速 $20\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ で送液し、Y字型の混合部を有する PTFE 製マイクロリアクタ内で混合した。混合液を別途調製しておいた ODA (0.0684 g) を含む IPA (49.32 g) 水 (0.300 mL) 溶液 (溶液C) へ吐出し、溶液AおよびBの全量を吐出するまでの約40秒間、攪拌を続けた。室温で24時間静置した後、吸引濾過あるいは遠心分離による固液分離、IPAによる洗浄、 60°C で一晩の乾燥過程を経て、試料粉末を得た。

2.3 MSSチップの作製

MSSチップは、既報にしたがい、SOI基板を利用して一般的な半導体プロセスにより作製されたものを用いた⁴⁾。

2.4 MSSチップ上への光応答表面の作製

MSSチップ上への位置選択的な細胞培養は、図2に示すような光応答表面を利用した方法により行った⁹⁾。光照射によって脱離する官能基を備えたシランカップリング剤によって、シリコン製のMSSの表面を被覆し、蛍光顕微鏡を用いて局所的にUV光を照射する。その後、細胞吸着剤を適用することで、任意の位置に細胞を配置することが可能になる。

2.5 細胞培養

MSS表面への培養可能性を探る予備的な検討を行う目的で、まずは一般に広く使用されているHeLa細胞を用いた。培地はRPMI-1640を用い、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 下で培養した。

3. 結果および考察

3.1 単分散チタニア - ODA ハイブリッド粒子の合成

ナノ粒子曝露が細胞に与える影響を定量的に調べるための前提条件として、

- ・ナノ粒子のサイズが揃っている
- ・ナノ粒子の形状が揃っている
- ・ナノ粒子のサイズを制御できる

以上が求められる。筆者はこれまで、チタニア、シリカをはじめとする種々の酸化物系ハイブリッドナノ粒子の合成に従事し、単分散粒子合成についてのノウハウを確立してきた。その概要を図1に示す。本手法は、マイクロメートルサイズの微小な空間を化学反応に利用可能な、いわゆる「マイクロリアクタ」を組み込んだフロー式の合成法であり、大きく2つの段階から構成される。それは、マイクロリアクタ内での原料の1次混合と、1次混合後の反応液をさらに別の原料と混合することによる2次混合である。チタニア系粒子の合成には、原料としてTTIPを用いることが多く、この加水分解・縮重合反応により、粒子の形成・成長を誘起する。しかし、TTIPの加水分解はきわめて短時間に進行することが知られており、一つの容器に順次原料を加えて、閉鎖系で反応させるようなバッチ合成では、局所的に反応が進行してしまい、結果として多分散粒子が形成するという問題が生じやすい。これを回避するための方法として、加水分解に必要な水をごく少量ずつ加えることにより (多くの場合、TTIP : 水のモル比が1 : 3程度)、反応をゆっくり進行させることが有効とされてきたが、この場合は未反応の原料が残存しやすく、収率の低下が問題となる。そこで本手法においては、1次混合時のTTIP : 水のモル比を1 : 3程度とし、ここで粒子の「核」のみを形成させることを試みた。動的光散乱測定により、1次混合直後の反応液中にはおよそ2~3 nm程度の微細な粒子が存在しており、核の形成に成功したことが示唆された。次いで、この核を含む反応液を、ODAおよび1次混合時と比較して多量の水を含む原料液と2次混合することで、粒子の成長を期待した。その結果、図1右下のSEMに示

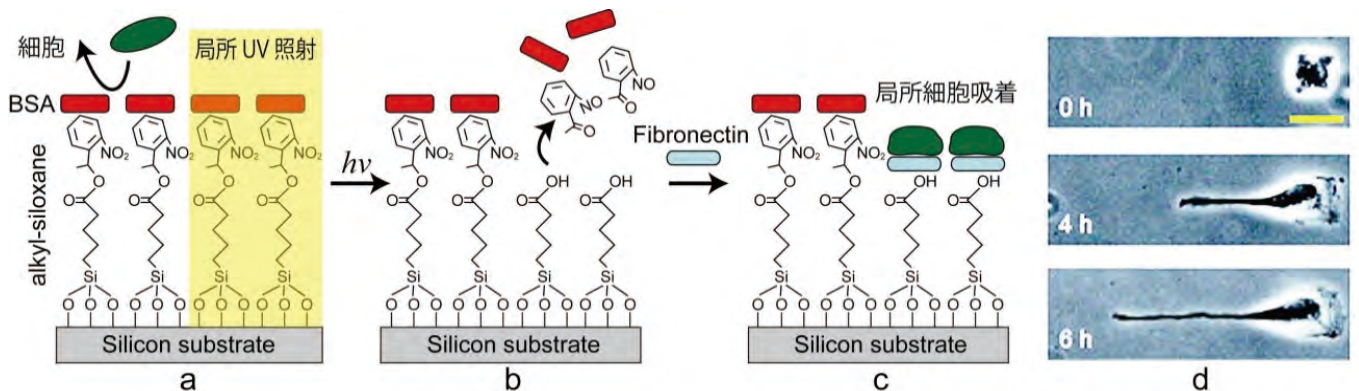


図2 光応答表面を利用した細胞配置・操作技術の模式図。光照射によって脱離するニトロベンジル基を備えたNPE-TCSPなどのシランカップリング剤によって、表面応力センサーのシリコン表面を被覆する。これをBSAなどで被覆し、細胞の吸着を阻害する表面を作製する(a)。蛍光顕微鏡を用いて、局所的に紫外光を照射することで、ニトロベンジル基を脱離させた後(b)、細胞吸着剤であるFibronectinなどを被覆することで、任意の位置に細胞を配置し、さらにその成長を誘導することが可能になる(c)。(d) 生きた細胞の配置・誘導の例

すようなサイズの揃った粒子を得ることができた。核形成と粒子成長の過程を分離することが、単分散粒子を得る上できわめて重要であることは古くから指摘されているが¹⁰⁾、合成条件をランダムに振るなどして最適条件を探していく以外、具体的な指針は得られていなかった。本手法を用いることで、1次混合で核を作りさえすれば、2次混合以降の反応環境を工夫することにより、最終生成物のサイズを調整できる可能性が示された。

次に、サイズ制御の可能性を明らかにするため、2次混合時の条件を検討した。2次混合前の段階では、未反応のTTIPが存在していると考えられるため、まずは原料を完全に消費することに焦点を絞って、2次混合時の水/IPAモル比の影響を検討した。その結果、水/IPAモル比を大きくしていくことにより、段階的にサイズの小さな粒子が生成することが分かった(図3)。Tiベースの収率は、いずれの場合も90%以上であった。ODAを添加せずに合成した場合、不定形の凝集粒子が得られたこと、Tiベースで計算した収率が約50%程度であったことも考慮すると、粒子の成長機構には疎水性相互作用が関係していると考えられる。つまり、ODAはアルキル鎖を外側に向けてチタニア粒子と相互作用しており、反応系に存在する水の量が増えるほど、最表面が疎水的なチタニア-ODAは、表面エネルギーを小さくするために周囲のチタニア-ODAと

相互作用(凝集)して、球状粒子を形成している可能性がある。水の量が少なければ、個々の粒子は大きく成長できるはずであり、これらのことは実験結果と一致している。アルキルアミンを用いたチタニア-アルキルアミン複合体形成に関する以前の報告において、アルキルアミン中のアミノ基と、チタニア表面の水酸基が水素結合により相互作用することが指摘されており¹¹⁾、本系においても、同様の現象が起こっているものとみられる。水/IPAモル比を調節することにより、チタニア-ODA粒子のサイズは70nm~500nm程度の範囲で制御可能であることが分かった。他の実験パラメータについても検討を進めており、予備実験の結果、既に10nm程度から1200nm程度までの広い範囲でサイズ制御できることを見出している。今後、結果をまとめて報告する予定である。

3.2 MSSの構造と基本性能

MSSは、「ナノメカニカルセンサー」^{4, 12, 13)}と呼ばれるタイプのセンサーの一種であり、代表的なカンチレバー型のセンサーを構造最適化することで、性能の飛躍的向上に成功したものである⁴⁾。これは、センサーチップに埋め込まれているピエゾ抵抗を用いた読み取り方法に基づくセンサーであり、図4にその基本的構造を図示した。MSSは「カンチレバー」構造と異なり、4つのピエゾ抵抗「検出ビー

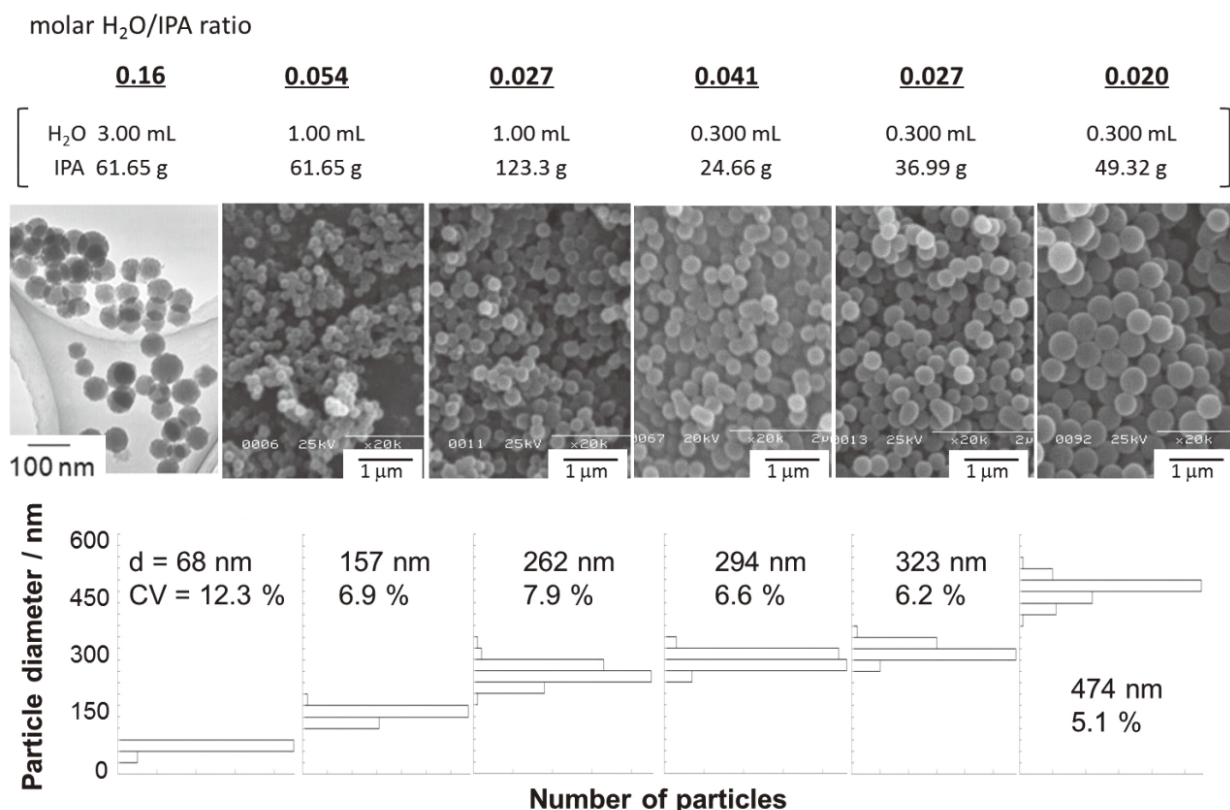


図3 溶液C中の水/IPAモル比を変えて合成したチタニア-ODA粒子のSEM像とサイズ分布

ム」によって支持された「吸着メンブレン」から成り、それら4つの piezo抵抗が完全ホイートストンブリッジを構成する。吸着メンブレン上に表面応力が印加されることによって生じるメンブレンの変形が、増幅された一軸性の応力として piezo抵抗ビームに効率的に変換される。プロトタイプ MSS の評価実験によって、標準の piezo抵抗カンチレバーの20倍以上の感度が得られることが明らかになり、光学的読み出しカンチレバーセンサーと同等の感度が実証された。このセンサーは、本研究を遂行するにあたって、以下のような様々な長所を有する。

- ・ 超高感度 (吸着メンブレン上のサブナノメートルの変形も検出可能)
- ・ 光学系が不要 (細胞による屈折率変化の影響が無い)
- ・ 高濃度・不透明溶媒 (細胞培養環境) 中で測定可能
- ・ 静的な測定のため、液体によるダンピングの問題が無い

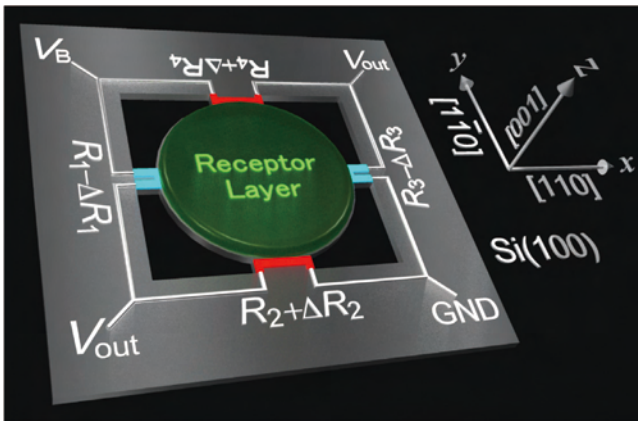


図4 MSSの構造と電気配線の模式図

- ・ 導電性液体中でも安定な動作が可能 (1ヶ月以上の安定な測定を確認済み)
- ・ センサー内の完全ホイートストンブリッジ構成により熱ドリフトが少ない

MSSのプロトタイプ (1G-MSS) は、1 cm × 1 cm のシリコンチップ上に8つのメンブレンが一次元に配列した構造を有する。1G-MSSの最小検出可能表面応力は0.2 ~ 0.3 mN/mであり、これまでに報告された細胞牽引力が2 mN/m程度であることから⁵⁾、さらなる感度の向上が必要であった。そのため、シリコンの特性や微細加工技術を踏まえた最適化を各構成要素に適用することで、感度向上を試みた。構造最適化を行う上で、チップサイズが大きくなると、測定チャンバーも大きくする必要があり、より多くの試料が必要になるだけでなく、チップ上の各メンブレンにおいて、試料や培養条件の不均一化が懸念される。そのため、チップサイズを小さく保つために、3 × 3の合計9チャンネルの二次元配列MSS (2G-MSS) チップを作製した (図5(a))。さらに、各MSSチャンネルの感度を向上させるために、以下の通り、各構成要素の最適化を行った¹⁴⁾。

- 1) 検出ビームと吸着メンブレンの両方の厚みを薄く (3.2 μm → 2.5 μm)
- 2) piezo抵抗部分の保護膜を薄く (CVD SiO₂ 650 nm + LPCVD Si₃N₄ 100 nm → 熱酸化SiO₂ 80 nm + LPCVD 80 nm)
- 3) piezo抵抗部のホウ素ドーピングを浅く (~500 nm → ~300 nm)
- 4) piezo抵抗部の負の領域を排除 (電流と応力の方向を

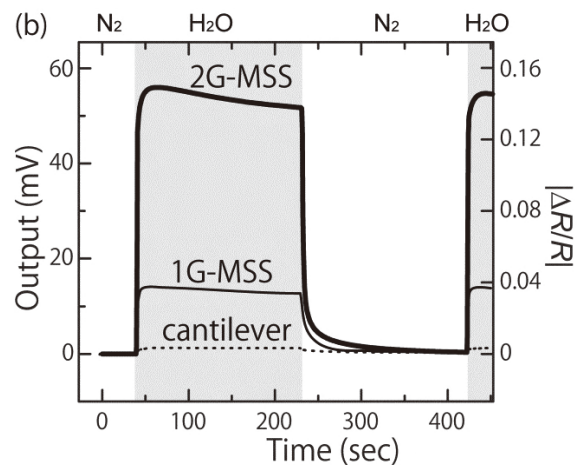
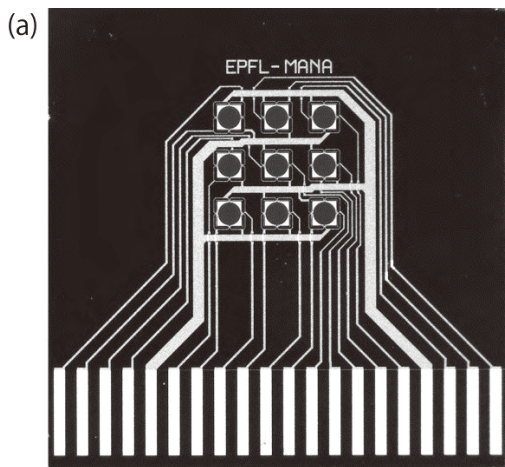


図5 (a) 2G-MSSチップの写真。MSSセンサー素子が3×3の合計9個、二次元配列されている。下部は0.5 mmピッチの電極であり、これを標準の0.5 mmピッチコネクタに差し込むことで、ワイヤーボンディングなどを行うことなく、すぐに測定が開始できる。(b) 2G-MSS、1G-MSS、およびpiezo抵抗カンチレバーからのシグナル。2G-MSSは、1G-MSS、piezo抵抗カンチレバーと比べて大幅に感度が向上していることが確認できる。poly(sodium 4-styrenesulfonate) (PSS) をインクジェットにより1 μm被覆し、100 mL/minで水蒸気を含む窒素ガスと純窒素ガスを3分間ずつ曝露

考慮して最適化)

これらの構造最適化の効果を、有限要素解析によって確認したところ、1G-MSSチップと比較して、約2.8倍の感度向上が見込めることが明らかになった。これらの最適化を行った2G-MSSチップの感度を実験的に検証してみたところ、1G-MSSの約4倍のシグナルを示した(図5(b))。これはピエゾ抵抗「カンチレバー」センサーと比較して、約100倍の感度であり、一般的に使用されている光(レーザー)読み取り型のカンチレバーセンサーと比較しても、数倍高い感度を有していることが確認された¹⁴⁾。

3.3 光応答表面作製技術を利用したMSSチップ上へのHeLa細胞の位置選択的培養

光応答表面修飾MSSチップは、以下の手順で作製した。まず、MSSチップ上の9つのメンブレンの表面を、末端に活性エステルを有する光分解性シランカップリング剤(TMS-2NP-NHS)によって修飾し、アミノポリエチレングリコール(PEG、分子量12,000)と反応させた。その後、いくつかのメンブレンにのみ蛍光顕微鏡を用いて紫外光を照射し、シランカップリング剤の分解に伴ってPEGを除去することにより、細胞吸着メンブレンを作製した。他のメンブレンはPEGで被覆されているため、細胞の吸着が抑制される。ここにHeLa細胞を播種し、24時間培養した後、正立顕微鏡を用いて観察した結果を図6に示す。特定

のメンブレンにのみ細胞が培養されている様子が確認できる。これにより、MSSチップに光応答表面を適用することによって、任意のメンブレン上にのみ細胞を配置することが可能であることが実証された。

4. 総括

マイクロリアクタを組み込んだフロー式の合成装置を用いて、オクタデシルアミン存在下、チタニウムテトライソプロポキシドの加水分解・縮重合反応を行うことにより、サイズの揃った真球状のチタニア-オクタデシルアミンハイブリッド粒子を得た。粒子形成反応の開始に必要な水に着目し、合成時の水/イソプロピルアルコールのモル比を変えることにより、70nmから500nmの範囲でサイズの揃った粒子を得られることが分かった。また、表面に生じる応力変化を高感度かつリアルタイムに測定可能な膜型表面応力センサー上に、HeLa細胞を培養する条件を検討した。紫外光照射により分解するシランカップリング剤を用いて表面修飾し、その上に細胞の吸着を抑制するアミノポリエチレングリコールを反応させた後、センサー表面にのみ紫外光照射することでポリエチレングリコールを除去した。これにより、位置選択的な細胞培養が可能であることを実証した。今後はセンサーによる測定と、顕微鏡による直接観察が可能な測定システムを構築することにより、ナノ粒子が細胞に与える影響に関して、詳細な検討を進めていく予定である。

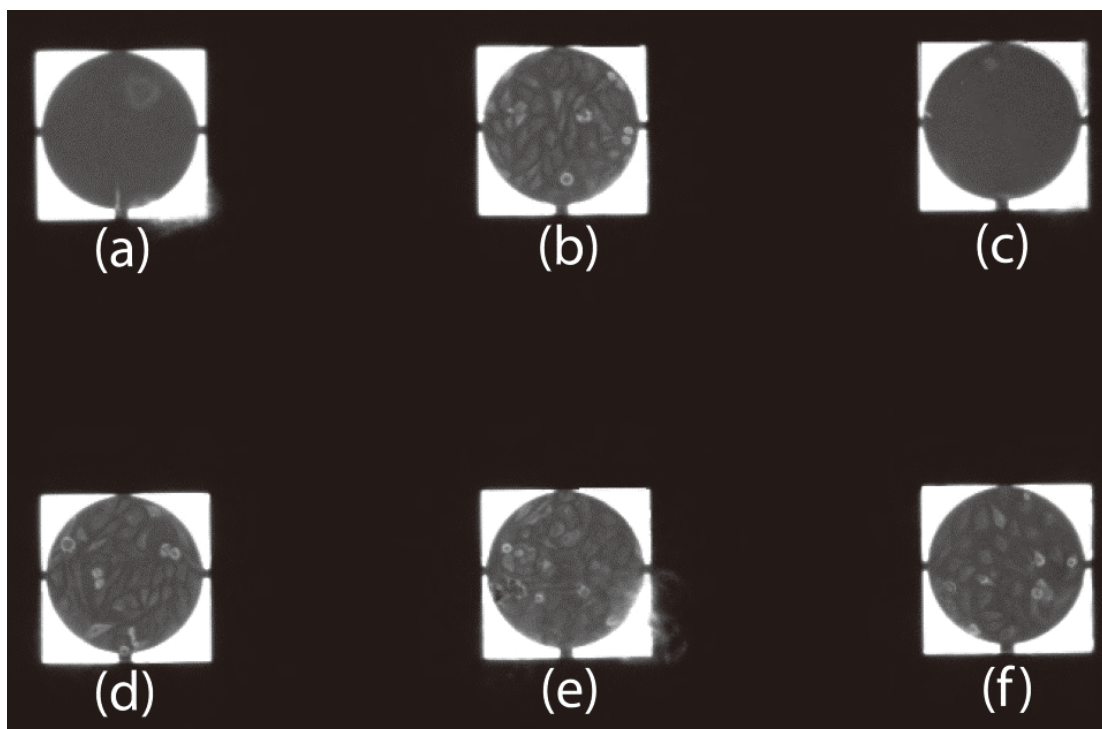


図6 光応答表面修飾2G-MSSチップ上に成長した細胞の顕微鏡写真。(b)(d)(e)(f)は紫外光を照射し、PEGを除去した細胞吸着メンブレンであり、(a)と(c)は、PEG被覆されているメンブレンである。細胞吸着メンブレンにのみ細胞が吸着していることが確認できる

謝 辞

MSSチップを用いた実験全般は、物質・材料研究機構の吉川元起博士の協力を得て行いました。また、光応答表面を利用した位置選択的な細胞培養は、物質・材料研究機構の中西淳博士の協力を得て行いました。ご多忙中にもかかわらず、快くお力添え下さったお二方に、心より感謝申し上げます。

(参考文献)

- 1) Medina C, Santos-Martinez MJ, Radomski A, Corrigan OI, Radomski MW, : Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance, *Br. J. Pharmacol.*, 150, 552-558, 2009.
- 2) Sharifi S, Behzadi S, Laurent S, Laird Forrest M, Stroeve P, Mahmoudi M, : Toxicity of nanomaterials, *Chem. Soc. Rev.*, 41, 2323-2343, 2012.
- 3) Hoet PHM, Bruske-Hohlfeld I, Salata OV, : Nanoparticles - Known and unknown health risks, *J. Nanobiotechnol.*, 2, 2-12, 2004.
- 4) Yoshikawa G, Akiyama T, Gautsch S, Vettiger P, Rohrer H, : Nanomechanical membrane-type surface stress sensor, *Nano Lett.*, 11, 1044-1048, 2011.
- 5) Bischofs IB, Schmidt SS, Schwarz US, : Effect of Adhesion Geometry and Rigidity on Cellular Force Distributions, *Phys. Rev. Lett.*, 103, 048101-1-048101-4, 2009.
- 6) Shiba K, Ogawa M, : Microfluidic syntheses of well-defined sub-micron nanoporous titania spherical particles, *Chem. Commun.*, 6851-6853, 2009.
- 7) Shiba K, Kambara K, Ogawa M, : Size Controlled Syntheses of Nanoporous Silica Spherical Particles through Microfluidic Approach, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 49, 8180-8183, 2010.
- 8) Shiba K, Onaka K, Ogawa M, : Preparation of mono-dispersed titanium dioxide-octadecylamine hybrid spherical particles in the submicron size range, *RSC Adv.*, 2, 1343-1349, 2012.
- 9) Nakanishi J, Kikuchi Y, Inoue S, Yamaguchi K, Takarada T, Maeda M, : Spatiotemporal control of migration of single cells on a photoactivatable cell microarray, *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 6694-6695, 2007.
- 10) LaMer VK, Dinegar RH, : Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols, *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 4847-4854, 1950
- 11) Wang YD, Ma CL, Sun XD, Li HD, : Synthesis and characterization of mesoporous TiO₂ with wormhole-like framework structure, *Appl. Catal. A: Gen.*, 246, 161-170, 2003.
- 12) Gimzewski JK, Gerber C, Meyer E, Schlittler RR, : Observation of a chemical-reaction using a micromechanical sensor, *Chem. Phys. Lett.*, 217, 589-594, 1994.
- 13) Thundat T, Warmack RJ, Chen GY, Allison DP, : Thermal and ambient-induced deflections of scanning force microscope cantilevers, *Appl. Phys. Lett.*, 64, 2894-2896, 1994.
- 14) Yoshikawa G, Akiyama T, Loizeau F, Shiba K, Gautsch S, Nakayama T, Vettiger P, de Rooij NF, Aono M, : Two Dimensional Array of Piezoresistive Nanomechanical Membrane-Type Surface Stress Sensor(MSS) with Improved Sensitivity, *Sensors*, 12, 15873-15887, 2012.

接触抑制シグナルによるケラチノサイトのホメオスタシスとその破綻病態

九州大学生体防御医学研究所ゲノム腫瘍学

鈴木 聡

Mice deficient in one or both copies of *Mob1a* and carrying a trapped mutation in *Mob1b* developed various cancers. Most frequent cancers in these mice resembled trichilemmal carcinomas. Keratinocyte-specific homozygous null mutations of *Mob1a* and *Mob1b* (kDKO) mice showed hyperplasia of keratinocyte progenitors. kDKO keratinocytes exhibited hyperproliferation, apoptotic resistance, impaired contact inhibition, enhanced progenitor self-renewal, and increased centrosomes. In addition, loss of *Mob1a/b*, or activation of downstream *YAP1* were replicated in human trichilemmal carcinomas.

1. 緒言

細胞間の接触により増殖が抑制される‘接触抑制現象 (Contact Inhibition)’は古くからその存在が知られており、この現象は創傷治癒、皮膚幹細胞維持、皮膚形態形成などに重要である。しかしながら、接触抑制に関わる細胞内シグナル活性化機構には、いくつかの細胞表面分子の関与が報告されているのみで、依然多くが不明であった。

近年ショウジョウバエにおいて、接触抑制や器官サイズを制御する新たなキナーゼ経路として、Hippo経路が報告された。哺乳類Hippo経路は、MSTキナーゼとLATSキナーゼの2つのキナーゼカスケードから構成され、この経路は細胞接触などの細胞外力、細胞外基質、ストレス刺激により活性化されて、下流の転写共役因子YAP1をリン酸化し、YAP1を核外に排除するとともに蛋白質を崩壊させ、細胞増殖などを負に制御する¹⁾。Hippo経路はこのように細胞増殖、細胞死、細胞未分化性、細胞遊走、平面極性などを制御して、器官のサイズや腫瘍形成を制御することが、近年わかってきた²⁾。また、Hippo経路のいくつかの遺伝子改変マウスにがんの発症の報告があること³⁾、ヒトがん患者では高頻度にHippo経路分子の発現低下や遺伝子変異をみとめ、これらの有無が悪性度と相関することなどから⁴⁾、Hippo経路はがん抑制遺伝子としても注目され、今後のがん治療の標的経路として期待されている。しかしながら、これまでに作製されたHippo経路分子欠損マウスの多くは胎生致死であったために⁵⁾、Hippo経路分子の成体における役割は多くが依然不明のままである。また、哺乳類各Hippo経路構成分子には相同分子が極めて多いため

に、今後各Hippo経路構成分子の生体における機能解析が必須である。Hippo経路のうち、MSTキナーゼとそのアダプター分子SAV1, LATSキナーゼとそのアダプター分子MOB1の4つがこの経路のコアコンポーネントである。MOB1には7つの相同分子があるが、このうちMOB1AとMOB1Bの2つのみがLATSキナーゼと結合できる。LATSキナーゼはそのキナーゼ活性は非常に弱いものの、MOB1が結合することによって、非常に強いキナーゼ活性を獲得する。しかしながらMOB1の生体における役割は未だ不明であった。

皮膚がんのうち最も頻度の高いものは基底細胞がんであり、結節型の基底細胞がんは毛包由来である。外毛根鞘細胞の増多を特徴とする皮膚外毛根鞘がんは、基底細胞がんと同様に毛包由来の腫瘍であるが、生検が必要な皮膚腫瘍例の0.05%と非常に稀な腫瘍で、発症は高齢者に多く、頭部や顔面、四肢に好発することが知られている⁶⁾。基底細胞がんは今やSHHシグナルの異常によることが判明してきたが^{7,8)}、外毛根鞘がんの原因遺伝子についてはこれまで全くわかっていなかった。

今回我々は、ケラチノサイト特異的なMOB1欠損マウスを作製したところ、このマウスに外毛根鞘がんが発症することを見出した。

2. 実験・結果

MOB1A/MOB1Bは初期発生に必須である

我々はまずMOB1A及びMOB1B単独遺伝子欠損マウスをそれぞれ作製した。しかしながら、これらの2分子は相同性が極めて高く互いにその機能を代償するためか、MOB1A、MOB1B各単独欠損マウスは正常に生育し、表現型を見いだせなかった。

そこで次にMOB1A/MOB1Bを二重に完全欠損(ホモ欠損)するマウスを作製したところ、着床直後に致死となった。これらの胚ではPDGFR α やGATA4の顕著な発現低下をみとめたことから、原始内胚葉への分化障害が致死の一因であると考えられた。



Keratinocytes homeostasis by contact inhibition signaling and its disorders

Akira Suzuki

Division of Cancer Genetics, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University

MOB1A/MOB1B部分欠損による腫瘍の発症

MOB1A/MOB1B二重完全欠損マウスが胎生早期に致死であったことから、MOB1A/MOB1B部分欠損マウス(MOB1AヘテロMOB1Bホモ欠損、あるいはMOB1AホモMOB1Bヘテロ欠損マウス)を長期観察したところ、これらマウスでは皮膚外毛根鞘がん、骨肉腫、筋線維肉腫、唾液腺腫瘍、乳がん、肝がんなどの様々な腫瘍を全例70

週以内に発症し、特に皮膚外毛根鞘がんは全例にみられた(図1、2)。また、これら部分欠損マウスにみられた腫瘍には、残された野生型アレルの欠失(LOH)をみたことから、MOB1が古典的ながん抑制遺伝子として作用することが示唆された。

その他MOB1A/MOB1B部分欠損マウスには、腫瘍形成の他に、歯芽の形成異常や骨梁数の増加、内耳有毛細胞

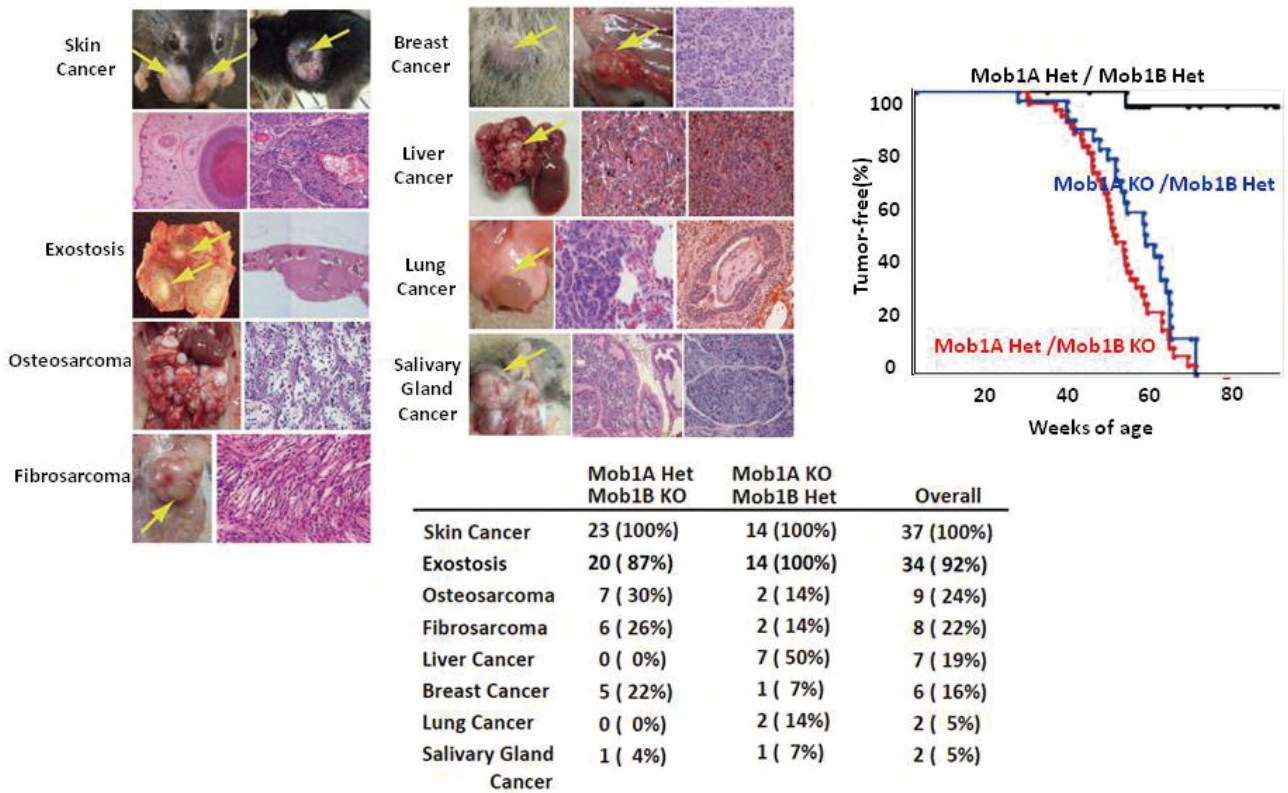


図1 Mob1A/Mob1B部分欠損マウスにみられる腫瘍形成 (JCI 2012⁹⁾ より引用)

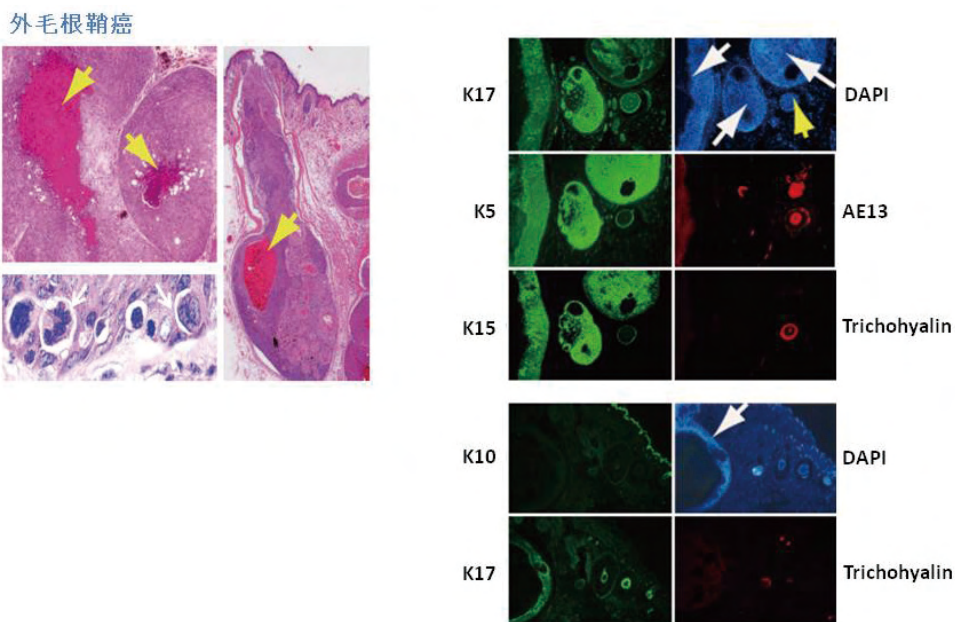


図2 Mob1A/Mob1B部分欠損マウスの全例にみられる Keratin 17 陽性の皮膚外毛根鞘がん (JCI 2012⁹⁾ より引用)

の整列障害による平衡障害などの表現型も観察された。

ケラチノサイト特異的MOB1A/MOB1B欠損マウスやMOB1A/MOB1B欠損ケラチノサイトの表現型

前述のようにMOB1A/MOB1B部分欠損マウスに全例皮膚外毛根鞘がんが発症したため、次にタモキシフェン誘導性・ケラチノサイト特異的MOB1A/MOB1B二重ホモ欠損マウスを作製した(タモキシフェンは生後1日目に投与)。ケラチノサイト特異的MOB1A/MOB1B二重ホモ欠損マウスは体が小さいものの、皮膚が顕著に肥厚し、毛髪は細くかつ彎曲していた。これらマウスは口腔粘膜上皮の肥厚による嚥下障害をきたし、生後3週齢までに全例栄養不良で死亡した。組織学的には毛嚢や毛嚢間上皮の顕著な肥厚、皮膚上皮の退縮障害による第一毛髪周期の不明瞭化を示した(図3)。また不全角化が顕著で、Keratin 15, Keratin 14, Keratin 5, SOX9等が陽性の未分化なケラチノサイトが増加する一方、Keratin 10, Filaggerin等が陽性の分化したケラチノサイトの比率は顕著に減少し、未分化性や自己複製能が亢進していた(図4, 5)。

細胞生物学的には、MOB1A/MOB1B二重欠損ケラチノサイトは、細胞増殖亢進、細胞死抵抗性、接触抑制障害(図6)、中心体数、染色体数異常、細胞分裂時間短縮(図7)などを認め、これらががんの発症に寄与したものと思われる。

生化学的には、MOB1下流のLATS1/2のリン酸化減少に加え、予期せぬことにLATS1/2は総蛋白質質量も顕著に

減少したことから、MOB1はLATS1/2蛋白質の安定化にも関与していることが示唆された。さらに、予想通りYAP1のリン酸化は減少し、細胞密度が高いにも関わらずYAP1が核に集積していた。

ヒト外毛根鞘がんの原因遺伝子としてのMOB1

前述のようにMOB1A/MOB1B部分欠損マウスの全例にみられた腫瘍はKeratin 17(外毛根鞘細胞マーカー)陽性の外毛根鞘がんであった(図2)。

そこで次にヒト外毛根鞘がん組織を用いてMOB1やその下流のYAP1の発現を検討したところ、約半数の症例でMOB1の発現低下を、3/4でYAP1の発現亢進や核局在の増強を認めたことから、MOB1を含むHippo経路の異常がヒト外毛根鞘がんの原因の一因であることを示した(図8)。

3. 考察と統括

本研究によってMOB1は初期発生に必須であること、種々のがんの発症に関与し、特にヒト外毛根鞘がんの一因となること等を個体レベルで世界ではじめて示すことができた⁹⁻¹¹⁾。

Hippo経路は細胞接触や細胞外基質からの刺激をうけて活性化するが、Hippo経路の異常によって高頻度に皮膚発がんに至ることから、今後新たに開発する化粧品の安全性は、Hippo経路の活性化程度を測定することによってスクリーニングできる可能性がある。

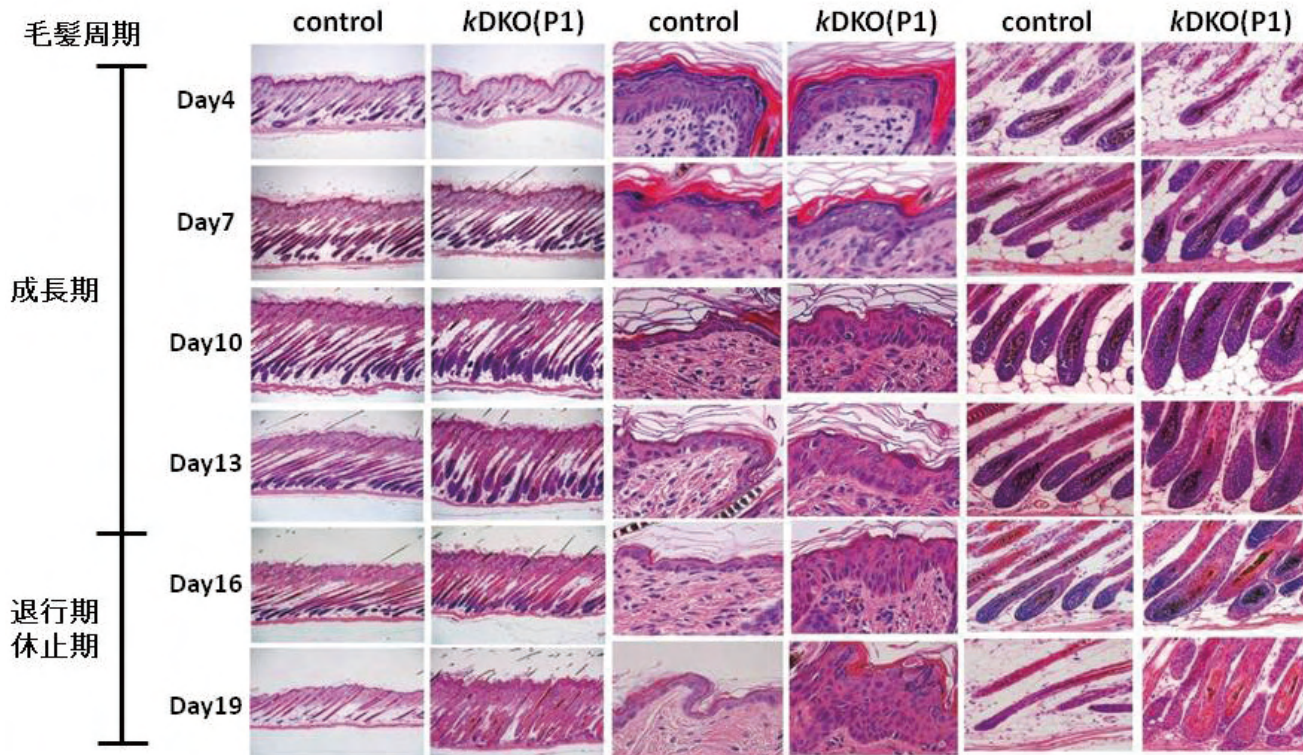


図3 ケラチノサイト特異的Mob1A/1B二重完全欠損マウスにみられる毛嚢や毛嚢間上皮の肥厚と毛髪周期の不明瞭化(JCI 2012⁹⁾より引用)

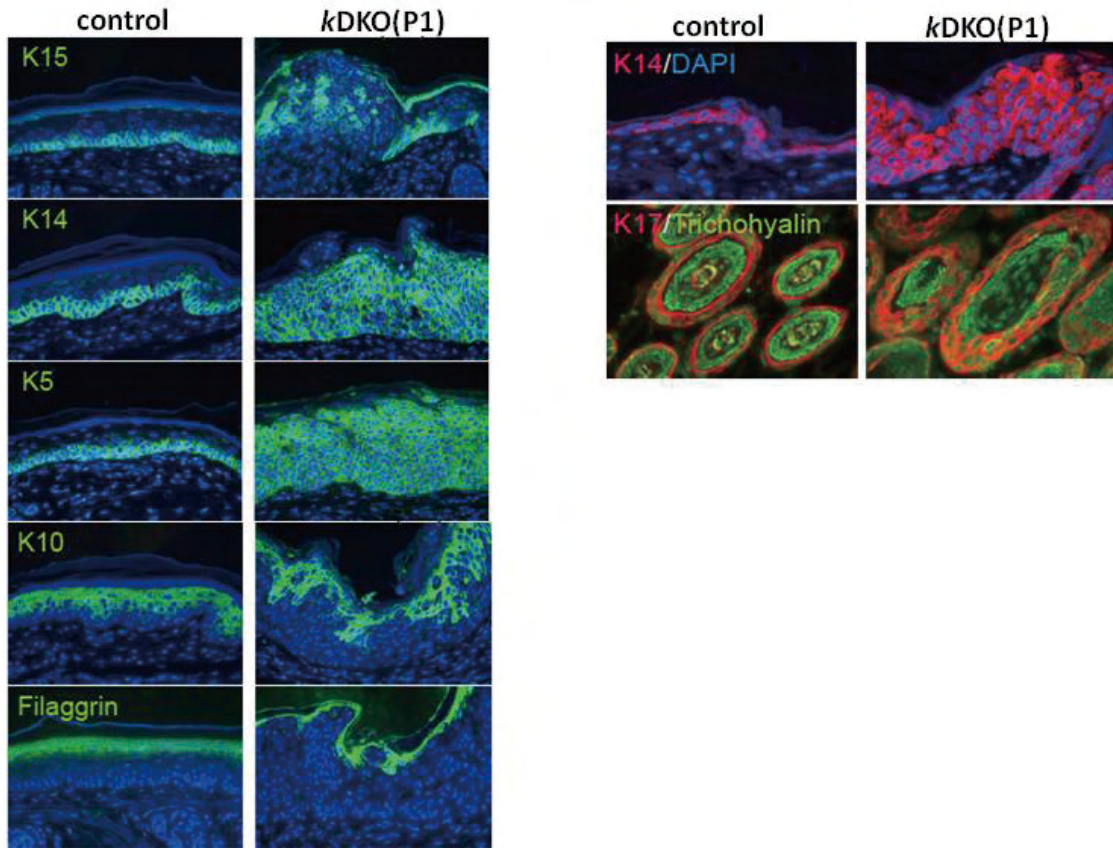


図4 ケラチノサイト特異的 Mob1A/1B 二重完全欠損マウスの毛嚢間上皮細胞にみられる未分化細胞の増加 (JCI 2012⁹⁾ より引用)

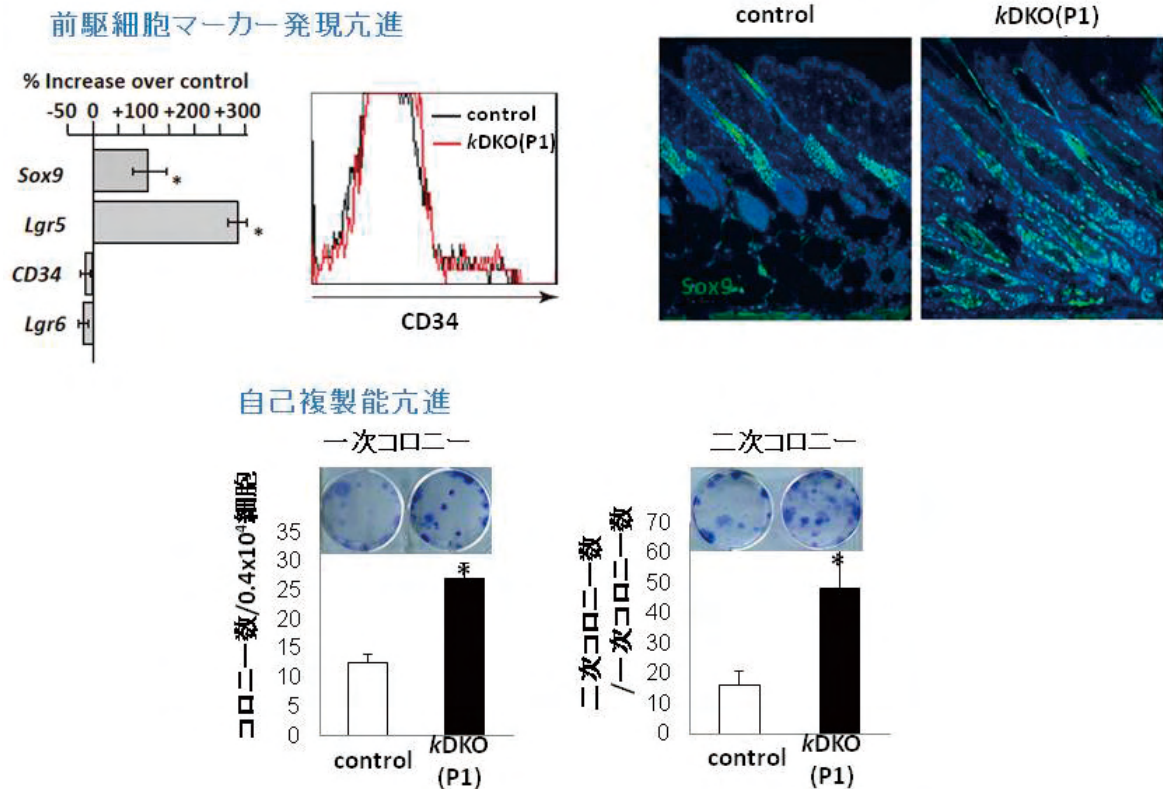


図5 ケラチノサイト特異的 Mob1A/1B 二重完全欠損マウスの毛嚢上皮細胞の未分化細胞の増加と自己複製能亢進 (JCI 2012⁹⁾ より引用)

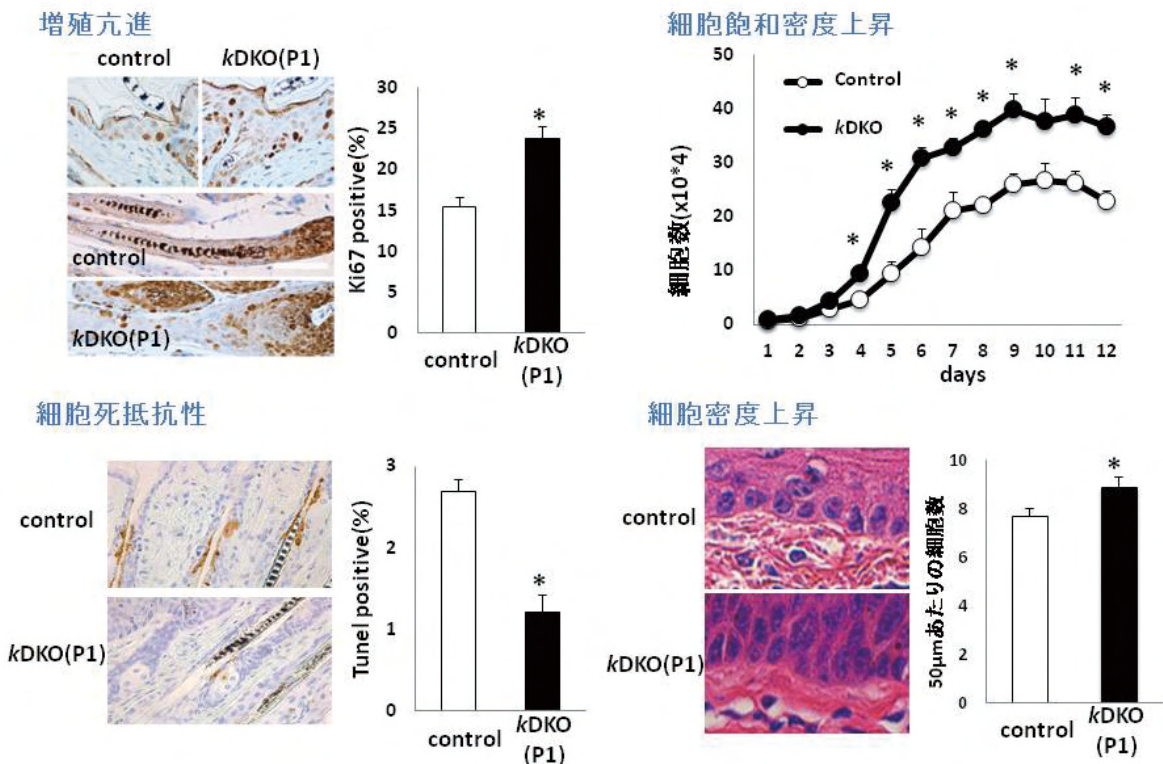


図6 Mob1A/1B二重完全欠損ケラチノサイトにみられる細胞増殖亢進、細胞死抵抗性、接触抑制障害 (JCI 2012⁹) より引用)

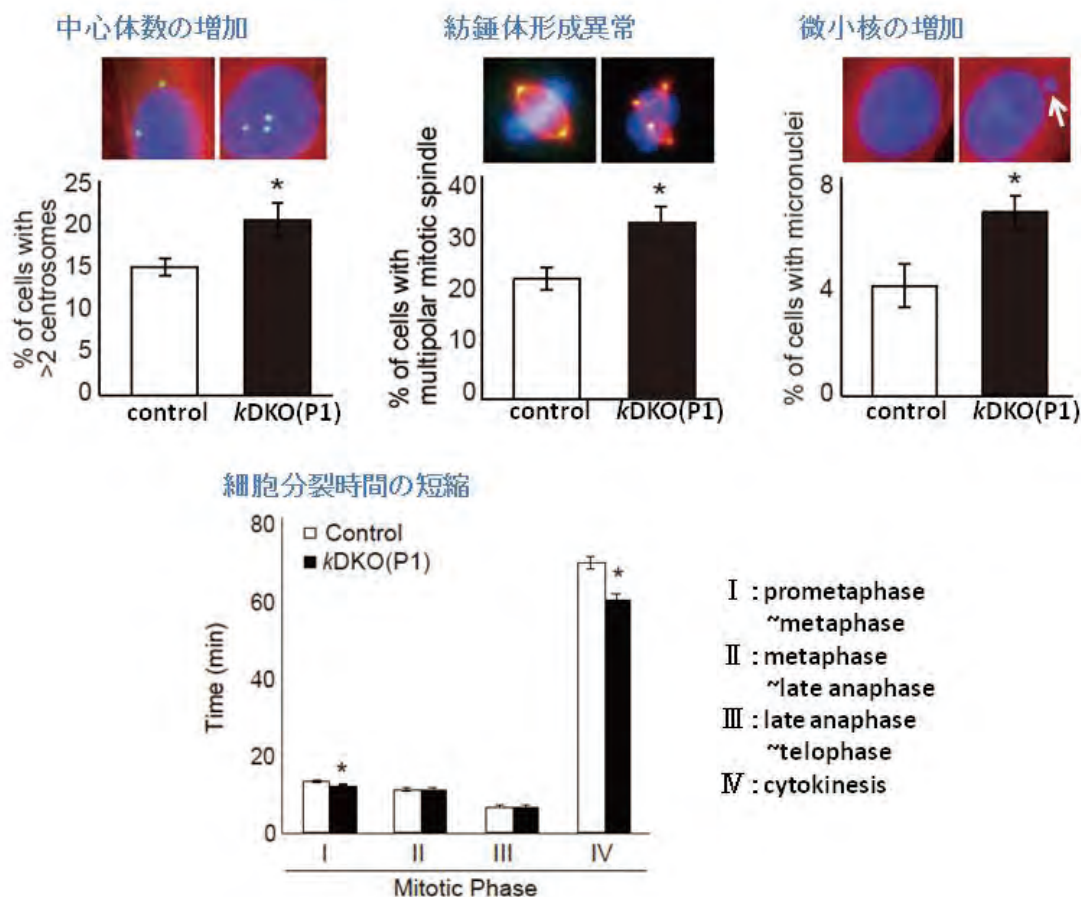


図7 Mob1A/1B二重完全欠損ケラチノサイトにみられる細胞分裂期異常 (JCI 2012⁹) より引用)

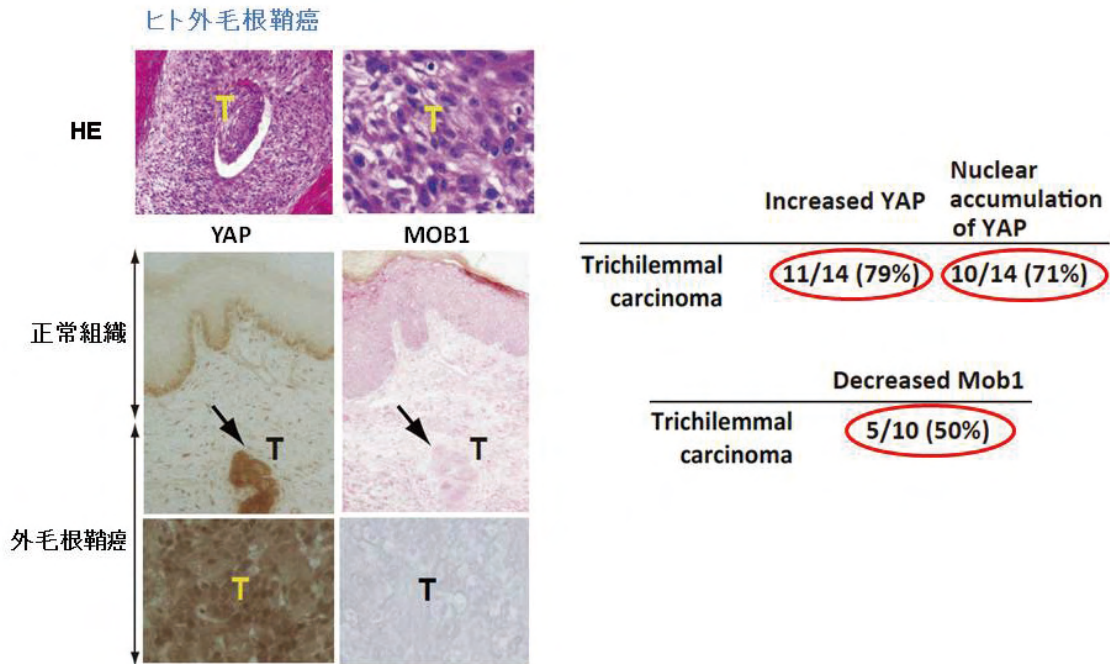


図8 ヒト皮膚外毛根鞘がんにおける MOB1 や YAP1 の異常の頻度 (JCI 2012⁹⁾ より引用)

我々は Hippo 経路を標的とする新たな抗腫瘍薬の開発にも着手しており、今回作製したマウスは、腫瘍モデルマウスとして薬効評価の良いツールとなる。

今後は皮膚創傷治癒における MOB1 の役割等を明示するとともに、MOB1 の遺伝子変異がヒトメラノーマで報告されていることから、メラノサイトにおける MOB1 の役割も明示したい。さらに MOB1 以外の Hippo 経路構成分子の機能も解析し、総じて Hippo 経路の皮膚における機能の全貌と、その破綻疾患を明示したい。

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から御礼申し上げます。

(文 献)

- 1) Zeng Q, Hong W. The emerging role of the hippo pathway in cell contact inhibition, organ size control, and cancer development in mammals. *Cancer Cell* 13:188-92, 2008
- 2) Zhao B, Tumaneng K, Guan KL. The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nat Cell Biol* 13:877-83, 2011
- 3) Edgar BA. From cell structure to transcription: Hippo forges a new path. *Cell* 124:267-73, 2006
- 4) Harvey K, Tapon N. The Salvador-Warts-Hippo pathway - an emerging tumour-suppressor network. *Nat Rev Cancer* 7:182-91, 2007
- 5) McPherson JP, Tamblyn L, Elia A, Migon E,

- Shehabeldin A, Matysiak-Zablocki E, Lemmers B, Salmena L, Hakem A, Fish J, Kassam F, Squire J, Bruneau BG, Hande MP, Hakem R. Lats2/Kpm is required for embryonic development, proliferation control and genomic integrity. *EMBO* 23:3677-8, 2004
- 6) Headington JT. Tumors of the hair follicle. A review. *Am J Pathol* 85(2):479-514, 1976.
- 7) Fan H, Oro AE, Scott MP, Khavari PA Induction of basal cell carcinoma features in transgenic human skin expressing Sonic Hedgehog. *Nat Med* 3(7):788-792, 1997.
- 8) Oro AE, Higgins KM, Hu Z, Bonifas JM, Epstein EH Jr, Scott MP. Basal cell carcinomas in mice overexpressing sonic hedgehog. *Science* 276(5313): 817-821, 1997.
- 9) Nishio M, Hamada K, Kawahara K, Sasaki M, Noguchi F, Chiba S, Mizuno K, Suzuki SO, Dong Y, Tokuda M, Morikawa T, Hikasa H, Eggenschwiler J, Yabuta N, Nojima H, Nakagawa K, Hata Y, Nishina H, Mimori K, Mori M, Sasaki T, Mak TW, Nakano T, Itami S, Suzuki A. Cancer susceptibility and embryonic lethality in Mob1a/1b double-mutant mice. *J Clin Invest*. 122(12):4505-18, 2012.
- 10) Nishio M, Otsubo K, Maehama T, Mimori K, Suzuki A. Capturing the Mammalian Hippo: Elucidating Its Role in Cancer *Cancer Sci* 104(10), 1271-1277, 2013
- 11) 西尾美希、三森功士、森 正樹、板見 智、鈴木 聡. Hippo 経路分子 MOB1 によるがん発症・進展制御とがん治療戦略 次世代がん戦略研究 update がん基盤生物学 - 革新的シーズ育成に向けて - 南山堂 2013 in press

皮膚表皮保湿成分セラミドの脂質シグナリング分子としての作用メカニズムの解明

九州大学大学院理学研究院化学部門

谷 元 洋

Ceramide, the backbone of membrane sphingolipids, is now recognized as an intracellular lipid second messenger that regulates various signal transduction systems including apoptosis. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, accumulation of intracellular ceramide causes strong growth defect. In this study, we screened yeast mutant strains showing abnormal sensitivity against ceramide accumulation. It was found that deletion of *IRA2* gene encoding GTPase-activating protein or *PDE2* gene encoding cyclic AMP phosphodiesterase, which negatively regulate Ras-cAMP-PKA signaling pathway, causes high sensitivity against the growth inhibition induced by ceramide accumulation. On the contrary, deletion of *RAS2* gene encoding small GTPase causes resistance against the growth inhibition. These results suggested functional relationship between ceramide signaling and Ras-cAMP-PKA pathway.

1. 緒 言

皮膚表皮の角質層には、水分漏出を防止する脂質バリアが存在する。この脂質バリアの構成成分の半分以上を占めているのがセラミドであり、セラミドは近年では化粧品成分としても大変注目されている（セラミドは、生体膜脂質二重層を構築するスフィンゴ脂質の疎水性部分に相当する構造である（Fig. 1））。一方で、セラミドは細胞内において微量に生成されることによって、細胞死（アポトーシス）、細胞分化、細胞増殖を制御する細胞内脂質シグナリング分子として機能することが、多くの文献によって報告されている¹⁾。しかしながら、セラミドのシグナリング分子としての分子レベルでの作用メカニズムに関しては、不明瞭な点が多く混沌としているのが現状である。本研究では、セラミドシグナリングの分子メカニズム解明を目的とし、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* をモデル生物として用いた解析を試みた。

2. 実 験

出芽酵母の複合スフィンゴ脂質は、イノシトールリン酸を頭部に持ったイノシトールホスホリルセラミド（IPC）を基本構造としており、これにマンノース、さらにイノシトールリン酸が付加したMIPC、M(IP)₂Cが存在する（Fig. 2）。これらは哺乳動物におけるスフィンゴミエリンやスフィンゴ糖脂質に相当すると考えられている。酵母においてセラミドをIPCに変換する酵素（Aur1p）は生存に必須であり、

その特異的阻害剤である Aureobasidin A（AbA）、または Aur1p の発現抑制によって、強力な生育阻害が引き起こされることが知られている。この生育阻害の原因は、①中間代謝産物であるセラミドの細胞内蓄積と、②複合スフィンゴ脂質（IPC, MIPC, M(IP)₂C）の減少であると考えられている。研究代表者らは、以前に AbA が誘導する生育阻害に対して、高感受性を示す酵母遺伝子変異株を 18 株、及び抵抗性を示す酵母遺伝子変異株を 1 株同定している^{2, 3)}。これらの変異株の解析を通して、セラミドの脂肪酸鎖の鎖長が変化することで、その細胞毒性が顕著に変化することを明らかにした³⁾。また、セラミドの長鎖塩基部分の C4 位の水酸基が消失することで、セラミドの毒性が減少すること、一方で脂肪酸部分の α -水酸化がなくなるとセラミドの毒性が上昇することを明らかにした⁴⁾。このように、特定の酵母変異株の Aur1p 阻害剤に対する感受性の変化を調べることで、セラミドの構造と生理機能の相関関係が明らかとなってきた。

本研究で研究代表者らは、テトラサイクリン調節プロモーター⁵⁾を組み込むことでドキシサイクリンによって Aur1p の発現抑制が可能な酵母変異株 (*tet-AUR1* 株) を用いて、Aur1p 発現抑制が誘導する生育阻害に対して、高感受性を示すような変異遺伝子の探索を試みた。探索には、酵母非必須遺伝子約 4800 個がそれぞれ破壊された酵

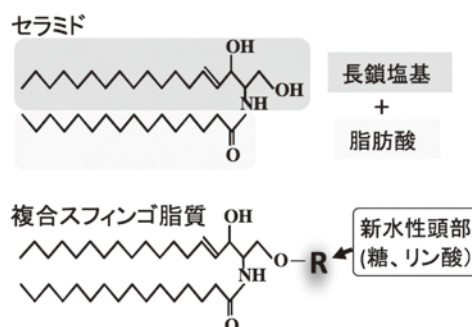


Fig. 1 スフィンゴ脂質の基本構造



Molecular mechanism of moisturizing factor, ceramides, as a lipid signaling molecule

Motohiro Tani

Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Kyushu University

母遺伝子ノックアウトライブラリー⁶⁾を用いた。酵母遺伝子ノックアウトライブラリーのそれぞれの株に *tet-AUR1* の変異を導入した二重変異株 (*tet-AUR1 xxxΔ* 株 (*xxx* は任意の非必須遺伝子)) を網羅的に作製した。網羅的作製は、Tong and Booneの方法⁷⁾に従って行った。具体的には、Mat α 型 *tet-AUR1* 株と Mata 型の酵母遺伝子ノックアウトライブラリー株をかけ合わせ、二倍体を作製、その後孢子形成を誘導し、二重変異が導入されている一倍体を選択培地にて単離するという方法である (Fig. 3)。一度に4800株のすべてに関して二重変異株を作製するために、菌の植

え継ぎには、384ピンのレプリケーターを用いた。これによって1枚の寒天プレート上で最大384株の菌株の操作を行うことが可能となる。このようにして作製された二重変異株 (*tet-AUR1 xxxΔ* 株) のドキシサイクリンに対する感受性を調べた。

3. 結果

3.1 Aur1p発現抑制に対して高感受性を示す遺伝子の探索

酵母非必須遺伝子4800個のそれぞれが欠損した株に *tet-*

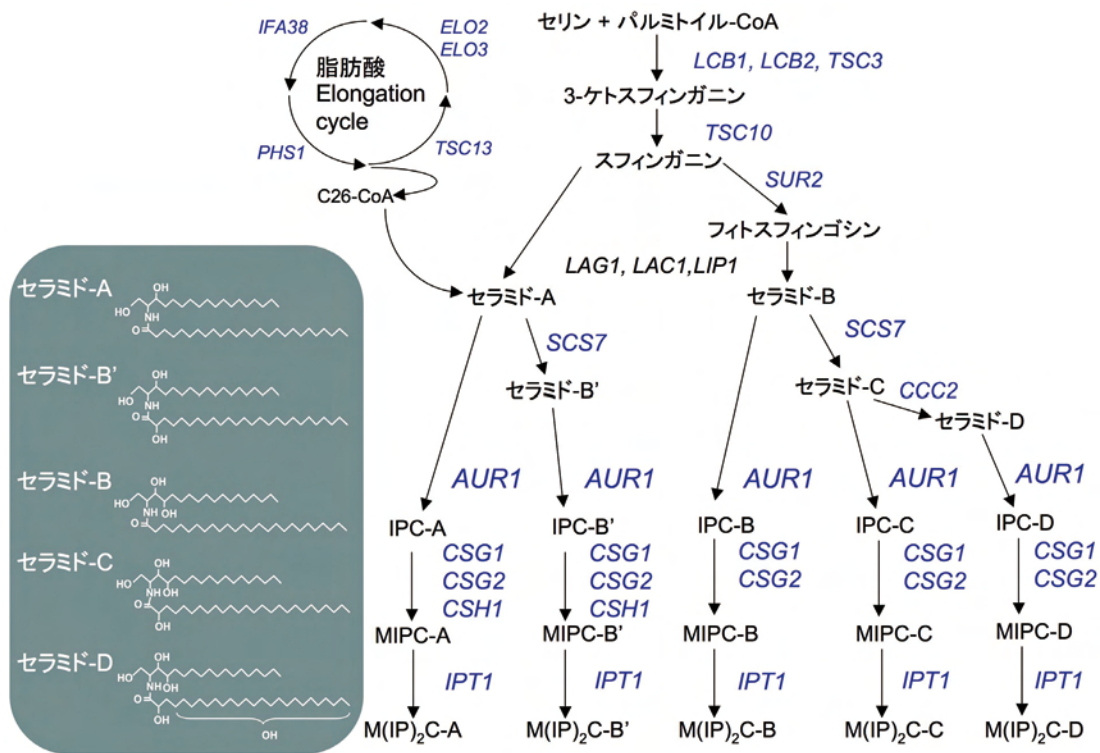


Fig. 2 出芽酵母のスフィンゴ脂質の生合成経路

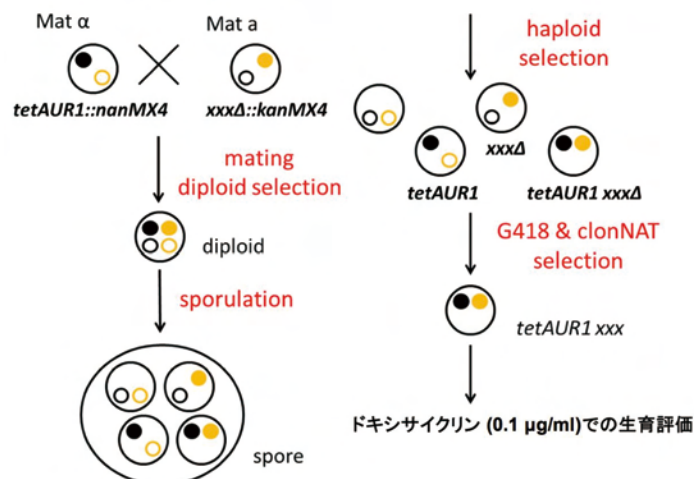


Fig. 3 *tet-AUR1 xxxΔ* 二重変異株の網羅的作製

*AUR1*を導入した二重欠損株を網羅的に作製し、384ピンレプリケーターを用いて、これらの株をドキシサイクリン0または0.1 µg/mlを含む合成培地に植え継ぎ、生育の観察を行った（ドキシサイクリン0.1 µg/mlは、*tet-AUR1*単独変異株が顕著な生育阻害を示さない濃度である）。その結果、低濃度ドキシサイクリン処理によって顕著にコロニーサイズが小さくなる二重変異株を最終的に10個同定した。これらの高感受性変異株の変異遺伝子には、小胞輸送に関与する遺伝子が4個、スフィンゴ脂質の構造修飾に関わる遺伝子が1個（*SCS7*）、細胞内情報伝達系に関わる遺伝子が1個（*IRA2*）、ホスホイノチシド脱リン酸化酵素が1個（*SAC1*）、機能未知遺伝子が3個、含まれていた。*SAC1*²⁾、*SCS7*⁴⁾に関しては、以前にAur1p阻害剤Aureobasidin Aに高感受性を示す遺伝子としても同定されたものである。今回は、この中で低分子量Gタンパク質活性化GTPase（GAP）をコードする*IRA2*遺伝子に注目をした。

3.2 Aur1p発現抑制による生育阻害とRas-cAMP-PKAシグナル経路との関連性

Ira2pは、低分子量Gタンパク質であるRas1p, Ras2pをGTP結合型からGDP結合型の不活性化型へと変換するGAPとして知られている（Fig. 5）。酵母においてRas1p,

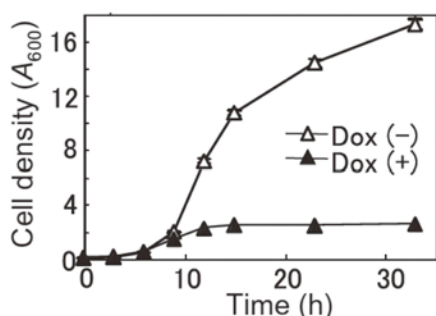


Fig. 4 *tet-AUR1* 株の10µg/mlドキシサイクリン (Dox) 添加による生育阻害

Ras2pは、アデニル酸シクラーゼであるCyr1pを活性化することで細胞内cAMP量を増大させPKA（Tpk1, Tpk2, Tpk3）を活性化させる（Fig. 5）。Ras-cAMP-PKAシグナル伝達経路は、酵母の細胞周期の調節による増殖制御、グルコース応答、ストレス応答等において重要な役割を果たしている⁸⁾。

*tet-AUR1 ira2Δ*の二重変異株は、*tet-AUR1*単独変異株が非常に弱い生育阻害しか示さないドキシサイクリン濃度（0.7 µg/ml）で生育が殆ど観察されなくなった。このような高感受性はAur1p阻害剤Aureobasidin Aを用いた時にも同様に観察されたことから、*Aur1*の機能阻害に対して*IRA2*欠損株は高感受性を示すことが明らかになった。次にRas-cAMP-PKAシグナル経路に関わるその他の因子の欠損株についても同様の解析を行った。その結果、*RAS2*欠損は*tet-AUR1*株のドキシサイクリンによる生育阻害に対する抵抗性を引き起こすことがわかった（Fig. 6）。またcAMPのホスホジエステラーゼをコードする*PDE2*欠損によって、*IRA2*欠損と同様に、Aur1p発現抑制に対して高感受性を示すことが判明した（Fig. 6）。これらの結果より、*IRA2*あるいは*PDE2*が欠損することでRas-cAMP-PKA経路が活性化されると、Aur1p発現抑制に対して高感受性となるが、逆に*RAS2*欠損によってRas-cAMP-PKA経路が抑制されると抵抗性となることが考え

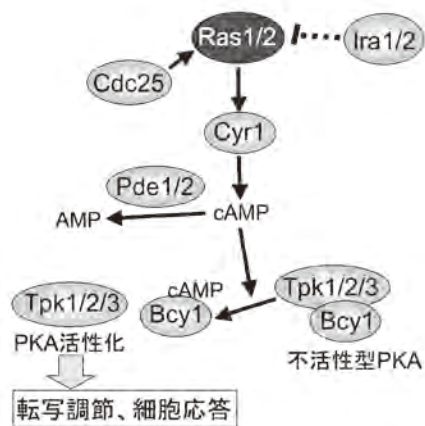


Fig. 5 出芽酵母のRas-cAMP-PKAシグナル伝達経路

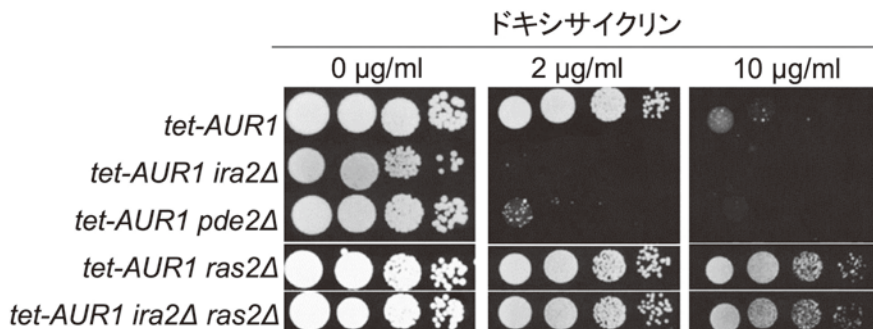


Fig. 6 Ras-cAMP 経路因子の欠損株の Aur1p 発現抑制に対する感受性

Ras-cAMP-PKA 経路が活性化されるような変異を導入すると Aur1p 抑制が誘導するセラミド蓄積に対して高感受性を示すが、Ras-cAMP-PKA 経路が抑制されるような変異を導入した場合、逆に抵抗性を示すことが確認された。Ras-cAMP-PKA 経路は、生育維持に必須であり、ストレス応答、細胞周期の調節に関与する重要なシグナル伝達系である。セラミド代謝異常によって、実際に Ras-cAMP-PKA 経路が活性化されているのか、抑制されているのかに関しては今後の重要な課題である。一方で、Aur1p 発現抑制に対するマルチコピーサプレッサーを探索した結果、ストレス応答転写因子をコードする *MSN2* を同定した。また、予備的な実験ではあるが、Aur1p 特異的阻害剤 Aureobasidin A で細胞を処理することで、GFP 融合 Msn2p が核移行することが観察されている。このことを併せると Aur1p 発現抑制が誘導する生育阻害の際に、ストレス応答因子である Msn2p が活性化されることで生育阻害を抑制していることが考えられる。さらに興味深いことに、Msn2p は PKA でリン酸化されることでネガティブな調節を受けることが報告されている¹⁰⁾。今後、セラミド代謝異常下における Ras-cAMP-PKA 経路と Msn2p によるストレス応答の役割を更に詳しく明らかにすることで、セラミドの細胞内シグナル伝達系に及ぼす影響を詳細に解明していきたい。また、今回調べた変異株以外に、スクリーニングで見つかった来たその他の変異株についても、詳細な解析を順次進めていきたい。

(引用文献)

- 1) Hannun YA, and Obeid LM, : Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9, 139-150, 2008
- 2) Tani M, and Kuge O, : Requirement of a specific group of sphingolipid-metabolizing enzyme for growth of yeast *Saccharomyces cerevisiae* under impaired metabolism of glycerophospholipids. *Mol Microbiol.* 78, 395-413, 2010
- 3) Tani M, and Kuge O, : Defect of synthesis of very long-chain fatty acids confers resistance to growth inhibition by inositol phosphorylceramide synthase repression in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem.* 148, 565-571, 2010
- 4) Tani M, and Kuge O, : Hydroxylation state of fatty acid and long-chain base moieties of sphingolipid determine the sensitivity to growth inhibition due to AUR1 repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun.* 417(2), 673-678, 2012
- 5) Belli G, Gari E, Aldea M and Herrero E, : Functional analysis of yeast essential genes using a promoter-substitution cassette and the tetracycline-regulatable dual expression system. *Yeast.* 14, 1127-1138, 1998
- 6) Winzeler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, Liang H, Anderson K, Andre B, *et al.* : Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science.* 285, 901-906, 1999
- 7) Tong AH, and Boone C, : Synthetic genetic array analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol.* 313, 171-192, 2006
- 8) Vandamme J, Castermans D, and Thevelein JM, : Molecular mechanisms of feedback inhibition of protein kinase A on intracellular cAMP accumulation. *Cell Signal.* 24, 1610-1618, 2012
- 9) 川口 諒太郎、久下 理、谷 元洋. IPC 合成酵素発現抑制に対して高感受性を示す酵母変異株の同定と解析, 2012 年度 日本生化学会大会講演要旨集.
- 10) Görner W, Durchschlag E, Martinez-Pastor MT, Estruch F, Ammerer G, Hamilton B, Ruis H, and Schüller C, : Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev.* 15, 586-597, 1998

皮膚老化における11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1の役割

大阪大学大学院医学系研究科皮膚科学講座

寺尾 美香

Glucocorticoids (GCs) are one of the most effective anti-inflammatory drugs to treat acute and chronic inflammatory diseases. However several studies show that GCs alter collagen metabolism in the skin and induce skin atrophy. Cortisol is the endogenous GC that is released in response to various stressors. Over the last decade, extraadrenal cortisol production in various tissues is reported. Skin is also known to synthesize cortisol through *de novo* pathway and through activating enzyme. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 (11 β -HSD1) is the enzyme that catalyzes the conversion of hormonally inactive cortisone into active cortisol in cells. We previously found that 11 β -HSD1 is negatively regulating proliferation of keratinocytes. To know the function of 11 β -HSD1 in dermal fibroblast and collagen metabolism, the effect of selective 11 β -HSD1 inhibitor was studied in mouse tissues and dermal fibroblasts. The expression of 11 β -HSD1 increased with age in mouse skin. Subcutaneous injection of selective 11 β -HSD1 inhibitor increased dermal thickness, and collagen content of the mouse skin. Proliferation of dermal fibroblasts significantly enhanced in cells derived from 11 β -HSD1 knockout mice compared with cells derived from wildtype mice. Taken together, these data suggest that 11 β -HSD1 is involved in collagen metabolism in the skin possibly by decreasing the proliferation of dermal fibroblasts. Our findings suggest that 11 β -HSD1 inhibition may reverse the decreased collagen content observed in intrinsically and extrinsically aged skin and in skin atrophy that is induced by GC treatment.

1. 緒言

コルチゾールは身体的・精神的ストレス時に副腎から産生され、代謝・血圧・血糖をコントロールする生体に必須のホルモンである。血中のコルチゾール濃度は組織中の濃度を反映すると考えられているが、局所コルチゾール修飾酵素の発見より必ずしも組織中の濃度が血中の濃度と反映しないことが明らかにされつつある。近年、我々のグループと他グループより表皮ケラチノサイトもコルチゾールの再活性化酵素と *de novo* 合成酵素をもつことが報告された¹⁻⁴⁾。

局所コルチゾール修飾酵素の一つである11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD) は細胞内でコルチゾールを再活性化する酵素(図1)であり、2001年に脂肪細胞に特異的な発現上昇がメタボリック症候群を引き起こすと報告されて以降、肥満・高血圧やメタボリック症候群の原因の一つとして研究が進んでいる酵素である⁵⁾。特に、肥満の予防薬・高血圧の治療薬といった観点より、現在・多施設において、11 β -HSD1阻害薬の開発がなされている。また、2010年に高齢マウスにおける11 β -HSD1発現の上昇が骨粗鬆症にも関与することが報告されており、緑内障の発症病態に関わるという報告もある⁶⁾。肥満や骨粗鬆症、緑内障はその発症の原因の一つとしてコルチゾールが良く知られ

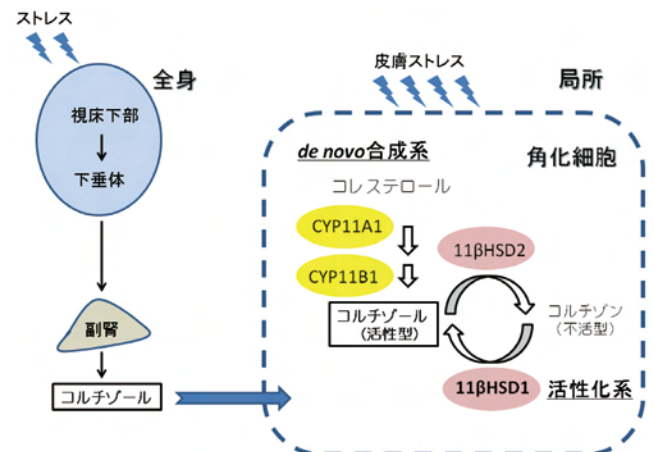


図1 局所コルチゾール制御機構

ており、組織中の11 β -HSD1の上昇が発症に関与することは興味深く、皮膚などの他臓器で同様の現象がおきていることを推測させる。

皮膚老化には内因性の老化(生理的老化)と外因性の老化があり、内因性の老化は遺伝的変異、外因性の老化は紫外線、喫煙、アルコール摂取などの影響をうける⁷⁾。生理的老化により、肉眼的には、皺、たるみ、乾燥などが認められ、表皮一真皮の接合力が弱くなり、軽微な外傷や摩擦で両者が分離し容易に水疱やびらんが形成される。機能的には創傷治癒の遅延、刺激に対する炎症応答の減弱、易感染性などがみられる。病理組織学的には、表皮突起の短縮がおき、表皮一真皮の境界が扁平化する。また、真皮線維芽細胞の数が減少し、基質を形成するグリコサミノグリカンも減少する⁸⁾。高齢者の真皮線維芽細胞は若年者に比べてコラーゲン産生量が低いことも報告されている^{9, 10)}。



The role of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in skin aging

Mika Terao

Department of Dermatology Osaka University Graduate School of Medicine

我々はこれらの生理的老化に伴う変化がグルココルチコイド過剰に伴う皮膚変化と類似することに注目した。

グルココルチコイド剤は強力な抗炎症作用のために、内服薬としても外用薬としても頻用される薬剤である。しかし、短期的にはグルココルチコイドの増加は組織の生存に働くが、ストレスに伴う慢性的な内因性のコルチゾール増加や外因性のグルココルチコイドは、糖尿病や高脂血症、白内障、骨粗鬆症を引き起こすことが知られている。また、長期間のグルココルチコイド剤の内服や外用の副作用の一つとして、皮膚の萎縮、脆弱化、易感染性、創傷治癒の遅延が引き起される。皮膚の萎縮は主にコラーゲン合成とグリコサミノグリカン合成の低下によるものであり¹¹⁾、ヒトの皮膚において、グルココルチコイドの全身投与や外用はタイプ1コラーゲンとタイプ3コラーゲン合成を低下させることが報告されている¹²⁾。このように、長期間のグルココルチコイド過剰に伴う皮膚萎縮は病理組織学的、分子生物学的に生理的老化と共通するところが多い。

本研究では、マウス皮膚における11 β -HSD1発現が年齢とともに上昇することに着目し、皮膚老化における11 β -HSD1の役割を11 β -HSD1阻害薬及び、ノックアウトマウス、表皮角化細胞・真皮線維芽細胞を用いて検討した。

2. 実験

2.1 細胞培養

生後1日のマウスから採取した皮膚組織を4 mg/ml PBSで調整したDispase (GIBCO, Carlsbad, CA) に浸し、37度1時間インキュベートの後、真皮から表皮を剥離した。得られた真皮を0.05% collagenase内で37度の恒温槽に40分間浸して振揺させた後、70 μ m filterを用いてろ過し、10% FBS添加Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM)を用いて培養した。

2.2 RNAの抽出と逆転写反応・リアルタイムPCR

ST Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI)を用いて、プロトコールに従いマウスから得た皮膚組織からmRNAを回収した。RT-MLV (invitrogen, Lincoln Center Drive Foster City, CA)を用いてmRNAの逆転写を行い、cDNAを得た。cDNAをtemplateとし、試薬Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem)にてサンプルを調整した。ハウスキーピング遺伝子としてGAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)を用いた。

2.3 ウェスタンブロット

マウスから背部の皮膚組織を採取し、液体窒素を用いて皮膚組織を粉碎し、更に超音波処理を行ったのちに、Lysis Buffer 2ml (0.5% sodium deoxycholate, 1% Nonidetp40, 0.1%

sodium dodecyl sulphate, 100 μ g/ml phenylmethylsulphonyl fluoride, 1mM sodium orthovanadate, protease inhibitor cocktail)で皮膚組織のタンパク質を4度over nightで攪拌しながら溶解させた。遠心分離した後、上清の蛋白溶解液をサンプルとした。

調製したサンプルを10%のポリアクアミドゲルにて0.02Aで80分間電気泳動した。電気泳動後のゲルを用いて、PVDFメンブレンへの転写を0.15Aで45分間行った。転写後のメンブレンを3%スキムミルクにて60分間ブロッキング後、一次抗体を4度over nightで反応させた。メンブレンを3%スキムミルクで3回洗浄した後、HRP標識二次抗体anti-rabbit IgG, anti-rat IgG, anti-mouse IgGを60分間反応させた。TBS-Tで洗浄した後、Pierce Western Blotting Substrate Plus (Thermo Fisher Scientific Inc)を用いて発色した。

2.4 MTSアッセイ

96 well plateに皮膚線維芽細胞を1 wellあたり細胞数1 \times 10³個ずつ10%FBS添加DMEMで培養した。培養した翌日を1日後とし、2日後、3日後、6日後にMTS試薬 (Promega, Madison, WI, USA)を1 wellあたり20 μ lずつ添加し、2時間インキュベートした後、吸光計 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)を用いて吸光度 (490nm)で測定した。

2.5 免疫組織学的染色

ヒト健常皮膚組織 (パラフィン包埋)を薄切し、キシレンで脱パラフィン、エタノールで脱水を行った。クエン酸バッファー (pH6.0)による熱処理 (oil bath 110度)で抗原賦活処理を10分間行ったのちに常温まで冷却、蒸留水で洗浄した後、DAKO Protein Block Serum Free (Dako, Carpinteria, CA)で室温15分blockingを行った。Antibody Diluent (Dako)で1次抗体rabbit anti-11 β -HSD1 (Abcam)およびmouse anti-keratin14 (Abcam)を100倍希釈し、4度で12時間反応させた。TBS-T (50mM Tris-HCl, pH7.6, 150mM NaCl, 0.1% v/v Tween-20)で5分間2回洗浄した後に二次抗体を反応させた。

3. 結果

3.1 皮膚における11 β -HSD1の発現

表皮角化細胞における11 β -HSD1発現を図2Aに示す。健常皮膚では11 β -HSD1は有棘細胞を中心に発現しており、基底層ではその発現はほとんどみられなかった¹³⁾。また、表皮角化細胞における11 β -HSD1発現はIL-1 β やTNF α などの炎症性サイトカイン、ハプテンや紫外線などの炎症刺激により誘導されることがわかった (図2)¹⁴⁾。

3.2 マウス皮膚における 11 β -HSD1 の発現

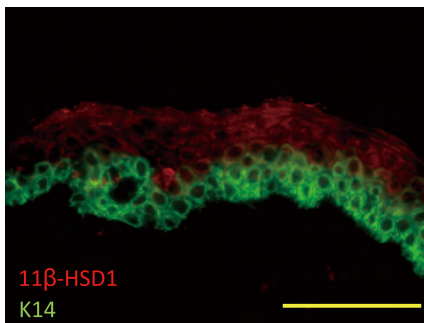
新生マウス、3週マウス、2ヶ月マウス、8ヶ月マウスの皮膚組織の 11 β -HSD1 発現をウエスタンブロットで検討したところ、成長とともにその発現の増加がみられた (図 3A)。また、真皮線維芽細胞を単離し培養後 RNA を抽出し、mRNA レベルでの 11 β -HSD1 発現を検討したところ、1年マウスより単離した真皮線維芽細胞では新生マウスより単離した真皮線維芽細胞に比べてその発現が有意に上昇し

ていた (図 3B)。

3.3 11 β -HSD1 阻害により表皮角化細胞および真皮線維芽細胞の増殖能が亢進した

マウスより表皮角化細胞、真皮線維芽細胞を単離し、増殖能を MTS アッセイで検討したところ、11 β -HSD1 阻害により細胞増殖が有意に亢進することより、11 β -HSD1 は細胞増殖を負に制御していると考えられる (図 4)。

A



B

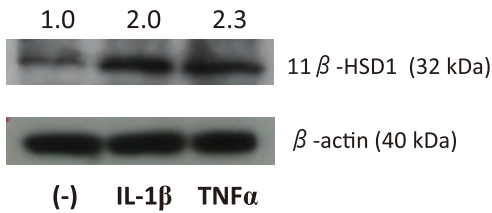
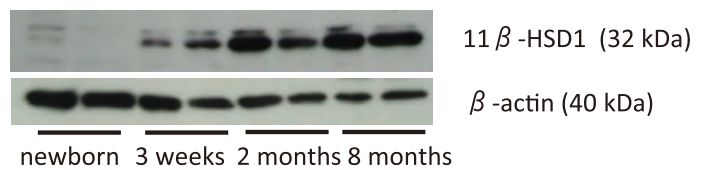


図2 ヒト健常皮膚における 11 β -HSD1 発現
A 免疫蛍光染色像。11 β -HSD1：赤、K14：緑
Bar = 50 μ M
B 表角化細胞に IL-1 β 、TNF α 添加後の 11 β -HSD1 発現量 (ウエスタンブロットティング)

A



B

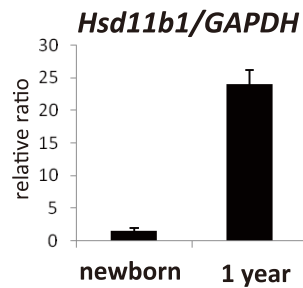


図3 マウス皮膚における 11 β -HSD1 発現
A 新生マウス、3週マウス、2ヶ月マウス、8ヶ月マウスの皮膚の 11 β -HSD1 発現量 (ウエスタンブロットティング)
B 生後4日および1年マウス皮膚線維芽細胞における 11 β -HSD1 発現量 (RT-PCR)

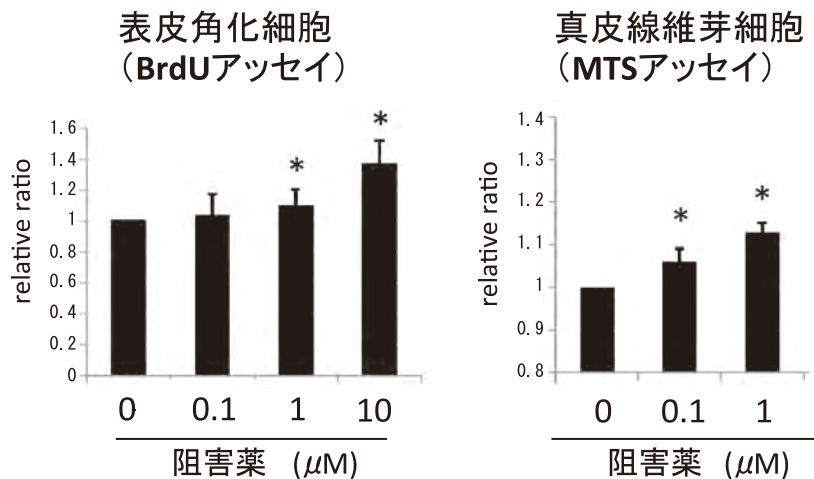


図4 11 β -HSD1 阻害は表皮角化細胞、真皮線維芽細胞の増殖を促進した
11 β -HSD1 阻害薬を投与 72 時間後に BrdU アッセイ (表皮角化細胞)、MTS アッセイ (真皮線維芽細胞) で細胞増殖能を測定した。

3.4 11β-HSD1阻害は表皮過剰増殖を引き起こした

ヘアレスマウス(Hos : HR-1)に11β-HSD1阻害薬(50μM)を5日間外用後の表皮を観察したところ、表皮の肥厚および、Ki-67陽性の増殖細胞の増加がみられた(図5)。この結果より、*in vivo*においても11β-HSD1は表皮角化細胞の増殖を負に制御していることがわかる。

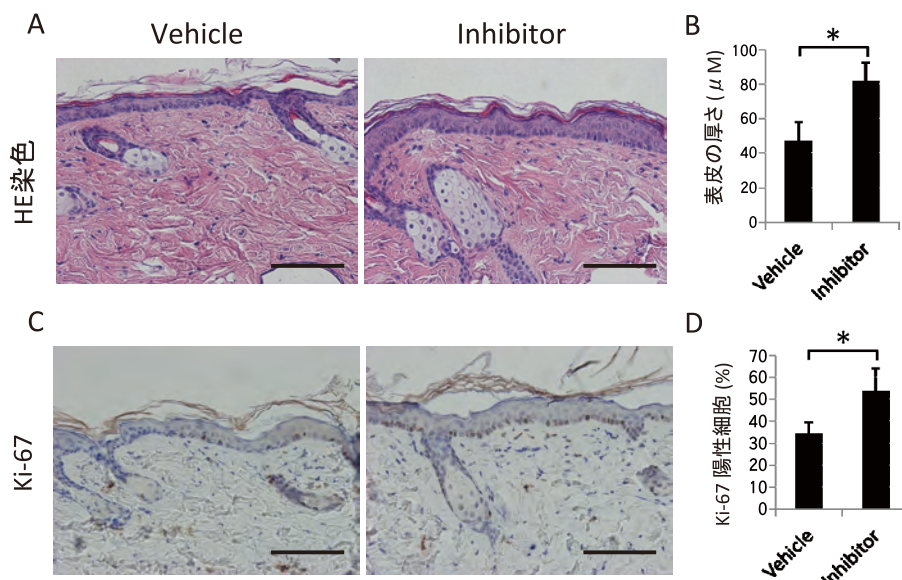


図5 11β-HSD1阻害薬の外用は表皮を増殖させた

- A, C ヘアレスマウス(Hos : HR-1)に11β-HSD1阻害薬(50μM)を5日間外用後のHE染色像(A)とKi-67免疫染色像(C) Bar=100μM
 B 表皮の厚さ(N=5)
 D Ki-67陽性細胞数(%) (N=5)

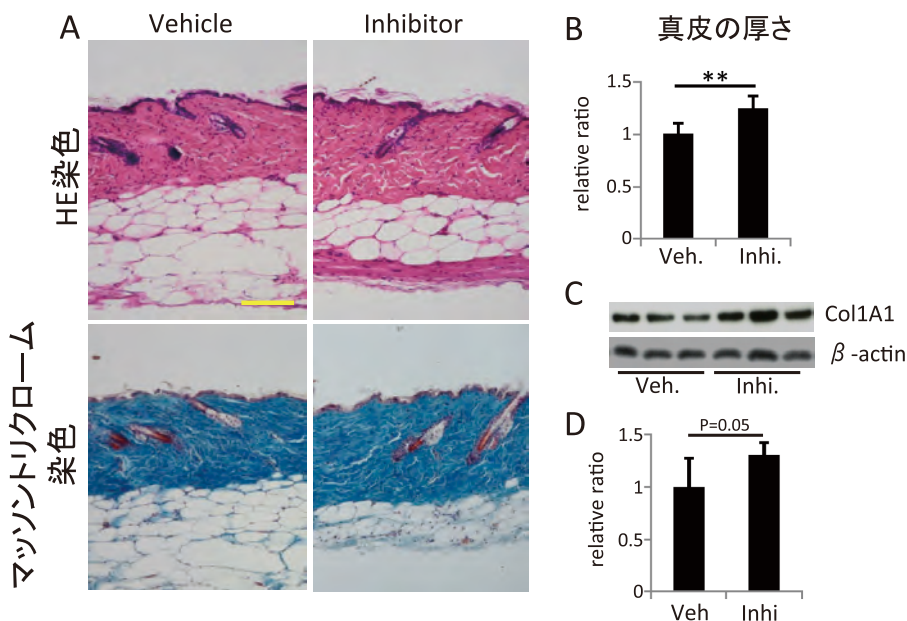


図6 11β-HSD1阻害により真皮コラーゲンが増加した

- A 11β-HSD1阻害薬(10μM)を21日間皮下投与後のHE像とマッソントリクローム染色像 Bar=100μM
 B 真皮の厚み(N=6)
 C, D コラーゲン1α1(Col1A1)の発現量(ウエスタンブロットティング)

果より、真皮のコラーゲン増生を11β-HSD1は負に制御していることがわかる。

3.6 11β-HSD1阻害により創傷治癒が促進した

11β-HSD1阻害によるマウス皮膚の創傷治癒を検討した。C57BL/6マウス背部に作成した8mm大の創傷に11β-HSD1 (10μM)を2日毎に投与し、創傷面積を測定したところ、阻害薬投与群では有意に創傷治癒の促進がみられた(図7)。

3.7 コルチゾールの濃度と炎症

グルココルチコイドは強い抗炎症作用を持つことより、様々な炎症疾患の治療に用いられているが、低濃度では、向炎症作用を持つことが報告されている。表皮角化細胞においても、低濃度コルチゾール(10⁻¹⁰M)はIL-6産生を誘導したが、高濃度コルチゾール(10⁻⁵M)は抑制した(図8)¹⁴⁾。

3.8 11β-HSD1による低濃度コルチゾールの誘導は炎症を正に制御した

培養表皮角化細胞の11β-HSD1をノックダウンし、IL-1β、TNFα誘導性の向炎症性サイトカインであるIL-6、IL-8をELISAで測定したところ、11β-HSD1ノックダウン細胞では向炎症性サイトカイン産生が低下していた(図9)¹⁴⁾。この結果より、11β-HSD1による低濃度コルチゾールの誘導は炎症を正に制御していることがわかる。

4. 考察

本研究では、マウス皮膚における加齢に伴う11β-HSD1増加が皮膚老化に及ぼす影響を11β-HSD1ノックアウトマウスおよび11β-HSD1阻害薬を用いて検討した。マウス皮膚ではヒトの非露光部皮膚と同様に、加齢とともに真皮のひ薄化がみられコラーゲンが疎となる。加齢とともに11β-HSD1発現が上昇すること、加齢皮膚がコルチゾール

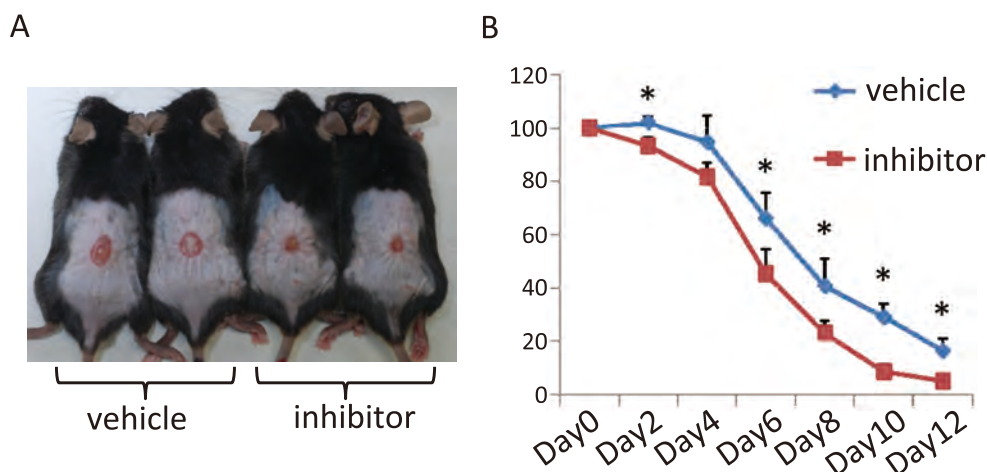


図7 11β-HSD1阻害は皮膚創傷治癒を促進した
マウス皮膚に8mm大の創傷を作成し、11β-HSD1阻害薬(10μM)を2日毎に外用した。
A, B C57BL/6マウス創傷作成後10日目の写真(A)と創傷面積(%) (B)。

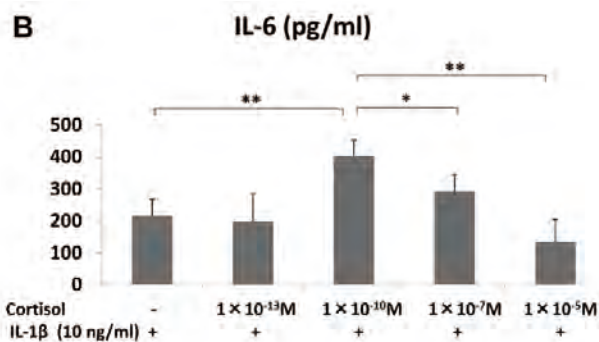


図8 コルチゾール濃度と炎症
培養表皮角化細胞を様々な濃度のコルチゾールで培養し、IL-1β誘導性IL-6をELISAで測定した。

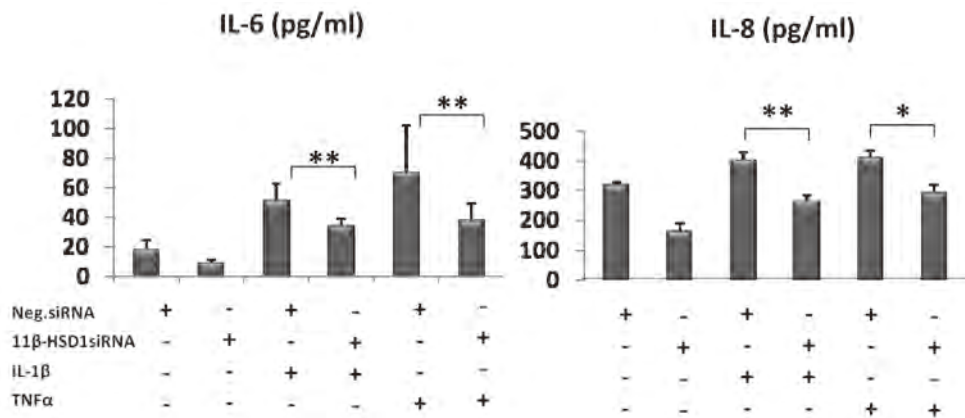


図9 11β-HSD1 阻害は炎症を抑制した
 培養表皮角化細胞の11β-HSD1をsiRNAでノックダウンし、IL-1β、TNFα誘導性のIL-6、IL-8をELISAで測定した。11β-HSD1siRNA：11β-HSD1ノックダウン細胞、Neg.siRNA：コントロール細胞

投与に伴う副作用でみられる皮膚委縮と類似することより、11β-HSD1発現の上昇に伴う細胞内におけるコルチゾール濃度の上昇は、加齢でみられる真皮のひ薄化、コラーゲンの減少に影響を及ぼしているのではないかと考えさらに解析をすすめた。まず、真皮線維芽細胞の増殖に及ぼす11β-HSD1の影響をノックアウトマウス由来の真皮線維芽細胞で検討したところ、野生型マウス由来真皮線維芽細胞に比べて有意に上昇していたことより、11β-HSD1の発現上昇は真皮線維芽細胞の増殖に抑制的に働くことが示唆された。次に、11β-HSD1阻害薬を皮下投与したところ、真皮の厚みが増加し、コラーゲン1α1発現量が上昇したところより、11β-HSD1を阻害すると真皮のひ薄化、コラーゲンの減少が改善、すなわち、加齢に伴う変化を改善することがわかった。

このように加齢や肥満に伴う機能的変化に11β-HSD1が関与していることが考えられるが、加齢に伴う形態的变化における11β-HSD1の関与は定まった見解がない。最近、11β-HSD1ノックアウトマウスにおいて、加齢に伴う真皮コラーゲン量の減少が抑制されたと報告されたが¹⁵⁾、我々が作成した11β-HSD1ノックアウトマウスでは6ヶ月マウス皮膚、1年マウス皮膚においてそのような結果は得られなかった。

5. 総括

皮膚の生理的老化はグルココルチコイド過剰状態による皮膚変化と類似するために、細胞内コルチゾール再活性化酵素である11β-HSD1の皮膚老化における役割を解析した。

高齢者や肥満に伴う細胞増殖能の低下や創傷治癒の遅延には11β-HSD1に伴う局所コルチゾールの上昇が関与していると考えられ、高齢者にみられる難治性の潰瘍に

11β-HSD1阻害が有効ではないかと期待される。さらに、最近の我々の結果より、11β-HSD1は皮膚の炎症応答にも重要な役割を果たしていることがわかり、加齢に伴う炎症の増幅に関与している可能性が示唆される。

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頂きましたことを深謝致します。

(引用文献)

- 1) Terao M, Murota H, Kimura A, et al. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase-1 is a novel regulator of skin homeostasis and a candidate target for promoting tissue repair. PLoS One 2011; 6: e25039.
- 2) Tiganeacu A, Walker E A, Hardy R S, Mayes A E, Stewart P M. Localization, age- and site-dependent expression, and regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in skin. J Invest Dermatol 2011; 131: 30-36.
- 3) Cirillo N, Prime S S. Keratinocytes synthesize and activate cortisol: first characterisation of a novel epidermal glucocorticoid system. J Cell Biochem 2011.
- 4) Vukelic S, Stojadinovic O, Pastar I, et al. Cortisol synthesis in epidermis is induced by IL-1 and tissue injury. J Biol Chem 2011; 286: 10265-10275.
- 5) Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, et al. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. Science 2001; 294: 2166-2170.
- 6) Weinstein R S, Wan C, Liu Q, et al. Endogenous glucocorticoids decrease skeletal angiogenesis.

- vascularity, hydration, and strength in aged mice. In: *Aging Cell*, 2010: 147-161.
- 7) Uitto J. Understanding premature skin aging. *N Engl J Med* 1997; 337: 1463-1465.
- 8) Naylor E C, Watson R E, Sherratt M J. Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas* 2011; 69: 249-256.
- 9) Fisher G J, Quan T, Purohit T, et al. Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin. *Am J Pathol* 2009; 174: 101-114.
- 10) Varani J, Dame M K, Rittie L, et al. Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation. *Am J Pathol* 2006; 168: 1861-1868.
- 11) Haapasaari K M, Risteli J, Koivukangas V, Oikarinen A. Comparison of the effect of hydrocortisone, hydrocortisone-17-butyrate and betamethasone on collagen synthesis in human skin in vivo. *Acta Derm Venereol* 1995; 75: 269-271.
- 12) Oikarinen A, Haapasaari K M, Sutinen M, Tasanen K. The molecular basis of glucocorticoid-induced skin atrophy: topical glucocorticoid apparently decreases both collagen synthesis and the corresponding collagen mRNA level in human skin in vivo. *Br J Dermatol* 1998; 139: 1106-1110.
- 13) Terao M, Itoi S, Murota H, Katayama I. Expression profiles of cortisol-inactivating enzyme, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase-2, in human epidermal tumors and its role in keratinocyte proliferation. *Exp Dermatol* 2013; 22: 98-101.
- 14) Itoi S, Terao M, Murota H, Katayama I. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase 1 contributes to the pro-inflammatory response of keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 440: 265-270.
- 15) Tiganescu A, Tahrani A A, Morgan S A, et al. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase blockade prevents age-induced skin structure and function defects. *J Clin Invest* 2013; 123: 3051-3060.

創傷治癒における細胞外マトリックスの一つである バーシカンの関与、RNAiによる検討

長崎大学病院皮膚科アレルギー科

富田 元

Traumatic injury leaves disfiguring scar and pigmentation, which provide significant reduction of QOL. Adequate skin wound healing leads to beautiful scar. Therefore, there is a need for a better treatment approach. Skin wound healing is a complex biological event as a result of the interplay of epidermis and dermis. Formed good dermis wound bed performs an essential function for epidermal cell migration and re-epithelization. Although, extracellular matrix existing dermis has relations with cell adhesion, cell migration, cell differentiation, and cell proliferation, little is known about a role of extracellular matrix in wound healing. To clarify a role of extracellular matrix in wound healing, we investigated mouse fibroblast cell using suppression of versican, which is a hyaluronan-binding, extracellular chondroitin sulfate proteoglycan.

The levels of versican expression were measured over time after mouse cutaneous wounding. On day 4 and 5, mRNA level of versican were significantly increased in day 4 and 5 relative to day 1 to 3. By contrast, mRNA level of versican were significantly decreased in day 6 and 7. Therefore, versican may regulate the wound healing process.

The mRNA expression of *Srpx2*, *Ccl6*, and *Smoc2* was increased in versican suppressed mouse embryonic fibroblast. Previous reports showed that these factors regulated the inflammatory cell infiltration and angiogenesis. These results suggest that versican may regulate the wound healing through *Srpx2*, *Ccl6* and *Smoc2*.

Blockade of versican changed the various factors in mouse embryonic fibroblast. These effects of versican blockade may occur in this wound study on day 1 to 3, 6, and 7. Taken together, it is possible that versican regulate the wound healing by the *Srpx2*, *Ccl6* and *Smoc2* at some stated periods.

1. 緒言

外傷などで損傷された皮膚は難治な場合に醜い瘢痕や色素沈着を残し、著しくQOLを低下させる。そのため、瘢痕や色素沈着が少なく美しく治るような適切な治療が常に求められている。皮膚潰瘍の治療には真皮側、表皮側の両方の再生が必要であり、良好な真皮側のウンドベッド(創床)形成が表皮細胞の遊走、再上皮化の前提条件である。この真皮側のウンドベッド形成には新生血管や線維芽細胞の増殖が必須の条件となっている。今回、それらの細胞間に存在する皮膚細胞外マトリックスに焦点をあてた。皮膚細胞外マトリックスは、細胞の接着、分化、増殖などに深く関わっていることが知られているが、創傷治癒における個々の成分の役割は未だ解明されていない点が多い。本研究はこれまで注目されてこなかったグリコサミノグリカン(コンドロイチン硫酸)を糖鎖に持つバーシカンの創傷治癒における役割をさぐる。

創傷治癒の過程は大きく分けて4つの過程から成ると考えられている。最初の過程は血液凝固期であり、創ができると血小板・フィブリンが凝集し、まず創部を塞ぐ。次の

で炎症期となり、好中球、マクロファージ、リンパ球などが創部に浸潤してくる。これら炎症細胞は侵入病原体を除去するのみならず、サイトカインや細胞成長因子を放出することによって、表皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞を活性化させ、次に続く増殖期を誘導する。増殖期では、表皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞などが増殖し、その結果再上皮化、肉芽組織の形成が起こる。その後、いったん生じた瘢痕組織などを正常の組織構築に置き換える再構築期という、比較的長く続く過程が生じる。

今回、バーシカンが創傷治癒の過程において経時的な発現の変化をとることが示され、創傷治癒過程のそれぞれの時期によって異なった役割を果たしている可能性があることが示唆された。線維芽細胞におけるバーシカンの発現を調節することで、創傷治癒におけるバーシカンの詳細な役割を検討することを本研究の目的とした。

2. 実験

2.1 マウスの創傷皮膚におけるバーシカンの発現

マウスの背部皮膚にメスを用いて長径2cmの全層性の皮膚潰瘍を作成し、テガダーム®にて創を被覆した。創傷の2mmマージンで創部の皮膚を採取し、全RNAを単離した。RNAをcDNAに逆転写し、バーシカンの転写産物をGlyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)のPCR産物と比較することで相対発現量を算出した。以上のRT-PCR法をもちいて創作生後の1日目から7日目までのマウス創傷部皮膚におけるバーシカンの発現を検討した。



Study the extracellular matrix, especially versican involvement of wound healing by use of RNAi

Hajime Tomita

Department of Dermatology, and Allergology, Nagasaki University Hospital

2.2 RT-PCRを用いたマウス胚線維芽細胞(MEF)のsmall interfering RNA (siRNA) 導入によるバーシカン産生抑制の確認

胎生10日のマウスより皮膚線維芽細胞を摘出し、MEFを培養する。Lipofectamin™ RNAiMAX®を用いてMEFにバーシカンのsiRNAを導入した。その5日後、7日後、10日後、14日後のMEFから全RNAを抽出し、RT-PCRを用いてバーシカンの発現を検討した。コントロールとしてネガティブsiRNAを同様の方法で導入したMEFを用いた。また、siRNA導入の3日目、5日目にそれぞれメディウムの変更を行った。

2.3 ドットプロットを用いたMEFのsiRNA導入によるバーシカン産生抑制の確認

siRNA導入7日目のメディウムを用い、バーシカンがタンパクレベルにおいても抑制されているかを確認した。採取したメディウム4μlをメンブレンに滴下し、バーシカンの抗IgG抗体及び蛍光抗体を用いてバーシカンの発現を確認した。コントロールとしてはネガティブsiRNAを導入したMEFのメディウムを用いた。また、siRNA導入の3日目、5日目にそれぞれメディウムの変更を行った。

2.4 DNAマイクロアレイ

MEFにバーシカンのsiRNAを導入して7日後のMEFサンプルとネガティブsiRNAを導入したMEFサンプルそれぞれのDNAを抽出し、マイクロアレイを用いてDNAの

変化を網羅的に観察した。

2.5 バーシカンの抑制によって変化した分子の検討

マイクロアレイにて変化を起こしていた分子に対して実際にMEFで変化がおきているかをRT-PCRを用いて確認した。サンプルとしてはバーシカンのsiRNAを導入したMEFを用い、導入後7日目のサンプルを用いた。コントロールとしてはネガティブsiRNAを導入したMEFのメディウムを用いた。また、siRNA導入の3日目、5日目にそれぞれメディウムの変更を行った。

3. 結果

3.1 経時的に変化するマウス創傷皮膚のバーシカンの発現 (図1)

創作成の1-3日目ではバーシカンの発現は認められなかった。しかしながら創作成4-5日目でバーシカンは過剰に発現した。しかしながら、創作成6-7日目はバーシカンの発現は4-5日目と比較して著明に抑えられた。創傷治癒の過程の一部でバーシカンが著明に発現し、その後抑制されていることが示された。

3.2 siRNA導入によるバーシカン産生の経時的变化 (図2)

MEFにバーシカンのsiRNAを導入することによってMEFのバーシカン産生の変化を確認した。導入5日目、7日目ではネガティブコントロールと比較して、著明にバ

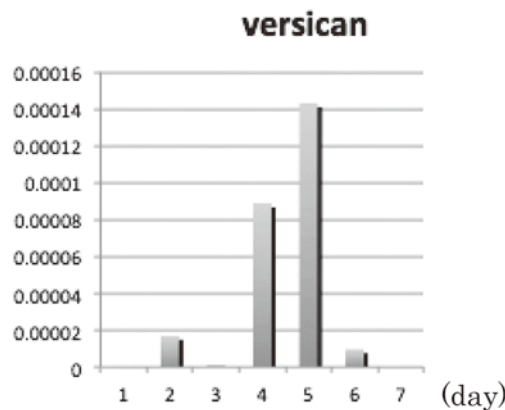


図1 経時的に変化するマウス創傷皮膚のバーシカンの発現

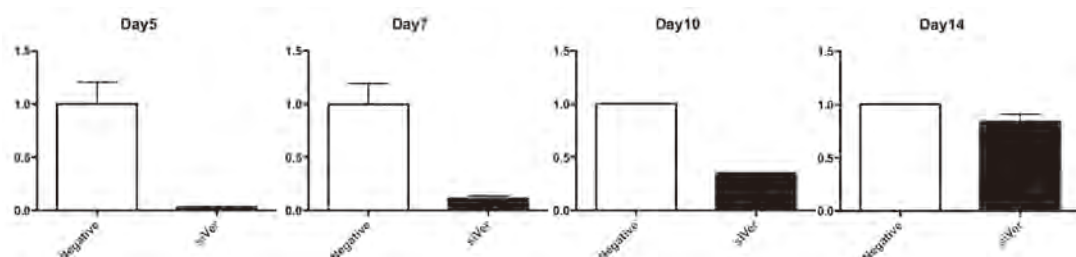


図2 リアルタイム RT-PCRによるバーシカン発現の変化

ーシカンの産生は減少していた。siRNA 導入14日目にはネガティブコントロールとほぼ変わらない結果となった。

3.3 タンパクレベルにおけるパーシカン発現の確認 (図3)

MEFにパーシカンのsiRNA 導入の後7日目において、メディアム中のパーシカンの発現は著明に減少していた。タンパクレベルでも siRNA 導入によってパーシカンの産生が抑制されていることが確認された。

3.4 パーシカンが抑制されることで変化した細胞外マトリックスやサイトカイン (図4)

マイクロアレイを用いてMEFのパーシカンを抑制した際に、上昇した3つの因子を実際にRT-PCRを用いて評価した。パーシカンのsiRNAを導入した7日目のMEFにおいて、コントロールと比較してSushi repeat-containing protein, X-linked 2 (SrpX2) と CC Chemokine Ligand-6 (Ccl6)、Secreted modular calcium-binding protein-2 (Smoc2) の発現がネガティブコントロールと比較して有意に上昇していた。

4. 考 察

マウス皮膚創傷治癒の過程において、パーシカンが一過性に発現し、その後に抑制されていることから、創傷治癒

に何らかの役割を担っている可能性が高いと考える。本研究では創傷作成後2-3日で上皮化することから、5日目は創傷治癒における増殖期から再構築期であり、その時期にパーシカンが発現していることが示唆される。またその後パーシカンの発現が低下していることから、今回のMEFのパーシカンを抑制する実験では、本研究の創傷治癒過程において6-7日目の状態を観察することができた可能性がある。

MEFのパーシカンを抑制するとSrpX2が上昇した。SrpX2は細胞外マトリックス蛋白の一つであり、セレクチンファミリーとともに働くことによって血管新生と血管内皮細胞の遊走を調節していることが報告されている¹⁾。パーシカンの抑制によりSrpX2が上昇することで、血管新生の促進、血管内皮細胞の遊走を介して創傷治癒を調節しているのかもしれない。

同様の実験でMEFのパーシカンを抑制した際にCcl6が上昇した。Ccl6はマクロファージやCD4陽性リンパ球、好酸球の遊走因子である事が知られている。また、Ccl6はマクロファージの遊走を促すことで創傷治癒を促進することが報告されている²⁾。実際の創傷治癒ではどの時期に働いているのかは不明であるが、パーシカンが抑制された状態ではCcl6を介して創傷治癒を促進していることが予想された。

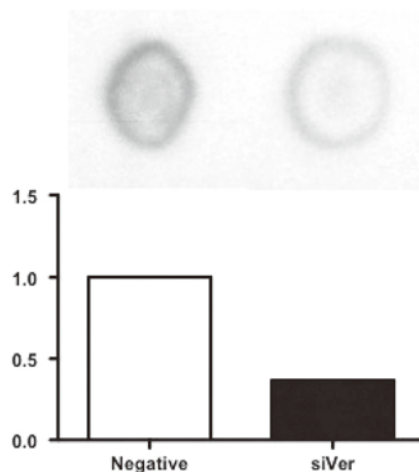


図3 ドットプロットによるパーシカン発現の確認

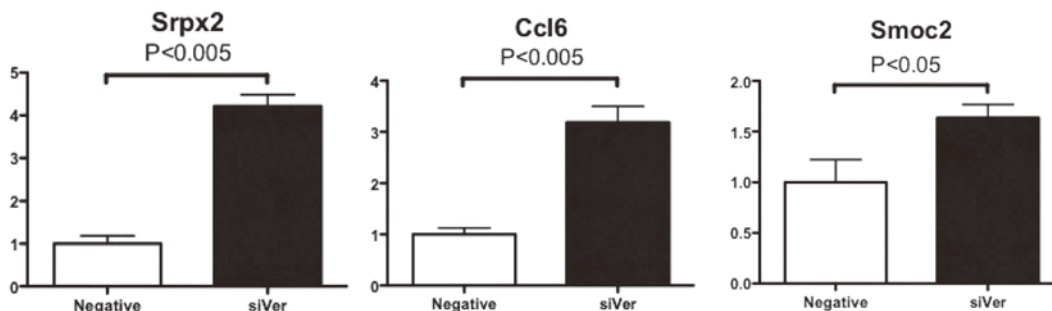


図4 MEFのパーシカンを抑制した際のSrpX2、Ccl6、Smoc2の発現

同様に、MEFのパーシカンを抑制した際にSmoc2が上昇した。Smoc2は細胞外マトリックスの一つであり、腫瘍の新生や創傷時の組織の修復に関与している事が知られている。具体的にはSmoc2は血管新生やケラチノサイトの遊走などを促進することが報告されている^{3,4)}。パーシカンを抑制されるとSmoc2の経路も介して創傷治癒を促進することが予想された。

パーシカンを抑制することでこれら3つの因子が上昇した。それぞれが創傷治癒を調節することが報告されており、これらの因子を介してパーシカンは創傷治癒を調節している可能性がある。よってin vivoでパーシカンを抑制することが出来た場合は創傷治癒に何らかの変化が起こることが予想された。

本研究では正常の創傷治癒においてパーシカが発現する時期は4-5日目と限られていたことがわかった。パーシカンの抑制実験が実際に本研究の創傷治癒における1-3日目、6-7日目を反映しているかどうかは確かめておらず、in vivoでの定量が今後必要であると考えた。

創傷治癒過程において一過性に発現するパーシカには創傷治癒を調節する役割があることが予想された。受傷1-3日目ではパーシカが抑制されており、Srp2やCcl6、Smoc2などが発現し、炎症細胞の浸潤や血管新生を促進して、肉芽の形成を促進している可能性がある。さらに言えば、これまでの報告で肉芽組織には過剰にパーシカが発現していることが知られており⁵⁾、受傷4-5日目では形成された肉芽を反映してパーシカが上昇していると思われる。受傷6日目以降ではパーシカの発現は再度抑制されており、再度Srp2とCcl6、Smoc2が上昇している事が予想される。よって受傷6日目以降は肉芽組織が減少する再構築期である可能性が高い。

MEFに対してRNAi法を用いることでパーシカを抑制すると非常に様々な変化を起こしていることが示唆された。MEFから発現するパーシカを抑制することでMEFの周囲の環境が変化し、Srp2やSmoc2などの細胞外マトリックス、Ccl6などのサイトカインに影響を及ぼしていた。その詳細なメカニズムは不明であり、今後のさらなる検討が必要であると考え。マイクロアレイ法にて変化した因子はSrp2とCcl6、Smoc2以外にも多数変化したものが認められ、他の分子においても検討を行い、パーシ

カの細胞に働きかける役割をさらに検討する必要があると考えた。

5. 総括

創傷治癒は様々な過程を経ているため非常に複雑であり、パーシカが経時的に発現、抑制されていることは非常に興味深い。特に肉芽形成を反映する増殖期に過剰発現し、その後に抑制されていることは意味があると考えられた。今後は実際に血管新生、炎症細胞遊走、線維芽細胞や表皮細胞の遊走に与える変化をin vitroにて検討していくこととなる。さらに、マウスを用いたin vivoの創傷治癒過程においてパーシカをRNAi法にて抑制した際の創傷治癒過程の変化を検討し、さらにSrp2やCcl6、Smoc2の発現の変化を検討する必要があると考える。これらの結果からパーシカが創傷治癒に与える影響を検討していく。また、マイクロアレイ法にて変化があったサイトカインや細胞外マトリックスに関してもin vitro、in vivoそれぞれにて発現の検討を行い、パーシカの線維芽細胞、マウスの皮膚に与える影響を詳細に検討していく必要がある。

(引用文献)

- 1) Miljkovic-Licina M, Hammel P, Garrido-Urbani S *et al.* Sushi repeat protein X-linked 2, a novel mediator of angiogenesis. *FASEB J* 2009; 23: 4105-16.
- 2) Kaesler S, Regenbogen J, Durka S *et al.* The healing skin wound: a novel site of action of the chemokine C10. *Cytokine* 2002; 17: 157-63.
- 3) Maier S, Paulsson M, Hartmann U. The widely expressed extracellular matrix protein SMOC-2 promotes keratinocyte attachment and migration. *Experimental cell research* 2008; 314: 2477-87.
- 4) Rocnik EF, Liu P, Sato K *et al.* The novel SPARC family member SMOC-2 potentiates angiogenic growth factor activity. *The Journal of biological chemistry* 2006; 281: 22855-64.
- 5) Hakkinen L, Westermarck J, Kahari VM *et al.* Human granulation-tissue fibroblasts show enhanced proteoglycan gene expression and altered response to TGF-beta 1. *J Dent Res* 1996; 75: 1767-78.

放射線療法後の皮膚障害ケアに関する基礎的検討

独立行政法人放射線医学総合研究所重粒子医科学センター 先端粒子線生物研究プログラム

中山 文明

The influence of radiation therapy on skin barrier functions remains unknown. In this study, skin barrier-associated proteins were examined after irradiation. As a result, skin moisture and the expression of skin barrier-associated protein loricrin were decreased after irradiation at a relatively low dose, whereas filaggrin proteins increased in skin after irradiation. These findings suggest that decreased loricrin proteins play an important role in the pathogenesis of radiation skin injuries.

1. 緒言

重粒子線治療などの新しい放射線療法や、IVRを使った血管内治療など、医療現場における放射線の利用がますます盛んになっている。今日では病巣へ放射線を集中させる技術が発達し、正常組織への影響は少なくなっており、皮膚潰瘍などの重篤な皮膚障害も極めて稀である。しかしながら、脱毛や乾性落屑などの比較的軽度な放射線皮膚障害は依然として発生し、美容的な問題として患者に大きな負担となっている。また、放射線皮膚障害の病態は十分に解明されておらず、有効な治療法も確立していない。一方、これらの研究に必要な放射線皮膚障害の評価方法も存在しなかった。そこで、我々は、放射線脱毛における毛包障害を検討し、化学療法による毛包障害と同様の組織学的なパラメーターを使って評価できることを明らかにし、放射線毛包障害の評価方法を確立した¹⁾。

皮膚バリア機能に関係する構造として、cornified cell envelopeは角質細胞の細胞膜を裏打ちし、loricrinやinvolucrinなどで構成されている。filaggrinもその構成蛋白質の一つだが、表皮の顆粒層でprofilaggrinとして生合成された後、脱リン酸化や限定加水分解によりfilaggrinとなり、さらに分解されて天然保湿因子となる。最近、filaggrin異常と尋常性魚鱗癬²⁾やアトピー性皮膚炎³⁾の病因との関連性が明らかになった。一方、放射線皮膚障害においても皮膚の乾燥傾向が顕著だが、放射線と皮膚バリア機能の関係は未だ不明である。

本研究では、放射線毛包障害の評価に基づき、マウスモデルの照射線量を検討する。そのモデルを用いて皮膚バリア機能に対する放射線による影響を組織・分子レベルで解析す

る。そして、放射線療法後の皮膚障害に有効な治療法や新たなスキンケア製品の開発に有用な動物モデル指標を見出す。

2. 実験

2.1 各毛周期における放射線脱毛の線量の検討

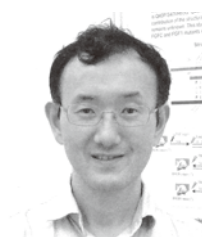
7週齢のオスBALB/cマウスを日本クレアより購入しSPFで飼育した。7週齢マウスの毛はすべて休止期(Telogen)であるが、抜毛によりすべて成長期(Anagen)に同調・誘導できる。そこで背部より抜毛後6日目、毛包がAnagenVIの毛包周期になった時に、セシウム線源(Gammacell 40, Atomic Energy of Canada, Ottawa, Canada)を使ってガンマ線を全身照射した。照射方法は、マウスを無麻酔でプレキシガラスの円形容器に入れ、0.57Gy/分の線量率で4~12Gyを1回照射した。抜毛後14日まで背部皮膚を観察し、発毛を認める線量を決定した。

2.2 放射線毛包変性の組織学的検討

マウスは皮膚を10%中性緩衝ホルマリンで固定後、パラフィン包埋切片を作成し、HE染色を行った。そして、以前報告した¹⁾放射線毛包障害の評価方法に基づき、これらの組織標本から各放射線障害パラメーターを測定した。すなわち、表1は、化学療法による変性毛包の分類⁴⁾を参考に、AnagenVIの毛包に12Gyを照射し、3.5日までの経時的な毛包変性に対して、その特徴を明らかにしたものである¹⁾。特に、(1)毛包のdermal papillaとbulbの直径比、(2)bulbの直径、(3)毛包の長さの比較が変性毛包の評価に有用であった。すなわち、初期変性成長期(early dystrophic anagen)では、bulb径がわずかに縮小する程度で、他に変化は認められなかった。中期変性退行期(mid dystrophic catagen)では、bulb径がさらに縮小する一方、DP/bulb比と毛包の長さが増大した。晩期変性退行期(late dystrophic catagen)では、DP/bulb比がさらに増加するが、毛包の長さは急速に短縮した。

2.3 皮膚水分率の測定

マウス背部より抜毛6日後、毛周期が成長期となった背



Basic Study of Skin Injury Care after Radiotherapy

Fumiaki Nakayama

Advanced Radiation Biology Research Program, Research Center for Charged Particle Therapy, National Institute of Radiological Sciences

部皮膚に対して、6 Gyのガンマ線全身照射を行い、肌湿度計 (SR-101、ロゼスター) で4点3回ずつ24時間おきに4日間測定し、皮膚水分率の平均値を算出した。なお、実験中のマウスの飼育環境は室温22.9～23.0℃、湿度50～51%と一定であった。

2.4 皮膚バリア機能関連蛋白の免疫組織化学染色

マウス背部より抜毛6日後、6 Gyのガンマ線全身照射を行い、照射後3日の皮膚を採取した。採取した皮膚は10%中性緩衝ホルマリンで固定後、パラフィン包埋切片を作成し、HE染色を行った。さらに、パラフィン包埋切片を脱パラフィン後、2%過酸化水素/メタノール溶液に室温で30分反応させて内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックさせた後、0.01Mクエン酸に浸して120℃15分のオートクレーブで抗原賦活処理を行った。組織中のマウスIgGをVECTOR M.O.M. immunodetection kitを用いてブロックした後、抗loricrin抗体 (PRB-145P, Covance) を反応させ、抗ウサギIgG-biotin抗体を2次抗体として反応させた後、VECTASTAIN Elite ABCキット (Vector Laboratories) を使ってDABで発色させた。一方、抗filaggrin抗体 (PRB-417P, Covance) による免疫組織化学染色では、コンパウンドで包埋した皮膚凍結切片を4%パラホルムアルデヒドで固定し、上記と同様に染色した。

2.5 Western Blotting

マウス背部より抜毛6日後、12Gyのガンマ線全身照射を行い、照射24、48、84時間後に皮膚を採取し液体窒素にて凍結した。約5 mm³の凍結皮膚組織片をBioMasher III (Nippi, Tokyo, Japan) で電動攪拌機 (Nippi) を用いてホモジナイズし、100 µlのlysisバッファーに溶解させた。そのlysateをBio-Rad Protein Assay (BioRad) で蛋白定量し、30 µgの皮膚lysateをミニプロテインTGXゲル (any KD, BioRad) で1次元蛋白質電気泳動を行った。PVDF膜に転写後、5%スキムミルクでブロッキングし、抗filaggrin抗体、抗loricrin抗体及び抗β-actin抗体 (4967, Cell Signaling) を反応させ、2次抗体として抗ウサギIgG-HRP (NA934, GE Healthcare) を反応させた。最後にECL select Western Blotting Detection System (GE Healthcare) で発光させ、LAS-4000 mini (Fujifilm) で検出した。

3. 結果

3.1 成長期における6 Gy照射後の発毛障害

抜毛により誘導された成長期の毛包は、抜毛後6日目にはAnagenVIとなっている。この成長期毛包に4、6、8 Gyのガンマ線照射を行い8日後の発毛を観察した (図1)。その結果、非照射マウスでは著明な発毛が観察され、4 Gy照射マウスでも非照射群と比べて短いながらも発毛が

表1 放射線毛包障害のパラメーターと毛包変性の分類

Time after radiation exposure	0 h	8 h	16 h	24 h	48 h	84 h
Bulb diameter		↓	↓	↓	↓↓	↓↓
Follicle length		→	→	↑	↑	↓↓
DP / bulb diameter ratio		→	→	→	↑	↑↑
Shape of DP	narrow	narrow	narrow	thinner	thin or round	round or ball-shaped
Position of DP	subcutis	subcutis	subcutis	subcutis	subcutis	border between dermis and subcutis
TUNEL ⁺ cells in the bulb	-	15-25%	10-20%	10-20%		
Act-Casp3 ⁺ cells in the bulb	-	+	±	±		
Apoptotic fragments in the bulb	-	++	+	+	-	-
Remnant of hair shaft in the proximal hair canal		±	+	+	+	+
Follicular distortion	-	+	+	+	+	+
Widened distal hair canal	-	-	±	+	+	++
Club hair	-	-	-	-	+	+
Epithelial Constriction between germ capsule and DP	-	-	-	-	+	+
Epithelial strand longer than DP diameter	-	-	-	-	-	+
Trailing CTS	-	-	-	-	-	+
Subcutaneous fat tissues		→	→	→	↓	↓↓
Speculated stage	Anagen VI	Early dystrophic catagen			Mid dystrophic catagen	Late dystrophic catagen

認められた。一方、6 Gyと8 Gyの照射では発毛が認められず、その背部皮膚に多数のしわを認め、点状の紫斑が散発していた。

3.2 成長期毛包に対する放射線照射後の障害パラメーターの変化

今回、抜毛後6日目のAnagenVIの毛包に対して4～12 Gyのガンマ線照射し、照射後8日(抜毛後14日)まで観察し、その背部皮膚組織標本を、表1の毛包変性のパラメーターに基づき解析した。その結果、

- (1) DP/bulb比は1日目には非照射では減少するのに対して、4～12 Gyのすべて照射群では線量依存性に増加した。3日目には10～12 Gyではさらに増加したのに対して、4～8 Gyでは減少に転じ、4 Gyと6 Gyは8日目には0 Gyと同じ値になった。
 - (2) bulb径は1日目に0 Gyでは不変だったのに対して、4～12 Gyのすべての照射群ではほぼ同程度に低下した。3日目には10～12 Gyではさらに減少したが、4～8 Gyでは3日目には横ばいとなった。そして、4 Gyと6 Gyでは8日目には増加に転じ、4 Gyの群は0 Gyと同じ値になった。8 Gy照射群は、8日目でも横ばいであった。
 - (3) 毛包の長さは、3日目には10 Gyと12 Gy群は減少した。4 Gyと6 Gy群は増加してゆき、8日目には0 Gyの長さと同じになった。
- 3つのパラメーターは、4～8 Gy照射群は0 Gy群と10～12 Gy照射群の中間の値を取る傾向にあった。4 Gy照射群では8日目までに3つのパラメーターすべてが0 Gy群と同じになり、4 Gy群で発毛を認めていることは、パ

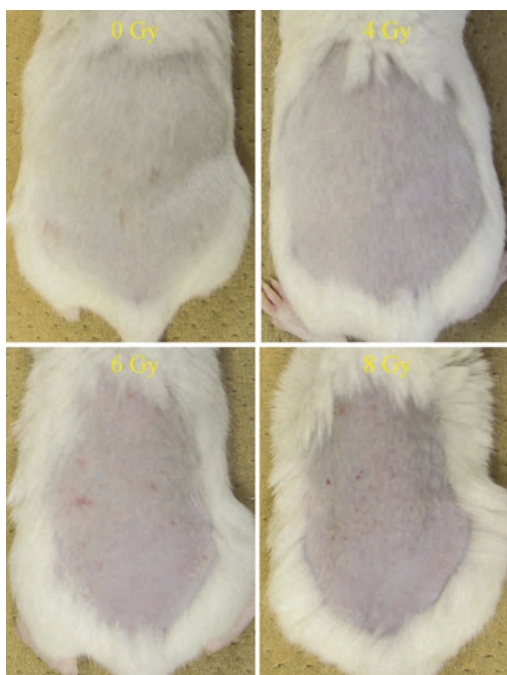


図1 成長期毛包の放射線障害

ラメーターの数値と矛盾しなかった。3日目の変性毛包の状態は、表1の3つのパラメーターに基づいて判定すると、10～12 Gyは晩期変性退行期、6～8 Gyは中期変性退行期、4 Gyは初期変性退行期と同程度の数値だった(図2)。

3.3 照射後の皮膚水分量低下

6 Gy照射後の皮膚にしわが発生していることから、皮膚水分量の低下が疑われた。そこで、抜毛後6日目のAnagenVIの毛包に対して、6 Gyのガンマ線を照射し、照射後4日目まで、24時間ごとに皮膚水分率を測定した。その結果、皮膚水分率はガンマ線6 Gy照射後3日目までは不変であったが、4日目に有意に低下した(図3)。

3.4 照射後のバリア機能関連蛋白質の皮膚における発現変化

6 Gy照射3日後の皮膚に対するHE染色では、表皮構造に大きな変化を認めなかった。しかしながら、loricrinは非照射皮膚では表皮顆粒層付近に局限して強発現していたが、照射によりその発現が著明に減少し、ほぼ消褪していた。一方、皮膚バリア機能関連蛋白質であるfilaggrinは、非照射皮膚では表皮顆粒層付近に局限して発現していたものが、照射によりその発現が基底層と有棘層、および角層の一部に及び、filaggrinの発現部位が著しく拡大していた(図4)。

3.5 照射後のバリア機能関連蛋白質発現の経時的变化

マウスに12 Gy照射し、経時的にサンプリングを行いwestern blottingで検討した。その結果、profilaggrin及びその中間体は48時間まで減少していったが、84時間で増

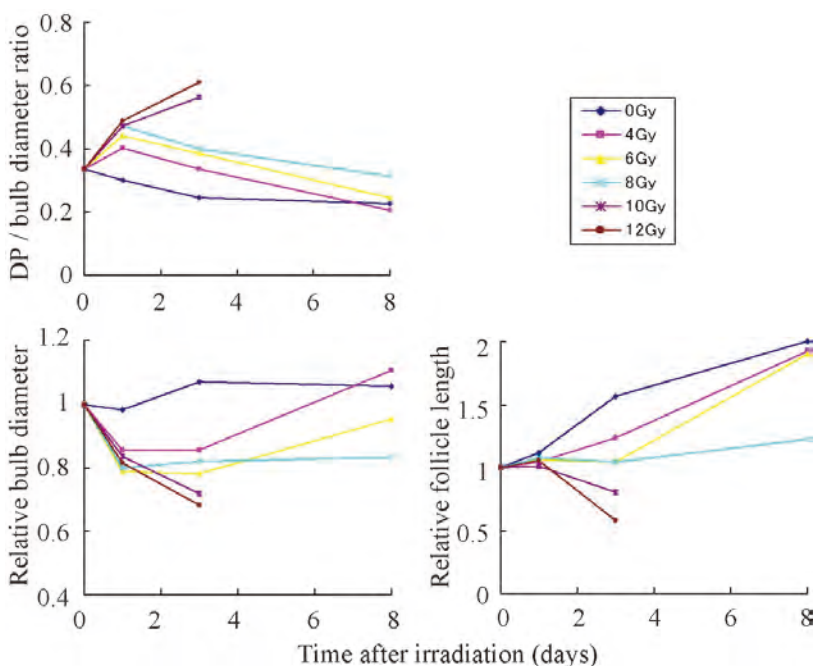


図2 成長期毛包の放射線障害指標の推移

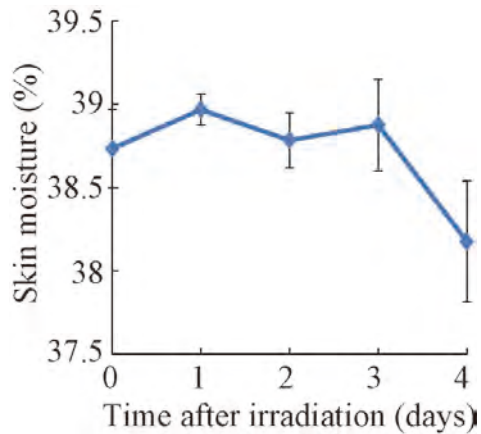


図3 照射後皮膚水分量の減少

加に転じていた。一方、filaggrinの発現量は48時間で軽度増加し、84時間でむしろ著明に増加していた。保湿成分になるfilaggrin分解産物も照射後徐々に増加していった。loricrinの発現はwestern blottingでも非照射では強発現しているのが示されたが、照射後24時間でも明らかな減少を認め、その後も経時的に減少を続け、今回検討した84時間では著減していた(図5)。

4. 考 察

本研究のマウスモデルでは、毛包成長期に対して4Gyのガンマ線照射では照射8日後で発毛が認められるが、6Gy以上の線量では発毛を認めなかった。我々が提案した変性毛包の組織学的パラメーターに基づいて照射3日目の毛包を評価すると、4Gyは初期変性退行期、6~8Gyは

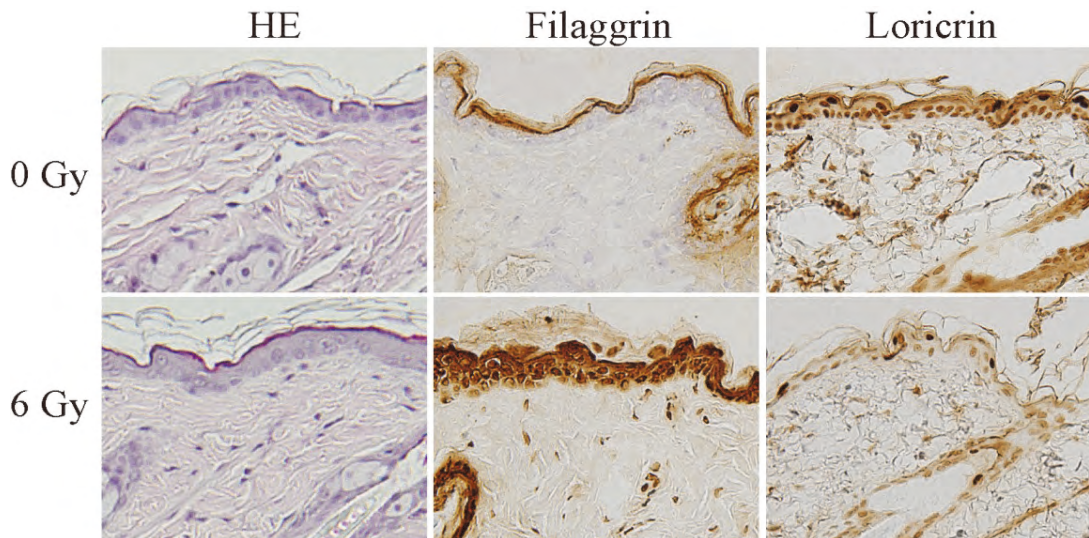


図4 照射後のバリア機能関連蛋白質の皮膚免疫組織化学染色

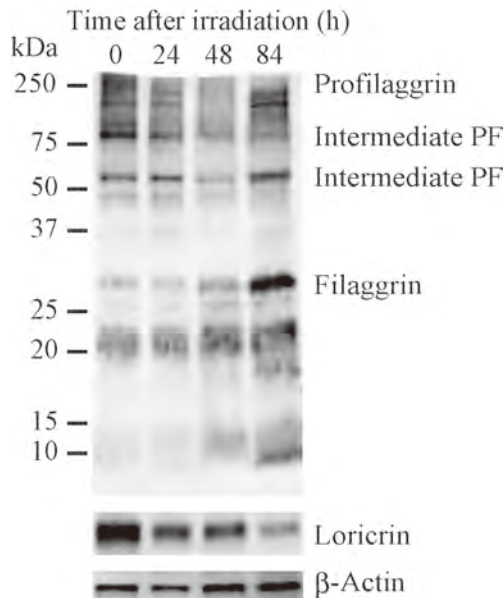


図5 照射後の皮膚バリア機能関連蛋白発現のwestern blot解析

中期変性退行期と分類され、6～8 Gy照射群の方が4 Gy群より後期の変性毛包であったが、10～12 Gy照射群の晩期変性退行期よりは早期の変性であった。この中期変性退行期を誘発する6 Gy以上の照射条件では、皮膚にしわも生じ皮膚の水分量の減少が示唆された。実際に皮膚水分率は、6 Gy照射後4日目より有意な減少が認められた。

皮膚バリア機能に関係するloricrinは、cornified cell envelope (CE) 構成蛋白質の一つで、表皮ではそれに由来する部分がCE成分の70%を占めるなど、主要成分となっている。しかしながら、loricrin欠損マウスでは、出生時には赤い半透明の光沢のある皮膚となるものの、他のCE成分が短期間にloricrinの機能を補うことにより、皮膚バリア機能低下の所見に乏しい⁵⁾。今回、放射線照射により、マウス表皮におけるloricrin蛋白の著明な減少が明らかになった。一方、filaggrinが増加している所見は、照射後4日目に認められた皮膚水分率の軽度低下が、loricrinの減少に由来することを示唆した。loricrin欠損マウスのwestern blottingでは、大きなfilaggrinの変化は認められていないと報告されているが、新たなprofilaggrinのバンドが検出されていることから⁵⁾、filaggrinもloricrin減少に補完的に作用している可能性がある。

ヒトの放射線皮膚障害では3～10 Gyで紅斑が生じ、8～12 Gyで乾性落屑と呼ばれる皮膚症状が生じる⁶⁾。一方、ヒトの脱毛は3 Gy以上で生じることから、今回マウスモデルで示した6 Gy照射による毛包障害と皮膚症状は、ヒトの脱毛と紅斑に相当する軽度の障害と考えられた。ヒトの紅斑は乾性落屑より軽い病態であり、今回のマウス皮膚モデルでは、明らかな発赤は認められなかったものの、皮膚水分率の低下とloricrin減少という皮膚バリア機能の低下が認められた。よって、皮膚バリア機能関連蛋白は、軽度の放射線皮膚障害でも変動し、その発症に関与している可能性が考えられた。

5. 総括

軽度の放射線皮膚障害でも、皮膚バリア機能関連蛋白であるloricrinの著明な発現低下が認められ、皮膚水分量の低下に関与していることが示唆された。そして、皮膚バリア機能の変化は、放射線皮膚障害の潜在的な病因であることが示唆され、放射線皮膚障害に有効な治療法や新たなスキンケア製品の開発のための有用な指標となることが示された。

(引用文献)

- 1) Nakayama F, Hagiwara A, Kimura M, Akashi M, Imamura T: Evaluation of radiation-induced hair follicle apoptosis in mice and the preventive effects of fibroblast growth factor-1, *Exp Dermatol*, 18, 889-892, 2009.
- 2) Smith FJ, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Sandilands A, Campbell LE, Zhao Y, Liao H, Evans AT, Goudie DR, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Munro CS, Sergeant A, O'Regan G, Bale SJ, Compton JG, DiGiovanna JJ, Presland RB, Fleckman P, McLean WH: Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris, *Nat Genet*, 38, 337-342, 2006.
- 3) Palmer CN, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Goudie DR, Sandilands A, Campbell LE, Smith FJ, O'Regan GM, Watson RM, Cecil JE, Bale SJ, Compton JG, DiGiovanna JJ, Fleckman P, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Sergeant A, Munro CS, El Houate B, McElreavey K, Halkjaer LB, Bisgaard H, Mukhopadhyay S, McLean WH: Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis, *Nat Genet*, 38, 441-446, 2006.
- 4) Hendrix S, Handjiski B, Peters EM, Paus R: A guide to assessing damage response pathways of the hair follicle: lessons from cyclophosphamide-induced alopecia in mice, *J Invest Dermatol*, 125, 42-51, 2005.
- 5) Koch PJ, de Viragh PA, Scharer E, Bundman D, Longley MA, Bickenbach J, Kawachi Y, Suga Y, Zhou Z, Huber M, Hohl D, Kartasova T, Jarnik M, Steven AC, Roop DR: Lessons from loricrin-deficient mice: compensatory mechanisms maintaining skin barrier function in the absence of a major cornified envelope protein, *The Journal of cell biology*, 151, 389-400, 2000.
- 6) IAEA. Diagnosis and treatment of radiation injuries. In: Safety Reports Series No. 2. Vienna: The Agency; 1998. p. 10.

加齢に伴う皮膚17型コラーゲン切断動態の解析

北海道大学病院皮膚科

西 江 渉

Bullous pemphigoid (BP) is the most common autoimmune blistering disorder, which affects elderly. IgG autoantibodies from BP patients target the transmembrane collagen XVII (COL17), a major component of hemidesmosomes in basal keratinocytes. Hemidesmosomes plays a vital role for keeping stable adhesion between the dermis and the epidermis, thus, autoimmunity to COL17 results in blistering phenotype. However, the pathogenesis for breaking the tolerance to COL17 is still uncertain. The major epitopes for IgG autoantibodies from BP patients are clustering within the juxtamembranous non-collagenous (NC) 16A domain, and interestingly, extracellular domain of COL17 is physiologically cleaved within the NC16A domain. In addition, certain autoantibodies from BP patients preferentially react with the shed ectodomain but not with the full-length form. Furthermore, cleavage of COL17 can induce neoepitopes around the cleavage-sites on the NC16A domain. These findings suggest the ectodomain shedding of COL17 is closely related with the development of autoimmunity to COL17, and non-physiological ectopic cleavage of the molecule due to aging may be related with the autoimmunity development. To address these issues, we tried to identify non-physiological cleavage sites within the NC16A domain and to produce a novel cleavage site-specific antibody which can detect the non-pathological cleavage site. We first identified Ser⁵⁰⁸ to be N-terminal cleavage site of COL17 ectodomain which is cleaved by plasmin, a potential serine protease expressing in lesional skin as well as blister fluid of BP. Second, we generated rabbit antibodies which specifically target pathological N-terminal cleavage site of cleaved COL17 ectodomain by immunizing short peptides corresponding to the identified cleavage site. The antibody demonstrated that COL17 is cleaved at Ser⁵⁰⁸ in lesional skin of some BP patients, however, the cleavage was not observed physiological setting even aged skin.

1. 緒 言

水疱性類天疱瘡 (bullous pemphigoid, BP) は、高齢者に好発し、自己免疫性水疱症のなかで最も頻度の高い疾患である。BP患者IgGの多くは、表皮真皮境界部に存在する17型コラーゲン (COL17) の細胞膜近傍のNC16A領域に強く反応する。近年、申請者らはCOL17のNC16A領域内でCOL17の細胞外領域が生理的に切断され、切断後に新しい抗原エпитープが生じることを明らかにした¹⁾。従って、COL17の切断は、BPにおける自己抗体の発症に大きく関与することが予想されるが、その病態生理は未だ十分に解明されていない。生理的な条件下では、COL17はADAM9、10、17によってNC16Aドメイン内の複数個所で切断されるが^{2,3)}、申請者らは、BPの水疱内容液中に含まれるセリンプロテアーゼによって生理的切断部とは異なる部位で切断を受ける可能性を示した¹⁾。しかし、実際のBP病変部で、生理学的切断部位と異なる部位でCOL17が切断されているかは不明である。一方、BPの病変部では、プラスミンの発現が亢進していることが知られており⁴⁾、実際に、プラスミンがCOL17の細胞外領域をNC16Aド

メイン内で切断することも報告されている⁵⁾。従ってプラスミンによるCOL17の切断部位が判明され、同部位に対する切断部特異抗体の作成が出来ると、BPの病変部に於けるCOL17の非生理学的切断の有無が明らかになる可能性が高い。更に、切断部が判明すると切断部を特異的に認識する抗体を作成することが可能となるため¹⁾、加齢に伴いCOL17が非生理学的部位で切断されるかどうかについても解明可能となる。BPは高齢者に好発する疾患であるため、BPの発症機序解明に迫る可能性がある。

本研究の目的は、COL17の切断部特異抗体を用い、COL17の切断によって生じる抗原エпитープの出現とBPとの関連について解明することである。本研究の特徴は、各種年齢の皮膚におけるCOL17の切断動態を解明し、高齢者皮膚の一部において、BP病変部と同様にCOL17が切断され、切断部に新規エпитープが生じているかを明らかにする点である。

2. 実 験

2.1 プラスミンによるCOL17の切断部位の同定

FLAGタグを組み込んだCOL17A1 cDNAをpcDNA5/FRTベクター (Invitrogen)へ導入し、pOG44ベクターと共にFlp-In293細胞へコトランスフェクション後、ヒグロマイシンによって安定発現株をクローニングする。安定発現株細胞にCOL17が正しく発現していることを、ウェスタンブロット等にて確認後、ライセートタンパクから、FLAGに対するマウスモノクローナル抗体 (M2, Sigma)を用い、アフィニティー精製する。精製された全長のリコ



Non-physiological cleavage of collagen XVII in aged skin

Wataru Nishie

Department of Dermatology, Hokkaido University Hospital

ンビナントCOL17タンパクをリコンビナントプラスミンで消化し、SDS-PAGEを行い、COL17の細胞外領域に該当する120kDのバンドをクマシー染色後に切り出し、トリプシンで処理後、マスペクトロメトリー (nano-LC/LC-MS) にて切断部を同定する。その際、トリプシン処理によって生じるアミノ末端断片とプラスミンによって生じた断片を鑑別する目的で、SDS-PAGE施行直前にサンプル中の全タンパクのアミノ末端をアセチル化し (Sulfo NHS-Acetate、Pierce)、nano-LC/LC-MS結果をMascotで解析する際、アセチル化条件でペプチド配列を算出する¹⁾。

2.2 プラスミン切断部位に対する切断部特異抗体の作成

同定された切断部から8アミノ酸程度のペプチド (システインをC末端に結合) を合成し、MBSを用いKLHに共有結合後、抗原として2匹の兎へ免疫する。抗原ペプチドカップリングアガロースを作成し (SulfoLink Coupling Resin and immobilization kit、Pierce)、得られた抗血清から切断部特異抗体をアフィニティー精製する。得られた切断部特異抗体の特異性は、プラスミン消化したCOL17タンパクおよび正常ヒト皮膚を基質として用い、それぞれウェスタンブロットと蛍光抗体法で確認する。最後に、得られた切断部特異抗体を用い、各種年齢の正常ヒト皮膚を染色し、BPの病変部と同様の病的な切断がCOL17に生じているかについて検討する。

2.3 各種切断部特異抗体を用いたCOL17の切断動態の解明

プラスミンによって切断された切断部特異抗体に加え、

これまで申請者が作成した生理的なCOL17の切断部位を特異的に認識する抗体を用い¹⁾、各種年齢の正常ヒト皮膚を染色し、BPの病変部と同様の病的な切断が年齢や部位特異的に生じているか検討する。

3. 結果

3.1 プラスミンによるCOL17の切断部位の同定

リコンビナントCOL17は、抗FLAG抗体によって極めて高純度に精製できた。コラーゲンは3本鎖を形成するが、精製COL17は非還元状態では540kD (180kD×3本)、還元状態では180kD付近に一本鎖として確認出来た (図1)。さらに精製リコンビナントCOL17をプラスミンで処理すると、COL17の細胞外領域に相当する120kDと97kDの断片を生じることを確認した (図1)。120kDの切断断片を切り出し、マスペクトロメトリーで解析したところ、生理的切断部位とは異なる、NC16A領域内の508番目セリン (Ser⁵⁰⁸) のアミノ末端で切断されることが判明した。

3.2 プラスミンによって生じる切断部に対する特異抗体の作製

Ser⁵⁰⁸から8アミノ酸のペプチドを合成し、2匹の野兎へ免疫した。抗原ペプチドカップリングカラムによってアフィニティー精製した切断部特異抗体は、プラスミンによって消化されたCOL17断片に反応することをウェスタンブロットで確認した。次に、凍結正常ヒト皮膚切片を薄切切片上でプラスミンと反応させ、作成した切断部特異抗体で染色したところ、表皮真皮間境界部に線状に沈着することを確認した (図2)。

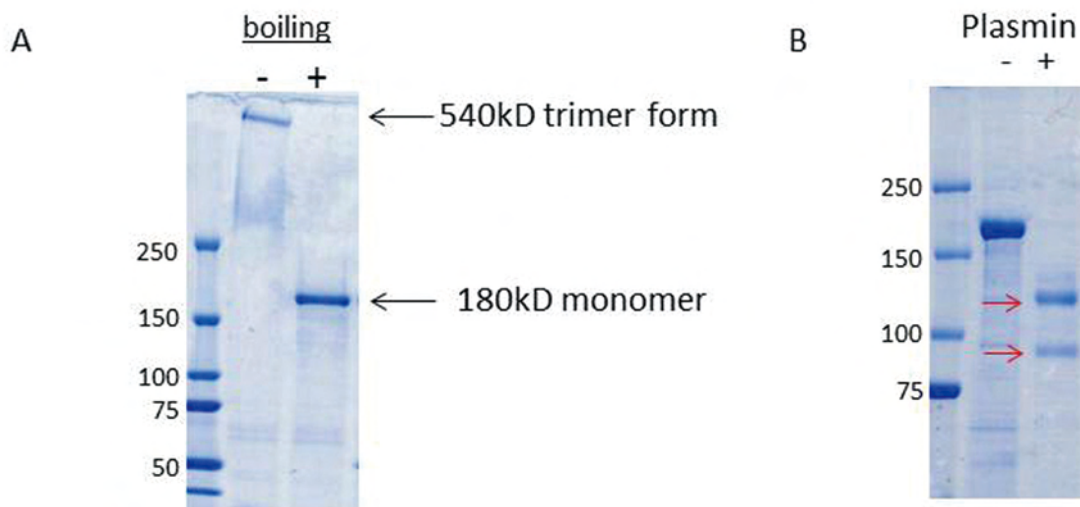


図1 精製COL17は非還元状態では540kD (180kD×3本)、還元状態では180kD付近に一本鎖として確認出来た (A、矢印)。さらに精製リコンビナントCOL17をプラスミンで処理すると、COL17の細胞外領域に相当する120kDと97kDの断片を生じた (B、赤矢印)。

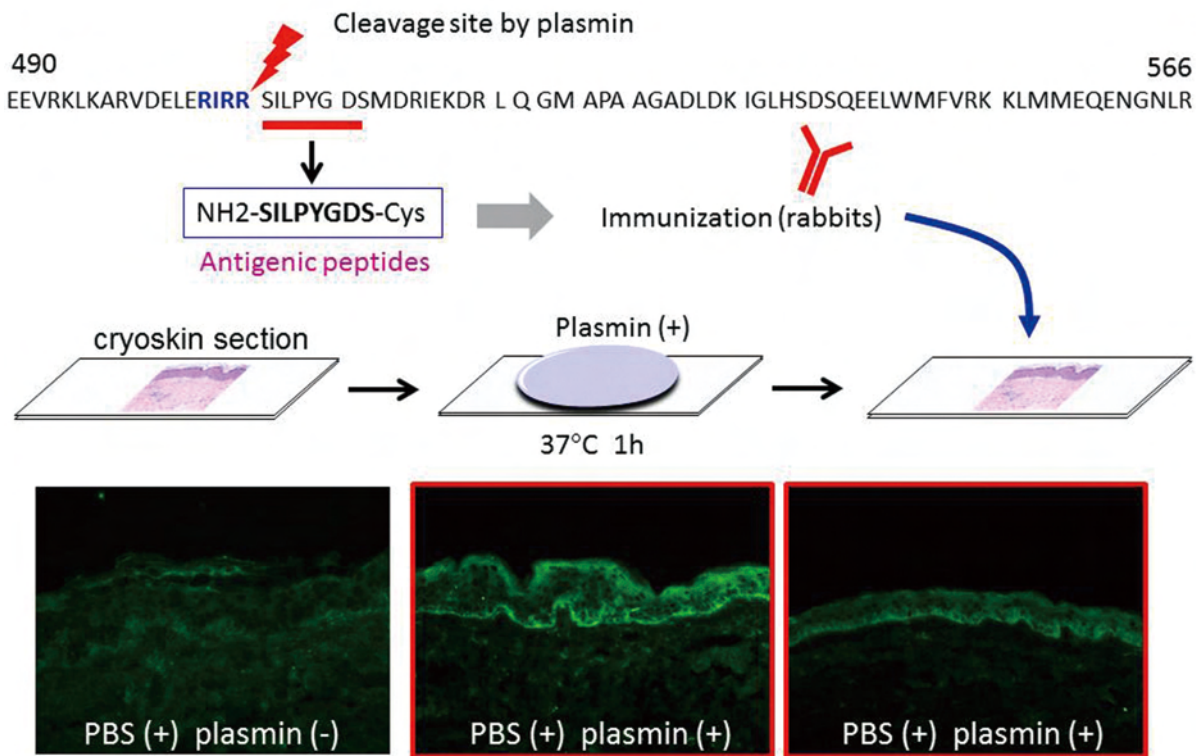


図2 凍結正常ヒト皮膚切片を薄切片上でプラスミンと反応させ、作成した切断部位特異抗体で染色したところ、表皮真皮間境界部に線状に沈着することを確認した。上方の配列は、プラスミンによる切断部位を明示した COL17 cDNA 中の NC16A 領域のアミノ酸配列。下線：抗原ペプチド。

3.3 各種切断部特異抗体を用いた COL17 の切断動態の解明

新たに作成した抗体は、COL17 の非生理学的な切断部を正しく認識することが判明した。この抗体を用い BP の病変部皮膚を観察した結果、15 例中 4 例の病変部において非生理学的な切断が生じていたことが判明した。一方、10 例の 80 歳以上の高齢者（正常部）皮膚において同様に検討した結果、いずれの検体でも非生理学的な切断は認めなかった。

4. 考察

BP は、IgG クラス自己抗体が自己抗原である COL17 に結合し、補体活性化に伴う炎症反応の惹起により発症すると考えられているが、自己抗体が生じるメカニズムは未だ不明である。本研究により、COL17 はプラスミンによって NC16A ドメイン内の生理学的部位とは異なる箇所での切断を受けることが明らかになった。同定された切断部に対する抗体（切断部特異抗体）の作成にも成功し、実際の BP 患者皮膚においても病変部特異的な切断が COL17 で生じていることが本研究によって解明された。BP の病変部特異的な COL17 の切断は生理的条件下では生じないため、健康人で生じると、同切断部への自己免疫反応が惹起され

ることが予想される。BP は高齢者に好発するため、高齢者皮膚において非生理学的な切断が生じている可能性を検討したが今回の研究では確認出来なかった。しかし BP は一部に高齢者に生じる疾患であり、一部の皮膚で COL17 の非生理学的切断が生じるだけで COL17 に対する自己免疫反応が誘発される可能性も想定される。今後、更なる研究によって BP が高齢者に好発する機序が解明されることが期待される。

(引用文献)

- 1) Nishie W, Lamer S, Schlosser A, Licarete E, Franzke C W, Hofmann S C, Jackow J, Sitaru C, Bruckner-Tuderman L: Ectodomain shedding generates Neopeptides on collagen XVII, the major autoantigen for bullous pemphigoid, *J Immunol.* 185., 4938-4947, 2010.
- 2) Franzke C W, Tasanen K, Schacke H, Zhou Z, Tryggvason K, Mauch C, Zigrino P, Sunnarborg S, Lee D C, Fahrenholz F, Bruckner-Tuderman L: Transmembrane collagen XVII, an epithelial adhesion protein, is shed from the cell surface by ADAMs, *EMBO J.*, 21, 5026-5035, 2002.

- 3) Franzke C W, Bruckner-Tuderman L, Blobel C P: Shedding of collagen XVII/BP180 in skin depends on both ADAM10 and ADAM9, *J Biol Chem.*, 284, 23386-23396, 2009.
- 4) Kramer M D, Reinartz J: The autoimmune blistering skin disease bullous pemphigoid. The presence of plasmin/alpha 2-antiplasmin complexes in skin blister fluid indicates plasmin generation in lesional skin, *J Clin Invest.*, 92, 978-983, 1993.
- 5) Hofmann S C, Voith U, Schonau V, Sorokin L, Bruckner-Tuderman L, Franzke C W: Plasmin plays a role in the in vitro generation of the linear IgA dermatosis antigen LADB97, *J Invest Dermatol.*, 129, 1730-1739, 2009.

皮膚組織において紫外線傷害を制御するユビキチン化システムの解析

北海道大学大学院医学研究科生化学講座

畠山 鎮次

Ataxia-telangiectasia (AT) is an autosomal recessive genetic disease characterized by immunological deficiencies, neurological degeneration, developmental abnormalities and an increased risk of cancer. Cells isolated from AT patients show hypersensitivity to ionizing radiation, cell cycle abnormalities and aberrant cytoskeletal organization. The *ataxia-telangiectasia group D (ATDC/TRIM29)* gene was identified by its ability to suppress radiosensitivity of the cell line AT5BIVA from the D group complementation group of the AT. Recently, we showed that TRIM29 suppresses apoptosis induced by UV irradiation in HCT116 cell lines. In this study, we performed biochemical analysis of TRIM29 to clarify the function of TRIM29 under UV-irradiation or other DNA damages.

1. 緒言

紫外線 (UV) は太陽から放射される電磁波であり、波長の長いものから、UVA、UVB及びUVCの3種類に分けられる。日焼けで皮膚が赤くなり炎症を起こすのはUVBであり、シミやソバカスの原因にもなる。さらに皮膚のDNAを傷つけ、後に皮膚癌を生じさせるのも主にUVBと考えられている。UVAは、波長が長いいため、UVBより皮膚の深部 (皮膚真皮) まで到達するため、皮膚のシミやたるみの原因になると考えられている。紫外線を受けた皮膚細胞の遺伝子 (DNA) は通常DNA修復酵素系によって治されるが、長年にわたり遺伝子を傷つけられることで修復の際にミスを生じることがある。このようにして突然変異が起きると、皮膚の扁平上皮細胞は老化を起こしたり、悪性細胞 (癌細胞) へと変化してしまうことがある。

毛細血管拡張性運動失調症 (AT: Ataxia telangiectasia) は協調運動不能、毛細血管拡張、感染症などを引き起こす遺伝性の免疫不全疾患であり、ATM (AT mutated) がその原因遺伝子である。ATは常染色体劣性遺伝性疾患で臨床的には進行性の小脳運動失調 (ataxia) を起こすのみでなく、毛細血管拡張 (telangiectasia)、精神遅滞、免疫不全、早老症状、発癌率の増加など幅広い症状を呈する。実際、AT患者由来の細胞は放射線高感受性や染色体不安定性を示すことが知られている。今日、癌治療の領域において、ATMタンパク質 (リン酸化酵素) が細胞周期のチェックポイント制御に重要な役割をしていることが判明している。さらに、AT患者由来の細胞を使用した細胞遺伝学的実験

により、ATの異常による表現型を相補する遺伝子としてTRIM29 (ATDC) 遺伝子が同定されている^{1,2)}。TRIM29 (ATDC) 遺伝子は、染色体11q23に存在し、588アミノ酸をコードしている³⁾。TRIM29 (ATDC) タンパク質はジンクフィンガーモチーフを有し、tripartite motif (TRIM) タンパク質の亜系のひとつとしても報告されている。TRIMタンパク質群の多くは、RINGドメインを有しており、ユビキチンリガーゼE3活性を示すことが推測されるが、TRIM29の構造的特徴としては、RINGドメインを欠損している。したがって、ATDCは酵素機能欠損型として生理的にドミナントネガティブ的な機能をしている可能性がある。最近においては、皮膚を含む扁平上皮細胞に特異的に発現し、かつUV照謝などで誘導されるp53の活性制御をつかさどるタンパク質として、ユビキチン化関連酵素TRIM29が報告されている^{4,5)}。

ユビキチンは76個のアミノ酸からなるタンパク質で、タンパク質の翻訳後修飾 (ユビキチン化) に用いられ、タンパク質分解、DNA修復、翻訳調節、シグナル伝達などさまざまな生命現象に関わる。ユビキチン化はミスフォールドタンパク質や不要になったタンパク質を細胞から除去するためにも重要な役割を持っており、このシステムはタンパク質の品質管理と呼ばれている。

本申請において、皮膚細胞でTRIM29がDNA傷害防御やタンパク質品質管理に関していかなる機能を有しているかを検証することを進めた。本研究成果により、ユビキチン化という新たな防御システムが皮膚の老化に関することが明らかとなれば、今までとは異なった角度から開発される薬剤や化粧品の発想につながることを期待できる。

2. 実験

2.1 TRIM29結合タンパク質の同定のための遺伝学的及び生化学的スクリーニング

皮膚扁平上皮細胞特異的TRIMタンパク質であるTRIM29に注目し、その結合タンパク質の同定を試みた。



Analysis of ubiquitin system regulating UV-damage in skin

Shigetsugu Hatakeyama

Department of Biochemistry, Hokkaido University Graduate School of Medicine

TRIM29結合タンパク質を同定するために、酵母ツーハイブリッド法もしくはプルダウン法による結合タンパク質の精製による質量分析解析を行った。

酵母ツーハイブリッド法：TRIM29の全長もしくは基質認識部位と考えられるC末端側の部分をbaitとして使用し、各種の酵母内発現ライブラリーから、結合タンパク質のcDNAの同定を試みた。

プルダウンアッセイを用いた質量分析解析(図1)：結合タンパク質同定のため、まずはFLAGタグ付きTRIM29タンパク質を恒常的に発現したHeLa-S3細胞株を樹立した。安定発現細胞株樹立に際して、レトロウイルス発現ベクター系を利用した。FLAGタグを使用した高度に調整された方法により、結合タンパク質を分離した。SDS-PAGEによりタンパク質を分離し、バンドとして確認できるものはMALDI-TOF/TOFを使用してタンパク質を同定する。もしくはSDS-PAGEのバンドに関係なくゲルを数10に均等に切り出し、すべてをESI-LC-MS/MSにより解析する。

2.2 扁平細胞株を使ったTRIM29に関する生化学的及び細胞生物学的解析

TRIM29による細胞機能に対する影響を調べるために、以下の実験を行った。

扁平上皮細胞株であるHaCaT細胞、PAM細胞、HSC2細胞、HSC4細胞及びCAS-22細胞等を使用した。特にRNAiによってノックダウンさせたSiHa細胞株を作製し、酵素-基質対応から推測される細胞機能に対して検討を試みた。実際には、フローサイトメーターを使用しTRIM29による細胞周期もしくは細胞死、及び細胞増殖等に関する

細胞生物学的実験を行った。

3. 結果

3.1 TRIM29結合タンパク質の同定

TRIM29の機能を解明するために、新たにTRIM29に結合するタンパク質の同定を試みた。酵母ツーハイブリッドを使用したスクリーニングでは新たに注目すべき遺伝子の同定にはできなかった。次に生化学的解析によりTRIM29結合タンパク質の同定を試みた。まず、レトロウイルス発現ベクター系を使用して、FLAGタグ付きのTRIM29の遺伝子が恒常的に発現するHeLa-S3細胞を樹立した。この細胞が樹立できたことで、安定的にTRIM29が発現する状態が実現でき、HeLa-S3細胞は浮遊培養が可能なので大量培養が可能となった。次にTRIM29抗体を使って、細胞質及び核分画のどちらに発現しているかを調べたところ、TRIM29のほとんどが核に発現していることが判明した(図2)。したがって、この安定発現細胞を大量培養し、核分画のみを選択的に精製し、その溶解液に対して抗FLAG抗体を使用してFLAG-TRIM29及びその結合タンパク質を網羅的に精製した(図1)。精製したタンパク質をSDS-PAGEにより分離し、銀染色を試みた。すると、結合タンパク質と思われる多数のバンドが検出された(図3)。質量分析により同定されたタンパク質を機能的に分類すると、DNA修復に関するタンパク質複合体の構成成分に分類されるものとクロマチンリモデリング(染色体構造変化)の関与するタンパク質複合体の構成成分に分類されるものであることが判明した(図4)。いくつかの同定されたタンパク質に関しては、TRIM29と実際に細胞内で結合してするかを確認した。

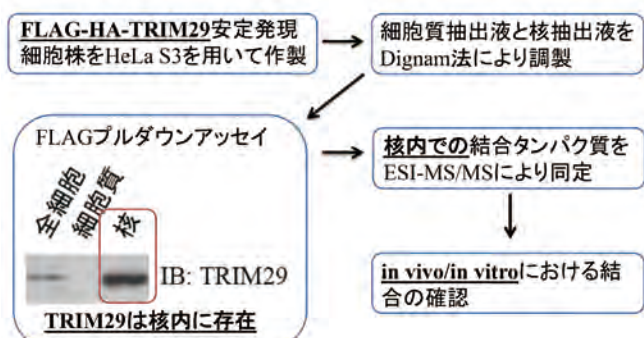


図1 TRIM29結合タンパク質の同定のフローチャート

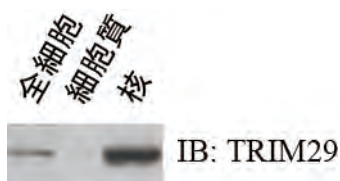


図2 細胞内分画によるTRIM29の発現部位の確認

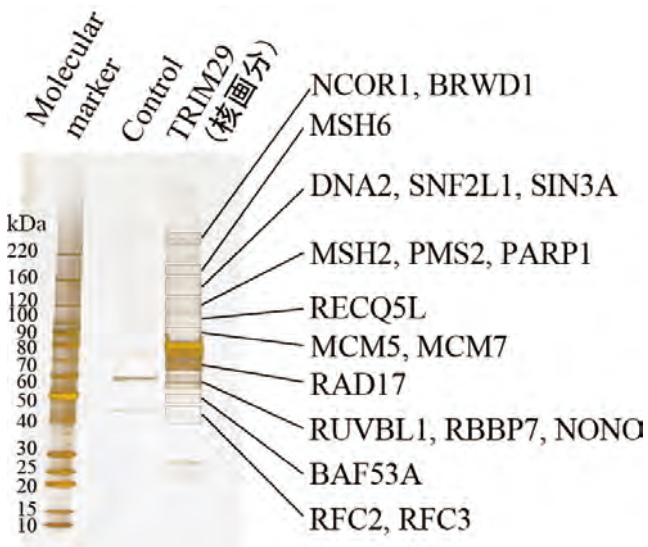


図3 精製されたTRIM29結合タンパク質の銀染色

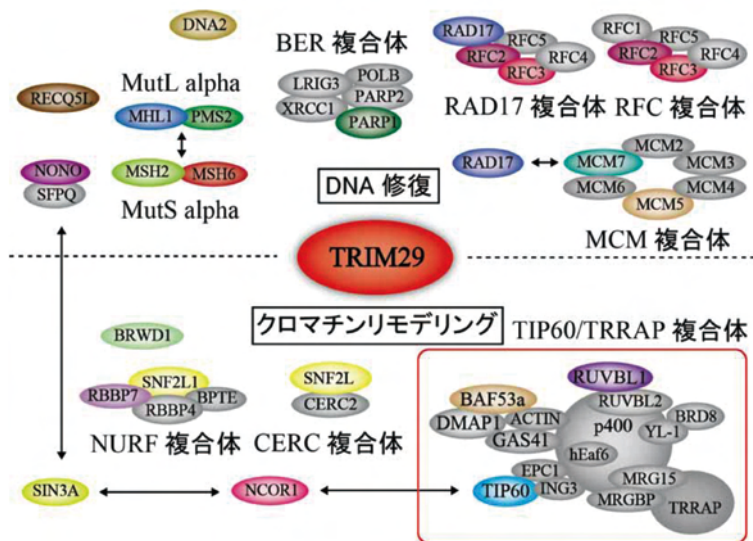


図4 同定された TRIM29 結合タンパク質の機能の可能性

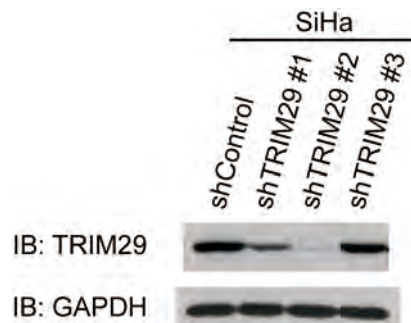


図5 TRIM29 遺伝子をノックダウンさせた SiHa 細胞株の樹立。抗 TRIM29 抗体を使ったイムノブロット解析で発現を確認した。

3.2 扁平細胞株を使った TRIM29 に関する生化学的及び細胞生物学的解析

これまでの報告から、TRIM29は癌抑制遺伝子p53依存性に機能することが示唆されている。そこで、扁平上皮細胞株の中でp53が野生型、かつTRIM29が発現している細胞株として、SiHa細胞株を細胞生物学的解析に利用した。まず、レトロウイルス発現系によるshRNAを使用し、TRIM29遺伝子の発現をノックダウンさせたSiHa細胞株を樹立した(図5)。この細胞株に対して、抗癌剤シスプラチン(CDDP)を作用させた際の細胞周期及び、アポトーシス細胞の比率を解析した。すると、対照細胞株と比較して、TRIM29ノックダウン細胞株ではCDDPに対して、アポトーシスを起こす細胞数が増加していることが判明した(図6)。したがって、CDDPを含むDNA傷害剤に対して、TRIM29は防御的な働きを有していることが示唆された。

4. 考察

皮膚細胞の老化の防御システムの研究を進める際に、DNA傷害に対して異常を示す表現型をもつ疾患群をモデルとして想定することは有効である。皮膚扁平上皮細胞株にTRIM29は高発現しており、EGF刺激により発現が減少することが知られている⁶⁾。最近においては、WntシグナルにおけるDvlにTRIM29が作用することで、Wntシグナルを活性化させることが報告されており、さらには膵臓癌とTRIM29との関係が示されている⁷⁾。また、TRIM29は癌抑制遺伝子産物p53に結合しその機能を抑制することで、癌遺伝子的振る舞いをすることが報告されている⁴⁾。さらには、ヒストン脱アセチル化酵素HDAC9の作用でTRIM29の機能が制御されていることが報告されている⁸⁾。

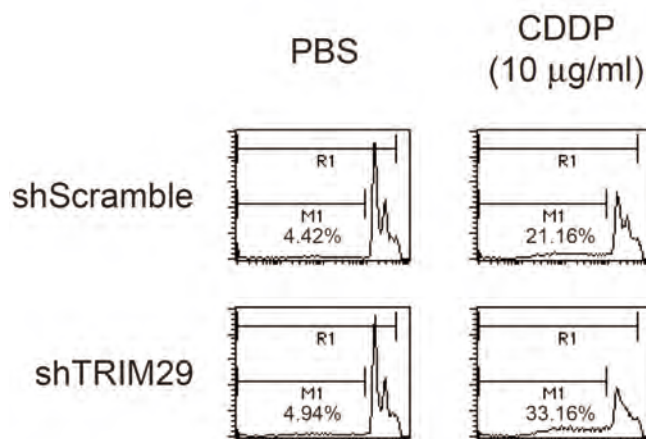


図6 TRIM29ノックダウン SiHa 細胞株に CDDP を作用させた際の FACS 解析

最近、申請者らはTRIM29がp53のアセチル化酵素Tip60と結合することで、p53の機能を抑制することを示唆する結果を報告した⁵⁾。これまでの内外の報告を総合的に考えると、TRIM29は癌遺伝子的機能、すなわち外来刺激による細胞死(放射線感受性)を抑制する機能を有していることが考えられる。紫外線等の刺激(傷害)に対して、一過性に上皮細胞を防御する機構としてTRIM29は重要な働きをしていると考えられるが、持続的に機能し続けると癌化を誘導させることになる可能性もあるので、細胞自体の傷害レベルに合わせた発現が重要になると思われる。また、EGFなどの刺激に対してTRIM29は発現量変化を受けることが報告されているので、TRIM29の機能解析とともにTRIM29の発現変動のメカニズムを検討することも重要な課題と思われる。

5. 総括

本研究により、DNA障害を起こすCDDPに対するTRIM29の機能が明らかとなった。さらに生化学的解析により、さまざまなDNA修復関連遺伝子産物がTRIM29と相互作用することも判明した。CDDPと同様に、紫外線照射によってもDNA障害が起きることが知られているので、皮膚上皮細胞にも高発現するTRIM29は皮膚で重要な働きをしている可能性が高い。今後はDNA修復におけるTRIM29のメカニズムを分子レベルで解明するために、今回同定した多くの結合タンパク質に関して詳細な生化学的解析を進めることが重要となる。

(引用文献)

- 1) Kapp LN, Painter RB, Yu LC, van Loon N, Richard CW 3rd, James MR, Cox DR, Murnane JP: Cloning of a candidate gene for ataxia-telangiectasia group D, *Am J. Hum. Genet.* 51, 45-54, 1992.
- 2) Hosoi Y, Kapp LN: Expression of a candidate ataxia-telangiectasia group D gene in cultured fibroblast cell lines and human tissues, *Int. J. Radiat. Biol.* 66, 71-76, 1994.
- 3) Hatakeyama S: TRIM proteins and cancer, *Nature Rev Cancer*, 11, 792-804, 2011.
- 4) Yuan Z, Villagra A, Peng L, Coppola D, Glozak M, Sotomayor EM, Chen J, Lane WS, Seto E: The ATDC (TRIM29) protein binds p53 and antagonizes p53-mediated functions, *Mol. Cell. Biol.*, 30, 3004-3015, 2010.
- 5) Sho T, Tsukiyama T, Sato T, Kondo T, Cheng J, Saku T, Asaka M, Hatakeyama S: TRIM29 negatively regulates p53 via inhibition of Tip60, *Biochim. Biophys. Acta*, 1813, 1245-1253, 2011.
- 6) Laderoute KR, Knapp AM, Green CJ, Sutherland RM, Kapp LN: Expression of the ATDC (ataxia telangiectasia group D-complementing) gene in A431 human squamous carcinoma cells, *Int. J. Cancer.*, 66, 772-778, 1996.
- 7) Wang L, Heidt DG, Lee CJ, Yang H, Logsdon CD, Zhang L, Fearon ER, Ljungman M, Simeone DM: Oncogenic function of ATDC in pancreatic cancer through Wnt pathway activation and beta-catenin stabilization, *Cancer Cell*, 15, 207-219, 2009.
- 8) Yuan Z, Peng L, Radhakrishnan R, Seto E: Histone deacetylase 9 (HDAC9) regulates the functions of the ATDC (TRIM29) protein. *J. Biol. Chem.*, 285, 39329-39338, 2010.

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

東京大学大学院薬学系研究科

花岡 健二郎

The development of sophisticated fluorescence sensor probes has contributed to elucidation of the molecular mechanisms of many complex biological phenomena. In particular, calcium ion (Ca^{2+}) is a pivotal second messenger inside cells, and fluctuation of intracellular Ca^{2+} works together with various biomolecules in biological systems. So, we expect that simultaneous visualization of Ca^{2+} and other biomolecules, i.e., multicolor imaging, brings us many biological findings. However, color choices are not sufficient at present, that is, reported long wavelength fluorescence probes for Ca^{2+} have some disadvantages. For example, AM ester form of Rhod-2, one of the most widely used red fluorescence probe for Ca^{2+} , often localizes into mitochondria and monitors mitochondrial Ca^{2+} concentration change, although cytoplasmic Ca^{2+} is much more important for the research of Ca^{2+} signaling. Thus, we set out to develop a red fluorescence probe for Ca^{2+} with excellent properties including the cytoplasmic distribution to elucidate cytoplasmic Ca^{2+} -related biological phenomena such as hydraulic pressure stimulation in skin and epithelial wound-healing.

So far, we have developed a novel fluorescein analogue, TokyoMagenta (TM), in which the O atom at the 10 position of the xanthene chromophore of fluorescein is replaced with a Si atom. The absorption and emission wavelengths of TM were about 90 nm longer than those of TokyoGreen (a fluorescein derivative). In this study, we introduced chlorine into the fluorophore and developed dichloro TokyoMagenta (DCTM). Then, by utilizing DCTM, we developed a red fluorescence probe for Ca^{2+} , CaTM-2, and its activation ratio of the fluorescence intensity reaching 16-fold was practically useful. The chlorination of the fluorophore was also advantageous, and the $\text{p}K_a$ value of CaTM-2 was greatly shifted to the acidic region compared with that of TM, and was sufficiently low ($\text{p}K_a = 5.1$) for practical use. For cellular application, we synthesized CaTM-2 AM, an AM ester form of CaTM-2. CaTM-2 AM diffused into cytosol uniformly in living cells, and showed the change in its fluorescence intensity by the histamine stimulus, monitoring the change of the cytoplasmic Ca^{2+} concentration. As a further demonstration of the usefulness of CaTM-2 AM, we confirmed that it could be applied to rat hippocampal slice cultures for monitoring activities of neurons. Thus, CaTM-2 and CaTM-2 AM would provide an innovative approach for researchers to work on many challenges related to Ca^{2+} .

1. 緒言

我々生物を構成する細胞の内側では、タンパク質や金属イオンなどの無数の生体分子がその濃度、局在、活性を連続的に変化させ、細胞の機能や恒常性を制御している。つまり、それら分子の協奏によって、個々の細胞は情報伝達を行い、アポトーシスなどの多岐に渡る生体応答を引き起こしている。そのため、細胞内におけるそれら生体分子の挙動を継時的に時々刻々と解析することは生物学研究において極めて重要であり、これまでに多くの研究が行われてきた。その中でも、蛍光分子や蛍光タンパク質を用いたバイオイメージング技術は細胞内における様々な生体分子の挙動をリアルタイムに観察する手法として有用であり、今日の生命科学研究の進展に大きく貢献している。我々は近年、さらに高度な蛍光イメージングを可能とすべく、有機小分子を基礎とした新たな蛍光団の開発とその応用に取り

組んでおり¹⁻⁴⁾、本研究では皮膚の生理機能の解明を目指し、新たなカルシウムイオン蛍光プローブの開発を行った。近年、皮膚の表面電位は表皮が起こしていること、また、表皮が正常に機能する上でイオンポンプの働きが重要であることが分かっている。この表面電位において、カルシウムイオンは角層の直下に分布し、皮膚の正常な機能の維持において重要な役割を担っていることが報告されている。このように、皮膚の生理機構とカルシウムイオンは深く関わっている⁵⁻⁷⁾。そこで、培養細胞レベルのみならず、動物個体レベルおよび組織レベルでの応用をも視野に入れて、赤色光領域でのカルシウム蛍光プローブの開発を行った。これまでに汎用されている緑色領域 (500nm 程度) より更に長い赤色の蛍光波長を有する蛍光プローブを開発することで、より低い自家蛍光および高い組織透過性、マルチカラーイメージングへの応用が期待され、より詳細にカルシウムイオンの役割を解明できると期待される。

2. 実験・結果

2.1 赤色蛍光を有するフルオレセイン類似蛍光色素 TokyoMagenta 類の開発

蛍光イメージングにおいて、蛍光団を特定の標的分子を検出できるようにセンサー化した化合物、すなわち、蛍光プローブが汎用されており、有機小分子をもととした蛍光



Development of a red fluorescence probe for monitoring dynamics of cytoplasmic calcium ion to elucidate physiological mechanism in skin

Kenjiro Hanaoka

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

プローブの蛍光団母核として、「フルオレセイン」という緑色蛍光色素が特に汎用されている(図1a: TokyoGreenはフルオレセインの誘導体である)。これはフルオレセインが、高い水溶性、高い蛍光量子収率、確立した蛍光制御機構など蛍光プローブの蛍光団母核として多くの長所を有しているためである。例えば、生細胞染色に用いられているCalcein AMや、カルシウムプローブFluo-3、Fluo-4などはフルオレセインを蛍光団母核として用いた蛍光プローブの代表例であり、実際に、現在多くの生物学研究に応用されている^{8,9)}。このようなフルオレセイン骨格を用いて開発された蛍光プローブは生物学研究に必要な不可欠なものとなっているが、それらは全て緑色光の波長領域に蛍光波長を有するため、例えば、汎用される緑色蛍光タンパクGFPを発現させた細胞や動物に応用することや、他の緑色蛍光プローブとの共染色を行うことは不可能である。そこで我々は、フルオレセインの蛍光プローブの蛍光団母核としての優れた特性を保持したまま、長波長蛍光を有する新たな蛍光団を開発し、それによってマルチカラーイメージングなど蛍光イメージングの可能性をさらに大きく広げることを目指している。このような蛍光波長を赤色光や近赤外光の波長領域へと移動させることは、自家蛍光を低く抑え、かつ、高い組織透過性をも得ることができる。以下にこれまでに開発に成功している赤色蛍光団であるフルオ

レセイン類似蛍光色素TokyoMagenta類について説明させて頂く。

長波長蛍光を有するフルオレセイン類似色素を、フルオレセインにおけるキサンテン環の10位O原子を他の原子に置換することにより開発することを試みた。これまでに、キサンテン環上の π 共役系近傍にSi-Me結合が存在することで、キサンテン環上の π 軌道および、Si-Me結合の σ^* 軌道とが結合性相互作用を起こし、LUMOが安定化することが報告されている^{10,11)}。これをもとに、我々は10位Si置換フルオレセイン類TokyoMagenta(TM)の設計、開発を行った(図1a, b)¹²⁾。その結果、狙い通りに水溶液中でのTMの吸収波長、蛍光波長が共に、フルオレセイン誘導体であるTokyoGreen(TG)と比較して90nmもの大きな長波長化を示した(図1c, d)。さらに、分子軌道計算によってTM、TGのHOMOおよびLUMOエネルギーレベルを計算したところ、TGと比較してTMのLUMOエネルギーレベルは大きく低下しており、このLUMOエネルギーレベルの安定化が波長変化の主な要因であると考えている(図1e)。

2.2 β -ガラクトシダーゼ活性検出蛍光プローブの開発

光学特性を精査する中で、TMに特徴的な光学特性を見出した。TGおよびTMにはpH依存的にアニオン型、ニ

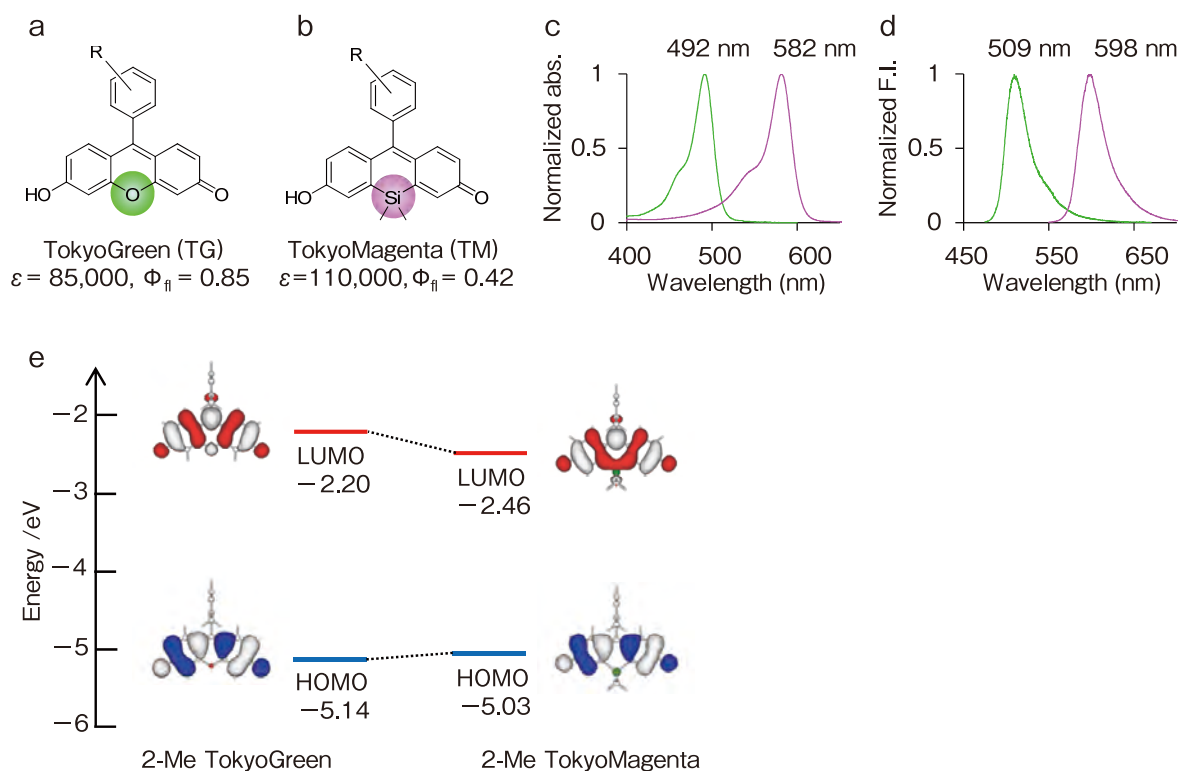


図1 (a, b) TokyoGreen (a)、および TokyoMagenta (b) の分子構造、モル吸光係数 (ϵ)、蛍光量子収率 (Φ_{fl}) (ϵ 、 Φ_{fl} は、共に R = 2-Me 体を用いて測定)。(c, d) 2-Me TokyoGreen (緑)、および 2-Me TokyoMagenta (赤) のリン酸ナトリウムバッファー (pH 9) 中での吸収 (c)、蛍光 (d) スペクトル。(e) Gaussian 09 を用いた時間依存密度汎関数法 (TDDFT) による分子軌道計算により算出した HOMO および LUMO エネルギーレベル。

ニュートラル型の平衡が存在し、アニオン型は強蛍光性、ニュートラル型は弱蛍光性を示す (図2a)。それら構造変化に伴う最大吸収波長の変化は、TGでは53nmであるのに対し、TMでは111nmと非常に大きな値を示した (図2b)。この実験結果から、キサンテン環の酸素原子上の構造変化をスイッチとすることで、高いS/Nを示す蛍光プローブの開発が可能であると考えた。つまり、ニュートラル型とキサンテン環上の酸素原子がアルキル化された化合物とが類似の光学特性を示すと推測し、例えば、アルキル化されたTM誘導体が標的分子とする特定の酵素などにより脱アルキル化を受けることでアニオン型のTMが生成し、その際、アニオン型のプローブ分子のみが励起されるよう励起波長を適切に選択することで、大きな蛍光強度上昇が実現できると考えた。実際に、この蛍光プローブの分子設計戦略が可能であるか検証するため、我々は β -ガラクトシダーゼの基質となる蛍光プローブ、2-Me TM β gal の設計、開発を行った (図3a)。2-Me TM β gal の吸収スペクトルは2-Me TMのニュートラル型のスペクトルと類似しており、 β -ガラクトシダーゼとの酵素反応により吸収波長は大きなレッドシフトを示した (図3b)。さらに、プローブ分子

を選択的にアニオン型での最大吸収波長で励起することで、酵素反応前後での大きな蛍光強度上昇を実現した (図3c)。このように励起波長を適切に選択することでアニオン型のプローブ分子を選択的に励起することができたのは、アニオン型とニュートラル型の111nmもの非常に大きな吸収波長の変化に因るものである。さらに、2-Me TM β gal を HEK293 β -ガラクトシダーゼ高発現細胞 (lacZ+) および非発現細胞 (lacZ-) にロードしたところ、高発現細胞からのみ強い蛍光が観察された (図3d, e)。これまでにTGを母核とした β -ガラクトシダーゼプローブも報告されているが、これはベンゼン環部位の酸化電位を厳密に制御し光誘起電子移動によって蛍光強度の大きな変化を実現している¹³⁾。そのため、TGを用いたプローブではベンゼン環部位の分子構造が大きく制限されている。一方でTMを用いた波長変化型プローブでは、ベンゼン環部位の酸化電位の厳密な制御が不必要であり、水溶性官能基や細胞内局在制御構造などをベンゼン環部位へと付与できるため、様々な目的に応じた自由度の高い分子設計が可能であり、より個々の研究目的に適合した蛍光プローブの開発が可能であると考えている。

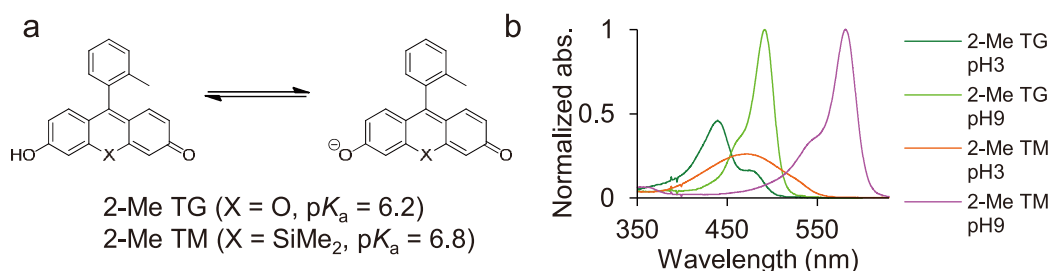


図2 (a) TG、TMのpH依存的な平衡。(b) TG、TMの酸性および、塩基性水溶液中での吸収スペクトル。

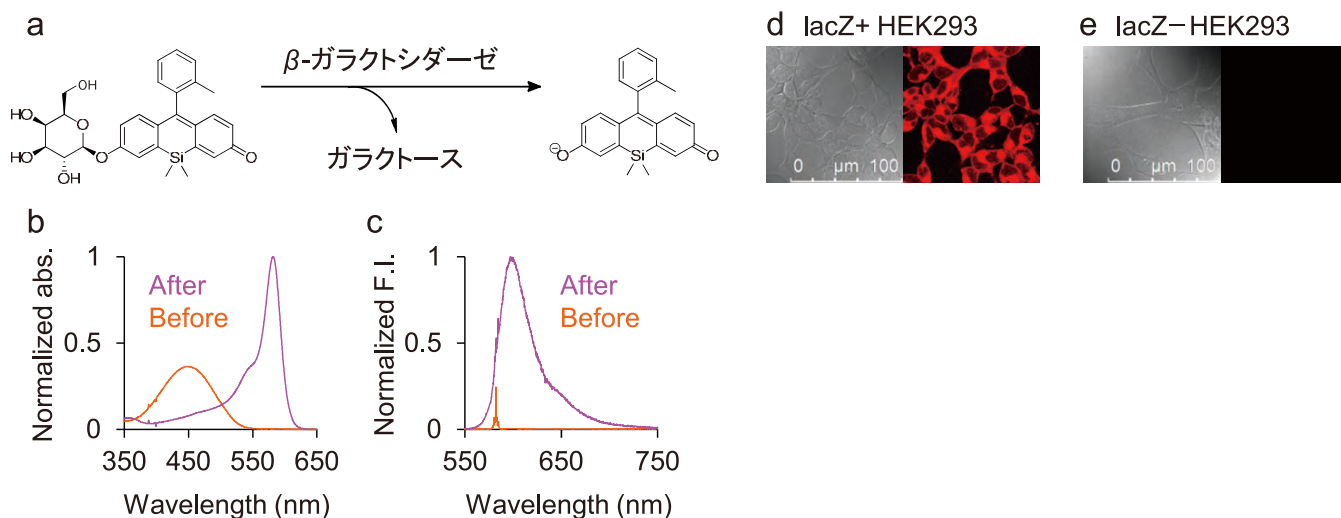


図3 (a) 2-Me TM β gal の分子構造および、 β ガラクトシダーゼとの反応。(b, c) 2-Me TM β gal の β ガラクトシダーゼとの反応前後での吸収 (b) および、蛍光 (c) (励起波長は 582 nm) スペクトル。(d, e) 2-Me TM β gal を HEK293 細胞の β ガラクトシダーゼ高発現株 lacZ+ (d) および、非発現株 lacZ- (e) にロードし、共焦点顕微鏡にて撮影した透過光像および、蛍光像。励起波長、検出波長はそれぞれ 580 nm、600–620 nm。

2.3 細胞質におけるCa²⁺をモニターする蛍光プローブの開発¹⁴⁾

カルシウムイオン (Ca²⁺) は生体の重要なセカンドメッセンジャーとして多くの生命現象に関与し、特に細胞内Ca²⁺濃度変動は様々な生体応答を惹起している。そのため、細胞内Ca²⁺濃度変動の可視化は、蛍光イメージングの分野において最も注目されている研究領域の一つとなっている。現在、緑色蛍光を有するFluo-3やFluo-4などのCa²⁺蛍光プローブが広く用いられているが、長波長を有するCa²⁺プローブは限定的な応用に留まっている。例えば、赤色蛍光を有するCa²⁺プローブで最も有名なRhod-2は、そのカチオン性のためミトコンドリアに局在しやすい特性があり、主にミトコンドリアにおけるCa²⁺イメージングに用いられているが、細胞質におけるCa²⁺の挙動解析には適していない。一方で、細胞質におけるCa²⁺はセカンドメッセンジャーとして多くのタンパク質に作用し、その濃度変動が様々な生体応答を引き起こすため、その可視化は非常に重要である。そこで本研究において、TMを用いて幅広い応用が可能な細胞質Ca²⁺をモニターできる蛍光プローブの開発を行った。Ca²⁺選択性の高いキレーター、BAPTA

(1,2-bis(*o*-aminophenoxy) ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid) 構造とTMを用いたCa²⁺プローブCaTM-1、さらに蛍光団に塩素原子を導入することでCaTM-1のCa²⁺濃度依存的な蛍光強度変化を改善したプローブCaTM-2を開発した(図4)。塩素原子導入により蛍光強度変化が改善した理由は、塩素原子が蛍光団のHOMOエネルギーレベルを低下させ、Ca²⁺非存在下において光誘起電子移動による蛍光の消光効率が高まったためと考えている。さらに、CaTM-2の細胞膜透過性体CaTM-2 AMを合成し、これを用いることでHeLa細胞におけるヒスタミン刺激による細胞質Ca²⁺濃度変動の可視化に成功した(図5a-c)。一方、Rhod-2 AMは同様の実験を行った結果、ミトコンドリアにおけるCa²⁺濃度変動を可視化した(図5d-f)。また、CaTM-2 AMの生物学研究における更なる有用性を示すため、ラット脳スライス切片へと応用した結果、神経細胞の活動を発火に伴った細胞質Ca²⁺濃度変動として捉えることに成功した(図6)。このように、皮膚の生理機能の解明研究を含めた生命科学研究に有用なCa²⁺蛍光プローブの開発に成功した。

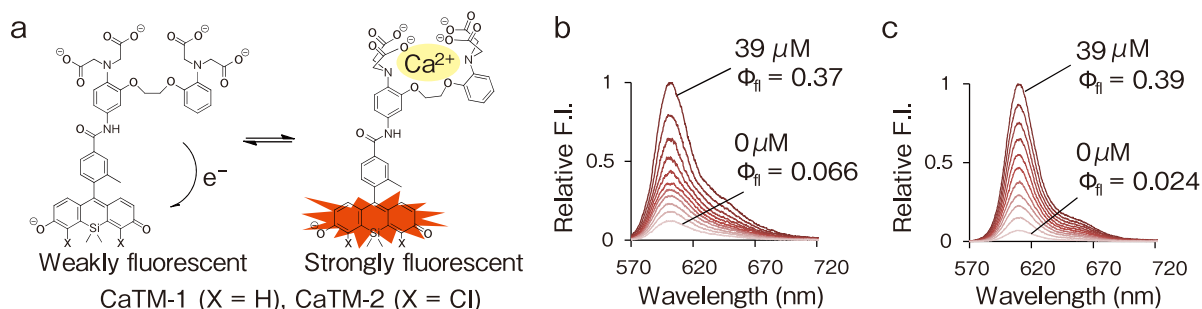


図4 (a) 新規赤色カルシウムプローブ CaTM-1 および CaTM-2 の分子構造と、Ca²⁺ が配位することによる蛍光強度変化の模式図。(b, c) CaTM-1 (b) および CaTM-2 (c) のCa²⁺ 依存的な蛍光スペクトル変化。励起波長は550 nm。

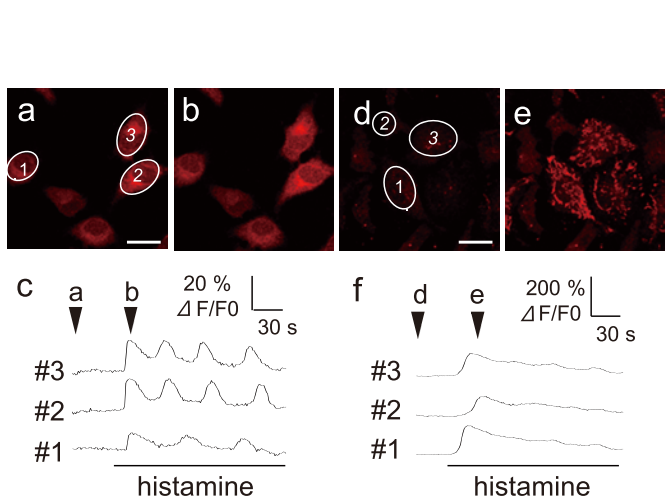


図5 (a-c) CaTM-2 AM を HeLa 細胞にロードし、ヒスタミン刺激を行った時の蛍光像 (a, b) および、蛍光強度の時間変化 (c)。(d-f) Rhod-2 AM を用いて (a-c) と同じ実験を行った結果。

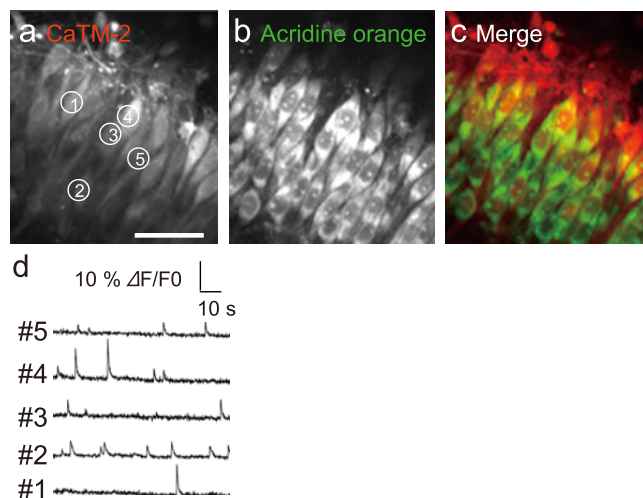


図6 CaTM-2 AM を用いたラット脳スライス切片における神経細胞の自然発火の可視化。(a-c) CaTM-2 (a)、細胞体を同定するために用いた Acridine orange の蛍光像 (b) および、重ね合わせた蛍光像 (c)。(d) CaTM-2 の蛍光強度変化。

3. 考察・総括

複数の蛍光プローブを同時に用いるマルチカラーイメージングは、複数の生体分子の同時解析や、細胞種、細胞内小器官など同定した上でのイメージングなどに有用とされる。同時に赤色領域の光は、低い自家蛍光および、高い生体組織の透過性など生体組織での蛍光イメージングに適している。また、蛍光プローブの蛍光団母核として汎用されているフルオレセインを、その分子構造の多くを保存したまま長波長化した新規赤色蛍光団TokyoMagentaは、今後、マルチカラーイメージングの可能性を大きく広げることが期待される。これまでに、 β -ガラクトシダーゼプローブ¹²⁾ および、カルシウムプローブ¹⁴⁾ の開発に成功しているが、これらの蛍光制御原理を用いることで、フルオレセインを母核とした他の緑色蛍光プローブも赤色領域にて再現できると考えている。今後、開発した赤色カルシウム蛍光プローブによって、皮膚の生理機構の解明が進展することを期待している。

(引用文献)

- 1) Egawa T, Hanaoka K, Koide Y, Ujita S, Takahashi N, Ikegaya Y, Matsuki N, Terai T, Ueno T, Komatsu T, Nagano T: Development of a far-red to near-infrared fluorescence probe for calcium ion and its application to multicolor neuronal imaging, *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 14157-14159, 2011.
- 2) Koide Y, Urano Y, Hanaoka K, Piao W, Kusakabe M, Saito N, Terai T, Okabe T, Nagano T: Development of NIR fluorescent dyes based on Si-rhodamine for in vivo imaging, *J. Am. Chem. Soc.*, 134, 5029-5031, 2012.
- 3) Kushida Y, Hanaoka K, Komatsu T, Terai T, Ueno T, Yoshida K, Uchiyama M, Nagano T: Red fluorescent scaffold for highly sensitive protease activity probes, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 22, 3908-3911, 2012.
- 4) Piao W, Tsuda S, Tanaka Y, Maeda S, Liu F, Takahashi S, Kushida Y, Komatsu T, Ueno T, Terai T, Nakazawa T, Uchiyama M, Morokuma K, Nagano T, Hanaoka K: Development of a new class of azo-based fluorescence probes to detect different levels of hypoxia, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 52, 13028-13032, 2013.
- 5) Goto M, Ikeyama K, Tsutsumi M, Denda S, Denda M: Calcium ion propagation in cultured keratinocytes and other cells in skin in response to hydraulic pressure stimulation, *J. Cell. Physiol.*, 224, 229-233, 2010.
- 6) Leiper LJ, Walczysko P, Kucerova R, Ou J, Shanley LJ, Lawson D, Forrester JV, McCaig CD, Zhao M, Collinson JM: The roles of calcium signaling and ERK1/2 phosphorylation in a Pax6^{+/-} mouse model of epithelial wound-healing delay, *BMC Biology*, 4, 27, 2006.
- 7) Denda M, Denda S: Air-exposed keratinocytes exhibited intracellular calcium oscillation, *Skin Res. Technol.*, 13, 195-201, 2007.
- 8) Kao JPY, Harootunian AT, Tsien RY: Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by fluo-3, *J. Biol. Chem.*, 264, 8179-8184, 1989.
- 9) Johnson I, Spence MTZ, Ed., *The Molecular Probes® Handbook: A guide to fluorescent probes and labeling technologies* 11th Ed., Molecular Probes, Inc., 2010.
- 10) Yamaguchi S, Tamao K: Silole-containing σ - and π -conjugated compounds, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 3693-3702, 1998.
- 11) Fu M, Xiao Y, Qian X, Zhao D, Xu Y: A design concept of long-wavelength fluorescent analogs of rhodamine dyes: replacement of oxygen with silicon atom, *Chem. Commun.*, 1780-1782, 2008.
- 12) Egawa T, Koide Y, Hanaoka K, Komatsu T, Terai T, Nagano T: Development of a fluorescein analogue, TokyoMagenta, as a novel scaffold for fluorescence probes in red region, *Chem. Commun.*, 47, 4162-4164, 2011.
- 13) Urano Y, Kamiya M, Kanda K, Ueno T, Hirose K, Nagano T: Evolution of fluorescein as a platform for finely tunable fluorescence probes, *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 4888-4894, 2005.
- 14) Egawa T, Hirabayashi K, Koide Y, Kobayashi C, Takahashi N, Mineno T, Terai T, Ueno T, Komatsu T, Ikegaya Y, Matsuki N, Nagano T, Hanaoka K: Red fluorescence probe for monitoring dynamics of cytoplasmic calcium ion, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 52, 3874-3877, 2013.

天然由来石鹼に含まれる脂肪酸によるTSLP産生とアレルギー誘発作用

東北大学大学院薬学研究科生活習慣病治療薬学分野

平澤 典保

Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) plays critical roles in the induction and exacerbation of allergic diseases. We found that medium-chain fatty acid such as nonanoic acid induced the production of TSLP in vivo. Nonanoic acid promoted sensitization to ovalbumin, resulting in an enhancement of the cutaneous anaphylactic response. In this report, we clarified that the exposure to nonanoic acid after the sensitization augmented picryl chloride-induced thickening of the ear, which was reversed in TSLP receptor-deficient mice. However, coconut oil, which includes medium-chain fatty acids, did not induce TSLP production. To clarify the molecular mechanisms by which free fatty acid induced TSLP production, mouse epithelium cell line PAM212 was used. We found that valeric acid potently induced TSLP production. Isovaleric acid but not the related compounds showed the activity. The agonists to GPR120, GPR84, GPR43 (FFA2R), GPR41 (FFA3R), and GPR40 were not induced TSLP production. PTX did not inhibit TPA-induced TSLP production but inhibited valeric acid-induced one. Valeric acid-induced TSLP production was inhibited by U0126 and TACP-1, suggesting that ERK and NF- κ B were involved in the production. These findings suggested that valeric acid induced TSLP production via G protein-coupled receptor and mediated by ERK and NF- κ B.

Conclusion: Low and medium-chain fatty acids have the activity to produce TSLP via unidentified receptors and TSLP exacerbated allergic inflammation. Although coconut oil shows no activity, our findings suggested that the natural soap, which includes medium-chain fatty acids, might be a risk to induce allergic dermatitis.

1. 緒言

近年、手湿疹など、アレルギー性の湿疹、皮膚炎が増加している。この原因の一つに、石鹼や化粧品に含まれる化学物質による影響が示唆されている。特に天然由来の石鹼には、界面活性作用による皮膚バリア機能の低下とともに、同時に含まれる種々の化学物質が免疫機能に影響を与える可能性がある。本研究では、特に天然油脂に多く含まれる低・中鎖脂肪酸のアレルギー誘発活性に着目した。

石鹼や化粧品などの化学的因子の影響を直接的に受ける細胞としては皮膚上皮細胞があげられる。上皮細胞はこれまで、バリア機能を担う細胞として認識されてきたが、近年では外的刺激に対してサイトカイン等の炎症性メディエーターを産生し、免疫応答の制御にも寄与する¹⁾ことが明らかとなり、アトピー性皮膚炎の病態への寄与が示唆されている²⁾。

Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) は、主に上皮細胞から産生される interleukin (IL)-7 様サイトカインである³⁾。産生された TSLP は TSLP 受容体を介して、未成熟な樹状細胞を活性化させて成熟樹状細胞へと分化させる。成熟樹状細胞はリンパ節に遊走し、naïve CD4⁺ T細胞を

IL-4、IL-5、IL-13などのTh2サイトカイン、tumor necrosis factor- α (TNF- α) などの炎症性サイトカインを産生する炎症性Th2細胞へと分化誘導し、さらに樹状細胞からの thymus and activation-regulated chemokine (TARC) および monocyte-derived chemokine (MDC) の産生を誘導することでTh2型のアレルギー反応を増強し⁴⁾、IgEの産生を高める。

アトピー性皮膚炎患者の病変部位⁵⁾や、重度の気管支喘息患者の気道上皮細胞⁶⁾では、TSLPが高発現しておりアレルギー疾患におけるTSLPの関与が示唆された。遺伝子組み換えマウスを用いた実験によって、皮膚に特異的なTSLPの過剰発現により湿疹、紅斑といったアトピー性皮膚炎様皮膚症状が自然発症する⁷⁾こと、またOVAを抗原としたアトピー性皮膚炎モデル⁸⁾や喘息モデル⁹⁾におけるアレルギー炎症はTSLP受容体欠損マウスにおいて顕著に抑制されることから、TSLPはアレルギー炎症において必要かつ十分なマスタースイッチとして働くと考えられている¹⁰⁾。

TSLPの誘導因子については、Toll like receptor (TLR) のリガンド、TNF- α やIL-4などのサイトカイン、タバコの煙 (Cigarette smoke extract) 等、さまざまな刺激因子が報告されているが、これらによるTSLP産生誘導メカニズムについてはいまだ不明な点が多い。また、これらの誘導因子に加えて、12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) や dibutyl phthalate といった化学物質もTSLP産生を誘導することが報告されている¹¹⁾。当研究室では、環境因子によるアレルギー増悪化の機序の一つとして、TSLPの関与を仮定し、身近に存在する化学物質によるTSLP産生を解



Effects of short- and medium-chain fatty acids on TSLP production and induction of allergy

Noriyasu Hirasawa

Laboratory of Pharmacotherapy of Lifestyle Related Diseases, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University

析した結果、*m*-xylene や 1, 2, 4-trimethylbenzene といったより身近な化合物が TSLP 産生を誘導する¹²⁾ ことを明らかにしている。特に、ヤシ油 (ココナツオイル) など天然由来石鹼等に多く含まれる低・中鎖脂肪酸に TSLP 産生を誘導する活性 (図 1)、更には外来蛋白質に対するアレルギーを増強する活性 (図 2) がある事を見いだした¹³⁾。そこで本研究では、低・中鎖脂肪酸の TSLP 産生誘導機構と、アレルギー誘発作用について、マウスのアレルギーモデル、ならびにマウスケラチノサイト細胞株の PAM212 細胞を用いて検討した。

2. 実験

2.1 マウス耳介塗布モデル

Balb/c 雄性マウスをジエチルエーテル麻酔し、耳介皮膚の表裏に種々の化合物計 20 μ l 塗布した。一定時間後、耳介皮膚組織を切り取った後、皮打ち抜きパンチ (直径 10mm) で一定面積を打ち抜き、耳介皮膚組織を電子天秤にて重量を測定した。耳介組織は、破砕用ビーズを用いて破砕した。遠心上清中の TSLP 量は Mouse TSLP DuoSet[®] ELISA を用いて測定した。また mRNA 測定のためには耳介組織 20–30mg を 5% Proteinase K 含有 RNAiso Plus 500 μ l 中で同様に破砕し、Real time PCR 法で解析した。

2.2 塩化ピクリルによるアレルギー性慢性皮膚炎様病態マウスの作製

C57BL/6 および TSLP 受容体欠損マウス (C57BL/6) を用いた。Cyclophosphamide 溶液 (30mg/ml) を 150mg/kg となるように腹部皮下に投与した。2 日後、マウスの右耳介皮膚に 7% (w/v) PiCl 溶液 50 μ l を表裏均等塗布することにより感作を行った。感作 5 日後と 10 日後に、感作を行った右耳介の表裏均等に nonanoic acid を 20 μ l 塗布

した。PiCl で感作を行って 12 日後、感作した右耳介皮膚表裏に 1% (w/v) PiCl 溶液 20 μ l を塗布することにより惹起を行った。その後経時的に耳介の厚さを測定した。

2.3 マウスケラチノサイト株 PAM212 細胞における TSLP 産生

PAM212 細胞を 10% FBS 含有 MEM α 中、 1×10^5 cells/ml になるように調製した。各濃度の阻害薬を添加して、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 存在下で任意の時間前処理した後、BSA 存在下各種濃度の fatty acid で刺激した。24 時間培養後、培養液上清中の TSLP を ELISA で測定した。細胞毒性は MTT 法で評価した。

3. 結果

3.1 PiCl 誘発性接触皮膚炎モデルにおける耳介浮腫に対する nonanoic acid の影響

Picryl chloride (PiCl) を抗原とした接触皮膚炎モデルにおいて、感作と惹起の間に nonanoic acid を塗布することで、惹起時の反応に対する影響を解析した。PiCl で感作を行い (day 0)、12 日後惹起を行った。その後、30 分、1 時間、2 時間、3 時間、6 時間、12 時間、24 時間後に耳介の厚さを計測した。各々の耳介の厚さから惹起前の厚さを引き、耳介皮膚の厚みの変化として表した。野生型 C57BL/6 マウスでは、惹起後に耳介肥厚がみられ、nonanoic acid を感作と惹起の間に 2 回塗布することで耳介肥厚が増強された (図 3A)。一方、TSLP 受容体欠損マウスにおいて、同様の実験を行った結果、惹起後の耳介肥厚はみられたが、nonanoic acid 塗布による耳介肥厚の増強作用は著しく減弱した (図 3B)¹³⁾。この結果から、nonanoic acid は PiCl による接触皮膚炎を増強すること、そしてこの作用は TSLP 産生を介していることが示唆された。

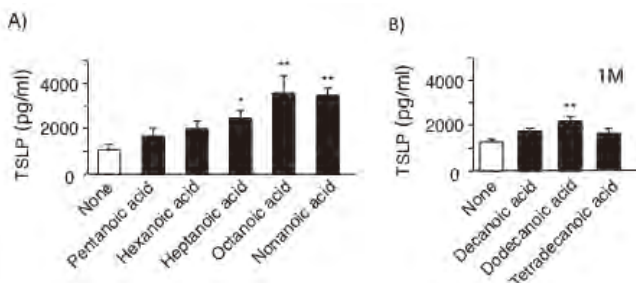


図 1 マウス耳介モデルにおける脂肪酸の TSLP 産生誘導活性¹³⁾
マウス耳介に各脂肪酸 20 μ l を塗布し、24 時間後の耳介組織ホモジネート中の TSLP 量を測定した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

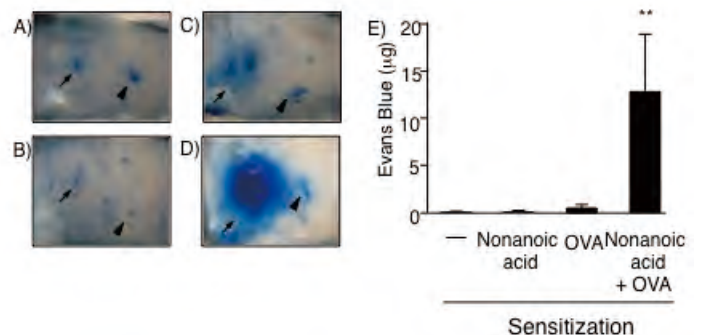


図 2 Nonanoic acid による外来蛋白質に対するアレルギー増強¹³⁾
BALB/c マウスに nonanoic acid (B, D) あるいは vehicle (A, C) を塗布し 24 時間後に同部位に ovalbumin (OVA) を皮内注射して感作した。9 日後、0.05% Evans blue 溶液を静脈内注射した後、vehicle (矢頭) および OVA 溶液 (矢印) を皮内注射した。30 分後、皮内に漏出した色素を抽出し定量した (E)。** $P < 0.01$

3.2 中鎖脂肪酸を含むココナツオイルの作用

中鎖脂肪酸を多く含む天然成分として、ヤシ油(ココナツオイル)が注目されている。ココナツオイルは炭素数12のラウリン酸などの中鎖脂肪酸を多く含み、天然由来石鹸等に用いられている。そこでまず、ココナツオイルをマウス耳介に塗布し、24時間後のTSLP産生を解析したが、TSLPの産生は認められなかった(data not shown)。

3.3 PAM212細胞におけるTSLP産生誘導

マウス耳介への脂肪酸刺激によりTSLP産生誘導がみられたことから、マウスケラチノサイト細胞株であるPAM212細胞を用いて、*in vitro*における短鎖および中鎖脂肪酸のTSLP産生誘導活性を解析した。PAM212細胞をBSA存在下各種脂肪酸で24時間刺激し、培養上清中TSLP濃度をELISAにより測定した。その結果、脂肪酸のTSLP産

生誘導活性には炭素数による違いがみられ、炭素数5のvaleric acidが最も強い活性を示した(図4)。またvaleric acidの類似化合物の活性について解析したところ、isovaleric acidには同程度のTSLP産生誘導活性が認められたが、pivalic acid、2-methyl butanoic acid、1-pentanol、2-pentanone、 γ -aminobutyric acid(図5)は2 mM濃度で活性は認められなかった。

3.4 ATPの作用

上皮細胞は物理的刺激によりATPを放出し。このATPがサイトカイン産生を誘導する可能性も報告されている。そこで、TSLP産生に物理的刺激により放出されるATPが関与しているかどうか明らかにするために、ATPのTSLP産生効果を検討した。その結果、ATPは1 mMまでの濃度範囲でTSLP産生を誘導しなかった(data not shown)。

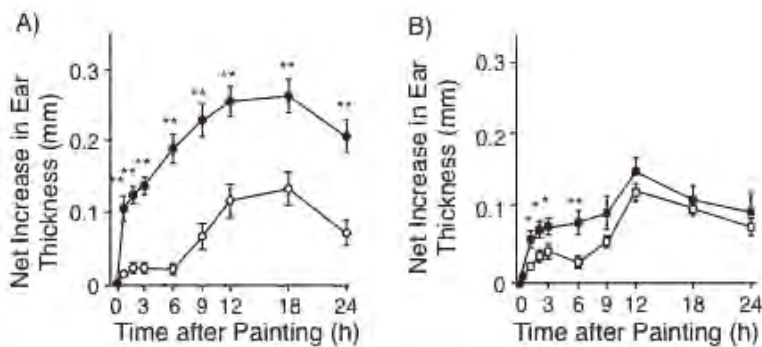


図3 Nonanoic acidによる塩化ピクリルによる接触アレルギーの増強¹³⁾
野生型マウス(A)あるいはTSLPR欠損マウスを2.2の方法で感作惹起した。感作と惹起の間(5日と10日)にnonanoic acid(黒丸)あるいはvehicle(白丸)を塗布した。惹起後経時的に耳介浮腫を計測した。
*P<0.05, **P<0.01

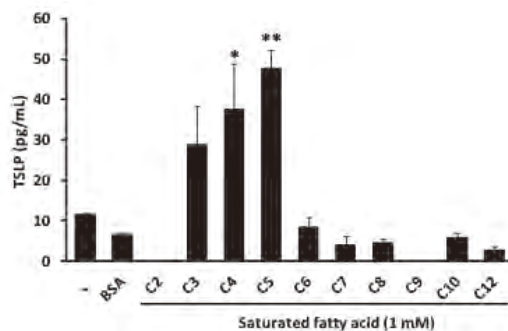


図4 PAM212細胞における脂肪酸によるTSLP産生
PAM212細胞を各炭素数の飽和脂肪酸1 mMで刺激し、24時間後の培養液上清中のTSLPを測定した。
*P<0.05, **P<0.01

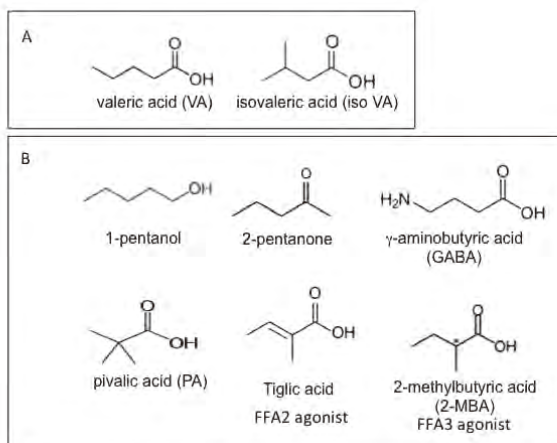


図5 Valeric acid類似構造化学物質
Valeric acidおよびisovaleric acid(A)にはTSLP誘導活性が見られたが、その他の化合物(B)には2 mMで活性は認められなかった。

3.5 G 蛋白質連関受容体 (GPCR) の関与

Valeric acid による TSLP 産生誘導メカニズムの解析にあたり、初めにこの反応が受容体を介する反応か否かについて明らかにするため、Gi タンパク質共役型 GPCR の関与の有無を検討した。百日咳毒素 (PTX) は G タンパク質の一つの Gi の α サブユニットを ADP リボシル化することで受容体との相互作用を阻害する。PAM212 細胞を 50, 100 nM の PTX で 1 時間前処理後、2 mM の valeric acid あるいは受容体を介さない刺激薬として 30 nM の 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) で刺激し、24 時間後の培養上清中 TSLP 濃度を ELISA により測定した。その結果、TPA による TSLP 産生は PTX の影響をほとんど受けないのに対し、Valeric acid による TSLP 産生は PTX の前処理により半分程度に抑制された (図 6)。この結果は、valeric acid の作用の少なくとも 1 部は GPCR を介したものであることを示唆している。

3.6 FFAR 関連の関与

これまで結果から、valeric acid の作用はカルボン酸が必要であること、受容体を介した作用であることが示唆されたため、次に中鎖-長鎖脂肪酸受容体 FFA1R (GPR40) および GPR120, 中鎖脂肪酸受容体 GPR84, 短鎖脂肪酸

FFA2R (GPR43) および FFA3R (GPR41) の関与を検討した。さらに上皮細胞の化学物質に対する核内受容体 AhR についても検討した。GPR84 のアゴニストである 3, 3'-diindolylmethane (DIM)、GPR40 のアゴニストである troglitazone、GPR40 および GPR120 のアゴニストである GW9508 はアゴニスト作用を十分発現する濃度 10 μ M まで TSLP 産生を誘導しなかった (data not shown)。また FFA2R アゴニストである tiglic acid、FFA3R アゴニストである 2-methylbutyric acid は valeric acid とおなじ 2 mM でも TSLP 産生を誘導しなかった。さらに PAM212 細胞を AhR のアゴニストである β -naphthoflavone (BNF) で刺激した場合にも TSLP 産生は増加しなかった (data not shown)。

3.7 TSLP 産生誘導シグナル

TSLP 産生誘導に関与する細胞内シグナルの同定のために、各種阻害薬の効果を検討した。PAM212 細胞を MEK 阻害薬の U0126 (1 μ M)、p38 阻害薬の SB203580 (10 μ M)、JNK 阻害薬の SP600125 (30 μ M)、PI3K 阻害薬の wortmannin (100 nM) で 1 時間前処理後、2 mM の valeric acid で刺激し、24 時間後の培養上清中 TSLP 濃度を ELISA により測定した。その結果、U0126 の前処理によってのみ、valeric acid による TSLP 産生は抑制された (図 7)。また、

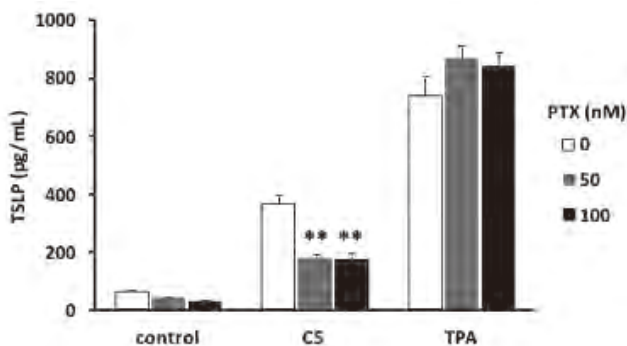


図 6 百日咳毒素の作用

百日咳毒素 50, 100 nM で 16 時間処理した後、valeric acid (C5) あるいは TPA で刺激し、24 時間後の培養液上清中の TSLP 量を測定した。**P<0.01

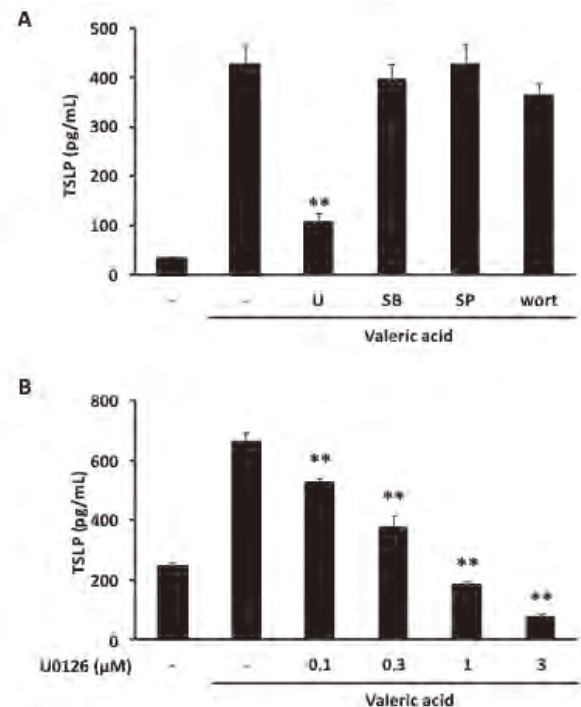


図 7 Valeric acid による TSLP 産生に対する各種阻害薬の効果

PAM212 細胞を U0126 (U, 1 μ M), SB203580 (SB, 10 μ M), SP600125 (SP, 30 μ M), および wortmannin (wort, 100 nM) (A) あるいは各濃度の U0126 (B) で 1 時間処理した後、valeric acid 2 mM で刺激し、24 時間後の培養液上清中の TSLP 量を測定した。**P<0.01

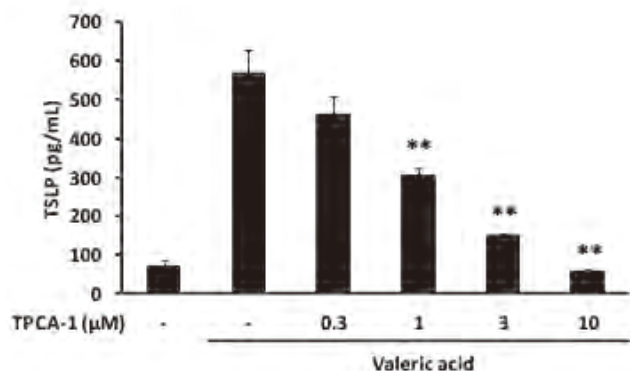


図8 Valeric acidによるTSLP産生におけるNF-κBの関与
各濃度のTPCA-1で1時間前処理したち、valeric acid 2 mMで刺激し、24時間後の培養液上清中のTSLP量を測定した。
**P<0.01

I-κB kinase-2 阻害薬のTPCA-1 (0.3, 1, 3, 10 μM) も、valeric acidによるTSLP産生を濃度依存的に抑制し、NF-κBが関与している事が示唆された(図8)。

4. 考 察

石鹸は脂肪酸のナトリウム塩あるいはカリウム塩が主成分となり、天然油脂として牛脂、ヤシ油(ココナツオイル)などが加えられることがある。ヤシ油には炭素数12のラウリン酸などの中鎖脂肪酸が多く含まれている。炭素数が少ない脂肪酸で作った石鹸は親水性が強いが親油性が弱い。今回、マウス耳介塗布モデルでは炭素数9のnonanoic acidが最も強い活性を、またPAM212細胞を用いた系では炭素数5のvaleric acidが最も強い活性を示したが、これは組織浸透性や培地への溶解性に基づくものであると考えられる。いずれの場合も、カルボン酸である事が必要で、アルデヒドやアルコール、ケトンでは活性が認められなかった。これまでマウス耳介において、TSLP産生を誘導することが明らかになっているnonanoic acidは外来抗原に対するIgE抗体産生を増大させるだけでなく、今回、接触抗原による皮膚アレルギーも増強する事が明らかになった。

低・中鎖脂肪酸の作用機構を明らかにするためにPAM212細胞を用いて解析した。最も活性が強かったものは炭素数5のvaleric acidおよびisovaleric acidであった。Isovaleric acidは足などの臭いの原因化合物である。類似化合物、ならびにこれまで明らかになっている脂肪酸受容体アゴニストはいずれもTSLP産生を誘導しないこと、GPCRを介する事、物理的的刺激で放出されるATPにも活性が認められない事から、脂肪酸は未同定の受容体に作用している可能性が示唆された。化学構造のわずかな相違により活性が大きく異なる事から、特異性の高い受容体を介しているものと推測される。各種阻害剤の効果を検討した結果、PKC、ERKならびにNF-κBの活性化が関与してい

る事が示唆された。

一方、中鎖脂肪酸が多く含まれるとされるココナツオイルをマウス耳介に塗布してもTSLP産生活性は認められなかった。したがって、通常の状態では、ココナツオイルが添加されても、アレルギー誘発のリスクはさほど大きくないと考えられる。これは中鎖脂肪酸がグリセロールにエステル化されているためであること、あるいは濃度が活性を示すまでに達していない事が考えられるが、感染等、付加的な環境要因が加わると加水分解等により中鎖脂肪酸濃度が充進して、アレルギーを増幅する可能性は否定できない。石鹸は、皮膚バリア機能を低下させるため、外来抗原の侵入を促進する可能性がある。「茶のしずく」のように、蛋白成分が石鹸に含まれる場合には抗原の侵入が容易になるとともに、石鹸成分の脂肪酸がTSLP産生を増大させて、アレルギーを増大させる可能性も考えられる。

5. 総 括

本研究により、天然油脂に多く含まれる低・中鎖脂肪酸には、皮膚上皮細胞において、TSLP産生をしめすことが明らかになり、これらの成分を含む石鹸、化粧品にはアレルギー誘発のリスクがある事が示唆された。そのリスクは大きいものではないと考えられるが、今後新しい製品を開発する上では、TSLP産生について評価する事が望まれる。脂肪酸の受容機構は、GPCRが関与している事が示唆されたが、その同定にはいたらなかった。今後更に、上皮細胞の化学物質受容機構について解析を加える予定である。

(引用文献)

- 1) Esche C, De Benedetto A, and Beck L: Keratinocytes in atopic dermatitis: inflammatory signals. *Cur. allergy asthma reports* 4, 276-284, 2004.
- 2) Holgate ST: The epithelium takes centre stage in asthma and atopic dermatitis. *Trends Immunol* 28, 248-251, 2007.
- 3) Ray R.J, Furlonger C, Williams DE, Paige CJ: Characterization of thymic stromal-derived lymphopoietin (TSLP) in murine B cell development in vitro. *Eur. J. Immunol* 26, 10-16, 1996.
- 4) Liu Y-J: Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation. *J. Exp. Med.* 203, 269-273, 2006.
- 5) Soumelis V, *et al.*: Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nature Immunol.* 3, 673-680, 2002.
- 6) Ying S, *et al.*: Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting

- chemokines and disease severity. *J. Immunol.* 174, 8183–8190, 2005.
- 7) Yoo J, *et al.* : Spontaneous atopic dermatitis in mice expressing an inducible thymic stromal lymphopoietin transgene specifically in the skin. *J. Exp. Med.* 202, 541–549, 2005.
- 8) He R, *et al.* : TSLP acts on infiltrating effector T cells to drive allergic skin inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 11875–11880, 2008.
- 9) Al-Shami A, Spolski R, Kelly J, Keane-Myers A, Leonard WJ: A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model. *J. Exp. Med.* 202, 829–839, 2005.
- 10) Harada M, *et al.* : Thymic stromal lymphopoietin gene promoter polymorphisms are associated with susceptibility to bronchial asthma. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 44, 787–793, 2011.
- 11) Segawa R, Hirasawa N: Exacerbation of allergic diseases by chemical s: roles of thymic stromal lymphopoietin. *J. Pharmacol. Sci.* 2015, in press
- 12) Satou N, *et al.* : Induction of thymic stromal lymphopoietin production by xylene and exacerbation of picryl chloride-induced allergic inflammation in mice. *Int. Archs Allergy Immunol.* 157, 194–201, 2012.
- 13) Yamashita S, Segawa R, Satou N, Hiratsuka M, Leonard WJ, Hirasawa N: Induction of thymic stromal lymphopoietin production by nonanoic acid and exacerbation of allergic inflammation in mice *Allergol. Int.* 62, 463-371, 2013.

化粧品向けナノ粒子の安全性評価を目的とした *in vitro*スクリーニングシステムの構築 —物理・化学的性状と安全性との関連—

産業医科大学産業生態科学研究所

堀江 祐範

Nanoparticles, particularly TiO₂, ZnO and SiO₂ are frequently used for cosmetics such as foundation and sunscreen. Although the nanoparticles are useful materials for cosmetics, toxic effect are also reported. In the present study, cellular influences of TiO₂, ZnO and SiO₂ nanoparticles were examined. ZnO nanoparticles showed strong cytotoxicity on human keratinocyte HaCaT cells. ZnO nanoparticles also caused oxidative stress, induction of cytokines and cell membrane damage. On the other hand, cellular effect of TiO₂ and SiO₂ nanoparticles were small. Zn²⁺ released from ZnO nanoparticles was most important factor for cytotoxicity of the ZnO nanoparticles. Gene expression of metallothionein (MT) was enhanced by ZnO nanoparticle exposure in HaCaT cells and 3D skin model. ZnO nanoparticles caused induction of cytokines on 3D skin models. These results suggest that ZnO nanoparticles have cytotoxic potential. And the MT gene expression may be promising biomarker for toxic effect of nanoparticles on cosmetics.

1. 緒言

ナノ粒子は、直径が1–100nmの範囲にある粒子と定義される (ISO/TS 27687:2008)。粒径が微小であるナノ粒子は光の散乱が小さく、ファンデーションや日焼け止めなどに配合し肌に塗布した場合に滑らかに肌になじみ、いわゆる粉っぽさを生じないことや、紫外線吸収効果など化粧品として有用な機能をもつ。ナノ粒子のなかでも、従来から化粧品材料として利用されてきた二酸化チタン (TiO₂) や酸化亜鉛 (ZnO)、二酸化ケイ素 (SiO₂) のナノ粒子は、さらなる機能付加の余地もある有望な化粧品材料である。一方で、ナノ粒子には毒性を含む生体影響も報告されている。ナノ粒子による生体影響を細胞レベルで見ると、多くの場合酸化ストレスを生じる。酸化ストレスにより細胞の抗酸化系が活性化されるが、抑制しきれない場合にはアポトーシスやネクローシスによる細胞死に至る。これらナノ粒子の細胞影響因子として、ナノ粒子からの金属イオンの溶出が最も重要である。ナノ粒子の特徴の一つに「溶けやすい」ことが挙げられる。従来不溶性とされてきた物質でも、ナノ粒子とすることで大きな溶解性を示す場合がある¹⁾。例えば、皮膚に塗布されたナノ粒子が、「金属イオンの供給源」として持続的に金属イオンを溶出し、皮膚細胞に対して影響を及ぼすかもしれない。一方ですべてのナノ粒子が大きな溶解性を示すわけではなく、ナノダイヤモンドなど「溶けない」ナノ粒子の細胞影響は小さい²⁾。そこで、

ナノ粒子の生体影響においては、粒子投与による細胞応答と共に、溶解性の把握が重要である。化粧品におけるナノ粒子の利用では、皮膚への塗布が最も主要な曝露ルートである。皮膚は表皮のバリアが存在するが、ナノ粒子と細胞とが直接出会う機会が考えられることから、化粧品に利用されるナノ粒子の細胞影響の把握は、より有効な利用のために必須である。本研究では、化粧品に多く用いられるナノ粒子のうち、TiO₂、ZnO、SiO₂について特に溶解性に着目して細胞影響を検討した。さらに、皮膚3次元モデルを用い、より実際の皮膚に近い状態での実験も行い、ナノ粒子の影響を推測する有効なマーカーを検討した。

2. 実験

2.1 細胞および皮膚3次元モデル

ヒトケラチノサイト由来HaCaT細胞 (German Cancer Research Centerより入手) を用いた。HaCaT細胞は10%ウシ胎児血清 (FBS) 添加ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) 中で、5% CO₂条件下、37℃で培養した。コラーゲンビトリゲルはAGCテクノグラスから購入し、取扱説明書に従って片面にHaCaT細胞を10% FBS添加DMEM中、2×10⁵個/mlの濃度で植え、培養した。皮膚3次元モデルとして、EPI-200SITを倉敷紡績 (大阪) から購入し、取扱説明書に従い使用した。培地はEPI-100-NMM-SIT/Assay Medium (MatTek Corporation) を用いた。

2.2 ナノ粒子

本研究では5種類のナノ粒子を使用した。TiO₂は水酸化アルミニウム (Al (OH)₃) によって処理された化粧品グレードのルチル型ナノ粒子を用いた。また、ZnOナノ粒子を石原産業 (大阪) より購入した。SiO₂コーティング ZnOナノ粒子は、昭和電工より購入した。SiO₂ナノ粒子



Safety evaluation of nanoparticles used for cosmetics; Association of physical/chemical properties and safety

Masanori Horie

Institute of Industrial Ecological Sciences, University of Occupational and Environmental Health, Japan

は電気化学工業より購入した。これらのナノ粒子の一次粒子径・比表面積等の物性を表1に示す。以下、各粒子は表1に示した略号で表記する。培養上清中の Zn^{2+} 濃度は、先の報告³⁾と同様に2-(5-Bromo-2-pyridylazo)-5-[N-n-propyl-N-(3-sulfopropyl) amino] phenol, disodium salt, dihydrate (5-Br-PAPS)を用いた比色法によって測定した。各培地中での溶解度の測定は以下の様に行った。ZnOおよびZnO-Sをそれぞれ1.0および10mg/mlの濃度で蒸留水、DMEM (FBSを含まない)、10% FBS添加DMEMおよびEPI-100-NMM-SIT/Assay Medium中に2分間の超音波処理後、37°Cで6時間保持した。その後、13000rpmで10分間の遠心後、上清をNanosep Centrifugal Devices 3K (Pall Life Sciences)を用いた限外ろ過によって粒子を除去した。通過液について、 Zn^{2+} 濃度を測定した。先行研究により、本研究で用いたTiO₂およびSiO₂は培地中ではほとんど溶解しないことを確認している⁴⁾。

2.3 ナノ粒子分散液の調製

ナノ粒子は、使用前に180°C、2時間の乾熱滅菌を行った。マイクロプレート及びビトリゲルを用いた試験では、ナノ粒子粉末を、滅菌した50ml容ガラス瓶中、1.0mg/mlウシ血清アルブミン (BSA, ナカライテスク) 水溶液中に10mg/mlの濃度となるように懸濁し、超音波槽 (Bioruptor, コスモバイオ) 内で2分超音波処理を行って分散した。その後、10% FBS添加DMEMでマイクロプレート用は1.0mg/mlおよび0.1mg/ml、ビトリゲル用は1mg/3mlとなるように希釈した。ビトリゲル上部には300 μ l (約100 μ gのZnOとなる)、下部には2mlの分散液を投与した。皮膚3次元モデルによる試験では、ナノ粒子超音波処理後の分散液をPBSで10倍及び100倍希釈し、50 μ lずつ皮膚モデル上に添加した。また、粉体として10mgのナノ粒子を皮膚モデル上に添加し、37°Cで24時間培養した。

2.4 細胞膜損傷の測定

培養上清へのLDH漏出の測定により、細胞膜損傷を評

価した。12穴マルチウェルプレートに細胞を 2×10^5 個/mlで植え、37°Cで一晩培養しウェル底面に接着させた。6時間および24時間培養した後に、上清を回収した。ビトリゲルでは、細胞側の培地を回収した。皮膚3次元モデルでも培養液を回収した。これらの培養液を13000rpm、5分の遠心し、大部分の粒子を除去したのち、LDH活性を測定した。LDH活性の測定は、細胞障害性検出キットPLUS (LDH) (ロシュダイアグノスティクス)を用い、プロトコルに従って行った。マイクロプレート、ビトリゲルによる試験では、漏出LDHは下記の式により算出した。

$$\text{細胞毒性 (\%)} = \frac{(\text{陽性対照の吸光度} - \text{陰性対照の吸光度})}{(\text{サンプルの吸光度} - \text{陰性対照の吸光度})}$$

ここで陰性対照は非投与細胞の吸光度、陽性対照はキット添付の細胞溶解液で強制的に溶解させた細胞の吸光度とする。皮膚3次元モデルではウサギ筋肉由来LDH (オリエンタル酵母) によって検量線を作成し、漏出したLDH活性を測定した。

2.5 細胞内ROSレベルの測定

細胞内ROSレベルの測定はDCFH法により行った。6穴マルチプレートまたはビトリゲル上に培養したHaCaT細胞の培養液をナノ粒子分散液に交換し、6時間および24時間培養した。その後分散液を除去し、10 μ Mの2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)を含むFBS非添加DMEMを1ml/well添加、37°C、5% CO₂条件下で30分インキュベートした。PBSで1回洗浄し、0.25%トリプシン処理により細胞を回収した。細胞をPBSで1回洗浄し、再度細胞を500 μ lのPBSに懸濁し、フローサイトメーター (ソニー EC 800セルアナライザー) で蛍光強度を測定した。

2.6 ヘムオキシゲナーゼ(HO-1)、メタロチオネイン(MT)およびサイトカインの測定

6穴マルチウェルプレートに細胞を 2×10^5 個/mlで植え、37°Cで一晩培養しウェル底面に接着させた。培養上清をナ

表1 本研究に用いたナノ粒子の物性

本報告における略号	物質	組成式	表面処理	純度* (%)	一次粒子径* (nm)	比表面積* (m ² /g)
TiO ₂	二酸化チタン	TiO ₂	Al(OH) ₃	96.3	30-50	37.1
ZnO	酸化亜鉛	ZnO	なし	97.4	21	49.6
ZnO-S			SiO ₂	ZnO: 80 SiO ₂ : 20	25 (SiO ₂ : 3)	ND
SiO ₂	二酸化ケイ素	SiO ₂	なし	ND	34	80

*メーカー値による

ノ粒子分散液に交換し、24時間培養した後に上清を回収し Human IL-6およびIL-8 ELISA Ready-SET-Go!® (eBioscience) を用いて上清中のIL-6およびIL-8濃度をELISA法により測定した。細胞からは、RNeasy kit (キアゲン) を用いてRNAを抽出した。RNAはHigh Capacity cDNA Revers Transcription kit (Applied biosystems) によりcDNAとしたのち、TaqMan® Gene Expression Assays (Applied biosystems) を用いたりリアルタイムPCR法によりHO-1, MT, IL-6およびIL-8遺伝子の発現を解析した。標的遺伝子のTaqMan®プロブはApplied biosystemsから購入した。Assay IDを以下に示す。MT1H: Hs00823168_g1, MT2A: Hs02379661_g1, HO-1: Hs01110250_m1, IL-6: Hs00985639_m1, IL-8: Hs00174103_m1, IL-1β: Hs01555410_m1, IL-12B: Hs01011518_m1。

3. 結果

3.1 マルチウェルプレートによる試験

はじめに、マルチウェルプレート上に培養したHaCaT細胞を用いて試験を行った。

3.1.1 細胞膜損傷

TiO₂、ZnO、SiO₂ ナノ粒子を10および100μg/mlの濃度で培地に分散し、ヒトケラチノサイトHaCaT細胞に投与、6時間および24時間後に培養上清に漏出したLDH活性を測定した(図1)。細胞内酵素であるLDHの培養上清への漏出は、細胞膜の損傷を示唆する。この結果、投与6時間後では顕著な細胞膜の損傷は認められなかった。投与24時間後では、ZnOおよびZnO-Sで顕著な細胞膜の損傷が認められた。細胞内の全LDH活性を100%としたとき、24時間後においてTiO₂投与群(100μg/ml)の培養上清中のLDH活性が3.0%であったのに対し、ZnO投与群では75.2%、ZnO-S投与群では85.3%であった。また、SiO₂では21.9%であった。

3.1.2 酸化ストレスの誘導

多くの場合、ナノ粒子の細胞影響には酸化ストレスが関与する⁵⁾ ことから、ナノ粒子投与細胞における細胞内活性酸素種(ROS)を測定した(図2A)。投与6時間の細胞内ROSレベルは、100μg/mlのZnOおよびZnO-S投与群において非投与細胞の1.6~2倍程度の上昇を示した。TiO₂でも1.2倍程度の若干の上昇が認められた。SiO₂投与細胞では、細胞内ROSレベルの上昇は認められなかった。一方、投与24時間後においては、いずれのナノ粒子でも細胞内ROSレベルの上昇は認められなかった(100μg/mlのZnOおよびZnO-S投与群では、細胞の損傷が激しく、正確な測定を行うことができなかった)。さらに、ナノ粒子投与細胞におけるヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)の遺伝子発現レベルを検討した(図2B)。HO-1は抗酸化に機能する酵素で、その遺伝子発現はROS産生などの酸化ストレスに鋭敏に反応する。なお粒子投与24時間後のHO-1の発現レベルは、100μg/mlのZnOおよびZnO-S投与群において著しく上昇した。遺伝子発現レベルはZnOで非投与細胞の64倍、ZnO-Sで215倍であった。一方、10μg/mlのZnOおよびZnO-S投与群では、それぞれ1.3および1.2倍であった。SiO₂ではいずれの濃度においても1.2倍程度の上昇が認められた。TiO₂では発現上昇は認められなかった。ZnOによる細胞影響には、溶出したZn²⁺が関与しているとの報告があることから、水溶性のZnCl₂を投与した細胞でもHO-1の発現レベルを検討した。この結果、濃度依存的なHO-1遺伝子の発現上昇が認められた。発現レベルは、Zn²⁺濃度として10、30および50μg/mlのとき、それぞれ非投与細胞の約16、46および31倍であった。

3.1.3 サイトカイン産生

ナノ粒子投与細胞について、IL-1β、IL-8およびIL-12の遺伝子発現を検討した。IL-1β遺伝子の発現は、TiO₂、ZnOおよびSiO₂を投与した細胞で有意に増加した(図

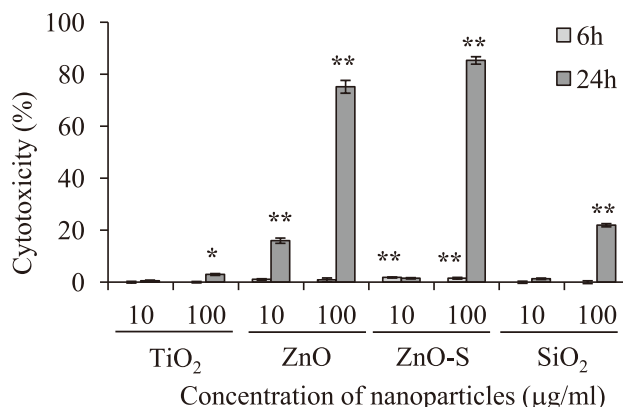


図1 ナノ粒子の細胞膜に対する影響
各ナノ粒子を10および100μg/mlの濃度でHaCaT細胞に投与し、24時間後に培養上清中のLDH活性を測定した。**p*< 0.05, ***p*< 0.01 (vs 非投与細胞, ANOVA, Dunnett)

3A)。IL-8遺伝子の発現は、100 μg/mlのZnOおよびZnO-Sを投与した細胞でそれぞれ非投与細胞の3.6および4.8倍上昇した。TiO₂およびSiO₂ではIL-8遺伝子の発現上昇は見られなかった。IL-12の発現上昇はいずれのナノ粒子の投与によっても上昇しなかった。ZnCl₂の投与では、Zn²⁺が10 μg/mlの濃度でIL-1β、IL-8、IL-12すべての遺伝子発現が上昇した。これらの遺伝子発現にZn²⁺濃度依存性は見られなかった。さらに、ELISA法により培養上清中のIL-8およびIL-1βタンパク質の濃度を測定したところ、ZnOおよびZnO-Sの投与により有意に上昇した(図3B)。また、上清中のIL-1βの濃度はいずれの投与群においても検出限界近くであり、ほとんど検出することができなかった。

3.1.4 亜鉛イオンの溶出

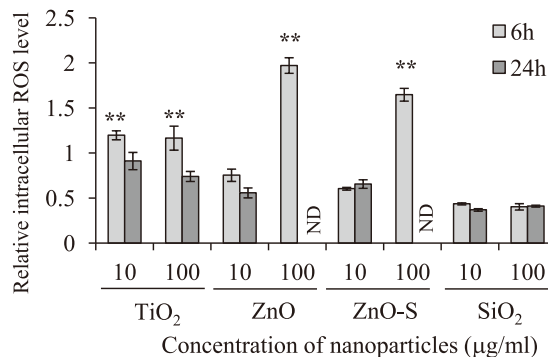
ZnOナノ粒子の細胞影響には、ZnOナノ粒子から溶出したZn²⁺が関与していることが知られている⁶⁾。ZnOおよびZnO-Sについて、蒸留水および本研究で用いた2種類の培地中でのZn²⁺の溶出を検討した。37℃で6時間保持した後、液中に溶出したZn²⁺濃度を測定したところ、液中のZn²⁺濃度は分散媒により著しく異なった(図4A)。蒸留水中よりも、培地中でより多くのZn²⁺が溶出した。

ZnOナノ粒子で強い細胞毒性が認められたことから、分散液中のZn²⁺濃度を測定した。その結果、細胞への投与24時間後の培養上清中でZn²⁺の溶出が認められた。ZnOおよびZnO-Sについて、培養上清中のZn²⁺濃度は、ZnO 10 μg/ml : 3.5 μg/ml、ZnO 100 μg/ml : 2.6 μg/ml、ZnO-S 10 μg/ml : 11.1 μg/ml、ZnO-S 100 μg/ml : 7.2 μg/mlであった。さらに、ナノ粒子投与細胞において、CuやCd、Znなどの金属イオンに反応し、金属毒性と酸化ストレスに働くメタロチオネイン1 (MT1) 遺伝子の発現を検討した(図4B)。この結果、ZnOおよびZnO-S投与細胞において有意なMT1の発現上昇を認めた。これらの結果は、ZnOおよびZnO-Sによる細胞影響が、Zn²⁺の溶出による可能性を示した。

3.2 ビトリゲル

試験に供したナノ粒子のうちZnOで強い細胞影響が認められたこと、また溶出したZn²⁺が細胞影響に関与していることが示唆されたことから、さらにZnOナノ粒子から溶出したZn²⁺が結合組織に浸透することによる影響を検討した。結合組織のモデルとしてコラーゲンビトリゲルを用いた。ビトリゲル上にHaCaT細胞を培養し、ビトリゲル

(A) 細胞内 ROS レベル



(B) HO-1 遺伝子発現

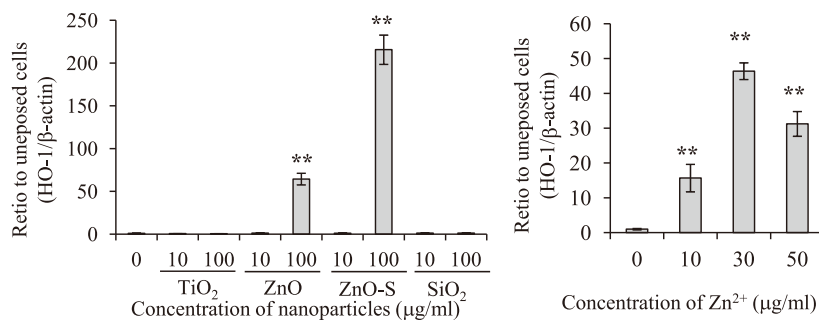
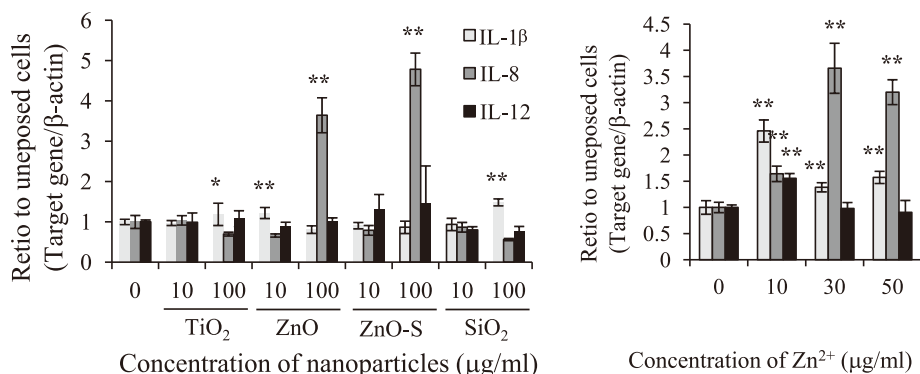


図2 ナノ粒子の細胞内酸化ストレスに対する影響

(A) 細胞内 ROS レベル。(B) HO-1 遺伝子発現。各ナノ粒子を 10 および 100 μg/ml の濃度で HaCaT 細胞に投与し、6 時間または 24 時間後に細胞内 ROS および HO-1 遺伝子発現を測定した。10, 30, 50 μg/ml の Zn²⁺ を含む ZnCl₂ 溶液でも同様の試験を行った。値は非投与細胞を 1 としたときの相対値として示した。**p<0.01 (vs 非投与細胞, ANOVA, Dunnett)

(A) サイトカイン遺伝子発現



(B) 上清中 IL-8 タンパク質濃度

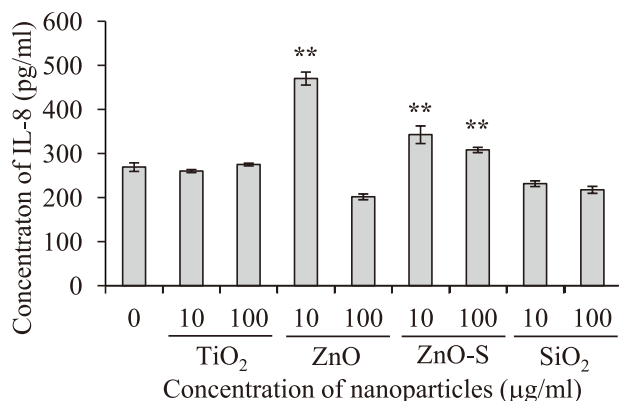
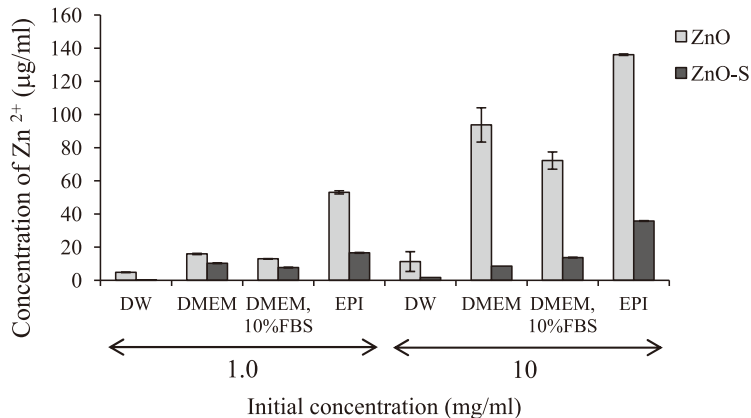


図3 ナノ粒子のサイトカイン遺伝子発現に対する影響

(A) サイトカイン遺伝子発現。(B) 培養上清中 IL-8 タンパク質濃度。各ナノ粒子を 10 および 100 μ g/ml の濃度で HaCaT 細胞に投与した。24 時間後に遺伝子発現及びタンパク質濃度を測定した。 $**p < 0.01$ (vs 非投与細胞, ANOVA, Dunnett)

A



B

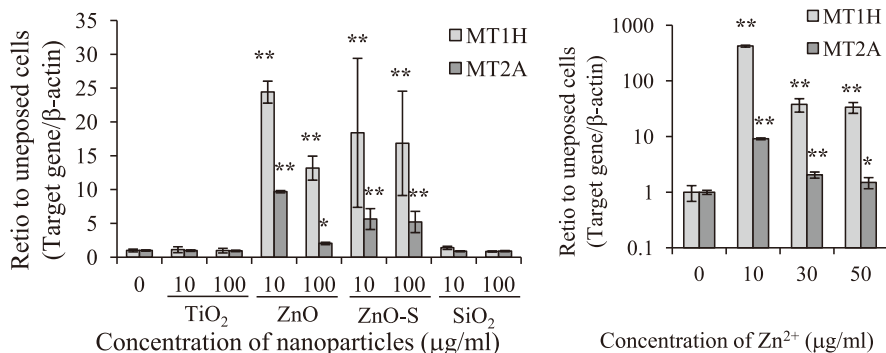


図4 ナノ粒子の細胞影響における亜鉛イオンの影響

(A) 酸化亜鉛ナノ粒子からの Zn²⁺ の溶出。ZnO および ZnO-S をそれぞれ 1.0 および 10mg/ml の濃度で蒸留水 (DW)、DMEM (FBS を含まない)、10% FBS 添加 DMEM および EPI-100-NMM-SIT 培地中に分散し、37°C で 6 時間保持した後、液中に溶出した Zn²⁺ 濃度を測定した。(B) ナノ粒子のメタロチオネイン遺伝子発現。各ナノ粒子を 10 および 100 μ g/ml の濃度で HaCaT 細胞に投与した。24 時間後に遺伝子発現及びタンパク質濃度を測定した。値は非投与細胞を 1 としたときの相対値として示した。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ (vs 非投与細胞, ANOVA, Dunnett)

ルの上部あるいは下部に ZnO 分散液を投与し、HaCaT 細胞に与える影響を検討した。投与の概要と略称を図 5 に示す。

3.2.1 亜鉛イオンの溶出

投与時の ZnO 分散液 (ZnO 濃度 1 mg/ 3 ml) 中の Zn²⁺ 濃度は、9.0 μg/ml であった。ZnO/DMEM におけるビトリゲル上部及び下部の Zn²⁺ 濃度は、それぞれ 4.1 μg/ml および 2.9 μg/ml であった。DMEM/ZnO では、ビトリゲル上部及び下部の Zn²⁺ 濃度は、それぞれ 9.5 μg/ml および 7.6 μg/ml であった (図 6)。分散液投与 24 時間後の細胞内のメタロチオネイン遺伝子の発現は、MT1A、MT2A とともに ZnO/DMEM および DMEM/ZnO 双方で非投与細胞の約 3~6 および 10 倍に増加した (図 7)。

3.2.2 細胞膜損傷

ZnO/DMEM では培地への LDH 漏出は若干の増加傾向にあったが、有意差は認められなかった。DMEM/ZnO では、培地中への LDH 漏出は有意に上昇した (図 8)。

3.2.3 酸化ストレス

ZnO 投与細胞の細胞内 ROS レベルは、24 時間後で非投与細胞に対し ZnO/DMEM で約 1.5 倍、DMEM/ZnO で約

4.7 倍増加した (図 9A)。HO-1 遺伝子の発現は ZnO/DMEM では非投与細胞に対し 1.6 倍上昇した有意差は認められなかった (図 9B)。DMEM/ZnO では非投与細胞に対し 85 倍上昇した。

3.2.4 サイトカイン

ZnO/DMEM および DMEM/ZnO 双方で培地中への IL-8 の分泌が認められた (図 10)。さらに、DMEM/ZnO では IL-6 の分泌も認められた。これらのサイトカインについて、

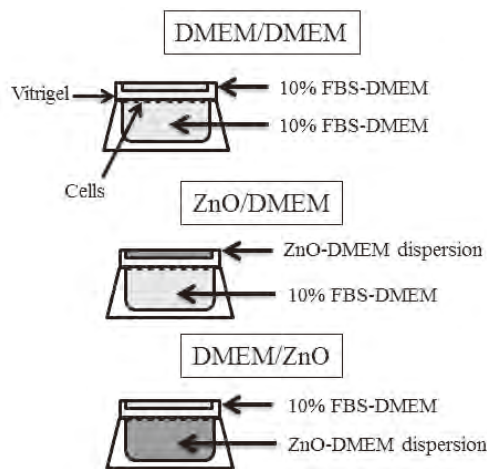


図 5 ビトリゲルを用いた ZnO ナノ粒子の投与実験の概要

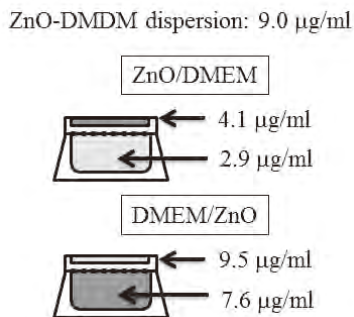
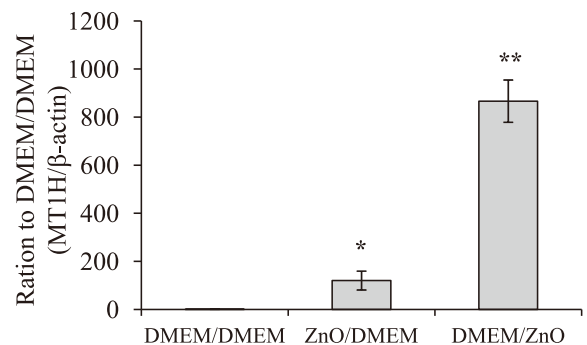
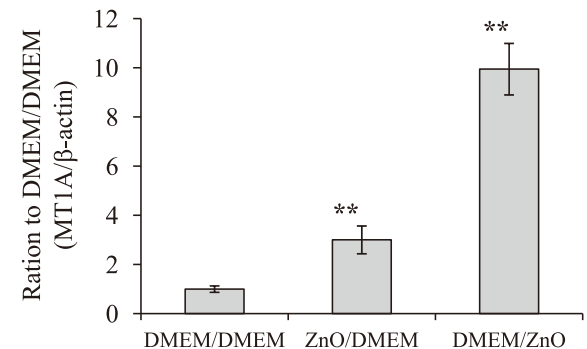


図 6 ZnO ナノ粒子を投与したビトリゲルにおける Zn²⁺ 濃度

MT1H



MT1A



MT2A

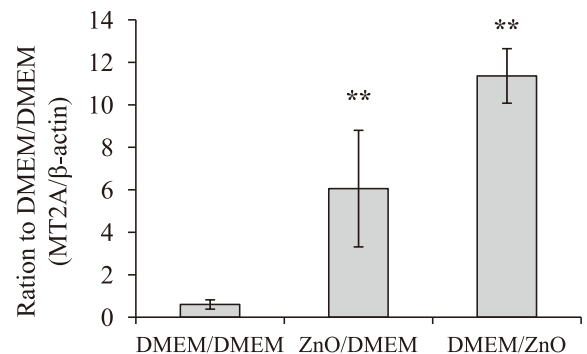


図 7 ナノ粒子のメタロチオネイン遺伝子発現に対する影響 (ビトリゲル) 投与 24 時間後に測定。**p*<0.05, ***p*<0.01 (vs 非投与細胞, ANOVA, Dunnett)

遺伝子発現を検討したところ、いずれも DMEM/ZnO で発現の上昇が認められた。ZnO/DMEM では発現の上昇は見られなかった。また、DMEM/ZnO では IL-1 β および IL-12 遺伝子発現が有意に上昇した。

3.3 皮膚3次元モデル

ビトリゲルによる検討で、ZnO ナノ粒子から溶出した Zn²⁺ が結合組織に浸透して下部の細胞に影響する事が示唆された。そこでさらにより実際に皮膚に近い3次元モデルを用いて検討を行った。対照として、溶解性を示さない TiO₂ でも試験を行った。

3.3.1 亜鉛イオンの溶出

皮膚モデル上に投与した ZnO 分散液中の Zn²⁺ 濃度は、ZnO 濃度が 0.1 および 1.0 mg/ml のとき、それぞれ 1.0 および 0.8 μ g/ml であった。培養液中の亜鉛イオンを測定したところ、ZnO 粉体を投与したものを除き、Zn²⁺ は検出されなかった。ZnO 粉体を投与したモデルでは、培養液中に 4.9 μ g/ml の Zn²⁺ が含まれていた。メタロチオネイン遺伝子発現を測定したところ、ZnO 分散液投与によって発現が上昇した (図 11)。

3.3.2 細胞影響

ZnO および TiO₂ 分散液/粉体を皮膚 3 次元モデルに投与し、24 時間後に培養液中の LDH 活性を測定した。ZnO および TiO₂ 投与による培地中への LDH の漏出は認められなかった。酸化ストレス応答タンパク質 HO-1 遺伝子発現は、1.0 mg/ml の ZnO 分散液の投与によって非投与モデルに対し 1.6 倍程度上昇した (図 12A)。ZnO および TiO₂ ナノ粒子の投与により、24 時間後の時点でのサイトカイン (IL-1 β , IL-8, IL-12) 遺伝子発現の上昇は認められなかった (図 12B)。一方で、ZnO 粉体の投与により、24 時間後の培地中の IL-8 タンパク質濃度は有意に上昇した。また、ZnO および TiO₂ 粉体を投与し、24 時間後の培地中の IL-6 濃度も有意に上昇した (図 12C)。

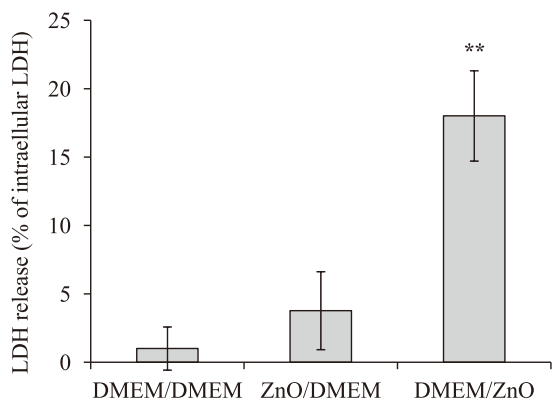
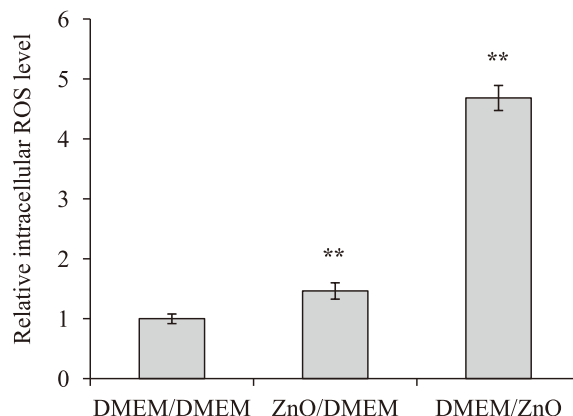


図 8 ZnO ナノ粒子の細胞膜に対する影響 (ビトリゲル) 投与 24 時間後に測定。** $p < 0.01$ (vs 非投与細胞, ANOVA, Dunnett)

4. 考察

本研究では、ナノ粒子のうち化粧品材料としてよく利用される TiO₂、ZnO および SiO₂ の細胞及び皮膚モデルに対する影響を検討した。これらのナノ粒子のうち、ZnO ナノ粒子で強い細胞影響が認められた。一方で、TiO₂ および SiO₂ の細胞影響は小さかった。ZnO を含むいくつかの金属酸化物ナノ粒子については、これまでに細胞影響が報告されている⁴⁾。これら細胞影響を示す金属ナノ粒子の最も重要な影響因子として、金属イオンの溶出が挙げられる⁵⁾。従来不溶性として分類されていた物質でも、ナノ粒子では大きな溶解性を示す事がある。例えば、酸化ニッケル (NiO) は水に不溶とされているが、一部の NiO ナノ粒子は培地中で高い溶解性を示した¹⁾。ZnO ナノ粒子も培地中に Zn²⁺ を溶出し、細胞に強い酸化ストレスを引き起こすことで細胞死をもたらす⁴⁾。また、ラットに ZnO ナノ粒子を気管内注入した実験では、肺に酸化ストレスと炎症を引き起こしたが、このとき、Zn²⁺ の溶出が重要であることが示唆さ

A



B

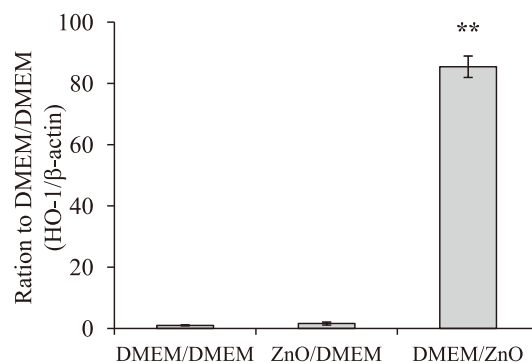


図 9 ZnO ナノ粒子の細胞内酸化ストレスに対する影響 (ビトリゲル)

(A) 細胞内 ROS レベル。(B) HO-1 遺伝子発現。投与 24 時間後に測定。値は非投与細胞を 1 としたときの相対値として示した。** $p < 0.01$ (vs 非投与細胞, ANOVA, Dunnett)

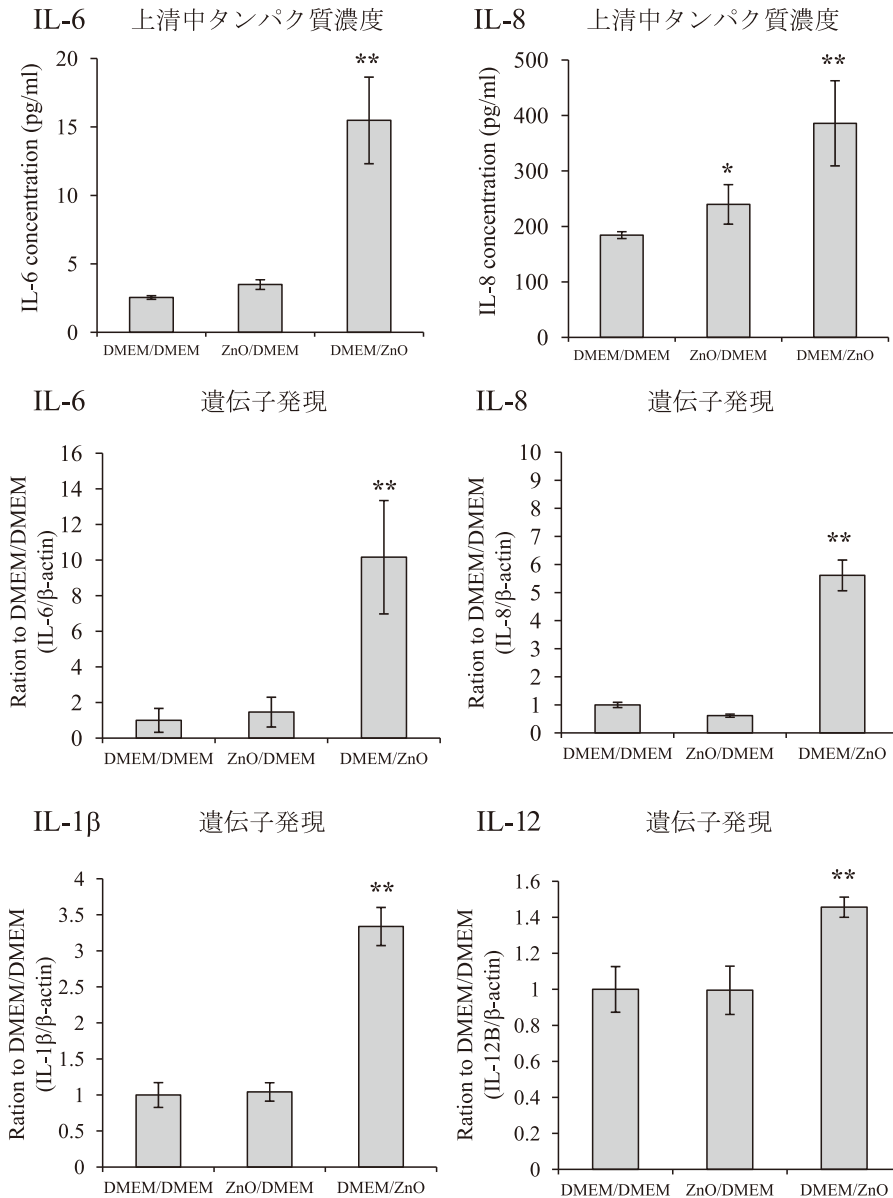


図10 ZnOナノ粒子のサイトカイン発現に対する影響 (ビトリゲル)
 培養上清中サイトカインタンパク質濃度およびサイトカイン遺伝子発現。各ナノ粒子を10および100 μ g/mlの濃度でHaCaT細胞に24時間投与した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (vs 非投与細胞, ANOVA, Dunnett)

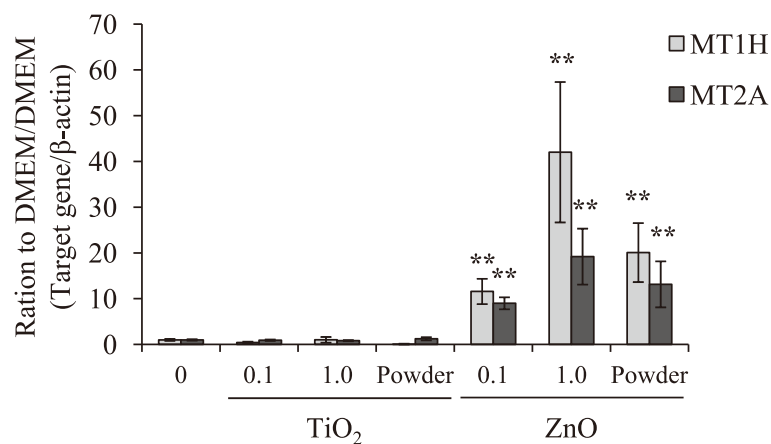
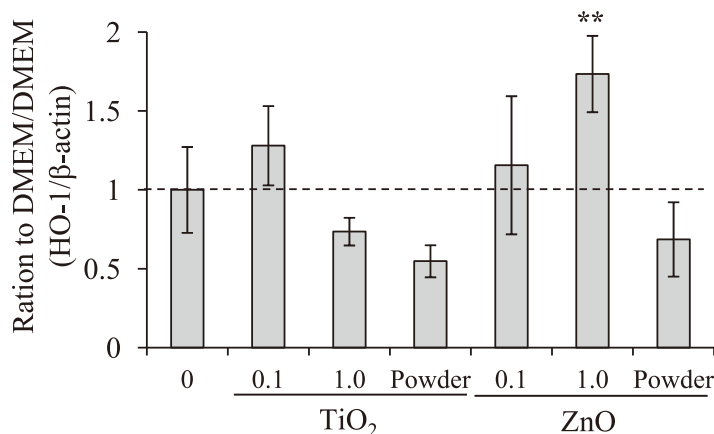


図11 ナノ粒子のメタロチオネイン遺伝子発現に対する影響 (皮膚3次元モデル)
 投与24時間後に測定。** $p < 0.01$ (vs 非投与モデル, ANOVA, Dunnett)

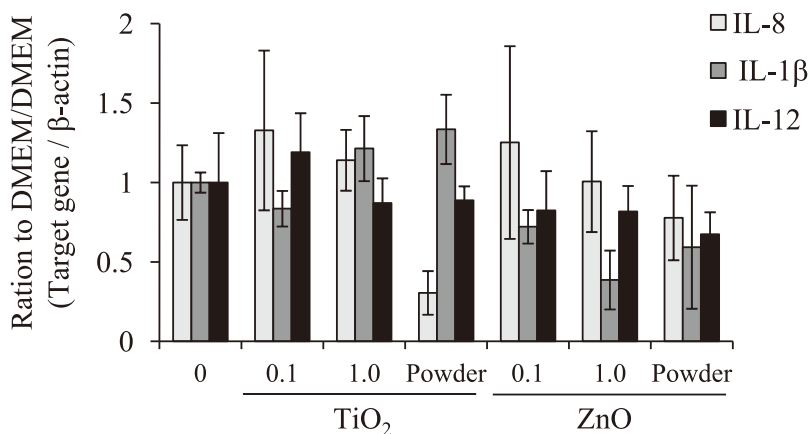
れている³⁾。TiO₂ナノ粒子の分散液をラット皮膚に塗布し、皮下へのナノ粒子の移行を検討したところ、粒子は表皮を通過せず、皮下への移行は認められなかった⁶⁾。ナノ粒子は凝集体を形成しやすく、通常分散液中で数十～数百nmの二次粒子を形成しており、一次粒子が単独で存在することはきわめてまれである。化粧品に使用されるTiO₂や

ZnO、SiO₂ナノ粒子が粒子の状態では何層にも重なった細胞間を通過し、真皮にまで到達することはきわめて考えにくい。しかし一方で、ZnOから溶出したZn²⁺が表皮に浸透し、真皮に到達する可能性は否定できない。本研究で、ビトリゲルを用いた実験により、ビトリゲルによって隔てられ、ZnOナノ粒子と直接の接触がないHaCaT細胞で、細胞内

(A) HO-1 遺伝子発現

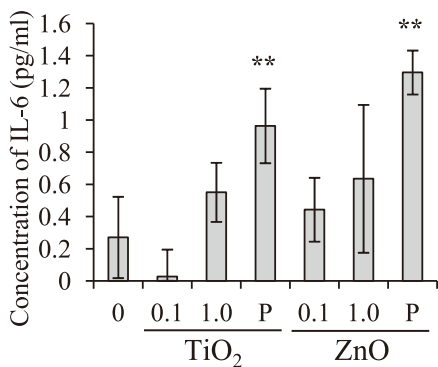


(B) サイトカイン遺伝子発現



(C) 上清中サイトカインタンパク質濃度

IL-6



IL-8

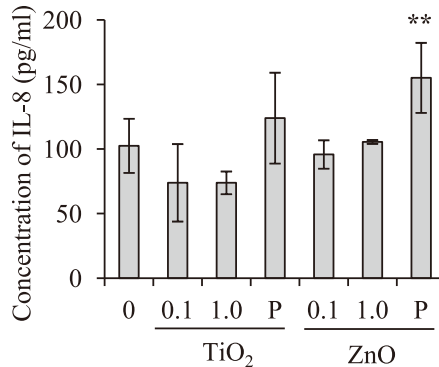


図12 ZnOナノ粒子のHO-1およびサイトカイン発現に対する影響(皮膚3次元モデル) 投与24時間後に測定。***p* < 0.01 (vs 非投与モデル, ANOVA, Dunnett)

ROSの上昇と、メタロチオネインおよびIL-8遺伝子の発現上昇が認められた。また、メタロチオネイン遺伝子の発現上昇とサイトカインの誘導は、ZnOナノ粒子を投与した皮膚3次元モデルでも認められた。メタロチオネインは Zn^{2+} を含む金属の存在によって発現が誘導される。B細胞の分化誘導因子であるIL-6は液性免疫に関わり、IL-8は好中球の走化性活性を示す代表的な炎症メディエーターである。また、IL-12はナイーブT細胞のTh1方向への分化に関与するが、 Zn^{2+} による発現の上昇が認められた。これらの結果は、ZnOナノ粒子では分散液の塗布による粒子自体の皮膚への侵入はないものの、溶出した Zn^{2+} が真皮にまで浸透し、上皮細胞に対して炎症誘発や酸化ストレスの誘導、アレルギー反応の惹起が生じる可能性を示唆する(図13)。本研究ではケラチノサイトであるHaCaT細胞および皮膚3次元モデル(ヒト正常表皮角化細胞により構成される)を使用した。金属酸化物ナノ粒子から溶出した金属イオンはランゲルハンス細胞を刺激し、アレルギー性皮膚炎を引き起こす可能性もある。ZnOなどの金属酸化物ナノ粒子からの金属の溶出は、分散媒により異なり、また皮膚への浸透の化学的な定量は困難である。メタロチオネインは Zn^{2+} を含む金属イオンにより誘導され、本研究においても Zn^{2+} の溶出に対し鋭敏な発現上昇を示した。また、影響が小さかった不溶性のTiO₂ナノ粒子の投与では発現の上昇は認められなかった。ナノ粒子の毒性に金属イオンの溶出は密接に関連しており、これらの結果から、メタロチオネイン遺伝子の発現解析は、皮膚における金属酸化物ナノ粒子毒性を考慮する上で有効なマーカーとなり得る。ビトリゲルと皮膚上皮細胞を組み合わせ、メタロチオネインの遺伝子発現を解析することで、有害な可能性のあるナノ粒子を選別することが可能であろう。今後の課題として、アイソザイムが存在するメタロチオネインの発現プロファイルを確立し検出精度を高めること、また溶出した金属イオンに対するランゲルハンス細胞の応答を検討することが重要である。

(引用文献)

- 1) Horie M, Nishio K, Fujita K, Kato H, Nakamura A, Kinugasa S, Endoh S, Miyauchi A, Yamamoto K, Murayama H, Niki E, Iwahashi H, Yoshida Y, Nakanishi J.: Ultrafine NiO particles induce cytotoxicity in vitro by cellular uptake and subsequent Ni(II) release. *Chem Res Toxicol.*, 22, 1415-1426, 2009.
- 2) Horie M, Komaba LK, Kato H, Nakamura A, Yamamoto K, Endoh S, Fujita K, Kinugasa S, Mizuno K, Hagihara Y, Yoshida Y, Iwahashi H.: Evaluation of cellular influences induced by stable nanodiamond dispersion; the cellular influences of nanodiamond are

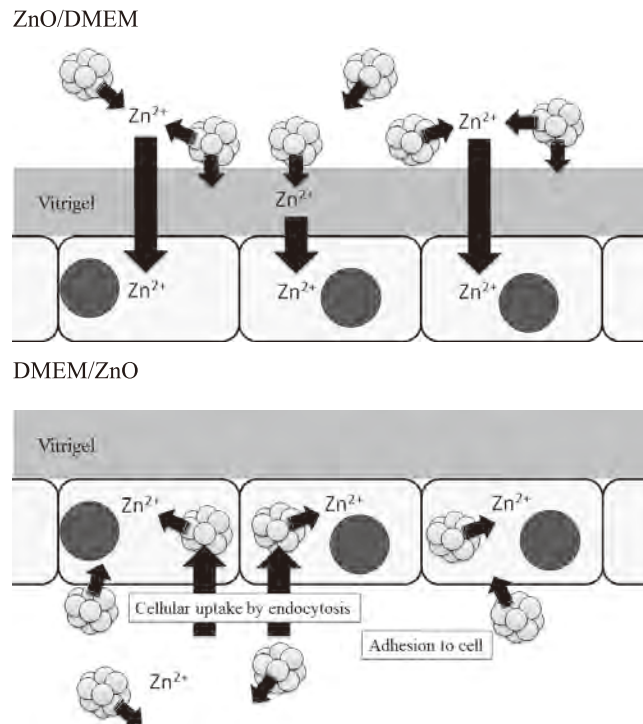


図13 ナノ粒子の皮膚に対する影響の概要
化粧品へのナノ粒子の利用において、ZnOナノ粒子のように溶解性を示すナノ粒子では、溶解した金属イオンが皮膚に浸透して、サイトカイン遺伝子の発現を誘導することで炎症などを引き起こす可能性がある。

small. *Diam. Relat. Mater.*, 24, 15-24, 2012.

- 3) Fukui H, Horie M, Endoh S, Kato H, Fujita K, Nishio K, Komaba LK, Maru J, Miyauchi A, Nakamura A, Kinugasa S, Yoshida Y, Hagihara Y, Iwahashi H.: Association of zinc ion release and oxidative stress induced by intratracheal instillation of ZnO nanoparticles to rat lung. *Chem. Biol. Interact.*, 198, 29-37, 2012.
- 4) Horie M, Fujita K, Kato H, Endoh S, Nishio K, Komaba LK, Nakamura A, Miyauchi A, Kinugasa S, Hagihara Y, Niki E, Yoshida Y, Iwahashi H.: Association of the physical and chemical properties and the cytotoxicity of metal oxide nanoparticles: metal ion release, adsorption ability and specific surface area. *Metallomics.*, 4, 350-360, 2012.
- 5) Horie M, Kato H, Fujita K, Endoh S, Iwahashi H.: In vitro evaluation of cellular response induced by manufactured nanoparticles. *Chem. Res. Toxicol.*, 25, 605-619, 2012.
- 6) Adachi K, Yamada N, Yamamoto K, Yoshida Y, Yamamoto O.: In vivo effect of industrial titanium dioxide nanoparticles experimentally exposed to hairless rat skin. *Nanotoxicology.*, 4, 296-306, 2010.

発汗能を制御し皮膚恒常性保持能力を回復させる試み

大阪大学大学院医学研究科情報統合医学皮膚科学教室

室田 浩之

Abnormal sweating has been thought to contribute to pathogenesis of various dermatoses in diverse ways. Exploration of novel sweating-regulating factors may provide a clue to formulate treatment strategies for these patients. Previously, we reported that decreased sweating contributed to pathogenesis of atopic dermatitis. If we could determine the factor influencing sweating in atopic dermatitis, it might be applied to treatment for patients with abnormal sweating. Thus, we explored the factors influence sweating in atopic dermatitis. Firstly, we focused on histamine, which is known as to play wide range roles in allergic dermatoses. The impact of histamine to acetylcholine-induced sweating response was measured with counting the number of active sweat gland by starch-iodin reaction, dynamic optical coherence tomography, visualizing sweat by two-photon excitation fluorescence microscopy, and quantitative sudomotor axon reflex test. Histamine demonstrably inhibited the acetylcholine-induced sweating in both murine and human via H1 receptor-mediated signaling. These results might provide basis for understanding pathogenesis and formulating novel therapeutic approach for dermatoses with dysregulated homeostasis.

1. 緒言

発汗は温度調節、感染防御、保湿という重要な機能を担う皮膚の生理機能であり、発汗過多は多汗症や低体温、乏汗はうつ熱・易感染性・皮膚乾燥に繋がる。発汗機能異常を制御する方法が確立できれば様々な皮膚のトラブルを改善できると想像される。現在のところ塩化アルミニウムによる汗管閉塞、水道水によるイオントフォーシスが多汗症に応用されているが無効例も少なくなく、乏汗は未だ有効な治療方法がないのが実情である。発汗を制御する方法が確立されればスキンケアはもとより様々な皮膚疾患の治療に応用できると期待される。

発汗はコリン作動性の交感神経支配を受けているが、具体的な制御機構は不明の点が多い。少なくともコリン誘導性発汗に影響を与える因子の探索は発汗制御因子の同定に繋がると期待される。これまでに私達はアトピー性皮膚炎患者におけるアセチルコリン反応性発汗機能を測定し、その中でアトピー性皮膚炎においてアセチルコリン誘導性発汗量が減少していることを報告してきた¹⁾。アトピー性皮膚炎でコリン性発汗が減少しているメカニズムを解明することにより、発汗機能を制御できる因子の同定に繋がるはずだ。先行する研究成果において、アトピー性皮膚炎は外用薬や抗ヒスタミン薬の内服によって症状が改善すると発汗機能も改善することが報告されている。このことからア

レルギー炎症に関わる化学伝達物質が発汗を抑制するのではないかと推察される。本研究では特にヒスタミンが発汗に与える影響について検討を行った²⁾。

2. 実験

2.1 動物

11 - 12週齢のC57BL6およびH1RKOマウスを用いた。マウスの全身麻酔はドミトール、ベトロファール、ドルミカム三種混合薬を腹腔内投与することで実施した。動物の管理は大阪大学のガイドラインに基づいて行った。

2.2 試薬

ピロカルピン塩酸塩 (50 µg/20 µl/mice)、ヒスタミン (120 µg/20 µl) を用いた。ヒスタミン受容体拮抗薬としてピリラミン (700 µg/body)、フェキソフェナジン (600 µg/body)、シメチジン (400 µg/body) を腹腔内投与した。

2.3 in vivo 発汗試験

マウスを用いたミノール法変法 (ヨウ素澱粉反応) により発汗量を半定量化する試みを行った。ヨウ素澱粉反応による発汗の評価方法は文献3を参照した。

2.4 光コヒーレンストモグラフィ(OCT)

マウスの足底の発汗の動態をOCTによって評価した。OCTのイメージはBモードOCTから得られたx-z planeより作成した。

2.5 二光子顕微鏡

マウス足底の生体における汗腺動態は二光子顕微鏡を用いて観察した。方法と条件は文献4を参照した。汗腺はM3受容体抗体、APQ5抗体を用いて、核はhoechst33342、



Maintenance of skin homeostasis via regulating sweating

Hiroyuki Murota

Department of Dermatology Course of Integrated Medicine Graduate School of Medicine, Osaka University

血管をTexas redラベルされたデキストランを静脈内投与することで可視化した。画像はVolocity 3Dイメージ解析ソフトを用いて作成された。

2.6 統計解析

Prism5ソフトウェアを用いて解析した。Bonferroni's multiple comparison testによって評価し、* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ を有意とした。

3. 結果

3.1 発汗評価方法の妥当性に関する検討

マウスの発汗を評価する方法としてミノール法変法がある。ピロカルピンをマウス足底に皮下注射し数分後のヨード澱粉反応点の数を評価したところ、ピロカルピン投与後に顕著な数の増加が確認された(図1A)。さらに表皮内から皮膚表面への汗の動態をOCTによって観察した。その結果、表皮内汗管に沿って上行し、皮膚表面に間欠泉のように吹き出す汗の様子が観察できた(図1B)。

3.2 ヒスタミンがピロカルピン誘導性発汗に与える影響

上述した発汗評価法を用い、ヒスタミンが発汗に与える影響を観察した。ピロカルピンとヒスタミンを同時に投与されたマウスではミノール法変法において皮膚表面への発汗が著しく減少しているのが確認された(図1A)。OCTによる観察では、ヒスタミン投与後、皮膚表面はもとより

表皮内汗管を通る汗も確認されなくなった(図1B)。ヒスタミンの発汗抑制作用はどの受容体を介して発揮されるのかを調べるために各種ヒスタミン受容体拮抗薬を投与し、ミノール法変法によって評価した(図2)。この抑制作用はH1受容体拮抗薬(ピリラミン、フェキソフェナジン)で阻害されるが、H2およびH4受容体拮抗薬では阻害さ

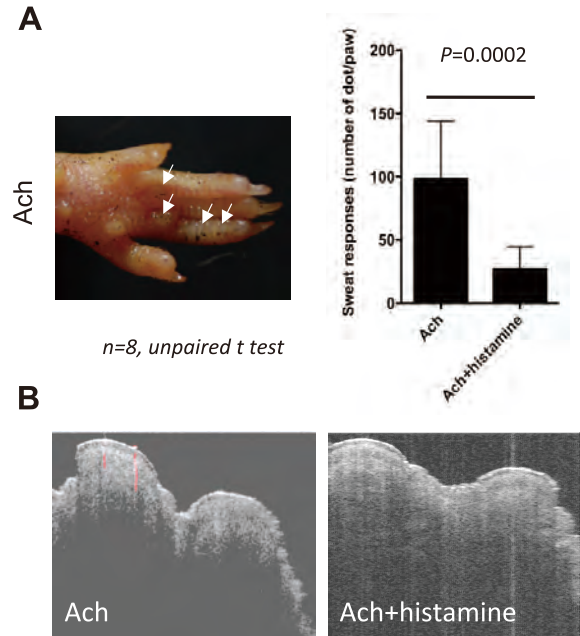


図1 マウスの足底の発汗動態の解析結果
A. ミノール法変法による発汗評価。Ach: ピロカルピン。
B. OCTによる汗の動態観察結果。

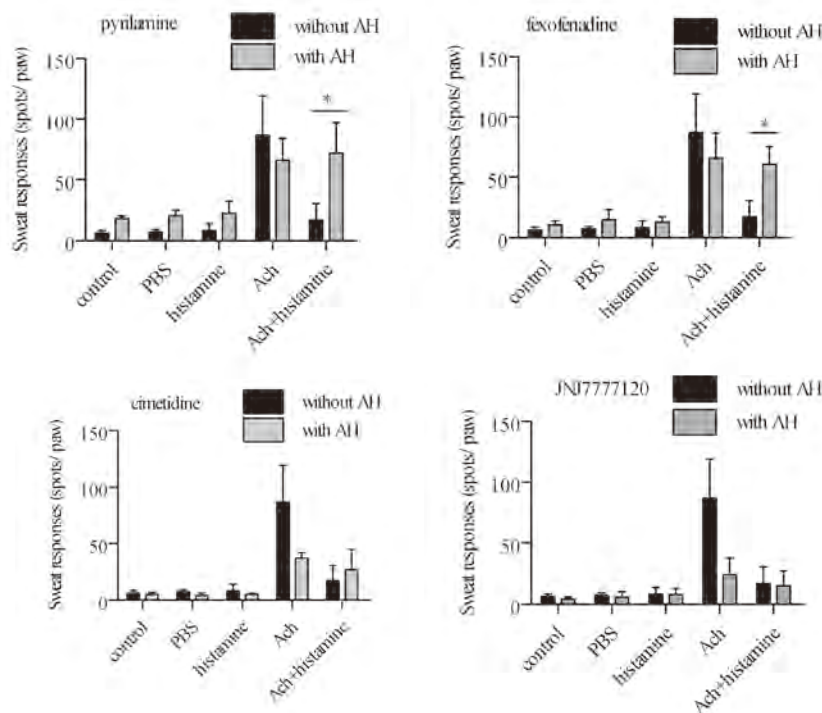


図2 ヒスタミン受容体拮抗薬の効果
ミノール法変法を用いて各種ヒスタミン受容体拮抗薬の影響を確認した。AH: antihistamine.
PBS: phosphate buffered saline. Ach: pirocarpin.

れない(図2)。このことからヒスタミンはH1受容体を介して抑制すると考えられた。実際にH1RKOマウスではヒスタミンによる発汗抑制作用は著しく減弱していた(data not shown)。

次にヒスタミンはどのように発汗を阻害するのかに疑問がのこる。ミノール法変法やOCTによる観察では表皮内汗管の汗も確認されなかったことからヒスタミンは汗腺に作用することで発汗を抑制すると想像される。しかし既存の評価方法では汗管よりも表皮側の領域しか観察することができない(図3)。そこで二光子顕微鏡を用いた汗腺の動態観察を試みることにした。

3.3 二光子顕微鏡を用いた汗腺の動態観察

二光子顕微鏡で観察した汗腺の動態観察結果を図4に示す。ピロカルピンを腹腔内投与し約10分後から発汗活動が観察される。汗腺に存在する汗腺分泌細胞が腫大し、縮まる際に黒いドット(opaque spot)様のFITC強度の退色が確認される。FITCの蛍光強度低下は汗の酸性によって生じるのではないかと想像され、このopaque spotが汗をあらわしていると考えた(図4A)。一方、ピロカルピンとヒスタミンを同時に投与した際、汗腺の拡張は確認されたが、opaque spotは確認されなかった(図4B)。さらに汗

腺の拡張は数十分続くことから、汗腺分泌細胞から汗管への汗の移動が損なわれているものと考えられた(図4C)。つまりヒスタミンは汗腺分泌細胞に作用することで汗の分泌を止めるものと考えられた。

4. 考察

上述したように私達はアトピー性皮膚炎で乏汗が生じている事をアセチルコリンによる定量的軸索反射発汗試験を

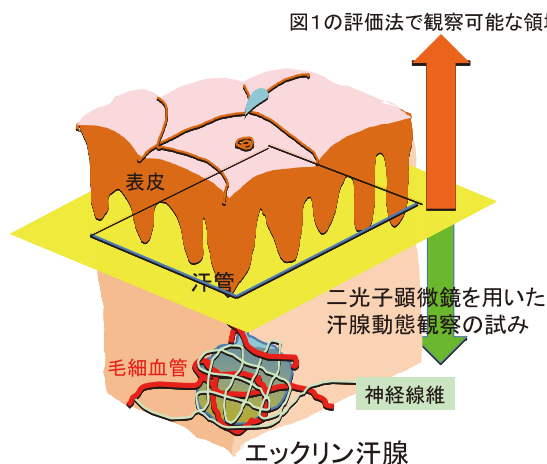


図3 汗腺の微小環境とこれまでの実験結果の小括のシェーマ

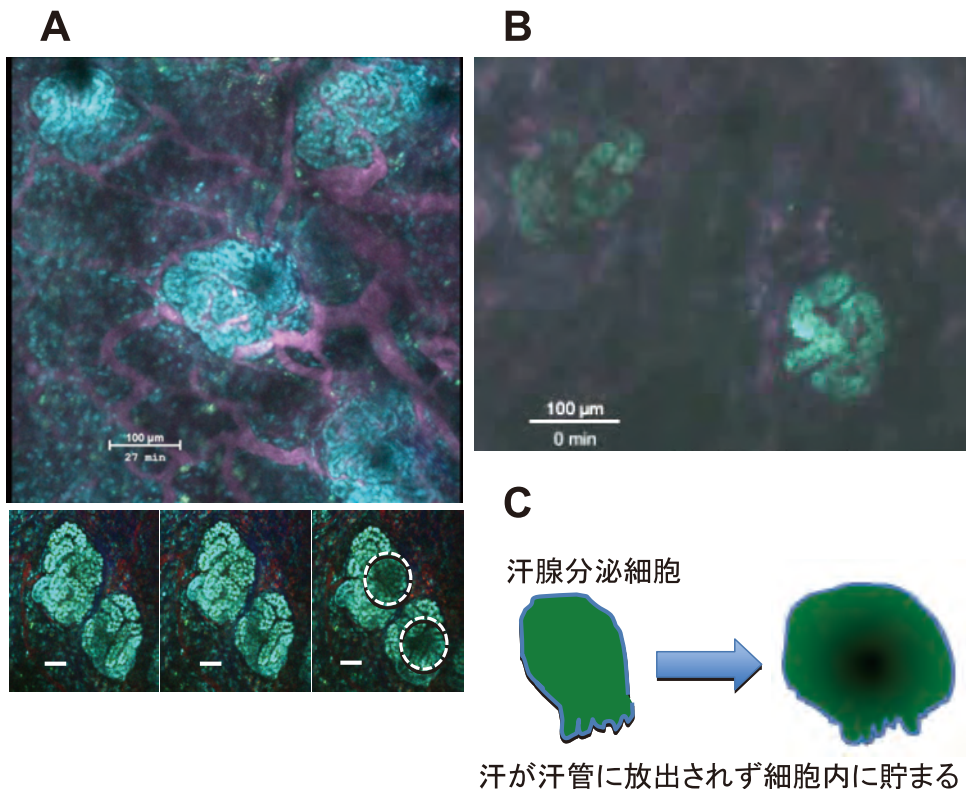


図4 二光子顕微鏡を用いた汗腺の動態観察

A. ピロカルピン投与後の汗腺。緑：汗腺。赤：血管。点線でかこんだ黒い opaque spot は汗を示す。B. ピロカルピンとヒスタミンを同時に投与した際の汗腺の動態。C. ヒスタミン投与後の汗腺分泌細胞の動態に関するシェーマ。

用いて証明してきた¹⁾。アトピー性皮膚炎患者でみられる発汗量の低下は皮膚の恒常性を損なうことで症状悪化に関わると考えられる。発汗量が低下する機序として(A)汗の排出異常、(B)汗腺からの汗の産生および分泌の異常、の2つがある。(A)の原因として汗孔の角栓形成に伴う閉塞、あるいは汗管から組織中への汗の漏出が考えられている。(B)の原因として、自律神経失調や発汗誘発因子であるアセチルコリンへの反応の低下が報告されている。アセチルコリン応答性発汗は定量的軸索反射性発汗試験(Quantitative Sudomotor Axon Reflex Test: QSART)で詳細な評価が可能である。この試験ではアセチルコリンをイオントフォレーシスによって皮膚に浸透させ、末梢神経の軸索反射を介して生じた発汗量(軸索反射性発汗量)と発汗に要する時間が測定できる。この結果、軸索反射性発汗量はアトピー性皮膚炎で少なく、健常人の約半分であることが分かった¹⁾(図4)。さらにアセチルコリン投与から発汗までの時間がアトピー性皮膚炎群では健常人よりも長時間かかる¹⁾(図4)。このように、アトピー性皮膚炎は乏汗状態にあり、発汗すべき時に少しずつまばらにしか汗が出ていないと想像できる。乏汗は皮膚に熱をこもらせ、乾燥させ、病原体への抵抗性を損なうため皮膚炎症状を悪化させる。乏汗の背景として自律神経の失調、患者の不安性格傾向、アレルギー炎症の関与が考えられている¹⁾。より詳細に乏汗のメカニズムが解明されれば、具体的な指導箋の確立に有益な情報になろう。私たちはアレルギー炎症の病態形成に関わる因子が発汗を抑制すると考え、乏汗を引き起こす因子の探索を行った¹⁾。その結果、ヒスタミンはアセチルコリン誘導性発汗を抑制する事を確認した。この現象はヨウ素澱粉反応と光コヒーレンストモグラフィーを用いた汗そのものの生体内動態イメージングで観察された²⁾。さらに二光子顕微鏡を用いたエックリン汗腺の生体内動態解析より、ヒスタミンは汗腺細胞からの汗の分泌を阻害しており、この現象はヒスタミンが汗腺分泌細胞内でグリコーゲン合成酵素の活性に影響する結果であることを確認した¹⁾(data not shown)。このヒスタミンによる汗分泌阻害作用はH1受容体を介しており、抗ヒスタミン薬はヒスタミンの関与する乏汗を改善する効果が期待される¹⁾。ヒスタミンがアトピー性皮膚炎で見られる乏汗にどのくらい関与するかについては懸案事項であるが、これらの知見は原因不明とされる後天性特発性全身性無汗症にもヒスタミンの関与する症例があるのではないかと想像させる。実際に、後天性特発性全身性無汗症の確立された治療方法はないが、ステロイドパルス治療の奏功する症例のあることから本治療が適用されてきた。しかし、ステロイドパルス治療にも抵抗性を示す症例も少なくない。本研究成果よりステロイ

ドパルス治療抵抗性を示す後天性特発性全身性無汗症症例の中に抗ヒスタミン薬の有効例があるかもしれないと考えた。QSARTおよび全身ミノール法によって無汗症の確認された後天性特発性全身性無汗症2症例に抗ヒスタミン薬を投与したところ、投与量を通常量から増量していく過程でQSARTにおいて検出可能なレベルの発汗が確認されるようになった。その後徐々に入浴や運動等によって患者の自覚できる発汗を促したところ、日常生活に支障のないレベルまで発汗が改善した。本研究の成果から着想に至った後天性特発性全身性無汗症の治療経験から、私たちはステロイドパルスを行う前に抗ヒスタミン薬の適宜増量と発汗を促す指導を施行することを推奨している(Suma A et al. *Acta Derm Venereol*, accepted)。発汗を制御することで皮膚恒常性維持に貢献できた具体的な事例となり、今後他疾患への応用も検討していく予定である。

5. 総括

無汗・乏汗症にはまだまだ未知の病態が隠されている。発汗機能を評価する科学的手法も進歩しており、これらを用いることで臨床現場での皮膚科医の些細な疑問や発見が病態の解明につながり、発汗による皮膚のホメオスタシス改善が新しい治療のアウトカムになりうるものと期待される。最後に謝辞として、このような貴重な機会を与えてくださったコスメトロジー研究振興財団、そして本研究にご協力ご指導をくださった大阪大学保健学 近江雅人先生、大阪大学医学系研究科免疫細胞生物学 石井 優先生に拝謝する。

(引用文献)

- 1) Kijima A, Murota H, Matsui S, Takahashi A, Kimura A, Kitaba S, Lee JB and Katayama I: Abnormal axon reflex-mediated sweating correlates with high state of anxiety in atopic dermatitis. *Allergol Int*, 2012; 61: 469-473.
- 2) Matsui S, Murota H, *et al.* Dynamic analysis of histamine-mediated attenuation of acetylcholine-induced sweating via GSK3b activation. *J Invest Dermatol*. 2013;134:326-334.
- 3) Nejsum LN, Kwon TH, Jensen UB, *et al.* Functional requirement of aquaporin-5 in plasma membranes of sweat glands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002;99:511-6.
- 4) Ishii M, Egen JG, Klauschen F, *et al.* Sphingosine-1-phosphate mobilizes osteoclast precursors and regulates bone homeostasis. *Nature* 2009, 458:524-8.

Ⅲ. 精神、文化に関する分野

交通渋滞中のドライバーの精神的ストレスおよび肉体的ストレス に対する芳香物質の影響 —パイロットスタディ—

東京農工大学大学院工学府機械システム工学専攻

佐藤 桂

The improvement of drivers' condition is required to reduce traffic accidents. The purpose of this study is to improve driver's condition during traffic jams by using aroma compounds. Since it is not clear which kind of stress drivers have during traffic jams, the effects of aroma compounds on mental stress and physical stress were analyzed respectively. Furthermore, the effect of aroma compounds which were supplied during driving a scenario of traffic jam on a driving simulator was also evaluated.

1. 緒言

近年の車社会において、交通渋滞は大きな問題の一つである。渋滞中の交通事故の発生率は、通常状態におけるその約8倍であり、特に追突事故に関しては約16倍である¹⁾。高速道路など二車線以上の道路上で渋滞に巻き込まれた場合、目的地に少しでも早く着こうと車線変更をくりかえすドライバーも数多くおり、自車線に進入される側にとってそれはさらなるストレスとなる。交通事故の原因の多くがヒューマンエラーによるものであると言われていることから、ドライバーの精神状態や身体状態は運転行動に大きく影響を与えると考えられ、注意力低下状態など不安全行動をとりやすい状況にあるドライバーの心身状態の改善は交通事故の低減に重要である。

ドライバーの状態を改善する方法の一つに香りの提示があげられる^{2,3)}。香り、つまり芳香物質は吸引されたのち、血液中にとりこまれ全身を巡り肝臓で代謝され体外に排出されることから、薬理効果や効果の持続性が期待される。(–)-linaloolはラベンダーオイルなどに含まれる化合物であり、その鎮静効果はこれまでも多くの論文で報告されている⁴⁾。一方1,8-cineoleはローズマリーオイルやペパーミントオイルに含まれており、これらの刺激作用が報告されている⁵⁾。

本研究の目的は、渋滞中のドライバーの精神的ストレスおよび肉体的ストレスの香りによる低減であるが、渋滞中のドライバーに具体的にどのようなストレスがかかるのか不明であり、またドライバーにとって鎮静させる香りが有効であるのかそれとも刺激する香りが有効であるのか不明であるため、相反する効果を有する2種の香りの効果を評価した。



Influence of aroma compounds on the drivers' mental and physiological stress during traffic jam – Pilot study –

Kei Sato

Department of Mechanical Systems Engineering, Faculty of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology

ヒトのストレスの測定には、脳波の測定や唾液中や血中に含まれるストレスホルモンの測定、心電図の測定などがあげられるが、運転時のドライバーの状態の測定には、安全面の観点から運転の邪魔にならない心電図の測定が有用であると考えられる。実世界の道路環境では同じ交通場面に遭遇することは皆無であり、被験者ごとに実験場面が異なってしまうことと、本研究が基礎研究に位置することから、現段階では同じ交通環境を再現できるドライビングシミュレータを用いて香りの効果の評価を行ったが、本研究の結果をもとに将来は実車実験により評価する予定であるので、本研究でも心電図の測定を行った。今回は、R波とR波の間隔であるR-R間隔(以下RRI)を指標として用いた。これは心拍の逆数で表され、RRIが大きい場合は拍動が遅く、リラックスしており、小さい場合は緊張またはストレス下にあるとされている。

2. 実験の部

2.1 試薬

(–)-linalool (≥95.0% GC sum of enantiomers)はシグマアルドリッチ社製を、また1,8-cineolは和光純薬製を用いた。

2.2 心電図測定機器

ニホンサンテック株式会社製の自律神経解析プログラム(Map 1060)を用いた。

2.3 ドライビングシミュレータ

ドライビングシミュレータ(以下DS)には、株式会社アストジェイ製のマルチエージェント交通流シミュレーション(ASSTranece)を用いた。DSの性能上、シナリオの時間は最長で28分となった。

2.4 被験者

普通運転免許を持つ本学の23歳男性8名であり、実験当日はカフェインを摂取しないよう教示した。また各実験の測定開始時刻は毎回同時刻とした。

なお、本研究は、東京農工大学の倫理委員会の承認のもと実施し、被験者には事前に研究内容を説明し、インフォームドコンセントを得た。

2.5 実験環境

実験室は換気扇を備えた約13.5m²の部屋で、気温を約23℃、湿度を30-40%に設定した。

2.6 香りの供給装置および濃度の決定

2.6.1 供給方法

空気および芳香物質の供給にはエアポンプを用い、被験者の鼻先から約10cmのところへ供給した。

2.6.2 濃度の決定

不快な香りを長時間吸引することは、ストレスになりかねないことと、香りを用いた警報システム等の商品化の際に非現実的であることから、香りの供給濃度として、2条件をアンケート結果により決定した。なお、空気の流量は変化させず一定とし、芳香物質の量により濃度高(300μl)と濃度低(100μl)の2条件を調整した。

2.7 実験条件

2.7.1 精神的ストレス

渋滞中のドライバーの精神的ストレスとして、①目的地に早く着きたいのに自分の意に反して進めない、②進もうとしているのに横入りにより邪魔される、③退屈するなどの意見が挙げられたことから、タスクとして、エクセルシート上ランダムに縦一行に並んでいる1から15までの数字を被験者に順番に1から15までとなりの行にマウスを用いてできるだけ早く縦に並べさせ、被験者が並べている間にオペレータが、カーソルの移動を邪魔したり等、被験者

の邪魔をしいらいらさせる作業を行った。このタスクを20回行わせ、1シート分の作業を終えるたびに、①疲れているか、②ストレスがあるか、③いらいらしているか、④気分が明るいかな、⑤眠いか、という質問に1-5のスケールで答えさせた。なお、オペレータの作業は毎回同じシナリオを用いて行った。香りの供給は、14回目から18回目の作業時に行い、一種の香りにつき2条件(供給濃度:高・低)の合計4条件を行った。なお被験者には、香りの効能等の説明はせず、測定当日に使用する香りの情報も与えなかった。

2.7.2 肉体的ストレス

渋滞中に身体にかかる肉体的ストレスとして、長時間座ったままであり、身体を伸ばすことができないなどがあるが、例えば正座をタスクにするといつ被験者にストレスがかかっているか不明であり、個人差も大きいことから、コールドプレッシャーテスト(以下CPT)を本実験では用いた。約3℃の冷水に肘から下を50秒間つけさせ、この間香りを供給した。

またテストの開始前、CPTの直後、テスト終了後に、①疲れているか、②ストレスがあるか、③いらいらしているか、④気分が明るいかなという質問に1-5のスケールで答えさせた。図1にプロトコルを示す。この測定は一種の香りにつき2条件(供給濃度:高・低)と香りの提示なし(空気のみ)1条件の下行った。

2.7.3 DS実験

作成した渋滞のシナリオAを図2に示す。図中のシナリオの「やや渋滞」と「渋滞」を入れ替えたシナリオBも作成し、各芳香物質につき2種類のシナリオを用いた。ただし、これらのシナリオを用いる順番はランダムとした。なお芳香物質はいずれのシナリオにおいても「大渋滞②」の

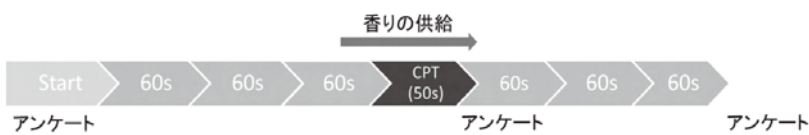


図1 CPTのプロトコル

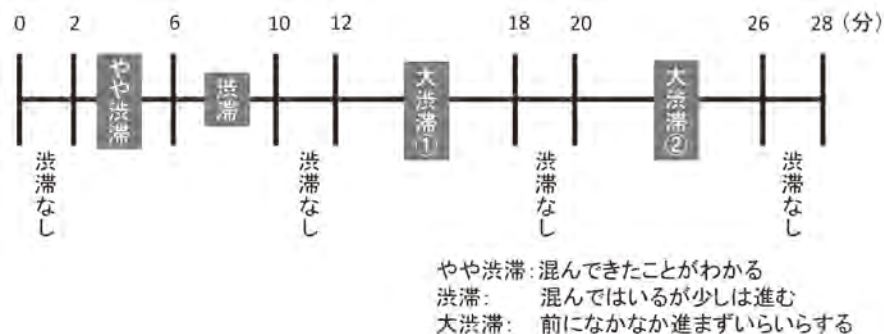


図2 渋滞シナリオA

ときに供給した。

まず、DSでの走行に慣れるために自車両の前後、横方向に他車両が存在しない通常のコースを10分ほど走行させた。被験者には通常の運転をするように教示し、車線変更をしたい場合はしてもよい旨を伝えた。

3. 結果および考察

紙面の都合上、被験者S1のデータを示す。

3.1 精神的ストレス

3.1.1 香りの嗜好性

まず、被験者の香りの嗜好性（どちらでもないを含む5段階）および被験者が感じた匂いの強弱（どちらでもないを含む5段階）を表1に示す。なおこの嗜好性は実験終了直後にたずねた。

3.1.2 アンケート結果

アンケートは、1シート毎のタスクが終わる度に行った。結果の詳細は紙面の都合上割愛するが、各条件下における簡単な結果を以下にまとめる。主に香りを供給した5シート分とその前後4シート分の結果を示す。

・(-)-linaloolの供給条件下

低濃度：香りの供給後にリラックスさせる傾向にあった。香りを供給した区間中の眠気が低下した。

高濃度：低濃度と同じくリラックスさせる傾向にあったが、いらいらも増した。供給後から気分の明るさが増加したが、眠気は供給前とは変わらず実験の終了まで変化しなかった。

・1,8-cineoleの供給条件下

低濃度：香りの供給後にリラックスの度合いが低下したが、イライラの度合いは減少した。眠気は減少し供給終了後からは再度増加した。

高濃度：リラックスの度合いは変動はなかったが、香りの供給直後はいらいらが増加し再度減少した。

3.1.3 各条件下におけるRRIの変動

図3から図6にそれぞれ、(-)-linalool（濃度：低）、(-)-linalool（濃度：高）、1,8-cineole（濃度：低）、1,8-cineole（濃度：高）を供給した結果を示す。タスクは20シート分行ったが、香りを供給した5シートの前後4シートのRRIの解析を行った。

4条件のうち、(-)-linalool（濃度：高）と1,8-cineole（濃度：低）を供給した時にRRIの値が上昇したことから、リラックスする傾向にあったと考えられる。特に前者の場合、嗜好性は-1と低かったが嗜好性の影響はないと考えられる。また、1,8-cineole（濃度：高）の条件下では、香りの供給まで眠気を感じており、供給により目が覚めたが、再度眠たくなったという申告が測定後であったことから、1,8-cineole（濃度：低）を供給した時に比べ、全体的に

表1 香りの嗜好性および強弱

		(-)-linalool						
濃度(低)	嗜好性	嫌い	-2	-1	0	1	2	好き
	強弱	弱い	-2	-1	0	1	2	強い
濃度(高)	嗜好性	嫌い	-2	-1	0	1	2	好き
	強弱	弱い	-2	-1	0	1	2	強い
		1,8-cineole						
濃度(低)	嗜好性	嫌い	-2	-1	0	1	2	好き
	強弱	弱い	-2	-1	0	1	2	強い
濃度(高)	嗜好性	嫌い	-2	-1	0	1	2	好き
	強弱	弱い	-2	-1	0	1	2	強い

RRIの値が高くなっており、香りの供給前後のRRIの値の変動が顕著でない可能性がある。

3.2 肉体的ストレス

3.2.1 香りの嗜好性

被験者の香りの嗜好性および感じた匂いの強弱を表2に示す。

3.2.2 アンケート結果

実験開始直前、CPT直後、実験終了直後に行ったアンケート結果の詳細は紙面の都合上割愛するが、コントロール条件、また低・高濃度の(-)-linaloolを供給した場合は、実験開始直前に比べストレスが増加した。

一方、1,8-cineoleを供給した場合はいずれの濃度の場合もストレスは減少した。しかし、低濃度の場合は、いらいらの度合いが増した。高濃度の場合はいらいらの度合いは0であった。なお、コントロール条件下および(-)-linaloolの供給条件下ではCPTによるいらいらは発生しなかった。

3.2.3 各条件下におけるRRIの変動

図7から図11にそれぞれ、コントロール条件下、(-)-linalool（濃度：低）、(-)-linalool（濃度：高）、1,8-cineole（濃度：低）、1,8-cineole（濃度：高）の供給条件下の結果を示す。CPTを行った前後2分間における50秒ずつのデータをそれぞれ切り出し、RRIの変化の解析を行った。

図8および図9に示すように、(-)-linaloolを供給した場合、濃度の高低にかかわらずRRIの変動は図7に示したコントロール条件の変動と同様の傾向を示した。従って(-)-linaloolにより肉体的ストレスは緩和されていないと考えられる。

一方1,8-cineoleを供給した場合は2条件下とも、(-)-linaloolと反対の傾向を示した。特に濃度の高い1,8-cineoleを供給した場合、RRIの値の上昇が顕著であることから、1,8-cineoleはこの被験者にとって、肉体的ストレスの緩和に有用であると考えられる。また香りの嗜好性についても、この実験条件下では(-)-linaloolの嗜好性は両濃度とも低く、高濃度の1,8-cineoleを好んでいることも結果に影響を及ぼしている可能性がある。

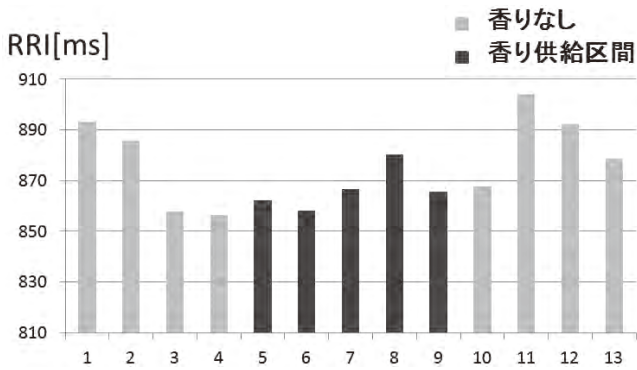


図3 (-)-linalool (濃度：低) 供給条件下の RRI の変動

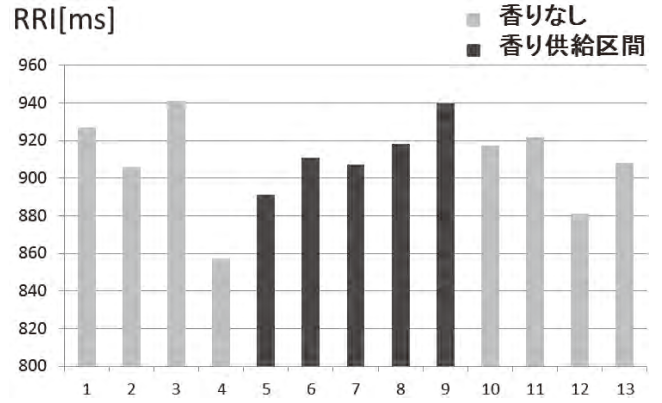


図4 (-)-linalool (濃度：高) 供給条件下の RRI の変動

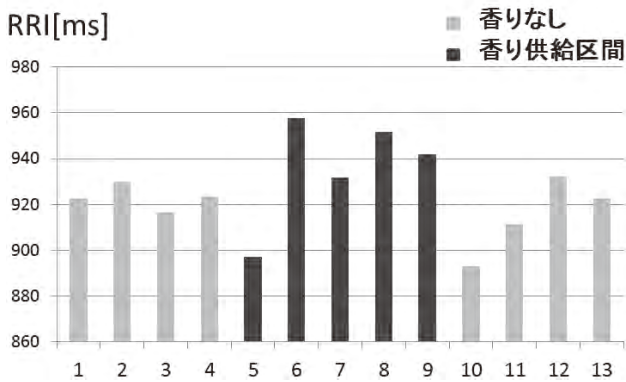


図5 1,8-cineole (濃度：低) 供給条件下の RRI の変動

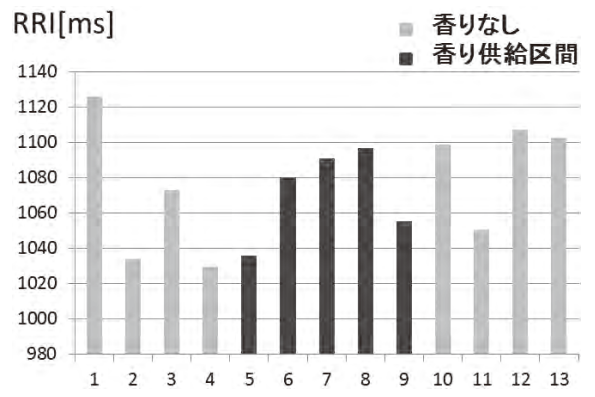


図6 1,8-cineole (濃度：高) 供給条件下の RRI の変動

表2 香りの嗜好性および強弱

		(-)-linalool						
濃度 (低)	嗜好性	嫌い	-2	(-1)	0	1	2	好き
	強弱	弱い	-2	(-1)	0	1	2	強い
濃度 (高)	嗜好性	嫌い	-2	(-1)	0	1	2	好き
	強弱	弱い	-2	(-1)	(0)	1	2	強い
		1,8-cineole						
濃度 (低)	嗜好性	嫌い	-2	-1	0	(1)	2	好き
	強弱	弱い	-2	-1	0	1	(2)	強い
濃度 (高)	嗜好性	嫌い	-2	-1	0	1	(2)	好き
	強弱	弱い	-2	-1	0	1	(2)	強い

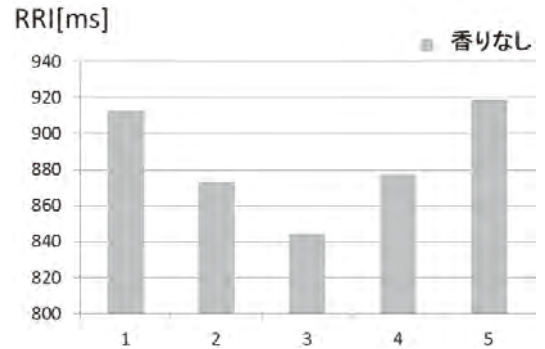


図7 コントロール条件下の RRI の変動

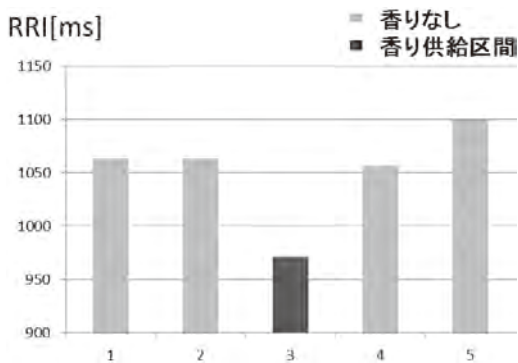


図8 (-)-linalool (濃度：低) 供給条件下の RRI の変動

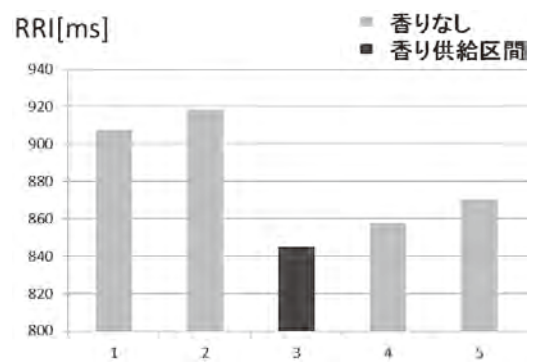


図9 (-)-linalool (濃度：高) 供給条件下の RRI の変動

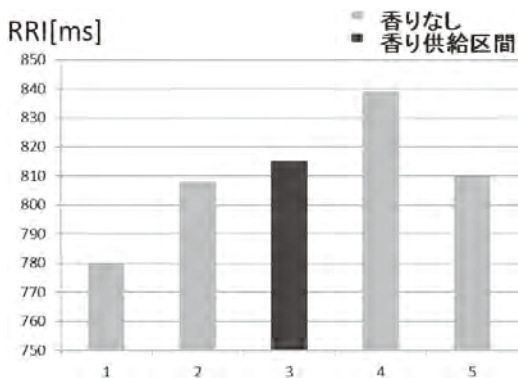


図 10 1,8-cineole (濃度:低) 供給条件下の RRI の変動

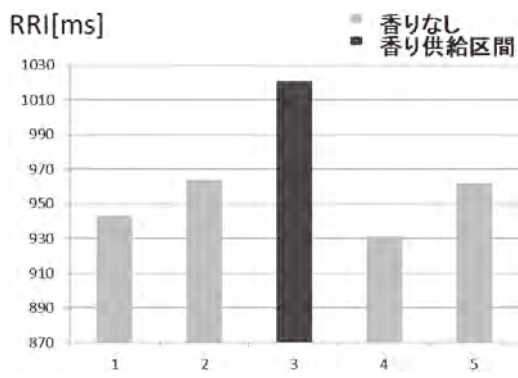


図 11 1,8-cineole (濃度:高) 供給条件下の RRI の変動

表3 香りの嗜好性および強弱

		(-)-linalool						
濃度 (低)	嗜好性	嫌い	-2	(-1)	0	1	2	好き
	強弱	弱い	-2	(-1)	0	1	2	強い
濃度 (高)	嗜好性	嫌い	-2	-1	(0)	1	2	好き
	強弱	弱い	-2	-1	(0)	1	2	強い
		1,8-cineole						
濃度 (低)	嗜好性	嫌い	-2	-1	0	(1)	2	好き
	強弱	弱い	-2	-1	0	(1)	2	強い
濃度 (高)	嗜好性	嫌い	-2	-1	0	1	(2)	好き
	強弱	弱い	-2	-1	0	(1)	2	強い

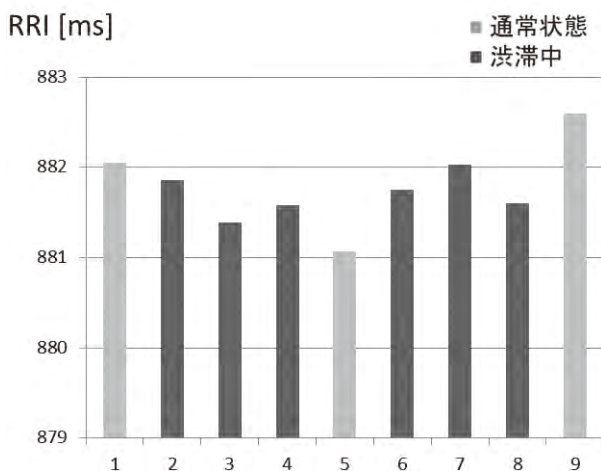


図12 (-)-linalool (濃度:低) 供給条件下の RRI の変動 (シナリオB)

3.3 DS実験

3.3.1 香りの嗜好性

被験者の香りの嗜好性および感じた匂いの強弱を表3に示す。

3.2.2 アンケート結果

走行開始直前, 走行直後, 実走行終了直後に行ったアンケート結果の詳細は紙面の都合上割愛するが, 低・高濃度の (-)-linalool を供給した場合は, 実験開始直前に比べ疲れが増加した。

3.2.3 各条件下における RRI の変動

図12から図15にそれぞれ, (-)-linalool (濃度:低), (-)-linalool (濃度:高), 1,8-cineole (濃度:低), 1,8-cineole (濃度:高) の供給条件下の「大渋滞①」の通常状態, 「大渋滞①」, 通常状態, 「大渋滞②」の間の RRI の変化を示す。なお, 通常状態からは120秒間の中間にあたる90秒分のデータを切り出した。また渋滞中からは, 360秒間の区間内前後45秒のデータを切り捨て, 中間の90秒のデータ3回分を切り出した。

図12および図13に示すように, (-)-linalool を供給した場合, 濃度の高低にかかわらず, 香りの影響によると考え

られる RRI の変動は見られなかった。

一方1,8-cineole を供給した場合は2条件下とも, 香りを供給しなかった前半の「大渋滞①」の時の RRI に比べ, 供給した時の「大渋滞②」におけるその値は上昇傾向にあった。従って, 被験者S1にとって渋滞シナリオの運転中の状態改善に, 1,8-cineole は有用であると考えられる。

4. 考察

精神的ストレスを与えられた場合, 肉体的ストレスを与えられた場合では, 香りの嗜好性が異なることが表1と表2の結果から示される。特にこれは (-)-linalool (濃度:低) の結果が顕著である。肉体的ストレスを与えられた時に, 嗜好性は低くなり, 肉体的ストレスの緩和にこの香りは影響していない。

一方1,8-cineole (濃度:高) の嗜好性は肉体的ストレスを与えられた場合に上昇しており, ストレスの緩和に有効であることが RRI の変動よりわかる。精神的ストレスを与えられた場合も, 1,8-cineole を供給した場合に RRI の値が上昇したことから, この被験者にとっては1,8-cineole は両ストレスの緩和に有用な香りであると推定できる。

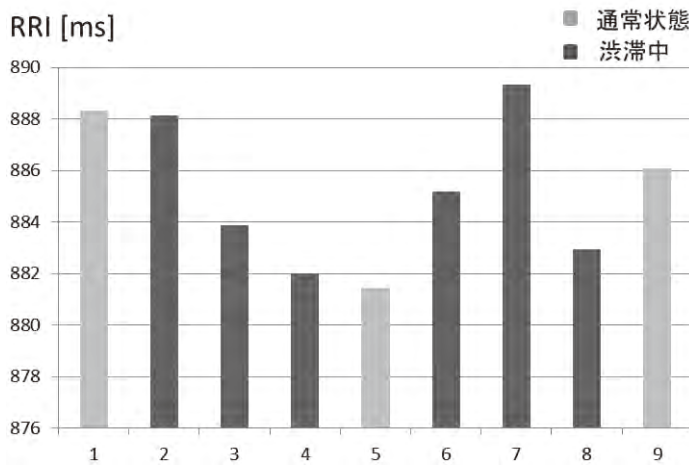


図 13 (-)-linalool (濃度:高)供給条件下の RRI の変動 (シナリオ A)

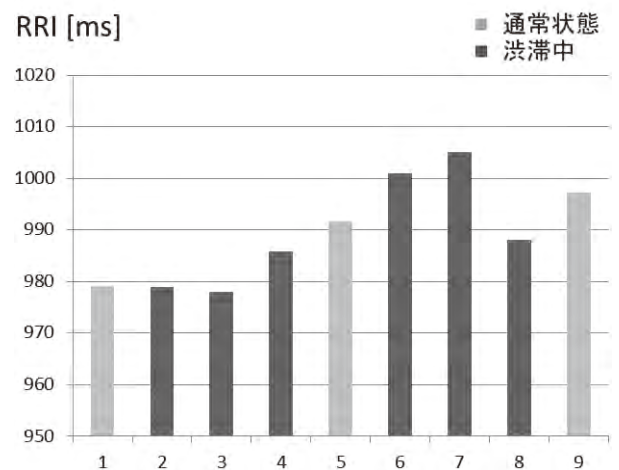


図 14 1,8-cineole (濃度:低)供給条件下の RRI の変動 (シナリオ A)

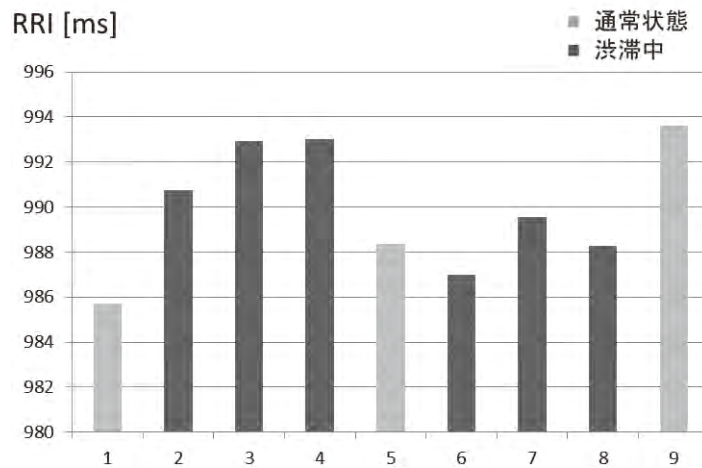


図 15 1,8-cineole (濃度:高)供給条件下の RRI の変動 (シナリオ B)

また渋滞中に感じるストレスに対しては、(-)-linalool は影響をほとんどおよぼさなかったが、1,8-cineole は解消させる傾向にあることがわかった。DS実験の終了後、この香りが供給されたとき、気分がすっきりしたと被験者が答えたことから、この香りが気分を与える影響も大きいと考えられる。この被験者は(-)-linalool よりも1,8-cineole を好む傾向にあり、刺激効果のある物質ではあるが、好きな香りで気分転換もできリラックスしたと考えられる。

(参考文献)

1) <http://www.shutokodeikou.jp/kensho/article/37.php>
首都高ドライバズサイト：首都高速道路株式会社
2) 平松真知子, 笠井純一, 田口満：自動車技術会論文集, Vol.26, No.2, 88-93,1995
3) 鈴木桂輔, 佐藤桂, 太田浩司:ヒューマンインタフェース学会学会誌 Vol.12, No.3, 115-124, 2010

4) Hoeflerl M, Krist S,Buchbauer G: Planta Medica, 72(13), 1188-1192, 200
5) Hongratanaworakit T: Sci Pharm, 77, 375-387, 2009
本研究内容は下記の学会にて発表いたしました。
1) K. Sato, M. Nagai. “Influence of (-)-linalool and 1,8-cineole on physical stress” International conference on natural products 2014, Putrajaya, Malaysia, March 2014 (要旨提出済み)
2) 寺沢拓馬, 佐藤桂, 永井正夫, “芳香物質が肉体的ストレスに及ぼす影響の心電図測定による評価”, 日本人間工学会東海支部2013年研究大会, 愛知, 2013年11月
3) K. Sato, T. Terasawa, M. Nagai. “Influence of aroma compounds on the driver’s mental and physical stress” 44th International symposium on essential oil, Budapest, Hungary, September 2013

女性の化粧顔の認知に関わる神経機構と顔の部分的化粧の影響について —機能的磁気共鳴画像法を用いた検討—

¹東北福祉大学感性福祉研究所、²東北大学大学院医学系研究科高次機能障害学分野

藤井 俊勝¹、上野 彩²、川崎 伊織²、伊藤 文人²

We conducted two functional magnetic resonance imaging (fMRI) experiments to explore neural correlates of facial recognition with cosmetics. In the first experiment, 28 subjects were presented with 144 face photographs (48 with cosmetics, 48 without cosmetics, and 48 scrambled photographs), and were asked to rate each stimulus for attractiveness. The face photographs with cosmetics were rated more attractive than those without cosmetics. Imaging data showed that face photographs with cosmetics, compared with those without cosmetics, activated the orbitofrontal cortex and the hippocampus. In the second experiment, 30 subjects were presented with 180 face photographs (36 with eye, lip, and foundation, 36 with eye and foundation, 36 with lip and foundation, 36 with foundation only, and 36 without cosmetics) and 36 scrambled images, and were asked to rate each stimulus for attractiveness. Imaging data showed that face photographs with eye make-up compared with those without eye make-up activated the hippocampus. We speculate that orbitofrontal activation is associated with increased facial attractiveness and hippocampal activation with enhanced memory encoding.

1. 緒言

これまでの心理学的研究から、化粧という行為が魅力度を上げることが知られている。化粧の各段階について(1)ノーメイクの状態、(2)ファンデーションのみの状態、(3)ファンデーションとアイメイクのみの状態、(4)ファンデーションとリップメイクのみの状態、(5)フルメイクの状態の5段階に分類し、それらが魅力度をどのように変化させるかについて検討した報告は、フルメイクの顔が、同一人物のノーメイクの顔に比べ、より魅力的であると評価されることを明らかにした¹⁾。また、評価をする際、女性にとってアイメイクが最も重要であった一方で、男性ではアイメイクとファンデーションが最も影響を持っていることが明らかとなった。その後の心理学研究では、化粧をしている女性が化粧をしていない女性に比べ、より健康的で自信に満ち、高い収入を得る能力を持ち権威のある職業に就いていると判断される傾向があることも報告されている²⁾。これらの報告は、化粧が他者からの印象形成において重要な役割を担っていることを明らかにしている。

一方、近年の脳機能画像法を用いた研究は、魅力的な顔を見たときの脳活動や好みの顔に対する脳活動を計測している。これらの研究は、眼窩前頭皮質が顔の魅力度や、顔に対する好みの処理に関わっていることを明らかにした³⁻⁵⁾。

しかしながら、化粧による魅力度の変化がどのように脳内で処理されているかについて、その詳細は明らかにされ

ていない。本研究では、実験1において、化粧による魅力度の上昇がどのように脳内で処理されているか、実験2においては化粧の過程を細分化し、各段階における顔を見ている際の脳活動を、磁気共鳴画像(fMRI: functional magnetic resonance imaging)を用いて検討した。

2. 実験

2.1 実験1

2.1.1 被験者

被験者は、精神疾患および神経疾患の既往がなく、Edinburgh利き手検査⁶⁾の結果、右利きであると確認された健常被験者28名(男性14名・女性14名、平均年齢20.7歳、年齢範囲20-26歳)であった。全被験者に対し、ヘルシンキ宣言に基づいた本研究の主旨・内容・実験の安全性および被験者の権利に関する説明を行い、書面による参加の同意を得た。本研究は東北福祉大学感性福祉研究所倫理委員会の承認を得て実施した。

2.1.2 刺激

事前に48名の若年女性(平均年齢21.5歳、年齢範囲18-25歳)について顔写真の撮影を行った。顔写真撮影の参加者全員に対し、事前に写真撮影の趣旨・内容・プライバシーの保護について説明を行った。その後、全員から書面による参加の同意を得た。写真撮影の参加者はfMRI実験には参加していない。顔写真の撮影は顔が正面を向いた状態で、DMC-FX7を使用し行った。また、撮影時にはフラッシュを使用し、解像度は1920×1080とした。参加者には表情が情動的にならないよう教示した。撮影条件はフルメイクをした状態(48枚)とメイクをしていない状態(48枚)の2条件である。メイクは各々の参加者に行ってもらった。撮影終了後、各々の顔写真は画像編集ソフト(Adobe Photoshop CS5.1)で色調・コントラストを補正した後、グラフィックソフト(Adobe Illustrator CS5.1)で顔の輪



*

Neural correlates of facial recognition with and without cosmetics: an fMRI study

*Toshikatsu Fujii¹, Aya Ueno², Iori Kawasaki², Ayahito Ito²

¹Life Science Research Center, Kansei Fukushi Research Institute, Tohoku Fukushi University, Sendai, Japan

²Department of Behavioral Neurology and Cognitive Neuroscience, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan

郭に合わせて切り抜き、黒の背景の中心にその顔写真を配置した(図1)。また、それぞれのノーメイク画像を20×20ピクセルに切り分けた後、配置をランダム化し、輝度・コントラスト情報が全く同一のスクランブル刺激を作成した。このスクランブル刺激も、顔写真と同様に黒の背景の中心に配置した(図1)。すなわち、本研究の実験条件は、フルメイク画像条件(full make-up: FM)、ノーメイク画像条件(no make-up: NM)、スクランブル画像条件(scrambled: SC)であった。fMRI撮像時には、48枚のフルメイク画像(FM1-48)、48枚のノーメイク画像(NM1-48)、48枚のスクランブル画像(SC1-48)の、計144枚の刺激を使用した。実験刺激は、List AとList Bの2種類の呈示リストに基づいて呈示した。List AはFM1-24、NM25-48、SC25-48の72枚から構成された。List BはFM25-48、NM1-24、SC1-24の72枚から構成された。それぞれのリストにおいて、刺激呈示順序は完全にランダム化された。被験者の半数は最初のfMRI runでlist A、1回目のfMRI runでlist Bが呈示され、残り半数の被験者では最初のfMRI runでlist B、2回目のfMRI runでlist Aが呈示された。この手順により、被験者間でカウンターバランスを行った。

2.1.3 実験手続き

fMRI撮像は、1 runあたり約11分間のスキャンを2 runs実施した。刺激呈示と被験者の行動データ取得の記録はWindows XP上で動作する刺激呈示ソフトであるPresentation (Neurobehavioral Systems, Albany, CA)を用いて行った。fMRI撮像中、被験者にはプロジェクターからの刺激が鏡を介して呈示された。刺激呈示時間は2.5秒であり、各刺激間には固視点を呈示した(図1)。固視点の呈示時間については5秒、7.5秒、10秒を3:2:1の割合で振り分けた。刺激が呈示された際に、被験者は呈示された顔刺激の魅力度(1:非常に魅力的ではない~6:非常に魅力的だ)について、左右の手に持ったボタンを押すことにより6段階で評定するよう教示された。また、スクランブル画像に対しては、魅力度の評定に使用しない左右どちらかの小指のボタンを押すように教示された。このボタン押しについても被験者間でカウンターバランスを行った。なお、被験者はfMRI撮像前に、刺激に対するボタン押しについて説明を受け、事前練習を行った。

2.1.4 データ取得・解析

脳画像の取得には、静磁場強度3.0テスラーのMRIスキャナー(MAGNETOM Verio, Siemens, Germany)を使用した。機能画像は、T2*-weighted echo planar imaging(EPI)法で撮像し、各パラメータはrepetition time (TR)=2500ms、echo time (TE)=30ms、flip angle=90°、matrix size=80×80、field of view=240 mm、slice number=43、slice thickness=3 mm、interslice gap=0.5 mmであった。また、脳底部付近の信号減少を改善するため、撮像は前交連と後

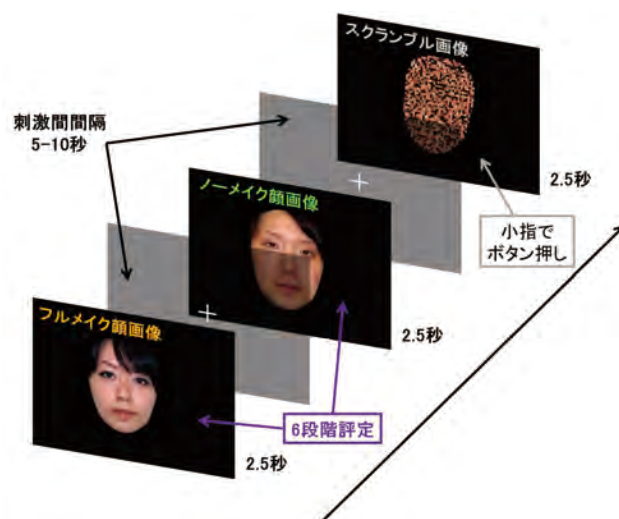


図1 実験1における実験刺激、及び課題説明図

実験刺激として、48枚のフルメイク画像、48枚のノーメイク画像、ノーメイク画像と同一の輝度・コントラスト情報を持つ48枚のスクランブル画像の3種類を使用した。fMRI撮像中、被験者にはこれらの画像をランダムに2.5秒間呈示した。被験者は、フルメイク画像とノーメイク画像に対してはボタン押しによる6段階の魅力度の評価を行い、スクランブル画像に対しては、小指を使った単純なボタン押しを行った。

交連を結ぶ直線から30°傾けて行った⁷⁾。構造画像は、magnetization prepared rapid acquisition gradient echo (MP-RAGE)法で撮像し、各パラメータはTR=1900ms、TE=2.99ms、flip angle=9°、matrix size=256×256、field of view=256 mm、slice number=176、slice thickness=1 mmであった。撮像中は、頭部の動きを最小限に抑えるためクッションによって頭を固定した。脳機能画像の各2 runsの撮像の最初の4枚(10秒分)は縦磁化が定常状態でない可能性があるため、解析から除外した。

本実験におけるデータ解析には、Matlab7.11.0(R2010b)(MathWorks, Natic, MA, USA)ソフトウェア上で実行されるSPM8 (Statistical Parametric Mapping 8; Wellcome Department of Imaging Neuroscience, London, UK)を使用した。まず、機能画像と構造画像の初期位置のずれを補正した(Reorientation)。その後、頭部の動きの影響を除外するために、動きの検出とその補正を行った(Realignment)。次に、機能画像のスライス間の撮像時刻のずれを補正した(Slice timing correction)。続いて、同一被験者の動き補正後の機能画像と構造画像の頭部の位置合わせを行い(Coregistration)、構造画像の灰白質/白質/脳脊髄液の分離手続きを行った(Segmentation)。各被験者の機能画像データを標準座標系に変換するため、まずSegmentationがなされた構造画像の灰白質のMontreal Neurological Institute (MNI) templateへの解剖学的標準化(re-sampled voxel size=3 mm×3 mm×3 mm)を行い(Spatial Normalization)、この際の変換パラメータを用いて各被験者の全機能画像

データの標準化を行った。その後、半値幅 (FWHM) 8 mm の3次元ガウシアンフィルターを用いて、空間的に標準化された機能画像を平滑化した (Spatial Smoothing)。機能画像の統計解析は、FM条件、NM条件、SC条件の3条件について行った。課題間のBOLD信号の解析における有意水準は、多重比較補正を行わない $p < 0.001$ とし、クラスターサイズで5ボクセル以上の領域を有意な賦活領域として同定した。

2.2 実験2

2.2.1 被験者

被験者は、精神疾患および神経疾患の既往がなく、Edinburgh利き手検査⁶⁾の結果、右利きであると確認された健常被験者30名 (男性15名・女性15名、平均年齢20.9歳、年齢範囲20-25歳)であった。全被験者に対し、ヘルシンキ宣言に基づいた本研究の主旨・内容・実験の安全性および被験者の権利に関する説明を行い、書面による参加の同意を得た。本研究は東北福祉大学感性福祉研究所倫理委員会の承認を得て実施した。

2.2.2 刺激

実験1で使用された顔写真の人物に対し、部分化粧 (ノーメイク、ファンデーションメイク、リップメイク、アイメイク、フルメイクの5条件)を施した場合の顔について撮影を行った。顔写真の撮影は顔が正面を向いた状態で、DMC-FX7を使用し行った。また、撮影時にはフラッシュを使用し、解像度は1920×1080とした。参加者には表情が情動的にならないよう教示した。メイクは各々の参加者に行ってもらった。撮影終了後、各々の顔写真は画像編集ソフト (Adobe Photoshop CS5.1) で色調・コントラストを補正した後、グラフィックソフト (Adobe Illustrator CS5.1) で顔の輪郭に合わせて切り抜き、黒の背景の中心にその顔写真を配置した。また、それぞれのノーメイク画像を20×20ピクセルに切り分けた後、配置をランダムマイズし、輝度・コントラスト情報が全く同一のスクランブル刺激を作成した。このスクランブル刺激も、顔写真と同様に黒の背景の中心に配置した。すなわち、本研究の実験条件は、ノーメイク画像条件 (no make-up: No)、ファンデーションメイク画像条件 (foundation make-up: Foun)、リップメイク画像条件 (lip make-up: Lip)、アイメイク画像条件 (eye make-up: Eye)、フルメイク画像条件 (full make-up: Full)、スクランブル画像条件 (scrambled: SC) の6条件であった。fMRI撮像時には、各条件36枚、計216枚の刺激を使用した。実験刺激は、被験者ごとに事前に作成された刺激呈示順序リストに基づいて呈示した。リスト作成においては、同じ顔が連続しないように留意した。

2.2.3 実験手続き

fMRI撮像は、1 runあたり約11分間のスキャンを3

runs実施した。刺激呈示と被験者の行動データ取得の記録はWindows XP上で動作する刺激呈示ソフトであるPresentation (Neurobehavioral Systems, Albany, CA)を用いて行った。fMRI撮像中、被験者にはプロジェクターからの刺激が鏡を介して呈示された。刺激呈示時間は2.5秒であり、各刺激間には固視点を呈示した。固視点の呈示時間については5秒、7.5秒、10秒を3:2:1の割合で振り分けた。刺激が呈示された際に、被験者は呈示された顔刺激の魅力度 (1:非常に魅力的ではない~6:非常に魅力的だ) について、左右の手に持ったボタンを押すことにより6段階で評定するよう教示された。また、スクランブル画像に対しては、魅力度の評定に使用しない左右どちらかの小指のボタンを押すように教示された。このボタン押しについても被験者間でカウンターバランスを行った。なお、被験者はfMRI撮像前に、刺激に対するボタン押しについて説明を受け、事前練習を行った。

2.2.4 データ取得・解析

脳画像の取得とデータ解析は、基本的に実験1と同様の方法で行った。機能画像の統計解析は、No条件、Foun条件、Lip条件、Eye条件、Full条件の5条件について行った。課題間のBOLD信号の解析における有意水準は、多重比較補正を行わない $p < 0.001$ とし、クラスターサイズで5ボクセル以上の領域を有意な賦活領域として同定した。

3. 結果

3.1 実験1の結果

3.1.1 行動データ

fMRI撮像中に得られた反応時間と顔の魅力度の評定値のデータを図2に示す。反応時間において、FM条件とNM条件の各平均値とSDは、FM条件で1711ms (SD=488)、NM条件で1704ms (SD=508)であった。次に、これら2条件間でt検定を行ったが有意差は認められなかった ($t(54) = 0.05, p = 0.72$)。

顔の魅力度の評定値において、FM条件とNM条件の各平均値とSDは、FM条件で3.6 (SD=0.5)、NM条件で3.0 (SD=0.4)であった。次に、これら2条件間でt検定を行った。その結果、NM条件に比べ、FM条件では評定値が有意に高いことが明らかになった ($t(54) = 4.72, p < 0.01$)。

3.1.2 脳機能画像データ

スクランブル画像を見ている場合と比べ、ノーメイク顔画像を見ている場合に、中脳、両側紡錘状回、両側側坐核の有意な賦活が認められた (図3)。ノーメイク顔画像を見ている場合と比較して、フルメイク顔画像を見ている場合に、左眼窩前頭皮質、右海馬の有意な賦活が認められた (図4)。

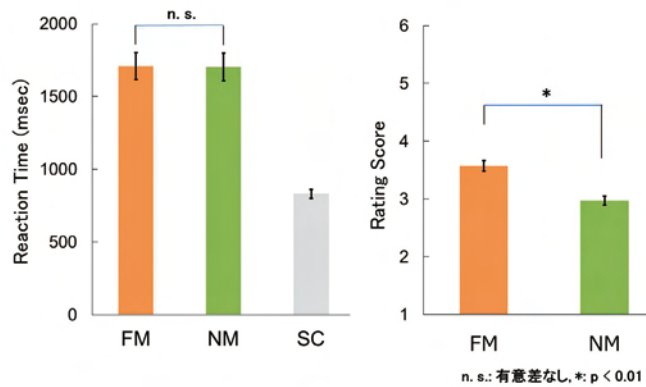


図2 実験1における行動データの結果

左のグラフは各条件の反応時間の平均値を、右のグラフは各条件の魅力度評定値の平均値を示す。エラーバーは誤差範囲（標準誤差）を示す。

FM, フルメイク画像条件；NM, ノーマイク画像条件；SC, スクランブル画像条件。

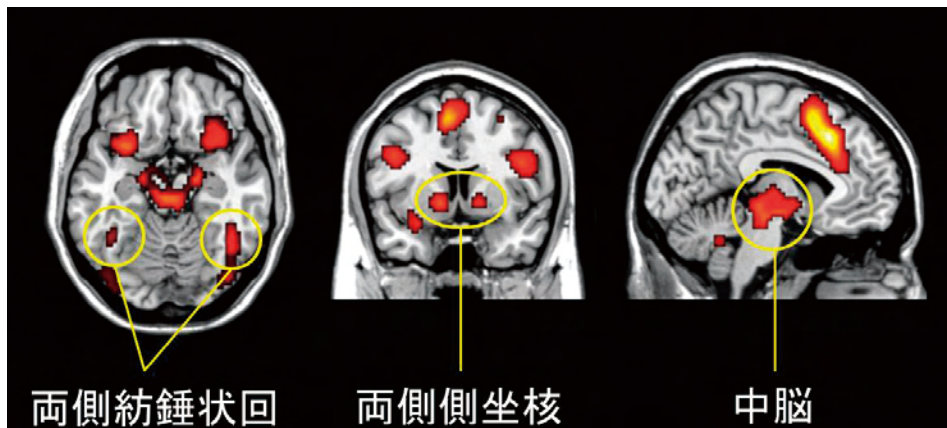


図3 実験1において、顔を見ている際に有意な賦活が認められた脳領域
スクランブル画像を見ている場合と比較して、ノーマイク画像を見ている場合に、両側の紡錘状回、両側の側坐核、中脳の有意な賦活が認められた。

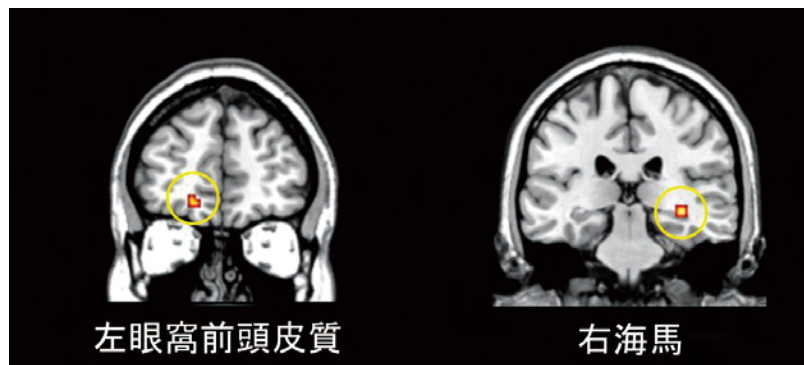


図4 実験1において、フルメイク顔画像を見ている際に有意な賦活が認められた脳領域
化粧をしていない場合と比較して、化粧をしている場合に、左眼窩前頭皮質、右海馬の有意な賦活が認められた。

3.2 実験2の結果

3.2.1 行動データ

fMRI撮像中に得られた反応時間と顔の魅力度の評定値のデータは図5に示す。

反応時間において、No条件、Foun条件、Lip条件、Eye条件、Full条件の各平均値とSDは、No条件で1606ms (SD=265)、Foun条件で1620ms (SD=264)、Lip条件で1643ms (SD=286)、Eye条件で1681ms (SD=290)、Full条件で1674ms (SD=387)であった。次に、これらの条件間で一元配置分散分析を行った。Greenhouse-Geisserの自由度の補正を行った結果、 $F(2.99, 86.7) = 6.47, p < 0.001$ で、反応時間に有意差が認められた。多重比較を行った結果、No条件、Foun条件それぞれに比べEye条件では反応時間が有意に遅く、Foun条件に比べFull条件で反応時間が有意に遅いことが明らかとなった ($p < 0.05$)。

顔の魅力度の評定値において、各条件の平均値とSDは、No条件で2.5 (SD=0.5)、Foun条件で2.9 (SD=0.3)、Lip条件で3.0 (SD=0.3)、Eye条件で3.2 (SD=0.3)、Full条件で3.1 (SD=0.6)であった。次にこれらの条件間で一元配置分散分析を行った。Greenhouse-Geisserの自由度の修正を行った結果、 $F(2.88, 83.5) = 52.3, p < 0.001$ で、顔の魅力度の評定値に有意差が認められた。多重比較を行った結果、No条件に比べ、その他全ての条件で評定値が有意

に高いことが明らかとなった ($p < 0.001$)。Foun条件に比べEye条件、Full条件それぞれで評定値が有意に高いことが明らかとなった ($p < 0.01$)。またLip条件に比べEye条件で評定値が有意に高く ($p < 0.001$)、Full条件でも評定値が有意に高いことが明らかとなった ($p < 0.01$)。しかし、Foun条件とLip条件の間、Eye条件とFull条件の間には有意差は認められなかった ($p = 0.33, p = 0.48$)。

3.2.2 脳機能画像データ

目の化粧が施されていない顔を見ている場合に比べ、目の化粧が施された顔を見ている場合に、左海馬の有意な賦活が認められた (図6)。逆に、目の化粧が施された場合に比べ、口の化粧が施された顔を見ている場合には有意に賦活する脳領域は認められなかった。また、口の化粧が施された顔と、口の化粧が施されていない顔を見ている場合の脳活動の比較を行った結果、有意な賦活は認められなかった。

4. 考察

実験1では、化粧をしている他者の顔と化粧を全くしていない他者の顔を見ている際の魅力度についての評定値と脳活動を比較して、その化粧がもたらす魅力度の変化について検討を行った。行動データの結果から、化粧をしている顔は化粧を全くしていない顔に比べ、魅力度が有意に高

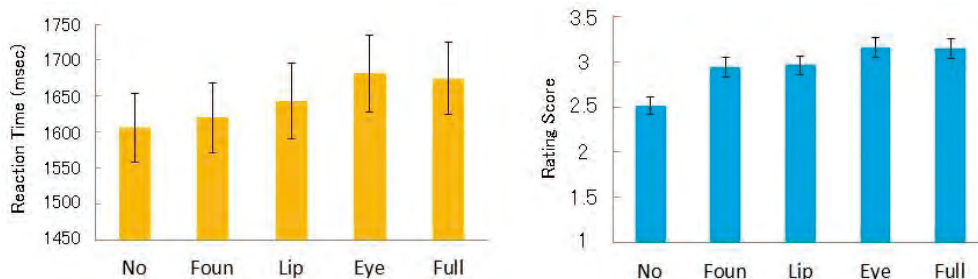


図5 実験2における行動データの結果

左のグラフは各条件の反応時間の平均値を、右のグラフは各条件の魅力度評定値の平均値を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

No, ノーマイク画像条件; Foun, ファンデーションメイク画像条件; Lip, リップメイク画像条件; Eye, アイメイク画像条件; Full, フルメイク画像条件。

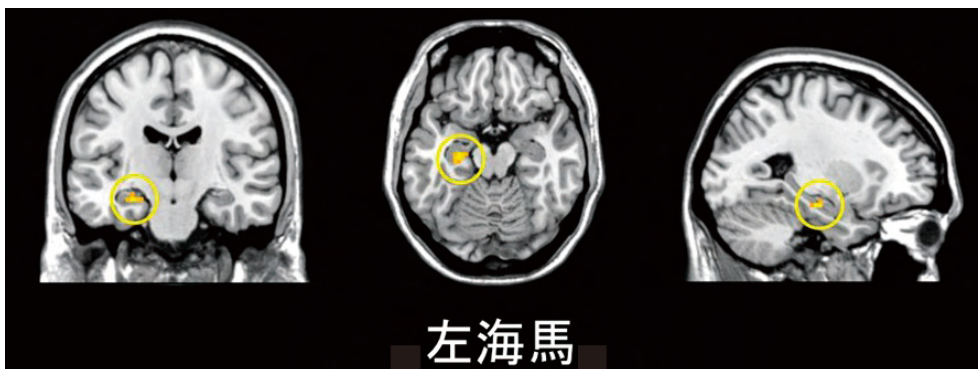


図6 実験2において、目の化粧が施された顔を見ている際に有意な賦活が認められた脳領域。目の化粧を施していない場合と比較して、目の化粧をしている場合に、左海馬の有意な賦活が認められた。

く評定されることが明らかとなった。この結果は先行研究とも一致しており、化粧がそれを施した人物の顔の魅力度を高めるといふ過去の知見を支持するものである。

脳機能画像データの結果から、スクランブル画像を見ている場合と比べ、ノーメイク顔画像を見ている場合に、中脳、両側紡錘状回、両側側坐核の有意な賦活が認められた。過去のfMRI実験では、顔を認知することに右の紡錘状回が関わっていることが明らかにされており⁸⁾、本研究において認められた紡錘状回の賦活は、先行研究の結果を支持するものであると考えられる。また、紡錘状回に加えて中脳と側坐核の活動も見られた。この二つの領域は「報酬系」と呼ばれるシステムの中核的な部位であることから、顔を見ること自体がヒトにとっての報酬となっている可能性を示唆するものであると考えられる。

また、ノーメイク顔画像を見ている場合と比較して、フルメイク顔画像を見ている場合に、左眼窩前頭皮質と右海馬の有意な賦活が認められた。化粧をしている顔は化粧を全くしていない顔に比べ、魅力度が有意に高く評定されたことを考慮に入れると、フルメイク画像を見ている場合に認められた眼窩前頭皮質の賦活は、顔の魅力度判断に関わっている可能性が高い。この眼窩前頭皮質の賦活は顔の魅力度判断に関わる神経基盤を検討した過去の研究結果と矛盾しないものであった。海馬は記憶に重要な役割を果たしている領域であることから⁹⁾、化粧により魅力度が上昇したことにより、化粧をしていない顔を見た時に比べ記憶が強く行われた可能性が想定される。

実験2では、ノーメイク画像、ファンデーションメイク画像、リップメイク画像、アイメイク画像、フルメイク画像を用いて、部分的な化粧が脳内でどのように処理されているか検討した。行動データの結果からフルメイク条件とアイメイク条件で最も魅力度が高まることが明らかとなった。また、ファンデーション条件とリップメイク条件では、ノーメイク条件よりも有意に魅力度が高まることが明らかとなった。しかしながら、フルメイク条件、アイメイク条件に比べると魅力度は有意に低いことが明らかとなった。これらの結果は過去の心理学研究を支持するものであると考えられる。

脳機能画像データの結果から、目の化粧が施されていない場合に比して、目の化粧が施されている場合に、海馬の有意な賦活が認められた。また、口の化粧の有無に対して、海馬の活動の変化は有意ではなかった。これらのことから、目の化粧が特に魅力度の上昇にとって重要であると考えられ、目の化粧により魅力度が上昇することで、その顔の記憶も高まっている可能性が想定される。

5. 総括

本研究では、女性の化粧顔の認知に関わる神経機構と顔

の部分的化粧の影響について、磁気共鳴画像法を用いた検討を行った。化粧をしている他者の顔と化粧を全くしていない他者の顔とを比較して、その魅力度に変化があるかどうかを行動データと脳機能画像データから検討を行った結果、過去の心理実験と同様に、化粧が顔の魅力度を高めることが明らかとなった。脳機能画像データの結果から、化粧による魅力度の上昇に海馬と眼窩前頭皮質が関わっていることが明らかとなった。更に、部分的な化粧が魅力度に与える影響を検討した結果、口の化粧に比べて、目の化粧が特に魅力度の上昇に重要であることが示唆された。脳機能画像データから、目の化粧が施されていない場合に比べ、目の化粧が施されている場合に海馬の有意な賦活が認められた。これらの結果は、化粧により魅力度の上昇した顔が脳内で報酬として処理されていることと魅力度の上昇がその顔の記憶を高めることを示唆している。

(引用文献)

- 1) Mulhern, R., Fieldman, G., Hussey, T., Leveque, J.L. & Pineau, P. Do cosmetics enhance female Caucasian facial attractiveness? *Int J Cosmet Sci* **25**, 199-205 (2003).
- 2) Nash, R., Fieldman, G., Hussey, T., Leveque, J.L. & Pineau, P. Cosmetics: They influence more than Caucasian female facial attractiveness. *J Appl Soc Psychol* **36**, 493-504 (2006).
- 3) Ishai, A. Sex, beauty and the orbitofrontal cortex. *Int J Psychophysiol* **63**, 181-185 (2007).
- 4) Lebreton, M., Jorge, S., Michel, V., Thirion, B. & Pessiglione, M. An automatic valuation system in the human brain: evidence from functional neuroimaging. *Neuron* **64**, 431-439 (2009).
- 5) O'Doherty, J., et al. Beauty in a smile: the role of medial orbitofrontal cortex in facial attractiveness. *Neuropsychologia* **41**, 147-155 (2003).
- 6) Oldfield, R.C. The assessment and analysis of handedness: the Edinburgh inventory. *Neuropsychologia* **9**, 97-113 (1971).
- 7) Deichmann, R., Gottfried, J.A., Hutton, C. & Turner, R. Optimized EPI for fMRI studies of the orbitofrontal cortex. *NeuroImage* **19**, 430-441 (2003).
- 8) Kanwisher, N., McDermott, J. & Chun, M.M. The fusiform face area: a module in human extrastriate cortex specialized for face perception. *J Neurosci* **17**, 4302-4311 (1997).
- 9) Tsukiura, T. & Cabeza, R. Remembering beauty: roles of orbitofrontal and hippocampal regions in successful memory encoding of attractive faces. *NeuroImage* **54**, 653-660 (2011).

記念講演

●
第 24 回表彰・贈呈式記念講演 天谷 雅行
●

角層を科学する

慶應義塾大学医学部皮膚科 教授

天谷 雅行



あまがい・まさゆき

慶應義塾大学大学院医学部研究科博士課程修了後、米国国立衛生研究所 (NIH) に留学、愛媛大学医学部皮膚科助手、慶應義塾大学医学部皮膚科専任講師を経て、2005年に同大学皮膚科教授に就任。

2007年10月から2013年の9月まで同大学病院副院長、同年4月から理化学研究所・総合生命医学研究センターチームリーダー (非常勤)、10月から慶應義塾大学医学部学部長補佐を兼任。

・専門分野：自己免疫性皮膚疾患 (特に天疱瘡を中心とした基礎及び臨床研究)、アレルギー性疾患 (特にアトピー性皮膚炎の基礎及び臨床研究)

・その他：日本学術振興会賞、日本免疫学会賞、ベルツ賞ほか数多くの賞を受賞

大変ご丁寧な、また、過分なご紹介ありがとうございます。また、このような講演の機会を与えていただきました。 Cosmetology 研究振興財団の皆様にも心から感謝いたします。そして、きょう研究助成を受賞なさった皆さん、ほんとうにおめでとうございます。私自身も数年前、この賞をいただき、研究活動に使わせていただき、大変たすかりました。

きょうは角層という話をしたいと思います。今までは、この角層というのは、どちらかという皮膚の「あか」とかの認識しかなく邪魔もの扱いでした。免疫学の世界ですと、最初に抗原を感作するときに、皮膚に塗ってもなかなか免疫がつかないので、角層のバリアを越えるために針で角層を物理的にぶち抜いて、角層の下に抗原を投与し感作させ、そこから免疫の実験が始まっていました。ところが、この角層が今非常に熱く、おもしろいという話を今日はしたいと思います。

私は、皮膚科医です。11月12日、皮膚の日というのを、日本臨床皮膚科医会と日本皮膚科学会が合同で、全国でさまざまな企画を行っています。それと同時に毎年このようなポスターをつくっています。「いい皮膚」のイメージとして、ここ数年、ずっと赤ちゃんの写真が使われています。やはり赤ちゃんの皮膚というのはみずみずしく、美しく、健康的で、素晴らしいと思います。

でも、この皮膚を標的としてさまざまな疾患が起こります。その1つが本日話題にするアトピー性皮膚炎です。いろんな統計がありますが、現在では、5人に1人はアトピー性皮膚炎、あるいは、鼻炎、食物アレルギー、喘息を含むアトピー性疾患にかかると言われており、社会的な問題でもあります。非常に健康である皮膚が、炎症を起こしてしまうと、本来の皮膚の機能を損なうばかりではなく、外観もかなり損なうものになります。

アトピー性皮膚炎は私たち皮膚科医にとっても大きな課題でした。そのアトピー性皮膚炎に関して教科書をひもといてみると、いろいろな病態・成因が複雑に絡み合うことが記載されています。その1つ1つの項目は正しいのです

が、もう少し病態がわかってくると、それぞれの項目に上下関係があり、どれが上流でどれが下流の出来事が明らかになってくるはずですが、でも、わからないときには、こうやって私たち医師は羅列的に理解をし、それぞれに対する対策を立て、治療として提供するわけです。

私自身、皮膚科医になって30年近く経ちましたが、アトピー性皮膚炎というのは難しい疾患だなとずっと思っていました。ところが、2006年、ダンディー大学のマックリー博士らが大きな発見をしました。私は、この発表を米国研究皮膚科学会という学会の会場で、千人以上の聴講者の1人として聞いておりました。その発表の内容は、アトピー性皮膚炎の患者さんの多くに、フィラグリンという蛋白の遺伝子に変異があるという発表でした。

遺伝子解析は数多く行われていて、アトピー性皮膚炎は炎症で、免疫が関与する疾患ですから、当然その原因として、免疫に関与する因子、分子が原因としてかかわってくるのではないかとすることは想像していました。そして、幾つか実際に免疫の関与する分子が発症に関与していることがわかってきています。ところが、この発見は、アトピー性皮膚炎発症における一番大きな危険因子の1つが、免疫に関与する分子ではなく、皮膚の構造を決める因子であるという点です。フィラグリンというのは角層の主要な蛋白です。つまり、アトピー性皮膚炎の発症には、炎症、免疫に直接関与する分子よりも、皮膚の構造の異常が重要であることを示しており、今までの考え方を大きく変えてしまいました。その話を聞いて私は鳥肌が立ちました。そして、皮膚の構造からアトピー性皮膚炎を攻めれば、自分たちも何かできるのではないかと感じた瞬間でもありました。

その時発表された内容が2006年の『Nature Genetics』という一流誌に掲載されていますが、「News and Views」の項目にも取り上げられています。健康な人の場合は角層がバリア機能を果たしており、外来抗原はなかなか体の中に入ってきません。ところが、フィラグリンがなくなると、角層のバリア機能が傷害され、外来抗原が容易に体の中に入って来てしまいます。体の中に入ってきた外来抗原とい

うのは当然異物ですから免疫系は排除しようと反応します。そして、外来抗原に対する免疫反応が慢性的に起こることによってアレルギー状態になるのではないかと考えられるようになりました。

今さまざまなアレルギー疾患において抗原が感作する、最初に免疫系が出会う場所は皮膚であるということが注目されています。アトピー性皮膚炎だけではなく、アレルギー性鼻炎、喘息、食物アレルギー、アナフィラキシーなどの疾患においても、最初に抗原と免疫が出会うのは皮膚であり、アレルギー性疾患発症における経皮感作の重要性が考えられています。一度経皮感作が成立してしまうと、抗原に消化管で曝露されると食物アレルギーになり、肺で曝露されると喘息になるという考え方です。

皮膚は表皮と真皮に分かれます。真皮には、血管、リンパ管、神経、付属器などがあります。表皮には、内側から外側に向かって4層に分かれます。基底層は、表皮細胞が分裂するところです。分裂した表皮細胞が外側に向かって分化し、有棘層になります。さらに分化すると、細胞内に顆粒が目立ってくる顆粒層となります。そして、表皮細胞は自分の核を壊し、細胞死を起こして、細胞体を角層の骨格として与えます。この角層は、実に正確に制御されていて、人間の場合、12から15層の厚さが保たれています。そして、最上層の15層目になると自然にハラリと剥がれていきます。これがどのような機序で、15層目ではがれていくのか、いまだにわかっていません。

フィラグリンの話に戻ります。フィラグリンは、顆粒層でフィラグリンユニットが10-12個つながった形のプロフィラグリンとして産生されます。角層に移ると1つ1つのユニットが切れ、ケラチンによる細胞骨格のネットワークに結合し、その骨格構造を強固なものにします。さらにシトルリン化などの修飾を受けた後、さらに分解されて天然保湿因子(NMF)になります。

このフィラグリンの機能を個体レベルで解析するための有力な手段として、ノックアウトマウスをつくるという方法があります。これは、マウスのフィラグリン遺伝子を翻訳できないように操作することにより、フィラグリン蛋白が全くできない個体を作出することができます。フィラグリン蛋白が完全に欠失した状態で、どのような影響がマウス個体に出るかということを観察することによって、フィラグリンの機能を類推することができるわけです。

フィラグリンを欠損したフィラグリンノックアウトマウスの角層は、外観上かさかさしており、乾燥皮膚状態を呈していました。ヒトでもそうですが、フィラグリンがないとどうやら角層がかさかさするようです。そして、かさかさした角層では、外来抗原の角層の透過性が更新していることがわかりました。外来抗原の1つの例として、今緑に光る色素を含んだリポゾームを角層に外から塗ってみると、

正常なマウスでは、この角層の一番外側にとどまっています。角層内に入っていくませんが、フィラグリンがない角層では、角層内にどんどんしみ込んでいってしまうのがわかりました。

TOF-SIMS (time-of-flight secondary ion mass spectrometry) という特殊な方法で、角層をさらに詳細に観察してみると、角層は機能的に3層に分かれていることもわかりました。カリウムイオンと天然保湿因子(NMF)のひとつであるアルギニンに分布を指標に角層を観察すると、外側から、カリウムが高くアルギニンがない層、カリウムがなくてアルギニンが高い層、カリウムもアルギニンもない層の3層があることが示されました。一番外側のカリウムが高くアルギニンがない層は、いろんなものが入ってきては出ていくという、スポンジの様な役割をしています。2番目の層、3番目の層はバリアとしての異なった機能があることがわかりました。例えば皆さんが長いことお風呂に入ったりすると角層がふやけますが、保湿因子を含んでいる2層目がふやけ、3層目は変化がないことがわかっています。新しい方法で角層を見てみると、角層は上・中・下と、少なくとも3つに分かれ、異なった機能を持っていることがわかりました。

さて、表皮バリアのひとつとして角層バリアを見てきましたが、次に2つ目のバリアであるタイトジャンクション、3つ目のバリアである免疫バリアを見ていきましょう。免疫バリアとしては、外来抗原を表皮内で捕捉することが知られているランゲルハンス細胞に注目します。

タイトジャンクションは主に腸管上皮でその役割が明らかになっています。腸管上皮は単層上皮です。腸管の管腔内と生体側の間を仕切っているのがタイトジャンクションです。タイトジャンクションは表皮に存在するのでしょうか。つい最近の2002年まで、タイトジャンクションは表皮にはないとか、あっても不完全なものしかできていないと言われていました。それはなぜでしょうか。私たちは、主に皮膚の観察を垂直に切った切片で行っています。垂直に切った切片でタイトジャンクションの分子を染めると、点状にしか見えません。でも、実は、この当たり前の垂直切片でいろんなものを検討するという方法論に問題がありました。

その問題を解消するために、皮膚組織を切片にしてから抗体で染色するのではなく、切片にする前の皮膚組織を塊の状態に染色して、三次元的に、立体的にタイトジャンクションを染色して、観察してみました。すると、表皮のタイトジャンクションは顆粒層の2層目に編み目状に形成されていることがわかりました。

ランゲルハンス細胞は、外から来た抗原を捕捉して、リンパ節に遊走して免疫を惹起する機能を持つ抗原提示細胞です。表皮を三次元染色してタイトジャンクションとラン

ゲルハンス細胞と一緒に見てみると、休止期のランゲルハンス細胞は、樹状突起を上方に向かって出していますが、その樹状の先端は決してタイトジャンクションを越えることはありません。これがこれまで思われていたランゲルハンス細胞とタイトジャンクションの位置関係です。しかし、活性化したランゲルハンス細胞は、樹状突起を上方に伸ばして、タイトジャンクションを越えて、角層のすぐ下までその突起を伸ばしていることが明らかになりました。バリアが壊れて、壊れた後にランゲルハンス細胞は抗原を捕捉するのではなく、タイトジャンクションの外側に、角層のすぐ下まで樹状突起を伸ばして、外来抗原を捕捉していることがわかりました。

このランゲルハンス細胞が樹状突起を伸ばすときにタイトジャンクションを無理やりこじあけて、タイトジャンクションを壊していくのでしょうか。それともこの樹状突起と角化細胞の間にタイトジャンクションをつくっていくのでしょうか。

普通、タイトジャンクションというのは2つの細胞の間でできます。ところが、必ず3つの細胞が集まったところというのが表皮細胞の中にあります。この部分が実はタイトジャンクションの機能上一番弱い部分であって、この弱い部分を補強するためにトリセルリンという特別な蛋白が出ます。角化細胞の3つが集まったところでは、トリセルリンが出ています。ランゲルハンス細胞が樹状突起を伸ばしてくると、必ず表皮細胞との間に3つの細胞が集まったトリセルラージャンクションができます。すると、そのトリセルラージャンクションにトリセルリンが発現されているのです。この結果により、ランゲルハンス細胞は、タイトジャンクションを壊すのではなくて、タイトジャンクションを保って、外側に樹状突起を伸ばしていることが明らかになりました。

ランゲルハンス細胞の樹状突起の先端にはランゲリンとかデクチン1などの細菌、真菌細胞のリセプターが高い濃度で発現しています。さらに、蛍光物質を外来抗原として角層に塗ったあとを詳細に観察してみると、ランゲルハンス細胞の樹状の中に取り込まれて細胞の中心のほうに輸送しているであろう像をとることもできました。

角層とタイトジャンクションとランゲルハンス細胞の3つの関係は実に秩序立って構成されていることがわかりました。ランゲルハンス細胞は、活性化すると、タイトジャンクションを抜けて樹状突起の先端を角層のすぐ下まで出して抗原を捕捉することが明らかにされました。経皮感作の起こりやすさ、起こりにくさは、角層の性状で決まっていると言うことになります。

さて、最後にもう一つ話題を提供します。それは、皮膚の付属器で最も重要なものの1つの毛です。毛は、何であるのでしょうか。もちろん物理的なバリアとしての役割は

しています。哺乳動物の定義でもあります。それ以外に、毛の役割はあるのでしょうか。

ランゲルハンス細胞が表皮の中に存在しますが、どこから表皮の中に入ってくるのか、基本的なことがわかっていませんでした。私たちの教室の永尾圭介さんが、ある方法でランゲルハンス細胞が表皮の中に全くいない状態を作って、新しいランゲルハンス細胞がどうやって表皮の中に入るのかを研究していました。そして、ランゲルハンス細胞は表皮の中で、コロニーを形成して増えていくのですが、コロニーがあると必ず毛があることに気がきました。毛とランゲルハンス細胞、あるいはその前駆細胞に何か関係があるかもしれないと考えたわけです。そこで、テープストリップにより表皮に物理的ストレスを与えた後に、皮膚の中でどのような変化が起こるのかを観察しました。その際に、生きた生物で様々な細胞の動きや機能をリアルタイムに観察することができるintravital imaging法を用いました。すると、テープストリップした30分から4.5時間の間に、白血球が毛の回りに集まってくるという現象を見いだしました。私たちは、この映像を見たとき、最初ほんとうに驚きました。

何故、毛の回りに白血球が集まるのでしょうか。毛から何かシグナルが出ているに違いないと考え、ケモカインを抗体で染色して見ると、CCL8というケモカインは、テープストリップした後、毛根で発現が上昇していることが確認されました。ひっかくという簡単な物理的刺激により、毛根からケモカインが出て、白血球を遊走させるということがわかりました。毛のもうひとつの新しい役割として、外的刺激に対する免疫センサーがあることが初めてわかりました。

ここで少し切り口を変えます。アトピー性皮膚炎をはじめとするアレルギー疾患は、最近先進国で増えています。角層機能から何か説明できることがありますでしょうか。

大手町の気温と湿度を1870年から測定した記録がありますが、高層ビルが建設され都市型になっていくと、外気温が、100年間で2℃上昇し、外気の湿度は15%以上下がっていることがわかります。私たちは建物の中で主に生活していますが、エアコンの使用により内気の湿度はさらに下がります。先進国になると、私たちはかなり低湿度の状態です。生活していることになり。それからもう一つ、入浴の習慣の違いです。イギリスのデータですが、石けんの販売量は1964年から2004年で5倍以上になっています。毎日シャンプーしたり、毎日体を洗ったり、昔の人に比べると相当きれい好きです。1人当たりの水の使用量も5倍以上です。入浴を頻回にする習慣、石けんで角層の脂質を洗い出してしまう習慣、そういうものが角層にとってはかなり厳しい環境になっているといえます。角層バリア機能を減弱させる生活環境の違いが、先進国におけるアトピー性皮

膚炎の罹患率の上昇に関係しているのかもしれませんが。

大学の外来でよくこのような患者さんを見かけます。「若い頃にアトピー性皮膚炎にかかったことはないのだけれども、最近やたらと皮膚がかゆくなるんです。皮膚科に行くと、軟膏を渡されて、つけると一時改善するけれども、またすぐ悪くなる。先生、根本から治してください。」と。その患者さんは、多くの場合、皮脂欠乏性湿疹です。患者さんの発疹の分布を見てすぐに、入浴しているときにタオルでのごし洗っていませんかということを聞きます。患者さんを見ると、腕で言えば、外側に発疹はありますが、内側には発疹はありません。つまり、タオルでこする部位に一致してかゆい湿疹ができていくことになります。そういう患者さんには、正しい入浴の方法をお教えします。タオルでこすることは止めていただいています。石けんは全身に使う必要はありません。石けんは脇の下と股にだけ使い、それ以外の部位は手で軽く流すだけで十分です。角層はこすらなくても、自然にはがれてきます。角層の外側3分の1はスポンジみたいな役割をしているので、あまり熱くないお風呂にゆっくり入っているだけで自然に汚れは取れていきます。もともと備わっている角層の力を使ってあげてください。入浴後には保湿剤を使うこともお勧めです。部屋が乾燥している時は、加湿器を使用してください。これから空気が乾燥してくる季節になりますので、正しい入浴をすることによって健康な肌を保っていただければと思います。

今年の10月1日から、私たちの大学に寄附講座が立ち上がりました。コーセースキンケア・アレルギー予防医学講座という寄附講座であります。この講座の目的は、今まで述べてきたことを中心に、このアレルギーというものがスキンケア、バリアケアで十分対応できるということがわかってまいりました。そして、この寄附講座のミッションは3つあります。アトピー性皮膚炎をはじめとするアレルギー性疾患の病態を解明すること。そして、スキンケア、バ

リアケアによるアトピー性皮膚炎の発症予防法、抑制法を社会普及させるために情報を発信すること。そして、その病態解明、社会へ情報発信するための人材を育成することです。この寄附講座、まだ始まったばかりですが、これからこの3つのミッションをしていくべく精一杯努力したいと思います。角層は化粧品領域の中で最も研究が蓄積されている分野ですが、その角層に多くの疾患が関与しているということが現在新たにわかって参りました。寄附講座の活動を通して、今後新たな展開を起こしていければと考えております。

本日の講演のまとめです。角層は外来抗原が体内に入らないように大切なバリアの働きをしています。そしてフィラグリンは角層機能に重要な蛋白です。フィラグリン遺伝子変異があるとアトピー性皮膚炎になりやすくなります。そして、角層を通過してきた外来抗原は、ランゲルハンス細胞によりタイトジャンクションの外側で捕捉され免疫系に提示されます。皮膚をひっかくと、毛包周囲に白血球が4時間以内に集まってきます。スキンケアにより角層機能を正常に保つことが非常に重要です。スキンケア、バリアケアがアトピー性皮膚炎の予防、再発防止に重要です。

アトピーを減らす、アレルギーを減らすためのスキンケア、バリアケアの大切さを社会に向かってきちっと情報発信をしていく必要があると思います。角層の質がアレルギーを決めています。本日いらっしゃる皆さんもぜひご自分の角層を大切にしてください。

最後、共同研究者です。多くの人の助けをかりました。その中でも特にフィラグリンの機能解析をフィラグリンノックアウトマウスを用いて行っている川崎洋さん、タイトジャンクションの三次元可視化、TOF-SIMSによる角層機能解析を行った久保亮治さん、そしてランゲルハンス細胞の解析から毛嚢の重要性を見つけ出した永尾圭介さんが大きな貢献をしてくれています。

ご清聴まことにありがとうございました。

コスメトロジー研究雑感

平成 23 年度 研究助成

女子学生に人気の化粧品研究

秋津 貴城

多彩な金属錯体の色や電子状態を可視紫外吸収スペクトルや理論を用いて解析する、一昔前ならば物理学の様な地で硬派な研究テーマに大学院時代から取り組んできた。意欲的な学生には理論的なテーマも任せることができたが、大多数の学生には、複合系の光化学反応を色の変化で追跡する実験的なテーマを与えてきた。しかも「酸化チタンは光触媒で有名」とか「色素増感太陽電池の基礎研究」とか、学生にとって分かりやすい動機を与えないと、モチベーションが上がらない。紫外線を吸収する色材としての新応用を模索していた頃、本助成研究に採択されて、「酸化チタンはおもしろいで有名」とか「UVカット化粧品の基礎研究」とか謳って、学生を良い意味で騙しつつ、報告した成果をあげることができた。この1年余は自分自身にとっても、界面化学や色素・顔料等の知識も結果的に増え幅も広がり、感謝している。

「化粧品」というキーワードは、女子学生にとって魅力的

なようで、その人気ぶりに驚いた。文部科学省主催サイエンス・インカレに出場したい卒業研究前の学部学生に、本研究テーマの「お試し版」を実験してもらったところ、3人の女子学生はレポートに次の様な緒言を書いてきてくれた。理想的な化粧品とは、どうやら「魔法の粉」らしい。

『昔から日本では白い肌が美の象徴とされ、身分問わず様々な女性の憧れであった。最初に日本で白粉が使われたのは飛鳥時代であり、その歴史はたいへん長い。かつては「塗る」だけであった白粉だが、現在では化粧下地、乳液、UVケアが含まれた「魅せる」ことを重視した多機能性の化粧品の開発が進められている。特に海外で人気であった Blemish Balm (キズ補修クリーム)、通称 BB クリームは日本の女性を虜にしている。そこで古来より使われている白粉に着目し、BB クリームの良いところを生かした魔法の粉を目指し、日本から世界へ発信できるような化粧品開発に繋がる基礎研究を試みる。』(東京理科大学理学部第二部化学科)

平成 23 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

片岡 洋行

人間の感覚には、視覚、聴覚、触覚、味覚、嗅覚など五感と言われるものがあるが、これらは美しく豊かな人間生活の実現を目指すコスメトロジーのキーワードとなっている。特に、今回の研究で取り上げた“におい”に関しても、人によっては快適な匂いと感じたり、不快な臭いと感じたりする場合があります。日常生活を営む上で、健康や安全性とも密接な関係がある。また、人の嗅覚は敏感であるが、個人差があり、すぐに慣れてしまい、濃度が上がると順応して鈍感になるなどの問題がある。一方、最近は清潔志向の高まりから体臭を気にする体臭恐怖症が増加しており、周囲の人が体臭を指摘するのは困難で判断基準も曖昧であることから、客観的にその成分を識別して正確に定量評価できる「体臭分析法」の開発が求められている。しかし、体表から発生する“におい”を定量的に捕集することは簡単ではなく、またその成分は複雑で極微量であるため、官能的に感知できても分析機器で検出困難な場合が多く、成分を分離同定・定量するためには、サンプリングや前処理を

効率化した高感度分析法が必要である。本研究で開発した固相マイクロ抽出法は、皮膚ガスや皮膚滲出液中の成分の効率的な抽出・濃縮が可能で、分析装置に直接導入できるため、痛みや出血を伴わず非侵襲的かつ簡便なサンプリング・分析が可能で、におい成分やその発生部位を特定する新しい体臭分析技術として注目されている。また、ガスクロマトグラフ-質量分析法との連結により皮膚ガスや皮膚滲出液中の微量体臭成分のスクリーニングや同定、高感度定量が容易に行えます。さらに体臭成分相互の反応による複合臭の要因の解析から、化粧品や食品に由来する新たな体臭成分あるいは香気成分の発見にも繋がり、デオドラント、スキンケア、ヘアケアなどのコスメトロジー関連分野における新製品開発のための基礎研究にも有効な知見を提供できるものと期待されます。今後は、第六感を働かせて、新たな発想で心や感覚を客観的に捉える分析技術の開発に取り組んでいきたい。

(就実大学薬学部応用分析化学研究室)

コスメトロジー研究振興財団研究助成に採択されて

黒崎 文也

「新しいことを始めてみよう、と若い人が思った時に、その思いを後押ししてくれる資金があると本当にうれしいですね。」

渋谷の長井記念館で催されたコスメトロジー研究振興財団研究助成贈呈式での記念講演で、講師の方がおっしゃった言葉である。残念ながら自分は「若い人」ではなかったが、ちょうどその頃、植物細胞の情報伝達系を改変して「普段は表に出ていない潜在的な有用物質生産能」を引き出してやることのできるのではないかと考え、研究に着手したところだった。幸いにも研究助成課題として採択された旨の連絡を財団からいただきうれしく思っていた直後に、思いがけなく新しい研究室を主宰するように命じられ、トウの立った新米教授として何人かの部下と学生とを養う使命を突然負わされることとなった。自分がこれまでいかに上司に保護されていたかを思い知らされながら毎日を送る中、コスメトロジー研究振興財団からいただいた助成が研究資

金面でどのくらい力になってくれたか計り知れない。幸いなことに、一連の研究の結果、植物の情報伝達系にかかわる Ca^{2+} 結合タンパクや単量体GTP結合タンパクをコードした遺伝子を植物の培養細胞に導入することによって、普段はマスクされている芳香成分の生成能が発現されるという結論が得られた。自分たちの予測に近い成果を上げ、財団への謝辞を述べさせていただいた論文を公表することができた。新しい研究室を立ち上げる際に助成を受けることができた幸運に対しては、「感謝」以外の言葉が思い浮かばない。

今後も、この研究助成によって何人もの研究者が、それぞれ状況は異なるとしても、自分と同じような感謝の念を抱くことであろう。コスメトロジー研究振興財団のご厚志に心より謝意を表させていただくとともに、ますますのご発展をお祈りする次第である。

(富山大学大学院医学薬学研究部)

ナノ粒子とコスメトロジー

齊藤 結花

プラズモニクスの研究をしているので、金や銀、またはアルミなどの金属ナノ粒子（直径10–100nm）を暗視野顕微鏡で観察することがある。プラズモニクスは金属内の自由電子とフォトンの結合を利用して、この結合効率は波数ベクトルの整合が関係しているから、粒子のサイズが重要になっている。サイズを変化させただけで物性が変わるということを不思議に思うかもしれないがこれは真実で、実際に顕微鏡下にある金や銀のナノ粒子は様々な色がついて見える。人間は目で見ると信用したくなるので、肉眼で見えるということはとても重要なことである。可視光に感度がある場合は普通の顕微鏡で観察できるが、紫外光域は

肉眼で見るわけにはいかないから、同じような観測を行うために特別な顕微鏡が必要になる。我々が開発した顕微分光システムは、紫外光を擬似的に“見る”ということに匹敵している。

最近、化粧品の宣伝の中でナノ粒子という言葉が聞くことが多くなった。金属の場合もあれば、有機分子の有効成分をカプセル化している場合もある。日頃顕微分光の研究をしているので、ナノ粒子と聞くとサイズや形状や集合状態が気になって仕方がない。今回の研究で開発した顕微分光システムを、是非コスメトロジー分野の研究者に利用してほしいと考えている。(大阪大学大学院工学研究科)

平成 23 年度 研究助成

乳化剤フリーエマルションとコスメトロジー

酒井 俊郎

エマルションは、相反する性質を有する二つの液体（水と油）を同時に含んでいる液体であることから、エマルション中には無数の界面が存在し、それにより液滴/界面/バルクの3つの領域が形成される。それぞれの領域がそれぞれ固有の性質を有しているため、一つの液体がいくつもの機能、また、それらの相乗的機能を発現する。例えば、エマルションは、水溶性物質と油溶性物質を同時に取り込むことが可能であり、エマルションの機能・価値が一層多元化する。さらには、油の持つ“潤い感（しっとり）”や水の持つ“爽快感（さらさら）”などの質感へも効果を与える。このようにエマルションは高機能・高付加価値を有する液体であるため、化粧品において重要は基材である。

エマルション製品の処方において、界面活性剤などの乳化剤の役割は大きい。そのため、新規界面活性剤の合成やその界面化学的物性、混合系による相構造、可溶化、乳化

などに関する研究は盛んに行われている。その結果、乳化剤を使用したエマルションに関する多くの有益な情報が蓄積されて、現在のエマルション製品の処方へとつながっている。一方で、油と水は不仲の代名詞とされ、これまで、油と水のみでエマルションを調製する試みはほとんど行われてこなかった。そのため、乳化剤を使用しないエマルションの調製に関する研究やエマルション製品の処方につながる事例は極めて少ない。今後の“乳化剤フリーエマルション”に関する系統的な研究の蓄積が、乳化剤フリーエマルション製品の実現やコスメトロジーの発展につながるものと考えられる。乳化剤フリーエマルション処方の確立は、コスメトロジーの新しい領域となりえるとともに、エマルション製品の処方技術に革新的な発展をもたらすものと期待される。今後も、エマルションの本質、油と水の界面の本当の姿に迫っていきたい。（信州大学工学部物質工学科）

平成 24 年度 研究助成

何故セルフリサイクル技術が必要か

藤井 敏弘

毛髪とそのタンパク質の研究をはじめて10年以上が過ぎてきている。この頃から“セルフリサイクル”のコンセプトを提唱しており、「動物や他者を使わず本人由来の生体物質（組織、成分）を用いた加工品の創出と適用」と定義した。また、「健康～医療に関わる製品をつくり、心身の健康美（QOL）に貢献」を目的とした。これを実証していくためには具体的な加工品を創出する必要があり、簡易人工皮膚を当面の目標とした。このため、フィルムへの加工と適用に向けた研究を必要とした。

毛髪主成分のケラチンが属する中間径フィラメントは、脱重合後に再重合できる。私たちは「信大法」と名付けた効率的なタンパク質の抽出方法と簡便に自己集合を誘導してフィルムを作製する手法を独自で開発した。死んだ毛髪細胞からのタンパク質は意外にも生きていた。ケラチンフィルムの分解性、生体適合性、安全性などの試験も実施したが、具体的な出口までには至らなかった。

ケラチンフィルムは紫外線に依存した酸化タンパク質を高感度に検出できるデバイスであることを2009年にプレス発表した。今までの毛髪損傷は三次元の髪の毛自体を実験材料としていたのに対して、二次元のフィルムを利用する発想の転換もあり、反響は大きかった。さらに、ブリーチ（酸化）、パーマ（還元と酸化）、加熱処理に対してもケラチンフィルムは代替毛髪として有効であった。応答性に加えて高い利便性をもつため、フィルムの販売と委託分析の事業化へと繋がってきている。

一方で、「国民医療費」は毎年1兆円もの増加となってきた。この一因としては「先進医療とその技術」の進歩と負担が挙げられる。安価で高機能な医用材料は今後求められ、個人対応できる毛髪は絶好の生物資源と考えられる。化粧品評価材料としての研究開発は区切りの時期となってきたので、医療へも適用できる技術開発に再度チャレンジしていきたい。（信州大学繊維学部）

機能性化粧品開発のための AGEs 生成阻害物質の簡便な探索法の開発を目指して 藤原 章雄

AGEs (Advanced glycation end-products) とは還元糖とタンパク質の非酵素的な反応であるメイラード反応によって生じる最終生成物の総称である。AGEs は糖尿病合併症や動脈硬化の発症や進展に関与しており、これらの病態の予防・改善のためのターゲット分子として注目されている。さらに近年では、コラーゲンに生成する AGEs が皮膚老化の原因物質としても考えられており、我々はコラーゲン特異的に生成する AGEs である N^ω-(carboxymethyl) arginine (CMA) に着目し、皮膚老化予防・改善を目的とした機能性化粧品の開発を目指した CMA 生成阻害物質のスクリーニングを行っている。スクリーニングを行うにあたり、多くの化合物の中から機能性化粧品に用いる候補化合物を絞り込むためには、迅速で簡便な AGEs の測定法が必要となる。AGEs の測定法として広範に用いられている簡便な測定法としては、AGEs の蛍光特性や褐色特性を利用した分光法、あるいはエピトープ未知の抗体法が用いられていることが多い。しかしながら、これらの定量法では蛍光特性をもたない CMA のような AGEs や、構造特異的

な AGEs の測定は困難であり、また蛍光性や褐色性を有する化合物共存下では、真の AGEs 含量を評価することは困難である。ゆえに、構造特異的な AGEs の検出には、質量分析や高速液体クロマトグラフィーといった機器分析による測定が必要であった。そこで、我々は特定の AGEs 構造体を認識する抗体を作製し、ELISA にて迅速かつ簡便に検出することのできる測定系を確立した。さらに、本測定系を用いて、AGEs の生成を制御する化合物や混合物（食品・植物・生薬抽出エキス等）のスクリーニングを可能とするアッセイ法を確立した。今回、助成頂いた研究でも、本アッセイ法を用いて生薬「芍薬」に含有されている Pentagalloylglucose などの化合物が CMA の生成阻害することで皮膚老化の予防・改善に有効であることを明らかにした。今後、確立したアッセイ系が広く使われることで、将来的に多くの候補化合物の同定を行うことができるようになり、皮膚老化予防・改善を目的とした機能性化粧品に含有される化合物が発見されることを期待している。

(熊本大学大学院生命科学研究部細胞病理学分野)

有機ナノチューブの魅力 増田 光俊

有機ナノチューブを電子顕微鏡で観察するたび、その構造の美しさと共に、何故このような構造が自発的に出来るのか？と不思議に感じてしまう。すでに理論的なメカニズムは液晶相の形成理論を援用することで理解されている。しかし材料開発屋である我々が、その理論に基づき実際の分子を設計・合成し、自己集合を試しても、ある分子はファイバー状の結晶、また他は無定形な固体になり、と失敗の連続であった。それでも研究を 10 年以上も続けると、チューブ内表面だけを修飾したり、内径を数マイクロメートルといった光学顕微鏡レベルのものから、数ナノメートルの電子顕微鏡でしか見えないものまで作り分けることもできた。またチューブによっては透明な寒天状のマテリアルとして取り扱えることや、チューブ内空間が不安定なタンパク質を守って保持するカプセルになることもわかってきた。

最近、これらの研究を振り返って「この様な材料が何に展開できて、役に立てるのか？」を明確に示せていなかったこともあり、今回のコスメトロジー助成に応募し、化粧品分野への基礎展開を検討した次第である。採用いただいたおかげで、化粧品成分を包み、保持し、制御しながら放出することができるナノの入れ物としての基礎物性をいくらかは示せたと思っている。研究の醍醐味を感じる事が出来た瞬間としては、例えばチューブの構成材料となる脂質分子を僅か一カ所を変化させる（今回はカルボン酸をメチルエステルに変換する）だけでそのカプセルとしての機能が大きく変化し、香料の放出制御につながったことである。とはいえ実用化には課題は山積しており、まだまだ長い道のりであることも実感させられた。

今後の実用化には、如何に多くの方々に有機ナノチューブを触って試して頂けるかが鍵となることを感じた。その

ため現在では試薬会社を通じた研究用試薬としての販売や、試料提供も開始している。そして少しずつその広がりを感じて居る。コスメトロジーという新しい分野への展開によ

ってどのような人々との出会いがあるか、楽しみにしている。
(産業技術総合研究所ナノシステム研究部門)

平成 23 年度 研究助成

界面活性剤はオワコンですか？

松原 弘樹

愚痴を書きます。お許しを。

私が研究室に配属された1998年、初めて参加したコロイド討論会では界面活性剤の物性研究が大変盛んでした。会場も一番大きな教室が割り当てられ、質疑応答も活発であったことをよく覚えています。それからおよそ15年、現在はナノ粒子に関する研究が発表の半数近くを占め、界面活性剤の研究は年々減少しています。淋しい限りです。

この状況の一因として、「界面活性剤を研究してもお金にならない」ことが挙げられます。例えば科研費の化学分野でキーワードにコロイド・界面を含む細目は、複合化学の機能物性か基礎化学の物理化学ですが、それぞれの審査員はここ数年、無機化学と構造化学の方が多く、ソフトマターを専門にされる方が減っているようです。これは多分コロイド・界面というキーワードがその基本物性よりも、むしろ新しいナノ粒子の合成や触媒の開発、界面への種々の分光手法の適用などを意図して選ばれているためだと思

いますが、いずれにせよ、複数の審査員の平均点を採用する現行システムでは、どちらに応募しても不利ですよ。科研費の獲得が人事に直結する状況では研究人口が減っていくのも致し方ないかもしれません。

私も例にもれず科研費には毎年苦勞しているのですが、好きで始めた研究なので背に腹は替えない覚悟で(今のところ)頑張っています。そのような状況ですので民間助成団体からの支援は大変ありがたいです。コスメトロジー研究助成で特に良かった点は、年度毎の採択件数が多いことと、研究期間を2年に延長できることです。九州大学でも校費では研究室のランニングコストも賄えない状況ですので、2年続けて運営費が $+\alpha$ になるのはとても心強かったです。財団のみなさまどうもありがとうございました。(まあ、科研費通らないのはオマエの申請書がつまんないだけだろ！といわれればそれまでなんですけどね…)

(九州大学大学院理学院化学部門)

平成 24 年度 研究助成

分散系についての研究とコスメトロジー

村上 良

私は学生のときに、両親媒性物質(界面活性剤)の空気/水表面や油/水界面への吸着や溶液内での分子集合体形成についての研究を行いました。両親媒性物質が形成する吸着膜内での分子間相互作用、吸着膜内における2次元の相転移や分子集合体形成の駆動力などを、熱力学・分光学的な立場から明らかにすることを目的としていました。このときは、界面化学を研究しているにも関わらず、界面の性質・状態が全体の性質を支配する系、すなわち、分散系もしくはコロイドについては書籍で学ぶ程度でした。したがって、分散技術が重要な基本技術となる化粧品についても取り立てて興味はありませんでした。大学院博士後期課

程終了後、イギリスのHull大学およびImperial College Londonでのポストドク時代に、エマルションや泡についての研究に取り組みました。これらの分散系を自分の手で作製してみて、作製条件の僅かな違いにより様々な外観や質感を示す分散系の研究に魅了されました。現在行っている研究は、現象の原理を解明することに主眼を置いているのですが、ときおり生まれてくるユニークな機能を持ったエマルションや泡が化粧品として応用できるのではないかと胸が躍るときもあります。このような研究の遂行をとおして、コスメトロジーの発展に貢献していきたいと考えています。

(甲南大学理工学部機能分子化学科)

ナノテクノロジーを用いて皮下酸化ストレスを抑制する 吉富 徹

酸化ストレス障害は癌や循環器疾患、消化器疾患を含め、極めて多岐にわたることが明らかにされつつある。一方で酸素による酸化反応はミトコンドリア内での電子伝達系を中心に、エネルギー産生のまさに中枢にあり、生命維持に極めて重要である。この電子伝達系では取り込んだ酸素から活性酸素を通して水が生成するため、すべての活性酸素を除去することは生命維持に反することになる。従って、低分子抗酸化剤のように生体内に広く拡散する分子はこの正常な電子伝達系を妨害しかねず、単なる抗酸化剤では利用に限界があった。近年、新しい素材を皮膚保護に利用する試みとして白金ナノ粒子やフラーレンを利用する試みもあるが、特有の着色料や汗による皮膚からの脱離などの問題があった。本研究では、触媒的活性酸素除去能を有するニトロキシドラジカル化合物をナノ粒子内に閉じ込めることにより、ミトコンドリアへの取り込みを防ぎ、「正常な

活性酸素はそのままに、過剰に産生した活性酸素のみを除去する材料設計に成功した。このようなアプローチは世界的に殆ど見られず、「善玉活性酸素」と「悪玉活性酸素」を見分け、悪玉のみを選択的に除去するナノ治療は極めて独創的な材料設計に基づく新たなアプローチである。また次世代の抗酸化剤として、レドックスインジェクタブルゲルの合成にも成功した。これは、皮下注射後、皮下に長期滞在する抗酸化剤として機能するだけでなく、長期の薬物徐放も可能となる。ここにペプチドやビタミン剤を物理的に封入することにより、新しいスキンケアの方法を提案することができる。このように、安全で効果の高い抗酸化作用を有する材料を創り込み、最適な素材を提供していくことにより、新しいスキンケアの構築につながると期待している。
(筑波大学大学院数理物質科学研究科)

脱毛症研究に携わって 伊藤 泰介

私の研究テーマは脱毛症、とくに円形脱毛症である。円形脱毛症はよくある疾患であり、円形の脱毛斑は1～数個ある程度の印象があると思う。しかし実際大学病院に駆け込んでくる患者は、頭部全体に及ぶ脱毛斑、全身の脱毛、眉毛や睫毛がぬけてしまうなど、社会生活に大きな影響を与える状況に陥り、精神的にも大きなダメージを受けている方が多い。不登校や鬱状態、失業、恋愛問題からプールや温泉等レジャー活動の制限など「生活の質」も大きく低下する。ヒトにおいては脱毛症で命が直接奪われることがないにしろ、頭部全体が脱毛すると髪の毛の重要性を感じる患者さんが多く、私もその重要性にあらためて気付くことが多い。頭部外傷が増えたり日焼けをしたり寒さを強く感じたり、目にゴミが入りやすくなる等いろいろである。ホ

ッキョクグマなどでは脱毛症は生命に関わる事態である。

男性型脱毛症の分野では、フィナステリドとミノキシジルによって、多くの方が薄毛から回復することが出来る時代となった。20年前には想像出来なかったことである。米国生まれのフィナステリドの売り上げは、日本が世界で最も多い。このように日本人は毛髪への意識が強いといえる。

一方、円形脱毛症の治療は皮膚疾患の中でもっとも難渋する疾患の1つである。脱毛症専門外来には多くの患者が相談に訪れている。この不安につけ込むやや問題のある業態も散見されるが、これは皮膚科学が患者の悩みを解決出来ていない証拠でもある。毛髪の研究者として今後も邁進していきたい。
(浜松医科大学皮膚科学講座)

平成 24 年度 研究助成

過酸化脂質研究とコスメトロジー

今井 浩孝

私はこれまで、リン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ (PHGPx) という酵素の機能の解析から、脂質の過酸化物であるリン脂質ヒドロペルオキシドが細胞や個体においてどのような機能を持つのかということとを20年来研究してきた。皮膚は紫外線をあび脂質酸化が起きることは周知の事実であるが、PHGPxの皮膚での機能解析はほとんど行われていなかったこともあり、タモキシフェン誘導型PHGPx欠損マウスの作成によりようやく、皮膚の研究にたどり着いた。これまでコスメトロジーの研究をやっていなかった我々の技術はまだ未熟であり、コスメトロジー解析の技術レベルをもっと上げなければと痛感させられた。本研究では、PHGPxの毛包細胞での重要性や脂質ヒドロペルオキシドが発毛の遅延に関与しそうなことまでは明らかにできたのだが、一方でこれまでいろいろな細胞においてPHGPxを欠損させると細胞死が誘導されるのになぜか皮膚細胞においては細胞死が誘導されないということも明らかとなった。皮膚は日常、上述し

たように紫外線から体内の障害を防御する役割を担っているので、PHGPx以外にも重要な脂質酸化防御系を獲得していると考えられ、過酸化脂質研究者としては、益々コスメトロジー研究の奥深さを感じるようになった。また化粧品の研究では、*In vivo*での研究から離れる傾向がある一方で、化粧品成分のヒトでの副作用の問題が大きく社会問題になったことから、動物実験での*In vivo*での研究もやはり重要なのではと思うこの頃である。

私は折しも研究助成を頂いた後、昨年4月より研究室を主宰する立場になり、研究室の立ち上げ時期にこの財団からのコスメトロジー研究助成は、非常にありがたく、私だけでなく若い研究者の研究推進のためにも大きな力の源になりました。この場をかりて厚く御礼申し上げます。私たちの研究成果が今後コスメトロジー研究の発展に役に立てよう今後もがんばっていきたいと思います。

(北里大学薬学部衛生化学研究室)

平成 23 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

江草 宏

最近、雑誌やインターネットで“口腔化粧品”という言葉をよく見かけるようになりました。歯磨材や洗口液のことですが、歯科医師である私にとっては口腔の健康づくりを推進すべきこれらの商品が「化粧品」と呼ばれていることに違和感をもちました。調べてみると、これら商品のいくつかは、薬事法のもと医薬部外品の承認を得るには時間とコストがかかるため、口腔化粧品として販売する戦略がとられているようでした。ただ、これらの商品の中には他の商品と差別化を図るために植物エキスなどが配合されているものもあり、アレルギー疾患への取り組みが課題となっている昨今、すべての消費者にとって安全性が高いかどうかはわかりません。このような背景から、私は患者に由来する細胞から作製した口腔粘膜や舌を用いて口腔化粧品の安全性評価ができないものかと考え、この度の申請に至りました。研究目的は、患者に由来するiPS細胞や骨髄由来間葉系幹細胞を用いて口腔粘膜、舌などの細胞を作製す

ることで、口腔化粧品に対する患者固有の反応を評価する技術に繋げることとしました。まだ道半ばですが、患者から採取した歯肉を用いることでiPS細胞を樹立し、粘膜に存在している樹状細胞に分化を誘導する技術にも目処がつかしました。これにあたり、共同で研究を進めていただいた大阪大学大学院歯学研究科の関根伸一先生に改めて深く感謝の意を表します。また、周期的伸展刺激が幹細胞の骨格筋細胞への分化誘導に応用できることが明らかとなり、今後の研究に繋がる成果をあげることができました。この度の研究をきっかけにコスメトロジーの観点でバイオテクノロジー研究を考える機会が増え、自分の中で学術分野の拡がりを感じることができました。将来、これらの技術がコスメトロジー研究の発展の一助となることを期待しております。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心から御礼申し上げます。(大阪大学大学院歯学研究科歯科補綴学第一教室)

コスメトロジー雑感

大山 学

今回の研究を始めるまでは、ヒト iPS 細胞を取り扱った経験がなく、手探りの状態であっただけに何とか結果を出せて正直ほっとしている。実際に実験を進めてみると、十把一絡げに iPS 細胞と称されているものの、セルラインごとにその生物学的特性は大きく異なっている。つまり、事前に自分が目的とするものに適した特性を有する iPS 細胞のラインを上手に選択することが大切であることが実感された。さらに継代数が高くなると未分化な状態を維持することが極めて難しくなる。現在ひろく世間では“夢の万能細胞”と捉えられ、何でもすぐにできてしまうような感覚を抱きがちである。世紀の大発明であることに異論はないが、実際に取り扱ってみると取り扱いの難しい細胞である。

iPS 細胞から様々な器官を作ることには大きな意義があるだろうが、組織幹細胞が同定・分離されているような場合には、その特性を失わせることなく培養する技術を開発するなどして、できるだけそれらを活用する方法を用いた方がはるかに臨床応用は早いであろう。iPS 細胞だけに注目するのではなく、うまくバランスをとりながら再生医療が発展していくことが大切ではないかと思う。

貴財団から援助いただいたのはちょうど研究費が枯渇し、財政的に困っている時期であった。本研究費のおかげで遂行できた実験は多い。改めて感謝申し上げたい。貴財団の今後益々のご発展をお祈り申し上げます。

(慶應義塾大学医学部皮膚科学教室)

コスメトロジー雑感

片岡 浩介

私が今回、天然保湿因子の形成に関する研究を行うようになったのは全くの偶然からです。従来から遺伝子発現調節と細胞の分化の仕組みについて、例えば睪臓の β 細胞などの研究をしていたのですが、まだ分化の仕組みがよくわかっていない他の細胞や器官はないだろうか、と考え、思いついたのが毛髪でした。毛髪・毛包の再生に関わる増殖因子などの研究は多いのですが、転写のレベルではまだ未知の領域が多く残っているように思われたので、自分たちが対象としていた転写因子の発現パターンを毛髪で調べることから始めたのです。

幸運なことに、狙ったとおりに毛髪の発生・分化に寄与することを明らかにできたのですが、いかんせん毛包というのは組織が小さい割に複雑で、得意の生化学に持ち込むことが難しく、詳細なメカニズムに踏み込むことはできませんでした。

一方で、ノックアウト・マウスの皮膚切片の染色像を眺めていて、表皮の角化細胞にもどうやら関与しそうだとい

うことに思い至り、あらためて解析を試みたのが始まりでした。表皮の分化の仕組みについての過去の知見を調べ、まだわかっていない面白そうなことを探る、ということをして、当時所属していた奈良先端大学の大学院生と一緒に始めました。表皮の層構造の名称はおろか、天然保湿因子という言葉すら知らないところからの出発でした。一見したところ、あまりはっきりしない表現型のように最初は思われたのですが、詳細に調べてゆくと、意外にもフィラグリンという重要な因子との関連がわかってきて、貴財団の助成を頂けることになりました。現在、ひとつの転写因子から出発して、フィラグリン遺伝子のエンハンサーに至り、そこからまた新たに別の転写因子(群)に辿り着くというやり方で、表皮の転写ネットワークが少しずつ垣間見えてきたところです。解明にはまだ先は長いですが、実用化にはさらに遠い研究ではありますが、ご支援をいただいたことで新しい領域を開拓することができました。あらためて御礼申し上げます。

(横浜市立大学生命医科学研究科)

平成 23 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

小泉 修一

私は、脳科学を専門としています。皮膚の研究は普段はあまり行いませんが、神経も皮膚も外胚葉由来だから、といった理屈ではなくて、同じ生体を構成する組織として、

皮膚の複雑さ、不思議さ、美しさに改めて気づくことができました。本研究の機会を頂き、有り難うございました。

(山梨大学医学部薬理学)

平成 23 年度 研究助成

コラーゲンの研究まだやっています

小出 隆規

私はプロの研究者になってからずっとコラーゲンを中心にすえた研究をおこなってきました。コラーゲンの3重らせん構造をみるとゾクゾクします。

昨今のコラーゲンブームについて以前に書きましたが、今回はその続きです。巷でのコラーゲンブームはいまだ衰えるどころかますます元気で、「生搾り」とか「ナノ」とか「ピコ」とか「男の」にいたるまで、わけのわからないさまざまな接頭辞をつけられて、なんだか特別のコラーゲンであるような雰囲気が醸し出されるようになってきました。これらの中にはコラーゲンですらないモノも結構あるのですが…。

というわけで、前にもまして、「コラーゲンを食べたらお肌ぷるぷるになるんですか？」と聞かれるようになりました。科学的知見にもとづいて、一から真面目な顔つきでご説明申し上げるのも無粋と思われるシチュエーションがおおく、最近では以下のように質問には質問で返すという技をつかうことにしています。

「じゃあ、ハゲには髪の毛を食べたらいいんですかねえ??」

「ははは…なるほど～」

と、たいていは納得してもらえます。

しかし、ふと不安になり、インターネットで調べてみると、え…！それがあったのです。

「毛髪をふやすためには、内側からケラチンを補うことが重要です…云々」

羽毛や羊毛由来のケラチンが、発毛のためのサプリメントとして商品化されていました。なんとも商魂たくましいです。参りました。でもね、羽とか毛糸とかが頭から生えてきたらどうしてくれるんだい？(想像してみるとなかなかシュールで楽しいです)

そろそろアカデミア発「コラーゲンを食べたらどうなるねん」という研究に真面目に取り組もうかと考えています。またの機会にご支援をいただけたら幸いです。

(早稲田大学理工学術院)

助成期間を振り返って

柴 弘太

この度は、研究助成の対象者として採択して下さり、研究の機会を与えて下さったコスメトロジー研究振興財団に、心より感謝申し上げます。

助成金をいただいて研究を行ったこの一年間は、私にとって決して忘れることのできない一年となりました。本研究助成への申請が採択されたとき、私は学位を取得してまだ半年程度の、駆け出し中の駆け出し研究者でした（今でも駆け出しに毛が生えたようなものですが）。少し前までは学費を払い、学生として研究をしていた私が、一転してお金をいただき、それを好きに使って自分の研究ができるという事実、大きな衝撃を受けたのを覚えています。研究者として第一歩を踏み出したばかりの私のアイデアを面白いと思い、その実現を期待して助成して下さる方がいるということは、にわかに信じがたいことでした。

大きな喜びを感じる一方で、背負っている責任の存在を感じたのも事実です。主体的・計画的に進めていかなければ、研究期間は瞬く間に過ぎていき、そのことを指摘して

くれる人もいません。そんな中で迫り来る成果報告のプレッシャーと闘いながら、冷静に研究を展開するという経験は、間違いなくこれからの研究人生の糧となる、貴重な体験だったと思っております。

心残りは、申請書に書いた内容を100%実現するまでには至らなかったということです。あれこれ調べて、流れを練って、完璧だと思っていた研究計画も、いざ開始してみると予想外のことばかりで、研究の難しさをあらためて実感した一年でした。しかし、進めていく中で予想もなかった興味深い事実を発見することができ、これがあるから研究は面白いのかもしれないと、深みにはまっていく感覚を楽しんでいるところでもあります。

今回助成していただいたことに対し、いつの日か大きな成果をもって恩返しすべく、今日も研究に励んでおります。今後の活躍をご期待いただければ幸いに存じます。

(物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点)

コスメトロジー雑感

鈴木 聡

この度はコスメトロジー研究振興財団の研究助成に採択していただきましてどうもありがとうございました。近年若手研究育成が叫ばれ、今や若手が応募する研究助成は無数にあるものの、45歳を超える頃から応募できる数が急激に減少します。このため、教室当たりの教員数が少なく、また多くの大学院生を抱えている50歳超の中堅研究者は、研究費獲得に非常に苦労しておられるのではないかと類推します。また近年は、日本経済再生のために、出口の近い応用研究に多くの資金が投入され、基礎研究の資金がとりにくくなっているのも実情です。しかしながら、優れた基礎研究なしには応用研究も花開きません。これらのことから、ぜひ中堅研究者や基礎的研究課題にも、今後引き続きご支援をしていただければ幸いです。

近年のコスメトロジーの進歩によって、女性がより美しくなり、多くの女性に自信を与えたように感じます。また女性がより美しくなり、家事から解き放され、職業選択も

より自由となって、昔より生き生きしているように見受けられます。

一方近年では男性の化粧品もでき、より多様な装いをした学生が多くなりました。しかしながら、昔に比べるとどこか覇気が失われているように思えてなりません。学生紛争の頃の男子学生の活力はどこに消えてしまったのでしょうか？ 留学希望者は少ないだけでなく、夜遅くまで研究をする日本人留学生も少なくなったように聞いています。「元気でhungryな男子学生を増やすこと！」…なかなか難しい課題ですが、このことがおそらく少子化対策にもなり、今後の日本の繁栄維持に何よりも重要だと思います。ぜひ、コスメトロジーを含めた全ての分野が、マスコミをも巻き込んで、この課題を強く意識する（かつ国民に意識させる）ことが大切のように思います。

(九州大学生体防御医学研究所ゲノム腫瘍学)

平成 23 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

谷 元洋

この度は本研究を進める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致します。私の研究テーマは、生体膜脂質の一つであるスフィンゴ脂質です。スフィンゴ脂質は細胞表面上でマイクロドメインという領域を形成し、細胞間及び細胞内シグナル伝達等において重要な役割を担うことがわかってきています。さらに、膜のスフィンゴ脂質の一部が分解されることによって生成されるセラミドは、細胞内シグナル伝達系を調節し、細胞死、細胞分化を制御するセカンドメッセンジャーとして機能します。一方で、セラミドは、皮膚表皮の角質層において水分子の保持を行い、バリアーとしてはたらくことも知られています。化粧品におけるセラミドの有効性は以前から知られていますが、ここ数年で、セラミドは健康食品分野でも盛んに取り上げられるようになりました。セラミド含有の健康飲料水まで現れて来ており、スフィンゴ脂質の基礎研究を昔から行ってきた者からすれば、このセラミドの各業界への浸透は驚くべき変化です。しかしながら、セラミドの「皮膚の保湿成分」、「細胞に対する強力な生理活

性物質」という二面性を考慮した時、その使用の安全性に関して考慮すべき点が多々存在すると考えます。特にセラミドの細胞死誘導活性は、非常に強力なものですが、その作用の分子メカニズムが明確化されていないため、その究明は非常に重要です。今回、私は出芽酵母をモデルとして、セラミドが誘導する細胞死の作用メカニズムに関する基礎的知見を得ることを目的としました。研究は、まだまだ未成熟ではありますが、今後さらなる解析を行うことで、セラミドの作用メカニズムに関する確固たる分子基盤をつくることを目標としたいです。酵母をモデル生物として用いる基礎的な研究が、ヒトの健康に役立つような応用研究に結びつくには、多くのステップが必要です。が、セラミドのように生化学的に非常に扱いにくい物質を研究するにおいて、多彩な遺伝学的アプローチが比較的容易に行える酵母が強力な武器になると信じています。今後、セラミドを基盤とした基礎研究が、化粧品、医薬品、食品等の幅広い分野で応用されることを願ってやみません。

(九州大学大学院理学研究院化学部門)

平成 23 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

寺尾 美香

私が細胞内コルチゾール活性化酵素の研究を始めたのは、大学院生時代に‘なんとなく’行なった実験に始まります。当時、肥満化してくるマウスの研究をしており、肥満の分野で脂肪細胞における細胞内コルチゾール活性化酵素がトピックとなっていたために、脂肪組織での発現を調べるついでに‘なんとなく’皮膚組織や表皮角化細胞もPCRにかけてみました。結果として脂肪組織同様に皮膚でも上昇しており、肥満だからそんなものかと思っていました。しかし、Pubmedで調べてみたところ、皮膚におけるこの酵素の報告はひとつもありませんでした。そこから、私の皮膚組織における細胞内コルチゾール活性化酵素の研究が始まり、表皮特異的ノックアウトマウスの作成を開始しました。2011年に皮膚における細胞内コルチゾール活性化酵素の役割を報告しましたが、同じ年に海外の2つのグループから皮膚におけるこの酵素の報告があり、他にも注目して

いる研究室があることがわかりました。その後、加齢とともに皮膚で細胞内コルチゾール活性化酵素が上昇してくることがわかり、生理的老化皮膚はコルチゾール過剰による皮膚萎縮とよく似ることより、皮膚老化にもこの酵素が関わっているのではないかと考え始めました。その頃にコスメトロジー研究助成に応募させて頂き、研究助成を頂くことができました。まだ、マウスを用いた仕事を中心ですが皮膚老化における細胞内コルチゾール活性化酵素の役割を明らかにできつつあります。今後は細胞内コルチゾール活性化酵素をターゲットとした治療が高齢者の難治性皮膚潰瘍の治療やステロイド投与に伴う皮膚萎縮の改善などにつながっていくよう、研究を進めて行きたいと考えております。最後になりましたが、本研究を支援頂きました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。

(大阪大学医学系研究科皮膚科学)

傷痕をきれいに

富田 元

「あの医師は手術の傷痕がとてもきれいできつと名医に違いない。」「まだ若いのに傷痕が残ることが心配です。」「名誉の負傷」など傷痕に関する意見は人それぞれです。ただすべての傷痕がきれいに、機能的に修復できるのであるならばより良い生活が送れるようになると思います。しかしながら創傷治癒のメカニズムは奥深く、非常に完成されたものであり、我々が介入する余地は少ないように思えます。今回細胞外マトリックスに焦点をあてて創傷治癒を研究することになりましたが、それ以外にも創傷治癒には表皮の角化細胞、毛包上皮、線維芽細胞、血小板、好中球、マクロファージ、リンパ球など様々な細胞が関わっており、それぞれにシグナルを出しては受け取っています。しかも経時的に役割が変わっているのです。シグナルには創傷治癒

を促進するもの、調節するもの、必要なもの、不必要なもの、逆に遅らせるもの、何も意味がないもの、様々な役割があるのだと考えられています。すべての細胞と細胞外マトリックス、シグナルが複雑に絡み合い創傷治癒を完成させている。なんと神秘的なのだろう。なんと人間らしいのだろう。と圧倒される毎日でありました。それぞれの詳細な機能の説明は控えますが、複雑に絡み合ったそれぞれの機能の一つずつ明らかにしていき、いつの日か全体が解明される日を願っております。本研究とこれからの活動がよりよい創傷治癒につながっていくことを信じて研究を続けていければと思います。最後になりましたが、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。（長崎大学大学院皮膚科アレルギー科）

放射線

中山 文明

2014年の現在でも、放射線という言葉を聞くと、まずネガティブな印象を持つ日本人は多いことでしょう。実際に、今回取り組んだ課題も、放射線皮膚障害に関するもので、紛れもなく放射線のネガティブな側面を扱ったものです。

ただし、立場が変わると放射線が非常に大事な存在となります。それが、「がん」になった時の放射線療法です。「がん」を克服するために有効な治療法です。ただし、この場合でも放射線のネガティブな側面が消えたわけではありません。放射線に対するネガティブな印象をもったまま、放射線治療に臨んでいる人もきっと多くいるはずで、さらに、程度の差はあれ実際に起きている副作用に目をつぶって、我慢している人も多いことでしょう。

実は、放射線治療の進歩は著しく、皮膚潰瘍のような重篤な副作用はもはや稀です。特に、放医研の重粒子線治療のような先進的な治療法ならば、腫瘍部に放射線を集中させ、その他の部位の被ばくを非常に低く抑えているため、副作用はほとんど認めません。それでも、美容的な観点からは皮膚には異常が生じています。放射線治療は、「切らずに治す」治療法です。このような治療は、体への負担だけでなく、精神への負担も軽くしていると思います。ネガティブな印象は変えられませんが、もしきれいに治せたら、患者の気持ちにどれだけ役立つことでしょうか。

「がん治療」に「コスメトロジー」は、とても大事だと思っています。

（独立行政法人放射線医学総合研究所重粒子医科学センター）

平成 23 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

西江 渉

私が皮膚科医として研究する一番の目的は、もちろん目の前にいる患者さんを治したいからですが、実際には直ぐに応用可能となるような研究は限られています。そのためどうしても基礎的な内容の研究が多くなってしまいますが、常に臨床とのリンクを考える様に心がけています。今回助成を頂いた研究は、自己免疫性水疱症の代表的疾患である水疱性類天疱瘡がなぜ高齢者に好発するか？という、まさに臨床から生じた疑問の解明を目指すものです。私は抗原タンパクである 17 型コラーゲンが加齢に伴い非生理的な切断を受けた結果、通常では生じない新しい抗原エピトープが出現するのでは？という仮説を立て、実際に水疱性類

天疱瘡の病変部で 17 型コラーゲンが非生理的切断され通常では生じない抗原エピトープが生じることを解明できました。高齢者の皮膚で 17 型コラーゲンが非生理的切断を受けている証明には至りませんでした。今回助成を頂いたことで水疱性類天疱瘡の病変部で抗原タンパクがどうなっているか垣間見ることができ、病態解明に大きく貢献したと思います。今後は今回得ることの出来た研究成果をもとに、臨床応用可能な研究を目標に研究を進展させていきたいと考えております。最後になりましたが、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。（北海道大学病院皮膚科）

平成 23 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

畠山 鎮次

コスメトロジー研究振興財団の研究助成に採択していただき、誠に有り難うございました。本研究助成の支援により、申請課題に提案させていただきました遺伝子の機能解析を進めることができ、誠に深謝しております。

「コスメトロジー」研究振興財団の研究助成の応募を拝見したとき、まず何に関しての研究申請が可能か、戸惑ったのが正直な気持ちでした。「コスメ」であるので、おそらく「お肌のお手入れ？」などの美容に関すること、もしくは化粧品に関することかと思いましたが、門外漢でありましたので、最初は申請を提出するかどうかしばらく戸惑いを感じました。小生の研究領域は、医学のなかの「生化学」で、組織や細胞を壊して重要な分子の機能を探ることが専門です。そこで応募要項を詳細に読ませていただいたとこ

ろ、「皮膚の生理機能や老化機構の解明の研究」も含まれるということでしたので、研究している遺伝子群のなかで、特に皮膚に発現している遺伝子に注目して、研究を申請させていただきました。採択していただいたおかげで、皮膚を含む扁平上皮細胞に高発現している本遺伝子に関して、DNA ダメージに対する影響に関する知見を得ることができました。遠い先のこともかもしれませんが、本研究成果が、今後の薬剤開発や化粧品開発において、少しでも役に立てれば幸いです。

最後になりますが、貴財団の助成を拝受し、本研究をご支援いただきましたことを心より御礼申し上げますとともに、貴財団のますますのご発展をお祈り申し上げます。

（北海道大学大学院医学研究科生化学講座）

蛍光プローブによるコスメトロジー

花岡 健二郎

この度は本研究を遂行するにあたりコスメトロジー研究振興財団よりご援助を頂きましたこと深く感謝申し上げます。私は、有機化学を用いて蛍光プローブを開発する研究を行っております。蛍光プローブとは、体の中の生体分子を選択的に捉えることで初めて蛍光を発する機能性分子のことで、例えば、蛍光プローブを溶かした水溶液を生体サンプルにふりかけることで、簡単に生体サンプルの中の見たい生体分子を、リアルタイムで自分の目で見るができます。実際の研究では、このような蛍光プローブを使う時には蛍光顕微鏡などを使って発せられた蛍光を観察しますが、その一方で、蛍光は我々の目で直接見ることができるものなので、生命科学研究のみならず、医療診断や分析化学にも有用であります。

本研究助成では、皮膚の生理機能の解明に役立つ蛍光プローブの開発を行いました。実際の研究現場で用いることができる蛍光プローブを開発することで、多くの生理機能が解明されることを期待しています。いくつかの文献では、皮膚は一つの臓器のようなもので、単純な体液の漏出を防

ぐバリアでなく、表皮からの信号を免疫系や中枢神経系などに伝えることにも深く関与していると述べています。この複雑で重要な生理機能の解明を通して、それら生理機能を維持し、人の健康と美しさが保たれるのではと考えています。同時に、蛍光プローブで目に見えるようにするものによっては、単に皮膚の生理機能の解明だけでなく、皮膚の健康状態の評価など様々なことができるかも知れません。身近なようでまだまだ分かっていないことが多い皮膚の生理機能が、今後更に解明されていくことを期待しております。

最後に、我々の開発している蛍光プローブの蛍光の美しさも人の美しさも目で直接見るという点では同じであり、また、それをうまくコントロールすることも蛍光プローブの分子設計と共通なものがあると考えています。美しさの分子設計というものでしょうか。末尾になりましたが、コスメトロジー研究の益々の発展をお祈りいたします。

(東京大学大学院薬学系研究科)

皮膚と化学物質

平澤 典保

近年、皮膚上皮細胞はバリア機能を担うだけでなく、本研究で取り上げたTSLPなどサイトカインを産生して免疫応答に重要な役割を果たしている事が明らかにされてきた。また、化粧品による健康被害が問題となってきており、化粧品に含まれる化学物質の皮膚上皮細胞に対する作用の研究が大きく発展するのではないかと考えている。一方、化粧品の開発に、実験動物の使用が制限されてきており、in vitroの実験だけで本当に免疫毒性を含む安全性が担保されるのか心配である。化粧品とはいえ種々の化学物質、ナノ粒子を含むものがあり、リスクは決して低くない。筆者は化学物質には蛋白と結合して新たな抗原を形成するものと、TSLPの産生を亢進して、他の蛋白質に対するアレルギーを増強するものがある事を明らかにしてきた。特に、

TSLPの主たる産生細胞は上皮細胞であることから、化粧品に含まれる化学物質について、TSLP産生誘導活性を必ず評価する必要がある。逆に、上皮細胞を用いたTSLP産生系は、in vitroで化学物質の免疫毒性を評価する1つの方法になると考えられる。

皮膚は外界からの様々な刺激に対するセンサーを有していると考えている。化学物質に対する応答もその一つではないだろうか。特に今回、臭いのある化学物質がTSLP産生を誘導している事から、嗅覚受容体のような化学物質センサーが存在しているのではないかと夢見ており、今後もこの観点から皮膚と化学物質について研究を続けていきたいと思っている。

(東北大学大学院薬学研究科)

平成 23 年度 研究助成

ナノ粒子の化粧品への応用

堀江 祐範

私は、最近8年間に亘り工業ナノ粒子の細胞影響評価に携わっている。この間、ナノ粒子の生体影響についての研究は、大きく進んだように思う。研究を始めた当初は、ナノ粒子が生体に対してどのような作用を及ぼすのか、ほとんど何もわからなかった。ナノ粒子については、機能性材料や素材としての研究が先行し、有害性を含めた生体影響の研究は遅れがちで、アスベストのように当初知られていなかった有害性が後から出来するのではないかと、という懸念が指摘されはじめていた。その後多くの研究によって、ナノ粒子が生体に対してどのような作用を及ぼすのか、そのメカニズムはどのようにになっているのか、一つずつ明らかになってきた。ナノ粒子の生体影響の研究では、経気曝露を想定した研究が最も多い。ナノ粒子の化粧品への利用においては、経皮が最も重要であるものの、その研究はまだ途上である。ナノ粒子は、粒子が細かいことから、肌に塗布した際に粉っぽさがなく肌が美しく見えるなど、化粧

品への利用にとって魅力的な特徴を多く持つ素材である。以前は、ナノ粒子を利用していることを惹句として大々に述べている製品も見られたが、近年では消費者のリスク意識の高まりと共に、そのような表記は減っているようだ。ナノ粒子の利用において重要なことは、有害性を含めたナノ粒子の性質を理解して、有効に利用することであろう。特に化粧品への応用は、日々の生活を豊かにするためにとっても有効である。そのためにも、ナノ粒子の生体影響を知り、必要に応じた対策を講じることは必須である。「データがない」ということは社会に受け入れられず「市場がない」ということである。今回、助成によって幸いにも多くの知見を得ることが出来たと思う。これらのデータが、ナノ粒子の生体影響の理解に貢献し、コスメトロジーの発展の一助となれば大きな喜びである。また、さらなる理解のために努力してゆきたい。

(産業医科大学産業生態科学研究所)

平成 24 年度 研究助成

汗の偉大さを知る

室田 浩之

汗は人知れず皮膚から放出され、そのほとんどが蒸散し、ごく一部は皮膚表面に残る。そうすることで皮膚の恒常性を支えている、けなげな「縁の下の力持ち」といえよう。今回の研究助成の好機を得、研究成果を通じて汗の偉大さに気づかせていただいた事に改めて御礼申し上げたい。今回はマウスの手掌足底の汗腺機能の評価を行った。マウスの汗腺は手掌足底にしかないため米粒ほどのわずかな面積での検討を強いられた。彼らは汗を滑り止めとして利用するが体温調節には用いない。ヒトのように全身に汗腺をまとっている動物は類いまれだ。それゆえヒトの恒常性維持に必要な機能の多くは発汗活動に頼っている。けなげに見えた汗も今やいよいよ輝きを増す。今回、おそらく世界で

初めて生体内で汗腺の動態観察に成功した訳だが、汗腺の動きはけなげそのものであった。ヒトは個体あたり200万～500万個の成熟した汗腺を持って生まれてくる。汗腺の数は生後増えることはないと言われる。このはかなく小さな臓器のかわいらしい動きが生体の恒常性を支えていると考えれば、汗腺がより愛おしい存在に見えてくるのは私だけだろうか。水は生命維持に必須である。ヒトは汗によって惜しげもなく水を放出する。それは汗をかくことがいかに大切な事を物語っている。何かと嫌われることの多い汗だが、本研究成果を発信することで汗を理解して汗とうまく付き合う糸口が見つければ幸いである。

(大阪大学大学院医学研究科情報統合医学皮膚科学教室)

ヒトは単純なのか複雑なのか

佐藤 桂

幼少のころから香りの魅力にとりつかれてきた。すっかり忘れていた昔のことを一瞬に思い出させたり、気持ちを明るくしたり暗くしたり。身体をリラックスまたは刺激したり。香りがヒトに及ぼす影響は大きい。

香りが及ぼす影響は、ストレスの種類によって異なるようである。一過性のいらいらや邪魔されることに対する腹立たしさを感じている時は、香りは気分転換になる場合と外乱になる場合にわかれるようである。肉体的ストレスを感じている時は、香りを嗅ぐことによって、それから気持ちをそらそうとする意識もみられた。被験者の実験に対する感想はRRIの変動と同様、十人十色であり、本実験とは別に実験参加者に香りをかがせ嗜好性を聞いてみても、日によって異なっており、実験の難しさを痛感した。

私事であるが、去年不思議な出来事に遭遇した。過労がたたり医者も理由がわからない体調不良が続いた。2か月目には遂にあれだけ好きだった香りで気分が悪くなるようになり、これまで使用してきた洗剤・シャンプー・化粧水

等を変えなければならなくなった。一つだけ、さしてふだん気にもとめていなかった普通の石鹸の香りが害を及ぼさずさらには安心させる香りであることに気付いた。その時に不快な気分にしたシャンプーは長年使用してきたものであったが、健康になった今、その香りは去年の辛い日々を思い出させるものになり、15年もの間好きだった商品があつという間に嫌いになってしまった。

渋滞中のいらいらを解消させる手段の一つとして香りは効果的ではないかと考えたが、辛い思い出を引き起こしたり、余計にいらいらさせたりといった弊害も考えられる。一方、自分の好きな香りを持つれば生活の質が向上する可能性もある。たかが香り、されど香り。嗅覚の研究をする人はよっぽどの変わり者か、出世を諦めた者だとか。古代から我々を魅了してきた香りについて今後も研究していきたい。

ちなみに石鹸の香りはまたどうでもよい香りに格落ちしてしまっ

(東京農工大学大学院工学府機械システム工学専攻)

コスメトロジー雑感

藤井 俊勝

我々の研究グループは、今回の研究を開始する前までは、主にエピソード記憶・顔や名前の記憶・虚偽記憶やうそ・対象の好き嫌いなどについて脳機能画像法 (PET: positron emission tomography, fMRI: functional magnetic resonance imaging) を用いて研究を続けてきた。今回の研究を始めるにあたり、今までの研究を概観してみたが、予想していたよりも化粧顔の認知についての脳機能画像法を用いた研究が少ないことに驚いたのが実感である。

今回の研究では、行動データの結果から、化粧をしている顔は化粧を全くしていない顔に比べ、魅力度が有意に高く評定されることが明らかとなった。脳機能画像データの結果から、ノーメイク顔画像を見ている場合と比較して、フルメイク顔画像を見ている場合に、眼窩前頭皮質と海馬の有意な賦活が認められた。

以上の報告書に記載した結果は被験者全員の平均データを基に解析したものである。いくつか気になるところがあ

ってもう少し詳細に結果を見てみた。まず、もともとの魅力度が結果に影響するかどうかを検討してみたところ、もともとの魅力度にかかわらず、化粧は魅力度を上昇させていた。また、化粧をしている顔は化粧を全くしていない顔に比べ、(被験者平均で) 20% くらいの刺激では魅力度が低下していた (変化なしが約 30%、魅力度上昇が約 50%)。今回は刺激作成に参加してもらった女性に自分で化粧してもらったが、化粧の仕方のうまい人と下手な人がいるのかもしれない。あるいは、その人にあっていない化粧をしている人がいるのかもしれない。その他にも、化粧についてはいくつか考えさせられるところがあり、今後さらに研究が膨らむ気がしている。

最後に、今回の研究にあたり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申し上げます。

(東北福祉大学感性福祉研究所)

コスメトロジー雑感

日下部 豊寿

人生とは、何がきっかけでその後の未来につながっていくのかは誰にも解りません。私には留学中に知り合った韓国の一人の先生がいました。ラボは違ったのですが専門分野が同じ歯科矯正学ということ、また隣国で国民性が似ていることもあり息が統合しました。そんなことから、一緒に食事をしたり、時には留学先周辺にいらっしやる著明な先生達の歯科医院を訪れ、共に勉強していました。そんな中、時々話していると感じていたのが、日本に一番近い国でありながら、審美に対する意識は、美容外科（形成外科）の普及をみても、日本人より高いということでした。その疑問を解消するにあたり、10年近く経った後コスメトロジー財団の支援により再び共に勉強する機会がもてるとは、当然ですが当時は全く思っていませんでした。そこで今回、日本人と韓国人の間で、自己顔の意識にどのような違いがあるか明らかにすることを目的に研究を行いました。

韓国を訪れてみると、駅の構内はもとより街角でも、美容外科の手術前と手術後の写真が大きくクリニックの広告として多く見受けられました。日本のマスメディアでも大きく取り上げられていましたが、現在は周辺のアジアの

国々から、美容外科を受けにソウルを訪れる人が多いそうです。現に、ソウルの若い人達が集まる、明洞（日本の渋谷的存在？）でもこのようなたくさんの広告が、韓国語、日本語、中国語等で書かれていました。このようなことは日本でも時々タウン誌や街角でも見られますが、広告の量は日本に比べるととても多いと感じました。

2年前に、コスメトロジー研究振興財団に採択いただいた助成金により、自己顔について研究をさせていただきました。その結果は、以下のような興味深いものでした。自己顔は、口元が後方にあり、好みの横顔も口元が後方にあったが、一般人は自己顔についてやや不満を感じていた。そこで、隣国である韓国の女性も同じように感じているのか、それとも審美に対する意識は日本人より敏感でありそうなので、異なる結果となるのではないかと考えました。結果は、コスメトロジー研究報告 COSMETOLOGY にて。

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心から御礼申し上げます。
(北海道大学病院咬合系歯科矯正歯科)

日本動物実験代替法学会第26回大会を終えて

今井 弘一

日本動物実験代替法学会は大学、企業や行政の研究者などから成り立っている日本学術会議の協力学術研究団体の一員で3Rs（実験動物の苦痛軽減：Refinement、使用量の削減：Reduction、動物実験代替法の使用：Replacement）の促進、普及を目的とし、研究、開発、教育、調査等を行っています。この分野では我が国唯一の学術団体で、学術大会は毎年冬に定期開催されています。第26回大会は「動物実験代替の基礎科学と新展開」のテーマで、平成25年12月19日(木)～21日(土)に、京都テルサ（JR京都駅より南約1.5km）にて開催致しました。昨年の大会は理化学研究所の杉山 雄一先生が慶應義塾大学薬学部 芝共立キャンパスにて大変立派な大会を開催されました。懇親会の内容も大変すばらしく、次回の大会長を仰せつかった者としては大きなプレッシャーがありました。

第26回大会は組織委員長として(株)ノエビア執行役員の奥村 秀信先生にお願いしましたところ快諾をしていただきました。組織委員のメンバーは関西を中心にお願いしました。組織委員は、大森 崇（プログラム委員長、同志社大学 文化情報学部）、山下 邦彦（プログラム副委員長、(株)ダイセル コーポレート研究所）、石井 宏（マルホ(株)京都R&Dセンター 医薬開発研究所）、植木 拓朗（(株)ノエビア）、加藤 雅一（(株)J-TEC 研究開発部）、金森 健之（サンスター(株)H&B 事業部）、斎藤 幸一（住友化学(株)生物環境科学研究所）、寒水 孝司（京都大学大学院医学研究科）、仲原 聡（(株)マンダム 技術開発センター）、中村 牧（小林製薬(株)中央研究所）、森本 隆史（住友化学(株)生物環境科学研究所）、山本 裕（(株)ノエビア）（敬称略、順不同）です。とくに(株)ノエビアの植木さん、山本さんにはもの凄いの仕事を1年間以上にわたって献身的にこなしていただきました。途中から(株)ノエビアの杉田 拓也さんはじめ、大阪歯科大学の橋本 典也 講師、本田 義知 講師、岡田 正弘 助教、廖 文 大学院生の各先生方にもお手伝いを賜りました。さらに、元大阪大学医学部で前会長の黒澤 努 先生にも顧問としてご助言を賜りました。皆さん貴重な時間を割いて終始多大な協力をしていただきました。大会当日は写真撮影やアルバイトをしていただいた方々などさらに多くの方々の貴重な協力を得ました。

プログラムは、特別講演をベルリン自由大学名誉教授

のHorst Spielmann教授、大阪大学 薬学部長の堤 康央 教授と京都大学iPS研究所副所長の戸口田 淳也 教授の3名の先生方、さらに教育講演は、公益財団法人食品農医薬品安全性評価センター理事長の林 真 先生にお願いしました。シンポジウムはJaCVAM国際シンポジウムを筆頭に8つのシンポジウムに加えて最終日には市民公開シンポジウムを開催しました。市民公開シンポジウムはチャレンジコンテストの他、京都市動物園 生き物・学び・研究センターの田中 正之氏、European CommissionのAnderson先生と黒澤先生にお話しをしていただきました。また、学会誌AATEXの活性化に向けてのワークショップも行いました。これらはチャレンジコンテストを除いて招待講演数は計49演題にも達しました。さらに、2つのランチョンセミナー、マンダム動物実験代替法国際研究助成研究報告会など多彩な企画を行いました。一般演題も過去最大の75演題ありました。発表していただいた方々には誌面をお借りして感謝申し上げます。

学術大会には400名以上の参加者がありました。とくに第一日目の19日には予想より多くの参加者があり、座席がないほど会場が超満員となり、組織委員の先生方には急遽足らなくなった椅子を準備していただきました。通路も満員で夢かと思いました。JaCVAMの協力で海外からの参加者も多く、さらに懇親会でも予想をはるかに超えた参加者がありました。懇親会は京都伝統の京舞や笛などを楽しんでいただきました。また、懇親会の前には京都府の協力で、ゆるキャラ「まゆまる」にも登場していただきました。当日のスナップ写真は大会ホームページ（<http://jsaae26.jp/>）で当分の間ですが公開しております。なお、京都府、京都市環境政策局、京田辺市にはロゴマークなどの使用許可をいただきました。

末筆ではございますが、公益財団法人コスメトロジー研究振興財団には貴重な学術集会支援助成金を賜り深謝致します。また、協賛28社、展示22社、広告5社、ランチョンセミナー提供2社、物品提供3社、さらに、懇親会には公益財団法人 京都文化交流コンベンションビューローから補助を頂戴しました。大会成功の基盤となったこれらに関係者の方々には本当に心から感謝申し上げます。

（日本動物実験代替法学会第26回大会長 大阪歯科大学）

付 録

●
事業報告（平成 25 年度）
役 員
●

事業報告書

(自平成 25 年 4 月 1 日 至平成 26 年 3 月 31 日)

《研究助成関連》

2013	5	7	公募開始	全国 534 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	8	公募締切り	応募数106件
	7/19	~ 8/23		各選考委員による個別審査
	9	4	選考委員会(第1分科会)	素材、物性に関する分野の選考
	9	5	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	6	選考委員会(第3分科会)	精神、文化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31課題を選考
11	28		理事会	本選考委員会より答申、助成課題決定
			第24回 表彰・贈呈式 記念講演	研究助成対象31課題の代表者へ、表彰状、助成金目録等を授与 演題：角層を科学する 演者：慶應義塾大学医学部皮膚科 教授 天谷 雅行 先生
	12	12	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》

2013	6	19	審査	応募課題の審査
	7	16	助成金交付	国際交流助成金の交付 50万円

《学術集会支援助成関連》

2013	8	19	審査	応募課題の審査
	9	24	助成金交付	学術集会支援助成金の交付 50万円

《理事会関連》

2013	5	30	第一回通常理事会	平成24年度事業報告及び収支決算報告の承認、補欠理事候補者の選出、補欠選考委員の選出、株主としての議決権行使、報告事項
	6	27	臨時(書面)理事会	平成24年度研究助成辞退1件の承認、平成24年度研究助成辞退1件に伴う繰上げ助成課題(次点)の承認
	11	28	第二回通常理事会	平成25年度(第24回)研究助成者等の承認、平成26年度事業計画及び予算案の承認、報告事項

《評議員会関連》

2013	6	14	第一回定時評議員会	平成24年度事業報告及び収支決算報告の承認、補欠理事1名の選任、役員及び評議員の報酬等並びに費用に関する規程の一部改正に関する承認、評議員1名の辞任願いに関する承認、報告事項
------	---	----	-----------	---

《その他》

1) 報告書発行

2013	5	1	研究中間報告集	研究業績 中間報告集 第22号
	9	1	研究完了報告集	コスメトロジー研究報告 2013 vol.21

2) 情報公開(当財団HP)

2013	3	25	事業計画及び収支予算	平成25年度事業計画及び収支予算書
	4	12	公募要領	2013年度「コスメトロジー研究」公募要領
	6	17	事業報告及び収支決算	平成24年度事業報告書及び収支決算報告書
	6	27	役員の変更	二木鋭雄理事の就任、溝口昌子評議員の辞任
	9	12	研究報告の要旨	コスメトロジー研究報告 2013 vol.21 掲載課題の要旨
	11	29	研究助成者及び課題名	平成25年度研究助成者名及び研究課題名

平成 25 年度 助成を受けられた方々

1) 研究助成 (31 課題)

第 1 分野：素材、物性に関する分野 (9 課題)

氏名	所属	研究課題
荒牧 賢治	横浜国立大学大学院 環境情報研究院	紫外線吸収剤を内包したO/I型ゲルエマルションの調製
落合 秋人	新潟大学工学部 機能材料工学科	天然由来の美白性ペプチド素材の探索とその作用機序の解明
斧田 宏明	京都府立大学大学院 生命環境科学研究科	新規リン酸亜鉛白色顔料の粒子サイズ制御
金井 俊光	横浜国立大学大学院 工学研究院機能の創生部門	紫外線カットマイクロカプセルの作製
齋藤 彰	大阪大学大学院工学研究科 精密科学・応用物理学専攻	モルフォ蝶のミステリーに基づく、けばけばしくならない光輝粉体の開発
佐藤 俊	独)産業技術総合研究所 環境化学技術研究部門	保湿性・抗菌性を有するバイオベースの新しいスキンケア素材の開発
竹岡 敬和	名古屋大学大学院工学研究科	角度依存性のない構造発色性顔料の調製
林 昌彦	神戸大学大学院 理学研究科化学専攻	コスメトロジー素材に向けてのアロエC-グリコシルクロモン類の高機能化
平田 修造	東京工業大学大学院 理工学研究科	明るい環境でより鮮やかに着色する有機材料の開発

第 2 分野：生体作用、安全性に関する分野 (15 課題)

氏名	所属	研究課題
市 育代	お茶の水女子大学大学院 人間文化創成科学研究科	必須脂肪酸欠乏時における皮膚障害発症のメカニズムの解明
宇都 拓洋	長崎国際大学薬学部 薬品資源学研究室	天然物特異的モノクローナル抗体を用いた甘草エキス成分の作用機構に関する研究
柏谷 英樹	鹿児島大学大学院医歯学総合 研究科 統合分子生理学	香り誘発性鎮痛の視床下部オレキシニューロンによる調節
木村 郁夫	京都大学大学院薬学研究科 薬理ゲノミクス分野	新規細胞膜上、女性ステロイドホルモン受容体を介した生理・病態機能の解明
国定 充	神戸大学大学院医学研究科 内科系講座皮膚科学分野	スピリリナの紫外線皮膚老化抑制効果に対する検討およびそのメカニズムの解明
白井 康仁	神戸大学大学院農学研究科	セラチノサイト分化におけるジアシルグリセロールキナーゼの機能解明
新藤 隆行	信州大学大学院 医学系研究科循環病態学講座	新しい生体ホメオスターシス機構に基づく、皮膚アンチエイジング法の開発
榛葉 繁紀	日本大学薬学部 健康衛生学研究室	皮膚機能のサーカディアンリズムと時計遺伝子によるその調節機構の解明
平良 淳誠	国立沖縄工業高等専門学校 生物資源工学科	酸化ストレス応答Nrf2-Keap1系調節作用物質の探索と薬用化粧品への応用

多田 政子	鳥取大学 染色体工学研究センター 染色体医療学研究部門	化粧品成分の安全性評価：CYP誘導性と肝毒性の in vitro 評価系の構築
乃村 俊史	北海道大学病院皮膚科	フィラグリンをターゲットにしたアトピー性皮膚炎の新規治療法の開発
早川 盛禎	自治医科大学医学部 生化学講座病態生化学部門	IL-33デコイ受容体による皮膚炎症の制御
藤原 裕展	独) 理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 細胞外環境研究チーム	皮膚感覚神経 - 毛包幹細胞相互依存における基底膜領域特殊化の役割
細川 雅史	北海道大学大学院 水産科学研究院 生物資源化学分野	新規な生体親和性化粧品素材ホスファチジル-パンテノールの抗炎症作用と分子機構の解明
柳 茂	東京薬科大学生命科学部	ミトコンドリア活性化による皮膚老化の抑制機序の解明と応用

第3分野：精神、文化に関する分野（7 課題）

氏名	所属	研究課題
川添 裕子	松蔭大学 観光メディア文化学部 観光文化学科	グローバル時代のハラールと化粧品に対するモロッコの人々の意識と行動 - 日常生活における宗教規範と美の実践
小原 克彦	愛媛大学大学院 老年・神経・総合心療内科	中・高年の見た目年齢の解析
三枝（安武） 千尋	東京大学大学院工学系研究科 先端学際工学専攻	顔の魅力度認知における部分情報の統合と自己認知
佐藤 和人	秋田県立大学 システム科学技術学部 機械知能システム学科	笑顔のリズムが創る印象空間の可視化と化粧品効果の測定
清水 邦義	九州大学農学研究院	睡眠誘導効果をもつ（-）- 酢酸ボルニルの睡眠促進効果ならびに肌質改善効果
八谷 百合子	産業医科大学保健センター	リラックスおよび安眠効果に有用な植物芳香成分の探索
吉永 淳	東京大学大学院 新領域創成科学研究科	19～20世紀にわが国で使用された含鉛おしろいに関する研究

2) 国際交流助成（1件）

海外派遣（1件）

派遣者	所属	内容及び招聘者
日下部 豊寿	北海道大学病院 咬合系歯科矯正歯科	韓国ウルサン大学 Sung教授 平成25年7月1日～12月31日の期間で3回渡航予定 テーマ「自己顔に対する意識に関する研究」

3) 学術集会支援助成（1件）

実施責任者	所属	内容及び招聘者
今井 弘一	大阪歯科大学 歯科理工学講座	日本動物実験代替法学会 第26回大会 平成25年12月19日～12月21日 テーマ「動物実験代替の基礎科学と新展開」

役員

平成 26 年 7 月 1 日現在

理事長	小林 保清	株式会社コーセー 名誉会長
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	関根 茂	日光ケミカルズ株式会社 代表取締役社長
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	山崎 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	村上 實	弁護士
評議員長	内藤 昇	株式会社コーセー 取締役
評議員	伊藤 正俊	東邦大学 名誉教授
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	元厚生省大臣官房審議官
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	宮崎 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.22/2014

非売品

2014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：株式会社コーサー 商品デザイン部デザイン1課