

ごあいさつ

この度コスメトロジー研究振興財団として、25冊目の研究報告書を刊行いたしました。

設立以来25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る次第でございます。

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

今回の報告書では、平成26～27年度に助成を受けられた方の中から29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、抗酸化、抗老化等の視点での機能性素材開発に関するテーマと、特に安全性の高い製剤化研究が顕著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、皮膚のバリア機能、恒常性維持などにおける新たなメカニズムに関わる研究と、例年のように皮膚の老化に関する研究が中心であったと思われま

す。精神、文化に関する分野の研究につきましては、世界各国の化粧品ニーズに関する研究や化粧のもたらす心理や行動への影響などの研究が大変興味深い内容であったと考えています。

この研究報告書COSMETOLOGY誌がより幅広く活用されることを祈念します。

当財団は分野の枠や研究機関の属性などにとらわれることなく、化粧品学の発展のために、優れた研究に対して積極的に助成を行っていきたいと考えております。

今後とも、皆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29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

- ・ 天然を超える抗酸化&抗菌活性の発現をめざしたポリフェノール模倣高分子の精密重合…………… 4
東京大学大学院工学系研究科 マテリアル工学専攻 江島 広貴
- ・ アーユルヴェータ生薬および熱帯植物からのアンチエイジングを志向した
抗糖化および美肌薬の創薬研究……………9
広島大学大学院医歯薬保健学研究科 杉本 幸子
- ・ エラスチン類似ポリペプチドの合理的設計による温度応答性ゲルの創製…………… 16
名古屋大学大学院工学研究科 応用物質化学専攻 鳴瀧 彩絵
- ・ 高分子ナノゲル粒子の短距離秩序に基づく色彩の研究…………… 21
九州大学大学院工学研究院 化学工学部門 三浦 佳子
- ・ 水溶性フラーレンの設計とそれらを用いた抗酸化作用に関する研究…………… 27
東京工業大学物質理工学院 道信 剛志
- ・ 安全性に優れた化学合成コラーゲンによるドラッグデリバリー用球状微粒子の創成 …… 30
九州工業大学大学院生命体工学研究科 宮崎 敏樹
- ・ バイオベースマテリアルを用いた人体により安全な染毛法の開発 …… 34
京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科 繊維学系 安永 秀計

II. 生体作用、安全性に関する分野

- ・ タイトジャンクションの形成を促進するシグナル伝達経路の解明…………… 42
九州大学理学研究院 生物科学部門 池ノ内順一
- ・ 酸化ストレスの生体分子イメージングから迫る対紫外線スキンケア分子の新規探索と機能評価…………… 46
群馬大学大学院医学研究科 教育研究支援センター岩脇研究室 岩脇 隆夫
- ・ 慢性皮膚炎モデルにおける HDC 遺伝子レポーターマウスを用いたヒスタミン産生細胞の同定 …… 50
東北大学大学院工学研究科 大津 浩
- ・ レチノイン酸の皮膚内濃度モニタリングと新規アンチエイジング分子の同定への応用…………… 56
滋賀医科大学 解剖学講座生体機能形態学部門 岡野 純子
- ・ 光線過敏症リスク予測方法の確立と国際協調活動の戦略的推進…………… 60
静岡県立大学薬学部 薬物動態学分野 尾上 誠良
- ・ 炎症時における細胞動態と酵素活性を in vivo で可視化する機能性 MRI プローブ…………… 68
大阪大学大学院工学研究科 菊地 和也
- ・ 皮膚顆粒細胞の活性化とタイトジャンクション修復による皮膚バリア機能増強と
アトピー・アレルギーの発症予防……………72
徳島大学先端酵素学研究所 木戸 博
- ・ 皮膚組織のコラーゲンが体の温度適応に与える影響 …… 78
甲南大学理工学部 統合ニューロバイオロジー研究所 久原 篤
- ・ 新規ナノ粒子を用いた皮内 siRNA デリバリーによる皮膚の恒常性維持…………… 83
長崎大学病院 薬剤部 佐々木 均

・ 創傷をより綺麗に修復させる皮膚再生促進薬の開発	89
東海大学医学部 基盤診療系再生医療科学 住吉 秀明	
・ 経皮吸収物質の体内動態のイメージング質量分析による解析	96
福井県立大学生物資源学部 生物資源学科 平 修	
・ 皮膚バリア機能障害を伴う皮膚疾患を対象としたラマン分光装置を用いた 角層天然保湿因子の解析	103
大阪医科大学 皮膚科 谷崎 英昭	
・ 極長鎖脂肪酸含有セラミドの表皮バリア形成における機能と分子機構の解明	108
大阪市立大学 複合先端研究機構 中台（鹿毛）枝里子	
・ 創傷治癒機構における小胞体ストレス応答の関与	113
和歌山県立医科大学 薬理学講座 松崎 伸介	

Ⅲ. 精神、文化に関する分野

・ 「香り」の社会言語学：人はどのように「香り」の言語化を行うのか	120
ユタ大学言語文化学部 東 照二	
・ ムスリム女性の「美」と消費 —中東におけるハラール化粧品の可能性—	126
神奈川大学外国語学部 大川真由子	
・ 患者や家族と看護者の化粧に対する認識の比較に関する研究	130
愛知県立大学看護学部 看護学研究科 萩 あや子	
・ 女子青年における容姿に対する劣等感への化粧効果の認識に関する発達心理学的研究	138
和光大学現代人間学部 高坂 康雅	
・ 消費者ニーズの変化と化粧品流通チャネルに関する研究 —日本・中国・イギリスの3か国比較—	152
同志社大学商学部 佐々木一郎	
・ バイオミメティック触覚センシングシステムによる化粧料の使用感評価	158
山形大学大学院理工学研究科 野々村美宗	
・ 女性の美における訴求表現に関する研究	162
静岡文化芸術大学文化政策学部 国際文化学科 広瀬 英史	
・ 化粧がもたらす自己の価値および社会行動における価値の変化 —行動学的検討—	170
福島県立医科大学医学部 システム神経科学講座 藤原 寿理	

■記念講演

・ 第27回表彰・贈呈式記念講演 「顔—その魅力の内側—美術解剖学的視点から」	179
東京藝術大学美術学部 宮永 美知代	

■コスメトロジー研究雑感

■付 録

事業報告書	205
2016年度 研究助成を受けられた方々	207
役員一覧	210

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

天然を超える抗酸化&抗菌活性の発現をめざした ポリフェノール模倣高分子の精密重合

東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻

江島 広貴

Polyphenols are plant-derived chemicals with more than or equal to two phenolic hydroxy groups by the Quideau definition. These molecules usually have both catechol and gallol groups in their chemical structures, that play key roles in their antioxidant and antibacterial activities. Inspired by this, I synthesized gallol-functionalized polymers via controlled radical polymerization for the first time. The reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization of 3,4,5-trimethoxystyrene was carried out using cyanomethyl dodecyl trithiocarbonate as the chain transfer agent. This method produces well-defined polymers with a wide range of molecular weight (from 5.4 to 53.4 kg mol⁻¹) and low polydispersity index ($M_w/M_n < 1.3$). Subsequent demethylation of poly(3,4,5-trimethoxystyrene) yields poly(3,4,5-trihydroxystyrene) (polyvinylgallol, PVGal). These newly synthesized polymers exhibit greater antioxidant activities than widely used catechol-functionalized polymers based on the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH), 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) methods. Given this high antioxidant property, the effective use of gallol-functionalized polymers in biomaterials is expected.

1. 緒言

持続型社会への転換要請から、バイオマス由来の素材を用いた機能性材料開発が求められている。ポリフェノールは植物の葉、茎、樹皮、果皮、種子などに多く含まれているバイオマス由来の化合物である。Quideauの定義¹⁾では、ポリフェノールとは分子内に2つ以上のフェノール性ヒドロキシ基を持つ植物成分の総称である。抗酸化作用、炎症性、抗菌作用といった優れた生理活性を持つものが多く、人類はその長い歴史の上で、伝統的にポリフェノールを活用してきた。例えば、薬や食品添加物としての例は数多く、革なめし工程におけるタンニン、ワインにおけるタンパク質系澱下剤、漆(ポリフェノールの一種)塗りやお歯黒における利用など、枚挙にいとまがない。ポリフェノールの抗菌作用は抗生物質と比べると弱いものの、環境と生体に優しい抗菌物質として近年再び注目を集めている。また、没食子酸プロピル(ポリフェノールの一種)は化粧品に抗酸化物質として既に配合されている。ところで、有機化学で用いられる‘ポリ’は2コ以上をさすため、フェノール性水酸基を2コ以上分子内に持てば‘ポリ’フェノールである。一方、高分子科学で用いられる‘ポリ’は通常10コ以上をさし、‘ポリ’フェノールはいわゆる‘ポリ’マーではない。

本研究ではポリフェノールの化学構造 (Fig. 1a) から着想を得て、そのシンプルかつ普遍的なビルディングブロッ

クであるフェノール性官能基(ガロール基)に着目し、これを側鎖に持つ新規ポリマー、ポリビニルガロール (PVGal) をリビングラジカル重合によって合成した (Fig. 1b)。これまで、有機低分子化合物として用いられてきた‘ポリ’フェノールをポリマー化することによって、優れた加工性、多価効果、隣接効果、分子量効果などが期待でき、天然のポリフェノールより優れた抗酸化or抗菌素材開発が可能になるものと期待される。

2. 方法

2. 1. Wittig反応による3,4,5-トリメトキシスチレン (TMS)の合成

窒素雰囲気下でメチルトリフェニルホスホニウムプロミド (26.2g, 74.9mmol) を無水THF (180mL) に懸濁し、-78℃に冷却して*n*-ブチルリチウム (1.6Mヘキサン溶液を47mL, 75.2mmol) を加えた。反応混合物を室温まで昇温させた後、3,4,5-トリメトキシベンズアルデヒド (TMB, 11.0g, 55.3mmol) を加え、一晚攪拌した。反応溶液を100mLの蒸留水に注ぎ、ジエチルエーテルで抽出した。硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過後、溶媒を減圧留去した。残渣をカラムクロマトグラフィー (シリカ、ヘキサン/酢酸エチル=4/1) で精製し、目的物を得た (収率64%)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) : (δ, ppm) 6.7 (2H, s, Ar-H), 6.7-6.6 (1H, m, CH=CH₂), 5.7-5.1 (2H, m, CH₂=CH), 3.9 (6H, s, OCH₃), 3.8 (3H, s, OCH₃)。 ¹³C NMR (400MHz, CDCl₃) : (δ, ppm) 152.7, 135.5, 104.4, 60.7, 55.8, 31.9。

2. 2. RAFT重合によるポリトリメトキシスチレン (PTMS)の合成

シュレンク管にTMS (2g, 10.3mmol)、cyanomethyl dodecyl trithiocarbonate (CDTTC)、重合開始剤



Controlled Radical Polymerization of Polyphenol-Inspired Polymers with High Antioxidant and Antibacterial Properties

Hiroataka Ejima

Department of Materials Engineering,
The University of Tokyo

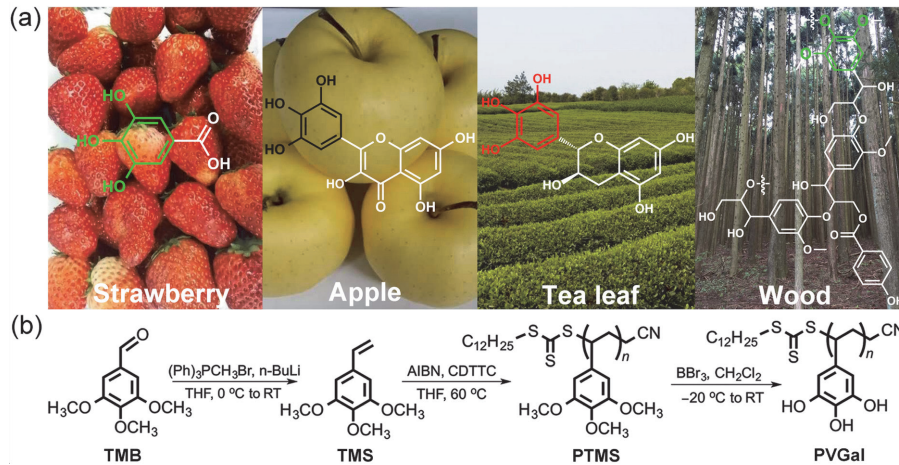


Fig. 1 Polyphenols and polyphenol-inspired polymers.

- (a) Chemical structures of gallic acid found in strawberry, myricetin in apple, epigallocatechin in tea leaf, lignin in wood.
 (b) Synthetic route for the preparation of poly(3,4,5-trihydroxystyrene), PVGal.

azobisisobutyronitrile (AIBN)、THF (4mL) を入れ、凍結脱気を3回繰り返した後、窒素を充填した。オイルバス中で60℃に加熱することでRAFT重合を開始した。この時のモノマー TMS に対する CDTTC と AIBN のモル比 ([TMS] : [CDTTC] : [AIBN]) を変えることで、様々な分子量の PTMS を合成した。重合後、反応溶液を0℃に冷却した。THF (10mL) を添加することでポリマーをよく溶解させ、これをヘキサンで再沈殿することでPTMSを得た (収率90%、Fig. 2)。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) : (δ, ppm) 6.3–5.5 (Ar-H), 4.0–3.4 (OCH₃), 3.3–3.1 (CH₂-S), 2.4–2.2 (CH₂-CN), 1.2–0.7 (C₁₀H₂₀-CH₃), 2.1–1.0 (CH (Ar)-CH₂)。¹³C NMR (400MHz, CDCl₃) : (δ, ppm) 152.7, 135.5, 104.4, 60.7, 55.8, 41.2, 31.7, 29.7, 22.9, 14.4。

2. 3. ポリビニルガロール(PVGal)の合成

100mLナス型フラスコ中でPTMS (0.96g, 5mmol) をジクロロメタン20mLに溶かし、15分間窒素でパージした。溶液を0℃まで冷却し、10分間攪拌した後、三臭化ホウ素(1M, 15mL, 15mmol)を10分間かけて滴下した。30分後に反応溶液を室温まで昇温し、一晩攪拌した。1%塩酸水溶液を加え、生じた沈殿を濾過によって回収した。これをメタノールに溶かして濾過した。濾液をエバポレーターによって濃縮し、THFに再び溶解した。これをヘキサンで再沈殿し、濾過で回収することで目的物を得た (収率60%)。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) : (δ, ppm) 9.1–8.0 (OH), 6.2–5.4 (Ar-H), 2.2–0.8 (CH (Ar)-CH₂)。¹³C NMR (400MHz, CD₃OD) : 144.8, 131.1, 106.7, 67.9, 40.3, 31.7, 25.2, 22.3, 13.3。

2. 4. 抗酸化能の測定

抗酸化能は2,2-diphenyl-1-picrylhydrazylラジカル消去活性

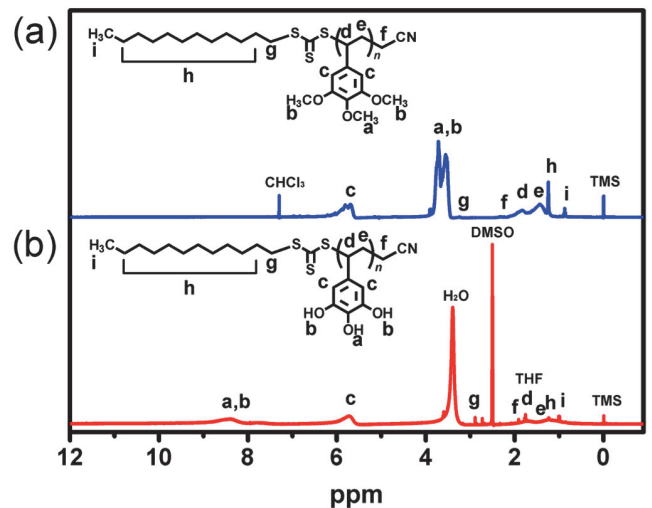


Fig. 2 ¹H NMR spectra of (a) PTMS and (b) PVGal.

法(DPPHアッセイ)、2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) カチオンラジカル消去活性法 (ABTSアッセイ)、oxygen radical absorbance capacity法 (ORACアッセイ)の3種の方法を併用して評価した。

2. 4. 1. DPPHアッセイ

36mgのDPPHを100mLのメタノールに溶かしてストック溶液とした。このストック溶液と抗酸化物質のメタノール溶液を適切な量希釈し混ぜることで、DPPHの終濃度が91μM、抗酸化物の終濃度が250, 100, 50, 25, 10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.25mMとなるように溶液を調製した。その後すぐに、515nmにおける吸光度を0.2秒ごとに12分にわたって測定した。抗酸化能は以下の式より計算した。

Radical scavenging effect (%) =

$$[(\text{Control Abs.}) - \text{Sample Abs.} / \text{Control Abs.}] \times 100$$

2. 4. 2. ABTSアッセイ

ABTSと硫酸カリウムの混合水溶液 (終濃度はそれぞ

れ 7.0, 2.5 mM) を 20 時間暗所で静置した。これを $\lambda=734$ nm における吸光度が約 1.0 になるように希釈し、所定の濃度の抗酸化物質と混ぜ、吸光度の退色を追跡した。抗酸化能は以下の式により標準物質 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) 換算値 (Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC) として計算した。ただし、 A_{12} は 12 分後の $\lambda=734$ nm における吸光度を表す。

$$\text{TEAC} = [A_{12} - A_0]_{\text{antioxidant}} / [A_{12} - A_0]_{\text{trolox}}$$

2. 4. 3. ORACアッセイ

フルオレセインのリン酸緩衝溶液 (70nM, pH7.4) と抗酸化ポリマー (モノマー単位の濃度で 10 μ M) のメタノール溶液 (0.3mL) を石英セル中で混合した。次に、2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH) のリン酸緩衝溶液 (18mM, pH7.4) を添加し、蛍光強度 (Ex: 468nm, Em: 520nm) を 60 分にわたって 2 秒ごとに測定した。蛍光強度を時間に対してプロットし、その曲線の下部の面積 (Area Under the Curve, AUC) を計算した。対照実験として、メタノールのみを加えた (サンプル濃度 0 μ M) ものと Trolox のメタノール溶液 (濃度: 1, 3, 5, 7 μ M) を加えたものでも測定して AUC を求め、検量線を作成した。この検量線を用いることで、抗酸化能は TEAC 値として算出した。

2. 5. 測定機器

^1H -, ^{13}C -NMR 測定は、日本電子社製の NMR 分光測定装置 (JNM-AL400) を用いた。紫外可視分光光度計は日立社製の U-3010 を使用した。フーリエ変換赤外分光装置は Thermo Scientific 社製の Nicolet iS10 FT-IR に Smart iTR attenuated total reflectance apparatus を装着したものをを用いた。数平均分子量 (M_n)、重量平均分子量 (M_w) は絶対分子量測定マルチ検出器システム (示唆屈折計検出器、粘度検出器、光散乱検出器) を備えた東ソー社製の GPC (HLC-8320) に TSKgel GMHHR-M カラムを装着したものをを用いて求めた。クロロホルムの流速は 1mL min $^{-1}$ 、相対

分子量を求める際はポリスチレンを標準物質として作成した検量線を使用した。絶対分子量を求める際に必要な屈折率濃度増分 (dn/dc) は 0.104mL g $^{-1}$ であった。

3. 結果と考察

RAFT 重合 (可逆的付加開裂連鎖移動重合) の際に使用する連鎖移動剤 (CTA) は、分子量の制御に重要である。CTA は成長ポリマー鎖からラジカルを受け取り、ポリマーの伸長を止めるが、ラジカルを受け取った CTA はモノマーを攻撃して再び重合を開始させる。この平衡反応の存在によりラジカル活性種の濃度が反応溶液中で低く抑えられるため停止反応などの副反応が起こりにくい。そのため RAFT 重合では通常のラジカル重合と比べて分子量分布の狭いポリマーを合成することができる。しかしながら、用いるモノマー種によって適する CTA と適さない CTA が存在するため、最適な CTA を探索する必要がある。

本研究では、まず 4 種類の CTA、2-(dodecylthiocarbonylthio)-2-methylpropionic acid (DDMAT)、cyanomethyl dodecyl trithiocarbonate (CDTTC)、2-cyano-2-propyl dodecyl trithiocarbonate (CPDTTC)、4-cyano-4-[(dodecylsulfanyl-thiocarbonyl) sulfanyl] pentanoic acid (CDSPA) を用いて、RAFT 重合条件の最適化を行った。[TMS] : [CTA] = 30 : 1 の条件で (標的重合度 30) 重合したところ、得られたポリマーの重合度は DDMAT, CDTTC, CPDTTC, CDSPA の場合、それぞれ 16, 29, 18, 18 であった。また多分散度 (M_w/M_n) は 1.4, 1.2, 1.2, 1.6 であった。CTA を用いないフリーラジカル重合では、得られたポリマーの重合度は 80 で M_w/M_n は 2.3 であった。最も標的重合度に近く、分子量分布も狭いポリマーが得られた CDTTC を CTA として用いることに決定した。

次に CTA と重合開始剤の比を [CDTTC] : [AIBN] = 1 : 1 に固定し、モノマーと CTA の比を [TMS] : [CDTTC] = 20 : 1, 30 : 1, 50 : 1, 100 : 1, 200 : 1, 300 : 1 で重合したところ、26, 35, 53, 115, 185, 276 量体の PTMS が得られた (Fig. 3)。すなわち M_n にすると 5-50kg mol $^{-1}$

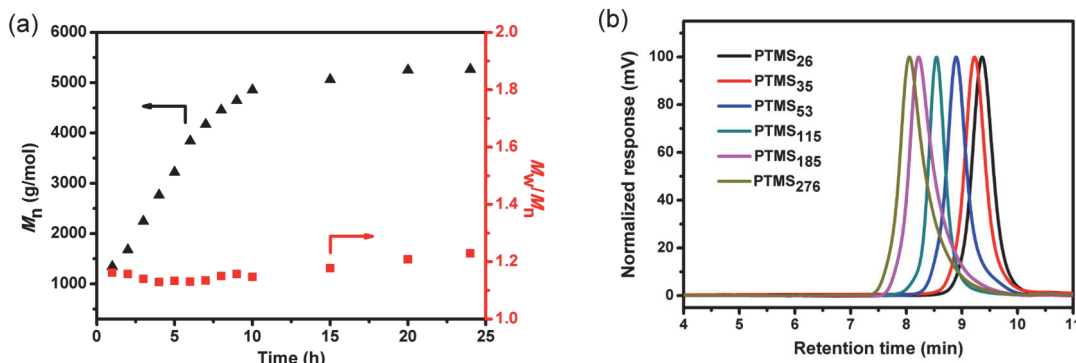


Fig. 3 (a) Plots of molecular weight (M_n) and polydispersity (M_w/M_n) against RAFT polymerization time. (b) GPC traces of PTMS with various molecular weight.

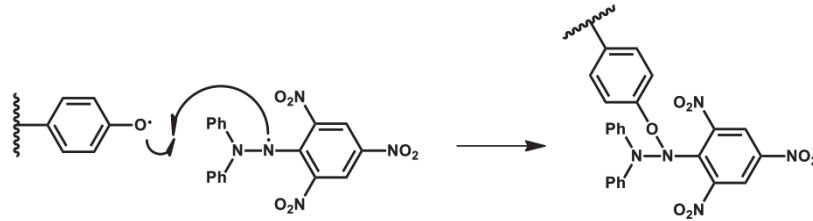


Fig. 4 Reaction of the DPPH radical and a phenolic molecule.

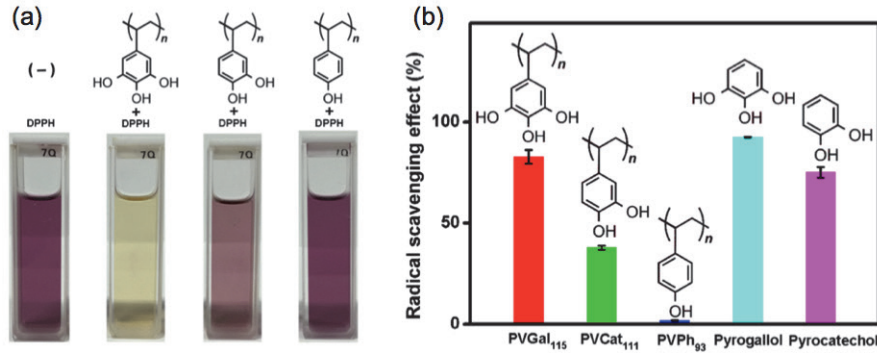


Fig. 5 (a) Decoloration of the DPPH radicals in methanol reacting with polyphenol-inspired polymers. (b) The antioxidant activity of polyphenol-inspired polymers and the corresponding monomers after 2 min with the tested antioxidant in the presence of DPPH.

の範囲で分子量を良好に調節できた。どの分子量のPTMSも M_w/M_n は < 1.3 であり、分子量が揃ったポリマーが得られた。最後に、PTMSのメトキシ基を三臭化ホウ素によって脱保護することでPVGalを得た。脱保護反応の進行は $^1\text{H NMR}$, $^{13}\text{C NMR}$, FT-IRによって、メトキシ基ピークの消失およびヒドロキシ基ピークの出現から確認した。

DPPHは安定なラジカルを持ち、紫色を呈色する。DPPHラジカルがFig. 4のような反応を経て抗酸化物質によって消去されると、色が黄色に変化するため、比色分析によって抗酸化活性を評価することができる²⁾。フェノール性水酸基をそれぞれ1つ、2つ、3つ持つ、PVPh、PVCat、PVGalの抗酸化活性をFig. 5に示した。フェノール性水酸基の数が増えるほど高い抗酸化活性を示した。PVGalはPVPhと比べると60倍以上、PVCatと比べても2倍程度の高い抗酸化活性を示した。この際、用いたフェノール性ポリマーの重合度は約100に揃えてある。低分子のピロガロールとピロカテコールは、ポリマーであるPVGalとPVCatよりも同じ重量濃度で比べると高い抗酸化活性を示したが、モル濃度で比べるとポリマーの方が高い抗酸化活性を示した。

Fig. 6にDPPHの紫色 (Abs. = 515 nm) の退色過程を時間に対してプロットしたものを示す。DPPHラジカルの消去速度はPVGal>PVCat>PVPhという順番であり、Fig. 5bの抗酸化活性と同様の順番であった。PVGalは約2分でDPPHをほぼ全て退色させたが、PVCatは10分以上を要した。また測定した12分という時間内においてPVPh

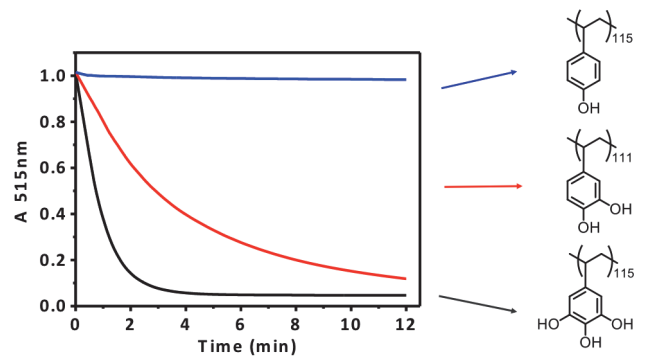


Fig. 6 DPPH decoloration kinetics for the tested antioxidant polymers.

では退色はほとんどみられなかった。使用したポリマーの重合度は約110量体で揃えてあるため、溶液中での拡散速度に大きな差はない。そのためPVGalの高いDPPHラジカル消去活性はその化学構造に由来すると考えられる。

ガロール基の3つのヒドロキシ基の酸化還元電位は1.16, 1.40, 1.92V (vs. Ag/AgCl) である。一方で、カテコール基の2つのヒドロキシ基の還元電位は1.18, 1.35V (vs. Ag/AgCl) である³⁾。1つ目の酸化還元電位はガロールの方が若干低いため、酸化されやすい。すなわち抗酸化活性は高い。それに加えて、ガロール基はFig. 7に示すように、発生したラジカルは隣接する2つのヒドロキシ基と水素結合して、カテコール基の場合よりもさらに安定化される。この効果は密度汎関数理論 (DFT) による計算から、ガロール基では 50kJ mol^{-1} 、カテコール基では 33kJ mol^{-1} と



Fig. 7 Stabilization of phenoxyl radicals via hydrogen bondings in gallol and catechol groups.

Table 1 Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) values of the antioxidants calculated from the ABTS and ORAC assays.

Antioxidant	ABTS	ORAC
Trolox	1.0	1.0
PVPh ₁₁₅	0.4	0.1
PVCat ₁₁₁	0.9	0.8
PVGal ₁₁₅	1.4	1.5

見積もられる。これにより、ガロール基を側鎖に多くもつ PVGal は高い抗酸化活性を示したと考えられる。

続いて、ABTS アッセイと ORAC アッセイから求めた TEAC 値を Table 1 に示す。TEAC 値とは、抗酸化物質の標準である Trolox の抗酸化能を 1 とし、それに対して相対的に抗酸化能がどのくらいかを表した換算値であり、値が大きい方が、抗酸化能が高い。ABTS/ORAC アッセイともほぼ同様の結果を与えた。PVGal の TEAC 値は約 1.5 となり、Trolox よりも大きな値となった。一方で天然のポリフェノールであるエピガロカテキンガレート (EGCG) の TEAC 値を ABTS アッセイで求めたところ 4.2 であり、PVGal はその値に及ばなかった。しかしながら、分子量の違いを考慮にいれた IC₅₀ 値では EGCG の 3.5 μM⁴⁾ に対し、PVGal は 0.3 μM と一桁低い値を示した。IC₅₀ 値は酸化を 50% 阻害する濃度であるから、その値は小さい方が少ない濃度で酸化を阻害できることを示しており、抗酸化活性が高い。

4. 総括

市販の化合物である TMB からポリフェノール模倣高分子 PVGal を合成する 4 ステップの合成ルートを確認した。さらにリビングラジカル重合の一種である RAFT 重合の条件を最適化し、分子量を制御した PVGal を得ることができた。今回合成した新規ポリマーである PVGal は他のフェノール性高分子と比べて特に高い抗酸化活性を示した。

謝辞

本研究の遂行にあたり、公益財団法人コスメトロジー研究振興財団によりご援助いただきましたことに深謝いたします。

(総括引用文献)

- 1) Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouysegu L : Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50, 586-621, 2011.
- 2) Piras A M, Dessy A, Dinucci D, Chiellini F : 2-Methoxy aniline grafted poly(maleic anhydride-*alt*-butyl vinyl ether) hemiester: A new biocompatible polymeric free radical scavenger, *Macromolecules*, 44, 848-856, 2011.
- 3) Carter M K: Correlation of electronic transitions and redox potentials measured for pyrocatechol, resorcinol, hydroquinone, pyrogallol, and gallic acid with results of semi-empirical molecular orbital computations-A useful interpretation tool, *J. Mol. Str.*, 831, 26-36, 2007.
- 4) Snijman P W, Joubert E, Ferreira D, Li X C, Ding Y, Green IR, Gelderblom W C : Antioxidant activity of the dihydrochalcones aspalathin and nothofagin and their corresponding flavones in relation to other rooibos (*aspalathus linearis*) flavonoids, epigallocatechin gallate, and trolox, *J. Agric. Food Chem.*, 57, 6678-6684, 2009.

アーユルヴェーダ生薬および熱帯植物からの アンチエイジングを志向した抗糖化および美肌薬の創薬研究

広島大学大学院医歯薬保健学研究科

杉本 幸子

Advanced glycation endproducts (AGEs), which readily form and accumulate with sustained hyperglycemia, contribute to the development of diabetic complications and, as such, are considered a potential therapeutic target. Some isolated compounds from two plants showed strong inhibitory activity toward AGEs formation, the inhibitory activity of a positive control, aminoguanidine, being 1.29 mM. The current results indicate that, in comparison with the reference compound, aminoguanidine, which once entered phase II clinical trials, but was withdrawn because of its side effects¹⁾, flavonoid glycosides were clearly more efficient in inhibiting the formation of AGEs. Thus, these compounds seem to be worthy of consideration as potential therapeutic agents for diabetic complications and related diseases though additional biological evaluation. Among the isolated compounds, isolinariins C, D and E (**1**, **2** and **3**) showed inhibition toward AGE formation (IC₅₀ values of 34.8, 35.0 and 19.5 μM, respectively). Collagenase is an enzyme that is known to be a member of matrix metalloproteinase (MMP) family. The agents that inhibit collagenase may have beneficial effects for maintaining healthy skin by preventing dermal matrix degradation. Therefore, the isolated compounds were evaluated the collagenase inhibitory activity. The results showed that linariin (**4**) and pectolinarin (**5**) exhibited weak inhibition with IC₅₀ values of 79.4 and 78.6 μM, respectively. Luteolin (8, 40.5 μM) showed stronger inhibitory activity than that of a positive control, caffeic acid (an IC₅₀ value of 120 μM) as reported previously²⁾.

1. 緒言

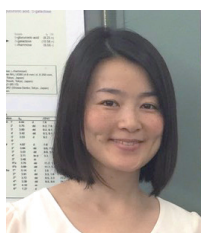
機能的食品や飲料、健康食品、サプリメント、医薬品など幅広い産業へと美白・アンチエイジング市場が拡大しており、特に医療と美容が融合したコスメシューティカル（機能的化粧品）が注目されている。その中でも特に美白機能を中心とした機能的化粧品が近年大きな市場となり、また、若年層をターゲットとした初期段階からの美白・老化症状の予防なども求められており、日本のみならず海外でも活発に研究がなされている。

本研究では、探索対象の植物が未利用植物、もしくはアーユルヴェーダ生薬であってもその含有成分や、薬理活性が未解明の植物が主であるため、*Entada*属植物で得られた含硫含窒素化合物のような³⁻⁵⁾、既存のものとは異なる新しいタイプの美容薬のリード化合物が期待できる。近年、活発に美白に関する研究は行われているが、実際の市場調査などによると、それら美白薬を使用して効果があると実感しているのは少数例である。そこで、遺伝的多様性に富む亜熱帯、熱帯地域産の未利用植物資源から抽出・単離を行い、美容薬の医薬シード化合物を見出すことを研究目的とする。

特に、皮膚の老化にかかわるだけでなく、糖尿病合併症

や動脈硬化症などの発症に関与することが知られている Advanced glycation end-products (AGEs) の生成阻害活性を有する化合物を天然物素材より探索する。AGEはタンパク質と糖によりメイラード反応や褐変反応といった非酵素反応で形成される。簡潔に書くとメイラード反応は二段階で起こり、最初のグリケーションは可逆的で、還元糖のカルボニルからのシッフ塩基の保護、タンパク質（リジン、アルギニン）の第一級アミノ基の保護を含んだ反応であり、イミン付加体は再転位してHbA1cのようなアマドリ化合物を形成する。アマドリ化合物は糖尿病のコントロールマーカーとして広く使われている。後の反応では複合体は不可逆的酸化反応、縮合と環化を起こし分子内外で架橋形成をして、AGEを形成する⁶⁾。

また、皮膚の老化や骨粗しょう症などの代謝性疾患、関節炎などの緩和に有効とされるコラゲナーゼ阻害化合物についても合わせて探索している。コラーゲンは動物の結合組織を構成する皮膚の弾力性やハリを保つ真皮の大部分を占める主要タンパク質であり、コラーゲンの減少・変性によってシワ、シミ、タルミなどの皮膚の老化現象が引き起こされる。種々の組織においてI型～XIII型の13種類の存在が知られている。コラゲナーゼは、コラーゲンタンパク質を特異的に切断する酵素であり、加齢や紫外線による皮膚のシワの発生や粘弾性の低下、骨粗しょう症等の代謝性疾患、炎症性疾患、リウマチなどの関節性疾患など多くの疾患に関与する。このコラゲナーゼ活性を阻害することにより、上述した疾患の改善につながると考えられる。このような背景のもと、我々は美容薬として有効な化合物を天然物素材から探索している。



Search for anti-aging drugs from ayurvedic and tropical plants

Sachiko Sugimoto

Graduate School of Biomedical & Health Sciences, Hiroshima University

2. 実験

2.1. 植物抽出エキスおよび各溶出画分からの化合物の精製・解析

本研究で用いた植物サンプルはいずれも乾燥物を室温で1週間メタノールに浸し、得られた抽出液はエバポレーターを用いて溶媒を留去させ、エキスを得た。そのエキスをヘキサン、酢酸エチル、ブタノール、水を用いて溶媒分配を行い、各移行部について、順相カラムシリカゲルクロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィー、および高速液体クロマトグラフィーを用いて化合物を単離した。単離した化合物については、薄層クロマトグラフィーで確認後、化学構造を決定するために、まず核磁気共鳴装置(NMR)を用いて化学構造を推定し、質量分析装置(MS)でその分子式を決定した。さらに、不斉炭素のある化合物についてはその旋光度測定や分解反応を行い立体配置を決定した。

測定機器に関しては、NMRはBruker Avance III 600 spectrometer、MSはLTQ Orbitrap XL、赤外吸収スペクトルはHORIBA FT-710、UVスペクトルはJASCO V-520 UV/Vis spectrophotometerを用い、旋光度測定にはJASCO P-1030 digital polarimeter、CDスペクトルにはJASCO J-720 spectropolarimeterを用いた。

2.2. AGEs形成阻害活性試験

96ウェルプレートに、10mg/mL ウシ血清アルブミンBSA (0.02%アジ化ナトリウムを添加した50mMリン酸緩衝液)に、0.5Mリボース溶液を加えたのち、サンプルを添加した。24時間37度で培養後、その蛍光を測定した(EnSpire, PerkinElmer Japan; Ex: 370nm, Em: 440 nm)。

ポジティブコントロールとして、アミノグアニジン塩酸塩(東京化成工業株式会社、CAS番号: 1937-19-5)を用いた(Fig. 1)。

阻害の程度については以下の式で算出した。

$$\text{Inhibition (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Fluorescence intensity(sample)} - \text{Fluorescence intensity(blank of sample)}}{\text{Fluorescence intensity(control)} - \text{Fluorescence intensity(blank of control)}} \right) \times 100$$

sample: 試料添加

blank of sample: 試料添加、リボースを添加せずに、BSAを代わりに添加

control: 試料添加なし

blank of control: 試料添加なし、リボースを添加せずに、BSAを代わりに添加

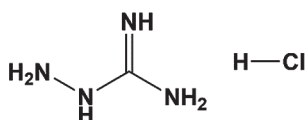


Fig. 1 Aminoguanidine Hydrochloride

2.3. コラゲナーゼ阻害活性試験

96ウェルにサンプル、50mM Tricine緩衝液、20μg/mLコラゲナーゼを加えて、37度で10分間培養後、40μg/mLの基質を加える。すぐに蛍光光度計でEx (測定励起波長)=320nm、Em (測定蛍光波長)=405nmで測定し、この時を0分後とし、15分後、30分後に測定をする。なお、測定するまでの間は常に37度にキープした。この活性試験の原理は、基質MOCAC-PRO-Leu-Gly-Leu-A₂pr (Dnp)-Ala-Arg-NH₂のLeu-Glyの結合を特異的にコラゲナーゼが切断し、切断された部分構造が蛍光光度計ではEx 320nm、Em 405nmで測定されることより、阻害化合物を添加することによって、コントロールに比べどの程度阻害されたのかが判断できる。

ポジティブコントロールはカフェイン酸(IC₅₀=2.91mg/mL、東京化成工業株式会社、CAS番号: 331-39-5)を用いた(Fig. 2)。コラゲナーゼはCollagenase from *Clostridium histolyticum* (Sigma Aldrich Japan, C9263)を使用し、基質はMOCAC-PRO-Leu-Gly-Leu-A₂pr(Dnp)-Ala-Arg-NH₂(ペプチド研究所、Code:3163-vLot:630316)を、Tricineは(東京化成工業株式会社、CAS番号: 5704-04-1)を用いた。

2.4. 細胞増殖抑制試験

ヒト肺がん上皮細胞(A549)を用いて化合物の細胞増殖抑制活性を検討した。10%FBS Dulbecco's modified Eagle's mediumに100μg/mLのkanamycinおよび0.5μg/mLのamphotericin Bで培養したA549細胞を、96ウェルプレートに5 × 10³cells/wellになるように播種し、サンプルを添加後二酸化炭素存在下37度72時間培養した。ポジティブコントロールはdoxorubicinを用いた。培地を吸引後MTT溶液を加え、1.5時間さらに同様に培養した。MTT溶液を吸引し、DMSOを添加し、マイクロプレートリーダー(Abs: 540 nm)でその吸光度を測定した。

3. 結果⁷⁻⁹⁾

3.1. ウンランからの化合物の単離・構造解析

ゴマノハグサ科ウンラン属 *Linaria japonica*、和名: ウンラン(海蘭)は海岸の砂地を這うように自生する多年草で、高さは10~15cm程度であり、葉は対生か3~4枚の輪生で楕円形をしている。花は黄白色の地上部の大きさに比べ、大きな花を咲かせる。近年は自然海岸が減少していることから、それに伴い、ウンランの自生地も減少していると言

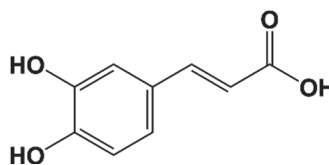


Fig. 2 Caffeic acid

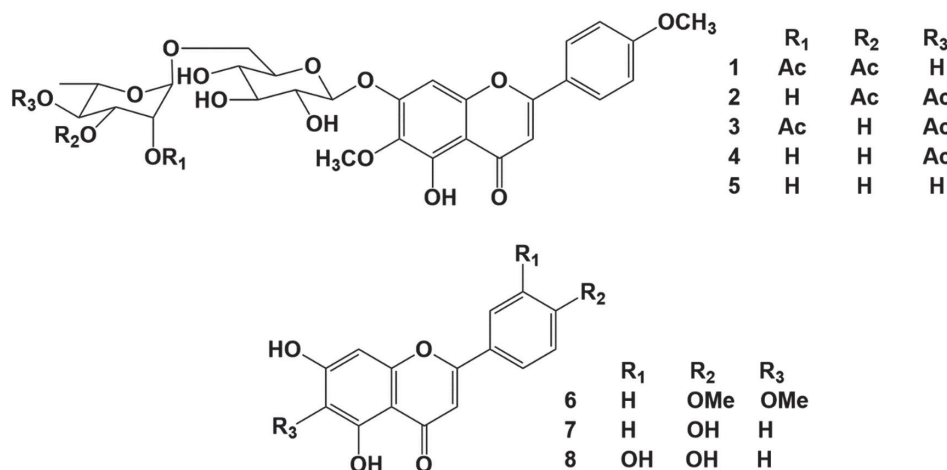


Fig. 3 Isolated compounds from *Linaria japonica*

われている。利尿作用や、緩下作用があり、乾燥した全草 5～10 gを煎じて服用する。

ウンランの全草をメタノールで抽出し、溶媒分配後、各種カラムクロマトを用いて含有化合物の単離を行ったところ、いずれもフラボノイド骨格を有する化合物が単離された (Fig. 3)。化合物 1~5 はフラボノイドの配糖体であり、そのうち 1~3 は新規化合物であったことから、各化合物をそれぞれ 5mg 秤量し、1M の塩酸を用いて酸加水分解後、amberlite IRA-400 を用いて中和後、溶媒を留去した。残渣および糖の標品をそれぞれ 0.2mL ピリジンに溶解させ L-cysteine methyl ester (15 mg/mL) を加えて 60 度で一時間反応させた¹⁰⁾。

標品との比較の HPLC 条件

[Cosmosil 5C₁₈ ARII (250 × 4.6 mm i.d., Nacalai Tesque) ; 溶出溶媒 25% CH₃CN 50mM H₃PO₄ ; 流速 0.8mL/min ; カラム温度 35℃ ; 検出波長 250nm]

サンプル誘導化合物および標品の誘導化合物の保持時間は D-glucose が 18 分、L-rhamnose は 30 分であり、相違ないことを確認した。

化合物 1 は負の旋光性 (-4.81, MeOH) を示す淡黄色の粉末として得られ、高分解能マススペクトルから、その分子式が C₃₃H₃₈O₁₇ であると分かった。IR スペクトルより、ヒドロキシ基 (3437cm⁻¹)、メチレン (2933cm⁻¹)、エステル (1746cm⁻¹)、α,β-不飽和結合 (1653 および 1606 cm⁻¹)、芳香環 (1566 および 1509cm⁻¹) およびエーテル結合 (1251cm⁻¹) を有することが示唆された。¹H NMR スペクトルより、ラムノースの 6 位のメチル基に由来するピーク δH 1.17 (d, J=6.2 Hz)、2 個のアセチル基のメチル部分に由来するピーク δH 1.75 (s) および 1.93 (s)、グルコースの酸素官能基に結合した 2 つのピーク δH 3.76 (m)、4.05 (d, J=9.9 Hz)、6H 分に積分値で観測された 2 個のメトキシ基由来のピーク δH 3.89 (s)、2 個のアノメリックプロトン由来のピーク δH 4.72 (br s) および 5.19 (d, J=7.2 Hz)、2 個の芳香環の

ピーク δH 6.68 (s) および 6.89 (s)、そして AA' BB' のカップリングパターンを示したピーク δH 7.08 (d, J=8.1 Hz) および 7.95 (d, J=8.1 Hz) が観測された。

¹³C NMR スペクトルでは計 33 本の炭素が確認され、HSQC スペクトルから ラムノースの 6 位のメチル (δC 18.0)、2 個のアセチル基に由来するピーク (δC 20.6, 171.5 および δC 20.8, 172.1)、2 個のメトキシ基由来のピーク (δC 56.2, 61.7)、酸素官能基に結合したメチレン (δC 67.5)、糖部分の 8 個の酸素官能基に結合したメチン (δC 70.0, 71.1, 71.3, 71.6, 73.3, 74.8, 77.3, 77.9)、4 個の二重結合のメチン (δC 95.5, 104.5, 115.8, 129.8)、2 個のアノメリックカーボン由来のピーク (δC 99.3, 101.6)、2 個の四級炭素 (δC 108.0, 124.7)、6 個の二重結合の四級炭素由来のピーク (δC 134.0, 154.3, 154.3, 158.0, 164.5, 166.9)、およびカルボニルカーボン δC 184.6 が観測された。

糖鎖構造のうち、グルコースのアノマーカーボン δC 101.6 に対応するプロトンは HSQC より (δH 5.19) であり、そのカップリング定数は (J=7.2 Hz) であったことから、グルコースは β 結合していることが明らかとなった。さらに、ラムノースは同様に、アノマーカーボン (δC 99.3) に対応するプロトンは (δH 4.72) に観測され、これは brs に観測されたことから、ラムノースは α 結合していることが判明した。

これらの NMR データは 2'' と 3''' 位の値を除いて linariin と非常に類似していた (Fig. 4)⁹⁾。低磁場に観測されたプロトンおよび δH 5.15、カーボン δC 71.1 の値から、アセチル基の一つは 2'' に結合していると推測された。また、同様に δH 5.01 に観測されたプロトン、δC 73.3 に観測された

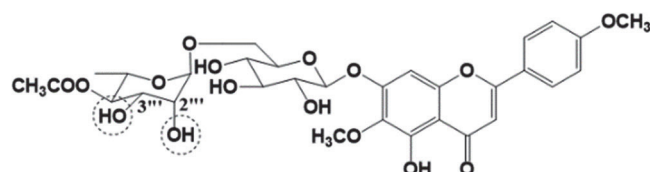


Fig. 4 Linariin

カーボンから3''位にもう一つのアセチル基が結合していることも推測された。これらはいずれも、二次元NMRの測定方法の一つであるHMBC相関から区別され、結合位置が決定できた。すなわち、H-2'' (δ H 5.15)と3'' (δ H 5.01)はそれぞれ δ C 171.5 (2''OAc)と172.1 (3''OAc)に相関が観測された。また、グルコースのアノマープロトンから7位の δ C 158.0 (C-7)にHMBC相関がみられ、ラムノースのアノマープロトンからはグルコースの6位である6''位 δ C 67.5 (C-6'')にHMBC相関が観測されたことから、それぞれ糖鎖の結合位置の決定をした。以上のように、各種物理化学データの解析および酸加水分解を行い、化合物1をpectolinarigenin-7-O- β -D-glucopyranoside-(1 \rightarrow 6)-2'',3''-O-diacetyl- α -L-rhamnopyranosideであると決定した。

他の化合物も同様の手法を用いて、その構造解析を行った。また既知化合物については報告のある文献をもとに、同定を行った。

3. 2. ウンランから単離された化合物のAGEs形成阻害活性

単離した全化合物についてAGEs形成阻害活性試験を行った結果、ポジティブコントロールとして用いたアミノグアニジン塩酸塩(図中はAGと表記)はIC₅₀が1.29 mMであ

ったのに対し、得られた新規化合物1から3のIC₅₀値はそれぞれ34.8 μ M、35.0 μ M、19.5 μ Mであり、ポジティブコントロールよりもかなり36~60倍程度強い阻害活性を示した。また既知化合物である化合物8のIC₅₀は85.8 μ Mであり、こちらも中程度の阻害活性を示した。なお、活性試験の回数は3回行っている(Fig. 5)。

3. 3. ウンランから単離された化合物のコラゲナーゼ阻害活性

単離した化合物に対して、活性試験を検討した結果、化合物4と化合物5のIC₅₀は79.4および78.6 μ Mであり、単離した化合物のうち一番活性が強かったのはluteolin(化合物8, 40.5 μ M)であった。ポジティブコントロールのカフェイン酸のIC₅₀は0.12 mMであったので、有意な阻害活性を示すことを明らかとした。しかしながら、新規化合物1~3には有意な活性が認められなかった(Fig. 6)。

3. 4. ウンランから単離された化合物の細胞増殖抑制活性

得られた化合物について細胞増殖抑制試験を行った。その結果、ポジティブコントロールとして用いたdoxorubicinのIC₅₀は0.70 μ Mであり、化合物6および8

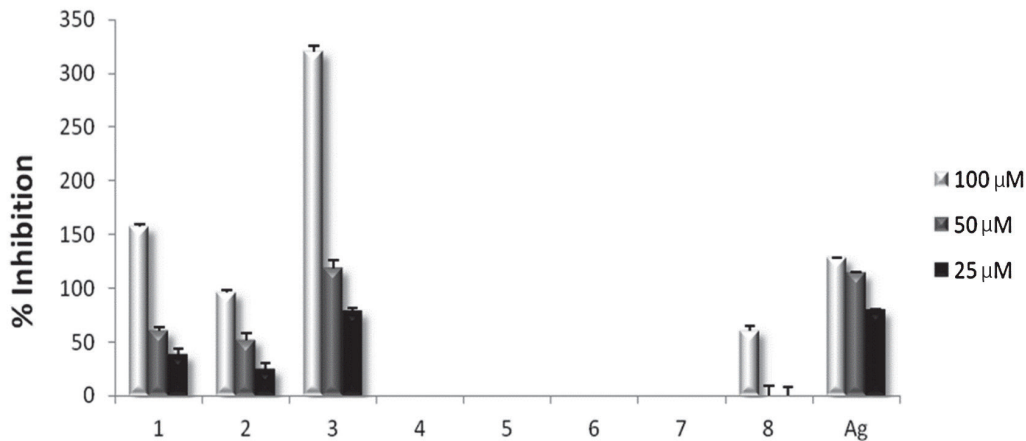


Fig. 5 AGEs formation inhibitory activity of compounds 1-8

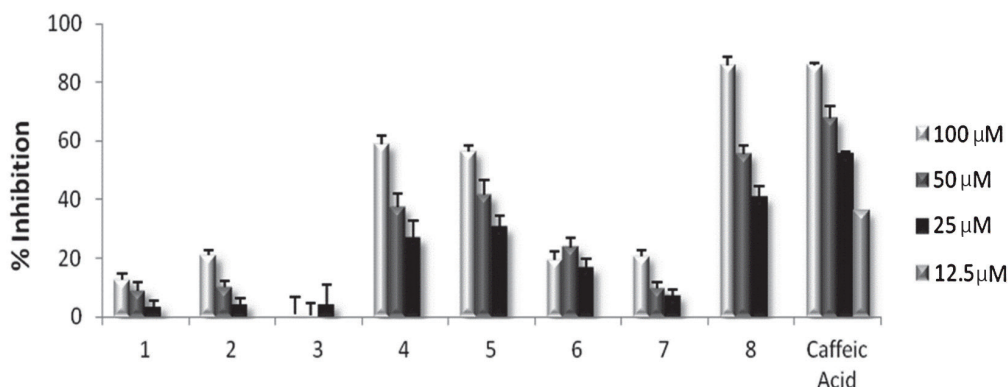


Fig. 6 Collagenase inhibitory activity of compounds 1-8

のIC₅₀は91.1および82.6 μMであり、ポジティブコントロールに比べて弱いものであった。

3. 5. *Ixora undulata*からの化合物の単離

アカネ科イクソラ属 *Ixora undulata* は東南アジアでは寺院への参拝の際に用いられる植物であり、赤やピンクなどの花を咲かせる。同属植物の *Ixora chinensis* はイリドイド化合物などがこれまでに、単離報告があるが、本植物については未詳であった。また、本植物は日本には自生しておらず、今回使用したものはエジプトで採取したものである。本植物も同様に化合物を探索し、その化学構造を決定した (Fig. 7)。

3. 6. *Ixora undulata* から単離された化合物のAGEs形成阻害活性

得られた化合物に活性試験を行った結果、化合物 9、10、12 それぞれのIC₅₀は76.6 μM、98.6 μM および 86.0 μM であった。ウンランから得られた化合物ほどではないが、本植物からも抗糖化抑制化合物が単離された。また、いずれの化合物にも細胞毒性は認められなかった。

3. 7. ミツバウツギからの化合物の単離およびコラゲナーゼ阻害活性

ミツバウツギ (*Staphylea bumalda* DC.) は山菜としての食経験を有する植物であり、アジアに分布する落葉低木で樹高は約3~5m、5~6月に白い花を咲かせる。葉は楕

円形で細鋸歯があり、三出複葉で対生する。山斜面の道端などに生え、新芽や若葉は山菜として食されてきた。果実に鎮咳去痰作用、根に活血作用がある。本植物の葉部に関して当研究室から新規メガスティグマン配糖体等を報告しているが¹¹⁾、機能性についての詳細な検討はこれまであまり行われていない。そこで、ミツバウツギ葉部の成分分析および各種活性評価試験を通して、本植物の機能性成分についての研究を行うこととした。

ミツバウツギ乾燥葉 5.71 kg の MeOH 抽出物を n-Hexane、EtOAc、1-BuOH、H₂O で順次分配後、これらの画分について各種生物活性試験を行った結果、EtOAc 可溶画分にコラゲナーゼ阻害活性を見出し EtOAc 可溶画分について、順相シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより 11 フラクションに分画し、活性試験を行った (Fig. 8)。そのうち、活性の比較的強かった fr. 2、3 は、TLC および HPLC 分析を詳細に行った結果、脂肪酸類、クロロフィル、カロテノイドなどを主に含むことが示唆された。これらの成分は植物には普遍的な成分であることから、これ以上の解析は行わなかった。

そこで、残る fr. 4~11 について、活性を指標に逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー、HPLC を用いて分離・精製を行った結果、12 種の化合物を単離することに成功した (Fig. 9)。単離した化合物についてコラゲナーゼ阻害活性試験を行った結果、終濃度 100 μg/mL において化合物 14、16~18 に阻害活性が見られた (Fig. 10)。

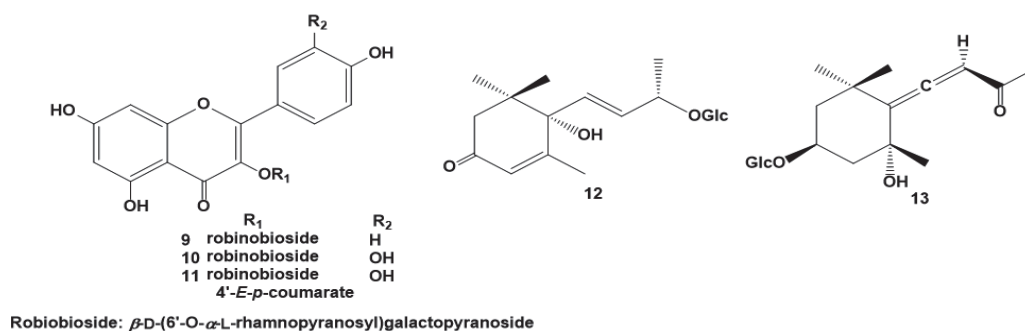


Fig. 7 Isolated compounds from *Ixora undulata*

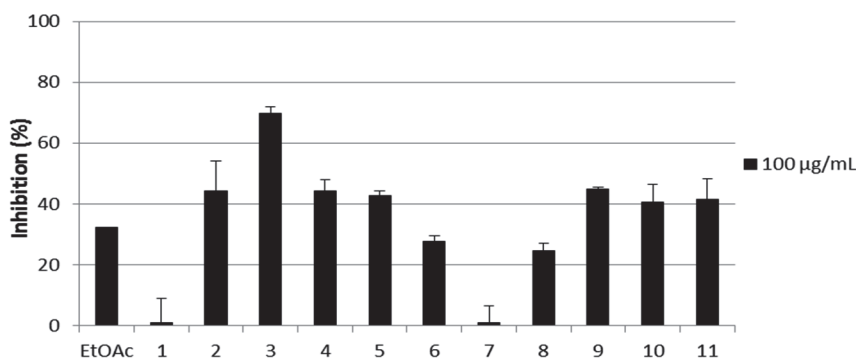


Fig. 8 Collagenase inhibitory activity of EtOAc layer after silica gel cc

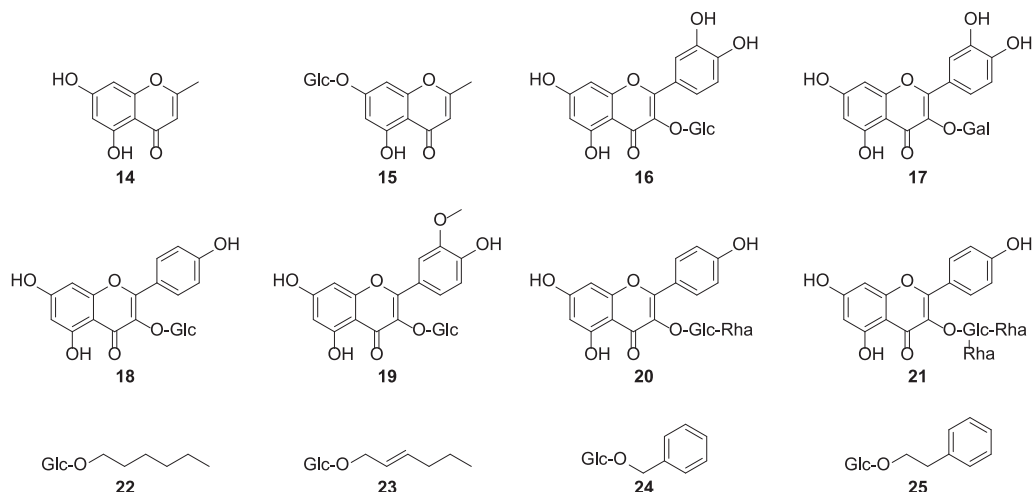


Fig. 9 Isolated compounds from *Staphylea bumalda* DC.

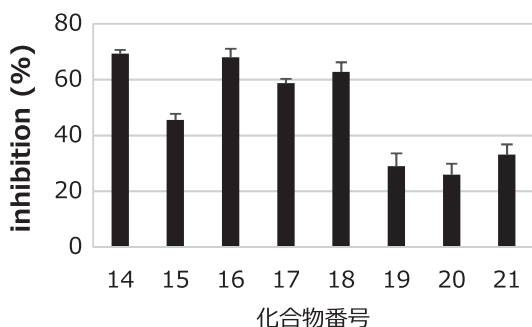


Fig. 10 Collagenase inhibitory activity of compounds 14-21

4. 考察

天然物素材は研究をやり尽くせないほどの数が存在し、まずは植物の選定が非常に重要となる。そこで特に含有成分や薬理活性が未詳の植物に限定して研究を行ったところ、ウンラン、Ixoraの抽出エキスが抗糖化抑制活性を有し、ウンラン、ミツバウツギの抽出エキスがコラゲナーゼ阻害活性を有することを見出した。続いてこれらの有効成分の単離構造解析を行ったところ、いずれもフラボノイド骨格を有する化合物が主な活性物質として得られた。一方、3.5.で示したIxora属から単離されたメガスティグマン配糖体は、天然物化学の分野ではあまり有用な活性が認められていなかった化合物群であり、今回、このメガスティグマンに強い活性が認められたことは大変に重要な知見となる。さらに、抗糖化抑制活性のポジティブコントロールである、アミノグアニジンは緒言にも書いたが、臨床試験にまで進んだ化合物でありながら、その副作用の為に薬となることはなかった。そういった背景から、今回の研究で抗糖化抑制活性を示しながら細胞毒性のない化合物が得られたことは重要な知見である。未利用植物の成分分析を通してその有用性を検証することや、様々な構造、薬効を持つ天然物を見出し、構造と薬効の情報を蓄積していくことが天然資

源の有効活用と創薬の両観点から重要である。

今後は、当研究室に保有するメガスティグマン化合物群について、抗糖化抑制試験を行い、その構造活性相関研究を行いたい。

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。

(参考文献)

- 1) Reddy V. Prakash, Beyaz Ayse: Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. *Drug Discov. Today* 11, 646-654 (2006).
- 2) Fumihiko Teramachi, Takashi Koyano, Thaworn Kowithayakorn, Masahiko Hayashi, Kanki Komiyama, Masami Ishibashi: Collagenase Inhibitory Quinic Acid Esters from *Ipomoea pes-caprae*. *J. Nat. Prod.*, 68, 794-796 (2005).
- 3) Sachiko Sugimoto, Katsuyoshi Matsunami, Hideaki Otsuka: Medicinal plants of Thailand. I: structures of rheedeiosides A-D and cis-entadamide A β -D-glucopyranoside from the seed kernels of *Entada rheedei* Sprengel. *Chem. Pharm. Bull.*, 59, 466-471 (2011).
- 4) Yoshihiro Iwamoto, Sachiko Sugimoto, Liva Harinantenaina, Katsuyoshi Matsunami, Hideaki Otsuka: Entadosides A-D, triterpene saponins and a glucoside of the sulphur-containing amide
- 5) from the kernel nuts of *Entada phaseoloides* (L.) Merrill. *J. Nat. Med.*, 66, 321-328 (2012).

- 6) Sachiko Sugimoto, Katsuyoshi Matsunami, Hideaki Otsuka: Medicinal plants of Thailand. II: chemical studies on the seed kernels of *Entada rheedii* Sprengel. *J. Nat. Med.*, 66, 552–557 (2012).
- 7) Luc Séro, Lionel Sanguinet, Patricia Blanchard, Bach Tai Dang, Sylvie Morel, Pascal Richomm, Denis Séraphin, Séverine Derbré: Tuning a 96-well microtiter plate fluorescence-based assay to identify AGE inhibitors in crude plant extracts. *Molecules* 18, 14320–14339 (2013).
- 8) Retno Widyowati, Sachiko Sugimoto, Yoshi Yamano, Sukardiman, Hideaki Otsuka, Katsuyoshi Matsunami: New cis-ent-clerodanes from *Linaria japonica*, *Phytochemistry Letters*, 14, 56–62 (2015).
- 9) Retno Widyowati, Sachiko Sugimoto, Yoshi Yamano, Sukardiman, Hideaki Otsuka, Katsuyoshi Matsunami: New isolinariins C, D and E, flavonoid glycosides from *Linaria japonica*, *Chem. Pharm. Bull.*, 64, 517–521 (2016).
- 10) Sachiko Sugimoto, Samir Wanas Amira, Tsutomu Mizuta, Katsuyoshi Matsunami, Hideaki Otsuka: Structure elucidation of secondary metabolites isolated from the leaves of *Ixora undulate* and their inhibitory activity toward advanced glycation end-products formation, *Phytochemistry*, 108, 189–195 (2014).
- 11) Takashi Tanaka, Tatsuya Nakashima, Toshihisa Ueda, Kenji Tomii, and Isao Kouno: Facile Discrimination of Aldose Enantiomers by Reversed-Phase HPLC, *Chem. Pharm. Bull.*, 55, 899–901 (2007).
- 12) Hideaki Otsuka, Yu Qian, Katsuyoshi Matsunami: Bumaldosides A, B and C from the leaves of *Staphylea bumalda*, *Heterocycles*, 80, 339–348 (2010).

エラスチン類似ポリペプチドの合理的設計による 温度応答性ゲルの創製

名古屋大学大学院工学研究科応用物質化学専攻

鳴瀧 彩絵

Elastin-like polypeptides (ELPs) are functional polymers that show elasticity and lower critical solution temperature (LCST) as native elastin. We have developed a novel class of “double-hydrophobic” block ELPs named GPG and its derivatives with added functional motifs. A series of GPG comprises proline-rich (VPGXG)₂₅ and glycine-rich (VGGVG)₅, both of which dehydrate at higher temperature but form distinct secondary structures, β -turn and β -sheet respectively. GPG initially assembles into nanoparticles, which further connect into beaded nanofibers. In this study, a new derivative GPPG, where (VPGXG)₂₅ is repeated twice via a short linker sequence, has been constructed for the purpose of obtaining a physical gel of ELP. The longer proline-rich sequence of GPPG might bent more freely than that of GPG, resulting in the formation of branching nanofibers. GPPG (20 μ M, 0.034 wt%) assembled into nanoparticles and aggregates of nanoparticles while GPG (20 μ M, 0.055 wt%) organized into nanofibers in water at 37 °C. When the concentration of polypeptides was increased to 0.3 wt%, both GPG and GPPG precipitated from aqueous solution. However, when GPG and GPPG was mixed at 9:1 weight ratio the mixture formed a physical gel at the polypeptide concentration of 0.3 wt%. The gel formation at such a low concentration is unprecedented in the field of ELP. The homogeneous nanofiber formation with suitable branching might be responsible for the gelation. This work will open up the possibility of ELPs for use in the cosmetology and biomedical research fields.

1. 緒言

エラスチンは、その名のとおり elasticity (弾性) に関与する細胞外マトリクスタンパク質であり、皮膚・血管・靭帯などにおいて線維状の弾性組織を形成し、組織に伸縮性を与える¹⁾。そのユニークな力学特性や生体適合性から、エラスチンは化粧品や医療材料への応用が期待されるが、他の細胞外マトリクス成分であるコラーゲンやヒアルロン酸に比べ、その利用は大幅に遅れている²⁾。これは、生体由来エラスチンが高度に架橋され不溶化しており、均質で扱いやすい素材を得るのが困難なためである。

本研究は、使いやすく、制御性のよいエラスチン材料を生み出すことで Cosmetology の発展に寄与することを大きな目的とする。エラスチン由来のアミノ酸配列を含み、人工的に作製されるエラスチン類似ポリペプチド (Elastin-Like Polypeptide: ELP) は、天然エラスチンの特色であるエントロピー弾性と下限臨界共溶温度 (LCST) を再現できる機能性高分子として注目されている³⁾。筆者らはこれまでに、エラスチン由来の2種類の配列モチーフを組み合わせた新規なブロック ELP である GPG (図1(a)) を作製し、これが水中で温度刺激によって自己集合し、生体エラスチンのような線維構造(ナノファイバー)を形成することを報

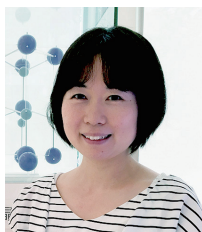
告した(図1(b))^{4,8)}。ナノファイバーは粒子が数珠状に連結したユニークな構造を持ち、分岐をほとんど持たない。GPGは、プロリンに富むP配列を分子中央部に、グリシンに富むG配列を分子両末端に有する。20°C付近にLCSTを持つP配列が疎水的に凝集してナノ粒子を形成したのち、G配列が粒子間で β -sheet構造を形成して数珠状ファイバーを形成するモデルをこれまでに提案している(図1(c))¹⁾。ナノファイバーが分岐を生じない理由は、P部位の剛直性にあると考えられる。つまり、P部位は β -turn構造が集積した β -spiralというらせん構造をとりやすく、ランダムコイル状の分子鎖と比較して長い持続長を持つ。このためP部位に連結したG部位は粒子の両極に位置しやすくなる。

ナノファイバーに適切な絡み合いを持たせて自立性のあるゲルへと展開できれば、エラスチンの粘弾性特性を活かした細胞培養基材や創傷治療剤の開発につながる。本研究では、ELP配列の合理的なデザインを通じて自己集合性ナノファイバーに分岐構造を導入することを目的とした。本研究で新しく作製するポリペプチドであるGPPGのアミノ酸配列を図1(a)に示す。GPPGはGPGにさらにP配列を挿入し、P配列間をフレキシブルなリンカー配列(KLGSG)で連結している。リンカーの効果により、GPPGではP配列の接続部分で分子鎖の柔軟な折れ曲がりが可能となり、分岐構造を生じると予想した。

2. 実験

2.1. GPPGの合成と精製

GPGをコードするプラスミドDNAであるpET22b(+)-GPG⁴⁾のBamHI制限酵素サイトにP配列をコードするDNA断片をライゲーションし、pET22b(+)-GPPGを得た。



Development of temperature-responsive gels through the rational design of elastin-like polypeptides

Ayae Sugawara-Narutaki

Department of Materials Chemistry,
Graduate School of Engineering, Nagoya
University

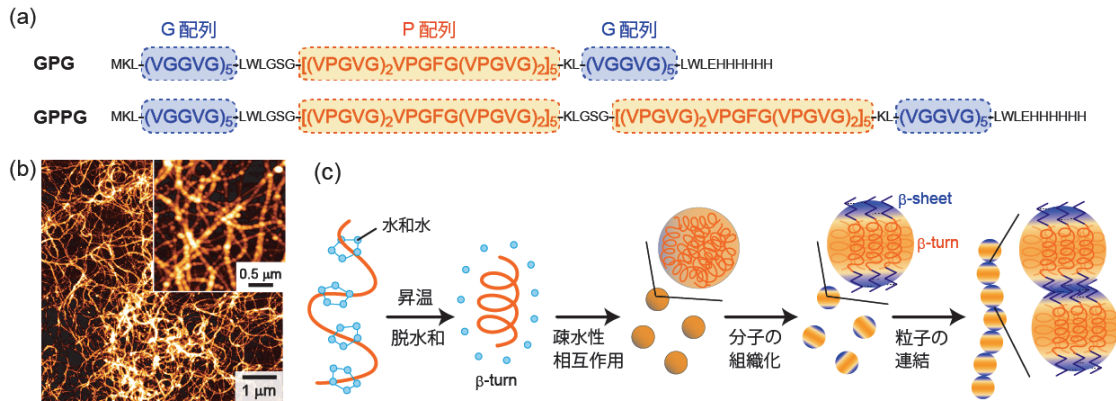


図 1 (a) GPG および GPPG のアミノ酸配列, (b) GPG ナノファイバーの原子間力顕微鏡 (AFM) 像¹⁾ (アメリカ化学会より許可を得て転載), (c) 予想される GPG 自己集合のモデル図.

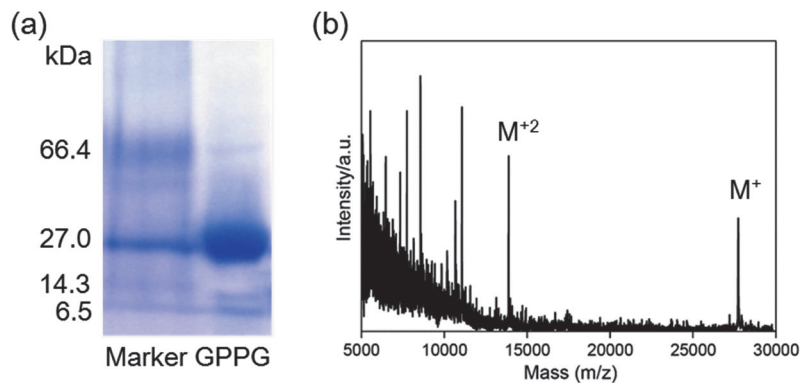


図 2 GPPG の(a) SDS-PAGE および(b) MALDI-TOF-MS の結果.

DNA シーケンサーを用いた配列解析により GPPG をコードする遺伝子の存在を確認した。pET22b (+)-GPPG を用いて大腸菌 BLR 株を形質転換し、GPPG タンパク質を発現させた。タンパク質を金属アフィニティークロマトグラフィーにより回収し、純水に対して透析して塩類を除去したのち、凍結乾燥して試料粉末を得た。ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) とマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF-MS) により精製を確認した。

2. 2. 自己集合体の形成

GPG と GPPG をそれぞれ 20 μM (それぞれ 0.034 および 0.055 wt%) となるように冷水に溶解させたのち、37 °C で 7 日間インキュベートした。この間、円二色性 (CD) 分散計で 190 ~ 260 nm の吸光度を測定することにより、タンパク質二次構造の変化を調べた。7 日後の試料溶液をマイカ基板に滴下し、37 °C で自然乾燥したのちに、原子間力顕微鏡 (AFM) で形態を観察した。

さらに、ポリペプチド濃度を 0.3 あるいは 0.4 wt% に増加させて 37 °C に昇温し、1 日後に溶液の外観の変化を観察した。総ポリペプチド濃度を 0.3 wt% に固定し、GPG と GPPG を所定量混合した試料についても観察を行った。

3. 結果

3. 1. GPPG の合成と精製

DNA シーケンサーを用いた配列解析の結果、pET22b (+)-GPPG には GPPG をコードする遺伝子が正しく挿入されていた。発現したポリペプチドについての SDS-PAGE および MALDI-TOF-MS の結果を図 2 に示す。GPPG の理論分子量は 27,700 Da である。SDS-PAGE において分子量 27 kDa のマーカー付近に最も濃いバンドが出現し、そのほかに複数本の薄いバンドが観察された。MALDI-TOF-MS で観測された生成物の分子量は 27,732 Da であった。以上のことより、GPPG を主成分とする生成物が得られたと言える。

3. 2. 自己集合体の形成

GPG および GPPG を、濃度が 20 μM となるように冷水に溶解させた。15 °C の条件で CD スペクトルを測定したところ、どちらのポリペプチドにおいても 200 nm に負のバンド、224 nm 付近に負のショルダーが現れた (図 3)。これらはそれぞれ、ランダムコイル構造および β-turn 構造に由来しており、(VPGXG)_n 配列を有する ELP に特徴的なスペクトルである^{4,9)}。この溶液を 37 °C に加温すると、スベ

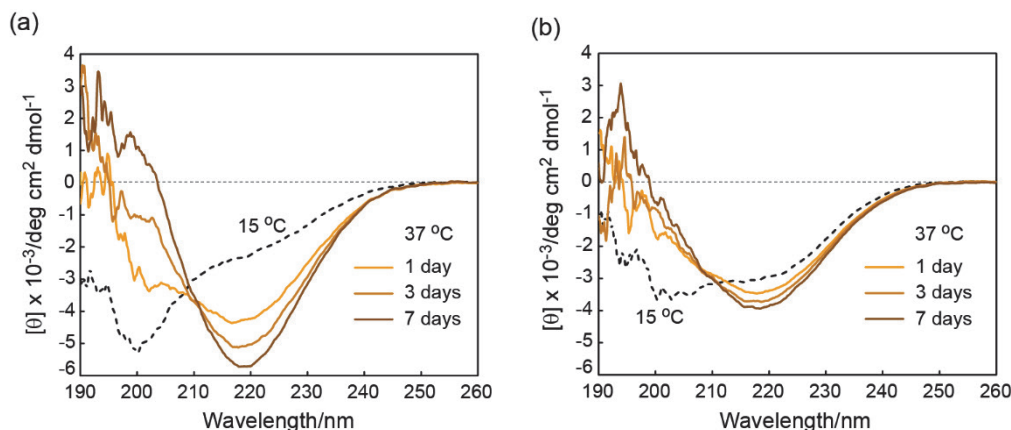


図3 (a) GPG および (b) GPPG の CD スペクトル。

クトルは経時的に変化した。どちらの場合にも、198 nm の楕円率が正の方向へ増大する一方、218 nm の楕円率は負の方向に増大した。これらは、 β -sheet 構造の割合が1週間にわたり増加し続けていることを示している。1モル残基当たりの楕円率を比較すると、 β -sheet 構造に由来する楕円率の強度はGPGのほうがGPPGよりも大きかった。

37 °C で1週間静置したサンプルをマイカ基板に滴下したのち乾燥させ、AFMで観察した結果を図4に示す。GPGはナノファイバーへと組織化しており、ファイバー径は 42.3 ± 7.5 nmであった。45 °C で自己集合させた場合⁴⁾と比較するとやや不明瞭ではあるが、数珠状のモルフォロジーを有していた。これに対し、GPPGは直径 25.6 ± 7.4 nmのナノ粒子を形成しており、その凝集体も多く見られた。

ポリペプチド濃度を0.4 wt%に上昇させ、37 °C で1日間インキュベートすると、GPGは半透明のハイドロゲルを形成した。一方、GPPGは同じ条件で沈殿を生じた。ポリペプチド濃度を0.3 wt%として37 °Cに昇温すると、GPG、GPPGの両方において沈殿を生じた。これに対し、総ポリペプチド濃度を0.3 wt%に固定した条件でGPGとGPPGを9:1(w/w)の割合で混合すると、1日後に半透明のハイドロゲルを形成した(図5)。GPGとGPPGを8:2、7:3で混合した場合には、粘調な液体が得られた。

4. 考察

ポリペプチド濃度が20 μ Mの条件におけるCDスペクトル測定の結果から、GPGとGPPGはともに37 °Cの水中で、経時的に β -sheet構造を形成することがわかった(図3)。GPPGにおいて1モル残基当たりの β -sheet構造形成割合が低いのは、 β -sheet構造を形成するG配列が分子中で占める割合が、GPG(26%) > GPPG(15%)であることに起因すると考えられる。両ポリペプチドが、生理学的温度に応答して分子間自己集合の駆動力となる β -sheet構造を形成したものの、GPGはナノファイバーへと組織化し、GPPGはナノ粒子およびナノ粒子の凝集体へと自己集合し

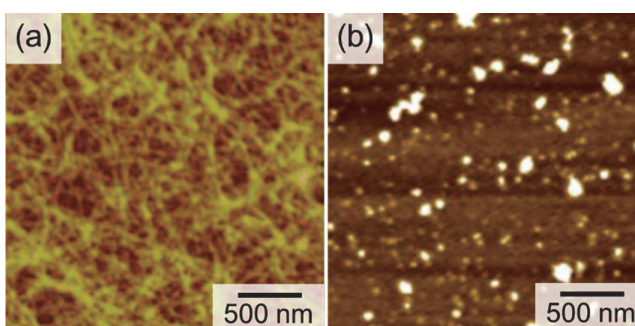


図4 (a) GPG および (b) GPPG が形成する集合体の AFM 像。

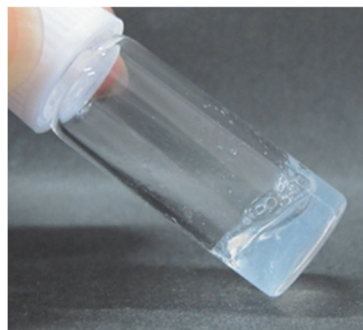


図5 GPGとGPPGを9:1(w/w)で混合して得られるハイドロゲルの写真(ポリペプチド濃度0.3 wt%)。

た(図4)。GPGにおいては、分子中央のP配列が β -turnの集積構造である β -spiral構造をとるため、棒状分子として振る舞うと推測される。疎水的なP配列は水中で集合してナノ粒子を形成するとともに、棒状の形態により互いに配列する。P配列に結合したG配列は粒子の両極に位置するようになり、他の粒子と β -sheet構造を形成して数珠状ナノファイバーへと組織化すると考えられる。一方、GPPGにおいてはP配列がフレキシブルなリンカー配列で接続されており、容易に曲がることのできる。このため、G配列は粒子中でよりランダムに配置し、粒子内部で β -sheet構造を完結させたり、あらゆる方向に粒子間 β -sheet構造を形成することが可能となる。この結果、GPPGはナノ粒子

状、あるいはナノ粒子の凝集体へと自己集合したと考えられる。今回検討を行った 20 μ M の濃度において、GPPG は当初の狙いであった分岐を持つナノファイバーへと組織化することはなかったが、高度に分岐した極端な状態としてナノ粒子の凝集体を形成したとも言える。

GPG が分岐の少ない数珠状ナノファイバーへ、GPPG がナノ粒子凝集体へと集合するのであれば、両者を適切な割合で混合することにより、分岐構造を持つナノファイバーが得られるのではないかと考えた。ファイバーの分岐構造は、マクロスコピックな溶液の粘弾性に影響を与えると予想し、ポリペプチド濃度を増加させて溶液のゲル化の有無を調べた。ポリペプチド濃度を 0.4 wt% (GPG : 238 μ M, GPPG : 144 μ M) とし、37 $^{\circ}$ C で 1 日インキュベートしたところ、GPG を含有する水溶液は流動性を失って半透明のゲルを形成した。GPPG は同じ条件で沈殿を生じた。濃度 20 μ M のときの結果から類推すると、GPG ではナノファイバーの絡み合いによってゲルを生じ、GPPG は凝集体を生じたと考えられる。ポリペプチド濃度を 0.3 wt% に低下させた場合、GPG でも沈殿を生じ、水溶液のゲル化には至らなかった。しかし、GPG と GPPG を重量比が 9 : 1 となるように混合した場合、ゲルを形成した (図 5)。8 : 2, 7 : 3 で混合した場合には粘調な液体となり、いずれも GPG または GPPG 単独の場合と異なる結果が得られた。GPG と GPPG の混合により、GPG が単独で形成するナノファイバーと比較して分岐構造が導入されてネットワーク構造を構築し、より低濃度でのゲル化が達成された可能性を考えている。

これまでに、架橋剤を用いて化学架橋されたエラスチン ELP ゲルは報告されているものの¹⁰⁻¹²⁾、疎水性が高く不均一に凝集しやすいエラスチンを均一なゲルとすることは根本的に難しく、報告例は少ない。また、化学架橋ゲルでは刺激に対するゾル-ゲル転移を示さない。エラスチンの LCST を利用して温度応答性の物理ゲルを作製するアイデアは以前より存在していたが、実現は容易ではなかった。エラスチンや ELP を LCST 以上に加熱すると、ゲル化ではなく相分離を起こして沈殿してしまうからである。Conticello らは、ELP ゲルの創製に向けて親水性を高めたブロックポリペプチドを合成したが、ゲル形成には 25 wt% もの高濃度の ELP が必要であった¹³⁾。近年では Olsen らが、 $([I_{0.6}V_{0.4}] \text{ PAVG})_n$ の配列を持つ ELP が相分離せずに均一なゲルを形成することを報告しているが、この場合にもゲル化には 10 wt% 以上のポリペプチドを要する¹⁴⁾。エラスチン配列に、シルク由来配列¹⁵⁾ や金属イオン結合配列¹⁶⁾ などの機能性配列を結合させた融合ペプチドからなる刺激応答性の物理ゲルも作製されている。この場合、架橋点となるのはエラスチン以外の配列であり、エラスチンの LCST は分子の局所的な濃度を高めるために補

助的に利用されているにすぎない。シルクエラスチンの場合、ゲル形成に必要な濃度は 4 wt% と報告されている¹⁵⁾。いずれにしても、1 wt% 以下での物理ゲル形成は ELP 研究では報告されておらず、本研究にて達成された 0.3 wt% でのゲル化は画期的であると言える。本 ELP ゲルは、均一なナノファイバーであり、水との接触界面積が大きい数珠状のモルフォロジーを持つことが、低濃度でのゲル化につながったと考えられる。本研究で開発した ELP は制限酵素サイトや精製用タグ配列を除けば、all-elastin 由来であるため、エラスチンが本来有する力学特性を最大限に再現できる材料となることが期待される。今後、GPG と GPPG の混合比を変化させることで、粘弾性特性を連続的に変化させることを試みる予定である。

5. 総括

本研究では、新規な ELP である GPPG を遺伝子工学の手法を用いて合成した。GPPG は、GPG がナノファイバー化する温度条件においてナノ粒子状およびナノ粒子の凝集体へと自己集合し、当初予想した分岐ナノファイバーは得られなかった。しかし、凝集体は数珠状ナノファイバーが多数の分岐を生じた極端な状態であると考え、GPG と GPPG を混合することにより GPG ナノファイバーへ分岐を導入することを試みた結果、GPG と GPPG を 9 : 1 (w/w) で混合することで、0.3 wt% という低濃度でハイドロゲルを得ることができた。筆者らはこれまでに、GPG の C 末端に様々な機能性モチーフを付加することより、化学架橋可能なナノファイバー⁶⁾、あるいは抗菌性⁷⁾ や細胞接着性を有するナノファイバーの創製に成功してきた。これらの GPG 誘導体を適宜混合したり、さらに新しい GPG 誘導体と組み合わせることで、様々な機能性ゲルが得られるであろう。生理食塩水やリン酸緩衝液等を溶媒とするハイドロゲル形成など、まだ課題は残されているものの、本研究で得られた温度応答性 ELP ゲルは、体温でゲル化する創傷被覆材や、各種細胞の 3 次元培養の担体、幹細胞の分化制御、人工血管の構成要素をはじめとする幅広い応用展開が期待される。

謝辞

AFM 観察でご協力をいただいた名古屋大学関隆広先生、永野修作先生、北村一晟氏に深く感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Mithieux SM, Weiss AS: Elastin, Adv. Protein Chem., 70, 437-461, 2005.
- 2) Rnjak J, Wise SG, Mithieux SM, Weiss AS: Severe burn injuries and the role of elastin in the design of dermal substitutes, Tissue Eng. B Rev. 17, 81-91, 2011.

- 3) Urry DW.: Molecular machines: How motion and other functions of living organisms can result from reversible chemical changes, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 32, 819-841, 1993.
- 4) D. H. T. Le, R. Hanamura, D.-H. Pham, M. Kato, D. A. Tirrell, T. Okubo, A. Sugawara-Narutaki, *Biomacromolecules*, 14, 1028-1034, 2013.
- 5) Le DHT, Okubo T, Sugawara-Narutaki A.: "Beaded nanofibers assembled from double-hydrophobic elastin-like block polypeptides: Effects of trifluoroethanol, *Biopolymers*, 103, 175-185, 2015.
- 6) Le DHT, Kawakami R, Teraoka Y, Okubo T, Sugawara-Narutaki A.: Cross-linking assisted stabilization of beaded nanofibers from elastin-like double hydrophobic polypeptides, *Chem. Lett.*, 44, 530-532, 2015.
- 7) Anh TTH, Xing M, Le DHT, Sugawara-Narutaki A, Fong E.: Elastin-based silver-binding proteins with antibacterial capabilities, *Nanomedicine*, 8, 567-575, 2013.
- 8) 鳴瀧彩絵.: 生体模倣ブロックポリペプチドの段階的自己集合, *Colloid & Interface Commun.*, 40(2), 12-14, 2015.
- 9) Urry DW, Shaw RD, Prasad KU.: Polypentapeptide of elastin: Temperature dependence of ellipticity and correlation with elastomeric force, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 130, 50-57, 1985.
- 10) Lim DW, Nettles DL, Setton LA, Chilkoti A.: Rapid cross-linking of elastin-like polypeptides with (hydroxymethyl)phosphines in aqueous solution, *Biomacromolecules*, 8, 1463-1470, 2007.
- 11) Trabbic-Carlson K, Setton LA, Chilkoti A.: Swelling and mechanical behaviors of chemically cross-linked hydrogels of elastin-like polypeptides, *Biomacromolecules*, 4, 572-580, 2003.
- 12) Zhang YN, Avery RK, Vallmajo-Martin Q, Assmann A, Vegh A, Memic A, Olsen BD, Annabi N, Khademhosseini A.: A highly elastic and rapidly crosslinkable elastin-like polypeptide-based hydrogel for biomedical applications. *Adv. Funct. Mater.*, 25, 4814-4826, 2015.
- 13) Wright ER, McMillan RA, Cooper A, Apkarian RP, Conticello VP.: Thermoplastic elastomer hydrogels via self-assembly of an elastin-mimetic triblock polypeptide, *Adv. Funct. Mater.*, 12, 149-154, 2002.
- 14) Glassman MJ, Olsen BD.: Arrested phase separation of elastin-like polypeptide solutions yields stiff, thermoresponsive gels, *Biomacromolecules*, 16, 3762-3773, 2015.
- 15) Dandu R, Von Cresce A, Briber R, Dowell P, Cappello J, Ghandehari H.: Silk-elastinlike protein polymer hydrogels: Influence of monomer sequence on physicochemical properties, *Polymer*, 50, 366-374, 2009.
- 16) Ghoorchian A, Simon JR, Bharti B, Han W, Zhao X, Chilkoti A.: Bioinspired reversibly cross-linked hydrogels comprising polypeptide micelles exhibit enhanced mechanical properties, *Adv. Funct. Mater.*, 25, 3122-3130, 2015.

高分子ナノゲル粒子の短距離秩序に基づく色彩の研究

九州大学大学院工学研究院化学工学部門

三浦 佳子

Synthetic polymer nanogels were investigated in view of structural color component and molecular recognition units. Synthetic nanogels with molecular recognition ability were prepared by addition of acrylamide derivative of sugar ligand. The polymer nanogel showed the blue color based on the short distance order. The structural color was changed by raising the temperature and molecular recognition of specific proteins.

1. 緒言

色彩は生活の上で欠かせないものであり、鮮やかな色彩は古代以来人類の興味の一つであった。色彩をどのように発現させるかは化合物の探索も含めて長い間研究されてきた。色を出す素材、色素については有機化合物、無機化合物、錯体など多くの化合物の研究が行われてきた。また、近年ではナノテクノロジーについても、光学技術の一つとして注目されている。有機化合物でも無機化合物でも、色素化合物は特殊な電子バンドを有していることが多く、望んだ色を発現させようとする研究には多くの困難が伴う。また、色素化合物は特殊な電子系を満足することが最重要であるため、生体毒性が強い化合物であることがしばしばである。

化合物の電子特性に依存せずに色彩を発現させる方法として、物質の構造特性を利用した、“構造色”の利用が考えられる^{1,2)}。構造色では、物質の周期構造に基づく光の干渉を利用しているため、特殊な電子構造を必要としない。周期構造を持つ分子には種々の有機、無機化合物があるが、均一な構造が必要とされている。私の研究グループでは、Poly(*N*-isopropylacrylamide)を主体とする高分子ナノゲル粒子を各種合成してきている^{3,4)}。このナノゲル粒子は粒径が均一に調製することが可能であるため、構造色の研究に適切であると予想された。高分子ナノゲル粒子の径を中心として、構造色を中心とした光学性質の検討を行った。

高分子ナノゲル粒子では、均一な微細粒子であるばかりではなく、その内部が柔軟であることから、タンパク質などの物質を包摂することができる^{5,6)}。特に、ナノゲル組成を選ぶことによって、特異的にタンパク質を認識する。本研究では、タンパク質に対して結合する、ナノゲルとそ

れを利用したバイオセンサーの開発も含めて検討した。また、癌関連タンパク質である、細胞成長因子に対して結合する、ナノゲル粒子についても新たに調製を行った。

2. 方法

2.1. ヒドロゲルナノ粒子の合成⁷⁾

N-イソプロピルアクリルアミド (NIPAAm)、ビスアクリルアミド (BIS)、開始剤 (V-501) を加えて重合を行った。界面活性剤として、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を用いて重合系に加えた。多くの高分子の組成としては、NIPAAm 95%、BIS 5%、SDSを用いた。ナノゲル粒子の粒径はSDSの濃度に大きく依存しており、SDSを減らした系についても検討した。ナノゲル粒子の直径は、動的光散乱 (DLS、マルバーン社、ゼータサイザーナノ) を用いて測定した。

また、生体分子認識製のモノマーとしては、生理活性糖を持つアクリルアミドを用いた (Figure 1)。糖鎖を側鎖に持つアクリルアミドについては、過去の文献と同じ方法で調製を行った。生体分子である糖の分子を円滑に行わせるために、適宜疎水性のモノマーである、*N*-tert-ブチルアクリルアミドを適宜加えている。例えば、マンノースを含み、コンカナバリン A と結合する高分子モノマーの組成は、NIPAAm 63%、t-BAM 20%、BIS 10%、アクリル酸 (AAc) 5%、マンノース 2% のモル比とした。タンパク質の分子認識については、下記に示す構造色センサーで調べるほか、水晶発振子 (QCM、Affinix Q4 イニシウム) によって測定を行った。

その外に癌関連のタンパク質を認識するナノゲル粒子についても合成を行った。ナノゲル粒子を認識するためのモノマーとして、硫酸基を有するアセチルグルコサミンを加えて、Figure 1 と同様に合成を行った。

2.2. ナノゲルを認識要素とした構造色の発現とバイオセンサーの開発³⁾

Figure 1 に示す、糖鎖認識ナノゲルを用いて、特異的なタンパク質センサーとしての機能を調べた。糖鎖認識ナ



Structural Color of Short Distance Order of Polymer Nanogel

Yoshiko Miura

Department of Chemical Engineering,
Graduate School of Engineering, Kyushu
University

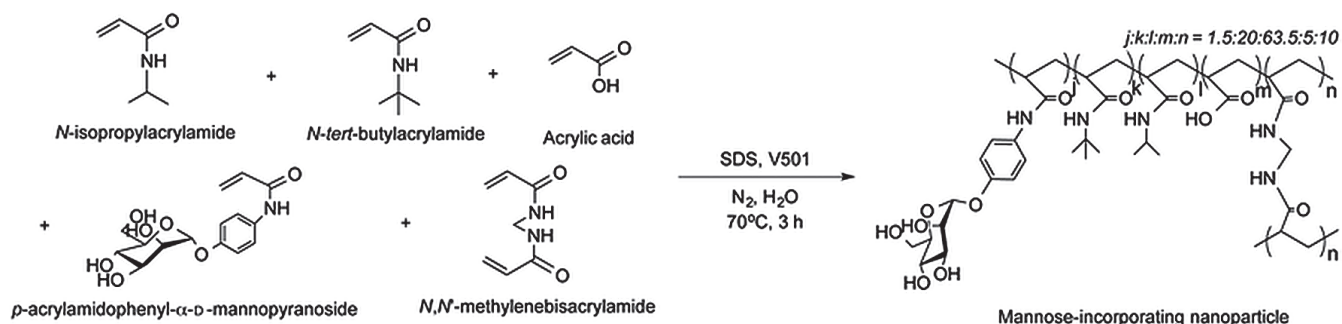


Figure 1 分子認識性を持つナノゲル粒子の合成。メインとなるモノマーとしてNIPAAmを選び、架橋剤、疎水性部位、電荷、糖を持つ各種のモノマーを加えた。

ノゲルはナノゲルの径からの短距離秩序による構造色の変化をUVスペクトルによって調べた。また、構造色を補足する機材として、230 nmの微細構造を持つ基盤を用いた。ナノゲル粒子を微細構造基盤にスクシイミド基を介して固定化した。このナノゲルに対して、垂直方向にファイバー式のUV分光光度計 (USB-4000-UV-Vis、オーシャンOPTIX) によって、スペクトルを測定し、タンパク質の分子認識に伴う構造色の変化を調べた。UVスペクトルは360-800nmまで測定した。また、タンパク質としては標的タンパク質としてコンカナバリンA、リファレンスタンパク質として牛血清アルブミンを用いた。

2. 3. PolyNIPAAmナノゲル粒子による構造色の発現

PolyNIPAAmナノゲルを2. 1. にしたがって調製した。ナノゲル粒子で多様な色調を発現させるためには、種々の短距離秩序(粒径の大きさ)を実現する必要がある。モノマー濃度、架橋剤、界面活性剤の濃度、種類を変化させてナノゲルの合成を行った。ナノゲルの大きさは100-2000nm程度までとした。これに伴う、構造色の発現について検討した。ナノ粒子の溶液の色は、希薄水溶液のスペクトルをUV分光光度計 (cary8453、アジレント) または、ナノゲル溶液をガラス基板に析出させた上で、ナノファイバー分光光度計によっても測定を行った。また、ナノゲル溶液については温度を変化させて測定を行った。

2. 4. ナノゲル粒子によるタンパク質の捕捉と生体材料としての展開^{B)}

ナノゲル粒子のいくつかは2. 1. に示すようにタンパク質のリガンドを含んでおり、タンパク質に対して分子認識性を示す。in vitroでのタンパク質の分子認識実験は、QCMにナノゲル粒子を固定化した上で、タンパク質を定量的に添加して周波数変化を測定し、Langmuir解析によって結合定数の解析を行った。また、一部のナノゲル粒子については、マウスに対するin vivo試験を行った。マウ

スに対する in vivo 試験は外注(静岡県立大学、カリフォルニア大学アーバイン校)によって行った。

3. 結果

3. 1. 構造色によるバイオセンシング

Figure 1 に示す組成の分子を用いて、ナノゲル粒子の合成を行った。ナノゲル粒子は、PolyNIPAAmを主体としているため、高温で収縮し、偽沈殿重合によってナノ粒子を形成した。タンパク質認識部位である、糖ユニット(マンノース)を加えてナノゲル粒子を合成した。

ナノゲル粒子については、マンノースを有するナノゲルで約200nmの直径を持つ粒子を用いた。この粒子を230nmの微細構造を持つ基材に対して、スクシイミド基を介して固定化した(Figure 2)。基材は微細孔に基づく色調を発して、500nm付近にUVピークを示した。この基材に対して、タンパク質を付与して、マンノースに特異的に結合するコンカナバリンA (ConA) を添加したところ、スペクトル強度が減少した。一方で、マンノースと結合しない、牛血清アルブミン (BSA) を添加した場合には、UVピークの変化は見られなかった。ピーク強度の変化をタンパク質の濃度に対してプロットして、Langmuir式によってフィッティングを行って、結合定数を算出した。タンパク質との解離定数 (K_d) は 10^{-6} Mオーダーで抗体に匹敵するような強さと特異性を示すことがわかった(Figure 3)。

このナノゲルを塗布した材料については、自然蒸発を用いて、ナノゲルを集積させたところ、青色のフィルムへと変化した。ナノゲル自体の構造色と考えられた。一方で、このゲルフィルムに対して、タンパク質溶液を添加したところ、色調は消失した。水自体の添加でも色が消失したため、ナノゲル構造体の自己組織化が弱いことが考えられた。自己組織体の材料特性を強くするために、ナノゲル集積体に対して、PEGジアクリレートを用いて架橋構造を作らせることとした。しかしながら、PEGジアクリレートでの架橋反応を行うときに色が消失することがわかった。

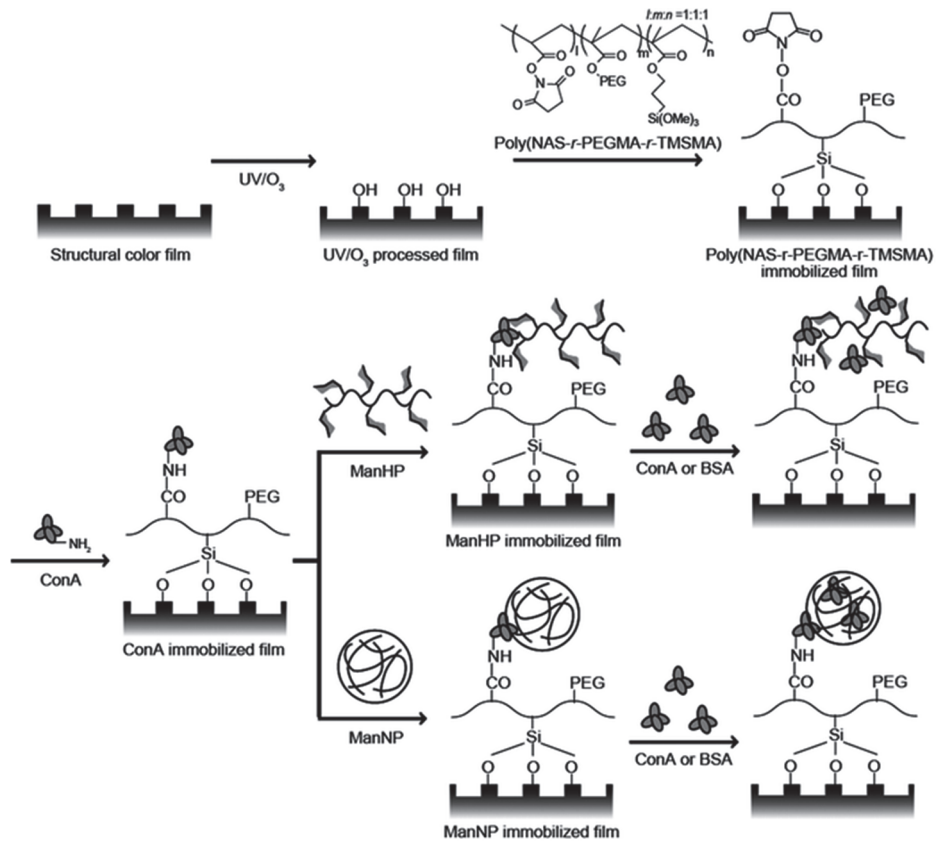


Figure 2 スクシイミド基を介した、ナノゲル粒子の固定化。凹凸基材が構造色を発揮する基板。

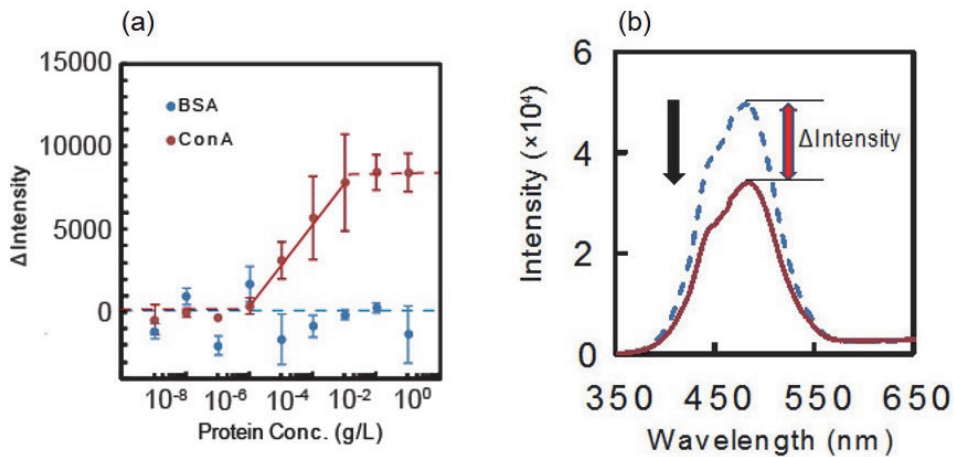


Figure 3 (a)ナノゲル粒子と構造色を組み合わせた基板によるタンパク質のセンシング。(b)構造色基板のスペクトルの代表例。

3. 2. ヒドロゲル粒子による構造色の発現

ナノゲルの溶液は短距離秩序と散乱光に基づく青色を呈している (Figure 4)。ナノゲルについては、PNIPAAmが温度応答性高分子であることから、33度付近で疎水性に変化して、収縮する。ナノゲル溶液についても、温度を上昇させると相転移に基づいて、青色の光を呈さなくなった。また、マンノースを有するナノゲルについては濃厚溶液については青白い散乱光を呈しているが、ConAを添加することによって、色調が見られなくなることがわかった。

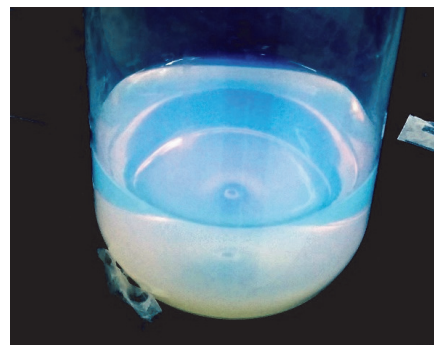


Figure 4 ナノゲル粒子溶液

BSAの添加によっては変化が見られなかった。

また、ヒドロゲル粒子の分散液については、分散光が大きく影響しているため、輝度とコントラストの改善のため、カーボンブラックを複合したナノ粒子の合成を行った。カーボンブラック(和光純薬)分散液を調製し、通常のヒドロゲル粒子と同様にPNIPAAmの合成を行った。ヒドロゲル粒子については、粒径の分散性(PDI)が大きくなり、明確な色を示さなくなった。

ナノゲル分散液の構造色については安定な分散が必要であることが示唆された。そこで、静電相互作用を導入した。正電荷を持つモノマーとして、ジメチルアミノ基を持つモノマー(ジメチルプロピルアミノメタクリルアミド(DMAPM))を加えて重合を行った。DMAPMを含むポリマーについては、室温では安定的に青い発色を示した。ナノゲル粒子については、中性(DMAPM、アクリル酸非含有)、イオン性に限らず、ゲル粒子の分散と発色には界面活性剤の添加が必要であった。

ナノゲル粒子については、界面活性剤を20 mMから2 μMまで変化させることによって、ナノゲルの粒径を変化させることができた。界面活性剤が多いと50 nm程度まで小さくなり、μMオーダーまで減らすことによって、ゲル粒子の粒径は2 μm程度まで増大させることができた。一方で、界面活性剤が多くなると径の均一性が失われる。粒度分布は粒径が1 μm以上では、1.5以上(動的光散乱測定による)であった。均一なナノゲル粒子(PDI 1.5以下)では、濃厚溶液及び、ガラス基板上で乾燥して調製したナノゲル集積体が青色を発色した。バックグラウンドとして、黒色ガラス(マツナミガラス)を使うと発色性が向上した。

3. 3. 癌関連タンパク質を認識するナノゲルの開発とセンシング

3. 1. では、ConAを認識するナノゲル粒子について報告した。ナノゲル粒子については、内部に分子認識空間を調製することで、抗体のような分子認識要素として用いることができる。3. 1. ではConAを認識するナノゲルについて報告したが、ConAは豆由来のタンパク質で一種のモデルタンパク質である。そこで、疾病などに関係する重要なタンパク質を認識するナノゲルの開発を行った。

N-アセチルグルコサミンに硫酸基を導入し、アクリルアミド化したモノマーを各種合成した。硫酸基について位置選択的に導入した。その上で、種々の硫酸化糖鎖高分子ナノゲルを合成した(Figure 5)。硫酸化糖のうち、3、4、6位に硫酸基を導入したナノゲルでは、細胞成長因子である、血管内皮細胞成長因子(VEGF)と結合することがわかった。他の硫酸化糖(3位硫酸化、4位硫酸化、6位硫酸化のモノ硫酸化のGlcNAcアクリルアミド)を含むナノゲルについては、VEGFとの結合が弱かった。疎水性のモノマーである、TBAmを加えることによって、VEGFの結合を最大化することができた。硫酸化糖鎖高分子ナノゲルについては、濃厚溶液は負電荷の導入によってよく分散し、青い色調を呈した。また、温度の上昇やVEGFの添加によって、青い色調は観察されなくなった。3. 1. の構造色基板に固定化することで、VEGFのセンサーを開発する予定である。

また、VEGFの結合を利用して、癌の阻害効果について検討した。VEGFは癌細胞による血管新生に深く関わっていることが知られている。腫瘍を移植したマウスに対して、硫酸化糖鎖高分子ナノゲルを断続的に投与したところ、癌

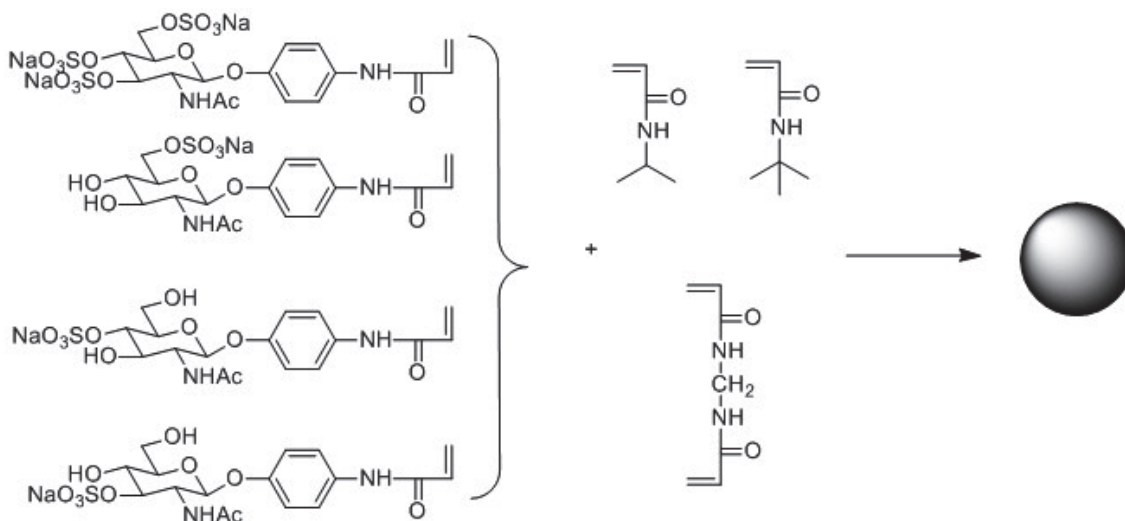


Figure 5 VEGFに結合するナノゲル粒子の合成スキーム。左に示す硫酸化グルコサミンのアクリルアミドモノマーを含むナノゲル粒子は、VEGFと特異的に結合する。

腫瘍体積の減少が見られた。

4. 考察

4.1. 構造色によるバイオセンシング

ナノゲル粒子は分子認識素子としてターゲットに対する強い結合と大きな容量を有している。そのため、ナノゲル粒子を用いて抗体を用いたときと同じようなバイオセンシングが可能である。構造色では、規則正しい基材の性質を用いて、色を発現させることができた。ナノゲル粒子と構造色基板を用いることで、構造色を用いたバイオセンシングを行った。構造色基板では、規則的な孔間の光干渉により構造色を生じる。ナノゲルを固定化しても、規則構造は失われずにUVスペクトルが強く発現された。ナノゲルの固定化、タンパク質の添加によって、反射率、規則構造が低下するため、ピーク位置は500nm程度で変化しないものの、強度が変化した。ナノゲル粒子の分子認識能は抗体と匹敵するほど強い(結合定数 10^7 (M^{-1}) オーダー)ことから、分子認識素子として適当であった。ナノゲル粒子を一層固定化することで、ターゲットタンパク質(ConA)をよく捕捉して高感度にタンパク質を検出することができた。

ナノゲルをゆっくり乾燥させて積層させた構造を作製することによって、青色の構造色を発する材料を調製することができた。この青色素材はナノゲル粒子の複合体による長距離秩序の構造色と散乱光によるものと考えられる。この積層構造はもろく崩れやすかった。PEGジアクリレートを架橋剤として加えたが、逆に規則構造が失われたため、色調が発揮されなくなった。また、ナノゲルの構造色を発揮する積層構造は、種々の刺激による構造体の変化に鋭敏に反応して色調が変化するため、環境のセンシングには適した性質であると考えられた。

4.2. ヒドロゲル粒子による構造色の発現

ナノゲル粒子の分散液では粒子の短距離秩序をベースとした干渉光と散乱光によって青色に発色した。この青色の構造色は分散状態が安定であれば恒常的に色を安定に発現する。短距離秩序をベースにするために、より粒径の大きな粒子も種々調製することができれば種々の色調のナノゲル構造色を実現できると考えられた。しかしながら、各種のナノゲルを調製したが、青色以外は発現させることができなかった。これは、ナノゲルの大きさをセミマイクロオーダーから変化させると粒径の均一性(PDI)が低下して、効果的に構造色を発現させることができないためであった。

また、構造色の発現については、界面活性剤による安定な分散が不可欠だった。重合時には界面活性剤を大量に加えるため、必ず青色色調の構造色を得ることができた。一方で、透析によって界面活性剤を取り除くと青色の色調が失われた。ナノゲル自体にアミンを加えても分散性は完全

には向上せず、透析後は構造色が失われた。硫酸化糖をモノマーとして加えた場合が最も分散性が保たれた。

界面活性剤を加えた状態では、構造色を安定的に発現した。温度を上昇させると、PNIPAmは温度応答性高分子であることから収縮して、粒径が変化した。その場合には青色の構造色が鋭敏に失われた。ナノゲル粒子の構造色では、均一な粒子の分散が重要であり、温度変化によって粒径の均一性が失われると、構造色が発現されなくなった。

4.3. 癌関連タンパク質を認識するナノゲルの開発とセンシング

VEGFや線維芽細胞増殖因子(FGF)などは細胞の成長に関係するとともに、癌細胞での血管新生による癌細胞の異常増殖に関係することが知られている。そのため、これらを免疫した抗体医薬が実際に治療に使われている。VEGF、FGFは細胞表面の硫酸化多糖(ヘパリン、ヘパラン硫酸など)に結合していることがわかっている。そこで、硫酸化多糖をベースにした、糖モノマーを合成することによって、ナノゲル粒子の開発を行った。硫酸化度が高いグルコサミンモノマーに疎水性を適宜加えることによって、VEGFを効率的に捉える、ヒドロゲル粒子の合成に成功した。QCM解析によって、結合力が抗体と同様に高いことを確認した。ナノゲル粒子をマウスに対して投与することで、in vivo試験を行った。ナノゲルがVEGFを捕捉することにより癌細胞の細胞増殖が抑えられることが実際に確かめられた。

得られた硫酸化糖ナノゲル粒子については、濃厚溶液では構造色に基づく青色色調を呈していた。硫酸基によって一定の分散性が保たれ、アミノ基を導入した場合よりも安定的に青色色調を呈した。この性質を利用することによって、癌関連の細胞成長因子の色調センシングが可能であることを示唆した。また、3.1.で示した構造色基板と組み合わせた構造色センシングを行うことが近々の課題と考えられる。

5. 総括

ナノゲル粒子を構成要素として構造色を基礎とした検討を行った。ナノゲル粒子としては、NIPAAmを主モノマーとして用いた。PNIPAAmは高温では収縮することから偽沈殿重合によって各種のナノゲルを均一に合成することができた。界面活性剤存在下で、均一なナノゲル粒子の場合には青色を効率よく発色した。ナノゲル粒子の粒径が、分子認識(タンパク質の包摂)、温度の上昇などの各種刺激によって変化することによって色が消失した。また、ナノゲル自体の開発については順調に進めることができた。モノマーの開発によって、ConA、VEGFといったタンパク質に特異的に強く結合するナノゲルを開発することができた。

ナノゲルについては種々の粒径の高分子ゲルの開発を行った。しかし一方で、粒径自体の構造色、短距離秩序に基づく構造色については色調を制御することは研究期間内では達成することができなかった。特にナノゲル粒子の分散性を制御すること、濃厚溶液を調製することが鍵であると考えられた。

構造色を持つ基板を用いてタンパク質のセンシングを行った。構造色を容易に発揮する基材を用いることで、ナノゲルの持つ分子認識能と構造を生かすことができた。構造色を生かすことで鋭敏なバイオセンシングを開発することができた。

今回の研究では、ナノゲルを新しい構造色の要素として種々の検討を行った。ナノゲルを構造色の発現には分散性が大きな鍵になることが示唆された。また、種々の粒径をつくることができたが多様な色を発現させることには未だ検討が必要と考えられた。

(引用文献)

1) 吉岡伸也、木下修一、日本物理学会誌、64、619-623、2009
 2) 木下修一、吉岡伸也、繊維学会誌、59、35-39、2003.
 3) Yue, M., Hoshino, Y., Ohshiro, Y., Imamura, K., Miura, Y., Temperature-Responsive Microgel Films as Reversible Carbon Dioxide Absorbents in Wet

Environment, *Angewante Chemie* **2014**, *126*, 2692-2695.
 4) Hoshino, Y., Ohashi, R., Miura, Y., Rational Design of Synthetic Nanoparticles with a Large Reversible Shift of Acid Dissociation Constants: Proton Imprinting in Stimuli Responsive Nanogel Particles., *Adv. Mat.* **2014**, *26*, 3718-3723.
 5) Hoshino, Y., Nakamoto, M., Miura, Y., Control of Protein-Binding Kinetics on Synthetic Polymer Nanoparticles by Tuning Flexibility and Inducing Conformation Changes of Polymer Chains., *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 15209-15212.
 6) Nakamoto, M., Hoshino, Y., Miura, Y., Effect of Physical Properties of Nanogel Particles on the Kinetic Constants of Multiple Protein Recognition Process., *Biomacromolecules*, **2014**, *15*, 541-547.
 7) Terada, Y., Hashimoto, W., Endo, T., Seto, H., Murakami, T., Hisamoto, H., Hoshino, Y., Miura, Y., Signal Amplified Two-Dimensional Photonic Crystal Biosensor Immobilized with Glyco-Nanoparticles., *J. Mater. Chem. B*, **2014**, *2*, 3324-332.
 8) Koide, H., Yoshimatsu, K., Hoshino, Y., Lee, S.I., Okajima, A., Ariizumi, S., Narita, Y., Yonamine, Y., Weisman, A. C., Nishimura, Y., Oku, N., Miura, Y., Shea, K. J., *Nature Chem.* **2017**. Doi:10.1038/nchem.2749.

水溶性フラーレンの設計とそれらを用いた抗酸化作用に関する研究

東京工業大学物質理工学院

道信 剛志

The radical scavenging properties of fullerene (C_{60}) have attracted much attention with a view to commercialization. However, a hydrophobic feature of C_{60} made it difficult to homogeneously distribute in an aqueous solution. In order to increase the water solubility, chemical modification was often adopted. Alkyne-appended C_{60} derivative was synthesized by a Bingel method. The alkyne moiety of this C_{60} derivative was further functionalized by the Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) reaction. Azide-substituted poly(ethylene glycol) (PEG) was attached to the C_{60} derivative by CuAAC, yielding PEGylated C_{60} . Although sufficiently long PEG with the molecular weight of 5000 was employed, the PEGylated C_{60} was not soluble in water but soluble in methanol. The high solubility in methanol allowed for the evaluation of radical scavenging properties. When a solution of PEGylated C_{60} in methanol was added to a mixed aqueous solution of β -carotene and linoleic acid, the peroxide attack to β -carotene was clearly suppressed. This was due to the radical scavenging property of the C_{60} derivative. This suppression effect became stronger when the concentration of PEGylated C_{60} increased. This result again supports the radical scavenging property of PEGylated C_{60} derivative and poses the potential use as an antioxidant.

1. 緒言

フラーレン (C_{60}) は優れたラジカル補足能を有しているため抗酸化剤としての応用が期待されている¹⁾。しかし、水への溶解性が極めて低いため、生体高分子との複合化は困難であった。表面に多数の水酸基を導入した水溶性フラーレンは「ラジカル・スポンジ」という商標名が与えられており、優れたラジカル補足能を有することが実証済みである²⁾。そのため、水溶性フラーレンを配合した化粧品は既に市販されており、肌の老化防止と美白効果を増進すると謳われている。水溶性フラーレンは一般的にビタミンCの172倍の抗酸化作用、プラセンタの800倍のコラーゲン生成促進能を有すると言われている。しかし、「ラジカル・スポンジ」の化学構造では C_{60} の π 共役系はほとんど完全に断絶されており、それにともない抗酸化作用に代表されるフラーレンの特性が失われていると考えられる。この問題を解決するために、フラーレンを希望の置換基で化学修飾する道筋がしばしば採用される³⁾。例えば、巨大な水溶性(高)分子鎖をフラーレンに置換することで水溶性の問題は解決できることが知られているが、置換基の分子量が大きくなるとフラーレン密度が低下するという新たな問題が生じる。本研究では、 C_{60} に水溶性高分子であるポリエチレングリコール(PEG)を連結することでメタノールへの

溶解性を付与することに成功した。また、PEG鎖の長さが溶解性を大きく左右することを明らかにした。得られたPEG-フラーレン誘導体の抗酸化作用を評価することを目的とした。

2. 方法

2.1. 試薬

フラーレン誘導体**1**は文献に従い、合成した⁴⁾。その他の試薬は関東化学、東京化成工業、Aldrichより購入し、そのまま使用した。

2.2. 合成

50 mLナス型フラスコにフラーレン誘導体**1** (24 mg, 0.022 mmol) と THF (7.2 mL) を加えた後、0 °C で攪拌した。テトラ-*n*-ブチルアンモニウムフルオリドのTHF溶液 (1 M, 0.055 mL) を加え、0 °C のままで1.5時間攪拌した。室温に戻した後、塩水 (200 mL) を加え、有機層のみをクロロホルム (400 mL) で抽出した。抽出した有機層はさらに塩水 (200 mL) で2回洗浄した後、硫酸ナトリウムを加えて乾燥した。ろ過して硫酸ナトリウムを除去した後、エバポレーションによりろ液を約15 mLに濃縮した。ここへメトキシポリエチレングリコールアジド5000 (111 mg, 0.0222 mmol) と Cu (PPh₃)₃Br (2.06 mg, 0.00221 mmol) を加えた後、窒素雰囲気下、60 °C で22時間攪拌した。室温に冷却した後、クロロホルムと水を加え、有機層を水で洗浄、硫酸ナトリウムで乾燥させた。ろ過により硫酸ナトリウムを除去した後、エバポレーションして溶媒を留去した。最後にカラム精製 (Bio-Beads S-X1, クロロホルム) により精製し、目的化合物を得た (89 mg, 68%)。得られたフラーレン誘導体はメタノールに可溶であったが、20 ~ 37 °C



Design and Antioxidative Effects of Water Soluble Fullerenes

Tsuyoshi Michinobu

Department of Materials Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology Tsuyoshi Michinobu

の温度範囲で水には不溶であった。

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.44\text{-}2.29$ (m, 7H), 3.37 (s, 3H), 3.44-3.80 (m, 4 (n+1) H), 4.29 (br s, 4H), 7.68 ppm (br s, 1H); IR (neat): 3243.7, 2884.0, 2130.0, 1717.3, 1591.0, 1483.0, 1466.6, 1451.2, 1358.6, 1342.2, 1280.5, 1241.0, 1144.6, 1105.0, 1060.7, 1006.7, 962.3, 879.4, 841.8, 717.4, 700.0, 664.4 cm^{-1} .

2. 3. 抗酸化作用の評価

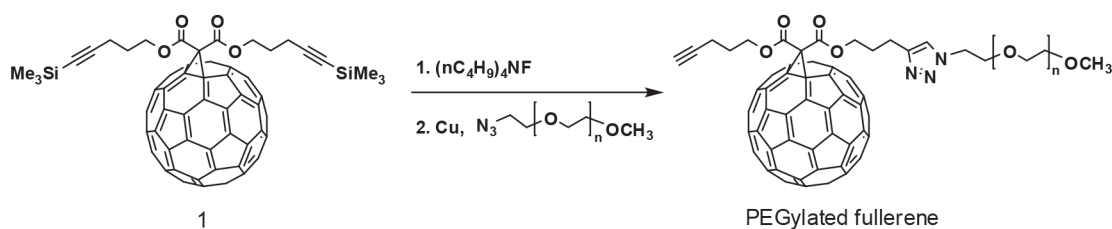
フラレン誘導体の抗酸化作用は既報の方法に従い、評価した^{5,6}。まず、フラレン誘導体のメタノール溶液 (0.0023 M) を作製した (A液)。次に、 β -カロテンのクロロホルム溶液 (1 g/L) (B液)、リノール酸のクロロホルム溶液 (0.1 g/mL) (C液)、Tween 40 のクロロホルム溶液 (0.2 g/mL) (D液) を調整した。B液 0.25 mL、C液 0.1 mL、D液 0.5 mL をサンプル瓶に量り取り、窒素ガスを噴きつけてクロロホルムを蒸発させた。そこに、超純水 (50 mL)、0.2 M phosphate buffer (4.45 mL) を加え、遮光して 30 分間攪拌した。この溶液を E 液とした。UVセルに E 液 2.85 mL と一定量の A 液を加え、50 $^{\circ}\text{C}$ で均一攪拌しながら β -カロテンの吸収 470 nm の時間変化を追跡した。比較試料として A 液と同量の超純水を用いて同様の測定を行った。470 nm 吸収の相対強度は以下の (1) 式に従い、算出した。

$$100 - \left\{ \frac{A_{\text{test at } 0 \text{ min}} - A_{\text{test at } t \text{ min}}}{A_{\text{control at } 0 \text{ min}} - A_{\text{control at } 180 \text{ min}}} \right\} \times 100 \quad (1)$$

3. 結果

Bingel 反応を用いて C_{60} 誘導体 **1** を合成した。**1** のトリメチルシリル基を脱保護した後、銅触媒存在下で 1 当量のメトキシポリエチレングリコールアジドを加えて付加環化反応 (クリック反応) させた (Scheme 1)。カラム精製により未反応原料を取り除き、目的物を単離した。ポリエチレングリコール (PEG) 鎖の分子量によってフラレン誘導体の溶解性に大きな差が現れた。PEG2000 を用いた場合はクロロホルムやトルエンのような有機溶媒に可溶であったがアルコールには不溶であった。一方、PEG5000 を用いた場合はメタノールに可溶となった。本研究では PEG5000 を連結した C_{60} 誘導体について詳細に述べる。

得られた PEG5000- C_{60} 誘導体は $^1\text{H NMR}$ 、IR、MALDI-TOF MS より構造を確認した。 $^1\text{H NMR}$ では、PEG 鎖、末端アルキンおよびトリアゾール環のピークが新たに検出された。IR では、末端アルキンの $\text{C} \equiv \text{C}$ 伸縮振動が 2130.0 cm^{-1} に観測された。さらに MALDI-TOF MS を測定したところ、PEG5000 ではピークトップ分子量 (Mass/Charge) 約 5000 で分子量分布を有するスペクトルが得られたのに対し (Fig. 1 (a))、PEG5000- C_{60} 誘導体ではピークトップ分子量が若干高分子量側にずれるとともに positive mode ではピーク全体がブロード化する様子が見られた (Fig. 1 (b))。これは n 型半導体特性を有する C_{60} 誘導体の MALDI-TOF MS の特徴であり、確かに目的物が得られたことを示している。



Scheme 1 Synthesis of PEGylated C_{60} derivative by CuAAC.

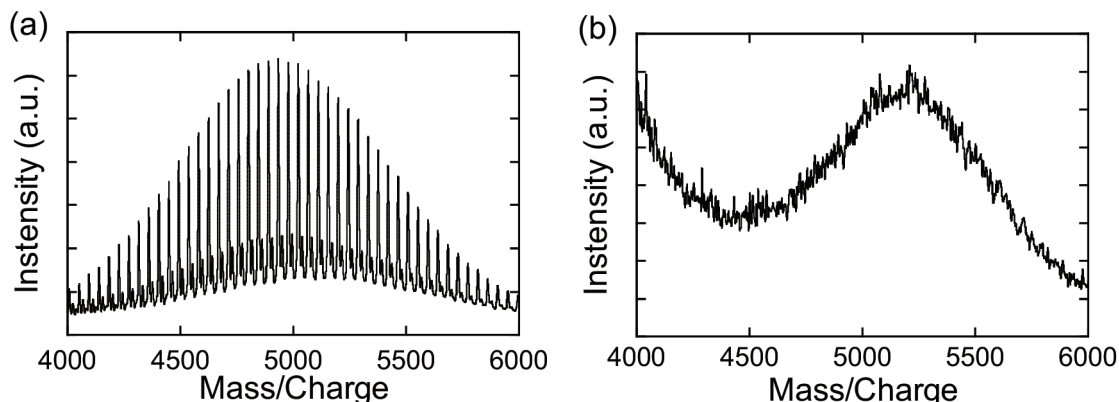


Fig. 1 MALDI-TOF MS spectra of (a) PEG 5000 and (b) PEGylated C_{60} (matrix: dithranol).

PEG5000- C_{60} 誘導体の抗酸化能を評価した。リノール酸の酸化により生成した過酸化ラジカルが β -カロテンを攻撃すると β -カロテンの470 nmの吸収強度が減少することが知られている^{7,8)}。ここにラジカル補足能がある抗酸化剤を添加しておくことで β -カロテンへの攻撃が妨げられる。470 nmの吸収強度変化が抗酸化能と直接関連すると仮定し、評価した。 C_{60} 誘導体を添加していない時は β -カロテン溶液にリノール酸添加後10分程度で470 nm吸収強度の急激な減少が起きたのに対し、PEG5000- C_{60} 誘導体を4.79 mM添加した場合は減少が穏やかになった (Fig. 2)。さらに、PEG5000- C_{60} 誘導体の濃度を9.96 mMへ増やすとさらに吸収強度の減少は緩和したことより、PEG5000- C_{60} 誘導体に明確な抗酸化作用があることが示唆された。水への溶解性が限られているためこれ以上高濃度での実験ができていないが、既報値と同等の抗酸化能を有していると考えられる。

4. 考 察

アルコールに溶解するPEG5000- C_{60} 誘導体を新たに合成し、その抗酸化作用を実証した。完全に水に溶解する C_{60} 誘導体を得るにはさらに長いPEG鎖を導入するか、2本のPEG鎖を C_{60} に付加させる必要がある。そうするとさらに高濃度溶液が調整できるため、ラジカル補足能および抗酸化能の向上を実現できるはずである。

今後の予定として、抗酸化作用を既存の抗酸化剤と比較する。また、それによって今回新規に合成したPEG- C_{60} 誘導体の抗酸化作用を定量的に評価する。さらに、 C_{60} 誘導体によるラジカル補足能を実証するため、スピントラップ試薬を用いてラジカル濃度を定量し、議論する。そのために水溶液用ガラスセル中で電子スピン共鳴 (ESR) によりラジカルを検出する。

また、今回合成したPEG- C_{60} 誘導体は未反応の末端アルキンがもう一つ残っている。分子量5000のPEGを置換することでアルコールへの溶解性が確保できているため、再度CuAAC反応を利用することでアジド化タンパク質へ C_{60} を連結できると考えている。新規なバイオナノ構造体の創製が可能になる道筋を確立する。

5. 総 括

フラレンの π 電子系を損なうことなく、水溶性置換基を導入する方法論を確立した。アジド基はフラレンと反応することが知られているが、CuAAC反応の方がはるかに速く進行するため、目的化合物が優先的に得られた

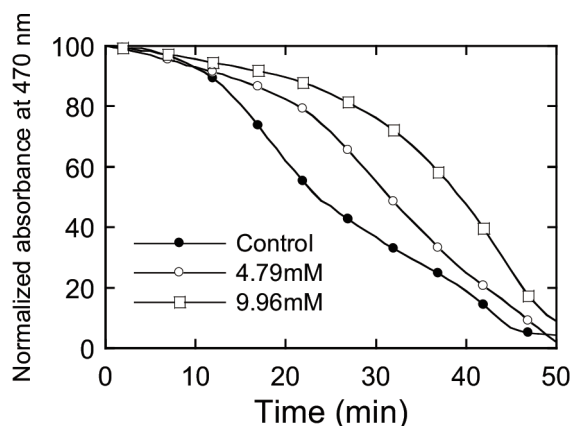


Fig. 2 Time-dependent absorbance change of β -carotene at 470 nm.

ものと考えられる。分子量5000のPEG鎖を導入することでメタノールへ可溶性な C_{60} 誘導体とすることができた。完全に水溶性とするにはさらに長いPEG鎖を導入する必要があることが分かった。得られたPEG5000- C_{60} 誘導体のメタノール溶液を用いて C_{60} 誘導体の抗酸化作用を評価した。PEG5000- C_{60} 誘導体を少量(4.79 ~ 9.96 mM)添加すると、リノール酸過酸化ラジカルが β -カロテンへの攻撃を抑制することが示された。このことよりPEG5000- C_{60} 誘導体には抗酸化作用があることが明らかとなった。

(引用文献)

- 1) E. Choe and D. B. Min, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2009**, *8*, 345-358.
- 2) L. Xiao, H. Takada, X. H. Gan, and N. Miwa, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 1590-1595.
- 3) Y.-G. Ko, S. G. Hahm, K. Murata, Y. Y. Kim, B. J. Ree, S. Song, T. Michinobu, and M. Ree, *Macromolecules* **2014**, *47*, 8154-8163.
- 4) J. Iehl and J.-F. Nierengarten, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7306-7309.
- 5) S. Kato, H. Aoshima, Y. Saitoh, and H. Miwa, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5293-5296.
- 6) M. Horie, A. Fukuhara, Y. Saito, Y. Yoshida, H. Sato, H. Ohi, M. Obata, Y. Mikata, S. Yano, and E. Niki, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5902-5904.
- 7) H. Tsuchihashi, M. Kigoshi, M. Iwatsuki, and E. Niki, *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *323*, 137-147.
- 8) R. Farhoosh, *Food Chem.* **2005**, *93*, 633-639.

安全性に優れた化学合成コラーゲンによる ドラッグデリバリー用球状微粒子の創成

九州工業大学大学院生命体工学研究科

宮崎 敏樹

Polymer microspheres are expected as novel drug delivery carrier for medical treatment. In addition, if hydrophilic/hydrophobic control is appropriately achieved on the microspheres, the incorporated drug can slowly release into body. Among the component of the microspheres, chemically synthesized collagen with amino acid sequence of proline-hydroxyproline-glycine is promising material because they have no risk of contamination with external pathogens. In the present study, microspheres of chemically synthesized collagen were prepared by cross-linking in water-in-oil emulsion. Water-in-oil emulsion was prepared from synthetic collagen solution as water phase and paraffin solution of surfactant Span 80 as oil phase by ultrasonic emulsification. Microparticles were prepared by addition of cross-linking agents into the emulsion. Surface structural changes were characterized by Fourier-transform infrared spectroscopy, scanning electron microscope and contact angle measurement. Microspheres with 5 to 10 μm in size were obtained, although some particles were peanut-like shape. It was found from model experiment on surface modification on natural collagen films that treatment with biphenyl-4-carboxylic acid was effective for fabrication of hydrophobic surface, suggesting that control in drug delivery properties is possible by this type of surface modification. Drug delivery from the microspheres should be examined in future study.

1. 緒言

1.1. ドラッグデリバリーについて

薬剤を必要な部位に必要な量だけ到達させるドラッグデリバリーシステム (DDS) の構築や高機能化は、薬効を最大限に発揮させる上できわめて重要である。特に抗がん剤などの副作用の高い薬剤においては、患者に対する負担を低減する意味でもこれらの技術確立が求められている。

DDSに向けた材料設計としては生体吸収性高分子などから微小球を作製しておき、これらに薬剤を担持させ徐放させる方法が一般的である¹⁾。一般に薬剤放出初期においては、急激に薬剤放出を起こすバーストと呼ばれる現象が現れ、薬剤の過剰投与につながりかねない。このバーストをいかに抑制するかが、高機能のDDS用材料を得る上で鍵となる。そこで、薬剤分子を微小球表面に予め化学結合させておいたり、バリアー層となる物質を微小球表面にコーティングしておけば、薬剤徐放速度を制御することもできる。生体吸収性高分子をDDS担体として適用するにあたっては、薬効の持続性能や望ましい薬剤放出タイミングに合わせた生体吸収性制御が必須である。しかし、薬剤と高分子マトリックスとの親水性の相違による制御の難しさなどの課題が残されている。最近では酵素や温度、pH変化、電場、磁場など外部刺激に応答しながら薬剤徐放能

を発揮できるインテリジェントな生体吸収性高分子の開発も進んでいる²⁾。

1.2. 化学合成コラーゲンについて

コラーゲンは動物の皮膚や結合組織を構成する主要なタンパク質であり、生物学的親和性に優れることから、ハイブリッド型人工骨の構成成分や人工皮膚、歯の抜歯部分の回復を助けるための充填材などさまざまな生体材料として用いられている³⁾。但し、コラーゲンは主にブタなどの動物由来製品が用いられており、最近では海洋生物などから抽出した製品も見られるものの、病因物質の混入を完全に排除することが困難である。また、抗原作用を回避するために分子鎖の末端改質などの前処理が必要である。これらの点を解決するため、コラーゲンの基本アミノ酸配列であるプロリン-ヒドロキシプロリン-グリシン (PHG) に倣った三重らせんモデルペプチドの合成が国内外で行われてきた⁴⁾。但し、このペプチドは分子量が小さいため溶解性が高く、生体内で一定期間留まり骨格を維持することが求められる医用材料や再生医療スキャフォールドとしての応用には難があった。

これに対して、岸本らは脱水重縮合条件を精密に制御することで、分子量を1万程度にまで高めた化学合成コラーゲンを開発した⁵⁾。これらは、化粧品の保湿成分として国内企業で量産化に成功し実用化されるとともに、生体材料への応用が期待されている。化学合成コラーゲンは安全性に優れており生体吸収性を示すとともに、反応性に優れたヒドロキシル基を持つので、適当な化学修飾をすることで薬剤を適度な相互作用により固定化して生体内での徐放を達成できると期待される。このように化学合成コラーゲンはドラッグデリバリー担体としても有用と考えられる。これ



Preparation of spherical microparticles for drug delivery from chemically synthesized collagen with high biosafety

Toshiki Miyazaki

Graduate School of Life Science and Systems Engineering, Kyushu Institute of Technology

までに天然コラーゲンの微小球化については種々報告がなされているが^{6,7)}、このような適用例や最適化は未だ例を見ない。

1. 3. 本研究の目的

本研究では、安全性の高いDDS用担体を得るための基礎的指針の解明を目的とした。具体的には、化学合成コラーゲンを基材とした微小球微粒子をエマルションなどを用いた方法により合成するとともに、疎水性/親水性制御により薬剤徐放制御を実現するための表面化学修飾の有効性についてモデル系により検討する。エマルションを用いた方法であれば、有機高分子にとどまらずセラミックスや複合材料などさまざまな微小球を望みの粒径で簡便に合成できることが明らかになっている。

2. 実験方法

2. 1. 化学合成コラーゲン微小球の作製

以下の記述において、特記なき場合は和光純薬工業製の試薬を用いた。本研究では、油中水型エマルション中での架橋反応を利用して微小球を合成した。水相は0.5%化学合成コラーゲン(株式会社PHG製)水溶液2mLとした。油相として界面活性剤Span80の1.3%流動パラフィン溶液3mLとした。これらを混合した後超音波ホモジナイザを用いて出力188Wにて30秒間乳化した。こうして得られたエマルションに、0.2%のN-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS)と0.05%の1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(EDC, 東京化成製)を含む水溶液2mLを添加し、1時間攪拌した。生成した微粒子を定量濾紙(アドバンテック東洋, No.5C)を用いて分離した。

2. 2. 表面の疎水化

DDS担体としての表面修飾の可能性を探るべく、コラーゲン系材料の親水/疎水性の制御を試みた。濡れ性評価などに際して大きな試料を要するため、本研究では、基礎的アプローチとしてブタ由来コラーゲン(新田ゼラチン製)を用いた。1%コラーゲン溶液をポリスチレン基板上に塗

布し、15W殺菌用紫外線ランプ(東芝製)を用いて紫外線を1時間照射し架橋反応させた。その後、未架橋のコラーゲンを水洗除去した後、4-フェニル安息香酸とEDCを含む水/アセトン混合溶液に1時間浸漬した。

2. 3. 試料の分析

試料の化学状態をフーリエ変換赤外分光分析(FT-IR, 日本分光FT/IR-6100)により調べた。同測定では全反射(ATR)法を用いた。試料の形態を走査型電子顕微鏡(SEM, 日立製作所S-3500N)にて観察した。観察に際し、試料表面にはイオンスパッタ装置(日立製作所E-101)により予め金-パラジウム合金薄膜をコーティングした。また水に対する基板の接触角を接触角計(協和界面科学DMe-200)により測定した。

3. 結果

図1に得られた化学合成コラーゲン粒子の走査電子顕微鏡写真を示す。5~20ミクロンの球状粒子が形成されている様子が観察された。その多くは真球状であったものの、一部球同士が結合したピーナツ状の形態を取っていた。これは水相と油相界面の界面張力が低く、エマルション中に分散している水相が変形しやすくなり、変形したままの状態でも架橋凝固したためと考えられる。今後は界面活性剤濃度を低減させることにより、界面でのすべり変形を抑制し、真球度の高い微小球が得られると考えられる。

図2に試料のFT-IRスペクトルを示す。未処理のポリスチレン基板では、700 cm^{-1} 付近にベンゼン環CH面外変角振動、1400及び1500 cm^{-1} 付近にベンゼン環由来のC=C結合、2800及び2900 cm^{-1} 付近にベンゼン環由来の CH_2 基、3000 cm^{-1} 付近にベンゼン環のCH伸縮振動に帰属されるピークが認められた。コラーゲン水溶液処理した試料では、基板のポリスチレン由来のピークに加えて1700 cm^{-1} 付近にアミドI、1600 cm^{-1} 付近にアミドII、3400 cm^{-1} 付近に水酸基に由来するピークが認められた。これらはコラーゲンのペプチド結合特有のピークであり、上記処理によりコラーゲンが表面に固定化されていることが分かる。しかし、

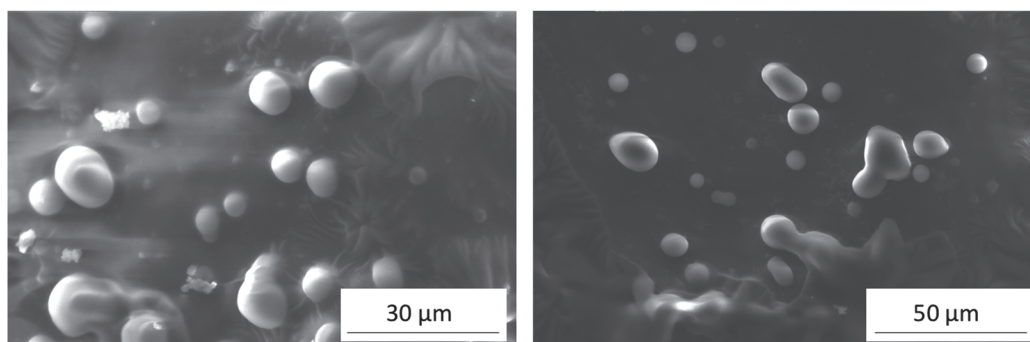


図1 化学合成コラーゲン粒子の走査電子顕微鏡写真

引き続き4-フェニル安息香酸溶液処理後もスペクトルに大きな変化は見られなかった。

水に対する接触角を測定した結果、コラーゲン固定化基板では50.0°, 4-フェニル安息香酸溶液処理後は66.1°であった(n=3)。これは4-フェニル安息香酸溶液処理により、表面が疎水化していることを示している。

4. 考察

エマルションを用いたプロセスにより化学合成コラーゲ

ンからなる微小球が作製できた。化学合成コラーゲンの側鎖にある水酸基が脱水重縮合により架橋して微小球を形成したと考えられる。サイズは5から10ミクロンであり、生分解性高分子から得られているDDS用微小球と同程度のサイズであるので、本研究の目的に適ったサイズになっている。

また、天然コラーゲンを用いたモデル実験により、4-フェニル安息香酸溶液処理することで表面の疎水化ができることが明らかになった。FT-IRでは大きな変化は認めら

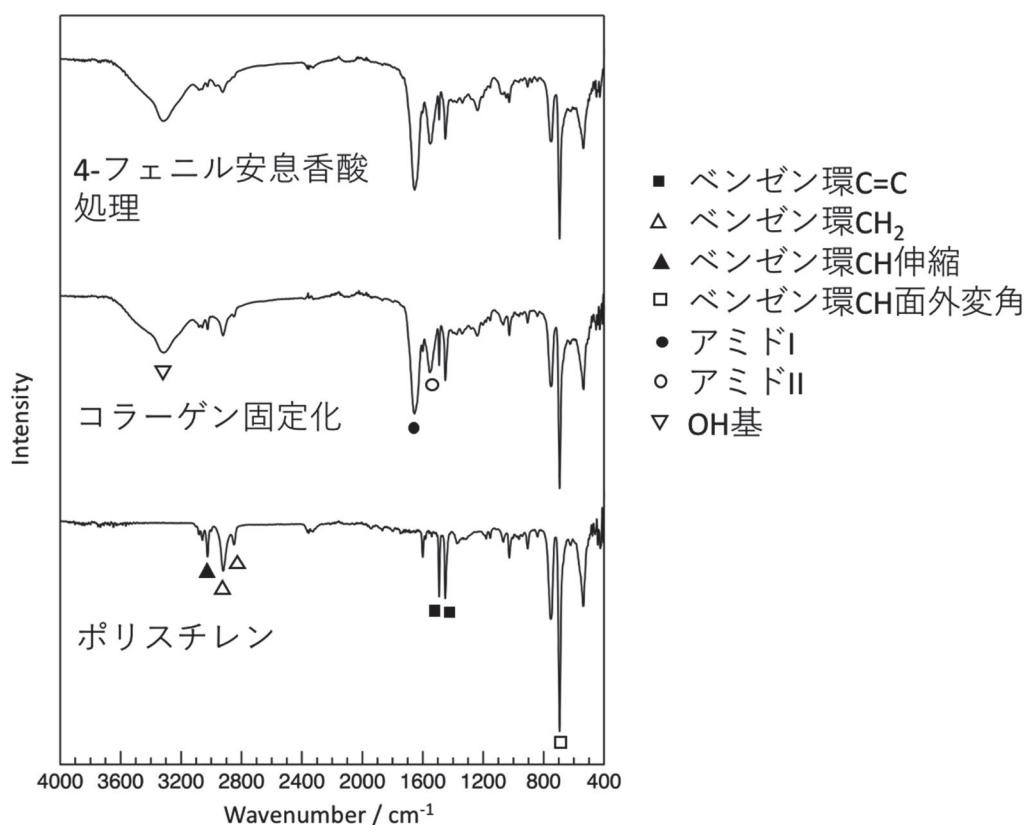


図2 試料のFT-IR ATR スペクトル

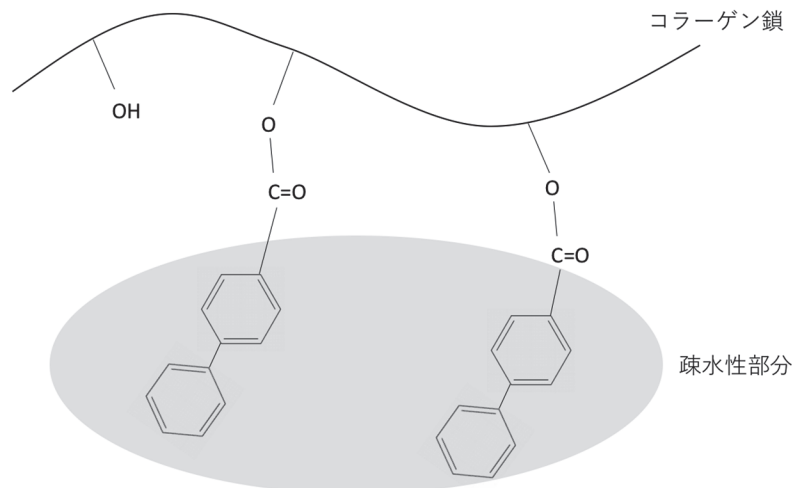


図3 4-フェニル安息香酸によるコラーゲンの疎水化メカニズム

れなかったものの、親水性の観点では変化が認められた。これは4-フェニル安息香酸溶液処理による表面改質が表面のごく近傍のみで生じたためと考えられる。具体的には、図3に模式的に示すように、4-フェニル安息香酸がコラーゲン中の水酸基と結合して表面に疎水性のベンゼン環が固定化され、疎水化に寄与していると考えられる。この結果は、担持させる薬剤の親水性にあわせて化学合成コラーゲン微小球の表面を改質すれば、薬剤徐放性能を制御しうることを示している。

今回は、得られた微小球がきわめて少量であったため、微小球そのものへの表面改質は行えなかったが、今後微小球の量産方法の確立も含めて、この点を明らかにしていく必要がある。

(引用文献)

- 1) 竹本喜一, 砂本順三, 明石満編, 高分子と医療, 三田出版会(1989).
- 2) 石原一彦, 埜 隆夫, 前田瑞夫編, バイオマテリアルの基礎, 日本医学館(2010).
- 3) 谷原正夫監修, コラーゲンの製造と応用展開, シーエムシー出版(2009).
- 4) R. Berisio, L. Vitagliano, L. Mazzarella and A. Zagari, Crystal structure of the collagen triple helix model [(ProProGly)₁₀]₃, *Protein Science*, **11**, 262-270 (2002).
- 5) T. Kishimoto, Y. Morihara, M. Osanai, S. Ogata, M. Kamitakahara, C. Ohtsuki, M. Tanihara, Synthesis of poly(pro-hyp-gly)_n by direct polycondensation of (pro-hyp-gly)_n, where n = 1, 5, and 10, and stability of the triple-helical structure, *Biopolymers*, **79**, 163-172 (2005).
- 6) N. Nagai, N. Kumasaka, T. Kawashima, H. Kaji, M. Nishizawa, T. Abe, Preparation and characterization of collagen microspheres for sustained release of VEGF, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **21**, 1891-1898 (2010).
- 7) L. Yao, F. Phan, Y. Li, Collagen microsphere serving as a cell carrier supports oligodendrocyte progenitor cell growth and differentiation for neurite myelination in vitro, *Stem Cell Res. Ther.*, **4**, 109 (2013).

バイオベースマテリアルを用いた人体により安全な染毛法の開発

京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科繊維学系

安永 秀計

The author has studied the invention of novel human hair dyeing techniques, which are milder and safer for a human body, in order to decrease the risks accompanying hair dyeing. In the paper, the results on a variety of hair dyeing techniques by using biobased materials are reported. The dyeing technique uses flavonoids such as (+)-catechin (Cat) as the dyestuff precursors. The precursors are oxidised and dyeing hair is performed by three kinds of methods as follows: i) dyeing hair by a redissolved catechinone dyestuff, which is preliminarily obtained by the oxidation of Cat enzymatically or chemically, "redissolution dyeing," ii) dyeing hair with Cat solution during enzymatic or chemical oxidation reaction, "simultaneous oxidation dyeing" and iii) dyeing the hair by oxidising enzymatically or chemically, which is treated previously with Cat, "post-oxidation dyeing." The resulting colours of hair samples were compared in order to find a better technique showing higher dyeability.

Next, the biocatechol materials, such as (-)-epicatechin, L-3,4-dihydroxyphenylalanine, hematoxylin, brazilin, rosmarinic acid, caffeic acid and chlorogenic acid were used to dye hair by the enzymatic simultaneous oxidation or post-oxidation dyeing method and their dyeability was estimated. It was found that the bio-catechols containing chroman (3,4-dihydro-2H-1-benzopyran) structure such as Cat, EC, HX and BZ are useful for hair colouring and a variety of colours are obtained.

On the other hand, dyeing hair by using saccharides and amino acids was tried. Yellowish brown and brown hairs are obtained by heating the dyeing solution, in which they are involved. The colour fastness to ultraviolet light and washing for hair dyed by the technique is very high. It was revealed that the dyeing temperature is decreased and dyeing time is shortened by the addition of bio-polybasic acids.

1. 緒言

現在、人毛の染色(染毛・ヘアカラーリング)には、天然由来の原料を用いた染料に比べて安価で多様な毛髪色が得られる合成染料が多く用いられている。そして、合成染料を用いた染毛法の中では、染色性や堅ろう性が高く、比較的短時間で染色可能で、濃色の毛髪でもより明るい色に染色できる酸化染毛剤が最も多く利用されている。しかしながら、発生率は高くはないものの、酸化染毛剤などによって染毛した後に皮膚にかぶれが生じたり、他の疾病が発生したりする問題がある¹⁻⁴⁾。そこで、より身体に影響を与えないような安全性を高めた染毛法が希求されている。

染毛時にはどうしても染色液は皮膚に触れ、染毛料や染毛剤に含まれる物質が体内に侵入することは避けられない⁵⁾。したがって、適当な期間をおいて繰り返し体内に若干量が浸透したとしても、健康上の害を与えないような物質を用いて染毛しなければならない。

このような背景のもとで、筆者らは人体への負荷のより少ない染毛法の創製を目的として、新しい染毛料と染毛法

の研究を行ってきた。そして、天然由来物質を原料として得られるバイオベースマテリアルを用いて、いくつかのアプローチによる染毛法の開発を試みた。本稿ではこれまでに実施した以下の研究結果について報告する。

- ①染料前駆体として利用可能なフラボノイド物質の内、(+)-カテキンから得られるカテキノン染料を再溶解させて染毛する「再溶解染色法」、②(+)-カテキンを酸化させながら染色を行なう「同時酸化法」、③(+)-カテキンを毛髪に先に吸着させた後に酸化処理を行なう「後酸化法」でそれぞれ毛髪を染色し、その染色性を調べた研究。
- (2) カテコール基を有する物質(バイオカテコール)を用いた染毛における染色性の研究。
- (3) 糖とアミノ酸を用いた染毛の研究。

2. 実験

2.1. カテキノンによる染毛

①(+)-カテキン(Cat)/チロシナーゼ/O₂系の酵素酸化法、あるいはCat/塩基/O₂系の化学酸化法によってカテキノンを合成し、それぞれから得られたカテキノン粉末のリン酸緩衝液(pH = 7.0)を調製した。その水溶液に脱色された白髪人毛(マタイ社)を投入して30℃で40分間染色した(再溶解染色法)。②Cat/チロシナーゼ/リン酸緩衝液(pH = 7.0)、あるいはCat/0.1 M 炭酸ナトリウム水溶液を調製し、それぞれの水溶液に白髪人毛を投入してO₂ガス供給下、30℃で40分間染色をした(同時酸化法)。③Cat水溶液に人毛を40分間浸漬した後、チロシナーゼ/



Development of Safer Hair Dyeing Technique by Using Biobased Materials

Hidekazu Yasunaga

Kyoto Institute of Technology Department of Fibre Science and Engineering

0.1 M リン酸緩衝液、あるいは0.1 M 炭酸ナトリウム水溶液に浸漬し、O₂ ガス供給下、30℃で40分間酸化処理をした(後酸化法)。以上の各方法で毛髪試料を処理し、ドデシルポリオキシエチレン硫酸ナトリウムを主剤とする洗浄剤による洗浄・蒸留水によるすすぎ・自然乾燥をそれぞれ行なった。得られた試料を分光測色計(コニカミノルタ CM-2600d)で測色し、L*a*b*表色系(CIE 1976)で毛髪の色を数値化した。L*は明度、a*は赤-緑色度、b*は黄-青色度、C*は彩度を示す。

2.2. バイオカテコールマテリアルを用いた染毛

(-)エピカテキン(EC)、L-3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン(DOPA)、ヘマトキシリン(HX)、ブラジリン(BZ)、ロスマリン酸(RA)、カフェー酸(CA)、クロロゲン酸(ChA)、エラグ酸(EA)を用いて、酵素酸化による同時酸化法と後酸化法でそれぞれ染毛実験を行なった。染色条件と測色法は2.1.と同様である。

2.3. 糖とアミノ酸を用いた染毛と堅ろう度の評価

D-キシロースと各アミノ酸(グリシン・β-アラニン・L-バリン・L-グルタミン酸ナトリウム・L-(+)-リシン・L-メチオニン・L-トリプトファン・L-セリン・L-チロシン・L-アルギニン)をそれぞれ溶解した炭酸水素ナトリウム水溶液に白髪人毛(ビューラックス社)を浸漬し(浴比:1:62.5)、70℃で4.0h振とうして染色した。得られた毛髪を蒸留水で2回洗浄後に自然乾燥し、2.1.と同様の方法で測色した。

他方、染色毛髪に、高圧水銀ランプ(石井商店 UV-HT型)を用いた紫外線照射(強度は15.1mWcm⁻² at 254 nm、6.3mWcm⁻² at 310 nm、2.88mWcm⁻² at 365 nm)、またはドデシルポリオキシエチレン硫酸ナトリウム水溶液(3.0 wt%)を用いた洗髪を行ない、試料毛の色の変化を追跡した。その際に、酸化染毛剤(花王ブローネシャイニングヘアカラー C1A + 花王クリームヘアカラー KT)または塩基性染料(C. I. Basic Brown 16)を用いて染色した毛髪試料にも同様の実験を行ない、比較した。

さらに、D-キシロース/β-アラニン系の処理水溶液に

クエン酸またはDL-リンゴ酸などのバイオ酸を添加し、そこにビューラックス社白髪人毛を浸漬し、染色温度や染色時間を系統的に変えながら上記と同様な条件下で染色した。その後、得られた毛髪の洗浄・乾燥を行ない、測色して染色性を評価した。

3. 結果と考察

3.1. カテキノンによる染毛⁶⁻⁷⁾

まず、酵素酸化系・化学酸化系の両方で再溶解染色・同時酸化・後酸化の各方法のいずれによっても、カテキノン染料で毛髪が染色されることが明らかとなった。各染色方法で染色した毛髪は黄~黄赤~赤茶色となる。染色した毛髪の写真を図1、測色結果を色度図・色調図でまとめて図2に示す。図1からわかるように、全体的には酵素酸化系よりも化学酸化系で染色した毛髪の方が暗い色調に染色される。酵素酸化系では、再溶解染色法よりも同時酸化法と後酸化法による染色で毛髪のa*値が高くL*値が低くなり、同時酸化法でさらにb*値が高くなる(図2)。化学酸化系においても後酸化法による染毛でa*値が高くL*値が低くなる。

酵素系と化学系酸化法での染色性の差は、①酵素の活性とその変化、②酸化種の寿命、③系の中での酸化種・活性化されたCat・カテキノン染料の発生場所の違いなどによって生まれると予想される。

また、後酸化法では全体で80分間の処理をしていて、他の2方法よりも処理時間が長い。染色では一般に染料前駆体分子や染料分子の拡散が律速となるので、後酸化法で拡散する時間が長くなることが毛髪色をより濃くした主要因ではないかと考えられる。

これまでの研究によりカテキノン染料は皮膚刺激性を示さないことがわかっているので⁸⁾、再溶解染色法での皮膚刺激性は極めて低いと考えられる。一方、同時酸化法・後酸化法では染色時に化学反応が伴うので、実用化にあたっては、この方法での安全性試験が必要である。特に化学酸化法では、中性で反応を行なう酵素酸化法と異なり、塩基性で反応させるので、このpHでの皮膚への刺激その他を



染色法	未染色	再溶解染色法		同時酸化法		後酸化法	
		酵素	化学	酵素	化学	酵素	化学
酸化法	—						
写真							

図1 酵素酸化系または化学酸化系で、再溶解染色法・同時酸化法・後酸化法のそれぞれによってカテキノンで染色した毛髪の写真。反応温度:30℃。

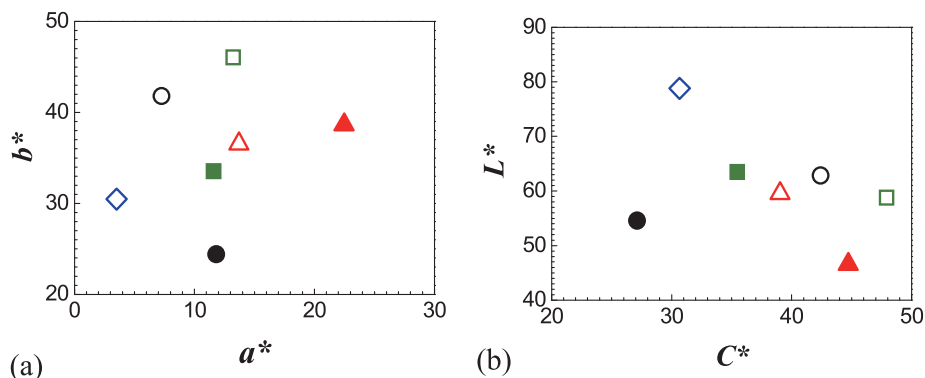


図2 酵素酸化系または化学酸化系で、再溶解染色法・同時酸化法・後酸化法のそれぞれによってカテキンで染色した毛髪の色調結果。(a) 色度図、(b) 色調図。未処理毛髪：◇、酵素系再溶解法染色毛髪(以下同様)：○、酵素系同時酸化法：□、酵素系後酸化法：△、化学系再溶解法：●、化学系同時酸化法：■、化学系後酸化法：▲。

染料前駆体	Cat	EC	DOPA	HX	BZ	RA	CA	ChA
写真								
L*	58.4	58.3	38.6	35.1	49.4	65.0	65.8	70.5
a*	16.9	16.9	0.89	6.22	12.1	3.89	3.85	4.18
b*	53.9	45.7	6.27	21.3	25.9	21.4	22.9	25.7
C*	56.5	48.8	6.33	22.2	28.5	21.7	23.2	26.1

図3 酵素酸化系同時酸化法で各バイオカテコールマテリアルを用いて染色した毛髪の写真と測色結果。染料前駆体としてのバイオカテコールマテリアルは、(+)-カテキン(Cat)、(-)-エピカテキン(EC)、L-3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン(DOPA)、ヘマトキシリン(HX)、ブラジリン(BZ)、ロスマリン酸(RA)、カフェー酸(CA)、クロロゲン酸(ChA)である。

評価する必要がある。

また、カテキン染料は主要成分の4-(3,4-ジヒドロ-3 α ,5,7-トリヒドロキシ-2H-1-ベンゾ-2 α -イル)-1,2-ベンゾキノンの他に少量の他の色素も含まれている(染料から副産物を除いて4-(3,4-ジヒドロ-3 α ,5,7-トリヒドロキシ-2H-1-ベンゾ-2 α -イル)-1,2-ベンゾキノンを単離して精製するのは極めて困難で、現時点では精製法を確立していない)。酵素酸化系と化学酸化系の染色毛髪の色の違いに、染料分子の組成の相違も要因として考えられる。特に特異性を示す酵素反応に対し、化学酸化系では副産物の種類や量も多いことが予想される。実用化に当たっては、その副産物の作用も考慮し、安全性を評価する必要もある。

3.2. バイオカテコールマテリアルによる染毛⁹⁻¹²⁾

Catに加え、8種のバイオカテコールマテリアルを用いて、それぞれ酵素酸化系で同時酸化法による染毛を試みたところ、ECではCatと同様に黄赤色に、DOPAでは彩度の低い灰色に、HXではくすんだ暗黄赤色に、BZでは黄味があった茶色に毛髪が染まることわかった。一方、

RAまたはCAまたはChAまたはEAを用いた染色系ではほとんど染まらない。染色した各試料毛髪の写真と測色結果を図3に示す。EA系では染色前後の毛髪の色と測色値が変化しないので図3からは除いてある。DOPAとHXの染色系はL*が低く、毛髪は濃色に染まる。CatとECではa*とb*が高く、その結果彩度C*が高い。DOPAではa*、b*、C*が低く、ほとんど無彩色といえる。HXとBZでは茶系の色が測色結果にも反映されている。

チロシナーゼを作用させた各反応溶液はEA系を除きCatと同様にいずれも発色し、ECは赤色、DOPA・RA・CA・ChAは黒褐色、HXは紫色、BXは濃い赤色と変化する。したがって、これらの染料前駆体物質でカテコール基が酵素反応によって酸化し、色素が生成しているといえる。しかし、毛髪を濃色に染色するのはCat・EC・DOPA・HX・BZの系である。染色可能な系で用いられる前駆体は、DOPAを除き、カテコールと共にクロマン(3,4-ジヒドロ-2H-1-ベンゾピラン)構造を有する。したがって、毛髪への染着にはクロマン構造が重要な役割を演じていることが示唆される。DOPAは人体においてメラニン色素が合成

される際の原料の一つで主要物質であり、その合成過程でチロシナーゼが働く。本研究のDOPAの系では、生成する色素が毛髪への吸着能を有しているといえる。

3.3. 糖とアミノ酸による染毛結果と堅ろう度評価¹³⁻¹⁵⁾

まず、D-キシロースとグリシンを用いて毛髪の染色を試みたところ、毛髪が茶色に染まることがわかった。そしてこの系では、より高濃度のグリシン、より長い染色時間、より高温の染色条件でより濃色に染色されることを明らかにした。次に、D-キシロースと他の各アミノ酸を反応させて毛髪の染色処理を行なった。得られた毛髪試料の測色結果を表1に示す。アミノ酸の種類によっては水に対する溶解度が低いものがあり、4.0Mの濃度にならないものは飽和濃度まで溶解させて染色した。アミノ酸を添加せずにD-キシロースのみでも毛髪は染色されるが、アミノ酸を添加した系ではいずれの毛髪のL*値もより低くなる。したがって、アミノ酸を添加することによって染色性が向上するといえる。最も高いa*値を示すのはグリシン添加系で、最も高いb*値を示すのはL-バリン添加系である。最も低いL*値を示すのはβ-アラニン添加系である。これは、添加するアミノ酸の種類によって生成する色素の種類・組成・量が変わるためであると考えられる。

還元性の糖とアミノ酸を加熱するとメイラード反応が起こり、メラノイジンという一群の色素物質が生成することが知られている¹⁶⁾。本研究の系でもこのメイラード反応によって茶褐色の色素が生成し、これが吸着して毛髪が染色されていると考えられる。さらに、アミノ酸を添加しない系でも毛髪が染色されていることから、添加アミノ酸だけではなく、毛髪を構成するケラチンの一部も反応に関与し、色素物質がケラチンと共有結合を形成している可能性

表1 D-キシロースとそれぞれのアミノ酸によって染色した毛髪の測色結果。

試料	c _A /M	L*	a*	b*
Initial hair	—	70.7	4.32	23.8
No amino acids	0	62.7	8.56	35.4
Glycine	4.0	41.7	20.9	36.5
β-Alanine	4.0	37.9	19.9	32.2
L-Valine	4.0	50.6	17.3	43.2
L-Glutamic acid monosodium salt	4.0	58.0	12.7	41.8
L-(+)-Lysine	4.0	58.3	8.35	29.2
L-Methionine	0.32	60.9	11.1	39.2
L-Tryptophan	0.10	54.1	7.21	36.0
L-Serine	2.4	44.8	17.1	35.7
L-Tirosine	2.5 × 10 ⁻³	58.3	8.85	32.0
L-Arginine	0.85	45.9	12.4	29.2

D-キシロース濃度：2.0M, アミノ酸濃度(c_A)：0-4.0M。

がある。

染毛において染色毛髪の色堅ろう性は重要な性質であるので、この染色法で染めた毛髪の紫外線に対する耐光堅ろう度と洗髪堅ろう度を調べた。ここでは、D-キシロース／グリシン系・D-キシロース／β-アラニン系で染色した試料を酸化染毛剤系・塩基性染料系の試料と比較した。

各系で染色した毛髪の染色直後の色と各紫外線照射時間(t)における色の色差(ΔE* = {(ΔL*)² + (Δa*)² + (Δb*)²}^{1/2}、ΔL*、Δa*、Δb*はそれぞれ染色直後と所定処理後の毛髪のL*、a*、b*の差)の変化を図4に示す。ΔE*が小さいほど色の変化が小さいことを示す。紫外線照射下でのD-キシロース／グリシン系またはD-キシロース／β-アラニン系染色毛髪のΔE*は最初の6.0hまでは上昇するが、それ以降は4程度でほとんど一定である。そして、24h紫外線照射時では、酸化染毛剤系または塩基性染料系で染色した毛髪の値と比較すると、糖／アミノ酸染色系のΔE*値は半分以下となっている。この結果より、D-キシロース／グリシン系とD-キシロース／β-アラニン系で染色した毛髪の耐光堅ろう度は非常に高いといえる。毛髪が紫外線に曝されて空気中の酸素による酸化が促進されたり他の反応が起こる場合に、毛髪に吸着しているメラノイジン物質にはさらに反応の進行とともに色素を形成するものがあることが予想される。このことと、染料物質が酸化反応も経て生成した安定な化合物を含むことが高い耐光堅ろう度に寄与しているのではないかと考えられる。

図5は各系の染色毛のΔE*を洗髪回数(n)に対してプロットした結果である。酸化染毛剤系または塩基性染料系ではΔE*が大きく上昇していくのに対して、糖／アミノ酸染色系の色変化はとても小さい。D-キシロース／グリシン系またはD-キシロース／β-アラニン系において、ΔE*は5回目まで緩やかに増加し、それ以降は4または3程度でほとんど一定である。この結果から、D-キシロース／グリシン系とD-キシロース／β-アラニン系で染色した毛髪

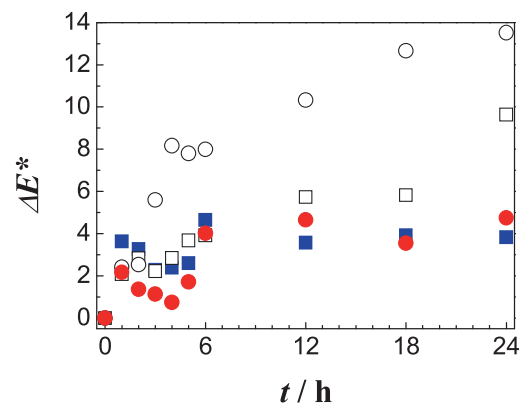


図4 D-キシロース／グリシン系(■)・D-キシロース／β-アラニン系(●)・酸化染毛剤系(□)・塩基性染料系(○)で染色した毛髪の紫外線照射時間(t)に対する色差(ΔE*)の変化。

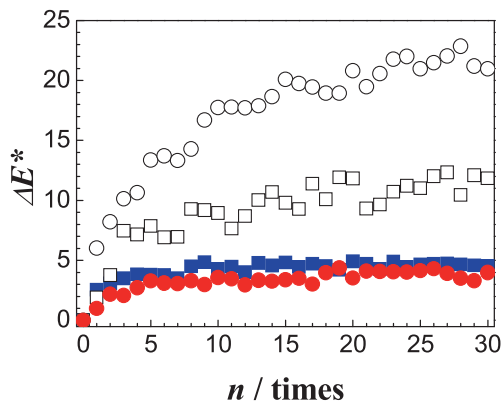


図5 D-キシロース/グリニン系(■)・D-キシロース/β-アラニン系(●)・酸化染毛剤系(□)・塩基性染料系(○)で染色した毛髪の洗髪回数(n)に対するΔE*の変化。

は洗髪堅ろう度も非常に高いといえる。先に述べたように、これは染料物質が毛髪ケラチンと共有結合を形成して強固に染着していることに起因している可能性がある。

この染毛法においては、濃色に染めるために70℃での加熱と4時間の染色時間を必要としていて、実用化のために、より低温・短時間で染色することが求められる。そこで、染料生成反応を促進し、染色温度を下げたり染色時間を短縮できるような添加物質を検討した。

D-キシロース/β-アラニン系に様々な化合物を添加して染毛した結果、クエン酸またはDL-リンゴ酸を添加することで、毛髪はより濃色に染色されることがわかった¹⁷⁾。図6に各染色系における染色時間(t)と染色毛の450nmにおけるK/S値(K/S_{450})の関係を示す。K/Sは、Kubelka-Munkの理論により定義され、 $[K/S]_{\lambda} = (1-R_{\lambda})^2 / 2R_{\lambda}$ により算出される。Kは吸光係数、Sは散乱係数、 R_{λ} は着色物の波長λの光の反射率である。K/S値が高い程、より濃色に着色されていることを示す。染色時間が1.0hまでの処理ではいずれの系もほとんど同じ色調を示すが、1.25から2.0hの間でK/S値に大きな差が生じる。そして例えば、1.5h処理をしたクエン酸添加染色系の毛髪($L^* = 36.4$)は、4.0h処理をした無添加系の毛髪($L^* = 37.6$)よりも濃い色を示す。また、DL-リンゴ酸添加系でも濃色効果が観察される。この結果より、クエン酸またはDL-リンゴ酸を添加することで染色時間の短縮が可能だといえる。一方、各染色系の染色温度について $L^* = 40$ 付近の値と比較すると、クエン酸の添加系では15℃、DL-リンゴ酸の添加系では12℃染色温度が下がる。

4. 総括

本研究によって、バイオベースマテリアルを染料前駆体として用いる酵素酸化法・化学酸化法・メイラード反応法などにより、毛髪を様々な色に染色できることを明らかにした。バイオベースマテリアルを用いた本研究の染色法で

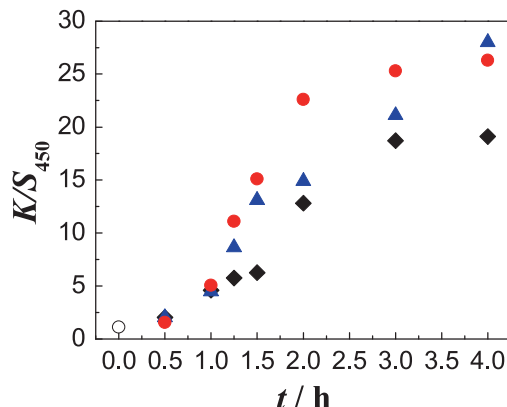


図6 染色時間(t)と染色毛の K/S_{450} の関係。記号は、未染色毛(○)、D-キシロース/β-アラニンのみで染色した毛髪(◆)、D-キシロース/β-アラニン+クエン酸で染色した毛髪(●)、D-キシロース/β-アラニン+DL-リンゴ酸で染色した毛髪(▲)を表す。

得られる毛髪の色堅ろう度は高いといえる。

今後の課題として、①染色機構の解明、②染色性の向上、③安全性の評価が挙げられる。

謝辞

本研究の遂行にあたり、公益財団法人コスメトロジー研究振興財団から助成を戴いたことに感謝致します。

(引用文献)

- 1) Søstved, H.; Agner, T.; Andersen, K. E.; Menné, T., 55 Cases of allergic reactions to hair dye: a descriptive, consumer complaint-based study, *Contact Dermatitis*, **47**, 299-303 (2002).
- 2) Ishida, W.; Makino, T.; Shimizu, T., Severe hair loss of the scalp due to a hair dye containing para phenylenediamine, *ISRN Dermatol.*, **2011**, 947284 (2011). doi: 10.5402/2011/947284
- 3) 消費者庁消費者安全調査委員会, 毛染めによる皮膚障害, 報告2015年10月23日, URL: http://www.caa.go.jp/csic/action/pdf/8_houkoku_honbun.pdf (2015).
- 4) Gupta, M.; Mahajan, V. K.; Mehta, K. S.; Chauhan, P. S., Hair Dye Dermatitis and p-Phenylenediamine Contact Sensitivity: A Preliminary Report, *Indian Dermatology Online Journal*, **6(4)**, 241-246 (2015). doi: 10.4103/2229-5178.160253
- 5) Goetz, N.; Lasserre, P.; Roré, P.; Kalopissis, G., Percutaneous absorption of p-phenylene diamine during an actual hair dyeing procedure, *Int. J. Cosmetic Sci.*, **10**, 63-73, (1988).
- 6) 積智奈美; 松原孝典; 綿岡勲; 浦川宏; 安永秀計, (+)-カテキンを用いた染毛法 I. 酸化・染色条件と染色性,

- 繊維学会秋季研究発表会, **70**, 27 (2015).
- 7) Takanori Matsubara; Chinami Seki; Hidekazu Yasunaga, The Relationships between Dyeing Methods and Dyeability in Hair Colouring by Utilising Enzymatic Oxidation of (+)-Catechin, *American Journal of Plant Sciences*, **7**, 1058-1066 (2016). doi: 10.4236/ajps.2016.77101
- 8) Yasunaga, H.; Takahashi, A.; Ito, K.; Ueda, M.; Urakawa, H., Hair Dyeing by Using Catechinone Obtained from (+)-Catechin, *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, **2(3)**, 158-163 (2012). doi: 10.4236/jcdsa.2012.23031
- 9) T. Matsubara; C. Seki; I. Wataoka; H. Urakawa; H. Yasunaga, Novel Oxidation Hair Dyeing by Using Bio-Catechol Materials, *The 13th Asian Textile Conference*, **3(c)**, 1061-1064 (2015).
- 10) 松原孝典; 積智奈美; 安永秀計, バイオカテコールの酵素酸化反応を活用した染毛法, 毛髪科学技術者協会第7回研究発表会(2016).
- 11) YASUNAGA, Hidekazu; TAKAHASHI, Akiko; ITO, Kazue; UEDA, Masahisa; TANIGUCHI, Saina; YANO, Asami; SEKI, Chinami; MATSUBARA, Takanori, Hair Dyeing Using Biobased Materials Prepared by Enzymatic and Chemical Reactions, *9th International Conference on Fiber and Polymer Biotechnology*, **39** (2016).
- 12) Takanori Matsubara; Chinami Seki; Hidekazu Yasunaga, Relationships between Species of Dyestuff Precursor and Dyeability in Hair Colouring Made by Enzymatic Oxidation Technique Using Bio-Catechols, *American Journal of Plant Sciences*, **8**, 1471-1483 (2017). doi: 10.4236/ajps.2017.86101
- 13) 安永秀計; 大崎洋; 綿岡勲; 浦川宏, 糖とアミノ酸を用いた染毛 II. 染色性に及ぼすアミノ酸種依存性と染色毛髪の堅ろう性の評価, 日本繊維機械学会年次大会, **68**, 98-99 (2015).
- 14) YASUNAGA, H.; OSAKI, H., Wool and Hair Dyeing by Using Saccharides and Amino Acids I. Dyeing Conditions and Dyeability, *The 13th Asian Textile Conference*, **3(c)**, 1106-1108 (2015).
- 15) YASUNAGA, Hidekazu; OSAKI, Hiroshi, Hair Dyeing by Using Saccharides and Amino Acids I. Relationships between Dyeing Conditions and Dyeability, *tekstilec*, in preparation.
- 16) Maillard, L. C., *Ann. Chim. Sér.* **9(5)**, 258-317 (1916).
- 17) 木田智康; 安永秀計, 糖とアミノ酸を用いた染毛 III. 染色性に対する酸添加の効果, 染色化学討論会, **53**, 25-27 (2016).

Ⅱ． 生体作用、安全性に関する分野

タイトジャンクションの形成を促進するシグナル伝達経路の解明

九州大学理学研究院生物科学部門

池ノ内 順一

Epithelial cells define the boundary between the outside and the inside of our body by constructing the diffusion barrier. Tight junctions (TJs) of epithelial cells function as barriers against invasion of harmful microorganisms into the human body and free diffusion of water or ions from the body. Therefore, formation of TJs has to be strictly controlled in epithelial cells. However, the molecular mechanisms governing this regulation are largely unknown. In this study, we identified Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) as a regulator of the barrier function of TJs. CaMKII inhibition led to enlargement of TJ-areas and up-regulation of the barrier function. CaMKII inhibition induced excess TJ formation in part by the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) and subsequent phosphorylation of claudin-1. As up-regulation of epithelial barriers is essential for the prevention of chronic inflammatory diseases, the identification of CaMKII as a modulator of TJ function paves the way for the development of new drugs to treat these diseases.

1. 緒言

私たち多細胞生物のからだは、数兆個の細胞から構成されており、細胞同士はタイトジャンクションと呼ばれる細胞接着装置によって密に結合している。タイトジャンクションを構成する細胞接着分子として、4回膜貫通タンパク質のClaudinが同定された。しかしながら一方で、タイトジャンクションの形成がどのような仕組みで制御されているかについては、殆ど明らかになっていない。

本研究では、タイトジャンクション形成の分子メカニズムを明らかにすることにより、皮膚のタイトジャンクションの形成促進を可能とする化粧品・外用薬・医薬品の開発の基礎となる知見を得ることを目的としている。

タイトジャンクションは、上皮細胞や血管内皮細胞などの細胞が持つ細胞接着装置であり、特に皮膚においては、タイトジャンクションは、体内からの水分の蒸散を防ぐ上で必須の構造である。皮膚の上皮細胞が持つタイトジャンクションを構成する膜タンパク質Claudin-1をノックアウトしたマウスでは、水分が蒸散して、生後すぐに脱水を呈する¹⁾。これまで皮膚において保湿を担うのは、角質のセラミド層であるとされていたが、上記の知見は、タイトジャンクションもセラミド層と同様に皮膚の保湿において重要な役割を果たすことを意味している。従って、タイトジャンクションのバリア機能を強化することは、保湿効果を高めることが期待できる。



Elucidation of molecular mechanisms involved in the formation of tight junction

Junichi Ikenouchi

Kyushu University Faculty of Science
Department of Biology

またClaudin-1の発現が低下したマウスでは、アトピー性皮膚炎に類似した症状を示すことが近年明らかになった²⁾。このことは、皮膚顆粒層に存在するタイトジャンクションが外来抗原に対するバリアとして機能し、タイトジャンクションの破綻が慢性炎症の原因になっていることを示唆する。

このようにタイトジャンクションやその主たる構成因子であるClaudinが生理的なバリアとして機能し、その破綻が病態発症につながるということが明らかになった。しかしながら、タイトジャンクションの形成がどのように制御されるかはこれまで全く明らかになってこなかった。タイトジャンクションの機能を人為的に制御することは医学的に重要な試みであるが、Claudinタンパク質の発現量を人為的に制御するだけでは不十分である。Claudin-1を過剰に発現しても余剰のタイトジャンクションは形成されない。私は、タイトジャンクションの形成に関わる分子機構を明らかにする目的で、小分子化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、タイトジャンクションの形成を促し、上皮細胞のバリア機能を亢進させるシグナル伝達経路の解明を試みた。

2. 方法

2.1. 細胞培養

実験に用いたマウス唾液腺由来培養上皮細胞であるCSGI細胞は、最終濃度10% Fetal Bovine Serum (FCS)を添加したDMEMを用いて37℃、5% CO₂で培養した。

2.2. 蛍光抗体染色

顕微鏡観察に用いる細胞はφ35 mm glass-base dishesまたはφ15 mmカバーガラス上でコンフルエントになるまで培養した。これを2% PFA/PBS (-)で10分間固定処理を行い、続いて50 μg/mL Digitonin/PBS (-)を用いて10分

間透過処理を行った。次いで、1% BSA/PBS (-)を加え15分間ブロッキング処理を行った。一次抗体を1% BSA/PBS (-)に適切な濃度で希釈したものを加え1時間、その後、同様に希釈した二次抗体を加え30分間静置し、よく洗浄を行ってから観察した。

2. 3. Western Blotting

ウェスタンブロットイング用に作製したサンプルをSDS-PAGEにより分離後、ウェット法によりニトロセルロース膜に転写した。転写した膜を5%スキムミルク/PBS (-)に浸し、室温で30分間振盪しブロッキングした。続いて一次抗体を5%スキムミルク/PBS (-)に適切な濃度で希釈したものを加え1時間、その後、5%スキムミルク/PBS (-)に1/2000に希釈した二次抗体を加え30分間室温で振盪した。その後PBS (-)で30分間振盪洗浄し、Super Signal west Dura 発色試薬を用いて検出した。

2. 4. 経上皮電気抵抗値(TER)の測定

CSG1細胞を12wellのトランスウエル(Corning)に細胞数が 1×10^6 個になるように播種し、2日ほど培地を交換してコンフルエントになるまで培養した。培養後、電気抵抗値を測定した。

3. 結果

3. 1. タイトジャンクションの形成を促進する化合物の同定

タイトジャンクションの形成を促進するシグナル伝達経路を同定する目的で、標的の明らかになった小分子化合物のライブラリーを用いて、上皮細胞のタイトジャンクション領域を拡大する化合物を探索した。具体的には、タイトジャンクションの構成分子であるClaudin-1にGFPを融合させたGFP-Claudin-1遺伝子を安定的に発現するL線維芽細胞を樹立し、化合物の添加によって、細胞間接着部位にClaudin-1の集積を促す化合物をスクリーニングした。その結果、カルシウム-カルモジュリン依存性キナーゼII (CaMKII)の阻害剤であるKN-93で処理すると、Claudin-1-GFPの細胞接着部位への集積が顕著に促進されることを見出した(図1)。

次に、KN-93によるタイトジャンクションの形成促進効果が、上皮細胞でも観察されるか検討を行った。マウスの唾液腺由来の培養上皮細胞であるCSG1細胞にKN-93を添加しClaudin-1に対する抗体で固定染色を行った。その結果、培養上皮細胞においてもClaudin-1が細胞接着部位のラテラル膜に過剰に集積する様子が観察された(図2)。

さらにこのようなClaudin-1のラテラル膜の集積がタイトジャンクション構造の拡大を反映しているかを確かめるために、凍結切断レプリカ法による電子顕微鏡観察を行っ

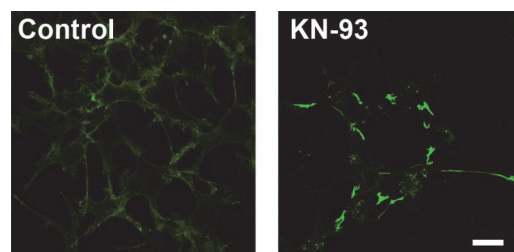


図1 GFP-Claudin-1を安定発現するL線維芽細胞にKN-93を最終濃度が $10 \mu\text{M}$ になるように添加した。DMSOを培地に添加した対照群に比べてKN-93を培地に添加した細胞ではGFP-Claudin-1が顕著に細胞間接着部位に集積している。スケールバーは、 $5 \mu\text{m}$ 。

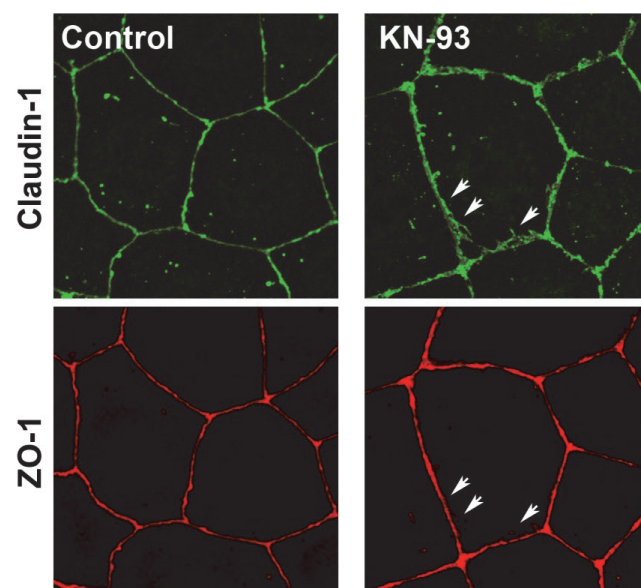


図2 マウス唾液腺由来の培養上皮細胞にKN-93を最終濃度が $10 \mu\text{M}$ になるように添加し、固定後、抗Claudin-1抗体と抗ZO-1抗体で二重染色した。DMSOを培地に添加した対照群に比べてKN-93を培地に添加した細胞ではClaudin-1の細胞間接着部位への集積がラテラル膜まで拡大している(白矢印)。Claudin-1に結合する裏打ちタンパク質のZO1の染色は拡大していない。

た。その結果、ラテラル膜に余剰なタイトジャンクションストランドが形成されていることを確かめた(図3)。

このことから、KN-93処理によってタイトジャンクションの形成量が拡大するということが明らかになった。

KN-93の効果について、上記の形態学的な評価に次いで、上皮細胞のバリア機能に対する評価を行った。経上皮電気抵抗測定(Trans-epithelial electrical resistance: TER)は、上皮細胞シートに一定の電圧をかけた際に流れる電流を測ることにより、タイトジャンクションを介して上皮細胞の間隙を通るイオンの通しやすさを測定する。TERが高いほど、イオンを通しにくく、したがって上皮細胞のバリア機能が高い状態であると言える。KN-93を培地に添加した上皮細胞では対照群に比べて高いTER値を示すことから、KN-93の添加によってタイトジャンクションのバリア機能

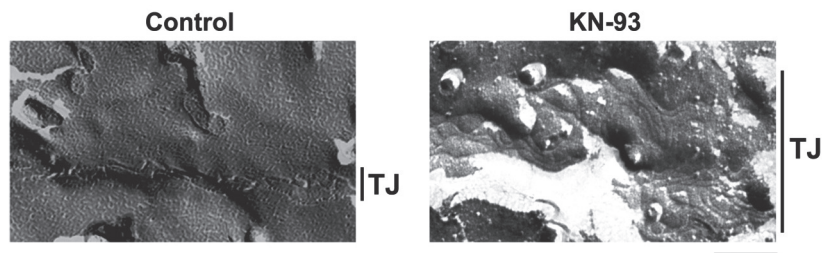


図3 マウス唾液腺由来の培養上皮細胞に KN-93 を最終濃度が 10 μ M になるように添加し、凍結切断レプリカ法による電子顕微鏡観察を行った。DMSO を処理した群に比べて、タイトジャンクションの形成領域が拡大している様子が観察された。スケールバーは、200 nm。

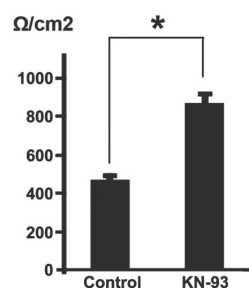


図4 マウス唾液腺由来の培養上皮細胞に KN-93 を最終濃度になるように添加し、TER の測定を行った。KN-93 で処理した細胞では TER が有意に上昇した。

が増加していることが明らかになった(図4)。

3. 2. KN-93 処理による Claudin の翻訳後修飾

KN-93 は細胞質に存在する CaMKII キナーゼの阻害剤であるが、これまでタイトジャンクションとの形成について研究されたことはなく、図に示したような効果をもたらす機序は全く不明である。タイトジャンクションが体内からの水分の蒸散を防ぎ皮膚の保湿に重要な構造であること、また外界からのアレルゲンや病原菌の侵入に対するバリアであることを考えると、CaMKII によるタイトジャンクションの形成が促進される分子メカニズムの詳細を解明することは重要であると考え、分子メカニズムに関する検討を行った。

まず、KN-93 で CSG1 細胞を処理した際に Claudin-1 のタンパク量が増加するか否か検討をウエスタンブロットにより行った。しかしながら KN-93 の処理によって Claudin-1 のタンパク量は変化していなかった。しかしながら、GFP-Claudin-1 を発現する L 細胞を用いて KN-93 で処理したときに、GFP-Claudin-1 のバンドが 2 本に分離し、特に高分子量側のバンドが顕著に減弱していることを見出した。

そこで、高分子量側のバンドに相当する Claudin-1 のバンドは、何らかの翻訳後修飾を受けたものである可能性を考えて、Claudin-1 の細胞質領域に存在するすべてのセリン・スレオニンアラニンに置換した変異体を作製した。191 番目のスレオニンをアラニンに置換した変異体 GFP-Claudin-1 (T191A) では、高分子量側のバンドしか出現しないことを見出した。さらに、T191A の非リン酸化型の変異株が高分子量側に移動する原因として、189 番目のリジンが恒常的にモノユビキチン化を受けていることがわかった。すなわち 191 番目のスレオニンのリン酸化状態によって、189 番目のリジンのユビキチン化状態が変化しており、KN-93 で処理した細胞では、191 番目のスレオニンのリン酸化が亢進することによって、モノユビキチン化される量が減少することが明らかになった。

KN-93 で処理した細胞では、Claudin-1 の 191 番目のスレオニンがリン酸化されることによって、モノユビキチン化される Claudin-1 が減少することによって、余剰の Claudin-1 が形質膜に蓄積した結果、過剰なタイトジャンクションが形成されると考えられる。上記の内容は全く新しいタイトジャンクション形成の制御機構であるため、論文報告を行った³⁾。

このように Claudin-1 のユビキチン化による制御が、タイトジャンクションの動的な制御に関わることを明らかにすることができた。現在は、Claudin-1 のユビキチン化に関わる酵素の探索を進めている。

4. 考察

皮膚の上皮細胞が持つタイトジャンクションは水分の恒常性を維持する必須の細胞膜構造である。保湿は皮膚の質感に大きな影響を与える要素である。一方で、皮膚のタイトジャンクションは、我々の体と外界を分け隔てる構造の実体であり、皮膚からの薬剤の吸収を障害する。このようなタイトジャンクションの機能を強化もしくは減弱させるシグナル情報伝達経路を同定し、人体への安全性の高い阻害剤や機能増強剤を開発することに成功すれば、それらを化粧品に添加することによってタイトジャンクションのバリア機能を制御することが可能となり、新しい化粧品の機能性成分に利用可能であると考えている。本研究で同定した CaMKII 阻害剤はそのまま化粧品など人体に使用することはできないが、CaMKII 阻害によるタイトジャンクションの形成促進の分子機構をさらに詳細に解析することによって、薬剤によって人為的に上皮バリア機能を強化させることができるのではないかと考えられる。近年、ヒトにおいて、皮膚の Claudin-1 の遺伝子多型 (SNP) とアトピー性皮膚炎の発症の関連に関する論文報告が為された⁴⁾。上皮バリアの破綻を原因とする慢性炎症の治療に向けて、さらに上皮バリアの制御に関わる分子機構の解明を引き続き目指していきたい。

(引用文献)

- 1) Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. : Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol.* 156, 1099-111., 2001
- 2) Shiomi R, Shigetomi K, Inai T, Sakai M, Ikenouchi J. : CaMKII regulates the strength of the epithelial barrier. *Sci Rep.*, 5, 13262, 2015
- 3) Yu HS, Kang MJ, Kwon JW, Lee SY, Lee E, Yang SI, Jung YH, Hong K, Kim YJ, Lee SH, Kim HJ, Kim HY, Seo JH, Kim BJ, Kim HB, Hong SJ. : Claudin-1 polymorphism modifies the effect of mold exposure on the development of atopic dermatitis and production of IgE. *J Allergy Clin Immunol.* 135, 827-30. 2015
- 4) Tokumasu R, Yamaga K, Yamazaki Y, Murota H, Suzuki K, Tamura A, Bando K, Furuta Y, Katayama I, Tsukita S. : Dose-dependent role of claudin-1 in vivo in orchestrating features of atopic dermatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 113, E4061-8. 2016

酸化ストレスの生体分子イメージングから迫る 対紫外線スキンケア分子の新規探索と機能評価

群馬大学大学院医学系研究科教育研究支援センター岩脇研究室

岩脇 隆夫

Oxidative stress has recently gotten a great deal of attention, because it is reported to be responsible for a variety of diseases and health concern and to be associated with fatigue and aging. Although oxidative stress is subject to occur everywhere of the body, skin cells are more exposed with oxidative stress by ultraviolet radiation, especially UV-A. The UV-related oxidative stress causes the protein degradation and accelerates the aging process in the skin cells. Thus, well-controlled oxidative stress needs for anti-aging of the skin cells. We have previously developed the gene constructs and model mice for visualizing oxidative stress in vivo. Here we also introduced the gene constructs into human-derived skin cells, and established experimental tools to easily measure oxidative stress in vitro. By using these tools, we discovered and evaluated the function of crocetin for anti-aging of the skin cells. Crocetin, is a carotenoid found in fruits of gardenia and saffron. We confirmed that crocetin mitigated oxidative stress and damage of the skin cells exposed to UV-A irradiation. These results indicate that crocetin might be potentially useful for protection against skin damage induced by UV-A.

1. 緒言

ストレスというと多くの人は心的なものを連想するが、生物の構成単位である細胞も外的および内的環境から様々なストレスに曝されている。それゆえに細胞はそれらストレスに対して順応できる分子メカニズムを発達させてきた。細胞レベルで感じとられるストレスの一種に「酸化ストレス」というものがあり、これは主に細胞内に発生する活性酸素が原因で生じるストレスである。この酸化ストレスは様々な疾患や健康問題の原因であることや、また疲労や老化とも密接に関連することが報告されるようになって、近年大きな注目を浴びている。さらには研究の世界だけでなく、美容の世界でも「酸化ストレス」は関心を集めていて、女性雑誌などでは酸化ストレスを解消する「抗酸化力」や「アンチエイジング」という言葉とともに特集が組まれるほどになっている。体のいたる所で酸化ストレスは発生する可能性を含んでいるのであるが、肌細胞ではとりわけ紫外線（特にUV-A波）が原因で酸化ストレスが生じやすい。この酸化ストレスは肌細胞内のタンパク質の酸化を引き起こし、肌の老化を進めてしまう。ゆえに肌細胞の老化を食い止めるには、酸化ストレスを上手くコントロールすることが重要である。そこで本研究では肌細胞で有用な抗酸化物質の新規探索および機能評価を行う。

私たちはこれまで主に小胞体ストレスや酸化ストレスなど



Screening and functional evaluation of molecules for anti-UV skin-care by using in vivo imaging of oxidative stress

Takao Iwawaki

Iwawaki Laboratory, Education and Research Support Center Graduate School of Medicine, Gunma University

の細胞ストレスについて研究を行ってきており、最近では酸化ストレス可視化モデルマウスの開発に成功している¹⁾。このマウスは酸化ストレス応答反応で重要な働きを担うNrf2の機能を巧妙に利用している。具体的には酸化ストレスレポーター遺伝子はNrf2の分解に関わるドメインとルシフェラーゼやGFP遺伝子の融合体が抗酸化応答エレメントで活性化されるように構成されている。このような遺伝子を持つマウスでは酸化ストレスに曝されると転写レベルでその酸化ストレスレポーター遺伝子が活性化される。さらに、その翻訳産物（酸化ストレスレポータータンパク質）は内在性Keap1の分解抑制から免れ、安定化することで光ようになるのである（図1）。

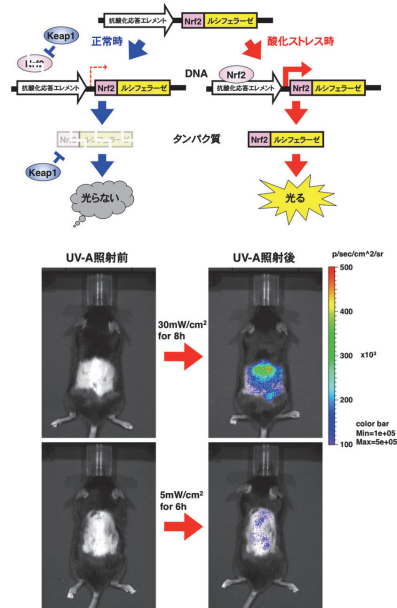


図1 上パネルはマウスに導入された遺伝子コンストラクトとその産物の酸化ストレス応答を模式的に表している。下のパネルはモデルマウスがUV-A紫外線照射された際のイメージング結果を示している。

2. 方法

株化肌細胞および試験管内再構成皮膚に先述の酸化ストレスレポーターを導入し、それらを用いて低分子化合物ライブラリーの中から紫外線誘導性酸化ストレスを軽減するものを探し出すこと、そしてその効果を評価することを目指した。具体的に使用した細胞は HEK001 細胞 (ATCC#CRL-2404) と NHEK-Ad 細胞 (Lonza#00192627) である。遺伝子導入方法としては一般的なリン酸カルシウム法、Effectene 法 (Qiagen#301425)、および Amaxa 法を順次試した。安定的な遺伝子導入株を選択する際の薬剤にはネオマイシン (シグマ #G8168) またはハイグロマイシン (InvivoGen#ant-hm-1) を使用した。ゆえにレポーター遺伝子はネオマイシン耐性遺伝子またはハイグロマイシン耐性遺伝子と共導入された。各遺伝子およびタンパク質の発現レベルはそれぞれ ABI 社の TaqMan プロブを用いたリアルタイム PCR 法および一般的に行われるウエスタンブロット解析または ELISA 解析により調べられた。レポーター (ルシフェラーゼ) 活性の測定には Dual luc assay キット (プロメガ #E1910) とルミノメーター (ベルトールド #LB9507) を用いた。レポーター (ルシフェラーゼ) 活性のライブイメージングには IVIS (Xenogen) を用いた。また活性酸素種の発生量を評価するために CM-H2DCFDA (Life Technologies#C6827) を用いた。

3. 結果

肌細胞を用いた研究は今回が初めてであったので、各 HEK001 細胞および NHEK-Ad 細胞の特徴をつかむところから実験をスタートさせた。HEK001 細胞を ATCC の推奨する条件で培養したところ、正常な増殖 (10 継代以上) を確認できた。NHEK-Ad 細胞も Lonza の推奨する条件で培養したところ、正常な増殖を確認できた。ただし、7 継代ぐらいで増殖が停止した。レポーター遺伝子の導入は低継代数で行うべきと考えた。安定的な遺伝子導入ではネオマイシン耐性遺伝子およびハイグロマイシン耐性遺伝子を選択マーカーとして用いることを考えたため、各細胞のネオマイシンおよびハイグロマイシンに対する感受性を確認することとした。その結果、1 週間の培養で完全に細胞を死滅させる濃度は、ネオマイシンが 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ハイグロマイシンが 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。酸化ストレス可視化用レポーター遺伝子の安定導入細胞株が得られた後、その品質確認を酸化ストレス誘導剤処理により行う予定であるため、各細胞の酸化ストレス誘導剤処理に対する反応性を確認しておく必要がある。そこで 3 種類の代表的な酸化ストレス誘導剤である亜硝酸ナトリウム (メルク #1.06277.1000)、ジエチルマレイン酸 (シグマ #D97703)、および過酸化水素 (ナカライ #18411-25) を様々な濃度で培地に加えて培養

し、細胞の生存性を確認した。また、HO-1 遺伝子の発現応答性も確認した。10 μM の亜硝酸ナトリウムを 8 時間処理したとき、HO-1 mRNA 発現レベルは非ストレス条件下の 70 ~ 120 倍に上昇する (図 2)。一方、100 μM のジエチルマレイン酸を 8 時間処理する場合や 200 μM の過酸化水素を 8 時間処理する場合でも HO-1 mRNA 発現レベルは非ストレス条件より上昇するが、亜硝酸ナトリウムに比べて、その程度は小さかった。したがって、安定導入細胞株の品質確認には 10 μM 亜硝酸ナトリウムの 8 時間を採用する。ちなみに HO-1 遺伝子は酸化ストレスにより活性化される Nrf2 を介して転写誘導されることが知られている。酸化ストレス可視化用レポーター遺伝子の安定導入細胞株を得るための遺伝子導入方法について GFP 発現プラスミドを用いて検討を行った。始めに最も安価に行うことができるリン酸カルシウム法を HEK001 細胞に試してみたが、GFP 陽性は全細胞あたり 1% 程度でしかなかった。続いて Effectene 法を試してみたが、GFP 陽性は全細胞あたり 2 ~ 3% 程度でしかなかった。そこで Amaxa 法を試してみたところ、GFP 陽性は全細胞あたり 60 ~ 70% であった。酸化ストレス可視化用レポーター遺伝子の安定導入細胞株を作成するにあたっては Amaxa 法を採用した。

HEK001 細胞へ酸化ストレス可視化用レポータープラスミドと内部標準用レポータープラスミドとネオマイシン耐性遺伝子発現プラスミドを 2 : 2 : 1 の割合 (質量比) で共導入した。15 日後、細胞からゲノム DNA を抽出し、PCR 法で導入遺伝子が保持されていることを確認した。また亜硝酸ナトリウムで酸化ストレス処理を行い、その 8 時間後にライブイメージング解析を行い、細胞溶解液のルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、酸化ストレス可視化用レポーターの活性は亜硝酸ナトリウム処理した方がしな

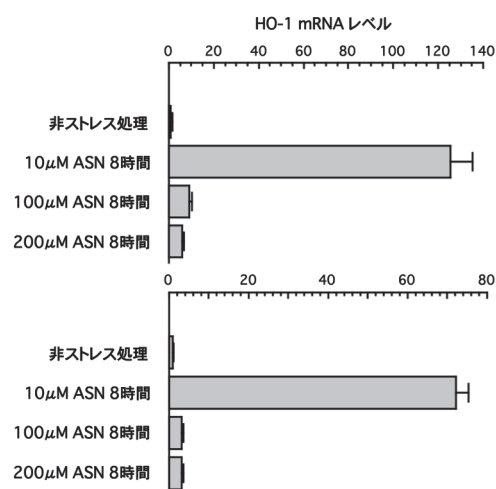


図2 各種濃度の亜硝酸ナトリウム (ASN) により処理された細胞における HO-1 遺伝子発現レベルを示す。上のヒストグラムは HEK001 細胞、下のヒストグラムは NHEK-Ad 細胞から得られたデータである。

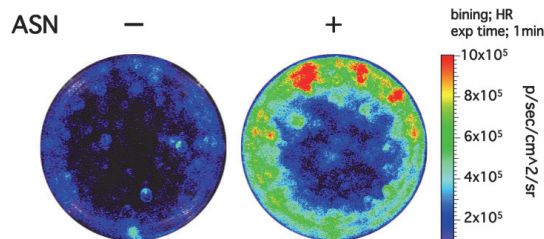


図3 酸化ストレスレポーター遺伝子を安定導入された HEK001 細胞におけるレポーター (ルシフェラーゼ) 活性のライブイメージング像を示す。亜硝酸ナトリウム (ASN) 処理により期待通り高レポーター活性が得られていることがわかる。

った方より 3.5 倍高かった (図 3)。一方、NHEK-Ad 細胞へもレポーター遺伝子を安定導入しようと試みたが、遺伝子導入後、細胞が十分な数に達する前に増殖が停止するため、これを諦めた。

2 種類の肌細胞のうち NHEK-Ad 細胞へのレポーター遺伝子安定導入はできなかったが、HEK001 細胞へは計画通り実行できた。ただ、この細胞の増殖速度が極めて遅かったため、また色々な条件検討が必要だったため、薬剤スクリーニングにずいぶん時間を取られたが漸く完了した。しかし結果はテストした低分子化合物ライブラリーの中には酸化ストレスを軽減するものが見出せなかった。一方で、本研究提案にはなかったが、国内で行っていた共同研究からクロセチンに紫外線誘導性酸化ストレスを軽減する効果²⁾が見出されたので本研究で樹立されたレポーター遺伝子安定導入細胞を用いて同効果の評価を行った。クロセチンはクチナシの実やサフランなどに含まれている黄色の天然色素で、カロテノイドカルボン酸の一つである。カロテノイドのうちβカロテンやリコピンには優れた抗酸化効果がよく知られているが、クロセチンはそれらメジャーなカロテノイドとは異なり両親媒性低分子化合物であり、体内へ取り込まれやすい性質を持つ。また抗酸化効果についても多くの報告があり、疲労回復や抗老化を謳った市販サプリメントなどに含まれて (特に目の) 健康を気にする人々からは注目を浴びている。しかしながら肌細胞におけるクロセチンの紫外線誘導性酸化ストレス軽減効果は不明であり、その効果は今回の研究で以下の通り示された。酸化ストレスレポーター遺伝子安定導入 HEK001 細胞へ UV-A 紫外線 (365nm 5mW/cm²) を 40 分間照射したところ、レポーター活性は非照射コントロール細胞に比べて 4.5 倍高かった (図 4)。また同様の実験を酸化ストレスレポーター遺伝子一過的導入 HEK001 細胞と NHEK-Ad 細胞で行ったところ、レポーター活性は UV-A 紫外線によって 4~4.5 倍上昇した (図 4)。さらにレポーター遺伝子を導入していない HEK001 細胞と NHEK-Ad 細胞で同様の実験を行い、酸

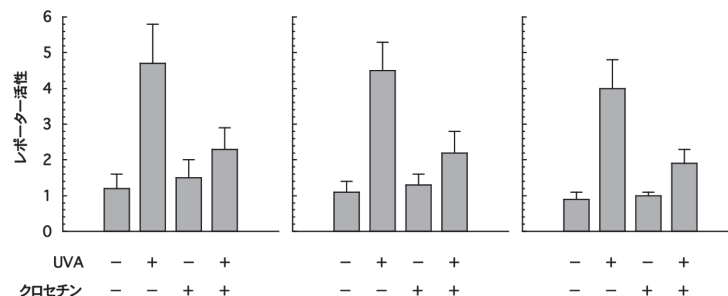


図4 UV-A 紫外線照射およびクロセチン添加の影響を酸化ストレスレポーター遺伝子により評価している。各ヒストグラムで用いられた細胞は、(左) 酸化ストレスレポーター遺伝子を安定導入された HEK001 細胞、(中) 酸化ストレスレポーター遺伝子を一過的に導入された HEK001 細胞、および(右) 酸化ストレスレポーター遺伝子を一過的に導入された NHEK-Ad 細胞。

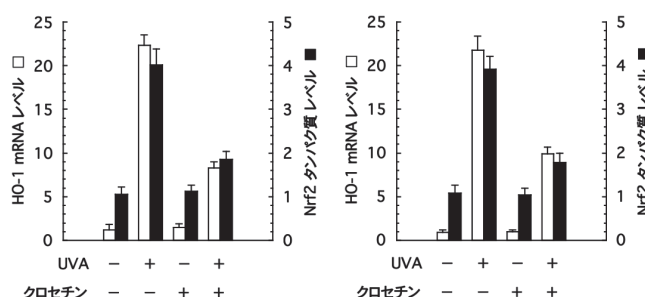


図5 UV-A 紫外線照射およびクロセチン添加の影響を HO-1 mRNA レベルと Nrf2 タンパク質レベルにより評価している。各ヒストグラムで用いられた細胞は、(左) HEK001 細胞と (右) NHEK-Ad 細胞。

化ストレス応答性分子である HO-1 mRNA および Nrf2 タンパク質の発現レベルを UV-A 紫外線照射と非照射間で比較したところ、UV-A 紫外線は両分子の発現レベルを顕著に高めた (図 5)。しかしながら UV-A 紫外線照射の 1 時間前にクロセチン (最終濃度 1 μM) を培地中へ加えると、上記のレポーターの活性上昇および酸化ストレス応答性分子の発現レベル上昇は幾分低く抑えられた (図 4 と 5)。次に活性酸素種の発生量についても UV-A 紫外線照射と非照射間およびクロセチン添加と非添加間で比較したところ、UV-A 紫外線は活性酸素種の発生量を顕著に高めるが、それはクロセチン添加によって部分的に軽減される結果が得られた (図 6)。

4. 考 察

私たちは今日までにイメージング技術を用いて簡便に酸化ストレスの評価ができる実験系を構築しており、それをヒトに由来するケラチノサイトへ導入することで肌細胞に特化した酸化ストレス評価を可能にした。これは抗酸化機能を有した低分子化合物のハイスループットな解析に適しており、有用な実験ツールとなることが期待される。実際、本研究では、以前より抗酸化機能性面で注目されていたクロセチンについてケラチノサイトでの UV-A 紫外線誘導性

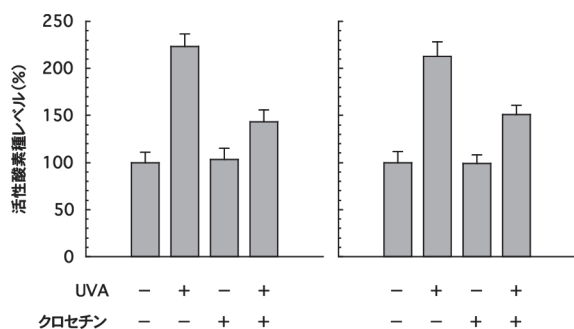


図6 UV-A 紫外線照射およびクロセチン添加の影響を活性酸素種の産生レベルにより評価している。各ヒストグラムで用いられた細胞は、(左) HEK001 細胞と(右) NHEK-Ad 細胞。

酸化ストレスに対する抗酸化性能を明らかにした。UV-A 紫外線照射に先立ってクロセチン処理を行うと、細胞内で発生する活性酸素種の量は抑えられ、これに伴って酸化ストレスにより活性化される応答分子の発現量も低下した。

このクロセチンによる抗酸化効果は他の細胞種では知られていたが、今回ヒトの肌細胞においても同効果を初めて確認できた。先にも述べた通り、クロセチンは既にサプリメントとして多くの方が口にしており、その安全性は高いと考えることができる。ゆえに本研究は今後のスキンケア商品開発において有意義な成果となるはずである。

(引用文献)

- 1) Oikawa D, Akai R, Tokuda M, Iwawaki T: A transgenic mouse model for monitoring oxidative stress, *Sci. Rep.*, vol. 2, no. 229, 2012.
- 2) Ohba T, Ishisaka M, Tsujii S, Tsuruma K, Shimazawa M, Kubo K, Umigai N, Iwawaki T, Hara H: Crocetin protects ultraviolet A-induced oxidative stress and cell death in skin in vitro and in vivo, *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 789, 244-253, 2016.

慢性皮膚炎モデルにおける HDC 遺伝子レポーターマウスを用いたヒスタミン産生細胞の同定

東北大学大学院工学研究科

大津 浩

Reducing the rate for contact dermatitis caused by cosmetic materials is crucial in cosmetology. Histamine is one of the physiological substances which produce itching sensation in contact dermatitis. We generated histamine-deficient mice by knocking out the gene for histamine producing enzyme, histidine decarboxylase (HDC), to be used for the analysis of histamine activity in vivo. The mechanisms of histamine activity in contact dermatitis were analyzed in mouse model which was produced by the repeated ointment of trinitro-chlorobenzene (TNCB) on their back skin. The inflammation of histidine decarboxylase knock out (HDC-KO) mice were milder compared to their wild type counterpart. The number of regulatory T cells (Tregs) in the dermis was found to be reduced by the existence of histamine. This control mechanism appeared to be transmitted by TGF- β 1 for its positive effect on the number of Tregs. The action of histamine is known to be transmitted through 4 types of histamine receptors (H1 to H4). H1 and H4 receptors among these receptors were pharmacologically found to transmit the signal of inflammation in this contact dermatitis model¹⁾. Including these information histamine is a key substance for producing noxious symptom in dermatological diseases e.g. chronic inflammation, would healing and contact dermatitis. The regulatory mechanisms of histamine synthesis, however, in their pathological contexts have not been completely clarified because of lack of experimental materials. We lately produced the reporter mice which produce fluorescent signal according to their expression of histidine decarboxylase gene. Since these gene-manipulated mice emit fluorescent signal when they are active in transcription of histamine-synthesizing gene, we could analyze the timing and source of cells for histamine production in disease model through observation of fluorescence using this reporter mice. Previously we generated plasmid-based reporter mice to this purpose, however, the mice were prove to be useless, since the emission of fluorescence was not limited to histamine producing cells. We produced lately a BAC (bacterial artificial chromosome)-based transgenic mice to dodge this problem. We will produce a model of contact dermatitis in the new transgenic mice and discuss the role of histamine producing cells in contact dermatitis.

1. 緒言

化粧品学において、皮膚の炎症は化粧品を開発していく上において重要な問題点である。皮膚の炎症を動物レベルで解析していくために、私たちは、trinitro-chlorobenzene (TNCB) などのハプテンを繰り返してマウス背部皮膚に塗布して慢性の接触皮膚炎を誘導し、表皮肥厚を起こすことを観察している。ヒスタミンは炎症において皮膚反応を起こす重要な生体内アミンである。ヒスタミンの合成酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素 (histidine decarboxylase HDC) をノックアウトさせた HDC-KO マウスを作製して、この接触性皮膚炎モデルを誘導し、野生型マウスと比較することによって、モデルにおけるヒスタミンの役割について検討している。その結果、HDC-KO マウスに接触皮膚炎を起こすと炎症の度合いが野生型に比較して弱く、ヒスタミンが接触皮膚炎を悪化させていることが判明している。その後、4種類のヒスタミン受容体(H1-H4受容体)のうち、特に、H1受容体とともにH4受容体もこのモデルにおいて重要であり、H1受容体阻害薬やH4受容体阻害薬で皮

膚炎の程度が軽快することを示している¹⁾。ヒスタミンはマウス皮膚において慢性炎症、皮膚創傷治癒、接触性皮膚炎など多岐に渡り影響を与えることが報告されており、化粧品学的にも重要であることがわかっている。

ところがヒスタミンの生体内での産生調節機構については不十分な点が多い。本研究ではヒスタミン産生源を明らかにすべく HDC 遺伝子の発現をモニターするレポーターマウスを作製した。このマウスを使うことによって、産生細胞および産生の調節機構を明らかにしようとしている。そのために HDC 遺伝子のレポーター遺伝子を工夫し、今回は BAC (Bacterial Artificial Chromosome) を利用し、プロモーター領域に蛍光色素のレポーター遺伝子を繋いだ HDC 遺伝子全体を含むような DNA でトランスジェニックマウスを作製し、上述した皮膚疾患モデルを再現する。ヒスタミンは必須アミノ酸の一種であるヒスチジンから生体内では唯一の酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) を介して産生されるため、この遺伝子の発現をモニターすることによりヒスタミンの産生について考察することが可能である。

2. 実験

マウス皮膚炎モデルでの実験

私たちはマウス皮膚にハプテンを繰り返して塗布することによって皮膚炎を起こし、HDC-KO マウスと野生型マウ

Identification of the histamine-producing cells in chronic allergic contact dermatitis model using HDC-gene reporter mice.

Hiroshi Ohtsu

School of Engineering, Tohoku University

スの反応と比較することにより、皮膚炎におけるヒスタミンの役割について検討している¹⁻³⁾。

以前にはプラスミッドを用いたHDC遺伝子発現のレポーターマウスを用意したが、このマウスはヒスタミン産生細胞以外にも非特異的に蛍光発光をするため、その後BACを用いたトランスジェニックマウスを作製することに予定を変更した。

計画は、接触皮膚炎モデルをトランスジェニックマウスで作製し、蛍光色素の強度と部位を病変部位で観察することである。近年T細胞、中でも制御性T細胞の皮膚アレルギー反応における重要性が明らかになってきており⁴⁾、ヒスタミンはアレルギー反応の惹起相ばかりではなく、炎症の感作相にも重要であることが明らかにされつつある。したがって、このアレルギー反応モデルにおいて感作相から惹起相に至る反応全体の中で、ヒスタミンの産生細胞は複数回、複数の種類の細胞に陽性にでることが予想でき、どの細胞のどの時相にでているかが興味深いと考えられる。その反応において、細胞特異的な表面マーカーを染色し、FACSにて解析し、蛍光の発光細胞の種類とその数について同定する。

さらに、ヒスタミンの反応経路において、その受容体であるH1～H4のうち、どの受容体を経由して皮膚疾患の増悪がみられるのかについて、それぞれの受容体のアゴニストとアンタゴニストをもちいることにより明らかにする。これによって、どのような薬剤が皮膚のアレルギー反応のどの時相に効果があるのかについて推測する。そして、その後化粧品を塗布して同様の実験を行なうことにより、化粧品によってヒスタミン産生細胞が出現するかどうかについての検討も進める。

3. 結果

3. a. BACを用いたHDC遺伝子トランスジェニックマウスについて

トランスジェニックマウスの作製

ヒスタミン合成酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) 遺伝子はマウスのChromosome 2に存在する全長約23kbの遺伝子である。この遺伝子は12エクソンからなる遺伝子で、エクソン1に既に翻訳開始点が存在するため、その翻訳開始点直前よりGFP遺伝子が入るように工夫した

プラスミッドを用意する。そのためには、HDC geneの入ったBAC (bacterial artificial chromosome) クローンを購入し、HDC遺伝子の転写開始点より637番目の塩基より、1777番目の塩基までPCRを用いて増幅する。増幅されたDNAをpGEM-T Easyに挿入し、クローン化する。このTA vectorを、multiple cloning siteにある2種類の制限酵素配列部位Sal IとApaIで消化すると、HDC遺伝子のPCR増幅部位を含む断片が切り出される。切り出された断片を予めクローン化していたHDC遺伝子のプロモーター約1kbを含むpBlue ScriptのHDCプロモーターの下流にあるSalIおよびApaI siteに挿入し、クローン化する(plasmid 1と命名)。GFP (green fluorescence protein)をmultiple cloning siteに含んだ7.1 IS GFP 3rd Versionより、XhoIとXbaIにてdouble digestionし切り出したGFP遺伝子を、pBlue Scriptの同様の制限酵素部位に挿入し、クローン化する。このプラスミッドのXbaI siteで再度酵素処理し、直鎖上にしたプラスミッドをKlenowによって平端化しておく。pBS-FRT-Neo-FRTよりKpnIとEcoRVで切り出しKpnI siteをT4 DNA polymeraseしてこちらも平端化したNeo遺伝子断片を、予め平坦化しておいたGFPを含むプラスミッドにblunt end ligationし、GFPの下流にNew遺伝子が挿入されたプラスミッドを用意する。このプラスミッドをXhoIとNotIで消化し、Klenow処理をして、NotI siteを平端化しておく。このDNA断片はGFPの下流にNeo遺伝子が繋がった断片である。plasmid1をSalIおよびHincII siteで消化したHDC promoterとHDC 1st Intronが入った断片と、GFP + Neo断片をligationすると、XhoI siteとSal I siteがコンカテマーであるために繋がり、HDC promoterとHDC 1st Intronの間にGFPとNeoを含むpBlue Scriptができて上がる。このプラスミッドをNotI siteで切り出すと、HDC promoterとHDC 1st Intronの間にGFPおよびNeoを含む断片ができて、その断片とHDCを含むBAC DNAとの間でhomologous recombinationを起こさせる。その結果、HDC promoterと1st Intronの間にGFPおよびNeo遺伝子が入ったBACが完成する。このBAC cloneの入った大腸菌をArabinose存在下で培養するとNeo遺伝子の両端に存在下CREが互いに反応してNeo遺伝子のないBACが完成する。完成したBAC cloneの簡単な構造を示す(Fig. 1)。

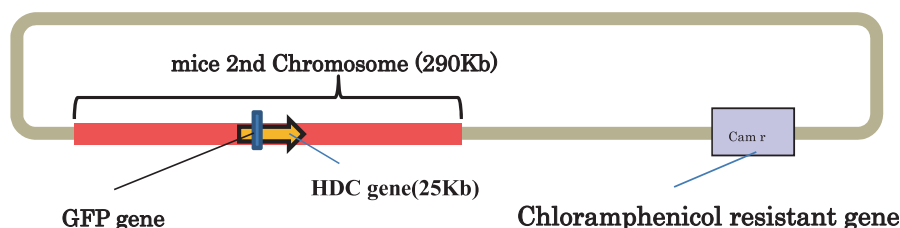


Fig. 1 完成した HDC-GFP BAC clone

この、BACクローンをmouse 受精卵に打ち込みその個体を発生させることにより、レポーターマウスが完成する。発生してきた個体の尾からゲノムDNAを抽出し、PCR法にて個体にGFP geneやChloramphenicol resistant geneの存在の有無を確かめたところ、高率にBACクローンが存在するマウスが発生してきた(Fig. 2)。

3. b. トランスジェニックマウスの確認

3. b. 1. 遺伝子の確認

受精卵への打ち込みにより発生した7個体内、No 569とNo572の2個体のマウスにBAC DNAが挿入されていることが確認された。

3. b. 2. 蛍光の確認

次に、このレポーターマウスの各臓器の切片を用意して、HDC産生細胞が蛍光を発するかどうかを蛍光顕微鏡にて

確認する。その結果、HDC遺伝子が発現する細胞群(脳: TMN (結節乳頭核)細胞、胃: ECL細胞など)で、GFPが染色されていた (Fig. 3: TMN cells 結節乳頭核、ECL エンテロクロマフィン様)。

さらにここで、脳視床下部や胃体部におけるGFP発現は免疫染色で確認しているがHDC産生細胞と一致しているかどうかについて確認が必要であった。レポーターマウスから摘出した胃におけるGFPとHDCの免疫染色を遂行した。近接する切片を使ってGFPの一次抗体(Cell Signaling Technology)とHDCの一次抗体(Acris Antibody)を反応させ、その後、ペルオキシダーゼを標識した二次抗体と反応させ、DAB染色キットを用いて二次抗体が結合した部位を褐色に発色させた。染色パターンはGFPとHDCで一致していることが判明した。また小腸壁での細胞においては、肥満細胞の他に、好酸球や好塩基球

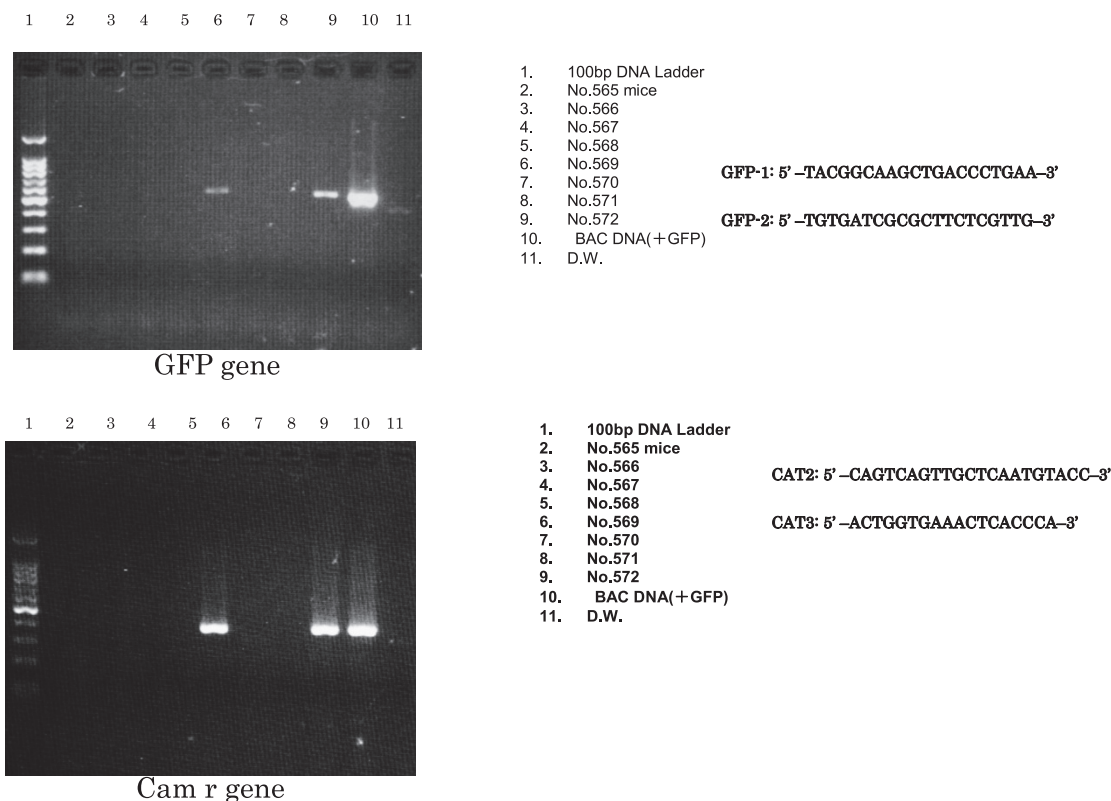


Fig. 2. 初代マウスの遺伝子解析
 挿入遺伝子内 GFP gene, Cam r gene の PCR による確認

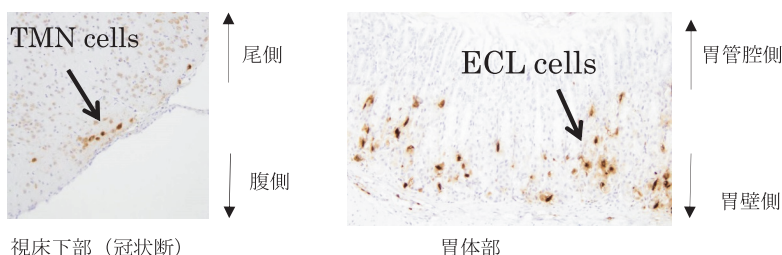


Fig. 3 GFP の免疫染色

にも蛍光の発光がみられ、現在まで考えられていた以上に多種類の血液細胞にヒスタミンが存在する可能性が出てきている。このため、今後様々な病態モデルを使った実験においても新たなヒスタミン産生細胞を認める可能性が高いと考えている。

3. c. 皮膚アレルギー実験

私たちは、TNCBを繰り返し塗布する実験系において、通常鱗屑をとともう紅斑が起り、皮膚の生検をすると表皮の増殖と細胞間の浮腫および真皮の線維化および細胞浸潤が起きていることを確認しているが、ヒスタミンを欠く HDC (-/-) マウスではその程度が減弱することを確認している (Fig. 4, 参考論文より改変)。トルイジンブルーで染色すると、肥満細胞数が減少しており、また、IL-4の皮膚内での濃度も優位に抑制されていた。

また、組織中の制御性T細胞の数も CTLA-4や Foxp3 に対する免疫染色で染色することによって計測すると、HDC (-/-) マウスに優位に増加していることが明らかとなった。次に TGF- β 1 のレベルを、制御性T細胞の遊走におよぼすサイトカインの代表として測定した。その結果、HDC (-/-) マウスでは TGF- β 1 の組織内での濃度はノックアウトマウスでは増えており、TGF- β 1 が制御性T細胞の遊走を促している可能性が出てきた。TGF- β 1 の直接的な影響について調べるために、毎日の TNCB の塗布の直前に、TGF- β 1 やその抗体を直接マウスの背部真皮に注射して制御性T細胞の数を測定してみた。その結果は、TGF- β 1 を注射することにより制御性T細胞の指標となる Foxp3 陽性細胞や CTLA-4 陽性細胞が増え、逆に、高 TGF- β 1 抗体を注射することによりこれらの陽性細胞数が減弱した。また BALB/c を用いた実験では、H1 受容体拮抗剤であるオロパタジン、H4 受容体拮抗剤である JNJ777120 の作用で、ともに TGF- β 1 や Foxp3 陽性細胞が上昇していることが分かった (Fig. 4)。

これらの基礎的な実験を踏まえて来年度はトランスジェニックマウスを用いた皮膚アレルギー実験を試行する予定

である。

4. 考察

ヒスタミンはアナフィラキシー様の反応を示す物質として約1世紀前に発見され、研究史が長いものの、最近まで知られているヒスタミン受容体は H1 と H2 の2種類のみであった。神経節前線維に H3 受容体が存在することは提唱されていたが、cDNA のクローニングが発表されたのは1999年である。更に H4 受容体が末梢白血球から見つかり cDNA のクローニングの報告は2000年である。このようにヒスタミンは長い研究史があるものの、近年、分子生物学の手法がとられるようになってから新しい機能が次々と発見されている。皮膚の炎症において、ヒスタミンはその進展に重要な影響を与え、発赤、腫脹、痒みなどを促す起炎物質である。私たちはヒスタミン合成酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素遺伝子をクローニングし、ノックアウトマウスを作製することによって、ヒスタミンを合成不能なマウスを得て実験を行ない、血管新生、肉芽種の形成にはヒスタミンの存在が重要であることと、その反応は H2 受容体を介することを明らかにした⁵⁾。従来までは皮膚炎は H1 受容体を介すると考えられていたが H4 受容体も重要であることが報告された^{1,6)}。このように皮膚炎には3種類のヒスタミン受容体すなわち H1、H2 および H4 受容体が重要であることがわかる。従って、皮膚炎におけるヒスタミンの作用は単純ではなく、今後、新しいトランスジェニックマウスを使った実験をすることにより、ヒスタミンの接触性皮膚炎における役割は、より詳細な解析が行なえる。

皮膚アレルギーの実験系において、ハプテンを繰り返し塗布することによって、皮膚疾患を慢性化させて、CACD (chronic allergic contact dermatitis) のモデルとなる⁷⁾。制御性T細胞は免疫の恒常性維持や自己免疫反応の予防に必要であるとともに、エフェクターT細胞を抑えて接触皮膚炎を改善させることが証明されている⁸⁾。ところが、制御性T細胞はCACDにおける働きがよくわかってはいない。

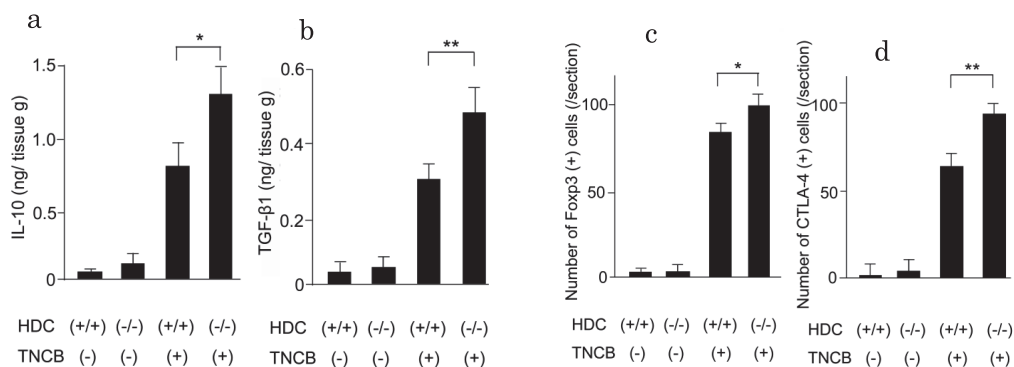


Fig. 4 HDC-KO マウスの慢性接触皮膚炎におけるサイトカインや制御性T細胞数の増強作用 (引用文献 11 より改変)

今回の実験によって、ヒスタミンは制御性T細胞の皮膚組織への遊走をおそらくTGF- β 1を介してコントロールすることが分かった。制御性T細胞におけるFoxp3は炎症の制御に重要であることはこの遺伝子の機能を無くさせる変異をいれたマウスでは多臓器における炎症反応が起きることが示されているからである⁹⁾。制御性T細胞を動物に外部から加えると接触性皮膚炎におけるマスト細胞の遊走や活性を抑え、炎症性サイトカインの産生を抑制することが知られている¹⁰⁾。このことは、CACDでもどのように考えられ、わたしたちの今回の報告でもマスト細胞の遊走やIL-4のレベルが抑えられていた¹¹⁾。制御性T細胞の抑制効果はCTLA-4を経由している可能性があることがCTLA-4への抗体を使った実験で示されている¹²⁾。気管支喘息のモデルにおいて、制御性T細胞はIL-10の産生を介してTh2細胞主体のアレルギー反応を抑えることが報告されているが¹³⁾、私たちもHDC (-/-) マウスではIL-10が組織で上昇してきたことを考えると、もし同様の機構が起きているとするとCACDの皮膚肥厚反応の抑制がIL-10を介して起きている可能性があると考えている。また、TGF- β 1が制御性T細胞を誘導してくる際にIL-2が必要であることが示されており¹⁴⁾、TGF- β 1を加えたマウスがIL-2が上昇してきた結果を鑑みるに、これらのサイトカインが相乗的に制御性T細胞を増やし、それによってCACDにおいてはエフェクターT細胞をコントロールする機構も考えられる。

本研究の中心課題は遺伝子改変マウスを用いたヒスタミンの接触皮膚炎に与える影響の研究である。これは化粧品を皮膚に塗布した際に起こりがちな接触皮膚炎をコントロールするために重要な情報を提供する。私たちが作製した新しいトランスジェニックマウスはヒスタミン合成が転写レベルで活性化したときに蛍光を発するためこのマウスで接触皮膚炎を起こし、蛍光顕微鏡を用いて観察すれば1)ヒスタミン合成細胞、2)ヒスタミン合成の時期がわかる。最近の研究によると従来知られているマスト細胞、マクロファージ、神経細胞に加え、好中球、好塩基球もヒスタミンを産生し、皮膚ケラチノサイト、樹状細胞からの産生報告もある。化粧品によっては、ヒスタミン合成促進あるいは合成抑制に働く可能性があり、基本的に合成抑制の基材を使うように開発を進めるための動物モデルの指標になる。以上のように、本研究課題の成果は医学的基礎知識を拡充させるとともに、コスメトロジーにおける基材の選択に役立たせる上でも重要な情報を提供すると考えている。

5. 総括

本報告ではトランスジェニックマウスの作製とその評価および現在までの皮膚アレルギー実験の結果をまとめた。今後、実際用意したトランスジェニックマウスを用いて、

皮膚アレルギーモデルを作製し、ヒスタミンの産生源となる細胞の同定を行なっていく予定である。

(引用文献)

- 1) Seike M, Furuya K, Ohmura M, Watanabe K and Ohtsu H. Histamine H4 receptor antagonist ameliorates chronic allergic contact dermatitis induced by repeated challenge. *Allergy* 65, 319-326, 2010.
- 2) Seike M, Ikeda M, Kodama H, Terui T and Ohtsu H. Inhibition of scratching behavior caused by contact dermatitis in histidine-decarboxylase gene knockout mice. *Exp Dermatol* 14, 169-75, 2005.
- 3) Hamada R, Seike M, Kamijima R, Ikeda M, Kodama H and Ohtsu H. Neuronal conditions of spinal cord in dermatitis are improved by olopatadine. *Eur J Pharmacol* 547, 45-51, 2006.
- 4) Gomez de Agüero M, Vocanson M, Hacini-Rachinel F, Taillardet M, Sparwasser T, Kissenpfennig A, Malissen B, Kaiserlian D, Dubois B. Langerhans cells protect from allergic contact dermatitis in mice by tolerizing CD8(+) T cells and activating Foxp3(+) regulatory T cells. *J Clin Invest* 122, 1700-11, 2012.
- 5) Ghosh AK, Hirasawa N, Ohtsu H, Watanabe T and Ohuchi K: Defective angiogenesis in the inflammation granulation tissue in histidine decarboxylase-deficient mice but not mast cell-deficient mice. *J Exp Med* 195, 973-982, 2002
- 6) Dunford PJ, Williams KN, Desai PJ, Karlsson L, McQueen D and Thurmond RL. Histamine H4 receptor antagonists are superior to traditional antihistamines in the attenuation of experimental pruritus. *J Allergy Clin Immunol* 119, 176-83, 2007.
- 7) Wang G, Savinko T, Wolff H, Dieu-Nosjean MC, Kemeny L, Homey B, Lauerma AI and Alenius H. Repeated epicutaneous exposures to ovalbumin progressively induce atopic dermatitis-like skin lesions in mice. *Clin Exp Allergy*. 37, 151-61, 2007
- 8) **Tomura M**, Honda T, Tanizaki H, Otsuka A, Egawa G, Tokura Y, Waldmann H, Hori S, Cyster JG, Watanabe T, Miyachi Y, Kanagawa O and Kabashima K. Activated regulatory T cells are the major T cell type emigrating from the skin during a cutaneous immune response in mice. *J Clin Invest*. 120, 883-93, 2010
- 9) Lin W, Truong N, Grossman WJ, Haribhai D, Williams CB, Wang J, Martín MG and Chatila TA. Allergic dysregulation and hyperimmunoglobulinemia

- E in Foxp3 mutant mice. *J Allergy Clin Immunol.* 116, 1106-15, 2005.
- 10) Su W, Fan H, Chen M, Wang J, Brand D, He X, Quesniaux V, Ryffel B, Zhu L, Liang D and Zheng SG. Induced CD4+ forkhead box protein-positive T cells inhibit mast cell function and established contact hypersensitivity through TGF- β 1. *J Allergy Clin Immunol.* 130, 444-52, 2012
- 11) Tamaka K, Seike M, Hagiwara T, Sato A and Ohtsu H. Histamine suppresses regulatory T cells mediated by TGF- β in murine chronic allergic contact dermatitis. *Exp Dermatol.* 24, 280-4, 2015.
- 12) Thornton AM, Piccirillo CA, Shevach EM. Activation requirements for the induction of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *Eur J Immunol.* 34, 366-76, 2004.
- 13) Kearley J, Barker JE, Robinson DS and Lloyd CM. Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J Exp Med.* 202, 1539-47, 2005.
- 14) Davidson TS, DiPaolo RJ, Andersson J and Shevach EM. Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol.* 178, 4022-6, 2007.

(財団事務局追記)

著者は本助成研究の期中に所属異動となり、採択課題の継続が困難になったため、中間時の報告を研究完了報告として掲載します。

レチノイン酸の皮膚内濃度モニタリングと新規アンチエイジング分子の同定への応用

滋賀医科大学解剖学講座生体機能形態学部門

岡野 純子

It has been noted that retinoic acid (RA) is effective for the anti-aging action in the skin. Topical treatment with RA on the skin improves tension and elasticity by decreasing wrinkles, however, its mechanism has not been fully determined. The one of impediments in this research field is that we cannot visualize endogenous RA level in the skin. Since RA is not a molecule but a compound, it is impossible to establish a mouse model by delete directly RA. Thus, we aimed to determine key molecule(s) associated with RA signaling in the skin and then attempted to establish mice in which we can visualize endogenous RA level by making use of the molecule(s). Targeting vector was designed and homologous recombination was performed in zygotes. As a result, chimera mice were delivered. This mouse model will be a powerful tool to analyze anti-aging actions of RA as well as effects of other anti-aging products on the skin.

1. 緒言

レチノイン酸 (Retinoic acid : RA) は表皮細胞においてターンオーバーを促進し、真皮細胞においてコラーゲン生成を増加させるため、小皺、ハリ改善作用がある。従って昔からアンチエイジング物質として注目されてきた¹⁾。しかし、レチノイン酸の皮膚におけるアンチエイジングのメカニズムは依然不明である。分子生物学の進歩により、レチノイン酸セレプターが次々クローニングされた。またその後、トランスジェニックマウス作成技術が発展し、次々とレセプターノックアウトマウスが作られたが、1つあるいは2つのレチノイン酸レセプターをノックアウトしても、予想した如く皮膚に著明な表現型は現れず、RAの皮膚における機能解析は困難であった。これは、レチノイン酸レセプターは大きく2種類 (Retinoic acid receptor : RAR, Retinoid X receptor : RXR) に分けられるが、それぞれアイソタイプ(- α , - β , - γ)を持ち、さらにそれぞれのアイソタイプにサブタイプ (-1, -2, -3) が存在し、それぞれが相補的な働きをするため、標的レセプターをノックアウトしても他のレセプターが失われた分子の働きを補ってしまうためであると考えられている。一方、レチノイン酸シグナリングに関わるレセプター以外の分子の皮膚における解析は未だ十分とはいえない。そこで、本研究においては、まずRAシグナリングに関わる分子のうち、皮膚において豊富に発現している分子を探索した。次に、皮膚におけるRA濃度をRAレセプターを用いて再検証した。最後に皮

膚においてRA濃度を可視化することを目標とし、現在のこの課題に取り組んでいる。

2. 方法および結果

2. 1.

2. 1. 1. レチノイン酸シグナリングに関わる分子の、皮膚における遺伝子発現解析

レチノイン酸が皮膚においてアンチエイジング作用を持つということは、皮膚をレチノイン酸で処理するとレチノイン酸シグナリングに関わる分子の発現変化があると予想できる。そこで、どの分子が皮膚の正常発生において豊富に発現しているかを検討した。まずレチノイン酸レセプター (Retinoic acid receptor : RAR, Retinoid X receptor : RXR) の発現を免疫染色およびin situ hybridizationを用いて調べたが、はっきりとした特異的発現パターンは見られなかった。これは、レチノイン酸レセプターに対する抗体はRARおよびRXRのサブタイプを判別することはできないことが原因と考えられた。次に、RARあるいはRXRの個々のアイソタイプのRNA in situ hybridizationのprobeを合成し、in situ hybridizationを試みた。しかし調べたレセプターのうちで、皮膚に特異的に発現するものを見つけることはできなかった。

よって、従来の活性リガンド (RA) が存在する部位にレセプターがありき、という概念では解析が難しいと考え、RAは、合成酵素 (retinaldehyde dehydrogenase : Raldh1, -2, -3) と分解酵素 (Cyp26 : Cyp26a1, -b1, -c1) のバランスによってその局在が決定される、という観点から解析を行うことにした (図1)。そこでRaldh1, -2, -3, Cyp26a1, -b1, -c1のin situ probeを作成し、in situ hybridizationを行ったところ、Cyp26b1のみに真皮および毛乳頭細胞に特異的な発現パターンが観察された (図2)。



Monitoring of endogenous retinoic acid levels in the skin to elucidate the anti-aging role of retinoic acid

Junko Okano

Department of Anatomy and Cell Biology,
Shiga University of Medical Science

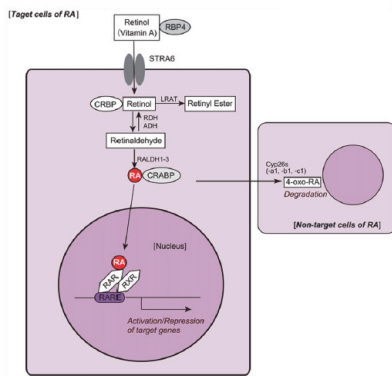


図1 レチノイン酸シグナリングのシエマ³⁾

RA 標的細胞 (左) において、レチノール/RBP 4 複合体は STRA6 から細胞質内に入る。細胞内に入ったレチノールは CRBP (cellular retinol-binding protein) に結合し、LRAT (lecithin retinol acyltransferase) によってエステル化されて、細胞質内に貯蔵される。あるいは、RDH/ADH (retinol dehydrogenase/alcohol dehydrogenase) によって Retinaldehyde に酸化される。さらに Retinaldehyde は Raldh1-3 によって RA に変換される。CABP (cellular retinoic acid binding protein) と結合した RA は核に移行し、ダイマーを形成する転写因子 RAR/RXR と結合する。RA-RAR/RXR は RA 応答配列 (RA responsive element) に結合して標的分子の活性化および抑制化を行う。

RA の非標的細胞 (右) においては、RA は Cyp26s に分解されてしまう。

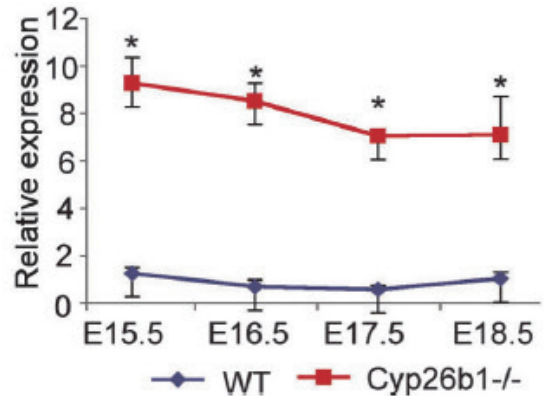


図3 皮膚発生・分化における RARβ の発現を示す。青：野生型マウスから採取した皮膚における RARβ の発現、赤：Cyp26b1^{-/-} マウスから採取した皮膚における RARβ の発現。

比較して 8 - 10 倍ほど発現が上昇していた (図 3、赤)。Cyp26b1^{-/-} マウスの皮膚は野生型マウスと比べて表皮の肥厚、毛包の分化停止が見られたことから、これは RA を分解する Cyp26b1 が皮膚組織で欠損しているために起こったと考えられる。すなわち、適切な RA 濃度は正常皮膚および毛包発生に必要であり、その調節は Cyp26b1 が担っていることが判った。

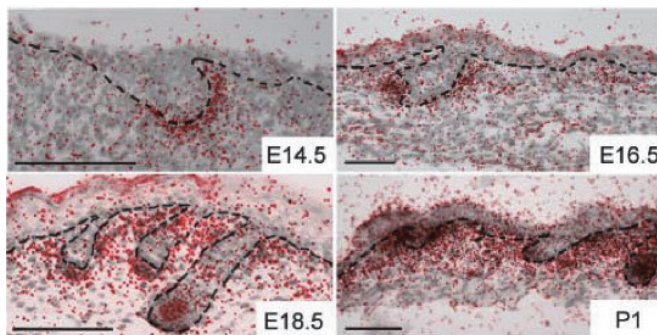


図2 皮膚発生および分化における Cyp26b1 の発現

Cyp26b1 の発現 (赤) を示す。皮膚発生が開始する胎生 14.5 から毛包周囲の間葉細胞に発現し、発生が進むに従い真皮、毛乳頭に強い発現を認める。

2. 1. 2. 皮膚のレチノイン酸の濃度の検証

レチノイン酸は分子ではなく化合物であり、分子量 300 と非常に小さいので、直接可視化するのは非常に困難である。多くは、レチノイン酸の direct target である RARβ の遺伝子発現をレチノイン酸の濃度とみなしている。そこで、マウスの胎児皮膚を経時的に採取し、正常発生および出生後の皮膚分化におけるレチノイン酸の発現を検証した。その結果、皮膚が発生・分化を開始する胎生 15.5 日から皮膚が成熟する胎生 18.5 日まで持続的に有意な RARβ の発現を認めた (図 3、青)。次に皮膚において特異的発現が観察された Cyp26b1 を全身で欠損させたマウス (Cyp26b1^{-/-} マウス) の RARβ の発現を調べたところ、正常マウスと

2. 2. レチノイン酸濃度の可視化

2. 2. 1. レチノイン酸シグナリングに関わる分子の、皮膚における遺伝子発現解析

皮膚においてレチノイン酸を可視化するために、まず 2. 1. に倣って RARβ の RARE を 3 回リピートした上流に hsp68 プロモーターおよび LacZ 配列をつないだ配列をゲノム内に持つトランスジェニックマウスの利用を試みた (以下 RARE-lacZ マウスと称する)。このマウスは、個体発生早期のマウスで、Raldh が発現する領域に LacZ が重複し、Cyp26s が発現する領域には決して重複しないことから、組織内の RA 濃度を反映することが過去の文献から判っている⁴⁾。皮膚は、個体発生の後期から発生・分化を始めることから、RARE-lacZ マウスの使用は今まで検証がなされていなかった。そこで RARE-lacZ マウスを用いて胎生 15.5-18.5 日の皮膚を用いて LacZ 染色を行った。また、RARE-lacZ マウスと Cyp26b1^{+/-} マウスを交配させて RARE-lacZ ; Cyp26b1^{-/-} マウスを作成し、Cyp26b1 を欠損することで体内 RA 濃度をあげた場合の皮膚 RA 濃度を検証した。その結果、正常皮膚では、胎生 15.5 日では皮内筋、胎生 16.5 日では皮内筋および periderm (周上皮)、胎生 18.5 日では皮内筋および真皮に強い LacZ の局在が観察された。また、RARE-lacZ ; Cyp26b1^{-/-} マウスの皮膚の発現パターンは胎生 15.5, 16.5 日は野生型と比べて同様な染色パターンを示し、胎生 18.5 日においては、真皮内に LacZ 発現が見られなかった (図 4)。

これは、2.1. の in situ hybridization に相反する結果である。すなわち、Cyp26b1 の発現する部位は RA が分解されているので RA は存在しないことが大原則だからである。従って、Cyp26b1 を欠損させたマウスでは基本的に RA 濃度が上昇するため、RARE-lacZ ; Cyp26b1^{-/-} マウスでは LacZ 染色が Cyp26b1 の発現領域に観察されることが他の臓器・組織で既に発表されている。試しに正常皮膚を用いて表皮と真皮とを分けた後、Cyp26b1 のリアルタイム PCR を行って見たが、真皮に優位な発現を認め、in situ hybridization の結果を支持するものであった。従って、RARE-lacZ マウスは少なくとも皮膚においては、RA 濃度を正確に反映していないことが判り、当マウスを用いて RA 濃度を可視化することはできないと結論した。

2.2.2. Cyp26b1 レポータートランスジェニックマウスの作製

そこで、免疫染色にても曖昧な結果しか出なかった

RARβではなく、真皮に豊富に発現していたCyp26b1を可視化すれば、皮膚におけるRA濃度を正確に観察できると考えた。まず、技術的に操作しやすいCyp26b1レポータートランスジェニックマウスの作製を試みた。Cyp26b1を含むBAC cloneを購入し、LacZを下流に持つtargeting vectorを作製した。これをマウス受精卵にインジェクションし、偽妊娠マウスに移植して数種類のラインを作製した。4ラインが得られ、発現を確認するためLacZ染色を行った。このうち、1ラインにおいて皮膚に強い発現が見られたため、詳細に検討した。しかし、LacZ発現は真皮より表皮に強く発現しており、これはCyp26b1の発現パターンと矛盾する。従って、この方法ではCyp26b1の発現を再現することはできないと考え、次の2.2.3の実験に移行した。

2.2.3. Cyp26b1 レポーターノックインマウスの作製

よって、今度は蛍光タンパクにIRES (Internal

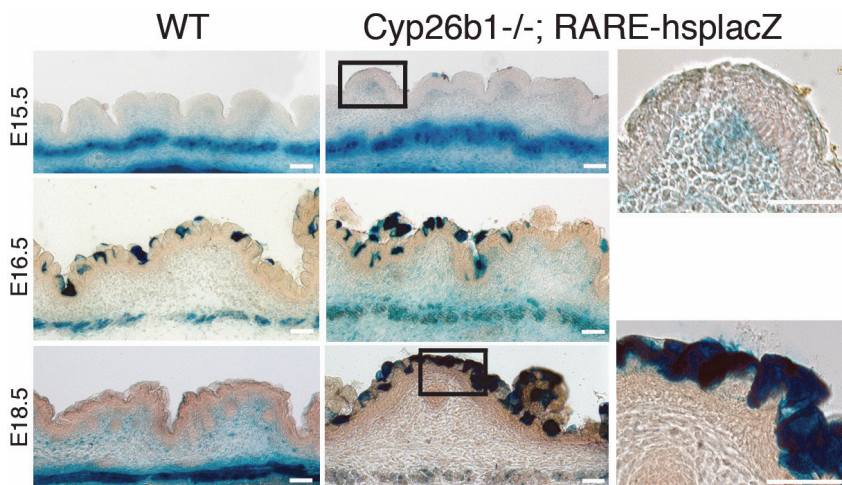


図4 RARE-lacZ マウスを用いた皮膚の RA 濃度可視化の試み

ライン# 31 トランスジェニック+

ライン# 31 トランスジェニック-

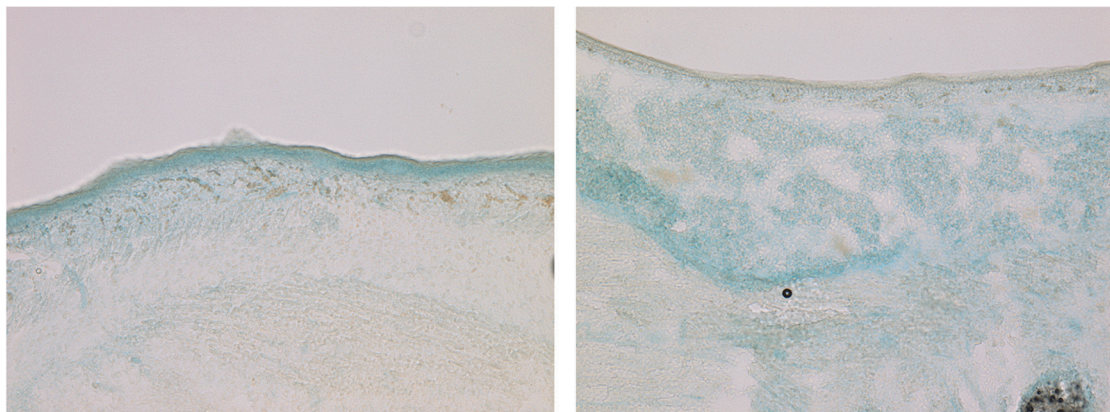


図5 左の Cyp26b1 に LacZ が入った胎児個体 (胎生 16.5) では、真皮より表皮に強い LacZ の発現を認めた。さらに右の Cyp26b1 に LacZ が入っていない個体 (同じ偽妊娠マウスから産まれた対照群の個体) においても真皮に LacZ の発現を認めた。この発現強度は、左の真皮における LacZ 発現と強度が類似しており、従って左の真皮における LacZ 発現は非特異的と考えられる。

Ribosome Entry Sites) をつけ、Cyp26b1 の 3' UTR にノックインしてレポーターマウスを作製することにした。この方法を用いると確実に Cyp26b1 の発現を蛍光タンパクにて再現することができる。DT、Ires-Venus、pgk-neo、FRT のカセットが入った標的ベクターと、ポジティブコントロールベクターを作成した。ポジティブコントロールベクターを ES 細胞に導入し、薬剤選択したコロニーからスクリーニングプライマー検定用ゲノム DNA を調整した。次に短腕側プライマーを 3 種類デザインして PCR によるスクリーニングの条件を最適化した。

標的ベクターを ES 細胞に導入して、ネオマイシンで選択後、100 クローンを取り出して増殖させ、スクリーニング用ゲノム DNA を調整した。これに PCR を施行して相同組換え体をスクリーニングした。相同組換え体が 6 クローン採取できたので、さらに長腕側のサザンプロットを行い、短腕と長腕の両側で正しく相同組換えが起こっていることを確認した。このうちの 2 クローンの ES 細胞を胚細胞期にインジェクションし、仮親に移植した。1 回目の移植ではキメラマウスが得られなかったため、もう一度クローンを取り直して移植した。今回はキメラマウスが生まれたので、現在交配して生殖細胞への寄与を確認中である。

3. 考 察

レチノイン酸はリガンドなので、そのレセプターを解析するのが王道であり、本研究もそこから着手したが、免疫染色や in situ hybridization ではどのレセプターも皮膚におけるクリアカットな発現を得ることができなかった。レチノイン酸シグナリングの場合非常にレセプターが多くかつ機能的に重複していることが、解析の大きな壁になっていると考えられた。そこで視点を変え、レチノイン酸合成-分解の観点から発現解析を行い、合成または分解酵素の中で皮膚においては分解酵素である Cyp26b1 のみの特異

的に発現していることを明らかにすることができた。

次に、皮膚発生および分化における RA 濃度を明らかにするため、再度レセプターを利用した解析を行ったが、この実験は上手くいき、RA は皮膚発生が始まる時期から一定の濃度で安定して皮膚に存在していることが判った。

さらに RA 濃度を可視化するため、まずすでに発表されたマウスを用いたが、皮膚の RA 濃度を正確に反映しているとは言いがたいことが上記の実験から判断することができた。よって、BAC (人工染色体) を用いたノックインレポーターマウスを作成する戦略に切り換えた。最初の仮親からはキメラマウスが生まれなかったため、もう一度同じ工程を繰り返すことになり結局非常に時間がかかってしまったが、次の試みで生まれたので、現在世界初のレチノイン酸可視化マウスを作るべく努力している段階である。

(引用文献)

- 1) Darienski R, Surber C, Fluhr JW: Topical retinoids in the management of photodamaged skin: from theory to evidence-based practical approach, *Br J Dermatol.* 163 (6), 1157-65, 2010.
- 2) Ross S, McCaffery P, Drager U et al.: Retinoids in embryonal development, *Physiol. Reviews.* 80 (3), 1021-54, 2000.
- 3) Okano J, Shiota K: Roles of retinoic acid signaling in normal and abnormal development of the palate and tongue, *Congenital Anom.* 54 (2), 69-76, 2014.
- 4) Rossant J, Zirngibl D, Cado M et al.: Expression of a retinoic acid response element-hsplacZ transgene defines specific domains of transcriptional activity during mouse embryogenesis. *Genes & Dev.* 5 (8), 1333-344, 1991.

光線過敏症リスク予測方法の確立と国際協調活動の戦略的推進

静岡県立大学薬学部薬物動態学分野

尾上 誠良

Photoreactivity and dermal/ocular deposition of compounds have been recognized as key considerations for evaluating the phototoxic risk of compounds. Because some drugs are known to cause phototoxic reactions via generation of potent phototoxic metabolites, photosafety assessments on parent drugs alone may lead to false predictions about their photosafety. This study aimed to establish a new photosafety assessment strategy for evaluating the *in vivo* phototoxic potential of both a parent substance and its metabolites. The *in vivo* phototoxic risk of fenofibrate (FF) and its metabolites, fenofibric acid (FA) and reduced fenofibric acid, were evaluated based on photochemical and pharmacokinetic analyses. FF and FA exhibited intensive UV absorption, with molar extinction coefficient values of 17,000 (290 nm) and 14,000 M⁻¹cm⁻¹ (295 nm), respectively. Superoxide generation from FA was significantly higher than from FF, and a marked increase in superoxide generation from FF was observed after incubation with rat hepatic S9 fractions, suggesting enhanced photoreactivity of FF after metabolism. FA showed high dermal/ocular deposition after oral administration (5 mg/kg, p.o.) although the concentration of FF was negligible, suggesting high exposure risk from FA. On the basis of these findings, FA was deduced to be a major contributor to phototoxicity induced by FF taken orally, and this prediction was in accordance with the results from *in vitro/in vivo* phototoxicity tests. Results from this study suggest that this new screening strategy for parent substances and their metabolites provides reliable photosafety information on drug candidates and would be useful for drug development with wide safety margins.

1. 緒言

薬剤性光線過敏症は特定の薬剤投与後の露光により引き起こされる皮膚および眼の異常反応であるが、近年、オゾン層の破壊によって太陽から地表に到達する紫外線 (UV) 量が増加していることから、本症の懸念が増大している¹⁾。体内に取り込まれた光毒性物質はまず皮膚組織に到達し、薬剤の分子内 chromophore、あるいは代謝によって獲得された chromophore が皮膚深部まで到達した光によって照射されると、基底状態の S₀ から励起一重項状態 S₁ に励起される (Fig. 1A)。励起一重項状態の寿命は極めて短く、すなわち蛍光を発して直ちに基底状態 S₀ に戻るか、項間交差により励起三重項状態 T₁ に遷移する。励起三重項状態にある化合物はりん光を発して基底状態 S₀ に戻る²⁾。基底状態ではまったく化学反応をしない条件でも、高い光エネルギーを獲得した励起分子は、そのエネルギーを駆動力として結合の解裂や生成または組み換えなどの化学反応を起こすことができる^{1,3)}。そのような過程を光化学過程といい、ラジカル反応である Type I 反応と、一重項酸素反応である Type II 反応とに分けられる。酸素分子は励起エネルギーのアクセプターとして機能し、それに伴い

産生された singlet oxygen や superoxide 等の活性酸素種 (Reactive oxygen species ; ROS) による生体内物質の酸化反応が薬剤性光線過敏症の発症原因の一つとして考えられている。これらの光化学反応の標的が細胞膜上の各種生体成分である場合には光刺激性を誘発し、また DNA の酸化あるいは塩基修飾によって光遺伝毒性や光がん原性が発現する (Fig. 1B)。励起された薬物がハプテンとなりタンパク質と光付加物を形成した際には、免疫原性を示すことになり、最終的に光アレルギー反応を惹起するものと考えられる。いずれにせよ、薬剤性光線過敏症の機序を考えると、最も重要なトリガーとなるのは太陽光の吸収、そしてそれに伴う化合物の励起であろう⁴⁾。

多くの場合、薬剤性光線過敏症は薬物本体によって引き起こされるが、一部の薬剤においては代謝物の関与が報告されている。これらのケースにおいては、親薬物も光反応性を有しているため、代謝によって薬物の光感受性が増強されたこと、あるいは生体内、特に露光組織において代謝物の存在比率が高いことに起因するものである。また、現在までのところ 5-aminolevulinic acid を除き、代謝によって新たに chromophore が形成される薬物は報告されておらず、親薬物が光反応性を有していなければ、その代謝物も光反応性を有していないと考える⁵⁾。一方で、親薬物が光反応性を有している場合には、代謝による光化学的反応性の増強が生じる可能性を否定できず、親薬物だけに着目していると *in vivo* における光毒性リスクを見誤る可能性があると考えられる。実際に我々は、薬物本体のみの光化学的および薬物動態学的特性に着目して光安全性評価を行った結果、代謝物が光毒性に寄与することが知られているクロル



Development of photosafety testing strategy and its strategic harmonization
Satomi Onoue

Department of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka

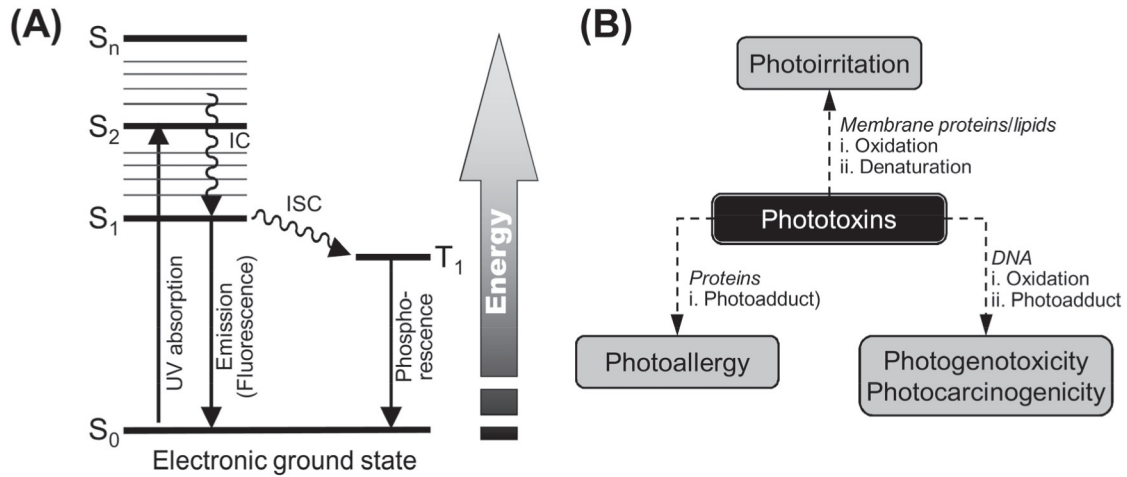


Fig. 1 Possible mechanisms for drug-induced phototoxicity.

(A) Jablonski diagram. S: singlet state; T: triplet state; IC: internal conversion; and ISC: intersystem crossing. Each line among singlet states indicates the excited vibrational states, and excited rotational states were not shown. (B) Several phototoxic responses caused by photo-activated drugs.

プロマジンにおいて予測の過誤を生じた。従って、親薬物が光反応性を有している限り、創薬において代謝物の光安全性評価も実施するべきであると考え、一方で ICH S10 では代謝物に関する評価の必要性について述べられていない。さて、Fenofibrate (FF) は経口高脂血症治療薬として汎用されている薬物であり、その副作用として光線過敏症が報告されている。FF の光毒性においてはその代謝物や光分解物が関与する可能性が報告されているが、*in vivo* におけるそれらの寄与は明らかとなっていない。また FF は、経口投与後速やかに carboxylesterase (CES) 1A1 によって活性代謝物である fenofibric acid (FA) に代謝され、FA はさらに CYP3A4 により reduced fenofibric acid (RFA) へと代謝されることが知られており (Fig. 2), これらが FF の主要代謝物であることが知られている^{6, 7)}。従って、FF の光線過敏症に対する主要代謝物の寄与を明らかにすることが、代謝物の光毒性リスク評価系の構築につながると考える。そこで、本研究では代謝物を含めた包括的光安全性評価系の構築を目的とし、FF とその主要代謝物である FA および RFA に対して、光化学的/光生物学的特性および体内動態の面から光安全性評価を実施した。

2. 実験

2. 1. 試薬類

Acetic acid, DMSO, ethanol (EtOH), formic acid, FF, imidazole, ketoprofen, NBT, p-nitosodimethylaniline, quinine HCl 2H₂O, NaH₂PO₄ 2H₂O, Na₂HPO₄ 12H₂O は和光純薬工業 (大阪, 日本) より購入した。ACN (HPLC grade) は Honeywell Japan (東京, 日本) より購入した。FA は AK Scientific Inc. (Union City, CA, USA) より購入した。RFA は Toronto Research Chemicals Inc. (Toronto,

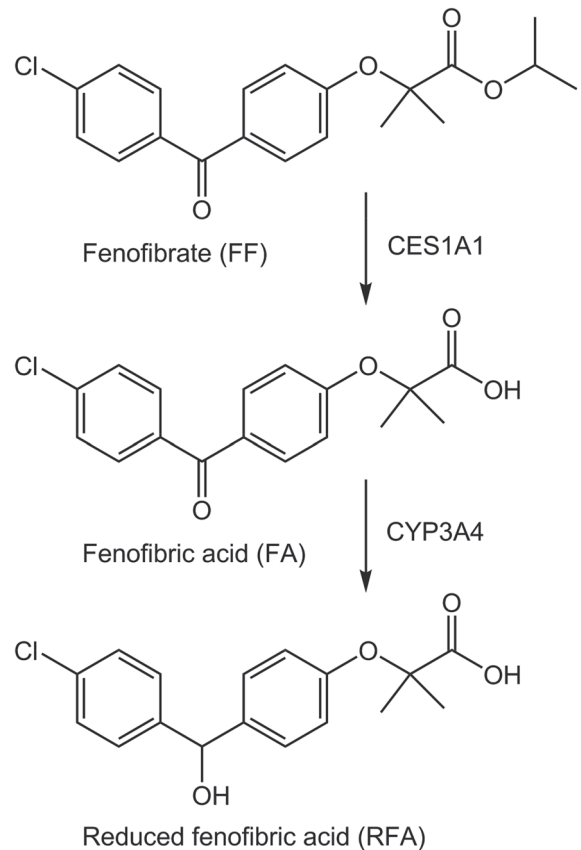


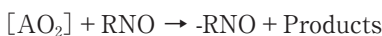
Fig. 2 Chemical structures of each test compound and metabolic pathways.

Ontario, Canada) より購入した。10% fetal bovine serum (FBS), dulbecco's modified eagle medium (DMEM), earle's balanced salt solution (EBSS), neutral red (NR), sulisobenzone は Sigma-Aldrich Japan (東京, 日本) より購入した。Pooled IGS Sprague-Dawley rat liver S9 fraction, pooled IGS Sprague-Dawley rat intestinal S9 fraction,

nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-regenerating systemは積水メディカル(東京, 日本)より購入した. その他のすべての試薬は市販品を用いた. ROS assay用 reaction containerはOzawa Science(愛知, 日本)より提供された.

2. 2. ROS アッセイ

擬似太陽光の照射にはXe arc lampを備えたAtlas Suntest CPS+(Atlas Material Technologies LCC, Chicago, IL, USA)を用いた. Atlas Suntest CPS+では短波長のUVをカットし実際の太陽光を模するためのフィルターを用いてCIE85/1989 daylight simulation requirementに良好に対応した擬似太陽光を照射している. 照射は28℃, 250 W/cm², で1h行った. 被検物質はDMSOに溶解し(10 mM), stock solutionとして用いた. Singlet oxygenはimidazoleをsinglet oxygenのacceptorに用いて, *p*-nitrosodimethylaniline水溶液の440 nmにおける吸光値をモニタリングすることで測定した^{3, 8, 9}. 測定原理を以下に示した.



A : ¹O₂ acceptor, imidazole

RNO : nitroso compounds

mROS assayにおいては被検物質の最終濃度が200 μMとなるように被検物質のstock solutionを, *p*-nitrosodimethylaniline (50 μM) およびimidazole (50 μM) を含む20 mM NaPB (pH7.4) with 0.5% Tween 20と混合した¹⁰. 酵素処理後のROS assayにおいてはrat S9 fractionsで処理したFFが30 μMとなるよう*p*-nitrosodimethylaniline (50 μM)およびimidazole (50 μM)を含む20 mM NaPB (pH7.4)と混合した. その混合液200 μLを96-well microplate(旭硝子, 東京, 日本; code number:3881-096; clear, untreated, flat-bottom)に分注し, 析出物の有無を確認後, 440 nmの吸光値をSAFIRE microplate spectrophotometer (TECAN, Mannedorf, Switzerland)を用いて測定した. その後, プレートをreaction containerに入れ石英の蓋を装着し, 擬似太陽光を1h照射した. 照射後のプレートは, 振盪後, 再び440 nmの吸光値を測定した. Superoxide anionはNBTの還元によって生成するnitroblue diformazanの560 nmにおける吸光値をモニタリングすることで測定した. 測定原理を以下に示した.



mROS assayにおいては被検物質の最終濃度が200 μMとなるように被検物質のstock solutionを, NBT (50 μM) を含む20 mM NaPB (pH7.4) with 0.5% Tween 20と混合した. 酵素処理後のROS assayにおいてはrat

S9 fractionsで処理したFFが30 μMとなるようNBT (50 μM)を含む20 mM NaPB (pH7.4)と混合した. その混合液200 μLを96-well microplate(旭硝子, 東京, 日本; code number:3881-096; clear, untreated, flat-bottom)に分注し, 析出物の有無を確認後, 560 nmの吸光値をSAFIRE microplate spectrophotometer (TECAN, Mannedorf, Switzerland)を用いて測定した. その後, プレートをreaction containerに入れ石英の蓋を装着し, 擬似太陽光を1h照射した. 照射後のプレートは, 振盪後, 再び560 nmの吸光値を測定した.

2. 3. 動物実験

雄性Sprague-Dawleyラット(11-12週齢, 体重約300-350 g)は日本SLC(浜松, 日本)より購入した. 実験までの間, ラットは動物飼育施設において自由に摂餌, 飲水が可能な環境で適切な気温(24 ± 1℃)および湿度(55 ± 5%)管理の下, 飼育した. 薬物動態学的評価に用いるラットは薬物経口投与前18hから絶食した. *In vivo*光毒性試験に用いるラットは, 試験開始18h前にpentobarbital (50 mg/kg, i.p.)麻酔下のラット腹部を剃毛した. 全ての動物実験は静岡県立大学内の動物愛護倫理委員会の承認を得たガイドラインに準じて実施した.

絶食したラットにFF (5 mg/kg)を投与後, 血液サンプル(約300 μL)を0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48hにおいて尾静脈より採取した. 血液サンプルを遠心分離(10,000 × *g*, 10 min, 4℃)して得られた血漿サンプルは, 2.5倍量(v/v)のACNを加え, 振盪後, 遠心分離(10,000 × *g*, 5 min, 4℃)し, 上清を0.20 μm membrane filter (Millex[®]-LG, Millipore Co., Ltd., Billerica, MA, USA)を通すことでろ過した. 得られたろ液にinternal standardであるketoprofen (1 μg/mL)を含む50% ACNと1:1で混合し, UPLC/ESI-MS分析による定量を行った. 皮膚および眼組織は経口投与後2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48h後において, ジエチルエーテル麻酔下, 下降大動脈より脱血, および氷冷生理食塩水によって還流したラットから採取した. 採取した組織サンプルは重量測定後, ハサミでミンズし, 4 mLのACNを加えPhycostron (Microtech Co. Ltd., 千葉, 日本)によりホモジナイズした. 得られたサンプルに, 振盪および超音波処理を10分間行い, 遠心分離(1,300 × *g*, 10 min)した. この抽出操作を2回行い, 上清はガラスチューブに分取したのち, 40℃で窒素乾固した. 残渣をketoprofen 500 ng/mLを含む50% ACNで溶解し, 0.20 μm membrane filter (Millex[®]-LG, Millipore Co., Ltd., Billerica, MA, USA)を用いてろ過したのち, UPLC/ESI-MS分析による定量を行った. UPLC/ESI-MSシステムはbinary solvent manager, column compartment, およびMicromass SQ detector connected with Waters Masslynx v 4.1.を含む

Waters Acquity UPLC™ system (Waters, Milford, MA, USA) から構成されており、カラムには Waters Acquity UPLC™ BEH C18 (particle size : 1.7 μm, column size : φ2.1 × 50 mm ; Waters) を用いた。カラム温度は 40 °C に保った。スタンダードおよびサンプルは Mili-Q water containing 0.1% formic acid (A) と ACN (B) から成るグラジエント移動相によって分離し、各化合物の保持時間は 1.1 min (IS); 1.2 min (RFA); 2.0 min (FA); 4.2 min (FF) であった。グラジエントコンディションは、0-1.0 min, 50% B ; 1.0-5.0 min, 50-95% B (linear gradient curve) ; 5-5.5 min, 95% B ; and 5.5-6 min, 50% B とし、流速は 0.25 mL/min とした。MS による検出では化合物に特異的なイオンの m/z (361.2 [M+H]⁺ for FF ; 319.2 [M+H]⁺ for FA ; 303.0 [M-OH]⁺ for RFA ; and 255.5 [M+H]⁺ for ketoprofen) を用いた。

2. 4. 3T3 NRU PT

マウス由来不死化線維芽細胞である Balb/c 3T3 cells (CloneA-31) を DMEM に 10% FBS を添加した培地を用いて継代し、20 継代未満のものを試験に用いた。培養は 37 °C, 5% CO₂ に保った CO₂ incubator を用い、2-3 日おきに継代した。試験は OECD Test Guideline 432 に準じて行った。2 枚の 96 well マイクロプレートに 2.0 × 10⁴ cells/well となるよう細胞を播種し、CO₂ incubator にて 24 h 培養した。培養液をデカントにより除去し、EBSS を用いて希釈、調整した被検物質 (FF, FA, quinine : positive control, sulisobenzone : negative control) を 100 μL 添加後、CO₂ incubator 内で 1 h 曝露させた。曝露後、metal halide lamp および UVB を減弱させるための H1 フィルターを搭載した SOL 500 Sun Simulator (Dr Hönle, Munich, Germany) にて UVA 照射量が 5 J/cm² となるよう照射した。非照射群はアルミホイルで遮光し、静置した。照射後、試験液を除去し、EBSS で洗浄した後、培養液を添加して 24 h 培養した。培養液を除去し、NR 液 (50 μg/mL in DMEM) を添加後 3 h 静置し、NR 液を除去、洗浄 (PBS, 150 μL) した。NR 抽出液 (Acetic acid : EtOH : water = 1 : 50 : 49) を添加し、10 分後に攪拌したのち 540 nm における吸光度を Benchmark Plus microplate spectrophotometer (BioRad, Hercules, CA, USA) を用いて測定した。UV 照射群および非照射群における concentration-response curve に基づいて mean photo effect (MEC) values を算出し、光毒性判定に用いた。

2. 5. ラット *in vivo* 光毒性試験

皮膚へ塗布する被検物質 (FF, FA, quinine : positive control, sulisobenzone : negative control) は 100 mg/mL となるよう DMSO に溶解した。あらかじめ腹部を剃毛し

たラットに pentobarbital にて麻酔し (50 mg/kg, i.p.), 1.5 cm × 1.5 cm サイズ中を切り取ったビニルテープを貼り付け、そこへ被検物質の DMSO 溶液 100 μL を塗布した。塗付後 4 h において薬液を除去し、水で湿らせたコットンで洗浄した。ラットは black light (FL15BL-B, National, 東京, 日本) を用いて UVA 照射量が 30 J/cm² となるまで照射した。照射強度は UV-Meter (Dr. Hönle AG, UV-Technology, Munich, Germany) を用いた。UV 非照射部位はアルミホイルで遮光した。照射終了後 24 h において色差計 (NF333, 日本電色工業, 東京, 日本) を用いて皮膚表面の色調を計測した。色差計は皮膚表面 3 次元色反射率を L*a*b* system (CIE 推奨) により記録する。輝度 (L*) は黒 (L*=0) から白 (L*=100) までの間で明るさを表し、色相 (a*) は赤 (a*=100) および緑 (a*=-100) 間のバランスを表し、彩度 (b*) は黄色 (b*=100) および青 (b*=-100) 間のバランスを表す。UV 照射前後の皮膚表面の色差 (ΔE) を以下のように算出し、光毒性の指標とした¹¹⁾。

$$\Delta E = \sqrt{\{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2\}}$$

3. 結果

3. 1. 光化学的特性評価

一般的に、薬物の光毒性反応においては、薬物分子が UV/VIS (290-700 nm) を吸収し励起状態となることが引き金になり、励起状態となった薬物分子の光化学反応が直接的な原因であると認識されている。そこで FF とその主要代謝物である FA および RFA の光化学的特性について UV 吸収特性と擬似太陽光曝露時の ROS 産生能に着目して評価した。FF および FA は強い UVA/B 吸収を示し、MEC 値はそれぞれ 17,000, 14,000 (M⁻¹cm⁻¹) と高い値であった (Fig. 3A)。従って FF および FA は高い光励起性を有することが明らかとなった。一方で RFA においては弱い UVB 吸収のみを認め、RFA の光励起性は弱いことが明らかとなった。Henry らは過去に、MEC 値が 1,000 (M⁻¹cm⁻¹) を超えない薬物は光毒性を示さない傾向にあることを報告している。従って、RFA の MEC 値が 1,000 (M⁻¹cm⁻¹) を下回っていることから、RFA の光毒性リスクは低いと考える。各化合物の実際の光反応性について精査すべく、擬似太陽光照射下における化合物からの ROS の産生能を評価した (Fig. 3B)。FF および FA は擬似太陽光照射下において強力な ROS 産生を示し、高い光反応性を示唆した。一方で、RFA からの ROS 産生は FF および FA と比較して有意に低値を示し、RFA の低い光反応性を示唆した。興味深いことに、FA からの ROS 産生能は FF と比較して有意に高く (P < 0.05)、FA の光反応性が FF よりも高いことを示唆した。特に FA からの superoxide anion の産生は FF の約 2 倍高値を示し、FA の顕著に高

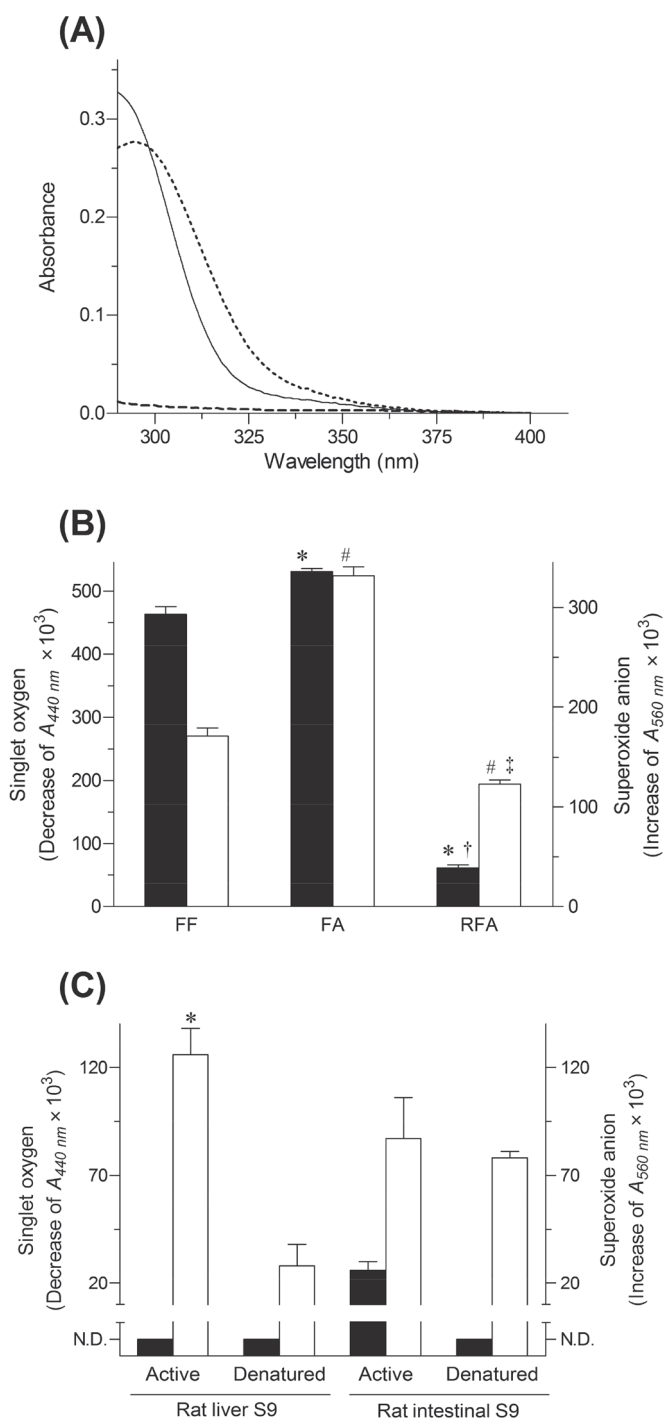


Fig. 3 Photochemical properties of FF, FA and RFA. UV-absorption spectra of test compounds (20 μM) in ethanol (A). Solid line, FF; dashed line, RFA; dotted line, FA. Generation of ROS from FF, FA and RFA (B) and from FF after incubation with active and denatured rat hepatic/intestinal S9 fractions (C). Filled columns, generation of singlet oxygen; Open columns, generation of superoxide. * $P < 0.05$, with respect to singlet oxygen of FF; † $P < 0.05$, with respect to singlet oxygen of FA; # $P < 0.05$, with respect to superoxide of FF; ‡ $P < 0.05$, with respect to superoxide of FA (B). * $P < 0.05$, with respect to superoxide in denatured rat hepatic S9 fractions (C). Data represent the mean \pm SD ($n=3$).

い superoxide anion 産生能を示唆した。これらの結果から、各化合物の光反応性の高さは以下のような順序となった：FA > FF > RFA。FAがFFよりも高いROS産生を示したため、FFが生体内での代謝を経て光反応性が変わる可能性について精査すべく、ラット肝/小腸S9画分で処理したFFからのROS産生を評価した (Fig. 3C)。ラット小腸S9画分で処理したFFから産生されたROSは熱失活させたもので処理したFFから産生されたROSと比較して有意な差は認めなかった。一方で、ラット肝S9画分で処理したFFから産生された superoxide anion は失活させたもので処理したFFの場合と比較して有意に高い値を示し、すなわち、FFの光反応性は肝代謝を経て増大する可能性を示唆した。

3. 2. 薬物動態学的評価

一般的に光毒性反応は皮膚や眼において生じるものであることから、薬物の全身曝露と同様に皮膚/目への曝露も *in vivo* 光毒性を予測する上で重要な指標となる。そこで各化合物の薬物動態学的特性について、全身および皮膚/眼への曝露に着目して精査した (Table 1)。FFをラットに経口投与後、FFは全ての組織において検出限界 (10 ng/mL, 7.1 ng/g tissue) 以下であり、ラット体内におけるFFの速やかな消失を示唆した。FAの血漿中および各組織中濃度は速やかかつ持続的に上昇し、 T_{max} は 6.0-13 h であった。FAの血漿および皮膚における C_{max} および $AUC_{0-\infty}$ は RFA と比較し、約 3-4 倍高く、RFA と比較して FA の生成速度は速く、また、全身および皮膚曝露量も高いことを示唆した。一方で、RFAの血漿中および各組織中濃度はゆるやかに上昇し、 T_{max} は 12-16 h となり、FA と比較して RFA の生成は遅いことを示唆した。RFA は血漿中および皮膚中からの消失半減期が FA と比較して約 1.5-2.0 倍長く、RFA は FA と比較して緩やかな消失を示した。よって、RFA は FA と比較して長く皮膚に保持される可能性がある。眼においては FA のみが発見でき、 C_{max} および $AUC_{0-\infty}$ はそれぞれ 100 ng/g tissue, 2.6 h \cdot ng/g tissue であった。得られた結果に基づき、各化合物の皮膚および眼への曝露を次のように順位づけた：FA > RFA > FF。

3. 3. *in vitro/in vivo* 光毒性試験

FAの光安全性について、光安全性試験代替法としてバリデートされ、汎用されている試験法である 3T3 neutral red uptake phototoxicity test (3T3 NRU PT)、およびラット *in vivo* 光毒性試験によって評価した。比較対象として親薬物である FF に対しても同様の光安全性試験を実施した。3T3 NRU PTにおいて、陰性対照である sulisobenzon を曝露した群では UV 照射群と非照射群の間で濃度-細胞生存率曲線の有意な変化は認めなかった。

Table 1 PK parameters in plasma, skin and eyes after oral administration of FF in rats

		$t_{1/2}$ (h)	C_{max} ($\mu\text{g/mL}$) or C_{max} (ng/g tissue)	T_{max} (h)	$AUC_{0-\infty}$ ($\text{h}\cdot\mu\text{g/mL}$) or $AUC_{0-\infty}$ ($\text{h}\cdot\text{ng/g tissue}$)	$MRT_{0-\infty}$ (h)
FF	Plasma	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	Skin	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
	Eye	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
FA	Plasma	6.4 ± 0.40	6.3 ± 1.1	9.7 ± 1.1	97 ± 14	13 ± 0.70
	Skin	11 ± 1.5	340 ± 17	13 ± 3.9	8.5 ± 1.3	20 ± 2.1
	Eye	22 ± 6.9	100 ± 5.5	6.0 ± 1.4	2.6 ± 0.33	34 ± 10
RFA	Plasma	12 ± 1.0	1.6 ± 0.10	12 ± 0.0	33 ± 3.2	21 ± 1.5
	Skin	17 ± 3.3	80 ± 6.7	16 ± 4.7	2.0 ± 0.60	30 ± 4.2
	Eye	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.

Each value represents the mean \pm SEM for 4-7 rats. N.A., not available due to concentrations below the limit of detection.

一方で、陽性対照である quinine を曝露した群ではUV照射により濃度-細胞生存率曲線が低濃度側へ大きくシフトし、すなわち quinine の 3T3 細胞に対する強力な光毒性を示唆した (Fig. 4A)。Quinine と同様に FF および FA においても UV 照射による大きな濃度-細胞生存率曲線の低濃度側へのシフトを認め、両化合物の強い光毒性を示唆した (Fig. 4B)。得られた濃度-細胞生存率曲線をもとに mean photo effect (MPE) 値を算出したところ FF で 0.40、FA で 0.54 となった。MPE 値は光毒性の有無を判定する基準として用いられており、MPE 値が 0.1 以上であれば光毒性陽性、0.1 を下回れば光毒性陰性となる。この判定基準に準ずると、FF と FA はともに光毒性陽性であると判明した。また、FA の MPE 値が FF の MPE 値を上回ったことから、FA の 3T3 細胞に対する光毒性は F よりも強力であることが明らかとなった。

*In vivo*における各化合物の光毒性について、ラット皮膚への薬物塗布およびUV照射前後の皮膚色調変化量 (ΔE) を指標として評価した (Fig. 4C)。予備検討において FF および FA 塗布後の皮膚内濃度は 2-6 h において増減を認めず、定常状態となっていると想定できるため、皮膚への塗布時間を 4 h と定めた (data not shown)。Sulisobenzone 塗布群では、UV 照射/非照射群間において皮膚表面の有意な色調変化は認めなかった。一方で、quinine は、以前の報告と同様に UV 照射によって顕著な Δb^* の増大を伴う有意な ΔE^* の増大を示した ($P < 0.05$)。FF および FA 塗布群において、 Δb^* が 6.4 (FF) および 5.9 (FA) 増大したことによる非照射群に比した UV 照射群における ΔE の有意な増大を認めた ($P < 0.05$)。さらに、FA 塗布群では UV 照射によって Δa^* も 4.7 増大し、顕著な炎症反応を示唆した。また、sulisobenzone 塗布、UV 照射群と、FF 塗布、UV 照射群の ΔE には有意な差を認めなかった一方で、FA 塗布、UV 照射群の ΔE は sulisobenzone 塗布、UV 照射群と比較し有意に増大していた ($P < 0.05$)。本知見から、FA はラット皮膚に対し FF よりも強い光毒性反応を惹起する

ことが明らかとなり、さらに、3T3 NRU PT の結果と一致していた。従って、FA の *in vitro/in vivo* 光毒性は FF よりも強いことが明らかとなった。

4. 考 察

光毒性において化合物が太陽光を吸収し、励起される過程は光毒性発症メカニズムの第一段階であり、それゆえ、UV 吸収スペクトルが光毒性リスクの一つの指標となりうる。一般的に、化合物の UV 吸収スペクトルは薬物分子内の π 電子共役系の長さに比例することが知られている。FF、FA および RFA の構造に着目すると、カルボニル基を有する FF と FA は強い UV 吸収を示している一方で、カルボニル基を欠いた RFA は極めて低い UV 吸収特性を示している。従って、カルボニル基は FF および FA の強い UV 吸収特性において重要な役割を担っているといえる。それは、カルボニル基が 2 つのベンゼン環の π 電子共役系の広がりにより寄与しているからであろう。UV/VIS の吸収により励起状態となった化合物は、type I/type II 光化学反応 (e.g. ROS 産生) を起こし、光毒性反応を誘発する。そのため、光照射下における化合物の ROS 産生能に基づいた光反応性評価は光安全性評価において信頼性のある指標として用いることができる。以前の報告によれば、光励起されたベンゾフェノン類は、type I 光化学反応 (e.g. superoxide の産生) を介して脂質過酸化を引き起こし、光刺激性反応を惹起する。FA の superoxide anion の産生能は FF よりも高く、FA は FF よりも高い光刺激性リスクを有しているであろう。また、本知見はラット肝 S9 画分処理により FF からの superoxide anion 産生が増大したことと良好に対応し、すなわち、FF が肝臓で FA に変換され、より強い光刺激性を惹起する可能性がある。皮膚および眼への曝露量に着目すると、FA が顕著に高い曝露量を示したことから、FA は極めて高い光毒性リスクを有すると考える。一方で RFA の皮膚曝露は比較的 low、その光毒性リスクは FA よりも低いと考える。これらの PK

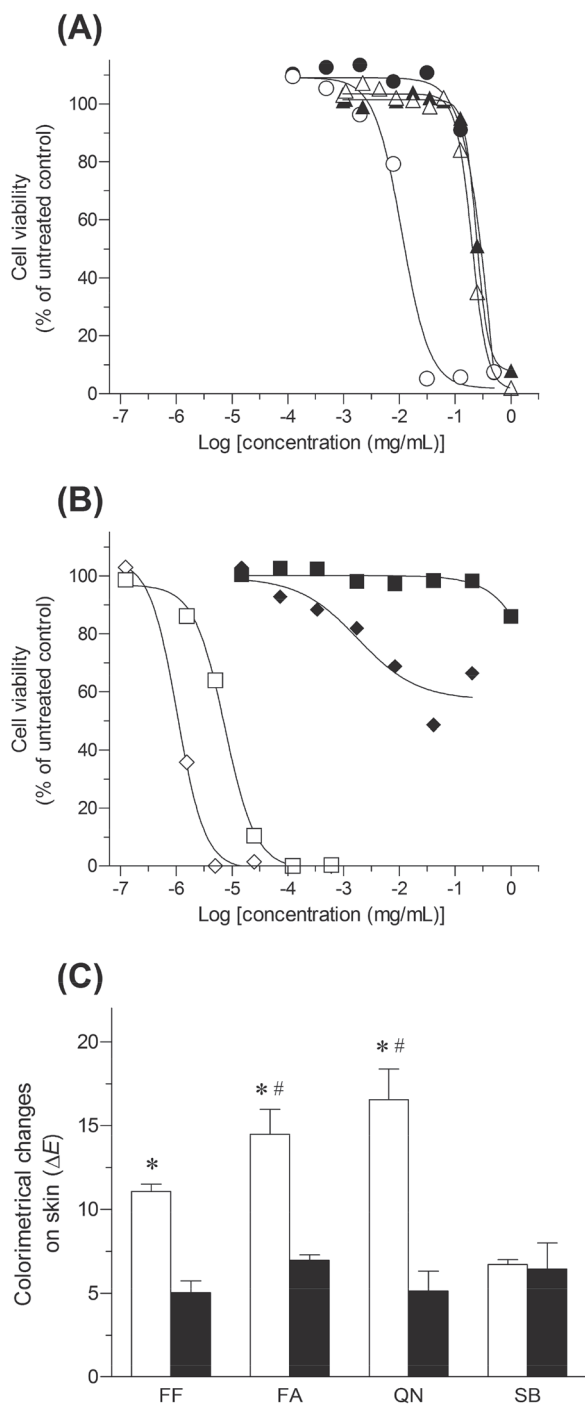


Fig. 4 *In vitro/in vivo* phototoxicity of compounds. Photodynamic cytotoxicity of QN: positive control and SB: negative control (A), FF and FA (B) in 3T3 NRU PT, and colorimetric evaluation of phototoxic skin responses in rats treated with FF, FA, quinine (QN) and sulisobenzone (SB) (C). Open symbols and open columns, UVA-irradiated groups; filled symbols and filled columns, non-irradiated groups. Each value represents the mean of duplicate measurements (A, and B) and the mean \pm SEM of 4 experiments (C). * $P < 0.05$ with respect to the non-irradiated group of each compound; # $P < 0.05$ with respect to UV-irradiated groups of SB.

特性はFFのCES 1A1による速やかな加水分解, さらにはFAのCYP 3A4による比較的緩やかなRFAへの代謝によるものであると考える. FAはCYP 3A4阻害活性を有することが報告されており, FAの代謝によるRFAの生成はFA自身のCYP 3A4阻害によって緩やかになっているかもしれない. RFAの皮膚曝露は比較的低いものであるが, RFAも光毒性リスクを有していると考えられる. なぜなら, RFAの長い皮膚滞留性が慢性投与時の皮膚への蓄積につながり, 光毒性を誘発しうるからである. 薬物の光毒性リスクは, 薬物の光化学的反応性の強さとは露光部位である皮膚/眼への到達量の両者を考慮することによって, 比較的良好に予測することができる. 複数のデータを考慮し, 系統的評価を行うことができる手法として matrix decision approach が用いられており, 本研究においても, 光化学的特性および薬物動態学的特性のデータを統合し, decision matrix を作成し, 光毒性リスク評価に用いた (Table 2).

Decision matrix においては, 光反応性および皮膚/眼曝露量の両データとも高い値であればその光毒性リスクは極めて高く, 光反応性あるいは皮膚/眼曝露量の一方のみが高いか, どちらも中程度であれば, その光毒性リスクも中程度, 光反応性および皮膚/眼曝露量どちらも低ければその光毒性リスクは低いことがわかる. FAは光反応性および皮膚曝露の両データにおいて高い値を示していることから, 最も高い光毒性リスクを有しているだろう. FFは強力な光反応性を有する一方で, 皮膚曝露が極めて低く, FFの光毒性リスクはそれほど高くはないと考える. RFAは光反応性が弱く皮膚曝露も比較的低い, 皮膚滞留性が高いことからFFと同程度の光毒性リスクを有するだろう. 従って, 各化合物の光毒性リスクは以下のような順序となった: $FA \gg FF \approx RFA$. この光毒性リスクの高さは *in vitro/in vivo* 光毒性試験の結果とも良好に対応し, 代謝物の光安全性評価における本評価系の妥当性を示唆した. また, 本知見から FF の光毒性にFAが大きく寄与していることが明らかとなった. 本研究において提示した包括的光安全性評価は, 信頼性のある医薬品候補化合物の光安全性情報を提供するものと考えられる.

謝 辞

本研究を遂行するにあたり, 公益財団法人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に深く感謝申し上げます.

(引用文献)

- 1) Onoue S, Seto Y, Gandy G, Yamada S: Drug-induced phototoxicity; an early *in vitro* identification of phototoxic potential of new drug entities in drug

Table 2 Decision matrix

		FF	FA	RFA
<i>Photochemical properties</i>				
UV absorbance				
λ_{max} (nm) [ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)]		290 [17,000]	295 [14,000]	290[850]
ROS assay	1O_2 ($\Delta A_{440\text{ nm}} \times 10^3$)	463	531	61.0
	O_2^- ($\Delta A_{560\text{ nm}} \times 10^3$)	171	332	123
<i>Distribution to UV exposed tissues</i>				
$t_{1/2}$ (h)	Skin	N.A.	11	17
	Eyes	N.A.	22	N.A.
C_{max} (ng/g tissue)	Skin	N.A.	340	80
	Eyes	N.A.	100	N.A.
$AUC_{0-\infty}$ (h \cdot μ g/g tissue)	Skin	N.A.	8.5	2.0
	Eyes	N.A.	2.6	N.A.

Each crucial factor was divided into three levels. Black, gray and white cells represent high, moderate and low levels, respectively. N.A., not available due to concentrations below the limit of detection.

discovery and development, *Curr Drug Saf*, 4, 123-136, 2009.

- 2) Jablonski A: Efficiency of anti-Stokes fluorescence in dyes, *Nature*, 131, 839-840, 1933.
- 3) Onoue S, Tsuda Y: Analytical studies on the prediction of photosensitive/phototoxic potential of pharmaceutical substances, *Pharm Res*, 23, 156-164, 2006.
- 4) Henry B, Foti C, Alsante K: Can light absorption and photostability data be used to assess the photosafety risks in patients for a new drug molecule?, *J Photochem Photobiol B*, 96, 57-62, 2009.
- 5) Moore DE: Drug-induced cutaneous photosensitivity: incidence, mechanism, prevention and management, *Drug Saf*, 25, 345-372, 2002.
- 6) Leenutaphong V, Manuskiatti W: Fenofibrate-induced photosensitivity, *J Am Acad Dermatol*, 35, 775-777, 1996.
- 7) Machet L, Vaillant L, Jan V, Lorette G: Fenofibrate-induced photosensitivity: value of photopatch testing, *J Am Acad Dermatol*, 37, 808-809, 1997.
- 8) Onoue S, Hosoi K, Wakuri S, Iwase Y, Yamamoto T, Matsuoka N, Nakamura K, Toda T, Takagi H, Osaki N, Matsumoto Y, Kawakami S, Seto Y, Kato M, Yamada S, Ohno Y, Kojima H: Establishment and intra-/inter-laboratory validation of a standard protocol of reactive oxygen species assay for chemical photosafety evaluation, *J Appl Toxicol*, 33, 1241-1250, 2013.
- 9) Onoue S, Hosoi K, Toda T, Takagi H, Osaki N, Matsumoto Y, Kawakami S, Wakuri S, Iwase Y, Yamamoto T, Nakamura K, Ohno Y, Kojima H: Intra-/inter-laboratory validation study on reactive oxygen species assay for chemical photosafety evaluation using two different solar simulators, *Toxicol In Vitro*, 28, 515-523, 2014.
- 10) Seto Y, Kato M, Yamada S, Onoue S: Development of micellar reactive oxygen species assay for photosafety evaluation of poorly water-soluble chemicals, *Toxicol In Vitro*, 27, 1838-1846, 2013.
- 11) Seto Y, Inoue R, Ochi M, Gandy G, Yamada S, Onoue S: Combined use of in vitro phototoxic assessments and cassette dosing pharmacokinetic study for phototoxicity characterization of fluoroquinolones, *AAPS J*, 13, 482-492, 2011.

炎症時における細胞動態と酵素活性を in vivo で可視化する 機能的 MRI プローブ

大阪大学大学院工学研究科

菊地 和也

Highly sensitive imaging of enzymatic activities in deep region of living organisms have been a difficult challenge for bioimaging materials. Among them, ^{19}F magnetic resonance imaging (MRI) probes are suitable for noninvasively visualizing enzymatic activities in vivo due to zero background signal. Although various enzyme-responsive ^{19}F MRI probes have been developed, most of them have not been applicable to in vivo imaging because of their low sensitivity. Recently, we developed perfluorocarbons-encapsulated nanoparticles and demonstrated that they showed outstanding sensitivity in vivo. Here, we developed enzyme-responsive ^{19}F MRI nanoprobes (FLAME-DEVD 2) for detecting caspase-3/7 activity by employing the paramagnetic relaxation enhancement effect as the OFF/ON switch of ^{19}F MRI signals. After intravenous injection of FLAME-DEVD 2 and apoptosis-inducing reagents, caspase-3/7 activity in a living mouse spleen was successfully imaged by ^{19}F MRI. The results demonstrated that this imaging platform has great potential for highly sensitive detection of enzymatic activities in vivo.

1. 緒言

生命活動は、生体分子が複雑に相互作用することでその恒常性が保たれている。中でも酵素は生命機能の維持と同時に癌やアルツハイマー病などの様々な疾患を引き起こすメディエーターとしての働きを持っている。生きた動物個体で酵素活性をイメージングすることは、その機能や動態の解析から、疾病の検出や薬効評価などの応用研究に繋がる。Magnetic Resonance Imaging (MRI) は核磁気共鳴現象を利用した三次元断層画像法であり、核磁化の励起にラジオ波を用いているので、放射線被曝の危険性がない。また空間分解能や組織コントラストが優れているため、生体内における酵素活性を検出するのに非常に優れている手法と言える。特に ^{19}F MRI は内在性バックグラウンドシグナルがほとんど存在しないため、生体に投与した ^{19}F MRI 造影剤のみを選択的にイメージングすることが可能である。これまでにいくつかの小分子化合物をベースとした酵素活性検出 ^{19}F MRI プローブが報告されており、本研究室も常磁性緩和促進 (PRE) 効果に基づいた酵素活性検出 ^{19}F MRI プローブを開発してきた。PRE 効果とは、常磁性種が持つ不対電子スピンの影響で、その近傍に存在する観測核の横緩和時間 T_2 が著しく減少する現象のことである。 T_2 は、MRI シグナル強度と相関があるパラメーターであり、 T_2 を制御することで MRI シグナルの OFF/ON のスイッチング原理を確立可能である。しかしながら小分子化合

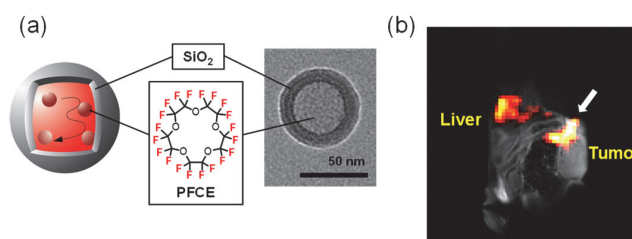


Fig. 1 (a) Structure and TEM image of FLAME., (b) In vivo MR image of FLAME in tumor bearing mouse.

物をベースとする ^{19}F MRI プローブは、in vivo において低感度という問題点があった。

これまでに、上記の問題点を解決するために高感度な ^{19}F MRI 造影剤 FLAME (FLuorine Accumulated silica nanoparticle for ^{19}F MRI Enhancement) の開発に成功している。FLAME は一分子内にフッ素を 20 個有する perfluoro 15-crown-5 ether (PFCE) を脂質により内包し、その周りをシリカで被覆した構造をしている (Fig. 1a)。そのため、生体内においても安定かつ非常に高感度な ^{19}F MRI シグナルを示すことがわかっている (Fig. 1b)。

本研究では、PRE 効果による OFF/ON スwitching 機構に基づき、生体内における酵素活性を検出する高感度な ^{19}F MRI 造影剤の開発を目的として取り組んだ。

2. 方法

2.1. カスパーゼ-1 活性検出用 ^{19}F MRI 造影剤

デザインした FLAME-WEHD X は、FLAME、 Gd^{3+} 錯体、カスパーゼ-1 基質から構成される (Fig. 2)。カスパーゼ-1 は基質配列 WEHD における D の C 末端を切断することが知られているので、この基質を介して FLAME と ^{19}F MRI シグナルを抑制する Gd^{3+} 錯体を連結させた。FLAME の ^{19}F MRI シグナルは、 Gd^{3+} が持つ PRE 効果により FLAME 内部のフッ素化合物の T_2 が短縮されており、一時的に消



Functional in vivo Imaging of Cellular Dynamics and Enzyme Activity after Inflammation Using Chemical MRI Probes

Kazuya Kikuchi

Graduate School of Engineering, Osaka University

失している。カパーゼ-1が基質を切断して、Gd³⁺錯体がFLAME表面から解離することで、PRE効果が解消され、¹⁹F MRIシグナルが回復する。またFLAMEとGd³⁺錯体が立体障害となってカパーゼ-1が基質部位にアクセスしにくいことが考えられる。そこで基質配列を2,3個と繰り返すことで、FLAMEとGd³⁺錯体間の距離が離れてカパーゼ-1がアクセスし易くなるとともに、酵素が基質を断する確率が増えると期待した。

3. 結果

3.1. FLAME-WEHD X (X=1-3)の酵素反応

作製したFLAME-WEHD Xとカパーゼ-1の酵素反応を行い、¹⁹F MRI測定を行った。FLAME-WEHD 1, 2ではカパーゼ-1存在下、非存在下において¹⁹F MRIシグナルの増大がほとんど見られなかったのに対し、FLAME-WEHD 3では酵素反応開始後6時間から¹⁹F MRIシグナルの増大が確認された(Fig. 3)。

3.2. FLAME-WEHD 3のマウス体内における¹⁹F MRIシグナル評価

FLAME-WEHD 3がカパーゼ-1存在下において¹⁹F

MRIシグナル増大を示したので、これをマウス実験に用いた。マウスはBlack 6を使用した。FLAME-WEHD 3のみを生理食塩水中に分散させ、Black 6マウスに皮下注射した。コントロールとして同じPFCE濃度のFLAME-COOHを反対側に皮下注射した。コントロール側では非常に強い¹⁹F MRIシグナルが観測された。FLAME-WEHD 3を打ち込んだ側においては冠状断と水平断の両方で3時間後から¹⁹F MRIシグナルが観測され始めた。この原因として皮膚への注射による

刺激に対する免疫応答、血清中の酵素による基質の切断が考えられる。しかし、ポジティブコントロールのalways ONのFLMAE-COOHと比べて¹⁹F MRIシグナルが非常に抑制されていることが確認された(Fig. 4)。

3.3. FLAME-WEHD 3を用いた生体における免疫応答の可視化

最後に人為的に免疫応答を起こすために、FLAME-WEHD 3 (1.67 mM, 120 μL) を刺激物であるIL-6と同時に皮下注射した。コントロール側では投与後7時間後から¹⁹F MRIシグナルが少ししか観測されなかったのに対し、IL-6を加えた側では投与後30分で非常に強い¹⁹F MRIシ

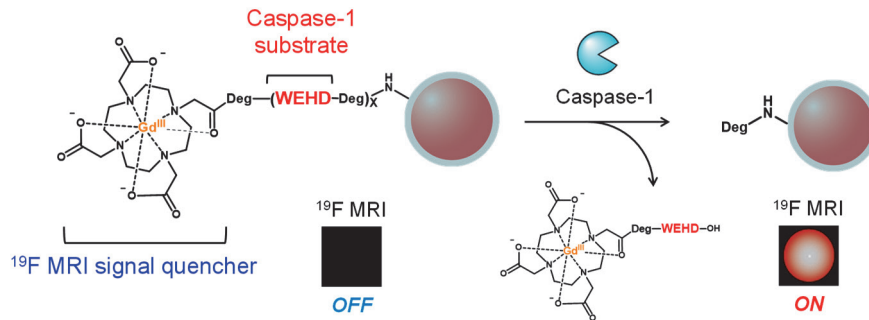


Fig. 2 Design principle of FLAME-WEHD X (X = 1-3).

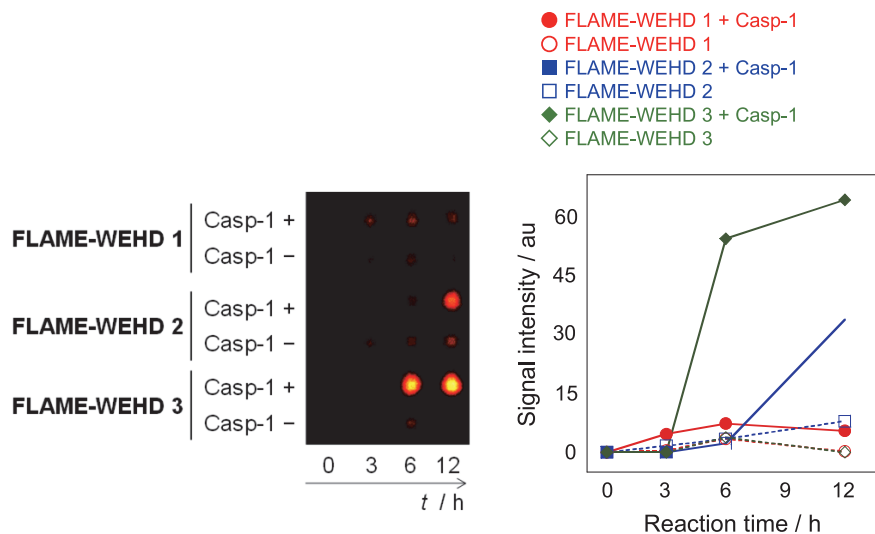


Fig. 3 (a) ¹⁹F MRI phantom images of FLAME-WEHD X with or without caspase-1. (b) Time course of ¹⁹F MRI signal intensity.

グナルが観測された。これはIL-6によって引き起こされた免疫応答に対してFLAME-WEHD 3が応答し、 ^{19}F MRI シグナルが増大したことを示唆する結果である (Fig. 5)。

4. 考 察

PRE効果を利用したOFF/ONスイッチング機構に基づいた分子設計をFLAMEに施し、in vivo応用可能な酵素活性検出 ^{19}F MRI造影剤の開発を行った。作製したFLAME-WEHD 3はマウス体内の免疫応答を ^{19}F MRIに

より検出した初めての例であり、今後この造影剤を用いて痛風関節炎などの様々な炎症性疾患の検出、評価を行うことで、 ^{19}F MRIを用いた新たな検出法として免疫学への貢献が期待される。

5. 総 括

本研究で、カスパーゼ-1活性検出用 ^{19}F MRI造影剤とカスパーゼ-3活性検出用 ^{19}F MRI造影剤の開発をそれぞれ行った。カスパーゼ-1活性検出用 ^{19}F MRI造影剤であ

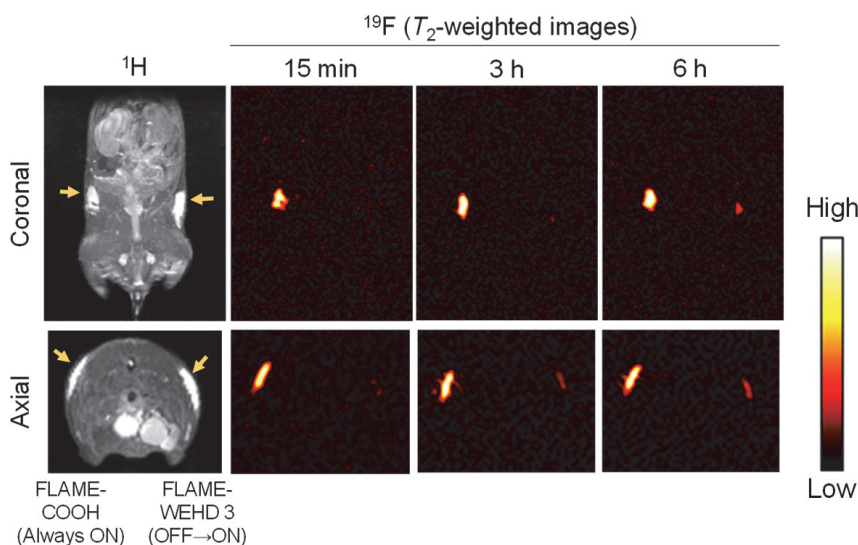


Fig. 4 In vivo $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ MRI measurement of FLAME-COOH and FLAME-WEHD 3 in black 6 mouse at 15 min, 3 h, 6 h, 9 h after subcutaneously injection.

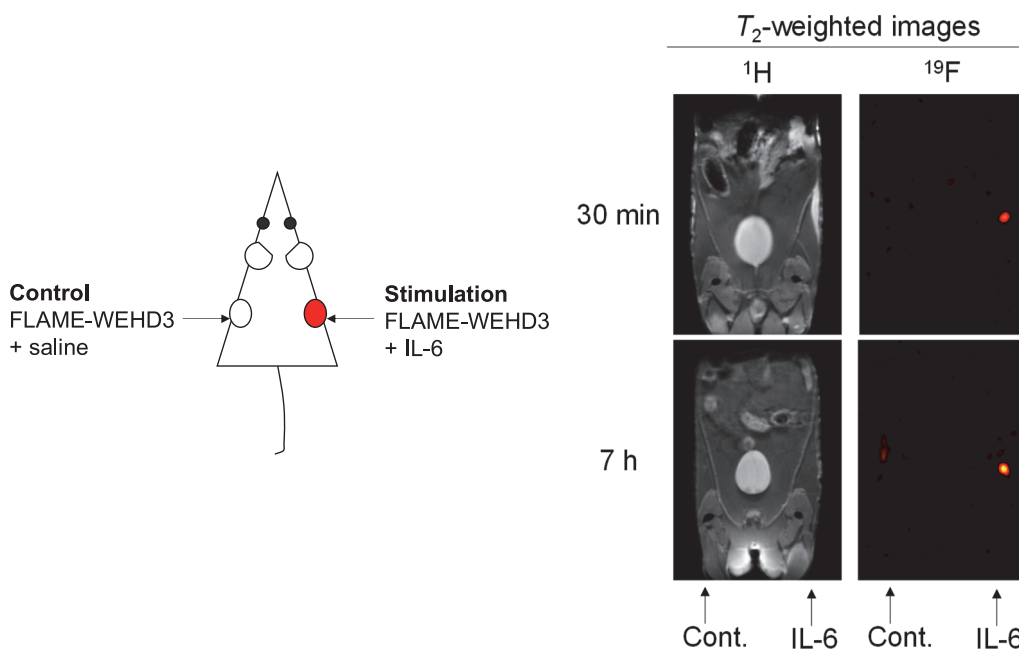


Fig. 5 In vivo $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ MRI measurement of FLAME-WEHD 3 in black 6 mouse at 30 min, 7 h, 2 days after subcutaneously injection with or without IL-6 ($1\ \mu\text{g}$). Total administered volume is $120\ \mu\text{L}$ ($C_{\text{PFCE}} = 1.67\ \text{mM}$). ^{19}F MRI RAREVTR method: coronal plane; the matrix size was 128×64 and the slice thickness was $40\ \text{mm}$. $T_{\text{E,eff}}$ was $16\ \text{ms}$. T_{R} was $1500\ \text{ms}$. The NEX was 128.

る FLAME-WEHD 3 は、カスパーゼ-1 の添加に伴いファントム像で ^{19}F MRI シグナルの増大が確認された。さらにマウスへの応用において、IL-6 と皮下注射することによりコントロールと比べて、非常に高感度にマウス体内の免疫応答を ^{19}F MRI 検出していることを示唆する結果が得られた。これはマウス体内の免疫応答を ^{19}F MRI により検出した世界で初めての例である。今後、細胞実験などを行うことに FLAME-WEHD 3 がどの程度カスパーゼ-1 に対して選択性を持っているか、そして FLAME-WEHD 3 のマウス体内の動態を詳しく調べていくことで、特定の炎症性疾患の ^{19}F MRI 検出も期待される。

カスパーゼ-3 活性検出用 ^{19}F MRI 造影剤である FLAME-DEVD 1, 2 は両者とも、ファントム像において非常に高コントラストにカスパーゼ-3 活性を検出できることが確認された。特に高コントラストにカスパーゼ-3 活性を検出できた FLAME-DEVD 2 に関しては、マウス体内のアポトーシスの ^{19}F MRI 検出を行うことにより、本研究で行ったプローブデザインが様々なプロテアーゼに応用可能であると考えられる。

(引用文献)

- 1) Nakamura T, Matsushita H, Sugihara F, Yoshioka Y, Mizukami S, Kikuchi K.: Activatable ^{19}F MRI Nanoparticle Probes for the Detection of Reducing Environments, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 54, 1007-1010, 2015.
- 2) Matsushita H, Mizukami S, Sugihara F, Nakanishi Y, Yoshioka Y, Kikuchi K.: Multifunctional Core-shell Silica Nanoparticles for Highly Sensitive ^{19}F MRI, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53, 1008-1011, 2014.
- 3) Okada S, Mizukami S, Sakata T, Matsumura Y, Yoshioka Y, Kikuchi K.: Ratiometric MRI Sensors Based on Core-Shell Nanoparticles for Quantitative pH Imaging, *Adv. Mater.*, 19, 2989-2992, 2014.
- 4) Okada S, Mizukami S, Sakata T, Matsumura Y, Yoshioka Y, Kikuchi K.: Ratiometric MRI Contrast Agents Based on Core-Shell Nanoparticles for Quantitative pH Imaging, *Dalton Trans.*, 42, 15864-15867, 2013.
- 5) Matsushita H, Mizukami S, Mori Y, Sugihara F, Shirakawa M, Yoshioka Y, Kikuchi K.: ^{19}F MRI Monitoring of Gene Expression in Living Cells via Cell Surface beta-Lactamase Activity, *ChemBioChem*, 13, 1579-1583, 2012.
- 6) Mizukami S, Matsushita H, Takikawa R, Sugihara F, Shirakawa M, Kikuchi K.: ^{19}F MRI Detection of β -Galactosidase Activity for Imaging of Gene Expression, *Chem. Sci.*, 2, 1151-1155, 2011.
- 7) Okada S, Mizukami S, Kikuchi K.: Application of Stimuli-Responsive Polymer for Development of Novel MRI Probes, *ChemBioChem*, 11, 785-787, 2010.
- 8) Mizukami S, Takikawa R, Sugihara F, Shirakawa M, Kikuchi K.: Dual Functional Probe to Detect Protease Activity for Fluorescence Measurement and ^{19}F MRI, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 48, 3641-3643, 2009.
- 9) Mizukami S, Takikawa R, Sugihara F, Hori Y, Tochio H, Wälchli M, Shirakawa M, Kikuchi K.: Paramagnetic Relaxation-based ^{19}F MRI Probe to Detect Protease Activity, *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 794-795, 2008.

皮膚顆粒細胞の活性化とタイトジャンクション修復による皮膚バリア機能増強とアトピー・アレルギーの発症予防

徳島大学先端酵素学研究所

木戸 博

Enhancement of skin barrier function by activation of granular layer cells and restoration of tight junction are important for the prevention of atopic and allergic dermatitis. We recently established a highly sensitive method for detection of allergen specific immunoglobulin class switching by the densely carboxylated protein (DCP) chip microarray. DCP chip provides sensitive quantitative measurement of allergen-specific IgGs, IgA and IgE by using limited amount of serum and also provides allergen-affinity of each immunoglobulins. By using the DCP chip, we measured the enhancement of skin barrier function after sensitization of allergen from skin. We analyzed the effects of pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) inhibitor on activation of mitochondria in the granular layer cells of skin. Treatment of PDK4 inhibitor from the skin effectively inhibited dinitrochlorobenzene-induced skin inflammation and proliferated granular layer cells. Treatment of PDK4 inhibitor also block skin sensitization of ovomucoid. These results suggest that PDK4 inhibitor plays a role for prevention and/or treatment of allergy induced by skin-sensitization.

1. 緒言

アレルギー・アトピーの発症病理学的研究の中で、抗原経皮感作の重要性に関する目覚ましい研究成果が近年相次いで発表され、これまで有効な予防と治療法がなかったアレルギー・アトピー領域が注目されている。その発端となった日本の研究者グループによる2報の論文が注目される。1つは、国立成育医療センターグループのHorimukai等による“Application of moisturizer to neonates prevents development of atopic dermatitis”¹⁾で、生後32週間保湿剤によるスキンケアをすることで、アトピーの発症が32%抑制されたことを記載した画期的な論文である。他は、慶応大学医学部皮膚科学教室のグループによる“Distinct behavior of human Langerhans cells and inflammatory dendritic epidermal cells at tight junctions in patients with atopic dermatitis”²⁾で、アトピー性皮膚炎では抗原提示細胞の突起がタイトジャンクションの間隙を介して伸展して、抗原提示に関与する機序についての論文である。この2報は、アトピーの発症とタイトジャンクション崩壊、保湿剤による角質層とタイトジャンクション保護との関係を示唆している。

我々は、国立成育医療センターグループとの前記の共同研究論文において、各種抗原特異的抗体価を測定して発表してきたが、続いて行った最近の乳児コホート研究から、胎盤を介して母子移行したIgG抗体が乳児の体内から

消える生後4ヶ月以後に、湿疹を介して抗原が経皮感作されると、乳児の食物アレルギーの発症に繋がることを明らかにした(Manuscript in preparation)。このように微量抗原の経皮感作によって、体内免疫系が大きく影響されることから、これを高感度に感知して予防と対策を講ずる必要がある。本プロジェクトでは、食物アレルギーの予防と治療のために、1)低侵襲性にしかも高感度に抗原特異的IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgAを測定する検査システムを開発するとともに、2)抗原の経皮感作を防ぐ皮膚のバリア機能を増加させる方法の一つとして、細胞間を繋ぐタイトジャンクションがミトコンドリア機能に密接に依存していることに注目して、ミトコンドリア機能活性化剤を皮膚に塗布した場合の抗原感作抑制効果を検討した。なお、申請者等のグループは、血管内皮細胞の透過性をコントロールするタイトジャンクションの修復の重要性をこれまでに明らかにしており³⁾、これらの研究を遂行する基盤を有している。

2. 実験方法

2.1. 高感度抗原特異的IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA 測定システム

高感度抗原特異的IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA測定システムとして、我々はこれまでに開発してきたDensely carboxylated Protein (DCP)-chipを用いた^{4,5)}。このデバイスは、僅か20-50 μ Lの血清で、10~33種類の抗原特異的抗体のクラススイッチパターンと、約100 μ Lの血清で抗原親和性の測定が可能なデバイスである。図1に、抗原蛋白質を共有結合で高密度に固定化するDCPチップの概要を示す。DCPチップは、シリコン基板にDiamond-like carbon (DLC)コート後、静電層カルボキシル基修飾を施したチップと、ガラススライドに静電層カルボキシル基修飾を施したチップ (IgSensor AMERIC[®])



Enhancement of skin barrier function by activation of granular layer cells and restoration of tight junction, and prevention of atopic and allergic dermatitis

Hiroshi Kido

Institute for Enzyme Research, Tokushima University

3. 結果と考察

3.1. 高感度抗原特異的IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA 測定システムの開発

IgSensor AMERIC[®]を用いた出生時の母体血、臍帯血、新生児血の鶏卵、ミルク抗原、杉抗原 (Cedar pollen)、ハウスダストと2種類のダニ抗原 (Dp, Df) に対する抗原特異的IgEの感作パターンを図3に示す。胎盤を通過できるIgG、IgG4は、母体血、臍帯血、新生児血間で相違は見られず、同一の感作パターンを示した。一方で胎盤を通過できないIgAとIgEでは、母体血と臍帯血、新生児血間に大きな違いが観察された。胎児及び新生児ではIgA産生が見られないことから、臍帯血、新生児血では抗原特異的抗体は全く観察されない。しかし抗原特異的IgEの場合、母体血と臍帯血、新生児血間で違いのあることが観察された。胎児期より胎児は抗原特異的IgEを産生するが、その抗原の由来は、胎盤を通過して胎児にもたらされる母体のIgG・抗原複合体に由来する主に食物抗原で、この抗原に対するIgE抗体が産生される。食物抗原以外の環境抗原によって感作される頻度の高い母体血との違いが生じると推定している。以上の結果は、胎児と臍帯血で見られる抗原特異的IgEは胎児由来であり、母体血が混入した結果見られるIgEではないことが明らかになった。一方、胎児はIgEを産生しているが、胎児期にアレルギーの発症がない理由として、胎児と臍帯血で見られる抗原特異的IgEは、抗原との親和性が低くヒスタミン遊離を誘発しない低親和性IgE抗体であることが判明している¹⁰⁾。

出生後0-6ヶ月までの乳児期の乳児を対象として、ミルク抗原特異的イムノグラブリンクラススイッチのモニターが行われた。特に乳児期の湿疹、アトピー性皮膚炎が食物アレルギーの発症の原因になることが明らかにな

ってきたことから^{11, 12)}、今後本研究課題と密接に関係した解析研究が望まれている。人工乳と混合栄養児の場合、乳児は牛ミルクの特異的抗原、Beta-lactoglobulin (BLG) に対する抗体を産生する。しかも乳児にとっては唯一の食物栄養源であることから、大量のミルク抗原に経口感作されることになる。一方、母乳栄養児の場合は、BLGに対する抗体産生は見られなかった。図4に示すように、乳児はイムノグラブリンクラススイッチのルールに従って、出生後0ヶ月から6ヶ月までの間に経時的に、IgG3 → IgG1 → IgG2 → IgG4 と IgG1 → IgE へのクラススイッチの順番で進んでいることが判る。IgMから最初に行える抗体がIgG3であるが、IgG3は速やかにIgG1にクラススイッチされ、乳児は異物反応として大量のIgG1抗体を産生する。その後、アレルギー発症抑制に関与するIgG1 → IgG2 → IgG4 へのクラススイッチが進む(この図ではIgG2が省略されている)とともに、アレルギーの発症に関与するIgG1 → IgE へのクラススイッチが進む。

上記の高感度イムノグラブリンクラススイッチの測定系ができたことから、今後経皮感作によるIgG1 → IgE へクラススイッチの高感度モニターが期待される。

3.2. 抗原経皮感作をモニターするモデルシステムの開発

上記のように高感度イムノグラブリンクラススイッチの測定系ができたことから、抗原経皮感作をブロックする薬剤のスクリーニングが可能になった。本研究は、これまでに我々が実施してきた研究からの仮説、「細胞間のタイトジャンクション機能がミトコンドリア機能に密接に関係しており、ミトコンドリア機能の低下がタイトジャンクション機能の低下や、皮膚バリア機能の低下を引き起こし、逆にミトコンドリア機能の上昇がタイトジャンクション機能

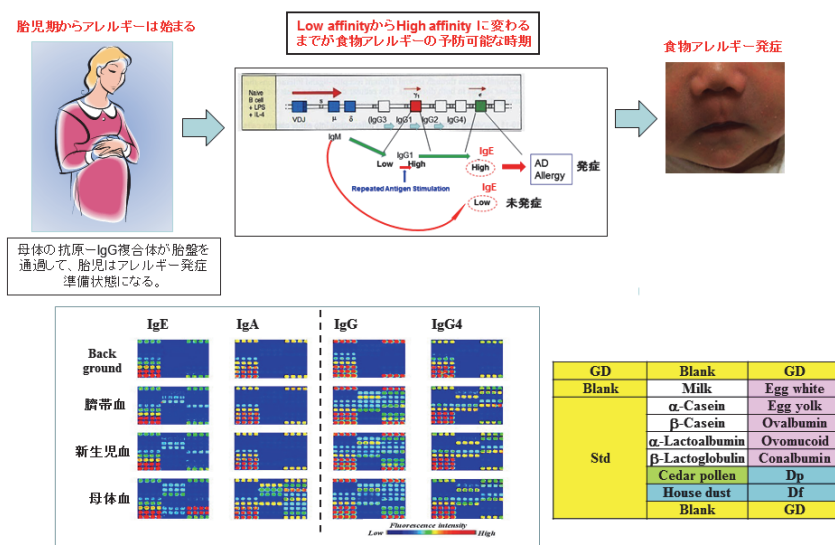


図3 母体血と臍帯血、新生児血間の抗原特異的各種イムノグロブリンの比較

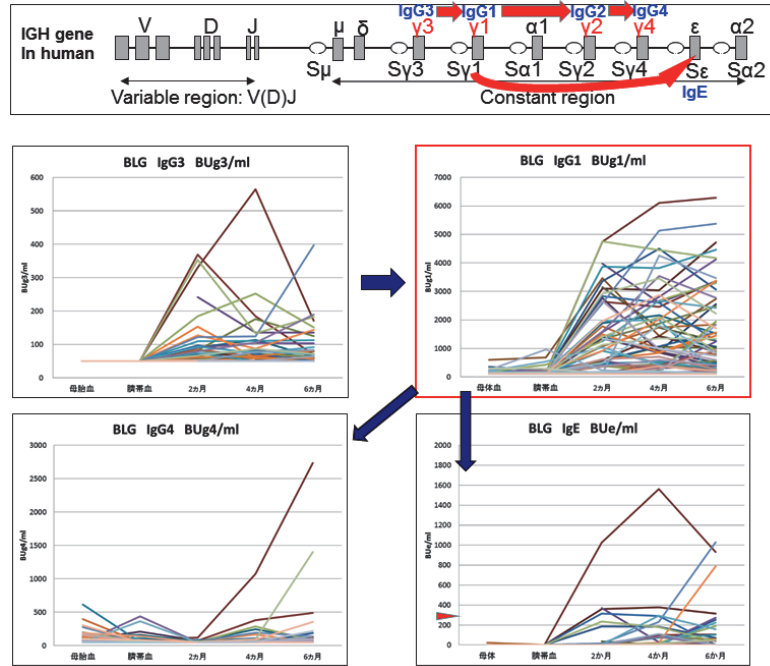


図4 母体血と出生後の0ヶ月から6ヶ月までのミルク抗原の経口感作とイムノグロブリンクラススイッチ

を増加させる」に基づいて実施された。図5は、この仮説の基になったこれまでの研究成果である^{4,13)}。種々の病原体は体内の防御システムを活性化して各種サイトカインの産生を促す。サイトカインは生体防御系の発動に不可欠であるが、過剰のサイトカインの産生(サイトカインストーム)は、体内の各臓器が微量産生している trypsin (異所性 trypsin)の発現を増加させ、そのレセプターの PAR-2 を介して細胞内の Ca^{2+} の異常増加とそれに伴うタイトジャンクションの崩壊を導く。サイトカインの増加は、体内代謝の中でもミトコンドリアのエネルギー代謝に深く関係しており、ミトコンドリア機能の低下と ATP クライシス、細胞機能の低下を引き起こす。この一連のシグナル伝達の中でサイトカインの増加は、エネルギー代謝の主役を担う糖代謝の調節因子、PDK4 の著しい増加を誘導することが判明した¹³⁾。PDK4 の増加は、その基質である PDH (Pyruvate dehydrogenase) をリン酸化して、PDH 活性を低下させる。PDH は、Glucose 代謝の key enzyme で、ミトコンドリアへの糖代謝の流れを調節している酵素である。即ち PDH の活性低下は Glucose のミトコンドリアへの輸送量の低下を招き、その結果 ATP 産生の低下、ミトコンドリア機能の低下と細胞機能の低下を引き起こす。このような観点から、PDK4 阻害剤の開発研究が進んでいる。

図6は、2% DNBC を3日間塗布することによって誘発されたアトピー・皮膚炎モデルの結果である。DNBC 塗布による皮膚炎を通常のローション基材のみで1週間治療した群では、DNBC を塗布しなかったマウスの皮膚に比べて、皮膚顆粒層が厚くなるとともに、角質層が薄く変化してい

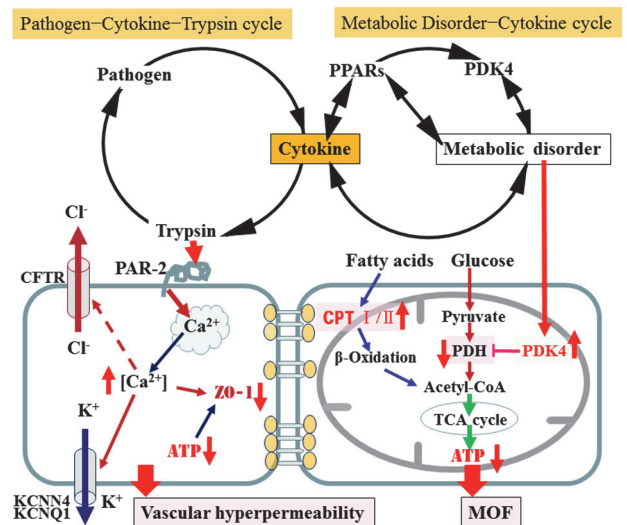


図5 細胞間タイトジャンクションの機能に関与するミトコンドリアのエネルギー代謝と、これに影響を与える病原体-サイトカイン-代謝不全サイクル

PPARs, peroxisome proliferator-activated receptors; PDH, pyruvate dehydrogenase; PDK4, pyruvate dehydrogenase kinase 4; PAR-2, protease activated receptor 2; CPT, carnitine palmitoyltransferase; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; KCNN4, potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4; KCNQ1, potassium channel, voltage dependent, KCNQ1(IPR005827); ZO-1, zonular occludens-1.

た。これに対して、PDK4 阻害剤を添加したローションで治療した群では、明らかに皮膚顆粒層の肥厚が抑制されると共に、角質層の厚みが比較的良く保たれていた。これら

のことは、PDK4 阻害剤の有効性を示唆している。

一方、皮膚を機械的に搔破した温和な経皮感作実験系では、高感度IgSensor AMERIC[®]を使用することで、OVM 抗原特異的IgE抗体の産生がモニターされた。実験系を図7に示す。初回の皮膚搔破の後、1週間皮膚の治療が行われたが、その皮膚治療の効果をOVMの抗原経皮感作と、抗原の経口ブースト感作でOVM特異的IgE産生を増幅誘

発してモニターした。この実験系では、初回の経皮感作(10日間の経皮感作)のみでは、OVM特異的IgE抗体産生は観察されず、その後の比較的大量の経口抗原ブースト感作することで、図8に示すようにIgE抗体は14日目に急速な増加を見た。一方、機械的搔破後にPDK4阻害剤を添加したローションで1週間治療した群では、その後の経皮抗原感作によってもIgE抗体産生の程度は弱く、経口抗原ブー

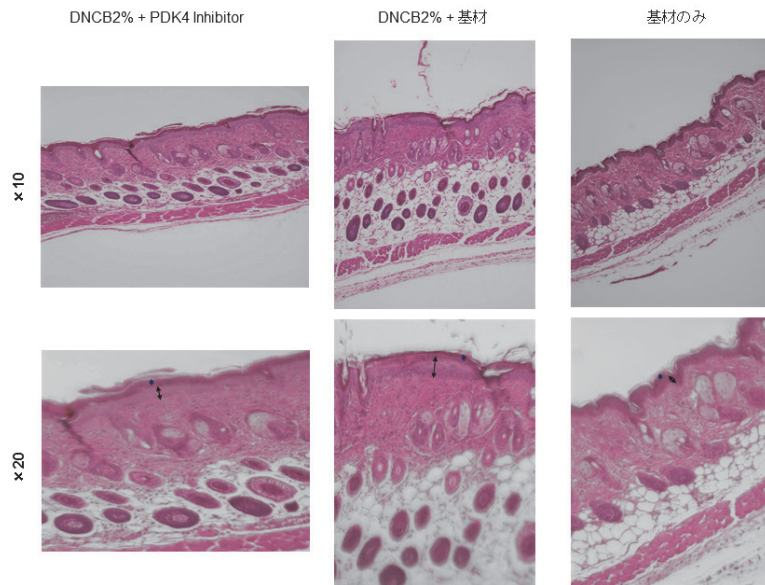


図6 DNCB 皮膚炎モデルにおける PDK4 阻害剤の皮膚顆粒層と角質層の保全効果
皮膚顆粒層(←→)と顆粒層の上部に位置する角質層(⇨)を示す。

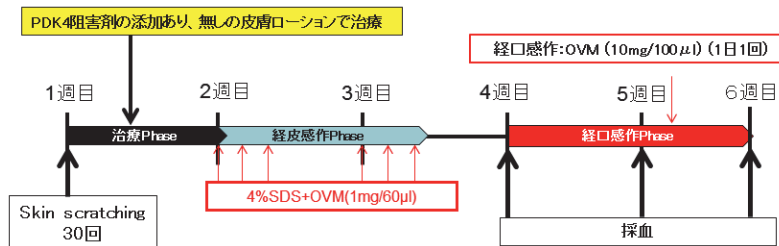


図7 皮膚搔破とその治療、これに続く経皮抗原感作スケジュール

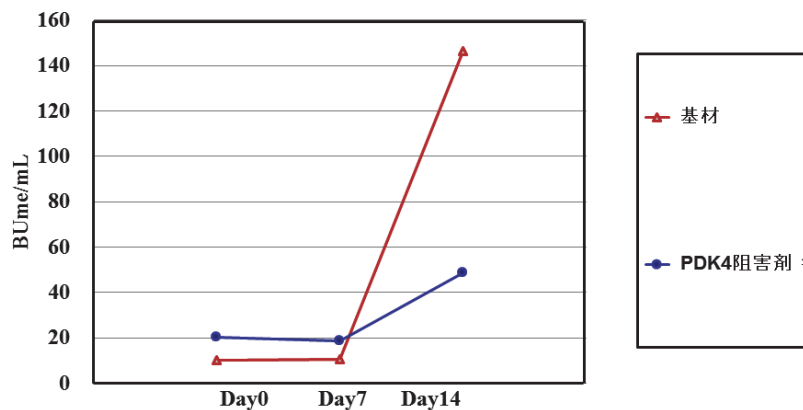


図8 OVM 経皮感作による OVM 特異的 IgE 抗体の産生と、これを抑制する PDK4 阻害剤添加皮膚ローションの効果

スト感作によるIgE産生が抑制されていた。

4. 総括

「皮膚顆粒細胞の活性化とタイトジャンクション修復による皮膚バリア機能増強とアトピー・アレルギー皮膚炎の発症予防」を目指して研究が行われた。そのため、高感度抗原特異的抗体のクラススイッチモニター系の確立と、このシステムを用いたタイトジャンクション修復による皮膚バリア機能増強効果の検証が、PDK4阻害剤を候補薬剤として検討された。その結果、PDK4阻害剤は、タイトジャンクション修復に効果のあることが証明された。今後皮膚顆粒細胞の活性化とタイトジャンクション修復に適したさらなるPDK4阻害剤のスクリーニングが求められる。また今後イムノグラブリンクラススイッチを高感度にモニターすることで、経皮感作を効果的に防止する最適な薬剤使用の時期を示すバイオマーカーが見いだされると期待している。

(引用文献)

- 1) Horimukai K, Morita K, Narita M, Kondo M, Kitagawa H, Nozaki M, Shigematsu Y, Yoshida K, Niizeki H, Motomura K, Sago H, Takimoto T, Inoue E, Kamemura N, Kido H, Hisatsune J, Sugai M, Murota H, Katayama I, Sasaki T, Amagai M, Morita H, Matsuda A, Matumoto K, Saito H, Ohya Y. Application of moisturizer to neonates prevents development of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 134(4): 824-830, 2014.
- 2) Yoshida K, Kubo A, Fujita H, Yokouchi M, Ishii K, Kawasaki H, Nomura T, Shimizu H, Kouyama K, Ebihara T, Nagao K, Amagai M. Distinct behavior of human Langerhans cells and inflammatory dendritic epidermal cells at tight junctions in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 134(4): 856-83064, 2014.
- 3) Wang S, Le TQ, Kurihara N, Chida J, Cissé Y, Yano M, and Kido H. Influenza virus-cytokine-protease cycle in the pathogenesis of vascular hyperpermeability in severe influenza. *J Infect Dis* 202(7):991-1001, 2010.
- 4) Kido H. Influenza virus pathogenicity regulated by host cellular proteases, cytokines and metabolites, and its therapeutic options. *Proc Jpn Acad Ser B* 91: 351-368, 2015.
- 5) Kido H, Okumura Y, Takahashi E, Pan H-Y, Wang S, Yao D, Yao M, Chida J and Yano M. Role of host cellular proteases in the pathogenesis of influenza and influenza-induced multiple organ failure. *Biochim Biophys Acta* 1824(1): 186-194, 2011.
- 6) Suzuki K, Hiyoshia M, Tada H, Bando M, Ichioka T, Kamemura N, and Kido H. Allergen diagnosis microarray with high-density immobilization capacity using diamond-like carbon-coated chips for profiling allergen-specific IgE and other immunoglobulins. *Anal Chim Acta* 706(2): 321-327, 2011.
- 7) Kamemura N, Tada H, Shimojo N, Morita Y, Kohno Y, Ichioka T, Suzuki K, Kubota K, Hiyoshi M and Kido H. Intrauterine sensitization of allergen-specific IgE analyzed by a highly-sensitive new allergen microarray. *J Allergy Clin Immunol* 130:113-121, 2012.
- 8) Kamemura N, Kawamoto N, Nakamura R, Teshima R, Fukao T, and Kido H. Low-affinity allergen-specific IgE in cord blood and affinity maturation after birth. *J Allergy Clin Immunol* 133(3): 904-905, 2014.
- 9) Zhang EY, Chen AY, Zhu BT. Mechanism of dinitrochlorobenzene-induced dermatitis in mice: Role of specific antibodies in pathogenesis. *PLoS one* 4, e7703, 2009.
- 10) Kamemura N, Kawamoto N, Nakamura R, Teshima R, Fukao T, Kido H. Low-affinity allergen-specific IgE in cord blood and affinity maturation after birth. *J Allergy Clin Immunol* 133(3): 904-905, 2014.
- 11) Flohr C, Perkin M, Logan K, Marrs T, Radulovic S, Campbell LE, et al. atopic dermatitis and disease severity are the main risk factors for food sensitization in exclusively breastfed infants. *J Invest Dermatol* 134:345-50, 2014.
- 12) Lack G. Update on risk factors for food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 129: 1187-1197, 2012.
- 13) Yamane K, Indalao IL, Chida J, Yomamoto Y, Hanawa M, Kido H. Diisopropylamine dichloroacetate, a novel pyruvate dehydrogenase kinase 4 inhibitor, as a potential therapeutic agent for metabolic disorder and multiorgan failure in severe influenza. *PLoS One* 9(5):e98032, 2014.

皮下組織のコラーゲンが体の温度適応に与える影響

甲南大学理工学部／統合ニューロバイオロジー研究所

久原 篤、太田 茜

Temperature is important environmental information. Animals therefore have acclimation and habituation mechanisms for changing environmental temperature. In this study, we used nematode *Caenorhabditis elegans* for studying temperature acclimation mechanisms. We found that a collagen known as an essential cortical component in many animals involved in cold acclimation, implying that our experimental system is useful for studying fundamental cosmetology research.

1. 緒言

温度は生物にとって重要な環境情報であるため、生物は環境温度の変化に適応し、生存するメカニズムをもっている。その中において、皮膚を構築する皮下組織の状態とその変化は、表皮の乾燥状態や柔軟性およびそれらによって起きる変化にとって重要なものである。本研究では、シンプルな実験動物である線虫 *C. elegans* を用いて、低温適応を介した温度適応メカニズムに関わる分子をスクリーニングしたところ、皮質成分として知られているコラーゲンをコードする遺伝子が多数単離されたため、その解析の現状を記載する。

生物の環境への適応として、高温環境や低温環境に対する適応があげられる。そのうち、低温環境に対する適応（低温適応）の研究は、高等動物だけでなく、植物や昆虫等においても行われている。低温適応とは、通常の生育温度よりも低温の環境でも生存できる性質のことであり、植物にも昆虫にも共通してみられる低温に対する耐性機構として、生体膜の不飽和脂肪酸含有量が多いことや、細胞内にアミノ酸などの凍結しにくい物質をもつことなどがあげられる。温度適応に関して、温度受容とアウトプットの代謝等についての解析は進んできたが、皮下組織のコラーゲンの観点からは未開拓であった。その理由は、個体を構成する細胞数が多い場合、特定の組織の一部と体全体との関係性を明らかにするためには時間を要するためであった。そこで、本研究では、シンプルな実験系を使い、温度適応に関わる新規分子の同定を行った。その中で、皮下組織の重要因子として知られているコラーゲンが単離された。

線虫 *C. elegans* は、959 個の体細胞で構成され、体長が

約 1mm の土壤中に生育する非寄生性の線虫である¹⁾。また、全塩基配列が決定されており、ゲノムサイズはモデル動物の中でも特に小さい約 100Mb である。全遺伝子の約 36% がヒトの相同遺伝子であるため、線虫で機能する遺伝子をヒトと対応付けしやすい。*C. elegans* の生活環は短く（野生型では 20℃ で約 3.5 日）、通常は雌雄同体で系統維持が簡単なことに加え、0.1% の頻度で出現する雄を利用して交配が可能であるため、遺伝的解析にも適している。

C. elegans の高温に対する耐性のひとつとして、耐性幼虫形成機構があげられる。*C. elegans* の生育温度は約 13 ~ 27℃ で、それよりも高温になると大多数の個体が耐性幼虫になる²⁾。耐性幼虫では体は細く、活動が鈍くなりエネルギー状態も低くなる。一方、ある温度で飼育された *C. elegans* は低温でも生育できることが最近見つかった^{3,5)}。具体的には、15℃ で飼育した *C. elegans* は 2℃ で 48 時間の低温にも耐えられるが、25℃ で飼育した *C. elegans* は低温に耐えられず、死滅してしまう（図 1）。低温適応の分子生理機構がこれまでに解析されてきており、頭部に存在する ASJ 感覚ニューロンが温度を受容すると、ASJ からインスリンが分泌され、腸や神経系がインスリンを受容し、低温適応が制御されていることが明らかとなっている（図 2）³⁾。一方で、他の組織や分子機構については未知の点が多い。そこで、*C. elegans* の低温適応の実験系を利用して、新規の分子の同定を目指した。本研究では、その最新のスクリーニングのなかで、コラーゲンをコードする遺伝子が多数見つかった。

2. 実験

2. 1. 低温適応テスト

20℃ で飼育した野生型の *C. elegans* を、4 個体ずつ新しい NGM プレートに植え継ぎ（P0）、各飼育温度（15、20、25℃）で 5 時間飼育し産卵させる。P0 を除去し、卵（F1）を各飼育温度で飼育する。F1 が adult まで成長したら、NGM プレートの蓋を上に向けた状態で、氷上に 20 分間置く。NGM プレートをタッパーに入れ、メディカルキャビネット内で 48 時間、低温刺激温度（2℃）で飼育する（cold



Collagen in hypodermis affects temperature acclimation of animal

Atsushi Kuhara, Akane Ohta

Faculty of Science and Engineering, & Institute for Integrative Neurobiology, Konan University

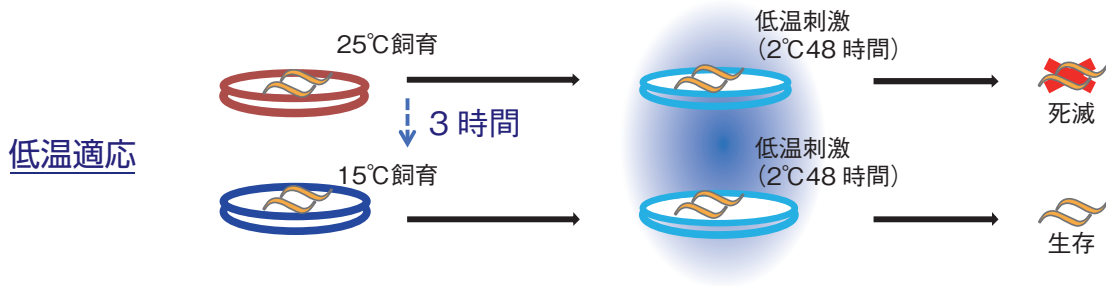


図1 線虫の低温適応

15°Cで飼育した *C. elegans* は2°Cで48時間の低温にも耐えられるが、25°Cで飼育した *C. elegans* は低温に耐えられず、死滅する。

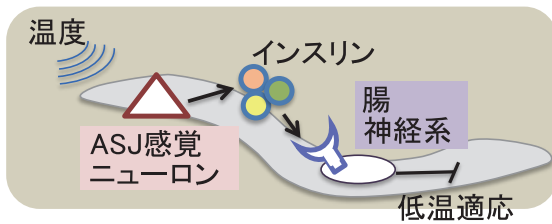


図2 線虫の低温適応の分子組織ネットワーク

頭部に存在する ASJ 感覚ニューロンが温度を受容すると、ASJ からインスリンが分泌され、腸や神経系がインスリンを受容し、低温適応が制御されている。

shock)。cold shock 後、キャビネットからタッパーを取り出し、15°Cで一晩置き、翌日生存個体と死滅個体を数え、生存率を算出する⁶⁾。

変異体を使用したテストでも同様の条件で行った。

1回のテストに、3枚のNGMプレートを用意し、これを3回試行した。

2.2. 温度適応細胞のトランスクリプトーム解析

温度受容に関わる細胞と温度を受容しない細胞それぞれから、mRNAを単離し、量を比較することで、温度受容に関わる細胞特異的に発現している遺伝子を同定する。

2.3. Single cell mRNA 解析の方法

1細胞からのmRNA取得法の大部分は、杉らの方法に従った⁷⁾。

温度受容に関わる細胞と、温度を受容しない細胞に遺伝子導入した個体を集収。成虫4個体を6～8時間産卵させてその後取り除き、各温度で飼育して成虫になった時点でM9緩衝液で回収した。6cm NGM 1プレートあたり100～200個体の成虫を回収した。

ホモジナイズ。回収して洗浄した線虫を固定後、液体窒素で凍結させてからホモジナイズした。

anti-FLAGのついたbeads (anti-Flag M2 beads: SIGMA) で免疫沈降後、mRNAを採取 (RNeasy Min Elute Kit: QIAGEN)。

RNAseq用のcDNAライブラリー作製。SMARTseq v4 Ultra Low Input (タカラバイオ)にてcDNA合成後、Agencourt AMPure XP kit (Beckman)にてcDNA断片を精製した。

2.4. 多段階温度シフト解析

(例:15°C→25°C(3時間)→2°C)

実験で使用する adult の *C. elegans* を、1個体ずつ新しいNGMプレートに植え継ぎ (P0)、飼育温度 (15°C) で24～30時間飼育し産卵させた。P0を除去し、卵 (F1) が adult になるまで、各飼育温度で飼育し続けた (15°Cでは約6日)。F1が adult まで成長したら、25°Cインキュベーター内で3時間静置した。その後、NGMプレートの寒天側を下にして、氷上に20分間おいた。NGMプレートをメディカルキャビネット内で48時間、各低温刺激温度 (2°C) で静置した (cold shock)。48時間後、メディカルキャビネットから取り出し、15°Cインキュベーター内で1日静置した後、生存個体と死個体を数え、生存率を算出した。

3. 結果

3.1. コラーゲン遺伝子の変異体が低温適応に異常をもつ

7つのパターンの温度刺激や飼育温度の条件で飼育した個体を用いて、温度受容に関わる細胞と、温度を受容しない細胞のそれぞれから採取したmRNAサンプルを単離し、比較解析を行った。具体的な温度刺激のパターンとしては、①15°C飼育、②20°C飼育、③25°C飼育、④25°Cを3時間経験後15°Cに温度シフト、⑤25°Cを18時間経験後15°Cに温度シフトし、⑥15°Cを3時間経験後25°Cに温度シフト、⑦15°Cを18時間経験後25°Cに温度シフト、の7つの条件である。これらのmRNAをcDNAに逆転写し、次世代シーケンサー解析に用いるcDNAライブラリーを作製し、それらのcDNAライブラリーを用いて、次世代DNAシーケンサーにより解析した (図3)。その結果、20°C飼育個体の温度受容に関わる細胞と、温度を受容しない細胞を比較解析し、温度受容に関わる細胞で特異的

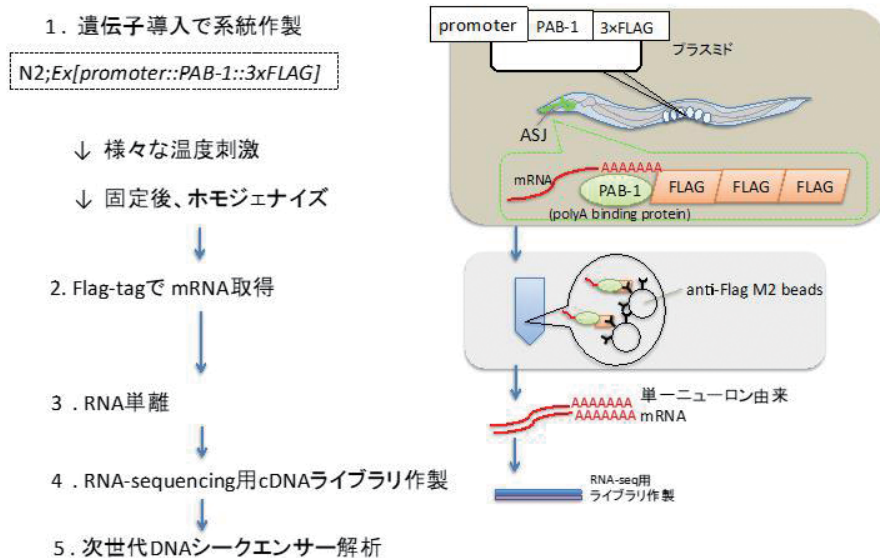


図3 Single cell mRNA 解析方法

細胞特異的プロモーターを使い、mRNAのポリAに結合するタンパク質であるPAB-1 (polyA binding protein)を発現させた。このPAB-1には、FLAG タグを3つ つないだ。この系統に様々な温度刺激を与え、固定した後に、ホモジェナイズし、FLAG タグを用いて免疫沈降によってmRNAを単離した。それを基に、RNA-seq用のcDNAライブラリを作成し、次世代シーケンサーで解析した。

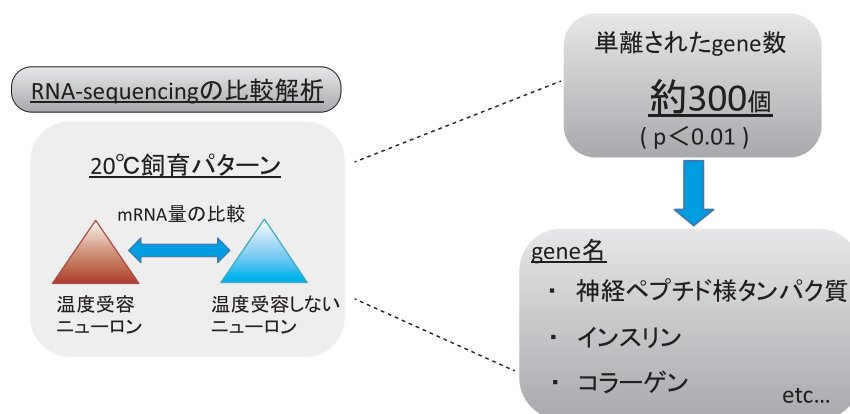


図4 RNA-seqの比較解析

20°C飼育個体の温度受容に関わる細胞と、温度を受容しない細胞を比較解析し、温度受容に関わる細胞で特異的に発現変動の高い遺伝子として、約613個の遺伝子が単離された。

に発現変動の高い遺伝子として、約300個の遺伝子が単離された(図4)。他の温度刺激条件においても多数の遺伝子の発現変動が観察された。これらの遺伝子には、コラーゲン、神経ペプチド様タンパク質、インスリンなどをコードする遺伝子が含まれていた。そこで、コラーゲンをコードする *bli-6* 変異体について低温適応を測定したところ、15°Cで卵から成虫まで飼育後に2°Cで48時間の低温刺激を与えると、野生株と同様にほぼ全ての個体が生存した。また、25°Cで卵から成虫まで飼育後に2°Cで48時間の低温刺激を与えると、野生株と同様にほぼ全ての個体が死滅した。これらの結果からは顕著な異常が観察されなかったため、15°Cで卵から成虫まで飼育後に、25°Cを3時間経験

させるタイムコース解析を行った。その結果、この条件で温度刺激を与えた場合には、野生株は、ほぼ全ての個体が死滅したのに対して、*bli-6* 変異体は、大多数の個体が生存する異常が観察された(図5)。

3. 2. 低温適応時の脂質構成率の変化

低温適応の制御に関して、神経系と腸以外に関与する組織が分かっていなかったため、DNAマイクロアレイ解析でインスリン経路の下流ではたらく遺伝子を同定し発現領域を調べた。その結果、生殖組織、特に精子で発現する遺伝子が多いことが明らかとなった。精子変異体の解析で低温適応異常が見られたことから、精子が低温適応に影響を

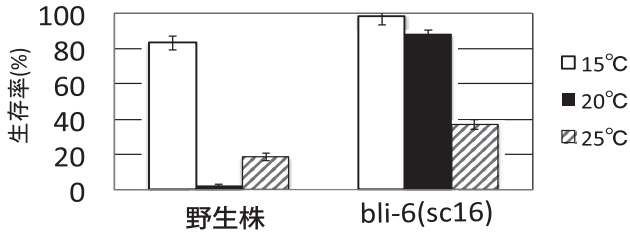


図5 コラーゼン *bli-6* 変異体の低温適応

bli-6 変異体は、15°Cで飼育後に2°Cで48時間の低温刺激を与えると、野生株と同様に生存した。25°C飼育後に低温刺激を与えると、野生株と同様に死滅した。15°Cで飼育後に、25°Cを3時間経験させた場合には、野生株は死滅したのに対して、*bli-6* 変異体は生存する異常が観察された。縦軸は生存率(%)。

与えることが明らかとなった⁸⁾。

線虫を含む多くの生物において、体を構成する様々な脂肪酸の比率は低温適応に大きく影響することが知られていたため、野生株と精子特異的プロテインフォスファターゼPP1を欠損する *gsp-4* 変異体の脂肪酸の脂質割合を測定した。野生株と *gsp-4* 変異体の脂肪酸組成を比較した結果、18:2n-6 や 18:3n-3 などの幾つかの脂肪酸において、野生株と *gsp-4* 変異体の間で弱いながらも優位な差が観察された⁸⁾。つまり、精子の異常により、体内の膜脂質の構成が変化し、低温適応に影響を与えている可能性が考えられる。

4. 考 察

温度シフトにおけるコラーゲンをコードする複数の遺伝子の発現量が変化していた。コラーゲンをコードする *bli-6* 変異体について低温適応を測定したところ、温度適応の異常が観察されたことから、コラーゲンの低温適応へ

の関与が示唆される。この *bli-6* 遺伝子は、感覚ニューロンだけでなく、他の多くの細胞でも発現しているため、今回見つかった低温適応の異常がどの細胞の異常によるかについては、今後の細胞特異的な回復実験などで明らかになると考えられる。さらに、*bli-6* 以外のコラーゲンの遺伝子の変異体やRNAi処理系統において、低温適応を測定したところ、生存率がコントロールである野生株や、RNAi用の plasmid vector をもつ大腸菌株 HT115 よりも上昇した。遺伝子発現量の増減と低温適応との相関性は、現在解析中である。

今回の解析から、線虫 *C. elegans* において、精子が低温適応に関与することが見つかった。さらに、他の解析から、最近、精子が頭部の温度受容ニューロン ASJ に影響を与えることで低温適応が調節されることを見つけてきた。これらの結果から、低温適応の組織ネットワークのメカニズムの一端が見えてきたと考えられる。

5. 総 括

コスメトロジーにおいて、皮膚および皮下組織の状態変化は、表皮の乾燥や柔軟性の状態やそれに伴う恒久的な変化にも繋がる重要なファクターである。その中において、皮下組織のコラーゲンは、真皮などを構成するタンパクであり、その状態は細胞外基質の状態を変化させ、皮膚および皮下組織に大きな影響を与える重要分子である。コラーゲンは、複数のコラーゲン分子同士が、縄を作るようにお互いに巻き付き、それらが集合することで繊維状構造を作り、皮下組織を構築している。そのため、コラーゲンの状態を制御する分子を見つけることで、コスメトロジーにお

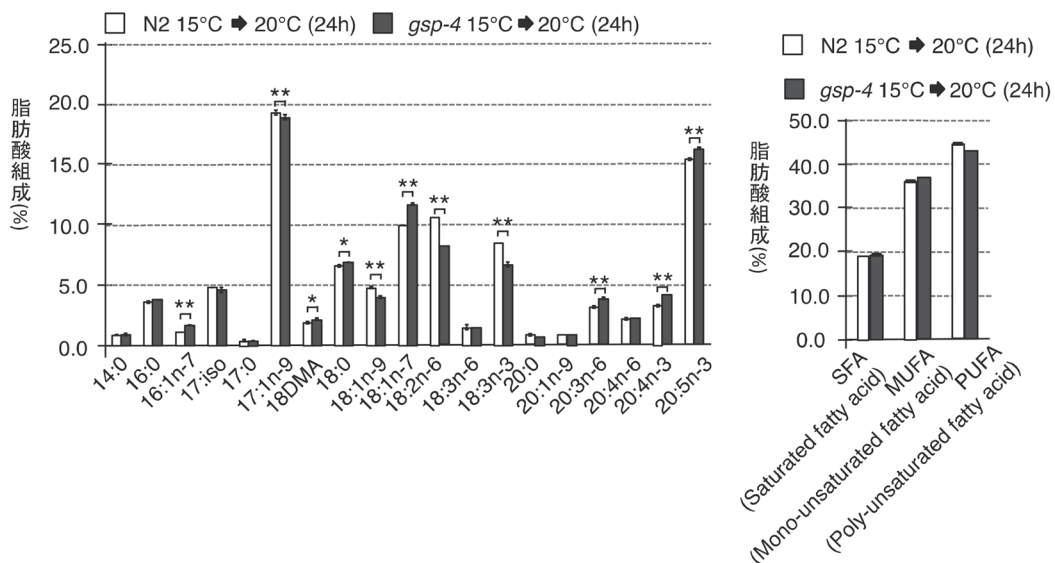


図6 野生型と精子変異体 *gsp-4* との脂肪酸組成の比較解析

野生株と *gsp-4* 変異体の総脂質を比較。18:2n-6 や 18:3n-3 などにおいて、野生株と *gsp-4* 変異体の間で優位差。文献⁸⁾より引用一部改変。

いて大きな波及効果がある。

皮膚は温度に過敏であり、環境温度の状態により、表皮および皮下組織の状態は大きく変化する。その際にはコラーゲンの構成パターンの変化が必要であることは知られているが、これまでにコラーゲンと個体全体の温度の適応に関与することは知られていない。そのため、本研究から皮下組織のコラーゲンと温度適応の関係を明らかにすることで、将来的に、例えば、化粧品含有化学物質と皮下組織と体感温度との関係などが明らかになり、体に良い影響を与えながら、より快適に使用できる化粧品や皮膚薬成分の検証などに繋がることが期待される。

(引用文献)

- 1) S. Brenner, The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**, 71 (1974).
- 2) N. Fielenbach, A. Antebi, *C. elegans* dauer formation and the molecular basis of plasticity. *Genes Dev* **22**, 2149 (Aug 15, 2008).
- 3) A. Ohta, T. Ujisawa, S. Sonoda, A. Kuhara, Light and pheromone-sensing neurons regulates cold habituation through insulin signalling in *Caenorhabditis elegans*. *Nature communications* **5**, 4412 (2014).
- 4) P. Murray, S. A. Hayward, G. G. Govan, A. Y. Gracey, A. R. Cossins, An explicit test of the phospholipid saturation hypothesis of acquired cold tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 5489 (Mar 27, 2007).
- 5) F. R. Savory, S. M. Sait, I. A. Hope, DAF-16 and Delta9 desaturase genes promote cold tolerance in long-lived *Caenorhabditis elegans* age-1 mutants. *PLoS One* **6**, e24550 (2011).
- 6) T. Ujisawa, A. Ohta, O. M., S. S., A. Kuhara, Cold tolerance assay for studying cultivation-temperature-dependent cold habituation in *C. elegans*. *Protocol Exchange*, (2014).
- 7) T. Sugi, Y. Ohtani, Simplified method for cell-specific gene expression analysis in *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical and biophysical research communications* **450**, 330 (Jul 18, 2014).
- 8) S. Sonoda, A. Ohta, A. Maruo, T. Ujisawa, A. Kuhara, Sperm affects head sensory neuron in temperature tolerance of *Caenorhabditis elegans*. *Cell Reports*, (2016).

新規ナノ粒子を用いた皮内 siRNA デリバリーによる皮膚の恒常性維持

長崎大学病院薬剤部

佐々木 均

To advance the therapeutic outcome of the skin disease, small interfering RNA (siRNA) is expected. However, the therapeutic use of siRNA requires a drug-delivery system because unmodified naked siRNA is immediately degraded by nucleases, it penetrates poorly through the plasma membrane, and it induces interferon responses after systemic injection. For safe and effective delivery of siRNA, we developed binary complex based on dendrigraft poly-L-lysine (DGL) and ternary complex which was constructed by addition of γ -polyglutamic acid (γ -PGA) to binary complex. The siRNA which could knock down the firefly luciferase gene was used as a model siRNA. The complexes were approximately 50-140 nm in particle size. The binary complex showed a cationic surface charge although an anionic surface charge was observed in the ternary complex. The binary complex and the ternary complex showed a significant silencing effect in the mouse melanoma B16-F10 cell expressing luciferase regularly (B16-F10/Luc cells). The binary complex showed significant cytotoxicity and blood agglutination although the ternary complex decreased these toxicities. Furthermore, the ternary complexes showed significantly silencing effects in the tumor-metastasized mice *in vivo*. Thus, we developed the siRNA vector having a potential to become a new nucleic medicine in skin disease therapy.

1. 緒言

皮膚は人体最大の臓器であり、絶え間ない異化同化を繰り返し、恒常性を保っている。しかし、外来抗原や紫外線などの刺激、表皮の細菌増殖、老化などにより、恒常性が破綻すると、しみ・そばかす、にきび、アレルギー疾患、感染症、膠原病、悪性腫瘍など、様々な疾患が引き起こされる。

近年、これらの疾患の理解が進み、治療標的として遺伝子やタンパク質が同定されている。特に遺伝子量やタンパク量を制御できる small interfering RNA (siRNA) への期待は大きい。しかし、核酸物質は生体内での安定性や持続性に劣り、皮膚透過性や細胞内取り込みが低い。このため、核酸物質を皮膚の標的細胞内へ安全に高効率に導入できる Drug Delivery System (DDS) 技術との組み合わせが有用である。現在、核酸医薬の DDS を目的とした微粒子、高分子および多機能性キャリアなどのベクター開発が活発に行われ、世界的な競争が展開されている。国内外において、導入効率の高いウイルスベクターを用いた研究が主流に行われてきたが、安全性や標的指向性の欠如が問題となっており、臨床応用には至っていない。導入効率の低い非ウイルスベクターにおいては、カチオン性成分が広く用いられてきたが、永年にわたる研究にもかかわらず、未だに実用

化には至っていない。この背景には、不十分な遺伝子発現効率や、血中投与後の細胞毒性や血液毒性などの問題点が挙げられる。

我々は、核酸物質と様々な電荷を持った高分子とを静電的に自己組織化させることで、安全性が高く、高効率に遺伝子を発現できるナノ粒子の構築に成功した(特願2012-501869, PCT/JP2011/054195)。このナノ粒子は表面が負電荷であり、細胞毒性を示さない^{1,2)}。また、サプリメントや医薬品に使用されている既知の成分により構築しているため、生体適合性および安全性が高く、迅速な臨床応用が可能である。

本研究では、我々が開発した画期的ナノ粒子を用いて、核酸物質を皮膚の標的部位へ安全かつ高効率に送達させることで、RNA干渉を引き起こすことを目的とする。皮膚モデルとして、マウスメラノーマ細胞株B16-F10細胞を用い、遺伝子発現抑制を評価するために、ルシフェラーゼを恒常発現させた細胞株B16-F10/Lucを作製した。核酸物質のモデルとして、核酸物質のDDS研究で汎用されるルシフェラーゼを抑制する siRNA を用い、ナノ粒子を作製した。作製したナノ粒子の細胞取り込み、遺伝子発現抑制および細胞毒性を B16-F10/Luc 細胞を用いて評価した。さらに、メラノーマ肺転移モデルマウスを作製し、*in vivo* における有用性についても評価した。

2. 方法

2.1. ナノ粒子の作製

siRNA として、ホタルルシフェラーゼを抑制する siRNA (センス鎖: 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT-3', アンチセンス鎖: 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTT-3') および scramble siRNA (センス鎖: 5'-CUUACGCUGUCAU



Maintenance of skin homeostasis by intradermal siRNA delivery using novel nano particles

Hitoshi Sasaki

Department of Hospital Pharmacy, Nagasaki University Hospital

GAUCGAdTdT-3'、アンチセンス鎖：5'-UCGAUCAUGACAGC GUAAGdTdT-3'を用いた。siRNAと第5世代のdendrigrapt poly-L-lysine (DGL)を様々な電荷比で組み合わせ、siRNA-DGL複合体を調製した。さらに、siRNA-DGL複合体にγ-PGAを様々な電荷比で添加し、siRNA-DGL-γ-PGA複合体を構築した。ポジティブコントロールとしてsiRNA-invivofectamine複合体も作製した。

2. 2. ナノ粒子の製剤学的評価

作製したナノ粒子の粒子径および表面電荷をZetasizer Nano ZS (Malvern社)で測定した。複合体の安定性を評価するために、アガロース電気泳動を行った。泳動後のゲルは、Gel Doc EZ Systemを用いて観察した。また、透過型電子顕微鏡JEM-1230 (日本電子株式会社)を用いてナノ粒子の形状を観察した。

2. 3. in vitroにおける遺伝子発現抑制の評価

細胞はルシフェラーゼを恒常発現しているマウスメラノーマ細胞株B16-F10/Luc細胞を用いた。B16-F10/Luc細胞を 1×10^4 個播種し、24時間前培養した。その後、siRNAの濃度が $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるようにOPTIMEMI培地で希釈した各ナノ粒子を細胞に添加し、2時間インキュベートした。インキュベート後の細胞を、RPMI1640でさらに22時間培養した。培養後に細胞をlysis bufferで溶解し、細胞中のルシフェラーゼ活性を測定した。

2. 4. in vitroにおける細胞毒性

B16-F10/Luc細胞を 3×10^3 個播種し、24時間前培養した。その後、siRNAの濃度が $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるようにOPTIMEMI培地で希釈した各ナノ粒子を細胞に添加し、2時間インキュベートした。インキュベート後の細胞をRPMI1640でさらに22時間培養し、WST-1 assayにより細胞毒性を評価した。

2. 5. メラノーマ肺転移に対する遺伝子抑制効果

C57BL/6NマウスにB16-F10/Luc細胞を 1×10^5 個静脈内投与し、メラノーマ肺転移マウスを作製した。細胞投与後14日目に、siRNA-DGL6-γ-PGA10複合体 (siRNA40 μg)を尾静脈内投与した。複合体投与24時間後(細胞投与後15日目)に肺を摘出し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

3. 結果

3. 1. siRNA-DGL複合体の製剤学的評価

siRNA-DGL複合体の粒子径と表面電荷を測定した。siRNA-DGL複合体は51-90 nmの粒子径、24-44 mVの表面電荷を示した(表1)。複合体の安定性を評価するために電気泳動を行った。Naked siRNAではバンドが確認

された。一方、siRNA-DGL複合体においては、siRNA-DGL2複合体でわずかなsiRNAの流出が観察されたが、その他のsiRNA-DGL複合体ではバンドは確認されなかった(図1)。siRNA-DGL複合体のsiRNA封入率を評価した。siRNA-DGL2複合体の封入率は89.2%であったが、電荷比が増加するにつれて封入率は上昇し、siRNA-DGL4, 6, 8, 10, 12複合体においてはほぼ100%の封入率であった(図2)。さらに、siRNA-DGL6複合体の形状を観察した結果、ゆがんだ球状であることが明らかとなった(図3)。

3. 2. in vitroにおけるsiRNA-DGL複合体の遺伝子抑制効果

siRNA-DGL複合体の遺伝子抑制効果をB16-F10/Luc細胞を用いて評価した。ルシフェラーゼを抑制するsiRNA

表1 siRNA-DGL複合体の粒子径と表面電荷

Complexes	Size (nm)	ζ-potential (mV)
siRNA-DGL2	51.3 ± 34.0	24.5 ± 1.2
siRNA-DGL4	66.4 ± 6.5	38.6 ± 0.2
siRNA-DGL6	89.5 ± 42.9	41.4 ± 0.7
siRNA-DGL8	64.6 ± 9.1	39.3 ± 0.7
siRNA-DGL10	57.2 ± 57.0	43.9 ± 0.5
siRNA-DGL12	59.3 ± 17.3	39.6 ± 1.5

Each value represents the mean ± S.D. (n = 3)

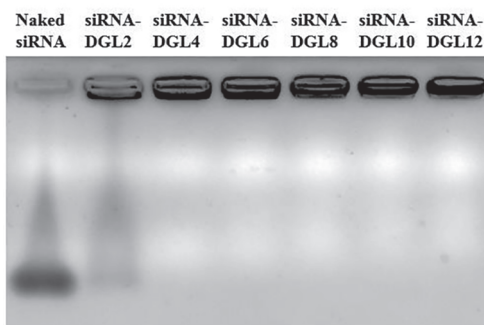


図1 siRNA-DGL複合体の電気泳動

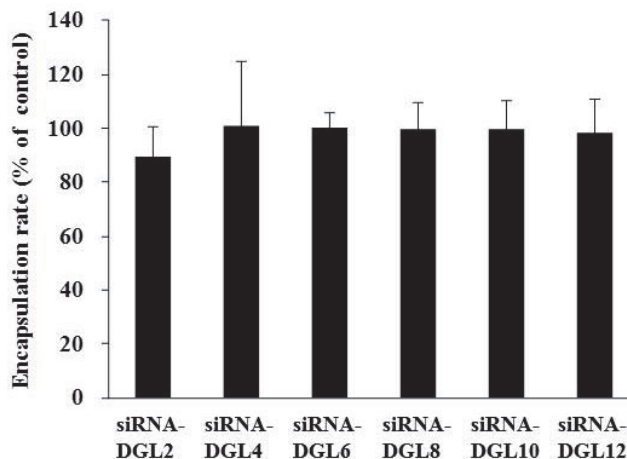


図2 siRNA-DGL複合体の封入率

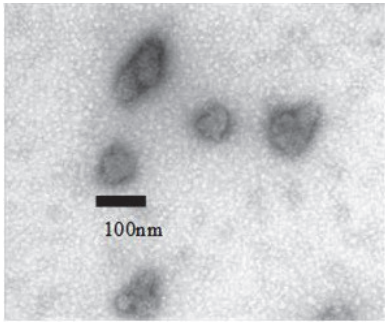


図3 siRNA-DGL 複合体の TEM image

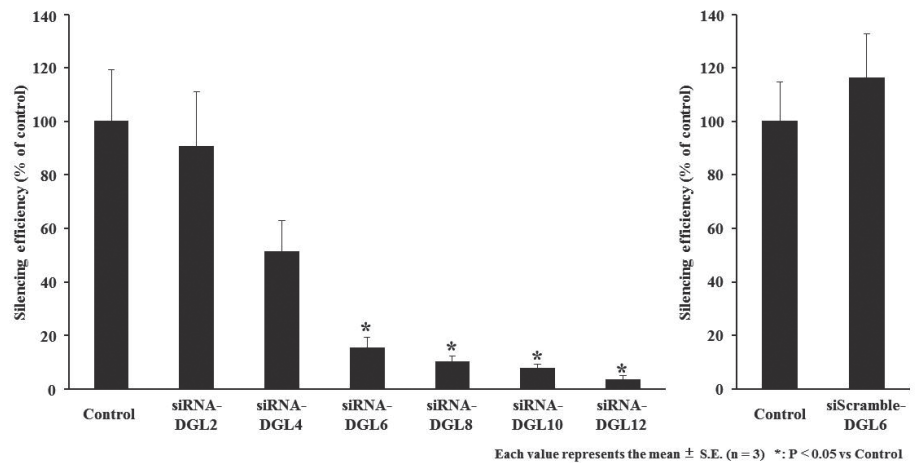


図4 siRNA-DGL 複合体の遺伝子抑制効果

を内包した siRNA-DGL6, 8, 10, 12 複合体は細胞中のルシフェラーゼ活性を有意に抑制した。一方、スクランブル siRNA を内包した siRNA-DGL 複合体では遺伝子抑制効果を示さなかった(図4)。

3. 3. in vitroにおける siRNA-DGL 複合体の細胞毒性

siRNA-DGL 複合体を B16-F10/Luc 細胞に添加し、細胞生存率を WST-1 assay により測定した。電荷比が 2 および 4 の siRNA-DGL 複合体は細胞毒性を示さなかったが、電荷比が 6 以上の siRNA-DGL6, 8, 10, 12 複合体では有意な細胞毒性が認められた(図5)。

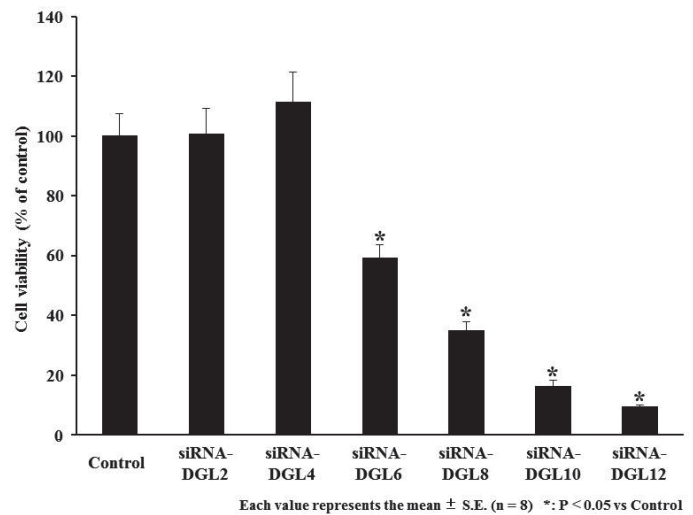


図5 siRNA-DGL 複合体の細胞毒性

3. 4. siRNA-DGL6-γ-PGA 複合体の製剤学的評価

siRNA-DGL6 複合体に様々な電荷比で γ-PGA を添加し、siRNA-DGL6-γ-PGA 複合体を調製し、粒子径と表面電荷を測定した(表2)。その結果、siRNA-DGL6-γ-PGA6 では凝集がみられ粒子径の測定ができなかったが、その他の siRNA-DGL6-γ-PGA 複合体は 64-140 nm の粒子径を示した。また、γ-PGA の添加量に比例して、表面電荷は低下し、電荷比が 6 以上で負電荷となった。複合体の安定性を評価するために電気泳動を行った。siRNA-DGL6-γ-PGA12 複合体でわずかな siRNA の流出が観察されたが、その他の siRNA-DGL6-γ-PGA 複合体ではバンドは確認されなかった(図6)。次に siRNA-DGL6-γ-PGA 複合体の siRNA 封入率を評価した。siRNA-DGL6-γ-PGA12 複合体の封入率は 76.8% とやや低かったが、その他の siRNA-DGL6-γ-PGA 複合体は 85% 以上の高い封入率を示した(図7)。また、siRNA-DGL6-γ-PGA10 複合体の形状を観察した結果、約 100 nm の球状のナノ粒子が観察された(図8)。

表2 siRNA-DGL-γ-PGA 複合体の粒子径と表面電荷

Complexes	Size (nm)	ζ-potential (mV)
siRNA-DGL6-γ-PGA4	139.2 ± 13.1	38.2 ± 0.5
siRNA-DGL6-γ-PGA6	n.d.	-5.9 ± 1.1
siRNA-DGL6-γ-PGA8	64.6 ± 13.3	-20.8 ± 0.7
siRNA-DGL6-γ-PGA10	117.1 ± 29.1	-35.1 ± 1.0
siRNA-DGL6-γ-PGA12	106.0 ± 56.1	-37.1 ± 1.3

Each value represents the mean ± S.D. (n = 3)

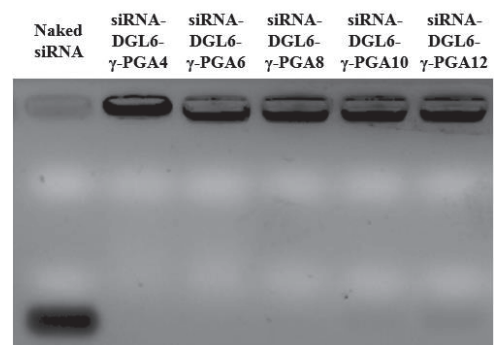


図6 siRNA-DGL-γ-PGA 複合体の電気泳動

3. 5. in vitroにおける siRNA-DGL6-γ-PGA 複合体の遺伝子抑制効果

siRNA-DGL6-γ-PGA 複合体の遺伝子抑制効果を

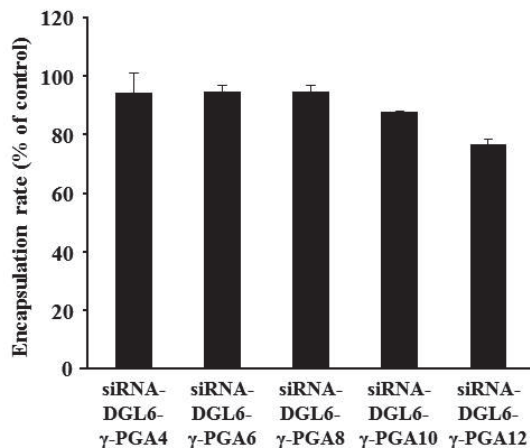


図7 siRNA-DGL- γ -PGA 複合体の封入率

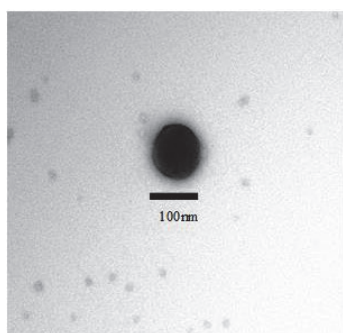


図8 siRNA-DGL- γ -PGA 複合体のTEM image

B16-F10/Luc細胞を用いて評価した。ルシフェラーゼを抑制するsiRNAを内包したsiRNA-DGL6- γ -PGA複合体の遺伝子抑制効果はsiRNA-DGL6複合体と同程度であり、B16-F10/Luc細胞中のルシフェラーゼ活性を有意に抑制した(図9)。

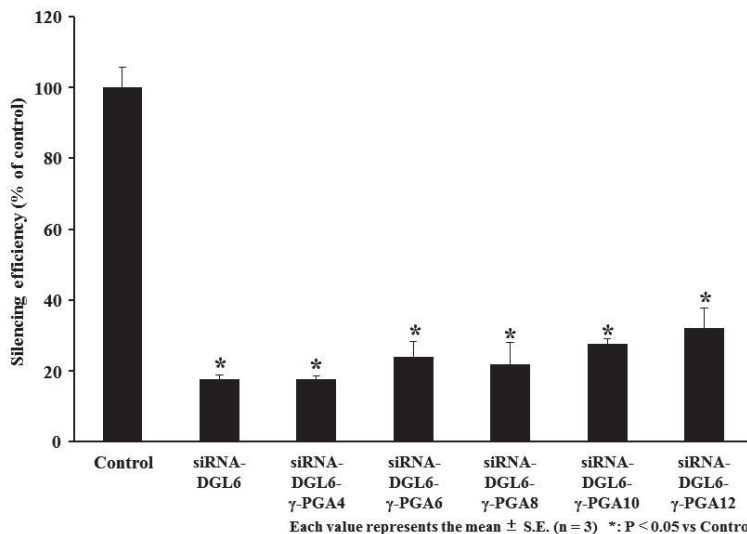


図9 siRNA-DGL- γ -PGA 複合体の遺伝子抑制効果

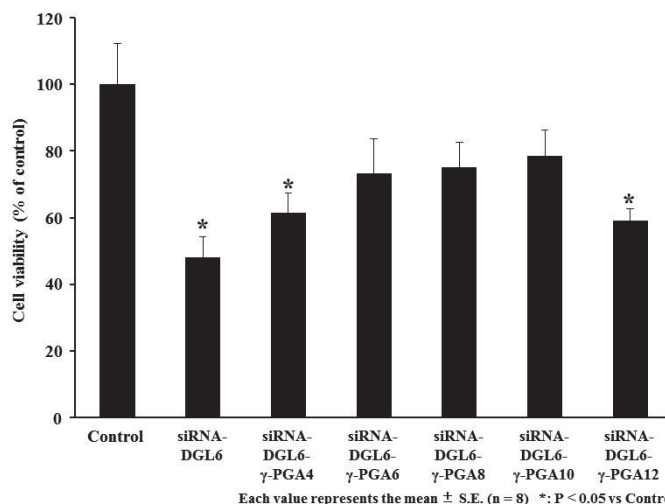


図10 siRNA-DGL- γ -PGA 複合体の細胞毒性

3. 6. in vitroにおけるsiRNA-DGL6- γ -PGA複合体の細胞毒性

siRNA-DGL6- γ -PGA複合体をB16-F10/Luc細胞に添加し、細胞生存率をWST-1 assayにより測定した。siRNA-DGL6- γ -PGA4複合体とsiRNA-DGL6- γ -PGA12複合体ではsiRNA-DGL6複合体と同様にコントロールと比較して有意な細胞毒性を示した。一方、siRNA-DGL6- γ -PGA6, 8, 10複合体においては、高い細胞生存率が認められた(図10)。

3. 7. 赤血球凝集試験

siRNA-DGL6複合体とsiRNA-DGL6- γ -PGA10複合体の血液毒性を赤血球凝集試験により評価した。siRNA-DGL6複合体は凝集を示したが、siRNA-DGL6- γ -PGA10複合体は凝集を示さなかった(図11)。

3. 8. メラノーマ肺転移に対するsiRNA-DGL6- γ -PGA10複合体の遺伝子抑制効果

siRNA-DGL6- γ -PGA10複合体をメラノーマ肺転移モデ

ルマウスに尾静脈内投与し、in vivoにおける遺伝子抑制効果の評価した。コントロールとして5%糖液を投与し、ポジティブコントロールとしてsiRNA-invivofectamine複合体を投与した。Naked siRNAおよびスクランブルsiRNAを内包したsiRNA-DGL6- γ -PGA10複合体では、遺伝子抑制効果を示さなかった。一方、ルシフェラーゼを抑制するsiRNAを内包したsiRNA-DGL6- γ -PGA10複合体はsiRNA-invivofectamine複合体に匹敵する高い遺伝子抑制効果を示した(図12)。

4. 考察

デンドリマーは、中心から規則的に分枝した構造を持つ樹状高分子であり、分岐度が高い、対称性が良い、分子構造と分子量の分布を持たないといったユニークな特徴を有しており、遺伝子ベクターとしての有用性が報告されている³⁻⁵⁾。今回使用したDGLはアミノ酸であるリジンだけで

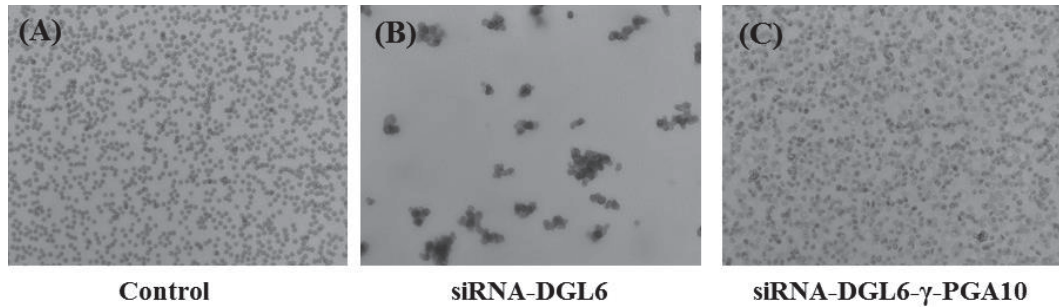
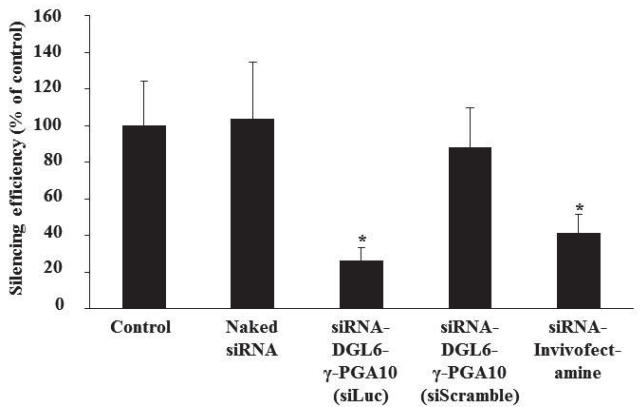


図 11 siRNA-DGL-γ-PGA 複合体の赤血球凝集



Each value represents the mean \pm S.E. (n = 4) *: P < 0.05 vs Control

図 12 メラノーマ肺移転に対する siRNA-DGL-γ-PGA 複合体の遺伝子抑制効果

構築された dendrimer 構造を有する新規カチオン性高分子であるため、生体適合性に優れており、臨床使用も期待できる。そこで本研究では DGL をコアとした siRNA ベクターの開発を行った。

まず、siRNA-DGL 複合体の製剤学的評価を行った。DGL の直径は 16 nm であり、siRNA と様々な電荷比で自己組織化することで粒子径 100 nm 以下のナノ粒子を形成した。また、粒子からの siRNA の流出がほとんどなかったことから、siRNA がナノ粒子に内包されていることが示唆された。さらに、siRNA-DGL6 複合体の TEM においても 100 nm 程度のナノ粒子であることが確認できた。

DGL の電荷比が 6 以上の複合体で B16-F10/Luc のルシフェラーゼ活性を抑制することができた。カチオン性複合体はアニオン性に帯電している細胞表面との相互作用により細胞取り込みが促進される。また、DGL は高い pH 緩衝能を有することが報告されている²⁾。そのため、エンドソーム脱出が促進されたことも高い遺伝子抑制効果を示した一因であると考えられる。一方で、カチオン性化合物はこの細胞表面との直接的な相互作用、あるいはカチオン性化合物の存在下で形成される活性酸素種 (ROS) によって、間接的に細胞傷害を引き起こすことが報告されている⁶⁾。実際、siRNA に対する DGL の電荷比が増加するにつれて細胞毒性も大きくなった。さらに、カチオン性化合物は生体

内において負電荷を帯びている血清タンパクや赤血球と結合し、凝集することも知られている。したがって、遺伝子ベクターを臨床応用するためには、このようなカチオン性由来の毒性を排除することが重要である。

カチオン性複合体の細胞毒性を克服するための有用な手段の 1 つとして、カチオン性化合物にアニオン性化合物を添加することが挙げられる。アニオン性化合物はカチオン性化合物と比較して、細胞膜の破壊が少なく、ミトコンドリアやリソソームへの損傷が弱いことが報告されている⁷⁾。我々は以前、様々なアニオン性化合物をスクリーニングした結果、γ-PGA がカチオン性化合物の毒性を軽減できることを見出した^{1,2)}。γ-PGA は非免疫原性で炎症反応を引き起こさない生体適合性に優れた生体分解型の高分子である⁸⁾。そこで、高い遺伝子抑制効果と比較的低い細胞毒性を示した siRNA-DGL6 複合体に様々な量の γ-PGA を添加し、siRNA-DGL6-γ-PGA 複合体の調製を試みた。

γ-PGA の濃度依存的に siRNA-DGL6-γ-PGA 複合体の表面電荷は低下し、siRNA に対する γ-PGA の電荷比が 6 以上で siRNA-DGL6-γ-PGA 複合体の表面電荷はアニオン性を示した。一方、siRNA-DGL6-γ-PGA 複合体の粒子径は siRNA-DGL 複合体とほぼ同じであった。また、siRNA-DGL6-γ-PGA 複合体からの siRNA の流出はほとんどなく、siRNA が安定に内包されていることが示唆された。しかしながら、siRNA-DGL6-γ-PGA12 複合体においては、siRNA の放出が確認された。硫酸ヘパリンなどの一部のアニオン性高分子はカチオン性複合体の静電的結合を崩壊し、siRNA の安定性を損なうことが知られている。そのため、siRNA-DGL6-γ-PGA12 複合体では、大量の γ-PGA と DGL との静電的相互作用により siRNA が部分的に放出されたと考えられる。

一般に、アニオン性複合体は細胞表面との相互作用が減少することによって、細胞取り込みが低下する。しかしながら、siRNA-DGL6-γ-PGA 複合体は表面電荷がアニオン性にも関わらず、カチオン性の siRNA-DGL6 複合体に匹敵する高い遺伝子抑制効果を示した。これらの結果は γ-PGA 被膜型複合体が γ-PGA に特異的な受容体を介してエネルギー依存的に取り込まれたという以前の報告に一致

するものであった。また、siRNA-DGL6- γ -PGA 複合体は siRNA-DGL6 複合体で認められた細胞毒性および血液毒性を軽減することができた。したがって、生体内へ投与後に血栓や塞栓を生じる可能性がなく、in vivo においても安全に投与できる可能性が示された。

そこで、siRNA-DGL6- γ -PGA 複合体の in vivo における有用性を、メラノーマ肺転移モデルマウスを用いて評価した。その結果、siRNA-DGL6- γ -PGA10 複合体は siRNA-invivofectamine 複合体に匹敵する遺伝子抑制効果を示した。一方で、スクランブル siRNA を内包した siRNA-DGL6- γ -PGA10 複合体では遺伝子抑制効果を示さなかったことから、siRNA-DGL6- γ -PGA10 複合体の効果は毒性によるものや off-target によるものではなく、複合体により効率的に siRNA をメラノーマ細胞へ導入できた結果であることが示唆された。

5. 総括

本研究では、siRNA と DGL および γ -PGA を自己組織化させることで siRNA-DGL- γ -PGA 複合体を作製することに成功した。siRNA-DGL- γ -PGA 複合体は皮膚がんであるメラノーマ細胞株において、細胞毒性を示すことなく、高い遺伝子抑制効果を示した。さらに、メラノーマ肺転移モデルマウスに siRNA-DGL- γ -PGA 複合体を静脈内投与した結果、in vivo においても遺伝子抑制効果を示した。したがって、siRNA-DGL- γ -PGA 複合体は皮膚に対して安全かつ高効率に siRNA を送達させることで、RNA 干渉を制御できる可能性が示唆された。

謝辞

本研究を遂行するに当たり、公益財団法人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) Kurosaki T, Kitahara T, Fumoto S, Nishida K, Nakamura J, Niidome T, Kodama Y, Nakagawa H, To H, Sasaki H, : Ternary complexes of pDNA, polyethylenimine, and gamma-polyglutamic acid for gene delivery systems, *Biomaterials.*, 30, 2846-2853, 2009.
- 2) Kodama Y, Nakamura T, Kurosaki T, Egashira K, Mine T, Nakagawa H, Muro T, Kitahara T, Higuchi N, Sasaki H, : Biodegradable nanoparticles composed of dendrigraft poly-L-lysine for gene delivery, *Eur J Pharm Biopharm.*, 87, 472-479, 2014.
- 3) Petit MW, Griffiths P, Ferruti P, Richardson SC, : Poly(amidoamine) polymers: soluble linear amphiphilic drug-delivery systems for genes, proteins, and oligonucleotides, *Ther Deliv.*, 2, 907-917, 2011.
- 4) Wang M, Hu H, Sun Y, Qiu L, Zhang J, Guan G, Zhao X, Qiao M, Cheng L, Cheng L, Chen D, : A pH-sensitive gene delivery system based on folic acid-PEG-chitosan - PAMAM-plasmid DNA complexes for cancer cell targeting, *Biomaterials.*, 34, 10120-10132, 2013.
- 5) Zhou J, Wu J, Hafdi N, Behr JP, Erbacher P, Peng L, : PAMAM dendrimers for efficient siRNA delivery and potent gene silencing, *Chem Commun.*, 22, 2362-2364, 2006.
- 6) Hui Yi Xue, Shimeng Liu, Ho Lun Wong, : Nanotoxicity: a key obstacle to clinical translation of siRNA-based nanomedicine, *Nanomedicine (Lond.)*, 9, 295-312, 2014.
- 7) Fröhlich E, : The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles, *Int J Nanomedicine.*, 7, 5577-5591, 2012.
- 8) Ye H, Jin L, Hu R, Yi Z, Li J, Wu Y, Xi X, Wu Z.: Poly(gamma, L-glutamic acid)-cisplatin conjugate effectively inhibits human breast tumor xenografted in nude mice, *Biomaterials.*, 27, 5958-5965, 2006.

創傷をより綺麗に修復させる皮膚再生促進薬の開発

東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学

住吉 秀明

It is generally known that a serious dermal injury causes scar formation. The cleaner dermal restoration, that is scarless regeneration, is an important theme in the next stage of regenerative medicine for keeping the quality of life of patients. Our previous study indicated that the scar tissue made a different composition of collagen fiber from that in normal dermal tissue. Artificial dermis has been utilized clinically for accelerating wound healing in the field of skin regenerative medicine. However, because of the inefficient re-epithelialization, conventional artificial dermis requires the subsequent epidermal auto-transplantation.

In the present study, we have developed a novel artificial dermis containing “jellyfish” collagen that accelerates skin regeneration through both re-epithelialization and granulation tissue formation. Since the jellyfish (*Aurelia aurita*) collagen is water soluble, the artificial dermis was prepared as a mixture of porcine type I collagen and jellyfish collagen. The effect was evaluated in vivo using the skin full-thickness wound mouse model. The results indicated that, the collagen film with jellyfish promoted epidermal cell migration. On the other hand, collagen sponge with jellyfish enhanced fibroblast infiltration into the granulation tissue. Subsequently we determined the most effective content ratio of the porcine and jellyfish collagens, and further examined the combinatorial effect of collagen film and sponge materials. Additionally we tried the freeze and drying procedure under t-butyl alcohol solvent, to mimic native dermal collagen fiber structure.

We developing new artificial dermis could also call “artificial skin” because more physiological infiltration both of donor keratinocytes and fibroblasts like native wound restoration. Experiments are in progress to demonstrate that accelerate cleaner dermal healing without scar formation when used with additional time span. It provides a novel devise that can be used in the variety range of skin diseases instead of the conventional manners.

1. 緒言

これまで重篤な創傷の後に「傷跡」が残ってしまうことは、止むを得ないこととされてきた。傷跡をいかに自然に近い状態で修復できるかというテーマは、美容面と精神面における受傷者のQOLを維持する上で重要な要素であるにも関わらず、未だ再生医療の主題にはなっていない。しかし今後の皮膚再生医療は損傷を回復させるだけでなく、より自然に綺麗に再生させることを実現させる段階に進むべきであると考え。

我々は本研究の目標として、傷跡と健全皮膚を構成する細胞外基質 (Extracellular matrix : ECM) の微細構造の相違点の解析と、健全皮膚構造を模倣し更に再生を促進するコラーゲンをベースとした新しい人工皮膚の開発を行なった。

マウスを用いた皮膚の創傷治療における我々の先行研究では、創傷時に新生されるコラーゲンは組成や微細線維構造が正常真皮組織と異なることを報告している¹⁻³⁾。再生肉芽組織は瘢痕となり傷跡を形成する。本研究において、更に長期 (9 ヶ月) にわたって傷跡の微細構造を解析し、特

に二次的な線維化として生じたコラーゲン線維がどのように走行しており、正常真皮と異なっているかを観察した。観察結果を基に、一般的な人工真皮に用いられているブタI型コラーゲンを基本成分とし、自然な真皮の線維構造をできるだけ模倣した細胞が進入し易い構造物の作製を試みた。

研究目的のもう一つは、早く綺麗に傷を治癒させるための付加的な成分の探索である。当初はV型コラーゲン $\alpha 3$ 鎖等、創傷治療過程で発現する微量ECM成分に着目したが、微量成分を充分量確保するのが困難であった。その進化の過程でV型コラーゲンと似ているといわれるミズクラゲ (*Aurelia aurita*) 由来のコラーゲン⁴⁾を配合した結果、従来の人工真皮にはない、再上皮化と肉芽形成両方を促進するはたらきが見出された。クラゲコラーゲンは安価で大量に確保できる新しい資源であり、細胞の接着性の評価⁵⁾、免疫の賦活化^{6, 7)}、軟骨組織の足場グラフトとしての利用例⁸⁾などがこれまで報告されているが、人工皮膚としての応用例はない。我々はこの表皮細胞と肉芽形成細胞に対する遊走促進効果を最大限発揮できるように最適化した人工真皮を作製し、さらに創傷モデルマウスへの移植実験を行ない、in-vivoにおける生着と皮膚再生の評価を行なった。

2. 方法

2. 1. マウスの創傷モデルの作製と瘢痕組織の観察・正常真皮との比較

マウスの創傷モデルは、6 mm の生検用トレパンを用い



Development of regenerating compounds for cleaner dermal restoration

Hideaki Sumiyoshi

Regenerative Medicine, Division Basic Clinical Science, Tokai University School of Medicine

て背部両側に表皮、真皮、皮下組織全層を欠損させるものを採用した。受傷後6日目と9ヶ月後の傷跡の組織の外観を撮影した後、マウスを安楽死させ、創面を横断する検体を採材し、パラフィン標本と電子顕微鏡用樹脂包埋標本を作製した。標本はHE染色、透過型電子顕微鏡による観察を行ない、細胞と組織形態、コラーゲン線維束の走行、密度、直径の計測を行ない、正常真皮と癒痕組織の組織構築における相違点についての比較を行なった。本研究の実験で用いたマウスは、東海大学内に設置される「東海大学動物実験委員会」の審査・承認を得た上で実施された。

2. 2. コラーゲンを基礎材料とした人工真皮用フィルム材・スポンジ材の作製

ブタI型コラーゲンはブタ胎児皮膚組織より既成の方法を用い、アテロコラーゲンとして抽出・精製を行なった⁹⁾。ミズクラゲコラーゲンは株式会社海月研究所より購入した。

2. 2. 1. コラーゲンフィルムの作製

コラーゲンフィルムは500 µg/mlのコラーゲン5mM酢酸可溶化液を1 X PBSによる中性化を行ない、線維形成させた後ラップフィルム上に薄く進展させ風乾することで作製した。ミズクラゲ混合コラーゲンフィルムはミズクラゲコラーゲン(以下J.C.)がブタI型コラーゲン(以下P.C.)に対し含まれる量が各0、20、40、45、50、55、60、65、80、100各%で混合したものを作製し、総コラーゲン量が500 µg/mlとなるようにした。風乾後85%エタノールで洗浄し脱塩を行なった。作製したコラーゲンフィルムは走査電子顕微鏡によって超微細構造を確認した。

2. 2. 2. コラーゲンスポンジの作製

コラーゲンスポンジは1 mg/mlコラーゲン5mM酢酸可溶化液を1 X PBSによって中性化し37℃に加温することで、コラーゲングルを作製し、そのまま凍結乾燥させるものと、エタノールからt-ブチルアルコール(t-BA)に溶媒転換して凍結乾燥させたものを作製した。ミズクラゲ混合コラーゲンスポンジはJ.C.がP.C.に対し、各0、20、50各%で混合したものを作製し、総コラーゲン量が1 mg/mlとなるようにした。コラーゲンスポンジは走査電子顕微鏡にて超微細構造を確認した。

2. 3. 創傷モデルマウスへのコラーゲン生体デバイス移植

2. 1. の全層欠損モデルに上記の人工真皮候補である、ミズクラゲコラーゲンを含有するフィルム材とスポンジ材をそれぞれ移植し、短期の創傷治癒に対する寄与を観察した。人工真皮デバイスを創部に密着させ、ドレッシングテープで被覆し創部の保護と保湿を行なった。移植後6日後にマウスを安楽死させ、人工真皮デバイスと創傷中心部を横断する面が表面に出るようにHE染色標本を作製した。

細胞と組織の観察をすると同時に、宿主マウスの表皮角化細胞の創傷辺縁部から人工真皮上への伸長距離と、肉芽形成細胞の人工真皮内への遊走数を計測した。全ての移植マウスの表皮角化細胞の伸長距離、肉芽形成細胞の遊走数を集計し、統計処理を行なった。有意差の検定はt検定を用いた。

2. 4. フィルム・スポンジハイブリッド型、J.C.混合人工皮膚の開発

フィルム材とスポンジ材の特性を併せ持つハイブリッド型人工真皮の成型を行なった。最終的にはt-BA凍結乾燥法を基本とし、酸性可溶化したコラーゲン溶液を液体のまま薄くコラーゲングル上にコーティングした後、t-BA置換し凍結乾燥する方法を開発し、フィルム構造を表面にもつ二層性の人工真皮が作製された。このハイブリッド型人工真皮を上記と同じく全層欠損モデルマウスへの移植を行ない、短期の創傷治癒に対する寄与について従来の人工真皮と比較した。

3. 結果

3. 1. 正常真皮組織と受傷後の癒痕組織(傷跡)のコラーゲン超微細組織構築の比較

皮膚を全層欠損する深い創傷から治癒した癒痕組織の特徴を、電子顕微鏡を用いて超微細構造レベルで解析した。受傷後6日目に形成されるコラーゲン線維は細くて方向性が一定でないコラーゲン細線維①(破線内)と、中間径のコラーゲン線維②が共に存在し(図1)、細線維は直径15.1 ± 1.1 nm (n 100)、中間径線維は40.6 ± 5.6 nm (n 100)であった。9ヶ月後の癒痕組織の外見は正常部位と色調、質感も異なり明瞭に見分けることが可能であった(図1)。コラーゲン線維径は直径39.2 ± 4.6 nm (n 100)であり、受傷後6日目の中間径線維と同じであった。これに対し正常真皮のコラーゲン線維は直径94.7 ± 7.1 nm (n 100)と明らかに太い上に、綺麗な流紋状の走行を持つこと、線維の間隙が密であり線維の表面も滑らかである等、構造上の明らかな違いがみられた(図1)。本実験から、創傷治癒後の再生組織はコラーゲン分子構造のレベルで異なる組織として構築されることが確認された。

3. 2. ブタ/ミズクラゲコラーゲンをを用いた新しい人工真皮の開発

広く臨床応用されている、ブタのI型コラーゲン(P.C.)を基本素材とし、新素材であるミズクラゲコラーゲン(J.C.)を組み込んだ新しい人工真皮の試作例を示す。SDS-PAGEによるタンパク質電気泳動像からJ.C.はP.C.に匹敵する分子量を持つことが示されている(図2A)。J.C.は水溶性であり、また中性下で加温してもゲル化しない性質が

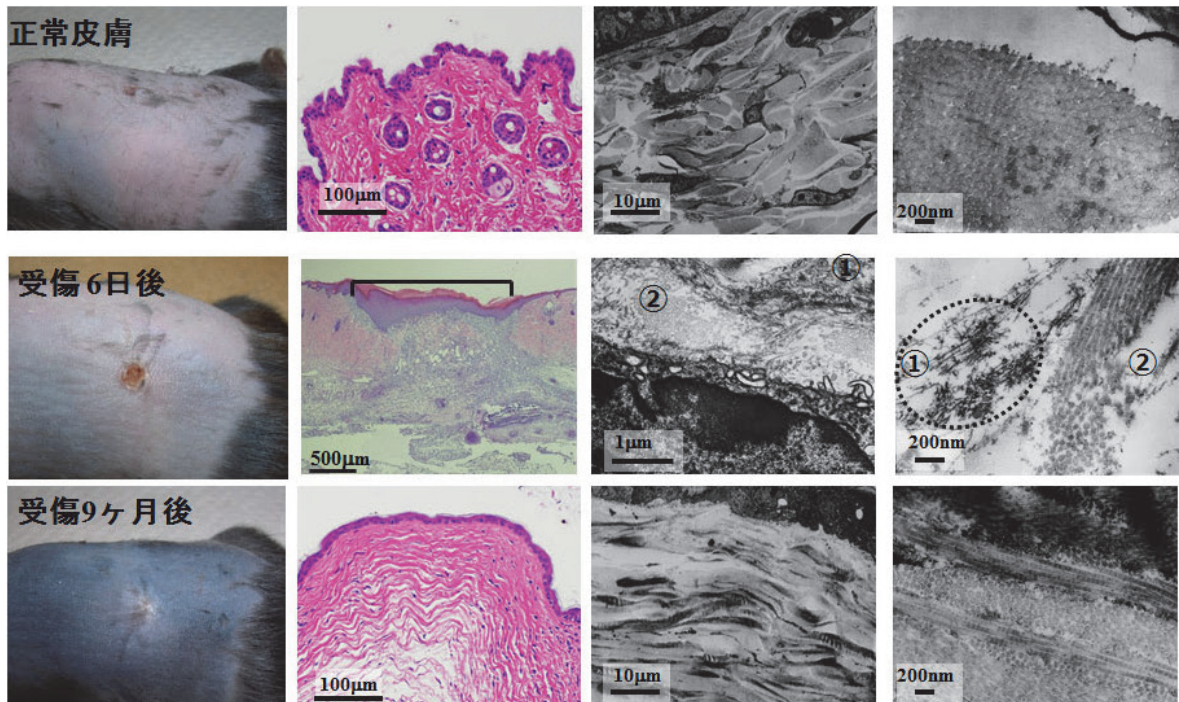


図1 正常真皮組織と瘢痕組織のコラーゲン超微細組織構築の比較

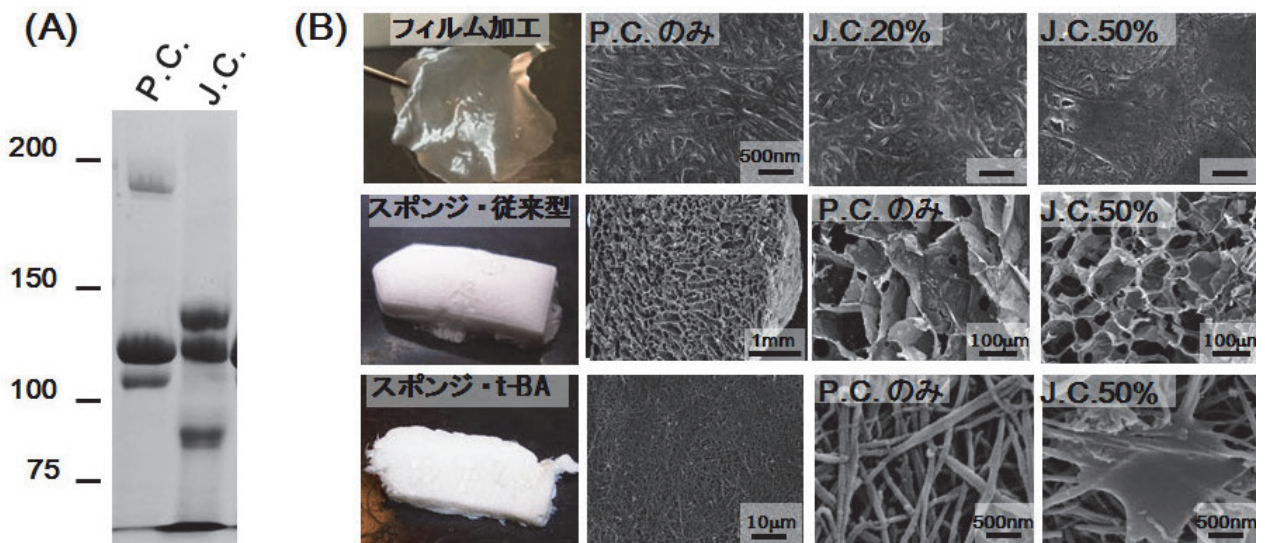


図2 ブタ・ミズクラゲ配合コラーゲンを素材とする人工皮膚デバイス

あるため、基本的にP.C.と混合することで新しい人工真皮の成型が行なわれた。走査型電子顕微鏡（以下SEM）のより確認された超微細構造を示す。

コラーゲンフィルムの作製

フィルム形状なら、J.C.が100%でも作製が可能であった。図2B上段にSEMによる超微細構造を示す。P.C.のみから作製したコラーゲンフィルムは直径100nmに及ぶ線維構造を有していた。J.C.濃度を高めるほどコラーゲンの線維量は少なくなり、50%より高濃度になるとほぼ無構造になった。

コラーゲンスポンジの作製

コラーゲンをゲル化させた後、凍結乾燥することでコラーゲンスポンジを作製した。この方法ではJ.C.濃度は50%まで作製できた。ゲル化コラーゲンをそのまま凍結乾燥すると、一般的なハニカム構造の発泡スポンジとなり、そこに線維構造は認められなかった。J.C.の混合による形状的な差も認められなかった（図2B中段）。我々はSEMでコラーゲン分子を観察する際に用いられるt-ブチルアルコール（以下t-BA）溶媒置換と凍結乾燥によるスポンジ成型を試みた。その結果、天然のコラーゲンと同等の直径約

100 nmの緻密な線維構造を再現したコラーゲンスポンジを作製することができた(2B下段)。このサンプルでJ.C.を含むスポンジは線維量が減少するものの線維径には影響を与えず、J.C.はP.C.の線維束形成過程に干渉しないと考えられた。また粗になったP.C.線維の隙間にJ.C.を混合したときのみ無構造の固形物が沈着しているのが観察された。

3. 3. 創傷モデルマウスへのコラーゲン埋め込みデバイス(人工真皮)の移植

皮膚全層欠損による創傷モデルマウスに実験3.2.で作製したコラーゲンフィルムとスポンジを人工真皮として移植する手術を行なった。移植手術行程を図3Aに示す。

①フィルム材移植例、②スポンジ材移植例、③シールと縫合による創部の保護、④⑤移植後6日経過時の外観である。④は100% P.C.フィルム材で上皮化が完全ではなく、滲出液のため光沢がある。⑤は50% J.C.混合フィルム材、既に上皮が被覆している。

図3Bは6日経過後の人工真皮組織サンプルにおいてHE染色像を行ない、表皮角化細胞の人工真皮上での伸長距離を測定した図であり、数字の単位は μm である。上段はフィルム材、下段はスポンジ材の代表例を示す。表皮角化細胞の伸長はおよそ500 μm 前後であったが、J.C.を50%含むフィルム材では伸長距離が突出して伸びていた。同様の効果は下段に示しているスポンジ材にはみられなかった。

図3Cは同じスポンジ材のサンプルを高倍率で観察した

ものであり、人工真皮内部への細胞の遊走・生着を調べたものである。J.C.を混合しないもの(左端)に比べ、20%、50% J.C.混合スポンジの方が明らかに多くの細胞が遊走していることが示されている。人工真皮内部への細胞の遊走は図3Bに示されるとおり、フィルム材にはみられていない。このことより、ミズクラゲコラーゲン(J.C.)の成分はフィルム形状では表皮角化細胞による再上皮化を、スポンジ形状では肉芽形成を促進し、創傷治癒を著しく促進することが示された。

図4は図3B、3Cの全実験データを数値化しグラフにしたものである。

図4Aは表皮角化細胞の伸長距離を表す。J.C.が40%以上のフィルム材において有意な伸長促進効果が示された。また45%以上で一定化し、60%以上になると人工皮膚が融解し、データが得られなかった。図4Bは単位面積あたりの、スポンジ内への細胞遊走数を示したもので、Eは辺縁部、Cは中央部である。J.C.を20%、50%含むスポンジで有意に多くの細胞が遊走しており、J.C.が肉芽を形成する細胞を人工皮膚内に誘引する効果が示された。

3. 4. フィルム・スポンジハイブリッド型、J.C.混合人工真皮の開発

これまでの実験結果を受け、フィルムとスポンジの特性を併せ持ったハイブリッド型人工真皮の成型を試みた。図5Aに示すように最薄5 μm のフィルムを表面に持つ二層性

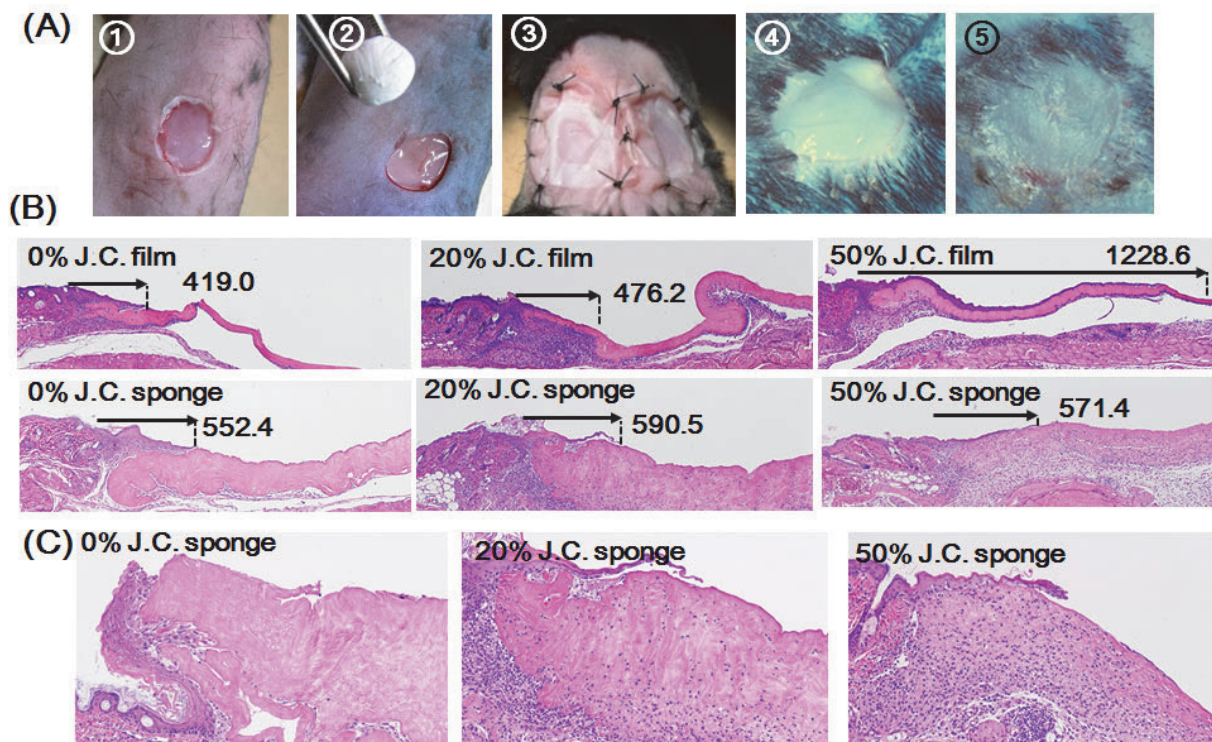


図3 創傷モデルマウスへの新型人工皮膚デバイスの移植と6日後組織の解析

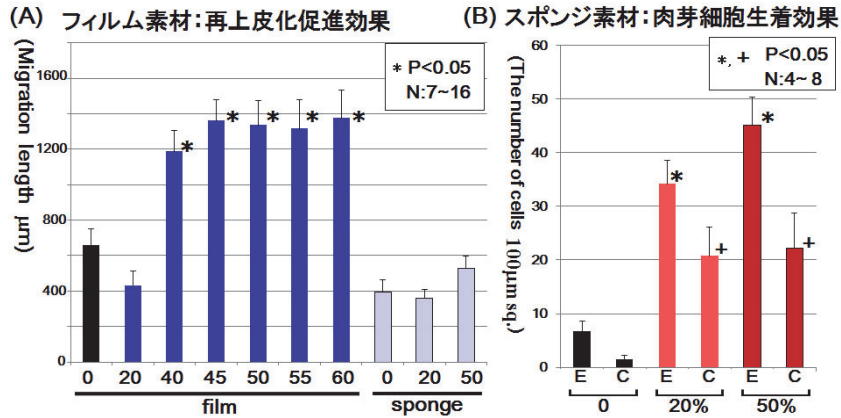


図4 人工皮膚への表皮角化細胞の伸長と肉芽組織細胞の遊走生着効果

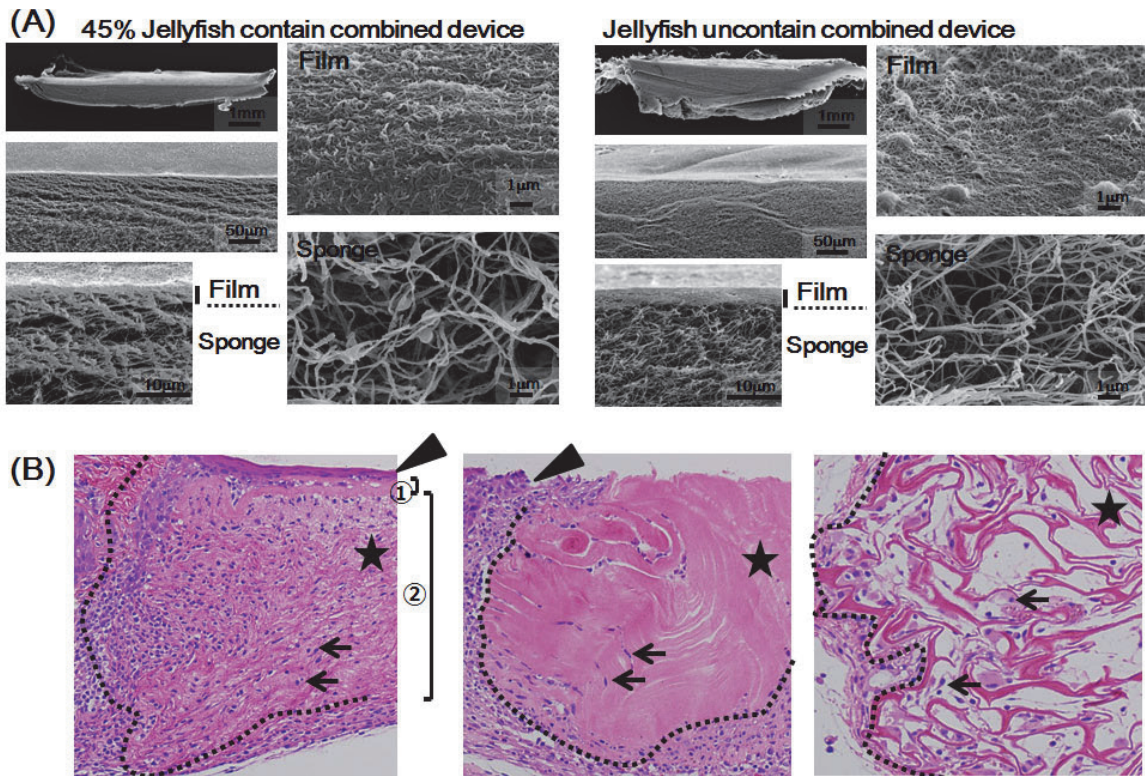


図5 フィルム/スポンジハイブリッド型人工皮膚 J.C. 複合・非複合タイプの作製

の人工真皮が作製された。45% J.C.混合(左側)と、P.C.のみで作製したもの(右側)を示す。

図5Bはこれらのハイブリッド型人工真皮を創傷モデルマウスに移植し、6日後の組織回復を観察したものである。ねらい通り45%J.C.を混合したもの(左端)はフィルム表面において、表皮角化細胞の伸長(黒矢頭)、人工真皮内部(星印)への肉芽細胞の遊走(矢印)両方に優れており、P.C.のみで作製したもの(5B中央)や市販人工真皮(同右端)と比べ、ミズクラゲコラーゲンの持つ治癒促進効果を最大限に引き出せる素材に仕上がった。

4. 考察

皮膚は人間の最外部のバリアであり、環境からの様々な刺激・衝撃に曝され、しばしば損傷するが直ぐ修復されることから皮膚の再生能力はかなり高いという認識がある。しかしながら、実験結果3.1.に示されるように、治癒後の瘢痕(傷跡)の組織は構築が全く異なり線維芽細胞の形態やコラーゲン線維の直径や走行も異なることから、創傷治癒は真皮線維芽細胞とは性質の異なる線維芽細胞によりなる異形の再生といえる。さらに瘢痕は後に拘縮し、引き攣れが起こってくる。つまり欠損による大規模な創傷では

真皮は再生しないのが現実である。真皮のコラーゲンは直径 100 nm 程の太くて密な線維が、規則的で綺麗な流紋を形成するがこれは他の組織にない独特の構造である。創傷治癒時に動員される線維芽細胞はこの構造を造れないため、創傷を綺麗に修復させるために真皮の構造を模したコラーゲン線維の足場を人工的に作製し、迅速に足場へ細胞を生着させる構造体を考えた。一般的な人工真皮にも用いられている、精製ブタ I 型コラーゲンを試験管の中で自己会合させると、直径 100 nm の真皮に近いコラーゲン線維を構築できるが、凍結乾燥を行なうと線維構造は失われハニカム構造となる。私達は走査電子顕微鏡のサンプル調整で用いる t-ブチルアルコール (t-BA) による凍結乾燥法を用いて線維束構造を保持したコラーゲンスポンジを独自に開発した。コラーゲンは加工性に優れており、風乾によりフィルム状、凍結乾燥によりスポンジ状の成形を行える。傷を綺麗に修復しうる構造材の理想的な形状の検討にこれを応用した。

本実験のもう一つねらいである創傷を早く治すための皮膚再生促進薬の探索について、V 型コラーゲンなどの創傷治癒時に特異的に発現してくる微量コラーゲン成分は mg 単位のコラーゲンスポンジに混合できる量の確保ができなかった。その一方でサンプルとして試験されたミズクラゲコラーゲン (J.C.) に予想外の表皮角化細胞の伸長促進と肉芽組織細胞の遊走促進効果が見出されたため、J.C. の皮膚再生医療への応用と可能性の開拓を目的とする新規人工真皮構造体の開発を行なった。

結果として、J.C. が加えられることによる効果は、表皮角化細胞の伸長はフィルム材に、肉芽組織細胞の遊走はスポンジ材に特異的に見られる現象であり、統計的に優位であることが確認された。その効果は 45% 以上で一定となり、J.C. の量比が多くなると構造体が脆くなることから、最適混合比を 45% とした。無脊椎動物の原始的線維性コラーゲンは V 型コラーゲンに構造的に近いとされるが、この効果の由来は現時点で不明である。J.C. はブタ I 型コラーゲンの線維形成を阻害せず、I 型コラーゲンは直径 100 nm の線維を形成し、隙間に J.C. に由来する固形物が充填される構造となること、また中性溶液で水溶性を示すことなど、哺乳類のコラーゲンと異なる性質を有していた。最終的に J.C. の効果を最大現に引き出せるよう、実験結果 図 5A に示される上面がフィルム、下面がスポンジの二層性ハイブリッド人工真皮を開発した。創傷モデルマウスへの移植により、この人工真皮が真皮の構造を模倣したコラーゲン線維を持ち、かつ、表皮角化細胞の伸長と、肉芽を形成する線維芽細胞の遊走・生着の両方を促進できる新しい機能を持っていることを確認した。

5. 総括

創傷部分の治癒・再生においては表皮角化細胞による再上皮化と線維芽細胞による肉芽形成が同時に速やかに進行することが、予後の改善に繋がる重要な要素となる¹⁰⁾。広範囲の欠損を従う重度外傷の治療法として人工真皮が用いられてきたが^{11, 12)}、従来の人工真皮は人工物の足場上に対する表皮角化細胞の生着が悪く、再上皮化が起こらないため、後日に表皮の再移植が必要となる点に課題があった。表皮の細胞が生着するには、コラーゲンスポンジ内に自身の細胞が侵入し自己組織化するのを待たなければならず、この間体液の漏出と感染を防がねばならない。我々は今回、人工真皮への直接的な自己表皮による再上皮化と、肉芽組織による自己組織化が同時に起こることだけでなく、肉芽由来の線維芽細胞は真皮を模したコラーゲン線維構造の型枠に鋤き込まれ、拘縮の起こらない真皮様組織を再現するというこれまでにない要素を持った「人工皮膚」を目指すものを開発した。この人工皮膚は乾燥体として常備することが可能で、従来品通りに開封して直ぐ使うことができる上、自家培養細胞、幹細胞、増殖因子を必要としない安価で汎用性の高いデバイスとしての利用が可能であり、数多くの事例に対処できることを期待している。長期経過についての検討がこれからであり、ミズクラゲコラーゲンの生体反応性の評価等、今後の課題として残されている面も多いが、本助成研究から生まれた新規のシーズとして、実用化を目指し育てていきたいと考えている。

(引用文献)

- 1) Sumiyoshi H, Kitamura H, Matsuo N, Tatsukawa S, Ishikawa K, Okamoto O, Fujikura Y, Fujiwara S, Yoshioka H, Transient expression of mouse pro- α 3(V) collagen gene in wound healing, *Connect. Tissue Res*, 53, 4, 313-317, 2012.
- 2) 住吉秀明, 稲垣 豊, マウス皮膚創傷治癒モデルにおける筋膜由来線維芽細胞と希少コラーゲンののはたらき, *日本食品・機械研究会*, : 食品加工技術, 33, 3, 2013, 22-28 頁
- 3) 住吉秀明, 稲垣 豊, コラーゲン分子種と線維症形成へのかかわり, *医歯薬出版*, : 医学のあゆみ, 244, 6, 2013, 515-520 頁
- 4) Miki A, Inaba S, Baba T, Kihira K, Fukada H, Oda M, Structural and physical properties of collagen extracted from moon jellyfish under neutral pH conditions, *Biosci. Biotethnol. Biochem.*, 79, 10, 1603-1607, 2015.
- 5) Addad S, Exposito J Y, Faye C, Blum S R, Lethias C, Isolation, characterization and biological evaluation

- of jellyfish collagen for use in biomedical applications, *Marine Drugs*, 9, 967-983, 2011.
- 6) Nishimoto S, Goto Y, Morishige H, Shiraishi R, Doi M, Akiyama K, Yamaguchi S, Sugahara T, Mode of action of the immunostimulatory effect of collagen from jellyfish, *Biosci. Biotethnol. Biochem.*, 72, 11, 2806-2814, 2008.
- 7) Morishige H, Sugahara T, Nishimoto S, Muranaka A, Ohni F, Shiraishi R, Doi M, Immunostimulatory effect of collagen from jellyfish in vivo, *Cytotechnology*, 63, 481-492, 2011.
- 8) Hoyer B, Bernhardt A, Lode A, Heinemann S, Sewing J, Klinger M, Notbohm H, Gelinsky M, Jellyfish collagen scaffolds for cartilage tissue engineering, *Acta Biomaterialia*, 10, 883-892, 2014.
- 9) 蛭原哲也, 服部俊治, :型別コラーゲンの精製・同定法 I型, III型コラーゲン, :細胞外マトリックス研究法, 畑隆一郎, 服部俊治, 新井克彦, (編) 1巻, コラーゲン技術研究会, 14-20, 1998.
- 10) Yamaoka H, Sumiyoshi H, Higashi K, Nakao S, Sumida K, Saito K, Ikoma N, Mabuchi T, Ozawa A, Inagaki Y, :A novel small compound accelerates dermal wound healing by modifying infiltration, proliferation and migration of distinct cellular components in mice, *J. Dermatol Sci*, 74, 3, 204-213, 2014.
- 11) Yannas I V, Lee E, Orgill D P, Skrabut E M, Murphy G F, Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 86, 933-937, 1989.
- 12) Akita S, Tanaka K, Hirano A, Lower extremity reconstruction after necrotizing fasciitis and necrotic skin lesions using a porcine-derived skin substitute, *J. Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*, 59, 759-763, 2006.

経皮吸収物質の体内動態のイメージング質量分析による解析

福井県立大学生物資源学部生物資源学科

平 修

This research should be of interest to a broad readership, particularly those whose research involves the mass spectrometric analysis of localization of xenobiotics. Because the present study describes emerging evidence suggested environmental factors as causative agent such as methyl 2-octynoate (2-OAm). Not only does 2-OAm have potential to cause visceral disease but importantly is used in environment such as lipsticks, hair dye, perfumes and food flavorings.

However, its disposition after percutaneous application is not revealed. We report the disposition and effect, visually, by nano-PALDI-based imaging mass spectrometry. Generally, small molecule like 2-OAm cannot be detected by LDI-based mass spectrometry (MS) due to the interference of organic matrix signal. Previously, we have reported nano-PALDI MS realize detection of small and high molecules (Anal. Chem. 2008, 2011. Analyst 2012, 2015).

The ionization ability of the nano-PALDI for 2-OAm was confirmed. 2-OAm was applied to mice skin and it permeated through the skin and accumulated in the liver. In livers of single dose mice, 2-OAm was delivered to the liver for 6 hours and excreted from the liver for 24 hours. On the other hand, in livers of long apply mice, 2-OAm was retained in the liver. Furthermore, we could be revealed that 2-OAm was accumulated in bile ducts by analyzing at a high resolution. In addition, CD8 staining indicated that an inflamed bile duct was observed. 2-OAm triggered the inflammation due to a coincident localization of 2-OAm and bile duct. This imaging approach is a promising technique for rapid quality evaluation of xenobiotics¹⁾.

1. 緒言

我々は、日常より多くの生体異物 (Xenobiotics) に囲まれて生活している。もちろん、病気になった際に治療薬として使用される薬剤もあるが、それ以外に意図せずに摂食・摂取している物質、Xenobioticsがある。その中には「毒物」「薬」といった扱いをされていない物質も多い。個々の物質は厳密な安全性試験をクリアしているが、それらが体内のどこに蓄積され、種々の代謝を受けた場合、どのような影響を受けるのかについては十分に分かっていない。

通常、こういった分析は生検材料、外科手術で摘出された種々の臓器を用いて、ヘマトキシリン&エオジン (HE) 染色などによる形態診断が基本である。しかし、

1. 経皮吸収後の標的物質自体の体内動態を視覚的に表すのは困難。
2. 標的物質と疾病との直接の因果関係を科学的に見るのは困難。

以上のことから、検査に3日以上を要することになる。そこで、新しい技術や手法の導入が求められている(図1)。

もし、肌に直接塗布する化粧品類に含まれる化学物質が、経皮吸収されているのか、吸収されたならば「どこ」の「ど

のような」形で移動し生体に影響を及ぼすのか視覚的に表すことができれば、安全性の知見を与えることができる。

1. 1. 化粧品類に含まれる化学物質の体内動態の可視化と生体への影響

最近、食品添加物や化粧品などに含まれる成分の中に自己免疫疾患に関与していることが報告され、Xenobioticsとして注目されている。例えば、中年女性に好発する自己免疫性の肝臓の炎症では、ミトコンドリアに対する自己抗体が100%の症例に出現するが、その対応抗原(ミトコンドリア内膜の呼吸酵素であるPDC-E2)と極めて類似する構造を有するXenobioticsが複数存在し、患者血清の多くがそれらXenobioticsと反応することが報告されている。共同研究者の常山らは、これらのXenobioticsの1つである、2オクチン酸メチル(2-OAm:分子量154)をマウスの腹腔内に連続投与し、抗ミトコンドリア抗体の出現とともに、PBCに特異的な胆管障害像が出現したことから、2-OAmへの持続的な曝露がPBC発症のトリガーとなっている可能性を報告している²⁾。2-OAmは化粧品や食品添加物に含有されており、2-OAmの皮膚から肝臓への移行、蓄積と、それを標的にした免疫異常が起きている可能性が示唆されるが、2-OAmなどの低分子Xenobioticsは、特異抗体が存在しないため、その体内での局在についてはこれまでまったく解析がなされていないのが現状である。

本報告では、マウスを用いて2-OAmをXenobioticsとして経皮的に投与し、臓器中への移行と蓄積の有無について検討する。また、臓器移行が確認された際には、長期経皮曝露を行い、Xenobioticsの蓄積の有無を検討した。



Liver disease risk of xenobiotics due to percutaneous absorption revealed by Nano-PALDI imaging mass spectrometry¹⁾

Shu Taira

Fukui Prefectural University, Department of Bioscience

経皮的に曝露された Xenobiotics が、どの細胞に蓄積し、周囲にどのような炎症が惹起されているか、という二次元情報が極めて重要である。これまで経皮吸収の評価は投与皮膚、内臓サンプルを磨りつぶした後、クロマト手法で得た結果と併せて、浸透イメージを想像してきた。本研究では、2つの技術をハイブリッドすることで、組織標本上の Xenobiotics の経皮吸収による体内動態の解析を目指した。以下に、その本研究の核となる技術を簡単に記述した。

1. 2. Xenobiotics (低分子物質)の新規検出法

一般的にガスクロマトグラフィー (GC) や、液体クロマトグラフィー (LC) を組み合わせた質量分析法 (GC-MS, LC-MS) は、定量性に優れていることから、化学物質の分析法として頻用される。通常、生体物質は複数の物質から構成されており、検出する際には、標的物質である Xenobiotics を抽出するための前処理を行う必要がある。物質毎の特性によって前処理条件も異なり、複数の処理工程を要するため煩雑である。マトリクス支援型レーザー脱離イオン化 (MALDI) 質量分析 (MS) 法は、混合物でも高率に検出が行えるため本研究に適している。ここで、一つ問題がある。MALDI で用いるイオン化支援剤は、一般的に有機物が多用される。この有機物マトリクス自身がイオン化することで、低分子領域にシグナルとして検出され、標的物質がバックグラウンドに埋もれてしまい解析が困難になる場合が多い。近年、低分子検出、イメージングを目的

に、ナノ微粒子をイオン化支援剤とするナノ微粒子支援型レーザー脱離イオン化 (Nano-Particle Laser Desorption/Ionization: Nano-PALDI) MS 法³⁻⁶⁾が開発されている。本法は、直径数ナノメートルの金属酸化物粒子に表面修飾などを施した物質で、レーザーエネルギーを受け取ると、ナノ微粒子自体はイオン化せず、近接する物質のみをイオン化する特性を示す。例として、農薬 (カルベンダジム: 分子量: 191) をイオン化した場合の両者の MS スペクトルを図 2 に示す。Nano-PALDI 法 (図 2a) ではサンプルのみイオン化しているのが分かる。ナノ微粒子自体はイオン化せず (図 2b)、サンプルも自己イオン化していない条件 (図 2c) である。MALDI 法では (この場合、有機マトリクスとして CHCA (Mw: 189) を使用)、有機マトリクス自体がイオン化し、様々な付加体としてシグナルが低分子領域に現れ、目的物質が検出できない (図 2d)。従来、MALDI 法は高分子解析に用いる手法であり、Nano-PALDI 法と使い分けることで低~高分子までの広範囲な検出が可能になる。さて、Xenobiotics は低分子量 (>500) のものが多く、今回の標的物質の 2-OAm (分子量: 154) も例外ではないため、検出法として Nano-PALDI 法を採用した。

1. 3. イメージング質量分析 (IMS)^{7,8)}

イメージング技術は、生物 (例: 免疫染色による神経細胞成長観察)、化学 (赤外分光イメージングによる基板上の異物検出)、物理学 (トンネル顕微鏡による薄膜解析) と多



図 1 本研究の概要

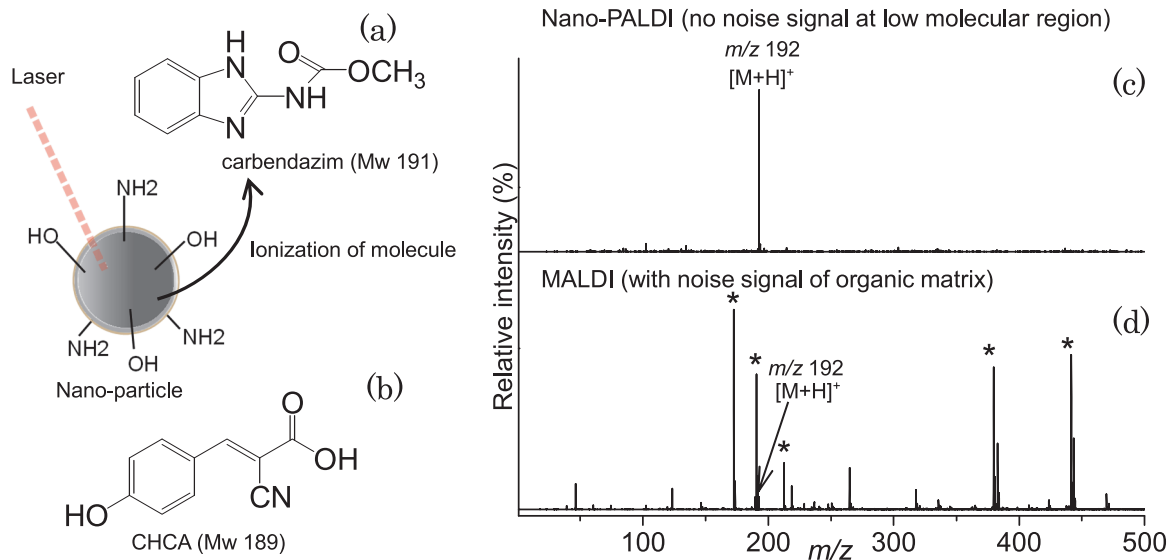


図 2 Nano-PALDI 質量分析

く分野で用いられる手法である。

近年、組織切片上を2次的にMSし、多数のMSスペクトルが注目するシグナル(標的物質)のみを抽出し、2次元画像とすることで標的物質の局在解析を行う、「IMS」法(図3)が開発された。利点として、一度の測定で、一枚の切片から抗体や染色材を必要とせず、複数の標的物質の局在を解析できることが挙げられる。また、特に特殊なMS装置を必要とせず、MALDI MS装置と専用ソフトがあればよい。主に、医学、生理学分野での研究例⁹⁻¹²⁾が多いが、最近では工、農学分野でも注目されている技術である¹³⁻¹⁸⁾。IMS法で農産物内の農薬の解析することは特殊な前処理も必要とせず、得られたMSスペクトルから標的物質の質量を選択するだけで、局在情報も得られることから簡便で、有用である。今回、標的物質であるXenobiotics, 2-OAmは、低分子イメージングに相当するため、Nano-PALDI IMS法を採用した。

2. 実験

2.1. 2-OAm単回塗布マウスの作成

4週齢のICR(♀)マウスの背中に、2-OAm(0.1%)を単回塗布し、1, 3, 6, 24時間後に肝臓を採取した。

2.2. 2-OAm長期塗布マウスの作成

4週齢のICR(♀)マウスの背中に、2-OAm(0.1%)を、1週間に1回のペースで塗布、これを19週連続で行った。その後、肝臓を採取した。

2.3. Nano-PALDI法で用いるナノ微粒子の合成

本研究で用いるナノ微粒子は金属酸化物をコアとし、その表層をSi-Oが覆い、表面より水酸基とアミノ基が露出している構造である。以下、調製法を示す。3-アミノプロピルトリエトキシシラン(APTES)(信越化学)溶液(22 M)と、8種類の金属塩化物溶液($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)(0.1 M)

(東京化成)を混合し、室温にて60分間攪拌した。遠心分離操作により未反応物を除去したのち、超純水で洗浄し、沈殿物をナノ微粒子サンプルとして回収した。得られたナノ微粒子について、赤外分光法(IR: Spectrum One; Perkin Elmer, USA)、透過型電子顕微鏡(TEM: H-7100; Hitachi, Japan)とX線回折(XRD: MiniFlex II; Rigaku, Japan)を用いて評価を行った。

2.4. Nano-PALDI MS

2-OAm(10 pmol)と酸化鉄ナノ微粒子(1 mg/mL: メタノール)と混合し、ターゲットプレートに滴下、乾燥させてからMS測定を行った。検出イオンはポジティブイオンとした。

2.5. Nano-PALDI IMS

マウスの肝臓の凍結切片(厚さ: 25 μm)を導電性透明電極であるインジウムチンオキサイド(ITO)ガラス上に作成後、イオン化支援剤として、酸化鉄ナノ微粒子(1 mg/mL: メタノール, 8 mL)をスプレーヤーで塗布した。ポジティブモードでIMSを行った。切片上から2-OAmが検出できるかを確認するために、コントロールマウスの切片に2-OAmを滴下し、その部位をイメージングした。レーザー照射間隔は70 μm とした。

イメージングMSの画像解像度は、レーザー照射間隔に依存しており、照射間隔が狭いほど画像が鮮明になる。通常のMALDIでは有機マトリクスを使用する。有機マトリクスが切片上で標的物質を抽出、共結晶(結晶の大きさ: 30-50 μm)を形成する。そのために共結晶以下のレーザー照射間隔を用いてイメージングしても正しい局在解析ができない場合がある。Nano-PALDI法は、標的物質と共結晶を形成せずにイオン化を行う方法であり、高解像度イメージングが可能になる(図4)。

イメージング質量分析(MS)とは

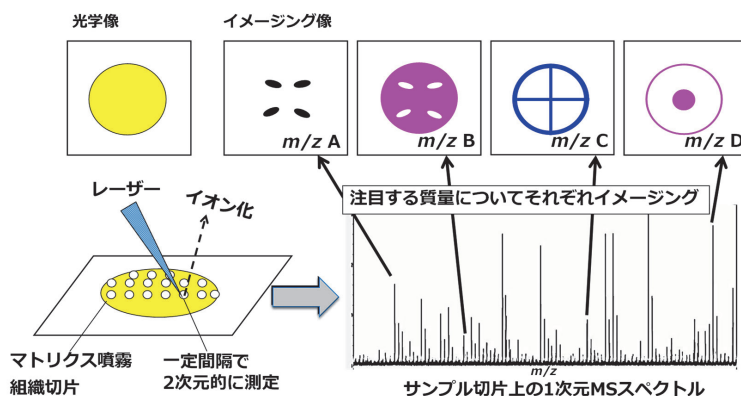


図3 イメージング質量分析

2. 6. 高解像度Nano-PALDI IMS

マウスの肝臓の凍結切片(厚さ: 25 μm)を導電性透明電極であるインジウムチンオキサイド (ITO) ガラス上に作成後、イオン化支援剤として、酸化鉄ナノ微粒子 (1 mg/mL: メタノール, 8mL)をスプレーヤーで塗布した。ポジティブモードでIMSを行った。レーザー照射間隔は 25 μm とした。

3. 結果と考察

3. 1. ナノ微粒子の特性評価

合成したナノ微粒子の物理化学的性質を調べた。

Feをコアとして合成したナノ微粒子(以下、Feナノ微粒子)のデータを図4に示す。X線回折(XRD)により構造解析を行った結果、 $2\theta = 35^\circ$ と、 63° に、ミラー指数(hkl)、(1 3 0)、(3 3 0)、(0 6 0) が観測され、データベースと照合

した結果、酸化鉄をコアとすることが分かった。また、鉍物に見られる、コランダム構造を単位とするマコーレート様構造であると決定した(図5 a)。IRスペクトル測定では、O-H ($3,400-3,100\text{ cm}^{-1}$)、C-H ($3,000-2,830\text{ cm}^{-1}$)、N-H ($1,640-1,560\text{ cm}^{-1}$) および、Si-O ($1,000-800\text{ cm}^{-1}$: データ非表示)の伸縮振動ピークが検出され、表面に水酸基、アミノ基およびSi-O層が存在することが確認された(図5 b)。TEM観察の結果、粒径は $3.6 \pm 0.1\text{ nm}$ であり、単分散にナノ微粒子が合成されていることが分かった(図5 c)。これらの結果より、Feナノ微粒子は、鉄酸化物をコア成分とし、その周りを水酸基およびアミノ基、シラノール基で被覆されたナノ微粒子であることが示された。

3. 2. 2-OAmの質量分析実験

標的物質がNano-PALDI MS法で検出されることを確

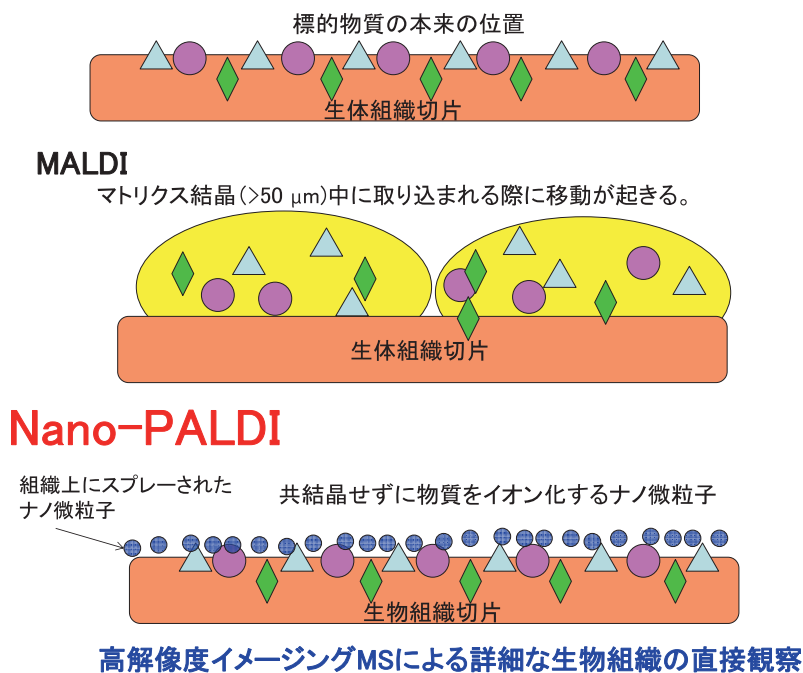


図4 Comparison of spatial resolution between MALDI and Nano-PALDI

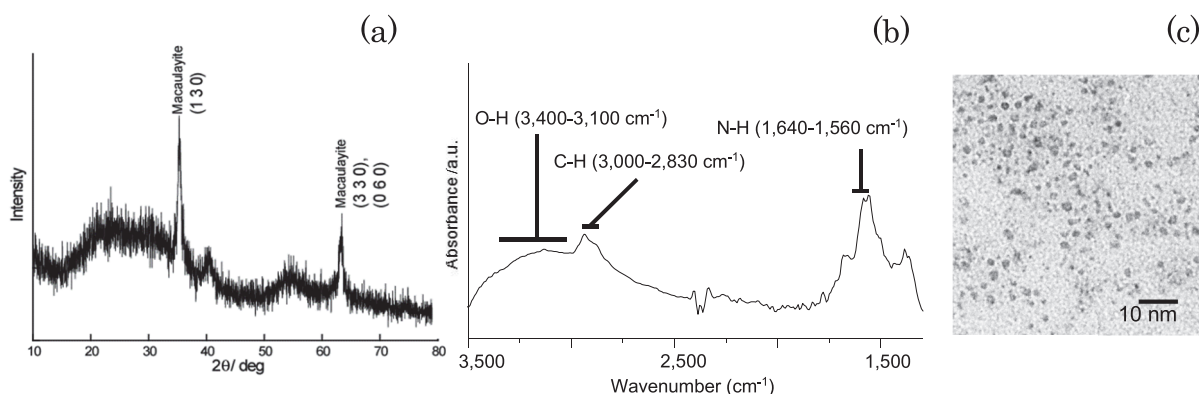


図5 The XRD pattern (a), the FT-IR spectrum (b) of and TEM image (c) of the iron oxide based nano-particle.

認するために、標準品を用いて実験を行った。 $[M+H]^+$ と $[M+Na]^+$ である m/z 155.1, 177.1が検出された。次に、肝臓切片上に2-OAmを滴下し、その部位をMS、IMSしたところ、滴下していない肝臓と比較すると、2-OAm滴下肝臓からは m/z 155.1, 177.1が検出された。強度比は1:10であった。

組織上の2-OAmがNano-PALDI MS法で検出可能なことを示した。また、Nano-PALDI法ではナトリウム付加体を優先的にイオン化することが分かっている⁶⁾のでイメージする標的シグナルを m/z 177.1とした。

3.3. 2-OAm単回塗布マウスのIMS

マウスの皮膚に2-OAmを塗布後、肝臓のNano-PALDIイメージングMSを行った。標的シグナルは2-OAmのナトリウム付加体である m/z 177.1である。その結果、2-OAmを皮膚に塗布してから6時間後に肝臓に2-OAm

が確認され、24時間後にはほぼ排出されていることが分かった(図2A)。強度比は、コントロール:投与後1時間:3時間:6時間:24時間=1:2:4:12:1であった(図6)。

2-OAm長期塗布マウスのIMS

2-OAmを皮膚に長期間塗布したマウスの肝臓を用いて、2-OAmの蓄積部位を検討した。その結果、2-OAmが単回塗布と違い、体外へ排出されず肝臓に蓄積していることが視覚的に分かった(図7)。これは、化粧品や染毛剤など長期に渡り使用している患者が肝臓疾患(炎症)を起こしていることに関係があることを示している。

2-OAm長期塗布マウスの高解像度IMS

2-OAmを皮膚に長期間塗布したマウスの肝臓をヘマトキシリン-エオジン(HE)染色したところ、コントロールでは胆管が観察できるのに対し、2-OAm群では胆管が潰れており観察が困難であった(図8)。

そこで、連続切片を用いて、炎症の有無を確認するため

2-OAmの**単回塗布**では、
6時間で肝臓に**送達**、24時間後には**排出**された。

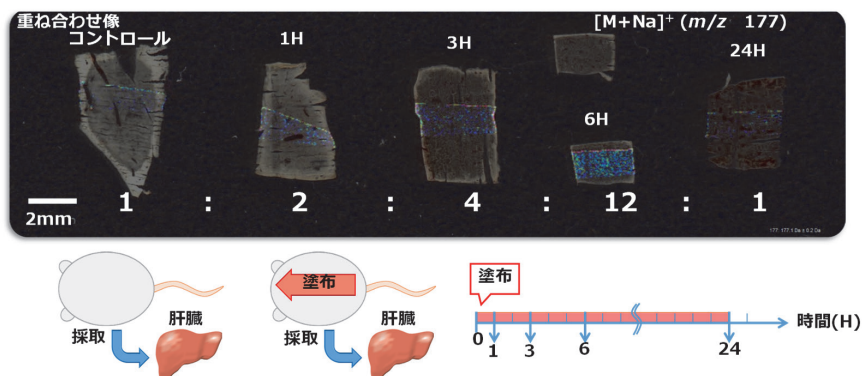
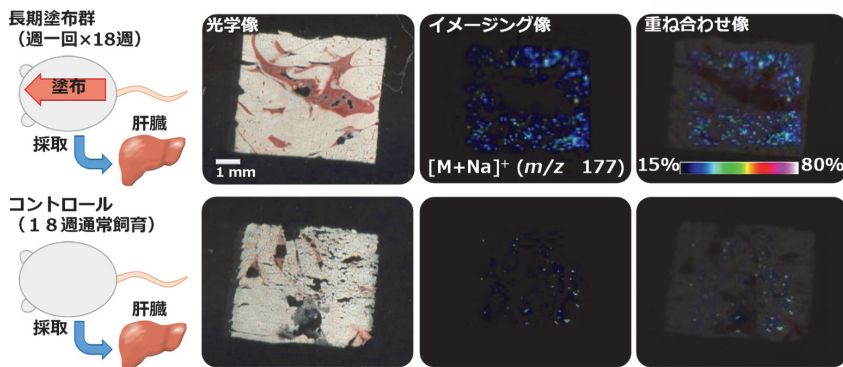


図6 単回塗布のマウスの肝臓イメージングMS像

2-OAmの**長期塗布**では、
肝臓に**蓄積**するようになっていた。



シグナル強度比(n=3) 塗布群:コントロール = 2.5:1

図7 長期塗布のマウスの肝臓イメージングMS像

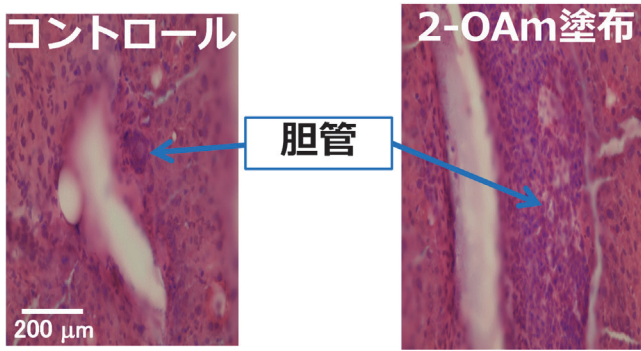


図8 HE staining of liver without (a) and with 2-OAm(b)

にCD8染色を行った。その結果、胆管付近はCD8陽性を示し、炎症が強く引き起こされていることが分かった。その同一部分に対してIMS（レーザー照射間隔 25μm）を行った。炎症を起こしている部分に2-OAmが局在していることが明らかになった(図9)。

別途、液体クロマトグラフィにより定量したところ、長期塗布群のマウス肝臓からは8.32 μg/g-liverの2-OAmが蓄積していた。

4. 総括

4.1. 薬剤送達・炎症の機序の視覚的説明

本結果は非常に興味深い。2-OAmはミトコンドリア内膜の呼吸酵素 (mitochondrial intima respiratory enzyme) の抗原として反応し、炎症を引き起こすことが知られているが¹⁹⁾、2-OAmが経皮吸収により内臓(肝臓)に送達されること、それが長期塗布により胆管付近に蓄積すること、

それにより炎症が引き起こされることを初めて視覚的に明らかにした。

4.2. 間接的から直接的なデータ表示へ

これまでの薬剤の経皮吸収の浸透具合、体内動態は、標本サンプルから抽出した溶液をHPLCなどクロマトグラフィカルなデータを基に浸透イメージ(想像)をコンピュータグラフィックに直すことで表す間接的な手法とも言える。

イメージング質量分析で表すイメージはサンプル切片上にある標的物質の局在を直接表した物であり、経皮吸収の有無、浸透性、安全性の確保を一般消費者へ科学的根拠を視覚的にアピールすることができる。

4.3. 基礎-、応用コスメトロジー両面の貢献へ

薬剤の経皮暴露による2-OAの肝臓へのダメージを視覚的に表すことを通して、安全性、有効性を示すことを目指す。得られた化粧品とはその殆どが皮膚への塗布であるから、本研究で得られた知見はコスメトロジー分野において基礎的な情報(浸透性)と、生体への影響(応用)の両面に貢献できる。

4.4. 新規評価法の提示

イメージング質量分析の化粧品学への応用は例が少なく、今回の研究は特許取得可能であり、その普及は、国際競争力を高めるだけでなく、国際標準化策定にも、一つの方向性を示すことになる。また、本評価技術が確立できれば、生物全般の幅広い分野に利用でき、イノベーションの創出

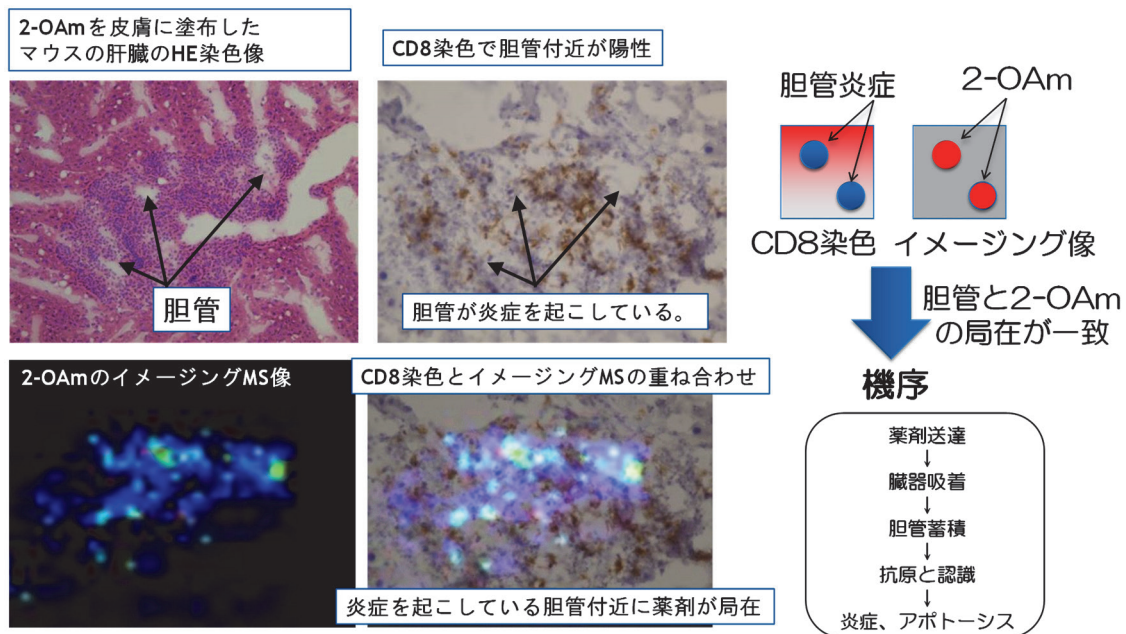


図9 High-spatial resolution nano-PALDI IMS of 2-OAm from mouse liver for long period of application. HE (a) and CD8 (b) stained images of liver tissues of 2-OAm-applied; MS spectra reconstructed as ion images of 2-OAm at 25μm in mouse liver (c); merged CD8 and ion image(d). Scale bar is 200 μm.

につながる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、適切なお助言をしていただいた徳島大学(医)、常山幸一先生、帝京大学(医)菊池先生に心から感謝申し上げます。イメージング質量分析を行うに辺り、装置を使用させていただいた北陸先端科学技術大学院大学・ナノテクプラットホーム事業にご担当いただいた宮里明夫先生に感謝いたします。

(引用文献)

- 1) Taira, S.; N. Yamaguchi; S. Morimoto; Y. Tatsuta; H. Katano; Y. Ichiyanagi; K. Tsuneyama; K. Kikuchi *International Journal of Recent Scientific Research*, **7**, 12589-12592. (2016)
- 2) Wakabayashi, K.; Z.-X. Lian; P. S. C. Leung; Y. Moritoki; K. Tsuneyama; M. J. Kurth; K. S. Lam; K. Yoshida; G.-X. Yang; T. Hibi; A. A. Ansari; W. M. Ridgway; R. L. Coppel; I. R. Mackay; M. E. Gershwin *Hepatology*, **48**, 531-540. (2008)
- 3) Komori, H.; R. Hashizaki; I. Osaka; T. Hibi; H. Katano; S. Taira *Analyst*, **140**, 8134-8137. (2015)
- 4) Taira, S.; I. Osaka; S. Shimma; D. Kaneko; T. Hiroki; Y. Kawamura-Konishi; Y. Ichiyanagi *Analyst*, **137**, 2006-2010. (2012)
- 5) Taira, S.; Y. Sahashi; S. Shimma; T. Hiroki; Y. Ichiyanagi *Anal. Chem.*, **83**, 1370-1374. (2011)
- 6) Taira, S.; Y. Sugiura; S. Moritake; S. Shimma; Y. Ichiyanagi; M. Setou *Anal. Chem.*, **80**, 4761-4766. (2008)
- 7) Stoeckli, M.; P. Chaurand; D. E. Hallahan; R. M. Caprioli *Nat. Med.*, **7**, 493-496. (2001)
- 8) Caprioli, R. M.; T. B. Farmer; J. Gile *Anal. Chem.*, **69**, 4751-4760. (1997)
- 9) Waki, M. L.; K. Onoue; T. Takahashi; K. Goto; Y. Saito; K. Inami; I. Makita; Y. Angata; T. Suzuki; M. Yamashita; N. Sato; S. Nakamura; D. Yuki; Y. Sugiura; N. Zaima; N. Goto-Inoue; T. Hayasaka; Y. Shimomura; M. Setou *PLoS ONE*, **6**, e26721. (2011)
- 10) Sugiura, Y.; R. Taguchi; M. Setou *PLoS One*, **6**, e17952. (2011)
- 11) Morita, Y.; K. Ikegami; N. Goto-Inoue; T. Hayasaka; N. Zaima; H. Tanaka; T. Uehara; T. Setoguchi; T. Sakaguchi; H. Igarashi; H. Sugimura; M. Setou; H. Konno *Cancer Science*, **101**, 267-273. (2010)
- 12) Taira, S.; M. Hashimoto; K. Saito; O. Shido *J. Biophys. Chem.*, **3**, 221-226. (2012)
- 13) Zaima, N.; T. Hayasaka; N. Goto-Inoue; M. Setou *International Journal of Molecular Sciences*, **11**, 5040-5055. (2010)
- 14) Zaima, N.; N. Goto-Inoue; T. Hayasaka; M. Setou *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **24**, 2723-2729. (2010)
- 15) Suzuki, T.; H. Fujiwake; K. Iwai *Plant Cell Physiol.*, **21**, 839-853. (1980)
- 16) Yoshimura, Y.; H. Enomoto; T. Moriyama; Y. Kawamura; M. Setou; N. Zaima *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1-11.
- 17) Taira, S.; D. Kaneko; K. Onuma; A. Miyazato; T. Hiroki; Y. Kawamura-Konishi; Y. Ichiyanagi *International Journal of Inorganic Chemistry*, **2012**, 7. (2012)
- 18) Taira, S.; R. Ikeda; N. Yokota; I. Osaka; M. Sakamoto; M. Kato; Y. Sahashi *Am. J. Chin. Med.*, **38**, 485-493. (2010)
- 19) Amano, K.; P. S. C. Leung; R. Rieger; C. Quan; X. Wang; J. Marik; Y. F. Suen; M. J. Kurth; M. H. Nantz; A. A. Ansari; K. S. Lam; M. Zeniya; E. Matsuura; R. L. Coppel; M. E. Gershwin *The Journal of Immunology*, **174**, 5874-5883. (2005)

皮膚バリア機能障害を伴う皮膚疾患を対象としたラマン分光装置を用いた角層天然保湿因子の解析

大阪医科大学皮膚科

谷崎 英昭

Stratum corneum (SC) is important to maintain the skin surface humidity and barrier function. Recent progress in confocal Raman spectrometer has enabled us to noninvasively assess the concentration of water, natural moisturizing factor (NMF) and lipids of the SC in vivo. Topical steroid has been widely used for a variety of skin inflammatory diseases including atopic dermatitis, but the effect on the SC compositions has not been elucidated yet. We sought to evaluate the effect of topical steroid on the profiles of SC of mouse and human skin. We evaluated the SC components of the skin of healthy donors, atopic dermatitis (AD) patients, C57BL/6 mice, and *filaggrin* knockout mice in the presence or absence of topical steroid treatments using a confocal Raman spectrometer. The depth-dependent profiles of SC were calculated from the respective spectra. Ceramide, pyrrolidone carboxylic acid, urea, and lactic acid, of AD patients were significantly decreased compared to healthy donors. In addition, long-term topical steroid treatment decreased the profiles of SC components in human. Consistently, SC components were lower in *Filaggrin* knockout mice when compared to C57BL/6 mice, and even after by topical steroid treatment. In addition, the recovery of SC components after degreasing treatment was markedly delayed in the steroid application group. We have demonstrated that topical steroid treatment decreased the components of SC of the skin in mice and humans. Although topical steroids are beneficial for controlling skin inflammation, we need to consider the risk of barrier disruption.

1. 緒言

表皮は、厚さが0.2mm程度の人体の最外層に位置する膜であり、角化プロセスによって細胞分裂と分化を日々繰り返している。その中でも角質層は外界と体内との境界部に位置して、皮脂膜と天然保湿因子：Natural Moisturizing Factor (NMF)、細胞間脂質をバランスよく保持することによって、「バリア機能」と「水分保持機能」という皮膚の機能における中心的な役割を担っている。フィラグリン蛋白は角層NMFの産生源として重要であり皮膚のバリア機能に必須の蛋白である。アトピー性皮膚炎は、遺伝的要因として乾燥肌を有し環境中の多様な因子が絡んで発症するが、フィラグリン遺伝子変異の有無がアトピー性皮膚炎の発症因子の中で最も頻度の高い因子であると近年報告されている¹⁾。

皮膚における水分・アミノ酸・脂質など各成分ごとの測定方法は、光工学による計測技術の進歩によって著しく発展している。従来、テープストリッピングなどによる皮膚剥離を行った後に蛋白量などを測定していたのに対し、共焦点ラマン分光装置の出現によって角層内の深さ分布や薬剤の皮膚への浸透性を非侵襲かつ無標識に高感度で詳細

な解析が可能となった²⁻⁴⁾。今回、皮膚の重要な機能である「バリア機能」と「水分保持機能」において中心的な役割を担っているNMFに注目し、共焦点ラマン分光装置を用いて、角質層におけるNMF含有量と皮膚表面から内部にかけての分布について非侵襲かつ無標識に詳細な解析を行った。加齢や気候による生理的な変化に加え、強い乾燥やかゆみをとまなうアトピー性皮膚炎、難治性の掌蹠角化症、慢性皮膚粘膜カンジダ症など何らかの皮膚免疫異常を呈する状態、更には外用剤治療前後の比較などさまざまな皮膚状態を対象とし、ヒト臨床検体と各モデルマウスを用いてNMFの機能解析・経皮水分蒸散量・pHなどの測定を通して、バリア機能障害の成因に総合的に迫りたいと考えている。

2. 方法

2.1. 長期間ステロイド外用加療を継続したアトピー性皮膚炎10名の皮膚の菲薄化を確認

アトピー性皮膚炎の治療の第一選択は、かゆみや炎症を速やかに抑制するためのステロイド外用剤である⁵⁾。症状や病変部位に応じて各レベルのステロイド外用を使用し、適宜タクロリムス軟膏や保湿剤への変更が望ましいとされるが、長期間のステロイド外用によって生じる皮膚萎縮、毛細血管拡張、潮紅、酒皸様皮膚炎、ステロイド紫斑、瘰癧、多毛、感染症の増悪などについても日常診療においてしばしば経験する。今回、長期間ステロイド外用患者ならびに健康人各10名の前腕皮膚厚について、超音波を用いて測定・比較し皮膚萎縮について評価した。



Effect of topical steroid on the stratum corneum compositions by using confocal Raman microscopy

Hideaki Tanizaki

Department of Dermatology, Osaka Medical College

2. 2. 長期間ステロイド外用を行った皮膚局所のpHや経皮水分蒸散量について解析

外用剤塗布時はチューブより薬剤を一定量（例えば1FTU量）出し、両手を用いることが多い。今回30年以上両手を用いて外用を継続しているアトピー性皮膚炎患者（39歳男性）と右示指のみを用いて外用を十数年以上継続しているアトピー性皮膚炎患者（35歳男性）の指腹について、pHや経皮水分蒸散量（transepidermal water loss：TEWL）について解析を行った。pHは堀場製作所製ポータブルpHメーターを用いて、TEWLは室温23度、湿度40-50%に保たれた部屋に入室後VAPOSCAN AS-VT100RS（Asahi Biomed社製）を用いて測定した。

2. 3. 長期間ステロイド外用を行った皮膚局所の天然保湿因子について解析

2. 2. と同患者を用い、River Diagnostics社製ラマン分光光度計confocal Raman microspectroscopyを用いて天然保湿因子とその関連分子について測定・解析を行った。測定は、左右の指腹を用いて任意の5点について各点の角質表層から4μm間隔で160μmまで測定し、解析はRiver Diagnostics社製ソフトウェアSkinToolsを使用した。

3. 結果

3. 1. 長期間ステロイド外用加療を継続したアトピー性皮膚炎10名の皮膚の菲薄化を確認

測定部位については、いずれの患者も軽度乾燥と苔癬化をとまっていたが、明らかな搔破痕などを認めない部位で測定した。長期間ステロイド外用患者ならびに健康人各10名の前腕皮膚厚について超音波像を示す（図1A）。健康人（Healthy）では 1.22 ± 0.8 mmの皮膚厚であったのに対し、アトピー性皮膚炎患者（AD）の平均値は 0.83 ± 0.22 mmと有意差をもって低下していた（図1B）。

3. 2. 長期間ステロイド外用を行った皮膚局所のpHや経皮水分蒸散量について解析

はじめに、ステロイド外用を日常的に行っていない同年代の健康者の左右の指腹の臨床像を示す（図2A）。両側において、指紋がはっきりと認められ乾燥の所見なども認められない。一方、30年以上両手を用いて外用を継続しているアトピー性皮膚炎患者（39歳男性）においては、両側の指紋が不明瞭となり、皮膚の乾燥による粗造が顕著に認められた（図2B）。右示指のみを用いて外用を十数年以上継続しているアトピー性皮膚炎患者（35歳男性）においては、外用を継続していた右側の指紋が不明瞭であり、左側と比較して皮膚の乾燥による粗造が顕著に認められた（図2C）。さらに、図2C患者におけるpHとTEWLにおいても、右側でpHの低下とTEWLの増加を認め、いずれも皮膚バリア障害の結果差が生じたと考えられた。

3. 3. 長期間ステロイド外用を行った皮膚局所の天然保湿因子NMFについて解析

最後に、長期間のステロイド外用によって生じたと考えられた皮膚バリア障害NMFについて図2C患者を中心に評価を行った。天然保湿因子全体においては、外用を行っていなかった左側において表層から30μmにかけて増加を認め、以後角層の深層にむかって低下する健康者（結果は示さず）と同様のパターンを示したのに対し、外用を行っていた右側では、角層の最外層から低下を示し表層から104μmにおいてほとんど測定限界値以下を示した（図3A）。その中でも天然保湿因子における主要構成成分であるピロリドンカルボン酸（pyrrolidone carboxylic acid: Pca）と尿素（urea）についても解析を行ったところ、天然保湿因子全体の結果を裏付ける変化を伴っていたことが判明した（図3B）。さらに水分保持量（water content）についても外用していた右側で優位に低下しており、角層直下の

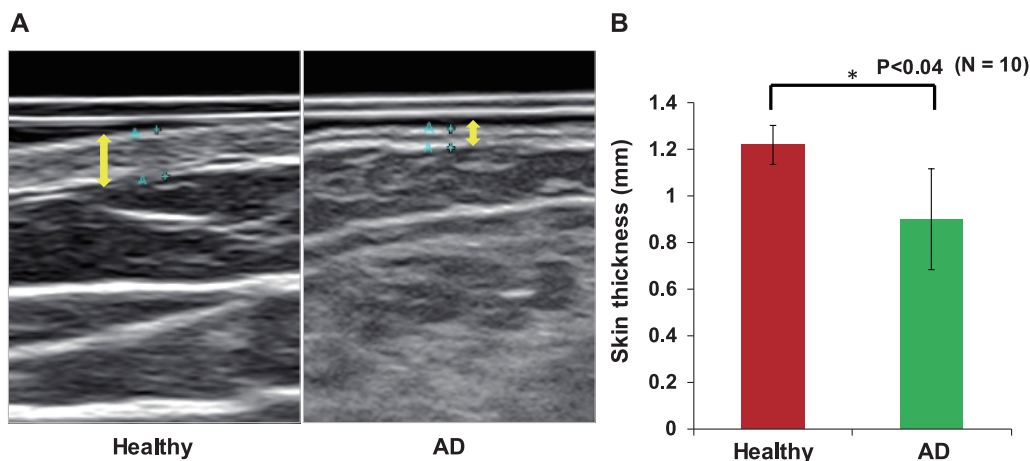


図1 長期間ステロイド外用加療を継続したアトピー性皮膚炎10名の皮膚の菲薄化を確認
 (A, B) 長期間ステロイド外用患者ならびに健康人各10名の前腕皮膚厚について、超音波を用いて測定・比較した。

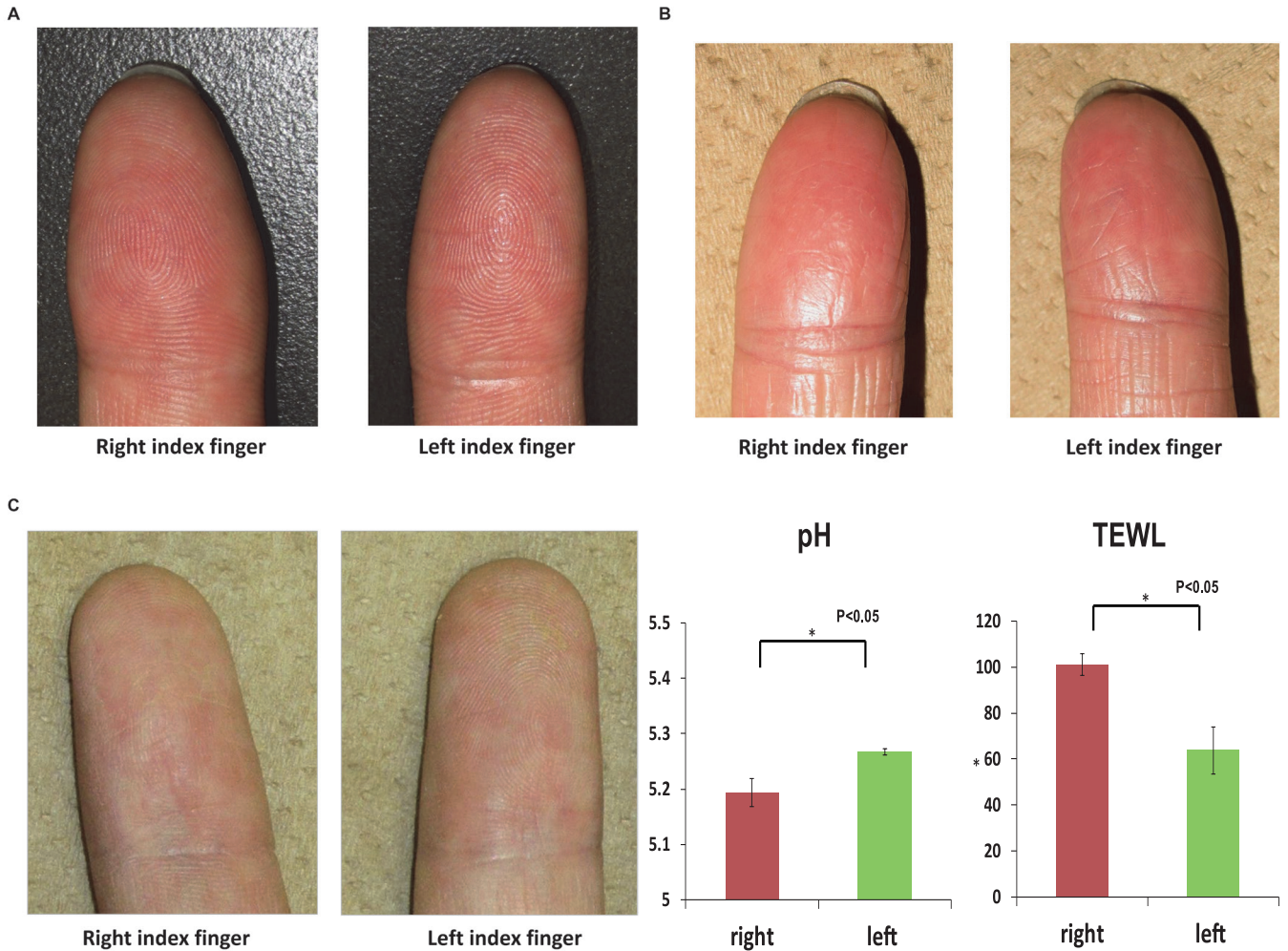


図2 長期間ステロイド外用を行った皮膚局所のpHや経皮水分蒸散量について解析

左右の指腹の臨床像を示す(A:健康者、B:アトピー性皮膚炎患者。両手を用いて外用を継続。C:アトピー性皮膚炎患者。右手のみを用いて外用を継続)。D:図2C患者におけるpHとTEWLの手指の左右差を示す。

顆粒層を位置する部位からも角層厚の低下を示す結果であった(図3C)。

4. 考察

皮膚のバリア機能は、天然保湿因子の含有量、角層含水量、経皮的角質水分蒸散量などで総合的に評価する必要がある。また、皮膚における水分・アミノ酸・脂質など各成分の測定は、光工学による計測技術の進歩によって著しく発展している。従来、テープストリッピングなどによる皮膚剥離を行った後に蛋白量などを測定していたのに対し、共焦点ラマン分光装置の出現によって角層内の深さ分布や薬剤の皮膚への浸透性を非侵襲かつ無標識に高感度で詳細な解析が可能となった。特にヒト検体においては、症状に苦しんでいる皮膚の状態そのままを短時間で測定できることに加え、皮膚生検や皮膚剥離などの検体採取時の影響をほぼ受けることなく評価できるように進歩してきている。長期間のステロイド外用剤使用においては、皮膚の局所副

作用は皮膚萎縮をはじめとして毛細血管拡張、潮紅、酒皸様皮膚炎、ステロイド紫斑、痤瘡、多毛、感染症の増悪などが従来知られており、図1のとおり今回超音波検査を併用することで再認識できた。さらに、比較的皮膚構造の厚い手指を用いて同一個体内で長期間のステロイド外用剤使用における評価を行えたことは貴重な機会であり、ステロイド外用によって皮膚の菲薄と天然保湿因子が低下していることが判明したことは、生体の最外層の重要な役割の一つである皮膚バリア障害がいかに低下し、感染症の増悪の一因となっているかが示されていると考えている。アトピー性皮膚炎患者における皮膚免疫バランスは、フィラグリン蛋白の発現低下にともなう生じるpHの低下、続発する皮膚バリア機能異常、付随して生じるTh2よりシフトすると考えられる各種サイトカインなどのアレルギー反応が複雑にからみあっている(図4)^{6,7)}。ステロイド外用剤の使用は上記における炎症反応を抑制する効果的な治療法であることは間違いないが、長期使用や誤った乱用によ

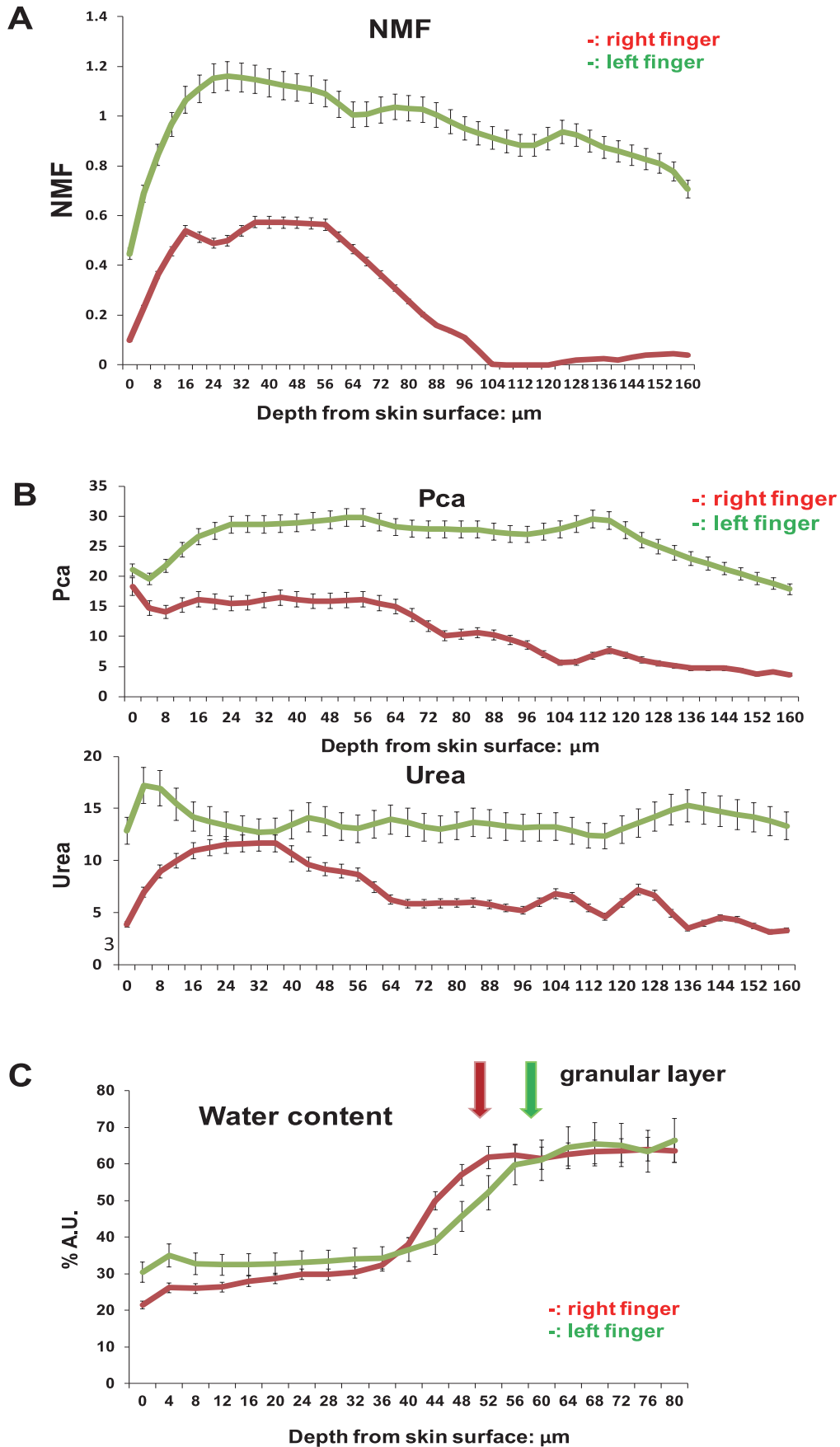


図3 長期間ステロイド外用を行った皮膚局所の天然保湿因子について解析
(A-C) ラマン分光光度計を用いて図2C患者における NMF、pyrrolidone carboxylic acid : Pca、Urea、water content の左右差を示す。

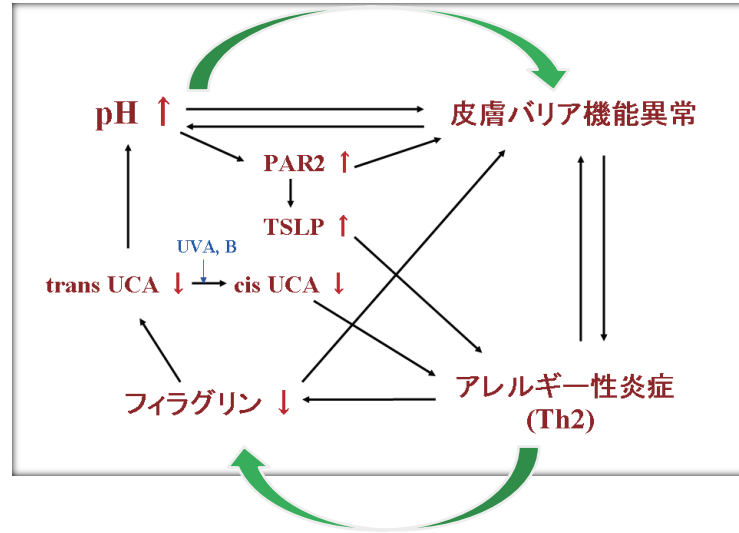


図4 アトピー性皮膚炎患者における皮膚免疫バランス
皮膚免疫応答を中心としたバリア機能異常、アレルギー性炎症、pH などのサイクル図を示す。

って皮膚の菲薄と天然保湿因子が低下につながり、図4のサイクルをより悪化させる可能性があることが今回の研究によってより鮮明になった。今回の研究で更に詳細な解明を行うことによって新たな側面で迫れたのみならず、健常皮膚をもつヒトの経時的な変化についても迫っていきたいと考えている。

(引用文献)

- 1) Osawa R, Konno S, Akiyama M, et al. Japanese-specific filaggrin gene mutations in Japanese patients suffering from atopic eczema and asthma: JID, 130, 2834-2836, 2010.
- 2) Tanizaki H, Nakashima C, Shimizuhira C et al. Performance comparison of a novel intradermal injection system with the Mantoux technique: J Dermatol Sci., 79, 310-313, 2015.
- 3) Amano W, Nakajima S, Kunugi H, et al. The Janus kinase inhibitor JTE-052 improves skin barrier function through suppressing signal transducer and activator of transcription 3 signaling: J Allergy Clin Immunol., 136, 667-677, 2015.
- 4) Egawa M, Tagami H. Comparison of the depth profiles of water and water-binding substances in the stratum corneum determined in vivo by Raman spectroscopy between the cheek and volar forearm skin: effects of age, seasonal changes and artificial forced hydration: Br J Dermatol., 158, 251-260, 2008.
- 5) 古江増隆, 佐伯秀久, 古川福実, 他6名: アトピー性皮膚炎診療ガイドライン: 日皮会誌, 119, 1515-1534, 2009
- 6) Demerjian M, Choi EH, Man MQ et al. Activators of PPARs and LXR decrease the adverse effects of exogenous glucocorticoids on the epidermis: Exp Dermatol., 18, 643-649, 2009.
- 7) Stojadinovic O, Lee B, Vouthounis C et al. Novel genomic effects of glucocorticoids in epidermal keratinocytes: inhibition of apoptosis, interferon-gamma pathway, and wound healing along with promotion of terminal differentiation: J Biol Chem., 282, 4021-4032, 2007.

極長鎖脂肪酸含有セラミドの表皮バリア形成における機能と分子機構の解明

大阪市立大学複合先端研究機構
中台(鹿毛) 枝里子

In multicellular organisms, the surface barrier is essential for maintaining the internal environment. In mammals, the barrier is the stratum corneum. Fatty acid transport protein 4 (FATP4) is a key factor involved in forming the stratum corneum barrier. Mice lacking Fatp4 display early neonatal lethality with features such as tight, thick, and shiny skin, and a defective skin barrier. FATP4 is a member of the FATP family that possesses acyl-CoA synthetase activity for very long chain fatty acids. How Fatp4 contributes to skin barrier function, however, remains to be elucidated. In the previous study, we characterized two *Caenorhabditis elegans* genes, *acs-20* and *acs-22*, that are homologous to mammalian FATPs. Animals with mutant *acs-20* exhibited defects in the cuticle barrier, which normally prevents the penetration of small molecules. We demonstrated that the incorporation of exogenous very long chain fatty acids into sphingomyelin was reduced in *acs-20* and *acs-22* mutants. In the present study, we further analyzed the skin barrier of *acs-20* and *acs-22* mutants. We also developed *C. elegans* infection models against human skin flora such as *Propionibacterium* and *Malassezia*.

1. 緒言

セラミドは表皮の細胞間脂質として表皮バリア形成に重要な役割を果たすと考えられている。実際に、ゴースェ病やアトピー性皮膚炎患者では皮膚のセラミド含有量が減少し、易感染性や水分保持能低下が起こる。2003年、Herrmannらのグループにより、角質細胞において機能する極長鎖アシルCoAシンテターゼFATP4のノックアウトマウスでは、低分子化合物の皮膚透過性が異常な高値を示すこと¹⁾(図1)、表皮のセラミドに含まれる極長鎖脂肪酸量が有意に低下することがわかり(極長鎖脂肪酸:一般に炭素数24以上の脂肪酸)、セラミドのなかでも極長鎖脂肪酸を含むものが表皮バリア形成に重要な役割を果たす可能性が示唆された。しかし、マウス研究は遺伝学的手法が煩雑であり、研究コストも高いことなどから、表皮バリアと脂質に関する分子遺伝学的基盤の全体像は未だ明らかになっていない。

そこで申請者は表皮バリア形成の解析のためのモデル動物として線虫 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) を用いることを着想し、FATP4ホモログ遺伝子 *acs-20* のノックアウト線虫の作製および解析を行った。その結果、ノックアウト線虫ではHoechstをはじめとする種々の化合物の表皮透過性が顕著に上昇していた²⁾(図2)。また極長鎖脂肪酸含有スフィンゴ糖脂質量が低下していた²⁾。本研究は上

Fatp4 +/- Fatp4 -/-



図1 表皮バリア異常によりX-galで真っ青に染まったFATP4ノックアウトマウス

記知見に立脚し、線虫をモデル動物として用いて極長鎖脂肪酸含有セラミドの表皮バリア形成/機能における役割と分子的基盤を明らかにすることを目的とする。また線虫を代替モデル宿主とした、ヒトの皮膚フローラを構成する細菌、真菌の感染実験系を構築し、脂質や表皮バリアの役割について明らかにすることを目指した。

2. 方法

2.1. 実験動物(線虫)

野生型 *Caenorhabditis elegans* としてN2株(Caenorhabditis Genetics Center (CGC)より分与)を使用した。*acs-20*変異体として、*tm3232*株または*tm3278*株²⁾を使用した。*acs-22*変異体として、*tm3236*株²⁾を使用した。レスキュー実験には、*tm3232*株に*acs-20*プラスミドDNAをマイクロインジェクションにより導入し、株化したものを使用した。線虫の飼育はBrenner (1974)に準じて行った。線虫は、餌となる大腸菌OP50株を培養したNGMプレー



The role of very long chain fatty acid containing ceramides in the epidermal barrier and the underlying molecular mechanisms

Eriko Kage-Nakadai

The OCU Advanced Research Institute of Natural Science and Technology, Osaka City University

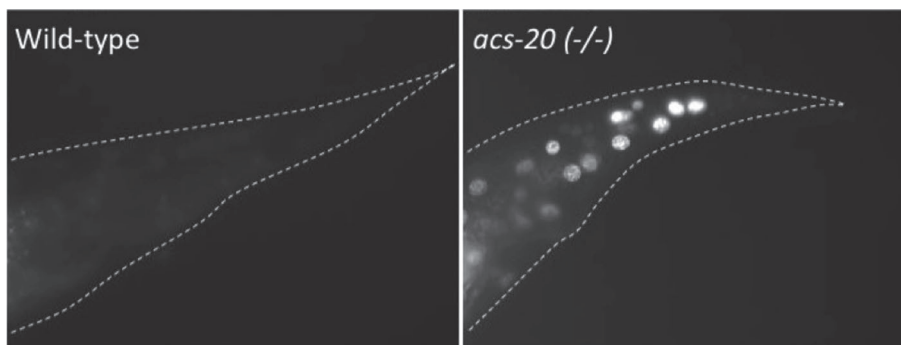


図2 *acs-20* ノックアウト線虫の表皮バリア破綻
Hoechst バイタル染色により核が簡単に染まってしまう(線虫尾部の写真。白破線で縁をかたどっている)。

ト上で飼育した。飼育温度は、通常の維持では20℃とし、生存分析および感染実験においては25℃にて行った。

2. 2. 1% SDS感受性試験

耐性幼虫を得るため、液体培養にて餌枯渇状態となつてから、さらに4日間20℃飼育を行った線虫を用いた。線虫は1% SDS溶液に15分間浸した後、M9バッファー(5 mM potassium phosphate, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, and 0.5 g/L gelatin)を用いて3回洗い、餌のないNGMプレート上に置いた。20℃24時間培養後、生存する虫の数をカウントした。

2. 3. マラセチア真菌感染実験

産卵期にある成虫より卵を回収し、孵化同調させた後、25℃3日間培養し、1日齢成虫を得た。マラセチア真菌株として *Malassezia furfur* NBRC0656株を用いた。培養はクロモアガーを用い28℃にて行った。寒天上のコロニーをかきとりM9バッファーに懸濁、調整、10 mg/plateとなるように5 cm NGM プレートに塗布した。対照群として、OP50株をTSA培地で37℃一晚培養後、M9バッファーで調整し、10 mg/plateとなるように5 cm NGM プレートに塗布した。同調した1日齢成虫を、各菌株を塗布したNGMプレート上に移し、25℃培養を行った。その後2日毎に新しく菌を塗布したプレートに移しながら経日的に観察し、ピッカーで軽く触れて反応のない個体を死亡とした。観察により得られた結果はKaplan-Meier法により生存率を計算後、Log-rank testにより各群間の生存率の差を比較した。

2. 4. アクネ菌感染実験

アクネ菌株として *Propionibacterium acnes* NBRC107605株を用いた。液体培養はGAMブイヨンを用い、アネロパックおよびアネロパックジャーを用いて37℃嫌気培養を行った。培養液をGAM寒天培地上にコンラージし、2日

間37℃嫌気培養を行った。寒天上のコロニーをかきとりM9バッファーに懸濁、調整し、10 mg/plateとなるように5 cm NGM プレートに塗布した。他は2. 3. の方法に準じて行った。

3. 結果

3. 1. *acs-20* ノックアウト線虫は1% SDS高感受性である

線虫は餌の枯渇した環境や高温度環境において耐性幼虫化することが知られている。耐性幼虫では体表のクチクラ層が口まで覆っており、高温、乾燥、界面活性剤などの薬剤に耐性となる。そこで、野生型線虫、*acs-20* ノックアウト線虫、*acs-20* のパラログであり主に腸において機能する *acs-22* 遺伝子のノックアウト線虫について耐性幼虫化条件における1% SDS感受性試験を行った。その結果、*acs-20* ノックアウト線虫は1% SDSに対し感受性を示すことがわかった。一方、野生型線虫と *acs-22* ノックアウト線虫においては耐性を示す虫が出現した。*acs-20* ノックアウト線虫の1% SDS耐性は、*acs-20* の導入により回復した(図3、図4)。

3. 2. マラセチア真菌 *M. furfur* は線虫 *C. elegans* に対し病原性を示す

マラセチア真菌はヒトや動物の皮膚に常在する担子菌系の不完全酵母である。*Malassezia* 属のほとんどの種は増殖に脂質を要求することから皮脂の多い部位に定着しやすく、癬風や脂漏性皮膚炎等の原因となる。これまでにマラセチア真菌のモデル宿主として線虫 *C. elegans* が用いられた報告はないため、本研究において実験系の確立を行った。25℃において *Malassezia furfur* NBRC0656 接種群は2日ほどで死滅した(図5)。20℃においても同様の結果が得られた(data not shown)。標準的な餌である大腸菌OP50株の接種では寿命は2~3週間であることから、*M. furfur* は線虫 *C. elegans* に対し強い病原性を示すことが示唆され

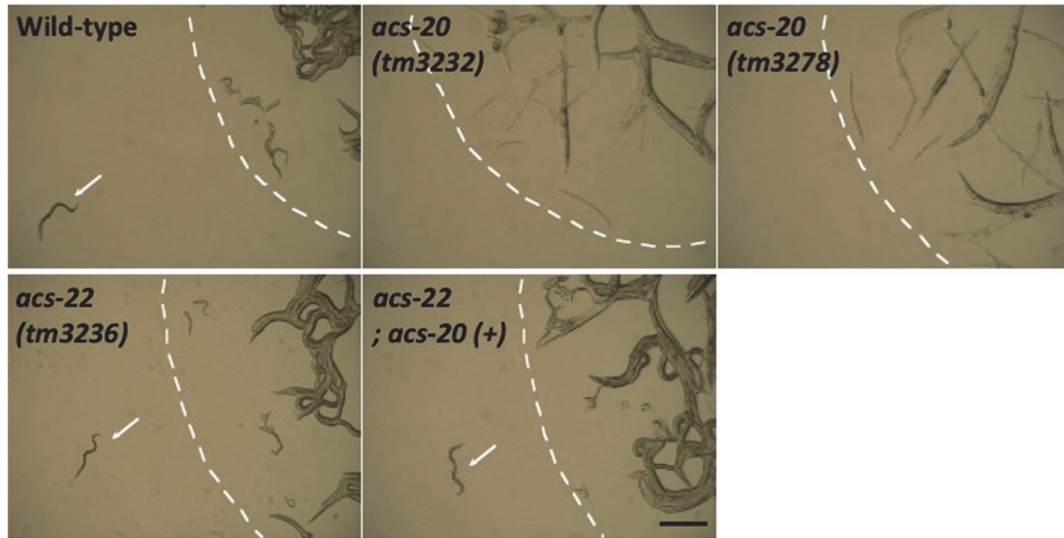


図3 1% SDS 感受性試験
 白い矢印は1% SDS に対し耐性を示し、生存している線虫を示す。

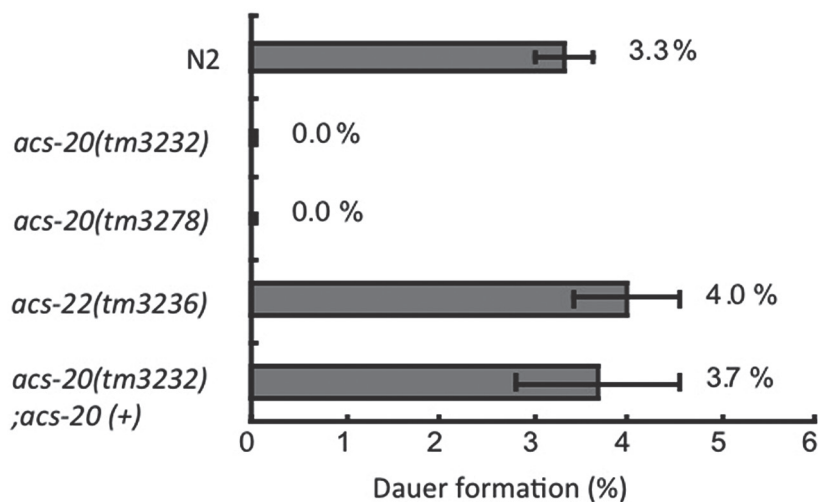


図4 1% SDS 耐性率 (耐性幼虫化率)
 Mean ± SE (n=3)

た。*acs-20* ノックアウト線虫においては野生型線虫と比較し、生存率が高い傾向はあったが、両者の間に有意な差はみとめられなかった(図5)。

3. 3. アクネ菌 *P. acnes* は線虫 *C. elegans* に対し病原性を示す

アクネ菌 *Propionibacterium acnes* はヒトの皮膚に常在するグラム陽性桿菌である。プロピオン酸を産生することから、寝たきりの高齢者などにみられる悪臭の原因となる。また近年、ディープシーケンス法の適用により、アクネ菌の特定の株がニキビ発症に関連している可能性が指摘されはじめた⁴⁾。これまでにアクネ菌のモデル宿主として線虫 *C. elegans* が用いられた報告はないため、本研究において実験系の確立を行った。実験には *Propionibacterium*

acnes NBRC107605 を用いた。その結果、標準的な餌である大腸菌 OP50 株の接種に比較し、生存率が有意に減少した ($p < 0.01$) (図6)。*P. acnes* は嫌気性細菌であるが、実験環境(好気条件)において少なくとも2日間は生菌が回収されることも確認した。*P. acnes* 接種群の生存個体は OP50 接種群と比較し、体が小さく透明度が高かった (data not shown)。

3. 4. アクネ菌接種による生存曲線は *acs-20* ノックアウト線虫と野生型線虫とは異なるキネティクスを示す

アクネ菌接種に対する感受性について野生型線虫と *acs-20* ノックアウト線虫を比較したところ、両者において有意な生存率の差はみとめられなかった。しかしながら、両

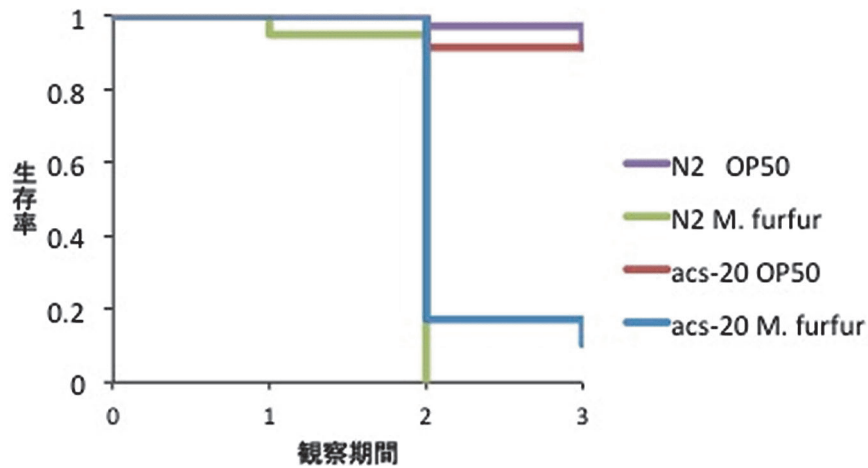


図5 マラセチア真菌感染実験

1日齢線虫に標準餌である大腸菌 OP50 またはマラセチア真菌 *M. furfur* を接種した。
1群あたりの個体数 n>50

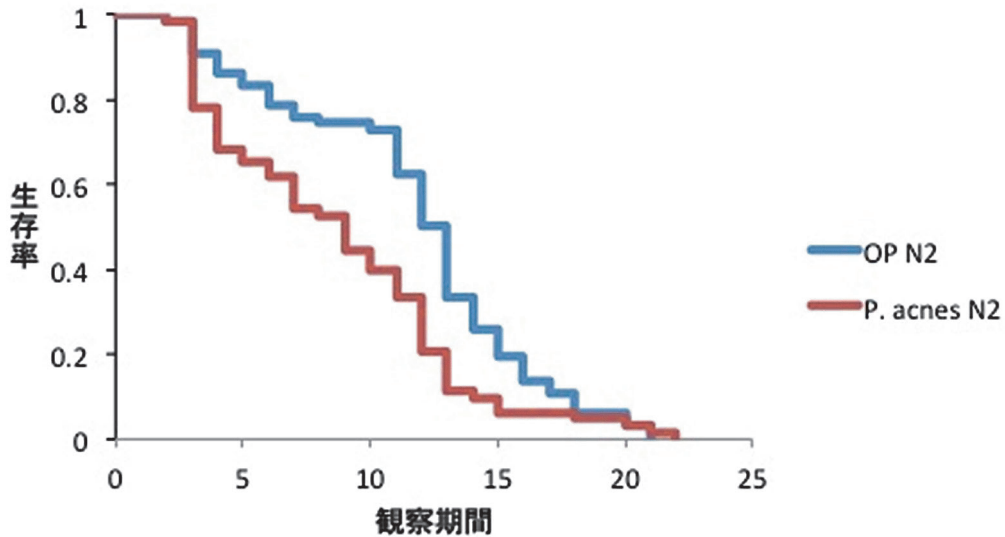


図6 アクネ菌感染実験

1日齢野生型線虫 N2 株に標準餌である大腸菌 OP50 またはアクネ菌 *P. acnes* を接種した。1群あたりの個体数 n>50

者の生存曲線は異なるキネティクスを示した。*acs-20* ノックアウト線虫は野生型線虫と比較し観察期間10日ころまでは生存率が高い傾向を示し、10日以降は逆に低い傾向を示した(図7)。

4. 考察

皮膚の角質層に存在する細胞間脂質は感染防御に重要な役割を果たすと考えられている。一方でヒトの皮膚の常在菌には好脂質性、脂質要求性の細菌、真菌が少なくない。*Propionibacterium acnes* (アクネ菌) は皮脂を好み、皮脂腺において増殖する性質を有する。*Malassezia* 属(マラセチア真菌)の多くは脂質存在下においてのみ増殖が可能である。このような菌、真菌については、有効な感染モデル

動物が存在せず、宿主との相互作用について未解決の課題が多く残されている。

線虫はわずか1,000細胞の単純な多細胞生物であるが、筋肉系、神経系、消化管系など多様な組織から構成されヒトと本質的には共通の生物学的特性を持っており、体表の構造もヒトの皮膚と類似点が多い。体表面には、ヒトの皮脂と同様に中性脂肪やリン脂質、スフィンゴ糖脂質などで構成される脂質層を有する。これまでに、哺乳類において皮膚バリアに重要な役割を果たす極長鎖アシルCoAシンターゼに着目し、その線虫ホモログである*acs-20* 遺伝子のノックアウト線虫の作製・表現型解析を行ってきた。

本研究においては、*acs-20* ノックアウト線虫が耐性幼虫化条件において1% SDS 高感受性を示すことを明らかに

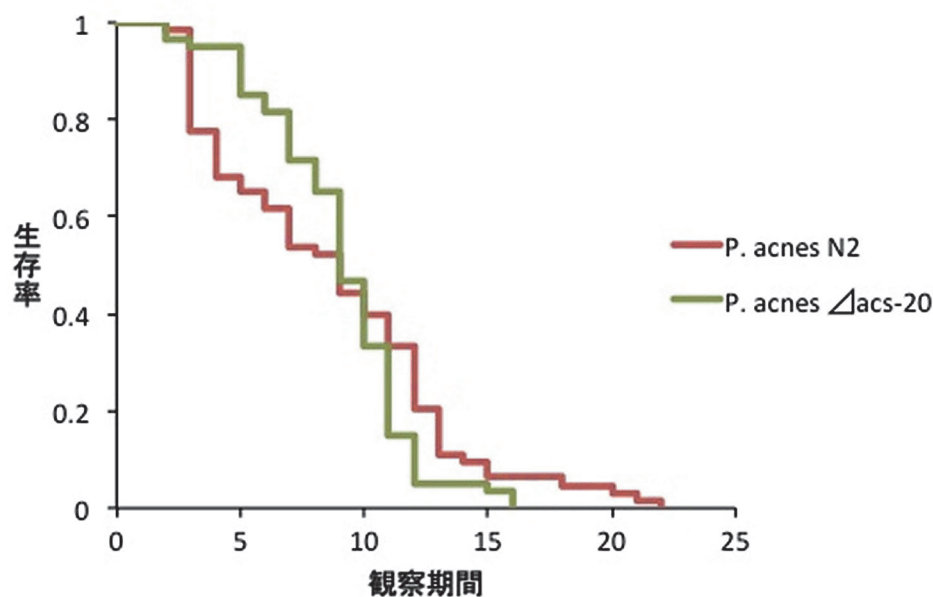


図7 *acs-20* ノックアウト線虫に対するアクネ菌感染実験
 1日齢 *acs-20* ノックアウト線虫に標準餌である大腸菌 OP50 またはアクネ菌 *P.acnes* を接種した。1群あたりの個体数 $n > 50$

した。この結果は *acs-20* ノックアウト線虫の表皮バリアが低下するというこれまでの知見を支持する。また、線虫 *C. elegans* がヒト皮膚常在菌、真菌の感染モデルとなる可能性を考え、種々の細菌、真菌の線虫への感染実験を行った。その結果、マラセチア真菌やアクネ菌が線虫に対して顕著な病原性を発揮することが明らかとなった。また *acs-20* ノックアウト線虫は、アクネ菌に対して野生型線虫と異なる生存キネティクスを示した。アクネ菌やマラセチア真菌は様々な脂質を基質とするリパーゼを分泌し、加水分解により生じた脂肪酸が炎症を誘発、増悪する可能性が指摘されている。以上のことから、*acs-20* ノックアウト線虫は、リパーゼの基質となる体表面脂質の変化により、アクネ菌やマラセチア真菌に対し野生型線虫と異なる反応を示す可能性が考えられた。

(引用文献)

- 1) Herrmann T1, van der Hoeven F, Grone HJ, Stewart AF, Langbein L, Kaiser I, Liebisch G, Gosch I, Buchkremer F, Drobnik W, Schmitz G, Stremmel W. Mice with targeted disruption of the fatty acid transport protein 4 (Fatp 4, Slc27a4) gene show features of lethal restrictive dermatopathy. *J Cell Biol.* 161,1105-1115, 2003
- 2) Kage-Nakadai E, Kobuna H, Kimura M, Gengyo-Ando K, Inoue T, Arai H, Mitani S. Two very long chain fatty acid acyl-CoA synthetase genes, *acs-20* and *acs-22*, have roles in the cuticle surface barrier in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 5, e8857, 2010
- 3) Tomida S, Nguyen L, Chiu BH, Liu J, Sodergren E, Weinstock GM, Li H. Pan-genome and comparative genome analyses of *propionibacterium acnes* reveal its genomic diversity in the healthy and diseased human skin microbiome. *MBio* 4, e00003-13, 2013

創傷治癒機構における小胞体ストレス応答の関与

和歌山県立医科大学薬理学講座

松崎 伸介

Recently, accumulating reports have suggested the importance of endoplasmic reticulum (ER) stress signaling in the differentiation of several tissues and cells, including myoblasts and osteoblasts. Secretory cells are easily subjected to ER stress during maturation of their secreted proteins. Skin fibroblasts produce and release several proteins, such as collagens, matrix metalloproteinases (MMPs), the tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) and glycosaminoglycans (GAGs), and the production of these proteins is increased at wound sites. It is well known that differentiation of fibroblasts into myofibroblasts is one of the key factors for wound healing. In this study, we examined the effects of ER stress signaling on the differentiation of fibroblasts, which is required for wound healing, using constitutively ER stress-activated primary cultured fibroblasts. The cells expressed positive α -smooth muscle actin signals without TGF- β stimulation compared with control fibroblasts. Gel-contraction assays suggested that ER stress-treated primary fibroblasts caused stronger shrinkage of collagen gels than control cells. These results suggest that ER stress signaling could accelerate the differentiation of fibroblasts to myofibroblasts at injured sites. The present findings may provide important insights for developing therapies to improve wound healing.

1. 実験背景

小胞体ストレス（以下ERストレス）による細胞死機構についての多くの研究がなされ、変性疾患発症過程におけるERストレスの重要性は多数報告されている¹⁻⁷⁾。一方、より強い筋組織の形成を行う過程でERストレスによる筋芽細胞の選択が行われていること⁸⁾、骨芽細胞の分化においてERストレス応答経路が重要であること^{9, 10)}が報告された。このことは、ERストレスが細胞死を誘導するだけでなく、成体の恒常性維持に重要であることを示唆している。

膵臓などの内分泌器官においては大量の分泌タンパク質の合成過程において生理的ERストレス状態にあると考えられている。我々は創傷皮膚においては多くの分泌タンパク質の合成が行われることから、膵臓などの内分泌器官同様生理的ERストレス状態にあると想定し、創傷治癒機構におけるERストレスの重要性に着目した。一方で、創傷治癒機構ではfibroblastからmyofibroblastへの分化が重要であることが知られている^{11, 12)}。そこで、創傷皮膚領域におけるERストレスの意義を検討する目的で、生理的ERストレスがfibroblast分化に及ぼす影響を検討することとした。

2. 実験概要

in vitro実験系において生理的ERストレスを再現する



Involvement of ER Stress in the wound healing of skin

Shinsuke Matsuzaki

Department of Pharmacology, Wakayama Medical University

目的で、ERストレスの1つである tunicamycin（糖鎖修飾阻害剤）の反復投与を行った。最終的には、細胞死の促進はなしにERストレス応答が亢進している状態を示す条件を絞り込み、それら条件に合致する実験条件を今後の方法として採用した。

細胞分化への影響についてはFibroblastからmyofibroblastへの分化をもとに検討した。その分化の指標としては α -SMA発現レベルの変化（上昇）を用いた。また、機能的な分化であったか否かを検討するためゲルコントラクションアッセイを用い、分化したfibroblastsの有する収縮能力を評価した。

詳細な方法と結果については下記の「3. 実験方法」、「4. 実験結果」の項目に記載する。

3. 実験方法

3. 1. Fibroblastの準備と培養

2-4日齢のC57B6マウスの皮膚を切除し培養ディッシュに貼付け、10% fetal bovine serum (FBS) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を添加し、酸素5%、二酸化炭素95%、37°Cの条件で培養した。その後、2度の播きかえを行い、各実験に用いる細胞培養用ディッシュにて培養。必要に応じて1 μ g/ml tunicamycin (an inhibitor of N-glycosylation in the ER)、又は溶媒である dimethyl sulfoxide (DMSO) による刺激を1日5分間、3日連続で実施した。この連続刺激が終了した後、3度目の播きかえ作業を実施し、血清を含まないDMEMへと変更、24時間経過した後、10ng/ml TGF- β 1 (R&D Systems Inc.) を含む又は含まないDMEMへと変更した。これらの実験は、大阪大学動物実験規定に基づき作成・承認を得た計画書に則り実施した。

3. 2. 細胞死アッセイ

Primary fibroblastsは96-well platesに 1×10^4 / wellにて播かれ36時間血清入りDMEMで培養された後、DMSO又はTMによる負荷が行われた。負荷時間は下図の通りである。負荷が終了した後phosphate buffered saline (PBS)にて2度洗い流し、DMEM (D1145, SIGMA)とWST-1試薬を混合した液にて3時間培養し、WST-1試薬の反応を吸光度計にて測定した ($\lambda 450 \text{ nm} - \lambda 650 \text{ nm}$)。3回以上同等の実験を実施し、得られた結果を標準誤差付して表示した。

3. 3. Western blot analysis

各刺激・負荷を受けた細胞はPBS洗浄を2度行った後に回収され、protease inhibitor cocktail (Roche, Sydney, Australia)を含むRIPA bufferにて溶解された。同量のタンパク質サンプルを5-20% gradient SDS-PAGE, e-PAGEL (ATTO CO., Tokyo, Japan)にて電気泳動した後、PVDF

membrane (Millipore, Bedford, MA)に転写、5% (w/v) skim milkによるブロッキング作業を行った後、GRP78/Bip又は β -actin抗体にて免疫反応を実施した。抗体としては、mouse anti-BiP/GRP78 antibody (BD Transduction Laboratories) / HRP-conjugated anti-mouse IgG antibody (Cell Signaling Technology)、又はanti- β -Actin HRP-DirecT (MBL Co., Nagoya, Japan)を使用。発色にはLuminata Classico Western HRP substrate (MERCK MILLIPORE)を用いた。結果を数値化するため得られたバンドをImage Jにて数値化した。独立した3回以上の施行結果を平均化し、標準偏差を付して示した。

3. 4. Collagen Gel Contraction Assay

各負荷を受けたfibroblastsに対してCollagen Gel Culturing Kit (Nitta Gelatin, Inc.)を用いたゲル収縮能の評価を行った。 2×10^5 cellsが0.5mlの培養用ゲル内に均一になるよう培養された。均一化された培養用ゲルは

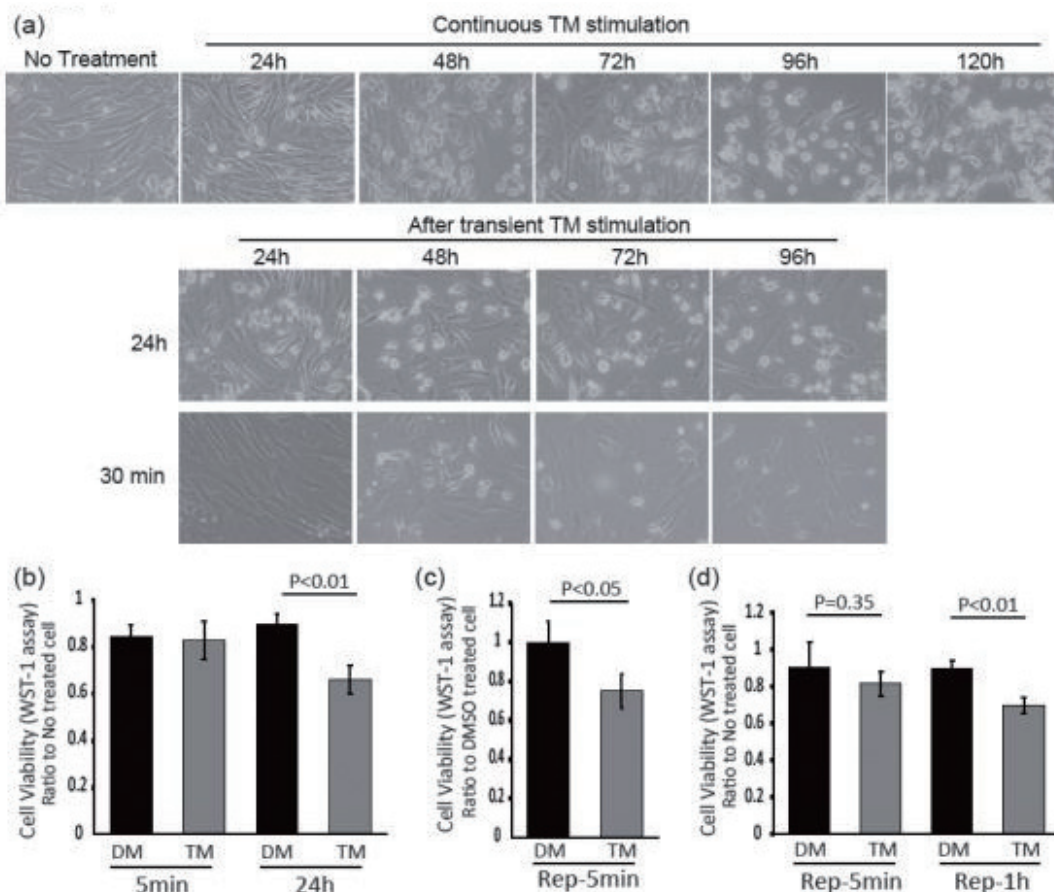


Fig. 1 Condition setting for physiological ER stressed fibroblast

(a) (upper panels) Primary cultured fibroblasts were treated with $1 \mu\text{g/ml}$ TM. The cells were observed each time points. (middle and bottom panels) Primary cultured fibroblasts were transiently treated with $1 \mu\text{g/ml}$ TM for 24 h or 30 min and the medium were changed to the culture medium. The cells were observed each time points after the medium change. (b-d) The effect of each ER stress methods on cell viability was measured by WST-1 assay. (b) 24h or 5 min of transient $2 \mu\text{g/ml}$ TM stimulation, (c) 5 min of repeated $2 \mu\text{g/ml}$ TM stimulation and (d) 1h or 5 min of repeated $1 \mu\text{g/ml}$ TM stimulation were adopted for these assays. Same amount of DMSO were used as controls. The P value was compared with the control and calculated by Student's T test.

4-well culture plates にて固められ、固まった後はゲルとの接地面を剥離、その状態での血清を含まないDMEMにて培養された。必要に応じてTGF- β 1の添加も行っている。各タイムコースでのゲルの大きさはImage Jにて数値化した。独立した3回以上の施行結果を平均化し、標準偏差を付して示した。

3. 5. Immunocytochemistry

各負荷を受けたfibroblastsに対して2度のPBS洗浄を行った後、4% paraformaldehydeによる固定を行った。その後、5% BSA and 0.1% triton-X処理を行い、一次抗体としてrabbit monoclonal antibody for α -SMA (Epitomics, Inc., CA, USA)又はrabbit polyclonal antibody for Bip(Cell Signaling Technology, Beverly, MA)、二次抗体としてfluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-rabbit

IgG antibodyを用い反応させた後、共焦点顕微鏡LSM-510laser scanning microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)を用いて観察を行った。

4. 実験結果

近年、生理的小胞体(ER)ストレスが細胞の分化に重要な働きをしていることが多数報告されるようになってきた。そこで、皮膚fibroblastの分化におけるERストレスについて検討することとした。生理的ERストレスを培養細胞レベルで再現する目的で、細胞死が誘導されずERストレス応答(本研究ではGRP78発現にて確認)が誘導される条件を検討することとした(図1・2)。まず、1 μ g/ml tunicamycin(TM)負荷を行い24・48・72・96時間後に観察した。その結果として24時間負荷では僅かな細胞死が確認された(図1a)。本結果をもとに、30分、24時間の

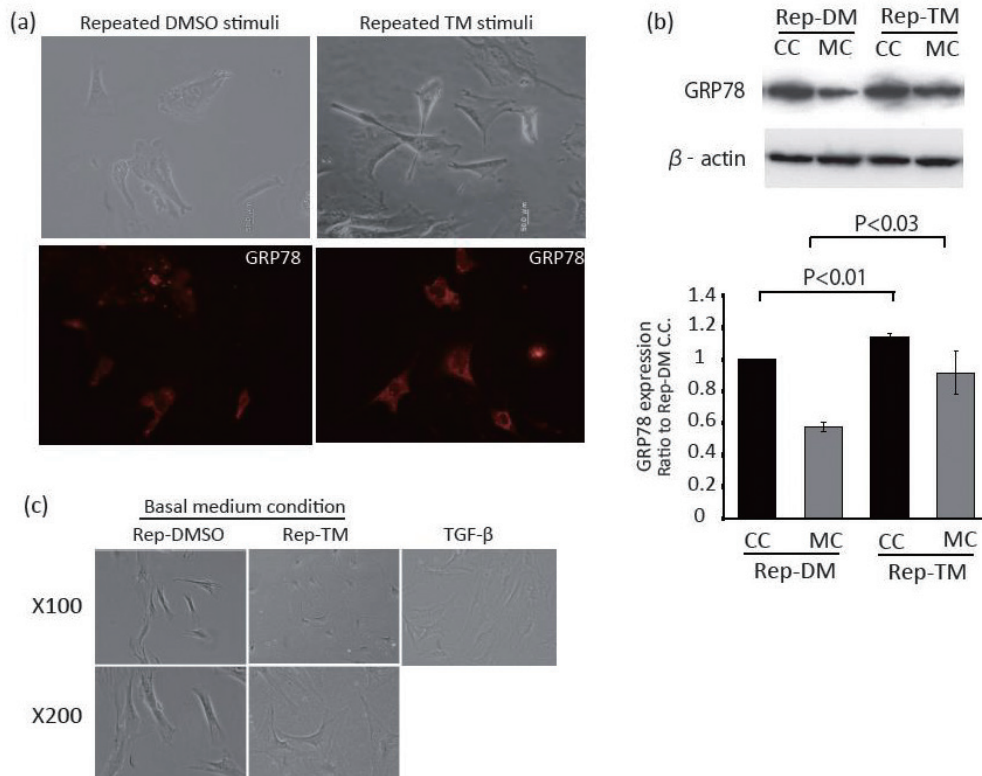


Fig. 2 Effects of repeated TM stimulation on fibroblasts' morphology and GRP78/BiP expression

Primary cultured fibroblasts were treated with 1 μ g/ml TM or DMSO for 5 minutes per day 3 days in series. After this repeated TM or DMSO stimulation, medium was changed to DMEM with 2% horse serum (Basal medium condition) and incubated for 12h to induce differentiation. Primary cultured fibroblasts were treated with 1 μ g/ml TM or DMSO for 5 minutes per day 3 days in series.

(a) Just after this repeated TM or DMSO stimulation, the cells were observed (upper panels) and stained by anti-Bip antibody (bottom panels).

(b) The cells treated with TM (Rep-TM) or DMSO (Rep-DM/Rep-DMSO) cultured in the culture condition medium (C.C.) or in the Basal medium condition for differentiation (M.C.) were collected and lysed. Western blot analysis was performed using an anti-Bip or anti- β -actin primary antibody (upper panels). Quantitative data were obtained by densitometry of the bands. Data are expressed as the mean \pm SEM for at least three independent experiments (shown as a ratio of the Rep-DM C.C.). The P value was compared with the control and calculated by Student's T test.

(c) Left and middle panels show the cells treated with TM (Rep-TM) or DMSO (Rep-DMSO) cultured at Basal medium condition. Right panel shows the cells treated with TGF- β 1 after the incubation at the basal medium condition.

TM単回負荷を行い、培養用メEDIUMに戻して24・48・72・96時間後に細胞の観察を行ったところ、24時間負荷細胞ではかなりの細胞死の促進が確認された(図1a)。

一方で、30分負荷細胞も軽度の細胞死誘導が確認された。そこで、5分間単発TM負荷を実施したところ細胞死は確認されなかった(図1b)。次に、24時間毎TM 5分、30分、1時間負荷を3度繰り返した細胞に対して細胞死アッセイ(WST-1アッセイ)を実施した。その結果、1 μ g/ml TM負荷では連続的5分間負荷細胞では細胞死の誘導が確認されなかったが、30分、1時間連続負荷細胞では細胞死の促進が確認された(図1d及びdata not shown)。一方で、2 μ g/ml TM負荷では連続的5分間負荷細胞が細胞死の促進を示した。この結果より、生理的ERストレスを培養細胞で模倣する方法として1 μ g/ml TM連続的5分間負荷(以下、TM反復刺激)を用いることとした。

上記方法にてfibroblastsへの負荷条件を決定した上で、ERストレス応答への影響を観察したところ、免疫染色法においてもウェスタンブロット法においてもGRP78発現が促進していることが確認された(図2a, b)。次に細胞形態を確認したところ、通常培養メEDIUM下ではTM反復負荷細胞とコントロールとして用いたDMSO反復負荷細胞の間に大きな差を認めなかったが、分化誘導前に用いる血清なしDMEM(basal medium)に変更後24時間でTM反復負荷細胞は扁平な形態を示すことを見出した(図2c)。一方で、TGF- β 1刺激がfibroblastsの分化を誘導することが知られていることから、fibroblastsにTGF- β 1刺激を行い形態観察したところ、扁平な形態変化を示すことから、TM反復負荷により分化が誘導されていることが予想された。そこで、fibroblastsが分化しmyofibroblastに

変化しているか否かを確認するため、 α -SMAによる免疫染色を行った。その結果、basal mediumにおいてTM反復負荷細胞ではDMSO反復負荷細胞に比して α -SMAの発現が上昇していることが明らかとなった(図3)。さらに、TGF- β 1刺激後の各fibroblastsにおいてもTM反復負荷細胞において α -SMAの発現上昇を認めた(図3)。このことは、ERストレス反復刺激がfibroblastの分化を促進していることを示唆している。

そこで、Collagen Gel Culturing Kitを用いたゲルコントラクションアッセイを実施し、TM反復負荷によるfibroblastの分化促進はゲル収縮力に影響するのか否かを検討することとした。TGF- β 1刺激なしの場合、TM反復負荷細胞ではDMSO反復負荷細胞に比して有為なゲル収縮能を示すことが明らかとなった。一方、TGF- β 1刺激では両者ともに強いゲル収縮能を示したもののTM反復負荷細胞ではより強い収縮傾向を示した(図4)。本結果より、fibroblastはERストレス反復刺激により分化誘導され α -SMA陽性細胞(myofibroblast)に変化し、ゲル収縮能を有するようになることを明らかとした。

5. 考 察

本研究結果は生理的ERストレスが皮膚由来fibroblastの分化に重要な役割を果たす可能性を示している。創傷部領域では創傷治癒に必要となる多くの分泌因子の合成が促進しており、過剰な蛋白質合成状態にある。すなわち生理的ERストレス状態にあることが予想され、創傷部ではERストレスを介した分化が誘導されていることが予想される。一方で、fibroblastの分化が促進状態にあり、強い収縮能を示す状態にあると考えられるケロイド領域におい

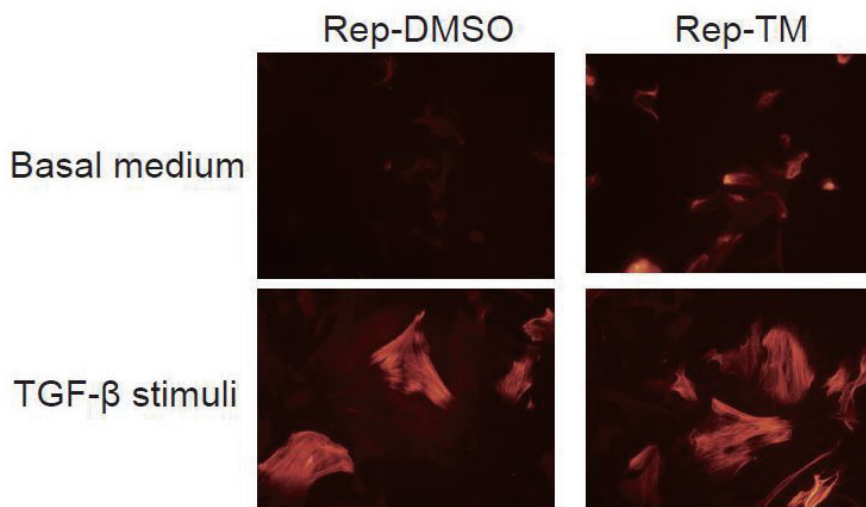


Fig. 3 The repeated TM treated fibroblasts showed α -SMA induction.

Rep-TM and Rep-DMSO cells were cultured at basal medium for 12 h (upper panels) and each cells were treated with TGF- β 1 after basal medium condition for 48 h. The cells were fixed and immunocytochemistry was performed with anti- α -SMA antibody.

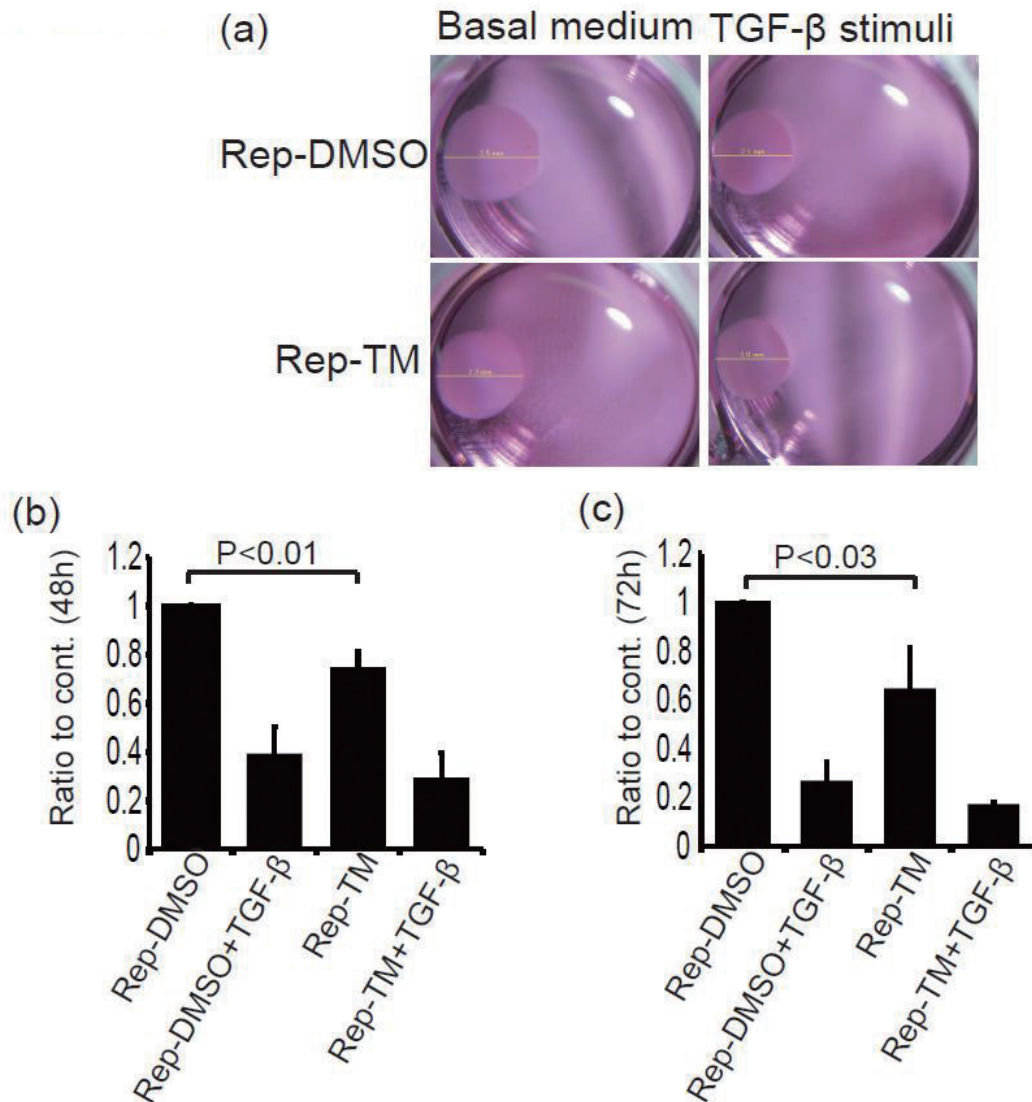


Fig. 4 The repeated TM treated fibroblasts showed accelerated collagen gel contraction.

Rep-TM and Rep-DMSO cells were embedded in collagen gels. After gel formation, the rims of the gels were detached and gels were overlaid with basal medium or TGF- β 1 containing medium. (a) these pictures show one of the experimental results of gel contraction. (b and c) Gel size of each conditions were measured at 48 and 72 h. Gel size containing Rep-DMSO cells treated with basal medium were used as control. Each bars show the ratio to control at 48 h (b) and 72 h (c). The P value was compared with the control and calculated by Student's T test.

てERストレス応答の亢進が報告されている¹³⁾。この報告は、皮膚fibroblastの分化にERストレスが関与していることを示しており、本研究結果を支持するものである。

追記

本報告内容は以下の雑誌に受理され掲載された。

- ・ [Matsuzaki S](#), Hiratsuka T, et. al., Physiological ER Stress Mediates the Differentiation of Fibroblasts. PLoS One. 10(4):e0123578. 2015.

(引用文献)

- 1) Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. Science 281: 1312-1316 pmid : 9721091

doi: 10. 1126/science. 281. 5381. 1312

- 2) Glücksmann A (1951) Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. Biol. Rev. 26: 59-86 pmid: 24540363 doi: 10. 1111/j. 1469-185x. 1951. tb00774. x
- 3) Kerr JFR, Wyllie AH, Currie A (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br. J. Cancer. 26: 239-257 pmid: 4561027
- 4) Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, et al. (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. Nature. 403 (6765) : 98-103. pmid: 10638761 doi: 10. 1038/47513

- 5) Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, Kudo T, Taniguchi M, Koyama Y, et al. (2004) Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol.* 165 (3) : 347-56. pmid: 15123740 doi: 10. 1083/jcb. 200310015
- 6) Katayama T, Imaizumi K, Sato N, Miyoshi K, Kudo T, Hitomi J, et al. (1999) Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol.* 1 (8) : 479-85. pmid: 10587643
- 7) Lindholm D, Wootz H, Korhonen L (2006) ER stress and neurodegenerative diseases. *Cell Death Differ.* 13 (3) : 385-92. pmid: 16397584 doi: 10. 1038/sj. cdd. 4401778
- 8) Nakanishi K, Dohmae N, Morishima N (2007) Endoplasmic reticulum stress increases myofiber formation in vitro. *FASEB J.*21 (11) : 2994-3003. pmid: 17435177 doi: 10.1096/fj. 06-6408com
- 9) Murakami T, Saito A, Hino S, Kondo S, Kanemoto S, Chihara K, et al (2009) Signalling mediated by the endoplasmic reticulum stress transducer OASIS is involved in bone formation. *Nat Cell Biol.* 11 (10) : 1205-11. doi: 10. 1038/ncb1963. pmid: 19767743
- 10) Saito A, Ochiai K, Kondo S, Tsumagari K, Murakami T, Cavener DR, et al (2009) Endoplasmic Reticulum Stress Response Mediated by the PERK-eIF2arufa-ATF4 Pathway Is Involved in Osteoblast Differentiation Induced by BMP2. *J Biol Chem.* 286 (6) : 4809-4818. doi: 10. 1074/jbc. m110. 152900
- 11) Garner WL, Rittenberg T, Ehrlich HP, Karmiol S, Rodriguez JL, Smith DJ, et al (1995). Hypertrophic scar fibroblasts accelerate collagen gel contraction. *Wound Rep. Reg.* 3, 185-191. doi: 10.1046/j.1524-475x. 1995. 30210. x
- 12) Hinz B (2007) Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair. *Journal of Investigative Dermatology* 127, 526-537. pmid: 17299435 doi: 10. 1038/sj. jid. 5700613
- 13) Butler PD, Wang Z, Ly DP, Longaker MT, Koong AC, Yang GP (2011) Unfolded Protein Response Regulation in Keloid Cells. *J Surg Res.* 167 (1) : 151-157. doi: 10. 1016/j. jss. 2009. 04. 036. pmid: 1963134

Ⅲ. 精神、文化に関する分野

「香り」の社会言語学：人はどのように「香り」の言語化を行うのか

ユタ大学言語文化学部

東 照 二

Human olfaction or the sense of smell is considered very difficult to verbalize in words. Ackerman (1991) rightly states that the sense of smell is a “mute sense.” Nevertheless, we talk about smells all the time. For example, the perfume industry heavily relies on our ability to express certain smells in words. How do we accomplish the challenging task of putting smell into words? The present study is a sociolinguistic analysis of the language pertaining to perfumes in Japanese and English. One of the findings is that we use other senses (e.g., taste) to put smell into words. Furthermore, a story-telling strategy lets the addressee be involved in making sense of the smell. This suggests that the language of smell is a “joint production” of meaning between a sender and an addressee.

1. 緒 言

私たちは「香り」から逃れることはできない。電車、オフィス、学校、店、病院、街、食堂、植物園などいたるところで、香りは私たちの日常生活に深く入り込んでいる。しかしながら、私たちの周りに豊富にある香りという五感の一つを、どうことばで表現し、他者に伝え、コミュニケーションをとるかという観点から考えてみると、他の感覚(味覚、触覚など)と違い、香りは独特な位置を占めているといえる。端的にいうと、アッカーマンの『感覚の自然史』(*A Natural History of the Senses*)¹⁾が指摘するように、香りは「ことばにできない感覚」(mute sense)といえる。つまり、言語化が難しい感覚だということになる。

特に、アッカーマンのいうところの「ことばにできない感覚」、つまり香りを表現する香り専用のことば(原義)が存在しない、ということを考えてみると、香りを表現するためには他の感覚を表わすことばで代用しないといけないということになる²⁾。これは、「共感覚」といわれるもので、「何かの感覚刺激を、本来の感覚以外の、別の感覚刺激が連動して感受する感覚」³⁾のことだといえる。春原(2010: 109)は、香りに関する先行研究について、「香りを、香り以外の感覚(視覚、聴覚、触覚、味覚)で表現する可能性を示唆している」⁴⁾としているが、実際、香り以外の感覚でしか表現できないのが、香りだといえるだろう。では、香り以外のどのような感覚で香りを表現しているのだろうか。春原(2010)は、香りと色(視覚)の共感性を報告している⁵⁾。たとえば、ヘアケア製品では、被験者は濃い目のピンクを

選び、台所用洗剤では、黄色(レモンやオレンジなどとの関連)を選んだという。櫻井(2000)は、香りと触覚語(「やわらかい」、「さらりとした」、「ふんわりとした」など)の強い結びつきを指摘している⁶⁾。雨宮・光田・宮原(2008)は、被験者への理解度調査などを通じて、味覚を示す形容詞が匂いを表現するために使われていることを指摘している⁷⁾。たとえば、「甘い匂い」、「すっぱい匂い」、「美味しい匂い」といった表現である。こういった研究成果は、私たちは香りを香り以外の感覚語(視覚、触覚、味覚など)を使って表現しており、香りそのものに限定したことばはないという確証を与えてくれる。つまり、嗅覚を原義とする形容詞や名詞などはないということになる。

もっとも、こういった研究は、主に実験的手法を用いたもので、それはたとえば被験者に香水を嗅がせて、あらかじめ用意された単語群(名詞や形容詞など)を提示し、適切な単語を選んでもらうというものであった。では、単語のレベルを超えて、どのような表現形式で、なおかつ実験ではなく、現実の場面で言語化しているのだろうか。そこで、本研究では「香り」は私たちの日常生活の中でどのように言語化されているのか、そこにはどのようなディスコース(談話)、特徴があるのか、そして「香り」の言語化は私たちの経験を語る(narrative)という文化にどう貢献しているのかを、社会言語学の観点から解明しようとするものである。

2. 方 法

本研究では、日本語と英語について、インターネットの様々なホームページに掲載されている香水に関する記述をもとに質的調査を行った。日本語では、香水を紹介するホームページ(shiawase-kousui.com, cosme.netなど)、さらに一般市民がネットを使って香水に関する質問をし、それに一般の閲覧者が答えるというホームページ(detail.chiebukuro.yahoo.co.jpなど)を調査対象とした。さらに英語については、様々香水に関するホームページのほかに、FragranticaやBasenotesというウェブサイトを調査した。



Putting smell into words: A sociolinguistic study of how we verbalize the sense of smell

Shoji Azuma

Department of World Languages and Cultures, University of Utah

こういったサイトは、香水の専門家ばかりでなく、一般市民、消費者の視点から香りに関して投稿がなされている人気サイトである。これらに掲載された香りの表現について、その内容、特徴などを探ってみた。

3. 結果

3.1. 共感覚

予想されたように、香りを表現するためには他の感覚語を使って香りを言語化している様子が見えてきた。日本語から、この「共感覚」の用例をあげてみると、次のようなものがある。

- (1) 味覚：「柑橘系やストロベリーの甘酸っぱい香りに、スパイスの隠し味がキリッ」(siawase-kousui.com)
- (2) 聴覚：「ライブジャズの音楽のように即興リズムを刻むかのようなグルーブ感あふれる香り」(item.rakuten.co.jp)
- (3) 視覚：「清楚なお姉さんをイメージできる爽やかさを強調したフローラル&フルーティの香り」(siawase-kousui.com)
- (4) 視覚：「洗練されたしなやかでスリムな香り」(siawase-kousui.com)
- (5) 触覚・視覚：「香水のボトルのように全体的に丸みのある香り」(family-neta.com)

香りそのものを示すことば(原義)はなく、ほかの感覚を借用して香りを表現している様子が見える。「甘酸っぱい」、「即興リズム」、「清楚なお姉さん」、「スリム」、「丸み」といった香り以外の感覚(味覚や聴覚など)から香りを類推、連想させる手法である。英語でも似たようなケースが観察された。以下に、いくつかの例をあげておく。

- (6) 味覚：It is sweet from berries and vanilla (fragrantica.com)
- (7) 触覚・視覚：It is heavy and dark (fragrantica.com)
- (8) 聴覚：Fragrance notes, directly smelling from fragrant blossoms (fragrantica.com)

特に、(8)では音楽の用語であるnote(「音色」)が香りを表現するために使われている。香りが時間を追って変化していく際にもこのnoteが使われている。あたかも交響曲のように香りを表現する方法である。

3.2. 実在する物からの類推

上記にみられるように、ほかの感覚に頼り、香りを表現するというストラテジー(共感覚)以外に、自然界に実在する植物などを比喻として使うことにより、香りを表現する方法も頻繁にみられた。相手にとって実際に香りを嗅い

だことがありそうな物であるため、その経験をもとにある程度想像することが可能となる。具体的な例としては次のような表現があげられる。

- (9)「爽やかなレモンティーのような柑橘系の香り」(matome-naver.jp)
- (10)「ムスクやジャスミンを効かせた香り」(shiwase-kousui.com)
- (11)「チャイニーズピオニーなどエキゾチックな香り」(shiwase-kousui.com)
- (12)「グリーンティーを基調としたピュアな香り」(shiwase-kousui.com)
- (13)「ジンジャーリリーの甘露な香り」(item.rakuten.co.jp)

レモンなどは、その香りについて、かなり容易に類推、想像できるケースといえるだろう。しかし、「チャイニーズピオニー」や「ジンジャーリリー」などはその植物名が指す物がどのようなものであり、一般的にどのような香りを発するのか、またそれらを嗅いだ経験があるかとなると、その知識や経験もない人も多いかもしれない。したがって、こういった比喻は、どの程度、効果的かは不明だ。しかしながら、相手の想像力を刺激し、経験の外にある非現実的ともいえる世界へ引き込むことには成功しているといえるだろう。英語からの例もみておこう。

- (14) Blending notes of orange blossom, pink pepper, iris, lilac, wisteria, hyacinth, heliotrope, powdery musk, talc, and rice (fragrantica.com)
- (15) boxing glove with humid, hot and leather tones (dmarge.com)

上記以外にも、様々な植物、野菜、木、動物(合成物)、嗜好品(チョコレートなど)、ハーブなどが使われている。(15)では、ボクシングのグローブ(革製品)が使われているが、香水として魅力的な香りになるかどうか、個人的な嗜好によるだろう。しかしながら、こういった比喻は、私たちに(嗅いだことのないものも含めて)様々な物から香りのイメージを想起させる。この想像という行為を通じて相手を引き込むストラテジーについては、後で考察の項でさらに触れてみたい。

3.3. 周囲と自己

母語、およびその背景文化という観点から「香り」の表現を日英語で比較してみると、一つの興味深い違いは、社会への受け入れに対し、どの程度、意識し過敏であるかという点である。概して、日本語のケースでは、自分の周囲、属する集団を意識し、あまり突出して目立つことのないよ

うにし、社会的な受け入れに大きな関心を払っているような表現が多いことが観察された。具体的な例として、次のような表現をあげることができる。

- (16) 「仕事場や私生活オールOK的な香りです」(amazon.co.jp)
 (17) 「万人ウケする香り」(migoro.jp)

自己を主張し、突出するのではなく、むしろその逆に、自分の周りの環境、社会に自分を溶け込ませ、受け入れられることを目的とする表現である。「万人ウケ」する香りというのは実際には存在しないであろう。しかしながら、社会、集団に属する大多数の人たちが受け入れてくれると願いたいような香り、つまり個性的というよりは社会的な通念にマッチするような香りを求めていることがわかる。消費者の一人は、オンラインショップで、次のようなコメントを載せている。

- (18) 「いかにも香水をつけているのが分かるような強い香りが苦手なのですが、これはちょうどよい香り具合で、匂いもさわやかで癒されます」(matome-naver.jp)

次の「～らしい」という表現は、こうあるべきだという社会的通念、要請、期待に応え、自分をそれに近づけることを意図したものだといえる。

- (19) 「女の子らしい香り」(www.cosme.)
 (20) 「上品で女性らしい香り」(realworld.jp)
 (21) 「全てを包み込むような男らしい香り」(beauty.pintoru.com)

これ以外にも、自分をあまり強く出さず、抑制気味に表現することばとして、「ふんわり」「ちょっぴり」「かるく」といった控えめ、謙虚さを示すことばも頻繁に観察された。その具体的な例をみてみよう。

- (22) 「甘いけど、ふんわり嫌味がなくて爽やかに香ります」(おすすめの香水.net)
 (23) 「香りが主張しすぎず、ふんわりと自然に香る」(kracie.co.jp)
 (24) 「チャーミングでちょっと野性的」(pure-la.net)
 (25) 「ちょっぴりクールな色気」(pure-la.net)
 (26) 「ふわっとかるく香水の香りがしてくる」(matome-naver.jp)

これらは、社会的通念を優先させ、自己を抑え、わきまえや謙虚さを良しとする価値観の表明である。しかし、英

語のケースをみても、日本語とは違い、個人が自信をもって、自己を主張していくことばで香りを表現する傾向がうかがえる。それは、たとえば次のようなケースだ。

- (27) perfect for the modern woman who is confident enough to let herself – not her fragrance – command attention (m.sephora.com)
 (28) Sassy. Fearless. Feminine. Step into a bright new world, one that is larger than life. Jump on this ride and get your world spinning. (www.amazon.com)
 (29) Old Spice enhances confidence and commands female attention (oldspice.com)
 (30) an explosion of, not only a powerful floral scent, but also burning passion and depth. (fragrantica.com)

日本語の場合は、周囲に細心の注意を払い、控えめに振る舞い、自分の周りの集団、社会に受け入れられることに価値をおくようなことばであった。しかし、英語では、confident, fearless, new world, confidence, commands, explosion, powerful, passionといったことばが象徴するように、恐れず、大胆に、自信を持って力強く、情熱的に自分を表現し、新しい世界を切り拓いていくという態度を示すことばが見受けられた。日英語で、周囲に注目するか、自己に注目するかによって表現に差が出てくるといえる。

4. 考 察

嗅覚を原義とすることばではなく、「香り」はまさに「ことばにできない感覚」(mute sense)であるとはいえ、「香り」をことばで表現し、相手に伝え、何らかの影響を相手に与えることが全くできないというわけではない。特に、様々な香水を商品として消費者に薦め、興味を持ってもらい、最終的には購買という行為にまで進んでもらいたいと考える香水の売り手たち、さらには一般の人で、香水についての自分の感想、評価などを他の人たちに伝え、何らかの貢献をしたいと考える人たち、こういった人たちは、どういうふうなことばを使い、相手とコミュニケーションをとっているのだろうか。オースチン(1962)の発話理論⁸⁾にあてはめて考えてみると、香りをことばで表現する、つまり「発話」する、そして香りについて相手に報告するという「発話内行為」を行う、そしてここで終わるのではなく、さらに進んで、相手に何らかの行動を起こさせる、例えば特定の香水を購買してもらうといった「発話媒介行為」まで誘発することばとは、一体どういうものであろうか。

4.1. 想 像

一般的には、具体的で証明可能な情報を相手に伝えることにより相手を説得し、賛同を勝ち取ることができるとい

える。つまり、ことばの指示機能を最大限に活用するような表現方法である。しかしながら、香りという「ことばにできない感覚」となると抽象的で証明不可能な印象、イメージを中心とせざるをえない。実際、香水などの広告には、同じ匂いに関する商品である消臭剤や脱臭剤と違い、具体的に証明可能な情報性が低く、曖昧な婉曲表現や誇張表現が多くみられるという指摘もある⁹⁾。抽象度の極めて高い表現だが、何らかのイメージを相手に呼び起こさせる例として次のようなものがある。

(31) 「思わず女性が振り向いてしまう香り」(store.shopping.yahoo.co.jp)

(32) 「イノセントな香り」(asiakirei.com)

(33) smells like ice, wind and freedom (news.oldspice.com)

(34) when I apply on me I feel like I'm dancing in the dark! (boisedejasmin.com)

「イノセントな香り」とは一体どういう香りなのであろうか。また、氷、風、そして自由を感じる香りとは、どういうものであろうか。具体的にコレだという香りではない。むしろ抽象度が高く、具体的でないがゆえに、際限ないといってもいいくらいに、人々に何らかの香りを想像させる刺激表現だといえる。抽象的なことばが、人々を想像の世界に巻き込んでいき、各人がことばの受け手という範疇をはるかに超えて、意味作りの積極的な参加者、また主役となる。

4.2. 関与

ここで、ことばの機能を考えてみよう。それは、とかく送り手から受け手への意味の伝達という一方向的で静的なものを想定しがちだ。しかし、実際は送り手と受け手が相互に関係し影響を与えながら二人で意味を作り上げる、つまり「共同産出」(joint production)であるというダイナミックな言語観も考えられる¹⁰⁾。送り手が一人で意味を作り上げ確定するのではなく、受け手がその意味作りに積極的に関わり、受け手の参加、関与(involvement)を得て初めて意味が作り上げられていくとする考え方だ。香りの表現は、まさにこの受け手の関わり、関与というものが極めて大きく、ダイナミックな言語観を象徴したものといえないだろうか。

社会言語学者のタネンは、この受け手の関与という点に着目し、関与を生み出す普遍的な言語的方略として、ストーリー・物語(narratives)を語ることをあげている¹¹⁾。ストーリーを語る方略では、受け手は知らず知らずのうちに物語の中に入り込み、物語の参加者となり、送り手と一体になって、その物語に意味づけをし、気がついてみると、自分なりの物語を作り上げていくことになる。その代表的

な例として、アメリカの有名ブランド「Old Spice」のテレビCMの一つをみてみよう。このCMでは、上半身を露わにした体格のいい男性が、視聴者に語りかけながら、美しい場所に連れていく。興味深いことに、商品の具体的な香りは一切説明されていない。物語は次のように始まる。

(35) Hello, Ladies. Where can you go when your man smells like me? Close your eyes and I'll show you. Do you feel it? The sand between your toe tips? I do. (old spice youtube commercial)

(淑女の皆さん。皆さんの相手が私のように香るなら、どこへ行けると思いますか？目を閉じてください、お見せしましょう。今、感じるができますか？あなたの指の間の砂を？私は感じますよ。)

男性がハワイの浜辺(らしき所)に立っている。ビーチでのバケーションである。すると、今度はスイスの雄大なアルプスが背景に見える山に登っている。かと思うと、そこから、いつの間にか、水中で熱帯魚とともにゆったりと泳いでいる。そして、男性は次のように語りかけてくる。

(36) You see. When your man smells like the fresh scents of Old Spice, you can go anywhere. (old spice youtube commercial)

(おわかりいただけだと思います。皆さんの相手がオールドスパイスの新鮮な香りのように匂うなら、皆さんはどこへでも行けますよ。)

そして、最後は暖炉の火がゆったりと燃えているリビングルームが映し出される。部屋には、隅に魚が泳ぐ水槽があり、男性はあたかもそこから抜け出してきたかのようにして、その隣に置かれた真っ赤なグランドピアノの上にゆったりと横たわっている。そして、次のように語りかけてくる：「もちろん、自分の家にいたければいいんですけど」(Unless, of course, you prefer to stay in.)。海辺、美しい山、水中、そして暖炉のある家などが映し出され、それとともに受け手は自分なりのバケーションを楽しむ(と想像する)。送り手が作った物語の中に入り込み、受け手も物語の参加者、主役になり、物語に自分なりの意味づけをしていく。ここまで来た時、受け手はすっかり物語の一部になってしまっている。完全な引き込み、関与(involvement)が達成される。

上記の例は、いくつかの場所を巡る物語であるが、時間軸を巡る物語も多く観察された。香水はつけた瞬間から時系列で香りが微妙に変化していくといわれている。大まかに、最初の10分ぐらいまでの香りをトップノート、それから2時間ぐらいまでをミドルノート、そこから香りが消

えてしまうまでをラストノートと区分けされている（英語では、fragrance pyramidと呼ばれている）。この時間を追った香りの変化を物語として表現することによって、受け手を引きつけていく手法である。例を日本語からみてみよう。

(37) 〈トップ〉ラム酒の芳醇な香りが弾け、パッションフルーツがトロピカルな甘酸っぱさでパンチを効かせます。〈ミドル〉熟したガーデニア(くちなし)の旨味のある甘さに、ムスクが柔らかなパウダリー感で奥行きを出します。〈ラスト〉トンカ・ビーンの杏仁を桜の葉で包んだような、ほろ苦い香ばしさがとろけだし、バニラが華やかな甘さを添えます。(kousuijyouhou.blog.fc2.com)

ラム酒の香り、そしてパッションフルーツの甘酸っぱい香りから、くちなしの花の甘い香りが広がり、そこから、桜の葉やバニラを思わせるような甘さへと変化していく。それぞれの時間帯での香りの変化を受け手も想像し、その変化のプロセスに自分も引き込まれ、参加、体験、意味作りをしていく。そうすることによって、与えられた香りの表現を自分の世界で再構築していくことになる。このことは、香りの表現・言語化とは、表現者である送り手だけが作り、それを受け手が単に受け取るというのではなく、受け手の関与、参加を得て、初めて意味が構築（あるいは再構築）されるものだということになる。

4.3. コミュニティー

次の英語の例では、ある香水の香りについて、一般の人たちが自分の経験、評価、考え、価値観などを、「石鹸」という比喩を通じてお互いに述べ合う。そして、そこから相手との繋がり、関与、「対話」を通じて、一種のコミュニティが形成されていく様子がうかがえる。興味深いことに、対話が進むに連れて、「石鹸」の意味、価値も変貌していく。

(38) Disappointment for me. I was expecting a classic but dynamic fragrance. All I get is old soap, may be a leftover from the 80'. Old orange blossom and dusty talc. Try before you buy.

(39) I was so expecting to love this. Instead I agree with others that I smell old soap. I also detect a hint of sweet pickles due to a chemical base that emerges at the end.

(40) Old soap with a hint of celery. This smells nothing like I thought it would based on the notes.

(41) At first it smells nice but soapy. By the time, you can feel the base notes and I really love it!! Maybe at first you don't like it but wait for 40 min or 1 hour ... then

it becomes a great signature.

(42) This is a very unique smell. I believe it belongs to the category love-it-or-hate-it.

(43) I have read that most say that this smells like a powdery soap but to me it smells quite lovely. (fragrantica.com)

最初の一人が (38) で古い石鹸のような香りがしてあまり薦められないと述べる。続く人たちも (39) や (40) で古い石鹸という比喩を受けて、それを自分の言葉で膨らませながら他者に繋げて述べていく。それを受けて、(41) で別の視点が提供されていく。少し時間を置いてみるととてもいい香りになると言う。(42) ではそれを受けて、異なった視点も尊重して考えてみると、好き嫌いがはっきり出てくる香りなのかもしれないと述べる。(43) では、自分にとっては素晴らしい香りだという意見が展開されていく。

「石鹸」のような香りを起点、テーマとして、それぞれの参加者が「石鹸」を飛び石のようにリンクして繋げていくように、一種の対話が発生、持続、そして変貌していく様子が見えてくる。全く面識のない人たちが、香水の香りを言語化するという行為の中で、繋がっていく。香りは、人を巻き込み、お互いに意味作りの参加者になってしまう効力があるといえるだろう。

5. 総括

香りとはそもそも何であろうか。その実態は、空気中に存在する何かしらの物理的なものであり、それに人間の脳が反応しているということであろうか。さまざまな学説を検証する中で、ケラーとヤング (Keller & Young 2014,1) は、香りの対象物は物理的な物ではなく、心理的な範疇に属するものであるという説を紹介している (the objects of olfactory perception are not objective physical entities, but affective categories)¹²⁾。ここから少なくともいえることは、香りとはただ単純に物理的な反応だけではなく、たぶん心理的、社会的、文化的な反応であるということである。たとえば、香りへの反応として、日本語では文化的に周囲に配慮することばが用いられる一方、英語では自己、自信を示すことばが用いられている。

さらに、香りは、「ことばにできない感覚」であるからこそ、他の感覚を用いて(共感覚)、送り手と受け手相互の想像力を振り所として表現されるものといえる。香りを表現するには、具体性が低く、抽象度の高いことばが使われることになるが、それは見方を変えれば、ことばの持つ可能性をより豊かに引き出すことのできる分野だと考えることもできる。ヘレン・ケラーは「香りとは時空を超えて人を別な世界に導いていく効果的な魔術師のようなものである」(Smell is a potent wizard that transports you across

thousands miles and all the years you have lived.) と述べている¹³⁾。まさに、香りは、ことばに魔術師の力を与えているといってもいいのではなかろうか。それは、ことばの使い手たち個人の文化、社会を反映し、当事者たちが意味を共同で構築し、改変し、また再構築する、こういったプロセスの中で、その姿を徐々に見せてくれる（と想像する）のが「香り」ではないだろうか。「香り」はことばの機能を考える際に、私たちに重要な「窓」を提供してくれているといえる。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、立命館大学、ユタ大学の学生諸氏に協力をいただいた。深く感謝したい。

(引用文献)

- 1) Ackerman, Diane. *A Natural History of the Senses*. New York: Vintage Books. 1995.
- 2) Williams, Joseph, M. Synaesthetic adjectives: A possible law of semantic change. *Language*, 52, 2, 461-478, 1976.
- 3) 春原吉美. 香りと色の共感覚性. 日本官能評価学会誌, 14, 2, 109-113, 2010.
- 4) Ibid.
- 5) Ibid.
- 6) 櫻井洋之. 化粧水の香りの共感的表現. 日本官能評価学会誌, 4, 1, 45-51, 2000.
- 7) 雨宮俊彦, 光田愛, 宮原朋子. 共感的形容詞の理解可能性と使用頻度の対応について. 関西大学社会学部紀要, 39, 3, 167-200, 2008.
- 8) Austin, John L. *How to do things with words*. London: Oxford University Press. 1962.
- 9) 有光奈美. 広告とネーミングにおける婉曲表現と誇張表現. 東洋大学経営論集, 72, 113-125, 2008.
- 10) Duranti, Alessandro. Intentionality and truth. *Cultural Anthropology*, 8, 214-245. 1993.
- 11) Tannen, Deborah. *Talking Voices: Repetition, dialogue, and imagery in conversational discourse*. Cambridge: Cambridge University Press. 2007.
- 12) Keller, Andreas & Benjamin D. Young. Olfactory consciousness across disciplines. *Frontiers in Psychology*, 5, 931, 1-2, 2014.
- 13) Helen Keller. BrainyQuote.com, Xplore Inc, 2017. <https://www.brainyquote.com/quotes/quotes/h/helenkeller130587.html>, accessed on April 28, 2017.

ムスリム女性の「美」と消費 —中東におけるハラール化粧品の可能性—

神奈川大学外国語学部

大川 真由子

This study explores the women's attitude and consciousness towards beauty and health through the acceptance of halal cosmetics in the Middle East, particularly, in the Gulf States (Saudi Arabia, United Arab Emirates, Kuwait, Qatar, Bahrain and Oman) which have the strongest purchasing power in 1.6 billion Muslim residence. "Halal" means "permitted" or "lawful" in Islam. Halal cosmetics are the products made of ingredients that are permissible to use according to Islamic law. Islam also does not recommend Muslim women to beautify themselves for somebody other than their husband.

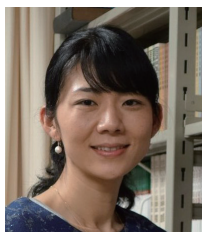
Halal products have long got much attention in both business scene and Islamic area studies, and its interest has been heavily on only halal food. Halal cosmetics, on the other hand, are new business but expected to grow by 13.4% annually from 2013 to 2018. Halal cosmetics are already popular in Malaysia but they are almost unknown in the Middle East.

I conducted fieldwork for 6 weeks from 2014 to 2016 for market survey and interviews in Oman, one of the oil rich Gulf states. However, I could not find any halal cosmetics on sale in any shops in Muscat, the capital of Oman. My interview result reveals that while Omani women are interested in and can afford to buy western natural and organic cosmetics, they do not recognize halal cosmetics. Many Omani women do not care of the ingredients of cosmetics whether they contain alcohol or not, and they interpret Islam to their advantage when it comes to beauty care. I expect that they will accept halal cosmetics in the near future because halal cosmetics have a certain similarity to natural, organic and even ethical cosmetics and that halal cosmetics have already gained attention in their wealthier neighbor, UAE.

1. 諸言

筆者が長年調査をおこなっている中東のアラビア半島オマーンはじめ湾岸諸国(サウジアラビア、クウェート、アラブ首長国連邦[UAE]、カタール、バハレーン、オマーン)では、近年ダイエットや歯のホワイトニング、レーザー脱毛などに関心を示し、またそれらを実践する女性が増えている。「美」に対する意識や実践が刻々と変化するなか、新しい現象・概念としてのハラール化粧品を湾岸諸国の女性がどのように受容する(あるいはしない)のだろうか。本研究は、今後成長が期待されるハラール化粧品を題材として、ムスリム女性の美に対する意識や消費行動の一端をあきらかにすることを目的としている。

まず、ハラール化粧品とは何かについて説明しておきたい。中東の化粧品市場規模は166億ドル(2011年)で、1人あたりの購買力が大きいのはサウジアラビアやUAEなど湾岸諸国が上位を占める。湾岸諸国は人口約4000万人を有し、そのうち半分は外国人が占めるが、国民の平均年齢が30歳という若さと高い購買力が魅力的な市場である¹⁾。中東の化粧品購入の特徴としては香水の売上げが大きい(全体の約4割)ことが挙げられる²⁾。



Beauty for Muslim women and their consumption: Halal Cosmetics in the Middle East

Mayuko Okawa

Faculty of Foreign Languages, Kanagawa University

ハラール化粧品だけに限定してみると、世界全体の経済規模は244億ドル(2015年)で、2020年までに450億ドルまで拡大すると予測されている。そのうちの大半は中東での消費で、とくに湾岸諸国では2015年から2020年までには年率15%の増加が見込まれている³⁾。とはいうものの、中東において化粧品全体の売上げのうちハラール化粧品の占める割合はまだ小さく、以下でみるように、湾岸発のハラール化粧品ブランドも少なく、浸透度は低い。そもそも中東ではとくに明記されていない限りはハラールであるという認識が一般的であるから、わざわざハラール認証をつけなくてもハラールなのだとなんか考えている。

ハラール食品と同様、ハラール化粧品にもグローバルな認証機関や基準は存在しない(現在審議中)。2014年末時点でハラール化粧品の基準が存在しているのはマレーシアとブルネイのみである。ここではマレーシア規格(MS2200:2008)を挙げておく⁴⁾。

- ・人間の身体の一部またはそれに由来する成分を含ままたは含有していない。
- ・イスラーム法によりムスリムが使用または摂取することを禁じられている動物、またはイスラーム法に従って食肉処理されていないハラール動物に由来する肉の一部または物質を含ままたは含有していない。
- ・イスラーム法により「不浄(*najis*)」と定められている材料または遺伝子組み換え生物を含有していない。
- ・イスラーム法による不浄なものに汚染されていない設備機器を使用して調合・調理、加工、製造、または貯蔵していない。
- ・調合・調理、加工または製造中に、上記の要件を満たし

ていない材料と接触しておらず、物理的に隔離されている。

・消費者や使用者に害を与えない。

アルコールやブタ由来の成分のほか、ミネラルやケミカル、遺伝子組み換え物質や放射線照射物質もハラーム(禁忌)でそれ以外がハラールであるということを考えると、認証プロセスに厳密には伝統的イスラームの規範とは別の論理や視点が導入されていることがわかる⁵⁾。

ハラール化粧品は、その存在自体が新しく、主要な研究はハラール化粧品の「先進国」であるマレーシアでの量的研究がほとんどである。本研究では、先行研究がほとんど存在しない湾岸諸国のなかでも、筆者がフィールドとしているオマーンでの人類学的調査から、オマーン人女性の美に関する意識を考察する。

2. 調査

本報告で提示するデータは、筆者が2014年から2016年にかけて断続的に合計6週間、オマーンの首都マスカットで実施した聞き取り調査や参与観察、および市場調査のデータに基づいている。対象としたのは10代から30代のオマーン人女性約30人(未婚、既婚含む)で、その多くには繰り返しインタビューをおこなっている。

オマーンは人口約400万人、うち約半分を外国人が占める。今回対象としているのは国籍をもつオマーン人である。民族的には、多数派のアラブ人のほか、インド系、アフリカ系、ペルシア系など多様だが、ほぼイスラーム教徒(ムスリム)である。湾岸諸国と呼ばれるアラビア半島の産油国は中東のなかでも経済的に裕福だが、世銀の統計によると、国民1人あたりのGNIで日本(38840米ドル)をはるかにしのぐカタール(83990米ドル)に対して、オマーンは2015年のGNIは16910米ドルと、比較的貧しい⁶⁾。

オマーンは中東のなかでも国家規模が小さく、化粧品販売市場規模としては3億2900万米ドル(2012年)と、トルコ(約38億米ドル)やイラン(約36億米ドル)など中東の大国には遠く及ばない。しかしオマーンの化粧品販売は2007年から2012年までの成長率が166%で、毎年9~12%の割合で急成長している産業のひとつである⁷⁾。国民1人あたりの購入金額はUAE、サウジに次いでオマーンは第3位である。売り上げの内訳は、ヘアケア(18%)、香水(18%)、スキンケア(16%)、メイク化粧品(color cosmetics, 14%)となっている⁸⁾。マスカット市内のショッピングモールには、ヨーロッパ系の高級ブランド化粧品店が建ち並び、そのなかには自然派化粧品店も目立つ。

筆者がインタビューした10~30代の女性の多くは化粧品に対しては肯定的で、美容や化粧品に関心をもっている。にきびや美白を気にする女性、髪の毛にボリュームを出したいと試行錯誤している女性、本来なら結婚前は整えるべき

ではない眉毛を手入れしようか悩んでいる女性などさまざまである。オマーン人女性に普段化粧をするかと問うと、ほとんどが「していない」と答える。実際、インタビューに応じてくれた女性はアイラインとリップだけの簡単なメイクしか施していない人がほとんどである。彼女たちにとって「化粧(makīyāj)」とはファンデーションを塗り、アイシャドウやアイライン、マスカラをしっかりと施すいわゆるフルメイクを意味するため、自分たちは「化粧はしていない」という認識をもっている。1日5回の礼拝前に顔を洗淨するため、ファンデーションをしっかりと塗ることはあまり実用的ではないからである。「化粧」は結婚式あるいは礼拝ができない生理中など特別な機会に限られている。

とはいえ、筆者が2000~2002年初頭に所属していた国立スルターン・カーブス大学では、当時と比べて化粧をしている学生が2010年代になって増加しているという印象を受ける。現役のカーブス大学の女子学生に聞くと「大学生が化粧するのは当たり前」と述べていたが、彼女はマスカットで生まれ育ち、普段からメイクをし、ネイルサロンにも行ってペディキュアをしているなど、おしゃれには敏感な女性である。他方で同大学は国内トップの大学で地方出身者も多いため、化粧をまったくしていない学生も多い。

メイク肯定派から聞かれるハディースが「まことにアッラーは美しく、美を愛する (*inna allāh jamīlun yuḥibb al-jamāl*)」というものである。ここでいう「美」とは外見と内面の2つを意味する。逆にフルメイクに対する罪悪感や忌避感をもっている女性が多い。エジプトの化粧に関する論考のなかで、人類学者の鳥山は「化粧は女性の道徳的価値を否定的に表象するアイコン」であると述べているが⁹⁾、オマーンでも同様で、軽いメイクは許容範囲であるが、濃い化粧は男女問わず否定的なニュアンスで語られる。結婚式出席のためにフルメイクをするときは、自宅から会場への移動中ニカーブで顔を隠す女性もいるほどである。これは濃い化粧が女性だけしかいない結婚式場という閉ざされた空間でなら許されるが、たとえ自家用車での移動であってもホテルの受付や駐車場で不特定多数の異性と接触する可能性を考えてのことである。ある30代の女性は化粧の濃い代表例としてレバノン人女性を挙げ、「レバノン人女性 (*Lubnānīyāt*) みたいなのはやりすぎだ」という言葉で語っていた。オマーンではむしろトレンドの最先端はクウェートだと認識されている。若い女性はクウェートの人気ブロガーやインスタグラマーをフォローし、彼女たちが使っている化粧品の情報を集める。ただし、こうしたメイク肯定派であってもラマダーン中は化粧を控えめにしているという点では一致している。

自宅でメイクアップ・アーティストをしている20代の女性は、「宗教的な理由でつけまつ毛を避ける客もいる」と

語る。イスラーム法はいかようにも解釈が可能である一方で、一般信徒にはその正確な解釈が難しい。したがって解釈をイスラーム法学者にゆだねることになる。とはいえ、つけまつ毛やまつ毛のエクステなど、近年の事象については、確立し、浸透している解釈があるわけではない。イスラーム法を厳格に解釈するのであれば、つけまつ毛やまつ毛のエクステ、髪の毛のエクステはハラーム（禁止＝ハラールの対義語）だとする法学者は多い。しかし、多くのオマーン人女性はその基準で解釈はしないのである。

インタビューに応じた女性は、化粧に関心があっても大半はハラール化粧品の存在を知らなかった。筆者もマスカット市内のモール内や薬局、スーパーなど複数軒で探してみたがハラール認証のついた化粧品をみかけることはなかったし、店員にハラール化粧品を置いているかと尋ねると「ハラール？」と怪訝そうな顔で逆に尋ねられた。また、オマーンではマニキュアを塗っている女性を数年前まであまりみかけることはなかった。マニキュアは爪に膜を張るため、礼拝前の洗浄が無効になる（膜が邪魔をして水が爪まで届かない）からである。ところが近年は、イスラミック・マニキュアという水が浸透する特別なマニキュアや、塗ったあとシールのようにはがせるタイプのマニキュアが発売され、ムスリム女性のあいだで話題となっている。30代の女性は「ようは解釈の問題。美容に関してはみんないように解釈している」と述べているし、香水の使用について20代の女性は「香水なんてアルコールだらけ。飲まなければ問題ない」と語る。マスカット市中心地にある最新のモール内の化粧品店で販売員に話を聞いたところ、オマーン人女性のあいだではアンチエイジングとホワイトニング商品が人気で、コラーゲンとビタミンCの美容液がよく売れるが原料を気にする客はいないし、質問されたこともないと語っていた。その化粧品店は高級志向であるため、顧客は中流から上流階級だと推測されるが、美容にある程度の投資することをいとわない層であってもハラール意識が希薄であることがわかる。

それでもオマーン人女性のあいだではナチュラル化粧品の人気は高く、使用者も多いことから、動物性か植物性かといったある程度の原料への関心はあることがわかる。ただし、たとえハラール化粧品の存在を知っていたとしても、ハラール性をめぐる複雑な知識や議論に否定的な見解を述べたり、ハラール商品化する傾向に懐疑的な人がいることもまた事実である。昨今のハラールブームについて、「なんでもハラールにすればいいというものではない。『アッラーはあなたがたに易きを求め困難を求めない』」と、クルアーンの章句（第2章185節）を引用しながら昨今の傾向を嘆く者もいた。

ハラールのビジネス化に対するこうした違和感は、自分たちの住む地域（中東）で売られている商品は原則的に

すべてハラールであるという信念や思い込みに起因する。2014年にハラール化粧品の規格を発表したUAEの規格検査庁ESMAの幹部が「美容製品の原料はすべてハラールであるべきだが、UAEではすべての製品がそもそもハラールだ」と述べているように¹⁰⁾、外国人の割合が高い湾岸諸国においても商品がハラールではないということを疑う消費者はほとんどいないだろう。だから香水にアルコールが入っていることを知って驚く者もいる。東南アジアでは浸透しつつあるハラール化粧品ではあるが、オマーンでは都市部であってもほとんど知られていないのが現状である。

3. 結果および総括

このように、オマーンではまだハラール化粧品の認知度が低く、2016年初頭の段階でハラール化粧品購入者の声を聞くことはできなかった。ハラール化粧品に関する限り、消費者はその基準を正しく理解しているわけではない。飲用目的でなければアルコールの使用はハラールであることや、動物性原料のなかにもハラールなものはたくさんあるという知識が十分共有されていないために、アルコールや動物性原料の使用が嫌悪されている。だから生産者側もアルコールや動物性原料のような「疑わしき」成分を使用していない。こうした事態が続くと、化粧品に使用されているいかなるアルコールもハラームであるという「誤解」を誘発することにつながらないだろうか。

さいごにハラール化粧品の消費から浮かび上がるイスラーム性について述べたい。ハラール化粧品を使用することはイスラーム的消費行為といえるが、化粧行為自体は必ずしもイスラーム的とはいえず、「誰に対して」という問題が常につきまとう。この点において、その商品や行為のもつイスラーム性が直接的ではない。夫以外の異性に美を見せること、あるいは公的な場に出るための化粧であるならば本来それはイスラーム的たりえない。しかしながらハラール化粧品を使用することで、化粧行為の社会的妥当性や合法性がブラックボックスに入れられる。化粧が社会的に肯定的に受けいれられていなくても、化粧品のハラール性が前面に出されることで、それを実践する女性にとっては化粧行為への罪悪感が軽減されるという免罪符的な面をもつのである。

今回の調査でオマーンにおけるハラール化粧品は確認できなかった。だが、隣国のUAEでは商品のハラール性に対する関心が高まりつつある。2011年の研究では、食品だけでなく化粧品のハラール性（不浄物やブタ由来成分、香水に含まれるアルコールなど）に関心を寄せる人が18%いるという結果がでている¹¹⁾。また、より新しい2016年の研究では、化粧品の購入時、ハラール認証の有無を重視する回答者が29.5%で、実際ハラール認証マークがある化粧品やトイレタリー製品を使っている回答者が41.4%

にのぼるというデータもある¹²⁾。湾岸随一の都市ドバイを抱えるUAEは、マレーシアに代わって世界のハラール・ハブになるべく、ハラール認証の規格化を急ピッチで進めている。人口の8割を外国人が占めるという特殊な社会的背景から、ハラール意識が湾岸のなかでも比較的高いのに加え、高価格のハラール化粧品を購入するだけの経済力もある。今後はUAEを中心として湾岸諸国にハラール化粧品が普及する可能性はあるだろう。

(引用文献)

- 1) ジェトロ海外調査部：『中東・北アフリカの化粧品市場調査概要』ジェトロ、2011.
- 2) Euromonitor International, : Passport: Global Marketing Information Database (GMID).
- 3) “Halal make-up shines in UAE” *Khaleej Times*, 2016/6/28. <http://www.khaleejtimes.com/nation/general/halal-make-up-shines-in-uae> (2016年12月3日閲覧)
- 4) ジェトロ海外調査部：『マレーシアにおける化粧品および美容関連商品の市場調査』ジェトロ、2012.
- 5) 八木久美子：「イスラーム的に消費するということ—ハラール概念の変容とその意味」『総合文化研究』16: 30-43、2013.
- 6) <http://data.worldbank.org/indicator/NY.GNP.PCAP>. CD
- 7) Euromonitor International 2013 *Consumer Middle East and North Africa 2014*. Euromonitor International.
- 8) 前掲書.
- 9) 鳥山純子：「化粧の消費と身体規範の転換——現代カイロの化粧をめぐる世代間の衝突」『コスメトロジー研究報告』20: 148-151、2012.
- 10) Abbas, Waheed: “All cosmetics sold in UAE are ‘halal’ by default: Esma” *Emirates24/7*, 2015/5/20. <http://www.emirates247.com/business/corporate/all-cosmetics-sold-in-uae-are-halal-by-default-esma-2015-05-20-1.591298> (2016年2月5日閲覧)
- 11) Ireland, J. & S. A. Rajabzadeh: “UAE consumer concerns about halal products” *Journal of Islamic Marketing*. 2 (3) : 274-283, 2011.
- 12) 埼玉県・三菱UFJリサーチ&コンサルティング株式会社：『イスラム諸国における化粧品市場調査結果(アラブ首長国連邦)』2016. <https://www.pref.saitama.lg.jp/a0707/halalcosmetics/documents/uae.pdf> (2016年10月23日閲覧)

患者や家族と看護師の化粧に対する認識の比較に関する研究

愛知県立大学看護学部看護学研究科

萩 あや子

The purpose of this study was to examine perceived makeup of nurses in patients, family members and nurses. A questionnaire survey was conducted at two general hospitals with more than 400 beds, and 395 nurses, 118 patients and 85 family members returned a completed questionnaire. As a result, the majority of the patients, family members and nurses reported that nurses with heavy makeup seemed to be hard to speak to, unapproachable or scary, while nurses with light makeup were easy to speak to, upright, trustworthy or gentle. Then, out of five classes of makeup, A (very light) to E (very heavy), makeup B received the highest rating in each group of the patients, family members and nurses, who reported that makeup B was most highly associated with each of five sorts of impressions: a feeling of cleanliness, tenderness, cheerfulness, a feeling of trust and honesty. Moreover, there was no significant difference between the three groups in A and C, while the patients and family members rated D and E lower than the nurses. The findings suggest that three classes of makeup: A, B and C give a pleasant impression on patients and family members, and also that heavy makeup is likely to give an unpleasant impression on patients and family members.

1. 緒言

日本看護協会は、2003年に「看護者の倫理綱領」¹⁾を定め、看護師などを対象とした行動指針を発表している。その中で、「看護者は、社会の人々の信頼を得るように、個人としての品行を常に高く維持する」と明示され、「看護に対する信頼は、専門的な知識や技術のみならず、誠実さ、礼節、品性、清潔さ、謙虚さなどに支えられた行動によるところが大きい」と述べられている。しかし、近年看護観や価値観、倫理観などの多様化により、医療現場の看護師の化粧が華美になる現状がある。

看護師の身だしなみにおいて化粧に着目すると、看護師自身は化粧を身だしなみの一部として捉えているとの報告がある²⁾。看護学生は華美でなければ化粧は顔色をよく見せることができるためのマナーの一部であり、マスカラの使用については約8割、アイライナーの使用は約7割、つけまつ毛の使用は約3割が賛成であると化粧を肯定的に捉えている³⁾。また、若い看護師や患者ほど化粧の程度を「本人の自由でよい」と回答していることや⁴⁾、患者や看護師は薄化粧や自然な化粧を望む記述もあるが、各々6割が化粧は「自由でよい」と捉えているとの報告がある⁵⁾。さらに、医療従事者の身だしなみに関する研究⁶⁾では、清潔な身だしなみは院内感染の予防のみならず、患者やその家族が医療機関の印象を決定づける一つの要因となり得ると指摘し

ている。つまり、看護師は患者の看護ケアにおいて直接的にかかわるために自分本位の化粧の好みや価値観で判断するのではなく、他の人がどのように感じているかを常に意識して化粧を施す必要がある。

先行研究では、化粧は身だしなみやマナーの一部として位置づけられており、患者が捉える看護師の印象には言葉遣いや態度、髪型や白衣などさまざまな要素を取り上げて調査をしている。しかし、看護師の化粧を主題にした文献は少なく、患者や家族を対象に看護師の化粧に対する認識について報告した研究はほとんど見当たらない。化粧は個人の価値観や生き方、生活環境により変化すると考えられるが、医療現場や教育現場において明確な基準は示されていない。患者やその家族により印象を与え、信頼関係を構築するためにも化粧の基準を見出すことが求められている。そこで、看護師の化粧に対する患者や家族の認識と、看護師との認識の違いを明らかにすることで、看護師にふさわしい化粧の基準を作成し、看護師の化粧に対する意識を高めるとともに、医療現場の管理者や看護学教育での指導の一助にしたいと考える。

2. 方法

2.1. 調査対象

看護師700名、患者350名とその家族350名を対象とした。対象の条件として、看護師は手術室や外来を除く病棟の看護師とし、患者は日帰り入院以外で、退院が決定した時に病棟の看護師長が、調査依頼が可能であると判断し、コミュニケーションが可能で意思疎通ができる者とした。また、家族については、入院中に患者のところへ何度か訪室して、退院時に患者とともに調査依頼の説明を受けることができる者とした。



Perceived makeup of nurses in patients, family members and nurses

Ayako Ogi

School of Nursing & Health Graduate
School of Nursing & Health, Aichi
Prefectural University

2. 2. 調査期間

201X年2～4月上旬

2. 3. データ収集方法

調査はA県内とB県内にある400床以上の一般病院4施設の院長または看護部長に研究依頼を行い、2病院より承諾を得た。その後、看護部長と連絡調整し、師長会議において、研究概要や倫理的配慮などについて文書と口頭で説明をし、調査協力への依頼を行った。各病棟の看護師長の協力のもとに患者および家族への調査依頼と、看護師への調査協力を依頼し承諾を得た。

調査内容は、Ⅰ基本情報と看護師の化粧に関する項目ⅡからⅤで構成した。Ⅰ基本情報は年齢や性別などの項目を、Ⅱ化粧の必要性については、した方がよいとノーメイクがよい、どちらでもよいの3択とした。Ⅲ化粧の「濃い・派手」と「薄い・地味」に対する印象については、1.清潔、2.不潔、3.安心・信頼できる、4.安心・信頼できない、5.健康、6.不健康、7.元気がでる、8.元気が出ない、9.怖い、10.優しそう、11.話しかけやすい、12.話しかけにくい、13.近づきやすい、14.近づきにくい、15.相手のことを真剣に考えている、16.相手のことを真剣に考えていない、17.相手のことを大切に思っている、18.相手のことを大切に思っていない、19.本人の自由である、20.その他の20項目の印象から複数回答とし、Ⅳ看護師の化粧に対する意見や感想は自由記述とした。Ⅴ化粧のイメージでは、独自に作成した調査票⁷⁾を使用し化粧の薄いもの(A)から濃いもの(E)の5段階で化粧モデルを作成し、清潔感、優しさ、明るさ、信頼感、真面目さの5項目について調査した。評価基準は、全く感じない1点、どちらかといえば感じない2点、どちらかといえば感じる3点、すごく感じる4点の4段階で評価した。5段階の化粧モデルは、化粧AからEに向かい順に濃くなっており、化粧Aはファンデーションと眉ずみのみを使用し、化粧Bは化粧Aにチークと口紅を加えている。化粧Cは化粧Bにアイラインとマスカラを追加し、化粧Dは化粧Cにアイシャドウを加え、化粧Eは化粧Dで使用したマスカラとアイシャドウを濃く塗っている。なお、髪型は、山田ら⁸⁾の研究から得られた好感のもてる看護師の髪型に整えている。

2. 4. 分析方法

統計解析ソフトはエクセル統計を用い、ⅠからⅢの結果は調査票の各項目で単純集計をした。Ⅴは、まず化粧モデルAからEにおいて、看護師、患者、家族別に5項目の評価を合計し平均評価得点(以下評価得点)を算出した。次に、看護師、患者、家族別に清潔感、優しさ、明るさ、信頼感、真面目さの各項目で化粧モデルAからEの評価得点を算出した。一元配置分散分析を用い、全体として群間で有意

差($p < .05$)を検定したのち、最も化粧が薄く素顔に近い化粧モデルAをコントロール群とし、他の化粧BからEの4群と比較した。多重比較検定にはFisherの最小有意差法を使用し、有意水準5%未満として評価得点を比較した。看護師、患者、家族間の認識の違いを検討するために化粧モデルAからEの評価得点を3者間で比較した。Ⅳの自由記述については内容分析を行い、看護師の化粧に対する考えを記述している部分をコード化(<>)し、内容が類似しているものでまとめてサブカテゴリ化(『』)、さらに、内容が類似しているものをまとめてカテゴリ化(【】)し、名前を付けた。

2. 5. 倫理的配慮

所属機関の倫理委員会で承認後、院長または看護部長に研究依頼を行い、承諾を得た。その後、師長会議において研究概要や倫理的配慮などについて文書と口頭で説明を行い、承諾を得た。研究への参加は自由意思によるものであり、研究対象者である看護師や患者とその家族が不利益や強制力を受けることがないように十分な説明を行った。看護師は、看護業務が終了し落ち着いた時間帯に、患者や家族も退院が決定し体調の安定した時期に実施できるように依頼した。調査票の回答時間は約15分で、対象者の負担が最小になるよう努めるとともに、調査は無記名で行い、個人が特定されないよう十分に配慮することや、調査への協力は自由意思によるもので、調査への参加を取り止めなくなった場合はいつでも参加を止めることができ、それによって不利益を被らないことを伝えた。また、データは厳重に保管し、調査以外の目的で使用しないこと、調査票は結果をまとめ、研究発表後は直ちに破棄すること、調査について疑問や質問があれば速やかに対応すること、調査票は回答と返送によって調査の同意が得られたこととする旨を文書と口頭で説明した。

3. 結果

3. 1. 基本情報

調査票は、2病院の看護師700名、患者350名、家族350名の1400名に郵送した。回答数(率)は、看護師407名(58.1%)、患者140名(40.0%)、家族95名(27.1%)で、有効回答数(率)は看護師395名(56.4%)、患者118名(33.7%)、家族85名(24.3%)であった。基本情報は表1のとおりで、総数598名のうち、男性は100名(16.7%)、女性が498名(83.3%)であった。年齢別では、看護師は20歳代が最も多く31.1%で、次に、40歳代30.1%、30歳代22.0%であった。患者は60歳代が最も多く27.1%で、次に40歳代22.0%、70歳代17.8%であった。家族は、40歳代が22.4%で最も多く、次に50歳代と60歳代が18.8%であった(表1)。

表1 基本情報

		看護師n=395	患者n=118	家族n=85	人数(%)
性別	男性	25 (6.3)	59 (50.0)	16 (18.8)	100 (16.7)
	女性	370 (93.7)	59 (50.0)	69 (81.2)	498 (83.3)
年齢	20歳未満	0 (0.0)	4 (3.4)	1 (1.2)	5 (0.8)
	20歳以上30歳未満	123 (31.1)	10 (8.5)	9 (10.6)	142 (23.7)
	30歳以上40歳未満	87 (22.0)	12 (10.2)	11 (12.9)	110 (18.4)
	40歳以上50歳未満	119 (30.1)	6 (22.0)	19 (22.4)	164 (27.4)
	50歳以上60歳未満	57 (14.4)	7 (5.9)	16 (18.8)	80 (13.4)
	60歳以上70歳未満	9 (2.3)	32 (27.1)	16 (18.8)	57 (9.5)
	70歳以上80歳未満	0 (0.0)	21 (17.8)	12 (14.1)	33 (5.5)
	80歳以上90歳未満	0 (0.0)	6 (5.1)	1 (1.2)	7 (1.2)

表2 看護師の化粧の有無

項目	看護師n=395			患者n=118			家族n=85			総数
	男性	女性	合計	男性	女性	合計	男性	女性	合計	
1.化粧をした方がよい	11 (44.0)	230 (62.2)	241 (61.0)	36 (61.0)	28 (47.5)	64 (53.8)	12 (75.0)	43 (62.3)	55 (64.7)	360 (60.2)
2.ノーメイクがよい	1 (4.0)	1 (0.3)	2 (0.5)	2 (3.4)	1 (1.7)	3 (2.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (0.8)
3.どちらでもよい	13 (52.0)	139 (37.6)	152 (38.5)	21 (35.6)	30 (50.8)	51 (43.7)	4 (25.0)	26 (37.7)	30 (35.3)	233 (39.0)

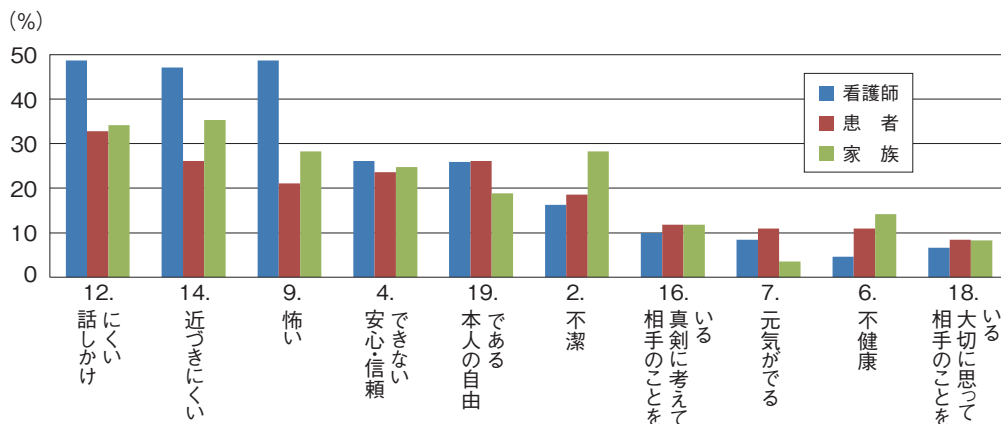


図1 濃い・派手な化粧に対する印象

3.2. 看護師の化粧の必要性

看護師の化粧の有無について看護師、患者、家族に3択で回答を求めたところ、看護師は化粧をした方がよいと回答した者は61.0%で、どちらでもよいは38.5%であった。患者は、看護師が化粧をした方がよいと回答した者は53.8%で、家族の64.7%よりも少なく、どちらでもよいと回答した者が43.7%と3者のなかで最も多かった。また、ノーメイクがよいと回答した者は、全体で5名と1割に満たなかった。さらに、家族の場合は、化粧をした方がよいと回答した者は男女ともに割合が高かった。しかし、患者では看護師が化粧をした方がよいと回答した者は、男性61.0%と高かったが、女性は47.5%と5割に達しておらず、どちらでもよいと回答した者の割合が高かった(表2)。

3.3. 看護師の化粧の濃淡に対する印象

化粧が「濃い・派手」と感じる看護師に対する印象は、看護師、患者、家族ともに「話しかけにくい」、「近づきにくい」、「怖い」、「安心・信頼できない」、「本人の自由である」、「不

潔」が上位を占めた。そのなかで「話しかけにくい」、「近づきにくい」、「怖い」印象は、患者や家族よりも看護師の回答の割合が高く、家族では「不潔」と回答した割合が、他に比べて高かった(図1)。

化粧が「薄い・地味」と感じる看護師に対する印象では、「話しかけやすい」、「清潔」、「安心・信頼できる」、「優しい」が上位を占めた。また、上位の回答は看護師や家族に比べて患者の割合が高く、患者の回答で最も割合が高かったのは「清潔」で約5割であった。また「薄い・地味」な化粧に対して、看護師は28.6%の者が「不健康」と回答したが、患者は25.2%が「健康」と回答していた(図2)。

3.4. 看護師の化粧に対する意見や感想

看護師の化粧に対する考えについて、患者、家族、看護師別に自由記述を分析した結果、患者の回答は114コードと30サブカテゴリ、13カテゴリ(表3)になり、家族の回答は93コードと27サブカテゴリ、11カテゴリ(表4)で、看護師の回答は、318コードと39サブカテゴリ、14カテ

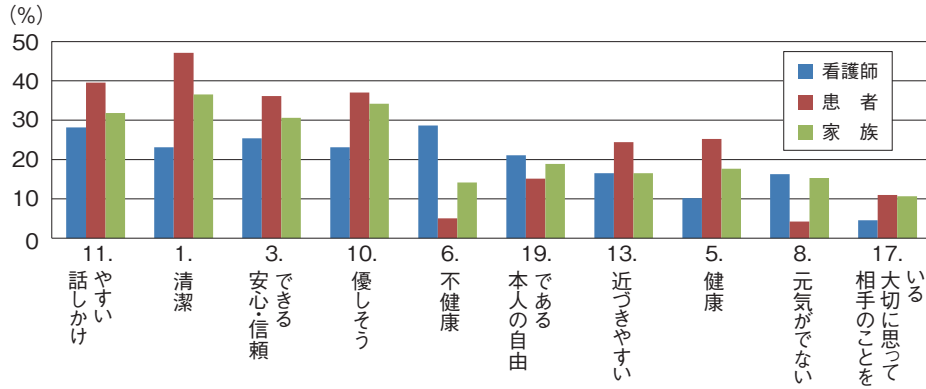


図2 薄い・地味な化粧に対する印象

表3 化粧に対する患者の考え方の内容分析

カテゴリ	サブカテゴリ	カテゴリ	サブカテゴリ
社会人としてのマナーである	社会人としての身だしなみである	派手な化粧は看護に合わない	派手な化粧は病院に合わない
	化粧はマナーのひとつである		濃い派手な化粧は好ましくない
	適度な化粧は必要である		濃い化粧は抵抗を感じる
ナチュラルメイクは好印象である	ナチュラルな化粧に好感をもつ	個別で化粧の感じ方は異なる	年齢や性別で化粧の感じ方が変わる
	薄い化粧は安心できる	化粧を気にしたことがない	化粧を気にする余裕がない
	化粧は少しした方が明るく感じる		化粧に関心がない
化粧は元気を与える	仕事に対する意欲が上がる	個人の自由である	本人の自由でよい
	化粧は患者に元気を与える		看護の仕事には尊敬の念しかない
清潔感のある化粧が第一である	清潔感が第一である	マスクの下の表情が大事である	メイクはマスクで気にならない
	化粧の成分と微生物が反応する		化粧より表情や話し方が大事である
その人らしい化粧がよい	人それぞれの個性でよい	香料のにおいは不快である	香水や柔軟剤のにおいは避ける
	その人に合った化粧がよい		化粧の香料のにおいはきつい
ノーメイクは疲れが顔に現れる	不健康な化粧は元気が出ない		
	ノーメイクは疲労感が出る		

表4 化粧に対する家族の考え方の内容分析

カテゴリ	サブカテゴリ	カテゴリ	サブカテゴリ
社会人としてのマナーである	社会人としての身だしなみである	ノーメイクは疲れが顔に現れる	ノーメイクは元気がなく見える
	化粧はマナーのひとつである		ノーメイクは疲れて見える
	常識のある範囲で必要である		疲れが見えない化粧がよい
	適度な化粧は印象がよい		
ナチュラルメイクは好印象である	ナチュラルメイクは印象がよい	派手な化粧は看護に合わない	派手な化粧は職場にふさわしくない
	薄い化粧は近づきやすい		派手な化粧の看護師に良い印象がもてない
健康的な化粧は元気が出る	明るく見える化粧がよい	濃い化粧は近づきにくい	目元が派手になりすぎない
	化粧に元気が出る		濃い化粧は話しかけにくい
	健康的な化粧は安心感がある	個人の自由である	本人の自由である
清潔感のある化粧が第一である	ノーメイクも選択肢のひとつである		
その人らしい化粧がよい	清潔感のある化粧が一番大切である	化粧を気にしたことがない	化粧を気にしたことはない
	清潔に見えることが大切である		化粧よりも笑顔や話し方が一番である
その人らしい化粧がよい	人柄が活きる化粧がよい	香料のにおいは不快である	化粧を意識したことがない
	その人に合った化粧がよい		濃い化粧はにおいが気になる
	化粧は自分の欠点をカバーできる		香料の強いものは近づきにくい

ゴリ (表5) に分類できた。共通していたものは【社会人としてのマナーである】【ナチュラルメイクは好印象である】【化粧は元気を与える】【清潔感のある化粧が第一である】【その人らしい化粧がよい】【ノーメイクは疲れが顔に現れる】【派手な化粧は看護に合わない】【濃い化粧は近づきにくい】【個人の自由である】【化粧を気にしたことがない】【香料のにおいは不快である】の11カテゴリであった。

3.5. 看護師の化粧モデルAからEのイメージ調査

化粧AからEの5段階で、看護師、患者、家族別に、清潔感、優しさ、明るさ、信頼感、真面目さの5項目を4段階の評価基準で評価し、評価得点±SDを算出した。看護師の化粧5群に対する評価得点は、Aが14.6±2.9点、Bが16.0±2.7点、Cが14.6±2.7点、Dは12.9±2.9点、Eが9.6±3.1点であった。化粧Aをコントロール群として、他の4群と比較した結果、化粧Bの評価得点が有意に高く、化粧D、

表5 化粧に対する看護師の考え方の内容分析

カテゴリ	サブカテゴリ	カテゴリ	サブカテゴリ
社会人としてのマナーである	社会人としての身だしなみである	目元の濃い化粧は印象がよい	マスカラやアイライナーは印象がよい
	化粧はマナーのひとつである		カラーコンタクトは雰囲気が変わる
適度な化粧は印象がよい	つけまつ毛は不要である		
ナチュラルメイクは印象がよい	まつ毛のエクステは必要ない		
健康的な化粧は元気を与える	健康的で明るい感じがよい	個人の自由である	本人の自由である
	化粧は他者に元気を与える		人や状況でノーメイクでもよい
清潔感のある化粧が第一である	清潔感のある化粧が第一である	化粧について学ぶ機会がほしい	相手に不快感を与えなければ自由でよい
	清潔なイメージを心がける		メイクの基準がはっきりしない
	つけまつ毛は清潔野に落下し不潔である	メイクが相手に与える影響を学ぶ機会がほしい	
その人らしい化粧がよい	年齢に合わせたメイクをする	髪型や髪の色などで顔の印象が変わる	顔のつくりに影響する
ノーメイクは疲れが顔に現れる	自分の欠点をカバーする		化粧がマスクに付き不潔に見える
ノーメイクは疲れが顔に現れる	ノーメイクは顔色が悪く見える		髪型や髪の色で印象が変わる
派手な化粧は看護に合わない	派手なメイクの看護師には相談しにくい	化粧は気に入らない	化粧より言動や態度が大切である
	濃い化粧は職業的品格を下げる		マスクのため気に入らない
	看護師は相手に不快感を与えない		特に何も思わない
	真っ赤な口紅は印象が悪い		
濃い化粧は近づきにくい	派手な化粧は好ましくない	香料のにおいは不快である	香水などにおいのあるものは不快である
	濃い化粧は怖い感じがする		化粧品のにおいが強いものは避ける
	濃い化粧は清潔感がない		
	濃い化粧は近寄りにくい		

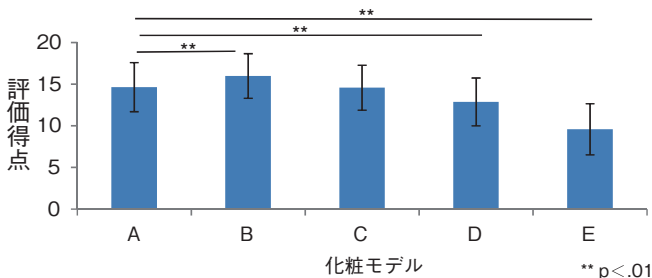


図3 看護師の化粧5群に対する評価得点の比較

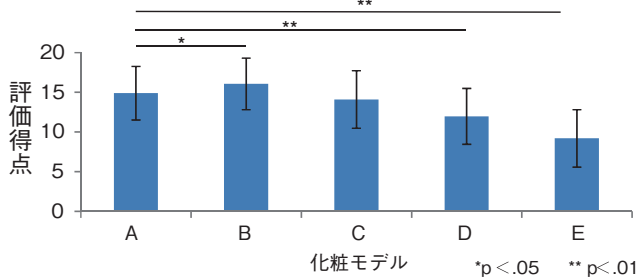


図4 患者の化粧5群に対する評価得点の比較

Eの評価得点が有意に低かった(p<.01) (図3)。

患者の化粧5群に対する評価得点は、Aが14.9 ± 3.4点、Bが16.1 ± 3.2点、Cが14.2 ± 3.7点、Dは12.1 ± 3.6点、Eは9.3 ± 3.7点であった。化粧Aをコントロール群として他の4群と比較した結果は、化粧Bの評価得点が有意に高く(p<.05)、化粧D、Eの評価得点は有意に低かった(p<.01) (図4)。

家族の化粧5群に対する評価得点は、Aが14.6 ± 3.1点、Bが16.6 ± 2.5点、Cが14.5 ± 3.1点、Dは12.2 ± 3.5点、Eは8.6 ± 3.1点であった。化粧Aをコントロール群として他の4群と比較した結果、化粧Bの評価得点が有意に高く、化粧D、Eは評価得点が有意に低かった(p<.01) (図5)。

次に、看護師、患者、家族別に清潔感、優しさ、明るさ、信頼感、真面目さの5項目の評価得点を、化粧Aをコントロール群として他の4群で比較した(表6-8)。看護師では、化粧Bの評価得点が真面目さ以外の項目で有意に高かった(p<.01)。清潔感では化粧C(p<.05)と、化粧D、E(p<.01)が、優しさと信頼感では化粧D、E(p<.01)が、真

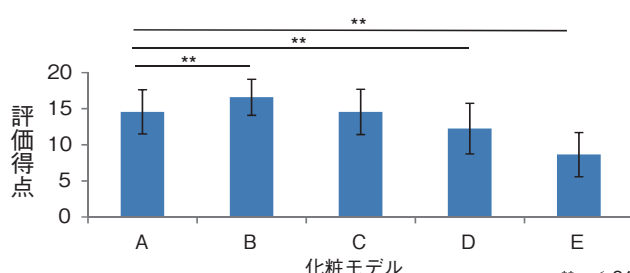


図5 家族の化粧5群に対する評価得点の比較

面目さでは化粧C、D、E(p<.01)の評価得点が有意に低かった。明るさは、化粧B、C、Dで評価得点が有意に高く(p<.01)、化粧Eで有意に低かった(p<.01)。患者では化粧Bが5項目で評価得点が高い傾向にあったが有意差が認められたのは明るさのみであった(p<.01)。また、明るさでは評価得点が有意に低かったのは化粧Eであった(p<.01)。清潔感と真面目さでは、化粧C(p<.05)と化粧D、E(p<.01)で、優しさと信頼感では化粧DとEで評価得点があり

表6 5項目別評価得点の比較(看護師の場合)

	清潔感		優しさ		明るさ		信頼感		真面目さ	
	評価得点±SD	p値	評価得点±SD	p値	評価得点±SD	p値	評価得点±SD	p値	評価得点±SD	p値
化粧A	3.0 ± 0.7		2.9 ± 0.7		2.6 ± 0.8		2.9 ± 0.6		3.1 ± 0.6	
化粧B	3.2 ± 0.6	**	3.2 ± 0.6	**	3.2 ± 0.6	**	3.1 ± 0.6	**	3.1 ± 0.6	n.s
化粧C	2.9 ± 0.6	*	2.9 ± 0.6	n.s	3.0 ± 0.6	**	2.9 ± 0.6	n.s	2.8 ± 0.6	**
化粧D	2.6 ± 0.6	**	2.6 ± 0.6	**	2.8 ± 0.7	**	2.5 ± 0.6	**	2.4 ± 0.6	**
化粧E	1.8 ± 0.7	**	1.9 ± 0.7	**	2.3 ± 0.9	**	1.8 ± 0.7	**	1.7 ± 0.7	**

注：化粧Aをコントロール群として化粧B,C,D,E群間で比較した
p値：Fisherの最小有意差法 * p<.05 **p<.01 n.s = not significant

表7 5項目別評価得点の比較(患者の場合)

	清潔感		優しさ		明るさ		信頼感		真面目さ	
	評価得点±SD	p値	評価得点±SD	p値	評価得点±SD	p値	評価得点±SD	p値	評価得点±SD	p値
化粧A	3.0 ± 0.7		3.0 ± 0.7		2.8 ± 0.8		3.0 ± 0.8		3.1 ± 0.8	
化粧B	3.2 ± 0.7	n.s	3.2 ± 0.7	n.s	3.2 ± 0.7	**	3.2 ± 0.7	n.s	3.2 ± 0.7	n.s
化粧C	2.8 ± 0.7	*	2.9 ± 0.8	n.s	3.0 ± 0.8	n.s	2.8 ± 0.8	n.s	2.8 ± 0.8	*
化粧D	2.4 ± 0.7	**	2.4 ± 0.8	**	2.6 ± 0.8	n.s	2.4 ± 0.8	**	2.4 ± 0.8	**
化粧E	1.7 ± 0.8	**	1.8 ± 0.8	**	2.2 ± 1.0	**	1.8 ± 0.8	**	1.8 ± 0.8	**

注：化粧Aをコントロール群として化粧B,C,D,E群間で比較した
p値：Fisherの最小有意差法 * p<.05 **p<.01 n.s = not significant

表8 5項目別評価得点の比較(家族の場合)

	清潔感		優しさ		明るさ		信頼感		真面目さ	
	評価得点±SD	p値	評価得点±SD	p値	評価得点±SD	p値	評価得点±SD	p値	評価得点±SD	p値
化粧A	3.0 ± 0.7		2.9 ± 0.7		2.5 ± 0.8		3.0 ± 0.7		3.2 ± 0.7	
化粧B	3.3 ± 0.6	**	3.3 ± 0.6	**	3.3 ± 0.6	**	3.3 ± 0.5	**	3.3 ± 0.6	n.s
化粧C	2.9 ± 0.7	n.s	2.9 ± 0.7	n.s	3.1 ± 0.6	*	2.9 ± 0.7	n.s	2.8 ± 0.7	**
化粧D	2.3 ± 0.8	**	2.5 ± 0.8	**	2.7 ± 0.7	*	2.4 ± 0.8	**	2.3 ± 0.7	**
化粧E	1.5 ± 0.6	**	1.7 ± 0.7	**	2.1 ± 0.9	**	1.7 ± 0.7	**	1.6 ± 0.7	**

注：化粧Aをコントロール群として化粧B,C,D,E群間で比較した
p値：Fisherの最小有意差法 * p<.05 **p<.01 n.s = not significant

表9 看護師と患者と家族間の認識の違い

	化粧A 評価得点±SD	化粧B 評価得点±SD	化粧C 評価得点±SD	化粧D 評価得点±SD	化粧E 評価得点±SD
看護師	14.6 ± 2.9	16.0 ± 2.7	14.6 ± 2.7	12.9 ± 2.9	9.6 ± 3.1
患者	14.9 ± 3.4	16.1 ± 3.2	14.2 ± 3.7	12.1 ± 3.6	9.2 ± 3.6
家族	14.6 ± 3.1	16.6 ± 2.5	14.5 ± 3.1	12.2 ± 3.5	8.6 ± 3.1

p値：Fisherの最小有意差法 *p<.05 **p<.01

意に低かった (p<.01)。家族では、真面目さ以外の項目で化粧Bの評価得点が高かった(p<.01)。清潔感と優しさ、信頼感は化粧D、Eで、真面目さは化粧C、D、Eで評価得点が有意に低かった (p<.01)。明るさは、化粧C、Dで評価得点が有意に高く (p<.05)、化粧Eは評価得点が有意に低かった(p<.01)。

最後に、看護師の化粧AからEに対する看護師、患者、家族間の認識の違いを検討した(表9)。化粧AからCの評価得点に有意差はなかったが、化粧Dは看護師が12.9 ± 2.9点、患者が12.1 ± 3.6点、家族が12.2 ± 3.5点で、看護

師と患者間に有意差が認められた (p<.01)。また、化粧Eは看護師が9.6 ± 3.1点、患者が9.2 ± 3.6点、家族が8.6 ± 3.1点で、看護師と家族間に有意差が認められた (p<.05)。

4. 考察

大坊は、化粧の効用として、①直接的な創造的行為を介しての自己効用、②満足感と対人的な効用といえる役割遂行、③自己呈示を通じての自尊心の向上、④他者からの評価の向上による満足感を挙げており、化粧が自分の価値を高め、社会的な適応にある⁹⁾ということを述べている。医

療現場で看護師は、患者との人間関係を基盤において看護実践するために、看護師の化粧を含む外観や立ち居振舞いがどのように受け止められているかや、他者にどのような影響を齎しているかについて関心を向ける必要がある。つまり、看護師は他者の認識を知り、自分自身の行動を振り返ったうえで常に看護師としての意識を高めていくことが重要であると考えられる。本調査では、化粧が「濃い・派手」と感じる看護師に対して、看護師、患者、家族は共通して、「話しかけにくい」、「近づきにくい」、「怖い」、「安心・信頼できない」、「不潔」という印象をもっていることが分かった。特に、看護師では「話しかけにくい」、「近づきにくい」、「怖い」の項目が患者や家族よりも高値で約5割を示していることが特徴である。これは、看護師という職業が社会の人々から注目され見られているということや、看護師自身も患者に寄り添い、心のケアを看護の役割としているという強い意識の現れであると考えられる。これに対して、患者では「話しかけにくい」や「近づきにくい」とともに「本人の自由である」が上位であり、看護師との違いが浮き彫りになった。患者の印象には、「濃い・派手」と感じる化粧に対する率直な印象と、本来の入院目的が達成され健康が回復されれば化粧には拘らないという思いの現れであると考えられる。化粧に対する患者の考えの内容分析には、【個人の自由である】のなかに、『看護師の仕事には尊敬の念しかない』や、【化粧を気にしたことがない】に『化粧を気にする余裕がない』などが含まれており、病気を治療する目的で入院している患者の状況や看護師に対する感謝の気持ちが反映されていると言える。家族では「安心・信頼できない」と「不潔」が3位で、「不潔」が上位にあることが特徴であり、それは【清潔感のある化粧が第一である】と、化粧に対して清潔感を重要視する考え方に基づくものと推察される。次に、化粧が「薄い・地味」と感じる看護師に対して、看護師、患者、家族は共通して、「話しかけやすい」、「清潔」、「安心・信頼できる」、「優しい」という印象をもっていることが分かった。これらの項目では、患者が家族や看護師よりも高値を示しており、特に「清潔」が約5割を示し患者の関心の高さが窺える。家族が「濃い・派手」と感じる化粧に「不潔」という印象をもつと同様に、患者もまた、清潔感がある化粧を重視していることが推察される。「薄い・地味」と感じる化粧に、素颜やありのままに近い看護師の姿がイメージされ、飾らないで自然体に接する看護師を求める患者の心理の現れではないかと考えられる。また、患者は「薄い・地味」な化粧に対して「健康」の回答が25.2%で、看護師は「不健康」が28.6%で相反する印象をもち、家族は「不健康」より「健康」の割合がわずかに高く、患者と同様の傾向であることが明らかになった。一方、看護師は「薄い・地味」と感じる化粧に対して「不健康」な印象を抱くことにより、その印象を払拭させて健康的に見せようとするため化粧を濃

くする原因になっていることが推察される。茂木は「化粧を通して、他者の視線を自分の中に取り込み、その他者の視線を意識しながら自分の姿を確認し、社会に開かれた自己の姿を構築している」¹⁰⁾と述べている。つまり、看護師の化粧では、個人が感じる化粧の濃淡が自分の好みや価値観だけで判断するのではなく、他者の視線にどのように映っているかやどのように感じているかを常に意識して自身自身の化粧を見直していく必要があると考えられる。

看護師の5段階の化粧モデルでは、看護師、患者、家族に共通して、化粧Bの評価得点が最も高いことから ($p < .01$)、化粧Bが看護師の化粧として支持されていると言える。また、化粧Bの評価については、筆者がこれまでに実施してきた看護学生の調査結果とも一致している^{11,12)}。この化粧Bは、化粧Aのファンデーションと眉ずみに、チークと口紅を加えたものであり、チークと口紅を追加することで、顔に明るさや表情を与えることに繋がり、優しさや明るさや信頼感など項目別の評価にも好影響を与えた可能性が考えられる。また、5段階の化粧モデルの評価得点は、看護師、患者、家族に共通して、化粧Cに有意差が認められないことから、化粧Aと同等程度の評価と捉えることができる。よって、化粧Cまでを看護師に好ましい化粧として推奨できると言える。化粧Cは化粧Bにアイラインとマスカラを追加したものであるが、それらは薄く自然な形で使用されていることによって、特に目元を強調した化粧にはなっていない。化粧AからCの特徴は、素颜を意識した化粧法であり、ファンデーションで肌を整え、チークや口紅によって明るい表情にし、眉毛や目尻の輪郭を整える程度の化粧であり、それが支持されたと言える。石田は、広義の化粧について「人体の表面に手を加えて加飾・加工する行為すべて」¹³⁾と表現しているが、メイクアップを施せば施すほど自然体からは遠くなり人工的に作られた印象は距離感を作り出すことに繋がるのではないかと考えられる。

看護師、患者、家族間の比較では、化粧Dは看護師の評価得点が最も高く、患者の評価得点が最も低く、看護師と患者間で有意差が ($p < .01$) 認められ、化粧Eは看護師の評価得点が最も低く看護師と家族間で有意差が ($p < .05$) あったことから、濃い化粧に対する認識に違いが生じており、看護師の評価より患者や家族の評価が厳しいことが示唆された。

石田は、「目と口を強調するメイクアップは、人間の顔のなかで最も表情を表す部分を強調したもので(中略)意図的で人工的な感じを与える」¹⁴⁾と述べている。つまり、人間対人間の看護のかかわりにおいて、濃い化粧や目を強調した化粧には、表情やその人らしさが見えにくく、「濃い・派手」な化粧に「話しかけにくい」「近づきにくい」「怖い」「安心・信頼できない」という印象があるため威圧感や不安感を強く感じていることが推察される。患者や家族は、看

看護師の化粧に対して【個人の自由である】とする一方で、看護師以上に【ナチュラルメイクが好印象である】と考えており、患者や家族が濃い化粧に対して評価が低い裏付けとなる結果であると言える。

5. 総括

看護師の化粧に対する患者や家族と看護師の認識の違いを明らかにする目的で質問紙調査を実施し、看護師 395 名、患者 118 名、家族 85 名から有効回答を得た。化粧が「濃い・派手」と感じる看護師の印象は、看護師、患者、家族ともに「話しかけにくい」「近づきにくい」「怖い」が、また、化粧が「薄い・地味」と感じる看護師の印象は、「話しかけやすい」「清潔」「安心・信頼できる」「優しそう」の割合が高かった。また、化粧の薄いもの(A)から濃いもの(E)の5段階で化粧モデルを作成し、清潔感、優しさ、明るさ、信頼感、真面目さを評価した結果、看護師、患者、家族ともに化粧Bの評価得点が最も高く、5項目すべてにおいて評価が高いことから推奨できる化粧であると言える。また、看護師、患者、家族間では化粧AとCの評価得点に有意差がないことから、化粧Cまでを看護師の好ましい化粧として提案したい。化粧DとEは、患者と家族の評価得点が看護師の評価得点よりも低いことから濃い化粧に対する認識の違いが生じていることが示唆された。

謝辞

本調査の実施にあたり、ご協力いただきました皆様に心より感謝申し上げます。また、共同研究者である大阪市立大学大学院看護学研究科の岡山加奈准教授に深謝申し上げます。なお、本研究は公益財団法人コスメトロジー研究振興財団の平成26年度研究助成費を受けて実施することができましたことに深く御礼申し上げます。

(引用文献)

- 1) 日本看護協会：看護者の倫理綱領, 1-6. 2003.
- 2) 松本じゅん子：入院患者の化粧行動に対する看護師の認識, 日本教育心理学会総会発表論文集(50), 55, 2008.
- 3) 野中浩幸, 加納みなみ：臨地実習における看護学生の身だしなみに関する意識調査, 医学と生物学, 155(6), 346-350, 2011.
- 4) 廣瀬規代美, 奥村亮子, 秋山恵, 内田真理子, 斎藤悦子, 佐保愛里, 樋口郭子, 武藤麻衣子, 森本知子, 林陸郎：看護婦の身だしなみに関する研究, 看護管理 11(6), 445-451, 2001.
- 5) 佐谷戸優子, 久保田香, 山岸晃子：身だしなみに関する研究－看護婦と患者の意識の違いについて－, 長野赤十字病院医誌 16, 113-116, 2002.
- 6) 佐藤法仁, 渡辺朱理, 苔口進：医療従事者の身だしなみに関する研究, 日本医事新報, 4498, 95-98, 2010.
- 7) 荻あや子, 玉谷奈都美, 岡山加奈：大学生が患者の視点で捉えた看護師の化粧に対する評価, 岡山県立大学保健福祉学部紀要, 21(1), 131-139, 2014.
- 8) 山田眞佐美, 米谷陽子, 久保恵子, 青木厚子, 佐藤眞一, 田久浩志：一般市民から見た看護師への茶髪許容度, 第39回日本看護学会論文集看護総合, 230-232, 2008.
- 9) 大坊郁夫：化粧と顔の美意識, 高木修監修, シリーズ21世紀の社会心理学9 化粧行動の社会心理学所収(1-9) . 京都. 北大路書房, 2001.
- 10) 茂木健一郎：化粧をする脳, 集英社新書, 2009. 58.
- 11) 前掲書7)
- 12) 荻あや子：看護学生の化粧の現状と認識に関する研究, コスメトロジー研究振興財団研究業績 中間報告集 25, 175-184, 2016.
- 13) 石田かおり：化粧と人間 -規格化荒れた身体からの脱出-. 法政大学出版局, 2009. 6.
- 14) 石田かおり：[現象学的化粧論] おしゃれの哲学. 理想社, 1995. 25.

女子青年における容姿に対する劣等感への化粧効果の認識に関する発達心理学的研究

和光大学現代人間学部

高坂 康雅

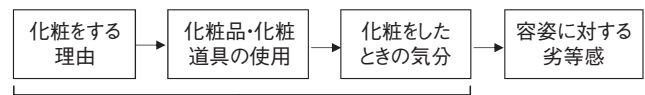
The purpose of this study is to examine the effect of make-up on reduce inferiority feelings in appearance among female adolescents. In study 1, 288 university students completed a questionnaire about reasons to make-up, frequency of using cosmetics and make-up sets, feelings after make-up, and inferiority feelings in appearance. Structural Equation Modeling (SEM) indicated that inferiority feelings were enhanced directly and indirectly by “For covering up their defects in appearance”, but were weakened by “For becoming their spirits aloft”.

In Study2, 1,000 females (age 16–30) completed a questionnaire of the same contents in study 1 on web. SEM indicated that inferiority feelings were enhanced directly and indirectly by “For enhancing the evaluations from others” among 16–18 females and “For manners” among 19–30 females, but were weakened by “For becoming their spirits aloft”, too.

1. 緒言

青年期は生涯の中で最も劣等感を感じやすい時期であり、特に女子青年は、青年期を通して、容姿・容貌に対する劣等感を抱えていることが明らかにされている¹⁾。劣等感を低減させる方法のひとつとして、劣っていると感じられる部分・側面に対して直接的に働きかけ、その部分・側面を改善・向上させようとする「補償」が用いられることが指摘されており、高坂²⁾は、成人を対象とした調査で、劣等感が解消した方法として「直接的努力(補償)」が用いられていたことを明らかにしている。また、宮城³⁾は、化粧は自我の主張や虚栄に役立つため、劣等感の克服に用いられるのは当然であると述べている。松井・山本・岩男⁴⁾も、化粧の効果のひとつとして「外見的欠点の補償」をあげており、また、化粧が外見的な欠点の補償のような即時的な効用だけでなく、対人的な積極性や自信というような持続的な効用をもつことも指摘している。

これまでの化粧に関する心理学的な研究は、①化粧行動の動機・理由・意識に関する研究、②化粧品の消費行動・使用頻度に関する研究、③化粧の効果に関する研究、の3領域にまとめられる。①化粧行動の動機・理由・意識に関する研究としては、上方・田頭⁵⁾は、大学生女子が化粧をする理由として、「変わる楽しさ」、「魅力の呈示」、「積極性の向上」、「リラクゼーション」、「肌の美しさ」の5因子を抽出している。また②化粧品の消費行動・使用頻度に関する研究としては、飛田⁶⁾が12種類の化粧品の使用頻度



化粧行動

Fig. 1 本研究の仮説モデル

を「ふだんの時」と「デートなどの時」で比較検討している。③化粧の効果に関する研究では、松井ら⁴⁾のほかに、宇山・鈴木・互⁷⁾が20～50代の女性を対象とした調査から、「積極性の向上」、「リラクゼーション」、「気分の高揚(対外)」、「気分の高揚(対自)」、「安心」の5因子を抽出している。

このように化粧に関する心理学的な研究は、主に3つの領域でその知見を蓄積してきている。しかし、化粧をすることが容姿に対する劣等感に及ぼす影響・効果について直接的に検討した研究は行われていない。また、調査ごとに対象者の年齢範囲や属性が異なっているため、単純に結果を比較検討することが困難である。さらに、研究によって“化粧”の定義(何をもちて“化粧”とするか)が異なっていたり、化粧の定義が明確にされていないものも少なくない。

これらの問題意識のもと、本研究では、女子青年において化粧行動が容姿に対する劣等感に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。なお、本研究における化粧とは、“顔の全体、または一部に、『つける』、『塗る』、『描く』という行為によって、見た目の変化が生じる行為”とした。また、化粧行動には、①化粧をする理由、②化粧品・化粧道具の使用、③化粧をしたときの気分、が含まれるものとする(Fig. 1)。

2. 研究1

2.1. 目的

研究1では、大学生を対象に、大学生の化粧行動が容姿に対する劣等感に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。



Developmental Psychological Study of Effects of Make-Up for Inferiority Feelings in Appearance among Female Adolescents

Yasumasa Kosaka

Wako University, Faculty of Human Sciences

2.2. 方法

2.2.1. 調査対象者

東京都内の大学生 288 名（男子 143 名，女子 143 名，不明 2 名；平均年齢 19.6 歳，標準偏差 2.9 歳）を調査対象者とした。

2.2.2. 調査内容

年齢，性別，学年に続き，以下の(1)~(4)への回答を求めた。

(1)容姿に対する劣等感項目

高坂^{8,9)}を参考に独自に 5 項目を作成した。「あなたにどの程度あてはまりますか」という教示のもと，「全くあてはまらない」(1 点)から「とてもあてはまる」(5 点)の 5 件法で回答を求めた。

(2)化粧品・化粧道具の使用頻度項目

大学生が一般的に使用していると考えられる 18 種類の化粧品・化粧道具について，1 週間の使用頻度を「使用しない」(1 点)から「毎日」(5 点)の 5 件法で回答を求めた。

(3)化粧をする理由項目

事前に行った予備調査で得られた 7 カテゴリーについて 5 項目ずつを独自に作成した。「あなたが普段，化粧をする理由に，どの程度あてはまりますか」という教示のもと，「全くあてはまらない」(1 点)から「とてもあてはまる」(5 点)で回答を求めた。

(4)化粧をしたときの気分

事前に行った予備調査で得られた 6 カテゴリーについて 5 項目ずつを独自に作成した。「あなたは，化粧を行った後，どのような気分になりますか」という教示のもと，

「全くあてはまらない」(1 点)から「とてもあてはまる」(5 点)の 5 件法で回答を求めた。

2.2.3. 調査時期・手続き・倫理的配慮

2015 年 7 月に，講義時間の一部を用いて，集団で調査を実施し，その場で調査用紙を回収した。その際，無記名であるため誰がどのように回答したか把握されないこと，調査への協力は任意であり，拒否することができること，調査を拒否しても一切の不利益は生じないこと，などを紙面および口頭で伝え，そのうえで回答した場合，調査への協力に同意したとみなした。

2.3. 結果

2.3.1. 化粧品・化粧道具の使用頻度と分析対象者の選定

18 種類の化粧品・化粧道具の使用頻度への回答の和を算出し，男女別の分布を Table 1 に示した。その結果，1 週間で 18 種類の化粧品・化粧道具を 1 日以上使用している者（使用頻度への回答の和 ≥ 19 ）は，男性 5 名，女性 111 名であった。

対象者全体のうち，化粧をしている男性が少数であったため，これ以降は，化粧品・化粧道具を使用している女性 111 名のみを分析対象者とする事とした。

2.3.2. 容姿に対する劣等感の主成分分析と得点化

容姿に対する劣等感項目 5 項目について主成分分析を行ったところ，5 項目すべてが第 1 成分に高い負荷量を示した (Table 2)。次に α 係数を算出したところ，.94 と高い内的一貫性が確認された。

そこで，5 項目の平均を算出し，「容姿に対する劣等感」得点(以下，劣等感得点)とした。

Table 1 化粧品・化粧道具の使用頻度の男女別分布

	18点	19~36点	37~54点	55~72点	73点以上	合計
男性	130名 (96.3%)	5名 (3.7%)	0名 (0.0%)	0名 (0.0%)	0名 (0.0%)	135名 (100.0%)
女性	29名 (20.7%)	50名 (35.7%)	48名 (34.3%)	13名 (9.3%)	0名 (0.0%)	140名 (100.0%)
合計	159名 (57.8%)	55名 (20.0%)	48名 (17.5%)	13名 (4.7%)	0名 (0.0%)	275名 (100.0%)

Table 2 容姿に対する劣等感項目の主成分分析結果

項目内容	第1成分	平均(SD)
2 自分の顔は他の人より魅力的ではない	.95	3.65 (1.07)
1 自分の顔は他の人と比べてかわいくない／かっこよくない	.94	3.59 (1.07)
3 他の人と比べて自分の顔は見劣りしている	.92	3.53 (1.11)
4 周りの人の顔を見ていると自分の顔に自信がなくなる	.86	3.60 (1.16)
5 今の自分の顔は、自分が求めているものには及んでいない	.82	3.62 (1.14)
寄与率(%)	81.0	
α 係数	.94	

N=111

2.3.3. 化粧をする理由項目の因子分析と得点化

化粧をする理由項目 35 項目について重みづけのない最小 2 乗法による因子分析を行ったところ、固有値 1.0 以上で 8 因子が抽出された。そこで、因子数を 8 から減らしながら、重みづけのない最小 2 乗法・promax 回転による因子分析を繰り返し行ったところ、因子の解釈可能性などから 5 因子解が最適であると判断された (Table 3)。

第 1 因子は「化粧をすることで、人にかわいい/かっこいいと思われたいから」など、他者からの評価をあげるた

めに化粧をしていると解釈されたため、「他者評価の上昇」と命名した。第 2 因子は「化粧をすることが、日常化しているから」など、毎日の習慣や他者と会うときのマナーとして化粧をしていると解釈されたため、「習慣・マナー」と命名した。第 3 因子は「化粧をすると、気分が入る」など、気持ちを高めるために化粧をしていると解釈されたため、「気分の高揚」と命名した。第 4 因子は「友人がいつも化粧をしているから」など、周りの人が化粧をしているため、自分も化粧をしていると解釈されたため、「周囲からの影

Table 3 化粧をする理由項目の因子パターン

項目内容	F1	F2	F3	F4	F5	平均(SD)
第1因子「他者評価の上昇」(α=.93)						
26 化粧をすることで、人にかわいい/かっこいいと思われたいから	.87	-.01	-.01	.04	-.06	3.61(1.10)
11 化粧をすることで、かわいくなりたいたから	.84	-.04	.06	-.13	.07	3.88(0.97)
33 人に綺麗だと思われたいから	.79	.02	.05	-.07	-.05	3.55(1.10)
4 化粧をすることで、綺麗になりたいから	.77	-.10	.03	-.16	.14	3.94(0.94)
5 化粧をすることで、他人によく思われたいから	.75	.01	-.04	-.04	.01	3.42(1.00)
12 化粧をすることで、印象をよくするため	.74	.03	-.10	-.07	.21	3.85(0.94)
32 化粧をすることで、理想の自分に近づくため	.59	-.21	.13	.18	.13	3.08(1.23)
18 おしゃれがしたいから	.58	.24	.21	-.03	-.14	3.78(1.16)
19 化粧をすることで、女性/男性らしく見せることができるから	.52	.03	.08	.28	-.09	3.65(1.05)
31 化粧をすると、自信がつくため	.49	.00	.44	.13	-.07	3.09(1.20)
25 化粧をすることで、雰囲気を変えたいから	.48	-.01	.35	.21	-.12	3.41(1.22)
第2因子「習慣・マナー」(α=.91)						
13 化粧をすることが、日常化しているから	-.05	.88	.02	-.09	.09	3.02(1.26)
20 普段から化粧をしているから	-.02	.85	.01	.00	.04	3.09(1.25)
6 化粧をすることが、習慣になっているから	.02	.82	.17	-.10	-.03	3.13(1.22)
29 化粧をするのが当たり前だから	-.16	.77	.07	.07	.11	2.74(1.22)
27 化粧をすることが、一日の生活サイクルに入っているから	-.02	.70	.14	.15	.03	2.86(1.24)
1 化粧をすることが、マナーだと思うから	.11	.69	-.09	-.10	-.21	3.35(1.18)
8 身だしなみのため	.50	.59	-.23	-.11	-.17	3.88(0.84)
22 化粧はしなくてはならないと思うから	-.15	.53	-.01	.31	-.08	2.60(1.21)
34 化粧をしなくて落ち着かないから	-.11	.41	.11	.22	.37	2.41(1.23)
第3因子「気分の高揚」(α=.91)						
24 化粧をすると、気分が入るから	.11	.06	.86	.06	-.20	3.22(1.27)
17 化粧をすると、モチベーションがあがるから	.22	.14	.71	-.14	.03	3.40(1.21)
10 化粧をすることで、気持ちを明るくするため	.23	-.01	.65	-.05	.12	3.32(1.20)
3 化粧をすることで、気持ちを切り替えるため	.19	-.03	.64	-.14	.06	3.56(1.21)
7 周りの人が化粧をしているから	.40	.11	-.510	.506	-.13	2.88(1.11)
16 化粧をすると、血色をよく見せることができるから	.14	.04	.26	.17	.16	3.52(1.25)
21 友人に化粧をすすめられたから	-.20	-.16	.13	.75	-.07	1.97(1.00)
第4因子「周囲からの影響」(α=.66)						
35 友人がいつも化粧をしているから	-.13	.09	-.19	.66	.21	2.07(1.03)
28 化粧をしていると、周りの人に褒めてもらえるから	.26	-.08	.10	.61	-.02	2.36(1.07)
14 化粧をしなくて、周りから浮いてしまうから	-.05	.14	-.09	.48	.18	2.35(1.08)
第5因子「欠点の隠匿」(α=.76)						
9 素顔に自信がないから	.21	.11	-.13	-.05	.68	3.27(1.33)
2 化粧をすることで、コンプレックスを隠すため	.30	-.06	.02	-.10	.65	3.47(1.22)
23 化粧をすることで、欠点をカバーすることができるから	.22	-.13	.05	.13	.63	3.46(1.17)
30 肌が荒れているから	-.17	-.06	-.03	.07	.52	2.70(1.31)
15 他人に会うから	.04	.26	-.02	.04	.30	3.74(0.98)
因子間相関						
第1因子「他者評価の上昇」	-	.48	.60	.24	.44	
第2因子「習慣・マナー」		-	.47	.49	.39	
第3因子「気分の高揚」			-	.36	.45	
第4因子「周囲からの影響」				-	.20	
第5因子「欠点の隠匿」					-	

N=110

注. 7「周りの人が化粧をしているから」は、第3因子への負荷量と第4因子への負荷量が僅差であること、また、この項目を除いた4項目(24, 17, 10, 3)でα係数を算出した方がα係数の値が高かったことから、この項目を第3因子の項目には含めなかった。

響」と命名した。第5因子は「素颜に自信がないから」など、自分の容姿の欠点やコンプレックスを感じている箇所を隠すために化粧をしていると解釈されたため、「欠点の隠匿」と命名した。

各因子に.40以上の負荷量を示した項目について α 係数を算出したところ、「他者評価の上昇」が.93、「習慣・マナー」が.91、「周囲からの影響」が.66、「欠点の隠匿」が.76とある程度の内的一貫性が確認された。そこで、それぞれに.40以上の負荷量を示した項目の平均を算出し、各得点とした。「気分の高揚」については、項目番号7「周りの人が化粧をしているから」の負荷量が第4因子「周囲からの影響」と僅差であり、この項目を含めた5項目で算出した α 係数(.81)よりも、この項目を除いた4項目(項目番号24, 17, 10, 3)で算出した α 係数(.91)を算出した方が、高い値を示したことから、項目番号7を除いた4項目の平均を算出し、得点とした。

2.3.4. 化粧品・化粧道具の使用頻度の因子分析と得点化

化粧品・化粧道具の使用頻度18項目について、重みづけのない最小2乗法による因子分析を行ったところ、固有値1.0以上で5因子が抽出された。そこで、因子数を5か

ら減らしながら、重みづけのない最小2乗法・promax回転による因子分析を繰り返し行ったところ、因子の解釈可能性などから、3因子解が最適であると判断された(Table 4)。

第1因子は「化粧下地」など基礎的な化粧品・化粧道具が高い負荷量を示したことから、「デイリーメイク」と命名した。第2因子は「ハイライト」など、陰影をつけたり強調したりする化粧品・化粧道具が高い負荷量を示したことから、「陰影メイク」と命名した。第3因子は「アイライナー」など目元を強調する化粧品・化粧道具が高い負荷量を示したことから、「目強調メイク」と命名した。

各因子に.40以上の負荷量を示した項目の α 係数を算出したところ、「デイリーメイク」が.78、「陰影メイク」が.80、「目強調メイク」が.65とある程度の内的一貫性が確認された。

そこで、各因子に.40以上の負荷量を示した項目の平均を算出し、各得点とした。

2.3.5. 化粧をしたときの気分項目の因子分析と得点化

化粧をしたときの気分項目30項目について、重みづけのない最小2乗法による因子分析を行ったところ、固有値

Table 4 化粧品・化粧道具の使用頻度項目の因子パターン

項目内容	F1	F2	F3	平均 (SD)
第1因子「デイリー・メイク」($\alpha=.78$)				
1 化粧下地	.77	.07	-.26	3.37(1.49)
3 ファンデーション	.69	-.15	-.09	3.11(1.53)
7 アイシャドウ	.67	.09	.09	2.72(1.53)
15 チーク	.57	.13	.03	2.88(1.53)
5 マスカラ	.47	-.01	.26	2.41(1.44)
14 口紅	.41	.16	-.04	2.19(1.49)
13 リップグロス	.32	-.09	.05	1.96(1.31)
12 色付きリップクリーム	.31	-.13	-.19	2.56(1.63)
第2因子「陰影メイク」($\alpha=.80$)				
17 ハイライト	.06	.83	-.03	1.49(1.13)
16 ノーズシャドウ	-.01	.74	.14	1.41(1.02)
18 シェーディング	-.16	.66	.02	1.22(0.77)
2 コンシーラー	.26	.395	-.08	1.57(1.19)
11 カラーコンタクト	-.12	.38	.31	1.47(1.12)
4 フェイスパウダー	.35	.36	-.14	2.48(1.58)
第3因子「目強調メイク」($\alpha=.65$)				
6 アイライナー	.33	-.11	.65	2.62(1.51)
10 二重まぶた化粧品	-.11	-.04	.58	1.48(1.16)
9 つけまつげ	-.24	.17	.52	1.18(0.65)
8 アイブロウ	.35	-.02	.47	2.80(1.68)
因子間相関				
第1因子「デイリー・メイク」	-	.39	.36	
第2因子「陰影メイク」		-	.40	
第3因子「目強調メイク」			-	

N=111

1.0以上で5因子が抽出された。そこで、因子数を5から減らしながら、重みづけのない最小2乗法・promax回転による因子分析を行ったところ、因子の解釈可能性などから、4因子解が最適であると判断された(Table 5)。

第1因子は、「楽しい気分になる」など、化粧をすることでポジティブで活力に満ちた気分になることを表していると考えられるため、「快活的気分」と命名した。第2因子は「かわいく/かっこよくなった気がする」など、化粧をすることで、自分の容姿に自信がもてたように感じられること

を表していると考えられるため、「自信」と命名した。第3因子は「変ではないか気になる」など、化粧が自分に合っているかを気にしていることを表していると考えられるため、「不安・懸念」と命名した。第4因子は「落ち着く」など、化粧をすることで気持ちが安定することを表していると考えられるため、「安心」と命名した。

各因子に.40以上の負荷量を示している項目の α 係数を算出したところ、「快活的気分」が.95、「自信」が.93、「不安・懸念」が.87、「安心」が.76と十分な内の一貫性を示したこ

Table 5 化粧をしたときの気分項目の因子パターン

項目内容	F1	F2	F3	F4	平均(SD)
第1因子「快活的気分」($\alpha=.95$)					
13 楽しい気分になる	.93	.10	-.05	-.15	2.94(1.11)
25 気分が高まる	.82	.19	-.04	-.12	2.89(1.15)
7 嬉しい気持ちになる	.75	.12	.07	-.10	2.77(1.03)
10 気持ちが安らぐ	.68	-.23	.09	.38	2.48(1.03)
14 自分が少し好きになる	.67	.26	-.20	-.09	2.63(1.12)
21 活動的になる	.66	.22	-.11	.01	2.76(1.12)
26 前向きになる	.66	.23	-.17	.04	2.86(1.20)
9 人に会いたくなる	.64	.09	-.05	.01	2.85(1.17)
11 性格が変わった気がする	.59	-.17	.31	.16	2.24(0.89)
28 気が楽になる	.58	-.24	-.05	.55	2.51(1.06)
5 新しい自分が見られたと思う	.57	.08	.21	.11	2.66(1.05)
17 違う自分になれた気がする	.54	.28	.14	-.03	2.65(1.05)
27 外出したくなる	.50	.27	-.09	.02	3.12(1.22)
第2因子「自信」($\alpha=.93$)					
8 かわいく/かっこよくなった気がする	.04	.76	.05	-.03	3.24(1.05)
20 綺麗になったと思う	.12	.75	-.05	-.04	3.07(1.01)
2 自信がつく	.20	.61	.16	.04	3.36(1.10)
15 モチベーションが上がる	.25	.59	-.01	.06	3.25(1.20)
23 印象が変わった気がする	.00	.58	.12	.16	3.18(1.13)
3 やる気がでる	.29	.56	.02	.15	3.22(1.05)
19 気が引き締まる	.22	.52	.06	.10	3.09(1.16)
1 明るい気分になる	.13	.52	.01	.29	3.41(1.13)
第3因子「不安・懸念」($\alpha=.87$)					
6 変ではないか気になる	-.06	.15	.87	-.21	3.27(1.13)
18 化粧が自分に合っているか気になる	.20	-.05	.87	-.20	3.22(1.16)
24 上手くいっているかどうか不安になる	-.10	.05	.82	.01	3.07(1.13)
30 他人の評価が気になる	.17	-.08	.68	.02	3.18(1.26)
12 欠点をカバーできているか気になる	-.38	.09	.67	.30	2.99(1.16)
第4因子「安心」($\alpha=.76$)					
16 落ち着く	.10	.00	-.11	.74	2.65(1.18)
22 人前に出ても恥ずかしくない	-.26	.35	-.18	.59	3.19(1.11)
4 安心できる	.24	.14	.00	.56	3.06(1.18)
29 素颜よりも大きく変化したと思う	-.08	.16	.13	.53	2.66(1.17)
因子間相関					
第1因子「快活的気分」	-	.66	.26	.58	
第2因子「自信」		-	.21	.47	
第3因子「不安・懸念」			-	.27	
第4因子「安心」				-	

N=108

とから、各因子に.40以上の負荷量を示した項目の平均を算出し、各得点とした。

2.3.6. 化粧行動が容姿に対する劣等感に及ぼす影響

化粧行動が容姿に対する劣等感に及ぼす影響を検討するため、仮説モデル (Fig. 1) に従って、化粧をする理由5得点を第1水準に、化粧品・化粧道具の使用頻度3得点を第2水準に、化粧をしたときの気分4得点を第3水準に、劣等感得点を第4水準としたモデルを作成し、それぞれに対して直接効果を設定して、共分散構造分析を行った。その後、有意にならなかったパス・共変動を削除しながら、繰り返し共分散構造分析を行い、すべてのパス・共変動が有意になったモデルを採用した (Fig. 2)。このモデルの適合指標はGFI=.934, AGFI=.853, CFI=.978, RMSEA=.060

であった。なお、それぞれの得点における劣等感得点への総合効果を Table 6 に示した。

まず、「欠点の隠匿」得点は、直接的に劣等感得点に正の影響を示し、また、「不安・懸念」得点を媒介として正の影響を示しており、最も容姿に対する劣等感を高めている理由であった。「他者評価の上昇」得点と「周囲からの影響」得点は、媒介する得点によって、劣等感得点に正の影響も負の影響も与えていたが、Table 2 より、それらの影響が相殺され、これらの理由は劣等感得点にはほとんど影響を及ぼしていないことが示された。「習慣・マナー」得点は、「不安・懸念」得点を媒介として、劣等感得点に負の影響を示した。

「気分の高揚」得点は、「自信」得点を媒介として、劣等感

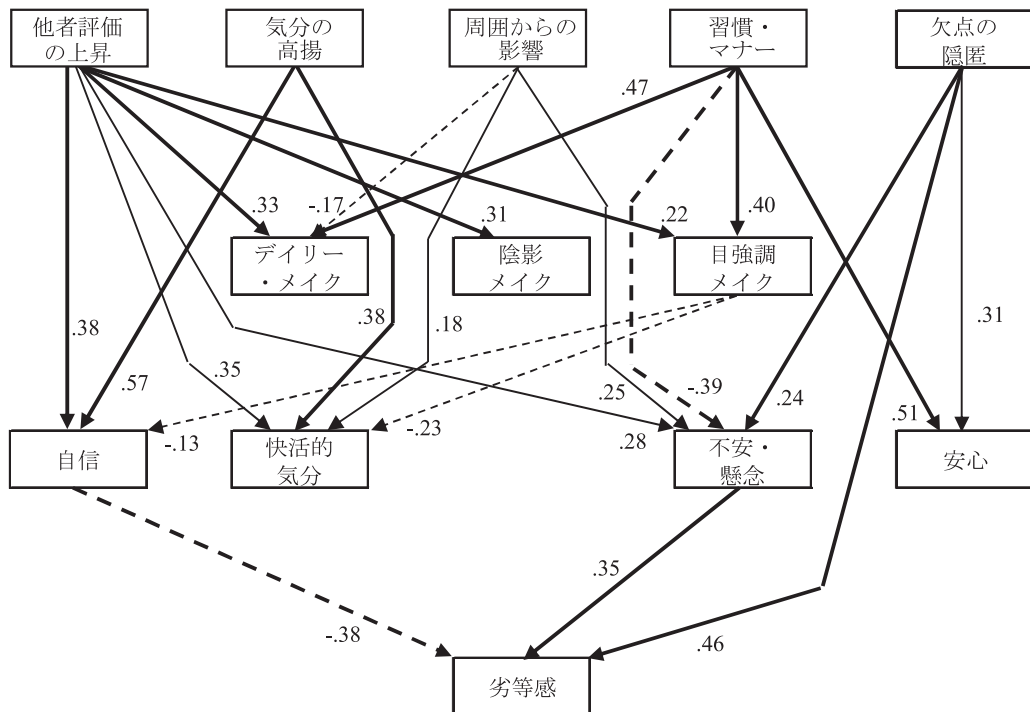


Fig. 2 化粧行動が容姿に対する劣等感に及ぼす影響

Table 6 各得点の劣等感得点に対する総合効果(標準化済)

		劣等感
理由・動機	他者評価の上昇	-.04
	習慣・マナー	-.12
	気分の高揚	-.22
	周囲からの影響	.09
	欠点の隠匿	.54
メイク	デイリー・メイク	-
	陰影メイク	-
	目強調メイク	.05
気分	快活的気分	-
	自信	-.38
	不安・懸念	.35
	安心	-

得点に負の影響を示した。

3. 研究2

3.1. 目的

研究1では大学生が対象であったため、より年齢範囲を広げて検討することにより、各年代の特徴が明らかになると考えられる。そこで、研究2では、16歳から30歳の未婚女性を対象として、再度、化粧行動が容姿に対する劣等感に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。

3.2. 方法

3.2.1. 調査対象者・実施方法

16歳から30歳の未婚で子どもがおらず、化粧品・化粧道具の使用頻度18項目のうち、少なくとも1項目に1「使用しない」以外の回答をした女性1,000名を調査対象者とした。

調査は、株式会社クロス・マーケティングに依頼をして、2015年8月にweb調査を実施した。対象者は16～18歳、19～22歳、23～27歳、28～30歳の4年齢群についてそれぞれ250名を割り付けた。それぞれの年齢群の職業分布をTable 7に示す。

3.2.2. 調査内容

調査内容は、年齢、性別、職業、婚姻経験、結婚の有無に加え、研究1で用いた(1)容姿に対する劣等感項目5項目、(2)化粧品・化粧道具の使用頻度項目18項目、(3)化粧をする理由項目35項目、(4)化粧をしたときの気分項目30項目を使用した。教示文、選択肢も同様であった。

3.3. 結果

3.3.1. 容姿に対する劣等感項目の主成分分析と得点化

容姿に対する劣等感項目5項目について主成分分析を行ったところ、5項目すべてが第1成分に高い負荷量を示した(Table 8)。また、5項目で α 係数を算出したところ、.94と十分な内的一貫性も確認された。

そこで、5項目の平均を算出し、「容姿に対する劣等感」得点(以下、劣等感得点)をとした。

3.3.2. 化粧をする理由項目の因子分析と得点化

化粧をする理由項目35項目について、最尤法による因子分析を行ったところ、固有値1.0以上で6因子が抽出された。そこで、因子数を6から減らしながら、最尤法・promax回転による因子分析を行ったところ、5因子が最適であると判断された(Table 9)。

第1因子は、「人に綺麗だと思われたいから」など、他者からの評価をあげるために化粧をしていると解釈され、研

Table 7 研究2の調査対象者の年齢群ごとの職業分布

職業	16~18歳	19~22歳	23~27歳	28~30歳	合計
会社勤務 (一般社員)	3 (1.2%)	27 (10.8%)	82 (32.8%)	103 (41.2%)	215 (21.5%)
公務員・教職員・ 非営利団体職員	0 (0.0%)	1 (0.4%)	19 (7.6%)	10 (4.0%)	30 (3.0%)
派遣社員・ 契約社員	0 (0.0%)	6 (2.4%)	19 (7.6%)	23 (9.2%)	48 (4.8%)
自営業 (商工サービス)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	5 (2.0%)	5 (0.5%)
SOHO	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.4%)	3 (1.2%)	4 (0.4%)
専門職(弁護士・ 税理士等・医療関係)	0 (0.0%)	1 (0.4%)	5 (2.0%)	10 (4.0%)	16 (1.6%)
パート・アルバイト	4 (1.6%)	34 (13.6%)	56 (22.4%)	54 (21.6%)	148 (14.8%)
学生	236 (94.4%)	155 (62.0%)	26 (10.4%)	7 (2.8%)	424 (42.4%)
無職	6 (2.4%)	25 (10.0%)	37 (14.8%)	30 (12.0%)	98 (9.8%)
その他	1 (0.4%)	1 (0.4%)	5 (2.0%)	5 (2.0%)	12 (1.2%)
合計	250 (100.0%)	250 (100.0%)	250 (100.0%)	250 (100.0%)	1000 (100.0%)

注. 「その他」には上記の職業や会社勤務(管理職)、会社経営(経営者・役員)、農林漁場は含まれない

究1での第1因子と同様の内容であると考えられるため、「他者評価の上昇」と命名した。ただし、研究2の場合、「他者評価の上昇」のなかには、「化粧をすることで、欠点をカバーすることができるから」、「化粧をすることで、コンプレックスを隠すため」など、研究1の第5因子「欠点の隠匿」に関わる内容が含まれていた。第2因子は、「化粧をする

Table 8 容姿に対する劣等感項目の主成分分析結果

項目内容	第1成分	平均 (SD)
2 自分の顔は他の人より魅力的ではない	.95	3.55 (1.16)
3 他の人と比べて自分の顔は見劣りしている	.94	3.50 (1.18)
1 自分の顔は、他の人と比べてかわいくない	.92	3.58 (1.13)
4 周りの人の顔を見ていると、自分の顔に自信がなくなる	.91	3.56 (1.19)
5 今の自分の顔は、自分が求めているものには及んでいない	.78	3.69 (1.10)
寄与率(%)	81.6	
α係数	.94	

Table 9 化粧をする理由項目の因子パターン

項目内容	F1	F2	F3	F4	F5	平均 (SD)
第1因子「他者評価の上昇」(α=.95)						
11 人に綺麗だと思われたいから	.98	.04	-.14	-.07	-.02	3.49(1.17)
1 化粧をすることで人にかわいいと思われたい	.96	-.01	-.14	-.09	-.02	3.53(1.13)
6 化粧をすることで、かわいくなりたいから	.95	-.02	-.12	-.02	-.01	3.61(1.17)
16 化粧をすることで、綺麗になりたいから	.95	-.01	-.05	-.01	-.04	3.54(1.15)
20 化粧をすることで、他人に良く思われたいから	.75	-.01	-.03	.01	.19	3.28(1.17)
27 化粧をすることで、理想の自分に近づくため	.63	.01	.22	-.01	.05	3.26(1.16)
30 おしゃれがしたいから	.57	-.01	.25	.01	.01	3.36(1.17)
32 化粧をすることで、女性らしく見せることができるから	.55	.02	.15	.19	.02	3.39(1.14)
24 化粧をすることで、印象を良くするため	.49	-.12	.13	.48	-.11	3.62(1.06)
15 化粧をすることで、欠点をカバーすることができるから	.48	.07	.06	.18	.01	3.44(1.14)
34 化粧をすると自信がつくため	.47	.07	.43	-.07	-.01	3.23(1.17)
10 化粧をすることで、コンプレックスを隠すため	.47	.04	.04	.11	.03	3.34(1.21)
5 素顔に自信がないから	.39	.01	-.05	.25	.05	3.35(1.22)
第2因子「習慣」(α=.94)						
12 化粧することが習慣になっているから	.01	.97	-.04	-.01	-.04	3.08(1.26)
2 化粧することが日常化しているから	.11	.91	-.10	.02	-.14	3.13(1.27)
7 普段から化粧をしているから	.03	.91	-.02	.00	-.03	3.04(1.24)
21 化粧することが、1日の生活サイクルに入っているから	-.10	.79	.12	-.02	.10	2.88(1.21)
17 化粧するのが当たり前だから	-.06	.76	-.07	.25	.00	3.08(1.21)
33 化粧をしないと落ち着かないから	.03	.39	.24	.06	.15	2.81(1.23)
第3因子「気分の高揚」(α=.91)						
8 化粧するとモチベーションが上がるから	.06	-.02	.88	-.05	-.04	3.29(1.19)
18 化粧をすることで、気持ちを切り替えるため	-.07	-.07	.86	.13	-.02	3.28(1.15)
3 化粧すると気合が入るから	.07	.00	.79	.01	-.08	3.35(1.18)
13 化粧をすることで気持ちを明るくするため	.10	.03	.75	.04	-.01	3.29(1.17)
35 化粧をすることで、雰囲気を変えたいから	.395	-.03	.42	-.01	.04	3.25(1.11)
26 化粧をすると、血色を良く見せることができるから	.16	.05	.30	.26	.08	3.22(1.14)
第4因子「マナー」(α=.83)						
28 身だしなみのため	.08	.06	.05	.74	-.13	3.69(1.05)
25 化粧することが、マナーだと思うから	-.09	.12	.08	.71	-.02	3.44(1.11)
23 他人に会うから	.24	-.05	.04	.67	-.16	3.69(1.17)
31 化粧をしなくてはならないと思うから	-.02	.18	-.08	.60	.16	3.26(1.16)
14 化粧をしないと、周りから浮いてしまうから	-.16	.00	-.04	.49	.45	2.99(1.19)
第5因子「周囲からの影響」(α=.73)						
4 友人がいつも化粧をしているから	.09	-.07	-.06	.04	.75	2.74(1.20)
29 友人に化粧をすすめられたから	.01	-.02	.03	-.22	.75	2.32(1.15)
22 周りの人が化粧をしているから	-.02	-.07	-.15	.47	.61	3.04(1.17)
9 化粧していると周りの人から褒めてもらえるから	.21	.12	.32	-.33	.41	2.59(1.12)
19 肌が荒れているから	.11	.08	.01	.06	.26	2.78(1.20)
因子間相関						
第1因子「他者評価の上昇」	—	.45	.74	.50	.31	
第2因子「習慣」		—	.55	.59	.42	
第3因子「気分の高揚」			—	.44	.31	
第4因子「マナー」				—	.37	
第5因子「周囲からの影響」					—	

ことが習慣になっているから」など、日常的な習慣として化粧をしていると解釈され、研究1の第2因子のうち、「習慣」に関わる項目だけで独立した因子を構成したと考えられるため、「習慣」と命名した。第3因子は「化粧をするとモチベーションが上がるから」など、気持ちを高めるために化粧をしていると解釈され、研究1の第3因子と同様の内容であると考えられるため、「気分の高揚」と命名した。第4因子は、「身だしなみのため」など、他者と会う際のマナーとして化粧をしていると考えられ、研究1の第2因子のうち、「マナー」に関わる項目だけで独立した因子を構成したと考えられるため、「マナー」と命名した。第5因子は、「友人がいつも化粧をしているから」など、周りの人が化粧をしているため、自分も化粧をしていると解釈され、研究1の第4因子と同様の内容であると考えられるため、「周囲からの影響」と命名した。

各因子に.40以上の負荷量を示した項目の α 係数を算出したところ、「他者評価の上昇」が.95、「習慣」が.94、「気分の高揚」が.91、「マナー」が.83、「周囲からの影響」が.73と、十分な内的一貫性が確認された。

そこで、各因子に以上の負荷量を示した項目の平均を算出し、各得点とした。

3.3.3. 化粧品・化粧道具の使用頻度の因子分析と得点化

化粧品・化粧道具の使用頻度18項目について最尤法による因子分析を行ったところ、固有値1.0以上で4因子が抽出された。そこで因子数を4に指定して最尤法・promax回転による因子分析を行ったところ、解釈可能な4因子が抽出された(Table 10)。

第1因子は「アイライナー」など、比較的使用頻度の高い目元に用いる化粧品・化粧道具が高い負荷量を示したことから、「デイリー目元メイク」と命名した。第2因子は「ノーズシャドウ」など、陰影をつけたり強調したりする化粧品・化粧道具が高い負荷量を示したことから、「陰影メイク」と命名した。第3因子は「化粧下地」など、基礎的な化粧品・化粧道具が高い負荷量を示したことから、「デイリーメイク」と命名した。第4因子は「二重まぶた化粧品」など、目元を強調する化粧品・化粧道具が高い負荷量を示したことから、「目元強調メイク」と命名した。

各因子に.40以上の負荷量を示した項目の α 係数を算出

Table 10 化粧品・化粧道具の使用頻度項目の因子パターン

項目内容	F1	F2	F3	F4	平均 (SD)
第1因子「デイリー目元メイク」($\alpha=.84$)					
6 アイライナー	.92	-.07	-.12	.09	2.55(1.50)
7 アイシャドウ	.81	-.01	.06	-.08	2.78(1.47)
5 マスカラ	.72	-.02	-.03	.06	2.42(1.43)
8 アイブロー	.49	.01	.24	.02	2.84(1.61)
第2因子「陰影メイク」($\alpha=.82$)					
16 ノーズシャドウ	.02	.88	-.13	.00	1.38(0.96)
17 ハイライト	.02	.84	-.04	-.09	1.53(1.08)
18 シェーディング	-.08	.69	-.01	.19	1.26(0.79)
4 フェイスパウダー	.17	.33	.28	-.14	2.32(1.53)
13 リップグロス	.07	.23	.22	.11	1.88(1.27)
第3因子「デイリーメイク」($\alpha=.74$)					
1 化粧下地	-.09	-.13	.82	.05	2.83(1.57)
3 ファンデーション	.09	-.12	.67	.04	2.94(1.49)
15 チーク	.29	.10	.46	-.13	2.88(1.48)
14 口紅	.14	.11	.35	.05	2.16(1.39)
2 コンシーラー	-.07	.32	.34	.00	1.80(1.29)
12 色付きリップクリーム	-.10	.17	.19	.10	2.00(1.40)
第4因子「目元強調メイク」($\alpha=.60$)					
10 二重まぶた化粧品	.02	-.09	.03	.57	1.44(1.07)
9 つけまつげ	.04	.23	.02	.49	1.25(0.78)
11 カラーコンタクト	.06	.15	.01	.46	1.36(0.91)
因子間相関					
第1因子「デイリー目元メイク」	—	.50	.70	.23	
第2因子「陰影メイク」		—	.42	.58	
第3因子「デイリーメイク」			—	.09	
第4因子「目元強調メイク」				—	

したところ、「デイリー目元メイク」が.84,「陰影メイク」が.82,「デイリーメイク」が.74,「目元強調メイク」が.60と、ある程度の内的一貫性が確認された。

そこで、各因子に.40以上の負荷量を示した項目の平均を算出し、各得点とした。

3.3.4. 化粧をしたときの気分項目の因子分析と得点化

化粧をしたときの気分項目30項目について、最尤法による因子分析を行ったところ、固有値1.0以上で4因子が抽出された。そこで、因子数を4に指定して、最尤法・promax回転による因子分析を行ったところ、解釈可能な

4因子が抽出された(Table 11)。

第1因子は「明るい気分になる」など、化粧をすることでポジティブで活力に満ちた気分になることを表していると考えられるため、「快活的気分」と命名した。第2因子は「性格が変わった気がする」など、普段とは異なる自分になれた気持ちになれることを表していると考えられるため、「変化の実感」と命名した。第3因子は「上手くいっているかどうか不安になる」など、化粧が自分に合っているかを気にしていることを表していると考えられるため、「不安・懸念」と命名した。第4因子は「落ち着く」など、化粧をすること

Table 11 化粧をしたときの気分項目の因子パターン

項目内容	F1	F2	F3	F4	平均(SD)
第1因子「快活的気分」($\alpha=.97$)					
1 明るい気分になる	.97	-.23	.08	-.03	3.51(1.05)
2 自信がつく	.95	-.17	.05	-.04	3.48(1.08)
3 やる気がでる	.89	-.18	.02	.10	3.35(1.11)
15 モチベーションが上がる	.86	-.03	-.04	.06	3.31(1.13)
8 かわいくなった気がする	.81	.21	.00	-.26	3.33(1.10)
26 前向きになる	.72	.09	-.03	.14	3.19(1.12)
25 気分が高まる	.69	.16	.02	.07	3.18(1.11)
20 綺麗になったと思う	.65	.33	-.09	-.12	3.16(1.14)
19 気が引き締まる	.64	-.02	.00	.19	3.26(1.11)
27 外出したくなる	.63	.10	-.04	.11	3.26(1.15)
14 自分が少し好きになる	.61	.29	-.04	-.02	3.11(1.11)
22 人前に出ても恥ずかしくない	.57	-.04	-.09	.21	3.35(1.12)
13 楽しい気分になる	.57	.28	.03	.02	3.17(1.12)
7 嬉しい気持ちになる	.52	.33	.05	.00	3.11(1.09)
21 活動的になる	.48	.31	-.14	.16	3.03(1.15)
9 人に会いたくなる	.43	.41	-.06	-.02	3.01(1.17)
23 印象が変わった気がする	.42	.41	.05	.00	3.16(1.10)
第2因子「変化の実感」($\alpha=.86$)					
11 性格が変わった気がする	-.22	.85	-.02	.17	2.63(1.13)
17 違う自分になれた気がする	.09	.74	.09	-.02	2.97(1.14)
5 新しい自分がみられたと思う	.15	.68	.09	-.06	2.97(1.11)
29 素颜よりも大きく変化したと思う	.05	.58	.03	.19	2.89(1.16)
第3因子「不安・懸念」($\alpha=.86$)					
24 上手くいっているかどうか不安になる	-.02	-.02	.85	-.01	3.35(1.12)
6 変ではないか気になる	-.14	-.01	.85	-.05	3.34(1.09)
18 化粧が自分に合っているか気になる	.06	-.01	.79	.02	3.38(1.10)
30 他人の評価が気になる	.11	.25	.56	-.07	3.20(1.11)
12 欠点をカバーできているか気になる	.05	.06	.51	.22	3.36(1.12)
第4因子「安心」($\alpha=.89$)					
16 落ち着く	.01	.06	-.05	.81	2.88(1.11)
10 気持ちが安らぐ	.01	.30	-.04	.65	2.80(1.10)
28 気が楽になる	.09	.18	.04	.64	2.97(1.11)
4 安心できる	.38	-.20	.14	.54	3.33(1.11)
因子間相関					
第1因子「快活的気分」	—	.75	.37	.68	
第2因子「変化の実感」		—	.40	.63	
第3因子「不安・懸念」			—	.30	
第4因子「安心」				—	

で気持ちが安定することを表していると考えられるため、「安心」と命名した。

各項目に.40以上の負荷量を示している項目の α 係数を算出したところ、「快活的気分」が.97、「変化の実感」が.86、「不安・懸念」が.86、「安心」が.89と、十分な内的一貫性を示した。

そこで、各項目に.40以上の負荷量を示した項目の平均を算出し、各得点とした。

3.3.5. 年齢群による諸得点の比較

化粧をする理由5得点、化粧品・化粧道具の使用頻度4得点、化粧をしたときの気分4得点、劣等感得点について、年齢群(4:16~18歳, 19~22歳, 23~27歳, 28~30歳)を要因とした1要因分散分析を行った。その結果、化粧をする理由の「習慣」得点、「気分の高揚」得点、「マナー」得点、化粧品・化粧道具の使用頻度の「デイリー目元メイク」得点、「デイリーメイク」得点、「目元強調メイク」得点、化粧をしたときの気分の「安心」得点、「不安・懸念」得点、劣等感得点において、要因の効果が有意であった(Table 12)。

そこで、多重比較(Tukey法)を行ったところ、「習慣」得点、「マナー」得点、「デイリー目元メイク」得点では、16~18歳が他の年齢群よりも得点が低かった。「気分の高揚」得点では16~18歳よりも19~22歳の方が高かった。「デイリーメイク」得点では、16~18歳は他の年齢群よりも得点が低く、また、19~22歳は28~30歳よりも得点が低かった。「目元強調メイク」得点では、16~18歳、19~22歳が他の2つの年齢群よりも得点が高かった。「安心」得点では16~18歳よりも23~27歳や28~30歳の方が得点が高かった。「不安・懸念」得点では、16~18歳が他の年齢群よりも得点が高かった。劣等感得点では、16~18歳の方が28~30歳よりも得点が高かった。

3.3.6. 年齢群ごとの諸変数間の相関

4つの年齢群ごとに、化粧をする理由5得点、化粧品・化粧道具の使用頻度4得点、化粧をしたときの気分4得点、劣等感得点の相関を算出した(Table 13)。

その結果、4年齢群のうち1群のみが有意になっていた、あるいは、有意になっていなかった箇所をカウントしたところ、16~18歳は9ヶ所、19~22歳は3ヶ所、23~27歳は2ヶ所、28~30歳は2ヶ所となっており、16~18歳の諸変数の関連は、他の年齢群とは異なる可能性が示唆された。

3.3.7. 化粧行動が容姿に対する劣等感に及ぼす影響

化粧行動が容姿に対する劣等感に及ぼす影響を検討するため、研究1と同様のモデルを作成し、16~18歳と19~30歳の2群における多母集団同時分析を行った。2群双方のモデルにおいて有意にならなかったパス・共変動を削除し、繰り返し共分散構造分析を行い、すべてのパス・共変動がいずれかのモデルにおいて有意になった時点で、そのモデルを採用した(Fig. 3, Fig. 4)。採用したモデルの適合度指標は、GFI=.986, AGFI=.959, CFI=.996, RMSEA=.020であった。なお、各モデルにおけるそれぞれの得点の劣等感得点への総合効果をTable 14に示した。

まず、「他者評価の上昇」得点は、「快活的気分」得点を媒介として劣等感得点に負の影響を及ぼしていた一方、「不安・懸念」得点を媒介として劣等感得点に正の影響を及ぼしていた。特に16歳~18歳については、直接的に正の影響がみられ、また、「安心」得点を媒介として劣等感得点に正の影響を及ぼしており、全体として劣等感得点に正の影響を示していた。

「習慣」得点は、「不安・懸念」得点を媒介として劣等感得点に正の影響を示し、また、「周囲からの影響」得点は「快

Table 12 年齢群を要因とした諸変数の1要因分散分析結果

	全体 1000名	A.16~18歳 250名	B.19~22歳 250名	C.23~27歳 250名	D.28~30歳 250名	F値 (df=3,996)	多重比較 (Tukey法)
他者評価の上昇	3.43(0.92)	3.42(0.94)	3.51(0.89)	3.33(0.91)	3.43(0.92)	1.74	
化粧理由 習慣	3.04(1.11)	2.48(1.11)	3.24(1.06)	3.17(1.06)	3.28(1.04)	31.21***	A<C・B・D
気分の高揚	3.29(0.99)	3.18(1.01)	3.42(1.00)	3.22(0.99)	3.35(0.96)	3.14*	A<B
マナー	3.41(0.86)	3.00(0.90)	3.49(0.79)	3.53(0.85)	3.62(0.76)	28.23***	A<B・C・D
周囲からの影響	2.67(0.86)	2.61(0.88)	2.76(0.86)	2.66(0.85)	2.67(0.85)	1.43	
化粧品道具 デイリー目元	2.65(1.23)	2.07(1.06)	2.81(1.24)	2.74(1.21)	2.97(1.24)	28.12***	A<C・B・D
陰影	1.39(0.82)	1.32(0.68)	1.47(0.96)	1.39(0.78)	1.39(0.84)	1.41	
デイリー	2.88(1.23)	2.36(1.20)	2.89(1.20)	3.08(1.21)	3.19(1.15)	24.02***	A<B<D, A<C
目元強調	1.35(0.69)	1.44(0.69)	1.44(0.80)	1.27(0.63)	1.26(0.61)	5.28**	D・C<A・B
化粧後気分 快活的気分	3.23(0.90)	3.22(0.91)	3.29(0.92)	3.14(0.89)	3.28(0.88)	1.58	
変化の実感	2.86(0.97)	2.93(0.95)	2.91(1.01)	2.75(0.96)	2.86(0.96)	1.88	
安心	3.00(0.96)	2.86(0.98)	3.10(0.95)	2.93(0.92)	3.09(0.96)	3.85**	A<D・B
不安・懸念	3.33(0.89)	3.51(0.89)	3.28(0.92)	3.24(0.85)	3.27(0.86)	4.92**	C・D・B<A
劣等感	3.58(1.04)	3.74(1.06)	3.58(0.96)	3.57(1.00)	3.42(1.11)	3.89**	D<A

*** $p < .001$, ** $p < .01$, * $p < .05$

「快活の気分」得点を媒介として劣等感得点に負の影響を示したが、いずれも劣等感得点に及ぼす全体的な影響は極めて小さかった。「気分の高揚」得点は、「快活の気分」得点を媒介として劣等感得点に負の影響を及ぼしていた。

「マナー」得点は、「快活の気分」得点や「不安・懸念」得点を媒介として劣等感得点に正の影響を及ぼしていた。特に19～30歳では、「マナー」得点の劣等感得点に及ぼす全体的な影響が大きかった。

なお、化粧品・化粧道具の使用頻度は、化粧をする理由や化粧をしたときの気分、劣等感とはいずれも関連を示さなかった。

4. 考察

本研究の目的は、化粧行動が容姿に対する劣等感に及ぼす影響を明らかにすることであった。研究1では大学生女子を対象として調査を実施し、「欠点の隠匿」を理由として

Table 13 年齢群ごとの諸変数の関連

		化粧道具				他者評価の上昇	化粧理由			周囲からの影響	化粧後気分				劣等感
		デイリー目元	陰影	デイリー	目元強調		習慣	気分の高揚	マナー		快活の気分	変化の実感	安心	不安・懸念	
デイリー目元	A	—	.49***	.65***	.31***	.24***	.50***	.33***	.37***	.23***	.27***	.18**	.37***	.11†	.08
	B	—	.40***	.59***	.32***	.29***	.45***	.28***	.20**	.13*	.26***	.21**	.25***	.03	.00
	C	—	.30***	.57***	.29***	.40***	.46***	.33***	.27***	.24***	.29***	.29***	.23***	.13*	-.06
	D	—	.36***	.55***	.33***	.30***	.34***	.30***	.13*	.18**	.33***	.31***	.31***	.13*	-.09
陰影	A	—	—	.33***	.41***	.03	.24***	.09	.03	.01	.08	.14*	.19***	-.01	.03
	B	—	—	.26***	.59***	.19**	.24***	.20**	.15*	.14*	.19**	.23***	.21**	.10	.02
	C	—	—	.24***	.44***	.23***	.14*	.18**	.09	.19**	.18**	.22***	.19**	.17**	-.08
	D	—	—	.18**	.55***	.13*	.09	.14*	.04	.19**	.20**	.26***	.33***	.02	-.11†
デイリー	A	—	—	—	.15*	.17**	.53***	.21**	.37***	.21**	.17**	.10	.29***	.07	.09
	B	—	—	—	.20**	.22***	.41***	.26***	.23***	.21**	.25***	.23***	.29***	.07	.03
	C	—	—	—	.15*	.24***	.40***	.18**	.27**	.16*	.21**	.14*	.16*	.02	-.15*
	D	—	—	—	.15*	.27***	.39***	.25***	.20**	.26***	.27***	.29***	.33***	.15*	.02
目元強調	A	—	—	—	—	.14*	.27***	.15*	.06	.11†	.12*	.19**	.25***	.03	.09
	B	—	—	—	—	.17**	.12†	.15*	.00	.16*	.16*	.25***	.15*	.09	.01
	C	—	—	—	—	.20**	.18**	.19**	.08	.18**	.18**	.25***	.19**	.07	-.03
	D	—	—	—	—	.17**	.18**	.17**	.11†	.17**	.17**	.21**	.14*	.03	-.06
他者評価の上昇	A	—	—	—	—	—	.34***	.76***	.48***	.39***	.74***	.62***	.52***	.03	.07
	B	—	—	—	—	—	.58***	.76***	.61***	.40***	.73***	.58***	.62***	.51***	.15*
	C	—	—	—	—	—	.57***	.81***	.57***	.39***	.70***	.53***	.57***	.49***	.10
	D	—	—	—	—	—	.49***	.78***	.61***	.36***	.76***	.54***	.55***	.50***	.09
習慣	A	—	—	—	—	—	—	.39***	.56***	.40***	.31***	.32***	.52***	.46***	.16**
	B	—	—	—	—	—	—	.56***	.59***	.36***	.50***	.36***	.54***	.22**	.04
	C	—	—	—	—	—	—	.56***	.66***	.42***	.42***	.32***	.48***	.21**	.05
	D	—	—	—	—	—	—	.49***	.52***	.32***	.42***	.30***	.51***	.21**	.02
気分の高揚	A	—	—	—	—	—	—	—	.39***	.40***	.31***	.32***	.52***	.23***	.04
	B	—	—	—	—	—	—	—	.49***	.32***	.80***	.60***	.68***	.32***	.08
	C	—	—	—	—	—	—	—	.46***	.34***	.74***	.52***	.59***	.40***	-.02
	D	—	—	—	—	—	—	—	.50***	.35***	.82***	.62***	.62***	.38***	-.02
マナー	A	—	—	—	—	—	—	—	—	.56***	.33***	.32***	.45***	.36**	.12†
	B	—	—	—	—	—	—	—	—	.48***	.42***	.28***	.47***	.50***	.25***
	C	—	—	—	—	—	—	—	—	.36***	.32***	.21**	.36***	.32***	.25***
	D	—	—	—	—	—	—	—	—	.29***	.45***	.30***	.42***	.39***	.19**
周囲からの影響	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.35***	.38***	.38***	.26**	.00
	B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.41***	.46***	.45***	.45***	.09
	C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.37***	.45***	.47***	.39***	.03
	D	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.39***	.54***	.44***	.28***	.06
快活の気分	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.77***	.75***	.34***	-.03
	B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.78***	.79***	.41***	-.02
	C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.79***	.77***	.52***	-.08
	D	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.76***	.75***	.45***	.09
変化の実感	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.71***	.42***	.09
	B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.64***	.46***	.01
	C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.74***	.47***	-.04
	D	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.70***	.50***	.09
安心	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.29***	.06
	B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.41***	.12†
	C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.54***	-.01
	D	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.42***	.00
不安・懸念	A	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.43***
	B	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.35***
	C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.34***
	D	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.36***

*** $p < .001$, ** $p < .01$, * $p < .05$, † $p < .10$

注. Aは16～18歳, Bは19～22歳, Cは23～27歳, Dは28～30歳を意味している。また、4年齢群において1群または2群においてのみ有意になっていた、あるいは有意にはなっていない箇所を網掛けをした。なお、有意傾向は「有意にはなっていない」として扱った。

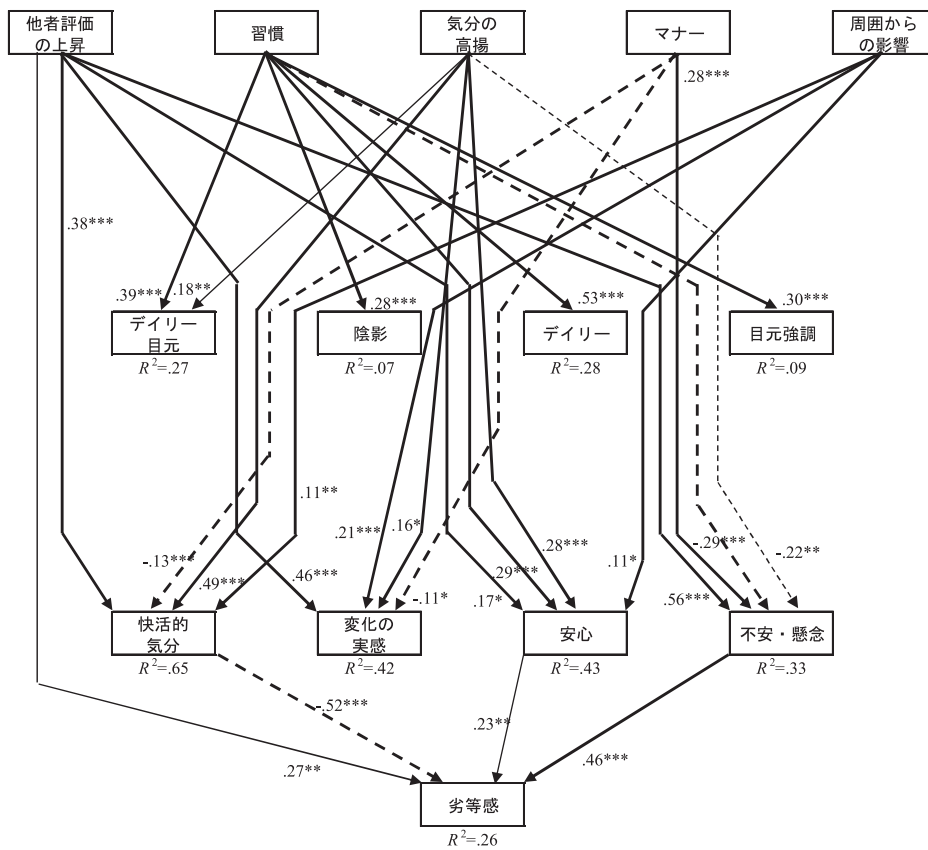


Fig. 3 化粧行動が容姿に対する劣等感に及ぼす影響(16～18歳)

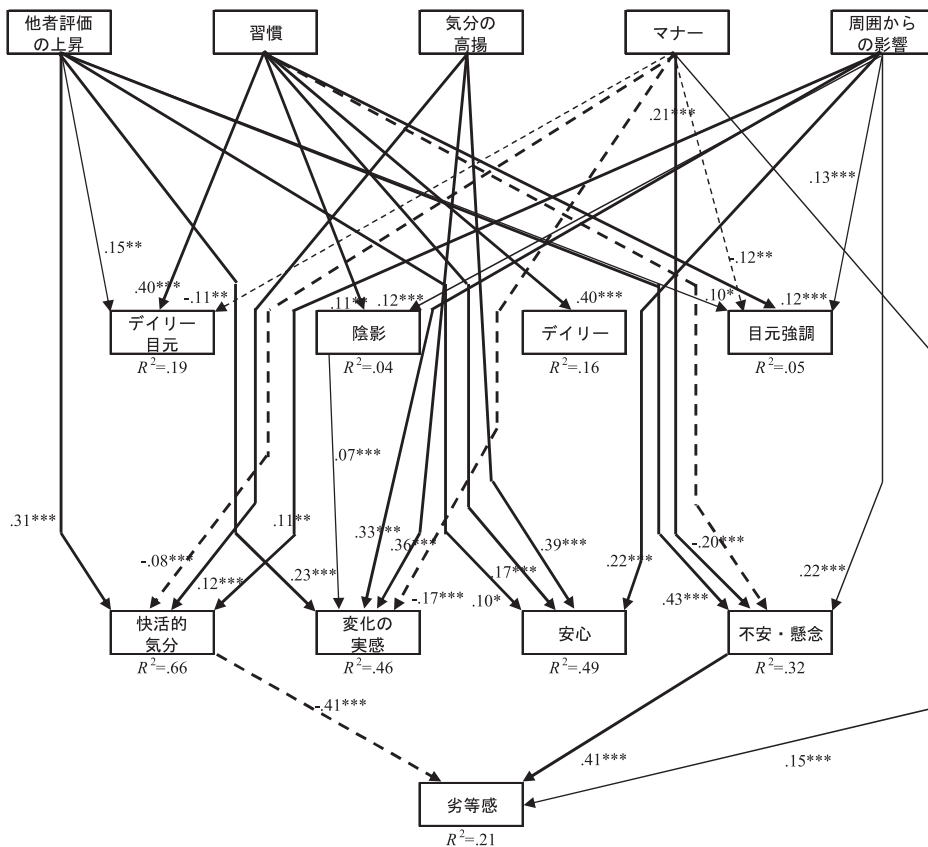


Fig. 4 化粧行動が容姿に対する劣等感に及ぼす影響(19～22歳)

Table 14 2年年齢群における劣等感得点に対する総合効果 (標準化済)

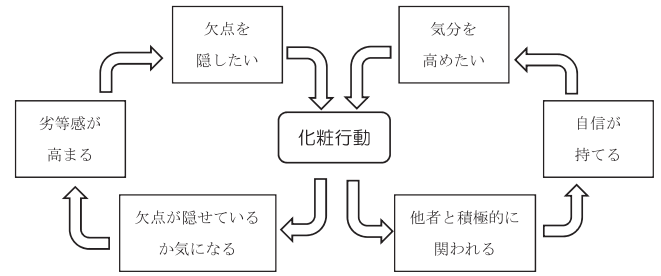
	16~18歳	19~30歳
他者評価の上昇	.36	.15
化粧理由		
習慣	-.06	-.07
気分の高揚	-.29	-.22
マナー	.09	.26
周囲からの影響	.00	.05
化粧道具		
デイリー目元	—	—
陰影	.00	.00
デイリー	—	—
目元強調	—	—
化粧後気分		
快活的气氛	-.52	-.41
変化の実感	—	—
安心	.23	.06
不安・懸念	.46	.41

化粧をすることで、容姿に対する劣等感は強まる一方、「気分の高揚」を理由として化粧をすることで、容姿に対する劣等感は低減することが明らかにされた。また、研究2では、16~30歳の女性を対象として調査を実施し、「他者評価の上昇」(内容としては「欠点の隠匿」も含む；特に16~18歳)や「マナー」(特に19~30歳)を理由として化粧をすることで、容姿に対する劣等感は強まる一方、「気分の高揚」を理由として化粧をすることで、容姿に対する劣等感は低減することが明らかにされた。

菅原¹⁰⁾は、気分を高めたいと思って化粧をすると、実際に気分が高まったように思える“自己の社会的アイデンティティの自覚”について論じている。研究1においても研究2においても、「気分の高揚」が容姿に対する劣等感を低減させていたことから、他者の目を意識せずに、まずは自分が化粧を楽しむ、化粧をすることで気持ちを高揚させようという思いが、結果として劣等感を低減させることにつながると考えられる。

一方、研究1の「欠点の隠匿」や研究2の「他者評価の上昇」、「マナー」は、他者を意識した化粧をする理由であると考えられる。高坂・佐藤¹¹⁾は、青年期における劣等感の規定因モデルを提唱している。そのうち、対自的側面にあたる自己評価の基準について、他者視点優位な自己評価を行うほど、劣等感が強まるとしている。本研究で劣等感を強める理由となっていた「欠点の隠匿」や「他者評価の上昇」、「マナー」はいずれも他者からの視点を意識した理由であり、高坂・佐藤¹¹⁾の他者視点優位に該当すると考えられる。

以上から、化粧をすることによって、容姿の欠点をなくす・隠すという“一次補償”はほとんど生じることなく、“一次補償”のツールとして化粧を用いると、かえって劣等感は強くなってしまふ可能性が示唆された。むしろ、気分を高める、気持ちを明るくするなど気分を高揚させるための



化粧による劣等感増加ループ 化粧による劣等感減少ループ
Fig. 5 化粧による劣等感増加ループと劣等感減少ループ

ツールとして化粧をすることで、他者と積極的に関わられるようになり、自信がもてる(劣等感が低減する)ようになると考えられる(Fig. 5)。

(引用文献)

- 高坂康雅, : 自己の重要領域からみた青年期における劣等感の発達的变化, 教育心理学研究, 56, 218-229, 2008.
- 高坂康雅, : 青年期における容姿・容貌に対する劣等感の解決に関する検討, 日本青年心理学会第16回大会発表論文集, 58-61, 2008.
- 宮城音弥, : 劣等感 その本体と克服, 東京書籍, 1979.
- 松井 豊, 山本真理子, 岩男寿美子, : 化粧の心理的効用, マーケティング・リサーチ, 21, 30-41, 1983.
- 上方美紀, 田頭穂積, : 女子大学生の化粧行動と自己意識との関連性, 教育相談センター年報, 10, 121-132, 2002.
- 飛田 操, : 化粧の個人的効果と対人的効果に関する実証的研究, コスメトロジー研究報告, 3, 145-150, 1996.
- 宇山侑男, 鈴木ゆかり, 互 恵子: メーキャップの心理的有効性, 日本化粧品科学会誌, 14, 163-168, 1990.
- 高坂康雅, 青年期における容姿・容貌に対する劣性を認知したときに生じる感情の発達的变化, 青年心理学研究, 20, 41-53, 2008.
- 高坂康雅, 青年期における容姿・容貌に対する劣性を認知したときに生じる感情と反応行動との関連, 教育心理学研究, 57, 1-12, 2009.
- 菅原健介, 化粧による自己表現, 高木 修監, 大坊郁夫編, : 化粧行動の社会心理学, 北大路書房, 102-113, 2001.
- 高坂康雅, 佐藤有耕, : 青年期における劣等感の規定因モデルの構築, 筑波大学心理学研究, 37, 77-86, 2009.

消費者ニーズの変化と化粧品流通チャネルに関する研究 —日本・中国・イギリスの3か国比較—

同志社大学商学部

佐々木 一郎

Currently, cosmetic marketing channels via the internet or mail orders are steadily increasing. But, little study has been done to investigate the factors affecting the internet or mail order sales channels, especially after controlling for socioeconomic status.

In this study, we analyzed the determinants of cosmetic marketing channels after controlling for socioeconomic variables by using internet survey data, which included 1500 women participants from Japan, China, and England.

We found that age and information source of cosmetic advice were associated with internet or mail order selection in cosmetic sales channels. Further research should examine the association between information source and cosmetic marketing channels for more details.

1. 緒言

1.1. 化粧品のネット通販選択の決定要因に注目することの重要性

化粧品は、人々が美しくなるうえで主要な手段の1つである。そして、美しさと社会経済的要因との関連を分析した先行研究から、美しさが増すことは、高い収入や幸福度と顕著な関連があることが定量的に示されている¹⁻³⁾。化粧品行動や美しさは、経済的な豊かさや幸福度の点からも、重要なファクターの1つであることが考えられる。家計の経済力の高低にかかわらず、より安価により多くの種類のなかから最適な化粧品を消費者が選択できるためには、化粧品流通チャネルの充実が、重要である。

化粧品を購入するサイドの消費者の経済環境に目を向けると、厳しさを増している。長引く経済不況、低収入の非正規雇用・フリーターの増加、経済格差拡大などに多くの消費者が直面している。低所得者が増加する中で、消費者にとって、化粧品の流通チャネルが増えることは、より良い化粧品を、より安価で購入できる可能性が高まることが期待できる。

化粧品メーカーから消費者の手元へ化粧品が届けられるまでの流通チャネルは、届けるための流通コストや、人々のライフスタイルの変化などにあわせて、時代を反映して変化していく。低所得要因の他にも、少子高齢化、ライフスタイル、働き方、結婚観、格差拡大など、女性を取り巻く社会経済環境は、大きな変化し、化粧品の購入チャネルも、

近年、大きな変化をみせている。化粧品は、多くの国々で、インターネットや通販のチャネルのウェイトが大きくなってきている。

なぜ、インターネット・通販は増えているのか、その増加にはどのような利点と問題点があるのか、どのような特徴をもつ人々が選択しているのか、化粧品を非対面販売で購入する際の知覚リスクをどのように工夫して処理しているのか。

化粧品は、実際に当該商品を購入・使用して効果を実感するまで、商品の内容や機能、安全性の商品情報がわかりにくいことに関する知覚リスクが大きい。特に、色などで内容や効果を把握しやすいメイクアップ化粧品よりも、すぐには効果がみえにくいスキンケア化粧品のほうが、初めて購入して使用する場合には、知覚リスクが大きいと考えられる。

そのため、店頭などでの対面販売でなければ、消費者は、当該商品情報の詳細を知ることは難しく、知覚リスクが顕在化しやすい。にもかかわらず、知覚リスクが高い化粧品について、インターネット通販チャネルを選択する人々が増加している。なぜであろうか。どのような要因が、インターネット通販チャネル選択に影響を及ぼしているのだろうか。

ネット通販チャネルを選択している人々は、ネット通販という非対面販売による知覚リスクをどのように処理しているのか、また、化粧品のチャネル選択の影響要因を明らかにすることは、社会経済環境が大きく変化するなか、重要な研究課題の1つであると考えられる。

1.2. 先行研究

生産メーカーから消費者へ商品・サービスが届けられるまでの流通チャネルには、スーパーやデパートなどの対面販売チャネルと、インターネットショッピングや通信販売などの非対面販売チャネルがある。非対面販売チャネルの



Determinants of cosmetic marketing channels in Japan, China and England

Ichiro Sasaki

Faculty of Commerce, Doshisha University

代表格であるインターネットショッピングや通信販売は、書籍やアパレルなどをはじめ、様々な商品・サービス領域でチャネル全体に占める割合を大きく伸ばしてきている。

インターネットショッピングについては、利便性や低価格などのプラス面と、非対面販売であることによる知覚リスクが高いというマイナス面の両面がある。そのため、消費者のタイプや特徴、購入対象商品の知覚リスクの高低等により、インターネットショッピングでの買い物に積極的な消費者と、消極的な消費者に大きく分かれることが先行研究から指摘されている。

Al-Debei et al. [2015] は、消費者がインターネットショッピングを利用するかどうかは、2つの要因によって大きく影響されることを指摘している⁴⁾。1つは、信頼である^{5,6)}。買い物行動・取引における信頼とは、消費者が自ら期待した内容・性能等をもつ商品を、生産者や流通業者がきちんと届けることを、能力と意図の両面において信じていることができることであり、この信頼の有無がインターネットショッピング利用の有無に影響することを示した。いま1つは、知覚された利益であり、インターネットショッピングの利用により、時間や物理的な流通コストがどれだけ節約できたか、利便性が増したかが、その利用度合いに大きく影響することを指摘している。

また、Chang et al. [2016] は、知覚リスクはインターネットショッピング利用を顕著に抑制するように作用することを明らかにしている⁷⁾。知覚リスクとは、消費者が実際に商品を手に取り使用するまでの当初予想していた性能等について、実際の性能等との乖離の可能性や、様々な諸コストである。知覚リスクには、商品に不具合があり消費者が予想・期待していた効果・効能が得られない性能リスク等があり、とりわけ、非対面販売チャネルであるインターネットショッピングにはこの知覚リスクが非常に大きいこと、さらに、知覚リスクはインターネットショッピングの利用にマイナスの影響が生じやすいことが定量的に明らかになっている⁷⁻⁹⁾。

化粧品領域の流通チャネルにおいては、先行研究では、化粧品チャネル選択の影響要因を様々な要因を同時に考慮したうえで分析した研究蓄積は非常に少ない。さらに、ネット通販チャネルに注目してそのチャネル選択理由に焦点を当てた研究も非常に少ない。

そこで本研究では、知覚リスクが大きいスキンケア化粧品に焦点を当て、日本、中国、イギリスの3か国の独自の調査データを用いて、ネット通信販売チャネル選択の決定要因は何かを明らかにすることを研究目的とする。

2. Methods

2.1. データ

本研究は、筆者が収集したWebアンケート調査データ

を用いて分析を行う、クロスセクショナルな研究である。調査票は筆者が作成し、調査実施は外部の調査会社へ委託した。調査対象は、20～69歳の日本、イギリス、中国の女性、各500サンプル、合計1500サンプルである。学生は調査対象から除外している。

2.2. アウトカム変数

本研究のベースとなるWebアンケート調査では、スキンケア化粧品の購入チャネルとして、ドラッグストア、インターネット・通信販売、デパート、専門店、コンビニエンス・ストア、スーパーマーケット、訪問販売、その他のチャネルを回答選択肢とした。

後述する本研究のロジットモデルのアウトカム変数については、これらのチャネルのうち、最も多く利用するチャネルとして、インターネット・通信販売を選択した場合は1、それ以外のチャネルを選択した場合は0を設定した。

2.3. 説明変数

説明変数については、大きく3つあり、人口統計学的要因、社会経済的要因、化粧行動関連要因である。第1に、人口統計学的要因については、年齢は、20～29歳、30～39歳、40～49歳、50～59歳、60～69歳に分類した。社会経済的要因については、経済的余裕は、余裕があると、余裕がないに区分した。雇用形態は、正社員、非正規雇用・パート、自営業・会社経営、無職に区分した。第3に、化粧行動関連要因については、スキンケア化粧品購入の参考情報源は、母親、姉・妹、友人、雑誌、インターネットの情報サイト、ビューティアドバイザーに分類した。スキンケアの1か月の購入金額は、日本は、1000円未満、1000～3000円未満、3000～5000円未満、5000円以上に、中国は、20円未満、20～50円未満、50～100円未満、100円以上に、イギリスは、5ポンド未満、5～10ポンド未満、10～20ポンド未満、20ポンド以上に分類した。スキンケア化粧品購入時のお店・チャネル比較については、よく比較する、やや比較する、あまり比較しない、比較しないに分類した。主観的な美しさは、非常に美しいとやや美しいは美しい、あまり美しくないと全く美しくないは美しくないの2つに分類した。

2.4. 統計分析

本研究では、様々な諸要因を同時に考慮したうえで、スキンケア化粧品チャネル選択に関して、2項ロジットモデルを用いた分析を行う。被説明変数は、スキンケア化粧品のネット・通販チャネル選択の有無であり、最も多く利用するチャネルとして、ネット・通販チャネルが該当する場合は1、それ以外のチャネルが該当する場合は0をとる。また、スキンケア化粧品を購入していないサンプルは、統

計分析から除外している。本研究の分析には、SPSS V.24.0 ソフトウェアを用いた。

3. 結果

表1は、記述統計量を示している。回答者の平均年齢は、日本は44.8歳(SD=13.4)、中国は44.3歳(SD=13.0)、イギリスは44.4歳(SD=13.7)である。スキンケア化粧品の購入チャネルは、日本では、ドラッグストアは43.0%、インターネット・通信販売は30.6%、デパートは6.0%、専門店は5.8%、コンビニエンス・ストアは0.4%、スーパーマーケットは6.4%、訪問販売は1.2%、その他のチャネルは3.0%、購入していないは3.6%である。中国では、インターネット・通信販売は34.2%、デパートは21.0%、イギリスでは、スーパーマーケットは33.8%、インターネット・通信販売は15.0%などとなっている。スキンケアを購入するときが一番よく参考にする情報源については、日本では、母親は3.6%、姉・妹は3.6%、友人11.8%、雑誌10.8%、インターネットの情報サイト57.6%、ビューティアドバイザー12.6%である。中国では、友人40.0%、インターネットの情報サイト31.0%、イギリスでは、インターネットの情報サイト33.0%、友人17.8%などとなっている。スキンケア化粧品を購入するとき、1つのお店・チャネルだけでなく、複数のお店・チャネルを比較するかどうかについては、日本では、よく比較するは12.4%、やや比較するは33.0%、あまり比較しないは32.2%、比較しないは22.4%である。よく比較する、やや比較するは、それぞれ、中国では、29.2%、52.4%、イギリスでは、26.0%、36.2%である。

表2は、ネット・通販チャネル選択に関するロジット推定結果を表示している。オッズ比が1よりも大きい場合、当該説明変数は、ネット・通販チャネル選択の確率が高いことを示している。第1に、人口統計学的要因については、ネット・通販チャネルを選択する確率は、20～29歳を基準とした場合、日本では、30～39歳は4.0倍、40～49歳は5.8倍、50～59歳は13.9倍、60～69歳は9.2倍である。ネット・通販チャネルの利用は、20代が最も低く、年齢が高くなるほど高くなり、60代では少し落ち込む傾向がある。中国、イギリスでは、逆に、20代、30代の若年層で、ネット・通販チャネルを選択する傾向がある。

第2に、社会経済的要因については、ネット・通販チャネルを選択する確率は、経済的余裕がない場合を基準とした場合、経済的余裕がある場合は、日本では0.74倍、中国では0.77倍、イギリスでは0.90倍であり、統計的には有意ではないものの、経済的余裕がある場合低い傾向がある。第3に、化粧行動要因については、ネット・通販チャネルを選択する確率は、スキンケア化粧品を購入するときが一番よく参考にする情報源については、ビューティアド

バイザーを基準にする場合、インターネットの情報サイトは、それぞれ、日本では16.1倍、中国では5.4倍、イギリスでは2.5倍高い。日本では、雑誌は6.6倍、友人は6.4倍高い。中国では、母親のケースでは5.2倍高い。スキンケアの1か月の購入金額については、日本では、1000円未満を基準にすると、1000～3000円未満は2.6倍、3000～5000円未満は3.2倍、5000円以上は7.5倍であり、購入金額が高い人々ほど、ネット・通販チャネルを選択する傾向は顕著であった。スキンケア化粧品購入時のお店・チャネル比較については、有意な差はみられなかった。

4. 考察

本研究の分析の結果、日本、中国、イギリスの女性サンプルを用いて、様々な要因を考慮したうえで、化粧品のネット・通信販売チャネル選択は、年齢面については、日本ではより高年齢であること、中国とイギリスでは逆に低年齢であること、また、スキンケアを購入するときが一番よく参考にする情報源がインターネットの情報サイトであること、日本では雑誌や友人、中国では母親のケースで、高い傾向があることが示された。いっぽう、購入時のチャネル比較については、有意な関連はみられなかった。

日本において購入金額が大きい人々ほどネット・通販チャネルの割合が顕著に高い理由は、購買経験が豊富であること、購入の絶対的規模が大きいことからより割安のネット・通販チャネル購入のメリットもより大きくなることのインセンティブが働いていることなどが考えられる。

本研究のオリジナルな点は、2点ある。第1は、これまで、諸要因を同時に考慮したうえで、スキンケア化粧品のネット・通販チャネルの関連要因を明らかにしたことである。第2に、その影響要因の影響の程度を、調査データから定量的に測定したことである。

本研究の限界点としては、クロスセクショナルなデータを用いているため、スキンケア化粧品のネット・通販チャネルの関連要因について、その因果関係については明らかになっていない点である。

5. 総括

近年、化粧品の購入チャネルについて、インターネット・通信販売の占める割合は増加している。だが、化粧品のネット・通信販売チャネル選択の影響要因について、諸要因を考慮した国際比較分析の先行研究は、研究蓄積が少ない。

そこで、本研究では、筆者が収集したデータを用いて、スキンケア化粧品購入のネット・通信販売チャネル選択に関する、クロスセクショナルな分析を行った。日本、中国、イギリスの女性1500サンプルのデータを用いて、諸要因を考慮したうえで、ロジットモデルによる分析を行った。

化粧品のネット・通信販売チャネル選択については、様々

表1 回答者の記述統計量

	日本 (N=500)		中国 (N=500)		イギリス (N=500)	
	N=500	%	N=500	%	N=500	%
年齢						
20-29歳	100	20.0	100	20.0	100	20.0
30-39歳	100	20.0	100	20.0	100	20.0
40-49歳	100	20.0	100	20.0	100	20.0
50-59歳	100	20.0	100	20.0	100	20.0
60-69歳	100	20.0	100	20.0	100	20.0
経済的余裕						
余裕がある	231	46.2	358	71.6	265	53.0
余裕がない	269	53.8	142	28.4	235	47.0
雇用形態						
正社員	102	20.4	309	61.8	202	40.4
非正規雇用・パート	146	29.2	41	8.2	119	23.8
自営業・会社経営	23	4.6	27	5.4	28	5.6
無職	229	45.8	123	24.6	151	30.2
主な化粧品購入チャネル選択 (スキンケア)						
ドラッグストア	215	43.0	40	8.0	111	22.2
インターネット・通信販売	153	30.6	171	34.2	75	15.0
デパート	30	6.0	105	21.0	72	14.4
専門店	29	5.8	74	14.8	32	6.4
コンビニエンス・ストア	2	0.4	13	2.6	7	1.4
スーパーマーケット	32	6.4	59	11.8	169	33.8
訪問販売	6	1.2	0	0.0	11	2.2
その他のチャネル	15	3.0	21	4.2	12	2.4
購入していない	18	3.6	17	3.4	11	2.2
化粧品購入の参考情報源 (スキンケア)						
母親	18	3.6	15	3.0	74	14.8
姉・妹	18	3.6	66	13.2	28	5.6
友人	59	11.8	200	40.0	89	17.8
雑誌	54	10.8	23	4.6	50	10.0
インターネットの情報サイト	288	57.6	155	31.0	165	33.0
ビューティアドバイザー	63	12.6	41	8.2	94	18.8
化粧品購入金額/月々 (スキンケア)						
日本:						
1000円未満	167	33.4	-	-	-	-
1000~3000円未満	190	38.0	-	-	-	-
3000~5000円未満	66	13.2	-	-	-	-
5000円以上	59	11.8	-	-	-	-
購入していない	18	3.6	-	-	-	-
中国:						
20元未満	-	-	29	5.8	-	-
20~50元未満	-	-	82	16.4	-	-
50~100元未満	-	-	100	20.0	-	-
100元以上	-	-	272	54.4	-	-
購入していない	-	-	17	3.4	-	-
イギリス:						
5ポンド未満	-	-	-	-	142	28.4
5~10ポンド未満	-	-	-	-	140	28.0
10~20ポンド未満	-	-	-	-	130	26.0
20ポンド以上	-	-	-	-	77	15.4
購入していない	-	-	-	-	11	2.2
複数の実店舗・ネット通販の比較						
よく比較する	62	12.4	146	29.2	130	26.0
やや比較する	165	33.0	262	52.4	181	36.2
あまり比較しない	161	32.2	66	13.2	108	21.6
比較しない	112	22.4	26	3.2	81	16.2
主観的な美しさ						
非常に美しい	8	1.6	19	3.8	23	4.6
やや美しい	149	29.8	300	60.0	186	37.2
あまり美しくない	261	52.2	166	33.2	224	44.8
全く美しくない	82	16.4	15	3.0	67	13.4

表2 スキンケア化粧品のネット通販チャンネル選択のロジット推定結果

	日本 (N=482)		中国 (N=483)		イギリス (N=489)	
	オッズ比	95% CI	オッズ比	95% CI	オッズ比	95% CI
年齢(参照：20-29歳)						
30-39歳	4.00	1.62-9.89	0.75	0.41-1.39	0.52	0.23-1.15
40-49歳	5.84	2.38-14.33	0.76	0.41-1.41	0.56	0.25-1.24
50-59歳	13.93	5.63-34.45	0.43	0.21-0.88	0.66	0.30-1.45
60-69歳	9.17	3.61-23.32	0.22	0.09-0.54	0.42	0.17-1.04
経済的余裕(参照：余裕がない)						
余裕がある	0.74	0.47-1.18	0.77	0.48-1.23	0.90	0.53-1.55
雇用形態(参照：正社員)						
非正規雇用・パート	1.27	0.64-2.51	1.13	0.51-2.47	1.16	0.59-2.30
自営業・会社経営	0.61	0.16-2.28	0.47	0.17-1.27	0.73	0.19-2.81
無職	1.15	0.61-2.20	1.21	0.61-2.40	1.53	0.78-2.99
化粧品購入の参考情報源(参照：ビューティアドバイザー)						
母親	2.65	0.24-29.27	5.17	1.18-22.65	1.16	0.43-3.13
姉・妹	3.29	0.61-17.83	1.47	0.48-4.48	0.67	0.13-3.38
友人	6.36	1.94-20.78	2.07	0.79-5.42	1.12	0.43-2.88
雑誌	6.60	1.96-22.22	1.91	0.50-7.25	0.56	0.14-2.20
インターネットの情報サイト	16.10	5.51-47.07	5.37	2.04-14.14	2.48	1.14-5.39
化粧品購入金額/月平均						
日本：(参照：1000円未満)						
1000～3000円未満	2.59	1.51-4.45				
3000～5000円未満	3.15	1.56-6.37				
5000円以上	7.52	3.31-17.07				
中国：(参照：20元未満)						
20～50元未満			2.26	0.78-6.59		
50～100元未満			2.76	0.97-7.88		
100元以上			1.29	0.48-3.48		
イギリス：(参照：5ポンド未満)						
5～10ポンド未満					1.91	0.93-3.92
10～20ポンド未満					0.99	0.45-2.17
20ポンド以上					1.66	0.72-3.82
複数チャンネルの比較検討(参照：よく比較する)						
やや比較する	0.92	0.42-2.02	0.66	0.42-1.05	0.50	0.25-0.96
あまり比較しない	1.01	0.46-2.22	0.40	0.20-0.82	0.76	0.35-1.61
比較しない	1.00	0.43-2.34	0.32	0.08-1.32	0.62	0.26-1.49
主観的な美しさ(参照：美しくない)						
美しい	1.06	0.65-1.74	0.92	0.59-1.44	0.76	0.42-1.36

な要因を考慮したうえで、年齢要因、スキンケア購入時の一番よく参考にする情報源などの要因が顕著に関連していることが明らかになった。購入時のチャネル比較については、有意な関連はみられなかった。

(引用文献)

- 1) John Karl Scholz and Kamil Sicinski, “Facial attractiveness and lifetime earnings: Evidence from a cohort study” ,*Review of Economics and Statistics*, Volume 97, Issue 1, pp.14-28, 2015.
- 2) Hamermesh D.S. and Abrevaya J., “Beauty is the promise of happiness?” , *European Economic Review*, Vol.64, pp.351-368, 2013.
- 3) Mobius M.M. and Rosenblat T. S., “Why Beauty matters” , *American Economic Review*, Volume 96, Issue 1, pp.222-235, 2006.
- 4) Al-Debei, M.M., Akroush, M.N.and Ashouri, M.I., “Consumer attitudes towards online shopping: The effects of trust, perceived benefits, and perceived web quality” ,*Internet Research*, Vol.25,Issue 5, pp. 707-733, 2015.
- 5) McKnight, D.H., Choudhury, V., and Kacmar, C., “Developing and validating trust measures for e-commerce: An integrative typology” , *Information Systems Research*, Vol. 13, Issue 3, pp.334-359, 2002.
- 6) Gefen, D., Karahanna, E. and Straub, D.W., “Trust and tam in online shopping: AN integrated model” , *MIS Quarterly: Management Information Systems*, Vol.27, Issue 1, pp.51-90, 2003.
- 7) Chang, H.H. ,Fu, C.S., and Jain, H.T., “Modifying UTAUT and innovation diffusion theory to reveal online shopping behavior: Familiarity and perceived risk as mediators” ,*Information Development*, Vol.32, Issue 5, pp.1757-1773, 2016.
- 8) Faroughian, F.F.,Kalafatis, S.P.,Ledden, L.,Samouel, P. and Tsogas, M.H., “Value and risk in business-to-business e-banking” ,*Industrial Marketing Management*, Vol.41, Issue 1, pp. 68-81, 2012.
- 9) Bart, Y., Shankar, V., Sultan, F. and Urban, G.L., “Are the drivers and role of online trust the same for all web sites and consumers? A large-scale exploratory empirical study” ,*Journal of Marketing*, Vol.69, Issue 4, pp.133-152, 2005.

バイオミメティック触覚センシングシステムによる化粧料の使用感評価

山形大学大学院理工学研究科

野々村 美宗

Nonlinear phenomena on the soft material surface are one of the most exciting topics of chemical physics. However, only a few reports exist on the friction phenomena under accelerated movement, because friction between two solid surfaces is considered a linear phenomenon in many cases. We aim to investigate how nonlinear accelerated motion affects friction on solid surfaces. In the present study, we evaluate the frictional forces between two polytetrafluoroethylene (PTFE) resins using an advanced friction evaluation system. On PTFE surfaces, the normalized delay time δ , which is the time lag in the response of the friction force to the accelerated movement, is observed in the pre-sliding friction process. Under high-velocity conditions, kinetic friction increases with velocity. Based on these experimental results, we propose a two-phase nonlinear model including a pre-sliding process (from the beginning of sliding of a contact probe to the establishment of static friction) and a kinetic friction process. The present model consists of several factors including velocity, acceleration, stiffness, viscosity, and vertical force. The findings reflecting the viscoelastic properties of soft material is useful for various fields such as in the fabrication of clothes, cosmetics, automotive materials, and virtual reality systems as well as for understanding friction phenomena on soft material surfaces.

1. 緒言

触覚による物質認知や感情喚起のプロセスは、ヒトとのコミュニケーションが求められるロボットや情報端末、バーチャルリアリティーの開発に欠くことができないが、これまでは、皮膚に加わる力学・熱刺激を摩擦計や熱量計を用いて解析するに止まっていた。しかし、これらの方法では、「なめらか感」「しっとり感」などの繊細で多様な感覚が生まれるメカニズムを説明することはできなかった。

われわれは、ヒトが持つ触覚増強の仕組みを模倣しきれなかったことがその一因と考える。第1の仕組みは皮膚の階層構造である。指先の皮膚表面は、指紋のような数百 μm スケールの凸凹の中に数十 μm スケールの角質細胞が存在、汗や皮脂も介在して皮膚に加わる振動刺激を増強する。第2の仕組みは触行動の非線形性である。ヒトが触れた瞬間から、運動速度や垂直力が緩やかに増大、ある極大を経て減少する、正弦波で近似できるダイナミックな刺激が皮膚に加わり続けることで、短時間に多様な力学情報の収集が可能になっている。

そこで、これらのヒトの感覚増強の仕組みを取り入れた『バイオミメティック触覚センシングシステム』を開発、触覚という心理現象を物理的観点から理解したうえで、化粧品およびその関連材料を評価、化粧品の塗り心地を定量

化する。本研究では、まず、触行動の非線形性を模倣するために、正弦運動を行う往復摩擦評価装置を用いて、2枚のポリテトラフルオロエチレン (PTFE) 樹脂間で起こる摩擦を系統的に評価し、非線形運動が固体表面における摩擦現象に及ぼす影響を考察した。これらの検討によって正弦運動における速度や垂直力が摩擦力に及ぼす影響を系統的に解析し、ソフトマテリアル表面における摩擦現象の基本モデルを提案することができた。次に、ファンデーションを肌に塗る際に用いられる化粧用スポンジに着目し、市販の化粧用スポンジでウレタン製人工皮膚を擦った時の摩擦特性を評価した。また、市販の化粧用スポンジで前腕を擦った時の触感と好感度を官能評価によって明らかにし、スポンジの摩擦特性と触感の関係を明らかにした。

2. 方法

正弦運動を行う往復摩擦評価装置を用いて摩擦力を評価した。Fig. 1に装置の写真及び概要を示す。正弦運動は、偏芯した円板を回転させてヨークを往復運動させる機構により実現した。さらに、接触子の内部に小型3軸加速度センサが装着されており、接触子に加わる接線方向及び法線方向の加速度を評価できる。下側に加わる力学刺激は、2個のロードセルにより接線方向及び法線方向の応力をセンシングする。2枚のポリテトラフルオロエチレンテープ(以後PTFE)間の摩擦力を評価した。正弦運動時の速度 V は、振幅 A 、角速度 ω 、時間 T を用いて以下の(1)式で表される。

$$V=A\omega\cos\omega T \quad (1)$$

A は14.5 mm、 ω は0.01、0.1、1.0、2.1 rad s⁻¹、垂直荷重 W は0.98、1.47、1.96、2.45 Nとした。

一方、ファンデーションの塗布プロセスの再現するために、5種類の化粧用スポンジを用いてウレタン製人工皮膚



Tactile evaluation of cosmetic products using biomimetic tactile evaluation system

Yoshimune Nonomura
Yamagata University

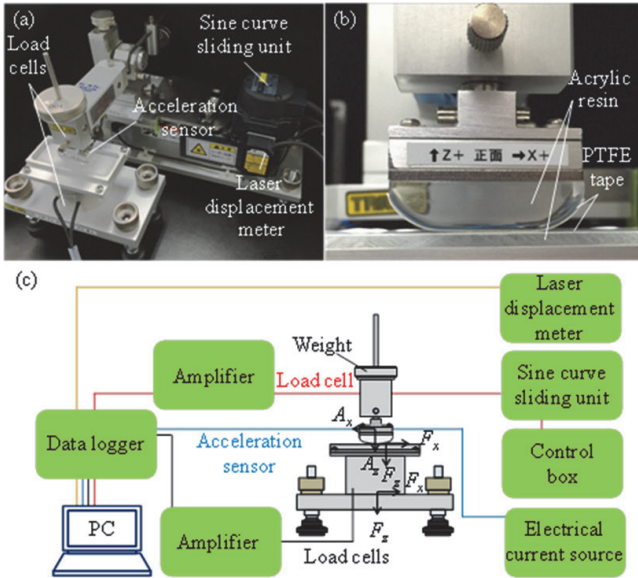


Fig. 1 Sinusoidal-movement sliding system. (a) Overall view, (b) contact probe of acrylic resin covered with PTFE tape, (c) conceptual diagram.

を擦った。5種類のスポンジのうち、**a**、**b**、**d**はポリウレタン製、**c**はニトリルブタジエンゴム製、**e**はスチレンブタジエンゴム製である。

3. 結果と考察

3.1. 摩擦プロファイル

Fig. 2に正弦運動摩擦評価装置で2枚のPTFEテープを擦った時の典型的な摩擦パターンを示す。ここで T は時間、 T_0 は接触子の往復にかかる時間である。試料を角速度 0.1 rad s^{-1} 、垂直荷重 0.98 N で擦った時、摩擦力は運動開始直後から急激に上昇し、 $T/T_0 = 0.02$ で 0.10 N の静摩擦力のピークを示した後、一定の動摩擦力 (0.07 N) を示した。Fig. 3に摩擦係数と速度の関係を示す。角速度 $0.01 \sim 2.1 \text{ rad s}^{-1}$ のすべての条件において、接触子が滑り出し直後に速度の上昇とともに一気に摩擦力が上昇するすべり前摩擦過程を経て静摩擦力に達した後、緩やかに速度依存性の小さい動摩擦過程に移行した。往復運動を行うと、逆方向に同程度の摩擦力が発生し、閉じたループが描かれた。この滑り前摩擦過程においては、往路と復路の間でずれが生じるヒステリシスが観察された。このヒステリシスはテフロン表面では接触子の運動に対して摩擦力が遅れて応答することを意味している。動摩擦過程のプロファイルは、角速度が 0.01 、 0.1 rad s^{-1} の時、摩擦係数は速度に依存せず一定だったが (Fig. 3(a), (b))、角速度が 1.0 、 2.1 rad s^{-1} の時、摩擦係数は速度に依存し、大きくなった (Fig. 3(c), (d))。すなわち、 2.1 rad s^{-1} の時、静摩擦直後 $V = 5.78 \text{ mm s}^{-1}$ で 0.10 N の動摩擦力が観察された後、速度の最大値 (30.3 mm s^{-1}) で 0.12 N まで上昇し、その

後 $V = 0 \text{ mm s}^{-1}$ で 0.04 N まで減少した。つまり、速度の速い条件では、動摩擦係数が速度に伴って増加する依存性が観察された。

この滑り前摩擦過程で接触子の動きに対して摩擦力が遅れる位相差 δ をFig. 4に示す。 δ は摩擦速度に依存し、速度が速い時に小さくなった。すなわち、速度 $V = 0.01 \sim 1.0 \text{ rad s}^{-1}$ の時、 $\delta = 0.012 \sim 0.016$ だったのに対し、 $V = 2.1 \text{ rad s}^{-1}$ の時、 $0.008 \sim 0.011$ だった。さらに、 δ は垂直荷重にも依存した。 $V = 0.1 \text{ rad s}^{-1}$ 、 $W = 0.98 \text{ N}$ の時 $\delta = 0.012$ だったが、 2.45 N では $\delta = 0.016$ だった。

3.2. ストライベック曲線

運動条件が摩擦力に及ぼす影響を俯瞰的に解析するために、摩擦係数とゾンマーフェルト数 ($S = \eta \times V/W$, η = 粘度、 V = 速度、 W = 垂直荷重) の関係をストライベック曲線に示す (Fig. 5)。この時、粘度は空気 (25°C) の粘度 $\eta = 18.2 \times 10^{-6} \text{ Pa s}$ とした。速度・垂直荷重によって、動摩擦過程に変化が現れた。 $S = 1.0 \times 10^{-11} \sim 10^{-6} \text{ m}^{-1}$ の時、動摩擦係数は約 0.07 で一定だったが、 S が $1.0 \times 10^{-6} \text{ m}^{-1}$ 以上になると S の増加と共に動摩擦係数も大きくなり、 $S = 2.2 \times 10^{-4} \text{ m}^{-1}$ では 0.14 に達した。すなわち、速度の遅い条件では、動摩擦の過程で摩擦係数はほとんど変化しないが、速度の速い条件では、流体潤滑のような速度に依存した摩擦係数の増加が観察された。

3.3. ソフトマテリアル表面における摩擦現象の粘弾性モデル

本研究で行った正弦運動下における摩擦評価によって、粘弾性を持つソフトマテリアルに特徴的な2つの現象が観察された。1つ目は、接触子の動きに対して摩擦力が遅れて現れる位相差 δ の発生、2つ目はゾンマーフェルト数 S の増加にともなう動摩擦係数の増加である。金属や金属酸化物のような弾性的なハードマテリアル表面では接触子が滑り出すと同時に摩擦力が発生するが、PTFEのような粘弾性のソフトマテリアルは、滑り出す時に変形するため、摩擦力が運動に対して遅れて発生する。また、粘弾性体のずり応力のうち粘性抵抗の因子はずり速度に比例して増加することが、 S の増加にともなう動摩擦係数の増加に対応している。

これらの特性に基づいて粘弾性体表面における摩擦のモデルを構築した (Fig. 6)。ここでは、質量 M の物体を垂直荷重 N を加えながら速度 $V = dx/dt$ (x = 位置、 t = 時間) で動かした時に発生する摩擦力を F_f 、 z をひずみ距離とする。従来のモデルでは、基盤は弾性率 k_s のばねによって固定されており、基盤上の物体が運動すると k_s に対応した摩擦力が発生するものと考えられてきた¹⁸⁾。本研究では、さ

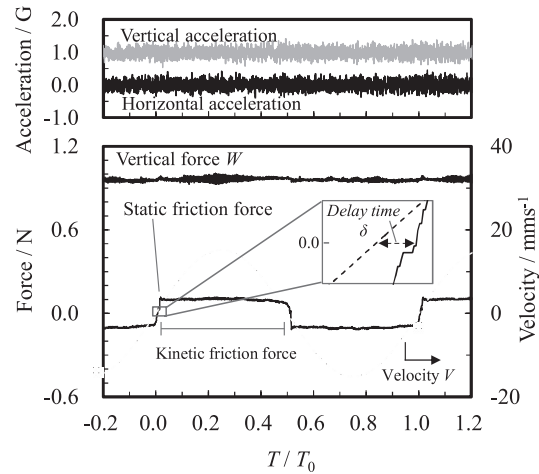


Fig. 2 Temporal change in the friction force, the velocity, the vertical force and the acceleration at an angular velocity $\omega = 0.1 \text{ rad s}^{-1}$, and the vertical force $W = 0.98 \text{ N}$.

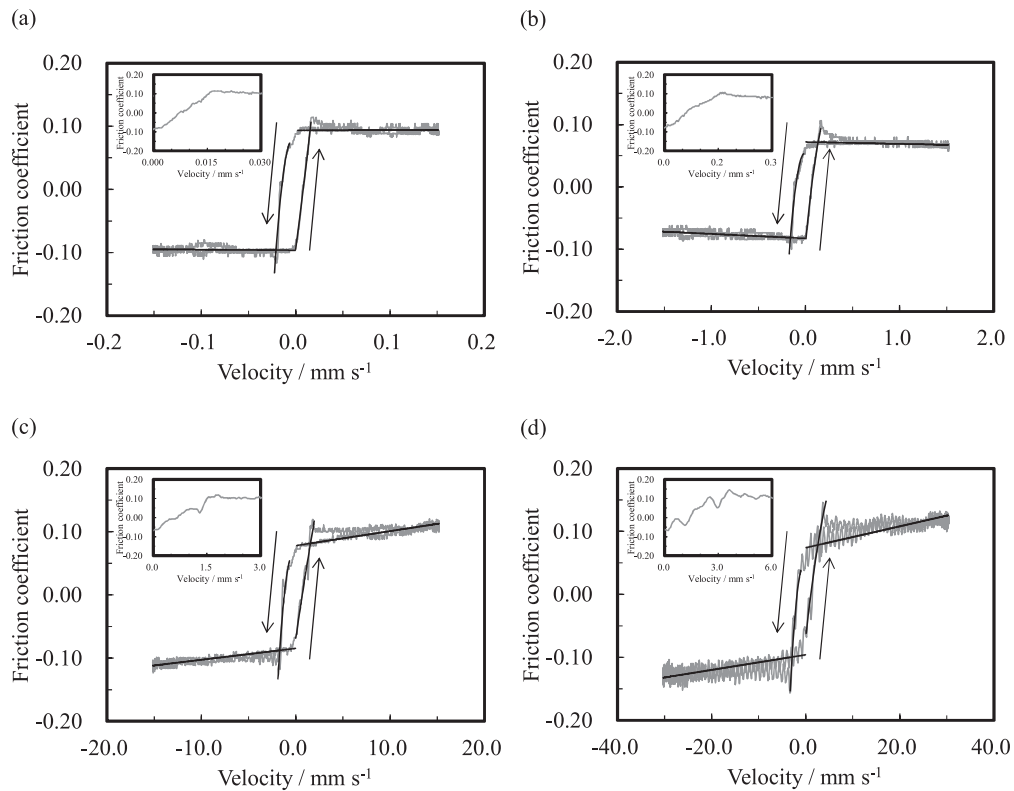


Fig. 3 The relation between the friction coefficient and the velocity based on typical experimental results (gray line) and the proposed model (black line) : (a) $\omega = 0.01 \text{ rad s}^{-1}$, $W = 0.98 \text{ N}$, (b) $\omega = 0.1 \text{ rad s}^{-1}$, $W = 0.98 \text{ N}$. (c) $\omega = 1.0 \text{ rad s}^{-1}$, $W = 0.98 \text{ N}$, (d) $\omega = 2.1 \text{ rad s}^{-1}$, $W = 0.98 \text{ N}$.

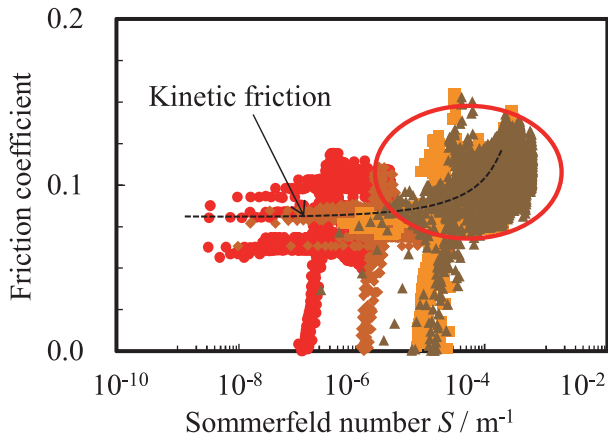


Fig. 5 Dependence of the friction coefficient on the Sommerfeld number S . $\omega=0.01 \text{ rad s}^{-1}$ (●), 0.1 rad s^{-1} (◆), 1.0 rad s^{-1} (■), 2.1 rad s^{-1} (▲).

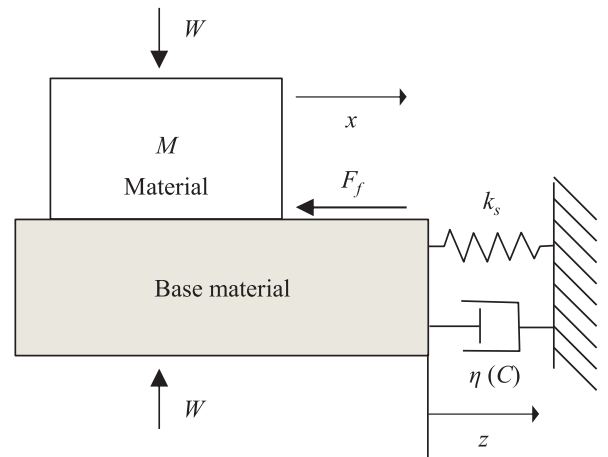


Fig. 6 Friction model of a soft material.

らに粘性率 η (粘性摩擦係数 C) のダッシュポットを加えることで、位相差 δ の発生などの粘性的応答を考慮することを可能にした。

本研究で得られた摩擦パラメーターの幾つかの特徴的な挙動は、この粘性的なダッシュポットの存在によって説明できる。ソフトマテリアル表面で現れた位相差 δ は、摩擦速度が速いと小さく、垂直荷重が大きいと大きくなった。この速度依存性は、接触面における凝着の切れ方が速度によって変化するために起こる¹⁶⁾。すなわち、速度が速い時は弾性的に振る舞い、力の応答が素早く、速度が遅い時は粘性的に振る舞い、力の応答が遅くなる。また、垂直荷重が大きくなると真実接触面積はそれに比例して大きくなる。接触面積が大きくなるにつれ、粘弾性体の粘性の影響が強くなるため、摩擦力の応答が遅くなったと思われる。ストライバック曲線において、速度の速い範囲で摩擦係数が増加したのも、粘性に起因し速度に依存して粘性摩擦力が生じる¹⁷⁾。従って、速度の速い範囲では、粘性摩擦が顕著に現れたため、動摩擦係数が速度に依存して増加したと思われる。

3.4. ファンデーション塗布過程における触感と摩擦

5種類の化粧用スポンジ **a**~**e** について、女性20名を被験者として好感度と触感に関する官能評価を行った。各スポンジの好感度に有意な差は見られなかったが、触感に関してクラスター分析をしたところ幾つかのグループに分類できた。全てのスポンジはMoist感が強く、しっとりしていた。**a**の特徴的な触感 Soft 感、Slippery 感で、発現率

はそれぞれ85%、70%だった。**e**の特徴的な触感 Rough 感、Dry 感で、発現率はそれぞれ20%、40%だった。この結果に基づいて、「すべすべ」、「ふわふわ」する Soft-Slippery group (**a**, **d**)、「ざらざら」、「ぱさぱさ」する Rough-Dry group (**c**, **e**)、突出した特徴がみられない group の3グループに分類した。これらのグループごとの触感の違いは、セル壁の厚さと表面張力、摩擦変化量によって説明できた。セル壁が厚く、表面張力・摩擦変化量が大きい時、Slippery 感が弱く、Rough 感が強く感じることが示された。また Rough 感が強い時は Soft 感が弱くなった。Dry 感の強いスポンジに触れた時は多くの場合「滑らかでない」という Rough 感と関係の深い言葉が選ばれたことから、Rough 感の強さが Dry 感を強めたものと考えられる。

4. 総括

我々は、ソフトマテリアルの動的運動下における摩擦現象を理解するために、PTFE間の非線形運動下における摩擦実験を行い、すべり前摩擦過程では速度と摩擦力の応答の差 δ を、動摩擦過程では粘性抵抗由来の摩擦係数の増加を見出した。これらの特性は摩擦の基盤がばねとダッシュポットで固定された粘弾性摩擦モデルを用いて定性的に説明することができた。さらに、この評価システムを化粧料スポンジの触感の評価に応用展開した。本研究で提案されたソフトマテリアルの動的摩擦現象のモデルは皮膚表面におけるヒトや動物の触覚認知・歩行プロセスから活断層における地震の発生プロセスまで様々な摩擦現象を理解するうえで有用である。

女性の美における訴求表現に関する研究

静岡文化芸術大学文化政策学部国際文化学科

広瀬 英史

There are two purposes of this study. The first is to analyze the appeal expressions of commercials advertising cosmetics. The second purpose is to describe the expressions used to convey the "beauty" of women historically. "Beauty" has been evaluated in various ways such as features, figure, clothes, make-up and hairstyles. Over time, these methods of evaluation have been recognized as important and valuable. The sense of values of each time period has been reflected in the "beauty" of women and has formed a part of the culture. Similarly, the schema of a language affects our world view and cognition. The appeal of advertising expressions is that it uses this schema very well. However, it will become a new appealing when advertising expressions depart from schema.

This study investigated about 8. The first purpose achievements by creating the Database.

In this report, it further progress on my interim report. It analyzes "beauty" of Women from the viewpoint of Vocabulary, Idiomatic Expressions, Collocation, WAKA in "KOKA TAIKAN", SALES COPY and ADVERTISEMENT EXPRESSION.

The result indicates one of image schema of "beauty" of Women.

1. 緒言

本研究の目的は2点ある。1点目は化粧品のCM・広告の訴求表現を分析すること、2点目は女性の「美」に関する表現を歴史的に記述することである。

女性の「美」は、顔立ち、体型、衣服、化粧、髪型等、様々な側面から評価され、価値付けられてきた。女性の「美」にはその時代の価値観が反映され、一つの文化が形成されてきたと言える。

ことばのスキーマは我々の世界観やものの見方に影響を与える。CM表現の魅力は、このスキーマを上手く利用するところにある。しかし、一方で、既存のスキーマを打ち破ることができたときに、新たな魅力ある表現が生まれる。

2. 調査(資料調査の報告)

以下の資料から用例を収集した。

①DVD-ROM『国歌大観』¹⁾からの用例収集

2015年度調査

「眉」「目」「睫」「頬」「頬」「鼻」「口」「唇」といった顔のパーツ

「顔」「容貌(かたち)」といった顔そのもの

「化粧(けはひ)」「白粉」

②「JapanKnowledge」²⁾を利用した小学館『新編 日本古典文学全集』(全88巻)からの用例収集。

2015年度調査(①に同じ)

③『日本国語大辞典』(小学館)

2016年度調査

「眉」「目」「睫」「頬」「頬」「鼻」「口」「唇」「顔」「容貌(かたち)」といった顔に関する語と句の収集

④『化粧史文献資料年表』(ポーラ文化研究所)の資料データベース化

2016年度調査(現在作業中)

⑤『資生堂宣伝史 TV・CM篇(1960-1991)』(資生堂)

2016年度調査

全TV・CMのセリフ・テロップを文字化・データベース化

⑥『資生堂宣伝史 総合篇(1979 - 1991)』

2016年度調査

ポスター記載の文字(キャッチコピー・タグライン等)をデータベース化

⑦KOSEのTVCM(株式会社コーセーからのDVD貸出により閲覧)

2016年度調査

1970-1998、2005-2006、2006-2008、2010、2011、2012、2013、2014のCM(1999-2004、2009は欠)のセリフ・テロップを文字化・データベース化

⑧その他

これまでにネット検索によりTVCM、ポスター等のキャッチコピーを収集



Studies on advertisement expressions with high appeal power for the beauty of women

Eishi Hirose

Department of International Culture,
Faculty of Culture policy and Management,
Shizuoka University of Art and Culture

⑤⑦に関しては以下のように語彙分析も行い、語彙表をつくった(図1)。語彙分析に際しては、形態素解析Mecab、KHCoder、そして、解析が上手くいかなかった語の点検と修正はエディタを使って手作業した。

出現	表音	見出し	品詞1	品詞2	品詞3	中項目	
ルーム	ルーム	ルーム・room	名詞・普通名詞一般			住居	
フレッシュ	フレッシュ	フレッシュ・fresh	形容詞一般			生命	
コロン	コロン	コロン・cologne	名詞・普通名詞一般			言語	
香り	カオリ	香り	名詞・普通名詞一般			自然	
が	が	が	助動詞			接続	
聞こえる	キコエル	聞こえる	動詞一般	下一段・ア行	連体形一般	言語	
踊っ	オドル	踊る	動詞一般	五段・ラ行	連用形・促音便	生活	
てる	テル	てる	助動詞		下一段・タ行	終止形一般	物質
ルーム	ルーム	ルーム・room	名詞・普通名詞一般			住居	
フレッシュ	フレッシュ	フレッシュ・fresh	形容詞一般			生命	
コロン	コロン	コロン・cologne	名詞・普通名詞一般			言語	
に	に	に	助詞・格助詞			自然	
香り	カオリ	香り	名詞・普通名詞一般			自然	
の	の	の	助詞・格助詞			天地	
ピアノ	ピアノ	ピアノ・piano	名詞・普通名詞一般			自然	
が	が	が	助動詞			接続	
デビュー	デビュー	デビュー・debut	名詞・普通名詞・サ変可能			事業	
し	スル	為る	動詞・非自立可能	サ行変格	連用形一般	事業	
まし	マス	ます	助動詞	助動詞・マス	連用形一般	作用	
た	タ	た	助動詞		終止形一般	土地利用	
香り	カオリ	香り	名詞・普通名詞一般			自然	
の	の	の	助詞・格助詞			天地	
ピアノ	ピアノ	ピアノ・piano	名詞・普通名詞一般			自然	

図1 語彙表(一部)

3. 結果及び考察

以下は、語彙表をKHCoderによって分析した結果である。図2は形容詞・形容動詞・サ変可能語の10例以上出現した語を取り上げ、対応分析表にしたものである。カタカナ語の出現の多さ、そして、各時代による語の偏りが見てとれる。ただ、用例数や対象商品CM数に偏りが大きいこと、この結果をもってすぐに時代差と結論づけられないことが欠点である。この利用法は客観的データにもとづいて語を抽出し(テキストマイニング)、それをもとに分析のきっかけとする手段である。図3は『分類語彙表』³⁾の分類番号(中項目別)を利用して、意味分類したものを使って、KHCoderでコーディングによる分析を行った結果の例である。

以下、詳細に報告(分析)するのは「眉」と「口」に限る。

3.1. 眉に関する表現

眉は、唇や頬、肌と違い、色よりも形が重視される部位である。切ったり剃ったりして形を整えられるためであろう。現代でも「太眉」「細眉」「並行眉」「アーチ眉」など、様々な形がトレンドになっている。また時代によっては、成人の儀式として、あるいは結婚したときに眉を剃るという風習もあった。

一方で、色についてはあまり重視されていない。2016年頃に「カラー眉」「眉カラー」が流行したが、歴史的に眉の色が継続して注目を浴びてきた記述は見当たらなかった。

では、「美しい」眉の形はどのように表現されてきたのか。

3.1.1. 『国歌大観』の用例から

『国歌大観』で「眉」の用例として分析可能なものは141例あった。共起語に着目して、特徴的なものを表1に取り上

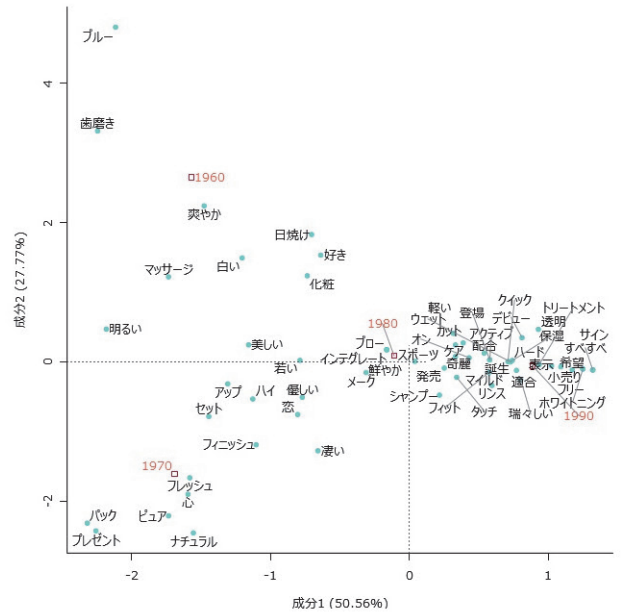


図2 形容詞・形容動詞・サ変可能

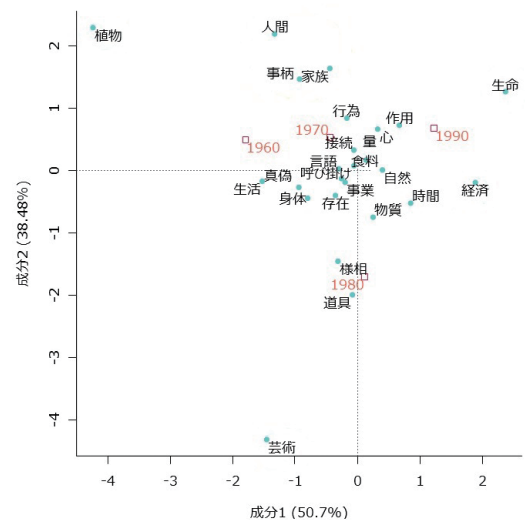


図3 コーディング

表1

柳	15例
月・三日月	14例
山	17例

げまとめる⁴⁾。

3.1.1.1. 柳

- (1) 君去りて我は留まる別離の心
桂の鬢何れの年ぞ一たび往きて見む
柳糸の眉は何の時にか還らざらむ
別様に帳前に来たらしめむ(新撰万葉⁵⁾)
- (2) 任氏の顔貌彷彿として宜し

粉黛無に^{ふんたい}あらず眉柳に似たり
朱砂企てざれども唇丹のごとし
心に思ひ肝に^う属けて猶胸焦がる(新撰万葉)

〈3〉桃の花紅色に^にほひたる 面輪のうちに
青柳の 細き眉根を 笑み曲がり……(万葉)⁶⁾

15例中13例が眉の形を「柳」と表現したものであった。

〈1〉〈2〉の『新撰万葉集』漢詩の例からわかるように、中国から入ってきた表現と思われる。「柳眉」という漢語もあり、「柳の葉のように細くて美しい眉。美人の眉にたとえていう語。柳の眉。」(『日本国語大辞典』より)という意味である。

〈2〉「顔貌彷彿として宜し」といった表現からも、「柳」は美しい眉、美人の眉を表していることがわかる。また、「柳眉」の語義や〈1〉「柳糸」〈3〉「細き」から、美しい眉とは細い眉と思われる。

ただし、ポーラ研究所『眉の文化史』⁷⁾では、『万葉集』から柳葉や三日月の例を引いたうえで、薬師寺の「吉祥天像」と正倉院宝物の「鳥毛立女屏風」を取り上げ「唐代においての眉(蛾眉)はこのように太く濃い眉であったことは想像できる」としている。実際これらの絵像の眉は太く描かれているが、言語表現上は細い眉と捉えられる点が興味深い。

3.1.1.2. 月・三日月

〈4〉振り放けて三日月見れば一目見し
人の眉引き思ほゆるかも(万葉)
〈5〉あはずしてけふ三日月の眉引くを
妹がおもわにみんよもがな(うけら)
〈6〉太公望の周文に遇へる 渭浜の波面に^{いひん}畳めり
綺里季の漢恵を輔くる 商山の月 眉に垂れたり
(和漢朗⁸⁾)

「柳眉」同様「月眉」という漢語があり、意味は「(1)三日月の細さを眉にたとえていう。眉月。(2)女性の細くひいた眉を月にたとえていう。」(『日本国語大辞典』より)。細い眉=美しい眉という認識があったならば、「月」もやはり美しい眉の表現であったと考えられる。とくに「三日月」は、その細く弓なりの形から美しい眉のたとえであった。

ただし、「月」は「柳」と違って美しい眉を表現しない例もある。〈6〉は「商山の月のように白い眉」という意味で「月」は年老いて白くなった眉のたとえ、歌の中で「月」と「眉」が共起する場合、必ずしも美しい眉に関する表現にはなっていない点が着目される。

3.1.1.3. 山

〈7〉山眉のてかけもせぬにとをだちて
日数のふればくる人もなし(他阿)
〈8〉今朝はまづそなたにうすき山眉の
遠きや霞む色をみすらん(後水尾)

〈9〉眉のごと雲居に見ゆる阿波の山
かけて漕ぐ船泊まり知らずも(万葉)

「山眉」は「山の端のほのかなさまを眉墨に、また、美しい眉を山の稜線に見立てていう語。」(『日本国語大辞典』より)。ただし『日本国語大辞典』には「山まゆ 遠山をながめて眉に似たるをいふ也」という『匠材集』の言葉も引かれており、〈8〉はこの用法と思われる。〈9〉は明らかに「阿波の山」を「眉のようだ」ととえている例。この他にも、山(の稜線)を眉でたとえる用例が複数ある。

また、「柳」「月(とくに三日月)」と「眉」の共通のスキーマは「細い」だが、「山」と「眉」の場合、「山」には太い・細いという概念はあてはまらないため、共通概念は「なだらかな曲線」であろう。「美しい眉」は「細い」だけでなく、山の稜線のように曲線を描いた眉であったことがわかる。

細く曲線的な眉を美しいとする、眉(の形)に関する美意識が近代まで続いてきたことは中間報告で述べた通りである。

後述するが、近代までの表現は自然物をメタファー化した表現であり、これが現在にも残っている。

3.1.1.4. 眉根搔き

「眉」との共起語として他に目立ったものは「眉根搔き(眉根搔く)」。万葉の時代から(いつ頃までかは不明であるが)、「眉がかゆくて搔くのは恋人に逢える前兆」と信じられており、反対に自ら眉を搔くことで恋人が逢いに来てくれるといった考え方もあった。「眉根搔き」の用例には男性が主体のものもあり、美しい(または美しい眉をもつ)女性に限定した表現ではないようだ。

また、「眉引き」「眉づくり」など眉化粧に関わる言葉も見られた。

3.1.2. 「眉」を使った慣用句から

weblioで「眉」を使った慣用句は19例あった。その意味特徴に注目し、分類した結果を下の表2にまとめた。

感情(「不安」「不快」「安心」「怒り」など)に集中する。『眉の文化史』では、『青眉抄』⁹⁾を引用しながら、「確かに、眉は人間の喜怒哀楽を最も端的に表す部分であり」とある。慣用句から見た言語生活史の結論と一致する。また、『眉の文化史』では、「化粧するとき形を最も変化させやすく、

表2 weblioに見られる「眉」を使った慣用句

感情	恋愛・結婚	化粧
眉に唾をつける、眉を集める、眉を曇らす、眉を寄せる、愁眉を開く、眉を伸べる、柳眉を逆立てる、眉を吊り上げる、焦眉の急、眉に火がつく、眉一つ動かさない、眉を読む、眉毛を読まれる	眉を落とす、眉根搔く	眉を書く、眉を引く
15	2	2

変化させたことで、顔の印象が大きく変わる部分でもある」と続けている。

眉化粧については、山村博美(2016)に「大陸の影響を受けた化粧が、日本独自の化粧へと変化するのは平安中期のことである。宮廷文化が洗練される過程で、支配階級である貴族たちによって、白粉・紅・お歯黒・眉化粧などの、日本の伝統化粧の基礎が築かれた。」とあり、「平安中期から」そして「眉化粧」が「日本の伝統化粧の基礎」のひとつであったことを述べている。

これらの眉に関する文化論・資料等から眉と美の関連が明確に示されている。この文化論に、さらに言語学的な解釈を加える。

眉には「眉(愁眉)を開く」のように「安心」を伝える表現があるが、これらの慣用句には背景的なデフォルトとなる意味として、「不安や心配ごとがある状態」が存在する。「眉一つ動かさない」もデフォルトとなる状態は美しさを感じる表情とはほど遠い。改めて、「感情」に含まれる慣用句を見ると(「眉を曇らす」「眉を吊り上げる」等)、「不安」「不快」「怒り」等を表し、顔を見た他者にも不快な感情を抱かせてしまうものが目につく。こうした感情を表す眉を「化粧」によって隠す必要がある。

3. 1. 3. 『日本国語大辞典』の語・語句の用例から

『日本国語大辞典』で眉を使った慣用句(語句含)は295語あった。そのうち、18語は人名地名等なので除いた。先と同じように意味特徴に分類した結果を下の表3にまとめた。

眉そのもの(顔を指し示すことも)を表すものが中心である。それを除くと、weblioの結果に一致する。ここに眉における日本人の意識がうかがえる。その詳細は既に『国歌大観』における和歌の分析で述べたとおりである。

3. 1. 4. CM・キャッチコピーの用例から

眉の化粧品に関するCM・キャッチコピーはあまり入手できなかったが、ここでは入手できた63用例から特徴的な表現をピックアップしていく(表4)。

3. 1. 4. 1. 自然(ナチュラル)

〈10〉KOSE エスプリーク「MAKE DRAMATIC」2011 CMより

Tp: ひと塗りで自然なライン、ほかしらずアイブロウ。

表3 『日本国語大辞典』に見られる「眉」を使った慣用句

意味分類	眉・顔	感情	化粧	比喩	人形	結婚・恋愛	その他	総計
語数	99	61	59	40	8	4	6	277

表4

自然(ナチュラル)	22例
ふんわり	12例

〈11〉KOSE エスプリーク「Wアイブロウ(リキッド&パウダー)」2016CMより

女: 繊細に描く ナチュラルに仕上げる

〈12〉KOSE エルシア「鉛筆アイブロウ」2017 CC

やわらかな芯で自然な仕上がり

〈13〉資生堂マキアージュ「ダブルブロークリエーター」

2017 CC

ペンシルとパウダーで自然な美眉に

〈14〉資生堂 インテグレート「アイブローペンシル N」

2017 CC

やさしく描けて、自然な仕上がり。髪色で選べるアイブロー

〈15〉カネボウ ケイト「ラスティングデザインアイブロウ W」2017 CC

自然な眉が簡単に仕上がる。落ちにくいWタイプのアイブロウ。

〈16〉ちふれ「まゆずみ ブラシ付」2017 CC

描きやすく、ナチュラルな仕上がりのアイブロー。

収集した用例の中では「自然」「ナチュラル」という表現をうたい文句にしたものが多く見られた。〈10〉～〈16〉の例からわかるように、「自然」「ナチュラル」は、様々なメーカー、ブランドで使われている。

また、本章冒頭で述べた近年トレンドの「眉カラー」についても、髪や目の色と異なる極端な色味ではなく、「自然」な色であることがポイントとなっているようだ。

〈17〉KOSE ファッション「カラーラスティングアイブロウマスカラ」2017 CC

ひと塗りで、染めたように 自然な眉色にチェンジ!

〈18〉カネボウ 「アイブロウカラー」2017 CC

自然な眉色に簡単チェンジ ふんわり上品 眉マスカラ

日本では、自然に生えている眉毛を抜き、眉墨で描く文化が長かったが、現代社会では反対に「自然」さが重視されていることが、化粧品に関する表現からも浮かび上がってくる。

3. 1. 4. 2. ふんわり

〈19〉カネボウ コフレドール「ブローデザイナー」2013 CMより

Na/男: パウダーなら ふわっと簡単にほかせる

Na/男: あとは すっとペンシルで

Tp: 簡単! ふんわりきれい眉

〈20〉KOSE エスプリーク「Wアイブロウ(リキッド&パウダー)」2017 CC

眉尻が夜まで消えないのに、ふんわり自然に仕上がるリキッド&パウダーアイブロウ。

〈21〉KOSE ファッション「パウダーアイブロウペンシル」2017

CC

簡単！ふんわりナチュラル眉

〈22〉資生堂 マジョリカマジョルカ「ブローカスタマイズ
(ソードカット) n」2017 CC
ふんわり描けてピタツときまる パウダータッチの
アイブロー

〈23〉カネボウ メディア 「Wアイブロー ペンシル&パウ
ダー」2017 CC

これ1本で簡単 自然なふんわり美眉

「ふんわり」を使った用例の中には、〈20〉〈21〉〈23〉の
ように「自然」「ナチュラル」と同時に使われている例も見
られた。つまり、ここでの「ふんわり」とはいかにも眉墨で
描いたような眉ではない自然な眉を表現した言葉である。

また、「ふんわり」もさまざまなメーカー、ブランドのキ
ャッチコピーになっている。

「自然」「ナチュラル」「ふんわり」ともに、キャッチコピ
ー等に使われている商品・ブランドの対象年齢層が様々あ
る点も注目される。どの年齢層においても、「自然な眉」が
美しいとされていることがうかがえる。

CM表現では、「眉」をメタファーとして表現するのでは
なく、形状的かつ直接的表現で示している。ただし、語の
中で抽象度の高い、擬音語・擬態語による表現であること
がうかがえる。

3. 2. 口に関する表現

3. 2. 1. 『国歌大観』の用例から

『国歌大観』で「口」の用例として分析可能なものは57例、
「口びる」が1例、「口走る」などの動詞の一部となっている
例や、「水口」「口なし」など身体の一部としての「口」の意
味からは離れた言葉も含むと全体で270例あった。

まず、「口」を含む言葉全体を見ていきたい(表5)。

「戸口」「水口」「袖口」など、何かの「出入りするところ」
を表す言葉が多いことがわかる。なお、「口」54例の中にも
「道の口」「山の口」「釜の口」「氷室の口」など、「口」が「出
入りするところ」という意味で使われている用例が見受け
られた。身体としての「口」が、呼吸、声、食べ物などが「出

表5 『国歌大観』に見られる「口」の用例

口	54例	口惜し	6例
クチナシ	43例	袖口	5例
戸口	31例	滝口	4例
川口	28例	野口	3例
山口	25例	大口	3例
水口	24例	江口	3例
隠口(こもりく)	14例	みしま江口*	3例

* 「みしま江」で地名

(各2例)口業、岸口、渡口

(各1例)唇、下口、妻戸口、坂口、門口、河口、溪口、矢口、堀口、
枝口、虎口、利口、隠国、口走る、口ずから、口清し、
口振り、口籠もる

入りするところ」であり、日常生活におけるその頻度も非
常に高いため、古い時代から意味の抽象化が進んでいった
ものと考えられる。

「川口」「水口」「滝口」「江口」「岸口」「渡口」と水辺に
関する言葉が多い点も注目される。水の摂取が人間の生命
維持に欠かせないためかとも思われるが、この点は本稿で
は掘り下げないこととする。

以下、「口」54例に絞って、共起語に着目して分析する。
「口」は眉のように、美しさを示す共起語として特徴的な言
葉を見出すことができなかった。では、どのような語と共
起しているのか。

3. 2. 1. 1. 「発話」に関する言葉

端(口の端)(5) 慣る(5) 閉づ(2) 言ふ(2) 聞こゆ(2)
聞く(1) たたく(1)

〈24〉手にむすび心におもひ口にいふ

御法のかひはけふぞみえぬ(玉葉)

〈25〉終りまつ心は声に出でにけり

口に仏の名こそ聞ゆれ(他阿)

〈26〉恋ひかねてことのなぐさに世の中を

うしといふをぞ口なれにける(六帖詠)

3. 2. 1. 2. 「飲食」に関する言葉

食ふ(1) すする(1) 含む(1) ささぐ(1)

〈27〉松樹に倚つて以て腰を摩れば

風霜の犯し難きことを習ふ

菜羹を和して口に啜れば

気味の克く調ほらんことを期す(和漢朗)

〈28〉老いし妻の飯匕とりて盛りたるを

一口君にささげ見まほし(志濃夫)

当然といえば当然であるが、「口」の機能である「発話」「飲
食」に関わる動作が多く見られる。他には特徴として取り
上げられるような動作はとくになかった。

なお、「口の端」あるいは次の用例のように「口」自体が「発
話」を意味することもある。

〈29〉さとりえて猶いかばかりとく法の

人に越えたる口のさかしき(黄葉)

身体の一部としての「口」ではなく「口から出た言葉」を表
しているシネクドキーである。

まとめると以下の図4のようになる。

3. 2. 2. KHCoderによる語彙表分析から

ここでは、資生堂・KOSEのCM表現からリップCMを

【具体】 (「口」の機能) 【抽象】
身体としての「口」→呼吸・発話・飲食→(何かが) 出入りするところ
→(口から出た)言葉

図4

表6 リップCM 年代と意味分野のクロス表

項目	1960	1970	1980	1990	合計	カイ2乗値	項目	1960	1970	1980	1990	合計	カイ2乗値
量	10 (100.00%)	23 (100.00%)	18 (100.00%)	23 (85.19%)	74 (94.87%)	7.964*	植物	7 (70.00%)	5 (21.74%)	1 (5.56%)	2 (7.41%)	5 (19.23%)	21.285**
心	10 (100.00%)	22 (95.65%)	15 (83.33%)	25 (92.59%)	72 (92.31%)	3.24	事柄	3 (30.00%)	5 (21.74%)	2 (11.11%)	4 (14.81%)	4 (17.95%)	1.962
自然	10 (100.00%)	18 (78.26%)	18 (100.00%)	24 (88.89%)	70 (89.74%)	6.516	感動	2 (20.00%)	0 (0.00%)	3 (16.67%)	8 (29.63%)	3 (16.67%)	7.947*
接続	10 (100.00%)	20 (86.96%)	15 (83.33%)	20 (74.07%)	65 (83.33%)	3.884	交わり	3 (30.00%)	4 (17.39%)	4 (22.22%)	0 (0.00%)	1 (14.10%)	7.704
時間	6 (60.00%)	14 (60.87%)	17 (94.44%)	20 (74.07%)	57 (73.08%)	6.802	物品	1 (10.00%)	6 (26.09%)	2 (11.11%)	2 (7.41%)	1 (14.10%)	3.998
食料	10 (100.00%)	13 (56.52%)	14 (77.78%)	16 (59.26%)	53 (67.95%)	7.831*	種類	3 (30.00%)	2 (8.70%)	1 (5.56%)	5 (18.52%)	1 (14.10%)	4.161
経済	3 (30.00%)	11 (47.83%)	14 (77.78%)	22 (81.48%)	50 (64.10%)	12.709**	機械	1 (10.00%)	5 (21.74%)	0 (0.00%)	1 (3.70%)	7 (8.97%)	7.293
事業	7 (70.00%)	11 (47.83%)	11 (61.11%)	12 (44.44%)	41 (52.56%)	2.668	衣料	3 (30.00%)	1 (4.35%)	1 (5.56%)	1 (3.70%)	6 (7.69%)	8.091*
道具	5 (50.00%)	10 (43.48%)	16 (88.89%)	9 (33.33%)	40 (51.28%)	14.238**	人物	2 (20.00%)	3 (13.04%)	1 (5.56%)	0 (0.00%)	6 (7.69%)	5.427
作用	4 (40.00%)	13 (56.52%)	8 (44.44%)	14 (51.85%)	39 (50.00%)	1.051	社会	2 (20.00%)	2 (8.70%)	1 (5.56%)	0 (0.00%)	5 (6.41%)	5.15
身体	6 (60.00%)	14 (60.87%)	11 (61.11%)	8 (29.63%)	39 (50.00%)	6.857	天地	0 (0.00%)	4 (17.39%)	1 (5.56%)	0 (0.00%)	5 (6.41%)	7.179
存在	6 (60.00%)	12 (52.17%)	11 (61.11%)	10 (37.04%)	39 (50.00%)	3.147	挨拶	1 (10.00%)	3 (13.04%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	4 (5.13%)	5.882
真偽	8 (80.00%)	10 (43.48%)	10 (55.56%)	9 (33.33%)	37 (47.44%)	7.027	公私	0 (0.00%)	2 (8.70%)	1 (5.56%)	1 (3.70%)	4 (5.13%)	1.262
生命	2 (20.00%)	8 (34.78%)	6 (33.33%)	18 (66.67%)	34 (43.59%)	9.606*	資材	1 (10.00%)	1 (4.35%)	1 (5.56%)	1 (3.70%)	4 (5.13%)	0.636
生活	6 (60.00%)	12 (52.17%)	8 (44.44%)	5 (18.52%)	31 (39.74%)	8.443*	生物	0 (0.00%)	1 (4.35%)	3 (16.67%)	0 (0.00%)	4 (5.13%)	6.954
物質	3 (30.00%)	9 (39.13%)	9 (50.00%)	8 (29.63%)	29 (37.18%)	2.184	仲間	0 (0.00%)	2 (8.70%)	1 (5.56%)	1 (3.70%)	4 (5.13%)	1.262
呼び掛け	5 (50.00%)	7 (30.43%)	7 (38.89%)	9 (33.33%)	28 (35.90%)	1.31	土地利用	1 (10.00%)	1 (4.35%)	0 (0.00%)	2 (7.41%)	4 (5.13%)	1.778
行為	4 (40.00%)	9 (39.13%)	5 (27.78%)	8 (37.04%)	26 (33.33%)	0.964	判断	2 (20.00%)	2 (8.70%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	4 (5.13%)	7.58
様相	4 (40.00%)	6 (26.09%)	9 (50.00%)	6 (22.22%)	25 (32.05%)	4.526	動物	0 (0.00%)	1 (4.35%)	1 (5.56%)	1 (3.70%)	3 (3.85%)	0.559
言語	3 (30.00%)	9 (39.13%)	6 (33.33%)	6 (22.22%)	24 (30.77%)	1.739	形	0 (0.00%)	0 (0.00%)	2 (11.11%)	0 (0.00%)	2 (2.56%)	6.842
人間	5 (50.00%)	10 (43.48%)	2 (11.11%)	6 (22.22%)	23 (29.49%)	7.798	住居	0 (0.00%)	0 (0.00%)	2 (11.11%)	0 (0.00%)	2 (2.56%)	6.842
待遇	2 (20.00%)	1 (4.35%)	7 (38.89%)	8 (29.63%)	18 (23.08%)	7.787	成員	1 (10.00%)	1 (4.35%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	2 (2.56%)	3.69
空間	3 (30.00%)	6 (26.09%)	2 (11.11%)	5 (18.52%)	16 (20.51%)	2.032	力	1 (10.00%)	1 (4.35%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	2 (2.56%)	3.69
芸術	3 (30.00%)	3 (13.04%)	9 (50.00%)	1 (3.70%)	16 (20.51%)	15.617**	ケース数	10	23	18	27	78	-
家族	3 (30.00%)	5 (21.74%)	2 (11.11%)	5 (18.52%)	15 (19.23%)	1.613							

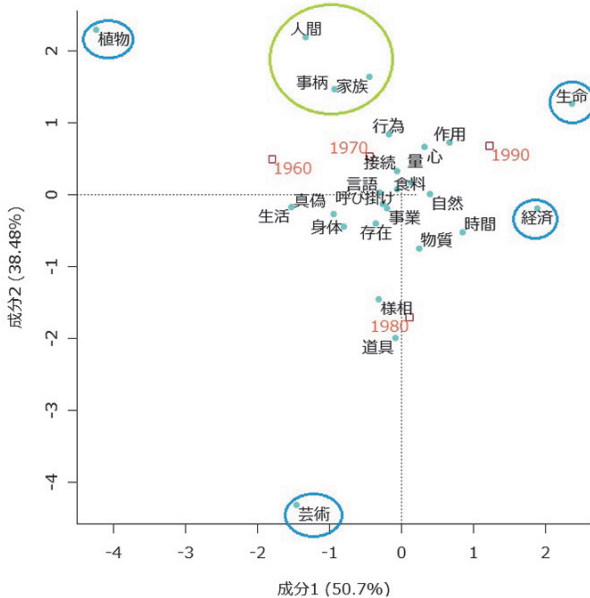


図5 リップCM コーディング対応分析

取り出し、KHCoderによる分析を行った。表6は年代と意味分野のクロス表である。年代による偏りが見られる。

図5は対応分析を行った結果である。青で丸が示しているのはカイ二乗検定で有意差が生じたコードで、かつ、対応分析を行った結果としてもかなり外れたところに位置する意味分野である。ここに含まれる語は年代差による偏りがある。緑で示した丸はカイ二乗検定で有意差は見られないのに、対応分析を行った結果としてもかなり外れたところに位置する意味分野である。今回は紙幅の都合上これ以上の分析は行わない。

3.2.3. CM・キャッチコピーの用例から

「口紅」「リップスティック」「リップペンシル」など口に

関わる化粧品のCM・キャッチコピーについて分析する。「眉」同様、共起語に着目しつつ、3.1.1. で見た「口」の意味的な広がりもふまえて考察していく。

中間報告においても、〈飲食行為〉と〈発話行為〉を参照点 (reference point) とした口紅CMについて取り上げた。今回は、より多くの用例を取り上げて確かめる。

3.2.3.1. 〈飲食行為〉に関する表現

資生堂のCM等で特によく見られた表現をもとに分析する。

1960年代には、「キャンディートーン口紅」(1961)「シャーベットトーン口紅」(1962)「フルーツカラー口紅」(1963)「チェリーピンク口紅」(1965)など商品名自体に食べ物の名前を含むものもあった。

CM中にも様々な食べ物や、食べ物に関する表現が用いられている。

■フルーツ色のメタファー

〈30〉資生堂「キャンディートーン口紅」1963 CMより

Na/女: スポーティーな洋服には、人参色のキャロットオレンジを。

Na/女: そして、オレンジ系のお召し物には、アーモンド色の口紅、アーモンドブラウンで美しく描いてください。

〈31〉資生堂「フルーツカラー口紅」1963 CMより

Sg: フルーツカラー ハネデュー マンゴー マママ、あ、アップル ウォータメロン ラズベリー フルーツカラー

色合いの鮮やかさや見た目のかわいらしさ、甘い、おいしいイメージのあるキャンディやフルーツ、新鮮、フレッシュなイメージのある野菜にたとえられる。つまりメタフ

ァー化している。このメタファーによって、「口にして快いもの」と「口紅」の結び付きが人々に認知されてくる。

■フルーツへのメトニミー

〈32〉資生堂「ナチュラルグロウ リップスティック」

1975 CMより

Tp: 彼女はフレッシュジュース

〈33〉資生堂 ベネフィークグレイシイ「リップスチック」

1980 CMより

Tp: 春の唇が、ピーチになりました。クリーミィでソフトな感触。

〈34〉資生堂 ルア「リップスチック」1980 CMより

Na/男: 美しいものは、おいしいのです。

〈35〉資生堂 フェアネス「ベジタブルスティック」1985 CMより

Na/男: この春は、野菜感覚がいっぱい。

これらは実際に「口にして快さを感じ取る」と「口紅」の結び付きが見られる。〈34〉など直接「おいしい」と言い切っている。これらのイメージと唇のイメージを近づけることによって、(該当化粧品を使った)唇そのものに「きれい」「おいしそう」「触れてみたい」といった魅力が付与される効果が考えられる。

■メトニミーを離れ、客観化・対象化

直接的な言語表現がなくても、ソフィーナ オープ「ルージュアクアブルーム」2004CM——「思わず触れてみたくなる」というNaとともに眠っている女性(片瀬那奈)の唇にフルーツを押し当てるもの、資生堂マキアージュ「ドラマティックルージュ」(「女っぽい唇」篇)2016CM——砂糖菓子や果物を女性(水原希子)が口にするシーンを印象的に写したものなどもある(図6、7)。

これらはフルーツが口の比喩としてではなく、対象物(元の食物)の役割に戻る。しかし、食物としての役割ではなく、唇を美しく見せるための役割を担う。

■属性(形容的)表現——より直接的

〈36〉資生堂 INTEGRATE「ジューシーバームグロス」2017 CC

うるふるジューシーな唇が続く、リップグロス

近年ではメッセージが直接的な表現が多くなってきた。回りくどくせず直接消費者に訴えた方が、美しさを伝えやすい場合もある。伝えるべき点は「潤い(乾燥を嫌う)」「丸み」「機能性(色が落ちることを嫌う)」「つや」である。

〈37〉資生堂 マキアージュ「トゥールールージュ」2017 CC

発色・つや・うるおいが持続

〈37〉の資生堂の例は直接的である。

さらに(飲食行為)については、それらの行為をしても「落ちない」口紅というのは訴求の大きな柱になっている。美しく装うだけでなく、その美しさを「保つ」ことも化粧品に求められる要素といえる。特に「口」は(飲食行為)と(発話行為)を日々幾度となく繰り返すだけに、化粧が落ちやすい部分でもある。最新のCCでは「保つ」ことを強調した表現が各メーカーで多く見られた。

〈38〉KOSE エスプリーク「ルージュグラッセ」2017 CC

ツヤがとろけて、うるんだ唇つづく、贅沢オイルインルージュ。

〈39〉KOSE ファシオ「カラーフィットルージュ」2017 CC

つけたての美発色が持続して落ちにくい!

〈40〉カネボウ メディア「ウェアリングキープルージュ」2017 CC

ワンストロークで鮮やか発色、スリムな落ちにくい

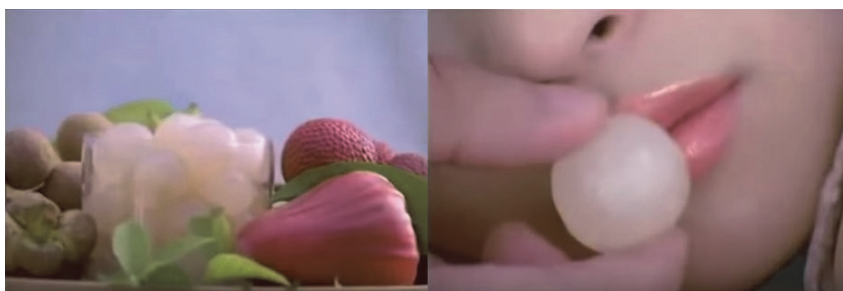


図6 リップCM 花王ソフィーナ オープ2004

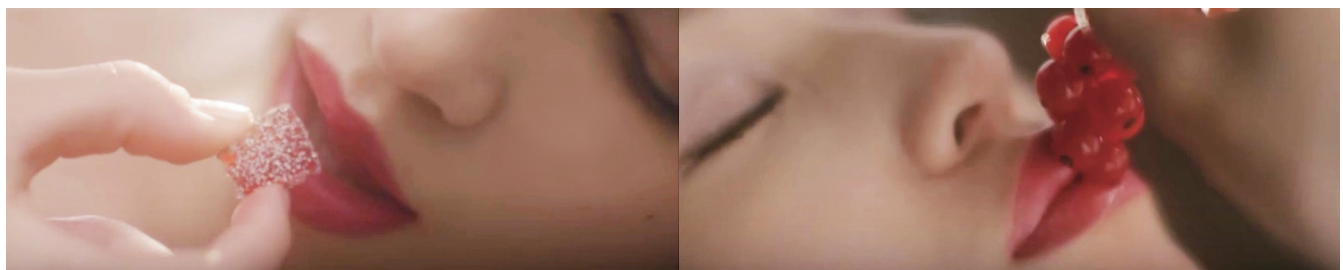


図7 リップCM 資生堂マキアージュ2016

口紅。

- 〈41〉カネボウ コフレドール「エレガントジュエリールー
ジュ」2017 CC
ぶるんとキレイな唇続く

3. 2. 3. 2. 〈発話行為〉に関する表現

■発話内容＝「口」との関係性＝メトニミー的

- 〈42〉資生堂 エリクシール「リップトレーニング」1985
CMより

女：あえいうえおあお かけきくけこかこ させしすせ
そさそ

あえいうえおあお あえいうえ

- 〈43〉資生堂「ラブ・インカラー口紅」1970 CMより

Sg：電話なんて信じない 信じない言葉なんて信じ
ない(略)

Na：今年の資生堂口紅は、あなたの選んだ色・信じた
い色。

- 〈44〉資生堂マキアージュ「エッセンスグラマラスルージュ」
2011 CMより

Tp, Sg：うるるるん ぶるるるん

〈42〉は女性たちが発声トレーニングをしている場面。引用した部分以降も様々な発声をする口元に着目させる構成となっている。〈43〉は何度も鳴る恋人からの電話をクッションで押さえたりカバンに入れたりして聞こえないようにしながら口紅を塗るという場面で、引用した歌が流れている。そして口紅を塗り終わると、女の子から電話をかける。「信じた色」の口紅をつけて「信じた色」恋人と電話をする、という〈発話行為〉に恋愛をからめたCM。〈44〉は、「う」「ぷ」と両唇を合わせて発音する音を効果的に用いて、音楽のリズムと合わせて繰り返している。セリフそのものを工夫して〈発話行為〉と「口」の関係を際立てているCMもあった。

■客観化

以上のような例もあるが、〈発話行為〉は行動のみで表現されるケースが多く見受けられた。たとえば前掲の「キャンディートーン口紅」は、4人の女性が電話ボックスでそれぞれ話している映像が使われている。

そもそも、出演する女優がしゃべったり笑ったりするだけで、〈発話行為〉の表現となるため、セリフやテロップで発話を意識させる必要性は低い。口元をクローズアップするだけでも〈発話行為〉を強く印象付けられる。これについての詳細は中間報告で述べたので割愛する。

4. 総括

このレポートでは、中間報告の結果を更に進展させた。特に、CM表現の語彙論的考察、慣用表現、コロケーション、国歌大観、そして、キャッチコピーの分析を行った。まだまだ、試行錯誤の段階である。その原因は、著作権の問題も関わりCM資料等の収集の困難さがあげられる。閲覧をお願いすることでさえ難しいのが現状である。資料が揃わないことが一番の原因といえるが、その上、CM表現分析の研究方法が確立されていない点が、研究を困難なものとしている。こうした中で、CM表現分析に挑戦し、新しいアプローチからの分析方法を試み、美のスキーマの一端を示せたことは、大きな一歩であるといえよう。

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支援いただきましたことを心から感謝いたします。本研究のデータベース作成のために、コーセーのCM集(DVD)を閲覧させていただきました。特に、株式会社コーセー宣伝部 宣伝制作課 青木瞳氏、研究企画室 研究企画U 石塚由紀子氏をはじめ、株式会社コーセーの皆様にはお世話になりました。また、資生堂アートハウス・資生堂企業資料館関係者の皆様や、アド・ミュージアム東京の図書館の皆様には、CMや広告資料に関してご助言いただきました。

(注記および参考文献)

- 1) 新編 国歌大観 DVD-ROM【通常版】、角川学芸出版、2012
- 2) JapanKnowledge Personal (URL <http://japanknowledge.com/personal/>)
- 3) 分類語彙表-増補改訂版データベース、国立国語研究所、大日本図書、2004
- 4) 共起語等の表記は代表表記(以下同)。
- 5) 『新撰万葉集』はそれぞれの和歌に漢詩が一首付加されている。本研究では漢詩部分の用例も採用した。用例は、読みやすさを優先し書き下して表す。
- 6) 『万葉集』の用例は『国歌大観』では万葉仮名であるが、読みやすさを優先し、『新編日本文学全集』の和文表記を用いる。
- 7) 『眉の文化史(眉化粧研究報告書)』、ポーラ文化研究所、1985
- 8) 『和漢朗詠集』には漢詩・漢文も含まれる。本研究では漢詩の用例も採用した。また、表記は『新編日本文学全集』の書き下しを用いる。
- 9) 7)に同じ

化粧がもたらす自己の価値および社会行動における価値の変化 —— 行動学的検討

福島県立医科大学医学部システム神経科学講座

藤原 寿理

Cosmetic studies have drawn many attentions not only in beauty business but in social psychology field. We used several questionnaires to measure the change in both explicit and implicit value of self by makeup. Forty-three healthy female university students who wear makeup usually participated in the study. They filled out the questionnaires twice on the different day, once after spending almost the whole day with makeup and once without it. They were also asked to rate the confidence on their answer of binary choice task with facial and house pictures or random dot motion coherence. We then compared the score of questionnaires and metacognitive confidence in two conditions within subject, and found that both explicit (one's mood, quality of life, mental health) and implicit (confidence on one's behavior) value increased significantly by makeup.

1. 緒言

近年、美容や服飾業界のみならず社会心理学の分野において、女性の体型や化粧などの美意識に関する研究が数多く行われている。これは多くの女性が自己の体型や外見に対して低い価値を抱いており、美の向上に強い関心を持つためと考えられる。特に質問紙を用いた行動学的研究では、化粧という行為が外見的な審美性だけではなく、内面的な自信を与えるといった効果や、社会的コミュニケーション能力にも影響を与えることが報告されている¹⁻³⁾。一方、医療の現場でも、リハビリメイクといった事故や手術等で外観に損傷を負った人に化粧を施すことで生活の質(QOL)の向上や社会性行動に自信を与える手法が知られており、化粧がもたらす効用が実際に患者の生活に影響を与えることが示している⁴⁾。本研究では、このような化粧の効用に着目し、日常的に化粧をする習慣のある健常の成人女性を対象に、質問紙とコンピュータを用いた行動学的実験により比較検討した。

これまでに行われた先行研究では、化粧を施した自己や他者の顔写真に対する顔認知についての研究が多く^{5,6)}、実験環境下での被験者の化粧の有無に関しては着目されてこなかった。これに対し本研究では、被験者自身が化粧をした状態あるいはしていない状態で実験を行い、心の健康度や自信の度合いが両者でどのように異なるのかを直接比較し明らかにする新しい手法を試みた。また質問紙による評価だけでなく、コンピュータを用いた認知課題を通して

自己の意思決定に対する自信度を客観的に評価させ、化粧をすることで自らの行動に対する自信が変化するかどうかを定量的に計測した。

2. 方法

2.1. 被験者

福島県立医科大学医学部/看護学部の学生のうち、日常的に化粧をする習慣のある健常女子学生43名(平均年齢 21.1 ± 1.4 歳)を対象に実験を行った。被験者の日頃の化粧に対する意識を調べるために、事前に簡単な意識調査を行った。

2.2. 実験手順

実験は2日間に分けて行った。実験内容は同じであるが、1日目と2日目の間を1週間あけ、片方は1日中化粧をした状態、もう片方は1日中化粧をしていない状態で過ごしたのちに実験を遂行してもらった。被験者43名を4グループに分け、実験日時および化粧あり・なしの順番をグループごとに入れ替えた。実験当日は朝から化粧あり・なしいずれかの条件で過ごしてもらい、必ず午前中に一度実験者と対面し確認を受けさせた。さらにその場で鏡を見て自己の外見と向き合う時間を約1分間設けた。夕方に実験室に集合し、再び鏡を見て自己の外見を確認させた。その後、数種類の質問紙への記入およびコンピュータを用いた二者択一弁別課題とそれに続く自信度評価を行わせた。質問紙と弁別課題の順番は被験者ごとにランダムにした。用いた質問紙および課題は以下の通りである。

〈気分チェック用質問紙〉

- ・ POMS2; 気分プロフィール検査

〈生活の質チェック用質問紙〉

- ・ WHO QOL26; 生活の質を計測
- ・ WHO SUBI; 心の健康度および心の疲労度を計測

〈二者択一弁別課題と自信度評価〉



Value change in self and social behavior by makeup –Behavioral study

Juri Fujiwara

Fukushima Medical University School of Medicine, Department of Systems Neuroscience

質問紙とは別にコンピュータを用いた二者択一弁別課題を行わせた。弁別課題への解答直後に、一問ごとに対する自信度を評価させた。これにより被験者の解答に対する自信度を計測した。弁別課題はコンピュータ上で作動するPresentationソフトウェア (Neurobehavioral Systems Inc.) を用いて作成した。課題内容は人物や家屋の写真を用いた濃淡の弁別およびランダムドットを用いた左右の動き弁別を含む全70問であり、いずれも難易度を高く設定した(図1)。被験者の課題に対する意欲を高めるため、被験者には正答数に応じて謝金額が異なると教示し、なるべく早く正確に答えるよう指示した。解答はセルフペースでキーボードのボタン押しによって行わせ、解答および反応時間をコンピュータに記録した。1日目と2日目の弁別課題は同様の難易度になるように用意し、被験者間でランダムな順

番にした。

得られたデータを各人につき化粧あり・なしの条件に分け、課題ごとに比較検討した。グラフ中に示したエラーバーは被験者43名の標準偏差である。統計解析には市販のソフトウェア (GraphPad Prism5, GraphPad Software, Inc.) を使用し、被験者内で対応のある両側t検定を行った。なお、公正を期すため、後日被験者には謝金が正答数にはよらないことを説明し、全員に一律の謝金を支払った。

3. 結果

3.1. 日頃の化粧に対する意識調査

実験に参加するにあたり、事前に全被験者に質問紙形式にて日頃の化粧に対する意識調査を行った。その結果を図2に示す。

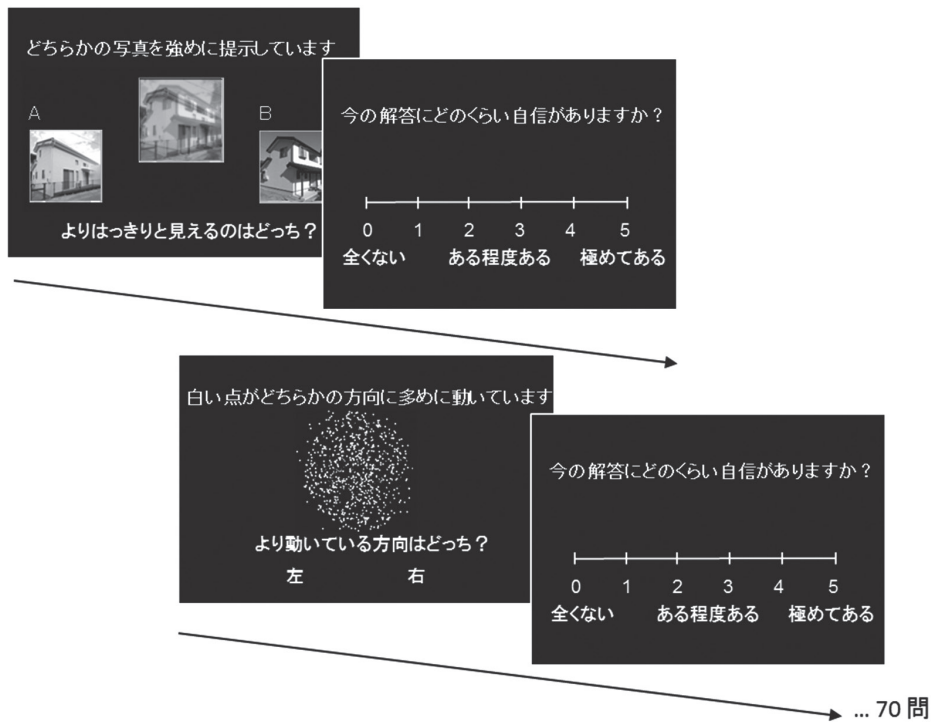


図1 課題の流れ

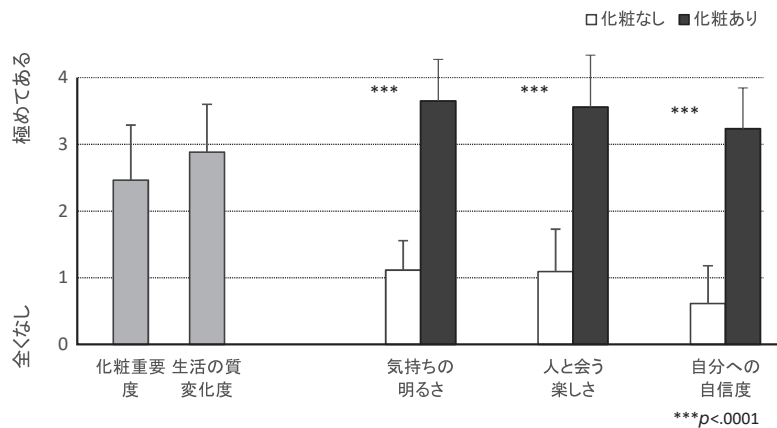


図2 化粧に対する意識調査

まず始めに化粧をすることは自分の生活にとってどのくらい重要であるか？および化粧のある・なしで自分の生活の質がどのくらい変わるか？という一般的な化粧への意識について質問した。それに対し、平均で中間（ある程度重要だ、ある程度変化する）より高い意識を持つ被験者群であることが示された。また化粧あり・なしを直接比較する質問に対しては、被験者内で気持ちの明るさ ($t(42) = 22.6, p < .0001$)、人と会う楽しさ ($t(42) = 15.3, p < .0001$)、自分への自信度 ($t(42) = 20.7, p < .0001$) のいずれの質問に対しても有意に高い回答を得た。

3.2. 気分プロフィール検査

被験者が1日中化粧をした状態あるいは化粧をしていない状態で過ごした実験当日の夕方の気分を質問紙(POMS2：気分プロフィール検査)を用いて計測し、条件間で気分状態に違いがみられるかについて比較検討した。その結果を図3に示す。

化粧なしの状態ですぐ1日を過ごすことにより、化粧ありの状態ですぐ1日を過ごすことに比較して総合的な気分状態の得

点が有意に高い(ネガティブな気分状態である)ことが示された ($t(42) = 5.5, p < .0001$)。さらにその気分状態の詳細を見てみると、混乱・当惑 ($t(42) = 3.0, p < .01$)、抑うつ・落ち込み ($t(42) = 4.2, p < .0001$)、疲労・無気力 ($t(42) = 4.8, p < .0001$)、緊張・不安 ($t(42) = 3.9, p < .001$)項目が化粧なし状態ですぐ有意に高くなることが分かった。一方で活気・活力項目については化粧あり状態ですぐ有意に高くなることが示された ($t(42) = 5.5, p < .0001$)。

3.3. 生活の質、心の健康度および心の疲労度検査

被験者の実験当日を通しての生活の質ならびに心の健康度・疲労度を質問紙(WHO QOL26、WHO SUBI)を用いて計測し、化粧あり・なし条件間で違いがみられるかについて比較検討した。その結果を図4、5に示す。

生活の質(QOL26)項目の内、日常生活動作や活力と疲労を含むⅠ. 身体的領域 ($t(42) = 3.6, p < .001$)、ボディイメージや自己評価を含むⅡ. 心理的領域 ($t(42) = 4.4, p < .0001$)、人間関係などを含むⅢ. 社会的関係 ($t(42) = 2.9, p < .01$)においていずれも化粧なしに比較して化粧あり条件

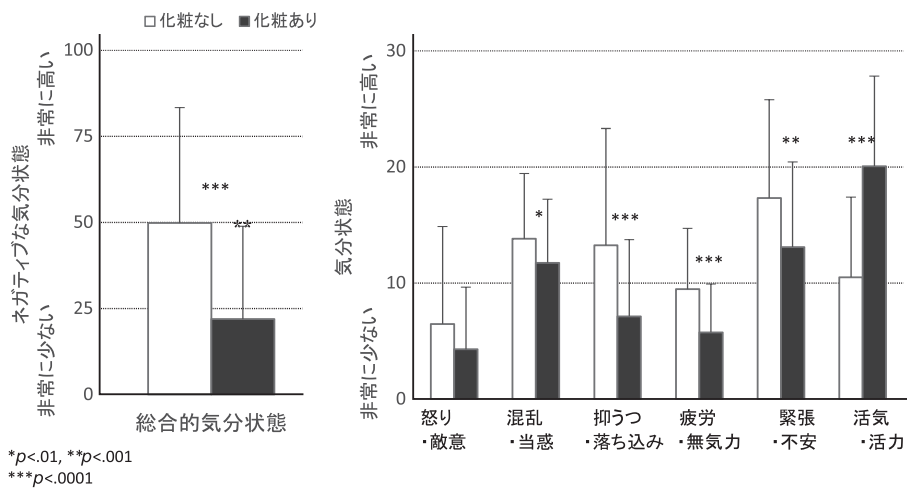


図3 POMS2 気分プロフィール

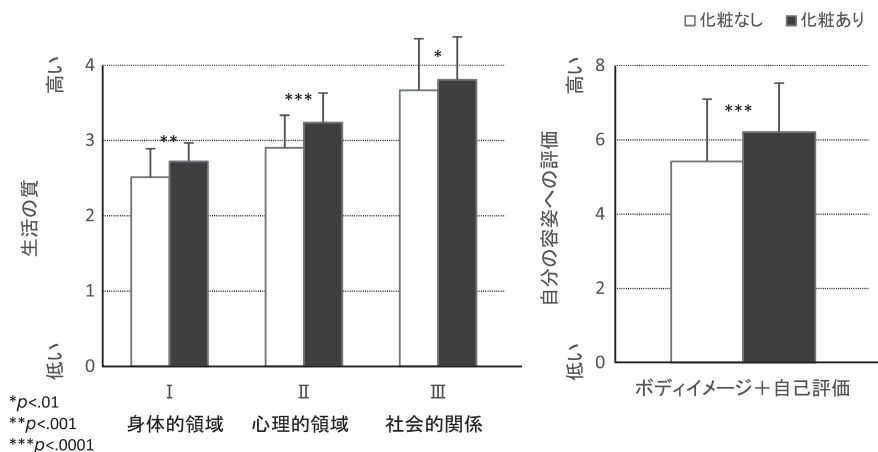


図4 生活の質 QOL26

で評価値が高くなることが示された。さらに、II. 心理的領域の細分項目である、ボディイメージ（自分の外見を受け入れることができますか？）および自己評価（自分自身に満足していますか？）に対する評価値に注目して比較すると、化粧あり条件での評価値が有意に高いことが示された ($t(42) = 4.5, p < .0001$)。

心の健康度・疲労度 (WHO SUBI) は、化粧あり条件がなし条件に比較して心の健康度が有意に高い (図5左, 左軸: ($t(42) = 5.2, p < .0001$) 一方で、疲労度は有意に低い (右軸: ($t(42) = 3.7, p < .001$) ことが示された。心の健康度について、その下位尺度を詳細に比較したところ、人生に対する満足度 ($t(42) = 3.6, p < .001$)、達成感 ($t(42) = 3.5, p < .001$)、自信 ($t(42) = 3.3, p < .001$)、至福感 ($t(42) = 4.4, p < .0001$) のいずれにおいても化粧あり条件の方がなし条件に比較して有意に高くなることが示された (図5右)。

3. 4. 二者択一弁別課題と自信度評価

コンピュータを用いて、自分の外見とは直接関係のない二者択一の弁別課題を行わせ、各問に対し自分の解答にど

れくらい自信があるかを聞いた。その正答率 (左軸) と自信度 (右軸) について図6に示す。また、化粧あり・なし条件ごとの正答と誤答別の自信度もあわせて示す。

正答率に関して条件間の差は見られなかった。一方、自分の解答に対する自信の度合いは正答、誤答に関わらず化粧なし条件に比較して化粧あり条件で有意に高くなることが示された ($t(42) = 2.2, p < .05$)。また、両条件ともに誤答に比べて正答だった場合には自信度も有意に高いことが示された (化粧なし: $t(42) = 4.0, p < .001$ 、化粧あり: $t(42) = 2.1, p < .05$)。弁別課題に解答するまでの反応時間および自信度を答えるまでの反応時間に条件間での有意な差はみられなかった。

弁別課題の正答率と正答した解答への自信度の関係を詳しくみると (図7参照)、化粧あり・なしの両条件で、正答率と自信度に正の相関がみられた (化粧なし (左上): $r = 0.4, p < .05$ 、化粧あり (左下): $r = 0.4, p < .01$)。一方、誤答率と誤答した解答への自信度の関係をみると、化粧あり条件でのみ、誤答率と自信度の間に負の相関が示された (化粧あり (右下): $r = -0.5, p < .01$)。

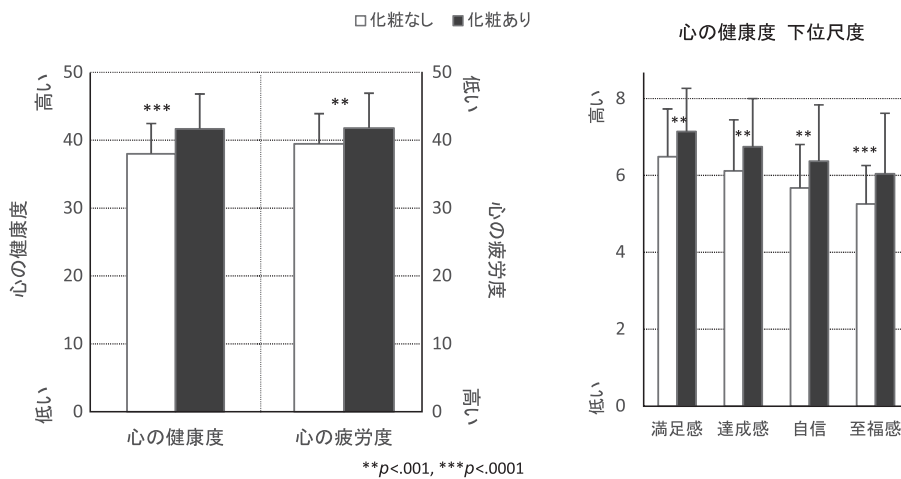


図5 心の健康度 SUBI

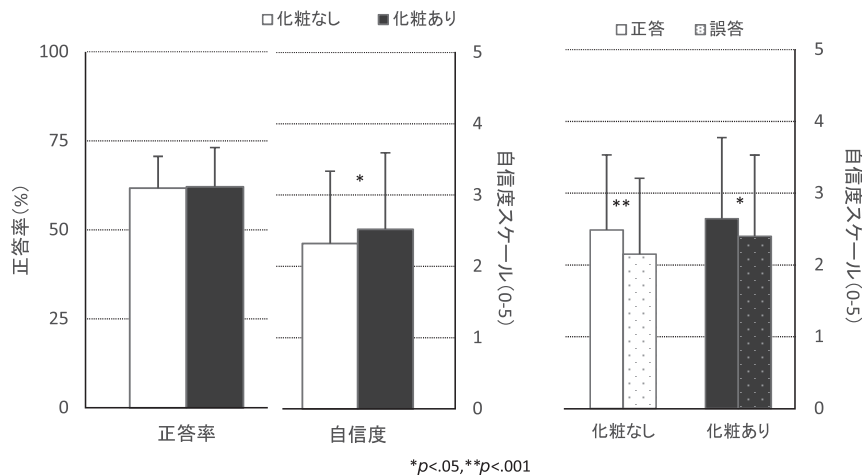


図6 弁別課題

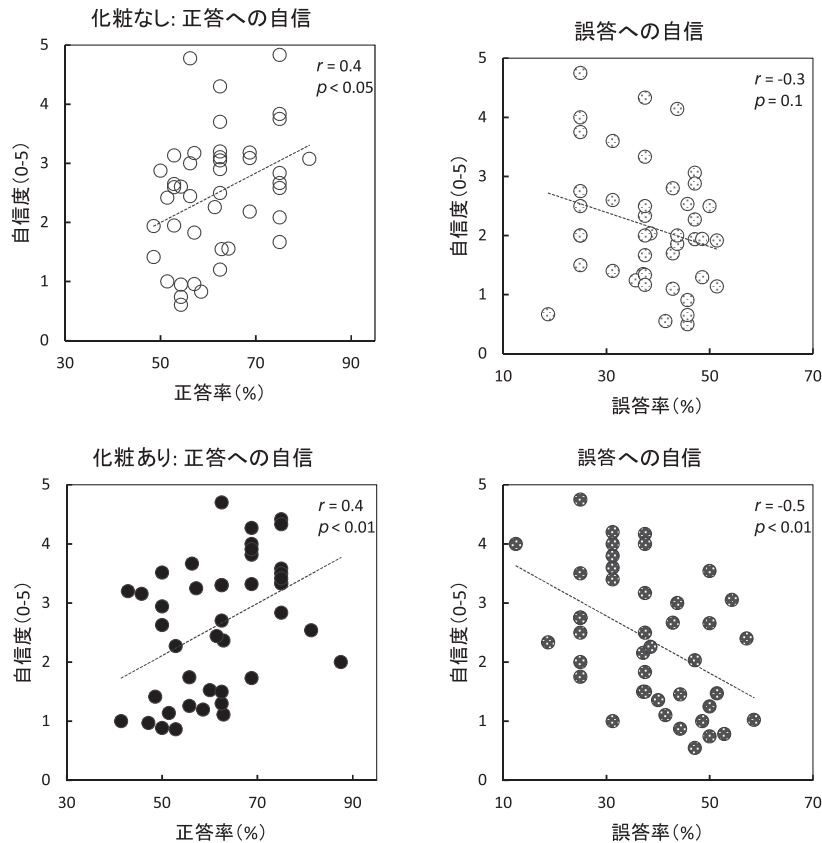


図7 正答率と自信の関係

4. 考察

本研究により、日常的に化粧をする習慣のある健常の成人女性では、化粧をしている状態としていない状態で気分状態、生活の質、心の健康度や自信といった内面に対する価値が異なることが示された。直接的に自己の外見や自分自身に対する自信の度合いを尋ねる質問紙においては、化粧をすることであらゆる価値が有意にポジティブな方向へ変化することが示された。また本研究では、自己の外見には直接関係のない二者択一の弁別課題を用いて自分の意思決定に対する潜在的な自信を計測することを試みた。弁別課題には、2枚の写真の濃淡や動きの方向を弁別させるという難易度の高い課題を用意した。したがって解答に対する自信を認知することは課題同様に難しいことが予想された。結果、正答率はチャンスレベルである50%よりもやや高い値であったが、化粧あり・なしの条件間では差がなく、いずれの条件でも難しい弁別課題であり、正答かどうかを予期することは困難であったことが示された。それに対して自信の度合いは、化粧あり条件の方がなし条件と比較して有意に高く、化粧をして過ごすことが判断の難しい問題に対して自信を持って解答することにつながる可能性が示唆された。また、化粧ありの場合、正答率が高い人ほど正答に対する自信度が高く、一方で誤答率が高い人ほど

誤答に対する自信が低くなる傾向がみられた。このことから、化粧をして過ごすことで自分の意思決定の結果（正答あるいは誤答）に対する自信の認知が高まる、すなわち自己のメタ認知能力が高くなる可能性が示唆された。これらの結果から化粧という行為が意識的にも無意識的にも外見の審美性だけではなく、QOLの向上や意思決定への自信を高めるといった効用を与え、社会性行動にポジティブな影響を与えることが示唆された。

本研究は、これまで漠然と受け入れられてきた、化粧をすることで自分に自信が持てるという心理的現象を実証科学の対象として扱い、その根拠となる行動データを示すという点で、社会的に意義がある。また臨床医学の現場にもリハビリメイクの意義を科学的に明らかにする点で発展性に富んでいる。女性に限らず全ての人々にとって髪型や服装など外見的に変化を加えることは、日々の生活の中に潤いを与えてくれるものである。本研究が提案するように、外見的变化が自らに与える効用をより意識的に捉えるように働きかけることは、外見だけではなく内面の心の健康度やQOLを上げ、生き方そのものにまで影響を与えることが予想される。

謝辞

本研究の遂行にあたり、助成をして下さいましたコスメ

トロジー研究財団に深く感謝いたします。助成金により遂行された研究成果は今後国内外の学会で発表させていただくとともに、速やかに論文として国際学術雑誌に投稿し、科学の発展に寄与することを目指します。

(参考文献)

- 1) Miller, L. C., & Cox, C. L. For appearances' sake: Public self-consciousness and makeup use. *Pers Soc Psychol Bull*, 8, 748-751 (1982).
- 2) Korichi R, Pelle-de-Queral D, Gazano G, Aubert A. Why women use makeup: implication of psychological traits in makeup functions. *J Cosmet Sci*. Mar-Apr; 59 (2):127-37 (2008).
- 3) Ramien ML, Ondrejchak S, Gendron R, Hatami A, McCuaig CC, Powell J, Marcoux D. Quality of life in pediatric patients before and after cosmetic camouflage of visible skin conditions. *J Am Acad Dermatol*. Nov; 71 (5) : 935-40 (2014).
- 4) Holme SA, Beattie PE, Fleming CJ. Cosmetic camouflage advice improves quality of life. *Br J Dermatol*. Nov; 147 (5):946-9 (2002).
- 5) Ueno A, Ito A, Kawasaki I, Kawachi Y, Yoshida K, Murakami Y, Sakai S, Iijima T, Matsue Y, Fujii T. Neural activity associated with enhanced facial attractiveness by cosmetics use. *Neurosci Lett*. Apr 30; 566: 142-6 (2014).
- 6) Tagai K, Ohtaka H, Nittono H. Faces with Light Makeup Are Better Recognized than Faces with Heavy Makeup. *Front Psychol*. Mar 1; 7: 226 (2016).

記念講演

●
第 27 回表彰・贈呈式記念講演 宮永 美知代
●

顔—その魅力の内側 美術解剖学的観点から

東京藝術大学美術学部 助教
宮永 美知代

みやなが・みちよ

1981年女子美術大学芸術学部絵画科を卒業、83年東京藝術大学大学院美術研究科修士課程を修了後博士課程に進学、同年9月から東京大学理学部人類学教室研究生に、1998年には医学博士号を取得。86年から東京藝術大学大学院美術教育美術解剖学の助教に就任、現在に至る。

・専門分野：美術解剖学(特に顔をテーマとした構造解析、絵画等の表現法)
・その他：美術解剖学会、日本顔学会理事、他多数数画



ただいま紹介いただきました宮永でございます。このたびはコスメトロジー研究振興財団の受賞を、おめでとうでございます。また、このような晴れがましい舞台で私が講演させていただけますことを、小林理事長さま、その他、多くの財団の先生方に御礼申し上げます。

今日、お話しさせていただきますのは、美術を通して、皆さんにはとても身近な顔の魅力について考えていただく、そのような内容となっております。

では、最初に出てくる2つの写真、皆さんはどちらを感じがいいと思われるか、ちょっとお伺いしてみたいと思います。

まず、1枚目の写真。もう1枚出てまいります。どちらが印象として良くお感じになるでしょうか。2枚目です。いかがでしょうか。

1枚目のほうが印象が良かったと思われる方は、手を挙げていただけますか。はい、ありがとうございます。では、2枚目のほう。はい、ありがとうございます。1枚目のほうが少し多かったようですが、ほんのわずかな差のような気がします。

でも、とにかく手を挙げていただいたということは、この2つに差を見つけておられるわけです。それはもちろん顔の中にあります。違いはどこにあるかということをお気付きになられた方はいらっしゃいますか。

では、もう一度1枚目に戻します。今、私は大変、印象深く思いましたのは、多くの方が手を挙げてくださったということです。実は私が行っております大学で同じように聞いてみますと、同じじゃないかというふうに言う人が半分ぐらいおります。つまり、この差異がなかなか見分けられないですね。でも、両者には歴然とした差異があるんです。それはどこかお答え下さる方、どなたかいらっしゃいますか。

いいですか。実は、こちらのほうを私が少し点描で大きくしているんですね。瞳孔の部分なのです。2枚目にしてみます。これがオリジナルの写真です。メーカーのCMの写真で、ちょうど良い正面顔でしたので使わせて

いただきましたが、この瞳孔の大きさの微かな変化に対して私たちはほとんど無意識のうちに違いを見出しています。心理学の実験では、興味のあるものに対して私たちは瞳孔を開きます。探していたものが見つかったとき、その部分が少しくリアに輝いて見える場合があります。それはつまり、よく見ようとして瞳孔を拡大し、光をたくさん取り込もうとするのだと思います。そのような反応が、眼をカメラに例えられる、瞳孔反射という側面以外に眼にはあるということですね。

私たち日本人は、瞳孔と光彩を含めて、一口に黒目というふうに言ってしまうかもしれませんが、このように虹彩と瞳孔のコントラストがある、いわゆるヨーロッパ系では非常にこの瞳孔の大きさというものが古来より問題になってきました。興味のある対象に対して瞳孔が開くということですから、瞳孔が大きいほうが魅力的という、そういう判断です。古代エジプトや中世のスペインでは、ペラドンナという薬草を目薬にして、それを差したと言います。それは神経毒で、瞳孔反射を奪うものです。当然、明るい光の下でもまぶしくとも瞳孔が大きくなったままで、失明の危険さえあるものでした。しかし、魅力的とするその美に対してかける執念のようなものが、そのことにはあったと思います。

この瞳孔の大きさに対して、どちらを魅力的に感じるかというのがほぼ半々でしたけれども、私が調べた結果では、ナチュラルに大きくしないほうが良いというほうが、むしろ多いという、そういう結果でもありました。

顔というものについて、私たちは非常に敏感です。野山を歩いていると、リラックスしているときにはこういう顔が立ち上がって来たりします。しかし日常、私たちの忙しい毎日では、これはただ木の芽であり、冬芽であり、というものにすぎないわけですね。

ここでは子どもの絵本から取りましたけれども、このお2人の写真家の非常に優しいまなざしというものが、カメラのファインダーを通して顔として立ち上がってまいります。ウサギのような、あるいは鹿のような、そういう顔で

すね。このような顔を発見するのは、本当に心が伸び伸びとした、リラックスした状態で、頭の中に煩わしいことが何もない、そういう状態でないとなかなか立ち上がってきません。

自然物の中だけではなく、人工物の中にもこのような顔はあります。この線路の脇にある石の中に去年のツタの跡を、根の跡がちょっとゆがんだ口になっているところが、非常に哲学的な瞑想をしている、そういう符号にも見えてまいります。

アルチンボルドという16世紀の画家は、王様に仕えたのですけれども、その王がとてもこういう不思議な絵を好んだので、たくさんのダブルイメージの絵を描いています。これは春という、春の花で、たくさん描かれているんですが、もうすぐにパンジーが見えて、このバラが頬ではないか、このユリのつぼみは鼻ではないかと思った瞬間に、顔が立ち上がってまいります。

これは夏ですね。ズッキーニが鼻として、そしてエンドウ豆がにっと笑った口からのぞく歯に見えた瞬間に、私たちはこれを顔として認知します。

これは冬ですね。このような四季の連作をアルチンボルドはたくさん描きましたが、こういうものもあります。陸の動物たち。ここに何か……草食獣ではない獣の背があり、そしてここに見えにくいですが、ちょっとトカゲがのぞいているのがまるで舌のように見えます。この獣の開いた口が目に見えた瞬間に、私たちはこれを横顔であるというふうに認識します。

これは水の生物で構成されています。このようなダブルイメージというのは、江戸時代には恐らく出島などを通して日本にも入ってまいりまして、これは歌川国芳の——江戸末期の画家ですね。この「みかけはこまわぬがとんだいゝ人だ」という、同様に絵の中に、組み合った人物で構成されているんですが、ダブルイメージが活かされています。

顔は発見されやすい性質を持っています。そして、いったん発見されますと、その形は顔以外には見えてこない非常に強固な枠組みを持っています。

では、顔の要素とは何でしょうか。

ちょっとひねったレバーですけれども、ウサギのような顔が私たちには見えます。2つの目と口、これさえあれば顔のようですね。何もマンホールの蓋にしか見えませんが、しかしここにはにっと笑った顔があります。

つまり顔を構成する要素とは、このような目、鼻、口、眉などの顔面の諸器官であり、また、その形と配置であります。そして私たちは、先ほど来の全ての顔の中に表情を読み取っています。困っている、笑っている、そういう表情ですね。

これは、晩年のクレーの絵になります。クレーは皮膚硬化症で腕が動かなくなったのですけれども、手に鉛筆をく

くり付けて晩年にたくさんの絵を描きました。この中に見えている顔は、いずれもとてもちょっといぶかし気というか、困ったというか、不機嫌な顔ばかりです。2つの目と鼻と口と、この要素さえあれば顔なんですね。多少、目がこのようにずれていても顔として私たちは認知します。クレーはこのとき、ナチスドイツの迫害を受け、スイスに亡命していました。戦争の終わりを知らずにクレーは亡くなってしまいます。

これはパントマイムの教本から抜いた顔です。さまざまな表情をしているんですけども、とても怒ったり驚いたり、笑ったりしています。しかし、どことなく人工的なというか、やはり自然な感じじゃないですね。それはなぜかということです。

表情というものは、必ず時間の経過とともに現れて、その表情のピークがあり、そして消えていきます。つまり動的な表情と言われるものは、必ず時間の中で移ろっていきのなんですね。それがここでは、そのピークがちょうどもう切り取ったようにピンナップされて並んでいます。東京駅でこのような顔をした人が前から歩いてきたら、多分、少し大きめにすれ違うときには距離を空けるんじゃないかと思うんですね。また、こういう人でもちょっと怖いかもかもしれません。

とにかく、私たちは表情というものを普段からよく読み取っています。そう考えてみると、空間芸術である絵画の中に表情を自然に盛り込むということが、いかに難しいことかということがお分かりいただけると思います。

17世紀の画家、フランス・ハルスの「ジブシーの少女」というルーブル美術館の小品です。ここでは、ハルスはほほ笑む少女の顔を捉えながら、非常に自然に表しています。私の師匠の美術解剖学の中尾喜保は、この少女の目がもうほほ笑んでおり、こちらの目はもう笑いが通り過ぎている。そしてこの口角はほほ笑みであり、こちらの口角は強く引き上がっている。つまり、笑いという動的な変化を1つの顔の中に有機的に表現している、そういうふうに説明をしました。それは本当に的を射ているなど、私もここで使わせていただくんですが、これは瞬間の微笑、数秒の微笑ですね。数秒間の笑いというものがここにあります。午前中の光でしょうか。そういう高い位置から射す光とそれによってできる影というものが、この少女の数秒間の笑いというものをつくり上げています。

恐らく中尾の講義を受け、自ら画家である福田美蘭は、その表情の時間性というものを彼女なりのやり方で表現しました。真珠のネックレスをもらってうれしいという、そういう女性の笑い、喜びというものを、ちょうど写真の多重露光のような表現でストロボを焚いたものを1枚に重合したような、そういう顔として表現しました。

一方、私たちはさまざまな名画の中でも、この光と影と

いうものの中に表情をアルカイクスマイルで表した名画として「モナ・リザ」を知っています。光と影が顔の中に描かれた最初の絵と言ってもいいと思います。

この中に、8枚の絵の中に唯一、正しい「モナ・リザ」という言い方は変なんですけど、本物の「モナ・リザ」の絵がありますが、どれだかお分かりいただけますでしょうか。これは1つ以外は全て私が顔面器官を少しずつ動かして作ったものです。これなどはちょっと舌を出したり、これは不機嫌そうで、まずこれは違うなというのは、外れてしまうと思うんですが、どれが本物の「モナ・リザ」でしょうか。

では、またお伺いしてみたいと思います。この絵だと思われる方。はい、ありがとうございます。この絵だと思われる方。はい、ありがとうございます。この絵だと思われる方。はい、ありがとうございます。これだと思われる方。はい、ありがとうございます。これだと思われる方。はい、ありがとうございます。これだと思われる方。はい、ありがとうございます。これが今、手を挙げた方々の多い順はこれ、これ、これ。この3つは同じように手が挙がりました。ありがとうございます。

正解を申し上げます。これです。

これはちょっと目が笑っていないような感じに作りました。これはその当時のアイドルのような感じに作ったものが、これとこれです。ちょっと鼻と口の間の距離を短くしたり、あるいは口角をより強く上げたりというような、そういうことをしてみました。そうして、この正しい「モナ・リザ」と比べていただきますと、いずれも少しずつ違っているということにお気づきいただけるんですが、でも同時に、この絵を本当の「モナ・リザ」と言った方は多かったですけれども、でも半分にも満たない感じですよ。

つまり、私たちは「モナ・リザ」というものを自分の心の中に温めて、そして自分の理想のように昇華させているんじゃないでしょうか。つまり、「モナ・リザ」は今日もはやアイコンです。アイコン化した「モナ・リザ」というものを、私たちはそれぞれの心の中に抱えている。よく知っていると思っているはずの「モナ・リザ」の表情が外れてしまうのは、つまり、表情というものが移ろうものだからです。大好きでお別れしてしまった過去の恋人の面影は、やはり美しい表情でよみがえるのではないのでしょうか。

絵画の中における顔の2つの見方ということについてお話をします。

それは、1つは顔の内部にある頭蓋を見る見方です。それは陰影の中にある顔であり、立体として顔を捉えています。

2つ目は顔面の諸器官を見る見方です。目、鼻、口、眉の形や色、質感、そして配置です。それは取りも直さず表情でもあります。

第1の例ですね。レンブラントの自画像です。晩年の彼

は破産宣告も受け、妻や子どもにも先立たれ、客観的に見れば非常に寂しい晩年だったんですが、しかし穏やかなほほ笑みを浮かべているような、そういうスポットが当たったような形で光と影の中に自分を描いています。レンブラントは先ほどの顔の中にある頭蓋を見る見方、陰影の中にある顔、立体として顔を捉えています。

これは2つ目の見方です。フリーダ・カーロの自画像です。時代も場所も性別も違いますが、カーロはたくさん自画像をレンブラント同様残しましたが、ここには意志的なつながった眉、はっきりとしたまなざし、濃いひげ、はっきりとした唇、もうこの耳もしっかり描くんですね。しかし、私たちの耳というのは、この鼻や目と比べるとかなり奥まった位置にあります。この顔をクローズアップした中では耳というのはすごく奥にあるはずですけども、すごく細かく見るのでぐっと手前に立ち上がってきています。これは顔面の器官、その配置、色、形、質感、そういうものにこだわった見方です。

レンブラントの若い頃の自画像ですが、もうこの頃に彼は光と影の扱い方を自家薬籠中の物としておりました。

フリーダ・カーロの別の自画像です。少女の時代に負った事故により、彼女はもともと悪かった足と反対の足も失ってしまう。もう生涯、人前では自分の足を見せない、長いスカートをはいていました。このときに事故で負った傷、痛み、そういうものをそのときにどんなふうに分の心が悲しかったか、そういうことを草木のない風景で表象しています。また非常に説明的ですけども、釘によって刺された自分の体を描いて痛みを伝えようとしています。顔はといえば、涙の粒、顔面器官、この形、配意、そういうものに意識がある顔であります。

実を言うと、この光と影の中で描くという第1の見方は、ヨーロッパ美術の中でレオナルド以来の、つまりルネサンス期以来の、つまり美術解剖学が画家によって学ばれる、そのような時代の中で、光と影のこのような描き方がスタンダードになっていきます。

これは、ロシアの画家レーピンの、エスキースというのは本制作に至る前の習作のことなんですけれども、ささっと筆で大きな筆致で描かれたこの立体的な顔立ちは骨格が透けて見えます。特にこれなどは本当に頭蓋を真正面から描いたんじゃないかと思えます。レーピンは頭蓋を描いたんでしょうか。いえ、そんなことはないんですね。本当に痩せた人物、年取った人物、自然に見えてくる光と影を描いているとそういう人の中に骨が見えてくるという、そういう状況なんだと思います。

これに象徴されるようなものです。例えばレーピンの完成作を見ても、このトルストイの骨格が立ち上がってくるような、そういう表現です。

では、2つ目の見方。これはルネサンス期にもありまし

たが、「ルクレツィア」、クラナッハの女性のクローズアップですね。平板な顔の中に、いかに眉や目、鼻、口、そういうものが配置されているか。また、その色や質感はどうかということがテーマになっています。ファン・デル・ワイデンも同様です。

実はこの2つの見方を、骨格を意識した見方、目、鼻、口の形を意識した見方を取って、縦軸に時代を取って見ますと、14世紀ごろまでは、ほぼこちら（目、鼻、口の形を意識した見方）ですね。そして、15世紀、16世紀とルネサンスになりますと、骨格を意識した見方、つまり光と影というものの中に顔を描く見方が現れてきます。ここには画家の名前がいろいろありますね。ラファエロや、そしてレンブラント、ベラスケス、フェルメール、そして19世紀のクールベなどもこのような骨格を意識した見方になります。

ヨーロッパでもまた同様に、このような顔面の器官を配置、色にこだわる見方も同様にありました。日本はというと、後で出てまいりますけどほとんどこちらですね。そして、円山応挙、鈴木春信、そういう浮世絵や名画もありますけれども、この渡辺崋山の時代になりますと、幕末ですね、西洋画が少し入ってきて骨格というものの意識が、応挙もそうですけれども出てまいります。そして本格的に光と影というものを学ぶというのは、19世紀末、明治期に開国し、ヨーロッパに画家たちが学びに行き、そしてそこから新たな見方を持ち帰ってくるということですね。

ここにピカソの名が2つ書かれていますけれども、ピカソの青の時代は非常にオーソドックスに光と影の中に慎ましく暮らす人々を描いていました。一方、キュビズムのバラ色の時代。この時代には日本の浮世絵やアフリカの美術の影響を受け、顔面の器官、そういうものをもうばらばらに配置したりしていますので、顔面器官の配置にこだわった見方ということになります。

先ほど例に挙げた第1の見方のレンブラントとフリーダ・カーロはこのような時代差があります。

このような見方は、写真においても同様です。

例えば、政治家のポートレートは大体、第1の見方で撮られます。光と影の中で、陰影を持って捉えられます。メーキャップの写真は逆です。第2の見方、すなわち前から光が来、目、鼻、口、どれにも陰影は付かないような見方になります。フラットな平板な顔の中にどのように目——この場合は多分リップスティックだったと思いますが、その発色の美しさ、艶やかさ、そういうものをプレゼンテーションする。そういう見方ですね。

これは第1の見方です。ピカソの肖像写真です。ピカソの骨格が現れてくるような見方。これも何かのメーキャップの写真ですが、コーカソイド系の彫りの深い顔立ちですが、ここではもう全くフラットです。平板な中に眉や目や

口がどのように配置されるか、その色や形が重要なわけですね。

このようなことを考えていて、私たちは2つの見方をしているということです。それは、実は私たちの持っている網膜の奥にある視細胞、コーンとロッドがありますけれども、昼間、私たちはコーンセルを働かせて、そして明るい光の中で顔面の器官、その配置、色、そういうものを見ています。それは実は第2の見方なんですね。で、夜になると私たちのコーンは眠ってロッドセルが起きてきます。たそがれ時というのはものが見にくいですが、ちょうど40分ぐらいかけてコーンセルからロッドセルにスイッチをしています。そのロッドが見るのは、立体的な光と影の中の顔なんですね。

対応しているじゃないかというふうに思いました。これは証明はしていません。しかし、この2つの見方と——顔の2つの見方、それと私たちの視細胞、それが何か対応しているように思います。

日本の絵画で、顔はどのように表現されてきたのでしょうか。先ほどグラフが出ましたのもうお分かりだと思います。2つ目の見方です。

この美しい——焼損して焼けてしまいましたけれども、法隆寺の金堂のこの顔の中には本当に壁面と同じフラットな顔面の中に、目、鼻、口、それがどのような形か色かということが重要になっております。これもそうです。私たちは第2の見方を伝統的に持っております。そして、今日の私たちが煌々と明るい蛍光灯の下で人の顔を見るほうが大好きです。だから、ヨーロッパを旅するとどこもかしこもなんて暗いんだろうと思ったりします。

そのようなことは、実は舞子さんのこのような化粧にも現れていると思います。伝統的に歌舞伎の化粧もそうですけれども真っ白に塗り込め、陰影を消してしまう。そして、新たに目、鼻、口というものを描くということですね。

これは歌麿の「寛政三美人」という図ですけども、全くフラットで影がありません。目、鼻、口、その色、形、配置が勝負というところですね。明治になりましたも、これは上村松園の「螢」という美人画ですけども江戸から自然に繋がった同様の見方です。

そして、今日の私たちにとっても、やはり顔は平板なですね。これはジブリの映画ですね。こっちは「トトロ」ですね。これは、タイトル何でしたっけ。あ、そうですね、ありがとうございます。「千と千尋の神隠し」でした。ここにちょっと影があるじゃないかと思われるかもしれませんが、実は顔の立体を表すためにはありませんよね。私たちは、こういう、フラットな顔を好むんですね。光と影の中ではなく、顔面の諸器官の形、色、配置。こちらは「魔女の宅急便」です。

そして、現代美術もそうです。この村上隆のこれらの絵

も、先だって森美術館で大々的な回顧展もありましたけれども、彼ももともとは日本画の出身で、日本画はフラットに対象を見ます。その日本独特のフラットな見方を彼の絵の強みとしてアメリカに打って出て、国際的に活躍するようになったわけです。

まとめますと、顔の見方には、陰影の中で立体に見る見方、そして顔面の諸器官の形、色、配置にこだわる、そういう見方の2つに分けることができます。そして、網膜の視細胞も昼間視と夜間視で視細胞を使い分けていまして、陰影の中での見方は夜間視の桿体細胞との特性と、また昼間視、それは形、色、質感、配置の昼間視の錐体細胞の特性と対応しているように見えます。

日本の伝統的な顔の見方は2つ目、つまりこの形、色、質感、配置にこだわる見方であり、顔の平面性は今日のアニメーションや現代美術にも見出すことができます。私たちの視文化の特徴、これは「視の型」、目がもうそういうふうに見るようになっていくというふうにもいいかもしれません。

では、私たちがあまり見ることをしていない、この頭蓋というものについて少し見ていきたいと思います。

これは解剖の教科書ですのでさっと見ていきますが、これを見ると大人の頭蓋であるということが分かります。これは子どもの頭蓋です。歯がないですものね。でも、同じ歯がなくても、これは子どもには見えません。これは無歯顎、歯を失ってしまった高齢の方の頭蓋です。でも、どことなく子どもに似たところもあります。だから私たちは、老いて童顔に戻る、なんていう、そういう比喩も持っています。

骨と生体、これはどのぐらい違うかという、このぐらい距離があります。頭や顔は大きく骨格の影響を受けているということです。これはかなり太った方なんですけれども、つまり私たちは、骨格というものを無視して顔面を考えることはできないのだということです。

そして次には、骨格の可変性ということを見ます。これは古代エジプトのアケナトンの娘と言われるネフェルティティの像です。これは石像ですけども王女の像ですね。このフォルムは非常に美しいものです。古い美術史などをひも解きますと、これはエジプト彫刻のデフォルメであるなんていうふうに書かれているんですが、実はそうではありません。これは人工的に作られた頭部で、それをそのまま写しているものです。

この長い頭に、女性らしく前傾した首が、ムーブマンの美しさをより高めていると思います。ムーブマンというのは、その造形物に感じる動きのようなものですね。動きの勢いと書きますけれども、高村光太郎がムーブマンを動勢というふうに訳しましたけれども、英語でムーブメントというところとちょっと別の意味になってしまいますので、フラン

ス語のムーブマンをそのまま日本の造形では使っています。

実はこれは、ここを固く結びまして、ヘアバンドをきつく巻いて、そして頭蓋が伸長する方向を後ろだけに限ってしまう。そのことによってこういう頭が出来上がったんですね。とても素敵ですけども、もう成人してしまうととても無理です。どのように作られたかという、子どもの頃から例えばこういうふうな板を当てます。そして、ずっと張力をこのひもに掛け続けるわけですね。そうすると、こことここは伸びることができませんので、頭はこういうふうに伸びていきます。これはちょっと伸びている状態ですね。これはもっと強力な感じがします。痛かっただろうなと思うかもしれませんが、そんなにすごい圧ではないと思います。

例えば別の方法としては、これはネフェルティティと同じような方法ですね。ぎゅっと頭を縛っている少女ですけども、大人になるとこのような頭になります。これは時代も場所も多様に見いだすことができます。古代エジプトやこのようなフランスでも、場所によっては近世まで行われていました。ただ、人間の体に行われるこのような身体変更は、その人が亡くなってしまいますと失われてしまいますので、今はなかなか見ることができません。

そして、インカですね。中南米、ペルーやそういうところにもありました。これはネイティブアメリカンのお母さんですが、これは現代的な視点から見ると幼児虐待以外の何ものでもないように思えますが、決してそうではなくて、このお母さんは精いっぱいこの子をかわいがって育てています。

昔ですと、赤ちゃんがばたばた暴れるのは、これは良くないと思ってぎゅっと固く縛ったりします。実はそれはスワドリングという育児法として東ヨーロッパなどにもあるんです。ひょっとしたら幼児キリストのイコンの像の中に、繭のようなものの中に巻き込まれたキリストを抱くマリアのような像をご覧になったことがあるかもしれません。

赤ちゃんは妊娠の最後の頃というのは、ものすごくお母さんのおなかの中が狭いので、その子宮の狭さみたいなものを感じるのか、ぎゅっと抱っこすると泣きやんだりするというのは事実でありますし、そのスワドリングには一定の合理性があると考えられます。

ですけども、この気を付けの姿勢でぎゅっとされているのを見ると、かわいそうになってやっぱり思ってしまいますね。それから、この頭に当たっている板ですけども、これもぎゅっとものすごく強い力がかかっているみたいですけども、これもお母さんのような格好いい頭にしてあげなきゃという、お母さんの愛情そのものですね。私たちは生きている今日の価値観、倫理観でどうしてもものを見てしまうんですけども、こういう多様な美意識がありました。

これは本当に上顎以下が失われてしまっているの、これが頬骨で、これが眼窩です。ですので、いかに頭が大きく後ろに高くそびえているかということがお分かりいただけると思いますが、このようなDeformed skullというものがありません。

私たちは、本当に簡単に過去は野蛮だとか野蛮な地域だというふうに言ったりしてしまうんですけども、実はその地域によって時代によって、美意識も揺れてきているということです。

そして私たちは、例えばこのような2つのコントラストを見ますと、顔の違い、どちらが美しいと思われるでしょうか。すみません、これは絵画と彫刻で、本来比較しようがないものかもしれませんが、この最後のスライドでも手を挙げていただきたいと思います。こちらが好きとおっしゃる方はどのくらいいらっしゃいますか。はい、ありがとうございます。こちらが好きとおっしゃる方。はい、良かったです。でも手を挙げてくださる方が10名くらいはいらっしゃいました。

実はこれは、先ほどささっと流してしまいましたけれども、最初のほうはゴヤですね。18世紀の終わりから19世紀にかけてのゴヤ——スペインの画家ですね。その人の「イザベラ」という絵です。ここでは、ゴヤは同国人の美というものをいかに、黒い衣装に身を包んだ本当に美しい女性を表現していると思います。この顔は彫りが深いです。非常に立体的な顔立ちを持ち、そしてはっきりとした二重のまぶたを持ちます。そして唇はぼつりと重厚感ある厚みを持った存在感ある赤い唇です。これを現在の私たちも美しいというふうを感じるんですね。

もう一つのほうは、実は浄瑠璃寺の吉祥天です。古色が付いて、顔の色がどうしても色が付いているものですから、これはもう本当に美しい造形なんです。見事な造形なんですけれども、それでちょっとモノクロにしてみます。

絵画と彫刻を比べるなんてちょっと無謀ではあるんですが、ここには非常に東洋的な顔の美というものが表現されています。平板な立体感のない顔立ち。そこにぐいっと引かれた長い眉と切れ長の細い目ですね。そしてその目は、実際の目よりもずっと長く表現してあります。そして口元は小さくて、しかし花が開いたように美しい形を持っています。鼻筋は通っていますね。そんなに高くないんですけども、しっかりと通すというのがやはり美だったんで

すね。

このような平板な顔というものは——先ほど手を挙げていただいたんですけども、ほぼ9割ぐらいの方が「イザベラ」の美を好みとして手を挙げてくださいました。私たちはその昔、例えば安土桃山時代でしたら、南蛮人渡来図屏風などがたくさん描かれました。南蛮人はポルトガル人、そして紅毛人というのはイギリス人だったようです。そういう西の野蛮な人というふうな捉え方をして描いていました。

当時には、鼻が高くてもみっともない、なんていう記述もあったりしたんです。しかし時代が変わって、明治の開国以降、私たちは欧米のものを無条件に取り入れて、そして美においても今日の私たちの美的規範というのはどうもヨーロッパにあるようです。でも、伝統的に持っている私たちの今日的な美意識というのものも、やはり大事なのではないだろうかということです。

私たちがこのように平板な顔立ち、そして張り出した頬骨や低めの鼻、そういうものを持つのは、実は寒冷地適用と考えられています。それは日本人の二重構造モデルということをお話になった埴原和郎によれば、もともと縄文人というのは南のスワンランドと言われる、今で言うとフィリピンとかインドネシア、そういう土地にいた人たちだったのではないかと。そこに新たに北方適応した弥生人と言われる人たちが、それは地図で言うと北のほうの大陸から来た人たちということですね。それが入り込んで弥生時代、そして古墳時代、そしてこのような奈良時代にもつながっていると考えられます。

今でも私たちの顔の中に縄文型、弥生型というものを見出すことができるのは、やはりそういう二重構造モデルという、その理論があるからなのかもしれません。ですので、私たちはこのような顔というものを本当に仏像としてしか拝まないのではありません、それは実は残念なことかもしれません。

最初に顔の見方ということからお話をしてきましたけれども、私たちは目、鼻、口、そういうものの配置というものにもすごくとらわれる、そういう「視の型」を持っており、そしてこのような文化というのものも、時代とともに移ろうものであるというふうにご覧いただいております。

ご清聴ありがとうございました。そして本日は本当におめでとうございます。

コスメトロジー研究雑感

平成 26 年度 研究助成

化粧品素材としてのポリフェノール

江島 広貴

「天然を超える抗酸化&抗菌活性の発現をめざしたポリフェノール模倣高分子の精密重合」と題した研究を平成26年度より2年間助成していただきました。本研究課題では植物性ポリフェノールに多く含まれているガロール基という化学構造に着目し、高い抗酸化/抗菌活性を持つ新規機能性高分子材料の開発に取り組みました。これは自然に学び、分子をデザインして、それを高付加価値な人工材料の創製につなげようという試みですが、そもそも天然に存在する植物性ポリフェノールは既に化粧品にも多く配合されており

市販されている化粧品で特に目にする機会が多いポリフェノールはイソフラボンでしょう。大豆及び大豆胚軸から水/エタノールで抽出され、これを含有する商品が数多く販売されています。大豆イソフラボンは*in vitro*でチロシナーゼ阻害作用、動物実験で経口摂取によるメラニン生成抑制作用、コラーゲン生成促進作用、ヒアルロン酸生成促進作用などがすでに認められています。また、キッコーマン株式会社では、大豆イソフラボンのヒト経口摂取による美肌作用を検証しており、肌弾力性改善効果とシワ悪化抑制効果を確認していると聞きます。一方で、イソフラボン

は女性ホルモンであるエストロゲンに似た性質も持っているため、過剰摂取によりホルモンバランスを崩す危険性があります。よって、化粧品として使う場合にも過剰な摂取には注意が必要でしょう。

天然の植物がポリフェノールを生合成することは、進化の上で適応してきた結果であり、植物自身にとって何か重要な意味があるはずで、それは植物自身を紫外線や病原菌から守るためと主には考えられていますが、ポリフェノールは植物界のみならず動物界にも多種多様なものが存在することが最近注目を集めています。厳密な定義では動物界のポリフェノールはポリフェノールとは呼びませんが化学構造的には似ています。一部の貝はポリフェノール性タンパク質を岩との接着に利用しており、きっとまだまだ多彩な機能がポリフェノールには隠されているのではないかと感じさせます。そのヒントは生物が長年をかけて最適化してきたポリフェノールの分子構造の中にあると思います。今後も自然の恩恵に感謝しながら、ポリフェノールにヒントを得た新規機能性素材の開発研究に取り組んで参ります。

(東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻)

平成 26 年度 研究助成

天然物化学と香粧品の関わり

杉本 幸子

私は大学で薬用植物学と天然物化学の講義を受け持つ中で、いかに天然から得られるものが人類にとって有効であったか、そしてこれからも有効であるようなことを教える立場にある。もちろん今日ある医薬品のリード化合物となった天然物は数知れず、現在も合成医薬品にも負けない天然物由来の医薬品は多い。ミブヨモギは駆虫薬としてかつて一世を風靡した植物であり、ミブヨモギを産生するために栽培場も広く作られたが、現在ではほとんど使われなくなってしまった。もちろん駆虫薬を使わなくてもよくなった現在に不満があるわけではないが、時代とともに必要とされるものが変わってくる。

時代とともに変わってきたといえ、おそらく人間の香りセンサーも変わってきているのではないかと感じる。

生薬のジャコウはワシントン条約により取引が禁止され

ているジャコウジカの雄の分泌腺を使用するが、このジャコウはその昔、良いにおいがするとして筆筒に入れて香りを楽しんだとの伝えがあるが、実際に嗅いでみると、けして筆筒には入れたくない匂いである。昔の人はなぜこれをいい香りとして扱ったのかはわからないけれども、今のような大気中にたくさんの化学物質が浮遊していない時代はもっと香りに敏感だったのだろう。そしてその繊細な香りを楽しめた時代があるのかと思うと、少々残念に思う。というのも、薬草園の見学者にシナモンの香りやショウガの香りを生で体験してもらうことをしているが、若い世代ほど匂いに鈍感である傾向にある。今後も天然物素材からの化粧品に有効なものを探索するが、常々世界の流行や我々の体は周囲の環境によって変化していることを感じとりながら、社会に必要とされる研究を進めていきたい。(広島大学)

自己組織化の魅力とコスメトロジー

鳴瀧 彩絵

無秩序な状態にある構成要素が、それらの相互作用を経て自律的に秩序構造を生み出す現象である自己組織化に魅せられ、15年以上研究をしてきました。この間、合成高分子や無機イオン結晶、ナノ粒子などいろいろな素材を扱ってきましたが、アミノ酸1残基からのシークエンス制御が可能な高分子であるタンパク質はやはり面白い、という思いに至っています。遺伝子工学の技術を用いて人工タンパク質を合成し、それを水中で高次の構造へ組織化させる基礎研究を進めるうち、「エラスチン」というタンパク質を模した人工タンパク質が、水中で人肌に温めることで、秩序立ったナノファイバーを形成することを見出しました。エラスチンは、コラーゲンと並んで人体に欠かせない構造タンパク質ですが、生体から抽出して使おうとすると、その高い疎水性のためハンドリングが難しく、利用が遅れていました。エラスチンのナノファイバー化の成果を社会に

役立てることはできないかと考えていたところ、貴財団の研究助成事業が目にとまりました。コスメトロジーという言葉と初めて出会い、コスメトロジー学がカバーする領域の広さに驚かされるとともに、研究のインスピレーションを得ることもできました。今回、研究助成金のご支援をいただき、エラスチンタンパク質の分野ではこれまでに例のない極低濃度で、ハイドロゲルを得ることができました。再生医療や創傷治療のための細胞足場として展開していきたいと考えています。

人体は自己組織化現象の宝庫であり、自己組織化の研究はコスメトロジー学や医学・薬学と非常に相性の良いものだと感じています。基礎研究が応用へとつながる道を拓いてくださった貴研究助成に深く感謝するとともに、今回得られた成果を大きく発展させるべく努力を続ける所存です。
(名古屋大学大学院工学研究科応用物質化学専攻)

コスメトロジー雑感

三浦 佳子

研究助成金はあちこちよく申し込んでいるため、“コスメトロジー研究振興財団”という貴財団の名称はずっと以前から存じ上げていて、変わった研究の名前だなど思いながらずっと記憶していました。コスメトロジーという分野については現在も完全に理解しているわけではありませんが、電気かバイオしか出口がないのに対して、化粧品に対する科学という新しく幅広い分野があるのは、とても面白く感じました。

我々の研究室ではナノゲルという100-500nmの小さな粒子を用いた合成高分子の研究をしており、タンパク質を特異的に捉える材料の開発を最近はじめました。ナノゲルは様々な用途があり、私は物質の吸着材料として作用することを中心に検討を行っています。ある日、ナノゲル溶液を放置していたところ、自然とナノゲルが集積化して青色を呈するのを見つけました。実際ナノゲルの溶液はいつもうっすらと青くて、構造に基づく色をいつも出してい

ます。ここから発想して、ナノゲルに関する構造色の研究課題について提案いたしまして、助成をいただくことになりました。その後、構造色に関するバイオセンサーの開発に成功しました。助成の課題申請書に申し込んだ内容に比べて実際には色を制御したり、発色させることは難しく、申請したほど思った発色を示しませんでした。ゲルの粒径制御や分子認識性の制御などに大きな成果を得ることができました。発色の研究ということで提案したために、色の研究としてはかなり苦戦し、報告書などの点で財団の皆様には毎回大変ご迷惑をおかけしました。お詫び申し上げます。ナノゲルの提案としてはとても発展し、2017年に入って、Nature Chemistryにバイオテクノロジーの応用に向けたナノゲルの開発を報告することができました。特に財源にはいつも苦勞しており、貴財団にはとても助けられました。(九州大学大学院工学研究院化学工学部門)

平成 26 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

道信 剛志

今回は水溶性フラーレンを合成して抗酸化作用を評価する研究を行いました。まずはご支援に厚く御礼申し上げます。もともとは有機太陽電池のアクセプターとしてフラーレン分子を用いていたのですが、その新しい応用を探索するつもりでこの研究を始めました。そのため、過去の文献検索から始まり、抗酸化作用の評価方法を修得するまで実に長い時間がかかりました。ただ、苦労した分だけ経験値が上がり、今後の研究や教育活動に活かせるような気がしています。それこそまさに異分野研究の醍醐味だと思っています。さて、この研究を通じて今更ながらフラーレン C₆₀ の化学構造に興味がわきました。ご存じの通り C₆₀ は球状分子であり、通常の化学反応では収率よく合成することが難しい分子です。宇宙空間に漂っていたりするそうですが、どこでどのようにして作られたのか大変不思議です。

また、その対称性の高さゆえラジカルを補足して安定に保持できるという特徴があります。本研究ではその特徴を活かして抗酸化剤として用いたわけですが、研究自体は予想外の困難もありましたが一応計画通り進み、抗酸化作用の評価まで実施することができました。残念ながらまだ学術論文として発表できていないので、これから時間を見つけてまとめの作業をしていきたいと思っています。そんな状況にもかかわらず、どういう伝手なのか分かりませんが、ある化粧品会社からこの研究内容について問い合わせがありました。もしかしたらコスメトロジー研究振興財団の助成リストを見ていただいたのかもしれない。うまく共同研究に発展できるよう追加実験と打合せを重ねていきたいと思っています。

(東京工業大学物質理工学院)

平成 27 年度 研究助成

生体材料とコスメトロジー

宮崎 敏樹

私の研究グループでは無機材料、有機材料、金属材料やこれらを組み合わせたハイブリッド材料などを使った医療用材料の研究を行っております。骨や歯の修復、体内深部がん治療などを主な研究ターゲットとしています。この種の材料設計では、微粒子の粒径や形態制御、材料表面の電荷や化学構造制御が生体適合性を支配する主な因子となっており、これらの最適化がきわめて重要です。生体材料に関連する学会や研究会を拝聴していると、化粧品の開発者が講演されることがしばしばあり、生体材料の設計思想はまさに化粧品の目指すところと同じだなと感じていたとこ

ろ、コスメトロジー研究振興財団の研究助成公募を目にし、応募するに至りました。本研究助成を契機として、研究の対象をドラッグデリバリーにも向け、これらに関する基礎的な成果が得られただけでなく、科研費等のプロジェクト応募に向けた新たなアイデア創出にもつなげることができました。化粧品業界は学生の就職先としての関心も高く、最近大学の同級生が外資系化粧品メーカーに転職したという話も聞きました。今後もこれをご縁に、コスメトロジーに関する研究動向にも注目していきたいと考えています。

(九州工業大学大学院生命体工学研究科)

光を当ててくださった

安永 秀計

髪を染めていない人にとっては、「髪など染めなくても生きていける。」ということであろうが、髪を染める必要に駆られる人にとっては、「何としても染めたい。」のである。実際、世界的な染毛人口の多さを考えれば、人類にとって染毛は容易に放棄できない重要な習慣・技術であるといえよう。

染毛とは染色する対象がヒトの毛髪であり、そこには他の材料や製品の染色とは異なる独特の科学的世界と技術的特徴がある。その基礎科学を探究する面白さがある一方で、実際に人体に応用される染毛技術においても解決されるべき課題が沢山ある。したがって、より多くの科学者や技術者がこの分野に集って協力し合うことが求められる。

しかしながら、私が専門としている染毛科学の分野に関して、現在の日本には「染毛学会」なるものはない。その理由の一つは染毛を研究している研究者、特に大学や公設の研究所に所属する人の数が少ないことである。そのために、自らの研究に関して他の専門家とじっくりと議論できる機会が少ない。

そこで、研究と同時に教育を生業としている身としては、この分野の専門家の育成にも力を注がなければならないのであるが、自身の非力さを痛感するばかりである。

そして、研究の推進のためにさまざまな協力と努力が必要であり、研究に必要な費用を工面することも重要である。ところが、研究費を獲得するために、例えば科学研究費助成事業（科研費）に応募の申請書を作成する際に、「分科・細目」を記入しようとするのが困ってしまうのである。【染毛】はおろか【染色】もない。つまり、「染毛科学」が認知されていないのである。論文を投稿する先の適切な雑誌を探すのにも苦労しているのであるから、まず、この分野を確立せねばならない。

そんな状況下にあつて、コスメトロジー研究振興財団の存在はありがたい。この度助成して戴いたのは、染毛はコスメ（化粧）分野の一角を占めていることを認定し、私の専門分野に光を当ててくださったことのように感じる。財団のますますの発展を願う。

（京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科繊維学系）

タイトジャンクション研究の新展開

池ノ内 順一

私は、タイトジャンクションに関する研究課題に関して研究助成を頂きました。皮膚におけるバリア機構としては角質のセラミド層について、多くの先行研究が為されています。それに比べて、タイトジャンクションによるバリア機構については、あまり研究が為されておられません。タイトジャンクションは、細胞同士の接着構造の一つで、細胞同士を密着させる役割を担っています。皮膚においては、顆粒層の細胞がタイトジャンクションを持ち、体内の水やイオンが体外に漏出することを防いでいます。

タイトジャンクションの主たる構成タンパク質はクローデインと呼ばれる膜タンパク質です。クローデインには27種類のアイソフォームがあり、その中でクローデイン1が皮膚バリアの形成に必須であることが明らかになっています。クローデイン1を欠損したマウスは、顆粒層で機能的なタイトジャンクションが形成できず、アトピー性皮膚

膚炎に類似した症状を示すことが明らかになっています。私は学部生と大学院生の間、クローデインを発見した月田承一郎教授の研究室で、タイトジャンクション研究に従事させていただきました。在籍当時はクローデイン以外のタイトジャンクションを構成するタンパク質を探するというプロジェクトを行いました。見つかったのは3つの細胞の間のタイトジャンクションにのみ存在するトリセルリンというタンパク質です。その後、大学院を出て10年経ちましたが、タイトジャンクションを構成する新規タンパク質の同定に関する論文はあまり出しておらず、タイトジャンクションの分子構築に関する知見はほぼ出揃った感があります。

2013年に自分の研究室を立ち上げた際に、今後タイトジャンクション研究の中心的な問題は何かと考えると、タイトジャンクションの形成量の制御機構の解明であろうと思に至りました。クローデインを発現ベクターなどで大

過剰に細胞に発現させても、タイトジャンクションの形成量は増加しません。一方で、細胞を高浸透圧の培地に曝すと、15分程度でタイトジャンクションの形成量が増加します。このとき、クローデインのタンパク量は変化していません。このように、何らかの方法で細胞は自分がどれくらいタイトジャンクションを形成するべきかを知り、その量を調節している可能性があります、そのメカニズムは全く不明です。

今回、貴財団より助成いただきました研究は、このタイトジャンクションの量の制御機構に関する論文で、独立後の最初の論文になりました。論文は現象の記載が中心で、分子メカニズムに関しては不明な点が多々残されていますが、今後の研究で明らかにしていき、化粧品開発に有用な知見につなげたいと考えています。

(九州大学理学研究院生物科学部門)

平成 26 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

岩脇 隆夫

私はずっと主に小胞体ストレスについて研究を行っている。その過程で小胞体ストレスの動物個体レベルでの解析の重要性を信じ、世界に先駆けて小胞体ストレス可視化モデルマウスを作製した。このマウスを用いれば生きてままで小胞体ストレスが調べられる。それ故、このマウスの利用価値は大きく、その広い普及を通じて世界の小胞体ストレスに関連する疾患の研究に深く貢献してきた。小胞体ストレス可視化の研究成果を学会などで話すも他のストレスでも同じように可視化技術ができないのか？と頻りに質問を受けた。それがキッカケで本助成研究でも中心となっている酸化ストレス可視化技術の開発に取り組んだ。酸化ストレスは小胞体ストレス以上に健康問題に大きく関わっており様々な疾患の原因究明や治療法開発に役立つだろうと

の期待からである。そう期待するには当時から今日に至るまで私自身の所属が医学系であることも大きく影響している。ただ実際に技術開発に成功して意外だったのは、この技術に関する問い合わせが医学・薬学分野の研究者と同等に化粧品会社や食品会社などからも押し寄せたことである。化粧品会社からの問い合わせがなかったら今回助成を受けた研究のアイデアは思いもつかなかったであろうし、財団より支援を受けることもなかったであろう。そういう意味で自身の研究に幅ができたし、実に良い経験をさせてもらった。本成果がどれだけコスメトロジー分野やスキンケア研究に貢献できたかは分からないが、少しでも次の研究へ繋がれば嬉しく感じる次第である。

(群馬大学大学院医学系研究科教育研究支援センター)

平成 26 年度 研究助成

基礎研究と臨床の橋渡し

岡野 純子

橋渡し研究が盛んなようである。何が橋渡しかという、基礎研究を臨床に結びつけるということらしい。私は大学院生時代、基礎研究室にお世話になったが、ボスは「基礎研究は、臨床にただちに結びつくものではない、長時間の研究を経てやっと臨床に結びつくものもある」と言っていた。もっともである。基礎分野でいくつもの知見が重なり、それがやがて臨床に応用する基盤となるのであるから、時間がかかるのは当然なことなのだとボスは言いたかったのだと思う。

ビタミンAの誘導体であるレチノールが皮膚のたるみ

やしわに良いことは、数十年前から市井の人でも知っている。しかし、レチノールを塗布するだけではどの程度、どの深さの細胞にレチノイン酸が届いているかわからない。レチノイン酸は基底細胞全体に作用するのが良いのか、基底細胞層にあるごく少数の幹細胞に直接作用すれば効果的なのか、まだまだわからないことだらけである。基礎研究では、遡って20世紀の遺伝子が次々とクローニングされた時代にレチノイン酸経路に関与する遺伝子は数多く見つけられ様々な成果があがっているのに、未だにヒトが身近に接するレベルではレチノールがどうのこうのと言っている。

しかもレチノールやレチノイン酸は脂溶性であり、過剰摂取では特に胎児催奇形が指摘されている。従って医薬品および化粧品に応用する際は、きちんと標的細胞を定め、かつレチノイン酸が分布する濃度に関するデータを持っているべきである。

これらの背景から、レチノイン酸を可視化するマウスを作製することは比較的臨床への橋渡しが近いのかと考えた。レチノイン酸自体は遺伝子ではないので、直接可視化できないという問題があったが、基礎研究の成果の恩恵から、可視化に適した遺伝子を見当をつけることが可能であ

る。思いの外時間がかかってしまっているが、貴財団に頂いた研究助成金によって着手可能になったマウスが完成すれば、レチノールが皮膚のどの細胞を標的としているのか同定できる。さらに、レチノールより効果がありかつ安全な医薬品が市井の人に届けられる可能性がある。それが実現すれば基礎とコスメトロジーの橋渡しができることになり、ささやかながら世の中に貢献ができるかも、と希望を持って今日も大学に通っている。

(滋賀医科大学解剖学講座生体機能形態学部門)

平成 26 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

尾上 誠良

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頂き、厚くお礼申し上げます。今回の助成対象として頂きましたのは薬剤性光線過敏症リスク予測に関するものです。医薬品売り上げ上位リストを見ますとその半数程度には光線過敏症が副作用の一つとして挙げられており、化学物質の安全性に関する近年の高い関心と相俟って、国際的なレベルで標準化された光安全性評価方法の開発が急務の課題の一つとなっています。光安全性評価方法に関する ICH S10 ガイドラインが 2014 年に公示されたことによって、国際的に標準化された戦略に従って光安全性評価を実施できるようになりました。しかし、現状のガイドラインで実質的にカバーされているのは光刺激性のみであり、他のタイプの光毒性リスク予測はまだ完全には出来ていません。これは、現状では光刺激性に関しては評価系が充実しているものの、光アレルギー性、光遺伝毒性

及び光がん原性の評価方法はまだ十分な選択肢があるとは言えない現状に起因していると考えます。それ故、光刺激性以外のリスクを評価可能な信頼性ある評価系の開発が未だ残る重要かつ難解な課題であり、今後、特に経皮適用剤や化粧品素材の光安全性を担保していくためには必須でありましょう。包括的な光安全性評価の為には *in vitro* 光毒性反応とその機序に関する情報だけでなく、被験物質の光化学的反応性を中心とした物理化学的特性、皮膚移行性ならびに皮膚滞留性などの薬物動態学的特性を深く精査することも必要であると考えます。これら光安全性評価系のさらなる充実とより詳細なメカニズム解明が光安全性に優れた新規物質の創製に結実するものと強く期待しつつ引き続き検討を続けて参りたいと考えております。

(静岡県立大学薬学部薬物動態学分野)

平成 26 年度 研究助成

気分高揚していた香り

菊地 和也

私は2月に咲く沈丁花の匂いが大好きである。春が来た、と体感できる気分が高揚する香りであると思っている。冬は苦手だが、苦手な理由は寒さより、鬱蒼とした夜が長いことである。しかし、2月に入ると、日に日に夜明けが早くなり、その冬の最終章において季節の移行を感じ、春への胸のときめきを決定づけるのは沈丁花の香りだ、と考

えてきた。言い換えれば、香りと視覚が同期して春の喜びを感じてきたのである。しかし、今年の2月にはほとんど沈丁花の香りがわからなかった。家族に同意を求めたが、どうやら今年も良い香りがしているらしい。そこで32年前にパリの百貨店で購入した、沈丁花の香りのする香水(Casaque)を取り出してみた。確かに、沈丁花の香りはす

るが以前ほどのパンチの効いた影響はなく、意気揚々な気持ちにはならなかった。家族は強く明るい気分になる匂いがする、と言っている。なんということか、気付かぬうちに自分が老化していて嗅覚が鈍っていたのだ。ここ2-3年で老眼が進行していることを実感していたが、それ以上に衝撃を覚えた。思えば、この香水を買った日のことは昨日のように覚えている。久しぶりにこの香水を開け、昔の記憶がよみがえってきた。当時は1泊千円ぐらいの宿に泊まっていたため、パリでの滞在費全てと同じぐらいのなけ

なしの予算でこの香水を購入した。残念ながら香りは記憶に留まっているが、当の本人の体は以前の感受性は持っていないらしい。激しい焦りを覚え、今後の自分の仕事や人生への向き合いかたに警鐘を与えてくれる、貴重な経験であった。パリで香水を購入した頃の、自分の目標は達成されているだろうか？花や香水の香りは永遠に再現されるが、自分の人生はうつろいやすい。そのなかで、悔いのないように時間を使っていきたい。

(大阪大学大学院工学研究科)

平成 27 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

木戸 博

2016年のNHKスペシャルによる報道と、この報道を基にした単行本、「アレルギー医療革命」(文藝春秋社)等によって、多くの国民は、従来のアレルギー治療の常識が大きく変化してきたことを認識し始めている。話題の中心は、「乳児期に始まる食物アレルギーの原因が、未熟な消化管を持つ乳児がアレルギー性食物を食べる事によって食物アレルギーを起こすのではなく、湿疹等によるアレルギーの経皮感作で食物アレルギーが起きることが証明された」事である。これまで多くの研究者の間で、食物アレルギーと経皮感作は直接関係するとは思っていなかったが、これが直接関係することが明らかになったのである。アレルギー

性食物を乳児期の早期から食べさせる事は、むしろ食物アレルギーを予防することとして早期離乳食摂取が始まっている。本研究では、このアレルギーの経皮感作を予防、治療する取組として研究させていただいた。研究は始まったところであるが、今後重要な意味を持つ研究成果として期待している。

最後に、本研究を遂行するに当たり研究助成の支援をいただきましたこと、コスメトロジー研究振興財団と関係者の皆様に心より感謝申し上げます。

(徳島大学先端酵素学研究所生体防御感染症病態代謝分野)

平成 27 年度 研究助成

コラーゲンや体内の脂質構成が体の温度適応に与える影響

久原 篤

このたびは貴財団の第26回研究助成に採択いただきまして、深く感謝申し上げます。一昨年度に研究室が大きくなりましたため、非常に勇気を頂き、天からの恵みとなりました。本助成研究のテーマは、皮下組織のコラーゲンが体の温度適応に与える影響を線虫をつかい解析するものです。線虫の温度適応研究は、現象の発見から始めたゼロからのテーマでしたので、採択されるとは思いませんでしたので、背中を押して頂いたと同時に、期待に応えられるよう結果を出すために精進したいと思いました。

本研究室では、*C. エレガンス*とよばれるちいさな線虫をつかって、動物がどうやって周りの環境温度を感じ、記憶

や適応するのかを解き明かそうとしています。具体的には、*C. エレガンス*の温度にたいする応答に着目して、動物が温度を感じるメカニズムや、温度環境に適応するメカニズムを解き明かそうとしています。これまでに、線虫の研究から、温度の感覚や記憶に関わる多数の遺伝子が見つかり、それらは人間の病気にも関わっていました。

本研究助成では、皮下組織のコラーゲンや体内の脂質構成が体の温度適応に与える影響を解析しました。その中で、予想外の結果が一部得られ、精子の変異体において、体内の脂質構成が変化していること、さらに、精子が頭部の温度感覚神経に影響を与えていることがわかりました

(Sonoda, et al., *Cell Reports*, 2016)。また、コラーゲンと温度適応の関係性も見つかりました。

今後はこれら現象をもとに、より実学に近い研究も進めたいと考えています。エレガントな動物のエレガントな応答のメカニズム、それを解き明かす研究は果てしな

いですが、目指す先にはしっかりと光が見えます。

これからも、本助成を受けられる多くの研究者の皆様のご活躍と貴財団のさらなる御発展をお祈り申し上げます。

(甲南大学統合ニューロバイオロジー研究所)

平成 26 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

佐々木 均

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、深く感謝申し上げます。本研究は、コスメトロジーの観点から、皮膚の恒常性をRNA干渉で制御する方法論を開発することを目的として遂行しました。皮膚は人体最大の臓器であり、絶え間ない異化同化を繰り返し、恒常性を保っています。しかし、外来抗原や紫外線などの刺激、表皮の細菌増殖、老化などにより、恒常性が破綻すると、しみ・そばかす、にきび、アレルギー疾患、感染症、膠原病、悪性腫瘍など、様々な疾患が引き起こされます。近年、皮膚疾患の理解が進み、治療の標的となる疾患原因遺伝子や疾患関連タンパク質等が同定されました。このような背景の中、遺伝子量やタンパク量を制御できるsmall interfering RNA (siRNA) が次世代の医薬品として大きな期待が寄せられています。しかし、siRNAのような核酸物質は生体内での安定性や持続性に劣り、皮膚透過

性や細胞内取り込みが低いため、核酸物質を皮膚の標的細胞内へ安全に高効率に導入できるDrug Delivery System (DDS) 技術との組み合わせが必須となります。私はこれまでに核酸物質と生体適合性の高い様々な高分子を組み合わせることで、様々な細胞へ核酸物質を効率よく安全に導入できるDDSを開発しました。本研究では、私が開発したDDS技術で代表的な皮膚がんであるメラノーマに対して安全かつ高効率にsiRNAを導入させ、遺伝子を抑制することに成功しました。今後は、肌の黒色化やしみ・そばかすの原因となるメラニンの生成や輸送に関与する遺伝子に対するsiRNAを用いた検討や、ナノ粒子の皮膚透過性やマイクロニードルへの応用など研究を推進していき、コスメトロジー研究の発展に貢献できればと考えております。

(長崎大学病院薬剤部)

平成 26 年度 研究助成

コスメトロジーと再生医療(連携研究の重要性)

住吉 秀明

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頂き、厚い御支援の下で本研究を遂行できましたこと、厚く御礼申し上げます。私は再生医療の研究分野において、コラーゲンを軸に臓器線維症の治療法と再生を促すスキャフォールドを研究テーマにしております。これまで皮膚における創傷治癒の過程で再生した「傷跡」の組織が元来のコラーゲンの構築と組成が異なっていることに注目し、このことは制御を外れた二次的な組織形成、つまり臓器の線維化やケロイドの形成とも結びつくのではないかと考えておりました。それが助成金申請の動機につながっております。今回の機会を頂いたことでコスメトロジーの観点から再生

医療を考える新しい挑戦と考えて始めた次第でありましたが、研究のテーマを通して予想外の新たな発見と人的な協力関係・共同研究の機会を得る事が出来ました。特に、ミズクラゲコラーゲンの皮膚の細胞に対する再生促進効果が発見されたことには大変驚かされました。この事を起点として、クラゲ由来のコラーゲンとムチンの資源化に取り組んでいるベンチャー企業である「株式会社海月研究所」と新しい人工皮膚の実現について、産学共同研究を実施することに至りましたことや、人工真皮の使用と改良に取り組んでいる形成外科の先生方との意見を交換する機会を得、傷を如何に拘縮させず綺麗な状態に保つ事にどれだけの御

苦勞をされ、どのような人工真皮が望まれているかという貴重な御意見を伺うことが出来ました。当然のことながら、研究は個人で出来るものでないことはよく理解しているつもりではありましたが、幾つもの専門領域にまたがる実用化・事業化を目指した研究についての連携研究の重要性を

改めて勉強致しました。今回の研究助成をきっかけとして、新しい研究シーズがもたらされ、それ以上に共同研究を行うことができる新たな人間関係が構築できたことが何よりもの財産になったと考えております。

(東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学)

平成 26 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

平 修

始めに、本研究を採択していただいた事に対しお礼申し上げます。化粧品は世界で使用されるものでありこの先も無くなることはないと思います。だからこそ安全性が非常に大事であります。様々な安全性試験が既にあります。今回は、それに+αで「イメージング質量分析」という手法を取り入れました。経皮吸収から臓器に送達され、塗布が長期に渡ることによって蓄積・炎症を引き起こすという非常に興味深い結果を残すことができました。この様なチャレンジングなアイデアを採択いただくのは「なんのしがらみもないフラットな評価、失敗してもいいからやってもなさい」

という財団系のグラントの懐の深さを感じます。横並びに様々な予算が削減され、研究が制限されつつある大学人としては非常に嬉しく、研究に打ち込めた2年間でした。理解も成果もない方々の心ない言葉に傷つき、成果を出せば妬まれる日もありますが、本研究のように世界初の発見ができたことで明日も研究しようという気持ちが奮い立ちます。最後に、本研究成果が今後の化粧品界の安全性という部分の一助になればと思います。

(福井県立大学生物資源学部生物資源学科)

平成 26 年度 研究助成

自分の皮膚を足がかりにした研究

谷崎 英昭

皮膚は、水分保持機能、体温保持機能、バリア機能など、内的ならびに外的環境変化に適応してホメオスタシスの維持を行うための様々な機能を担っている。自分自身がアトピー性皮膚炎歴40年近くになるにつれ、見慣れているはずの自分の皮膚をみながらふと気づくこともあり、自分の皮膚を足がかりにした研究テーマもなるべく取り組んでいきたいと考えていた。

今回採択していただいたテーマは、冬場の乾燥時期を中心として指先に昔よりも亀裂が生じやすくなっているという「痛くつらい」想いを起点としており、ステロイド外用剤長期使用によって薄くなった皮膚をいかに評価するか、そして潤っている皮膚がいかに素晴らしいかを再認識するいい機会となった。残念ながら、谷崎自身の皮膚は季節を問わず乾燥し、薄く、現在の治療では容易に回復しないこと

がわかってしまったが、皮膚そのものの天然保湿因子を新たな評価項目に加え、かゆみやQOLなどと併せて評価することで、コスメトロジーと特に近い関係にあると思われる皮膚を、よりいい状態に保つことが出来るような時代が近い将来やってくるのではないかと期待している。アトピー性皮膚炎である自分の利点は、「かゆみ」が解るのみならず、治療薬の効果や使用感を自分の皮膚を通じて確認出来ることである。効果や工夫を患者に直接伝えることで、少しでも治療の向上につなげることが出来るのでは、と信じながら今後も日々の診療と研究に取り組んでいきたい。

最後になりましたが、本研究をご支援いただきましたコスメトロジー研究振興財団及び関係者の皆様にご心からお礼申し上げます。

(大阪医科大学皮膚科)

線虫と化粧品 中台（鹿毛） 枝里子

この度は研究助成を頂きましたこと、心より感謝申し上げます。貴財団の研究助成に応募致しましたころは、ちょうど新天地でテニユアトラック期間が始まったばかりでした。少し落ち着いて、さあ研究をバリバリやるぞ、という時に助成の決定通知を頂きました。その後新たな細菌感染実験を開始するにあたり、実験室の改修と居室の分離が必要となったのですが、さあお金はどうしよう…。貴財団に問い合わせたところ、研究課題の遂行に必要であれば部屋の整備費として使用しても良いとの有難いお返事を頂き、無事に研究を進め、成果を得ることができました。PIとして独り立ちをし始めたばかりで少し心細さや不安もあった頃でしたので、応援して下さる方たちがいることに大変励まされました。

助成を頂きまして、極長鎖脂肪酸含有セラミドの表皮バリア形成における機能と分子機構の解明に取り組んでまいりました。研究のモデルとしては線虫 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) を用いています。ヒト皮膚の角質層に存在する細胞間脂質は感染防御に重要な役割を果たすと考えられています。一方でヒト皮膚の常在菌には好脂質性、脂質要求性の細菌、真菌が少なくありません。*Propionibacterium acnes* (アクネ菌) は皮脂を好み、皮脂

腺において増殖する性質を持ち、*Malassezia* 属 (マラセチア真菌) の多くは脂質存在下においてのみ増殖が可能です。このような菌、真菌については、有効な感染モデル動物が存在せず、宿主との相互作用について未解決の課題が多く残されていました。

線虫はわずか 1,000 細胞の単純な多細胞生物ですが、筋肉系、神経系、消化管系など多様な組織から構成されヒトと本質的には共通の生物学的特性を持っており、体表の構造もヒトの皮膚と類似点が多くあります。体表面には、ヒトの皮脂と同様に中性脂肪やリン脂質、スフィンゴ糖脂質などで構成される脂質層を有しています。本研究から、線虫がアクネ菌やマラセチア真菌の代替モデル宿主となる可能性が提示されました。近年、動物愛護の観点から、哺乳類を用いた動物実験に対するハードルが高くなってきており、化粧品業界も例外ではないと思います。線虫は倫理上の制約がなく、飼育も簡便で低コスト、また前述のような特徴を有していることから、代替モデルとして有用であると考えられます。今後、化粧品開発において、線虫研究の重要性が増していくのではないかと期待しています。

(大阪市立大学複合先端研究機構)

コスメトロジー雑感 松崎 伸介

まず、コスメトロジー研究振興財団研究助成を頂きましたこと感謝申し上げます。本研究助成のおかげをもちまして、我々がすすめて参りました『小胞体ストレスの創傷治癒機構への影響』についての論文を国際誌 PLoS ONE に掲載することが出来ましたことご報告申し上げます。

我々の研究グループは、以前より、創傷治癒機構についての研究を進めて参りました。ケロイド・肥厚性瘢痕では、その領域の疼痛・搔痒、時には皮膚の硬化によるひきつれ感のため運動機能への問題が生じます。これまでは、これら症状を改善することを念頭に置いて研究を進めて参りました。これら研究の経緯で貴財団より研究助成頂き、創傷治癒研究が美容にもたらす影響についてより深く考えるよ

うになり、我々が対象としていた症状のみならず、美容上の問題から心の問題へと発展するなど、その重要性をより考えるようになりました。昨今、男女問わず美容に対する意識・重要性が高まっており、医療を進めていく中で美容上の問題は切り離せないと考えております。今後は、本研究を通して得られた知見をもとに“皮膚創傷・損傷にいかにかに傷跡を残さずに治癒させることができるのか”、とりわけ美容上問題となる“ケロイド組織等をどの様に予防するのか”、についての研究を推進し、コスメトロジー研究領域の発展に微力ながらご助力できるようつとめて参りたいと考えております。(和歌山県立医科大学薬理学講座)

平成 26 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

東 照二

私たちは日常的に「香り」をどのように言語化し、他者に伝え、コミュニケーションを行っているのかというトピックには、ずっと前から興味を持っていました。一般的には、話者が何かの物理的な「香り」と呼ばれるものに反応し、脳を通じて、それをことばという信号に置き換えて、発話し、聞き手に伝え(ようとす)ということになると思います。しかしながら、別な言語観として、発話されたことばが意味を作るのは、聞き手の参加を得て初めてなされるものであること、さらに、そもそもことばの意味作りとは、話者だけ、あるいは聞き手だけが行うものではなく、話者と聞

き手が共同で行うものである、というダイナミックな言語観もあります。そして、特に、この後者の言語観を検証するために、「香り」のことばの研究はとても有効な分野になると思いました。さらに、人間の香りへの反応は、物理的、生理的なものであるだけでなく、極めて文化的、社会的なものでもあると考え、今後ますます社会言語学的な研究の宝庫になるのがコスメトロジーではないか、と考えるに至りました。今回のコスメトロジー研究振興財団からの研究助成に深く感謝いたします。(ユタ大学言語文化学部)

平成 26 年度 研究助成

コスメトロジー雑感

大川 真由子

これまで 20 年近く中東のオマーンをフィールドに人類学的調査をおこなってきたが、化粧品というテーマは数年前に始めたばかりの新しいテーマである。もともと美容には個人的な関心はあったものの、それを研究テーマにするとは考えてもみなかった。中東・イスラーム研究という自分の専門と、美容という個人的な趣味が合致したのが今回取り上げた「ハラール化粧品」である。折しも、イスラーム研究においては「ハラール」がブームとなっていたが、ハラール製品のなかでもハラール化粧品研究は日本において手付けずの状態だったのである。

趣味と実益(研究)を兼ねている美容の調査は楽しかった。オマーンは敬虔なイスラーム教徒が多く、女性は美容行為1つとってもそれがイスラーム的に合法か否かを気にする。「結婚前に眉毛を整えるのは?」「まつ毛のエクステは?」「マニキュアを塗るのは?」などなど。厳格なイスラーム法学者であれば、これらの美容行為はすべて禁止である。と

ころが現地の女性は、イスラーム法を「柔軟に」解釈しつつ、こまめに眉毛を手入れし、まつ毛のエクステも一般的、最近ではマニキュアをする女性も増えている。その様子は日本の女性となんら変わりはない。

ただ、この研究を始めて以来、まだ一度も現地でハラール化粧品を目にしていない。ハラール先進国であるマレーシアでは認知されつつあることから、中東、とくに裕福な湾岸諸国にハラール化粧品が普及するのにも時間の問題だと考えていた。「湾岸にもハラール化粧品が来る!」とさまざまな研究会で豪語したのが4年ほど前。ところがわたしの予想に反して、オマーンにいまだその気配はない。わたしは「狼少年」になってしまうのだろうか。そうならないよう、今後ともハラール化粧品の動向を見守っていきたい。

最後に、本研究を遂行するために研究助成のご支援を頂きましたコスメトロジー研究振興財団に心より感謝申し上げます。
(神奈川大学外国語学部)

コスメトロジー雑感

萩 あや子

平成 26 年 12 月に、第 25 回公益財団法人コスメトロジー研究振興財団研究助成費の採択のご連絡をいただき、約 2 年間をかけて研究課題を終えることができましたことに心より感謝申し上げます。

本研究の始まりは、大学生を対象に自分自身が患者であると想定し、看護師にどのような化粧が好まれるかを、学部生とともに調査をしたことでした。医療現場において看護師は常に人の生命と向き合っており、高度な専門知識や看護技術と、人間関係を確立するために看護実践能力を必要とされます。そのため、看護師の立ち居振る舞いが凛として美しく、しなやかな物腰で対応することができれば、病に苦しむ患者やその家族の方々の健康の回復に何か影響を及ぼすことができるのではないかと考えました。調査結果を学会で発表しましたところ、医療現場では、華美な化粧で働く看護師に対して、根拠をもって納得できる説明ができないために、現状を改善することが困難な状況である

ことが分かりました。また、同様のことが看護学教育の現場にも見られましたので、改善するための方法を見出す手がかりにしたいと本研究に取り組みました。

本調査は、看護師だけでなく、患者やその家族の方々にも協力依頼が必要になりましたので、倫理的な手続きも含めて、本格的な調査を開始するまでに時間を要しました。2 施設の関係者には多大なご協力をいただき、貴重なデータを収集することができました。心より御礼申し上げます。今回の研究目的は、患者や家族、看護師の化粧に対する認識を明らかにすることでありましたが、医療現場で働く看護師が、好ましい化粧を施すことにより看護師自身の働く意識を高め、看護という仕事に自信をもって、質の高い看護ケアを提供することができれば、患者や家族にもよりよい影響を齎すことができると考えます。真の看護専門職者としての品行を兼ね備え、社会から期待される看護師の育成を目指していきたいと思えます。(愛知県立大学看護学部看護研究科)

女子青年における化粧の意味

高坂 康雅

普段化粧をすることのない私にとって、身近な女性である妻や女子学生が毎朝化粧をし、夜になると化粧を落とすという一連の作業をしていることに、なんと労力がかかる作業をしているのだろう、なんのためにこのような作業をしているのだろうと、漠然とした関心を抱いていた。確かに化粧をすることによって見た目は変化するが、それは見た目だけではなく、心理的なもの—本研究では劣等感—にも関わっているのではないかと考えていたが、なかなかそれを検証した研究もなく、化粧とは縁遠い私が研究にとりかかるきっかけもなかった。

今回、コスメトロジー研究振興財団に、この私の漠然とした関心にもとづいた研究計画を採択していただいたことは、化粧をすることが容姿に対する劣等感にどのような効果をもたらしているのかについて、実証的な検討をする機会となった。そのような機会をいただけたことを、改めて心から感謝申し上げます。

結果は研究報告書に示した通り、化粧をする理由によって、劣等感を高める場合もあれば、低減させる場合もあることが明らかとなった。単に化粧をすればよいというものではなく、誰に向けて(何のために)化粧をするのかという意識が重要であることを示すことができたと考えている。数量的には、確かにこのような結果が得られたのだが、この結果を学会や研究会で報告すると、女性から異論を出されることが少なくない。目を強調するメイクを一生懸命している学生に対して、そのような目を強調するメイクをすとかえって劣等感が高まると伝えても、あまりピンとこない様子も見られる。ここが数量的な検討の限界なのかもしれない。

化粧には多義的・複層的な意義・影響があると考えられる。今後は劣等感を中心に、そのような多義的・複層的な化粧の意義・影響をさらに検討していけたらと考えている。(和光大学)

平成 26 年度 研究助成

経営学・マーケティングと化粧品販売チャネルの研究

佐々木 一郎

このたびは、コスメトロジー研究振興財団より大変貴重な研究助成を頂き、心より感謝申し上げます。私は現在、経営学・マーケティングの視点から、化粧品販売チャネルと消費者行動の研究を進めております。化粧品の販売チャネルには、ドラッグストア、デパート、インターネットショッピング、通信販売、専門店、訪問販売など、さまざまなチャネルがあります。便利なネット・通販や化粧品情報サイトの拡大、社会経済環境の大きな変化のもとで、化粧品の販売チャネルについては、ネット・通販チャネルの占める割合が増加してきています。

なぜ、ネット・通販チャネルが増加しているのかをめぐり、社会経済的要因や化粧品購買要因や美の評価などを同時にコントロールした定量的研究の蓄積は、十分ではありません。今回の研究助成を頂くことで、調査データから、日本、中国、イギリスの3か国におけるネット・通販チャ

ネル選択の決定要因を定量的に分析することができました。

今後は、消費者の化粧品購買行動に関するWebアンケート調査を引き続き実施し、ネット・通販チャネルとリアル店舗の相互作用の分析を深めていきたいと考えております。デパートなどのリアル店舗での購買経験や情報収集がネット・通販チャネル購買に及ぼす影響や、逆に、通販チャネルでの購買経験がリアル店舗での購買に及ぼす影響の分析です。また、化粧品会社が、リアル店舗での消費者と、ネット・通販チャネルでの消費者と、どのようにコミュニケーションをはかり自社のブランドを確立していくべきかなど、費用対効果分析も含めた最適な販売チャネル管理のあり方も研究していきたいと考えております。

末尾になりましたが、コスメトロジー研究振興財団のますますのご発展を心より祈念申し上げます。

(同志社大学商学部)

平成 27 年度 研究助成

化粧と触覚

野々村 美宗

化粧品の研究を始めて20年たった。特に化粧に興味があったわけではなく、会社に入って配属されたのが化粧品の商品開発をする研究所だったただけなのだけれど、大学に移ってもまだ続けているということは、性に合っているのだろう。最近では他の分野の企業や研究者とのコラボレーションも多くなってきたけれど、化粧品業界には、根が明るく楽観的なひとが多いようだ。ひとを清潔に、美しくし、時に楽しませることを考えて過ごしていると、性格も前向きになるのかもしれない。

今回は、ヒトの触覚をセンシングするシステムに関する研究で採択していただき、心から感謝している。「さらさら」とか「べたべた」とか「しっとり」とか、ヒトはがいろいろな感覚を感じて生きていることは確実なのだけれど、これらの感覚がどのようにして生まれるのか、物理的な理解はまだされていない。まだまだ先は長いけれど、ひとが世界を鮮やかに感じ取るメカニズムを明らかにすることで、少しでもコスメの世界に役に立てるように、研究を続けていきたい。

(山形大学大学院理工学研究科)

「美」に関する表現の魅力、歴史、そして、研究

広瀬 英史

私は「ことばと文化」や「ことばと人間」の関わりについて興味を持ってきましたし、現在もそれは変わりません。言語研究に携わる者として、私が目指すのは、日本語自体の仕組み(特に語彙の構造)の解明と、言語分析による文化研究です。前者は言語研究そのものです。一方、後者は、言語研究の範疇を超え、言語研究でのアプローチに限界を感じることもあります。文化研究とはそもそも複合的な視野(多分野の視点)を必須とするのでしょうか。ただ、それでも文化研究をする上で、言語からのアプローチに拘るのは、私が言語研究に携わる者であるという理由だけでなく、「ことばそのものも文化」だという事実があるからです。文化を研究するにあたって歴史の記述が必須です。文化研究＝歴史研究だともいえます。そして、ことばの担い手は人間であるし、社会です。ことばを通じた文化研究の命題を具体的に示すならば、ことばがどのように社会(生活)の中で機能しているのか、また、ことばがたとえばある時代にどのように人々に影響を与えていたのかです。

私は訴求表現に目を付けたというより、従来から魅了されておりました。特に、CMや広告の表現は魅力的です。これらの表現を、客観的に、どう位置付け、そこから、どのように表現史として記述するかといった研究方法の確立は容易ではありません。あるCFをとりあげ評論することは可能です。好きなCFや記憶に残るCFなどの調査から

とりあげるのも1つの方法です。CFは、音楽、映像、そして言葉などによって複合的に解釈されます。それでも、流行のことばや魅惑的な言語表現は、CFから離れて、ことばだけで多くの人々へと拡散されていきます。

今回、助成金を受け、何度もアド・ミュージアムに足を運び、引札をはじめ広告の発祥に触れ、また、KOSEと資生堂のCFを何度も繰り返し見る機会に恵まれました。月並みな表現ですが、美に歴史があり、それをどうにか表現しようとしてきたクリエイター達の苦心した業績を経年の見えてきました。この歴史を何とか表現したいという気持ちです。まだまだ、試行錯誤の段階ですが、「美に関する表現」をはじめ、その他の訴求表現について引きつづき研究していきたいと思えます。

最後になりましたが、本研究をご支援いただきましたコスメトロジー研究振興財団に心からお礼申し上げます。また、本研究に際し、コーセーのCM集(DVD)を閲覧させていただきました。株式会社コーセー 宣伝部 宣伝制作課 青木瞳氏、研究企画室 研究企画U 石塚由紀子氏をはじめ、株式会社コーセーの皆様には大変お世話になりました。また、資生堂アートハウス・資生堂企業資料館関係者の皆様や、アド・ミュージアム東京の図書館の皆様には、CMや広告資料に関してご助言いただきました。心より感謝申し上げます。(静岡文化芸術大学文化政策学部国際文化学科)

化粧をしていると自分に自信が持てる？

藤原 寿理

このたびはコスメトロジー研究振興財団の研究助成に採択いただき、誠にありがとうございました。私はヒトの意思決定、価値表現が非常に曖昧で揺らぎやすいことに興味があります。テーマとしては日常生活で自らが感じることにについて扱いたいと考え、常に研究のアンテナを立てて過ごしています。本研究テーマもそういった背景から生じました。

私は日頃化粧をするように心がけておりますが、それはどうしてかと言われるとよく分かりません。自分の外見に自信などありませんから少しでもよく見せたいという思い

はあります。一方で面倒という気持ちもあります。人前に出る必要のない時は化粧をすることはありません。本研究を通して、20代前半の女子学生にさまざまな意見を伺いました。化粧は面倒だがしていないと人に会うことが恥ずかしい。化粧をしていると華やかで楽しい気持ちになる。雑誌等で化粧の勉強をすることが楽しい。マナーの一つである。など、私と似た思いを抱いている方が多かった印象でした。このような意見からも、化粧という外的な刺激が、ヒトの内面にいかに影響を与えるかが伺えました。本研究の結果から、予想通り化粧がその人の内面にポジティブな

影響を及ぼすことが示されました。直接的にアプローチした質問紙法ではもちろんのこと、本研究で新しく試みた、自己の判断に対する自信度を計測するメタ認知的アプローチにおいても化粧によるポジティブな効果を示すことが出来たのは非常に重要な成果だったと思います。これまで漠然と受け入れられてきた、化粧をすることで自分に自信が持てるという考えに対してその根拠となるデータを示すこ

とで化粧の意義に説得力を与えることができたと感じます。本研究を遂行できたのも、コスメトロジー研究振興財団が化粧に関する研究を化学的・分子生物学的側面だけでなく精神・文化的側面までサポートしてくださったおかげだと強く思います。心より御礼申し上げます。

(福島県立医科大学医学部システム神経科学講座)

平成 28 年度 国際交流助成

国際交流とコスメトロジーとの結びつき

小島 肇

アジアにおける動物実験代替法の促進と連携強化、動物実験の3Rsの普及および推進をより確かなものにするために、2016年11月15～18日に唐津市、福岡市で日本動物実験代替法学会第29回大会と合同で開催されたThe Asian Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences 2016 (Asian Congress 2016)には、国内外から450名を超える参加者があった。海外だけでも、中国や韓国等18の国と地域から約70名の参加があり、大変盛会な会議となった。基調講演等に加え、参加者の専門性毎に、国際動向、化粧品、化学物質、生物材料(ワクチンなど)、若手研究者、将来展望などの6つのキーワードに準じたセッションが開催されたが、その中でも、もっとも参加者の多かったセッションは「化粧品規制と動物実験代替法」である。フランス、中国、韓国、インド、タイ、日本の演者が各国の化粧品規制とそれに関する動物実験代替法の状況について講演し、実りあるセッションとなった。

2013年に欧州で始まった化粧品開発に動物を用いない

という規制は世界各国に広がりつつある。日本においても、多くの化粧品企業が動物実験を中止しており、自主基準とはいえ、化粧品の安全性確保への懸念が心配されている。一方で、医薬部外品の薬用化粧品の許認可の妨げになりつつある。今回の会議が、国際交流の場となり、アジアでの経済活動を活発にするとともに、日本の行政への情報発信となり、日本の化粧品規制において動物実験代替法の利用を促す切っ掛けになったと確信している。

なお、本会を開催するにあたり、多大なる支援を頂いたコスメトロジー研究振興財団、Humane Society International (HSI) およびジャパン・コスメティックセンター (JCC) を初めとする賛助企業および団体の皆様に、この場をお借りして感謝の意を表したい。

(日本動物実験代替法学会会長／国立医薬品食品衛生研究所生物試験研究センター安全性予測評価部室長／日本動物実験代替法評価センター事務局長)

第 67 回コロイドおよび界面化学討論会での国際シンポジウムを終えて 石田 尚之

日本化学会・コロイドおよび界面化学部会では、以前からオーストラリアと強い研究上の結びつきがあります。また、近年台湾との研究交流も活発化しています。部会ではこのようなオセアニア・アジア地域の国際交流をさらに発展することを目指して、第 67 回コロイドおよび界面化学討論会(平成 28 年 9 月 22～24 日・北海道教育大学旭川校)において、海外から参加者を広く集めた国際シンポジウムを開催しました。部会国際交流委員会の出口茂委員長(海洋機構)と米澤徹委員(北大)がオーガナイザーとなり、筆者を事務局として準備を行ないました。

しかし、通常の討論会ではこのような国際シンポジウムを行うことはほとんどありませんので、専用 HP を独自に作成したり、国際学会並みに参加費のクレジットカード払いに対応したり、海外の学会に参加される先生方にフライヤーを配っていただくなど、普段と異なる様々な工夫が必要でした。また、前年にオーストラリアと台湾の主催学会で日本人研究者を基調講演者として招待していただいた「返礼」に、気鋭の研究者として台湾から Tai-Chou Lee 先生(National Central University)、Ling Chao 先生(National Taiwan University)、De-Hao Tsai 先生(National Tsing Hua University)、オーストラリアから Chiara Neto 先生(The University of Sydney)、Sally Gras 先生(The University of Melbourne)をコスメトロジー研究振興財団の国際交流助成にて招待し、日本の近藤行成先生(東京理

科大)とともに基調講演を務めていただきました。

このようにほとんど手探りで準備でしたので、海外からのくらい人が集まるかは大変に不安でした。しかし幸いにも、オーストラリア・台湾を中心としたアジアの国々、さらにドイツなど欧州を含めた 10 カ国から、予想をはるかに上回る申込みがありました。日本からも多数の参加があり、当初 1 会場の予定を 2 会場に分けなければならないほどでした。これはオーガナイザーの熱意や上記のような集客の工夫に加え、何より北海道、旭川という土地の魅力のなせる業だったのではないのでしょうか。3 日間を通して、6 名の先生の基調講演はもとより、一般講演も素晴らしい発表と熱のこもった討論が展開され、非常に活気のあるシンポジウムになりました。

学会が終わった 3 日目夜には国際シンポジウムの懇親会が開かれ、参加者同士の交流が和やかに行われました。さらにその翌日には旭岳へのエクスカッションも行い、晴天の中、紅葉の見頃を迎えた絶景を楽しむことができました。参加者からも多くの満足の声が聞かれ、お陰さまで成功と言えるシンポジウムとなったかと思えます。

最後になりますが、コスメトロジー研究振興財団の国際交流助成をいただきましたことに、改めて深く感謝申し上げます。

(第 67 回コロイドおよび界面化学討論会・国際シンポジウム事務局/岡山大学大学院自然科学研究科)

第 21 回天然薬物の開発と応用シンポジウムを終えて 石橋 正己

このたび、コスメトロジー研究振興財団の学術集会支援助成を受け、平成 28 年 10 月 27 日・28 日の 2 日間にわたって、千葉市の千葉大学薬学部 120 周年記念講堂において、第 21 回天然薬物の開発と応用シンポジウムを開催させていただきました。

本シンポジウムは、日本薬学会の生薬・天然物化学関連分野の先生方を中心に立ち上げられたもので、和漢生薬を始め、薬用植物・微生物・海洋生物などから見出された医薬シーズとしての生物活性物質からの創薬をめざして、隔

年ごとに開催されてきた伝統あるシンポジウムであり、今回で第 21 回目の開催となります。平成 18 年 4 月に日本薬学会に生薬天然物部会が新設されたのに伴い、部会主催シンポジウム「天然薬物の開発と応用シンポジウム」として位置づけられ、同じく部会主催シンポジウムとなった「食品薬学シンポジウム」と交互に開催されているものです。

天然薬用資源からの美白効果等の化粧品(コスメトロジー)や創薬に関する研究の歴史は古く、現在用いられている化粧品や医薬品の中には、天然物あるいはその誘導体、

または天然物関連の化学構造をもつ合成化合物など、天然物に関連しているものが大きな割合を占めています。今回のシンポジウムでは、「天然物ケミカルバイオロジー」および「カテイングエッジ生薬学」という2つのテーマを掲げ、各々特別講演1題とシンポジウム講演4題が発表されました。また一般講演およびポスター発表では、生薬シンのメラニン生成抑制成分などの美白剤に関する研究を始めとして、種々の薬用資源から見出された化粧品および医薬シーズ等に関する最先端の研究が発表されました。全国から

例年を上回る人数の参加があり、今回のシンポジウムが天然薬物およびコスメトロジー関連分野の活性化と発展に寄与する有意義な討論の機会となったことが実感され、2日間のシンポジウムを成功裏に終えることができました。

最後にご支援を賜ったコスメトロジー研究振興財団にあらためて感謝申し上げます。

(千葉大学大学院薬学研究院活性構造化学／
第21回天然薬物の開発と応用シンポジウム実行委員会委員長)

平成 28 年度 学術集会支援助成

第16回美容口腔管理学会学術講演会を終えて 金子 潤

平成28年11月5～6日の2日間にわたり、幕張国際研修センター（千葉市美浜区）において第16回美容口腔管理学会学術講演会が、公益財団法人コスメトロジー研究振興財団の学術集会支援助成を受けて開催されました。無事に学会が終了できましたことを、関係各位に感謝申し上げます。次第です。

美容口腔管理学会 (Academy of Cosmetic Oral Care) は、主に歯科医師、歯科衛生士、歯科関連企業、その他の歯科医療関係者で構成される学術団体で、2001年に設立されました。永続的に美しくなりたいと願う患者／クライアントの要望にエビデンスをもってアプローチするために、年次学術大会や講習会、学会誌等を通じて多くの臨床的な調査結果を整理・統合することを目的としています。なかでも、目に見える Cosmetic Oral Care である「歯のホワイトニング (Tooth Whitening)」と、目には見えない Cosmetic Oral Care である「口臭予防 (Anti-halitosis)」を本学会の2大テーマとして学術活動を展開してきました。

第16回を数える本学術講演会では、大会テーマを『ホワイトニング科学の新たな展開』とし、近年大きな進展を遂げつつあるホワイトニングの歯および口腔への影響に着目

しました。教育講演では、東京医科歯科大学大学院の大槻昌幸先生に研究者の立場から、東京都中央区でご開業の北原信也先生に臨床医の立場から、それぞれ歯科ホワイトニングに関する最近のトピックスをご紹介いただきました。特別講演では、神奈川歯科大学大学院の飯塚純子先生に「ホワイトニングを利用した審美的再石灰化へのアプローチ」と題したご講演をいただきました。初期う蝕病巣体部に侵入してエナメル質の再石灰化の進行を妨げている唾液タンパク質を、ホワイトニング処置によって変性・除去し再石灰化を亢進させる可能性について、一連の研究成果と今後の展望とともにご紹介くださり、大変興味深い内容でした。また、一般講演およびシンポジウムにおいても、参加者の活発な討論の場を提供できたのではないかと考えております。

今回の学術講演会での成果を今後の歯科臨床に活かしていくとともに、学会開催に対してご支援賜った公益財団法人コスメトロジー研究振興財団にあらためて感謝申し上げます。次第です。

(千葉県立保健医療大学健康科学部歯科衛生学科／
第16回美容口腔管理学会学術講演会大会長)

付 録

●
事業報告書
役 員
●

事業報告書

(自平成 28 年 4 月 1 日 至平成 29 年 3 月 31 日)

《研究助成関連》

2016	5	9	公募開始	全国 589 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	11	公募締切り	応募総数104件
	7/15	8/26		各選考委員による個別審査
	9	5	選考委員会(第3分科会)	精神、文化に関する分野の選考
	9	8	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	13	選考委員会(第1分科会)	素材、物性に関する分野の選考
	9	29	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32課題を選考
	11	22	理事会	本選考委員会より答申、助成課題決定
			第27回 表彰・贈呈式 記念講演	研究助成対象32課題の代表者へ、助成金贈呈書、目録等を授与 演題：顔——その魅力の内側 美術解剖学的視点から 講演者：宮永 美知代 先生 東京藝術大学美術学部 助教
	12	11	助成金交付	採択課題に対し研究助成金を交付 総額3,000万円
2017	2	20	選考委員への承認(書面)	2017年度研究助成公募要領他

《国際交流助成関連》

2016	6	22	審査	国際交流(招聘)：アジア動物実験代替法会議2016の審査
	7	25	助成金交付	国際交流助成金の交付 50万円
	8	8	審査	国際交流(招聘)：第67回コロイドおよび界面化学討論会の審査
	8	25	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》

2016	4	6	審査	学術集会支援：第21回天然薬物の開発と応用シンポジウムの審査
	4	25	助成金交付	学術集会支援助成金の交付 50万円
	5	18	審査	学術集会支援：第16回美容口腔管理学会学術講演会の審査
	5	31	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》

2016	5	26	第一回通常理事会	平成27年度事業報告及び収支決算報告の承認、任期満了に伴う選考委員の選任、任期満了に伴う理事候補者の選出、経理規定の一部改定の承認、公印取扱内規策定の承認、選考委員会規則第12条(審査謝金等)の一部改定の承認、株主としての議決権行使の承認、報告事項
	6	5	理事への承認(書面)	新理事体制における代表理事等の互選並びに関連事項の承認
	10	6	理事への承認(書面)	平成28年9月29日開催の選考委員会決定内容の承認
	11	22	第二回通常理事会	平成28年度収支予算書の一部変更の承認、平成28年度(第27回)研究助成者等の承認、平成29年度の事業計画及び予算案の承認、報告事項

《評議員会関連》

2016	6	10	定時評議員会	平成27年度事業報告及び収支決算報告の承認、任期満了に伴う理事の選任、報告事項
	11	25	評議員への報告(書面)	第二回通常理事会議決事項、第27回表彰・贈呈式の報告

《その他》

1) 報告書発行

2016	5	1	中間報告書	研究業績 中間報告集 第25号
	9	1	完了報告書	コスメトロジー研究報告 Vol. 24 (2016)、CD版を作成

2) 情報公開 (当財団HP)

2016	4	8	公募要領	2016年度「コスメトロジー研究」公募要領を掲載
	6	30	事業報告及び収支決算 新役員	平成27年度事業報告書及び収支決算報告書を掲載 新役員等を掲載
	9	1	研究報告書	コスメトロジー研究報告 Vol. 14 (2006) から最新号までの全文pdfを 掲載
	11	24	予算書一部修正 研究助成者及び課題名	平成28年度予算書の一部修正 平成28年度研究助成者名及び研究課題名を掲載
2017	2	1	研究報告書	研究報告 Vol. 1 (1993) からVol. 13 (2005) までの全文pdfを追加掲載 研究報告書 (創刊号~最新号) の全文検索システムを稼働
	3	1	事業計画及び収支予算	平成29年度事業計画及び収支予算書等を掲載

2016 年度助成を受けられた方々

1) 研究助成 (32 名)

第1分野：素材、物性に関する分野 (13 名)

氏名	所属	職位	研究課題
朝倉 浩一	慶應義塾大学理工学部応用化学科	教授	サンスクリーン剤の紫外線防御能を普く正確に <i>in vitro</i> 評価する測定方法の確立
川下 将一	東北大学大学院医工学研究科	准教授	抗菌性と生体適合性を併せ示す生糸織物の開発
黒岩 崇	東京都市大学工学部 エネルギー化学科	准教授	リン脂質を主成分とする巨大分子集合体の構造発色性を利用した新規化粧品素材の開発
小出 隆規	早稲田大学先進理工学部	教授	特異的に生体コラーゲンに結合するペプチドの分子設計・合成と応用
相良 剛光	北海道大学電子科学研究所	助教	化粧品の評価・開発に資する微小な力を検知する水溶性の分子集合体の開発
菅 恵嗣	大阪大学大学院基礎工学研究科 物質創成専攻	助教	抗酸化物質から成るCubosomeの開発およびマイクロ・メソ・マクロ特性の評価
津田 明彦	神戸大学大学院理学研究科	准教授	渦のねじれ流によるコラーゲンナノファイバーの形成制御と形態変換
深水 啓朗	明治薬科大学	教授	顕微ラマン分光法を用いた皮膚角質層の評価法および透過性スクリーニング法の構築
古海 誓一	東京理科大学理学部第一部 応用化学科	准教授	カラフルな反射色を永続的に維持できるセルロース誘導体の創製
増原 陽人	山形大学大学院理工学研究科	准教授	アミノ化合物によるナノ結晶 (粒子) の成長抑制技術の開発
森 直	大阪大学大学院工学研究科	准教授	マイコスポリン様アミノ酸誘導体の電荷共鳴吸収を基盤とする新規天然由来サンスクリーン材料
森田 洋行	富山大学和漢医薬学総合研究所 天然物科学分野	教授	ミャンマー産ハーブの美肌効果の検証と美肌成分の解析
山田 純	芝浦工業大学工学部機械工学科	教授	メーキャップ化粧品の光学的機能評価に向けた人工皮膚の開発

第2分野：生体作用、安全性に関する分野 (14 名)

氏名	所属	職位	研究課題
今江理恵子	東京大学大学院薬学系研究科	助教	ホスファチジルイノシトールの特徴的脂肪酸組成の皮膚恒常性における役割の解析
岩淵 徳郎	東京工科大学応用生物学部 先端化粧品コース	教授	女性頭髪における休止期 - 成長期移行シグナルメカニズムの <i>in vitro</i> 解析系の構築
近藤 嘉高	東京都健康長寿医療センター 研究所	研究員	ヒト培養表皮におけるアスコルビン酸の経皮吸収および紫外線UVBによる細胞障害に対する予防、回復効果の検討
神人 正寿	熊本大学大学院生命科学研究所 皮膚病態治療再建学	准教授	皮膚老化におけるエキソソームの働きの解明と治療応用の可能性の検討
高橋 勇人	慶應義塾大学医学部皮膚科	専任講師	皮膚における自己反応性CD4 ⁺ T細胞による標的抗原認識機構の解明
武富 芳隆	東京都医学総合研究所 生体分子先端研究分野	主席 研究員	皮膚制御に関わる新規機能性脂質の同定と脂質フローによる皮膚疾患調節機構の解明

氏名	所属	職位	研究課題
中山 文明	放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部	チーム リーダー	増殖因子による毛包休止期制御機構の解明
原 雄二	京都大学大学院工学研究科	准教授	皮膚組織修復におけるリン脂質局在制御機構の役割
日沼 州司	千里金蘭大学生活科学部 食物栄養学科	教授	細胞生存促進効果を有する糖内包化リポソームのアンチエイジング化粧品への応用
廣明 秀一	名古屋大学大学院 創薬科学研究科	教授	構造情報を利用したタイトジャンクション増強剤の実用的な化合物への骨格転換
福田 智一	岩手大学理工学部 化学・生命理工学科	教授	刺激性試験のための元の性質を維持しながら無限分裂するヒト角膜上皮細胞の作成
藤枝 伸宇	大阪大学大学院工学研究科 生命先端工学専攻	助教	チロシナーゼと基質複合体結晶構造に基づいた反応機構の解明
柳 輝希	北海道大学大学院医学研究科 皮膚科学分野	特任助教	紫外線曝露による皮膚老化・発癌においてミトコンドリア関連分子が果たす役割を解明する
渡利 彰浩	大阪大学大学院薬学研究科 生体機能分子化学分野	助教	表皮バリア機構に立脚した新規経皮吸収促進法の開発

第3分野：精神、文化に関する分野（5名）

氏名	所属	職位	研究課題
伊藤 文人	東北福祉大学感性福祉研究所	特任講師	他者からの評価を推論するメカニズムがその人物に対する選好の形成に与える影響
四角 隆二	岡山市立オリエンタ美術館	副主査 学芸員	サーサーン・ガラス成立の背景～ユーフラテス川以東へ流入した地中海周辺地域の化粧文化を探る
谿 雄祐	関西学院大学理工学部 人間システム工学科	研究特別 任期制 講師	肌の魅力に関する意識構造の年代間、性別間比較
西尾美登里	福岡大学医学部看護学科	助手	男性介護者の妻・母へのスキンケアと化粧意識と介護者役割受容に関する研究
眞部 寛之	同志社大学研究開発推進機構	准教授	香りの記憶形成・固定化メカニズムの解明

2) 国際交流助成（2件）

受入責任者	招聘者	目的
国立医薬品食品 衛生研究所 小島 肇	Founder and Managing Director, Orange House Partnership, Italy Herman B. W. M. Koetër	アジア動物実験代替法会議2016 基調講演 (平成28年11月15日～18日、唐津市民会館および九州大学)
岡山大学大学院 自然科学研究科 准教授 石田 尚之	The University of Sydney, Australia Chiara Neto The University of Melbourne, Australia Sally Gras National Taiwan University, Taiwan Ling Chao National Tsing Hua University, Taiwan De-Hao Tsai National Central University, Taiwan Tai-Chou Lee	第67回コロイドおよび界面化学討論会 国際シンポジウム 基調講演 (平成28年9月22日～24日、北海道教育大学旭川校および旭川市民文化会館)

3) 学術集会支援助成 (1件)

実施責任者	所 属	職 位	集 会 名
石橋 正巳	千葉大学大学院薬学研究院	教授	第21回天然薬物の開発と応用シンポジウム (平成28年10月27日～28日、千葉大学)
金子 潤	千葉県立保健医療大学	准教授	第16回美容口腔管理学会学術講演会 (平成28年11月5日～6日、幕張国際研修センター)

役員

2017年4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	(常勤)
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 取締役会長
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	野呂 影勇	早稲田大学 名誉教授
理事	廣部 雅昭	東京大学 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
評議員会長	内藤 昇	株式会社コーセー 常務取締役
評議員	伊藤 正俊	東邦大学 名誉教授
評議員	齊藤 勲	元厚生省大臣官房審議官
評議員	仙名 保	慶應義塾大学 名誉教授
評議員	中村 陽子	元厚生省医薬安全局安全対策課安全対策企画官
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. 25 / 2017

非売品

2017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 〒171-0014 東京都豊島区池袋四丁目24番7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室