

## ごあいさつ

明治34年（1901年）の年初に報知新聞が「21世紀への予言」を特集し、23の予言を紹介しています。その中の「遠距離の写真」「7日間世界一周」「自動車の世」「暑寒しらず」などの工業技術に関するものの予測が多く、その殆どが実現していますが、「人と獣の会話」「大砲で暴風を飛ばす」「人の身体6尺以上」などの生物、自然に関するものは実現していません。この事は20世紀は科学技術の発展が人の夢の実現に直結するとの期待が高かった事、そして「20世紀は戦争の世紀」と言う人もいますが、戦争を介して発展した技術の世紀とも言えることができるかもしれません。

これからの100年に関して「21世紀の科学技術の展望とあり方」というアンケートを科学技術施策研究所が11分類にまとめたものがあります。それによると、“遺伝子技術の発展で疾病因子の少ない人類が可能となるが、多型性が乏しく感染症が死因の1位となる。”“脳科学の発展により①脳へ直接情報を記憶・消去が可能となる。②ロボットが人間並みに創造活動が行なえる。③倫理観、道徳観の欠落や衝動的犯罪行動と脳の関係が解明し、その対応策が確立して犯罪が殆どなくなる。”“バイオマスによる素材産生やエネルギーの創生。また、ナノテクノロジーによる原子レベルへの分解による完全リサイクル技術の実現”“生活の場としては宇宙空間を活用する一方で地下利用が進む。”などが予測されており、生物、自然そしてその環境への言及が特徴的に感じられます。生体の本質の解明が進むにつれ、地球上で“人だけが特別視される存在ではなくなり、「人の本質」「自然環境の中での生のあり方」が重視され“やっではない研究・技術応用”が大事になると訴える人もいるように「生命の本質究明」の進展が技術の活用の意味を問い直し、「自然界（地球全体）の調和」の重要性を誘導することとなり、総合科学の視点での研究遂行・解明が要求される時代となると思われます。

コスメトロジー研究振興財団では、化粧品学との限定された分野ではありますが、設立当初よりこの総合科学研究を指向して助成を行なってきました。今世紀も引き続きこの方針を堅持し、化粧品学の体系化を目指したいと考えております。

関係各位の益々のご協力・ご支援をお願い申し上げます。

平成13年8月

財団法人 コスメトロジー研究振興財団  
理事長 小林 禮次郎

## 目 次

### ■ ごあいさつ

### ■ 研究報告

#### I. 素材、物性に関する分野

- ・逆ミセルを用いた水の構造化とその機能性に関する研究 ..... 2  
静岡県立大学経営情報学部 五 島 綾子
- ・古細菌由来のエーテル型リン脂質の物性と機能に関する基礎的な研究 .....14  
東京工業大学大学院理工学研究科 江 口 正
- ・森林生物資源からの育毛活性成分の探索 .....21  
九州大学大学院農学研究院 近 藤 隆一郎
- ・含フッ素非対称置換トレハロース誘導体の合成と皮膚に対する保湿性と親和性の検討 .....26  
北里大学看護学部 森 島 直彦
- ・匂いの感性計測を行うセンサーシステムの開発 .....31  
九州大学大学院システム情報科学研究院 都 甲 潔
- ・分散安定性に優れたサーファクタント・フリー・エマルジョンの  
調製法の確立とその凝集・合一過程の解明 .....37  
東京理科大学理工学部 阿 部 正彦
- ・分子量および官能基を制御した新規キトサン系界面活性剤の機能化に関する研究  
—市販パクチナーゼとその化学修飾酵素による N-アセチル化キトサンの  
加水分解に及ぼす N-アセチル化度の影響— .....47  
東京工業大学大学院理工学研究科 梶 内 俊夫

#### II. 生体作用、安全性に関する分野

- ・日光老化について  
—とくに日光弾性線維症の発症機構ならびに UV<sup>S</sup> 症候群の病態に関する研究— .....52  
熊本大学医学部 小 野 友道
- ・紫外線ならびに放射線により皮膚で惹起されるラジカル反応の無侵襲測定と  
皮膚障害予防を目的とした抗酸化剤評価への応用 .....56  
放射線医学総合研究所 小 澤 俊彦
- ・ヒト角層細胞の cell envelope の発生とその機能障害を来す病態の解析 .....62  
帝京大学医学部 秋 山 真志
- ・微小透析法を用いた皮膚内の化粧品素材動態および生体成分動態の系統的解析法の確立 .....69  
長崎大学医学部 佐々木 均
- ・接触性皮膚炎の研究:皮膚刺激とマクロファージ「細胞交通」の関与 .....77  
静岡県立大学薬学部 今 井 康之
- ・アスコルビン酸膜透過促進キャリアーの開発と機構探求 .....84

## 目次

東北大学大学院薬学研究科 鈴木 巖

- ・ 創傷を負った表皮組織に特異的な遺伝子の組み替えを用いた、  
創傷治癒過程の追跡と表皮再生メカニズムの決定 .....90  
京都大学大学院医学研究科 高橋 健造
- ・ ヒト皮膚線維芽細胞における脂肪酸、コレステロール代謝調節機構 .....97  
東京大学大学院農学生命科学研究科 佐藤 隆一郎
- ・ ヒト脂腺細胞に代るハムスター脂腺細胞を用いた皮脂代謝に関する基盤研究 .....101  
東京薬科大学薬学部 佐藤 隆
- ・ 紫外線照射で生じる DNA 損傷部位に特異的に結合するタンパク DDBp48 の発現調節 .....106  
熊本大学発生医学研究センター 山泉 克
- ・ サイトカインノックアウトマウスにおける免疫反応とストレス応答を指標とする皮膚機能の解析 .....110  
昭和大学薬学部 吉田 武美
- ・ 白血球分画が皮膚の健康状態と関連するメカニズム .....116  
新潟大学医学部 安保 徹
- ・ UVA による酸化的遺伝子損傷の細胞内修復機構 .....121  
広島大学大学院理学研究科 井出 博
- ・ 太陽紫外線による細胞のアポトーシスとサンスクリーンの効果 .....127  
放射線医学総合研究所 古澤 佳也

### Ⅲ. 精神、文化に関する分野

- ・ 化粧品における非対称性 .....136  
神戸松蔭女子学院大学文学部 藤本 浩一
- ・ 口唇口蓋裂患者の顔面の改善に対する化粧の効果 .....142  
大阪大学歯学部 飯田 征二

### ■ 記念講演

- 平成12年度記念講演 『細胞の老化と個体の老化』 .....151  
静岡県立大学大学院健康科学研究科 加治 和彦

### ■ コスメトロジー研究雑感 .....163

### ■ 付録

- 平成12年度事業報告 .....179
- 役員一覧 .....186
- 研究助成課題一覧 .....187

# 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**

# 逆ミセルを用いた水の構造化とその機能性に関する研究

静岡県立大学 経営情報学部

五 島 綾 子

Reversed micelles can control the size of water pools and the physical property of water by changing  $W_o$  ( $=[\text{water}]/[\text{surfactant}]$ ). The property of bound water and its function were studied based upon the enzymatic catalysis and the dimerization of cysteine by the irradiation in water pools. Sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate (AOT), hexadecyltrimethyl ammonium chloride (HTAC) and octaethylene dodecylether ( $C_{12}E_8$ ) were used as anionic, cationic and nonionic surfactants, respectively. Hexokinase (HK) and polynucleotide phosphorylase (PNPase) were used as enzymes. The electrostatic effect due to the inner surfaces of AOT and HTAC reversed micelles increased with increasing  $W_o$ , leading to the suppression of the HK activity. On the other hand, high HK activity was revealed in hydrated ethyleneoxide chains of  $C_{12}E_8$ . The PNPase could also polymerize ADP in  $C_{12}E_8$  reversed micelles by using a small amount of  $Fe^{3+}$  in stead of  $Mg^{2+}$ . Furthermore, it was found that the formed poly(A) was precipitated with increasing temperature. This means that the formed poly(A) can be isolated easily from the reversed micellar solution. This phenomenon is closely related with appearance of free water molecules due to elevation of temperature.

The effect of bound water on the conversion of cysteine by UV irradiation was studied. It was assumed that the solubilized cysteine in water pools was easily converted into cystine in bound water by UV irradiation. The results suggested a long life time of activated oxygens produced by UV irradiation in bound water region.

## 1. 緒 言

肌の保水効果を維持する化粧品の研究開発とともに、近年では水自体の性質が紫外線照射による皮膚の生理機能との関連も推測され、一層水と化粧品との関わりが深くなりつつある。水は大きく分けて自由水と構造化された結合水に分けられる。結合水は自由水に比べ、蒸発しにくいなどその一般的な性質はよく知られている。しかし結合水は総称であり、構造化の程度や性質は親水基やイオンの種類により異なることが予測されているが、系統的な研究はなされていない。その理由として水溶液中では自由水が多量に存在するので、結合水の性質を直接特定できないからである。

油の中で界面活性剤と少量の水により形成される逆ミセルにはその内殻の界面活性剤の親水基近傍に構造化された結合水が存在し、 $W_o$  ( $= [\text{水}] / [\text{界面活性剤}]$ ) を変えることにより、結合水/自由水の割合を調整することができる。一方、界面活性剤の親水基の構造を変えたり電荷を持たせたりすることで、逆ミセル界面に構造化された結合水の直接的な情報を得ることができる<sup>1-7)</sup>。水の構造化と

紫外線、放射線によるラジカル発生の関係についても成果が現在期待されている。

本報告書においては水の構造化と機能を逆ミセルの water pool を用いて二つの視点で捉えた研究成果を報告する。一つは逆ミセルの water pool に酵素を溶解し、水の構造化が酵素活性に及ぼす影響を明らかにする。酵素としては細胞に幅広く存在し、糖代謝に深く関わる基本的な酵素、ヘキソキナーゼ (Hexokinase, HK) と著者らのグループが研究対象として検討してきたポリヌクレオチドフォスフォリラーゼ (Polynucleotide phosphorylase, PNPase) を用いた<sup>8-10)</sup>。さらにもう一つの研究は紫外線や放射線の照射により活性酸素が発生するが、この発生と水の構造化との関係を明らかにするため、逆ミセルの water pool にシステインを溶解し、その重合化から検討した。

## 2. 実験の部

### 2.1 ヘキソキナーゼを用いた実験

#### 試薬

界面活性剤として Sodium bis (2-ethylhexyl) sulfosuccinate (AOT, Sigma)、Hexadecyltrimethyl ammonium chloride (HTAC, Merck) 及び Octaethylene glycol dodecyl ether ( $C_{12}E_8$ , 日光ケミカルズ) を用いた。HTAC はアセトノーメタノール混合溶媒で再結晶した。ヘキソキナーゼ (Hexokinase, HK, Boeringer Mannheim) は酵母由来である。Adenosine 5'-diphosphate trisodium salts (ATP, Fluka), 2-Deoxy-D-(+) glucose (DG, Sigma) やその他の反応基質は Fluka や関東から購入した。



Study of Hydration and its Function by Using Reversed Micellar Systems

Ayako Goto

School of Administration and Informatics

## 実験

逆ミセル溶液の調製：Isooctane に乾燥した AOT を適当量溶解した溶液に  $W_o$  に応じて 50mM Tris / HCl 緩衝液 (pH8.0) を溶解する。HTAC 逆ミセルの調製は有機溶媒として Isooctane/octanol (85 : 15v/v) を、 $C_{12}E_8$  逆ミセルの調製は Isooctane/octanol (90 : 10v/v) を用いた。

酵素反応；逆ミセル系の酵素反応は AOT 及び  $W_o$  が同じ溶液を二つ調製し、一方には DG と HK を、他方には ATP と  $MgCl_2$  を溶解し、両者を 0.5mL ずつ混和後、37℃ で反応を開始した。ATP 及び DG の water pool における最初の濃度は 10mM 及び 30mM であり、 $MgCl_2$  の water pool における濃度は 20mM であった。なお HK の water pool における濃度は AOT 及び HTAC に関しては 1.74mg/mL であり、バルク水溶液及び  $C_{12}E_8$  の場合は 0.0174mg/mL であった。酵素活性は反応溶液 0.1mL を緩衝液と  $CHCl_3$  で抽出し、遠心分離後、水層中の ADP 及び ATP を HPLC で測定した。HPLC は Shim-pack WAX-1 と Shim-pack プレカラム Doil を用いグラディエント法により検出した。なお HK のみかけの Kinetic parameter は Eadie Hofstee plots に従った。

ミセルの大きさの測定；逆ミセルの大きさは動的光散乱 (DLS700, 大塚電子) により測定した。

## 2.2 フォスホリラーゼを用いた実験

### 試薬

Polynucleotidephosphorylase (PNPase, E.coli. 由来, Sigma), ADP (Fluka),  $^{14}C$ -Adenosine 5'-diphosphate trisodium salt ( $^{14}C$ -ADP, NEN) などを使用した。NMR 測定には  $H_2^{17}O$ , d-octane を用いた。その他は 2.1 と同じであった。

### 実験

2.1 と同様に AOT は Isooctane に、 $C_{12}E_8$  は 12% v/v 1-Octanol/Isooctane に溶解し、逆ミセル溶液とした。基本的には 2.1 で述べた方法に従う。ADP を溶解した 50mM Tris 緩衝液 (pH9.5) を 0.2M 逆ミセル溶液に各々の  $W_o$  になるように溶解した。同様に PNPase を同じ  $W_o$  になるように溶解し、同量の 150  $\mu$ L ずつ混和し、反応を開始した。 $^{14}C$ -ADP と ADP を合わせた濃度を 2.0mM (1.85kBq) とし、PNPase は 2.5unit を使用した。反応後、反応液を上清と沈殿に分け、それぞれに 0.2% アルブミンと 10% トリクロロ酢酸を加え、反応を停止した。エタノール 1000  $\mu$ L を加え、ガラスフィルターでろ過し、Tris 緩衝液とエタノールそれぞれ 1000  $\mu$ L で 2 回洗浄し、ろ過後、液体シンチレーションカウンターでガラスフィルター上の放射エネルギーを測定した。

生成 poly (A) の確認はアガロース電気泳動及びキャピラリー電気泳動を行った。アガロース電気泳動は 1.8

%アガロースゲルで行い、各々のゲルの断片中の放射エネルギーを液体シンチレーションカウンターで測定した。キャピラリー電気泳動は充填剤に Oligonucleotide Polymer Solution A、泳動緩衝液として Oligonucleotide 緩衝液を用いて、HP 3DCapillary Electrophoresis System (Hewlett PACKARD 社) で 30 分測定した。

逆ミセルのサイズ分布の測定は 2.1 で述べたものと同じであった。

NMR は 500MHz FT-NMR $^{17}O$  プローブ (日本電子, GSX500) で測定した。

## 2.3 システインの光重合反応

### 試薬

界面活性剤は 2.1 と同様なものを用いた。Cysteine は Sigma 製を用いた。

### 実験方法

逆ミセルは 2.1 と同様な方法に従い調製した。逆ミセルに可溶化する緩衝液は 50mM Tris 溶液 (pH 9) を用いた。water pool における cysteine 濃度は主に 50mM であった。UVA、UVB の照射にはアトー社製 HP-30LM、UVC はアトー社製 HP-50C を用いた。SH 基の変化は蛍光試薬である N-(9-acridinyl) maleimide を用いて、蛍光高度計 (F-4500, HITACHI) で測定した。逆ミセル溶液の試料の場合はメタノール/水混合溶媒で希釈し測定した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 逆ミセルの water pool に溶解した酵素活性と水の構造化との関係

#### 3.1.1 ヘキソキナーゼについて<sup>11)</sup>

ヘキソキナーゼ (Hexokinase ; HK) は細胞における糖代謝に重要な酵素である。この HK は  $Mg^{2+}$  イオン存在下、りん酸基のドナーとして ATP を用いてグルコースのりん酸化を触媒する酵素である<sup>12)</sup>。この HK の活性は酵素のまわりの微視的環境に大きく依存する。例えば HK は  $NH_2$  を末端につけた疎水基を持ち、この疎水基をミトコンドリアの生体膜に貫入し、その活性を制御していると言われる。またこの HK はグルコースと結合すると、HK の構造はドラマチックに変化し、水分子が外に追い出されることも推測されている。すなわちこの HK の活性は水の性質や媒体の電場や極性に大きく依存することが推測される<sup>13~16)</sup>。

そこで界面活性剤として陰イオン性で最もその逆ミセルのキャラクタリゼーションが判明している AOT とともに、荷電効果を調べるために、陽イオン性の界面活性剤として HTAC、非イオン性の界面活性剤として  $C_{12}E_8$  を用いた。Fig. 1 は AOT 逆ミセル溶液における HK の活性に対する  $W_o$  の影響を示している。 $W_o = 10$  のところで極大値が認

められる。しかし全体としてバルク水溶液中における HK の活性と比較すると低下し、バルク水溶液のそれをを 1 とすると  $W_o = 10$  で 0.015 であった。このように  $W_o$  に最適値が出現する理由として以下のように推測される。反応基質の ATP は負電荷を持ち、一方、AOT 逆ミセルの内側の界面も  $-SO_3^-$  基の負電荷で覆われ、相互に電気的反発力が働き、ATP は water pool の中央に局在するであろう。一方、HK は  $NH_2$  基を疎水基の先端に持っているので、静電力と疎水結合で AOT 単分子膜層近くに局在あるいは埋め込まれている可能性もある。しかし  $W_o$  が大きくなるにつ

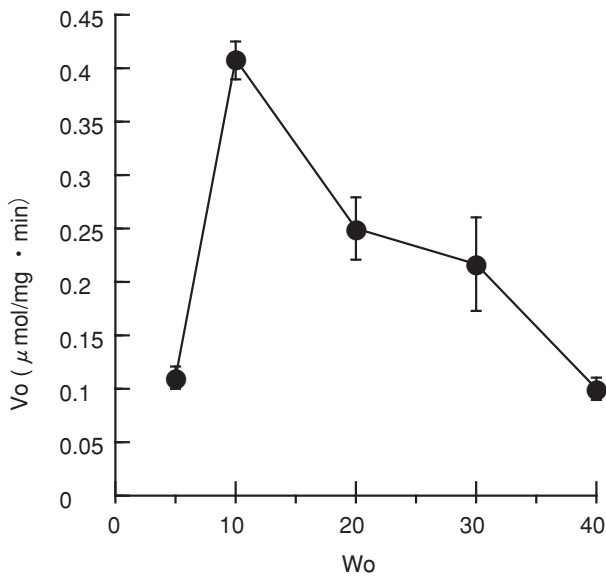


Fig.1 Effect of  $W_o$  on HK activity in 0.1M AOT/isooctane reversed micelles at 37°C

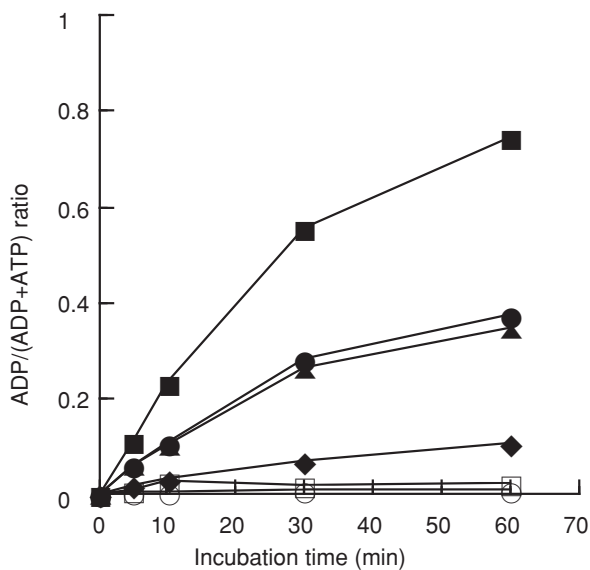


Fig.2 Substrate specificity of HK in 0.1M AOT/isooctane reversed micelles ( $W_o=10$ ) at 37°C

■, D-(+)Glucosamine; ●, 1-Thio-D-glucose; ▲, 2-Deoxy-D-glucose; ◆, Fructose; □, D Mannose; ○, N-Acetyl-D-glucosamine

れ自由水が出現し極性が高くなり、一層電場効果が顕著に現われ、酵素と ATP の距離は離れ HK の活性にマイナスに働く。一方、HK はバルク水溶液中で活性を高く示すので、water pool が大きくなり、 $W_o = 10$  を超えると自由水が出現すると有利に作用すると推測される。この相反する二つの効果により  $W_o$  に最適値が出現すると推測される。これは water pool の KCl の濃度の増加させると、HK の活性が増加し、最適  $W_o$  が消えることから支持された。すなわち負電荷の AOT 単分子層に  $K^+$  イオンが十分吸着され、塩析効果も働き、HK は膜から追い出され、water pool の中央に局在するようになり、ATP と HK の距離を縮めて触媒効果が高まると推測される。

このように AOT 逆ミセル中では HK の酵素活性は低下するが、Fig. 2 に示すように種々の糖を用いた基質特異性の実験で AOT 逆ミセル中で HK が基質特異性を保持していることが判明した。それぞれの基質特異性の比率はバルク水溶液と同じであった。しかし AOT 逆ミセル中では最適 pH はバルク水溶液系のそれに比べ 0.5 アルカリ方向へシフトしていた (Fig. 3)。これは AOT の陰イオンの電荷により  $H^+$  が吸着され、water pool 中で  $H^+$  の分布が不均一になったためであると思われる。

Fig. 4 は HTAC 逆ミセル溶液における HK の活性に対する  $W_o$  の影響を示している。AOT 逆ミセルと同様に  $W_o = 10$  付近で極大値を示すが、HK の活性は AOT 逆ミセルの活性に比べ、全体にわたり 2 倍高い。これは陽電荷の表面は負電荷の表面に比べ HK 活性の発現に有利に働くと推測される。水溶液中で陰イオン性界面活性剤ミセルにより HK は容易に可溶化されるが、陽イオン性界面活性剤ミセルには HK は可溶化されないことが知られているので<sup>17)</sup>、

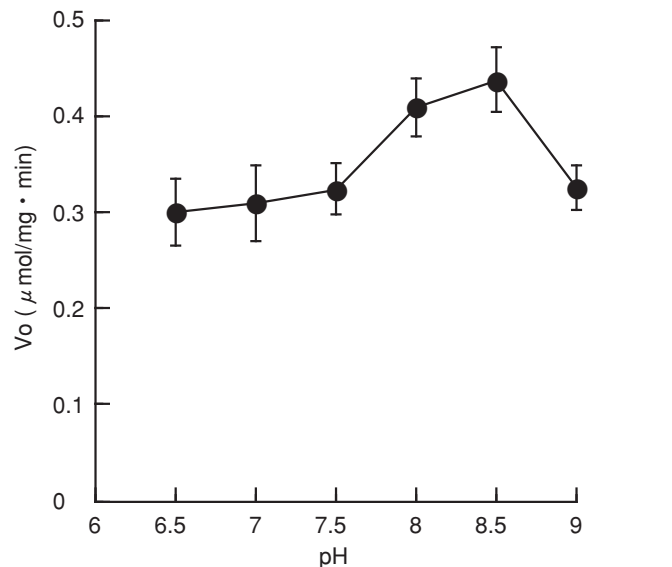


Fig.3 Effect of pH on HK activity in 0.1M AOT/isooctane reversed micelles ( $W_o=10$ ) at 37°C

同様にHKの-NH<sub>2</sub>によりHTAC逆ミセルの膜界面にHKは深く貫入せず、HKのコンフォメーションが変化しやすいことがあげられる。またHTAC逆ミセルの方がAOT逆ミセルに比べ、そのサイズが大きいこともHKの活性発現に有利に働くように思われる。

C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>逆ミセル系ではW<sub>o</sub>が20まで徐々にHK活性は上昇し、その後なだらかに増加し、W<sub>o</sub> = 30で最大値を示した (Fig. 5)。C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>逆ミセル中の酵素活性はAOT逆ミセルやHTAC逆ミセルのそれらに比べ非常に高く、ほぼバルク水のそれと等しかった。また極大値を示したW<sub>o</sub> = 30にお

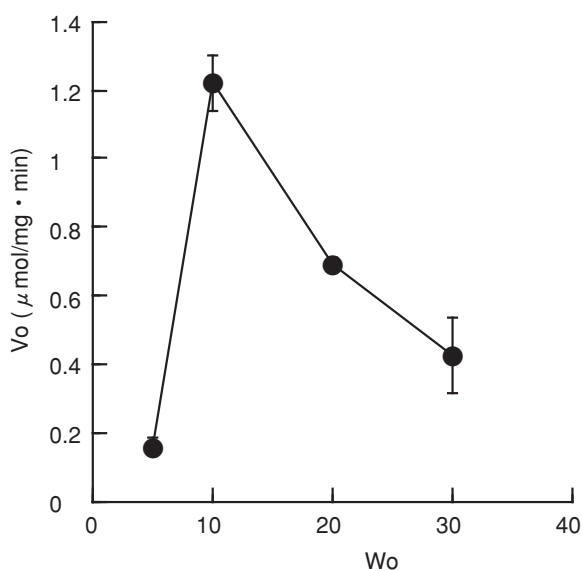


Fig.4 Effect of W<sub>o</sub> on HK activity in 0.1M HTAC/isooctane-octanol reversed micelles at 37°C

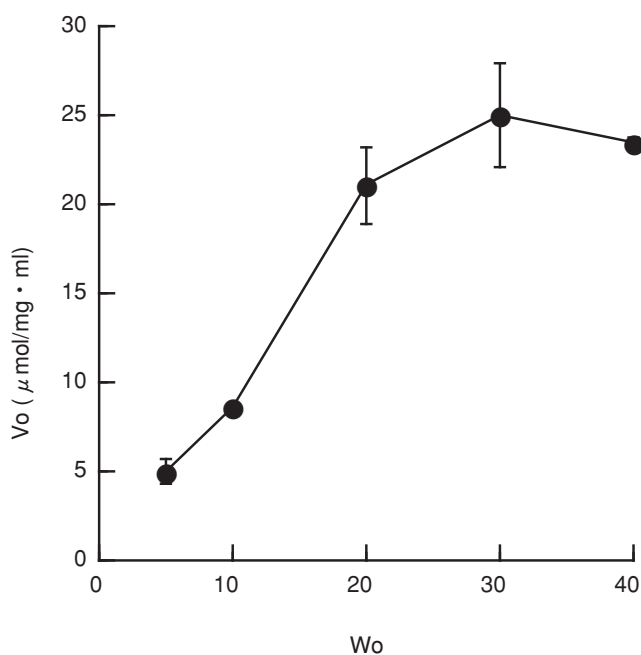


Fig.5 Effect of W<sub>o</sub> on HK activity in 0.1M C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>/isooctane-octanol reversed micelles at 37°C

いてpH効果を検討した結果、至適pHはバルク水のそれと等しくH<sup>+</sup>の分布はバルク水のH<sup>+</sup>の分布と等しいと推測された。しかしC<sub>12</sub>E<sub>8</sub>の濃度効果を検討した結果、HKの活性は濃度の増加とともに増加した (Fig. 6)。通常W<sub>o</sub>を一定にしておけば、界面活性剤の濃度を変化させても、water poolの状態は変わらないはずである。界面活性剤の濃度とともに活性が低下する場合は、酵素が逆ミセルの膜と結合している場合が多い<sup>18)</sup>。AOT系でのHKの活性に対するAOT濃度の効果はこれに相当する (データは示されていない)。しかし反対に界面活性剤濃度とともに活性が増加する場合は、逆ミセルや水の構造の変化が起きている場合で、酵素は膜と結合していないと推測される。C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>逆ミセルの場合は後者に相当する。

表1はAOT、HTAC及びC<sub>12</sub>E<sub>8</sub>逆ミセル、バルク水溶液の見かけのV<sub>max</sub>及びK<sub>m</sub>を示している。見かけのV<sub>max</sub>はAOT<HTAC<<C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>逆ミセル<バルク水溶液の順であった。見かけのK<sub>m</sub>はC<sub>12</sub>E<sub>8</sub>逆ミセル中ではバルク水溶液のそれと等しいが、AOTやHTAC逆ミセルのそれらよりかなり低かった。これはC<sub>12</sub>E<sub>8</sub>逆ミセル中ではHKと基質の相互作用がバルク水溶液とほぼ等しく、AOTやHTAC逆ミセルの場合と大きく異なることを示している。

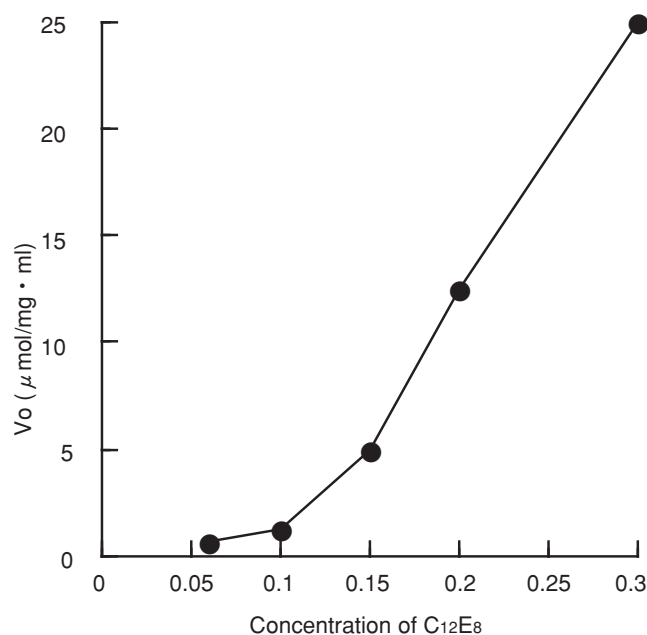


Fig.6 Effect of C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> concentration on HK activity in C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>/isooctane-octanol reversed micelles (W<sub>o</sub>=30) at 37°C

Table 1 Apparent kinetic parameters of HK in three kinds of reversed micellar solution

	bulk water	AOT	HTAC	C <sub>12</sub> E <sub>8</sub>
km (μmol/ml)	0.99	3.69	2.79	1.02
Vmax (μmol/min)	26.81	5.11	13.48	18.93

HK は前述したようにミトコンドリア表面に疎水結合と静電力で結合し、HK がグルコースを抱き込むと、そのコンフォメーションが大きく変化すると推測されているが、三種類の逆ミセルの中での酵素活性から、HK の活性は微視的環境に大きく依存することが判明した。上記の結果から、AOT、HTAC、 $C_{12}E_8$  逆ミセルにおける酵素反応のスキーム (Fig. 7) を示す。AOT 逆ミセルの場合は HK のアルキル基とその末端のアミノ基により HK が膜に結合し、埋め込まれたような状態となり、HK のコンフォメーションが変化しにくく反応が進行しにくいことがまず第一にあげられる。HTAC 逆ミセルの場合は、HTAC の陽電荷と HK のアミノ基の電氣的反発力により比較的 water pool の中央に位置するとともに、動的分散の測定から、AOT 逆ミセルの大きさに比べ、HTAC 逆ミセルの大きさは大きいので、酵素がコンフォメーションが変化しやすいことが考えられる。さらに陰イオン性、陽イオン性の界面活性剤からなる逆ミセルの water pool は静電力が強く、特に  $W_o = 30$  が大きくなると自由水が増加しその傾向は強くなる傾向にある。従って反応基質の ATP や  $H^+$  の water pool における分布が電荷のある表面膜に強く影響を受け、反応基質と酵素の距離や pH を変化させることになり、HK の触媒的作用を抑制する。

他方、非イオン性  $C_{12}E_8$  逆ミセルは HK の触媒活性に有利であった。その理由として二つあげられる。1) 静電場効果がないので、反応基質、HK、 $H^+$  の分布が逆ミセルの中で比較的均一に分布する。2)  $C_{12}E_8$  逆ミセルの特異的な構造が挙げられる。 $C_{12}E_8$  逆ミセルははっきりした境界領域が分かれた water pool を持っているのではなく、殆どの水分子は  $W_o = 30$  ぐらいまでは、エチレンオキサイド鎖に水和している<sup>19, 20</sup>。エチレンオキサイド基はアルキル基より長く、エチレンオキサイド鎖と水和水からなるマントル層であり、この中に酵素も反応基質も存在し、容易に反応基

質と結合し、反応が進行していくと推測される。in vivo において脂質膜はポリサッカライドとその結合水で覆われ、この状態はエチレンオキサイド層からなるマントルと類似していると考えられる。HK の活性は HK の微視的環境例えば、疎水性、静電効果、結合水のような因子に影響を受けることが判明した。 $C_{12}E_8$  逆ミセルの場合は、 $W_o = 30$  ぐらいまでは結合水からなると推測されるが、 $W_o = 30$  を超えると、活性が低下するのでエチレンオキサイド層からなるマントルにおいては結合水が有利に働くと推測された。

### 3.1.2 ポリヌクレオチドフォスホリラーゼについて<sup>21)</sup>

逆ミセルの water pool の中に酵素、ポリヌクレオチドフォスホリラーゼ (Polynucleotide Phosphorylase, PNPase)、 $FeCl_3$ 、ADP を溶解し、RNA 合成を検討し、water pool の水の性質との関係を検討した。通常は ADP の酵素的重合には  $Mg^{2+}$  イオンが有効であるが、今回は低濃度の  $Fe^{3+}$  イオンを用いたことが特徴的である。その理由の一つとして、Beljanski<sup>22)</sup> が PNPase による核酸塩基の重合化は  $Fe^{3+}$  イオンの方が  $Mg^{2+}$  イオンに比べ効果があることを報告しているからである。二つ目の理由は、微量の二価、三価鉄塩を含む  $\pi$  Water は実体は不明であるが、特異な生理活性を持つと言われ、その点でも興味深いからである。

Fig. 8 は  $0.2M C_{12}E_8$  逆ミセル溶液の酵素的 ADP 重合化に対する  $Fe^{3+}$  と  $Mg^{2+}$  イオンの存在下における  $25^\circ C$  及び  $37^\circ C$  の結果である。ここで water pool の  $Fe^{3+}$  イオン濃度として  $FeCl_3$  の飽和濃度の  $0.05mM$  を用いているが、 $Mg^{2+}$  イオン濃度が water pool において  $10mM$  濃度を用いた。その理由は  $Fe^{3+}$  イオン濃度と同じ  $Mg^{2+}$  イオン濃度が  $0.05mM$  においては殆ど反応が進行しなかったため、最も反応が進行した  $10mM$  の濃度を用いた。縦軸の重合率は最初に加えた  $^{14}C$ -ADP の全放射エネルギーに対する生成された重合体の放射エネルギーの割合である。Fig. 8 の結果が示すように poly (A)

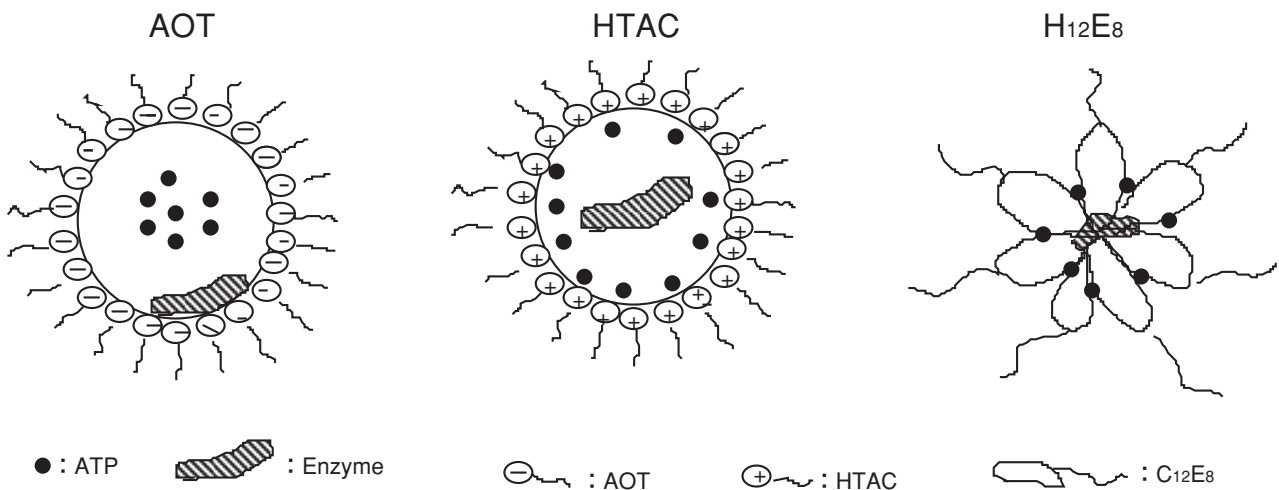


Fig.7 Models of reversed micelles containing HK and ADP

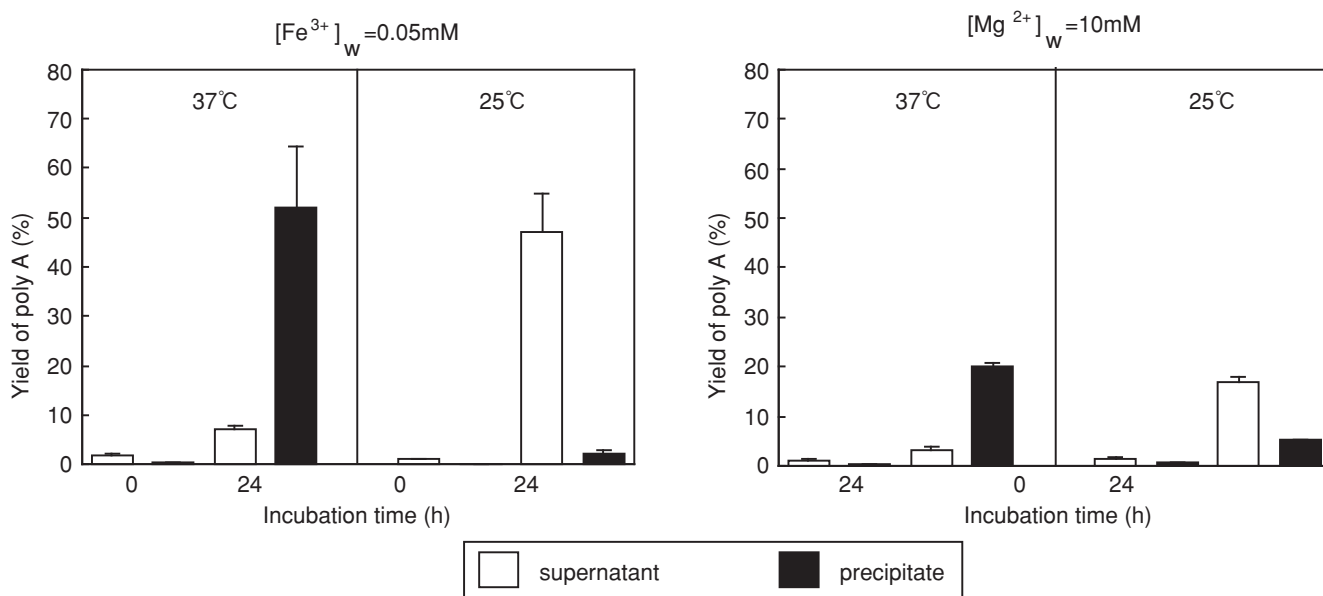


Fig. 8 Effect of Metal Ions and Temperature on ADP Polymerization in C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> Reversed Micellar Solution

生成物は沈殿物と逆ミセル溶液の上澄み液の両者に存在した。この時の逆ミセルの大きさや water pool の特徴を示す  $W_0$  ( $= [\text{水}] / [\text{界面活性剤}]$ ) は 20 である。これはすでに報告してある AOT 逆ミセル系で  $\text{Mg}^{2+}$  イオンを用いた場合、 $W_0 = 20$  の場合が最も重合化が進行したからである<sup>9~11)</sup>。結果は示していないが、Beljanski<sup>22)</sup> がすでに報告したように、Tris 緩衝液中では  $\text{Fe}^{3+}$  イオンは  $\text{Mg}^{2+}$  イオンに比べ 2 倍効果を示しており、37°C では重合化の程度はほぼ 10% であることが確認された。しかし結果は示していないが、AOT 逆ミセル系では  $\text{Mg}^{2+}$  イオンの方が  $\text{Fe}^{3+}$  イオンに比べ圧倒的に効果が高く、しかも 37°C に比べ 25°C の方が生成した poly (A) が沈殿する割合が高い。それに対して Fig. 8 に示されるように、C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 逆ミセル系では  $\text{Mg}^{2+}$  イオンに比べ約 2 倍  $\text{Fe}^{3+}$  イオンの方が効果的であった。また  $\text{Fe}^{3+}$  イオンの場合、C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 逆ミセル系の重合率は水系に比べ 6 倍の 60% の重合率を超え、しかも 37°C で poly (A) が沈殿し、生成された生成物を容易に分取しやすくなることが判明した。

AOT 逆ミセル系においては  $\text{Fe}^{3+}$  イオンがほとんど効果を示さなかったのは、AOT 逆ミセルの water pool のマイクロ界面が陰イオン性で、特に  $\text{Fe}^{3+}$  イオンは 3 価のために、Schultz-Hardy の法則に従い、そのマイクロ界面に吸着されやすくなり、water pool の中央は  $\text{Fe}^{3+}$  イオンの濃度が極めて低くなるためと推測される。一方、反応基質の ADP は負電荷を持つため、AOT 逆ミセルの陰イオン界面と反発し、むしろ water pool の中央に存在する割合は高くなり、重合化が進行しにくいと推測される。前述したように C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 逆ミセル系では AOT 逆ミセル系に比べ電場効果はなく、8 ケのエチレンオキシド基の親水層がアルキル鎖より長く、水素結合により水分子が水和している厚いネッ

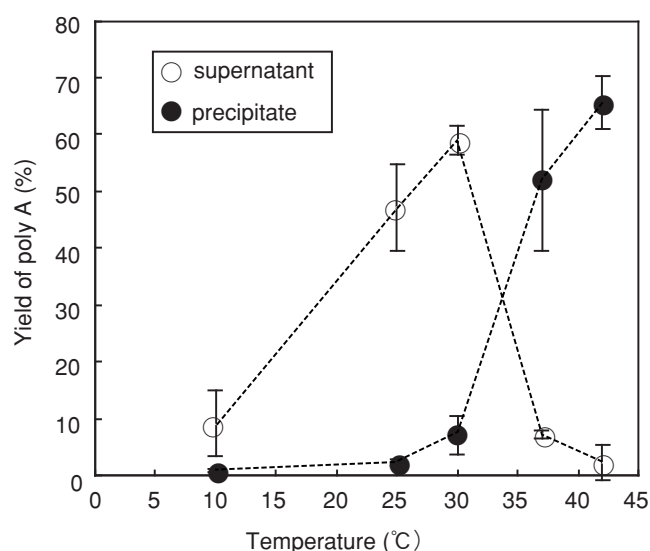


Fig.9 Effect of temperature on polymerization after 24h

ト状でないかと推測される。水溶液中の通常のエチレンオキシド系非イオン性ミセル系においては、 $\text{Fe}^{3+}$  イオンはエチレンオキシド鎖の水和水と置換してエチレンオキシド基に結合することが知られているので、逆ミセルにおいても  $\text{Fe}^{3+}$  イオンはエチレンオキシド基の親水層に ADP とともに存在し、反応が進行すると推測される。このように C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 逆ミセル系では  $\text{Fe}^{3+}$  イオンの方が活性があり、かつ 37°C で沈殿しやすいので、この現象をさらに詳細に検討した。

Fig. 9 と Fig.10 はそれぞれ C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 逆ミセルの poly (A) 生成に及ぼす温度と反応時間の影響を調べたものである。低温の 10°C では重合化は殆ど進行しないが、反応温度が 30°C 以上になるとほぼ 60% 重合し、それ以上温度を上昇させても総重合率は変化しなかった。しかし 37°C 以上で

は急激な沈殿量の増加が認められた。一方、反応時間の効果を調べると (Fig.10)、6時間以上で重合化は60%に達し、それ以後変化しない。しかし6時間から9時間の間に生成物は沈殿した。すなわち重合化にはある程度の熱が必要であるが、生成物の沈殿には熱とともにある程度の時間が必要であった。エチレンオキサイド鎖をもつ界面活性剤の水溶液における通常のみセルは温度の影響を強く受け、温度を上昇していくと相分離し、水溶液全体が濁ることはよく知られている。これはエチレンオキサイド鎖が脱水和するため、疎水性と親水性のバランスが変化し、疎水性の性質が高まり、相分離するのである。従って逆みセルのエチレンオキサイド鎖の結合水が温度上昇に伴い、脱水和により逆みセルの構造が変化し、その結果、酵素反応に影響すると推測された。言い換えればエチレンオキサイド鎖をもつ界面活性剤の逆みセルの water pool は温度制御可能な酵素の反応場であることを示唆している。

次に37°Cで24時間後の重合化に及ぼす  $W_0$  の影響を調べた。 $W_0$  の増加とともに逆みセルのサイズとともに water pool のサイズが増加することはよく知られている<sup>1)</sup>。よく研究されてきた AOT 逆みセル系については、特に  $W_0$  が10以下では結合水が存在し、 $W_0$  が10以上では water pool の中央に自由水が出現してくることが知られている<sup>1,6)</sup>。すでに報告したように、AOT 逆みセル系では  $Mg^{2+}$  イオン存在下、poly (A) の生成は  $W_0$  が20で極大を示し、ある大きさの water pool が必要であり、結合水だけでは重合化は進行しないことが判明した<sup>10)</sup>。すなわち  $W_0 = 20$  では、結合水と自由水が半々ぐらいの状態が存在し、これが重合に有利に働くと推測された。しかし Fig.11 が示すように、 $C_{12}E_8$  逆みセルの poly (A) 生成は  $W_0 < 10$  では重合化はわずかにしか進行しないが、 $W_0 >$

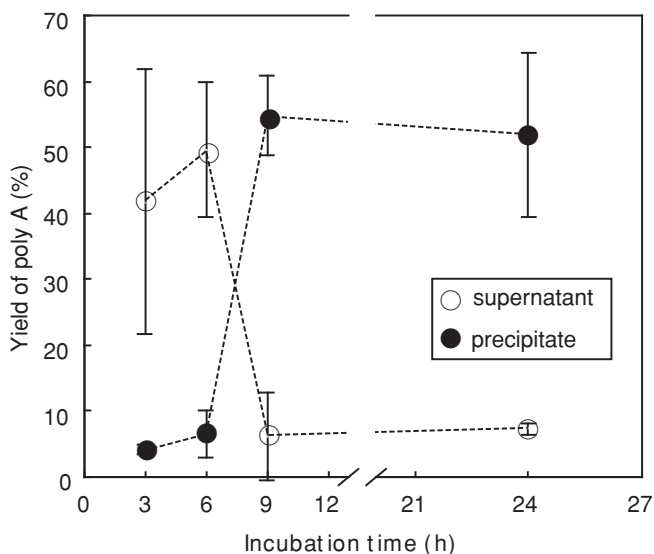


Fig.10 Time course of polymerization at 37°C

15では重合化は速やかに進行する。すなわちある程度の逆みセルの大きさと自由水の存在が重合に好ましい。しかし  $W_0 > 15$  で沈殿した poly (A) と上澄み液中の poly (A) を併せた総重合率はほぼ一定であり、自由水が多ければ多いほど、重合化が進行するとはいえない。データは示していないが、0.2M  $C_{12}E_8$  逆みセルの  $W_0$  に対して水の  $H_2^{17}O$  の NMR の半値幅をプロットすると、 $W_0$  が10付近で屈曲点を示し、 $W_0 < 10$  では、逆みセル中の殆どの水はエチレンオキサイド基に水和している。しかし  $W_0 > 10$  で自由水が増加してくることが推測される。すなわち  $W_0 < 10$  では水が強く構造化され、重合化に対して不利に働くようである。

以上より  $C_{12}E_8$  逆みセル中においては  $W_0 > 15$  において37°Cで6時間以上の反応時間で poly (A) の重合化が最も高くしかも圧倒的に沈殿することが判明した。この沈殿現象は重合体の単離に都合がよい。そこでこの沈殿現象の機構を検討した。

Fig.12 は  $W_0 = 20$  の場合の  $C_{12}E_8$  逆みセル中の水の  $H_2^{17}O$  の NMR の半値幅を温度に対してプロットしたものである。温度の上昇とともに  $H_2^{17}O$  の NMR の半値幅は低下し、水の運動性が増加するが、約35°C以上で  $H_2^{17}O$  の NMR の半値幅は一定値に近づく。データは示していないが、温度が上昇すると、逆みセルのサイズは大きくなり、特に water pool に  $Fe^{3+}$  が存在すると、逆みセルはさらに大きくなった。我々はすでに AOT 逆みセル系について  $W_0$  が増加し、水の運動性が増加すると、逆みセルが集合する Flocculation の現象が起こることを Cryo-電子顕微

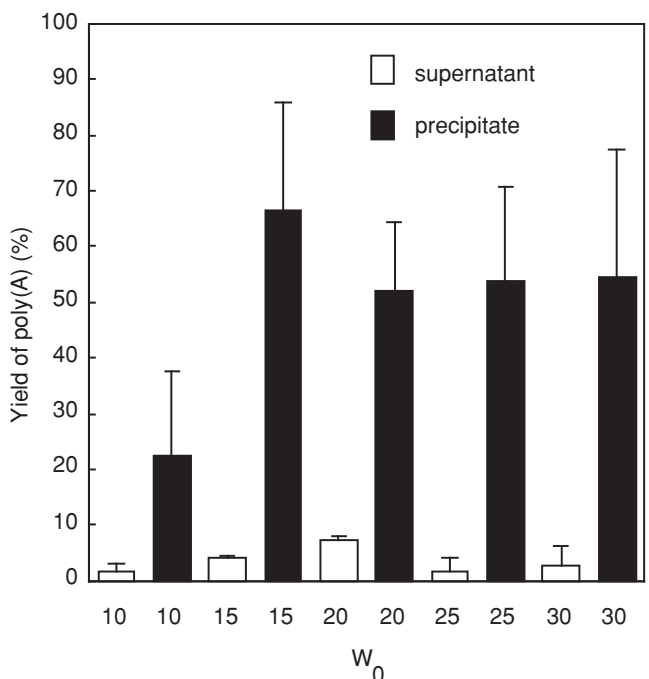


Fig.11 Effect of  $W_0$  on the precipitation of poly(A) in  $C_{12}E_8$  reversed micellar solution at 37°C

鏡で観察したが<sup>7)</sup>、C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 逆ミセル系についても、温度が上昇と Fe<sup>3+</sup> の存在が逆ミセルの Flocculation を引き起こしている可能性が推測される。これが温度が 37°C 以上で、かつ Fe<sup>3+</sup> が存在すると、PNPase により生成された poly (A) が沈殿する現象の一つの要因として推測された。

逆ミセル系での酵素反応に関する多くの研究は AOT 逆ミセル系についてであった。ここに述べた研究例はエチレンオキサイド基をもつ非イオン性界面活性逆ミセルは系全体が油の系であるにもかかわらず、酵素反応に有利であることを示している。特にエチレンオキサイド基のまわりの結合水は温度感受性で温度の上昇とともに脱水和して曇点

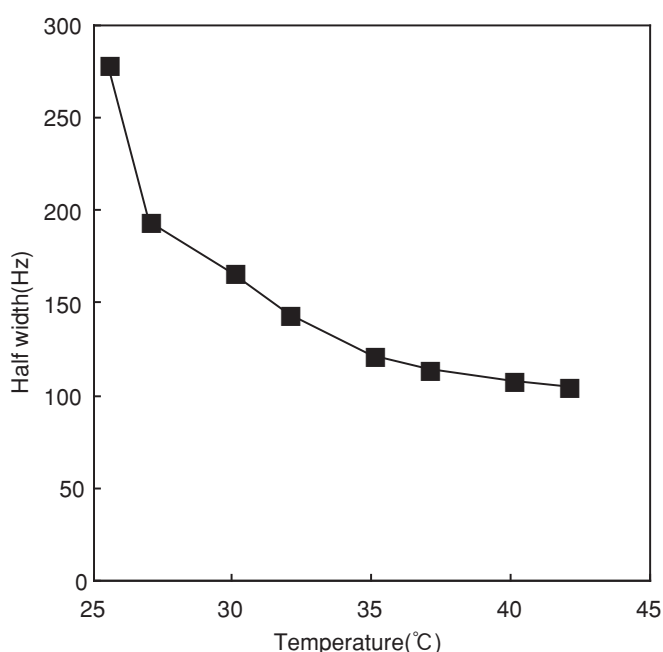


Fig.12 Plots of <sup>17</sup>O line of the H<sub>2</sub> <sup>17</sup>O signal of C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> reversed micelles against temperature

現象を示すことが知られているが、この現象はエチレンオキサイド系界面活性剤逆ミセルの水もその効果を示し、温度を変化させることにより逆ミセルの水の性質を制御し、高分子生成物の単離が可能であることを示した。

### 3.2 膜界面におけるチオール化合物の光重合<sup>23)</sup>

環境中に存在する紫外線は UVA 及び UVB で、UVC は殆ど存在していないが、近年のオゾン層破壊にともない UVB の増加が観察されており、さらに破壊が進行し UVC が増加することも懸念されている。紫外線は細胞膜の膜タンパク中の SH 基の酸化（主に S-S 結合の生成）をきたし、レセプターの clustering や膜酵素の不活性化さらに紫外線の情報伝達にも関与している可能性が報告されている<sup>24, 25)</sup>。本研究では膜タンパク中の SH 基の変化に膜界面の近傍の水の状態（結合水や自由水）と静電場の影響を検討するため逆ミセルを用い、cysteine の SH 基は容易に酸化され、二量化する性質に着目して以下の仮説を立てた。紫外線の照射により脂質膜近傍で産出される活性酸素により cysteine が cystine に酸化されやすいという仮説の基に AOT 逆ミセルを中心にしてその water pool 中に cysteine を溶解し、紫外線照射後の cysteine の変化量を蛍光法により検討した。特に逆ミセルの単分子膜を膜モデルと考え、W<sub>0</sub> を変化させて膜界面の水の性質を連続的に変化させて検討した。

cysteine バルク水溶液および water pool 中に cysteine を溶解した逆ミセル溶液に紫外線 (20J/cm<sup>2</sup>) を照射後の SH 基減少率を測定した (Fig. 13)。バルク水溶液と逆ミセル溶液では SH 基の減少（酸化）に顕著な差が観察された。バルク水溶液においては UVA では SH 基の変化はほとんど見られなかったが、UVB では約 20%、UVC では約 60% の減少であった。この減少は cysteine の SH 基が

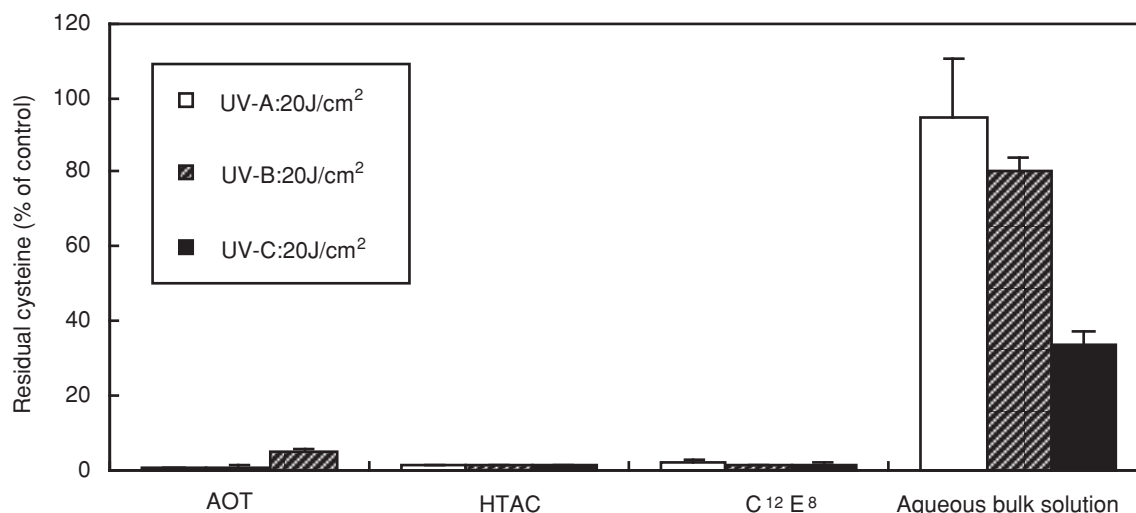


Fig. 13 Conversion of cysteine in reversed micellar solution and in aqueous solution by UV-irradiation

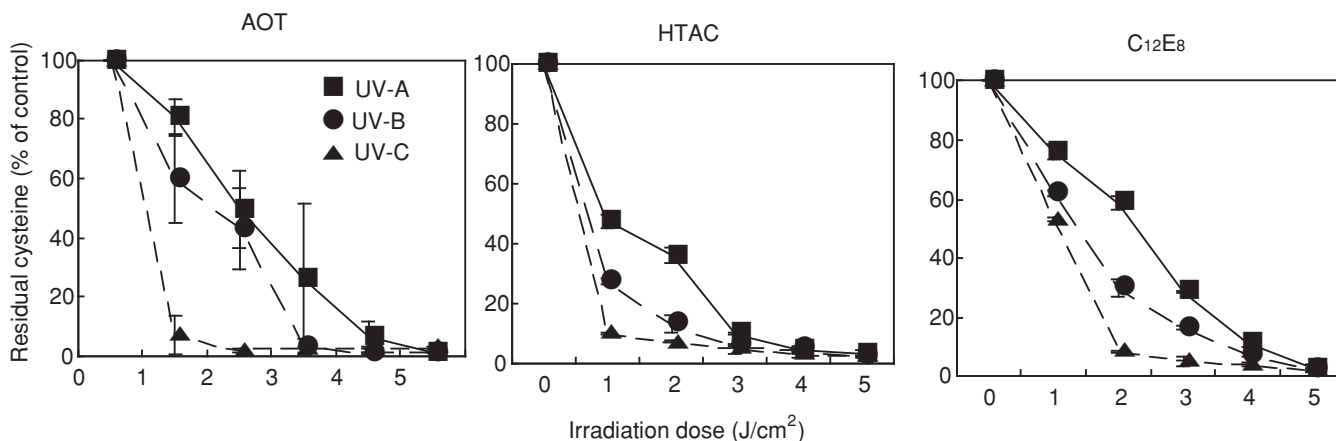


Fig.14 Conversion of cysteine as a function of irradiation dose

酸化されたことを意味するが、バルク水溶液に比べ、 $W_o = 20$  の AOT 逆ミセル系では顕著に進行することは大変興味深い。この反応が cysteine の cystine への酸化であることを薄層クロマトグラフィーにより確認した。また紫外線の種類による減少率の違いは個々の紫外線がもつエネルギーの差によると考えられる。すなわち、UV のエネルギーが大きいほど酸化しやすいことを示している。また逆ミセルでは  $20\text{J}/\text{cm}^2$  照射で 3 種類の紫外線とも SH 基減少率が 90% 以上となったが、線量依存性があることも確認した。この結果は cysteine の変化に AOT 逆ミセルの water pool が重要であることが示唆された。

Fig. 14 に示したように  $0.2\text{M}$ AOT 逆ミセル ( $W_o = 20$ ) では UVA および UVB  $2\text{J}/\text{cm}^2$  照射時にはほぼ 50% の減少率となり、UVC に対してはさらに減少率が高くなり、 $1\text{J}/\text{cm}^2$  照射ではほぼ反応が終了していることが観察された。一方、陽イオン性の  $0.2\text{M}$ HTAC 逆ミセル ( $W_o = 20$ ) の場合は  $2\text{J}/\text{cm}^2$  照射時に UVA で約 60%、UVB では 90% 以上の減少率を示した。UVC 照射では  $1\text{J}/\text{cm}^2$  照射でもかなり反応が進行していた。非イオン性の  $0.2\text{M}$ C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 逆ミセル ( $W_o = 20$ ) の場合は  $2\text{J}/\text{cm}^2$  照射時に UVA は約 40%、UVB では約 70% の減少率を示し、UVC ではほとんど cysteine が酸化されていた。この結果より、紫外線の場合  $\text{HTAC} \geq \text{AOT} > \text{C}_{12}\text{E}_8$  の順に cysteine の変化が起りやすいと言える。この反応が静電場により影響を受けていることを示唆した。

このように cysteine の UV による酸化には膜界面の関与が示唆されたので、さらに膜界面の水の状態および膜電荷の影響について検討した。以下の実験では UVA および UVB では  $2\text{J}/\text{cm}^2$ 、UVC では  $0.5\text{J}/\text{cm}^2$  の線量で行った。 $W_o$  値を変えて水の状態の影響を、AOT、HTAC、C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 界面活性剤の逆ミセルについて膜電荷の影響を検討した (Fig. 15)。界面活性剤の種類、紫外線の種類に関係なく、 $W_o$

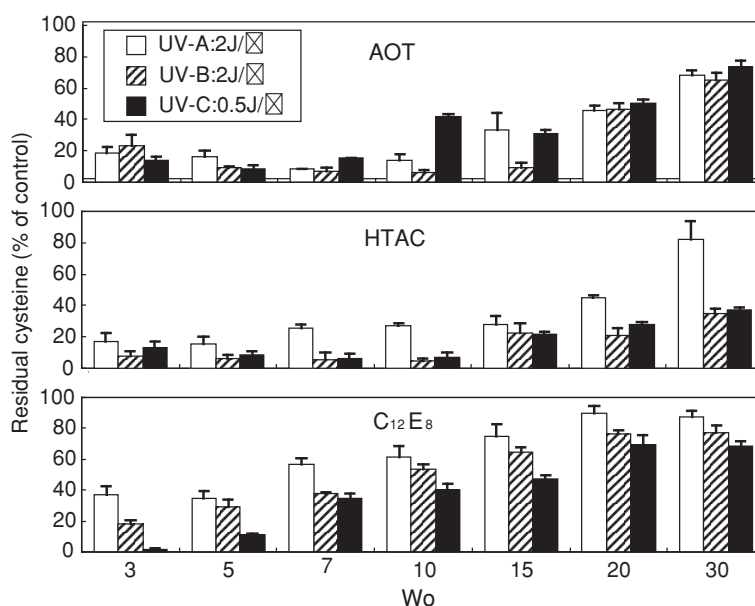


Fig.15 Conversion of cysteine in reversed micellar solution of various  $W_o$  by UV-irradiation

が大きくなるすなわち自由水の割合が増加するとともに cysteine の SH 基減少率が低くなり光重合が進行しにくいことが判明した。これは逆ミセル溶液は圧倒的に有機溶媒が多い状態であるにもかかわらず、内殻水の状態により SH 基減少率に差があったことを意味する。このことよりこの反応は有機相より水相が重要であること即ち結合水が重要であることが確認された。従って  $W_o$  の増加とともに反応率が低下するのは cysteine が自由水中に多く存在することにより、反応が進行しにくくなるためと推測された。同じ  $W_o$  値でも検討した界面活性剤によっても SH 基減少率に差が確認された。全体的に見て  $\text{HTAC} \geq \text{AOT} > \text{C}_{12}\text{E}_8$  の順に反応が起りやすいことが観察された。この結果も前述したように電荷が関与していることを示しており、cysteine の逆ミセル界面での配向の仕方が影響していると推測される。また紫外線と同じ  $W_o$  値の UVA と UVB を比較した場合には UVB の方がより反応を進行させた。

逆ミセルの内殻水中の cysteine の存在場所は、両性の電荷を持つためおそらく均一に存在していると考えられるが、逆ミセルの界面の電荷により cysteine の配向は若干異なっていると推測される。いずれにしても SH 化合物が膜界面に多く存在すればより反応は進行しやすいと考えられる。そこで長いアルキル側鎖による疎水性のために逆ミセルの膜界面に多く存在すると推測される n-dodecanethiol を用いて検討した (Fig. 16)。紫外線によって cysteine とは逆に  $W_o$  が大きくなると SH 基減少率が高くなった。これは  $W_o$  が小さい場合は膜界面に出ている SH 基が少ないために反応率が低下し、 $W_o$  が大きくなると内殻水のサイズが大きくなり、膜界面の SH 基が増加したために反応率が高くなったと考えられた。n-dodecanethiol の反応率が cysteine に比べて相対的に低いのは n-dodecanethiol のかなりの量が有機溶媒 (Isooctane) 中に存在しているためと考えられる。このことは n-dodecanethiol を Isooctane または Methanol に溶解させて、同様に紫外線や放射線を照射して SH 基の変化を検討したが、ほとんど SH 基の減少は見られなかったこのことから確かめられた。これらの結果はさらに結合水の存在の重要性とともに膜界面の必要性を示した。

以上より逆ミセル中 cysteine の SH 基がで紫外線によって酸化され、主として cystine が生成することが明らかとなった。紫外線照射によって一重項酸素、過酸化水素、スーパーオキシドアニオン、水酸化ラジカルなどの活性酸素が生成することが報告されている<sup>26~29)</sup>。活性酸素の生成には溶存酸素が必要であると考えられるので、まず使用する溶媒を窒素置換して溶存酸素の影響を調べた。Fig. 17 から明らかなように  $W_o$  が 7 および 20 のいずれにおいても、SH 基減少率の低下が確認された。従ってこの cysteine の変化に酸素が関与していることが示唆された。また一般的に膜界面には溶存酸素が安定的に存在するとされているので、 $W_o = 7$  のとき回復の割合が  $W_o = 20$  に比べて低いのは、今回行った窒素置換条件では十分に溶存酸素が除去できなかったものと考えられた。

次に一重項酸素の関与をクエンチャーである  $\text{NaN}_3$  を用いて検討した。UVA、UVB、UVC 共に  $W_o = 7$  および 20 で SH 基減少率の低下が観察された (Fig. 18)。UVB、UVC、放射線照射によって一重項酸素は生成しないと考えられているので、 $\text{NaN}_3$  による SH 基減少率の低下はこの試薬が他の生成した活性酸素種を阻害したことによるものと推測している。一例としてヒドロキシラジカル ( $\text{OH}$  ラジカル) を阻害することが報告されている。そこでその他の活性酸素の影響をまず親水性の抗酸化剤である Trolox の作用について検討した (Fig. 19)。いずれの

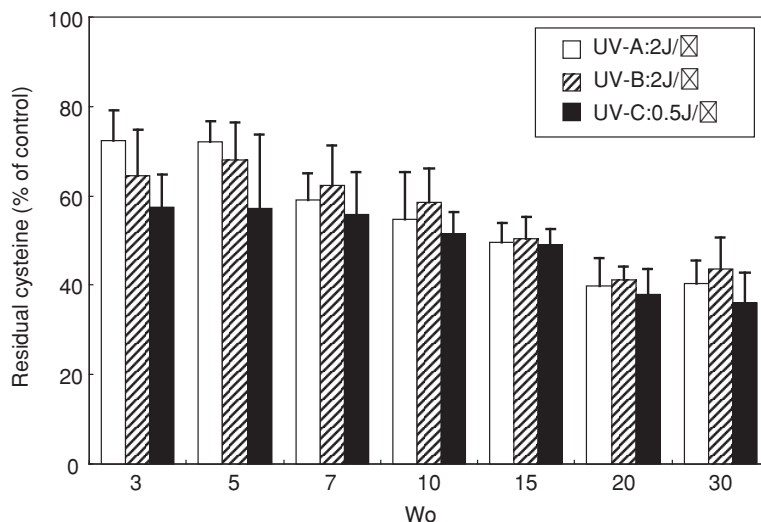


Fig. 16 Conversion of 1-dodecanethiol in AOT reversed micellar solution of various  $W_o$  by UV-irradiation

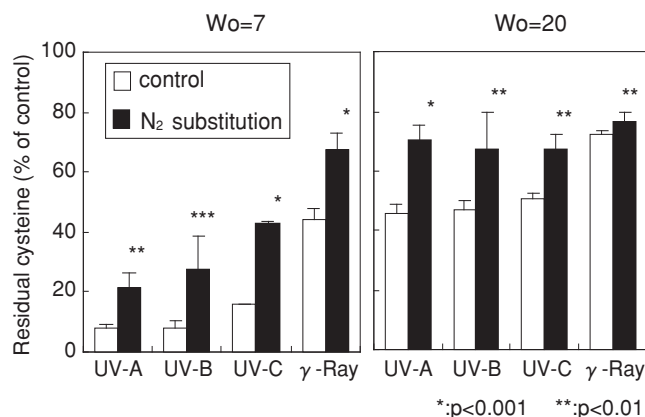


Fig. 17 Effect of nitrogen substitute on conversion of cysteine in AOT reversed micelles by UV irradiation

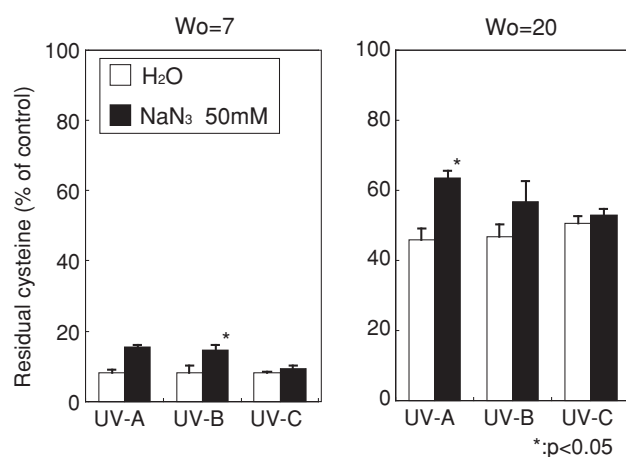


Fig. 18 Effect of  $\text{NaN}_3$  on conversion of cysteine in AOT reversed micelles by UV irradiation

紫外線でも SH 基減少率が低下した。  $W_o = 7$  と 20 では Trolox の作用に差は認められなかった。これらの結果は逆ミセル内殻水に存在する抗酸化剤はある程度活性酸素の発生を抑制することを示した。さらに疎水性の抗酸化剤

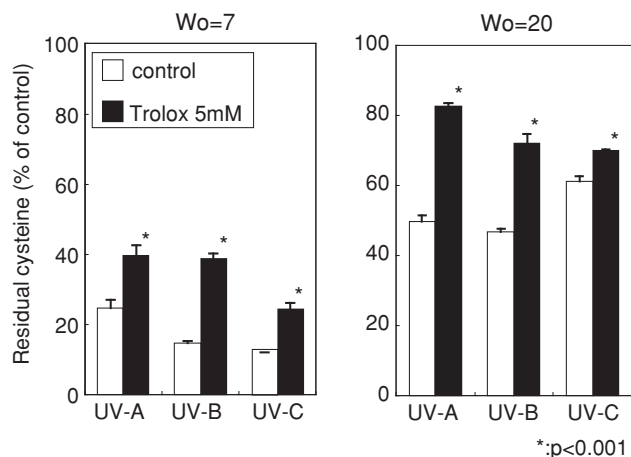


Fig.19 Effect of Trolox on conversion of cysteine in AOT reversed micelles by UV irradiation

である vitamine E は有機溶媒中あるいは膜界面近くに存在すると考えられる。Fig. 19 から明らかなように、UVA、UVB、UVC に対して顕著に SH 基減少率の低下を示した。特に  $W_o = 7$  においては Trolox より強く作用している傾向が観察された。従って活性酸素は主として膜界面近傍で多く発生すると推測された。

無生物系への紫外線照射によっても活性酸素が発生することが観察され、その発生には膜界面、結合水、電荷などが重要な点であることが示された。このことは生体膜においても膜界面に存在する SH 基を持つ蛋白質成分が、紫外線照射によって影響を受けやすいことを示唆した。

#### 4. 結論

in vivo の脂質界面の水の性質や電場効果が生理作用とどのように関わるかは重要な課題であるが、in vitro でそのモデル実験を構築することはむずかしい。我々グループの研究対象である逆ミセルの water pool の水分子は動的な柔らかい単分膜に包まれ、 $W_o$  が低い領域では界面活性剤の親水基とその対イオンの結合水として存在するが、 $W_o$  がある大きさを超えると、water pool の中央に自由水が出現するようになる。従って  $W_o$  を連続的に変化させると結合水と自由水の割合を制御でき、その上、極性や電場も制御可能であり、脂質界面の水の性質や電場効果が生理機能との関わりについての知見が期待される。本研究では脂質界面の水の性質や電場効果が酵素反応に与える影響と紫外線照射に活性酸素の発生への影響を逆ミセルを用いて検討した。

その結果、以下の点が明らかにされた。

- 1) in vivo の研究で膜界面や水の性質に大きく依存すると推測される HK については、逆ミセルを用いて明らかにすることができた。すなわち強い電場は基質や酵素の局所的な位置を大きく変化させ、特に負電荷の膜は HK の活性発現に好ましくない。またエチレンオキサイド鎖近

傍の結合水は HK の酵素活性発現に有利に働くことが判明した。

- 2) PNPase の酵素活性発現には膜の電荷により、金属触媒の作用は強く依存し、エチレンオキサイド鎖をもつ  $C_{12}E_8$  逆ミセル系では、 $Fe^{3+}$  が有効に作用し、さらに温度を上昇することにより、エチレンオキサイド鎖の結合水の状態を制御し、高分子の poly (A) を沈殿させ、単離しやすくできる系であることが判明した。
- 3) 膜界面の結合水は紫外線により発生した活性酸素の寿命を長くしチオール化合物を容易に酸化することを明らかにし、in vitro のモデル実験は膜蛋白質の SH 基が紫外線により容易に酸化され、膜蛋白質の構造や生体膜の状態を変化させ、情報伝達などに影響を与えることを支持した。

#### 謝辞

本研究は静岡県立大学大学院生活健康科学研究科五島廉輔教授、伊吹裕子助手とそのグループとの共同研究でなされたものであり、ここに謝意を表する。

#### (参考文献)

- 1) 五島綾子, 逆ミセル内殻水の性質, 表面, 32,96(1993).
- 2) A. Goto and H. Kishimoto, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2, 1990, 73.
- 3) A. Goto and H. Kishimoto, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2, 1990, 891.
- 4) A. Goto, H. Yoshioka, H. Kishimoto, T. Fijita, Langmuir, 8, 441(1992).
- 5) A. Goto, S. Harada, T. Fujita, Y. Miwa, H. Yoshioka, and H. Kishimoto, Langmuir, 9, 86(1993).
- 6) A. Goto, H. Yoshioka, M. Manabe, and R. Goto, Langmuir, 11, 4873(1995).
- 7) A. Goto, Y. Kuwahara, S. Suzuki, H. Yoshioka, R. Goto, H. Iwamoto, and T. Imae, J. Mol. Liquid, 72, 137(1997)
- 8) P. Walde, A. Goto, p-A. Monnard, M. Wessicken, and P. L. Luisi, J. Amer. Chem. Soc., 116, 7541-7547(1994).
- 9) A. Goto, K. Hakamda, Y. Kuwabara, R. Goto, P. Walde, P. L. Luisi, and T. Imae, Prog. Colloid & Polymer Science, 106, 245(1997).
- 10) A. Goto, R. Goto, Y. Kuwahata, H. Hakamada, Y. Ibuki, P. Walde, P. L. Luisi, and T. Imae, Langmuir, 14, 3454(1998)
- 11) Y. Kuwahara, A. Goto, Y. Ibuki, K. Yamaguchi, and R. Goto, J. Colloid Interface Sci., 233, 190(2001).
- 12) K. C. Pedley, G. E. Jones, M. Magnani, R. J. Rist, and R. J. Nabtalin, Biochem. J. 291, 515(1993).
- 13) P. G. Plokis, J. E. Wilson, Arch. Biochem. Biophys.

- 236, 328 (1985).
- 14) R. M. Lynch, K. E. Forarty, F. S. Fay, *J. Cell Biology*, 112, 383(1991).
- 15) A. E. Aleshin, H. J. Fromm, R. B. Honzatko, *FEBS Letter* 434, 42(1998).
- 16) D. Ardail, J-P. Privat, M. Egret-Charlier, C. Levrat, F. Lerme, and P. Louisot, *J. Biol. Chem.* 265, 18797(1990).
- 17) E. A. -Foucher, B. Fonte, D. C. Gautheron, *Arch. Biochem. Biophys.* 232, 391(1984).
- 18) K. Martinek N. L. Klyyacho, A. V. Kavanov, Y. L. Khmel'nitsk, A. V. Levasov, *Biochim. Biophys. Acta*, 981, 161(1989)
- 19) Z. M. Zhu, K. I. Feng, Z. A. Schelly, *J. Phys. Chem.* 96, 2382 (1992).
- 20) S. P. Moulik, M. L. Das, P. K. Bhattacharya, A. R. Das, *Langmuir*, 8, 2315(1992).
- 21) A. Goto, H. Suzumori, Y. Ibuki, K. Yamazaki, and R. Goto, "Polyelectrolytes" edited by I. Noda and E. Kokufuta, Yamada Conference L. 1999.
- 22) K. Beljanski, *J. Mol. Evol.*, 42, 493(1996).
- 23) R. Goto, H. Goto Y. Ibuki, A. Goto, 13th International Congress on Photobiology and 28th Annual Meeting American Society for photobiology, July, 2000, San Francisco
- 24) Rossette, C. and Karin, M., *Science*, 274, 1194(1996).
- 25) Knebel, A., Rahmsdorf, H. J., Ullrich, A. and Herrlich, P., *EMBO J.*, 15, 5314(1996).
- 26) McCormick, J. P., Fischer, J. R., Pachlatko, J. P. and Eisenstark, A., *Science*, 191, 468(1976).
- 27) Horio, T. and Okamoto, H., *J. Invest. Dermat.*, 88, 699(1987).
- 28) Tyrrell, R. M. and Pidoux, M., *Photochem. Photobiol.*, 49, 407 (1989).
- 29) Masaki, H., Atsumi, T. and Sakurai, H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 206, 474(1995).

# 古細菌由来のエーテル型リン脂質の物性と機能に関する基礎的な研究

東京工業大学大学院 理工学研究科物質科学専攻

江口 正

Archaeal membrane lipids are structurally unique and are consisted of isoprenoid chains linked to glycerol with ether bond in contrast to the ester linkage of eubacterial and eukaryotic membrane lipids. The most striking feature of archaeal membrane lipids is the presence of macrocyclic structures as large as 36-membered rings of methanogens.

An objective of this research is to develop synthetic methodology of these extreme macrocycles and the unique archaeal ether lipid, which are useful for studies on physico-chemical properties as membrane lipid and to develop new materials with intriguing properties.

For this purpose, we have successfully synthesized archaeal 36-membered macrocyclic membrane lipids and its acyclic congener. Described in this report is the biophysical significance of the archaeal 36-membered macrocyclic diether phospholipid 36MPC as a function of temperature, which was studied by measuring of membrane fluidity, liposomal proton permeability, and liposomal thermostability in comparison with its acyclic counterpart, DPhyPC, egg yolk lecithin eggPC, and a mixed lipid of DMPC-cholesterol (2:1). Fluorescence anisotropy measurements indicated that the macrocyclic structure led to a decrease in the fluidity in the inter-membrane hydrophobic part more than in the membrane surface by limiting the motional freedom of the alkyl chains. The proton permeability was also significantly reduced by introducing a macrocyclic structure. Liposomal thermostability measurements using 6-carboxyfluorescein (CF) suggested that 36MPC formed liposomes with greater thermal stability than those of DPhyPC. The presence of glycolipids to the corresponding phospholipids greatly reduced the CF leakage from liposomes. Most importantly, DMPC-cholesterol liposome showed less leakage than 36MPC at 40°C. However, by raising the temperature, this situation was completely reversed. This suggested that the cyclic structure contributed to the formation of stable liposomes, especially at higher temperatures. These findings clearly demonstrate that the 36-membered macrocyclic lipid membrane plays an important role for the thermophilic archaea to adapt to extreme environments.

## 1. 緒言

すべての細胞は細胞膜によって外界から自己を確立し、生命活動を営む。すなわち細胞膜こそ「生きている」ことの証である。微生物・動物・植物を問わず、大部分の細胞膜は脂肪酸とグリセロールを主構成要素とするリン脂質の集合体から成る脂質二重膜によって作られている。細胞膜脂質は生命の根幹ともいえる生体成分であるので、地球上の生物すべてに構造的に普遍的なものと考えられてきた。ところが、通常の生物の生育環境とは大きく異なった、温泉、海底火山、塩湖などのように高温、高圧、高酸性、または高塩濃度等の苛酷な環境下で棲息している古細菌と命名された微生物の一群が存在し<sup>1)</sup>、自己と外界を分ける細胞膜が特異であることが明らかとなってきた。古細菌の細胞膜はイソプレノイド鎖とグリセロールがエーテル結合し

た構造を持っている (Figure 1、化合物 1、2)<sup>2)</sup>。その中でも極めて特徴的なものとして、イソプレノイド鎖の末端が結合し、36員環を形成した大環状エーテル型脂質の存在が挙げられる<sup>2)</sup>。古細菌は過酷な生息環境にこれらの特異な膜脂質によって、適応していると考えられているが、その機能は明確にはされていない。

一方、レシチンに代表されるリン脂質は、界面活性機能に優れ、保水剤、乳化剤、乳化安定剤やリポソーム剤として使用されている。しかしながら、安定性の面で問題点があり、熱や酸化、加水分解などに不安定である。この不安定性の原因は化学構造的に見るとレシチンが脂肪酸とエステル結合しており、また、不飽和脂肪酸が存在していることに基因している。これらの古細菌の脂質の化学的な構造の特徴及びその生育環境を考えると、高温や乾燥など厳しい下で安定した機能を保持する化粧品基剤として注目すべき新素材であると考えられる。

本研究では、古細菌の膜脂質、特に大環状膜脂質の機能を解明することを目的として研究を進めている。そこで、培養等の手段では純粋に得ることが難しい古細菌の大環状脂質を、合成によって純粋かつ十分量得て、それから調製される脂質膜の性質について種々の測定法を用いて検討することとした。既に我々は、McMurry 反応およびオレフィンメタセシス反応による環化を鍵とした至適生育温



Fuctional Role of Archaeal Ethereal Phospholipids

Tadashi Eguchi

Department of Chemistry and Materials Science, Tokyo Institute of Technology

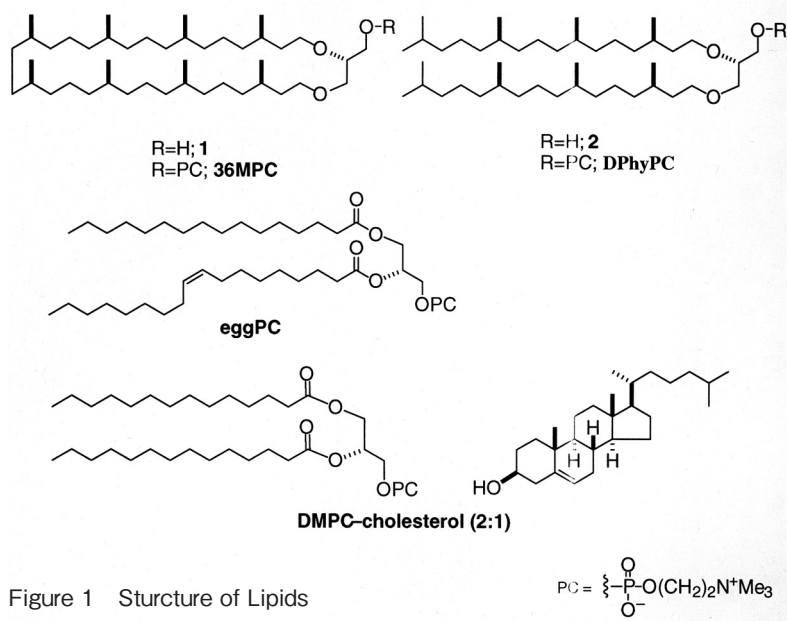


Figure 1 Structure of Lipids

度 85℃ のメタン生成細菌 *Methanococcus jannaschii* が有する 36 員環脂質 2 の全合成に成功している<sup>3)</sup>。それら研究の成果は既に総説として発表した<sup>3)</sup>ので、本報告書では詳細を省略させていただき、それらの膜脂質の性質を中心として述べさせていただく。

## 2 実験、結果および考察

### 2.1 実験で使用した脂質

古細菌ジエーテル型リン脂質の膜としての性質を検討するにあたり、通常生物のエステル型脂質との比較も行った。本研究で用いた脂質は Figure 1 に示した我々が合成した 36 員環脂質 2 およびその非環状類縁体 1 のホスホコリン誘導体 (DiPhyPC および 36MPC) を用いた<sup>3)</sup>。また、エステル型脂質はニワトリの卵黄レシチン (eggPC) 及びジミリス Toil-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリンとコレステロール (2 : 1) の混合脂質 (DMPC-cholesterol) の二種類である。

### 2.2 光学顕微鏡によるリポソームの観察<sup>4)</sup>

【実験】GUV は静置水和法を用いて調製した。まず脂質 1 mg をクロロホルム-メタノール 360  $\mu\text{L}$  (2 : 1) に溶解し、そのうちの 1.5  $\mu\text{L}$  をカバーガラス上に滴下する。10 分間乾燥させて得たラメラ状のサンプルを顕微鏡上に載せ、50  $\mu\text{L}$  の緩衝液で希釈する。そうするとサンプルが緩衝液に浸ったところから巨大ベシクルの形成がみられるようになる。なお、染色剤には脂質二重膜に取り込まれる蛍光物質 Nile Red を用い、脂質二重膜の発光イメージを逐一観察した (励起波長 485 nm、蛍光波長 525 nm)。

【結果】36 員環リン脂質 36MPC の蛍光顕微鏡像の写真を Figure 2 に示す。明らかに 36MPC は単独で巨大リポ

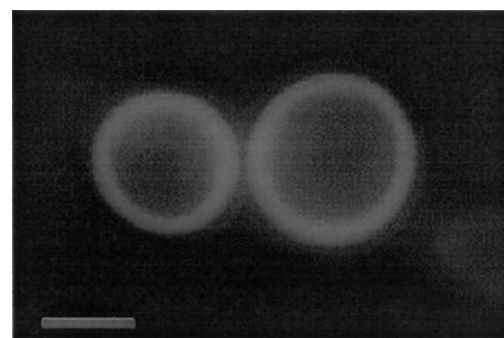


Figure 2 Image by differential interference contrast fluorescence optical microscopy of 36MPC ( $T = 298 \text{ K}$ ,  $\text{pH} = 7.0$ ,  $\lambda = 551 \text{ nm}$ , Nile Red 1% mol.). Scale bar 10  $\mu\text{m}$ .

ソーム (GUV) を形成していることが分かる。これは大環状脂質が単独でリポソームを形成することが分かった初めての例である。

### 2.3 熱分析 (DSC)

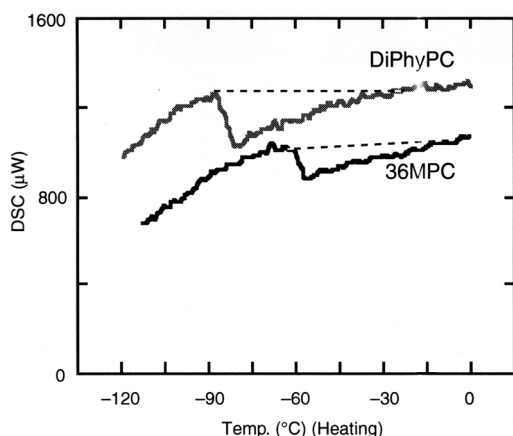
古細菌型リン脂質 36MPC、DiPhyPC の水分散液及びコア脂質 1、2 の乾燥試料の DSC を測定した。

【実験】リン脂質分散液: 脂質 (7 mg) をエチレングリコール-水 (50 mg ; 4 : 1 v/v) に溶かし、70  $\mu\text{L}$  のアルミニウム製パンに入れ、何度か昇温、降温を繰り返した後 1  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  の速度で走査した (-40 ~ 60 $^{\circ}\text{C}$ )。

コア脂質乾燥試料: 脂質 (ca. 10 mg) をそのまま 20  $\mu\text{L}$  のパンに入れ、何度か昇温、降温を繰り返した後 2  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  の速度で走査した (-120 ~ 0 $^{\circ}\text{C}$ )。

【結果】古細菌型リン脂質 36MPC、DiPhyPC の DSC を水-エチレングリコール (4 : 1) 中に分散して測定した。両方の脂質とも測定温度範囲では相転移の存在は見出せなかった。従って、常温では液晶状態をとっていることがわかる。

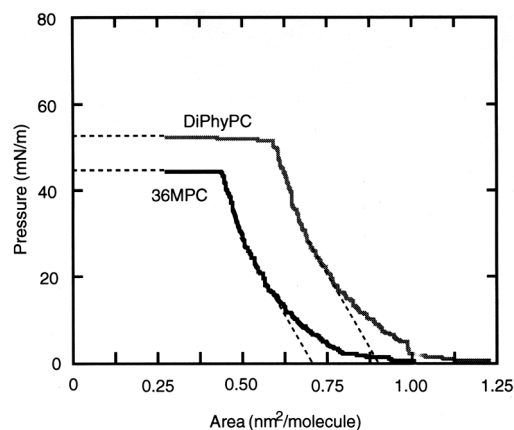
一方、古細菌型コア脂質 2、1 の DSC を Figure 3 に示す。古細菌 72 員環テトラエーテル型コア脂質の乾燥試料では -53 $^{\circ}\text{C}$  付近にラメラ相の融解と思われる吸熱ピークが観測されたが、ジエーテル型コア脂質でも同様に低温領域に吸熱ピークが観測された。その熱力学的データについて、環状脂質 2 の方が非環状脂質 1 に比べて  $T_c$  は高く、 $\Delta H_c$ 、 $\Delta S_c$  は小さいことが分かった。この傾向はリン酸ジエステル型モデル化合物<sup>5)</sup> 及び Menger らのジエーテル型モデル化合物<sup>6)</sup> での結果と同じものであった。すなわち環状脂質における  $T_c$  の上昇は相転移により大きな熱運動を必要としたためであり、 $\Delta H_c$  及び  $\Delta S_c$  の低下は各々相転移



	$T_c$ (°C)	$\Delta H_c$ (kcal/mol)	$\Delta S_c$ (cal/mol-K)
36MPC	-56.5	0.72	3.3
DiPhyPC	-78.8	1.5	7.7

Scanning rate; 2 °C/min

Figure 3 DSC thermograms of archaeal core lipids 1 and 2, and the kinetic parameters of phase-transition.



	Limiting area (nm²/molecule)	Collapse pressure (mN/m)
36MPC	0.70	44
DiPhyPC	0.92	52

0.32 mm/sec at 20 °C

Figure 4 The  $\pi$ -A isotherms of 36MPC and DiPhyPC, and the characteristic data derived from  $\pi$ -A isotherms.

前後でのトランス-ゴーシュ変化が生じる部位の減少、炭化水素鎖の自由運動の抑制に起因すると考えられる。これら観測された相転移は層状に重なったラメラ相の融解によるものと考えられる。

## 2.4 単分子膜の分子占有面積<sup>7)</sup>

【実験】20°Cの蒸留水上に脂質溶液を滴下して10分間静置した後、0.32mm/secの一定速度で可動バリアを押し進め、いき  $\pi$ -A 曲線を得た。

【結果】測定結果を Figure 4 に示す。常温で液晶状態にある古細菌型脂質 36MPC、DiPhyPC の分子占有面積は、分岐メチル基を有さない脂質と比較して大きな値をとっていた<sup>5)</sup>。これは一概には比較できないが、古細菌型脂質での大きな値はイソプレレン鎖のかさ高さに起因するものといえる。環状脂質 36MPC と非環状脂質 DiPhyPC との比較では 36MPC の方が分子占有面積が小さいことが分かった。すなわち炭化水素鎖末端が結合していることにより単分子膜面での広がりが DiPhyPC よりも抑制されていると考えられ、環状脂質は非環状脂質よりも密なパッキングを有した単分子膜を形成することが分かった。

## 2.5 蛍光偏光解消<sup>7)</sup>

脂質二重膜に垂直に取り込まれた蛍光プローブが、膜の流動化によりその配向が乱され蛍光偏光の解消が生じ、その結果蛍光偏光度  $P$  及び蛍光の異方性パラメーター  $r$  値が低下するので、間接的に脂質膜の流動性を見出すことが出来る。これらは以下の式で求められる。

$$P = (F_{\parallel} - F_{\perp}) / (F_{\parallel} + F_{\perp})$$

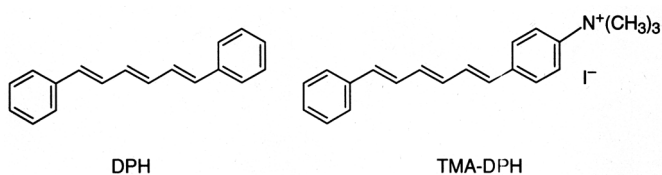


Figure 5 Structure of DPH and TMA-DPH.

$$r = (F_{\parallel} - F_{\perp}) / (F_{\parallel} + 2F_{\perp})$$

ここで  $F_{\parallel}$  は励起光の振動方向と平行に振動する偏光強度成分であり、 $F_{\perp}$  は励起光の振動方向と直角に振動する偏光強度成分である。

蛍光プローブは DPH (ジフェニルヘキサトリエン) と、DPH にカチオン性極性基を有した TMA-DPH (1-[4-(トリメチルアミノ)-フェニル]-6-フェニルヘキサ-1,3,5-トリエン) を用いた (Figure 5)。DPH は脂質分子の疎水基末端から中央部分の流動性、TMA-DPH は脂質分子の極性基付近の流動性を求めるのに各々利用した。

【実験】脂質 3~4mg に緩衝液 (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH7.5) 9 mL を加え、超音波処理法で SUV 分散液を調製した。得られた分散液 3mL に 3 $\mu$ L の DPH 及び TMA-DPH (ともに 0.5mM in DMF) を各々加えた。励起側、蛍光側に各々偏光板を取り付けた蛍光光度計により蛍光強度 (励起波長 350nm、蛍光波長 460nm) を測定した。

【結果】測定結果を Figure 6 に示す。ほとんどのサンプルについて温度が上昇するにつれて  $r$  値が減少、すなわち流動性が向上している。環状脂質 36MPC は非環状脂質 DiPhyPC と比べてあらゆる温度で流動性が低かった。疎

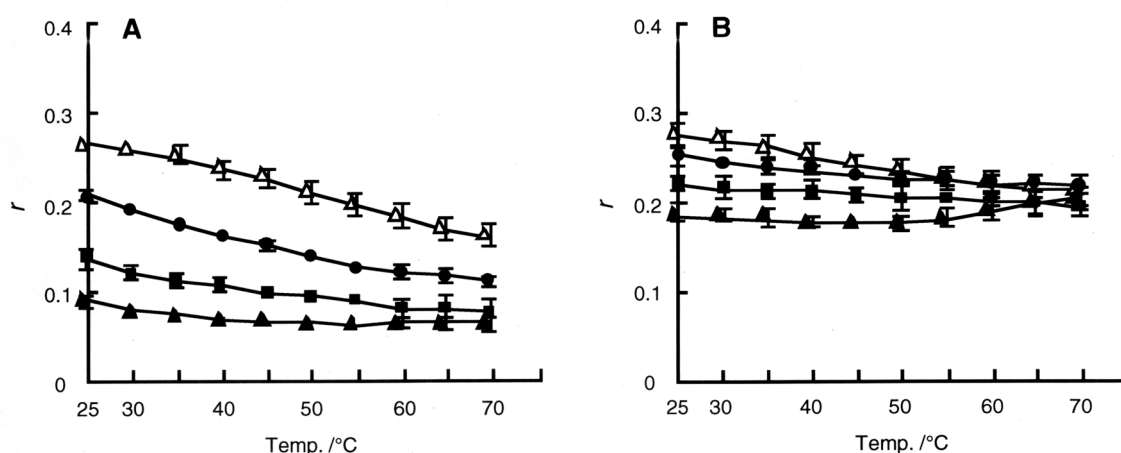


Figure 6 Temperature dependence of the fluorescence anisotropy of A, DPH; B; tma-DPH incorporated in the bilayers of the lipids; 36MPC, ●; DiPhyPC, ■; eggPC, ▲; DMPC-cholesterol (2:1); △. The concentrations of lipid and probe were 0.5 mM and 0.5 M, respectively.

水部でその差が大きかったことを考えると、炭化水素鎖末端の結合が脂質二重膜の流動性低下に大きく寄与していることを示しているといえる。また親水部でもその傾向がみられたことは、環状構造が疎水部のみでなく脂質分子全体の流動性、運動性を低下させていることを示している。eggPCはこれらの中でもっとも流動性が高かった。屈曲した炭化水素鎖を有するeggPCでは脂質分子の間隔が疎水部となっていて、そのために蛍光プローブが活発なブラウン運動をすることが出来たと考えられる。コレステロールで膜を補強したリポソームは逆にもっとも流動性が低かった。エステル脂質とコレステロールとが強固に疎水性相互作用をしていることで蛍光プローブの運動が抑制されたと考えられる。以上のことを考えると古細菌型脂質はイソプレノ鎖の分岐メチル基により分子同士で適度に疎水性相互作用をし、その結果eggPCよりも流動性が低くなったと考えられる。

以上より環状脂質は非環状脂質と比べて流動性が低いことが分かった。疎水部、親水部の両方で同様の傾向を示したことにより、環状構造をとることで脂質分子全体の運動性、流動性が低下することを明らかに出来た。

## 2.6 リポソームのプロトン透過性<sup>8)</sup>

小型の水溶性物質である6-カルボキシフルオレセイン(CF)(Figure7)は490 nm付近に励起波長を、520 nm付近に蛍光波長をもつ蛍光色素である。これは低濃度でも蛍光を検出可能なだけでなく、pH感受性であり、pHが低下するにつれてその蛍光強度も減少する。そこでこの性質を利用し、リポソームのイオン透過性について検討した。pH 7～8付近で調製したリポソーム分散液を酸性緩衝液に浸すとリポソーム内にプロトンが流入する。その結果内水相に封入されたCFの蛍光強度が減少するので、その減

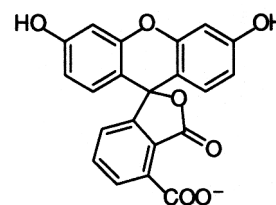


Figure 7 Structure of CF.

少の割合を見積もることでリポソームのプロトン透過性を検討した。

**【実験】** 脂質 3～4 mg に 1 mL の CF 含有緩衝液 (50 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ -クエン酸、150 mM NaCl、4 mM CF、pH 7.5) を加えて凍結融解法で LUV を調製し、エクストルーダーで 200 nm にサイジングした。得られた分散液は現段階では外水相にも CF を含んでいるため、セファデックス G-50 (1.5 × 30～45 cm) 担体を用い、緩衝液 (50 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ -クエン酸、150 mM NaCl、pH 7.5) で溶出してゲル濾過をし、外水相の CF を除去した。

アッセイは次のようにして行った。すなわち、蛍光セルホルダーで各温度にインキュベートした 3 mL の酸性緩衝液 (50 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ -クエン酸、150 mM NaCl、pH 2.5) 中に CF 含有 LUV 懸濁液 (20  $\mu\text{L}$ ) を加えたとき ( $t = 0$ ) の蛍光強度を  $F_0$  とし、各時間  $t$  での蛍光強度  $F_t$  を逐次測定した (励起波長; 480 nm、蛍光波長; 520 nm)。このとき得られる蛍光強度相対比  $F_t/F_0$  の減少割合はプロトン透過速度を示す。すなわち  $F_t/F_0$  の減少率が高ければプロトン透過速度の高いリポソームであるといえる。

**【結果】** 各温度での測定結果を Figure 8 に示す。リポソームへのプロトン透過は非常に速く、数分以内で平衡に達した。

まず古細菌型脂質の比較で、環状脂質 36MPC は非環状脂質 DiPhyPC と比べてあらゆる温度で  $F_t/F_0$  の減少率が

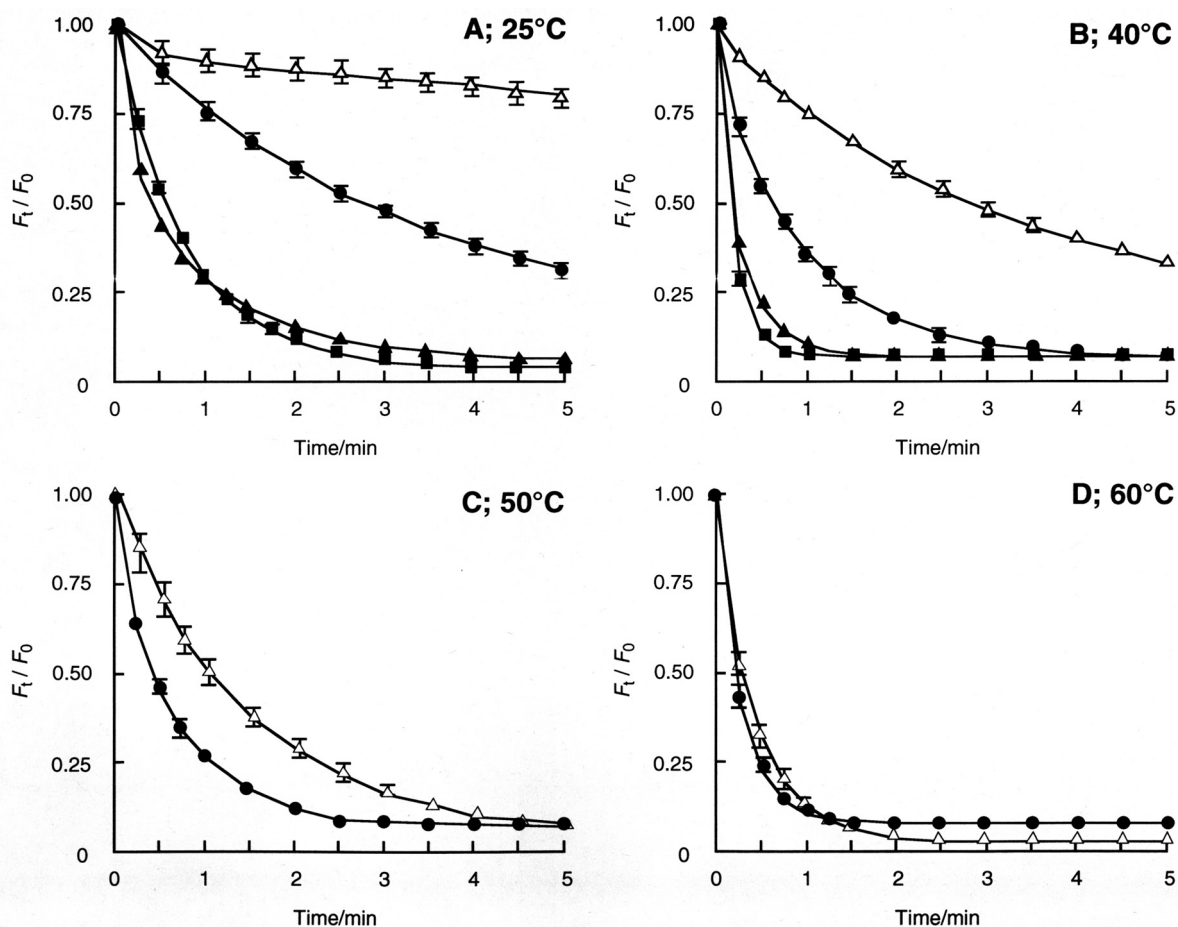


Figure 8 Proton permeability of large unilamellar vesicles of the phospholipids (36MPC, DPhyPC, eggPC, DMPC-cholesterol). Plots of fluorescence intensity of CF  $F_t/F_0$  vs. incubation time  $t$ . A, at 25°C; B, at 40°C; C, at 50°C; D, at 60°C; 36MPC, ●; DPhyPC, ▲; eggPC, ■; DMPC  $\ddot{\text{c}}$  cholesterol (2:1),  $\triangle$ . Initial pH gradient; pH 7.5 (inner), pH 2.5 (outer).

小さい、すなわちプロトン透過速度が遅いリポソームを形成することが分かった。DMPC-cholesterol は特に低温・中温領域において、プロトン流入に強い抵抗性を示した。高温領域 (>60°C) では 36MPC 及び DMPC-cholesterol とともに瞬間的にプロトン流入が進行した。

また DiPhyPC は eggPC リポソームに匹敵するプロトン透過速度を有しており、この結果プロトン透過にインプレン鎖はほとんど影響しないことが分かった。つまり 36MPC におけるプロトン流入速度の低下は環状構造によるものが大きいといえる。

## 2.6 リポソームの熱安定性<sup>9)</sup>

蛍光物質はその濃度が 100 mM 以上になると自己消光で蛍光強度は著しく減少する。つまり、リポソーム内に高濃度に封入した CF が温度変化により外水相へ漏れ出してくることで希釈されてはじめて蛍光が検出されるようになるので、この性質を利用して蛍光強度を測定すれば漏れしてきた蛍光物質の量を見積もることが出来る。

**【実験】** 脂質 3~4mg に 1 mL の CF 含有緩衝液 (20mM Tris-Cl, 200 mM NaCl, 200 mM CF, pH 7.5) を加え

て凍結融解法で LUV を調製し、エクストルーダーで 200 nm にサイジングした。得られた分散液に対しセファデックス G-50 (1.5  $\times$  30~45cm) 担体を用い、緩衝液 (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 7.5) で溶出してゲル濾過を行い、外水相の CF を除去した。

アッセイは次のようにして行った。すなわち、蛍光セルホルダーで各温度にインキュベートした 3mL の同じ緩衝液中に CF 含有 LUV 懸濁液 (5~20  $\mu$ L) を加えたとき ( $t = 0$ ) の蛍光強度を  $F_0$  とし、各時間  $t$  での蛍光強度  $F_t$  を逐次測定した (励起波長: 480nm, 蛍光波長: 520nm)。一定時間測定した後、非イオン性界面活性剤 10% Triton X-100 を 10  $\mu$ L 加え、蛍光物質の全強度  $F_{\text{max}}$  を測定した。リポソームからの CF の漏れ量は次式から算出できる。

$$\text{Leakage extent of CF [\%]} = (F_t - F_0) / (F_{\text{max}} - F_0) \times 100$$

測定したサンプルは 36 員環リン脂質 36MPC、非環状リン脂質 DiPhyPC、DMPC-cholesterol (2:1)、eggPC の計 4 種類であり、各々 40、50、60、70°C で測定した。

**【結果】** 各温度における測定結果を Figure 9 に示す。まず古細菌型リン脂質の比較で、環状脂質 36MPC は非環状脂質 DiPhyPC と比べてあらゆる温度で蛍光物質の漏れ量

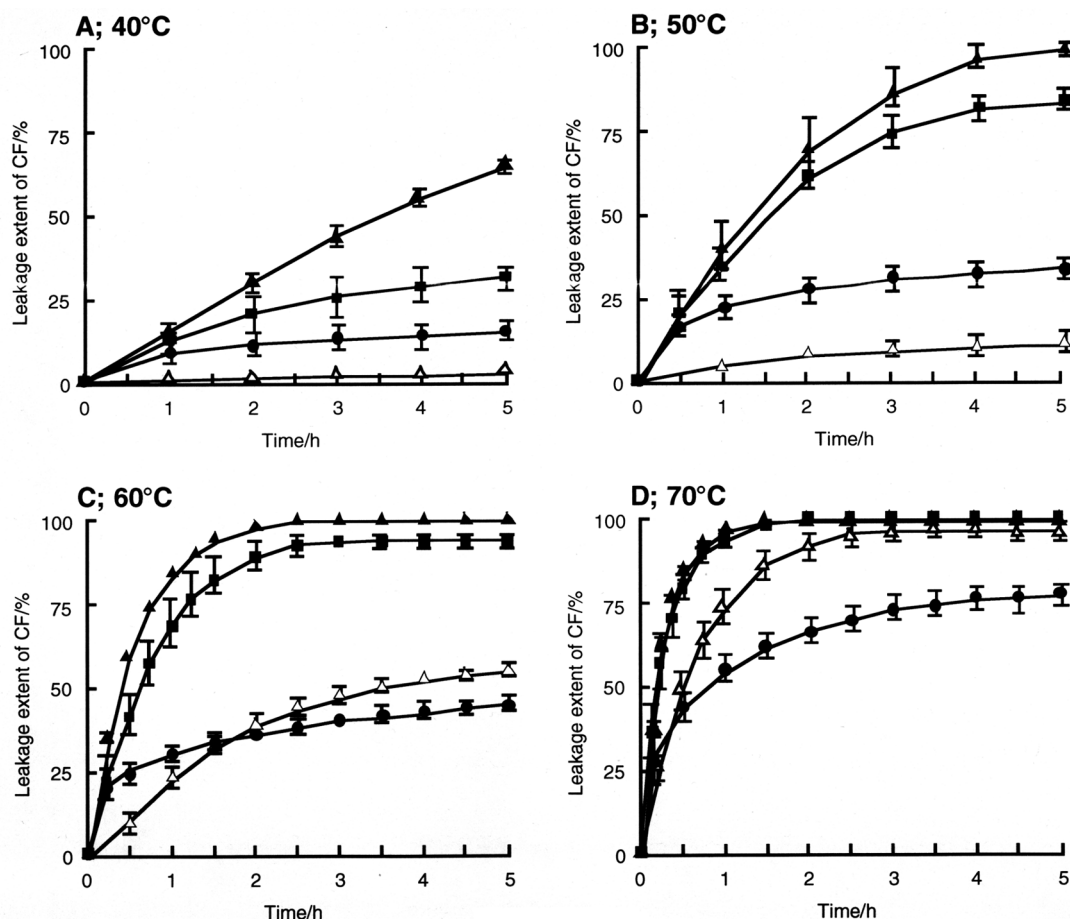


Figure 9 Thermostability of large unilamellar vesicles of the lipids (36MPC, DPhyPC, eggPC, DMPC-cholesterol). Plots of the leakage extent of CF vs. incubation time  $t$ . A, at 40°C; B, at 50°C; C, at 60°C; D, at 70°C; 36MPC, ●; DPhyPC, ■; eggPC, ▲; DMPC  $\ddot{m}$  cholesterol (2:1), △.

が少ない、物質保持能に優れたリポソームを形成することが分かった。一方、エステル型脂質において、eggPCは測定サンプル中で最も蛍光物質の漏出速度が高いことが分かった。コレステロールで膜を補強したDMPC-cholesterolリポソームは中温領域では非常に高いバリアー能を有していたが、高温になるにつれて蛍光物質の漏出速度が上昇し、36MPCよりも物質保持能は低下した。36MPCはDMPC-cholesterolと比べて、温度変化による漏出速度の変化量が小さく、高温でも高バリアー能リポソームを形成することが示唆された。古細菌型脂質は中温領域でも測定初期に若干CFを放出するのだが、これは古細菌型脂質リポソームの高い膜流動性により放出されたものであろうと考えている。

従って、環状脂質は非環状脂質と比べて非常に物質保持能に優れたリポソームを形成することが分かった。また、高温ではコレステロールで補強したリポソームをも凌駕するバリアー能を有することも見出すことが出来た。よって、大環状脂質が好熱性古細菌の高温環境への適応に寄与していることを明らかにすることが出来た。

### 3. 結論

古細菌 36 員環ジエーテル型脂質の脂質膜の性質について得られた知見を総合すると以下のようにまとめられる。

- 1) 様々な形状に変化する、流動性に富んだリポソームの形成が観察された。
- 2) リン脂質の相転移温度は-40°C以下である。
- 3) コア脂質は低温領域に相転移温度を有し、非環状脂質と比べて高い相転移温度、小さい相転移エンタルピー及びエントロピー値をとる。
- 4) 密なパッキングを有した単分子膜を形成する。
- 5) 脂質膜の流動性が低い。
- 6) プロトン透過速度が遅いリポソームを形成する。
- 7) 高温でも安定なリポソームを形成する。

以上の結果、古細菌 36 員環ジエーテル型脂質の脂質膜の性質については、モデル化合物での知見及び非環状脂質との比較から環状構造のもたらす影響を総合的に評価できたと考えている。運動性、流動性、充填度、リポソームのプロトン透過性・熱安定性といった諸性質が密接に絡み合うことで、古細菌 36 員環ジエーテル型脂質の興味深い膜

機能を発現していることが明らかとなった。

第一に脂質分子における環状構造が、膜機能へ多大な影響を与えていることを明らかに出来た。環状構造が脂質分子の運動性を低下させることで膜流動性の低下が生じ、その結果物質透過・熱に対する高いバリアーを発現したと考えられる。

第二に古細菌脂質に特徴的なイソプレン鎖は、リボソームの熱安定性に直接的にはそれほど関与せず、古細菌 36 員環脂質からなるリボソームの安定性が環状構造に由来することを強く示唆するものである。

メタン生成細菌 *Methanococcus jannaschii* において培養温度が上昇するにつれて環状脂質の割合が増加すること<sup>10)</sup>、好熱性古細菌において培養温度が上昇するにつれてシクロペンタン環の数が増大すること<sup>11)</sup>、絶対嫌気性真正細菌の脂質膜においても温度及び有機溶媒・抗生物質の添加などの外的ストレスで橋かけ構造をした脂質や大環状脂質が生成すること<sup>12)</sup>などを考え合わせると、古細菌大環状脂質が好熱性古細菌の高温環境への適応に大きな役割を果たしているといえる。

このように高バリアー能かつ安定なりボソームを形成する古細菌 36 員環脂質は、機能性リボソームへの応用も期待できる。単純なイソプレン鎖より更なる高バリアー能かつ膜安定化作用を有する古細菌 36 員環脂質についても、ドラッグデリバリーシステム (DDS) や生理作用のあるペプチド、糖鎖で修飾した機能性リボソームの開発など、将来的に医学・材料科学分野への幅広い利用価値を見出すことが出来よう。

#### (参考文献)

- 1) (a) Woese, C. R.; Fox, G. E. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **1977**, 74, 5088. (b) Woese, C. R.; Kandler, O.; Wheelis, M. L. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **1990**, 87, 4576. (c) Delong, E. F. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **1992**, 89, 5685.
- 2) (a) 古賀 洋介, 亀倉 正博, 「古細菌の生物学」, 東京大学出版会 (1998). (b) Takashina, T.; Hamamoto, T.; Otozai, K.; Grant, W. D.; Horikoshi, K. Syst. Appl. Microbiol. **1990**, 13, 177.
- 3) Eguchi, T.; Arakawa, K.; Terachi, T.; Kakinuma, K. J. Org. Chem. **1997**, 62, 1924.
- 4) Pozzi, G.; Birault, V.; Werner, B.; Dannenmuller, O.; Nakatani, Y.; Ourisson, G.; Terakawa, S. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **1996**, 35, 177.
- 5) Taguchi, K.; Arakawa, K.; Eguchi, T.; Kakinuma, K.; Nakatani, Y.; Ourisson, G. New J. Chem. **1998**, 22, 63.
- 6) Menger, F. M.; Chen, X. Y.; Brocchini, S.; Hopkins, H. P.; Hamilton, D. J. Am. Chem. Soc. **1993**, 115, 6600.
- 7) (a) 寺田 弘, 吉村 哲郎, 「ライフサイエンスにおけるリボソーム 実験マニュアル」, シュプリンガー・フェアラーク東京 (1992). (b) 村上 幸人, 「超分子化学の基礎と応用」, エヌ・ティー・エス (1996).
- 8) Komatsu, H.; Chong, L. -G. Biochemistry **1998**, 37, 107.
- 9) Yamauchi, K.; Doi, K.; Kinoshita, M.; Kii, F.; Fukuda, H. Biochim. Biophys. Acta **1992**, 1110, 171.
- 10) Choquet, C. G.; Patel, G. B.; Beveridge, T. J.; Sprott, G. D. Appl. Microbiol. Biotechnol. **1994**, 42, 375.
- 11) De Rosa, M.; Esposito, E.; Gambacorta, A.; Nicolaus, B.; Bu'Lock, J. D. Phytochemistry **1980**, 19, 827.
- 12) (a) Clarke, N. G.; Hazlewood, G. P.; Dawson, R. M. Biochem. J. **1980**, 191, 561. (b) De Rosa, M.; Gambacorta, A.; Huber, R.; Lanzotti, V.; Nicolaus, B.; Stetter, K. O.; Trincone, A. J. Chem. Soc., Chem. Commun. **1988**, 1300. (c) Carballeira, N. M.; Reyes, M.; Sostre, A.; Huang, H.; Verhagen, M. F. J. M.; Adams, M. W. W. J. Bacteriol. **1997**, 179, 2766. (d) Lee, J.; Jung, S.; Lowe, S.; Zeikus, J. G.; Hollingsworth, R. I. J. Am. Chem. Soc. **1998**, 120, 5855.

# 森林生物資源からの育毛活性成分の探索

九州大学大学院 農学研究院森林資源科学部門

近藤 隆一郎

The investigation of bioactive natural products has, in recent years, assumed a greater sense of urgency in response to the expanding human population and its subsequent demands for food, cosmetics, good health, and increasing areas of land on which to live. It has so far been known a lot of hair regrowth promoters of that the efficacies are mainly the stimulation of blood circulation and the vasodilatation. Recently the basic researches for hair growth and hair follicle cycle have been rapidly improved by the progress of cell culture technique and genetic engineering. In general the following factors have been mentioned as probable causes on hair loss: the hormonal effect of androgen, the inactivation of hair matrix cells, the reduction of blood circulation around hair follicle and so on. The purpose of this investigation is to identify extracts or components from plants having proliferating effects on mouse hair epithelial cells.

The proliferation activity of 49 samples prepared from extract of heartwood was examined. The extracts from *Cercidiphyllum japonicum* showed proliferation activity on hair epithelial cells by [<sup>3</sup>H] thymidine uptake assay. Structure-activity investigation suggested that catechol structure is important for expressing ability of proliferation activity on hair epithelial cells.

## 1. 緒言

樹木は化学的にはセルロース、ヘミセルロース、リグニン及び抽出成分に分類できる。特に、抽出成分は樹種により質的、量的に多種多様であり、これまでに様々な生理活性物質が報告されており<sup>1), 2)</sup>、これらから有用な機能を備えた物質が見つかる可能性は高いと考えられる。

また育毛剤の需要は年々高まってきている。従来、育毛剤のターゲットは中高年の男性であったが、近年の社会的環境の変化に伴い若年層や女性にまでその需要が拡大している。以前の育毛剤は頭皮の環境整備や栄養補給、経験的な民間薬が主であった。しかし近年、毛の成長や脱毛症に関する基礎的研究の進展により見いだされた知見に基づく新しい観点からの育毛活性成分の開発が試みられるようになってきている<sup>3)</sup>。本研究で着目した毛根由来上皮系細胞は最終的に毛に分化する細胞であり、同細胞の増殖促進活性を有する物質は育毛剤原料の候補となり得る。

そこで本研究では豊富な生理活性成分を有している樹木抽出物からの育毛活性成分の探索として、毛根由来上皮系細胞増殖促進物質を見出すことを目的とした。

## 2. 実験

### 2.1 毛根由来上皮系細胞の培養

毛根由来上皮系細胞の単離および培養は Tanigaki<sup>4)</sup> の方法を一部改良して行った。

4日齢マウスより背部皮膚片を採取した。皮膚片を幅2~3mm程度の短冊状にし、その皮膚片を500unit/mL ディスパーゼ入り5% FBS-DMEMに移し、4℃で17.5時間静置した。この際に抗生物質 (GIBCO, Antibiotic-antimycotic) を1% v/vとなるように添加した。

ディスパーゼ処理した皮膚片を、ピンセットを用いて表皮を剥離除去し、真皮を0.25% コラゲナーゼ入り5% FBS-DMEMに移した。これを37℃で1時間インキュベートした。インキュベート後、真皮の固まりが見えなくなるまでピペッティングを行い、1000rpmで5分遠心し、真皮繊維芽細胞および毛根組織を得た。

遠心後、ペレットにPBS (-)を加え、十分に懸濁させた後、真皮繊維芽細胞を取り除くために400rpmで1分遠心処理し、上清を吸引除去した。この操作を4回繰り返した。さらに真皮繊維芽細胞を取り除くために70μmのフィルターを通し、フィルター上に残ったものをバックウォッシュし、これを毛根組織とした。

得られた毛根組織を遠心処理で集め、0.25%トリプシン/0.1% EDTA溶液を加え、5分間ピペッティングした。FBSをトリプシンと同量加え、さらにPBS (-)を10倍量加えた。この細胞懸濁液をシリコンメッシュで濾過し、シリコンメッシュを通過してきたものを毛根由来上皮系細胞とした。

得られた毛根由来上皮系細胞を遠心後、上清を吸引除去し、5% FBS-DMEMに懸濁した。血球計算盤にて細胞数を計測し、所定濃度となるように5% FBS-DMEM (0.5



Investigation on active compounds of hair growth from forest bioresources

Ryuichiro Kondo

Laboratory of Systematic Forest and Forest Products Sciences, Faculty of Agriculture, Kyushu University

%抗生物質を含む)にて細胞を希釈した。type 1 collagen でコートした 24well plate (FALCON) に  $5 \times 10^5$  cells/well の細胞密度で播種した。播種した細胞は 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 17 時間培養した。

17 時間培養後、5%FBS-DMEM を吸引除去し、PBS (-) で洗浄後、培地を MCDB153 (SIGMA) (insulin: 5 µg/mL、hydrocortisone: 1.4 µM、EGF: 5ng/mL、BPE: 50µg を含む) に交換し、培養を続けた。培養は 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で行った。なお MCDB 153 に培地交換した日を培養初日と定義した。

## 2.2 毛根由来上皮系細胞増殖促進活性評価法

所定期間培養した毛根由来上皮系細胞に [<sup>3</sup>H] thymidine 溶液 (8KBq/well) (statistic ability, 1.81 TBq/mmol) (Amersham) を添加し一定時間取り込ませた。その後、各 well を冷 PBS (4°C) で 2 回洗浄、冷 10%トリクロロ酢酸で 1 回洗浄した。さらに冷 10%トリクロロ酢酸を加え、4°C で 30 ~ 60 分静置した。トリクロロ酢酸を除去後、1N の NaOH を添加し 1 時間以上 37°C で静置した。その後、数回ピペティングし液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。

## 2.3 サンプル調製およびスクリーニング

国産樹木 (主に落葉広葉樹) は九州大学演習林よりサンプリングした。直径が 20cm 以上の幹もしくは枝を伐採し、心材部と樹皮に分けた。心材部、樹皮それぞれを木粉 (#80pass) にし、室温でメタノールに浸して 1 日静置を 3 回繰り返すことによりメタノール抽出物を得た。

タイ産樹木は葉部、茎部、花部に分けそれぞれをアセトン抽出した。

調製した抽出物を毛根由来上皮系細胞培養初日に添加 (1/1000 v/v、エタノール溶液) した。4 日間培養後、[<sup>3</sup>H]thymidine を添加し細胞増殖促進活性を評価した。なお溶媒のみを加えたものを control とし、control を 100% として各サンプルの細胞増殖促進活性を評価した。

## 2.4 カツラ (Cercidiphyllum japonicum) に含まれる成分の探索

カツラ材部メタノール抽出物 2474mg を n-ヘキサン、エーテル、酢酸エチルで逐次分配し、n-ヘキサン可溶部、エーテル可溶部、酢酸エチル可溶部、水層残渣を得た。各可溶部の重量を測定し、分配比を算出した後、各可溶部の細胞増殖促進活性について試験した。さらにエーテル可溶部をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン→酢酸エチル→メタノール) により 8 つに分画した。各画分に含まれる成分を逆相分取 HPLC により単離し、NMR、MS、旋光度により同定した。

## 3. 結果

### 3.1 毛根由来上皮系細胞増殖促進活性評価系の確立

細胞増殖促進活性評価系の確立の際にポジティブコントロールとして毛根由来上皮系細胞増殖促進効果ならびに発毛効果が報告されている minoxidil (70ppm) を用いた。よって minoxidil と control の間に顕著な [<sup>3</sup>H]thymidine 取り込み量の差が観察される系の構築を目的とした。

培養 2 日目以降の [<sup>3</sup>H]thymidine 取り込み量を経時的に測定した結果培養 4 日目に control と minoxidil 添加系に差が観察された (Fig. 1)。この結果から control と minoxidil 添加系に差が観察されるのは培養 4 日目前後であることが判明した。また control の取り込み量は経時的に減少していくのに対し、minoxidil 添加系では培養 4 日目以降から取り込み量が減少している。Control は分化し、その結果、増殖能が失われ取り込み量が減少していると考えられる。一方 minoxidil は毛根由来上皮系細胞の分化を遅延、増殖期間を延長するために培養 4 日目から [<sup>3</sup>H]thymidine 取り込み量に差がでていると考えられる。

よって minoxidil と同様の効果を持つ物質の探索を行うことを目的に、スクリーニングでは培養初日にサンプルを添加し、培養 4 日目に [<sup>3</sup>H]thymidine を添加しその取り込み量を測定することで各サンプルの毛根由来上皮系細胞増殖促進効果を評価することとした。

### 3.2 樹木抽出物のスクリーニング

49 種の樹木抽出物をスクリーニングした結果、アカマツ心材メタノール抽出物、カツラ心材メタノール抽出物、ニセアカシア樹皮メタノール抽出物、Albizia myriophylla 葉部アセトン抽出物に minoxidil と同等の細胞増殖促進活性が観察された (Fig. 2)。

最も再現性よく、また入手が容易であるカツラ材部メタノール抽出物について培養 2 日目以降の [<sup>3</sup>H]thymidine 取

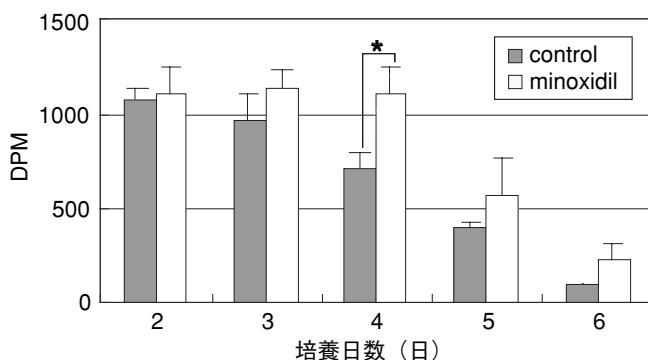


Fig.1 [<sup>3</sup>H] thymidine取り込み量の経時変化 mean±SD, n=3, \*p<0.05 to control

り込み量を経時的に測定した結果、カツラ材部メタノール抽出物にも minoxidil と同様に毛根由来上皮系細胞の増殖期間の延長効果が観察された (Fig. 3)。このことからカツラ材部メタノール抽出物に minoxidil と同様の効果をする物質が含まれると考えられる。

### 3.3 カツラ材部メタノール抽出物に含まれる成分の探索

カツラ材部メタノール抽出物に着目し、これに含まれる成分の探索を行った。有機溶媒分配後の各可溶部の細胞試験結果 (Fig. 4) を示す。細胞試験の結果より、エーテル可溶部に 1 ppm、0.1 ppm 両濃度において高い毛根由来上皮系細胞増殖促進活性が観察された。そこでエーテル可溶部に含まれる成分の探索を行った。その結果 (2R,3R) - (+) - aromadendrin, kaempferol, sexangularetin, (2R,3R) - (+) - taxifolin, quercetin, (2R,3R) - (+) - ampeloptin, myricetin, gallic acid を同定した (Fig. 5)。kaempferol, sexangularetin 以外の単離・同定した化合物を細胞試験に供したところ (2R,3R) - (+) - taxifolin,

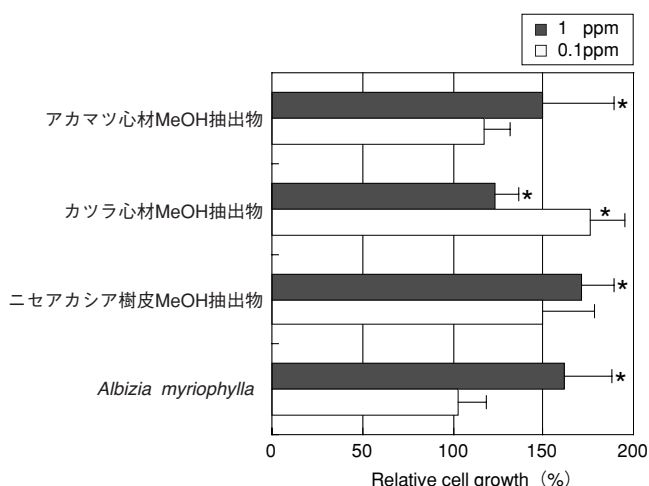


Fig.2 樹木抽出物の毛根由来上皮系細胞増殖促進活性評価系を用いたスクリーニング結果  
mean±SD, n=3, \*p<0.05

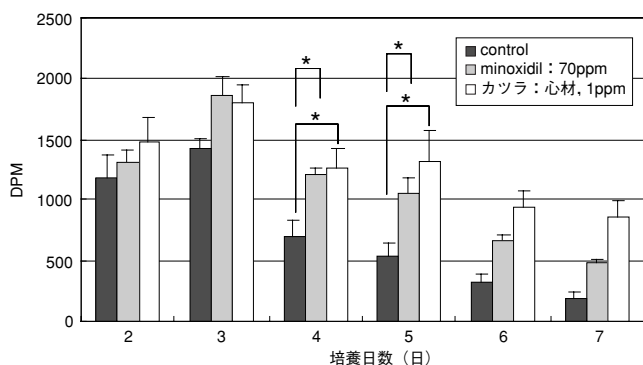


Fig.3 カツラ材部メタノール抽出物添加系の [3H] thymidine 取り込み量の経時変化。  
mean±SD, n=3, \*p<0.05 to control

quercetin, (2R,3R) - (+) - ampeloptin, myricetin, gallic acid に有意な活性が観察された (Fig. 6)。これら活性を示した化合物のどのような構造が活性発現に寄与しているの検討するために、共通構造に着目した構造-活性相関を行った。

### 3.4 フラボノイドおよび関連化合物の細胞増殖促進活性

細胞増殖試験に供した化合物の一部を Fig. 7 に、試験結果を Fig. 8 に示す。フラボノイド化合物では flavone、(±) - 4'-hydroxyflavanon、(±) - naringenin、apigenin に活性が観察されなかった。B 環の水酸基パターンに注目するとカテコール構造を有するもの (luteolin、(±) - eriodictyol、(+) - catechin、(-) - epicatechin、(-) - epigallocatechin (EGC)) に活性が観察された。またフラボノイド以外の化合物でもカテコール構造を有している

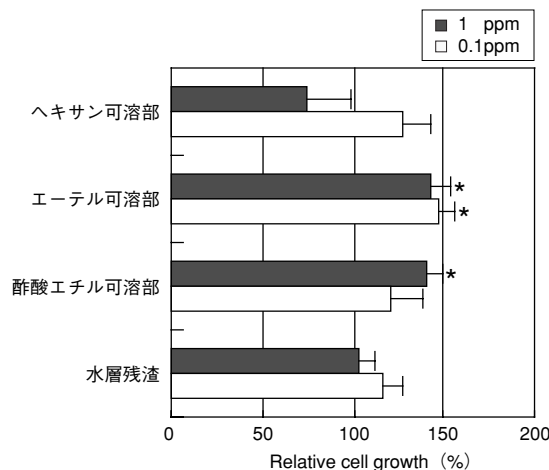


Fig.4 カツラ材部メタノール抽出物各可溶部の細胞増殖促進活性  
mean±SD, n=3, \*p<0.05

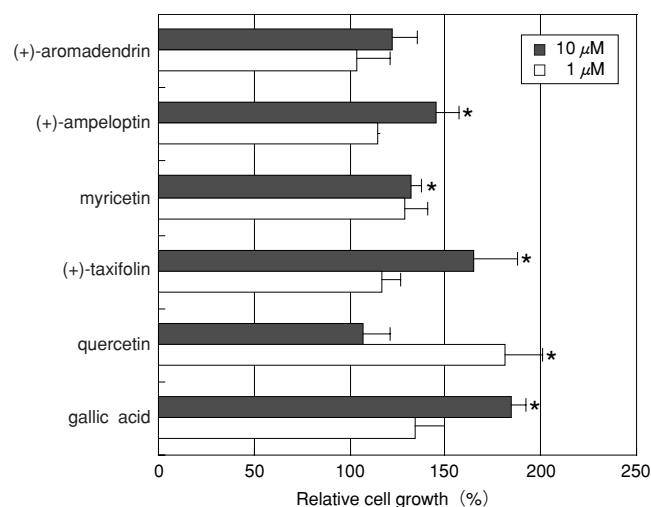


Fig.6 カツラ材部メタノール抽出物エーテル可溶部より単離した化合物の細胞増殖促進活性  
mean±SD, n=3, \*p<0.05

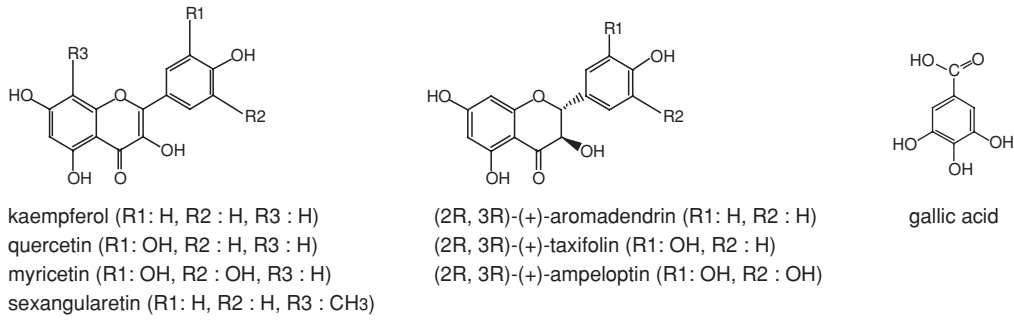


Fig.5 カツラMeOH抽出物エーテル可溶部より単離・同定された化合物

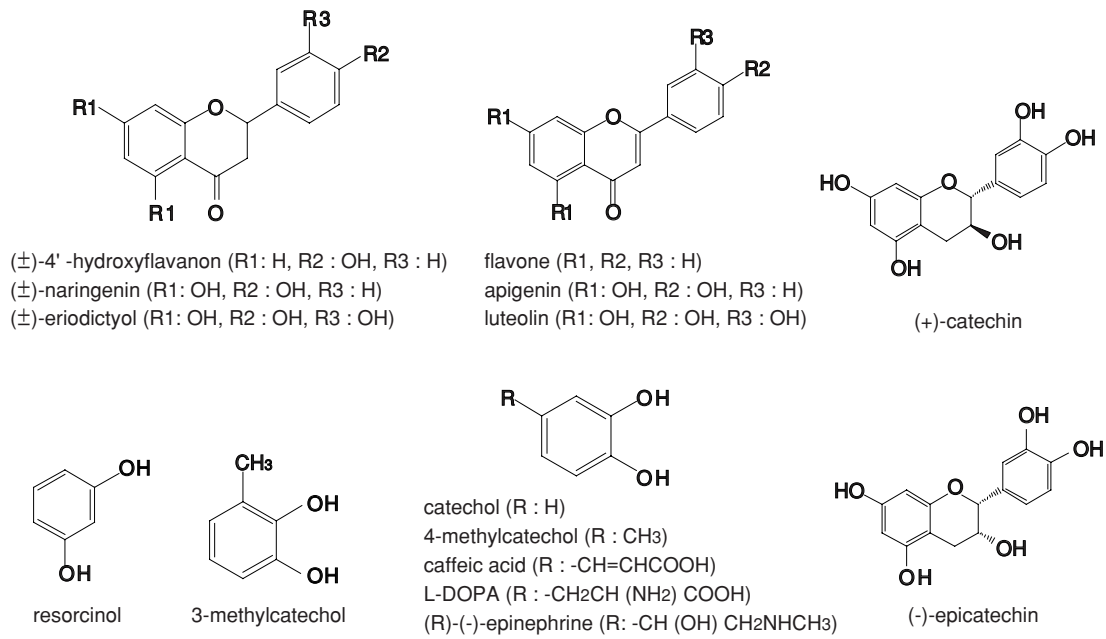


Fig.7 フラボノイドおよび関連化合物

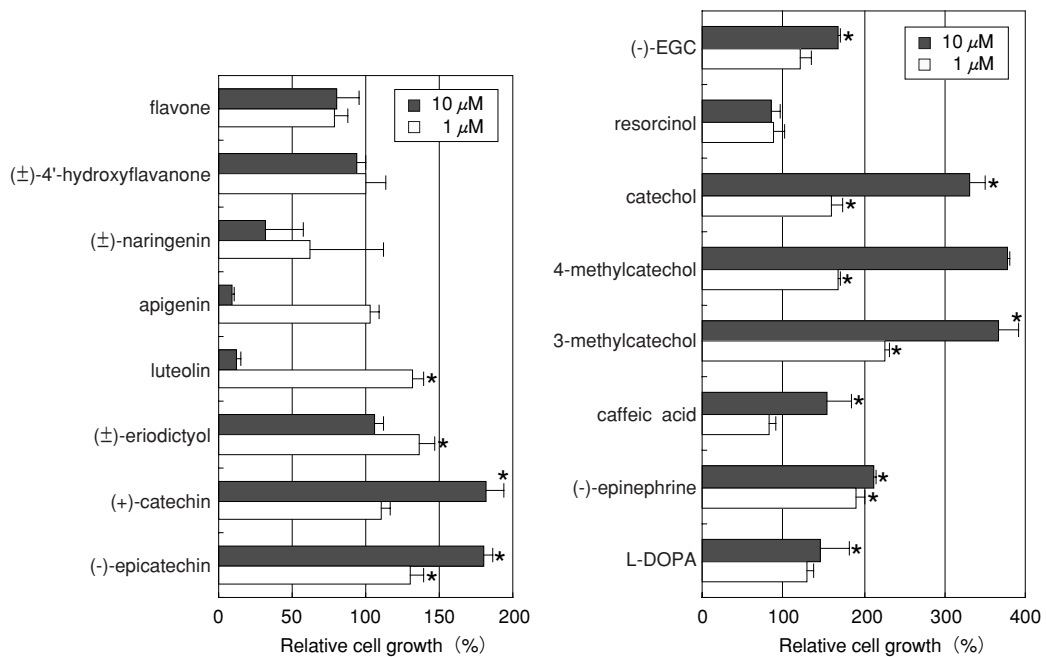


Fig.8 フラボノイドおよび関連化合物の細胞増殖促進活性  
 mean±SD, n=3, \*p<0.05 to control

もの (catechol, 4-methylcatechol, 3-methylcatechol, caffeic acid, L-DOPA, (-) -epinephrine) に活性が観察された。カツラより単離された活性化合物も分子内にカテコール構造を有している。これらの結果から活性発現にはカテコール骨格の存在が重要であることが示唆された。

#### 4. 考 察

今回、毛根由来上皮系細胞の培養系および [<sup>3</sup>H] thymidine 取り込み法を用いた細胞増殖促進活性評価系を構築した。また minoxidil が毛根由来上皮系細胞の増殖期間を延長していることが示され、樹木抽出物より minoxidil と同様の効果を有する物質を探索した結果、カツラ材部メタノール抽出物を選抜した。カツラ材部メタノール抽出物は毛根由来上皮系細胞に対し、minoxidil と同様に同細胞の増殖期間の延長が観察された。

カツラ材部メタノール抽出物の活性成分として gallic acid, taxifolin, quercetin, myricetin, ampeloptin などのポリフェノール類を同定した。これらの化合物をもとに構造 - 活性相関を検索したところ、分子内にカテコール構造を有するポリフェノール類に活性が観察された。このことから毛根由来上皮系細胞増殖促進活性の発現には分子内にカテコール構造を有していることが重要であることが示

唆された。

今後は今回見出された活性化合物の活性発現機構の解明を行うとともに活性化合物をリードとした新規育毛剤の開発が期待される。

#### (引用文献)

- 1) C. Polotti, R. Kondo, K. Shinmizu et al: An examination of the anti fungal components in the heartwood extracts of *Pterocarpus indicus*. Mokuzaigakkaishi, 41, 593-597 (1995)
- 2) K. Shimizu, R. Kondo, K. Sakai: The inhibitory components from *Artocarpus incisus* on melanin Biosynthesis. Planta Medica, 64, 408-412 (1998)
- 3) Takahashi T, Kamiya T, Yokoo Y: Proanthocyanidins from grape seeds promote proliferation of mouse hair follicle cells in vitro and convert hair cycle in vivo. Acta Derm-venereol, 78, 428-432 (1998)
- 4) Tanigaki N, Ando H, Ito M, Hashimoto A, Kitano Y. Electron microscopic study of cultured cells from the murine hair tissues: cell growth and differentiation. Arch Dermatol Res 282, 402-407 (1990)

# 含フッ素非対称置換トレハロース誘導体の合成と皮膚に対する保湿性と親和性の検討

北里大学 看護学部

森 島 直 彦

$\alpha,\alpha$ -Trehalose derivatives are known to have a moisture-holding ability and has already been used as an additive for cosmetics. As a trial to enhance the moisturizing effect of  $\alpha,\alpha$ -trehalose without introducing any hydrophilic functional groups, substitution of hydroxyl groups with fluorine atoms and/or introduction of one or two glucopyranosyl residues to  $\alpha,\alpha$ -trehalose were performed to give the following oligosaccharides: 1) 6,6'-Difluoro-2-O- $\alpha$ - and  $\beta$ -D-glucopyranosyl- $\alpha,\alpha$ -trehaloses were synthesized through the reductive cleavage of 2,2',4,6,4',6'-tri-O-benzylidene- $\alpha,\alpha$ -trehalose giving the 2,3,4,3',4'-penta-O-benzyl derivative, against which selective fluorination at the 6- and 6'-positions with DAST, and then  $\alpha$ - or  $\beta$ -glycosylation. 2) 3-Deoxy- $\alpha$ -D-mannopyranosyl 3-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranoside was synthesized from 2,2',3-tri-O-tosyl- $\alpha,\alpha$ -trehalose with epoxidation at 2'- and 3'-positions followed by the simultaneous ring-opening and reduction. 3) Tri- and tetrasaccharides including  $\alpha,\alpha$ -trehalose moiety were prepared with the glycosylation of partially benzylated derivatives of 4,6,4',6'-di-O-benzylidene- $\alpha,\alpha$ -trehalose. Remarkable increase in moisture content after being exposed in wet atmosphere was observed for some trisaccharides.

## 1. 緒 言

長時間、直接皮膚に接触している化粧品については、近年、皮膚に対する安全性とともに乾燥防止効果が要求されている。保湿剤の化粧品への利用においては、基剤との混合性に加えて皮膚との適合性や親和性も重要である。保湿剤として用いられる物質として、天然物からの抽出物質を用いるのが1つの方法であるが、それらをさらに化学修飾あるいは化学変換してより適切な配合添加物を得る手段も有効であろう。その1例として、 $\alpha,\alpha$ -トレハロースの硫酸化誘導体には保水効果が認められており、クリーム、ローションなどの化粧品に保湿剤としてすでに利用されている。

トレハロースは、グルコース2分子が互いに(1→1)グリコシド結合した二糖の総称であり、 $\alpha,\alpha$ -、 $\alpha,\beta$ -および $\beta,\beta$ -の3つの異性体があるが、天然に存在するのは $\alpha,\alpha$ -トレハロースのみである。したがって、 $\alpha,\alpha$ -トレハロースはしばしば単にトレハロースと表される。 $\alpha,\alpha$ -トレハロースは化学的に極めて安定で、スクロースの約45%の良質な甘味を有している<sup>1)</sup>。また、還元末端をもたないため、甘味料として用いる場合にアミノ酸やタンパク質とともに加熱しても着色しないという利点を持ち、さらに、食品や医薬の分野においても安定化剤として利用されている。近年、デンプンを酵素的に分解することによる $\alpha,\alpha$ -

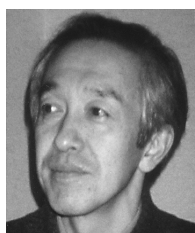
トレハロースの大量合成法が確立され、容易に入手可能となり、その利用も盛んになってきている。

$\alpha,\alpha$ -トレハロースは通常二水和物として存在しているが、それ自身に保水性は見出されてはいない。糖は、その分子内に多くのヒドロキシル基をもつので高い親水性を有するが、保水性については、単糖や二糖のような単純な構造のものよりも、三次元的に複雑な構造をもつオリゴ糖に期待すべきであろう。

$\alpha,\alpha$ -トレハロース分子の化学構造は、その核磁気共鳴スペクトルにおいて2つのグルコース分子のスペクトルがまったく重なり合った単糖のようなパターンがみられることから解るように、グリコシド酸素に対して対称である。したがって、一般には、その誘導体もやはり対称形をしているものが多いが、これまでに酵素による非対称グリコシル化<sup>2)</sup>や部分置換の例<sup>3,4)</sup>もいくつか報告されている。

また、医薬品の分野でその有効性が認められている含フッ素有機化合物では、フッ素原子のもつ高い水素結合形成能が活性発現に寄与していると考えられている。したがって、オリゴ糖のヒドロキシル基のいくつかをフッ素原子に置換した誘導体は、その優れた水素結合形成能により水分子を包含しやすくなることが考えられる。フッ素置換のもう1つの興味ある点は、分子内水素結合による部分的な疎水化ができることである。保湿剤がその分子中に疎水部分をもつということは一見矛盾しているように思えるが、この疎水部分は脂質やタンパク質と疎水結合を形成できるため、フッ素を含むオリゴ糖は基剤との混合性や皮膚との親和性に優れていることが予想される。

そこで、本研究では、ターゲット物質をフッ素を含む非対称置換トレハロース誘導体とし、皮膚への保湿効果と親和性の両者を有する保湿剤としてコスメトロジーにおける評価と化粧品における有効利用が期待される物質の合成を行った。



Synthesis of Fluorine-Containing  
Unsymmetrically Substituted Trehalose  
Derivatives and their Moisture-Holding  
Ability and Affinity for Skin

Naohiko Morishima

School of Nursing, Kitasato University

## 2. 実験

$\alpha, \alpha$ -トレハロースを基本構造とするオリゴ糖の合成には純粋な有機合成化学的手法を用いた。目的とする化合物として、[1] フッ素を含むオリゴ糖、[2] デオキシ糖からなる  $\alpha, \alpha$ -トレハロース型のオリゴ糖、および [3] 三次元的に込み入った構造が考えられる  $\alpha, \alpha$ -トレハロースを含む三糖ならびに四糖を選んだ。

[1] は、 $\alpha, \alpha$ -トレハロースの糖残基間ベンジリデンアセタールの還元的開裂反応により生成する部分保護  $\alpha, \alpha$ -トレハロースの遊離ヒドロキシル基のフッ素置換とグリコシル化により合成した。[2] の合成には、 $\alpha, \alpha$ -トレハロースの4,6;4',6'-ジ-O-ベンジリデン誘導体の非対称部分トシル化とその還元反応を利用した。[3] は、 $\alpha, \alpha$ -トレハロースまたはその4,6;4',6'-ジ-O-ベンジリデン誘導体の部分ベンジル化を利用して得られる部分保護体のグリコシル化により合成した。

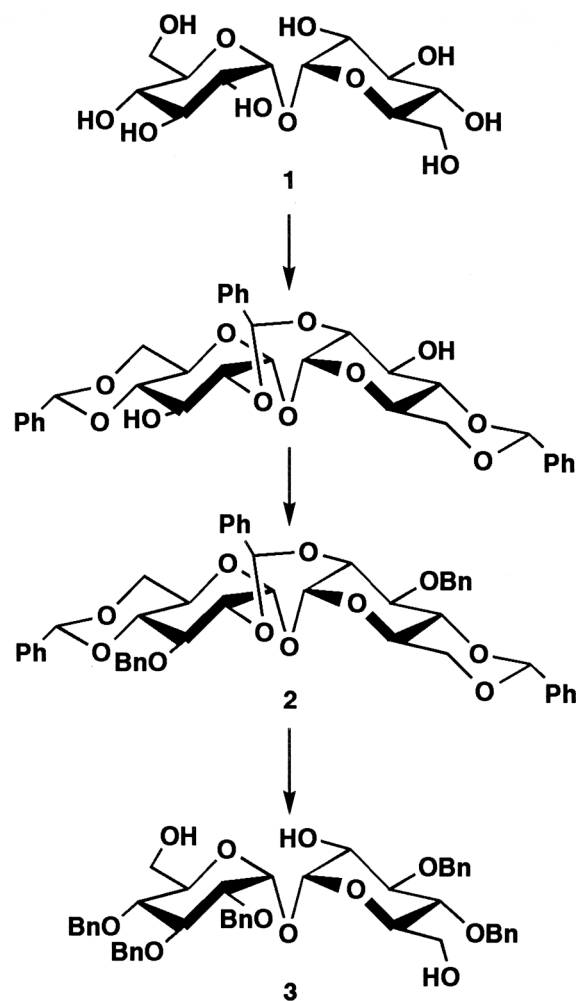
## 3. 結果

### 3.1 $\alpha, \alpha$ -トレハロースから誘導される含フッ素オリゴ糖の合成

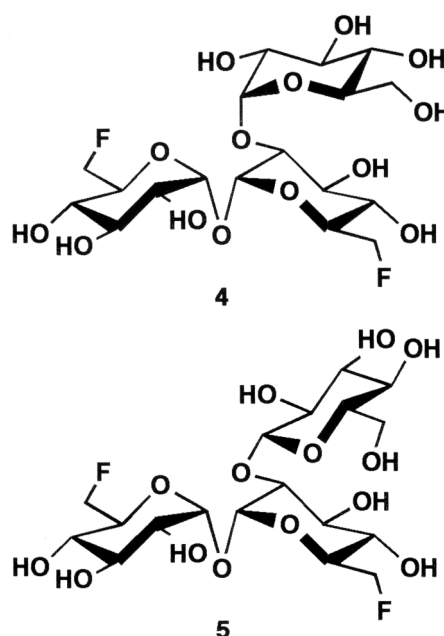
$\alpha, \alpha$ -トレハロース(1)をN,N-ジメチルホルムアミド中、4倍モルの1,1-ジメトキシトルエンと120℃で2時間反応させると、2,2';4,6;4',6'-tri-O-benzylidene- $\alpha, \alpha$ -trehalose (2)が主生成物として得られた。2の遊離ヒドロキシル基をベンジル保護したのち、3つのベンジリデンアセタールを、エーテル中水素化アルミニウムリチウムと塩化アルミニウムを作用させる<sup>5,6)</sup> ことにより還元的に開裂させると、1の非対称部分保護誘導体3が生成した (Scheme 1)。化合物3の6および6'のヒドロキシル基のみを選択的にフッ素置換したのち、2'に  $\alpha$ -および  $\beta$ -グリコシル化を行い、生成物を脱保護することにより4および5を得た。 $\alpha$ -グリコシル化には、2,3,4,6-テトラ-O-ベンジル-D-グルコピラノースをグリコシル供与体とし、塩化p-ニトロベンゼンスルホン、トリフルオロメタンスルホン酸銀、N,N-ジメチルアセトアミドおよびトリエチルアミンを作用させる方法<sup>7)</sup>を用いた。また、 $\beta$ -グリコシル化には、アセトブロモグルコースを供与体とし、トリフルオロメタンスルホン酸銀とテトラメチル尿素を用いる方法を適用した。

### 3.2 デオキシ糖からなる $\alpha, \alpha$ -トレハロース型オリゴ糖の合成

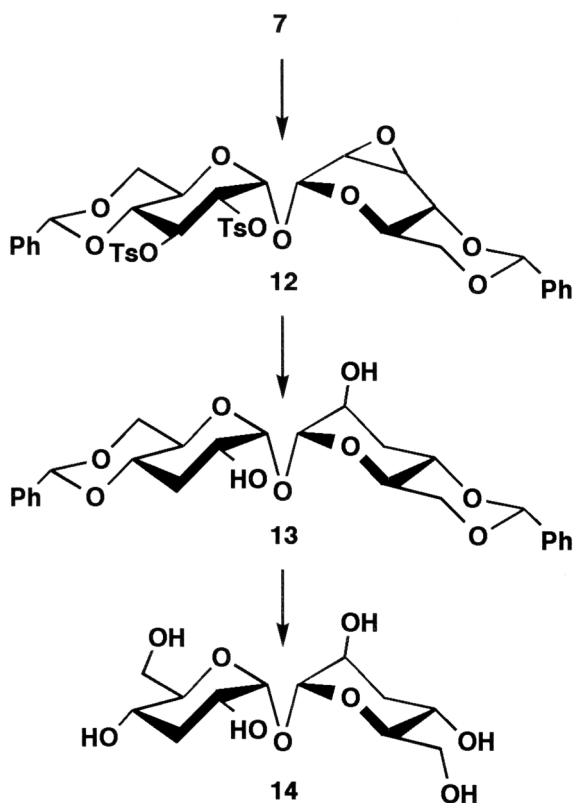
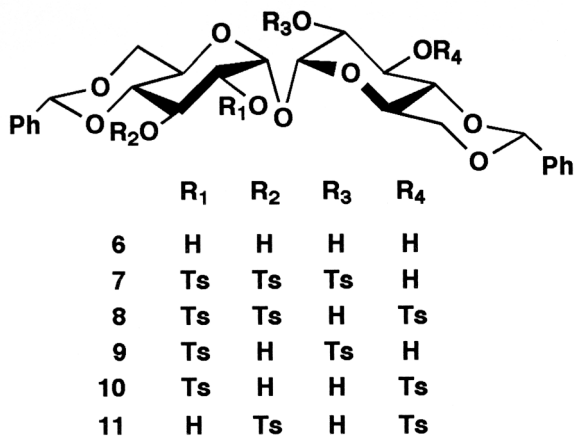
1のベンジリデンアセタール化を、用いる1,1-ジメトキシトルエンの量を2.4倍モルに減じて行ったところ、4,6;4',6'-ジ-O-ベンジリデン誘導体6を収率よく得ることができた。6にピリジン中、過剰量の塩化トシルを加え、40℃で20時間反応させてもテトラ-O-トシル誘導体はほ



Scheme 1



とんど生成せず、主生成物は2,2',3'-トリ-O-トシル誘導体**7**であった。このほかに、2,3,3'-トリ-O-トシル誘導体**8**、2,2', 2,3'-および3,3'-ジ-O-トシル誘導体（**9**、**10**および**11**）も単離された。しかし、塩化トシルの量を多少増減させても**7**の優位は変化しなかった。そこで、**7**にメタノール中、ナトリウムメトキシドを作用させることによりモノエポキシド**12**とし、**12**にエーテル-テトラヒドロフラン混合溶液中、水素化アルミニウムリチウムを作用させ、エポキシドの開環と2位の立体配置を保持した3-



Scheme 2

デオキシ化を同時に起こさせて4,6-O-ベンジリデン-3-デオキシ- $\alpha$ -D-マンノピラノシル=4,6-O-ベンジリデン-3-デオキシ- $\alpha$ -D-グルコピラノシド (**13**)を得、これを脱ベンジリデン化することにより**14**を合成することができた (Scheme 2)。

### 3.3 $\alpha, \alpha$ -トレハロースを構造中に含む三糖ならびに四糖の合成

$\alpha, \alpha$ -トレハロースを、塩化ベンジルと水酸化アルカリによりベンジルエーテル化<sup>8,9)</sup>する方法により部分保護誘導体を得る試みを行ったところ、**15-17**のような化合物が単離できた (Scheme 3) が、収率は極めて低く実用的な方法ではなかった。その原因は、塩化ベンジルに対する $\alpha, \alpha$ -トレハロースの溶解性の乏しさにあると思われるので、次に $\alpha, \alpha$ -トレハロースのジ-O-ベンジリデン誘導体**6**のベンジル化を試みた。

**6**を塩化ベンジルと水酸化アルカリを用いてベンジル化したところ、三置換体**18**および**19**、二置換体**20**、**21**、**22**および**23**がすべて生成した (Scheme 3) が、それらの生成比は反応条件や用いるアルカリの種類により著しく変化した。すなわち、水酸化ナトリウムを6倍モル用いて反応させると**22**が主生成物として収率36%で得られ、水酸化カリウム4倍モルでは**18**が、水酸化ルビジウム4倍モルでは**20**が、6倍モルでは**19**がそれぞれ約40%の収率で得られた。

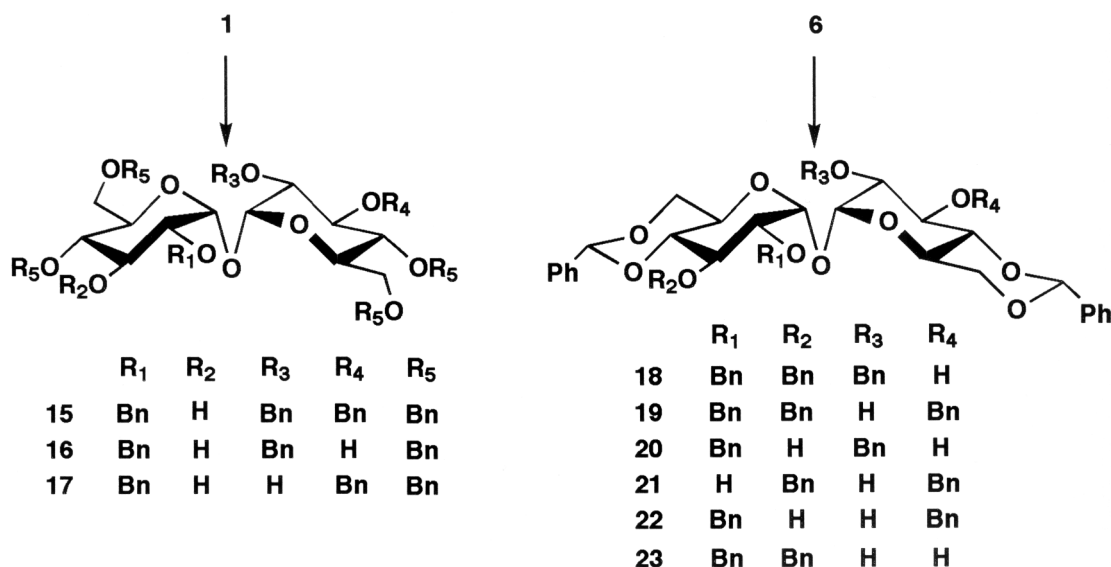
このようにして調製した $\alpha, \alpha$ -トレハロースの部分保護誘導体**18**および**19**に対し、前述の $\alpha$ -および $\beta$ -グリコシル化反応を適用し、続いて脱保護することにより、それぞれ三糖**24,25**および**26,27**を合成した。また、二置換体**20**および**22**に対し、同様にグリコシル化を行い、対称型四糖**28,29**および非対称型四糖**30**および**31**を合成した。

### 3.4 保水性の検討

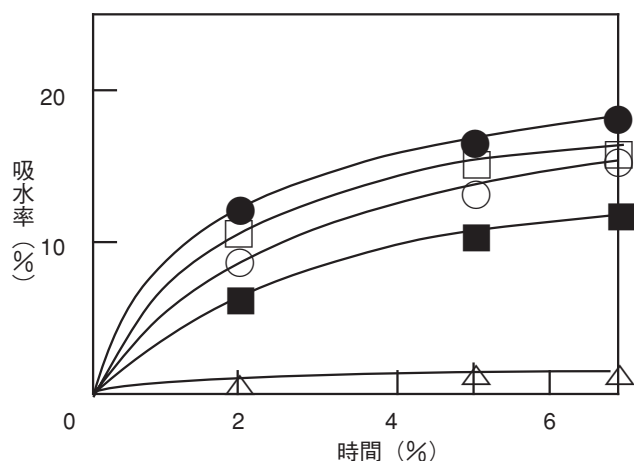
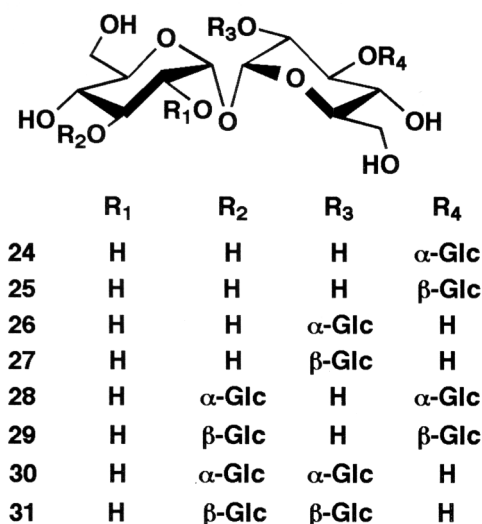
皮膚に対する保水性を検討するための予備試験として、合成したオリゴ糖を湿潤空气中に放置し、質量の経時変化を調べたところ、 $\alpha, \alpha$ -トレハロースではほとんど増加が認められなかったが、三糖**24-27**については顕著な質量の増加がみられた (図1)。

## 4. 考察

保湿効果をもつことが期待される化合物として、 $\alpha, \alpha$ -トレハロース型の種々のオリゴ糖をターゲットに選び、それらの合成について検討した。基本的な考え方として、市販の $\alpha, \alpha$ -トレハロースを原料に用い、これの化学修飾やグリコシル化を組み合わせた方法を採用した。大別して3種のオリゴ糖を合成したが、いずれにおいてもまず原料の



Scheme 3

図1 吸水率の経時変化 ( $\Delta$ :1,  $\circ$ :24,  $\bullet$ :25,  $\square$ :26,  $\blacksquare$ :27)

部分保護誘導体の調製を必要とした。

3・1に述べた合成では、糖残基間にベンジリデンアセタールが結合した誘導体の単離とその還元的開裂反応による部分ベンジル保護誘導体の合成が問題となった。2,2'位間のアセタールの形成には、グリコシド結合まわりの回転が必要となり、化合物は極めて不安定であるが、シリカゲルクロマトグラフィーを行う際に溶出溶媒にトリエチルアミンを0.1%混在させることで単離を可能にすることができた。2,2'-O-ベンジリデン基の還元的開裂反応は短い反応時間でスムーズに完結し、2位にベンジル基、2'位にヒドロキシル基をもつ部分保護体3へと変換できた。3のフッ素化に、6,6'-ジ-O-トシル誘導体のフッ素イオンによる置換反応を用いると不飽和化合物の生成が主反応になる<sup>10)</sup>と予想されたので、フッ素化剤として三フッ化ジエチルアミノ硫黄 (DAST)<sup>11-13)</sup>を用いるヒドロキシル基の直

接フッ素置換を試みた。DASTの使用量を制限することで2位のフッ素化を起こさず、6,6'位のみを選択的にフッ素置換することができた。

$\alpha, \alpha$ -トレハロースは対称型分子であるため、これに対する反応も両方のグルコース残基に同等に進行すると考えがちであるが、実際には不均等に反応し非対称の化合物を与えることがある。 $\alpha, \alpha$ -トレハロースのジ-O-ベンジリデン誘導体6のトシル化では、40℃で20時間反応させると2,2',3'-トリ-O-トシル誘導体7が選択的に収率よく得られたが、テトラ置換体が主生成物となるためには1週間を要した。この非対称置換体7を利用し2位と2'位の立体化学の異なるデオキシ糖14を合成した。13が生成する際、副生成物としてエポキシドが逆方向に開環して生成した3,3'-ジ-デオキシ誘導体も得られた。

結晶水をもつ  $\alpha, \alpha$ -トレハロースの有機溶媒に対する溶

解性は極めて乏しく、塩化ベンジルと水酸化アルカリによる  $\alpha, \alpha$ -トレハロースのベンジル化は容易ではなかった。15-17 のような部分保護体を単離することができたが収率は高々 10% であった。そこで、溶媒への溶解性の向上と未保護のヒドロキシル基の位置を限定する目的でジ-O-ベンジリデン誘導体 **6** の部分ベンジル化を行った。結果の項に述べたように、用いる水酸化アルカリや反応条件を選ぶことにより、選択性よく部分保護体 **18**, **19**, **20**, **22** を得ることができた。

これらの部分保護  $\alpha, \alpha$ -トレハロース誘導体の  $\alpha$ -グリコシル化には、報告者が以前に開発した選択的  $\alpha$ -グリコシル化法<sup>7)</sup>を試みた。その方法は、反応性に乏しいヒドロキシル基にも適用可能であるので、良好な収率で目的とする三糖および四糖の保護体を得ることができた。また、 $\beta$ -グリコシル化は汎用されている Koenigs-Knorr 反応を利用し収率よく目的物を得た。保護基は、ナトリウムメトキシドによるエステル交換反応および水酸化パラジウムを触媒とする接触還元により定量的に除去し、遊離のオリゴ糖を得た。

含水率の経時変化をいくつかのオリゴ糖について調べたところ、顕著な増加傾向を示したが、 $\alpha, \alpha$ -トレハロースではほとんど増加しなかったことから、 $\alpha, \alpha$ -トレハロースの 2 または 3 にグルコース残基が結合した形のオリゴ糖には保水作用が期待できそうである。これはあくまで予備実験の結果であり、さらに精密な保水性の測定を要することはいうまでもない。

#### (参考文献)

- 1) 日本化学会編, “化学総説 No.40, 味とにおいの分子認識”, 学会出版センター, 1999, pp50-60.
- 2) Kurimoto M, Nishimoto T, Nakada T, Chaen H, Fukuda S, Tsujisaka Y, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 699-703, 1997.
- 3) Wallace PA, Minnikin DE, *Carbohydr. Res.*, **263**, 43-59, 1994.
- 4) Boucha M, Gelas J, *Carbohydr. Res.*, **305**, 17-25, 1997.
- 5) Liptak A, Jodal I, Nanasi P, *Carbohydr. Res.*, **44**, 1-11, 1975.
- 6) Mori Y, Morishima N, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **66**, 2061-2067, 1993.
- 7) Koto S, Morishima N, Owa M, Zen S, *Carbohydr. Res.*, **130**, 73-83, 1984.
- 8) Morishima N, Koto S, Oshima M, Sugimoto A, Zen S, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **56**, 2849-2850, 1983.
- 9) Koto S, Takenaka K, Morishima N, Sugimoto A, Zen S, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **57**, 3603-3604, 1984.
- 10) Mori Y, Morishima N, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **67**, 236-241, 1994.
- 11) Middleton WJ, *J. Org. Chem.*, **40**, 574-577, 1975.
- 12) Tsuchiya T, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **48**, 91-277, 1990.
- 13) Mori Y, Morishima N, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 826-828, 1992.

# 匂いの感性計測を行うセンサーシステムの開発

九州大学大学院 システム情報科学研究院

都 甲 潔

An odor sensor was developed using a surface polarity controlling method. In this method, changes of electric potentials of the electrode show the different surface electrical polarity, and hence the interaction between odor substances and the electrode surface is different in each electric potential. Thus the response ability and information about chemicals can be obtained through controlling surface polarity. Pt electrode was adopted and the surface polarization of the Pt electrode was controlled by sweeping electrode potential from negative to positive values (e.g. -0.7V to 0.3V) through a potentiostat. Chemicals with electrical charge and high polarity interact with polarized surface, and nonpolarized and hydrophobic substances interact with nonpolarized surface. Thus various chemicals can be detected with one electrode. Electrochemical impedance was measured at each electrode surface potential to detect the interactions between the electrode surface and chemical substances. Frequency dependencies of the surface impedance of the electrode were measured by superimposing small amplitude sinusoidal signal. Equivalent circuit of the electrode impedance was based on a surface roughness model. The equivalent circuit was determined by curve fitting procedures.

The sensor can detect various chemical substances; both electrolytes and nonelectrolytes (hydrophobic and hydrophilic substances) with high sensitivity. As a result, various odor substances can be detected using this sensor, and much information can be obtained through surface polarity control. Electrode potential profiles of the surface impedance had various patterns according to the characters of chemicals. Adsorption of chemicals to the surface altered the surface resistance and capacitance. Hydrophobic substances affected the surface resistance in the negative region and the surface capacitance in the potential area where the neutral surface was attained. Furthermore, response patterns to odor substances, especially hydrophobic odorants, could be modified by replacing base solutions in which the electrode was immersed; used base solutions were KCl solution with additive of acetone and triton X-100. Principal component analysis was carried out to response patterns, and the principal component map was able to be categorized into some groups by the quality of used odorants. Thus the information from the electrode can be utilized to distinguish the odor quality. The present method was simple and bio or organic materials were not used. So the results denote that odor sensations are dominated by physicochemical characteristics of chemicals interacting with the electrochemical surface. These results suggest that the surface polarity controlling method can be utilized for the mechanism of sensor transducers for odor sensor.

## 1. 緒 言

匂いの客観的な計測手段が欠けている現在、匂いの評価はガスクロマトグラフィなどの機器分析を補助とした官能検査に依存している。機器分析の結果は匂いの質的な評価手段としては非力であり、感性的な情報を必要不可欠とする匂い計測は実質的に人の嗅覚に頼らざるを得ないのが現状である。優れた嗅覚と経験を持つ人的な資源は限られており、単純な匂い計測にそのような資源を用いることは、本来、創造的な目的に使われるべき人の能力を無駄にしていると言える。一方、人の嗅覚は疲労や感度のばらつきなどがあるため計測手段としては極めて不安定であり、一般には人の嗅覚に頼った様々な工業製品の生産管理、環境計測では十分に目的を達成することはできない。

このような状況にあって、感性の測定を可能とする匂い

センサの開発は匂いを扱う様々な分野に対する影響・貢献は非常に大きいと考えられる。さらに、物質が持つ分子物理化学的な特性と匂いの感性的な特性の結び付きを明らかにすることは、人がどのようにして良い香り、心地好い香り、不快な香りといった感情を引き起こすのかを物質レベルで客観的に数値化できる可能性がある。人と人のコミュニケーションにおいて重要な意味を持つコスメトロジーに対し、その重要な要素である匂いの立場から匂いのセンシングが貢献する役割は大きい。

匂いのセンシングが困難である要因の一つに、対象となる化学物質の種類や数の多さと性質の多様性がある。匂い物質の中には非常に不快であったり刺激をもたらしたりする有機酸のような極性の強い物質から、極性がほとんど無く水への溶解度が非常に低い芳香をもたらす各種香料まで、化学物質として広い性質の幅を持っている。このように極性が強い物質と疎水性が強い中性物質を同時に検出することは難しい。また、匂いの質を決定する物質の要素は、官能基、分子の大きさと形、電気双極子、立体構造などであり、分子が感覚刺激をひき起こす濃度領域は物質ごとに大きく異なる<sup>1,2)</sup>。このような物質の性質のうち、匂いとしての特性を反映させるようなセンシング方法を用いることが、感性としての匂い測定を可能にする直接的な方法である。



Development of sensor system for odor sensation measurements

Kiyoshi Toko

Graduate School of Information Science and Electrical Engineering, Kyushu University

表面分極制御型センサは、このように物質の性質が異なり、広い範囲に渡る匂い物質を検出することを目的としている。さらに、匂いや味といった化学感覚を検出する場合に重要となるセンサから物質に関する情報をいかに取り出すか、という点に着目している。その際、化学物質が持つ匂いに関する属性が物質のどのような特性に依存しているかに着目する。既に実用的な領域に入りつつある味を計測するマルチチャンネルセンサも多くの情報をパターンとして引き出し、処理することで化学感覚情報に変換している<sup>3-6)</sup>。

ここで取り上げる表面分極制御型化学感覚センサはトランスデューサの情報を多重化させること、化学物質に関する連続的な情報を入手することに主眼点を置いている。単一のトランスデューサでその特性を連続的に変化させ、様々な化学物質と相互作用させ、物質に関する情報を連続的に入手し、センサの情報を多重化する。電極の特性を変化させる方法として、電極の表面分極制御を行った。これは極性の強い電解質と同時に、電気的に検出の困難である疎水性が強く水になかなか溶け込まない中性物質などの匂い物質の高感度な検出をめざしたものである。表面分極の制御方法としては、電極電位規制を用いた。この方法は電極表面の分極特性を変調することで、匂い物質と電極界面の相互作用を変化させ<sup>7,8)</sup>、様々な極性の匂い物質を検出しようというものであり、物質識別に有効な手段になり得ると考えられる。化学感覚はそのレセプターが存在が明らかになるにつれ、分子認識的手法の重要性が強調される傾向があるが、実際には分子が持つ部分構造や物理化学的な特性がその質の発現には重要な要素を占める。このような感覚情報の測定において単なる分子認識的な手法は現状では工学的にも有利な手段とは言えない。本研究では、物質が持つ特徴や部分構造を反映した応答を大まかにとらえることで、その化学感覚としての質との対応付けが行なえるかどうかにも着目した。

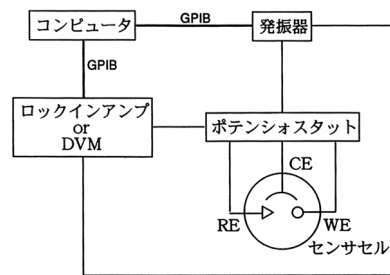
## 2. 実験

表面分極は水溶液中の化学物質と表面との相互作用を決める重要な要素である。一方、化学物質が持つ極性が匂いの質を大きく左右する事から、電極表面の分極を制御する事で、物質が持つ化学感覚刺激の質に関する情報を捉える事ができる可能性がある。表面分極の制御は直接、電極電位を変化させることで行なった。この場合、電極インピーダンスが測定量とした<sup>8-10)</sup>。

測定系を図1に示す。トランスデューサとして用いる白金電極はポテンシostatにより電位規制され、発振器とロックインアンプあるいはデジタルボルトメータにより微小振幅の正弦波と直流電圧を印加する。電極電位は水の電気分解反応など正味の反応電流が流れないように  $-0.7V$  から  $0.3V$  まで  $0.05V$  ステップで変化させる。図

2に用いた白金電極の電極インピーダンスのベクトル軌跡を示す。電極インピーダンスの等価回路として電極表面のラフネスを考慮したモデルを採用し、周波数応答の軌跡からカーブフィッティングにより電極抵抗 ( $R_{45}$ ) とそれと並列につながるキャパシタンス ( $C_{dl}$ )、および直列につながる抵抗 ( $R_s$ ) に分解した。 $R_s$  は主に溶液と電極表面近傍を含んだ抵抗に起因する。一方、電極表面の抵抗成分は電極表面のラフネスのために周波数に依存するため、その

(a) 測定系



(b) 作用電極

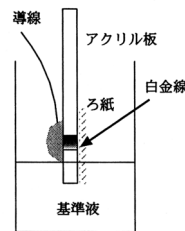
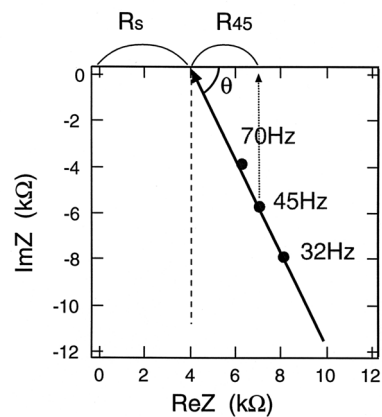


図1 測定系

a) ベクトル軌跡



b) 等価回路

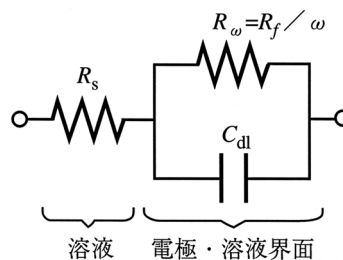


図2 電極インピーダンスのベクトル軌跡と等価回路

45 Hz における値を推定して  $R_{45}$  とする。 $C_{dl}$  は電気 2 重層部分の静電容量である。図には匂い物質を測定する場合の電極系のセットアップを示しているが、水溶液中の化学物質を直接検出する場合は電極を水溶液に浸漬した状態で測定する。

実験はまず基準液である 100 mM KCl を測定し、その値をベースラインとし、匂い物質による変化を匂い物質への応答値とする。ベースラインとなるインピーダンスの電極電位依存性は白金電極表面への水素イオンの吸着と脱着（負電位領域）と酸素の吸脱着（正電位領域）により生じる。匂い物質の検出はこの基本特性が匂い分子の電極表面への吸脱着により変化することにより行うことになる。

### 3. 結果

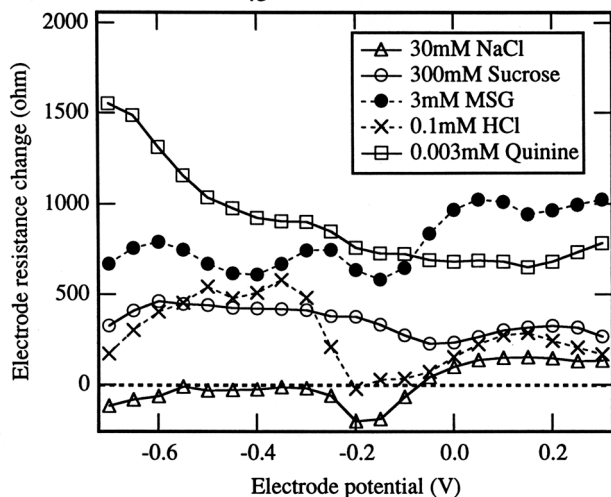
#### 3.1 化学物質応答

本研究で開発を目指す表面分極を制御し、情報を増やすセンサの特徴の 1 つは電解質や極性が強い物質だけでなく、中性および疎水性の化学物質の検出が可能である事である。本研究で開発を行ったセンサは電極電位を変化させる事で化学物質応答パターンを引き出す。水溶液に浸漬した電極の電気化学インピーダンスと、その電極電位依存性を調べることで、様々な化学物質、特に匂い物質の検出を行う。図 3 は化学物質により引き起こされる感性として代表的な味に関する物質への応答例である。応答を電気化学インピーダンスの変化（電極電位プロファイル）として示している。電極電位依存のパターンが現れることから分かるように、電極電位プロファイルは電極電位により変化する領域、すなわち主に電極の表面近傍での状態変化を反映している。電極抵抗は味物質の吸着性を示すと考えられ、味物質の種類によりそのプロファイルは大きなバラエティー

を持つ。電極キャパシタンスについては味の種類による差は小さく、吸着性の有無に大きく依存する。ここでは示さないがそれぞれの基本味物質に類似の味を示す味物質についてもそれぞれの味の質に依存した類似パターンが得られる。これは本方法で測定される単純な物理化学現象である化学物質の吸着などによる電極の電気化学インピーダンス変化が物質の味としての特徴を大きく反映していることを意味する。逆に物質が持つ味としての属性のかなりの部分が単純な物理化学現象に依っている事を示唆すると言える。

電極表面がゼロ電荷状態になる電位は本実験系では 0.05 V 付近であると考えられるが、この電位では物質の添加により電極キャパシタンスに大きな変化が現れる。このようにキャパシタンスに影響を及ぼすのは吸着性を示す物質と考えられる。単純で特異吸着性が無い電解質では変化が現れない。特に、キニーネなどの吸着性味物質では大きな変化がゼロ電荷点のキャパシタンスに現れる。一方、電極抵抗についてはゼロ電荷点以外で多くのピークが現れるが、これは水素イオンと酸素の吸着をプローブとした表面状態測定と考えられ、化学物質の吸着を鋭敏に反映する。例えばベンゼン環などの疎水部分を持つ物質は電極電位が負の領域で応答のピークが現れる傾向がある。カプサイシンやペペリンなどの辛味物質、さらには環境ホルモン様物質などもこの部分で高感度な検出が可能である。分極制御による化学物質の検出は、従来の電気化学的手法のベースにあった酸化還元反応などに着目している訳ではなく、表面分極による表面と水溶液中の化学物質との相互作用を変化させ検出する事に基本的な考えを置いている。そして、この方法が物質と表面との相互作用を検出し、物質の極性を反映する事から、化学感覚のセンシングに有効であり、この考えは、匂い測定においても成り立つと考える。

a) 電極抵抗 ( $R_{45}$ ) 変化



b) キャパシタンス ( $C_{dl}$ ) 変化

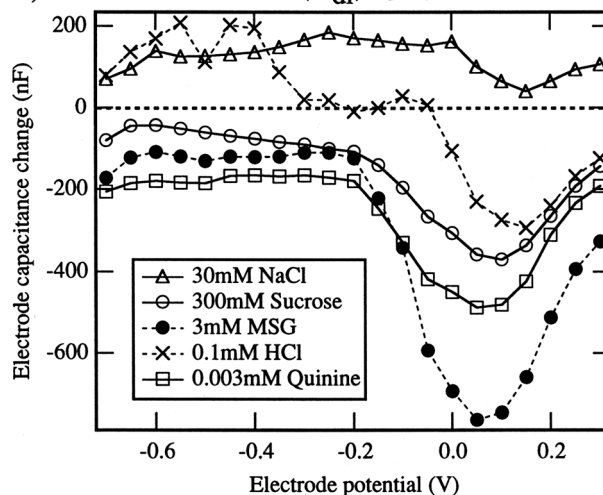


図 3 味物質応答

### 3.2 匂い物質応答

この電極を匂いセンサに応用した結果を示す。図4にエタノールへの応答を示す。5%エタノール水溶液をバブリングすることで匂いを発生させ、無臭の空気との混合比を変えることで匂い濃度を变化させた。電極インピーダンスの電極電位プロファイルは味物質の場合に比べると単純である。なお、匂い物質については電極インピーダンスを成分に分けずインピーダンスの絶対値で示した。様々な匂い物質について応答を調べたが、応答感度は親水性の物質については人より高いものが得られたが疎水性物質については人には及ばなかった。これは本方法が匂い物質を一旦水溶液に溶かし、電極への影響を調べるため疎水性物質については水溶液への分配が小さく、応答速度も遅い事が原因であると考えられる。

匂い物質への電極電位プロファイルは図4に示した通

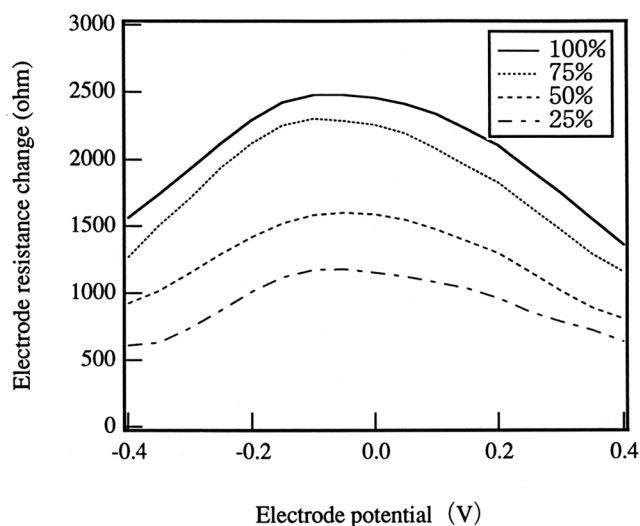


図4 エタノール応答

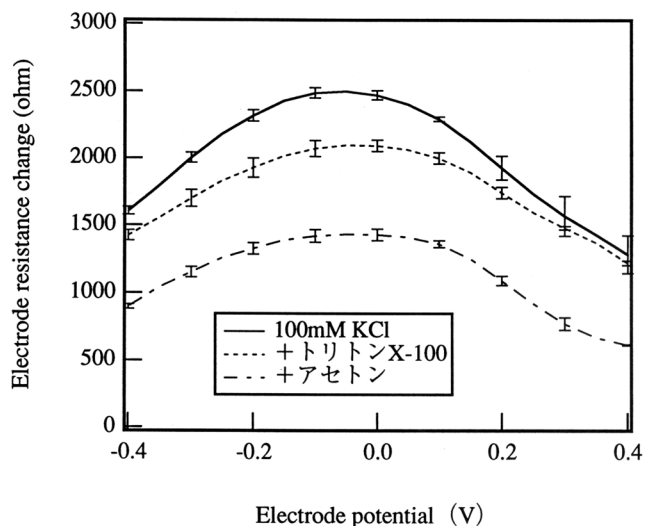


図5 基準溶液によるエタノール応答の変化

りピークの数はいくつか単調である。味物質場合と同じように0.05Vステップで電極電位プロファイルを得ているが、味物質の場合とは異なり細かなピークは現れない。良く知られている通り、匂い物質の種類と質の数は非常に多く、匂いセンサはその識別を可能とする多くの情報を出力できる能力が要求される。今回は、電極表面に存在する基準溶液の組成を变化させることで応答プロファイルを变化させ、匂い物質に対する応答性を変調させた。味の場合と異なり匂い物質は気体として作用させるため基準溶液の変更は容易であり、物質を作用させた際に基準溶液の組成への影響は小さい。基準溶液にトリトン X-100 およびアセトンを混合した場合の応答を図5にエタノールを、図6にベンズアルデヒドを示す。なお図中には応答の標準偏差も示している。エタノールに対する基準溶液の効果は小さく、ベンズアルデヒドの電極電位プロファイルへの影響は大きい。エタノールのように親水性が強く主に水酸基により白金電極と相互作用する物質は基準溶液の影響を大きくは受けない。一方、アルコール類でも炭素鎖が長くなると基準溶液により電極電位プロファイル（応答パターン）が变化する。図に示したベンズアルデヒドもそのような物質であり、香料など多くの疎水性の匂い物質では基準溶液により情報を増やすことが可能であり、これは匂いセンサーでは有効な方法であると言える。

基準溶液に混合された物質は味物質の場合と同じように表面に吸着すると考えられる。これは実質的な電極の表面修飾に相当する。修飾電極は化学物質センシングでは応答特異性を変える有効な手段であるが一般に修飾に要する手間、修飾電極の安定性や再現性などが問題となることが多い。本研究で用いた方法は基準溶液に電極表面の特性を变化させる物質を添加するだけで、容易にしかも安定に電極の特性を变化させることができる。さらに、気体中の匂い

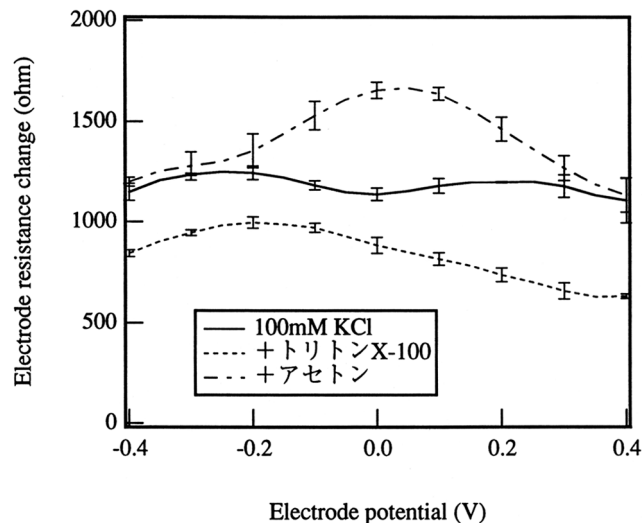


図6 基準溶液によるベンズアルデヒド応答の変化

物質の基準溶液への分配も変化すると考えられるが、電極電位プロファイルが変化することから考えて分配が影響するのは応答感度に対してであり、匂い物質情報には基準溶液の組成は大きな寄与はしないと考えられる。

### 3.3 匂い物質の質の推定

図7に12種類の様々な質を持つ匂い物質への応答を主成分分析した結果を示す。用いた応答データは3種類の基準液を用いた場合の電極インピーダンスの電極電位プロファイルである。なお、酢酸やアセトアルデヒドといった物

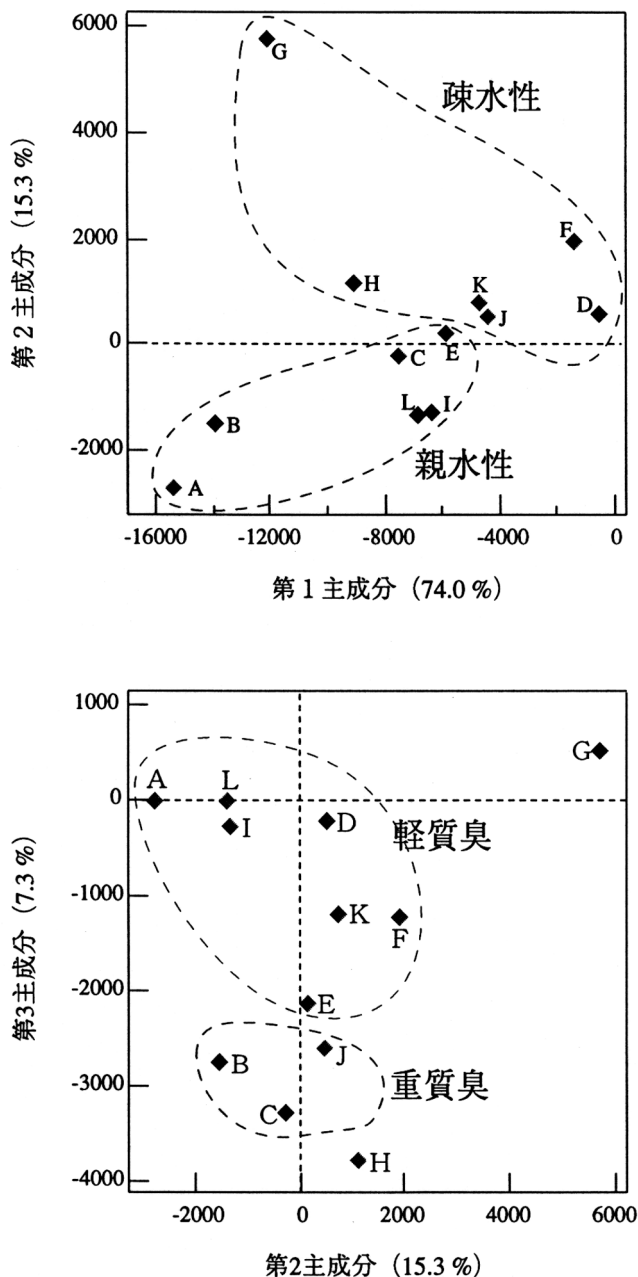


図7 匂い物質の主成分マップ(A: エタノール、B: プロパノール、C: ブタノール、D: フェニルエチルアルコール、E: アセトン、F: メントール、G:  $\beta$  イオン、H: ベンズアルデヒド、I: シトラール、J: ベンゼン、K: クロロホルム、L: テトラヒドロフラン)

質へは非常に大きな応答が得られ、この主成分マップの同一面上には描けないため省いた。このように物質の極性が大きく異なる場合、応答の差は人の嗅覚においても応答メカニズムに違いがあるものと考えられる。今回用いたトランスデューサは物質が持つ極性をその応答に大きく反映させることができ、極性による化学物質が持つ化学感覚情報への質の差を検出することができる。

図から分かる通り、匂い物質は第2主成分により親水性と疎水性に大きく分られる。第3主成分は匂いの質を反映しており軽質でどちらかと言えば良い匂いの物質が第3主成分軸の中央付近に集まる。なお、第1主成分は応答の大きさを反映しており、主成分分析の結果として得られるサイズファクターとなっており質を表す軸とはなっていない。この場合、第2主成分以降の軸が質に関連するシェイプファクターであるが、さらに高次の成分が匂いの質とどのような相関があるかが重要であるが、これについては再現性などを考慮して解析を進める必要がある。

## 4. 考察

本研究では匂い物質の検出の手がかりとして匂い物質の持つ極性に着目し、トランスデューサの表面分極規制による電極インピーダンスの測定が、匂い物質をはじめとして化学物質の検出とその感性量の推定に有効であることを示した。実験の結果から、親水性物質のエタノール等は人よりも高い感度で応答することが分かったが、疎水性物質については人の応答感度には及ばなかった。これは今後のもっとも大きな課題である。

この分極制御型センサは表面での化学物質との相互作用を捉えるもので、そのため一般的な電気化学的手法と異なり、広く化学物質を測定可能である。これは生物の化学受容が行なっている機構にも近い。しかも、その応答パターンが匂いの質に関する情報を含んでいることは、このセンサが匂いの感性量を測定できる可能性を示唆している。このような化学物質の測定方法は化学感覚のセンサとしてだけでなく、広く化学物質検出に用いることができる。また、特に匂いセンサのように化学物質の検出手法から派生した化学物質検出由来の化学感覚センサとは異なったアプローチである<sup>11)</sup>。

匂い測定では水溶液を介することで、より生物に近い応答機構で匂い物質を検出し、生物の嗅覚に近い応答特性を得ることを目指しているが、現段階では匂い物質への感度が不足しており、特に疎水性の匂い物質に対する実用的なセンサの構築には電極材料の選択や電極表面の改質など電極系の改良が必要である。本方法が基準溶液を用いる事を活かし、基準溶液中に様々な物質をあらかじめ溶解しておくことで化学物質への応答特性が変化する事を示した。この方法は特に気体を基準液に溶かし込むことで応答させ

る匂い物質の場合に有効である。応答感度に関しては、一般的に生物の嗅覚に対して劣っているが、電極系と測定手順により変更可能であることは、感性計測を目的としたセンサとしては重要である。そのため、応答濃度範囲が広く、しかも検出閾の幅も広い生物の嗅覚に合わせる事ができる。

本方式はトランスデューサ材料という点では生物由来のものは全く用いていないが、応答メカニズムという点では匂い物質を生物と似た方法で捉えている。このような方法は実用化の上で常に困難がつきまとう有機材料を用いない新しいタイプのバイオセンシング方式の一つとして有効な手段であると考えられる。

#### (参考文献)

- 1) E. アムーア: 匂い—その分子構造, 恒星社恒星閣, 1972.
- 2) 日本化学会編: 味と匂いの科学, 学会出版センター, 1976.
- 3) K. Hayashi, M. Yamanaka, K. Toko and K. Yamafuji: Multichannel taste sensor using lipid membranes, *Sens. Actuators, B2*, 205-212, 1990.
- 4) 都甲編: 味覚センサ, 朝倉書店 (1993).
- 5) T. Nakamoto, K. Fukunishi and T. Moriizumi: Identification capability of odor sensor using quartz-resonator array and neural network pattern recognition, *Sens. Actuators, B1*, 473-476 (1990).
- 6) K. Toko: *Biomimetic Sensor Technology*, Cambridge Univ. Press. 2000.
- 7) J. N. Israelachvili: *Intermolecular and Surface Forces*, Academic Press, 1985.
- 8) 田村, 松田: 現代電気化学, 培風館, 1977.
- 9) 玉虫: 電気化学, 東京化学同人, 1991
- 10) 藤嶋, 相澤, 井上: 電気化学測定法, 技報堂出版, 1984.
- 11) C. Ziegler, W. Gopel, H. Hammerle et al.: Bioelectronic noses, *Biosensors and Bioelectronics*, 13, 539-560, 1998.

# 分散安定性に優れたサーファクタント・フリー・エマルションの調製法の確立とその凝集・合一過程の解明

東京理科大学 理工学部

阿部 正彦

We have investigated surfactant-free O/W emulsions (SFEs), which can be prepared without addition of surfactant with ultrasonicator at extremely low oil concentrations ( $\sim 0.1$  vol%) slightly above oil solubility. SFE is relatively unstable compared with ordinary emulsion stabilized by surfactant, however, it keep dispersion for a certain time under surfactant-free condition. For example, when droplet size was observed by dynamic light scattering (DLS) measurement for benzene SFE, droplet size distribution changed from  $\sim 30$  nm (S class), to  $\sim 300$  nm (M class) and to  $\sim 3000$  nm (L class) with lapse of time during one or two hours, while for n-hexadecane SFE, droplet size around 50 nm in diameter grew up to 200 nm during 3 days. Summarizing the droplet sizes of several kinds of hydrocarbon SFEs observed by DLS, SFE consisting of hydrocarbon with longer chain length was more stable than shorter one. Furthermore, we found that hydrocarbon having longer chain length and branch like glyceroltrioleto makes significantly stable emulsion under absence of surfactant. Larger molecules is able to form rigid surface of droplet and prevent molecular diffusion from droplet surface.

## 1. 緒言

エマルションおよび乳化技術は、化粧品分野を初めとし医薬品分野、食品分野など種々多岐に渡る分野で活用されている。ここで用いられているエマルションとは、水と油のように均一に溶解しない二種類の液体の一方を微粒子（分散質）とし、もう一方の液体（分散媒）中に分散させている系を指し、当然の事ながら分散質表面には界面活性剤分子などが吸着している。このようなエマルションは概して熱力学的に不安定な系であるため、さまざまな不安定化要因や機構、例えば、重力による分離（比重差）、凝集、合一、オストワルド熟成により時間が経過すると必然的に崩壊する（水と油との2相に分離する）<sup>1~5</sup>。このようなエマルションの複雑な不安定機構を解明するために、これまでに様々なアプローチがなされてきているが<sup>6~10</sup>、界面活性剤（乳化剤）などの安定化剤が共存するために液/液分散系における液滴の分散安定性の理解を分かりにくくしているのが現状である。また、エマルションの本来の目的は、水あるいは油だけの一液相では決して得られない高付加価値を両者を任意に混合することにより作り出すことであり、乳化剤を添加することが目的な訳ではない。さらに、エマルション本来の姿である分散相や分散媒の特性は、界面活性剤自身の乳化能力に依存するあまり、見落とされている可能性もある。そこで、シンプルな系であるサーフ

ァクタント・フリー・エマルション（界面活性剤無添加エマルション）の物性を十分に理解することができれば、エマルション溶液などの液/液分散系の本質の解明に大いに寄与できるものと考えている。

## 2. 実験

### 2.1 試料

油相として、炭素鎖長が6から16の偶数のアルカン、環状構造を有するシクロヘキサン、芳香族であるベンゼン、長鎖かつ分岐構造を有するスクワラン、カルボキシル基を有するオレイン酸、メチルオレート、エチルオレート、グリセロールトリオレートを使用した。水相には注射用蒸留水を用いた。

### 2.2 調製と測定

サーファクタント・フリー・エマルションは、水相に所定量の油相を滴下し、超音波発振機（ブラウンソニック 220 型、125W、45kHz）を用いて分散処理を施すことにより調製した。油滴の粒子径の測定は動的光散乱法（Malvern サブミクロンパーティクルアナライザー MODEL4700 と NICONP MODEL 380 ZLS）、表面電位は電気泳動レーザー Doppler 法（NICONP 製 Model 380 ZLS）、直接観察には、凍結切断レプリカ法—TEM（日立製作所）を用いた。

## 3. 結果および考察

### 3.1 動的光散乱法による粒子径測定

まず、水中における分散安定性が悪いと言われている炭化水素鎖長が6の油（ベンゼン、n-ヘキサン、シクロヘキサン）を強力な外的因子を印加した場合（超音波照射）の水中油滴の粒子径の経時変化を動的光散乱法（DLS）を



The Establishment of a Preparation of Stable Emulsion under Surfactant-free Condition and Explication of flocculation/coalescence processes

Masahiko Abe

Faculty of Science and Technology, Science University of Tokyo, 2641, Yamazaki, Noda, Chiba 278-8510

用いて測定した<sup>11)</sup>。ベンゼンの場合、Fig.1(a)に示すように、分散の初期段階では主として数十 nm 径 (Sクラス) の粒子が多数存在し、少数の数百 nm 径 (Mクラス) を有する粒子が観測された。約 20 分が経過すると、Sクラスの

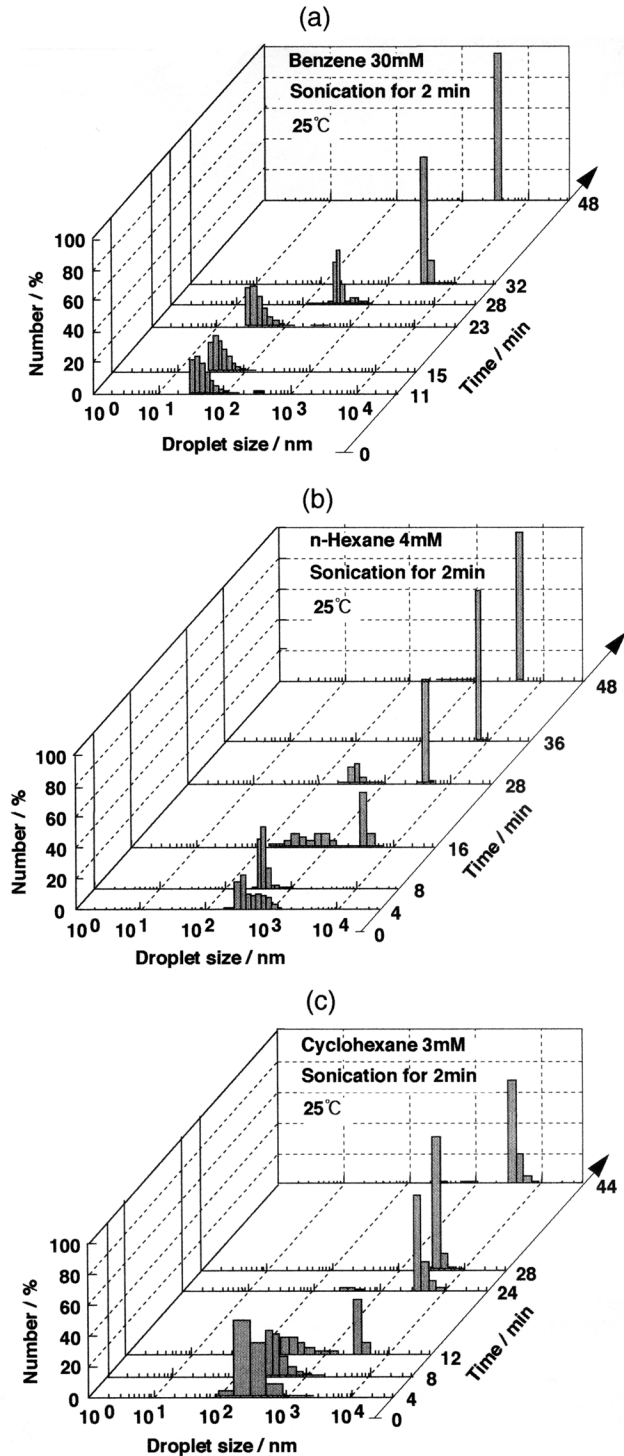


Figure1 Size distributions at various elapsed times of benzene droplets at 25°C measured by dynamic light scattering (Sub-micron particle analyzer system 4700 : Malvern Instrument Co.) after ultrasonication Concentration of oils : (a) benzene; 30mM, (b) n-hexane; 4mM and (c) cyclohexane; 3mM. Ultrasonic treatment time 2 min.

粒子数が減少して、Mクラスの粒子数が増加した。最終的には粒子径は数千 nm 径 (Lクラス) を有する油滴へと成長した。一方、n-ヘキサン、シクロヘキサンの場合(Fig.1 (b), (c))、超音波照射直後も数十 nm 径 (Sクラス) の油滴は観測されず、数百 nm 径 (Mクラス) のみが観測された。その粒子径分布はベンゼンの場合と同様に時間とともに不連続に数千 nm 径 (Lクラス) へと成長した。

さらに、飽和炭化水素類の炭素鎖長を増加させて同様の検討をしてみた (Fig. 2)。Fig. 2から明らかのように、炭化水素鎖長の増加とともに初期粒子径が減少すると同時にその粒子径の経時安定性も向上している (●-■-▲-△-□-○)。炭化水素数 16 のヘキサデカンを用いた場合には、約 3 日間 Sクラスの油滴を観測することができた<sup>12)</sup>。また、油の種類、初期粒子径、成長過程を分類すると、Table 1 のような3つのタイプに大別できる<sup>13)</sup>。

タイプ(A) : ヘキサンやオクタンのような炭化水素鎖長の短い油は、MクラスからLクラスへ速やかに成長する。

タイプ(B) : ヘキサデカンのような炭化水素鎖長の長い油は、SクラスからMクラスへ緩やかに成長する。

タイプ(C) : ベンゼンのような芳香族炭化水素は、Sクラス、Mクラス、Lクラスへと速やかに成長する。

これらのことから、初期粒子径、粒子径の維持 (安定性)、成長過程などは油の種類により特異的な挙動を示すことが分かった。そこで、油滴の生成や成長過程を油の物性との関係から検討した<sup>14)</sup>。

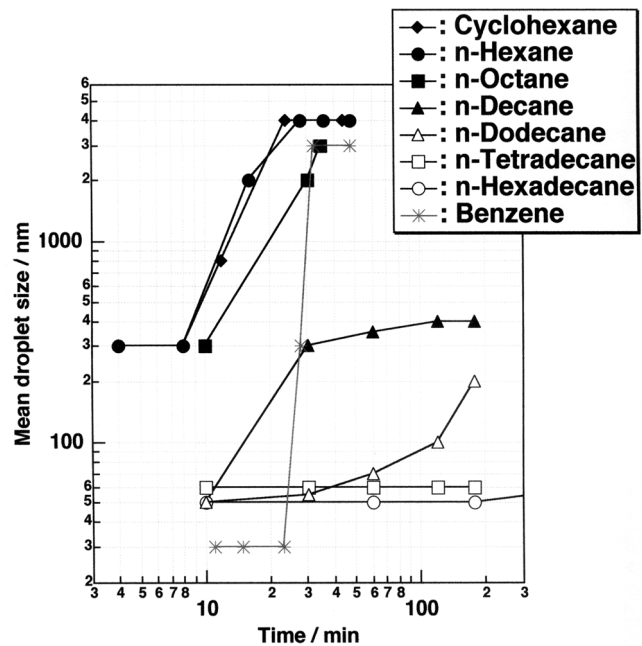


Figure 2 Temporal change of mean droplet size as a function of time for hydrocarbons. Benzene; 30mM( \* ), cyclohexane - ; 3mM( ◆ ), n-hexane; 4mM( ● ), n-octane; 1mM( ■ ), n-decane; 1mM( ▲ ), n-dodecane; 1mM( △ ), n-tetradecane; 1mM( □ ), and n-hexadecane; 1mM( ○ ).

Table 1 Types of hydrophobic oils

	[A] n-hexane type	[B] n-hexadecane type	[C] benzene type
Solubility	As low as 1 mM	Quite lower	As high as 23 mM
Viscosity	Very low	medium	Very low
Interfacial tension	~50 mN m <sup>-1</sup>	~50 mN m <sup>-1</sup>	25 –33 mN m <sup>-1</sup>
$\gamma/\eta$	large	small	small
Initial droplets size	200 – 300 nm	90 – 100 nm	30 – 50 nm
Growing	Fast M to L change	Slow S to M change	Fast S to M change

Table 2 Evolution pattern and stability of fine particle

	Molecular formula	M.W.	m.p. / °C	b.p. / °C	Density / g cm <sup>-3</sup>	Surface tension <sup>b)</sup> / mN m <sup>-1</sup>	Interfacial tension <sup>a)</sup> / mN m <sup>-1</sup>	Viscosity <sup>c)</sup> / mPa s	Vapor pressure <sup>b)</sup> / mN m <sup>-2</sup>	Results	
										Evolution pattern	Stability of fine particle
Water	H <sub>2</sub> O	18.02	0	100	0.99705	72.59	-	0.7973	<b>3.1673 × 10<sup>6</sup></b>	-	-
Benzene	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	78.11	5.533	80.100	0.87372	28.24	<b>35.0</b>	0.564	<b>1.2689 × 10<sup>7</sup></b>	<b>[C]<sup>b)(d)(e)</sup></b>	<b>~20 min<sup>b)(d)(e)</sup></b>
Cyclohexane	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>	84.16	6.541	80.719	0.77853	24.65	<b>50.59</b>	0.825	<b>1.3009 × 10<sup>7</sup></b>	<b>[A]<sup>b)(d)</sup></b>	<b>0<sup>b)(d)</sup></b>
n-Hexane	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	86.18	-95~-100	68.7	0.6603	17.90	<b>50.80</b>	0.290	<b>2.5387 × 10<sup>7</sup></b>	<b>[A]<sup>b)(d)(e)</sup></b>	<b>0<sup>b)(d)(e)</sup></b>
n-Octane	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub>	114.23	-56.8	125.7	0.7026	21.14	<b>51.68</b>	0.480	<b>1.8634 × 10<sup>6</sup></b>	<b>[A]<sup>c)(e)</sup></b>	<b>0<sup>c)(e)</sup></b>
n-Decane	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub>	142.29	-30	174.0	0.7300	23.37	<b>52.30</b>	0.835	<b>1.7315 × 10<sup>5</sup></b>	<b>[B]<sup>c)(e)</sup></b>	<b>~20 min<sup>c)(e)</sup></b>
n-Dodecane	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub>	170.34	-9.6	214.5	0.7511	24.91	<b>52.78</b>	1.257	<b>1.5351 × 10<sup>4</sup></b>	<b>[B]<sup>c)(e)</sup></b>	<b>~3 days<sup>c)(e)</sup></b>
n-Tetradecane	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>	198.39	5.5	252.5	0.7624	26.13	<b>53.32</b>	1.783	<b>1.2645 × 10<sup>3</sup></b>	<b>[B]<sup>c)(e)</sup></b>	<b>~3 days<sup>c)(e)</sup></b>
n-Hexadecane	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>	226.45	18.13	286~293	0.7734	27.05	<b>53.77</b>	2.571	<b>9.0072 × 10<sup>1</sup></b>	<b>[B]<sup>c)(e)</sup></b>	<b>~3 days<sup>c)(e)</sup></b>

a)20°C, b)25°C, c)30°C, d)Ultrasonication for 2min, e)Ultrasonication for 8min

Evolution pattern of oil droplets: **[A] ~10<sup>-2</sup>(middle class)→~10<sup>-3</sup>(visible class)**  
**[B]~10<sup>-1</sup>(fine class)→ ~10<sup>-2</sup>(middle class)**  
**[C]~10<sup>-1</sup>(fine class)→ ~10<sup>-2</sup>(middle class)→~10<sup>-3</sup>(visible class)**

炭化水素数6から16までの偶数のアルカン（飽和炭化水素）およびベンゼン、シクロヘキサンの物性と油滴の成長パターンをTable 2に示す。物性を比較してみると、油/水の界面張力は炭化水素鎖長が増加してもほとんど変わりなくほぼ50mN m<sup>-1</sup>であったが、粘度および蒸気圧は大きく異なっている。炭化水素鎖が6と16を比べた場合、粘度では約10倍、蒸気圧では約1/10<sup>5</sup>倍である。このことから、粘度と蒸気圧は油滴の安定性や粒子の大きさを決定する重要なファクターであることが示唆される。ま

たこのことは、ヘキサンの場合に見られる微細油滴の成長過程は分子拡散（オストワルド熟成）が支配的であることも示唆している。得られた粒子径の経時変化をこの2つの因子（粘度、蒸気圧）から分析すると以下ようになる。**タイプ(A)の油**：炭化水素鎖長の短いヘキサンやオクタンのような油は、粘度が低いため水中に分散させるのは容易であるが、分子拡散が起こりやすい（蒸気圧が大きい）ので分散安定性に劣る。ヘキサンのような極めて粘度の小さな油は、かな

り大きな蒸気圧（ヘキサデカンの約  $10^5$  倍）を持つため、その状態（小粒子）を維持できずに速やかに大粒子へと成長する。また、水に対する溶解度が極めて小さいため、分子状態で水中に存在することができない。そのため M クラス以上の油滴では分子拡散は期待されない。数十 nm 径（S クラス）の油滴については、超音波照射により一時的に形成されたとしても、極めて速い分子拡散あるいは合一（小粒子(S) → 大粒子(M)）が起こるため、事実上、観測されないものと考えられる。

**タイプ(B)の油：**炭化水素鎖長の長いヘキサデカンのような油は、粘度が大きいため破碎しにくい、超音波によっていったん微細化されてしまえば、蒸気圧が小さいために分子拡散を起こしにくくなるので成長は緩やかとなる。

**タイプ(C)の油：**タイプ(A)と同様に、粘度が低いため水中に分散させるのは容易であるが、分子拡散が起こりやすい（蒸気圧が大きい）ので分散安定性に劣る。しかし、疎水性分子の中でベンゼンのような極めて溶解性の高い油は、他の油に比べ水中に溶解した分子が多数存在するため、分子拡散は溶解状態で律速段階（小粒子(S) → 溶解 → 大粒子(M)）をとるものと考えられる。そのため、溶解度の極めて小さなタイプ(A)のヘキササンなどに比べ、S クラスから M クラスへの成長が明確に観測されたものと考えられる。

### 3.2 ベンゼン油滴の凝集・合一過程のフリーズフラクチャー TEM (FFEM) による直接観察

これまで述べてきたように、油の種類を替え、系統的に油滴の成長過程をまとめると3つのタイプ ((A)(B)(C)) に大別されることが分かった。その中で、特に分子拡散が成長過程に大きく起因していることが示唆された。しかし、成長過程には、もう一つのプロセスである凝集・合一過程がある。動的光散乱法ではこれらの成長過程の違いを明確に区別することは困難であるため、ベンゼン油滴をフリーズフラクチャー TEM (FFEM) を用いて、直接観察することを試みた。フリーズフラクチャーレプリカ法は、液体試料を液体プロパンや液体窒素中に投入して、 $1000 \sim 10000^\circ\text{C}/\text{s}$  の凍結速度で試料を急速に凍結して溶媒である水分子をアモルファス状態で固定化することができる。ベンゼン油滴のような調製後約 30 分という短い時間で S クラス、M クラス、L クラスへと刻々と変化するような試料からなる分散液内部の状態をより正確に捉えるためには、瞬間凍結によって固定化できるフリーズフラクチャー法は極めて有効である。さらに、階層構造（S クラス、M クラス、

L クラス）などを視覚的に捉えることができる魅力をも持っている。

まず、調製直後の動的光散乱法 (DLS) による粒子径分布（数分布）と FFEM 像を Fig. 3 に示す<sup>15)</sup>。Fig. 3(a) に示すように、 $20 \sim 100\text{nm}$  (S クラス) の主な粒子径分布と  $300 \sim 500\text{nm}$  (M クラス) の小さな粒子径分布が観察された。FFEM 像 (Fig. 3(b)) を見ると、 $30 \sim 200\text{nm}$  の油滴が観察されている。その中でも特に、 $30 \sim 100\text{nm}$  の油滴 (DLS での S クラスの粒子径分布に相当) が多数観察された。また、 $200 \sim 500\text{nm}$  の凝集体 (白矢印) を数個観察することができた。これらのサイズもまた、DLS で得られた M クラスの粒子径分布とよく一致している。これらの FFEM 結果は、DLS によって観測された離散的な粒子径分布を支持していることが分かった。

次に、調製 60 分後における DLS から得られた粒子径分布（数分布）と FFEM 像を Fig. 4 に示す。Fig. 4(a) から明らかなように、DLS では S クラスの粒子径分布は観測されず、 $200 \sim 400\text{nm}$  (M クラス) の小さな分布と  $3000 \sim 4000\text{nm}$  (L クラス) の大きな分布を観測することができた。Fig. 4(b) の FFEM 像によって M クラスに相当する  $200 \sim 500\text{nm}$  の油滴が観察された。またこの FFEM 像のなかで、隣接する M クラスの 2 つの油滴が合一している

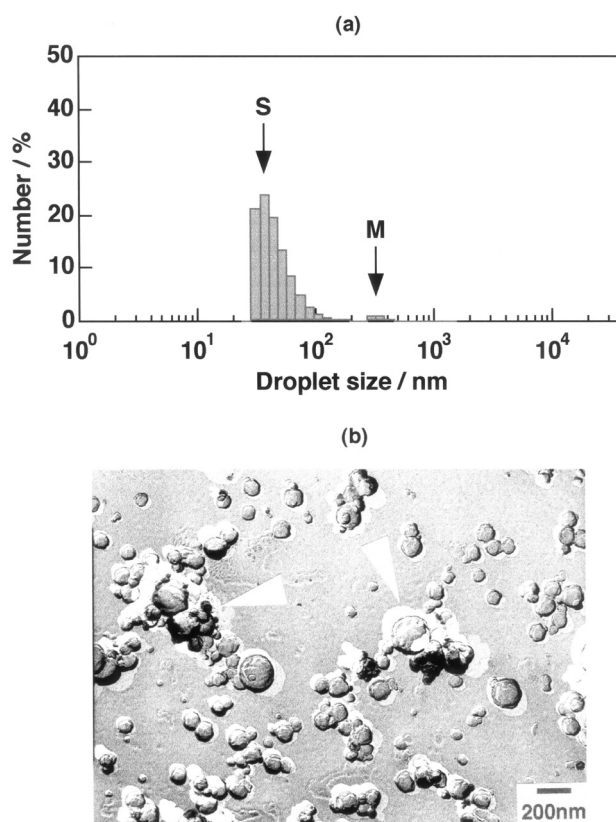


Figure 3 (a) Size distribution measured by dynamic light scattering (Sub-micron particle analyzer system 4700 : Malvern Instrument Co.), and (b)FFEM image of benzene droplets dispersed in water, immediately after sonication.

FFEM 像 (白矢印) を得ることができた。一方, Fig. 4 (c)から明らかなように, 60 分後においても小さな油滴はお互いに凝集している様子も捉えることができた。このことから, サイズの小さな S クラスの油滴は “凝集” しても合一しないが, サイズが大きな M クラスの油滴は, 油滴が接触すると速やかに “合一” して成長しており, Fig. 5 に示すような凝集・合一成長モデルを示すことができる<sup>15)</sup>。

### 3.3 油滴としての分散安定性に優れた油の探索

測定した直鎖飽和炭化水素の中でヘキサデカン油滴が最も安定性に優れていたことは前述した通りであるが, さらに安定性に優れた油の探索を試みた。不飽和炭化水素類である 1-デセンや 1-ヘキサデセンを用いた場合<sup>18)</sup>には,

前述の飽和炭化水素類よりも分散安定性は劣るが, 分岐のある飽和炭化水素であるスクワランを用いた場合<sup>13, 14)</sup>には (Fig. 6), 数十 nm の極めて小さい粒子径が少なくとも 3 日間存在できることが分かった。そこで, スクワランのように疎水基鎖長が長く, かつ分枝構造を有し, さらにカルボキシル基という弱い極性部位を持つ脂肪酸や脂肪酸エステルなどの油脂類を用いてサーファクタント・フリー・エマルションの調製を試みた<sup>16, 17)</sup>。

まず, 油脂である脂肪酸エステルの共通骨格であるオレイン酸について検討してみた。水中に分散させたオレイン酸滴の粒度分布を Fig. 7 に示す。なお, 分散はボルテックスマキサーで 1 分間攪拌した後, 超音波発振機 (ブラウンソニック 220 型 125 W) で 8 分間, 超音波を照射する

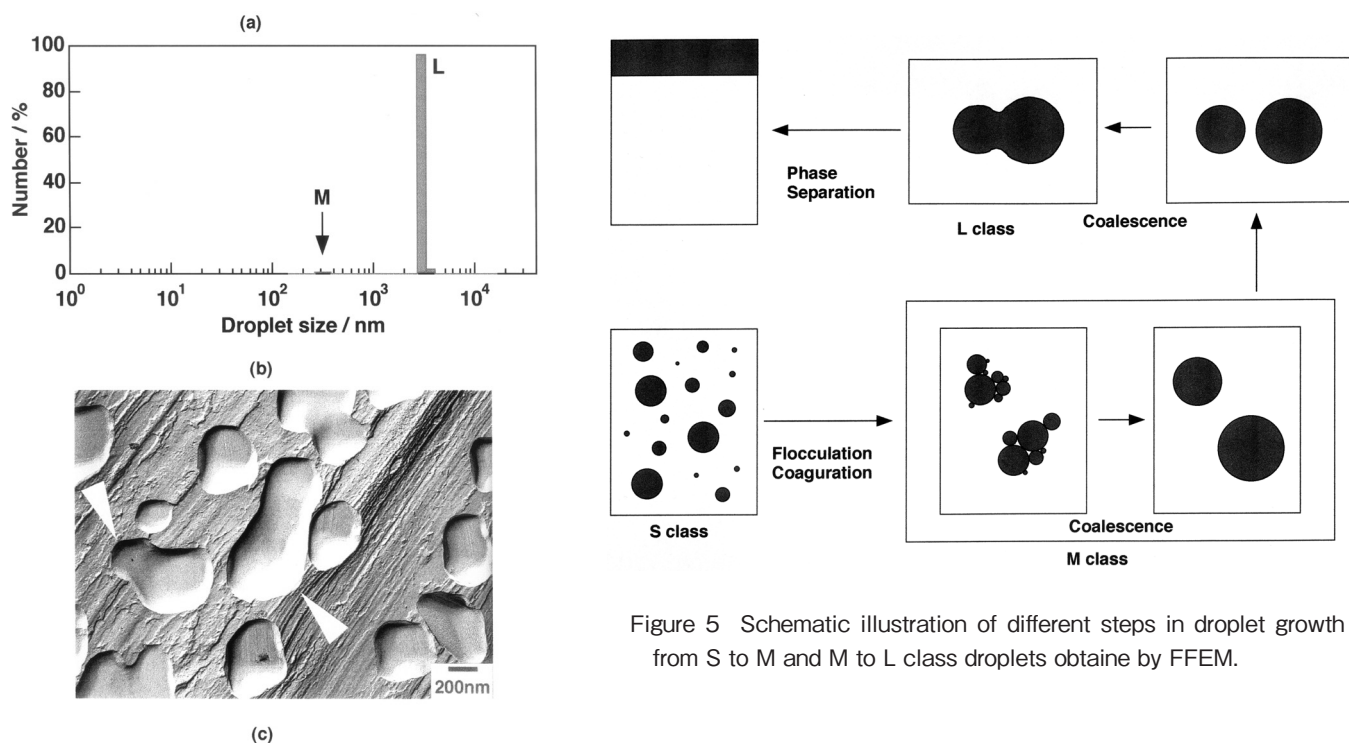


Figure 5 Schematic illustration of different steps in droplet growth from S to M and M to L class droplets obtained by FFEM.

Figure 4 (a) Size distribution measured by dynamic light scattering (Sub-micron particle analyzer system 4700 : Malvern Instrument Co.), and (b)FFEM image of coalescence of benzene droplets dispersed in water, and (c) FFEM image of small aggregate of benzen droplets 60 min after sonication.

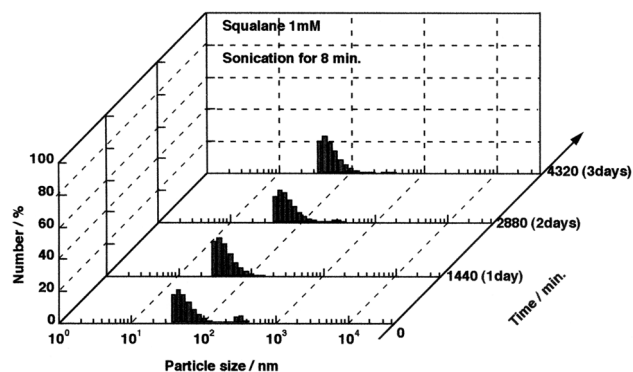


Figure 6 Size distributions at various elapsed times of squalane droplets at 30°C measured by dynamic light scattering method. Squalane concentration is 1mM. Sonication time is 8min.

ことにより行った。Fig. 7から明らかなように、油滴調製10分後では、数十nmにピークを持つSクラスと数百nmにピークを持つMクラスの粒度分布が観察され、時間の経過とともに離散的（不連続）に成長した（ベンゼン滴など<sup>11)</sup>と同様）。一方、アルコール部分のアルキル鎖長が短い脂肪酸エステルのもethylオレート滴の場合（Fig. 8）、調製直後では数十nmにピークを持つSクラスだけのピークが観察され、そのMクラスへのシフトは連続的に起こった。この傾向は、アルキル鎖長をより長くしたデシルオレートとオレイルオレートの場合にも観察され、またLクラスの粒子は数分布で表現すると無視できるほど少なかった。さらに、methylオレートの場合、その粒子径が2~3倍成長するのに2~3日間要したが、デシルオレートやオレイルオレートの場合は2~4週間要し、粒子径の成長時

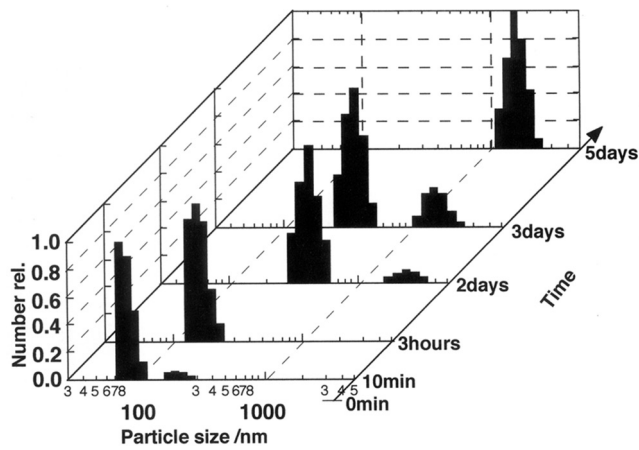


Figure 7 Size distributions at various elapsed times of oleic acid droplets in water at 30°C measured by a dynamic light scattering method.

間はエステル鎖長の増加に伴い鈍くなる傾向にあった。次に、用いた脂肪酸エステルの中で大きな分枝構造を持っているグリセロールトリオレート滴の粒度分布をFig. 9に示す。ここで注目すべきことは、調製10分後に観察されたSクラス（数十nm）の粒子径が、少なくとも24ヶ月間保持され続けていることである。ちなみに、この粒子径は現在もなお持続している。表面電荷（ $\zeta$ 電位）も粒子径の変化に対応して経時変化を示し（Fig.10）、油滴を調製した直後の場合、油滴の表面は油の種類に依存せず約マイナス32mVの $\zeta$ 電位を持っていたが、分散安定性の悪い油であるオレイン酸は時間とともにその絶対値を減少させた。

ここで用いた脂肪酸エステルの界面張力および密度は、種類によって大きな違いはないが、粘度はアルコール部分のアルキル鎖長などの増加に伴い、methylオレート

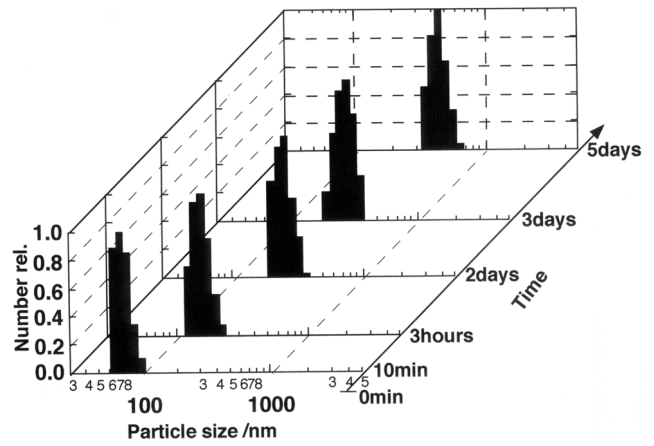


Figure 8 Size distributions at various elapsed times of methyl oleate droplets in water at 30°C measured by a dynamic light scattering method.

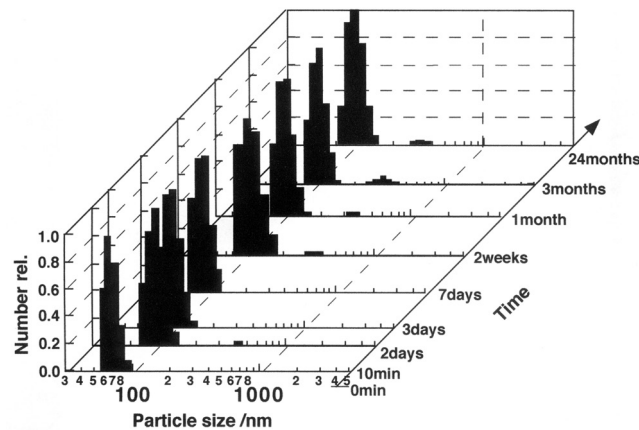


Figure 9 Size distributions at various elapsed times of glycerol trioleate droplets in water at 30°C measured by a dynamic light scattering method.

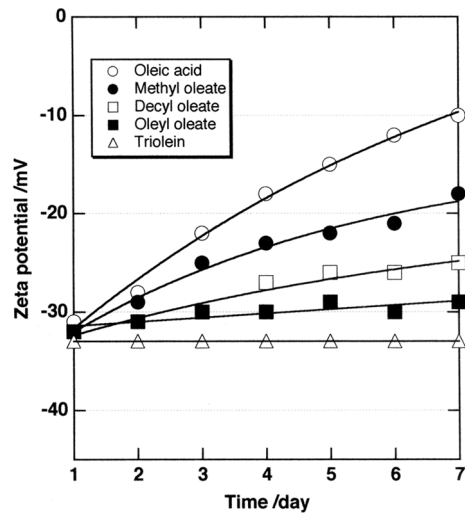


Figure10 Changes in zeta potential of oil-droplets dispersed in water as a function of time. oleic acid (○), methyl oleate (●), decyl oleate (□), oleyl oleate (■), and glycerol trioleate (△)

(4.88mPas)、デシルオレート (12.7mPas)、オレイルオレート (24.0mPas)、グリセロールトリオレート (56.0mPas) と増加する。つまり、アルキル鎖長の長い油、また分枝構造を有する油ほど粘度は大きくなり、分散安定性に優れた油滴を調製できるものと考えられる。

ところが、油の種類によっては、油滴の分散安定性が油の粘度と比例関係にないものも存在した。例えば、前述したように、脂肪酸エステルと共通の骨格を持つオレイン酸は高粘度を有している (23.0mPas) にも関わらず、油滴の分散安定性は悪かった。そこで、これらの分散油滴の成長過程を比較してみることにする。エマルションが物理化学的に破壊分離していく過程の違いについては、前述したように、粒子同士が凝集・合一を起こす現象と、分子拡散による成長の2つが考えられる。後者は、オストワルド熟成と呼ばれ、物質が微小になるほど溶解度が増大するという事実に起因する現象であり、小さい粒子を形成している物質が分散媒中に溶解し、拡散によって大きい粒子に吸収あるいは吸着され、粒度分布が変化するというものである。Lifshitz<sup>18)</sup>らは、次式で表される微粒子のオストワルド熟成の理論 (LSW 理論) を提唱した。また、Taylor<sup>19)</sup>やKabalnov<sup>20)</sup>はこの式を用いて、液滴のオストワルド熟成を証明している。

$$\omega = \frac{dr^3}{dt} = \frac{9}{8} \cdot \frac{DC_{\infty}M}{\rho^2 RT} \quad (3)$$

ここで、D は分散媒中に溶解した分散相の拡散係数、 $C_{\infty}$  は分散相の水に対する溶解度、 $\gamma$  は油/水 2 相間の界面張力、M と  $\rho$  はそれぞれ分散相の分子量と密度、r は系の平均粒子半径である。

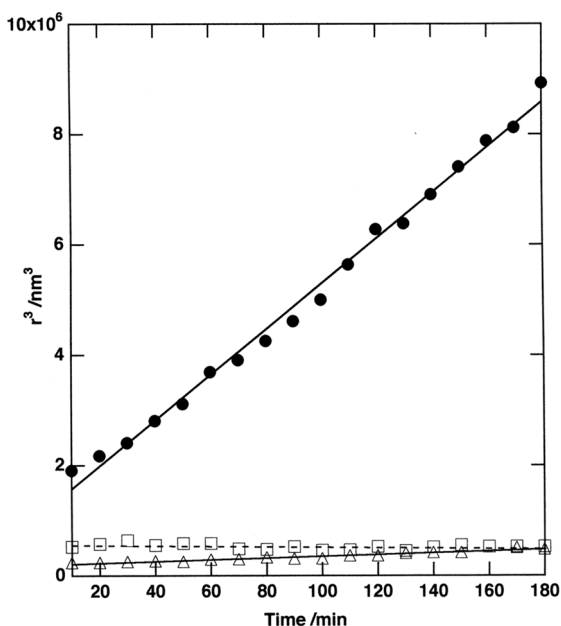


Figure 11 Plots of the cube of droplet size  $s$  as a function of time. Oleic acid (●), methyl oleate (△), and glycerol trioleate (□).

分散安定性の悪いオレイン酸およびメチルオレート、分散安定性が最も良いグリセロールトリオレート滴の  $r^3$  値の経時変化をプロットした (Fig.11)。なお、測定時間はオレイン酸、メチルオレート油滴の M クラスへの成長が観察された 3 時間である。オレイン酸油滴の  $r^3$  の値は、時間の経過に伴い、直線的に増加した。一方、油滴の安定性が悪いメチルオレートの場合も  $r^3$  の若干の増加が認

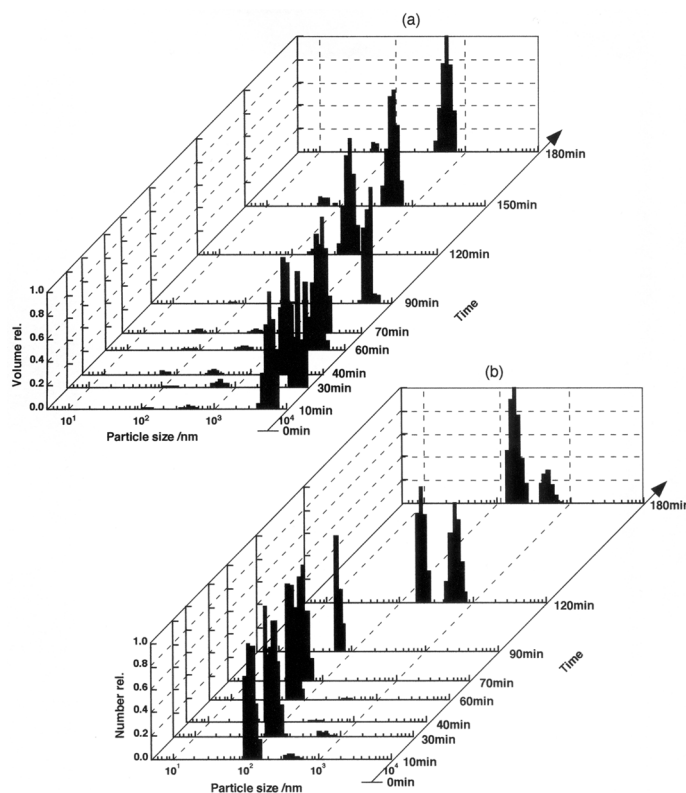


Figure 12 Size distributions ; (a) volume and (b) number distribution, at various elapsed times oleic acid droplets in water at 30°C measured by a dynamic light scattering method.

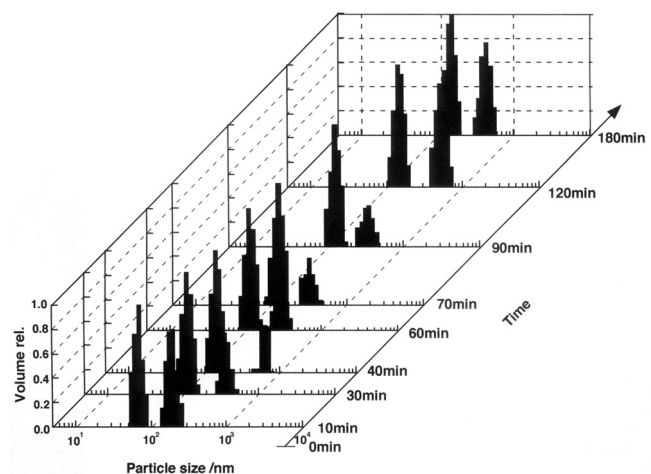


Figure 13 Size distribution (volume distribution) at various elapsed time of methyl oleate droplets in water at 30°C measured by a dynamic light scattering method.

められたが、メチルオレートの  $\omega$  値はオレイン酸の  $\omega$  値の40分の1であった。したがって、オレイン酸の場合のオストワルド熟成の成長速度はメチルオレートの場合と必ずしも同じではない。一方、グリセロールトリオレートの  $r^3$  値はほとんど経時変化を示さなかった。この測定時間（10分から180分）におけるオレイン酸滴の粒子径の体積分布と数分布の挙動を Fig.12(a)および(b)に示す。体積分布で表現すると大きな粒子に属する分子の割合の変化が分かり、また数分布で表現すると小さな粒子の位置がより正確にわかるので、Fig.12(a)からはSクラスの小粒子が時間経過に伴い小さくなっていく傾向、さらに(b)からはLクラスの大粒子が90分以降観測されなくなる傾向が分かる。これは、オストワルド熟成による成長プロセスを

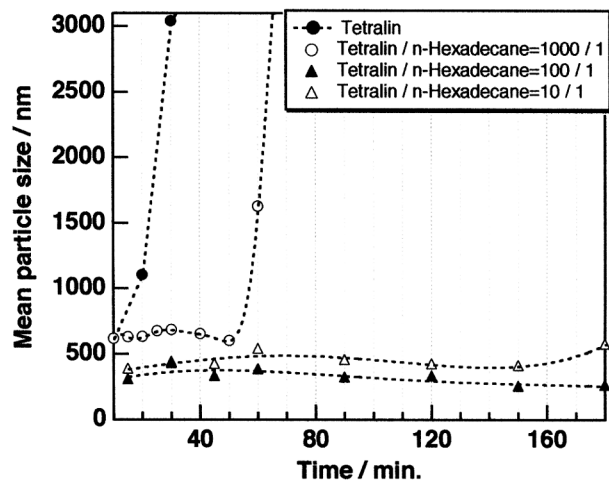


Figure 14 Temporal change of droplet size in tetralin dispersion as a function of time on n-hexane addition. Mixing ratio to 1mM tetralin is 1:1000 (○), 1:100 (▲), and 1:10 (△). Tetralin alone (●).

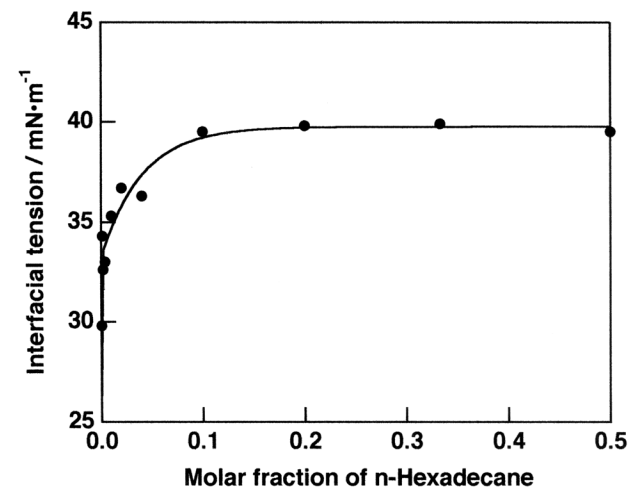


Figure15 Interfacial tension ( $\gamma$ ) for tetralin-water boundary at various contents of n-hexadecane (30°C).

支持するものである。つまり、小さい粒子の分子拡散により大きい粒子の成長が起り、クリーミングしたことが考えられる。一方、Fig.13に示すメチルオレート油滴の場合、オレイン酸の場合とは異なり、その体積分布からも小粒子の連続成長が確認される。すなわち、メチルオレートをはじめとする脂肪酸エステルの場合の微小油滴の成長は凝集・合一によるものであると考えられる。

### 3.4 別の油の共存による油滴の安定性の向上

また我々は、分散安定性が悪いベンゼンやテトラリン滴に、それ自身で分散安定性が極めて良い n-ヘキサデカンあるいはスクワランを少量添加すると、分散安定性が向上することを見出した<sup>12)</sup>。テトラリンにヘキサデカンを添加した場合の平均粒子径の経時変化を Fig.14 に示す。図から明らかなように、テトラリンのみの分散油滴は数十分程度で成長するが、ヘキサデカンを添加すると粒子径はほとんど変化しなくなった。油/水界面張力を測定したところ、テトラリン中のヘキサデカンの濃度が増加していくに従って増加することが分かった (Fig.15)。このことは、疎水性の高いヘキサデカンが油/水界面に配向していることを示し、あたかも界面活性剤のように作用していることがわかった。また、ベンゼンにヘキサデカンを少量添加した場合の目視による経時変化の観察結果を Fig.16 に示す。写真から明らかなように、ヘキサデカンを少量添加すると安定性が飛躍的に向上している。そこで、グリセロールトリ

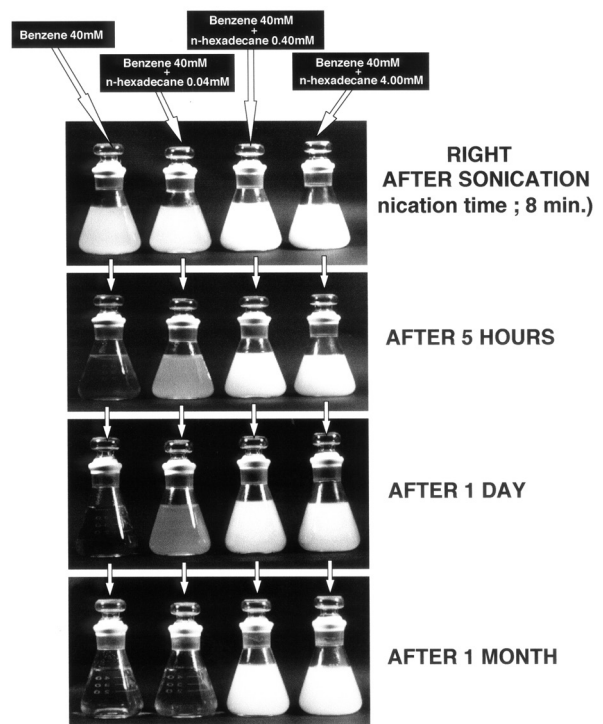


Figure16 Photographic recording of droplet stabilization for n-hexadecane/benzene mixture in water at 30°C .

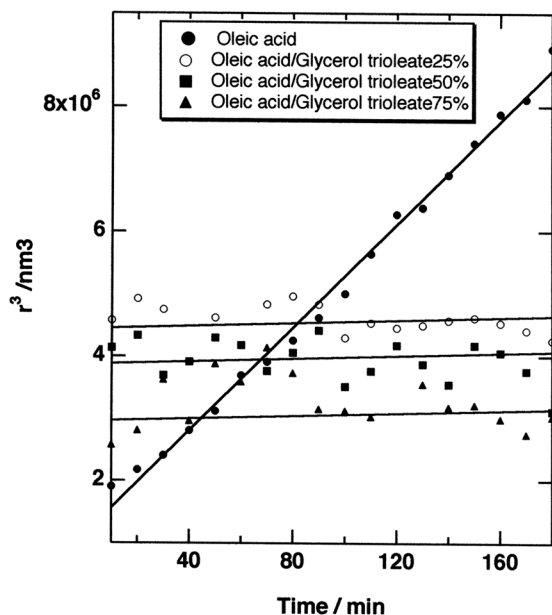


Figure 17 Plots of the cube of droplet size at various contents of glycerol trioleate as a function of time at 30°C. Oleic acid/glycerol trioleate=25% (○), 50% (■), 75% (▲), and 100% (●).

オレートにも同様な作用があるのか確かめてみた<sup>17)</sup>。Fig.17に示すように、少量のグリセロールトリオレートを添加することでオレイン酸の $\omega$ 値の経時変化に対する傾きは極端に小さくなった。この場合も、*n*-ヘキサデカンの場合と同様に、オレイン酸滴の表面近傍にグリセロールトリオレートが局在化し、油滴を安定化させているものと考えられる。

これまで述べてきたように、油単独、混合油のいずれの場合においても、長鎖かつ分岐を有する分子を用いた場合の方が水中における油滴の分散安定性は向上している。これは一見すると、疎水性／親水性のバランスから考えた場合には異常な現象に思われるが、実際には油／水界面に配向するとは考えにくい疎水性の高い油分子が油滴表面近傍に局在化することにより、短鎖炭化水素の分子拡散を抑制して粒子が安定化されているとみなせる。

#### 4. 総括

現時点までに得られた結果を整理すると、以下のようになる。

1. 界面活性剤が存在しない多量の水と少量の油からだけなる系に、超音波などを用いて強力な機械的な外力を印加すると、ある特定の時間範囲内でエマルション状態を維持できる。油の選択により1年以上も安定なサーファクタント・フリー・エマルションを調製できる。
2. 水中において生成する油滴の大きさは、通常言われている油と水との界面張力の値よりもむしろ油の粘性と密接に関係し、粘性が大きい油の方が生成する油滴の大き

さは小さくなる。

3. 水中において生成した油滴は必然的に経時変化して大きくなるが、そのプロセスには2通りある。一つは、水に対する溶解度をほとんど無視できる油を用いた場合に観察されるプロセスで連続的な成長である。二つ目は水に対する溶解度がある程度ある油、あるいは粘性の小さな油を用いた場合に観察されるプロセスで離散的に成長する。
4. これらの不安定な油滴に、粘性が大きく、かつ、相互溶解性のない油を少量添加すると、それらの粒子径は安定化されてあたかも粘性の高い油が界面活性剤のような振る舞いをして、言い換えれば、“油が油を乳化する”興味深い現象を引き起こす。

油そのものの物性を十分理解した上で、エマルションの調製を行うことは、界面活性剤の使用の低減など、現在、大きく取り上げられている環境問題の解決の糸口となるものと考えられる。

#### (参考文献)

- 1) Evans DF, Wenersrrom H.: THE COLLOIDAL DOMAIN SECOND EDITION: Wiley-VCH, Inc., New York, 1999.
- 2) McClements DJ, : Food Emulsions: Practice and Techniques: CRC Press, Boca Raton, FL, 1998.
- 3) Hunter RJ, : Foundations of Colloid Science: Vol. 1, Oxford University Press, Oxford, 1986.
- 4) Hiemenz PC, Rajagopalan R, : Principles of Colloid and Surface Chemistry, 3rd ed.: Marcel Dekker: New York.
- 5) Davis SS, Smith A, : Theory Practice Emulsion Technol: Academic Press, London, 1976.
- 6) Weiss J, McClements DJ, Langmuir, **16**, 2145, 2000.
- 7) Mukesh D, Das AK, Ghosh PK, Langmuir, **8**, 807, 1992.
- 8) Bolzinger-Thevenin MA, Grossiord JL, Poelman MC, Langmuir, **15**, 2307, 1999.
- 9) Strey R, Colloid and Polymer Science, **272**, 1005, 1994.
- 10) Bernheim-Groswasser A, Tlustý T, Safran SA, et al., Langmuir, **15**, 5448, 1999.
- 11) Kamogawa K, Sakai T, Momozawa N, Shimazaki, M., Enomura, M., Sakai, H., Abe, M., J. Jpn. Oil Chem. Soc., **47**, 159, 1998.
- 12) Kamogawa K, Matsumoto M, Kobayashi T, Sakai, T., Sakai, H., Abe, M., Langmuir, **15**, 1913, 1999.
- 13) Kamogawa K, Abe M, : Encyclopedia of Surface and Colloid Science: Marcel Dekker, New York, in press.

- 
- 14) 阿部正彦, フレグランスジャーナル, **1998**-8, 29, 1998.
  - 15) Sakai T, Kamogawa K, Harusawa F, Momozawa, N., Sakai, H., Abe, M., Langmuir, **17**, 255 (2001)
  - 16) 阿部正彦、機能性化粧品 III、鈴木正人監修、シーエムシー, 316-325, 2000.
  - 17) Kamogawa K, Akatsuka H, Matsumoto M, Yokoyama S., Sakai, T., Sakai, H., Abe, M., Colloids and Surfaces : Physicochemical and Engineering AspectsA, **180**, 41 (2001).
  - 18) Lifshitz IM, Vsevolod V, J. Phys. Chem. Solids, **19**, 35, 1961.
  - 19) Taylor P, Advances in Colloid and Interface Science, **75**, 107, 1998.
  - 20) Kabalnov AS, Langmuir, **10**, 680, 1994.

# 分子量および官能基を制御した新規キトサン系 活性剤の機能化に関する研究 —市販ペクチナーゼとその化学修飾酵素による N-アセチル化キトサンの加水分解に及ぼす N-アセチル化度の影響—

東京工業大学大学院 理工学研究科

梶 内 俊 夫

Three types of N-acetylated chitosans (NACs) with different degree of acetylation (DA) were prepared and used as a substrate for enzymatic hydrolysis with a commercially available pectinase and a modified one. Pectinase modification was conducted using polyalkyleneoxide-maleic anhydride copolymer (PEO-MA copolymer). The effects of DA on enzymatic reaction with native and modified pectinases were investigated experimentally. Initial hydrolysis rate and Michaelis-Menten kinetic parameters were measured by analysis of reducing sugars. DA of NAC strongly affected the hydrolytic characteristics of native and modified pectinases. N-acetylation of chitosan increased the initial hydrolysis rate and the enzyme-substrate affinity with respect to both pectinases; NACs with DA over 0.3 showed high initial hydrolysis rate and strong affinity between enzyme and substrate. Especially when NAC with DA over 0.3 was treated with modified pectinase, the affinity became much stronger than the native pectinase.

## 1. 緒 言

キトサンは甲殻類、昆虫、カビなどの外骨格に存在する天然多糖類キチンの脱アセチル化物である。キチン類は固体廃棄物として水産加工場などから得ることが出来る。

キトサンは D-グルコサミン (GlcN) と N-アセチル-D-グルコサミン (GlcNAc) の  $\beta$ -1,4-結合によって出来る直鎖状のヘテロ多糖類である。市販のキトサンは主にキチンの不均一系 N-脱アセチル化によって得られ、GlcNAc 含量は 0 から 0.3 程度であり、GlcNAc 残基はブロック状に分布している。このようなキトサンは酸性水溶液にのみ可溶であり、中性あるいは塩基性水溶液には溶解しない<sup>1)</sup>。

近年キトサン類は興味深い生理活性を多く持つことから注目を集めている。生理活性と重合度の関係からみると、低分子化キトサンはキトサン高分子に匹敵する生理活性を持つことが明らかになっている。さらに、キトサンの低分子化によってその水溶性は向上し、溶液粘度は低下する。このため、キトサンの低分子化によってキトサン類を広範な分野で応用可能にすることが期待されている。

酵素的加水分解はキトサンの低分子化を行う方法として期待されている。酵素的加水分解は化学的加水分解よりも通常穏和な条件で行われる。しかしながら、キトサンの酵素的加水分解は、キトサナーゼやキチナーゼなどの特異的酵素が高価であることから、工業的規模では利用されるに

至っていない。

近年、数種類の加水分解酵素、例えばリゾチーム、セルラーゼ、パパイン、リパーゼ、ペクチナーゼなどがキトサン高分子中のグリコシド結合を加水分解することが明らかになってきた<sup>2-4)</sup>。これらの酵素は現在工業的に広く利用されており、安価に利用することができる。さらに、我々はポリエチレンノキシド-無水マレイン酸共重合体 (PEO-MA) で化学修飾したペクチナーゼが高い熱安定性を有し、酵素とキトサンとの間の親和性が高いことを報告した<sup>5)</sup>。

本研究では、異なる N-アセチル化度 (DA) を持つ 3 種類の N-アセチル化キトサン (NAC) を用いて酵素的加水分解を行い、NAC の酵素的加水分解に及ぼす DA の影響を未修飾酵素および修飾酵素を用いた場合について明らかにした。

## 2. 実 験

### 2.1 実験材料

キトサン 10B (フナコシ (株)) を NAC を調製するために使用した。市販のペクチナーゼ (MERCK) を NAC の酵素的加水分解に使用した。ペクチナーゼの修飾剤として、日本油脂 (株) から提供していただいた PEO-MA を用いた。

### 2.2 NAC の調製

異なる DA を持つ NAC は Kubota 等の報告したキトサンの均一系 N-アセチル化法にしたがって行った<sup>6)</sup>。最終的に得られた NAC の DA は Hirai 等の報告した <sup>1</sup>H-NMR 法によって決定した<sup>7)</sup>。

### 2.3 ペクチナーゼの化学修飾

ペクチナーゼの化学修飾は、我々が以前報告した方法にしたがって行った<sup>5)</sup>。使用した PEO-MA の分子量は 15,000 であり、その構造を Fig. 1 に示した。本研究で使



Development of Novel Chitosan-based Surfactant with Controlled molecular weight and functional groups: Effect of N-Acetylation Degree on N-Acetylated Chitosan Hydrolysis with Commercially Available and Modified Pectinase

Toshio Kajiuchi

Graduate School of Science and Engineering,  
Tokyo Institute of Technology

用した PEO-MA 修飾ペクチナーゼの修飾率は 88%であった。

## 2.4 キトサンの酵素的加水分解

2.5g/L 酵素溶液(0.50mL)を 1w%キトサン溶液(0.50 mL)に加えることにより酵素反応を開始した。ただちに反応液を 40℃の恒温槽に移し、120rpm による振とうを行った。初期基質濃度および初期酵素濃度はそれぞれ 0.5w% および 1.25g/L とした。反応液の pH は 5.9 とした。反応開始から 2 時間後に 0.5mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  水溶液 (1mL) を反応液に添加し反応を停止させた後、生成還元糖を定量した。生成還元糖の定量は D-グルコサミンを標準物質として Schales 変法によって行った<sup>8)</sup>。

酵素反応速度論を求めるためには、初期 NAC 濃度( $S_0$ )を 0.5g/dm<sup>3</sup> から 5.0g/dm<sup>3</sup> の間で変化させて、初期加水分解速度 ( $v_0$ ) の測定を行った。ミカエリス定数 ( $K_m$ ) と最大速度 ( $V_m$ ) の値は  $S_0/v_0$  対  $S_0$  プロットの勾配 ( $V_m^{-1}$ ) と切片 ( $K_m/V_m$ ) より求めた。

## 3. 結果と考察

### 3.1 調製した NAC の DA

NAC の DA と N-アセチル基の分布はキトサンの溶液物性に著しい影響を及ぼす<sup>6, 9)</sup>。これによって NAC の酵素的加水分解も影響を受けることが予想される。本実験ではキトサンの N-アセチル化を均一系で行った。したがって、N-アセチル基はキトサン分子鎖中でランダムに分布

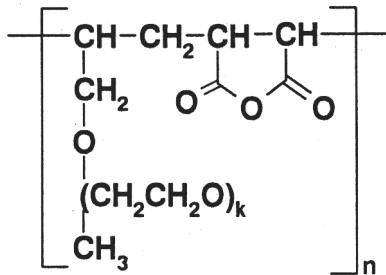


Fig.1 Structure of polyethyleneoxide-maleic anhydride copolymer.

Table 1 Characteristics of N-acetylated chitosans prepared under homogeneous condition.

Rm* [-]	DA** [-]	Solubility***
0	0.022	soluble
2.06	0.153	soluble
6.17	0.328	soluble
25.7	0.540	soluble

\*) Rm, Molar ratio of acetic anhydride to D-glucosamine unit in Chitosan 10 B.

\*\*) DA, Degree of N-acetylation, was determined by <sup>1</sup>H-NMR method.

\*\*\*) Solubility, Solubility in acetate buffer (pH 5.9)

しているものと考えられる。NAC の DA の調整は添加する無水酢酸の量を変化させることによって行った。得られた NAC の DA を Table 1 に示す。すべての NAC は酵素反応に使用する酢酸緩衝液に溶解した。

### 3.2 異なる DA を持つ NAC の初期加水分解速度

ヘテロ多糖類としてのキトサンに作用する酵素は 2 種類に分類することができる。一つは GlcN 還元末端での加水分解を触媒するキトサナーゼ型の酵素であり、もう一つは GlcNAc 還元末端での加水分解を触媒するキチナーゼ型の酵素である。このように DA はキトサンに対する酵素の作用において重要な役割を果たす。キトサナーゼの場合は DA の増加とともに初期活性は増大する<sup>10)</sup>。キチナーゼの場合は DA の増加とともに初期活性は減少する<sup>11, 12)</sup>。

本実験では酵素反応を 40℃, pH5.9 の条件下でキトサンの均一溶液を用いて行った。Fig. 2 に NAC の DA と初期加水分解速度の関係を示す。未修飾酵素を用いた場合には、キトサン 10B (DA = 0.022) の初期加水分解速度はほとんど 0 であったが、DA = 0.3 までの範囲では DA の増大とともに初期加水分解速度は増大した。DA = 0.3 以上では初期加水分解速度は変化しなかった。この結果は未修飾酵素が NAC 分子中の GlcNAc 残基を認識していることを示している。また、キトサンの N-アセチル化によってペクチナーゼによる初期加水分解速度を増大させることがわかった。

修飾酵素の場合には、DA の値にかかわらず未修飾酵素より初期加水分解速度は若干低くなった。これは PEO-MA 共重合体による酵素の化学修飾によって、部分的に酵素活性が失われたためと考えられる。一方、修飾酵素の場合も、DA の増大とともに初期加水分解速度は増大しており、修飾酵素も NAC の GlcNAc 残基を認識していることがわかった。

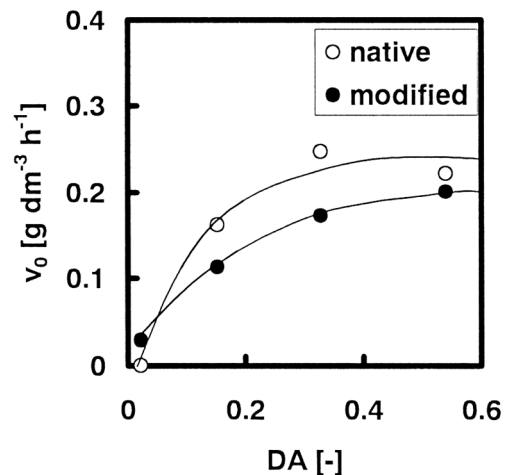


Fig.2 Effect of DA on  $v_0$ . Open and closed circles show the  $v_0$  value of native and modified pectinases, respectively.

### 3.3 速度論量に及ぼすDAおよび酵素の化学修飾の影響

基質のDAによって酵素と基質との間の親和性が変化することが予想される。そこで初期基質濃度 ( $S_0$ ) を  $5.0 \text{ g/dm}^3$  から  $5.0 \text{ g/dm}^3$  の範囲で変化させて、初期加水分解速度 ( $v_0$ ) を測定し、速度論量  $K_m$  と  $V_m$  を  $S_0/v_0$  対  $S_0$  プロットより求めた (Fig. 3)。

$K_m$  と基質のDAの関係を Fig. 4 に示す。 $K_m$  値は酵素とNACとの間の親和性を表す指標と考えることが出来る。未修飾酵素を用いた場合、NACのDAが高いほど  $K_m$  値は小さくなり、酵素とNACとの間の親和性が增大した。この結果から、未修飾酵素によるNACの加水分解はGlcNAc残基を認識することによって起こることがわかった。

PEO-MAによるペクチナーゼの化学修飾によって酵素

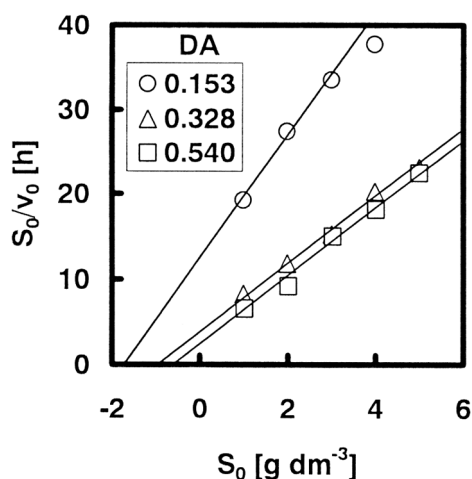


Fig. 3 Examples of  $S_0/v_0$  versus  $S_0$  plots for the determination of kinetic parameters. Open circle, triangle and square mean the data of NACs with DA of 0.153, 0.328 and 0.540, respectively, used as substrate. Enzyme, native pectinase.

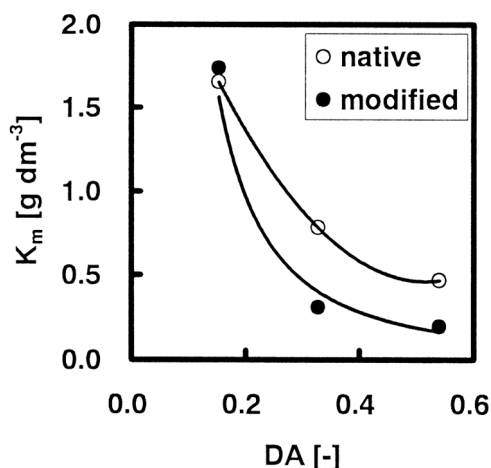


Fig. 4 Relationship between  $K_m$  and DA. Open and closed circle show the  $K_m$  value of native and modified pectinases, respectively.

と基質の親和性が変化することが予想される。Fig. 4 に示したように、DA = 0.15 のNACに対しては酵素を化学修飾した場合も  $K_m$  値は変化しなかった。一方、DA = 0.3 以上のNACに対しては酵素を化学修飾した場合には  $K_m$  値は著しく低下し、酵素と基質との親和性が高まることがわかった。このような修飾酵素と基質の親和性が增大する理由として、疎水的相互作用、静電的相互作用、水素結合などにより酵素表面の微小環境が変化したことが考えられる<sup>13)</sup>。

$V_m$  とDAの関係を Fig. 5 に示す。未修飾酵素、修飾酵素どちらの場合も、DAが0から0.3の範囲ではDAの増加とともに  $V_m$  値は増大し、DAが0.3以上では  $V_m$  値は変化しなかった。

## 4. 総括

未修飾ペクチナーゼおよび修飾ペクチナーゼを用いて異なるDAを持つNACの加水分解を行った。実験結果から、どちらの酵素の場合もNACのDAによって加水分解特性が影響を受けることが明らかになった。さらに、修飾酵素を用いた場合には未修飾酵素とは異なる加水分解特性を示した。

未修飾酵素を使用した場合、DAが0.3までの範囲ではDAの増加とともに初期加水分解速度は増大し、DAが0.3以上の範囲では初期加水分解速度は変化しなかった。一方、修飾酵素を使用した場合、DAが0.5までの範囲でDAの増加とともに初期加水分解速度は増大した。また、修飾酵素の初期加水分解速度は未修飾酵素より若干低い値であった。

未修飾酵素および修飾酵素によるNAC加水分解における  $K_m$  値はどちらの場合もDAの増加とともに減少した。すなわち、DAの増加とともにNACと酵素の親和性が增大することがわかった。DAが0.3以上の範囲では修飾酵素は未修飾酵素より低い  $K_m$  値を示した。これによって、

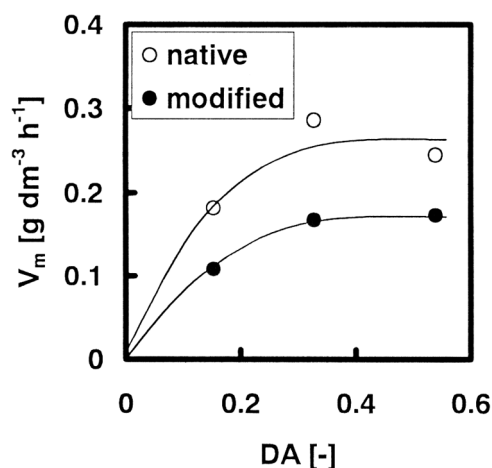


Fig. 5 Relationship between  $V_m$  and DA. Open and closed circle show the  $V_m$  value of native and modified pectinases, respectively.

---

ペクチナーゼの PEO-MA による化学修飾が酵素と NAC の親和性を向上させる働きがあることが明らかになった。

なお、本研究の成果は *Biochemical Engineering Journal*, 7, 85-88 (2001) に報告した。

**(引用文献)**

- 1) K.M. Varum, M.H. Ottoy, O. Smidsrod, *Carbohydr. Polym.* 25 (1994) 65-70
- 2) D. Pantaleone, M. Yalpani, M. Scollar, *Carbohydr. Res.* 237 (1992) 325-332
- 3) R.A.A. Muzzarelli, W. Xia, M. Tomasetti, P. Ilari, *Enzyme Microb. Technol.* 17 (1995) 541-545
- 4) M. Yalpani, D. Pantaleone, *Carbohydr. Res.* 256 (1994) 159-175
- 5) Y. Shin-ya, T. Kajiuchi, H. Hinode, J.W. Park, *J. Chem. Eng. Japan* 31 (1998) 930-935
- 6) N. Kubota, Y. Eguchi, *Polym. J.* 29 (1997) 123-127
- 7) A. Hirai, H. Odani, A. Nakajima, *Polym. Bull.* 26, (1991) 87-94
- 8) T. Imoto, K. Yagishita, *Agr. Biol. Chem.* 35 (1971) 1154-1156
- 9) M.W. Anthonsen, K. M. Varum, O. Smidsrod, *Carbohydr. Polym.* 22 (1993) 193-201
- 10) N. Hutadilok, T. Mochimasu, H. Hisamori, K. Hayashi, H. Tachibana, T. Ishii, S. Hirano, *Carbohydr. Res.* 268 (1995) 143-149
- 11) S. Hirano, H. Tsuchida, N. Nagao, *Biomaterials* 10 (1989) 574-576
- 12) S. Aiba, *Int. J. Biol. Macromol.* 15 (1993) 1-5
- 13) H.F. Gaertner, A.J. Puigserver, *Enzyme Microb. Technol.* 14 (1992) 150-155

## **Ⅱ. 生体作用、安全性に関する分野**

# 日光老化について —とくに日光弾性線維症の発症機構 ならびに UV<sup>s</sup> 症候群の病態に関する研究—

熊本大学 医学部皮膚科

小野 友道

Long-term incubation of proteins with glucose leads to the formation of advanced glycation end products (AGEs), which are characterized by fluorescence, brown color, and cross-linking. AGEs are thought to be involved in aging and age-enhanced diseases. Chronic exposure of the skin to sunlight induces hyperplasia of the elastic tissue in the upper dermis known as actinic elastosis.

Herein we used a monoclonal anti-AGE antibody (6D12) and a rabbit polyclonal anti-AGE antibody, which are shown to recognize N $\epsilon$ -(carboxymethyl)lysine (CML) as those epitope. Fifty-seven skin samples of sun-exposed and -unexposed areas were obtained from 51 patients aged 9–100 years. Immunohistochemically, CML deposition was observed in the elastic materials from all these specimens showing actinic elastosis with marked elastic-tissue changes. In contrast, CML deposition was not found in the specimens from sun-unexposed areas without significant actinic elastosis. Immunoelectron microscopic examination demonstrated that CML accumulated predominantly in elastic fibers especially in the amorphous electron-dense materials corresponding to photo-induced degenerated area rather than the electron-lucent region. Immunochemical analyses with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of elastase-soluble fractions demonstrated that the CML levels of the sun-exposed area were significantly higher than those of the sun-exposed area.

These results indicate that elastin in actinic elastosis lesions of photoaged skin is modified by CML which has been proposed as a potential biomarker of oxidative damage of tissue proteins *in vivo*. Although it is not clear whether AGE accumulation in the skin *per se* is a cause of the disease or simply its effect, it could at least serve as a biomarker for the duration and severity of oxidative damage to the skin *in vivo*. To support this idea, further studies are needed to elucidate direct effects of UV irradiation on the formation of AGEs *in vivo* and *in vitro*.

## 1. 緒言

太陽から限り無い恩恵を享受され、その太陽を神と崇めて来たヒトが、太陽の陰の部分に認識しはじめたのはそう古い話ではない。1970年代のオゾン層の破壊と皮膚がんの関連が指摘され、急速に紫外線による皮膚への障害が注目を浴びたのである。我々はこの紫外線の皮膚への影響を、二つの観点に焦点を当てて研究を進めている。すなわち慢性日光障害としての日光弾性線維症の発症機構、そして遺伝性日光過敏性疾患の発症解明と診断システムの開発である。

日光弾性線維症については、皮膚真皮の弾性線維の変化が主体であるが、その変性にメイラード反応が関与する事を我々ははじめて明らかにした<sup>1)</sup>。すなわち、メイラード反応後期反応生成物 (AGE: Advanced Glycation Endproducts) の弾性線維への沈着を確認し、現在種々の抗 AGE 抗体を作成し<sup>2)</sup>、その詳細を検討している。また後者に関しては、新しい疾患概念 UV<sup>s</sup> 症候群を確立し、また遺伝性日光過敏性疾患診断フローチャートの作成を試みている。



Photoaging – Studies on the pathogenesis of actinic elastosis and the diagnostic method for UV<sup>s</sup> syndrome –

Tomomichi Ono

Department of Dermatology, Kumamoto University School of Medicine

今回は日光弾性線維症の発症機作について検討する。

## 2. 実験

### 2.1 日光弾性線維症について

#### 2.1.1 材料および方法

腫瘍などの外科的に切除された皮膚の周辺正常部を、ホルマリン固定ならびに  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存された 9 歳から 100 歳の 51 名 57 件体を用いた。免疫組織学的検索に用いた抗体は堀内らが開発した抗 AGE ポリクローナル抗体<sup>3)</sup>、抗 CML 抗体 (6D12)<sup>4)</sup> を用いた。

免疫組織学的観察：凍結切片を用いて AGE の存在および分布を検索した。新鮮凍結組織に凍結組織包埋剤 (OCT-compound, TISSUE-TEK 社) を加えた後、クリオスタットで、 $6\mu\text{m}$  に薄切し、gelatin-coated glass slide に貼付、室温で 2–4 時間風乾した。その後  $4^{\circ}\text{C}$  アセトンで 10 分固定、メタノール処理後 3% 過酸化水素水に 10 分浸し、内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックした。PBS で 10 分間、3 回洗浄後、一次抗体として 5% ウマ血清アルブミンを含んだ PBS で 1000 倍に希釈した CML (carboxymethyl lysine protein) をエピトープとした polyclonal、および monoclonal anti-AGE antibody、および 4000 倍に希釈した mono-clonal anti-bovine alpha-elastin antibody (Elastin Product Company) を用いて、 $4^{\circ}\text{C}$  で一昼夜反応させた。次に PBS で 10 分間、3 回洗浄後ビオチン化抗マウス IgG、抗体にて 30 分間反応させた。さらに PBS で 5 分間 3 回洗浄後 avidin-biotinylated peroxidase complex (Vectastain

社)にて45分間反応させた。DAB・H202にて発色、Hematoxylinで核染色を行い脱水封入した。対照試験には monoclonal anti-AGE antibody を AGE-BSA で吸収して用いる吸収試験を行った。

電顕観察：通常電顕用は Karnovsky 液で前固定、PB 洗浄後2%オスミウム酸で固定した。エタノール系列で脱水、Epon812で包埋した。薄切後クエン酸鉛と酢酸ウラニウムで二重染色および一部の切片についてはタンニン酸染色を行った。免疫電顕用には post-embedding 法を用いた。LR White resin 包埋後超薄切片を、金コロイド法で、抗 CML 抗体を 15nm, 抗エラスチン抗体には 6nm で標識した。

動物実験：ヘアレスマウス (Hos:Hr-1, 雄, 試験開始時 7週齢) を用いた。紫外線照射はタイマーを用いて 8:00 ~ 20時の間、15週、30週および45週毎日照射した。紫外線強度は紫外線照度計 (UVR 305/365 D II, TOPCON 製) で一ヶ月ごとに補正した。肉眼的観察、病理組織学および免疫組織学的検討を行った。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 背景

紫外線は長波長 (320–400nm)、中波長 (290–320nm) および短波長に区分されている。それぞれ UVA、UVB として UVC と略記される。UVC はオゾン層が破壊されなければ地上に届くことはない。一方、UVA はその地表への到達量は UVB の 10 倍以上である。幸い UVA の光生物学的効果は UVB の 1/1000 とみなされている。つまり UVA は安全な紫外線と思われて来たのである。小麦色に焼けた肌が健康のシンボルとされていたのである。いわゆる「日焼けサロン」はその一つの現象である。しかし、最近 UVA の皮膚への影響が注目され始めている。一つは UVB との相乗的に作用し、それは日光発がんに関係すること。もう一方で UVA が真皮深く到達するために、線維芽細胞にまでその影響をおよぼし、光老化のフリーラジカル説からも、その影響を無視できないことである。さらに高齢社会の今日、日光老化による発がんと皮膚の老化が社会生活において、その QOL を著しく低下させていることが認識されねばならない。

我々はこのような観点から、日光老化、なかんずくそのもっとも顕著な病理学的変化である「日光弾性線維症」のについて検討している。

さて、日光弾性線維症は病理組織学的に真皮網状層に好塩基性に染まる彎曲・ちじれ・膨化した線維として観察される。高度になるとそれは一塊となり、無均質な塊状物質として観察される。この断列した線維あるいは塊は、1) 光顕的に弾性線維染色陽性、2) 抗エラスチン抗体陽性、3) 弾性線維周囲 micro-fibril を認識する抗 amyloid P com-

ponent 抗体<sup>5)</sup>ならびに抗 HB-8 抗体陽性<sup>6)</sup>、4) 電顕的に弾性線維構造を示す部分があること、また酸オルセイン染色陽性であることなどから本物質が弾性線維由来であることが示唆され、elastotic material とも呼ばれている。その産生機序として、既存の弾線維の変性あるいは紫外線の影響で変化した線維芽細胞が異常な弾性線維前駆物質分泌により、異常な弾性線維形成などの説<sup>7)</sup>がある。また elastotic material がその増加が顕著なのは、lysozyme による elastase の分解抑制がおこるとの説<sup>8)</sup>もある。いずれにせよ elastotic material 形成の機序は全く不明である。

#### 3.2 日光弾性線維症とメイラード反応後期生成物 (AGE)

##### 3.2.1 メイラード反応後期生成物 (advanced glycation endproducts, AGE) について<sup>9)</sup>

多くの蛋白質が生体内で非酵素学的修飾、メイラード (Maillard) 反応を受ける。この反応は古く 1912 年 Maillard<sup>10)</sup> が、アミノ酸と還元糖を加熱すると黄褐色色素が生成されることを発見したことから始まる。蛋白質のアミノ酸と還元糖のカルボニル基とが反応し、シッフ塩基、さらにアマドリ転位生成物を形成する前期反応と、これらの前期反応生成物がさらに酸化、脱水、縮合、環状化などの反応を経由して、メイラード反応後期生成物 (advanced glycation end-products, AGE) にいたる後期反応がある。すなわち、AGE は蛋白質の非酵素的糖付加反応によって不可逆的に生成された構造の総称である。現在迄に明らかにされてきた AGE 構造体は、CML (カルボキシメチルリジン)、ピラリン、ペントシジン、クロスリン、X1、ピロピリジンなどである。当初、本反応は食品化学領域で重視されてきた。しかし、1960 年代に入りアマドリ転位生成物としてのヘモグロビン A1c が血糖コントロールの指標として応用されるようになり、生体でのメイラード反応が注目されるようになった。すなわち、老化あるいは粥状動脈硬化症、糖尿病などとの関連が知られて来た。特に CML 形成において、酸化が重要な意義を有することが明らかとなるにつれ、CML が glycoxidation products (GOP) として提唱され、生体蛋白質の糖化および酸化を反映する指標となることが示唆されて来た。CMLs はその産生過程で、活性酸素が産生され、それが生体分子を損傷し、またさらに AGE 形成を促進したりするのである。

##### 3.2.2 日光弾性線維症における AGE 局在

電顕・免疫組織学的レベルでの局在：我々は堀内らが作成したポリクローナルおよびモノクローナル抗 AGE 抗体 (6D12, CML をエピトープ) を用いて、日光弾性線維症病変部に AGE が局在することを免疫組織学的に確認した。そして、抗エラスチン抗体局在部とその沈着がほぼ一致す

ることを共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。すなわち9歳から100歳までの51人からの露光部あるいは非露光部皮膚57検体を材料として検討を行った。HE染色で明らかに日光弾性線維症の所見を認めた28検体は53歳以上であったが、それらはいずれも凍結切片で免疫組織学的に、病変部に一致してCML陽性であった(図1)。28歳から42歳の5検体においては、HE染色にて明らかな日光弾性線維症所見は見られなかったが、免疫組織学的に僅かに線状にCML陽性が認められた。10代4検体では完全に陰性であった。非露光部20検体は年齢に関わらずHE染色で陰性であった。免疫組織学的には2例で僅かな陽性を呈した。さらに皮膚組織内におけるCMLの存在を確認するために、薄切した凍結組織をエラスターゼで消化後、エラスターゼ可溶性分画をCMLを用いたELISA法で測定した。71歳から91歳の5例の、それぞれの露光部および非露光部皮膚での比較では全例露光部の値が非露光部より高値を示した。また露光部あるいは非露光部の一方から採取され

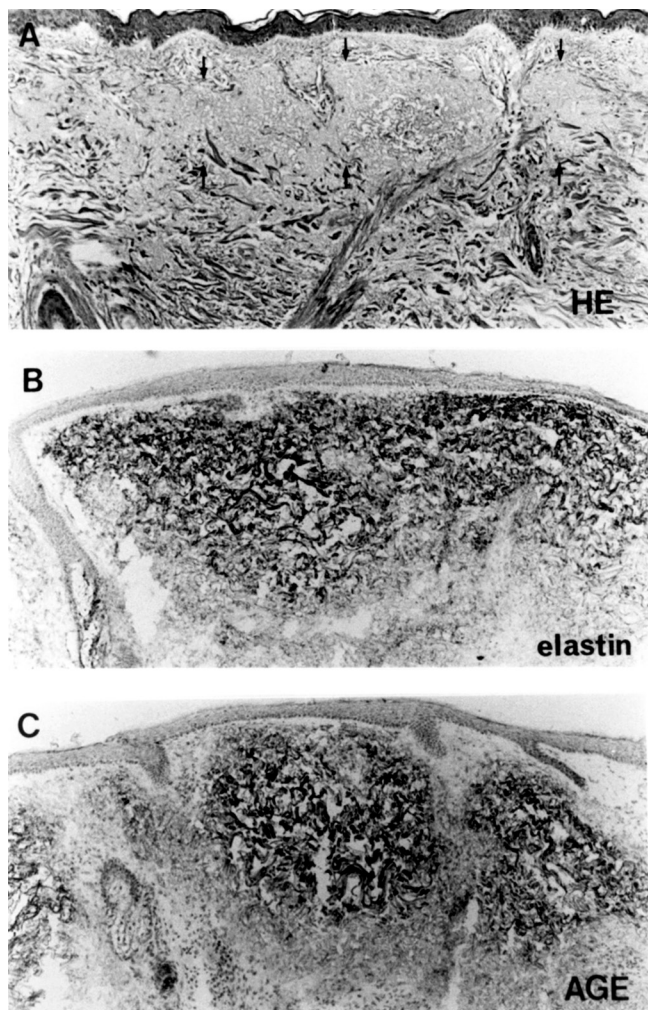


図1 日光弾性線維症： A) HE；真皮に好塩基性に染色される塊状の物質(←)が認められる、 B) 抗elastin抗体での免疫染色；日光弾性線維症部に一致して陽性、 C) 抗CML抗体での免疫染色；日光弾性線維症部に一致して陽性

た13検における群間比較でも、露光部に優りにCMLレベルは高いことが判明した。

免疫電顕レベルでの局在：通常日光老化部の真皮に観察される高電子密度部の増加した弾性線維においては、エラスチンを示す6nm金粒子は弾性線維低電子密度部に限局する傾向がみられた(図2)。一方、CMLの局在を示す15nm金粒子は高電子密度部に存在した。なお同一症例の非露光部弾性線維には、高電子密度部がほとんど観察されず、CMLの局在も認められなかった。

なお、電顕的にも明確に弾性線維と断定できない amorphous material には、CMLがエラスチンと混在して認められた。一方、コラーゲン線維には明らかなCMLの局在は確認できなかった。

以上の結果から日光老化皮膚に認められる日光弾性線維症病変部の elastotic material は弾性線維がCMLの修飾を受けていること、日光により変化した弾性線維の高電子密度部の発現にはCMLが関与していることが明らかにされたと考えている。

マウスにおける日光老化とAGE: UVA,UVBおよびUVA+UVB照射をそれぞれ5匹ずつ行った。UVA+UVB群が肉眼的に顕著なしわ、皮膚肥厚がみられ、日光老化の所見を呈したが、それでもヒトにみられる日光弾性線維症は確認できなかった。また免疫組織学的にもAGEの局在は確認できなかった。

### 3.3 今後の展望

前述したようにAGE, なくなくCMLの生成には酸化過程は活性酸素産生をともなうことが明らかになって来た。このことは日光老化が紫外線誘発の酸化ストレスと深く関



図2 日光弾性線維症；二重免疫染色電顕像：弾性線維の高電子密度部に一致して15nmの金粒子(←)が存在し、CMLの局在を示す。また6nm金粒(◄)は低電子密度部に認められるエラスチンの局在を示す(Bar:100nm)

わっていることの傍証にもなる。この点で我々の研究は日光老化のきわめて重要なポイントを捉えている可能性が強い。

今後、他の AGE, たとえばペントシジンなどについても検討を予定しているが、我々は光顕レベルではやはり日光弾性線維症部にその局在していることを確認している。なお、我々の観察ではコラーゲ線維には CML は確認されなかった。その理由が判明すると、さらに日光老化の解明が進むと考えている。またマウスでの実験で日光弾性線維症が発症しにくいことの原因を解明することも、動物側の因子のみならず、日光弾性線維症の発症に紫外線のみならず、他の日光成分の影響も含めて検討されねばならないと考えている。

(文 献)

- 1) Mizutani K, Ono T, Ikeda K, et al. : Photo-enhanced modification of human skin elastin in actinic elastosis by N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine, one of the glycoxidation products of the Maillard reaction, *J. Invest. Dermatol.*, 108, 797-802, 1997.
- 2) Itoh T, Fujiwara Y, Ono T, et al. : UV<sup>S</sup> syndrome, a new general category of photosensitive disorder with defective DNA repair. Is distinct from xeroderma pigmentosum variant and rodent complementation group 1, *Am. J. Hum. Genet.*, 56, 1267-1276, 1995.
- 3) Horiuchi S, Araki N, Morino Y, : Immunochemical approach to characterize advanced glycation end products of the Maillard reaction ; evidence for the presence of a common structure, *J. Biol. Chem.*, 266, 7329-7332, 1991.
- 4) Ikeda K, Higashi T, Sano H, et al. : N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine protein adduct is a major immunological epitope in proteins modified with advanced glycation end products of the Maillard reaction, *Biochemistry*, 35, 8075-8083, 1996.
- 5) Mera SL, Lovell CR, Jones RR, et al. : Elastic fibers in normal and sun-damaged skin; an immunohistochemical study, *Br. J. Dermatol.*, 117, 21-27, 1987.
- 6) Matsuta M, Izaki S, Ide C, et al. : Light and electron microscopic immunohistochemistry of solar elastosis; a study with cutis rhomboidalis nuchae, *J. Dermatol.*, 14, 364-374, 1987.
- 7) Bouissou H, Pieraggi MT, Julian M, et al. : The elastic tissue of the skin, a comparison of spontaneous and actinic (solar) aging, *Int. J. Dermatol.*, 27, 327-335, 1988.
- 8) Albrecht S, From L, Kahn HJ, : Lysozyme in abnormal dermal elastic fibers of cutaneous aging, solar elastosis and pseudo-xanthoma elasticum, *J. Cutan. Pathol.*, 18, 75-80, 1991.
- 9) Horiuchi S, : Advanced glycation end products (AGE)-modified proteins and their potential relevance to atherosclerosis, *Trends Cardiovasc. Med.*, 8, 163, 1996.
- 10) Maillard LC, : Action des acides amines sur les sucres ; formation des melanoïdines par voie méthodique, *CR. Acad. Sci. (Paris)*, 154, 66-68, 1912.

# 紫外線ならびに放射線により皮膚で惹起されるラジカル反応の無侵襲測定と皮膚障害予防を目的とした抗酸化剤評価への応用

放射線医学総合研究所

小澤 俊彦、竹下 啓蔵

There have been little reports about direct evidence of generation of free radicals including oxygen radicals during exposure to ultraviolet (UV) light, although free radicals may be involved in various injuries caused by UV light. In this study, generation mechanism of oxygen radicals during photodynamic reaction was examined precisely with *in vitro* spin trapping technique, and then induction of radical reaction in skin of living mouse was examined under UV light by using *in vivo* electron spin resonance (ESR) spectroscopy. ESR signal of hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ) adduct of spin trapping agent, DMPO, formed during uroporphyrin photosensitization increased in the presence of NADPH. This increase was suppressed by addition of scavengers of  $\cdot\text{OH}$  and singlet oxygen ( $^1\text{O}_2$ ), and enhanced in deuterated solvent. The appearance of  $^1\text{O}_2$ , as determined by the oxidation of TEMPD, was delayed with an increase in the concentration of NADPH, while the production of  $\cdot\text{OH}$  was upregulated. Addition of  $\text{H}_2\text{O}_2$  did not increase the signal. These results suggest that the  $\cdot\text{OH}$  was produced  $^1\text{O}_2$ -dependently, and that its production involves neither superoxide anion radical nor  $\text{H}_2\text{O}_2$ . An aqueous solution of carbamoyl-PROXYL was injected intravenously as a redox probe to an anesthetized mouse, and ESR spectrum of the probe was measured at the dorsal region of hair-removed ddY mice and hairless mice using an L-band ESR spectrometer with a surface-coil-type resonator. The rate of signal decay increased during irradiation of UV light. The increase was statistically significant. The increase of signal decay rate was suppressed by pre-administration of spin trapping agent, PBN, while PBN did not change the decay rate of non-irradiated mouse. These observations suggest that the estimation of radical generation under UV-irradiation may be possible by using *in vivo* ESR spectroscopy with a nitroxyl redox probe./

## 1. 緒言

太陽光に含まれ地上にまで達する紫外線は UVA (320-400nm) と UVB (280-320nm) で、これらの過剰の曝露は皮膚に日焼け、炎症、老化、免疫抑制、発がんなどを起こす。最近の研究では、これら障害の一因として生体構成成分(核酸、脂質、タンパク質)の酸化や、ある種の遺伝子発現の促進による細胞内シグナル伝達の変化が関係していることがわかってきている<sup>1-4)</sup>。さらに、紫外線照射による生体構成成分の酸化が活性酸素消去剤により抑制されることや生体内抗酸化物質の量の変動すること、培養細胞系や切除皮膚の紫外線照射でスピントラップ-ESR法により酸素ラジカルが確認されたことなどから、紫外線照射により活性酸素やフリーラジカルが生成することが示唆されている<sup>1,2,5-7)</sup>。また、電離放射線についても皮膚がんなどを発生させ、また、*in vitro*の実験では水の電離分解によりヒドロキシルラジカル( $\cdot\text{OH}$ )などの活性酸素を生じさせることが古くから知られている。活性酸素・フリーラジカルは遺伝子の損傷や転写調節に関与することが培養細胞を用いた実験等で示唆されていることから、紫外線・電離放射線による細胞内シグナル伝達に活性酸素・フリーラジ

カルが関わっていることが十分考えられる。

最近、UVA照射によりウミホタル・ルシフェリンアナログ(CLA)を塗布したマウス皮膚で発光が起こることが報告された<sup>8)</sup>。CLAはスーパーオキシドラジカル( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )や一重項酸素( $^1\text{O}_2$ )に特異的に反応すると考えられていることから、これは活性酸素生成を比較的特異的に、しかも非侵襲的に検出した最初の報告である。しかし、この場合発光は紫外線照射をやめた直後から増加し始め、照射中に生きた動物皮膚でどのような活性酸素あるいはラジカルが生成されているかは不明である。

本研究では、まずウロポルフィリン光増感反応による $^1\text{O}_2$ 発生系を利用して $^1\text{O}_2$ がNADPH等の存在で強力な酸素ラジカルである $\cdot\text{OH}$ に変換されることを*in vitro*で示した。さらに、生体内ラジカル反応の無侵襲測定が可能な生体計測ESR(電子スピン共鳴)と試料表面のラジカル検出に最適なサーフェイスコイル型検出器を組み合わせ、生きた動物皮膚において紫外線等により惹起されるラジカル反応を解析した。

## 2. 実験

### 2.1 *In vitro*の光増感反応における活性酸素の測定

酸素ラジカルの生成は5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide(DMPO)を用いたスピントラップ法によるDMPO付加体の生成により、また $^1\text{O}_2$ の生成はTEMPDの酸化による2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidone-N-oxyl(TEMPO)の生成により調べた。ウロポルフィリン(UP)とDMPOあるいはTEMPDを含み20mMリン酸緩衝液(pH7.4)で調製した試料溶液をESR測定用の石英製フラットセルに入れ、室



Non-invasive measurement of radical reactions in skin induced by UV and ionizing radiation and its application to evaluation of antioxidants for protection of skin injury.

Toshihiko Ozawa, Keizo Takeshita  
\*  
National Institute of Radiological Sciences

温で可視光線を照射し、X-バンド ESR (JEOL JES RE-1X) で測定した。過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) は Frew らの方法<sup>9)</sup> で測定した。この方法では  $H_2O_2$  は 4-aminoantipyrine および phenol と反応し、505nm に吸収極大をもつ quinoneimine chromogen を生成する。いずれも、可視光源として反射板と集光レンズを装備したタングステンランプを用いた。光照射はスピントラップ法では  $0.7W/m^2$  で、 $H_2O_2$  の定量には  $10W/cm^2$  で行った (SL021/FQI 検出器を装着した IL 1400 A 光量計 (International Light, Inc.) による計測)。

## 2.2 紫外線照射によるラジカル生成の *in vivo* 検出

除毛した ddY 系マウス (雄性, 4 週齢) あるいはヘアレスマウス (雄, 5 週齢) をペントバルビタールナトリウムで麻酔し、ESR マグネットの間にうつ伏せに固定した。尾静脈より 3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolidine-N-oxyl (carbamoyl-PROXYL) 水溶液 (280mM, 60 $\mu$ L) を投与し、直ちにサーフェイスコイル型共振器を背部皮膚に当てて ESR を測定した。ESR 測定装置は、直径 5mm の電子同調サーフェイスコイル型共振器<sup>10,11)</sup> 並びに磁場変調コイルを日本電子製 L-バンド ESR 測定装置に接続して用いた。紫外線照射はマウスの照射部以外の部位をアル

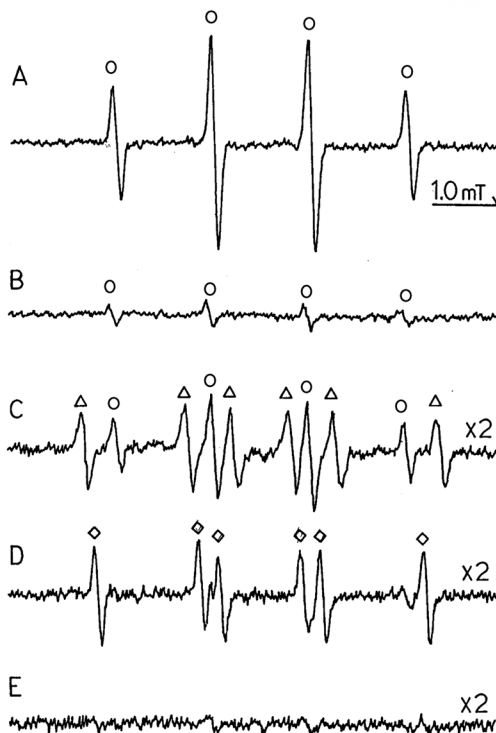


図1 UP 光増感反応で生成した DMPO 付加体の ESR スペクトル (A) UP+NADPH+DMPO 2 分間照射, (B) UP+DMPO 2 分間照射, (C) UP+NADPH+DMPO+ エタノール 2 分間照射, (D) UP+NADPH+DMPO+ ぎ酸ナトリウム 2 分間照射, (E) UP+NADPH+DMPO+ アジ化ナトリウム 2 分間照射, (○) DMPO の  $\cdot$ OH 付加体, ( $\Delta$ ) DMPO の  $\cdot$ CH(OH)CH<sub>3</sub> 付加体, ( $\diamond$ ) DMPO の  $\cdot$ CO<sub>2</sub><sup>-</sup> 付加体。

ミ箔で覆った後、マウスの上方からラジカルリサーチ社製 RUVF-203S 型紫外線照射装置に 290nm カットフィルターを装着して行った。この装置は光源に水銀キセノンランプを用いており、365nm、410nm 及び 435nm にピークを持つ。

## 3. 結果

### 3.1 $^1O_2$ 依存的酸素ラジカルの生成

#### 3.1.1 NADPH 存在下の $\cdot$ OH の生成

UP を NADPH と DMPO の存在下光照射したところ、4 本線の ESR スペクトルが観測された (図 1A)。このスペクトルはピーク比 (1:2:2:1) と超微細分裂定数 ( $a^N=a^H=1.49mT$ ) から、DMPO の  $\cdot$ OH 付加体 (DMPO-OH) のスペクトルと同等された。このスペクトルのシグナル強度は NADPH を省いたときには小さく (図 1B)、また暗所に同じ時間おいたときにはシグナルが検出されなかった。この反応系にエタノールあるいはぎ酸ナトリウムを存在させたところ、DMPO-OH のシグナルは小さくなり、代わりに DMPO の  $\cdot$ CH(OH)CH<sub>3</sub> 付加体 ( $a^N=1.59mT$ ,  $a^H=2.29mT$ ) あるいは  $\cdot$ CO<sub>2</sub><sup>-</sup> 付加体 ( $a^N=1.57mT$ ,  $a^H=1.87mT$ ) に由来する 6 本線シグナルが観測された。エタノール、ぎ酸ナトリウム、あるいは dimethylsulfoxide (DMSO) を添加した場合には DMPO-OH のシグナルが 3 - 30% に減少した (図 1、表 1)。これらのことから検出された DMPO-OH の 70% 以上は  $O_2^{\cdot-}$  の DMPO 付加体の分解などによるものではなく、遊離の  $\cdot$ OH と DMPO との反応によるものであることが示唆される。

#### 3.1.2 $\cdot$ OH の生成における $^1O_2$ 依存性

NADPH 存在下の DMPO-OH のシグナルは  $^1O_2$  消去剤であるアジ化ナトリウム、L-ヒスチジン、1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) の添加で完全に消失した (表 1)。アジ化ナトリウムを添加した場合には、 $\cdot$ OH とアジ化ナトリウムとの反応で生じる  $\cdot$ N<sub>3</sub> の DMPO 付加体のシグナルはほとんど検出されなかった (図 1E)。 $^1O_2$  の寿命は溶媒を重水素化することで延長されることが

表1 NADPH 存在下 UP 光増感反応で生成する DMPO-OH に及ぼす活性酸素消去剤の影響

阻害剤	濃度	DMPO-OH (relative signal intensity)
None		1.89 $\pm$ 0.26 (100)
$\cdot$ OH 消去剤		
Ethanol	600 mM	0.53 $\pm$ 0.03 (27)
DMSO	143 mM	0.33 $\pm$ 0.14 (18)
Sodium formate	143 mM	0.06 $\pm$ 0.03 (3)
$^1O_2$ 消去剤		
NaN <sub>3</sub>	5 mM	0.06 $\pm$ 0.02 (3)
L-Histidine	5 mM	0.06 $\pm$ 0.02 (3)
DABCO	5 mM	0.26 $\pm$ 0.01 (14)
鉄キレート剤		
Dsferrioxamine	20 $\mu$ M	2.03 $\pm$ 0.21 (107)
$O_2^{\cdot-}$ 及び $H_2O_2$ 消去剤		
SOD	100 U/mL	2.93 $\pm$ 0.59 (155)
Catalase	280 U/mL	2.43 $\pm$ 0.40 (129)
SOD+Catalase	100 U/mL+280 U/mL	2.70 $\pm$ 0.20 (143)

平均 $\pm$ S.D.(阻害剤なしに対する百分率)

知られているため、 $\cdot\text{OH}$ の生成における $^1\text{O}_2$ の関与を確認するために、反応溶媒を重水素化して同様にDMPO-OHの生成を調べた。97%の水を重水に置き換えるとDMPO-OHの生成速度と生成量が共に増加した(図2)。これらのことは、 $^1\text{O}_2$ が $\cdot\text{OH}$ の生成中間体であることを強く示唆する。

$\cdot\text{OH}$ の生成と $^1\text{O}_2$ の関係を調べるために、 $\cdot\text{OH}$ と $^1\text{O}_2$ を別々に測定し重ね描きした(図3)。NADPHの存在しないときにはTEMPONのシグナルが時間と共に増加した。このシグナルは $^1\text{O}_2$ の消去剤であるアジ化ナトリウムやL-ヒスチジンの存在で減少したが、 $\cdot\text{OH}$ 消去剤、カタラーゼ、およびスーパーオキシド・ジスムターゼ(SOD)の存在はシグナル強度に影響しなかった(表2)。このことはTEMPDからTEMPONへの酸化はこの条件下では $^1\text{O}_2$ に特異的であることを示している。この系にNADPHを存在させるとTEMPONのシグナルの出現にラグタイムが生じた。このラグタイムはNADPHの濃度が増加するに従い

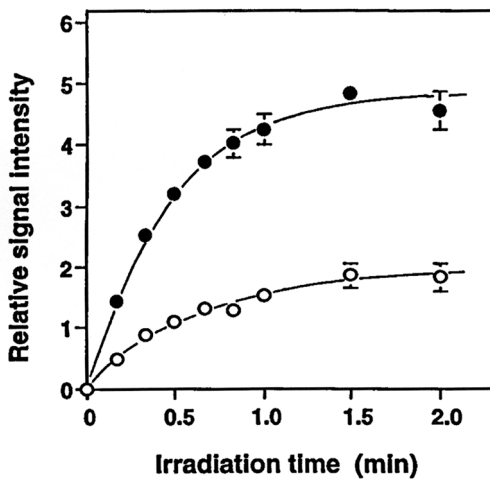


図2 重水素化溶媒中でのDMPO-OHの増加  
UP+NADPH+DMPOをH<sub>2</sub>O(○)あるいは97% D<sub>2</sub>O-3% H<sub>2</sub>O(●)中で調製し、光照射した。

表2 NADPH非存在下UPの光増感反応で生成するTEMPONに及ぼす活性酸素阻害剤の影響

阻害剤	濃度	TEMPON (relative signal intensity)
None		0.396±0.084 (100)
$^1\text{O}_2$ 消去剤		
NaN <sub>3</sub>	5 mM	0.135±0.025 (34)
L-Histidine	5 mM	0.000±0.000 (0)
DABCO	5 mM	0.295±0.025 (74)
$\cdot\text{OH}$ 消去剤		
Ethanol	600 mM	0.393±0.020 (99)
DMSO	143 mM	0.276±0.031 (70)
Sodium formate	143 mM	0.275±0.022 (67)
鉄キレート剤		
Desferrioxamine	20 μM	0.282±0.087 (71)
$\text{O}_2^{\cdot-}$ , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 消去剤		
SOD	100 U/mL	0.425±0.060 (107)
Catalase	280 U/mL	0.391±0.027 (99)

平均±S.D.(阻害剤なしに対する百分率)

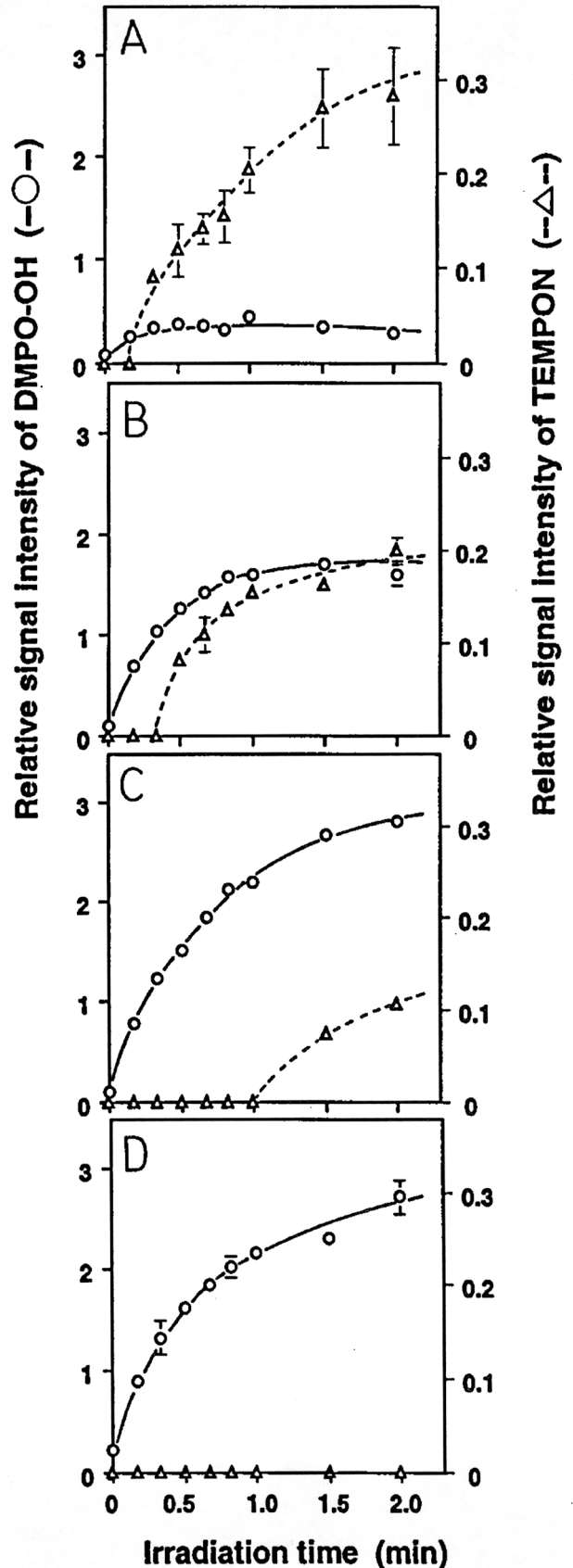


図3 UP光増感反応でのDMPO-OHおよびTEMPON生成におけるNADPHの効  
UP+DMPOにNADPHを(A) 0M, (B) 7M, (C) 33 M, and (D) 167Mを添加して光照射した。

延長された。一方、DMPO-OHの生成速度はNADPHの濃度が増加するに従い増加した。このことは、NADPH依存的に $^1\text{O}_2$ が $\cdot\text{OH}$ に変換されることを意味する。このときTEMPONのシグナルの出現にラグタイムが見られるのは、 $^1\text{O}_2$ とNADPHとの反応が $^1\text{O}_2$ とTEMPDとの反応に比べてはるかに速いためと推測される。

### 3. 1. 3 $^1\text{O}_2$ 依存的 $\cdot\text{OH}$ の生成経路

$^1\text{O}_2$ はNAD(P)Hにより一電子還元あるいは二電子還元されてそれぞれ $\text{O}_2^{\cdot-}$ <sup>12,13</sup>、 $\text{H}_2\text{O}_2$ へ変換されること<sup>14</sup>がすでに報告されている。 $\text{O}_2^{\cdot-}$ や $\text{H}_2\text{O}_2$ は金属触媒下 $\cdot\text{OH}$ を生成することがわかっている。NADPH存在下のUP光増感反応で検出された $\cdot\text{OH}$ が $\text{O}_2^{\cdot-}$ や $\text{H}_2\text{O}_2$ を経由してきたものか否かを調べるため、DMPO-OHの生成に及ぼすdesferrioxamine (DFO)、SODおよびカタラーゼの影響を調べた(表1)。その結果DFOおよびカタラーゼはDMPO-OHの生成を減少させなかった。SODはDMPO-OHの生成をわずかに増加させたが、ここにカタラーゼを存在させても増加は抑えられなかった。このことはSODによりDMPO-OHの量がわずかに増加した結果がSODによる $\text{O}_2^{\cdot-}$ の不均化により $\text{H}_2\text{O}_2$ の生成が増加したためではないことを示している。カタラーゼは存在濃度を21000U/mLまで増加させても影響無かったが、DFOは0.7mMまで濃度を増加させるとDMPO-OHのシグナルが減少した。

反応経路をさらに明らかにするためにNADPH存在下UPの光増感反応で生成する $\text{H}_2\text{O}_2$ を定量した。その結果約50 $\mu\text{M}$ の $\text{H}_2\text{O}_2$ が生成された。カタラーゼおよびアジ化ナトリウムは完全に $\text{H}_2\text{O}_2$ 生成を抑えたが、SODは影響なかった。DFOは $\text{H}_2\text{O}_2$ の生成を少し増加させた。 $\cdot\text{OH}$

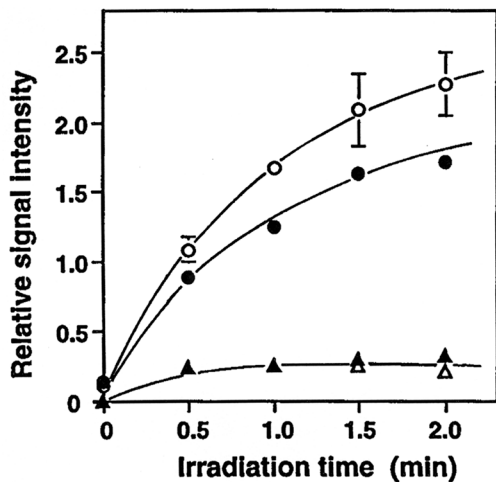


図4 UP光増感反応によるDMPO-OH形成に及ぼす $\text{H}_2\text{O}_2$ 添加の影響

UP+DMPO (△), UP+DMPO+ $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.63 mM) (▲), UP+NADPH+DMPO (○), UP+NADPH+ $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.63 mM)+DMPO (●)

の生成における $\text{H}_2\text{O}_2$ の役割を確認するために、UPおよびUP-NADPH系に0.63mMの $\text{H}_2\text{O}_2$ を添加しDMPO-OHの生成を調べた。図4に示すようにDMPO-OHの生成は $\text{H}_2\text{O}_2$ の存在下でも増加しなかった。このことは、 $\text{H}_2\text{O}_2$ から $\cdot\text{OH}$ への変換はたとえ $\text{H}_2\text{O}_2$ が生成されてもこの反応系では起こりにくいことを示している。またその結果は同時に、DMPO-OHの生成をSODが増加させ、DFOが減少させたのは $\cdot\text{OH}$ 生成が $\text{H}_2\text{O}_2$ の鉄触媒反応に由来したためではなく、SODおよびDFOの別の反応によるものであることを示唆する。SODはCu触媒 $\cdot\text{OH}$ 生成反応を起こし<sup>15</sup>、DFOは $\cdot\text{OH}$ を消去することが報告されている<sup>16</sup>。

### 3. 2 *In vivo* におけるラジカル反応の検出

#### 3. 2. 1 サーフェイスコイル型共振器で測定されたESRシグナル

Carbamoyl-PROXYLをヘアレスマウスに静脈内投与した後、背部にてサーフェイスコイルを用いてESRを測定すると、ほぼ等強度の3本線シグナルが観測された。そのシグナルの時間変化を図5Aに示す。シグナルはcarbamoyl-PROXYL投与2-3分後まで増加した後減少した。一度剥離したマウスの皮膚を再びもとの場所へ戻し、その上にサーフェイスコイルを当てて、静脈内投与したcarbamoyl-PROXYLのESRを測定すると、シグナル強度は未処理のマウスの場合の約2/3となった。このことから皮膚表面でサーフェイスコイル型共振器によって検出されたシグナルのうち約1/3は皮膚に存在するcarbamoyl-

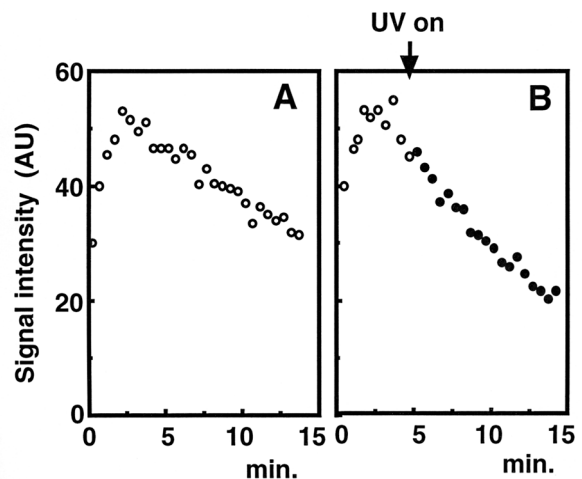


図5 サーフェイスコイル型共振器により皮膚表で測定されたcarbamoyl-PROXYLのESRシグナル強度の時間推移と紫外線照射の影響

A. ヘアレスマウスにcarbamoyl-PROXYLを尾静脈内投与し、背部においてサーフェイスコイル型共振器を装着したLバンドESRでシグナルの消長を追跡した。

B. Carbamoyl-PROXYL投与5分後から紫外線を照射しながら測定した。

PROXYL に由来するものと推定される。

### 3. 2. 2 シグナルの消長に及ぼす紫外線照射の影響

図 5B は carbamoyl-PROXYL の投与 5 分後から紫外線を照射しながら測定したときのシグナル強度の時間推移を示す。明らかに照射してからのシグナルの消長が照射しない場合 (図 5A) に比べて増加した。剥離した皮膚を再び元の場所に戻したマウスを用いて同様の実験を行ったところ、紫外線照射によるシグナル消失速度の増加は見られなかった。このことは、紫外線によるシグナル消失速度の増加は皮膚に存在するプローブの消失によることを示唆する。

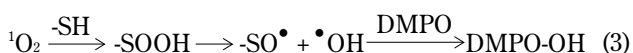
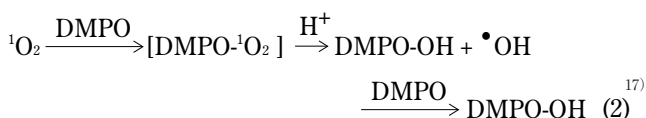
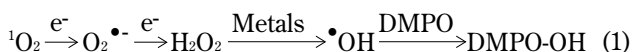
シグナル消失速度を 1 次反応速度定数として求め、紫外線照射の有無で比較した結果を表 3 に示す。この実験はヘアレスマウス並びに除毛した ddY 系マウスを用いて行ったが、いずれの場合にもシグナル消失速度の増加は統計的に有意であった。

### 3. 2. 3 紫外線照射によるシグナル消失速度の増加とラジカル反応の惹起

紫外線照射による carbamoyl-PROXYL のシグナル消失速度の増加とラジカル反応惹起との関係を調べるためにスピントラップ剤 N-t-butyl- $\alpha$ -phenylnitron (PBN) の投与効果を調べた。図 6 に示す様に紫外線照射によるシグナル消失速度の増加は PBN の投与により見られなくなった。一方、紫外線照射しない場合には PBN はシグナル消失速度に影響しなかった。このことから紫外線照射下では何らかのフリーラジカルが生じ、それが carbamoyl-PROXYL のシグナル消失を促進した可能性が考えられる。

## 4. 考 察

*In vitro* の光増感反応で得られた結果は、NADPH 存在下で  $^1O_2$  を介して  $\cdot OH$  が生成することを示している。 $^1O_2$  依存的 DMPO-OH の生成は様々な系で報告されており、次の経路が推定されている。



NADPH の存在下で  $^1O_2$  依存的に  $O_2 \cdot^-$  や  $H_2O_2$  の生成が起こることが報告されている<sup>12-14)</sup>。NADPH 存在下の UP 光増感反応では  $H_2O_2$  が生成することが確認されたため、もし遷移金属がこの反応系に存在すれば  $\cdot OH$  が生成する可能性が考えられる。しかし、本研究で見られた現象は、

表 3 ESR シグナル消失速度 (/min) に及ぼす UV 照射の影響

	除毛ddYマウス	ヘアレスマウス
UV照射下	0.063±0.006 (14)	0.082±0.008 (3)
UV非照射下	0.048±0.007 (17)	0.065±0.005 (3)

p<0.001

p<0.05

数値は平均±S.D. (n) 有意差検定はStudent's t-testによった。

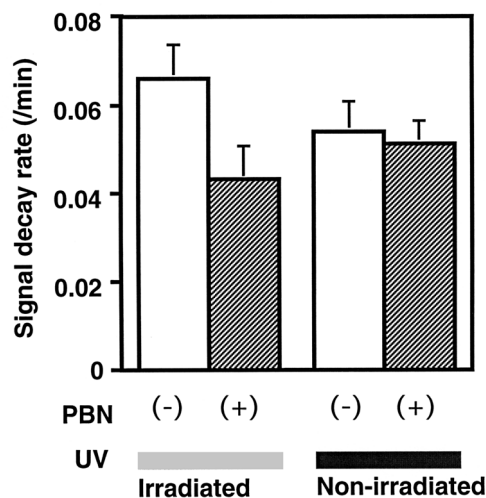


図 6 紫外線照射による ESR シグナル消失速度の増加に及ぼす PBN の影響

PBN は照射 35 分前に腹腔内投与した。

(i) 反応系に  $H_2O_2$  を添加しても DMPO-OH の生成量の増加は見られなかったこと、(ii) カタラーゼ、DFO はいずれも NADPH 存在下の UP 光増感反応における DMPO-OH の生成に影響しなかったことから経路 (1) によるのではないことが明らかである。また、70% 以上の DMPO-OH のシグナルがエタノールなどの  $\cdot OH$  消去剤の存在で失われたことから経路 (2) により DMPO-OH が生成された可能性も除去されよう。Buettner<sup>18)</sup> はシステイン存在下ヘマトポルフィリン誘導体の光増感反応で  $\cdot OH$  が生成することを見だし、 $-SH$  と  $^1O_2$  との反応による  $-SOOH$  がホモリチカルに解裂して  $\cdot OH$  が生成したと推定した。今回の反応で同様な反応が起きているか否かは不明であるが、ここで得られた結果はこれまでに報告されている経路とは異なる経路で  $\cdot OH$  が生成している可能性を示唆している。NADPH はシステインと同様に生体内で絶えず turn over されている物質である。本研究で得られた結果は皮膚で  $^1O_2$  が生成すれば  $\cdot OH$  の様な傷害性の強い酸素ラジカルに即座に変換される可能性を示唆するものである。

一方、紫外線で生じるラジカル反応の *in vivo* 測定では、紫外線照射下で惹起されるラジカル反応を *in vivo* でモニタリングできる可能性を示した。Carbamoyl-PROXYL の ESR シグナル消失速度の増加が如何なる活性酸素あるい

はフリーラジカルの生成によるものかは、今後様々なラジカル消去剤を用いてそのシグナル消失への影響を調べることにより明確になるものと思われる。また、更にこのラジカル反応のモニタリング系が確立されれば、抗酸化剤あるいはサンスクリーン剤のラジカル反応の抑制に基づく *in vivo* における評価法として有用となるものと思われる。

#### (引用文献)

- 1) Fuchs J, : Potentials and limitations of the natural antioxidants RRR-alpha-tocopherol, L-ascorbic acid and beta-carotene in cutaneous photoprotection, *Free Radic. Biol. Med.*, 25, 848-873, 1998.
- 2) Rytter SW, Tyrrell RM, : Singlet molecular oxygen ( $^1\text{O}_2$ ): a possible effector of eukaryotic gene expression, *Free Radic. Bio. Med.*, 24, 1520-1534, 1998.
- 3) Hattori Y, Nishigori C, Tanaka T, et al., : 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine is increased in epidermal cells of hairless mice after chronic ultraviolet B exposure, *J. Invest. Dermatol.*, 107, 733-737, 1997.
- 4) Saliou C, Kitazawa M, McLaughlin L, et al., : Antioxidants modulate acute solar ultraviolet radiation-induced NF-kappa-B activation in a human keratinocyte cell line, *Free Radic. Biol. Med.*, 26, 174-183, 1999.
- 5) Connor MJ, Wheeler LA, : Depletion of cutaneous glutathione by ultraviolet radiation, *Photochem. Photobiol.*, 46, 239-245, 1987.
- 6) Taira J, Mimura K, Yoneya T, et al., : Hydroxyl radical formation by UV-irradiated epidermal cells, *J. Biochem.* 111, 693-695, 1992.
- 7) Masaki H, Atsumi T, Sakurai H, : Detection of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 206, 474-479, 1995.
- 8) Yasui H, Sakurai H, : Chemiluminescent detection and imaging of reactive oxygen species in live mouse skin exposed to UVA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 269, 131-136, 2000.
- 9) Frew JE, Jones P, Scholes G, : Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide and organic hydroperoxides at low concentration in aqueous solution, *Anal. Chim. Acta*, 155, 139-150, 1983.
- 10) Hirata H, Walczak T, Swartz HM, : Electronically tunable surface-coil-type resonator for L-band EPR spectroscopy, *J. Magn. Reson.*, 142, 159-167, 2000.
- 11) 高城徳子, 竹下啓蔵, 平田 拓 ほか2名, : ポルフィリン症モデルマウスの光照射により皮膚で生じるラジカル反応の *in vivo* ESR 解析, 磁気共鳴と医学, 10, 135-138, 1999.
- 12) Peters G, Rodgers MAJ, : Single-electron transfer from NADH analogues to singlet oxygen, *Biochim. Biophys. Acta*, 637, 43-52, 1981.
- 13) Inoue K, Matsuda T, Saito I, : A convenient method for detecting the superoxide ion from singlet oxygen reactions of biological systems. Superoxide formation from hydrogenated nicotinamide adenine dinucleotide and 5-hydroxytryptophan, *J. Photochem.*, 25, 511-518, 1984.
- 14) Bodanes RS, Chan PC, : Singlet oxygen as a mediator in the hematoporphyrin-catalyzed photooxidation of NADPH to  $\text{NADP}^+$  in deuterium oxide, *J. Biol. Chem.*, 10, 8554-8560, 1977.
- 15) Yim MB, Chock PB, Stadtman ER, : Copper, zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 5006-5010, 1983.
- 16) Halliwell B, : Protection against tissue damage *in vivo* by desferrioxamine; what is its mechanism of action?, *Free Rad. Bio. Med.*, 7, 645-651, 1983.
- 17) Feix JB, Kalyanaraman B, : Production of singlet oxygen-derived hydroxyl radical adducts during merocyanine-540-mediated photosensitization: Analysis by ESR-spin trapping and HPLC with electrochemical detection, *Arch. Biochem. Biophys.*, 291, 43-51, 1997.
- 18) Buettner GR, : Thiyl free radical production with hematoporphyrin derivative, cysteine and light: a spin-trapping study, *FEBS Lett.*, 177, 295-299, 1985.

# ヒト角層細胞の cell envelope の発生とその機能障害を来す病態の解析

帝京大学医学部附属市原病院皮膚科学教室

秋 山 真 志

Terminally differentiated stratified squamous epithelium forms a lining of the plasma membrane called the cornified cell envelope (CCE), a thick layer of several covalently cross-linked precursor proteins including involucrin, small proline-rich proteins (SPRPs) and loricrin. Their cross-linking isodipeptide bonds are formed by epidermal transglutaminases (TGases) 1, 2 and 3. The formation of CCE and sequential expression of major CCE precursor proteins, TGases, and 25-kD lamellar granule-associated protein (LGP) were studied in human embryonic and fetal skin. Ultrastructurally, membrane thickening has already started in periderm cells of the two-layered epidermis and an electron dense, thickened cell envelope similar to CCE in adult epidermis is observed in periderm cells at the three-layered and later stages of skin development. In the two-layered epidermis (49-65 days EGA), immunoreactivities of involucrin, SPRPs, all the TGases and LGP were present only in the periderm. In the three-layered epidermis and thereafter (66-160 days EGA), loricrin became positive in the periderm cells, TGases extended to the entire epidermis, and LGP was detected in intermediate cells as well as periderm cells. Immunoelectron microscopy demonstrated that all three major CCE precursor proteins, involucrin, SPRPs and loricrin, were restricted to the CCE in periderm cells at this stage of development. After 160 days EGA, the periderm had disappeared and CCE proteins and LGP were expressed in the spinous, granular and cornified cells and TGases were detected in the entire epidermis. These findings indicate that CCE precursor proteins, TGases, and LGP are expressed in coordination in periderm cells during human epidermal development and suggest that periderm cells form CCE in the process of regression.

As a next step, five patients with non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma (NBCIE), one patient with lamellar ichthyosis and two patients with mutilating palmoplantar keratoderma (MPPK) were studied.

In one patient out of five NBCIE cases, expression of TGase 1 molecule was markedly reduced in the patient's epidermis. Electron microscopy revealed incomplete thickening of CCE during keratinization in the epidermis. Sequencing of the entire exons and exon-intron borders of TGase 1 gene (TGM1) revealed that the proband was a compound heterozygote for two novel mutations, 9008delA and R388H. These findings indicate that the compound heterozygote for missense mutation (R388H) in the core domain and the frameshift mutation (9008delA) resulting in a premature termination codon at the tail of the TGase 1 peptide leads to the NBCIE phenotype. TGM1 mutations were also found in the lamellar ichthyosis patient.

In the patients with MPPK, ultrastructural, immunohistochemical, and immunoelectron microscopic analyses revealed malformed CCE and reduced deposition of loricrin to CCE. Sequencing of the entire exons and exon-intron borders of loricrin gene of the patients excluded a mutation in loricrin DNA sequence. These data confirm the presence of MPPK phenotype with abnormal loricrin cross-linking at the final stage of CCE formation that is not caused by mutations in the epidermal differentiation complex region.

## 1. 緒 言

皮膚の角層は、角化細胞と呼ばれる高度に分化した細胞より成っているが、角化細胞は、cornified cell envelope という非常に厚い膜状物質に覆われている<sup>1)</sup>。この cornified cell envelope は、角化細胞のバリアー機能、相互接着、剥離において重要な役割を果たすと考えられており、魚鱗癬等、角化細胞の剥離の障害によって起こる過角化を主症状とする疾患の発症に関与している可能性が示唆されている。さらに、“肌荒れ”を来す角層のバリアー機能の障害にも密接に関与しているものと思われる。近年、生化学的、分

子生物学的解析により、cornified cell envelope は表皮細胞が分化し角化する際に、細胞膜に loricrin, small proline-rich proteins, involucrin 等の複数の cornified cell envelope 前駆蛋白が結合して形成されることが明らかになってきた。この前駆蛋白間の結合は表皮に発現している transglutaminases (TGases) によって形成される<sup>2) 3)</sup>。

ヒトの胎生期皮膚は、胎生 40 日以前では、表皮に特徴的な形態的所見を有さない単層の上皮細胞層として認められる。胎生 40 日を過ぎると、表皮は最上層の periderm とその下の基底細胞層の 2 層性となる<sup>4)</sup>。periderm は、胎生期の皮膚にのみ認められる細胞層であり、periderm を形成する細胞は、細胞質内小器官に乏しく、ケラチン線維束を少量しか持たず、細胞辺縁には大小の多数の突起を有するなど、他の表皮細胞とは異なった形態的特徴を示す<sup>2) 3)</sup>。胎生 65 日を過ぎる頃より、periderm と基底細胞層の間に、intermediate cell layer が認められるようになり、表皮は 3 層性となる。胎生 95 日を経ると、表皮は 4 層以上となり、periderm は、次第に退縮傾向を示すようになる。それにつ



Studies on the developmental processes of human cornified cell envelope and the pathogenesis of its dysfunction

Masashi Akiyama

Department of Dermatology, Teikyo University School of Medicine, Ichihara Hospital

れて、下方の細胞層は、成人の表皮細胞に近い形態を示すようになり、胎生 160 日を過ぎると、periderm は消失し、それと同時に、下層の細胞層は角化する。この時期の表皮には、既に成人の表皮に認められる基底層、有棘層、顆粒層、角層の各成分がそろっている。

periderm について多くの研究がなされてきたが、いまだに、この細胞層の本態は明らかにされておらず、その機能、および、この細胞層の退縮、消失するメカニズムも不明である。この periderm について、明らかなことは、はじめは、単層上皮として生じ、細胞表面、および、細胞内小器官の一連の形態学的変化をへて、表皮の角化が始まるのと時を同じくして消失することである<sup>4)</sup>。

loricrin, small proline-rich proteins, involucrin 等の cornified cell envelope 構成蛋白それぞれの、ヒト皮膚における発現様式、および、超微形態学的分布には、未だ不明な点が多く、ヒト皮膚における cornified cell envelope の機能の解析、その機能障害を来す病態の解明に際して大きな障害となっている。今回の研究の第 1 の目的は、ヒト胎生期皮膚の periderm を含む表皮における cornified cell envelope の形成のメカニズムを明らかにすることである。

さらに、最近、葉状魚鱗癬の患者家系において、分子遺伝学的に、表皮の transglutaminase の異常が報告されたが<sup>5)</sup> <sup>6)</sup>、この表皮の transglutaminase は、cornified cell envelope の構成蛋白を表皮細胞膜へ結合させる際に働くことが知られている。以上の事実より、葉状魚鱗癬の発症に、cornified cell envelope の構成蛋白の細胞膜への結合障害を含めた、cornified cell envelope の形成異常が関与している可能性が強く示唆されている。さらに、非水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症 (non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma) の症例においても、表皮の transglutaminase の活性の低下が報告されている。以上の事実より、cornified cell envelope の形成異常が葉状魚鱗癬、非水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症の発症において、重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

本研究の第 2 の目的は、先天性魚鱗癬などの角化異常症の病変部皮膚における cornified cell envelope 構成蛋白の発現および分布様式を解析することにより、involucrin, loricrin, small proline-rich proteins 等の cornified cell envelope 構成蛋白がヒト角層細胞の cell envelope の機能維持に果たす役割を解明することである。

## 2. 実験

### 2.1 ヒト胎児皮膚検体：

本研究に用いられたヒト胎児組織は全て、Central Laboratory of Human Embryology, University of Washington (Seattle) より、Human Subjects Review Board の認可のもと、United States DHEW policies に従

い、供与されたものである。今回は、胎生 49 日齢から 163 日齢までの、皮膚疾患以外の障害により死亡、または、妊娠中絶されたヒト胎児よりの皮膚組織が用いられた。

### 2.2 形態学的観察：

ヒト胎児皮膚組織を 2% グルタルアルデヒドにて固定、オスミウム酸にて後固定、型通り脱水後エポキシ樹脂中に包埋、光顕観察用に厚さ 1 μm の切片、電顕観察用には、厚さ 70 nm の切片を作製観察した。

### 2.3 抗体：

本研究に用いた一次抗体は、以下のものである：モノクローナル抗ヒト SPRPs 抗体 (mouse)<sup>7)</sup>、ポリクローナル抗ヒト involucrin 抗体 (rabbit) (Biomedical Technologies, Inc.)、ポリクローナル抗ヒト loricrin 抗体 (rabbit)<sup>8)</sup>、ポリクローナル抗ヒト TGase 1 抗体 (goat)<sup>9)</sup>、ポリクローナル抗ヒト TGase 2 抗体 (rabbit)<sup>10)</sup>、ポリクローナル抗ヒト TGase 3 抗体 (rabbit)<sup>10)</sup>、モノクローナル抗ヒト LGP 抗体、AE17 (mouse)<sup>11)</sup>。

### 2.4 免疫蛍光抗体法、免疫電顕法：

免疫蛍光抗体法は、皮膚組織より未固定の厚さ 6 μm の凍結切片を作成、FITC 飽和二次抗体を用いて染色した。必要に応じて propidium iodide にて核染色を施行した。免疫電顕用には、皮膚組織を液体プロパンを用いて凍結固定、エタノールによって凍結置換し、Lowicryl K11M 中に包埋したブロックを用いた。超薄切片を作製後、免疫反応を施行、1 nm ゴールド粒子飽和二次抗体を用い、silver enhancement 法を行ない一次抗体の沈着部位を観察した。

### 2.5 先天性角化異常症患者：

非水疱型魚鱗癬様紅皮症 5 例 (4 家系)、葉状魚鱗癬 1 例 (1 家系)、mutilating palmoplantar keratoderma 2 例 (1 家系) について、完全な informed consent に基づき、皮膚生検を施行した。遺伝子変異の検索のため、末梢血を採取、genomic DNA を抽出した。同時に、家系内の健常者からも、可及的に DNA を得た。

### 2.6 遺伝子変異の同定

患者ならびに家族の末梢血より得られた genomic DNA について、上記の形態学的検討の結果、発現、分布に異常のみられた蛋白 (今回は、transglutaminase 1 および loricrin) について遺伝子変異の検索を行った。genomic DNA を鋳型として、PCR にてその遺伝子のすべての exon ならびに exon-intron 境界部分を増幅し、自動シーケンサーにて解析した。遺伝子変異が見い出されたものについては、enzyme digestion 法あるいは allele specific oligonucleotide

hybridization 法により、遺伝子変異を確認した。

### 3. 結果

#### 3.1 ヒト胎児表皮における cornified cell envelope の発生<sup>12)</sup>

##### 3.1.1 2層性の表皮 (胎生 40 - 65 日) :

2層性の表皮 (胎生 40 - 65 日) の時期のヒト胎児皮膚は最表層の periderm と、その下方の基底膜上の基底細胞層の2層からなっている (図1)。この期間の初期には、電顕上、Periderm の細胞は、厚さ 7-9nm の平坦な細胞膜を有していた (図2)。後期に入ると、Periderm の細胞の細胞膜が次第に厚くなって来るが、同時期の基底細胞の細胞膜には肥厚は認められなかった。免疫組織学的には、involucrin、および、SPRPs が、periderm の細胞に陽性であり、細胞辺縁により多く存在していた。他方、この時期、involucrin、SPRPs とともに、基底細胞は、発現していなかった。TGases 1, 2, 3 は、periderm に陽性であり、基底細胞にも、弱い発現が認められた。loricrin はこの時期、periderm の細胞、基底細胞ともに陰性であった。層板顆粒の成分蛋白も、periderm の細胞のみに、発現がみとめられた。

##### 3.1.2 3層性の表皮 (胎生 66 - 95 日) :

3層性の表皮 (胎生 66 - 95 日) になると、periderm の下層には、基底細胞と periderm の間の intermediate cell が見られる (図1)。この時期、電顕的には periderm の細胞膜はさらにその厚さと電子密度を増した (図2)。免疫蛍光抗体法では、TGases 1, 2, 3, involucrin, SPRPs, および、loricrin は、全て periderm に陽性であった。それらの蛋白は、すでにこの時期に、蛍光顕微鏡レベルでも、periderm の細胞辺縁に分布していることが分かった。cell envelope の構成蛋白の periderm の細胞膜への局在は、免疫電顕によって確認された。periderm より下方の基底細胞、intermediate cell でも、TGase の発現は認められるものの、periderm と比較すると非常に弱い発現であった。

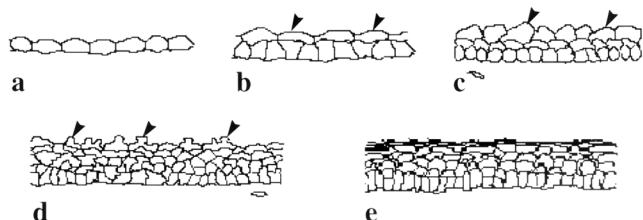


図1. ヒト胎児表皮の発生の模式図

(a) 未分化な単層の上皮より成る表皮 (<40 days estimated gestational age (EGA)). (b) 2層性の表皮 (40-65 days EGA). (c) 3層性の表皮 (66-95 days EGA). (d) 4層以上の表皮 (96-160 Days EGA). (e) 毛嚢間表皮の角化を示す表皮 (>160 days EGA). 矢尻, periderm. (文献 12 より引用)。

loricrin, SPRPs などの、cell envelope の構成蛋白は、intermediate cell、基底細胞には、まだ、発現が見られなかった。層板顆粒の成分蛋白は periderm と intermediate cell に発現がみられ、特に、強い線状の分布が、periderm と intermediate cell が接する部分にみられた。

##### 3.1.3 4層性、および、それ以降の表皮 (胎生 96 - 160 日) :

4層性、さらに、それ以上の多層性の表皮 (胎生 96 - 160 日) になると (図1)、電顕的には periderm の細胞膜は3層性の時期よりさらにその厚さと電子密度を増し、この時期の後期の periderm の細胞膜は成人の角化細胞の cell envelope と同様、約 15nm の厚さの高電子密度の層になった (図2)。3層性の表皮から引き続いて、この時期の早期から、periderm には、免疫蛍光抗体法では、TGases 1, 2, 3, involucrin, SPRPs, および、loricrin は、全て陽性であった。この periderm における TGases 1, 2, 3, involucrin, SPRPs, および、loricrin の発現は、表皮の角化にともない periderm が消退するまで、常に認められた。

cell envelope の構成蛋白が、実際に、periderm の細胞膜近傍で cell envelope を、形成しているのかどうかを知るため、免疫電顕を用いて調べると、平坦な部分、細胞突起を形成している部分ともに、involucrin, SPRPs, および、loricrin は、periderm の細胞膜の厚くなっている部分に局在して認められた (図3)。periderm 直下の intermediate cell では、involucrin の発現が見られるものの、その他の

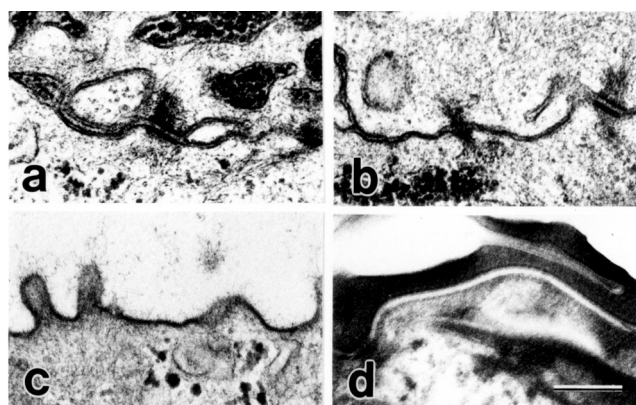


図2. ヒト胎児表皮の発生過程における cornified cell envelope の形成の電顕像

(a) 2層性の表皮 (51-65 days EGA). (b) 3層性の表皮 (66-95 days EGA). (c) 4層以上の表皮 (96-160 Days EGA). (d) 毛嚢間表皮の角化を示す表皮 (>160 days EGA). (a) periderm cell の細胞膜の肥厚は、2層性の時期の表皮において既に始まっている。3層性の表皮 (b) および 4層以上の表皮 (c) では、periderm cell の細胞辺縁には高電子密度の厚い cell envelope が既に見られる。(d) periderm が退縮したあとの表皮では角化した表皮細胞の細胞辺縁に cell envelope が形成されている。Bar; 0.3 μm. (文献 12 より引用)。

cell envelope の構成蛋白 (loricrin, SPRPs など) は、基底細胞、および、intermediate cell では陰性であった。TGase の発現はこの時期の表皮の全層に認められるが、角化において最も重要な TGase の subtype である TGase 1 の発現は、基底細胞層では弱かった。層板顆粒の成分蛋白は、3 層性の表皮におけるのと同様に、periderm と intermediate cell に認められた。periderm とその直下の intermediate cell とが、接する面にみられる強い線状の発現は、3 層性の表皮の時期より、さらに、強調されてきていた。これは、periderm の下床の細胞層が、この後の時期に、最初の角化を始める予兆とも言える。

### 3.1.4 Periderm 退縮後の角化を示す表皮 (胎生 161 日以降) :

毛嚢間表皮が角化を示す胎生 160 日以降の表皮では、periderm は完全に消失している (図 1)。最上層の角化し

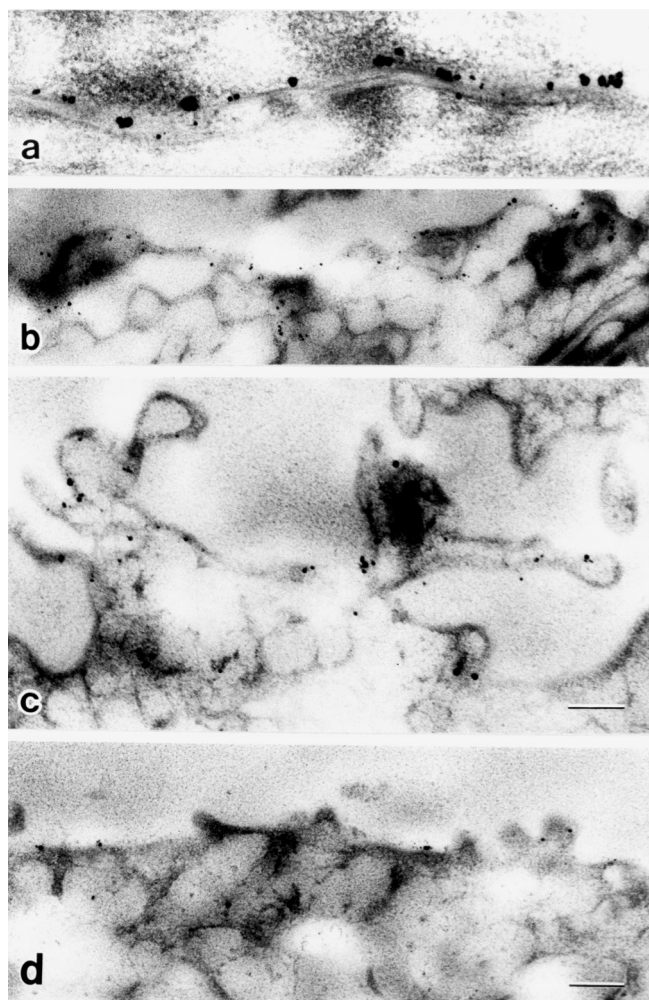


図 3. 免疫電顕像：ヒト胎児表皮の periderm における cornified cell envelope の形成

Colloidal gold を用いた immunoelectron microscopy にて、periderm の細胞膜に involucrin (b,c)、および、loricrin (d) が結合していることが示された。(a) は、正常成人皮膚における角層細胞の細胞膜への involucrin の沈着 (文献 12 より引用)。

始めた細胞は、厚さおよそ 15nm の、成人の皮膚の角層の cell envelope と類似の厚く、電子密度の高い細胞膜を形成していた (図 2)。cell envelope の構成蛋白、involucrin, SPRPs, loricrin, ならびに層板顆粒の成分蛋白のすべてが、この時期の顆粒細胞層および角化細胞層に陽性であった。層板顆粒の成分蛋白は、角層と顆粒層の間に特に強く線状に分布していた。TGase 1, 2, 3, の発現は、表皮全層にみられ、TGase 1 および 3 の分布は細胞辺縁に膜状に認められた。これらの所見は、成人の皮膚で見られるものと同様であった。

## 3.2 先天性角化異常症患者における cornified cell envelope の形成

### 3.2.1 非水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症

5 例中 4 例の非水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症患者において、involucrin, loricrin, TGases 1, 2, 3 の分布は正常であった<sup>13)</sup>。1 例の非水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症患者においてのみ、TGase 1 の発現に低下が見られた<sup>14)</sup>。超微形態学的には、前者 4 例では、cornified cell envelope の正常な形成が認められたが、TGase 1 の発現に異常がみられた 1 例では、cornified cell envelope の形成不全が観察された (図 4)<sup>14)</sup>。

### 3.2.2 葉状魚鱗癬

今回検索した 1 例の葉状魚鱗癬患者において、involucrin, loricrin, TGases 2, 3 の分布は正常であったが、TGase 1 蛋白の発現に低下が見られ、TGases 1 活性も低下していた。超微形態学的にも、cornified cell envelope の形成不全が確認された。

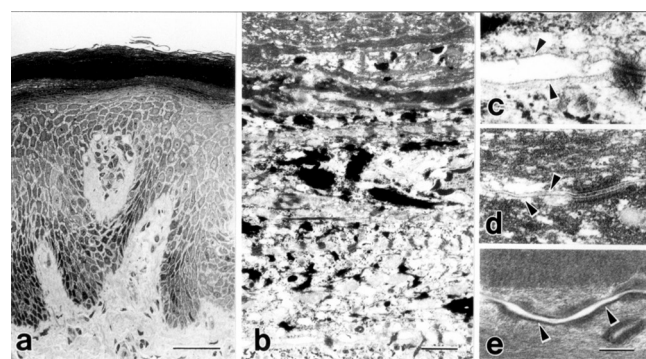


図 4. TGase 1 活性の低下を認めた非水疱型魚鱗癬様紅皮症症例における皮膚の病理組織像、および電顕像

(a) 著明な hyperkeratosis と中等度の acanthosis が患者皮膚には見られた (toluidine blue stain)。(b) 電顕的には顆粒細胞内の keratin clump や脂肪滴は認められなかった。(c) 顆粒層の細胞では、薄い cell envelope (矢尻) が正常に形成されていた。(d) 角層では、cornified cell envelope (矢尻) は、患者皮膚では著明に薄く、低形成を認めた。(e) 正常皮膚における cornified cell envelope (矢尻)。Bars, 50  $\mu$ m(a), 1  $\mu$ m(b), 0.3  $\mu$ m(c-e)。(データは文献 14 より引用)。

### 3.2.3 Mutilating palmoplantar keratoderma<sup>15)</sup>

2例(1家系)の患者病変部皮膚において免疫蛍光抗体法では、involucrin および SPRPs は、病変部では正常皮膚に比して、より広い範囲で、正常の顆粒層の部分より下方においても発現していた。光顕レベルでも involucrin および SPRPs の顆粒細胞における細胞膜への局在が認められた。loricrin の発現は、病変部皮膚において著明に減弱しており、顆粒細胞においても細胞質内に弱い染色性が認められるのみであり、細胞膜への沈着は認められなかった。超微形態学的には角化細胞内に異常な脂肪滴が認められた。移行細胞から上方において、cornified cell envelope の形成がみられたが、正常ヒト皮膚で認められる顆粒細胞から角化細胞にかけての、電子密度の高い物質の沈着による cornified cell envelope の肥厚が見られなかった(図5)。免疫電顕法では、病変部皮膚においても、正常皮膚と同様に、involucrin および SPRPs は cornified cell envelope の形成に伴い cornified cell envelope 部分に局在していた。しかし、loricrin の cornified cell envelope への沈着は正常皮膚と比べて減少していた(図6)。

### 3.3 先天性角化異常症患者における遺伝子解析結果

#### 3.3.1 非水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症：

TGase 1 の発現に異常を認めた1例で、direct sequencing の結果、TGase 1 gene (TGM1) に、heterozygous な2つの変異、9008delA (paternal) と R388H (maternal)、が認められた(図7)。これらの変異は、コントロールとした正常日本人50人のDNAには、認められなかった。TGM1のすべてのexons、exon-intron borders について direct sequencing を行ったが、この変異の他には、病因となり得る変異は見られなかった。

#### 3.3.2 葉状魚鱗癬：

今回検索した1例で、direct sequencing の結果、TGase 1 gene (TGM1) に、heterozygous な2つのミスセンス変異、L204Q と R306W、が認められた。これらの変異は、コントロールとした正常日本人50人のDNAには、認められなかった。GM1のすべてのexons、exon-intron borders について direct sequencing を行ったが、この変異の他には、病因となり得る変異は見られなかった。

#### 3.3.3 Mutilating palmoplantar keratoderma：

loricrin gene の2つのexonsには、調べ得たかぎ

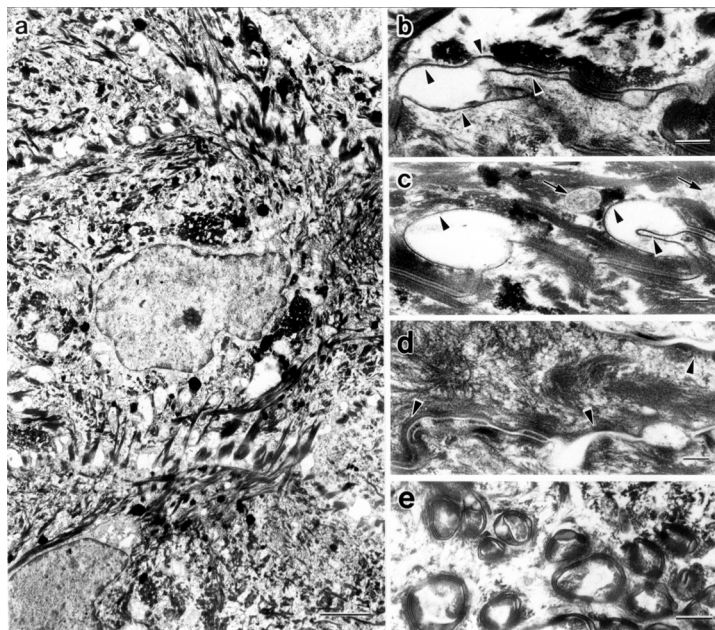


図5. mutilating palmoplantar keratoderma 病変部皮膚の電顕像

(a) 顆粒層の細胞は、正常なケラチン束とケラトヒアリン顆粒を形成していた。(b) 正常な、薄い cornified cell envelope (矢尻) が、顆粒層の細胞には見られた。(c) 患者病変部の角層では cornified cell envelope (矢尻) の低形成があり、cornified cell envelope (矢尻) は正常皮膚(d)におけるものにくらべて著明に薄かった。薄い cornified cell envelope と desmosome からなるリング状の構造が、顆粒層上部の細胞に見られた(e)。矢尻, cornified cell envelope; 矢印, lipid droplets. Scale bars, 2 μm (a), 0.2 μm (b-d), 0.5 μm (e). (文献 15 より引用)。

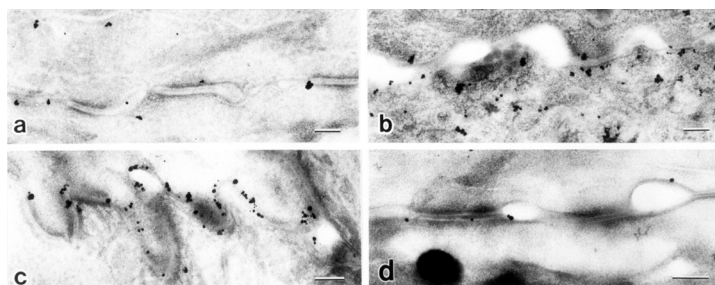


図6. 免疫電顕像：mutilating palmoplantar keratoderma の症例における cornified cell envelope の形成不全

患者皮膚(a)では、正常人皮膚(b)と比べて loricrin の細胞膜への結合が少ない。他方、患者皮膚(c)での involucrin のラベルは、正常人皮膚(d)より強い(文献 15 より引用)。

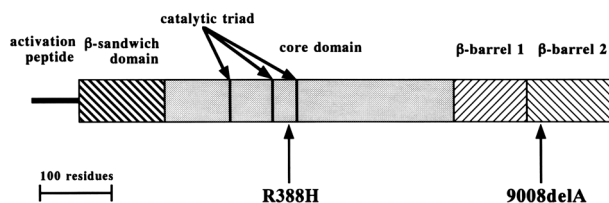


図7. TGase 1 活性の低下を認めた非水疱型魚鱗癬様紅皮症例に見られた TGase 1 遺伝子の変異、9008delA および R388H

本家系の父方の変異、9008delA は、TGase 1 蛋白の c 末に 置する β-barrel 2 domain 内にある。母方の変異、R388H は、TGase 1 蛋白の酵素活性部位を含む core domain 内にある(文献 14 より引用)。

り、mutation は発見されなかった。

#### 4. 考 察

本研究の結果、主な cornified cell envelope 前駆蛋白である involucrin, SPRPs, および, loricrin は、ヒト皮膚の発生過程において periderm の細胞に存在していることが明らかになった。さらに、胎生期に、TGases 1, 2, 3, LPG が、やはり、periderm の細胞に発現していることが示された。これらの免疫蛍光所見と、超微形態学的に periderm の細胞膜に肥厚が認められることを考え合わせると、ヒト胎児の発生過程にある表皮の periderm は、その退縮過程において、成人皮膚の角化細胞が形成するものと類似の cornified cell envelope を形成することが推測される。免疫電顕による検討の結果、主な cornified cell envelope 前駆蛋白である involucrin, SPRPs, および, loricrin は、ヒト皮膚 periderm の肥厚した細胞膜に結合した形で存在していることが確認された。これは、上記仮説、すなわち、periderm が cornified cell envelope を形成するという考えを支持するものである。以上の今回得られたデータより、cornified cell envelope の形成という点からみると、periderm の退縮過程は、成人皮膚表皮のケラチノサイトの角化過程と類似したものであるといえるであろう。

periderm の細胞は、胎芽から胎児へと発達する時期から、毛嚢間表皮が角化を始める時期までの間に、顕著な形態学的変化を示す。この periderm の細胞の形態学的変化のなかで、後期（退縮期）の変化と、表皮細胞の角化との間には、類似点が見られる。periderm の細胞も、退縮期には、中間径繊維をのこして、細胞内小器官を失い、核は凝集してくる。これらの所見から、periderm は、「普通とは異なる角化様式を示す角化細胞層」とも考えられるわけである。periderm の退縮から表皮の角化への、角化様式の転換は、羊水中から出生後の環境へと、急激に変化する外部環境に、胎児が適応するように、胎児の体表面を変えることになる。periderm の存在意義、及び、その退縮のメカニズムを解明するためには、さらなる今後の研究が必要と思われる。

近年、cell envelope 前駆蛋白のなかで重要なものである loricrin の異常による cell envelope の形成不全が、Vohwinkel syndrome<sup>16)</sup> や erythrokeratoderma<sup>17)</sup> 等の遺伝性角化異常症の病因であることが明らかになり、また、loricrin 分子の異常以外にも、cell envelope の異常が掌蹠角化症等の原因となり得ることが示唆されている<sup>15)</sup>。葉状魚鱗癬の一部の家系でも、TGase 1 の異常による cell envelope の形成不全がその病因であることが報告されている<sup>5) 6)</sup>。今回の研究の結果からは、検索した 1 例の日本人葉状魚鱗癬患者において、TGase 1 遺伝子に変異が認められた。さらに、非水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症でも、

TGase 1 の遺伝子変異が原因である可能性が示された。また、本研究の対象となった mutilating palmoplantar keratoderma の症例では cornified cell envelope の形成不全がありながら、既知の cornified cell envelope 関連蛋白遺伝子に変異がある可能性は否定的であった。このことから、今回の mutilating palmoplantar keratoderma の症例については、その病因として、他のまだ明らかにされていない cornified cell envelope 関連蛋白等が想定された。

出生時に最も重篤な症状を呈する葉状魚鱗癬などの場合、病像の形成に胎生期の cell envelope の形成異常などが関与している可能性が考えられ<sup>18) 19)</sup>、ヒト胎生期表皮の periderm の退縮、ケラチノサイトの角化などの過程は、表皮細胞の発達、分化のメカニズムを理解するという意味のみでなく、重症型魚鱗癬の病態の解明という点からも今後の興味深い研究対象である。

近年、腫瘍発生のメカニズム、遺伝性皮膚疾患とその出生前診断、遺伝子治療と関連した幹細胞の生物学、各種の分化、増殖の制御因子の研究等、様々な分野で発生学的なアプローチは、盛んに行われている。今後、ますます、皮膚発生学が皮膚科学、皮膚の生物学の領域で占める役割は大きくなるものと考えられる。この発生学的アプローチと角化異常症の患者皮膚を対象とした研究によって、さらに他の cell envelope 構成蛋白の分布、役割が明らかになり、他の cornified cell envelope 関連蛋白と角化症の病因の関係、さらには、cornified cell envelope 本体、ならびに個々の構成蛋白の機能が明らかになることが期待される。

#### (参考文献)

- 1) Hohl D: Cornified cell envelope. *Dermatologica* 180:201-211, 1990
- 2) Greenberg CS, Birckbichler PJ, Rice RH: Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzyme that stabilizes tissues. *FASEB J* 5:3071-3077, 1991
- 3) Steinert PM, Marekov LN: The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodi-peptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *J Biol Chem* 270:17702-17711, 1995
- 4) Holbrook KA, Odland GF: The fine structure of developing human epidermis: light, scanning, and transmission electron microscopy of the periderm. *J Invest Dermatol* 65:16-38, 1975
- 5) Huber M, Rettler I, Bernasconi K, et al: Mutations of keratinocyte transglutaminase in lamellar ichthyosis. *Science* 267:525-528, 1995
- 6) Russell LJ, DiGiovanna JJ, Rogers GR, et al: Mutations in the gene for transglutaminase 1 in autosomal recessive

- 
- lamellar ichthyosis, *Nature Genet* 9:279-283, 1995
- 7) Hohl D, de Viragh PA, Amiguet-Barras F, et al: The small proline-rich proteins constitute a multigene family of differentially regulated cornified cell envelope precursor proteins. *J Invest Dermatol* 104:902-909, 1995
- 8) Mehrel T, Hohl D, Rothnagel JA, et al: Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin. *Cell* 61:1103-1112, 1990
- 9) Kim I-G, McBride OW, Wang M, et al: Structure and organization of the human transglutaminase 1 gene. *J Biol Chem* 267:7710-7717, 1992
- 10) Tarcsa E, Marekov LN, Andreoli J, et al: The fate of trichohyalin: sequential post-translational modifications by peptidyl-arginine deiminase and transglutaminases. *J Biol Chem* 272:27893-27901, 1997
- 11) O'Guin WM, Manabe M, Sun T-T: Association of a basic 25K protein with membrane coating granules of human epidermis. *J Cell Biol* 109:2313-232, 1989
- 12) Akiyama M, Smith LT, Yoneda K, et al: Periderm cells form cornified cell envelope in their regression process during human epidermal development. *J Invest Dermatol* 112:903-909, 1999
- 13) Akiyama M, Shimizu H, Yoneda K, et al: Collodion baby: ultrastructure and distribution of cornified cell envelope proteins and keratins. *Dermatology* 195:164-168, 1997
- 14) Akiyama M, Takizawa Y, Kokaji T, et al: Novel mutations of TGM1 in a child with congenital ichthyosiform erythroderma. *Br J Dermatol* 144:401-407, 2001
- 15) Akiyama M, Christiano AM, Yoneda K, et al: Abnormal cornified cell envelope formation in mutilating palmoplantar keratoderma unrelated to epidermal differentiation complex. *J Invest Dermatol* 111:133-138, 1998
- 16) Maestrini E, Monaco AP, McGrath JA, et al: A molecular defect in loricrin, the major component of the cornified cell envelope, underlies Vohwinkel syndrome. *Nature Genet* 13:70-77, 1996
- 17) Ishida-Yamamoto A, McGrath JA, Lam H-M, et al: The molecular basis of autosomal dominant erythrokeratoderma: a frameshift mutation in the loricrin gene. *Am J Hum Genet* 61:581-589, 1997
- 18) Akiyama M: Severe congenital ichthyosis of the neonate. *Int J Dermatol* 37:722-728, 1998
- 19) Akiyama M: The pathogenesis of severe congenital ichthyosis of the neonate. *J Dermatol Sci* 21:96-104, 1999

# 微小透析法を用いた皮膚内の化粧品素材動態および生体成分動態の系統的解析法の確立

長崎大学 医学部附属病院薬剤部

佐々木 均、中嶋 幹郎

Microdialysis is a relatively new technique for sampling tissue extracellular fluid that is gaining popularity in kinetic and dynamic studies of drugs in experimental animals. Intradermal microdialysis permits us to measure directly the concentration in dermis of test substances applied to the skin without loss of fluid volume. In this study, we have attempted to use this technique for characterizing the kinetic behavior in dermis of cosmetic compounds applied to living skin and evaluating the effect of cosmetic compounds permeated through the skin on biological elements in the surrounding dermal tissue of the rats. In general, several cosmetic compounds showing pharmacological activity were formulated in commercially provided cosmetics with various additives. It is important to evaluate the adequacy of intradermal microdialysis to quantify the interest cosmetic compound in cutaneous tissue following the topical application of its commercial product including various the other cosmetic compounds. Therefore, first we used Sandimmun that is 10% oily pharmaceutical preparation of cyclosporin (CYA), a low skin-permeable peptide, as the model product reflecting commercial cosmetics and measured the dermal concentration of CYA applied topically alone or with absorption enhancers. As the results, intradermal microdialysis enabled us to monitor cutaneous CYA quantitatively in proportion to its applied concentration to the skin. In addition, we found suitability of glycerin as an enhancer in the cutaneous penetration of CYA from its commercial product. Subsequently, the effect of barrier perturbation by delipidization on the cutaneous penetration of salicylic acid (SA) and the effect of SA permeated through the skin on the dermal endogenous homovanillic acid (HVA) were examined. SA was chosen as the model cosmetic compound because it is extensively used in the commercial cosmetics. As the results, enhanced cutaneous penetration of SA was correlated with the increase in barrier perturbation activity by delipidization. However, the dermal endogenous HVA levels were virtually unaffected by the increase in cutaneous penetration of SA in the various delipidized skins. A correlation between the dermal endogenous HVA levels and the cutaneous concentrations of SA was not found in the barrier-damaged skins.

This technique must become an available tool for kinetic analysis in dermis of cosmetic compounds and evaluation of their effects on biological elements in the surrounding dermal tissue.

## 1. 緒言

近年、美白剤など様々な新しい化粧品素材が開発されているが、市販の化粧品には、香料や色素のほか、薬理活性を示す化合物が保湿剤や血行促進剤として配合され、経皮的な適用が行われている。しかし、皮膚表面の最外層に位置する角質層が、外部から皮膚内への物質の透過に対するバリアー機能として働いているため、経皮適用された物質が皮膚内へ浸透するには、著しい制限が加えられている。この透過障壁においては、角質細胞間脂質が重要な因子であることが明らかとなってきた<sup>1)</sup>。そこで、市販の化粧品に含有されている薬用成分の経皮吸収性を向上させる試みとして、角質層と親和性の高い油性基剤の利用<sup>2)</sup>や、従来、薬物の皮膚透過性改善の目的で利用されてきた経皮吸収促進剤の化粧品への応用<sup>3)</sup>等が報告されている。

しかし、吸収促進剤の応用には、それら自身が皮膚内に浸透し、刺激性や毒性を発現する可能性も懸念される。このように、市販の化粧品には様々な薬用成分や添加剤が配合されているにもかかわらず、皮膚内における化粧品成分の動態や相互作用、化粧品使用時における皮膚内生体成分の変動に関する情報は極めて少ない。従来、化粧品成分の皮膚内濃度や生体成分への影響などに関しては、動物レベルで放射性物質を用いた研究が行われてきた。それらは被験物質を経皮適用した後、動物を屠殺して皮膚組織を採取し、皮膚内濃度を測定する方法が主なもので、通常、1試料に1個体を必要とするため、実験には多くの動物が必要とされる。このことがこの分野の系統的な研究の妨げとなってきた。

微小透析法は、血管または任意の組織中に、先端に半透膜のついた小型の透析プローブを挿入することにより、非侵襲的に近い状態で、血液や組織の細胞外液中に存在する物質の濃度を連続測定できる独創的な *in vivo* サンプリング法である (Fig. 1)<sup>4)</sup>。

本法は、主として神経薬理学研究の領域で、脳内の薬物濃度や内因性神経伝達物質の検出に用いられてきた<sup>5)</sup>。しかし、実験動物を屠殺せずに1個体から多数の試料を採取することが可能で、被験物質の非結合型濃度を直接測定できるといった優れた利点を有しているため、近年では、様々



Application of Microdialysis to *In Vivo* Kinetic Analysis in Dermis of Cosmetic Compounds and Biological Elements

Hitoshi Sasaki, Mikiro Nakashima

\*  
Department of Hospital Pharmacy,  
Nagasaki University School of Medicine

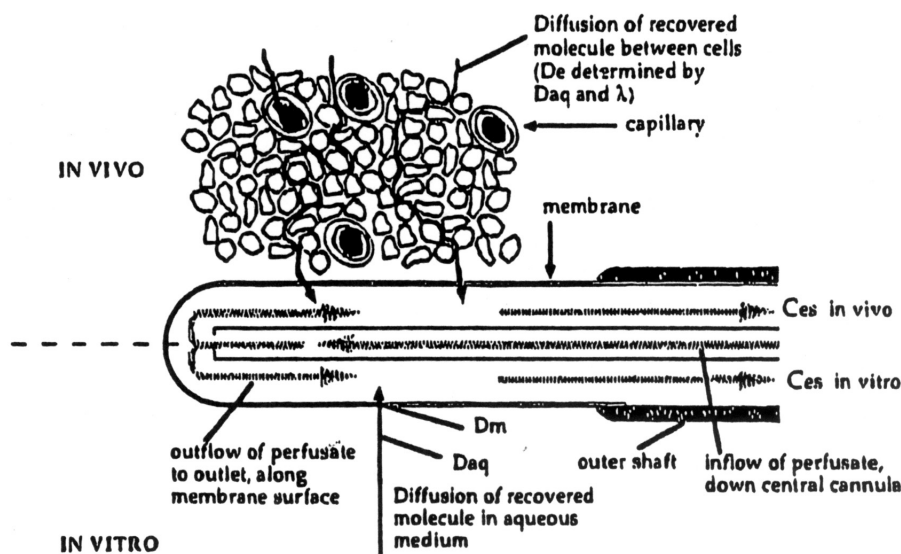


Fig.1 Schematic representation of solute recovery in vivo and in vitro during microdialysis. Cited from reference 4.

な組織中における薬物濃度の測定に用いられるようになってきた<sup>4)</sup>。著者らもこれまで微小透析法を用いて、各種薬物動態の詳細な解析に成功している<sup>6~11)</sup>。経皮吸収動態の解析においては、皮膚内から抜去可能なガイドカニューレを利用した透析プローブのみの皮膚内挿入法を世界に先駆けて試み、ラットへ経皮適用した抗炎症薬の皮膚組織中濃度の連続測定に、本法が適用できることを明らかにした<sup>11)</sup>。組織中物質濃度の in vivo 定量法として本法を適用する際には、被験物質の組織細胞外液中からプローブ灌流液中への回収率（透過率）を厳密に算出することが必要である。しかし、その回収率の正確な測定は難しく、本実験法は、組織における被験物質動態の相対的変化を検討する方法としては極めて高い有用性を示すが、絶対量を検討する方法としては限界があるとも考えられる。

今回著者らは、様々な薬用成分を含有する市販化粧品を皮膚表面へ適用した際の被験成分の皮膚内動態や他成分との相互作用、皮膚内生体成分への影響等を in vivo の状態で定量的に評価する簡便な実験系として、この微小透析法を応用することを考案した。本研究では、まず最初に、市販化粧品のモデルとして、被験化合物に加えて他の化合物が添加剤として配合されている医療用油性製剤を選び、ラット皮膚表面へ製剤適用後の被験化合物の経皮吸収動態を経皮微小透析法により種々検討し、市販化粧品を皮膚適用した際の皮膚内における特定成分濃度定量法としての本法の有用性について評価した。さらに、化粧品成分として繁用されているサリチル酸 (SA) をモデルに選び、ラット皮膚表面へ SA を適用した際の SA の経皮吸収速度に及ぼす角質層の脱脂方法の影響と、その時の内因性カテコールアミン濃度の変動を本法により検討し、物質浸透性が変化した皮膚における化粧品成分の吸収動態と皮膚内生体成分

動態との関連性の解析を試みた。

## 2. 実験

### 2.1 試料ならびに試薬

市販医療用製剤としては、主成分であるシクロスポリン (CYA) に種々の添加剤を加え、エタノールとオリーブ油に混合し 10% 油性溶液とした Sandoz Pharma 製のサンディミュン内用液を用い、オリーブ油で希釈することにより CYA の 0.5、2 および 8% 濃度油性溶液を調製した。化粧品に適用可能な吸収促進剤の候補として、広く化粧品に用いられているグリセリンと、経鼻吸収型カルシトニン製剤に吸収促進剤として添加されているピロチオデカン (久光製薬より供与)

<sup>12, 13)</sup> を選び、それらを種々の濃度 (1、3、6、10 および 20%) で加えた 2% CYA 油性溶液を調製した。化粧品成分のモデルである SA はナカライテスクの特級試薬を用い、皮膚に適用する際にはエタノールに混合し 5% SA 溶液とした。角質細胞間脂質の除去溶媒として用いたアセトン、ジエチルエーテル、クロロホルムならびにメタノールは全てナカライテスクの特級試薬を用いた。CYA の蛍光偏光免疫測定用試薬キットはダイナボットから購入した。カテコールアミン類 (ドーパミン塩酸塩、ノルエピネフリン塩酸塩、DOPAC、ホモバニリン酸; HVA) は全て Sigma の特級試薬を用いた。オクタンスルホン酸ナトリウムは Aldrich の特級試薬を用いた。過塩素酸、塩酸、リン酸一カリウム、リン酸ならびにエチレンアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA・2Na) は全て和光純薬の特級試薬を用いた。その他の試薬についても全て特級品を使用した。

### 2.2 微小透析装置

Carnegie Medicin 製の CMA/100 微量注入ポンプに CMA/10 透析プローブ (透析膜の長さ 10mm) を接続し、リンゲル液を 2.5  $\mu\text{L}/\text{min}$  の微小速度で灌流した。

### 2.3 動物実験

Wistar 系雄性ラット (体重 250 ~ 270g) をウレタン 1.5g/kg の腹腔内投与による麻酔下、腹部皮毛を電気バリカン (動物用 900 型、大東電気工業) で除毛した。透析プローブを皮膚から抜去可能な自製の経皮用ガイドカニューレ (ポリエチレン製) を用いてラットの皮膚内へ挿入し、自製のガラスリザーバー (内径 20mm) をプローブ挿入部位の皮膚上にアロンアルファ A (三共) にて固定した<sup>11)</sup>。

CYA 油性溶液を用いた実験では、ガラスリザーバー固

定1h後に種々のCYA油性溶液2mLをその中に充填し、適用6h後まで透析液を1h毎に皮膚内より回収し、全量をCYA濃度測定用に供した。

SAエタノール溶液を用いた実験では、ガラスリザーバーを固定した後、アセトン、ジエチルエーテルまたはクロロホルム/メタノール(2:1)混合液2mLをそれぞれリザーバー中に加え、1hにわたって角質層の脱脂を行った。コントロールについては生理食塩水を加えた。脱脂溶媒除去1h後に5%SAエタノール溶液2mLをリザーバー中に充填し、適用6h後まで透析液を1h毎に皮膚内より回収し、100 $\mu$ LをSA濃度測定用に、40 $\mu$ Lをカテコールアミン測定用に供した。なお、カテコールアミン測定用の試料には酸化を防ぐ目的で1M過塩素酸10 $\mu$ Lを加えた。

## 2.4 定量

透析液中のCYAは、TDX自動測定装置(Abbott Laboratories)を用いた蛍光偏光免疫測定法により定量した。

透析液中のSAは、先に報告した方法<sup>14)</sup>を参考にし、得られた試料にアセトニトリルを等容量加えた混合物を調製した後、高速液体クロマトグラフィー蛍光検出法により定量した。高速液体クロマトグラフはLC-6A型ポンプ(島津)を用い、RF-535型蛍光検出器(島津)を励起波長300nm、測定波長410nmにおいて用いた。カラムはCosmosil 5C18-MS(4.6 $\times$ 150mm、ナカライテスク)を用いた。溶出は、水-メタノール-酢酸(58:38:4)の混合液を移動相とし、室温で、ポンプ流速を1.0mL/minに設定して行った。

透析液中のカテコールアミン類は、高速液体クロマトグラフィー電気化学検出法により定量した<sup>7)</sup>。高速液体クロマトグラフはLC-6A型ポンプを用い、L-ECD-6A型電気化学検出器(島津)を設定電位800mVにおいて用いた。カラムはTSK-GEL ODS-80TM(4.6 $\times$ 150mm、東ソー)を用いた。溶出は、1.1mMオクタンスルホン酸ナトリウム、1mM EDTA $\cdot$ 2Naおよび15%メタノールを含みリン酸

でpHを2.95に調整した0.05Mリン酸カリウム緩衝液を移動相とし、室温で、ポンプ流速を1.0mL/minに設定して行った。

## 2.5 速度論的解析

皮膚内から回収された透析液中におけるCYAおよびSAの累積回収量を時間に対してプロットし、各プロットの直線部分の傾きおよび時間軸に対する切片より、透析液中へのCYAおよびSAの回収速度およびラグタイムを算出した。なお、皮膚透析液中での物質の時間変化は皮膚内への物質の累積吸収量の時間変化と等しいと仮定できるため<sup>15)</sup>、上述の回収速度とラグタイムは、CYAおよびSAのみかけの経皮吸収速度と経皮吸収のラグタイムに相当する。

## 2.6 統計処理

得られた実験値の有意差の検定はStudentのt検定を使用した。

## 3. 結果と考察

種々の添加剤が配合されている市販品から調製したCYAの油性溶液を、ラット皮膚表面へ適用した後のCYAの経皮吸収動態を経皮微小透析法を用いて種々検討することにより、市販化粧品を皮膚適用した際に皮膚へ吸収された特定成分の定量法としての本法の有用性を評価した。CYA油性溶液を単独で皮膚適用した際に、経皮微小透析法により得られた皮膚内CYA濃度とその累積量の経時変化をFig. 2に示す。いずれも適用直後から皮膚内にCYAが検出され、その濃度は速やかにプラトーに達した。また、皮膚表面に適用した油性溶液中のCYA濃度を増加させると、皮膚内のCYA濃度も増大した。

そこで、皮膚内累積量の経時変化から、みかけの経皮吸収速度とラグタイムを算出した結果(Table 1)、皮膚表面に適用したCYA濃度の上昇とCYAのみかけの経皮吸

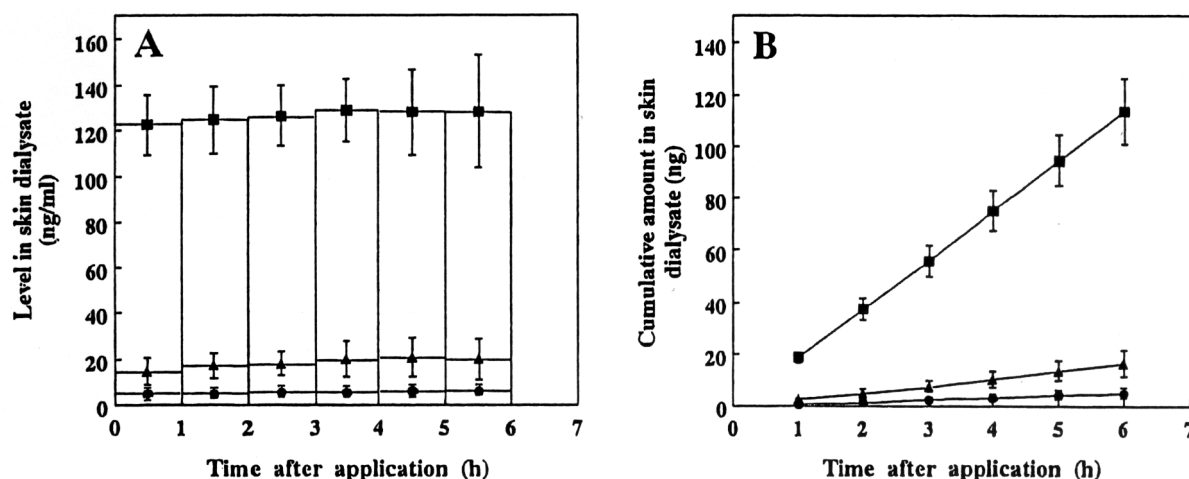


Fig.2 Level (A) and cumulative amount (B) profiles of CYA in the skin dialysate after topical application of 0.5% (●), 2% (▲) and 8% (■) CYA oily solutions in rats. Data represent the mean $\pm$ SE of 5 rats.

収速度の増加には良好な正の相関が認められた (Fig. 3)。このことより、経皮微小透析法は、皮膚内へ浸透した被験物質の吸収量の変化を *in vivo* の状態で正確にモニターできる方法であることが立証された。

CYA は、11 個のアミノ酸からなる免疫抑制作用を有

Table 1 *In vivo* skin apparent absorption parameters for CYA after topical application of CYA oily solutions in rats.

CYA concentration (w/v%)	Apparent absorption rate in skin dialysate (ng/h)	Lag time (h)
0.5	0.85±0.39	0.21±0.14
2.0	2.78±0.89	0.18±0.22
8.0	19.02±2.08	0.06±0.05

Values represent the mean±SE of 5 rats.

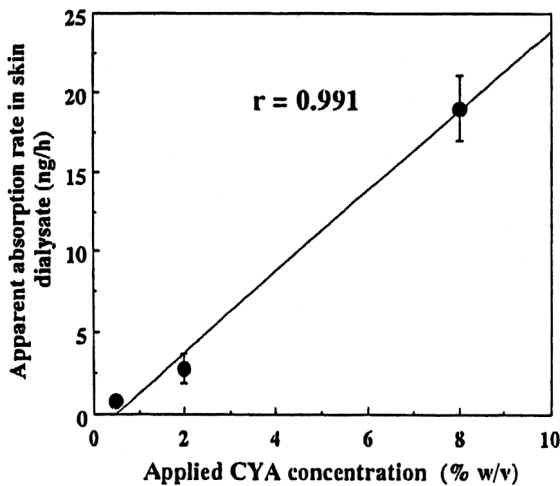


Fig.3. Correlation between topically applied CYA concentration and *in vivo* skin apparent absorption rate of CYA. Data represent the mean±SE of 5 rats.

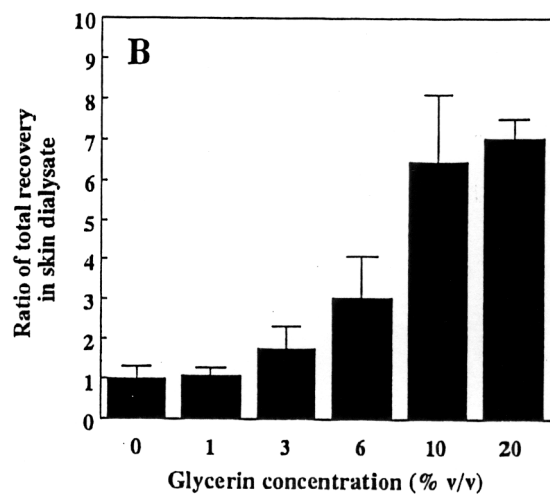
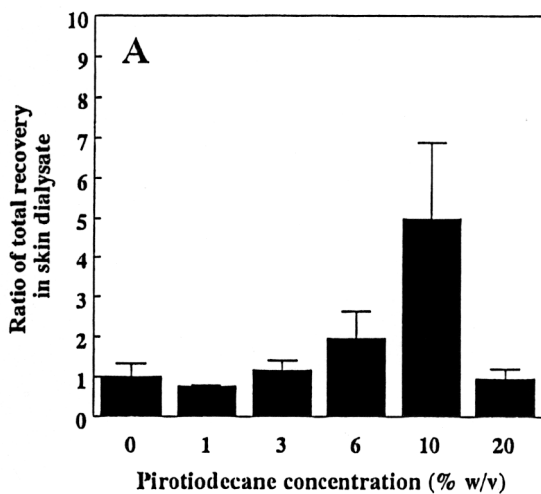


Fig.4. Ratio of total CYA recovery in the skin dialysate for 6 h after topical application of 2% CYA oily solutions with pirotiodecane (A) and glycerin (B) at various concentrations to that without them in rats. Control value was 16.5±5.1 ng. Data represent the mean±SE of 3-5 rats.

する分子量約 1200 の皮膚透過性の極めて低い環状ポリペプチドである。Hermannら<sup>16)</sup>は、ヒト摘出皮膚を拡散セル装置に装着し、*in vitro*で透過性を検討する実験を行い、CYA自身の皮膚透過性の低さは、アルコール類、非プロトン性極性溶媒、Azoneなど既存の経皮吸収促進剤を併用した場合においても改善されなかったと報告している。一方、Duncanら<sup>17)</sup>およびColeら<sup>18)</sup>は、本研究と同様、種々の添加剤が配合されているCYAの市販品から試験製剤を試作し、ヒト摘出皮膚を用いた種々の検討を行い、CYAが皮膚透過性を示すことを報告している。しかし、CYAの皮膚透過性に関して、Duncanら<sup>17)</sup>はアルコール類とAzoneの添加により改善されると報告しているが、Coleら<sup>18)</sup>は吸収促進剤としてアルコール類を添加しても改善されなかったと報告している。これらCYAの経皮吸収性における研究結果の相違は*in vitro*での実験条件の違いに起因するものと考えられる。従来、物質の経皮吸収性を評価する実験法としては、除毛した実験動物の摘出皮膚を拡散セル装置に装着し、*in vitro*でその透過性を検討する方法が繁用されてきた<sup>19)</sup>。しかし、同法は、非生理的条件下での実験法であるため、摘出皮膚間の含水量の違い<sup>20)</sup>、や微生物の繁殖<sup>21)</sup>などの問題点があり、実際の生体での経皮吸収状態を反映することが難しい。経皮微小透析法による*in vivo*経皮吸収実験法においては、皮膚内で微小灌流を行うため水分含量も一定で、生理的条件下に近い状態で被験物質の経皮吸収性を検討できる利点がある。そこで次に、化粧品にも適用可能な吸収促進剤の候補として、実際に化粧品に広く用いられているグリセリンと医療用製剤の添加剤として実用化されているピロチオデカンを選び、CYAの経皮吸収性に及ぼす促進効果を経皮微小透析法により測定し、得られた結果を比較した。

2% CYA 油性溶液の皮膚適用 6 h 後までの皮膚内 CYA 蓄積量に対する種々の濃度でピロチオデカンまたはグリセ

リンを添加した2% CYA 油性溶液の適用6h後までの皮膚内CYA蓄積量の割合をFig. 4に示す。ピロチオデカンは、添加濃度が6%以下では経皮吸収性の改善を認めなかったものを、10%まで上げるとCYAの皮膚内への吸収量は著しく増大し、みかけの経皮吸収速度は4.9倍有意に増大した(Table 2)。しかし、添加濃度を20%まで上げるとその効果は消失した。これらの結果より、油性溶液中CYAの経皮吸収性改善の目的でピロチオデカンを用いる場合には、その効果発現に至適濃度が存在することが示唆された。一方、グリセリンの場合は、添加濃度が3~10%の範囲でその濃度上昇に比例した経皮吸収性の改善効果が認められ、10%を超えるとその効果が飽和するといった一般的な吸収促進剤の特性が認められた。油性溶液中CYAのみかけの経皮吸収速度は、6%のグリセリンの添加で3.0倍、10%以上の添加では6.4~6.9倍有意に増大した(Table 3)。今回の研究結果から、広く化粧品に用いられているグリセリンが、皮膚透過性の低い物質の経皮吸収性改善のためにも利用できることが示唆された。

次に、化粧品成分として繁用されているSAの5%エタノール溶液を用いて、皮膚内への化粧品成分の吸収速度と皮膚内生体成分動態に及ぼす角質層の脱脂方法の影響を経皮微小透析法により検討した。一般に物質の皮膚浸透性は、正常皮膚に比べて、角質層除去皮膚(stripped skin)および脱脂皮膚(delipidized skin)では上昇することが知られている。角質細胞間脂質を脱脂するには、種々の有機

溶媒を用いる方法が報告されているが、大きく分類すると、メタノール、エタノールおよびアセトン等の水と混和性の溶媒を使用する方法と、ヘキサン、ジエチルエーテルおよびクロロホルム等の非混和性の溶媒を使用する方法である<sup>22)</sup>。その他、より脂質の脱脂効果の強い溶媒として、水と混和性、非混和性の溶媒の混合系についても、クロロホルム/メタノール(2:1)混合液が報告されている<sup>23)</sup>。これら種々の溶媒の脱脂効果については、水の透過性の変化を指標とした報告があり、エタノール<アセトン<ジエチルエーテル<クロロホルム<クロロホルム/メタノール(2:1)混合液の順であることが確認されている<sup>22)</sup>。一方、経皮微小透析法による皮膚内生体成分の検出は、一酸化窒素<sup>24)</sup>、ヒスタミン<sup>25)</sup>およびグリセロール<sup>26)</sup>等が、ヒトまたはラットの正常皮膚を用いて報告されている。しかし、化粧品成分浸透の障壁となる角質細胞間脂質を脱脂した皮膚を用いて、皮膚内生体成分量の変化を測定した報告は見当たらない。著者らは、これまでラットの血液中、脳内および胎仔組織中等において内因性カテコールアミン量を測定し、その結果を報告してきた<sup>7, 27)</sup>。そこで、本研究では、脱脂効果の異なるアセトン、ジエチルエーテル、クロロホルム/メタノール(2:1)混合液の3つの溶媒により脱脂したラット皮膚を用いて、5% SAエタノール溶液適用後に、物質浸透性が変化した状態の皮膚から吸収されたSA動態を求めると同時に、皮膚内の内因性カテコールアミン量を測定し、それらの関連性を解析した。

Table 2 In vivo skin apparent absorption parameters for CYA after topical application of 2% CYA oily solutions with various concentration of pirotidecane in rats.

Parameter	Pirotidecane concentration (w/v%)					
	0	1	3	6	10	20
Apparent absorption rate in skin dialysate (ng/h)	2.78±0.89	2.09±0.21	3.27±0.65	5.40±1.93	13.67±5.17*	2.64±0.71
Lag time (h)	0.18±0.22	0.10±0.10	0.18±0.16	0.15±0.04	0.14±0.19	0.18±0.13

Values represent the mean±SE of 3-5 rats. \* $P<0.05$  compared with value obtained without pirotidecane (Student's *t*-test).

Table 3 In vivo skin apparent absorption parameters for CYA after topical application of 2% CYA oily solutions with various concentration of glycerin in rats.

Parameter	Glycerin concentration (v/v%)					
	0	1	3	6	10	20
Apparent absorption rate in skin dialysate (ng/h)	2.78±0.89	2.93±0.50	4.78±1.67	8.39±2.78*	17.67±4.46*	19.21±1.37*
Lag time (h)	0.18±0.22	0.04±0.05	0.19±0.24	0.21±0.11	0.05±0.05	0.01±0.01

Values represent the mean±SE of 3-5 rats. \* $P<0.05$  compared with value obtained without glycerin (Student's *t*-test).

5% SA エタノール溶液を正常皮膚または脱脂皮膚の表面に適用した際、いずれも適用直後から皮膚内に SA が検出され、その濃度は 2h 以降からプラトーに達した。そこで、SA の皮膚内累積量の経時変化から、みかけの経皮吸収速度とラグタイムを算出した結果 (Table 4)、脱脂皮膚では正常皮膚に比べて、みかけの経皮吸収速度が、アセトン<ジエチルエーテル<クロロホルム/メタノール(2:1) 混合液の順番で増大した。特に、クロロホルム/メタノール(2:1) 混合液による皮膚脱脂後には、SA のみかけの経皮吸収速度は正常皮膚に比べて 3.7 倍有意に増大した。この結果は、溶媒の脱脂効力の強さの順番<sup>22)</sup> と一致するもので、SA の皮膚吸収量は、角質細胞間脂質が脱脂される程度に依存し、増大することが示唆された。一方、SA の経皮吸収ラグタイムに関しては、有意差は認められなかったものの、溶媒の脱脂効力の強さの順番<sup>22)</sup> に符号し、減少する傾向が示された。これらの結果は、洗顔用化粧品等の使用により皮膚が脱脂された場合には、化粧品成分の皮膚浸透性が、容量的および時間的に変化することを示唆するものである。

微小透析法を用いた SA の経皮吸収性に関する検討は、Murakami ら<sup>28)</sup> および Benfeldt ら<sup>29)</sup> によっても報告されている。前者は、種々の基剤による SA の軟膏剤を試作し、除毛したラットの正常皮膚と角質層除去皮膚に塗布する実験を行い、除去皮膚での SA 吸収量の変化は、水溶性基剤を用いた軟膏剤の場合が最も大きかったと報告している。また後者は、本研究と同様、5% SA エタノール溶液を試作し、ヘアレスラットの正常皮膚、角質層除去皮膚な

らびに脱脂皮膚に表面適用する検討を行っているが、アセトンによる脱脂皮膚からの SA の経皮吸収量は、正常皮膚での結果と変化なかったと報告している。SA の経皮吸収性に関するアセトンの脱脂効果についての我々と Benfeldt ら<sup>29)</sup> の研究結果の相違は、使用した実験動物の違いに起因するものと考えられる。

内因性的のカテコールアミン類は、一般にストレスにより大きく濃度変動することが知られているが、著者らは、ラットの脳内へ透析プローブ挿入後、1h 以上経過すると、ドーパミンをはじめ、ノルエピネフリン、DOPAC および HVA いずれも内因性物質量は安定することを報告している<sup>7)</sup>。また、ラットの血液中や胎仔組織中でも、透析プローブ挿入 1h 後には HVA の内因性物質量が安定することを報告している<sup>27)</sup>。そこで、本研究では、ガラスリザーバー中から皮膚脱脂用の溶媒または生理食塩水を除去した直後から、皮膚透析液中のカテコールアミン量の測定を開始した。その結果、ドーパミン、ノルエピネフリンおよび DOPAC はいずれの透析液中でも検出されなかったが、HVA は検出された (Table 5)。しかし、正常皮膚へ SA エタノール溶液を適用する前のコントロールに比べて、皮膚透析液中の HVA 量が有意に変化したのは、クロロホルム/メタノール(2:1) 混合液による脱脂皮膚へ SA エタノール溶液を適用した後のみであった (1.7 倍有意な上昇)。このことより、表面を溶媒で脱脂するストレスを加えられ、物質の角質層浸透性が変化した皮膚では、SA の経皮吸収量は有意に変化するものの、皮膚内カテコールアミン量の変動は小さいことが示唆された。

Table 4 In vivo skin apparent absorption parameters for SA after topical application of 5% SA ethanol solution to normal skin and various delipidized skins in rats.

Parameter	Normal skin	Delipidized skin		
		Acetone	Diethyl ether	Chloroform/methanol (2:1)
Apparent absorption rate in skin dialysate ( $\mu\text{g}/\text{h}$ )	0.16 $\pm$ 0.05	0.19 $\pm$ 0.03	0.36 $\pm$ 0.06*	0.59 $\pm$ 0.21*
Lag time (h)	0.85 $\pm$ 0.41	0.64 $\pm$ 0.22	0.45 $\pm$ 0.25	0.46 $\pm$ 0.31

Values represent the mean $\pm$ SE of 3 rats. \* $P$ <0.05 compared with value obtained normal skin (Student's  $t$ -test).

Table 5 Endogenous HVA levels obtained in skin dialysates after topical application of 5% SA ethanol solution to normal skin and various delipidized skins in rats.

Parameter	Normal skin	Delipidized skin		
		Acetone	Diethyl ether	Chloroform/methanol (2:1)
Level before application of SA (pmol/h)	0.46 $\pm$ 0.18	0.54 $\pm$ 0.16	0.58 $\pm$ 0.25	0.68 $\pm$ 0.13
Level after application of SA (pmol/h) <sup>1)</sup>	0.48 $\pm$ 0.14	0.54 $\pm$ 0.17	0.63 $\pm$ 0.31	0.78 $\pm$ 0.08*

Values represent the mean $\pm$ SE of 3 rats. <sup>1)</sup> average value for 6 h. \* $P$ <0.05 compared with value obtained level before application of SA in normal skin (Student's  $t$ -test).

#### 4. 総括

以上、経皮微小透析法を用いることにより、皮膚内へ浸透した化粧品成分の吸収量の変化を *in vivo* の状態で正確にモニターできることが明らかとなった。さらに、本法を用いて、ラットの脱脂皮膚表面へ適用した化粧品成分の経皮吸収動態の定量を行うと同時に、皮膚内生体成分量の変動を測定することにより、角質層透過性が変化した皮膚での化粧品成分吸収性と生体成分動態との関連性を解析することができた。経皮微小透析法による *in vivo* 経皮吸収実験においては、皮膚内で微小灌流を行うため水分含量も一定で、生理的条件に近い状態で化粧品成分の経皮吸収性を検討できる利点がある。経皮微小透析法を用いた評価法では、化粧品成分の皮膚内動態を、皮膚内生体成分動態と関連づけながら解析できるため、安全性と障害性の検討が同時にできる利点がある。

#### (参考文献)

- 1) Proksch E, Holleran WM, Menon GK, et al. : Barrier function regulates epidermal lipid and DNA synthesis, *Br. J. Dermatol.*, **128**, 473-482, 1993.
- 2) 西坂崇宏、山崎誠司 : 経皮吸収油剤の探索、*DDS*, **13**, 347-351, 1998.
- 3) 季梅花、上田秀雄、杉林堅次、ほか1名 : 角質保湿剤ヒアルロン酸ナトリウムの皮膚浸透に及ぼす超音波照射の影響、*DDS*, **12**, 415-419, 1997.
- 4) Elmquist WF, Sawchuk RJ : Application of microdialysis in pharmacokinetic studies, *Pharm. Res.*, **14**, 267-288, 1997.
- 5) Stahle L, Segersvard S, Ungerstedt U : Theophyllin concentration in the extracellular space of the rat brain : measurement by microdialysis and relation to behaviour, *Eur. J. Pharmacol.*, **185**, 187-193, 1990.
- 6) Nakashima M, Takeuchi N, Hamada M, et al. : *In vivo* microdialysis for pharmacokinetic investigation : a plasma protein binding study of valproate in rats, *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 1630-1634, 1994.
- 7) Nakashima M, Zhao MF, Nakashima MN, et al. : *In vivo* microdialysis to determine the relative pharmacokinetics of drugs, *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 988-994, 1996.
- 8) Nakashima M, Sasaki H, Ohira A, et al. : *In vivo* ocular microdialysis to monitor ocularly applied cyclosporin in the anterior chamber of rabbits, *Pharmaceutical Sciences*, **3**, 179-182, 1997.
- 9) Nakashima M, Shibata S, Tokunaga Y, et al. : *In vivo* microdialysis study of the distribution of cisplatin into brain tumour tissue after intracarotid infusion in rats with 9L malignant glioma, *J. Pharm. Pharmacol.*, **49**, 777-780, 1997.
- 10) Tokunaga Y, Nakashima M, Sasaki H, et al. : Local distribution into brain tumor and pharmacokinetics of 4-pyridoxate diammine hydroxy platinum, a novel cisplatin derivative, after intracarotid administration in rats with 9L malignant glioma : simultaneous brain microdialysis study, *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 1491-1496, 2000.
- 11) Matsuyama K, Nakashima M, Nakaboh Y, et al. : Application of *in vivo* microdialysis to transdermal absorption of methotrexate in rats, *Pharm. Res.*, **11**, 684-686, 1994.
- 12) Yano T, Higo N, Furukawa K, et al. : Evaluation of a new penetration enhancer 1-[2-(decylthio)ethyl]-azacyclopentan-2-one (HPE-101), *J. Pharmacobio-Dyn.*, **15**, 527-533, 1992.
- 13) 井戸田義弘、林正弘、大竹宏、ほか2名 : 吸収促進剤ピロチオデカンによるウサギ鼻粘膜吸収における作用機構の検討、薬物動態、**14**, S188, 1999.
- 14) Shibasaki J, Inoue Y, Kadosaki K, et al. : Hydrolysis of salicylic acid in rabbit intestinal microorganisms, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **8**, 989-995, 1985.
- 15) Hashimoto Y, Murakami T, Kumasa C, et al. : *In vivo* calibration of microdialysis probe by use of endogenous glucose as an internal recovery marker : measurement of skin distribution of tranilast in rats, *J. Pharm. Pharmacol.*, **50**, 621-626, 1998.
- 16) Hermann RC, Taylor RS, Ellis CN, et al. : Topical cyclosporin for psoriasis : *in vitro* skin penetration and clinical study, *Skin Pharmacol.*, **1**, 246-249, 1988.
- 17) Duncan JI, Payne SNL, Winfield AJ, et al. : Enhanced percutaneous absorption of a novel cyclosporin A formulation and assessment of its immunosuppressive activity, *Br. J. Dermatol.*, **123**, 631-640, 1990.
- 18) Cole GW, Shimomaye S, Goodman M : The effect of topical cyclosporin A on the elicitation phase of allergic contact, *Contact Dermatitis*, **19**, 129-132, 1988.
- 19) Sasaki H, Kojima M, Mori Y, et al. : Enhancing effect of pyrrolidone derivatives on transdermal penetration of 5-fluorouracil, triamcinolone acetonide, indomethacin, and flurbiprofen, *J. Pharm. Sci.*, **80**, 533-538, 1991.
- 20) Hinz RS, Hodson CD, Lorence CR, et al. : *In vitro* percutaneous penetration : evaluation of the utility of hairless mouse skin, *J. Invest. Dermatol.*, **93**, 87-91,

- 1989.
- 21) Sloan KB, Beall HD, Weimar WR, et al. : The effect of receptor phase composition on the permeability of hairless mouse skin in diffusion cell experiments, *Int. J. Pharm.*, **73**, 97-104, 1991.
- 22) Matoltsy AG, Downes AM, Sweeney TM : Studies of the epidermal water barrier. II. Investigation of the chemical nature of the water barrier, *J. Invest. Dermatol.*, **50**, 19-26, 1968.
- 23) Blank IH, Scheuplein RJ, MacFarlane DJ : Mechanism of percutaneous absorption. 3. The effect of temperature on the transport of non-electrolytes across the skin, *J. Invest. Dermatol.*, **49**, 582-589, 1967.
- 24) Clough GF, Bennett AR, Church MK : Measurement of nitric oxide concentration in human skin in vivo using dermal, *Exp. Physiol.*, **83**, 431-434, 1998.
- 25) Rizell M, Naredi P, Lindner P, et al. : Validation of the internal reference technique for microdialysis measurements of interstitial histamine in the rat, *Life Sci.*, **65**, 1765-1771, 1999.
- 26) Dodt C, Lonnroth P, Fehm HL, et al. : Intraneural stimulation elicits an increase in subcutaneous interstitial glycerol levels in humans, *J. Physiol.*, **521**, 545-552, 1999.
- 27) 岩永宏、中嶋幹郎、佐々木均、ほか3名 : マイクロダイアリシス法を用いたレボドパの胎盤移行性と胎児内動態の検討、*薬物動態*, **13**, S185, 1998.
- 28) Murakami T, Yoshioka M, Okamoto I, et al. : Effect of ointment bases on topical and transdermal delivery of salicylic acid in rats : evaluation by skin microdialysis, *J. Pharm. Pharmacol.*, **50**, 55-61, 1998.
- 29) Benfeldt E, Serup J : Effect of barrier perturbation on cutaneous penetration of salicylic acid in hairless rats : in vivo pharmacokinetics using microdialysis and non-invasive quantification of barrier function, *Arch. Dermatol. Res.*, **291**, 517-526, 1999.

# 接触性皮膚炎の研究：皮膚刺激とマクロファージ「細胞交通」の関与

静岡県立大学 薬学部微生物学教室

今井 康之

During the sensitization phase of contact hypersensitivity through skin, it is widely accepted that Langerhans cells pick up antigens within epidermis and then migrate to the draining lymph nodes to present antigens to recirculating T lymphocytes in association with major histocompatibility complex class II molecules. We discovered trafficking of connective-tissue macrophages from dermis to draining lymph nodes during skin sensitization as an independent phenomenon from Langerhans cell trafficking using FITC as an antigen. We could differentiate trafficking of macrophages from that of Langerhans cells using monoclonal antibodies specific for macrophage calcium-type lectin (MMGL) that is a connective-tissue specific macrophage marker. The extent of dermal macrophage migration was greatly influenced by the selection of vehicles to dissolve FITC. Using several kinds of vehicles, we observed a positive correlation between the efficiency of skin sensitization and the extent of macrophage migration. These results indicated that chemicals in the vehicles may exhibit an adjuvant activity through the induction of tissue macrophage trafficking. We directly demonstrated macrophages migration upon skin sensitization by local cell transfer experiments. Interestingly, the migration was induced by vehicle alone, such as acetone/dibutyl phthalate (AD), without FITC. These results also confirmed the critical role of vehicles with adjuvant activity.

We observed the initiation of dermal macrophage trafficking using mouse skin after epicutaneous application of AD. Thus, we immunohistochemically detected that MMGL-positive dermal macrophage density was transiently and reversibly decreased after epicutaneous application of AD. We also developed an organ culture system, in which skin fragments taken from the site of AD application were subjected to a short term organ culture. The density of MMGL-positive dermal macrophage decreased irreversibly in this system. Using the organ culture system, we discovered that AD treatment induced local production of pro-inflammatory cytokines during skin sensitization. Furthermore, we also found the activity that induces dermal macrophage exit was mediated by pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$ , using recombinant cytokines and antibodies against cytokines. A possibility that IL-1 $\beta$  treatment down regulates MMGL expression in macrophages has been excluded.

In conclusion, our studies revealed importance of connective tissue macrophage trafficking during skin sensitization as a mechanism of adjuvant activity of chemicals. Our *ex vivo* organ culture system using skin fragments will be useful to examine chemicals that might enhance skin sensitization.

## 1. 緒言

接触性皮膚炎は、遅延型アレルギー反応の一種であり、化粧品に限らず生活環境にある様々な化学物質の抗原性が原因となっている場合がある。化粧品の安全性を確保する上でも、接触による抗原感作がどのようにして起こるのかを正しく理解することが重要である。また、シックハウス症候群として問題となっているアレルギーでは、複数の化学物質による感作や、ある種の化学物質がそれ自身の抗原性とは別に何らかの作用機構を通じて抗原に対する感受性を高めている可能性が推察される。すなわち、化学物質のアジュバント活性について、その実態を明らかにすると共に、作用メカニズムを解明する必要がある。

皮膚からの接触感作では、表皮に存在する抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞が経皮的に侵入した抗原を拾い上げ、自ら所属リンパ節のT細胞領域に移動し、リンパ節に再循環してきたT細胞に対して主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスII分子を介して抗原提示を行い感作が成立すると一般に考えられている。リンパ節に移動したランゲルハンス細胞は、相互連結性樹状細胞とも呼ばれている。我々は、マクロファージ細胞表面に存在するカルシウム依存性レクチン(MMGL)の研究を通じて<sup>1-3,5,7)</sup>、この分子が表皮のランゲルハンス細胞と真皮の組織マクロファージを区別しうる、特異性の高いマーカーであることを見出してきた<sup>4)</sup>。すなわち、MMGLは、真皮の組織マクロファージに発現しているが、表皮のランゲルハンス細胞には発現していない。

我々の作製したMMGLに対するラットモノクローナル抗体を使って<sup>2,8)</sup>、接触性感作においてランゲルハンス細胞の所属リンパ節への移動とは別に、真皮マクロファージの所属リンパ節への移動が起こることを発見した<sup>6)</sup>。本研究では、接触性感作を増強する化学物質自体が、真皮から所属リンパ節へのマクロファージの細胞交通を誘導することを明らかにしたうえで、細胞交通の誘導活性と接触性感



Involvement of Macrophage Trafficking in Contact Dermatitis during Skin Sensitization

Yasuyuki Imai

Department of Microbiology, University of Shizuoka School of Pharmaceutical Sciences

作を増強する活性との間の相関を検討した。また、該当する化学物質が皮膚局所から組織マクロファージの細胞交通を開始させる活性があるかどうかを、皮膚局所を直接観察し評価する実験系を構築して解析した<sup>9)</sup>。さらに、この過程において、炎症性サイトカインが関与することを明らかにした<sup>10)</sup>。

## 2. 実験

### 2.1 接触感作と感作成立の評価

マウス (ICR または BALB/c、雌) の上腕部の毛を刈り、溶媒に溶解した FITC (0.5%、w/v) を 80 $\mu$ L 塗布した。6 日後に、アセトン/フタル酸ジブチル (AD) に溶解した FITC 20 $\mu$ L をマウスの右の耳介外面に塗布して惹起を行い、その 24 時間後の耳介の厚さをダイヤルシクネスゲージで計測した。左耳介を対照とした。

### 2.2 接触感作における溶媒の効果

感作時に FITC を溶解した溶媒は、以下の通りである。AD: アセトン/フタル酸ジブチル (1:1)、AO: アセトン/オリーブオイル (4:1)、EtOAc: 酢酸エチル、EtOH: エタノール、DMF: ジメチルホルムアミド、DMSO: ジメチルスルホキシド、SDS: 30%ラウリル硫酸ナトリウム水溶液。惹起には、すべて AD を用いた。

### 2.3 MMGL 陽性組織マクロファージの免疫組織化学的検出

リンパ節および皮膚の凍結切片を作製し、アセトン固定後、MMGL に対するラットモノクローナル抗体 LOM-14 を用いて、免疫組織染色を行なった<sup>3, 4)</sup>。

### 2.4 皮膚からの MMGL 陽性マクロファージの分離・精製と蛍光トレーサー標識

マウス皮膚 (腹部、背部、前後肢) の毛を刈ったのち細切し (1 辺 2 mm 程度)、コラゲナーゼ消化によって皮膚細胞を単離した。MMGL に対するラットモノクローナル抗体 LOM-8.7 を反応させた後、抗ラット IgG の結合したマグネチックビーズを反応させ、抗体の結合した細胞をマグネチックセルソーターを用いて回収した。MMGL 上の別の抗原決定基に対する抗体 LOM-14 を用いて評価した結果、皮膚細胞浮遊液中に 2~3% 程度含まれる MMGL 陽性細胞が 90% 以上にまで濃縮精製されることが分かった。精製した皮膚由来の MMGL 陽性マクロファージを、蛍光トレーサー CMTMR で標識した。

### 2.5 マクロファージ細胞交通の検出<sup>6)</sup>

CMTMR 標識した BALB/c マウスの皮膚由来 MMGL 陽性マクロファージを BALB/c マウスの前肢に皮内移

植した (10<sup>6</sup> 個 / 20 $\mu$ L)。16 時間後、移植部位の皮膚に FITC / AD または AD のみを塗布した。さらに 24 時間後に所属リンパ節である上腕 (brachial) リンパ節を採取して凍結切片を作製し、トレーサー陽性細胞を赤色蛍光にて検出するとともに、抗原である FITC を緑色蛍光、細胞の同定をモノクローナル抗体 LOM-14 / Cy5 標識抗ラット IgG による深赤色蛍光によって、3 重標識蛍光を検出可能なレーザー共焦点顕微鏡にて解析した。

### 2.6 皮膚小片の器官培養<sup>9, 10)</sup>

マウス皮膚の小片 (1cm $\times$ 1cm) を直径 1 $\mu$ m の小孔のあるポリエチレンテレフタレート膜上に、表皮側を上にして設置した (図 1)。これを、細胞培養用の 6 穴プレートに置き、無血清培地 ASF104 (味の素) を加え、皮膚小片が液相と気相の界面に来るように培養液の量を調整した。5% CO<sub>2</sub> / 95% 空気 の条件で CO<sub>2</sub> インキュベーターを用いて 37 $^{\circ}$ C で培養した。また、マウス皮膚小片を 24 時間培養し、培養上清を調製した。培養上清中の IL-1 $\beta$  量を ELISA で測定した (R&D Systems)。組換え型マウス IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  およびハムスター抗マウス IL-1 $\alpha$ 、抗マウス IL-1 $\beta$ 、抗マウス TNF- $\alpha$  を Genzyme より購入し、皮膚器官培養系で用いた。

## 3 結果および考察

### 3.1 FITC を用いた接触性皮膚炎モデルの評価

接触性皮膚炎の実験モデルにおいては、いかなる溶媒を用いて動物を感作するかが実験の成否をわける重要なポイントであることが従来より指摘されていた。FITC を抗原として用いたマウス接触性皮膚炎のモデルにおいては、アセトン/フタル酸ジブチル (1:1) を溶媒として用いるのが最適であることが報告されている。まず、この実験モデルにおいて、FITC 自身が抗原性を担っており、溶媒として用いた AD が抗原として相加的に働いてはいないことを確認するため、感作時および惹起時に AD に溶解した FITC、もしくは AD を単独でマウス皮膚に塗布し、耳介を用いた常法にしたがって遅延型過敏症の発症を観察した (図 2)。その結果、感作時および惹起時に FITC が存

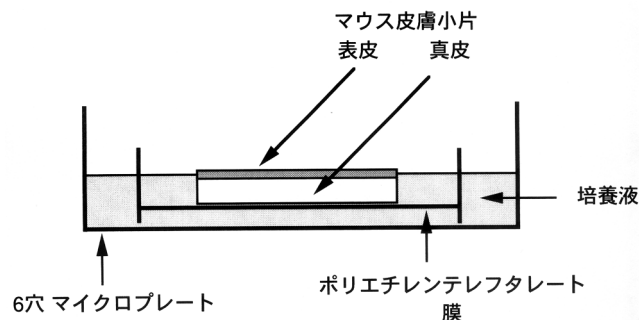


図 1 皮膚小片の器官培養法

在しているときにのみ、有意な耳介の膨らみが観測された。FITCの抗原性が確認され、ADの抗原としての貢献度は低いことが示された。

### 3.2 感作時に用いた溶媒中の化学物質の感作成立におよぼす影響

次に、抗原FITCを溶解する溶媒を変えて感作を行い、感作における溶媒の効果を比較検討した。なお、耳介における惹起時の溶媒としては、ADを用いた。免疫系がどの程度強く感作されるのかは、感作に用いた溶媒によって違うことが示された(図3)。従来から知られていたように、

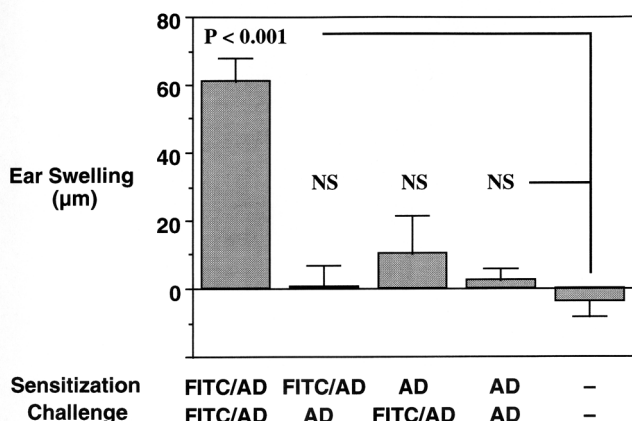


図2 フルオレッセイン (FITC) を抗原として用いたマウス接触皮膚炎モデル。FITCの溶媒としてアセトン/フタル酸ジブチル (AD) を用いている。耳介における遅延型過敏症応答には、感作/惹起ともFITCが必要であり、AD単独では抗原として有効ではない。

ADが最も有効な溶媒であり、他方DMSOを用いた場合全く感作が成立しなかった。

### 3.3 所属リンパ節におけるMMGL陽性マクロファージの増加

FITCを抗原として経皮的感作に用いる一つの利点は、抗原としてランゲルハンス細胞に取り込まれたFITCを蛍光で容易に追跡できる点である。実際、マウス上腕部にFITCを塗布した24時間後、上腕リンパ節の凍結切片を作製して蛍光顕微鏡下観察すると、リンパ節のT細胞領域にFITCを取り込んだ細胞が観察された。

一方、上腕リンパ節の凍結切片を経時的に作製し、MMGLに対するモノクローナル抗体を用いて免疫組織化学的に検出すると、感作後24時間をピークとして一過性にリンパ節内でMMGL陽性細胞数の増加が観察された。ランゲルハンス細胞は、表皮においてMMGL陰性であるため、この増加したMMGL陽性細胞はランゲルハンス細胞由来ではなく、真皮の組織マクロファージ由来ではないかと考えられたが(この証明は、3.5項参照)、これを支持する別の実験結果として、FITCを保有する細胞のうちMMGL陽性である割合が10%未満に過ぎなかったことがあげられる。このことは、表皮からリンパ節に抗原を運んできた抗原提示細胞(ランゲルハンス細胞/相互連結性樹状細胞)とは独立に、真皮から組織マクロファージの細胞交通が存在することを示唆する。さらに、MMGL陽性細胞の増加がFITCを溶解していないAD単独で起こることがわかった。したがって、この過程は、抗原であるFITCのランゲルハンス細胞への取り込みやプロセッシングとは別の現象としてとらえることが出来る。

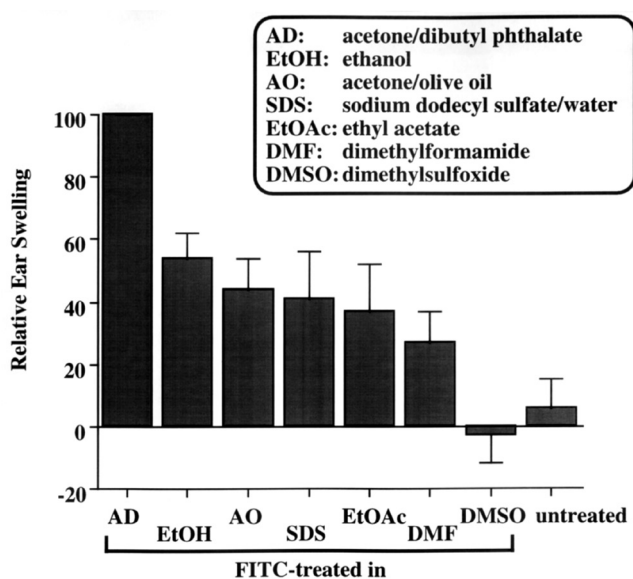


図3 FITCを抗原としたマウス接触皮膚炎モデルにおける溶媒の効果。FITCを様々な溶媒(横軸)に溶解しマウスを感作した。ADに溶解したFITCを耳介に塗布して惹起後、耳介の膨らみを測定した。ADで感作した場合の応答を100として標準化した。

### 3.4 リンパ節内のMMGL陽性細胞の増加と抗原感作成立との関係

そこで、様々な溶媒を用いて感作を行なったとき、感作の成立の程度と(1)ランゲルハンス細胞の細胞交通の誘導能および(2)所属リンパ節におけるMMGL陽性マクロファージの一過的増加を比較検討した。その結果、強力に感作を成立させる溶媒(例えばAD)の場合、ランゲルハンス細胞の細胞交通の促進およびMMGL陽性細胞の増加ともに大きいことが判明した。一方、典型的にはSDSの場合であるが、FITCを提示したランゲルハンス細胞の移動は少ない場合でも、ある程度の有効な感作が成立する場合があり、この場合MMGL陽性細胞の増加が顕著に認められることが分かった。

そこで、リンパ節におけるMMGL陽性細胞の増加をリンパ節内のコンパートメントごとに整理して観察し、それをスコア化した。すなわち、(1)T細胞領域(とくに傍皮膚質とリンパ胞の境界)での分布、(2)皮膚から輸入リン

パ管経由で細胞やリンパ液が入ってくる辺縁洞での分布、(3)未感作の状態において最も MMGL 陽性細胞の密度が高い髄質での分布にわけて整理した。その結果、T 細胞領域で MMGL 陽性細胞の増加がみられること、および髄質で MMGL 陽性細胞の枯渇が起きていないことが有効な感作成立のための条件であることが示唆された(表1)。MMGL 陽性細胞のリンパ節内での分布のスコア

の合計点と抗原で惹起した後の耳介の厚さにより評価した感作成立の程度との間には、良好な相関が認められた(図4)。このことは、所属リンパ節において MMGL 陽性細胞を増加させる溶媒中の化学物質の働きが、接触性皮膚炎の感作成立に重要な役割を担っていることを示唆している。

### 3.5 アジュバント活性のある化学物質による皮膚組織マクロファージの細胞交通の誘導：in vivo での証明

所属リンパ節において MMGL 陽性細胞が増加することが、真皮からの組織マクロファージの細胞交通によっていることを証明するために、以下の実験を行った。皮膚から MMGL 陽性細胞を単離し蛍光トレーサーで標識した後、レシピエント動物の皮内に移植し、移植部位より経皮的に感作した。感作 24 時間後に所属リンパ節の凍結切片を作製し、T 細胞領域の任意の視野における蛍光トレーサー陽性細胞の分布密度をレーザー共焦点顕微鏡を用いて計数した(図5)。FITC / AD により経皮的感作を行なうと、所属リンパ節の T 細胞領域に蛍光トレーサー陽性細胞が観察された。抗体を用いた多重染色によって蛍光トレーサー陽性細胞に MMGL が発現していることを確認した。さらに、蛍光トレーサー陽性細胞の出現は、抗原 FITC を加えずに AD のみを塗布した場合にも同様に見られたが、全く感作していない場合には認められなかった。この結果は、真皮から所属リンパ節への MMGL 陽性細胞の細胞交通が、溶媒である AD によって開始されたことを示唆している。

### 3.6 化学物質による組織マクロファージ細胞交通の開始：皮膚局所での証明

真皮の組織マクロファージは、組織中にとどまっておらず、ランゲルハンス細胞の様に移動しないと一般には信じられている。そこで、この常識に反論するためには、皮膚局所で組織マクロファージの移動が AD などの化学物質の塗布によって実際に開始されていることを示す必要がある。

まず、ICR マウスの前肢皮膚に AD を塗布後、皮膚の凍結切片を作製し、MMGL に対するモノクローナル抗体

表1 感作時に用いた様々な溶媒による感作成立の程度と所属リンパ節における MMGL 陽性細胞の皮膚からの移動との関係

溶媒	MMGL 陽性細胞の所属リンパ節での分布			Overall Index	耳介反応の強度 (相対値)
	T細胞領域(境界)	辺縁洞	髄質		
AD	3	1	1	5	100
EtOH	2	0	0	2	54
AO	1	0	0	1	44
SDS	2	1	0	3	41
EtOAc	2	0	-1	1	37
DMF	1	1	-2	0	27
DMSO	0	0	-1	-1	-3

感作後の所属リンパ節内の MMGL 陽性細胞の分布を免疫組織化学的に評価し、スコア化した。各部位におけるスコアを合計し、overall index とした。耳介反応の強度は、抗原 FITC で惹起後の耳介の厚さを相対的に示した。

### Ear Response

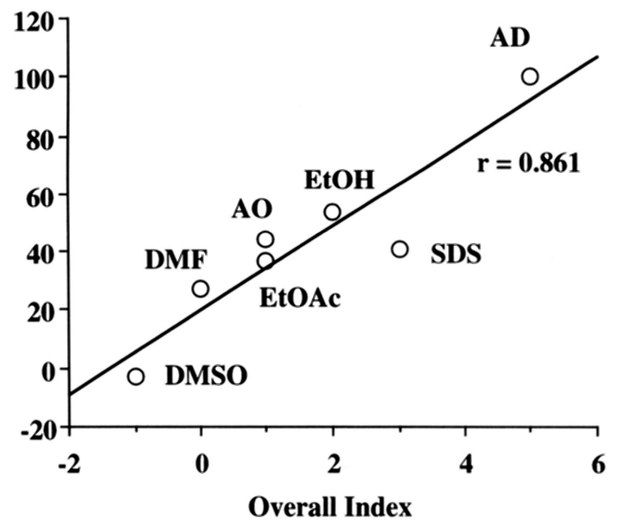


図4 感作時に用いた様々な溶媒による感作成立の程度と所属リンパ節における MMGL 陽性細胞数変動との相関性。リンパ節での MMGL 陽性細胞の存在程度をスコア化した overall index (表1 参照) を横軸にとり、耳介反応の強度 (相対値) を縦軸にとって、各溶媒を用いたときの結果をプロットした。各点の近くに、感作時に用いた溶媒の種類を示した。

LOM-14 で免疫組織染色後、MMGL 陽性組織マクロファージの真皮内での分布を調べた。結果をヒストグラムとして整理した(図6)。AD 塗布 4 時間後より、真皮内の MMGL 陽性細胞の分布密度が減少し、8 時間後に最も低密度となった。この変化は可逆的で、24 時間後には AD を塗布する前の状態に復帰した。

次に、真皮からの MMGL 陽性細胞の減少を試験管内で再現することを試みた。すなわち、マウスの腹部皮膚に AD を塗布後、塗布した部位の皮膚を採取し、図1に示した方法によって器官培養した。経時的に皮膚サンプルの凍結切片を作製した後、MMGL 陽性細胞の密度の多い領域 (> 15%) の数と観察した領域の総数との比率を求めた。すなわち、MMGL 陽性細胞の分布の多い領域の出現頻度を比較したことになる(図7)。その結果、生体内 (in vivo) で AD を塗布した場合、24 時間後には塗布以前

トレーサー陽性細胞密度  
(細胞数/200 × 200 μm)

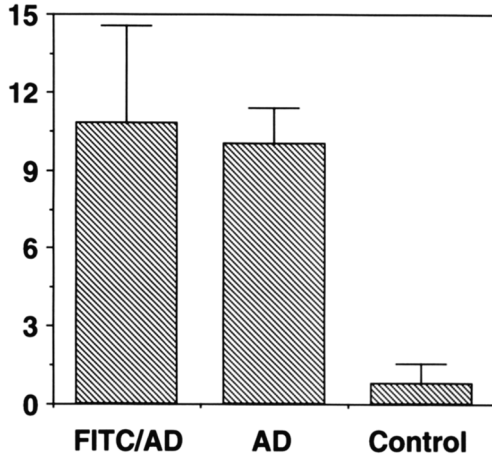


図5 経皮的感作によって誘導された真皮組織マクロファージの所属リンパ節への移動。皮膚より単離したMMGL陽性マクロファージを蛍光トレーサーで標識し、レシピエントマウスの皮内に移植した。24時間後、FITC/ADあるいはAD単独を移植局所の表皮に塗布した。Controlは未処置群。所属リンパ節のT細胞領域内に出現した蛍光トレーサー陽性細胞の密度を縦軸に示した。

の頻度に復帰したが、器官培養によって生体から切り離れた皮膚組織片の場合 (ex-vivo) 分布密度は回復せずに一方的に減少した。このことは、生体内ではMMGL陽性組織マクロファージが常に血液循環によって補充されているが、宿主から切り離れた皮膚片では補充が起こらないためと解釈できる。また、ADを塗布していない皮膚片を器官培養しても、MMGL陽性細胞の分布密度に変化がなかったことから、この変化が皮膚へのADの塗布によって誘導されたことが明かとなった。

以上の結果より、ADによる皮膚への刺激によって真皮からMMGL陽性細胞の移動が開始されることを、直接皮膚局所の観察によって明らかにすることができた。

### 3.7 化学物質による皮膚組織マクロファージ細胞交通の開始機構

ADのような化学物質が組織マクロファージの移動を開始させる機構の一端を解析した。ランゲルハンス細胞が表皮から所属リンパ節に移動する場合、局所で産生された炎症性サイトカインが関与していることが報告されている。また、ランゲルハンス細胞の所属リンパ節への移動には、ケモカインSLC

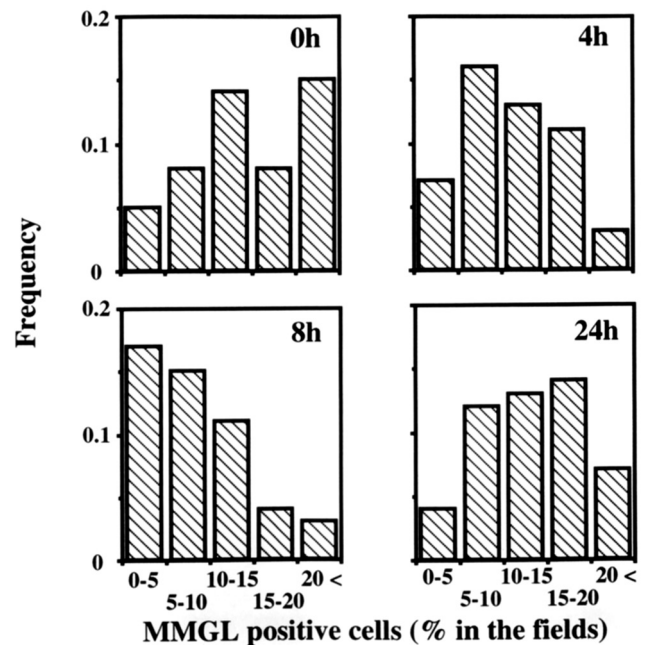


図6 マウス皮膚へのアセトン/フタル酸ジブチル (AD) 塗布後の、MMGL陽性細胞の真皮中での密度の変化。任意の長方形 (75 × 95 μm) の領域内の全細胞数に対するMMGL陽性細胞数の割合を、AD塗布後の時間経過をおいて調べた。合計50領域を計測し、MMGL陽性細胞の密度についてのヒストグラムを作製した。横軸が、MMGL陽性細胞の密度、縦軸がその細胞密度を有する領域の出現頻度を表す。AD塗布後MMGL陽性細胞の密度の多い領域 (> 15%) が減少し、24時間後に塗布前の状態に復帰した。

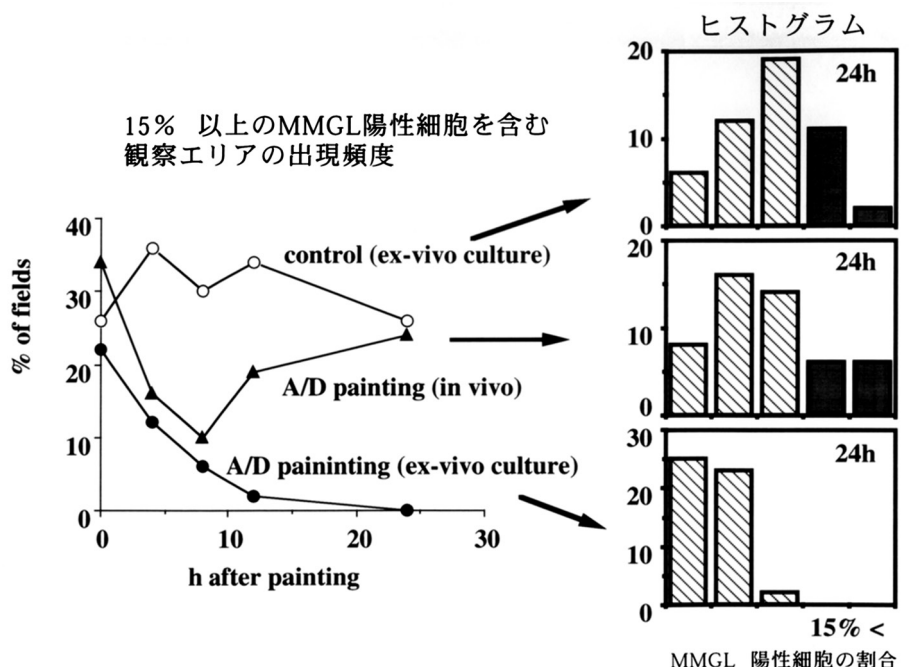


図7 マウス皮膚器官培養によるMMGL陽性細胞密度の変化。ADを塗布した30分後(黒丸)、あるいは未処置(白丸)のマウスの皮膚を図1の方法で器官培養した。経時的に皮膚サンプルを採取し、真皮内のMMGL陽性細胞の分布を計測した。図6と同様な方法でヒストグラムを作製し、AD塗布後MMGL陽性細胞の密度の多い領域 (> 15%) の出現頻度をプロットしてある。比較として、ADをマウスに塗布し、一定時間後に皮膚を採取した場合 (in vivo) を示した(黒三角)。図7の右側のヒストグラムは、AD塗布24時間後のMMGL陽性細胞の密度についての例である。

の関与を示した報告もある。

組織マクロファージの細胞交通の開始における可溶性因子の関与を調べるため、まず、ADを塗布したマウス皮膚を組織培養してその培養上清を回収した。未処置マウスの皮膚器官培養系にAD塗布したマウス皮膚の培養上清を添加し観察すると、培養上清の添加量に応じて真皮のMMGL陽性細胞の分布密度の低下が観察された。次に、培養上清をセントリコンフィルターを用いて分画すると、活性は分子量10,000以上の画分に保持された。このことは、活性の本体がケモカインではなく、それ以外のサイトカインであることを示唆している。さらに、ケモカイン受容体はGタンパク共役型であり百日ぜき毒素によってシグナル伝達が阻害されることが知られているが、AD塗布したマウス皮膚の器官培養系に百日ぜき毒素を共存させても、真皮のMMGL陽性細胞の分布密度の低下を阻止しなかった。

AD塗布したマウス皮膚の器官培養系に炎症性サイトカインに対する抗体を共存させて影響を調べた。抗マウスIL-1 $\alpha$ 、抗マウスIL-1 $\beta$ 抗体の共存によって、AD塗布後の真皮からのMMGL陽性細胞の減少が有意に阻害されたが、対照のハムスターIgGでは影響がなかった(図8)。また、抗マウスTNF- $\alpha$ にも同様に効果が認められた(not shown)。次に、正常マウス皮膚の器官培養で、AD塗布したマウス皮膚の培養上清中の因子の活性を調べる実験系を用いて、抗体の作用を調べた。培養上清の効果は、抗マウスIL-1 $\alpha$ 、抗マウスIL-1 $\beta$ 抗体によって解除された

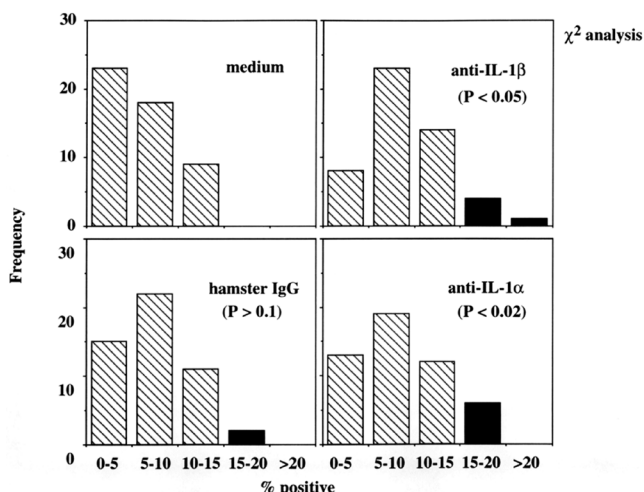


図8 AD塗布マウス皮膚器官培養における抗サイトカイン抗体の効果。ADを塗布したマウスの皮膚を器官培養する時に100 $\mu$ g/mLの抗体を共存させた。24時間後のMMGL陽性細胞の真皮中での密度を図7と同様に求めヒストグラムを作製した。横軸が、MMGL陽性細胞の密度、縦軸がその細胞密度を有する領域の出現頻度を表す。AD塗布後MMGL陽性細胞の密度の多い領域(>15%)が減少するが(medium)、IL-1 $\beta$ やIL-1 $\alpha$ に対する抗体を共存させるとその減少が抑制された。対照のハムスターIgGには効果がなかった。

(図9)。また、抗マウスTNF- $\alpha$ にも同様に効果が認められた(not shown)。さらに、組換え型サイトカインの効果も調べた。マウスIL-1 $\alpha$ 、マウスIL-1 $\beta$ 、マウスTNF- $\alpha$ は、正常マウス皮膚の器官培養系において、真皮からのMMGL陽性細胞の減少を誘導した(図10)。

次に、AD塗布マウス皮膚の培養上清に、実際にサイトカインが含まれているかどうかを調べた。ELISAによって、AD塗布したマウス皮膚の培養上清中にIL-1 $\beta$ が検出された(表2)。さらに、ADを塗布した皮膚におけるIL-1 $\beta$ の産生細胞を免疫組織学的に調べると、表皮のランゲルハンス細胞が主要な産生細胞であることがわかった。

これらの観察結果は、ADの塗布によって皮膚局所でIL

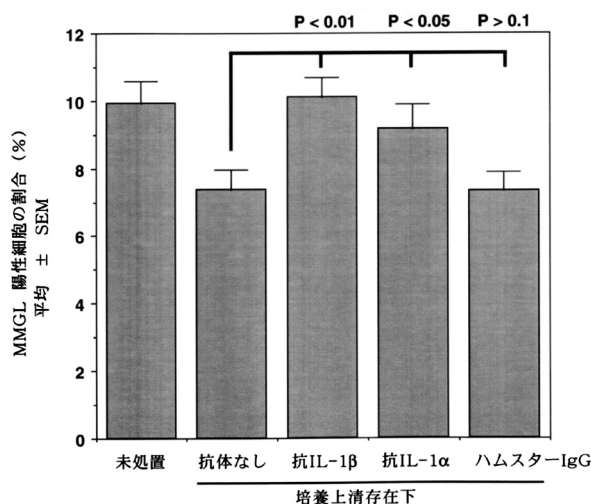


図9 正常マウス皮膚器官培養におけるAD塗布マウス培養上清の効果と、抗体による中和。AD塗布したマウス皮膚を培養し培養上清を作製した。正常マウス皮膚を器官培養する際に培養上清を添加するとともに、サイトカインに対する抗体も共存させた。縦軸に、器官培養24時間後の皮膚片の真皮におけるMMGL陽性細胞の細胞密度の平均値を示した。培養上清添加によって減少したMMGL陽性細胞密度がIL-1 $\beta$ やIL-1 $\alpha$ に対する抗体によって回復したが、対照のハムスターIgGには効果がなかった。

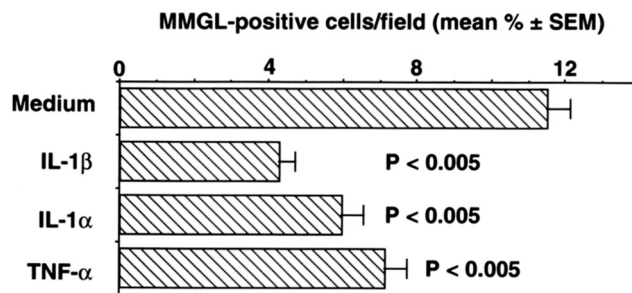


図10 正常マウス皮膚器官培養における炎症性サイトカインの効果。縦軸に、器官培養24時間後の皮膚片の真皮におけるMMGL陽性細胞の細胞密度の平均値を示した。マウスIL-1 $\beta$ 、IL-1 $\alpha$ およびTNF- $\alpha$ は、正常マウス皮膚片の真皮中のMMGL陽性細胞密度を減少させた。

表2 マウス皮膚片培養上清中に検出された IL-1 $\beta$

AD 塗布の方法	皮膚器官培養上清中のIL-1 $\beta$ 濃度 ng/ml
未処置	0 $\pm$ 0
マウスに塗布後、皮膚片採取	4.5 $\pm$ 2.9
採取した皮膚片に塗布	0 $\pm$ 0.3

-1 などの炎症性サイトカインが産生され、その作用によって MMGL 陽性マクロファージの移動が開始されることを強く示唆しているが、AD がマクロファージの MMGL 分子の発現自体を細胞レベルで下方調節している可能性を完全には否定できていない。そこで、マウス皮膚から MMGL 陽性細胞を単離し IL-1 $\beta$  存在下で培養した後、細胞を界面活性剤で可溶化した。可溶化した膜タンパク質を電気泳動しウエスタンブロッティングを行った後、mAb LOM-14 を反応させて MMGL を検出した。その結果、IL-1 $\beta$  は、42kDa の MMGL の発現量に細胞レベルでなら影響を与えないことがわかった。

#### 4. 総括

皮膚を介した感作において、ランゲルハンス細胞の移動とは別に、真皮内の組織マクロファージが所属リンパ節に移動することを、組織マクロファージ特異的な細胞表面マーカーを用いて明らかにした。この現象は、抗原である FITC を溶解した溶媒中の化学物質によって誘導されることが分かった。また、マクロファージの移動を誘起する能力の高い化学物質は、FITC による抗原感作を強めるアジュバントとして働くことを見出した。皮膚から単離した組織マクロファージを蛍光トレーサーで標識し、細胞移植実験によって細胞が実際に移動することを証明した。さらに、皮膚局所の観察および皮膚片の器官培養によって、溶媒中の化学物質が真皮からマクロファージの移動を開始させることを直接明らかにした。また、マクロファージ移動の開始過程で IL-1 をはじめとした炎症性サイトカインが関与していることを発見した。

本研究により、真皮をはじめとする結合組織性マクロファージの細胞交通が、抗原感作の局面で重要な役割を果たしていることが明らかとなり、化学物質のアジュバント作用の発現メカニズムとして重要であると考えている。また、試験管内の皮膚器官培養系は、化学物質アレルギーを誘発あるいは補助する恐れのある化学物質の検索に有用と思われる。

#### (引用文献)

- 1) Imai, Y. and Irimura, T. Quantitative measurement of carbohydrate binding activity of mouse macrophage lectin. *J. Immunol. Methods.*, **171**: 23-31, 1994.
- 2) Kimura, T., Imai, Y. and Irimura, T. Calcium-dependent conformation of a mouse macrophage calcium-type lectin. Carbohydrate binding activity is stabilized by an antibody specific for a calcium-dependent epitope. *J. Biol. Chem.*, **270**: 16056-16062, 1995.
- 3) Imai, Y., Akimoto, Y., Mizuochi, S., Kimura, T., Hirano, H. and Irimura, T. Restricted expression of galactose/N-acetylgalactosamine-specific macrophage C-type lectin to connective tissue and to metastatic lesions in mouse lung. *Immunology*, **86**: 591-598, 1995.
- 4) Mizuochi, S., Akimoto, Y., Imai, Y., Hirano, H. and Irimura, T. Unique tissue distribution of a mouse macrophage C-type lectin. *Glycobiology*, **7**: 137-146, 1997.
- 5) Hosoi, T., Imai, Y. and Irimura, T. Coordinated binding of sugar, calcium, and antibody to macrophage C-type lectin. *Glycobiology*, **8**: 791-798, 1998.
- 6) Sato, K., Imai, Y. and Irimura, T. Contribution of dermal macrophage trafficking in the sensitization phase of contact hypersensitivity. *J. Immunol.*, **161**: 6835-6844, 1998.
- 7) Akimoto, Y., Imai, Y., Hirabayashi, J., Kasai, K. and Hirano, H. "Histochemistry and Cytochemistry of Endogenous Animal Lectins" *Progress in Histochem. Cytochem.*, vol. **33**, number 1, Gustav Fischer Verlag, pp. 1-92, 1998.
- 8) Kimura, T., Hosoi, T., Yamamoto, K., Suzuki, N., Imai, Y. and Irimura, T. Epitope mapping of monoclonal antibodies specific for a macrophage lectin: a calcium-dependent epitope is in the carbohydrate recognition domain. *Molec. Immun.* **37**: 151-160, 2000.
- 9) Chun, K-H., Imai, Y., Higashi, N. and Irimura, T. Migration of dermal cells expressing a macrophage C-type lectin during the sensitization phase of delayed-type hypersensitivity. *J. Leukocyte Biol.* **68**: 471-478, 2000.
- 10) Chun, K-H., Imai, Y., Higashi, N. Irimura, T. Involvement of cytokines in the skin-to-lymph node trafficking of cells of the monocyte-macrophage lineage expressing a C-type lectin. *Int. Immunol.* **12**: 1695-1703, 2000.

# アスコルビン酸膜透過促進キャリアーの開発と機構探求

東北大学大学院 薬学研究科

鈴木 巖

We synthesized lipophilic cyclodextrins (CDs) having ionizable amino groups to investigate their abilities to form ion pair compounds with a biologically important reducing agent of ascorbic acid (vitamin C, AsA). Although permethylation on the hydroxy groups of hydrophilic CD derivatives to make them lipophilic is unsuccessful, peracetylation affords lipophilic CD derivatives having amino groups with excellent yields. The preliminary studies using hydrophilic amino-CDs revealed that the amino group introduced to the  $\beta$ -CD platform is able to form an ion pair with AsA. The binding constants of two monoamino- $\beta$ -CDs, one of which has an amino group at the primary hydroxy side (1) and the other has it at the secondary hydroxy side (2), for AsA are 140 and 220  $M^{-1}$ , respectively, indicating the superiority of the secondary hydroxy side modification.  $\beta$ -CD itself may bind AsA, but the binding constant for the  $\beta$ -CD-AsA complex cannot be obtained spectroscopically. Guest binding studies with adenine nucleotides, which have similar negative charges support the ion pair formation between amino-CDs and AsA even in the highly polar aqueous solutions. Binding AsA by the amino-CDs is also supported by the retardation effect on the oxidative degradation of AsA. Ion pair formation between lipophilic CDs having amino groups and AsA is indicated by liquid-liquid extraction and liquid membrane transportation experiments. When the hydroxy groups of 1 and 2 are acetylated (**Ac1** and **Ac2**, respectively) to make them lipophilic, they successfully extract AsA dissolved in aqueous phase into ethyl acetate phase where the lipophilic amino-CDs exist. The extraction abilities of **Ac1** and **Ac2** are greater than tetrabutylammonium bromide, a well know ion pair agent, indicating that both amino group and CD framework are critical for the uptake of AsA from aqueous to organic phases. As the binding strength difference observed for the corresponding hydrophilic CDs, 1 and 2, the secondary hydroxy side modification is superior to the primary hydroxy side modification indicated by the greater extraction ability of **Ac2**. The results obtained in this study suggest that (1) lipophilic amino-CD derivatives may be useful in uptake of AsA across an organic layer, especially those which have amino groups at the secondary hydroxy side, and (2) the transmembrane permeation abilities of lipophilic CD derivatives for AsA may be estimated from simple binding studies in aqueous solutions using corresponding hydrophilic CD derivatives.

## 1. 緒言

アスコルビン酸 (AsA; Fig. 1) はその標準酸化電  $E^{1\circ}$  が 0.127 V (vs. NHE, pH5.0) であり, 容易に酸化される物質, すなわち還元剤であり, 生体に対する著しい低毒性とあわせ, 生体内で発生する酸化作用を有するラジカル種を還元することで抗酸化作用の主要な部分を担っている物質である<sup>1)</sup>. 一般に AsA のような高い親水性を有する化合物の場合, 生体はそれらの物質が必要とされる標的細胞に, それらに対する輸送タンパクを生体膜上に具備し, その膜輸送を行っている. しかしながら, 輸送タンパクがない細胞や, AsA を積極的に外部に投与しその優れた抗酸化作用を発揮させる場合には, 細胞表面にて親水性物質を本質的には透過させない生体膜の存在は大きな障害となる. AsA の経皮投与などを考慮する場合, 疎水性の細胞膜や細胞間脂質を透過させる必要があり, この観点から AsA に脂溶性側鎖を導入する試みがなされている<sup>2)</sup>. しかしな

が, 脂溶化 AsA 誘導体は脂質膜中に滞留する傾向が高く, 細胞内への AsA の導入には AsA を直接吸収させる方が効率が良いといえる. 本研究では, AsA 同様, 生体に対する毒性が著しく低いシクロデキストリン (CD; Fig. 2)<sup>3)</sup> に正電荷を持たせ, かつ脂溶化することで, AsA と脂溶性のイオン対を形成させ, AsA の膜透過を実現可能か否かについての検討を行うこととした.

## 2. 実験

### 2.1 合成

**水溶性  $\beta$ -CD の過アセチル化:**  $\beta$ -CD あるいは既報<sup>4-6)</sup> により合成したアジ化- $\beta$ -CD あるいは 2,3-マンノエポキシド- $\beta$ -CD をピリジンに溶解させ無水酢酸を加え, 50°C にて 2 日間反応させた後, 溶媒溜去. 残滓にクロロホルムを加え, 硫酸水素ナトリウム溶液, 炭酸水素ナトリウム溶液, および飽和食塩水にて洗浄後, シリカゲルカラムクロマトグラフィーに附し (溶媒は酢酸エチル-メタノール系), 目的物を収率 83 ~ 92% で得た.

**Ac1 の合成:** 上で得られた過アセチル化-アジ化- $\beta$ -CD をメタノール-酢酸溶媒中, 水素雰囲気下でパラジウム触媒による接触還元を常温, 常圧で行い目的物を収率 75% で得た.

**Ac2 の合成:** 上で得られた過アセチル化-2,3-マンノエポキシド- $\beta$ -CD に, ベンジルアミンを作用させ, シリカゲルショートカラムクロマトグラフィーにて精製 (溶媒は酢酸



Development of Carrier Molecules Capable of Transmembrane Permeation of Ascorbic Acid and Exploration of Its Mechanism

Iwao Suzuki

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University

エチル-メタノール) した後, このベンジル基を Ac1 で行ったのと同じ条件下, パラジウム触媒による接触還元にて除去し, 目的物を収率 44% で得た.

## 2.2 AsA の安定性

AsA 1.0mM と各種水溶性 CD 誘導体と 5.0mM 含むリン酸緩衝液 (100mM; pH7.2) を恒温槽中に放置し, 定期的にサンプルを採取し, HPLC (UV 検出, 波長 284nm; ODS カラム 4.6 × 150mm; 溶離液 pH5.0 リン酸緩衝液: アセトニトリル (8 : 2), 5mM の臭化テトラエチルアンモニウム (TBAB) を含む) にて AsA を定量し<sup>7)</sup>, 擬一次反応速度式に従い AsA の見かけの消失速度定数  $k$  を算出した. 温度は 7, 15, 25, 35, 45°C の各温度で行い, アレニウスプロットおよびアイリングプロットより活性化エネルギー  $E_a$ , 頻度因子  $A$ , 活性化エンタルピー  $\Delta H^\ddagger$ , および活性化エントロピー  $\Delta S^\ddagger$  を求めた.

## 2.3 結合定数の算出

AsA の  $7.5 \times 10^{-5}$  M 水溶液 (pH5.0 リン酸緩衝液) に種々

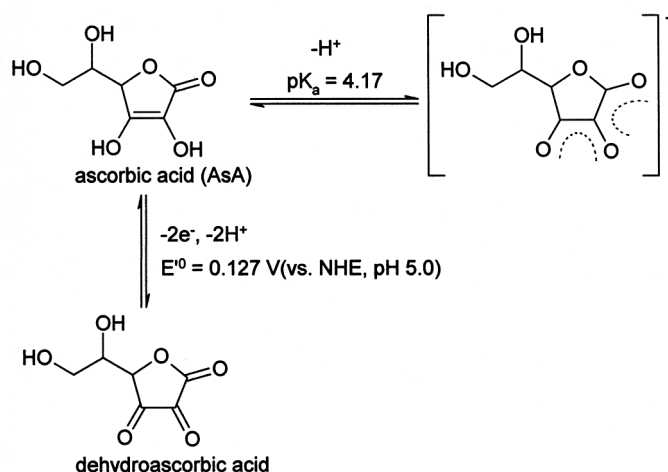


Fig.1 Structures of ascorbic acid (AsA), its deprotonated form, and dehydroascorbic acid.

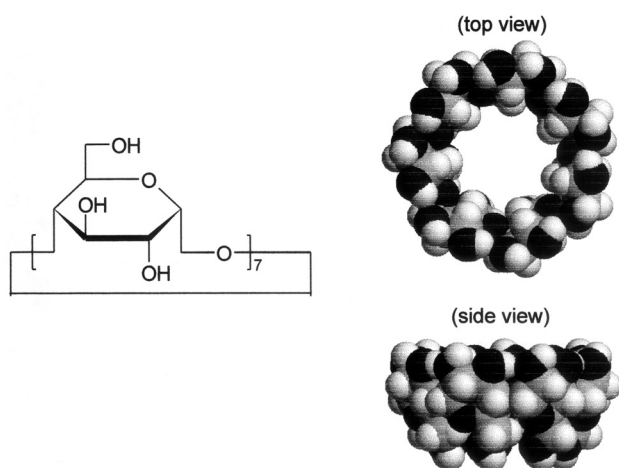


Fig.2 Structures and space filling model of  $\beta$ -CD.

の濃度になるよう, 各種水溶性  $\beta$ -CD 誘導体を添加し, 円二色性スペクトルを測定し, 265nm 付近の円二色性強度変化より, ベネジ-ヒルデブランドプロット<sup>8)</sup> より, 結合定数を算出した.

## 2.4 液-液抽出実験

AsA 1.0mM リン酸緩衝液 (5.0mL) と各種脂溶性  $\beta$ -CD 誘導体を 1.0, 2.0, 3.0mM になるよう溶解させた酢酸エチル溶液をマグネチックスターラーにて 900rpm の角速度にて 10 分間攪拌し, 2 相に分離後, 水相および有機相を採取し, HPLC (条件は 2.2 に同じ) にて AsA を定量, 分配係数  $K_p$  ( $=[\text{AsA}]_{\text{有機相}} / [\text{AsA}]_{\text{水相}}$ ) を求めた.

## 2.5 液膜輸送実験

AsA の液膜輸送には内径 20mm, 高さ 70mm, 連結部の長さ 50mm, 連結部の内径 20mm の H 型セルを用いた. 送相として 10mM の AsA の pH5.0 リン酸緩衝液 5.0mL, 受取相として pH5.0 リン酸緩衝液 10.0mL を用い, 有機相には各種脂溶性  $\beta$ -CD 誘導体を 5.0mM 含む酢酸エチル溶液 30mL を用いた. 定期的に 2 つの水相から 10mL をサンプリングし, 適宜希釈した後, HPLC (条件は 2.2 に同じ) にて AsA を定量した. なお, 実験中, 2 つの水相はマグネチックスターラーにて 100rpm の角速度にて攪拌した.

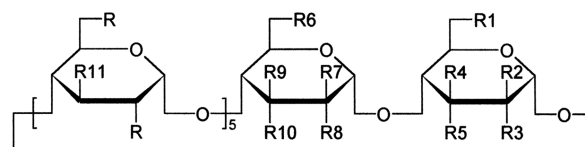
## 3. 結果

### 3.1 CD 誘導体の合成

本研究で用いた, あるいは合成を試みた  $\beta$ -CD 誘導体を Table1 に示した. CD の 1 つの水酸基を常法によりトシル化した後, アジドあるいはエポキシドに導き, これら中間体の残存する水酸基をピリジン中で無水酢酸を用いるアセチル化<sup>7)</sup> あるいは DMF 中 NaH-ヨウ化メチルを用いるト

Table 1 Structures of  $\beta$ -CD Derivative Used in This Study

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R
$\beta$ -CD	OH	H	OH	OH	H	OH	H	OH	OH	H	OH	OH
1	NH <sub>2</sub>	H	OH	OH	H	OH	H	OH	OH	H	OH	OH
2	OH	OH	H	H	NH <sub>2</sub>	OH	H	OH	OH	H	OH	OH
3	NH <sub>2</sub>	H	OH	OH	H	NH <sub>2</sub>	H	OH	OH	H	OH	OH
DM	OMe	H	OMe	OH	H	OMe	H	OMe	OH	H	OH	OMe
TM	OMe	H	OMe	OMe	H	OMe	H	OMe	OMe	H	OMe	OMe
Ac $\beta$	OAc	H	OAc	OAc	H	OAc	H	OAc	OAc	H	OAc	OAc
Ac1	NH <sub>2</sub>	H	OAc	OAc	H	OAc	H	OAc	OAc	H	OAc	OAc
Ac2	OAc	OH	H	H	NH <sub>2</sub>	OAc	H	OAc	OAc	H	OAc	OAc
Ac3	NH <sub>2</sub>	H	OAc	OAc	H	NH <sub>2</sub>	H	OAc	OAc	H	OAc	OAc



リメチル化,あるいはDMF-DMSO混合溶媒中Ba(OH)<sub>2</sub>-BaO共存下でジメチル硫酸で処理するジメチル化により脂溶性を試みた。最後にアジド基は還元し,エポキシ基はベンジルアミンによる環解裂後,接触還元によりアミノ基へと変換した。メチル化した場合には,副生物が多く中間体の精製が困難であった。一方,アセチル化を施したAcb, Ac1, Ac2では,一般に良好な収率で目的とするCD誘導体を得ることができた。CDに複数のアミノ基を導入したAc3は,副生物が多く目的物を純品で得ることはできなかったが,予備的に実験に用いた。

### 3.2 水溶性CD誘導体によるAsAの包接の確認

脂溶性CD誘導体を用いる前に,脂溶化していない

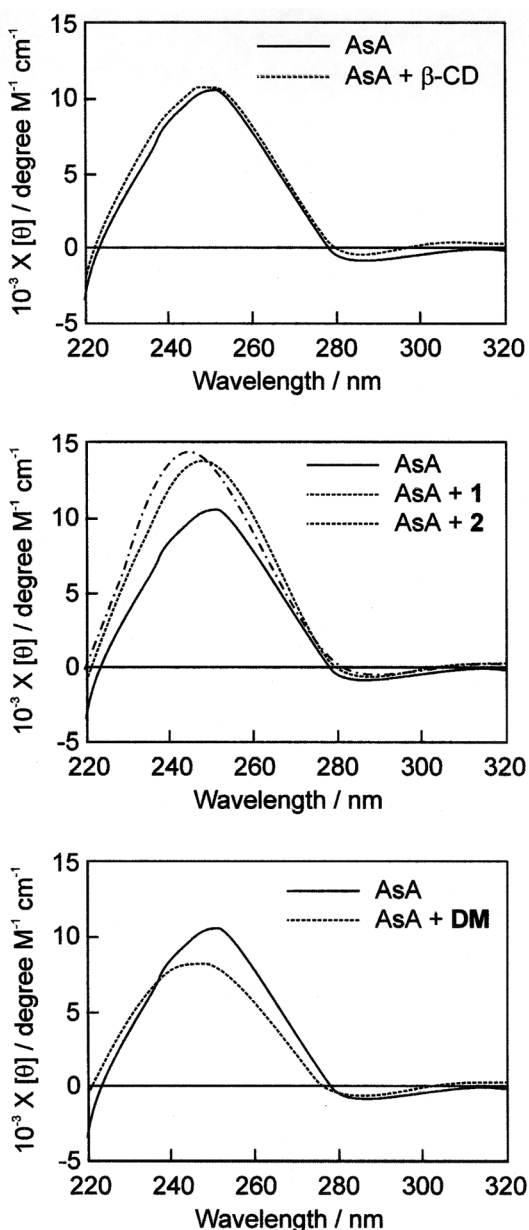


Fig.4 Circular dichroism spectra of AsA ( $7.5 \times 10^{-5} \text{M}$ ) in phosphate buffer solutions (pH7.4), alone or in the presence of 5.0mM of  $\beta$ -cd (top), 1 or 2 (middle), and DM (bottom).

$\beta$ -CD およびその誘導体について, AsA の包接が起こるかどうかを検討した。Fig. 4に AsA の円二色性スペクトルとそれに及ぼす各種水溶性  $\beta$ -CD 誘導体の影響を示す。AsA と  $\beta$ -CD との包接化合物形成は,すでに AsA の吸光度と電極反応に及ぼす  $\beta$ -CD の影響よりその結合定数が pH 1 で  $K=1200 \text{M}^{-1}$  と報告されている<sup>9)</sup>が,われわれが行った円二色性ならびに NMR の結果では pH5 および 7 で  $\beta$ -CD が AsA を包接しているという確証は得られなかった。しかしながら, Table2 に示したように, AsA の酸化分解を抑制するため,弱いながらも包接は起こっている可能性が高い。一方,アミノ化した  $\beta$ -CD である **1** および **2** では, AsA の円二色性スペクトルが **1** および **2** の添加により変化したことから, **1** と **2** は AsA を包接していることが示唆された。この円二色性スペクトルの変化より,結合定数が算出可能であり, **1** は  $K=140 \text{M}^{-1}$ , **2** は  $K=220 \text{M}^{-1}$  にて AsA を包接することが明らかとなった。

AsA の水溶液中 (pH7.2) での安定性に及ぼす各種 CD 誘導体の効果をみたところ,円二色性スペクトル上にて包接が示唆された **1** と **2** では,顕著に AsA の安定性を増大させた (Table2)。また,AsA の分解過程の DH と DS に及ぼすこれら CD 誘導体の影響は小さく (Table3)<sup>10)</sup>, AsA の酸化分解祖素反応には CD は関与しない,すなわち,包接することで AsA の酸化分解を抑制していることが強く示唆される。

$\beta$ -CD のメチル化体である 2,6-ジメチル- $\beta$ -CD (DM) と 2,3,6-トリメチル- $\beta$ -CD (TM) は両親媒性物質であり,水溶性を具備していることから円二色性による包接の確認を行ったところ,AsA の円二色性スペクトルに影響を与え,包接化合物形成が示唆された。しかしながら,結合定数解析では,1:1 の包接を仮定しても,結合定数が得られず,他の化学両論比の包接化合物の形成が考えられるが,現時点ではその詳細は不明である。また,他の  $\beta$ -CD 誘導体とは異なり,DM と TM は AsA の安定性を減少させたことから,あるいは溶存酸素を含んだ形の包接化合物を形成している可能性も考えられる。

水溶液中におけるイオン対形成が可能なことは,AsA と同様の負電荷を生理学的 pH において負電荷を有し,かつ 5 炭糖部分を持つアデニンヌクレオチドを用いて,さらに検討した。円二色性スペクトルによる検討から,各種アデニンヌクレオチドと **1** および **2** との間の包接化合物の結合定数を得ることができた (Table4)。その結果,やはり CD 上にアミノ基を導入することにより,ゲストアニオンとの間の効果的なイオン対形成が起こり,電荷を持たない  $\beta$ -CD よりも各種アデニンヌクレオチドを強く認識できることが明確に示された。さらに,1H-NMR スペクトルを検討したところ,リボースのアノマープロトンが CD 誘導体添加によって大きくシフトし,アデニンヌクレオチドで

Table 2. Apparent Pseudo-First Order Rate Constants for Auto-Oxidation of AsA in at Various Temperature<sup>a,b</sup>)

Condition	k / h <sup>-1</sup>				
	7°C	15°C	25°C	35°C	45°C
AsA only	0.0095	0.0278	0.124	0.131	0.365
with β-CD	0.0094	0.0248	0.0408	0.116	0.257
with DM	0.0182	0.0408	0.158	0.277	0.408
with TM	0.0166	0.0338	0.135	0.225	0.412
with 1	0.0105	0.0204	0.0630	0.136	0.315
with 2	0.0078	0.0178	0.0356	0.102	0.244

- a) All measurements were performed with 0.1 M phosphate buffer (pH 5.0).  
 b) The initial concentration of AsA was 1.0 mM and the concentrations of the additives were 5.0 mM.

Table 3. Activation Energy (E<sub>a</sub>), Activation Enthalpy (ΔH<sup>‡</sup>), and Activation Entropy (ΔS<sup>‡</sup>) for the Auto-oxidation of AsA

Condition	E <sub>a</sub>	ΔH <sup>‡</sup>	ΔS <sup>‡</sup>
	kJ / mol <sup>-1</sup>	kJ / mol <sup>-1</sup>	J K / mol <sup>-1</sup>
AsA only	70.5	73.1	137
with β-CD	64.9	67.5	116
with DM	65.2	67.5	122
with TM	66.5	69.0	126
with 1	69.4	72.0	132
with 2	68.8	71.1	127

Table 4 Binding Constants of β-CD Derivatives for Adenine Derivatives in pH 7.4 Aqueous Solutions at 25°C

guest	K / M <sup>-1a)</sup>		
	β-CD	1	2
adenosine	16 (12)	13 (5.4)	- (-) <sup>b)</sup>
AMP	44 (44)	46 (39)	79 (52)
ADP	19 (15)	66 (4.9)	140 (38)
ATP	32 (38)	75 (30)	160 (120)

- a) The values in parentheses were obtained in the presence of 20 mM of MgCl<sub>2</sub>.  
 b) Values could not be obtained owing to the small circular dichroism changes caused by the addition of 2.

はアデニン環ではなく、リボース部分が包接されることが判明した。

### 3.3 脂溶性 CD 誘導体による AsA の液 - 液抽出

水溶性 CD 誘導体による結果から、アミノ基を導入した β-CD 誘導体はイオン対形成を補助駆動力として AsA を包接することが示唆された。したがって、より疎水的な環境下では Ac1, Ac2 などの脂溶性した β-CD 誘導体との間

でより効果的なイオン対形成が期待された。そこで、有機相に酢酸エチルを用い、その中に各種脂溶性 CD 誘導体を溶解させ、水相中に存在する AsA の抽出能を検討した。なお、有機相の溶媒として酢酸エチル以外にもクロロホルムや n-ブタノールを用いたが、その場合には混合・振とう時にエマルジョン形成が起こったため、抽出能を評価することは不能であった。液 - 液抽出の結果を Table 5 に示す。β-CD の過アセチル化体である Acb は AsA の有機相への抽出には何ら効果を示さなかったのに対し、アミノ基を有する Ac1 では小さいながらも抽出能が認められた。さらに、Ac2 は Ac1 よりも効果的に AsA を有機相へと移行させることがわかった。両親媒性物質である DM および TM はアゾ色素の液膜輸送に有効であることが報告されているが<sup>11)</sup>、AsA の液 - 液抽出においては、全くその効果を示さなかった。これらは上述の通り、水溶液中で AsA を包接することが示唆されており、かつ有機溶媒に可溶であるにもかかわらず、AsA の有機相への移行を行えなかったことから、有機相への AsA の移行には CD の空洞のみではなく、正荷電を持ちうるアミノ基の存在が重要であること、したがって、水相 - 有機相の界面でのイオン対形成が必要であることが示唆された。このことは対照実験として行った TBAB をイオン対形成剤として用いた場合に、わずかではあるが、

有機相への移行を観察できたことから支持される。また、TBAB と Ac1 や Ac2 の AsA に対する分配係数 K<sub>p</sub> を比較すると、Ac1 で約 2 倍、Ac2 では約 4 倍の抽出能が認められた。このことから、単なるイオン対形成ではなく、界面での包接に CD 空孔も関与していることが示唆された。

### 3.4 脂溶性 CD 誘導体による AsA の液膜輸送

前節での結果をふまえ、H 型セルを用いる AsA の液膜

Table 5 Partition Co-efficient ( $K_p$ ) of AsA between Aqueous and Ethyl Acetate Layers<sup>a)</sup>

Additives	$K_p$			
	0	1.0 mM	2.0 mM	3.0 mM
Ac $\beta$	0	0	0	0
DM	0	0	0	0
TM	0	0	0	0
Ac1	0	> 0.01	0.02	0.04
Ac2	0	0.02	0.05	0.08
TBAB	0	> 0.01	0.01	0.02

a)  $K_p$  is defined as (concentration of AsA in organic layer) / (concentration of AsA in aqueous layer).

Table 6 Transmembrane Transportation Rates (unit in mM h<sup>-1</sup>) at 25°C for AsA Mediated by Lipophilic CD Derivatives<sup>a)</sup>

Ac $\beta$	DM	TM	Ac1	Ac2	Ac3	TBAB
0	0	0	0.0146	0.0201	0.0226	0.0078

a) See Experimental Section for the detailed experimental conditions.

輸送について検討した. ここでも有機相として酢酸エチルを使用した. その結果を Table 7 に示す. 液-液抽出にて効果のなかった Ac $\beta$  と DM, TM は, 予想通り AsA の液膜輸送を行い得なかった. これに対し, 液-液抽出にて効果を示した Ac1 および Ac2 は, おそいながらも液膜輸送を行いえた. すなわち, Ac1 は 0.0146 mM h<sup>-1</sup> の速度で, また Ac2 は 0.0201 mM h<sup>-1</sup> の速度で送出相から受取相へと AsA を輸送した. Ac1 および Ac2 は本来, 荷電を持たない形であり, プロトン化することで正荷電を獲得する. したがって, Fig. 3 に示したように, 界面で AsA とともにプロトンを送出相から受け取り, 受け取り相との界面にて AsA とプロトンとを放出する機構が考えられる. また, 精製が不十分ではあるが, 2つのアミノ基を有する Ac3 を液膜輸送の単体として用いたところ, 界面が時間の経過とともに白濁し, 長時間での測定は不能であったが, 初期の輸送速度は 0.0226 mM h<sup>-1</sup> であり, この結果は複数のアミノ基の CD への導入により, より効果的な AsA の膜輸送担体とすることができる可能性を示唆するものである.

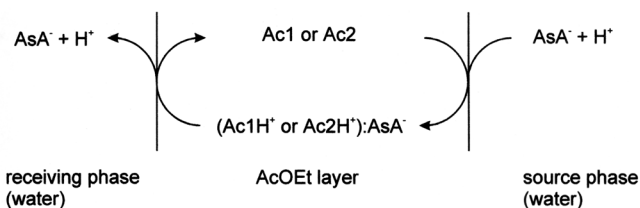


Fig.3 Proposed mechanism for Ac1- or Ac2-mediated transportation of AsA across liquid membrane.

#### 4. 考 察

AsA は親水性物質であり, 主として疎水性相互作用を駆動力とする  $\beta$ -CD とは包接化合物を形成しにくい物質である. しかしながら, CD は安息香酸アニオンを包接する際に, 極めて親水的であるはずのカルボキシラート部分を疎水性空孔内に取り込んでいることが知られており<sup>12)</sup>, AsA についても, すでに報告されているように,  $\beta$ -CD に包接される可能性は否定できない. それが AsA の安定性改善に対する要因であると思われるが, 他の分光学的手法では包接化合物形成を確認できず, その結合定数は小さいものと推定できる. 対照的に,

pH 5 あるいは pH7.2 にてプロトン化し, 正荷電を有する 1 および 2 では, 水溶液中においても AsA を包接しうることが示唆された. これは, ホスト側に正電荷, ゲストである AsA に負電荷があり, その間でイオン対形成が起こり, AsA が  $\beta$ -CD 空孔に包接されたものと考えられる. このことは, AsA と同じく生理学的 pH にて負電荷があり, かつ 5 炭糖構造を有するアデニンヌクレオチドに対する CD 母核上のアミノ基のイオン対形成に基づく包接力の増強からも確認することができる.

ここで, CD の修飾位置に関する違いを見てみると, 1 級水酸基側にアミノ基を導入したものより, 2 級水酸基側にアミノ基を導入したものが, AsA の安定性の増大に対する効果が大きい. このことは, 2 倍の水酸基が存在し, より親水的な環境であると考えられる CD の 2 級水酸基側に正電荷を導入することで, より効果的な AsA の包接を行うことが可能になることを示している<sup>13)</sup>.

この 2 級水酸基側への正電荷の導入の優位性は, CD を脂溶化した Ac2 においても, 液-液抽出ならびに液膜輸送実験にも現れた. すなわち, 対応する 1 級水酸基側修飾体である Ac1 に比べ, 液-液抽出能で約 2 倍, 液膜輸送能で約 1.4 倍の効果を AsA の有機相移行に対して示した. また, イオン対試薬として汎用されている TBAB とも比較して, Ac2 は約 4 倍の液-液抽出能, および約 2.5 倍の液膜輸送能を AsA に対して示した. このことは, 液-液界面にて AsA と Ac1, そして特に Ac3 は単なるイオン対形成によって AsA を有機相に移行させるのみでなく, AsA の形状を認識して包接することを示唆している. し

かしながらアミノ基のない Acb や、水溶液中でも AsA を包接することが示唆された DM および TM では界面での AsA の捕捉を行い得なかったことから、界面における AsA 認識の主たる駆動力はイオン対形成であり、CD 空孔の関与する認識力(おそらくは van der Waals 力であろう)は補助的な役割を担っていると考えられる。

アミノ基を有する CD 誘導体について、本研究から得られた示唆の 1 つとして、水溶液中で AsA を包接しうるものは、界面においても有効なホストとして機能し、水溶液中での包接の強さと界面での捕捉力にはある程度の相関が認められたことである。まだ例数が少ないため、確定的なことはいえないが、仮に水溶液中での結果と界面での捕捉力とがパラレルな関係にあるとすると、今後、このタイプの AsA 輸送キャリアーをスクリーニングする手段として、簡便である水溶液中での各種分光的手法による包接化合物形成を確認することで代用できる可能性がある。

## 5. 総括

本研究でこれまでに得られた成果は上述の通りである。すなわち、 $\beta$ -CD にわずか 1 つのアミノ基を導入することで、水溶液中での AsA の安定性を向上させることが可能であった。これはこれら CD を基盤とする分子がホスト分子として AsA を包接し、溶存酸素による酸化を抑制する機能を有していること示すものである。さらに、これらの水溶性  $\beta$ -CD を過アセチル化により脂容化することで、少なくとも酢酸エチル相への AsA の移行を促進することが可能であった。予備的に行った 2 つのアミノ基を有する脂溶性  $\beta$ -CD 誘導体は 1 つのアミノ基のみを有する  $\beta$ -CD 誘導体よりも効率的に AsA の有機相への移行を促進する結果が得られており、今後、2 つのアミノ基を有する  $\beta$ -CD 誘導体の効率的な合成法および精製法を確立することで、あるいはより効果的なキャリアー分子を開発できる可能性がある。

本研究では、AsA の脂質膜透過を促進するキャリアー分子を、生体に対する毒性の低い CD 誘導体にて実現させる系についての検討を行う予定であったが、肝心の脂質膜透過性を検証するには至らなかった。この点については、今後も引き続き検討する予定である。

## 引用文献

1) Kaneko K, Nagao N, Miwa N, :Vitamin C: A structure-activity Correlation and Cytoprotective Actions through Free Radical Scavenging and

Extracellular Matrix Construction: *Nippon Rinsho*, **57**, 2223-9, 1999.

- 2) For example; Schmid E, Figala V, Roth D, et al, :Antioxidant and Nuetrophil-Inhibiting Properties of New 2-O-Methyl-6-(alkylthio)ascorbic Acid Derivatives: *J. Med. Chem.*, **36**, 4021-4029, 1993.
- 3) Szejtli J, Osa T (eds), :Comprehensive Supramolecular Chemistry, Volume 3, Cyclodextrins: Pergamon, Oxford, 1996.
- 4) Melton LD, Slessor KN, :Synthesis of Monosubstituted Cyclohexaamylose: *Carbohydr. Res.*, **18**, 29-37, 1971.
- 5) 戸田不二緒監修・上野昭彦編集, :シクロデキストリン-基礎と応用- :産業図書, 東京, 1995, 第 4 章.
- 6) Teranishi K, Watanabe K, Hisamitsu M. Et al., :Efficient Regioselective Synthesis of Mono-2-O-Sulfonyl-Cyclodextrins by the Combination of Sulfonyl Imidazole and Molecular Sieves: *J. Carbohydr. Chem.*, **17**, 489-494, 1998.
- 7) Pappa-Louisi A, Pascalidou S, :Optimal Conditions for the Simultaneous Ion-Pairing HPLC Determination of L-Ascorbic, Dehydro-L-Ascorbic, D-Ascorbic, and Uric Acids with On-line Ultraviolet Absorbance and Electrochemical Detection: *Anal. Biochem.*, **263**, 176-182 (1998).
- 8) Benesi HA, Hildebrand JH, :A Spectrophotometric Investigation of the Interaction of Iodine with Aromatic Hydrocarbons: *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 2703-2707 (1949).
- 9) Manzanares MI, Sol s V, de Rossi RH, :Effect of Cyclodextrins on the Electrochemical Behaviour of Ascorbic Acid on Gold Electrodes: *J. Electroanal. Chem.*, **407**, 141-147 (1996).
- 10) 中間報告に記載のデータに誤りがありました。謹んでお詫びいたします。
- 11) Harada A, Takahashi S, :Transport of Neutral Azobenzene Derivatives by Methylated Cyclodextrins: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1987**, 527-528.
- 12) Suzuki I, Obata K, Anzai J, Ikeda H, Ueno A, :Crown Ether-tethered Cyclodextrins: Superiority of the Secondary Hydroxy Side Modification in Binding Tryptophan: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2000**, 1705-1710.

# 創傷を負った表皮組織に特異的な遺伝子の組み替えを用いた、創傷治癒過程の追跡と表皮再生メカニズムの決定

京都大学大学院 医学研究科

高橋 健造

Injury to the skin tissue elicits a repair response aimed at restoring the epithelial continuity, which is essential to a normal skin barrier function. Epidermal keratinocytes at the wound edge are recruited for the re-epithelialization of the wound site. However, the mechanism of the re-epithelialization is not easily understood compared with the simple epithelia. While the migration of keratinocytes occurs in the form of a stratified sheet, the relative contribution and ultimate fate of progenitor and differentiating keratinocytes during this vital process remains unclear. In this study, we use the transgenic technology to induce the wound specific gene recombination. We prepared two kinds of the transgenes to introduce the injured epidermis specific gene expression at the suprabasal keratinocytes, one for the wound specific expression of the cre recombinase and the other for the expression of the marker proteins. We used the double transgenic mice to trace the migration of the suprabasal keratinocytes activated at the wound edge. By this transgenic work we might be able to conclude the long term question, whether the suprabasal keratinocytes could recover the mitogenic property and migrate into the ulcerative surface or not.

## 1 はじめに

皮膚はヒトの体の最も外側に位置し、生体内部の臓器を保護する重要なバリアーとして働いている。外傷などによる皮膚の欠損は、きわめてすばやい治癒反応を引き起こす。この創傷治癒反応は、秒単位で現われる血小板や血管内皮細胞の関与する凝固・止血反応にはじまり、真皮線維芽細胞による創傷部の収縮・肉芽の形成、表皮欠損部への表皮角化細胞の遊走・増殖とこれらによる潰瘍表面の再上皮化から最終的には新生表皮組織の再構築へと続く(文献2, 3, 8, 10)。

外胚葉性の上皮組織であり体表を取り巻く表皮細胞は、消化管や肝臓・腎臓などの内胚葉由来の単層上皮より構成される組織とは異なり、重層化した数層よりなる扁平組織により構成する。すなわち皮膚は基底細胞(Basal Cell)と基底細胞の上層に位置する有棘細胞(Suprabasal Cell)、顆粒細胞(Granular Cell)さらに最外層をなす角質層の数十層の細胞より形成され、単層上皮と比較して遙かに複雑な構成成分よりなる(文献3)。

基底細胞が順次上層の細胞へと分化し、十分な保護能力を獲得しつつアポトーシス類似のシステムにより死滅し脱落していくこの過程は角化と呼ばれ、表皮や口腔粘膜、角膜などの重層扁平上皮に特有な分化形態である。各角化段階の細胞層はそれぞれ固有の機能やそれに伴う細胞生物学的・生化学的な特徴を有する。このため表皮組織の創傷治癒過程は、単層上皮組織のものよりもはるかに複雑な段階

を有する。表皮組織の創傷治癒過程においては、いずれの分化段階の細胞がそれぞれどのような役割を担っているのかはわかっていない。すなわちどの層の細胞が潰瘍部に遊走し、再生し上皮化した新生表皮を構築しうるのはどの細胞に由来しているのかなどは、いまだ決定されていない。

表皮に代表される重層扁平上皮の創傷治癒機転のモデルとして、従来より2つのモデルが提唱されている(図1)(文献7, 8, 10-12)。1つは重層上皮の再上皮化においても単層上皮と同様に、基底細胞の増殖と遊走のみが重要な役割を担い、基底層より上に位置する有棘細胞は補助的な役割のみを持つか、あるいは積極的な関与がないとする考えである(スライディング仮説)(図1上)。

一方、別のモデルであるローリング仮説によると、表皮組織においては創傷外縁の有棘細胞が、基底層へと転がり落ちキャタピラのように次々と欠損した上皮を覆っていくというものである。この考えによると基底層上層の有棘細胞

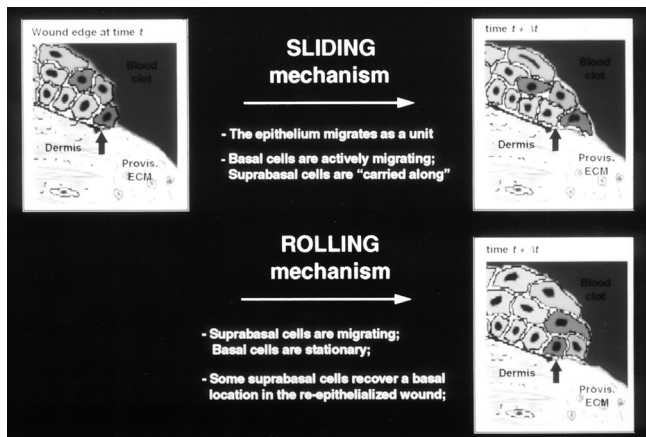


図1 これまでに提唱されている重層上皮組織の創傷治癒過程のモデル

創傷近傍の基底層の細胞のみが潰瘍面に直接遊走すると考えるスライディング仮説と、有棘層の細胞も潰瘍面に転がり落ち、上皮化に参加するとする2説が提唱されてきた。



Injury specific gene marking to follow the wound healing process under the injured epidermis specific gene recombination

Kenzo Takahashi

Department of Dermatology, Kyoto University Graduate School of Medicine

胞も表皮の再生に積極的な役割を果たしていることになる(図1下)。しばしば創傷治癒過程の皮膚においては、有棘層の細胞が基底細胞を乗り越え潰瘍面へと落ち込んでいるかのような組織像が観察され、このローリング仮説はこのような組織学的所見にはうまく合致する。しかしながら正常な皮膚組織においては、有棘層より上層の細胞は基底細胞より分化し分裂能を失った細胞であると考えられている。実際、マウスや人の摘出皮膚を短期間 BrdU や放射性サイミジンの存在下で標識しても正常な有棘層の細胞はラベルされてこない。このようにローリング仮説は、有棘細胞が創傷などの刺激により、再び増殖・分裂能を回復し基底細胞の性格を取り戻す脱分化を起こしうるのかという問題に直面する。このように、重層上皮の創傷治癒機転を考える上で、創傷治癒後に再上皮化した新生表皮組織が創傷部近傍の基底細胞にのみ由来するのか、あるいは基底層上層の有棘細胞にも由来するのかは、皮膚の創傷治癒研究における長年の解決すべき大きな命題である。

今回我々は、近年の遺伝子導入マウスの技術を応用し、創傷治癒にかかわる表皮角化細胞、特に有棘層の細胞にマーキングをすることで、創傷部位近傍の有棘細胞が実際の治癒過程においてどう遊走し、表皮の再生にどのような役割を担っているのかを決定したいと考えた。

## 2 実験方法

創傷表皮に特異的に遺伝子を誘導するために、創傷部近傍の有棘細胞に強く発現することの知られているヒトケラチン6遺伝子を利用することから始めた。我々はこれまでにヒトのケラチン6遺伝子には6種以上の同位体が存在し、それぞれ異なった発現調節をなされていることを同定している(図2)。その中より創傷やフォルボールエステル、レチノイン酸などの刺激により最も強く誘導される同位体であるケラチン6aの発現活性(表1)をトランスジェニックマウスの作製に用いることにした。

今回の研究ではすでに単離し解析を加えてきたヒトのケラチン6a遺伝子の5'側非翻訳領域の(約5kbp)をプロモーターとして利用した発現ベクターを開発した。まず始めに、この発現ベクターを用いてレポーターとなるガラクトシダーゼ蛋白質を繋げた遺伝子を構築し、この導入遺伝子を持つトランスジェニックマウスを作成し、(図3上)このプロモーターの誘導活性を様々な刺激を加えたマウスの表皮組織において検討を加えた。

この導入遺伝子を持つマウスでは実験結果(図4)に示すように創傷表皮にのみ特異的にガラクトシダーゼ遺伝子を強く発現することが観察された。このマウスを用いて創傷治癒実験を行い、治癒過程を組織学的に追跡することで、創傷治癒過程の早期における有棘細胞の遊走のようすの観察が可能となり、またこのプロモーターが創傷表皮の有棘

層よりも上層の細胞にのみ発現することを確認した。

そこでさらに創傷治癒過程後期あるいは潰瘍局面が再上皮化された後の再生表皮細胞が基底細胞あるいは有棘細胞のどちらの細胞に由来するのかを決定するために、創傷表皮に特異的な遺伝子組み替えシステムを用意した。バクテリオファージ由来のCre/LoxPの組み替えシステムを用い創傷表皮に特異的な遺伝子の組み替えを誘導し、導入した遺伝子自体をマーカーとすることで、潰瘍面に遊走する有棘細胞を追跡することを目指した。マーカーとして導入遺伝子自身を活用することで、レポーターとなる蛋白質が細胞内で変性され追跡が困難になることなく、治癒過程の後期における細胞の遊走の様子や由来の観察が可能となると考えた。創傷治癒過程の完了後に新たに再上皮化された表皮細胞がどのレポーターを発現しているのかを観察することで、新生表皮は表皮基底細胞あるいは基底層上層の有棘細胞のどちらに由来するのかを観察し、創傷治癒過程にお

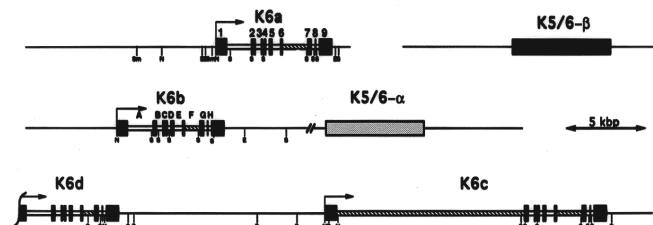


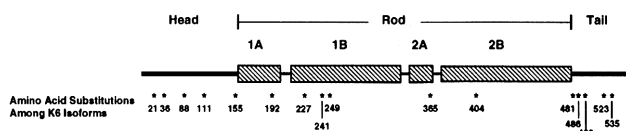
図2 ヒトケラチン6遺伝子同位体群の構造

ヒトの染色体上には少なくとも6種以上のケラチン6同位体が存在し、そのいくつかは互いに隣接して存在する。エクソン-イントロン構造や大きさなど極めて類似した構造を示す。

表1 ヒトケラチン6a遺伝子同位体群の発現様式

ケラチン6同位体は極めて類似した遺伝子構造を保持するが、発現活性は同位体間で大きく異なっている。ケラチン6a同位体がいずれの部位においても有意に発現している。

	No. of clones examined	Isoform profile					
		K6a	K6b	K6c	K6d	K6e	K6f
Skin cDNA library	64	77%	13%	0%	0%	5%	5%
		K6a	K6b + K6f	K6c	K6d + K6e		
Tissue samples							
Scalp skin	155	66%	31%	-	3%		
Sole skin	86	84%	14%	1%	1%		
SCC skin	115	69%	27%	1%	3%		
Cultured samples							
Foreskin	88	99%	1%	-	-		
NHSK	51	80%	14%	2%	4%		
SCC-13	28	96%	-	4%	-		
SCC-9	53	83%	7%	4%	6%		



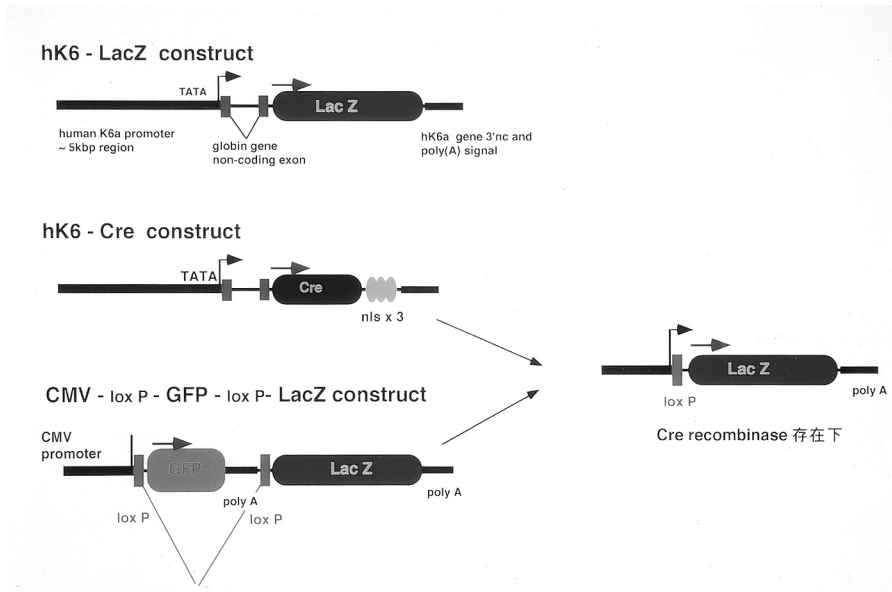


図3 導入遺伝子の構造

上段 (K6a-LacZ) がヒトケラチン 6a 遺伝子プロモーターの下流にガラクトシダーゼ遺伝子を有する。この導入遺伝子によりケラチン 6a 遺伝子を用いた発現ベクターの *in vivo* での転写活性を詳細に検討し、創傷治癒反応の初期における角化細胞の遊走の様子を検討した。中段 (K6a-Cre) はこのヒトケラチン 6a 遺伝子の発現ベクターに Cre リコンビネースを連結した導入遺伝子である。下段 (CMV-LoxP-GFP-LoxP-LacZ) はサイトメガロウイルスプロモーターにより転写されるレポーター遺伝子を表す。第一のレポーターである緑色蛍光蛋白 (GFP) はその両端に LoxP 配列を有し、その下流には第二のレポーターであるガラクトシダーゼ遺伝子が結合する。

いては有棘層の細胞が実際に分裂能を取り戻しうるのかを決定できる。

このために、次の 2 種類の導入遺伝子を構築した。1 つ目の導入遺伝子は、バクテリオファージ由来の Cre リコンビネースを創部表皮の有棘細胞にのみ特異的に誘導するためのもので、上記のヒトケラチン 6a 遺伝子由来の 5kbp のプロモーターの下流に Cre リコンビネースを連結させた (図 3 中)。さらに導入遺伝子をマウスの生体内でマーカーとして使うためのレポーター遺伝子の組み合わせをもう 1 つの導入遺伝子として用意した。第一のレポーターである緑色蛍光蛋白 (GFP) の両端に、Cre リコンビネースによって認識される LoxP 配列を配置しておく (図 3 下)。この第一レポーターの下流には第二のレポーター遺伝子としてガラクトシダーゼ遺伝子を繋げ、これらは上流に存在するウイルスのプロモーターにより、全ての細胞に発現されよう構築した。これらの導入遺伝子を染色体上に導入されたトランスジェニックマウスをそれぞれ作成し、両者をかけ合わせ、両方の導入遺伝子をもつダブルトランスジェニックマウスを創傷治癒実験に用いた。

この実験系において、創傷特異的な発現活性をもつケラチン 6a のプロモーターに誘導される Cre リコンビネースは、健全な上皮組織に発現されることはなく、LoxP 配列を認識した組み替えは起こらない。しかし、ひとたびこのダブルトランスジェニックマウスの皮膚に創傷刺激を加えると、近傍の有棘細胞においてケラチン 6a 遺伝子による Cre リコンビネースの発現が誘導され、この働きにより LoxP 配列を介した第一のレポーター遺伝子の組み替えが起こりマウスの染色体より切り離される。その結果、創傷刺激を受けた有棘細胞では第二のレポーターであるガラクトシダーゼ遺伝子の発現が誘導されると考えた。

もし創傷部位への遊走に基底細胞のみがかかわっている

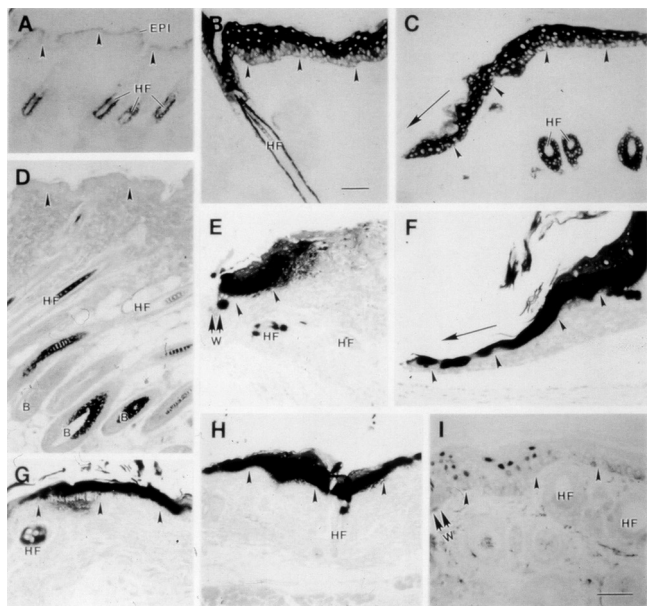


図4 K6a-LacZ 導入マウスを用いた創傷治癒実験。

創傷やフォルボールエステル、レチノイン酸塗布によりガラクトシダーゼ遺伝子は創傷近傍の有棘層の細胞に強く誘導されるが、内在性のケラチン 6a が恒常的に発現する毛嚢などの表皮付属器には、全く転写活性はない。

のなら、再上皮化が完了したのちの新生表皮細胞は依然として、第一のレポーターである緑色蛍光蛋白 (GFP) のみを発現している。一方ローリング仮説が予言するように、基底層上層の有棘細胞が再上皮化にかかわるのならば、新生した表皮細胞はすでに Cre リコンビネースによるレポーター遺伝子の組み替えが起こった後なので、第二のレポーターであるガラクトシダーゼ遺伝子が基底細胞から有棘層の細胞まで全ての表皮細胞層で新生表皮において観察されるはずである。

### 3 結果

図3に示した3種類の導入遺伝子を染色体上に組み込まれたトランスジェニックマウスをそれぞれ数系統ずつ作製した。その中で発現活性の強い子孫への導入遺伝子の伝搬の良好な2-3系のマウスに代表させ以下の実験に用いた。

まずは今回の実験系の基礎となるケラチン6a遺伝子を用いた発現ベクターの転写活性を詳細に検討するために、ガラクトシダーゼ遺伝子をレポーター(図3上)とした導入遺伝子を持つトランスジェニックマウスを用いて創傷治癒実験を行った。

ヒトのケラチン6蛋白質はケラチン6a同位体蛋白を含め、健全な皮膚においては、毛嚢や脂腺などの付属器の恒常的に発現しているが、表皮角化細胞には基底層から有棘層、顆粒層のいかなる細胞にも発現していない。しかし創傷やフォルボールエステルなどによる刺激を表皮に加えるとケラチン6の蛋白質は急速にそして大量に基底層よりも上層の有棘層・顆粒層の細胞に誘導される(図4)。

ヒトケラチン6a遺伝子の5kbpの非翻訳領域をプロモーターとして利用することにより、ガラクトシダーゼ遺伝子は創傷刺激やフォルボールエステル、レチノイン酸による刺激を受けた表皮や舌、口腔粘膜などの扁平上皮組織の基底層より上層の有棘細胞に強く発現誘導されたが、本来ケラチン6が恒常的に発現している毛嚢などの皮膚の付属器での転写活性は全く失活していた(図4)。このマウスでは、創傷を受けた表皮などの重層扁平上皮においてのみガラクトシダーゼ遺伝子が誘導されるが、その他の健全な表皮や他の上皮組織においては、発生、成長の段階をとおして導入遺伝子は発現されない。また創傷部においても基底層の細胞はガラクトシダーゼ遺伝子の発現は見られない。これらの結果より5kbpのケラチン6a遺伝子プロモーターは創傷表皮の有棘層のマーキングに大変有用な発現ベクターとなることが証明された。実際、創傷治癒過程の早期において、創部近傍の表皮角化細胞が潰瘍部へと遊走する様子が観察された(図4)。しかしながらこの組織像より直接に有棘層の細胞が潰瘍表面を覆い再上皮化した皮膚を構成しているとは決定できない。有棘層の細胞同様基底層の細胞も潰瘍面へと遊走し、その後の分化過程により基底層上層へと角化した細胞がガラクトシダーゼ遺伝子を発現するに至ったとも考えられるためである。また再上皮化が終了した後の再生表皮においては一旦発現したガラクトシダーゼ蛋白は遺伝子の発現がなくなり、蛋白の分解により観察されなくなる。

そこで我々はこの発現ベクターのアイデアを進め創傷部に誘導されるガラクトシダーゼ蛋白ではなくて、遺伝子そのものを追跡マーカーとして用いる導入遺伝子のシステムを構築した。上の実験方法にあげたように部位特異的な

遺伝子組み替え作用を有するCreリコンビネースを上で検討したケラチン6aの発現ベクターを用いて誘導する。

創傷特異的な発現活性をもつケラチン6aのプロモーターに誘導されるCreリコンビネースは、健全な上皮組織に発現されることはなく、第二の導入遺伝子に存在するLoxP配列を認識した遺伝子の組み替えは起こらない。そのため健全な表皮組織においては、基底細胞から有棘層、顆粒層のすべての細胞に上流に位置するレポーターである緑色蛍光蛋白(GFP)の発現のみが観察される。しかし、ひとたびこのダブルトランスジェニックマウスの皮膚に切開を加えると、その近傍の有棘細胞においてケラチン6遺伝子によるCreリコンビネースの発現が誘導され、この働きによりLoxP配列を介した第一のレポーター遺伝子の遺伝子の組み替えが生じ、マウスの染色体より切り離される。その結果、創傷刺激を受けた有棘細胞では第二のレポーターであるガラクトシダーゼ遺伝子の発現が誘導されると考えた。もし創傷部位への遊走に基底細胞のみがかかわっているのなら、再上皮化が完了したのちの新生表皮細胞は依然として、第一のレポーターである緑色蛍光蛋白(GFP)のみを発現している。一方ローリング仮説が予想するように、基底層上層の有棘細胞が再上皮化にかかわるのならば、新生した表皮細胞はすでにCreリコンビネースによるレポーター遺伝子の組み替えが起こった後なので、第二のレポーターであるガラクトシダーゼ遺伝子が基底細胞から有棘層の細胞まで全ての表皮細胞層で新生表皮において観察されるはずである。

まずは、今回開発した発現ベクターを用いたCre/LoxPの遺伝子組み替えシステムが、表皮角化細胞において有効に働くことを示すために培養表皮細胞株(DJM-1)の形質転換に用い、これらの2つの導入遺伝子を*in vitro*の系で強制発現させた。GFPとガラクトシダーゼ遺伝子の連結したレポーター遺伝子のみの形質転換では、第一のレポーターであるGFPの発現のみ観察され、ガラクトシダーゼ遺伝子の発現は全く認められなかった。しかしCreリコンビネースの遺伝子と共発現させた際にはGFPの発現は消失しガラクトシダーゼ遺伝子の発現が確認された(図5)。これらの事実は、少なくとも培養表皮細胞においてはこの遺伝子組み替えシステムが働いていることを証明するものである。

これら2種類の導入遺伝子(図3中、下)をもつ遺伝子導入マウスを作成し、それぞれについて5-10系統のマウスのラインを獲得した。この中より発現の強い子孫へと導入遺伝子を伝搬する効率の高い系統を選び、これらを掛け合わせることで創傷治癒後期の表皮角化細胞の遊走の様子を観察した。耳にパンチにより付けた創傷後の組織を48時間後にX-Gal染色したところ、CreとLoxPの両者の導入遺伝子を持つダブルトランスジェニックマウスも創

傷周囲にガラクトシダーゼ遺伝子を誘導しているのが観察された(図6)。そこで、マウスの尾に細長い創傷を作り、経時的に再生上皮におけるガラクトシダーゼ遺伝子の発現を追跡した。マウスの尾は下床直下に尾骨があり、創傷治癒過程に真皮の創傷収縮が関与する率が少なく、上皮の遊走・再生が大きな役割を示すために用いた。

創傷治癒が完了し再上皮化の終了した後の尾皮膚の新生上皮においてはガラクトシダーゼ遺伝子は僅かの孤立的な細胞における発現しか観察されなかった(図7)。

さらに体幹部の皮膚に直径2-3cm程の皮膚全層の切除を加え、経時的な生検によりさまざまな段階でのマーカー

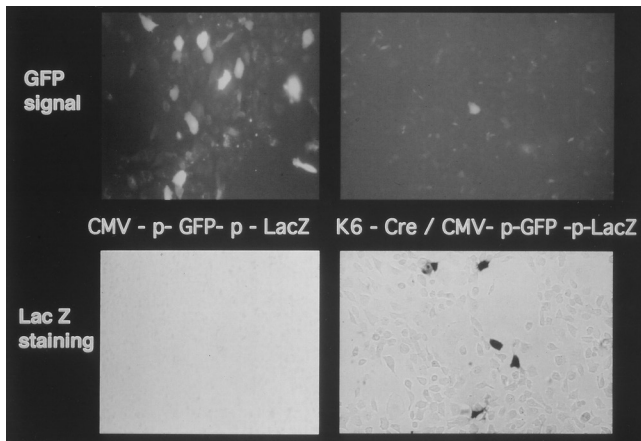


図5 培養表皮角化細胞での導入遺伝子の発現活性  
CMV-LoxP-GFP-LoxP-LacZ 遺伝子単独では、GFP 蛋白のみが発現するが、K6a-Cre と CMV-LoxP-GFP-LoxP-LacZ の共導入においては、GFP 蛋白は切り出され発現が消失するが、LacZ が誘導されている。

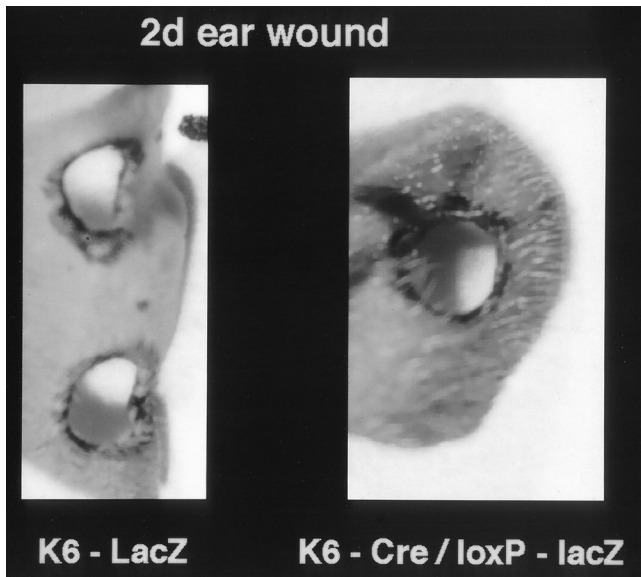


図6 マウスの耳の創縁  
イアーパンチ後のマウスの耳を X-Gal で染色し、導入遺伝子の転写活性を検討した。K6a-Cre と CMV-LoxP-GFP-LoxP-LacZ のダブルトランスジェニックマウスと K6a-LacZ マウスとも創傷局面に青く染色される。

一遺伝子の発現を検討した。体幹表皮を用いたこの創傷治癒実験においても、創傷初期においては第二のレポーターであるガラクトシダーゼ遺伝子の発現が観察されたが、治癒反応の終了した後の再上皮化した表皮においては、ガラクトシダーゼ遺伝子を発現する細胞は僅かにしか観察されない(図8)。

しかしながら、この事実が直ちに有棘層の細胞が創傷治癒に貢献していないことの証明であるとは断定できない。このマウスの創傷部の表皮の病理像を蛍光抗体法により観察したところ、創傷表皮における Cre リコンビネースの発現は、比較的高いレベルの有棘層あるいは顆粒層に相当する細胞にのみ限られ、基底層の近傍の細胞には発現誘導されていない。このため Cre リコンビネースによって引き起こされる遺伝子組み替えは、さらに遅れ最終的なガラクトシダーゼ遺伝子の発現は顆粒層から角層に近い層に局限するものとして観察された(図9)。そこでヒトケラチ

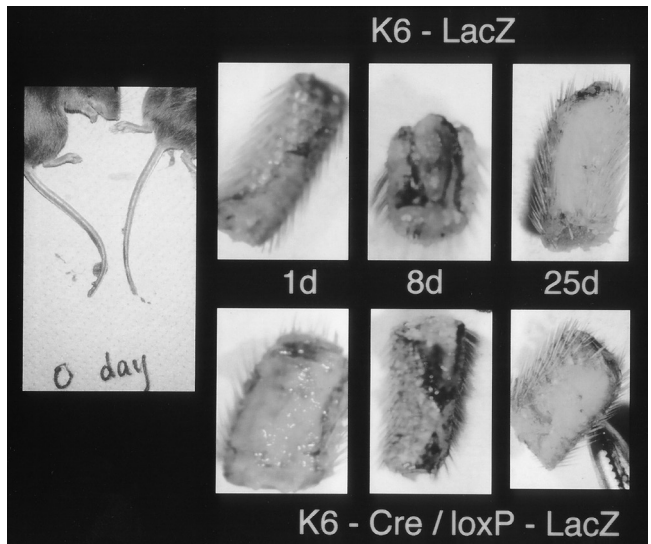


図7 マウス尾部での創傷治癒実験  
創傷治癒面近傍の細胞のみ青く染色され、再生された表皮(25d)においては、染色性は消失している。

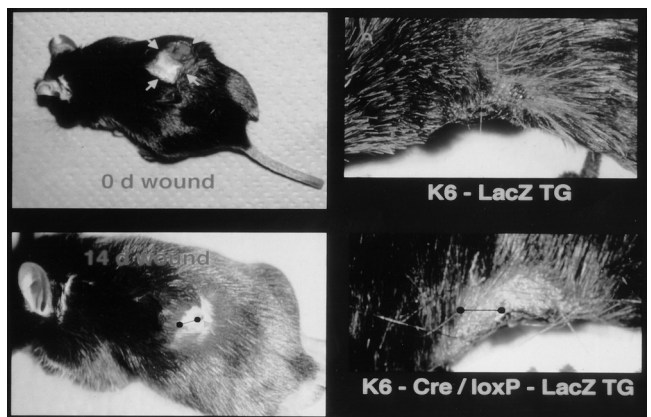


図8 マウスの体幹での創傷治癒実験  
治癒過程の遊走面では青く染色されるが、再生表皮組織は LacZ 蛋白の発現は見られない。

ン6a 遺伝子により転写される Cre リコンビネースの活性を強く基底層直上付近まで誘導されるように、トランスジェニックマウスをかけ合わせ、Cre リコンビネース導入遺伝子のコピー数を増加させたマウスを創傷治癒実験に用いた。さらにこのマウス尾部に創傷を加える前処理としてフォルボールエステル (PMA) を尾部に連日塗布し、Cre リ

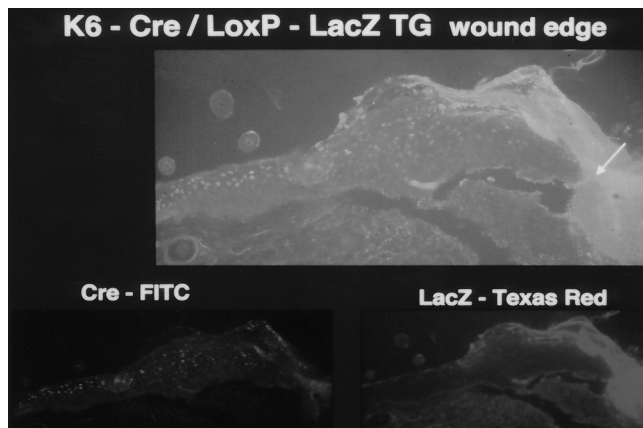


図9 マウス創傷表皮の免疫染色像

創傷表皮において Cre 蛋白は有棘層上層から顆粒層にかけて発現しているが、LacZ 蛋白はさらに表層の角化層に近い細胞にのみ発現している。

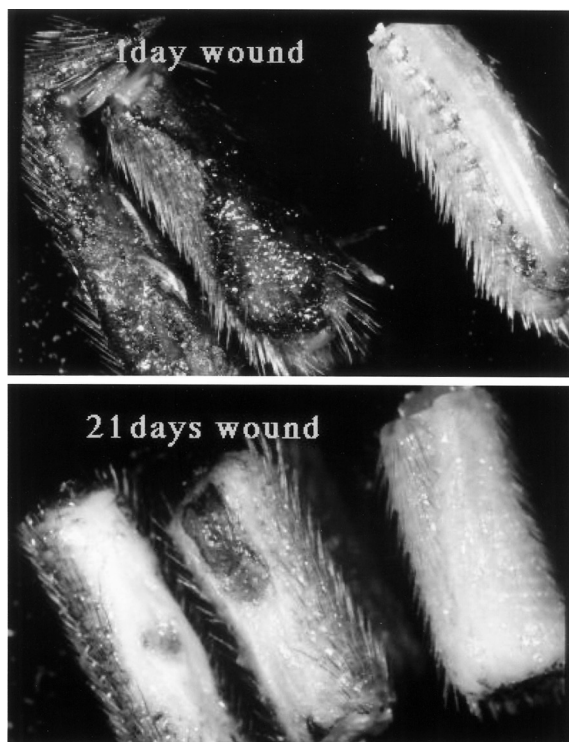


図10 フォルボールエステルによる前処理を加えたマウスの創傷治癒実験

PMA を連日塗布後に尾部に切開を加え、経時的に X-Gal で染色した。左の2ヶが、K6a-Cre と CMV-LoxP-GFP-LoxP-LacZ のダブルトランスジェニックマウスで、右の尾が K6a-LacZ マウスのものである。傷面へむかう遊走表皮細胞は青く染色されるが、再生表皮は青く染まらない。

コンビネースをあらかじめ有棘層へと誘導しておいて切開を加える治癒実験を行った。創傷治癒過程の早期においては上記の実験同様に潰瘍面や遊走する細胞にガラクトシダーゼ遺伝子の発現が観察される。さらに健全な尾部表皮全体にもガラクトシダーゼ遺伝子が発現するがこれは全処理のフォルボールエステル塗布により創傷刺激を加える前よりガラクトシダーゼ遺伝子が誘導されていたことを示す (図10上)。治癒過程後期の尾部においても、潰瘍面へと遊走していく角化細胞にはガラクトシダーゼ遺伝子の発現が観察されるが、その遊走面と健全表皮の間の再上皮化の完成した再生表皮においてはガラクトシダーゼ遺伝子の発現は見られない。なおこのころには健全表皮のガラクトシダーゼ遺伝子の発現は消失している (図10下)。

#### 4 結語

これまで上記の導入遺伝子を持つマウスの尾部や体幹の皮膚に大きめの切開を加え、さまざまな段階でのマーカー遺伝子の発現を検討してきた。創傷初期から早期においては第二のレポーターであるガラクトシダーゼ遺伝子の発現は潰瘍へ遊走する細胞に発現する様子が観察されたが、治癒反応の終了した後の再上皮化した表皮細胞においてはガラクトシダーゼ遺伝子を発現する細胞は僅かにであった。この結果は創傷の前処理としてフォルボールエステルによる誘導を試みたマウスにおいても同様であった。

これらの事実を考えると重層上皮においても、ローリング仮説の予想するような有棘層の細胞が再び基底層の細胞へと脱分化し、再生・分裂能を回復するとする考えは証明され得なかった。今後は、単層上皮同様に、表皮組織においてもスライディング仮説が予測するように基底層のみが創傷治癒に重要であるのか、あるいはこの実験系では十分に検証できない欠点があるのかを検討していきたい。

#### 謝辞

この研究のためご支援いただきましたコスメトロジー研究財団に心より感謝いたします。

#### (文献)

- 1) Pauline Wong, Emma Colucci-Guyon, Kenzo Takahashi, Changhong Gu, and Pierre A Coulombe. "Introducing a Null Mutation in the Mouse K6a and K6b Genes Reveals Their essential Structural Role in Oral Mucosa Epithelia." **J. Cell Biol.** 150, 921-928 2000
- 2) Reiko Inada, Masato Matsuki, Keiko Yamada, Yoichi Morishima, Shen-Chun Shen, Nobuo Kuramoto, Hirokazu Yasuno, Kenzo Takahashi, Yoshiaki Miyachi and Kiyofumi Yamanishi "Facilitated Wound Healing

- 
- by Activation of the Transglutaminase 1 Gene." **Am J Pathol.** 157 (6), 1875-1882, 2000
- 3) Kenzo Takahashi, Pierre A. Coulombe and Yoshiki Miyachi. "Using transgenic models to study the pathogenesis of keratin-based inherited skin diseases." **J. Dermatol. Sci.** 21(2), 73-95 1999
- 4) Kenzo Takahashi, Bing Young, Kiyofumi Yamanishi, Sadao Imamura and Pierre A. Coulombe. "Two functional keratin 6 genes of mouse show a differential regulation and evolved independently from their human orthologs." **Genomics** 53 (2 ), 170-183, 1998
- 5) Kenzo Takahashi and Pierre A. Coulombe. "Defining a region of the human keratin 6a gene that confers inducible expression in stratified epithelia of transgenic mice." **J. Biol. Chem.** 272 (18), 11979-11985, 1997
- 6) Kenzo Takahashi and Pierre A. Coulombe. "A transgenic mouse model with an inducible skin blistering disease phenotype." **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 93, 14776-14781, 1996
- 7) Rudolph D. Paladini, Kenzo Takahashi, Nicola S. Bravo and Pierre A. Coulombe "Onset of Re-epithelization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining role for keratin 16" **J. Cell Biol.** 132, 381-398, 1996
- 8) Kenzo Takahashi, and Pierre A. Coulombe. "The cellular mechanisms of keratinocyte migration into a skin wound site: An open question with important implications" **Cell Vision, J Analytical Morphology** 3 (3), 217-223, 1996
- 9) Kenzo Takahashi, Rudy Paladini and Pierre A. Coulombe. "Cloning and characterization of multiple human genes and cDNAs encoding highly-related type II keratin 6 isoforms." **J. Biol. Chem.** 270 (31), 18581-18592, 1995
- 10) Pierre A. Coulombe, Nicola S. Bravo, Rudolph D. Paladini, Diem Nguyen and Kenzo Takahashi. "Overexpression of human keratin 16 produces a distinct skin phenotype in transgenic mouse skin." **Biochem. Cell Biol.** 73 (9-10), 611-618, 1995
- 11) Rudolph D. Paladini, Kenzo Takahashi, Tracey M. Gant and Pierre A. Coulombe. "cDNA cloning and bacterial expression of the human type I keratin 16" **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 215 (2), 517-523, 1995
- 12) Kenzo Takahashi, Janet Folmer and Pierre A. Coulombe. "Increased expression of keratin 16 causes anomalies in cytoarchitecture and keratinization in transgenic mouse skin." **J. Cell Biol.** 127 (2), 505-520, 1994

# ヒト皮膚線維芽細胞における脂肪酸、コレステロール代謝調節機構

東京大学大学院 農学生命科学研究科・応用生命化学

佐藤 隆一郎

In an attempt to identify unknown target genes for SREBP-1, total RNA from a stable CHO cell line (CHO-487) expressing a mature form of human SREBP-1a (amino acids 1 to 487) with a LacSwitch Inducible Mammalian Expression System was subjected to a PCR subtraction method. One of the fragments was found to have 90 and 86% homology with rat and human ATP citrate-lyase (ACL) cDNA, respectively. When Hep G2 cells are cultured under either sterol-loaded or -depleted conditions, expression of the gene is induced approximately 2 to 3-fold by sterol depletion. To investigate the direct effect of SREBP-1a on transcription, luciferase assays using the promoter of the human ACL gene were performed. These deletion studies indicated that a minimum 160-base pair segment contains the information required for the transcriptional regulation brought about by enforced expression of SREBP-1a. Luciferase assays using mutant reporter genes revealed that SREBP-dependent transcriptional regulation is mediated by two nearby motifs, the SREBP-binding site (a TCAGGCTAG sequence) and the NF-Y-binding site (a CCAAT box). It was confirmed by gel mobility shift assays that recombinant SREBP-1a binds to the sequence. Data from studies with transgenic mice and reporter assays show that the ACL gene promoter is activated by SREBP-1a more strongly than SREBP-2 in contrast to the HMG CoA synthase and LDL receptor gene promoters, which exhibit the same preference for the two factors. Therefore, SREBPs transcriptionally regulates ACL enzyme activity, which generates the cytosolic acetyl CoA required for both cholesterol and fatty acid synthesis.

## 1. 緒言

皮膚表面は皮脂によりコーティングされた表皮角質層、その下層に表皮細胞由来の脂質が多層構造をなし、水分バリア機能を担っている。この恒常性が破壊されたとき、種々の皮膚疾患が発症することを考えると、皮膚組織での脂質代謝調節維持が疾患予防、治療にとり重要であることがうかがわれる。本研究課題では、脂肪酸合成・コレステロール代謝調節の中心的役割を担う転写因子 SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein) の機能を、分子細胞生物学的アプローチにより明らかにすることにより、皮膚細胞における脂質代謝調節解明の基礎研究になることを目的とした。

SREBP は互いに 47% の相同性を持つ SREBP-1 と SREBP-2 の 2 種類の蛋白質から成るファミリーを形成するが、その機能的役割分担について不明な点が多い。SREBP-1 が主として脂肪酸代謝関連遺伝子、SREBP-2 がコレステロール代謝関連遺伝子を転写制御するものと考えられているが明確な知見は少ない<sup>1~3)</sup>。我々は、それぞれを一過的に発現する細胞株を樹立し、SREBP-1、-2 のそれぞれに応答する遺伝子を subtract PCR 法にて同定することを試みた<sup>4)</sup>。

## 2. 実験

### 2.1 ヒト活性型 SREBP-1 を一過的に発現する CHO 細胞株の樹立

あらかじめ Lac I を安定発現する CHO 細胞株を樹立し (CHO-Lac)、これに Lac I により発現が抑制される発現プラスミドにヒト活性型 SREBP-1 を組み込んだものを遺伝子導入し、IPTG 含有培地で一過的に発現が認められる細胞株 CHO-487 を獲得した。

### 2.2 subtract PCR 法による応答遺伝子の単離

CHO-Lac ならびに CHO-487 細胞をコレステロールを過剰に含む培地に、1mMIPTG を添加し、19 時間培養し、総 RNA を回収した。定法に基づき、CHO-487 細胞で発現が亢進している遺伝子のフラグメントを獲得した。そのフラグメントを用いて、双方の細胞から回収した RNA を用いて Northern hybridization を行い、確かに CHO-487 細胞で発現の亢進が認められたクローンについてそれらの塩基配列を決定した。

### 2.3 Luciferase assay 法による応答領域の決定

応答遺伝子として新たに見出された ATP クエン酸リアーゼ (ACL) について、ヒト遺伝子の転写開始点から上流 300bp から下流 29bp を含む領域をクローニングし、ルシフェラーゼ遺伝子の 5' 上流に挿入した ACL-300 を構築した。PCR 法により -251 から +29 を含む ACL-251、以下同様にして種々の長さのプロモーター領域を含むレポーター遺伝子を構築した。レポーター遺伝子と活性型 SREBP-1 発現プラスミドを HEK293 細胞に遺伝子導入し、2 日



Regulation of fatty acid and cholesterol metabolism in human fibroblast cells

Ryuichiro Sato

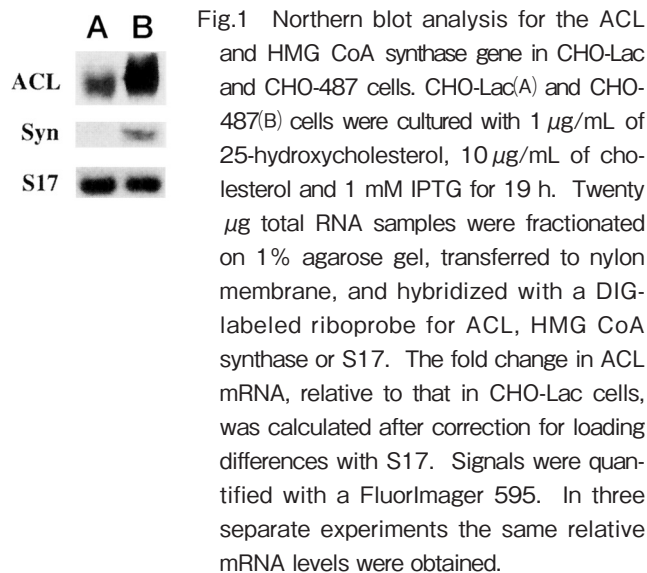
Department of Applied Biological Chemistry,  
Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo

後にルシフェラーゼ活性を測定した。

### 3. 結果と考察

CHO-487 細胞で SREBP-1 を一過的に過剰発現させ転写が亢進した遺伝子を subtract PCR 法により単離し、その塩基配列を決定した。その結果、これまで報告のある SREBP 応答遺伝子の他に ACL 遺伝子が見出された。エネルギー過剰状態でミトコンドリア内で生成されたアセチル CoA は、そのままの形では細胞質へと移行できず、クエン酸へと変換後細胞質へ移行し、細胞質で ACL の働きにより再びアセチル CoA へと変換される。このアセチル CoA は脂肪酸、コレステロール合成の基質となる。従って、脂肪酸、コレステロール合成経路を調節する SREBP がその初発酵素の転写を制御することは、十分にあり得ることと言える。そこで新たな応答遺伝子として同定された ACL、SREBP の制御を受ける HMG CoA synthase mRNA の変動をそれぞれの CHO 細胞株を用いて検討した。CHO-Lac 細胞、CHO-487 細胞をコレステロールを過剰に含む培地に IPTG を添加し、19 時間培養し、総 RNA を回収し、アガロースゲルにて電気泳動し、それぞれのプローブを用いて Northern Blot 解析を行った (Fig. 1)。いずれの細胞でも過剰のコレステロールのために内因性の SREBP は不活性化状態であり、CHO-487 細胞でのみ IPTG により外因性のヒト活性型 SREBP-1 が発現されている。この状況下で、HMG CoA synthase mRNA は CHO-Lac 細胞では検出限界以下まで減少し、一方 CHO-487 細胞では外因性 SREBP-1 によりバンドが検出された。ACL については HMG CoA synthase mRNA と同様な濃淡のパターンは認められたものの、コレステロール過剰状況下の CHO-Lac 細胞でも発現が確認され、SREBP-1 は転写の一部を調節していることが推察された。

この様な ACL 遺伝子の転写制御が、SREBP-1 の過剰

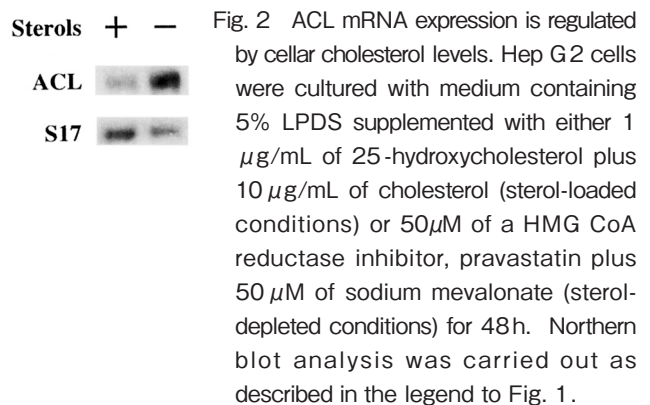


発現により観察される人為的な現象なのか、細胞内コレステロールの増減に応じて起こる SREBP の活性化によっても引き起こされるのかについて、ヒト肝細胞 Hep G2 による解析を行った。Hep G2 細胞をコレステロール過剰培地もしくはコレステロール合成阻害剤を含む培地で培養し、RNA を回収し、Northern Blot 解析を行った (Fig. 2)。ACL は細胞内のコレステロールの増加に伴い発現が低下し、減少に伴い発現増加が認められた。以上の知見は、生理的条件下の細胞内コレステロール量の変動に伴う内因性 SREBP の活性化、不活性化に伴い、本遺伝子が転写調節を受けうることを意味している。

続いてヒト ACL 遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、ルシフェラーゼ遺伝子の 5' 上流に挿入したレポーター遺伝子を用いたルシフェラーゼアッセイを行い、SREBP-1 による転写調節応答領域の同定を試みた。転写開始点から 131 bp 上流までは SREBP-1 による調節を受けたが、94 bp まで短くするとその調節は失われた (Fig. 3)。

そこで、131 から 94 bp の塩基配列中、SREBP の応答配列の候補部位を 3 ヶ所、SREBP 結合部位の近傍に存在し協調的に働く NF-Y の結合部位 1 ヶ所にそれぞれ変異を入れたレポーター遺伝子を構築し、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、上流 110 bp 付近の配列に回答するとともに (ACL-131SREbKO)、それに近接する CCAAT 配列も調節に必須であることが明らかになった (Fig. 4)。SREb 配列への SREBP の結合はゲルシフトアッセイにより確認した。

ACL は脂肪酸合成、コレステロール合成の出発物質であるアセチル CoA 生成を触媒する酵素であり双方の経路に重要であるが、インスリンへの応答等これまでの知見からエネルギー過剰状況下で脂肪酸合成等を誘導するリポジェニック酵素として認識されている。従って、コレステロール代謝関連遺伝子の転写調節に主に機能する SREBP-2 に比べて脂肪酸代謝関連遺伝子の転写調節に関与する SREBP-1 による支配を強く受ける可能性がある。そこでルシフェラーゼアッセイの系にヒト SREBP-1、SREBP-2 発現プラスミッドをそれぞれ導入し、応答を検討した



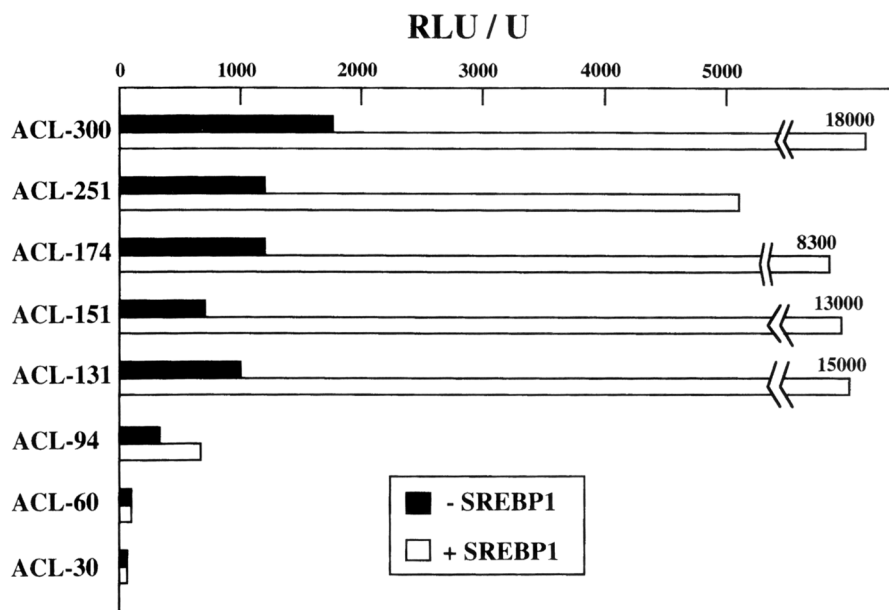


Fig. 3 Regulation of ACL promoter-luciferase reporter genes by SREBP-1a(1-487). HEK 293 cells were transfected with one of human ACL promoter reporter genes (200 ng), a plasmid encoding  $\beta$ -galactosidase (100 ng), and an expression plasmid (10 ng), pSREBP1(1-487) for 4 h. The cells were incubated for 48 h and then lysed, and enzyme activities were determined. The ratio of luciferase activity in relative light units (RLU) is divided by the  $\beta$ -galactosidase activity (U, units) to give a normalized luciferase value (RLU/U). The values given are the average of data from more than three experiments performed in triplicate.

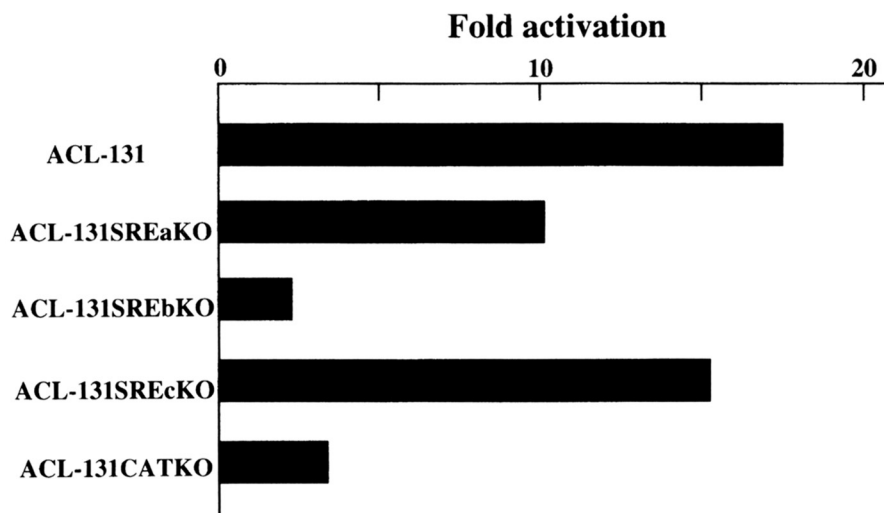


Fig. 4 Effect of the mutation of the SRE or the NF-Y binding site on the expression of reporter gene. HEK 293 cells were transfected and cultured as described in the legend to Fig. 3. The fold activation (luciferase activity with SREBP-1 versus without SREBP-1) is shown. The luciferase activities obtained by the reporter genes were in the range of 400 to 1000 RLU/U. The values given are the average of data from more than three experiments performed in triplicate.

(Fig. 5)。その結果、ACLはSREBP-1により高い感受性を持って反応した。一方、コントロールで用いたHMG CoA synthase、LDL受容体遺伝子は双方に対してほぼ同等の反応を示した。さらにSREBP-1、SREBP-2を過剰発現するトランスジェニックマウス肝臓中でのそれぞれの

mRNA量を測定したところ、HMG CoA synthase、LDL受容体mRNAは両トランスジェニックマウス間で差が認められなかったのに対し、ACL mRNAはSREBP-1トランスジェニックマウスで高値を示し、ルシフェラーゼアッセイの結果と一致した。

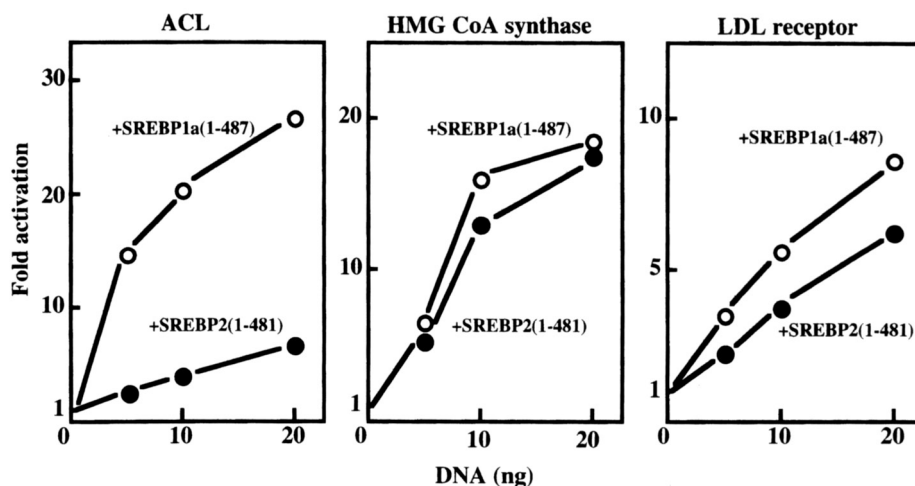


Fig. 5 Differential sensitivity of the ACL, HMG CoA synthase and LDL receptor promoters to overexpressed SREBP-1 a or SREBP-2. HEK 293 cells were transfected with one of reporter genes (ACL-131, pHMG S and pLDLE; 200ng), a plasmid encoding  $\beta$ -galactosidase (100ng), and an indicated amount of expression plasmid, pSREBP 1 a (1-487) or pSREBP2(1-481), for 4h. The cells were incubated for 48 h and then lysed, and enzyme activities were determined. The fold activation (luciferase activity in the presence of SREBP-1 a or SREBP-2 versus in the absence) is shown. The values given are the average of data from three experiments performed in triplicate.

#### 4. 総括

脂質代謝関連遺伝子の転写を調節する SREBP の新規応答遺伝子として ACL を初めて同定し、その転写調節機構を明らかにした。同様な調節機構は皮膚線維芽細胞でも存在し、皮膚における脂質代謝のダイナミズムに深く関与している可能性がある。今後この様な基礎知見を積み重ねることにより、皮膚細胞での脂質代謝の恒常性維持を目指したコスメトロジー研究の発展が期待される。

#### (引用文献)

1) 佐藤隆一郎：膜結合型転写因子 SREBP 蛋白質核酸酵素, 45, 2612-2623, 2000.

2) Sato, R., Inoue, J., Kawabe, Y., 他 3 名：Sterol-dependent transcriptional regulation of sterol regulatory element-binding protein-2. *J. Biol. Chem.* 271, 26461-26464, 1996.

3) Sato, R., Miyamoto, W., Inoue, J., 他 3 名：Sterol regulatory element-binding protein negatively regulates microsomal triglyceride transfer protein gene transcription. *J. Biol. Chem.* 274, 24714-24720, 1999.

4) Sato, R., Okamoto, A., Inoue, J., 他 5 名：Transcriptional Regulation of the ATP Citrate-lyase Gene by Sterol Regulatory Element-binding Proteins. *J. Biol. Chem.* 275, 12497-12502, 2000.

# ヒト脂腺細胞に代るハムスター脂腺細胞を用いた 皮脂代謝に関する基盤研究

東京薬科大学 薬学部第1生化学教室

佐藤 隆

Sebaceous gland is one of important skin appendages and sebum excretion is considered to associate with maintaining normal cutaneous functions. Development of sebaceous glands is dependent on androgens in vivo and sebocytic differentiation sequentially occurs with accumulating abundant cytoplasmic lipids. In addition, the abnormal augmentation of lipogenesis causes the sebaceous gland disorder such as acne vulgaris. However, the regulation of lipid metabolism in sebaceous glands remains unclear. We have recently established the culture system of hamster sebocytes from the auricles, and investigated the regulation of lipid metabolism in the cultured hamster sebocytes. Insulin, interleukin 6 (IL-6) and prostaglandin  $F_{2\alpha}$  (PGF $_{2\alpha}$ ) were found to augment the accumulation of intracellular lipid droplets, whereas epidermal growth factor (EGF) suppressed in hamster sebocytes. The regulation of lipogenesis by these factors was due to the alteration of intracellular triglyceride (TG) level. On the other hand, perilipin, which is located exclusively at the surface of intracellular lipid, mainly TG, and may participate in the lipid metabolism in adipocytes, was found to be expressed on the surface of lipids accumulated in hamster sebocytes. Furthermore, the expression of perilipin was augmented by insulin and IL-6 along with the lipid formation. These results suggest that insulin, IL-6 and PGF $_{2\alpha}$  are endogenous modulators for lipogenesis in hamster sebocytes, and that perilipin may be involved in the formation of lipid droplets and the regulation of lipid metabolism in hamster sebocytes.

## 1. 緒言

皮膚は生体の最も外側に位置する器官であり、外界の刺激から体を保護するためのいくつかの機能を備えている。皮脂腺からの皮脂の分泌も皮膚機能のひとつに挙げられ、皮膚表面を覆う弱酸性の脂質層を形成し、外的物質の侵入防止や脂溶性有害物質の排泄など重要な役割を担っていると示唆されている<sup>1)</sup>。また、皮脂はその過剰分泌により、脂漏性皮膚炎やニキビの発症、肌のでかりといった健康および美容上の好ましくない現象を引き起こすことが知られている<sup>2)</sup>。一方、皮脂腺における脂質生合成調節に関しては、脂腺細胞の単離培養が困難なことから、動物実験を用いた組織学的検討や皮表脂質の組成分析がなされてきた<sup>3~5)</sup>。最近になり、ヒトおよびラットの脂腺細胞が単離培養され<sup>6, 7)</sup>、細胞レベルでの研究が進みつつある。しかしながら、脂腺細胞における皮脂産生調節の詳細に関しては、ほとんど明らかにされていないのが現状である。

我々は、ハムスターの耳介部より自発的に脂質を細胞内に蓄積し、継代かつ長期培養が可能な脂腺細胞を樹立した。また、その細胞特性がヒト脂腺細胞と類似していることから、皮脂腺の研究においてヒト脂腺細胞に代る有用な細胞

であると考えている。一方、多様な皮膚機能調節には増殖因子、サイトカインやホルモンなど種々の生理活性物質が寄与することが示唆されており<sup>8~10)</sup>、これら因子が皮脂産生調節に対しても何らかの作用を示すことが推察される。そこで、本研究ではハムスター脂腺細胞を用いて、1) 上皮成長因子 (EGF)、インスリン、インターロイキン6 (IL-6) やプロスタグランジン (PG) 類の皮脂産生に対する影響を検討した。また、脂肪細胞において同定された細胞内の脂質蓄積の調節分子であるペリリピン<sup>11,12)</sup>に着目し、2) 脂腺細胞における皮脂の蓄積とペリリピンの発現制御について検討した。

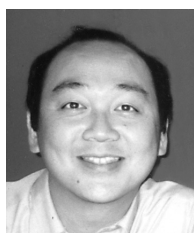
## 2. 実験

### 2.1 細胞調製と処理方法

ハムスター脂腺細胞を定法<sup>13)</sup>により5週齢の雄ゴールデンハムスターの耳介部より単離し、6%ウシ血清と2%ヒト血清を含むDMEM/F-12培養液において培養した。細胞を播種後、翌日にEGF (10ng/mL)、インスリン (20nM)、IL-6 (5ng/mL) またはPGF $_{2\alpha}$  (10 $\mu$ M) を添加した培養液で培養した。培養液は3日ごとに交換し、11日間培養した。

### 2.2 Oil red O 染色とペリリピンの免疫染色法

細胞内に脂質を蓄積した細胞を4%中性ホルマリン溶液で固定して、oil red O 染色液で細胞内脂質を染色した。また、細胞内のペリリピン局在は、同様に固定した細胞においてマウスペリリピン抗体 (愛媛大学医学部 澄田道博博士より供与) を用いて蛍光抗体法により検出した。



Molecular mechanism of intracellular lipid metabolism in hamster sebocytes in vitro

Takashi Sato

Department of Biochemistry, Tokyo University of Pharmacy and Life Science, School of Pharmacy

### 2.3 細胞内トリグリセリド量の定量

ハムスター脂腺細胞の細胞内脂質の組成としては、トリグリセリド (TG) が総脂質量の約 70% を占めることを確認していることから、薬物処理した細胞中の TG 量を測定した。すなわち、0.25% トリプシン / 0.02% EDTA 溶液を用いて回収した細胞を超音波細胞粉碎装置により細胞を破壊して試料とし、細胞内の TG 量を市販の TG 測定キットを用いて定量した。

### 2.4 ウエスタンブロット法によるペリリピン発現調節の解析

薬物処理した細胞を 1% nonidant P-40 10.1% SDS で溶解し、10,000rpm で遠心した後の上清を試料として、マウスペリリピン抗体を用いて ECL-ウエスタンブロット法によりペリリピン発現調節を解析した。また、試料中のタンパク質量を Lowry 法<sup>14)</sup> により定量した。さらに、ペリリピンは脂肪細胞でその発現が報告されていることから、インスリン処理により分化させたマウス 3T3L1 細胞の試料をペリリピンのポジティブコントロール<sup>15)</sup> とした。

## 3. 結果

### 3.1 培養ハムスター脂腺細胞の脂質産生調節

ハムスター脂腺細胞は自発的に脂質を細胞内に蓄積し (図 1 A)、その割合は全細胞数の約 40% であることをフローサイトメトリーにより確認している。細胞をインスリン (20nM) で処理すると細胞内脂質の蓄積に依存して oil red O 染色陽性細胞数の増加が観察された (図 1 B)。また、IL-6 (5ng/mL) および PGF<sub>2α</sub> (10μM) の処理においても同様の結果が観察された (図 1 D および E)。しかしながら、EGF (10ng/mL) を処理した細胞では細胞内脂質の減少が観察された (図 1 C)。一方、各処理における細胞内 TG 量を測定したところ、インスリン (20nM) 処理により細胞内量は 3.3 倍に増加し、IL-6 (5ng/mL) および PGF<sub>2α</sub> (10μM) 処理においてもそれぞれ 2.0 倍増加することが明らかとなった。また逆に、EGF (10ng/mL) 処理では細胞内 TG 量は未処理群の 10% まで減少した (図 2)。

### 3.2 ハムスター脂腺細胞におけるペリリピン発現

細胞内脂肪の代謝に寄与するペリリピンは、脂肪細胞

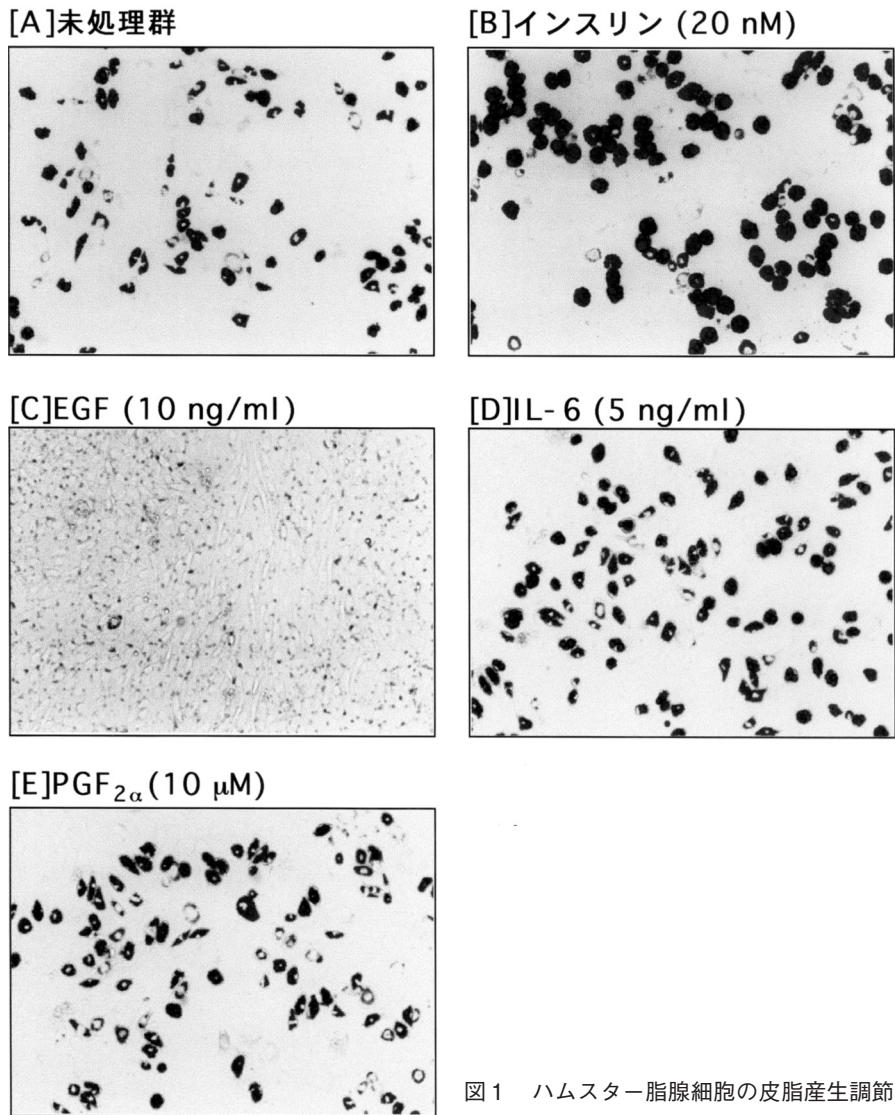


図1 ハムスター脂腺細胞の脂質産生調節

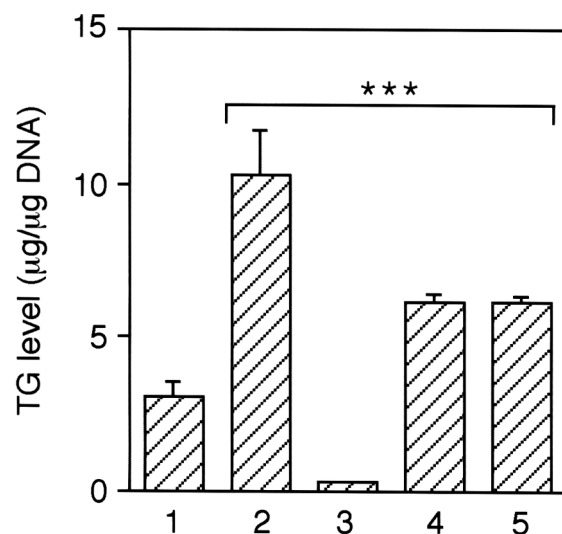


図2 インスリン、EGF、IL-6 および PGF<sub>2α</sub> によるハムスター脂腺細胞の脂質産生調節

Lane 1, 未処理群; lane 2, インスリン (20nM); lane 3, EGF (10ng/mL); lane 4, IL-6 (5ng/mL) および lane 5, PGF<sub>2α</sub> (10 M). \*\*\*p<0.001 (vs control).

11, 12, 15) や副腎皮質細胞<sup>16, 17)</sup> においてのみその発現が認められているが、脂腺細胞の皮脂形成にも寄与するか否かについては全く不明である。そこで、ハムスター脂腺細胞におけるペリリピン発現を蛍光染色法により検討した。その結果、インスリン処理により皮脂産生を促進させた細胞において、細胞内脂肪滴の周囲にリング状のペリリピンの染色が認められた (図3)。この結果より、ハムスター脂腺細胞において細胞内の脂質蓄積とともにペリリピンが発現することが初めて明らかとなった。また、そのタンパク質の局在が脂肪細胞と同様に脂肪滴周囲であることが判明した。

### 3.3 ハムスター脂腺細胞のペリリピン産生調節

ハムスター脂腺細胞の皮脂産生調節に寄与するインスリン、EGF、IL-6 および PGF<sub>2α</sub> のペリリピン産生に対する作用を検討した。その結果、ハムスター脂腺細胞において恒常的にペリリピンが発現しており、分化したマウス 3T3-L1 脂肪細胞に発現されたペリリピンと免疫学的に同一であることが判明した (図4 および5)。また、この脂腺細胞のペリリピンはウエスタンブロット法により分子量が約 57-kDa であることから、現在報告されている4つのペリリピンアイソタイプのペリリピン A<sup>12, 16)</sup> であることが明らかとなった。一方、インスリン (20nM) 処理によりその発現は 1.4 ~ 2.0 倍増加した (図4 および5)。ま

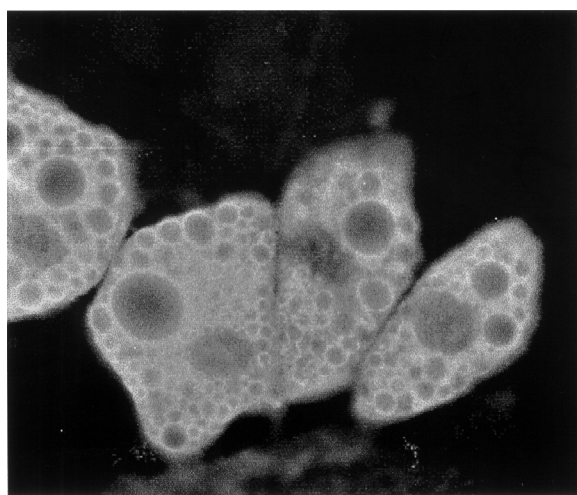


図3 ハムスター脂腺細胞におけるペリリピン発現

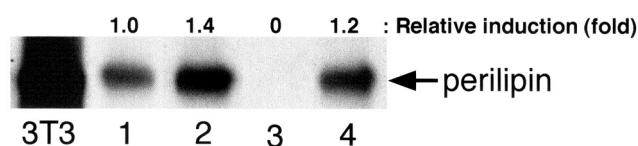


図4 インスリン、EGF および IL-6 によるハムスター脂腺細胞のペリリピン発現調節

Lane 1, 未処理群; lane 2, インスリン (20nM); lane 3, EGF (10ng/mL) および lane 4, IL-6 (5ng/mL). 3T3, 分化誘導したマウス 3T3 細胞.

た、IL-6 (5ng/mL) 処理においてもペリリピン発現は促進される傾向を示した (図4)。しかしながら、EGF (10ng/mL) 処理では皮脂産生抑制に比例してペリリピン発現は抑制された (図4)。一方、皮脂産生を促進した PGF<sub>2α</sub> はインスリンおよび IL-6 とは異なり、ペリリピン発現には全く影響を及ぼさなかった (図)。これらの結果より、ハムスター脂腺細胞のペリリピン発現はインスリンおよび IL-6 により促進されること、また EGF 処理により抑制されること初めて明らかとなった。

## 4. 考 察

皮脂腺における皮脂の産生は、男性ホルモンにより促進的に、ビタミン A (レチノイン酸) により抑制的に調節されることが周知の事実である<sup>1, 3, 4)</sup>。また、ヒトおよびラット脂腺細胞においても同様の報告がなされている<sup>6, 7)</sup>。皮膚機能調節にはホルモンやサイトカインといった様々な生理活性物質が寄与すると示唆されることから<sup>8-10)</sup>、皮脂腺の脂質代謝調節にもこれら因子が関与することが推察される。本研究において、インスリン、IL-6 および PGF<sub>2α</sub> がハムスター脂腺細胞の皮脂産生を促進すること、また EGF は皮脂産生を抑制することが判明した。したがって、インスリン、IL-6 および PGF<sub>2α</sub> は皮脂産生促進因子として、EGF は皮脂産生抑制因子として機能するものと示唆される。

ペリリピンの機能は十分に明らかにされていないが、脂肪細胞においてその発現促進と細胞内の脂質蓄積が相関することが報告されている<sup>11, 15-17)</sup>。また、ペリリピンは cAMP 依存性プロテインキナーゼ A (PKA) によりリン酸化されることが知られており<sup>18)</sup>、このペリリピンのリン酸化によりホルモン感受性リパーゼによる細胞内脂質の分解が促進されることが報告されている<sup>19, 20)</sup>。すなわち、ペリリピンは脂肪細胞の細胞内脂質の蓄積と代謝を制御する機能タンパク質であると示唆される。本研究において、ハムスター脂腺細胞内に形成された脂肪滴の周囲にペリリピンが発現していることを初めて明らかにした。このことは、脂肪細胞と同様にハムスター脂腺細胞においてもペリリピンが細胞内の脂質代謝に関与することを示唆するものである。

ペリリピンの発現調節に関しては、脂肪細胞において腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) がその発現を抑制し、それに伴い細胞内脂質分解が誘導されるという報告のみである<sup>20)</sup>。本研究において、脂質合成を促進するインスリンや IL-6 が

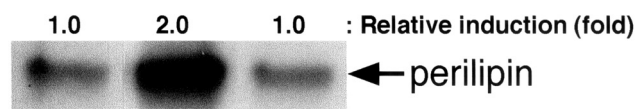


図5 PGF<sub>2α</sub> によるハムスター脂腺細胞のペリリピン発現調節  
Lane 1, 未処理群; lane 2, インスリン (20nM); および lane 3, PGF<sub>2α</sub> (10M).

ペリリピン発現を促進すること、逆に脂質合成を抑制するEGFではその発現が抑制されることを初めて明らかにした。すなわち、ハムスター脂腺細胞において、これらサイトカインや増殖因子によるペリリピン発現制御に起因して皮脂産生が調節されているものと示唆される。

一方、ハムスター脂腺細胞においてPGF<sub>2α</sub>は皮脂産生を促進したもののペリリピン発現には影響を及ぼさないことが判明した。ペリリピンは、その発現制御のみならずPKA 依存的リン酸化による分子修飾により脂質分解が促進される<sup>18)</sup>。逆に、細胞内脂質分解を制御する分子機序として、プロテインホスファターゼによるペリリピンの脱リン酸化機構が存在することも報告されている<sup>21)</sup>。したがって、現時点では皮脂産生を促進するPGF<sub>2α</sub>がペリリピン発現に影響を及ぼさない理由は不明であるが、PGF<sub>2α</sub>がペリリピンのリン酸化機構を制御することで皮脂産生を調節している可能性が示唆される。

## 5. 総括

ハムスター脂腺細胞の皮脂産生は、インスリン、EGFおよびPGF<sub>2α</sub>により促進的または抑制的に制御されることが示唆される。また、ハムスター脂腺細胞において細胞内脂質の代謝調節分子であるペリリピンが細胞内脂肪滴周囲に発現していることを初めて明らかにした。さらに、このペリリピン発現がインスリンやEGFにより促進的または抑制的に制御され、その結果、脂腺細胞の皮脂産生が調節されるものと示唆される。

### (引用文献)

- 1) Thody AJ, Shuster S, : Control and function of sebaceous glands, *Physiol. Rev.*, 69, 383-416, 1989.
- 2) 北村謙始, 小山純一, : オイリースキンの発生要因とその特徴/乳液, クリーム, 保湿剤, 宮地良樹編, : 臨床医のためのスキンケア入門, 先端医学社, 東京, 1997, 146-155 頁
- 3) Strauss JS, Kligman AM, Pochi PE, : Effects of androgens and estrogens on human sebaceous glands, *J. Invest. Dermatol.*, 39, 139-155, 1962.
- 4) Thody AJ, Cooper MF, Bowden PE, et al., : Effect of alpha-melanocyte-stimulating hormone and testosterone on cutaneous and modified sebaceous glands in the rat, *J. Endocrinol.*, 71, 279-288, 1976.
- 5) Plewig G, Luderschmidt C, : Hamster ear model for sebaceous glands, *J. Invest. Dermatol.*, 68, 171-176, 1977.
- 6) Zouboulis ChC, Korge B, Akamatsu H, et al., : Effects of 13-cis-retinoic acid, all-trans-retinoic acid and acitretin on the proliferation, lipid synthesis and keratin expression of cultured human sebocytes in vitro, *J. Invest. Dermatol.*, 96, 792-797, 1991.
- 7) Rosenfield RL, Eplewski D, Kentsis A, et al., : Mechanisms of androgen induction of sebocyte differentiation, *Dermatology*, 196, 43-46, 1998.
- 8) Birnbaum JE, Sapp TM, Moore JB, : Effects of reserpine, epidermal growth factor, and cyclic nucleotide modulators on epidermal mitosis, *J. Invest. Dermatol.*, 66, 313-318, 1976.
- 9) Kupper TS, Min K, Sehgal P, et al., : Production of IL-6 by keratinocytes. Implications for epidermal inflammation and immunity, *Ann. NY Acad. Sci.*, 557, 454-465, 1989.
- 10) Sato T, Kirimura Y, Mori Y, : The co-culture of dermal fibroblasts with human epidermal keratinocytes induces increased prostaglandin E2 production and cyclooxygenase 2 activity in fibroblasts, *J. Invest. Dermatol.*, 109, 334-339, 1997.
- 11) Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, et al., : Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets, *J. Biol. Chem.*, 266, 11341-11346, 1991.
- 12) Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, et al., : Isolation of cDNAs for perilipin A and B: Sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 12035-12039, 1993.
- 13) Ito A, Sakiguchi T, Kitamura K, et al., : Establishment of a tissue culture system for hamster sebaceous gland cells, *Dermatology*, 197, 238-244, 1998.
- 14) Lowry OH, Rosebrough NJ, Lewis Farr A, et al., : Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951.
- 15) Blanchette-Mackie EJ, Dwyer NK, Barber T, et al., : Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes, *J. Lipid Res.*, 36, 1211-1226, 1995.
- 16) Servetnick DA, Brasaemle DL, Gruia-Gray J, et al., : Perilipin are associated with cholesteryl ester droplets in steroidogenic adrenal cortical and Leydig cells, *J. Biol. Chem.*, 270, 16970-16973, 1995.
- 17) Brasaemle DL, Barber T, Kimmel AR, et al., : Post-translational regulation of perilipin expression: Stabilization by stored intracellular neutral lipids, *J. Biol. Chem.*, 272, 9378-9387, 1997.
- 18) Egan JJ, Greenberg AS, Chang M-K, et al., : Control of endogenous phosphorylation of the major cAMP-dependent protein kinase substrate in adipocytes by

- insulin and beta-adrenergic stimulation, *J. Biol. Chem.*, 265, 18769-18775, 1990.
- 19) Londos C, Brasaemle DL, Gruia-Gray J, et al., : Perilipin: Unique proteins associated with intracellular neutral lipid droplets in adipocytes and steroidogenic cells, *Biochem. Soc. Trans.*, 23, 611-615, 1995.
- 20) Souza SC, de Vargas LM, Yamamoto MT, et al., : BRL 49653 blocks the lipolytic actions of tumor necrosis factor- $\alpha$ : a potential new insulin-sensitizing mechanism for thiazolidinediones, *Diabetes*, 47, 691-695, 1998.
- 21) Clifford GM, McCormick DKT, Londos C, et al., : Dephosphorylation of perilipin by protein phosphatases present in rat adipocytes, *FEBS Lett.*, 435, 125-129, 1998.

# 紫外線照射で生じる DNA 損傷部に 特異的に結合するタンパク DDBp48 の発現調節

熊本大学 発生医学研究センター

山 泉 克

Cell strains from a subset (Ddb<sup>-</sup>) of individuals carrying XP complementation group E (XPE) lack a damage-specific DNA binding (DDB) activity. Because DDB was reported to recognize many types of DNA lesions and is inducible by treatment with DNA-damaging agents in a p53-dependent manner, DDB was originally expected to play a role in damage recognition prior to nucleotide excision repair. However, recent studies have reported that DDB is not required for nucleotide excision repair *in vitro*. Thus, its function is still remaining uncertain. Here, we reinvestigated the classification of three Ddb<sup>+</sup> XPE cells and found that they belong to other complementation groups of XP and UVsS. We analyzed the putative p53 responsive element in the intron 4 of the DDB2 gene, and found that it has a weak binding activity to p53 as determined by a gel-shift assay, and that it stimulates transcription of a reporter gene containing the element when co-expressed with wild type p53.

## 1. 緒 言

太陽紫外線の被曝により、皮膚細胞の DNA にはピリミジン 2 量体や (6-4) 光産物に代表される傷が生じる。これらの傷の蓄積が加齢に伴う皮膚老化の重要な要因と考えられる。DDB (Damaged DNA binding protein) は太陽光による DNA の傷のうち、主として (6-4) 光産物に高い親和性で結合するタンパクとして見つかり、p127 (DDB1) と p48 (DDB2) のヘテロ 2 体であることが既に報告されている。このうち DDB1 は DNA 上の損傷部への結合に関与し、一方 DDB2 は DDB1 の結合活性化に関与しているといわれている。DNA 修復異常症である色素性乾皮症の E 群 (xeroderma pigmentosum E : XPE) の一部に DDB2 欠損が見つかることから、DDB は DNA 修復に関与していると考えられてきた<sup>1)</sup>。しかし、DNA 修復反応を解析するために開発された *in vitro* での再構成系に DDB は不要なことから、その機能はごく最近まで不明であった。我々はこのタンパクが欠損すると (6-4) 光産物の修復効率が低下し、長時間にわたって傷が残存することを見出した<sup>2)</sup>。興味深いことに DDB は細胞周期の G1 期から S 期への移行に重要な役割を担う転写因子 E2F と結合してその転写活性を調節していること、更ながん抑制遺伝子 p53 により p48 自身の発現が調節されていることが相次いで見つかり、その発現調節機構が注目されている。我々は DDBp48 遺伝子の全塩基配列を決定する過程で、イントロンの 1 つに p53 結合配列 (p53 responsive element:

p53RE) に適合する配列を見出している。本研究は、XPE と DDB2 との関係を明らかにした上で DDBp48 の調節機構を解明し、これを基盤としてその発現を人為的にコントロールすることで皮膚の老化等の防止に応用可能かどうかを検討するために企画された。

## 2. 実 験

### 2.1 DNA 修復異常の検出

既に XPE と診断された患者のうち、DDB 活性 (+) の細胞株 3 株について、DNA 修復異常の指標ではある不定期 DNA 合成能 (UDS)、RNA 合成能の回復 (RRS)、S 期 DNA 合成能 (RDS)、及び複製後修復能 (PRR) を細胞レベルでのオートラジオグラフィ (UDS、RRS、RDS) ならびにアルカリ蔗糖密度勾配遠心法 (PRR) で解析した。また紫外線に対する感受性はコロニー形成法で調べた。DDB2 遺伝子の変異はゲノム DNA の各部分を PCR で増幅した後、センス鎖・アンチセンス鎖について塩基配列を決定して調べた。一部の細胞については既知相補性群に属する細胞との融合細胞を用いて UDS、RRS、RDS を指標として相補性テストを行った。

### 2.2 紫外線照射後の DDB2 の転写活性化

正常ヒト繊維芽細胞に 20J/m<sup>2</sup> の UVC を照射し、その後の DDB2 mRNA の転写量の経時的変化を Northern blot により検討した。陽性コントロールとして p53 により転写活性化を受ける p21/WAF1 の mRNA 転写量の変化を観察した。

### 2.3 DDB2 の p53RE と GST-p53 との結合

ゲルシフトアッセイにより放射性同位元素で標識した (RI 標識) DDB2 の p53RE と大腸菌で作製した GST-p53 融合蛋白質との結合を検討した。RI 標識した DDB2 の p53RE をプローブとして、GST-p53 と混合した後、ゲル



Regulation of expression of the UV-induced damage-specific DNA binding protein, DDBp48

Masaru Yamaizumi

Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University

電気泳動で分離し、オートラジオグラフィー上で GST-p53 と DDB2p53RE との特異的結合の有無を調べた。陽性コントロールとしては既に p53 との結合が明らかになっている p21/WAF1 遺伝子に含まれる p53 コンセンサス配列 (p53CON) を用いた。

## 2. 4 DDB2 の p53RE の転写活性化能

ルシフェラーゼアッセイにより DDB2 の p53RE の転写活性化能を検討した。このため p53 を発現するプラスミドと、minimal heat shock promoter で制御されるホタルルシフェラーゼの発現プラスミドの 5' 側上流に DDB2 の p53RE を組み込んだものを骨肉腫由来細胞株 Saos2 (内因性の p53 を欠損する) に一過性に共発現させ、p53 による転写活性をルシフェラーゼの発光強度としてルミノメーターで計測した。この時、内部コントロールとしてウミシイタケルシフェラーゼ (ホタルルシフェラーゼとは発光基質が異なる) を発現するプラスミドを同時に導入して、遺伝子導入効率のサンプル間での誤差を補正した。p53 は野性型及び 273 番目のアルギニンをヒスチジンに置換したもの (R273H; 転写活性を欠損する) を対照として用いた。p53 転写調節を受ける陽性コントロールとしては p21/WAF1 遺伝子の p53 RE を DDB2 と同様に組み込んだプラスミドを用いた。

## 3. 結果と考察

### 3. 1 DDB(+) の XPE 群について

これまで DDB(+) の XPE 細胞として報告されていた 3 株 (XP24TO, XP43TO, XP89TO) について、再度の詳細な細胞生物学的解析を行った<sup>3)</sup>。表 1 に示すように、XP24TO については UDS、RDS いずれも正常で、RRS の著明な低下が認められ、相補性テストの結果 UVsS と判定された。XP43TO は UDS、RRS は正常で RDS の低下が認められ、カフェイン存在下での紫外線感受性の増

加のあることから XPV と判定された。XP89TO は RRS、RDS は正常で UDS の低下があり、相補性テストの結果 XPF と判定された。従来 XPE には DDEB (+) のものと DDB (-) の明らかな生化学的な多様性があることから、DDB と XPE 遺伝子との対応が大問題となってきたが、今回得られた解析結果より、少なくとも我々の調べた範囲内ではすべての XPE については DDB2 遺伝子に異常が見つかり、DDB(+) の XPE については診断のまちがいによる可能性が高まった。このことは今後 XPE の原因及び病態を考える上で極めて重要な結果と考える。

### 3. 2 紫外線照射後の DDB2 の転写活性化

DDB2 mRNA の転写活性化は UVC 照射 16 時間後より認められた (図 1)。対照として p21/WAF1 mRNA の転写量を同時に観察したが、UVC 照射 8 時間後より増加が観察され、DDB2 は紫外線照射後、p21/WAF1 より遅れて転写が活性化されることがわかった。DDB2 の転写量が p21/WAF1 と同じく p53 によって制御されるのであればどのようにしてその転写活性化の遅延がもたらされるのか興味深い。

### 3. 3 DDB2 の p53RE と GST-p53 との結合

DDB2 遺伝子のほぼ全域にわたるゲノム塩基配列を決定して、p53 結合配列 (p53RE) を検索したところ、第 4 イントロン内に 1ヶ所 p53RE に合致する配列を見出した (図 2)。ゲルシフトアッセイではこの DDB2 の予想 p53RE と GST-p53 との結合、及び抗 p53(421) 抗体によるスーパーシフト、非 RI プローブによる競合阻害が確認された (図 3)。しかしながら DDB2 の p53RE と p53 との結合は p21/WAF1 の p53CON と比較して明らかに弱かった。

### 3. 4 DDB2 の p53RE の転写活性化能

ルシフェラーゼアッセイにより DDB2 の p53RE は p53

表 1 Ddb<sup>+</sup> を示す XPE 細胞の特長と相補性テストのまとめ

Cell strain	NER <sup>a</sup>	PRR <sup>b</sup>	UV sensitivity <sup>c</sup>	DDB activity <sup>d</sup>	Mutations in DDB2 gene	Proposed complementation group
XP24KO	Normal	ND <sup>e</sup>	+	+ <sup>g</sup>	ND <sup>e</sup>	UV <sup>s</sup> S
XP43TO	Normal	Abnormal	+ <sup>f</sup>	ND <sup>e</sup>	ND <sup>e</sup>	XPV
XP82TO	Near normal	Normal	-	- <sup>h,i</sup>	A730G <sup>k</sup>	XPE
XP89TO	Significantly reduced	ND <sup>e</sup>	+	+ <sup>h</sup>	None <sup>k</sup>	XPF
GM02415B	Near normal	Normal	-	- <sup>j</sup>	G818A <sup>k</sup>	XPE

<sup>a</sup>NER (nucleotide-excision-repair) determined by UDS (unscheduled DNA synthesis) levels.

<sup>b</sup>PRR determined by PRR and RDS (recovery of replicative DNA synthesis) assays.

<sup>c</sup>UV sensitivity measured by a colony-forming assay with/without caffeine.

<sup>d</sup>DDB (damage-specific DNA binding) activity assayed by an electrophoretic mobility shift assay.

<sup>e</sup>Not determined.

<sup>f</sup>UV sensitivity was observed in the presence of caffeine.

<sup>g</sup>Kataoka and Fujiwara, 1991.

<sup>h</sup>Keeney *et al.*, 1992.

<sup>i</sup>Itoh *et al.*, 1999.

<sup>j</sup>Chu and Chang, 1988.

<sup>k</sup>Nichols *et al.*, 1996.

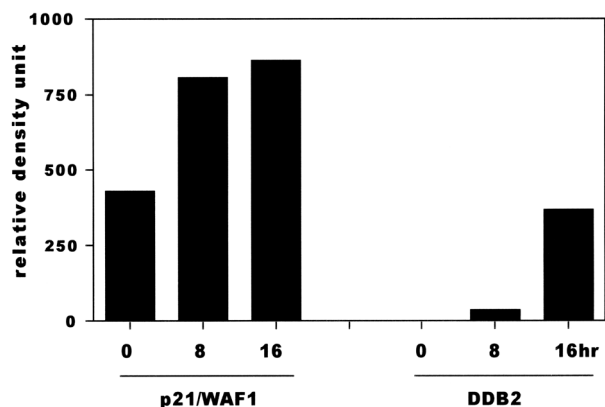


図1 紫外線照射後のDDB2の転写活性化  
ヒト繊維芽細胞に20J/m<sup>2</sup>のUVCを照射し、各時間毎に回収したtotal RNAによるNorthern blotにより観察されるDDB2, p21のバンド濃度をデンストメーターで測定したもの。

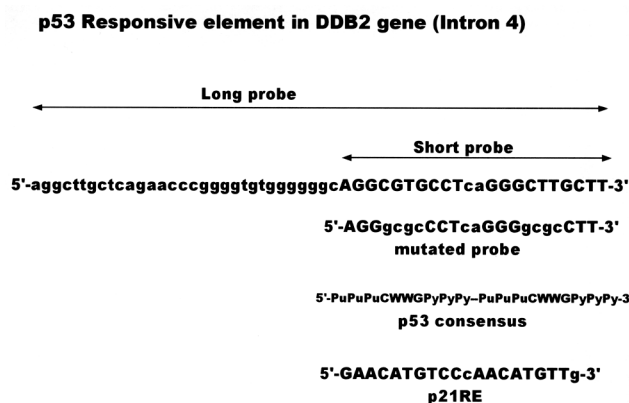


図2 ゲルシフトアッセイ、ルシフェラーゼアッセイに用いたDDB2, p21由来のp53-responsive element (p53RE)。DDB2ではp53 consensusに相当するショートプローブとその近傍の配列も含むロングプローブを用いた。参考のためp53コンセンサス塩基配列とp21/WAF1のp53RE(p53CON)を示す。

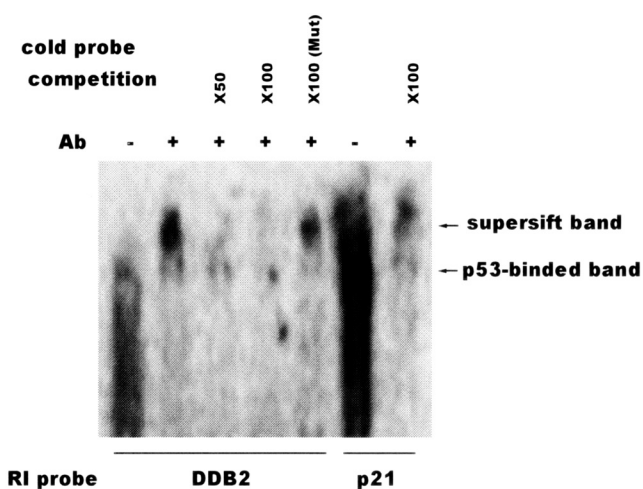


図3 DDB2・p21/WAF1のp53REをプローブとして用いたゲルシフトアッセイ。非RIプローブによる競合、抗p53抗体(421Ab)添加によるスーパーシフトが観察される。

の発現に伴い転写が増大することがわかった。しかしながらその活性化能はp21/WAF1のp53CONによる転写活性化能よりかなり弱かった(図4)。さらにDDB2のp53REの5'側の近傍にp53CONの片側に合致する10塩基の配列が見つかるが、この部分まで含む配列を用いた場合にはp53REが全く挿入されていないルシフェラーゼ発

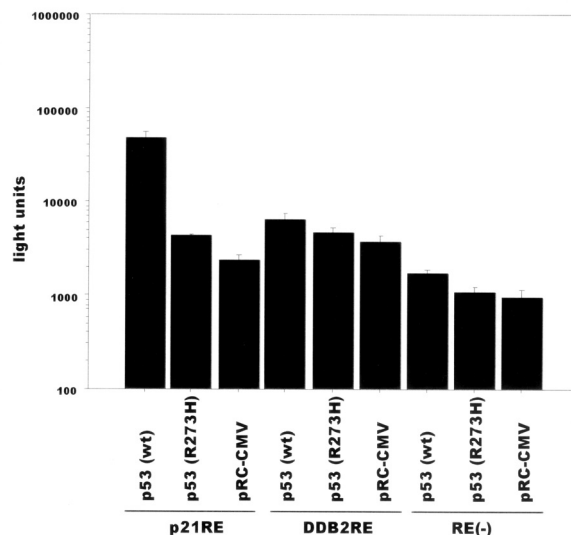


図4 DDB2由来のp53REをエンハンサーとして用いた場合のp53による転写活性化をルシフェラーゼ活性として測定した。陽性コントロールはp21/WAF1由来のp53CON。陰性コントロールはエンハンサーを持たないルシフェラーゼ発現プラスミドを使用している。p53は野生型(wt)の他、転写活性化能が低下する変異体(R273H)、p53ORFを持たないベクターのみ(pRC-CMV)を同時にSaos-2に導入している。

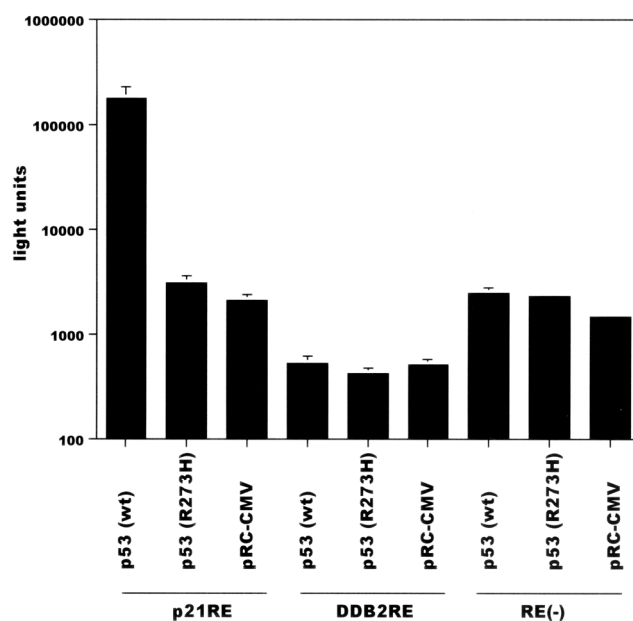


図5 DDB2由来のp53REの周辺領域をエンハンサーとして用いた場合のp53による転写活性化をルシフェラーゼ活性として測定。

現プラスミドを陰性コントロールとして用いた場合以下のルシフェラーゼ活性を呈した (図 5)。

#### 4. 総括

紫外線照射後の DDB2 の転写活性化は、同じく p53 により転写の活性化を受ける p21/WAF1 よりかなり遅れて起こっていた。DDB2 遺伝子のイントロン 4 に存在する p53 RE の p53 結合性はゲルシフトアッセイにより確認され、その転写活性化能もルシフェラーゼアッセイにより確認されたが、その活性化能は p21/WAF1 の p53CON と比較すると相当弱く、更に DDB2 遺伝子の p53RE 近傍の配列も含めてルシフェラーゼアッセイを行うと陰性コントロール以下の転写活性化能を示した。これらのことから、DDB2 遺伝子のイントロン 4 に存在する p53RE は、活性化した p53 により弱い活性化を受け、しかも p53 近傍の配列により抑制的な調節を受けていることが考えられた。p21/WAF1 の p53CON と比較した場合、DDB2 の p53RE としての活性は弱く、しかもその周辺の配列により抑制的な調節を受けていることが、紫外線照射後の DDB2mRNA 転写量の増加が p21/WAF1 の場合と比較して微弱で、しかもかなり遅く起こることの原因である可能性が考えられる。

DDB2 は E2F1 (DNA 合成関連遺伝子の発現を positive に制御する転写因子) の co-activator であることが報告されている<sup>4)</sup>。細胞周期の進行を止める方向に働く p53 により何故 E2F1 の co-activator といわれる DDB2 の転写が誘導されるのか、一見矛盾しているようであるが、DNA 損傷後の p53 と DDB2 の発現のタイムコースのズレがここで重要なものかもしれない。DDB2 による E2F1 の活性化は、E2F1 の抑制機能を持つ Rb 蛋白の共存下でも認められる事より、通常の細胞周期中でも何らかの役割を果たしている可能性が考えられる。

ヒト培養細胞において紫外線で傷害された DNA の global genomic repair に p53 が要求されるが、そのメカニズムの詳細は不明である。本研究は独自に得た DDB2 遺伝子の塩基配列情報をもとに、その CON 配列の機能を解析する事でヌクレオチド除去修復系の制御に於ける p53 の役割を明らかにする足がかりを与えるものと考えられる。

今後の課題としては、

##### 1) DDB2 転写調節機構の解析:

ヒト初代培養線維芽細胞に DNA 損傷を伴わない細胞ストレス (熱ショック、浸透圧ショック等) で p53 を誘導した場合と、逆にテトラサイクリンで p53 の発現を誘導できる培養細胞に UV 照射した場合の DDB2 発現の

タイムコース及び E2F1 制御下の DNA ポリメラーゼ  $\alpha$ 、dihydrofolate reductase 等の mRNA、もしくは蛋白の発現のタイムコースを調べ、DNA 傷害の有無により DDB2 発現や E2F1 活性が p53 により誘導されるタイムコースに違いが生じないか確認する。

##### 2) DDB2 転写調節機構の解析:

1. 細胞周期や DNA 損傷で DDB2 の転写が正・負に調節されている事がわかれば、これに関与するシス・及びトランスエレメントの解析を行う。すなわち DDB2 遺伝子のプロモーター領域の紫外線照射前後の細胞抽出液を用いたフットプリント解析、サウスウエスタン法によりその発現を制御する p53 以外の転写因子の同定を試みる。

2. Yeast two-hybrid system により DDB2 と結合する蛋白質を検索し、その中から DDB2 の E2F1 転写活性化能に影響を与える転写調節因子を同定する。指標には E2F1 プロモーターにより制御されるルシフェラーゼ活性を用いて、DDB2 と共発現させた場合にその活性が修飾されるものを探す。

##### 3) 細胞周期に伴う発現パターンの解析:

ヒト初代培養線維芽細胞の血清除去による同調系を用いて、細胞周期特異的な UV-DDB 活性の変動がないか、特に G1/S 期での増加の有無を検討する。

といった研究が必要と思われる。

#### (参考文献)

- Nichols A.F, Itoh T, Graham J.A, Liu W., Yamaizumi M, Linn S: Human damage-specific DNA binding protein p48. *J. Biol. Chem.*, 275, 21422-21428, 2000.
- Itoh T, Mori T, Ohkubo H, Yamaizumi M: A newly identified patient with clinical xeroderma pigmentosum phenotype has a non-sense mutation in the DDB2 gene and incomplete repair in (6-4) photoproducts. *J. Invest. Derm.*, 113, 251-257, 1999.
- Itoh T, Linn S, Ono T, Yamaizumi M: Reinvestigation of the classification of five cell strains of xeroderma pigmentosum group E with reclassification of three of them. *J. Invest. Derm.*, 114, 1022-1029, 2000.
- Hayes S, Shiyonov P, Chen X, Raychaudhuri P: DDB, a putative DNA repair protein, can function as a transcriptional partner of E2F1. *Mol. Cell. Biol.*, 18, 240-249, 1998.

# サイトカインノックアウトマウスにおける免疫反応と ストレス応答を指標とする皮膚機能の解析

昭和大学 薬学部毒物学教室

吉田 武 美

The induction of contact sensitization is associated with the movement of epidermal Langerhans cells (LC) from the skin and their migration to draining lymph nodes where they accumulate as immunostimulatory dendritic cells (DC). It has been reported that interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) are key cytokines for LC migration and/or maturation. This study has determined the effect of 2,4,6-trinitrochlorobenzene (TNCB) on contact sensitization in IL-1 $\alpha/\beta$  gene deficient (IL-1KO) and TNF  $\alpha$  deficient (TNF  $\alpha$  KO) mice. IL-1KO mice showed weak ear swelling response (about 85% of wild). LC existed in IL-1KO epidermis appeared to be morphologically similar to that observed in wild. The migration ratio of LC in IL-1 was almost the same as that seen in wild. These results suggest that IL-1 may not be a key factor of the contact sensitization in mouse skin. Additionally, we preliminary found that functional changes in immune reaction in TNF  $\alpha$  KO mice, however, the findings will be required further study.

Ultraviolet A (UVA) is known to induce the expression of many stress responsive genes due to the generation of reactive oxygen species (ROS). However, UVA's role in inducing metallothionein (MT) gene expression has not been studied. Furthermore, Ishizaki et al. (1996) demonstrated that UVA enhanced 12-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-mediated induction of ornithine decarboxylase (ODC) activity in mouse skin<sup>1)</sup>. Considering these facts, we examined the interaction of UVA, TPA and antioxidants on the induction of MT and ODC mRNA in mouse skin. UVA (19J/cm<sup>2</sup>) induced MT mRNA in mouse skin. The study using antioxidants suggest that ROS produced by UVA exposure may contribute to its ability to induce MT mRNA. UVA enhanced TPA-mediated ODC enzyme activity and TPA-mediated MT mRNA induction. Alpha-tocopherol pretreatment inhibited the induction of ODC enzyme activity by TPA treatment combined with UVA exposure (TPA+UVA). In addition, pretreatment of mouse skin with curcumin resulted in the almost complete inhibition of TPA- and/or UVA-mediated gene expression. These results demonstrate that UVA can induce MT gene expression and enhance TPA-induced ODC and MT gene expression. The data further suggest that these effects are partially mediated by ROS.

## 1. 緒 言

皮膚は生体内外からの様々な刺激に対する防御機能を果たすと共に、生体内の生理的病的症状の表現の場でもある。皮膚組織には、インターロイキン1 (IL-1)をはじめ多くのサイトカインが存在し、生体内外からの刺激に対し生理的かつ防御的応答の情報伝達に重要な役割を果たしていると考えられている。例えば、遅延性アレルギーを獲得する上で重要な感作の過程においては、IL-1 $\beta$ とTNF $\alpha$ がトリガーとなりその主要な役割を果たしていると言われている<sup>2)</sup>。しかしながら、遺伝子欠損マウスを用いた詳細な研究は成されていない。

アレルギー性接触皮膚炎は、皮膚に存在するランゲルハンス細胞 (LC) が抗原を局所リンパ節に提示することが発症メカニズムの第一段階であると言われているが、このランゲルハンス細胞の遊走及び成熟にIL-1 $\beta$ やTNF $\alpha$ が大

きく関与していることがそれぞれのサイトカインに対する抗体を用いた研究などで報告されている<sup>2)</sup>。しかしながら、その詳細については不明な点もあり、サイトカイン遺伝子欠損動物モデルを用いた研究によりその役割に関する情報が得られると予想される。そこで、本研究ではIL-1 $\alpha/\beta$ ノックアウトマウス (IL-1KOマウス) およびTNF $\alpha$ ノックアウトマウス (TNF $\alpha$ KO) を用いてアレルギー性接触皮膚炎や感作の成立過程におけるサイトカインの役割を検討した。

UVによる細胞障害や数々の毒性反応は良く知られた事実である。しかしながら、UVAはその光毒性は比較的弱く、作用機序もUVAにより産生された活性酸素に起因する事から、UVBやUVCとは光毒性の強さも性質も異なると報告されている。また、毒性の強いUVBやUVCには古くから数多くの研究報告があるが、UVAはそれに比べると報告も多くない。さらに、UVAは活性酸素を産生する事から、活性酸素により発現するストレス応答タンパク質に影響を及ぼすのではないかと考えた。そこで本研究では、UVAにより発生した活性酸素が皮膚におけるストレス応答タンパク質、特にストレス応答タンパク質としてよく研究されているメタロチオネイン (MT)<sup>3)</sup> やオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) の遺伝子発現にどの様に影響しているかについて皮膚研究に比較的多く用いられているCD-1マウスを用いて検討した。



The study on immune reaction and stress response in cytokine knockout mouse skin.

Takemi Yoshida

Department of Biochemical Toxicology,  
School of Pharmaceutical Sciences, Showa  
University

## 2. 実験

### 2.1 アレルギー性接触皮膚炎の実験

#### 2.1.1 実験動物および繁殖

実験には10週齢前後のIL-1KO<sup>4)</sup>、TNF $\alpha$ KO<sup>5)</sup>及びWildマウスを用いた。サイトカイン遺伝子欠損マウスは、東京大学医科学研究所、岩倉洋一朗教授より供与された親株を当大学実験動物研究施設内で交配させ、PCRによる遺伝子チェックを行ってそれぞれのサイトカイン遺伝子欠損マウス株およびWildマウス株を得、系統維持繁殖を行った。本研究では、雌雄マウスを使用した。

#### 2.1.2 Ear Swelling Test

マウスの腹部の毛を刈り3% 2,4,6-trinitrochlorobenzene (TNCB; アセトン:オリーブ油=4:1の溶媒に溶解)溶液を100 $\mu$ L塗布した。その6日後に片方の耳に1% TNCBをもう片方の耳に溶媒を25 $\mu$ Lずつ塗り、24時間後に耳厚をダイヤルシクネスゲージ(株ミットヨ)で測定しその耳厚差を表示した。

#### 2.1.3 マウスの耳介表皮シートの免疫染色

0.5% TNCBと溶媒をマウスの耳それぞれに25 $\mu$ Lずつ塗布し、その約16時間後に耳介を採取した。試薬を塗布した側の耳介を20mM EDTA含有PBS処理した表皮シートを得、冷アセトン溶液で固定した後、ピオチン化抗マウスIA $\delta$ 抗体(ファーマンジェン社)で一次染色した。抗体はペルオキシダーゼ標識した後、DABにより発色させ立体光学顕微鏡で写真撮影(対物 $\times$ 20、接眼 $\times$ 2.5; 0.336mm<sup>2</sup>)を行い、その写真を用いてLC数を数え、1mm<sup>2</sup>当たりのLC数を求めた。

#### 2.1.4 リンパ節細胞(LNC)増殖反応

0.05~3% TNCBをマウスの両耳に25 $\mu$ L/ear塗布し、その72時間後に耳下腺リンパ節よりLNCを採取し、トリチウムチミジンの取り込みを測定した。

### 2.2 UVAによるストレス応答タンパク質の遺伝子発現への影響の実験

#### 2.2.1 実験動物および処置

日本チャールスリバーラボラトリーズ(株)より購入した雌性CD-1マウスを用いた。マウスは、実験に用いる2~3日前に背部の毛をバリカンで刈った後、ヘアリムーバー(資生堂(株))にて完全に毛を取り除いた。

#### 2.2.2 光源

蛍光Black Blueライト(FL15 BL-B、ナショナル(株); 300-400nm)を用い、ガラス板にてUVBを除いた。光量はUVR

305/365 Dradiometer(クリニカルサブライ社)を用いて測定した。

#### 2.2.3 UVA照射および抗酸化物質処置

本研究で用いた抗酸化物質は、1,4-diazabicyclo-[2,2,2]-octane (DABCO; 10<sup>-4</sup>M)、*a*-トコフェロール(2 $\times$ 10<sup>-4</sup>M)、クルクミン(10<sup>-4</sup>M)であり、いずれもアセトンに溶解し、脱毛したマウス背部皮膚に100 $\mu$ L塗布した。12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)は、ジメチルスルフォキシドに溶解した後アセトンで40倍希釈したものを100 $\mu$ L(8nmol TPA)塗布した。対照動物には同量の溶媒を塗布した。UVAは固定したマウスに19J/cm<sup>2</sup>照射した。また、UVA照射開始時間を0時間と表示した。

#### 2.2.4 RNA調製およびノーザンブロット法

処置一定時間後のマウス背部皮膚を取り、グアニジンチオシアネート-フェノール-クロロホルム抽出法<sup>6)</sup>にてtotal RNAを採取した。total RNA(20 $\mu$ g)を1.2%アガロース-ホルムアルデヒドゲル上で電気泳動した。ノーザンブロット法に用いたプローブは、オルニチン脱炭酸酵素(ODC; 0.72kb, pMK934 mODC cDNAのEcoRI fragment)、メタロチオネイン-1(MT-1; 0.4kb, マウスpMT-1 cDNAのHindIII/EcoRI fragment)、グリセルアルデヒド-3-フォスフェートデヒドロゲナーゼ(GAPDH; 0.5kb, GAPDH cDNAのPstI fragment)である。

#### 2.2.5 表皮サンプル採取法およびODC酵素活性測定法

マウス表皮は、O'Brein等の方法により採取した<sup>7)</sup>。すなわち、採取したマウス皮膚を冷水に60秒間浸漬した後、55 $^{\circ}$ Cの温湯に30秒間浸し、再び冷水に浸漬した。この皮膚より表皮を片刃カミソリでかき取り、50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.2, 1mMジチオスレイトール、0.1mMピリドキサルリン酸、0.1mM EDTA含有)に集め、ソニケーターでソニケート(19W, 2分)した。これを遠心した(30000g, 20分間)上清を用いてODC酵素活性測定を行った。

ODC活性は、RussellとSnyderの方法により測定した<sup>8)</sup>。

## 3. 結果と考察

### 3.1 IL-1KOマウスを用いたアレルギー性接触皮膚炎の研究

#### 3.1.1 Ear swelling testの検討

アレルギー性接触皮膚炎がIL-1KOマウスで生じるか否か検討する目的で、アレルギー性接触皮膚炎の指標として汎用されているear swelling testを行った(Fig. 1)。この結果、IL-1KOマウスの耳厚差は、Wildマウスのそれ

の約 80%と、わずかながら減少した。

### 3.1.2 免疫染色による LC 遊走の比較検討

次に、0.5% TNCB 塗布 18 時間後の耳表皮 LC を抗マウス IAd 抗体で免疫染色を行い、溶媒処置のものと比較することにより LC 遊走を検討した (Fig. 2)。まず、抗 IAd 抗体による免疫染色の結果、IL-1KO マウスにも LC が存在し、形態学的観察では Wild の LC と特に大きな差

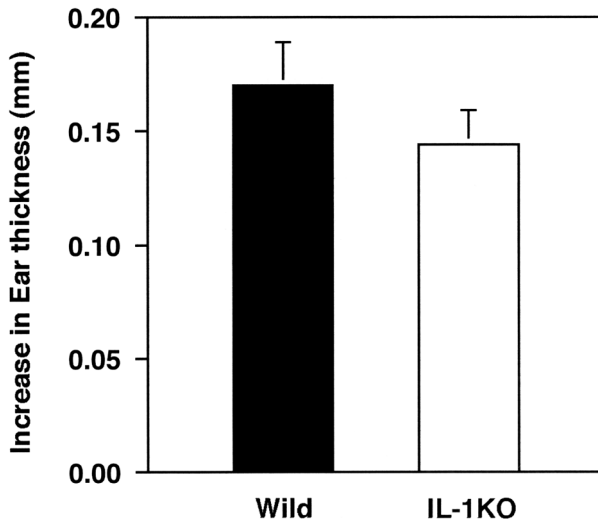


Fig. 1 Ear swelling response induced by TNCB in IL-1KO and wild mice. Three percent of TNCB was painted on mouse abdomen and one percent of TNCB or vehicle was applied on each ear 6 days after the sensitization. Ear thickness was measured 24 hr after the challenge.

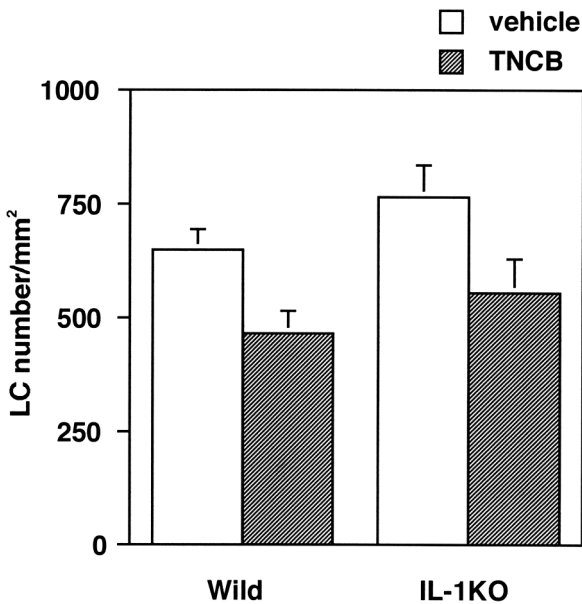


Fig. 2 The effect of TNCB on LC migration in wild and IL-1KO mice. TNCB (0.5%) or vehicle was painted on each ear and epidermal sheet was prepared 16 hr after the treatment. LC was stained with a monoclonal antibody against IAd and number of LC was counted.

が認められなかった。また、TNCB 塗布により、表皮から明らかに LC が減少している事が認められた。実際に LC 数を計測して比較したところ、IL-1KO マウスの方がもともと持っている LC 数が多い傾向にあった。TNCB 処置により LC は、Wild、IL-1KO 共に溶媒処置に比較して約 20% 減少した。これらのことは、IL-1 が存在しなくても LC は発現し、ハプテンの刺激にも反応して遊走する事を示している。そこで、次に近位リンパ節で LNC がハプテンの信号を受け取って増殖しているかどうかを LNC 増殖反応により検討した。

### 3.1.3 LNC 増殖反応

感作性物質の検出試験法の一つである LNC 増殖反応を 0.05 から 3% TNCB で検討したところ、0.1% TNCB の場合は IL-1KO マウスでの LNC 増殖反応は Wild より弱くなる傾向が認められたが、高濃度の TNCB では Wild とほぼ同様に増殖反応が起きていることが明らかになった (Fig. 3)。

本研究の結果、IL-1 が不在でも LC の遊走や感作は正常動物と同程度に生じ、IL-1 を介さない LC 遊走や感作成立の系が存在することが示唆された。しかしながら、遺伝子欠損動物は生まれながらにして特定の遺伝子産物が欠損していることから、何らかの他の因子によって代償作用が生じている可能性も否定できないことから、今後その点に関する検討が必要である。

## 3.2 その他のサイトカイン KO マウスを用いた研究

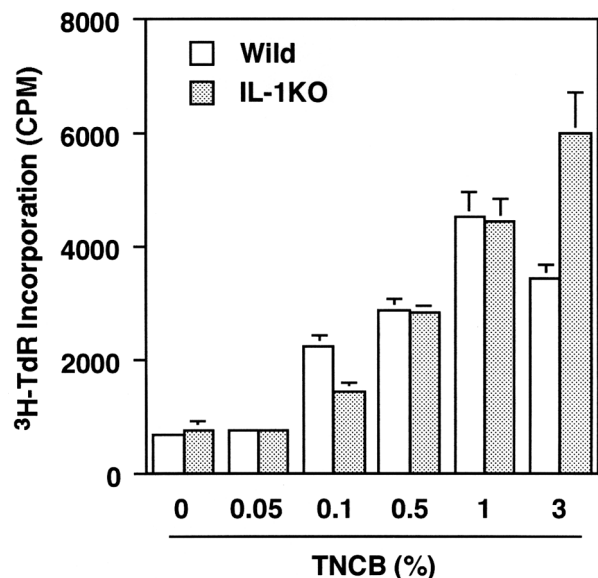


Fig. 3 The effect of TNCB on LNC proliferation in IL-1KO and wild mice. TNCB (0.05-3%) was painted on both ears and draining lymph nodes were excised. LNC was isolated and the incorporated radioactivity of <sup>3</sup>H-thymidine was measured.

IL-1KO マウスにおけるアレルギー性接触皮膚炎に対する応答は、Wild マウスと特に大きな相違が認められなかったことから、TNF $\alpha$ KO マウスを用いて同様の検討を進めた。現在まで得られている知見は、最終的に詳細な確認を必要とするものであるが、TNF $\alpha$ KO マウスでは LC に異常が発生している結果が得られている。さらに本条件下においてもアレルギー性接触皮膚炎を正常動物よりは弱い明らかに成立しているという重要な成果が得られている。本成果は皮膚 LC のアレルギー性接触皮膚炎における役割に関して重要な話題を提供するものである。現在強力にその解明の検討を進めている。

### 3.3 UVA によるストレス応答タンパク質の遺伝子発現への影響<sup>9)</sup>

#### 3.3.1 UVA による MT 遺伝子発現の経時変化

まず始めに、UVA がマウス皮膚 MT に直接的な作用を引き起こすかどうか検討した (Fig. 4)。UVA は、MT mRNA を照射直後ですでに著しく増加させ、照射開始 4 時間後には、対照の約 6 倍の MT mRNA が認められた。その後、徐々に mRNA 量は減少し始め、照射 24 時間後にはほぼコントロールレベルに回復した。UVA はマウス表皮における ODC 遺伝子発現に、本実験で検討した限りにおいては全く影響しなかった。これは、以前の我々の報告や他のグループの報告と一致している<sup>1, 10)</sup>。

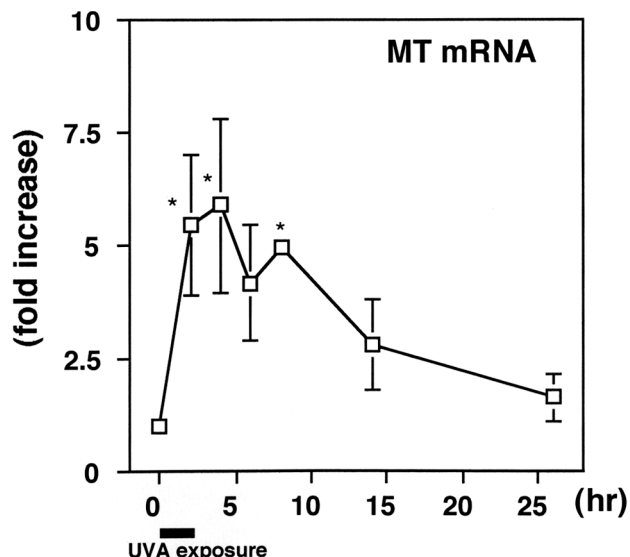


Fig. 4 Time course study of MT and HO-1 mRNA following UVA exposure in mouse skin. Mouse dorsal skin was irradiated with UVA (19J/cm<sup>2</sup>) and the skin was collected at the times indicated. Time 0 indicates the starting time of UVA exposure. Each blot was semiquantified and the signal of MT mRNA was normalized with that of GAPDH. Symbols represent the mean  $\pm$  SE for three mice. \*Significantly different from controls at  $p < 0.05$ . (引用文献 9 より)

#### 3.3.2 UVA による MT mRNA 誘導に及ぼす抗酸化剤の影響

UVA は活性酸素を生じることから、この活性酸素が MT mRNA 誘導におよぼしている影響を検討する目的で、抗酸化剤である  $\alpha$ -トコフェロール<sup>11)</sup> および一重項酸素捕獲剤である DABCO<sup>12)</sup> を UVA 照射 30 分前に処置した (Fig. 5)。 $\alpha$ -トコフェロールは UVA による MT mRNA 誘導を 20%、DABCO は 40% 阻害した。このことから、UVA による MT mRNA 誘導は部分的に UVA 照射により生じた活性酸素<sup>13)</sup>、特に一重項酸素が関与していることが示唆された。活性酸素以外の要因としては、UVA により産生されると報告されており、またエンドトキシンによる MT 誘導の主な要因といわれている IL-6<sup>14)</sup> が考えられる。

#### 3.3.3 UVA の TPA により引き起こされる ODC や MT 誘導の増強効果ならびに $\alpha$ -トコフェロールによる防御作用

TPA は強力な皮膚発ガンプロモーターとして古くから良く知られた化合物であり、ODC<sup>1, 7)</sup> や MT<sup>3)</sup> など様々

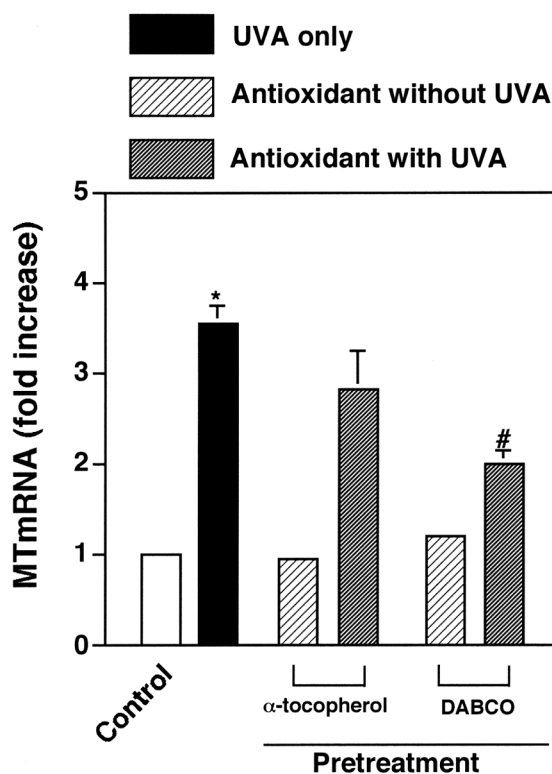


Fig. 5 Effect of antioxidant pretreatment on UVA-mediated expression of MT gene in mouse skin. Antioxidants were applied to the skin and followed with UVA exposure. The skin was collected 4 hr after starting UVA exposure. Each blot was semiquantified and the signal of MT mRNA was normalized with that of GAPDH. Symbols represent the mean  $\pm$  SE for three or four mice. \*Significantly different from controls at  $p < 0.05$ . #Significantly different from UVA alone at  $p < 0.05$ . (引用文献 9 より)

なストレス応答タンパク質を誘導することが明らかにされている。また、TPA は活性酸素を産生する事も報告されていることから、UVA との相互作用に興味を持たれ検討した (Fig. 6)。UVA 照射は TPA による ODCmRNA 誘導をさらに増加する傾向が認められたのみであった。しかし、ODC 活性誘導は UVA 照射により顕著に増強され、TPA 単独処置の約 1.7 倍の活性を示した。また、TPA による MTmRNA 誘導は UVA 照射により著しく増幅し、TPA 単独処置の約 2 倍になった。

ここで認められた UVA 照射の TPA 誘導性 ODC や MT 増強作用に、活性酸素が関与しているかどうか知る目的で、 $\alpha$ -トコフェロールを TPA 塗布直前に処置した。 $\alpha$ -トコフェロールは、UVA 照射による mRNA 増幅作用にはほとんど影響を与えなかった。興味深いことに、 $\alpha$ -トコフェロールは、UVA 照射により増幅した ODC 活性を TPA 単独処置による誘導レベルに回復した。この事は、UVA 照射の TPA による ODC 誘導増幅効果が、何らかの活性酸素により引き起こされていること、またこの活性酸素が ODC タンパク質のターンオーバーを遅らせるなどに

より ODCmRNA レベルではなく、酵素タンパクレベルに作用していることが示唆された。

### 3.3.4 クルクミンの UVA による ODC や MT 誘導増強効果におよぼす影響

ターメリックの主要な黄色素成分であり、活性酸素捕獲作用を有する<sup>15, 16)</sup>ことが知られているクルクミンの UVA による TPA 誘導性 ODCmRNA や MTmRNA 増幅作用に及ぼす影響について検討した (Fig. 7)。クルクミン前処置は、TPA による ODC および MTmRNA 誘導をほぼ完全に阻害しただけでなく、UVA 照射によるこれらの増強作用も阻害した。これらの事実は、クルクミンが活性酸素を捕獲する<sup>16)</sup>だけでなく、TPA によるプロテインキナーゼ C を介したシグナル伝達を直接的に阻害<sup>17)</sup>していることを示唆している。

本研究により UVA 照射は皮膚において MT 遺伝子発現を誘導するのみでなく、TPA による ODC や MT 誘導を増幅する作用があることが明らかになった。UVA は皮膚の IL-6 を増加させるという報告があるが、本研究で認

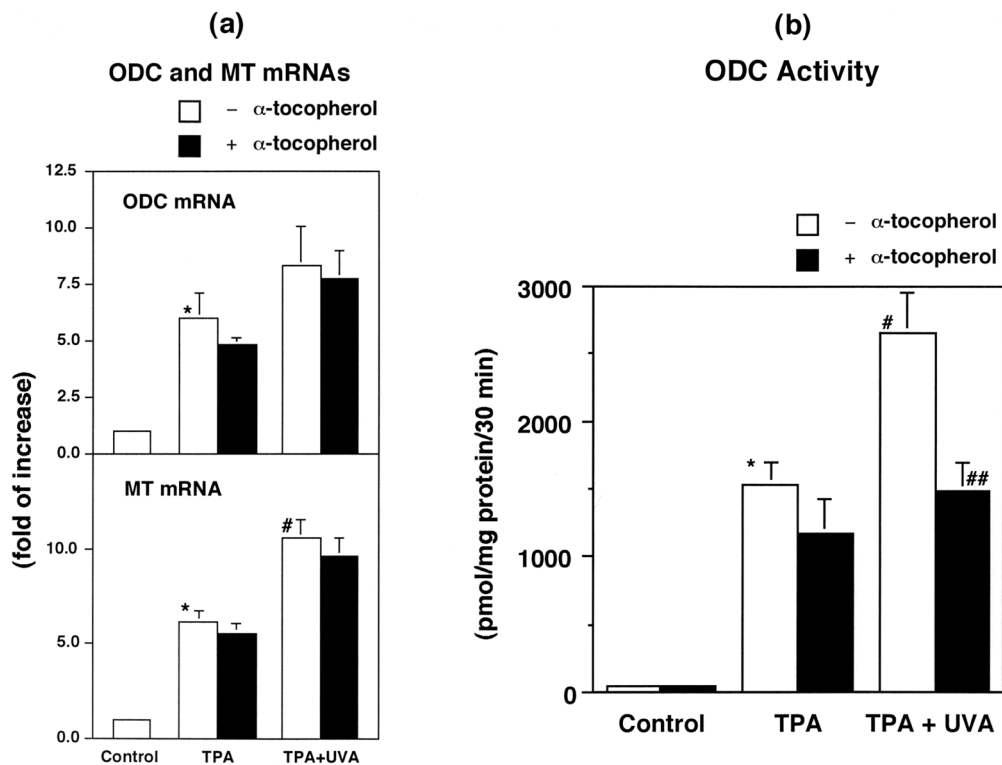


Fig. 6 Effect of  $\alpha$ -tocopherol on UVA-mediated enhancement of ODC activity, ODC and MT gene expression after TPA application in mouse skin.  $\alpha$ -Tocopherol and/or vehicle was applied to the dorsal skin just before TPA application on the mouse dorsal skin. Two hours after UVA exposure, the skin was collected. (a) Blots of ODC and MT mRNA were semiquantified and normalized with that of GAPDH. Symbols represent the mean  $\pm$  SE for three or six mice. \*Significantly different from controls at  $p < 0.05$ . #Significantly different from TPA alone at  $p < 0.05$ . (b) The epidermis was obtained from the rest of the skin and ODC activity was measured as described in "Materials and Methods." Symbols represent the mean  $\pm$  SE for six or ten mice. \*Significantly different from controls at  $p < 0.05$ . #Significantly different from TPA alone at  $p < 0.05$ . ##Significantly different from the group without  $\alpha$ -tocopherol treatment at  $p < 0.05$ . (引用文献 9 より)

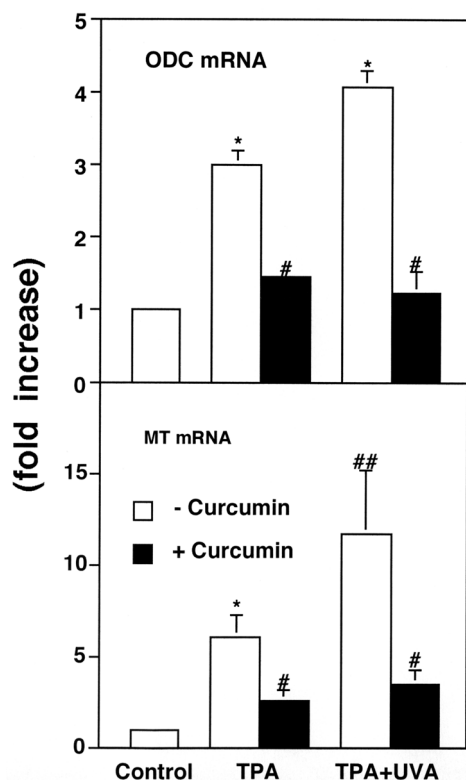


Fig. 7 Effect of curcumin on UVA-mediated enhancement of ODC and MT gene expression following TPA application. Curcumin was applied just before TPA application. Skin was collected 2 hr after UVA exposure. For a group without UVA treatment, skin was collected 4 hr after TPA application. Blots for ODC and MT mRNA were semiquantified and normalized with that for GAPDH. Symbols represent the mean  $\pm$  SE for three or six mice. \*Significantly different from controls at  $p < 0.05$ . #Significantly different from the equivalent group without curcumin treatment at  $p < 0.05$ . ##Significantly different from TPA alone at  $p < 0.05$ . (引用文献 9 より)

められた作用にどのようなサイトカインが関与しているかは、今後サイトカインノックアウトマウスなどを用いた検討を進めていく必要がある。

### 謝 辞

本研究を行うに際し、貴重なサイトカインノックアウトマウスを後供与していただきました、東京大学医科学研究

所、ヒト疾患モデル研究センター、岩倉洋一郎教授に深く感謝いたします。

### (引用文献)

- 1) Ishizaki, C., Oguro, T., Yoshida, T., et al.: *Dermatology* **193**, 311-317, (1996)
- 2) Kimber, I., Dearman, RJ, Cumberbatch, M., et al., *Curr. Opin. Immunol.* **6**, 614-619. (1998)
- 3) Klaassen, C. D., Liu, J., and Choudhuri, S.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 267-294. (1999)
- 4) Horai, R., Asano, M., Sudo, K., Kanuka, H., et al.: *J. Exp. Med.* **187**, 1463-1475. (1998)
- 5) Tagawa, Y., Sekikawa, K., and Iwakura, Y. : *J. Immunol.* **159**, 1418-1428. (1997)
- 6) Chomczynski, P., and Sacchi, N. : *Anal. Biochem.* **162**, 156-159. (1987)
- 7) O'Brien, TG., Simsiman, RC., and Boutwell, RK.: *Cancer. Res.* **35**, 1662-1670. (1975)
- 8) Russell, D., and Snyder, SH. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **60**, 1420-1427. (1968)
- 9) Oguro, T., and Yoshida, T.: *Photoderm. Photoimmunol. Photomed.* **17**, in press. (2001)
- 10) Hillebrand, GG., Winslow, M. S., Benzinger, M. J., et al. : *Cancer Res.* **50**, 1580-1584. (1990)
- 11) Jurkiewicz, BA., Bissett, DL., and Buettner, GR.: *J. Invest. Dermatol.* **104**, 484-488. (1995)
- 12) Cynshi, O., Takashima, Y., Katoh, Y., et al.: *J. Biolumin. Chemilumin.* **10**, 261-269. (1995)
- 13) Wlaschek, M., Wenk, J., Brenneisen, P., et al.: *FEBS Lett.* **413**, 239-242. (1997)
- 14) Lee, DK., Carrasco, J., Hidalgo, J., et al: *Biochem. J.* **337**, 59-65. (1999)
- 15) Lu, YP., Chang, RL., Huang, MT., et al.: *Carcinogenesis* **14**, 293-297. (1993)
- 16) Nakamura, Y., Ohto, Y., Murakami, A., et al: *Jpn. J. Cancer Res.* **89**, 361-370. (1998)
- 17) Lin, JK., Chen, YC., Huang, YT., et al.: *J. Cell Biochem. Suppl.* **28-29**, 39-48. (1997)

# 白血球分画が皮膚の健康状態と関連するメカニズム

新潟大学医学部 免疫学・医動物学

安 保 徹

We, multicellular organisms, must cooperate, to some extent, all cells when we behave for one purpose. In this regard, we carry the autonomic nervous system and all cells are cooperated with each other under unconsciousness. All cells in our body are under the regulation of autonomic nervous system and leukocytes are not excluded from this rule. Therefore, if the autonomic nervous system becomes unbalanced, the distribution of leukocytes is also deviated. This leads to the disorder of organs, including the skin, and we finally fall victim to disease.

Key words: cooperation among cells, autonomic nervous system, leukocyte, disease

## 1. 緒 言

全身に分布する他の細胞と同様に、白血球も自律神経支配を受けていることが明らかになった<sup>1, 2)</sup>。顆粒球（主なものは好中球）は膜上にアドレナリン受容体を持ち、主に交感神経刺激で活性化し、逆に、リンパ球は膜上にアセチルコリン受容体を持ち、主に副交感神経刺激で活性化する。このため、生体に激しいストレスが加わると次のような連鎖反応が引き起こされる。ストレス→交感神経緊張→顆粒球増多→組織（粘膜や皮膚）破壊、の図式である。この考えを導入すると、これまで医学や生物学で解明が難しかったいろいろな問題の謎が明らかになってゆく。白血球の日内リズムや年内リズム<sup>1)</sup>、ストレスと組織障害<sup>3)</sup>、新生児にみられる顆粒球増多<sup>4)</sup>、痛み止めやステロイドホルモンの副作用<sup>5)</sup>、手術侵襲と多臓器不全、など多数ある。

もう少し具体的に言うと、精神的ストレスでも身体的ストレスでも、多くの場合生体は交感神経緊張状態になり、いろいろな自律神経反応が引き起こされる、例えば、頻脈、高血圧、末梢循環不全、分泌抑制、消化管機能の停止などがある。そして、好中球も膜上にアドレナリン受容体を持つために他の細胞と同様にこの自律神経反応の中に組み込まれる。具体的には、

- 1) 骨髄の好中球プールから末梢への移行
  - 2) 好中球の活性酸素放出による皮膚や各種臓器での組織破壊
  - 3) その後、骨髄での好中球産生の促進
- である。



Mechanisms underlying the relationship of leukocyte distribution with healthy conditions of the skin

Toru Abo

Department of Immunology and Medical Zoology, Niigata University School of Medicine

皮膚に注目してこれらの変化を述べると、過労や心の悩みは末梢の循環不全と顆粒球増多をもたらし、かさかさの皮膚から吹き出物がでる皮膚へと進展してゆく。もちろん、からだ内部の循環障害と顆粒球による組織破壊も伴う。顔の表情筋は内臓筋由来なので上記した内臓の変化は顔にも現われ、容貌の変化としても現われてくる。結局、過労や心の悩みは、その人の美しさとも関係してくる。

## 2. 白血球の自律神経支配

生体防御系の基本細胞はマクロファージであるが、進化の過程でこれから顆粒球とリンパ球が生じている（図1）。マクロファージ時代の食能に磨きをかけたのが顆粒球であり、マクロファージ時代の接着能を進化させ認識系をつくったのがリンパ球である。そして、この進化の過程で顆粒球（好中球）は主にアドレナリン受容体を受け継ぎ<sup>1)</sup>、リンパ球は主にアセチルコリン受容体を受け継いでいる<sup>2)</sup>。

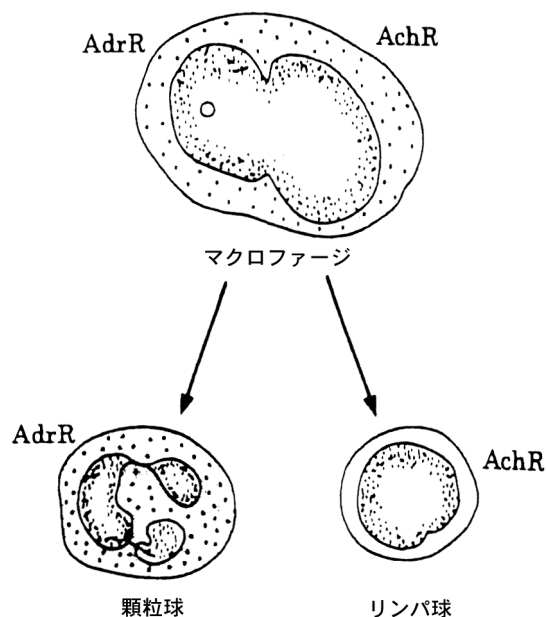


図1 白血球の自律神経支配

この進化は、生物が活動する時に手足から進入する細菌を効率よく処理し、逆に、生物が食物摂取や球速の時にはウイルスや異種蛋白などの貪食には小さ過ぎる物質を効率よく処理するための合目的なものだったのであろう。

マウスに徐放性にアドレナリン (Epinephrine) を投与すると全身に顆粒球 (Gr-1<sup>+</sup>) 増多が出現しているのがわかる (図2)。この反応は骨髄での顆粒球産生の増加によって起こることがその後明らかになっている<sup>6)</sup>。

### 3. 白血球の生理的変動

白血球の自律神経支配は、ストレスの無い通常状態でも白血球の分布に影響を与えている。我々ヒトの生体は日中が交感神経優位で、夜間が副交感神経優位なために、この自律神経系のリズムに応じた白血球の日内リズムが見られる (図3)。白血球総数はゆるやかではあるが日中多く、夜間低いという日内リズムが認められる。さらに顆粒球、リンパ球、単球 (monocytes) はその膜上の自律神経レセプターの発現に応じたリズムを示す。アドレナリン受容体が優位の顆粒球と単球は日中増加するリズムで、リンパ球は逆転した夜間増加するリズムである<sup>1)</sup>。

<sup>125</sup>I-シアノピンドロールを用いてヒト白血球分画でのアドレナリン受容体の発現量を比較した (図4)。単球 (Mφ、マクロファージ) と顆粒球の他、系統発生学的に古いリンパ球であるNK細胞や胸腺外分化T細胞 (CD56<sup>+</sup>T細胞) もアドレナリン受容体の発現量が高い。進化したT、B細胞がアドレナリン受容体の発現が低く、逆にアセチルコリン受容体の発現が高い傾向にある<sup>2)</sup>。

ヒト末梢血でさらにリンパ球サブセットの日内リズムを検索した (図5)。アドレナリン受容体持つCD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>NK細胞とCD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>胸腺外分化T細胞は、顆

粒球や単球と同じ日中増加する日内リズムを示した。アセチルコリン受容体を優位に持つ胸腺由来のCD3<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>通常T細胞は夜間に増加する日内リズムを示した。

なお、データには示さないが、顆粒球の中でも好中球と好塩基球は日中増加のリズム、好酸球のみはリンパ球と似

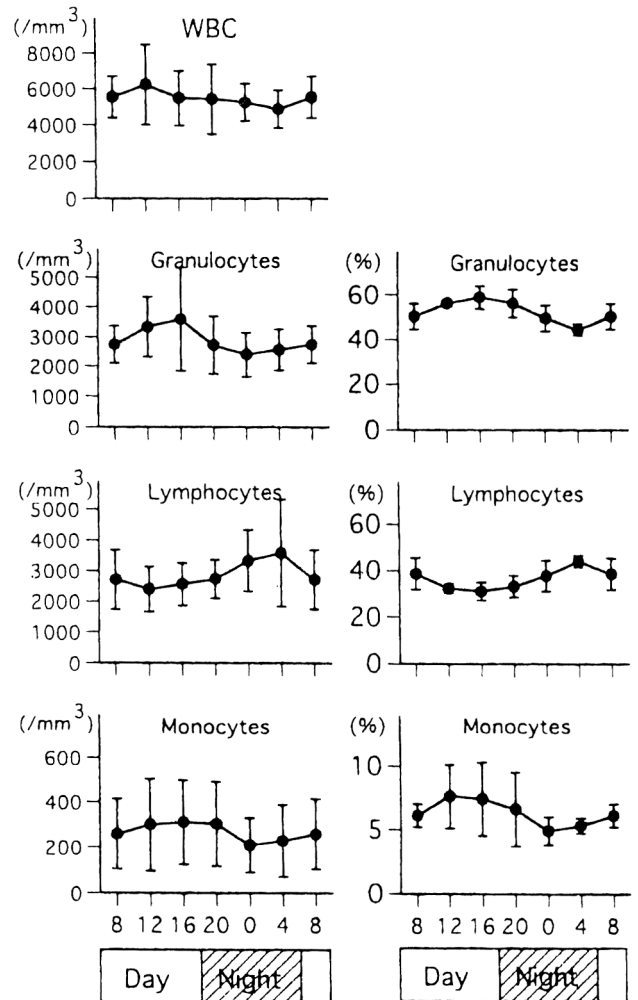


図3 ヒト白血球総数とその分画のアドレナリン受容体の発現の比較

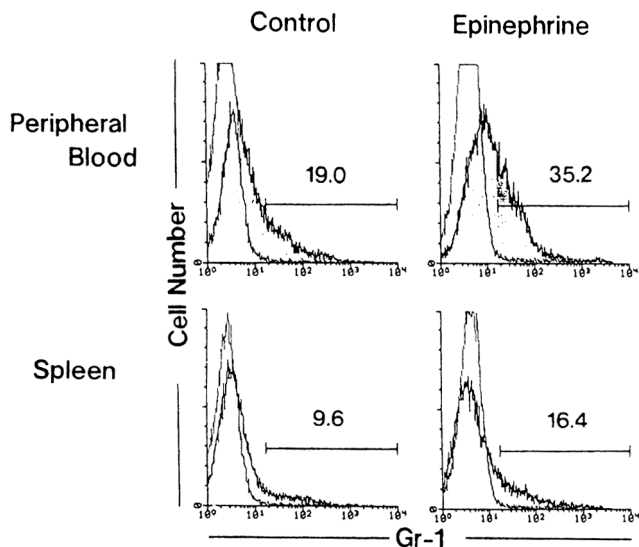


図2 マウスにアドレナリン (Epinephrine) を投与したときの顆粒球増多

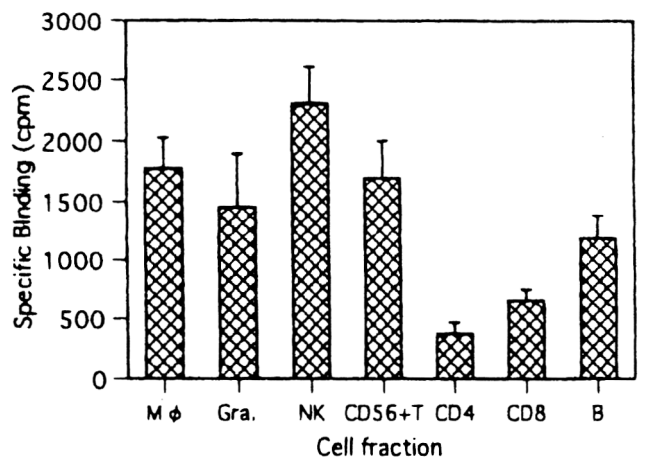


図4 ヒト白血球分画のアドレナリン受容体の発現の比較

た夜間増加のリズムを持っていたことを付け加えておきたい。

#### 4. 急性ストレスと顆粒球 (好中球)

徐放性にアドレナリンを与えたり、慢性的ストレスを与えたときは、骨髄での好中球の産生が高まり、その後全身性の好中球増多がくる<sup>6)</sup>。では、急性ストレスに対して顆粒球 (好中球) はどのように反応してくるのであろうか。マウスをメッシュにはさみ、8時間と24時間後に各種免疫臓器にある顆粒球の数の変化を調べた (図6)。顆粒球の著しい減少が見られた。逆に、ストレス開始8時間後に末梢血や肝では顆粒球が増加していた。これは骨髄の顆粒球プールから末梢への移行が起こったことを示唆している。一方、胃の粘膜ではストレスの時間延長と共にしだいに顆粒球の数が増加していった。そして、24時間後には確実に

に胃潰瘍の形成が出現した<sup>3)</sup>。

このようにストレスは末梢への好中球浸潤を誘導し、組織破壊を引き起こす。好中球は成熟後の寿命が2日と短い。これは好中球が生き続ける遺伝子 bcl-2 を欠損していることによる。好中球はアポトーシスで寿命を終えるが、生きている段階からこの反応が進んでいる。好中球が多核球とも言われるように生きた状態で既に核にくびれがはいっているのはこの反応の進行のためであろう。

好中球は常在菌も含めた細菌との戦いで、寿命を終えることが促進される。ストレスによる組織破壊が常在菌の存在する場所に出現するのはこのためである。代表的なものを挙げるとストレスによる歯周病 (歯槽膿漏) (Str. mutans)、胃潰瘍 (H. pylori)、潰瘍性大腸炎 (E. coli)、痔 (E.

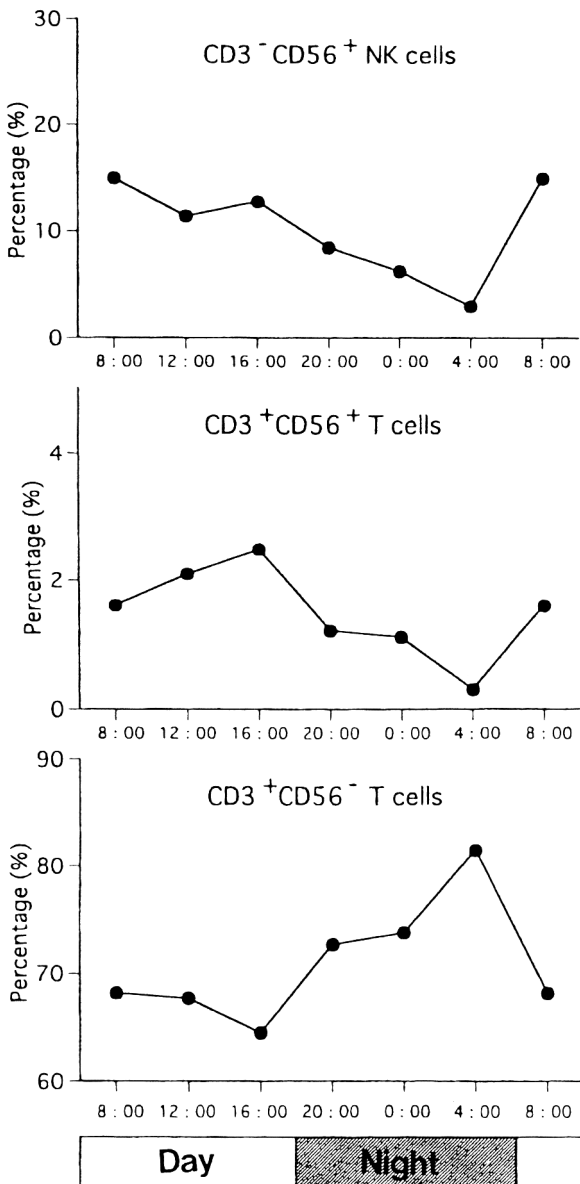


図5 ヒトリンパ球サブセットの日内リズム

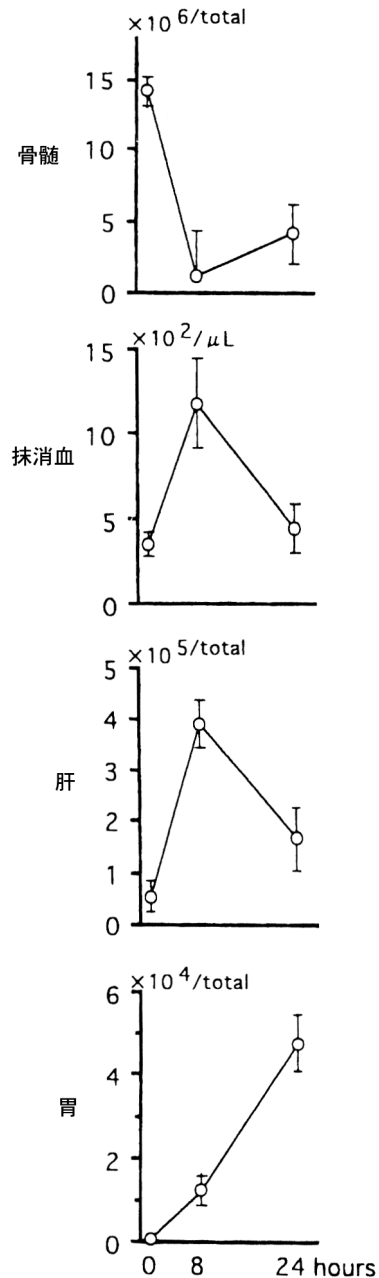


図6 マウス急性ストレス後の全身の顆粒球数の変化

coli) などである。ストレスが強い場合は常在菌の存在しない場所でも好中球の標的となる。アルコール過剰摂取時の急性腎炎や肝炎、過労ややけど時の急性腎炎などである。

精神的ストレスや身体的ストレス以外にもストレスと同様の交感神経緊張を誘導するものがある。1) 痛み止め(消炎鎮痛剤、NSAIDs)の長期使用、2) ステロイドホルモンの過剰使用(湿布や塗り薬として、外用使用したときも含む)、3) 細菌感染症などである。特に、NSAIDsは顆粒球の炎症に対しては起炎剤として働くことを知ってほしい<sup>5)</sup>。これは、プロスタグランジンがカテコールアミン産生の抑制系として働いているためである。もう少し具体的に言うと、NSAIDsによってプロスタグランジン産生が抑制され、この反応を主体とするリンパ球炎症(カタル性炎症やアレルギー性炎症)は抑制されるが、逆にカテコールアミン産生系によって刺激される化膿性の炎症は悪化することになる。

生理的に放出されるステロイドホルモンや投与初期のステロイドホルモンは、ストレスを軽減しその後誘導される好中球増多を消失させる力を持っている。しかし、外用などで使用して生体に残ったステロイドホルモンは酸化コレステロールとなり、今度は逆に激しい交感神経緊張、末梢循環器不全、好中球増多を呼び込む。これがアトピー性皮膚炎の患者がステロイド外用薬を使用した時の病状悪化である。ステロイドが酸化した、いわゆる、酸化コレステロールは胆汁酸として肝→胆嚢→腸の経路を通して排泄されるが、この能力には限界があるので上記した反応が引き起こされることになる。

## 5. ストレスと皮膚の状態、容貌、そして全身的な美しさ

ストレスはかならず全身の循環障害を伴うので、ストレスが続くと皮膚の水みずしさが失われ、かさかさしてくる。また、顆粒球の増多も伴うので化膿性の炎症が起きやすくなる。若い人に見られるニキビを“青春のシンボル”と言うのは危険である。実際は、精神的ストレスによる循環障害(血液のうっ滞-黒赤い皮膚)と顆粒球増加(常在菌である*P. acnes*と反応して化膿巣を形成している)の病気だからである。年齢がもっと上の人でもストレスによって突然アトピー性皮膚炎がくる所以でもある。水みずしい皮膚を保つには交感神経緊張をもたすことのないような生活をする必要がある。睡眠不足は一日の交感神経緊張状態を長くすることであるからすぐ皮膚の荒れがくることになる。

ストレスによる皮膚の異常はかならず内臓の変化を伴っている。内臓(消化器)のほとんどの働きは副交感神経支配である。従って、ストレスによって交感神経緊張の時間が多くなると消化管の働きは低下する。具体的には分泌抑

制(消化液がでない)と蠕動運動抑制(便秘となる)である。このままでは、食事ができず生命が危険にさらされる。これを救う反応として副交感神経反射が一過性に起こる。これが胃潰瘍や十二指腸潰瘍患者に見られる腹痛と酸分泌である。また、潰瘍性大腸炎や刺激結腸に見られる腹痛と下痢である。従って、対症療法ばかりしている医者は患者を治すことができない。真の原因(ストレスの原因)をつきとめて除かなければならない。

内臓の変化は、顔の表情の変化を伴う。顔の表情筋が内臓筋由来だからである<sup>7)</sup>。従って下記のような内臓(消化管)が障害を受けている人は苦しい容貌となってくる。健康な人が美しい理由である。

骨や筋肉の細胞は、白血球と兄弟の関係で進化している。つまり、白血球の元祖であるマクロファージが細胞外マトリックスに $\text{Ca}^{2+}\text{PO}_4^{3-}$ (細胞の興奮の時に使われた老廃物)を $\text{OH}^-$ と共にため置いたものが骨である(ハイドロキシアパタイト)。一方、マクロファージの遊走能(もっと具体的には、細胞内骨格や収縮物質を使用)を発達させたのが筋細胞である。従って、ストレスが続くと骨は少なく硬くなる。そして、循環障害によって変形がくる。このようなわけで、過労や心の悩みのある人が手足の骨や、背骨、腰や肩の骨が変形してゆくのである。このような状態を多くの医者は、しかたのない老化による骨の変形として診断して、その症状から痛み止めなどを処方するが病気は悪化する。逆に、ストレスを除くと痛みはとれ、骨の変形もしだいに元に戻ってくる。当然、ストレスによる骨の変形は姿勢を悪くするのでその人の全身的美しさをも乱すことにつながる。

## 6 おわりに

ストレスは免疫系を変え病気を引き起こすと共に、皮膚のつや、顔の容貌、全身的な姿勢を悪化させ、その人の美しさを決めていることを明らかにした。

## 7 結論

我々多細胞生物は、一つの目的に向かって行動する時、細胞全体がある程度協力し合わなければならない。このために自律神経系があり、無意識の内に協力体制が整う。自律神経の支配下にあるのは細胞にほとんど例外はなく、血液中を流れる白血球も同様であった。このため自律神経のバランスが崩れると白血球の分布が変化し、皮膚も含めて全身に異常がきてついには病気となる。

### (参考文献)

- 1) Suzuki, S., Toyabe, S., Moroda, T., Tada, T., Tsukahara, A., Iiai, T., Minagawa, M., Maruyama, S., Hatakeyama, K., Ento, K. and Abo, T. Circadian

- 
- rhythm of leukocytes and lymphocyte subsets and its possible correlation with the function of autonomic nervous system. *Clin. Exp. Immunol.* **110**: 500-508, 1997.
- 2) Toyabe, S., Iiai, T., Fukuda, M., Kawamura, T., Suzuki, S., Uchiyama, M., and Abo, T. Identification of nicotinic acetylcholine receptors on lymphocytes in periphery as well as thymus in mice. *Immunology* **92**: 201-205, 1997.
- 3) Moroda, T., Iiai, T., Tsukahara, A., Fukuda, M., Suzuki, S., Tada, T., Hatakeyama, K. and Abo, T. Association of granulocytes with ulcer formation in the stomach of rodents exposed to restraint stress. *Biomed. Res.* **18**: 423-437, 1997.
- 4) Kawamura, T., Toyabe, S., Moroda, T., Iiai, T., Takahashi-Iwanaga, H., Fukuda, M., Watanabe, H., Sekikawa, H., Seki, S. and Abo, T. Neonatal granulocytosis is a postpartum event which is seen in the liver as well as in the blood. *Hepatology* **26**: 1567-1572, 1997.
- 5) Yamamura, S., Arai, K., Toyabe, S., Takahashi, E. H. and Abo, T. Simultaneous activation of granulocytes and extrathymic T cells in number and function by excessive administration of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell. Immunol.* **173**: 303-311, 1996.
- 6) Tsukahara, A., Tada, T., Suzuki, S., Iiai, T., Moroda, T., Maruyama, S., Minagawa, M., Musha, N., Shimizu, T., Hatakeyama, K. and Abo, T. Adrenergic stimulation simultaneously induces the expansion of granulocytes and extrathymic T cells in mice. *Biomed. Res.* **18**: 237-246, 1997.
- 7) 西原克成 現代医学の盲点と生命科学の統一理論(12)。容姿・容貌の医学と健康科学。治療 **80**: 145-159, 1998。

# UVA による酸化的遺伝子損傷の細胞内修復機構

広島大学大学院 理学研究科

井出 博

Solar ultraviolet radiation with wavelength between 320-400 nm (UVA) passes through stratospheric ozone without absorption and reaches the earth's surface. When exposed to UVA, reactive oxygen species (ROS) generated by endogenous photosensitizers cause damage to DNA, mostly oxidative base lesions, in living organisms. In this study, the damage specificity has been elucidated of two base excision repair enzymes [endonuclease III homolog 1 (NTH1) and 8-oxoguanine glycosylase 1 (OGG1)] that are potentially involved in removal of UVA-induced oxidative DNA lesions. Duplex oligonucleotide substrates containing unique lesions were incubated with the enzymes and products were analyzed by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. Pyrimidine lesions such as uracil, thymine glycol, 5,6-dihydrothymine, and 5-hydroxyuracil were efficient substrates for NTH1, and purine lesions such as 7,8-dihydro-8-oxoguanine and formamidopyrimidine were also good substrates for OGG1. Interestingly, further analysis of the damage specificity revealed that NTH1 recognized formamidopyrimidine, a purine lesion, and OGG1 recognized the pyrimidine lesions except thymine glycol but in a paired base-dependent manner. These results suggest that NTH1 and OGG1 may be able to act as a mutual backup enzyme, albeit not perfectly, in cells. The repair activity for 5-formyluracil, a major UVA-induced oxidative lesions, was also investigated using mouse tissues. Incubation with the crude cell extracts from several tissues including brain, heart, lung, thymus, and liver all resulted in incision of a substrate at the 5-formyluracil site, demonstrating the presence of repair activity for this lesion. Several lines of evidence suggested that the observed activity for 5-formyluracil resided on a novel enzyme that had not been identified before.

## 1. 緒言

太陽光には、UVA (320-400 nm)、UVB (290-320 nm)、UVC (190-290 nm) の紫外線成分が含まれる (表1)。この波長域に吸収帯を持つ分子が紫外線を吸収すると、分子の構造が変化したり、活性酸素などの反応種を生じ他の分子を攻撃する。DNAに含まれる4種の塩基 (A, G, C, T) はいずれも260nm付近に吸収極大を持ち、約300nm以下の紫外線を吸収する。したがって、UVCおよびUVBは、DNAに吸収され直接的に塩基の構造変化を引き起こ

表1 太陽光の紫外線とDNA損傷

紫外線成分	UVC	UVB	UVA
波長 (nm)	190-290	290-320	320-400
相対エネルギー (%) <sup>a</sup>	0	0.5	5.6
DNAの吸収	あり	あり (短波長)	なし
DNA損傷 <sup>b</sup>	CPD, 6-4PP	CPD, 6-4PP	酸化損傷
DNA修復機構 <sup>c</sup>	NER	NER	BER

<sup>a</sup> 地表に到達する太陽光エネルギー (紫外線, 可視光, 赤外線) に占める割合

<sup>b</sup> CPD: cyclopurimidine dimer, 6-4PP: (6-4) photoproduct

<sup>c</sup> NER: nucleotide excision repair, BER: base excision repair

す。水素結合による相補的な Watson-Crick 型塩基対形成は、遺伝子の複製や発現に中心的な役割を果たすため、構造変化に伴う塩基対形成能の異常は、生物にとって極めて重大な脅威となる。UVCおよびUVBは、2つのピリミジン塩基が連続した dipyrimidine site に cyclopurimidine dimer (CPD) と (6-4) photoproduct (6-4PP) を生じる (図1A)<sup>1)</sup>。両損傷はDNA複製を強く阻害するため細胞致死の原因となるほか、6-4PPでは、損傷を乗り越えたDNA複製が起こると、新生鎖に相補的ではない誤ったヌクレオチドが取り込まれ突然変異が誘発される。ヒトでは、表皮を形成する細胞の失活や突然変異、さらに悪い場合は皮膚癌の発症にもつながる。幸いなことに、地球を取りまくオゾン層は紫外線を吸収するため、地上に生息する生物は、最も脅威となるUVCのすべて、および短波長領域UVBによるDNAの傷害を免れている。

一方、UVAはオゾン層にまったく吸収されず地表に到達する。UVAはUVBに比べ光子エネルギーは小さいが、地表に到達する全エネルギー量はUVBの約10倍に達する (表1)。DNAはUVAの波長域 (320-400nm) には吸収帯を持たないため、UVCやUVBとは異なり直接的にはDNA損傷を引き起こさない。しかし、細胞内にはUVA波長域に吸収を持つ多種の色素団分子 (たとえば、NAD, FAD, ポルフィリン化合物など) が存在する。これらの分子は、本来細胞内において物質・エネルギー代謝に関連した補酵素として重要な働きをしているが、UVAが細胞に照射されると励起され、エネルギー移動により活性酸素 (Reactive oxygen species, ROS) が発生する (Type II reaction と呼ばれる)<sup>2)</sup>。



Cellular repair mechanisms of oxidative DNA damage induced by UVA

Hiroshi Ide

Graduate School of Science, Hiroshima University

ROSは、周辺に存在するDNA、生体膜、タンパク質と反応しこれらの分子を酸化する。生体膜の脂質過酸化やタンパク質の分解はこれらを再合成することにより対処できるが、遺伝情報を担うDNAの損傷は、UVCおよびUVBの場合と同様に生命活動にとって多大な脅威となる。

細胞内色素団分子が関与するUVA由来のDNA損傷としてはthymine glycol (TG), 5-formyluracil (FU), 7,8-dihydro-8-oxoguanine (OG), 2,6-diamino-4-hydroxyformamidopyrimidine (FAPY)などが同定されている(図1B)<sup>3-5)</sup>。TGおよびFAPYは突然変異性は低いが、いずれもDNA複製を強く阻害する。一方、FUおよびOGは複製阻害効果は低いが、突然変異性を示す。したがって、DNAに生じたこれらの損傷は、速やかに除去される必要がある。最近、これらの酸化損傷を認識する哺乳類修復酵素(ヒトおよびマウスNTH1, OGG1)が同定され遺伝子がクローニングされた<sup>6,7)</sup>。NTH1はTG, OGG1はOGおよびFAPYを認識し、これらの損傷をDNAから除去する。さらに、OGG1については、

ノックアウトマウスが作製され phenotype の解析が行われたが、マウスは正常に発育し有意に高い発癌率は観察されなかった<sup>8,9)</sup>。NTH1ノックアウトマウスはまだ報告されていないが、大腸菌のNTH1ホモログ欠損株(nth)では、明確な phenotype が認められないことから<sup>10)</sup>、NTH1ノックアウトマウスでも同様な結果が予想される。したがって、NTH1およびOGG1は哺乳類の主要な酸化損傷修復酵素として位置づけられているにもかかわらず、これらの酵素による修復欠損が直ちに phenotype として現れない可能性が高い。DNAの酸化は、UVAのような外的要因だけでなく好氣的代謝といった内的要因でも生じるため、遍在性の高い損傷である。このような損傷に対しては、何らかの原因で一つの修復酵素が働かない場合、他の酵素がこれをバックアップすることにより fail-safe system を形成している可能性が考えられる。

本研究では、以上の観点からNTH1およびOGG1の基質特異性を詳細に調べ、認識する損傷のオーバーラップによる修復バックアップの可能性をまず検討した。さらに、FUを認識する哺乳類修復酵素はこれまでに同定されていないことから、この活性の検索もあわせて行った。

## 2. 実験

### 2.1 オリゴヌクレオチド基質

TG, urea (UR), 5,6-dihydrothymine (DHT), 5-hydroxyuracil (HOU)は配列1のXの部位、FUは配列2のYの部位、OGおよびFAPYは配列3のZの部位に選択的に導入した。

配列1 ACAGACGCCAXCAACCAGG

配列2 CATCGATAGCATCCGYCACAGGCAG

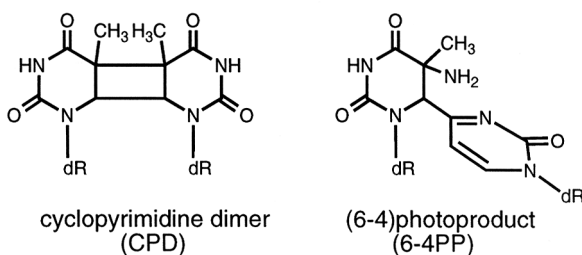
配列3 CATCGATAGCATCCTZCCTTCTCTC

配列1-3の相補鎖はホスホロアミダイト法により合成した。DHT, HOU, FU, OGは、それぞれ対応する損傷アミダイトモノマーを用いて合成し、導入した損傷塩基が分解しない穏和な条件下で脱保護を行った。TGは対応する位置にチミンを含むオリゴヌクレオチド(配列1, X=T)のKMnO<sub>4</sub>処理により合成し、逆相HPLCにより分取精製した。URを含む基質は、TGを含むオリゴヌクレオチドのアルカリ処理(pH11.4)により調製した。FAPYは、前駆体として7-メチルグアニンをDNAポリメラーゼ反応により導入し、これを室温下、pH11.4で処理しFAPYに変換した。

### 2.2 修復酵素アッセイ

マウスNTH1, ヒトOGG1, 大腸菌endonuclease III (Endo III), formamidopyrimidine glycosylase (Fpg) およびヒトmethylpurine glycosylase (MPG)は、それぞれクローニングした遺伝子のマウス大腸菌発現系を用いて発現し、イオン交換およびアフィニティークロマトグラフィーによりSDS-PAGEで単一バンドになるまで精製した<sup>11, 12)</sup>。酵素

## A UVB-induced DNA damage



## B UVA-induced DNA damage

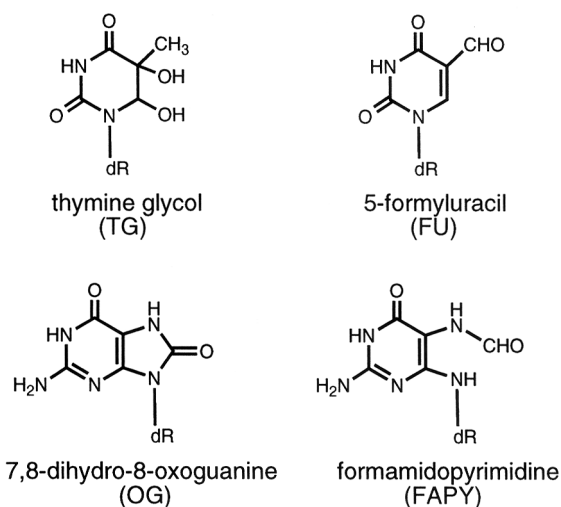


図1 UVBおよびUVAにより生成するDNA損傷  
A: UVBにより生成するピリミジン二体, B: UVAにより生成する酸化損傷

活性アッセイは以下の通り行った。損傷を含むオリゴヌクレオチドを $5'$ - $^{32}\text{P}$  標識後、相補鎖とアニールシ二重鎖基質とした。基質 (5-10nM) を酵素 (1-10ng) と $37^\circ\text{C}$  でインキュベートした。反応生成物は16%変性ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) で分離し、バンドの放射活性はBAS2000により解析した。NaBH<sub>4</sub>トラッピングアッセイでは、標識基質とNaBH<sub>4</sub> (50mM) を混合し、これに酵素を加え $37^\circ\text{C}$  で1時間インキュベートした。反応生成物は、10% SDS-PAGE で分離し、バンドの定量は活性アッセイと同様に行った。

### 3. 結果および考察

#### 3.1 NTH1の損傷特異性

NTH1が認識するDNA損傷を明らかにするために、UR, TG, DHT, HOUを同一配列中に含むオリゴヌクレオチド二重鎖を基質とし基質特異性を検討した。UR, TG, DHTの対合塩基にはA, HOUの対合塩基にはGを用いた。基質をNTH1とインキュベート後、生成物をPAGEで分析した。4種の損傷はすべてNTH1に認識され、損傷部位で特異的に切断された生成物バンドが認められた。また、切断生成物のゲルの移動度から、 $3'$ 末端はhydroxypentenal- $5'$ -phosphateであり、NTH1のAPリアーゼ活性により生じた $\beta$ 脱離生成物であることが示された。次に、これらの損傷に対する活性を定量的に比較するために、切断バンドの放射活性を測定し切断生成物の量を定量した。URに対する活性は他の損傷に比べ2倍程度高いものの、すべての損傷はNTH1のよい基質となることがわかった (図2A)。

原核生物 (大腸菌) には、NTH1のホモログEndo IIIが存在する<sup>6, 7, 11</sup>。両酵素の基質特異性の差異を明らかにするために、Endo IIIのUR, TG, DHT, HOUに対する活性をNTH1と同様な方法で定量した。Endo IIIは、UR, TG, HOUを同程度の効率で認識したが、DHTに対しては著しく低い活性しか示さなかった (図2B)。以上のNTH1およびEndo IIIの結果から、両酵素ではDHTに対する活性が大きく異なることが示された。この理由を明らかにするために、TGおよびDHTに対するNTH1とEndo IIIの酵素パラメータ ( $K_m$ ,  $k_{cat}$ ) を決定した。NTH1の $K_m$ はTGとDHTで同じ値であったのに対し (3nM), Endo IIIのそれはTG ( $K_m=19\text{nM}$ ) とDHT ( $K_m=510\text{nM}$ ) で27倍の差が認められた。この結果は、Endo IIIのDHTに対する親和性が極めて低いことを示している。また、NTH1の $k_{cat}$ はTGとDHTで同程度 ( $k_{cat}=0.02-0.03\text{min}^{-1}$ ) であったのに対し、Endo IIIの値は、TG ( $k_{cat}=0.78\text{min}^{-1}$ ) とDHT ( $k_{cat}=0.07\text{min}^{-1}$ ) で11倍の差があった。これらのパラメータから、DHTに対するEndo IIIの極めて低い活性は、基質親和性の低下および触媒速度の減少の両因子に由来していることが明らかとなった。

上記の活性アッセイの結果から、NTH1はピリミジン

環開裂生成物 (UR), C5-C6飽和生成物 (TG, DHT), C5水酸化物 (HOU) をDNAから同程度の効率で除去することが示された。さらに、NTH1の酵素触媒メカニズムを明らかにするため、反応中間体の解析を行った。この目的で、NTH1と基質をNaBH<sub>4</sub>存在下でインキュベートし、反応生成物をSDS-PAGEで分析した。その結果、遊離の基質のほかにNTH1-基質複合体が確認された。後者は、N-グリコシラーゼ活性により生じた糖のアルデヒド基 (C1'位) とNTH1の活性中心にあるLysの間に形成されたSchiff塩基 (反応中間体) がNaBH<sub>4</sub>により還元され生じたものと考えられる (図3)。また、UR, TG, DHT, HOUでトラップされた反応中間体の量は同じであった。この結果は、活性アッセイの結果とも一致した。

#### 3.2 OGG1の損傷特異性

OGG1はプリン酸化損傷OGおよびFAPYをDNAから除去する活性を持つことが知られている<sup>7, 8</sup>。OGについては、ホスホロアミダイト法を用いたオリゴヌクレオチド合成法が確立されているため、多くの研究が行われている。しかし、FAPYを特異的に含むオリゴヌクレオチド基質の

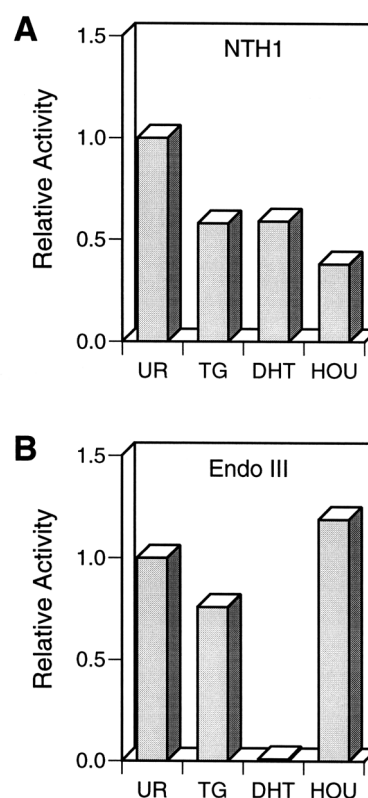


図2 NTH1およびEndo IIIのピリミジン酸化損傷に対する活性  
urea (UR), thymine glycol (TG), 5,6-dihydrothymine (DHT),  
5-hydroxyuracil (HOU) を含む基質と酵素をインキュベート  
し、生じた鎖切断生成物をPAGE分析により定した。各基質  
に対する活性はURに対する相対値として示す。A: NTH1, B:  
Endo III

合成法はこれまでに確立されていなかったため、OGG1の両基質に対する活性の定量的な比較は行われていなかった。本研究では、まずFAPY導入法を検討した。7-メチルグアニン(7mG)は、アルカリ処理によりイミダゾール環が開環しメチルFAPYに変化する。そこで、FAPYの前駆体として、7-メチルデオキシグアノシン三リン酸をDNAポリメラーゼ反応により目的の配列中に導入した。これを室温下、pH11.4で処理し、7mGをFAPYに変換した。ピペリジン処理および種々の酵素処理により7mGからFAPYへの変換効率を調べた結果、導入した7mGは定量的にFAPYに変換されていることが示された。7mGはデプリネーションを起こしやすい塩基であるが、実験に用いた条件ではデプリネーションは起こらなかった。

上記の方法により同一配列中にOGおよびFAPYを含むオリゴヌクレオチド基質の調製が可能になったことから、これを用いてOGG1の両損傷に対する活性を比較検討した。

OGおよびFAPYの対合塩基にはCを用いた。基質とOGG1をインキュベートし、生成物をPAGEで分析した結果、損傷部位で特異的に切断されたバンドが認められた(図4)。両損傷とも生成物は $\beta$ 脱離により生じた切断生成物であった。大腸菌のOGG1機能ホモログFpgについても同様な実験を行ったところ、生成物としては $\delta$ 脱離生成物が生じた(図4)。したがって、真核生物由来OGG1および原核生物由来Fpgは、OGおよびFAPYを認識しN-グリコシラーゼとして作用するが、引き続きAPリアーゼの作用モードは異なると考えられる。次に、種々の基質濃度条件下で生じた生成物を定量し、OGG1の酵素パラメータを決定した。OGおよびFAPYに対する $K_m$ は、それぞれ23nMおよび15nM、また $k_{cat}$ は、それぞれ $0.034\text{min}^{-1}$ および $0.025\text{min}^{-1}$ となり、両損傷で大きな違いは認められなかった。その結果、反応効率( $k_{cat}/K_m$ )もほぼ等しい値となった(OG:FAPY=0.9:1)。以上の結果から、OGG1が主要プリン酸化損傷OGおよびFAPYを同じ効率でDNAから除去することが明らかとなった。

### 3.3 NTH1とOGG1の認識基質オーバーラップ

NTH1とOGG1の基質オーバーラップを調べるために、両酵素のUR, TG, DHT, HOU, OG, FAPYに対する活性を調べた。既に述べたNTH1(3.1)およ

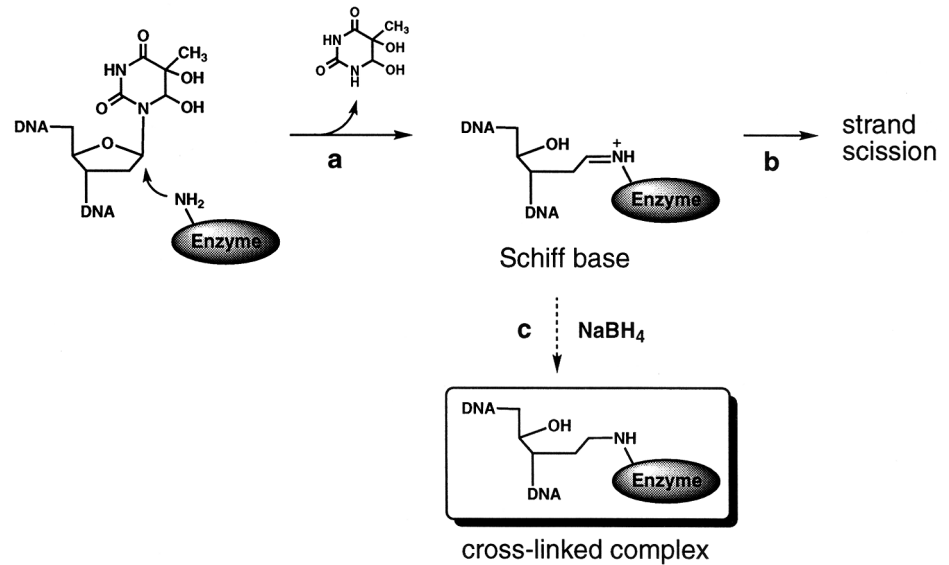


図3 NaBH<sub>4</sub>によるNTH1反応中間体のトラップ反応

NTH1の活性部にあるLysのデオキシリボースC1'への攻撃によりN-グリコシド結合が切断され(a)、NTH1と基質の間に反応中間体(Schiff base)が形成される。これから $\beta$ 脱離反応が起こりDNA鎖が切断される(b)。NaBH<sub>4</sub>存在下では、Schiff baseのimineが還元され、安定な酵素-基質クロスリンク複合体が形成される(c)。

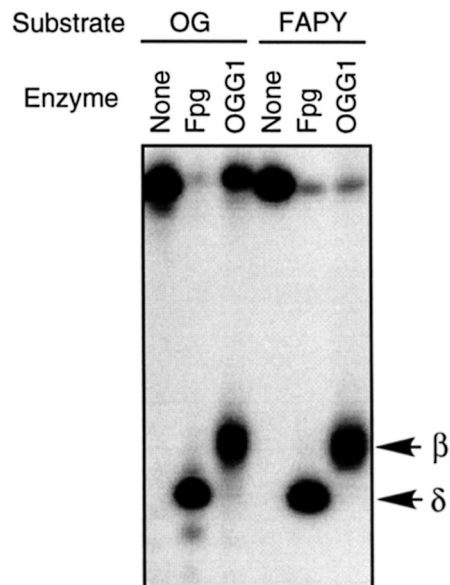


図4 OGG1およびFpgのプリン酸化損傷に対する活性分析  
7,8-dihydro-8-oxoguanine(OG)およびformamidopyrimidine(FAPY)を含む基質を、OGG1あるいはFpgとインキュベートし、生成物を16%変性PAGEで分析した。図中の矢印は、 $\beta$ 脱離生成物と $\delta$ 脱離生成物を示す。

びOGG1(3.2)の実験では、損傷の対合塩基をA(UR, TG, DHT), G(HOU), C(OG, FAPY)としたが、本実験では4種の対合塩基(A, G, C, T)をすべて用いて活性を検討した。活性は、基質と酵素のインキュベーションにより生成した切断バンドから定量した。NTH1は、UR:N, TG:N, DHT:N, HOU:N(N=A, G, C, T)だけでなく、これまでOGG1のみに認識されると考えられてい

たFAPY:N (N=A, G, C, T) に対しても活性を示した(図5). さらにFAPYに対する活性は, NTH1の本来の基質の1つであるTGに対する活性と同程度であった. しかし, NTH1はOG:Nに対してはまったく活性を示さ

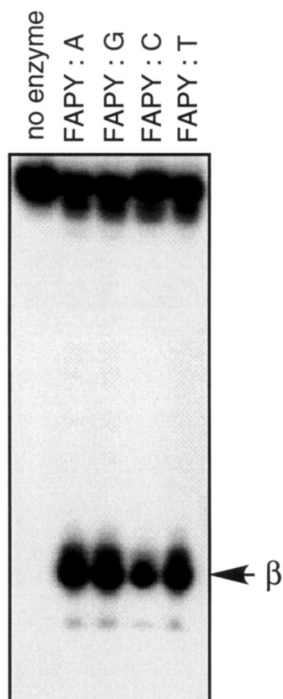


図5 FAPYに対するNTH1の活性分析

4種の塩基と対合したFAPY (FAPY:N, N=A,G,C,T)を含む基質をNTH1とインキュベートし, 生成物を16%変性PAGEで分析した. 図中の矢印は, β脱離生成物を示す.

なかった. 一方, OGG1は, NTH1と異なり, 同じ損傷でも対合塩基により活性が変化した. プリン損傷に対する活性の対合塩基依存性は, OGではOG:C >> OG:T > OG:G > OG:A, またFAPYではFAPY:C > FAPY:T ~ FAPY:G ~ FAPY:Aとなった. ピリミジン損傷では, UR:C, DHT:C, HOU:Cに対し活性を示したが, 他の塩基(T, G, A)と対合した場合は活性は認められなかった. したがって, OGG1はこれまで報告されているプリン損傷ばかりではなく, ピリミジン損傷に対しても潜在的な修復活性を持つが, この活性は特徴的な対合塩基依存性を示すことが明らかとなった.

### 3.4 FU修復活性

FUを認識する哺乳類修復酵素を, 精製酵素および細胞粗抽出物を用いて検討した. 精製酵素を用いた検索では, 酸化損傷修復酵素(NTH1, OGG1)のほかに, 大腸菌のFU修復酵素であるAlkAの哺乳類機能ホモログ(MPG)を用いた<sup>12, 13</sup>. しかし, NTH1, OGG1, MPGいずれもFUに対しては活性を示さなかった. したがって, 哺乳類のFU修復酵素はこれまでに同定されていない新規なものであると考え, 細胞粗抽出液中のFU修復活性を調べた. マウスの脳, 心臓, 肺, 胸腺, 肝臓を摘出し, それぞれの細胞粗抽出物を調製した. これを基質とインキュベート後, 除タンパクし, 反応生成物をPAGEで分析した. その結果, 比活性に差はあるものの, 用いたすべての臓器でFU部位で切断された生成物が認められた(図6). この生成物は,

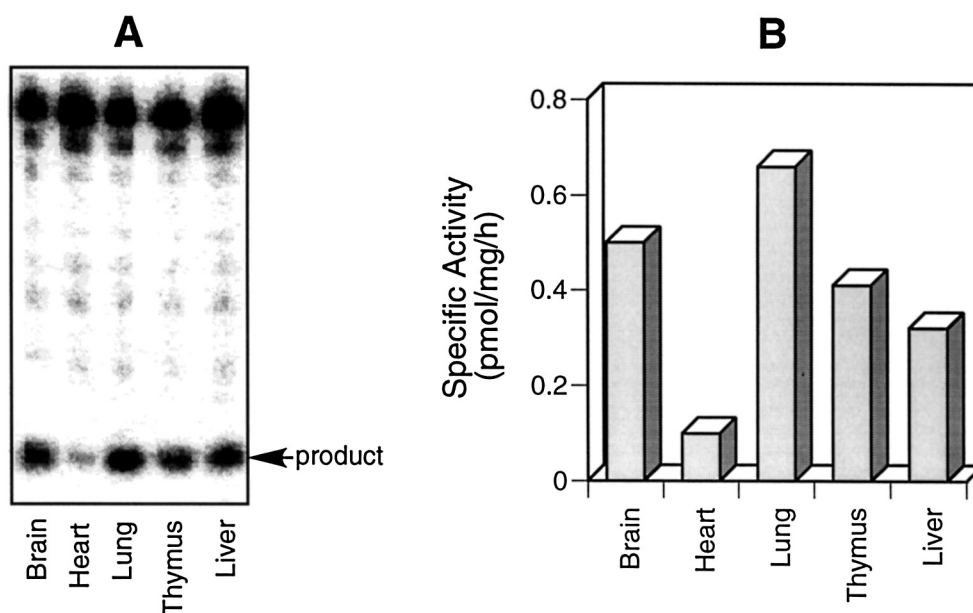


図6 マウス臓器のFU修復活性

A: マウスから脳, 心臓, 肺, 胸腺, 肝臓を摘出し, 細胞粗抽出物を調製した. これを5-formyluracil (FU)を含む基質とインキュベートし, 生成物を16%変性PAGEで分析した. 図中の矢印は, FU特異的な切断生成物を示す. B: FU特異的な切断生成物を定し, 各臓器の比活性を示した.

FUの代わりに未損傷のチミンを含む基質では認められなかったことから、損傷特異的な活性であることが示された。活性を精製する目的で、細胞粗抽出物を大量に調製し、これを陽イオンクロマトグラフィーにより分離した。溶出された分画のFU, TG, OG活性を分析した結果、FU活性はTGおよびOG活性が溶出される分画とは明らかに異なった分画に溶出された。この結果は、精製NTH1およびOGG1がFUに対して活性を示さなかった結果とよく一致する。今後、この活性をSDS-PAGEで単一バンドになるまで精製し、得られた酵素の性状を詳細に解析していく予定である。

#### 4 総括

UVBおよびUVAは、それぞれ固有の遺伝子損傷を誘発し、前者ではピリミジン二量体(CPD, 6-4PP)が重要であるのに対し、後者では細胞内に存在する種々の色素が関与した酸化損傷が重要である。本研究では、UVAにより生じる酸化的塩基損傷の修復に関わる哺乳類修復酵素NTH1およびOGG1の損傷特異性を検討した。NTH1およびOGG1は、それぞれピリミジン損傷およびプリン損傷特異的修復酵素と考えられていた。実際、TGおよびOGは、それぞれNTH1およびOGG1のみに認識され、両酵素の固有な基質であった。しかし、他の損傷(UR, DHT, HOU, FAPY)は、対合塩基に依存した形で両酵素の基質となった。活性の対合塩基依存性に関する生物学的意味づけは今後の課題であるが、この結果は、酸化的塩基損傷修復におけるNTH1とOGG1の修復バックアップシステム形成を支持するものと考えられる。今後見つてくると予想される他の哺乳類酵素についても同様な検討を行い、細胞内における塩基除去修復バックアップシステムの全貌を明らかにしていく必要がある。また、これまでに真核生物では明らかにされていなかったFU修復活性がマウスの臓器に存在し、精製酵素を用いた検討およびクロマトグラフィーの溶出挙動から、この活性はNTH1, OGG1, MPGのいずれでもないことが示された。今後、この新規酵素をさらに精製し、UVAならびに種々の環境因子に対する遺伝子防御における役割を明らかにしていく必要がある。

本研究を遂行するあたりご援助を賜りましたコスメトロジー研究振興財団に厚く御礼申し上げます。

#### (引用文献)

- 1) Friedberg EC, Walker GC, Siede W, : DNA repair and mutagenesis, ASM Press, New York, 1995.
- 2) Lester P, Helmut S, : Singlet oxygen, UVA, and ozone, Methods in Enzymology, 319, Academic Press, New York, 2000.
- 3) Pouget JP, Douki T, Richard MJ, et al., : DNA damage induced in cells by gamma and UVA radiation as measured by HPLC/GC-MS and HPLC-EC and comet assay. Chem. Res. Toxicol., 13, 541-549, 2000.
- 4) Decarroz C, Wagner JR, Van Lier JE, et al., : Sensitized photo-oxidation of thymidine by 2-methyl-1,4-naphthoquinone. Characterization of stable photoproduct, Int. J. Radiat. Biol., 50, 491-505, 1986.
- 5) Saito I, Takayama M, Kawanishi S, : Photoactivatable DNA-cleaving amino acids: highly sequence-selective DNA photocleavage by novel L-lysine derivatives, J. Am. Chem. Soc., 117, 5590-5591, 1995.
- 6) Memisoglu A, Samson L, : Base excision repair in yeast and mammals, Mutat. Res., 451, 39-51, 2000.
- 7) Krokan HE, Nilsen, H, Skorpen F, : Base excision repair of DNA in mammalian cells, FEBS Lett., 476, 73-77, 2000.
- 8) Klungland A, Rosewell I, Hollenbach S, et al., : Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 96, 13300-13305, 1999.
- 9) Minowa O, Arai T, Hirano M, et al., : Mmh/Ogg1 gene inactivation results in accumulation of 8-hydroxyguanine in mice, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97, 4156-4161, 2000.
- 10) Cunningham RP, Weiss B, : Endonuclease III (nth) mutants of Escherichia coli, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, 474-478, 1985.
- 11) Sarker AH, Ikeda S, Nakano H, et al., : Cloning and characterization of a mouse homologue (mNth1) of Escherichia coli endonuclease III, J. Mol. Biol., 282, 761-774, 1998.
- 12) Masaoka A, Terato H, Kobayashi M, et al., : Enzymatic repair of 5-formyluracil. I. Excision of 5-formyluracil site-specifically incorporated into oligonucleotide substrates by AlkA protein (Escherichia coli 3-methyladenine DNA glycosylase II), J. Biol. Chem., 274, 25136-25143, 1999.
- 13) Terato H, Masaoka A, Kobayashi M., et al., : Enzymatic repair of 5-formyluracil. II. Mismatch formation between 5-formyluracil and guanine during DNA replication and its recognition by two proteins involved in base excision repair (AlkA) and mismatch repair (MutS), J. Biol. Chem., 274, 25144-25150, 1999.

# 太陽紫外線による細胞のアポトーシスとサンスクリーンの効果

放射線医学総合研究所

古澤佳也、青木瑞穂

An outbreak of skin cancer may be caused by exposure of ultraviolet light in the sunlight through induction of apoptosis on skin cells. Shielding the skin from the sunlight, especially from the UV-B light by use of sunscreen is thought to be important to escape the harmfulness. However, action spectrum for the induction of apoptosis by the ultraviolet light is not well known. To determine the action spectrum of apoptosis upon mammalian cells, L5178Y cells were used, and the wavelength dependence of the apoptosis exposed to ultraviolet light was investigated using monochromatic lights from the Okazaki Large Spectrograph (OLS) at the National Institute of Basic Biology (INBB), Okazaki, quasi monochromatic light from filtered lights by mercury lamps or fluorescent lamps, and from natural sunlight. Cells were exposed to ultraviolet light at different wavelengths in the UV-A, -B, and -C regions, and the frequencies of apoptotic cells in total cells were determined with chromatin condensation after fluorescent staining following adequate post-incubation after UV exposure. The light-exposure level used to induce apoptosis in 10% of the cells were 24 J/m<sup>2</sup>, 182 J/m<sup>2</sup>, and 141 kJ/m<sup>2</sup> at 280, 300, and 320 nm, respectively. The measured action spectrum for apoptosis induction showed a slightly steeper curve to that for the minimum erythema dose (MED). The peak of the effective action spectrum for induction of apoptosis to sunlight i.e. the products of spectra for apoptosis induction or MED and solar-light intensity on the ground, was found at 303 nm, which was also took place in shorter wavelengths region than that for MED. The difference between the effective action spectrum may be caused by the shielding of the skin keratinocytes locating just above the target cells.

## 1. 緒言

1980年代に南極オゾンホールが発見されて全地球的規模でのオゾン層の減少が指摘され、モントリオール議定書をはじめとしてオゾン層の保護政策が始まった。太陽光に含まれる紫外線の地表での強度分布はオゾン層に敏感に反応して変化し、強い生物影響を与えるUV-B領域の紫外線はその強度が数パーセント変わることによって生物効果は何倍も異なる事が示唆されている。このためオゾン層の減少による地上での紫外線の増加が懸念され、生態系にもたらされる影響も危惧される。これらの影響を受けて90年代の初期から紫外線に対する興味が高まり、一般公衆にも日焼け防止の目的でサンスクリーン剤の使用が一気に普及した。しかし国外では発癌など重篤な疾患に敏感であるのに対し、日本での一般の関心は「美白」ブームのようにまだ「美容」に中心が置かれている。しかし紫外線の増加が確実にになると興味の関心は発癌などにも移って行くものと考えられる。

太陽紫外線による癌の発生の機構には、DNAに損傷が起こればその結果間違った遺伝情報を持つ前癌細胞が増加することが第一である。紫外線誘発アポトーシスによって前癌細胞周辺の正常細胞が消失し、その空間を埋めるために

細胞の増殖が起こる。そして前癌細胞でその部位が置換されることによって、この間違った遺伝情報を持つ細胞が増加するとの考えがあり、太陽紫外線によるアポトーシスの誘発が重要な意味を持つ。一方、紫外線による生体影響の指標には、皮膚紅斑の発生を指標にした最小紅斑線量を用いられることが多いが、アポトーシスとの関連やUV-B領域でのアポトーシス誘発の波長依存性や紫外線量依存性については判っていない。こういったことから紫外線による発癌の危険性や、これを回避するために用いられるサンスクリーン剤の効果を評価するために、アポトーシス誘発の波長依存性や紫外線量依存性を明らかにする事を目的として研究を行った。

## 2. 実験

### 2.1 光源

実験室で紫外線照射実験を行うために、本助成金によってUV-A、-B、-Cで照射するための照射装置を作成した。この装置には参照光源としてUV-C光を照射するための殺菌灯、さらにUV-B光を得るために健康線用蛍光ランプ(FL-20S・E、東芝)およびUV-A光源を内蔵させた(写真1)。UV-A領域ではアポトーシスの感受性が低いため太陽光と同等以上の強度を持つ光源が必要となる。そのため光源としてブラックライト蛍光ランプでは不十分であるので、400ワットのブラックライト水銀ランプ(H400BL、東芝)から得られる準単色光を用いて照射を行うための専用照射光学系を作成した(写真2)。微量のUV-C、-B光の混入によって生物効果は大きく影響を受けるので、ランプの外球にコートされている紫外線透過青紫フィルター



Sunscreen and Induction of Apoptosis upon Mammalian cells Induced by Natural Sunlight

Yoshiya Furusawa, Mizuho Aoki

National Institute of Radiological Sciences

\*

の他に UV-A 光のみを透過させる紫外線透過フィルター (U-340、保谷) および短波長カットフィルター (UV-34、保谷) を用い不要輻射を出来る限り減少させた。さらに試料位置での光強度を増加させるため 2 枚の石英レンズ (シグマ光機) を用いて集光を行っている。この光源には可視光はほとんど含まれないものの赤外線領域の熱輻射は強いので熱吸収ガラスフィルターを、さらに試料の直前には水フィルターを設置して試料の温度上昇を防ぐ工夫を行った。この装置を用いることで 365nm の水銀輝線光を 200 W/m<sup>2</sup> 弱の強度で得ることが出来た。これは太陽光に含まれる UV-A 光の 2 倍以上の強度に相当する。UV-B 光源は健康線用ランプを用いた。しかしその輻射波長が UV-C にも及ぶため、約 305nm にカットオフを持ち単波長紫外線を透過しないプラスチックフィルム (100 μm; ダイアfoil、三菱) を管球に巻いて短波長光を除く事が出来た。ただし、アポトーシス誘発の効率が UV-A と -C の中間に位置する UV-B 光領域 (280 ~ 320nm) に対しては、その生物効果の波長依存性が急峻<sup>1~4)</sup> であるので、こうい



写真1 試作した UV-A、-B、-C 照射装置

上部の突出部分に 400W のブラックライト水銀灯が装置され、庫内上段に懸垂した光学系で集光され、中段のラボジャッキ上の試料に照射される。中段は殺菌灯を設置したところで、下段のラボジャッキ上の試料を照射する。中段と下段の棚板を入れ替えることで、UV-B 照射用ブラックライト蛍光灯ランプが中段に配置できる。最下段には各ランプのスイッチとランプの安定器が内蔵されている。

った準連続光源を用いた場合は短波長成分の光が生物効果の大部分に寄与すると考えられ、分光学的実験とはならないため定性的な参考データを得る場合のみに用いた。UV-B 領域光による波長依存性を明らかにする目的の実験は基礎生物学研究所大型スペクトログラフ装置 (OLS) を利用し純度の高い単色光を得て実験を行った。

## 2.2 照射法と線量測定

OLS では 30kW の水銀ショートアークランプから取り出された光をダブルブレードグレーティング分光器で分光し、焦点面に届いた水平光を反射面を 45° に傾けた反射鏡で反射させ、6 mm φ のカップに入れたサンプル上方より落射光として照射した (写真3)。このとき分光器の入射スリットは開口幅を 50mm にセットして用いた。325nm より長波長の UV-A 領域の照射では、光強度が十分ではないので 50 × 50mm (at 325nm) あるいは 100mm φ (>345nm) の石英レンズを用いて集光した。線 測定は 6 × 6 mm のシリコンフォトダイオード (S1332-66BQ ;

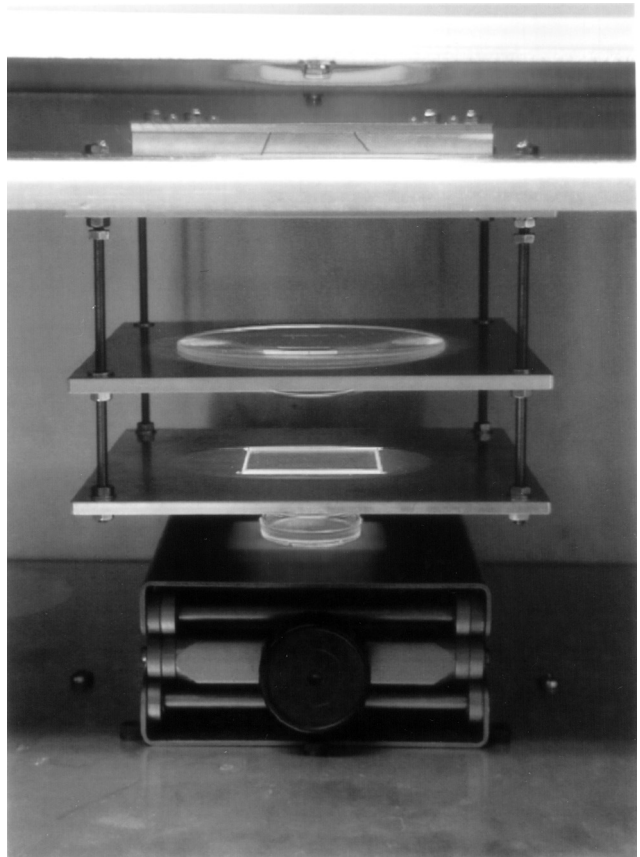


写真2 試作した照射装置の UV-A 用集光光学系

最上段に配置した赤外線フィルターを透過した光は、石英レンズ (写真ではレンズは見えない) で平行光となり、もう一枚の石英レンズで集光される。長時間の照射となる場合はこのレンズ間の空隙に水フィルターを挿入してさらに赤外線を吸収させることが出来る。この UV-A 光はさらに短波長吸収フィルター (四角) を通過した後、サンプルに照射される。強度は約 200 W/m<sup>2</sup> 程度。

浜松フォトニクス) を用い、波長毎の量子収率あるいは感度定数は個々のダイオードの浜松フォトニクスによる校正データを基にして、100 Ω の抵抗負荷に対する誘発電圧を測定 (Model DMM 2000; Keithray) して行った。

UV-A 実験では上記光源の集光部分に 35mm φ プラスチックシャーレを用いた。UV-B、-C についても同様の方法で照射を行った。線量率は光源からの距離を変化させ、線量測定はそれぞれの波長域で校正されている紫外線計 (UVR- 2 + UD-36/UD-25; トプコン) を用いた。

太陽光に対する照射実験では照射中に試料の温度が上昇

するため、本助成金で製作した冷却機能付きの専用照射容器を用いた。この容器は試料の温度上昇を防ぐために底面から冷却出来て照射時間毎に光を遮断できる蓋を持つ容器で、4 × 2 列、計 8 個のサンプルが、2 個ずつ順次あるいは同時に照射出来る (写真 4)。サンスクリーン剤の効果を調べるためには、蓋とするサンプル毎の石英板に薬剤を塗布して照射する。細胞を入れた 35 mm φ のプラスチックディッシュは容器内の個々のホルダーに入れ、サンプル毎に石英板を蓋として被せて雑菌からの細胞の汚染を防いで照射を行う。

太陽光の紫外線量測定のためには、全日射量、UV-A 紫外線計、UV-B 紫外線計及び生物効果荷重型 UV-B 紫外放射計 (MS-802、MS-210A、MS-212W、MS-212D; 英弘精機) を施設の 5 F 屋上に設置 (写真 5) し、毎 10 秒毎の太陽光強度データがコンピューターで集計されるシステムとして昼夜連続測定を行っている。この仕様は国立環境研究所地球環境センターの有害紫外線モニタリングネットワークの観測基本的要件に準拠しており、生物荷重型 UV-B 線量計は筆者らの光学系<sup>1)</sup> によるものである。

### 2.3 細胞実験

細胞はリンパ球系培養細胞 (L5178Y) を用い、10% 牛胎児血清を含む RPMI-1640 培地中に浮遊させ、5% 炭酸ガスを含む 37°C の湿潤空气中で培養を行った。照射に用いる細胞は遠心分離 (1000rpm, 3min) によって培地を除き、 $3 - 6 \times 10^6$  cells/mL となるよう燐酸緩衝生理食塩水中に再分散したものを照射試料とした。OLS での実験では、直径 6mm φ のイミュノアッセイ用小型プラスチックカップ (2580; COSTAR) に 0.1mL の細胞浮遊溶液を移

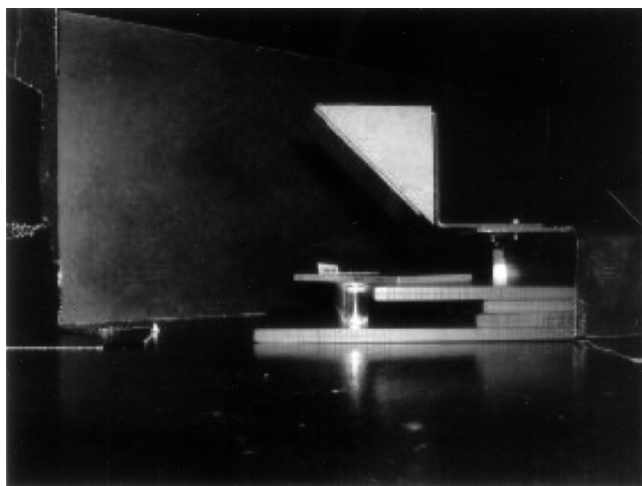


写真3 大型スペクトログラフ照射時の照射部分

水平ビームとして取り出された単色紫外光は、45° にセットした反射鏡で垂直光に変換され、細菌などの汚染防止を兼ねた短波長吸収フィルターで十分に短波長迷光を取り除いた上で細胞に照射される。サンプル容器は 6mm φ のプラスチックカップ。

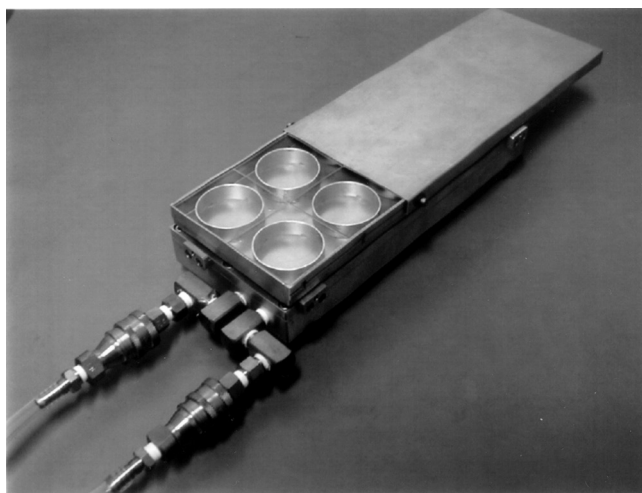


写真4 太陽光照射のための冷却容器

合計 8 つのサンプルホルダー (4 つだけ見えている) 中に 35mm φ プラスチックシャーレに入れた細胞に石英ガラス (あるいはサンスクリーン剤塗布したもの) を被せ、水平面で太陽光に暴露させる。下部は冷却のための循環水出入口。時間に従って、上部の蓋をスライドさせて開閉することで、4 種類の照射量が選べる。



写真5 研究所屋上に設置した紫外線計測装置

手前から、全日射量計、UV-A 紫外線計、UV-B 紫外線計及び生物効果荷重型 UV-B 紫外放射計 (MS-802、MS-210A、MS-212W、MS-212D; 英弘精機)。10 秒毎のデータがコンピューターシステムで集計される。

してこれを照射試料とした。このカップの上に短波長の迷光を阻止すると共に雑菌からの細胞の汚染を防ぐ目的で清浄な短波長カットフィルター（UV-28、UV-30、UV-32、UV-34；保谷、UV-29、UV-31、UV-33；東芝）を被せて室温で照射を行った。研究室での照射はOLSでの実験と同様あるいは35mmプラスチックディッシュ中に1.5mLの細胞浮遊溶液を入れて行った。太陽光の照射も35mmφのプラスチックディッシュを用いて照射を行った。

照射した細胞は2mLのRPMI-1640培地に回収し、5～20時間培養を行った後、遠心分離（1000rpm、3min）によって回収し、0.1mLの1%グルタルアルデヒド溶液を加えて冷蔵庫中に放置（4℃、24hr）して固定し、ヘキスト33342によって蛍光染色を行ったのち蛍光顕微鏡下で細胞を計数し、観察した全細胞のうちクロマチン凝縮を起こした細胞数を求めてアポトーシスの誘発頻度を求めた。

### 3. 結果

#### 3.1 アポトーシスの検出

ブラックライト水銀灯から得られるUV-A領域の紫外線をL5178Y細胞に照射した後5時間培養し、DNAを抽出後アガロースゲル電気泳動により断片化（DNAラダー）を検出したものである（写真6）。照射線を325または650kJ/m<sup>2</sup>（中、右レーン）とした時、アポトーシスに特異的なラダーの形成が見られた。ここで左レーンは陽性対照でUV-C光（殺菌灯）を照射したものである。また紫外線照射後フローサイトメトリー法で細胞のDNA含量の変化を調べた（図1）。非照射群ではG<sub>1</sub>期、S期、G<sub>2</sub>/M期に相当する細胞DNA含量に対応したパターンが観察された（左）が、650kJ/m<sup>2</sup>照射群では照射5時間後にはsub-G<sub>1</sub>に大きなピークが検出された（右）。これは紫外線照射により正常の細胞周期からはずれた細胞がアポトーシスの過程に移行し、小さなDNA分画を持つアポトーシス小体が形成されたものと考えられる。

これらの結から365nm付近の紫外線（UV-A）の照射でアポトーシスが誘発されることが明らかになった。またpositive controlでみられるようにUV-C光でも同様に結が観察され、波長の異なる紫外線でアポトーシスが誘発されていることが実験室において確認できた。UV-Bに関しては、微量なUV-C光の混入によってもUV-B光によるアポトーシスより、その発生頻度が優である可能性があるため、クロマチン凝縮を指標にしてOLSにおいて実験を行った。

UV-A及び-B光によるクロマチ

ン凝縮の形態を写真7に示す。（上）は非照射のL5178Y細胞をHoechst33342で染色後、蛍光顕微鏡観察したものである。核内には網目状のクロマチン構造らしきものが確認された。（中）は280nmの紫外線を50J/m<sup>2</sup>照射後20時間培養した細胞像である。アポトーシスに特徴的な核の断片化を起こし、凝縮部分で強い蛍光を示す細胞が観察された。（下）は365nmの紫外線を650kJ/m<sup>2</sup>照射後5時間培養した細胞像（研究所実験室の結）である。280nmで見られたような核の断片化を起こした細胞も観察されたが

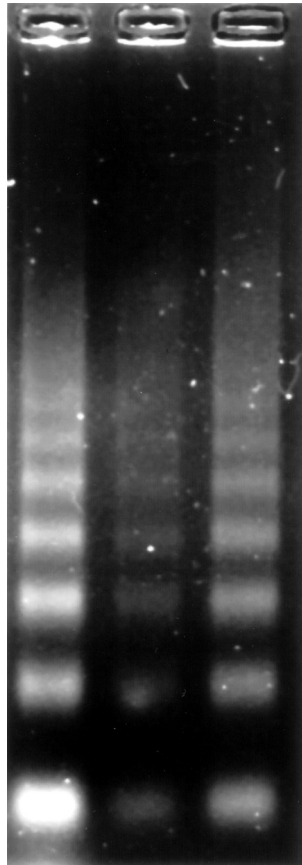


写真6 アポトーシスによるDNA断片化の電気泳動結果

UV-A紫外線をL5178Y細胞に照射した後のDNAの断片化像。左から陽性対照（UV-C照射による20時間後の試料）、UV-Aで照射線量を325または650kJ/m<sup>2</sup>とし、5時間培養後にDNAを抽出し電気泳動を行ったもの。

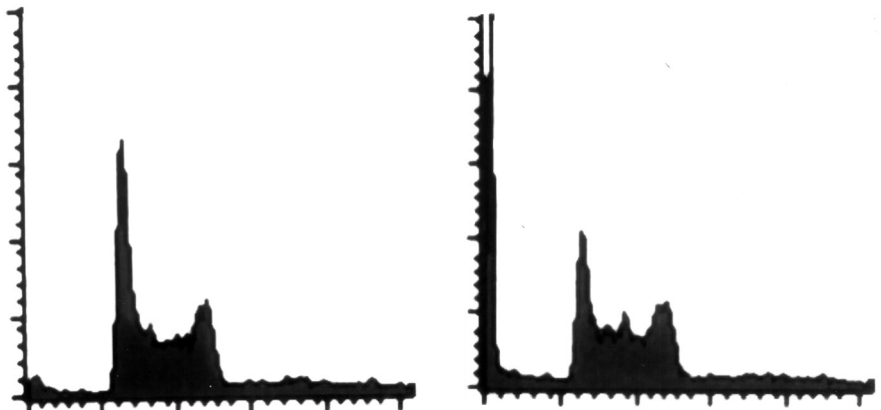


図1 フローサイトメーターによるDNA含量の変化

非照射細胞（左）ではG<sub>1</sub>期、S期、G<sub>2</sub>/M期に相当する細胞DNA含量に対応したパターンが観察され、UV-Aを650kJ/m<sup>2</sup>照射した細胞（右）では照射5時間後にはG<sub>1</sub>期細胞よりDNA含量の少ないsub-G<sub>1</sub>に大きなピークが検出された。

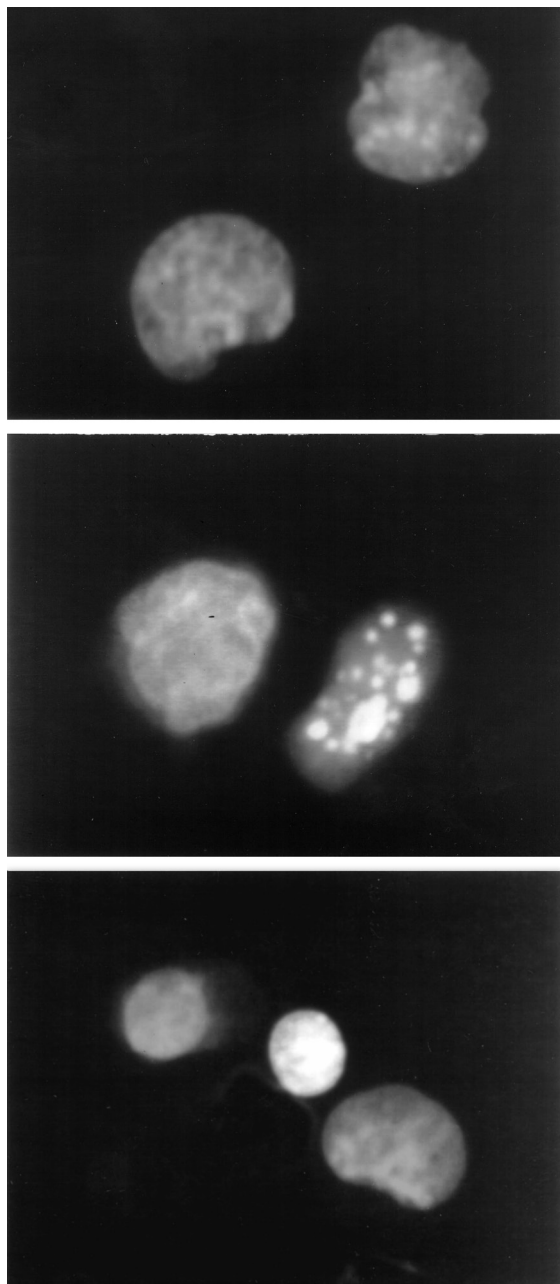


写真7 アポトーシスによるクロマチン凝縮像

細胞は Hoechst33342 で蛍光検鏡の直前に染色したものの。上は非照射の正常細胞。中は 280nm 光によるもので、20 時間後にクロマチンの断片化（右）が観られる。下は 365nm 光によるもので、5 時間後に細胞核が小さくなって観察（左と中央）され、20 時間後には細胞が消失する。

その数は少なく、むしろ細胞全体が収縮して小さくて均一な強い蛍光を示す単核の細胞像が多数見られた。一方、この細胞を太陽光に約 1 時間照射後 5 時間培養した細胞では 280nm で見られたような核の断片化を起こした細胞（写真 8）が多数観察された。さらにこの変化は 280nm では断片化が観察されるのに 20 時間を要したのに対し、365nm でみられたように 5 時間程度の培養後に同様の変化がみられた。

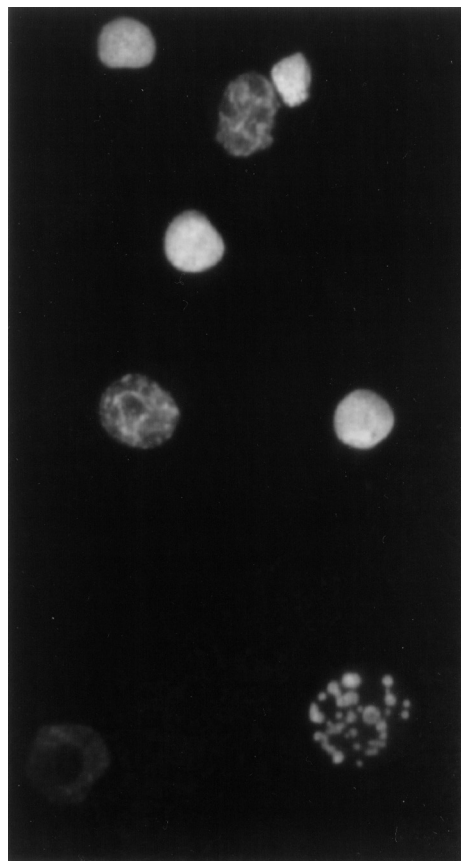


写真8 太陽光によるアポトーシスのクロマチン凝縮

太陽光に約 1 時間被爆後、5 時間培養の細胞像。正常な細胞（上中央と中左）と共に核全体が凝縮して全体に強い蛍光を示す細胞（上方に 4 つ）とクロマチンが断片化した細胞（下右）などが同時に観察される。

### 3.2 波長依存性

図 2 は L5178Y 細胞に各波長の紫外線を照射した際に誘発されるアポトーシスの線量依存性を求めたものである。どの波長でも線量の増加に伴ってアポトーシスの頻度は増加した。この図では線量を示す軸が対数軸で表してあるように、波長によってその効率は大きく異なり、280 と 365nm では 4 桁もその効率が異なっていた。図 3 は本実験による細胞の紫外線照射誘発アポトーシスの感受性と DNA の紫外線吸収<sup>5)</sup> 及び地表での太陽光強度<sup>6)</sup> を波長ごとにプロットしたものである。ここでの感受性とは 10% の細胞にアポトーシスを誘発する線量の逆数 ( $m^2/J$ ) である。太陽光の強度が大きく変化する UV-B 領域 (280 ~ 320nm) で感受性は長波長になるほど低下し、280 ~ 320 (~ 365) nm では 4 桁も低下した。これは DNA の紫外線吸収スペクトルとよく一致している。320nm 以上になると感受性は波長に依存せずほぼ一定の値を示した。またこの領域では DNA の吸収スペクトルとアポトーシスの感受性は一致しなくなった。

アポトーシスの実効スペクトルは入射光量と感受性の積

として表されるので、標準的な地表での太陽光強度スペクトル<sup>6)</sup>と、実験で求めた感受性スペクトルからこれを求めた(図4)。参考に皮膚紅斑に対する実効スペクトルはCIE(国際照明委員会)の紅斑スペクトル<sup>6,7)</sup>を用いて求めたものである。皮膚の最小紅斑の実効スペクトルが310nm 辺りにピークを持つのにに対し、アポトーシスのピークは303nm にみられ、皮膚の紅斑スペクトルよりも短波長側にシフトしていた。以上の結果を表1にまとめた。

#### 4. 考察

クロマチン凝縮(写真7)、DNA ラダーの形成(写真6)、フローサイトメトリー(図1)による sub-G<sub>1</sub> ピークの形成などのアポトーシスに特徴的な変化が観察され、UV-A ~ UV-C 領域の紫外線によって L5178Y 細胞にアポトーシスが誘発されることが確認できた。しかし波長ごとにその変化は異なり、短波長型と長波長型に分けることが出来る(表1)。短波長の260 ~ 305nm 単色光または UV-C 及び UV-B ではアポトーシスが誘発されるのに照射後20時間以上を要するのに対して、313nm 以上の UV-B 領域から UV-A 領域の単色光、あるいは UV-A の準単色光では5時間以内にアポトーシスが誘発された。またクロマチン凝縮の形態も短波長と長波長領域では異なり、短波長領域では断片化した小さな核が細胞内に多数観察された。これは X 線(電離放射線)照射によって誘発されるアポトーシスの場合と同じであった。長波長領域での像は細胞全体が収縮するタイプのものが大部分を占め、小さな断片化した核を持った細胞像は少なかった。

このちがいは短波長と長波長でアポトーシスを誘発する標的が異なる為であると考えられる。アポトーシス誘発と DNA の紫外線吸収(図3)は260 ~ 320nm の範囲で

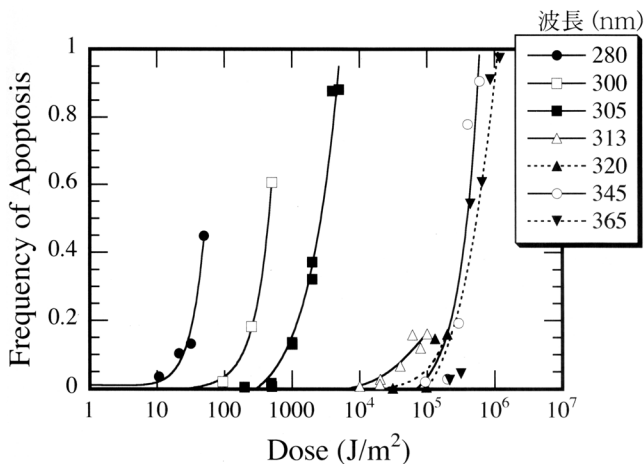


図2 アポトーシスの線量—効果関係

図中に示す波長で照射した場合のアポトーシスの誘発頻度。観察全細胞のうちクロマチン凝縮を起こした細胞の割合を表す。305nm 以下は20時間の培養後、315nm 以上は5時間培養後の結果。横軸は対数であることに注意。

は一致していて、この領域で誘発されるアポトーシスの標的は DNA であると考えられる。この事は電離放射線によるアポトーシス誘発の LET 依存性<sup>8)</sup>と同様であり、UV-B、-C 領域でも DNA 上の損傷が原因となってアポトーシスが誘導されていると考えられる。しかし320nm 以上で両者は異なり、この領域での標的は DNA ではなく、タンパクではないかと考えられる。

このように波長によってアポトーシスの誘発が異なることはすでに報告<sup>9)</sup>されているが、蛍光ランプなどの準単色光源を用いているため明確な波長依存性は示されていない。ここでは波長域によって異なるアポトーシスのタイプ

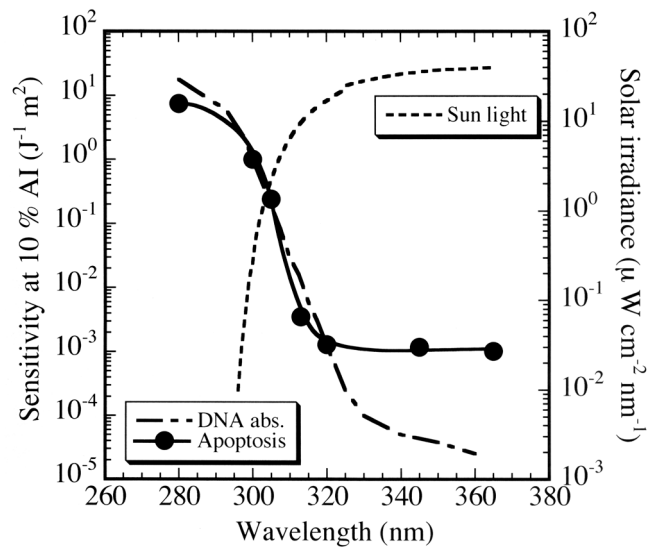


図3 アポトーシス誘発の感受性の波長依存性

感受性は10%の細胞にアポトーシスを誘発する線量の逆数(m²/J)。波長によってその効率は大きく異なり、280と365nm では4桁もその効率が異なる。参考に DNA 吸収スペクトル(Setlow 1974)と地表での太陽光強度(CIE 1972)をプロットした。

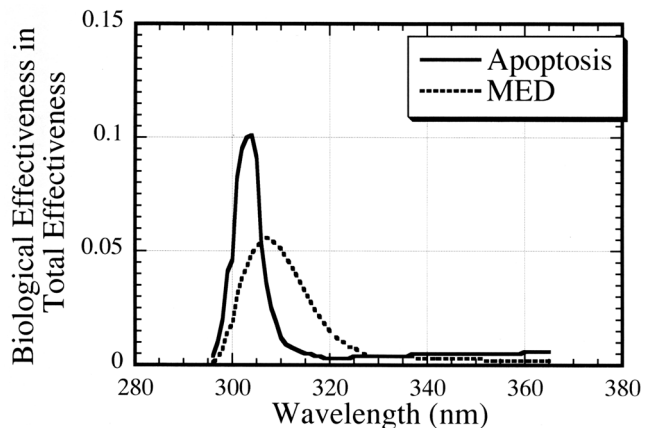


図4 アポトーシスの太陽光に対する実効スペクトル

入射光量と感受性の積として表される実効スペクトルを、アポトーシスと最小紅斑(MED)形成について求めた。ここで太陽光とMEDのスペクトルはCIE(1972)の値を用いた。

表1 紫外線誘発アポトーシスと波長依存性

紫外線	波長 (nm)	10%誘発線量 (J/m <sup>2</sup> )	誘発時間 (hr)	形態	タイプ
UV-C	254	-	> 20	核の断片化	短波長型
	280	24			
	300	180			
	305	750			
	313	52,000			
	320	140,000	< 5	細胞の凝縮	長波長型
	365	180,000			
太陽光	連続	1 hr	< 5	混在	相互作用

を3つに分けられている。X線および紫外線のどの波長(UV-A、-B、-C領域)によっても照射後4時間以降に引き起こされるアポトーシスを遅延型、UV-BおよびUV-Cによって照射後0.5~4時間以内に引き起こされる中間型、UV-Aによって0.5時間以内に引き起こされる即時型アポトーシスである。本実験で用いたUV-A領域の光は強度が弱い照射に数10分から数時間を要するためにこの即時型アポトーシスを観察することは出来なかったが、本実験の結果と類似しており、波長によりアポトーシス誘発の標的は異なることの裏付けとなっている。また単色光を用いた本研究により、長波長型と短波長型の境界が305~313nmの間にあり、連続光である太陽光では誘発時間と形態の違い(写真8)から短波長型と長波長型の間に相互作用がある可能性が示唆できた(表1)。

### 5. 総括

オゾンホールが発見などにより紫外線の生態系への影響の懸念が浸透する以前より、太陽紫外線の影響について分光学的手法を用いて研究してきた。従来の物理的帯域型線量計はその結果は即時に知れるものの、分光感度分布は生物の急峻な感受性に追従出来ず生物影響を正確に評価<sup>10)</sup>できないことと、生物線量計は分光感度分布が優れているものの取り扱い性及び即時性に欠け、さらに対象とする生物系とエンドポイントによって分光感度分布が異なるため、ヒトの紅斑及びDNAの吸収を基準とした感度分布を持つ狭帯域紫外線線量計を開発・評価<sup>1)</sup>し、この線量計の生産モデルは気象庁での紫外線測定に用いられている。さらに取り扱い性の良い紅斑誘発のスペクトルを持った生物線量計を開発<sup>3, 4)</sup>し、特にオゾン層破壊に社会的関心の高いドイツで実用化されている。これらの線量測定計を、季節・緯度の異なる地域で太陽光の地表における分光測定結果と直接比較する為に野外実験を行い、太陽紫外線の分光強度分布の変動に対して良く追従すること等を示して<sup>3, 11)</sup>来た。しかしこれらの生物線量計はDNAの損傷や紅斑の評価には適当であるかも知れないが、発癌のリスクの評価が出来るかどうかはさらに研究を要する。そこで、近年の話

題となっているアポトーシスを研究の系に加えて今回の研究に発展させ、ここで発癌と関連があるかも知れないと考えられているアポトーシス誘発のUV-B領域での波長依存性を明らかにさせた<sup>11)</sup>が、実効スペクトルは紅斑から推定される予想よりも短波長側にあり、これは皮膚の角質層による吸収などが考えられ、培養細胞系で波長依存性を求めることの限定条件となっている。

この研究にさらに引き続き、皮膚上皮系の細胞より適当なものを検索し実際の生体系に近い実験系を確立する必要があり、太陽光紫外線の変動とアポトーシスの発生効率について経時的に調査を行う予定であり、さらにサンスクリーニング剤による遮蔽の程度との関連として調べる。これには地域差や季節変動<sup>1, 13)</sup>が含まれるので、紫外線の強い時期や弱い時期あるいは時間帯を考慮して行う。さらにはヌードマウス等実験動物を用いた系の利用の可能性を考えているが、皮膚構造の違いもありヒトのリスク評価に直接的には結びつかないであろう。

研究目的の項でも述べたように、サンスクリーニング剤の効用は一般にはまだ「美容」に中心が置かれている。しかし、すでにオーストラリアの例にもあるように、将来はサンスクリーニング剤利用に関する興味の内発癌の防止に対する考慮が大きな意味を占めてくると考えられる。オーストラリアでの例では南極オゾンホール拡大の心配が大きく作用して、政府レベルで特に子供への紫外線被曝の低減が法規化されたが、近い将来において太陽紫外線の被曝による発癌の危険性が科学的にさらによく理解されるようになるであろう。アポトーシスによって前癌細胞が大量に蓄積する可能性が示唆されれば、現在の紅斑スペクトルと紫外線被曝量を基準とした紫外線防護の考えとは異なり、社会医学的見地からも発癌防止を視程に入れたサンスクリーニング剤の開発などが望まれる。

### (参考文献)

- 1) Furusawa Y, Suzuki K, and Sasaki M: Biological and physical dosimeters for monitoring solar UV-B light. *J Rbdiat Res* **31**, 189-206 (1990)

- 
- 2) Furusawa Y, Fukutsu K, and Quintern L E: Evaluation of a biological solar ultraviolet dosimeter "Biofilm": An action spectrum in the longer ultraviolet wavelengths region. *Photomed Photobiol* **15**, 141-144, (1993)
  - 3) Munakata N, Morohoshi F, Hieda K, et al.: Experimental correspondence between spore dosimetry and spectral photometry of solar ultraviolet radiation. *Photochem Photobiol* **63**, 74-78 (1996)
  - 4) Quintern L E, Furusawa Y, Fukutsu K, et al.: Characterization and application of UV detector spore films: The sensitivity curve of a new detector system provides good similarity to the action spectrum for UV-induced erythema in human skin. *J Photochem Photobiol; B Biol* **37**, 158-166 (1997)
  - 5) Setlow R: The wavelengths in sunlight effective in producing skin cancer: a theoretical analysis., *Proc Natl Acad Sci USA*, **71**, 3363-3366, (1974).
  - 6) CIE: Recommendations for the integrated irradiance and the spectral distribution of simulated solar radiation for testing purposes., In: Publication CIE No. 20 (TC-2. 2), pp. 1-54, International Commission on Illumination, Paris, (1972).
  - 7) 伊藤友之、上野丈夫、梶原良一、他：地上到達紫外線の監視技術の開発 - オゾン層変化に伴う地上到達紫外線量の変化のスペクトル観測による評価 -. *気象庁時報*, **43**, 213-373, 1991.
  - 8) Aoki M, Furusawa Y, and Yamada T : LET Dependency of heavy-ion induced apoptosis in V79 cells. *J Radiat Res* **41**, 163-175 (2000).
  - 9) Godar D E: Light and death: photons and apoptosis., *J. Investig Dermatol. Symp. Proc.*, **4**: 17-23, (1999).
  - 10) Furusawa Y, Takeshita S, Sakata T, et al.: Comparative measurement of performances of six commercially available ultraviolet-A radiometers. *Photomed Photobiol* **14**, 101-104 (1992)
  - 11) Furusawa Y, Quintern L E, Holtschmidt H, et al.: Determination of erythema-effective solar radiation in Japan and Germany with a spore monolayer film optimized for the detection of UVB and UVA. - Results of a field campaign. *Appl Microbiol Biotechnol* **50**, 597-603 (1998)
  - 12) Aoki M, Furusawa Y, and Soga F: Wavelength dependency of apoptosis induction upon mammalian cells by monochromatic ultraviolet light. *Photomed Photobiol* **22**, 25-30 (2000)
  - 13) Sasaki M, Takeshita S, Furusawa Y, et al.: Ground-based observation of biologically active solar ultraviolet-B irradiance at 35°N latitude in Japan. *J Geophys Geomag* **43**, 473-485 (1993)

### **Ⅲ. 精神、文化に関する分野**

# 化粧における非対称性

神戸松蔭女子学院大学 文学部心理学科

藤本 浩一

The purpose of this study is to examine the impression of asymmetrical makeup faces compared to faces without makeup and normal makeup faces.

200 female students aged from 19 to 20 years at women's university in Kobe participated in this experiment. 8 face-photographs (2 person(A,B) × 4 conditions (non-makeup, normal makeup, two kinds of asymmetric makeup)) were presented, and subjects rated for each one of them 21scales. The results indicated that asymmetrical makeup was looked rather eccentric ("preference to novelty", "different from others") while the face without makeup was looked more friendly and the normal makeup face was looked more attractive. The results also showed that one of the asymmetrical makeup face was looked more attractive, while another more eccentric.

It is found from these results that the effect of asymmetric makeup depends both on the person's face itself and the type of asymmetric makeup.

## 1 緒言

### 1.1 シンメトリー

シンメトリーは安定した形であり情報処理しやすいが、複雑な美的判断において必ずしも最優先されるとは限らない。一般大学生には対称性などの規則性が好印象を与える(藤本 1984)が、美術大学生は一般大生に比べてより非具象的で非対称的なものを好んで製作した(藤本 1986、藤本・仲谷 1987)。被服の分野では左右の袖の色が互いに異なるセーターや、片袖を着脱できる衣服が見られる。もっとも、左右非対称の化粧を顔に施すことに人々は慎重であり、今後このような化粧が採用されるかどうか未知数である。

### 1.2 化粧の歴史とアシンメトリー

アイラインやアイシャドーがはじまった紀元前 530 年頃以来、化粧は左右対称であり、顔に対する左右非対称の装飾としては、化粧の歴史の中で 17 世紀に流行したパッチ(美斑)が見出される程度で(青木英夫 1979)、顔の化粧としての非対称化粧は見られない。

非対称化粧はこのように歴史の中になく、また、自然界に起源を持たない。しかし様々な試みが行われつつある新しい世紀に、突如現れないとも限らないのである。

### 1.3 化粧の意味と効用

化粧には変身や自分の姿の管理・演出といった動機があり、

気分の覚醒、不安の低減、自信の増大などの効用がある(大坊郁夫(高木修監修 1996))。本論では種々の個人内要因と非対称化粧に対する印象評定との関連を検討することを目的の 1 つとした。

非対称化粧は外見上人体が左右対称であるというリアリズムを無視し、日常的でないことから、人々にとって特別な日のためという象徴的な意味を持つと考えられる。

石田(デズモンド・モリス、石田 1999)は「鏡」をキーワードにして化粧を考察した。自己のイメージを見つめる「一人称の鏡」、親しい間柄の人の反応を見て自分を振り返る「二人称の鏡」、そして他人にどう見られているかを気にする「三人称の鏡」という 3 種類から化粧を論じているが、本論実験Ⅲではその言葉を用いて、非対称化粧について、自分自身・親しい相手・そして一般他者という 3 種類の眼差しとの関連で非対称化粧を論じる。

### 1.4 本論の目的

本論では 3 つの調査研究により、非対称化粧の特徴を考察する。まず非対称化粧が他者にどのように評価されるかを調べ、素顔や普通化粧顔と比較した非対称化粧顔の印象の基礎的データを収集する。次に自己意識や流行を追う心理などの個人内要因と非対称化粧に対する態度との関連を検討する。最後に女性被験者に実際に化粧を行わせて対人場面の体験報告を求めて、非対称化粧の満足度や社会的な意味づけを問う。

## 2 実験 I

(本実験の詳細は藤本「非対称化粧の印象評定」コスメトロジー研究振興財団研究業績中間報告集第 9 号 Pp86-94 を参照されたい)



Asymmetry in makeup face

Koichi Fujimoto

Department of Psychology, Kobe Shoin Women's University

## 2.1 目的

非対称化粧を施した女性の顔写真の印象を調べた。

## 2.2 方法

### 2.2.1 被験者

神戸の女子大学1、2回生200名。年齢平均値18歳11ヶ月。

### 2.2.2 材料

2名の人物(A、B)×4種類の化粧条件(素顔、化粧顔、非対称化粧1、非対称化粧2)の計8画像を用いた。非対称化粧とは図1のように、人物Aについては普通程度の化粧に加えて淡青色のアイシャドーを右目の上だけ少し濃くしたもの(非対称化粧A1)と、同じく普通化粧を施した上で左頬骨に小さな三日月型のラメシールを貼ったもの(非対称化粧A2)である。また、人物Bでは右目尻に銀粉ラメを散らしたもの(非対称化粧B1)と、右目は目の上にピンク系のアイシャドーと目の下にブルー系のアイ

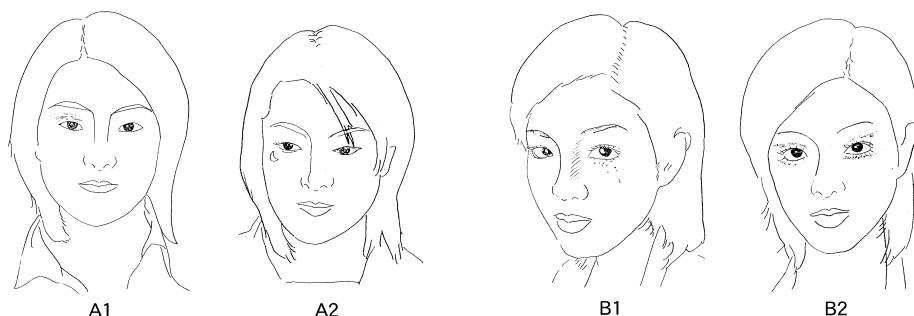


図1 非対称化粧の例

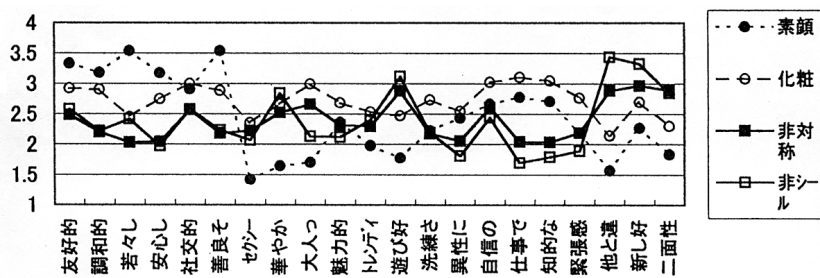


図2 Aさんの化粧印象

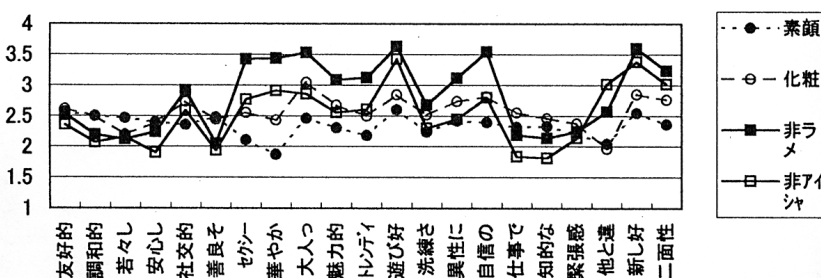


図3 Bさんの化粧印象

シャドーを施し、左目についてはその上下を逆にしたもの(非対称化粧B2)である。人物を2名にすることで特定人物の影響を少しでも相対化しようと試みた。

### 2.2.3 評定尺度

人格的特徴・魅力・知性などを表す21の項目について4件法で評定させた。

### 2.2.4 手続き

教材提示装置を用いて授業中に集団で実施した。

## 2.3 結果

### 2.3.1 人物Aに関する因子分析

素顔、化粧顔、2種類の非対称化粧顔、の4種類の化粧条件を通じて21尺度の評定値を主因子分析し、バリマックス回転を行って固有値が1以上の条件で因子を抽出した。得られた3因子を次の通り命名した：

第1因子(人柄)…友好的・調和的・若々しい・安心した、等

第2因子(女性的成熟度)…セクシーな、華やかな、大人っぽい、魅力的、他

第3因子(知的緊張感)…仕事できそう、知的な、緊張感のある、等

### 2.3.2 人物Aの化粧条件別・尺度別平均評定値

人物Aの平均評定値をほぼ因子別の順序に従って図2に示した。(他と少し違った)、(新しいもの好き)、(二面性のある)、などのいわば「奇抜さ」がその特徴といえる。この人物においては若さや魅力を表すためには普通化粧で十分であり、非対称化粧によって特に好意的な印象が形成されることはなかったといえよう。顔と化粧との相性、および、ここでの非対称化粧が奇抜すぎたなどの理由が考えられる。

### 2.3.3 人物Bに関する因子分析

人物Aと同様に21尺度について主因子分析を行いバリマックス回転したところ、2因子が抽出され、次の通り命名した：

第1因子(女性的成熟度)…セ

クシー、華やか、遊び好き、トレンドイ、大人っぽい

第2因子(人柄)…調和的、友好的、安心した、若々しい等

2つの因子の分かれ方は人物Aとほぼ同じ結果であったが、第3因子は固有値が1以下になるので省略した。

#### 2.3.4 人物Bの化粧条件別尺度別平均評定値

人物Bの尺度別平均評定値を人物Aと同じ尺度順序で図3に示した。片側の目尻にラメを散らした画像について、より多く(セクシー)、(華やか)、(大人っぽい)と評定された。また、(自信のある)印象を与え、この人物Bでは非対称化粧が自分の魅力上昇と自己肯定感の形成を印象づける上で有効に働いていた。もう1つの非対称化粧である青・赤系の上下アイシャドウ左右逆の画像は、(他の人と少し違った)・(新しいもの好き)・(二面性)等のいわゆる「奇抜さ」の尺度で高得点であり、この点は人物Aの非対称化粧印象と共通する。

## 2.4 考察

### 2.4.1 非対称化粧の印象

Workmann& Johnson 1991(高木 1996より)の研究では、化粧度に依って魅力度や女性性が増し、逆に道徳性が低下することを示したが、非対称化粧の印象評定ではさらにその傾向が顕著であった。すなわち、「女性的成熟度」や「奇抜さ」の印象を与え、他方、人柄については否定的評価が見られた。適度なズレは好ましく感じられる場合があるが、対称化粧からの隔たりは人々に許容される程度のものにとどめておく方がよいのであろう。

### 2.4.2 人物間の非対称化粧の効果の違い

幼な顔(A)ではあまり奇抜な非対称化粧は有効ではなく、逆に成熟顔(B)では適度に目新しい非対称化粧が魅力や自信を引き上げてくれることが示唆される。

## 3 実験 II

### 3.1 目的

非対称化粧をやってみたく、また、他者がやっているのをどう思うかなどを調べる非対称化粧受容度と、個人の自己意識・流行を追う心理・自己評価重要度などの諸要因の間の関係を集団調査により検討する。なお、私的自己意識とは、自分の心の動きや気持ちの変化など内面に関心を持ち、自己反省したりするはたらきで、他方、公的自己意識とは、他人から見られる自分の行動や容姿に注意を向けることである。仮説としては、化粧への関心が高い人は私的自己意識よりも公的自己意識が高く、より多く流行が気になり、自分は友好的よりも魅力的でありたいと思っている、などが考えられる。

## 3.2 方法

### 3.2.1 被験者

実験Iとは異なる1回生女子大生173名。

### 3.2.2 調査項目等

①非対称化粧受容度質問紙(事前テスト)…10項目から成る質問紙。

1~5の項目については「非対称メイクを次の場面でやってみたくですか」と教示し、4(とてもやってみたく)から1までの4段階で回答させた。項目は次の通りである: 1. 買い物や通学などの日常生活で、2. 夜の飲み会で、3. 異性が集まる合コンで、4. コンサートに出かける時、5. 部屋の中で1人で試しに。

6~9では「このメイクをもしも誰か他の人がやっているのを見たら貴方はどう思いますか」と尋ねる4段階評定で、項目は以下の通りであった: 6. キャンパスで見かけた見知らぬ女子学生、7. 合コンで集まった友達の1人、8. スポーツクラブのインストラクター、9. 藤原紀香のような人気女性タレント。

第10項目は「このメイクを仮に同世代の女性の何%がしていたら貴方もしますか」と尋ねて、5(5%前後)、4(20%前後)、3(35%前後)、2(50%前後)、1(70%前後)のうち1つを選ばせた。

②私的自己意識、③公的自己意識、④対人不安質問項目…押見輝男(1992)から引用した30項目からなる私的・公的自己意識と対人不安(人がいると神経質になる、自分から視線をそらす、等)を測定するものを原著通り5段階評定させた

⑤流行追求度質問項目…「ブランドものが気になる」等の11項目(4段階評定)

⑥自己重要度項目…実験Iの21尺度をすべて用いて、「友好的な」などについて「自分がそう見えることがどれくらい重要か」を4段階で評定させた。実験Iでの因子分析結果を踏まえて全項目を人柄・成熟度・仕事・奇抜さに4分類した。

⑦化粧品購入額…第63問は春から実験実施の夏までの化粧品購入額を1(2000円まで)から5(3万円以上)までの5段階で回答させた。

手続き:実験Iで得られた非対称メイク写真のうち1枚(図1-B2)をLL教室の教材提示装置を用いて被験者2人1組で見られるように提示し、①非対称化粧受容度の評定を行わせた。その後②~⑦について質問紙に回答を求めた。

## 3.3 結果

### 3.3.1 非対称化粧受容度

全10項目の評定平均値を示した図4の通り、日常生活

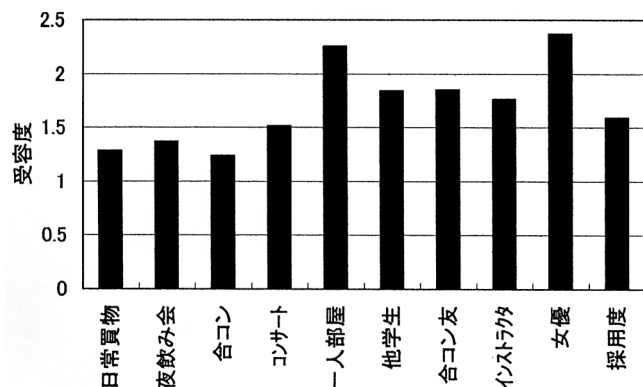


図4 項目別の受容度平均値

や合コンではやってみたくないという気持ちが強く、コンサートや夜の飲み会でも自分でこうしたメイクをすることには否定的であったが、「部屋の中で1人試しに」やってみてもよいとする傾向が少し見られた。また、他者がやっているのを見てあまり快く思わないものの、第9項目の「藤原紀香のような人気女性タレント」ならまずまずの印象であった。次にこの10項目の主因子分析を行ったところ、第1因子として第1～4項目（日常の買い物で・夜の飲み会で・合コンで・コンサートで、各々の場面で自分自身がやってみたくどうか）の因子負荷量が高かったので個人別に得点を合計して「自己因子」得点とし、また、第6～9項目（キャンパスの他学生・合コンでの友達・インストラクター・女優、の各々がやっているのを見てどう思うか）を第2因子として「他者因子」としてまとめ、次に述べる相関の算出に利用した。

### 3.3.2 自己意識、対人不安、自己重要度その他の諸要因と非対称メイク受容度との関係

諸要因間の相関係数を求めた。なお、⑤の流行追求度については、11項目を主因子分析して第1因子の負荷量が高かった4つの項目（同世代の～服や小物が気になる、～新商品が気になる、ブランドものが気になる、流行もの～が気になる）の値を平均して個人得点とした。有意差があった相関係数に基づいておもな結果を以下に文章化した：

1. 流行が気になる人は、採用度「同世代の何%がしていたら貴方もしますか」と関係し、このメイクに比較的積極的であった。また、コンサートに出掛ける時などにこのメイクをしてもいいと思うものの、キャンパスの見知らぬ女子学生がしていると快く思わない。
2. 自分にとって成熟度（魅力的、洗練された等）を重視する人は、他学生や合コンで友達が非対称メイクをしていると好ましく思わない。また、成熟度を重視しない人ほどこのメイクは他者がやったらいいと思っている（「他者因子」との相関）。
3. 同様に、奇抜さを重視する人は合コンで友達がこの

メイクをしていると快く思わない。

4. 化粧品購入額が高いと、自分自身がやってみたくと思うし（「自己因子」との相関）、特に異性が集まる合コンで自分がやってみたくと思う。
5. 私的自己意識の高い人はこのメイクはインストラクターなどがやればよいと思っている。
6. 公的自己意識の高い人は、流行が気になるが自分に大事なのは人柄であり奇抜さは重視していない。

## 3.4 考察

### 3.4.1 自己意識との関連

公的自己意識が高い人は、人に見られる自分を強く意識するので、化粧一般および非対称化粧に対する関心が高くなるといえる。他方、私的自己意識の高い人は、いかに見られるかを演出する化粧そのものに対して自我関与が低く、非対称化粧などはどこかの誰かがやればよいと他人事になっている。

### 3.4.2 別の自分を演出することと一般他者の価値観の二重構造

日常生活で非対称化粧を自分ではして見たくないし他人がしているのもよいと思わないにもかかわらず、「部屋で1人で試しに」なら興味があるという結果が見られた。このことから、非対称化粧はおかしい、変だといういわゆる「三人称の鏡」すなわち客観的・世間的な確固たる価値基準が被験者の中に存在し、同時に他者の批判的な眼差しを逃れたところで密かに変身してみたい願望があるといえる。三人称の一般他者に承認される「健全な」自分でいたいという気持ちと、冒険して少し妖しい自己を演出したいという願望の狭間に非対称化粧が位置づけられよう。

女性的成熟度や奇抜さが自分にとって大事だと思う人や、流行が気になる人が、他者が非対称化粧をしていると快く思わないという結果も、上記の二重構造から考察できる。自分だけが目新しい・魅力的・流行の先取りをしていると一般他者から見られるためには、その一般他者がありきたりで穏当であり特別の自分と差別化されなければいけない。主として三人称の一般他者との関係について述べたが、次のモニター実験報告では二人称の親しい眼差しが重要となる。

## 4 実験Ⅲ

### 4.1 目的

非対称メイクを施した若い女性が知人や他人の中で数時間過ごし、その結果どのような感想を持つかを記録して、他者からの眼差しの影響の受け取り方や非対称メイクに関する自己意識の変化を調べる。

## 4.2 方法

### 4.2.1 被験者

共学大学に通学する1回生の女子学生4名。

### 4.2.2 手続き

7月の授業期間中に、朝10時頃から学内の一室で女性メイク係りにより被験者は順次メイクを施された後に、10時40分からの授業に出席したり食堂で食事をしたり友人と語らう等して通常の大学生活を過ごし、質問紙や記録紙に回答した。

### 4.2.3 調査項目等

実験Ⅱの①から⑦までと同じものに、さらに2種類の調査を加えた。

①非対称化粧受容度（事前テスト・メイク前に実施した）、②私的自己意識、③公的自己意識、④対人不安、⑤流行追求度、⑥自己重要度項目、⑦化粧品購入額、⑧モニター記録票…時刻・状況・心に浮かんだ考え・満足度（5段階評定）の4列×5行からなるB5用紙の記録票を携帯させて、モニター実施中の少なくとも30分以内毎に、または場面・状況が変わる度に各欄に記入を求めた。記入例として、12:35・モニター3名と食堂で談笑中・隣の席の視線を感じて～・3（満足度）、などと用紙の冒頭に例示した。⑨非対称メイク受容度質問紙（事後テスト）…①と同じもの（実験Ⅱ参照）を実験終了後のメイクを落とす直前に行わせた。

## 4.3 結果

### 4.3.1 非対称化粧受容度の事前・事後テストの比較

4名中3名は事前・事後でメイク受容度にあまり変化がなかったが、うち1名についてはメイク後数時間経過した方がより肯定的に評価するようになった。なお、この1名と他の3名との間に、私的・公的自己意識や自己重要度その他の測定値について目立った差異は見られなかった。

### 4.3.2 モニター時の時間経過に伴う記録票記載事項や満足度の変化

（ユカ子）もっとも満足度が高かったユカ子については最初3（どちらでもない）でスタートし、知り合いに「パリコレみたいでカッコいい」と言われて4に上昇したが、別の知人に「デビルマンみたい」と言われて1（とても不満）に変わった。しかしその後あまり気にならなくなり、また友達に「かわいい」とほめられるなどして楽しくなり4→3→5と推移し、「慣れてきて」3→3→4と最後は満足気味に終わった。

（マミ）親しい相手に直接言われたことばに加えて、自分で思い込み、反応していた。メイクの最初に不安が募っ

て0（とても不満）でスタートしたが、「友達の反響がよかったので落ち着き」3になった。しかしトイレの鏡に写った自分を見て「誰かになぐられたようだ」と思い、落ち込んで1に下降した。友人がそんなにわからないと言ったので4に上がったが、下を向いた時にアイシャドーがわかると言われ少しショックを受ける。通りすがりの人に目が合ってヘンな顔をされたので、「自分のことではなかったかも知れないが」気になる。その後3→2→3と推移し、友達と普通にしゃべりメイクを忘れてしまうくらいで5に上がるが、知人から下のブルーシャドーがなぐられたように見えると言われショックを受けて終了。

（カズヨ）モニターを依頼した時にもっとも積極的だったが、メイク前から緊張し（2:やや不満）、スタート直後エレベータの中で男子学生がずっと目を見てきて恥ずかしくなり（1）、友達に「そんなにわからない」と言われてようやく安心した（3）。大学構内の生協で買い物した折にはずっと伏し目がち（1）だったが、友達が普通の反応だったので恥ずかしくなくなる（4）。しかしある教員に人相を見てもらうもののメイクについてのコメントがなく、寂しい思いをする（2）。その後も大勢の中で視線を感じて恥ずかしくなる（2）ことと知り合いの反応が普通なので安心する（4）ことが交代して現れる。最後は図書室に行く時にエレベータや廊下を平気で歩いて「見るなら見ろ」と開き直って満足度4で終了した。

（ユリ）実施前にもっとも難色を示していたが、始まるにつれて普段あまりメイクをしたことがなかったから「少しおもしろい」という気持ちも湧いた（3）。友達に「あまりわからない」と言われてホッとしたり（4）、「よく見たら結構わかる」と指摘され（2）、皆が気づかないかと恥ずかしく思う（2）。慣れてきたり（4）、鏡の自分に違和感を覚えたり（2）、また、「どこかでうったのかと思った」などと言われてショックを受けたり（2）しながら、最後の安堵感（4）で終了した。

## 4.4 考察

### 4.4.1 自己意識等との関連

4名について非対称化粧への関心は、自己意識などの諸要因と明確な関係が見られなかったことから、それ以外に自分の容貌に対する自尊心や楽観主義などの要因と関係するかも知れず、人格変数や社会的態度と非対称化粧受容度との関係の検討が今後の課題である。

### 4.4.2 一人称（自分自身）、二人称（親しい相手）、三人称（一般他者）の眼差し

モニター被験者は、親しい友達に「かわいい」、あるいは「デビルマンみたい」などと言われる度に一喜一憂していた。非対称化粧に対する各場面の満足度は、友達のこと

ばや反応によって推移することが多かった。被験者の一人が「パリコレみたいでかっこいい」と言われてうれしくなったように、若者たちは他の人と少し違う自分を演出して斬新さと自由と個性を主張しようとする。その時に最も肯定的な関心を示してほしい相手は、見ず知らずの他人ではなく、身近にいる親しい人間なのであろう。また、親しい人間関係だからこそ「殴られたみたい」などと率直な意見も聞ける。

通りすがりやエレベータに乗り合わせた他学生の冷やかな視線すなわち三人称の鏡は、非対称化粧によって演出された別の自分の姿を振り返らせ、違和感を蘇らせてしまう役目をする。また、自分自身で文字通りトイレの鏡を見ること（一人称）で、常識的な三人称の視線を先取りする。非対称化粧に対する個人の評価（一人称）の中に常識（三人称）が内包され、入れ子構造になって被験者自身に批判的な視線を浴びせる、しかし、他方で、親しい友が平静にながめる二人称のいつもの眼差しは、被験者に化粧していることを忘れさせ、満足を与えるのである。自分のメイクや着こなしによほど自信があるならともかく、普段私たちは外出前に、自分の服装や化粧が似合っているかどうかを親しい人に確認する。冒険心のある化粧や服装を取り入れた時に、親しい人からの肯定的な評価は、他者の批判的な眼差しが内在化して自分を責め立てることから自分を護り、自信を持って前に進むことを支援する役目を持つ。

三人称の視線は自己を演出する上でとても大事である。少し危ない自分を提示する（露出する）時に、人目を避け

たい、でも見て欲しいという両方の気持ちがあり、二人称だけではこうしたワクワクした体験は味わえないであろう。

(参考文献)

- 1) Rosen,J. (永田雅宜監訳・吉沢保枝訳 1977) シンメトリーを求めて (紀伊国屋書店)
- 2) 青木英夫 1979 西洋化粧文化史 (源流社)
- 3) 押見輝男 1992 自分を見つめる自分自己フォーカスの社会心理学 (サイエンス社)
- 4) 高木 修 (監修) 大坊郁夫・神山 進 (編) 1996 被服と化粧の社会心理学 (北大路書房)
- 5) 竹内久美子 2000 シンメトリーな男 (新潮社)
- 6) デズモンド・モリス、石田かおり 1999 「裸のサル」は化粧好き (求龍堂)
- 7) 仲谷洋平・藤本浩一 1984 パターンの良さ及び好み判断について - 美術群と非美術群の比較 - 関西心理学会第 96 回大会発表論文集
- 8) 藤本浩一 1984 パターンの良さ及び好み判断と知的能力の関係 日本心理学会第 48 回大会発表論文集
- 9) 藤本浩一 1986 良いパターンの創造における規則性の要因 日本教育心理学会第 28 回大会発表論文集
- 10) 藤本浩一・土肥伊都子 2000 非対称化粧の意味を探る 繊維製品消費科学 41,70-79.
- 11) 藤本浩一・仲谷洋平 1987 美的パターンの創造過程 - 美大生との比較 - 日本心理学会第 51 回大会発表論文

# 口唇口蓋裂患者の顔の改善に対する化粧の効果

大阪大学 歯学部

飯田 征二、小原 浩、古郷 幹彦、宮 成典、松矢 篤三

Cleft lip and/or palate patients are born with the incidence of 1 for 500 births in Japan. Patients must be taken some times of surgical operations to develop oral function and aesthetics.

At present, aesthetics has been improving due to progress of the operation technique. Still, because of wound in the face, and moreover the psychologic influence on these patients can't be avoided in daily clinic.

This research is to investigate how the facial wound and asymmetric, middle facial concaved feeling varied according to having make-up.

We examined a facial three-dimensional change by wearing foundation and lipstick. And in addition to this, whether the impression received from other people changed by making up.

As results, middle facial concaved feeling, asymmetric and scar impression improved even by using only foundation. Impression improved more by using lipstick which was dark red.

Though it became clear that facial impression improved by giving make-up, it also became clear that facial three-dimensional change could be solved only by surgical operation.

## 1. 緒言

口唇口蓋裂とは日本人においては約 500 人に 1 人と高頻度に発生する<sup>1)</sup> 顎顔面領域の先天的外表奇形である。本疾患は哺乳、咀嚼、発音（構音などの口腔の機能障害のみならず、口唇、外鼻、などの審美的障害を伴う。加えて上顎骨の発育不良により中顔面の陥凹感を伴うのが本疾患患者の特徴とされている。口唇口蓋裂患者に対して我々は、生後まもなくより口唇形成術、口蓋形成術を行い、歯列不正に対して歯列矯正を行い、また顎裂部腸骨移植術、外鼻形成術、口唇外鼻修正術などの手術を重ね、顔面における機能的および審美的な形態の獲得を行っていくのであるが、機能的な改善を為し得たとしても、顔面の手術創など審美的には患者ではない人と比較して顔面の多少の非対称感を認めることは否めない。

一般的に女性は化粧を施すことが多く、それによって自分を美しく見せたいと思うものであるが、口唇口蓋裂患者のように審美的障害のある人はなおさらであろうと推察される。

そこで本研究では、口唇口蓋裂患者の顔面が化粧によってどのように改善するのかを知る目的で、化粧による顔面の三次元形態の変化についての実験と化粧によって顔面から受ける第三者の印象の違いについての調査を行った。



Effect of Make-up on the Faces of Cleft Lip and Palate Patients

Seiji Iida, Hiroshi Kohara, Mikihiko Kogo, Shigenori Miya, Tokuzo Matsuya

Division of Pathogenesis and Control of Oral Diseases, Graduate School of Dentistry, Osaka University

## 2. 実験

検討は、化粧をすることによる顔面の三次元的形態の変化と、化粧の違いによる他者よりの印象の変化を顔面写真を用いて行った<sup>2)</sup>。

被験者は両側性唇顎口蓋裂患者（23 歳、女性）で、生後 2 ヶ月から 19 歳になるまでに計 9 回の手術を受け、以降治療は完了となっている。被験者の手術歴は以下のとおりである。

昭和 52 年	3 月	出生
同年	5 月	口唇形成術（二回法、第一回目）
同年	8 月	口唇形成術（二回法、第二回目）
昭和 53 年	11 月	口蓋形成術
昭和 56 年	6 月	口唇修正術
平成元年	3 月	口蓋ろう孔閉鎖術、舌弁移植術
同年	4 月	舌弁切離術
平成 5 年	7 月	Abbe's flap 移植術
同年	8 月	Abbe's flap 切離術、外鼻修正術
平成 8 年	3 月	口腔前庭部形成術

被験者の顔面においては化粧なしと 5 パターンの化粧ありの計 6 パターンを設定し、三次元 真を撮影した。6 パターンの顔 真は次のとおりとした。

番号 1 : 化粧なし  
2 : ファンデーションのみ  
3 : ファンデーション + 茶系色口紅  
4 : ファンデーション + 濃桃色口紅  
5 : ファンデーション + 赤色口紅  
6 : ファンデーション + 薄桃色口紅

### 1) 化粧による顔の三次元形態の変化

研究には MINOLTA 社製 VIVID700<sup>®</sup> を用いた。VIVID700<sup>®</sup>

はレーザー光線を用いた高速非接触型三次元形状入力機である。その精度は0.3mmと顔面計測においては十分である。

VIVID 700<sup>®</sup>にて撮影して得られた三次元画像の解析には解析ソフト Rugle<sup>®</sup>を用い、各画像を顔面のランドマーク4点（両側内眼角および両側口角縁）を基準に写真1と2、写真1と3、写真1と4、写真1と5、写真1と6とを各々重ね合わせて三次元的形態を比較検討した。

## 2) 化粧による顔面の形態に対する他者よりの印象の変化

被験者の6パターンのカラー画像写真を判定者計20人に見せて、アンケート用紙にて白唇部の傷、中顔面の陥凹感、顔面の左右対称感、口唇の形、鼻の形について5段階評価をしてもらい、化粧による他者よりの印象の変化を調べて、各評価と人数の関係についてのグラフ（図7から11）を作成し分析した。

また5段階評価のよい順に20点、15点、10点、5点、0点と得点をつけ、各項目の平均得点を出し、総合評価として5項目の総得点（20点×5＝100点満点）を出した。

## 3. 結果

### 1) 化粧による顔面の三次元形態の変化

三次元画像の重ね合わせを行った結果は図1から6のと



図1 左図は化粧なしの写真、右図は化粧ありの写真である。両画像を Rugle<sup>®</sup>にて重ね合わせを行った。

おりとなった。図にはカラースケールにて重ね合わせた画像の三次元的差異が表示されている。緑色および黄色の表示は各三次元座標の差が1.00mm以内であることを示し、差が大きくなるにつれて+の場合には赤色へ、-の場合には濃緑色へ変化する。化粧なしの画像と化粧ありの画像とで明らかに三次元的に差異が生じたことを示すカラー表示になっている箇所はなく、化粧を施した領域全体はほぼ均一な緑色の表示となった。このことから、化粧の有無から顔面形態の三次元的差異が生じることはなかったと考えられた。

### 2) 化粧による顔面の形態に対する他者よりの印象の変化

#### ①白唇部の傷の目立ち具合について（図7）

化粧なしの写真1においては目立たない、あまり目立たない、と答えた人がおらず、どちらとも言えないと答えた人が3人であり、化粧ありの写真に比べて極めて少なかっ

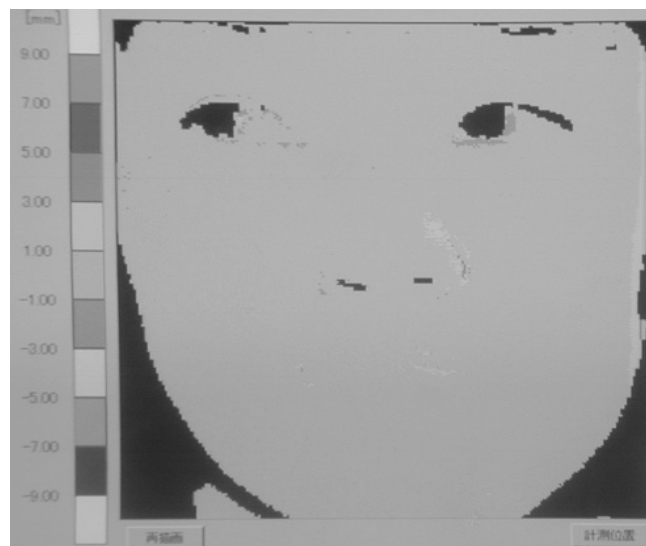


図3 写真1と写真3との重ね合わせ

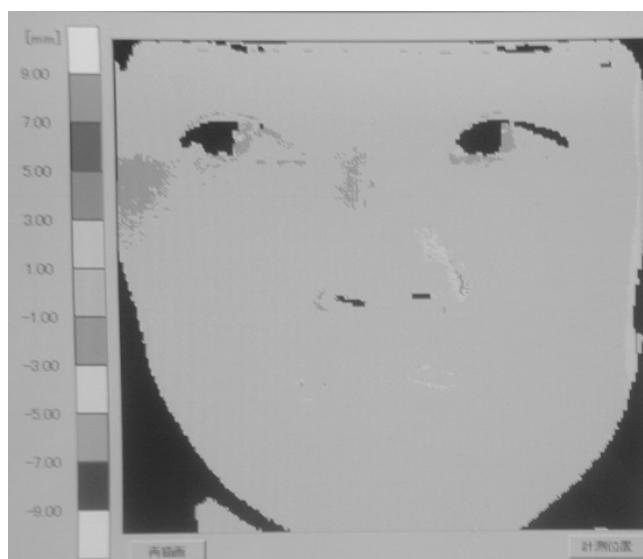


図2 写真1と写真2との重ね合わせ



図4 写真1と写真4との重ね合わせ



図5 写真1と写真5との重ね合わせ



図6 写真1と写真6との重ね合わせ

た。それに対し化粧ありの写真においては目立たない、あまり目立たないと答えた人が多かった。化粧ありの写真同士で比較すると、目立たない、あまり目立たない、どちらとも言えないと答えた人が最も少なかったのは写真2と写真5の12人で、写真6は13人、写真4は16人、写真3の18人、という順に目立たない、あまり目立たない、どちらとも言えないと答えた人が増加した。

### ②中顔面の陥凹感について (図8)

全体的に陥凹がないと答えた人は0であった。化粧なしの写真1においてはあまり陥凹がないと答えた人がおらず、どちらとも言えないと答えた人が半数の10人を占めた。化粧ありの写真においては、あまり陥凹がない、どちらとも言えないと答えた人は写真6に最も少なく13人で、次いで写真2と写真3の14人、写真5の15人、写真4の17人、という順にあまり陥凹がない、どちらとも言えないと答えた人が増加した。

### ③顔面の左右対称感について (図9)

化粧なしの写真1においては対称、やや対称、どちらとも言えないと答えた人が11人と全体の55%であった。それに対し化粧ありの写真においては対称、やや対称、どちらとも言えないと答えた人が写真4、と写真6で14人、写真4で16人、写真2、写真3、写真5で18人と70%以上を占めた。

### ④口唇形態について (図10)

美しい、やや美しい、どちらとも言えないと答えた人が写真6で12人と最も少なく、次いで写真2で14人、写真1で15人、写真4で16人と増加し、写真3と写真5が19人と最も多かった。

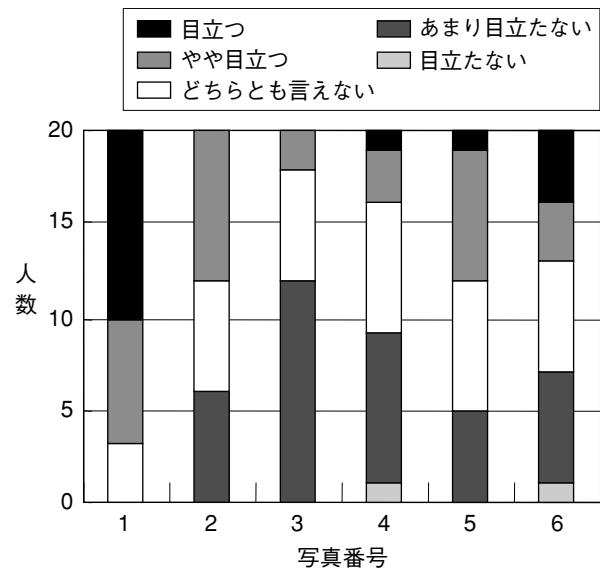


図7 傷についての判定 (人数)

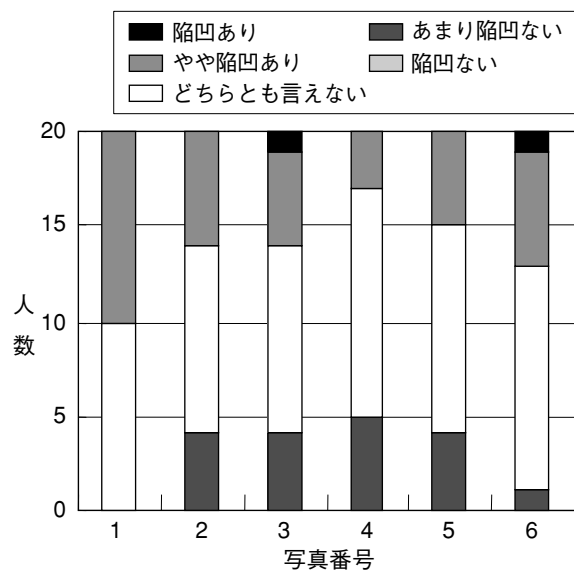


図8 中顔面の陥凹感についての判定 (人数)

⑤鼻形態について (図 11)

美しい、やや美しい、どちらとも言えないと答えた人が、写真1において17人、写真2と写真4とが18人、写真3、写真5、写真6とが19人であった。

⑥総合評価について

各項目の平均点および総合評価を算出すると、図12から16のとおりとなった。総合評価 (図17) では写真1は41.98、写真2は51.73、写真3は56.98、写真4は57.00、写真5は56.98、写真6は47.95となった。

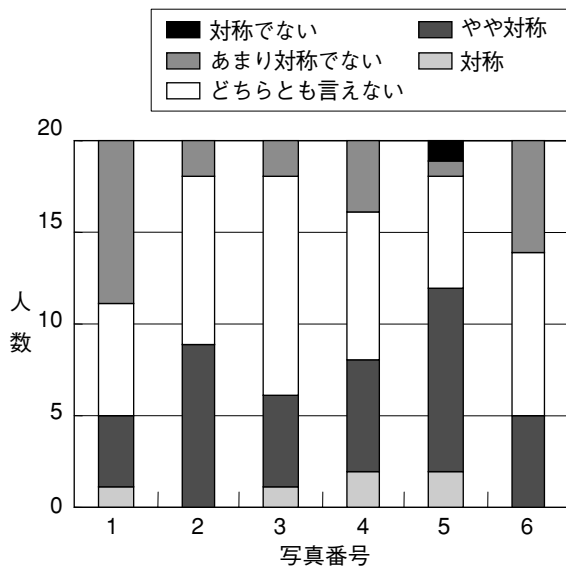


図9 顔面の左右対称感についての判定 (人数)

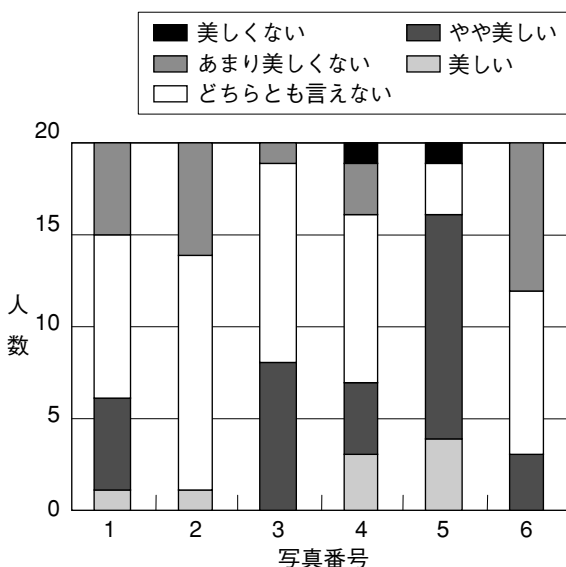


図10 口唇形態についての判定(人数)

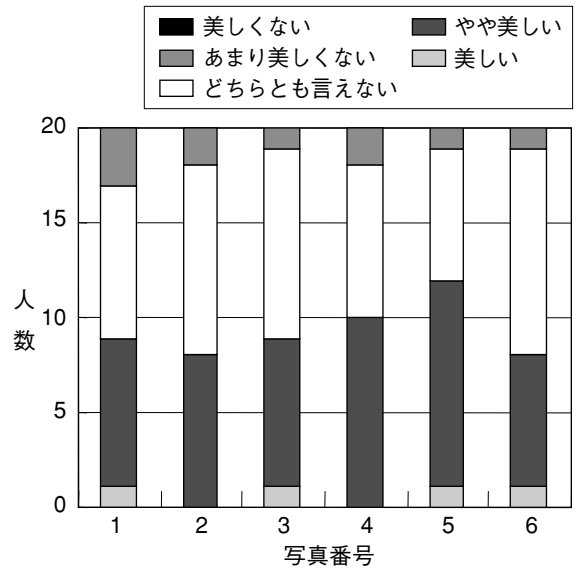


図11 鼻形態についての判定 (人数)

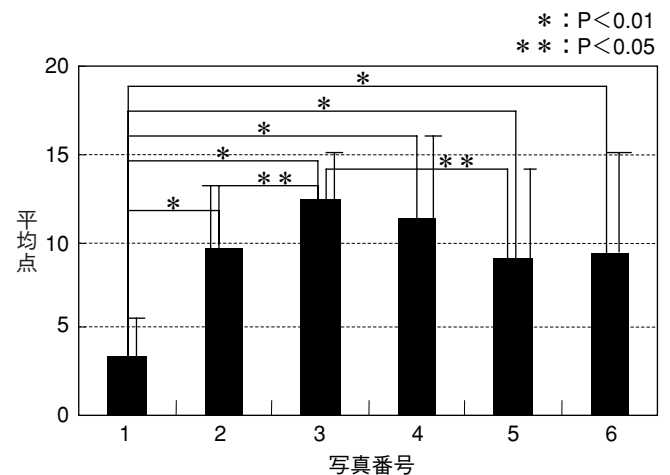


図12 傷についての判定 (点数)

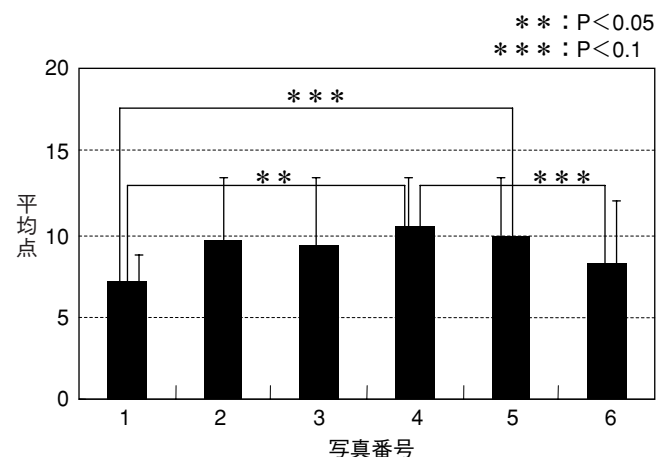


図13 中顔面の陥凹感についての判定 (点数)

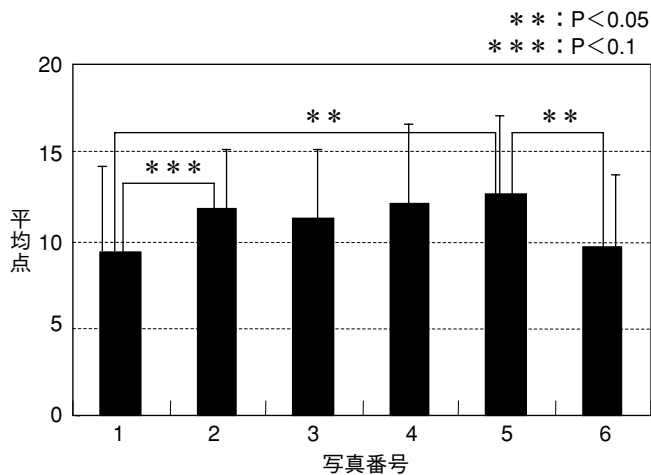


図14 顔面の左右対称性についての判定 (点数)

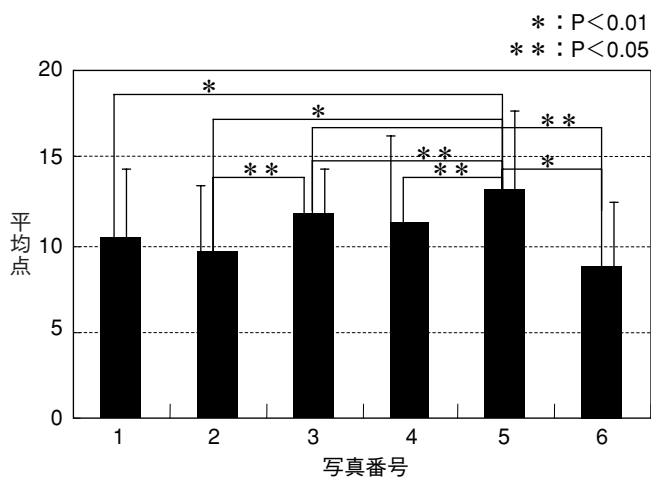


図15 口唇形態についての判定 (点数)

#### 4. 考 察

口唇口蓋裂という顎顔面に奇形をもって出生した患者にとって、手術及び矯正による顎顔面の機能的及び解剖学的形態の回復は第一に重要なことである。これに関しては医療技術の進歩によって現在ではかなりの水準で審美的な回復が得られるようになった。

しかしながら、例えば手術による白唇部の傷の状態や骨格に起因する中顔面の陥凹感が若干残ることは否めない。特に両側性裂に関しては中間唇部の口輪筋の欠損、鼻柱の短小、鼻中隔軟骨や大鼻翼軟骨の未発達、キュービッド弓が元々の中間唇に存在しないこと、また、中間顎が左右の顎によって固定されておらず手術によって偏位を起しやすいくことなど、様々な顎顔面形態及び機能に不利となる要素が多い。今回検討に際し、両側性唇顎口蓋裂の患者を被験者に用いたのは上記などの理由によるものである。即ち顎顔面形態に対して不利となる要素が多い患者に対して、化粧によりどの程度の審美的回復がなされるのかを検討するため、本研究の対象に良いと考えられた。

また今回施した化粧についてであるが、一般的な化粧と

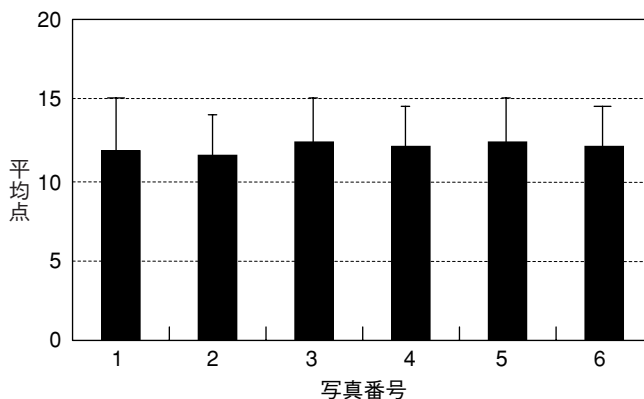


図16 鼻形態についての判定 (点数)

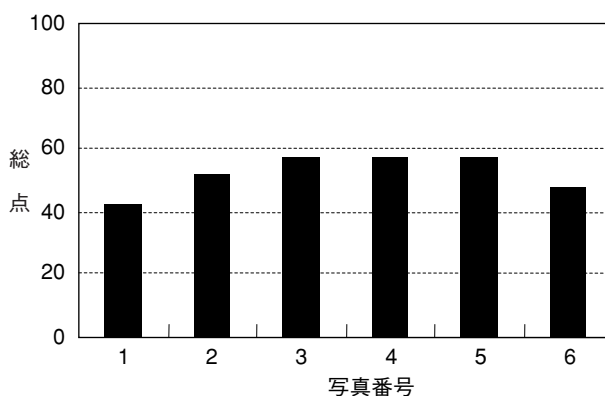


図17 総計

いうのを基準とした。というのも、一般の人が一般的に自宅などでやっているであろう程度の化粧でどれだけの審美的な回復ができるかを目的としたからである。従って、ファンデーションの濃淡をつけず、頬紅なども用いなかった。また検討における見た目の評価において判定者の混乱を避けるため写真の枚数にある程度制限しなければならない。従って、化粧による変化をみる項目は主に口紅のつけ方、色の変化などによって行った。さて、三次元的な顔面形態の変化であるが、これは化粧の有無、種類に関わらずいずれも差が認められなかった。この事に関しては、結果については当然といえるかもしれない。特種メイクで三次元的に変化させるものもある<sup>3) 4)</sup>と思われるが、一般的なメイクで三次元的な座標の変化が出るとは思われにくい。むしろ、三次元的な変化に関しては手術による形態回復が、本疾患にとっては最適であると思われた。言い換えれば、三次元的な回復は手術が最適であり、それは口腔外科医の分野であると思われた。

一方、他者からの印象による評価においては差が認められた。即ちファンデーションを均一に顔面に塗布したにも関わらず中顔面の陥凹感、及び非対称性は改善していた。均一な塗布なので改善は余り見込めないと思われたが予想以上の効果が得られた。ファンデーションに濃淡をつけることにより、陥凹感がさらに改善できる事が示唆できる。

白唇部の傷に関してはファンデーションを塗布することによりマスキングされると思われたので、改善が見られたことは良好な結果と思われた。しかし、外鼻孔底における鼻孔内の傷に関してはファンデーションの応用が難しいのではないかとと思われるので、今後の課題である。手術による瘢痕除去も一方法であろう。今回、この鼻孔内の傷を指摘する評価者が多かったのも事実である。

口唇形態については口唇裂をとともなう患者にとって心理的には一番気になる場所と思われる。これは口紅をつけることによりやはり改善が見られた。なかでも写真番号5の赤系の色の濃い口紅では一番印象が良かった。これは赤系の濃い色により口唇の量感が増したのと同時に評価者の心理的な側面も影響していると思われる。「口唇は赤い」という先入観があるのであろう。これは同じく濃い系の茶色にはあまり評価が現れてないことより推察できる。これに対して、薄いピンク系の口紅において評価が低いのは淡い色を用いることにより、立体感及び量感が不足していたためと思われた。両側性口唇口蓋裂患者は中顔面の発育不全に加え上口唇の絶対的な量の不足がある。淡い色系はそれを助長し、口唇形態の判定に悪影響を及ぼしていると考えられた。

鼻形態に関しては、やはり化粧の効果が余りみとめられなかった。原因として、今回の検討ではファンデーションを均一に顔面に塗布していることが挙げられる。濃淡をつけることによりより改善するものと思われるので今後の検討課題である。しかしながら、やはり限界はあるものと思われるので、手術による鼻形態の改善が口唇口蓋裂患者によって最適であると思われた。

以上のことより、総合評価においてもファンデーションに加えて濃色系の口紅を塗布したものの評価が高いといえる。

## 5. 総括

人間の顔面形態において全くの左右対称ということはないものであるにも関わらず、日常我々が目にする相手の顔面形態がほぼ左右対称であると感ずることは多い。その理由として表情と目の錯覚とがあげられよう。表情によって顔の印象はずいぶんと異なり、また錯覚によって通常ある

べき形態と異なる形態として捉えてしまう。このような効果の得られる方法の一つが化粧であろう。化粧をすることで表情は異なり、そして光や影を利用して本来は見えない形状を創り出すのである。このことを三次元的画像および他者からの印象によって確認したのが本研究である。

本研究の結果、化粧をしても三次元的形態の変化はなかったが、化粧をすることにより口唇口蓋裂患者にしばしば見られる顔面の形態の非対称性についての他者よりの見た目が変化した。

今回は一般的な化粧ということで、化粧の施行、特にファンデーションを均一としたが、均一なものでも口紅と合わせることによりかなりの改善が得られた。今後はさらに、パラメディカル化粧<sup>5)</sup>という観点に基づいてさらなる検討が必要となってくると思われる。

現在では、パラメディカル化粧という言葉が存在し、医療では十分に治せない病気やけがで生じた外見の問題について化粧が役割を果たすという考えが出てきている。また欧米では医療とメイクの専門家が協力して患者の社会復帰を手助けする機関が存在している。これらの根底にある考えは、患者の心の問題を大きく捉えているところにある。

口唇口蓋裂患者では、先天的な顎顔面の奇形が存在することで言語の問題も存在することにより、やはり心理面での影響は無視できない要素である。この観点からも手術を施行する側の口腔外科医と医療 cosmetologist との連携は重要である。

## (参考文献)

- 1) 河合幹他：口唇口蓋裂の疫学的研究、東山書房、7 - 23
- 2) 小坂正明他：視覚による顔面非対称性の識別精度、日本形成外科学会誌、19 : 316 ~ 322、1999
- 3) B.Hell,etc : Camouflage in head and neck region-a non - invasive option for skin lesions,International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery,1999;28:90-94
- 4) 難波雄哉他：メイクアップ、美容形成外科学、南江堂、16 - C、220 - 228、1987
- 5) 化粧、ケアの重要な柱、読売新聞社、7.9.1999

# 記念講演

●  
平成12年度記念講演 加治和彦  
●



# 細胞の老化と個体の老化

静岡県立大学大学院 健康科学研究科

加 治 和 彦

場所 日本薬学会会長井記念ホール  
日時 平成12年11月20日(月)

## 1 序

私は4年前に機会があり静岡県立大学大学院の教育に携わる身となりました。静岡に来ましてやはり何と申しまして一番印象に残ったのは、私の研究室から目の前に見える富士山でございます。このようなことから、今回の老化の話の枕として老化の研究と富士山の関係についての話をさせていただきます。

ある時、ふと富士の山というのは実は老化の研究と非常に関係が深いということに気が付きました。ふじのやまというのは今は“富士山”と書きますが、昔は“不死の山”ということのようです。竹取物語をひも解きますと、その頃富士山は煙を噴いておりました。この煙は一体なにかと言いますと、かぐや姫に振られた帝が、折角得られました不老長寿の薬も、もはやかぐや姫が居ないのではしょうがないということで、高い山に登り燃やした煙、それが富士山の煙であり、その時からこの山に“不死の山”というように名前が付けられたようです。

その不老長寿の薬が今で言えば何であろうか、今日の話にも出てきますテロメラーゼではないか、などと考えることもあり、老化の研究の中で富士山を時々思い出します。

今日は細胞老化と、細胞が死ぬという二つの現象について話したいと思います。田内 久先生、日本における老化の研究の大家がいらっしゃいますが、最近「100寿者、100歳老人」に関する本をお書きになりました。その田内先生の数多くのお仕事の中で特に重要なものは何かと申しますと、加齢の進んだ人と若い人を比較して、老化に伴い組織あたりの細胞数が減るといふ発見です。肝臓にしる腎臓にしる、老化し、高齢に達した個体では日本人、アメリカ人を問わず細胞数が減少するということが明らかにされました。

しかしながら、細胞数が減少した分だけ一つ一つの細胞が大きくなったり、多倍数性の細胞となり、遺伝子であるDNAを増やして代償作用を起こしますから、細胞数の減少

がそのまま老衰に至るというわけではありません。では細胞数はどのようにして減少するのと言いますと、二つの過程で細胞数が減少すると考えられます。一つは細胞が死ぬことです。もう一つは細胞が減った場合に、それを補う作用、つまり細胞が分裂して元の数を回復するという作用がありますが、その細胞の数を回復させる能力が段々衰えてくる。普通ならばその細胞が死んだことに気づいて細胞が分裂して元に戻すわけですが、どうやらその能力に限界がありそうだということです。このことを我々は細胞老化という名前で呼んでいます。要するに再生能力を失っていくことと細胞が死んでいくことの二つの過程で細胞数が総合的に減っていくということです。今日はこの2つの話をいたしたいと思いますが主に細胞が老化するということを中心にお話します。

細胞が死ぬということに関しましては、ここ10年位非常に盛んな研究が行われてきました。いわゆるアポトーシス(apoptosis)という現象です。ギリシャの大学院の女性にギリシャ語でアポトーシスというのは本当の発音はどうかと聞きますと、アポトーシスというのが正式の発音であるとのことでした。アポトーシスという場合は途中でサイレントのPがあるのですが、それを発音するかしないかと議論したところ、ギリシャではこれは発音しますと言うので、日本ではカタカナでアポトーシスと書いてありますが、私のこれからの細胞死の話に関してはアポトーシスと発音したいと思います。

## 2 平均寿命と最長寿命

日本人の平均寿命をご承知のように、現在女性は84歳付近、男性は76歳付近というように伸びてきますが、これが将来どこまで伸びるのかという問題があります。明治時代は平均年齢40数歳で亡くなっていたものが昭和に入り急に伸びてきました。この主な原因は乳幼児の死亡率の減少です。明治、大正では10人生まれますと、1.5人位が幼いうちに亡くなっていたのが、今では殆ど亡くなくなりました。つまり、乳幼児の死亡率がどんどん減ってきたことが今の平均寿命を押し上げていることになると思われます。

寿命に関するデータを見る時に大切なことは、その信憑性を考慮することです。識字率が非常に高いこと、役場がしっかりしていて、集団の生存を記録できていることです。



Aging in vitro and in vivo  
Kazuhiko Kaji

Laboratory of cell and Molecular Biology of Aging, Department of Food and Nutritional Sciences, Graduate School of Nutritional and Environmental Sciences, University of Shizuoka

すなわち文化程度が高いところで初めて生存曲線を描くことが可能です。コーカサスやアンデスなどで170歳や200歳の人があった、というような新聞記事がでますが、このような辺境における最長寿命の200歳と識字率とは逆相関があります。150歳を越える人、200歳を越える人というのは真実ではないと断言してよいと思います。

18世紀前半のウィーンと20世紀のアメリカの生存曲線を見ますと、200年前の多分ハイドンなどの時代と思われませんが、ウィーンでは乳児の死亡率が非常に高い。10数人子供を産んだとしても満足に大きくなったのは2、3人と言うことがあたりまえであったと思われる。しかし、乳幼児の頃に大きく下がった生存率は、その後は緩やかな下降カーブとなり100歳位まで生存者がいる。アメリカでも乳児の死亡率は少ないのですが、百歳を越える人は滅多にいない。どうやら最長寿命というのは文化・文明が浸透しても一定して動かないだろうということです (Fig. 1)。

ここで大切なことは平均寿命は変化しますが、最長寿命は変化しないだろうということです。最長寿命が変化しないということは、なんらかの意味でプログラムされているだろうと考えられます。これは老化の研究をやっている上では心おだやかなことです。老化の研究をやっている200歳、300歳の方々がたくさん出てくるようになりますと、ただでさえ今問題になっている超高齢者社会を更に推進するということになる。しかし、幸いなことに天寿というのがどうやらありそうだとことです。

97年8月の朝日新聞に122歳の最長寿者ジャンヌ・カルマンさんが大往生されたという記事が載りました。カルマンさんは若い頃にゴッホに実際あったことがあり、ゴッホはいつも酒臭かったと語ったことがあるという内容です。現在のところこの122歳がヒトの最長寿命です。いかに乳幼児の死亡率が減ろうとも今のところ115から125歳位が最長寿命の限界であろうと思われ。人間の最長寿命は種としてこの辺のところに固定されているらしい、プログラムされているらしい。

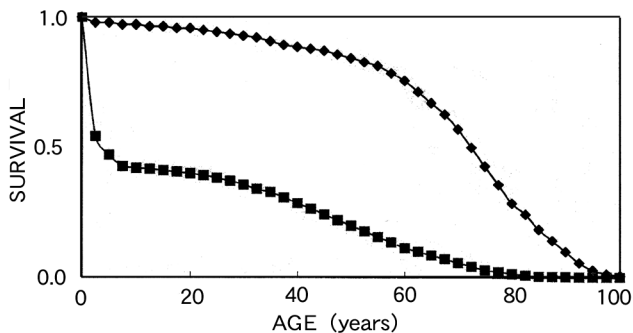


Fig.1 時空を隔てて比較した人の生存曲線

18世紀前半のウィーン (1728 ~ 1739) 「下側の曲線」と20世紀前半 (1973) のアメリカ「上側の曲線」の生存曲線

### 3 老化する細胞

#### 3.1 寿命とは？

私は生物にとって、寿命は第一義的なものではないかと思ひます。寿命がない生物がいてもおかしくないと思ひます。寿命がある生物は寿命がない生物からある時点で寿命を獲得したと考えてよいと思ひます。無生物の寿命を考えてみます。つまり、どの位長持ちするかということですが、トンカチとか鍋とかフライパンというのはまず寿命がないであろう。それに対して我々はパソコンとか自動車などに寿命を感じます。自動車を約10年くらい乗っていますとやはりガタがくるというのは一目瞭然です。生物と無生物を問わず、寿命がないものと寿命があるものの何処に違いがあるか。寿命がないものは単純なつくりである。寿命があるものは複雑な体制をもっている。生物で言えば多分中枢神経系、及び免疫系の発達による中枢支配というものが鍵になるのではないかと思ひます。そのような中枢支配がでてきて寿命が生じてきた。即ち、寿命というのは二義的に生物に備わってきたものである。少し意外なこともかもしれませんが、私はそのように考えた方が寿命というものがとらえ易いのではないかと思ひます。寿命のあるものの特徴は非常に複雑な部品からできているということです。そして、非常に複雑な部品とは細胞動物にとっては細胞ということになります。そのようなことから細胞のレベルでの寿命を考えてみます。

#### 3.2 細胞増殖

細胞の寿命を研究する目的でヒトの皮膚組織を採って培養してみます。数日経ちますと皮膚の組織から表皮細胞(ケラチノサイト)がはいだしてきます(out growth)。さらに一週間経ちますとこのケラチノサイトの上をまたぐようにして、この組織から違うタイプの細胞が出てきます。この細胞が、線維芽細胞(ファイブロブラスト)というものです。これはコラーゲンの産生をはじめ細胞が生存する上で必要な、いろいろな細胞外基質を分泌する役割を果たしている細胞です。なお、培養初期にみられたケラチノサイトは分化し、最後には死んで培養系からみられなくなります。線維芽細胞は他の正常細胞と同様に、必ず堅いガラスとかプラスチックのシャーレの底に貼り付いて増えてきます。シャーレ全面を覆いつくしてしまうと、正常な線維芽細胞の場合は分裂が停止してしまいます。停止した細胞をバラバラにして4つに分けて培養し、1週間経ちますとそれぞれがまた、もとの細胞集団の数になります。つまり、底面に余裕があるうちは細胞が増えて、その間に2回分裂します。これを繰り返すと、その細胞の平均分裂回数を算定することができます。細胞はこの方式で、どこまでも分裂増殖し続けることができるのでしょうか。

#### 3.3 細胞の増殖限界

かつては個体には寿命があるが、それを構成している細

胞には寿命はないということが一つのテーゼとして信じられていました。信じられていたというよりも、その当時の実験的事実に基づいていました。まずはヒール細胞という癌細胞が無限に増えるということが判っていました。ついでパストールの高弟であるカレルは自分が培養している鶏の線維芽細胞は30数年間にわたって分裂し続けているので、個体には寿命があるが、それを構成している細胞には寿命はない、と報告しています。ところが1961年にヘイフリックとモアヘッドが、何回実験をやっても細胞が活発に増える時期とその後分裂能力を失う時期の2つに分かれるという現象を見つけました。要するに正常細胞は無限には分裂できないという非常に奇妙な性質を持っている。これをヘイフリックの限界仮説と呼んでいます。ここで注目すべきことは何回か分裂するとそれ以上分裂できなくなる時期が来る。分裂の回数に限界があるということです (Fig. 2)。約9ヵ月かけた私の実験でも、細胞を採ってきてシャーレに撒いて1週間経ちますと1対4に分割してまた、培養するというのを繰り返しますと、大体最初の内は元の細胞密度まで戻りますが段々と戻らなくなります。つまり増殖能が非常に活発な時期と、その後落ちてくる時期があることがたしかに観察されました。

何回分裂したかということをお我々は population doubling level (PDL) と言います。細胞の年齢が分裂回数で数えられるわけです。TIG3細胞 (ヒト線維芽細胞) で28.3PDLの若い線維芽細胞と80.5PDLの年とった線維芽細胞を比較してみますと、若い細胞に対して年とった細胞は大きくなり、細胞の配向性が乱れてくることなどが観察されます。私達の体の中の線維芽細胞はシャーレの中で50回から100回分裂します。150回とか200回という例はまず出てきません。このようにたいへん意外なことに我々の体の細胞はたかだか50回

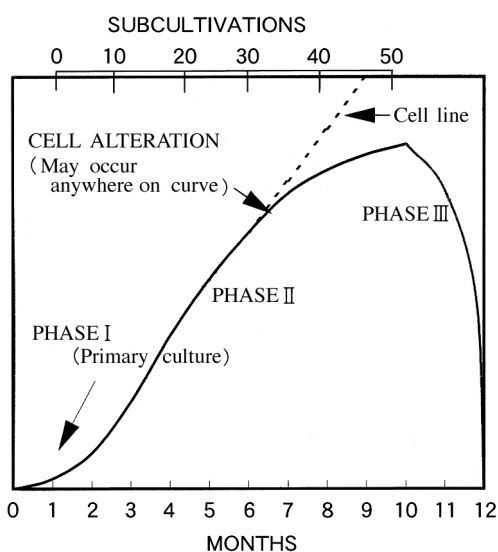


Fig.2 RELATIVE NUMBER OF CELLS

Hayflick, L. &amp; Moorhead P. S.

Exp. Cell Res., 25, 585 (1961)

から100回しか分裂できない細胞であるということです。

### 3.4 細胞寿命の確認

epidermal growth factor (EGF) という細胞成長因子を添加して、細胞を培養すると、EGFを高い濃度加えた若い細胞は非常によく増殖する。一方、62PDLの年取った細胞ではEGFにより増殖は促進されるが、それはわずかである。各年齢におけるEGFの必要量は大体25ng/mL程度である。この至適濃度は若くても、年とった細胞でも同じである。要するに年とった細胞にいくらEGF、細胞性のホルモンを加えても、若い細胞ほどは回復しない。年とった細胞を増殖させる良い薬はない、という非常に悲観的なことが示されています (Fig. 3)。

### 3.5 形質転換する細胞

先ほどのヘイフリックの話で細胞には分裂回数に限界があると言いましたが、癌細胞ではどうか。マウスの線維芽細胞で同じようなことを試みますと、ヒトの場合とは大きく違ってきます。増殖する時期のあと分裂能力を失います。

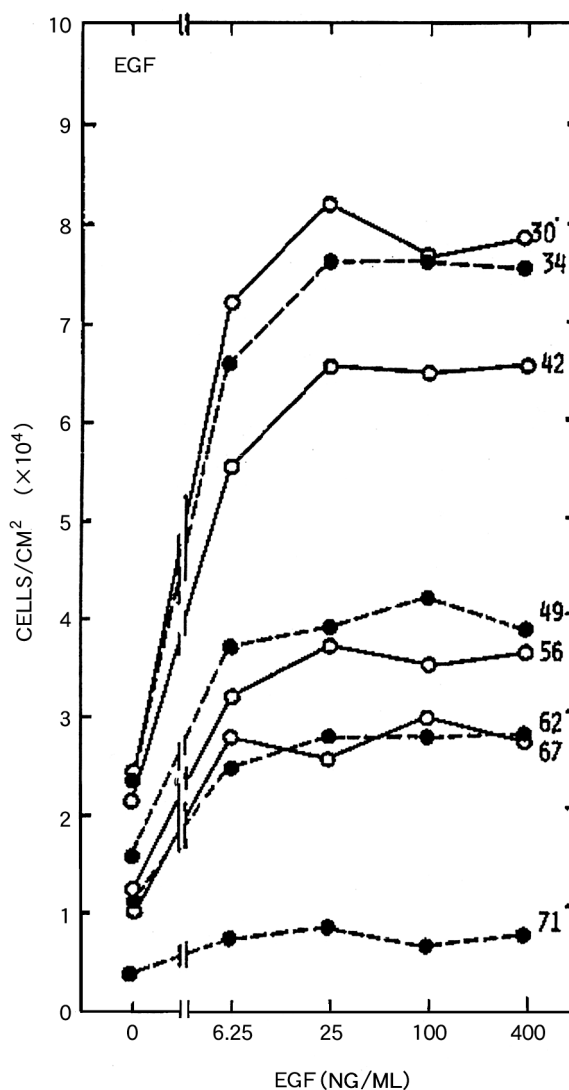


Fig.3 EGF DOSE-RESPONSE CURVES OF WI-38 CELLS

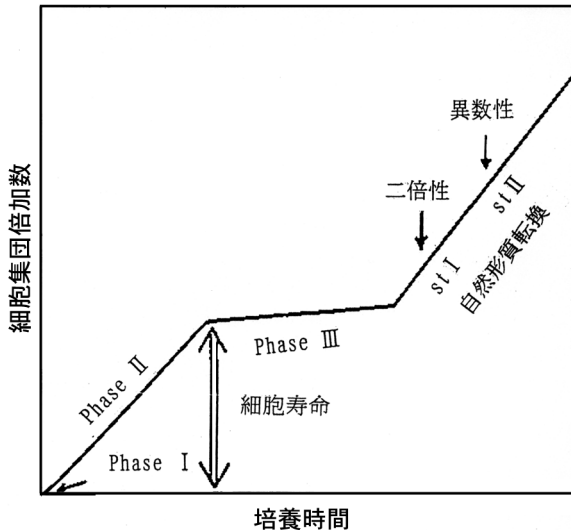


Fig.4 マウス線維芽細胞の細胞加齢模式図

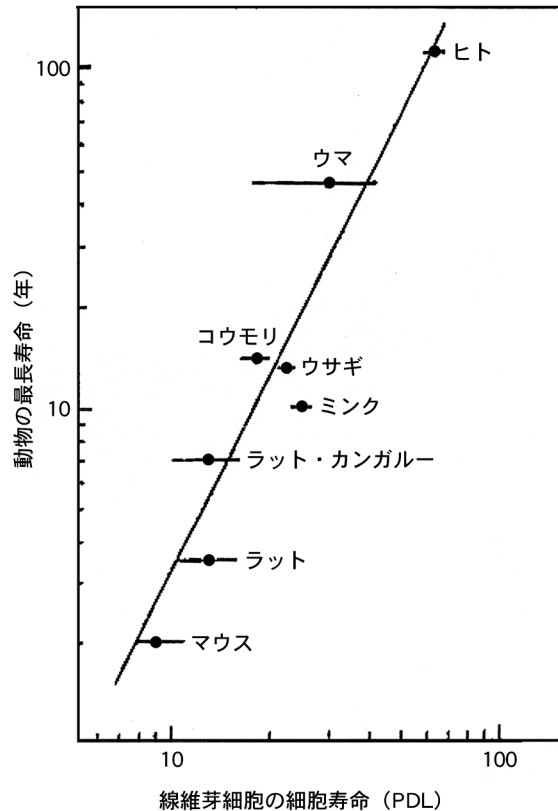
ここまではヒトのそれと同様です。その後、マウスの線維芽細胞はいつのまにか形質転換して癌細胞になります (Fig. 4)。癌細胞はこのように正常細胞が一定の経過時間を通った後に生じる。癌細胞と正常細胞はこの全過程に含まれる。この後でも話が出てまいります、テロメラーゼがこれらの過程のキーになっている。ただ、マウスの場合一旦増殖能力を失った後、又、増殖が再開されるのに対しヒトの場合は増殖能力を失ったら、それっきりで自然には形質転換しない。ヒトの場合、自然には癌化はシャーレの中では起こってこないということです。最初に細胞増殖が停止する分裂回数、ここまで至るものを細胞寿命と定義します。ヒトの場合ですと 50 から 100 回ですから、ヒトの細胞寿命は 50PDL から 100PDL であるということになります。

#### 4 動物の寿命と細胞寿命

##### 4.1 動物の最長寿命と細胞寿命

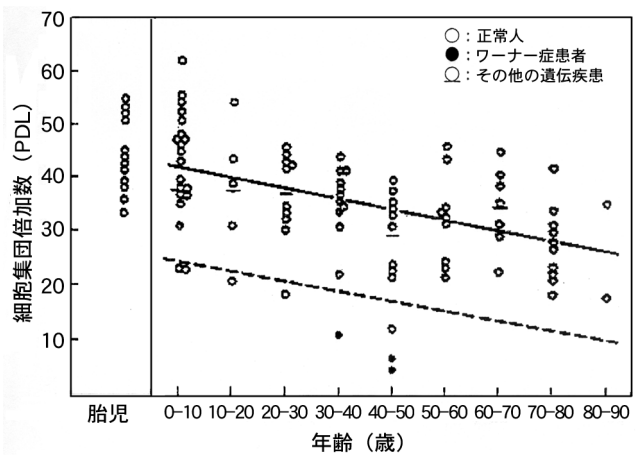
この細胞寿命と個体の寿命がどう相関するかを、横軸に線維芽細胞の寿命、縦軸に動物の最長寿命をプロットして見てみます。例えばヒトでは最長寿命が約 100 歳で、線維芽細胞の寿命は 50 回です。マウスは最長寿命約 3 年で、線維芽細胞はたかだか 10 回位です。他のいろいろな動物、ウマとかコウモリとかウサギについて見てみますと、この線維芽細胞細胞寿命と動物の最長寿命にはなにか相関がありそうだということを、20 年程前にレーメという人が報告しています (Fig. 5)。

また、これは 30 年程前のデータです。高齢に達したヒトから採取した線維芽細胞は、その年齢にいたるまでの 90 年、100 年間に少なからず分裂しているから、分裂する余力がないだろう。したがって、そこから採った線維芽細胞は細胞寿命が少下がっているだろう。実際に線維芽細胞は確かに *in vivo* においても、その分裂する回数を数えていて、年を取ったヒトからの線維芽細胞は有限の回数から今まで分裂した数を差し引いた値がシャーレの中で再現されるという。これは



ROME, D. (1981)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA  
78, 5009-5013

Fig.5 動物の最長寿命とその線維芽細胞の細胞寿命の相関



Martin, G. et al. (1970) Lab. Invest., 23, 86-92

Fig.6 ヒト細胞の供与者年齢と細胞寿命の相関

Martin の仕事です (Fig. 6)。この報告に関しては今から 2 年前に反論が出てきました。いろいろ検討しなければいけない時期にきていますが、今日の話の筋道としてはこのデータが正しいということで先に進めたいと思います。

##### 4.2 老化の横断型研究と縦断型研究

老化の研究には二つのタイプの研究があります。一つは

横断的な研究であり、もう一つは縦断的な研究です。例えばフロリダで一ヶ月の間に人口調査をして老化の研究をします。そうすると結論はこうなります。フロリダは若い時は黒人や白人の肌の色が違う人が沢山いるが、高齢者は断然白人が多い。フロリダは高齢化した人たちが余生を送るところのようです。フロリダにおいて老化を横断的に研究すると、ヒトは若い頃にはいろいろな皮膚の色をしているが、高齢者になると白くなる、というとんでもない結論がでてくる。横断的研究をする場合、時としてこのような間違った結論がでてくる。これに対しては縦断的な研究が行われなければいけません。人の一生は約100年ですが、100年にわたって1,000人以上のボランティアをプールしておいて、各個人における加齢の進行を調べていく。そのような研究がアメリカのボルティモアで、30年前あたりから蓄積されている。日本においてもそのような研究が少しずつ進んでいます。

この縦断型の老化研究の事例をご紹介します。これは92年頃、私が学会に発表し、その内容が朝日新聞に記事として紹介されたことがあるものです。年齢が36歳2ヶ月の人から線維芽細胞を採って、それから約11年強経ってから、もう一回採りました。つまり同じ人の36歳と47歳のところで線維芽細胞を採りました。更に此の人が50代後半になった時点で採取し、現在これを調べています。このように同じ供与者が年齢を経たところでのデータの比較が世界で殆どされていません。36歳と47歳ではどう違うかを見ますと、36歳で採ったものでは66.5PDL、47歳で採ったものでは62.1PDLと11年隔てますと最長寿命に4PDLの違いができました。人の一生は約100年ですから10%程度の加齢進行におけるPDLの変化です。一生の間に40PDL位の変化が期待されます。現在この仕事は20年目にかかっています。

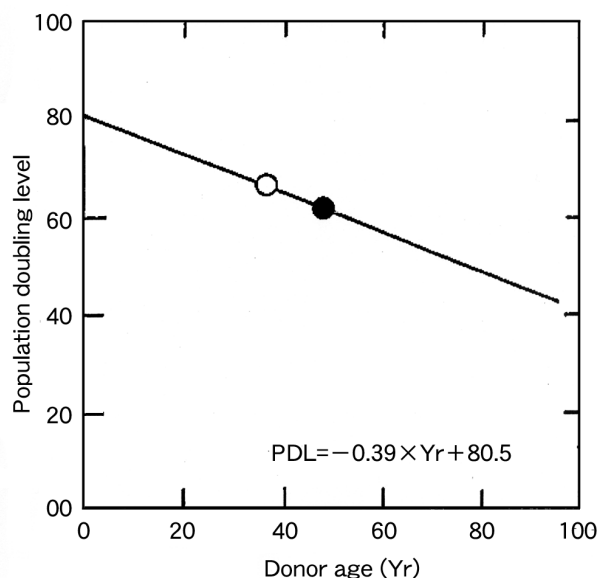


Fig.7 FINITE LIFESPAN OF TWO SKIN FIBROBLAST LINES DERIVED FROM A SAME INDIVIDUAL

この20年間のデータは来年の3月頃には結果がでると思われれます。36歳と47歳のところで何回分裂できるかを見ます。そうしてこれを逆算して、この人が0歳の時にはその細胞は何回位分裂する能力があるのかということ推定しますと、80.5ということになります (Fig. 7)。それで1年間当たりの数値は0.4回という数値がでてきます。現在この人は57歳ですが、あと10年経った時の数値がとれるとこのデータはかなり信用ができるものになってくると思われれます。

#### 4.3 回数券型老化

細胞を20PDL位のところで分裂を止め7ヶ月37°Cで代謝をさせます。分裂させない状態にしますが、長期間(ここでは7ヶ月)分裂させなかったものをまた分裂させるようにします。そうすると分裂回数として貯えていたもの、一種の回数券みたいなものがここで使われる。実際に7ヶ月というシャーレの中での環境においても、分裂回数を保持しているということが判りました (Fig. 8)。これが何を意味しているかということ細胞の老化というのは分裂回数を数える方法で進行している。では分裂回数を数えているものは一体何か。

#### 4.4 テロメア仮説

染色体の両端をテロメア(染色体末端粒)といいます。テロメアは最近良く話にのぼるものですが、生物学辞典などを開きますと、もうかなり古い時期からテロメアというものが知られていて、その頃はテロメアという名前ではなく、染色体の末端の構造、染色体末端粒という名前が出ています。この両端の同じ構造のものを実際にDNAの配列を調べてみると実はTTAGGGという6つの塩基が繋がったものの繰り返し配列になっているということが判ってきました。ヒトの場合にはこれが約2,000個位繋がっています。

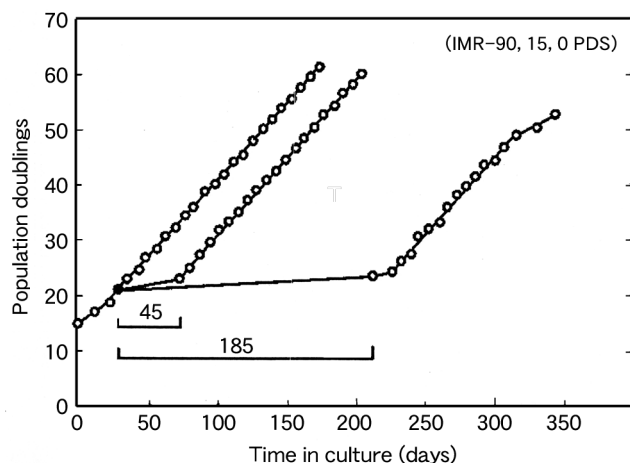


Fig.8 CUMULATIVE POPULATION DOUBLES OF HUMAN FIBROBLASTS AFTER RESING FOR 45 AND 185 DAYS IN CONFLUENT STATE

これが染色体上で見られる繰り返し配列ということで回数券に相当するものと思われます。

TTAGGG、TTAGGG の繰り返し配列があると、これが分裂するたびに一定の数で脱落していく。即ち老化が進行するに従ってテロメアが回数券がちぎれるように減っていく。そして、ある程度減ったところで細胞が老化してしまうという考えが出てきた。これは大体 1990 年からここ 10 年位の間でしきりに論議されてきています。

実際に我々はテロメア、つまり、この TTAGGG の配列が短くなっていくのかどうかをサザンブロットという方法で調べました。老化が進むにつれて、このバンドの重心が段々小さくなっていくのが認められます。細胞が老化するに従って、テロメアが小さくなっていくことが確かめられました (Fig. 9)。

つまり、先ほどの 36 歳と 47 歳の人のテロメアの長さを見ますと、14kbp という長さから 8kbp 位の長さまで下がってきていることが確かめられて、DNA の中でテロメアが確実に短くなっていくことがわかりました。今のところ DNA レベルで加齢にともなう変化としてはテロメアだけが知られています。

テロメアが短縮することによって細胞が老化する。つまり回数券が少なくなる。回数券を自分で作り出したらどうなるか。そういう機構が誘導されると癌化に至る。癌化するときは、テロメアを元に戻す酵素というものがあって、テロメアの長さを元に戻してしまう。即ち、テロメラーゼがあると死なない。これが富士山の煙ではないかということです。しかし、このテロメラーゼが誘導されると正常細胞でも癌になってしまうわけですから、その辺は難しい話です。

癌細胞になった場合のテロメアはどうなっているのか。ところどころに、とんでもなく長いテロメアが出現することが観察される。即ちこの細胞の中ではテロメラーゼが活性化されていて、ある種の染色体においては非常に長くなってしまふ。癌細胞ではこのように異常な長さのテロメアが観察されます。

## 5 細胞寿命に影響を与える因子

### 5.1 テロメア短縮の要因

細胞老化はテロメアが短縮することによって起こる。分裂するたびにテロメアが短縮していく、ということからテロメアは細胞老化の時計の役割をしているのではないかと最近いわれている。さて細胞の時計はコチコチと時を刻むので、私たちの人生の長さというのはいかんともしがたく運命的なものである。年齢がくればそれでパツといくということになり、なんの取柄もない。しかし、現在私が関心を持っているのは、このテロメアが短縮する時に環境因子がテロメアの短縮速度に影響を与えているのではないかとということです。その環境因子として代表的なものは活性酸素に代表されるもの。また、細胞の中にあるサイトカインとか growth factor によってその短縮率が変わってくる可能性があるのではないかと。つまり、短縮速度に環境因

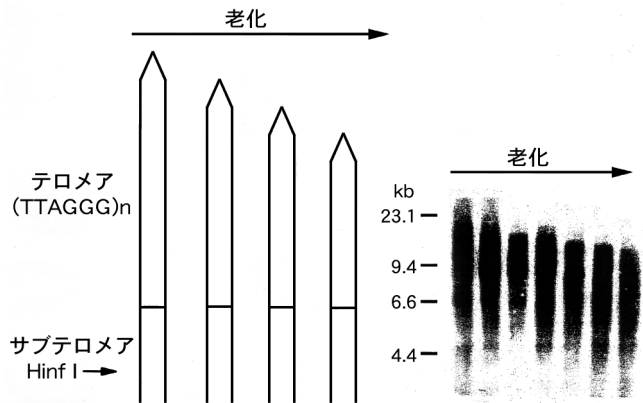
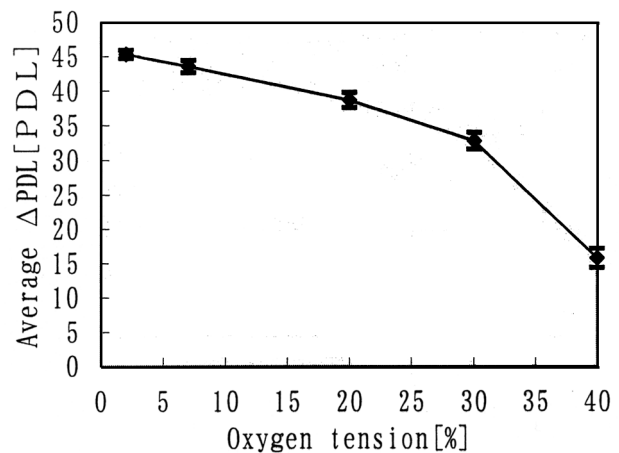


Fig.9



Cell Lines	Δ PDL	Average
2%	1	46.6
	2	44.2
	3	45.0
7%	1	43.9
	2	45.2
	3	41.4
20%	1	40.0
	2	36.0
	3	39.8
30%	1	32.5
	2	30.5
	3	35.1
40%	1	18.7
	2	15.1
	3	13.3

WI-38 (started at 18.3PDL)

Fig. 10 WI-38 細胞の細胞寿命に及ぼす酸素の影響

子とか生体内にある因子が関係している可能性があるのではないかと。これは、

実際に我々は線維芽細胞ではないのですが、人の正常上皮細胞に TNA- $\alpha$  (tumor necrosis factor) というある種のサイトカインを加えて調べて見ますと、コントロールに対して、TNA- $\alpha$  100U 添加では寿命が短縮します。そして、

テロメアも早く短縮される。一回あたりの分裂について TNA- $\alpha$  があると短縮が非常に早く進むということが判りました。ちょっとこれは意外な結果でした。

## 5.2 酸素分圧の影響

次に酸素分圧の話をしてします。線維芽細胞を普通の酸素分圧で培養したものと、40%で培養したものを調べますと、通常のものでは60PDL付近までいきますが、40%では、それが30PDL強で終わってしまう。高い酸素分圧では細胞寿命が短くなる。酸素分圧2%、7%、40%で培養したものを比較すると酸素分圧が高いところでは速やかに寿命が短くなるということがわかりました (Fig.10)。現在このテロメアの長さを測定しているところです。同じようなことが平滑筋細胞 (smooth muscle cell) でも言えて、酸素分圧2%で培養したものでは一回の分裂に関してテロメアは約80 base pair (bp) 落ちますが、酸素分圧が高くなると、その倍以上の速さで落ちる (Fig.11)。要するに酸素分圧が高いところで生活していた細胞は倍の速度で老化するということが判りました。このようにテロメアは老化時計ですが、その老化する速度は、その環境因子によって大きく変化する。果たして環境因子によって、これだけ大きく変化するものを本当の細胞時計といって良いのかどうかということも逆に問題になってきます。テロメアは必ず一方的に短くなりますが、短くなりかたは環境因子によってかなり変わり得ることが示されました。

## 5.3 長波長紫外線を起因とした影響

次は皮膚の老化の話になります。ご承知のように太陽光線のうちUV-Aが90%占めています。UV-Aを照射することによって細胞にどのようなダメージが出てくるのか。実際に人の皮膚由来の線維芽細胞にUV-Aを当てて老化を見てみました。UV-Aが照射されると、活性酸素が発生しますが、この活性酸素のうちどれが一番有効であろうか。活性酸素というのは種類の酸素ではなくて、いくつかの種類がある。シングレットオキシジェン (singlet oxygen)、super oxideそれからH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、hydroxy radicalなどあります。UV-A照射によって、どれが大きな影響を与えるのかというのを我々はここ数年検討しています。

UV-Aで何が出現してくるのか。それを特定する目的で、細胞にUV-Aを照射すると同時に幾つかの薬剤を加えて実験しました。例えば、ヒスチジンを加えますとsinglet oxygenがスカベンジャーとして働きます。それからD<sub>2</sub>O (重水) はsinglet oxygenの寿命を延ばすことに注目しまし

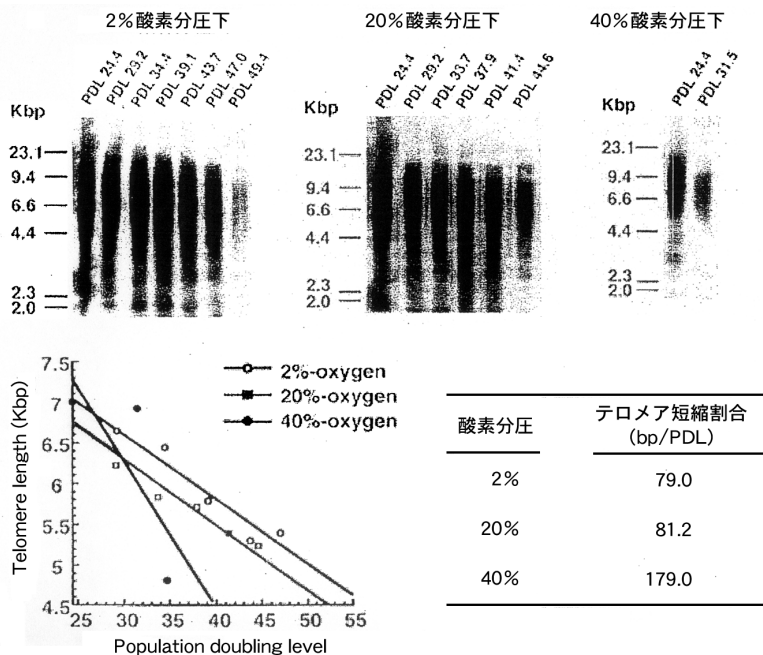


Fig.11 ヒト平滑筋細胞の細胞老化—酸素分圧の影響—

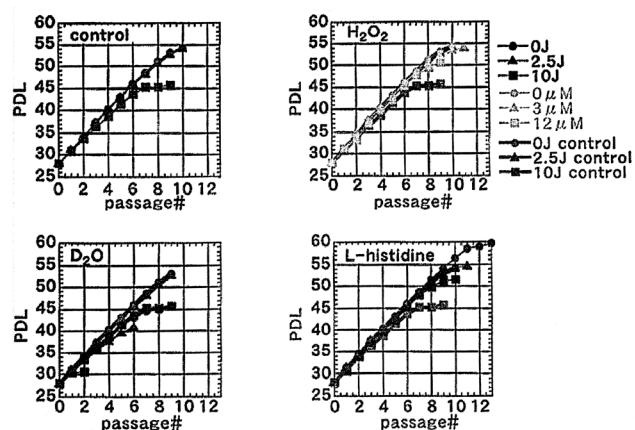


Fig.12 細胞老化におけるUV-Aと薬剤処理の影響-1

た。また、ローズベンガルですが、ローズベンガルというのはUV-Aとは関係なく普通の可視光を当てるとsinglet oxygenを発生します。この3つに注目してみました。

UV-Aを10J当てると、細胞寿命が短縮します。その時に重水(D<sub>2</sub>O)を加えておくとより早く老化します。D<sub>2</sub>Oというのはsinglet oxygenの寿命を延ばすものですから、そのD<sub>2</sub>Oによってsinglet oxygenによる老化がより促進されることが期待される。結果は予想通り短い細胞寿命になってきた (Fig.12)。このことからUV-Aを当てることによる寿命短縮の主な原因は多分singlet oxygenであろうということが推定されました。また、UV-Aを当てるのではなくて、単に可視光をあてることによってローズベンガルがsinglet oxygenを出すので、実際にローズベンガルを加えて、光を当てて培養すると細胞寿命が短くなります。その時にヒスチジンを入れておくとこの作用が消えて、ヒスチジンによってsinglet oxygenによる細胞短縮が抑制され

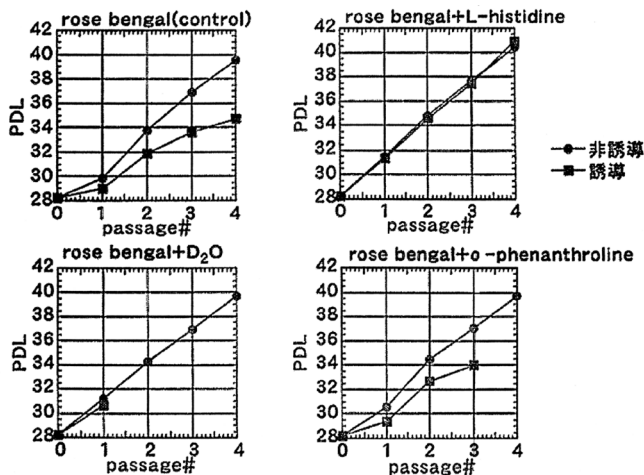


Fig.13 一重項酸素の細胞増殖阻害と薬剤処理の効

る。つまり、rescue作用があるということがわかりました (Fig.13)。ローズベンガルに更に先ほどの singlet oxygen を長期に保たせる D<sub>2</sub>O で行なうと速やかに老化してしまう。現在のところ UV-A による寿命短縮というのは、それから最終的に得られる singlet oxygen が原因物質であるということが考えられています。その中で L-ヒスチジンという単純なアミノ酸が UV-A の細胞障害を回復させるということがわかりました。

## 6 細胞のアポトーシス

それでは次に細胞のアポトーシスの話に移りたいと思います。加齢が進むにつれて心臓病と脳血管病が増えてきます。即ち、我々の体の中で一番老化のペースメーカーになりうるものは血管の内皮細胞であろう。ということで血管の細胞の研究も進めています。我々の個体というのは表皮の部分の細胞群、それから一番内側にある血管の細胞がある。我々の体の老化は外側から皮膚の老化としてわかるし、内部の老化というのはこの内皮細胞が担っているのではないか。

まず我々はヒト、へその緒の静脈内皮細胞を単離しました。この内皮細胞を培養するためには、ある種の growth factor が必要です。この growth factor を除くと細胞は死んでいきます。growth factor によって細胞が死んでいくということは、実は奇妙なことです。本来 growth factor がないと細胞は増殖を停止するはずですが、今回の場合この growth factor は生存因子としても働いているらしい。この死ぬ機構を調べて見ました。

今から8年前の92年頃、丁度アポトーシスの研究が出始めた頃のことで、アポトーシスの論文は今では年間に非常に多くのペーパーがでていますが、その時代では Apoptosis is not general といわれるくらいにとりあげる研究者も少なかったようです。

内皮細胞の培養系から growth factor を除くと4~6時

間で細胞が浮いてきて、アポトーシスを起こす。つまり細胞が死んでいく。同時にヌクレオソーム単位の切断が進行する。これはアポトーシスを起こしているものに特徴的にみられるものです。即ち内皮細胞はある種の growth factor がないと生存できないということです。

これは一つの典型的な例です。内皮細胞は培養系で growth factor を必要とするが *in vivo* ではどうか。実際に我々の体の中で内皮細胞に生存因子を出しているのは近接している smooth muscle cell であろうと思われます。2つのタイプの細胞があった時お互い同士が相手の細胞に対する生存因子を出し合って、相手がいることを確認してお互いに生きるといふ。こういうネットワークが生体の中に起こってくるのではないかと考えられます。例えば神経細胞と末端の筋肉であるとし、神経繊維を切断するとこの神経細胞は標的細胞から生存因子を得られなくなる。それによって死んでいく。即ち、筋肉が生存していれば神経細胞の生存を促すためにある growth factor を得ることができる。具体的には何かと言いますと nerve growth factor が筋肉で作られて逆輸送される。したがって、ここを断たれた神経細胞はアポトーシスを起こしていく。逆も真なりということになると思われます。このようにして体の中では、様々な growth factor が生存因子を通してお互いに生存を助け合っているということが言えます。

## 7 これからの生命科学

21世紀を迎えるということですが、これからの医療の分野、さらにはコスメトロジーに関して、栄養学に関しても重要な二つのフィールドがあります。その一つが現在ポストゲノム時代と言われていること。もう一つはクローンによる再生医療です。ポストゲノムに関してはご承知のように、ヒトのゲノムが全て解ったということです。このゲノムを用いて何が出来るか。これにはDNAの問題と遺伝子発現の問題の二つがあると思います。DNA自身の方ではDNAの多型、個人毎に違った遺伝子を持っているということからオーダーメイドの化粧品、オーダーメイドの薬というような方向性がある。さらに生まれた後に somatic mutation、突然変異(体細胞突然変異)が起こります。癌の患者さんのDNAのエラーの部分は癌毎に特異的です。こういう具合にポストゲノム時代の一つの方向性としては、DNAを研究しようということです。もう一つは更に同じように大事なことはDNAがどういう環境で発現するか。gene expressionの問題です。ご承知のようにポストゲノム時代の非常に有効な機械としてDNAチップとかDNAアレイとか言われるものが、現在動いています。これは今のDNAの問題と、gene expressionの問題の両問題を解くための素晴らしい装置です。ポストゲノム時代はこの2つの方向で暫くいくのではないかと思いますし、病気の方に

関しましても、化粧品に関しても、栄養に関してもオーダーメイドのものが追求されてくるであろう。一方環境因子、例えば光が当たった場合とか、酸化ストレスがあった場合に、どのようなゲノムが動いていくのかということ。すなわち gene expression の問題です。

それと同時に現在、とんでもないことが起こった。いわゆるドリーの事件です。大人の細胞からベビーが生まれたということです。これで話が終わりになるかと思っていたのですが、ここ2年位の間に大きな変化がありました。我々には多分化能を持っている細胞が骨髄に大部分揃っている。骨髄細胞の中には、心臓の細胞にもなれば、肝細胞にもなる、膵臓細胞にもなる。そういうものがワンセット揃っているということがわかってきました。恐らく医療の分野でこれを利用した再生医療、このような我々の体に含まれている、多分化能の細胞をいかに利用していくのかということが大きな問題になってきています。今のところ、皮膚の火傷の治療の分野では既に行われている。しかし、これを視野に入れた日常生活、即ち化粧品にしる、栄養学にしる、これから大きな問題になってくる可能性があるのではないかと思います。医療の分野はポストゲノムの話と再生医療のこの二つの二本立てが大きな車輪になって暫く進むのではないのでしょうか。コスメトロジーにおいても、これは避けて通れないことではないかと思いますし、大きな期待が寄せられるところではないかと思います。

最後に話の締めくくりとして、超高齢化の時代になり、これからどのような生き方が求められるか、を考えてみます。島崎藤村の随筆集を読んでいて、面白いことが書いてありました。彼は老化に関心を持っていて、100人のうち99人は朽ちる、老衰する。しかし、100人に1人だけは朽ちない、老成する。老衰と老成は全然違うんだという話を書いています。いかに我々が老成していくことができるのかというのは、多分これは遺伝的な問題ではなくて、むしろ技術的な教育的な、というかテクノロジーの問題ではないかと私は思います。現在75歳を越えた人の中でよく話になるのは、老人が老人を支えるということだと言われています。75歳を越すと老成した人と老衰した人がはっきり分かれてきて、老成した人が老衰した人を助けるということ。老人同士が助け合うようになってきているそうです。いかに老成していくかということが重要で、大きな問題と思われれます。一昨日、聖路加病院の名誉病院長の話がありましたが、この方は85歳を超えて今なお名誉病院長であり、平均睡眠時間は5時間、しかも分刻みで実際の医療活動をしているという正に老成した人の典型です。これからは、いつまでも若くということではなく、年とった人には年とった人なりの文化を深めていき、老成という1つの技術を開発することが、これから非常に大事になってくるのではないかと思います。

# コスメトロジー研究雑感

平成 10 年度 研究助成

## コスメトロジー雑感

江口 正

本研究で行ったのは、報告書にも書いたように古細菌という少し他の生物とは違った生き物（細菌）の細胞膜脂質の基礎的な研究です。この変わった生き物は、例えば温泉、海底火山の噴出口付近などの普通の生き物が住んでられないような pH が 1 や 2 という高い酸性度や沸騰水温度近くの環境に暮らしているものもあります。その細胞膜は基本的にはリン脂質ですが、少し他の生物のものとは化学的に構造が異なります。ご存じの通り、レシチンに代表されるリン脂質は、界面活性機能に優れ、保水剤、乳化剤、乳化安定剤やリポソーム剤として使用されていますが、古細菌のリン脂質はその生育環境を考えると、高温や乾燥など厳しい下で安定した機能を保持する化粧品基剤として注目すべき新素材になるのでは無いかと考えたのが本助成研究のきっかけです。

古細菌の一群であるメタン菌は、炭酸ガスを炭素源として成育し、メタンを発生します。そのリン脂質がうまく使えることになれば、有用なリン脂質をつくりながら地球温暖化の原因となっている炭酸ガスを消費し、出てきたメタンは（これも温暖化の原因となりますが）、もう一度燃料としてエネルギーを取り出し、炭酸ガスにし、リサイクルできると考えられます。本研究の結果は、直接すぐにコスメトロジー分野に還元できるものではなかったかもしれませんが、21 世紀に向けて地球環境に優しい物質生産への夢は広がっていきます。

最後に、本研究に当たり多大なご支援をいただきましたコスメトロジー研究振興財団に厚く御礼申し上げ、この拙速な文を終わらせていただきたいと思います。

(東京工業大学大学院理工学研究科)

平成 10 年度 研究助成

## コスメトロジーと海外協力

近藤 隆一郎

私は、現在九州大学農学研究院（組織改革でこのような名称になりましたが、実質的には農学部）の森林資源科学部門に所属しております。本財団の研究助成を頂いた時は、農学部林産学科の所属で、林産物をいかに有効に利用するかが、研究の主体となります。樹木成分は、化学的にはセルロース、ヘミセルロース、リグニン及び抽出成分に分類できますが、主成分であるセルロース、ヘミセルロース、リグニンは、針葉樹と広葉樹で組成や存在量に違いがありますが、同じ広葉樹であれば、個々の樹種で大きな違いはありません。一方、抽出成分は樹種により、組成も含量も大きく異なり、ケモタキソノミーとして分類学としても利用されており、言わば“樹木の顔”と言えます。

世界の森林面積の 40～50% は熱帯林であり、特に熱帯多雨林は蓄積量も多く、かつ構成樹種が極めて多種多様であることを特徴としています。これらの樹種の特徴は、化学成分的にみると、微量成分である抽出成分の量的、質的な大きな変異としてあらわれます。即ち、熱帯樹木抽出成分は、有用成分の宝庫であり、興味ある成分が見いだされ

る可能性が極めて高いのです。

私はこれまで、国際協力事業団や大学間拠点校プロジェクトなどで、パプアニューギニア、インドネシア、タイを訪問する機会を得ました。各国では、まず現地の研究者とその国で伝統的に美白や育毛効果があると伝えられている、天然物を入手するとともに、色々な樹種の抽出成分を集めます。それらを材料として、有用成分のスクリーニングを行う訳ですが、その作業は共同研究者に私どもの研究室に来ていただき、日本で行います。このような研究の結果、天然物より、いくつかの美白効果が認められる化合物が見つかってきました。これらは、言わば海外の諸国が有している貴重な遺伝子資源です。これまで、先進国が行ってきたような独占は許されません。今回の助成金も、広い意味での海外協力に利用させていただきました。今後も海外の研究者と協力しながら、貴重な遺伝子資源の機能を明らかにしていきたいと思っています。

(九州大学大学院農学研究院)

## 妻から学んだコスメロジー

森島 直彦

私の年代の男性がもっている化粧品に対するイメージ、知識、関心、利用度などは、どれをとってもおよそオソマツなのが普通であろう。私より13歳年下の妻は、「女はいつも美しくなければいけない」という考えの持ち主で、実際外出時など化粧をきちんとすると確かに美しかった。当初、私は様々な化粧品を塗って化けることが化粧と思っていたが、折りにふれて妻の化粧品を見ているうちに、しばしば、「moist……」「hydro……」などの言葉が使われていることに気付いた。土台の表面が粗悪であれば化粧品はきれいにのらない、つまり塗装と同じ（失礼！）ではないか、とも思った。すなわち、美しくなるためには皮膚の

ケアが必要不可欠であることを理解した。

あるとき、私の研究パートナーでもあった妻は、「これから新しいプロジェクトを始めるなら化粧品ね、何か思いつかない?」「地球上に女がいる限り、化粧品は生きていくのよ」と言った。丁度その頃、貴財団の研究助成のポスターを目にし、フッ素化糖の研究で学位を取得した妻は、ためらわず私に応募を薦めた。今は向こう岸から静かに見守ってくれている妻と助成金を交付して下さった貴財団に感謝しながら、今後もコスメロジーに関する研究を続け、発展させていきたいと思っている。

(北里大学看護学部)

## 21 世紀のコスメロジー

都甲 潔

今回、私どもの研究「匂いの感性計測を行うセンサーシステムの開発」へご支援下さり、貴財団に厚くお礼申し上げます。おかげさまで、1年間無事に研究を走らせることができ、その成果を近いうちに発表できる段階になっています。この「コスメロジー雑感」を書くにあたり、cosmetology の語源を調べてみました。ギリシャ語のcosmos に由来すること。混沌 (chaos) の中から生まれた秩序ある宇宙 (cosmos)。どうやらコスメロジーとは、宇宙に世界に、そして個人に秩序を創りあげる自己組織化 (self-organization) の学問と理解できそうです。

コスメロジー研究振興財団のパンフレットを見ますと、化粧品は約7万年前の旧石器時代から存在していたとのこと。想像がつかないほどの大昔です。そのころの人類は、今の私たちとは「生きる」という根元・目的は同じだったとしても、ものに対する具体的価値観や生き方は異なっていたはずで

色を塗るといふこと、匂い (香り) を放つといふこと、これは個体と個体の最も生物的ともいえる古今東西共通のインターフェイスなのでしょう。そして、私たち21世紀に生きる人類は、これを科学の言葉で昇華させ、さらに高次の文化を築こうとしているように思います。

21世紀は、情報技術をもとに人の医 (衣)・食・住の向上を目指す総合科学-ヒューマン・インフォマティクス (Human-infomatics) - が花開く世紀です。その中核をなす学問がコスメロジーです。何となれば、コスメロジーは人の感性、本質に迫る学問だからです。

本研究を通じて、人の生物としての本質、また万物の尺度としての人間の本質について思いを巡らすことができました。もちろん、当初の目的であった匂いの感性計測に向けて大きく前進することができました。貴財団のますますのご発展をお祈り申し上げます。

(九州大学大学院システム情報科学研究院)

平成 11 年度 研究助成

## 人生の節目にするために

阿部 正彦

私は、この助成金採択の連絡を、名古屋の病院で聞く羽目になった。希望が叶ってうれしいと言う想いと、採択された研究が遂行できるのかという心配が交錯していた。遠くで誰か自分の知らない人を呼んでいるかのような錯覚から自分のことを呼んでいる執刀医であることに気付くまでそんなに時間はかからなかったような気がしていた。5時間以上の手術後、看護婦さんからリハビリは2週間後から行いますと言われたとき、横になっているのは確かに事実だがこんなに意識がはっきりしているのに何を言っているのか当初は理解できなかった。両手両足をベットにくくりつけられて2夜が過ぎ、頭の向きを替えたとき、天井が回るのを体験したとき、事の重大さに気が付いた。リハビリという言葉が重くのしかかり、ついに不自由な体になって

しまったかのがっかりした。・・・時間が過ぎ、幾つかのリハビリのメニューも順調に消化し、目眩もなくなり、1ヶ月も経とうとするとき、親友達の計らいで慎重に自宅に戻してもらった。寝るのが仕事の生活が1ヶ月程過ぎ、散歩を30分、1時間、1時間30分と徐々に増し、3ヶ月後には無理をしなければ通常の仕事ができるまでになった。でも、尋ねられるたびに全快しましたと言いながら、自分では完全でない想いが長い間していた。半年が過ぎ、8ヶ月が過ぎようとするとき、体重も増え、本来の自分を取り戻したような気がする。締め切りが近づいて原稿を書いている今、繰り返すことがないように、また健康であることの大切さとコスメトロジーとの関係を、改めて考え直しているところである。(東京理科大学理工学部)

平成 11 年度 研究助成

## コスメトロジー雑感

梶内 俊夫

この度、貴研究振興財団の研究助成をいただきました。心からお礼申し上げます。全くの私個人つきましては、コスメティックとかコスメトロジーというものは一切関係ないものと思っていました。愚妻も私の方から「少しは美顔術でも施せ、それが亭主に対するサービスだ」といっている位ですから、我が家の洗面台の周辺で目につくのは、歯磨き道具と髭剃り一式といったところです。それでも、シェービングクリーム、白髪を若干緩和させるヘヤクリーム、女房の口紅、洗顔クリーム程度はあります。業界の皆様、申し訳ありません。そんな私が助成金をいただけただのですから恐縮する次第です。

そもそもは、廃棄されている有機物の有効利用が大切だ、として、セルロースの酵素分解のための修飾酵素の開発を細々とやっておりました。研究室の学生(当時)がキ

チン、キトサンをやってみたいというので、それでは生理活性のある適当な糖数のオリゴマーだけを効率よく生産・分離できるプロセスを開発しよう、というのが発端でした。そのために、アセチル化度を種々調整したキトサンと修飾酵素の特異性を組み合わせた反応分離場の構築を行っています。また、適当な分子量に調整したオリゴマーに種々の官能基を導入して界面活性効果を向上させた新規の界面活性剤の開発も同時に行っています。一部の界面活性剤については抗菌性のテストも続けています。最終的には、我々の開発したものが、化粧品の構成物質の一つに加えられて、女性(男性でもいいのですが)をますます健康で美しくするのに貢献できればと夢見ております。

(東京工業大学大学院理工学研究科)

## 刺青考

小野 友道

刺青も Cosmetology の対象であろうか。その身体に対する修飾、その目的、あるいは社会との関わり、それらはやはり Cosmetology の分野の課題を提供するであろう。

子どもの時、鉛筆の芯で手の甲を刺し、その鉛が皮膚に残存したかわいい小さな思い出の刺青から、背中一杯の“くりからもんもん”刺青まで、刺青は広く、深い。

あの『魏志倭人伝』にも倭人に入れ墨があることが記載され、そのことによって、その資料の価値が存在するときに言われている。このように古くからある刺青は、なお今日も大いに親しまれ、例えば、アメリカのプロバスケットボール選手の逞しい腕にはしばしば刺青がある。子供達が刺青に憧れるのも無理はない。今の時代、ファッション感覚で刺青を入れる若者達にそれを禁じることは恐らくできない。

しかし、刺青は一度入れると、その除去は極めて困難で

ある。また高校生達がお互いに針などで刺青を入れると、感染を起こす危険性がある。

それで、一方でシールを貼ったりする“一過性刺青”がある。また HENNA の色素を用いて描かれた刺青(?)がある。いずれも本格的に施行すると、極めて刺青的である。このような「消える刺青」は、それこそファッション感覚で楽しめる。腕に痣などがある子どもに、彼らの好きなデザインの「消える刺青」でカバーすることも考えられる。小さな手術の後、日光に曝されるのを防ぐための、サンスクリーン剤入りの「消える刺青」はどうであろうか。あるいはピアスやイヤリングの代わりになりはしないか。いっそ、Cosmetology の分野で、質の良い副作用のない「消える刺青」を開発・販売してみたいかがであろうか。その用途は意外に広いのではないだろうか。若者の刺青流行を案じる余りの愚見を述べた。(熊本大学医学部)

## 活性酸素とCosmetology

小澤 俊彦

COSMETOLOGY の第8巻を拝読いたしました。素材・物性に関する分野、生体作用・安全性に関する分野、精神・文化に関する分野と Cosmetology に関する研究分野が極めて広いことをあらためて認識いたしました。また、それぞれに Cosmetology の捉え方が異なり、この面からも Cosmetology 研究の広さを理解した次第です。我々の研究も皮膚に対する放射線や紫外線の障害機構に関する研究の一端を担っており、前記の分類では生体作用・安全性に関する分野に属すると考えられます。

紫外線が皮膚に照射されると多くの場合、一重項酸素が皮膚表面で生成されることが報告されています。我々は、この一重項酸素が細胞障害性の高いヒドロキシルラジカルに変わることを明らかにし、その機構を推測しました。この結果は、紫外線照射に対する皮膚障害の防御には一重項酸素捕捉剤だけでなく、ヒドロキシルラジカル捕捉剤も必要であることを示唆するものであります。従って、スキンケアを考えた化粧品にもこのような捕捉剤を加えると一層

効果が高いのではないかと考える次第です。

一方、放射線ですが、我々が通常自然界から浴びている自然放射能(年間2.2mSv)では恐らく皮膚にはほとんど影響しないのではないかと考えられます。しかし、がん治療などで放射線を用いる時に、場合によっては放射線皮膚炎(線量が低いときには、発赤、軽い痛み、かゆみなどが、高い線量になるとびらん、潰瘍、色素沈着、色素脱色など)が起こることが知られています。この原因も活性酸素・フリーラジカルの生成による可能性が推測されていますが、未だ実証されていません。今後は更にこの面でも研究を遂行して放射線皮膚炎の防御などを目指して行きたいと思っております。我々の研究が少しでも Cosmetology の進歩に役立てれば幸いです。

最後に本研究の遂行に多大なご支援を賜りました Cosmetology 研究振興財団に深謝いたします。

(放射線医学総合研究所)

## コスメトロジーの観点から見た私の研究展開

秋山 真志

今回助成金を頂き有難うございました。助成金によって行いました研究は皮膚の一番表面にある細胞層、角層の角化細胞が形成する厚い細胞膜、cornified cell envelope についての研究です。この細胞層は、人間の体のなかで一番外側にある部分であり、常に外界と対峙し、外の環境の変化に対応しながら、人体の内部環境を一定に保つために働いているわけです。そのように考えますと、脳細胞も、肝細胞も重要ですが、この角層の細胞も結構重要な役割を担っているわけです。そして、報告書に詳しく述べましたが、その角層の細胞のはたらきのために重要な構造の一つが cornified cell envelope です。化粧品に期待される働きの中で重要なものの一つに、肌の質を改善するということが挙げられます。つまり、きれいな肌、良い肌を手に入れるということでしょうが、この「肌の質」という曖昧で、時に主観的で、漠然としたものを規定する要素には本当に多くのものが含まれていると思います。しかし、間違いなく

言えることは、皮膚の最表面の角層の細胞の性状が「肌の質」に重要な影響を与えるであろうと言うことです。この角層の状態を左右するものにはいろいろとありますが、例えば、角層内の脂肪成分の組成、水分量、pH バランスや角化細胞自身の接着能、強度などが考えられます。これらのたくさんの要素がお互いに影響しあって、角層の状態を決め、最終的に肌の質に影響を与えていると考えられています。確かに最近注目されているように、角層内の脂肪成分の組成や pH バランスも、非常に重要な要素ではあると思います。しかし、角層の細胞の強度や接着能、さらに細胞の形そのものに微妙な影響をあたえる角化細胞の肥厚した細胞膜 (cornified cell envelope) も忘れてはならない肌の質の決定要素であると予想されます。今後、この cornified cell envelope をターゲットにした化粧品が出来てくるのも、もしかしたら、そう遠い話ではないかもしれません。

(帝京大学医学部附属市原病院)

## 私のコスメトロジー観

佐々木 均

皮膚は体を保護するコンテナであり、固いバリアーを構成し、体の中の水分が蒸散するのを防ぎ、外界からの細菌や化学物質の侵入を防ぎます。一方、皮膚は体温を調節し、呼吸とともに、外界に対する感覚器官として働いています。外界から身を守り、外界の状況を鋭敏に把握するために、人間はワニのように硬くなく、くらげのようにやわらかすぎない、固い柔軟な皮膚を進化の過程で手に入れることに成功したわけです。一方、みずみずしい皮膚は年齢とともにしわが寄りシミができて変貌してしまいます。このため、既に紀元前の昔から美顔術が行われていたそうです。

薬学の分野から皮膚を扱ってきましたが、まず、薬や化粧品の成分の透過バリアーとしての角質層に興味をひかれました。皮膚最外層の角質層は、細胞から核が抜け、脂質と高分子の塊となって堆積する生命のない鏡のイメージを持っていました。薬の皮膚内挙動を計算し、さまざまな現象を物理化学的に捉えていく過程で、皮膚を透過しやすい物質の性質や皮膚バリアー能を変化させる物質を明らかに

することもできました。こうした数学的な計算をやっていると、しばしば、皮膚が人体の中で、もっとも大きい臓器であることを忘れてしまいます。しかし、角質層は表皮や真皮に支持され、外界の環境によって呼吸をし、水を含み、血管により放熱し、さまざまな生活を営んでいます。従って、細胞のターンオーバーにより再構築され、機能の恒常性を維持している臓器として、皮膚を認識する重要性にあらためて気づかされました。皮膚の恒常性を正常に保つことがコスメトロジーのひとつの目的なのでしょう。炎症から皮膚の代謝バランスが破壊され、バリアー能がなくなり皮膚炎になることもあります。体の全身状態が悪いと臓器のひとつとしての皮膚の調子が悪くなることもあります。また、寝不足やストレスなど、長期にわたる精神的な問題も、皮膚の調子をおかしくすることがよく知られています。そういう意味では、心身の健康維持もコスメトロジーの目的のひとつではないでしょうか。

臨床に用いられる薬物に比べると、化粧品成分の皮膚透

過が極めて低く、速効的な効果は疑問があります。しかし、今後の化粧品は、効き目がおだやかで、副作用がなく、長期に補充することで、しだいに、皮膚の臓器としての恒常性のバランスを取り戻させるという意味合いが強くなると考えます。そのためには、外界からの刺激や、化学成分に対して、皮膚の深部でどのような反応が生じているかを知ることが極めて重要であると思われます。

今回の私の研究は、マイクロダイアリスという手法を用い、皮膚内の薬物濃度や皮膚成分の濃度の変動をモニターする方法論の確立です。薬物の透過だけでなく、皮膚成分の微量な変化をとらえることで、薬物や化粧品が皮膚という臓器に及ぼす影響を生化学的に検討することができま

す。本研究が今後のコスメトロジー研究の一助になればと願っております。  
(長崎大学医学部附属病院)

平成 10 年度 研究助成

## コスメトロジーと免疫学

今井 康之

平成 10 年度、私は静岡県立大学に赴任し、新たな研究環境の構築の必要性に迫られていました。その時期に、財団の研究助成を頂くことができ大変感謝しております。私が当初コスメトロジー（化粧品学）という言葉から受けた印象は、文化系の学問分野というものでした。たとえば、もののけ姫というアニメ映画がありましたが、もののけ姫とその敵役の女性の化粧は、記号として映画のなかで高い存在感を発しています。このように、化粧は言葉と同様な意味を人間関係のなかで持つものと思います。ところで、私の研究課題も含め研究助成の多くが安全性の分野へ向けられています。私の専門領域は免疫学ですが、皮膚は外界の環境から体を守るバリアーとして大変重要です。皮膚は細菌を通しませんし、皮膚の表面は乾燥していて細菌の繁殖に不利な状況を作り出します。皮膚からの抗原の情報は常にモニターされていて、病原体に対する免疫応答の基礎となっています。このように皮膚は免疫器官として活動的で

あるので、逆に好ましくない免疫反応であるアレルギーがおきる場所としても重要です。化粧品は、衣装や他の装身具よりも直接皮膚に適用する性格が強いため、安全性に関する研究が重要であり取り組みが進んでいるのは当然といえます。炎症反応が発現するときの分子機構については関心も高く研究も進んできたと思いますが、皮膚からの抗原感作がそもそも初めて起きる場合のメカニズムについては、まだまだ解明すべき点が多く残されています。今回の研究で、皮膚からの抗原感作の過程でも、炎症反応が発現するときと共通した分子が働いていることを明らかにすることができました。私たちの問題の切り口は、原因を特定しにくいアレルギーについても解決の糸口を提供しようと考えています。コスメトロジーは、人間と環境の接点に位置する学問分野であり、人間の体や精神の健康に貢献する分野としてさらに発展を続けることを期待しております。

(静岡県立大学薬学部)

平成 10 年度 研究助成

## 私のコスメトロジー感

鈴木 巖

若い男の子がきれいになったのは、いつ頃からでしょうか？私が小学生の頃、ちょっと上のお兄さんたちは、むさ苦しい服装で、やはりむさ苦しい顔だちであったと記憶しています。それが格好良かったと思っていました。

自分が中学生くらいになるころ、どうもそのあたりに異変が起きたような気がします。ちょうどそのころ、流行の創造を目指すある雑誌が刊行され、毎号欠かさず眺めていました。ファッション特集号に登場するモデルさんたちは、

それまでの長髪・破れたGパン、といった基本アイテムから、遠く離れた、清潔感漂う格好をしていました。もちろん胸毛などその片鱗も見えませんでした。それがとても新鮮に見えたのです。それ以来でありましょうか、巷からそれまでの男臭さが消えたように思えます。年を経るにしたがい、私はファッションの世界とは疎遠になってきましたが、今でも行きつけの床屋さんでは、顔パックされ、恍惚に浸る瞬間を喜んでいます。昔は女性の特権であったい

つまでも美しくありたい、という願望はジェンダーフリーの世の中になり、中年に入りつつある私も心のどこかで思っているのでしょう。美しくなること、すなわち上手に齢を重ねることは、すでに物質的に満たされている（といっても研究費は満たされてませんが……。どうもありがとうございました）日本人が思うことなのでしょう。すべすべお肌をキープできれば、心はうきうき。昔からいわれているように、健康な体は健康な精神に宿るので、結果、長生きに繋がります。学問としてのコスメトロジーを追求する

ことは、人間の欲求を満たすだけでなく、健全な長寿社会を形成するのに必要なことであると感じる今日この頃です。美白、顔グロ、etc. いろいろ流行はありますが、いろいろなファッションを追求をさせるのもコスメトロジーであれば、何の思慮もなく追求したツケを拭い去るのもコスメトロジーだと思うと、地球環境と現代科学との関係に似ているなあ、とも思うのでした。

(東北大学大学院薬学研究科)

平成 10 年度 研究助成

## どうやって傷はきれいに治るのか

高橋 健造

ヒト遺伝子ゲノムの概要が、当初の計画よりずいぶんと前倒しとなりこの2月には一般の遺伝子データベース上にも公開になりました。まだずいぶんとラフで未確定なデータも多いようですが、日々新しいデータへと書き換えられていますので、数年で実用上問題のないヒトの全遺伝子の完全な情報となるでしょう。このデータを基に個人間や人種間での遺伝子のほんの僅かな相違の意義を検討し、単一遺伝子の異常により生じる遺伝性疾患の解明にはますます拍車がかかり（多分この数年間で）、さらには複数の遺伝的素因が関与するであろう乾癬やアトピー性皮膚炎などの発症機序も着々と解き明かされていくと思われまます。このようなヒトを含めた生物の遺伝情報に関する研究の爆発的な進歩は、大腸菌からヒトのゲノムに至るまでどの遺伝子にも共通で、誰が扱っても比較的簡単な方法論と実験手技が通用し機械化するのが容易であったという遺伝子工学の特徴によるところが大きいと考えられます。

しかし個々の疾患に対する治療法となると薬剤の開発や薬剤導入のための手段が、疾患や臓器あるいは対象となる個々人ごとに大きく異なるために病因の解明ほどには容易に運びそうにはありません。

そこでこれからの臨床医学、特に治療面での期待が大きいのが、臓器の再生に関する再生医学の研究です。

そんなわけで表皮組織の再生のメカニズムを知る実験が続いています。

皮膚科医ならずとも、外傷や熱傷の後に皮膚が自然に再

生して創部を埋めていくのは当然のこのように思われがちですが、実際には表皮や毛嚢のどの層の角化細胞が、どのように潰瘍底に遊走し、実際の再生表皮の基底層や幹細胞を再構成するのか、今のところはっきりした解答はありません。

これはどうしたら瘢痕や色素沈着が残らずによりきれいに傷が治るのか、あるいは創傷治癒のどの過程のどの細胞を標的とした治療が望まれるのか、などに答える研究ともなります。表皮細胞の再生・分裂能を上手くコントロールすることは創傷治癒の大きな鍵を握ります。実際、母体内の胎児の皮膚の傷は全く瘢痕を残さずに治癒することが知られていますが、一方で幼児や若年者は容易に肥厚性瘢痕を形成しがちでもあります。高齢者では瘢痕を形成することは稀ですが、今度は治癒そのものが遅延しがちで大きな潰瘍や熱傷は将来の発癌母地となってしまいます。

そこで生きたままの状態で、表皮細胞がどのように遊走し潰瘍面を埋めていくのかを長期間観察できればと考え、トランスジェニックマウスを使った実験をしています。マウスの皮膚と人の皮膚とではずいぶんと違う治癒過程を示します。真皮線維芽細胞による創傷の収縮機構がマウスでは非常に強く働き、体幹面積の2～3割にもおよぶ人間にとっては致命的な皮膚潰瘍が、2～3日後には数mmの大きさにまで収縮してしまいます。マウスの傷はあっという間に治りますが、残念ながら実験は思ったほど進みません。

(京都大学大学院医学研究科)

## 21 世紀とコスメトロジー

佐藤 隆一郎

アメリカで4年間の留学生活を送った。1990年代初頭、アメリカ経済は低迷していたものの、アメリカ人女性のほとんどが入念な化粧をし、特に香水の香りは強烈で日米の差を感じた。その後日本でも化粧をする女性の低年齢化、さらには若年男性までもが化粧をする傾向が見られ、アメリカに5年、10年遅れで近づいている感がある。

アメリカは能力主義社会であり、そのために個人は自らの能力、個性をアピールする必要がある。また多民族社会であり、皮膚、髪、眼の色がそれぞれ異なり、その組み合わせは多様である。この様な中で個人が個性を引き出し、自らの良さ、美しさを強調するための手段として化粧があるのに対し、単一民族社会である日本では流行をみんなが真似る、横並び、均一化の手段として化粧があるように思える。もちろんその様な状況のなかで、奇抜さを好む傾向も現れ、真っ黒に日焼けした顔に眼、口の周りは白く縁取

る「顔グロ」ファッションが話題にもなったが、グローバル・スタンダードに照らしてもあれば美しくなく、紫外線被曝の実害に対する知識も著しく欠如しており、若年齢層へのコスメトロジー教育の必要すら感じる。

21世紀を迎えた現代社会では情報化が一層進み、あらゆるものへの価値観は一元化する方向にあり、グローバル・スタンダードが定着して日米間の差も小さくなるだろう。日本でも個人の能力、個性が高く評価される時代が到来することは間違いなく、それに伴い化粧への要望、化粧の頻度が高まることが予想される。その様な化粧の質的、量的な変化を科学的側面から支えるのがコスメトロジーであり、人々の生活に最も身近な21世紀の先端科学としてコスメトロジーが大いなる発展をするものと確信すると共に期待している。(東京大学大学院農学生命科学研究科)

## コスメトロジー雑感

佐藤 隆

皮膚は、外部からの刺激や障害から生体を保護するバリアーであるとともに、コスメトロジーの領域では“自己表現の場”、すなわち男女を問わず“美”を表現する“キャンパス”として重要であると感じている。それ故、肌荒れや皮膚疾患、または化粧の善し悪しは日々の気分の抑揚に大きく影響し、精神的ストレスをもたらす要因にもなる。このような自己の美を気にする意識は思春期頃から高揚するが、この時期には“にきび”といった大敵も現れる。私も高校の頃、この“にきび”に出会い、何とかして治したいと願ったこともあった。やはり、顔にたくさんの“にきび”ができていくと格好が悪いし、女性にとってみれば化粧も思うにいかなくなると感じた人は多いことであろう。でも、その時には“にきびはどうしてできるのか”など考えたこともなかった。ましてや、皮脂の研究に携わるなど思ってもみなかったことである。しかし、皮脂腺の研究を進める

うちに、実は皮脂の生合成や分泌機構などは十分に理解されておらず、非常に面白いテーマであると実感した。

最近のコマーシャルの影響か、“皮脂は困り者”という認識が少なからずあるのではないだろうか。“てかり防止のファンデーション”が巷では売れているのもこのような意識を増長させているのかもしれない。皮脂は皮膚のみならず生体の機能維持には不可欠なのだが、確かに皮脂の分泌量が多い人は、脂性肌や肌のでかりに悩まされ、その防止に苦慮していることだろう。そういう人のためにも、また快適な生活を営む上でも、皮脂の重要性を考慮しつつ、皮脂の分泌をほどよく制御できるような化粧品の誕生が望まれる。今後、脂腺細胞を用いて皮脂の分泌調節機構を詳細に解明し、将来の化粧品開発に貢献したいと願っている。

(東京薬科大学薬学部)

平成 11 年度 研究助成

## 皮膚の老化と遺伝子

山泉 克

皮膚老化の主要な原因が太陽光被曝（日焼け）であることは多くの観察の示す所である。更にその原因を探っていくと、太陽光の中の紫外線が DNA に傷をつけ、それが長い間に少しずつ蓄積することが重要であることが判ってきた。一方、喫煙と肺癌・循環器疾患などの因果関係が疫学的研究により十分明らかになっている。にもかかわらず、若い人達における喫煙者数の減少はいっこうに認められない。将来かなり高い確率で皮膚の老化や発癌・循環器障害が起こることがわかっているにもかかわらず日焼けや喫煙がやめられないのは、凡人にとって 10 年後、20 年後は現在の自分とは全くの別世界であり、現在の延長線上にあることが実感できないことによるのであろう。対策のむずかしさもこの辺にあると思われる。ところで、紫外線による DNA 損傷の修復機構は、代表的な光線過敏症である色素性乾皮症 (XP) の研究を通して明らかになってきた。この修復機構はヌクレオチド除去修復と呼ばれ、複数の XP 蛋白質の協同作用で傷のついた DNA 部分が切り出され、その後別の蛋白質がその部分を正確に穴埋めすることで傷の部分は元通りに

復元される。修復のあらまはこんなものであるのだが、多くの光線過敏症の患者さんの診断を行っている、どうしても既存の疾患のいずれにも該当しない場合に遭遇することが少なくない。しかもこれらの中には兄弟で同じ症状を示すなど、遺伝的な原因が考えられる場合も多々見つかる。DNA 修復といった基本的な防御システムは、下等生物から高等生物にいたるまで進化の過程を通して共通に保存されているというのが現代生物学の基本的な認識である。基礎研究の分野では紫外線感受性を示す出芽酵母の変異体が多数分離されており、これらの中には上記のヌクレオチド除去修復に異常を持つものも当然含まれている。問題はそれ以外の変異体で、近年これらの変異体に対応するヒト遺伝子が続々と単離されてきた。これらの中にはチェックポイントと呼ばれる、DNA の品質管理にかかわる一連の遺伝子も含まれている。今後これらの遺伝子異常がヒトの光線過敏症と関係しているのかどうかを明らかにし、更にこれらを系統的に診断する方法の開発が待たれる。

(熊本大学発生医学研究センター)

平成 11 年度 研究助成

## コスメトロジーへの期待

吉田 武美

今回(財)コスメトロジー研究振興財団より助成金をいただきましたことを感謝申し上げます。本研究助成により、実験的皮膚生化学に関する成果が得られました。本研究助成による課題は、皮膚とサイトカインの関係や皮膚のストレス応答に関するものでしたが、皮膚に多いとされるサイトカインの IL-1 に興味をもち、そのノックアウトマウスでのアレルギー反応の研究を開始したのですが、何をしているのか不明な結果に終わりましたが、その他のサイトカイン欠損で、LC に大きな影響が出るという重要な成果を得ることができました。また、皮膚の紫外線に対するストレス防御に対する抗酸化剤とりわけカレーなど食品として重宝されるウコン成分クルクミンの防御効果は目を見張るものがあります。これまで皮膚関連研究を続けてきておりますが、皮膚の外部刺激に対する機能の解析や防御反応および調節機構など多くの実験的研究が残されているように思えます。

コスメトロジーは、今日まで皮膚表面をあらゆる観点から追求し、発展してきております。21 世紀は、この国では高齢化と少子化がさらに進むことが予想されます。とくに高齢者においては、皮膚機能を常に若々しく保っていただきたいことを望んでいると考えられます。コスメトロジーは、このような社会においては、益々発展していかなければならない分野といえるでしょう。社会的には、生活改善薬や機能性食品などが生み出されており、コスメトロジー分野でもその特長の一端ともいえる知覚、嗅覚、触覚などを生かした精神的癒しの世界への展開を期待するところです。極近い将来に皮膚の生理から分子生物学的研究も含めた大きな展開があることでしょう。それにつれてコスメトロジーも益々発展し、皮膚機能の維持と改善を約束する方向性を打ち出してくれることでしょう。コスメトロジーが高齢化社会を彩る分野への展開を期待しつつ。

(昭和大学薬学部)

## コスメロジーと白血球と自律神経系 安保 徹

多細胞生物になって多くの機能の分化した細胞が生じたが、単細胞生物時代の自分自身の性質を変えずに残ったのが白血球である。そして、私たちのからだを守る細胞として働き続けている。

このように理解すると、いかに白血球が生体にとって大事であるかの謎が解けるように思う。

もう一つ大事なことがある。白血球を最も効率よく使用するためには、体調に合わせて適切な白血球分画を練り出さなければならない。

活発な体調（交感神経優位）で手足が傷ついて細菌が侵入してきたときは、細菌処理にすぐれた顆粒球を準備する必要がある。逆に、食べ物を消化・吸収する時（副交感神経優位）は、微量抗原処理にすぐれたリンパ球を準備する。免疫を司るリンパ球は消化管の周りで発生進化している。

これらを「白血球の神経支配の法則」と呼んでいる。

このような、体調、自律神経、白血球の同調するリズムは、本来からだにとって合目的なのである。

しかし、これらのリズムが一方に偏ると生体は破綻をきたす。働き過ぎの交感神経緊張の持続は、顆粒球を増加させ過ぎ、吹き出物が出やすくなったり、皮膚の血流が悪くなってかさかさし、不健康になってくる。

逆に、リラックス過剰で副交感神経優位の過剰は、アレルギー反応を起こしやすくなったり、血流がうっ滞してむくみが出て皮膚がぶよぶよになってくる。

このように本研究では、体調、自律神経、免疫が、健康な皮膚（顔の表情も）や美しさの維持に深く関係することを明らかにすることができたと思っている。

（新潟大学医学部）

## 本研究とコスメロジー 井出 博

地表に到達する太陽光紫外線は、波長の短いUVBと波長の長いUVAに分けられます。UVBはサンバーンの主な原因であり、皮膚の炎症、皮膚発癌、皮膚免疫などとの関連から詳しい研究が行われています。さらに、最近の研究の進展により、UVBで発生する遺伝子の「きず」が細胞の中でどのような仕組みで直されるのかということが詳しくわかってきました。UVBはオゾン層でそのほとんどが吸収されてしましますが、もう一つの紫外線成分であるUVAはまったく吸収されずに地表に到達し、サンタン（皮膚の黒化）を引き起こします。DNAはUVAを吸収しないため、UVAでは遺伝子の「きず」はできないと思われていました。しかし、最近の研究からUVAは細胞の中にある別の物質に吸収され「活性酸素」を発生し、UVBとは全く違ったタイプの遺伝子の「きず（酸化損傷）」を発生することが明らかになりました。UVBで発生する遺伝子の「きず」はピリミジンダイマーとよばれる損傷で、ヌクレオチド除去修復機構という仕組みで修復されます。し

かし、この仕組みではUVAで発生する遺伝子の酸化損傷は直すことができません。そこでUVAで発生する遺伝子の「きず」がどのような仕組みで直されるのかを明らかにしたいと考え、本研究を行いました。その結果、塩基除去修復機構という別の仕組みが働き遺伝子の「きず」を直すようだということがわかりました。今後さらに研究を進め、この機構に関係する酵素の役割や遺伝子を明らかにしたいと考えています。

最近新聞やテレビを賑わせているオゾン層の破壊だけでなく、アウトドアレジャーの普及などライフスタイルの変化により、私たちが太陽光紫外線に曝される機会が増えています。今後、UVAおよびUVBにそれぞれ特徴的な遺伝子の「きず」を直す仕組みを明らかにすることができれば、新しい指標に基づくスキンタイプの分類や、この指標に応じたサンスクリーン化粧品の使用法および開発も可能になると期待しています。（広島大学大学院理学研究科）

平成 11 年度 研究助成

## 紫外線と私と美容のブーム

古澤 佳也

太陽紫外線が生物にどの程度影響を与えるか？ 1983年にこのような趣旨で研究を始めたのは、大学院での本来の研究テーマである真空紫外線や超軟X線の実験が大型の加速器を用いた共同利用実験であり、実験の出来る日数が限られていたからであった。光の仕事は分光スペクトルの測定から始まると考えている。折しも、岡崎の基礎生物学研究所の大型スペクトログラフを知り、最も簡単な生き物としてバクテリオファージを携えて、致死の波長依存性を調べたのが始まりであった。そのころ南極でオゾンホールが発見されてにわかに紫外線の影響が心配され始めた。ただ実際には海やスポーツで使うサンスクリーンでなく、サンスクリーンがファンデーションなどにも取り入れられるようになるのには、まだまだ数年を要した。このころは晴れた日のお昼前後は大学のキャンパスで、「ひなたぼっこ」紛いと冷やかされながらファージの入った容器を太陽に向

けていた。以外と晴れの日は少なくて1年間やって50日分のデータしか取れなかった。こんな経緯で紫外線とのつきあいが始まって20年になろうとしている。

1990年初頭に、なぜあれほどもサンスクリーンの配合が盛んになり、一気に普及したかは未だに首をひねるばかりである。確かに紫外線を浴びないことは将来の健康にとって良いことではある。しかし、疑問は「なぜブーム」かである。女性の美しくなる願望が日焼けを防ぐことに始まって、今のブームは美白である。それより前には「小麦色の日焼け」が健康美と考えられていた。「ガングロ」とはなんだろうか。健康のためにすでに浸透した化粧品へのサンスクリーンの配合が続く事を願うが、「美容」にのみ囚われているように見える女性の気持ちを、多少とも「健康」のために、と啓蒙する必要がまだまだ不十分のように思えてならない。  
(放射線医学総合研究所)

平成 10 年度 研究助成

## コスメトロジーと非対称

藤本 浩一

当研究助成をいただいて実験計画を立案していた頃は、右と左で色の違う靴下をはいていた若者をどこそで見かけたなどの「目撃情報」がいくつかあって、さては流行の兆しかと浮き立つものがあったが、研究を終える今の時期になっても非対称の化粧は流行していない。残念というか、当たり前なのか、それとも時期尚早だったのか。かなり大胆なものには違いない。

女子学生に依頼して非対称の化粧をしてもらい、その日一日通常のキャンパス・ライフを過ごしてもらった。逐次求めた体験報告の中で印象的だったのは、彼女たちが友達の評判に一喜一憂することだった。親しい友達という二人称の相手に、自分がどのように映るかをもっとも気にする。あまり目立ち過ぎないようにと気を配る。かく言う私も朝出がけに、「また靴下の色があってない」などと家族に呼び止められるのがその例であろう。そうかと思うと、せっかく派手な化粧をしているのだから、誰か注目してよ、という三人称からの賞賛を彼女たちは十分期待している。そ

して一人称についてはどうか。おかしな化粧だけど、自分一人の部屋でこっそりとなら試してみたいと案外多くの人か思っていた。化粧の心理は入り組んだ多重構造なのだろう。あたかも徒競走で、自分がフライングぎりぎりでも人よりも有利なスタートを切り、あまり離さず離されず、そこそこにゴールしたいという心境のようでもある。もう一つ印象に残ったのは、当初実験参加に積極的だった女子学生が、いざ化粧を始める時になってとても不安を示し、他方であまり気がすすまなかった学生が、実験終了後とても満足して、また機会があれば声をかけて欲しいとメールしてきたことである。態度(考え)と行為が不一致の時に人がどのように行動するかという社会心理学の実験を目の当たりにしているようだった。

このようなあまり人が手がけない研究の機会を与えて下さった当財団に深く感謝したい。

(神戸松蔭女子学院大学文学部)

## コスメトロジー雑感

飯田 征二

私が小学生の頃、同級生の弟に口唇口蓋裂患児がいた。今にして思えば彼は見た目にそれとわかる、外鼻および口唇の変形した顔貌をしており、言葉は不明瞭で鼻咽腔閉鎖が十分にはできていなかったのであろう。口唇口蓋裂児は日本人において約500人に1人の割合で出生することから、学校に1人存在しても何ら不思議ではないと今なら思えるが、当時はそのような病気が存在することなど知る由もなく、彼はその顔貌と言葉の不明瞭さから、周囲からいじめられる絶好の対象となっていた。私は彼が同級生の弟ということはいじめ側にはまわらなかったのであるが、彼の顔貌と言葉の特異性を不思議に感じてはいた。現在、診療の場にて多くの口唇口蓋裂患者に接しているため彼らの顔貌などを不思議には思わないが、今回このコスメトロジーの研究に着手し筆を手に執りながら記憶の彼方から同級生の弟の彼に関することが脳裏に蘇ってきた。そして、果た

して彼は今どうしているのだろうか、治療は続けたのであろうか、などいろいろと考えを巡らし、昔のアルバムを開いてみると1枚だけ彼の写っている写真を見つけた。その写真を眺めながら、彼のことを思い、そして自分を振り返ってみた。私は自分の理想を描いて歯科医師になり、自分の最も興味のある分野を自分の意志で専攻したつもりであったが、実はそうではなく、小学生のあの頃彼に出会った時から口唇口蓋裂に関与する仕事に就くように決まっていたのではないか、などという思いがうかんできた。万が一そうであっても、またそうでなくても彼と出会えたことは私にとってかけがえのない思い出であり、彼にとってもそうであって欲しいと思う。それと同時に口唇口蓋裂の治療およびコスメトロジーに私が関与できるようになったことに感謝の気持ちでいっぱいである。（大阪大学歯学部）

## 分子生物学的手法を用いた皮膚角化細胞の分化・増殖に関する分子の解析及び遺伝子治療の標的細胞としての表皮幹細胞の同定

筑波大学臨床医学系講師 川内 康弘

私は1998年12月から2001年6月までの約2年半、米国テキサス州ヒューストン市にありますベイラー医科大学・分子細胞生物学教室（デニス・ループ教授）において、表皮角化細胞の分化・増殖と転写因子との関わりを主なテーマとして研究を行ってきました。幸い研究はうまく進行し、Nature Genetics 誌をはじめとしていくつかの論文を既に発表、もしくは投稿準備中です。しかし、渡米当初は英会話能力のなさもあって「このままでは研究で成果を出すことはおろか日々の生活もままならない…」と途方に暮れたこともありました。当然のことながらアパートの契約から、車の購入、電話・電気の契約など全てを「英語」で行わねばなりません。幸いこれも徐々に慣れて何とか生きながらえて帰国することができた次第ですが、日本人がいかに英語（特に聞き取りなどの会話能力）ができないことで国際的に不利益を被っているか身をもって体験しました。文部科学省にはこの貧弱な日本の英語教育の改革を早急をお願いする次第です。

ヒューストン日本ではいけば奄美諸島くらいの緯度に位

置しており、最高気温が40℃くらいの夏が4月から10月くらいまで続き、紫外線の量も尋常ではありません。特に白人は絶対に紫外線に対する防御が必要だと思うのですが、多くの学校では平気で炎天下で子供を無防備に遊ばせており、多くの白人の子供の頬部には無数の雀卵斑（そばかす）が認められます。彼（彼女）らが年をとるに従って、しわ・しみの増加は必発であり、ひいては悪性腫瘍の発生さえ懸念されます。日本にいとあまり切実には感じないのですが、白人中心の人口構成と亜熱帯性気候の環境で、紫外線がいかに皮膚の健康、美容に悪いかを目の当たりにし、遮光の必要性を再認識した2年半でもありました。また、あれほど厳密に禁煙を励行しているアメリカ人が、なぜ高発ガン性が明らかな紫外線からの防御を真剣に議論しないのか不思議でもありました。

最後になりましたが、私の今回のアメリカ留学に際しまして多大な御援助をいただいた(財)コスメトロジー研究振興財団の関係の皆様は厚く御礼を申し上げますとともに、財団のますますの御発展をお祈り申し上げます。

# 付 録

●  
事業報告書（平成12年度）  
役員  
研究助成課題一覧  
●



# 事業報告書

(自平成12年4月1日 至平成13年3月31日)

## I. 平成12年度(第11回)事業

昨年に引き続き以下のような事業を計画し、実行しました。

自然科学や社会科学の各分野にわたり、ひろくかかわりをもつ化粧品を総合的に体系化することを目的として

- ①化粧品学の調査・研究に関して顕著な成績をあげた研究者や機関に対して功労金をもってこれを表彰する。(1件あたり100万円)
- ②皮膚の生理機能や老化機構の解明、美容に役立つ素材の研究等化粧品学に関連した生命科学、その他の分野の調査・研究に対する助成を行う。  
(1件あたり200万円、100万円、又は50万円)
- ③化粧品学の調査・研究にたずさわる研究者の海外派遣や招聘に対して資金援助を行う。  
(1件あたり50万円まで)

## II. 募集及び選考の経過

本年度の各事業につきましては平成12年5月8日より募集を開始し、同12年7月7日をもって締め切りました。

研究助成事業は本年度も一 公募を原則とし全国239ヶ所の大学・病院・研究機関等にダイレクトメールで推薦書を送付するほか、関係学術雑誌8誌にも広告し、その結果 多数の応募をいただきました。応募者の研究分野が多岐にわたったため、選考委員会の中に3分科会を設け、それぞれにおいて予備選考を行い平成12年9月22日(金)ルビーホールにおいて本選考委員会を開催して受賞候補者を決定し、11月20日の理事会及び評議員会の議決を経て、受賞者を最終決定しました。

## III. 第11回功労賞・研究助成等の結

以下のとおり合計17件が決定され、研究助成金1,750万円が交付されました。

功労表彰(小林 孝三郎賞)	0件
研究助成	17件
国際交流援助	0件

## IV. 会議等

### 第1回 常理事会

開催日時 平成12年6月20日(木) 午後2時

開催場所 東京都中央区日本橋3-6-2 (株)コーセー 2階会議室

理事総数 12名 本人出席 11名 委任状出席 1名(賛成)

監事 2名 出席 2名

## 審議事項

第一号議案 平成 11 年度事業報告ならびに収支決算報告を承認する件

配付された資料に基づき、平成 11 年度の事業内容が事務局より詳細に説明され、続いて収支計算、財産内容などが詳しく報告された。次いで小田倉監事より、上記内容が適正適法である旨の監査報告がなされた。

慎重審議の結、本議案は書 表決者を含め全員一致で可決承認された。

第二号議案 評議員の選任に関する件

当財団第 5 期（平成 10 年 4 月～平成 12 年 3 月）の評議員の任期満了に伴い、第 6 期（平成 12 年 4 月～平成 14 年 3 月）の評議員候補として、再任 13 名、新任 1 名、退任 1 名の提案がなされ、満場一致で可決承認された。次いで、被選任者は即時、就任を承諾した。

理事長及び専務理事互選の件

（評議員会で第 6 期理事・監事の選任の可決、承認を受け新理事会として審議）

専務理事より議長代行を行うことので了承を求める提案があり、これが了承された後、小林禮次郎氏を理事長に、宮澤 香氏を専務理事とする提案がなされ、新理事の全員一致で可決、承認された。

第三号議案 選考委員の選任に関する件

当財団第 5 期の選考委員の任期満了に伴い、第 6 期の選考委員候補として、再任 13 名、新任 1 名、退任 1 名の提案がなされ、満場一致で可決承認された。

第四号議案 株主としての議決権行使について

株コーセーの第 58 回株主総会における議決権行使を理事長に一任する旨の提案に対し、株主総会議案と併せて検討された結、満場一致で可決承認された。

## 報告事項

平成 12 年度の研究助成事業について

研究助成事業、国際交流援助事業、功労表彰の実施計画及び事業経過の概要について説明がなされ、了承された。

その他

本年 9 月中にコスメトロジー研究報告第 8 号（収載論文 18 編）を発行予定であること、また助成金贈呈式を平成 12 年 11 月 20 日に開催予定であることが報告された。最後に株式分割による基本財産の増加が報告され、いずれも了承された。

## 第 1 回 常評議員会

開催日時・場所は第 1 回 常理事会に同じ。

評議員総数 14 名 本人出席 5 名 委任状出席 7 名（賛成） 欠席 2 名

**審議事項**

第一号議案 平成 11 年度事業報告及び収支決算報告を承認する件  
理事会の決議を全員一致で確認した。

第二号議案 理事及び監事の選任に関する件

当財団第 5 期の理事・監事の任期満了に伴い、第 6 期の理事候補として、再任 12 名、監事候補として、再任 2 名の提案がなされ、満場一致で可決承認された。次いで、被選任者は即時、就任を承諾した。

**報告事項**

理事会に同じ。

**第 2 回 常理事会**

開催日時 平成 12 年 11 月 20 日(月) 午後 2 時 30 分

開催場所 東京都渋谷区渋谷 2-12-15 日本薬学会長井記念館会議室

理事総数 12 名 本人出席 10 名 委任状出席 2 名 (賛成)

監事 2 名 出席 2 名

**審議事項**

第一号議案 平成 12 年度 (第 11 回) 研究助成者等を承認する件

配付された資料に基づき、平成 12 年度の研究助成課題 (17 題) の選定経緯に関する説明がなされた。

慎重審議の結、本議案は書 表決者を含め全員一致で可決承認された。

第二号議案 平成 13 年度事業計画及び予算案を承認する件

配付された資料に基づき、平成 13 年度の事業計画及び、平成 13 年度予算案について詳細説明がなされた。

慎重審議の結、本議案は書 表決者を含め全員一致で可決承認された。

第三号議案 (評議員会の議案につき省略)

第四号議案 専務理事の互選に関する件

専務理事である宮澤 香氏の辞任に伴い、有本 亨氏が理事の互選により専務理事として選任された。

第五号議案 選考委員の選任に関する件

坂本 純選考委員の退任に伴い、後任として光岡俊成氏 (厚生省医薬安全局審査管理課) を選考委員として選任したい旨の提案がなされた。

本議案は満場一致で可決承認された。

## その他

「研究報告第8号」よりB5版からA4版に変更し、表紙のデザインも新しくしたこと、及びこれを日本化粧品工業連合会の加盟各社に贈呈する予定であることが報告され、了承された。

## 第2回 常評議員会

開催日時・場所は第2回 常理事会に同じ。

評議員総数 14名 本人出席 9名 委任状出席 4名（賛成） 欠席 1名

### 審議事項

第三号議案 理事の選任に関する件

理事の宮澤 香氏の辞任に伴い、後任として牧野利孝氏（日本化粧品工業連合会専務理事）を理事として選任したい旨の提案がなされた。

本議案は満場一致で可決承認された。尚被選任者は即時就任を承諾した。

その他理事会の決議を全員一致で確認した。

## 臨時理事会

開催日時 平成13年2月22日(木) 午前10時

開催場所 東京都中央区銀座3-5-12 (財)コスメトロジー研究振興財団

理事総数 12名 本人出席 4名 委任状出席 8名（賛成）

### 審議事項

第一号議案 株式会社コーセーと株式会社ウッドとの合併契約書承認の件

株式会社コーセーの臨時株主総会（平成13年2月23日）における議案「株式会社コーセーと株式会社ウッドとの合併契約書承認の件」に関し、その議決権の行使を小林禮次郎理事長に一任したい旨の提案がなされ、慎重審議の結果、本議案は書表決者を含め全員一致で可決承認された。

## 選考委員会

### 分科会Ⅰ

開催日時 平成12年9月14日(木) 午後6時

開催場所 東京都千代田区大手町1-5-1 トップオブザスクエア会議室

審議事項 素材、物性に関する分野の選考

### 分科会Ⅱ

開催日時 平成12年9月5日(火) 午後6時

開催場所 東京都千代田区大手町1-5-1 トップオブザスクエア会議室

審議事項 生体作用、安全性に関する分野の選考

### 分科会Ⅲ

開催日時 平成12年9月13日(水) 午後6時

開催場所 東京都千代田区大手町1-5-1 トップオブザスクエア会議室

審議事項 精神、文化に関する分野の選考

## 本選考委員会

開催日時 平成12年9月22日(金) 午後5時30分

開催場所 東京都千代田区丸の内1-9-1 ルビーホール会議室

審議事項 各分科会の結を総合的に判断して助成候補者が決定された。

## 表彰贈呈式

開催日時 平成12年11月20日(月) 午後4時

開催場所 東京都渋谷区渋谷2-12-15 日本薬学会長井記念ホール

以上

## 第 11 回 研究助成を受けられたかたがた

(J：一 研究助成)

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
J-00-01	A、B領域紫外線の直接照射によりSCIDマウス移植ヒト皮膚に誘発される遺伝子変異とその予防	実験病理学 皮膚科学	大阪大学大学院 医学系研究科助教授 本行忠志
J-00-02	微生物代謝工学に基づく必須および新規脂肪酸の大量生産	脂質生化学 微生物育種工学	筑波大学応用生物化学系教授 小林達彦
J-00-03	皮膚老化の分子メカニズムの解明：老化マウスklothoにおける解析	医学	群馬大学医学部教授 倉林正彦
J-00-04	水分子の移動とその速度制御のための分子膜の開発	コロイド、界面化学 反応速度論 物理化学	九州大学大学院理学研究院教授 師井義清
J-00-05	ヒト皮膚線維芽細胞におけるI型コラーゲン遺伝子の個人依存性発現制御機構	分子細胞生物学	神奈川歯科大学歯学部教授 畑隆一郎
J-00-06	ヒト皮膚における遊離脂肪酸の動態に及ぼす皮膚常在細菌ならびに化粧品の影響に関する研究	生物分析化学	東京薬科大学薬学部助手 小谷明
J-00-07	4位置換レゾルシノール誘導体のメラニン生成抑制効果	天然物化学 生物有機化学	九州大学大学院農学研究院講師 清水邦義
J-00-08	酸化セリウム系紫外線遮断剤の開発	無機材料化学 希土類化学	大阪大学大学院工学研究科助手 増井敏行
J-00-09	逆ミセルの微細構造を利用した生理活性物質内包型ナノカプセルの創製	生物工学、コロイド化学 物理化学、有機化学 溶液化学、化学工学	九州大学大学院工学研究院助手 小野努
J-00-10	皮膚保護作用を有するセラミドの生理作用発現機構に関する研究	細胞生理学	東北大学大学院薬学研究科教授 中畑則道
J-00-11	爪の形状に対するⅦ型コラーゲンの変異がかかわる影響について	遺伝性皮膚疾患 分子生物学 細胞外マトリックス他	北海道大学医学部附属病院助手 松村和子
J-00-12	表皮角層細胞間脂質形成に対する上皮型脂肪酸結合蛋白(E-FABP)の機能解析—E-FABPノックアウトマウスを用いた検討—	生化学 分子生物学 組織学	東北大学大学院 医学系研究科講師 大和田祐二
J-00-13	癌患者への「化粧」技術指導プログラムの日本への適用可能性に関する研究	精神腫瘍学	東京大学大学院医学系研究科助手 高橋都
J-00-14	<sup>13</sup> C <sub>4</sub> 配座のグルコース環状六量体、反転シクロデキストリンの創製	有機合成化学 糖化学	関西学院大学理学部助教授 山田英俊
J-00-15	紫外線及び化学合成化合物のヘアレスラット皮膚に対する障害作用及びその防御	皮膚科学 炎症薬理学	城西大学薬学部教授 谷 覺

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
J-00-16	化粧品素材としての合成スメクタイトの高機能化	材料化学	東北大学反応化学研究所助手 白井 誠之
J-00-17	化粧文化史の変遷と流行した化粧の受け入れ方の考察	生活美学	武庫川女子大学大学院 家政学研究科院生 玉置 育子

(敬称略 受付順)

## 役員

平成13年3月31日現在

理事長	小林禮次郎	(株)コーセー代表取締役会長
専務理事	有本 亨	
理事	磯邊 律男	(株)博報堂取締役相談役
理事	宇佐美昭次	早稲田大学理工学部教授
理事	内山 充	(財)日本薬剤師研修センター理事長
理事	小林 保清	(株)コーセー代表取締役社長
理事	菅原 正文	高砂香料工業(株)代表取締役会長
理事	橋 久	帝京大学名誉教授
理事	西川 武二	慶應義塾大学医学部教授
理事	花輪 隆昭	昭和館 館長
理事	廣部 雅昭	静岡県立大学学長
理事	牧野 利孝	日本化粧品工業連合会専務理事
監事	小田倉正典	公認会計士
監事	黒田 節哉	弁護士
評議員	上野 芳夫	東京理科大学薬学部教授
評議員	緒方 宏泰	明治薬科大学教授
評議員	北原 文雄	東京理科大学名誉教授
評議員	近藤 保	東京理科大学名誉教授
評議員	齊藤 勲	(社)東京医薬品工業協会理事長
評議員	長野 哲雄	東京大学薬学部教授
評議員	西岡 清	東京医科歯科大学医学部教授
評議員	野田 裕充	(株)コーセー常務取締役
評議員	野呂 影勇	早稲田大学人間科学部教授
評議員	福内 靖男	慶應義塾大学医学部教授
評議員	溝口 昌子	聖マリアンナ医科大学教授
評議員	宮 榮三	千歳科学技術大学教授
評議員	山崎 幹夫	千葉大学名誉教授
評議員	渡辺 徹	日本薬剤師会専務理事

素材、物性に関する分野

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
J 90-03	リン脂質膜の表面修飾と分子集合体としての機能発現に関する研究	界面物理化学	筑波大学化学系助教授 古澤邦夫
J 90-06	ヒアルロン酸で表面を修飾したりポソームからの内容物の温度による放出制御	薬品物理化学	東京理科大学薬学部助手 牧野公子
J 90-07	皮膚DDSとしての高分子脂質リポソームの基礎研究	高分子合成	早稲田大学理工学部教授 西出宏之
J 90-15	皮膚への作用性を有する各種糖脂質の合成	有機合成化学	千葉大学薬学部助教授 中川昌子
J 90-16	新製剤法及び新素材を用いた化粧品の品質確保に関する研究	衛生化学	国立衛生試験所 環境衛生化学部長 武田明治
J 91-02	生体適合性逆型ベシクルの生成、安定化と応用に関する研究	溶液論 界面化学	横浜国立大学工学部助教授 国枝博信
J 91-05	新しいDDS剤型としての高分子ミセルの設計と機能開発	高分子合成 DDS	東京理科大学 生命科学研究所助教授 片岡一則
J 91-06	化粧品素材としての利用が可能な乳酸菌の新規育種技術の開発	応用生物化学	早稲田大学理工学部専任講師 桐村光太郎
J 91-08	化粧品素材としての竹節人參並びに甘草の組織培養による物質生産並びに大量増殖に関する研究	生薬 薬用生物学	広島大学医学部助教授 神田博史
J 91-10	界面活性剤を含む溶液混合系の相挙動と濡れの挙動に関する研究	界面化学 物理化学	九州大学理学部助教授 荒殿誠
J 91-11	超微粒子分散系の構造と物性及び自己制御コロイド系の開発	高分子物性 コロイド物性	京都大学工学部助手 松本孝芳
J 91-20	各種界面活性物質によるマクロ及びマイクロエマルジョンの調製並びに物性に関する物理化学的研究	応用界面化学	東京理科大学理工学部講師 阿部正彦
J 92-01	ヒトリゾチームタンパク質を高分泌する酵母突然変異体を用いた素材生産の効率化研究	分子生物学 遺伝学	広島大学理学部助手 鈴木克周
J 92-03	化粧品の紫外線照射による光酸化メカニズムの研究	物理化学 界面化学	明星大学理工学部教授 日高久夫

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
J 92-04	水素添加大豆リン脂質を用いた油性ゲル及び水性ゲルの保湿作用に関する研究	薬剤学	昭和薬科大学薬学部講師 藤井 まき子
JA-93-05	細胞膜の脂質の物性と機能の基礎的な研究 ーリン脂質物性のコスメトロジーへの応用ー	生体物性学 細胞生物物理学	東北大学理学部教授 大木 和夫
JA-93-06	化粧品基本素材金属酸化物の酸性大気汚染物質との相互作用	物理化学 固体界面化学	千葉大学理学部教授 金子 克美
JA-93-08	新規な構造を有するヒアルロン酸類似多糖の開発	糖鎖工学 高分子化学	東京工業大学生命理工学部助教授 畑 中 研 一
JB-93-01	ペプチドシナージストによるビタミンEの抗酸化能の向上ーヒト血清アルブミン由来のペプチドシナージストの開発ー	脂質生化学 食品化学	水産大学校講師 幡手 英雄
JB-93-02	層状鉱物を用いたホストーゲスト反応による有機色素のカプセル化	無機材料化学 粘土科学	早稲田大学理工学部助教授 菅原 義之
JA-94-01	ハーダー腺の分泌するアルキルジアシルグリセロールの物性解明とその素材としての応用開発	生化学 脂質生化学	東京大学医学部教授 脊山 洋右
JA-94-02	植物組織培養法を用いたクチナシ植物からの橙黄色色素Crocin及び青色色素イリドイド配糖体の生成に関する研究	植物細胞工学	東京理科大学総合研究所助教授 生田 安喜良
JA-94-04	植物培養細胞・組織による化粧品素材としての活性成分の生産と育種に関する研究	生薬学 植物細胞・組織培養	九州大学薬学部教授 正山 征洋
JA-94-07	遺伝子工学的手法を用いた必須脂肪酸 $\gamma$ -リノレン酸の高等植物における多量生産	植物生理学 植物細胞工学	九州大学理学部助教授 射場 厚
JA-94-10	遠赤外線の水の構造と物性に及ぼす影響及び遠赤水の保湿効果に関する研究	物理化学 (薬学・医学系)	静岡県立大学薬学部助教授 片山 誠二
JB-94-05	弾性線維蛋白質エラスチンの自己組織化集合体の構造、物性、機能に関する研究	物理化学 生体物性学	九州大学理学部助手 甲斐原 梢
JB-94-06	バイオシグナル分子を固定化した細胞成長促進タンパク質ハイブリッド材料の合成	生体材料化学 高分子化学	京都大学工学部助手 伊藤 嘉浩
JA-95-01	材料表面ー生体分子間相互作用の直接解析に基づく生体適合性の発現機構の解明	高分子化学	九州大学工学部助教授 高原 淳

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
JA-95-06	生体膜構造をもつ高分子中の水の構造解析と生体反応の解明に関する研究	高分子化学 生体材料学	東京医科歯科大学 医用器材研究所助教授 石原一彦
JA-95-07	オリゴ糖による皮膚の耐乾燥保護の分子メカニズムに関する基礎的研究	生体分子工学	東京工業大学生命理工学部教授 井上義夫
JA-95-10	両親媒性分子が構築する超分子の構造と機能性に関する研究	超分子物性化学 高分子物性	名古屋大学理学部助教授 今栄東洋子
JB-95-02	光学活性化合物合成を目的とする新規不斉触媒及び新規不斉触媒サイクルの開発研究	有機合成化学	早稲田大学理工学部助教授 中田雅久
JA-96-02	単分散無機顔料粒子のモルフォロジー制御とそのキャラクターゼイション	コロイド化学 界面化学	大阪教育大学教育学部助教授 神鳥和彦
JA-96-05	合成糖脂質の超分子集合体に関する研究	高分子化学 高分子物性	早稲田大学理工学部助教授 武岡真司
JA-96-07	高分子経皮吸収促進剤の開発と応用研究	高分子化学 製剤学	相模中央化学研究所主任研究員 長瀬裕
JA-96-08	新発見の糊代を持ったタンパク質の基礎と応用 (タンパク質接着能を有する化粧品素材の開発)	生物化学	東京工業大学生命理工学部教授 広瀬茂久
JB-96-02	食用乳酸菌による化粧品素材としての機能性多糖の生産とその改質	生物材料化学 応用生物化学	新潟大学工学部教授 谷口正之
JB-96-03	メラニン生合成阻害作用を示す海洋天然物の探索	生薬学 天然物化学	北海道大学薬学部教授 小林淳一
JA-97-01	微粒子酸化チタン上に形成された多鎖型界面活性剤吸着層への紫外線吸収剤の吸着可溶化	コロイド 界面化学	東京理科大学理学部教授 江角邦男
JA-97-02	新規な機能を有するコラーゲンの創製	生物化学 分子生物学 バイオテクノロジー	東京工業大学生命理工学部助教授 斎藤佑尚
JA-97-03	脂質エマルション表面単分子膜とリポソーム表面2分子膜の示す顕著なバイオ機能の差異	界面化学 製剤物理化学	京都大学大学院薬学研究科教授 半田哲郎
JB-97-03	植物由来環状ペプチド類のチロシナーゼ阻害活性に関する研究	生薬 天然物化学	東京薬科大学薬学部助教授 竹谷孝一

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
JB-97-07	逆ミセルを用いた水の構造化とその機能性に関する研究	コロイド界面化学	静岡県立大学経営情報学部助教授 五島綾子
JA-98-03	古細菌由来のエーテル型リン脂質の物性と機能に関する基礎的な研究	生物有機化学	東京工業大学大学院 理工学研究科助教授 江口正
JA-98-05	森林生物資源からの育毛活性化成分の探索	森林生物化学 天然物化学	九州大学農学部助教授 近藤隆一郎
JB-98-01	動的光散乱法を用いた合成および天然高分子のゲル化機構の多面的解析	高分子物性 化学物理	京都工芸繊維大学繊維学部教授 柴山充弘
JB-98-07	化粧品による皮膚かぶれを防ぐ菌類成分の探索	薬理活性天然物化学	千葉大学薬学部助教授 藤本治宏
JB-98-11	遺伝子の増殖を制御する人工の脂質膜の開発	生物化学 脂質化学 界面化学	九州大学有機化学 基礎研究センター助教授 石川雄一
JB-98-13	発光、電子分光スペクトルによる酸化亜鉛中の表面・欠陥の状態解析と発光特性制御	酸化物半導体物性 (粉体の光学的性質)	東京工業大学工学部助手 大橋直樹
JB-98-14	含フッ素非対称置換トレハロース誘導体の合成と皮膚に対する保湿性と親和性の検討	糖質生化学 有機合成化学	北里大学看護学部助教授 森島直彦
JA-99-01	匂いの感性計測を行うセンサーシステムの開発	感性工学 センサー工学	九州大学大学院 システム情報科学研究科教授 都甲潔
JB-99-01	新規化粧品素材としての植物由来クロロゲン酸代謝産物の配糖体合成と美白効果ならびに感作性の検討	有機合成化学	近畿大学工学部教授 野村正人
JB-99-03	分散安定性に優れたサーファクタントフリーエマルションの調製法の確立とその凝集・合一過程の解明	界面化学 コロイド化学 物理化学	東京理科大学理工学部教授 阿部正彦
JB-99-09	化粧品素材としての含硫化合物の生産に関する研究	応用生物化学	早稲田大学理工学部教授 木野邦器
JB-99-14	分子量および官能基を制御した新規キトサン系界面活性剤の機能化に関する研究	精錬工学 応用界面化学 生物化学工学	東京工業大学大学院 理工学研究科教授 梶内俊夫
J-00-02	微生物代謝工学に基づく必須および新規脂肪酸の大量生産	脂質生化学 微生物育種工学	筑波大学応用生物化学系教授 小林達彦

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
J-00-04	水分子の移動とその速度制御のための分子膜の開発	コロイド、界面化学 反応速度論 物理化学	九州大学大学院理学研究院教授 師井義清
J-00-07	4位置換レゾルシノール誘導体のメラニン生成抑制効果	天然物化学 生物有機化学	九州大学大学院農学研究院講師 清水邦義
J-00-08	酸化セリウム系紫外線遮断剤の開発	無機材料化学 希土類化学	大阪大学大学院工学研究科助手 増井敏行
J-00-09	逆ミセルの微細構造を利用した生理活性物質内包型ナノカプセルの創製	生物工学、コロイド化学 物理化学、有機化学 溶液化学、化学工学	九州大学大学院工学研究院助手 小野努
J-00-14	$^1\text{C}_4$ 配座のグルコース環状六量体、反転シクロデキストリンの創製	有機合成化学 糖化学	関西学院大学理学部助教授 山田英俊
J-00-16	化粧品素材としての合成スメクタイトの高機能化	材料化学	東北大学反応化学研究所助手 白井誠之

生体作用、安全性に関する分野

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
J 90-01	染毛剤成分の代謝に関する研究	薬物代謝	食品薬品安全センター秦野研究所 中尾 美津男
J 90-02	ドレイズ試験代替法の開発ーヒト細胞、昆虫細胞を用いた高感度迅速試験法の開発研究ー	組織培養学	理化学研究所副主任研究員 大野 忠夫
J 90-05	胆汁酸生合成のメカニズムに関する研究	生物有機化学	東京工業大学理学部助教授 藤本 善徳
J 90-08	皮膚の老化に伴うエラスチン遺伝子発現の動態	皮膚科学	慶應義塾大学医学部講師 多島 新吾
J 90-09	Werner症候群患者皮膚由来培養線維芽細胞のサイトカイン細胞成長因子に対する応答性	皮膚科学	横浜市立大学医学部助手 佐々木 哲雄
J 90-10	光化学反応によるフリーラジカルの産生と表皮培養細胞に対する影響	医科学 生化学	東京大学医科学研究所教授 金ヶ崎 士朗
J 90-11	色素性皮膚病変に対するレーザー療法の研究	皮膚科学	帝京大学医学部助教授 渡辺 晋一
J 90-12	表皮糖脂質の生化学的、形態学的並びに臨床的研究 (エピデルモシド)	皮膚科学 生化学	山口労災病院皮膚科部長 浜中 すみ子
J 90-13	生体の酸化的障害に対する防御機構の生化学的研究ービタミンEの活性発現機構の解析ー	生化学	東京大学薬学部助手 新井 洋由
J 90-14	皮膚生理機能賦活物質の経皮吸収に対する評価解析理論の確立	薬剤学	京都大学薬学部教授 瀬崎 仁
J 91-01	培養表皮細胞及び線維芽細胞におけるグリコサミノグリカン及びコラーゲンの代謝	生化学	東京薬科大学教授 森 陽
J 91-03	活性酸素、フリーラジカルによる生体膜障害の防止に関する研究	有機生化学	東京大学 先端科学技術研究センター教授 二木 鋭雄
J 91-04	パッチテスト結果のコンピューター処理システムの開発	皮膚科学 接触皮膚炎	名古屋大学 医学部附属病院分院皮膚科長 早川 律子
J 91-07	皮膚過敏症に対するマスト細胞の役割ーマスト細胞欠損動物を用いた検定法の開発ー	実験病理学	大阪大学医学部教授 北村 幸彦

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
J 91-09	マウス悪性黒色腫を用いたチロシナーゼ抑制因子の精製と応用	皮膚科学 メラニン色素	北里大学医学部講師 亀山 孝一郎
J 91-12	接触光過敏症のマウスモデルを用いた化粧品による光アレルギーのスクリーニング及びサンスクリーンの効果の評価	光生物学 皮膚免疫	浜松医科大学教授 滝川 雅浩
J 91-14	メラニン生合成の調節	分子生物学	東北大学医学部教授 柴原 茂樹
J 91-16	ビタミンCと上皮成長因子によるヒト皮膚線維芽細胞の増殖とコラーゲン代謝調節機構の分子細胞生物学的研究	分子細胞生物学 医化学	東京医科歯科大学助手 畑 隆一郎
J 91-17	人工皮膚を用いた皮膚の形成機構及び皮膚の反応性試験に関する研究	細胞生物学	広島大学理学部教授 吉里 勝利
J 91-18	サンスクリーンの紫外線表皮障害に対する防御作用の免疫生物学的研究	皮膚科学	京都大学医学部講師 古川 福実
J 91-19	ダイレクトスキンセンサーを用いて測定した皮溝と加齢の関係	老年病学 動脈硬化	慶應義塾大学医学部助手 本間 聡起
J 91-22	フリーラジカルとポルフィリン代謝に関連する皮膚の老化機構解明に関する研究	環境科学 毒性学	国立公衆衛生院 労働衛生学部室長 市川 勇
J 92-02	光熱変換分光法による薬物の組織及び細胞への非侵襲吸収計測法の開発	分析化学	東京大学工学部教授 澤田 嗣郎
J 92-05	アスパラギン酸プロテアーゼ類の蛋白工学的機能改変によるケラチナーゼの開発	蛋白工学 生化学	東京大学理学部助手 井上 英史
J 92-06	神経ペプチドによる皮膚炎症反応の成立機序とその特異的制御	内科学 アレルギー学	千葉大学医学部助手 岩本 逸夫
J 92-07	皮膚の機能と脂質代謝に関する基礎的研究	生化学	新潟大学医学部教授 小野 輝夫
J 92-08	転移因子を用いたアントシアニン色素生合成遺伝子とその発現調節因子遺伝子の解析	分子遺伝学 分子生物学	東京理科大学基礎工学部教授 飯田 滋
J 92-09	モノクローナル抗体を用いた紫外線誘発DNA損傷の定量とメラニン色素のサンスクリーン効果の実験的証明	皮膚科学	奈良県立医科大学大学院生 小林 信彦

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
J 92-10	皮膚の老化における染色体構造の変化と遺伝子修復機構に関する研究	細胞生理学	理化学研究所主任研究員 花岡文雄
J 92-11	アスコルビン酸2-β-D-グルコシドの生物学的有用性研究—経皮吸収によるビタミンC活性発現の評価—	免疫薬理学	岡山大学薬学部教授 山本 格
JA-93-01	還元型ネオプテリン (NPH-4) の紫外線照射皮膚障害に対する効果	放射化学 薬理学 生化学	東京理科大学 生命科学研究所講師 小島周二
JA-93-02	化粧品による光老化の抗酸化制御に関する細胞生物学的及び生化学的研究	皮膚科学 紫外線生物学	群馬大学医学部教授 宮地良樹
JA-93-03	太陽光紫外線でヒトDNA中に誘発される損傷とその修復に関する研究	放射線生物学 細胞生物学	金沢大学薬学部教授 二階堂 修
JA-93-07	色素化合物の光照射下での反応の解析	生物物理化学 光化学治療 光増感化学	東京工業大学生命理工学部教授 大倉 一郎
JA-93-09	いわゆる“しみ” (肝斑など) の発症機構とその増悪因子に関する研究	皮膚科学	東北大学医学部講師 富田 靖
JB-93-04	尋常性痤瘡の発症機序の解明のための皮膚の保湿機能と脂質代謝に関する研究	皮膚科学	新潟大学医学部助教授 山本綾子
JB-93-05	哺乳類皮膚細胞のアポトーシスと細胞接着をつかさどるセラミドの研究	糖生物学 発生生物学 生化学	九州大学理学部助教授 野村 一也
JB-93-06	不飽和脂肪酸とその過酸化生成物の皮膚角質層への作用に関する研究	製剤学	大阪薬科大学薬学部助教授 森本 一洋
JA-94-03	表皮ケラチノサイトにおけるヒト細胞老化因子の研究	皮膚科学	大阪大学医学部助教授 橋本公二
JA-94-06	皮膚生理機能賦活物質の合理的吸収促進法の開発	薬剤学	京都大学薬学部教授 橋田 充
JA-94-08	リポソーム封入薬剤の皮膚吸収過程の解析と皮膚内ラジカル消去への応用	生体物理化学 生体医用化学	九州大学薬学部教授 内海英雄
JA-94-09	表皮細胞の細胞接着と角化制御に関するシグナル伝達	皮膚科学 細胞生物学	岐阜大学医学部教授 北島康雄

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
JA-94-11	微生物に由来する多糖分解酵素のコスメトロジーへの応用	遺伝子工学 生化学	東京工業大学 生命理工学部助教授 中村 聡
JB-94-01	皮膚発現型レチノイン酸受容体のドミナントネガティブ・トランスジェニックマウスを用いた皮膚の成熟過程の検討	皮膚科学 遺伝子工学	京都大学医学部助手 田中 俊宏
JB-94-02	化粧品が高温環境下の発汗反応及び選択的脳冷却機構に及ぼす影響	環境生理学 温熱生理学	金沢大学医学部助手 田辺 実
JB-94-03	サンスクリーン剤の光ハプテンとしての性格	皮膚科学	浜松医科大学医学部講師 戸倉 新樹
JA-95-02	脂質皮膚モデルを利用した化粧品及び水の浸透と安全性に関する基礎的研究	生物物理化学 高分子物性	東京工業大学工学部助教授 谷岡 明彦
JA-95-03	小分子化学物質によるアトピー性皮膚炎の発症と予防についての基礎研究	免疫薬理学	岐阜薬科大学教授 永井 博 式
JA-95-04	ヒト皮膚移植SCIDマウスを用いた新しいコスメトロジー研究	実験病理学	大阪大学医学部教授 野村 大成
JA-95-08	接触皮膚炎におけるマスト細胞活性化反応の解析	生化学	昭和大学薬学部教授 工藤 一郎
JA-95-09	放射線照射あるいは制癌剤投与による脱毛の抑制	生化学 放射線生物学	星薬科大学講師 太田 節子
JB-95-01	皮膚表皮細胞におけるリポドバイオフィクターの機能発現機構	生化学 分子生物学	新潟大学医学部助教授 藤井 博
JB-95-03	炎症後色素沈着におけるエイコサノイドによるメラノサイト活性化機構の解明	皮膚科学 生化学	京都大学医学部助教授 井階 幸一
JB-95-04	細胞内小器官ペルオキシソーム：エーテルリン脂質の生合成と酸素ラジカルスカベンジャー機能及び欠損症	細胞生化学 分子生物学	九州大学理学部教授 藤木 幸夫
JB-95-06	多成分油性皮膚浸透促進システムの有効性及び作用機構に関する研究	製剤学	城西大学薬学部助教授 杉林 堅次
JA-96-01	化粧品用生理活性物質の皮膚透過と皮内貯留性及びヒト皮膚と動物並びに培養皮膚との比較	生物薬剤学 皮膚科学	近畿大学薬学部教授 小木曾 太郎

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
JA-96-03	酸化ストレスにより生体膜に生成する酸化型リン脂質の代謝機構の解明	生化学 薬学	北里大学薬学部教授 中川靖一
JA-96-06	HGFによる皮膚の再生促進と老化防止の基礎的研究	生化学 細胞生物学	大阪大学医学部助教授 松本邦夫
JA-96-09	in vitro ヒト樹状細胞培養系を用いた化学物質の感作性試験の可能性についての基礎的検討	皮膚科学 皮膚免疫	東北大学医学部講師 相場節也
JA-96-10	ケラチノサイトの発現するエラスチンと皮膚老化の関連について	皮膚科学 生化学 分子生物学	防衛医科大学校助教授 多島新吾
JB-96-05	免疫不全マウス再構成皮膚における培養毛乳頭細胞による毛包形成の誘導と関連因子の検討	皮膚科学	聖マリアンナ医科大学助教授 窪田泰夫
JB-96-06	細胞増殖因子および接着分子による皮膚硬化制御に関する分子生物学的研究	皮膚科学 膠原病学	獨協医科大学助教授 山蔭明生
JA-97-04	男性ホルモンによる毛の発育制御機序の解析	皮膚科学 内分泌学	大阪大学医学部助教授 板見智
JA-97-05	新規蛍光プローブを用いた一酸化窒素 (NO) の皮膚における作用解析	有機化学 分析化学 細胞生物学	東京大学大学院薬学系研究科助手 菊地和也
JA-97-06	生体計測工学に基づいた非侵襲的な皮膚の性状の測定法の開発	皮膚科学 化粧品科学 生体工学 医用工学	東北大学医学部教授 田上八朗
JA-97-07	老化による皮膚色素沈着の画像定量自動解析システム確立のための基礎研究	皮膚科学	慶應義塾大学医学部専任講師 田中勝
JB-97-01	接触過敏症の皮膚浸潤細胞に特異的に発現している遺伝子の解析	免疫学 分子生物学	東邦大学理学部教授 小林芳郎
JB-97-02	ノックアウトマウスをもちいた cell envelope のバリアー機能解析	分子生物学 発生工学 遺伝子工学 皮膚科学	京都府立医科大学医学部講師 山西清文
JB-97-04	紫外線吸収効果をもつ酸化チタンの光触媒作用と生体適合性	生体材料	東京理科大学基礎工学部助教授 鈴木高広
JB-97-05	日光老化についてとくに日光弾性線維症の発症機構ならびにUV <sup>S</sup> 症候群の病態に関する研究一	皮膚科学 生化学 分子生物学	熊本大学医学部教授 小野友道

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
JB-97-06	眼粘膜への障害を指標とした化粧品素材の安全性評価のための基礎的検討—眼内動態の定量的評価法の確立	薬剤学	長崎大学薬学部教授 中村 純 三
JB-97-08	紫外線誘発DNA損傷および修復酵素の細胞内分布状態の三次元的表示	放射線生物学	奈良県立医科大学助教授 森 俊 雄
JB-97-10	皮膚器官培養系を用いた化学物質の刺激性、抗原性の検討	免疫学 アレルギー 分子生物学	東京医科歯科大学医学部助教授 横 関 博 雄
JB-97-11	皮膚の老化に伴うテロメア短縮化とフリーラジカル障害に対する、細胞内アスコルビン酸のエンリッチング化による防御効果	皮膚生化学 細胞薬理学	広島県立大学大学院 生物生産システム研究科教授 三 羽 信 比 古
JA-98-01	紫外線ならびに放射線により皮膚で惹起されるラジカル反応の無侵襲測定と皮膚障害予防を目的とした抗酸化剤評価への応用	生体物理化学	放射線医学総合研究所総合研究官 小 澤 俊 彦
JA-98-02	ヒト角層細胞のcell envelopeの発生とその機能障害を来す病態の解析	皮膚科学	慶應義塾大学医学部助手 秋 山 真 志
JA-98-04	微小透析法を用いた皮膚内の化粧品素材動態および生体成分動態の系統的解析法の確立	臨床薬剤学	長崎大学医学部附属病院助教授 佐 々 木 均
JB-98-02	接触性皮膚炎の研究：皮膚刺激とマクロファージ「細胞交通」の関与	免疫学 アレルギー学	静岡県立大学薬学部教授 今 井 康 之
JB-98-03	老化抑制遺伝子klothoの結合細胞老化における病態生理学的意義の解明と治療法開発への応用	老化学	群馬大学医学部教授 永 井 良 三
JB-98-04	サンスクリーンの皮膚悪性黒色腫発症予防効果の解析	免疫学 皮膚科学	名古屋大学医学部助手 加 藤 昌 志
JB-98-05	アスコルビン酸膜透過促進キャリアーの開発と機構探求	薬品物理化学 生物有機化学	東北大学薬学部講師 鈴 木 巖
JB-98-06	表皮有棘細胞に特異的な遺伝子組み替えを用いた、ダメージスキンの修復機序の研究	皮膚科学 分子生物学 細胞生物学	京都大学大学院医学研究科助手 高 橋 健 造
JB-98-08	太陽光紫外線変異原性の作用スペクトラムとサンスクリーンの効果	変異機構学	岡山大学薬学部助教授 根 岸 友 恵
JB-98-09	ヒト毛細胞特異的ペプチジルアルギニンデイミナーゼのcDNAクローニングと毛髪新生における生理機能の解析	皮膚科学 生化学 分子生物学	帝京大学医学部 附属市原病院助教授 川 田 暁

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
JB-98-12	美白剤の紫外線色素沈着抑制機構とその安全性に関する研究	皮膚科学	神戸大学医学部附属病院講師 船坂陽子
JA-99-02	ヒト皮膚線維芽細胞における脂肪酸、コレステロール代謝調節機構	分子細胞生物学 生化学	大阪大学大学院 薬学研究科助教授 佐藤隆一郎
JA-99-03	高発現型メラニン色素産生遺伝子のコスメトロジーへの応用	遺伝子治療学 遺伝子工学	広島大学医学部教授 杉山政則
JB-99-02	ヒト脂腺細胞に代るハムスター脂腺細胞を用いた皮脂代謝に関する基盤的研究	生化学 分子生物学	東京薬科大学薬学部講師 佐藤隆
JB-99-04	紫外線照射で生じるDNA損傷部位に特異的に結合するタンパク質DDBp48の発現調節	細胞生理学	熊本大学医学部附属 遺伝発生医学研究施設教授 山泉克
JB-99-05	サイトカインノックアウトマウスにおける免疫反応とストレス応答を指標とする皮膚機能の解析	毒性生化学 皮膚生化学	昭和大学薬学部教授 吉田武美
JB-99-06	糖転移酵素の関与するメラニン産生制御の解析	生化学 糖鎖生物学	大阪大学大学院 医学系研究科教授 谷口直之
JB-99-07	白血球分画が皮膚の健康状態と関連するメカニズム	免疫学 皮膚科学	新潟大学医学部教授 安保徹
JB-99-08	UVAによる酸化的遺伝子損傷の細胞内修復機構	生化学 放射線生物学	広島大学大学院 理学研究科教授 井出博
JB-99-10	太陽紫外線による細胞のアポトーシスとサンスクリーンの効果	放射線生物学	放射線医学総合研究所主任研究官 古澤佳也
JB-99-11	ゼラチンによるアレルギー反応のエピトープ解析と安全なゼラチンの開発	細胞外マトリックス の分子医化学	東京医科歯科大学 難治疾患研究所助手 堀久枝
JB-99-13	皮膚色素性病変の新しい診断法の開発～デジタルマイクロスコープと病理組織三次元再構築法を用いた早期メラノーマ診断～	皮膚科学	北海道大学医学部助手 松村哲理
J-00-01	A、B領域紫外線の直接照射によりSCIDマウス移植ヒト皮膚に誘発される遺伝子変異とその予防	実験病理学 皮膚科学	大阪大学大学院 医学系研究科助教授 本行忠志
J-00-03	皮膚老化の分子メカニズムの解明：老化マウスklothoにおける解析	医学	群馬大学医学部教授 倉林正彦

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
J-00-05	ヒト皮膚線維芽細胞におけるⅠ型コラーゲン遺伝子の個人依存性発現制御機構	分子細胞生物学	神奈川県立大学歯学部教授 畑 隆 一 郎
J-00-06	ヒト皮膚における遊離脂肪酸の動態に及ぼす皮膚常在細菌ならびに化粧品の影響に関する研究	生物分析化学	東京薬科大学薬学部助手 小 谷 明
J-00-10	皮膚保護作用を有するセラミドの生理作用発現機構に関する研究	細胞生理学	東北大学大学院薬学研究科教授 中 畑 則 道
J-00-11	爪の形状に対するⅦ型コラーゲンの変異がかかわる影響について	遺伝性皮膚疾患 分子生物学 細胞外マトリックス他	北海道大学医学部附属病院助手 松 村 和 子
J-00-12	表皮角層細胞間脂質形成に対する上皮型脂肪酸結合蛋白 (E-FABP) の機能解析—E-FABPノックアウトマウスを用いた検討—	生化学 分子生物学 組織学	東北大学大学院 医学系研究科講師 大 和 田 祐 二
J-00-15	紫外線及び化学合成化合物のヘアレスラット皮膚に対する障害作用及びその防御	皮膚科学 炎症薬理学	城西大学薬学部教授 谷 覺

精神、文化に関する分野

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
J 90-04	化粧が意識性に及ぼす効果の研究	心理学	早稲田大学人間科学部教授 春木 豊
J 91-13	香料に関する定量的解析	感覚生理学	北海道大学薬学部教授 栗原 堅三
J 91-15	アルツハイマー型老年痴呆症者と、いわゆる“ぼけ”症状を呈する人々への化粧による情動活性化の研究	感情心理学 臨床心理学	同志社大学文学部教授 浜 治世子
J 91-21	「色白」の嗜好構造に関する一考察	心理学 色彩心理学 造形心理学	早稲田大学 人間総合研究センター 齋藤 美穂
Js-92-01	病院看護における化粧に関する研究	基礎看護学	埼玉県立衛生短期大学教授 大河原 千鶴子
Js-92-02	高齢者のおしゃれ行動とその評価に関する研究	人間行動科学	北海道教育大学教育学部助教授 藤森 立男
JA-93-04	色彩の心理学的意味空間の研究	計量心理学 認知心理学 行動計量学	金沢大学文学部助教授 岡本 安晴
JB-93-03	化粧の個人的効果と対人的効果に関する実証的研究	社会心理学	福島大学教育学部助教授 飛田 操
JA-94-05	化粧と痴呆老人に関する基礎的研究	脳神経外科学 心理学	産業医科大学名誉教授 松岡 成明
JB-94-04	対人魅力の形成にかかわる顔の構造的特徴と化粧行動の影響の研究	社会心理学 対人魅力	北星学園大学文学部教授 大坊 郁夫
JA-95-05	化粧皿を通じた古代ヘレニズム世界における化粧文化の研究	装飾文化 デザイン	神戸芸術工科大学助教授 服部 等作
JB-95-05	化粧品の表示に関する研究—ことに警告表現について—	社会心理学	筑波大学社会工学系講師 吉川 肇子
JA-96-04	化粧品の香り表現に関する研究	心理学 官能評価	東京学芸大学教育学部助教授 神宮 英夫
JB-96-04	高齢女性における情動活性化の試み：リハビリテーション・プログラムへの適用可能性の検討	情動心理学 発達心理学	同志社大学 文学部学生（博士課程） 伊波 和恵

管理番号	研究課題	分野	代表研究者
JB-97-09	高齢者の被服行動の変容が、高齢者の自尊感情及び日常生活行動に与える影響	行動学 老年心理学 臨床心理学	京都大学教育学部助教授 吉川 左紀子
JB-97-12	健康な笑いつくりの方法について	感情心理学 健康心理学	福岡大学人文学部教授 高下 保幸
JB-98-10	化粧とよそおいにおける非対称性 ーアシンメトリー流行の可能性ー	造形心理学 社会心理学	神戸松蔭女子学院大学文学部教授 藤本 浩一
JB-98-15	空間演出における環境芳香の与える心理的影響に関する研究	人間工学	早稲田大学人間科学部助手 河合 隆史
JB-99-12	口唇口蓋裂患者の顔面の非対称感の改善に対する化粧の効果	顎顔面口腔外科学 心理学	大阪大学歯学部助手 飯田 征二
J-00-13	癌患者への「化粧」技術指導プログラムの日本への適用可能性に関する研究	精神腫瘍学	東京大学大学院医学系研究科助手 高橋 都
J-00-17	化粧文化史の変遷と流行した化粧の受け入れ方の考察	生活美学	武庫川女子大学大学院 家政学研究科院生 玉置 育子

\*本財団についてのお問い合わせは下記に  
お願いいたします。

財団法人 コスメトロジー研究振興財団

〒104-0061 東京都中央区銀座三丁目5番12号  
電話 03 (3564) 6731

コスメトロジー研究報告 Vol. 9 / 2001

非売品

2001年9月1日発行

編集責任者 有本 亨

発行 財団法人 コスメトロジー研究振興財団  
〒104-0061 東京都中央区銀座三丁目5番12号  
電話 03 (3564) 6731

制作 エイエム企画  
〒170-0013 東京都豊島区東池袋三丁目15番2号  
電話 03 (3590) 5375

印刷 太陽印刷工業