ISSN 2188-563X

コスメトロジー研究報告

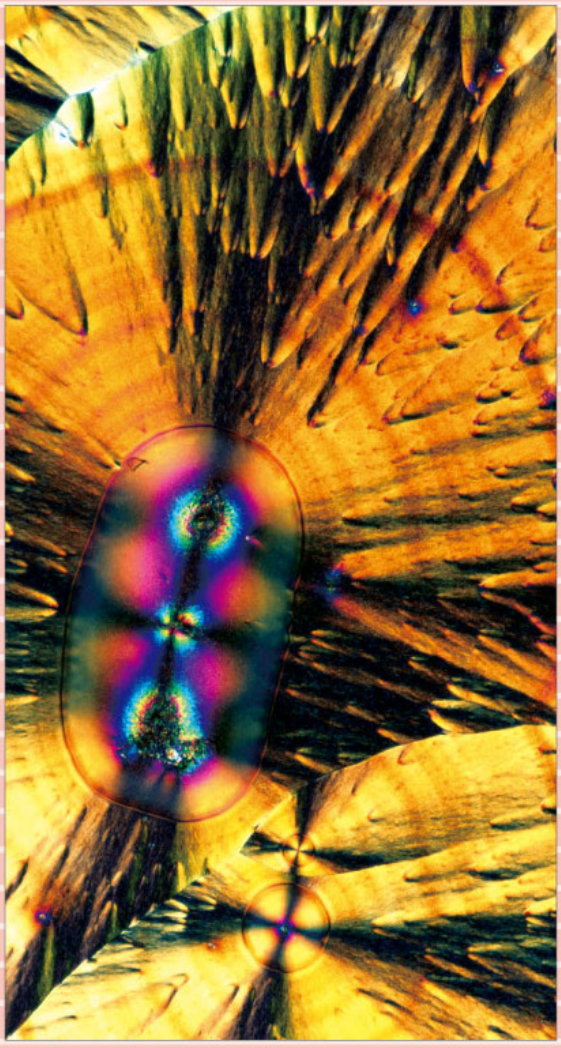
Annual Report of Cosmetology

COSMETOLOGY

2019

■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

volume 27



Ascorbic Acid

公益財団法人 コスメトロジー研究振興財団

ごあいさつ

このたび、コスメトロジー研究振興財団として27冊目の研究報告書を刊行いたしました。

本財団を設立して以来、コスメトロジー（化粧品科学）の発展をめざす研究テーマへの助成活動を滞りなく継続できたましたことは、多くの関係者の皆様のご理解とご協力によるものと、改めて感謝申し上げる次第でございます。

そもそも化粧品科学は、医学、生理学、化学、薬学、心理学、社会学など幅広い学問領域を基盤に成り立っており、これらの専門分野の研究者が新たに化粧品分野の研究にも参画していただくことで、今日のコスメトロジーが形作られたと申し上げることができます。

本財団が支援した研究テーマも、皮膚科学から新素材開発、機能評価、化粧心理、文化論など多種多様であり、それぞれ独創的で波及性のある研究成果をお示しいただきました。この活動により、これまで本財団がコスメトロジーの発展に微力ながら貢献できましたことは、私どもの大きな喜びとするところでございます。

今回の報告書では、2016年度から2017年度に助成を受けられた先生方35名の研究報告を掲載しております。また、昨年秋の第29回表彰・贈呈式にてご講演いただいた早稲田大学齋藤美穂先生の講演録、および今回助成を終えられた先生方の所感をまとめた「コスメトロジー研究雑感」を合わせて掲載しています。

この研究報告書COSMETOLOGY誌をご高覧いただきまして、皆様にコスメトロジーの更なる発展に向けてご活用いただきますことを祈念しています。

引き続き本財団は、化粧品科学の発展のために、優れた研究に対して積極的に助成を進めて参る所存でございます。

今後とも、皆様のますますのご協力とご支援をお願い申し上げます。

2019年9月

公益財団法人 コスメトロジー研究振興財団

理事長 小林　保清

目　次

■ごあいさつ

■研究報告

Ⅰ．素材、物性に関する分野

・サンスクリーン剤の紫外線防御能を普く正確に *in vitro* 評価する測定方法の確立 …… 4
慶應義塾大学理工学部　朝倉　浩一

・MRI と時間温度換算則を応用したエマルション化粧品の高精度乳化安定性予測 …… 10
富山大学大学院医学薬学研究部（薬学）　大貫　義則

・抗菌性と生体適合性を併せ示す生糸織物の開発…… 17
東京医科歯科大学生体材料工学研究所　川下　将一

・化粧品の評価・開発に資する微小な力を検知する水溶性の分子集合体の開発…… 24
北海道大学電子科学研究所　相良　剛光

・抗酸化物質から成る Cubosome の開発およびミクロ・メソ・マクロ特性の評価 …… 30
大阪大学大学院基礎工学研究科　菅　　恵嗣

・渦のねじれ流によるコラーゲンナノファイバーの形成制御と形態変換…… 36
神戸大学大学院理学研究科・滋賀医科大学医学部・内蒙古医科大学薬学院　津田　明彦

・ケルセチン含有化粧品の最有効使用のための有機ナノコンポジット設計…… 40
大阪薬科大学　戸塚　裕一

・顕微ラマン分光法を用いた皮膚角質層の評価法および透過性スクリーニング法の構築…… 47
明治薬科大学　藤井　美佳、深水　啓朗

・カラフルな反射色を永続的に維持できるセルロース誘導体の創製…… 52
東京理科大学理学部第一部応用化学科　古海　誓一

・アミノ化合物によるナノ結晶（粒子）の成長抑制技術の開発…… 58
山形大学大学院理工学研究科　増原　陽人

・マイコスポリン様アミノ酸誘導体の電荷共鳴吸収を基盤とする新規天然由来サンスクリーン材料…… 64
大阪大学大学院工学研究科　森　　直

・ミャンマー産ハーブの美白効果の検証と美白成分の解析…… 68
富山大学和漢医薬学総合研究所　森田　洋行

・メーキャップ化粧品の光学的機能評価に向けた人工皮膚の開発…… 75
芝浦工業大学工学部機械工学科　山田　　純

Ⅱ．生体作用、安全性に関する分野

・ホスファチジルイノシトールの特徴的脂肪酸組成の皮膚恒常性における役割の解析…… 84
東京都健康長寿医療センター研究所　今江　理恵子

・女性頭髪における休止期－成長期移行シグナルメカニズムの *in vitro* 解析系の構築 …… 90
東京工科大学応用生物学部　岩渕　徳郎

・ヒト培養表皮におけるアスコルビン酸の経皮吸収および紫外線 UVB による細胞障害に対する予防、回復効果の検討…… 96
東京都健康長寿医療センター研究所　近藤　嘉高

・皮膚老化におけるエキソソームの働きの解明と治療応用の可能性の検討…… 98
和歌山県立医科大学皮膚科　神人　正寿

・皮膚における自己反応性 $CD4^+$ T 細胞による標的抗原認識機構の解明 …… 104
慶應義塾大学医学部皮膚科　高橋　勇人

・皮膚制御に関わる新規機能性脂質の同定と脂質フローによる皮膚疾患制御機構の解明…… 108
東京大学大学院医学系研究科分子細胞生物学専攻細胞情報学分野　武富　芳隆

・化粧品成分の安全性評価のための製品性状を考慮した経皮曝露量推算スキームの構築
－マニキュア用可塑剤の経皮曝露を考慮したリスクトレードオフ評価－…… 113
静岡県立大学　徳村　雅弘

・ナノ粒子が細胞膜を透過する現象の理解：分子動力学計算および平面脂質膜法による解析…… 120
大阪府立大学大学院工学研究科物質・化学系専攻化学工学分野　仲村　英也

・増殖因子による毛包休止期制御機構の解明…… 127
国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所
組織再生治療研究プログラム　中山　文明

・皮膚組織修復におけるリン脂質局在制御機構の役割…… 132
京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻　原　雄二

・構造情報を利用したタイトジャンクション増強剤の実用的な化合物への骨格転換…… 137
名古屋大学大学院創薬科学研究科構造分子薬理学分野　廣明　秀一

・刺激性試験のための元の性質を維持しながら無限分裂するヒト角膜上皮細胞の作成…… 145
岩手大学理工学部細胞工学・分子遺伝学研究室　福田　智一

・創傷治癒過程において、血管網の再構築が表皮幹細胞の分裂制御に果たす役割…… 152
神戸学院大学大学院薬学研究科　水谷　健一

・メラノソーム膜に局在する OCA4 型アルビノ原因遺伝子 MATP を標的としたメラニン合成阻害剤の開発…… 155
名古屋市立大学大学院薬学研究科　保嶋　智也

・紫外線曝露による皮膚老化・発癌においてミトコンドリア関連分子が果たす役割を解明する…… 161
北海道大学大学院医学研究院皮膚科学教室　柳　輝希

・表皮バリア機構に立脚した新規経皮吸収促進法の開発…… 169
大阪大学大学院薬学研究科　渡利　彰浩

Ⅲ．精神、文化に関する分野

・化粧の濃さと社会的文脈の循環的相互作用に関する行動経済学的アプローチ…… 176
広島大学大学院総合科学研究科　有賀　敦紀

・他者からの評価を推論するメカニズムがその人物に対する選好の形成に与える影響…… 180
サウサンプトン大学心理学部、日本学術振興会、北海道大学保健科学研究院　伊藤　文人

・眼瞼裂幅測定による耳鼻咽喉科心身症患者の客観的評価のこころみ…… 185
独立行政法人国立病院機構東京医療センター耳鼻咽喉科　五島　史行

・サーサーン・ガラス成立の背景
～ユーフラテス川以東へ流入した地中海周辺地域の化粧文化を探る～…… 189
岡山市立オリエント美術館　四角　隆二

・認知症の妻・母へスキンケアをする男性の特性…… 194
福岡大学医学部看護学科　西尾　美登里

・香りの記憶形成・固定化メカニズムの解明…… 200
同志社大学研究開発推進機構　眞部　寛之

■記念講演
・第 29 回表彰・贈呈式記念講演
「日本人の白嗜好と、感性をつなぐ色彩」…… 209
早稲田大学常任理事　齋藤　美穂

■コスメトロジー研究雑感・…… 219

■付　録

事業報告書　…… 241
2018 年度　研究助成を受けられた方々　…… 243
役員一覧　…… 246

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

サンスクリーン剤の紫外線防御能を普く正確に *in vitro* 評価する測定方法の確立

慶應義塾大学理工学部
朝倉　浩一

Concerns have increased for the establishment of reliable and reproducible *in vitro* evaluation method of UV protection efficacies of sunscreens, since it gives results more quickly, is less expensive and is more ethical. In this study, attempts were made to establish accurate and universal *in vitro* evaluation method of UV protection efficacies of sunscreens. Two subjects, hydrophilicity of the substrate surface on which sunscreens are applied and surface roughness of the cosmetic standard PMMA UV evaluation plates, were studied to analyze their influence on the value of *in vitro* UV protection efficacies.

Corona-discharge treatment was conducted on the quartz plate, and it was succeeded to make the surface super-hydrophilic to have a contact angle of water at 0 degree. The contact angle exponentially recovered to the initial value and its half life was around 5 d. Four types of commercially available sunscreens, water gel type, mist spray type, silicone/water type, and non organic UV absorber type, were applied onto the quartz plate exhibiting different hydrophilicity. It was found that the wettability of each sample differed and the values of *in vitro* UV protection efficacies drastically changed by changing the hydrophilicity of the surface.

Surface structures were analyzed for three cosmetic standard PMMA UV evaluation plates: Helioplates HD6 (Sa= 6 μm) and ISO plates (Ra=2 and 5 μm). Solution of acrylsilicone resin was added dropwise onto the plates and the solvent was evaporated. The plates were cut and the cross section was analyzed using SEM-EDS. The maximum depth of penetrating of acrylsilicone resin was larger than Ra and cracks into which the acrylsilicone resin penetrated were observed. Clear solution type pseudo-sunscreen samples containing acrylsilicone resin were deposited on the plates. It was found that the addition of acrylsilicone resin drastically changed the UV transmission.

1．緒　言

サンスクリーン剤のSPFおよびUVA-PFを*in vitro*測定する方法[1, 2]、すなわち規定量のサンスクリーン剤を基板上に塗布し、その塗布層の紫外線吸光度を測定して紫外線防御効果を評価する方法の開発が、測定コストの低減および倫理的観点から世界的に期待されている。ところが、これまでに*in vitro*測定法の再現性および信頼性に対し多くの問題点が指摘されてきた[3]。

そのような中、本著者らは、サンスクリーン剤の塗布の際にヴィスコスフィンガリングと呼ばれる現象により空間周期パターンが塗布層に自発的に発生[4, 5]し、この形状により紫外線吸光度が変動することを示してきた[6]。また、米国で近年導入されたBroad Spectrumの認定をするための臨界波長の測定[7]に対しても影響を及ぼすことを見いだした[8]。さらに、空間周期パターンの自発的発生が起こらないサンスクリーン剤の塗工法を見いだし、正確な*in vitro*測定法の開発に成功してきた[9]。

ただし、これまでの研究では、純粋に紫外線吸収剤分子による紫外線吸収しか存在しない理想的な溶液化した擬似サンスクリーン剤を用い、塗布層に形成された空間周期パターンが*in vitro*測定値に与える影響を検討してきたものであった。ところが、市販のサンスクリーン剤はエマルション系や無機粒子混合系など多相系である場合が多く、相間界面での屈折や反射あるいは無機粒子表面での散乱など、紫外線透過に影響を与える因子が複数となる。また、紫外線吸収剤分子は複数の相に分配平衡値に依存した濃度で分布し、この濃度分布は紫外線透過光強度の局所的な変動をもたらす。さらに、基板との親和性の問題から、塗布層の形成が困難なサンスクリーン剤も存在する。そこで、本研究では、様々な性状のサンスクリーン剤について、その紫外線防御能を普く正確に*in vitro*評価する方法の開発を目指した。また、すでにISO法となったUVA-PFの*in vitro*測定法[2]ならびにBroad Spectrumの認定をするための臨界波長の測定法[3]では、粗い表面構造を持つPMMAプレートに試料を塗布して紫外線透過光強度を測定する。そこで、この表面粗さが測定値に与える影響についても検討した。



Establishment of accurate and universal *in vitro* evaluation method of UV protection efficacies of sunscreens

Kouichi Asakura

Department of Applied Chemistry, Faculty of Science and Technology, Keio University

2．方　法

2．1．石英基板の親水性化ならびにその基板表面に形成されたサンスクリーン剤塗布層の紫外線遮蔽能の測定

石英基板にコロナ放電処理を施すことで、基板表面の超親水性化を試みた。また、その後その基板を放置して水の接触角の経時変化を測定した。つづいて、4種の市販のサンスクリーン剤(a：Water gel type、b：Mist spray type、c：

Silicone/water type、d：Non organic UV absorber type）を表面の親水性が異なった石英基板に塗布し、その塗布層の構造を観察するとともに、SPFアナライザーを用いてその紫外線透過光強度を測定した。

2．2．*in vitro* 紫外線遮蔽能測定用標準PMMA基板の表面粗さの評価

一辺の長さ5cmの正方形のHelioplates HD6（Sa=6μm）（**HD6**）ならびにISO plates（Ra=2および5μm）（**ISO2**および**ISO5**）の3種の*in vitro*紫外線遮蔽能測定用標準PMMA基板について、その断面のSEM観察を行った。つづいて、この表面にアクリルシリコーン樹脂の溶液を滴下し、溶媒蒸発終了後にその断面を走査型電子顕微鏡（SEM）で観察するとともに、SEM/エネルギー分散形X線分析装置（EDS）元素マッピング法を用いてSi元素のPMMA基板表面から深さ方向への分布を測定した。

2．3．標準PMMA基板の表面粗さの*in vitro*紫外線遮蔽能測定に与える影響の評価

数種類の異なった濃度のアクリルシリコーン樹脂の溶液に同一量の紫外線吸収剤を溶解させ、これらを擬似サンスクリーン試料とした。これら試料を*in vitro*紫外線遮蔽能測定用標準 PMMA基板**ISO5**上に滴下し、溶媒蒸発終了後、その表面の粗い構造が試料で埋まる様子を観察するとともに、SPFアナライザーを用いてその紫外線透過光強度を測定した。また、同一量の紫外線吸収剤を含む擬似サンスクリーン試料が、標準 PMMA基板の粗い表面を樹脂量の差により異なった体積で埋めることで、紫外線透過光強度がどのように変動するかを検討する数値シミュレーションを試みた。

3．結果と考察

3．1．石英基板の親水性化ならびにその表面に形成されたサンスクリーン剤塗布層の紫外線遮蔽能に対する影響

コロナ放電処理を石英板表面に施すとその表面上に置かれた水の接触角が0°となり、表面が超親水性化されることが認められた（Fig. 1）。その後この基板を放置することで徐々に接触角は元の値へと戻り、初期値との差の半減期は約5日であった。したがって、表面の親水性の調整は比較的簡単であった。また、プラズマ処理によっても同様に石英板表面は超親水性化された。

このようにして作製した親水性の異なった石英板表面上に4種の市販のエマルション型サンスクリーン剤を塗布し、紫外線吸光度の測定を行った。その結果、いずれの試料の紫外線吸光度も表面の親水性に大きく影響を受け、種類によりその傾向が異なることが認められた（Fig. 2）。特にWater gel typeおよびMist spray typeの試料は、基板がある程度以上の親水性とならないと、その紫外線吸光度が顕著に低下した。それぞれの塗布層の表面を観察したところ、これら2種の試料については、基板の親水性が低い場合、試料層にディウェッティングが起こり、試料で覆われておらず紫外線が全く遮蔽されない領域が出現することが認められた。

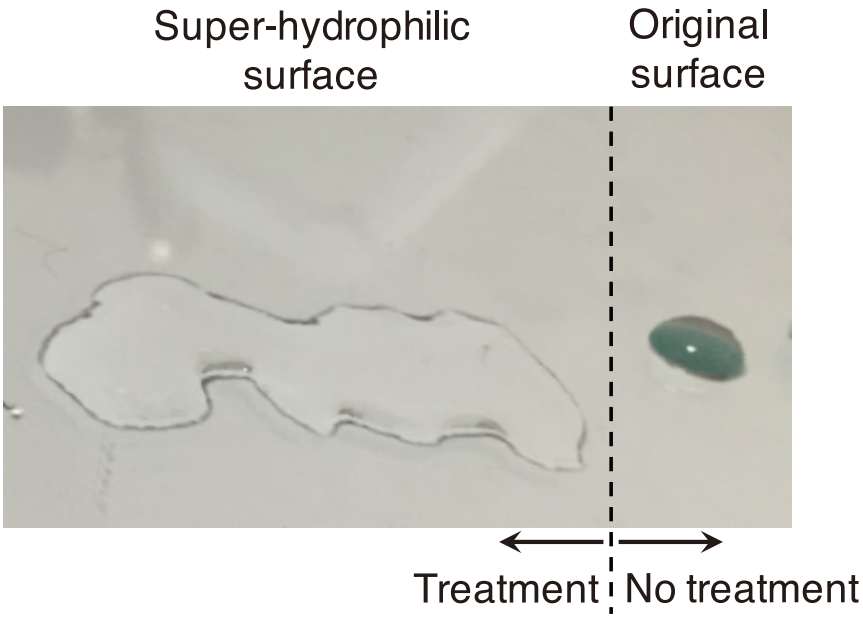


Fig. 1　Difference of the wettability by water on the original quartz surface and the super-hydrophilic quartz surface prepared by corona-discharge treatment.

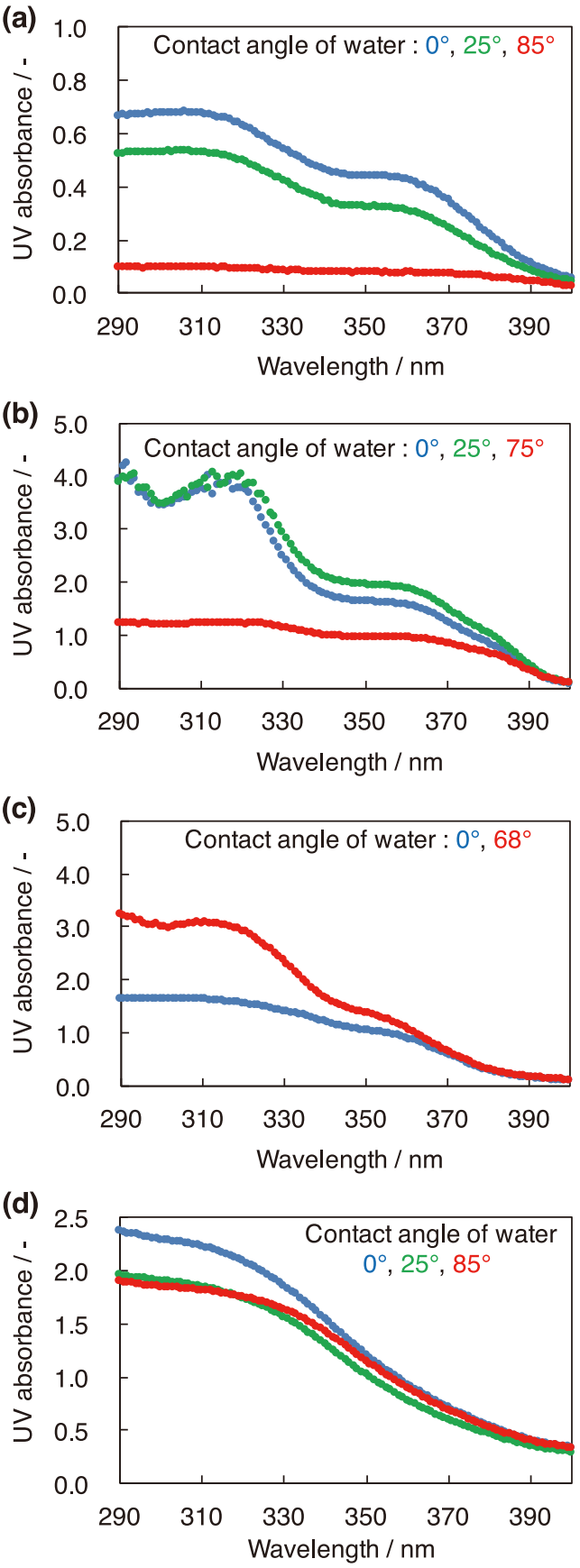


Fig. 2　UV absorbance of applied sample sunscreen layers on the quartz plate having different contact angle of water. (a)：Water gel type, (b)：Mist spray type, (c)：Silicone/water type, (d)：Non organic UV absorber type.

3．2．*in vitro* 紫外線遮蔽能測定用標準 PMMA 基板の表面粗さの評価ならびにその紫外線遮蔽能測定に与える影響

3種の標準PMMA基板である**HD6**ならびに**ISO2**および**ISO5**について、SEM観察ではそれら表面構造の顕著な違いは認められなかったが、SEM/EDS元素マッピング法によるSi元素の基板表面から深さ方向への分布は、各基板毎に異なる様子が観察された。Fig. 3の黄色い部分はそこにSi元素が存在していることを意味しており、**ISO2**および**ISO5**は比較的単純な表面粗さを有しているのに対し、**HD6**は孤立してSi元素が存在している領域があり、このことは基板に亀裂がありそこへアクリルシリコーン樹脂の溶液が侵入したことを示している。そして、アクリルシリコーン樹脂の溶液を滴下し溶媒を蒸発させた**HD6**の断面について、表面から深さ方向の何点かにおいて、Si元素の存在量のSi、C、Oの全元素存在量に対する比を測定したところ、その値は表面から漸近的に減少するのではなく、局所的にその比が高い領域が存在することが認められた(Fig. 4)。このことからも、**HD6**の表面付近には、アクリルシリコーン樹脂の溶液が侵入し易いような亀裂が存在していることが確認された。

つづいて、数種類の異なった濃度のアクリルシリコーン樹脂の溶液に同一量の紫外線吸収剤を溶解させた擬似サンスクリーン試料を作製し、標準基板**ISO5**上に滴下して溶媒を蒸発させたところ、当然の結果ではあるが、試料中の樹脂量の増加に伴い標準基板表面粗さの凹部がより多く埋められていく様子が確認された（Fig. 5)。そして、これらの紫外線透過光強度を石英板を参照として測定した結果、試料に添加した紫外線吸収剤では紫外線吸収が起こらない波長においても透過光強度が減衰することが認められ、その傾向は樹脂を添加しなかった試料において極めて顕著であることが認められた（Fig. 6(a))。したがって、この透過光強度の減衰は標準基板の粗い表面における乱反射によるものであり、その度合いは試料中の樹脂量の増加に伴って低下したと判断された。そこで、試料と同量のアクリルシリコーン樹脂のみを溶解させた試料を滴下して溶媒を蒸発させた標準基板を参照として、再び紫外線透過光強度を測定した結果、これら試料の紫外線吸光度が測定されたと言える結果が得られた(Fig. 6(b))。

そして、ここで試料1～5はいずれも同量の紫外線吸収剤が含まれているにもかかわらず、紫外線吸光度は大きく異なり、アクリルシリコーン樹脂量の減少に伴い大きく低下する傾向が見られた（Fig. 6(b))。試料中のアクリルシリコーン樹脂量が少なくなると、試料はより標準基板の表面粗さの底部に集中する傾向が観察され（Fig. 5)、したがって紫外線吸収剤がより局所的に偏在するようになると言える。これまでに本著者らは、サンスクリーン剤の塗布の際

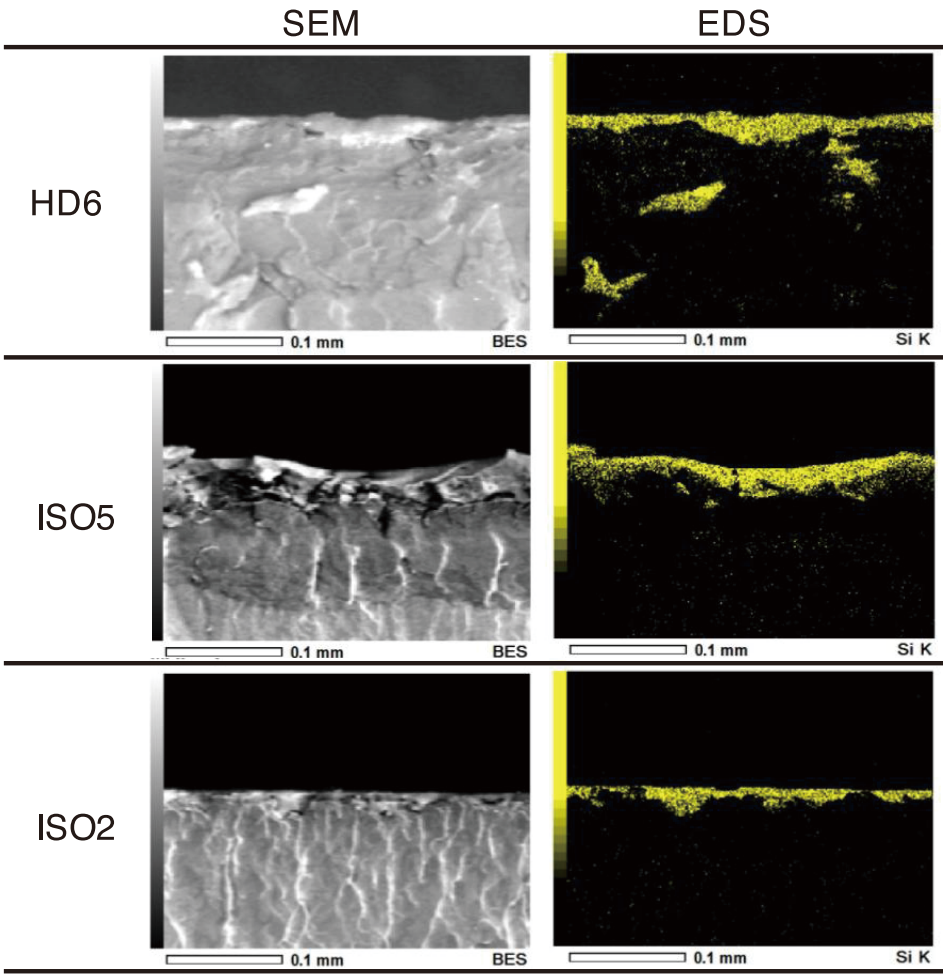
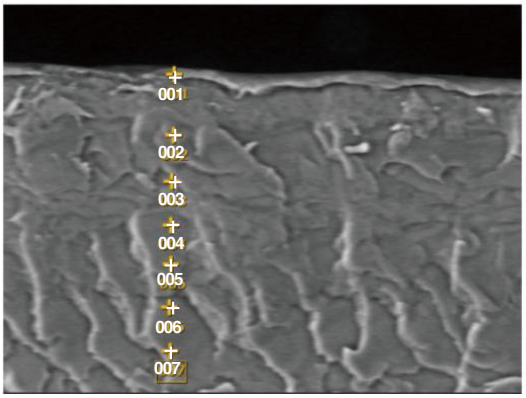


Fig. 3　SEM－EDS mapping images of the cross section of **HD6**, **ISO2**, and **ISO5** on which acrylsilicone resin was deposited. Yellow color represents the existence of Si atom. Amount of acrylsilicone resin per unit area was 2.0 mg cm^{-2}.



Analyze point No.	Si atomic ratio in O, C, Si / %	Depth / μm
001	3.36	0
002	0.15	36
003	0.31	65
004	0.07	91
005	0.05	114
006	0.02	140
007	0.04	166

Fig. 4　SEM image of the cross section of **HD6** on which the acrylsilicone resin was deposited (1.3mg cm^{-2}), and the and Si atom ratio at different depth from the surface of **HD6** determined by the point analysis.

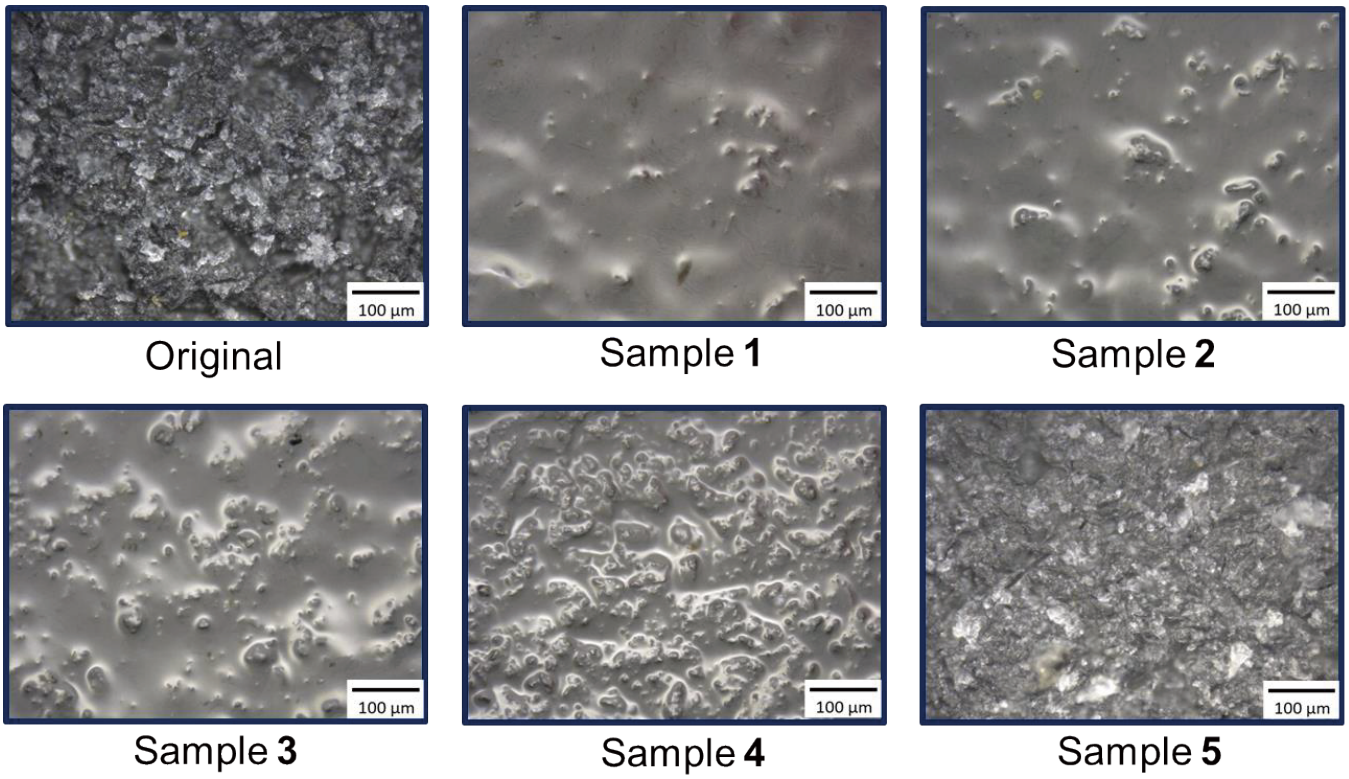


Fig. 5 Digital microscope image of the surface of **ISO5** on which pseudo-sunscreen sample was deposited. All the pseudo-sunscreen samples consisted of 1.0 mg of the same UV absorbers and 0.80 mL of hexane, while the content of acrylsilicone resin in the sample **1**, **2**, **3**, **4**, and **5** was 40, 30, 21, 11, and 0 mg, respectively.

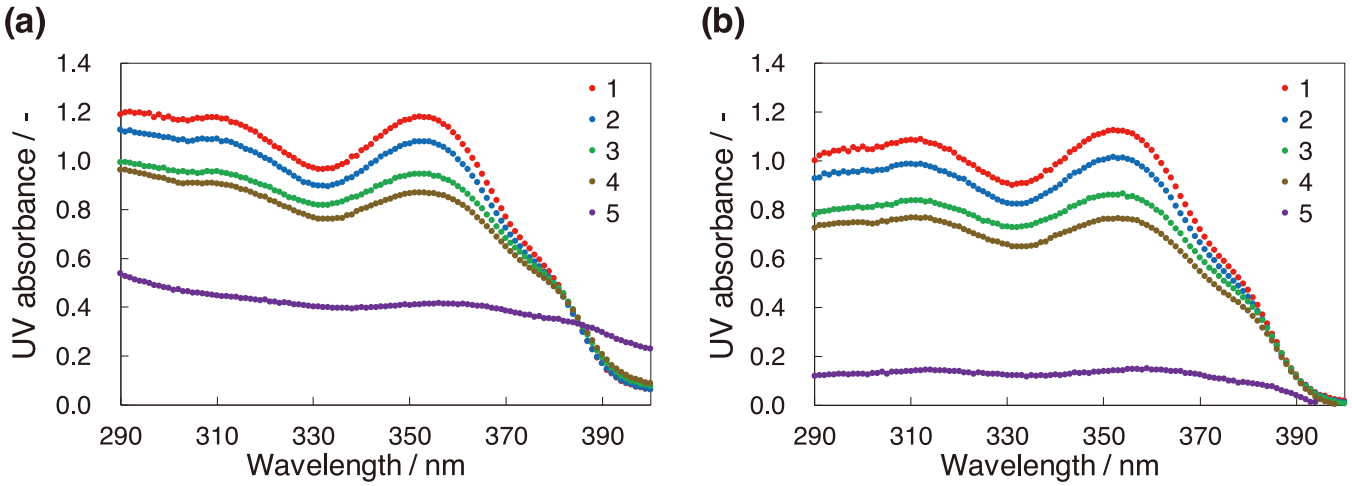


Fig. 6 Values evaluated as UV absorbance of the cosmetic standard PMMA UV evaluation plates on which pseudo-sunscreen sample was deposited. (a) : Using a flat quartz plate as a reference. (b) : Using the plates on which the identical amount of resin was deposited.

のヴィスコスフィンガリング現象により空間周期パターンが塗布層に発生すると、それに伴い紫外線吸収剤の存在量に空間的な分布が発生し、その分布の度合いが大きくなるほど紫外線吸光度が低下することを実験的に確認し、また理論的にも証明してきた[6, 8]。本研究で見出された、紫外線吸収剤が同量の試料が粗い表面を持つ標準基板に塗布された際、その体積が小さくなることで紫外線吸光度が低下する現象は、この以前の研究結果と合致する。なお、本研究においても、試料体積と紫外線吸光度の関係は、理論的なシミュレーションによりほぼ再現できることが確認できている[10]。

4．総　括

本研究によって、実際の市販のサンスクリーン剤の紫外線遮蔽能を*in vitro*評価するには、適切な親水性度の基板を使用する必要があることが明らかとなった。また、現在認定されている*in vitro*性能評価用の標準PMMA基板の表面粗さについては、例えば紫外線吸収剤含有量の同じ試料であってもその体積が変動しただけで大きく測定値が変動することが確認されたため、その妥当性については検討が必要であると思われる。なお、以上の研究成果を、The Asian Conference on Oleo Science, Tokyo（Sep. 2017）、IFSCC 2017 Conference, Seoul（Oct. 2017）、IFSCC 2018 Congress, Munich（Sep. 2018）にて学会発表した。また、この間に執筆した2報の公刊論文が学術誌に掲載された[11, 12]。さらに、本課題が採択される直前に出願した特許[13]について、本研究の成果に基づいて優先権PCT出願し、この国際出願特許[14]を日本、米国、フランス、イタリアへ各国移行申請した。今後は、本研究で得られた成果に基づいて、コスメトロジー技術に関わる諸機関との連携を強め、最終的には、サンスクリーン剤を普く正確に*in vitro*性能評価する日本発の世界標準法の確立に繋げたい。

（引用文献）

1）COLIPA Guideline, *In vitro* method for the determination of the UVA protection factor and “critical wavelength” values of sunscreen products, 2011.

2）International Standards Organization, ISO 24443 Cosmetics –Sun protection test methods– Determination of sunscreen UVA photoprotection in vitro, 2012.

3）M. Rohr, E. Klette, S. Ruppert, R. Bimczok, B. Klebon, U. Heinrich, H. Tronnier, W. Johncock, S. Peters, F. Pflucker, T. Rudolph, H. Flosser-Muller, K. Jenni, D. Kockott, J. Lademann, B. Herzog, S. Bielfeldt, C. Mendrok-Edinger, C. Hanay, L. Zastrow, *Skin Pharmacol. Physiol.* **23**, 201-212 (2010).

4）A. Kuroda, T. Ishihara, H. Takeshige, K. Asakura, *J. Phys. Chem. B* **112**, 1163-1169 (2008).

5）朝倉浩一，黒田章裕，武重日香里，石原司，特許第5283819号.

6）K. Fujikake, S. Tago, R. Plasson, R. Nakazawa, K. Okano, D. Maezawa T. Mukawa, A. Kuroda, K. Asakura, *Skin Pharmacol. Physiol.* **27**, 254-262 (2014).

7）U. S. Food Drug Administration and（FDA）, Sunscreen drug products for over-the-counter human uses; Final rules and proposed rules. *Federal Register* **76**, 35623-35665 (2011).

8）M. Wakabayashi, K. Okano, T. Mukawa, D. Maezawa, A. Kuroda, K. Asakura, *Photochem. Photobiol.* **92**, 637-643 (2016).

9）朝倉浩一，黒田章裕，特許第5825654号.

10）K. Sakai, T. Banno, N. Sato, N. Nakamura, D. Maezawa, S. Yahagi, H. Masaki, A. Kuroda, K. Asakura, Proceeding of IFSCC 2018 Congress, #P-S2-302.

11）K. Asakura, A. Kuroda, *IFSCC Magazine* **21**, 53-57 (2018).

12）A. Kuroda, K. Sakai, S. Yahagi, T. Mukawa, N. Sato, N. Nakamura, D. Maezawa, H. Masaki, T. Banno, K. Asakura, *J. Oleo Sci.* **68**, 175-182 (2019).

13）朝倉浩一，黒田章裕，特願2016-174084.

14）朝倉浩一，黒田章裕，PCT/JP2017/3162.

MRIと時間温度換算則を応用したエマルション化粧品の高精度乳化安定性予測

富山大学大学院医学薬学研究部（薬学）
大貫　義則

The time–temperature superposition principle (TTSP) was applied to the destabilization kinetics of an emulsion. A cream preparation that is clinically used for the treatment of dermatological diseases was tested as the model emulsion. After storage at temperatures ranging from 30 to 45 °C for designated periods, the emulsion state was monitored using magnetic resonance imaging, and then the phase separation behaviors observed were analyzed according to the Arrhenius approach applying TTSP. The Arrhenius plot showed a biphasic change around 35 °C, indicating that the separation behaviors of the sample were substantially changed between the lower (30–35 °C) and higher (35–45 °C) temperature ranges. This study also monitored the coalescence behavior using a backscattered light measurement. The experiment verified that the destabilization was initiated by coalescence of oil droplets and then it eventually led to obvious phase separation via creaming. Furthermore, we note the coalescence kinetics agreed well with the phase separation kinetics. Therefore, in the case of the sample emulsion, the coalescence behavior has a dominant influence on the destabilization process. This study offers a profound insight into the destabilization process of pharmaceutical emulsions and demonstrates the promising applicability of TTSP to pharmaceutical research.

1．緒　言

エマルションは互いに混じり合わない2成分以上の液体の一方を微粒子（分散相）として他方の液体（連続相）中に分散させた多相系であり、医薬品や化粧品の基剤として広く利用されている[1]。熱力学的に不安定であり、不安定化機構には油相と水相の比重差によって生じるクリーミング、粒子間に働く引力によって生じる凝集・合一、オストワルド熟成と呼ばれる分散相の分子拡散などを経て、最終的に分散相と連続相の2相に分離してしまう。なお、スキンクリームなどのエマルション製剤においては、クリーミングなどの軽微で可逆的な変化であっても、製品の品質（外観や有効成分の含量均一性など）を、著しく損なう恐れがある。そのため、エマルション製剤の設計において、優れた保存安定性を確保することは、有効性と安全性の確保に並ぶ重要な課題である。エマルション製剤の長期保存安定性を正確に理解するためには、わずかな乳化状態の変化を検出できる高感度かつ高精度な評価手法と、経時的な乳化状態の変化挙動を取り扱える優れた時系列解析手法との融合が必要であると考えられる。

エマルションの保存安定性評価手法としては、最も簡便な目視による評価の他に、粒子径測定法、動的光散乱法、濁度法などの様々な手法が提案されている。また、当教室ではこれまでに、エマルション製品の保存安定性を非破壊的かつ高感度に評価するため、核磁気共鳴画像法（magnetic resonance imaging, MRI）を応用した新規エマルション製剤の評価方法を構築してきた[2,3]。MRIは核磁気共鳴（nuclear magnetic resonance, NMR）現象の原理を応用した分子イメージング技術であり、分子運動性を反映するMRパラメーター（T_1およびT_2緩和時間や、拡散係数など）を用いて画像化すると、検体内部に含まれる水分子などの分子運動性を可視化することも可能である。MRIを応用した新規評価手法は、容器内部で起こるクリーム剤本来の劣化挙動を非破壊的に可視化できる点や、劣化挙動に対する感度が目視観察と比較して良好であるといった点において、他の評価手法よりも優れている。以上のような研究によって、エマルション製剤の保存安定性評価手法は、要求を十分に満たすレベルの手法が構築されつつある。

一方で、エマルション製剤の長期保存安定性を予測する手法については、これまでにほとんど研究が行われておらず、十分な予測手法が確立されたとは言い難い。一般的にエマルションの長期保存安定性を予測したい場合、加速試験が適用される。最も容易な加速試験は高温加速試験と呼ばれる高温条件（例えば40℃など）でエマルションを保存し評価する方法である。しかし、現時点では、これら加速試験で得られたエマルションの不安定化挙動を扱う解析手法が構築されていないため、得られたデータから試料の長期保存安定性を定量的に予測することは極めて困難である。

以上の背景から、本論文ではエマルションの高精度な長期保存安定性予測を目指し、高温保存および遠心分離法を利用した加速試験による乳化状態の変化挙動について速度論的な解析を試みた。なお、速度論的な解析を行うために、本研究では時系列データ解析手法の1つである時間－温度



Precise prediction of the kinetic analysis of destabilization of pharmaceutical emulsions using magnetic resonance imaging and time–temperature superposition principle

Yoshinori Onuki

Graduate School of Medical and Pharmaceutical Science, University of Toyama

換算則(time-temperature superposition principal, TTSP)に着目した。TTSPは、ある事象に対する時間と温度の影響が等価であることを前提とした経験則である[4, 5]。高分子素材の機械的および電気的緩和挙動の解析にしばしば用いられる。温度依存性を示す事象の経時的変化について、速度定数を求めずに、アレニウスプロットを用いた解析を行えるなどの利点がある。これまでに高分子素材などの素材化学の分野では、経時的な物性変化を評価するために盛んに用いられてきた。エマルションの劣化挙動はTTSPが活用できると考えられるものの、今のところ製剤物性評価への応用例は極めて限られている[6]。そこで、我々はTTSPを応用してエマルション製剤の保存安定性を詳細に評価することとした。

メントール配合ジフェンヒドラミンクリームは、市販ジフェンヒドラミンクリームにメントールなどの清涼物質を配合したクリーム剤であり、慢性腎臓病に伴う掻痒症の治療のために院内製剤として広く処方されている。本製剤は、患者からの薬効面での評価は高いものの、その一方で、我々の過去の検討から保存安定性に課題があることが指摘されている[7, 8]。そこで、本研究では、この相分離挙動をTTSPによって詳細に評価することとした。検討では、調製した試料を異なる温度で保存し、経時的に試料のMRI画像を撮像した。そして、MRI画像によって観察される相分離挙動にTTSPを適用し、本製剤の相分離機構について詳細な評価を行った。さらに、本研究ではスタビリティーテスターを用いて試料中の油滴の合一挙動を評価し、本製剤の相分離機構への関与についても詳細な検討を行った。

2. 方　法

2.1. 試料および試薬

レスタミンコーワクリーム1%は興和株式会社(Aichi, Japan)より購入したものを用いた。*d*-カンフルは小堺製薬株式会社(Tokyo, Japan)より購入したものを用いた。エタノールはヤクハン製薬株式会社(Hokkaido, japan)より購入したものを用いた。*l*-メントール、チモールはマイラン製薬株式会社(Tokyo, Japan)より購入したものを用いた。

2.2. メントール配合ジフェンヒドラミンクリームの調製

メントール配合ジフェンヒドラミンクリームの処方をTable 1に示した。まず*d*-カンフルを30%溶解させたエタノール溶液を調製した。続いて、メントール溶液は*l*-メントール、チモール、ハッカ油および*d*-カンフルを30%溶解させたエタノール溶液をそれぞれ全量の7、0.4、0.9および1.75%となるよう調製し、処方に対して全量が14%となるようエタノールを加え調製した。最後にメントール溶液およびレスタミンコーワクリーム1%の混合比

Table 1　Formulation of the menthol and diphenhydramine cream.

Components	Weight (%)
Menthol-containing ethanol solution	14
/-Menthol	7.0
Thymol	0.40
Mentha oil	0.90
10% Camphor in ethanol	5.2
Ethanol	0.50
Diphenhydramine Cream	86

が14:86となるよう秤量し、ハイブリッドミキサー(Model HM-500; Keyence, Osaka, Japan)を用いて自転800rpm、公転2,000rpmで5分間混合した。

2.3. MRIを用いた相分離挙動の観察

調製した試料を1mLずつアシストチューブに分注し、恒温器(Mini Incubator MI-100/G; Yonezawa Inc, Shizuoka, Japan)で任意の時間保存した。保存温度は30、33、35、38、40、43および45℃とした。経時的に試料を取り出し、核磁気共鳴装置(MR mini SA; DS Pharma Biomedical Co., Ltd, Osaka, Japan)を用いてT_2強調画像を作成した。繰り返し時間(repetition time; TR)を2,000ms、エコー時間(time to echo; TE)を89ms、撮像視野(field of view; FOV)を60 × 60mm^2、マトリックスサイズを128 × 256、積算回数を1回、スライス厚を1mmに設定した。撮像したT_2強調画像を基に、メントール配合ジフェンヒドラミンクリーム中の水相の比率を算出した。画像処理にはImage j (Bethesda, MD, USA)を用いた。

2.4. スタビリティーテスターを用いた合一挙動の観察

メントール配合ジフェンヒドラミンクリームの合一挙動は、スタビリティーテスター(ST-1; Eko instruments, Tokyo, Japan)を用いて測定した。スタビリティーテスターはレーザー光(λ=870nm)を試料に照射し、その透過光および後方散乱光強度の経時的変化から、エマルションの分散安定性を評価可能である。試料をおよそ7mLずつサンプル管に分注し、30、33、35、38、40、43および45℃の条件下において、任意の時間間隔で測定した。

2.5. 光学顕微鏡による粒子観察

モデル試料の乳化粒子の状態を観察するために、35℃で0、50および100分間保存した試料の一部を採取し、光学顕微鏡(VHX-700FSP1344; Keyence, Tokyo, Japan)を用いて観察を行った。

2.6. TTSPによる解析

MRIおよびスタビリティーテスターによって得られた測

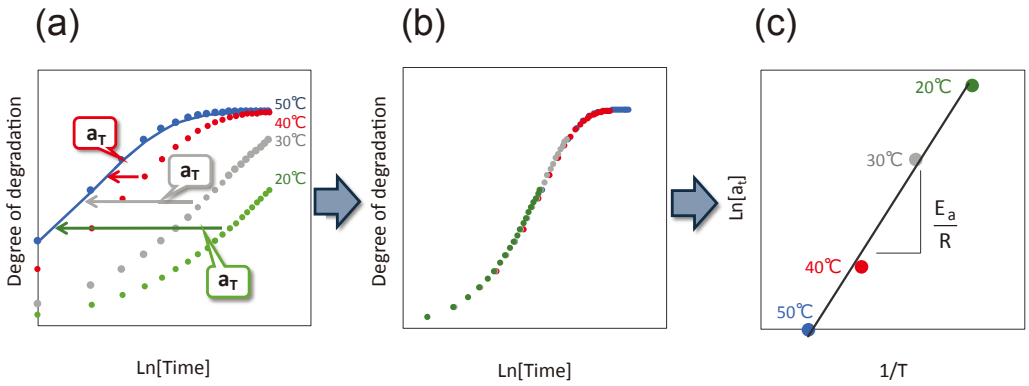


Fig. 1　Flow chart of TTSP. (a) The value of shift factor (a_T) at various temperature was calculated from the difference between the regression curves at reference temperature and the measured degree of degradation. (b) Time-course model of degree of degradation superposed with the regression curves at 50℃ using the a_T value. (c) Typical example of Arrhenius plot using the a_T of the TTSP.

定結果に対しTTSP4, 5を適用した。TTSPによる解析手順を大まかに記す。例えば、様々な保存温度で保存した時の事象変化を測定した場合、まず、Fig. 1(a)のように特性値-対数時間の曲線として表す。続いて、これらの曲線の1つをマスターカーブとして設定し、このマスターカーブに重なるように他の曲線を水平移動し、1つの曲線を作成する(Fig. 1(b))。

この時の時間軸上の水平移動量はシフトファクター（a_T）と呼ばれ、以下の式(1)によって表される。

$$a_T=\frac{t_{ref}}{t_T}\cdots\cdots(1)$$

ここで、t_{ref}は基準とした温度（T_{ref}）での時間で、t_Tは任意の温度（T）で同様の特性値を得るのに必要な時間である。なお、一般的にシフトファクターと測定温度の関係は、アレニウス式(2)として表すことができる。

$$\ln k=\ln A-\left(\frac{E_a}{RT}\right)\cdots\cdots(2)$$

ここで、kは反応の速度定数、Aは頻度因子、E_aは見かけの活性化エネルギー、Rは気体定数およびTは絶対温度を表す。なお、式(1)、(2)を組み合わせると、シフトファクターは式(3)と定義される。

$$a_T=exp\left[\frac{E_a}{R}\left(\frac{1}{T_{ref}}-\frac{1}{T}\right)\right]\cdots\cdots(3)$$

ここで、T_{ref}およびTは絶対温度である。式（3）から、シフトファクターの対数と絶対温度の逆数の間に存在する直線の傾きから、見かけの活性化エネルギーを算出することや、任意の保存温度におけるシフトファクターを算出することが可能である(Fig. 1(c))。

T_{ref}を45℃とした。マスターカーブから各プロットの水平移動量を算出し、各プロットの平均水平移動量をa_Tとした。得られたa_Tの対数値と絶対温度の逆数からアレニウスプロットを作成した。

3．結　果

3．1．TTSPによるメントール配合ジフェンヒドラミンクリームの相分離挙動解析

本研究では、調製したメントール配合ジフェンヒドラミンクリームを異なる温度で保存し、経時的に試料のT_2強調画像を撮像して、それらの相分離挙動を観察した（Fig. 2)。撮像した画像から、すべての実験条件下で相分離が観察された。なお、我々の過去の研究から、上層はクリーム相、下層は水およびエタノールで構成された水相を示している[7]。本試料を45℃で保存した場合、4時間以内に明らかな相分離が観察された一方で、30℃で保存した場合、相分離が生じるのに要した期間はおよそ3日であった。このように、本試料の相分離挙動には保存温度依存性が確認されたため、TTSPによる詳細な解析を行うこととした。

Fig. 3(a)は、Fig. 2の結果から得られた各保存温度における、試料の水相面積の比率と時間の関係を表している。45℃で保存した場合で水相面積の比率の最大値が観察されたため、45℃を基準温度T_{ref}とした。Fig. 3(b)は45℃の回帰曲線とa_Tを用いて水平移動した各温度のプロットを示した。各温度のデータは45℃のマスターカーブに収束しており、得られたa_Tの妥当性が示された。a_Tの対数に対して各温度の逆数をプロットすることでアレニウスプロットを作成した（Fig. 3(c))。作成したアレニウスプロットは、35℃付近を境に二相性を示したことから、メントール配合ジフェンヒドラミンクリームの相分離機構は高温側（35～45℃）と低温側（30～35℃）で異なることが示唆された。回帰直線の傾きから相分離挙動の見かけの活性化エネルギーを算出すると、35～45℃では89.1kJ/mol、30～35℃では416kJ/molであった。よって、低温側での保存と高温側での保存ではおよそ330kJ/molほど見かけの活性化エネルギーの差が存在すること明らかとなった。

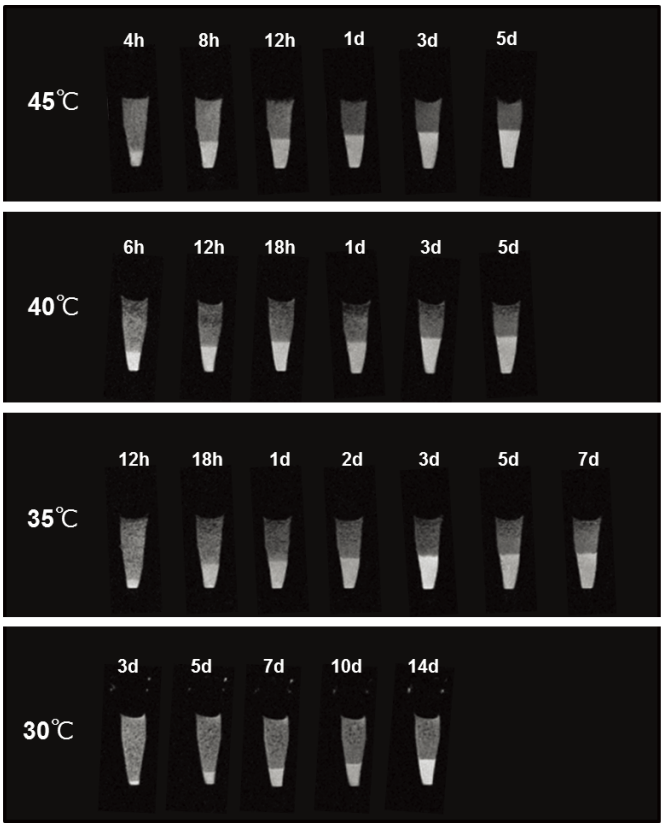


Fig. 2 Continuous monitoring of the phase separation of the menthol-diphenhydramine cream

The test creams were stored at different temperatures ranging from 30°C to 45°C, and then their T_2 weighted images (T_2WIs) were acquired at designated intervals using MRI. The acquisition parameters were as follows; TR=2000ms, TE=89ms, FOV=60 X 60mm^2, matrix size=128 X 256, number of excitation=1 and slice thickness=1mm.

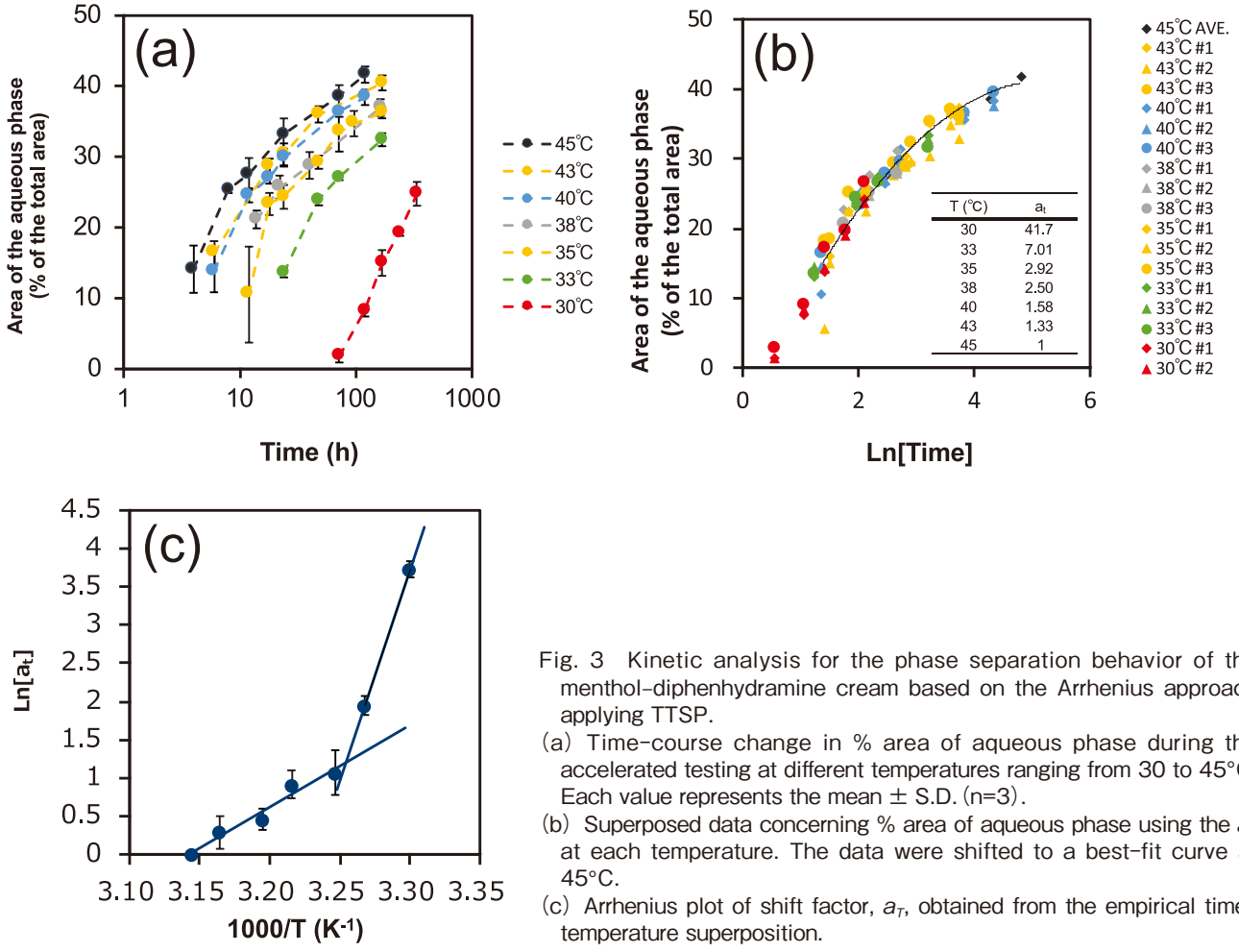


Fig. 3 Kinetic analysis for the phase separation behavior of the menthol-diphenhydramine cream based on the Arrhenius approach applying TTSP.

(a) Time-course change in % area of aqueous phase during the accelerated testing at different temperatures ranging from 30 to 45°C. Each value represents the mean ± S.D. (n=3).

(b) Superposed data concerning % area of aqueous phase using the a_T at each temperature. The data were shifted to a best-fit curve at 45°C.

(c) Arrhenius plot of shift factor, a_T, obtained from the empirical time-temperature superposition.

3．2．保存温度の上昇に伴うメントール配合ジフェンヒドラミンクリームの相分離機構の変化

3. 1. の結果から、実験した温度範囲（30～45℃）では、試料の乳化状態の変化挙動には異なる2つの機構が存在する可能性が示された。本製剤の不安定化は、油滴の上方への移動によって生じるクリーミングが主な原因であると考えられる。クリーミング速度はストークスの式（5）で表すことができる[1]。

$$v = 2r^2(\rho - \rho_0)g/9\eta \cdots\cdots (5)$$

ここで、v はクリーミング速度、rは粒子径、ρ_0 は連続相の密度、ρは分散相の密度、η は粘度、g は重量加速度を示す。ストークスの式によると、クリーミングを防ぐ方法として平均粒子径の減少、連続相と分散相間の密度差の減少および連続相の粘度の増加が挙げられる。特に、エマルション中の油滴径がその安定性に大きく影響することがよく知られている。本実験における温度変化によって、連続相と分散相間の密度差および連続相の粘度の変化はほとんどないと考えられるものの、油滴の粒子径は大きく変化する可能性が考えられる。すなわち、35℃付近を境に油滴の合一挙動が変化し、その結果として相分離機構が変化したと考えた。

そこで、本検討では、スタビリティーテスターを用いて、試料中の油滴の合一挙動を詳細に評価することとした。スタビリティーテスターは多重光散乱現象を用いて試料の分散および保存安定性を評価する装置である。Fig. 4 は 30, 35, 40 および 45℃で保存した時の試料の後方散乱光強度の経時的な変化を示している。縦軸は測定開始時の値を0%とした場合の後方散乱光強度の変化率を示し、横軸は試料の高さ方向の位置を示す。各サンプリング時間は、カラースケールで表されており、赤および紫のプロファイルはそれぞれ初期値および実験終点の測定結果に対応する。いずれの試料においても、実験開始直後は、後方散乱光強度がベースラインに並行に低下した。その後、30 および35℃といった低温保存の試料では、それぞれおよそ 18 時間後および2時間 40 分後から、試料底部の後方散乱光強度が急激に低下した（Fig. 4）。実験開始直後のベースラインの低下は油滴の合一を、また、その後の急激な後方散乱光強度の低下は相分離が開始したことを示していると考えられる。事実、35℃での保存試料について顕微鏡による油滴観察を行ったところ、ベースラインの低下のみが観察

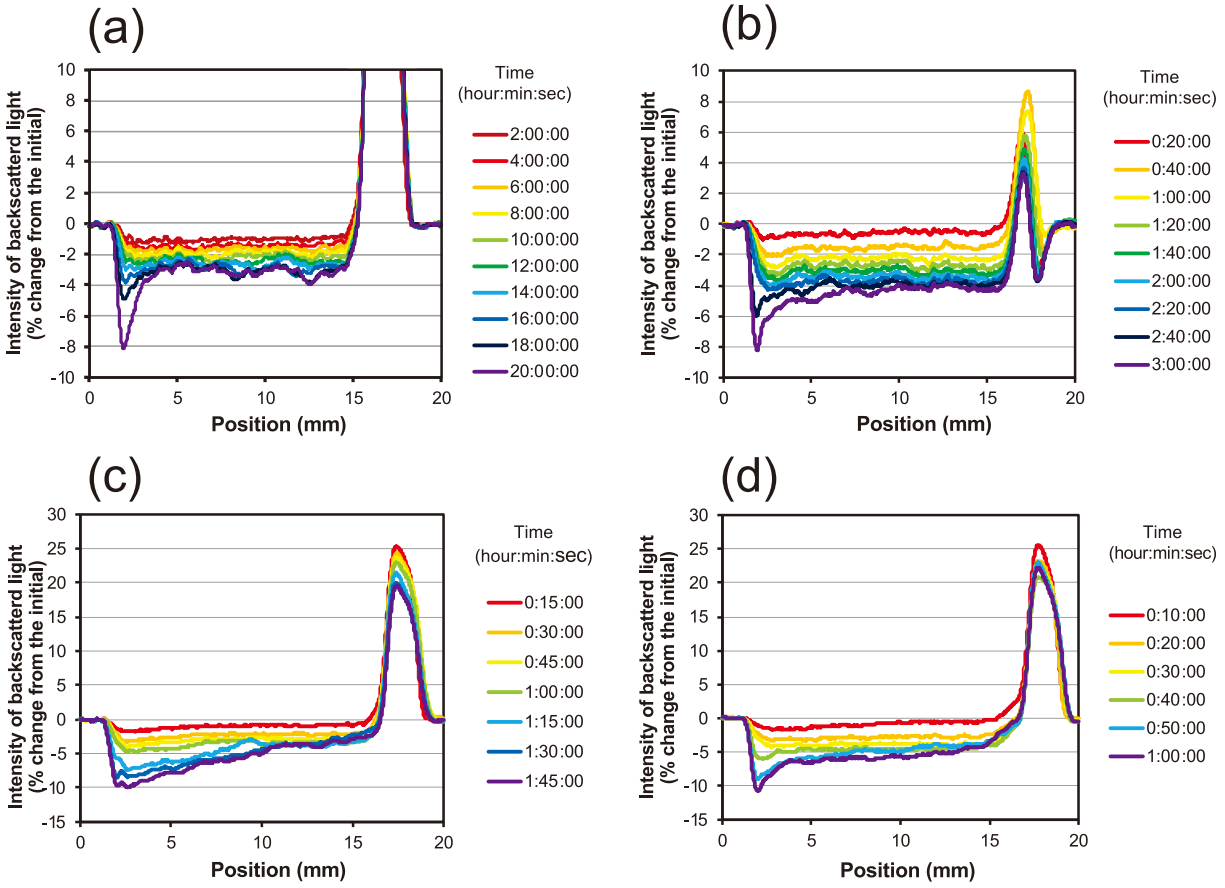


Fig. 4　Changes in backscattering profiles of the menthol–diphenhydramine cream during the accelerated testing at (a) 30°C, (b) 35°C, (c) 40°C, and (d) 45°C. The *X*-axis represents the position of the sample bottle; the position "0" corresponds to the bottom of the sample. Line profiles measured at different times are color-coded: the initial and the last sampling times correspond to red and purple lines, respectively.

された 100 分後までの試料からは、時間の経過と共に油滴径は増大し、合一が進んでいる様子を確認することができた（Fig. 5）。一方で、高温保存（40 および 45℃）では実験時間が短かったため急激な後方散乱光強度の低下は観察されなかったものの、油滴の合一に伴うベースラインの低下に続き、徐々に試料底部から上部にかけて勾配が観察された。これは合一した粒子が上方へ移動したことに起因しており、試料底部で油滴密度が減少し、相分離が開始したことを示している。

以上の検討結果から、スタビリティーテスターによって試料中の油滴の合一挙動を評価できることが示された。

Fig. 3 で観察された低温領域と高温領域における相分離挙動の相違には油滴の合一挙動が深く関与していると考えられる。そこで、続いての検討では、両者の関係について詳細な検討を行った。Fig. 6 (a)に、相分離が観察されるまでの試料中間部分の後方散乱光強度の変化を示した。すなわち、このグラフの後方散乱光強度の低下は、合一が進み、油滴径が増大していく様子を表している。結果より、後方散乱光強度の低下は温度依存的であり、45℃の時に最も速やかな後方散乱光強度の低下が観察された。したがって、保存温度の上昇に伴って油滴の合一速度が増大している様子が確認された。

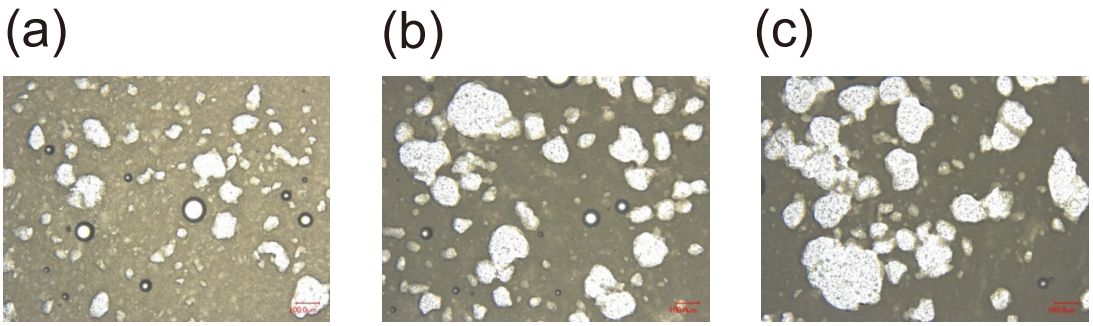


Fig. 5　Microscopic images of droplets dispersing in emulsions stored at 35°C for (a) 0 min, (b) 50 min and (c) 100 min (250 × magnification).

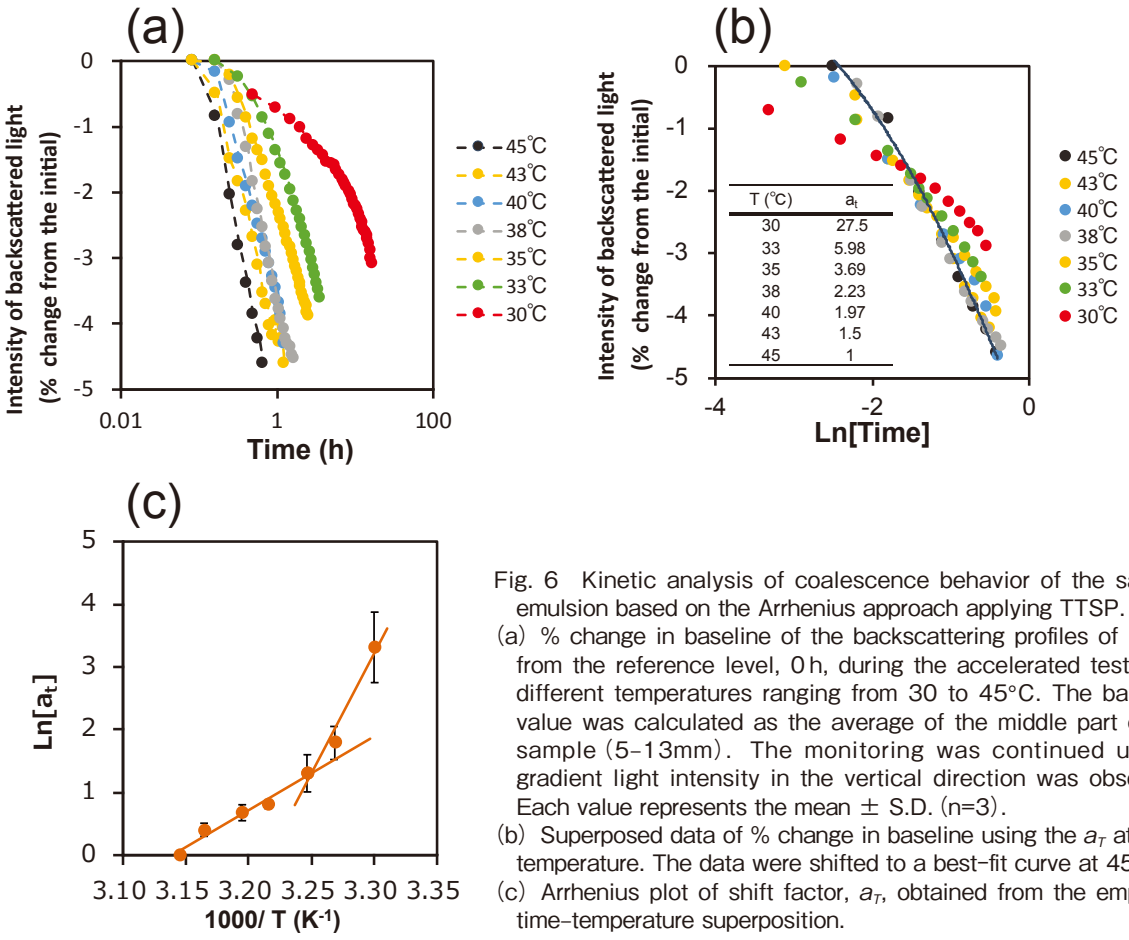


Fig. 6　Kinetic analysis of coalescence behavior of the sample emulsion based on the Arrhenius approach applying TTSP.
(a) % change in baseline of the backscattering profiles of Fig. 4 from the reference level, 0 h, during the accelerated testing at different temperatures ranging from 30 to 45°C. The baseline value was calculated as the average of the middle part of the sample (5–13mm). The monitoring was continued until a gradient light intensity in the vertical direction was observed. Each value represents the mean ± S.D. (n=3).
(b) Superposed data of % change in baseline using the a_T at each temperature. The data were shifted to a best-fit curve at 45°C.
(c) Arrhenius plot of shift factor, a_T, obtained from the empirical time-temperature superposition.

続いて、Fig. 6(a)で得られた油滴の合一挙動についてTTSPによる解析を試みた。相分離挙動の場合と同様に45℃をT_{ref}として選択し、各保存温度におけるa_Tを算出した。Fig. 6(b)は、45℃の回帰曲線とa_Tを用いて水平移動した各温度のプロットを示した。33～43℃のプロットは、45℃のマスターカーブによく収束しており、a_Tの妥当性が示された。一方で、30℃のプロットは、マスターカーブと若干異なる挙動を示した。これは、測定開始時の後方散乱光強度の低下が比較的緩やかだったため、a_Tのばらつきが増大したことが原因と考えられる。Fig. 6(c)はアレニウスプロットおよびその回帰直線を示す。合一挙動から作成したアレニウスプロットも35℃付近を境に二相性を示した。この検討によって、本試料の相分離において、35℃付近を境に油滴の合一挙動が変化したことが明らかとなった。なお、回帰直線の傾きから合一挙動の見かけの活性化エネルギーを算出すると、35～45℃では97.9kJ/mol、30～35℃では318kJ/molであった。この活性化エネルギーの値はMRIを用いた相分離挙動の解析で得られた値と類似した。このことより、本試料の相分離挙動は、試料中の油滴の合一挙動に強く支配されていると結論付けた。

4．総　括

本研究では、慢性腎臓病に伴う掻痒症の治療のために院内製剤として用いられるメントール配合ジフェンヒドラミンクリームの製剤安定性をより深く理解するため、MRIおよびスタビリティーテスターなどを活用して相分離挙動を評価し、さらにTTSPによる時系列解析を行った。本研究成果によってTTSPによる時系列解析がエマルション製剤の製剤安定性を評価する上で非常に有用であることが明らかになった。相分離機構が同じ範囲であれば本手法によってエマルション製剤の相分離挙動を予測することは可能である。さらに、解析結果から、エマルション製剤の安定化機構をより深く議論することもできる。本手法は、エマルションに限らず、様々な製品物性の評価に応用可能であると考えられる。そのため、今後、様々な用途でのさらなる応用が期待される。

謝　辞

本研究の遂行にあたり、多大なるご支援をいただきました公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に心より感謝申し上げます。

（引用文献）

1）Aulton, M.E., Taylor, K.M.G., 2013, Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines, Elsevier, Edinburgh.

2）Onuki, Y., Horita, A., Kuribayashi, H., Okuno, Y., Obata, Y., Takayama, K., 2014, Non-destructive monitoring of creaming of oil-in-water emulsion-based formulations using magnetic resonance imaging, Drug Dev Ind Pharm, 40, 937-943.

3）Onuki, Y., Kida, C., Funatani, C., Hayashi, Y., Takayama, K., 2016, MRI as a promising tool for evaluation of the stability of cosmetic emulsions, Int J Cosmet Sci, 38, 272-278.

4）Ding, H.-Z., Wang, Z.D., 2007, Time-temperature superposition method for predicting the permanence of paper by extrapolating accelerated ageing data to ambient conditions, Cellulose, 14, 171-181.

5）Alwis, K.G.N.C., Burgoyne, C.J., 2006, Time-temperature superposition to determine the stress-rupture of aramid fibres, Appl Compos Mater, 13, 249-264.

6）Mochizuki, K., Takayama, K., 2014, Prediction of color changes using the time-temperature superposition principle in liquid formulations, Chem Pharm Bull, 62, 1225-1230.

7）Onuki, Y., Machida, Y., Yokawa, T., Seike, C., Sakurai, S., Takayama, K., 2015, Magnetic resonance imaging study on the physical stability of menthol and diphenhydramine cream for the treatment of chronic kidney disease-associated pruritus, Chem Pharm Bull, 63, 457-462.

8）Onuki, Y., Yokokawa, M., Utsumi, S., Obata, Y., Machida, Y., Seike, C., Hayashi, Y., Takayama, K., 2016, Effect of surfactants and thickeners on the stability of menthol-diphenhydramine cream identified by magnetic resonance imaging, Chem Pharm Bull, 64, 1616-1621.

抗菌性と生体適合性を併せ示す生糸織物の開発

東京医科歯科大学生体材料工学研究所
川下　将一

Raw silk can be doped with metal element such as Ca and Zn due to high affinity of sericin, outer layer of the raw silk. Thus, raw silk doped with metal element is expected to show various functions favorable as biomaterials. In this study, we investigated to apatite-forming ability in simulated body fluid (SBF) and antibacterial activity against *Escherichia coli* of metal-doped raw silk fabric. The samples were prepared by soaking in the aqueous solution containing Ca, Cu or Zn ion. Cu-doped and Zn-doped raw silk fabric showed antibacterial activity, suggesting antibacterial agents of Cu and Zn released from the samples killed the bacteria. On the other hand, Ca-doped raw silk fabric showed both apatite-forming ability and antibacterial activity. The apatite formation on fabric is might be because Ca ion released from the sample increased a degree of supersaturation of SBF to respect with apatite and accelerate the apatite formation. Also, it is considered that release of Ca ion causes pH increase locally and the bacteria hardly survive at the sample surface. Therefore, Ca-doped, Cu-doped and Zn-doped raw silk fabric are useful as antibacterial biomaterials. Further, Ca-doped raw silk fabric has potential to bond to living bone.

1．緒　言

生糸は蚕の繭を構成する天然繊維であり、フィブロインをセリシンが覆ったタンパク質の２層構造を取っている[1]。これまで生糸表面のセリシンはアルカリ溶液やセッケン水などにより除去および廃棄されてきたが、セリシンには創傷治癒効果[2]や抗酸化作用[3]に加え，ヒト皮膚線維芽細胞の接着促進効果[4]などが最近報告されているようになり、近年では様々な医用材料への応用が期待されている。また、セリシンに含まれるセリンやアスパラギン酸は側鎖にヒドロキシ（OH）基あるいはカルボキシル（COOH）基を含むため、カルシウム（Ca）や亜鉛（Zn）などの金属元素と高い親和性を示す[5]。従って，生糸表面に金属元素を導入すれば、生糸がバイオマテリアルとして有用な様々な機能を発現する可能性がある。

骨結合性材料は、生体内においてその表面に骨類似アパタイトを形成し、それを介して生体骨と結合する[6,7]。人工材料のアパタイト形成能を評価する方法として、ヒトの血漿とほぼ等しい無機イオン濃度を有する擬似体液（SBF：simulated body fluid）に試料を浸漬する方法がある[8]。これまでにSBFのイオン濃度を1.5倍にした1.5SBF中において、生糸織物表面にアパタイトが形成することが見出されている[9]。しかし、1.5SBF中で生糸織物表面に形成されたアパタイトは、そのCa/P比や格子定数がヒトのアパタイトのそれらと大きく異なる[10]ため、生体内で優れた骨結合性を示さない可能性がある。一方、CaO-SiO_2-P_2O_5系ガラスやケイ酸カルシウムで処理したエチレン-ビニルアルコール重合体は、材料中からCaイオンが溶出することによって、SBF中でもアパタイトを形成する[11,12]。従って、生糸にCaイオンを導入できれば、SBF中においても生糸がアパタイトを形成する可能性がある。さらに、生糸を織物にすれば、生糸中心部のフィブロインが機械的強度に優れる[1]ことから、高荷重のかかる腱や靭帯などの代替材としての応用を期待できる。

一方、近年、人工材料埋入時の手術創部の感染症（SSI：surgical site infection）が問題となっている。整形外科領域においては、脊椎手術では0.6～11.9%、初回人工関節置換術では0.2~2.9%、人工関節再置換術では0.5~17.3%のSSI発症が報告されている[13]。一度SSIを発症してしまうと、埋入した人工材料の再置換が必要となり、患者に大きな負担を強いることから、人工材料自体が抗菌効果を発揮することが望ましい。近年では、抗菌元素として知られる銀(Ag) や銅(Cu)、Znなどを材料に担持させる方法[14-16]や、酸化チタン（TiO_2）の光触媒による酸化作用を利用する方法[17]が試みられている。後者の方法では光の届かない生体内における抗菌効果は期待できないが、前者の方法であれば生体内でも抗菌効果を期待できる。そこで本研究では、Ca、CuあるいはZnを導入した生糸織物のSBF中におけるアパタイト形成能および大腸菌に対する抗菌性を評価することにより、骨結合性や抗菌性を示す生糸織物を得る基礎的条件を調べた。

2．方　法

2．1．試料の作製

いずれも特級試薬の塩化カルシウム（$CaCl_2$）、塩化銅（II）



Development of raw silk fabric with antibacterial activity and biocompatibility
Masakazu Kawashita
Institute of Biomaterials and Bioengineering
Tokyo Medical and Dental University

二水和物（$CuCl_2 \cdot 2H_2O$）あるいは塩化亜鉛（$ZnCl_2$）を蒸留水に溶解させることにより、1 Mの$CaCl_2$、$CuCl_2$あるいは$ZnCl_2$水溶液を調製した。1cm四方に裁断した市販の生糸織物（R-Silk）を各水溶液30mLに36.5℃で24時間浸漬した後、取り出し、蒸留水で洗浄してから室温で自然乾燥させた。$CaCl_2$、$CuCl_2$あるいは$ZnCl_2$水溶液に浸漬した試料の名称は、それぞれR-Ca、R-Cuあるいは R-Znとした。なお、後述の抗菌試験には、1.5cm四方の試料に上記処理を行ったものを用い、1cm四方の試料の場合と単位面積あたりの液量を合わせるため，1.5cm四方の試料を浸漬する$CaCl_2$、$CuCl_2$あるいは$ZnCl_2$水溶液の量は67.5mLとした。

2．2．試料表面の形状および元素分析

R-Silkおよび2. 1.で得られた試料の表面を電子走査型顕微鏡（SEM）を用いて観察した。また、5日間真空凍結乾燥したR-Silk、R-Ca、R-CuおよびR-Znの表面に存在する元素をX線光電子分光分析装置（XPS）を用いて調べた。

2．3．試料の溶出試験

1000mLの蒸留水に6.118gのトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを溶解させ、そこに水溶液のpHが7.4になるように1 M 塩酸を加え、これをトリス塩酸緩衝液（TBS）とした。R-Ca、R-CuまたはR-Znを30mLのTBSに36.5℃で1、3あるいは7日間浸漬した。その後、TBSから試料を取り出し、それぞれのTBS中におけるCa、CuあるいはZnイオンの濃度を誘導結合プラズマ発光分光分析装置（ICP-AES）によって測定した。また、TBSに7日間浸漬した試料の表面に存在する元素を、XPSを用いて調べ、TBSに7日間浸漬した試料から溶出したCa、CuあるいはZnの割合を式（1）によって見積もった。

$$溶出割合(\%) = \frac{(C_0 - C_7)}{C_0} \times 100 \cdots\cdots (1)$$

C_0：TBS浸漬前の試料表面のCa，CuあるいはZnの存在率を炭素（C）の存在率で規格化した値。

C_7：TBS浸漬7日後における試料表面のCa、CuあるいはZnの存在率をCの存在率で規格化した値。

2．4．擬似体液（SBF）浸漬試験

ISO23317：2014に準拠し、pH7.4に調製したSBFを作製した。R-Ca、R-CuあるいはR-Znを30mLのSBFに36.5℃で3、5あるいは7日間浸漬し、その後、試料を取り出し、蒸留水で洗浄した後、室温で自然乾燥させた。SBF浸漬後の試料の表面構造をSEMおよびX線回折装置（XRD）を用いて調べた。SBFに7日間浸漬した試料については、エネルギー分散型X線分光器（EDX）を用いて表面の元素分析を行った。また、試料浸漬によるSBFのCaおよびリン（P）のイオン濃度の変化をICP-AESを用いて測定した。

2．5．ハロー法による抗菌試験

JIS L 1902：2015を参考にして、ハロー法によって試料の抗菌性を定性的に評価した。蒸留水に肉エキス、ペプトンおよび塩化ナトリウムを加えてブイヨン培地を作製した。大腸菌（*Escherichia coli*）1コロニー分をブイヨン培地20mLに移植後、18時間一次培養し、さらに菌液0.4mLを新しいブイヨン培地20mLに移し替え、4時間二次培養した。蒸留水で20倍に希釈したブイヨン培地を用いて二次培養後の菌液を100倍に希釈し、これを抗菌試験に用いた。調製した菌液1mLをペトリディッシュに加え、その上から普通寒天培地15mLを加えてよくかき混ぜた。普通寒天培地上に試料を静置し、36.5℃で24時間培養した。培養後、試料の周りのハロー（菌の発育阻止帯）の有無を確認し、大腸菌に対する試料の抗菌性を評価した。

2．6．菌液吸収法による抗菌試験

JIS L 1902：2015を参考にして、菌液吸収法によって試料の抗菌性を定量的に評価した。蒸留水に肉エキスおよびペプトンを加えて、ニュートリエント培地（NB）を作製した。大腸菌1コロニー分を2. 5.と同様の方法でNBにて一次培養および二次培養を行った。蒸留水で20倍に希釈したNBを用いて、二次培養後の菌液を1000倍に希釈し、これを抗菌試験に用いた。

バイアル瓶に入れた6検体に、上記で調整した菌液50μLをそれぞれ数か所に分けて接種した。3検体は36.5℃で18時間培養、残りの3検体はポリソルベート80を添加した生理食塩水を加え30回手振りして菌を洗い出した。続いて、洗い出した菌液から10倍希釈系列を作製した。それぞれの倍率で希釈した菌液1mLをペトリディッシュに加え，その上から混釈平板培養法用寒天培地（EA）を15mL加えてよくかき混ぜた。EAは、蒸留水に脱水酵母エキス、カゼイン製トリプトン、D(+)-グルコースおよび寒天を加えることで作製した。36.5℃で24時間培養後、コロニー数を数えた。

菌液を接種して18時間の培養を行った3検体についても上記と同様の方法で大腸菌のコロニー数を数えた。その後、JIS L1902：2015に従って、菌増殖値（F）および抗菌活性値（A）を算出した。なお，コントロールには1.5cm四方のR-Silkを用いた。有意差の評価については、Tukeyの方法を使用し、有意水準は5％とした。

3．結　果

3．1．試料表面の構造および元素分析

Fig. 1に各試料のSEM写真を示す。R-CaおよびR-Cuの表面形状とR-Silkのそれに差異は見られなかったが、R-Znの表面には析出物（矢印）が確認された。Table 1に

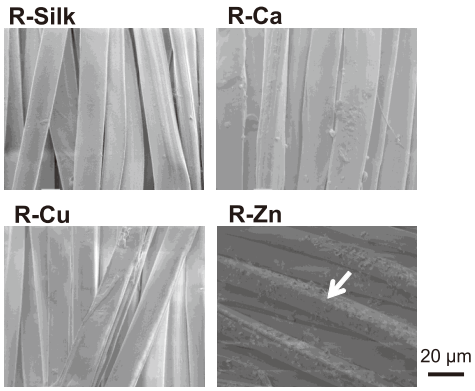


Fig. 1 SEM photographs of R-Silk, R-Ca, R-Cu and R-Zn.

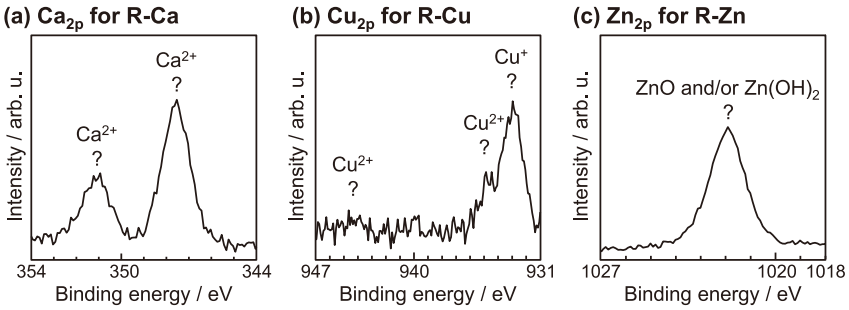


Fig. 2 Ca_{2p} XPS spectrum of R-Ca (a), Cu_{2p} XPS spectrum of R-Cu (b) and Zn_{2p} XPS spectrum of R-Zn (c).

Table 1 Surface abundance of elements on samples which was measured by XPS.

Sample	Surface abundant (atomic%)							
	C	N	O	Cl	Si	Ca	Cu	Zn
R-Silk	67.3	4.82	20.8	—	7.07	—	—	—
R-Ca	65.7	4.56	18.4	0.37	8.47	0.62	—	—
R-Cu	65.2	5.27	20.6	0.17	8.64	—	0.13	—
R-Zn	66.1	4.47	19.2	0.83	8.67	—	—	0.76

(—: Not detected)

XPSによる各試料表面の元素分析の結果を示す。R-Ca、R-CuあるいはR-Znについて、それぞれ微量のCa、CuあるいはZnが検出された。また、全ての試料において、ケイ素(Si)が検出された。

Fig. 2にR-Ca, R-CuあるいはR-ZnのCa_{2p}、Cu_{2p}あるいはZn_{2p}XPSスペクトルを示す。R-Caは、347.6および351.1 eV付近にCa^{2+}に帰属されるCa_{2p}ピークを与えた[18, 19]。また、R-Cuは、932.9、934.8および944.6 eV付近にCu^{+}およびCu^{2+}に帰属されるCu_{2p}ピークを与えた[19]。さらに, R-Znは、1022.0 eV付近に酸化亜鉛（ZnO）および／あるいは水酸化亜鉛（$Zn(OH)_2$）に帰属されるZn_{2p}ピークを与えた[19, 20]。

3．2．試料の金属イオン溶出特性

Fig. 3に種々の期間TBSに浸漬した各試料から溶出したCa、CuあるいはZnイオンの濃度を示す。R-Ca、R-CuあるいはR-Znを浸漬したTBSにおいて、それぞれCa、CuあるいはZnイオンの濃度が上昇した。また、いずれの金属イオンの場合も、TBS浸漬1日後と浸漬7日後でその濃度はほぼ同じであった。Table 2にTBSに7日間浸漬した各試料の表面のXPSによる元素分析の結果を示す。Table 1、2および式(1)から、R-Ca中のCaは73.3 %、R-Cu中のCuは33.2 %、R-Zn中のZnは35.7 %程度、TBS中に溶出したと見積もられた。

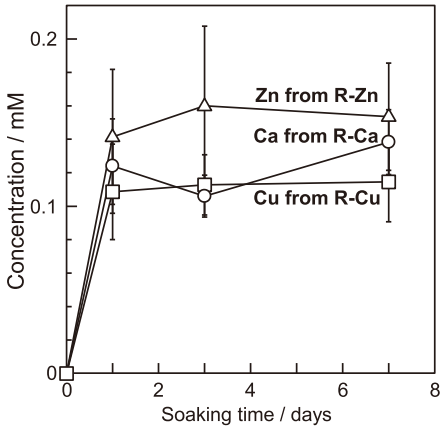


Fig. 3 Concentrations of Ca, Cu and Zn released from R-Ca, R-Cu and R-Zn into TBS, respectively.

Table 2 Surface abundance of elements on samples after soaking in TBS for 7 days which was measured by XPS.

Sample	Surface abundant (atomic%)							
	C	N	O	Cl	Si	Ca	Cu	Zn
R-Ca	67.4	4.12	19.6	—	8.72	0.17	—	—
R-Cu	67.5	4.74	18.8	—	8.88	—	0.09	—
R-Zn	67.6	4.56	18.7	0.19	8.49	—	—	0.50

(—: Not detected)

3．3．試料のアパタイト形成能

Fig. 4に、SBF浸漬後のR-Ca、R-CuあるいはR-ZnのSEM写真を示す。R-Caでは、SBF浸漬後3日後にその表面に析出物(矢印)が観察され、浸漬後5日後から7日後にかけてR-Caの表面全体が析出物によって覆われた。R-Cuでは、SBF浸漬前後においてその表面構造に変化は見られなかった。R-Znでは、SBF浸漬前から表面に見られた析出物(Fig. 1)が浸漬後7日後にも残存していた。

Fig. 5に、SBF浸漬後のR-Ca、R-CuあるいはR-ZnのXRDパターンを示す。SBFに5あるいは7日間浸漬したR-Caでは、水酸アパタイト（HAp、$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$）に帰属される回折ピークが観察された[9, 21]。一方、R-CuおよびR-Znでは、SBF浸漬後7日までの間にXRDパター

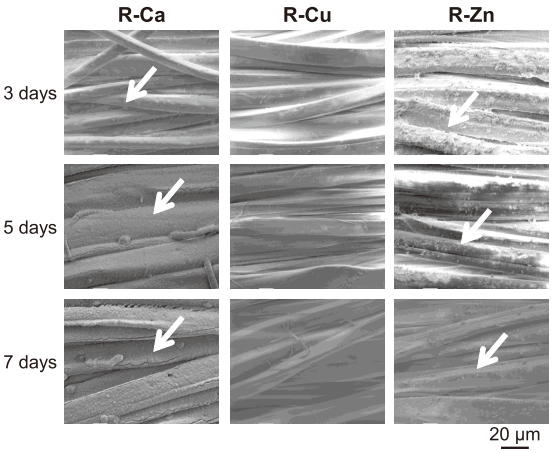


Fig. 4 SEM images of R-Ca, R-Cu and R-Zn after soaking in SBF for various periods. Arrows indicate precipitates.

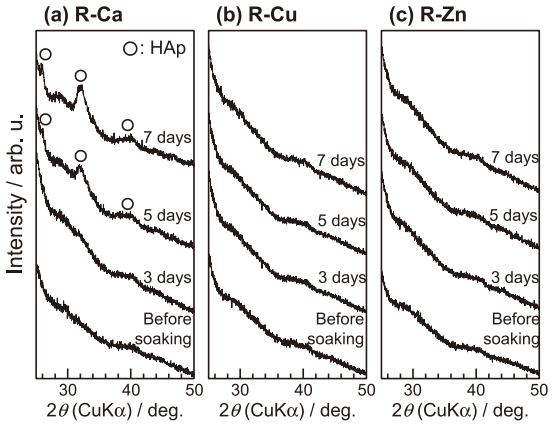


Fig. 5 XRD patterns of R-Ca, R-Cu and R-Zn after soaking in SBF for various periods.

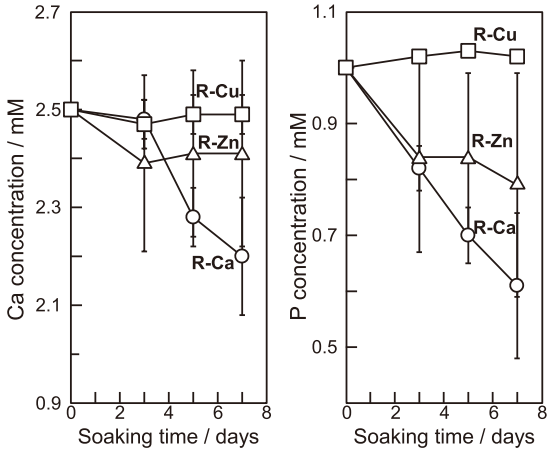


Fig. 6 Change in calcium and phosphorus concentration of SBF after soaking R-Ca, R-Cu and R-Zn for various periods.

ンに変化は見られなかった。

Fig. 6 に、試料浸漬による SBF の Ca および P 濃度の変化を示す。R-Ca の浸漬によって SBF 中の Ca および P イオンの濃度が顕著に低下したが、R-Cu では、Ca および P イオンの濃度低下は見られなかった。また、R-Zn を浸漬した SBF においても Ca および P イオン濃度の顕著な低下は確認されなかった。

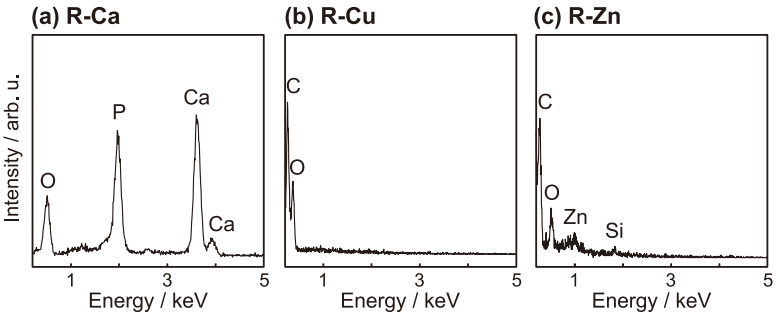


Fig. 7 EDX spectra of R-Ca, R-Cu and R-Zn after soaking in SBF for 7 days.

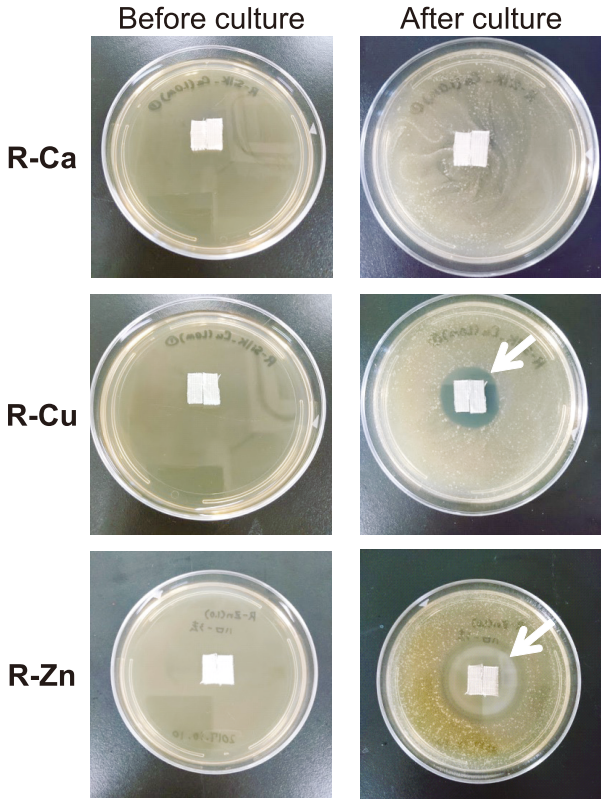


Fig. 8 Results of qualitative antibacterial tests for R-Ca, R-Cu and R-Zn before and after culture.

Fig. 7 に，SBF 浸漬 7 日後の各試料の EDX スペクトルを示す。R-Ca では、Ca と P の EDX ピークが見られたが、R-Zn では、それらのピークは確認されず、Zn の EDX ピークがわずかに見られた。また、R-Cu においては、Cu の EDX ピークがほとんど見られなかった。

3．4．試料のアパタイト形成能

Fig. 8 に、ハロー法による抗菌試験の結果を示す。培養 24 時間後において、R-Cu および R-Zn ではハロー（矢印）が見られた。従って、これらの試料は大腸菌に対して抗菌

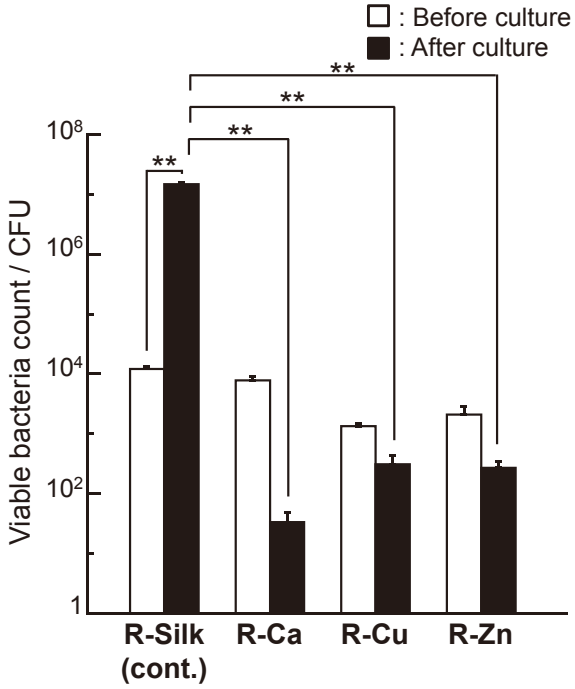


Fig. 9 Results of quantitative antibacterial tests for R-Ca, R-Cu and R-Zn. (**P<0.01)

性を示すことが分かる。Fig. 9に、菌液吸収法による抗菌試験の結果を示す。コントロールとして用いたR-Silkでは、培養前後で大腸菌が有意に増殖したが、R-Ca、R-CuおよびR-Znにおいては、培養前後で大腸菌の生菌数が減少した。さらに、各試料間の培養後の生菌数を比較すると、R-Ca，R-CuおよびR-Znの生菌数はR-Silkのそれよりも有意に小さかった。Fig. 9の結果から菌増殖値（F）と抗菌活性値（A）を算出した結果をTable 3に示す。JIS 1902:2015では、2.0≦A＜3.0となる試料に抗菌効果が認められ、A≧3.0となる試料には強い抗菌効果が認められると定義されていることから、R-Ca，R-CuおよびR-Znは、大腸菌に対して強い抗菌性を示すことが分かった。

4．考　察

4．1．試料表面の構造および元素分析

R-Ca、R-CuあるいはR-Znの表面にそれぞれ微量のCa、CuあるいはZnが検出された（Table 1）ことから、$CaCl_2$、$CuCl_2$あるいは$ZnCl_2$水溶液浸漬によってR-SilkにCa、CuあるいはZnを導入できたことが分かる。また、全ての試料において検出されたSiは、生糸繊物にわずかに含まれる無機物に由来すると考えられる[22)]。

Fig. 2より、R-Ca中のCaはCa^{2+}として存在していると考えられる。セリシンのOH基あるいはCOOH基はCaとキレート結合を作ると考えられている[5)]が、セリシンの等電点が4.3程度である[23)]ことから、COOHは$CaCl_2$水溶液中において電離してCOO^-となっており，そこにCa^{2+}が

Table 3 Growth value (F) and antibacterial activity value (A) for R-Ca, R-Cu and R-Zn. R-Silk was used as control.

	F	A
R-Silk	+3.09	Control
R-Ca	-2.37	5.46
R-Cu	-0.64	3.78
R-Zn	-0.89	3.98

配位すると考えられる。従って、R-Ca中のCaは主にアスパラギン酸の側鎖に担持されている可能性が高い。また、R-Cu中のCuはとして存在していると考えられる。Cu^{2+}の一部がCu^+に還元された理由については不明だが、これらイオンはCaと同様に、主にアスパラギン酸の側鎖に担持されていると推察される。さらに、R-Zn表面の析出物（Fig. 1）は、ZnOおよび／あるいは$Zn(OH)_2$と考えられる。

4．2．試料の金属イオン溶出特性

Fig. 3に示すように、R-Ca、R-CuあるいはR-ZnのTBSへの浸漬によって、TBSのCa、CuあるいはZnイオンの濃度が上昇したことから、それぞれの試料に導入した金属イオンがTBS中へ溶出したことが分かる。また、いずれの金属イオンの場合も、TBS浸漬1日後の濃度と浸漬7日後のそれがほぼ同じであったことから、各試料からの金属イオンの溶出はTBS浸漬1日以内に終わると考えられる。

4．3．試料のアパタイト形成能

Fig. 4および5より、R-CaはSBF中においてアパタイト形成能を示すが、R-CuおよびR-Znはアパタイト形成能を示さないことが明らかとなった。Fig. 6に示すように、R-Caの浸漬によってSBF中のCaおよびPイオンの濃度が顕著に低下したことから、CaやPイオンがR-Caの表面に取り込まれ、アパタイトが形成されたと考えられる。なお、CaおよびPイオンの濃度低下がR-Caの浸漬3日後にすでに生じていたことから、SBF浸漬3日後にR-Ca表面に見られた析出物（Fig. 4）は低結晶性のリン酸カルシウムであると考えられる。R-Cuを浸漬した場合は、CaおよびPイオンの濃度低下は見られなかった（Fig. 6）ことから、R-Cuにおいては、CaやPイオンが表面に取り込まれず、従ってアパタイトが形成されなかったと考えられる。なお、SBF浸漬後のR-CuのEDXスペクトル（Fig. 7(b)）にCuのEDXピークがほとんど見られなかったことから、R-Cuに導入されたCuは7日間のSBF浸漬によってほとんど溶出したと考えられる。R-Znを浸漬した場合でもCaおよびPイオン濃度の顕著な低下は確認されなかったことから、

SBF浸漬後のR-Zn表面に見られた析出物(Fig. 4)は、SBF浸漬後にも残存したZnOおよび／あるいは$Zn(OH)_2$と考えられる。このことは、SBF浸漬後のR-ZnのEDXスペクトルにおいて、ZnのEDXピークが僅かに見られた(Fig. 7(c))ことからも示唆される。

以上より，R-Caにおいては，$CaCl_2$水溶液処理によって導入されたCaイオンがTBS中 (Fig. 3) と同様にSBF中に溶出することでSBFに対するアパタイトの過飽和度を上昇させたため、Caイオンが試料表面に取り込まれ、アパタイトが形成したと考えられる[11, 12]。一方、R-CuやR-Znにおいては、CuまたはZnイオンがTBS中 (Fig. 3) と同様にSBF中に溶出したと推測されるが、それにも関わらず試料表面にCaイオンは取り込まれず、アパタイトは形成しなかったと考えられる。これは、CuまたはZnイオンの溶出に伴ってSBF中のCaイオンとのイオン交換が生じているとしても、SBF中にはCaイオン以外にもヒドロニウムイオン、ナトリウムイオン、カリウムイオン、マグネシウムイオンなどが存在しており[8]、これらイオンがCaイオンの試料表面への選択的導入を阻害した可能性がある。

4．4．試料の抗菌性

Fig. 8に示すように、ハローが形成されたR-CuおよびR-Znにおいては、試料から抗菌元素であるCuイオンまたはZnイオンが溶出したことにより、抗菌性が発現したと考えられる[14]。これらの抗菌メカニズムを既往の研究から推察すると、R-Cuについては、溶出したCuイオンがタンパク質の変性や酵素機能の阻害を引き起こし，細菌の増殖を抑制した可能性がある[24, 25]。また、R-Znについては、Znイオンの溶出によって、能動輸送の阻害やアミノ酸の代謝機構および酵素機能の阻害などが生じた可能性がある[26]。さらに、R-Znでは、溶出したZnイオンだけでなく、表面に形成された亜鉛の化合物も抗菌性に寄与していると考えられる。ZnOは暗所においても活性酸素を生成し[27]、細菌の細胞壁を破壊する。従って、R-Zn表面の形成物にZnOが含まれているとすれば、ZnOが抗菌性に寄与した可能性がある。一般に活性酸素は飛程距離が短く不安定であるが、ZnOが寒天培地中に拡散することによって、試料から離れた細菌に対しても抗菌効果を示したと考えられる。これは、ZnOが水に不溶であることや、R-Zn周囲に生じたハローが白く濁っていた (Fig. 8) ことからも示唆される。また、R-Caについては、ハロー法では抗菌性を示さなかったが菌液吸収法 (Fig. 9) では強い抗菌性を示した。これは、R-Caに担持されたCaイオンが培地中に溶出することで、R-Caのごく表面に存在するH^+がイオン交換によって試料中に取り込まれ、試料表面付近のpHが上昇したためと考えられる。既往の研究によれば、大腸菌の成長における最適なpHは6~8であることから[28]、培地をアルカリ化することによって菌を死滅し得る[29]。

5．総　括

本研究では、Ca、CuあるいはZnイオンを導入した生糸織物のSBF中におけるアパタイト形成能および大腸菌に対する抗菌性を調べた。Caイオンを導入した生糸織物をSBFに浸漬すると、同織物はその表面にアパタイトを形成した。これは、同織物からのCaイオンの溶出によって、アパタイトに対するSBFの過飽和度を上昇させたためと考えられる。また、Ca、CuあるいはZnイオンを導入した生糸織物は、大腸菌に対して強い抗菌性を示した。Ca導入試料においてはCaイオンの溶出に伴って試料表面付近のpHが上昇したことによって、Cu導入試料においては抗菌元素であるCuイオンが溶出したことによって、またZn導入試料においては、Znイオンの溶出と活性酸素の生成によって抗菌性が発現したと考えられる。

(引用文献)

1) G. H. Altman, F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R. L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond, D. L. Kaplan, Silk-based biomaterials, *Biomaterials*, **24** (2003) 401-416.

2) P. Aramwit, A. Sangcakul, The effects of sericin cream on wound healing in rats, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71** (2007) 2473-2477.

3) N. Kato, S. Sato, A. Yamanaka, H. Yamada, N. Fuwa, M. Nomura, Silk protein, sericin, inhibits lipid peroxidation and tyrosinase activity, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62** (1998) 145-147.

4) K. Tsubouchi, Y. Igarashi, Y. Takasu, H. Yamada, Sericin enhances attachment of cultured human skin fibroblasts, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69** (2005) 403-405.

5) M. Sasaki, H. Yamada, N. Kato, Consumption of silk protein, sericin elevates intestinal absorption of zinc, iron, magnesium and calcium in rats, *Nutr. Res.*, **20** (2000) 1505-1511.

6) M. Neo, S. Kotani, T. Nakamura, T. Yamamuro, C. Ohtsuki, T. Kokubo, Y. Bando, A comparative study of ultrastructures of the interfaces between four kinds of surface-active ceramic and bone, *J. Biomed. Mater. Res.*, **26** (1992) 1419-1432.

7) L. L. Hench:, Bioceramics, *J. Am. Ceram. Soc.*, **81** (1998) 1705-1728.

8) T. Kokubo, H. Takadama, How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, **27** (2006) 2907-2915.

9) A. Takeuchi, C. Ohtsuki, T. Miyazaki, H. Tanaka, M. Yamazaki, M. Tanihara, Deposition of bone-like apatite on silk fiber in a solution that mimics extracellular fluid, *J. Biomed. Mater. Res. A*, **65** (2003) 283–289.

10) H. M. Kim, K. Kishimoto, F. Miyaji, T. Kokubo, T. Yao, Y. Suetsugu, J. Tanaka, T. Nakamura, Composition and structure of the apatite formed on PET substrates in SBF modified with various ionic activity products, *J. Biomed. Mater. Res. A,* **46** (1999) 228–235.

11) C. Ohtsuki, T.Kokubo, T. Yamamuro, Mechanism of apatite formation on CaO-SiO_2-P_2O_5 glasses in a simulated body fluid, *J. Non-Cryst. Solids*, **143** (1992) 84–92.

12) A. Oyane, M. Kawashita, K. Nakanishi, T. Kokubo, M. Minoda, T. Miyamoto, T. Nakamura, Bonelike apatite formation on ethylene–vinyl alcohol copolymer modified with silane coupling agent and calcium silicate solutions, *Biomaterials*, **24** (2003) 1729–1735.

13) K. Matsushita, S. Abe, T. Ishi, S. Kajiyama, A. Kotani, M. Saito, T. Masaoka, T. Suguro, Prevention of perioperative infection in bone and joints, *Jpn. J. Chemother.*, **60** (2012) 319–326. (In Japanese)

14) D. H. Nies, Microbial heavy metal resistance, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51** (1999) 730–750.

15) T. N. Kim, Q. L. Feng, J. O. Kim, J. Wu, H. Wang, G. C. Chen, F. Z. Cui, Antimicrobial effects of metal ions (Ag^+, Cu^{2+}, Zn^{2+}) in hydroxyapatite, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **9** (1998) 129–134.

16) C. Prinz, M. Elhensheri, J. Rychly, H. G. Neumann, Antimicrobial and bone-forming activity of a copper coated implant in a rabbit model, *J. Biomater. Appl.*, **32** (2017) 139–149.

17) K. Gupta, R. P. Singh, A. Pandey, A. Pandey, Photocatalytic antibacterial performance of TiO_2 and Ag-doped TiO_2 against *S. aureus. P. aeruginosa and E. coli, Beilstein J. Nanotech.*, **4** (2013) 345–351.

18) W. Gu, D. W. Bousfield, C. P. Tripp, Formation of calcium carbonate particles by direct contact of Ca$(OH)_2$ powders with supercritical CO_2, *J. Mater. Chem.*, **16** (2006) 3312–3317.

19) J. F. Moulder, W. F. Stickle, P. E. Sobol, K. D. Bomben, *Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy*, ULVAC-PHI, Inc., (1995) 68–69, 86–89.

20) J. Duchoslav, R. Steinberger, M. Arndt, D. Stifter, XPS study of zinc hydroxide as a potential corrosion product of zinc: rapid X-ray induced conversion into zinc oxide, *Corros. Sci.*, **82** (2014) 356–361.

21) A. Takeuchi, C. Ohtsuki, T. Miyazaki, M. Kamitakahara, S. Ogata, M. Yamazaki, Y. Furutani, H. Kinoshita, M. Tanihara, Heterogeneous nucleation of hydroxyapatite on protein: structural effect of silk sericin, *J. R. Soc. Interface*, **2** (2005) 373–378.

22) M. Mondal, K. Trivedy, S. N. Kumar, The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, *Bombyx mori* Linn., – a review, *Caspian J. Env. Sci.*, **5** (2007) 63–76.

23) A. M. Sookne, M. Harris, Electrophoretic studies of silk, *J. Res. Natl. Stand.*, **23** (1939) 299–308.

24) R. B. Thurman, C. P. Gerba, G. Bitton, The molecular mechanisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses, *Crit. Rev. Environ. Control.*, **18** (1989) 295–315.

25) R. M. Sterritt, J. N. Lester, Interactions of heavy metals with bacteria, *Sci. Total Environ.*, **14** (1980) 5–17.

26) A. Sirelkhatim, S. Mahmud, A. Seeni, N. H. M. Kaus, L. C. Ann, S. K. M. Bakhori, H. Hasan, D. Mohamad, Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism, *Nano-Micro Lett.*, **7** (2015) 219–242.

27) K. Hirota, M. Sugimoto, M. Kato, K. Tsukagoshi, T. Tanigawa, H. Sugimoto, Preparation of zinc oxide ceramics with a sustainable antibacterial activity under dark conditions, *Ceram. Int.*, **36** (2010) 497–506.

28) E. Padan, D. Zilberstein, S. Schuldiner, pH homesstasis in bacteria, *Biochim. Biophys. Acta*, **650** (1981) 151–166.

29) J. F. Siqueira, H. P. Lopes, Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review, *Int. Endod. J.*, **32** (1999) 361–369.

化粧品の評価・開発に資する微小な力を検知する水溶性の分子集合体の開発

北海道大学電子科学研究所
相良　剛光

Molecular assembled materials that change emission properties in response to tiny mechanical forces are valuable to develop various cosmetic products. In this study, we developed a green-emissive, one-dimensional supramolecular fiber consisting of fluorescence dumbbell-shaped amphiphile **1** having 9,10-bis(phenylethynyl)anthracene as the emission core. Mechanical grinding leads to emission color change from green to yellow on glass substrates under ambient condition. The emission spectrum shows a further red-shift when the ground sample was exposed to water vapor. Interestingly, the green fluorescence recovers after exposure to methanol vapor. Emission lifetime measurements and steady-state spectroscopic measurements reveal that the observed color change from green to yellow is ascribed to mechanical stimuli-induced excimer formation between the fluorescent cores. Infrared spectroscopic measurements clarified the amide groups are involved in hydrogen bonding and closer inspection revealed that a peak corresponding to C=O stretching becomes broad after mechanical grinding, which suggested that a linear hydrogen-bonds become disordered ones upon grinding. One-dimensional linear supramolecular fibers with width of ca. 5 nm were observed in transmission electron microscope images for the initial samples, while micellar structures were found to attach the both edges of short fibrous structures for ground samples. These results indicated that mechanical stimuli cut the supramolecular fiber and the micellar molecular assemblies form at the cut positions. The emission cores never form excimer in the initial fibers. In contrast, excimer should form in the mechanical stimuli-induced micellar molecular assemblies. Because the green-emissive fibers do not dissolve in water, we searched suitable amphiphilic molecular structures. Though we were not able to find the best amphiphiles, correlation between the dendritic structures and the molecular assembled structures in water have been partially clarified.

1．緒　言

化粧品は成熟した人類社会ではなくてはならないものであり、化粧品市場がさらに拡大することが容易に想像できる。市場の拡大と共に化粧品に求められるのは、より安全で、高機能な化粧品であることは言うまでもない。そのような最先端の化粧品開発において重要であるのは、その機能評価である。化粧品を肌に塗布する際には機械的刺激が発生しているが、印加される機械的刺激を細胞レベルで評価することは極めて難しい。

本研究では、きわめて小さい力を鋭敏に検出できる親水性かつ蛍光性の分子集合体を開発することを目指している。近年、機械的な刺激により蛍光色が変化する有機分子集合体の報告例が、我々の報告に端を発し[1]、世界的に増えている[2]。観察される蛍光色変化は、機械的な刺激により蛍光団の共有結合が切断されることが原因ではなく、材料内の蛍光団の集積構造が変化することで達成されている。このような材料は、比較的大きな力を必要とする共有結合の切断を伴わずに蛍光色変化を達成できるため、皮膚に印加される微小な力を評価・可視化する際には、とても有望である。

我々はこれまでに、約15～20個の両親媒性分子で構成される水溶性の繭状分子集合体を設計・開発し、水中でその繭状分子集合体が機械的刺激を受けて内部の蛍光部位の集積構造が変化し、蛍光スペクトルが短波長シフトすることを見出している[3]。この繭状分子集合体は市販のリンカー化合物を用いることで、表面にアミノ基を持つガラスやポリマー材料、さらには生細胞に共有結合を介して導入することができ、十分な力がガラスやポリマー材料に印加されると繭状分子集合体の発光色が変化することが確認できた。しかし、この繭状分子集合体が機械的刺激に応答して示す蛍光スペクトル変化は非常に小さく、そのため生細胞にかかる力を正確に評価できなかった。

そこで本研究課題では、先行研究の結果を踏まえ、より大きな蛍光色変化を示し、生細胞に作用する機械的刺激を鋭敏に検出することができる水溶性の分子集合体を創製することを目指した。

2．方　法

2．1．両親媒性分子1の合成

先行研究[3]において開発した両親媒性分子は、1,6-bis（phenylethynyl）pyreneを発光部位として持ち、水溶性のデンドロン構造がアミド基を介して二つ導入された分子構造となっている。そこで、本研究では発光部位を9,10-bis（phenylethynyl）anthracene骨格に変更し、先行研究と同じデンドロンを蛍光団の長軸方向ではなく、60°ねじれた位置に導入した新規の両親媒性分子**1**を設計・合成し



Development of water-soluble molecular assemblies that detect tiny mechanical forces to evaluate and prepare cosmetic products

Yoshimitsu Sagara

Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University

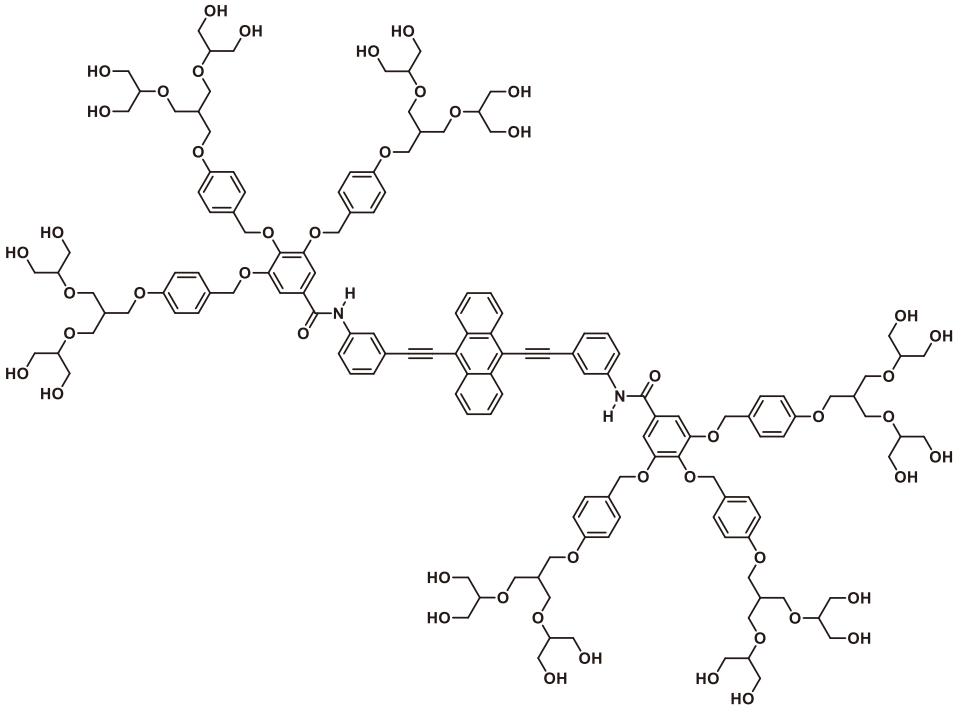


図１　新しく合成した両親媒性分子 **1** の分子骨格

た(図 1)。

２．２．両親媒性分子1の機械的刺激に対する応答性評価

新しく設計・合成した両親媒性化合物 **1** が示す刺激応答発光特性をバルクの状態で調べた。図 2 に外部刺激に応答して **1** の発光色が変化する様子を示す。

化合物 **1** は 365 nm の励起光照射下、初期状態では緑色の発光を示す。これをスパチュラなどでこすると発光色が黄色に変化する。この発光色変化は、先行研究の繭状分子集合体が示した応答特性とは全く異なり、長波長側にシフトしていることがわかった(先行研究では短波長シフト)。さらに黄色に変化した発光色は、水蒸気に曝露することで発光色が橙色まで変化する。また、面白いことに、その後メタノールの蒸気にさらすと元の緑色の発光色が回復する。一方で、初期状態のサンプルを機械的刺激を印加せずに水蒸気にさらしても発光色変化は観察されない。橙色の発光色を得るには最初に機械的刺激を印加することが必要要件となることがわかった。

次に、固相での発光スペクトル測定を行った (図 3)。機械的刺激を印加する前は 537 nm にピークを持つスペクトルが観察される。一方で、機械的刺激を印加すると、発光スペクトルは大きく長波長シフトし、そのスペクトルの形状はブロードとなった。これは機械的刺激を印加されて、発光部位がエキシマーを形成できるようになったことを示唆している。さらに水蒸気にさらすと、蛍光スペクトルがより長波長側にシフトすることがわかった。一方でメタノ

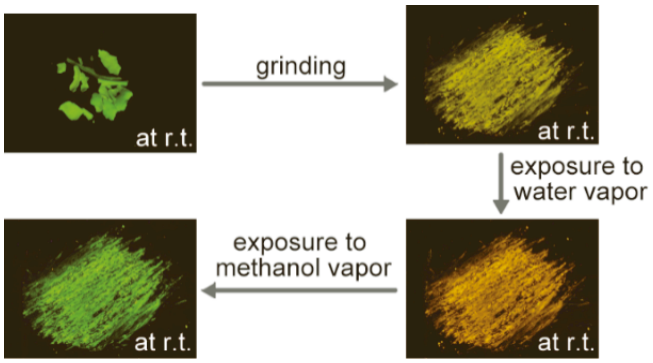


図２　化合物 **1** が固相で示す、外部刺激に応答して発光色が変化する様子

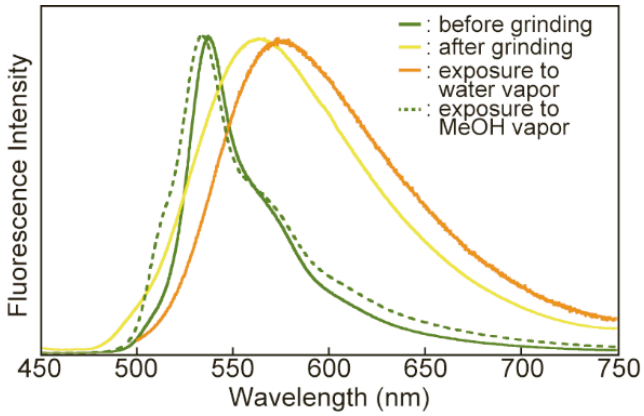


図３　化合物 **1** の固相での発光スペクトル変化

ール蒸気にさらした後は蛍光スペクトルが大きく短波長シフトし、機械的刺激を印加する前のスペクトルと同じ波長領域に観察されるようになった。

機械的刺激を印加したのちに得られる発光色が発光部位のエキシマー形成に起因しているかどうかを確かめるため、蛍光寿命測定を行った。溶液及び固相で機械的刺激を印加する前後の減衰曲線を図４に示す。クロロホルムとメタノールの混合溶媒（混合比１：１）中では2.9nsの単一成分が観察される（黒線）。一方で固相での減衰曲線は溶液の減衰曲線とは大きく異なっており、それぞれtriexponential decay functionでのフィッティングを行った。機械的刺激を印加する前（緑線）では0.8，2.9，9.3nsの成分が観察され、機械的刺激を印加したのちは（黄線）、1.2，6.0，23nsの寿命成分が観察される結果となった。機械的刺激を印加した後の23nsの成分が発光部位のエキシマーに対応していると考えられる。以上より、機械的刺激を印加した際に、発光部位がエキシマーを形成できる相関配置となった結果、発光色が緑から黄色に変化したのだと結論付けた。

さらに、化合物**1**が形成する分子集合構造中でアミド基が水素結合を形成しているかを明らかにするために、IR測定を行った。結果を図５に示す。固相で機械的刺激を印加する前後で1650cm^{-1}付近にアミド基のC=O伸縮振動に対応するピークが観察され、固相ではアミド基間で水素結合が形成されていることがわかった。しかし、そのピークの形状は機械的刺激を印加する前後で大きく異なっている。印加前はシャープなピークが観察されるのに対して、印加後はピークがブロードニングすることがわかった。これは、機械的刺激を印加する前はリニアな水素結合が形成されていたが、機械的刺激を印加されることにより、ある程度乱れた水素結合モードに変化したことを意味している。

化合物**1**がどのような分子集合構造を形成しているかを明らかにするために、透過型電子顕微鏡観察を行った。得られた像を図６に示す。均一な太さを持つファイバー状の分子集合体が観察され、このファイバーの幅はおよそ5nmであり、これは化合物**1**の分子長とほぼ同じ大きさであった。すなわち化合物**1**は機械的刺激を印加する前は隣接する分子のアミド基間でリニアな水素結合を形成し、超分子ファイバーを形成することがわかった。さらに面白いことに、機械的刺激を印加したサンプルでは、ファイバーが切断されている箇所が著しく増加しており、切断箇所に繭状の分子集合体が形成されていることがわかった。この繭状の分子集合体は先行研究で観察されたミセル状の分子集合体とよく似ていた。先行研究では、ミセル内でエキシマーが形成されていたため、化合物**1**が切断箇所で形成する繭状の分子集合構造内でも発光部位がエキシマーを形成していると考えられる。

以上の実験事実より、機械的刺激により発光色が変化

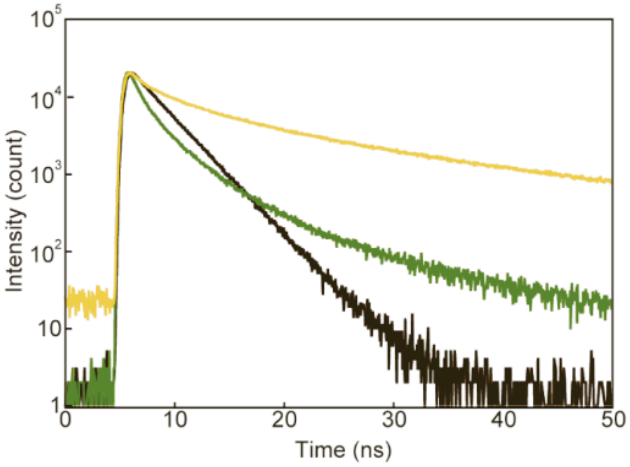


図４　蛍光減衰曲線



図５　機械的刺激印加前後のIRスペクトル

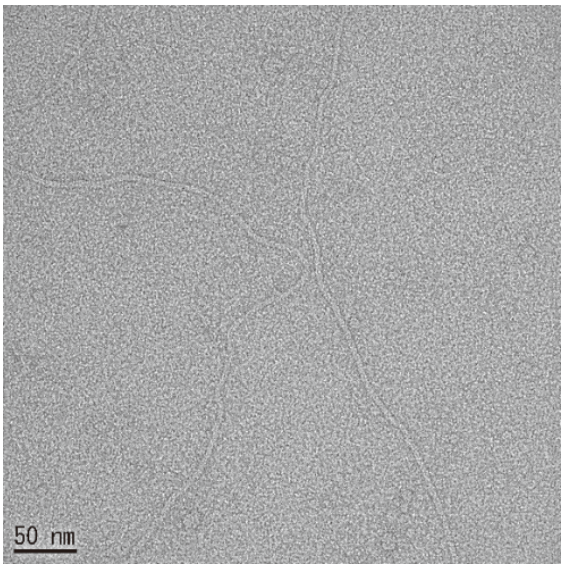


図６　透過型電子顕微鏡での観察結果

するメカニズムは次のように考えられる。化合物**1**は最初、一次元の超分子ファイバーを形成し、そのファイバー内で発光部位は規則正しく並び、エキシマーは形成されず緑色の発光色が観察される。しかし、いったん機械的刺激が印加されると、ファイバーが切断されると同時に切断箇所で分子の再配列が起き、発光部位がエキシマーを形成できる相関配置となることで発光色が緑から黄色に変化したと考えられる。

2．3．構造を変えた両親媒性分子の探索

両親媒性分子**1**は先行研究の繭状分子集合体とは異なり、一次元の超分子ファイバーを形成し、切断されることにより発光色変化が達成される全く新しい特性を示す分子となった。しかし、初期状態では水には不溶となってしまった。そこで、次に化合物**1**が示す、「機械的刺激を受けて蛍光スペクトルが長波長シフトする」という特性を維持したまま、水溶性を付与することを試みた。まず、化合物**1**に導入した水溶性デンドロンの世代を1世代増やした化合物**2**の合成を試みたが、水酸基を保護した状態のデンドロン骨格がかさ高過ぎたため、9, 10-ジブロモアントラセンとアセチレン基を持つデンドロン構造との間の薗頭反応がうまく進行せず、目的化合物を得ることはできなかった。そこで脂溶性骨格の構造やデンドロンの世代を変更した化合物**3**～**5**（図7）を設計・合成した。しかし、いずれの化合物も化合物**1**が初期状態で形成する緑色発光を示す超分子ファイバーを形成せずに、黄色の発光を示す水溶性の分子集合体を初期状態から形成してしまうことがわかった。

3．考　察

両親媒性分子**1**では先行研究の分子とは異なり、初期状態で緑色の蛍光色を示す超分子ファイバーを形成した。先行研究の分子から、水溶性デンドロンの導入位置を変更し、蛍光団を変更しただけであるが、その刺激応答発光特性は大きく変化した。先行研究では、分子が15～20個程度集まり、発光部位がスタックすることでエキシマーを形成し、黄色の発光色が観察されていた。機械的刺激が印加されると、発光団がエキシマー形成できない相関配置に置かれ、発光色が緑色となる。ここで重要な点は、先行研究では発光色変化を誘起するために、繭状分子集合体を形成するすべての分子でエキシマー形成を阻害する必要があるということである。少しでもエキシマーサイトが残っていると、そこにエネルギー移動が起きてしまい、分子集合体からの発光色に変化は観察されない。一方で化合物**1**では、機械的刺激を受けて発光部位がエキシマーを形成していない相関配置から、エキシマー形成できる相関配置に変化する。ファイバーが少しでも切断されれば、付近のエキシマーを形成していないサイトからのエネルギー移動が起き、すべての分子をエキシマー形成できる相関配置に変換しなくとも、全体としての発光色変化が達成される。つまり、化合物**1**では機械的刺激に対する蛍光特性変化が増幅されるのである。スペクトル変化の大きさも、化合物**1**の方が先行研究のシフト幅と比較して大きいことと併せて、**1**が形成した緑色蛍光超分子ファイバーは、水には不溶ではあるが、機械的刺激のセンシング材料として非常に有望である。

次に、初期状態での緑色蛍光超分子ファイバーに水溶性を付与することを目的とし、分子骨格の探索を行った。デンドロンの導入位置が重要ではないか考え、デンドロンを導入する位置は化合物**1**と同じとし、デンドロン構造の異なる分子**3**-**5**を合成したが、残念ながら緑色の発光を示す超分子ファイバーの形成は確認できず、おそらく先行研究と同様に繭状の分子集合体を形成していることが考えられる。以上の知見から**1**のデンドロンの枝分かれ構造が、緑色の蛍光色を示す超分子ファイバーの形成に重要な役割を担っていると考えられる。今後は、**1**の分子骨格を大きく変更せずに、形成される超分子ファイバーに水溶性の付与を目指したい。

4．総　括

本研究では、きわめて小さい機械的刺激を検知して蛍光色が変化する親水性の分子集合体の開発を目指した。もし鋭敏に力を検出し、大きな発光色変化を誘起できる材料ができれば、化粧品を肌に直接塗布する際に発生するきわめて小さい機械的刺激を、細胞レベル、さらには分子レベルで可視化・評価することができるようになるのではないかと考えている。これまでに多数の機械的刺激応答性蛍光材料が開発されているが、それらは疎水性の高い材料であり、生体に応用することはできない。また、限られた分子数でユニット化されていないため、蛍光色変化を誘起するために必要な力が大きかった。本研究で目指している、きわめて鋭敏な機械的刺激応答性蛍光材料は、これらの課題をすべて解決することになり、化粧品を肌に塗布する際に重要な因子となっている機械的刺激の影響を製品開発の段階で定量的に評価できるようになることが期待できる。最近我々のグループが報告したロタキサン型超分子メカノフォア[4]などと併せて、個々の細胞が生み出す力や印加される力を定量的に評価できるようになれば、化粧品を肌に塗布する際に起きる細胞内の様々な機械的刺激によるシグナル伝達を解明することができるようになり、それらの知見は、より安全・高品質な化粧品の開発に生かされることになる。

本研究では研究実施期間中に、先行研究の発光特性変化より、大幅に機械的刺激に対する応答性が改善された1次元超分子ファイバーを形成できる化合物**1**の特性評価を行い、そのメカニズムが解明された。残念ながら水溶性の1次元超分子ファイバーを形成することができる化合物の

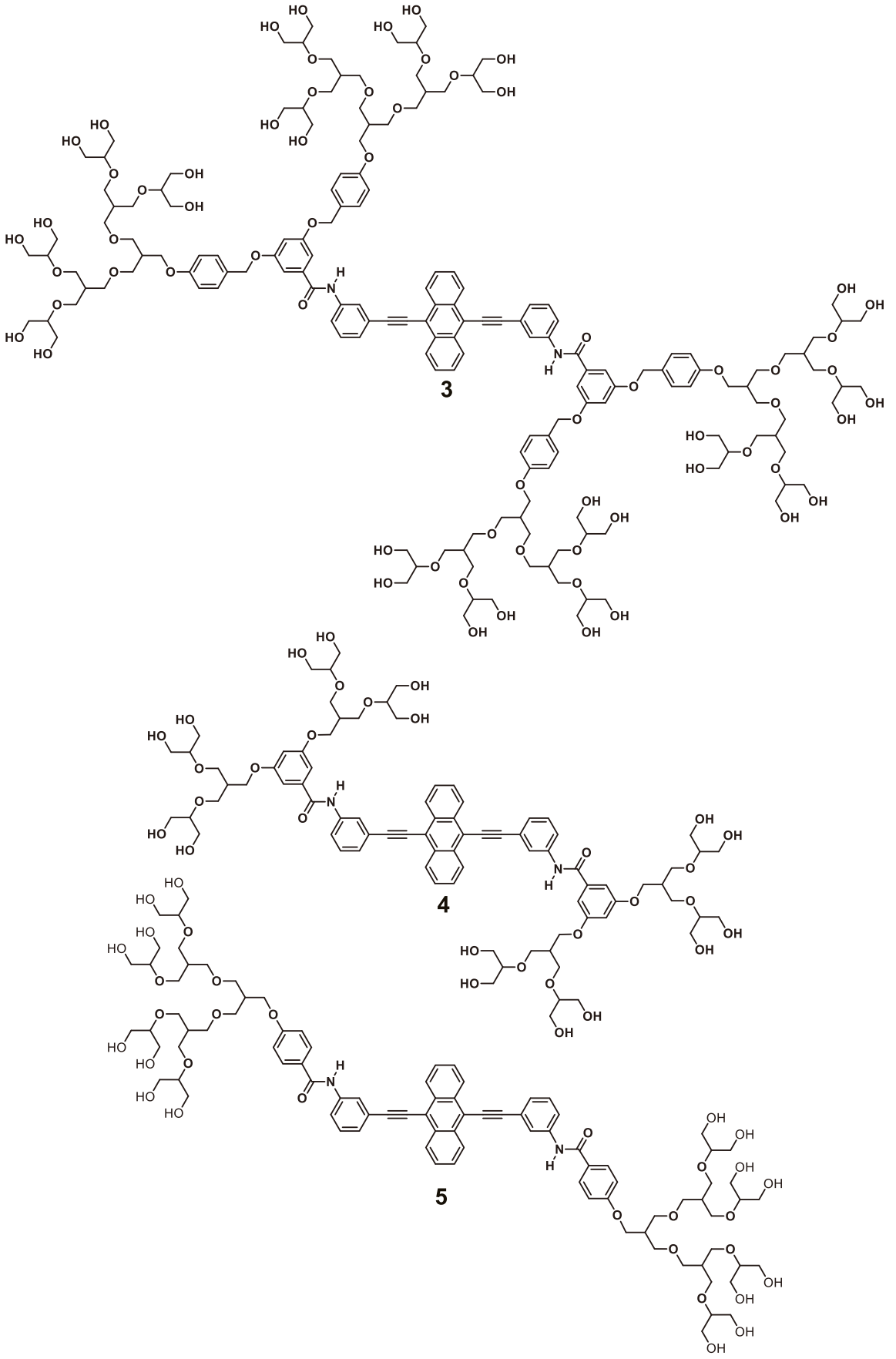


図７　新しく設計・合成した両親媒性化物３– ５の分子骨格

発見には至らなかったが、デンドロン構造と分子が最初に形成する集合体の発光特性との相関に関する知見を多く得ることができた。引き続き、機械的刺激を受けて切断され、発光色変化が達成されるような超分子ファイバーの創製に取り組む予定である。

最後に、本研究はコスメトロジー研究振興財団の助成金によって、はじめて推進することができました。私の研究課題を採択して頂いた財団の方々、選考委員の先生方に厚く御礼申し上げます。

（引用文献）

1） Y. Sagara, T. Mutai, I. Yoshikawa, K. Araki, *J. Am. Chem. Soc., 129*, 1520–1521 (2007) ; Y. Sagara, T. Kato, Angew. Chem. Int. Ed., 47, 5175–5178 (2008).

2） Y. Sagara, T. Kato, *Nat. Chem., 1*, 605–610 (2009); Y. Sagara, S. Yamane, M. Mitani, C. Weder, T. Kato, *Adv. Mater., 28*, 1073–1095 (2016).

3） Y. Sagara, T. Komatsu, T. Ueno, K. Hanaoka, T. Kato, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc., 136*, 4273–4280 (2014).

4） Y. Sagara, M. Karman, E. Verde-Sesto, K. Matsuo, Y. Kim, N. Tamaoki, C. Weder, *J. Am. Chem. Soc., 140*, 1584–1587 (2018).

抗酸化物質から成るCubosomeの開発およびミクロ・メソ・マクロ特性の評価

大阪大学大学院基礎工学研究科物質創成専攻化学工学領域

菅　恵嗣

Cubosomal self-assemblies, composed of monoolein (MO) and fatty acid, were prepared by the pH titration method. The assemblies including 25–50 mol% of MO showed gel-like high viscosity at pH 5.0. Various kind of self-assemblies were systematically characterized by Raman spectroscopy and fluorescent probe analyses. The membrane property of cubosomal assembly was highly packed and less hydrated state. As application, cubosomal self-assembly could be prepared using functional lipids, e.g. linoleic acid (anti-oxidant), polymerizable lipid (precursor of polydiacethlene).

1．緒　言

脂肪酸は、生体内で脂肪組織を形成し栄養源として活用されている。また、脂肪酸の両親媒性構造は、脂質膜の骨格を形成するのに適しており、生体膜や始原細胞系をモデル化するための研究として注目されている[1)]。一般的には、オレイン酸のような脂肪酸は水にとけないが、pH滴定等の所定の手順によって分子集合体を形成し水中に分散可能となる[2)]。このような脂質分子集合体は、薬剤分子や栄養素の輸送担体としての活用が期待されている[3)]。目的物質が水溶性分子の場合、ベシクル（あるいはリポソーム）をキャリアとして活用できるが、脂溶性分子の輸送においては、疎水場体積に限りがあり、担持できる物質の容量に限界がある。ベシクル同様に2分子膜構造を有し、かつ膨大な疎水場を形成する自己組織系として、共連続相を有するCubic相が報告されており、物質輸送や物質分離への応用が期待されている[4, 5)]。一方、Cubic相やCubosomeの「膜」に着目した研究例は少なく、物理化学的な膜特性に関する知見は乏しい。

本研究では、脂肪酸を基本骨格とする膜材料の開発を目的とし、Cubosomeの調製手法ならびに評価手法の開発を行った。不飽和脂肪酸であるオレイン酸やリノール酸は、分子自体が酸化されやすいため、radical補足剤として働く。即ち、高濃度で不飽和脂肪酸を担持させた膜材料には抗酸化能力があり、なおかつ物質輸送に活用できると期待される。これまでに脂質Cubic相やCubosomeの膜に着目した研究例は少なく、基礎的な集合体の物性を俯瞰的に解析するための方法論について検討した[6)]。



Micro-, Meso-, and Macro-scopic Characterization of Cubosomal Self-Assemblies Composed of Antioxidants

Keishi Suga

Division of Chemical Engineering, Graduate School of Engineering Science, Osaka University

2．方　法

2．1．Cubosome調製

超純水にオレイン酸（OA）、リノール酸（LiA）、重合成脂肪酸（10,12-Tricosadiynoicacid（TCDA））およびモノオレイン（MO）を添加し（総脂質濃度：100 mM、OA/MO=（1/1））、40℃で24時間攪拌した。1 M NaOHで鹸化した後、HClを用いてpHを調整した。

2．2．脂質膜パッキング密度の解析

共焦点ラマン顕微鏡を用いて、各pHにおける脂質分子集合体のラマンスペクトルを測定した。CH_2対称伸縮振動に由来するピーク（2850 cm^{-1}）およびCH_2非対称伸縮振動に由来するピーク（2890 cm^{-1}）を測定し、脂質分子のパッキング密度R（$=I_{2890}/I_{2850}$）[7)]を解析した。

2．3．膜界面の極性環境解析

蛍光プローブLaurdanは周囲の水分子との相互作用により蛍光特性が変化する[8)]。10 μLの脂質分子集合体（総脂質濃度100 mM）を純水で希釈し、10 μLのLaurdan溶液（1 mM（inEtOH））を1 mLのサンプルに添加した。暗所で5分間静置した後、励起波長はλ_{ex}=340 nm、400–600 nmの波長範囲において蛍光スペクトルを測定した。さらに、Laurdanの蛍光スペクトルをPeakfit（Systat SoftwareInc.、CA、USA）を用いて2つのスペクトルにデコンボリューションした。1つは無秩序相（500 nm付近のピーク、親水性環境、A_1）に局在するLaurdanに由来し、もう1つは秩序相（450 nm付近のピーク、疎水性環境、A_2）に局在するLaurdanに由来する。ピーク面積から、次式により膜界面の親水性を算出した。

$$\Phi_m=A_1/(A_1+A_2)$$

3．結果および考察

3．1．OA/MO集合体の相挙動

OA/MO集合体についてpH滴定を行い、相挙動を解析

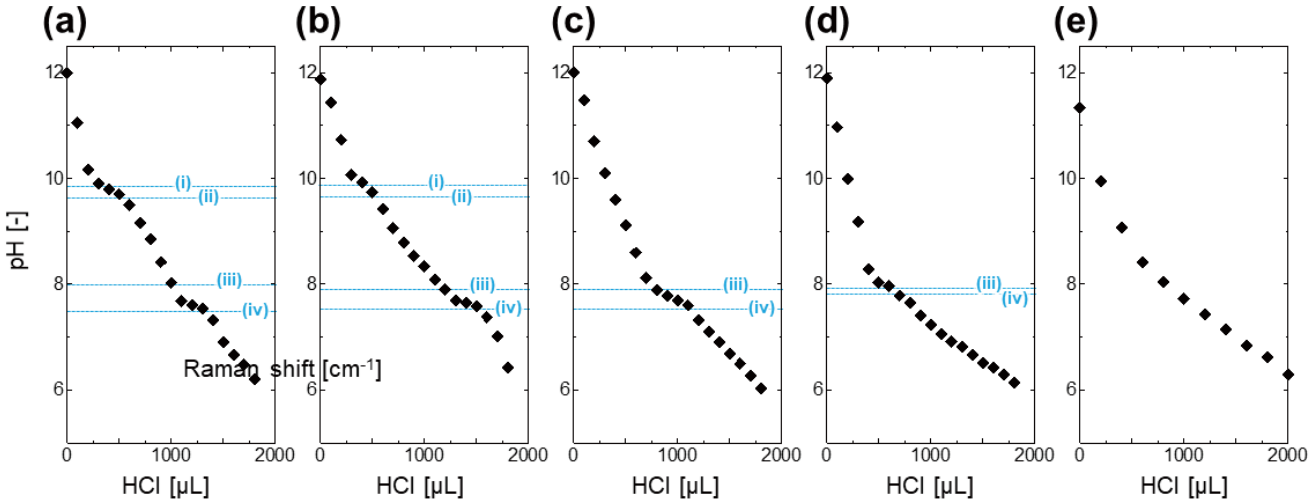


Figure 1　OA/MO 分散液の pH 滴定曲線。(a) [OA+Oleate]、(b) [OA+Oleate] /MO= (3/1)、(c) [OA+Oleate] /MO= (1/1)、(d) [OA+Oleate] /MO= (1/3)、(e) MO のみ。(i)、(ii)、(iii) および (iv) は、滴定曲線の変曲点を示す。

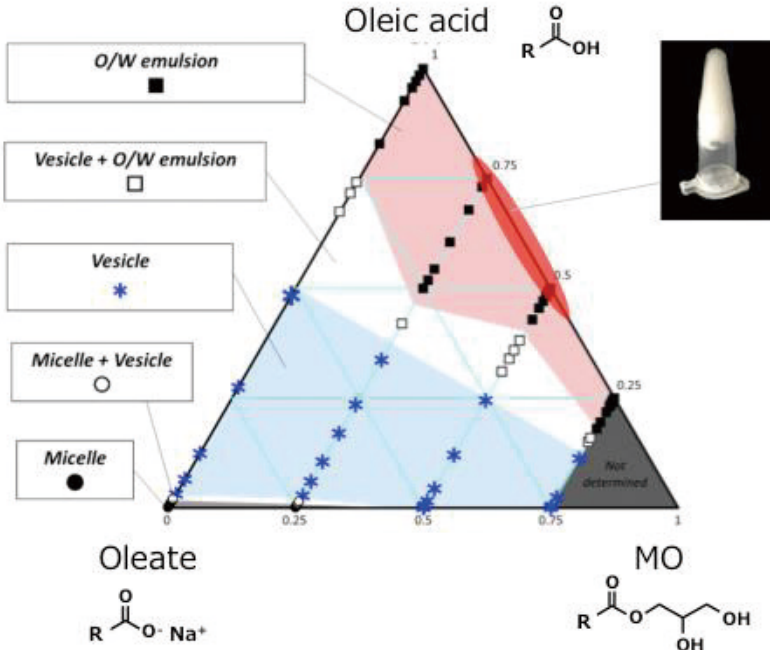


Figure 2　OA/Oleate/MO 自己集合系の相図

した（Figure 1）。pH滴定曲線における変曲点近傍では集合体の相転移がおこる。MO 25mol%では4つの変曲点が観察され、pHに応じてミセル⇄ベシクル⇄O/Wエマルジョンへと相転移したと考えられる。一方、MO50mol%および75mol%ではベシクル⇄エマルジョンの変曲点のみが観察された。MOのheadgroupは小さく、集合体においてコーン型分子と同様の役割を果たすと考えられる。

ここで、オレイン酸（OA、R-COOH）はpH>pKaにおいて電離した状態（Oleate、R-COO^-）である。従って、集合体の相挙動はOA/Oleate/MOのモル比によって記述できる（Figure 2）。ここでは、ミセル、ベシクル、O/Wエマルジョンの3状態を示している。[OA+Oleate] /MO= (1/1)、pH5.0の条件下で、ゲル状集合体の形成が確認された。O/Wemulsion領域内に存在するが、懸濁液の粘性に大きな差がみられた。この粘性の増加は、cubic相の形成を示唆している[9]。

3．2．分子集合体の物理化学的特性評価

脂質膜の物理化学的特性として、i）ラマン分光解析に基づく脂質膜パッキング密度、ii）蛍光プローブLaurdanを用いた膜極性を検討した。ラマン分光解析では、炭化水素鎖（2800−3000 cm^{-1}）由来のピーク強度より脂質膜のパッキング密度を評価可能である。ゲル状集合体（［OA+Oleate］/MO=1:1、pH5.0）において、顕著なパッキング密度の増大が観察された（R>1）（Figure 3）。リポソーム２分子膜においては、ゲル相（solid-ordered相）においてR>1となる[7]。従って、ゲル状分子集合体においては、脂質分子が秩序高く密にパッキングされた状態であるといえる。また、蛍光プローブLaurdanスペクトル解析により、膜内部の親水性度Φ_mについて評価した（Figure 4）。ベシクルやミセルでは親水的な膜特性を示した（Φ_m>0.5）一方、ゲル状集合体やCubic相の場合、比較的疎水的な膜界面を有することがわかった（Φ_m<0.5）。

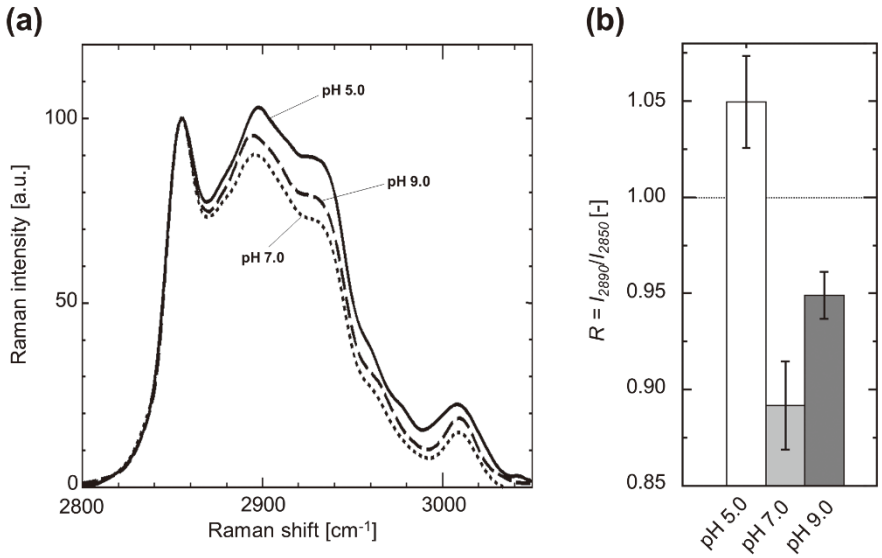


Figure 3　(a)［OA+Oleate］/MO=（1/1）分子集合体のラマンスペクトル。破線：pH9.0（vesicle）、点線：pH7.0（vesicle）、太線：pH5.0（gel）。(b) R 値の pH 依存性。

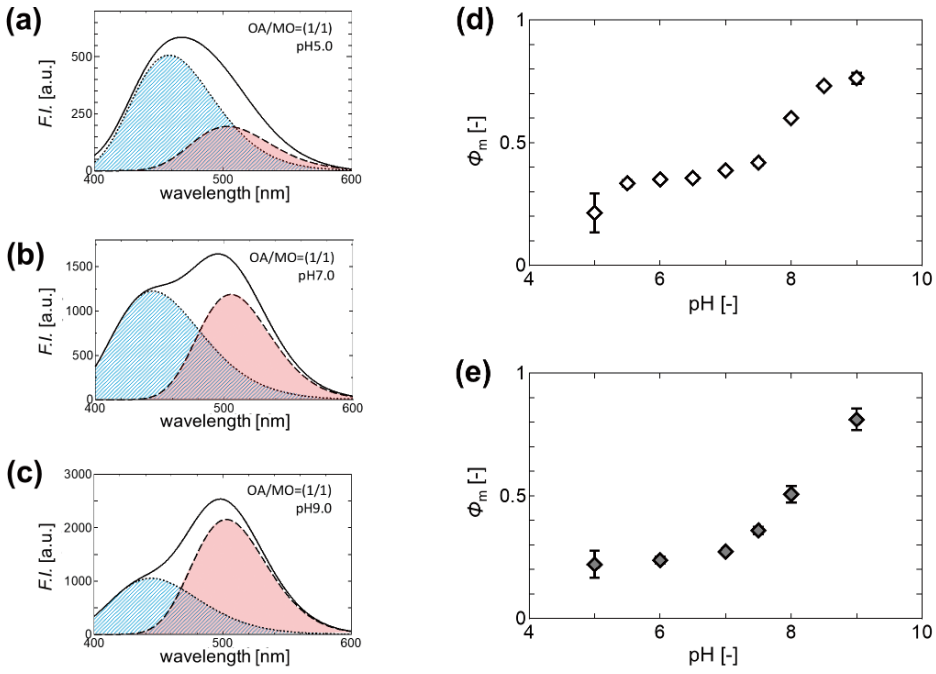


Figure 4　［OA+Oleate］/MO 分子集合体の Laurdan スペクトル（a-c）ならびに親水性度 Φ_m（d：［OA+Oleate］、e：OA+Oleate］/MO=（1/1））。

3．3．俯瞰的な膜特性解析に基づく分子集合体の評価

上述のとおり、分子集合体の相転移に伴い膜特性（R、Φ_m）は変化する。特に、$R>1$ かつ $\Phi_m<0.5$ を満たす集合体は粘性が高くゲル状である。既報の知見と合わせると、ゲル状集合体はCubosome（Cubic 相）と考えられ、その膜特性は水溶液中に形成される 3 次元ネットワーク構造を反映している。ここでは、既報に基づき構成する脂質が異なるCubosome を調製し[10, 11]、各種の分子集合体について、俯瞰的に R 値および Φ_m 値を比較した（Figure 5）。興味深いことに、一般的に認知されているCubosome 集合体はいずれも $R>1$ かつ $\Phi_m<0.5$ を満たすことがわかった。従来ではCubic 相構造を評価する方法はCryo-TEM 観察あるいはX 線散乱解析に限定されていた。本研究の知見より、脂質膜の物理化学的な特性に基づきCubic 相形成を観察できる可能性が示された。

3．4．不飽和脂質および重合成脂質を導入したCubosomeの調製

MO 分子はCubic 相形成において重要な役割を担う。所定量の脂肪酸（オレイン酸（OA）、ラウリン酸（LaA）、リノール酸（LiA））と混合しpH を調製することで戦略的にCubosome を調製できることがわかった（Figure 6）。特に、リノール酸は複数のC=C 結合を有する多価不飽和脂肪酸であり、食品や化粧品分野でも活用できる抗酸化物質として期待されている。従来では、リノール酸は油状または乳液状で製品化される場合が多かったが、Cubosome を調製することでゲル状物質（Figure 6、Entry 12、13）として取り扱うことが可能となる。

一方、Cubosome ゲルは温度およびpH 変化により簡単にsol 化するため、bulk 材料として活用するためには機械的特性の改善が課題となる。そこで重合成脂質TCDA を

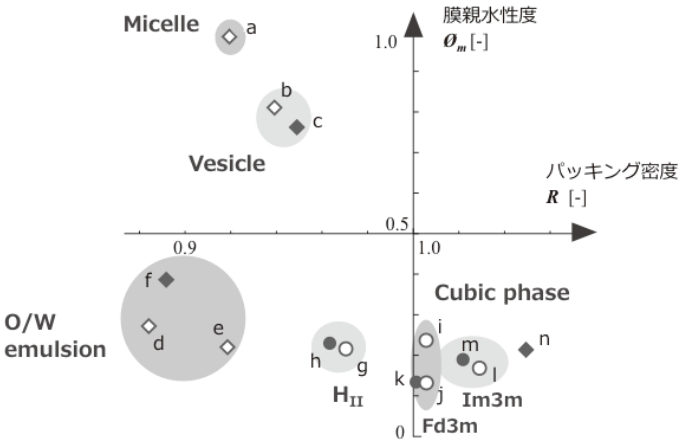


Figure 5　分子集合体の俯瞰的な膜特性解析。
a）[OA+Oleate]、pH11.0、b）[OA+Oleate]、pH7.0、
c）[OA+Oleate] /MO=1/1、pH7.0、d）[OA+Oleate]、pH5.0、
e）[OA+Oleate]、pH7.0、f）[OA+Oleate] /MO=1/1、pH7.0、
g）[OA+Oleate] MO=1/1、pH6.6、500mM+stabilizer[10]、
h）[OA+Oleate] /MO=1/1、pH7.0、270mM+stabilizer[11]、
i）[OA+Oleate] /MO=4/1、pH6.5、340mM+stabilizer[10]、
j）[OA+Oleate] /MO=1/1、pH5.5、500mM+stabilizer[10]、
k）[OA+Oleate] /MO=9/1、pH7.0、270mM+stabilizer[11]、
l）[OA+Oleate] /MO=1/9、pH7.5、273mM+stabilizer[10]、
m）[OA+Oleate] /MO=1/9、pH7.0、270mM+stabilizer[11]、
n）[OA+Oleate] /MO=1/1、pH5.0。
これら集合体のうち i、j、k、l、m、n は Cubic 相である。

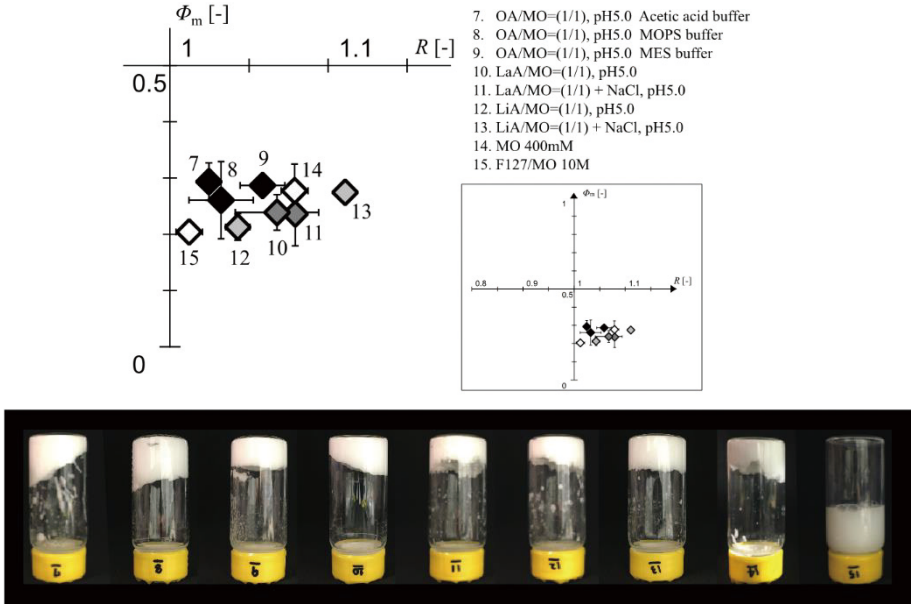


Figure 6　各種の脂質から成る Cubosome の膜特性（Top）および写真（Bottom）[6]。

修飾し、集合体内部に化学架橋を導入することでゲル安定性を向上させることができる（Figure 7）。UV照射により形成されるポリジアセチレンは，刺激応答性材料としてセンサー等へ応用が可能であり，本研究で開発したCubosome調製手法は各種の機能性脂質を担持できる材料設計戦略としても期待される。

4．総　括

本研究では、モノオレイン（MO）と各種脂肪酸を混合した分子集合体の調製手法について検討し、戦略的にCubic相（Cubosome）を設計できる可能性を示した。ラマン分光法ならびに蛍光プローブ（Laurdan）法に基づき、集合体の“ソフトな”膜特性を体系的に評価することで、メソスケールの脂質膜特性と集合体の相挙動の相関を明らかにした（Figure 8）。Cubosome集合体は、水溶性物質・脂溶性物質の双方を輸送できる担体として期待される。ゲル状集合体はbulk材料としても活用できる。用途に合わせて物質性状を設計することにより、Cubosome集合体が医療、食品、化粧品各分野へと応用されることを願う。

謝　辞

本研究の遂行にあたりご尽力いただきました大塚葉子氏

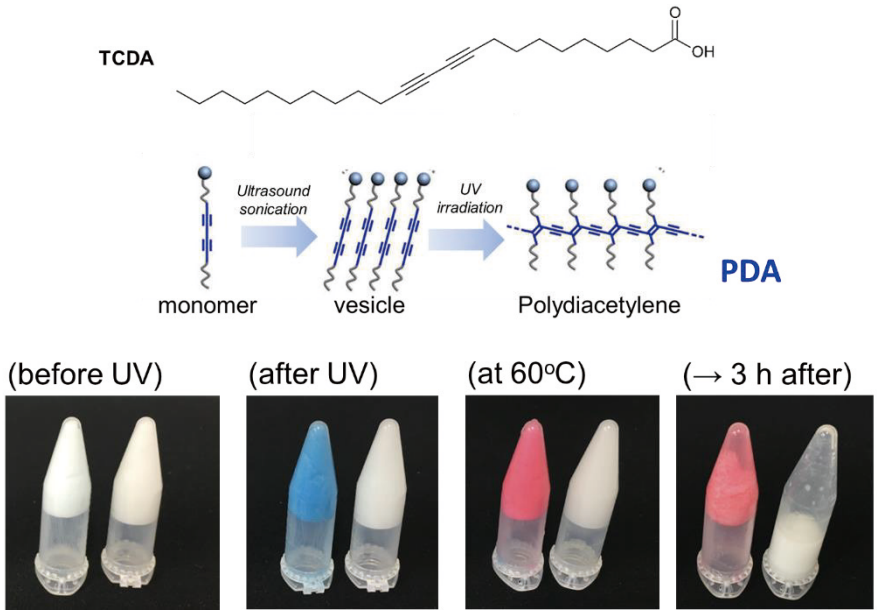


Figure 7　重合成脂質 TCDA を導入した Cubosome の熱安定性[11]。
（Left）TCDA/MO1/1pH5.0、（Right）［OA+Oleate］/MO=1/1、pH5.0。

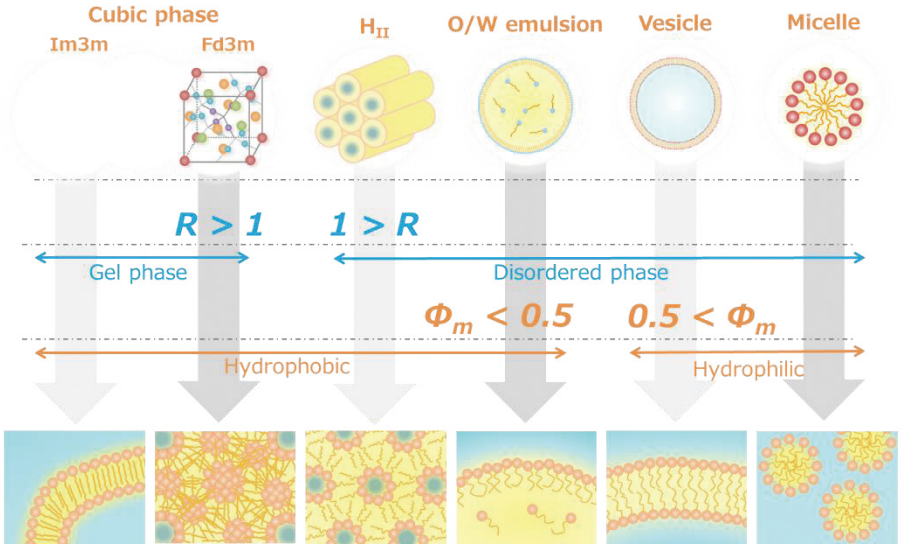


Figure 8　メソスケール膜特性と各種集合体の相挙動。

(大阪大学)、吉田健悟氏(大阪大学)、小嶋一輝氏(大阪大学)に心より感謝申し上げます。また、研究設備の提供ならびに研究評価にご協力いただきました馬越大教授(大阪大学)に感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人コスメトロジー研究振興財団よりご助成いただきましたことを心より感謝申し上げます。

(引用文献)

1) Walde P., Building artificial cells and protocell models: Experimental approaches with lipid vesicles, *BioEssays*, 32, 296-303, 2010.
2) Morigaki K., Walde P., Fatty acid vesicles, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 12, 75-80, 2007.
3) Cyrus S.R., Kai E.L., Materials chemistry: Liposomes derived from molecular vases, *Nature*, 489, 372-374, 2012.
4) Barriga H.M.G., Holme M.N., Stevens M.M., Cubosomes: The Next Generation of Smart Lipid Nanoparticles?, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 58(10), 2958-2978, 2019.
5) Deshpande S., Venugopal E., Ramagiri S., Bellare J.R., Kumaraswamy G., Singh N., Enhancing cubosome functionality by coating with a single layer of poly-ε-lysine, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 6, 17126-17133, 2014.
6) Suga K., Otsuka Y., Okamoto Y., Umakoshi H., Gel Phase-Like Ordered Membrane Properties Observed in Dispersed Oleic Acid/1-Oleoylglycerol Self-Assemblies: Systematic Characterization Using Raman Spectroscopy and a Laurdan Fluorescent Probe, *Langmuir*, 34 (5), 2081-2088, 2018.
7) Fox C.B., Uibel R.H., Harris J.M., Detecting Phase Transitions in Phosphatidylcholine Vesicles by Raman Microscopy and Self-Modeling Curve Resolution, *J. Phys. Chem. B*, 111, 11428-11436, 2007.
8) Parasassi T., Gratton E., Membrane lipid domains and dynamics as detected by Laurdan fluorescence, *J. Fluoresc.*, 5, 59-69, 1995.
9) Kulkarni C.V., Wachter W., Iglesias-Salto G., Engelskirchen S., Ahualli S., Monoolein: a magic lipid?, *Phys. Chem. Chem. Phys*, 13, 3004-3021, 2011.
10) Salentinig, S., Sagalowicz, L., Glatter, O., Self-assembled Structures and pKa Value of Oleic Acid in Systems of Biological Relevance, *Langmuir*, 26, 11670-11679, 2010.
11) Nakano M., Teshigawara T., Sugita A., Leesajakul W., Taniguchi A., Kamo T., Matsuoka H., Handa T. Dispersions of Liquid Crystalline Phases of the Monoolein/Oleic acid/Pluronic F127 System, *Langmuir*, 18, 9283-9288, 2002.
12) Suga K., Otsuka Y., Yoshida K., Umakoshi H., Smart Preparation of Polydiacetylene Hydrogel Based on Self-Assembly of Tricosadiynoic Acid and 1-Oleoylgrycerol (Monoolein), *J. Chem. Eng. Japan.*, 52 (3), 311-316, 2019.

渦のねじれ流によるコラーゲンナノファイバーの形成制御と形態変換

神戸大学大学院理学研究科[1]、滋賀医科大学医学部[2]、内蒙古医科大学薬学院[3]

津田　明彦

Natural nanofibers attract much attentions in the field of nanocosmetics. In this study, we have studied formation controls and structural transformations of the bionanofibers such as collagen and amyloid fibrils by torsional flows of vortex. Linear dichroism (LD) spectroscopy allowed spectroscopic visualization of the flow-induced alignment of the nanofibers in the solution. Although collagen showed poor LD response, insulin amyloid fibril provided strong LD response upon stirring of the solutions. We found that insulin molecules self-assemble to form a nanofiber that enables flow-induced alignment in the vortex flows, but form fibrous aggregates that show no alignment without stirring of the solution. The results obtained in this study suggest the importance of fluid flows in the process of protein fibrillations.

1．緒　言

植物のパルプから抽出されるセルロースナノファイバーは、高い粘性と大きなチキソトロピーインデックスを有しているため、流動性のないゲル状であってもスプレー噴霧でき、タレ止めに応用できる。肌の上でしっかり定着する化粧下地や、振って液状にしたものを顔に吹きかけ固まる美容パックなどへの応用が可能である。さらに水中での乳化・分散安定効果に優れるため、各種オイルの乳化安定化や、金属箔、金属酸化物など高比重の粒子の沈降防止、分散安定化など、リキッドファンデーションや日焼け止めなどへの応用が期待されている。化粧品にナノファイバーが配合された「ナノコスメ」関連商品が社会で広がりを見せようとしている。

ナノコスメにおいて植物性ナノファイバーに期待と関心が集まる一方で、コラーゲンなど動物性線維への関心が薄れつつある。コラーゲンは、美容や健康を目的としたサプリメントやドリンク、様々なコスメアイテムに配合され、現在も数多くの商品が存在する。しかし、分子化学的な視点から、コラーゲン線維からミクロフィブリル（ナノファイバー）を取り出し、その構造や形態をナノレベルで修飾・制御して、機能を引き出している例は数少ない。これまでに商品化されているコラーゲン配合化粧品の多くは、その効用として肌の保水効果をうたっている。しかし、コラーゲンナノファイバーには、上記セルロースナノファイバーと同様の機能に加え、その高い柔軟性や伸縮性、人体とのより高い親和性などを活かした様々な新機能が期待される。



Formation control and morphology conversion of collagen nanofibers by torsional flows of vortex

Akihiko Tsuda

Graduate School of Science, Kobe University[1]/ Department of Chemistry, Shiga University of Medical Science[2]/School of Pharmaceutical Sciences, Inner Mongolia Medical University[3]

本研究課題において我々は、「コラーゲンナノコスメ」への展開を目標に、メカニカル撹拌によって生じる渦のねじれ流を用いることによるコラーゲンナノファイバーの形成制御と形態変換を企てた。

我々の研究グループでは、これまでに生体高分子を模倣した様々な超分子ナノファイバーを創製し、分子化学的な視点からそれらの構造解析と機能開拓を行ってきた。それらの超分子ナノファイバーは溶液の流れに沿って配向し、直線二色性（LD）を誘起する[1-5]。一方向にねじれた構造を持つナノファイバーは、撹拌によって生じる渦の流れに沿ってねじれ配向して、ファイバーと渦のねじれ方向が一致する時、より効率的に配向することができる。またその時、形成するナノファイバーのサイズも大きくなる。そのような現象を見出し、我々は、動物体内に大量に存在するバイオ線維として知られているコラーゲンと、渦の流れの不斉流体力学的相互作用に着目した。体内におけるコラーゲン線維の形成や分解には、血液、リンパ液、および組織液などの体液の流れ（体内流）が深く関わっている。したがって、コラーゲンによる体内流刺激のメカノセンシングと体組織による体内流統制のメカノバイオロジー機構の研究が、コラーゲンナノコスメにおける全く新たな技術と概念を生み出す可能性を秘めている。

我々は、上記の目標を掲げてコラーゲンナノファイバーの開発を行った。コラーゲン水溶液の加熱による変性コラーゲン（ゼラチン）の形成過程、および、その溶液の冷却による変性コラーゲンの再凝集過程において、溶液の撹拌を行うことにより渦の流れを生み出し、その流れとの流体力学的相互作用による変性コラーゲンの凝集形態の制御を企てた。本研究期間において我々は、流体力学的な相互作用によってコラーゲンが渦の流れに沿って配向することを見出したが、コラーゲンナノファイバーの構築までには至らなかった。しかし一方で、タンパク質のインスリンを用いることによって当該目標を達成することができた。

インスリンは熱変性によってアミロイド線維を形成する

ことが知られている。アミロイド線維は、タンパク質のミスフォールディングにより形成されるタンパク質の集合体であり、アルツハイマー病やパーキンソン病などの疾病に関わる物質として高い関心を集めている。アミロイド線維の形成プロセスは、モノマーから部分的に構造変化した中間体を経て核を形成し、さらには集合化による線維化が起きる経路が最も支持されている（図1）[6, 7]。我々は、渦の流れによるマクロな流体力学的相互作用がミクロなアミロイド線維の核形成に寄与し、その線維の形態を大きく変化させることを見出した。

2．方　法

加熱・撹拌条件下におけるコラーゲンやインスリンの線維化に伴う配向現象を観測するために、それらの水溶液中での加熱・撹拌前後の紫外-可視光吸収スペクトルとLDスペクトルを測定した。インスリンの配向挙動はLDスペクトルを用いて測定することができる。LDの強度は$LD=A_{\parallel}-A_{\perp}$で表される。$A_{\parallel}$は縦方向の直線偏光の吸収強度、$A_{\perp}$は横方向の直線偏光の吸収強度を示す。LDの測定にはϕ8×11mmの円柱状のネック部分がある10×10×40mmの光学セル（1mmの厚さの石英ガラス製）を使用した。撹拌子はテフロン製のϕ3×8mmを使用した。

①コラーゲンと液体の流れによる流体力学的相互作用を期待し、左右の撹拌によって生じる不斉な渦の流れにおけるコラーゲン分子（三重鎖および一重鎖）のねじれ配向挙動をフロー誘起LDスペクトル法で調査し[8]、コラーゲンと渦の流れの流体力学的相互作用およびキラルセンシング機構を明らかにした。石英セルに0.05mg/mLのコラーゲンもしくはゼラチン水溶液を3mL加え、ϕ2×5mmのスターラーバーで溶液を1300rpmの回転速度で撹拌し、LDスペクトルを測定した。

②インスリン0.4μmol（2.5mg）を25mM塩酸0.2mLに溶かし、超純水2.6mLに希釈した。その後、14mM塩化ナトリウム水溶液0.2mLを添加し、0.14mMのインスリン濃度，3mL，pH3，［NaCl］=0.28mMのサンプルを調製した。また、加熱・撹拌の測定は温度：75℃，撹拌子の回転速度：1400rpmの条件下で行った。

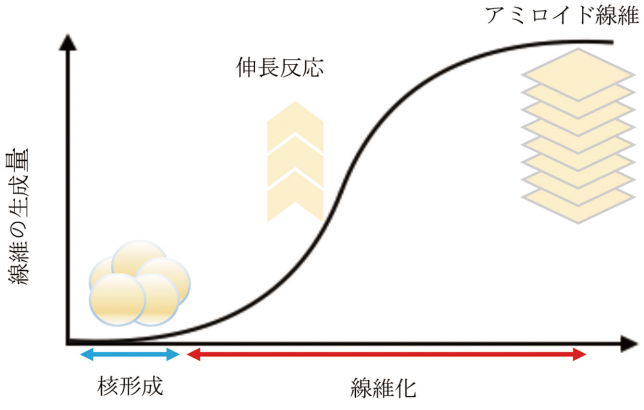


図1　アミロイド線維形成プロセスの概略図

3．結　果

①無撹拌条件下、10℃あるいは20℃でコラーゲン水溶液のLDスペクトルを測定しても、LDシグナルを観察することはできなかった。しかし、撹拌条件下において測定を行ったところ、コラーゲンの吸収帯に相当する200nm付近に誘起LDを確認することができた。撹拌のON-OFFに応じて、LDスペクトルも即座に変化した。温度を一旦75℃まで上昇させて、再度20℃にまで冷却し、LDを測定したところ、撹拌条件下において誘起LD強度の著しい減少が確認された。一方、ゼラチン水溶液を用いて同様の実験を行っても、撹拌による誘起LDを確認することはできなかった。

②加熱撹拌条件下におけるインスリンの線維化に伴う配向現象を観測するために、水溶液中におけるヒトインスリンの加熱・撹拌の前後における紫外-可視吸収スペクトルとLDスペクトルを測定した（図2）。276nmと283nmに極大吸収波長が得られ、LDスペクトルでは吸収スペクトルに対応した負の誘起LDが得られた。次に撹拌が線維の配向挙動にどのように寄与しているのか調べるために、加熱撹拌により生成したアミロイド線維に対して撹拌状態を切り替えながらLD強度の経時変化を測定

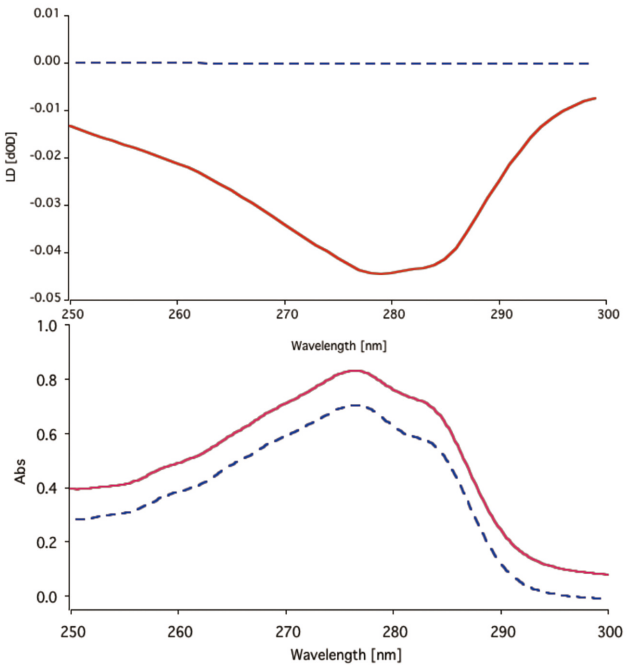


図2　加熱・撹拌によるインスリン水溶液のLDスペクトルおよび紫外-可視吸光スペクトルの変化．加熱・撹拌前（---），加熱・撹拌後（—）．

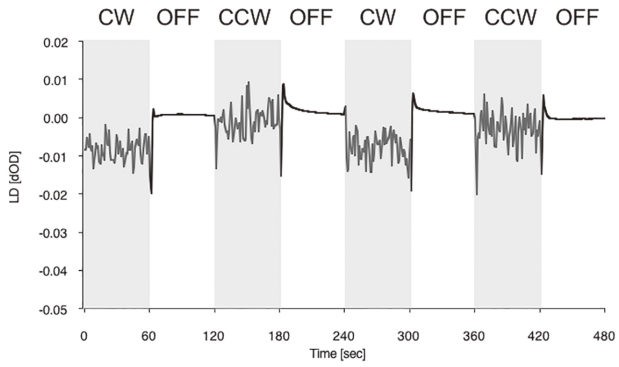


図３　撹拌のスイッチングによる波長固定（276nm）LD スペクトルの変化

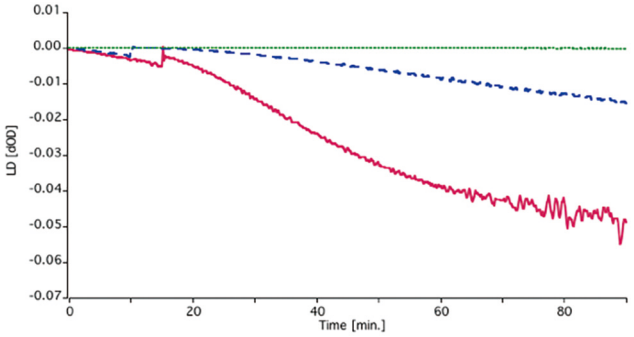


図４　加熱開始から 10 分間(---) および 15 分間(—) の撹拌、加熱開始後 75–90 分(---) に撹拌を行った際に得られた経時変化 LD プロファイル

した（図 3)。無撹拌状態ではLD不活性だったが、撹拌状態では負のLDシグナルが現れ、左右の撹拌で異なった強度のLDが現れた。次に撹拌が線維形成のどの過程に作用しているのかを明らかにするためにインスリン水溶液の加熱初期に一定時間だけ撹拌をONにし、その後OFFにして、LD強度の経時変化スペクトルを測定した（図 4)。成長の初期に撹拌を行うと溶液の流れに配向する線維が形成していることが明らかになった。

4．考　察

①上記の結果より、三重鎖構造を持つコラーゲンは、比較的剛直で硬い構造を持つため、溶液の流れに沿って配向することができ、誘起LDを与えたと考えられる。一方、ゼラチンは、コラーゲンの三重鎖がほどけた構造を持ち、剛直性が低く柔らかい構造のため、溶液の流れに沿って配向することができなかったと考えられる。実際にそれを支持する結果として、三重鎖構造を持つコラーゲンを加熱すると、三重鎖が解離してゼラチンと同じ状態となり、誘起LDの強度が弱まることが確認できている。

②上記の結果より、撹拌によってアミロイド線維の成長が線維の伸長方向に促進され、線維が渦の流れに沿って配向しているものと考えられる。また、図３の結果から、アミロイド線維の高次のねじれ構造が渦の流れの方向に対して非等価な流体力学的相互作用を生じているのではないかと考えられる。図４において、成長の初期（～17分）に撹拌を行うと溶液の流れに配向する線維が形成していることがわかる。加熱撹拌によって生じる溶液の流れとインスリンの流体力学的相互作用が線維状に成長する核形成段階に関与していると考えられる。

5．総　括

①本研究から、三重鎖構造を持つコラーゲンが溶液の流れに沿って配向することが明らかになった。一方、それが解離したゼラチン状態では配向現象を与えないこともわかった。

②インスリン水溶液に加熱・撹拌を行うと、線維化を生じ、形成した線維が渦の流れに応答して配向することが明らかとなった。撹拌を行わずに加熱するだけでもインスリンの集合化が生じるが、撹拌を行うことで線維形態のアミロイド線維への成長が促進された。また興味深いことに、撹拌による渦の流れの物理刺激が核形成過程において関与しているという可能性が得られた。

上記の研究結果は、タンパク質の線維化プロセスにおける溶液の流れの重要性を示している。今後、変性コラーゲンの再凝集過程を溶液の流れで制御することによる変性コラーゲンの凝集形態の制御をさらに検討したい。

（引用文献）

1）Tsuda A, Alam M A, Harada T, Yamaguchi T, Ishii N, Aida T. Spectroscopic visualization of dynamic vortex flows using a dye-containing nanofiber. Angew. Chem. Int. Ed. 46: 8198–8202.（2007）

2）Ando Y, Sugihara T, Kimura K, Tsuda A. A self-assembled helical anthracene nanofibre whose *P*- and *M*-isomers show unequal linear dichroism in a vortex. Chem. Commun. 47: 11748–11750.（2011）

3）TsujimotoY, Ie M, Ando Y, Yamamoto T, Tsuda A. Spectroscopic visualization of right- and left-handed helical alignments of DNA in chiral vortex flows. Bull. Chem. Soc. Jpn. 84: 1031-1038.（2011）

4）Yamamoto T, Tsuda A. Vortex-induced alignment of a water soluble supramolecular nanofiber composed of an amphiphilic dendrimer. *Molecules* 18: 7071–7080.（2013）

5）Tsuda A. Hydrodynamic helical orientations of

nanofibers in a vortex. Symmetry 6: 383–395.（2014）
6） Ahmad A, Uversky V N, Hong D, Fink A L. Early events in the fibrillation of monomeric insulin. J. Biol. Chem. 280: 42669–42675.（2005）
7） Nielsen L, Frokjaer S, Brange J, Uversky V N, Fink A L. Probing the mechanism of insulin fibril formation with insulin mutants. Biochemistry 40: 8397–8409.（2001）
8） Adachi R, Yamaguchi K, Yagi H, Sakurai K, Naiki H, Goto Y. Flow-induced alignment of amyloid protofilaments revealed by linear dichroism. J. Biol. Chem. 282: 8978–8983.（2007）

ケルセチン含有化粧品の最有効使用のための有機ナノコンポジット設計

大阪薬科大学
戸塚　裕一

We investigated the formulation design of nanocomposite structure for the effective cosmetic utilization of quercetin. Especially, we focused on the improvement of water solubility of quercetin (QUE) by preparing amorphous solid dispersion of ternary dispersed system with transglycosylated rutin (Rutin-G) and isoquercitrin (IQC). The solubility enhancement effect of IQC addition on QUE solubility was investigated. Evaporated particles (EVPs) were prepared by rotary evaporator with QUE, Rutin-G, and IQC. Differential scanning calorimetry and powder X-ray diffraction analysis indicated the amorphization of QUE and IQC by evaporation with Rutin-G. No characteristic diffraction peaks were observed in EVPs even after storage in sealing condition for 8 weeks at 40℃. The amount of dissolved QUE from the physical mixture was enhanced according to the increase of Rutin-G ratio because QUE was solubilized in the aggregated structure of Rutin-G, an associated nanocluster of Rutin-G, formed in proportion to Rutin-G concentration. The concentration of dissolved QUE from the EVP samples increased when IQC was added in QUE/Rutin-G binary formulation. The concentration of dissolved QUE from EVPs of QUE/Rutin-G/IQC (1/7/3, w/w/w) and QUE/Rutin-G/IQC (1/5/5, w/w/w) was much higher than that with QUE/Rutin-G/IQC (1/10/0, w/w/w). These results suggested that IQC inhibit the re-crystallization from an amorphous QUE in dissolution medium, resulted in the enhancement in stability of an amorphous QUE in the supersaturated state. In conclusion, the addition of IQC into QUE/Rutin-G binary system could obviously improve the water solubility of QUE by forming nanocomposite structure.

1．緒　言

化粧品への天然物の有効利用を考慮したとき、食品成分中には有用な化合物が多く存在する。そのうち、安価でかつ有効利用可能な化合物として、難水溶性ポリフェノールが挙げられる。ポリフェノールは抗酸化作用を有するものが多く、食品などから簡単に抽出可能である。ところが、ポリフェノールには水中への溶解度が低いものも多く、化粧水などの水系に溶解させる場合にはハンドリングに問題があり、界面活性剤などを用いて難水溶性のポリフェノールを溶解させることが必要となる。しかし、界面活性剤には細胞毒性などの問題から使用上限が設けられる。本研究の目的は、界面活性剤を用いることなく難水溶性のポリフェノールを可溶化させることであり、化粧品開発時に難水溶性化合物を水系に溶解させる新しい技術を提案することにある。

今回は難水溶性ポリフェノールのターゲットとして、野菜や果物中に存在する身近なフラボノイドであるケルセチン（quercetin：QUE）に着目した。ケルセチンには様々な効果が期待されており、抗炎症作用や抗酸化作用などがその代表的な効能と考えられている[1)]。そのうち、特に抗酸化作用は化粧品開発において興味深い性質である。現在、化粧品などに使用されている紫外線吸収剤は、光毒性や累積刺激性などの問題や、物性および安全性の面での懸念があるものも存在するが、ケルセチンは、化粧品に有効でかつ食品加工にも使用できる、安全で効果的な紫外線防御物質として効果が期待される化合物である。ケルセチンは化粧品に配合して日焼け止め効果のある化粧品を作ることなどにも有用な化合物と考えられるが、前述したように、最大の問題点は水に極めて溶けにくい点にあり、その溶解度は、水中では0.4μg/mLと報告されている[2)]。したがって、ケルセチン含有化粧品の開発を試みた場合には、安全な手法で水系に溶解させる技術が必要となる。

これまで、我々はRutinに対して酵素処理によって糖を付加した糖転移化合物（transglycosylated rutin：Rutin-G）を添加剤として用い、ナノコンポジット形成現象により、難水溶性のフラボノイドの溶解度を飛躍的に改善することを報告してきた[3-9)]。本研究ではRutin-Gに加え、QUEに単糖が付加されたイソケルセチン（isoquercitrin：IQC）をさらに処方中に添加することで複合粒子を作製し、更なる溶解性の向上を検討した。

2．方　法

2．1．使用物質

ケルセチン水和物（QUE, Figure 1(a)）、イソケルセチン（IQC, Figure 1(b)）およびα-グルコシルルチン（Rutin-G, Figure 1(c)）は東洋精糖株式会社から供与いただいたものを使用した。用いたそれぞれの添加物の構造式および構造類似性に関してFigure 1に示した。



Evaluation of nanocomposite structure for the effective cosmetic utilization of quercetin
Yuichi Tozuka
Osaka University of Pharmaceutical Sciences

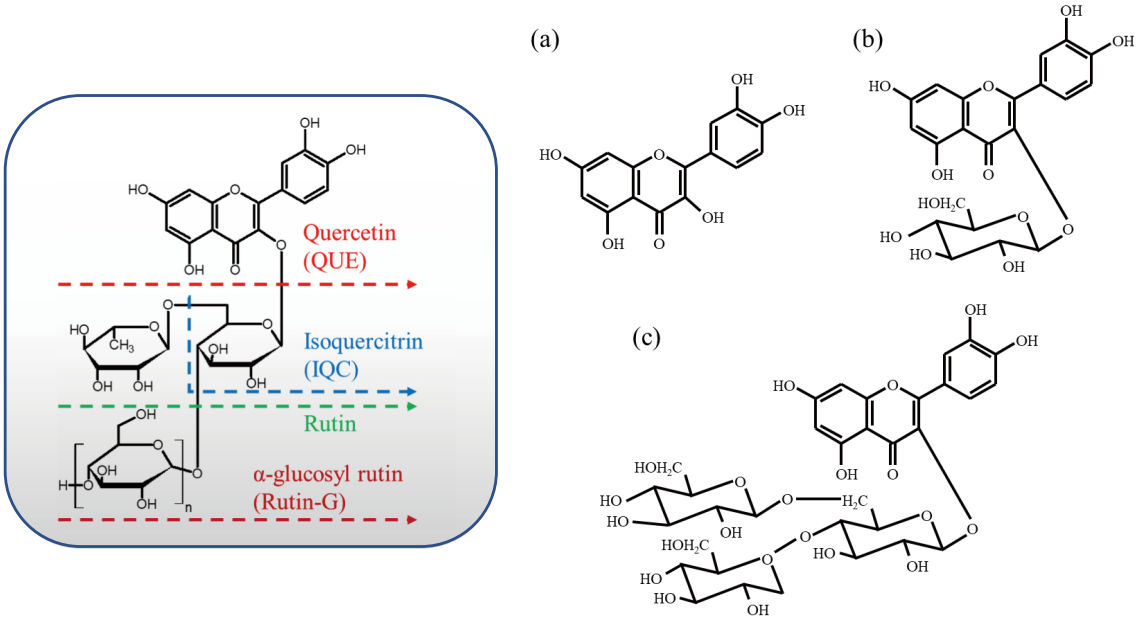
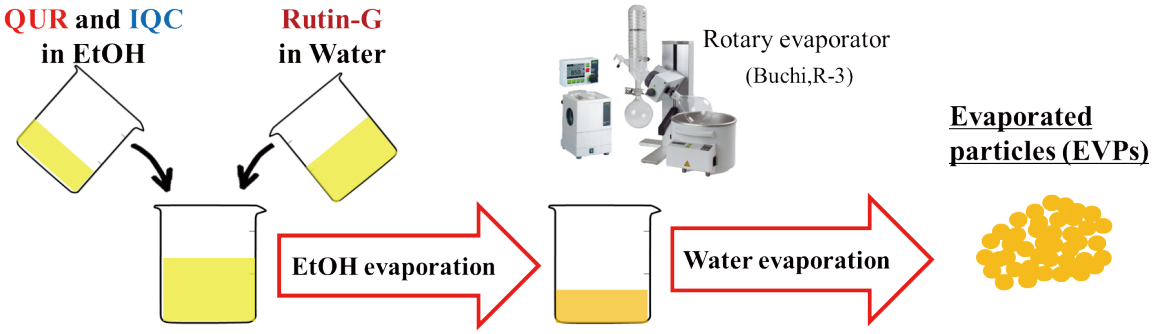


Figure 1　Chemical structure of (a) quercetin (QUE), (b) isoquercitrin (IQC), and (c) α-glucosyl rutin



QUR/Rutin-G/IQC (w/w/w)	1/10/0	1/9/1	1/8/2	1/7/3	1/6/4	1/5/5	1/1/9
QUR (mg)				200			
Rutin-G (mg)	2000	1800	1600	1400	1200	1000	200
IQC (mg)	0	200	400	600	800	1000	1800
Water (mL)				175			
EtOH (mL)				75			

Figure 2　Preparation method of QUR involved evaporated samples (EVPs)

2．2．溶媒留去物(Evaporated samples：EVPs)の調製法

QUEとIQC は超音波照射下でエタノール溶媒中に完全に溶解させ、精製水中に添加剤（糖転移化合物：Rutin-G）を溶解させた後、混合させ、ロータリーエバポレーター（R-3；Buchi, Tokyo, Japan）を用いてエタノール溶媒を留去し（102 mbar, at 50°C）、その後（20 mbar, at 50°C）で全残留溶媒を留去することにより溶媒留去物を調製した。調製した試料中に含まれる化合物の存在割合はFigure 2に示すとおりである。

2．3．溶媒留去物の形状観察

調製した試料の形状観察は走査型電子顕微鏡（Scanning electron microscopy：SEM；TM3030, HITACHI, Japan）を用いて行った。減圧下で白金蒸着させた試料を用いて、加速電圧：15kV条件で測定した。

2．4．溶媒留去物の結晶性の評価

溶媒留去物の結晶性の評価に関しては、粉末X線回折測定（Powder X-ray diffraction：PXRD, Miniflex600 powder X-ray diffractometer, Rigaku Corporation,

Japan）および示差走査熱分析装置（Differential scanning calorimetry：DSC；Diamond DSC, Perkin Elmer, USA）を用いて評価した。 それぞれの測定条件は下記のとおりである。

PXRD：Scanning rate 4°/min, 2θ range of 5° – 35°.

DSC：10 mg of sample powder was placed in aluminum open-pan. Heat from 35°C to 200°C at 20°C/min, a nitrogen flow rate of 40 mL/min.

2．5．溶媒留去物からのケルセチンの溶解性の評価

溶解度試験は蒸留水中で37°C条件において振とう速度100 s/minで行った。QUE原末、物理的混合物（PM）および調製した各複合粒子製剤（QUE量20 mg）（EVPs）に対して精製水10 mLを加え、1時間および4時間振とう後（37°C）における溶解度をHPLC（SPD-10 A, Shimadzu co., Ltd., Japan）により定量した。HPLC測定条件は以下のとおりである。

Mobile phase：0.1（w/w）% acetic acid and acetonitrile（65：35 v/v）, Flow rate：1.0 mL/min, Column Temperature：40°C, UV：254 nm, Injection volume：10 μL）

3．結　果

3．1．溶媒留去物の物理化学的特性（QUE/Rutin-G/IQC：3成分混合系）

Figure 3には、未処理のQUE、IQC、Rutin-G、およびQUE/Rutin-G/IQCの3成分系の溶媒留去物についてのSEM写真を示す。未処理のQUEは針状の形状を示し、Rutin-Gは球状の形状を示している。また、未処理のIQCは微細粒子が凝集している様子が観察された。調製したすべての溶媒留去物は、滑らかな表面を有する凝集塊を形成しており未処理のQUEの形状とは異なることが確認された。

DSCおよびPXRD測定により溶媒留去物の結晶性について検討した結果を、それぞれFigure 4およびFigure 5に示した。DSCによる分析の結果、未処理のQUEおよびIQCにおいては、結晶の融解に伴う吸熱ピークが観察されるのに対し、溶媒留去物においては、融解に伴う吸熱ピークが観察されなかった（Figure 4）。一方、PXRD測定においても、未処理のQUEおよびIQCにおいては、結晶性の回折ピークが認められるのに対し、溶媒留去物においては、いずれの試料においてもQUEおよびIQCの結晶由来

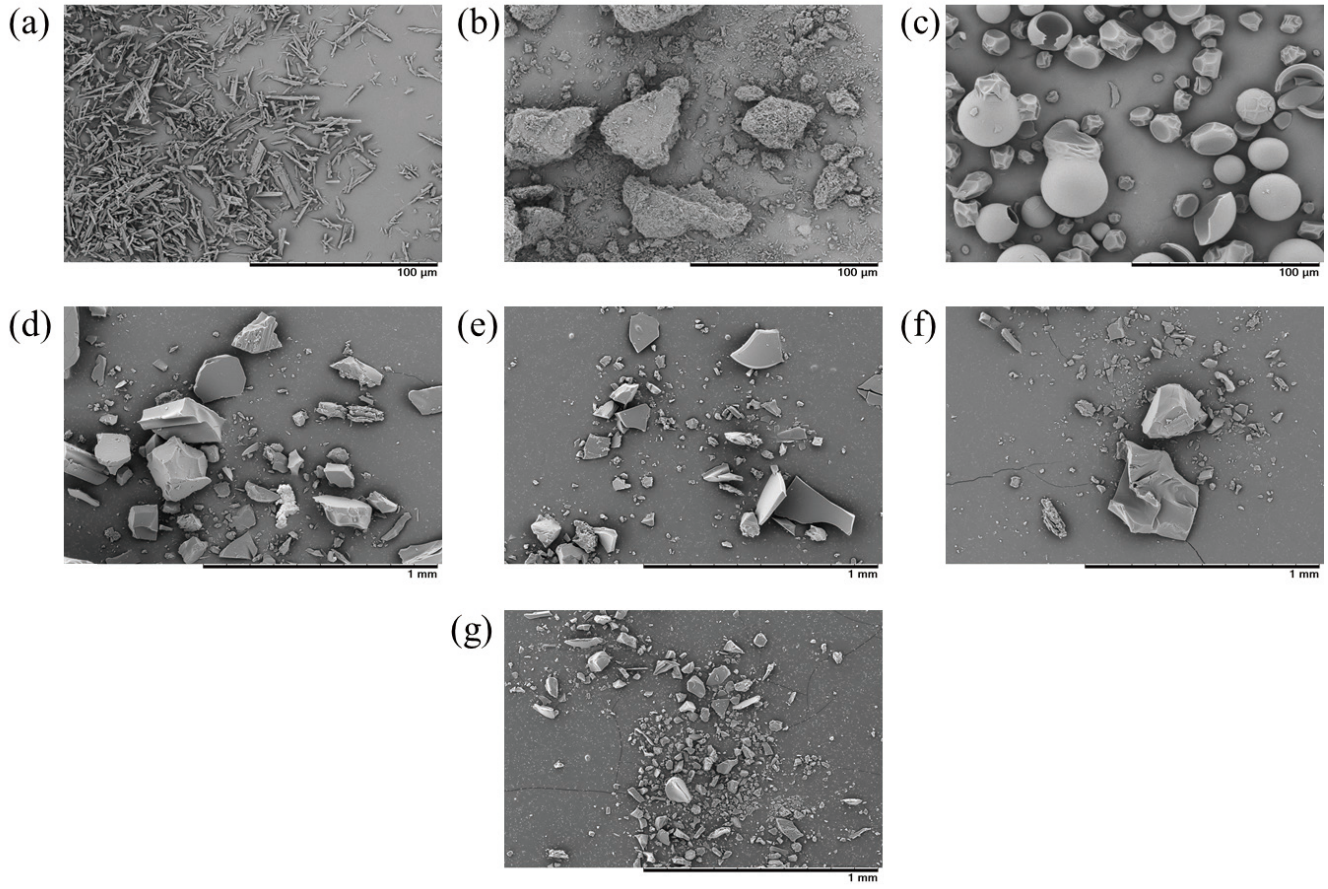


Figure 3　Scanning electron microscope（SEM）photographs of evaporated particles（EVPs）.（a）untreated quercetin（QUE）,（b）untreated isoquercitrin（IQC）,（c）α-glucosyl rutin（Rutin-G）,（d）EVPs of QUE/Rutin-G/IQC（1/10/0）,（e）EVPs of QUE/Rutin-G/IQC（1/9/1）,（f）EVPs of QUE/Rutin-G/IQC（1/7/3）and（g）EVPs of QUE/Rutin-G/IQC（1/5/5）

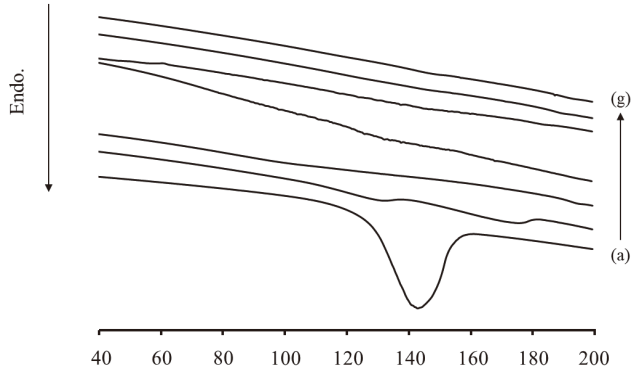


Figure 4　Differential scanning calorimetry (DSC) plots of evaporated particles (EVPs). (a) untreated quercetin (QUE), (b) untreated isoquercitrin (IQC), (c) α-glucosyl rutin (Rutin-G), (d) EVPs of QUE/Rutin-G/IQC (1/10/0), (e) EVPs of QUE/Rutin-G/IQC (1/9/1), (f) EVPs of QUE/Rutin-G/IQC (1/7/3) and (g) EVPs of QUE/Rutin-G/IQC (1/5/5)

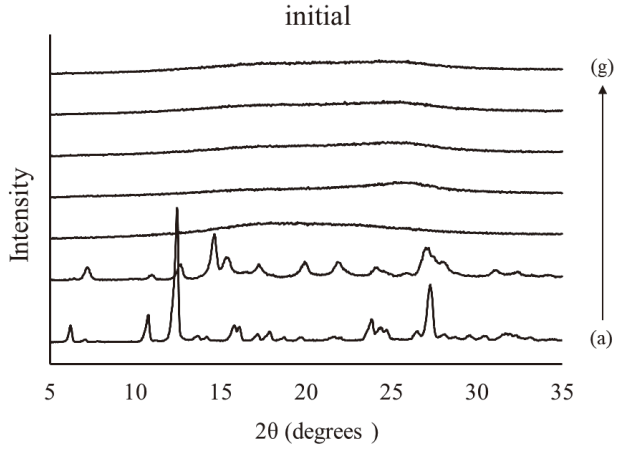


Figure 5　Powder X-ray diffraction (PXRD) patterns of evaporated particles (EVPs) after preparation. (a) untreated quercetin (QUE), (b) untreated isoquercitrin (IQC), (c) α-glucosyl rutin (Rutin-G), (d) EVPs of QUE/Rutin-G/IQC (1/10/0), (e) EVPs of QUE/Rutin-G/IQC (1/9/1), (f) EVPs of QUE/Rutin-G/IQC (1/7/3) and (g) EVPs of QUE/Rutin-G/IQC (1/5/5)

の回折ピークは認められなかった (Figure 5)。したがって、DSCおよびPXRD測定の結果から、QUE/Rutin-G/IQCの3成分混合系の溶媒留去物において、QUEおよびIQCは非晶質状態で存在することが示唆され、非晶質の粒子として存在しているか、あるいは分子分散した状態で系中に存在することが考えられた。

Figure 6には閉鎖系で40℃・8週間保存した試料のPXRDパターンを示した。いずれの試料においてもQUEおよびIQCの結晶由来の回折ピークは認められず、ハローパターンを維持したまま、結晶析出は起こっていないことが示唆された。

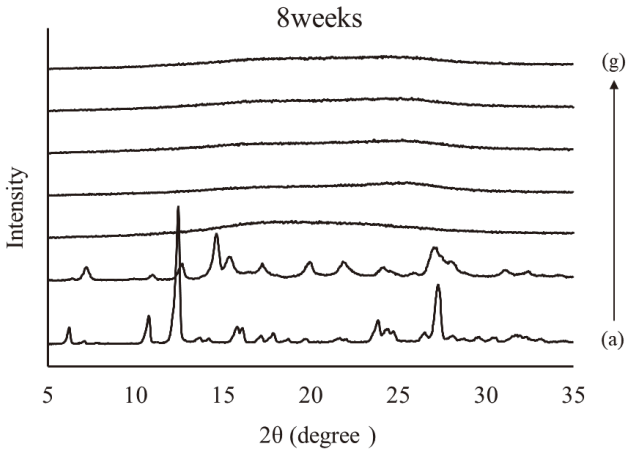


Figure 6　Powder X-ray diffraction (PXRD) patterns of evaporated particles (EVPs) after storage in sealing condition for 8 weeks at 40°C. (a) untreated quercetin (QUE), (b) untreated isoquercitrin (IQC), (c) α-glucosyl rutin (Rutin-G), (d) EVPs of QUE/Rutin-G/IQC (1/10/0), (e) EVPs of QUE/Rutin-G/IQC (1/9/1), (f) EVPs of QUE/Rutin-G/IQC (1/7/3) and (g) EVPs of QUE/Rutin-G/IQC (1/5/5)

3．2．溶媒留去物からのケルセチンの見かけの溶解度の評価

物理的混合物におけるQUEの溶解度変化、および溶媒留去物におけるQUEの溶解度変化についての結果を、Figure 7およびFigure 8にそれぞれ示した。なお、ケルセチンの見かけの溶解度の評価は37℃の蒸留水中でのQUE/Rutin-G/IQCの3成分混合系からのQUEの溶解度変化の結果であり、今回の検討においては、in vitroの胃内条件、腸内条件や模擬消化管を用いた検討は行えていない。

物理的混合物は、一定割合のQUE/Rutin-G/IQCを単純にvortex mixerを用いて1分間混合したものを使用した。Figure 7の一番左のデータに示すように、37℃・水中での4時間振とう後のQUEの溶解度は、およそ1.4μg/mLであり、水への溶解度が極めて低いことが確認された。前述したように、QUEは極めて疎水性が高い化合物であり、消化管内での溶解度も極めて低いため、消化管からの吸収性も乏しいと考えられる。そのため、もし経口摂取したQUEを体内で有効に活用するためには、溶解性を改善してバイオアベイラビリティを改善する必要がある。Figure 7に示すように、37℃で4時間インキュベートしたときの物理的混合物におけるQUEの溶解度は、QUE/Rutin-G/IQC (1/10/0)、QUE/Rutin-G/IQC (1/9/1)、QUE/Rutin-G/IQC (1/7/3)およびQUE/Rutin-G/IQC (1/5/5)の値がそれぞれ、101.5 ± 2.6, 69.1 ± 2.6, 73.4 ± 3.4および56.3 ± 4.6μg/mLであり、Rutin-Gの存在によって、単純混合操作のみでも見かけの溶解度の上昇が認められた。

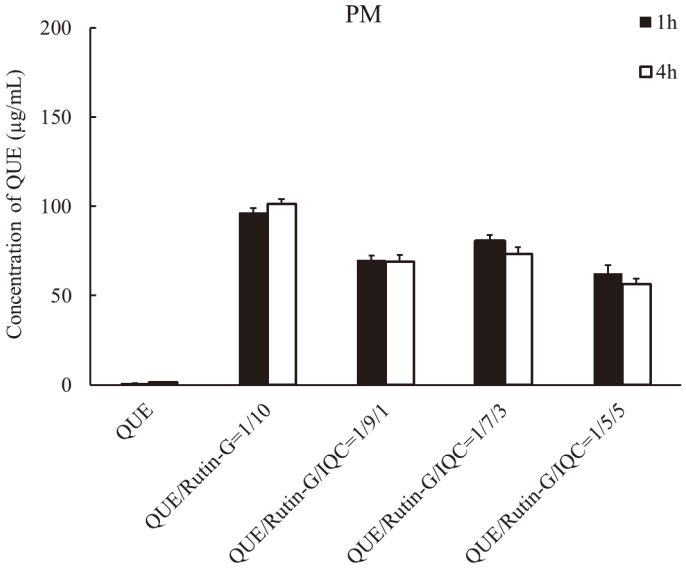


Figure 7　The solubility study of quercetin from physical mixtures (PMs) at 37°C in distilled water. Each data represents the mean ± S.E. (n=3). Solubility study was performed in distilled water at 37 degrees C under shaking at 100 s/min. Samples at a QUE concentration of 20 mg were added in 10 mL distilled water.

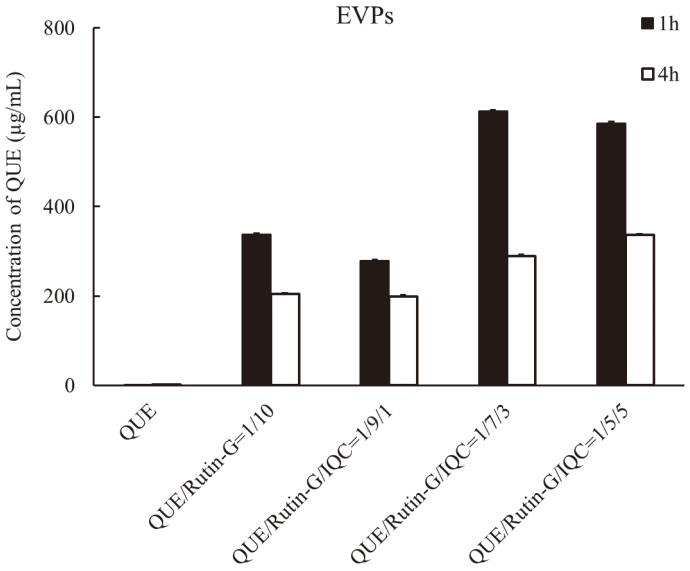


Figure 8　The solubility study of quercetin from evaporated particles (EVPs) at 37 degrees C in distilled water. Each data represents the mean ± S.E. (n=3). Solubility study was performed in distilled water at 37 degrees C under shaking at 100 s/min. Samples at a QUE concentration of 20 mg were added in 10 mL distilled water.

Figure 8には、QUE/Rutin-G/IQCの3成分混合系の溶媒留去物からのQUE見かけの溶解度変化の結果を示した。Figure 7と比較すると明らかなように、溶媒留去物からのQUE見かけの溶解度は、物理的混合物と比較して顕著な上昇が認められている。溶媒留去物からのQUE見かけの溶解度は、物理的混合物のケースとは異なり、Rutin-Gの存在割合との相関は認められなかった。また、溶媒留去物からのQUE見かけの溶解度は、QUE/Rutin-G/IQC（1/7/3)、QUE/Rutin-G/IQC（1/5/5）においては、QUE/Rutin-G/IQC（1/10/0）に比べて明らかに高い溶解度上昇効果が認められている。これらの結果は、非晶質状態からの溶出によってQUEが過飽和の状態で液中に存在していることに起因すると考えられた。

4．考　察

非晶質状態は結晶状態と比較して、熱力学的なエネルギー状態が高く不安定であるので、薬物が保存中に非晶質状態で保存したい場合には、非晶質から結晶へと変化してしまう結晶転移が起こらないようにしなくてはならない。非晶質状態からの薬物の水中への溶出は、結晶状態と比較して溶出性に優れるため、保存中に結晶転移が起こることは溶出性が変化してしまう、すなわち水中で薬物が溶けにくくなってしまうことを意味している[10]。本研究では、非晶質QUEの皮膚への塗布を想定した応用を目指しているため、QUEの非晶質状態の維持は大事な課題である。非晶質が結晶化する現象、すなわち非晶質状態の安定性に影響する因子としては、保存温度が大きな要因となり得る。非晶質状態にある物質が高温条件にさらされたときには、分子運動性が上がることにより結晶化が促進される[11]。Figure 6に示すように、本研究においては40℃・8週間の保存においても、PXRD測定においてQUEの再結晶化に伴うピークは観察されておらず、溶媒留去法によって、比較的安定な非晶質固体分散体が調製できたと考えられる。しかしながら、非晶質固体分散体の安定性に関して、三成分目として添加したIQCが固相中でどのような効果をもたらしているのかは不明であり、今後の課題として検討が必要である。

本研究の最も興味深い点は、Figure 7およびFigure 8に示されるように、QUEを含有する溶媒留去物が非晶質固体分散体を形成し、QUEの見かけの溶解度を最大で数百倍まで上昇させることに成功している点である。この現象には2つの要因が影響しているものと考えられ、一つはRutin-Gが水中で形成するナノ集合体の存在であり、もう一つがIQCを含む非晶質固体分散体が過飽和状態を保持することが推察される。Figure 9に示すように、QUEはRutin-Gの添加量に応じて直線的に見かけの溶解度が向上する。我々はこの現象がRutin-Gが水中で5mg/mLの濃度でナノ集合体を形成することに関連することを報告しており[3]、Figure 10に模式図として示すように、そのナノ集合体構造内に難水溶性の化合物を取り込むような形で、ナノコンポジット構造(<5nm)を形成することを報告している。したがって、Figure 7のQUE/Rutin-G/IQC(1/10/0)において、単純に物理的混合を行ったのみでQUEの溶解

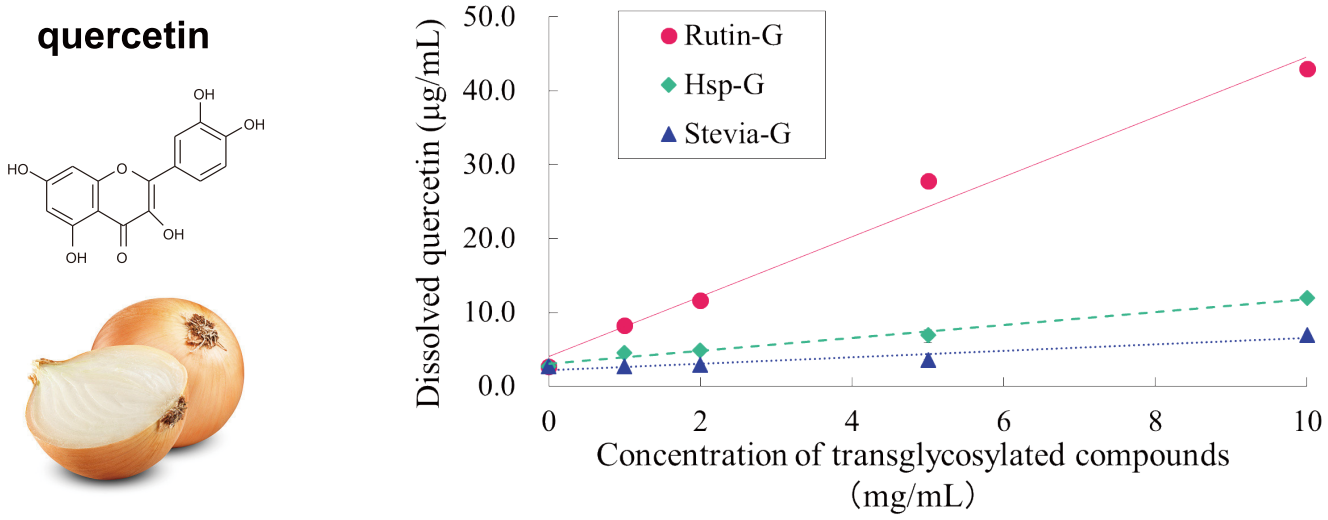


Figure 9　Relationship between the amount of quercetin dissolved and transglycosylated additives

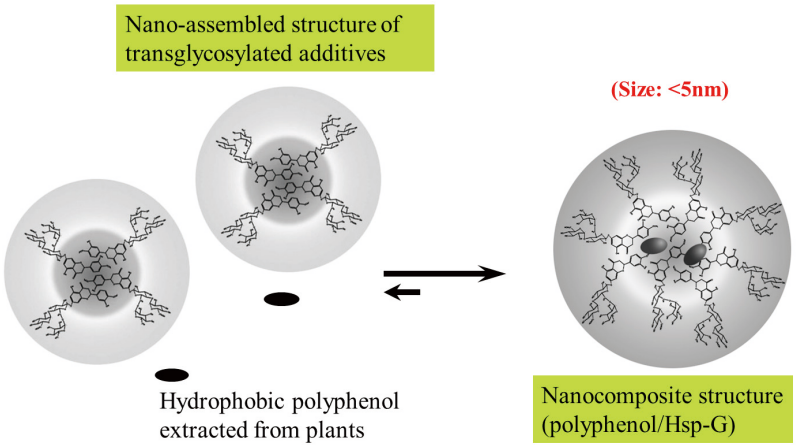


Figure 10　The plausible scheme of soluibilization mechanism of poorly water soluble compound by a nanocomposite formation of Rutin-G

度が大きく向上した現象は、Rutin-Gの存在による水中でのナノコンポジットの形成に起因することが考えられる。

一方、Figure 4およびFigure 5のDSCおよびPXRDの結果から、QUEは溶媒留去物中では非晶質状態で存在していると推察される。非晶質状態は熱力学的に不安定であり、結晶のような長秩序の規則性を持つ構造もなく、結晶と比較して、水への高い溶解度と水への高いぬれ性を示すことが報告されている[12]。しかしながら、非晶質からの薬物の溶解度は一旦上昇するが、水中での再結晶化により薬物溶解度は大きく減少することがしばしば認められる。この再結晶化は、水溶性高分子の添加によって抑制されることなども報告されている。Figure 8の結果に示すように、今回の我々の結果において、QUEの溶解度が大きく上昇した現象は、Rutin-Gのナノコンポジット形成と、非晶質状態からのQUEの過飽和状態がIQCの添加によって維持されていることが関与していると推察される。この要因の一つは、Figure 1に示すように、IQCとRutin-Gの化学構造がQUEと類似していることにも起因すると考えられる。詳細な相互作用様式や、水中での3成分のそれぞれの状態は明らかにはなっていないが、3成分目に添加したIQCがQUEもしくはQUEとRutin-Gの両者と比較的強い相互作用で水中に存在し、結晶化の抑制に働いているのではないかと推察している。

5．総　括

今回の研究結果から、従来報告してきたナノコンポジット形成現象は、3成分目に結晶化を抑制するような化合物を添加することにより、難水溶性化合物の溶解度の向上と維持に関して発展的な成果を出せることが示唆された。QUEを化粧品中の紫外線防御物質として活用するために

は、Rutin-GとIQCを添加して、一旦全成分が溶解した状態から、溶媒留去して非晶質状態を形成させればよいことがわかり、また、今回の３つの成分は、それぞれが抗酸化作用を有する物質で、かつ食品添加剤であるため応用性が期待される結果が得られたと確信している。

なお、今回の助成により得られた成果はEnvironmental Control in Biology, 56, 161-165, 2018に掲載されており、公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に深謝します。

（引用文献）

1） A.W. Boots, G.R. Haenen, A., Bast, A., Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *Eur. J. Pharmacol*., 585, 325-337, 2008.

2） Y. Zheng, I.S. Haworth, Z. Zuo, M.S.S. Chow, A.H.L. Chow, Physicochemical and Structural Characterization of Quercetin-β-Cyclodextrin Complexes. *J. Pharm. Sci.* 94, 1079–1089, 2005.

3） Y. Tozuka, K. Higashi, T. Morita, M. Nishikawa, H. Uchiyama, J. Zhang, K. Moribe, K. Nishikawa, H. Takeuchi, K. Yamamoto, Transglycosylated Rutin-Specific Non-Surface-Active Nanostructure Affects Absorption Enhancement of Flurbiprofen, *Euro. J. Pharm. Biopharm*., **82**, 120-126 (2012)

4） M. Fujimori, K. Kadota, K. Shimono, Y Shirakawa, H. Sato, Y. Tozuka, Enhanced dissolution of quercetin by forming composite particles, *J. Food Eng*., 149, 248-254, 2015

5） H. Sato, M. Fujimori, H. Suzuki, K. Kadota, Y. Shirakawa, S. Onoue, Y. Tozuka, Absorption improvement of tranilast by forming highly soluble nano-size composite structures associated with α-glucosyl rutin, *Euro. J. Pharm. Biopharm*., 92, 49-55, 2015

6） M. Fujimori, K. Kadota, K. Kato, Y. Seto, S. Onoue, H. Sato, H. Ueda, Y. Tozuka, Low hygroscopic spray-dried powders with trans-glycosylated food additives for enhanced solubility and oral bioavailability of a ipriflavone, *Food. Chem*., 190, 1050-1055, 2016

7） K. Kadota, S. Otsu, M. Fujimori, H. Sato, Y. Tozuka, Soluble hydrolysis-resistant composite formulation of curcumin containing α-glucosyl hesperidin and polyvinylpyrrolidone, Adv. Powder Tech., 27, 442-447, 2016

8） K. Kadota, K. Semba, R. Shakudo, H. Sato, Y. Deki, Y. Shirakawa, Y. Tozuka, Inhibited photodegradation of highly-dispersed folic acid nanoparticles by antioxidant effect of transglycosylated rutin, *J. Agr. Food. Chem*., 64, 3062-3069, 2016

9） K. Kadota, H. Arima, R. Shakudo, K. Semba, H. Uchiyama, K. Sugiyama, Y. Tozuka, Emergent composite structures following the amorphization of itraconazole with transglycosylated rutin by over-grinding, *Powder Technol*., 323, 69-75, 2018

10） S.M. Wong, I.W. Kellaway, S. Murdan, Enhancement of the dissolution rate and oral absorption of a poorly water-soluble drug by formation of surfactant-containing microparticles, *Int. J. Pharm*. 317, 61-68, 2006.

11） B.C. Hancock, S.L. Shamblin, G. Zografi, Molecular Mobility of Amorphous Pharmaceutical Solids Below Their Glass Transition Temperatures. *Pharm. Res*., 12, 799-806, 1995.

12） B.C. Hancock, M. Parks, What is the true solubility advantage for amorphous pharmaceuticals? *Pharm. Res*., 17, 397-404, 2000.

顕微ラマン分光法を用いた皮膚角質層の評価法および透過性スクリーニング法の構築

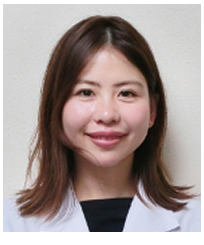
明治薬科大学
藤井　美佳、深水　啓朗

In this study, lipid structural change was monitored using Raman spectroscopy during heat treatment, along with the impact of lipid states on the structural and physical properties during the preparation process of the intercellular lipid model (MODEL) in stratum corneum. Moreover we demonstrated the availability of the MODEL for an evaluation of skin permeation mechanisms for skin permeation enhancers. The lipid states in preparation process was monitored by valuable temperature (VT) -Raman spectroscopy and differential scanning calorimetry. The Raman spectra were analyzed by perturbation correlation two-dimensional correlation spectra. The microstructure of MODELs prepared different temperatures and the structural changes of MODELs after application of skin permeation enhancers (vesicle and micelle solution) were detected by small angle X-ray scattering and powder X-ray diffraction measurements. The microstructures of the MODEL changed depending on the melting of lipid ingredients in the preparation process. It was recognized that VT-Raman spectroscopy is a useful and attractive tool for the sensitive monitoring of lipid state changes and lipid melting. These results suggested that monitoring lipid structural changes during the heating step is important to precisely prepare target MODEL. The MODEL structure changed after application of skin permeation enhancers. Especially the vesicle solution that promote skin permeation of low molecular weight compounds rather than micelle solution, was made the model structure disorder. It is expected that the MODEL would apply for the elucidation of skin permeation mechanisms.

1．緒　言

皮膚の最外層に存在する角層は，生体内への病原体・異物の侵入抑制および生体内からの水分蒸散抑制における重要な役割を担っている．特に角層細胞間脂質は低分子化合物の経皮吸収における主な経路となることが知られており，化合物の経皮吸収メカニズムの解明には，化合物と細胞間脂質の相互作用評価が重要である．しかしながらヒト角層は，採取する部位，被験者の年齢，性別および人種による構造および組成のばらつきが大きく，由来の異なる角層検体間での評価結果を単純に比較することが難しい．また2009年以降，EUにおいて動物実験を実施した化粧品の販売が禁止され，化粧品開発においては動物皮膚の使用も難しい状況にある．このような背景から，ヒトおよび動物の角層細胞間脂質の代替として，構造や組成の偏差が少ない細胞間脂質モデル（MODEL）が注目されており，様々なMODELが開発されている[1, 2]．MODELの組成や調製条件の違いは，その構造および物性に大きく影響するため，望ましい構造またはプロファイルを示すMODELをデザインするためには，調製過程における構成脂質の構造変化を詳細に理解することが重要と考えられる．

本検討では，セラミド（CER），パルミチン酸（PA）およびコレステロール（CHOL）を構成脂質としたMODEL[3,4]について，調製過程における脂質の構造変化をラマン分光法でモニターし，調製温度が及ぼすMODEL構造への影響を調べた．また，経皮吸収促進剤の適応によるMODELの構造変化を観察し，皮膚透過性評価におけるMODELの有用性を検証した．





Construction of evaluation method for human stratum corneum and screening method for percutaneous adsorption by Raman spectroscopy

Mika Y. Fujii, Toshiro Fukami
Meiji Pharmaceutical University

2．方　法

2．1．材　料

CERとして（2S, 3R）-2-（2-Hydroxyhexadecanoyl）amino octadecane-1, 3-diol（Takasago International Corporation, Tokyo, Japan）を使用した．PA（PALMAC 98-16）およびCHOLは，Acidchem International Sdn Bhd（Penang, Malaysia）およびFUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation（Osaka, Japan）からそれぞれ購入して使用した．

経皮吸収促進剤として，イソステアリルグリセリルエーテル（Penetol®GE-IS, Kao, Tokyo, Japan, 以下, GE-IS）およびポリオキシエチレン（60）硬化ひまし油（HCO-60, Nikko Chemicals, Tokyo, Japan, 以下, HCO-60）を用いた．

2．2．細胞間脂質モデル（MODEL）の調製

まずCER/CHOL/PA（42：15：43, w/w）の物理混合物を調製した．これらの物理混合物をクロロホルム／メタノール溶液（2：1）に溶解後，ガラスプレートに滴下した．32℃で溶媒を揮発させ，脂質膜（LM）を得た．MODEL 80は，LMを80℃で30 min加熱した後，室温まで冷却して調製した．同様にMODEL 120は，LMを120℃で30 min加熱した後，室温まで冷却して調製

した.

2．3．脂質膜（LM）およびMODELの物性評価

2．3．1．示差走査熱量計（DSC）

示差走査熱量計（DSC）はMettler Toledo DSC1（Mettler Toledo International Inc.）を用いた．LMを20℃から80℃または120℃まで，5℃/min（40mL/min., N_2環境下）の速度で昇温する過程の熱量変化を測定した.

2．3．2．温度可変顕微ラマンスペクトル測定

温度可変顕微ラマンスペクトル測定は，顕微ラマン分光装置（Work Station™, Kaiser Optical Systems Inc., Ann Arbor, MI, USA）および10083（Linkam Scientific Instruments Ltd., UK）を用いた．ヒートステージ上にLMをセットし，20℃から120℃まで昇温した．昇温速度は10℃/minとし，10℃毎に2min間保持した後にラマンスペクトルを測定した．ラマン分光装置は，照射レーザー波長785nm，積算回数3回，露光時間30s，測定範囲300-3500cm^{-1}，100倍の対物レンズを用いて測定した．得られたラマンスペクトルは，2Dshige version 1.3を使用して，摂動相関二次元相関スペクトル（PC2D）を得た．各温度のラマンスペクトルは，ガラス基板に由来する1698.6cm^{-1}のピーク強度が一定になるように規格化した.

2．3．3．粉末X線回折（PXRD）

PXRDは，MiniFlex600（Rigaku Corporation, Tokyo, Japan）を使用した．2θ側測定範囲2-28°，ステップサイズ0.02°，スピード4°/min，X線出力 管電圧40kV，管電流15mA，線源Cu-Kα（λ=1.5418Å）で測定した.

2．3．4．小角X線散乱（SAXS）

SAXSは，SAXS space（Anton paar, Graz, Austraria）を使用した．露光時間1min，積算回数4回，線源Cu-Kα（λ=1.5418Å）で真空下にて測定した．Repeat distance（d）は，d=2π/qより算出した（q：散乱ベクトル）.

2．4．経皮吸収促進剤によるMODEL構造の変化

経皮吸収促進剤には，5wt% GE-IS / 5wt% HCO-60によるベシクル溶液，5wt% HCO-60によるミセル溶液を用い，溶媒にはそれぞれ50mMクエン酸緩衝液を使用した．MODEL（10.5mg）に，各溶液を20μL滴下し，室温で24h静置後，SAXSで測定した.

3．結果および考察

3．1．調製過程におけるLM中脂質構造のダイナミクス

ラマン分光法は脂質炭化水素鎖のC-C結合やCH_2結合等，対称性の高い振動モードの検出を得意とし，ラマンスペクトルの変化から炭化水素鎖の周辺環境の変化を検出できる．加熱過程におけるLMの構造変化をより詳細に調べるために，20℃から120℃までLMの温度を変化させ，その過程をラマン分光法でモニターし，PC2Dで解析した．PC2Dは，摂動に対するスペクトル変化を捉えることが可能であり，スペクトル強度の変曲点を把握するのに有効である[5].

昇温過程におけるLM中脂質のラマンスペクトル変化および熱挙動をFigure 1に示す．DSC曲線では，58.6℃の吸熱に続いて，71.2℃および81.4℃の吸熱ピークが認められた．ラマンスペクトルでは，脂質炭化水素鎖のC-C伸縮振動に由来する1061cm^{-1}あるいは1128cm^{-1}のピーク強度が70-80℃で低下した．これらのピークは，脂質炭化水素鎖の運動性を示していることから[6]，DSC曲線で認められた81.4℃の吸熱ピークはゲル－液晶相転移を示

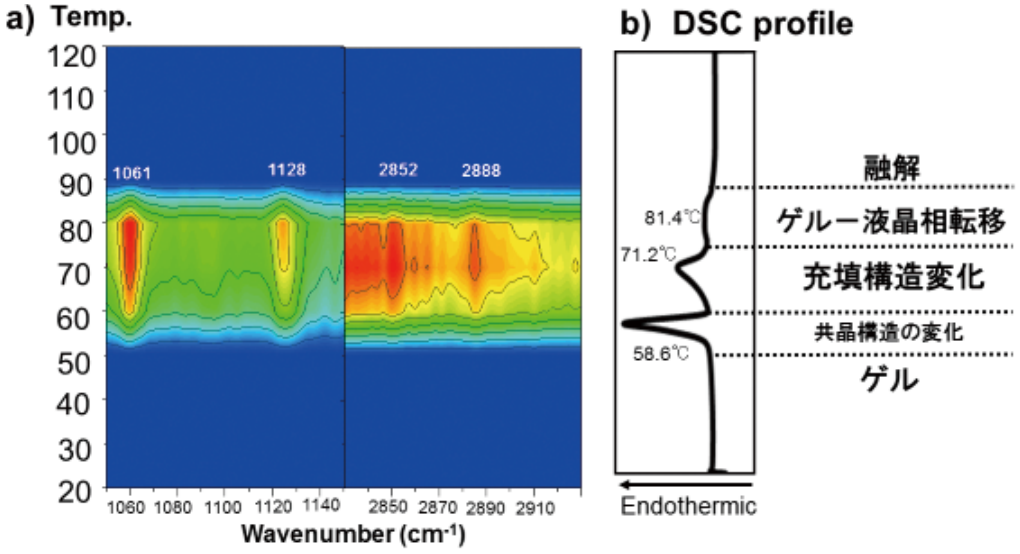


Figure 1　昇温過程における LM の PC2D スペクトル　a）および DSC 曲線 b）

している と考えられる．また，2852 cm^{-1} の CH_2 対称伸縮振動のピーク強度は 70–80℃，2888 cm^{-1} の CH_2 逆対称伸縮振動のピーク強度は 70℃で急激に低下することが明らかとなった，これらのピークは細胞間脂質の充填構造の情報を反映することが知られており[7]，DSC 曲線で認められた 71.2℃の吸熱ピークは，充填構造の変化に起因すると推察される．一方，DSC 曲線で吸熱ピークが観察された 58.6℃では，ラマンスペクトルに大きな変化は認められなかった．このピークは構成脂質単独の吸熱ピークとは一致しないことから（data not shown），共晶の構造変化による吸熱ピークと考えられる．また，ラマンスペクトルのピーク強度は 90℃付近で一定となることが明らかとなり，約 90℃で LM が完全に融解したと考えられる．

3．2．MODEL の周期構造解析

ラマンスペクトル（Figure 1）の結果から，調製温度の違いによって MODEL 形成までに経験する構造変化が異なることが示唆された．そこで 80℃または 120℃で得られた各 MODEL について，ラマン分光法では得ることができないより長距離の周期構造を PXRD および SAXS を用いて評価した．

LM, MODEL 80 および MODEL 120 の PXRD および SAXS パターンを Figure 2 に示す．LM および MODEL 80 の PXRD パターンから，直方晶および六方晶を示す約 21.5° および 23.8° の回折ピークが認められた．またこれらの充填構造に加え，約 19.6°，23.5° および 24.6° に回折ピークが認められたことから，複数の複格子構造が混在すると考えられる．一方，MODEL 120 ではこれらのピークは消失し，直方晶および六方晶のみが認められた．LM および MODEL 80 の SAXS パターンでは，4.32–4.38 nm の d 値を有する構造（ⅰ）および，3.60 nm の d 値を有する構造（PA）が観察された．PA の単斜晶は約 3.60 nm の d 値を有することから[8]，当構造は PA が単独で形成する結晶によると考えられる．ヒト角層では，CER：脂肪酸：CHOL はおよそ当モル比で存在することから[9]，当 MODEL は PA の配合量が多いことが分かる．つまり，過剰に存在する PA が単独で結晶構造を構築したと考えられる．一方，構造ⅰは CER，PA および CHOL の共晶によるピークと推察される．MODEL 120 では 4.60 nm（Ⅰ），4.00 nm（Ⅱ）および 3.60 nm（PA）の d 値を有する構造が認められた．3.6 nm は，PA の結晶由来と推察され，PA 結晶は調製温度に因らず，当 MODEL 中に存在することが明らかとなった．構

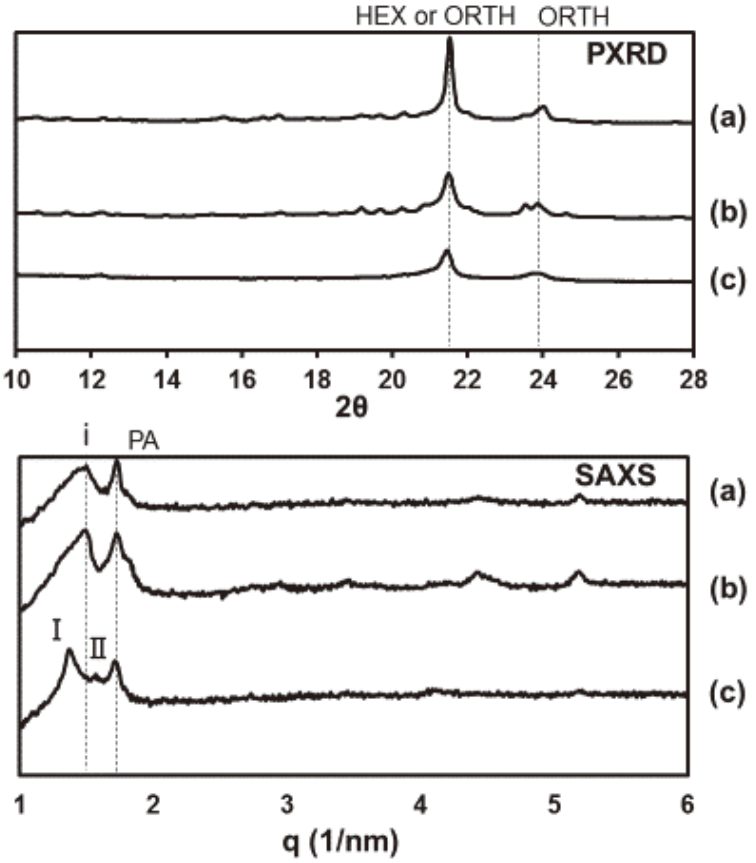


Figure 2　LM (a), MODEL 80 (b) および MODEL 120 (c) の PXRD および SAXS パターン（HEX：六方晶，ORTH：直方晶，PA：パルミチン酸の結晶）

造ⅠおよびⅡはCER，PAおよびCHOLの共晶による構造と考えられるが，特に構造Ⅰの構造はCERのヘアピン構造による結晶であると推察される（CERヘアピン構造の分子長：約2.1-2.3nm）．以上の結果よりMODELの構造は調製温度によって異なり，特に共晶構造および充填構造はMODEL 80とMODEL 120で大きく異なることが分かった．Figure 1より，調製過程において構成脂質は90℃以上で完全に融解することが明らかとなっており，調製過程の脂質の融解状態がMODEL構造に影響すると推察される．ヒト角層細胞間脂質の充填構造は六方晶と直方晶から成ると考えられている[10]．そこで，六方晶および直方晶を充填構造として有していると考えられるMODEL 120を使用し，経皮吸収促進剤の適応によるモデルの構造変化を評価した．

3．3．経皮吸収促進剤によるMODEL構造の変化

ベシクル溶液，ミセル溶液および50mMクエン酸緩衝液を適応したMODELのSAXS patternsを二次微分したピークトップをTable 1に示す．

当研究で使用したベシクル溶液はミセル溶液と比較して，低分子化合物の皮膚透過量を1.5-3倍向上させることが明らかとなっている（data not shown）．Table 1より，50mMクエン酸緩衝液適応後のMODELは，4.48，3.98，3.58および2.26nmのd値を有しているが，ベシクル溶液の適応により，Second peak（3.98nm付近）が消失した．ミセル溶液においてもピーク強度は減少したが，その構造は完全には消失しないことが明らかとなった（Figure 3）．またPXRD測定の結果から，ベシクル溶液を適応したMODELの広角側に，ハローパターンが認められ（Figure 3），MODELが非晶質化したことが示唆された．これより，細胞間脂質の構造が一部乱されたことが，ベシクル溶液による低分子化合物の皮膚透過性促進作用の機序の一つであると考えられる．

4．総　括

本研究では先ず，調製過程におけるMODEL構成脂質の

Table 1　各製剤を適応したMODEL 120のd値（nm）

	50 mM citric acid buffer	Vesicle	Micell
First peak	4.48	4.51	4.48
Second Peak	3.98	-	3.96
Third Peak	3.58	3.59	3.57
Forth peak	2.26	2.25	2.27

Each data was gained by second derivative of SAXS patterns（Figure 3).

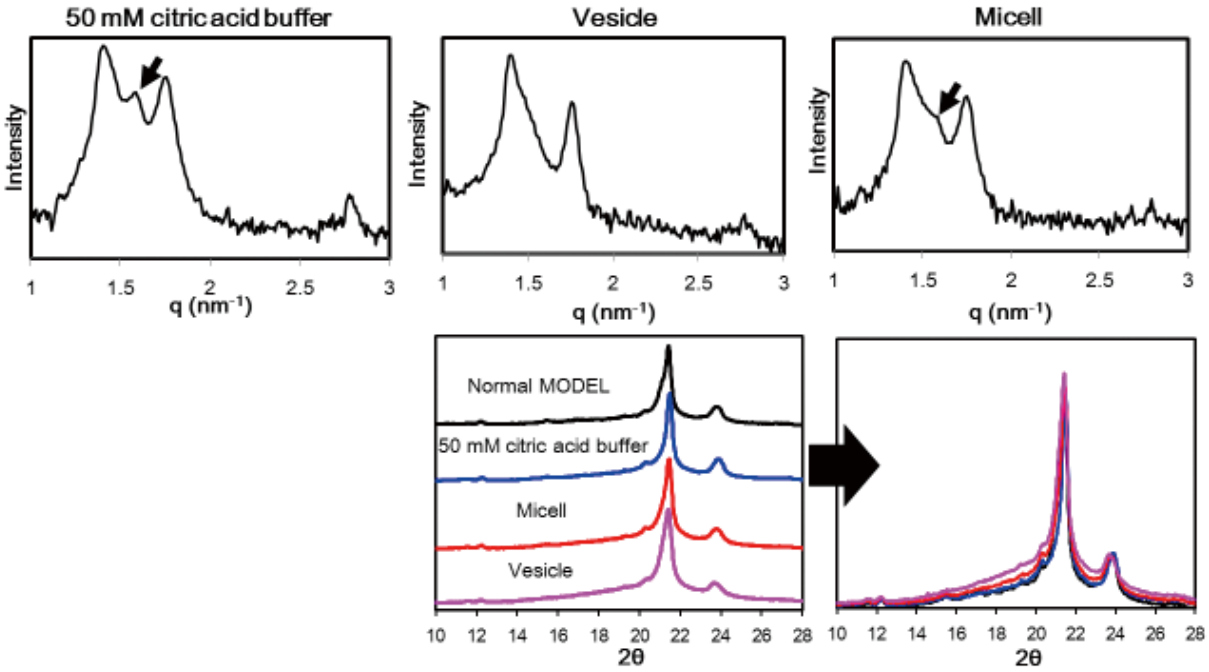


Figure 3　各溶液を適応したMODELのSAXSおよびPXRDパターン

状態変化を温度可変ラマン分光法でモニターし，調製温度が及ぼすMODEL構造への影響を調べた．調製過程でLMを完全に融解することで，ヒト角層細胞間脂質に類似した充填構造を有するMODELを調製できることが明らかとなった．加熱過程におけるLMの構造変化を分子レベルで理解することは，適切なMODELを調製するうえで必要不可欠であり，温度可変ラマン分光法はその構造変化を*in situ*モニタリングできる有効なツールであることが示された．次に，当MODELに経皮吸収促進剤であるベシクルおよびミセル溶液を適応し，MODELの構造変化を評価した．低分子化合物の皮膚透過性を亢進させる，ベシクル溶液を適応すると，MODELの構造が一部消失し，非晶質化することが示唆された．経皮吸収促進剤がMODELに与える影響については，更に詳細な検証が必要とされるものの，本MODELは経皮吸収促進剤等の浸透促進メカニズムの解明に応用が期待される．

（引用文献）

1） D. Groen, *et al.*, *Langmuir*, **26**, 4168–4175 (2010).
2） A.P. Ramos, M. Lafleur, *Langmuir*, **31**, 11621–11629 (2015).
3） H. Watanabe, *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, **58** (3), 312–317 (2010).
4） X, Wang, *et al.*, *Coll. Surf. B*, **78**, 92–100 (2010).
5） M. Thomas, H. H. Richardson, *Vib. Spectrosc.* **24**, 137–146 (2000).
6） A. N. C. Anigbogu, *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **125**, 265–282 (1995).
7） R. Koynova, M. Caffrey, *Biochim. Biophys. Acta*, **1255**, 213–236 (1995).
8） X, Wang, *et al.*, *Coll. Surf. B*, **78**, 92–100 (2010).
9） A. Weerheim, M. Ponec, *Arch. Derm. Res.*, **292**, 191–199 (2001).
10） S. Ramakrishman, *et al.*, *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* EXS-A H6. 2. 1. (2004).

カラフルな反射色を永続的に維持できるセルロース誘導体の創製

東京理科大学理学部第一部応用化学科
古海　誓一

This report describes the syntheses and reflection properties of cellulosic derivatives with permanently colorful reflection characteristics. Cellulosic derivatives tethering appropriate side chains are well known to form cholesteric liquid crystals with visible reflection features in line with Bragg's law. When hydroxypropyl cellulose (HPC) was chemically modified by various aliphatic groups in the side chains, the reflection peak monotonously shifted to longer wavelength upon stepwise heating process. This happened from the increase in CLC helical pitch. By using crosslinkable HPC derivatives tethering acryloyl side chains, we succeeded in the permanent preservation of periodic helical CLC structure with visible reflection features by photocrosslinking reaction between the acryloyl groups, resulting in facile fabrication of full-color imaging films. Such films of cellulose derivatives could be also applied to intriguing sensors with respect to mechanical stress and surface roughness. This report provides promising clues to fabricate the next-generation photonic devices from an environment- and human-benign biomass of cellulose.

1．緒　言

私たち人間の生涯で最も触れる化合物は、何であろうか？液体では「水」になるが、固体であれば「セルロース」かもしれない。なぜならば、セルロースは古代から現代にわたる日常生活において人間と密着しているからである。人間は衣類に使われている綿を身に付けることがあり、何かを書き記すときには紙を使う。建物や家具に木材を使うこともある。これら綿、紙、木材の主成分は、セルロースである。さらに、文房具として古くから身近なセロハンテープは、セルロースを水酸化ナトリウムと二硫化炭素で反応させたビスコースから製造されている。セルロースと無水酢酸を反応させた酢酸セルロースは半合成繊維であるアセテート繊維として知られており、難燃性という特徴があるため繊維だけでなく、電線の中の絶縁体やたばこのフィルターにも使われている。さらに、今日の生活で一日に一度は目にする液晶ディスプレイの中には直線偏光子が組み込まれているが、その保護フィルムとして、光学異方性がほとんどないセルローストリアセテートが採用されている。

セルロースは、水と二酸化炭素を使った植物の光合成によって作られる天然高分子である（図1(a)）。地球表面の約1割は森林により覆われており、この森林、すなわち植物の質量の約4割はセルロースが占めていることからも、セルロースが地球上に最も豊富に存在する天然高分子であることがわかると思う。セルロースの化学構造は、β-グルコースユニットが隣り合うグルコースユニットと交互にグルコースの環平面の上下の向きを変えながら結合しており、直鎖状の高分子になっている。デンプンもグルコースからできた天然高分子であるが、デンプンとセルロースの大きな違いは、モノマーユニットであるグルコースの化学構造がそれぞれα-グルコースとβ-グルコースで構成されていることである。人間はα-グルコースからできたデンプンを栄養源として食べることができるが、β-グルコースからなるセルロースを食べても分解できず栄養源にならない。すなわち、セルロースは人間にとって非可食性の天然資源である。しかしながら、自然界には、セルロースをグルコースに変換できる酵素をもった草食動物や昆虫も数多く存在している。



Cellulose Derivatives with Permanently Colorful Reflection Characteristics
Seiichi Furumi
Department of Applied Chemistry, Faculty of Science, Tokyo University of Science

このような研究背景があるなか、本研究者らは最近、セルロースの側鎖を化学修飾することにより室温付近で鮮やかな反射特性を示す新しいコレステリック液晶の合成に成功した[1)]。コレステリック液晶はキラルな液晶分子が平行配列した層を有し、隣り合う層と連続的に回転することで全体として分子らせん構造を自発的に形成することができる（図1(b)）。このように、コレステリック液晶の分子らせん構造は屈折率（誘電率）が周期的に変調しているので、液晶の中に侵入した光は干渉を起こし、ブラッグの条件を満たすある特定の波長領域の光だけが反射される。この光の反射現象は、ブラッグ反射と呼ばれている。この反射光の中心波長（λ_{Ref}）は、コレステリック液晶の平均屈折率（n_{Av}）と分子らせんピッチ（p）でおおよそ決定でき、ブラッグの法則を満たす次式で表すことができる。

$$\lambda_{Ref} = n_{Av} \times p \quad \cdots\cdots (1)$$

分子らせんピッチが数百ナノメートルのコレステリック液晶に白色光を照射すると、可視波長域に現れたブラッグ反射を目で観察できる。流動性の高い低分子コレステリック液晶は温度、電場、磁場といった外部刺激によって分子

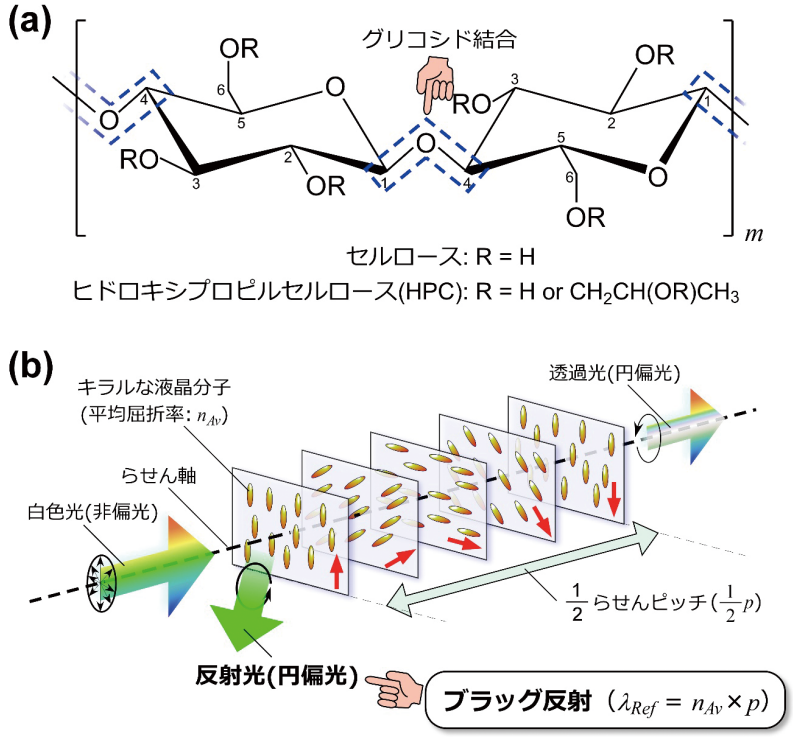


図１　(a) セルロースとヒドロキシプロピルセルロースの化学構造式．
(b) コレステリック液晶における分子らせん構造とブラッグ反射の模式図．

らせんピッチを容易に伸縮することができるので、ブラッグ反射を任意にコントロールすることで反射型ディスプレイ、光メモリー、レーザーへ応用できる[2,3]。

本研究課題の目的は、地球環境や人体に優しいセルロースに着目して、新しい架橋性セルロース誘導体の合成とフルカラーイメージング材料への応用である。不飽和二重結合を有する官能基でセルロースの側鎖を化学修飾すると、ブラッグ反射が全可視波長領域で発現するだけでなく、光架橋反応を施すとカラフルな反射色を永続的に維持した固体膜になることを見出した。しかも、ある種の架橋性セルロース誘導体はコレステリック液晶由来の反射色だけでなく、ゴム弾性も有したセルロース・コレステリック液晶エラストマー膜（以降、「セルロース液晶エラストマー膜」と呼ぶ）になることがあり、圧力や凹凸のセンシングへの応用も実証することができた。

2．方　法

2．1．試　料

図１(a)に示すようなヒドロキシプロピルセルロース（HPC；M_W：2.8 × 10^4；M_W/M_N：1.6）は和光純薬工業㈱製を用いた。^{1}H-NMR 測定から HPC のβ-グルコースモノマーユニットにおけるヒドロキシプロピル基の平均数（MS）は 4.0 であり、モノマーユニットにおける置換されたヒドロキシ基の平均数（DS）はイソシアン酸トリクロロアセチルを用いた滴定によって 2.3.であることを確認した[4]。エステル化反応で用いる溶媒と塩基は、和光純薬工業㈱製の脱水アセトンまたは脱水テトラヒドロフランと脱水ピリジンをそのまま用いた。

2．2．測　定

赤外吸収スペクトルは、日本分光㈱製フーリエ変換赤外分光光度計 FT/IR-4600 により測定した。^{1}H-NMR スペクトルは、BRUKER 製 ULTRASHIELD 400 PLUS を用いて測定した。HPC および HPC 誘導体の重量平均分子量（M_W）と分子量分布（M_W/M_N）は、東ソー製高速ゲル浸透クロマトグラフィー（GPC）システム HLC-8220GPC を使用し、テトラヒドロフランを溶離液として用い測定した。標準スチレンの検量線を基準として、M_W と M_W/M_N の値を換算した。

液晶セルの透過スペクトルは、Ocean Optics 製 HALOGEN LIGHTSOURCE HL-2000 を光源ランプとして液晶セルに法線方向から照射し、2 枚のアクロマティック集光レンズで集光した透過光を Ocean Optics 製小型分光器 USB2000+で透過スペクトルを測定した。液晶セルの温度は、METTLER TOLEDO 製ホットステージ HS82 で制御した。

2．3．HPC 混合エステルの合成

HPC 混合エステルは、次に述べるような簡便な方法で

合成した[1)]。

たとえば、HPCプロピオニル・ブチリル混合エステル（HPC-Pr/Bu）の合成では、減圧下、50℃で12時間以上乾燥したHPC3.0gを三口フラスコに秤量し，脱水アセトン50mLに撹拌しながら溶解した。このとき，β-グルコースモノマーユニットにおけるヒドロキシ基のモル数はMS値から23mmolと計算することができる。脱水ピリジン3.7mL（46mmol）を入れた後、塩化ブチリル1.2mL（12mmol）を加えた。55℃のオイルバス中で4時間反応させた後、塩化プロピオニル2.6mL（30mmol）を加え、さらに20時間反応させた。反応終了後、反応溶液を1.0Lの超純水に投入し、白色の生成物を得た。超純水で生成物の洗浄を2回行った後、乾燥した。引き続き、少量のアセトンで生成物を溶解した後、1.0Lの超純水に再析出した。生成物を超純水で洗浄した後、乾燥することで、HPCプロピオニル・ブチリル混合エステル（HPC-Pr/Bu）を得た。

同様の合成手順で、他のHPC混合エステルも合成した。

2．4．液晶セルの作製

液晶配向膜材料はAldrich製ポリビニルアルコール（PVA；M_W：1.3 × 10^4 ～ 2.3 × 10^4，87 ～ 89% hydrolyzed）を用い、1.0wt%水溶液を調製した。Active製スピンコーターACT-220D IIを用いてスライドガラスに1.0wt% PVA水溶液を800rpmで4秒間，続けて2000rpmで7秒間スピン塗布した。その後、キュプラで巻いた棒を用いてPVA塗布基板の表面を一軸方向に10回擦り、ラビング処理を施した。110℃から120℃に加熱したホットステージ上で、2枚のラビング処理PVAガラス基板の間に200μmのPTFEスペーサーとともにHPCエステルを挟んだ。さらに、せん断配向処理を施すことで、均質に配向した液晶セルを得た。

3．結果と考察

3．1．HPC混合エステルの合成と構造解析

本研究者らはHPCの側鎖を化学修飾することで、100℃以下の温度領域で鮮やかなブラッグ反射を示す新しいコレステリック液晶の創製を目指した。

HPCに塩化プロピオニルや塩化ブチリルといった種々の酸塩化物と反応させて、図2のようなさまざまなHPC-R’エステルを合成した。^{1}H-NMRスペクトルから、HPC混合エステルにおける2種類の官能基のエステル化度を算出することができる。HPCにおける一つのグルコースユニットには3つのヒドロキシ基が存在しているので、理論的にはそれぞれのエステル化度の総和は3.0になるはずであるが、^{1}H-NMRスペクトルにおける積分値を使ったエステル化度の算出値には約0.1の誤差が生じることがある[1)]。

3．2．HPC混合エステルの温度による反射特性変化

2枚のガラス基板にHPC-R’エステルを挟み込むことで液晶セルを作製し、温度を変化させながら透過スペクトルを測定した。図3(a)は、HPCをプロピオニル基単独で十分にエステル化したHPCプロピオニルエステル（HPC-Pr；PrE=2.97）の透過スペクトルの変化である。HPC-Prの液晶セルを90℃に加熱すると、紫外波長領域である390nm付近にブラッグ反射のピークを観察することができた。その後、10℃ずつ昇温すると、ブラッグ反射の波長は連続的に長波長側にシフトし、緑色の500nmを経て、130℃では赤色の620nmまでシフトした。これは、HPC-Prはサーモトロピックなコレステリック液晶特性を示し、昇温することで分子らせんピッチが伸張し、これに付随して反射波長が長波長シフトしたと解釈できる。一方で、プロピオニル基よりも炭素数が一つ増えたブチリル基単独で十分にエステル化したHPCブチリルエステル（HPC-Bu；BuE=2.95）では、可視波長のブラッグ反射が現れる温度はHPC-Prよりも低い70℃から120℃になり、さらに、ブラッグ反射波長のシフト範囲は拡大し、480nmから780nmの波長範囲でシフトすることがわかった（図3(b)：●）。

この実験結果を踏まえて、HPC側鎖をプロピオニル基とブチリル基の2種類の官能基を異なるエステル化度で混

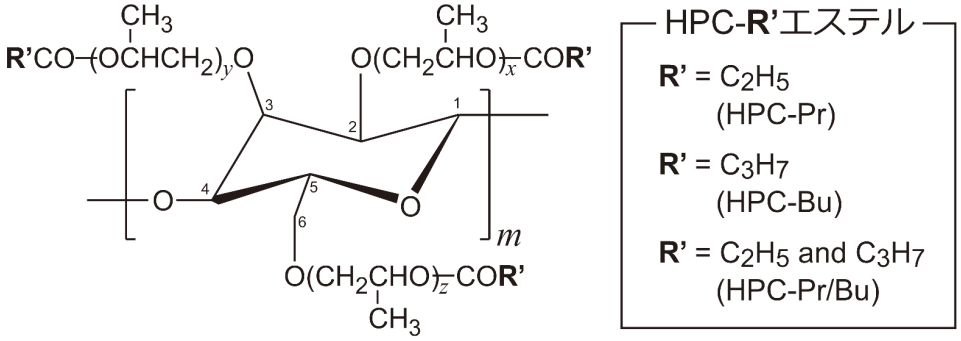


図2　ヒドロキシプロピルセルロースのエステル化物の化学構造式．

合修飾したHPC-Pr/Bu混合エステル（PrE：BuE=1.56：1.41，PrE：BuE=0.45：2.49）を合成して、温度変化によるブラッグ反射の波長シフトを調査した。その結果、単独で官能基をエステル化したHPC-Pr（図3(b)：○）とHPC-Bu（図3(b)：●）の反射波長シフトの間の値を保ちながら、HPC-Pr/Bu混合エステルの反射波長はシフトした（図3(b)：■，□）。したがって、HPC側鎖をプロピオニル基とブチリル基を有する2種類の酸塩化物でエステル化することで、それらが相分離を起こさずに、ブラッグ反射のピーク波長はシフトすることがわかった。さらに、図3(b)の実験結果を詳しく考察すると、一定温度におけるブラッグ反射の波長は、ブチリル基の導入量が増加するにつれて長波長側に現れた。この実験結果から、HPCをエステル化する酸塩化物のアルキル鎖長が長い程、コレステリック液晶の分子らせんピッチを拡大していると推察できた。

実際に、図2(a)のR'の官能基として、分子的に嵩高く、かつ分子キラリティーを有するコレステリル基を導入したHPC混合エステルを合成した。HPCのヒドロキシ基に対してわずか4.7%のコレステリル基をエステル化で導入し、残りをプロピオニル基で化学修飾したHPC混合エステルについて昇温過程における透過スペクトルを測定すると、30℃から80℃の比較的低い温度範囲においてブラッグ反射を観察することができた[1)]。しかも、温度を変えることで、ブラッグ反射のピーク波長は400nmから800nmの全可視波長域で連続的にシフトすることも見出した。

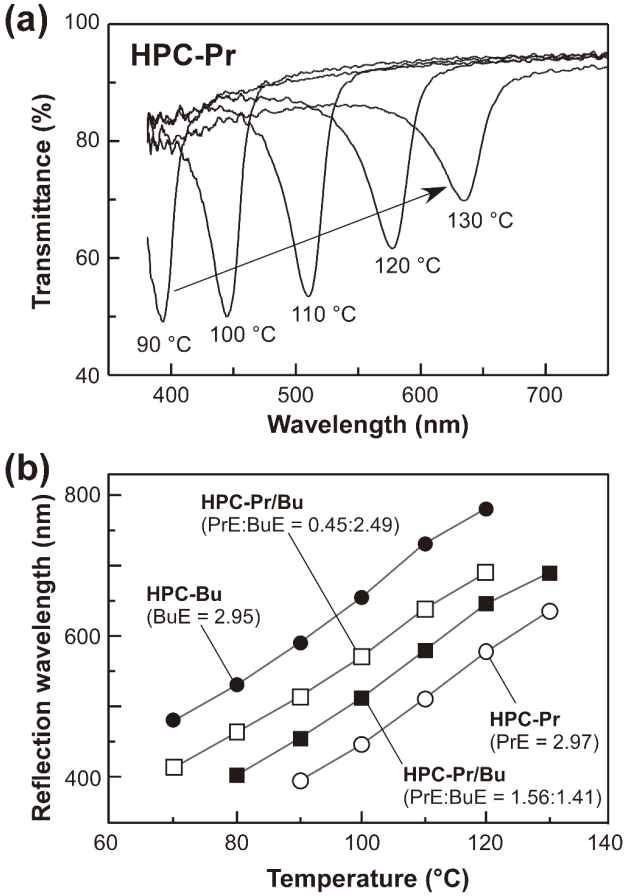


図3 (a) HPC-Pr (PrE=2.97) の液晶セルを90℃から130℃に昇温した時の透過スペクトル変化．(b) HPC-Prエステル (○: PrE=2.97)、HPC-Buエステル (●：BuE=2.95)、HPC-Pr/Bu混合エステル (□：PrE：BuE=0.45：2.49，■：PrE：BuE=1.56：1.41) における反射ピークの温度依存性．

3．3．架橋性HPC誘導体によるフルカラーイメージング

前述のように、鎖長の異なるアルキル基で混合エステル化したHPC混合エステルは、その化学構造を最適化すると100℃以下の比較的低い温度範囲で可視波長のブラッグ反射が現れた。しかし、当然ながら、ある温度に加熱して観察できたコレステリック液晶由来の反射色は、異なる温度にすると変色してしまう。そこで、図2(a)のようなコンセプトで、HPC混合エステルの官能基として不飽和二重結合を有するアクリロイル基を導入することで、ポリマーネットワーク間における架橋反応を利用してコレステリック液晶の反射色の固定化を試みた。

たとえば、図4(a)に示すように、側鎖の一部をアクリロイル基で残りをブチリル基で混合エステルした架橋性セルロース誘導体、すなわちHPC-Ac/Bu混合エステルを合成した。アクリロイル基とブリチル基の混合比で異なるが大半のHPC-Ac/Buでは、30℃から110℃の温度範囲において、400nmから800nmの全可視波長領域におけるブラッグ反射を示した。しかも、HPC-Ac/Buをコレステリック液晶相温度に加熱しながら紫外線を照射すると、誘導体側鎖のアクリロイル基間で光架橋反応が進行し、コレステリック液晶由来の分子らせん構造、すなわち反射色を永続的に固定化できることを発見した。また、アクリロイル基の導入量が多いHPC-Ac/Buでは100℃程度に加熱し続けると、アクリロイル基間で熱架橋反応が起き、分子らせん構造を固定化できた。一方、アクリロイル基の導入量が比較的少ないHPC-Ac/Buでは、一度、100℃程度に加熱した後に降温しても、ブチリル基の導入量が多いことでアクリロイル基の過度の架橋反応を抑制し、反射波長は可逆的に短波長シフトすることも見出した。

この現象を利用すると、図4(b)に示すように、架橋性セルロース誘導体を用いて多種多様なフルカラーイメージングを作製することに成功した。まず、架橋性セルロース誘導体の液晶セルをある液晶相温度に加熱しながらフォトマスクを通じて紫外線を照射し、フォトマスクのパターンをある反射色で固定した。続いて、異なる液晶相温度にして全体に紫外線を照射することで、先のパターンの色とは異なる反射色の背景などを創り出すことができた。このように、架橋性セルロース誘導体はブラッグ反射特性で赤･緑･

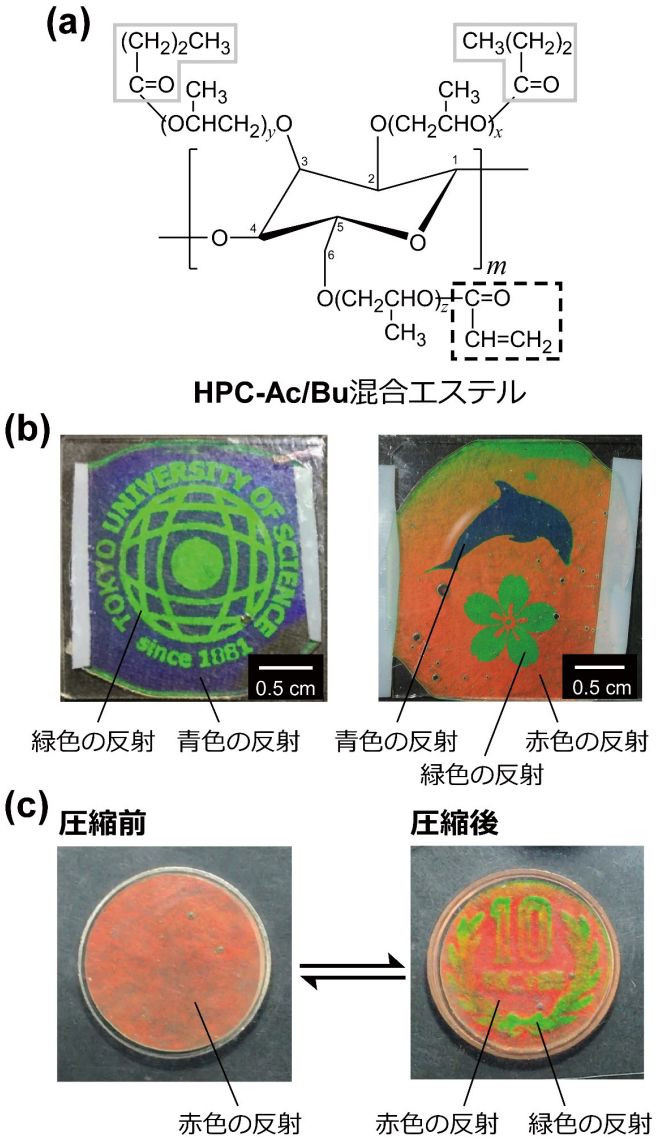


図４　(a) 架橋性セルロース誘導体である HPC-Ac/Bu 混合エステルの化学構造式．(b) 架橋性セルロース誘導体によるフルカラーイメージングフィルム．(c) 架橋性セルロース誘導体を用いた物体表面上の凹凸の可視化．圧縮前、赤色の反射を示すフィルムに 10 円硬貨を押し付けると、緑色の数字と模様が浮かび上がり、10 円硬貨表面のわずかな凹凸を反射色の変化で可視化できる.

青の「光の三原色」を表現でき、光照射による架橋反応を利用することでフルカラーイメージングを実証することができた[5]。

３．４．架橋性 HPC 誘導体による凹凸センシング

前述した架橋性セルロース誘導体のさらなる特長として、ブラッグ反射特性のみならずゴム弾性を有したセルロース液晶エラストマー膜になることが挙げられる。２枚のガラス基板の間で作製したセルロース液晶エラストマー膜を２枚のガラス基板から剥離すると、この膜は反射色を保ちつつゴム弾性も有していた[6]。

たとえば、初期状態で赤色の反射、すなわち約 630 nm の反射波長を示すセルロース液晶エラストマー膜を用意して透明なプラスチックスプーンで押しつけると、興味深いことに、圧縮した部分だけが赤色から緑色の反射に変化した。このときの反射波長は約 480 nm であった。しかも、押しつけていたスプーンを膜表面から取り去れば、緑色の反射は初期状態の赤色に直ちに戻った。圧縮と解放を繰り返しても、この反射色の変化は可逆的であることも確認した。この現象は、機械的圧力によってセルロース液晶エラストマー膜の膜厚を縮めたことで、コレステリック液晶の分子らせんピッチ (p) も同時に収縮し、式 (1) にしたがってブラッグ反射の中心波長 (λ_{Ref}) が短波長側にシフトしたと推察できる。

この現象を利用すると、物体表面の凹凸を可視化することができた[7-9]。たとえば、黒いゴムシート上にセルロース液晶エラストマー膜を作製し、10 円硬貨の表面上にこの黒いゴムシートを載せた。圧縮前は赤色の反射を示したが、透明なアクリル板を介してセルロース液晶エラストマー膜を圧縮すると、図４(c)のように 10 円硬貨の表面上に刻まれた数字や模様が緑色の反射として浮かび上がり、物体表面の凹凸を可視化することができた。なお、10 円硬貨の表面上の凹凸の高さの差はおおよそ 100 μm である。今後、セルロース液晶エラストマー膜をさらに最適化すれば、より微細な表面の凹凸を可視化することができるはずである。

本研究で発見したセルロース液晶エラストマー膜をトンネルや高速道路の外壁などに貼り付ければ、外壁にクラックや歪みなどが生じたときに反射色が瞬時に変化するので、いち早く崩落の危険性を視覚的に察知することができる。さらに、人体の表面に貼り付ければ、ウェアラブルセンサーとして活用でき、脈拍や血圧などリアルタイムでモニターができる可能性がある。これらに加えて、圧電素子を使えば、簡便で低環境負荷な反射型フルカラーディスプレイへの応用も期待できる。

４．総　括

本報告では、セルロースを原料にしたコレステリック液晶の創製とフルカラーイメージングや凹凸センシングへの応用について紹介した。

本発表者らは低環境負荷なセルロースに着目して、セルロースの側鎖を適切な官能基で化学修飾すると、100℃以下という比較的低い温度領域で鮮やかなブラッグ反射を示す新しいコレステリック液晶を創製することができた。さらに、ある種の架橋性セルロース誘導体は全可視波長領域、すなわち赤・緑・青でブラッグ反射を示し、加熱しながら光架橋反応を起こせば、フルカラーイメージングへの応用も実証することができ、今後、人体に優しい化粧品の色材

への応用を目指す。しかも、これだけでなく、機械的な圧力を加えることで反射色が変わるセルロース・コレステリック液晶エラストマー膜になることも発見し、物体表面の凹凸センシングも可能であった。

謝　辞

ここで紹介した研究は当研究室のメンバーの協力による成果であり、メンバー各位に心よりお礼を申し上げます。また、本研究課題を遂行するにあたり、公益財団法人コスメトロジー研究振興財団のご支援を頂きましたことに深謝を申し上げます。

（引用文献）

1）T. Ishizaki, S. Uenuma, and S. Furumi, Kobunshi Ronbunshu, **72**, 737（2015）.
2）S. Furumi, Chem. Rec., **10**, 394（2010）.
3）S. Furumi, Polym. J., **45**, 579（2013）.
4）M. Fukawa and S. Furumi, EKISHO, **22**, 214（2018）.
5）https://www.nikkan.co.jp/articles/view/00495823.
6）古海 誓一, 鈴木 花菜, 石﨑 拓郎, 特願 2016-186266.
7）古海 誓一, 鈴木 花菜, 府川 将司, 特願 2018-014066.
8）古海 誓一, 府川 将司, 鈴木 達也, 鈴木 花菜, 特願 2018-063259.
9）古海 誓一, 鈴木 花菜, 府川 将司, 早田 健一郎, 古川 真実, 青木 瑠璃, 川口 茜, PCT/JP2019/003267.

アミノ化合物によるナノ結晶（粒子）の成長抑制技術の開発

山形大学大学院理工学研究科
増 原 陽 人

Recently, the demand for cosmetics combined with nanomaterials is increasing to realize the quality that consumer's needs. By achieving the nano-sized materials for cosmetics, it is expected that stretchability, texture, and transparency will be improved in cosmetic efficacy and their nano-sized cosmetics enable to bring the active ingredient to the dermis. On the other hand, fullerene (C_{60}) is greatly expected to be used for cosmetic products owing to its antioxidant effects for human skins. In order to maximize the antioxidant effect, down-sizing of C_{60} is an effective way to penetrate C_{60} molecules into the dermis through the skin. Various techniques have been reported for preparing nanosized C_{60} crystals, however considering the penetration into the skin, a technique without using a surfactant is required. We have already succeeded in suppressing crystal growth of C_{60} nanocrystals by using amine compounds in the reprecipitation method which is a simple and convenient method to prepare the nano-sized various organic crystals under the atmosphere. And we have already prepared the many kinds of organic nanocrystals by the method and also controlled crystal sizes and shapes. However, the suppression mechanism of C_{60} crystal growth by amine compounds is not clear. Thus, in this study, it was found that carbamino compounds produced by the reaction of amino solvents and carbon dioxide play an important role in the suppression of crystal growth. By TGA and IR analysis of the obtained nanocrystals, it was revealed that C_{60} and a compound with a carbamino compound suppress aggregation between C_{60} nanocrystals.

1．緒　言

ここ数年、ナノマテリアルを配合した化粧品の数は増加傾向にある。ナノサイズにすることにより、伸び、広がりやすさ、感触、透過性等の向上が期待できることに加え、角層を越え真皮にまで有効成分を到達させることが可能なことが理由である（図1）。本研究では、化粧品における有効成分の到達領域を決める重要な要素である精緻な有効成分のサイズ制御を目的とする。

有効成分として、ビタミンCの172倍の抗酸化機能及びその効果が12時間を超える等の高い持続性に特徴を有するC_{60}[1, 2]を選定した。ナノ化対象化合物としたC_{60}は、これまでにも、我々が扱ってきた物質であり、知見も深い。このC_{60}を、これを極めてシンプルなナノ結晶作製手法である“再沈法[3, 4]”により、精緻なナノ結晶のサイズ制御を試みた（図2）。本手法にアミノ化合物を添加し、従来、ナノ結晶サイズの制御に必須であった界面活性剤を導入することなく、目的とするナノ結晶を所望のサイズで直接作製する技術を開発する。一般的に、ナノ化対象化合物が結晶性化合物である場合、結晶成長速度が速いため、目的サイズのナノ結晶を得るには、結晶成長を如何に抑制するかがポイントとなる。我々は最近、アミノ化合物と二酸化炭素の反応を利用することで、C_{60}ナノ結晶の結晶成長抑制が可能であることを偶然発見した。具体的には、再沈法における任意の良溶媒・貧溶媒を用いてC_{60}ナノ結晶分散液を作製し、その直後に(*S*)－(－)－1-phenylethylamineを添加することで、結晶成長が抑制された（図3）。この結晶成長抑制効果は、二酸化炭素を排除したグローブボックス中での検討では確認できない（図4）ことから、本抑制効果は、

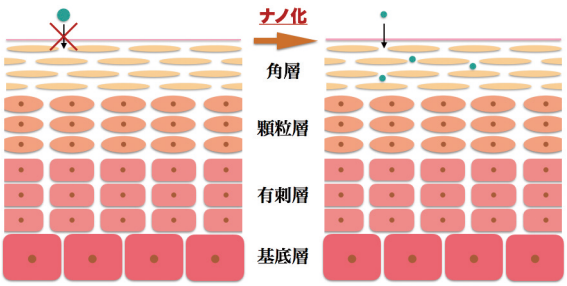


図1　ナノ化により、肌の奥へ有効成分が到達

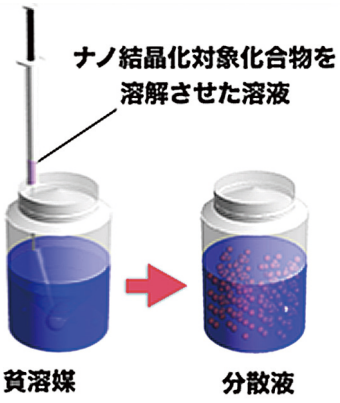
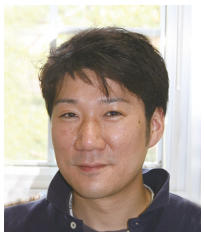


図2　再沈法の概略図



Development of techniques suppressing crystal growth for nanocrystals (particles) using amines

Akito Masuhara

Graduate School of Science and Engineering, Yamagata University

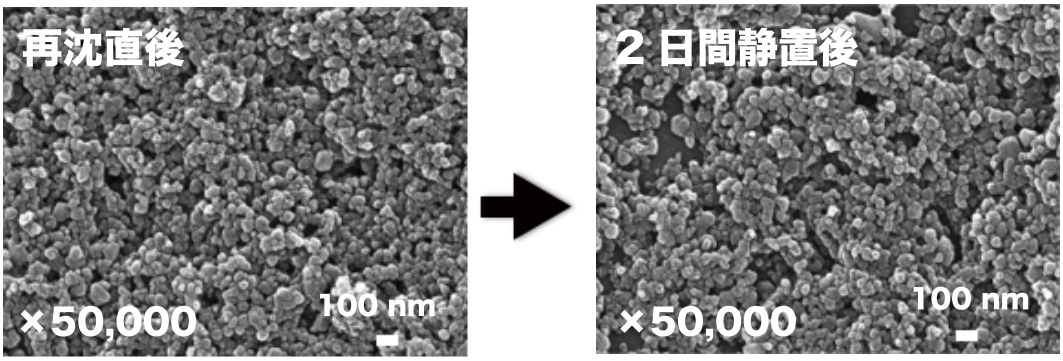


図３　大気下での再沈直後と２日間静置後の C_{60} ナノ結晶（*S*-(−)-1-phenylethylamine/acetonitrile）

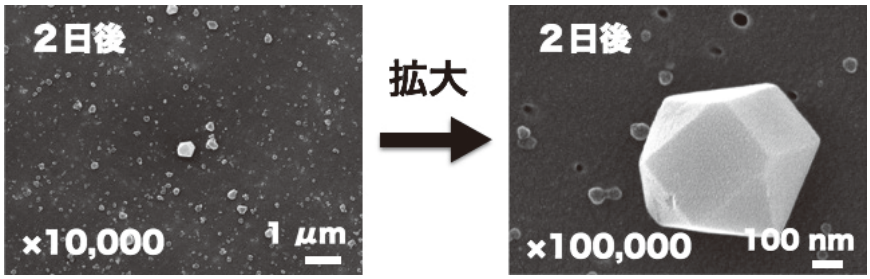


図４　グローブボックス内での再沈直後と２日間静置後のナノ結晶（*S*-(−)-1-phenylethylamine/acetonitrile）

(*S*)－(−)－1-phenyl-ethylamine と空気中や分散液中に溶存している二酸化炭素が反応したことにより生成する白色化合物が要因である可能性が高い。この白色化合物は、カルバミノ系化合物の一種であると思われるが、詳細な化学組成等に関して未解明である。これら生成した白色化合物の化学組成等を明らかにし、ナノ結晶の結晶成長抑制効果の要因を解明し、ナノ結晶サイズを精緻に制御できれば、所望のサイズのナノ結晶を簡便且つ迅速に作製でき、化粧品は当然のこと、他の有機化合物へも応用が可能となり、今後のナノ結晶の応用範囲拡大への大きな一助となる。

２．方　法

ナノ結晶の結晶成長抑制効果の要因を解明する為、以下 2.1.～2.3. に簡単な本研究における研究方法を示す。

２．１．結晶成長抑制作用の検討

結晶成長抑制効果が見込まれるアミン系添加試料に着目し、４種のアミン系溶媒（R-(+)-1-phenylethylamine, 2-phenylethylamine, *N*-1-methylaniline, aniline）を用いて、C_{60} ナノ結晶を作製し、アミノ化合物と二酸化炭素の反応により生成する化合物の結晶成長面への付着による抑制効果を検討する。作製した C_{60} ナノ結晶の表面解析、生成化合物の同定等により、抑制因子の解明を進める。

２．２．形状解析

C_{60} ナノ結晶を分散液より回収・解析し、ナノ結晶化対象化合物、アミン系溶媒と二酸化炭素の３物質の有無の条件下で作製したナノ結晶の内部及び表面の構造を比較する。C_{60} ナノ結晶のサイズ・形状測定には走査型電子顕微鏡（SEM：Scanning Electron Microscope, JSM6700M/JEOL）を用いた。試料は、再沈後に得られた分散液をメンブレンフィルター上に通して吸引濾過した後、導電性カーボンテープで試料台に固定した。また、測定試料のチャージアップ現象発生を防ぐ為、オートファインコーター（JFCM-1600/JEOL）を用いて白金によるスパッタ処理（10nm）を行った。（測定条件：真空下、加速電圧：15kV、放出電圧：10A）

２．３．成長抑制原因物質の同定

再沈法における導入溶媒に、200μlのアミン系溶媒を加えた混合溶媒に対し、所定量の二酸化炭素を溶解、反応させ、生成物を固体NMR等にて評価し、生成化合物を同定する。IRスペクトルの測定には、フーリエ変換赤外分光光度計（FT-IR：Fourier Transform Infrared Spectroscopy, IRPrestige-21/SHIMADZU）を用いた。測定法はKBr錠剤法、ATR法で行った。熱重量減衰の測定には熱重量測定装置（TGA：Thermo Gravimetry Analyzer, TG/DTA 6200/SII）を用いた。白金パンを用い、窒素雰囲気下で上限900℃まで温度を上げて測定を行った。また下記手順にて、測定サンプルを作製した。まず、C_{60}（80mg）をS-(−)-1-phenylethylamine（100ml）中に投入し溶液を作製し４日間攪拌した。次いで、エバポレーターを用いて大部分

の溶媒を除去し、タール状の物質を得た。methanolを注ぎ遠心分離にかけて上澄み（S-（−）-1-phenylethylamine, methanol）と沈殿物に分離させた。沈殿物を乾燥させ、茶褐色の粉末を得た。この茶褐色粉末をtolueneに投入し、再び遠心分離にかけ、上澄み（C_{60}，toluene）と沈殿物に分離させた。その後、乾燥させ黒色粉末を得た。

3．結果と考察

3．1．カルバミノ系化合物の生成がC_{60}ナノ結晶の結晶成長抑制作用に与える影響

再沈法における最適な良溶媒・貧溶媒種の組み合わせに関して、鋭意検討中であるが、S-（−）-1-phenylethylamineを添加剤としてではなく、良溶媒として導入した場合でも貧溶媒にmethanol, ethanol を選択した場合、再沈直後から結晶成長が抑制できることを確認した。この条件にて析出するナノ結晶の分子量を測定すれば、C_{60}とS-（−）-1-phenylethylamine間の化学結合・修飾[2]状態を明らかにできる。そのため、ナノ結晶の質量分析を行ったところ、C_{60}とS-（−）-1-phenylethylamineの間に化学結合・修飾[2]の有無の確認を行った。しかし、得られたMSスペクトルから確認できた分子量はC_{60}のみであり、化学結合は確認できず、C_{60}とS-（−）-1-phenylethylamineとの相互作用の特定には未だ至っていない。

そこでまず、二酸化炭素とアミノ系化合物が反応し生成するカルバミノ系化合物による結晶成長抑制効果を検討するため、SS-（−）-1-phenylethylamineと類似した分子構造を持つ新たな4種の溶媒を使用し、C_{60}ナノ結晶を作製し、その後、条件等を相互比較することで、結晶成長抑制作用の解明を試みた。S-（−）-1-phenylethylamineと類似した分子構造を有するアミノ系溶媒として、（a）R-（+）-1-phenylethylamine,（b）2-phenylethylamine,（c）*N*-1-methylaniline,（d）anilineを選定した（図5）。その結果、aniline, *N*-1-methylanilineでは、結晶成長抑制効果が確認できない一方、(a) R-（+）-1-phenylethylamine, (b) 2-phenylethylamine では、R-（+）-1-phenylethylamineと同様に、結晶成長抑制効果が確認でき、用いるアミノ系溶媒の級数や二酸化炭素との反応性が結晶成長抑制作用に著しく寄与するといえる。アニリンでは、電子供与性であるアミノ基が芳香環に直結しているとN原子上の非共有電子対の電子が芳香環に供与されることで、アニリンが共鳴構造をとり安定化することが知られている。そのため、二酸化炭素との反応が低下し、カルバミン酸系化合物は生成しないと考えられる。その結果、C_{60}と相互作用し得るカルバミン酸系化合物が、ナノ結晶成長分散液中に存在せず、結晶成長は抑制されない。その一方、二酸化炭素と反応しカルバミン酸系化合物を生成するphenylethylamineやbenzylamineを用いた場合、R-（+）-1-phenylethylamineと同様に顕著に結晶成長抑制効果を発揮する。これらアミノ系溶媒の検討により、アミノ化合物と二酸化炭素から生成するカルバミン酸塩が結晶成長抑制の重要因子である可能性を見出した。

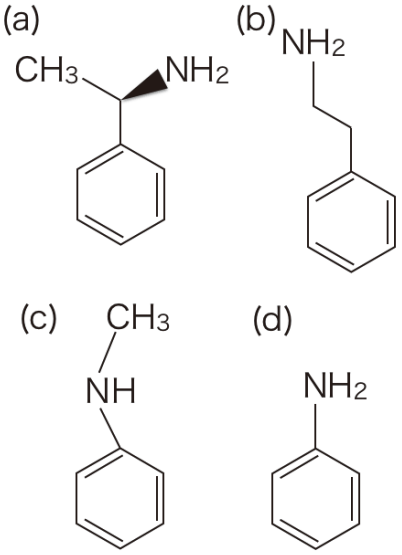


図5　用いた良溶媒の構造式
（a）*R*-(+)-1-phenylethylamine
（b）2-phenyl-ethylamine
（c）*N*-1-methylaniline
（d）aniline

3．2．カルバミノ系化合物が修飾したC_{60}ナノ結晶の溶解性

代表的なC_{60}誘導体であるPCBM（テトラヒドロフラン［6,6］-Phenyl-C61-Butyric Acid Methyl Ester（フェニルC61酪酸メチルエステル））[5]が、C_{60}とは全く異なる溶解挙動を示しことを参考に、カルバミノ系化合物修飾C_{60}ナノ結晶の溶解性を評価した。溶解性の検討として、試料として2. 3. の手順で得た黒色粉末、溶媒としてTetrahydrofuran（THF）を用いて検討を行った。純粋なC_{60}のTHFに対する溶解度は、0.000mg/mlである。そのため、図6（左）に示すように、THFに溶解することなく、沈殿物が生じる。一方、黒色粉末をTHFに添加したところ、黒色粉末は溶解し、茶色を呈する溶液となり、明らかに溶解性を示している。これにより、カルバミノ系化合物修飾C_{60}ナノ結晶が、PCBM同様に、溶解性が向上し、THFに溶解し易くなったためであると考えられる。

3．3．カルバミノ系化合物とC_{60}ナノ結晶との化学結合

C_{60}ナノ結晶とカルバミノ系化合物間の化学結合を評価するため、2. 3.の手順で得た黒色粉末を使用し、FT-IR

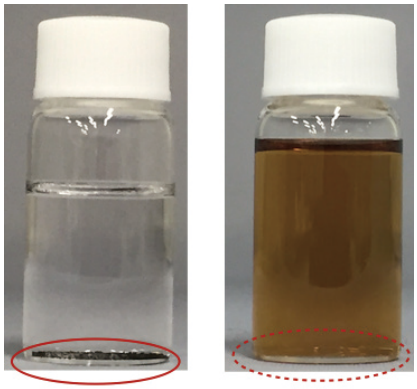
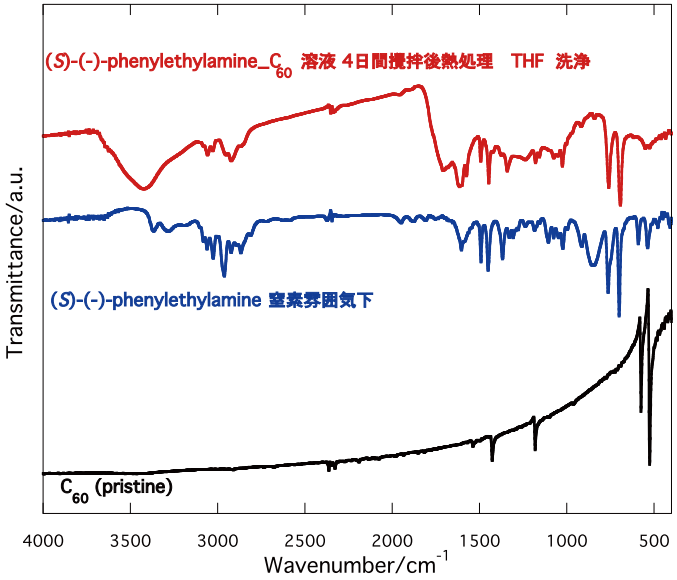


図６　THF に対する溶解性
（左：C_{60}，右：S-（-）-1-phenylethylamine_C_{60}）

の測定を行った。FT-IRによる測定の結果を図７に示す。C_{60} 由来のピークは 525 cm^{-1}, 575 cm^{-1}, 1180 cm^{-1},1427 cm^{-1}, 1538 cm^{-1} の５つであるが、黒色粉末では 525 cm^{-1} のみが確認できた。これは純粋な C_{60} が大幅に減少した、あるいはなくなったことを示している。低波数側のピークのみが確認できるのは、C_{60} の誘導体としてよく知られている PCBM と同様[1] である（図８）。また、1722 cm^{-1} に新しくカルボニル-C=O のピークが出現している。カルボニルの出現はアミノ化合物と二酸化炭素との反応によるものだと考えられる。また、S-（-）-1-phenylethylamine では 3300 cm^{-1} 付近にあった２本の NH 伸縮が黒色粉末では１本になっている。これは、アミノ基 $-NH_2$ が何かと結合し、-NH になったことが理由だと考えられる。



（赤）：S-(-)-1-phenylethylamine 修飾 C_{60}
（青）：S-(-)-1-phenylethylamine
（黒）：C_{60} pristine

図７　FT-IR スペクトル

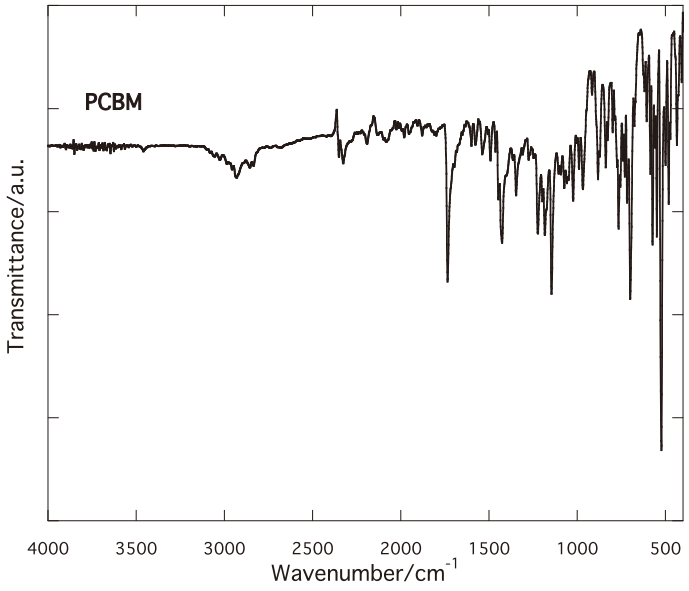


図８　PCBM の FT-IR スペクトル

3．4．カルバミノ系化合物のC60ナノ結晶への修飾が重量減衰に与える影響

カルバミノ系化合物のC_{60}ナノ結晶への修飾が、重量減衰に与える影響を評価した。図9に得たTGA曲線を示す。黒線がC_{60}、赤線が黒色粉末の重量減衰曲線である。C_{60}に関しては800℃で大きな重量減衰を確認することができる。一方、黒色粉末では、確認できない。また、黒色粉末の300℃付近までの減衰は残留溶媒、それ以降の減衰は、カルバミノ系化合物修飾C_{60}ナノ結晶の減衰に由来すると考えられる。また、C_{60}同様に、800℃で大きな重量減衰を確認できないのは、代表的なC_{60}誘導体であるPCBMと同様の挙動[2)]である。

3．5．カルバミノ系化合物によるC60ナノ結晶の結晶成長抑制メカニズム

カルバミノ系化合物修飾C_{60}ナノ結晶の溶解挙動、化学結合および重量減衰の評価を元に、カルバミノ系化合によるC_{60}ナノ結晶の結晶成長抑制メカニズム（図10）を提案する。はじめに、C_{60}とアミン化合物が反応し、化学結合を形成する。C_{60}とアミン化合物の化学結合後、アミノ基が

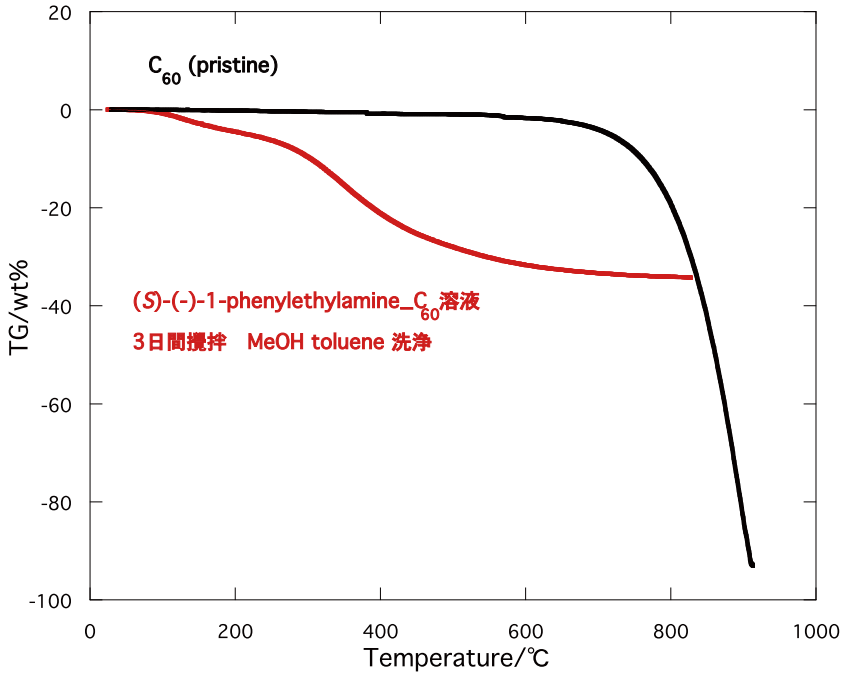


図９　PCBM の TGA 曲線
（赤）：S-(-)-1-phenylethylamine 修飾 C_{60}
（黒）：C_{60} pristine

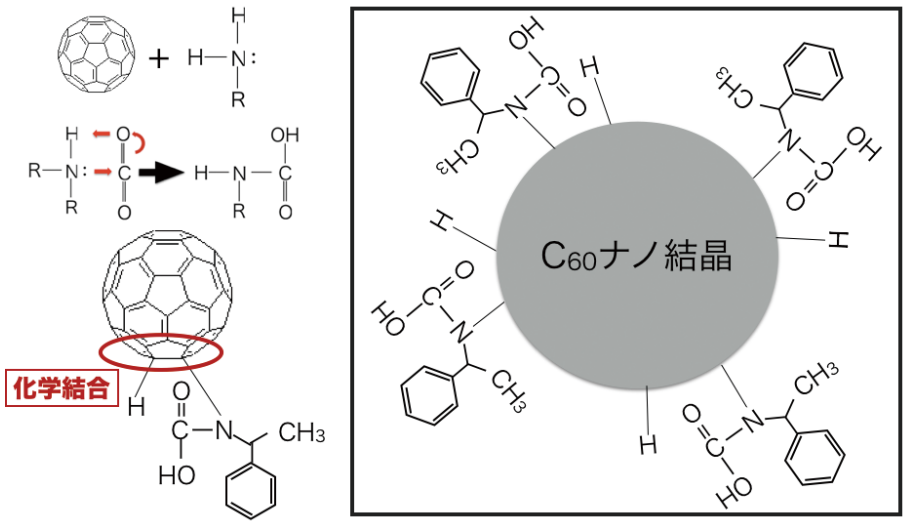


図 10　カルバミノ系化合物による C_{60} ナノ結晶の結晶成長抑制メカニズム

二酸化炭素と反応し、カルバミノ系化合物とC_{60}ナノ結晶との新しいC_{60}誘導体が生成すると考えられる。この反応が、C_{60}ナノ結晶表面で起こり、立体障害により、C_{60}ナノ結晶の結晶成長が抑制されると考えられる。

4．総　括

本研究では、高い抗酸化作用を有し化粧品への応用が期待されるC_{60}を対象に、界面活性剤フリーでのC_{60}ナノ結晶作製技術の開発を目指し、C_{60}ナノ結晶の結晶成長抑制メカニズムを検討した。電子顕微鏡を用いて、C_{60}ナノ結晶成長抑制効果を有するのは、アミノ基が芳香環に直結していないアミノ化合物であり、大気下でカルバミノ系化合物を形成するアミン系溶媒であることを明らかにした。また、アミノ化合物と二酸化炭素が反応し生成するカルバミン酸化合物がC_{60}ナノ結晶の成長抑制に関わっている可能性を見出した。結晶成長抑制されたC_{60}ナノ結晶（黒色粉末）の溶解性、化学結合、重量減衰挙動を評価することにより、次に示すC_{60}ナノ結晶の結晶成長抑制メカニズムが提案できる。はじめに、C_{60}とアミノ化合物が化学結合を形成し、アミノ化合物のアミノ基部分と二酸化炭素が反応し、カルボニル基を持つC_{60}誘導体が形成する。この反応がC_{60}ナノ結晶表面の至る所で生じ、立体障害が大きくなる結果、他のC_{60}分子間の接近を阻害し、結晶成長が阻害される。本研究で明らかにした成長抑制因子の特定は、再沈法を用いたナノ結晶の精緻なサイズ制御を多くの有機化合物で達成にも応用できると考えている。

余計な操作、化合物を使用することなくナノ結晶のサイズを精緻に制御できれば、化粧品における添加剤使用量の削減に繋がり、本来所望する効果発現を増大させるだけでなく、添加剤による生体への悪影響も減少させることが可能と考える。

（引用文献）

1）篠原久典, 齋藤弥八, “フラーレンの化学と物理”, 名古屋大学出版会(1997).
2）谷垣勝己, 菊地耕一, 阿知波洋次, 入山啓治, “フラーレン～魅惑的な新物質 群、C60とその仲間達～”, 産業図書(1992).
3）E. Kwon, H. Oikawa, H. Kasai and H. Nakanishi, Cryst. Growth Des., 7, 600（2007）.
4）H. Kasai, H. S. Nalwa, H. Oikawa, S. Okada, H. Matsuda, N. Minami, A. Kakuta, K. Ono, A. Mukoh and H. Nakanishi, Jpn. J. Appl. Phys. 31, L1132（1992）.
5）K. Chen et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 1193（1993）.
6）松尾豊, “有機薄膜太陽電池の科学”, 化学同人(2011).

マイコスポリン様アミノ酸誘導体の電荷共鳴吸収を基盤とする新規天然由来サンスクリーン材料

大阪大学大学院工学研究科

森　直

The UV-protective ability of mycosporine-like amino acids (MAAs) has been well documented, but not much explored nor investigated. Indeed, this effect is believed to serve as a protecting capability of marine organisms from solar radiation. Nevertheless, the effective UV absorption by MAAs has not been easily correlated to neutral MAA structures. In this study, the origin of UV-protecting ability of MAAs was elucidated by experimental spectroscopy and theoretical investigations. The absorption maxima of mycosporine-related molecules in the UVA region were practically unaffected over a wide range of pH 4-10 and only slightly blue-shifted at pH 1-2. It was revealed that the zwitterionic nature of the amino acid residue facilitates the protonation to the chromophoric 3-aminocyclohexenone and 1-amino-3-iminocyclohexene moieties and the operation of the charge resonance in the protonated species well accounts for their allowed low-energy transitions in the UVA region. The theoretical calculations for the protonated forms well reproduced the observed transition energies and oscillator strengths of MAAs with slight systematic overestimations. This study clearly demonstrated that the 3-aminocyclohexenone as well as 1-amino-3-iminocyclohexene moieties, which are readily protonated at a wide range of pH, are responsible for the UV-protective ability of aqueous solution of MAAs. Based on these considerations, together with the study on the stability and photoliability of the species, we further tried to develop the novel sunscreens that absorb in the different wavelength that covers whole the UVA regions.

1．緒　言

紫外線（UV）は、急性皮膚反応や皮膚がんなどを誘発することが知られており、特に太陽光の大半を占めるUVA（320 ～ 400nm）は、天候に関わらず年中一定量が地表に達するため、また、ガラスをも透過して室内に侵入することが問題となっている。したがって、「日常的なUVAからの保護」が社会的ニーズとなってきている。国内外において、様々な種類のUV防御剤（サンスクリーン）が市販されているが、現行製品は、主に芳香族系合成有機化合物が使用されており、

①光励起によるメラニンの生成、付随するかゆみやアレルギーの誘発の問題

②合成化学物質が化粧品に利用されることによる消費者イメージの悪化

③光安定性・分解物の副作用などの問題

などの課題が残っている。一方、サンスクリーン市場は国内だけで340億円にも達しており、国外市場も考えると、その改善策を確立することができればコスメトロジーに与えるインパクトは極めて大きいものと考えられる。

マイコスポリン様アミノ酸（MAA、図1）は芳香族基を有しない天然物であり、UVA2（320 ～ 340nm）の効果的な吸収材となることが古くより知られている。MAAは海産藻類が産することが知られていたが、天然からはごく微量しか得ることができず、またいわゆる有機合成的手法による生成は困難であった。ところが最近、遺伝子組換放線菌を用いた生物学的合成（微生物による合成）により、代表的なMAAであるシノリンの大量生産が可能となり、工業化への展望が開けた。しかしながら、サンスクリーンとしての製品化やさらなる開発・改良に必要とされるMAAの物性研究は、ほとんどなされていないのが現状である。また、シノリン単独の素材のみでUVB（280 ～ 320nm）やUVA1（340 ～ 400nm）といった全波長領域の紫外線をカバーすることはできないため、MAAの吸収機構を活用した、より広範なサンスクリーン剤の開発が望まれている。本研究では、MAAに特徴的な吸収機構を解明し、それを活用することで類縁体構造を有するこれら波長域の新たな紫外線吸収材の開発を行い、これまでの有機系サンスクリ

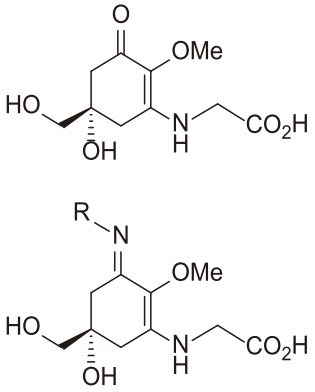


図1



New Natural Sunscreens based on Biologically Produced Mycosporine-like Amino Acids through their Efficient Charge Resonance Absorption

Tadashi Mori

Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka University

ーンに置き換わる、天然由来の新規サンスクリーン材を開発することが目的である。

2．方　法

本課題では新規な天然由来UV防御材（サンスクリーン）の開発にあたり、主として次に挙げる3つの目標を定めて研究を進めた。

2．1．マイコスポリン様アミノ酸(MAA)誘導体の吸収機構の解明

・各種分光測定に加え、最先端の量子化学計算を併用し、通常では容易に理解できないMAAの吸収メカニズムを解明し、以下の研究に資する理論的基盤を得る。

高精度の量子化学計算を用いることで、様々な化学種の電子状態の予測が可能となってきた。しかしながら、よく用いられるTD-DFT計算などは、比較的良好な結果が高速で得られるという報告が散見される一方、電子状態の記述において様々な不具合も指摘されている。本研究ではより高精度なクラスター展開型の計算を併用することで、より厳密に遷移エネルギーを見積もることを検討する。また、溶媒効果についても理論的なアプローチを試みる。実験的には、有機溶媒と水中でのスペクトル変化を考察するとともに、水溶液のpH依存性を検討し、吸収機構の足掛かりを得る。

2．2．より吸収特性の良いMAA誘導体の創出

・先の結果を踏まえ、量子化学計算を併用しながら、280～400nmにおける特定の波長の紫外線を強く吸収する複数の誘導体の最適構造を設計、または設計指針を取得する。
・吸光度の確保に関して、溶媒極性など環境因子の効果の検討を進める。
・吸収波長、吸収能力を担保しながら生物合成の優位性を活かせる設計へと転換する。

シノリンはMAAの一種であり、芳香環は有していないが、330nm付近に極大吸収波長を有し、特に皮膚へUVの影響が大きいUVA2（320～340nm）の効果的なサンスクリーンとなる。このような単一の化学種の吸収は、通常1つの吸収帯のみで構成されているため、単独の素材のみでUVB（280～320nm）やUVA1（340～400nm）といった全波長領域の紫外線をカバーすることは難しい。MAA類縁体構造を有するこれら波長域の新たな紫外線吸収材の開発が進めば、例えば複数の誘導体を混在させるなどにより、サンスクリーンとしての用途の飛躍的な拡大が見込まれる。そのためには、シノリンの吸収帯であるUVA2領域のモル吸光係数の向上と、他の波長領域（UVBやUVA1）に大きな吸収能を有する化合物の設計および開発が必要である。量子化学計算を用いる分子構造・スペクトル予測を活用した先述の方法論により、合理的なターゲット誘導体を提案し、高機能材料の開発スピードの向上に結び付ける。

2．3．MAA誘導体の分解挙動、物性研究を鍵とする人体に優しいサンスクリーンへの展開

・熱、酸素などに対する安定性を精査し、分解様式の特定を進める。
・分解物に関し各種分光学的手法を用いてその物性を明らかにする。
・種々の要因による分解機構を解明、フィードバックし、より安定な誘導体を設計する。

MAAは実験的には一定の安定性を有することがわかっているが、商品化においては長期的な保存や多様な条件下での安定性評価など、さらなる詳細な検討が必要である。MAAは電子密度の高いオレフィン部位を持ち、酸素やラジカルに対し不安定となりうるため、保存状態によっては分解物を生成する。このような分解産物の特定と物性研究は、化粧品素材として展開する予定のMAAの安全性を担保する上で必須であるだけでなく、分解を抑制する条件探索にも資すると期待できる。複雑な分解機構すべてを解明することは難しいが、その主要なプロセスを明らかとすることで、将来的には屋外壁面部材の退色防御剤といった汎用的工業用製品だけでなく、生体適合性を発揮でき得る医療用光学材料などへの展開をも視野に入れることができ、経済的波及効果も大きいものと考えられる。

3．結果と考察

3．1．マイコスポリン様アミノ酸(MAA)誘導体の吸収機構の解明

本研究の主たる検討対象であるMMAのUV吸収帯を形成する基本骨格は、3-アミノシクロヘキセノン、または1-アミノ-3-イミノシクロヘキセンである。中性状態において、これらの系では、単純な置換アルケンに比較すればπ系の共役のため遷移エネルギーの低下が期待されるものの、サンスクリーンとして機能するほどのエネルギー領域には到底及ばない。理論計算による予測では、置換基などの存在により吸収波長の多少の移動は認められるものの、最大300nmまでの吸収にとどまると示唆された。すなわち、この化合物の構造そのままで作用する機構は考えにくい。また、極めて高いUV吸収能を考えると、この化合物から分解して生成する不純物による機能とも考えにくい。

検討の経緯の詳細は省略するが、最終的に、3-アミノシクロヘキセノンあるいは1-アミノ-3-イミノシクロヘ

キセン骨格がプロトン化され、連続する5元素間で電荷共鳴を起こすことで遷移エネルギーの著しい低下がみられ、サンスクリーンに必要とされるUV吸収能を取得することが明らかとなった（図2）。この状態では、分子全体にHOMOおよびLUMO軌道が非局在化することで、遷移エネルギーの低下が引き起こされるとともに、吸光係数も飛躍的に増大する。このような化学種を想定した理論計算を行うと、見事に実験的に得られるスペクトルを再現することができた。すなわち、MAAの特異的なUV吸収能はそのプロトン化体の電荷移動共鳴が鍵であることを世界で初めて明らかとすることができた[1)]。また、さらに興味深いことに、アミノ酸残基のツビッターイオン性により、水中では広範なpH領域（pH=4～10）で、MAA誘導体がプロトン化状態を維持できることも明らかとなり、このことが本質的な溶液状態における強いUV吸収能の獲得につながっていることも明らかとすることができた。このような作用機構に基づくUV吸収は斬新でありかつインパクトの強いものであったため、関連分野内外において様々な研究に引用されている。また、総説や書籍にも発表直後から引用され始め、本分野での先導的な研究となったものと自負している[2,3)]。

3．2．より吸収特性の良いMAA誘導体の創出

より吸収特性の良いマイコスポリン様アミノ酸（MAA）誘導体の創出に関しては、種々のシノリン誘導体候補に関して、まずは従来型の経験的考察による分子設計を行い、それらのうちの代表的な選定化合物に関して汎密度関数法、クラスター展開法による高精度量子化学計算を行った。母体シノリンのカバーするUVA2（320～340nm）以外の波長領域に吸収を持つ化合物として、一群の誘導体が見出され、UVB（280～320nm）とUVA1（340～400nm）をそれぞれ吸収領域とする有効な誘導体に分類するとともに、構造物性相関を詳細に検証した。さらに多角的に解析によって、相当数の候補化合物群を提案するとともに、吸収波長や吸光度における物性マッピングを達成することができた。今後のバイオ技術改良により入手ルートにおける問題解決を図りつつ、より容易かつ安価に入手可能な誘導体の分子設計へとフィードバックすることで、より効果的、効率的な材料開発へとつなげたい。

3．3．分解挙動、物性研究を鍵とする人体に優しいサンスクリーンへの展開

より人体に優しいサンスクリーンへと発展させるためには、サンスクリーンを実際に利用するシーンにおける安定性などがあわせて問題となる。そこで、MAA誘導体の種々の要因（加熱や光など）による分解機構を解明するとともに、より安定な誘導体の設計へとフィードバックし、また、分解物に関し各種分光学的手法を用いてその物性を明らかにすることとした。多数の少量分解物が含まれており困難を極めたが、反応系における可能な化学反応プロセスの考察、質量分析、紫外可視、円二色性、蛍光スペクトル、核磁気共鳴スペクトルによる追跡、ならびにクロマトグラフィーなどの結果を総合的に勘案することで、少なくとも主要な複数の酸化性分解物の特定に至った。これを足掛か

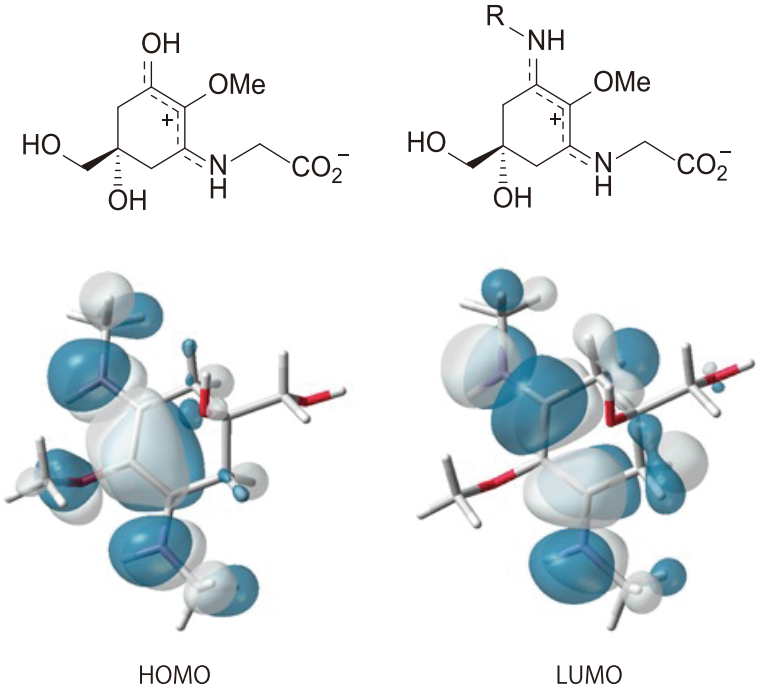


図2

りに、作用機構の考察へとフィードバックし、一連の分解物の推定が可能となった。また、これら分解物の各条件下での生成量の追跡などの詳細を検討することで、その作用機構の詳細をも明らかとすることができた。これらの知見を活用して合理的にシノリンの安定性向上を検討することが可能となり、必要条件も明らかとなった。今後の継続検討により、商品化へもつながるものと期待している。また、本研究の主題であるコスメトロジー、即ち化粧品材料への展開にとどまらず、コスト面での問題が解決すれば、工業用・建材用UV防御剤（壁面などの退色防止剤）への展開も視野に入ってきた。

4．総　括

有機物や無機物を用いたサンスクリーンの開発は、国内外で精力的に進んでおり、とくに企業での研究が盛んである。製品としても、化粧品業界から多数のものが市場に出回っている。日焼け止め化粧品は、国内外ともに、今後大きな発展が見込まれる市場であるのは言うまでもなく、国内市場は340億円程度【富士経済・化粧品マーケティング要覧2014より】、世界市場としては58億ドル【Chipalkatti, 13th International Sun Protection Conference, 2015, London】であり、さらに成長する可能性が高い。一方、これらのほとんどは、芳香族性の有機物合成化学品を基盤にしたものであり、アレルギーなどの実害にもつながっているなど、人体に優しい生物由来の製品とはなっていない。一時的な利用であれば十分な性能を有しているが、有害な紫外線のうち、太陽光の大半を占めるUVA（320～400nm）は、天候に関わらず年中一定量が地表に達し、ガラスをも透過して室内に侵入するため、UVAからの保護の目的としては、「日常使い」可能なサンスクリーンの開発が急務といえる。また、幼児などへの用途も急増している。このような点で、現在主流な有機物、無機物を主成分とするサンスクリーンに代わる、生物由来のサンスクリーンの開発が望まれている。しかしながら、その学術的、応用的研究は、国内外ともにほとんど進んでいない。本研究は、放線菌を利用する生体的な合成法が最近になり確立された、マイコスポリン様アミノ酸（MAA）の主成分である、シノリンに着目したものであり、代替サンスクリーン開発への実現可能性が最も高いものと期待される。

本研究では、その特異な吸収機構を、理論的検証を交えながら世界で初めて明らかとすることができた。また、類縁体の構造・スペクトル予測による新規構造体の探索に関して、化学的、理論的考察に基づいた種々のシノリン誘導体に対して、汎密度関数法、クラスター展開法による高精度量子化学計算を行い、母体シノリンのカバーするUVA2（320～340nm）以外の波長領域として、UVB（280～320nm）やUVA1（340～400nm）をそれぞれ吸収領域とする有効な誘導体も確認できた。さらに、化学構造とスペクトルの波長シフトの相関、典型的な置換基効果などに関する知見も得ることができた。また、MAAの精製、安定性、および分解物の解明に関して、化学反応プロセスの考察、質量分析、紫外可視、円二色性、蛍光スペクトル、核磁気共鳴スペクトルによる追跡、ならびにクロマトグラフィーなどの結果を総合することで、いくつかの酸化性分解物の特定に至り、主要なプロセスの確立に成功した。また、これら分解物の各条件下での生成量の追跡などの詳細を検討することで、その作用機構の一端を明らかとすることにも成功した。これらの知見を用いて安定性を向上させる条件探索を合理的に行い、分解を一定程度遅延させる保存条件をも見出すことができた。

本研究で得られた知見は効果的なUV防御能を有するMAA誘導体の設計指針となり、世界的なトレンドである「天然由来」・「環境にやさしい」・「安全・安心」といった付加価値のあるサンスクリーンの開発を可能とするものである。さらに解析、開発が進めば、現存のサンスクリーン市場に置き換わる技術・製品ともなりうるものと期待される。本研究の成果が今後のサンスクリーン業界、ひいてはコスメトロジーにわずかならず影響を与えることを期待する。

謝　辞

本研究にご支援をいただきました公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に篤く御礼申し上げます。また、実質的な共同研究者である長瀬産業松山恵介氏、大阪大学西嶋政樹氏に感謝いたします。

（引用文献）

1）Matsuyama, K.; Matsumoto, J.; Yamamoto, S.; Nagasaki, K.; Inoue, Y.; Nishijima, M.; Mori, T. pH-Independent charge resonance mechanism for UV protective functions of shinorine and related mycosporine-like amino acids. *J. Phys. Chem. A* **119**, 12722-12729（2015）.

2）Shailendra, R.; Jainendra, P. S.; Sinha, P. R. P Cyanobacterial factories for the production of green energy and value-added products: An integrated approach for economic viability renewable and sustainable *Energy Reviews* **69**, 578-595（2017）.

3）Kageyama, H.; Waditee-Sirisattha, R. Mycosporine-like amino acids as multifunctional secondary metabolites in cyanobacteria: From biochemical to application aspects, *Studies in Natural Products Chemistry*, **59**, 153-194（2018）.

ミャンマー産ハーブの美白効果の検証と美白成分の解析

富山大学和漢医薬学総合研究所
森田　洋行

The bark and wood of *Hesperethusa crenulata* Roem., *Naringi crenulate* (Roxb.) Nicols., *Limonia acidissima* Linn. belonging to Rutaceae, as well as *Premna integrifolia* Linn. (Verbenaceae) have been used to produce traditional cosmetics, also known as "Thanaka" cream, for over 2000 years in Myanmar. Applying the paste to the skin of the face, arms, and legs have been believed to make it smooth, clear, and cool, and also increases the production of collagen and elastin to prevent wrinkles and skin aging, excessive facial oil, serious acne, pimples, blackheads, and whiteheads. Among the plants used as "Thanaka", the most popular ones among customers are the former three, whereas the last one is especially popular in the Tanintharyi Region, in the southern part of Myanmar. However, *P. integrifolia* has not been investigated in a scientific, evidence-based manner. Hence, we evaluated *in vitro* melanin deposition regulatory, anti-inflammatory, antibacterial, and antifungal activities of the water, methanol, and chloroform extracts of *P. integrifolia*, and found that all extracts showed the above mentioned activities. In particular, the chloroform extract showed the highest potency in the anti-melanin deposition and anti-inflammatory activities, suggesting the cosmetic effectiveness of this plant. In order to further clarify the cosmetic effectiveness of this plants from the chemical component point of view, we carried out the isolation of the compounds from the chloroform extract, and obtained 21 compounds including six new lignans. Interestingly, ten compounds exhibited strong or moderate anti-melanin deposition activities, providing new insight into the effectiveness of this plant as a cosmetic ingredient. Additionally, five compounds showed weak melanogenesis enhancing activities. The present results also suggest that the cosmetic anti-melanin deposition efficacy of the *P. serratifolia* wood should be discussed with consideration of the melanogenesis enhancing activities of the chemical constituents in this plant.

1．緒　言

ミャンマーでは、ミカン科植物*Hesperethusa crenulatax* Roemの枝木・樹皮・根のペーストが“タナカ”という名で伝統的に天然美肌化粧品として用いられている。現地では、この化粧品には、毛穴収縮作用と皮脂の過剰分泌阻害作用による肌の保湿効果、抗酸化作用による肌荒れの軽減効果、さらには皮膚病予防の効果があると言われている。また、日焼止めとして、肌の老化防止効果を目的に使用されている。一方、ミャンマー南部のベイやダウェイでは、クマツズラ科植物*Premna integrifolia* L.（異名：*Premna serratifolia*）がタナカとして利用されている。この植物は、インドでは美肌化粧品には利用していないが、解熱、解毒、貧血改善、皮膚障害治療、健胃薬、抗炎症、肝障害改善、便秘、強心薬などの多岐に亘る症状に有効なアーユルヴェーダ生薬の一つとして、頻繁に利用されている[1)]。既に、タイ産*H. crenulatax*については、水や有機溶媒抽出液が強い抗炎症・抗酸化作用、比較的強いチロシナーゼ阻害活性、及び、弱いながらも抗菌活性を示すことが明らかになった[2)]。また、同時に、細胞毒性の極めて弱いことが報告されるに至り、*H. crenulatax*の美肌化粧品素材としての有効性が間接的に示唆されている。産地は不明であるが、同植物に含まれるクマリン誘導体が抗菌活性や抗酸化作用を示すことも報告されている[3)]。*P. integrifolia*については、アルカロイドやポリフェノールなどの単離が報告されている[4－13)]。しかし、化粧品素材として検証した例は極めて少ない[4, 10－12)]。伝統的に使用されてきた天然資源の中には、経験的に効果が認識されて長年用いられているものが数多くあり、その科学的検証により医薬品及び化粧品の開発に繋がっているものが多々ある。また、同一の植物であったとしても、天然資源の化学成分は気候風土によって左右され、他の地域のものとは異なった効能を示すことがあることから、ミャンマー産の*P. integrifolia*には、新たな美肌化粧品天然素材としての可能性が大いに期待される。本研究では、ミャンマー産の*H. crenulatax*と*P. integrifolia*の化粧品素材としての機能性を比較することで、*P. integrifolia*に新たな美肌化粧品素材としての科学的根拠を与えることを目的とした。



Verification of whitening effect of Myanmar herb and analysis of whitening component

Hiroyuki Morita

Institute of Natural Medicine, University of Toyama

2．方　法

2．1．化合物抽出液の調整

ベイとヤンゴンで購入したミャンマー産の*P. integrifolia*及び*H. crenulatax*の木部・樹皮・根を破砕機を用いて粉末化し、水、メタノール、クロロホルムに各々一晩浸すことで化合物の粗抽出液を調整した。

2．2．抽出液の生物活性評価と単離した化合物のメラニン産生調節活性評価

メラニン産生調節活性は、細井らの方法に準じ[14]、100μMのα-メラノサイト刺激ホルモン(α-MSH）と0.25μMの3-イソブチル-1-メチルキサンチン（IBMX）にてメラニン色素の産生を誘導したB16-F10マウス黒色細胞の培養液に抽出液を加え、1N NaOHで細胞融解後に360nmの吸光度を測定することにより、メラニン色素産生に及ぼす影響を評価した。メラニン産生調節活性には、アルブチンをコントロールとして用いた。単離した化合物のメラニン産生調節活性評価についても同様に行った。抗炎症作用は、予め抽出液を作用させたマウスマクロファージ様細胞RAW264.7細胞にリポ多糖（LPS）で炎症を誘起した場合と、LPSで炎症を誘起したRAW264.7細胞に抽出液を作用させた場合の一酸化酸素産生抑制能を測定した[15]。抗菌作用は、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌、セレウス菌、大腸菌、及び肺炎桿菌、抗真菌作用はカンジダの培養液に抽出液を加え、これらの増殖阻害を測定することにより評価した[16,17]。

2．3．化合物の単離・構造決定

クロロホルム抽出液をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供して分画した後、さらに、カラムクロマトにおいて分画操作を繰り返すことにより、化合物を単離・精製した。得られた化合物の化学構造は、NMR、HR-ESIMS等の各種スペクトル分析、化学変換、及び計算化学を用いて決定した。

2．4．化合物14と21のチロシナーゼ阻害活性評価

2.5mMのL-3、4-ジヒドロキシフェニルアラニン（L-DOPA）と化合物**14**または**21**（終濃度6.25、2.5、25、50、100、及び200μM）を、Sigma社から購入した80units/mLのマッシュルーム由来チロシナーゼに作用させ、37℃の条件下で、492nmの吸光度を3分毎に30分間測定することでチロシナーゼ阻害活性を評価した。

2．5．化合物14と21のcAMP伝達経路阻害活性評価

100μMのα-メラノサイト刺激ホルモン（α-MSH）と0.25μMの3-イソブチル-1-メチルキサンチン（IBMX）にてメラニン色素の産生を誘導したB16-F10マウス黒色細胞の培養液に、100μMの化合物**14**または**21**を加え、37℃で24時間培養後、mRNAを抽出した。次いで、抽出したmRNAを鋳型として逆転写反応を行い、得られた1本鎖DNAを鋳型として、色素細胞の分化増殖制御因子(MITF)、チロシナーゼ(TYR)、チロシナーゼ関連タンパク質1（TRP-1)、チロシナーゼ関連タンパク質2（TRP-2）遺伝子に特異的なプライマーを用いて各遺伝子を増幅し、その発現量を精査した。3リン酸デヒドロゲナーゼ(GADPH)のmRNAの発現をコントロールとした。

3．結　果

3．1．*P. integrifolia*と*H. crenulatax*粗抽出液の生物活性評価

*P. integrifolia*と*H. crenulatax*の木部・樹皮・根に係る水、メタノール、及び、クロロホルム粗抽出液について、メラニン産生調節活性、抗炎症活性、抗菌活性、抗真菌活性を測定した。その結果、いずれの粗抽出液においても、弱い抗炎症作用と抗菌活性が認められた。それらの中でも、クロロホルム粗抽出液については抗炎症作用が最も強かった。さらに、興味深いことに、*P. integrifolia*木部のクロロホルム粗抽出液が、81.3μg/mLの穏和なメラニン産生

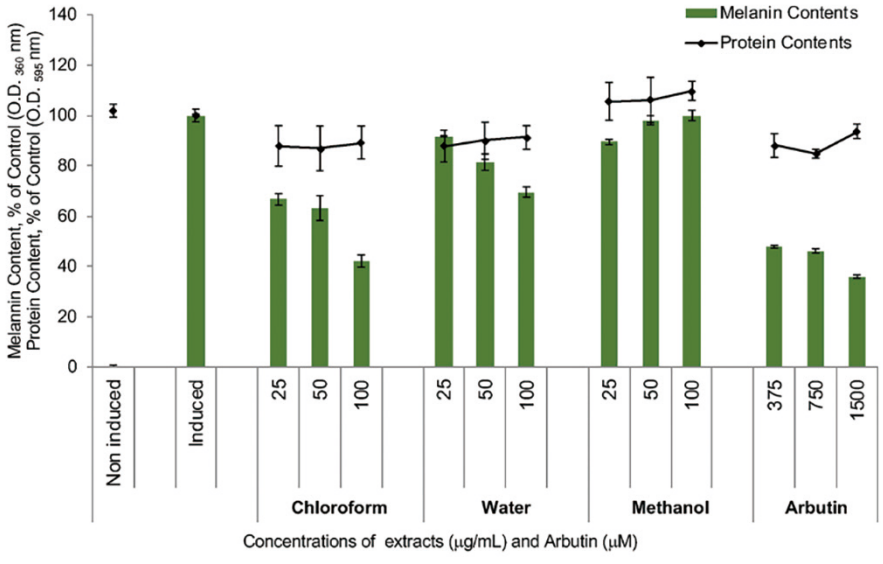


Fig. 1　Anti-melanin deposition activities of chloroform, water, and methanol extracts of the *P. integrifolia* wood against α-MSH and IBMX-induced melanogenesis and protein contents in B16-F10 cell line.

抑制活性を示すことが明らかになった（Fig. 1）。これまでに、*P. integrifolia*の化粧品素材としての検証が行われていないが、本結果は*P. integrifolia*の化粧品としての効果を示唆するものである。

3．2．*P. integrifolia*木部由来クロロホルム粗抽出液の化学成分の単離と化学構造決定

そこで、*P. integrifolia*の木部3kgから得たクロロホルム粗抽出液を各種クロマトグラフィーを用いて化合物の精製を繰り返し、10種の精製化合物を得た[18]（Fig. 2）。これらについて、各種スペクトル分析を用いて化学構造を決定した結果、2種の新規テトラヒドロフラン型リグナンtaungtangyiols A（**1**；20mg）とB（**2**；4mg）、及び8種の既知フロフラン型リグナンasarinin（**3**；10mg）、sesamin（**4**；55mg）、paulownin（**5**；20mg）、4*α*-hydroxysesamin（**6**；50 mg）、4*α*,8*α*-dihydroxysesamin（**7**；2.5mg）、xanthoxyol（**8**；10mg）、1*α*-hydroxy-6-epipinoresinol（**9**；15mg）、1*α*-hydroxypinoresinol（**10**；7mg）であることが判明した。セサミンやその類縁体には、強い抗酸化作用や抗炎症作用、メラニン産生調節活性が報告されている。

一方、この精製課程において、本クロロホルム粗抽出液には、単離した量が少なかったので化学構造を決定するまでには至らなかったものの、セサミン類縁体が含まれている可能性が^{1}H NMRによる解析により示された。

さらに、他の含有成分について検討するため、4.5kgの*P. integrifolia*木部から新たに得たクロロホルム粗抽出液について、再度、化合物の単離・精製を進めた。その結果、上記の化合物に加え、10種のリグナンpremnan A（**11**；1.7mg）、premnan B（**12**；1.6mg）、tauntangyiol C（**13**；3.0mg）、7,9-dihydroxydolichanthin B（**14**；8.1mg）、premnan C（**15**；2.1mg）、（3*R*、4*S*）-4-（1,3-benzodioxol-5-ylcarbonyl）-3-[（*R*）-1-（1,3-benzodioxol-5-yl）-1-hydroxymethyl] tetrahydro-2-furanone（**16**；1.6mg）、（−）-aptosimon（**17**；3.4mg）、（−）-diasesamin-di-γ-lactone（**18**；17.1mg）、（+）-epi-sesaminone（**19**；4.0mg）を、2種の既知トリテルペンoleanonic acid（**20**；4.2 mg）と（2*α*, 3*α*）-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid（**21**；3.3mg）とともに得ることができた[19, 20]（Fig. 2）。新たに得たリグナンのうち、**11**-**14**は新規リグナンであった。また、**16**につい

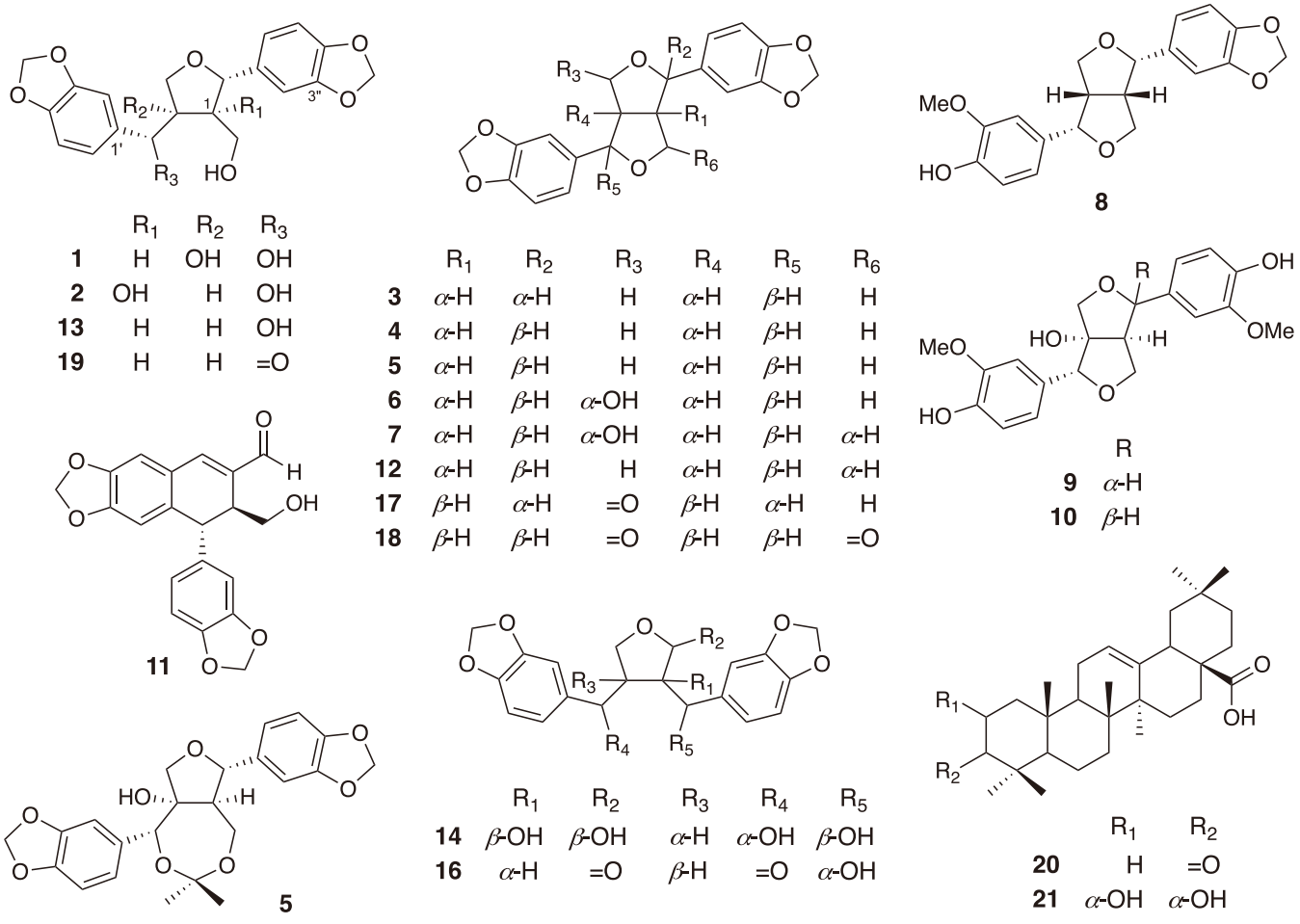


Fig. 2　Structures of isolated compounds from chloroform extracts of the *P. integrifolia* wood.

ては、合成品として既に報告されていたが、天然資源から得られたのは今回が初めてである。一方、**15**は、抽出液のHPLC分析においては存在を検出できなかった。このことから、**5**は、抽出・精製課程において生じた人工物であると推測される。

3．2．*P. integrifolia*木部から得た化合物のメラニン産生調節活性評価

まず、単離した**1**–**10**について、メラニン産生調節活性を測定した[18]。その結果、既知フロフラン型リグナン**4**–**8**が10μM以下のIC_{50}値でB16-F10マウス黒色細胞のメラニン産生を強く抑制すること、及び、新規テトラヒドロフラン型リグナン**1**と**2**がIC_{50}値で50.7μMと40.9μMの穏和なメラニン産生抑制活性を示すことが明らかになった(Table 1)。

Table 1　Antimelanin deposition activities of **1**–**10**.

Compound	IC_{50} (μM)	Compound	IC_{50} (μM)
1	50.7	**6**	< 10
2	40.9	**7**	< 10
3	<10	**8**	< 10
4	<10	**9**	> 100
5	<10	**10**	> 100
Arbutina[a]	364.4		

[a]apositive control.

次に、化合物**11**–**21**について、メラニン産生調節活性を評価した結果、新規テトラヒドロフランリグナン**14**及び既知トリテルペン**21**が各々18.4μMと11.2μMのIC_{50}値で、B16-F10マウス黒色細胞に細胞毒性を示さずにメラニン産生を抑制できることが判明した（Fig. 3)。また、既知トリテルペン**20**は、50μMの濃度ではB16-F10マウス黒色細胞に細胞毒性を示すものの、それ以下の濃度においては、B16-F10マウス黒色細胞のメラニン産生を17.7μMのIC_{50}値で抑制することが示された(Fig. 4)。

一方、これらの化合物とは逆に、新規フェニルナフタレン型リグナン**11**、新規フロフラン型リグナン**12**、新規テトラヒドロフラン型リグナン**13**と**14**、及び既知フロフラン型リグナン**16**が、弱いながらもメラニン産生増強活性を示すことが明らかになった(Fig. 3)[19]。

3．3．化合物14と21のチロシナーゼ阻害活性評価

メラニン産生抑制活性を示した化合物のうち、新規テトラヒドロフランリグナン**14**と既知トリテルペン**21**について、チロシナーゼ阻害活性を評価した。しかし、いずれの化合物もチロシナーゼ阻害活性を示さなかった(Fig. 5)。

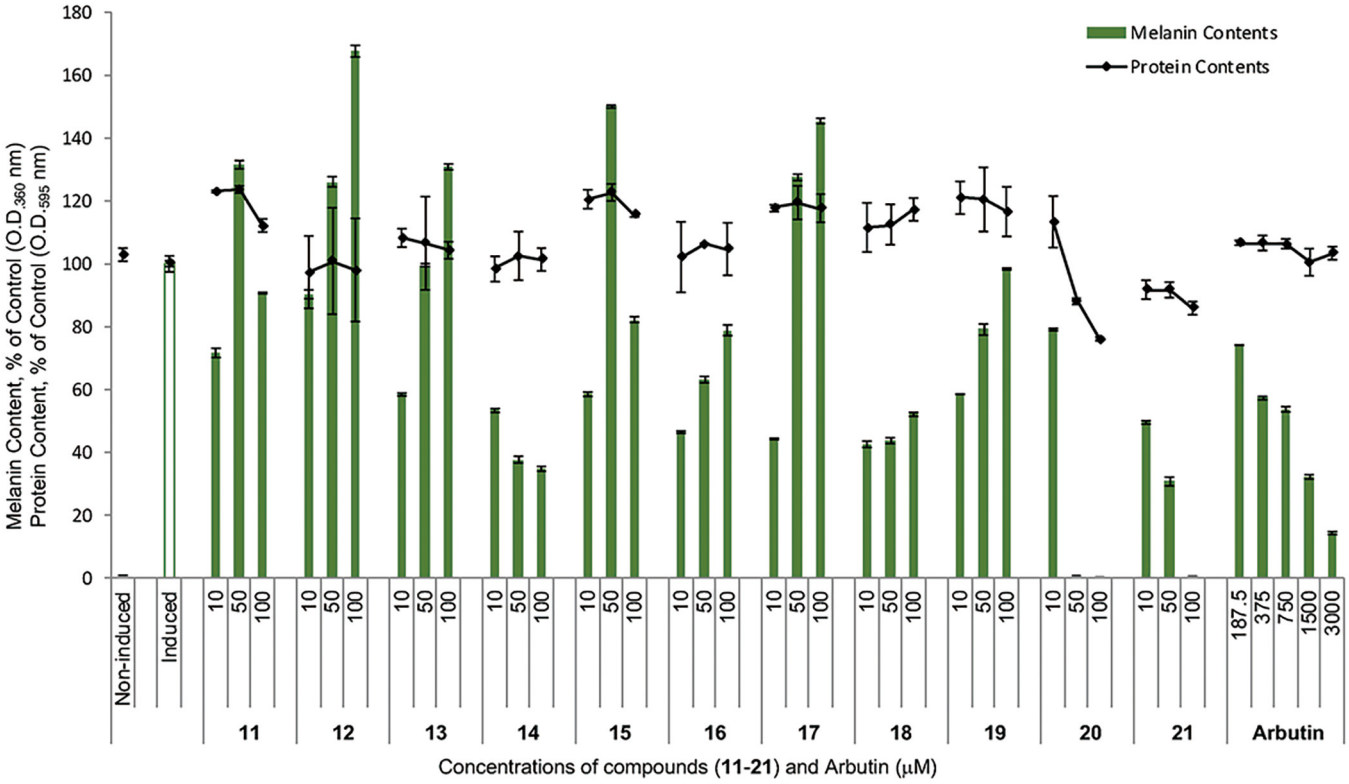


Fig. 3　Melanin deposition regulatory activities of **11**–**21** against α-MSH and IBMX-induced melanogenesis and protein contents in B16-F10 cell line.

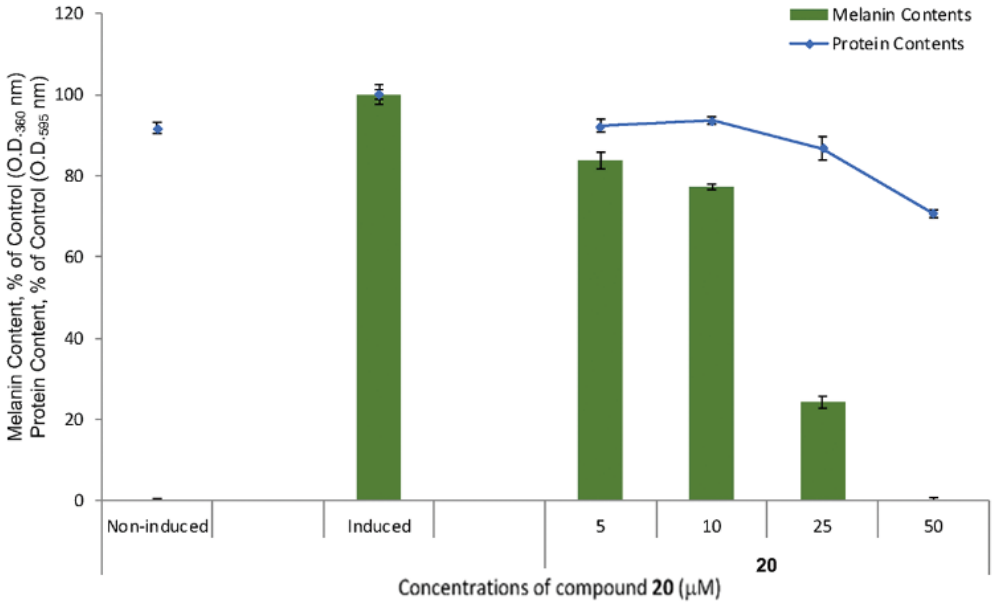


Fig. 4 Anti-melanin deposition activity of **20** against α-MSH and IBMX-induced melanogenesis and protein contents in B16-F10 cell line.

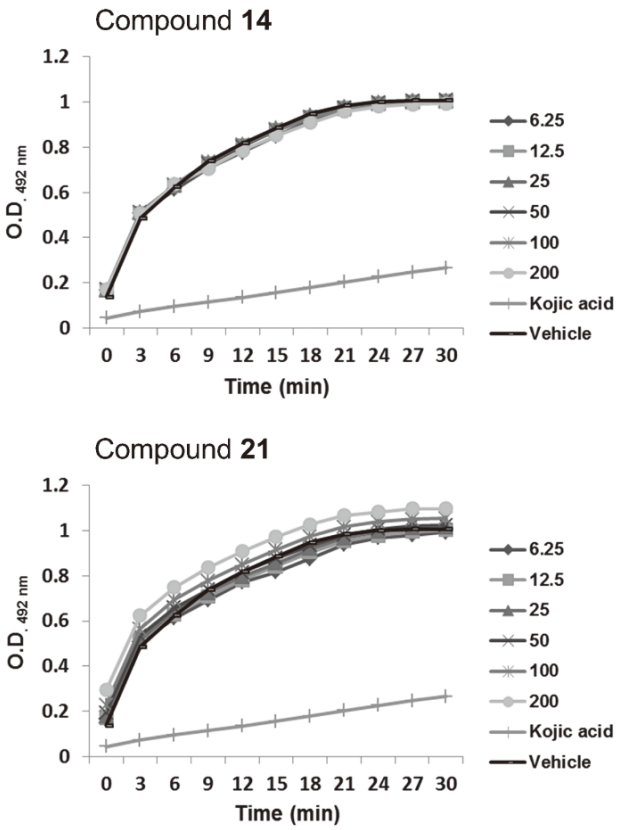
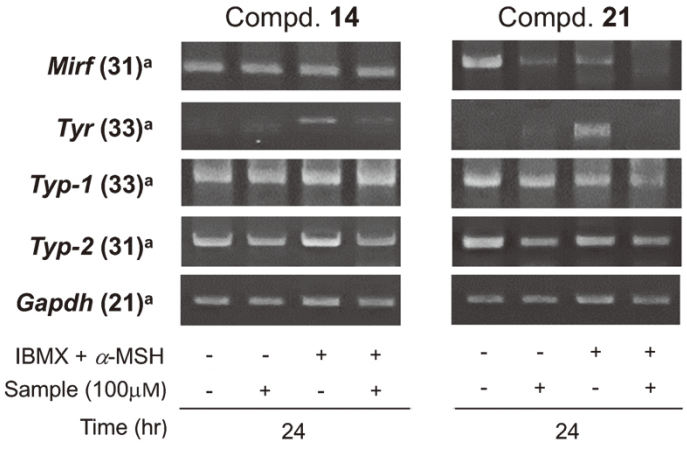


Fig. 5 Tyrosinase inhibitory activities of **14** and **21**



a( ): The number of PCR cycles

Fig. 6 Effects of **14** and **21** on the expression of key melanogenesis mRNAs.

3．4．化合物 14 と 21 の cAMP 伝達経路制御機構の解析

化合物 **14** と **21** のメラニン産生抑制活性のより詳細な機構の解明を目指し、メラニン合成経路の一つである cAMP 伝達経路に及ぼす影響を、MITF、TYR、TRP-1、及び TRP-2 の mRNA の発現量を精査することで評価した。その結果、化合物 **14** が TYR mRNA の発現を抑制することにより、メラニン産生抑制活性を示していることが示された。一方、化合物 **21** は、その上流にある MITF mRNA の発現に影響を及ぼすことにより、メラニン産生抑制活性を制御していることが明らかになった（Fig. 6）。

4．考　察

本研究において、*P. integrifolia* 木部のクロロホルム粗抽出液が、その樹皮や根の水及びメタノール抽出液よりも強い抗炎症作用を示すことに加え、穏和なメラニン産生抑制活性をも示すことが明らかになった。ミャンマーでは、伝統化粧品であるタナカは、その木部をペースト状にし、顔などに塗布するやり方で用いられている。ペーストとしての利用は、脂溶性化合物の効果も期待できる使用法である。本研究における結果は、*P. integrifolia* の化粧品としての効果を示唆するだけでなく、そのペーストとしての利用方法についても科学的根拠を与えたものと考える。

さらに、本研究においては、*P. integrifolia* 木部のクロロホルム粗抽出液から化合物の単離・精製を行うことにより、*P. integrifolia* に含まれるセサミンなどのリグナン類がそのメラニン産生抑制活性を示すことで、化粧品としての効果をもたらしている可能性が示された。しかし、本研究において、単離した化合物の中には、弱いながらもメラニン産生増強活性を示すものが見い出されている。クロロホルム抽出液ではメラニン産生抑制活性が示されていることから、*P. integrifolia* の化粧品としての効果は示唆されるが、そのメラニン産生抑制活性においては、本植物に含まれるメラニン産生抑制活性化合物と増強活性化合物の総和的効果によって、適度に化粧品としての効果を発揮しているものと推定される。また、化合物 **14** と **21** において、メラニン産生抑制の制御機構に違いが見られる。メラニン合成は、Wnt シグナル伝達経路によっても制御されるため、他のメラニン産生抑制活性を示した化合物についても含め、cAMP 伝達経路のみならず、Wnt シグナル経路についても詳細に検討し、その総和的効果を解明していくことが必要である。

一方、*P. integrifolia* の木部 *H. crenulatax* の主成分及び化粧品としての活性本体については、クマリン誘導体の可能性が指摘されており、成分の違いによる *H. crenulatax* と *P. integrifolia* の化粧品としての効果の違いに興味が持たれる。また、ミャンマーにおいては、*H. crenulatax* と *P. integrifolia* 以外にも、他のミカン科植物である *Naringi crenulate* と *Limonia acidissima* の木部などもタナカの名で伝統的化粧品として利用されている。*H. crenulatax* はミカン科に属すことから、これらの植物中にもクマリン誘導体が含まれ、化粧品としての効果を発揮している可能性はあるが、これらの植物の化学成分と化粧品としての相関関係についても興味が持たれるところである。

5．総　括

本研究においては、*P. integrifolia* が、*H. crenulatax* とは異なった含有成分により、伝統的化粧品としての効果を発揮している可能性が示された。しかし、本研究は、*P. integrifolia* のメラニン産生調節活性について検討しているが、抗酸化作用や抗炎症などの効果について詳細に検討するには至っていない。今後、精製した化合物の抗炎症作用や抗菌活性の評価を進めるとともに、*P. integrifolia* と *H. crenulatax* の各抽出液、及び単離・精製した化合物のジフェニルピクリルヒドラジルラジカル（DPPH）消去活性を指標とした抗酸化作用や抗炎症作用などについて、他の化粧品としての効果についても詳細に検討する必要がある。

謝　辞

計算科学を用いて化合物の絶対配置を決定するにあたり、ご支援賜りました東京大学大学院薬学系研究科教授 阿部郁朗先生及び大学院生 星野翔太郎氏に心より感謝申し上げます。

本研究を助成対象課題として採択いただきました公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に心から御礼申し上げます。

（引用文献）

1）Mali P.Y. *Premna integrifolia* L.: A review of its biodiversity, traditional uses and phytochemistry. *Anci. Scie. Life*, 35, 4-11 (2015).
2）Wangthong S., Palaga T., Rengpipat S., Wanichwecharungruang S.P., Chanchaisak P., Heinrich M. Biological activities and safety of Thanaka (*Hesperethusa crenulata*) stem bark. *J. Ethnopharmacol.*, 132, 466-472 (2010).
3）Nayar M.N.S., Bhan M.K. Coumarins and other constituents of *Hesperethusa crenulata*. *Phytochemistry*, 11, 3331-3333 (1972).
4）Rathore R.S., Prakash A., Singh P.P. *Premna integrifolia* Linn, a preliminary study of anti-inflammatory and anti-arthritic activity. *Rheumatism*, 12, 130-134 (1977).
5）Gopal R.H., Purushothaman K.K. Effect of plant

isolates on coagulation of blood: an in vitro study. *Bull. Medico. Ethno. Botanical Res*., 5, 171–177 (1984).

6) Dash G.K., Patrolm C.P., Maiti A.K. A study on the anti-hyperglycaemic effect of roots of *Premna corymbosa*. Rottl. *J. Nat. Remedies*, 5, 31–34 (2005).

7) Jothi E.T., Suryalakshmi P.K.P.V., Srinivasababu P. Gastroprotective potential of *Premna serratifolia* Linn. leaves against aspirin included ulcer in albino rats. Pharmacologyonline, 3, 189–198 (2010).

8) Karthikeyan M., Deepa M.K. Anti-inflammatory activity of *Premna corymbosa* (Burm.f.) Rottl. & Wild. leaves extracts in Wistar albino rats. *Asian Pac. J. Trop. Med*., 4, 510–513 (2011).

9) Karthikeyan M., Deepa M.K. Antinociceptive activity of *Premna corymbosa* (Burm.f.) Rottl. & Wild. *J.Basic Clin. Physiol. Pharmacol*., 21, 347–356 (2010).

10) Rajendran R., Basha N.S. Antimicrobial activity of crude extracts and fractions of *Premna serratifolia* Linn. root. *Medicinal Plants*, 2, 33–38 (2010).

11) Yadav D., Masood N., Luqman N., Brindha P., Gupta M.M. Antioxidant furofuran lignans from *Premna integrifolia*. *Industrial Crops and Products*, 41, 397–402 (2013).

12) Habtemarian S., Varghese G.K. A novel diterpene skleton: Identification of a highly aromatic, cytotoxic and antioxidant 5-methyl-10-demethyl-abietane type diterpene from *Premna serratifolia*. *Phytother. Res*., 29, 80–85 (2015).

13) Biradi M., Hullatti K. Bioactivity guided isolation of cytotoxic terpenoids and steroids from *Premna serratifolia*. *Pharm. Biol*., 55, 1375–1379 (2017).

14) Hosoi J., Abe E., Suda T., Kuroki T., Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1α, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid, *Cancer Res*., 45 1474–1478 (1985).

15) Morita H., Nishino H., Nakajima Y., Kakubari Y., Nakata A., Deguchi J., Nugroho A.E., Hirasawa Y., Kaneda T., Kawasaki Y., Goda Y. Oxomollugin, a potential inhibitor of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production including nuclear factor kappa B signals. *J. Nat. Med*., 69, 608–11 (2015).

16) Nguyen H.M., Ito T., Kurimoto S., Ogawa M., Win N.N., Hung V.Q., Nguyen H.T., Kubota T., Kobayashi J., Morita H. New merosesquiterpenes from a Vietnamese marine sponge of *Spongia* sp. and their biological activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett*., 27, 3043–3047 (2017).

17) Woo S., Win N.N., Wong C.P., Ito T., Hoshino S., Ngwe H., Aye A.A., Han N.M., Zhang H., Hayashi F., Abe I., Morita H. Two new pyrrolo-2-aminoimidazoles from a Myanmarese marine sponge, *Clathria prolifera*. *J. Nat. Med*., 72, 803–807 (2018).

18) Win N.N., Woo S., Ngwe H., Prema, Wong C.P., Ito T., Okamoto Y., Tanaka M., Imagawa H., Asakawa Y., Abe I., Morita H. Tetrahydrofuran lignans: Melanogenesis inhibitors from *Premna integrifolia* wood collected in Myanmar. *Fitoterapia*, 127, 308–313 (2018).

19) Woo S., Hoshino S., Wong C.P., Win N.N., Awoufack M.D., Prema, Ngwe H., Zhang H., Hayashi F., Abe I., Morita H.. Lignans with melanogenesis effects from *Premna serratifolia* wood. *Fitoterapia*, 133, 35–42 (2019).

20) Woo S., Wong C.P., Win N.N., Hoshino S., Prema, Ngwe H., Abe I., Morita H. A new tetrahydrofuran type lignan from *Premna integrifolia* wood. *Nat. Prod. Commun*., 14, 113–116 (2019).

メーキャップ化粧品の光学的機能評価に向けた人工皮膚の開発

芝浦工業大学工学部機械工学科
山田　純

In the current cosmetics industry, when developing make-up cosmetics and evaluating its appearance, a visual assessment has been performed by applying the cosmetics to human's skin. An evaluation using artificial skin using a resin material has been attempted, but it is not used for final evaluation of cosmetics. Since the present artificial skin cannot completely reproduce the characteristics of light propagation inside and surface of the living human skin, the appearance of the artificial skin is different from the living skin. In this study, we proposed a method that can individually adjust three optical properties and surface structures to create the artificial skin reproducing the appearance of the living human skin.

As for the absorption coefficient, it was shown that the mass concentration of dye and the absorption coefficient have linearity, so that the absorption coefficient can be controlled. With regard to the scattering coefficient and phase function, it was suggested that the scattering coefficient and phase function of the skin can be reproduced by controlling the particle diameter and particle volume fraction based on Mie theory. From these results, it was shown that artificial skin reproducing the optical properties of living human skin can be created by individually controlling the absorption coefficient by some dyes and the scattering coefficient and scattering phase function by white particles.

Three machining methods such as cutting, sandblasting and shaking were tried on the A5052 substrates to reproduce the characteristics of surface reflection on the human skin. Subsequently to the developing the surface structure, the surface structure data was measured using a laser microscope. These data indicated that it is possible to create a structure that can reproduce the optical characteristics on the human skin surface by combined several machining methods appropriately.

1．緒　言

現在の化粧品業界では，メーキャップ化粧品を開発し，その見栄えを評価する場合，実際に人の皮膚に化粧品を塗布した際の仕上がりを視感によって評価している[1-3]．しかし，この方法では被験者ごとの肌の違いや，同一被験者であっても，肌の状態が変化するために，定量的な評価は困難である．

これまでに，樹脂素材を使用した人工皮膚が製作されており，それを用いた評価も試みられている．しかし，化粧品の最終評価には利用されていない．これは，現在ある人工皮膚では，皮膚内部の光伝播が十分に考慮されていないからである．色味は似ていても，実際の皮膚の質感と異なっていることが一つの理由である．

人の皮膚の見え方については，Computer Graphics（CG）分野を中心に盛んに研究が進められている[4-7]．従来の研究として，皮膚の見え方を再現する手法の一つとして，二方向反射率分布関数（BRDF：Bidirectional Reflectance Distribution Function）をCGに適用したモデルが考えられてきた[4, 5]．しかし，この技術を用いて人の皮膚を再現した場合，実際の人の皮膚の持つ透明感などの質感を感じられないことが課題とされていた．そこで，近年では皮膚内部での散乱光を二方向散乱面反射分布関数（BSSRDF：Bidirectional Scattering Surface Reflectance Distribution Function）をCGに適用したモデルが注目されるようになってきた[6, 7]．これらの研究結果から，皮膚―空気界面での光反射性質だけでなく，皮膚内部での散乱及び吸収（光物性）を考慮した反射光を再現することにより実際の人の皮膚に近い質感が再現されることが示された．

人工皮膚作製に関する従来の研究は，化粧分野では，化粧品の塗りやすさの試験や評価[8]を目的としたものがある．また，医療分野では，レーザー治療や画像診断技術の研究[9]，超音波診断や針・メスなどの医療器具の練習用[10]として人工皮膚の開発が行われてきた．これらの人工皮膚では，人の皮膚の硬さや動摩擦係数など機械的性質の再現に関する研究が多く，光学特性に着目したものでも皮膚の見た目の再現が目的ではなく，使用するレーザーやx線など限定的な波長での光学特性の再現とされている．一方，人の皮膚の見た目を再現することを目的とした人工皮膚の作製に関する研究は少ない．Ivaら[11]は，人工皮膚で人の皮膚の分光反射率を再現することを目的に研究を行った．その結果，シリコーン樹脂に馬の血液と脂肪乳剤の主成分の一つであるイントラリピッドを用いて，人の皮膚に近い分光反射率を持った独自の9層の人工皮膚を開発した．また，今後は，真皮層及び皮下組織も同様に色再現を行っていく必要があることを結論として述べている．前述したように，人の皮膚の見え方（質感）を再現した人工皮膚の作製には，



Development of artificial skin for optical performance evaluation of makeup cosmetics
Jun Yamada
Department of Engineering, Shibaura Institute of Technology

分光反射率の調整だけでなく，皮膚―空気界面での光反射性質と皮膚内部での散乱及び吸収を再現することが不可欠である．

筆者ら[12]は皮膚表面の構造が光反射性質に与える影響を調べ，皮膚の持つ皮溝と皮丘にある細かい凹凸の傾きの方向分布を決定することで，人の皮膚の空気―皮膚界面での光反射性質を再現できることを示した．また，筆者ら[13,14]は，非侵襲で生きた人の皮膚の光物性を計測する手法及び計測装置の開発を行い，多数の日本人の皮膚の光物性の計測を行ってきた．本研究では，これらの計測データに基づき，人工皮膚において人の皮膚の質感を再現するために，空気―皮膚界面での光反射性質及び皮膚の光物性を再現する手法の確立を目的とする．

2．方　法

2．1．光物性の制御方法

人の皮膚では，外から皮膚に入射した光のうち，一部は皮膚表面で反射されるが，残りは皮膚内部に浸透する．内部に浸透した光には，散乱されて再び皮膚の外に出ていくもの，あるいは，吸収されて熱に変わるものがある．このことから，皮膚は散乱・吸収性を持つ連続媒体と考え，次の光輸送方程式により取り扱われることが多い[15]．

$$\frac{dI(s,\boldsymbol{\Omega})}{ds}=-(\sigma_s+\alpha)I(s,\boldsymbol{\Omega})+\frac{\sigma_s}{4\pi}\int_{4\pi}p(\boldsymbol{\Omega}'\rightarrow\boldsymbol{\Omega})I(s,\boldsymbol{\Omega})d\boldsymbol{\Omega}\quad\cdots(1)$$

ここで，I（W/m^2･sr）は光の強度，$\boldsymbol{\Omega}$（－）は光の進行方向を表す単位ベクトル，s（m）はその方向の距離である．この輸送方程式には，吸収係数α（mm^{-1}），散乱係数σ_s（mm^{-1}），散乱位相関数p（－）といった光物性が現れる．これら３つの光物性が皮膚内部での光伝播を特徴付ける．

これまでの人工皮膚の製作では，上記の光物性の再現という視点がなかったことに加えて，製作された人工皮膚が，実際の皮膚と同等であることを，光物性レベルで評価されることはなかった．本研究では，散乱係数，吸収係数の可視光域におけるスペクトルが実際の皮膚と同等となる人工皮膚の製作を目指す．

具体的な手法として，透明な樹脂を母材とし，吸収係数を染料で，散乱係数及び散乱位相関数を可視光において吸収のない白色粒子で，独立に制御することにより光物性の再現を試みる．

2．2．空気-皮膚界面での光反射性質の制御方法

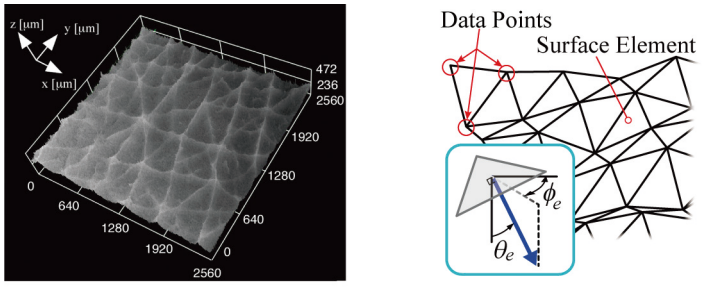
筆者らは，共焦点レーザー顕微鏡によって取得した皮膚表面構造の形状データ（Fig.1）を用いて，空気―皮膚界面での光反射性質を予測できる解析モデルを構築してきた[12]．

図１(a)のような，皮膚表面形状データは，一定間隔で記録された高さデータ群から構成される．この形状データの，隣り合うデータを結んだ三角形の表面要素(図１(b))を考え，その法線ベクトルの傾斜角度を算出する．そして，傾斜角度に関する確率密度関数としてまとめる．この確率密度関数は，Mを表面要素の数，M_{tot}を一つの形状データに含まれる，全表面要素数，$\Delta\Omega_e$を表面要素の法線ベクトルが向くθ_e，φ_e方向まわりの立体角として，(2)式で表される．

$$p_{surf}(\theta_e,\phi_e)=\lim_{\Delta\Omega e\rightarrow 0}\frac{\Delta M(\theta_e,\phi_e)}{M_{tot}\Delta\Omega_e}\quad\cdots\cdots(2)$$

これによって算出された二方向反射率は，実験から得られた皮膚表面の光反射性質と一致することが分かった．つまり，表面構造の光反射性質は，その表面要素の傾斜角度に関する確率密度関数を算出することによって評価できる．本研究では，人工皮膚作の表面形状データ（表面要素の傾斜角度に関する確率密度関数）が，実際の皮膚と同等となる人工皮膚の製作を目指す．

一般的に，人工皮膚の作製では，皮膚色に調整したシリコーン樹脂やウレタン樹脂を形成容器に流し込み，硬化させて作られる．よって，目的とする人工皮膚を実現するためには，空気―皮膚界面での光反射性質を再現できる構造を付与するための鋳型を作製する必要がある．本研究では，鋳型となる金属表面に様々な加工方法を用いて細かい凹凸を作製し，どのような加工方法が皮膚の表面構造の再現に適しているかを検証した．



(a)　　(b)

Fig. 1　(a) Surface morphology data of human skin and (b) analytical model of surface structure.

3．結果と考察

3．1．人工皮膚における光物性の再現

3．1．1．吸収係数の線形性

透明樹脂に添加する染料の質量濃度を変化させたサンプルを作製し，透過率τを分光光度計（株式会社日立ハイテクサイエンス，U-5100）を用いて測定し，以下のLambert-Beerの法則に基づき，染料の吸収係数を計測した．

$$\tau = \beta s_d, \quad (\beta = \sigma_s + \alpha) \quad \cdots\cdots (3)$$

式中のs_d（m）は光路長である．ここで，染料は母材の透明樹脂に溶解し，散乱を生じないものを用いる．そうすることで，減衰係数β（mm^{-1}）のうちの散乱係数σ_sが0となり，透過率から吸収係数が測定可能となる．本研究では，染料と透明樹脂との相性を考慮し，透明なウレタン樹脂（株式会社ポリシス，PC-00）と，日本化薬株式会社製；Yellow GN，Red B，有本工業株式会社製；Plast Blue，Plast Green，Plast Orangeの5種類の染料を使用した．

Fig.2に染料（Plast Green）の質量濃度と吸収係数のグラフを示す．Fig. 2の結果から，質量濃度と吸収係数が線形性を持つことが示された．同様の計測を行った結果，全ての染料において，質量濃度と吸収係数の線形性が示された．

3．1．2．染料の足し合わせによる吸収係数の制御

3．1．1．項の結果から，染料の質量濃度を調整することで吸収係数を制御可能であることが確認された．そこで，前述した5種類の染料をウレタン樹脂に混ぜ，人の皮膚の吸収係数の再現する人工皮膚を作製し，そのときの光物性を，本研究室で開発した光物性計測装置[13]で計測した（Fig. 3）．この際，Fig. 2の濃度に対する吸収係数の傾きα_λを全ての染料について算出し，非負の最小二乗法[16]を用いて，必要とされる染料の配合する質量濃度を求めた．その結果，人工皮膚の吸収係数は，予め計算した染料の足し合わせで得られることが確認できた．吸収係数の制御が本手法で可能である．

3．1．3．Mie理論による散乱係数の計算

媒質中の散乱係数は球形の粒子を用いた場合，Mie理論から導かれる粒子一つの散乱断面積と，粒子数密度を与えることで求められる．これまでの筆者らの研究[17]で，粒子の粒径分布を考慮したMie理論を適用することで，粒子の平均直径D_N（μm）と体積分率f_v（-）から，Fig. 4に示すように，人の皮膚の散乱係数スペクトルに近い値を再現できると予測された．しかし，この結果を基に製作した人工皮膚の散乱係数スペクトルは，大きさ，プロファイルとも予測値とは異なった．この原因は，散乱位相関数の波長依存性にある．

3．1．4．散乱位相関数の影響を考慮した散乱係数の制御

皮膚の光物性を計測した手法（RSPM）[13]では，波長

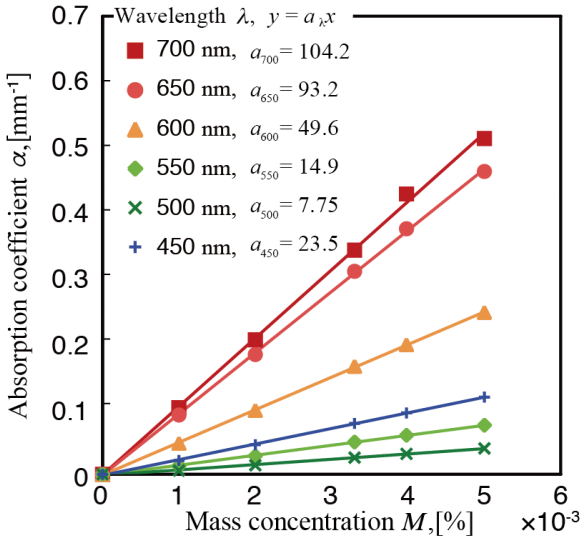


Fig. 2　Absorption coefficient of green dye samples.

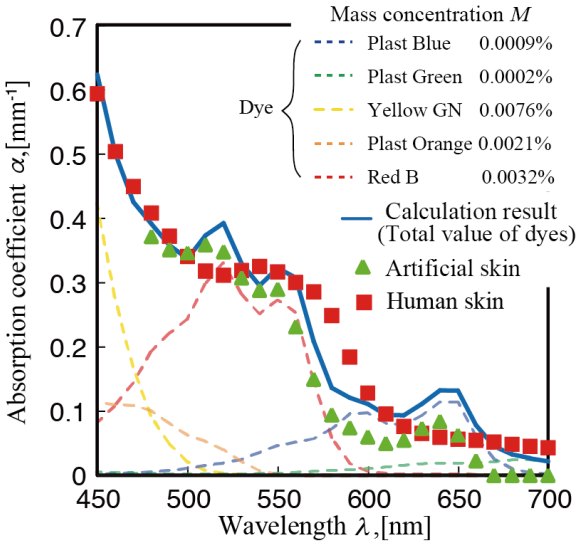


Fig. 3　Reproduction of skin absorption coefficient.

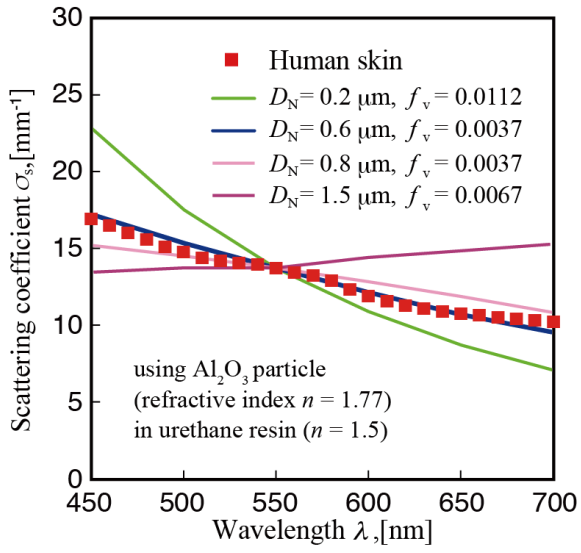


Fig. 4　Calculated scattering coefficient by Mie theory.

λ=633nmの培養皮膚の散乱位相関数[7]を与えて，逆解析を通じて散乱係数，吸収係数を推定している．しかし，実際の散乱位相関数には波長依存性があり，Mie理論においても波長の関数として散乱位相関数が導かれる．先に述べた，人工皮膚で散乱係数を再現できなかった原因は，Mie理論での予測と計測における逆解析で，散乱位相関数が異なっていたためである．

そこで，Fig. 5に示すモデルを用いて，Mie理論から算出された散乱係数(σ_{sa})，吸収係数及び散乱位相関数を皮膚の物性値として割り当て，培養皮膚の散乱位相関数を用いて逆解析により推定される値(σ_{se})を数値シミュレーションにより求めた（Fig. 6）．Fig. 6の結果から，散乱位相関数が異なる場合，σ_{sa}とσ_{se}に大きな差が生じることが分かる．また，このシミュレーションから，粒子径が0.1-0.2μmのAl_2O_3粒子を用いれば，σ_{se}が人の皮膚について計測された散乱係数スペクトルを再現できると考えられる．

本解析の検証として，D_N=0.6μmのAl_2O_3粒子（住友化学株式会社，アドバンストアルミナAA-05）を使用したサンプルを作製し，そのときの光物性をRSPMで計測した（Fig. 7）．Fig. 7の結果より，シミュレーションから予想される結果と人工皮膚の計測結果の値と傾きはよく一致し，この手法から散乱係数・散乱位相関数の制御が可能であることが示された．

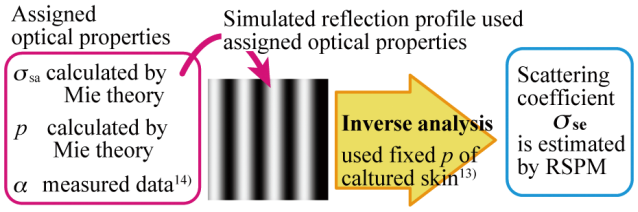


Fig. 5　Simulation flow.

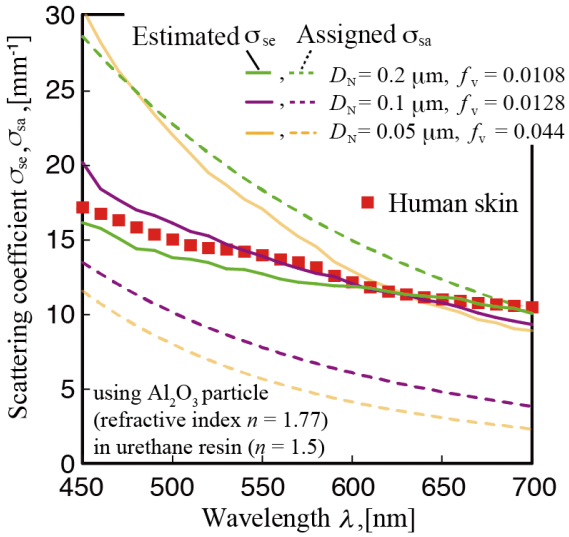


Fig. 6　Simulation of influence of scattering phase function.

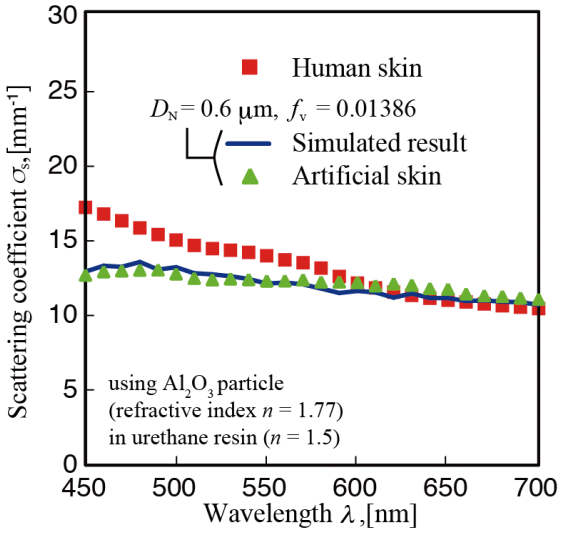


Fig. 7　Comparison of simulated result and artificial skin.

3．2．人工皮膚における空気-皮膚界面での光反射性質の再現

3．2．1．鋳型の製作方法

鋳型となる形成容器の一面に機械加工を施し，その加工法に応じて，どのような光性質を持つ表面が作られるか検討する．Table 1に，今回行った加工法を示す．鋳型は，アルミニウム合金で作製することを想定し，大きさ50×50×3mmのA5052基板を対象としてその表面に加工実験を行う．

3．2．2．試作した鋳型の評価及び光性質の予測

Fig. 8に，各加工法で処理された表面の拡大画像，Fig. 9に，各表面構造のプロファイルの一例を示す．加工法1（切削）では，約15μm程度のピーク形状が見られる．加工法2（サンドブラスト加工）では，不規則で細かい凹凸が形

Table 1　Machining to construct the surface structures on A5052 substrates.

加工法1：切削(Cutting)	カッターナイフによってランダムな方向に溝状の傷を付与する
加工法2： サンドブラスト加工(Sandblasting)	砥粒径 ϕ=425-600μmのアルミ系サンドブラスト用砂を，噴射ノズルから加工するA5052基板表面までの距離を約50mmに固定した状態で，噴射圧0.3 MPa，8分間吹き付ける．
加工法3：揺動(Shaking)	大きさW73×D73×H80の容器底部に両面テープでA5052基板を貼付け，その中に粒径 ϕ=1.6mmの球状のステンレス投射材を入れて，手動で上下に揺動させることによってA5052表面に凹凸構造を付与する．上下の揺動幅は約110mm，振動数は1分間に約200回とした．

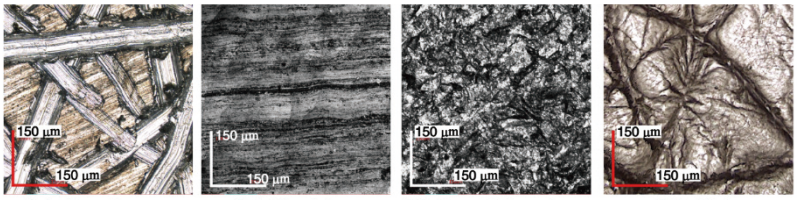


Fig. 8　Surface image of A5062 substrates after machining and human skin surface.

成されているが，その深さは約 6–12 μm 程度と見積もられる．加工法 3（揺動）は，サンドブラスト加工と類似して，不規則で細かい凹凸が見られるが，その構造は，サンドブラスト加工と比較してかなり小さく，ほとんど平滑であった．これは，手加工の方が，投射材の速度が遅かったためだと考えられる．

Fig. 10 に，各加工法によって形成された表面形状データから算出した，傾斜角度に関する確率密度関数 $p_{surf}(\theta_e, \varphi_e)$ を示す．この図より，実際の皮膚の表面構造の $p_{surf}(\theta_e, \varphi_e)$ は，傾斜角 $\theta_e = 45^\circ$ 付近でゆるやかに上昇する傾向が見られた．これは，皮溝の斜面に起因すると考えられる．同様に，切削加工の $p_{surf}(\theta_e, \varphi_e)$ で $\theta_e = 75^\circ$ 付近に小さなピークが現れるのも，溝構造の斜面によるといえる．そして，前述の確率密度関数をもとに，各表面に，光を入射角 $\theta_{in} = 45^\circ$ で入射させたときの光反射性質を予測した結果を，Fig. 11 に示す．全ての加工法において，皮膚表面の光反射性質と異なる結果となった．特に，揺動加工で作製した表面構造の光反射性質は，Fig. 11 に示されるように，正反射方向付近の二方向反射率が急激に上昇した．Fig. 10 の結果より，これは，表面がほとんど傾斜のない構造であったことが原因だと考えられる．

これらの結果から，投射材形状や加工法により，表面構造の特徴を制御できることが示された．よって，これらの適切な組み合わせが明らかになれば，実際の皮膚表面構造を人工皮膚に転写せずとも，皮膚表面構造による光性質を再現する可能性があることが示された．

3．2．3．表面構造の違いが内部での光伝播に与える影響

次に，皮膚内部での光伝播も再現した人工皮膚作製に向け，Fig. 10 に示すような，表面傾斜角度の確率密度関数の違いが，皮膚内部での光伝播にどの程度影響を及ぼすかを，数値解析によって検討した．この光伝播解析は，Fig. 12 のような解析モデルに対して，Monte Carlo 法によって行う．これは，光を，エネルギーを持つ光束とし，解析モデルに入射させる試行を繰り返すことで近似的に解を求める解析方法である．皮膚表面での光挙動は，前述のように，表面形状データから算出される，傾斜角度の確率密度関数 $p_{surf}(\theta_e, \varphi_e)$ よりに決定した．光の入射角度は $\theta_{in} = 45^\circ$ とし，光束が皮膚－空気界面に到達したとき，Fig. 5 の確

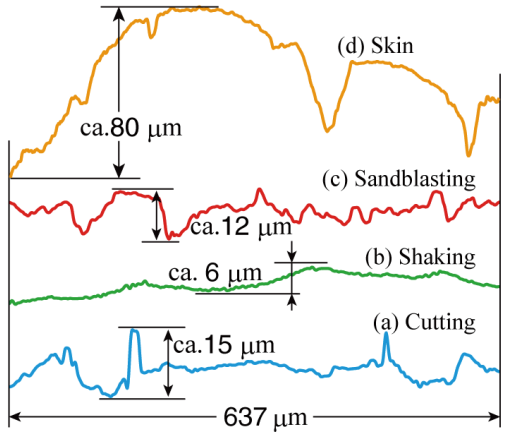


Fig. 9　Surface profile of A5052 substrates after machining and human skin.

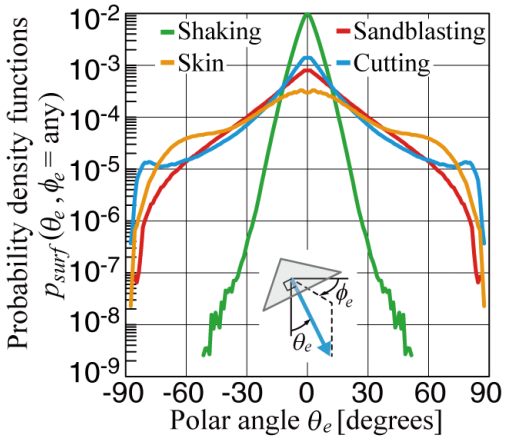


Fig. 10　Probability density function for machining surface structures and human skin.

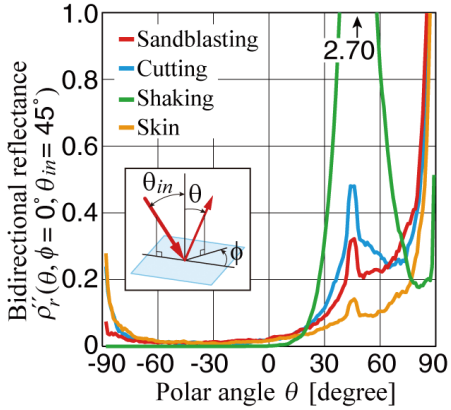


Fig. 11　Bidirectional reflectance for machining surface structures and human skin obtained by numerical analysis.

率密度関数をもとに，これが出くわす表面要素，及び，その表面要素上で反射するか，あるいは透過して皮膚内部に進むかが決定される．解析モデルの大きさは，一般的な皮膚の厚みとされる 1.9mm とし，その周囲は周期境界とした．そして，光束が，皮膚内部で吸収されるか，あるいは再び皮膚－空気界面に達して皮膚外に射出されるまで追跡する．

表面構造による光性質の違いが，皮膚内部での光伝播に与える影響を調べるために，実際の皮膚を含む各表面構造について，表面構造を透過した直後の二方向透過率を Fig. 13 に，皮膚内部で散乱されて，再び皮膚外に射出された光が到達した最大の深さと光量の関係を Fig. 14 にまとめた．

Fig. 14 の結果より，光がより深くまで到達したのは，揺動加工によるものであった．この加工法によって作られた表面構造は，Fig. 9, 10 の結果より，ほとんど傾斜がない．そのため，光がこの構造表面を透過しても，その指向性が大きく変化せず，その結果として，深さ方向に進む光が減少しなかったためである．逆に，皮膚表面を透過した光は，その指向性が低下したため，皮膚の深くまで進む前に皮膚から射出されたと考えられる．これらの結果から，皮膚表面構造は，皮膚内部の光伝播にも影響を与えることが明らかとなった．

4．総　括

本研究では，生きた人の皮膚内部での光伝播及び空気－皮膚界面での光反射性質を再現した人工皮膚の作製を目的とし，吸収係数や散乱係数・散乱位相関数の 3 つの光物性を制御する方法及び表面構造を転写する鋳型の加工方法を検討した．

吸収係数については，人工皮膚の母材となる透明樹脂に溶解する染料を用いた場合，質量濃度と吸収係数が線形性を持ち，複数の染料を組み合わせることで，吸収係数を制御可能であることが示された．散乱係数については，散乱位相関数が Mie 理論と計測における逆解析とで異なっているため，その違いを考慮した新たな解析モデルを導入した．その結果，この解析モデルから計算した値と，作製したサンプルの光物性の計測値を比較した結果，散乱係数スペクトルの一致が確認された．これらのことから，吸収係数を染料で，散乱係数・散乱位相関数を白色粒子で，独立に制御することにより，人の皮膚の光物性を再現した人工皮膚が作製可能であることが示された．

また，様々な加工方法を用いて，金属盤上に様々な表面構造を作製し，その構造が生じさせる光反射性質を分析した結果，一種類の加工方法では人の皮膚の光反射性質を再現することができないが，複数の加工方法を組み合わせることで，人の皮膚の光反射性質を再現可能であることが示された．

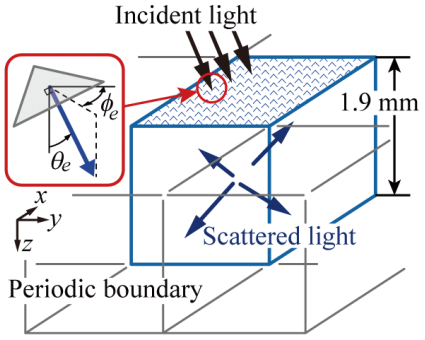


Fig. 12　Analytical model to analyze the influence of the structure of the skin surface on light propagation inside the skin.

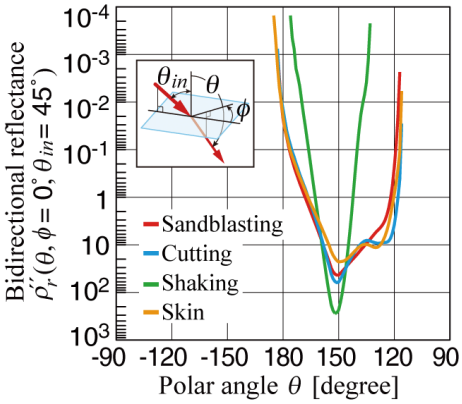


Fig. 13　Light transmittance for each direction on the surface structures obtained by the numerical analysis.

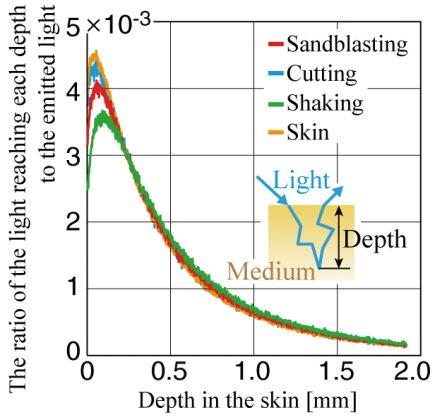


Fig. 14　Influence of the surface structure on the light propagation inside the skin.

本研究では，人工皮膚の光学的な性質を生きた人の皮膚と同等のものにするための手法を，内部と表面を個別に分けて検証した．ここでは，作製した人工皮膚の質感の評価までは行えておらず，その作製方法の検証のみであったが，これらの内部と表面の製作方法を合わせて一つの人工皮膚を作製することで，より生きた人の皮膚の質感を再現した物を作製可能になると考えられる．また，本研究では，光

学的な性質を個別に制御する手法を提案しているため，本手法を利用することで，個人差が大きく，人によって異なる皮膚の光学的な性質に合わせて，化粧品の評価に使用するための様々な種類の人工皮膚の製作できる．

謝　辞

本報告書の作成にあたり，共同研究者である河野貴裕氏(芝浦工業大学)に多大な貢献をいただいた．ここに記して謝意を表す．

(引用文献)

1) Nishimura H, Takasuka Y, Yamamoto M. Optical properties of skin gloss and development of mizumizushii-looking makeup foundation. Int. J. Cosmet. Sci., 29, 67, 2007.
2) Nishikata, N., Nishimura, H., Mohri, K., Nakamura, N. A Natural-Looking Makeup. Cosmetics & Toiletries Magazine, 112, 39-56, 1997.
3) 上原孝一，南浩治，岩本啓，長田みゆき，五十嵐崇訓，中尾啓輔，大崎和友，植松隆史，野尻尚材，樫本明生，福田啓一：透過光制御による若顔印象ファンデーションの開発．日本化粧品技術者会誌，44, 48-56, 2010.
4) Weyrich T, Matusik W, Pfister H, Bickel B, Donner C, Tu C, McAndless J, Lee J, Ngan A, Jensen HW, Gross M. Analysis of human faces using a measurement-based skin reflectance model. ACM Trans. Graphics, 25, 1013-1024, 2006.
5) Marschner SR, Westin SH, Lafortune EPF, Torrance KE, Greenberg DP. Image-based BRDF measurement including human skin. In Rendering Techniques' 99, Springer, Vienna, 131-144, 1999.
6) Alotaibi S, Smith WAP. A Biophysical 3D Morphable Model of Face Appearance. Proc. 2017 IEEE Conf. Comput. Vision and Pattern Recogn., 824-832, 2017.
7) Jensen HW, Marschner SR, Levoy M, Hanrahan P. A practical model for subsurface light transport. Proc. 28th Annu. Conf. Comput. Gr. Interact. Techniques, 511-518, 2001.
8) 菅沼薫，丹羽雅子：マッサージクリームの触感と物理物性との関係．日本化粧品技術者会誌，24, 212-219, 1991.
9) Jędrzejewska-Szczerska M, Wróbel MS, Galla S, Popov AP, Bykov AV, Tuchin VV, Cenian A. Investigation of photothermolysis therapy of human skin diseases using optical phantoms. 18th Int. School on Quantum Electron.: Laser Phys. Applications, Int. Soc. Opt. Photonics, 9447, 2015.
10) Aminzadeh R, Saviz M, Shishegar AA. Theoretical and experimental broadband tissue-equivalent phantoms at microwave and millimetre-wave frequencies. Electron. Lett., 50, 618-620, 2014.
11) Iva S, Tanabe A, Maeda T, Funamizu H, Aizu Y. Development of non-deterioration-type skin tissue phantom using silicone material. Opt. Rev., 21, 353-358. 2014.
12) Nakamura K, Ogawa T, Takata S, Yamada J. Numerical model for optical characteristics of the human skin surface. Thermal Sci. Eng., 23, 61-69, 2015.
13) Kono T, Yamada J. Development of measurement instrument for optical properties of human skin in vivo. Jap. J. Thermophys. Prop., 31, 72-80, 2017.
14) Kono T, Toma S, Nozawa K, Yamada J. Scattering and Absorption Coefficients of Human Skin in Japanese People. Proc. 1st Pacific Rim Thermal Eng. Conf., Hawaii's Big Island, 15081-1-5, 2016.
15) Siegel R, Howel JR. Thermal Radiation Heat Transfer, 3rd edn., Taylor and Francis, New York, 686-689, 1992.
16) Lawson CL, Hanson RJ. Solving Least Squares Problems, Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 161, 1974.
17) Sarasuk K, Kono T, Nakamura K, Yamada J. Effect of scattering particle size on extinction coefficient of artificial human skin. Proc. 1st Pacific Rim Thermal Eng. Conf., Hawaii's Big Island, 15111-1-5, 2016.

Ⅱ． 生体作用、安全性に関する分野

ホスファチジルイノシトールの特徴的脂肪酸組成の皮膚恒常性における役割の解析

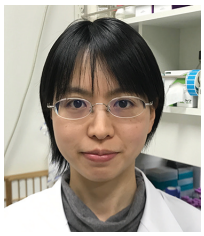
東京都健康長寿医療センター研究所
今江　理恵子

Phosphatidylinositol (PI) is a versatile lipid that not only serves as a structural component of cellular membranes, but also plays important roles in signal transduction through distinct phosphorylated derivatives of the inositol head group. PI contains stearic acid (18:0) as the predominant fatty acid at the *sn*-1 position. This fatty acid composition is formed through fatty acid remodeling by sequential deacylation and reacylation. We previously identified acyltransferases responsible for the incorporation of stearic acid into the *sn*-1 position of PI in *C. elegans* (*acl-8*, *acl-9* and *acl-10*) and mice (*lycat*). However, the biological significance of the enrichment of stearic acid at the *sn*-1 position of PI is largely unknown. In this study, we analyzed the phenotypes of *acl-8 acl-9 acl-10* triple mutants in *C. elegans* and found that the epithelial morphology was disrupted. The mutants showed defects in the amount and localization of actin filaments at the apical junction of epithelial cells. In addition, PI(4,5)P2 was significantly accumulated at the apical junction of epithelial cells. Furthermore, our genetic screen identified the ether lipid biosynthetic pathway genes *acl-7/DHAPAT* and *ads-1/AGPS* as suppressor genes of *acl-10* mutants. We found that *acl-7* mutation rescued both the reduced amount of stearic acid at the *sn*-1 position of PI and the defects at the apical junction of epithelial cells in *acl-8 acl-9 acl-10* triple mutants. Taken together, these results indicate the important role of stearic acid in the *sn*-1 position of PI in the epithelial cell integrity through proper actin filament organization.

1．緒　言

皮膚の恒常性は、表皮幹細胞から表皮角化細胞が分裂、分化して剥がれ落ちる“ターンオーバー”の繰り返しや、バリア構造の形成等によって維持される。一方、加齢によって表皮幹細胞数が減少することや、表皮のターンオーバーが遅くなることが知られている。また、バリア構造の破綻はアトピー性皮膚炎等の皮膚疾患を引き起こす。角質バリアにおいては、セラミドに代表される細胞外脂質が重要な働きを担っていることが知られている。脂質は生体膜の重要な構成成分でもあり、膜タンパク質機能の調節因子として、あるいはシグナル分子として、細胞機能に必須の役割を果たす。しかし、皮膚の恒常性において生体膜脂質がどのような役割を果たすのかについては、あまり明らかになっていない。

私は、生体膜リン脂質の一つであるホスファチジルイノシトール（PI）の特徴的な脂肪酸組成を規定する酵素群の同定及び機能解析を行ってきた[1-3]。PIは、グリセロール骨格の*sn*-1位にステアリン酸（18：0）、*sn*-2位にアラキドン酸（20：4）を持つ分子種が圧倒的に多い。これまでに、モデル生物である線虫を用いて、PIの*sn*-1位へのステアリン酸導入に関わる酵素として、ホスホリパーゼA_1（*ipla-1*）、脂肪酸転移酵素（*acl-8, 9, 10*）を世界に先駆けて同定し、線虫表皮幹細胞の非対称分裂においてPIの*sn*-1位の脂肪酸組成が重要な役割を果たすことを明らかにしている[2]。さらに、*acl-8, 9, 10*の哺乳動物相同分子であるLYCATについても、マウスにおいてPIの*sn*-1位の脂肪酸組成を規定していることを明らかにした[3]。しかし、PIの*sn*-1位の脂肪酸組成がどのようにして上皮細胞の恒常性に寄与しているか、その分子メカニズムについては未だほとんど明らかになっていない。本研究では、PIの特徴的な脂肪酸組成が上皮細胞の恒常性において果たす役割を分子レベルで解明することを目的とした。



The roles of the characteristic fatty acid composition of phosphatidylinositol in the homeostasis of skin

Rieko Imae

Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital and Institute of Gerontology

2．方　法

2．1．アクチンフィラメントの観察

young adult期の線虫を回収後、ホルムアルデヒド、アセトンにて固定後、Alexa Flior 546-phalloidinで染色した。観察は共焦点顕微鏡ライカTCS SP8を使用した。

2．2．*xhIs3503[dpy-7p::PLCδ1-PH::GFP]*の作成

MoSCI法にて、線虫ゲノム（IV番染色体の特定の部位）にシングルコピーで外来遺伝子（上皮細胞特異的*dpy-7* promoterの下流にPLCδ1-PH::GFPをつないだDNA配列）を挿入した株を作成した。

2．3．サプレッサー遺伝子の同定

線虫（Bristol N2株）の近縁種であるHawaiian株を用いたSnip-SNPs法を用いて、原因遺伝子の染色体、ゲノム

領域を絞り込んだ。該当するゲノム領域に存在する遺伝子について、feeding RNAi法にて発現抑制し、原因遺伝子と考えられる遺伝子についてサンガー法にてシークエンス解析し、原因変異の同定を行った。

2．4．脂質解析

線虫を回収後、超音波処理により破砕、Brigh and Dyer法にて脂質を抽出した。個々のリン脂質脂肪酸量の定量については、TLCにて各リン脂質を分離後、メチルエステル化してGC-MSにて解析した。また、リン脂質脂肪酸分子種の測定にはLC-MSを用いた。

3．結　果

3．1．*acl-8,9,10*三重変異体は上皮細胞のapical junction部位のアクチンフィラメントの量や局在に異常を示す

線虫を用いて、上皮細胞におけるPIの*sn*-1位の脂肪酸組成の役割を明らかにするため、*acl-8, 9, 10*三重変異体を用いて上皮細胞の形態を観察した。野生株では、幼虫期から成虫期になる段階で、上皮細胞の一種であるseam cellが互いに融合し、細長い多核の細胞になる。seam cellは、隣接する大きな上皮細胞であるhypodermal cellとadherence junctionを形成しており、アピカルジャンクション複合体の構成分子であるAJM-1::GFPを発現する株（*syIs78*）を用いて観察すると、AJM-1::GFPは２本の平行なラインとして観察される（図１A）。一方、*acl-8, 9, 10*三重変異体では、seam cellが途切れてギャップが生じる様子や、小さく分断されている様子が観察された（図１A）。*acl-8, 9, 10*三重変異体ではseam cell同士の融合の過程には異常が見られなかったことから、seam cellが融合した後、何らかの原因で細胞の形態が維持できなくなり、分断が生じたものと考えられる。

細胞の形態維持には、アクチンフィラメントの裏打ち構造が重要である。上皮細胞においては、細胞接着に関わるadherence junctionにアクチンフィラメントが局在していることが知られている。そこで、細胞間接着部位のアクチンフィラメントを観察した。野生株では細胞間接着部位にアクチンフィラメントが一様に存在しており、詳細に観察すると細かいドットが連なったように配置している（図１B）。一方、*acl-8, 9, 10*三重変異体では、細胞間接着部位におけるアクチンフィラメントが大きな不定形のドット状に局在し、細胞間接着部位に一様には存在しないことが分かった（図１B）。また、細胞間接着部位におけるアクチンフィラメントの量を解析したところ、*acl-8, 9, 10*三重変異体では顕著に増加していることが分かった（図１C）。アクチンフィラメントの大きなドットは、seam cellの分断が生じている部分と完全ではないが一致したことから、アクチンフィラメントの制御が異常になったことにより、細胞間接着部位に異常な張力が生じ、上皮細胞の形態に異常が生じた可能性が考えられる。

3．2．*acl-8, 9, 10*三重変異体は上皮細胞のapical junction部位のPI（4，5）P2の量が顕著に増加する

PIは、極性頭部のイノシトール環がリン酸化されることで様々なphosphoinositideに変換され、シグナル伝達や小胞輸送等、細胞内の様々な現象に関与する。PIの*sn*-1位の脂肪酸組成が変動すると、phosphoinositideの産生や分解、あるいはphosphoinositideの局在等に影響が生じる可能性が考えられる。一方、アクチン調節タンパク質には、phosphoinositideの一つであるPI（4, 5）P2によって活性制御を受けるものが多い。そこで、*acl-8, 9, 10*三重変異体の上皮細胞で、PI（4, 5）P2の量や局在に異常がないか解析した。PI（4, 5）P2に結合するPLCδ1のPHドメインにGFPを結合したプローブ（PLCδ1-PH::GFP）を上皮細胞で発現させた株（*xhIs3503*）を作成し、*acl-8, 9, 10*三重変異体バックグラウンドと比較して観察した。同時にアクチンフィラメントの染色も行い、PLCδ1-PH::GFP

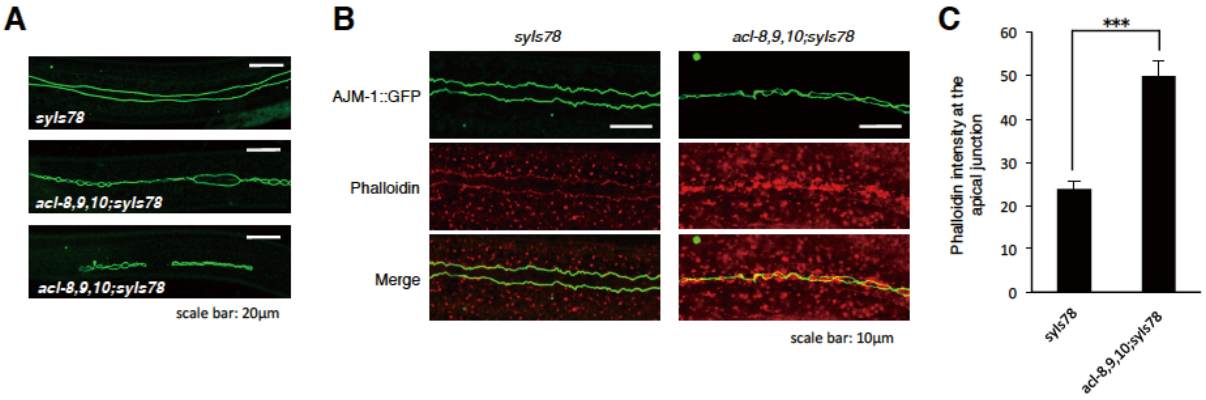


図１　*acl-8, 9, 10*三重変異体は上皮細胞のapical junctionにおけるアクチンフィラメントの量や局在に異常を示す

の局在との関連を調べた。*xhIs3503* では、アクチンフィラメントが存在する apical junction 部位に弱く PLCδ1-PH::GFP が局在する様子が観察された（図 2A）。一方、*acl-8, 9, 10*；*xhIs3503* では apical junction 部位に PLCδ1-PH::GFP がドット状に集積する様子が観察された（図 2B, C）。興味深いことに、この PLCδ1-PH::GFP のドットとアクチンフィラメントのドットの位置は、完全ではないが一致していた。以上の結果から、*acl-8, 9, 10* 三重変異体では、apical junction 部位において PI（4, 5）P2 が過剰に集積しており、それによってアクチン調節タンパク質が活性化され、アクチンフィラメントが過剰に動員された可能性が考えられる。

3．3．*acl-10* 変異体のサプレッサー遺伝子として、エーテル型リン脂質合成酵素 *acl-7* と *ads-1* を同定

PI の *sn*-1 位の脂肪酸組成の上皮細胞における役割の分子メカニズムをさらに探る目的で、*acl-8, 9, 10* と遺伝学的に相互作用する分子のスクリーニングを行うことにした。*acl-8, 9, 10* のうち、*acl-10* は上皮細胞にメインに発現しており、*acl-10* 変異体は単独でも AJM-1::GFP のパターンに異常を示す（図 1A）。そこで、遺伝学的操作を簡便にするため、*acl-10* 変異体を用いてサプレッサー遺伝子のスクリーニングを行った。*acl-10* 変異体に突然変異剤（EMS）を処理し、表現型が回復する個体を単離して原因遺伝子をマッピングする、という方法で行った。*acl-10* 変異体は、低張液に浸すと体が破裂しやすいという特徴があり、スクリーニングにはこの表現型を利用した。変異剤処理した *acl-10* 変異体の F2 世代から、1st スクリーニングとして水に浸しても生存している個体を単離し、2nd スクリーニングとして AJM-1::GFP のパターンを観察し、成虫期において途切れのない系統を選別した。44000 haploid genome をスクリーニングし、サプレッサー変異体として 2 系統を単離した。うち 2 系統（原因遺伝子変異：*xh25* 及び *xh26*）（図 3A, B）について、バッククロスを 2 回行った後、近縁種との SNPs を利用した原因遺伝子のマッピングを行った。その結果、*xh25* については *acl-8, 9, 10* と同じ AGPAT acyltransferase family に属する *acl-7* における exon/intron 境界での G→A の置換であり、exon/intron 構造が乱れ、フレームシフトが起こり、premature stop となる変異であった（図 3C）。*xh26* については、*ads-1* の exon 中での C→T の置換であり、進化的に保存された P が L に置換する P281L の変異であった（図 3D）。*acl-7, ads-1* の RNAi でも *acl-10* 変異体の表現型の抑圧が観察されたことから、*acl-7*（*xh25*）, *ads-1*（*xh26*）は loss /reduction of function となる変異であると考えられる。*acl-7* と *ads-1* は、エーテル型リン脂質を合成する初発段階の酵素である（エーテル型リン脂質とは、*sn*-1 位の脂肪酸の結合様式が通常のリン脂質のようにエステル結合ではなくエーテル結合であるものを指す）。このことから、*acl-10* 変異体の表現型はエーテル型リン脂質合成と何らかの関わりがあることが示唆された。

3．4．*acl-7,8,9,10* 四重変異体では PI の脂肪酸組成、apical junction 部位の異常が共に回復する

サプレッサー遺伝子を用いてさらに解析を進めるため、*acl-7* の deletion mutant を作成した（*tm3252*）（図 4A）。*tm3252* は acyltransferase motif の下流に欠失部位があるが、フレームシフトを起こして premature stop となることが予想されるため、ACL-7 の局在部位であるペルオキシソームに局在できず、null になると考えられる。実際、

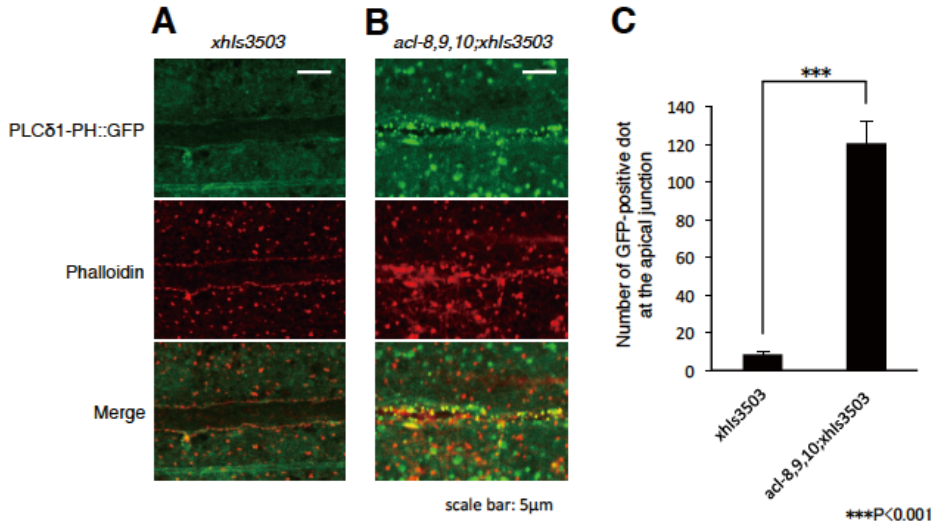


図 2　*acl-8, 9, 10* 三重変異体では上皮細胞の apical junction における PI（4, 5）P2 の量が顕著に増加する

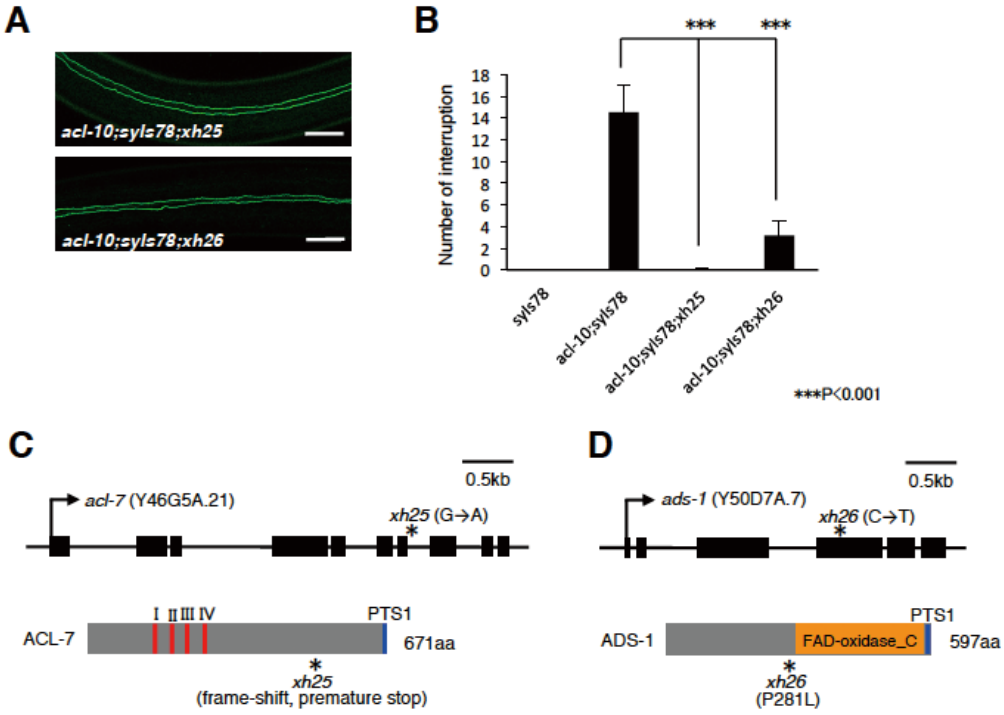


図 3　*acl-8, 9, 10* 三重変異体のサプレッサー遺伝子として、エーテル型リン脂質合成酵素 *acl-7* と *ads-1* を単離

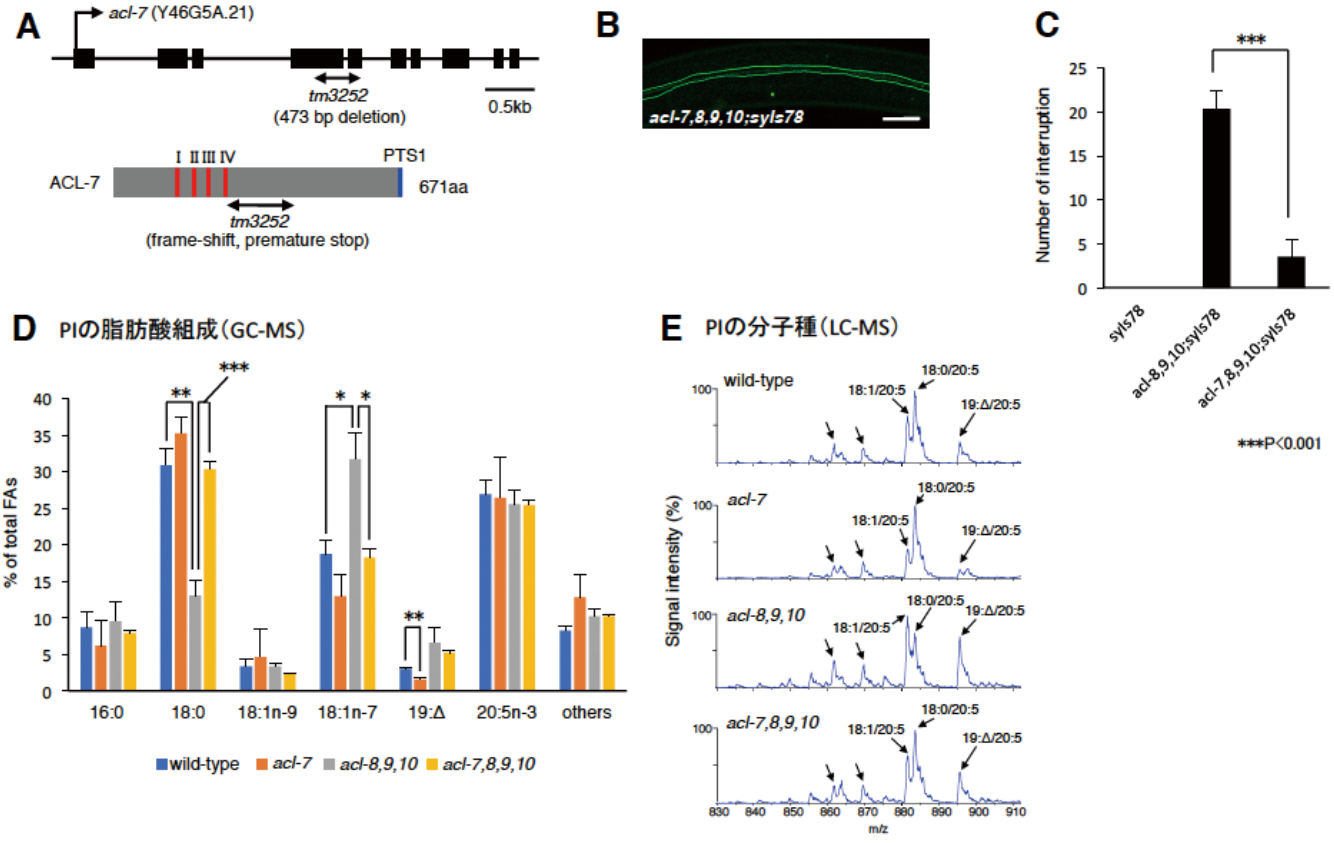


図 4　*acl-7, 8, 9, 10* 四重変異体では ajm-1::GFP のパターン及び PI の脂肪酸組成が回復している

acl-7（*tm3252*）ではエーテル型リン脂質の一つであるアルケニル型PEの量が検出限界以下であったことから、機能喪失型変異体であることが確認された。*acl-7*(*tm3252*)と*acl-8, 9, 10; syIs78*を交配して作成した*acl-7, 8, 9, 10; syIs78*についても、AJM-1::gfpのパターンの異常は顕著に回復していることが確認できた（図4B, C）。*acl-7*（*tm3252*）による表現型の抑圧が、脂質組成が戻ったことによるのかどうかを判別するため、*acl-7, 8, 9, 10*四重変異体の脂質解析を行った。まず、GC-MSを用いてリン脂質の脂肪酸組成を解析した。その結果、PIの脂肪酸組成において、*acl-8, 9, 10*三重変異体では18 : 0の量が減少し、18 : 1n-7の量が増えているが、*acl-7, 8, 9, 10*四重変異体では、18 : 0の量が野生株と同程度まで増加し、18 : 1n-7の量も野生株と同程度まで減少していることが分かった（図4D）。さらに、LC-MSを用いてPIの脂肪酸分子種を解析した。野生株では18 : 0/20 : 5がmajorで18 : 1/20 : 5がminorピークとして存在するのに対し、*acl-8, 9, 10*三重変異体では18 : 1/20 : 5がmajorピークとなり、18 : 0/20 : 5はマイナーピークとして存在する。一方、*acl-7, 8, 9, 10*四重変異体ではこの二つの分子種の比率が野生株と同程度まで戻っていることが分かった（図4E）。以上の結果から、サプレッサー変異体ではPIの脂肪酸組成が野生株と同様に戻ったことにより、表現型が回復したと考えられた。近年、線虫のエーテル型リン脂質合成の変異体を単離し、解析した報告[4]において、脂肪酸合成の促進、SCD（Stearoyl-CoA desaturase）（*fat-5, 6, 7*）の発現低下により、脂質全体で18 : 0/18 : 1 ratioが増加していることが報告されている。実際、PEについてもGC-MSで脂肪酸の量を定量したところ、*acl-7*（*tm3252*）では18 : 0の量が劇的に増え、18 : 1n-7の量が減少していた。PIにおいても*acl-7*（*tm3252*）における18 : 0/18 : 1n-7 ratioの増加傾向が見られており（図4D）、これによって*acl-7, 8, 9, 10*四重変異体におけるPIの脂肪酸組成がレスキューしたものと考えられた。さらに、*acl-7, 8, 9, 10*四重変異体では、上皮細胞接着部位におけるアクチンフィラメントの集積や、PI（4, 5）P2の集積についてもレスキューしているかを検証した。その結果、これらの表現型についてもレスキューする傾向が見られた（図5）。この結果から、上皮細胞接着部位におけるアクチンフィラメント及びPI（4, 5）P2の量の制御は、PIの*sn*-1位の脂

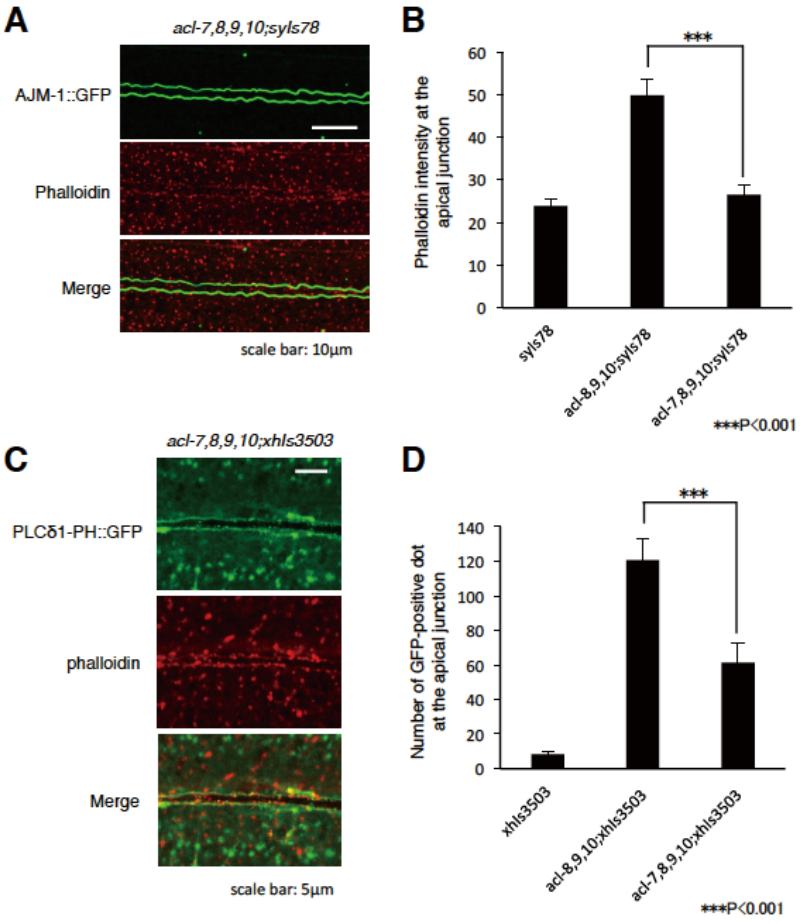


図5　*acl-8, 9, 10*四重変異体では上皮細胞のapical junctionにおけるアクチンフィラメントの量、PIP2の蓄積が回復する

肪酸組成が重要な役割を果たしていることが強く支持された。

4．考　察

本研究から、*acl-8, 9, 10* 三重変異体では上皮細胞間接着部位においてPI（4, 5）P2が過剰に蓄積していること、また、その蓄積部位に高頻度でアクチンフィラメントが集積していることが明らかになった。このアクチンフィラメントの過剰な集積が引き起こす収縮力によって、上皮細胞形態に異常を来した可能性が考えられる。PI（4, 5）P2は、アクチンフィラメントの重要な制御因子であるRhoファミリー低分子量Gタンパク質（RHO-1, RAC-1, CDC-42等）を正に制御することから、過剰に蓄積したPI（4, 5）P2はこれらの分子の活性化を介してアクチンフィラメントの集積を引き起こした可能性が考えられる。その他にも、PI（4, 5）P2のeffectorで、アクチンフィラメントの重合を制御する分子は多数存在するので、そうした分子の活性化を介している可能性も考えられる。

生細胞において観察されるPI（4, 5）P2シグナリングは非常に早い応答であり、高度にコンパートメント化されている。PIの*sn*-1位の18：0が18：1に置換されると、上皮細胞間接着部位においてPI（4, 5）P2のドット状の集積が観察されたことから、PIの脂肪酸組成は局所における適切なPI（4, 5）P2の制御に重要であると考えられる。すなわち、PIの*sn*-1位の脂肪酸組成が異常であると、PI(4, 5)P2の産生酵素あるいは分解酵素の基質認識に異常が生じ、異所性にPI（4, 5）P2の産生が起きる、あるいはPI（4, 5）P2の分解が妨げられる可能性がある。また、脂肪酸組成が異常なPI（4, 5）P2は、生体膜における局在化（コンパートメント化）に異常を来し、mis-localizasionが起きてしまうことも考えられる。一方、AJM-1::GFPや他のアピカルジャンクション構成分子（E-Cadherin/HMR-1やα-catenin/HMP-1）はアピカル側に正常に局在していたことから、上皮細胞の極性そのものには大きな異常はないと思われる。

近年、ヒトやマウスにおいて、*acl-8, 9, 10* の相同分子であるLYCATが肺線維症や喘息に関わることが報告されている[5,6]。*acl-8, 9, 10* 三重変異体で上皮細胞の細胞間接着部位の異常が見られたこと、細胞間接着は上皮バリア機能の形成に重要な役割を担うことから、マウス肺においても、PIの*sn*-1位の脂肪酸組成が異常になると、細胞間接着に異常を来し、肺胞上皮や気道上皮バリア機能が破綻した結果、肺線維症や喘息が引き起こされる可能性が考えられる。ヒト皮膚バリア機能においても同様に、PIの*sn*-1位の脂肪酸組成は重要な役割を担っている可能性が高い。また、加齢によるPIの脂肪酸組成変化の報告もある[7]。このように、皮膚の疾患や美容において、PIの脂肪酸組成変化が原因となっている場合も存在すると考えられるが、本研究により異常発症の分子メカニズムの一端が明らかになった。この結果は、皮膚恒常性破綻の予防法や治療法の開発に貢献できるものと考えられる。

（引用文献）

1）Lee HC, Inoue T, Imae R, Kono N, Shirae S, Matsuda S, Gengyo-Ando K, Mitani S, Arai H. *Caenorhabditis elegans mboa-7*, a member of the MBOAT family, is required for selective incorporation of polyunsaturated fatty acids into phosphatidylinositol. Mol Biol Cell. 19（3）: 1174-84, 2008.

2）Imae R, Inoue T, Kimura M, Kanamori T, Tomioka NH, Kage-Nakadai E, Mitani S, Arai H. Intracellular phospholipase A1 and acyltransferase, which are involved in *Caenorhabditis elegans* stem cell divisions, determine the *sn*-1 fatty acyl chain of phosphatidylinositol. Mol Biol Cell. 21（18）: 3114-24, 2010.

3）Imae R, Inoue T, Nakasaki Y, Uchida Y, Ohba Y, Kono N, Nakanishi H, Sasaki T, Mitani S, Arai H. LYCAT, a homologue of *C. elegans acl-8, acl-9*, and *acl-10*, determines the fatty acid composition of phosphatidylinositol in mice. J Lipid Res. 53（3）: 335-47, 2012.

4）Shi X, Tarazona P, Brock TJ, Browse J, Feussner I, Watts JL. A *Caenorhabditis elegans* model for ether lipid biosynthesis and function. J Lipid Res. 57（2）: 265-75, 2016.

5）Huang LS, Mathew B, Li H, Zhao Y, Ma SF, Noth I, Reddy SP, Harijith A, Usatyuk PV, Berdyshev EV, Kaminski N, Zhou T, Zhang W, Zhang Y, Rehman J, Kotha SR, Gurney TO, Parinandi NL, Lussier YA, Garcia JG, Natarajan V. The mitochondrial cardiolipin remodeling enzyme lysocardiolipin acyltransferase is a novel target in pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 189（11）: 1402-15, 2014.

6）Huang YT, Liang L, Moffatt MF, Cookson WO, Lin X. iGWAS: Integrative Genome-Wide Association Studies of Genetic and Genomic Data for Disease Susceptibility Using Mediation Analysis. Genet Epidemiol. 39（5）: 347-56, 2015.

7）Ulmann L, Mimouni V, Roux S, Porsolt R, Poisson JP. Brain and hippocampus fatty acid composition in phospholipid classes of aged-relativecognitive deficit rats. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 64（3）: 189-95, 2001.

女性頭髪における休止期－成長期移行シグナルメカニズムの *in vitro* 解析系の構築

東京工科大学応用生物学部
岩渕　徳郎

Development of *in vitro* evaluation system for telogen-anagen transition was attempt. The respiration activity of mixed monolayer-culture of human dermal papilla cells (hDP) and human outer root sheath cells was significantly increased in 10 days, however, that of sphere-formed hDP and human outer root sheath cells was significantly decreased. The results on respiration activity of sphere indicated that characteristics of the sphere-formed hDP was similar to the hair bulb in telogen phase. Gene expression profile of hair cycle regulating-factors in sphere suggested that the profile of sphere-formed hDP was similar to hDP in telogen phase. When cyclosporin A which is a powerful hair growth inducer was added to sphere-formed hDP, gene expression profile for hair cycle regulating-factors was similar to hDP in anagen phase. The results suggested that sphere-formed hDP might be used as an *in vitro* system to evaluate for new hair induction. This system would be useful for screening of hair regrowth reagent for female hair loss.

1．緒　言

男性だけでなく、女性でも薄毛は大きな毛髪悩みである。男性の薄毛は毛髪径の減少の影響が大きいが、女性の薄毛は毛髪密度の低下の影響が大きい[1,2]。これは、女性では発毛が重要であることを示唆している。これまで男性の薄毛研究の結果、「太く、長く」を訴求する薬剤が探索されてきたが、女性の薄毛の研究例は少ない[3]。

ヒトの毛髪には毛が成長する成長期、毛が成長しない休止期、成長期から休止期へ移行する退行期の３つの期があり、生涯を通して成長期、退行期、休止期を繰り返す。これを毛周期と言う[4-6]。発毛とは毛周期の休止期から成長期への移行であり、新たな毛球部の形成が上皮系細胞－間葉系細胞間の相互作用によって起こる現象である[7]。発毛評価法は現時点ではマウスの *in vivo* 発毛試験のみが実用化されているが、動物実験廃止の流れにそぐわず、ヒト頭髪とマウス体毛の差異の説明も難しい。

報告者らのこれまでの研究により、２種の毛包由来細胞（毛乳頭細胞[hDP]と外毛根鞘細胞[hORS]）を用いて、
①３次元培養（スフェア形成）を行うと毛包様構造を形成すること
②hORSがhDPを取囲むように配置すること
③既知発毛薬剤でhORSのみが増殖刺激を受けること
が確認されている。これらより、ヒト毛髪細胞の３次元培養で発毛様のイベントを解析できる可能性が示唆された。

本研究は女性の薄毛で重要な課題である発毛を解析可能な *in vitro* 評価系を構築することを目的とした。そのため、ヒト毛包由来の細胞および関連細胞を用いてスフェアを形成させ、その特性を解析した。

2．方　法

2．1．細胞、培地、細胞培養

細胞は、間葉系細胞としてヒト女性毛包由来の毛乳頭細胞（hDP-49F）を使用した。上皮系細胞としてヒト女性毛包由来の外毛根鞘細胞（hORS-40F）または正常ヒト角化細胞（hKC）を使用した。

培地は、間葉系細胞用の基礎培地としてDMEM（Life Technologies）を使用し、栄養培地として10% FBS-DMEMを使用した。上皮系細胞用の基礎培地として、Life Technologies社指定のサプリメントを添加しないKeratinocyte-SFM（K-SFM；Life Technologies）を、栄養培地としてサプリメントを添加したK-SFMを使用した。全ての培地には抗生物質（ペニシリン、ストレプトマイシン、アムホテリシンB）を添加した。

細胞の３次元培養法として、非接着性丸底プレート（PrimeSurface 96Uプレート、以下PS-96Uプレート；住友ベークライト）を使用し、本プレートの各ウェルに細胞を2000播種した。細胞播種後、37℃-5% CO_2 で培養し、スフェアを形成させた。対照実験として、通常の細胞培養用プレートで単層培養を同条件で行った。

2．2．遺伝子発現解析

遺伝子発現の解析は、形成させたスフェアおよび単層培養細胞から、ISOGEN（日本ジーン）でmRNAを調製した後、SuperScript Ⅲ（Invitrogen）を用いて、cDNAを調製した。調製したcDNAを鋳型にreal time PCRで被検遺伝子の発現量を単層培養と３次元培養の場合とで比較した。



Development of *in vitro* evaluation system for telogen-anagen transition in female hair cycle

Tokuro Iwabuchi

Faculty of Bioscience and Biotechnology, Tokyo University of Technology

発毛薬剤であるcyclosporin A（CsA）に対する応答性に対する培養方法の比較は、3次元培養および単層培養したhDPにCsA（終濃度50ng/ml）を添加し、37℃ -5% CO_2で培養後、遺伝子発現をreal time PCRで比較した。

2．3．細胞増殖測定

細胞の増殖性は細胞の呼吸活性を指標に、AlamarBlue（BioRad）を用いて測定した。単層培養は96wellプレートで、3次元培養（スフェア形成）はPS-96Uプレートで行った。いずれのプレートとも、1種の細胞を培養する時は1wellあたり3000細胞を、2種の細胞を培養する時は1wellあたり両細胞とも2000細胞（計4000細胞）を播種した。培養後、1wellの培地量の1/100量のAlamarBlueを添加し4時間37℃ -5% CO_2インキュベーターで静置したのち測定した（Ex. 560nm, Em. 590nm）。スフェアの呼吸活性測定時は、96wellプレートに全量移して測定した。

2．4．細胞染色

O. C. T Compoundでスフェアを凍結固定後、ミクロトームでスフェア切片を作成し、スライドグラスに固定した。さらに、4%パラホルムアルデヒド（PFA）でスフェア切片を固定し、TritonX-100処理を行い、3%BSA-PBS（-）に60分間浸漬し、1次抗体反応を行った。PBS（-）で洗浄後、2次抗体反応を行い、DAPIを含有したマウント剤を添加し、蛍光顕微鏡で観察した。毛乳頭細胞検出用には間葉系細胞マーカーとしてVimentin［Anti-Vimentin（D21H3；CST ジャパン）］を、上皮系細胞検出用には上皮系細胞マーカーとしてPancytokeratin［Cytokeratin Pan Monoclonal Antibody（PAN-CK; Life Technologies）］を選定した。

3．結　果

3．1．毛包由来細胞の単層培養とスフェアでの呼吸活性の違い

hDP単独での単層培養とスフェアにした場合の経時での呼吸活性変化を図1に示した。単層培養では、経時的に有意に呼吸活性は増加したのに対し、スフェアでは細胞播種後6日では変化はなく、10日目に有意に減少を示した。

混合培養（hDP+hORS）での単層培養とスフェアにした場合の経時での呼吸活性変化を図2に示した。単層培養では、経時的に有意に呼吸活性は増加したのに対し、スフェアでは細胞播種後6日以降有意に減少を示した。

3．2．毛乳頭細胞と上皮系細胞から形成したスフェアの内部構造

前項の検討から、hDP単独およびhDP+hORS混合のス

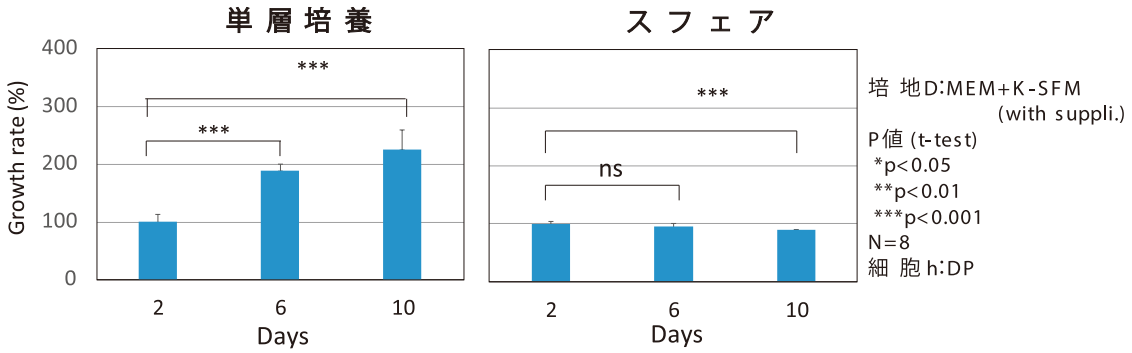


図1　単層培養とスフェアでの呼吸活性比較（毛乳頭単独培養）

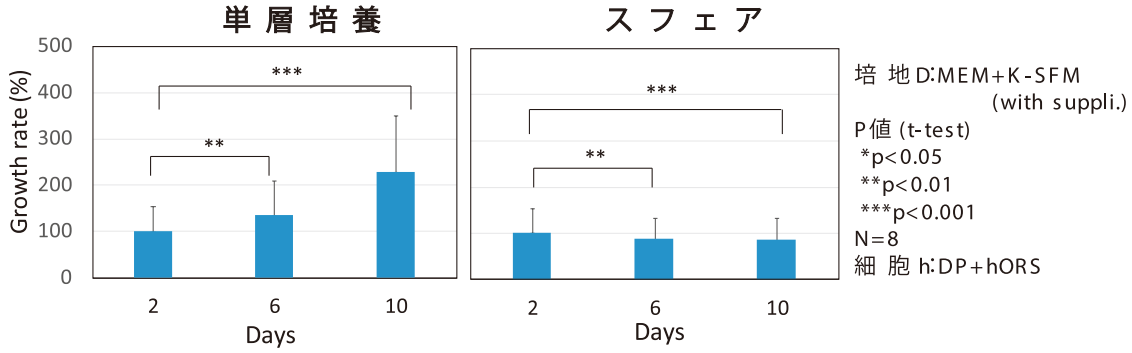


図2　単層培養とスフェアでの呼吸活性比較（混合培養）

フェアはいずれも、呼吸活性が低下し、休止期状態の毛球部と似ている状態であることがわかった。次に、混合スフェアを作成した時のスフェアの構造を解析した。本実験では上皮系細胞として、hORSに代えてhKCを使用した。hDPを特異的に認識する抗Vimentin抗体を、hKCを特異的に認識する抗Pancytokeratin抗体を使用し、抗Vimentin抗体を検出する2次抗体にはFITCが、抗Pancytokeratin抗体を検出する2次抗体にはAlexa Fluor 594が蛍光物質として結合している。なお、細胞核はDAPIで蛍光染色した。

hDP+hORS混合スフェアの切片の染色像を図3に示した。中心部が緑色（FITC）を示したことから、hDPが中心部に凝集し、それを取り囲むように外側に赤色（Alexa Fluor 594）を示したことからhKCが配置していることが確認された。実際の毛球部では、中心に毛乳頭細胞があり、毛乳頭と隣接するように局在する。このことから毛球部の細胞局在と類似した、スフェアであると考察した。本実験は実際の毛球部を再現することが重要であるので、評価に用いることができる可能性を示した。

3．3．スフェア化したhDPの生存性

hDPをスフェア化すると呼吸活性が低下することが3.1.の検討で明らかとなった。これは、細胞が生存していない可能性を疑わせた。そこで、スフェア形成後10日経過し十分に呼吸活性が低下してスフェア化したhDPを取り出し、再度平板上で培養し細胞の生存性を観察した。図4に平板に静置後1日のhDPスフェア（左）を、静置後10日のhDPスフェア（右）を示した。hDPスフェアから明らかにhDPがアウトグロースしており、インタクトな毛乳頭を単離して培養した時と同様の様子を示した。結果から、スフェア化したhDPは生存しており、単に呼吸活性が低下しただけの状態であることが確認された。

3．4．毛乳頭細胞単独の単層培養とスフェアでの毛周期関連遺伝子の発現特性

hDPのスフェアと単層培養細胞を作成し、休止期維持因子（BMP-4）[8]、成長期維持因子（FGF7、アルカリ性フォスファターゼ［ALP］）[9,10]、退行期誘導因子（TGF-β2、FGF5）[11,12]の発現をreal time PCRで評価した（図5）。単層培養からスフェアに変化することで、①休止期維持因子BMP-4の発現は有意に亢進、②成長期維持因子FGF7とALPは有意に低下、③退行期誘導因子TGF-β2とFGF5は有意に低下した。これらの結果は、①BMP-4の発現亢進はスフェアになることによって休止期に近い状態、②FGF-7とALPの発現低下はスフェアが成長期初期から中期以外の時期に似ている、③TGF-β2とFGF5の発現低下は成長期後期から退行期以外の時期に似ていることを示唆していた。以上より、スフェア化hDPは成長期初期から退行期以外の期、つまり休止期であることを示唆していた。

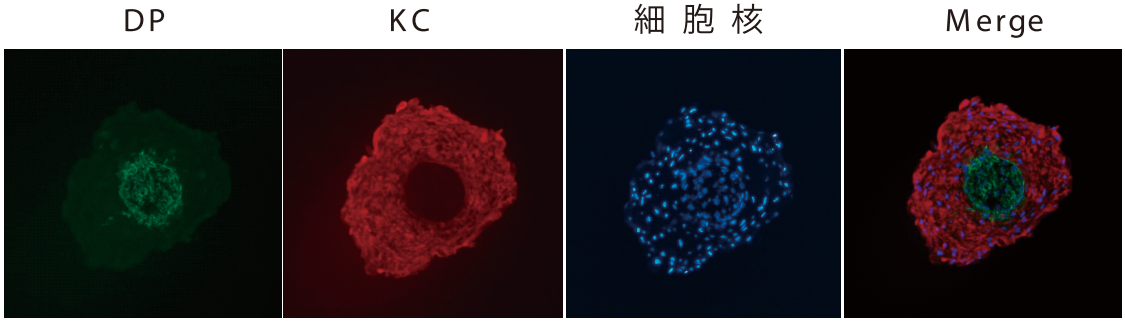


図3　スフェア内の間葉系細胞（hDP）と上皮系細胞（hKC）の局在

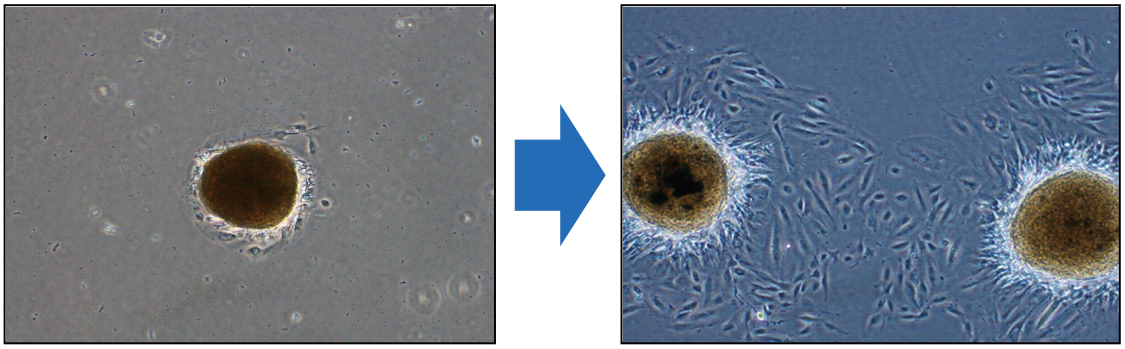


図4　静置1日のhDPスフェア（左）、および静置10日のhDPスフェア

3．5．毛乳頭細胞単独のスフェアにCsAを添加した時の毛周期関連遺伝子の発現特性

スフェア化したhDPに発毛薬剤CsA[13]を添加（50ng/ml）の有無での休止期維持因子（BMP-4）、成長期維持因子（ALP、血管内皮細胞増殖因子［VEGF］）[14]、退行期誘導因子（TGF-β2、FGF5）の発現をreal time PCRで評価した（図6）。スフェア化したhDPにCsAを添加（50ng/ml）することで、①休止期維持因子であるBMP-4の発現は有

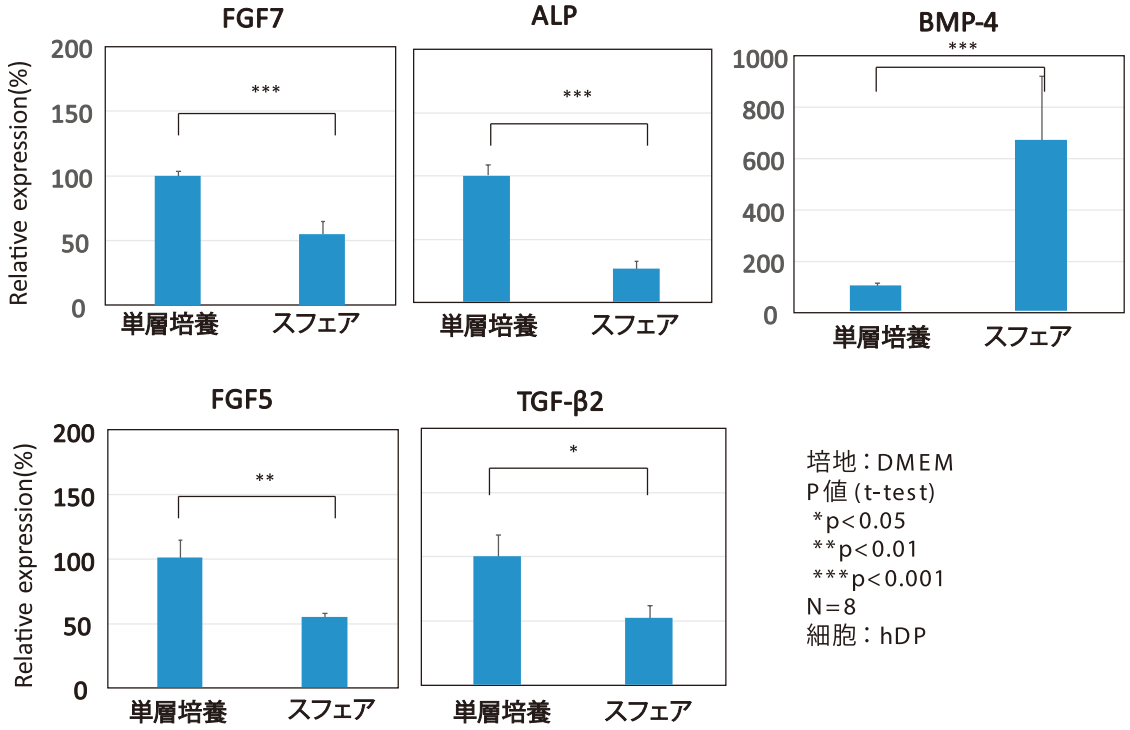


図５　単層培養とスフェアしたhDPでの各種毛周期関連遺伝子の発現比較

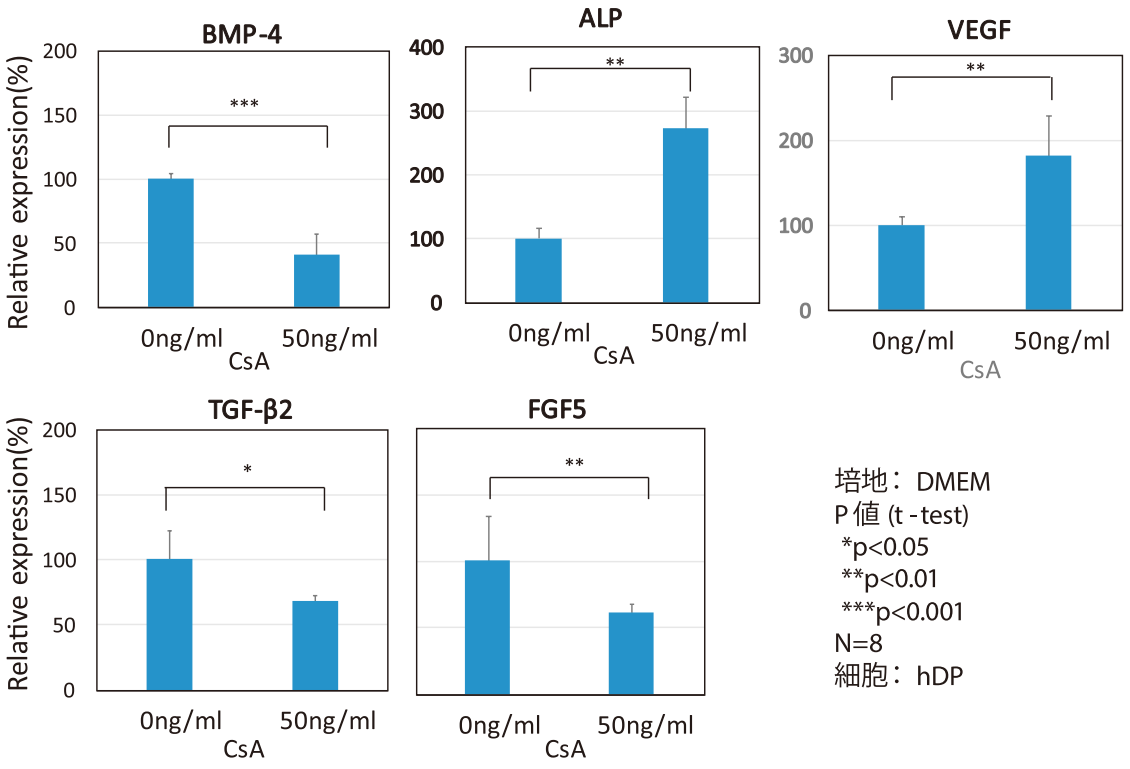


図６　スフェア化hDPにCsAを添加した時の各種毛周期関連遺伝子の発現比較

意に低下、②成長期維持因子であるALPとVEGFは有意に亢進、③退行期誘導因子であるTGF-β2とFGF5は有意に低下した。これらの結果は、①BMP-4の発現低下はCsA添加によって成長期極初期に近い状態になることを、②ALPとVEGFの発現更新はCsA添加によって成長期極初期に近い状態になることを、③TGF-β2とFGF5の発現低下は成長期後期から退行期以外の時期に似ていることを示唆していた。以上より、スフェア化したhDPに発毛薬剤CsAを添加すると、成長期初期に類似した遺伝子発現特性を示すことが明らかとなった。

4．考　察

女性由来の毛乳頭細胞を用い、3次元培養（スフェア化）を行うことによって*in vitro*発毛評価系の構築を試みた。毛乳頭細胞を単独および上皮系細胞と混合でスフェア化すると呼吸活性が低下し、休止期毛包と類似した状態となった。さらに、混合でのスフェアは実際の毛球部と同様に毛乳頭細胞が中心部に凝集し、その周囲を上皮系細胞が取り囲む構造を呈した。

ヒトの毛乳頭細胞を単離し、初代培養を行うと細胞が集塊を形成し盛り上がってくる現象が観察される。また、この盛り上がり部にはALPが強く発現していることが知られている。毛乳頭細胞は凝集化すると形質が変化する性質があることが予想される。本検討において、3次元培養によって細胞集塊（スフェア）を人為的に形成させることによって何らかの変化を生じさせたことが考えられた。これらのことから、形態的には毛乳頭細胞のスフェアを用いて*in vitro*での発毛評価系を構築できる可能性が出てきた。

スフェア化した毛乳頭細胞における毛周期関連遺伝子の発現特性を検討した結果、休止期に類似した遺伝子発現特性を示していることが確認された。さらに、発毛薬剤CsAによって、遺伝子発現特性が成長期の極初期に類似した状態に変化することが確認された。毛乳頭細胞のスフェア化によってなぜこのような反応が起こるのか詳細は不明だが、細胞接着が毛周期関連遺伝子の発現に関与している可能性が考えられる。細胞接着を強くし過ぎないように働くコンドロイチン硫酸プロテオグリカンの一種であるバーシカンが、毛乳頭細胞の毛包誘導能の維持に関与している例がある[15]。何らかの毛乳頭細胞間の接着機構が単層培養の毛乳頭細胞とスフェア化した毛乳頭細胞の特性の違いとなって現れていると思われた。

形態学的特性、スフェア化による毛周期関連遺伝子の発現特性変化、発毛薬剤による毛周期関連遺伝子の発現特性変化の結果から、スフェア化した毛乳頭細胞はヒトでの発毛を*in vitro*で評価できる実験系と成り得る可能性が強く示唆された。

（引用文献）

1）Ishino A, Takahashi T, Suzuki J, Nakazawa Y, Iwabuchi T, Tajima M. Contribution of hair density and hair diameter to the appearance and progression of androgenetic alopecia in Japanese men. Br. J. Dermatol. 171: 1052-1059.（2014）

2）Tajima M, Hamada C, Arai T, Miyazawa M, Shibata R, Ishino A. Characteristic features of Japanese women's hair with aging and with progressing hair loss. J. Dermatol. Sci. 2007: 45: 93-103.（2007）

3）Birch MP, Messenger JF, Messenger AG. Hair density, hair diameter and the prevalence of female pattern hair loss. Br. J. Dermatol. 144: 297-304.（2001）

4）Courtois M, Loussouarn G, Hourseau C, Grollier JF. Hair cycle and alopecia. Skin Pharmacol. 7: 84-89.（1994）

5）Silver AF, Chase HB. DNA synthesis in the adult hair germ during dormancy（telogen）and activation（early anagen）. Dev. Biol. 21: 440-451.（1971）

6）Tezuka M, Ito M, Ito K, Tazawa T, Sato Y. Investigation of germinative cells in generating and renewed anagen hair apparatus in mice using anti-bromodeoxyuridine monoclonal antibody. J. Dermatol. Sci. 2: 434-443.（1991）

7）Mohammadi P, Youssef KK, Abbasalizadeh S, Baharvand H, Aghdami N. Human hair reconstruction: close, but yet so far. Stem Cells Dev. 25: 1767-1779.（2016）

8）Zhang J, He XC, Tong WG, Johnson T, Wiedemann LM, Mishina Y, Feng JQ, Li L. Bone morphogenetic protein signaling inhibits hair follicle anagen induction by restricting epithelial stem/progenitor cell activation and expansion. Stem Cells. 24: 2826-2839.（2006）

9）Danilenko DM, Ring BD, Yanagihara D, Benson W, Wiemann B, Starnes CO, Pierce GF. Keratinocyte growth factor is an important endogenous mediator of hair follicle growth, development, and differentiation. Normalization of the nu/nu follicular differentiation defect and amelioration of chemotherapy-induced alopecia. Am. J. Pathol. 147: 145-154.（1995）

10）Hamada K, Suzuki K. Evaluation of biochemical indices as a hair cycle marker in C3H mice. Exp. Anim. 45: 251-256.（1996）

11）Soma T, Tsuji Y, Hibino T. Involvement of transforming growth factor-beta2 in catagen induction during the human hair cycle. J. Invest. Dermatol. 118: 993-997.（2002）

12) Hébert JM, Rosenquist T, Götz J, Martin GR. FGF5 as a regulator of the hair growth cycle: evidence from targeted and spontaneous mutations. Cell. 78: 1017–1025. (1994)
13) Iwabuchi T, Maruyama T, Sei Y, Adachi K. Effect of immunosuppressive peptidyl-prolyl cis–trans isomerase (PPIase) inhibitors, cyclosporin A, FK506, ascomycin and rapamycin, on hair growth initiation in mouse: immunosuppression is not required for new hair growth. J. Dermatol. Sci. 9: 64–69 (1995)
14) Yano K, Brown LF, Detmar M. Control of hair growth and follicle size by VEGF-mediated angiogenesis. J. Clin. Invest. 107: 409–417. (2001)
15) Kishimoto J, Ehama R, Wu L, Jiang S, Jiang N, Burgeson RE. Selective activation of the versican promoter by epithelial–mesenchymal interactions during hair follicle development. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96: 7336–7341. (1999)

ヒト培養表皮におけるアスコルビン酸の経皮吸収および紫外線 UVB による細胞障害に対する予防、回復効果の検討

東京都健康長寿医療センター研究所
近 藤　嘉 高

Several studies have reported the effects of vitamin C (L-ascorbic acid, AA) on ultraviolet B (UVB)-induced cell damage using cultured keratinocytes. However, the epidermis consists of multiple cell layers, and the effect of AA on UVB-induced damage to the human epidermis remains unclear. Therefore, we investigated the effect of AA on UVB-induced skin damage using reconstituted human epidermis. The reconstituted human epidermal surface was treated with 100 and 500 mM AA and cultured for 3 h before (pre-AA treatment) or after (post-AA treatment) 120 mJ/cm^2 UVB irradiation. Pre- and post-AA treatments of the epidermal surface suppressed UVB-induced cell death, apoptosis, DNA damage, reactive oxygen species (ROS) production, and the inflammatory response by downregulating tumour necrosis factor-α (TNF-α) expression and release. Moreover, the pre-AA treatment was more effective at preventing UVB-induced skin damage than the post-AA treatment. In summary, pre- and post-AA treatments of the epidermis prevent UVB-induced damage.

1．緒　言

皮膚は、表皮、真皮、皮下脂肪という構造をとる。表皮の角質層は、保湿や異物の侵入を防ぐバリア機能を担う。地上に届く太陽光には、表皮から真皮上層までしか到達しない紫外線UVB（280-320nm）と、真皮深層まで到達するUVA（320-400nm）が含まれる。私たちは、紫外線を浴びると日焼け、すなわち、皮膚が赤く炎症を起こす急性症状とメラニン色素の沈着が起こる。この時、表皮細胞で発生する種々の活性酸素種によって、細胞障害さらにはアポトーシスが起こり、炎症が惹起される。また、表皮細胞のDNAは、紫外線により傷害されて、その蓄積は皮膚がんの原因となる。従って、第一の対策としては、日焼け止めを皮膚に塗り、サンスクリーンによって紫外線を遮断することが重要である。しかし、完全には紫外線を遮断できないことから、第二の対策として、細胞内で発生する活性酸素種を消去できる抗酸化物質を摂取することが肝要となる。

アスコルビン酸（ビタミンC）は、紫外線で生ずる一重項酸素をはじめ、種々の活性酸素種を消去できる水溶性の強力な抗酸化物質である。私たちヒトは、進化の過程でアスコルビン酸の合成能を欠損したため、食事など外からアスコルビン酸を摂取する必要がある。従って、紫外線対策としては、アスコルビン酸の経口摂取にくわえて、アスコルビン酸が含まれる日焼け止めを利用することも有効であろう。しかし、ヒトの皮膚に塗布したアスコルビン酸がどのくらい表皮に吸収されるのか、吸収された表皮のアスコルビン酸は活性酸素種を消去して細胞障害やアポトーシス、炎症を抑制するのか、塗布するタイミングはいつが効果的なのかなど、科学的な知見が不足しているのが現状である。本研究では、ヒト正常皮膚細胞より再構築された3次元培養表皮を用いて、アスコルビン酸の経皮吸収およびUVBによる日焼けに対する予防、回復効果を明らかにする。



Protective effect of pre- and post-vitamin C treatments on UVB-irradiation-induced skin damage
Yoshitaka Kondo
Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

2．方　法

2．1．ヒト培養表皮へのアスコルビン酸の取り込み

初めに、皮膚に塗布したアスコルビン酸が経皮吸収されるかどうかを明らかにするため、ヒト正常皮膚細胞より再構築された3次元培養モデルの表皮を用いてアスコルビン酸の経皮吸収を調べた。培養カップ内のヒト培養表皮は、最下層の基底膜側にはアスコルビン酸を含まない培地を入れ、最上層の角層はバリア機能を持つため空気と接した状態で培養した。表皮上にアスコルビン酸ナトリウム溶液(0, 10, 100, 500, 1000 mM）を添加して、3時間後および6時間後に表皮を回収した。表皮中の総アスコルビン酸(アスコルビン酸とデヒドロアスコルビン酸）は、高速液体クロマトグラフィーおよび電気化学検出器を用いた方法により高感度に定量した。

2．2．UVB照射によるヒト培養表皮の細胞障害評価

次に、ヒト培養表皮にUVB（50, 80, 120 mJ/cm^2）を照射して、24時間後に細胞障害を評価した。細胞生存率は、MTTアッセイで測定した。表皮の厚さは、培養表皮の凍結切片をヘマトキシリン・エオシン染色した後、染色画像の表皮厚を測定した。表皮の層構造は、凍結切片を用いたシトルリン化タンパク質やfilaggrin、loricrin、keratin 10、keratin 14、collagen type IV、trichohyalinの免疫蛍光染色により評価した。アポトーシス頻度は、凍結切片をTUNEL染色した後、TUNEL陽性細胞数を定量した。

DNA 損傷は、DNA 二重鎖切断の指標である γ-H2A.X の免疫蛍光染色により、陽性細胞率を定量した。

2．3．UVB 照射によるヒト培養表皮の細胞障害に対するアスコルビン酸の効果

ヒト培養表皮に UVB（120 mJ/cm^2）を照射する前または後の 3 時間、アスコルビン酸ナトリウム溶液（100, 500 mM）を表皮表面に添加した。UVB 照射 24 時間後に、細胞生存率やアポトーシス頻度、DNA 損傷、酸化ストレスを評価した。酸化ストレスは、脂質過酸化の指標である 4-hydroxynonenal（4-HNE）の免疫蛍光染色により、活性酸素種は、スーパーオキシドアニオンを検出する dihydroethidium（DHE）染色により評価した。また、UVB 照射 3 時間後に定量的 PCR 法により培養表皮の TNF-α 遺伝子発現量を、照射 9 時間後に ELISA 法により培養上清の TNF-α タンパク質量を測定した。

3．結　果

アスコルビン酸を添加しないヒト培養表皮では、表皮中に総アスコルビン酸は全く検出されなかった。一方、アスコルビン酸を添加したヒト培養表皮では、総アスコルビン酸が検出され、添加濃度（10, 100, 500, 1000 mM）が高い群ほど、総アスコルビン酸量は多かった。

次に、ヒト培養表皮に UVB（50, 80, 120 mJ/cm^2）を照射して、24 時間後に細胞障害を評価した。照射量が多い培養表皮は、細胞生存率が低く、アポトーシス細胞や細胞の空胞化、DNA 損傷が多かった。しかし、表皮の厚さや層構造に明らかな差は認められなかった。一方、UVB 照射の前または後にアスコルビン酸を添加した培養表皮は、添加しない群に比べて細胞生存率が高く、アポトーシス頻度や細胞の空胞化、DNA 損傷、酸化ストレス、活性酸素種が少なかった。特に、アスコルビン酸を UVB 照射前に添加した培養表皮は、照射後に添加した時に比べて、UVB による細胞障害がより抑制された。

4．考察、総括

ヒト 3 次元培養表皮に添加したアスコルビン酸は、経皮吸収されることが明らかとなった。アスコルビン酸は、角層のバリアがあるものの、おそらく細胞間隙を通過して表皮中に入り、ナトリウム依存性ビタミン C トランスポーター（SVCT）により角化細胞に取り込まれると考えられる。3 次元培養表皮は、ヒトの表皮構造を再現したモデルであることから、ヒトの皮膚に塗布したアスコルビン酸も経皮吸収されることが示唆される。

これまでに、表皮の角化細胞を用いた単層培養の試験からは、抑制効果と増悪効果のいずれも報告されており、議論が続いていた。しかし、生体内により近いヒト 3 次元培養表皮を用いた本研究により、経皮吸収されたアスコルビン酸は、UVB による細胞障害を抑制することが明らかとなった。表皮中のアスコルビン酸は、UVB により産生される活性酸素種を消去することにより酸化ストレスを抑制して、DNA 損傷やアポトーシスなどの細胞障害を防いだと考えられる。さらに、アスコルビン酸塗布のタイミングについて、UVB 照射の前の方が後よりも効果的であることも明らかとなった（図）。この研究成果は、皮膚におけるアスコルビン酸の機能解明や紫外線対策に貢献することが期待される。

（引用文献）

1）Kawashima S, Funakoshi T, Sato Y, Saito N, Ohsawa H, Kurita K, Nagata K, Yoshida M, Ishigami A. Protective effect of pre- and post-vitamin C treatments on UVB-irradiation-induced skin damage. Sci Rep. 8（1）, 16199（2018）

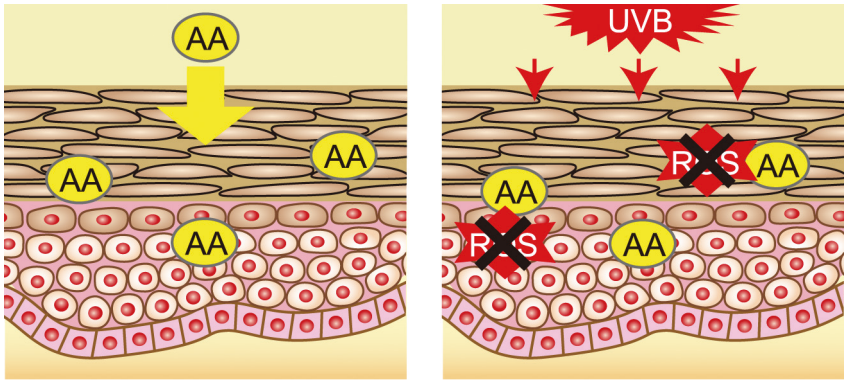


図　皮膚へのアスコルビン酸塗布は、紫外線照射による細胞障害を抑制
UVB 照射の前または後にアスコルビン酸を表皮表面に添加すると、表皮にアスコルビン酸が取り込まれて、UVB 照射による細胞障害を抑制した。特に、UVB 照射前にアスコルビン酸を塗布した方が、後から塗布するよりも効果的であった。
AA：アスコルビン酸、ROS：活性酸素種、UVB：紫外線

皮膚老化におけるエキソソームの働きの解明と治療応用の可能性の検討

和歌山県立医科大学皮膚科
神人　正寿

Skin senescence may be induced by various factors including intrinsic aging and extrinsic aging. In this study, we compared the expression of exosome and microRNAs in the serum and skin between young and senescent people. Exosome expression was determined using ELISA and immunostaining. microRNA expression was evaluated by PCR array, real-time PCR analysis, and in situ hybridization. microRNA was forcedly overexpressed using microRNA mimics. Cell senescence was examined by senescence-associated β-galactosidase (SA-β-gal).

We could not find significant correlation of age with exosome expression of serum or skin in young and senescent people. However, according to the result of microRNA PCR array, miR-124 was the most increased microRNA in senescent skin when compared to young skin. in situ hybridization revealed that the signal for miR-124 was evident in keratinocytes of senescent skin, but not in the young skin.

Cultured normal human epidermal keratinocytes (NHEKs) overexpressed with miR-124 mimic changed their morphology to an enlarged and irregular shape. In addition, SA-β-Gal positive NHEKs were significantly increased by the transfection of miR-124 mimic.

The expression of miR-124 was increased in the UVB-irradiated NHEKs compared to control cells in a dose-dependent manner. Taken together, our results indicated that miR-124 is increased by UV irradiation in keratinocytes, which causes cell senescence.

1．緒　言

他臓器の老化と比しての皮膚の老化の特徴として、intrinsic aging（内因性老化）とextrinsic aging（外因性老化）の２つの要因が存在する点がある。前者では加齢による細胞の機能低下により皮膚の萎縮や細かいシワの形成がみられる一方で、後者の主な原因は紫外線の影響により生じるphotoaging（光老化）であり、表皮の肥厚と深いシワ、シミ、さらには毛細血管拡張などをきたす。しかしこのような複雑な老化に対する科学的アプローチは進んでおらず、シワ・シミなどの変化のそれぞれに特異的に関与する分子メカニズムは未だ分かっていない。

皮膚老化には上記のように遺伝素因と環境素因が発症に関与すると考えられているが、研究代表者らはその環境素因を媒介するものとしてnon-coding RNAに注目してきた。ヒトの細胞には蛋白質をコードしていないnon-coding RNAが存在しこれまで「ゴミ」と思われてきたが、実はDNA（遺伝素因）を後天的に修飾することで環境因子としてDNA-mRNA-蛋白発現をオン／オフする機構であるエピジェネティクスに関わる（図1）。小分子RNAを主体とするものと比較的長いRNAを主体とするものに分類され、前者の代表が平均22塩基程度のmicroRNAであり、様々なmRNAのthree prime untranslated regions（3' UTRs）の相補的配列に結合し翻訳を阻害することで蛋白発現調節をしている。ヒトゲノムには2,000種類以上のmicroRNAが存在することが分かっており、60％以上の遺伝子を制御しうると考えられている[1]。近年、microRNAが生体内で様々な遺伝子発現を調節することで細胞増殖や分化において重要な働きをしていることが明らかになっているが、microRNAの各疾患における役割も検討されつつある。例えば、全身性強皮症ではmiR-29aが低下しており、targetであるコラーゲン遺伝子などの発現を増加させることで線維化に関与している[2]。microRNA関連の研究論文はH31.2月現在Pubmed上で約82000編と急速に増加しており、研究代表者らもmicroRNAと皮膚疾患に関してこれまで46編の研究論文を発表している。その中で我々は皮膚老化とmicroRNAの関連についての研究報告を他の研究室にさきがけて行ってきた。具体的には老化皮膚にみられる血管異常であるcherry angiomaでは血管内皮細胞が増殖しているが、その血管内皮細胞でmiR-424の発現が減少しており、そのためにMEK1とcyclin E1が増加することで細胞増殖能が活性化し内皮細胞の腫瘍性増加をきたすことを見出し、このような経路の阻害が本腫瘍の新しい治療につながる可能性を示した[3]。さらに老化皮膚・紫外線暴露で多く出現する有棘細胞癌におけるmicroRNAの関与も明らかにしている[4]。

一方、H29年7月に国立がん研究センターが血液1滴に含まれるmicroRNAから13種類の癌を早期発見する新しい検査法を開発したことがプレスリリースされ注目された。従来、microRNAを含むRNAは体液中ではRNaseの働きにより直ちに分解されると考えられてきたが、実際には体液中の



The role of exosome in skin aging and its implications to therapy

Masatoshi Jinnin

Department of Dermatology, Wakayama Medical University Graduate School of Medicine

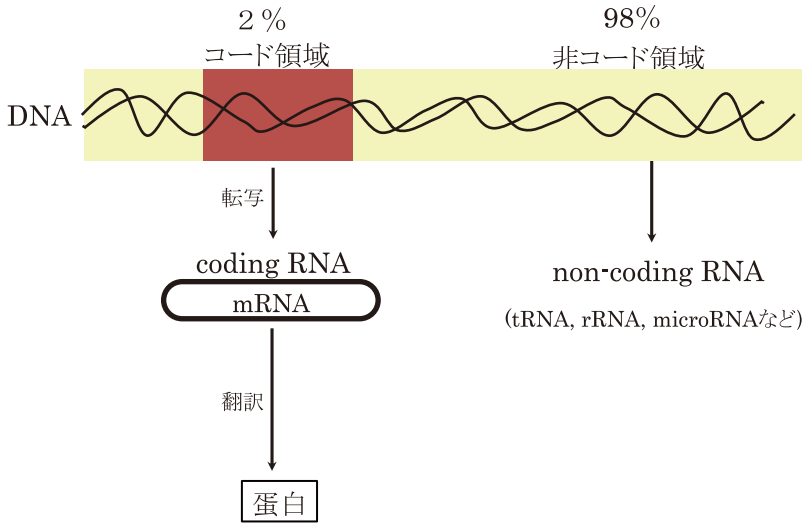


図 1　coding RNA と non-coding RNA の相関

microRNA は比較的安定して検出できる。近年の研究により、その理由は microRNA がエキソソームなどに保護されているからではないかと考えられている。エキソソームは細胞から細胞外に分泌される 0.1μm 以下の小胞で、血液、唾液、尿、関節液、さらには乳汁など様々な体液中に存在し、脂質二重膜で形成されているため非常に安定している（4℃で 2 週間保存が可能）。内部には microRNA のほか、蛋白質や mRNA を含有している。その後分泌元の細胞の情報を持つエキソソームがほかの細胞に取り込まれることによって細胞間コミュニケーションが行われていることも判明しており、様々な疾患の病態における役割が精力的に研究されるようになった。例えば悪性腫瘍において腫瘍細胞の転移先の臓器特異性を決定するメカニズムはこれまで不明であったが、エキソソームに含まれるインテグリンにより規定されていることが報告され[6]、エキソソーム解析による早期癌の検出・診断やエキソソーム治療などの可能性が示唆されている。

我々もこれまで microRNA が多数の皮膚疾患の病態に関わるのみならず、その血中あるいは毛髪中濃度が全く新しい診断あるいは病勢マーカーになりうると同時に、治療のターゲットとなる可能性を明らかにしてきた。たとえば尋常性乾癬においては表皮の増殖を cyclin E1 や MEK1 を介して制御する miR-424 の血清濃度がバイオマーカーとなることをみいだした[7]。また、重症薬疹の皮疹部表皮では miR-124 が増加し、アポトーシスに抑制的に働く BCL2L10 発現を抑えて皮膚のアポトーシスを誘導するとともに、血清中 miR-124 濃度が重症度と相関することを明らかにした[8]。同様に、全身性強皮症の硬化皮膚では let-7a の発現が低下しており、皮膚線維芽細胞において target であるコラーゲン発現を増加させることで線維化に寄与している[9]。さらに血清 let－7a 濃度は疾患の活動性と逆相関し、またマウスの腹腔内に let-7a を注射することで皮膚に強発現させるとブレオマイシンによる線維化を抑制できることを示した。

さらにエキソソームそのものについても、我々は最近全身性強皮症の皮膚線維化にエキソソームが関係することを初めて証明する[10]とともに、現在難治性皮膚潰瘍に対するエキソソームの臨床試験を行っている（NCT02565264）が、これは現時点で国内唯一のエキソソームの臨床応用の試みである。

以上のような取り組みを経て、本研究計画において我々は、皮膚老化においても microRNA やエキソソームの量、あるいはエキソソームの質（microRNA、蛋白質、あるいは mRNA の発現プロファイル）が変化し、皮膚を構成する各細胞（角質細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞など）の変化を誘導している可能性に注目し、皮膚老化と血液中・皮膚組織中の microRNA あるいはエキソソームの量および質の相関を調べた。

2．方　法

2．1．血清および皮膚組織

血清サンプルは、13 名の 27 ～ 56 歳の正常人から採取した。また、0 ～ 10 歳の若年者と 80 ～ 100 歳の高齢者の顔面の手術時の余剰皮膚をそれぞれ 3 例収集しホルマリン固定・パラフィン包埋したものを研究に使用した。また、非露光部の正常皮膚サンプルもそれぞれ 3 例ずつ用意した。

2．2．エキソソーム解析

血清中のエキソソームは ExoQuick（SBI 社）を用いて収集した。さらにそれぞれのサンプルについて ExoELISA kit（SBI 社）を用いた enzime-linked immunosorbent assay（ELISA）を行い、定量を行った。

2．3．microRNA PCR Array

PCRアレイには細胞の分化および発生に関する88種類のmicroRNAに対するプライマーがセットされた96-well RT^2 miRNA PCR Array Kit（SABioscience社）を使用した。Kitに含まれるhouse keeping geneを用い比較Ct法で解析した。

2．4．real-time PCR

Takara Thermal Cycler Dice（TP800）によりreal-time PCR法を行った。プライマーとしてはmiR-124およびU6を使用した。

2．5．in situ hybridization

miR-124に相補的な配列を持つ5’-locked digoxigenin-labeled nucleic acid probe（Exiqon社）を使用して、4μmに薄切したパラフィン包埋組織に対してin situ hybridizationを施行した。

2．6．senescence-associated β-galactosidase（SA-β-Gal）染色

Cellular Senescence Assay Kit（Chemicon International Inc社）を用いて行った。細胞にfixing solutionを投与し15分間室温でおいた後、SA-β-gal Detection Solutionを加え、37度で1晩培養した。

2．7．in situ hybridization

正常ヒト表皮角質細胞（normal human epidermal keratinocytes; NHEK）はLonza社から購入した。KGM-Gold Bullet Kitを用いて、5% CO_2インキュベーターで培養を行った。

2．8．microRNA mimic

内在性microRNAの機能を模倣するようにデザインされた合成二本鎖RNAであるmicroRNA mimicはQiagen社から購入した。本研究ではmiR-124に特異的なmicroRNA mimicおよびcontrol microRNA mimicを使用し、transfection reagentとしてはlipofectamine RNAiMAX（invitrogen社）を用いて細胞に導入した。

2．9．細胞数測定

細胞数測定に際しては、接着細胞をトリプシン処理で浮遊させ、Coulter Particle Counter（Beckman Coulter社）で細胞数をカウントした。

2．10．統計解析

統計解析として、中央値の比較にはMann-Whitney testを使用し、p値<0.05を統計学的に有意とした。

3．結　果

3．1．年齢とエキソソーム量の相関

最初に、27～56歳の正常人から血清中のエキソソームを抽出し、その抽出物をELISA法にて定量した。年齢と血清中エキソソーム量の相関を調べたが、明らかな相関を認めなかった（R=0.18, P=0.55, 図2）。また、免疫染色を施行したが老化皮膚とエキソソーム発現量を見いだすことができなかった（data not shown）。

そこで次に老化皮膚におけるmicroRNA発現の検討を行った。

3．2．老化皮膚とmicroRNAの検討

まず、若年者（0～10歳）と高齢者（80～100歳）の顔面

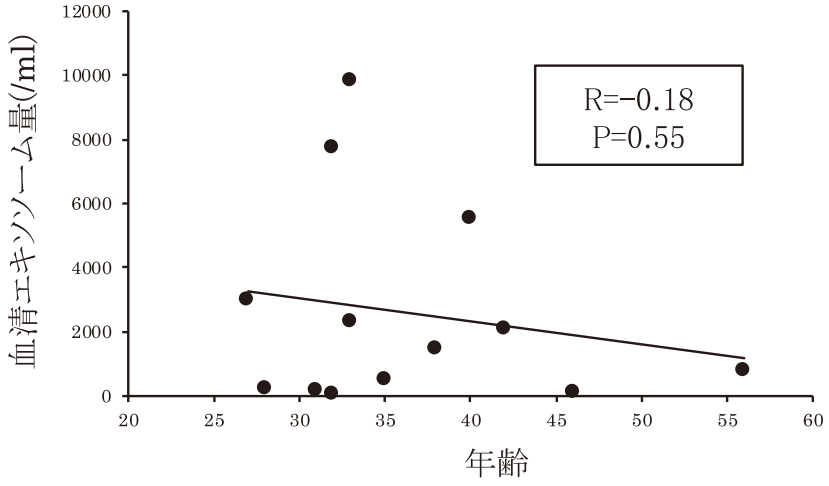


図2　正常人における、年齢と血清中エキソソーム量の相関

皮膚組織3例ずつから抽出したmicroRNAを等量混合したサンプルを用意し、それぞれの皮膚におけるmicroRNAの発現パターンをPCRアレイで評価した。アレイに含まれる88種類のmicroRNAの中で若年者に比べ高齢者の顔面皮膚で発現が増加しているものとして、let-7a, miR-18a, miR-124, miR-192, miR-196a, miR-206, miR-208, miR-215, miR-219-5p, miR-302c, miR-488, およびmiR-518bがリストアップされた。この中で最も発現の差が大きかったmiR-124に注目した。アレイの結果をvalidateするためにサンプル数を増やし、miR-124に特異的なプライマーを用いてreal-time PCRを行ったところ、miR-124は若年者に比べて高齢者の顔面の皮膚において発現が上昇しており、統計学的な有意差もみられた（図3）。そのため、PCRアレイの結果が再現されたと考えられた。

次に、miR-124が老化皮膚のどの細胞で増加しているか局在を調べた。若年者および高齢者の正常顔面皮膚組織のin situ hybridizationでは、高齢者の表皮基底層がmiR-124のプローブで染色されたが、若年者のほうでは染色されなかった（図4）。つまり、miR-124は老化皮膚の表皮基底層で増加していると考えられた。

続いて、老化皮膚におけるmiR-124の機能を調べた。miR-124 mimicを強発現させると培養ヒト正常表皮角化細胞の形態が大型化し細胞老化の兆候を示した（図5）。SA-β-galにて老化細胞の核を染色するとmiR-124 mimicを導入した細胞ではコントロール細胞よりもSA-β-gal陽

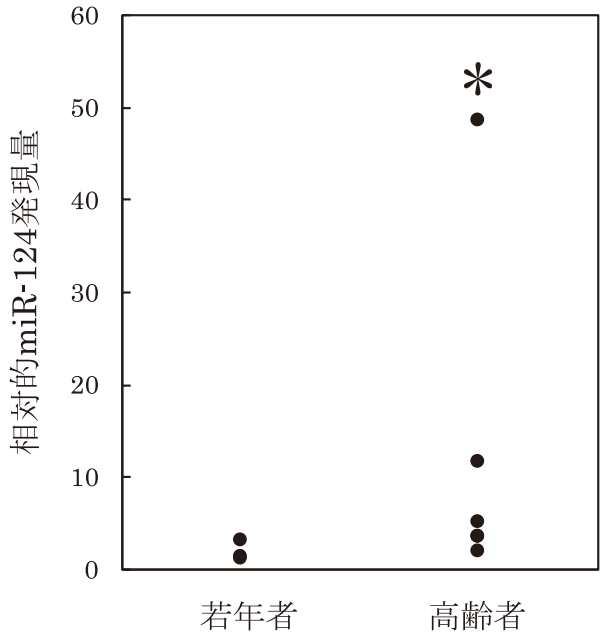


図3　若年皮膚(n=3) と高齢者皮膚(n=6) における miR-124 発現量の比較　*p<0.05

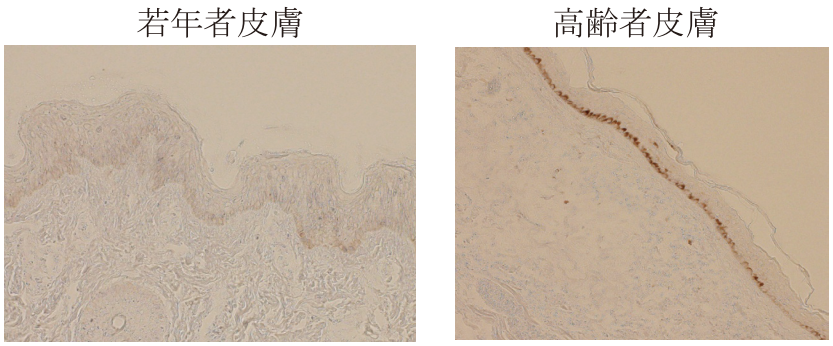


図4　in situ hybridization 法による、若年者および高齢者の正常顔面皮膚組織の miR-124 発現の比較

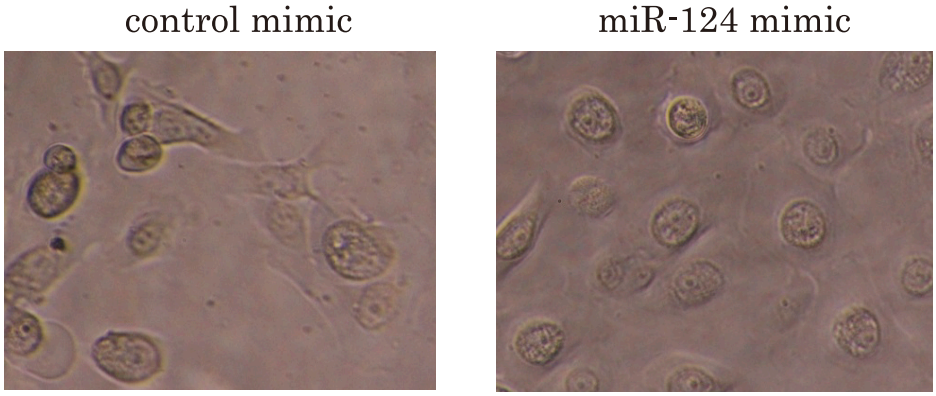


図5　miR-124 強発現下での、細胞形態の変化

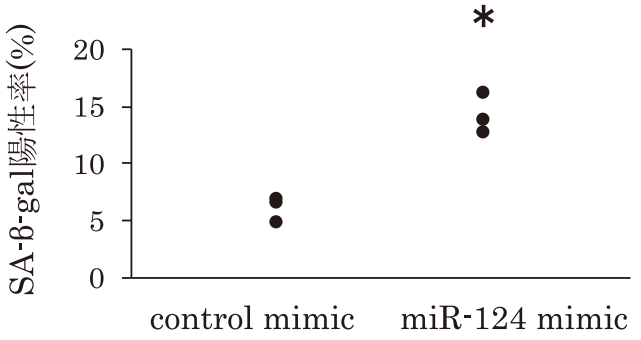


図６　miR-124 強発現下での、培養正常表皮角化細胞の SA-β-gal 染色率の変化　*p＜0.05

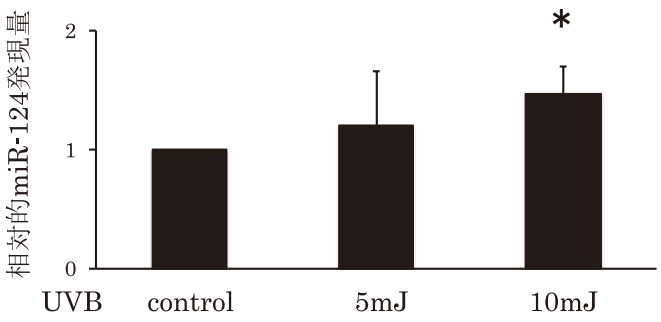


図７　培養正常表皮角化細胞における、miR-124 発現量に対する UVB 照射の影響　*p＜0.05

性細胞の率が有意に高くなった（図6）。つまり、miR-124は表皮角化細胞において細胞の老化を誘導している可能性が示唆された。

最後に、miR-124が老化皮膚で増加するメカニズムを検討した。培養正常表皮角化細胞にUVB照射を３日間連続で行い、その24時間後に細胞からmicroRNAを回収した。miR-124の発現は、UVBの照射量に比例して上昇し、コントロール群と10mJ照射群では有意差が見られた（図7）。逆に、非露光部の正常皮膚組織を用いてreal-time PCRを行ったが、若年者と高齢者でmiR-124発現に有意差は認めなかった（data not shown）。この結果により、紫外線暴露が老化皮膚でのmiR-124の発現上昇に関係していると示唆された。

４．考　察

本研究において我々はmicroRNAのうちmiR-124が老化皮膚において紫外線の影響で増加し、それによって細胞老化を誘導していることを示した[11]。皮膚老化の予防・改善はコスメトロジーの重要なテーマである。これまで我々は基礎研究として、例えば老化の原因となる活性酸素を除去するSuperoxide dismutaseの皮膚疾患における研究歴を有する[12-14]。そして、この研究により皮膚老化のmicroRNAを介した分子機序が明らかになれば、microRNAによる皮膚老化・肌年齢の定量化や客観的評価に加え、microRNAによる皮膚老化のコントロールが可能になる可能性がある。さらに、microRNAによる皮膚老化の予防は美容という観点のみならず、皮膚老化に伴う様々な疾患（皮膚癌や皮膚掻痒症など）の予防につながる可能性もある。今後、miR-124のターゲットの同定も必要となるが、たとえばweb上のプログラムであるTargetscan（http://www.targetscan.org/vert_72/）ではERK2など細胞増殖に関わる分子がターゲットと予測されている。

一方、エキソソームについても今後さらに皮膚および血清サンプル数を増やして実験を繰り返すことで、将来的に皮膚老化における関与の有無を再度確かめたいと考えている。

本報告書は文献11の内容をもとに作成した。

（引用）

1）Friedman, R.C., *et al.* Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* **19**, 92-105（2009）.
2）Maurer, B., *et al.* MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* **62**, 1733-1743（2010）.
3）Nakashima, T., *et al.* Down-regulation of mir-424 contributes to the abnormal angiogenesis via MEK1 and cyclin E1 in senile hemangioma: its implications to therapy. *PLoS One* **5**, e14334（2010）.
4）Yamane, K., *et al.* Down-regulation of miR-124/-214 in cutaneous squamous cell carcinoma mediates abnormal cell proliferation via the induction of ERK. *J. Mol. Med. (Berl)* **91**, 69-81（2012）.
5）Shimozono, N., *et al.* NUP160-SLC43A3 Is a Novel Recurrent Fusion Oncogene in Angiosarcoma. *Cancer Res.* **75**, 4458-4465（2015）.
6）Hoshino, A., *et al.* Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* **527**, 329-335（2015）.
7）Ichihara, A., *et al.* microRNA-mediated keratinocyte hyperproliferation in psoriasis vulgaris. *Br. J. Dermatol.* **165**, 1003-1010（2011）.
8）Ichihara, A., *et al.* Upregulation of miR-18a-5p contributes to epidermal necrolysis in severe drug eruptions. *J. Allergy Clin. Immunol.* **133**, 1065-1074（2014）.
9）Makino, K., *et al.* The downregulation of microRNA let-7a contributes to the excessive expression of type

I collagen in systemic and localized scleroderma. *J. Immunol.* **190**, 3905-3915 (2013)
10) Nakamura, K., *et al.* Altered expression of CD63 and exosomes in scleroderma dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci.* **84**, 30-39 (2016).
11) Harada, M., *et al.* The expression of miR-124 increases in aged skin to cause cell senescence and it decreases in squamous cell carcinoma. *Biosci. Trends* **10**, 454-459 (2017).
12) Jinnin, M., *et al.* Elevated serum levels of manganese superoxide dismutase in patients with eosinophilic fasciitis. *Clin. Rheumatol.* **22**, 505 (2003).
13) Jinnin, M., *et al.* Serum levels of manganese superoxide dismutase in patients with localized scleroderma. *Exp. Dermatol.* **13**, 357-360 (2004).
14) Jinnin, M., *et al.* Serum levels of manganese superoxide dismutase in patients with mixed connective tissue disease. *Clin. Exp. Rheumatol.* **23**, 549-550 (2005).

皮膚における自己反応性 $CD4^+$ T 細胞による標的抗原認識機構の解明

慶應義塾大学医学部皮膚科
高橋　勇人

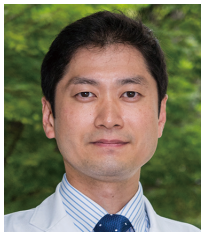
Interface dermatitis is a pathological term that consists of lymphocyte infiltration into dermo-epidermal junction, exocytosis, liquefaction degeneration of keratinocytes in the basal layer, Civatte body. This pathological change is commonly and frequently seen in several inflammatory skin diseases such as lichen planus, graft-versus-host disease, dermatomyositis, lupus erythematosus, severe drug adverse eruption and so on. However, the details on the pathomechanism of the disease remains still unclear. Recently we developed Dsg3-specific T cell receptor transgenic mice (Dsg3H1 mice) that T cells recognize Dsg3, epidermal targeted autoantigen by pemphigus vulgaris. Dsg3H1 $CD4^+$ T cells can recognize Dsg3 in vivo and attack epidermal keratinocyte when they are transferred into $Rag2^{-/-}$ mice. In this study, we investigated pathomechanism of interface dermatitis by using Dsg3H1 T cells. When factor X is knocked-out in Dsg3H1 $CD4^+$ T cells, recipient $Rag2^{-/-}$ mice did not develop interface dermatitis. However, Dsg3H1 $CD4^+$ T cells vigorously proliferated in skin-draining lymph nodes and prominent lymphadenopathy was observed. This result suggested that factor X is important for Dsg3H1 T cells to leave lymph nodes to target tissue but not to recognize the antigens and proliferate. On the other hand, how Dsg3H1 $CD4^+$ T cells recognize epidermal autoantigen and damage keratinocytes is another question. Antigen presentation by MHC class II on keratinocytes is believed to mediate this action. But supportive evidence is very limited. Using animal model of interface dermatitis, this fundamental question can be answered. The investigation to obtain a conclusion is still under way. In conclusion, through this study, factor X was identified as crucial molecule to achieve interface dermatitis.

1．緒　言

Interface dermatitis（ID）は扁平苔癬、移植片対宿主病（GVHD）、膠原病（皮膚筋炎、全身性エリテマトーデスなど）、重症薬疹（Stevens-Johnson症候群、中毒性表皮壊死症）などに認める皮膚炎の一型であり、皮膚病理学的な分類である。IDは様々な疾患に共通して認める病理学的変化であるため、日常診療において比較的遭遇する頻度の高い皮膚炎である。しかしその発症メカニズムの詳細に関して、明確には理解されていない。

以前より、私たちは尋常性天疱瘡（PV）自己抗原であるDsg3[1]に対する自己反応性T細胞の研究を行ってきた。Dsg3は表皮角化細胞に発現し、デスモゾームを構成するカドヘリン型膜タンパクであり、角化細胞同士の細胞接着に重要な働きを持つ。PVでは抗Dsg3自己抗体が産生され、Dsg3の細胞接着が障害されることで、角化細胞がバラバラとなり、口腔粘膜などに水疱・びらんが生じる自己免疫疾患である。Dsg3特異的T細胞の解析はPVモデルマウスを用いて解析された。PVモデルの作成には、まずDsg3に対する免疫寛容が成立していない$Dsg3^{-/-}$マウスを組み替えDsg3タンパクで免疫する。免疫された$Dsg3^{-/-}$マウスは容易に抗Dsg3抗体を産生するが、標的となるDsg3がないためPVの病態は再現できない。そこで$Dsg3^{-/-}$マウスのリンパ球を$Rag2^{-/-}$マウスに移入し、移入されたリンパ球が$Rag2^{-/-}$マウスで発現するDsg3を認識し、抗Dsg3抗体を産生するようになり、PVの病態が再現される[2]。

Dsg3特異的T細胞はこのPVモデルを利用し、以前にクローンが樹立された。そのクローンのいくつかは$Dsg3^{-/-}$マウス由来のB細胞と一緒に$Rag2^{-/-}$マウスに移入するとB細胞からの抗Dsg3抗体の産生を誘導し、PVフェノタイプを再現することができ、病原性を持つクローンであることがわかった[3]。次に、このクローンが持つDsg3特異的T細胞受容体遺伝子を単離し、これを利用してDsg3特異的T細胞受容体トランスジェニックマウス（H1マウス）を作成した[4]。H1マウス由来$CD4^+$T細胞はB細胞と一緒に$Rag2^{-/-}$マウスへ移入すると皮膚炎が著明に生じた。しかし、病理学的に観察しても抗Dsg3抗体の産生やPVフェノタイプは認めなかった。その代わりに、移入されたT細胞自身が皮膚に浸潤し、とくに表皮真皮境界部への浸潤と、基底層角化細胞の液状変性、Civatte bodyなどが観察され、観察された皮膚炎はIDであることがわかった。これを実験的自己免疫性皮膚炎（EAD; experimental autoimmune dermatitis）と呼んでいる。一方、H1マウスを$Dsg3^{-/-}$マウスと交配し、Dsg3非存在下でH1 T細胞を分化させ、これをB細胞と一緒に$Rag2^{-/-}$マウスへ移入すると抗Dsg3抗体の産生やPVフェノタイプが誘導され



Analysis on the mechanism of antigen recognition by autoreactive $CD4^+$T cells in the skin
Hayato Takahashi
Department of Dermatology, Keio University School of Medicine

た。すなわちDsg3特異的T細胞はある条件下においてはPVフェノタイプとIDの両方の病理学的変化を誘導できることがわかった。通常PVではIDは観察されないが、paraneoplastic pemphigus（PNP）ではPVフェノタイプとIDが同時に観察される。以上の過去の成績からDsg3特異的T細胞によるIDはPNPにおけるIDを考察するうえで、重要なモデルであると考えられた。

従来、T細胞による組織傷害性は$CD8^+$T細胞が主に担うものとされてきたが、EADでは$CD4^+$T細胞が組織傷害活性を持つ。$CD4^+$T細胞はMHC class II分子からの抗原提示を受けて、抗原認識を行う免疫細胞である。H1 T細胞は肝臓などDsg3を発現しない組織は傷害せず、Dsg3を発現する表皮を傷害する。一方、表皮角化細胞はIFN-γの刺激によりMHC class II分子を発現するが、角化細胞が自己抗原を適切に処理し、MHC II分子上に提示できる抗原提示細胞としての機能は十分には知られていない。そこで本研究ではEADを利用し、$CD4^+$T細胞がどのように末梢組織で抗原を認識し、組織を構成する細胞（角化細胞）を傷害するのか、その過程を詳細に解析し、$CD4^+$T細胞による組織傷害過程に関わる細胞集団や機構を第一の目標として明らかにする。

一方、臨床の現場においては、全身性ループスエリテマトーデス（SLE）に対してリツキサン（抗ヒトCD20モノクローナル抗体）が有効であることが報告されている。SLEは自己抗体が出現する自己免疫疾患ではあるが、自己抗体のみで病態が形成されるわけではなく、T細胞の浸潤を各病変組織で認める。SLEで生じる皮膚炎はIDの病型をとるが、皮膚においてもT細胞が浸潤し組織傷害を及ぼすことで病変が形成され発疹が生じていることがわかっており、自己抗体で皮膚炎が生じるとは考えられていない。このような臨床的な事実から、T細胞が介する炎症においても、B細胞がその病態において重要であることが示唆されるが、純粋にT細胞のみで生じる自己免疫の病態におけるB細胞の重要性については十分に理解されていない。そこで、EADをモデルに、T細胞依存性皮膚炎の病態におけるB細胞の役割を第二の目標として検討していく。

これらの解析結果によりIDを効果的に抑制する新たな方法を開発する基礎的データを構築することを本研究の目的とする。

2．方　法

2．1．Interface dermatitisの発症に重要なT細胞因子の同定

H1 T細胞はIFN-γ依存性にIDを誘導することからEADはTh1型の炎症であると考えられている[4]。そこで、T細胞がTh1に分化するのに必要な因子XのIDにおける重要性を検討するために、因子Xのノックアウトマウスと H1マウスを交配し、$X^{-/-}$-H1マウスを作成する。このマウス由来の$X^{-/-}$-H1 $CD4^+$T細胞を単離後、$Rag2^{-/-}$マウスへ移入し、IDの状態を観察する。また移入後にレシピエントマウスの脾臓やリンパ節を観察する。

2．2．Interface dermatitisの発症に重要な抗原提示細胞の解析

組織における、$CD4^+$T細胞の抗原認識機構を明らかにするため、抗原認識に必須の分子であるMHC class II分子を皮膚の様々な細胞から欠損させるマウスを作成する。各マウスの中で、EADが生じるか否かを評価することにより、$CD4^+$T細胞が末梢組織を傷害する際に必要な抗原提示細胞を明らかにしていく。具体的には、野生型マウス、MHC class II-KOマウス、Langerin-DTAマウス、Rag2-KOマウスなどを交配し、骨髄移植を組み合わせることにより、角化細胞、ランゲルハンス細胞、真皮樹状細胞などがMHC class II分子を欠損する、あるいは、細胞が存在しないことにより抗原提示がされない状況を作成できる。これらのマウスをレシピエントとしてH1 T細胞を移入してEADの誘導を試み、EAD発症の有無を確認する。

2．3．EADの病態におけるB細胞の役割の検討

Dsg3H1マウスよりDsg3H1 T細胞を単離し、$Dsg3^{-/-}$マウス由来B細胞と一緒に$Rag2^{-/-}$マウスへ移入するとIDが生じる。この時、B細胞を一緒に移入しない群を同時に作成し、移入後に観察される体重減少、皮疹重症度のスコア、14日後の病理学的変化を両群で比較検討する。この実験により表皮に対する細胞性免疫におけるB細胞の重要性が検討できる。

3．結　果

3．1．Interface dermatitisにおける因子Xの役割の検討

因子XはT細胞がTh1に分化する際に重要な働きを持つ分子である。この因子Xを欠失したH1 T細胞を$Rag2^{-/-}$マウスに移入し、レシピエントマウスの皮膚症状を観察したところ、コントロールマウスに比べて症状が軽微であった。またレシピエントマウスの皮膚所属リンパ節を観察すると、コントロールマウスのリンパ節に比べて、$X^{-/-}$-H1 $CD4^+$T細胞を移入されたマウスのリンパ節は著明に腫脹していた。またリンパ節に存在する$X^{-/-}$-H1 $CD4^+$T細胞のIFN-γ産生はほとんど観察されなかった。これらの結果から、因子XはEADにおいてTh1への分化に大事であることがわかった。またリンパ節内での抗原認識自体には因子Xは関連しないため、リンパ節内で$X^{-/-}$-H1 $CD4^+$T細胞は抗原刺激をうけ増殖するが、リンパ節から皮膚へ遊走できなくなっている機序が考えられた。

3．2． Interface dermatitisの発症に重要な抗原提示細胞の解析

本研究を進めていく中で、MHCII$^{-/-}$マウスに野生型から骨髄移植したマウスは2～3ヶ月かけて全身に炎症が生じることがわかった。このマウスにはCD4^{+}T細胞は通常通り分化している。炎症が生じる機序として分化したT細胞に対する免疫寛容機構が通常通り働かない状態となっていることが想定された。さらに、末梢組織におけるMHC class II分子は発現できない状況にあるが、それにもかかわらず、末梢組織の炎症が観察されることから、末梢組織でのMHC class II分子は末梢組織の炎症が惹起されるうえで無関係である可能性が示唆された。しかし、このマウスではCD8^{+}T細胞が炎症を惹起している可能性もあり得るため、さらなる検討が必要と考えられた。

一方、Rag2$^{-/-}$マウスとLangerin-DTAマウスを交配しLangerin-DTA-Rag2$^{-/-}$マウスを作成した。Langerin-DTAマウスではランゲルハンス細胞を欠失する。このマウスにH1 CD4^{+}T細胞を移入したところ、EADの症状が増悪することがわかった。またランゲルハンス細胞とCD4^{+}T細胞を共培養すると制御性T細胞が有意に増殖することがわかった。これらの結果から、ランゲルハンス細胞は制御性T細胞の誘導と関わり、EADの症状に対して抑制的に働いていることがわかった。

最後に、MHCII$^{-/-}$マウスにRag2$^{-/-}$マウスから骨髄移植し、角化細胞などのradio-resistantな末梢組織を構成する細胞でMHC class II分子が欠損した状態で、かつT細胞とB細胞を欠失したマウス（[Rag2$^{-/-}$→MHCII$^{-/-}$]マウス）を作成した。コントロールとしてRag2$^{-/-}$マウスにRag2$^{-/-}$マウスから骨髄移植した[Rag2$^{-/-}$→Rag2$^{-/-}$]マウスでは通常通りのEADが生じた。一方で、[Rag2$^{-/-}$→MHCII$^{-/-}$]マウスにH1 CD4^{+}T細胞を移入すると、軽度のEADが生じることが観察された(図1)。しかし、[Rag2$^{-/-}$→MHCII$^{-/-}$]マウスを解析すると骨髄移植が完全ではなくレシピエント側の血球も観察し得たことから、観察されたEADの程度が軽微であった理由として、制御性T細胞の残存や、ランゲルハンス細胞残存の影響など角化細胞以外の影響の存在も考えられた。今後は、実験条件の改善が結論を得るために必要と考えられた。

3．3．EADの病態におけるB細胞の役割の検討

H1マウスよりH1 CD4^{+}T細胞を単離し、Dsg3$^{-/-}$マウス由来B細胞と一緒にRag2$^{-/-}$マウスへ移入した群と、T細胞のみを移入した群を作成し、両群を比較した。その結果、T細胞とB細胞を両方移入した群でより著しい体重減少と皮疹重症度のスコアの悪化を認めた。この実験結果から、T細胞による表皮に対する細胞性免疫においても、B細胞の存在が重要であることがわかった。

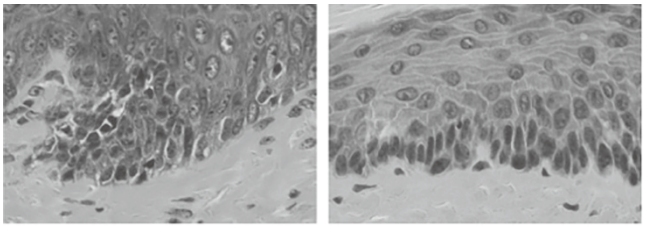


図1　骨髄移植で作成したレシピエントマウスで生じたID
(左) Rag2$^{-/-}$ マウスから Rag2$^{-/-}$ マウスに骨髄移植したマウスに ID を誘導した。表皮内に細胞浸潤を認める。
(右) はコントロール。明らかな細胞浸潤を認めない。

4．考　察

T細胞はinterface dermatitisだけでなく、湿疹、接触性皮膚炎、アトピー性皮膚炎、脂漏性皮膚炎や乾癬、その他のほぼ全ての炎症性皮膚疾患の病態にかかわり、自己抗原あるいは外来抗原特異的に免疫応答を開始する。本研究を通じてなされる、皮膚におけるT細胞の抗原認識機構の理解はinterface dermatitisのみならず、湿疹やアトピー性皮膚炎などの疾患制御の観点から重要であるだけでなく、皮膚の健康維持のために大きく役立つと考えられる。

本研究では因子Xのinterface dermatitisにおける重要性が明らかになったが、それ以上に因子Xが欠損すると、Tリンパ球がリンパ節外に出ることができず、リンパ節内にとどまって、増殖を続けることがわかった。現在、そのメカニズムについては検討中であるが、少なくとも、この結果は、因子Xを阻害するような治療は症状の緩和には有用である可能性はあるが、自己免疫応答自体を止めることができないことを意味し、因子Xを阻害する戦略は、治療としては不完全なアプローチになりうることがわかった。

次に本研究では、まだ最適な条件ではないものの、角化細胞のMHC class II分子が欠損した状態でも、interface dermatitisが生じうることが示唆された。このことは、T細胞が角化細胞を認識し、傷害するためには、角化細胞由来の抗原を認識する必要があるが、角化細胞自身が抗原提示をしなくても、角化細胞が認識され傷害されることを意味する。現在のところ、想定される機序は不明であるが、新しい抗原認識機構が存在する可能性がある。

5．総　括

本研究を通じて、interface dermatitisが生じるために必要な分子や新たな抗原認識機構の可能性が明らかになった。今後、より詳細なメカニズムが明らかになれば、皮膚の健康増進に貢献できると考えられた。

(参考文献)

1) Amagai M., Klaus-Kovtun V. and Stanley J. R.

Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. Cell 1991; 67（5）: 869–77.

2） Amagai M., Tsunoda K., Suzuki H. et al. Use of autoantigen–knockout mice in developing an active autoimmune disease model for pemphigus. J Clin Invest 2000; 105（5）: 625–31.

3） Takahashi H., Amagai M., Nishikawa T. et al. Novel system evaluating in vivo pathogenicity of desmoglein 3–reactive T cell clones using murine pemphigus vulgaris. J Immunol 2008; 181（2）: 1526–35.

4） Takahashi H., Kouno M., Nagao K. et al. Desmoglein 3–specific $CD4^+$ T cells induce pemphigus vulgaris and interface dermatitis in mice. J Clin Invest 2011; 121（9）: 3677–88.

皮膚制御に関わる新規機能性脂質の同定と脂質フローによる皮膚疾患制御機構の解明

東京大学大学院医学系研究科分子細胞生物学専攻細胞情報学分野

武富　芳隆

Epidermal lipids are important for skin homeostasis. However, the overall view of the roles of lipids, particularly nonceramide lipid species, in epidermal biology still remain obscure. Here we show that epidermal sPLA$_2$ (Ep-PLA$_2$), a functionally phospholipase A$_2$ expressed in the stratum granulosum of the mouse and human epidermis, regulates epidermal permeability barrier homeostasis and protects against atopic dermatitis through mobilization of polyunsaturated fatty acids (PUFAs). In a survey of knockout mouse lines of the various PLA enzymes, global and keratinocyte-selective Ep-PLA$_2$ knockout mice has a defect of the epidermal barrier, due to reduced synthesis of natural moisturizing factor, combined with abnormal type 2 immune responses and showed exacerbated antigen-induced atopic dermatitis. Primary keratinocytes from Ep-PLA$_2$-null mice had signs of aberrant cell proliferation, differentiation, and activation in association with skin barrier defect. Several screening approaches by lipidomics analysis of mouse skin, phenotypic analyses of mouse lines deficient in various lipid receptors and biosynthetic enzymes, and gene expression profiling in keratinocytes revealed that Ep-PLA$_2$ is coupled with the production of a large pool of cutaneous PUFA-derived lipid mediators. The constitutive levels of PUFAs and their metabolites in the skin were lower in Ep-PLA$_2$-null than in wild-type mice. Actually, an abnormality in epidermal permeability barrier observed in mice lacking Ep-PLA$_2$ were phenocopied in lipid X receptor-deficient mice. The expression of Ep-PLA$_2$ and the lipid receptor are upregulated during keratinocyte differentiation. Treatment with the lipid receptor agonist restored defective differentiation and/or activation of Ep-PLA$_2$-null keratinocytes. In human atopic dermatitis lesions, the expression levels of Ep-PLA$_2$ was inversely correlated with the severity of atopic dermatitis. Thus, our results underscore a previous unrecognized role of nonceramide lipid species in skin allergy, and the novel role of a particular Ep-PLA$_2$-driven lipid metabolism in epidermis.

1．緒　言

環境因子に常に曝されている皮膚には、皮膚バリアによって異物の侵入や水分蒸散を防ぐなどの固有の防御機構が備わっている。皮膚のバリア機能が損なわれることにより環境因子が過度に体内に侵入すると、2型免疫系が過剰に活性化し、難治性の慢性皮膚疾患であるアトピー性皮膚炎へと遷移するとともに、遠隔組織に喘息や鼻炎などの様々なアレルギー性疾患を招く。したがって、皮膚バリアあるいはその異常に基づく過剰な免疫応答を適切に統制することは、皮膚の健康の増進のみならずアレルギー性疾患の克服を目指す上で重要である。

脂質の量的・質的な異常は皮膚の調節に大きな影響を与えるが、皮膚における生理的環境下での機能性脂質の固有の動員経路やその生物学的意義は体系的に理解されているとは言いがたい。脂質メディエーターをはじめとする生理活性脂質の多くはホスホリパーゼA$_2$（PLA$_2$：グリセロリン脂質を分解して脂肪酸とリゾリン脂質を生成する酵素群）により量と質が規定される。著者が所属する研究チームは、数多く存在するPLA$_2$分子群の固有の機能に着目し、本酵素群の欠損マウスの網羅的な導入と各欠損マウスが発症する表現型の一斉解析を実施すると同時に、これにPLA$_2$を起点とした脂質代謝フローを同定するための脂質網羅的分析（リピドミクス）を組み合わせた解析アプローチを展開することにより、各種PLA$_2$に固有の脂質代謝産物の同定とそれにより制御される生体応答の動作原理を解明してきた。皮膚との関連について我々は、①リンパ組織中のⅡD型分泌性PLA$_2$がドコサヘキサエン酸（DHA）などのω3脂肪酸あるいはそれ由来の脂質メディエーターの動員を介してTh1型またはTh17型免疫応答依存的に接触性皮膚炎または乾癬を抑制すること[1,2]、②毛包のⅡE型sPLA$_2$が毛の育毛に関わること[3]、③表皮角化細胞由来のⅡF型分泌性PLA$_2$が表皮中にリゾリン脂質（プラズマロージェン型リゾホスファチジルエタノールアミン）を動員することにより乾癬や皮膚癌などの表皮肥厚疾患を増悪すること[4]、④表皮角化細胞に発現している細胞内酵素PLPLA1（カルシウム非依存性PLA$_2$の一種）がアシルセラミドの生合成を通じて角層バリアの形成に必須の役割を担うこと[5]、などを報告した。我々はさらに、PLA（PLA$_1$またはPLA$_2$）群欠損マウスの皮膚の網羅的解析の過程において、epidermal PLA$_2$（Ep-PLA$_2$）が皮膚のバリア機能の調節に関わる予備的知見を得た。

そこで本研究では、PLA$_2$の新機能を切り口として、未解明であった皮膚における機能性脂質の動員機序とそれによる皮膚の恒常性・変容の新しい制御機構を解明すること、



Epidermal phospholipase A$_2$-driven lipid metabolism regulates skin barrier homeostasis and atopic dermatitis

Yoshitaka Taketomi

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo

ならびに当該脂質代謝の量的・質的な変動がアトピー性皮膚炎などの皮膚疾患に占める位置付けを確立することを目的とした。

2．方　法

2．1．マウスの皮膚バリア機能

マウスの皮膚のバリア機能は、①テヴァメーターを用いた経表皮水分蒸散、②ラマン分光法による皮膚中の角質細胞間脂質(セラミドやコレステロール)、天然保湿因子の測定、③タンパク質抗原の皮膚透過試験、④一次刺激性皮膚炎に関する表現型、などにより評価した。

2．2．アトピー性皮膚炎モデル

アトピー性皮膚炎モデルとして抗原誘導アトピー性皮膚炎を採用した。マウスの皮膚への抗原の反復塗布により生じるTh2型免疫応答(血中の抗原特異的IgEや所属リンパ節におけるTh2サイトカイン(IL-4、IL-5、IL-13)産生など)ならびに皮膚におけるアレルギー性炎症(好酸球浸潤や皮膚肥厚など)について解析した。

2．3．表皮角化細胞を用いた解析

表皮角化細胞は、新生児マウスの皮膚より単離した初代培養表皮角化細胞またはヒト表皮由来初代角化細胞を用い、カルシウムによる分化刺激に伴う応答性について解析した。

2．4．リピドミクス解析

マウスの皮膚中の高度不飽和脂肪酸（PUFAs）やそれ由来の脂質メディエーター、アシルセラミドなどの脂質成分は液体クロマトグラフィー／質量分析法LC-MS/MSを用いて測定した。

2．5．ヒト検体を用いた解析

東京大学医学部附属病院皮膚科との連携のもと、ヒトアトピー性皮膚炎の皮膚検体を用い、脂質代謝関連分子の発現を検討した。

3．結　果

3．1．皮膚バリアに関わるPLA2の網羅的スクリーニング

皮膚のバリア機能が損なわれると体内の水分が損失し、乾燥状態が生じる。通常飼育環境下における成体のPLA群欠損マウスの経表皮水分蒸散量を測定した結果、唯一Ep-PLA_2欠損マウスで経表皮水分蒸散の亢進が認められた。

皮膚バリアの乱れによって刺激物質に対する過敏反応が生じるが、経表皮水分蒸散の場合と同じく、PLA群欠損マウスの中でEp-PLA_2欠損マウスでのみ野生型マウスと比べ一次刺激性皮膚炎の増悪が認められた。

これらのPLA群欠損マウスの網羅的スクリーニングを通じて、Ep-PLA_2が皮膚バリアの調節に関与する可能性が浮上した。

3．2．皮膚におけるEp-PLA2の発現

皮膚は表層より表皮、真皮、皮下組織に分けられ、このうち表皮は下層から表層へ向けて基底層、有棘層、顆粒層、角層の4層から構成される。マウス皮膚を用いた免疫染色の結果、Ep-PLA_2は主に表皮に発現しており、顆粒層マーカーであるロリクリンと同一の局在性を示した。マウスまたはヒトの表皮角化細胞において、Ep-PLA_2の発現は分化に伴い表皮角化細胞に特有の分化マーカー（ケラチン1など）と同様に誘導された。したがって、Ep-PLA_2は表皮角化細胞の分化に伴い発現誘導され、顆粒層に局在することが明らかとなった。

3．3．Ep-PLA2欠損マウスが呈する皮膚バリア異常

皮膚のバリア機能の維持にはセラミドを中心とする脂質ラメラによる角層バリアと、タイトジャンクションを中心とする顆粒層の表皮バリアが関わる。角質細胞間脂質（セラミド、脂肪酸、コレステロール）および天然保湿因子は角層で水分を保つ上で重要な働きを担う。これらの成分について解析した結果、Ep-PLA_2欠損マウスではセラミドやコレステロールは野生型マウスと同様に正常であったが、天然保湿因子が減少していた。さらに、野生型マウスの皮膚にタンパク質抗原を塗布すると表皮の顆粒層バリアによって抗原の浸透が妨げられたが、欠損マウスでは抗原が容易に顆粒層を超え真皮にまで達した。

欠損マウスの皮膚では、表皮の基底層マーカー（ケラチン5）の発現は正常であったが、有棘層マーカー（ケラチン1）の発現が野生型マウスより増加し、反対に顆粒層マーカー（ロリクリン）の発現が減少しており、分化異常を生じていた。

我々はコンディショナルEp-PLA_2欠損マウスを樹立し、表皮角化細胞（ケラチン14プロモーター）選択的に本酵素を欠損させ、当該皮膚解析を実施した。その結果、全身性のEp-PLA_2欠損マウスにおいて認められる表皮バリア異常は皮膚選択的Ep-PLA_2欠損マウスにおいても同様に認められた。したがって、表皮角化細胞に発現しているEp-PLA_2が表皮バリアの恒常性の維持に重要であることが強く示唆された。

3．4．Ep-PLA2欠損マウスの表皮角化細胞の異常

マウスの皮膚より表皮角化細胞を単離し、表皮角化細胞の機能におけるEp-PLA_2欠損の影響について解析した。欠損細胞では野生型細胞と比べ増殖および遊走能が低下し

ており、分化刺激に対して分化マーカー（ケラチン1、ケラチン10）の発現誘導が亢進した状態、すなわち分化異常（過分化）を生じた。さらに、欠損細胞では2型免疫応答に関わるサイトカイン（IL-33、TSLP）の発現（活性化の指標）が亢進した。

マウスの皮膚あるいはそれ由来の表皮角化細胞を用いたマイクロアレイ解析の結果、Ep-PLA_2欠損では細胞間接着分子（クローディンやタイトジャンクションタンパク質など）の発現が全体的に減少傾向を示すと同時に、これらの分子を分解するプロテアーゼ（カリクレインなど）の発現が野生型より増加していたことから、顆粒層のバリアが損なわれていることが想定された。

これらの結果から、Ep-PLA_2欠損マウスの表皮角化細胞は、増殖分化異常、活性化亢進、遊走不全、ジャンクション形成不良を生じることが示唆された。

3．5．Ep-PLA_2欠損マウスのアトピー性皮膚炎に関する表現型

Ep-PLA_2欠損による表皮バリア異常ならびに2型免疫応答の増強がアトピー性皮膚炎などの慢性アレルギー病態を進展させるかについて検討した。Ep-PLA_2欠損マウスにアトピー性皮膚炎モデルを施行した結果、野生型マウスと比べ抗原曝露に伴う血中の抗原特異的IgEの産生が亢進するとともに、所属リンパ節における抗原依存的なTh2サイトカインの産生が増強され、Th2型免疫応答が亢進していた。さらに、欠損マウスでは抗原曝露に伴う皮膚肥厚や真皮中への好酸球浸潤の増多などのアトピー性皮膚炎に特徴的なアレルギー性炎症の増悪が認められた。これら一連の結果より、Ep-PLA_2欠損マウスでは表皮バリアの恒常性が異常を生じることで、抗原曝露に伴う2型免疫系の活性化が亢進し、アトピー性皮膚炎の慢性アレルギー病態が進展したものと考えられる。

3．6．Ep-PLA_2が動かす脂質代謝経路の包括的探索

Ep-PLA_2欠損マウスは通常飼育下で表皮バリア異常を呈することから、Ep-PLA_2の下流で機能する責任脂質は欠損マウスの皮膚中で構成的に減少していることが予想された。そこで、通常飼育下の野生型およびEp-PLA_2欠損マウスの皮膚を用いてリピドミクス解析を行ったところ、野生型マウスと比べ欠損マウスの皮膚中では、PUFAs（リノール酸、アラキドン酸、ω3脂肪酸など）ならびにそれら由来の代謝物の多くが部分的に減少していた。したがって、Ep-PLA_2は正常皮膚においてPUFAsまたはその代謝物を動員することが示唆された。

Ep-PLA_2の下流で産生される何らかの責任脂質が表皮バリアに関わるならば、脂質メディエーターの生合成酵素・受容体の欠損マウスの中にEp-PLA_2欠損マウスと同様の表現型を示す系統が存在するはずである。そこで我々は、各種脂質代謝酵素・受容体の欠損マウスの皮膚バリア機能を網羅的に解析した。その結果、あるPUFA由来の脂質メディエーターの受容体の欠損マウスにおいてEp-PLA_2欠損マウスと同様の皮膚バリア異常、すなわち経表皮水分蒸散の亢進と一次刺激性皮膚炎の増悪が認められた。

皮膚バリアに関わる責任脂質受容体は表皮角化細胞に発現しているはずである。そこで、マウス皮膚由来表皮角化細胞の分化に伴い発現誘導される脂質受容体を定量的PCRにより網羅的にスクリーニングしたところ、当該脂質受容体の発現が表皮角化細胞の分化に伴い最も著明に誘導された。

以上の結果を統合すると、Ep-PLA_2は表皮中においてPUFA由来脂質メディエーター経路を始動することが考えられる。

3．7．Ep-PLA_2を起点とした脂質代謝フローの検証

Ep-PLA_2欠損による表皮角化細胞の異常は当該脂質シグナルの低下を原因として生じることが想定される。そこで、上記3．4.のEp-PLA_2欠損マウスの表皮角化細胞の異常が、当該脂質受容体シグナルの賦活化によって正常化するかについて検証した。欠損表皮角化細胞の分化培養系に当該脂質受容体の作動薬を添加したところ、Ep-PLA_2欠損により生じる表皮角化細胞の分化（過分化：ケラチン10の発現亢進）および活性化（2型免疫亢進：IL-33の誘導増強）の異常が野生型細胞が示す応答性と同等まで正常化した。したがって、当該PUFA由来脂質シグナルは表皮角化細胞の適切な分化および過剰な2型免疫応答の抑制に関与することが示唆された。

3．8．ヒトアトピー性皮膚炎におけるEp-PLA_2の発現

Ep-PLA_2のヒトアトピー性皮膚炎との関連について検討を行った。健常人ならびにアトピー性皮膚炎患者の皮膚検体におけるEp-PLA_2の発現を免疫染色あるいは定量PCRにより解析した。健常人の皮膚において、Ep-PLA_2の染色はマウス皮膚の場合と同様に表皮に強く認められた。一方、アトピー性皮膚炎患者の皮膚では表皮全体が弱く染色され、これに加え真皮に浸潤した免疫細胞にも陽性所見が認められた。定量解析において、Ep-PLA_2の皮膚における発現は、健常人では発現分布および強度ともに健常人と比べアトピー性皮膚炎では減少した。本酵素の発現強度は、健常人では表皮の厚さと正の相関を示したのに対し、アトピー性皮膚炎患者では表皮の肥厚度（病態の重症度）と逆相関した。

さらに、Ep-PLA_2 mRNAの発現は角層で分解されて天

然保湿因子を生成するフィラグリンあるいは当該脂質受容体のmRNA発現と正の相関を示した。

したがって、Ep-PLA_2の皮膚における発現は皮膚バリアと連関すること、ならびにアトピー性皮膚炎の発症進展に伴い減少することが明らかとなり、Ep-PLA_2欠損マウスの結果と合致した。

4．考　察

Ep-PLA_2は表皮顆粒層において表皮角化細胞から分泌され、PUFAsならびにそれら由来の脂質メディエーターを動員することにより、皮膚バリアの恒常性の維持に重要な役割を担うことが明らかとなった（図）。このEp-PLA_2を起点とする脂質代謝に不全が生じると、顆粒層の表皮バリアが損なわれ、環境因子の曝露に対して過剰な2型免疫応答が生じることによってアレルギー病態が慢性化し、アトピー性皮膚炎へと遷延化するものと考えられる。本研究の結果から、Ep-PLA_2の下流で動員される脂質経路を賦活化する戦略は、皮膚バリアを向上させることでアトピー性皮膚炎を予防するのに役立つことが期待される。また、Ep-PLA_2の発現は皮膚の健康状態の診断マーカーあるいはアトピー性皮膚炎の病態バイオマーカーとなり得る。

角質細胞間脂質のひとつである脂肪酸の皮膚における役割においては、リノール酸が皮膚バリア機能に必須なアシルセラミドに構成要素として取り込まれる必要があり、この欠乏は重篤な皮膚バリア異常をもたらすことが広く知られてきた[6]。また、リノール酸はさらに不飽和化・伸長化を受け、アラキドン酸やω3脂肪酸などのPUFAsに代謝され、生体膜に取り込まれる。しかしながら、一旦リン脂質に取り込まれたPUFAsが皮膚局所環境のいつ、どこで、いかなる経路を通じてどのような機能性脂質に変換され、皮膚の恒常性または変容機構の調節にどのように関わるのかについては定見が得られていなかった。これまでに、免疫応答との関連を中心にこれらのPUFA由来脂質メディエーターの機能が解析されてきたが、表皮角化細胞における役割については未解明な点が多い。最近、アラキドン酸代謝物である12-HHTが表皮角化細胞の遊走制御を通じて皮膚恒常性に関与することが報告され[7]、改めて非セラミド脂質による表皮角化細胞の調節に関心が向けられているが、本研究で見出した機能性脂質の受容体の欠損による皮膚バリア機能の異常は12-HHTの欠損と比べてはるかに顕著である。総じて本研究は、皮膚恒常性の調節に関わる新しいPLA_2依存的脂質メディエーター経路を明らかにしたものである。今後は、Ep-PLA_2が始動する脂質経路の異常による皮膚バリアの破綻からアトピー性皮膚炎、さらには肺における喘息など遠隔組織へとアレルギーが伝播するプロセスをさらに解明し、「皮膚の新規脂質経路によるアレルギーマーチの統制」に関する論文としてまとめたい。

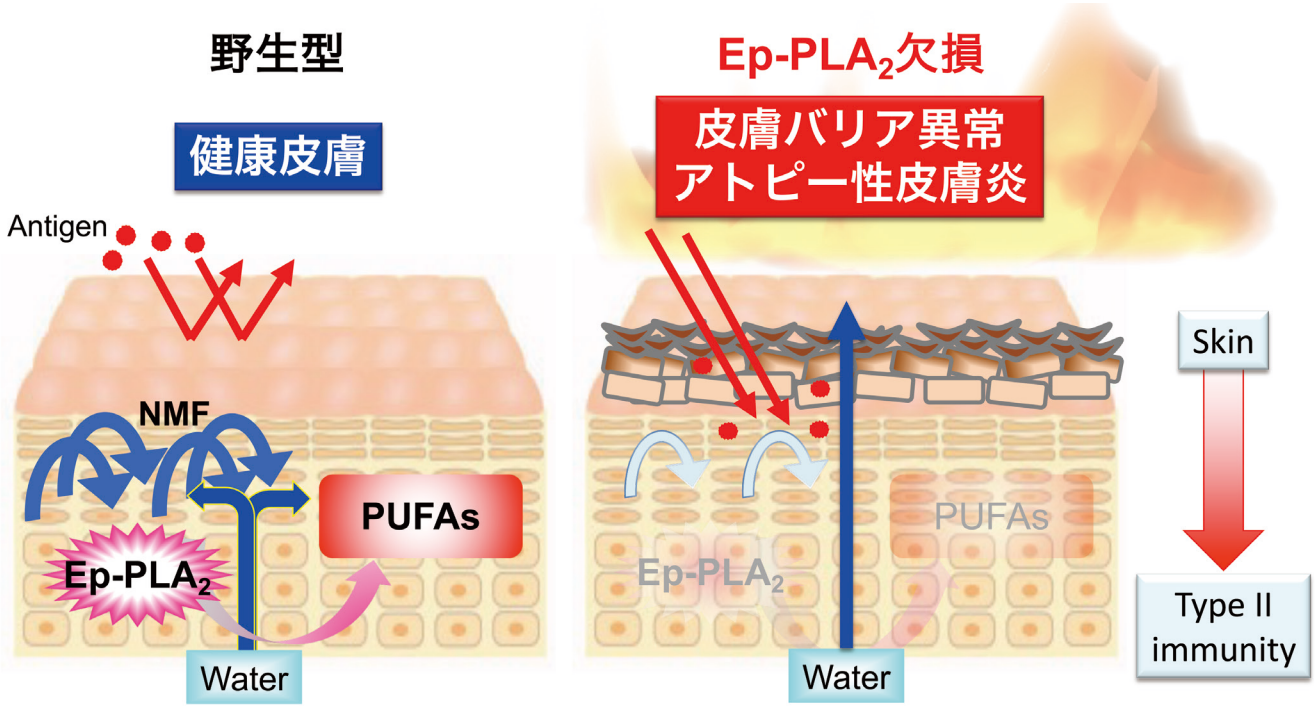


図　Ep-PLA_2は表皮バリアの恒常性を維持することによりアトピー性皮膚炎を抑制する

（引用文）

1）Miki, Y., Yamamoto, K., Taketomi, Y., Sato, H., Shimo, K., Kobayashi, T., Ishikawa, Y., Ishii, T., Nakanishi, H., Ikeda, K., Taguchi, R., Kabashima, K., Arita, M., Arai, H., Lambeau, G., Bollinger, J. M., Hara, S., Gelb, M. H., Murakami, M. Lymphoid tissue phospholipase A_2 group IID resolves contact hypersensitivity by driving anti-inflammatory lipid mediators. *J. Exp. Med.* 210, 1217–1234 (2013).

2）Miki, Y., Kidoguchi, Y., Sato, M., Taketomi, Y., Taya, C., Muramatsu, K., Gelb, M. H., Yamamoto, K., Murakami, M. Dual roles of group IID phospholipase A_2 in inflammation and cancer. *J. Biol. Chem.* 291, 15588–15601 (2016).

3）Yamamoto, K. Miki, Y., Satao, H., Nishito, Y., Gelb, M. H., Taketomi, Y., Murakami, M. Expression and function of group IIE phospholipase A_2 in mouse skin. *J. Biol. Chem.* 291, 15602–15613 (2016).

4）Yamamoto, K., Miki, Y., Sato, M., Taketomi, Y., Nishito, Y., Taya, C., Muramatsu, K., Ikeda, K., Nakanishi, H., Taguchi, R., Kambe, N., Kabashima, K., Lambeau, G., Gelb, M. H., Murakami, M. The role of group IIF secreted phospholipase A_2 in epidermal homeostasis and hyperplasia. *J. Exp. Med.* 212, 1901–1919 (2015).

5）Hirabayashi, T.　Anjo, T., Kaneko, A., Senoo, Y., Shibata, A., Takama, H., Yokoyama, K., Nishito, Y., Ono, T., Taya, C., Muramatsu, K., Fukami, K., Munoz-Garcia, A., Rrash, A. R., Ikeda, K., Arita, M., Akiyama, M., Murakami, M. PNPLA1 has a crucial role in skin barrier function by directing acylceramide biosynthesis. *Nat. Commun.* 8, 14609 (2017).

6）Melton, J. L., Wertz, P. W., Swartzendruber D. C., Downing, D. T. Effects of essential fatty acid deficiency on epidermal O-acyl-sphingolipids and transepidermal water loss in young pigs. Biochim. Biophys. Acta. 921, 191–197 (1987).

7）Liu, M., Saeki, K., Matsunobu, T., Okuno, T., Koga, T., Sugimoto, Y., Nakamizo, S., Yokoyama, C., Kabashima, K., Narumiya, S., Shimizu, T., Yokomizo, T. 12-Hydroxyheptadecatrienoic acid promotes epidermal wound healing by accelerating keratinocyte migration via the BLT2 receptor. *J. Exp. Med.* 211, 1063–1078 (2014).

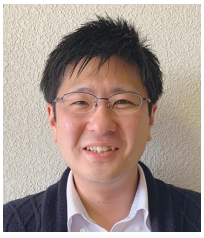
化粧品成分の安全性評価のための製品性状を考慮した経皮曝露量推算スキームの構築 —マニキュア用可塑剤の経皮曝露を考慮したリスクトレードオフ評価—

静岡県立大学
徳村　雅弘

Phosphorus-based compounds are ubiquitously found in indoor environment owing to their various applications (e.g., plasticizer and flame retardant), which are taken via various exposure routes. Conventionally, dust ingestion and inhalation are known as dominant exposure routes for these compounds. In this study, the dermal exposure to phosphorus-based compounds via using nail polish was quantitatively investigated as an alternative exposure route. The concentrations of phosphorus-based compounds in 45 nail polishes purchased from Japanese market were determined. Triphenyl phosphate (TPhP) were detected from the nail polishes made in USA, whose concentrations ranged 1.1–1.8 wt%. The potential dermal exposure rates of TPhP via using the nail polishes were estimated by using ConsExpo (Consumer Exposure Model v 5.0). The potential dermal exposure rates ranged 200 (5%ile)–1700 (50%ile)–5000 (95%ile) ng kg-bw^{-1} day^{-1}, which were more than 1400 times higher than the exposure rates via dust ingestion and inhalation previously reported. Margin of exposure (MOE) was 3.6×10^{5} (5%ile)–4.1×10^{4} (50%ile)–1.4×10^{4} (95%ile). As a comparison, the potential dermal exposure rates of dibutyl phthalate (DBP) and acetyltributylcitrate (ATBC), which are conventional and alternative plasticizers, respectively, were also estimated. The potential dermal exposure rates of DBP and ATBC ranged 360–3500–14000 and 430–4100–17000 ng kg-bw^{-1} day^{-1}, respectively. MOEs of DBP and ATBC were 4.1×10^{3}–4.2×10^{2}–1.1×10^{2} and 2.3×10^{5}–2.4×10^{4}–5.9×10^{3}, respectively. The dermal exposure to TPhP via using nail polish could be a significant exposure route and source for phosphorus-based compounds.

1．緒　言

リン系化合物は，可塑剤や難燃剤として多くの室内製品で使用されている[1-6]。これらリン系化合物は，室内空気を介した経気曝露とハウスダストを介した経口曝露が主な曝露経路として考えられていた[7-9]。しかし，近年，経皮曝露がリン系化合物の重要な曝露経路の一つである可能性が示唆されている[10-13]。例えば，Cequier et al.（2014）[14]は，皮膚に付着したハウスダストを介したリン系化合物の経皮曝露量が，経口曝露量と同等であったと報告している。また，Pelletier et al.（2017）[15]によれば，空気との接触に伴う気相中リン系化合物の経皮曝露量が，呼吸に伴う経気曝露量と同等であることを報告している。以上の様に，ハウスダストや空気を介したリン系化合物の経皮曝露に関する研究は行われているものの，リン系化合物を含む製品との直接接触に伴う経皮曝露に関する研究は，ほとんど行われていない。化学物質の移動速度（拡散速度）は，媒体間の濃度差に比例することを考えると，ハウスダストおよび空気中と比べてリン系化合物濃度が非常に高い製品との直接接触に伴う経皮曝露は，リン系化合物の主要な曝露経路となりえる[16]。



Estimation of Dermal Exposure Rates of Cosmetic Ingredients –Risk Tradeoff Assessment for Plasticizers in Nail Polish–

Masahiro Tokumura
University of Shizuoka

リン酸トリフェニル（TPhP）は，フタル酸ジブチル（DBP）の代替として，マニキュア用の可塑剤として使用され始めた[17]。Young et al.（2018）[18]によれば，米国で販売されているマニキュア中のTPhP濃度は，<0.002–7940 μg g^{-1}であったと報告している。一方，Mendelsohn et al.（2016）[17]は，マニキュアを使用した人と使用していない人の尿中のTPhP代謝物濃度を測定し，マニキュアの使用に伴うTPhPの経皮曝露量は，経気曝露量より多かったと報告している。しかし，米国製以外のマニキュアに含まれるTPhPの情報はなく，定量的な曝露量評価に関する研究は行われていない。

本研究では，日本で購入したマニキュア液45サンプル中の，TPhPを含む15種のリン系化合物を測定し，マニキュアの使用に伴うTPhPの経皮曝露量の推算を行った。経皮曝露量の推算には，オランダ国立公衆衛生環境研究所（RIVM）が，消費者製品中に含まれる化学物質の曝露評価を行うために開発した無料ソフトウェアであるConsExpo（バージョン5.0）を使用した[19]。比較のため，被代替可塑剤であるDBPと，代替可塑剤であるクエン酸アセチルトリブチル（ATBC）の経皮曝露量も推算した[20]。

2．方　法

2．1．試薬とサンプル

リン酸トリブチル（TBP）-d_{27}，リン酸トリス（2-エチルヘキシル）（TEHP）-d_{51}，TPhP-d_{15}，リン酸トリクレジル（TCsP）-d_{21}，およびリン酸トリス（2-クロロエチル）（TCEP）-d_{12}を林純薬品工業株式会社から購入し，内部標準として用いた。アセトニトリル，メタノール，および

アセトンは，富士フイルム和光純薬株式会社から購入した。日本で販売されているマニキュアの代表的なサンプルを得るため，売上や人気に基づいて購入するマニキュアを選択した。マニキュアは，フランス製が9サンプル，日本製が17種，中国製が2種，台湾製が6種，韓国製が2種，アメリカ製が9種であった。

2．2．分析方法

分析用の試料を調製するため，およそ10mgのマニキュア液を10mL試験管に入れ，5mLのアセトンに溶解し，10分間超音波処理した後，3000rpmで10分間遠心分離した。次に，上清み50μLに930μLのアセトニトリルおよび20μLの混合内部標準溶液を加えた。液体クロマトグラフ－タンデム質量分析装置（LC-MS/MS）（Thermo Fisher Scientific Inc.）を用いて，試料中のリン系化合物の分析を行った。イオン化には，大気圧化学イオン化法（APCI）を用いた。カラムにはAccucore Vanquish C18カラム（長さ：100mm，内径：2.1mm，粒径：1.5μm；Thermo Fisher Scientific Inc.）を用いた。分析条件は我々の既往研究と同様に行った[5, 21, 22]。注入量は10μLとした。移動相には水（溶媒A）と20%アセトニトリル／メタノール溶液（溶媒B）を用い，流速は300μL min^{-1}とした。カラム温度は50℃に保持した。

2．3．精度管理

リン系化合物の検量線は，3-1000ng mL^{-1}（3，10，30，100，300，1000ng mL^{-1}）の濃度範囲において直線性を示した（$r^2 > 0.99$）。すべてのサンプルにおいて内標準物質の回収率は良好であった（101 − 109%）。リン系化合物の検出下限値は，シグナル／ノイズ比（*S/N*比）が3-10のブランクサンプルを5回注入したときの標準偏差の3倍とした。本研究で測定対象としたリン系化合物は，ブランク試料中からは検出されなかった。

2．4．経皮曝露量およびリスクの推算方法

マニキュア中の可塑剤の経皮曝露量（ng $kg\text{-}bw^{-1}$ day^{-1}）はConsExpoを用いて計算した。パラメータとしては，マニキュア中の可塑剤濃度（wt%），塗布したマニキュアの量（g），使用頻度（$year^{-1}$），塗布面積（cm^2），可塑剤の皮膚透過係数（cm h^{-1}）および使用者の体重（kg）を用いた。ConsExpoでは，入力パラメータは個々の任意の確率密度分布を与えることができるので，各々のパラメータの確率密度分布に従って10万回のランダムサンプリングを行い，経皮曝露量分布を求めた。マニキュア液中のDBP（0.7-7.0wt%）とATBC（0.8-7.0wt%）の濃度分布は，既往研究より得た[23-25]。使用者の体重として，一般的な日本の成人女性の体重を用いた[26]。温度は室温とした。可塑剤は，爪は透過しないことが報告されているため[27]，爪の周りにはみ出たマニキュアのみの経皮曝露を考慮し，その面積は文献から得た値に基づいて決定した[27]。マニキュアの塗布量や曝露時間，使用頻度の値は文献から得た[27]。可塑剤の皮膚透過係数は，ConsExpoに搭載されている定量的構造活性相関（QSAR）モデルにより，分子量とオクタノール／水分配係数（Log K_{OW}）から推算した。マニキュアの使用に伴う可塑剤の経皮曝露のリスクを評価するため，曝露マージン(MOE)（-)を用いた。MOEは，参照用量（RfD）を，経皮曝露量で割ることで求めた[28]。

3．結果と考察

3．1．マニキュアに使用されている可塑剤の調査

マニキュア容器に貼られているラベルの成分表によると，主要な可塑剤としてはATBC（45本中33本），TPhP（2本），トリメチルペンタニルジイソブチレート（2本），DBP（1本），スクロースベンゾエート（1本）が使用されていた。また，2種類の可塑剤が含まれていた場合もあり，トリメチルペンタンジイルジベンゾエート（6本），スクロースベンゾエート(6本)，カンファー（3本)，ATBC（2本)，TPhP（1本)が含まれていた。DBPが含まれていたマニキュアも存在した。

3．2．マニキュアに含まれるリン系化合物の調査

マニキュア中の15種類のリン系化合物濃度を測定した結果を図1に示す。米国製の3つのマニキュアからTPhPが検出された（1.1，1.4，1.8wt%）。低濃度ではあるが，リン酸クレジルジフェニル（CsDPhP）も検出された（0.040，0.019wt%）。他のリン系化合物は，いずれのサンプルにおいても検出されなかった。既往研究においても，Mendelsohn et al.（2016）[17]は，米国製のマニキュアからTPhPを検出している(0.49 − 1.7wt%)。

3．3．マニキュアに使用されている可塑剤の経皮曝露量の推算

TPhP，DBPおよびATBCの経皮曝露量の推算結果を図2に示す。TPhP，DBPおよびATBCの経皮曝露量はそれぞれ200（5%ile）-1700（50%ile）-5000（95%ile），360-3500-14000および430-4100-17000 ng $kg\text{-}bw^{-1}$ day^{-1}であった。TPhPの経皮曝露量(例えば50%ile値)が最も少なく，ATBCが最も多かった。ConsExpoに搭載されているQSARにより推算された可塑剤の皮膚透過係数は，本研究で対象としている3種類の可塑剤の分子量（TPhP: 326，DBP: 278，ATBC: 402）とLog K_{OW}（TPhP: 4.59，DBP: 4.50，ATBC: 4.29）が同等であったことから，差異は小さかった（TPhP: 0.089，DBP: 0.097，ATBC: 0.076 cm h^{-1}）[29]。一方，マニキュア中のATBC濃度の範囲(0.8-7.0

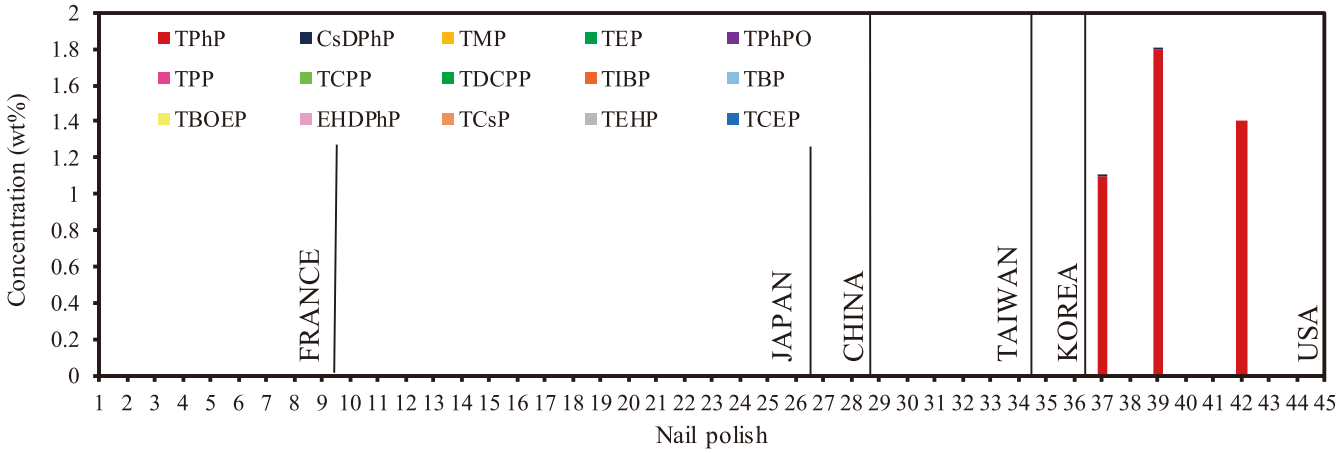


図１　日本で購入したマニキュアに含まれるリン系化合物

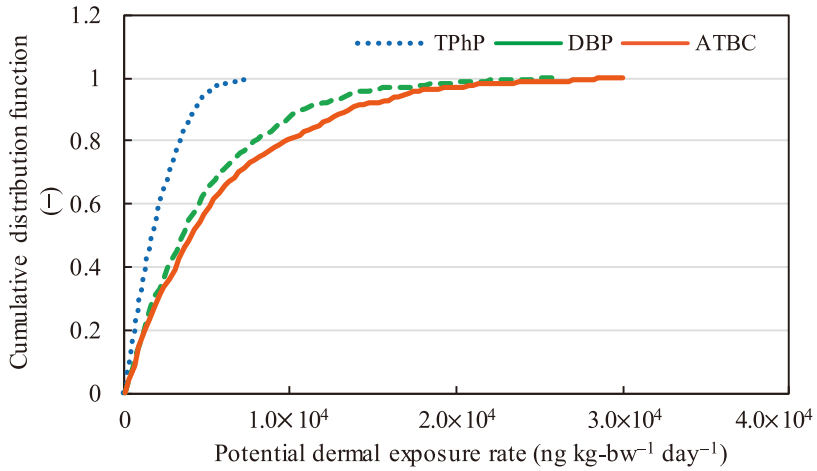


図２　マニキュアに含まれる可塑剤の経皮曝露量分布
（TPhP：リン酸トリフェニル，DBP：フタル酸ジブチル，ATBC：クエン酸アセチルトリブチル）

wt%）は，TPhP濃度の範囲（1.1–1.8 wt%）よりも高かったことから，マニキュア中の可塑剤の経皮曝露量を決定するための重要なパラメータであることが示唆された。

3．4．マニキュアに使用されている可塑剤のリスク評価

マニキュア中に含まれる可塑剤の経皮曝露に対するMOEの推算結果を図3に示す。TPhP，DBPおよびATBCのMOEの範囲は，それぞれ，3.6×10^{5}（5%ile）— 4.1×10^{4}（50%ile）— 1.4×10^{4}（95%ile），4.1×10^{3} — 4.2×10^{2} — 1.1×10^{2} および 2.3×10^{5} — 2.4×10^{4} — 5.9×10^{3} であった。ATBCの経皮曝露量が最も多かったが，リスクに関してはDBPがもっと高かった。これは，DBPのRfD値が最も低かったためだと考えられる（TPhP: 70,000,000 ng kg-bw^{-1} day^{-1} [30]，DBP: 1,500,000[31]，ATBC: 100,000,000[32]）。2つの代替可塑剤（TPhPおよびATBC）は，被代替可塑剤（DBP）よりも低いMOEであった。

3．5．他の曝露経路との比較

本研究で推算したTPhPの経皮曝露量を，既往研究で報告されている他の曝露経路からの曝露量と比較した[6, 14, 33–38]。その結果を図4に示す。本研究で推算したマニキュアを介したTPhPの経皮曝露量は1700 ng kg-bw^{-1} day^{-1}（50%ile）であり，空気を介した経気曝露や，ハウスダストや食品を介した経口曝露，皮膚に付着したハウスダストを介した経皮曝露と比較し，およそ1400倍以上も多いことが示唆された。一般的なハウスダスト中のTPhP濃度と比べ（数百ng g^{-1}），マニキュア液中のTPhP濃度は1.1–1.8 wt%と非常に高い。Fickの法則によると，媒体間の濃度差に比例してTPhPの移行速度が上昇することから，ハウスダストと比べてより高濃度のTPhPを含むマニキュア液と直接接触することで経皮曝露量が多くなったと考えられる。

4．総　括

本研究では，化粧品の例としてマニキュア，化粧品成分の例として可塑剤をとりあげ，皮膚との直接接触に伴う経

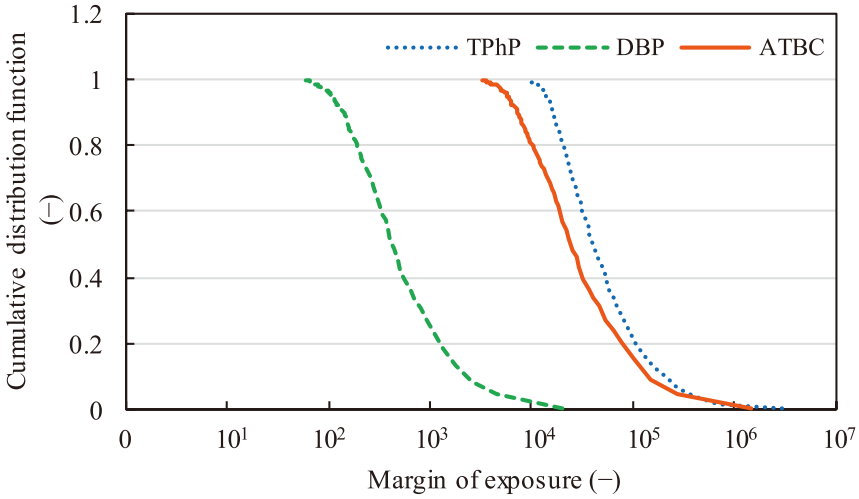


図３　マニキュアに含まれる可塑剤の曝露マージン（MOE）分布（TPhP：リン酸トリフェニル，DBP：フタル酸ジブチル，ATBC：クエン酸アセチルトリブチル）

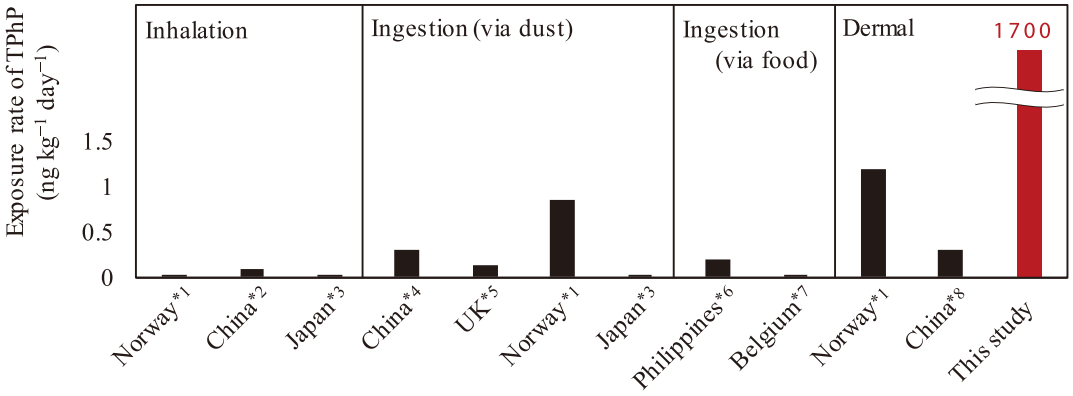


図４　TPhP の曝露経路ごとの曝露量の比較

*1Cequier et al. (2014)[14], *2Yang et al. (2014)[38], *3Tokumura et al. (2017)[6], *4Wu et al. (2016a)[13], *5Brommer and Harrad (2015)[33], *6Kim et al. (2011)[34], *7Malarvannan et al. (2015)[36], *8Liu et al. (2017a)[35]

皮曝露量の推定方法のスキームを開発した。本研究結果より，TPhPを高濃度で含むマニキュアとの直接接触により，他の曝露経路と比較して，多量のTPhPを曝露する可能性が示唆された。

現在，本研究で構築した経皮曝露量推算スキームで求めた経皮曝露量の正確さを調べるため，人工皮膚などを用いた皮膚透過試験を実施している。これにより，より正確な経皮曝露量の推算が行えるようになるだろう。

化粧品は主に皮膚に直接塗布して使用するものが多いため，本研究の成果の活用範囲は広範囲にわたると考えられる。例えば，経皮曝露量を正確に見積もることは，化粧品の安全性の向上だけでなく，機能性の向上にも重要であると考えられる。経皮曝露量を正しく推算することで，化学物質の薬用をより詳細に考察でき，より効果的な化粧品の開発にも貢献できると考えられる。

最後に，本研究で得られた研究成果の一覧を下記に示す。

原著論文

1）Masahiro Tokumura, Makiko Seo, Qi Wang, Yuichi Miyake, Takashi Amagai, Masakazu Makino, Dermal Exposure to Plasticizers in Nail Polishes: An Alternative Major Exposure Pathway of Phosphorus-Based Compounds, Chemosphere, 226, 316-320, 2019.（IF=5.108）

2）Masahiro Tokumura, Sayaka Ogo, Kazunari Kume, Kosuke Muramatsu, Qi Wang, Yuichi Miyake, Takashi Amagai, Masakazu Makino, Comparison of Rates of Direct and Indirect Migration of Phosphorus Flame Retardants from Flame-Retardant-Treated Polyester Curtains to Indoor Dust, Ecotoxicology and Environmental Safety, 169, 464-469, 2019.（IF=4.527）

国際会議

1）Kosuke Muramatsu, Masahiro Tokumura, Sayaka Ogo, Kazunari Kume, Qi Wang, Yuichi Miyake, Takasi Amagai, Masakazu Makino, Novel effective method to evaluate risks of phosphorus flame retardant, The 4th International Conference on Pharma and Food（ICPF2018）, Shizuoka, Japan.（November, 2018）
2）Kosuke Muramatsu, Masahiro Tokumura, Sayaka Ogo, Kazunari Kume, Qi Wang, Yuichi Miyake, Takasi Amagai, Masakazu Makino, Development of screening method to evaluate resks of flame retardants in indoor environments, THE 23rd Shizuoka Forum on Health and Longevity, Shizuoka, Japan.（November, 2018）
3）Masahiro Tokumura, Kosuke Muramatsu, Qi Wang, Yuichi Miyake, Takashi Amagai, Masakazu Makino, Comparison of Rates of Direct and Indirect Migration of Phosphorus Flame Retardants from Flame-Retardant-Treated Polyester Curtains to Indoor Dust, the 38th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants（POPs）& 10th International PCB Workshop（Dioxin 2018）, Kraków, Poland.（August 2018）
4）Mai Shindo, Kotone Terao, Kosuke Muramatsu, Masahiro Tokumura, Qi Wang, Yuichi Miyake, Takashi Amagai, Masakazu Makino, Estimating Potential Dermal Exposure to Organophosphorus Flame Retardants via Direct Contact with Products, the 38th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants（POPs）& 10th International PCB Workshop（Dioxin 2018）, Kraków, Poland.（August 2018）
5）Mai Shindo, Kotone Terao, Kosuke Muramatsu, Masahiro Tokumura, Qi Wang, Yuichi Miyake, Takashi Amagai, Masakazu Makino, Device for Measuring Dermal Exposure Rate of Flame Retardants via Direct Contact with Products, The 12th Asia Impact Assessment Conference（AIC 2018）, Shizuoka, Japan.（August 2018）
6）Masahiro Tokumura, Sayaka Ogo, Kazunari Kume, Kosuke Muramatsu, Qi Wang, Yuichi Miyake, Takashi Amagai, Masakazu Makino, Migration Mechanism of Phosphorus Flame Retardants from Flame-Retardant-Treated Polyester Curtains to Indoor Dust, the 15th Conference of the International Society of Indoor Air Quality & Climate（ISIAQ）（Indoor Air 2018）, Philadelphia, PA, USA.（July 2018）

国内会議

1）村松 孝亮, 徳村 雅弘, 小郷 沙矢香, 久米 一成, 王 斉, 三宅 祐一, 雨谷 敬史, 牧野 正和, カーテン中に含まれるリン系難燃剤の反応速度論的解析, 平成30年室内環境学会学術大会, 東京.（2018年12月）
2）新堂 真生, 村松 孝亮, 徳村 雅弘, 王 斉, 三宅 祐一, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 室内製品との直接接触に伴うリン系難燃剤の経皮曝露量スクリーニング法の開発, 平成30年室内環境学会学術大会, 東京.（2018年12月）
3）新堂 真生, 徳村 雅弘, 王 斉, 三宅 祐一, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 身の回りの製品に含まれる化学物質の経皮曝露量測定法の開発, 富士山麓A&Sフェア2018, 富士.（2018年11月）
4）新堂 真生, 寺尾 琴音, 村松 孝亮, 徳村 雅弘, 王 斉, 三宅 祐一, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 製品中難燃剤の直接接触に伴う経皮曝露量推算のための測定デバイスの開発, 環境科学会2017年会, 東京.（2018年9月）
5）徳村 雅弘, 瀬尾 真紀子, 王 斉, 甲斐 葉子, 三宅 祐一, 雨谷 敬史, 牧野 正和, マニキュア液中に含まれる可塑剤の経皮曝露を考慮した確立論的リスク評価, 第27回日本臨床環境医学会学術集会, 三重.（2018年7月）
6）新堂 真生, 寺尾 琴音, 村松 孝亮, 徳村 雅弘, 王 斉, 三宅 祐一, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 製品中難燃剤の直接接触に伴う経皮曝露量測定デバイスの基礎的検討, 第27回環境化学討論会, 那覇.（2018年5月）

受　賞

1）富士山麓A&Sフェア2018 最優秀ポスター発表賞, 新堂 真生, 徳村 雅弘, 王 斉, 三宅 祐一, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 身の回りの製品に含まれる化学物質の経皮曝露量測定法の開発(2018年11月)
2）平成30年室内環境学会学術大会 優秀ポスター賞, 村松 孝亮, 徳村 雅弘, 小郷 沙矢香, 久米 一成, 王 斉, 三宅 祐一, 雨谷 敬史, 牧野 正和, カーテン中に含まれるリン系難燃剤の反応速度論的解析(2018年12月)
3）平成30年室内環境学会学術大会 優秀ポスター賞, 新堂 真生, 村松 孝亮, 徳村 雅弘, 王 斉, 三宅 祐一, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 室内製品との直接接触に伴うリン系難燃剤の経皮曝露量スクリーニング法の開発(2018年12月)
4）第27回環境化学討論会 RSC（英国王立化学会）賞, 新堂 真生, 寺尾 琴音, 村松 孝亮, 徳村 雅弘, 王 斉, 三宅 祐一, 雨谷 敬史, 牧野 正和, 製品中難燃剤の直接接触に伴う経皮曝露量測定デバイスの基礎的検討(2018年5月)

謝　辞

本研究は公益財団法人コスメトロジー研究振興財団よりご援助をいただき，実施されました。

（引用文献）

1） Arnold, K., Teixeira, J.P., Mendes, A., et al., 2018. A pilot study on semivolatile organic compounds in senior care facilities: Implications for older adult exposures. Environmental Pollution. 240, 908-915.

2） Kuang, J., Abdallah, M.A.-E., Harrad, S., 2018. Brominated flame retardants in black plastic kitchen utensils: Concentrations and human exposure implications. Science of The Total Environment. 610-611, 1138-1146.

3） Langer, S., Fredricsson, M., Weschler, C.J., et al., 2016. Organophosphate esters in dust samples collected from Danish homes and daycare centers. Chemosphere. 154, 559-566.

4） Miyake, Y., Tokumura, M., Nakayama, H., et al., 2017. Simultaneous determination of brominated and phosphate flame retardants in flame-retarded polyester curtains by a novel extraction method. Sci Total Environ. 601-602, 1333-1339.

5） Miyake, Y., Tokumura, M., Wang, Q., et al., 2018. Identification of Novel Phosphorus-Based Flame Retardants in Curtains Purchased in Japan Using Orbitrap Mass Spectrometry. Environmental Science & Technology Letters. 5, 448-455.

6） Tokumura, M., Hatayama, R., Tatsu, K., et al., 2017. Organophosphate flame retardants in the indoor air and dust in cars in Japan. Environ Monit Assess. 189, 48.

7） de Boer, J., Ballesteros-Gómez, A., Leslie, H.A., et al., 2016. Flame retardants: Dust – And not food – Might be the risk. Chemosphere. 150, 461-464.

8） Kademoglou, K., Giovanoulis, G., Palm-Cousins, A., et al., 2018. In Vitro Inhalation Bioaccessibility of Phthalate Esters and Alternative Plasticizers Present in Indoor Dust Using Artificial Lung Fluids. Environmental Science & Technology Letters.

9） Schreder, E.D., Uding, N., La Guardia, M.J., 2016. Inhalation a significant exposure route for chlorinated organophosphate flame retardants. Chemosphere. 150, 499-504.

10） Abdallah, M.A.-E., Pawar, G., Harrad, S., 2015. Effect of Bromine Substitution on Human Dermal Absorption of Polybrominated Diphenyl Ethers. Environmental Science & Technology. 49, 10976-10983.

11） Abou-Elwafa Abdallah, M., Pawar, G., Harrad, S., 2016. Human dermal absorption of chlorinated organophosphate flame retardants; implications for human exposure. Toxicology and Applied Pharmacology. 291, 28-37.

12） Liu, X., Yu, G., Cao, Z., et al., 2017b. Estimation of human exposure to halogenated flame retardants through dermal adsorption by skin wipe. Chemosphere. 168, 272-278.

13） Wu, C.-C., Bao, L.-J., Tao, S., et al., 2016a. Dermal Uptake from Airborne Organics as an Important Route of Human Exposure to E-Waste Combustion Fumes. Environmental Science & Technology. 50, 6599-6605.

14） Cequier, E., Ionas, A.C., Covaci, A., et al., 2014. Occurrence of a Broad Range of Legacy and Emerging Flame Retardants in Indoor Environments in Norway. Environmental Science & Technology. 48, 6827-6835.

15） Pelletier, M., Bonvallot, N., Ramalho, O., et al., 2017. Dermal absorption of semivolatile organic compounds from the gas phase: Sensitivity of exposure assessment by steady state modeling to key parameters. Environment International. 102, 106-113.

16） Abdallah, M.A.-E., Harrad, S., 2018. Dermal contact with furniture fabrics is a significant pathway of human exposure to brominated flame retardants. Environment International. 118, 26-33.

17） Mendelsohn, E., Hagopian, A., Hoffman, K., et al., 2016. Nail polish as a source of exposure to triphenyl phosphate. Environment International. 86, 45-51.

18） Young, A.S., Allen, J.G., Kim, U.-J., et al., 2018. Phthalate and Organophosphate Plasticizers in Nail Polish: Evaluation of Labels and Ingredients. Environmental Science & Technology.artificial human skin. Proc. 1st Pacific Rim Thermal Eng. Conf., Hawaii' s Big Island, 15111-1-5, 2016.

19） Delmaar, J.E., Park, M.V.D.Z., van Engelen, J.G.M., ConsExpo 4.0 consumer exposure and uptake models. program manual. RIVM, 2005.

20） Bui, T.T., Giovanoulis, G., Cousins, A.P., et al., 2016. Human exposure, hazard and risk of alternative plasticizers to phthalate esters. Science of The Total Environment. 541, 451-467.

21） Tokumura, M., Miyake, Y., Wang, Q., et al., 2018. Methods for the analysis of organophosphorus flame retardants-Comparison of GC-EI-MS, GC-NCI-MS, LC-ESI-MS/MS, and LC-APCI-MS/MS. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng. 53, 475-481.

22） Tokumura, M., Ogo, S., Kume, K., et al., 2019a. Comparison of rates of direct and indirect migration of phosphorus flame retardants from flame-retardant-

treated polyester curtains to indoor dust. Ecotoxicology and Environmental Safety. 169, 464–469.
23) Environmental Working Group, Beauty Secrets Does A Common Chemical In Nail Polish Pose Risks To Human Health?
24) Johnson, J., 2002. Final Report on the Safety Assessment of Acetyl Triethyl Citrate, Acetyl Tributyl Citrate, Acetyl Trihexyl Citrate, and Acetyl Trioctyl Citrate. International Journal of Toxicology. 21, 1–17.
25) Orsi, D.D., Gagliardi, L., Porrà, R., et al., 2006. A environmentally friendly reversed-phase liquid chromatography method for phthalates determination in nail cosmetics. Analytica Chimica Acta. 555, 238–241.
26) Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan, The national health and nutrition survey in Japan, 2016. 2016.
27) Bremmer, H.J., Cosmetics Fact Sheet. 2006.
28) Tokumura, M., Seo, M., Wang, Q., et al., 2019b. Dermal exposure to plasticizers in nail polishes: An alternative major exposure pathway of phosphorus-based compounds. Chemosphere.
29) USEPA, the Estimation Program Interface (EPI) Suite Version 4.11 (November, 2012). 2012.
30) Sutton, W.L., Terhaar, C.J., Miller, F.A., et al., 1960. Studies on the Industrial Hygiene and Toxicology of Triphenyl Phosphate. Archives of Environmental Health: An International Journal. 1, 33–46.
31) Lee, K.-Y., Shibutani, M., Takagi, H., et al., 2004. Diverse developmental toxicity of di-n-butyl phthalate in both sexes of rat offspring after maternal exposure during the period from late gestation through lactation. Toxicology. 203, 221–238.
32) CSTEE, Opinion on the toxicological characteristics and risks of certain citrates and adipates used as a substitute for phthalates as plasticisers in certain soft PVC products. 1999.
33) Brommer, S., Harrad, S., 2015. Sources and human exposure implications of concentrations of organophosphate flame retardants in dust from UK cars, classrooms, living rooms, and offices. Environ. Int. 83, 202–207.
34) Kim, J.-W., Isobe, T., Chang, K.-H., et al., 2011. Levels and distribution of organophosphorus flame retardants and plasticizers in fishes from Manila Bay, the Philippines. Environmental Pollution. 159, 3653–3659.
35) Liu, X., Yu, G., Cao, Z., et al., 2017a. Occurrence of organophosphorus flame retardants on skin wipes: Insight into human exposure from dermal absorption. Environment International. 98, 113–119.
36) Malarvannan, G., Belpaire, C., Geeraerts, C., et al., 2015. Organophosphorus flame retardants in the European eel in Flanders, Belgium: Occurrence, fate and human health risk. Environmental Research. 140, 604–610.
37) Wu, M., Yu, G., Cao, Z., et al., 2016b. Characterization and human exposure assessment of organophosphate flame retardants in indoor dust from several microenvironments of Beijing, China. Chemosphere. 150, 465–471.
38) Yang, F., Ding, J., Huang, W., et al., 2014. Particle Size-Specific Distributions and Preliminary Exposure Assessments of Organophosphate Flame Retardants in Office Air Particulate Matter. Environmental Science & Technology. 48, 63–70.

ナノ粒子が細胞膜を透過する現象の理解：分子動力学計算および平面脂質膜法による解析

大阪府立大学大学院工学研究科物質・化学系専攻化学工学分野
仲村　英也

In next generation cosmetics utilizing nanoparticles, the nanoparticles are often required to translocate across a cell membrane. Application of the external electric field has been utilized to increase the cell membrane permeability, however, damage to the cell can be a great concern. Using a molecular dynamics simulation, we here show that even under a weak external electric field that is lower than the membrane breakdown intensity a cationic nanoparticle directly translocates across a model cell membrane without membrane disruption. We then reveal its physical mechanism. At the contact interface between the nanoparticle and the cell membrane, the electric potential across the membrane is locally enhanced by superimposing the nanoparticle surface potential on the externally applied potential, resulting in the nanoparticle direct translocation. Our finding implies that by controlling the nanoparticle-induced local enhancement of the membrane potential the cellular delivery of nanoparticles via non-endocytic and non-disruptive pathway can be realized.

1．緒　言

ナノ粒子を利用した治療・診断技術の開発が活発に行われている。ナノスケールのサイズと、それに起因して発現する特異的な諸特性を利用して、薬物や遺伝子の送達キャリア、ハイパーサーミア、フォトサーマル治療、バイオイメージングなどへの応用が精力的に研究されている[1)]。化粧品においても、ナノ粒子を活用したいわゆるナノ化粧品の開発が活発化している。これらのナノ粒子医療技術やナノ化粧品においてその効果を最大限に引き出すには、ナノ粒子は標的となる細胞の内部に送達される必要がある。そのためには、ナノ粒子は細胞を覆う最も基本的な生体障壁である細胞膜を透過しなければならない。一方で、ナノ粒子の種類によっては、粒子が細胞膜を透過して細胞内部まで到達すると、生体へのリスクが高まる場合もある。すなわち、十分な効能と安全性の両方を兼ね備えたナノ粒子医療技術やナノ化粧品を実現するには、ナノ粒子が細胞膜を透過する現象を理解し、これを精密に制御するための学理が必要である[1)]。

ナノ粒子と生細胞との相互作用は幅広い分野において関心が高く、最近の研究をまとめると、ナノ粒子の細胞膜透過経路はエンドサイトーシスと直接透過の大きく２つに大別されることが分かってきた[1)]。エンドサイトーシスは生細胞固有の生物的取り込み機能として知られている。細胞膜が変形してナノ粒子を包み込んで小胞を形成し、最終的にこの小胞ごと細胞内にナノ粒子が取り込まれる。一方、直接透過経路は、ナノ粒子が小胞化されずに細胞内に直接輸送される透過経路である。生細胞にナノ粒子が作用した場合の多くは、エンドサイトーシスが最もよく発現する主要な透過経路であることが分かってきた。しかしながら、エンドサイトーシスによって取り込まれたナノ粒子は小胞から脱出できず、結果的に送達効率が低下してしまうという課題がつきまとう。一方で、直接透過経路は小胞にトラップされずにナノ粒子を細胞内部に送ることができるため、これを実現できれば高い送達効率が期待できる。しかしながら、直接透過は自発的には起こりにくい透過経路であるため、これを何かしらの工夫で促進する必要がある。

直接透過を促進する手法として、電場・超音波・磁場などの外力場を印加する物理的手法がこれまで提案されている。その中で、電気穿孔法(エレクトロポレーション)は、細胞に外部から電場を印加することで、一時的に膜透過性を向上させ、エンドサイトーシスを介さずに物質を細胞内部に直接送達する手法である。近年では、ナノ粒子の細胞内送達への応用も多数報告されており、粒子を高効率で細胞内に直接送達できることが見出されている[2)]。一方で、過度な高電場の印加は、細胞死を引き起こすことが欠点となる。従って、電場印加環境におけるナノ粒子の細胞膜透過を適切に制御し、高い送達効率と低侵襲性を両立することが望まれる。しかしながら、電場印加時のナノ粒子の細胞膜透過メカニズムは明らかとなっていない。

以上の背景のもと、本研究では電場印加環境におけるナノ粒子の細胞膜透過現象に焦点を当て、これを分子動力学（MD）シミュレーションにより詳細に解析した。その結果、「微弱な電場の印加によってナノ粒子が細胞膜を直接透過する」新奇な透過現象を見出し、そのメカニズムを明らかにしたので報告する[3)]。加えて、平面脂質膜法を用いた実験系の構築にも取り組んだので、これについても報告する。



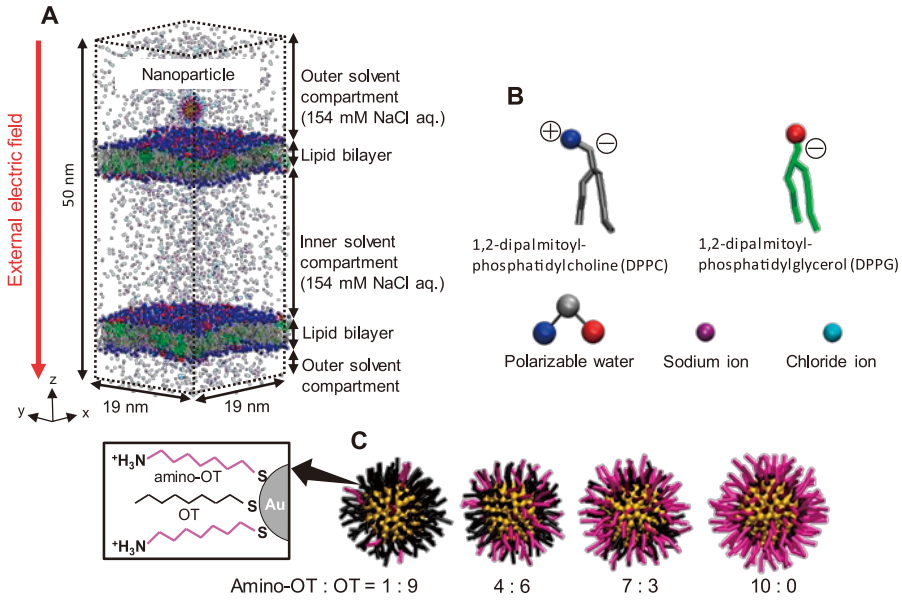
Understanding of direct translocation of nanoparticle across cell membrane: analysis by molecular dynamics simulation and planer lipid bilayer method

Hideya Nakamura

Department of Chemical Engineering, Osaka Prefecture University

2．計算方法

本研究では、粗視化分子動力学法(Coarse Grained-Molecular Dynamics: CG-MD）により、電場印加時のナノ粒子の細胞膜透過現象を解析した。粗視化分子動力学法は、複数の原子をある1個の相互作用点（粗視化サイト）で代表させ、この粗視化サイトのダイナミクスを追跡することで系全体の分子のダイナミクスを計算する手法である。これにより、本研究で必要となるナノ粒子、細胞膜、溶媒層からなる比較的大きな計算領域（一辺が20nm以上）を扱うことができる。粗視化サイト間の相互作用を規定する力場には、生体分子用に近年開発されたMARTINI粗視化モデル[4]を用いた。Fig. 1に、本研究で用いた計算系を示す。モデル細胞膜には、生細胞膜の基本骨格である脂質二重膜を用いた。脂質二重膜は、両イオン性リン脂質DPPCおよび負帯電性リン脂質DPPGの2成分で構成し、一般に表面が負に帯電している実際の生細胞膜を模擬した。このモデル細胞膜を2つ配置し、互いに独立した2つの溶媒区画を設けて、これらを細胞の内外に見立てた。各溶媒区画には分極を考慮した粗視化水分子[5]とナトリウムイオンおよび塩化物イオンを挿入し、生理食塩水と等張な154mM NaCl aq.とした。ナノ粒子には、様々な治療・診断へ活用されているアルカンチオール修飾正帯電性金ナノ粒子[6]をモデルナノ粒子として用いた。ここで、本透過現象において粒子の表面電位は重要な因子である。そこで、末端が正電荷を持つアンモニウム基で修飾された8-アミノ-1-オクタンチオール（amino-OT）と、電荷がゼロの無極性1-オクタンチオール（OT）の割合（amino-OT: OT）を変化させて、表面電位が異なる粒子を用意した（Fig. 1C and D）。ナノ粒子の粒子径はどれも同等で約4nmである。これらを用いて、ナノ粒子の表面電位が透過現象に及ぼす影響を解析した。ナノ粒子は細胞膜の上部に配置し、計算の初期状態を得た。電場Eの印加を計算に考慮するため、電荷q_iを有する系内の全粗視化サイトに外力$F=q_iE$を付与した。電場Eは膜の法線方向下向きに印加した。電場の印加によって発生する膜電位（膜の内表面を基準とした外表面の電位差）を、印加膜電位$\Delta\psi_{appl}$と定義した。ここで、印加膜電位は$\Delta\psi_{appl}=Ed$により算出した。dは細胞膜の膜厚であり、本研究ではd=4nmで一定とした。また、膜の穿孔・破壊が起こり始める臨界印加膜電位を$\Delta\psi_{appl,C}$と定義し、粒子を含まない条件で計算を



D

Amino-OT:OT		1:9	4:6	7:3	10:0
Total number of ligand	[-]	120	120	120	120
Number of amino-OT	[-]	12	48	84	120
Particle diameter	[nm]	3.78	3.82	3.86	3.90
Surface charge density	[e/nm^2]	0.27	1.05	1.79	2.51
$\psi_{1/k}$ (in 154 mM NaCl)	[mV]	7.8	20.5	24.0	25.7

$\psi_{1/k}$ = NP's surface potential at the Debye length

Fig. 1 Simulation system used in this study. (A) Initial configuration. Water molecules are not displayed for clarity. (B) Individual coarse-grained molecules. (C) Snapshots and (D) physical properties of nanoparticles.

行い$\Delta\psi_{appl,C}$を予め決定した。その結果、$\Delta\psi_{appl,C}$=230mVであり、この値は実験値とおおよそ同じであったことから、計算の妥当性が確認された[7]。本研究では、印加膜電位が臨界電位を超えない条件（$\Delta\psi_{appl}<\Delta\psi_{appl,C}$）で計算を行った。すなわち、外部電場の印加だけでは膜の穿孔は起こらない微弱な電場の範囲に絞って検討を行った。

3．結果および考察

比較のため、はじめに、電場を印加しなかった場合のナノ粒子の挙動を解析した。Fig. 2Aに、電場は印加せずに粒子のみに一定の外力を付与して下向きに強制的に移動させたpullシミュレーションの結果を示す。図はz軸に沿った計算系断面を表している。amino-OT:OT＝1:9および4:6のナノ粒子の場合、ナノ粒子表面が比較的疎水性であることから、下向きへの強制移動に伴い粒子は細胞膜の疎水部に侵入した。さらに下向きに移動させると、粒子は内部溶媒層に到達したが、このとき、細胞膜は元の平面膜から大きく変形し、一部に欠損も見られた。一方、表面電位が比較的高いamino-OT:OT＝7:3および10:0のナノ粒子の場合は、粒子は膜表面に付着した後、さらに粒子を膜に対して強制的に押し込んでも、粒子は膜に包まれたままで、膜を透過することはなかった。以上より、電場を印加しない場合、amino-OT:OT=7:3および10:0のナノ粒子は細胞膜を透過できないことが分かった。また、amino-

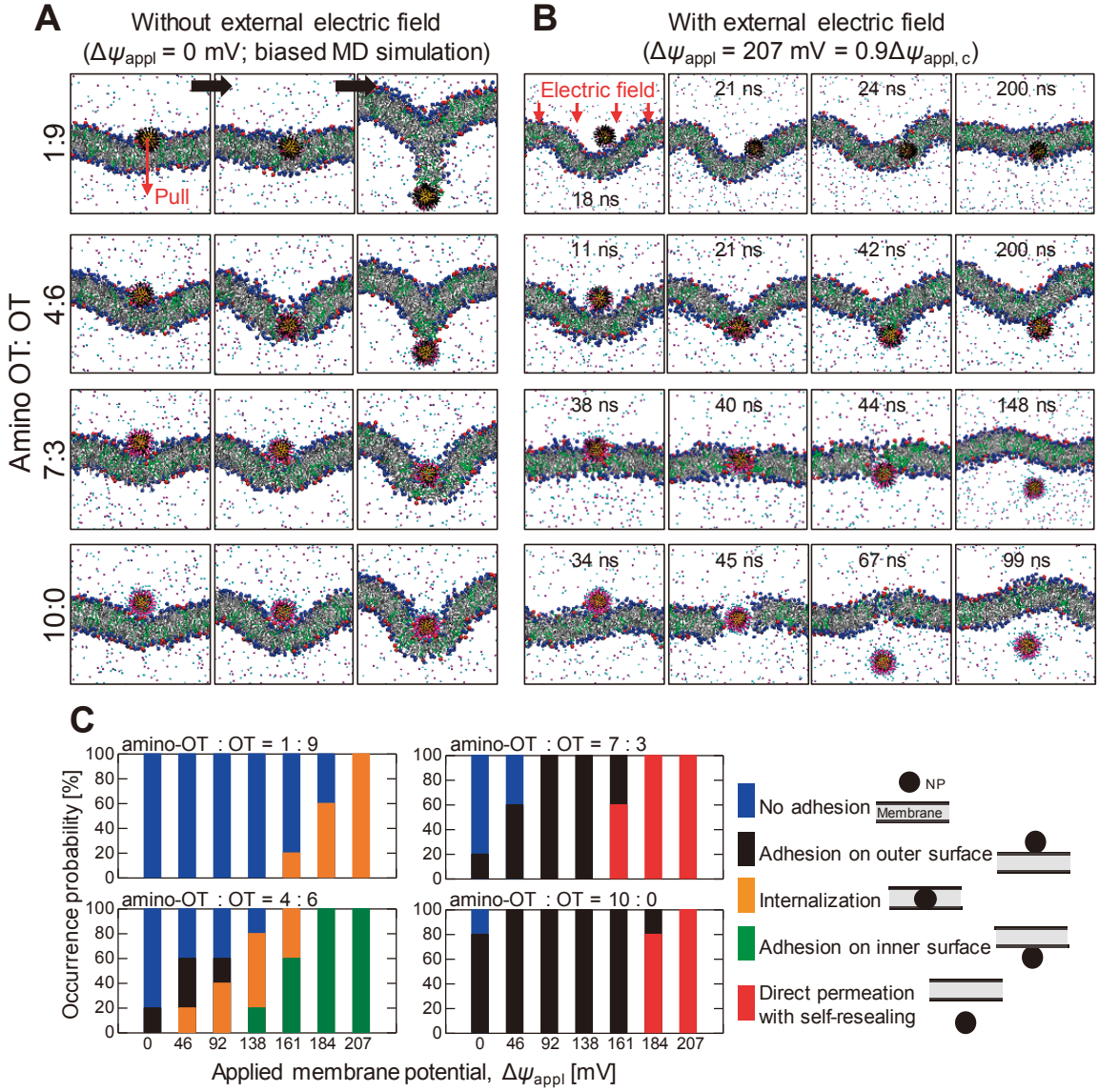


Fig. 2 Interaction of NP with cell membrane under external electric field. Dynamics of NPs (A) without external electric field and (B) with external electric field ($\Delta\psi_{appl}$= 207 mV = 0.9 $\Delta\psi_{appl,c}$). Water molecules were not shown for clarity. Snapshots are cross-sectional side view. (C) Occurrence probabilities of five modes of final fate of each NP as a function of applied membrane potential.

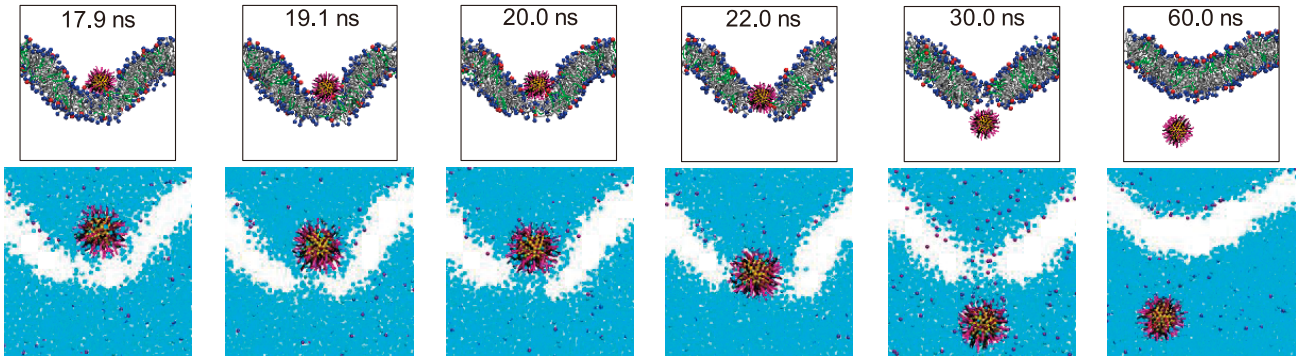


Fig. 3　Dynamics of solvent molecules during the direct permeation of NP across the cell membrane. Cyan dots show water molecules. Purple and cyan beads are sodium and chloride ions, respectively. In the case of the NP with amino-OT:OT = 7:3 under $\Delta\psi_{appl} = 207$ mV $= 0.9\ \Delta\psi_{appl,c}$. Snap shots are cross-sectional side view.

OT:OT=1:9 および 4:6 のナノ粒子の場合は、粒子に外力を付与することで細胞膜を透過する可能性が示されたが、透過の際には膜の変形および欠損が著しかったことから、ダメージが大きい透過経路であると考えられる。また、ナノ粒子にのみ外力を付与することそのものが、実際には極めて困難であることも粒子すべき点である。

一方、電場を印加すると、ナノ粒子の細胞膜透過挙動は大きく変化した。Fig. 2Bに、粒子の典型的な細胞膜透過挙動を示す。Fig. 2Cには、計算系に種々の電位を印加した際の、各粒子挙動の発生頻度を示す。なお、この計算では、ナノ粒子には印加電場から受ける静電気力以外の外力は作用していない。結果より、興味深いことに、pullシミュレーションでは膜を透過しなかったamino-OT:OT=7:3および10:0のナノ粒子が、電場を印加することで細胞膜を直接透過することが分かった。Fig. 2Bに示すように、amino-OT:OT=7:3および10:0のナノ粒子は、細胞膜表面に付着した後、膜の構造が変形し、二重膜を貫通する親水性の細孔が生成した。そして、粒子は脂質膜小胞にトラップされたり、脂質分子を膜から引き抜いたりすることなく、親水性の膜貫通孔を通じて細胞膜を直接透過した。さらに着目すべき点として、粒子の侵入により膜に生成した細孔は、粒子透過後に瞬時に縮小し、膜が自己修復することが分かった。すなわち、細胞膜をほとんど損傷しない透過経路であると言える。Fig. 2Cより、この直接透過経路が発現するには、161 mV以上の印加膜電位（$\Delta\psi_{appl} \geq 161$ mV $= 0.7\ \Delta\psi_{appl,C}$）が必要であることも分かった。以降では、この新奇なナノ粒子の細胞膜直接透過経路に焦点を当てて、さらに詳細な解析を行った。

Fig. 3に、粒子が膜を透過した際の水分子の挙動を示す。ナノ粒子が細胞膜に侵入し始める前に、水分子のワイヤー状のクラスターが膜を横切って形成された（17.9 ns and 19.1 ns in Fig. 3）。この水分子クラスターはさらに成長して、水分子チャネルとなり（20.0 ns in Fig. 3）、この水分子チャネルを通じてナノ粒子は細胞膜を透過した（30.0 ns in Fig. 3）。粒子が膜を透過した後は、水分子チャネルは消失し、膜は自己修復した（60.0 ns in Fig. 3）。以上より、ナノ粒子の細胞膜直接透過は、ナノ粒子と細胞膜表面の接触界面直下で水分子ワイヤーが形成されることにより誘発されることが明らかとなった。この溶媒分子のダイナミクスは、典型的なエレクトロポレーションにおけるものと非常に類似している[8]。しかしながら、本研究で印加している膜電位は、穿孔が起こる臨界値よりも低い電位であり、ナノ粒子が存在しない場合、水分子ワイヤーは生成しないことが特徴である。

以上の結果より、まず、ナノ粒子の細胞膜直接透過にはある大きさ以上の電場の印加が必要であることが分かった。さらに、ナノ粒子の透過は、典型的なエレクトロポレーションと類似して、ナノ粒子と細胞膜表面の接触界面直下における水分子ワイヤーの形成に誘発されることも分かった。これらの知見を踏まえて、我々は、ナノ粒子と細胞膜表面の接触界面電気現象の変化が、ナノ粒子の細胞膜直接透過を引き起こしているという仮説を立てた。そして、この仮説を検証するため、ナノ粒子と細胞膜表面の接触界面における局所的な膜電位を解析した。Fig. 4Bに、ナノ粒子を含まない計算系に電場を印加した際の膜電位分布を示す。結果より、電位を印加しない場合、膜電位はおおよそ0 mVであったのに対し（Fig. 4A）、電場を印加すると、印加膜電位（この場合、$\Delta\psi_{appl} = 184$ mV）よりも高い約300 mVの膜電位が発生することが分かった。これは、溶媒中のイオンの電気泳動による膜表面の電荷のインバランスに起因している。すなわち、外部電場の印加によって溶質イオンは電気泳動するが、細胞膜を透過できないため、カチオン（Na^+）は細胞膜の上側（外層）表面に、アニオン（Cl^-）は下側（内層）表面に局在する。その結果、細胞膜表面電荷のインバランスが生じ、付加的な膜電位が発生したと考えられる。本研究では、この膜表面電荷のインバランスに起因する膜電位を$\Delta\psi_{sci}$と表記する。Fig. 4C, Dに、ナノ粒子が細胞膜表面に付着した際の膜電位分布を示

す。結果より、ナノ粒子と細胞膜との接触界面においては、印加膜電位にナノ粒子の表面電位が重畳することで、膜電位が局所的に増強されることが明らかとなった（Fig. 4Cの$\Delta\psi_{NP}$）。以上の結果より、ナノ粒子と細胞膜の接触界面においては局所的に高い膜電位が発生し、その総膜電位（$\Delta\psi_{overall}$）は、①印加膜電位（$\Delta\psi_{appl}$）、②膜表面電荷のインバランスに起因する電位（$\Delta\psi_{sci}$）、③ナノ粒子の膜表面への付着によって生じる電位（$\Delta\psi_{NP}$）の３種類の総和となることが分かった（i.e., $\Delta\psi_{overall}=\Delta\psi_{appl}+\Delta\psi_{sci}+\Delta\psi_{NP}$）。最後に、この接触界面における膜電位増強とナノ粒子の細胞膜直接透過を定量的に関係付けるために、接触界面における総膜電位と膜穿孔が起こる臨界膜電位の比較を行った。Fig. 5に、接触界面における総膜電位$\Delta\psi_{overall}$と印加膜電位$\Delta\psi_{appl}$の関係を示す。図中の$\Delta\psi_{overall,\,C}$は膜破壊が起こり始める総膜電位の臨界値であり、膜表面電荷のインバランスに起因する電位$\Delta\psi_{sci}$を考慮して予め求めたところ、本計算系では$\Delta\psi_{overall,\,C}$=337 mVであった。結果より、ナノ粒子が細胞膜を直接透過した$\Delta\psi_{appl}\geq$184 mVの範囲においては、ナノ粒子と細胞膜の接触界面における総膜電位$\Delta\psi_{overall}$は臨界電位$\Delta\psi_{overall,\,C}$を超えていることが分かった。すなわち、細胞膜の破壊が起こらない微弱な電場を印加したにも関わらず、ナノ粒子と細胞膜の接触界面における局所的な

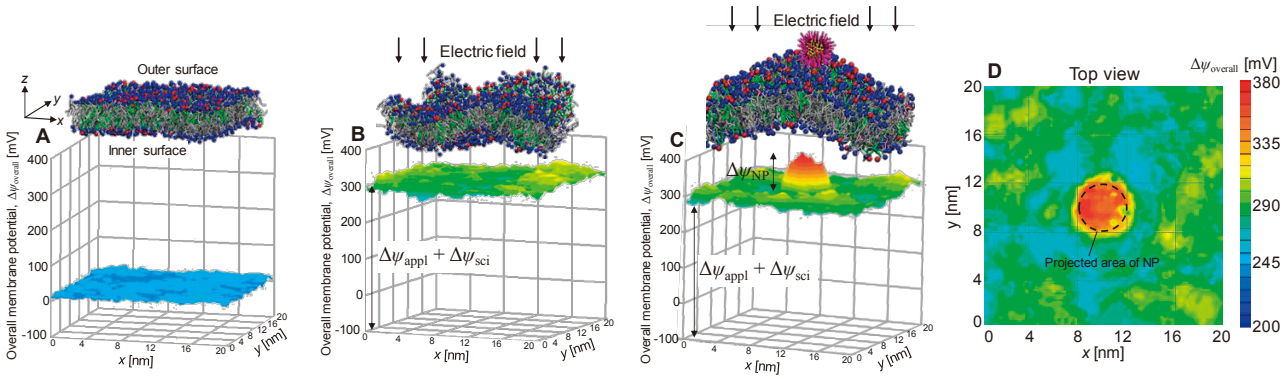


Fig. 4 Typical contour maps of the calculated overall membrane potential ($\Delta\psi_{overall}$) along the membrane surface: (A) without external electric field and without NP; (B) under external electric field without NP; (C, D) under external electric field with NP adhesion on the membrane surface. In the case of $\Delta\psi_{appl}$=184 mV = 0.8 $\Delta\psi_{appl,\,c}$ and NP with amino-OT:OT=10:0. $\Delta\psi_{sci}$ is the membrane potential derived from imbalance of the membrane surface charge. $\Delta\psi_{NP}$ is the enhanced membrane potential arising from the NP adhesion.

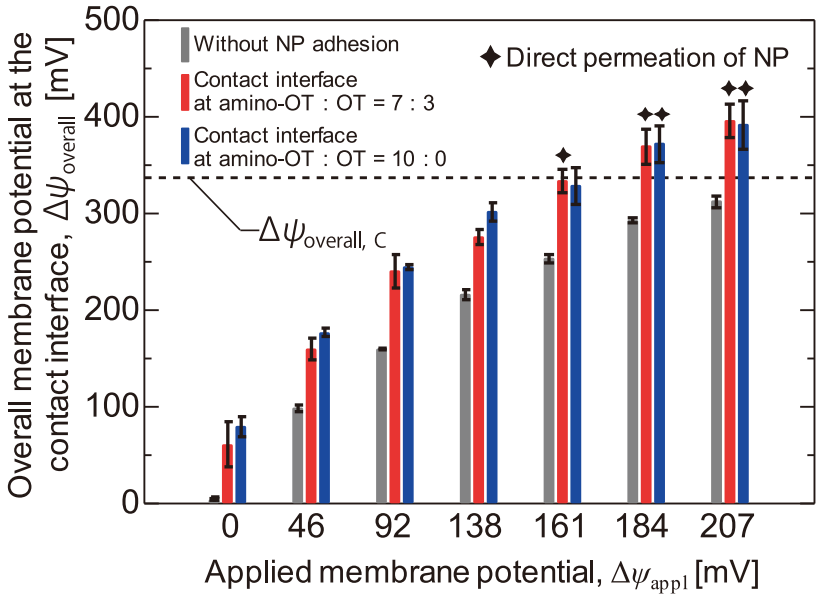


Fig. 5 **Overall membrane potential at the contact interface between the NP and the membrane surface as a function of the applied membrane potential.** Error bar corresponds to the max-min within five independent simulation runs. $\Delta\psi_{overall,\,c}$ is the critical overall membrane potential for the membrane breakdown. The $\Delta\psi_{overall,\,c}$ was preliminarily determined as 337 mV. Detail about the determination of $\Delta\psi_{overall,\,c}$ can be found in Supplementary Text and fig. S4.

膜電位は、膜穿孔に必要な臨界電位を超えうることが示された。Fig. 6には、ナノ粒子が細胞膜を透過する直前および直後の膜電位を示す。結果より、ナノ粒子が細胞膜を透過した後は、粒子が細胞膜から脱離するため透過前に見られた局所的な膜電位増強が粒子透過後には消失し、系全体の膜電位は臨界強度を$\Delta\psi_{overall,\,C}$を下回った。その結果、細胞膜はエネルギー的に安定な二重膜の構造へと自己修復することができたと考えられる。

4．平面脂質膜法を用いた実験系の構築

MDシミュレーションの結果を検証するために、実験系の構築にも取り組んだ。以下ではその概要を報告する。本研究では、人工細胞膜（すなわち純粋なリン脂質2重膜）を用いた実験系の構築に取り組んだ。その中でも、膜を介した物質の透過を電気的に測定可能である平面脂質膜法に着目した。平面脂質膜の作成には、比較的安定した膜を簡便に形成できる液滴接触法[9]を用いた。Fig. 7Aに、液滴接触法により作成した脂質膜の模式図を示す。リン脂質デカン溶液を図の左右の各区画に予め注入し、ここにKCl水溶液をさらに注入することで、リン脂質分子で安定化されたW/O型の水滴を2個作成した。これらの水滴を接触させると、接触界面で平面脂質膜が形成される。この平面脂質膜を作成するための実験装置として、Fig. 7Bに示すアレイデバイスを独自に試作した。デバイスはPMMA製で、

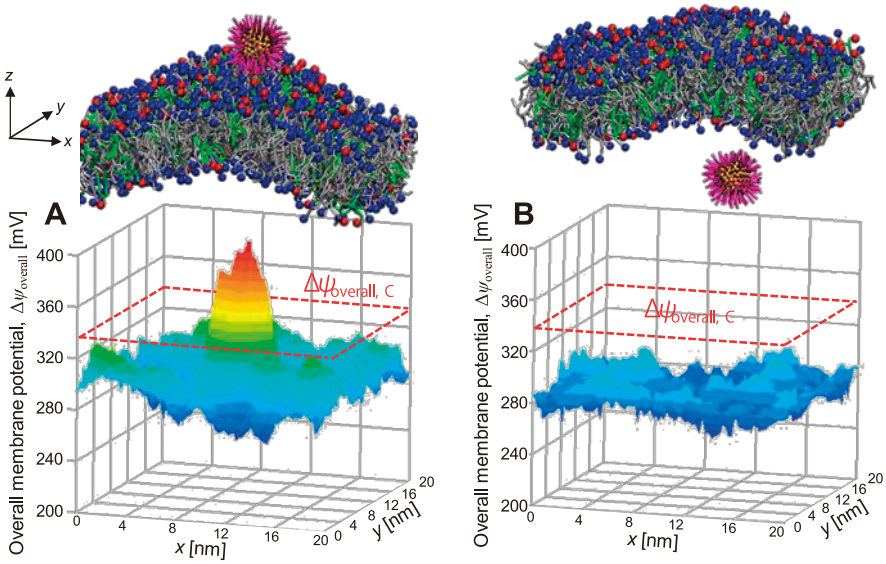


Fig. 6　Contour maps of the calculated overall membrane potential（$\Delta\psi_{overall}$）(A) before and (B) after membrane-crossing of the NP. $\Delta\psi_{overall,\,c}$ is the critical overall membrane potential for the membrane breakdown. In the case of the NP with amino-OT : OT=10:0 under $\Delta\psi_{appl}$ = 184 mV =0.8 $\Delta\psi_{appl,\,c}$.

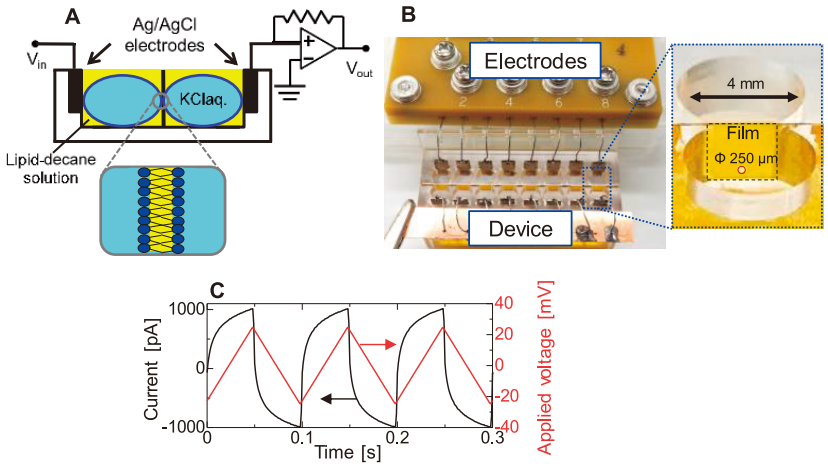


Fig. 7　Developed experimental set-up. (A) Schematic of droplet contact method. (B) Multi-well device and multi-channel electrode used in this study. (C) Applied voltage and measured current when bilayer was formed.

直径250μmの小孔が開いたフィルムを内径4mmの2つのウェルで挟み込んだ基本ユニットが8個設けられている。このウェル内部に7.5μLのリン脂質デカン溶液と16.5μLのKCl水溶液をピペッティングするだけで、フィルムの小孔を介して水滴が接触し脂質二重膜を簡便に形成することができる。また、各ウェルにはAg/AgCl電極が埋め込まれており、この電極は電圧印加装置、8ch同時測定が可能な微小電流検出アンプ、データロガーに接続されている。このセットアップで、電圧を印加することによって脂質膜を介して流れる微小電流をアンプで増幅して測定することができる。すなわち、検出された電流変化やそこから算出される膜比容量から、物質が脂質2重膜を介して移動する様子を捉えることが可能である。

脂質二重膜は、その構造から抵抗とコンデンサが並列に接続されたRC並列回路と電気的に等価と見なすことができる。これを利用して、Fig. 7Cに示すような三角波電圧を印加した際に測定される微小電流の矩形波から、膜比容量を算出した。その結果、本装置で測定された平均膜比容量は$0.37 \pm 0.19\,\mu F/cm^2$となった。これは液滴接触法を用いた膜比容量の文献値[10]（0.4–0.6μF/cm^2）と同等であり、これより構築した実験系で、脂質二重膜が形成できることを確認できた。今後はこの実験系を用いて、電場印加環境下におけるナノ粒子の細胞膜透過を解析していく。

5．総　括

本研究では、微弱な電場印加環境下におけるナノ粒子の細胞膜透過現象を分子動力学シミュレーションにより解析した。その結果、以下のメカニズムでナノ粒子が細胞膜を直接透過することを新たに見出した。①まず、ナノ粒子が細胞膜表面に付着することによって、ナノ粒子と細胞膜との接触界面において膜電位が局所的に増強される。そして、②この増強された膜電位が臨界電位を超えた際、ワイヤー状の水分子クラスターが接触界面近傍で生成し、これがナノ粒子の細胞膜直接透過を引き起こす。さらに、③ナノ粒子の膜透過後は、局所的に高い膜電位が消失するため、細胞膜は自己修復する。

細胞にダメージを与えることなく、細胞内に物質を直接送達することは、理想的な送達方法である。ここで、物質が細胞膜を透過する際に生じてしまう欠損をできるだけ小さくし、ナノメートルスケールにすることができれば、理想的な低侵襲送達が実現できると思われる。本研究で得られた知見は、外部から印加した微弱な電場に、ナノ粒子の表面電位を重畳させることで、前述したナノメートルスケールの細胞膜穿孔を実現できる可能性も示唆している。今後も、ナノ粒子と細胞膜との界面電気現象に着目した研究を進めていきたい。

謝　辞

本研究を行うにあたり、多大なるご援助を賜りました公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に深く感謝申し上げます。

（引用文献）

1）Nakamura H, Watano S: Direct Permeation of Nanoparticles across Cell Membrane: A Review, KONA Powder Part. J., 35, 49–65, 2018.
2）Zu Y, Huang S, Liao WC, Lu Y, Wang S: Gold Nanoparticles Enhanced Electroporation for Mammalian Cell Transfection. J. Biomed. Nanotechnol. 10, 982–992, 2014.
3）Nakamura H, Sezawa K, Hata M, Ohsaki S, Watano S: Direct permeation of nanoparticle across model cell membrane by nanoparticle-induced local enhancement of membrane potential, submitted.
4）Marrink SJ, Risselada HJ, Yefimov D, Tieleman, de Vries AH: The MARTINI Force Field: Coarse Grained Model for Biomolecular Simulations, J. Phys. Chem. B, 111, 7812–7824, 2007.
5）Yesylevskyy SO, Schäfer LV, Sengupta D, Marrink SJ: Polarizable Water Model for the Coarse-Grained MARTINI Force Field, *PLoS Comput. Biol.*, 6, 1–17, 2010.
6）Elahi N, Kamali M, Baghersad MH, Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review, Talanta, 184, 537–556, 2018.
7）Shimizu K, Nakamura H, Watano S: MD Simulation Study of Direct Permeation of a Nanoparticle across the Cell Membrane under an External Electric Field, Nanoscale, 8, 11897–11906, 2016.
8）Tieleman DP: The molecular basis of electroporation. BMC Biochem. 5, 1–12, 2004.
9）Kawano R, Tsuji, Sato K, Osaki T, Kamiya K, Hirano M, Ide T, Miki N, Takeuchi S: Automated Parallel Recordings of Topologically Identified Single Ion Channels, Sci. Rep., 3, 1995, 2013.
10）Funakoshi, K, Suzuki H, Takeuchi S: Lipid Bilayer Formation by Contacting Monolayers in a Microfluidic Device for Membrane Protein Analysis, Anal. Chem., 78, 8169–8174, 2006.

増殖因子による毛包休止期制御機構の解明

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所 組織再生治療研究プログラム

中山　文明

The expression of several Fibroblast growth factors (FGFs) is synchronized with the hair cycle in the skin and some FGFs play a key role in regulation of the hair cycle. In particular, the expression of FGF18 peaks in the telogen phase, and maintains the telogen phase to determine its duration. Although the expression of FGF13 also peaks in the telogen phase, the role of FGF13 in the hair cycle remains unknown. This study investigated the involvement of recombinant FGF13 in the duration of the telogen phase and produced Fgf13 hemizygous knock-out mice using CRSPR-Cas9 system to examine the physiological effects of FGF13. Recombinant FGF13 was administered intraperitoneally to three-week-old female C57BL/6 mice harboring uniform telogen phase hair follicles three times a week and the duration of the telogen phase was determined by assessing the dynamics of skin color changes in a previously shaven telogen skin. FGF13 significantly prolonged the telogen phase to delay the transition into the anagen phase. In addition, FGF13 pretreatment of eight-week-old mice harboring uniform telogen phase hair follicles suppressed the proliferation of hair follicle cells to delay the process of anagen phase induced by depilation. In contrast, Fgf13 gene knock-out using CRISPR-Cas9 system failed to produce homozygous Fgf13 knock-out mice, but produced only heterozygous knock-out mice. However, heterozygous Fgf13 knock-out mice did not significantly show the prolongation of the telogen phase. These results indicate that recombinant FGF13 prolongs the telogen phase, suggesting that FGF13 plays an essential role in maintaining the telogen phase. Assessing the fetuses from the edited embryo suggested that constitutive Fgf13 knock-out mice might be embryonic lethal. Therefore, conditional keratinocyte-specific Fgf13 knock-out mice must be generated to examine the physiological mechanism of the hair cycle regulation by FGF13.

1．緒　言

毛周期は、休止期、成長期、退行期の３つの時期からなり、種々の線維芽細胞増殖因子（FGF）の発現変動と連動し[1]、FGFに制御されていることが明らかになってきた（図1）。特に、FGF18は毛包幹細胞が存在するバルジ領域で発現し[2]、休止期で発現が増加し、成長期で低下することで[1]、休止期を維持していることが明らかになった[3]。一方、FGF13もFGF18と同様に休止期で発現が多く、成長期で発現が低下している[4]。しかも、X連鎖性先天性多毛症では毛包においてFGF13遺伝子の発現が著しく低下し、このFGF13発現低下が多毛症の原因と考えられていることから[5]、FGF13も毛周期制御に関係し、FGF18と同様に休止期の維持に重要な役割を担っていると推定される。しかしながら、FGF13の毛周期に対する機能は未だ証明されていない（図1）。

FGF13を含むFGF11サブファミリーのFGFは、他のFGFと異なりFGF受容体と反応できない。しかも、その分泌機序も不明なことから、FGF11サブファミリーは“細胞内FGF”とよばれ、細胞外での作用は全く知られていなかった。ところが、我々は、このFGF11サブファミリーのFGFが細胞外から細胞内に容易に移行できることを見出した[6]。この発見は、何らかの機序でFGF13が細胞外に放出されれば、FGF13もFGF18と同様に細胞に作用できることを意味し、FGF13のシグナル分子としての可能性を飛躍的に広げることになった。そして、組み換え体FGF13を生体に投与することで、FGFの毛包周期への役割を探索できる可能性を示した。

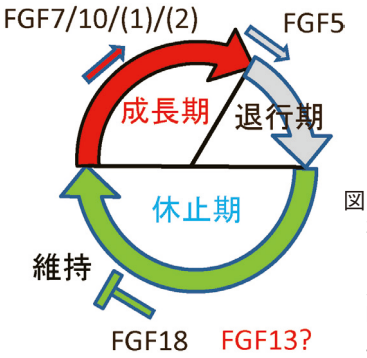
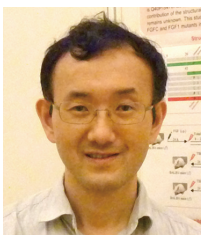


図１　毛周期とFGF。各毛周期で発現が増加するFGFを示した。多くのFGFが毛周期を前に進めるが、FGF18は抑制的に働き休止期を維持する。

FGF13の生体での役割を知るために、その遺伝子のノックアウトマウスを調べることは非常に有用である。しかしながら、FGF13は、脳神経系で発現が多いことが知られているが、そのノックアウトマウスの表現型の報告がない[7]。すなわち、FGF13遺伝子の全身性ノックアウトマウスが誕生し、長く生存できるか未だ不明である。



The Regulation of Hair Cycle Resting Phase by Growth Factors

Fumiaki Nakayama

Regenerative Therapy Research Program, National Institute of Radiological Sciences, National Institute for Quantum and Radiological Science and Technology

以上、他のFGFと同様に、FGF13も毛周期制御に関与している可能性が考えられた。そこで、本研究では、組み換え体FGF13を利用して、FGF13の毛周期への関与を検討した。近年、CRISPR-Cas9システムにより、ノックアウトマウスの作成が迅速、簡便化されてきたことから、CRISPR-Cas9システムにてFGF13ノックアウトマウス作成も試みた。

2．実　験

2．1．組み換え体FGF13タンパク質の作成

ヒトFGF13には種々のsplicing variantが存在するが、本研究ではtranscript variant 3（NM_001139501）配列のFGF13を用いた。この遺伝子配列をGateway pDEST17 Vectorに組み込み、pET発現システムにより、大腸菌（BL21（DE3）pLysS）内でHisタグ付きFGF13蛋白質を大量に産生させ、Ni Sepharoseカラムで精製した[6]。さらに、PBSで透析した後、−80度に分注保存し、用時解凍して使用した。

2．2．FGF13投与中のマウス毛周期の測定

マウスは、日本クレアから3週齢のメスC57BL/6NJclを購入して使用した。マウスの毛包は、出生後しばらく毛周期が同調しており、3週齢のC57BL/6では休止期に揃っている。この3週齢のマウスを項部から背部1/3にかけて電動バリカン（Pet club ER803, Panasonic）で剃毛し、項部の皮膚の色調の変化を観察することにより、毛周期の変化を判定した。すなわち、休止期では皮膚がピンク色だが、成長期に移行するに従って毛包のメラニンが増加し、皮膚は青色に変化することで判定した。マウス1匹あたり10μgのFGF13を0.5mLの5％マウスserum含有生理食塩水に希釈して、マウス腹腔内に投与した。コントロールマウスには、0.5mLの5％マウスserum含有生理食塩水のみ投与した。FGF13は剃毛後2日目から週3回、計8回投与し、皮膚の写真撮影も週に3回麻酔下で実施した（図2A）。

2．3．FGF13投与による成長期誘導後の細胞分裂の検出

日本クレアから8週齢のメスC57BL/6NJclを購入して使用した。8週齢のC57BL/6は生後2サイクル目の休止期に毛包が揃っている。この8週齢のマウスの背部を抜毛すると、休止期の毛包は成長期へと誘導させる。抜毛24時間前

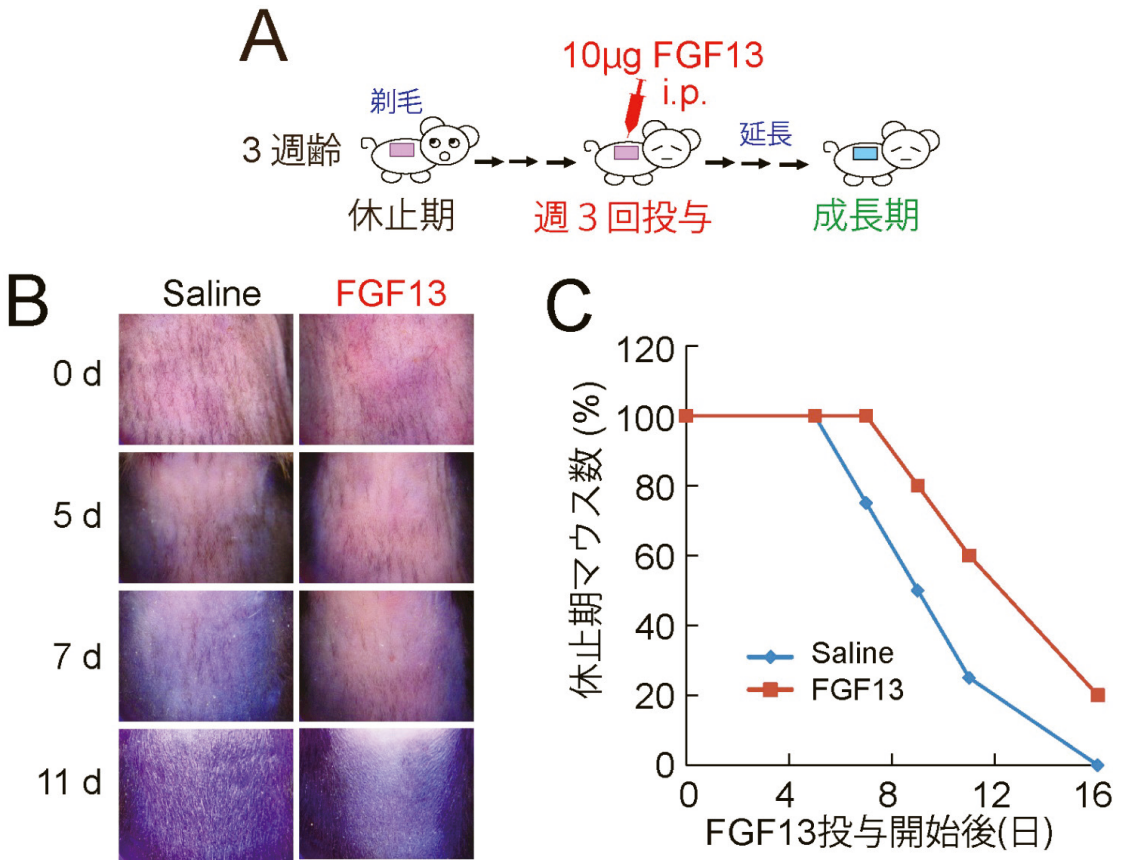


図2　FGF13投与による毛包休止期の延長。3週齢マウスの背部を剃毛し、週3回FGF13を投与しながら、項部の毛周期を皮膚色で判定した。

に100μgのFGF13を腹腔投与し、抜毛後24時間と72時間に皮膚を採取した。採取2時間前にもBrdUラベリング液を腹腔に注射して、分裂中の細胞核をBrdUでラベルした。パラフィン包埋切片を抗BrdU抗体で免疫組織化学染色し、分裂中の細胞を検出した(図3A)。

2．4．CRISPR-Cas9システムによるFGF13KOマウスの作成

Alt-R® CRISPR-Cas9 Systemを用いたゲノム編集によりFgf13遺伝子のノックアウト(KO)マウスの作成を試みた。マウスはC57BL/6NJclを用い、gRNAはFgf13のvariant 1～4の共通部分を壊すように設計した。そして、Cas9 NucleaseとgRNA Complexの複合体をマウス受精卵にエレクトロポレーションにて導入し、培養後2細胞期の受精卵を偽妊娠マウスの卵管へ移植した。19日後分娩により新生仔を得た。

3．結　果

3．1．組み替え体FGF13によるマウス毛包休止期の延長

3週齢のC57BL/6では、毛包は休止期に揃っており、剃毛した皮膚の色調はすべてピンク色だった。生理食塩水を投与したコントロール群は5日目で軽度青色を呈し、成長期の開始が示された（図2B)。さらに、9日目では約半数のマウス項部が青色になり、16日目で全頭が成長期となった（図2C)。一方、10μgのFGF13を週3回腹腔投与した群では、7日目でもピンク色を保ち、依然として毛包休止期が持続し、9日目でも80%のマウスが休止期を維持した（図2C)。よって、FGF13投与群では、2～4日の休止期の延長が認められた。

3．2．組み替え体FGF13による成長期誘導の阻害

8週齢のC57BL/6の毛包も休止期に揃っており、抜毛することで一斉に毛包を成長期に誘導できる。そこで、抜毛後72時間で毛包角化細胞へのBrdUの取り込みを観察すると、BrdU陽性細胞が著明に検出できることから、角化細胞は分裂を始め、毛包は成長期に入ったことが示された（図3B)。一方、抜毛の24時間前にFGF13を腹腔注射しておくと、BrdU陽性細胞が極めて少ないことから、細胞分裂が抑制されていることがわかった。さらに、毛包の形態変化からも成長期の開始がコントロールに比べて遅延していることが明らかになった(図3B)。

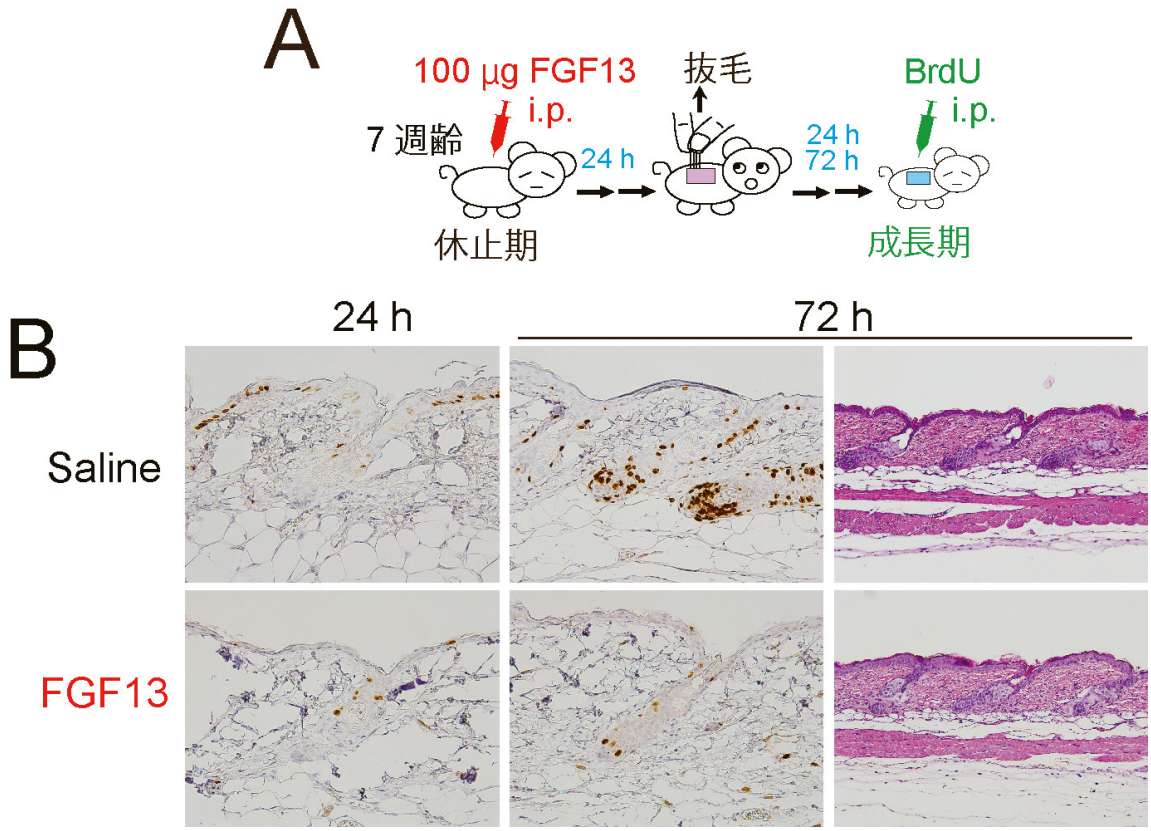


図3　FGF13投与による成長期誘導の阻害。8週齢マウスにFGF13投与後、抜毛による成長期誘導を行い、BrdUの取り込みにより細胞分裂を判定した。

3．3．CRISPR-Cas9システムによるFGF13遺伝子ノックアウト

CRISPR-Cas9システムによってFGF13遺伝子の全身性ノックアウトを試みた。1匹の妊娠マウスから7匹の仔マウスが得られたが、FGF13遺伝子がホモでノックアウトされた個体は得られず、ヘテロでノックアウトされた雌が1匹だけ得られた。一方、別の2匹の妊娠マウスを出産予定日前日に帝王切開したが、着床痕は20個以上認められたものの、胎仔は計8匹しか存在しなかった。しかも、ゲノム解析の結果これらの胎児のFGF13遺伝子はすべて野生型で、ヘテロノックアウトマウスも得られなかった。

雌のヘテロノックアウトマウスと野生型マウスとの交配により、数匹のメスのヘテロノックアウトマウスが得られた。FGF13遺伝子座はX染色体上にあるため、オスのノックアウトマウスが得られれば、FGF13の発現が完全に欠損しているはずだが、オスのノックアウトマウスは生まれてこなかった。これらのヘテロノックアウトマウスの背部を剃毛して皮膚色を観察し、休止期の長さを測定した。生後から3周期ほどの観察では、毛包休止期の長さについてヘテロノックアウトマウスと野生型マウスとの間に有意な違いは認められなかった。

4．考　察

マウス毛包は、3週齢から休止期が1週間続き、その後成長期が始まる。休止期では毛包は短縮し、毛幹の先端も毛包から分離して容易に抜ける状態となっている。この時、毛をバリカンで剃ると、皮膚にはほとんど毛幹が残らないため、皮膚色はピンク色となる。一方、成長期が始まると、毛包が下へ伸長するとともに、毛包先端から黒い毛幹が伸びてくるため、剃毛後の皮膚は青色調を呈する。したがって、実験開始から1週間、すなわちマウスが4週齢になると、無処置のコントロールマウスでは、皮膚色がピンク色から青色に変化する（図3）。ところが、組み替え体FGF13を腹腔投与した群では、1週間たってもピンク色のままで、約2~4日ほど成長期への移行が遅延した（図3）。すなわち、FGF13の投与が明らかに毛包休止期の期間を延長した。

休止期に抜毛することで、毛包は成長期に誘導されることが知られている。そのメカニズムは、毛幹にFGF18などを分泌する細胞が接しているが、抜毛により毛幹とともにこの細胞が除かれ、毛包のFGF18の濃度が低下することで、成長期に移行すると考えられている。抜毛後にはFGF13の発現も低下することから[1]、FGF13についても同様の作用が推定されたため、組み替え体FGF13を抜毛前にマウス個体に投与してみた。驚くべきことに、FGF13の投与により毛包の成長期への誘導は阻害された。すなわち、FGF13の事前投与が抜毛により失われた休止期維持の機構を補ったことを意味している。これは、FGF13がFGF18同様に休止期の維持に大きな役割をはたしていることを示唆している。

FGF13の毛包周期における生理的な役割を調べるためにFGF13のノックアウトマウスは有用である。しかしながら、FGF13遺伝子の全身性ノックアウトマウスについて情報がなく、出生できるか不明であった。そこで、本研究では、CRISPR-Cas9システムによりFGF13の全身性ノックアウトマウス作成を試みた。その結果、残念ながらFGF13遺伝子のホモ欠損マウスを得ることができず、ヘテロノックアウトの雌マウスが得られただけだった。雌のヘテロノックアウトマウスで毛包周期を観察したが、野生型マウスと有意な違いを認めなかった。毛包でFGF13の発現が低下しているヒトのX連鎖性先天性多毛症では、男性患者でほぼ全身に強く多毛症の症状が出現しているのに対して、変異のある遺伝子座が1つしかない女性キャリアでは、ごくわずかに体幹に多毛傾向を示すのみである[5]。よって、FGF13遺伝子の雌のヘテロノックアウトマウスに何らかの毛の異状を見出すのは困難で、毛包においてさらなるFGF13減少もしくは発現欠損が毛の表現型の異状を検出するために必要と考えられた。一方、FGF13遺伝子座はX染色体上にあるため、オスのノックアウトマウスが得られればFGF13発現のないマウスとなるが、雌のヘテロノックアウトマウスとの交配を繰り返しても、オスのノックアウトマウスは全く得られなかった。生後の食殺の可能性も考慮し、出産直前の帝王切開も実施したが、FGF13遺伝子ホモノックアウトの胎仔を認めなかった。胎盤着床痕の数に比べて、胎仔数が少ないことからも、FGF13遺伝子の破壊は胚性致死になる可能性が高いと考えられた。よって、FGF13の毛包周期における生理的な役割を調べるためには、皮膚角化細胞だけFGF13を欠損させるコンディショナルノックアウトマウスの作成が必要と結論づけられた。

5．総　括

組み替え体FGF13を用いたマウス実験により、FGF13が毛包角化細胞の分裂を抑制し、毛包休止期を延長させることが明らかになり、FGF13が毛包休止期の維持に重要な役割を果たしていることが示唆された。今回、FGF13の全身性ノックアウトマウス作成を試み、ヘテロノックアウトマウスを得られたが毛周期の異状を認めなかった。また、FGF13全身性ノックアウトマウスは胚性致死になる可能性が高いことも示した。今後、皮膚角化細胞特異的にFGF13を欠損させたコンディショナルノックアウトマウスを作成することで、FGF13による生理的な毛周期制御機構の解明につなげていく予定である。

（引用文献）

1） Kawano M, Komi-Kuramochi A, Asada M, Suzuki M, Oki J, Jiang J, Imamura T: Comprehensive analysis of FGF and FGFR expression in skin: FGF18 is highly expressed in hair follicles and capable of inducing anagen from telogen stage hair follicles, J. Invest. Dermatol., 124, 877–885, 2005.

2） Hsu YC, Pasolli HA, Fuchs E: Dynamics between stem cells, niche, and progeny in the hair follicle, Cell, 144, 92–105, 2011.

3） Kimura-Ueki M, Oda Y, Oki J, Komi-Kuramochi A, Honda E, Asada M, Suzuki M, Imamura T: Hair cycle resting phase is regulated by cyclic epithelial FGF18 signaling, J. Invest. Dermatol., 132, 1338–1345, 2012.

4） Kawano M, Suzuki S, Suzuki M, Oki J, Imamura T: Bulge- and basal layer-specific expression of fibroblast growth factor-13 (FHF-2) in mouse skin, J. Invest. Dermatol., 122, 1084–1090, 2004.

5） DeStefano GM, Fantauzzo KA, Petukhova L, Kurban M, Tadin-Strapps M, Levy B, Warburton D, Cirulli ET, Han Y, Sun X, Shen Y, Shirazi M, Jobanputra V, Cepeda-Valdes R, Cesar Salas-Alanis J, Christiano AM: Position effect on FGF13 associated with X-linked congenital generalized hypertrichosis, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 110, 7790–7795, 2013.

6） Nakayama F, Yasuda T, Umeda S, Asada M, Imamura T, Meineke V, Akashi M: Fibroblast growth factor-12 (FGF12) translocation into intestinal epithelial cells is dependent on a novel cell-penetrating peptide domain: involvement of internalization in the in vivo role of exogenous FGF12, J. Biol. Chem., 286, 25823–25834, 2011.

7） Itoh N, Ornitz DM: Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease, J. Biochem., 149, 121–130, 2011.

皮膚組織修復におけるリン脂質局在制御機構の役割

京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻
原　雄二

Membrane repair is the fundamental process that is essential for maintaining the homeostasis of live cells. Phospholipids' distribution has been thought to be dramatically changed during membrane repair, but the detailed mechanisms underlying the membrane repair is still elusive. To elucidate the role of phospholipids' distribution in membrane repair, we have focused on phospholipid flippase that can translocate specific phospholipids from the outer to the inner leaflets of biological membranes, thus generating asymmetric distribution of phospholipids. We first established cell lines lacking phospholipid flippase by the CRISPR/Cas9 system, and performed membrane damage assays using a membrane-impermeable dye (FM1-43) or GFP-tagged membrane repair proteins expressed in the phospholipid flippase-deficient cell lines. Phospholipid probes were also utilized to elucidate the role of phospholipids' localization in membrane repair. Our results revealed that continuous influx of FM1-43 was observed in phospholipid flippase-deficient lines after introduction of membrane damages. Accumulation of one of membrane repair-related proteins to damaged sites was affected in the flippase-deficient cells, suggesting that the membrane repair was affected by deficiency in the phospholipid flippase. Moreover, during the course of this project, we identified PIEZO1, a mechanosensitive cation channel that is activated by membrane tension, as a downstream target of phospholipid flippase-dependent phopsholipids' localization. Our results indicate that phospholipid flippase plays a role in the membrane repair system, thus providing the therapeutic strategies for a variety of diseases including skin diseases.

1．緒　言

生体膜は、生命の基本単位である細胞を形づくる構造体である。形質膜の構造が損なわれると、細胞における恒常性が破綻し、筋ジストロフィーをはじめ様々な疾患が惹起される[1)]。形質膜に対する損傷は骨格筋だけでなく皮膚等様々な組織で見られる。

機械刺激や炎症等により惹起される形質膜損傷を認識し、直接修復する機構については、脂質結合ドメインを有するタンパク質Dysferlinの発見により端を発した[2)]。同タンパク質が筋線維内の小胞とともに形質膜損傷部位に集積し、カルシウムイオン(Ca^{2+})依存的に損傷が修復される仮説が提唱され、脂質結合タンパク質群が膜ダメージ認識に関与すると報告がなされている[3)]。一方、皮膚をはじめとする上皮細胞に対する保護・修復機構は、組織の構造・機能恒常性維持に必須である。これまでに損傷部位に集積する免疫細胞から産生されるサイトカイン等の液性因子等様々な修復関連因子が同定されてきた[4)]。しかし膜修復における分子機構の詳細は依然明らかではない。それは、膜構造・機能破綻を主原因とするにも関わらず、形質膜構成因子であるリン脂質分子群に焦点をあてた「膜修復素過程の包括的理解」が進んでいないことが大きな要因と言える。例えば膜修復関連タンパク質群による膜損傷後の意義、膜修復時における脂質分子群の動態等が未解明であること等が挙げられる。

そこで、本研究では皮膚を構成する上皮細胞における膜修復機構に焦点をあてた。特に皮膚への損傷時に膜リン脂質分子そのものの動態やリン脂質分子局在を制御するタンパク質群の機能解析を行うことで、皮膚修復機構解明を目指した。具体的にはリン脂質の形質膜内層・外層間の輸送を制御するリン脂質輸送体群に着目した。リン脂質輸送体は外層から内層にリン脂質を輸送するフリッパーゼ、両方向に輸送するスクランブラーゼ、内層から外層に輸送するフロッパーゼからなり、これらの役割によりリン脂質の局在は決定される。興味深いことに、哺乳動物細胞では内層側にホスファチジルセリンやホスファチジルエタノールアミン等が、外層側にホスファチジルコリンやスフィンゴミエリンなどが局在し、非対称分布を形成する[5)]。

以上の観点のもと、本研究ではリン脂質輸送体が小胞融合時のリン脂質局在の制御を行うことで、皮膚細胞における修復に関与するという作業仮説を提唱し、検証を目指した。申請者のこれまでのバックグラウンドをもとに、まずモデル系として筋芽細胞株を用いた解析を行うことで、皮膚をはじめとする修復過程におけるリン脂質動態の役割の解明を目指した。



Role of phospholipid translocases in skin repair
Yuji Hara
Graduate School of Engineering, Kyoto University

2．実　験

2．1．リン脂質フリッパーゼの欠損細胞株の樹立

リン脂質フリッパーゼ欠損筋芽細胞株について、CRISPR/Cas9法により樹立を行った。各遺伝子配列に対するターゲット配列をCRISPR-directを用いて設計し、pX330ベクター（Addgene）に該当配列を組み込むことで設計を行った。C2C12細胞株（ATCC）へpX330-ターゲット配列-PGK-puromycinカセットを組み込んだベクターを、ViaFect（Promega）を用いてトランスフェクションした。その後Puromycin耐性細胞について、単一細胞クローニングを行い、ゲノムDNAを鋳型としたゲノミックPCRを行い、得られたPCR産物について各遺伝子配列をダイレクトシーケンシングすることで、各遺伝子欠損を確認し細胞の樹立を行った。

2．2．細胞膜修復アッセイの構築

膜損傷導入系として、マイクロマニピュレーターにより微小ガラス管を操作し、細胞膜への損傷を与えた。二光子顕微鏡（LSM780; Zeiss社）下にて二光子パルスレーザを用いる方法、あるいはマイクロマニピュレーターにて微小ガラス端にて細胞膜にダメージを与える方法を試みた。膜修復に関わる因子群の挙動観察のため、膜修復関連因子（MG53, ESCRTIII複合体, Annexin）について、各GFP融合タンパク質の集積を評価した。

2．3．リン脂質フリッパーゼ欠損マウスの樹立

リン脂質フリッパーゼ（*Atp11a*）欠損マウスについては、Wellcome Trast Sanger Instituteより購入した。同遺伝子の全身性欠損により胎生致死に至ることから、コンディショナル遺伝子欠損システムとして、Cre-LoxPシステムにて、筋芽細胞特異的なCreレコンビナーゼ（Myf5-Cre）を用いて、同マウスの解析を試みた。

2．4．遺伝子欠損細胞株の増殖能アッセイ

リン脂質フリッパーゼ欠損細胞の増殖能を検討するため、同遺伝子欠損マウスより筋芽細胞を単離し、培養を行った。コンフルエントになるまで同細胞を培養し、スクラッチアッセイを行い、その後の増殖能について観察を行った。また、増殖過程の観察のため、筋芽細胞株を用いて、京都大学医学研究科の共通施設に設置されているインキュベーター型顕微鏡（Olympus LCV110）を用いてタイムラプス観察を行った。

2．5．リン脂質フリッパーゼ欠損マウスの解析

リン脂質フリッパーゼ（*Atp11a*）欠損マウスについて、その表現型解析を行った。組織における修復能への影響を探索するため、骨格筋線維に対して溶解作用を有するカルジオトキシンを用い、その後の再生過程への効果を検討した。

2．6．リン脂質フリッパーゼにより制御されるイオンチャネル群の同定および解析

リン脂質の非対称分布により制御を受けるイオンチャネルとして、我々はカルシウム透過型イオンチャネルの関与を検討した。筋芽細胞に発現するイオンチャネルをqRT-PCR法にて同定後、各イオンチャネルについてアゴニスト刺激後のイオンチャネル活性の計測を行った。今回着目したイオンチャネルとしてPIEZO1が挙げられるが、PIEZO1特異的アゴニストYoda1[6]を用いて、カルシウム指示薬Fura-2を用いてカルシウム測光を行った。

3．結　果

3．1．培養細胞系におけるリン脂質輸送体の機能解明

本研究遂行にあたり、我々は膜外層から内層にリン脂質分子を輸送する「リン脂質フリッパーゼ」に着目した。リン脂質フリッパーゼは主要ユニットであるP4-ATPase、補助ユニットであるCDC50の各ファミリーよりなる（図1）。研究の端緒として、申請者の研究バックグラウンドとして骨格筋における幹細胞として機能する筋芽細胞に着目し、検討を行った。筋芽細胞は互いに融合することで、筋管とよばれる多核の構造体を形成し、筋線維へと成熟する。リン脂質フリッパーゼの発現プロファイルを検討したところ、P4-ATPase、CDC50各ファミリーにて高発現する分子として、Atp11aおよびCdc50a各遺伝子の同定に成功した。その結果をもとに筋芽細胞株にて各遺伝子欠損株の樹立をCRISPR/Cas9法にて行い、その機能解析を行った。まず筋芽細胞からの分化能を検討した。低血清培地による筋管形成の誘導後、野生株では細長い筋管構造を呈するのに対し、各分子欠損株では異常な構造体の形成が認められた。タイムラプス観察の結果、野生株では秩序だった融合過程に続き、長軸方向へ正しく伸長する様子が観察された。一方、リン脂質フリッパーゼ欠損株（Atp11a, Cdc50a各欠損細胞）では、細胞同士の融合の異常な亢進、および融合後に細胞極性を失うことで、長軸方向への伸長が損なわれ

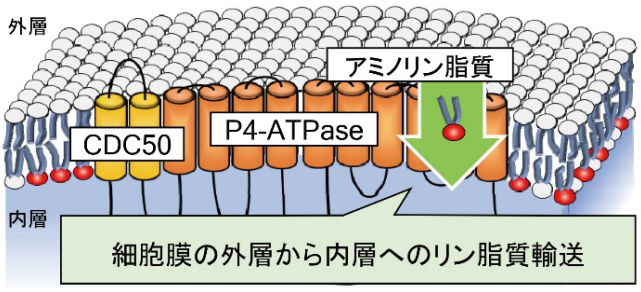


図1　リン脂質フリッパーゼ

ることが示された。この結果より、リン脂質フリッパーゼは細胞極性の形成に関わりうることが示唆された。

さらに我々はリン脂質フリッパーゼの下流にて機能する分子の同定を試みた。特に膜融合過程では、融合する細胞同士で押し合うことに伴い膜張力が増強し、この力学的な刺激が融合促進に関わることが想定されている[7]。そこで我々は膜張力を感知する分子群とリン脂質フリッパーゼが機能的に関わると作業仮説を立てた。特に、膜張力感知に関わり細胞質内でのシグナル伝達をもたらす機械受容イオンチャネルに焦点を当てた。機械受容イオンチャネルは細胞膜の張力や、細胞骨格からの力を感知して活性化されることが知られており、多くのイオンチャネルが該当すると考えられている。特に筋芽細胞株C2C12において、PIEZO1、TRPM7、PKD2などの発現が認められた。これらのうち、PIEZO1イオンチャネルはリン脂質フリッパーゼ欠損により、その機能が大きく減弱することを明らかにした（図2）。同イオンチャネルアゴニストであるYoda1[6]を添加すると、野生株では急激なカルシウム上昇が見られるのに対し、Atp11a欠損細胞では同チャネル活性の減弱が、さらにCdc50a欠損細胞では、ほぼ完全に同チャネル活性が消失することを明らかにした（図3）。さらにPiezo1欠損細胞では、細胞同士の融合が促進し、かつ融合後の形態が損なわれた。以上の結果より、リン脂質フリッパーゼによるリン脂質動態は、機械受容イオンチャネルの活性を正に制御することが示された。

続いて、リン脂質フリッパーゼ、PIEZO1の下流経路について解明を試みた。これらの欠損細胞株では細胞形態の著しい変化が生じたことから、細胞骨格が関わることが想定された。また先行研究により、筋管細胞での形質膜直下でのアクトミオシン（アクチン－ミオシン複合体）の形成が、秩序だった細胞形態に関わることが示された。実際、アクチンの重合をファロイジンにて、およびミオシンの集積を抗ミオシン（NMIIA）抗体にて検出したところ、野生型では形質膜直下での集積が認められたが、各欠損株ではその集積が消失することが示された。アクトミオシン形成には、低分子量GタンパクRhoAおよびRhoキナーゼが活性化され、MLC2（ミオシン軽鎖）のリン酸化を経てもたらされる。そこで各欠損株にて、アクトミオシン形成をレスキューするために、上記経路を活性化させることとした。RhoA活性化剤CN03、およびミオシン活性化剤CalyculinAを添加すると、リン脂質フリッパーゼ欠損あるいはPIEZO1欠損細胞株で見られた筋管形態の異常が、少なくとも部分的にレスキューされた。以上の結果より、我々は「リン脂質フリッパーゼによるリン脂質の細胞膜間の輸送は、PIEZO1イオンチャネルにより感知され、様々な細胞機能をもたらす」という「フリップ・フロップ　スイッチ機構」を提唱した[8]。

3．2．細胞遊走におけるリン脂質フリッパーゼの役割

リン脂質フリッパーゼは、リン脂質の細胞膜間の挙動を制御することにより、多様な役割を担うと考えられてきた。実際我々は、リン脂質フリッパーゼの一つである

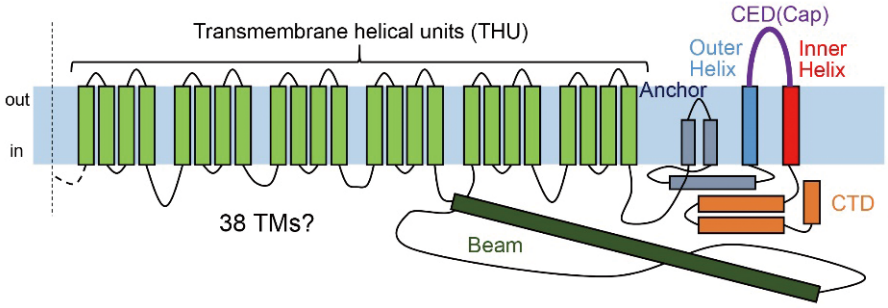


図２　リン脂質フリッパーゼと機械需要イオンチャネル PIEZO1 の機能的連関

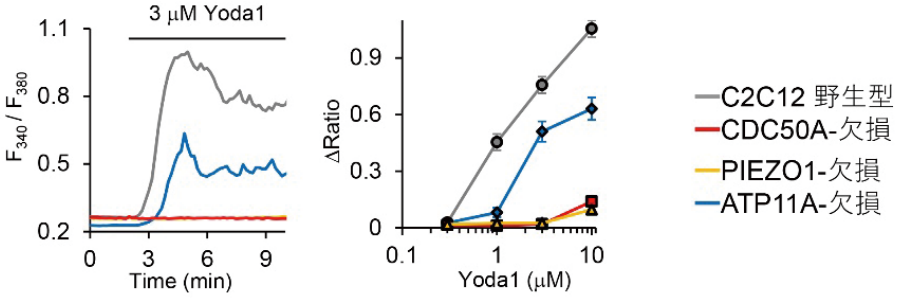


図３　リン脂質フリッパーゼ欠損細胞でのカルシウム測光

ATP8A1が、CHO-KI細胞での細胞遊走に関わることを示した[9]。ATP8A1のノックダウンにより細胞遊走能が著しく減弱すること、さらにこの下流経路としてRac1が関わることを明らかにした。これらの知見のもと、我々はリン脂質フリッパーゼATP11Aが筋芽細胞の細胞遊走能を制御する可能性を追究した。*Atp11a*欠損マウスより単離した筋芽細胞にて、コンフルエントになるまで培養し、スクラッチ後の細胞増殖能の検討を行った。興味深いことに、野生型と比較して細胞遊走能の減弱が認められた（図4）。また筋芽細胞株C2C12を用いた解析により、特にCdc50a欠損細胞株ではラメディポディア（葉状仮足）の形態に変化が見られた。リン脂質フリッパーゼはCDC50ファミリーの存在下、正しく局在し機能を果たすことから、筋芽細胞にて唯一発現するCdc50aを欠損すると、リン脂質フリッパーゼの機能はほぼ欠損すると考えられる。以上の結果より、リン脂質フリッパーゼは形質膜のリン脂質動態を介して、細胞遊走を正に制御すると考えられる。

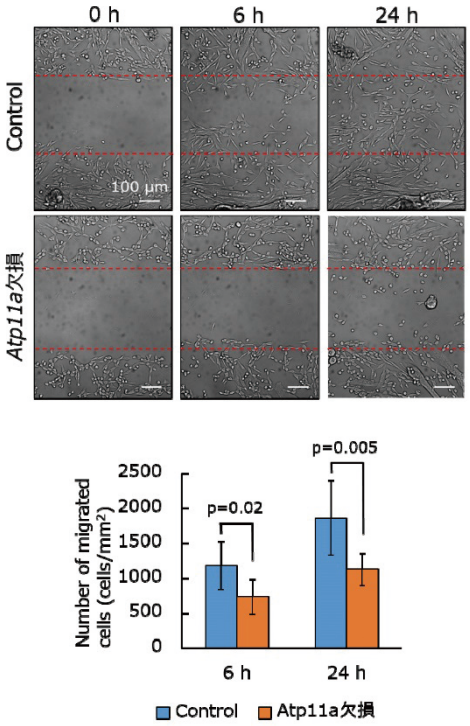


図4　リン脂質フリッパーゼ欠損細胞での遊走能評価

3．3．膜修復機構におけるリン脂質フリッパーゼの役割

リン脂質フリッパーゼの役割をさらに明らかにするため、我々は膜損傷の修復機構への関連に着目した。形質膜は細胞を外界から隔てる役割を有しており、その構造破綻により内容物の漏出等により細胞死が引き起こされる。細胞死を防ぐため、前述のとおり細胞内には内在性の修復機構が備わっている。特に細胞膜直下の微小小胞が損傷を感知して損傷部位に集積・融合することで、細胞膜が修復される機構が知られている。膜修復機構には(a)膜損傷認識因子群による、膜損傷部位への小胞集積および(b)小胞集積後の膜構造の再編成　という機構が考えられている[1,3]。

上記の背景のもと、リン脂質フリッパーゼ欠損細胞における膜修復機構の影響について検討を行った。膜損傷認識因子としてMG53、膜構造の再編成に関わる因子としてESCRTIII複合体を例として、それぞれの損傷部位への集積の検討を行った。膜ダメージとしてリン脂質フリッパーゼ欠損株ではMG53の挙動は野性型と変わりなかった。一方ESCRTIII複合体の集積については、野生型は一過的

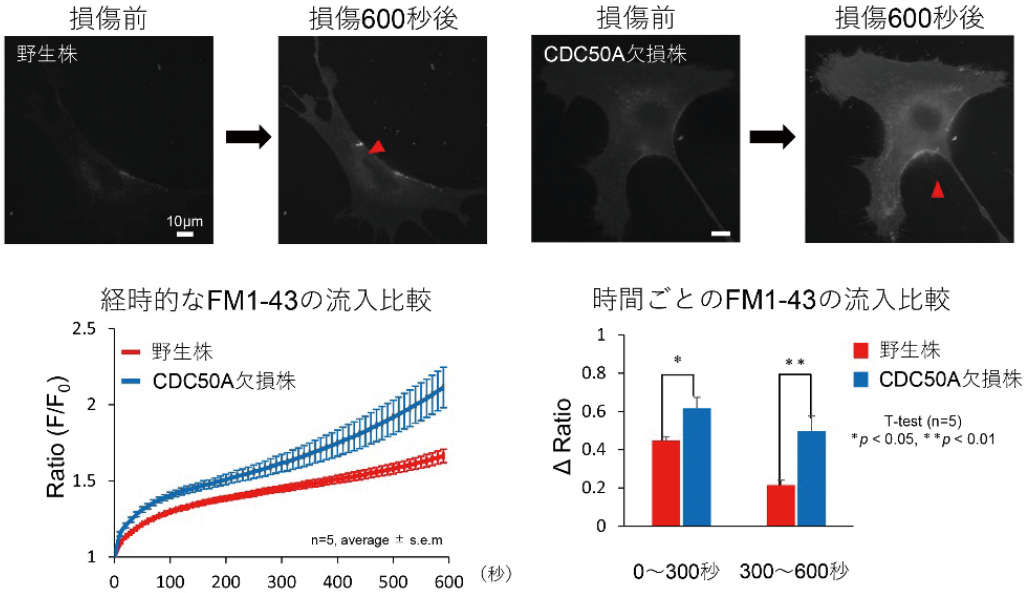


図5　CDC50A欠損株における膜修復機能の低下

に集積が解離した(すなわち膜修復が完了した)のに対し、同欠損株ではESCRTIII複合体は解離せず、損傷部位にとどまったままであった。このことから、リン脂質フリッパーゼは膜修復機構に関与する可能性が示唆された(図5)。

リン脂質フリッパーゼはホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン（PE）等のアミノリン脂質を基質として、細胞外層から内層への輸送を行う。我々はこれまで外層に露出したPEを特異的に検出する環状ペプチド(Ro09-0198) [9] を用いて研究を行ってきた。興味深いことにRo09-0198はその添加により細胞毒性を示す。我々は同試薬を用いることで、膜構造の変化を介して細胞毒性を示すこと、膜修復タンパク質群の特異的な集積を示すことをそれぞれ明らかにした。

4．考　察

細胞膜を構成するリン脂質は、膜外層および内層間で異なる局在を示すことが想定されている。この特異的な局在により、細胞遊走、細胞分裂、細胞死過程等、様々な細胞機能に関わると想定されてきた[10]。本研究ではリン脂質挙動を司るリン脂質輸送体のうち、特に外層から内層に特定のリン脂質を輸送するリン脂質フリッパーゼに着目した。申請者の研究バックグラウンドの関係上、まず筋芽細胞を用いた解析を試みることで、皮膚上皮細胞との共通性を示す現象について着目した。皮膚には幹細胞が存在し、高い再生能を有すると考えられている。筋芽細胞においても幹細胞(筋衛星細胞)の存在により、絶え間ない筋収縮に伴う筋線維へのダメージに応じて、高い再生能を有する。本研究では、リン脂質フリッパーゼがいかに筋線維再生に関わるのか解明を試みた。その結果、リン脂質フリッパーゼの一つATP11Aおよび補助ユニットCDC50A複合体が、秩序だった筋管形態形成に関わることを明らかにした。その過程で、フリッパーゼの下流分子として、機械受容イオンチャネルPIEZO1が膜張力を感知して活性化することで、細胞骨格の再編成がもたらされることをそれぞれ見出した。PIEZO1は上皮細胞や血管内皮細胞に高発現することが知られており、上皮機能の維持および血管形成および機能に関わることが報告されている[11]。当研究により、上皮細胞での機能においても、リン脂質フリッパーゼが機能することで、膜張力などの物理的な力を感知するイオンチャネルPIEZO1の活性が制御されることが示唆される。

一方、予備検討により、リン脂質フリッパーゼ欠損に伴い、PIEZO1以外のイオンチャネルも活性制御されることを見出している。皮膚組織において、PIEZO1以外にも様々なイオンチャネルが発現されると考えられている。また、皮膚における触覚感知においては、PIEZO1のホモログであるPIEZO2が関与することが報告されている[12]。本研究をさらに発展させ、リン脂質動態を介したイオンチャネル活性化が皮膚組織の恒常性に関わるという「フリップ・フロップ　スイッチ」機構の解明を目指したい。

また、本研究では、リン脂質フリッパーゼは膜損傷に対する修復過程に関わること、さらに膜修復機構のうち、主に膜構造の再編成に関わることを明らかにした。これまで、膜修復機構は関連するタンパク質群の同定・解析が主であった。本研究により、リン脂質動態機構が膜修復機構に関わることが示されたことから、膜リン脂質そのものも膜修復機構に関わることが示された。細胞膜損傷時から修復過程において、膜の物性が著しく変化することが想定されている。本研究をさらに発展させ、リン脂質フリッパーゼと膜物性の相関についても明らかにする必要があり、今後の研究が待たれる。

5．総　括

膜損傷は細胞の恒常性を破綻させることから、膜修復機構はきわめて重要な役割を果たしている。今後、リン脂質フリッパーゼ依存的な膜修復機構のさらなる解明（下流因子群の同定、遺伝子欠損マウスの解析等）を行うことで、皮膚細胞においてもその寄与を明らかにすることで、コスメトロジー分野への進展に微力ながら貢献したい。

最後になりましたが、多大なるご援助を賜りました公益財団法人コスメトロジー研究振興財団様にこの場をお借りして心より御礼申し上げます。

(引用文献)

1）Davies KE et al., Nat Rev Mol Cell Biol. 7: 762-773, 2006.
2）Bansal D et al., Nature, 423:168-172, 2003.
3）Cai C et al., Nat Cell Biol. 11: 56-64, 2009.
4）Gurtner GC et al., Nature. 453: 314-321, 2008.
5）Murate M et al., J Cell Sci. 128: 1627-1638, 2015.
6）Choung S-Y et al., Biochim Biophys Acta 940: 180-197, 1988.
7）Kim JH et al., Dev. Cell 32: 561-573, 2015.
8）Tsuchiya M et al., Nat. Commun, 2049, 2018.
9）Kato U et al., J Biol Chem, 288: 4922-4934, 2013.
10）van Meer G et al., Nat Rev Mol Cell Biol, 9:112-124, 2008.
11）Wu J et al., Trends Biochem Sci, 42, 157-171, 2017.
12）Ranade SS et al., Nature. 516: 121-125, 2014.

構造情報を利用したタイトジャンクション増強剤の実用的な化合物への骨格転換

名古屋大学大学院創薬科学研究科構造分子薬理学分野

廣明　秀一

Tight junction (TJ) is an inter-cellular adhesion machinery that is maintained by epithelial cells in a dynamic equilibrium between biogenesis and degradation. Biogenesis of TJ is mainly proceeded by ZO-1 (and its paralogs ZO-2/3), whereas TJ degradation is promoted by LNX1. In detail, two PDZ domains in ZO-1 and LNX1 are competing each other among molecular interaction against claudins' C-termini. Inhibition of either ZO-1 or LNX1 interaction to claudin may result in TJ-opening or TJ-closure, respectively. In this study, we screened compounds from natural products that binds ZO1-PDZ1. We found glycyrrhizin binds ZO1-PDZ1 with a reasonable affinity, while baicalin, baicalein, hesperetin and naringenin exhibited weak affinity against ZO1-PDZ1. Among these four flavonoids, baicalin and baicalein showed significant reduction CLD-2 from the intercellular membrane between two adjacent cells. Naringenin exhibited a marked increase in CLD-2 density between two adjacent cells. Baicalin and baicalein are candidates for drug absorption enhancers, whereas naringenin is a promising candidate for TJ barrier enhancer.

1．緒　言

タイトジャンクション（TJ）は、上皮細胞の細胞間の頂端部に形成される強固な細胞間接着装置である。TJの機能は臓器の種類により異なる。例えば水やイオン分子以外の物質を透過させない強固なバリアとして機能する一方で、特定のイオンの再吸収のみを促す選択的細胞間チャネルとして機能するなど、多彩な機能を担う。その主要成分は生体内にヒトゲノム中に27種類あると考えられている4回膜貫通タンパク質クローディン（CLD）と、同じく4回膜貫通タンパク質であるものの機能が未知のオクルーディン、その裏打ちタンパク質で分子内にPDZドメインを3個有するZO-1/2/3などである（図1A）。TJは、皮膚においては表皮・顆粒細胞層において皮膚バリア機能を担っている。これまでTJは、その生化学的実験における難溶性と電子顕微鏡により観察された強固な構造から、TJは生理的に「安定」な構造体であると信じられてきた。2007年に生理研（岡崎）の古瀬らは、CLDを特異的にユビキチン化してエンドサイトーシスするタンパク質LNX1を発見した（図1B）。これにより、TJは、エンドサイトーシス・分解経路による分解と、新規合成・重合促進による形成の、動的平衡によって保たれているという新しいモデルが示された[1]。この作業仮説で特徴的なのは、TJの形成促進と、TJの内在化・減弱が、ともにTJの制御タンパク質に含まれるPDZドメインとCLDのC末端の相互作用によりスイッチされているという点である（図1C）。

筆者らのグループでは、2009年より、コスメトロジー研究振興財団の支援のもと、TJ抑制因子であるLNX1のPDZドメインの構造決定に成功した（論文投稿準備中）。他方、TJ形成促進因子ZO-1のPDZドメインについてもNMR解析を進め[2]、そのPDZドメインにホスファチジルイノシトールリン酸が結合し、CLD結合と拮抗する作用を持っていることを明らかにした[3]。更に上記PDZドメインの構造情報をインシリコ創薬手法に活用し、新規の非ペプチド性LNX1阻害薬、NPL-1010、NPL-1011、NPL-3009の化合物を同定した[4]。これら阻害剤はモデル上皮細胞でTJ形成を増強した。また化合物探索の過程で、類似骨格を有する類縁化合物から、TJ形成促進因子であるZO1-PDZ1に結合し、TJを減弱させバリアを緩和する化合物も発見することができた[5]。

しかし、筆者らが発見した「第一世代TJ制御低分子」はいずれも合成低分子であり、ヒト皮膚などに対する刺激性・安全性などは未確認であるため、化粧品原料として必ずしも望ましくはない。そこで本研究では、インシリコ手法の一つである化合物骨格転換（スキャフォールドホッピング）の技術を用いて、TJを強化または減弱させる作用を持つ天然物由来あるいは食品由来の成分を新たに探索することとした。その際、下記の2つのアプローチによる研究を計画した。

【アプローチ1】

既知情報を活用した化合物探索：すでに筆者らは、天然物である真菌フシジウム・コキネウム培養上清から単離された四環系トリテルペノイド抗生物質、フシジン酸（FUS）が、複数のPDZドメインに結合することを発見



Scaffold conversion of tight junction enhancers into ready-to-use compounds based on 3D-structure of PDZ domains

Hidekazu Hiroaki

Laboratory of structural and molecular pharmacology, Graduate school of pharmaceutical sciences, Nagoya University

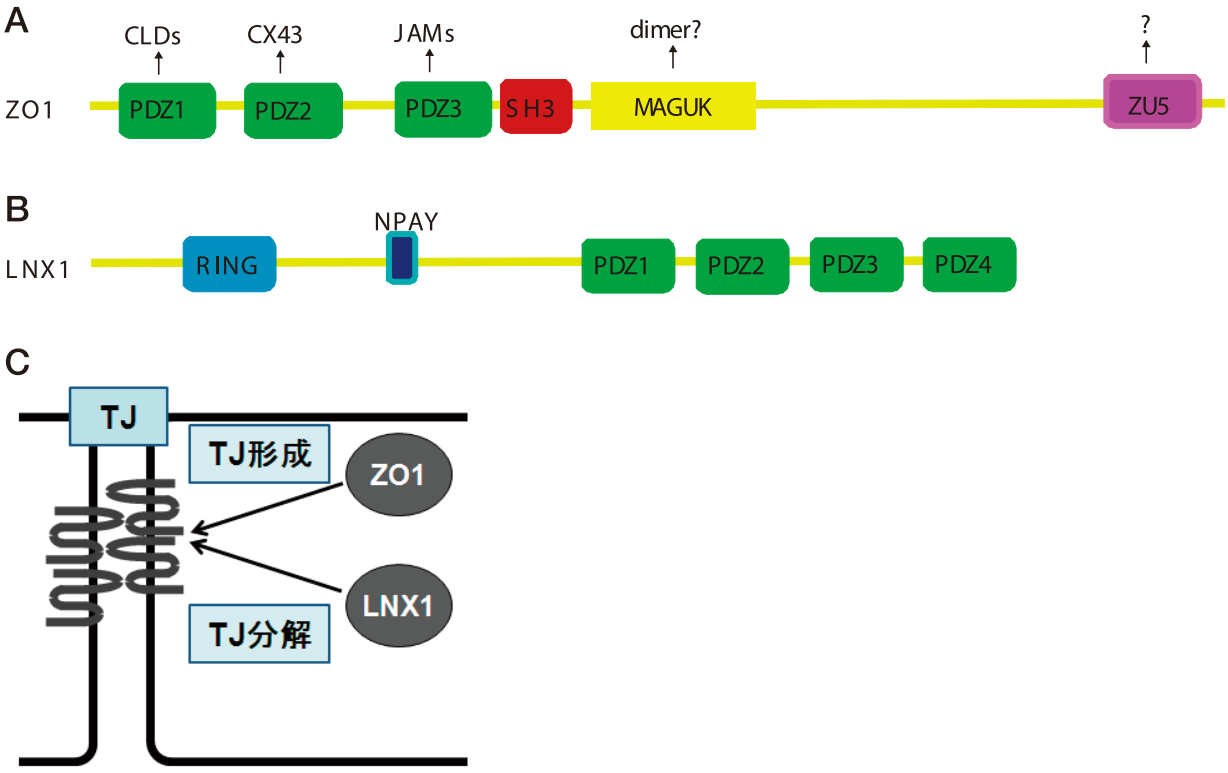


図1　TJ形成促進因子ZO1ならびにTJの抑制分解因子LNX1のドメイン構成（A, B）と、CLDのC末端相互作用の拮抗による TJ 動的制御仮説（C）

し報告している[6]。そこで、米NCBIが公開している化合物DBであるPubChemを利用して、トリテルペノイド化合物のリストを作成し、FUSと似た負電荷を持つグリチルレチック酸（GA）ならびにグリチリチン（GRZ）に着目し、ZO1-PDZ1ドメインとの相互作用解析、ならびにイヌ腎臓尿細管上皮細胞MDCK II細胞に対する薬理作用を観察した。

【アプローチ2】

既報の相互作用の文献情報を活用した化合物探索：筆者らはアミノベンジルまたはアミノベンゾイル構造を分子内に有するジクロフェナクならびにフルフェナミン酸が、ZO1-PDZ1のみならず複数のPDZドメインに弱く結合することを見だしている。そこで、ZO1-PDZ1と配列が類似した他のPDZドメインに結合する天然物を文献情報より探索し、その天然物ならびに類縁化合物とZO1-PDZ1・LNX1-PDZ2の相互作用を実験により検証する、という手法で、新規相互作用の探索を行った。具体的には、PSD-95のPDZドメインと、生薬オウゴンに含有されているフラボノイドの直接相互作用が報告されていた[7]。そこで、主要なオウゴン含有フラボノイドならびに、類似のフラボノイド計13種を購入し（図2）、NMRによる相互作用解析、ならびにMDCK II細胞に対する薬理作用を観察した。

2．方　法

2．1．NMR試料の調製

mZO1-PDZ1の発現は、当研究室で作成したpGEX-6P3-PRESAT/mZO1-PDZ1プラスミドを使用した。このプラスミドを用いて大腸菌BL21（DE3）に形質転換した。LB寒天培地に生えたコロニーを数個拾い、LB培地（50μg/mL ampicillin）10mLに添加し、37℃で約5時間培養した。その後、$^{15}NH_4Cl$（0.5g/L）を唯一の窒素源とするM9培地1Lに培養液を加え、$O.D._{600}$＝0.4になるまで培養した。その後、温度を20℃に下げ再び培養した。$O.D._{600}$＝0.45の時に終濃度が0.5mMになるようにIPTGを加えて発現誘導し、20℃で一晩培養した。

回収した菌体1gに対して20mLの破砕バッファー（50mM Tris-HCl, 500mM NaCl, 0.3% Triton X-100, pH7.2）を加え、懸濁し、Bioruptor（Cosmo Bio）で超音波破砕した（on time 30 sec/off time 30 sec, total 10min×4回）。破砕後、遠心分離し（20000rpm, 20min, 4℃, KUBOTA3700）、上清を回収した。回収した上清をDEAE Sepharose Fast Flowカラム（GE Healthcare）とGST-acceptカラム（nacalai tesque）に流し、GST融合ZO1-PDZ1をレジンに結合させた。カラムに150μLのPreScission Proteaseを添加して4℃で静置し、GSTタグを切断した。切断後、バッファーで目的タンパク質を溶出した。

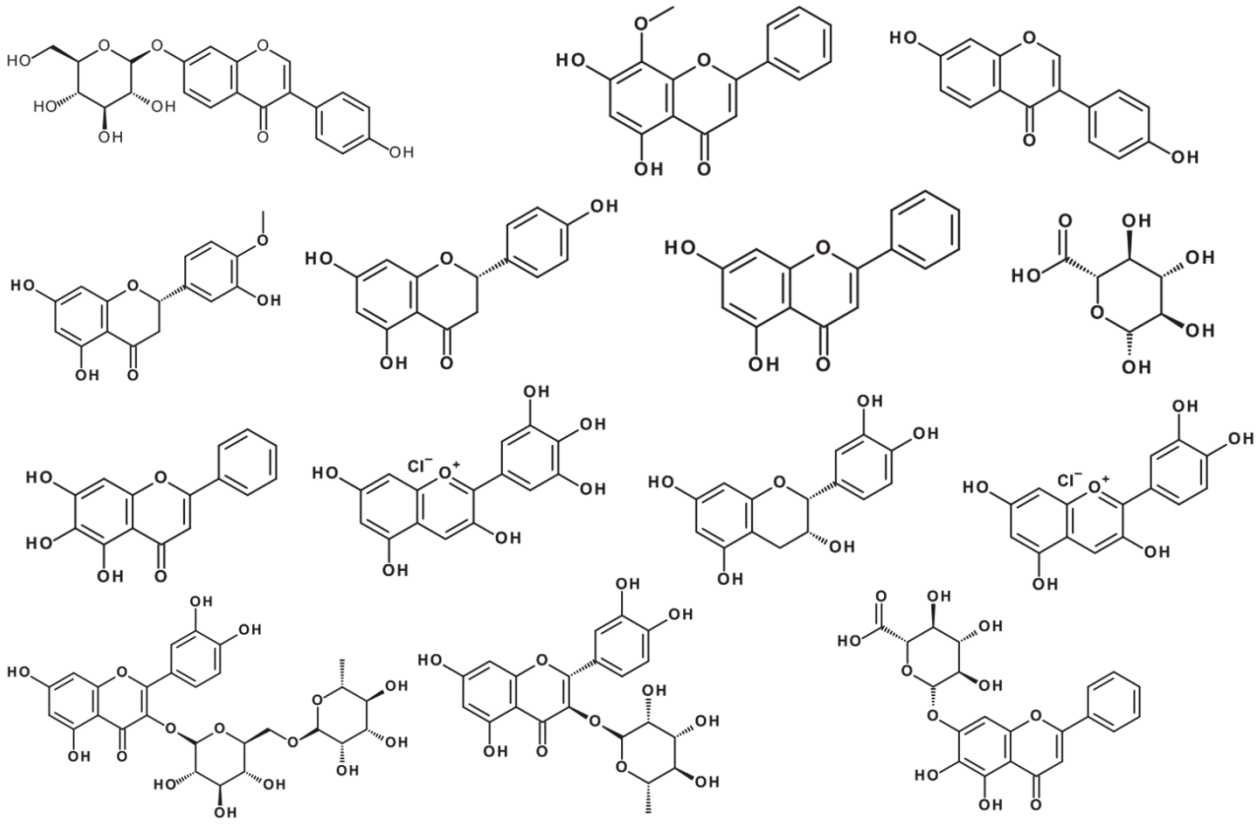


図２　探索に用いた 13 種のフラボノイドとグルクロン酸（コントロール）

mZO1-PDZ1は限外ろ過器により濃縮後、AKTAprime plus（GE Healthcare）を用いてゲルろ過クロマトグラフィー（50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH7.2）により精製し、更に濃縮後、NMRバッファー（20 mM MES, pH5.9）に透析し、^{15}N mZO1-PDZ1サンプルとした。

２．２．NMR滴定実験によるタンパク質・低分子化合物相互作用の観察と評価

^{15}N標識したPDZドメイン（0.1 mM）に２当量、または10当量のフラボノイド（5% d_6-DMSO, 10% D_2O）を添加し、^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルを測定し、下記の計算式でシグナル移動度Δδ［ppm］を算出した。各化合物ごとに閾値を決定し、閾値以上のシグナル移動度を示す残基をZO1-PDZ1（PDB：2RRM）の立体構造にマッピングし、PyMOLで作図した。マッピングの結果、CLD結合ポケット部位にマッピングが集中し、さらにHSQCスペクトルでシグナルの移動が見られた化合物に関して、相互作用があったと定義した。測定はBruker社Avance Ⅲ 600 MHzデジタルNMR装置を用いた。

$$\Delta\delta=\sqrt{(\delta H_{com}-\delta H_{free})^2+(\frac{\delta N_{com}-\delta N_{free}}{6})^2}$$

ここで、δH_{com}, δH_{free}, δN_{com}, δN_{free}はそれぞれ化合物混合時（com）またはd_6-DMSO添加時、つまり化合物なし（free）の水素軸（H）または窒素軸（N）の化学シフト値を示している。

２．３．MDCK II 細胞を用いたTJ増強（緩和）効果の観察

６穴プレートにカバーガラスを入れ、そこに30×10^4個のMDCK II細胞を播種し、37℃、5% CO_2環境下で24時間静置培養した。その後、D-MEM培地に100 μM、d_6-DMSO濃度0.1%になるように化合物を混合し、細胞に添加した後、37℃、5% CO_2環境下で48時間、また96時間インキュベートした。96時間インキュベートの場合、48時間後に化合物を同濃度になるよう混合し直し細胞に添加した。血清、抗生物質を含有していないD-MEM培地で１回洗浄後、4%-パラホルムアルデヒド溶液-リン酸緩衝液（nacalai tesque）を添加し、室温で10分間静置した。PBSで１回洗浄後、透過溶液（0.5% Triton X-100 in PBS）を添加し、室温で５分間静置した。その後、PBS-t（0.1% Tween20 in PBS）で３回洗浄後、ブロッキング溶液（2% BSA in PBS-t）を加え、１時間インキュベートした。ブロッキング溶液で希釈した100 μLの一次抗体の上に固定した細胞面を下にしてカバーガラスをかぶせ、4℃で一晩インキュベートした。翌日、カバーガラスを回収し、TBS-tで３回洗浄した。その後、ブロッキング溶液で希釈した100 μLの二次抗体の上に固定した細胞面が下になるようにカバーガラスをかぶせ、室温、遮光条件で１時間インキュベートした。TBS-tで３回洗浄後、封入剤40 μLを

スライドガラスの上に滴下し、その上にカバーガラスをかぶせ、封入した。これらのサンプルは倒立顕微鏡IX71（OLYMPUS社）を用いて顕微鏡観察した。なお、露光時間は1/100秒で固定した。

一次抗体

・Rabbit anti-Claudin-2 antibody（Sigma-Aldrich）1/200希釈

二次抗体

・Anti-Rabbit IgG, F（ab'）2 flagment-Cy3 antibody（Sigma-Aldrich）1/1000希釈

3．結　果

3．1．グリシルリチンはZO1-PDZ1と強く特異的に相互作用する

NMR滴定実験を行った結果、グリシルリチン（GRZ）の添加によりZO1-PDZ1のCLD結合ポケット周辺の残基に大きな化学シフト変化を観測した（図3B）。GRZとの相互作用の着想の発端となったFUS（図3A）と化学シフト移動の度合いを、残基あたりで標準化した平均化学シフト変化で比較したところ0.026 ppm（GRZ）に対して0.004 ppmとほぼ6倍の移動度の変化であった。またこの値は、我々のグループで既に発見している合成のZO1-PDZ1阻害剤であるNPL-3013の平均化学シフト変化（0.013 ppm）に較べても大きかった（data not shown）。別の実験によりNPL-3013とZO1-PDZ1の解離定数（*Kd*）はおよそ60 μM程度であることがわかっている。ここから概算するとGRZとZO1-PDZ1の*Kd*は、30 μMかそれよりも小さいであろうと予想された。

GRZとZO1-PDZ1の分子認識機構をより詳細に検討するために、GRZ分子内に含まれる2つのカルボキシルグループに着目した。これはPDZドメインがもともとタンパク質のC末端カルボキシルグループを認識するドメインであり、また、ZO1-PDZ1に既に結合することがわかっているすべての分子（ジクロフェナク・フルフェナミン酸・フシジン酸およびNPL-3013）がカルボキシル基を有しているからである。そこでGRZのアグリコンであるグリチルレチック酸（GA）とZO1-PDZ1の相互作用を調べたところ、顕著な結合が見られなかった（図3C）。このことから、GRZとZO1-PDZ1の相互作用には、GRZ糖部グルクロン酸のカルボキシル基が重要な役割を担っている可能性が示唆された。参考までに、ドッキングソフトGOLDにより予測された、FUSとGRZのZO1-PDZ1複合体の立体構造モデルを示す（図3D, E）。GRZのテルペノイド部分がPDZドメインの溝を覆い隠すように結合しているモデルが得られた。今後、更に詳細に検証する予定である。

このようにGRZはZO1-PDZ1に結合するため、もし、細胞内でZO1-PDZ1の機能を阻害するなら、例えば

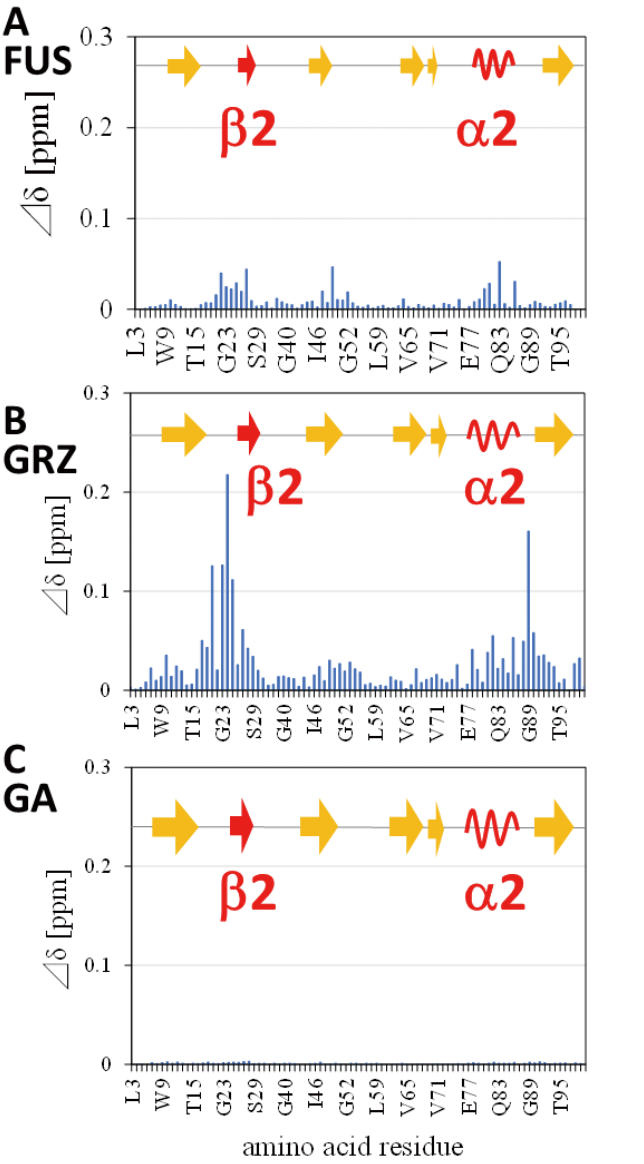


図3　テルペン類化合物とZO1-PDZ1の相互作用。A～C, NMR滴定実験、A, FUS；B, GRZ；C, GA。D, Eはドッキングソフト GOLDにより予測された複合体のモデル図

MDCK II細胞を処理した際に、TJの減弱効果が見られるはずである。他方、GRZやGRZを多く含む植物であるカンゾウには、粘膜細胞の保護機能が知られており、これは

TJの機能強化を介している可能性がある。今回、MDCK II細胞のTJに対するGRZの効果を調べたところ、当初はわずかながらTJの強化が観察されたが、実験の再現性は得られなかった。他方、MDCK II細胞をGAに曝露したところ、細胞毒性が観察された 。

3．2．フラボノイドからのZO1-PDZ1に相互作用する化合物の探索

NMR滴定実験により、化合物のZO1-PDZ1への相互作用能を評価した。化合物はバイカリン、バイカレインの構造に似たフラボノイドを全13種類選定した。ZO1-PDZ1溶液に対し、2当量の化合物を添加して^{1}H-^{15}N HSQCスペクトルを測定した。その結果、バイカリン、バイカレイン、ヘスペレチンを添加したときにシグナルの化学シフトが変化した。また、ヲゴニン、クリシン、(−)-エピカテキンはタンパク質溶液を添加した際に沈殿が生じた。シグナルは観測できたが、シグナルの化学シフトの変化は観測できなかった（data not shown）。D-グルクロン酸、ナリンゲニン、シアニジンクロライド、デルフィニジンクロライドでは2当量の添加でわずかなシグナル変化が観測された。そのため、化合物の濃度を10当量に変更し、^{1}H-^{15}N HSQCを測定し直したところ、10当量ではシグナルの化学シフトが変化した(表1)。その他の化合物ではシグナルの化学シフト変化は観測できなかった 。

ZO1-PDZ1における化合物の結合部位を決定するために、化合物を添加した際に化学シフトが変化した残基（閾値以上のシグナル移動度を示した残基）を同定し、ZO1-PDZ1の結晶構造にマッピングした。その結果、D-グルクロン酸以外の、化学シフトが変化した化合物（バイカリン、バイカレイン、ヘスペレチン、ナリンゲニン、シアニジンクロライド、デルフィニジンクロライド、グリシルリチン)に関して、ZO1-PDZ1のα2ヘリックスとβ2シートの間にあるCLD結合ポケットに特異的に結合することが示された。以上の結果を表1にまとめる。また、後述するように、TJに影響を与えた3つのフラボノイド、バイカリン、バイカレイン、ナリンゲニンについて、NMR化学シフト変化をZO1-PDZ1ドメインの残基ごとに図示したグラフならびに立体構造に結合部位をマッピングした図を示す(図4A～4C)。

3．3．オウゴン由来フラボノイドによるTJ緩和効果

前述のNMR実験で顕著な化学シフト変化をもたらしたフラボノイドのうち、オウゴン由来フラボノイドであるバイカリン、バイカレイン、ヲゴニンについて、MDCK II細胞に曝露し、TJへの影響を調べた。具体的には、化合物（100μM）で48時間曝露後に細胞を固定し、CLD-2抗体を用いた免疫染色実験により、TJの変化を観察した。Contorolでは細胞膜にCLD-2が局在する様子が観察されたが、バイカリン、バイカレイン曝露ではCLD-2の消失が観察された（図5A～C)。ヲゴニン曝露でもCLD-2の消失が観察されたが、同時に細胞毒性も観察され、細胞の培養ディッシュへの接着も不十分であったため、純粋なTJによる影響ではないと考えた(data not shown)。

前述のNMR滴定実験をさらに精密に行ったところ、ZO1-PDZ1とバイカリンの解離定数はおよそ1.8mMと試算された。細胞内への化合物の吸収を考えると、

表1　フラボノイドによるZO1-PDZ1/LNX1-PDZ2のNMR滴定実験のまとめ

化合物	ZO1-PDZ1			LNX1-PDZ2
	相互作用	Δδave (2eq) [ppm]	Δδave (10eq) [ppm]	相互作用
Baicalin	○	0.0067	n.d.	×
Baicalein	○	0.0058	n.d.	×
D-glucuronic acid	×	0.0027	0.0082	n.d.
Wogonin	＊	0.0013	n.d.	n.d.
Chrysin	＊	0.001	n.d.	n.d.
Rutin	×	0.0019	n.d.	n.d.
Astilbin	×	0.0016	n.d.	n.d.
Daidzin	×	0.0017	n.d.	n.d.
Daidzein	×	0.0016	n.d.	n.d.
Hesperetin	○	0.0052	n.d.	×
Naringenin	○	0.0022	0.0043	×
(−)-Epicatechin	＊	0.001	n.d.	n.d.
Cyanidin chloride	○	0.0026	0.0075	×
Delphinidin chloride	○	0.0031	0.0083	×
Glycyrrhizin	○	0.026	n.d.	×
Glycyrrhetinic acid	＊	0.001	n.d.	n.d.

○：相互作用あり、 ×：相互作用なし、 ＊：沈殿が生じた、 n.d：no date

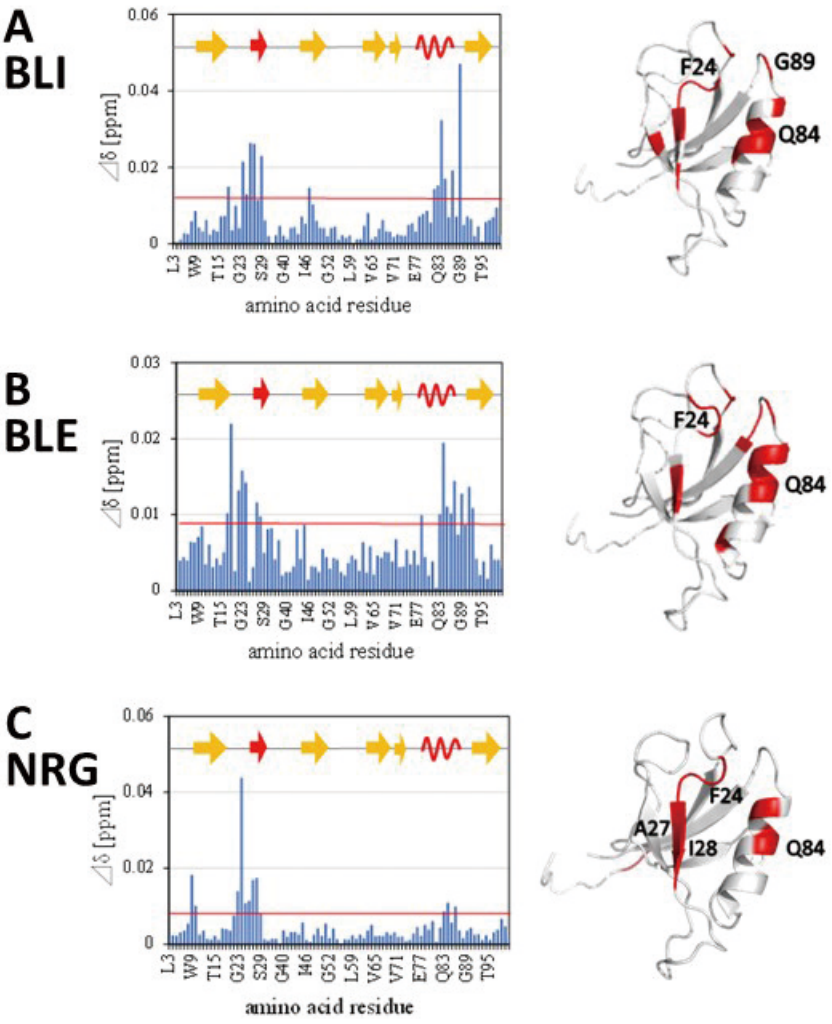


図４　フラボノイドとZO1-PDZ1の相互作用のNMR滴定実験による確認（左）と立体構造へのマッピング(右)。A, Baicalin, 2 eq., B, Baicalein, 2 eq., C, Naringenin, 10 eq.

100μM濃度でのTJ緩和活性は、ZO1-PDZ1阻害のメカニズムでは説明しづらい。先行研究によると、岐阜薬科大学の五十里らが、MEK/ERK経路の活性化によってMDCK II細胞でCLD-2が減少したことを報告していた[8]。そこで、MEK1阻害剤であるU0126を用いて、バイカリン、バイカレインによるTJ減弱化がMEK/ERK経路の活性化によるものかどうかについて検討した。その結果、U0126を用いてもCLD-2の減少は回復しなかった（図5D～I）。この結果は、バイカリン、バイカレインによるTJ緩和機構を解明する上で、重要な足掛かりとなるものと考えられる。

3．4．ナリンゲニンによるTJ強化効果の発見

グレープフルーツなどの柑橘類に含まれるナリンゲニン、ヘスペレチンがZO1-PDZ1に弱いながら結合したため、TJに対する薬理作用をより詳細に調べることにした。CLD-2抗体を用いた免疫染色実験により、TJへの影響をさらに評価した。ヘスペレチンではTJの変化は観察されなかった一方で、ナリンゲニン曝露後48時間でCLD-2が細胞膜に集積し、細胞境界線がはっきりした様子が観察された（図5J～K）。このナリンゲニンによるTJ強化はヒト小腸細胞であるCaco-2細胞でも報告されているがMDCK II細胞での観察は今回が初めてである[9]。ナリンゲニンによるTJ強化は、異なる由来の上皮細胞でも普遍的である可能性がある。今後、より化粧品への応用に近い、皮膚TJに対するバリア機能強化の可能性について調べていきたい。

4．考　察

グリチルリチンおよびいくつかのフラボノイドには、腸管などの粘膜の保護機能や、小腸バリアの強化機能などが知られている。筆者らは既に、LNX1-PDZ2の特異的阻害剤であるNPL-1011と、ZO1-PDZ1の阻害剤であるNPL-3004, NPL-3013を発見しており、これらの化合物によりMDCK II細胞のTJの強化と減弱をそれぞれ観察し

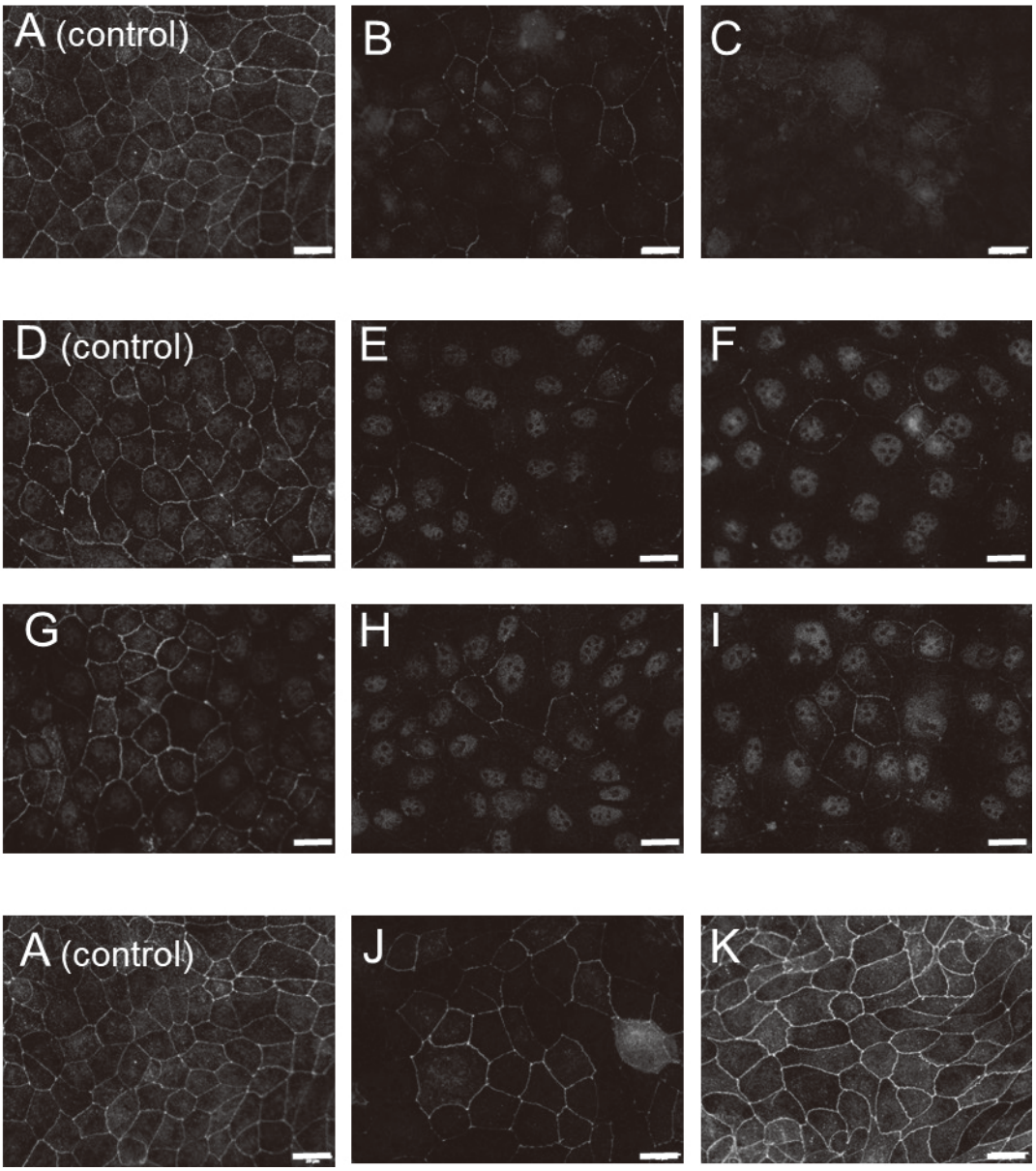


図５　フラボノイドおよび MEK/ERK 阻害剤 U0126 の MDCK II 細胞の CLD2 局在への影響。A, DMSO のみ（control）; B, Baicalin（100μM）; C, Baicalein（100μM）; D, DMSO のみ（control）; E, Baicalin（100μM）; F, Baicalin（100μM）+ U0126（5μM）;G, U0126（5μM）; H, Baicalein（50μM）; I, Baicalein（50μM）+ U0126（5μM）; A, DMSO のみ（control），再掲; J, Hesperetin（100μM）; K, Naringenin（100μM），scale bar = 20μm。

ている（論文投稿準備中）。今回、グリチルリチンおよび４種のフラボノイドとZO1-PDZ1の直接相互作用をNMRにより観察した。そのうち、細胞内でZO1-PDZ1を阻害することと矛盾しないTJ制御効果を示したのはバイカリン、バイカレインであった。

グリチルリチンによるMDCK II細胞の効果は、当初はTJ強化機能であると考えられたがその変化は小さく、実験の再現性がなかった。グリチルリチンの分子量ならびに極性官能基の数を考えると、いわゆるリピンスキー則から外れるため、細胞膜と透過して細胞内へ移行する効率は極めて低いと考えられる。そのため、細胞外部からの投与でTJが変化しなかったと考察した。他方、グリチルレチック酸はZO1-PDZ1には相互作用しなかったため、少なくとも３位のグルクロン酸はZO1-PDZ1結合に必須と考えられる。例えばグリチルレチン酸3-O-グルコニドは、グリチルリチンよりも糖が一残基分小さいので、何らかのTJ活性を示すかもしれないと予想している。

今回TJ緩和効果を示した２種のフラボノイド・バイカリン、バイカレインについて、その薬理作用について文献検索を行ったところ、すべてがTJないし臓器のバリア

機能を強化または保護する機能であり、TJ緩和効果を記した文献はなかった。文献[10]にはバイカリンのバリア保護機能の報告の一例をあげる。他方、ratに対する高濃度のBaicalin投与がTGFβ経路を介して、腎臓の線維化を促進するという副作用の報告があり（文献）、これはEMTを示唆するため、変性の途中でTJの減弱・分解を含んでいる可能性がある。ZO1-PDZ1との結合の弱さから考えて、バイカリン、バイカレインのTJ減弱効果はZO1-PDZ1阻害以外の何らかのシグナル伝達系を介していることは間違いなく、その候補としてTGFβ経路の活性化があげられる。

他方、今回TJ強化を示したNaringeninについては、TJバリア機能を強化するシグナル伝達系であるAMPKを活性化することを示唆する報告があり、MDCK II細胞のTJ強化においても同様の機構であると考えられる。その場合、フラボノイド分子の作用点がどこか、については、更なる研究が必要である。今後、柑橘系に含まれる他のフラボノイドとの比較や、AMPK経路の活性化の確認などを行いつつ、皮膚バリア機能強化のための有望な成分として研究を続ける予定である。筆者らが既に見だしているLNX1を阻害することによるTJ強化と、相乗効果が期待できるかどうかなど、精査したい。

最後に、本研究を遂行するにあたり、ご支援いただきました財団法人コスメトロジー研究振興財団に心より感謝いたします。

（引用文献）

1） Takahashi S, Iwamoto N, Sasaki H, Ohashi M, Oda Y, Tsukita S, Furuse M*: The E3 ubiquitin ligase LNX1p80 promotes the removal of claudins from tight junctions in MDCK cells., *J Cell Sci*, **122**, 985-994, 2009.

2） Umetsu Y, Goda N, Taniguchi R, Satomura K, Ikegami T, Furuse M, Hiroaki H*: ^{1}H, ^{13}C, and ^{15}N resonance assignment of the first PDZ domain of mouse ZO-1., *Biomol NMR Assign.* **5**, 207-210, 2011.

3） Hiroaki H*, Satomura K, Goda N, Nakakura Y, Hiranuma M, Tenno T, Hamada D, Ikegami T: Spatial Overlap of Claudin- and Phosphatidylinositol Phosphate-Binding Sites on the First PDZ Domain of Zonula Occludens 1 Studied by NMR., *Molecules.* **23**, E2465, 2018.

4） 特願2016-535943 「タイトジャンクション形成制御剤及び該制御剤を含む医薬組成物」、発明者：廣明秀一、天野剛志、中倉由香子、野田翔太、出願日：2015/7/22（再表）

5） 特願2017-520717 「タイトジャンクションの緩和剤、該緩和剤を含む薬剤吸収補助剤、及び該緩和剤を含む医薬組成物」、発明者：廣明秀一、天野剛志、野田翔太、出願日：2016/5/24（再表）

6） Tenno, T., Goda, N., Umetsu, Y., Furuse, M., Ota, M., Kinoshita, K., and Hiroaki, H*. Accidental interaction between PDZ domains and diclofenac revealed by NMR-guided virtual screening. *Molecules*. **18**, 9567-9581, 2013.

7） Tang W, Sun X, Fang JS, Zhang M, Sucher NJ: Flavonoids from Radix Scutellariae as potential stroke therapeutic agents by targeting the second postsynaptic density 95（PSD-95）/disc large/zonula occludens-1（PDZ）domain of PSD-95., *Phytomedicine*. **11**, 277-284, 2004.

8） Ikari A, Takiguchi A, Atomi K, Sugatani J*: Epidermal growth factor increases clathrin-dependent endocytosis and degradation of claudin-2 protein in MDCK II cells. *J Cell Physiol*., **226**, 2448-2456, 2011.

9） Noda S, Tanabe S, Suzuki T*: Naringenin enhances intestinal barrier function through the expression and cytoskeletal association of tight junction protein in Caco-2 cells. *Mol. Nutr. Food Res*. **57**, 2019-2028, 2013.

10） Chen J, Zhang R, Wang J, Yu P, Liu Q, Zeng D, Song H, Kuang Z: Protective effects of baicalin on LPS-induced injury in intestinal epithelial cells and intercellular tight junctions. *Can J Physiol Pharmacol*., **93**, 233-237, 2015.

11） Cai Y, Ma W, Xiao Y, Wu B, Li X, Liu F, Qiu J, Zhang G: High doses of baicalin induces kidney injury and fibrosis through regulating TGF-β/Smad signaling pathway. *Toxicol Appl Pharmacol*. **333**, 1-9, 2017.

12） Liu X, Wang N, Fan S, Zheng X, Yang Y, Zhu Y, Lu Y, Chen Q, Zhou H, Zheng J: The citrus flavonoid naringenin confers protection in a murine endotoxaemia model through AMPK-ATF3-dependent negative regulation of the TLR4 signalling pathway. *Sci Rep*., **6**, 39735, 2016.

刺激性試験のための元の性質を維持しながら無限分裂するヒト角膜上皮細胞の作成

岩手大学理工学部細胞工学・分子遺伝学研究室

福田　智一

The Draize test has been used on rabbits since the 1960s to evaluate the irritation caused by commercial chemicals in products such as cosmetics or hairdressings. However, since 2003, such tests, including the Draize test for cosmetics, have been prohibited in European countries because they are considered problematic to animal welfare. For this reason, replacement of *in vivo* methods with alternative *in vitro* methods has become an important goal. In this study, we established a corneal epithelial cell line co-expressing a mutant cyclin dependent kinase 4 (*CDK4*), Cyclin D1, and telomerase reverse transcriptase (*TERT*). The established cell line maintained its original morphology, and had an enhanced proliferation rate. Furthermore, the cells showed a significant, dose-dependent, decrease in viability in an irritation test using glycolic acid. These cells can now be shared with toxicology scientists, and should contribute to increasing the reproducibility of chemical testing *in vitro*.

1．緒　言

刺激性を含む化学物質の安全性を評価することは、化粧品および身の回りのシャンプーなどの生活用品を開発する上で重要な項目である。1960年代より、様々な刺激性を評価する方法が考案されてきた[1)]。これらの方法のうち、ウサギを用いたドレイズ法は事実上の標準手法であった。しかし2003年より欧州ではあらゆる化粧品の安全性試験においてドレイズ法を含む動物実験が禁止されている。これらの動物実験の禁止は動物愛護の観点から実施されたものである。したがって眼を用いた動物の刺激性試験を代替する評価法を考案することは科学的および動物愛護の観点から重要な課題である。

角膜上皮細胞は眼球組織の最も外側に存在する上皮細胞であり、外界からの物質の侵入を防御している。刺激性によって最初に暴露されるのが組織の特性上、角膜上皮細胞であり、このことから角膜上皮細胞で試験管内刺激性試験を実施することは必然性がある。この考えのもとに、ウサギの初代角膜上皮細胞を用いて短期暴露法（STE法）が開発された[2)]。この方法はウサギの角膜上皮細胞へ被験物質を短時間暴露し、細胞死の割合で刺激性を判定する。しかしこれらの細胞であったとしても、ウサギはウサギであり、人間とは本質的に異なる。このためにウサギの眼のデータはあくまでヒトの眼のモデルであり限界がある。このことから我々はヒト由来角膜上皮細胞によって試験管内の刺激性試験の材料として利用できないかと考えた。しかし初代培養細胞は数回の細胞継代の後に細胞分裂を培養ストレスのために停止してしまう。無限に細胞分裂できないことはヘイフリック限界と呼ばれている[3)]。

細胞老化による分裂停止の限界を乗り越えるために様々な方法が従来用いられてきた。具体的にはSV40ラージTやヒトパピローマウィルス由来のE6/E7遺伝子産物である。これらの癌遺伝子産物は腫瘍抑制遺伝子であるp53やRBを不活性化することが知られており、無限分裂させる方法として最も一般的である[4)]。しかしこれらのSV40ラージTやE6/E7遺伝子の発現は染色体の異常を誘発することが知られている[5,6)]。

2011年に新たな無限分裂の方法が報告された。塩見らによるとR24C変異を持つサイクリン依存性キナーゼ4（CDK4），サイクリンD1，テロメア逆転写酵素（TERT）の発現によってヒト筋肉由来細胞の無限分裂が可能になった[7)]。これらの細胞は分化能力および元の染色体パターンを維持していた。この方法は導入する遺伝子の末尾の文字から、K4DT法（変異型CDK4，サイクリンD，TERT）と名付けられた。さらに我々の研究チームは新規に作られたK4DT法がウシ、ブタ[8)]、スイギュウ[9)]、サル[10)]、アメリカ平原ハタネズミ[11)]を含む様々な動物種で適用可能であることを示した[12)]。この幅広い動物で使用可能である原理として、導入するCDK4およびサイクリンD1遺伝子のアミノ酸配列が進化の上で高い保存性を持つことが予想された[12)]。本研究ではヒト角膜上皮由来の無限分裂細胞が従来の動物を用いた刺激性試験の代換えになると予想される。本研究は毒性研究ならびに動物愛護の見地から見て重要な研究である。



Human-derived Corneal Epithelial Cells Expressing Cell Cycle Regulators as a New Resource for in vitro Ocular Toxicity Testing

Tomokazu Fukuda

Graduate School of Science and Engineering, Iwate University

2．方　法

2．1．細胞およびその培養法

ヒト角膜上皮細胞は米国Lifeline Cell Technology社からクラボウ株式会社を通じて購入した。培養にはLifeline Cell Technology社が提供する基礎培地および増殖因子を使用した。細胞の継代には1XPBSにて洗浄し、Stem Pro Accutaseによって細胞を剥離、分散を行った。剥離、分散した細胞は800G, 5分間遠心を行い、ペレット化した後に新しい培地によって再度分散を行った。

2．2．レンチウィルスの作製および感染

新規に無限分裂するヒト角膜由来上皮細胞を作製するために組み換えレンチウィルスの作製および濃縮を行った。組み換えレンチウィルスの基本骨格として理化学研究所バイオリソースセンターの三好博士より分与いただいたCSIIレンチウィルスベクターを用いた。感染効率をモニタリングするために、発現ベクターのオープンリーディングフレームの下流にIRES（Internal Ribosomal Entry Sites）およびVenus蛍光タンパク質を持つCSII-CMV-MCS-IRES-Venusベクターを使用した。CSII-CMV-MCS-IRES-Venusのマルチプルクローニングサイトへ変異型CDK4およびサイクリンDのタンパク質翻訳領域を2A自己消化ペプチドで連結したインサートを挿入した。また、CSII-CMV-R24CCDK4およびCSII-CMV-CyclinD、そしてCSII-CMV-TERTの3種の遺伝子をモノシストロニックに発現するレンチウィルスを混合した混合組み換えウィルス溶液を作製した。ウィルス作製は293T細胞へのリポフェクション法で行い、詳細に関しては我々の過去の研究報告に準拠した[13]。TERTを発現するレンチウィルスはその他のCDK4およびサイクリンD1を発現するレンチウィルスと比較して、4kbと長いインサートサイズを持つためにレンチウイルスのタイターが低くなる。このためにK4DT細胞へ追加でハイグロマイシン耐性遺伝子を持つTERT発現レトロウィルスを重感染させ、ハイグロマイシン耐性のK4DT細胞をK4DT+Tと表記した[14]。

2．3．ウェスタンブロッティング

野生型、K4DおよびK4DT+T細胞よりタンパク質を可溶化させるために、我々は50mM Tris-HCl（pH 7.4), 0.15M NaCl, 1% Triton X-100, 2.5mg/mLのデオキシコール酸を含む溶液を使用した。CDK4およびサイクリンD1のタンパク質レベルを検出するために、それぞれに対する特異的抗体を使用した。またコントロールとして抗tubulin抗体を用いて検出した。全ての検出において二次抗体としてanti-mouse IgGもしくはanti-rabbit IgGを使用した。詳細な検出条件は過去に我々の研究室から発表した論文の内容に準拠した[14]。検出は化学発光で行い、画像はLAS4000 miniで取得した。

2．4．Population doubling assay

初代およびK4D, K4DT+T細胞における細胞増殖活性を測定するために、連続的な細胞継代を行った。詳細には各継代開始時に5×10^4細胞を3つの35mm dishへ播種した。その後、どれかのウェルがコンフルエントになった時点で全てのウェルの細胞をaccutase処理し、剥離した。全てのウェルに存在した細胞数を計測した。測定した細胞数からPDL値を算出した。PDL=$\log_2$（A/B）の式に基づいた。Bは各パッセージの最初に播種した細胞数、Aは各パッセージの終わりに得られた細胞数である。それらのPDL値を累積として計算した。

2．5．PCR解析

初代ヒト角膜上皮細胞、K4DおよびK4DT+T細胞よりゲノムDNAを抽出した。導入した遺伝子内に設定したプライマー配列もしくは、ヒト由来結節性硬化症原因遺伝子（TSC2）のエクソン内に設定したプライマー配列をコントロールとして使用した。TSC2遺伝子はヒトゲノム上に2コピーしか存在せず、類縁した遺伝子が存在しないこと、偽遺伝子が存在しないことが知られていることから内部コントロールとして使用した。増幅には東洋紡のKOD-FXおよび特異的プライマーを用いて増幅を行った。PCR産物は分子量マーカーとともに1%アガロースゲルにて電気泳動し、エチジウムブロマイドによって検出した。

2．6．F-アクチンの染色

野生型、K4DおよびK4DT+T細胞をLab-Tekチャンバースライド中に細胞形態を確認するために播種した。4%パラフォルムアルデヒドで固定後、0.2% Triton×100溶液にてパーミアビライズ処理した後にFアクチンを染色するために1/40希釈したローダミン標識したファロイジン染色によって染色した。核染色を1/300希釈したDAPI溶液を用いて行った。観察はキーエンス社の蛍光顕微鏡BZ9000にて実施した。

2．7．細胞周期解析

細胞周期解析を行うため、おおよそ4×10^5細胞の野生型、K4DおよびK4DT細胞を70%エタノールにて固定した。野生型、K4DおよびK4DTについて6回分の細胞からデータを得た。固定した細胞はMillipore社のcell cycle assay kitを用いて染色を行った。検出はMillipore社のMuse Cell Analyzerを用いた。検出結果はノンパラメトリック法の多重比較であるSteel法を用いて有意差を検出した。

2．8．刺激性試験

高橋らによって開発された短時間暴露法（STE法）を用いて試験管内の暴露を行った[2]。我々はグリコール酸を陽性対象物質として用いた。初代培養細胞もしくはK4DT+T細胞に関して、0.5%もしくは5%のグリコール酸を5分間暴露した。PBSを陰性対象として用いた。PBSにて2回洗浄後、アキュターゼにて剥離した。剥離した細胞をトリパンブルーによって染色、生存細胞数、総細胞数を算出した。細胞生存率は総細胞数における生存細胞数によって算出した。

3．結　果

無限分裂するヒト由来角膜上皮細胞を作製するために、ポリシストロニックに変異型CDK4およびサイクリンD1を発現するレンチウィルス（CSII-CMV-CDK4R24C-Cyclin D-IRES-Venus）およびモノシストロニックに発現するレンチウィルスの混合溶液(CSII-CMV-CDK4R24C, CSII-CMV-CyclinD, CSII-CMV-TERT）を用いた。Figure 1Aに導入したレンチウィルスの遺伝子構造を示す。K4DTの混合レンチウィルスを感染させた後に、前述したようにTERTのウィルスのタイターが比較的低いために、ハイグロマイシン耐性遺伝子を持つTERTの発現レトロウィルスベクターの追加感染を行った。Figure 1BにPCR法によるゲノム状のTERTの挿入遺伝子の検出結果を示す。K4DT細胞においてのみ、TERT遺伝子の挿入が認められた。

Figure 2Aに遺伝子導入後の細胞の形態を示す。変異型CDK4およびサイクリンD1、TERTの導入は細胞形態の変化を認めなかった。さらに詳細な細胞骨格の変化の可能性を考慮し、細胞骨格の主要要素であるF-アクチン染色を行った。結果をFigure 2Bに示す。その結果、野生型角膜上皮細胞と比較して有意なFアクチンの分布変化は認められなかった。

Figure 3Aに連続的な細胞継代を行った結果を示す。野生型細胞は継代1回にて細胞増殖を停止した一方、K4DT+T細胞はPD20を超える細胞増殖を示した。さらにK4D細胞はおおよそ3回目の継代において細胞増殖を停止した。Figure 3Bに継代1回目の細胞形態の様子を示す。野生型はほとんど細胞増殖を停止しているが、K4DおよびK4DT+T細胞は継続的に細胞増殖していることがわかる。興味深いことに継代3回目においてK4D細胞の一部において上皮から間葉系の細胞への形態変化が認められた(Figure 3C and D)。

次に継代1回目の細胞において細胞周期に対するCDK4, サイクリンD1およびTERTの発現の影響を評価した。Figure 4A, B, Cに示すように細胞周期の解析結果を示した。G0/G1, G2/M, S期の細胞を異なる色で示した。K4DおよびK4DT細胞においてG2/M期の細胞割合の増加とG0/G1期の細胞の統計学的に有意な減少が野生型細

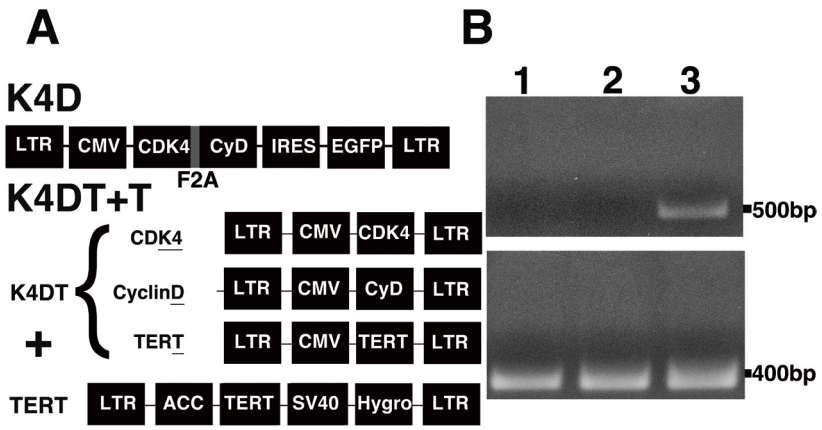


Figure 1　Schematic representation of the different expression vectors used in this study, and confirmation of genomic integration and protein expression.(A) Structure of the expression vectors used to establish the K4D and K4DT+T cell lines. LTR; long terminal repeat, CMV; cytomegalovirus promoter, Hygro; Hygromycin resistant gene. (B) Confirmation of the genomic integration of the TERT expression cassette by PCR: 1; primary cells, 2; K4D cells, 3; K4DT+T cells. The upper panel shows the specific 500 bp PCR product confirming the presence of the TERT expression cassette, whereas the lower panel shows the 400 bp PCR product derived from the human Tuberous Sclerosis Type II gene. (C) Detection of the introduced genes at the protein level by western blot analysis: 1; primary cells, 2; K4D cells, 3; K4DT+T cells. Western blots using anti-CDK4 (upper panel), anti-Cyclin D (middle panel), and anti-tubulin (lower panel) antibodies are shown.

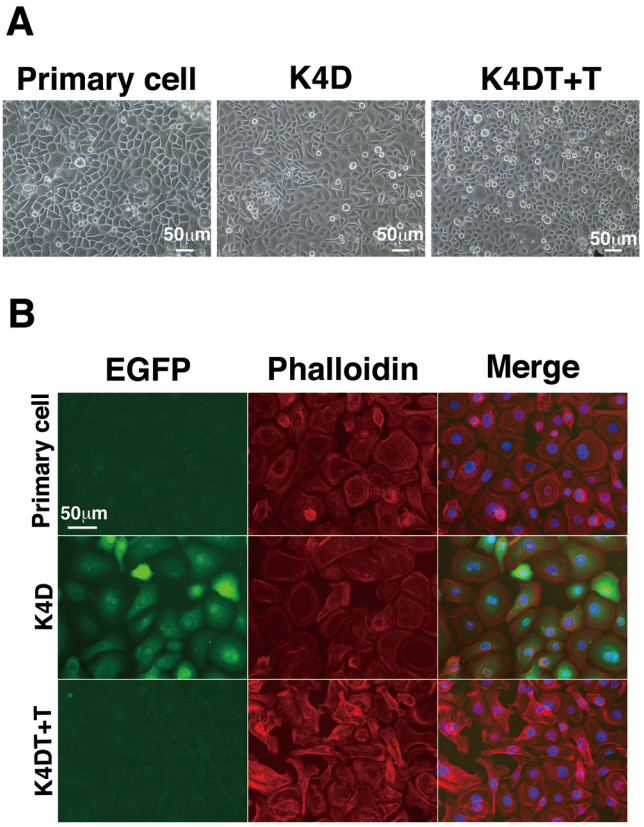


Figure 2　Cell morphology of primary, K4D, and K4DT+T cells. (A) Cell morphology using phase contrast microscopy at passage 0. (B) Morphological observation of the cytoskeleton (F-actin) and the nucleus, following staining with rhodamine-labelled phalloidin and DAPI, respectively. Left-hand panel, EGFP fluorescence, middle panel, phalloidin staining, right-hand panel, merged images of the phalloidin, DAPI, and EGFP stains.

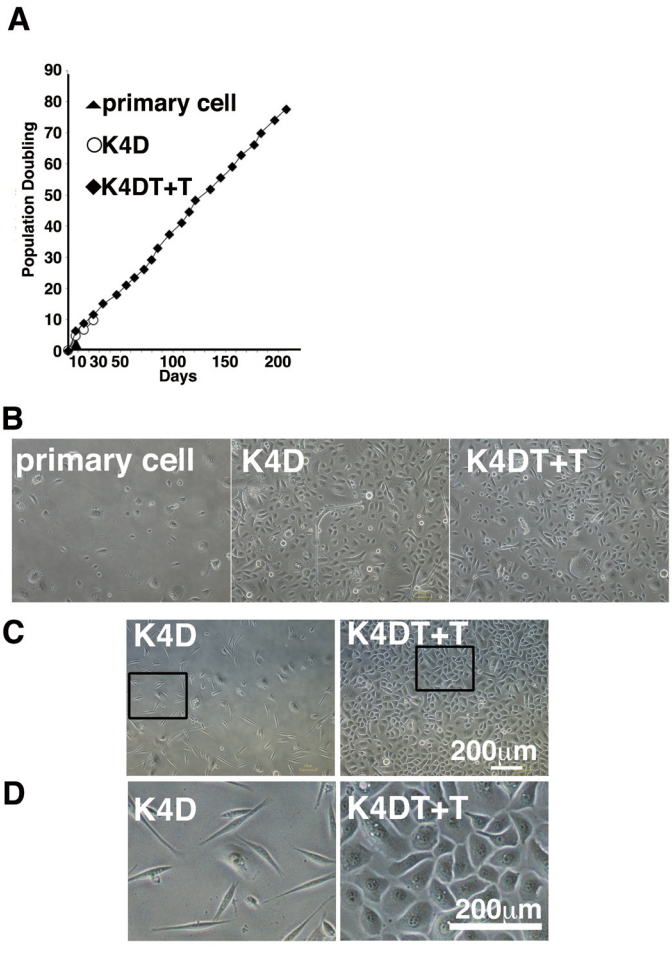


Figure 3　Cell growth status and morphological observation of primary, K4D, and K4DT+T cells. (A) Cell growth and sequential passaging of primary, K4D, and K4DT+T cell. Cell growth is represented by the cumulative population doubling value. (B) Morphological observation at passage 1 in the population doubling assay. (C) Cell morphology of K4D and K4DT+T cells at passage 3. Upper panels, lower magnification of K4D (left-hand panels) and K4DT+T cells (right-hand panels). Lower panels, higher magnification of K4D cells (left-hand panels) and K4DT+T cell (right-hand panels).

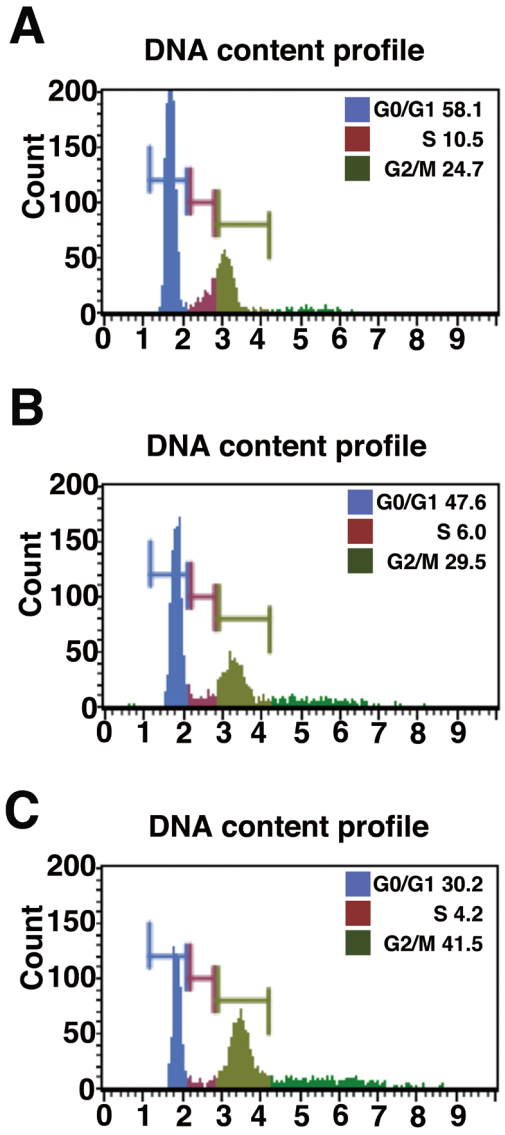


Figure 4　Cell cycle analysis of primary, K4D, and K4DT cells. (A) Cell cycle analysis of primary cells. (B) Cell cycle analysis of K4D cells. (C) Cell cycle analysis of K4DT+T cells.

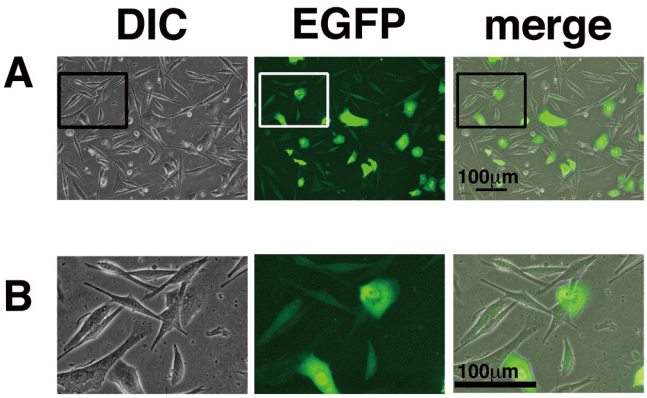


Figure 5　Cell morphology and EGFP expression of K4D cells at passage 3. (A) K4D cells at passage 3. Cell morphology by differential interference contrast microscopy (DIC, left-hand panel), EGFP fluorescence (EGFP, middle panel), and merged images(merge, right panel). (B) High magnification view of K4D cells at passage 3 by DIC (left-hand panel), EGFP fluorescence (EGFP, middle panel), and merged images (right-hand panel).

胞と比較して認められた。これらの結果からヒト角膜上皮細胞において変異型CDK4およびサイクリンD1の発現によって細胞増殖および細胞回転が加速されていると結論した。

我々はK4D細胞において継代3回目周辺より間葉系細胞への形態変化が認められた。我々はこの原因を探るためにまず、細胞形態および下流に位置する蛍光タンパク質の発現量を蛍光顕微鏡にて検出を行った。Figure 5AおよびBに示すように、上皮形態を維持する細胞においてはEGFPを強く発現していたが、間葉系の細胞形態を示す細胞は比較的蛍光強度が弱かった。EGFPと変異型CDK4およびサイクリンD1の発現カセットはIRES配列で繋がれているため、両者の発現量は高い相関を持つと考えられる。このことから蛍光強度が低下した間葉系細胞においては細胞内の変異型CDK4およびサイクリンD1遺伝子の発現量が上皮様形態の細胞と比較して低いと予想される。間葉系の形態を示す細胞の割合は継代数が増加するにつれ増加した。これらの状況からポリシストリロニックに変異型CDK4およびサイクリンD1を発現するヒト角膜上皮細胞は刺激性試験の代換えとして利用するためには安定性に欠けると判断した。

前述したように高橋らはウサギの角膜上皮細胞を利用して短時間暴露法(STE法)を開発した。これに従って0.5%および5%グリコール酸を用いて野生型およびK4DT+T細胞へ暴露を行い、STE法によって評価した。Figure 6Aに示したように野生型およびK4DT+T細胞は0.5%もしくは5%のグリコール酸によって有意に細胞数が低下した。また暴露後の細胞形態ではFigure 6Bに示したように細胞質内の空胞化や核の明瞭化を伴い、細胞の変性を示していた。これらの結果から我々の作製したヒト角膜由来のK4DT+T細胞は化学物質の刺激性を判断する上で有用な試験管内検出系になると考えられた。

4．考　察

本研究において我々は新規ヒト角膜由来の無限分裂上皮細胞の作製に成功した。作製には変異型CDK4、サイクリンD1およびTERTを用いた。野生型のヒト角膜上皮細胞は低密度で播種することで1回の細胞継代にも耐えられず、細胞分裂を停止した。しかしK4DT+T細胞は低密度においてもより強い細胞増殖活性を示した。これらのK4DT+T細胞の特性は細胞のハンドリングのしやすさを示しており、再現性の良い試験結果を得る上で有用な性質

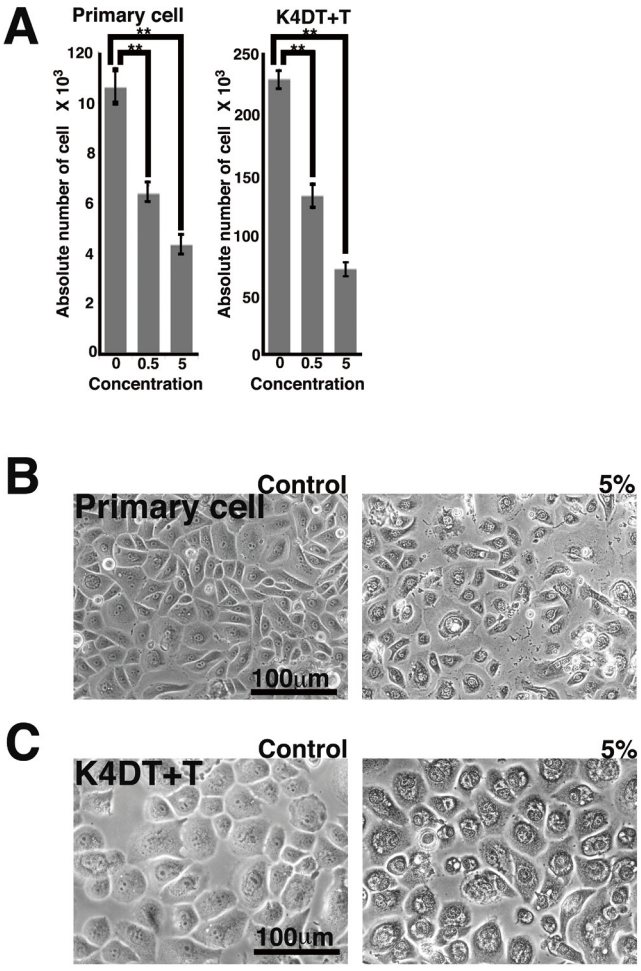


Figure 6　Assessment of glycolic acid (0.5% and 5%) as an irritant in primary and K4DT+T cells using the short time exposure (STE) method. (A) Number of primary and K4DT cells. The data are expressed as the mean, with the error bars representing the standard error. Two stars indicates a statistical significance more than 1%. (B) Cell morphology of PBS treated (control) primary cells (left-hand panel), and 5% glycolic acid treated primary cells (right-hand panel). (C) Cell morphology of PBS treated K4DT+T cells (left-hand panel) and 5% glycolic acid treated K4DT+T cells (right-hand panel).

と考えられる。また初代培養細胞の場合は、比較的短期間で細胞増殖活性を失うために繰り返しサンプリングと培養を繰り返さなければならない。このことは試験の再現性において影響する因子である。一方、我々の作製した無限分裂細胞は世界中の研究者と研究資産として共有化できるため、将来的に標準化のための材料として利用できる可能性がある。

細胞が培養ストレスに晒された場合、p16を含む老化蛋白質が蓄積することが知られている[15]。老化蛋白質p16はCDK4-サイクリンD1蛋白質複合体に結合し、キナーゼ活性を抑制する。その結果、細胞周期のG1/S期への突入が抑制される。R24C突然変異を持つCDK4はp16の結合部位である25番目のアミノ酸に突然変異を保つためにp16と結合しないために、p16による負の制御を受けることがない[12]。結果的に腫瘍抑制遺伝子蛋白RBの恒常的リン酸化をもたらし、転写因子E2Fの遊離、そして下流の遺伝子の活性化をもたらす。変異型CDK4およびサイクリンD1の発現は細胞周期の加速をもたらすが、染色体末端のテロメア配列の短縮からは逃れることはできない。この制限を乗り越えるためにテロメア逆転写酵素（TERT）の発現が必要である。我々が作製したK4DT+T細胞はテロメア発現カセットの導入を確認しているので、無限分裂に至っている可能性が高い。

興味深いことにポリシストロニックに変異型CDK4およびサイクリンD1を発現するレンチウィルスでは、ヒト角膜上皮細胞の上皮細胞の形態を維持できず、途中から間葉系の細胞形態を示す変化が認められた。これらの細胞形態の変化は原因として2つの可能性がある。1つめはテロメラーゼ活性がないためのテロメア長の短縮である。テロメア長の短縮のために細胞増殖が阻害された可能性がある。もうひとつの可能性はTERTが存在しないため、CMVプロモータの活性が低下したことである。詳細な分子メカニズムは明らかではないが、我々はTERTを同時発現した際に、CMVプロモータによって発現する変異型CDK4およびサイクリンD1の蛋白質レベルが明らかに上昇する例を経験した。本研究において認められた間葉系細胞の蛍光蛋白質の量は上皮様形態を示す細胞のものより明らかに低かった。細胞の上皮様形態を維持するためにはより高いレベルの変異型CDK4およびサイクリンD1蛋白質を必要とする可能性がある。

我々は新たなヒト角膜由来上皮細胞の作製の後に、刺激性試験を行った。結果を初代およびK4DT+T細胞の間で比較を行った。我々は陽性対象としてグリコール酸を選択した。グリコール酸への曝露は有意かつ容量依存的に生存細胞数の低下を引き起こした。我々の研究データは我々が樹立したK4DT+T細胞が化学物質の刺激性試験に使用できる可能性を示している。無限分裂細胞の使用は刺激性試験の再現性の向上に貢献すると考えられる。

4．考　察

我々は変異型CDK4、サイクリンD1およびテロメア逆転写酵素の導入により、化粧品を含む様々な化学物質や日用品の刺激性を評価する試験管内実験系を構築した。本研究は刺激性試験の再現性の向上へ貢献すると考えられる。

（引用文献）

1) Buehler, E. V, and Newman, E. A. (1964). A comparison of eye irritation in monkey and rabbits. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 6, 701-10. Available at:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14235837 [Accessed September 3, 2018].

2) Takahashi, Y., Koike, M., Honda, H., Ito, Y., Sakaguchi, H., Suzuki, H., et al. (2008). Development of the short time exposure (STE) test: An in vitro eye irritation test using SIRC cells. *Toxicol. Vitr.* 22, 760–770. doi:10.1016/j.tiv.2007.11.018.

3) Hayflick, L., and Moorahead, P. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25, 585–621. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13905658 [Accessed September 3, 2018].

4) Tsao, S. W., Wang, X., Liu, Y., Cheung, Y. C., Feng, H., Zheng, Z., et al. (2002). Establishment of two immortalized nasopharyngeal epithelial cell lines using SV40 large T and HPV16E6/E7 viral oncogenes. *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* 1590, 150–158. doi:10.1016/S0167-4889 (02) 00208-2.

5) Duensing, S., Lee, L. Y., Duensing, A., Basile, J., Piboonniyom, S. -o., Gonzalez, S., et al. (2000). The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 10002–10007. doi:10.1073/pnas.170093297.

6) Ray, F. A., Peabody, D. S., Cooper, J. L., Cram, L. S., and Kraemer, P. M. (1990). SV40 T antigen alone drives karyotype instability that precedes neoplastic transformation of human diploid fibroblasts. *J. Cell. Biochem.* 42, 13–31. doi:10.1002/jcb.240420103.

7) Shiomi, K., Kiyono, T., Okamura, K., Uezumi, M., Goto, Y., Yasumoto, S., et al. (2011). CDK4 and cyclin D1 allow human myogenic cells to recapture growth property without compromising differentiation potential. *Gene Ther.* 18, 857–66. doi:10.1038/gt.2011.44.

8) Donai, K., Kuroda, K., Guo, Y., So, K.–H., Sone, H., Kobayashi, M., et al. (2013). Establishment of a reporter system to monitor silencing status in induced pluripotent stem cell lines. *Anal. Biochem.* 443, 104–112. doi:10.1016/j.ab.2013.08.014.

9) Fukuda, T., Iino, Y., Eitsuka, T., Onuma, M., Katayama, M., Murata, K., et al. (2016). Cellular conservation of endangered midget buffalo (Lowland Anoa, Bubalus quarlesi) by establishment of primary cultured cell, and its immortalization with expression of cell cycle regulators. *Cytotechnology* 68, 1937–1947. doi:10.1007/s10616-016-0004-0.

10) Kuroda, K., Kiyono, T., Eitsuka, T., Isogai, H., Takahashi, K., Donai, K., et al. (2015). Establishment of Cell Lines Derived From the Genus *Macaca* Through Controlled Expression of Cell Cycle Regulators. *J. Cell. Biochem.* 116, 205–211. doi:10.1002/jcb.24963.

11) Katayama, M., Kiyono, T., Horie, K., Hirayama, T., Eitsuka, T., Kuroda, K., et al. (2016). Establishment of an immortalized cell line derived from the prairie vole via lentivirus–mediated transduction of mutant cyclin–dependent kinase 4, cyclin D, and telomerase reverse transcriptase. *Exp. Anim.* 65, 87–96. doi:10.1538/expanim.15-0061.

12) Fukuda, T., Eitsuka, T., Donai, K., Kurita, M., Saito, T., Okamoto, H., et al. (2018). Expression of human mutant cyclin dependent kinase 4, Cyclin D and telomerase extends the life span but does not immortalize fibroblasts derived from loggerhead sea turtle (Caretta caretta). *Sci. Rep.* 8, 9229. doi:10.1038/s41598-018-27271-x.

13) Fukuda, T., Kondo, Y., and Nakagama, H. (2008). The anti–proliferative effects of the CHFR depend on the forkhead associated domain, but not E3 ligase activity mediated by ring finger domain. *PLoS One* 3, e1776. doi:10.1371/journal.pone.0001776.

14) Gouko, R., Onuma, M., Eitsuka, T., Katayama, M., Takahashi, K., Nakagawa, K., et al. (2018). Efficient immortalization of cells derived from critically endangered Tsushima leopard cat (Prionailurus bengalensis euptilurus) with expression of mutant CDK4, Cyclin D1, and telomerase reverse transcriptase. *Cytotechnology* 70, 1619–1630. doi:10.1007/s10616-018-0254-0.

15) Meerson, A., Milyavsky, M., and Rotter, V. (2004). p53 mediates density–dependent growth arrest. *FEBS Lett.* 559, 152–158. doi:10.1016/S0014-5793 (04) 00027-4.

創傷治癒過程において、血管網の再構築が表皮幹細胞の分裂制御に果たす役割

神戸学院大学大学院薬学研究科

水谷　健一

Endothelial cells (ECs) form an extensive network of blood vessels that has numerous essential functions in the vertebrate body. In addition to their well-established role as a versatile transport network, blood vessels can induce organ formation or direct growth and differentiation processes by providing signals in a paracrine (angiocrine) fashion. ECs are emerging as important signaling centers that coordinate regeneration and help to prevent deregulated, disease-promoting processes. Vascular cells are also part of stem cell niches and have key roles in hematopoiesis, bone formation, and neurogenesis. Here we established the experimental system to observe vascular networks in skin tissue, and found that vascular regularity in the back skin was predominantly disrupted with aging. Furthermore, the wound healing was significantly delayed in VEGFR-1 heterozygous knockout mice, suggesting that healing process requires the proper restoration of vasculature in the skin tissue.

1．緒　言

血管系の発生過程では、脈管形成と呼ばれる、血管内皮前駆細胞が集合して原始血管叢を形成し、続いて血管新生の過程において、組織構築に伴い低酸素に応答して原始血管叢が無血管領域へと浸潤し、より複雑な毛細血管網を構築する。原始血管叢の発芽領域では、成長中の血管の先端に位置する血管内皮細胞が、無数の糸状仮足を無血管領域に向けて伸展する。この糸状仮足を伸ばす血管内皮細胞を、血管先端内皮細胞、その背後から増殖して血管伸長を支える血管内皮細胞を血管柄細胞と呼ぶ。血管先端内皮細胞は無血管領域に発現する血管内皮成長因子（VEGF）の濃度勾配に応じて糸状仮足を伸ばしながら遊走し、血管成長の方向性を決定する。一方、血管柄細胞は活発な増殖により後続する血管網の細胞数を規定し，両者は可塑性を保ちながら血管網を構築している。こうして形成される血管系を制御するシグナル伝達系に関しては、数多くの研究が行われてきた結果、VEGFに加え、アンジオポエチン、エフリン等の諸因子が重要な役割を果たすことが明らかとなっている。中でも、VEGFとそのチロシンキナーゼ受容体のシグナル伝達系は、生理的血管新生のみならず様々な病態における血管新生においても中心的な役割を果たすことが知られている。VEGF受容体の中でも、VEGF-AはVEGFR-1（Flt-1）とVEGFR-2（KDR/Flk-1）受容体型チロシンキナーゼを利用し、この２つの受容体には明確な違いがあり、VEGF-Aとの結合の強さはVEGFR-1の方がVEGFR-2よりも10倍以上強い一方で、チロシンキナーゼ活性については、VEGFR-1はVEGFR-2に比べて10分の１程度であることが明らかとなっている。つまり、主要なシグナル伝達を担うのはVEGFR-2であり、VEGFR-1は調節的な役割を果たすことが強く示唆されており、ノックアウトマウスの解析結果はこれと合致している。また、最近の研究ではVEGFR-2は血管先端内皮細胞や微小血管に優位に発現する一方で、VEGFR-1は中・大動脈内皮細胞に優位に発現する傾向があることが分かっている。

近年、血管の酸素養分の運搬路という基本的な機能に加えて、血管によって構築される微小環境（niche）の概念が提唱されており、組織形成の理解において、幹細胞を支持する生物学適所としての血管の役割に注目が集まっている。皮膚には、表皮、毛包をそれぞれ生み出す幹細胞が存在し、肌の恒常性の維持、毛の生え変わり、皮膚損傷の治癒などの役割を担っている。そこで本研究では、皮膚の恒常性の維持、創傷治癒における細胞外環境としての毛細血管の役割を明確化することを目的とした。



Interaction between the capillary-milieu and the epidermal stem cells regulates wound healing

Ken-ichi Mizutani

Laboratory of Stem Cell Biology, Graduate School of Pharmacentical Sciences, Kobe Gakuin University

2．方　法

2．1．皮膚組織における毛細血管のイメージング技術の確立

組織内の毛細血管を明瞭に観察するためには、薄切切片では断片的な情報しか得られないため、できる限り組織を厚みのある状態で観察すると共に、蛍光免疫染色ではなく高感度で毛細血管を観察する必要がある。このため、VEGFR-1プロモーターの制御によりtDsRedを発現するトランスジェニックマウス[1]、およびVEGFR-2プロモーターの制御によりGFPを発現するトランスジェニックマウス[2]を用いて背中皮膚組織を採取し、観察した。組織はPBS中で解剖後、4%パラホルムアルデヒ

ド／PBSで浸透固定した。固定した組織は、PBSで2回洗浄後、4℃で一晩、30%スクロース／PBS置換を行った。その後、OTCコンパウンドで包埋し、クライオスタットを用いて100μmの厚さの凍結切片を作製した。凍結切片はPBS-0.1%Triton-X（PBST）で3回洗浄後、10% donkey serum/PBSTで室温にて1時間ブロッキングを行い、10% donkey serum/PBSTで希釈した1次抗体で、4℃で一晩反応させた。PBSTで3回洗浄した後、10% donkey serum/PBSTで希釈した2次抗体で、室温で1時間反応させ、PBSTで3回洗浄後にマウントして観察標本を作成した[3]。これらの組織切片の観察は、蛍光顕微鏡IX81（Olympus）およびコンフォーカル顕微鏡FV1000（Olympus）にて行った。

2．2．VEGFR-1ヘテロノックアウトマウスにおける創傷治癒の解析

生後40日のVEGFR-1ヘテロノックアウトマウス[4]およびワイルドタイプマウスを麻酔し、背部に直径6mmの円形皮膚全層欠損創を皮膚生検トレパン（KAI STERILE DISPOSABLE BIOPSY PUNCHES口径6mm、カイインダストリー㈱）を用いて作製し、治癒するまでの創傷部を経時的に観察することで完治するまでの日数を評価した。

3．結　果

皮膚は老化に伴って表皮や真皮の菲薄化、細胞外マトリックスの減少等の組織学的な加齢変化が顕著であることが指摘されているが、皮膚を構成する毛細血管の加齢変化については不明な点が多い。そこで本研究では皮膚組織における毛細血管の規則性と老化に伴う組織学的な変化を見出すことを目的として、皮膚組織内の毛細血管が明瞭に観察できる実験系の構築を先ず行った。具体的には、VEGFR-1-EGFPおよびVEGFR-2-DsRed BACtgマウスを用いて、若齢期から老齢期における皮膚組織を比較し、蛍光蛋白を発現する血管内皮細胞を指標に、加齢に伴ってどのように組織内の密度および分布が変化するかを詳細に解析した。その結果、若齢期では組織内の血管密度が高く、VEGFR-1あるいはVEGFR-2を発現する毛細血管が規則的に毛包に沿って分布することが観察された（Fig. 1）。この際、VEGFR-1を発現する毛細血管、VEGFR-2を発現する毛細血管、両者を発現する毛細血管が各々存在し、皮膚組織内を構成する毛細血管が極めてヘテロな集団であることが示唆された。一方、老齢になると組織内の毛細血管の分布が大きく損なわれ、VEGFR-1を発現する毛細血管においても、VEGFR-2を発現する毛細血管においても何れも組織内の密度が顕著に減少し（Fig. 1）老齢期では無血管な領域も観察された。こうした老齢期における毛細血管の分布異常は、組織内に本来適切に供給されるべき酸素、栄養分が枯渇するばかりでなく、微小環境の破綻によって組織幹細胞が担う様々な生理現象への影響が懸念される。

そこで次に、組織内の血管密度が破綻したVEGFR-1ヘテロ欠損マウスを用いて、創傷後の治癒過程を評価することで、毛細血管の規則的な分布が新生皮膚組織の再構築に果たす役割を解析した（Fig. 2）。その結果、VEGFR-1ヘテロ欠損マウスでは、ワイルドタイプと比較して、創傷治癒が優位に遅延することが確認された（Fig. 2）。現時点では、皮膚の恒常性の破綻と周囲の組織幹細胞の関連性については評価できていないが、VEGFR-1ヘテロ欠損の治癒過程では新生血管の遊走や浸潤、周囲の組織幹細胞との物理的な接触がいかに変化し、結果的に組織の再構築にどのような影響を及ぼすかについて、現在、解析を進めている。本研究課題の成果がさらに発展することで、創傷治癒における血管新生と組織幹細胞の分化制御の関連性が明確化され、これが様々な組織修復の基盤技術に応用されることが

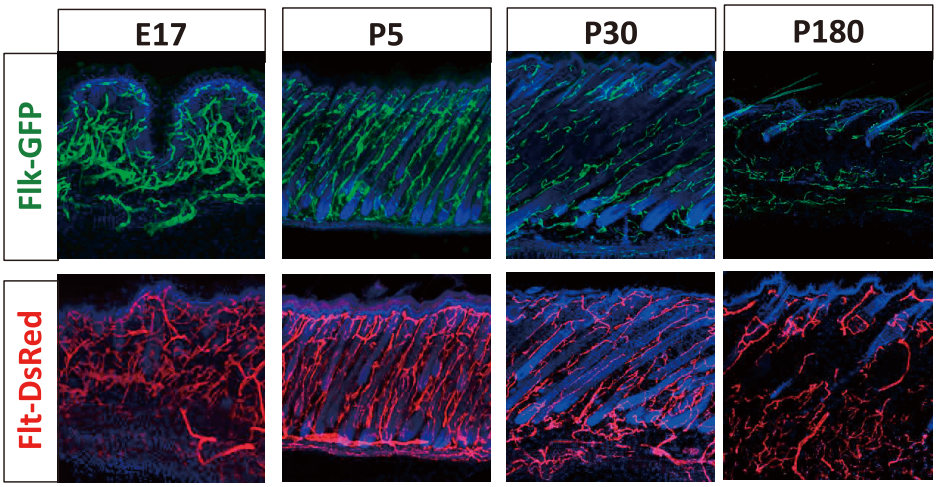


Fig. 1　血管リポーターマウスを用いた皮膚組織における毛細血管の加齢変化

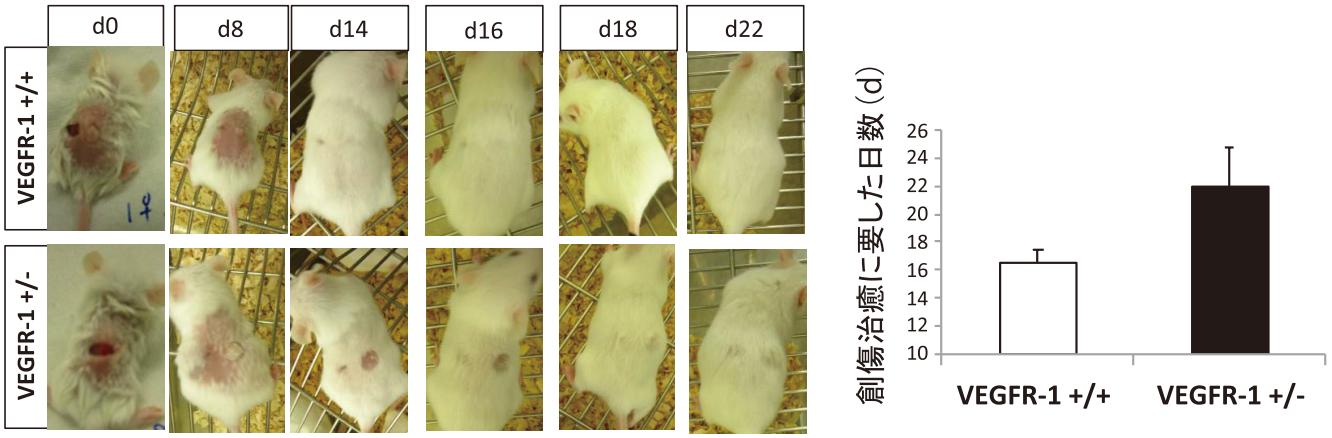


Fig. 2　VEGFR–1 ヘテロ欠損マウスにおける創傷治癒の解析

期待される。

4．考　察

血管は組織細部にわたり栄養分や酸素を運搬する極めて重要な器官の一つであり、一定の組織空間に規則的に分布する。血管が空間に如何に伸展し、その進展を止めるのかという、血管発生を調節する分子機構は未だ未解明の問題が数多く残されており、最近の研究では、組織・臓器ごとに血管発生・新生を制御する分子機構が大きく異なり、こうした血管内皮細胞の不均一性が、組織・臓器ごとの加齢変化の違いと密接に関連している可能性が指摘されている。こうした背景から、本研究では細胞外環境としての毛細血管の役割に着目し、VEGFR–1 プロモーターの制御により tDsRed を発現するトランスジェニックマウスと、VEGFR–2 プロモーターの制御により GFP を発現するトランスジェニックマウスを用いて、組織学的に詳細に解析を行った。その結果、表皮や真皮の組織内で毛細血管が規則的に分布することが本研究によって確認された。これまでの先行研究では、組織を構築する幹細胞は周囲の血管と密接な相互依存性があり、幹細胞が物理的に接することや血管由来のシグナル分子に依存して、幹細胞の分裂・分化が大きく変化することが知られている。たとえば、骨組織においては、成体の早い時期から特徴的な毛細血管が減少することで微小環境が破綻し、これが骨量の減少と密接に関連することが報告されている。一方、損傷皮膚組織の治癒過程では、炎症期、増殖期、成熟期を経て損傷を受けた組織を元どおりに修復する分子機構があり、この際、新たに形成された肉芽組織に酸素と栄養を供給するために血管新生が観察されるが、血管新生の乏しい肉芽組織は創傷治癒が遅延、障害され、難治性になることが古くから指摘されてきた。このため、低酸素環境で血管内皮細胞の動員が盛んであることに着目して[5]、低酸素による血管新生促進効果を期待した酸素不透過の被覆材が臨床の現場で広く用いられている[6]。今後、創傷治癒における血管新生と組織幹細胞の関連性がさらに明確化され、これが様々な組織修復に応用されることが期待される。

(引用文献)

1) Matsumoto, K., Azami, T., Otsu, A., Takase, H., Ishitobi, H., Tanaka, J., Miwa, Y., Takahashi, S. & Ema, M. Study of normal and pathological blood vessel morphogenesis in Flt1–tdsRed BAC Tg mice. *Genesis* **50**, 561–71 (2012).

2) Ishitobi, H., Matsumoto, K., Azami, T., Itoh, F., Itoh, S., Takahashi, S. & Ema, M. Flk1–GFP BAC Tg mice: an animal model for the study of blood vessel development. *Exp. Anim.* **59**, 615–22 (2010).

3) Inoue, M., Iwai, R., Tabata, H., Konno, D., Komabayashi–Suzuki, M., Watanabe, C., Iwanari, H., Mochizuki, Y., Hamakubo, T., Matsuzaki, F., Nagata, K. & Mizutani, K. Prdm16 is crucial for progression of the multipolar phase during neural differentiation of the developing neocortex. *Development*, **144**, 385–399 (2017).

4) Fong, G.H., Rossant, J., Gertsenstein, M. & Breitman, M.L. Role of the Flt–1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* **376**, 66–70 (1995).

5) Semenza, G.L., Vascular responses to hypoxia and ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 648–652 (2010).

6) Knighton, D.R., Silver, I.A., Hunt, T.K. Regulation of wound–healing angiogenesis–effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. *Surgery* **90**, 262–70 (1981).

メラノソーム膜に局在するOCA4型アルビノ原因遺伝子MATPを標的としたメラニン合成阻害剤の開発

名古屋市立大学大学院薬学研究科
保嶋　智也

Melanin is produced from tyrosine by tyrosinase localized in melanosomes in melanocytes present at the cutaneous epithelium. There are also many reports indicating that various amino acid-related compounds other than tyrosine are involved in controlling melanin synthesis. Based on these, it may be likely that transport of amino acid-related compounds for the supply or elimination at the melanosomal membrane by a transporter is involved in melanin synthesis as the rate-determining step. Solute Carrier (SLC) 45A2, which has been identified as a causative gene for Oculocutaneous Albinism Type 4 (OCA4), is for a transporter that operates for translocation of small molecules across biological membranes. It is also notable that the OCA4 patients are present at a quite high frequency among the Japanese. Thus, the designated genetic polymorphism of SLC45A2 has already been indicated to be linked to a major type of OCA, but the mechanism behind that remains to be elucidated. We, therefore, attempted to investigate into that possibility and successfully identified putrescine, an amino acid-related compound as a substrate of SLC45A2. Putrescine has been reported to suppresses melanin synthesis by inhibiting tyrosinase. Based on these, it would be possible to hypothesize that melanin synthesis is impaired in OCA4 patients because of its extensive accumulation into melanosomes due to the dysfunction of SLC45A2. Therefore, elucidation of the function of SLC45A2 and its role in the synthesis of melanin in relation to OCA4 should be of great help in the development of melanin synthesis inhibitor.

1．緒　言

現代の日本においては、多くの女性が肌を白く保とうとする傾向があり、美白を目的とした化粧品・医薬部外品等が多く販売されている。しかしながら、それら化粧品・医薬部外品等に配合される有効成分は、メラニン合成酵素であるチロシナーゼの阻害を標的としているものがほとんどであり、それ以外の分子標的については、ほとんど明らかとなっていないのが現状である。肌の黒色化は、主にメラニン合成の亢進によるが、そのメラニンはチロシンを原料として皮膚上皮細胞のメラノソーム内に局在するチロシナーゼにより産生される。メラニンはその物理化学的性質として水や有機溶媒に不溶で安定な化合物であるため、一度生成されると除去されにくい特徴を有するが、その中でも特に安定性の高い亜メラニンの生成にはシステインが関与していることが知られている。また、細胞増殖に不可欠な化合物と知られているポリアミンが、メラニン合成を制御しているとの報告がある。このように、メラニン合成の律速段階としてメラノソーム内へのチロシンやシステイン、ポリアミン等のアミノ酸関連物質の供給過程が関与している可能性が極めて高いと考えられる。アミノ酸関連物質は高水溶性（低脂溶性）である等の物理化学的な性質から、メラノソーム膜をはじめとする生体膜（脂質膜）を透過する過程においては、その分配を要する単純拡散機構の寄与は小さく、トランスポーター（膜内在性輸送タンパク質）による担体介在的な機構が関与していると考えられている。

そこで、メラノソーム膜に局在しアミノ酸関連化合物を輸送するトランスポーター群の候補遺伝子を探索し、Membrane-Associated Transporter Protein（MATP）に着目した。MATPはOCA4型アルビノの原因遺伝子として発見され[1]、特に日本人のアルビノ罹患者に最も多くみられる型の一つであることが報告されている[2]。近年、MATPがメラノソーム内pHの調整を行い、それによってチロシナーゼの活性を制御しているとの報告がされた[3]。このことから、Binらのグループは MATP が H^+ を輸送基質にしていると考察しているが、明確なデータを示せておらず H^+ が輸送基質であるか現在のところ断定されていない。MATPはsolute carrier 45（SLC45）familyに属しており、proton-associated sugar transporterであるSLC45A1と高い相同性を有している[4]。このことから、MATPは糖類を輸送基質とすることが予想されたが、これまでの申請者の検討からそれらを輸送基質としないことが分かっている。また、MATPは有機物（糖類）を輸送するSLC45A1と高い相同性を有することから、無機物である H^+ を本来の輸送基質にすることは考え難い。以上のような研究現状より、本研究では、MATPの機能解明を行い、メラニン合成阻害の有望な標的分子になりうるかを検証した。



Development of melanin synthesis inhibitor targeting MATP localized in melanosomal membrane

Tomoya Yasujima

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University

2．方　法

2．1．ヒトMATP（hMATP）のクローニング

hMATP（accession no, NP_057264.3）のcDNAは、ヒト皮膚のtotal RNA試料よりRT-PCRによってクローニングをした。1μgのtotal RNAを用い、オリゴdTプライマーと逆転写酵素ReverTra Ace（TOYOBO, Japan）によってcDNA試料を得た。hMATPのcDNAはGenBankに登録されている配列よりopen reading flame領域が増幅されるよう設計したプライマーを用い、KOD plus polymerase（TOYOBO, Japan）を使用してPCRを行った。得られたhMATPのcDNA配列は自動シークエンサー ABI PRISM 3100（Applied Biosysytems, U.S.A.）にて確認した。発現ベクターであるpCI-neo vector（Promega, U.S.A）にhMATPのcDNAを組み込んで、hMATPプラスミドを作成した。また、その際にN末端にFLAG sequence（DYKDDDDK）が付与されるように組み込んだ。

2．2．hMATPの各種変異体の作製

各種変異体を作製するにあたり、pCI-neo vectorに組み込んだFLAG-hMATPを鋳型とし、所定の変異が導入されるよう設計したプライマーを用い（Table 1）、PrimeSTAR Max DNA Polymeraseを使用しPCRを行った。得られたPCR産物を37℃で1時間のDpnI（TOYOBO, Japan）処理後、T4 Polynucleotide Kinase（TOYOBO, Japan）、2 × ligation mix（NIPPON GENE, Japan）を用いてライゲーションし、ヒートショック（42℃、1min）によって大腸菌(DH5α)に導入した。その大腸菌を、ampicillinを添加したLBプレートに播き、37℃で一晩培養した後、プレート上のコロニーを採取した。そこからプラスミドDNAを抽出し、制限酵素処理後、電気泳動を行うことによりインサート部分を確認した。予想された長さのインサート部分が確認されたコロニーから得られたプラスミドの配列は、自動シークエンサーABI PRISM 3100（Applied Biosysytems, U. S. A.）により確認し、目的とする部分の塩基配列に変異があることを確認した。

2．3．hMATPとその各種変異体の一過性発現系細胞

実験には、イヌ腎由来MDCK Ⅱ細胞を用いた。MDCKII細胞は継代に際し、ビュルケルチュルク盤を用いて細胞数を計測した後、3×10^5cells/mlとなるように調製し、24wellプレートに500μl/wellずつ播種した。その約1時間後、導入試薬として3μg/wellのpolyethyleneimine（Polyscience, U. S. A.）を用いて、各プラスミド（hMATPとその各種変異体）を導入した。その後、36-48時間の培養によって、一過性にそれぞれのタンパクを発現させ、コンフルエントに達した状態のものを実験に用いた。また、対照としてpCI-neo vectorのみを導入したmock細胞を作成した。細胞培養培地として、10% fetal bovine serum、1% penicillin/streptomycinを含むDulbecco's modified

Table 1　各種hMATP変異体作製のためのプライマー配列

Mutant	Orientation	Sequence (5' to 3')
N-deletion	Forward	GGTAAGCTTACAGCATGGCCATGGCCATGTTCG
	Reverse	-
Y268S	Forward	TGTACGAGTCTGGTTCTATCGAGAAAGTT
	Reverse	ATAGAACCAGACTCGTACATTCCATCTGA
Y317S	Forward	CTCCTCACTCCCGCTACCTTTGCATCA
	Reverse	AGGTAGCGGGAGTGAGGAGGCATGTTC
Y319S	Forward	ACTACCGCTCCCTTTGCATCAGCCACCTC
	Reverse	ATGCAAAGGGAGCGGTAGTGAGGAGGC
KVK273AVA	Forward	ATCGAGGCAGTTGCAAATGGTTACGTAAATCCAATCG AGGCAGTTGCAAATGGTTACGTAAATCCA
	Reverse	ACCATTTGCAACTGCCTCGATAGAACCATACTCGAGTA TGGTTCTATCGAGGCAGTTGCAAATGGT
KNK289ANA	Forward	GGAGCAGCAAACGCAAATCATGCTGAACAGACTGGA GCAGCAAACGCAAATCATGCTGAACAGACT
	Reverse	ATGATTTGCGTTTGCTGCTCCCTGCATTGCCAGCTGGC AATGCAGGGAGCAGCAAACGCAAATCAT

Eagle's medium を使用し、37℃、95% air－5% CO_2 インキュベーター内で培養した。

2．4．取り込み実験

取り込み実験用緩衝液として、10mM HEPES を加えた Hanks' solution（136.7mM NaCl, 5.36mM KCl, 0.952mM $CaCl_2$, 0.812mM $MgSO_4$, 0.441mM KH_2PO_4, 0.385mM Na_2HPO_4, 25mM D-glucose）または、10mM HEPES を加えた Mannitol buffer（5.37 mM K-gluconate, 273.4mM Mannitol, 0.441mM KH_2PO_4, 0.812mM $MgSO_4$, 0.952mM Ca-gluconate, 0.385mM K_2HPO_4, 25mM D-glucose）を用い、2M の NaOH を用いて pH7.4 に調整した。この緩衝液中に［^{3}H］tyrosine（5nM）または［^{3}H］putrescine（2nM）を加え、取り込み試験液とした。

取り込み実験に際して、まず、well 中の培地を吸い取り、37℃の Hanks' solution（1ml）を加えて 5 分間プレインキュベーションした。その後、取り込み試験液（250μl）を加え、取り込みを開始させた。所定の時間経過後、氷冷した Hanks' solution（stop solution, 1ml）を加えることにより反応を停止させ、stop solution（2ml）で細胞を 2 回洗浄した。続いて、0.5% SDS を含む 0.2M NaOH を 500μl 加え、細胞を可溶化させ、カウンティングバイアルに回収した。そこに液体シンチレーションカクテル 2 ml を加え、液体シンチレーションカウンター（LSC-5100, Aloka Co., Tokyo, Japan）により放射能活性を測定することで取り込む量を評価した。

2．5．データ解析

2．5．1．取り込みデータ解析

細胞への薬物の取り込み量は以下の式を用いて算出した。

$$Uptake = \frac{A_s\, C_m}{A_{ct}\, A_v}$$

ここで、*Uptake* は取り込み量（pmol/mg protein）、A_s はサンプルの放射能（dpm/well）、A_{ct} は取り込み試験液の放射能（dpm/μl）、A_v は細胞のタンパク量（mg protein/well）、C_m は取り込み試験液の基質濃度（μM）である。

取り込み量（Uptake）を取り込み時間（t, min）で割ることにより、取り込み速度（V, pmol/min/well）を求めた。

$$V = \frac{Uptake}{t}$$

2．5．2．統計処理

MDCKII 細胞における 1 回の実験のデータは、同時に調製した細胞の 2 サンプル（well）における実験値として得た。実験回ごとに細胞を調製して、複数回の実験を行い、合計のサンプル数を例数（n）とした。

データは、原則として平均値±標準誤差として示した。2 群間の比較には、Student's t-test を用いた。多重比較を要する場合には、ANOVA の後に Dunnet's test を用いた。

3．結　果

3．1．MATP のメラノソーム膜局在シグナル配列の探索

現在までに MATP の輸送基質は同定されておらず、MATP の機能変動に起因する OCA4 型アルビニズム発症の機構については不明なままである。前述したように、MATP の輸送基質としてアミノ酸関連物質が予想されるため、それら化合物が MATP の輸送基質となるか検証を行う必要があるが、MATP はメラノソーム膜に局在するため、細胞外に暴露された検討対象化合物を輸送することができない。細胞内小器官に局在するトランスポーターの生体膜透過の検討には、ジギトニンをはじめとした界面活性剤で細胞表面を処理することにより細胞膜透過性を上昇させ、検討対象化合物を細胞質内へ移行させ評価する方法が一般に用いられている。しかし、界面活性剤処理の条件設定が難しく、再現性や安定性に問題がある。そこで、メラノソーム膜に局在させる移行シグナルに着目した。膜貫通タンパクの細胞内ドメインに D/ExxxLL や Yxxφ、KxK（x：任意のアミノ酸、φ：疎水性アミノ酸）の配列を有するとメラノソーム膜やライソソーム膜に局在することが知られている[5,6]。そこで、MATP のアミノ酸配列を解析すると、細胞内に複数の YxxL、KxK 配列を有していることが確認された。また、その配列は種間の保存性が高く MATP のメラノソーム膜への局在制御に関わっている可能性が強く示唆された（Fig. 1）。よって、この配列を Sxxφ、AxA に変換することでシグナルを除去し、メラノソーム膜に発現する MATP を強制的に細胞膜へ移行させることで輸送基質の検討を行うこととした。

3．2．hMATP とその各種変異体による tyrosine 輸送能の解析

メラニンは、メラノソーム内のチロシナーゼの働きにより、アミノ酸の一種である tyrosine を原料に合成される。そのため、メラノソーム内へのメラニン供給経路は、生体におけるメラニン合成において、律速段階になっていると考えられる。アミノ酸は一般的に高水溶性（低脂溶性）であるため、その物理化学的な性質から、脂質膜で構成される生体膜を透過する過程においては、細胞膜（脂質膜）への分配を要する単純拡散機構の寄与は小さい。そのため、トランスポーター（膜内在性輸送タンパク質）による担体介在的な機構の関与が古くから示唆されており、現在までに多くのアミノ酸トランスポーターの分子実体が明らかになってきた[7]。メラノソーム膜においても例外ではなく、アミノ酸などの高水溶性化合物の膜透過過程には、トランスポーターが重要な役割を担っていると考えられる。メ

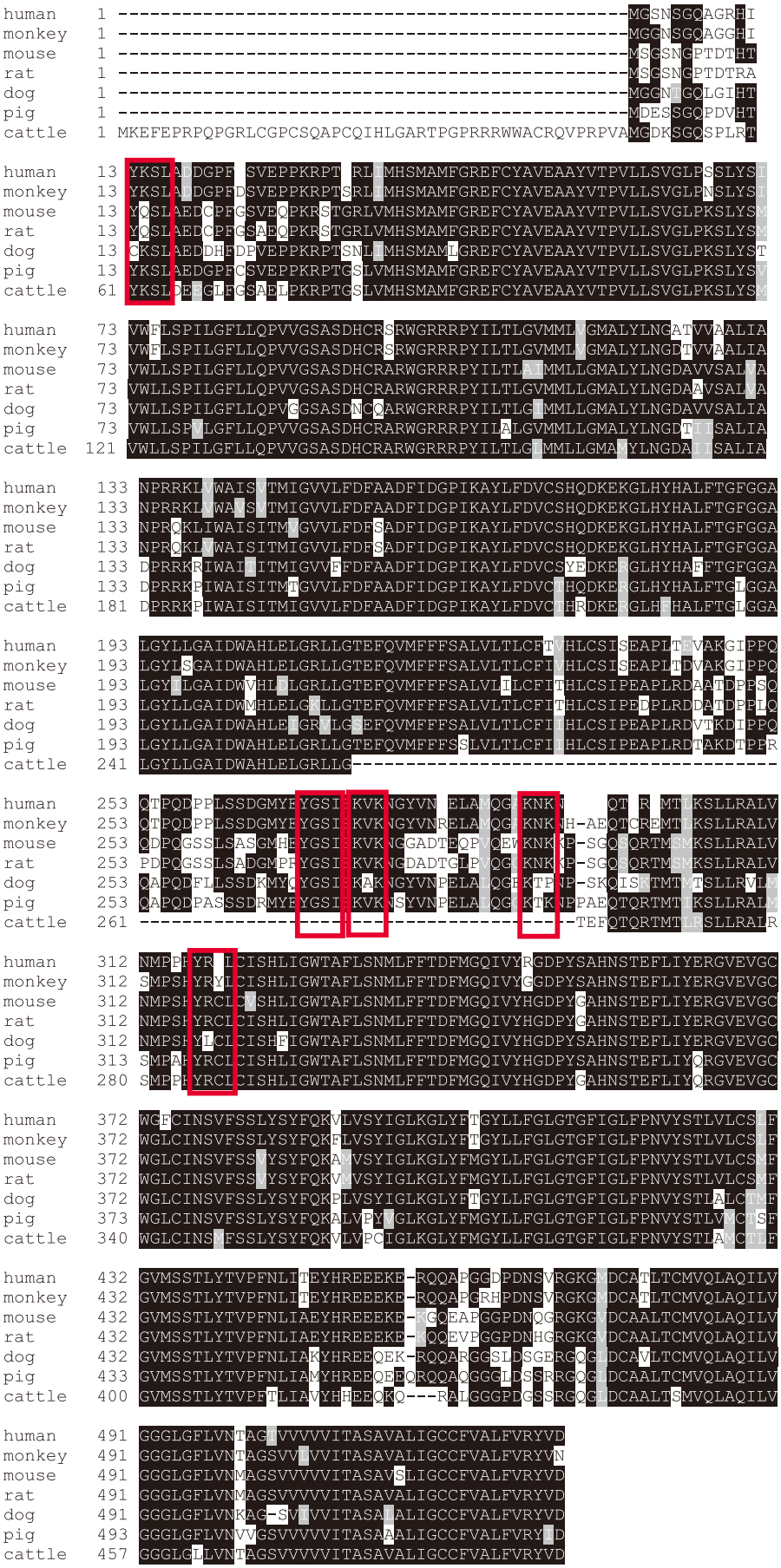


Fig. 1　MATP の種間の相同性とメラノソーム膜局在シグナル配列

ラノソーム膜におけるチロシン輸送には、トランスポーターの関与を示唆する報告はあるが[8]、その分子実体の同定には至っていない。そこで、MATPがこの過程を担う分子実体であるとの仮説をたて、MATPとその各種変異体によるtyrosine輸送能の解析を行った（Fig. 2）。その結果、Y317S変異体においてわずかながらtyrosine輸送量の増加傾向がみられた。このことから、Y317S変異体はMATPのメラノソーム膜局在シグナルが除去され細胞膜に局在し、tyrosine活性を有していることが示唆された。ただ、その活性は非常に弱いことから、他に良好な輸送基質が存在していることが考えられたため、Y317S変異体を用いて、他の輸送基質の探索を進めた。

3．3．hMATPとその各種変異体によるputrescine輸送能の解析

細胞の増殖等、生理機能の維持に重要であるポリアミンは、チロシナーゼ活性を抑制しメラニン合成を減少させるとの報告がある[9, 10]。MATPの遺伝子多型による機能不全によりメラノソーム内からのポリアミン排出が停止し、メラニン合成能不全が惹起されている可能性が考えられる。

ポリアミンはポリカチオン構造を有することから高水溶性であるため、その生体膜透過にはトランスポーターが必要であると考えられている。そこで、MATPのY317S変異体を用いて、ポリアミンの一種であるputrescine輸送能の解析を行った（Fig. 3）。その結果、ナトリウムイオン、塩化物イオンを除去した条件では（mannitol buffer）、mock細胞と比較してY317S変異体におけるputrescine輸送量は有意に上昇した（約3倍）。このことから、MATPはメラノソームからポリアミンを排出し、チロシナーゼの活性の維持に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

4．考　察

本研究において、hMATPのアミノ酸配列の中の$Y^{317}XXL^{320}$がメラノソーム膜局在に重要である可能性が示唆された。また、Y317Sの変異体は細胞膜に局在し、細胞膜輸送に基づいた簡便で再現性の高い機能評価系の

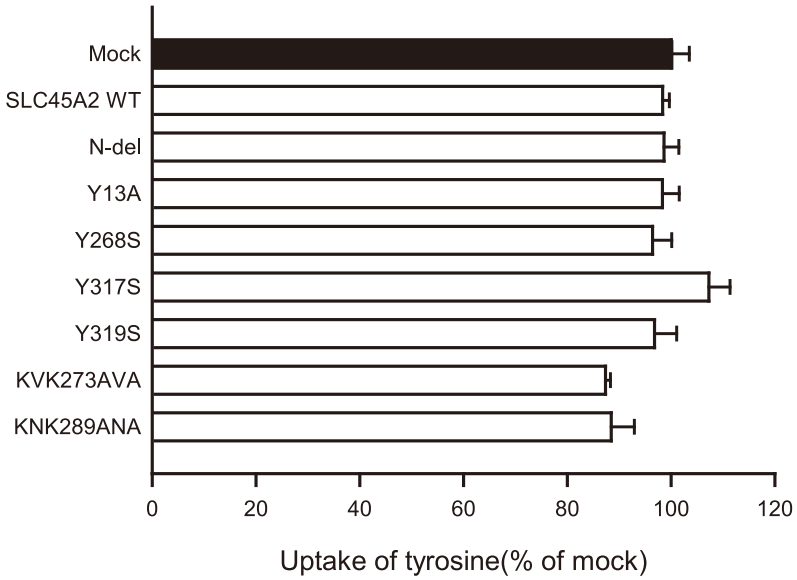


Fig. 2　hMATP とその各種変異体による tyrosine 輸送能の解析

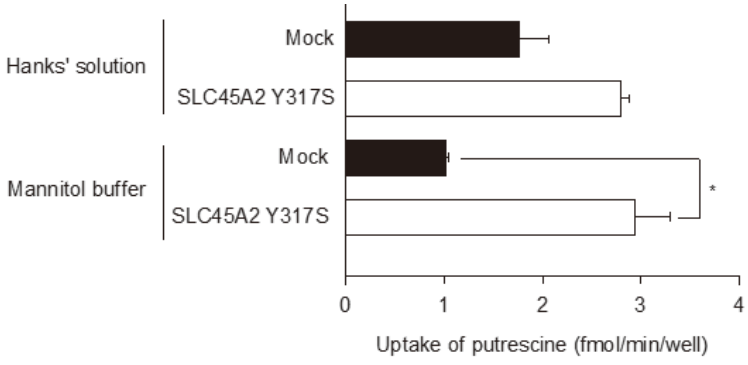


Fig. 3　hMATP とその変異体（Y317S）による putresine 輸送能の解析

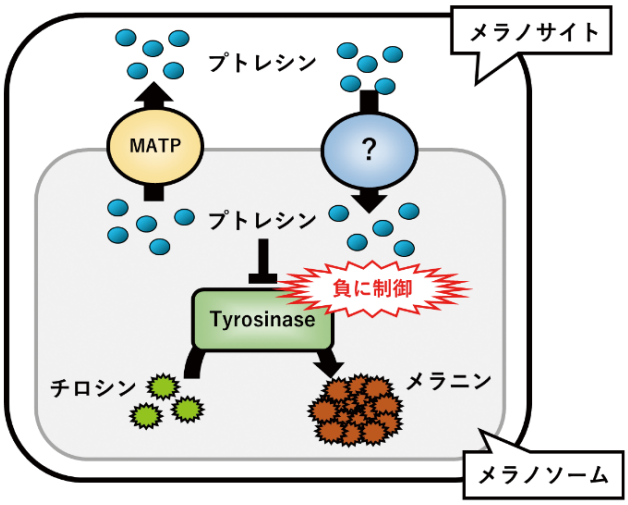


Fig. 4　メラニン合成に係る MATP の寄与

確立に成功した。MATP は tyrosine 輸送能を有していたが、その活性は弱く、生体における役割においては重要ではないことが示唆された。一方、ポリアミンの一種である putrescine の輸送活性が認められた。MATP の遺伝子多型による機能不全は、メラニン合成能が欠損しアルビノを発症するため、MATP がメラニン合成酵素であるチロシナーゼの活性低下に寄与するポリアミンをメラノソーム外に排出している可能性が示唆された（Fig. 4）。よって、MATP の阻害剤はメラノソーム内にポリアミンを蓄積させることに貢献し、チロシナーゼ活性を抑制する可能性が示唆された。この知見は、MATP の輸送機能及び分子特性の解明を進展させ、MATP の機能変動に起因する OCA4 型アルビニズム発症の機構の解明、また、その阻害剤がメラニン合成阻害の有望な化合物の開発に役立つ情報の提供につながるものと期待される。

（引用文献）

1）Newton JM, Cohen-Barak O, Hagiwara N, Gardner JM, Davisson MT, King RA, Brilliant MH. Mutations in the human orthologue of the mouse underwhite gene (uw) underlie a new form of oculocutaneous albinism, OCA4. *Am J Hum Genet*, **69**, 981-988, (2001).

2）Inagaki K, Suzuki T, Shimizu H, Ishii N, Umezawa Y, Tada J, Kikuchi N, Takata M, Takamori K, Kishibe M, Tanaka M, Miyamura Y, Ito S, Tomita Y. Oculocutaneous albinism type 4 is one of the most common types of albinism in Japan. *Am J Hum Genet*, **74**, 466-471 (2004).

3）Bin BH, Bhin J, Yang SH, Shin M, Nam YJ, Choi DH, Shin DW, Lee AY, Hwang D, Cho EG, Lee TR. Membrane-Associated Transporter Protein (MATP) Regulates Melanosomal pH and Influences Tyrosinase Activity. *PLoS One*, **10**, e0129273 (2015).

4）Shimokawa N, Okada J, Haglund K, Dikic I, Koibuchi N, Miura M. Past-A, a novel proton-associated sugar transporter, regulates glucose homeostasis in the brain. *J Neurosci*, **22**, 9160-9165 (2002).

5）Dietrich J, Kastrup J, Nielsen BL, Odum N, Geisler C. Regulation and function of the CD3gamma DxxxLL motif: a binding site for adaptor protein-1 and adaptor protein-2 in vitro. *J Cell Biol*, **138**, 271-281 (1997).

6）Guarnieri FG, Arterburn LM, Penno MB, Cha Y, August JT. The motif Tyr-X-X-hydrophobic residue mediates lysosomal membrane targeting of lysosome-associated membrane protein 1. *J Biol Chem*, **268**, 1941-1946 (1993).

7）Fotiadis D, Kanai Y, Palacín M. The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Mol Aspects Med*, **34**, 139-158 (2013).

8）Gahl WA, Potterf B, Durham-Pierre D, Brilliant MH, Hearing VJ. Melanosomal tyrosine transport in normal and pink-eyed dilution murine melanocytes. *Piment Cell Res*, **8**, 229-233 (1995).

9）Käpyaho K, Jänne J. Stimulation of melanotic expression in murine melanoma cells exposed to polyamine antimetabolites. *Biochem Biophys Res Commun*, **113**, 18-23 (1983).

10）Sunkara PS, Chang CC, Prakash NJ, Lachmann PJ. Effect of inhibition of polyamine biosynthesis by DL-alpha-difluoromethylornithine on the growth and melanogenesis of B16 melanoma in vitro and in vivo. *Cancer Res*, **45**, 4067-4070 (1985).

紫外線曝露による皮膚老化・発癌において ミトコンドリア関連分子が果たす役割を解明する

北海道大学大学院医学研究院皮膚科学教室

柳　輝希

Mitochondria exerts a central function in various cellular responses, and repeats fusion and division to change their morphology. In recent years, a group of GTP hydrolases involved with fusion and division of mitochondria has been identified. Mitofusin (Mfn) 1, Mfn 2, and OPA 1 are involved in the process of fusion, and DRP 1 (Dynamin Related Protein 1) is involved in the division process. Although it has been reported that DRP1 is essential for maintaining the cell division of malignant tumors such as malignant melanoma, the molecular function in ultraviolet-related carcinogenesis of keratinocytes is unknown. Herein we conducted experiments using clinical specimens and cultured cells to analyze the function of DRP1 in skin aging, UV-related skin disorders and cutaneous squamous cell carcinoma (SCC). We investigated cell proliferation, cell cycle, mitochondrial morphology, and MAPK signaling pathway using cutaneous SCC A431 and DJM1 cells that were transfected with shRNA vectors targeting Drp1. The Drp1 gene-knockdown SCC cells showed lower cell proliferation than scramble control cells, as assessed by direct cell counting and clonogenic assays. DNA content analysis showed Drp1 knockdown to cause G2/M arrest. Morphologically, the depletion of Drp1 resulted in an elongated,hyper-fused mitochondrial network. The MEK inhibitor PD325901 suppressed cell proliferation, as well as inhibiting the phosphorylation of ERK1/2 and Drp1(Ser616). Also, PD325901 caused the dysregulation of the mitochondrial network. In tumor xenografts of DJM1 cells, the knockdown of Drp1 suppressed tumor growth in vivo, and clinically, the expression levels of Drp1 were higher in cutaneous SCCs than in normal epidermis, and correlated positively with the advanced clinical stages. Our findings suggest that the mitochondrial division-related molecule “DRP1” may become a new biomarker in cutaneous SCC as well as a novel therapeutic target.

1．緒　言

ミトコンドリアは、酸素呼吸により細胞内のエネルギーをつくりだすオルガネラであり、さまざまな細胞応答において中心的な機能を発揮している。またミトコンドリアは活発に融合と分裂を繰り返し、その形態を変化させている。近年、ミトコンドリアの融合と分裂に機能するGTP加水分解酵素群が同定された。融合にはMitofusin（Mfn）1、Mfn2、OPA1、分裂にはDRP1（Dynamin Related Protein 1）が関与する（図1）[1]。また、DRP1が悪性黒色腫などの悪性腫瘍の細胞分裂維持に必須であることが報告された[2]。しかしながら、紫外線発癌や紫外線老化におけるこれらの分子の機能は不明である。本研究では、紫外線発癌および皮膚老化（特に紫外線による光老化・皮膚障害）におけるミトコンドリア分裂関連分子DRP1の機能について、各種実験を行った。

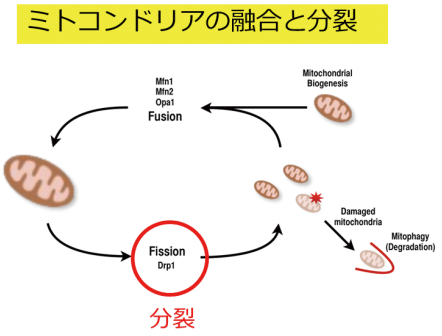


図1　ミトコンドリアは融合と分裂を繰り返している。DRP1は分裂を制御する。

高齢化のすすむ現代、皮膚癌の頻度は増加の一途をたどっている。有棘細胞癌（Squamous cell carcinoma、以下SCCと略す）は表皮由来の皮膚癌の一種であり、その発生率は高齢化とともに近年増加している。SCCの発生には紫外線、慢性的な炎症、機械的刺激、ウイルス、放射線などが関与する。なかでも、紫外線の関与は大きく、本邦でもSCCの6割が日光露光部に発生し、ますますSCCの発生数が増加することが予想されている。SCCは、日光角化症、Bowen病、熱傷瘢痕、慢性膿皮症などの先行病変の上に発生し、はじめのうちは小丘疹～結節として生じるが、増大すると腫瘤や難治性の潰瘍などを形成するようになる。さらに巨大になると、しばしばカリフラワー状と形容され、表面が乳頭状の腫瘤性病変を呈する。また、角質や痂皮、あるいは壊死組織などを付着し、細菌の二次感染を来たして、悪臭を伴うものも多く、患者のQOL（Quality of Life）を大幅に損ねることも多い。病理組織学的には、表皮と連続した異型細胞が、個細胞角化や細胞の配列の乱れ、核異型・細胞分裂・癌真珠などを形成しながら増殖する。未分化になるほど、角化傾向が少なくなり、浸潤・増



Functions for mitochondrial molecules in skin aging and tumorigenesis

Teruki Yanagi

Department of Dermatology, Faculty of Medicine and Graduate school of medicine, Hokkaido University

殖能も強く、一般的には予後が悪くなる。SCCは、低悪性度のうちは、外科的切除で根治が期待できるが、転移を伴うような進行例になると、化学療法にしばしば抵抗性を示し、治療に難渋することも少なくない。リンパ節転移を認める症例においては、リンパ節郭清を根治的に行うこともあり、外科的切除以外には放射線療法や化学療法などの集学的治療が行われる。近年では、Epidermal growth factor receptor阻害剤や種々の免疫チェックポイント阻害薬を用いた治験などが試みられている。しかしながら、進行期のSCCにおいては、治療の選択肢は未だ限定的であり、さらなる治療の研究開発が望まれている。

2．方　法

2．1．皮膚有棘細胞癌腫瘍部におけるDRP1の発現解析（免疫染色）

北海道大学皮膚科にて治療歴のある皮膚有棘細胞癌30例について、抗DRP1抗体（BD611133）を用いて、免疫染色を行った。ホルマリン（Wako）固定パラフィン切片を4μmの厚さで切り出して、免疫染色を施行した。同一観察者（筆者）によりスコアリングは行い、別視野で少なくとも3回それぞれ100個の細胞をランダムに選択して評価した。免疫染色スコアは、proportional score（免疫強度；0 なし，1 0–25%，2 25–50 %，3 50–75%，4 > 75%）、intensity score（染色強度;0 なし，1 弱陽性，2 中等度陽性，3 強陽性）の2つのパラメータの和で算出した。

2．2．RNA干渉を用いたDRP1ノックダウンによる皮膚有棘細胞癌株の表現型観察

ヒト有棘細胞癌株A431細胞、DJM1細胞、シグマ社pLKO-shRNAシステムを用いてノックダウン実験を実施した。継続的なDrp1のノックダウンには、レンチウイルスを用いたshort-hairpin RNA（以下shRNAと略す）を使用した。細胞のセレクションはpuromycinにより行った。20％コンフルエントになるようにあらかじめ293FT細胞（Invitrogen, R700-07）を播種しておき、24時間37℃でインキュベートした後、20μmolのshRNA vector（pLKO-423, 426, 1097, scrambled–puromycin, 1μg/mL）3μLとDNAmix（pLP1, pLP2, pVSVG,　各1μg/mL）9μLをそれぞれ1mLのOpti–MEMで溶解し、さらにPolyethylenimine（以下PEIと略す）15μLを加えてよく混合し、室温で15分静置した。この混合液を、準備した293FT細胞に添加し、24時間37℃でインキュベートした。トランスフェクション効率を確認するため、コントロールとしてenhanced green fluorescent protein（以下EGFPと略す）で標識したプラスミドのpcDNA3-EGFP（1μg/mL）3μLと、PEI 15μLを1mLのOpti-MEMに混合し、室温で15分静置した混合液を293FT細胞に添加し、24時間インキュベートして準備した。24時間後に蛍光顕微鏡でgreen fluorescent protein（以下GFPと略す）がどのくらいの割合で入っているかを視認し、トランスフェクション効率を確認した。また、A431、DJM1細胞を6cmディッシュに30％コンフルエントになるように播種しておき、24時間37℃でインキュベートした。293FT細胞から得られたウイルス上清は、45μmフィルタを通して回収した。播種しておいたA431、DJM1細胞にウイルス上清を1mLずつ添加し、puromycin（最終濃度1μg/mL）を培地に加えて培養し、ウイルス産生細胞株を樹立した。以後、培養液にはpuromycinを添加してセレクションをかけて培養した。

2．3．DRP1ノックダウン時の、ミトコンドリア形態の観察

MitotrackerRedFM（Invitrogen）とBZ-9000（キーエンス社）にて、ミトコンドリア形態の観察を行った。ミトコンドリアの形態はMito Tracker Red（ThermoFisher）を用いて、蛍光染色を行い観察した。観察細胞をPBSで十分に洗浄した後、Mito Tracker Redを1μL添加し、37℃で30分静置した。その後、Phenol redの入っていないDMEM（Life Technology）を添加した。観察顕微鏡には、BIOREVO BZ-9000（KEYENCE）およびFluoview FV10i（Olympus）を使用した。ミトコンドリアの形態は、ミトコンドリア1つあたりの面積で評価した。ミトコンドリアの面積は、画像解析ソフトImage J（developed by Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD; available at http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html）を用いて導出し、定量化した。

2．4．DRP1活性化機構の解明

MEK阻害剤（PD325901）を0, 0.5, 1, 5, 10, 50μMの濃度で添加し、RIPA Bufferにて細胞内タンパクを抽出し、SDS-PAGE・免疫ブロット法を実施した。Drp1、MEK阻害剤としてMdivi-1（Santa Cruz Biotechnology）およびN-difluoro-2-benzamede（以下PD325901と表記，Cayman Chemical）を使用した。Mdivi-1は分子量が353.22であり、まず5mgをDMSO 1.416mLに溶かして10mMの濃度になるように調整した。本剤を使用している論文では、10–50μMの濃度で投与しているため、さらに希釈して各濃度のMdivi-1を調整した。またPD325901は分子量が482.2であり、5mgをDMSO 1.037mLに溶かして10mMの濃度になるよう調整した。本剤は10–100μMで使用されており、これを希釈して各濃度の調整を行った。阻害剤の添加については、40–50％コンフルエントになるように対象細胞を10cmまたは6cmシャーレに播種しておき、対象濃度の1000倍に調整したMdivi-1およびPD325901を10cmシャーレでは10μL、6cmシャーレで

は5μLそれぞれ添加した。コントロール群ではDMSOを投与した(最終DMSO濃度が0.1%になるように調整)。

2．5．DRP1阻害剤による皮膚有棘細胞癌治療

DRP1阻害剤(Midivi-1, Santa Cruz)を使用して有棘細胞癌株への治療実験を実施した。

2．6．ATP活性測定法を用いたCell viability assay

対象となる細胞の細胞数をCell counter(TC10TM, Bio-Rad)で測定した後、96ウェルプレートに5000-10000個／100μL・ウェルになるように細胞を播種した。このとき、熱による物理的刺激を避けるため、播種したウェルの外側のウェルにもPBSを100μLずつ分注・静置した。48時間37℃でインキュベートした後、Cell titer glo solutionを各ウェルに100μLずつ加えてピペッティングでよく混濁し、室温で遮光しながらさらに15分インキュベートした。各ウェルの混合液を観察用のwhite 96 well plateにそれぞれ移し換えた後、吸光度をSpectra Max Paradigm(Molecular Devices)を用いてそれぞれ測定した。

2．7．細胞増殖アッセイ

細胞を6cmディッシュに1.0×10^5個ずつ播種し、37℃でインキュベートした。1、3、5、7日後にPBSで洗浄し、750μLの0.25% Trypsin-EDTA(Thermo Fisher Scientific)をそれぞれ加えて、6分間37℃で静置して細胞をディッシュから剥がし、細胞の計測を行った。

Dead cell ratioの測定においては、死細胞を含む上清培養液を一度ファルコンチューブに集めておき、0.25% Trypsin-EDTAで細胞を剥がしたあとで、集めておいた培養液で再懸濁を行った(HPEKpの細胞株においては，上清のCnT-PRを一度回収し、Trypsin-EDTAの反応を10%FBS添加PBSでアンインキュベートし、遠心して上清を吸引した後、避けておいたCnT-PRで再懸濁した)。その後、細胞数を測定し、「dead cell ratio =(全細胞数−生細胞数)／(全細胞数)× 100」として導出した。

2．8．コロニー増殖アッセイ

35mmの6ウェルプレートに、対象細胞を5.0×10^2個ずつ播種し、14日間37℃で静置した。培地は7日目に1度交換した。PBSで2回洗浄した後、70%エタノールを各ウェルに1.5mLずつ添加して30分間室温で静置し固定した。エタノールをすべて除去し、0.5% crystal violet dye(100mLあたり、0.5g crystal violetを25mlメタノールおよび75mLの滅菌水に溶解して精製)を各ウェルに1.5mLずつ添加し、30分室温で静置しコロニーの染色を行った。水道水で洗浄し、直接目視によりコロニー数を計測した。コロニーは最低50個以上の細胞数があるものを有意とみなした。

2．9．ウエスタンブロット

2．9．1．ライセートの回収

Lysed bufferには、RIPA buffer(50mM Tris pH7.5, 150mM NaCl, NP40 1%, sodium deoxycholate 0.5%, SDS 0.1%, NaF, final concentration 1nM, NaV3O4, final concentration 10μM, Roche)を使用した。対象細胞をPBSで2回洗浄した後、RIPA bufferを添加し、氷上で30分静置した。次に、セルスクレーパーを用いて各ウェルの表面を擦過し、融解液をすべて2mLのエッペンチューブに回収した。4℃、15000rpmで20分遠心した後、上清を回収して別のエッペンチューブに移し、NuPAGE LDS Sample Buffer(lithium dodecyl sulfate, pH8.4, Invitrogen)、NuPAGE Sample Reducing Agent(500mM dithiothreitol at a ready-to-use 10x concentration, Invitrogen)を加え混和し、ライセートを回収した。

2．9．2．電気泳動、転写、ブロッキング

回収したライセートは、70℃で10分間ボイルしてヒートブレイクした後、マーカーとともにSDS-PAGE5-10% Gel(Invitrogen)にセットした。バッファーにはMOPS SDS Running Buffer(#1908733, Life Technology)を使用し、電気泳動を行った。その後、iBLOT2(Invitrogen)でpolivinylidene difluoride membranes(Invitrogen)に転写した。転写したメンブレンは、5%スキムミルク(Wako)溶解1xTBS-T(20mM Tris, 150mM NaCl, 0.1% Tween20)に浸し、室温で揺らしながら60分間ブロッキングを行った。

2．9．3．1次抗体、2次抗体による酵素抗体反応

上述の抗Drp1抗体(mouse, #611113, BD Transduction Lab)、抗Drp1Ser616抗体(rabbit, #611738, Cell Signaling Technology)、抗ERK1/2抗体(rabbit, #4695, Cell Signaling Technology)、抗ERK1/2リン酸化抗体(rabbit, #9191, Cell Signaling Technology)、抗CDK1抗(mouse, #610037, BD Biosciences)、抗CDK2抗体(mouse, #610145, BD Transduction Lab)、抗phospho-histone H3抗体(rabbit, #3377, Cell Signaling Technology)、抗β-actin抗体(mouse, #A5441, Sigma)を1次抗体として使用し、4℃で揺らしながら、抗原抗体反応行った。1xTBS-Tで20分3回洗浄した後、HRP標識ウマ抗マウスIgG抗体およびHRP標識抗ラビットIgG抗体(Cell Signaling Technology)を二次抗体として60分間室温で抗原抗体反応させた。再度1xTBS-T3回洗浄した後、Image Quant LAS4000(GE Healthcare)で撮像した。

2．10．細胞周期解析

細胞周期はpropidium iodide DNA stainingを行い、fluorescence-activated cell sorting(以下、FACSと略す)により解析した。PI solution(Wako)はPBS 1000μLあた

りTritonX-100 1μL、RNAseA 20μL、PI 20μLをそれぞれ添加して調製した。対象細胞は10cmディッシュで培養し、PBSで洗浄した後、1mLの0.25% trypsin-EDTAを加え、37℃で6分間インキュベートした。血清培地を9mL添加して懸濁し、ファルコンチューブに全量を回収して1000rpm，室温で3分間遠心した。上清をアスピレーション後、PBS 5mLで再懸濁した後、1000rpm，室温で3分間再遠心し、上清をすべて除去した。70%エタノール5mLを添加し、サンプルを固定し4℃に静置した。次に、サンプルを1000rpm，室温で3分間遠心した。エタノールを除去し、さらにPBSで2度洗浄した。次にPI solutionをそれぞれ500μLずつ添加し、37℃で15分インキュベートした。FACSには、AriaIII（BD Biosciences）を使用し、縦軸に細胞数を、横軸にPhycoerythrin（PE）を設定した状態で、サンプル数を10000カウントし、ヒストグラムを描出した。

2．11．In vivo異種移植モデル（Xenograft）

5週齢、メスのBALB/cAJcl-nu/nu（CLEA）を用いて実験を行った。マウスは北海道大学医学部の動物実験施設にて管理され、搬入されたマウスは少なくとも5日間当施設で飼育し、環境に適応したことを確認して実験に用いた。尚、本研究の動物実験申請については、ヘルシンキ宣言に基づき、当院動物実験承認機関で審査承認済である。移植する細胞株は、scrambled shRNA/shRNA#3をトランスフェクションしたDJM1細胞を選択した。移植部位1か所あたり5×10^6個の細胞を使用した。対象細胞はPBSで洗浄後、0.25%Trypsin-EDTAを加えて37℃で6分間静置し、DMEMを9cc加えて懸濁した。その後、懸濁液を全てファルコンチューブに回収し、1000rpmで室温で3分間遠心させ、上清を全て吸引し、PBSで再懸濁した。細胞の個数を測定し、1箇所あたり少なくとも5×10^6個の細胞数になるようにPBSを加えてトータル200μLに調整した。この混合液を1ccの注射器（27G針）に吸引し、氷上で保存した。これらを速やかにヌードマウスの両側側腹部に皮内注射して異種移植し、Xenograftを作成した。その後、経時的に腫瘍の動態を観察した。

Drp1阻害剤添加の実験においては、腫瘍の長径が5-7mmになった時点で、1.75mgのMdivi-1（Santa Cruz Biotechnology）をDMSO25μLに溶解したものを、腫瘍に直接局所注射した。コントロール群には、25μLのDMSOを投与した。術後、腫瘍の長径・短径を1日おきに測定し、腫瘍の容積を“$(1/2) \times (\text{長径}) \times (\text{短径})^2$”で近似して導出した。移植後15日目に頚椎脱臼法によりマウスを安楽殺し、ピンセットと眼科用曲尖を用いて、生着していた皮下の腫瘍を周囲の軟部組織から剥離しながら摘出した後、腫瘍の重量を測定した。摘出した腫瘍組織は、十分量のホルマリンで固定した後、パラフィン切片を作成し、Hematoxylin and Eosin（HE）染色により病理組織学的解析を行った。また免疫染色として、Ki-67染色およびTUNEL染色を行った。免疫染色の評価には、100か所あたりの陽性細胞を異なる視野で5回カウントし、その平均値を免疫染色陽性細胞率として算出した。

なお、侵襲を伴う処置については、麻酔下に施行した。麻酔はイソフルレン（Abbi）による吸入麻酔と、抱水クロラール（Wako）の腹腔内投与（300mg/kg）を併用した。また、鎮静剤として術後3日間はアスピリン（Wako）の経口投与（150mg/kg）を行った。

3．結　果

3．1．DRP1は皮膚有棘細胞癌部で高発現している

51検体（紫外線発癌が疑われる「露光部」の皮膚有棘細胞癌Squamous cell carcinoma: SCCおよび正常皮膚）を用いた免疫染色を行ったところ、これらの腫瘍部分においてミトコンドリア分裂因子であるDRP1の発現が亢進していた（図2）。

3．2．DRP1ノックダウンは有棘細胞癌の増殖を抑制する

皮膚有棘細胞癌細胞A431細胞、DJM1細胞においてRNAi法（shRNA）を用いたDRP1遺伝子発現ノックダウンを実施した。2・3種類の塩基配列にてDRP1のノックダウンを行ったところ、蛋白レベルで90%以上のノックダウン効率を認めた（図3）。これらの細胞について、細胞増

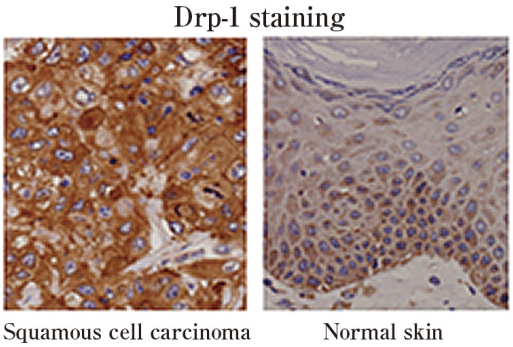


図2　皮膚有棘細胞癌ではDRP1発現が亢進している。

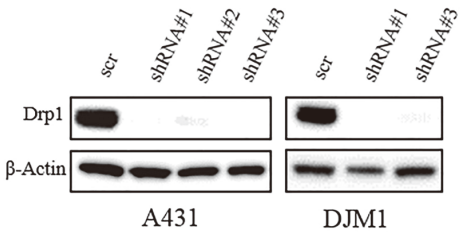


図3　皮膚有棘細胞癌細胞株A431およびDJM1細胞に対して、DRP1ノックダウンを行った（J Dermatol Sci, 88; 298-307, 2017）。

殖能をセルカウントにて評価したところ、DRP1 ノックダウン群は、コントロールに比べて有意に増殖能が抑制された（図 4）。さらにノックダウン細胞の Clononic assay を行ったところ、同様に DRP1 ノックダウン細胞にて細胞増殖の抑制が認められた（図 5）。次に、DRP1 阻害剤（Mdivi-1, 0-100 μM）を添加したところ、濃度依存性に細胞増殖が抑制された（Cell viability assay, Clonogenic assay, 図 6）。次に、細胞増殖抑制機序を解明するため FACS を用いた

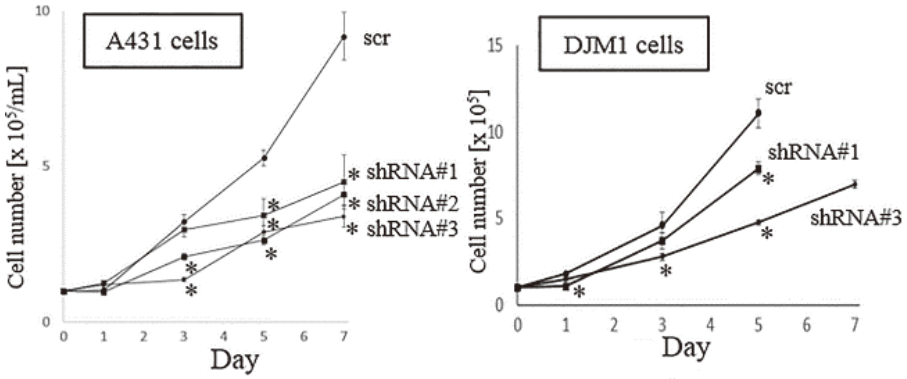


図 4　DRP1 ノックダウン細胞は細胞増殖が抑制される（J Dermatol Sci, 88; 298–307, 2017）。

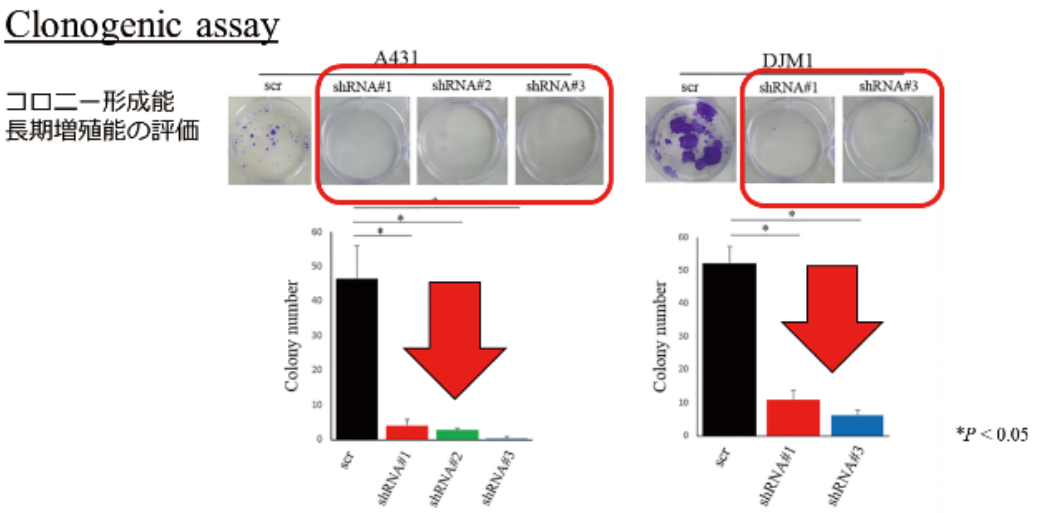


図 5　DRP1 ノックダウン細胞株を用いた Clonogenic assay（J Dermatol Sci, 88; 298–307, 2017 を改変）。

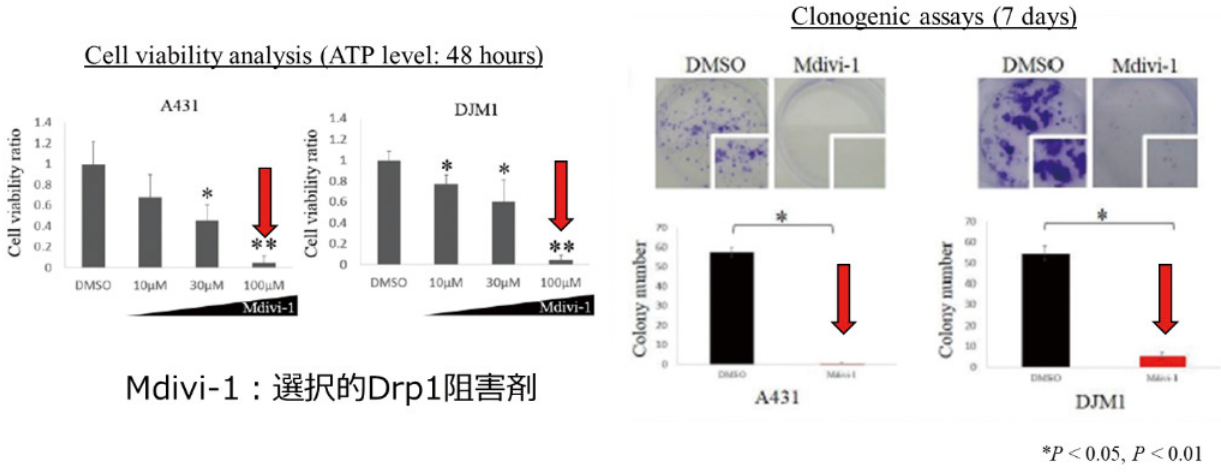


図 6　有棘細胞癌株に対する Mdivi-1 を用いた DRP1 阻害実験　Midivi-1 投与によって細胞増殖が抑制された（J Dermatol Sci, 88; 298–307, 2017）。

細胞周期解析を実施したところ（DNA contents analysis)、DRP1のノックダウン細胞では、G2/M期の細胞の割合が多くなっており、さらにphospho histone H3の発現レベルから、G2期における細胞周期の停止と考えられた(図7)。

3．3．Drp1の欠損は、長いミトコンドリアネットワークを誘導する

Mitotracker（Thermo Fisher Scientific)をもちいてミトコンドリアの形態学的評価を実施した。その結果、DRP1のノックダウン細胞およびDRP1阻害剤を加えた細胞では、コントロールに比べて長いネットワーク構造を呈したミトコンドリアが観察された（図8)。以上より、DRP1が皮膚有棘細胞癌においてもG2/M期のミトコンドリアの分裂に関与しており、DRP1の欠損あるいは阻害によって分裂不全となることが示唆された。

3．4．MAPK経路によりDrp1は活性化する

DRP1は増殖シグナルの一つであるMAPK経路を介して活性化するという既報告がある[2)]。そこで、私たちも皮膚有棘細胞癌においてMAPK経路について観察したところ、経路の上流に位置するMEK阻害剤を添加すると、その下流にあるERKと同調してDRP1のリン酸化Ser616が

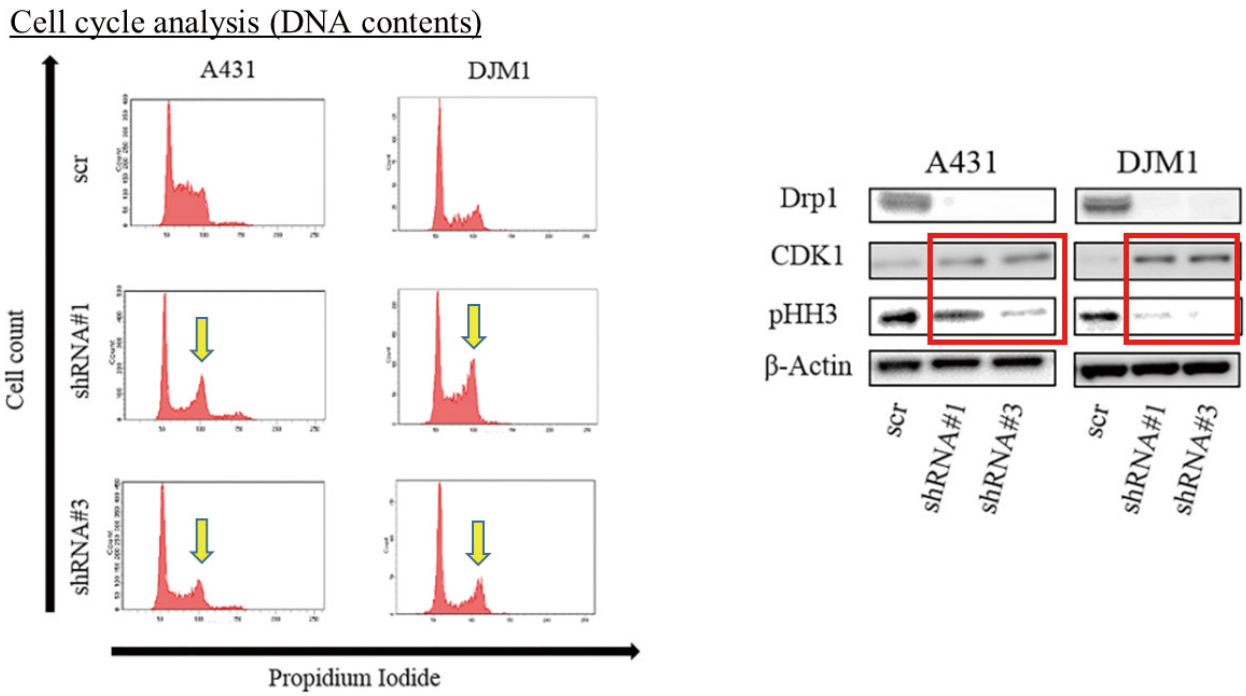


図7　DRP1 ノックダウンによって、G2/M 期での細胞周期の停止が認められる（J Dermatol Sci, 88; 298–307, 2017 を改変)。

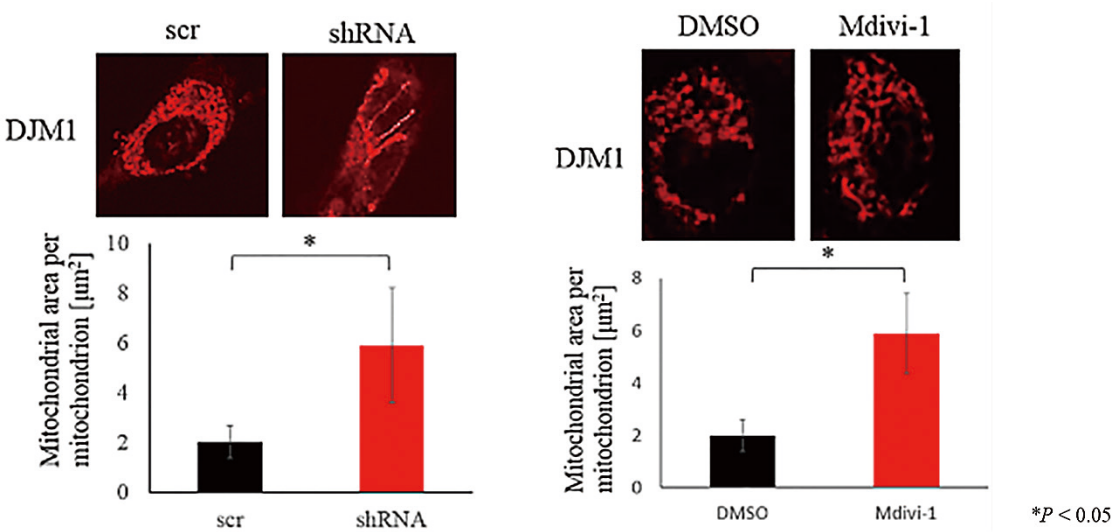


図8　DRP1 ノックダウンによってミトコンドリア形態が変化する（J Dermatol Sci, 88; 298–307, 2017)。

阻害された。この結果から、DRP1はMAPK経路を介して活性化されることが解明された(図9)。

3．5．異種皮下移植モデルにおいて有棘細胞癌の細胞増殖はDrp1欠損により抑制される

ヌードマウスの皮下に皮膚有棘細胞癌DJM1細胞を投与して異種移植を行い、腫瘍の動態について観察したところ、DRP1のKD群では、有意に細胞の増殖が抑制された。同様に、DRP1阻害剤を腫瘍内に局所注射した、腫瘍の動態を観察したところ、DRP1阻害剤添加により、腫瘍の増殖が抑制された(図10-12)。

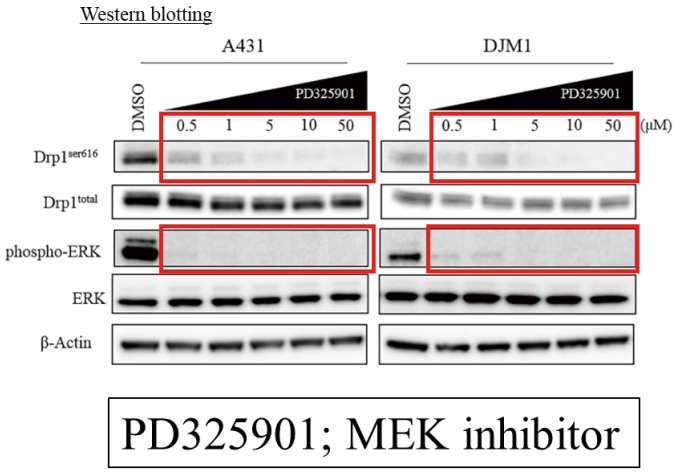


図9　MEK阻害剤によってDRP1のリン酸化が抑制される(J Dermatol Sci, 88; 298-307, 2017)を改変。

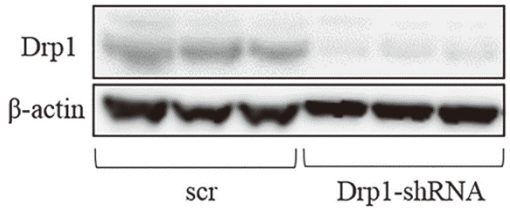


図10　異種皮下移植後の組織抽出物を用いた、免疫ブロット法(J Dermatol Sci, 88; 298-307, 2017)

4．考察・まとめ

本研究では、皮膚有棘細胞癌では、他の癌種でも報告されているように、DRP1は細胞の増殖、細胞周期、ミトコンドリアの分裂などを調整していることが分かり、有棘細胞癌の新規治療ターゲット分子の候補となりうる可能性が示唆された(図13)[3]。

肺癌、転移性乳癌、神経芽細胞腫、結腸直腸癌、膵臓癌、および黒色腫を含むいくつかの癌の細胞において、DRP1の高発現または活性化の更新が観察されている。例えば、Rehman らは、DRP1の喪失は肺癌細胞増殖の減少および自発的アポトーシスの増加をもたらすことを報告した[4]。

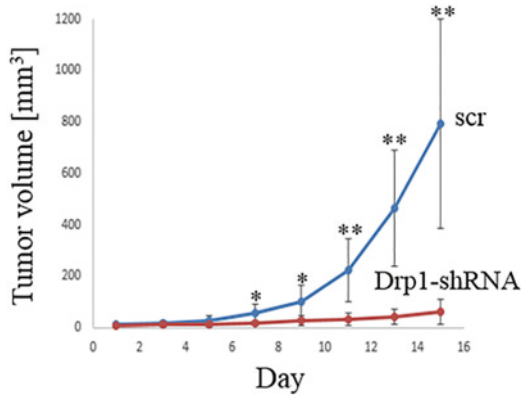


図11　DRP1ノックダウン腫瘍細胞は生体内でも細胞増殖が抑制された(腫瘍体積)(J Dermatol Sci, 88; 298-307, 2017)。

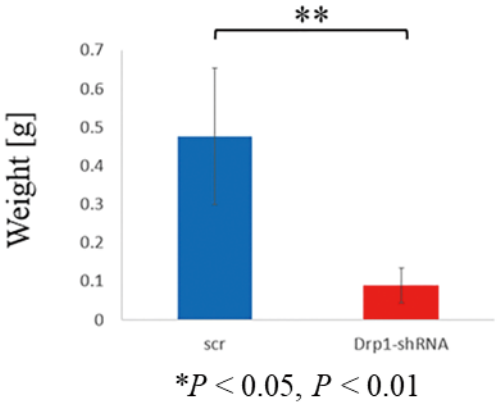


図12　DRP1ノックダウン腫瘍細胞は生体内でも細胞増殖が抑制された(腫瘍重量)(J Dermatol Sci, 88; 298-307, 2017)。

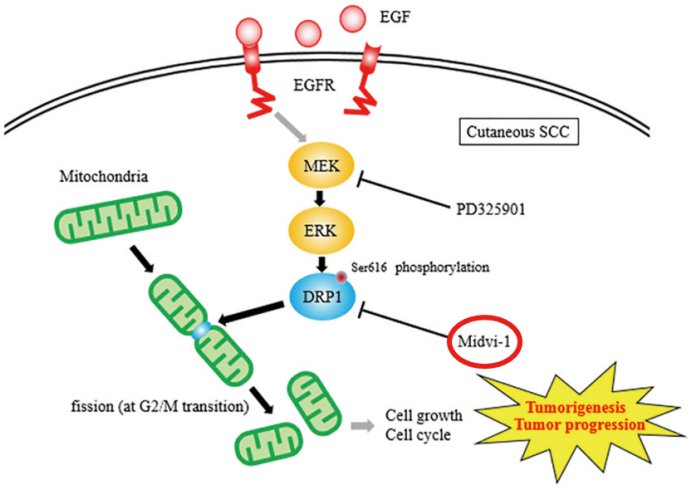


図13　皮膚有棘細胞癌におけるDRP1の機能(模式図)(J Dermatol Sci, 88; 298-307, 2017 から改変)

また、Inoue-Yamaguchi らは、DRP1の消失が結腸癌におけるアポトーシスを増加させることを示した[5]。皮膚科領域においては、リン酸化されたDrp1S616はBRAFV600Eメラノーマの発生率と相関し、DRP1の阻害はBRAFV600Eメラノーマ細胞の生存を抑制することが報告されている[6]。さらに、DRP1活性化機構としては、2つの独立した研究グループが、Ras-MAPKシグナル伝達がDRP1活性を調節することを報告した[4]。皮膚有棘細胞癌では、EGFRは過剰発現しており、予後不良と相関する[7]。EGFRは、Ras-MAPKの主な活性化因子の1つとしても知られており、EGFR-Ras-MAPKシグナル伝達は、皮膚有棘細胞癌におけるDRP1活性化を調節するための重要な経路である可能性が高い。

ミトコンドリア分裂は、細胞周期停止およびアポトーシスを促進する機構に関連している[8]。細胞周期において、Drp1Ser616は主にS期初期にリン酸化され、ミトコンドリア分裂促進に至り、細胞をG2/Mに移行させる。報告では、DRP1の喪失がミトコンドリアの過剰融合を誘導し、ATM依存性のG2/M停止およびアポトーシスを引き起こすとされている。今回の私たちのデータは、これまでの研究結果と一致しており、皮膚腫瘍においても同様の細胞機構があることが考えられた。

DRP1はまた、いくつかの悪性腫瘍における予後因子となる可能性がある。Chiangらは、DRP1の核発現が肺腺癌の不良予後と相関することを報告している[9]。我々の研究では、DRP1の発現レベルは、皮膚有棘細胞癌の病期の進行と相関していた。 DRP1の免疫染色スコアと分化度との間に相関関係に有意差はなかったが、相関の負の傾向はP=0.08として示された。DRP1の発現レベルも、有棘細胞癌において、低分化病変よりも分化した病変の方が低かった。

私たちは、DRP1が皮膚有棘細胞癌における「細胞増殖・アポトーシス・細胞周期」の重要な分子であることを示した。今後、DRP1の正常皮膚組織における解析を進めたいと考えている。

謝　辞

本研究はコスメトロジー研究振興財団の助成を得て実施いたしました。深く感謝いたします。

（引用文献）

1） Koshiba T, Detmer SA, Kaiser JT, Chen H, McCaffery JM, Chan DC: Structural
basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. Science 305: 858-862, 2004.

2） Kashatus JA, Nascimento A, Myers LJ, Sher A, Byrne FL, Hoehn KL, Counter CM, Kashatus DF: Erk2 phosphorylation of Drp1 promotes mitochondrial fission and MAPK-driven tumor growth. Mol Cell 57: 537-551, 2015.

3） Kitamura S, Yanagi T, Imafuku K, Hata H, Abe R, Shimizu H: Drp1 regulates mitochondrial morphology and cell proliferation in cutaneous squamous cell carcinoma. J Dermatol Sci 88: 298-307, 2017.

4） Rehman J, Zhang HJ, Toth PT, Zhang Y, Marsboom G, Hong Z, Salgia R, Husain AN, Wietholt C, Archer SL: Inhibition of mitochondrial fission prevents cell cycle progression in lung cancer. FASEB J 26: 2175-2186, 2012.

5） Inoue-Yamauchi, A. and Oda, H. Depletion of mitochondrial fission factor DRP1 causes increased apoptosis in human colon cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 421: 81-85, 2012.

6） Wieder, SY, Serasinghe MN, Sung JC, Choi DC, Birge, MB, Yao JL, Bernstein E, Celebi JT, Chipuk JE: Activation of the mitochondrial fragmentation protein DRP1 correlates with BRAF（V600E）melanoma. J Invest Dermatol 135: 2544-2547, 2015.

7） Cañueto J, Cardeñoso E, García JL, Santos-Briz Á, Castellanos-Martín A, Fernández-López E, Blanco Gómez A, Pérez-Losada J, Román-Curto C: Epidermal growth factor receptor expression is associated with poor outcome in cutaneous squamous cell carcinoma. Br J Dermatol 176: 1279-1287, 2017.

8） Zhao J, Zhang J, Yu M, Xie Y, Huang Y, Wolff DW, Abel PW, Tu Y: Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells. Oncogene. 32: 4814-4824, 2013.

9） Chiang YY, Chen SL, Hsiao YT, Huang CH, Lin TY, Chiang IP, Hsu WH, Chow KC: Nuclear expression of dynamin-related protein 1 in lung adenocarcinomas. Mod.Pathol 22: 1139-1150, 2009.

表皮バリア機構に立脚した新規経皮吸収促進法の開発

大阪大学大学院薬学研究科
渡利　彰浩

The tight junction (TJ) is responsible for the epithelial barrier function of the skin. A TJ is composed of membrane proteins such as claudins, occludin, and ZO-1. It has previously been thought that only the stratum corneum is responsible for skin barrier function; however, knock-out mouse analysis has shown that claudin-1 is essential for skin barrier function. Furthermore, other TJ components including claudin-4 and occludin also contribute to the skin TJ-barrier. Homoharringtonine (HHT) is an alkaloid derived from the evergreen tree Cephalotaxus harringtonia. HHT reduces intestinal epithelial barrier function by inducing a change in the expression and localization of TJ components. However, the effect of HHT on the skin TJ barrier remains unclear. In the present study, we investigated HHT's influence on the skin TJ barrier and the compound's potential to enhance transdermal absorption. HHT decreased transepithelial membrane electrical resistance (TEER) values and enhanced the paracellular flux of FD-4 in NHEK cells in a dose-dependent manner. The protein expression of TJ components such as claudin-1, claudin-4, and occludin was decreased by HHT in NHEK cells. HTT also reduced the expression of TJ components that are important for construction of the skin TJ barrier, including claudin-1, claudin-4, and occludin. Examination of the transdermal absorption-promoting activity of HHT *in vivo* showed that the amount of FD-4 absorbed over 24 h of treatment was increased by HHT in a dose-dependent manner. A time-course of FD-4 absorption indicated that HHT increased the amount of FD-4 absorbed starting after about 6 h of treatment. Analysis using model dextrans showed that compounds with molecular weights of up to 10,000 were absorbed. These findings indicated that HHT acts on the epidermal TJ barrier and may serve as a novel transdermal absorption-promoting agent that permits the passage of high-molecular-weight drugs such as biopharmaceuticals.

1．緒　言

昨今の皮膚生理学の進展に伴い、しみやそばかすの要因や老化に伴うしわなどの生成メカニズムが明らかになってきており、色素沈着を阻害する物質、抗酸化物質、コラーゲン合成促進物質などが美白成分やアンチエイジング成分として注目されている。これら有効成分の効果を十分に発揮させるには、皮膚内の作用部位（皮下に存在するメラノサイトや真皮領域など）まで到達させなければならず、単に皮膚表面に塗布しただけでは目的部位に浸透する割合は極めて低い。表皮は大まかに角質層と生きた表皮細胞層からなり、生きた表皮細胞層の顆粒層には、隣接する細胞間に密着結合（タイトジャンクション：TJ）が形成され、TJにより細胞間隙をシールすることで生きた表皮細胞層での物質透過が制限されている。近年、TJを構成する膜タンパク質claudin（CLDN）が表皮TJバリアの中心的な役割を担うことが明らかとなり[1, 2]、表皮TJバリアを制御することによる経皮吸収促進法開発の可能性が提唱されている。しかしながら、角層バリアを克服するための技術は多く開発されているのに対し、表皮TJバリア制御に焦点を当てた経皮吸収促進法の開発はほとんど行われていないのが現状である。

当グループはこれまでに、アルカロイドの一種であるHomoharringtonine（HHT）がTJ構成タンパク質であるCLDNの発現低下や局在変化を誘導することで、腸管上皮細胞のバリア機能を低下させることを見出している[3]。しかしながら、HHTによる表皮TJバリア機能制御活性に関しては明らかにされていない。そこで本研究は、HHTによる表皮TJバリア制御活性の解析、ならびに化粧品有効成分を見据えた高分子モデル物質の*in vivo*経皮吸収活性の検証を行うことで、メラノサイトや真皮領域に対して効率的に各種有効成分を送達する経皮吸収促進技術の基盤研究を行った。

2．方　法

ヒト表皮細胞であるNormal Human Epidermal Keratinocytes（NHEK）細胞を用い、HHTの表皮TJバリア制御活性を検証するため、TJバリア機能を評価する方法として汎用されている膜電気抵抗値（transepithelial electrical resistance, TER）の測定、ならびにトレーサー分子の細胞間隙透過性を評価するtracer flux assayを行った。また、HHTの細胞傷害性を評価するためLDH release assayを行った。HHT作用時の細胞間接着分子への影響は、Western Blotting法により検証した。HHTを作用させた際のマウス皮膚でのTJ構成タンパク質への影響を組織免疫染色法により検証した。



Development of transdermal penetration enhancer by regulating epidermal tight junction barriers
Akihiro Watari
Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University

3．結　果

3．1．Homoharringtonineの上皮バリア制御能の検証

HHTの表皮TJバリア制御活性を検証するため、膜電気抵抗値（TER）および細胞間隙透過性の評価を行った。TER assayの結果、HHTを24時間作用させた時点でのTER値がHHT濃度依存的に低下していた（Fig. 1a）。さらにこの際、Top側に添加した4kDaのFITC-dextran（FD-4）のBottom側への移行量を測定した。Tracer flux assayの結果、TER assayの結果と相関して、HHTを添加した細胞群では、Controlに比べ細胞間隙透過性の亢進が認められた（Fig. 1b）。また、LDH release assayにより、HHT添加時の細胞傷害性を確認したところ、バリア機能低下が観察されたHHT濃度においても傷害性は認められなかった（Fig. 1c）。以上の結果から、HHTはNHEK細胞において細胞傷害性を示すことなく、TJバリア減弱作用を示し、細胞間隙透過性を亢進することが明らかとなった。

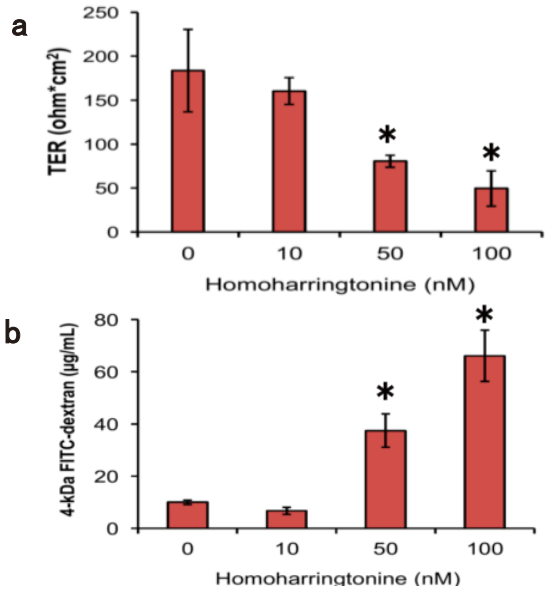


Fig. 1a, b　NHEK細胞におけるHHTの上皮バリア制御活性の検証

(a)　NHEK細胞におけるHHTによる膜電気抵抗値の変化

(b)　NHEK細胞におけるHHTによるFD-4の細胞間隙透過性の変化

NHEK細胞をtranswell plateに播種。細胞がコンフルエントに達してから、1.8mM $CaCl_2$を含む培地に交換し、さらに2日間培養。(a) 0, 10, 50, 100nMのHHTを添加24時間後のTERを測定。(b) 0, 10, 50, 100nMのHHT添加24時間後、FD-4をTop側に添加し、1時間インキュベーション後、Bottom側の培地中に含まれるFD-4の濃度を測定。Data are means ± SD (n=3)，*$P < 0.05$ vs. vehicle treated groups.（Dunnett's test）

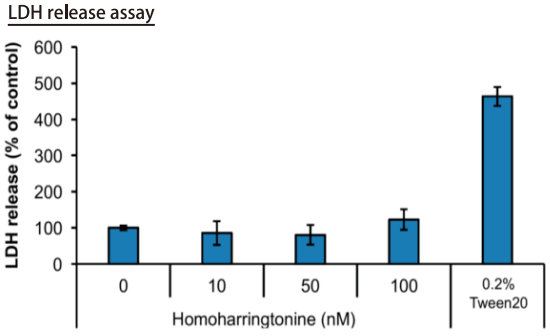


Fig. 1c　NHEK細胞におけるHHTの上皮バリア制御活性の検証

(c)　LDH release assay

Transwellの Top側、Bottom側に0，10, 50, 100nMのHHTを添加。24時間後、非処理群のTop側を0.2% Tween-20に調節した培地に交換。15分後、全ウェルのTop側より1μLを96-well plateに移し、PBSで50倍に希釈後、培地中のLDHを検出。

3．2．HHTによる細胞間接着分子への影響の検証

NHEK細胞におけるHHTのTJバリア抑制能が示されたため、HHT作用時の細胞間接着分子への影響をWestern Blotting法により検証した。腸管バリア機能に関する検討において発現が低下していたCLDN-1、-4、またはTJ構成タンパク質の一つであるOccludin（OCLN）、CLDNやOCLNの裏打ちタンパク質であるZO-1、上皮組織における接着装置の一つであるAdherens junctionの主要構成因子のE-Cadherinについて検討を進めた。その結果、CLDN-1、CLDN-4、OCLNの発現低下が確認された。一方、ZO-1やE-Cadherinの発現低下は確認されなかった（Fig. 2）。以上の結果から、HHTによるバリア機能減弱時において、細胞接着分子の中でもTJ構成因子の発現が低下していることが確認された。

3．3．HHTによるモデル分子の経皮吸収促進活性の評価

表皮細胞を利用した検証により、HHTの上皮バリア制御能が確認されたため、マウス皮膚でのHHTによる経皮吸収促進活性の評価を行った。まず、異なる濃度のHHTを作用させた際のマウス皮膚から吸収された血漿中蛍光基質濃度を調べた。本検証ではHHTによる表皮TJバリアへ

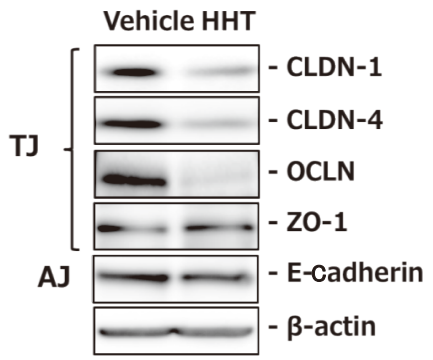


Fig. 2　HHT作用時の細胞間接着分子発現への影響

50nMのHHTを添加24時間後、SDS pageを行い、CLDN-1、CLDN-4、OCLN、ZO-1、E-Cadherin、β-actinの抗体を用いて、Western Blotting解析を行った。

の影響を確認するため、除毛5日後にTape-strippingを8回行うことにより角質層は除いたC57BL/6J ♂ 7週齢マウスの皮膚に貼付体を貼付することにより評価を行った。

HHT（0mM、0.1mM、0.5mM、1mM）を作用させて0時間から24時間までのFD-4吸収量を比較した結果、濃度依存的なAUCの増加が確認された（Fig. 3a）。この際、1mMのHHT作用マウスにおいて経時的に血漿中蛍光基質濃度を測定したところ、Tape-strippingの影響で貼付直後の吸収増加も確認されるが、貼付約6時間後以降に吸収量が上昇することが確認された（Fig. 3b）。また、HHTを作用させて24時間後のマウスの皮膚の様子を観察したところ、皮膚障害性は見られず（Fig. 4）、約2週間後には再び体毛が生え変わることも確認された（data not shown）。

Tape-strippingにより角質を除去したマウスの皮膚から、HHTの作用により4kDaのトレーサーの吸収促進活性が確認されたことから、次に、HHTによりどの程度のサイズのトレーサーが吸収促進できるのかについて検証を行った。モデル分子として分子量4,000、10,000、20,000（FD-4、FD-10、FD-20）のトレーサーを用い、1mMのHHTによる皮膚からの吸収量を調べた。その結果、Control群と比べて、分子量10,000までのトレーサー分子が有意に吸収されることが確認された（Fig. 5）。

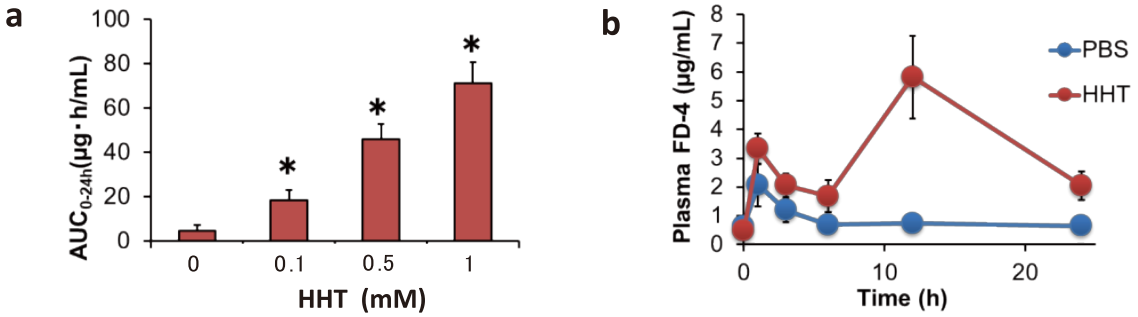


Fig. 3　HHTによるマウス経皮におけるFD-4吸収促進活性

(a)　HHT濃度別におけるFD-4貼付24時間のAUCの比較
(b)　FD-4貼付24時間までの血漿中蛍光基質濃度の推移
除毛5日後、Tape-strippingを8回行い、20mg/mL FD-4を貼付体に染み込ませ皮膚に貼付。0, 1, 3, 6, 12, 24時間において血漿中蛍光基質濃度を測定。Data are means ± SE (n=6), *P < 0.05 vs. vehicle treated groups. (Dunnett's test)

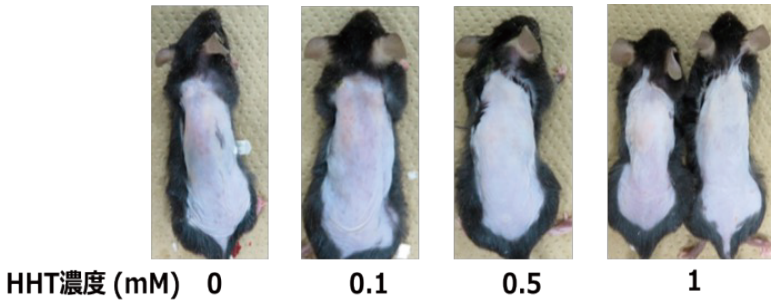


Fig. 4　HHT作用後の皮膚の状態

除毛5日後Tape-strippingを8回施行し、HHTを24時間作用させた後のマウスの皮膚の様子。

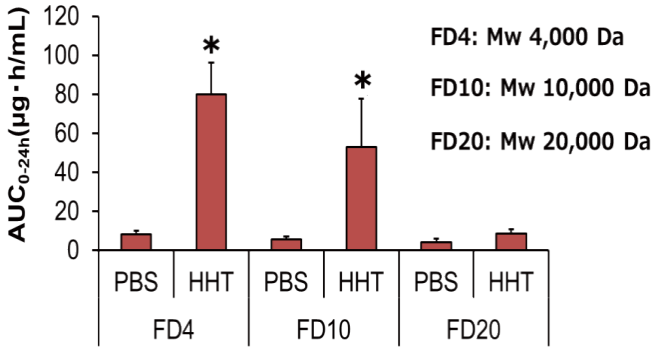


Fig. 5　HHTによる各分子量の蛍光基質の吸収量

除毛5日後、Tape-strippingを8回行い、貼付体に1mMのHHTを含む薬液を染み込ませ、24時間作用させた。各蛍光基質（FD-4、-10、-20）はそれぞれ20mg/mL含有。0, 1, 3, 6, 12, 24時間において蛍光基質濃度を測定し、AUCを算出。Data are means ± SE (n=6), *P <0.05 vs. PBS treated groups. (Student t-test)

3．4．HHTによる表皮TJ構成タンパク質への影響

HHTによるマウス表皮組織でのバリア機能低下作用についてメカニズムを探るために、HHTを作用させた際のTJ構成タンパク質への影響を蛍光免疫染色法により検証した。ヒト表皮細胞でのWestern Blotting解析による検証において発現低下が確認されたCLDN-1、CLDN-4について解析を進めた。その結果、CLDN-4の発現量や局在の変化は観察されなかった。一方、CLDN-1の局在に変化は見られなかったが、顆粒層での発現量が低下していることが確認された（Fig. 6）。以上の結果から、HHTが表皮バリア機能を低下させるメカニズムとして、CLDN-1の発現量低下が関与することが示唆された。

3．5．HHTによる経皮透過作用の検証

これまでの上皮バリアに関する研究において、分子量600程度のトレーサー分子を皮下に注入すると、野生型マウスでは、細胞間隙を透過したトレーサー分子がTJの存在部分でとどまるのに対し、CLDN-1 KOマウスでは表皮TJバリアが破綻しているため、トレーサー分子が細胞間隙を透過し、TJを超え、角質層まで移動することが報告されている[1)]。この報告をうけ、HHTを作用させたマウスの皮膚でのトレーサー分子の透過性を観察した。その結果、Control群と比べて、HHTを作用させたマウスの表皮では、トレーサー分子がTJを超え角質層付近まで透過している領域が多くみられたことから、TJバリア領域におけるトレーサー分子の透過率が増加していることが確認された（Fig. 7）。以上の結果から、HHTによりCLDN-1の発現が低下することで、上皮バリア機能が抑制され、上皮透過性が上昇していることが示唆された。

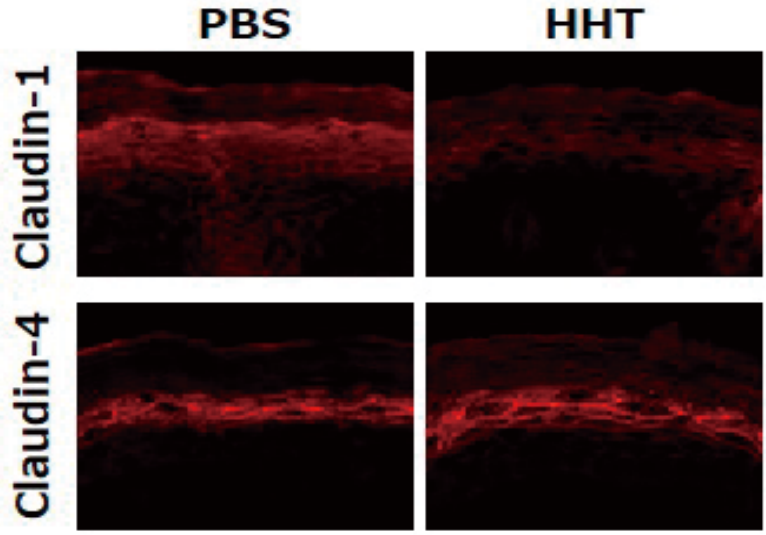


Fig. 6 HHTによるCLDN-1、CLDN-4への影響

除毛5日後、Tape-strippingを8回行い、PBS（10% DMSO）または1.0mM（10% DMSO）HHTを24時間作用させた。薬液を作用させた箇所の皮膚組織を回収し、凍結切片を作製した。CLDN-1、CLDN-4の1次抗体、2次抗体Cy®3を用いて免疫染色を行った。

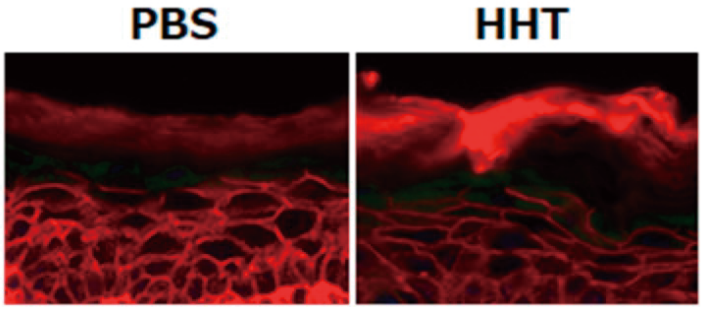


Fig. 7　HHTによる上皮透過性への影響

生後2日の新生児マウスにTape-strippingを3回行い、PBS（10% DMSO）または1.0 mM（10% DMSO）HHTを24時間作用させた。貼付体除去後、10mg/mLのbiotinを含む薬液（1 m M $CaCl_2$ 含）を50μL皮下に投与し、30分間インキュベーションした。薬液を作用させた箇所の皮膚組織を回収し、凍結切片を作製した。OCLNの1次抗体、2次抗体FITC（OCLNに対して）、Strepttavidin, Alexa Fluor®555 conjugate（biotinに対して）を用いて免疫染色を行った。

4．考　察

本研究では、HHTによる表皮TJバリア制御能を検討することで、表皮TJの経皮透過における重要性を検証し、表皮TJバリアに焦点を当てた新規経皮吸収促進法開発の可能性を探るため、*in vitro*および*in vivo*におけるHHTの経皮吸収促進活性の検証、また、HHT作用時のTJ構成タンパクの変動の検証を行った。

ヒト表皮細胞であるNHEK細胞を用い、TER assayおよびtracer flux assayを行った結果、HHT濃度依存的なTER値の低下、および細胞間隙透過性が亢進していたことから、HHTは表皮TJバリア制御活性を示すことが明らかとなった。また、この際、HHTによる細胞間接着分子への影響をWestern Blotting法により解析した結果、HHTはCLDN-1をはじめとしたTJ関連分子の発現低下を誘導することが確認されたため、HHTによる表皮TJバリア機能の低下はTJ構成タンパク質の変動によるものであると考えられる。続いて、角質層を除いたマウス皮膚において、HHTによる経皮吸収促進活性を評価したところ、分子量4,000のモデル分子が皮膚から吸収され、血中にまで移行することが明らかとなった。この際、分子レベルでの影響を検証するため、免疫染色法による解析を行ったところ、HHTを作用させたマウスの皮膚において、CLDN-1の発現量減少がみられた。以上の結果より、HHTの表皮TJバリア制御活性により高分子量の薬物が透過可能であることが示された。

続いて、HHTによる経皮吸収促進が可能な分子量の検証を行ったところ、分子量10,000までのトレーサー分子の有意な経皮吸収促進活性が確認された。通常、皮膚は分子量600以下のものであれば通過するとされているが[4-6]、Tape-strippingを行った皮膚では、HHTにより分子量10,000までのトレーサーの吸収が可能であり、低分子医薬品（分子量500以下）やペプチド（分子量500-2,000程度)、またはタンパク質製剤(分子量10,000-30,000程度)や、核酸医薬品(分子量3,000-10,000程度)の一部などのバイオ医薬品を経皮吸収促進する活性を有すると考えられる。

経皮吸収量の経時的変化を検証した結果、Tape-strippingの影響で貼付後すぐの吸収も見られるが、HHTを貼付してから6時間以降で有意な吸収促進効果がみられたことから、HHTによる吸収促進効果が示されるまでには数時間を要することが分かった。この理由として、TJ構成因子のターンオーバーが関わっていると考えられる。HHTは、タンパク質翻訳阻害活性をもつことが知られている[7-10]。HHTがTJ構成タンパク質の翻訳を阻害し、TJ構成因子の発現低下が認められるまで数時間を要するため、バリア抑制能を示すまでに約6時間かかると考えられる。今後さらにHHT作用濃度や作用時間などの検討を行うことにより、体内への吸収量の調整なども可能であると考えられる。

本研究ではHHTの表皮TJバリアへの影響を検証するため、除毛5日後、Tape-strippingを8回行うことにより角質層は除いた皮膚において検証を進めている。今後、より実用的な非侵襲性投与法として応用するためには、角質層バリア透過を可能にする技術と併用する必要がある。例えば、透過させたい薬物によって、Azoneやエタノールなどの化学的吸収促進、イオントフォレシスやソノフォレシスなどの物理的吸収促進法等[4,11,12]との最適な組み合わせを検証していく必要がある。

4．総　括

本研究では、表皮バリア機能の中でも表皮TJバリアに着目し、表皮TJの経皮透過における重要性の検証、また、HHTによる経皮吸収促進活性、およびTJ構成タンパク質への影響を検証した。本研究で得られた最も重要な知見は、HHTがCLDN-1の発現量を低下させることにより表皮TJバリア機能を抑制すること、また、化粧品有効成分の経皮吸収促進活性を示す可能性が示唆されたことである。本研究では、TJ構成タンパク質においてのみ、発現の影響の検証を行ったが、今後は、HHTを作用させた際のTJ構成タンパク質以外の分子への影響の検証、また、HHTの分子レベルでの作用機序の解明等さらに詳細な検証を進めていく必要がある。本研究により得られた成果は、皮膚バリア機能において重要な表皮TJバリアに関する基礎知識の蓄積に資するのはもちろんのこと、近年開発が進んでいる美白成分やアンチエイジング効果を示す機能性ペプチドや既存の有効成分の皮膚内への効率的な送達法開発に繋がる可能性を有し、コスメトロジーの分野に貢献するものと期待される。

(引用文献)

1) Furuse M. et al., Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice., *J Cell Biol.*, 156 (6), 1099-111, 2002.

2) Nakajima M. et al., Claudin-1 Binder Enhances Epidermal Permeability in a Human Keratinocyte Model., *J Pharmacol Exp Ther.*, 354 (3), 440-7, 2015.

3) Watari A. et al., Homoharringtonine increases intestinal epithelial permeability by modulating specific claudin isoforms in Caco-2 cell monolayers., *Eur J Pharm Biopharm.*, 89:232-8, 2015.

4) Barry B.W., Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery., *Eur J Pharm Sci.*, 14, 101-114, 2001.

5) Mitragotri S., Immunization without needles., *Nat Rev Immunol*., 5.12, 905-916, 2005.
6) Han S., et al., Epidermal kinetics and skin condition: I. Stripping technique for quantitating stratum corneum turnover in hairless mouse skin., *J. Toxicol-Cut. & Ocular Toxicol*., 8, 539-553, 1989-1990.
7) Perdue, R. E., et al., Cephalotaxus-source of harringtonine, a promising new amti-cancer alkaloid., *American Horticultural Society*., 49.3, 19-22, 1970.
8) Baaske, D.M., and P. Heinstein., Cytotoxicity and cell cycle specificity of Homoharringtonine., *Antimicrob. Agents Chemother*., 12, 298-300, 1997.
9) Shen, J. P., et al., Cytotoxicity of Homoharringtonine on leukemic stem-like cells in AML cell line KG-1., *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*., 41.5, 485-490, 2012.
10) Kantarjian, H. et al., Effectiveness of Homoharrinhtonine (omacetaxine mepesuccinate) for treatment of acute myeloid leukemia: a meta-analysis of Chinese studies., *Chin, Lymphoma Myeloma Leuk*., 15, 13-21, 2015.
11) Veena K., et al., Investigation on the synergistic effect of a combination of chemical enhancers and modulated iontophoresis for transdermal delivery of insulin., *Drug Dveloopment and industrial Pharmacy*., 36.8, 993-1004, 2010.
12) Brown MB. et al., Transdermal drug delivery system: skin perturbation devices., *Methods Mol Biol*., 437, 119-39, 2008.

Ⅲ． 精神、文化に関する分野

化粧の濃さと社会的文脈の循環的相互作用に関する行動経済学的アプローチ

広島大学大学院総合科学研究科

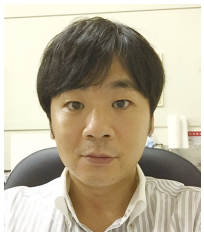
有賀　敦紀

Faces with light makeup are consistently perceived more attractive as compared to those with heavy makeup or those without makeup. Given behavioral economic research, however, human judgment regarding the attractiveness of others depends on the visual similarity among them. This study examined whether an evaluation of the attractiveness would depend on the visual similarity based on the degree (no/light/heavy) of makeup among target faces. In Study 1, I made stimulus images comprising no-makeup, light-makeup, and heavy-makeup women. For these images, participants correctly perceived the degree of makeup, and furthermore evaluated the light-makeup women as more attractive than the heavy-makeup or no-makeup women. In Study 2, I manipulated the social context based on the visual similarity of the degree of makeup. More specifically, two light-makeup women and 1 heavy-makeup woman were simultaneously displayed under a light-makeup-dominant condition; that is, two light-makeup women were similar to one another with respect to the degree of makeup. On the other hand, under a heavy-makeup dominant condition, two heavy-makeup women and 1 light-makeup woman were displayed. Participants were required to choose the most attractive women among those targets. Under the light-makeup-dominant condition, participants chose the light-makeup woman more likely than the heavy-makeup woman, whereas the heavy-makeup woman was chosen more likely than the light-makeup woman under the heavy-makeup-dominant condition. These results suggest that the attractiveness judgment does not depend merely on the degree of makeup, but also on the visual similarity (or social context) based on the degree of makeup.

1．緒　言

化粧の濃さは観察者の印象形成に大きな影響を与える。例えば，日本人を対象とした最近の認知心理学的研究では，薄化粧の人物は厚化粧やノーメイクの人物に比べてポジティブな印象形成を促す[1)]。同様の傾向は海外においても見られ，薄化粧の人物は厚化粧の人物に比べて魅力的に評価されることが一貫して報告されている[2, 3)]。さらに，厚化粧によって高められた信頼性や魅力は観察時間が長くなるにつれて低下するが，薄化粧によって高められた印象は観察時間に依存せず一定であることもわかっている[2)]。つまり，現代社会において薄化粧は，厚化粧やノーメイクと比較してポジティブな印象を観察者に対して持続的に与える。

化粧が魅力を高める理由として，先行研究では修正効果が指摘されている[3)]。化粧品を使うことによって顔立ち（配色や肌質，形など）を適切に修正することができるため，顔の魅力が高まるという主張である。しかし，もし修正効果のみが魅力を高める要因になっているのであれば，修正量の多い厚化粧の人物の魅力がもっとも高くなるはずである。したがって，薄化粧の人物の魅力が高くなる要因として，修正効果以外の要因を検討する必要がある。



A behavioral economic approach to the effects of makeup-based social contexts on attractiveness judgement

Atsunori Ariga

Graduate School of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University

近年の行動経済学では，人間の価値評価は対象の絶対評価ではなく，社会的文脈（選択肢間の類似性）に依存した相対評価にしたがうことが指摘されている。例えば，A，B，Cの三つの選択肢を用意し，そのうち二つの選択肢（A，B）が視覚的に類似している場合，人間はその比較しやすい二つに注目して相対的な価値評価を行う。結果として，残された選択肢（C）は評価対象にならず，その価値は実際よりも低く見積もられる[4)]。これにしたがえば，薄化粧が流行している現代では，化粧の濃さの側面で互いに類似している薄化粧の人物のみが（上述した例のA，Bのように）比較評価対象とされ，厚化粧の人物は（上述した例のCのように）評価対象になっていないと考えられる。そして，厚化粧の人物の魅力が低く見積もられた結果，薄化粧の人物の魅力が高くなっているのかもしれない。つまり，薄化粧の人物が多い現代の社会的文脈は，厚化粧の人物にとっては不利な環境であると言える。逆に言えば，化粧の濃さに基づいて社会的文脈を操作することができれば，厚化粧の人物を薄化粧の人物よりも魅力的に見せることが可能になると推測される。

本研究では，薄化粧の人物の魅力評価が高くなる一つの要因として，社会的文脈（化粧の濃さに基づく視覚的類似性）に注目した。これまでのコスメトロジーでは，主に単独の他者に対する観察者の印象が測定されたが，現実場面では複数の他者が同時に存在する。それならば，社会的文脈（化粧の濃さに基づく他者間の視覚的類似性）が価値評価に影響を与えるはずである。本研究は上述した行動経済学的知見をコスメトロジーに応用し，「化粧の濃さによって他者間の視覚的類似性（社会的文脈）が生まれ，それが循環

的に個々の魅力評価を歪める」と考え，この仮説を検証することを目的とした。

2．研究１：刺激の妥当性の検討

2．1．方　法

まず９名の女性モデル（平均年齢20.4歳，標準偏差1.0）のノーメイクの顔を正面から撮影した。次に，モデル自身の判断で薄化粧，厚化粧をしてもらい，その顔を正面から撮影した。計27枚（ノーメイク画像９枚，薄化粧画像９枚，厚化粧画像９枚）のカラー画像を本研究で用いる刺激とした。すべての顔は中立表情であり，服装は写っていなかった。各画像は12.01 × 8.39cmであった。刺激はパソコン画面上に呈示された。視距離は約50cmであった。

実験参加者（女性19名，男性20名，平均年齢19.5歳，標準偏差1.4歳）は画面に１枚ずつ呈示された顔画像の化粧の濃さについて６件法（１＝ノーメイク，６＝厚化粧）で回答した。加えて，顔画像の魅力について４件法（１＝全く魅力的でない，４＝非常に魅力的）で回答した。呈示された顔画像は，27枚の画像からランダムに選択された９枚であった。ただし，９枚の内訳はノーメイク３枚，薄化粧３枚，厚化粧３枚になるようにし，かつ参加者内で同一人物が繰り返し呈示されることがないようにした。参加者は９試行を行った。

2．2．結果と考察

モデルの化粧の濃さ（ノーメイク画像，薄化粧画像，厚化粧画像）に基づいて平均評定値を算出し，図１（評定された化粧の濃さ）と図２（評定された魅力）に表した。

まず評定された化粧の濃さについて，１要因３（化粧の濃さ）水準の分散分析を行った結果，化粧の濃さの主効果が有意であった（有意水準は5%，以下の分析も同様）。多重比較の結果，ノーメイク画像よりも薄化粧画像は化粧が有意に濃いと評定され，薄化粧画像よりも厚化粧画像において化粧が有意に濃いと評定された。なお，実験参加者の性別による結果の違いは認められなかった。これらの結果は，実験参加者は男女ともに化粧の濃さを正確に認知していたことを示しており，本研究で使用する画像において化粧の濃さが適切に操作されていることが確認された。

続いて，評定された魅力について同様の分析を行ったところ，化粧の濃さの主効果が有意であった。多重比較の結果，薄化粧画像がノーメイク画像や厚化粧画像よりも有意に魅力的であると評価された。なお，実験参加者の性別による結果の違いは認められなかった。これらの結果は，薄化粧の人物はノーメイクや厚化粧の人物よりも魅力的な印象を与える，という先行研究[1–3]の結果と一致するものであった。

3．研究２：化粧の濃さに基づく視覚的類似性が人物の魅力に与える影響

3．1．方法

研究１で作成した薄化粧画像と厚化粧画像の計18枚の画像を刺激として用いた。これらの中から，３枚の画像をランダムに選択して横一列に並べた。このとき，３枚の画像の化粧の濃さに基づいて二つの条件が設けられた。薄化粧２人条件では，３枚のうち２枚は薄化粧画像，残りの１枚は厚化粧画像であった。厚化粧２人条件では，３枚のうち２枚は厚化粧画像，残りの１枚は薄化粧画像であった。どちらの条件も，３枚の画像は互いに異なる人物であった。３枚の画像の呈示位置は参加者間でランダムに操作された。

実験参加者（薄化粧２人条件：女性58名，男性45名，平均年齢18.7歳，標準偏差1.0歳；厚化粧２人条件：女性74名，男性77名，平均年齢18.8歳，標準偏差1.2歳）の課題は，紙上にカラーで印刷された３枚の画像に写った人物の中からもっとも魅力的だと思う人物を１名選択することであった。参加者は１試行を行った。

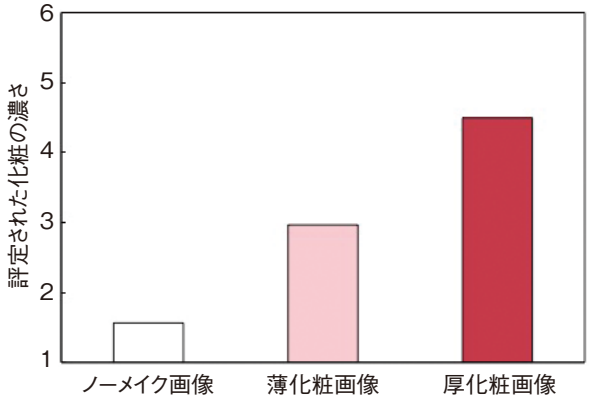


図１　各画像に対して評定された化粧の濃さ

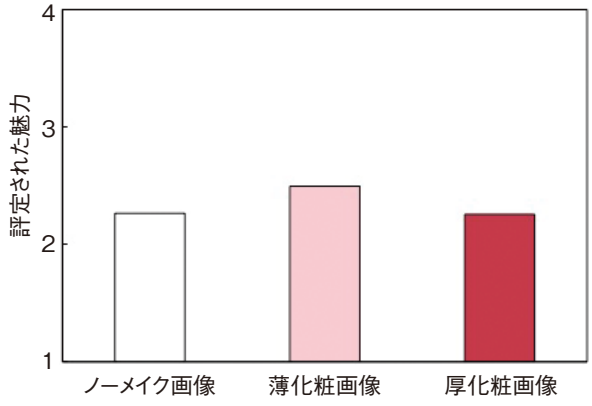


図２　各画像に対して評定された魅力

3．2．結果と考察

各条件において，薄化粧の人物および厚化粧の人物を選択した割合を実験参加者の性別ごとに算出して，図３に表した。X^2 検定の結果，条件ごとの実験参加者の性別と各画像の選択率の間に有意な偏りが認められた。残差分析の結果，薄化粧２人条件では男性参加者，女性参加者ともに薄化粧画像の選択率（男性：60.0%，女性：55.2%）が期待値よりも有意に高く，厚化粧２人条件では女性参加者において厚化粧画像の選択率（71.6%）が期待値よりも有意に高いことがわかった。男性参加者における厚化粧画像の選択率（62.3%）と期待値の間に有意差はなかった。つまり，魅力的な人物として選択された人物の化粧の濃さは，同時に呈示された他の人物の化粧の濃さに依存していた。これらの結果は，「化粧の濃さによって他者間の視覚的類似性（社会的文脈）が生まれ，それが循環的に個々の魅力評価を歪める」という本研究の仮説を支持するものであった。

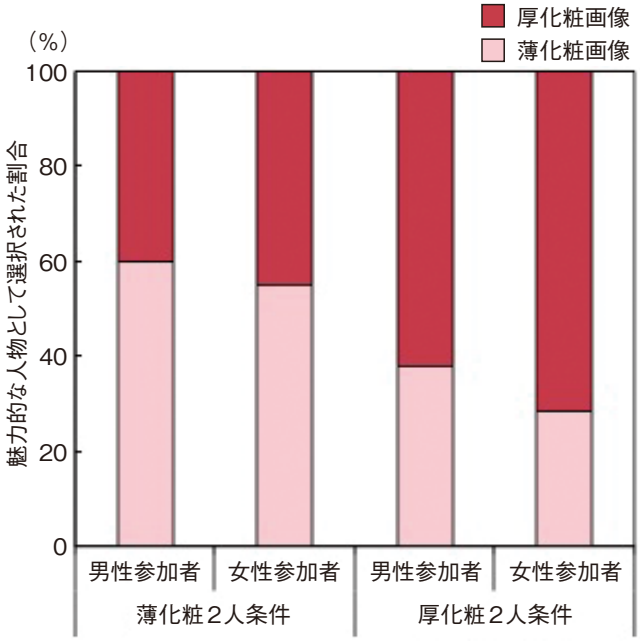


図３　社会的文脈と実験参加者の性別ごとの各画像の選択率

4．総合考察

本研究は行動経済学的知見をコスメトロジーに応用し，「化粧の濃さによって他者間の視覚的類似性（社会的文脈）が生まれ，それが循環的に個々の魅力評価を歪める」と考え，この仮説を検証することを目的とした。まず研究１では，様々な化粧の濃さの刺激画像を作成し，その妥当性を検討した。その結果，ノーメイク，薄化粧および厚化粧といった化粧の濃さが適切に認知されていることが確認された。さらに，薄化粧の人物がノーメイクや厚化粧の人物よりも魅力的に評価されることがわかり，先行研究[1-3]と一致した結果が得られた。

次に研究２では，化粧の濃さに基づいて社会的文脈を操作し，それが魅力評価にどのような影響を与えるのかを調べた。その結果，３名のモデルのうち２名が薄化粧，１名が厚化粧の場合，薄化粧の人物が魅力的であると選択される割合が高かった。一方，３名のモデルのうち２名が厚化粧，１名が薄化粧の場合，厚化粧の人物が魅力的であると選択された割合が高かった。研究１および先行研究[1-3]の結果にしたがえば，薄化粧の人物が一貫して魅力的であると評価されたため，研究２のいずれの条件においても薄化粧の人物の選択率が高くなることが予測された。しかし，実際の選択率は化粧の濃さに基づく他者との視覚的類似性に依存した。つまり，化粧の濃さが互いに類似している人物の中から魅力的な人物が選択された。これらの結果は，薄化粧の人物がノーメイクや厚化粧の人物よりも常に魅力的であると評価されるわけではないことを表している。化粧の濃さだけが魅力評価を決める要因ではなく，化粧の濃さに基づく社会的文脈も魅力評価に影響を与える一つの要因になっていると考えられる。したがって，本研究の結果は，「化粧の濃さによって他者間の視覚的類似性（社会的文脈）が生まれ，それが循環的に個々の魅力評価を歪める」という仮説を支持するものであった。

ただし研究２の結果は，実験参加者が評価対象となる画像をランダムに選択した結果である可能性も考えられる。薄化粧２人条件では薄化粧の人物が多く，厚化粧２人条件では厚化粧の人物が多かったため，それらの人物が偶然選択される可能性が高かっただけかもしれない。しかし，研究２は１試行だけの実験であり，実験参加者が適当に課題を行った可能性は低いと思われる。さらに，この可能性を検討するために，研究２の各条件における実験参加者の性別ごとに二項検定を行ったところ，薄化粧２人条件では男性参加者，女性参加者ともに薄化粧画像の選択率はチャンスレベル（66.6%）よりも有意に低かった。厚化粧２人条件では，男性参加者における厚化粧画像の選択率はチャンスレベルよりも有意に低かったが，女性参加者における厚化粧画像の選択率はチャンスレベルよりも有意に高かった。いずれの条件でも選択率はチャンスレベルと解離していたため，本研究の結果は，参加者が適当に課題を行った結果を反映しているのではなく，化粧の濃さに基づく社会的文脈に応じて魅力評価を行っていたことを示唆するものであると考えられる。今後は，３名のモデル全員について魅力評定を求める実験や，３名のモデルのうち１名は選択対象でない事態で研究２と同様の実験を行うことで，本研究の主張を補強することができると考えられる。

5．総　括

本研究では，これまで一貫して報告されてきた薄化粧のポジティブな影響が，社会的文脈に依存したものであるこ

とを示すことができ，化粧の濃さと社会的文脈の循環的相互作用を明らかにすることができた。この成果は，コスメトロジーにおける学術的な知見の蓄積としての価値があるだけでなく，マーケティング実務における化粧の濃さの戦略的利用，さらには流行を操作する際の手がかりになることも将来的に期待される。

近年の日本では東日本大震災の自粛ムードが影響して，薄化粧が流行していると言われている。本研究の結果に基づけば，その流行が少数の厚化粧の人の評価を歪めている（実際よりも低下させている）と言える。つまり，化粧の濃さを操作することで，薄化粧がさらに魅力的に映る社会的場面を戦略的に設計することが可能になると考えられる。同時に，薄化粧が流行している現在においても，厚化粧が魅力的に映る社会的場面を設計することも可能になると考えられる。

本研究の知見に基づけば，化粧の適切な濃さに関する科学的なアドバイスを消費者に与えることが可能になるだろう。近年では男性が化粧をする場合もあるため，化粧の濃さ（あるいは有無）が形成する社会的文脈は，今後男性における化粧文化の拡大に促進的に作用する可能性もある。

謝　辞

本研究は，広島大学総合科学部の田中そらさんの協力のもと行われました。ここに謝意を表します。

（引用文献）

1）Tagai, K., Ohtaka, H., Nittono, H. Faces with light makeup are better recognized than faces with heavy makeup. Frontiers in Psychology, 7, 1–8.（2016）.

2）Etcoff, N. L., Stock, S., Haley, L. E., Vickery, S. A., House, D. M. Cosmetics as a feature of the extended human phenotype: Modulation of the perception of biologically important facial signals. PLoS ONE, 6, e25656.（2011）.

3）Mulhern, R., Fieldman, G., Hussey, T., Lévêque, J.-L., Pineau, P. Do cosmetics enhance female Caucasian facial attractiveness? International Journal of Cosmetic Science, 25, 199–205.（2003）.

4）Ariely, D. Predictably irrational, Harper Perennial.（2010）.

他者からの評価を推論するメカニズムが その人物に対する選好の形成に与える影響

サウサンプトン大学心理学部、日本学術振興会、北海道大学保健科学研究院
伊藤　文人

In the present study, we investigated whether neural processes associated with valuation of faces were preceded by "being-liked" prediction which is associated with predicting other's preference of the self (i.e., meta-perception). During the fMRI, participants were asked to simply press a button when presented with photographs of opposite gender faces. After the scanning, they were unexpectedly asked to perform three impression ratings for each face: 1) attractiveness, 2) preference, and 3) willingness-to-talk (WTT) ratings. They were also asked to predict 4) the extent to which each person thinks the subject is attractive, and 5) the extent to which each person likes the subject (i.e., being-liked prediction). A factor analysis revealed that the former three types of ratings (i.e., impressions to others) and the latter two types of ratings (i.e., meta-perception) were classified into distinct factors. A mediation analysis showed a marginally significant mediation effect for the association between attractiveness rating and preference rating. Parametric modulation analysis based on principal component score calculated from the data of the former three ratings showed significant positive correlation in the ventromedial prefrontal cortex (vmPFC) ($p < 0.001$ uncorrected at peak, $p < 0.05$ FWE corrected at cluster level). Parametric modulation analysis based on principal component score calculated from the latter two ratings also revealed significant positive correlations in the vmPFC. Although preliminary, these results suggest that the vmPFC automatically codes belief about "being-liked" and subjective preference.

1. 緒　言

人にとって他者の存在は不可欠なものであり、「人の社会性」については多様な検討がなされてきた[1, 2]。特に他者との相互作用においてどのような認知・神経基盤が役割を果たしているかについては心理学と脳神経科学の両面から多くの研究が報告されている。

他者との相互作用に関して特に注目を浴びてきた認知過程は2つに大別できる。1つ目は、他者の顔に対する好みの評価など、自己が他者を評価する際に役割を果たす心理過程である[3, 6, 10]。他者の顔を好みと感じると、内側前頭前野の中でも特に腹側領域（腹内側前頭前野）の活動が上昇することが報告されている。この領域は金銭報酬を得た際や、ジュースを飲んだときにも賦活することが知られており、全般的な報酬（主観的な好ましさ）の処理に関わっていることが示唆されている領域である。2つ目は、「他者からどういった印象を持たれているか」といった、心の理論やメンタライジングと呼ばれる他者の視点に立って考える際に役割を果たす心理過程である[16, 22, 23]。この心理過程にも内側前頭前野が関わっていることが報告されている。発達障害の一種である自閉症では、この「他者の視点に立って考える」機能に問題があることが示唆されており、この心理過程は医学的にも大きな注目を集めている。興味深いことに、どちらの心理過程にも内側前頭前野の関与が示唆されているが[24, 25]、これらの心理過程はそれぞれの文脈において独立に検討されることが多く、これらの心理過程に関連があるのか、あるとしたらどのような関連があるのかに関する神経科学的なエビデンスは非常に少ない。「他者に対する主観的な判断」と「他者からどういった印象を持たれそうかの判断」のどちらの心理過程にも内側前頭前野が役割を果たしているという過去の知見は、これらの心理過程が内側前頭前野において互いに協働しながら「人の社会性」を支えている可能性を示唆しているものの、その詳細は未だ不明である。そこで本研究では、行動実験と機能的磁気共鳴画像法（以下、fMRI）を組み合わせ、この2つの心理過程にどのような関連があるか検討を行うことを目的とした。



The effect of "being-liked prediction" on valuation to others' faces

Ayahito Ito

Department of Psychology, University of Southampton. Japan Society for the Promotion of Science. Department of Health Sciences, Hokkaido University

2. 方　法

本研究における fMRI 撮影には、精神疾患および神経疾患の既往がない健常若年成人 43 名（女性 21 名、男性 22 名、平均年齢 20.39 歳、年齢範囲 20–23 歳）が参加した。全被験者に対し、ヘルシンキ宣言に基づいた本研究の主旨・内容・実験の安全性および被験者の権利に関する説明を行い、書面による参加の同意を得た。なお、本研究は北海道大学保健科学研究院倫理委員会の承認を得て実施したものである。

事前に上記とは別の健常若年成人 86 名（女性 42 名、男性 44 名、平均年齢 21.97 歳、年齢範囲 20–28 歳）について顔写真の撮影を行った。86 名の参加者全員に対し、事

前に写真撮影の趣旨・内容・プライバシーの保護について説明を行った。その後、全員から書面による参加の同意を得た。顔写真の撮影は顔が正面を向いた状態で、DMC-FX7 を使用し行った。また、撮影時にはフラッシュを使用し、解像度は 1920 × 1080 とした。参加者には表情が情動的にならないよう教示した。fMRI 撮影に参加した 43 名の被験者も同様に、この顔写真撮影に参加した。すなわち、この手続きにより 63 名の女性の顔写真、66 名の男性の顔写真を取得したこととなる。

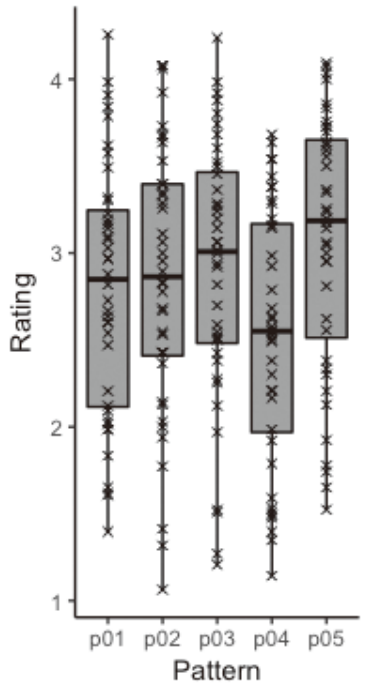
fMRI 撮像は、約 10 分間のスキャンを 1 run 実施した。刺激呈示および行動データの記録は Presentation（Neurobehavioral Systems, Albany, CA）を用いて行った。fMRI 撮像中、被験者にはプロジェクターから異性の顔写真が鏡を介して呈示された。刺激呈示時間は 2.0 秒であり、各刺激間には固視点として白い十字を呈示した。固視点の呈示時間は 3.0–9.0 秒間であった。被験者は、顔写真が呈示されたら、できるだけ早く人差し指でボタン押しをするよう教示された。なお、この被験者は fMRI 撮像に先立ち、ボタン押しについて説明を受け事前練習を行った。fMRI 撮影終了後、被験者は改めて fMRI 撮影中に呈示された顔写真を PC 画面上に呈示され、その人物がどれくらい魅力的か（項目①）、その人物の顔がどれくらい好みか（項目②）、その人物とどれくらい話したいか（項目③）どれくらい自分を魅力的だと思ってくれそうか（項目④）、どれくらい自分を好きになってくれそうか（項目⑤）の 5 つの項目について 7 段階で評定を行った。

3. 結　果

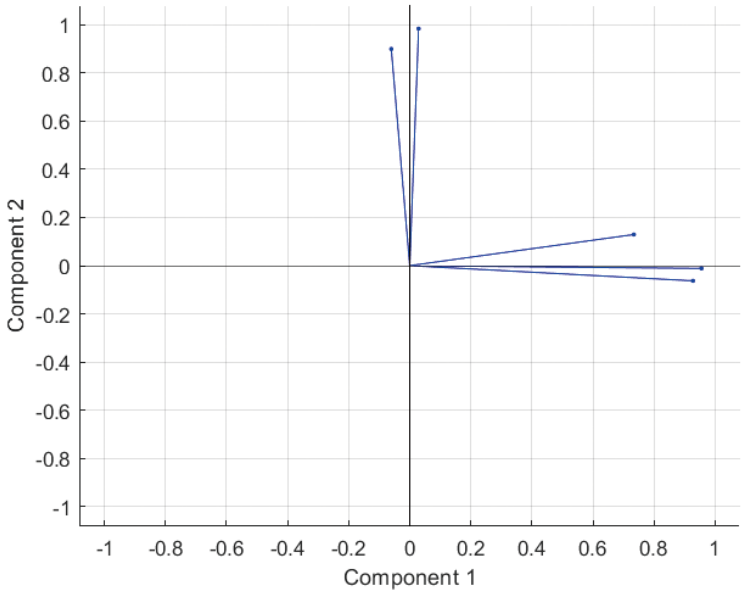
行動データの結果は図 1 のとおりである。fMRI 撮影後の評定課題のデータについて、項目①②間および、項目③④間での t 検定を行った結果、項目③④間のみに有意な差が認められた（$p < 0.05$）（図 1A）。次にこれら 5 種類の評定値について因子分析を行ったところ、項目①～③と項目④～⑤が大別されることが明らかとなった（図 1B &1C）。

次に項目①を説明変数、項目②を目的変数、項目⑤を媒介変数とした媒介分析を実施した（表 1）。この媒介分析には Jamovi（https://www.jamovi.org）を使用し

A



B



C

Rating type	Comp 1	Comp 2	Communality
項目①	0.955	−0.012	0.913
項目②	0.734	0.129	0.555
項目③	0.927	−0.063	0.864
項目④	−0.060	0.899	0.812
項目⑤	0.029	0.984	0.968

図 1　行動データ

図 1A　fMRI 撮像後の評定結果を示す。縦軸は評定値を表し、横軸（p01–p05）はそれぞれ、①その人物がどれくらい魅力的か、②どれくらい自分を魅力的だと思ってくれそうか、③どれくらい自分を好きになってくれそうか、④その人物の顔がどれくらい好みか、⑤その人物とどれくらい話したいか、と対応している。各クロスは各被験者における平均値を表している。

図 1B & C　因子分析の結果を示す。第一因子（Component1）は項目①～③の評定、すなわち相手に対する印象評定で構成され、第二因子（Component2）は項目④～⑤の評定、すなわち相手からもたらされる印象の予想で構成されていることが明らかとなった。

表１　評定項目①、②、⑤を用いた媒介分析の結果。部分媒介傾向が確認された。

Mediation Estimates

Effect	Estimate	SE	Z	p
Indirect	0.103	0.0607	1.70	0.089
Direct	0.667	0.1056	6.31	< .001
Total	0.770	0.0939	8.20	< .001

た。その結果、部分媒介傾向があることが確認された。脳活動データの解析には Statistical Parametric Mapping 12（https://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/software/spm12/）を用いた。項目①～③の評定および項目④～⑤の評定に対して主成分分析を実施し、それぞれの第一主成分スコア（以下、それぞれスコア①、スコア②と呼ぶ）を用いて、このスコアと活動が相関する領域を parametric modulation analysis を用いて検討した（図２）。

スコア①を用いた解析の結果、腹内側前頭前野および両側島皮質を含む領域において有意な相関が確認された（$p < 0.001$ uncorrected at peak, $p < 0.05$ FWE corrected at cluster level）。スコア②を用いた解析の結果、腹内側前頭前野および左上前頭回を含む領域において有意な相関が確認された（$p < 0.001$ uncorrected at peak, $p < 0.05$ FWE corrected at cluster level）。また、これら２つの解析における共通領域として、腹内側前頭前野が認められた。

4. 考　察

本研究では、他者からの評価を顔から推論することに関わる認知神経基盤と、他者の顔に対する選好に関わる認知神経基盤の関連について検討を行った。行動データの解析の結果、有意傾向ではあるものの、顔に対する魅力度評定と好み評定の関係は、「相手からどれくらい好かれそうか評定」によって媒介される可能性が示唆された。脳機能画像解析の結果、どちらの認知プロセスにも腹内側前頭前野が関与していることが明らかとなった。これらの結果は、他者に対する好み判断に関わる情報が、相手から自分がどう思われそうかに関わる情報処理と密接に関連している可能性を示唆している。

自己が他者を評価する際に役割を果たす心理過程[3, 6, 10]と、「他者からどういった印象を持たれているか」といった、心の理論やメンタライジングと呼ばれる他者の視点に立って考える際に役割を果たす心理過程[16, 22, 23]はこれまで異なる文脈で研究されてきた。しかしながら、どちらの心理過程にも内側前頭前野の関与が示唆されてきた現状がある[24, 25]。本研究結果は、内側前頭前野の中でも特に腹側領域がこれらの認知過程に重要な役割を果たしていることを示唆している。また本研究結果は、我々が他者に対する好み評価を行う際に、「他者からどういった印象を持たれそうか」に関わる情報から影響されている可能性を示した点で、これらの心理過程の関連を行動学的・脳科学的に示唆するものであると考えられる。

社会心理学における好意の返報性（reciprocal liking）に関わる議論において、自分が他者から好意を持たれているとわかるとその相手に好意を持ちやすくなることが明らかにされている[26]。本研究結果は、この現象が相手からの実際の評価無しでも起こりうる可能性を示唆している。本研究において被験者はただ他者の顔写真を呈示されるだけで、それぞれの他者が自分にどういった印象を持っているかに関わる情報は一切呈示されない。しかしながら、自分がその人物から好かれそうだと予想をした際には、その人物に好意を抱く傾向が確認された。すなわち、人は相手が自分にどういった印象を持ちそうか自動的に予想を行い、相手の自己に対する印象の予想に基づいて相手を評価している可能性があると考えられる。さらに、脳機能画像解析の結果から、この一連の過程に腹内側前頭前野が重要な役割を果たしていることが示唆される。腹内側前頭前野は他者に好意を抱いたときだけでなく、他者から好意を抱かれていることを認知した際にも活動が上昇することが知られている[27]。このことから、他者を評価することに関わる

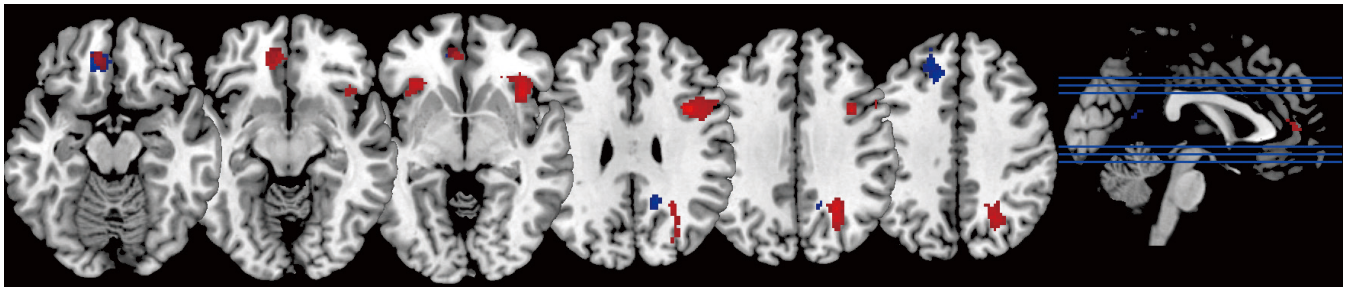


図２　スコア①およびスコア②を用いた相関解析（parametric modulation analysis）の結果を示す。スコア①を用いた解析の結果、腹内側前頭前野および両側島皮質を含む領域において有意な相関が確認され（赤で示された領域）、スコア②を用いた解析の結果、腹内側前頭前野および左上前頭回を含む領域（青で示された領域）において有意な相関が確認された。

メカニズムと他者からどのような印象を持たれそうか予想するメカニズムは共通の神経基盤によって実現されていると考えられる。

しかしながら、上記の可能性を立証する上で、さらなる検証が必要であることも付け加えておきたい。１つ目に、本研究ではfMRI撮像中の顔呈示課題終了後に５種類の評定課題を実施しているのみで、好意の返報性において用いられてきたパラダイムを使用していない。そのため、本研究に参加した被験者において実際に好意の返報性の現象が起こるかどうかの確認はできていない。２つ目に、腹内側前頭前野において上記の２つの処理が異なるタイミングで起こっていることは実証できていない。今後は時間解像度に優れた脳磁図のような手法も取り入れながら研究を行っていく必要があると考えられる。３つ目に、本研究で行った媒介分析の媒介効果の結果はあくまでも有意傾向に過ぎない。より被験者を多くする等の対策によりさらなる検証を行っていく必要があると考えられる。

以上のような限界はあるものの、相手に対する印象判断と、相手からもたらされる評判を予想するプロセスの関連性を行動レベル・脳レベルで検討した研究は極めて少なく、本研究の意義は大きいものと考えている。

（引用文献）

1）D.L. Ames, S.T. Fiske, Outcome dependency alters the neural substrates of impression formation, Neuroimage, 83 (2013) 599-608.

2）E.D. Boorman, J.P. O'Doherty, R. Adolphs, A. Rangel, The behavioral and neural mechanisms underlying the tracking of expertise, Neuron, 80 (2013) 1558-1571.

3）J.C. Cooper, S. Dunne, T. Furey, J.P. O'Doherty, Dorsomedial Prefrontal Cortex Mediates Rapid Evaluations Predicting the Outcome of Romantic Interactions, J Neurosci, 32 (2012) 15647-15656.

4）C. Corradi-Dell'Acqua, F. Turri, L. Kaufmann, F. Clement, S. Schwartz, How the brain predicts people's behavior in relation to rules and desires. Evidence of a medio-prefrontal dissociation, Cortex, 70 (2015) 21-34.

5）E. Fouragnan, G. Chierchia, S. Greiner, R. Neveu, P. Avesani, G. Coricelli, Reputational priors magnify striatal responses to violations of trust, J Neurosci, 33 (2013) 3602-3611.

6）A. Ito, N. Abe, Y. Kawachi, I. Kawasaki, A. Ueno, K. Yoshida, S. Sakai, Y. Matsue, T. Fujii, Distinct neural correlates of the preference-related valuation of supraliminally and subliminally presented faces, Hum Brain Mapp, 36 (2015) 2865-2877.

7）K. Izuma, R. Adolphs, Social manipulation of preference in the human brain, Neuron, 78 (2013) 563-573.

8）J.T. Kaplan, S.I. Gimbel, S. Harris, Neural correlates of maintaining one's political beliefs in the face of counterevidence, Sci Rep, 6 (2016) 39589.

9）C.W. Korn, Y. Fan, K. Zhang, C. Wang, S. Han, H.R. Heekeren, Cultural influences on social feedback processing of character traits, Front Hum Neurosci, 8 (2014) 192.

10）M. Lebreton, S. Jorge, V. Michel, B. Thirion, M. Pessiglione, An automatic valuation system in the human brain: evidence from functional neuroimaging, Neuron, 64 (2009) 431-439.

11）P.L. Lockwood, M.K. Wittmann, M.A.J. Apps, M.C. Klein-Flugge, M.J. Crockett, G.W. Humphreys, M.F.S. Rushworth, Neural mechanisms for learning self and other ownership, Nat Commun, 9 (2018) 4747.

12）P. Mende-Siedlecki, Changing our minds: the neural bases of dynamic impression updating, Curr Opin Psychol, 24 (2018) 72-76.

13）P. Mende-Siedlecki, S.G. Baron, A. Todorov, Diagnostic value underlies asymmetric updating of impressions in the morality and ability domains, J Neurosci, 33 (2013) 19406-19415.

14）P. Mende-Siedlecki, Y. Cai, A. Todorov, The neural dynamics of updating person impressions, Soc Cogn Affect Neurosci, 8 (2013) 623-631.

15）P. Mende-Siedlecki, A. Todorov, Neural dissociations between meaningful and mere inconsistency in impression updating, Soc Cogn Affect Neurosci, 11 (2016) 1489-1500.

16）R. Saxe, N. Kanwisher, People thinking about thinking people. The role of the temporo-parietal junction in "theory of mind", Neuroimage, 19 (2003) 1835-1842.

17）S.G. Shamay-Tsoory, R. Tomer, B.D. Berger, J. Aharon-Peretz, Characterization of empathy deficits following prefrontal brain damage: the role of the right ventromedial prefrontal cortex, J Cogn Neurosci, 15 (2003) 324-337.

18）L.H. Somerville, T.F. Heatherton, W.M. Kelley, Anterior cingulate cortex responds differentially to expectancy violation and social rejection, Nat Neurosci, 9 (2006) 1007-1008.

19）S. Suzuki, R. Adachi, S. Dunne, P. Bossaerts, J.P. O'Doherty, Neural mechanisms underlying human consensus decision-making, Neuron, 86 (2015) 591-

602.
20) S. Suzuki, N. Harasawa, K. Ueno, J.L. Gardner, N. Ichinohe, M. Haruno, K. Cheng, H. Nakahara, Learning to simulate others' decisions, Neuron, 74 (2012) 1125-1137.
21) W. van den Bos, A. Talwar, S.M. McClure, Neural correlates of reinforcement learning and social preferences in competitive bidding, J Neurosci, 33 (2013) 2137-2146.
22) C.D. Frith, U. Frith, The neural basis of mentalizing, Neuron, 50 (2006) 531-534.
23) K. Izuma, K. Matsumoto, C.F. Camerer, R. Adolphs, Insensitivity to social reputation in autism, Proc Natl Acad Sci U S A, 108 (2011) 17302-17307.
24) D.M. Amodio, C.D. Frith, Meeting of minds: the medial frontal cortex and social cognition, Nat Rev Neurosci, 7 (2006) 268-277.
25) O. Bartra, J.T. McGuire, J.W. Kable, The valuation system: a coordinate-based meta-analysis of BOLD fMRI experiments examining neural correlates of subjective value, Neuroimage, 76 (2013) 412-427.
26) C.A. Lowe, Goldstei.Jw, Reciprocal Liking and Attributions of Ability - Mediating Effects Off Perceived Intent and Personal Involvement, Journal of Personality and Social Psychology, 16 (1970) 291-&.
27) C.G. Davey, N.B. Allen, B.J. Harrison, D.B. Dwyer, M. Yucel, Being liked activates primary reward and midline self-related brain regions, Hum Brain Mapp, 31 (2010) 660-668.

眼瞼裂幅測定による耳鼻咽喉科心身症患者の客観的評価のこころみ

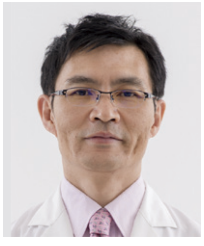
独立行政法人国立病院機構東京医療センター耳鼻咽喉科
五島　史行

The first impression of the men is easily determined by the appearance of the face, especially the eye. In addition the width of the eye lid is very important. If the width is narrow, the observer think the man is not so in active. On the contrary if the width is wide, the observer thinks the man is in active. We try to investigate the utility of the measuring the width of eye lid in the patients with chronic dizziness before and after the vestibular rehabilitation, which is one of the treatment option. The subjects were 12 chronic dizzy patients. The width of the eye lid was measured before and after the treatment. The values were compared afterwards. As a result there was no significant deference before and after the intervention.

1．緒　言

日常生活では第一印象で他人の健康状態や気分状態を見極めることが無意識のうちに行われている。その評価を決定づける大きな因子として顔面の表情、特に目および眼裂の印象は大切である。その印象を決定する要素として眼瞼裂幅は重要なものである。医師として実際に外来診療をしていて、患者が心身ともに健康になるにつれて眼瞼裂幅の開大が認められるという印象を持ち本研究を発案した。眼瞼裂幅は意識的な努力により一時的には開大させることが可能である。しかし、リラックスした状態では一定の幅になる。眼瞼裂幅は自律神経の影響を受けることがしられている。そのため、眼瞼裂幅の測定は心身的健康状態の尺度となる可能性がある。

診療に当たる医師は忘れがちであるが､健康とは身体的･精神的・社会的に完全に良好な状態であり、たんに病気あるいは虚弱でないことではなく総合的な健康度を意識する必要がある。古くから眼は口ほどにものを言うと言い、眼の印象は人間の心の鏡であると考えられてきた。病院における医療行為では患者の状態は医学的検査による客観的検査に基づいて行われているが、大まかな心身の健康状態を判断するためには、ぱっとみた印象(第一印象)は重要なものである。特に、いわいる｢目つき｣は多くの情報を提供していると考えられる。現在の医療の問題点は、人間の “心” の部分を正確に評価していないこと、そして“心”を意識した診断的、治療的アプローチを行っていないことにある。心を捉える一つの試みとして眼瞼裂幅を測定し患者のめまい症状や気分状態との関係を調べることを発案し本研究を行った。



The objective evaluation of the patients with psychosomatic problem in department of otolaryngology by measuring the width of eye lid

Fumiyuki Goto

Department of otolaryngology, NHO Tokyo medical center

2．方　法

図1にプロトコールをしめした（図1)。介入前に自覚的評価としてDHI（dizziness handicap inventory めまい障害度質問紙）[1]、抑鬱不安を調べる質問紙(HADS; hospital anxiety and depression scale[2])を行う。また客観的評価のため神経耳科学的検査一式および重心動揺検査（アニマML5420）による評価を行う。あわせてICS impulse（図2）[3] を用いて右眼で眼瞼裂幅測定（測定時間による変化を防止するため朝8時半に測定）を行う（図2、3)。治療として5日間の入院によるめまいリハビリテーション[4] を行い、治療後に以下の測定を行う。介入前と同様に質問紙としてDHI, HADSおよび、神経耳科学的検査一式および重心動揺検査、眼瞼裂幅測定を行う。また退院後は1ヶ月後に同様の測定を行う。4ヶ月後には眼瞼裂幅測定のみを行った。統計学的検討にはGraph pad prism3.0を用いて二群間の比較には対応のあるt検定を用い、多群間比較にはBonferroni法を用い、$P<0.05$で有意な変化がありとした。

3．研究の目的

これまで健康状態の客観的尺度としてはとらえられてこなかった眼瞼裂幅の測定を患者の健康度の指標として応用することを目的とする。特にリラックスした状態での眼瞼裂幅を客観的に測定することの臨床応用を目指す。

4．対　象

めまいを主訴として耳鼻咽喉科を受診した患者のうち、3ヶ月以上めまい症状が遷延し改善の認められないめまいの慢性例12例(男性2名女性10名)を対象とする。平均年齢51.6±15.5歳であった。対象症例を表1に示した。



図１　方　法

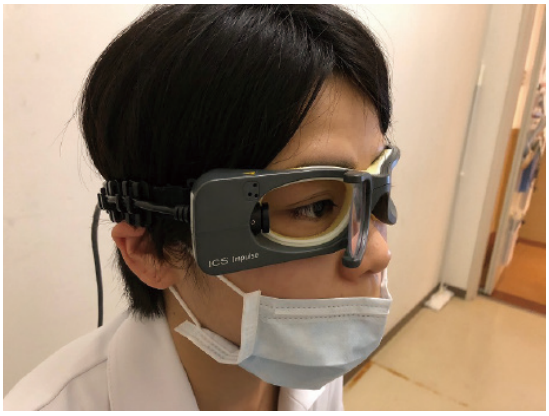


図２　測定機器

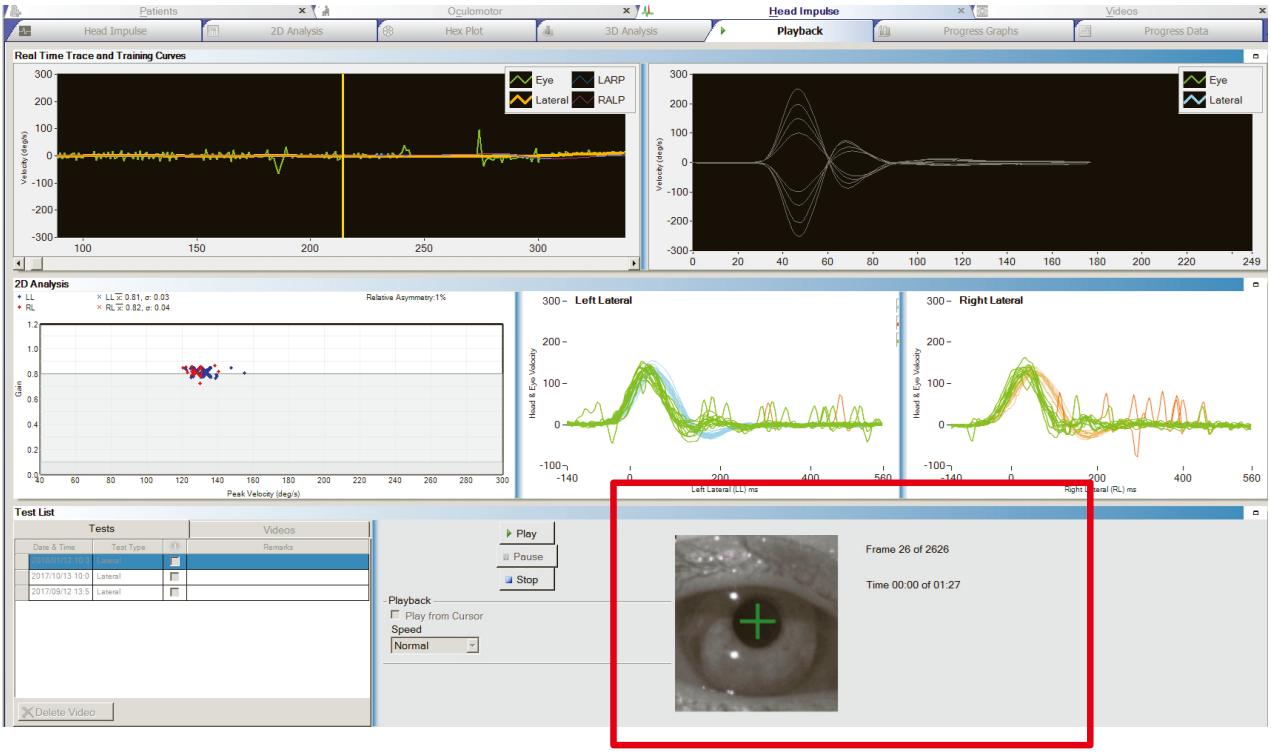


図３　測定画面

表１　症例一覧

疾患名	人数
前庭神経炎	5
メニエール病	2
心因性めまい（不安）	2
片頭痛関連めまい	1
良性発作性頭位めまい症（後半規管）	1
突発性難聴後遺症	1
合　計	12

5．結　果

はじめに代表的な症例を提示する。50歳女性の良性発作性頭位めまい症症例（図4）である。図に示したように眼瞼裂幅の開大が認められ、それにつれ、DHIも改善を認めた。しかし表2に示したように全例では有意な変化を認めなかった。DHIその他のパラメータについても有意な変化を認めなかった（表3）。1ヶ月後に眼瞼裂幅の開大を認めた症例は3例、変化無しが1例、縮小が8例であった。眼瞼裂幅の開大を認めた3例について介入前と1ヶ月後のDHIなどのスコアについて検討を行ったが有意な改善を認めなかった。

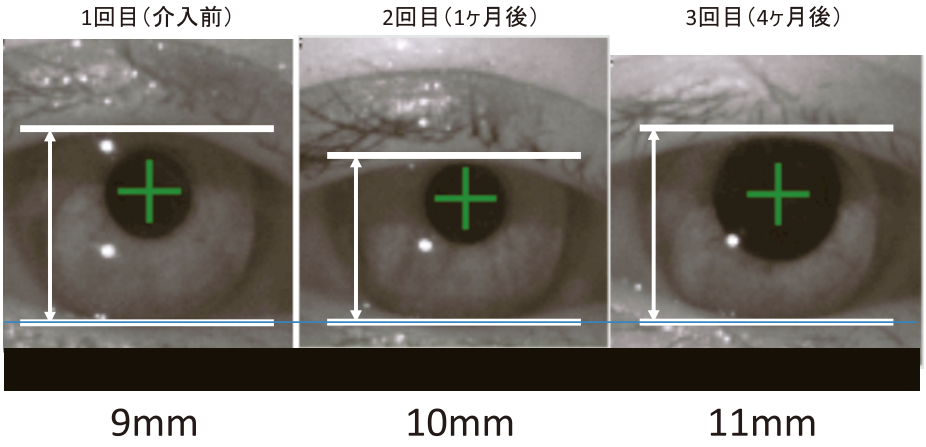


図4　眼瞼裂幅測定の実際

表2　眼瞼裂幅の変化

	介入前（測定①）眼瞼裂幅	1ヶ月（測定②）眼瞼裂幅	4ヶ月（測定③）眼瞼裂幅
平均（mm）	9.0	8.6	8.5
SD	1.3	1.8	1.8

表3　各種パラメータの変化

		介入前		1ヶ月後		統計
		平均	SD	平均	SD	
DHI	P	13.8	5.1	10.7	6.2	n.s.
DHI	E	16.2	6.5	13.0	6.6	n.s.
DHI	F	17.7	9.5	14.5	9.9	n.s.
DHI	合計	47.7	19.3	38.2	18.9	n.s.
STAI	状態不安	46.3	8.9	46.0	8.5	n.s.
STAI	特性不安	47.5	8.9	44.6	8.4	n.s.
SDS		41.7	7.3	42.8	10.0	n.s.
HADS	A	7.4	4.1	5.9	5.2	n.s.
HADS	D	6.5	2.7	6.8	3.0	n.s.
HADS	合計	13.9	5.5	12.7	7.7	n.s.
軌跡長	開眼	111.8	63.8	81.2	27.1	n.s.
軌跡長	閉眼	179.0	164.7	120.5	93.5	n.s.
外周面積	開眼	8.7	8.3	4.6	3.3	n.s.
外周面積	閉眼	12.1	11.9	7.4	10.0	n.s.

6．考　察

かっと見開いた目は元気な象徴であるが開眼を司るのは動眼神経である（図5）。動眼神経が上眼瞼を上眼瞼挙筋によって挙上させる。逆に加齢による眼瞼挙筋の衰えにより瞼がさがる状態を眼瞼下垂という。上眼瞼挙筋は、眼筋のひとつである。眼球の後方、視神経管の前で眼窩上面で起始し、上横走靭帯（Whitnall靭帯）を過ぎてから次第に筋成分を失い、結合組織、すなわち腱膜となって上眼瞼および上眼板の上縁に停止する。動眼神経に支配され、上眼瞼を挙上し開眼する。

上瞼板筋（ミュラー筋）は上眼瞼挙筋の先端付近から起こり、平滑筋細胞が数十個ずつ筋束を形成しながら、上瞼板上端にまで達している。この筋肉は上頸神経節からの交感神経の支配をうけている。驚き、不安など交感神経が興奮すると眼瞼が挙上し、表情が変わることになる。ホルネル症候群など交感神経の障害では逆に軽度眼瞼下垂が生じる[5]。本研究ではこのミュラー筋に着目した。これまで健常者の眼瞼裂幅を測定した報告がある[6]。

今回対象となった慢性めまい患者はめまいの治療のためにリハビリテーションを行った。その結果自覚的、他覚的めまい症状は改善した。他覚的所見は重心動揺検査によって行った。また気分状態も抑うつ、不安が改善した。これらのことから患者の自律神経には何らかの変化が起きることが予想される。特に活力が上昇していることから交感神経の活性化があると想像した。しかし交感神経機能を反映すると考えられる眼瞼裂幅には有意な変化は認められなかった。

一方、医師が評価する患者の表情は全例で元気があるという印象を持った。眼瞼裂幅に有意な変化がなかったことから医師の感じるこの元気があるという印象は眼瞼裂幅の変化によるものではない可能性が考えられた。患者の第一印象で元気があるという印象を決めるのは眼瞼裂幅のみではなくその他の複数の因子が関与しているのかも知れない。本研究の問題点として眼瞼裂幅の測定方法があげられる。今回用いたICSによる方法で手技的な問題がないか、眼瞼裂幅が自律神経機能を直接的に反映しているのかという点である。また、患者の自律神経機能は介入後どのような変化を示しているのか、自律神経機能検査によって検討する必要がある。そして自律神経機能と眼瞼裂幅の関係を調べる基礎的な実験が必要と考えられた。

今回の結果では眼瞼裂幅がめまいの自覚、他覚症状との関係は明確ではなかった。また、患者の気分状態との関係も明確ではなかった。今後は、眼瞼裂幅の測定方法についても検討し自律神経調節障害検査との関係にも着目し眼瞼裂幅測定の自律神経機能検査としての臨床応用を目指したい。

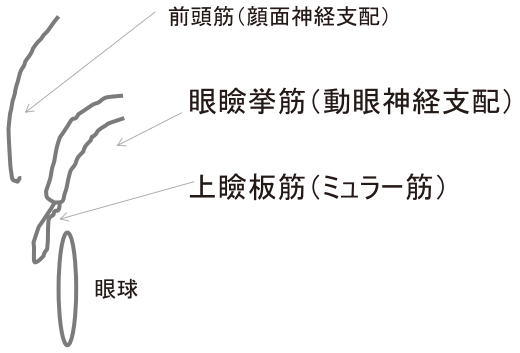


図５　眼瞼挙上に関連する筋肉とその支配神経

7．まとめ

眼瞼裂幅が患者の自律神経機能を反映している可能性はある。しかし今回の検討では患者の活力と眼瞼裂幅の間には直接的な関係は認められなかった。今後は眼瞼裂幅の測定法の改良や他の自律神経機能検査と眼瞼裂幅都の関係を調べるなどの検討が必要である。

（文　献）

1） Goto F, Tsutsumi T, Ogawa K: The Japanese version of the Dizziness Handicap Inventory as an index of treatment success: exploratory factor analysis. Acta Otolaryngol 2011; 131: 817–25.
2） 岡浩一朗，山田純生，井澤和大，他：心臓リハビリテーション患者における不安・抑うつの評価　Hospital Anxiety and Depression Scale（HADS）日本語版の応用．心臓リハビリテーション 2002; 7: 160–163.
3） 小板橋美香，五島 史行，荒井美希，他：前庭型片頭痛患者の前庭動眼反射機能についてvideo head impulse test（vHIT）を用いた検討．耳鼻咽喉科・頭頸部外科 2017; 89: 367–372.
4） 五島 史行，山本 修子，進藤 彰人，他：高齢者と若年者におけるめまい集団入院リハビリテーションによる治療効果の比較．医療 2014; 68: 175–181.
5） 宇賀茂三：神経眼科入門シリーズ　眼瞼　解剖．神経眼科 2012; 29: 95–102.
6） 門屋講司，辻川 寛，横枕 侑加：日本人若年者の外眼部の生体計測演習の結果について．東北文化学園大学医療福祉学部リハビリテーション学科紀要 2017; 13: 33–39.

サーサーン・ガラス成立の背景
～ユーフラテス川以東へ流入した地中海周辺地域の化粧文化を探る～

岡山市立オリエント美術館
四角　隆二

Sasanian glass is well known as trade products travelled ancient Silk-road. But it is not clear that the definition of Sasanian glass and the difference between Sasanian and Roman/Byzantine glass, because the study was mainly based on looted materials. The author has investigated the Sasanian glass collection in UK, which was excavated late 19th- early 20th century. In the course of study, that leads to the hypothesis that the Sasanian glass and the cosmetic culture of Mediterranean are closely related.

In this study, it is focused on Sasanian glass from Kish archaeological site, 100km south of Bagdad. As a result of typological study and X-ray fluorescent analysis, it can be pointed out that the influx of cultures from the Mediterranean is north high south low, and that it is likely that the Mediterranean cosmetic culture such as scented oil and eye liner have brought by Christian.

1．緒　言

東アジア古代史研究において、「サーサーン朝のガラス」あるいは「ペルシアのガラス」といえば、教科書にも記述される正倉院蔵白瑠璃碗を筆頭に、奈良県新沢千塚や福岡県沖ノ島からの出土品、伝安閑天皇陵出土品や京都府上賀茂神社境内採集品などがよく知られている。こうした事実を重視し、サーサーン・ガラスは古代末期のシルクロード交易を代表する交易品と理解する立場から、「サーサーン朝は金属器やガラス、染織品などの工芸品を東西に輸出し経済的利益を上げていた」などとする理解がある（吉水 1992、小寺 2012）。

一方、西アジア考古学研究においては、「サーサーン・ガラス」の定義は不明確で、その年代観や帰属文化をめぐる議論に対し、研究者間で理解が分かれる場合も散見される。そもそも、「サーサーン・ガラス」は「3～7世紀、サーサーン朝領域で作られたガラス製品」である。しかし、1）1960年代以降、話題を提供してきた伝イラン北部古墓由来の博物館資料のほとんど全てはいわゆる盗掘品であって、考古学研究に必要な情報を喪失した「美術品」、2）メソポタミア所在のサーサーン朝都市遺跡出土品は欧米の限られた機関にのみ所蔵され、その公開が不十分、3）同時代の東地中海系ガラスの強い影響をうけて成立したサーサーン・ガラスは、器形や製作技法など視覚的属性から両者の区別は困難、4）製作工房の未検出という問題があり、サーサーン・ガラスに関する本質的な理解を妨げてきたのである。

報告者らは、6年前から大英博物館に所蔵されるサーサーン朝都市遺跡出土ガラスの考古資料化研究に取り組んできた。これらは19世紀末から20世紀初頭の考古学黎明期、英国隊が発掘したニネヴェやニムルドといった古代メソポタミアの著名都市遺跡からの出土したもので、これまでサーサーン朝を含む上層出土品は顧みられることはなかった。分析の結果、北メソポタミア都市遺跡出土品では、伝イラン北部古墓由来博物館資料ではあまり知られていない閉塞器形小型容器（小型瓶）が主体的で、開放器形容器（碗や鉢）は客体的数量を占めるに過ぎないこと、サーサーン朝が支配するユーフラテス川以東でガラス生産が本格化する3世紀以降も地中海方面から、ガラス容器が流入し続けていたことが判明した。

地金自体が価値を持つ貴金属器と違い、簡素な作りの小型ガラス容器そのものが価値を持ったとは考えにくい。ガラスが宝物としての扱いを受けた東アジアでの需要と異なり、メソポタミア都市遺跡ガラスの性質は実用の域を超えることはない。だとすれば、当時のサーサーン朝領域の人々にとって価値を持ったのはガラスではなく、その内容物ではなかっただろうか。この理解に立てば、正倉院蔵白瑠璃碗で注目を集める厚手のカット容器ではなく、メソポタミア出土品の多数を占める小瓶こそが、サーサーン・ガラスの本質を理解する鍵になるのではないか。

本研究は、地中海方面からユーフラテス川を越えて流入したとみられる香油と化粧文化の視点から、ユーフラテス川以東の吹きガラス産業成立と展開を検討しようとするものである。

2．方　法

アシュモレアン博物館（英国オックスフォード市）が所蔵するメソポタミア南部のキシュ遺跡出土品の資料化研究



The background of Sasanian Glass –In search of the Mediterranean Cosmetic Culture flow into beyond Euphrates–
Ryuji Shikaku
Okayama Orient Museum

を行った。アシュモレアン博物館より調査許可を得た110点余のうち、84点について観察、実測・写真撮影を行い、分類を行った。

さらに44点については、研究協力者の阿部善也東京理科大学講師により、可搬型蛍光X線分析装置（OURSTEX 100FA II）によって、非破壊分析を行った。この分析装置は、資料を真空に近い条件下（約500Pa）に置くことで、軽元素領域の感度を高める工夫がなされている。また、国内博物館に所蔵されるサーサーン・ガラスについて、資料化・蛍光X線分析も継続した。

さらに、大英博物館（英国ロンドン市）所蔵のニネヴェ（モースル市近郊）など北メソポタミア出土品と比較検討を行った。

3．結　果

3．1．キシュ遺跡出土ガラス容器の器形と頻度

キシュ遺跡はイラクの首都バグダードの南約100kmに位置する、大型都市遺跡である。1934年、メソポタミアに所在する都市遺跡として、初めてサーサーン・ガラスが報告書に記載された遺跡として名高い。今回、当時の報告に見られる資料を含め、84点を考古資料化した。

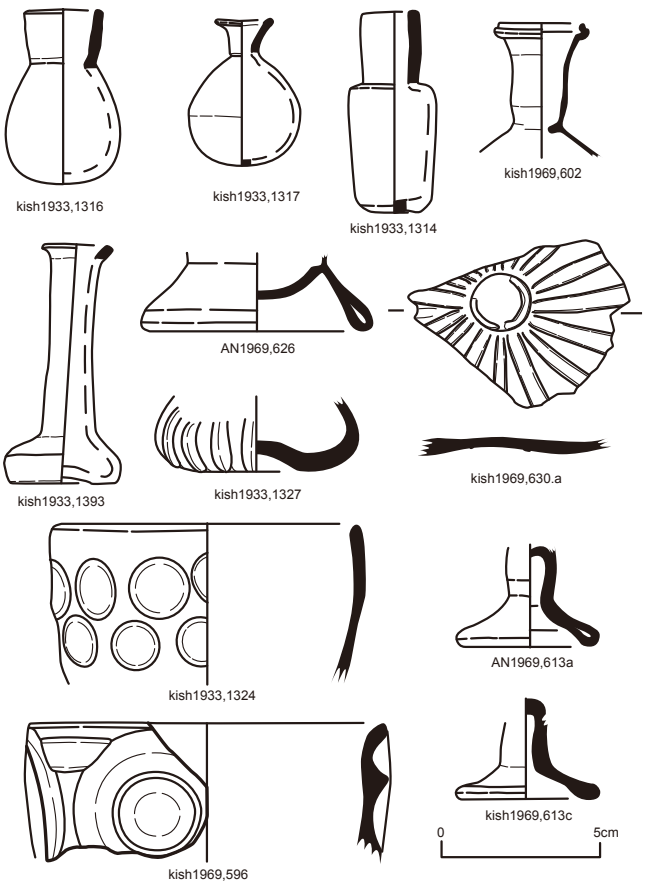


図1　キシュ出土ガラス容器

まず、器形に着目すると、器形判別可能な資料は大きく3分類できる（図1）。すなわち、小型瓶、碗形容器、台付杯である。このうち、小型瓶は22点で、短頸丸底、長頸平底が含まれる。開放器形容器は23点が確認でき、いずれも口径が10～15cm程度の厚手碗形を呈し、円形切子や二重円形切子が施される。台付杯は、器壁の薄い容器部は失われ、脚台のみが確認できる。

色調に着目すると、小型容器の大半は淡緑色透明で、厚手碗形容器には淡褐色を呈する例が含まれる。このうち、淡緑色は原料に不純物として含まれる鉄が発色したものである。一方、淡褐色は消色材として添加されたマンガンMnに起因するもので、いずれも意図的に着色された形跡はなかった。

これらの出現頻度をグラフ化したのが、図2である。小片のため器形判別が困難な資料が多数含まれるものの、小型壺（Bottle）と飲酒器（Bowl, Stemmed Goblet）の出現比率は2：3となる。

同時代の東地中海系ガラスの器種組成と比較すると、サーサーン・ガラスは大型貯蔵容器が欠落する。キシュ出土ガラスのうち、器形判別が困難な資料にも大型容器片と推定できる資料は見られなかった。

3．2．製作技法

製作技法に目を転じると、サーサーン・ガラスでは容器の製作・成形の両方において、ガラス製パイプ（共竿）を用いる。このため、底部にリング状の痕跡が確認できる（底部を処理したカットガラスでは確認できない）。キシュ出土品のポンテ竿の痕跡は、直径1.3～1.7cmのものと、直径2cmを超える資料が含まれる。一般に、細い吹竿の先にとることのできるガラス種は少なく、大型容器を吹くのは難しい。

これまでに調査した、北メソポタミア都市遺跡出土品（大英博物館所蔵）では直径1.3～1.7cmが大半で、直径2cmを超える資料は極めて少数だった。キシュ遺跡における大

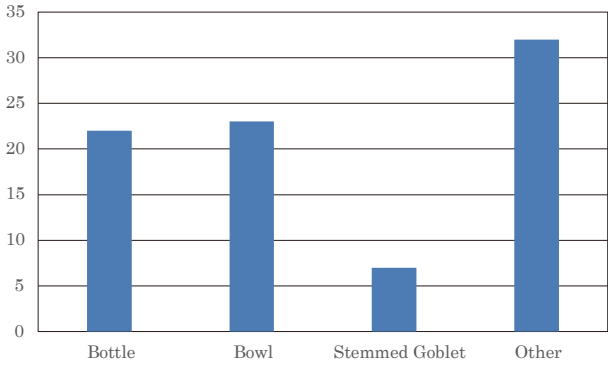


図2　キシュ出土ガラス容器の器種組成

口径のポンテ竿の出現頻度の高さは、厚手切子容器など比較的大型容器が多い事実と無関係ではないだろう。

3．3．装　飾

ガラスの装飾技法はホット・ワークとコールド・ワークに大別される。前者は、ガラスの温度が下がり、可塑性を失う前に行う加飾で、後者は製品となった後に施される加飾である。キシュ出土品では、モール型吹や突起装飾がホット・ワークの代表的なものであるが数はそれほど多くない。カット装飾を持つ厚手の容器片が比較的多く見られるが、いずれも開放器形の飲用器で、薄手の閉塞器形容器にはカットは施されない。

3．4．蛍光Ｘ線分析結果

東京理科大学阿部善也講師による非破壊蛍光Ｘ線分析結果（図3）によれば、北メソポタミアでは見られない不純物の多い組成を示すグループが確認でき（S1b-LP、S2-LP）、在地の工房が操業した可能性を支持するものといえよう。すなわち、北メソポタミアの遺跡では見かけない装飾を持つ、厚手あるいは大型の碗形容器にはキシュ特有の消費行動が反映されている可能性がある。

4．考　察

キシュ出土品は、これまで調査してきた北メソポタミア出土品と比べ、開放器形大型容器が多数含まれることが特筆される。厚い器壁のカットガラス片が多く見られ、カット文様の多様性も顕著である。メソポタミア全域を視野に入れると、正倉院タイプ円形切子碗はメソポタミア各地に広い分布を示すが、上賀茂神社タイプ二重円形切子碗、沖ノ島タイプ浮出円形切子碗はキシュ遺跡以外での出土は知られていない。このような器形やカットの多様性は、容器を製作する吹きガラス工房と、製品を装飾するカット工房が、キシュ遺跡周辺で操業していたことを推測させる。こうした事実は、碗形容器に対する消費者需要の地域性を反映しているものと考えられる。

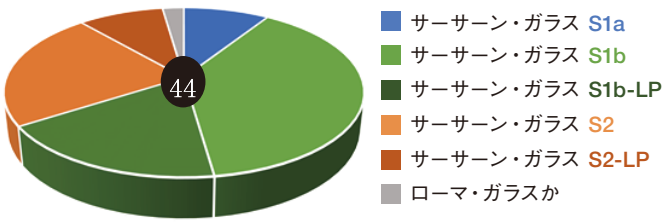


図３　キシュ出土ガラスの組成別割合
（分析：阿部善也東京理科大学講師）

4．1．北メソポタミア都市の状況

図４は、北メソポタミアを中心とするサーサーン朝都市遺跡出土ガラス（大英博物館所蔵）を器形別に分類したものである。閉塞器形小型容器が主体的数量を占め、その他の器形は客体的なものに過ぎないことがわかる。図１と比較するとその違いは歴然である。

これまでのところ、大英博物館所蔵北メソポタミア都市遺跡出土品とキシュ出土品を比較すると、以下の点が指摘できる。すなわち、1）閉塞器形小型容器はそれほど多くなく、2）開放器形容器が比較的多く、台付杯や厚手のカットガラス容器などヴァリエーション豊富であり、3）ユーフラテス川以西の西アジアで作られた、いわゆるローマ／ビザンツ・ガラスがほとんど含まれない、である。ニネヴェなど北メソポタミア都市では、３～７世紀頃に年代付けられる、東地中海系の碗形容器が確認できる（写真１）。代わりに、キシュではカット装飾の碗形容器が多く見られることが対象的である。

層位的な発掘が行われたウェフ・アルダシール Veh Ardasir 遺跡出土ガラスを分析したネグロポンチによれば、

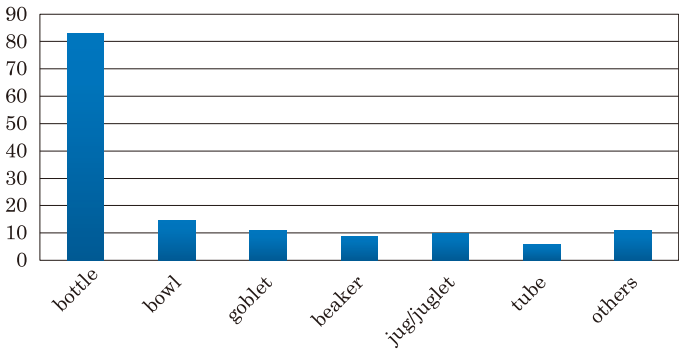


図４　北メソポタミア都市遺跡出土ガラス容器の器種組成

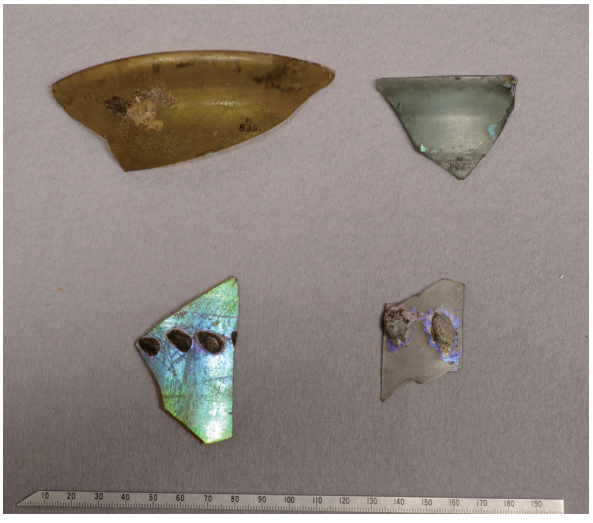


写真１　ニネヴェ出土東地中海系ガラス

3世紀前半に、吹きガラス産業が成立した。器形や装飾など製作技術は同時代の東地中海ガラスに準じ、長頸・短頸の小瓶が大半を占め、碗や鉢が大半を占めるという。当初、工具やモール型を用いたホットワークの加飾が中心であるが、4世紀以降、加飾技法はカットへ移行する。5世紀中葉に洪水被害にあい、都市が衰退する6世紀に至るまで、器形や装飾はほとんど変化がないという(Negro Ponzi 1983)。

上記のようなウェフ・アルダシールの状況は、大英博物館所蔵ニネヴェ遺跡の出土品と類似し、キシュ遺跡に大型容器が多く見られるのは同遺跡で検出された大型建物の帰属年代が6世紀に比定されていることと無関係ではないだろう(Harden 1934)。

ここで、ガラス容器の内容物について考えてみたい。まず、閉塞器形小型容器は、長頸・短頸で丸底・平底のものがあり、一般に香油瓶と考えられている。プリニウスが「軟膏はアラバスター製の箱に入れておくと一番持ちがよい」(「博物誌」13巻19)と記すように、ガラス容器に香油を保存するのは、ガラスの持つ耐酸・耐アルカリ性や気体や液体を通さない性質を利用し、劣化しやすい香油の酸化を防ぐためである。実際、伝イラン北部古墓由来のガラス容器には、アラバスターの縞文様を写したガラス容器が知られている。

一方、北メソポタミアのニネヴェでは、地中海周辺地域に特徴的なクフル(アイライナー)容器の在地模倣品が見られるなど、西方からの文化流入が顕著であったらしい。こうした地中海方面からのクフル、香油などの化粧文化はどのような人々が持ち込んだのだろうか。

シンプソンは、ニネヴェにはキリスト教会やユダヤ教のシナゴーグがあった可能性を指摘している。また、写真1下段のガラス容器片2点は、東地中海周辺地域で4世紀頃用いられたランプと考えられている。メソポタミアでは、ニネヴェとウェフ・アルダシールの2遺跡で出土が確認でき、いずれもキリスト教会が所在していた(Simpson 2005)。



写真2　ニネヴェ出土クフル容器

報告者はかつて、サーサーン朝のガラスと銀器がそれぞれ、器形や文様に類似性が低いことを指摘した(四角 2016)。こうした相違には、それぞれの使用者と場面の違い、すなわち、地中海周辺地域の文化に親しんだ人々が主に用いたガラス容器と、イラン固有の文化の場面で用いられた銀器といった違いが想定できるのではないか。

今回分析の対象としたキシュでは、東地中海方面から搬入ガラスは見られない理由については、1)中南部メソポタミアにまでは地中海方面からの香油やクフルなどの化粧文化が浸透していなかった可能性、2)分析に使用した遺跡の存続年代の違い、が想定できるが、層位的な発掘が行われた遺跡が少ない現状では、前者の可能性を指摘しておくに止まる。今後、許可を得た全点について資料化作業と分析可能な資料については蛍光X線分析を行うことで、メソポタミア全域における実態を明らかになるだろう。

5．総　括

地中海方面からの香油やクフルといった化粧文化の流入を跡付けるべく、中部メソポタミアのキシュ遺跡出土品の調査を中心に行った。予想に反して、キシュでは比較的大型の飲用器が多数見られた事実は、サーサーン・ガラスと地中海方面からの文化流入を考える上で重要である。閉塞器形小型容器の内容物は油だったと考えられる。メソポタミアにおける油はゴマ油が一般的であるが、サーサーン朝時代にゴマ油生産が飛躍的に増大したという記録はないことから、地中海周辺地域から流入したオリーブ油やオリーブ油をベースとした香油がその内容物だったと解釈できる。ローマ・ビザンツ帝国とサーサーン朝は政治的に対立しあったが、香油やアイシャドウといった化粧文化はユーフラテス川を越え、東へと波及していったのだろう。

層位的な情報を持つウェフ・アルダシール遺跡では、3世紀半ばの最下層から6世紀に至るまで器種組成に変化がないことが報告されている。大英博物館所蔵の北メソポタミアを中心とする都市遺跡出土品の器形はウェフ・アルダシール遺跡の器種組成に準じていたことから、筆者はサーサーン朝において「ガラス容器は香油やワインなど地中海的要素の強い文化と強固に結び」ついて成立し、その性格を変えることはなかったと解釈してきた。しかし、本研究で明らかとなったキシュ遺跡出土品からは、地中海文化的要素は南北メソポタミアで温度差があることを示しており、再検討する必要があることが判明した。今後は、サーサーン朝領域で活動したキリスト教徒やユダヤ教徒の動向について検討する中で、サーサーン・ガラスの成立と展開について考察していきたい。

（主要参考文献）

1） Harden, D.B. “Glass from Kish,” in S. Langdon and D. B. Harden, ‘Excavations at Kish and Barghuthiat 1933’, Iraq 1: 131–36. 1934
2） Negro Ponzi, M. ‘Glassware from Choche（Central Mesopotamia)’. Arabie orientale, Mésopotamie et Iran méridionale de láge du fer au début de la période islamique, R. Boucharlat and J–F Salles（ed.), Editions Rocherche sur les Civilisations, 33–40. 1984
3） Simpson, St.J ‘Christians at Nineveh in Late Angiquity’. Iraq 67/1: 285–294. 2005
4） 小寺智津子『ガラスが語る古代東アジア』同成社、2012
5） 四角隆二「岡山市立オリエント美術館所蔵突起装飾ガラス碗をめぐる考察」『岡山市立オリエント美術館研究紀要』28、1–11 頁。岡山市立オリエント美術館、2014
6） 四角隆二「古代末期、東方拡散したサーサーン・ガラスの二面的性格」シンポジウム「古代西アジアと人類史における『グローバリゼーション』」要旨集、2016
7） 由水常雄「古代のガラス」「世界ガラス美術全集 1　古代・中世」求龍堂、1992

認知症の妻・母へスキンケアをする男性の特性

福岡大学医学部看護学科
西尾　美登里

This study aim to confirm the characteristics of male caregivers who provide skin care a mother or wife with dementia living at home. Participants were 90 male caregivers of a female family member with dementia who living at home. The study period was from May 2017 to January 2018 .We investigated the actual state of skin care and, nursing care burden. We assessed care burden using the question “Do you have a physical, emotion, social, or financial care problem?” and the Zarit Caregiver Burden Scale-8. Participants self-esteem was assessed using the Rosenberg Self Esteem Scale and the question “Do you have fun in your life?”

Caregivers who were the husband of the care recipient tended to be older. Those who were sons of the care recipient tended to be long-team caregivers, their care recipient (mother) tended to be older. Care recipients who were wives received more skin care.

Male caregivers that provide skin care had higher self-esteem than those that did not.

We found that male caregivers who were husbands wanted their wife to look beautiful or healthy. The key characteristic of male caregivers is treat oneself and mother or wife dementia.

1．緒　言

わが国では、人口構成の変化や社会的要因の変化に伴い、家族の介護役割を担う続柄は大きく変化している[1)]。家族の主介護者は、従来女性の役割とされてきたが、男性の主介護者の割合は、1999年では18.6％から2016年では34.0％と[2)]、約15年で50％程度増加している。男性の家族介護者は、介護者役割の継続において、慣れない介護への問題を抱えているが[3, 4)]、男らしさに固執するため、弱音を吐かないことが報告されている[5)]。

介護が原因での殺人事件の量的研究によると[6)]、殺人事件の原因の第3位に介護が挙げられる。続柄で最も多いのは夫が妻を殺害する事件であった。また、加害者は72.3％が男性であり、被害者の74.3％が女性であった。これらの数値からも、特に家族を男性が介護することは、困難を抱えていると言わざるを得ない。

在宅介護を継続するためには､男性介護者自身の身体的･精神的・社会的健康が必須であり、男性介護者の支援においては、医療だけで対応できるものではなく、男らしさの過剰な意識からの解放が、男性の健康に繋がると言われている[7)]。

自宅で女性の家族を介護する男性たちからは、スキンケアの方法や化粧品の使用方法について困惑している声が多く聞かれた。老年期の皮膚は、皮下脂肪が薄く、皮膚が脆弱である[8)]ため、適切なスキンケアや化粧をすることによりQOLが向上する[9)]。家族会や男性介護者の会などの集いにおいて、化粧をした妻に対し、男性介護者が手をさすり、頬をなで話しかけるなど愛情深く接している姿を目にすると、母や妻への化粧は、母や妻を健康的で若々しい状態に保ち、介護継続への意欲に繋がる効果があることが予想される。しかし日本においては、男性介護者のスキンケアの実態や、介護者としての役割受容との関係は明らかにされておらず、研究も見当たらない。

したがって当研究により、妻や母にスキンケアを実施する男性の実態と特性を明らかにし、母や妻にとってスキンケアの効果を検証する。



Characteristics of male caregivers, who provide skin care to a mother or wife with dementia

Midori Nishio

Faculty of Medicine School of Nursing, Fukuoka University

2．方　法

2．1．研究対象者

在宅で認知症の妻または母を介護する男性90名。

2．2．調査方法

自記式質問紙調査。

2．3．調査項目

2．3．1．対象者の基本属性：

介護者との続柄、年齢、就労の有無、経済状況、介護期間、自尊感情　要介護者へ実施するスキンケアの有無と所要時間と頻度、介護において身体的・精神的・社会的・経済的困難感、楽しみの有無。

2．3．2．対象者が介護している要介護者の基本属性：

年齢、診断名、介護保険制度における介護度。

2．3．3．使用尺度

介護者の介護負担感：Zarit介護負担尺度日本語版にて測定した（Zait Caregiver Burden lnterview：以下J-ZBI_8)。荒井らによって日本語版に翻訳された22項目のJ-ZBI10）を8項目[10,11]の短縮版として開発された。介護をストレッサーとしたときの負担感を測定するものである。介護そのものによって生じる項目と介護を始めたために生じる負担，全体的な介護負担感を問うものである。回答は、「思わない」「たまに思う」「時々思う」「よく思う」「いつも思う」の5件法で、32点満点である。

自尊感情[12,13]：ローゼンバーグの自尊感情尺度日本語版（Rosenberg Self Esteem Scale：以下（RSES-J））にて測定した。当尺度は10項目で構成されている。国外において最も多く用いられている尺度である。国内において2007年に日本語版において信頼性・妥当性が検証されている。回答は「全くあてはまならない」「あてはまならない」「あてはまる」「非常にあてはまる」の4件法で40点満点ある。

2．3．4．分析方法

項目ごとに基本統計量を求め平均値と標準偏差を用いた。妻と母の連続係数の群の差はt検定、加えてスキンケアの有無においてX^2とマンホイットニーのU検定を用いた。解析にはSPSS 23.0J for Windowsを用い有意水準は5%とした。

2．3．5．倫理的配慮

福岡大学医の倫理審査委員会の承認を得て行われた（承認番号　2017M040)。対象者には，研究協力を依頼する際は，研究の趣旨，協力の任意性，被験者にならなくても不利益がないこと，守秘義務，学術誌などで発表することなどを調査の依頼文に明記した。調査票の返送をもって調査への同意とみなした。

3．結　果

3．1．在宅で認知症の人を介護する男性の概要

要介護者との続柄は、妻は55名(61%)、母は35名(39%)で妻を介護する男性が多かった。平均年齢は、妻を介護する男性は75歳(SD 6.6)、母を介護する男性は66歳(SD 9.4)であり、全体は72歳（SD 8.9）であった。有意に妻を介護する男性が高齢であった。仕事を有する男性数と経済状況において、妻介護男性群と母介護男性群の差はなかった。介護における身体的困難感がある男性は55名（60.4%)、精神的困難感がある男性は69名（75.8%)、社会的困難感がある男性は35名（38.5%)、経済的困難感がある男性は29人(31.9%)であった。楽しみを有している男性は74人(81.3%)であった。介護負担感の平均得点は、差はなかった。介護期間と1日の介護平均時間は、有意に妻を介護する男性が長かった。

情緒的支援平均数において、妻と母の属性や家庭内外との差はなかった。自尊感情平均総得点はスキンケア実施群が有意に高かった(表1)。

3．2．在宅で生活する認知症の女性の概要

被介護者の平均年齢は、妻は73歳(SD 6.6)、母は89歳（SD 6.2）で有意に母が高齢であった。被介護者の認知症の診断名は、妻はアルツハイマーが最も多く、次いでレビー、前頭側頭型の順であった。母はアルツハイマーが最も多く、次いでレビー、脳血管型の順であった。介護保険における要介護度は、妻は最も要介護3が多く、次いで要介護5であった。母は最も要介護4と5が多かった(表2)。

3．3．妻と母へのスキンケアの有無と頻度

スキンケアを実施している男性は45名（49.5%）で、妻介護群は34名(62%)、母介護群は11名(32%)と有意に妻がスキンケアを受けていた。スキンケア実施の頻度は、妻介護群は「毎日」が最も多く53%、次いで「外出時のみ」が29%、「週に数回」が18%であった。母介護群は「外出時のみ」が最も多く46%、次いで「毎日」が36%、「週に数回」が9%などであり、妻は母よりもスキンケアを受ける頻度が高かった(表3)。

3．4．スキンケアを実施する男性の特性

スキンケア実施群は未実施群よりも困難感が低かった。介護における負担感では、群間差が見られなかった。自尊感情はスキンケア実施群が有意に高く、楽しみはスキンケア未実施群が有意に有していた(表4)。

4．考　察

4．1．在宅で認知症の異性を介護する男性の属性

要介護者の続柄と各年齢や介護期間から、後期高齢者の息子が母親を7年以上介護していることを示し、後期高齢者の夫が年下の妻を4年以上介護していることを示している。息子介護者に着眼すると、50代後半で家族介護者という家庭内での役割を担ったこととなる。現在の日本における定年の平均は、60歳が79.3%、65歳が16.4%であることから[14]、息子介護者は、社会的役割を担ったまま母の介護が始まった可能性が高い。今後の定年となる年齢は、60歳定年が79.3%と前年度80.7%から減少し、65歳定年が16.4%と前年度より1.2%増加、加えて66歳以上定年導入の企業は1.4%と前年度より0.4%増加していることから、長く社会で勤務できる体制が創られることが予想される。社会的な役割を担う年齢が高齢化するとなれば、年齢が高くなるほど介護リスクが高まり、介護と仕事の問題に直面する人数も増加することを示唆する。2012年度の就労状況基本調査では[15]、介護や看護を理由に離職や転職をした介護者が増加している。つまり、介護により退

表１　在宅で認知症の人を介護する男性の概要

項　目			n	結果（%）
続柄（人）		妻	55	(61.0)
		母	35	(39.0)
年齢（歳）	妻		75	SD 6.6 ┐**
	母		66	SD 9.4 ┘**
	総計		72	SD 8.9
職の有無	妻	有職	21	(38.1)
		無職	34	(39.0)
	母	有職	15	(42.8)
		無職	20	(39.0)
困難感		身体的	55	(60.4)
		精神的	69	(75.8)
		経済的	35	(38.5)
		社会的	29	(31.9)
私は楽しみを有している（人）			76	(83.5)
一日の介護時間（時間）	妻		4.0	SD 1.2
	母		3.4	SD 1.4
平均介護負担感*	妻		10.5	SD 5.1
	母		12.8	SD 1.2
情的支援者数	妻	家族内	3.73	(2.4)
		家族外	3.27	(2.2)
	母	家族内	4.00	(2.3)
		家族外	3.70	(2.1)
経済状態（人）	妻	十分に生活できる	26	(47.3)
		生活には支障ない	25	(45.6)
		支障あり	4	(7.2)
	母	十分に生活できる	16	(45.7)
		生活には支障ない	18	(51.4)
		支障あり	1	(2.9)
平均介護期間(月)	妻		48	SD 42.6 ┐**
	母		89	SD 6.2 ┘**
平均自尊感情(点)	妻		23.8	SD 4.6
	母		24.9	SD 1.8

＊Japanese version of the Zarit Caregiver Burden Scales Student's-test　*$p < 0.05$　SD：標準偏差

表２　在宅で生活する認知症の女性の概要

項目			結果 (%)		
平均年齢（歳）	妻		73	SD 6.6	**
	母		89	SD 6.2	
認知症の診断名	妻	アルツハイマー型	28	(50.9)	
		レビー小体型	18	(32.7)	
		前頭側頭型	6	(10.9)	
		脳血管型	3	(5.5)	
	母	アルツハイマー型	19	(54.3)	
		レビー小体型	10	(28.6)	
		前頭側頭型	1	(2.8)	
		脳血管型	5	(14.3)	
	妻	要支援	3	(5.5)	
		要介護1	6	(10.9)	
		要介護2	5	(9.1)	
		要介護3	13	(23.6)	
		要介護4	8	(14.5)	
		要介護5	16	(29.1)	
		申請なし	4	(7.3)	
	母	要支援	3	(8.5)	
		要介護1	0	0.0	
		要介護2	4	(11.4)	
		要介護3	7	(20.0)	
		要介護4	8	(22.9)	
		要介護5	8	(22.9)	
		申請なし	5	(14.3)	

Note. Care support is a less intensive level of support required than care need. The numbers refer to increasing levels of care required.
Student's-test *p<0.05

表３　スキンケアの有無と頻度

項目			n	結果(%)	
続柄					
スキンケアを受けている人	妻		34	(62.0)	**
	母		11	(32.0)	
順位					
ｽｷﾝｹｱの頻度	妻	1 毎日		(53.0)	**
		3 週に2.3回		(10.9)	
		2 外出時のみ		(18.0)	
	母	2 毎日		(36.0)	
		3 週に2.3回		(9.0)	
		1 外出時のみ		(46.0)	

Mann-Whitney U test　** : P<0.01

表４　スキンケアを実施する男性の特性

項目	スキンケアをしていますか?		X^2
	はいn=36	いいえn=48 (%)	
身体的困難感がありますか（人）	はい 24(66.7)	33(68.8)	p＜0.001
	いいえ 12(33.3)	15(31.2)	
精神的困難感がありますか（人）	はい 27(75.0)	44(91.7)	p＜0.001
	いいえ 9(25.0)	4(8.3)	
社会的困難感がありますか（人）	はい 16(44.4)	20(41.7)	p＜0.001
	いいえ 20(55.6)	28(58.3)	
経済的困難感がありますか（人）	はい 13(36.1)	17(35.4)	p＜0.001
	いいえ 23(63.9)	31(64.6)	
楽しみを有していますか（人）	はい 35(97.3)	41(85.4)	p＜0.001
	いいえ 1(6.7)	3(6.2)	
		(SD)	Z値
介護負担感平均得点（点）	38.99(8.7)	45.14(7.4)	-1.145 n.s.
自尊感情平均得点 （点）	50.63(11.1)	35.39(12.6)	-2.894 ＊

X^2: individual variable of comparison between skin care and not.
J-ZBI: Japanese version of the Zarit Caregiver Burden Scale -8
RSES-J:Japanese version of the Rosenberg Self-Esteem Scale.
*: p＜0.05　　n.s.: not signinficant

職せざるを得ない息子介護者が今後増加する可能性がある。母親を介護する息子の年齢は40歳～60歳で有職者である現状[16]から、特に母を介護しながら仕事を有する息子介護者に着眼し、介護役割を担う中で問題を抱えていないか、周囲は注意深く観察する必要がある。現在、介護が原因の虐待の加害者は男性が7割で、続柄の4割以上が息子介護者である[6]。離職すると貧困となるリスクは否めず、貧困は医療とのつながりが希薄となり生活破綻や社会的孤立の原因となる可能性がある[17]。従って男性介護者の中でも特に息子介護者へ焦点をあて、仕事と介護を継続するための支援が必要と考える。

４．２．母と妻が受けるスキンケアの効果

お世話をする家族が男性の場合、続柄において、母よりも妻のほうがスキンケアを受けている実態が明らかになった。スキンケアの一部である化粧の効果は、見た目や本人の気持ちを若くし、見た目の若さは内臓機能とは有意な相関を示すことから、スキンケアは健康であることにも影響を与えているとされる[18]。これらから、介護している男性への心理的効果は、妻は母よりも、認知症の家族である異性へ美しく若々しくいてほしいという気持ちを、スキンケアにより投影されていると考えられる。また、社会的コミュニケーションを、スキンケアの中の化粧は円滑にすることや[19,20]、社会的な治療効果を期待されることから[9]、認知症の妻は母よりも、日常の中で、外部ともコミュニケーションを図られている可能性があると考える。

４．３．スキンケアを通して看る男性の特性

化粧の身体的効果は、化粧前よりも脳波のパターンが有意に安定化し、不安定となったニューロン活動を安定化させる効果があり[21]、皮膚からの感覚刺激は、記憶や人間特有の高次機能を活性化する効果により神経活動が安定することから[22]、認知症者特有の不安定な神経活動による行動を軽減する可能性がある。不安定な神経活動による問題行動によって、つい手を挙げてしまいたくなる被介護者について、[高崎]らは、ストレス反応を軽減する目的で対処して、現実は問題解決せずストレス反応と悪循環すると述べ[23]、スキンケアは認知症者の問題行動の抑止力となり、男性の介護者への問題解決となる可能性がある。

スキンケア実施群と未実施群において、身体的介護困難感、精神的介護困難感、社会的介護困難感、経済的介護困難感の差があるにも関わらず、介護負担感においては差がみられない。説明がつかないようにも思えるが、Pearinのストレスモデルで考えると、介護負担感は介護ストレッサ

ーを測定するものであり、心身の健康や社会や経済の困難の有無は、介護役割を継続する資源を測定する項目とも考えられる。従ってスキンケアを実施する男性はしない男性よりも、介護を担う資源に恵まれている可能性がある。また、スキンケア群は有意に自尊感情が高かった。自身の自尊感情が高いことは、内的な強さを持ち、内面的強さは、優しさや生き方を認知するという結果[13]から、認知症である異性へ思いやりを持ち介護生活を継続していると考える。

5．総　括

認知症の妻は母よりも有意にスキンケアを受けていることが明らかとなった。認知症の妻は母よりも家庭内外でコミュニケーションが図られ、スキンケアを実践する夫は愛情深く認知症の妻を介護している可能性がある。一方で、認知症の母を介護する息子介護者は、介護と仕事の両立で悩み、仕事の継続に困難を抱えている可能性がある。

当研究において、介護に問題を抱えていないかなどを見極める指標の一つに、スキンケアがあると考える。スキンケアは認知症者の問題行動の抑止力となり、男性の介護者への問題解決の一助となる可能性がある。

6．当研究の限界

今後は、仕事の有無や年齢の違い、介護の経験などの異なる対象についても調査、比較検討することが必要であると考える。更に対象者を増やし、介護による虐待防止と共に介護離職防止に向けた取り組みが必要であると考える。

謝　辞

当研究は、コスメトロジー研究振興財団による研究助成により実施された。当研究にご協力いただいた家族会やクリニックの皆様、男性介護者の皆様へ心からお礼申し上げます。

（引用文献）

1）津止正敏：家族介護支援のリアリティ ―男性介護者研究から提言―, 高齢者虐待防止研究, 5：32–38. 2008.
2）厚生労働省統計情報・白書(2013)「国民生活基礎調査」(http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/k–tyosa/k–tyosa16/dl/05.pdf, 2018. 7.4).
3）金子克子, 彦聖美, 鈴拓恵：在宅医療助成報告「男性介護者を地域で支える方略に関する調査研究」, 公益財団法人勇美記念財団, 東京, 2010.
4）永井邦芳, 堀容子, 星野順子ほか：男性家族介護者の心身の主観的健康特性, 日本公衆衛誌, 58(8)：606–615. 2011.
5）奥田祥子：男性漂流 第1版, 第講談社＋α, 東京. 2015.
6）湯原悦子：介護殺人から見出せる介護者支援の必要性, 日本社会福祉大学社会福祉論集, 134：9–30. 2016.
7）彦聖美　大木秀一：男性介護者の健康に関連する社会的決定要因と支援の方向性, 石川看護雑誌, 13：1–10. 2016.
8）根来佐由美, 葉山有香, 井上智子：地域女性高齢者の皮膚の乾燥状況と乾燥にに関連する生活習慣の実態, 日本健康医学雑誌, 21（4）：237–243. 2013.
9）カルデナス暁東, 西尾ゆかり, 福井奈央ほか：わが国の医療現場におけるメイクセラピーの応用に関する文献検討, 大阪医科大学看護研究雑誌, 3：69–77. 2013.
10）Arai Y, Kudo K, Hosokawa T, et al：Reliability and validity of the Japanese version of the Zarit Caregiver Burden Interview. Psychiatry and Clinical Neuroscience, 51：216–226. 1997.
11）荒井 由美子, 田宮 菜奈子, 矢野 栄二：Zarit 介護負担尺度日本語版の短縮版（J–ZBI_8）の作成 その信頼性と妥当性に関する検討, 日本老年医学会雑誌, 40（5）：497–503. 2003.
12）Coopersmih S：The antecedents of self–esteem, W. H Freeman, 1967.
13）遠藤辰雄, 井上祥治, 蘭千壽：セルフエスティームの心理学 第8版, ナカニシヤ出版, 京都. 2007.
14）厚生労働省（2017）「就労条件総合調査」(https://www.mhlw.go.jp/toukei/itiran/roudou/jikan/syurou/17/index.html,2018.7.3）.
15）総務省統計局（2012）「就労状況基本調査」(http://www.stat.go.jp/data/shugyou/2012,2018.7.7).
16）彦聖美, 鈴木祐恵, 金川克子ほか：高齢期の妻や親を介護する男性の介護状況に関する実態調査, 石川看護雑誌, 10：37–46. 2013.
17）藤田孝典：下流老人 第13版, 朝日新書,（東京）2015.
18）小原克彦：中・高年の見た目年齢の解析, コスメトロジー研究報告, 24：59–171. 2016.
19）茂木健一郎：化粧する脳 第1版, 集英社, 東京. 2009.
20）大坊郁夫, 高木修：化粧行動の心理学 化粧する人間のこころと行動, 北大路書店, 京都. 2009.
21）町田 明子, 白土 真紀, 高田 定樹ほか：脳波を用いた高齢者に対する化粧療法の効果検証, 老年精神医学雑誌, 23（8）：978–987. 2012.
22）町田明子：脳波を中心とした生理学的指標による化粧療法の効果検証, 東京工業大学, 平成25年度学位論文, 東京. 2013.
23）高崎絹子：実践から学ぶ高齢者虐待の対応と予防 第1版, 日本看護協会出版会, 東京. 2010.

香りの記憶形成・固定化メカニズムの解明

同志社大学研究開発推進機構
眞部　寛之

It is known that the odor memories are associated with not only what the odor is but also the episode that experienced when we smelled the odor. However, the neural mechanism of association between an odor and the episode is still unclear. The piriform cortex, a major part of the olfactory cortex, is known as an association cortex integrating incoming olfactory sensory information from the olfactory bulb with top-down input from higher regions such as the orbitofrontal cortex. To reveal the neural mechanisms of association memory between an odor and the episode when the odor was experienced, we recorded the neural activities in the anterior piriform cortex (aPC) of freely moving rats performing an odor-guided go/no-go task and its reversal learning task. To reveal memory consolidation mechanisms of the aPC, we recorded the neural activities during the pre- and post-task sleep.

We found that many aPC neurons fired during the odor presentation period and the specific behavioral scene during the odor-induced behavioral go/no-go events, such as the moving to the reward port scene, the consumption of rewards scene, and so on. Such the odor-scene responsive aPC neurons were tuned to a smaller scale scene within each behavioral scene. After rats learned the reversal task, many aPC neurons respond to the reversed odor-scene combinations. We also found that the odor-scene responsive neurons reactivated associated with the olfactory cortex sharp-waves.

These results suggest that the odor-scene responsive aPC neurons have an important role in the memory formation and the consolidation between the odor inputs and the top-down scene signals related to the odor-guided learned behaviors.

1．緒　言

匂いの記憶は、単にその匂いがどのような匂いであるかだけでなく、そのときに経験したエピソードも含めて想起されることは我々の日常生活においてもよく経験することである。この匂いと連合した経験によって、例えば、特定の香水に対する愛着などがおこると考えられる。匂いによって過去の経験が想起される心理現象は、「プルースト効果」と呼ばれている[1)]。この名前は、フランスの小説家、マルセル・プルーストの著書『失われた時を求めて』の中に、主人公が紅茶に浸したマドレーヌを口にした時、幼少期の体験が鮮明に思い出されるという有名な一節がもとになっている[2)]。小説では、主人公がマドレーヌの芳醇な香りによって過去の経験（エピソード）を思い出すが、このたった一度の経験でも起こりうる、匂いとエピソードとの連合学習と想起システムの脳内機構は全く不明である。

1991年に嗅覚受容体が発見され[3)]、嗅覚系の研究は急速に発展し、嗅覚受容体を発現する嗅上皮や1次中枢である嗅球での情報処理の基本ロジックは明らかとなってきた。しかし、嗅球からの情報が統合される嗅覚2次中枢の嗅皮質が持つ機能は未だほとんど解明されていない。本研究の第一の目的は、匂いとエピソードを繋ぐ連合記憶の神経回路機構を明らかにすることである。我々は嗅皮質の中でも、嗅球からの嗅覚情報と、高次領域からのトップダウン入力を受ける梨状皮質に着目した。匂いを手掛かりとした行動学習課題遂行中のラット梨状皮質からリアルタイムに神経活動をモニターすることで、匂いとエピソードの連合学習における梨状皮質の役割を検討した。

記憶の固定化研究は海馬で進んでおり、海馬においては、経験時の活動パターンがその後の睡眠時（オフライン時）に、鋭波と呼ばれる特徴的な脳波に伴って繰り返し再現される（再活性化される）ことで記憶が固定化されると考えられている[4)]。

我々は近年、徐波睡眠時のラット嗅皮質において、海馬とよく似た特徴を持つ鋭波が観察されることを発見し、嗅皮質鋭波と名付けた[5)]。嗅皮質鋭波の出現と同時に、特定の嗅皮質ニューロン群が発火活動を起こすことから、海馬と同様に、嗅皮質鋭波上で睡眠直前に経験した神経活動パターンが再活性化されている可能性がある。本研究の第二の目的は、徐波睡眠時の嗅皮質鋭波上で再現される情報とその様式を明らかにすることで、匂いとエピソードの長期固定化機構を明らかにすることである。匂いを手掛かりとした行動学習課題遂行後の睡眠中、梨状皮質で匂いとエピソードの記憶に関わるニューロンが、再活性化するかどうかを検討した。



Neural mechanisms of odor memory formation and consolidation
Hiroyuki Manabe
Organization for Research Initiatives and Development, Doshisha University

2．方　法

2．1．匂いを手掛かりとしたgo/no-go行動学習課題と逆転学習、課題前後の睡眠

本実験のすべては、同志社大学動物実験等の実施に関する規定に従い、同志社大学動物実験委員会の審査を受け、学長の承認を得た上で実施したものである。

実験には、雄のLong-Evans Rat（清水実験材料）成獣を用いた。匂いが出る匂いポートと、水報酬が出る水ポートが壁に設置されているオペラントボックス（自作）にラットを入れた。ラットが匂いポートに鼻を入れると、0.5秒間匂いを提示し、匂いの内容に応じて2種類の行動を学習させた（図1A）。

・go行動：匂いAの提示後、2秒以内に水ポートに鼻を入れて水報酬を得る。
・no-go行動：匂いBの提示後、水ポートに鼻を入れず2秒間待つ。

go行動では、2秒以内に水ポートに鼻を入れられなかった場合、no-go行動では2秒間待てなかった場合、次試行に移行するまでに2秒間の遅延罰を与えた。go試行とno-go試行はランダムに提示し、1日に1セッション、数百試行を行わせた。タスクの制御はコンピューター制御で自動化して行った（Bpod、Sanworks）。匂いの制御は自作オルファクトメーターを用いて行った。オルファクトメーターはタスク制御装置によってコンピューター制御できるようにした。使用する匂い分子は様々な化合物またはその混合物を使用し、実験ごとに変えた。

逆転学習は、上記の匂いを手掛かりとしたgo/no-go行動学習成立後、刺激－報酬の連合関係を、セッションの途中で、匂いA → no-go行動、匂いB → go行動の関係に突然入れ替えることによって行った。

徐波睡眠中のニューロン活動をモニターするために、行動学習課題の前後にラットをオペラントボックスに入れたまま1-2時間放置し、ラット睡眠中（前睡眠、後睡眠）の前梨状皮質ニューロンの活動を記録した。

2．2．電気生理とデータ解析

ケタミン（67.5mg/kg）およびメデトミジン（0.5mg/kg）にて麻酔したラットの前梨状皮質に15本のテトロード電極を挿入する手術を行った。テトロードは直径12.5μmのタングステンワイヤー（California Fine Wire）を4本束ねたものを使用した。テトロードは自作マイクロドライブに取り付け、マイクロドライブ上のケーブル接続用基盤に接続した。マイクロドライブは、ネジを動かすことで電極の深度を変えられる装置であり、日々深度を変えることで、多くのニューロンの活動を記録できる。これをラット頭部に設置でき、ラットの行動を制限しないサイズに設計した。

ラット頭蓋骨に穴をあけ、テトロードを真っ直ぐに下ろして前梨状皮質に到達させた。マイクロドライブは接着剤を用いて頭蓋骨に固定した。グランドとリファレンスのために、小脳上の骨にビス電極を埋め込んだ。

1週間以上回復期間を設け、その後、匂いを手掛かりとしたgo/no-go行動学習課題と逆転学習を遂行中、またその前後の睡眠中、前梨状皮質のニューロン活動を記録した。記録は、多チャンネル記録システム（NeuralynxまたはOpenEphys）を用いて行った。ユニットレコーディング用のサンプリングレートは32kHz（Neuralynx）または30kHz（OpenEphys）であり、取得したシグナルはバンドパスフィルター（600-6000Hz）をかけた。セッション終了後、テトロード電極を40μmまたは75μm下すことで、日々新たなニューロン集団から記録した。

データは全てMatlab（Mathworks）を用いて解析した。記録したマルチユニットをオフラインにてスパイクソーティングすることで、シングルユニットとして解析した。

3．結　果

3．1．匂いを手掛かりとしたgo/no-go行動学習課題遂行中の前梨状皮質ニューロン活動の解析

学習が成立したラットは、匂いAが提示されれば、隣の水ポートに行き水報酬を獲得する行動を行い、匂いBが提示されれば、水ポートには行かず待つ行動を獲得した。この、go/no-go行動学習課題遂行中の前梨状皮質から多数のニューロン活動を記録した。前梨状皮質ニューロンは、行動時の様々な場面で応答した。その中で、記録した251個のニューロンのうち、138個のニューロンが、匂い提示区間と、その後の特定の行動状態（シーン）の2か所で応答することが分かった。図1Bは匂い提示シーンとその他シーンの2か所に応答するニューロンの例（3例）である。匂い提示後のどのシーンに対して応答するかはニューロンごとに異なっていた。図1Cは、匂い提示時に応答したニューロンが、その後のどのシーンで応答するかを示した図である。正解した試行のみを用い、各行がそれぞれのニューロンの活動パターンを示し、応答のピークが黄色になるようにカラーマップで示した。ニューロンを、応答のピークの順番に並べると、匂い提示後のすべてのシーンをカバーするように応答することが分かった（匂いが出るシーンの後、黄色い線が、ニューロン間で連続して続いているように見える）。また、匂いBに応答するニューロンは、水ポートに行かず待機するシーンのすべてをカバーするように応答することが分かった。すなわち、これらのニューロンは、匂い刺激と、特定のシーンとを連合するニューロンであると考えられた。

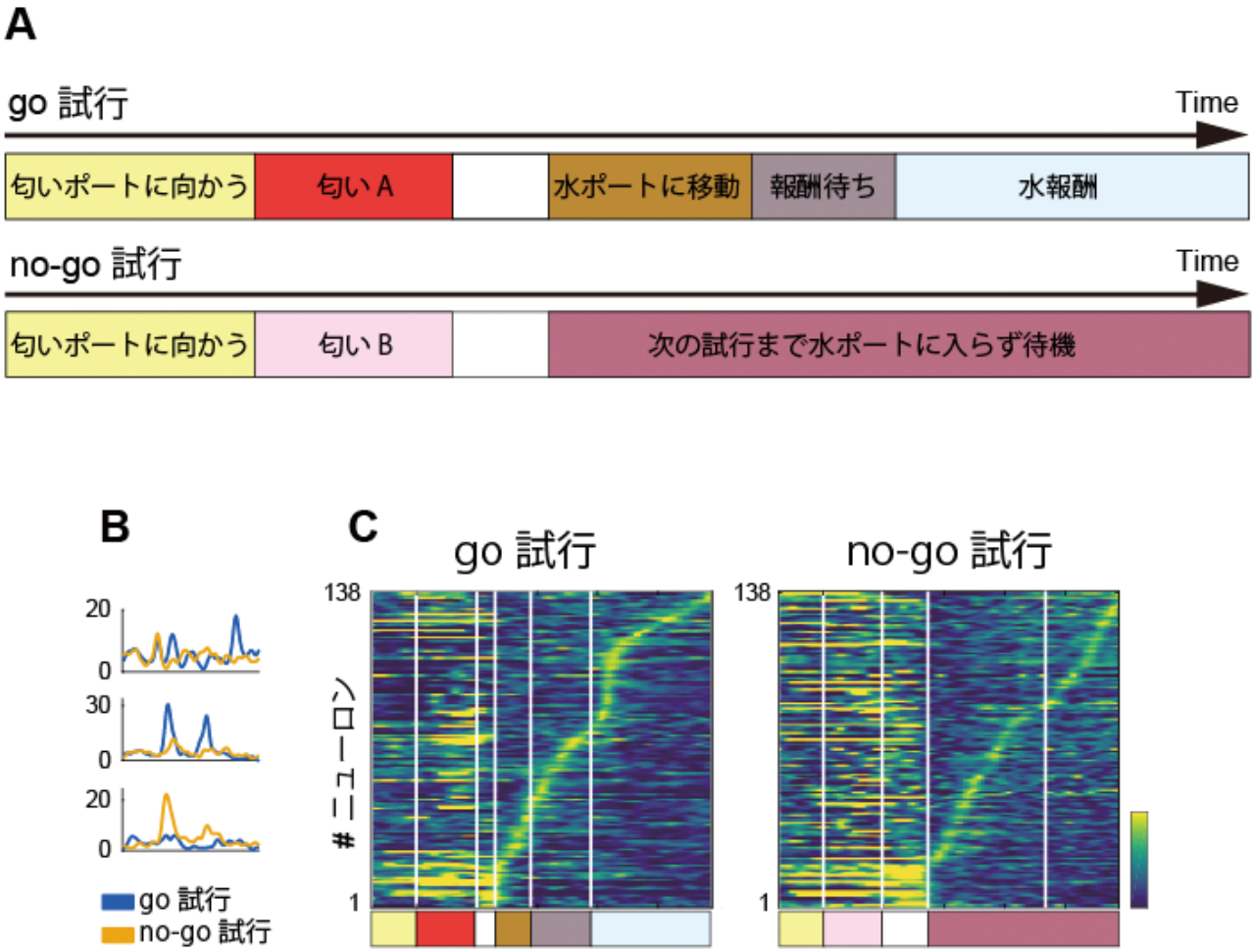


図 1　学習課題と aPC ニューロンの応答

A：匂いを手掛かりとした go/no-go 行動課題
B：課題遂行中の aPC ニューロンで見られた、匂い提示区間とその後のシーンの両方に応答するニューロンの例
C：匂いとその後のシーンの両方に応答するニューロンを、シーン応答のピーク順に並べたもの

3．2．go/no-go 行動学習課題の逆転学習時の前梨状皮質ニューロンの解析

匂いを手掛かりとした go/no-go 行動学習課題を充分に学習したラットを用いた。ある日のセッション中、刺激－報酬の連合関係を、匂い A → no-go 行動、匂い B → go 行動の関係に突然入れ替える逆転学習を行わせ、その際の前梨状皮質ニューロンの活動を継続的に記録した（図 2A）。刺激－報酬の連合関係を逆転されると、逆転直後には、それまでの学習で得られた行動を行うため正答率は落ちるが、ラットが新しいルールを学習すると共に正答率が上昇した。図 2B に、ある日の正答率を示す。安定した正答率（80％以上）が得られた段階で、匂いと行動との関係を逆転した（図 2B 赤線）。一旦正答率は落ちるが、数十試行後には高い正答率に達した（図 2B グレー線）。前梨状皮質の応答は、逆転学習前には、匂い A とその後の go 行動時の特定のシーンの両方に応答するニューロンが記録されたが（図 2C 左上、ここでは、匂いが出たあとのシーンのみを示している。）、逆転学習成立後には、匂い A とその後の no-go 行動時の特定のシーンの両方に応答するニューロンが記録されるようになった（図 2C 左下）。また、逆転学習前には、匂い B とその後の no-go 行動時の特定のシーンの両方に応答するニューロンが記録されたが（図 2C 右上）、逆転学習成立後には、匂い B とその後の go 行動時の特定のシーンの両方に応答するニューロンが記録されるようになった（図 2C 右下）。すなわち、逆転学習によって匂いと行動の新しいルールを学習すると、梨状皮質ニューロンの発火パターンも新しい刺激－行動の連合関係を構築することを意味しており、匂いとそれに紐づくシーンの両方に応答するニューロンの応答特性は、学習によって形成されると考えられる。

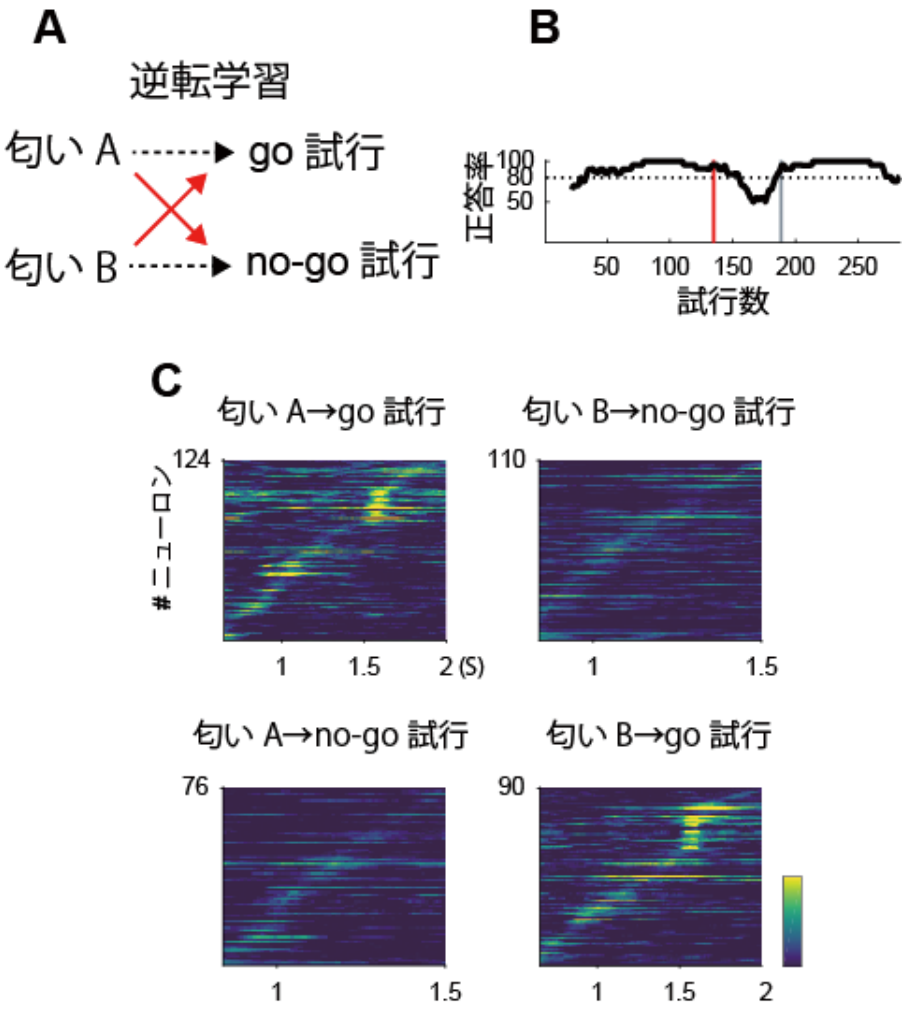


図２　逆転学習と逆転学習による aPC ニューロンの応答変化

A：逆転学習　試行途中から赤矢印の関係に突然変化する

B：逆転学習時の正答率の変化

C：逆転学習前後における、シーンに対する応答変化　上段；逆転学習前、下段；逆転学習後

３．３．課題後のニューロン再活性化の解析

匂いを手掛かりとした go/no-go 行動学習課題に加え、その前後の睡眠中の前梨状皮質ニューロンの活動も記録し、覚醒中の課題遂行時に活動したニューロンが、その後の徐波睡眠時に、嗅皮質鋭波に伴って再活性化するかどうかを検証した（図 3）。匂いを手掛かりとした go/no-go 行動課題中に、匂いとその後のシーンの両方に応答したニューロン２例を示す（図３真ん中のヒストグラム）。左右のヒストグラムは、それぞれのニューロンが課題前後の睡眠中、嗅皮質鋭波に同期して発火したかどうかを示すグラフである。0 を嗅皮質鋭波のトラフとして、鋭波のトラフ前後に発火したかどうかを多数の嗅皮質鋭波イベントの加算で表した。ピンクのラインを越えれば、統計的に有意に発火したといえる。これらのニューロンは、前睡眠中、嗅皮質鋭波出現時に同期した発火はほぼ見られなかったが、後睡眠では嗅皮質鋭波に同期して発火するようになった。すなわち、行動課題で発火した匂い区間とシーンの両方に応答するニューロンが、課題後の徐波睡眠中、ニューロン発火活動の再活性化を起こしたと考えられる。

４．考　察

本研究で見つかった、匂いとそれに紐づくシーンの両方に応答するニューロンは、匂いとシーンを連合する役割をもつニューロンであると考えられる。また、逆転学習の結果から、匂いとシーンの連合関係は学習依存的であると考えられる。各々の前梨状皮質ニューロンが異なるシーンに対して応答することから、前梨状皮質のニューロン集団で見ると、匂いとそれに紐づくシーンの集合である、エピソードを表象すると考えられる。すなわち前梨状皮質は、匂い情報とエピソードの連合学習の場である可能性がある。

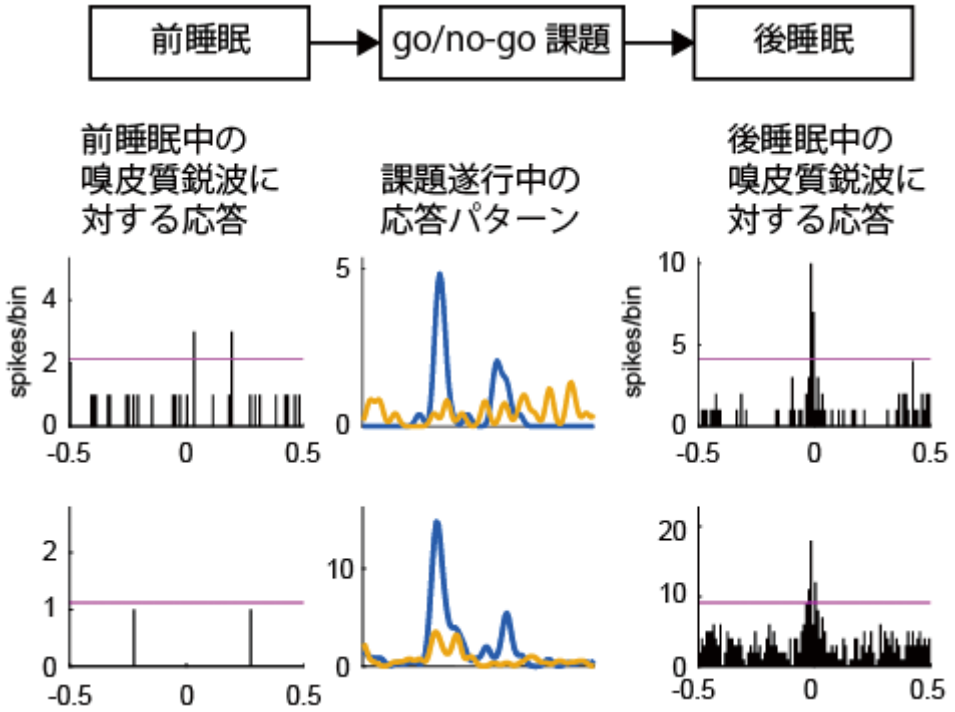


図3　課題前後の睡眠時における、匂いとその後のシーンの両方に応答する aPC ニューロンの再活性化

前梨状皮質は、嗅球から直接入力を受ける。また、嗅皮質亜領域同士が密に連絡しており、嗅覚情報は嗅球から直接、または他の嗅皮質亜領域経由で入力されるので、匂い提示区間での応答は、これらの経路からの入力であると考えられる。一方、シーン情報はどこから来るのか？最近我々は、内側前頭前野から直接入力を受ける ventral tenia tecta（VTT）と呼ばれる嗅皮質亜領域のニューロンが、様々なシーンに特異的に応答することを発見した[6]。前梨状皮質で見られたように、シーンに応答する VTT ニューロンを集めると、行動中のすべてのシーンに対応することが分かった。すなわち、VTT ではエピソードを表象することが分かった。前梨状皮質は VTT から直接入力を受けるため、シーンの情報は VTT から入力される可能性がある。また、前梨状皮質は眼窩前頭皮質からの直接入力を受ける。内側前頭前野と眼窩前頭皮質も密に連絡があり、シーン情報は眼窩前頭皮質から入力される可能性もある。

匂いとそれに紐づくシーンの両方に応答する前梨状皮質ニューロンは、課題後の徐波睡眠時、嗅皮質鋭波に伴って再活性化することから、嗅皮質鋭波は覚醒時の記憶の固定化に寄与している可能性がある。

5．総　括

これまでの嗅覚研究は、匂い情報をどのように獲得し、匂いがどのように脳で表現されるかについての研究が主であり、匂いがどのように記憶や行動に結びつくのかについてはほとんど不明であった。しかし近年、嗅球の基本的な回路機構が解明され、嗅球の次の高次領域である嗅皮質の機能に注目が集まってきた。嗅皮質は、嗅球からの匂い情報を統合するだけでなく、高次野からのトップダウン入力を受ける領野であり、匂い情報とトップダウン情報の連合の場であると考えられてきた。

本研究は、匂い情報とそれに紐づくエピソードとが前梨状皮質で連合するという新しい仮説を提唱するものであり、本研究を足掛かりとすることで匂い記憶の研究の発展に寄与したいと考えている。また、本研究は、これまで心理学的な考察しかされてこなかったプルースト効果を、神経科学的に解明する糸口になる可能性があり、今後の研究の発展が期待できる。今後は、オプトジェネティックスなどを導入し、匂いとシーンとの連合を阻害したときにどのような行動変化が起こるのかを明らかにしたい。

エピソードの想起は、単に起こったことを思い出すだけでなく、そのときの心理的な状況（楽しかったや悲しかったなど）も想起される。すなわち、エピソードには、情動や感情などの情報も内包されると考えられる。匂いの印象は大抵、何らかの情動や感情が伴うことが多い。本研究は匂いとシーンの連合に着目したが、匂いとそれによって起こる情動や感情などの連合も梨状皮質上で起こっている可能性があり、本研究を発展させることで、我々が嗅いだ匂

いに抱く印象がどのようにして起こるのか、その神経回路機構を明らかにできるかもしれない。

徐波睡眠時に起こる、嗅皮質鋭波での再活性化は、成立した記憶の固定化の場としての機能を持つと考えられ、この再活性化の阻害による記憶定着の阻害実験などを行いたいと考えている。また、今回の研究では、前睡眠→課題→後睡眠を通じて記録できたニューロンの数が少なく、再活性化のルールや、逆転学習後の再活性化様式などは不明のままであり、今後の研究で明らかにしたいと考えている。

今後、今回発見した匂いとエピソードの両方をコードするニューロンの連合学習様式と再活性化様式をさらに解明していくことで、匂い記憶とその固定化の神経機構の基本ロジックを明らかにしたい。

（引用文献）

1）Ernst A. The Proust Effect: The Senses as Doorways to Lost Memories. Perception. 43: 1404–1406, 2014.

2）鈴木道彦.『プルーストを読む―『失われた時を求めて』の世界』集英社新書. 2002 ISBN 978-4087201758.

3）Back L, Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. Cell. 65（1）: 175–187, 1991.

4）Wilson MA, McNaughton BL. Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. Science. 265: 676–679, 1994.

5）Manabe H, Kusumoto–Yoshida I, Ota H, Mori K. Olfactory Cortex Generates Synchronized Top–Down Inputs to the Olfactory Bulb during Slow–Wave Sleep. The Journal of Neuroscience. 31（22）: 8123–8133, 2011.

6）Shiotani K, Manabe H, Tanisumi Y, Murata K, Junya H, Sakurai Y, Mori K. Tuning of ventral tenia tecta neurons of the olfactory cortex to distinct scenes of feeding behavior. BioRxiv. doi: 10.1101/455089.

記念講演

第 29 回表彰・贈呈式記念講演　齋藤 美穂

（ステーションコンファレンス東京・平成 30 年 11 月 20 日）

日本人の白嗜好と、感性をつなぐ色彩



早稲田大学　常任理事
齋藤　美穂

さいとう・みほ
1985 年早稲田大学大学院文学研究科博士課程心理学専攻を修了、1996 年早稲田大学人間科学部助教授、2001 年早稲田大学人間科学学術院教授に就任。2010 年より早稲田大学理事、2018 年から早稲田大学常任理事、2019 年度より名誉教授。先生は、色白肌嗜好の心理学的研究、色彩嗜好の国際比較、色と香りの心理、生理学的効果など、色と香りを通して人の感性を独自の視点でご研究されておられます。
・専門分野：感性認知科学、色彩心理学
・その他：1993 年日本色彩学会色彩学論文賞、1991 年第 2 回コスメトロジー研究助成受賞

皆さまこんにちは、齋藤でございます。ただ今は、素晴らしいご紹介をありがとうございました。まずは、このような素晴らしい場所、そして懐かしいコスメトロジー研究振興財団の表彰式と記念講演でお話をさせていただきますことを、大変うれしく思っております。

今日お話をさせていただきます内容に関してでございますが、まずは研究の原点となりました色彩の好みの国際比較から始めたいと思います。国際比較を続けておりました時に、日本人が白に対して非常に高い嗜好を示すということが分かりまして、それを様々に研究しておりました時に、嗜好の構造、これは色彩の嗜好だけではなくて、嗜好というものの構造を検討することができました。そしてそれを検討した結果が、私どもの学位論文になりました。私は 1997 年に学位を取得したのですが、ちょうどその時に、第 2 代社長の小林禮次郎さんも早稲田大学で学位を取られて学位授与式をご一緒しました。そういった意味でも深いご縁を感じている次第でございます。学位を取る前のことですが、白に対する嗜好が高いということが、もしかすると色白肌への嗜好、すなわち色の白いは七難隠すという言い回しは、よく聞かれたことがあると思いますが、その嗜好の心理的背景、そういったものと何らかの関係があるかもしれないと思ったところから、そのような研究をしたいと思った時に、コスメトロジー研究振興財団からの助成金を頂戴して研究がスタートいたしました。その研究は、確か日本人の女子大生を対象とした研究でしたが、その後に日本とインドネシアでの比較をいたしまして、その研究を日本心理学会が発行する「心理学研究」で論文として発表いたしました。それがきっかけとなり、それをご覧になった企業の方から、今度は日本と中国で比較をしてみたいというオファーがございまして、企業との共同研究、これも始まったわけでございます。ですから、コスメトロジー研究振興財団からのこの研究助成が、私の研究の広がりを作ってくれたというように思っております。

もう一つ今日お話をさせていただきますのが、「感性をつなぐ色彩」というものでございます。今は企業でもどこでも、感性という言葉が非常に大切なキーワードになっております。その感性はもしかすると色彩というものがつなぎ目になるのではないか、そういう発想から、感性をつなぐ色彩の役割を検討しました。その中から、今日は、色と香りの調和関係による香りの可視化の研究、こちらのほうをご紹介させていただきたいと思っております。盛りだくさんでございますので、少しスピードを上げながら進めてまいります。

＊　　＊

さて、最初は色彩嗜好の国際比較の研究でございます。この研究は、日本を中心としたアジアの地域、そして欧米から幾つかの地域、そして南アフリカ共和国とオセアニアの地域、あと日系アメリカ人、在日米国人という方たちを対象に、こちらにございます同じ色見本を 1,000 人以上の方たちにご覧になっていただき、この中の好きな色と嫌いな色を選んでいただいて、その理由を聞くという調査でございます。非常に単純なものなのですが、そこのところに文化的なものが見え隠れするという、私もやっていて非常に面白い研究だと思いました。

その結果でございます。早速お見せしたいんですが、このスライドの図にあります左側のほうが嗜好色、そして右側のほうが嫌悪色になっております。嗜好された色に関して、日本、中国、韓国、台湾、インドネシア、アメリカ、ドイツ、デンマーク、オーストラリア、パプアニューギニア、南アフリカ共和国、日系アメリカ人、在日アメリカ人とございますが、ここで注意していただきたいのは、日本、中国、韓国、台湾、インドネシアというアジアの国において、白が嗜好色の上位に位置しているというところでございます。実際のところ日本で調べますと、40 ～ 50 年間ずっと、日本では白に対する嗜好が高いというのが、非常に特徴的なものでございました。それが果たして他のアジアの国にも共通するのかどうかということを調べた結果、やはり共通して白に対する嗜好が非常に高いということが分かりました。

もう一点、気をつけていただきたいのは、ここにどこの

地域にも共通して出てくる色があるんです。この色というのが、実は「ビビッドブルー」という「鮮やかな冴えた青」というものでして、この青というのが、どの国でもどの地域でも共通して好まれるという色でございました。これは私の色の好みの研究だけではなく、Faber Birrenという色彩学者がいるのですが、その方も青というのは、恐らく人類にとって普遍的な嗜好色であろうということを言っておりますし、それからCharles Winickという人が、様々な国でのタブー色を調べた研究がございまして、その研究の中でも、青は、唯一タブーにならなかった色ということでした。いろいろな国でコーポレートカラーでもこういった色が使われるのは、実はある意味、理にかなっているのかなと思えるぐらい、この青というのは、どの地域でも好まれる、受け入れられやすい色であるということが言えるかと思います。この2つの点に注目しながら、何回かこのような調査を繰り返してまいりました。その結果、空間や時間の変化にかかわらず、常に好まれる色と、常に嫌われる色、これが存在するということが分かりました。つまり10年後ぐらいに、もう一回同じところで調査をやってみますと、それでも共通して常に嫌われたり、常に好まれたりする色があるということなんです。その一方で、変化する好みもあるということ、すなわち普遍性と流動性が好みには存在するということが分かるわけです。恐らくその普遍性というのは、私たち人類に生得的に備わっている何かに関連しているんではないかというように思います。流動性というのは、学習とか経験による獲得的なもの、これに根付いているものではないかというように思うんですね。そこで嗜好の構造をモデル化し、嗜好を形成する要因と3層構造をモデル図にして学位論文で私が発表したものがこちらになります。その図のほうをご覧に入れたいと思います。

こちらがその3層構造でございます。まずは、おそらく人類にとって生得的な嗜好、それは快・不快感情による普遍的な嗜好、これが中心核にあって、その外側に年齢とか性とか個人的な要因、個体要因による個人的な嗜好があり、これは生得的、プラス獲得的。その外側に環境要因による、例えば流行とか慣習とか、そういったものによる社会的嗜好があり、これは獲得的でございます。こういった3層の構造があり、外側に行けば行くほど流動的になる、例えば流行によって変化するとか、その時の気候とか風土によって変化するとか、外側に行くほど流動的になるけれども、内側に行けば行くほど普遍的であり、固定的であるというような、こういう3層構造で考えると、嗜好、例えば色に対する嗜好もそうですし、香りに対する嗜好もそうですし、味に対する嗜好もそうですけれども、嗜好というものの構造を捉えやすく、何となく具合がいい図であると、私も納得したわけでございます。

実は、このような考えに至ったのは、その当時から脳科学というのがだんだんと進んでまいりまして、今はどんどんと知見が新しくなっておりますけれども、それからデバイスも新しくなってまいりましたので、いろいろな知見がたまってきており、それがベースにあります。今の知見も含めてお話ししますけれども、脳というのは古い皮質があって、その上にかぶさるように新しい皮質がございます。これは脳を断面にしたところでございますけれども、古い皮質というのは、この中心のほうにある、これは人間の本能に深く関わりを持っていて、人間の生き死に、すなわち自分の生命の維持とか、そういったものにも非常に関係が深いところであります。そこのところに関係するものは、まず中心のものでして、それは人類に普遍的であり、たぶん固定的であろうと考えられるんですね。その外側というのは脳の新しい皮質、これは学習、経験、そういったものによってどんどんと獲得的に変化してまいります。それは社会、文化的な要素でありまして、それが流動性を持って様々に私たちの脳というものを形成していると考えられるのではないかと思います。そうするとちょうどこの3層構造というのが、意外にピッタリとします。しかも好みというものの中枢として考えられるのが、扁桃体といわれる、これはAmygdalaと言われるところなんです。こちらの扁桃体という部位は、実は元々人間がここは危険か安全か、これは食べても大丈夫か、これは生命に関係ないかどうか、それを見極めるためのそういう器官でありました。危険なものは人間にとって不快です。それがやがて嫌いという感情になり、そして安全なものは人間にとって快い、それがやがて好きというような感情に変わってくるわけですね。その扁桃体というところがこの脳の中心のところに位置している、これをちょっと覚えておいていただきたいと思います。あとでまた出てまいります。その近くに海馬という、これはご存知だと思いますけれども、記憶の中枢ですね。ですからある音を聞いたとき、ある音楽を聞いたときに、ああ懐かしい音楽だ、これは昔聞いたことがある、あの時はこんなことをしていたなということを、はっと思い出すことがありますよね。それは扁桃体に各モダリティーを通して得た全ての感覚情報が通過するからなんです。そうしてここが活性化いたしますと、その近くに海馬、すなわち記憶の中枢がありますので、そこも同時に活性化して、そういったものを思い出すというような仕組みが生じるわけです。こちらにいらっしゃる皆さまは、おそらく人間の快感情にご興味があるかと思いますので、もう一つちょっと大事な脳の部分をお伝えしたいと思います。ここは赤く記してありますけれども、側坐核といわれるところです。実は腹側被蓋野も快感情に関係しているんですが、今日はちょっと置いておきまして、側坐核というところです。これが実は、快感情と非常に関係が深いのです。

さてこちらをご覧になってください。真っ赤なフェラーリです。皆さまはこれをご覧になって、かっこいいと思われたでしょうか。もしもそう思われたなら、その時には皆さま方の脳の側坐核が活性化していたということになります。側坐核というのは、大脳の内側に両側性に位置するニューロンの集合体になります。側坐核は快情動の処理に関与するといわれておりまして、先ほどお話ししました扁桃体、好き嫌いというようなものに深く関わるところです。扁桃体、視床下部、脳幹、眼窩前頭前野、これは前頭眼窩野ともいいますけれども、Orbitofrontal cortexという、ちょうど目の後ろ側に位置するところでして、こちらが実は、脳の報酬系に関係しています。報酬系というのは、これも聞いたことがある方がいらっしゃるかもしれませんけれども、これは心地良いことが起きたりとか、それから欲求が満たされた時や、満たされると分かった時に活性化するところでして、私たちがいいなと思った時には、この報酬系がわっと活性化するんです。その報酬系と側坐核というのは、相互の連携を取っているというところになります。ですから側坐核という場所は脳科学の中で、快感情と非常に深いつながりがありますので、一つ覚えておいていただきたいと思います。

さて、先ほどの扁桃体のほうに戻りたいと思いますが、扁桃体というのは、先ほども申しましたように、側頭葉の前方内側に位置する神経核複合体で、情動に関与して、快と不快のどちらの情動刺激に対しても人の扁桃体が活動します。大脳皮質、あるいは皮質下の経路を経て、全モダリティーの感覚信号が入力されていきます。それから扁桃体というのは、後天的に学習して柔軟に対象を広げていくということも、最近の脳科学で分かっております。それがゆえに、私どもがここに書きました3層構造も矢印をつけまして、これはきっちりと領域が決まっているわけではなくて、外側からまた内側に入り込んでいく、あるいは外側に出てくるような、そういうような好みもあるというように、柔軟に対象が少しずつ変化するというところも取り混ぜております。そんなわけで、このような3層構造を皆さまにご紹介させていただきました。

さてちょっとお話を戻します。先ほど色の好みの研究を最初の原点の研究と申し上げましたけれども、その研究の中で、白がアジアの地域に共通して好まれている、しかも非常に高く好まれるということ、これをお話しさせていただきました。ですが、白はアジアで共通して好まれるんですが、白を好む理由はそれぞれに異なっています。例えば純血というふうな理由が中国、台湾、韓国では非常に高いのですが、日本ですと清潔が、やはり清潔好きの国民といわれますけれども、清潔という理由が非常に高いです。インドネシアでは、明るいという理由が、非常に多く挙げられました。またもう一つ、日本では白を嫌う人というのはほとんどいないのですが、中国では白に対する好悪、これが拮抗するという面白い現象もあります。でも白に対する嗜好は、むしろ中国のほうが実際は高いんです。それでも一方で、嫌いな人もいると。日本人は、白を嫌う人はほとんどいないですね。というようなことで、やはりそんなところの文化的な違いというものも見られるかと思います。

白嗜好の文化的な背景というのは、これは文化人類学の本をひもとくと、いろいろと出てきます。これをお話ししていますと他のお話に行けませんので、一つだけお話しさせていただくのは、白に対する神聖視、これが日本では際だってあるということです。これは太陽信仰との関わりなんですが、天照大御神、日本の国をつくったという太陽神、そして白を太陽の光の色という位置づけで考えますと、白というものが神聖な色として位置づけられるのは、これは理解可能なことだと思います。ですから神道の素木、これはソキと書きますけれども、シラキと呼びますね。素をシラと呼びますけれども、シラキのシラというのは、この白ではなくて、生成りの無垢なものや清らかなものを表しているものです。神道では、御幣とかそういったところにも白が使用されておりますが、こういったところに端を発しているものでございます。このような神聖視が、白の希少性と優位性をより確固たるものにしていくという流れになりまして、それでもう白というもの自体が神聖視の対象となって、天皇や権力者に献上された祥瑞、これ自体に白いものが使われることが非常に多くなってくるという、そういう関係性も出てまいります。

そこで、この白というものが色白肌にも関係してくるのではないかと思って、研究が始まってきたわけでございます。その研究をご紹介する前に、日本人の美人の要素というのを、ちょっとこちらでご紹介させていただきます。江戸時代は、うりざね顔、肩が細くて、やや鼻が低くて平面的で面長、この要素が美人というように思われていました。今とは随分と違うんですけれども、その当時は着物で髷を結っています、鬢の張った髪型をしますので、そうするとこのような着物を着るには平板な感じの、平面的な感じのほうがきれいに着られますし、それからやはり面長のほうが鬢の張った髪型には合うんですね。そういった形でこの要素が美人。明治時代になりますと、ふっくらした顔とか、丸顔というような要素になってまいります。それが大正時代になりますとフェミニズムが台頭してきますので、大きな目とか大きな口、やや下がり気味の眉、細い顎というように少し主張する、そのような造作になってくるわけです。それが昭和になりますと、もっと大柄で立体的で、もっと西洋的な感じですね。はっきりとした眉とか、より大きな目とか唇が強調されるとか、そのようになってまいります。

それで現代の日本における魅力的な外見というのが、じゃあどのようなものかと。これは多くの方たちに行ったア

ンケートを基にまとめられた研究の結果なんですが、多変量解析をした結果、「色白で目元がはっきりしたタイプ」と、「ほっそりした目鼻立ちの整ったタイプ」、こういったタイプが美しいと思われる魅力的な外見だという、そういう結果が得られたわけです。その時に同時にパーソナリティー、これは「暗黙のパーソナリティー」というんですが、それはあとでまたお話をさせていただきますが、「こういう外見を持っている人は、どんなパーソナリティーだと思いますか」という質問をした結果、魅力的、信用できる、素直なという、そういうパーソナリティーだと。これはその人を知らないのに、一見しただけで感覚的にそのように思われてしまうという、ある種のステレオタイプなのかもしれないですけれども、そのような結果が得られたということなんです。

ここで魅力的な女性の条件として、色白肌というのが出てまいりましたけれども、日本では最初に申しましたように、色の白いは七難隠す、七難というのは仏教用語になりますけれども、七難を隠すということでパーソナリティーの欠点まで覆い隠しますよという、そういうような内容になりますね。中国でも実は同じような表現がありまして、漢字を見ただけでも、1つの白さが100の醜さをカバーするという意味に書かれているようなことわざ、そういったものもあるわけです。

この白さということに関しては、日本でも古代に色白嗜好というのが始まってきたのは、おしろいとともに中国大陸から恐らく伝播されまして、遅くとも7世紀末にはその存在は知られていたことになります。白い肌の美意識というのが、平安時代に一層に明確となります。これは今のように室内が明るくないですので、暗い室内で何が映えるかというと、明るさ、すなわち白というのは一番反射率が高いですので、そのような暗いところでも一番映えるのは、白い肌になります。黒い髪と対照的な白い肌というコントラストで、それが美しさというものにだんだんと明確に、平安時代になると一層明確になってくるという流れを持ちます。

お化粧ができるほど裕福なのは貴族階級ということで、貴重なおしろいを塗った結果、白い肌となっていったため東洋でも西洋でも貴族階級は色白肌であったわけなのですが、しかし欧米では変わってくるんですね。これが面白いところなんですが、日焼け肌のほうが魅力的で好ましいと思われているんです。今もそうです。もちろんホワイトニングの化粧品も出ておりますけれども、でも意外に肌を焼くことはそんなにためらわずに焼かれるんですね。どうしてかといいますと、産業革命後に、労働する場所が屋外から屋内に変わります。そうすると労働者の肌の色が白くなってしまうんですね。そうすると有閑階級、つまり貴族階級の人の優位性というのがここでなくなってしまうということで、白の持つ優位性と特殊性が薄れて、有閑階級の間では逆に日焼けが流行して、ヨーロッパでは1930年代から日焼けした肌色が、肌を焼きに行けるほど裕福で、十分な休暇を取ってバカンスをエンジョイできる人を意味するようになるという、こんな逆転現象が出てまいります。日本でも、ガングロとかそういうようなものも流行った時がありますけれども、今はもう色白肌のほうに、ホワイトニング化粧品のほうに随分とシフトされていると考えられるかと思います。

先ほどの「暗黙のパーソナリティー理論」というものですが、これは心理学者のBruner, J. S.が提唱したもので、人の性格に対して、私たちは漠然とした感じで、会った途端にこの人はこういう人じゃないのかというのは、何となくありますよね。これは多分無意識のうちに、こんなタイプの人という具合に性格の体系の中に当てはめて認知する私たちの傾向なんですね。それはすなわち、第一印象というものを形成しまして、その体系に当てはめることによって多くの情報を、逆にいえば効率よく処理する、情報処理の1つの方略であるということで、「暗黙のパーソナリティー理論」というのがございます。

そこで色白肌というものが、どんなパーソナリティーと関連して捉えられるのかというのを研究したのが、この研究になります。日本とインドネシアで行いました。何万人と取った日本人の肌の色の中間的な肌の色がございまして、その中の色白、色白寄り、色黒寄り、色黒といった、そういう4パターンを色紙で用意いたしまして、その上にこのように女性に見えるような線画を描きました。これを日本とインドネシアで、人物を評価する52の評価語、こちらを用意し、この評価語に当てはまるものが何かを選んでもらいまして、それでその結果を見たわけでございます。色白肌だけについて今日はお話しさせていただきますが、日本とインドネシアで両方とも一番最初に選ばれたのは「弱々しい」という、そういう形容詞でございました。弱々しいというのですが、その後の順位の言葉を見てまいりますと、ちょっと違いが分かります。日本人の場合は、弱々しいのですが、それが「貴族的、デリケートな、静かな、おとなしい、上品な、育ちが良い、消極的な、女性的な、保守的な」というふうな、こういったものが次に続くような弱々しさなんですね。ところがインドネシアのほうは弱々しいという言葉の後に、「威張ったとか、貴族的な、幼い、しゃれた、明るい、派手な」とか、どちらかというとネガティブな部分も出てくるんですね。インドネシアの方たちにその後に聞いたところ、色白肌というのは確かに好まれるんだけれども、色白の女性というのがなんかちょっと威張っているようなところがあって、とてもそういう印象が強いと。ちやほやされるから、威張っているような感じがするという、そういうことで威張ったとか派手なと

か、そういう形容詞や言葉と関連づけられるんじゃないかという、そんなことをアドバイスしてくれました。この調査は、実は色紙を使った調査でしたが、肌の色というのは、決して色紙と同じではないですね。そこに肌理（きめ）というような要素もございます。

そこで次に日本と中国で行った研究というのが、肌理を加えた研究です。これは 300 ぐらいの女性の頬の部分を撮った写真の画像から、肌理の細やかさと粗さで、こちらに行くと、肌理が粗い、色白、色黒という画像、たとえばこのビジュアルＡは肌理が細やかで、そして色白。ビジュアルＢは色白だけれども肌理が粗い、ビジュアルＣは肌理が細かいけれども色黒で、ビジュアルＤは肌理が粗くて色黒という、この４つのビジュアルで両国の違いを見たわけです。日本と中国の両方の国で、面白い傾向が見られましたので、それだけをお伝えさせていただきたいと思います。このビジュアルＡの色白で肌理が細やかな肌というのは、日本人も中国人も、実は共通して美しいと思うし、上品だと思うし、好きだと思っています。またビジュアルＣのほう、こちらは肌理が細やかで色黒の肌ですが、これに対しては中国人も日本人も、愉快な、特色のある、陽気なというパーソナリティーあるいは外観から受ける印象と結びつくわけです。ところが派手な、健康的な、明るい、若々しいというのは、日本人は色黒肌のほうに持つイメージなんですね。ところが中国人のほうは、色白肌のほうに持つイメージだということで、ここに両国の違いというものが現れた点としてご紹介できるかと思います。アジアの国でこのように白は好まれるし、共通して色白肌というものも受け入れられるわけなんですけれども、ただし、そこには微妙に文化の違いというもの、そんなものも感じられる、そういう結果となりました。

＊　　＊

さて今日のもう一つのお話ですが、感性をつなぐ色彩についてお話をさせていただきたいと思います。今までのお話は色彩というものをベースとしまして、文化的な側面を見ましたけれども、感性というのは文化を越えてわれわれ人類に共通する、そういう一つの感覚であります。感覚といって申し上げていいのでしょうか、感性という言葉を辞書で調べますと、いろいろと書いてありますが、このことをまとめていいますと、どうも物事を心に深く感じる働きとか感受性、こういったものが、われわれが一般的に感性といっているようなものに近いもののようです。すなわち、私たちが感性という時には、必ず、まずはそれを感受する働きと能力、これが必要となります。

すなわち感覚の存在、これが必須なんですね。外界を感受する時、この時には、例えば今、この部屋の中でも音声は聞こえています。また、視覚刺激がございます。それから空調の温度という、そこから来る触感覚というものがあります。それからあとはもちろん聴覚刺激など様々な刺激があります。外界を私たちが感受する時、外界を受け取っている時というのは、一つの感覚だけではなくて多感覚を活用していることが多いわけでございます。そこで視覚、嗅覚、聴覚などが同時に働いていることが多いということで、今クロスモーダル知覚という研究が、いろいろなところで流行っております。

クロスモーダル知覚というのは、異なるモダリティーが交錯し統合する知覚で、crossmodal perception（クロスモーダル　パーセプション）とか、こんな言い方を外国ではいいますけれども、私も 2000 年頃にオックスフォード大学にまいりました時に、オックスフォードでは既にもう、このクロスモーダルのことが盛んに行われておりまして、あちらでは有名な研究者の方もいらっしゃいます。多感覚とは別に、共感覚というのは、これはある種の能力です。例えば画家のカンディンスキーとか、それから、音楽の好きな方だったら作曲家のスクリャービンとか、そういう方たちは共感覚を持っている方たちですけれども、その研究は別にあるんです。それとは別に、これまでの五感の研究を統合的に捉える働き、その動きが、これが心理学、特に知覚心理学とか認知心理学、また神経科学の分野で着目されています。

この色彩というのは視覚情報ですが、実は他の感覚とも密接に結び付きます。例えば昔からキーキーキャーキャーいうような声というのは「黄色い声」といいますが、これはクロスモーダルな表現ですよね。このように確かにクロスモーダルの表現も存在しますし、黄色い声といわれると、何となく甲高い声じゃないかというふうに、私たちは感覚的にそんな感じがいたします。

先ほども申し上げましたように、視覚、聴覚、嗅覚、そして味覚、触覚、体性感覚など、入力された全ての感覚情報が大脳辺縁系、特にこの扁桃体、これを通過することによって、人が何かを見たり聞いたりした時に、他のモダリティーとも連動するメカニズムが生まれる、そして記憶も呼び起こされる。こういったメカニズム、これがあるんだということを念頭に置いた時に、これは何か色彩と結びつけられないかということで、感覚の中でも明確な分類ができる色彩と結びつけて考えようと思ったのが、発想の出発点でございました。

これは美術の時間などで、教室に１つはあったのではないかと思いますが、「色立体」といわれるものでして、色というものは色相、すなわち赤とか黄色とか青とか緑とか、そういったものと、それから明度、明るい赤と暗い赤といったような、明るさの度合い、それから鮮やかな赤や濁った赤というような具合に、彩度、すなわち鮮やかさの度合いというように、この３つの属性で説明をすることができます。ですので、ここにある色１点は、必ずこの属性、３つの属性で説明し、そしてこの立体の中に位置づけること

ができるわけです。

ところが香りの分類というのは、実は非常に困難でして、いろんな人がこのように分類をしたりしております。ですがなかなかまとまらないんですね。香りというのは非常に厄介でして、実は香りというのは周りに飛び散ってしまうんですね。そこでその香りというものをなかなか表現することも難しいですし、それが香りというものの分類が難しいというように言われる理由なんです。しかし香りにはイメージがあります。色にもイメージというのがあります。

そこでこの色のイメージなんですが、ちょっと皆さま、こちらをご覧になっていただいて、どんなイメージを持たれるか直感で考えてみてください。また、これからあるメンズの香りのついたムエットをお配りします。今この香りを嗅がれて、どのような印象を持たれたでしょうか？どうでしょうか。まだ前のほうの方しか配られていないと思いますが、香りと、この色の感じと何か共通するところがございましたでしょうか。もしそのように感じていただいたならば、実はこのメーカーの意図に合っているのでございます。

これはDolce & Gabbanaの「Light Blue」という名前のメンズのオードトワレです。こちらがパッケージですが、ライトブルーのまさにその色を使っております。このイメージに合う色を使ったというのは、実は大正解なんですね。なぜそれが正解かというのも、あとでちょっとご紹介させていただきたいと思います。このように色にもイメージがありますし、香りといったものにもイメージがあるということ、今匂いを嗅いでいただいて何となく何らかのイメージといったものと、例えばこれがきつい香りだとか、あるいは優しい香りだとか、そんな具合でも結構ですけれども、あるいは何かをほうふつとさせたりとか、具体的なものを連想したりとか。何かイメージとの連合があったと思います。色もそうなんですね、色も何かイメージと連合していくということです。

そこで、色彩というのが多感覚の結び目になれるのではないだろうかという、こういう発想に気付いたわけです。色彩というのは先ほども言いましたように、3属性できちっと属性が分類できます。ですから、それに「ひも付け」する形で、他の感覚を結びつけてしまうという発想です。ただし、色の3属性に寄り添わせて感覚の分類の可能性を探っていきますと、寄り添わせるためには、何らかの媒介が必要です。その粘着剤として、私は「調和」という概念を利用しました。

なぜ調和にするかというのは、あとでまた申し上げますけれども、例えば優しい色、優しい香りというように、色にも香りにも共通するイメージがありますが、優しい香りに調和する香りは、決してきつい香りではないんですね。優しい色に調和する香りとなりますと、やはり優しい色であるということが研究の結果で分かってまいりまして、この関係性を20年ほど前から研究しております。

その研究の結果、印象の類似しているものは調和するという関係性を明らかにいたしました。また調和関係は、心理的にも生理的にも良い効果があることを明らかにいたしました。その発想を基盤にして、色彩と香りの調和、色彩と音との調和、これを研究いたしまして、調和というものを粘着剤として、色に寄り添わせて分類するという研究を続けております。その先にあるものなんですが、それは色彩、香り、音の調和に関する共通軸を見つけまして、その共通軸に基づいて多感覚が調和する快適空間、これを構築することにございます。

こういった研究がどのように発展していくかということですけれども、色と香りの調和の心理的、生理的効果、こういう研究をすることによって、例えば化粧品会社とか、今は食品会社とも少し関係しておりますけれども、香りの付いた製品のパッケージデザインへの応用ですとか、あるいはデータベースを構築いたしまして、今これも作っていますけれども、そのアプリケーションシステムを、デザインの提案や応用に活用していただくことも1つです。それから脳科学的な検討、これは非常に大事でして今の時代、脳のどこが活性化するか、それは快感情になっているかどうかということ、これは商品開発の中でも非常に大事なのです。ノーベル賞を受賞した行動経済学の理論から発展して、ニューロエコノミクスのように脳科学と経済学の融合も進んでおります。そういう形で、調和、快感情に対する脳科学研究への広がりというところに関係してまいります。

私が何を目指しているかというと、色彩というものを中心軸として、音とか画像とか香りとか、そういったものを様々なユーザーの属性とか、嗜好とか、ライフスタイルとか、パーソナリティーとか、そういった要素を取り入れまして、そしてそれらにプラス、そのイメージですとか、気分とか生体情報、こういったものを全部加味して個人の印象や気分にカスタマイズされた快適空間、もしこういったものを提案できるならば、例えば末期がん患者さんに対する緩和医療とか、そういったところにもきっと役立てていただけるようなことになるんじゃないかと思って、実際にWell beingという「より良く生きる」といったことに、どうにかして結び付けたいなと思っているところでございます。

これは簡単なアルゴリズムですけれども、要するにここのところに各感覚の共通軸を、印象のイメージの共通軸として見つけていきます。その共通軸ができますと、それを統合的に管理するそういった空間、統合管理システムというものを構築します。そこのところに、これを計算モデルによってシステムを構築いたしまして、そこに先ほど申しました報酬系の脳内メカニズムといったものをモデル化することを加味することによって、人間にとって快適な空間

を作り出そうというところ、こんなところが一つの起点となって研究をしております。

ではその共通軸の見つけ方なんですが、細かいことは申しませんけれども、例えば香りと色彩の印象空間をどのように作っているかというと、香りと色の印象をたくさん聞きまして、そしてその結果、共通する軸というものを抽出してまいります。左のほうが香りの印象次元、そして右のほうが色彩の印象次元になりますが、その印象次元を見てみますと、こちらにマイルドとクリアという共通軸、2つの共通する軸が見つかりました。

この共通軸が見つかりますと、その上に、同じ軸上でこのように香りをプロットします。今は200種類ぐらいの香りの結果をプロットしております。それを色彩と香りのこの2つの軸上にプロットいたしまして、それを最終的に、色というものの上にプロットするというようなマッピング、香りのマッピングをいたしまして、最終的に香りを可視化する、色に寄り添わせた香りの可視化をするという形で実験、研究を行っているわけです。例えば、これはオレンジスイートという香りでございますけれども、オレンジスイートというのは、この香りはこの色と非常に相性がよいというような、そういう香りというようにご覧になっていただいて、ある色という、3次元空間の色に、それぞれの色にひも付けるような形で、音とか香りとか、その色と相性のいい、すなわち調和関係にあるものを見つけていくという、そういう作業を行っているということです。色に寄り添わせて香りをマッピングして、可視化する可能性ということが、ここで提案できたわけです。先ほども申し上げましたように、調和関係というものを媒介としておりますので、応用範囲も広がるというふうに考えております。なぜ調和がいいのかということ、最後にそれだけをお伝えさせていただきたいと思います。

調和というものが心理的、生理的にどのような効果をもたらすかというのを研究してまいりました。まず心理的な調査といたしましては、心理学ではよくSD法という手法を使います。Semantic Differentialというものの略なんですが、SD法は印象を捉えるのにある意味優れた方法です。この方法というのは、後ろのほうの方はご覧になりにくいかもしれないんですが、相対する言葉、例えば「重い」に対して「軽い」ですね、「暖かい」に対して「冷たい」です。このように対極にある軸のスケールの中で、ある対象のイメージを評価してもらいます。たとえば、ここで見ますと、この3.0というのが、真ん中のところです、これがどちらでもないところになる。要するに重くもなく、軽くもない。次々と形容詞対が、たとえば大人っぽい―子どもっぽい。嫌いな―好きな。浅い―深い。個性的な―平凡なとかがございます。対極のスケールの中で、その対象に対してどんなイメージを持つかということを評定する、そういうやり方なんですけれども、それでこちらを見ていただきたいんですが、この赤で示した線分は、ピーチになります。ピーチという香りは想像がつくと思いますが、この赤い線分はピーチの香り単独のイメージです。大体、真ん中の「どちらでもない」という辺りをうろうろしているイメージかと思います。ところがピーチと非常に相性のいい、すなわち調和しているといわれる色があるんですね。それがペールレッドという、いってみればピンクのちょっと赤に寄ったほうのような、そういうピンクです。それで囲まれた壁面の中で、ピーチの香りを嗅いでもらうという実験を行います。その時に印象を聞くと、このように、今まで「女性的な」というのはこの程度だったのが、余計に女性的に感じる。「軽い」という感じも、より軽いと感じる。好きな感じも高まる、快い感じも高まる、優しいという感じも高まるということが分かりました。つまり心理的な面から見ますと、色と香りが調和している関係というのは、その香りの持つイメージを、相乗的に高めるということが分かります。これは実は、気分評定でも同じでした。ピーチ単独の気分よりも、ピーチと相性のいいペールレッドが加わった時に、それに対する気分、例えば「穏やかな気分」とか「幸福な気分」が、より高まっているということが分かります。

その他に、幾つかの生理的な手法も取っております。こちらはCNVの脳波を取ったものですけれども、このスライド、ちょっとお分かりになりますでしょうか、色で囲まれた領域で、これは皿電極が付いていない状態です。電極をつけて、今皆さま方に持っていただいたムエットで、ある香りを嗅いでいただきます。そしてある香りと調和している色で囲まれた空間、あるいは不調和な空間で囲まれているような時に、どのような脳波の関係性になるかというのを見たり、それから心電図、これは寝ておりますのでここのところに電極を付けまして、HF値という高周波成分の変化を見ております。それからあとはストレスを感じると、唾液中のクロモグラニンA（CgA）のレベルが上がるんですね、濃度が上がります。それらを見ております。

CNVの、これは覚醒か沈静かを見るものですが、マッチングペアで沈静、ミスマッチングペアで覚醒という結果を得ました。それから心電図の高周波成分ですね、HF値、これは心臓副交感神経活性の指標となっているものですが、ミスマッチングペアでHF値が低下している、すなわちこれはストレスを感じているということが分かりました。それから、先ほど言いました、唾液中のストレスに敏感な応答物質であるクロモグラニンA、これの濃度がミスマッチングペアの時には増加しております。ということは、ストレスを感じていたということが分かりましたので、多分生体にとって、調和しているほうがいいのではないかということが言えそうですね。

もう少し深くこの辺りを調べたいと思いまして、fMRI

を使った研究をしましたので、最後にそちらをご紹介させていただきたいと思います。fMRIによる、脳機能における香りと色の調和関係の研究をいたしました。これは好きな香りを1つ選択して、その香りと提示された色との調和度を判断している際の脳機能を測定するという実験です。被験者の方が自分が好きだと思う香りを、120種類の香りの中から選んでいただくんですが、120種類全部の香りを嗅ぐことはできませんので、大体フローラル系が好きですかとか、柑橘系が好きですかと、おおまかなグループでカテゴライズしたものから選んでいただきます。

例えば柑橘系が好きだとおっしゃったら柑橘系の中で、例えばグレープフルーツの香りとか、オレンジの香りとか、レモンの香りとかという具合に、その中で最も好きなものを1つ選択していただきます。それに色をこうやって用意しておきまして、fMRIの中で9段階の調和度を香りと調和していると思った時に、示してもらうというような実験です。

このような実験の簡単な略図なんですけれども、fMRIの中に横たわった方に、ここに鏡の後ろにスクリーンがございます、ここに色を提示します。この色は鏡に映し出されてこの鏡を通して被験者のところに届き見えるようになっています。このエアコンプレッサーなんかは、MRIの部屋には絶対に入れられませんので、これは室外に置いておいて、エアコンプレッサーからシリンダーに入った香りを、ブロックデザインに従って、一定の間隔でシュッと送り出します。その時に提示されている色と香りが調和していると思ったら、スイッチを押してもらうというような、そういう手続きで行いました。

その結果、活性化した部位というのが、先ほどの最初のほうのお話で出てまいりました、眼窩前頭皮質というところ、思い出していただけますでしょうか、報酬系というところに深く関わっているところです。例えば美しいと思う絵を見た時、いいなと思うような、そういう予感とか予想とか、それから実際に心地良いという感覚を得た時に、この辺が活性化いたします。それからもう1つ「島」というところ、「島」というのは感覚統合に関するところで、やはり報酬に関わるところです。それから中脳ですね、これも中枢神経系と密接に関わるところでして、こんなところと多感覚の調和は非常に関わりがあるということが分かったわけでございます。

ということで、このようなところが活性化したということを総合的に解釈いたしますと、次のようなことがいえるのではないかと思います。調和しているという関係は、どうやら脳では報酬として受け止められているということ。よって、多感覚の調和という概念を、製品開発ですとか空間の構成等にもっと取り入れることによって、快適な生活空間に寄与できるのではないかと考えられます。なぜなら、私たちは多感覚が統合された、そういう環境の中で生活しているからでございます。

＊　　＊

終わりに、今回は少し駆け足ではございましたけれども、まずは色彩嗜好の国際比較を通して、嗜好というものの構造、これを検討いたしました。その構造を検討する中で脳との関係、これも少なからずどこかで関係があるのではないかという、そういうモデル図を皆さまにご紹介いたしました。

そして白に対する嗜好が日本、そしてアジアで高いということから、色の白いは七難隠す、そういった言葉が共通して存在するアジアの国で、色白肌嗜好の心理的背景について国際比較研究を行ったものを紹介させていただきました。

もう一つの今日のテーマといたしまして、今、企業でもどこでも特に注目を浴びています「感性」というもの、そのつなぎ目に、おそらく色彩というものが関与できるのではないかということをお話しさせていただきました。

そして特に色彩との調和関係、これがもたらす快適空間ですとか快適性、こういったものを追究するということは、人間にとって非常に大事なことであるのではないかということ、こんなところにたどり着いたわけでございます。

そのようなわけで、色彩を中心とした私の研究のお話しではございましたが、色彩研究というのは人間と関わりが深い分野でございますので、人間とは何かというものを理解するのに、非常に面白い研究分野だと思います。色彩研究の可能性の深さ、そしてその広がり、これを皆さまにお伝えさせていただきまして、ちょうどお時間となりましたので、講演のほうを終わらせていただきたいと思います。ご清聴、どうもありがとうございました。

平成 28 年度　研究助成

化粧品を使用する場面で発生する挙動・現象を化学するコスメトロジー研究

朝倉　浩一

最近の自分自身の言動を客観的に振り返ると、年齢も 50 台後半となったためか、どうしても一言余計に若い学生に対して物申してしまう傾向がある。現在、共同で研究室を運営している 30 台半ばの専任講師との差は顕著で、所謂ウザいオッサンと感じられていることは間違いない。育った時代の環境や価値観の相違なども認識して付き合っていかなければと思うが、これからも絶対に譲れないことがある。それは、「研究において観察された挙動・現象は、物理的および化学的に、厳密に考察されなければならない」である。

化粧料を 1 つの化学システムと見なすと、それを使用する場面は「力学的エネルギーが加えられ続け薄層化する」とか、「外部環境との間に急速に巨大な界面相が形成される」とか、「揮発性成分が急速に外部環境へ移動する」など、平衡から遠く離れた化学システムとなる場合が多い。化学システムが平衡から遠く離れると、平衡近傍では絶対に起こらない「ゆらぎの成長」が起こり、1977 年のノーベル化学賞の対象となった概念である「散逸構造」が発生する。

この度、大変に有難くもコスメトロジー研究振興財団の研究助成を賜り、取り組んだ研究は、化粧料使用時を平衡から遠く離れた化学システムと見なし、そこで起こる挙動・現象を、「散逸構造」の概念に基づいて厳密に物理的および化学的に解析し制御するものであった。システムはデバイスの組み合わせにより構成されるが、平衡から遠く離れた化学システムで起こる興味深い挙動・現象について、その原因をいとも単純に化学システムを構成する 1 デバイスの性質に帰着させるような考察をする若い学生の姿勢に対しては、厳しい態度を取ってきたつもりである。

おかげさまで、国際会議での発表や学術誌への公刊論文の掲載に加え、本研究助成を賜る直前に出願した特許について、本研究の成果に基づいて優先権 PCT 出願し、さらに日本、米国、フランス、イタリアへ各国移行申請することができた。ここに、コスメトロジー研究振興財団に対し厚く御礼申し上げるとともに、今後もコスメトロジーの発展に寄与できるよう尽力致す所存である。　（慶應義塾大学理工学部）

平成 29 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

大貫　義則

このたびはコスメトロジー研究振興財団の研究助成に採択していただき、誠にありがとうございます。関係する皆様に厚く御礼申し上げます。

採択していただいた研究課題では、MRIという分子イメージング技術を応用してスキンクリームなどのエマルション化粧品の乳化安定性を視覚的に評価いたしました。MRIは核磁気共鳴（NMR）現象を利用した非破壊的・非侵襲的な分子イメージング技術であり、特に医療分野では、今日欠かせない画像診断技術です。非破壊的・非侵襲的な画像化技術は、MRIの他にも様々な技術（CT、レントゲン、超音波画像診断など）がありますが、検体に含まれる水などの物質の分子運動性を可視化できる技術はMRI固有のものと言えます。筆者は、そのようなMRIの分子運動性可視化技術に着目し、以前より化粧品や医薬品の物性評価を行ってきました。今回の検討では、エマルションのわずかな乳化状態の変化をMRIの分子運動性可視化技術によって高感度に検出できることを明らかにし、乳化状態を詳細に評価できる新規評価手法の構築に成功しました。非常に興味深い成果を得るためのご支援をいただきましたことに心から感謝申し上げます。

筆者が研究を行っている富山には、医薬品産業を中心として非常に多くの企業があります。筆者らはそうした地の利を生かして実学と基礎科学が融合した実践的な研究を展開し、実際の製品研究者に有益な情報を提供していきたいと考えています。なお、本申請課題はスキンクリームを開発する企業研究者との対話から見出され、基礎研究の観点で綿密な実験を実施することで総括されました。筆者の理想に近い研究活動が実践できたという意味でも、本研究は印象深いものになりました。貴重な経験を積ませていただき、本当にありがとうございました。

今後、本研究助成で得られた知見をさらに発展させ、香粧品や医療業界の製品開発に少しでも貢献できるよう尽力したいと考えています。（富山大学大学院医学薬学研究部）

平成 28 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

川下　将一

この度は、コスメトロジー研究振興財団の研究助成に採択下さり、誠に有り難うございました。今回採択頂いた研究テーマは、生糸繊物に抗菌性や生体適合性を付与し、抗菌・消臭シート、抗菌性創傷被覆材あるいは組織再生用人工膜の開発に繋げることを目的としています。本研究は、２年ほど前に学生とのディスカッションの中から生まれたものであり、この研究助成を頂くまでは、少ない研究費を何とかやり繰りして細々と進めてきました。そのような状況の中でコスメトロジー研究振興財団から研究助成金を頂けたことは、本研究を大きく前に進める原動力になりました。お陰様で、本研究は、これまで学術論文１報、国際会議発表２件、国内会議発表１件の成果として結実し、本研究を私と共同で行った学生は国際会議において表彰されました。現在、同学生は大学院博士課程に進学し、本研究をさらに発展させるべく、研究を進めています。このように、コスメトロジー研究振興財団の研究助成は、間接的にではありますが、若手研究者の育成にも活用することができました。

私の研究室では、がんや骨疾患の治療に貢献する（体内埋入型の）医用材料の開発を主に行っていますが、医用材料の開発プロセスと化粧品のそれとの間にはいくつかの共通点があり、医用材料と化粧品の両方に同じ素材が用いられることもあります。例えば、コラーゲンはいくつかの市販の化粧品に含まれていますが、コラーゲンと水酸アパタイトからなる複合体は人工骨として臨床応用されています。今回の研究テーマにおいて我々が着目した生糸繊物やその構成成分の一つであるセリシンも、医用材料としてだけでなく、化粧品の成分としても有用であると期待されます。今後は、本研究の成果を医用材料だけでなく、化粧品の開発にも結びつけていきたいと思っています。末筆ながら、コスメトロジー研究振興財団の今後の益々のご発展をお祈り申し上げます。この度は、誠に有り難うございました。

（東京医科歯科大学生体材料工学研究所）

平成 28 年度　研究助成

機械的刺激に応答して色が変化する材料

相良　剛光

このたびはコスメトロジー研究振興財団の研究助成に採択して頂き、大変ありがとうございました。採択当時は研究資金が乏しく、非常に助かりました。厚く御礼申し上げます。

さて、私はかれこれ 10 年以上、力（機械的刺激）に応答して蛍光特性が変化する分子集合体に関する研究を行ってきていますが、何とか生体材料に適用できないものだろうか？と日々考えてきました。既に多くの結晶性の有機化合物や金属錯体が、すり潰すことで発光特性が変化することが報告されていますが、残念ながら実用化を考える際には課題が山積していると言わざるをえません。私の研究は実用的なメカノセンサーとしての応用を目指し、「より柔らかく、より小さく、より生体親和性を高く」をモットーに、多様な研究をほぼ一人で進めています。

化粧品の開発においては、肌触りや塗布感が非常に重要な要素の一つであると聞いたことがあります。現状ですと、レオメーターなどの装置を使って評価を行っているのかと思いますが、力で発光特性が変化するような材料を用いれば、より簡便に機能評価できるのではないかと考えています。また、より学問的な方向に目を向けますと、近年、メカノバイオロジーと呼ばれる学問が大きな潮流となりつつあります。極めて小さな力を可視化することのできるメカノプローブ群ができれば、分子レベルでの機械的刺激の伝達機構や、細胞内外のメカニカルストレスによって引き起こされるシグナル伝達等を明らかにすることができると考えられ、当該学術領域に大きな貢献ができると思います。

これからも、今回助成して頂いた研究をはじめ、様々なタイプの実用的なメカノセンシング材料を開発していきたいと考えておりますので、温かく見守っていただければと存じます。

（北海道大学電子科学研究所）

平成 28 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

菅　恵嗣

大阪大学には化学系学部が3学科（理、工、基礎工）あり、私は基礎工学部（研究科）・化学工学コース（領域）に所属しています。学生からは「化粧品、食品、化成系メーカーに就職したい」といった声をよく耳にします。どうやら彼ら（彼女ら）は漠然と研究開発を志望しているようなのですが、実際には化学工学系の学生に期待される進路は生産技術や品質管理などであり、希望する企業に採用されたとしても研究開発に携わっている卒業生は少ないように思います。私自身、高校生の頃は医薬品の研究に憧れ、大学時代は化粧品・食品分野に大いに興味があったものの、自分の出身からはアプローチの難しい分野であると思いこみ、気がつけば若かりし頃の夢は立ち消え状態となっていました。

現在の研究テーマであるCubosomeは、水と油（＋界面活性剤）から成る“乳液”のような物質です。広い意味では、保湿クリームやマヨネーズにもCubic構造が含まれており、気づかないうちに我々はCubosomeの恩恵を受けていた可能性は十分にあります。まだ基礎研究段階ではありますが、脂質および界面活性剤から成る分子集合体のミクロ～メソスケールの特性を制御することで、物質としての性状（Sol or Gel）を設計できる可能性が見えてきました。本研究助成により得られた知見を活用し，様々な物質についてシーンに見合った運用法を提案していくことで、医療･化粧品･食品等分野に貢献できる科学技術へと発展させたいと思い、今後も研究に励みたいと考えております。まだ志半ばではありますが、あの頃は遠かった夢が少しだけ近づいたような気がしました。

最後になりましが、本研究をご支援いただきました公益財団法人コスメトロジー研究振興財団および関係者の皆様に心より感謝申し上げます。

（大阪大学大学院基礎工学研究科）

平成 28 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

津田　明彦

この度は、貴財団からの研究助成を賜りまして誠にありがとうございました。本研究助成を得て、新たな挑戦的研究に取り組めましたことに心からお礼を申し上げます。

当研究グループは、有機合成化学による機能性材料の創製を目的として、研究に取り組んでおります。化粧品分野への応用を意識して、本研究課題に取り組んだ経験によって、我々が開発した化合物や材料の化粧品への応用を強く意識するようになりました。アカデミアにおける研究では、例えば「化粧品として利用ことができるかもしれない」などのコメントを付して様々なシーズが生み出されますが、実際に化粧品の製造および販売に関わる企業からのニーズを取り込んで生み出されるシーズは数少ないと思われます。株式会社コーセーを母体とする貴財団と直接関わることができたことで、新たな経験と人脈を得ることができ、そして有機合成に必要とされている化粧品分野からのニーズを敏感に捉えることができるようになりました。

現在、当研究グループでは、光オン・デマンドin situホスゲン化反応という工業的にも実験室レベルでも非常に重要な有機光反応を見出しており、産学官連携でその実用化に向けた研究を行っております。それを用いると、酸素の存在下、ハロメタン溶媒に光を照射するだけで、ホスゲン（工業的に極めて重要なC1ビルディングブロックであるが猛毒）を溶媒中に発生させることができ、in situでそれを即座にアルコールなどの基質と反応させることによって、安全、安価、簡単に、ポリマーやその原料、および医薬品中間体などが合成できます。この化学と技術は、化粧品分野にも恩恵をもたらす可能性を秘めており、それらが当該分野で利用されることを目標に、今後ともクリエイティブかつイノベーティブに物質合成やプロセス開発に取り組む所存です。

（神戸大学大学院理学研究科・滋賀医科大学医学部・内蒙古医科大学薬学院）

平成 29 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

戸塚　裕一

このたびは、貴財団の研究助成に採択いただき、本研究を遂行できましたことに厚く御礼申し上げます。私の専門分野は製剤学であり、日本の薬学部の中ではマイノリティの領域になるかもしれません。製剤学は、人間の体内に投与する際の、薬の形(剤形)に関与するような領域です。したがって、錠剤、カプセル剤、顆粒剤などの固形の剤形から、ソフトカプセルや液剤などの液体、軟膏剤、クリーム剤などのエマルションなどを研究領域とするため、界面にまつわる研究対象も多く、食品や化粧品の分野の研究領域においても共通の悩みを持つことも多く、研究領域がオーバーラップしている分野でもあります。

今回採用いただいた研究内容は、'水に溶けないものを溶かす' という新たな試みに関するものです。医薬品のみならず、水に極めて溶けにくい(難水溶性)性質を持つが、人体に役に立つものは自然界にも多く存在し、食品や化粧品の分野でも様々な物質が対象となっています。生体への利用を考えるため、毒性がなく、すでに上市されている添加剤を使用することが我々の研究課題に取り組む際の原点であり、「研究のための研究にならずに、できれば商品化までつなげたい。でも、科学的なバックグラウンドにはこだわって、エビデンスに基づく成果としたい」といつも悩んでおります。本研究を通して、化粧品産業、食品産業、医薬品産業の垣根を越えてみると、面白い素材や研究対象がたくさん存在することを改めて認識できました。今後も、垣根を越えて融合できるような研究内容を見つけていきたいと考えております。最後になりましたが、今回の助成による成果が、原著論文として報告できましたことを感謝し、貴財団のますますの発展をお祈り申し上げます。

(大阪薬科大学)

平成 28 年度　研究助成

薬学とコスメトロジーの製剤学

深水　啓朗

筆者が専門とする「製剤学」は，一般の方々が「薬学」に抱くイメージとしては異端 (?) というか，あまり意識されていない分野だと思います．薬学の研究といえば「新薬開発」を最初に想像すると思いますが，開発中の新薬は企業秘密の最たるものなので，一般の目に触れることはまずありません．大勢の知るところとなるのは新薬として承認された後で, 成功をおさめたほんの一握りといえるでしょう．「製剤」も当然ながら高度な技術に支えられて開発されますが, ユーザーが直接的に触れる製品であるため，求められる技術は必然的に，ヒトに対する優しさ，すなわちフレンドリーさが求められます．

コスメトロジーは，ヒトのQuality of Lifeを高めるために，主に物質的な手段を提供するサイエンス(学問)だと捉えており，薬学における製剤学とも親和性が高いことを常々感じています．筆者が共同研究している受託製造の工場を見学させていただいた際，クリーム剤やローション剤はもちろんのこと，散剤(粉薬)・錠剤に似たファンデーションや，性状・形状ともに坐剤と似た口紅 (用法は決定的に異なる) の製造工程を目のあたりにして，その共通点の多さに感動を覚えました．つい最近では，本邦における外用製剤のトップ企業から，頭部の乾癬治療に有効なシャンプー剤が上市されるに至り，医薬品の製剤学とコスメトロジーの垣根は取り払われつつあると考えています．含有成分が表す薬効の程度や，それにともなうレギュレーションの違いはありますが，薬学とコスメトロジーの製剤は，手をとりあって更に発展できると確信しています．

本助成はその大いなる潤滑油として，ときには研究の情熱を燃やす油として，今後も持続的な発展を期待しています．本研究を助成していただきました公益財団法人コスメトロジー研究振興財団と関係者各位に，この場を借りて心から御礼申し上げます．(明治薬科大学分子製剤学研究室)

平成 28 年度　研究助成

色に魅せられて

古海　誓一

私たちの研究室では、「光と物質の相互作用」を考究して、コロイド、液晶、ゲル、エラストマーといったソフトな有機材料、いわゆるソフトマターから新しいフォトニックデバイスを創出する「基礎研究」と「応用研究」について取り組んでいます。このような堅苦しい言葉を使って学生に研究を説明していますが、単刀直入に言うと、私は「色」に関する研究をしています。

私は幼い頃から「色」に興味を持っていて、絵を描くことが好きでした。異なる色の絵の具を混ぜると違う色に変化することに、とても驚くとともに、胸を躍らされました。学生の頃には、今では当たり前ですが、ノートパソコンの液晶ディスプレイがモノクロからカラーに変わったときには、いろいろなメーカーの液晶ディスプレイを見比べた記憶があります。

今日の日常生活で「色」は溢れています。たとえば、同じ赤でも異なった表情が現れることがあり、化粧品の口紅でも時代によってトレンドがあるでしょう。個人的には、化粧品にラメが入っていると、その人の顔の印象は随分変わると思っています。このラメのような光沢は、よくマイカで目にすることがあります。マイカは無機化合物の結晶ですが、私の興味はソフトな有機・高分子材料で光沢を出したいと考え、研究を進めています。特に、今日の環境問題や資源問題を考慮して、今回の提案では「カラフルな反射色を永続的に維持できるセルロース誘導体の創製」という題目で研究テーマを申請させて頂きました。

コスメトロジー研究振興財団からご支援を頂いたお陰で、最近では面白い研究成果が出ています。植物の主成分であるセルロースは、地球上において最も豊富に存在する天然高分子です。このセルロースを化学修飾すると、鮮やかな反射色を示すコレステリック液晶になることがあります。そこで、私たちは、不飽和二重結合を有する架橋性セルロース誘導体を合成し光架橋すると、カラフルな反射色を永続的に維持したフィルムになること発見しました。これだけでなく、このフィルムは反射色だけでなくゴム弾性も兼ね備えることがあり、フィルムに力を加えると可逆的に変色することを発見しました。この研究成果は「テレビ東京・ワールドビジネスサテライト」に出演して紹介し、「日経産業新聞」、「日刊工業新聞」、「ゴム化学新聞」の記事にも掲載され、広くアピールすることができました。近い将来、私たちの研究成果が社会に還元されるよう、学生とともに研究に邁進していきたいと思っております。

（東京理科大学理学部第一部応用化学科）

平成 28 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

増原　陽人

2010 年の初旬に独立して研究室を立ち上げることとなり、研究室の運営の為、予算の獲得は必須となりました。それまで、財団による助成金を目を皿のようにして探すことはありませんでしたが、日々チェックを怠ることなく探すようになった際に、本「コスメトロジー研究振興財団」を知ることとなりました。しかしながら、自分の研究分野が有機ナノ材料であり、さらに、“コスメ”との単語から、男性である私にとって、研究対象として全く注目することはありませんでした。そんな中、日本学術振興会のプロジェクトの採択により、2015 年の夏より、オーストリアで 1 年半研究する機会を頂きました。滞在した研究室は、世界的に有機太陽電池の研究を行っており、有機半導体やデバイス作製の研究を展開する環境下で、フランスの会社の方が研究室を訪問され、講演会が開催されました。髪への染色に関する研究といった内容でありましたが、用いる化合物は、有機半導体にも使用される材料が多く、研究室メンバーが活発に質疑応答しているのを目の当たりにし、自分の視野の狭さを痛感すると同時に、自分の使用している材料群の中でも、化粧品等の他分野に貢献できる技術やアイディアがあるのではないかと考えるようになりました。そんな中、「コスメトロジー研究振興財団」を思い出し、まだ研究シーズになり得るかも分からないデータを駆使して、自らのアイディアを申請書にぶつけた記憶が今でも鮮明に残っております。お陰様で、化粧品への応用が可能かどう

かは未だに未知でありますが、有機半導体材料のナノ結晶成長抑制に関する新たな知見を得ることができ、さらには、本財団で得た結果を発展させ次のプロジェクトへと繋がる成果を得るに至っております。

自らの視野を広げることが、新たな研究に繋がることを再認識するきっかけを設けて頂いた本コスメトロジー研究振興財団は勿論のこと、一緒に研究を行ってくれている学生をはじめとして、これまでに研究室を支えてくれている方々に深く感謝し、今後も研究・教育活動に邁進していく所存です。

（山形大学大学院理工学研究科）

平成 28 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

森　直

私の専門は光化学や分子キラリティーですが、本助成金のもと、アミノ酸を母体とする生体にやさしい新しい光吸収材の開発を行いました。

近年、科学研究に対して、いわゆる成果偏重が危惧される一方、現実問題としてそのような状況に置かれている我々研究者にとって、成果がうまく得られるかどうか担保されていない、専門分野外の研究へ手を伸ばすことは、興味があってもなかなかためらわれる状況にあります。本光吸収材に関する研究では、励起状態化学種に関する考察やその理論的検証など、私の専門的知識がいかされるであろうことはわかっておりましたが、いわゆるゴールをある程度きちんと提示することが求められる科研費などの一般的な競争的資金ではなかなか着手できない派生研究であり、これまでは実際に着手することができずにおりました。

今回、本助成をいただいたことにより、新しい光吸収材としての将来性を提示できたことはもちろん重要な成果ですが、新たに私自身の研究のすそ野を広げることができたこと、また最終的には論文発表などの一定の成果も得ることができたことで、新しい分野への挑戦という期待感と同時に、最終的にはこのようなチャレンジを今後も続けていきたい、続けていくべきだという、私自身の自信にもつながる貴重な経験をさせていただきました。

昨今、財団におかれましても様々なご事情があることとは思いますが、今後も自由な発想のわくわくするような研究に対してのサポートを継続していただければ、一研究者としてもたいへんありがたく存じます。財団助成金の役割もますます重要になってくるものと感じております。

末筆になりましたが、今回のご支援たいへんありがとうございました。

（大阪大学大学院工学研究科）

平成 28 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

森田　洋行

私が薬用や化粧品として伝統的に使用されている天然資源に興味を持ち、その効能について、含有成分に着目して研究を始めたのは、現所属の富山大学に異動となった 7 年前からになります。平成 28 年に貴財団から研究助成をいただいた時には、研究室の研究環境はだいぶ整ってはいたものの、本格的に研究を進めるには、まだ不十分でありました。貴財団より大変心強いご支援を賜り、研究の進展にご支援くださいましたことに心より感謝申し上げます。

私が、各国の伝統的薬用資源に興味を持ったのは、天然資源の科学的検証が医薬品や化粧品の開発に実際に繋がってきたというだけでなく、これらの天然資源の効能が多様な成分の相互の折り合いにより効果が発揮されているからです。この複雑性を理解するのは現代の科学技術を持ってしても容易なことではないかもしれませんが、この複雑性の解明は、あらたな発想に基づく、医薬品や化粧品の開発へと繋がる可能性があります。また、伝統薬や伝統化粧品の多くは、西洋科学に基づいて調整された医薬品や化粧品と比べて、その効果は即効性ではなく、また弱いのが常ですが、その反面、安全性が高く、かつ多様な効果に富む傾向にあると思います。科学的根拠が皆無な伝統薬や化粧品は数多く残っています。例えば、キツネノマゴ科*Rhinacanthus communis* 葉の水抽出液は、髪の劣化を防ぐ天然コンディ

ショナーとしてミャンマーで用いられています。さらに、本植物には白髪予防効果があるとして、女性のみならず、若い男性も毛髪剤として使用しています。今後も、伝統的に使用される天然資源を対象とした基礎研究に取り組んでいき、社会に貢献したいと考えています。

（富山大学和漢医薬学総合研究所）

平成 28 年度　研究助成

化粧品の評価

山田　純

私が化粧品にかかる研究を始めて，20 年近くが経過しました．振り返って見るとあまり成果は得られなかったように感じています．私の専門分野は熱工学で，その中で，ふく射（光，電磁波）の散乱を扱ってきました．メーキャップ化粧品は様々な粒子からなり，肌の見映えを粒子の散乱で制御するわけですから，それまでの研究で得た知見をもって，この分野に貢献できるのでは，という期待をもって研究を始めました．しかしながら，難しいですね．「何をどうすれば，良い化粧品が作れるか？」という問いがあったとして，そもそも「良い」ってなんだろう？と行き詰まります．「良い（悪い）」を「見映え」に限定しても，答えを見いだすことはできません．

化粧の見映えは，人の視感によって評価されます．人がどのような評価項目で，見映えを評価しているかは，評価者本人も明確に意識しているわけではありません．おそらく複数の評価項目が（頭の中に）あって，それぞれに適当な重み付けをした上で，総合的な評価を下しているのだと思います．実際，化粧品の開発に携わっている関係者も，このように考え，いくつも評価項目をあげて，それらが見映えにどの程度寄与しているかを調べていました．

評価項目には，「明るい」，「なめらかな」というような関連する物理量を連想しやすいものもありますが，「みずみずしい」，「透明感のある」といった曖昧なものが多く並びます．他の分野に目を向けてみましょう．自動車をつくるとき，例えば，エンジンのパワーやトルクといったわかりやすい評価項目で，車の良し悪しを判断しています．この「わかりやすい」は「計測できる」という意味です．それらに比較して化粧品はどうでしょう．評価項目の多くは，質感に係るものが多く，どれもが曖昧で計測することはままなりません．自動車業界は，定量的な評価に基づいて開発を進めることで発展してきました．化粧品業界はもちろんですが，コスメトロジーの発展にも，化粧に係る質感の定義づけ，および，その定量的評価手法の開発が必要に思えます．

（芝浦工業大学）

平成 28 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

今江　理恵子

この度は、貴財団の研究助成に採択していただき、厚く御礼申し上げます。私はこれまで、生体膜リン脂質の一つであるホスファチジルイノシトール（PI）の特徴的な脂肪酸組成に着目して研究を行ってきました。PIは、イノシトール部分がリン酸化されることで、シグナル伝達などの重要な役割を担っています。PIは脂肪酸部分においても特徴があり、*sn*-1 位にステアリン酸、*sn*-2 位にアラキドン酸を持つ分子種が多く存在します。特に*sn*-1 位のステアリン酸の含有量は極めて高く、マウスでは多くの臓器でPIの*sn*-1 位の脂肪酸はほぼステアリン酸のみとなっています。PIの重要な役割を考えると、脂肪酸組成がこれだけ厳密に規定されているのも理由があるだろうと考えていました。顕微鏡下で観察されるPIの*sn*-1 位の脂肪酸組成が変動している線虫の変異体は体表にハリがなく、上皮細胞に異常がありそうなことは分かるのですが、分子レベルでのメカニズムは全く不明でした。この現象のメカニズムを何としても解明したいと考えていた折に、この研究助成をいただけたことは、研究を進める非常に大きな原動力となりました。助成期間中にいくつか結果を出すことができ、メカニズムの解明にあたって大きく進歩したと考えております。現在、本研究の成果発表に向けた準備を進めています。

折しも研究助成期間中に所属が変わり、老化や老化関連疾患に関わる研究所に移りました。PIの脂肪酸組成は厳密に制御されているため、老化などでそれが破綻した時には、上皮細胞において異常が生じ、皮膚の恒常性に大きな影響を与えることが予想されます。老化や疾患において、タンパク質を中心とした研究は盛んに行われておりますが、生体膜脂質も同様に重要なファクターになることから、脂質も見なければならないと思っています。今後、このような観点から研究を進め、コスメトロジー分野に貢献できる成果を出していきたいと考えております。

（東京都健康長寿医療センター研究所）

平成 28 年度　研究助成

女性の薄毛問題におけるコスメトロジー研究の役割

岩渕　徳郎

皮膚科学的に言えば毛髪は皮膚の付属器であるため、毛髪科学は皮膚科学の一分野に過ぎません。コスメトロジーの分野においても、毛髪分野は皮膚分野に比べてマイナーな分野と言えます。しかし、人の印象に与える影響度において、毛髪は皮膚やメイキャップに引けを取らない大きな影響力があります。ある調査で、女性の見た目の年齢を決める要素として何が重要だと思うかという質問に対して、肌状態やスタイル（体型）を抑えて「ツヤ、色、ヘアスタイルを含めた毛髪」が堂々の第一位だったという結果があります。このような視点から考えると、毛髪は「人の美」において単なる学問上の位置づけよりも、ずっと重要な位置を占めています。特に女性の場合、「髪は女の命」と言われるほど大きな意味を持ちます。

女性の薄毛はここ 10〜15 年の間に以前より深刻な問題となっています。それは、病院の脱毛外来に訪れる女性患者数の増加からうかがい知ることができます。研究面でも最近 10 年の間に、男性の薄毛と女性の薄毛の特徴の違いが浮き彫りにされてきました。男性の薄毛は毛が極端に細くなるのに対し、女性の薄毛は毛の数が減少してしまうのが主原因であることが明らかになってきたのです。つまり、女性の薄毛ほど「発毛」効果が強く求められるのです。しかし、育毛薬剤の探索・開発現場では薬剤の「発毛」効果を評価できる実験系が殆どないのが現状なのです。

このような中、コスメトロジー研究が女性の薄毛問題に対してなすべきこと、それは「発毛」効果を評価できる実験系の開発と、女性の薄毛の発生原因の究明ではないでしょうか。今回私が助成頂いた研究も、これに関する研究でした。しかし、これらの問題解決にはまだ程遠い状態と言えます。今後もぜひ、女性の薄毛を解決する研究テーマにご理解を頂戴できればと思います。いつまでも若く美しくありたい、という女性の願いに少しでも応えていければと思っています。

（東京工科大学応用生物学部）

平成 28 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

近藤　嘉高

この度は、本研究課題「ヒト培養表皮におけるアスコルビン酸の経皮吸収および紫外線UVBによる細胞障害に対する予防、回復効果の検討」に研究助成をして頂き、厚く御礼申し上げます。

アスコルビン酸（ビタミンC）は、還元性物質として活性酸素種の消去や各種の酵素反応の補因子として、様々な組織で色々な働きをしています。しかしながら、その多様性ゆえに、ビタミンCの機能は、まだまだ分かっていないことが多く残されています。私たちは、ビタミンCを体内で合成できないマウス（SMP30 ノックアウトマウス）を用いた研究から、色々な臓器におけるビタミンCの機能や抗老化作用を明らかにしてきました。さらに、本研究では、ヒト培養表皮を用いた解析から、表皮に塗布したビタミンCは、しっかりと表皮に取り込まれて、紫外線による細胞障害を抑制することを示すことができました。また、紫外線を浴びる前に、ビタミンCを取り込んで備えておくことが効果的であることも分かりました。今後、紫外線対策として、紫外線の遮断の他にも、ビタミンCを含む化粧品や日

焼け止めの塗布が予防策として普及することになれば、嬉しく思います。　（東京都健康長寿医療センター研究所）

平成 28 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

神人　正寿

和歌山県立医科大学皮膚科では国公立大学初の自費診療での美容外来を行っており、また以前より美容皮膚科の分野で臨床研究・基礎研究による実績を積み上げてきた。一方、私個人は東京大学や熊本大学でこれまで膠原病・コラーゲンや血管腫の研究に打ち込んできたが、皮膚老化においてもコラーゲンや血管などの変化が関与するためこれまでの研究経験を活かすことができる分野であると大いに興味を抱いていたところ、1 年半前に縁があり和歌山県立医大に赴任した。

本プロジェクトについては今後、紫外線反復照射により皮膚老化を誘導したマウス皮膚に、miR-124 のinhibitorを局所注射・外用して*in vivo*での皮膚老化に対する抑制効果の有無を確認し、microRNA創薬の可能性を検討したい。さらにはmiR-124 は皮膚老化では増加する一方で有棘細胞癌の腫瘍細胞では抑制されており、皮膚老化の制御は皮膚癌の予防にもつながると期待している。

また、今回の検討ではエキソソームそのものと皮膚老化の関与を示すことはできなかったが、将来サンプル数を増やして再度その関与を示すことができれば、皮膚老化・肌年齢の定量化や客観的評価に加え、エキソソームによる皮膚老化のコントロールが可能になる可能性がある。またエキソソームを外用剤や軟膏、そして化粧品として使用する例はこれまで報告されておらず、その点でも十分な新規性を有する研究課題であると考える。

皮膚老化の予防・改善はコスメトロジーの重要なテーマである。幸運にもコスメトロジー研究助成事業のご支援を得ることができ、私のこれまでの研究テーマであるgeneticsとepigeneticsの知識を武器に、これからも皮膚老化の臨床・基礎研究の発展に微力を尽くしたいと考え、審査員の先生方および関係者の皆様にあらためて深謝申し上げる次第である。　（和歌山県立医科大学皮膚科）

平成 28 年度　研究助成

コスメトロジー研究を考える機会を頂いて

高橋　勇人

この度は、2016 年度のコスメトロジー研究・研究助成金をいただきまして、ありがとうございました。

コスメトロジー＝化粧品学という分野は今回この研究助成に応募するまでは触れる機会は多くありませんでしたが、改めて考えてみますと、皮膚科医として認識すべき重要な分野の一つであると感じました。皮膚疾患により外観が損なわれますと、患者さんにとっての精神的ダメージは非常に大きいことは多くの方が理解できるものと思います。皮膚科医として皮膚疾患を治療していくことで、皮膚の健康だけでなく、患者の精神的サポートを心がけてきました。しかし、疾患が必ずしも跡を残さずに治癒しないことも多く、その場合、“お化粧”という形で、精神的サポートをすることが可能です。

単に“お化粧”といっても、皮膚疾患を患った部位に使用するわけですので、健康な皮膚に使用する場合と異なった考えも必要と思います。本研究助成におきましても、対象課題として素材・物性、生体作用・安全性、精神・文化とあるように、多岐にわたって化粧品学においては検討すべき内容が存在いたします。医療現場にいる一員として、素材・物性・安全性に対する化粧品学の発展を強く願っております。また、私達の研究におきましては、皮膚疾患の理解を通じた皮膚の健康維持を目指しております。疾患が生じるために必要なことは何か？　それを治す方法として必要なことは何か？　これらを正しく理解することで、より安全で有効な化粧品の開発が可能になると思います。今後も、皮膚科医として皮膚疾患の理解を通じて、コスメトロジーの発展に貢献していければと思います。

（慶應義塾大学医学部皮膚科）

平成 28 年度　研究助成

脂質代謝による皮膚制御の新機軸

武富　芳隆

本研究を通じて、表皮角化細胞の分化に伴い発現誘導されるホスホリパーゼ A_2（Ep-PLA_2）が、高度不飽和脂肪酸およびそれ由来の脂質メディエーターの動員を介して天然保湿因子が関わる表皮バリアの恒常性を維持することによりアトピー性皮膚炎を抑制することが明らかとなってきた。本研究成果は、Ep-PLA_2 を起点とした新しい非セラミド性脂質の産生機構や脂質メディエーターの新しい生理作用の発見など多くの新知見を含み、脂質および皮膚科学の双方の研究領域に貢献するものである。

本研究成果を基盤として当該脂質シグナルを応用する戦略が、皮膚クオリティの新しい評価系の樹立、より安全な化粧品の開発、難治性皮膚疾患の予防に向けた画期的な創薬などに繋がることが期待される。具体的には、Ep-PLA_2 の発現は天然保湿因子の産生に関わるフィラグリンや当該脂質受容体の発現と正の相関を示し、アトピー性皮膚炎の重症度と逆相関することから、皮膚における Ep-PLA_2 や当該脂質受容体の発現あるいは非侵襲性に角層中の当該脂質を定量することが皮膚の健康状態を検査するや、アトピー性皮膚炎の予見・診断マーカーとなる可能性がある。これに加え、当該脂質受容体の選択的作動薬、あるいは Ep-PLA_2 の酵素活性を上昇する天然化合物を発見し、これらを皮膚局所に適用することにより、皮膚バリア機能の向上とアトピー性皮膚炎の改善が実現できる可能性がある。今後、これらの健康・医療シーズの創出へ向けた土台を築く研究を展開したい。

最後に、本研究助成を受けることで、皮膚の健康を真剣に見つめコスメトロジー研究を推進できたことに感謝したい。　（東京大学大学院医学系研究科分子細胞生物学専攻）

平成 29 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

徳村　雅弘

この度は，コスメトロジー研究振興財団の研究助成に採択していただき，誠にありがとうございます。お陰様で今後の研究の基礎となるような，多くの研究成果が得られました。関係者の皆様に心より感謝いたします。

室内環境中のリン系化合物のリスク評価は，世界中で活発に研究が行われており，環境化学の分野において，現在，最もホットなトピックの一つにあげられます。しかし，現状では，室内空気やハウスダスト中のリン系化合物の測定にとどまっており，室内製品からの直接接触による経皮曝露は考慮されておりません。特に，化粧品に含まれるリン系化合物に関しては，ほとんど前例や知見がないのが現状でした。今回，助成していただいたことで，化粧品中のリン系化合物の実測や，経皮曝露を考慮したリスク評価に関する研究を行うことができました。化粧品は主に皮膚に直接塗布して使用するものが多いため，本研究の成果を応用することで，化粧品の安全性の向上だけでなく，化学物質の薬用をより詳細に考察できるようになることから，機能性の向上など，より効果的な化粧品の開発にも貢献できると考えられます。

最後になりましたが，重ねまして，ご援助いただいたことに感謝を申し上げるとともに，コスメトロジー研究振興財団のますますのご発展をお祈りします。（静岡県立大学）

平成 29 年度　研究助成

ナノ粒子と細胞膜の界面現象

仲村　英也

近年、ナノ粒子の生体作用・安全性の評価は、動物を用いた*in-vivo*実験や細胞・微生物を用いた*in-vitro*実験で行われている。化粧品にも含まれる酸化亜鉛、酸化チタン等のナノ粒子も研究対象として広く検討されている。しかしながら、これらの実験だけでは生体影響を把握することはできても、生体内で起こる本質的なメカニズムを捉えることはできない。また、用いられる動物や細胞・微生物の種類は極めて多様で多岐にわたるため、*in-vivo, in-vitro*実験で知見を蓄積してもこれを普遍化・体系化することは難しい。

先程述べた「本質的メカニズム」を規定するには非常に難しいが、その一つは、「粒子と基本的な生体障壁である細胞膜との相互作用」であろう。このような発想のもと、私は、これまでにナノ粒子と細胞膜の界面現象に焦点を当てた研究を行ってきた。しかし、実験でこれを把握することは簡単ではない。界面で何が起きているのか??　分子レベルのメカニズムを把握することができないか??　そこで着目したのが分子シミュレーションである。分子シミュレーションでどのようなことが、どこまで分かるのかを、本助成で行った研究で報告させて頂いた。コスメトロジーの分野では、理論計算を用いた事例があまりないと（私が知る限りは）感じているので、新しい切り口のひとつとして見て頂ければ幸甚である。また、ナノ粒子と細胞膜の界面現象に関する研究をさらに推進していくためには、理論と実験の融合が重要となると考えている。本助成により、実験系を立ち上げることもできた。感謝申し上げたい。

最後になりましたが、ご支援を賜りましたコスメトロジー研究振興財団に改めて感謝の意を表します。

（大阪府立大学大学院工学研究科物質・化学系専攻化学工学分野）

平成 28 年度　研究助成

めずらしいFGF

中山　文明

私の主たる研究テーマは放射線障害の治療法の開発であり、それは所属機関のミッションである。今回の研究で扱ったFGF13は、FGF11サブファミリーに属する増殖因子であり、以前同じサブファミリーメンバーであるFGF12の基礎・応用研究を行っていた経験から派生してきた研究対象である。放射線と関連づけず、本来のミッションから遠いように思われる研究テーマだが、基礎研究がないと応用も利かないので大切にしている。そのため、この課題に研究費をつけていただけたことは大変有難く、少しでも前進できたことに大いに喜んでいる。FGF11サブファミリーは、典型的なFGFと相違点が多く、重要性が認識されていないためか、あまり研究が進んでいない。誰も顧みない領域には、それなりに理由があるのだろうが、必要に迫られて参入し、いろいろ探求してみた。その結果、この領域の基礎研究はとても面白く、FGF分子の別の側面を顧みることができた。さらに、私の所属機関のミッション、疾患研究、美容研究等へといろいろ応用可能なとても潜在性のあるものに思えてきた。今では私の数少ない基礎研究テーマとなったが、今後とも大事にしてゆきたい。

最後に、本研究に対してご支援を賜りました公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に対し厚く御礼申し上げます。

（放射線医学総合研究所）

平成 28 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

原　雄二

この度は、貴財団より多大なるご支援を賜り、心より御礼申し上げます。

私の研究は、細胞膜の構成成分であるリン脂質について、細胞膜間での局在変動がどのように細胞・生体に影響を与えているか研究を行っております。特に細胞膜の外層から内層にて、特定のリン脂質を輸送するリン脂質フリッパーゼを介したリン脂質挙動が、イオンチャネルをはじめとした膜タンパク質の活性制御について興味を持っており、これまでに膜張力により活性化される PIEZO1 イオンチャネルとリン脂質挙動の関係性を明らかにいたしました。また、リン脂質挙動の微細な変化は、細胞遊走、増殖などに重要な役割を果たしていることが明らかになりつつあります。最近の私共の研究でも、これまでの研究結果を支持するデータを得ており、皮膚細胞、組織の恒常性維持に、リン脂質局在の制御機構が関わる可能性が示唆されています。リン脂質動態および細胞膜物性感知機構の相関について、今後もさらに研究を進めていく所存でございます。

最後になりましたが、コスメトロジー研究に対し門外漢だった私に、多大なるご支援および研究機会を賜りましたこと、深く御礼申し上げるとともに、貴財団のますますのご発展を祈念申し上げます。（京都大学大学院工学研究科）

平成 28 年度　研究助成

ドラッグリポジショニング手法をコスメトロジー研究に応用する

廣明　秀一

私は、コスメトロジー研究振興財団研究助成による助成を受けるのは平成 21 年（第 20 回）に引き続き、今回が 2 度目です。前回の助成により、LNX1 の PDZ ドメインの立体構造を決定することに成功しました。その後、文部科学省科学技術研究費補助金などに助成されつつ、その PDZ ドメインを特異的に阻害することで、複数種類の細胞のタイトジャンクションを強化する化合物を、発見するに至りました。この化合物を実用化することで、皮膚のバリア障害やそれに引き続き起こる炎症の治療・予防などが革新的に進むのではないか？　当時の私は、そのように思い、意気揚々でした。

しかし、当該化合物について、企業との共同開発を目指して、技術展示会に出展したり、日本医療開発機構などが主催する DSANJ 商談会などに出席して情報提供を行っても、社会実装は進みませんでした。それは、タンパク質構造などの基礎研究などに注力する私の研究室ではマウスなどの動物実験を遂行する予算も人員もなく、せっかく発見した化合物であっても、*in vivo* の POC 研究が不十分であるからです。それに必要な研究資金はどこからも得られませんでした。

そこで私は、同じように開発コスト削減の強烈な圧力にさらされている創薬の現場でとられている「ドラッグリポジショニング」戦略を取り入れました。具体的には、既に医薬品として認可されている化合物、あるいは化粧品原材料として登録されている物質（およびエキスなどに含まれている成分）に着目して、目指す機能性成分を再発見する手法です。これも、私が、創薬科学研究科という創薬技術の最先端の動向を知ることがたやすい部局に所属しているからこその発想である、と自負しております。創薬科学研究科の大学院生の多くは製薬企業を目指して日々知識を研鑽しております。しかし、単一業界に限定した出口だけではなく、化粧品や香料・ファインケミカルといった、幅広い分野で活躍できる専門家を育てていきたい、と考えております。

最後になりましたが、コスメトロジー研究振興財団研究助成を頂き本研究をご支援いただきましたこと、心から感謝申し上げます。

（名古屋大学大学院創薬科学研究科構造分子薬理学分野）

平成 28 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

福田　智一

このたび、コスメトロジー研究振興財団から支援くださりまして心から御礼申し上げます。このたびは動物の刺激性試験の試験管内検出系としてヒト角膜上皮細胞を使用する研究を行わせていただきました。使用した角膜上皮細胞はとても取り扱いが難しく、少し細胞密度が低下するとすぐに細胞増殖能力を失う大変ハンドリングが難しい細胞でした。しかし我々が行った無限分裂操作によって、かなり扱いやすい材料へ改変することができました。この改変によって再現性の高い試験管内の刺激性試験の実施が可能になると考えられます。

研究を開始した当初はなかなか研究が思うように進まず、苦しんだ時期がありました。特に細胞を良い状態に維持したまま、遺伝子導入するための最適化に試行錯誤が必要でありました。角膜上皮細胞は刺激性試験に使用されるほど感受性が高いために、通常の組み換えウィルスの実験条件では弱ってしまうという矛盾した状態でありました。組み換えウィルスを高純度に精製することで乗り越えたのですが、何とか成果を上げられたのは、共同研究者の先生方ならびに財団のご支援の賜物と考えています。現在、研究成果を英文論文として投稿中ですが、査読においてさらに追加実験が要求されています。最新の研究成果を発表するためには厳しい査読を乗り越えなければなりません。近年の傾向を見ると要求されるデータ量がかなり増加しており、厳しい状況が続いています。おそらく最近、生物学の領域では研究倫理の問題が指摘されており、より厳しい基準に適合しないと出版させないという動きがあるのだと思います。現在も本研究は査読を乗り越えるための追加実験を実施中であります。近年、我が国の科学技術の低下、英文原著論文数の減少が指摘されています。今後も私どもの研究へご理解とご支援をお願い申し上げます。

（岩手大学理工学部）

平成 29 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

水谷　健一

このたびは貴財団の平成 29 年度研究助成に採択いただきまして、深く感謝申し上げます。一昨年に本所属に異動し、研究室の再始動のための大きな励みをいただきました。本研究助成のテーマは、創傷治癒過程における皮膚組織の血管網を観察するという内容で、私自身は脳の発生・形態学を専門にする研究者ですので、皮膚に関する研究は全くの新規テーマであるため、採択いただけるとは考えていませんでした。このため、本助成の採択を機に、皮膚研究にも取り組めるきっかけをいただいたことに、重ねて御礼申し上げます。

現在、私の研究室が最も興味があることは、毛細血管の発生・発達・老化であり、これが周囲の組織幹細胞の微小環境の構築・破綻にいかに関連性があるのかについて、脳や皮膚の発生・発達・老化を中心に研究を行っています。特に、毛細血管が極めて多種多様な性質をもったヘテロな内皮細胞の集団であることに着目し、固有の性質をもった血管が特有の生理機能を発現することが、組織の発生・発達・老化現象を解く上で重要であるとの観点から、研究を進めています。今回、これまで研究室で確立していた脳の組織学的な実験系を皮膚組織に応用し、試行錯誤の結果、この一年間で皮膚の組織学実験の系を立ち上げることができたことが何よりの成果だと考えています。皮膚科学の分野はまだまだ知識が浅く、学ぶべきことが無数にある段階ではありますが、本助成をきっかけに皮膚組織の血管の形態学的な特徴と創傷治癒における生理機能の一端が明らかになったことは大きな成果だと考えています。

末筆になりましたが、コスメトロジー研究振興財団の益々のご発展を心から祈念申し上げます。

（神戸学院大学大学院薬学研究科）

平成 29 年度　研究助成

コスメトロジー研究振興財団 研究助成を受賞して

保嶋　智也

この度は、貴重な研究助成金をいただきまして公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に深く御礼申し上げます。私は、低分子化合物である薬物や生理活性物質など体内動態を司る「トランスポーター」と呼ばれる分子の研究を専門としております。その研究を進めるうちに、メラニン合成に関わるトランスポーター分子に関わることになり、貴財団の研究助成事業に応募することとなりました。多くの解析を進めるうえで研究資金の不足に悩まされていた当初の私にとって、貴財団からの助成金は非常にありがたく感じたのを覚えております。また、このコスメトロジー研究振興財団研究助成が私にとって財団からの初めての研究助成の受賞となり、研究者として大きなステップアップになったと感じています。今後とも、多くの研究者の研究を支える研究助成事業を行っていってほしいと思います。最後になりましたが、公益財団法人コスメトロジー研究振興財団の益々のご発展を祈念いたしまして、挨拶のお言葉とさせていただきます。　（名古屋市立大学大学院薬学研究科）

平成 28 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

柳　輝希

この度は「コスメトロジー研究助成」を賜り、誠にありがとうございました。私は、ミトコンドリアに注目し、紫外線曝露による皮膚老化と表皮細胞の発癌について検討いたしました。従来より、ミトコンドリアは細胞増殖と細胞死において中心的な機能を持つことが報告されていました。本研究にて、紫外線曝露によっておこる皮膚癌（扁平上皮癌）においてもミトコンドリア分裂関連分子が関与していることがわかりました。この成果が、紫外線曝露後に生じた皮膚癌の治療につながることができれば大変うれしく思います。引き続き研究を発展させていきたいと存じます。一方で、正常皮膚組織においてはミトコンドリア分裂関連分子は細胞死を適切に遂行するために必要な分子と考えられております。したがって、正常細胞と癌性の細胞においては、その果たす機能が全く異なることが予想されます。今後は正常表皮細胞におけるミトコンドリア分裂関連分子の機能を、別のアプローチで解析していく予定です。

この度は研究助成を賜り誠にありがとうございました。今後も、化粧品学・皮膚科学への研究助成を継続いただければ、大変ありがたく存じます。どうぞよろしくお願い申し上げます。　（北海道大学皮膚科）

平成 28 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

渡利　彰浩

表皮は角層および生きた表皮細胞層で構成されますが、生きた表皮細胞層の１つである顆粒層では、隣接する細胞間にタイトジャンクション（TJ）が形成され、TJにより細胞間隙がシールされることで生きた表皮細胞層での物質透過が制限されます。美白成分やアンチエイジング成分等の有効成分を効果が期待できる部位まで届ける方法として“TJ制御”という観点から研究を行っていますが、コスメトロジー研究の雑感にあたり、今後のTJ制御の発展について述べさせていただきます。

クローディンをはじめとしたTJバリアを構成する主要分子の発見から、様々なTJ modulatorが開発されてきました。これまでのTJ modulatorは、２つの細胞間に形成

されるTJバリアを制御するものでしたが、最近は３つの細胞間で形成されるTJ構造に着目した新たなTJ modulatorが開発され始めています。３細胞間の TJは２細胞間のTJと比較し間隙のサイズが広いことから、より大きな有効成分の送達経路として利用できるのではないかと推察されます。また、2014年にクローディンの立体構造が明らかとなり、2016年にはクローディンとTJ modulator複合体の立体構造も解明されました。これらの成果により、クローディンの立体構造をベースとしたより精度の高いTJバリア制御法の開発が始まったと言えます。このような分子生物学的発展が積み重なることにより、効果的で安全な有効成分の浸透法が出てくるものと期待されます。

最後になりましたが、本研究をご支援いただいた公益財団法人コスメトロジー研究振興財団及び関係者の皆様に心より御礼申し上げます。　（大阪大学大学院薬学研究科）

平成 29 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

有賀　敦紀

この度は研究助成をいただき，大変うれしく光栄に思っております。審査に携われた先生方，日頃からご指導いただいております先生方に感謝申し上げます。

私は認知心理学を専門としており，化粧の濃さがもたらす心理的影響に興味がありました。近年の日本では薄化粧が流行していますが，なぜ薄化粧が流行しているのか，なぜ薄化粧が魅力的に評価されるのか，といった点を明らかにすることができれば，流行を操作することができるのではと考えておりました。しかし，今回の研究は行動経済学に着想を得ており，私自身，初めてのアプローチでした。冒険的な研究であったため，なかなか勇気を持って取り組むことができませんでした。そのとき，ちょうどコスメトロジー研究振興財団より助成金をいただけることが決まり，この研究に取り組むことができた次第です。

結果として本研究において，化粧の濃さの魅力は，それだけで決まるのではなく，化粧の濃さに基づく他者との視覚的類似性によっても決まることを明らかにすることができました。今回の知見をベースに，今後も高いモチベーションを持って研究に励みたいと思います。

研究の機会を与えてくださったコスメトロジー研究振興財団には，心より感謝申し上げます。

（広島大学大学院総合科学研究科）

平成 28 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

伊藤　文人

私は人が社会生活の中でどのように意思決定を行っているのか、背景に脳のどのような機能があるのかという点に興味を持ち研究を行って参りました。本研究で着目した「他者からの評価」は、人が社会生活を送る上で避けられないものとなります。この他者からの評価は様々な場面でその人の人生を左右することになっていきます。例えば、上司から良い評価を得られれば昇進に結びつくかもしれませんし、妻からの良い評価を得られていれば幸せな結婚生活が続くかもしれません。つまり、より良い印象を他者に与えることが翻ってより良い人生を送ることにつながると言っても過言ではないかもしれません。こうして考えると、相手からどう思われているか、つまり「他者からの評価の推論」も必然的に重要となってくることが明らかです。本研究はこうした認知のベースにある脳の機能を明らかにするものでありました。化粧をするという行為は相手に良い印象を与えるための重要な方略と考えられますが、福島県立医科大学の藤原寿里先生のご研究は、「化粧がその人の内面にポジティブな影響を及ぼす」というもう一つ化粧の重要な役割を示唆しております。化粧の役割が他者に与える印象の操作のみならず自己認知の変容にもあるという事実は、化粧という慣習の心理学的重要性を再認識させるものであります。もしかすると、「化粧をすると他者が自分に良い印象を持ってくれそうだ」という無意識の他者からの評価の予想が、女性の自己認知を変容させ、内面にポジテ

ィブな影響を与えているのかもしれません。こうした今後の研究につながるアイデアをいただくことができた点でも今回助成していただいて本当にありがたかったと実感しております。助成してくださったコスメトロジー研究振興財団様ならびに、助成期間中に様々なイレギュラーが発生したにも関わらず、長い間サポートをしてくださった事務の方々に心より御礼申し上げます。

（サウサンプトン大学心理学部、日本学術振興会、北海道大学保健科学研究院）

平成 29 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

五島　史行

この度、コスメトロジー研究振興財団研究助成をいただきましたことを心から御礼申し上げます。私は耳鼻咽喉科において、心理治療や心身医学に力を注いでいます。この領域は非常に重要なものであると考えておりますが、その思いとは裏腹にあまり日の目を見ない領域であります。体の病気と心は密接に結びついているという考えは現代の医学教育ではあまり強調されていないのが現状です。患者さんがどのような症状で病院を受診しているかを言葉を交わす前にどのくらい感じることができるかというトレーニングをしばらくしてみたことがあります。その際には診察室に患者さんが入ってきたときの様子、目の様子を観察するようになります。そのような診療を心がける中で気づいたのは心理的な健康状態が眼瞼裂幅に関連することです。このことから患者さんの心の健康度を眼瞼裂幅によって評価することを発想しました。眼瞼裂幅測定による耳鼻咽喉科心身症患者の客観的評価のこころみというテーマで研究を行いました。しかし実際に研究を行ってみると、眼瞼裂幅は日内変動があり自律神経の影響を強く受けていることが分かりました。今回の研究では一年という短い研究期間であったために、日内変動の記録を十分にとることができませんでした。眼瞼裂幅が健康度に影響を与えるという仮説を検証するためにはまだまだデータの収集が必要と感じています。このことをさらに深め心身医学、行動医学に応用していきたいと考えています。

（独立行政法人国立病院機構東京医療センター）

平成 28 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

四角　隆二

このたびは、コスメトロジー研究振興財団の研究助成に採択いただきまして、誠にありがとうございました。私が研究の中心に置いている、サーサーン・ガラスの研究分野を開拓されたのは、深井晋司氏でした。1959 年以前、欧米の学界では「古代ガラス」と言えば、いわゆるローマ・ガラス、「西アジアのガラス」と言えば、イスラーム・ガラスを指していました。深井氏は、イランの首都テヘランの古物商の店先で、正倉院タイプ円形切子碗類品を発見するにおよび、サーサーン朝のガラスである、と発表されたのです。以後、東西交流史あるいは美術史的側面での理解は進みましたが、研究が考古学的情報を喪失した盗掘品に依拠していたこと、1979 年のイラン・イスラーム革命とその後のイラン・イラク戦争勃発の結果、考古学的な理解はほとんど進展することなく、今日に至ります。

勤務する岡山市立オリエント美術館には多数のサーサーン・ガラスが所蔵されていますが、いずれも美術市場を介した購入品であり、考古学情報を喪失しており「美術品」以上の扱いが困難でした。展覧会開催で知り合った、シンプソン，St, J 大英博物館研究員のご厚意でメソポタミア都市遺跡出土品の調査を始めたところ、博物館資料サーサーン・ガラスでは見たことのなかった小瓶の数的卓越に驚いたことが本研究の出発点です。

サーサーン朝は文字記録に乏しく、ローマ／ビザンツ勢力との軍事的記録以外の政治経済史は不明確です。ユーフラテス川を越えて東方へ流入する東地中海系ガラスの内容物はなんだったのか。いろいろ考えていたところ、大学院

修士時代に調査したシリアの農村遺跡では、村落消費を超える規模の大型オリーブ・プレスが出土していたことを思い出しました。さらにローマ時代にはバラやユリの香りを移した香油文化が花開いたことを学ぶにおよび、西方から流入した化粧文化の可能性を想定したのです。

考古資料サーサーン・ガラスを用いた本研究において、南北メソポタミアで小型容器の出現頻度が異なることを確認できたことは大きな成果です。化粧文化が地中海周辺から同心円状に拡散する現象をキリスト教徒やユダヤ教徒を結びつける予察を提示しましたが、今後はサーサーン朝領域内のキリスト教徒の動向を解明していきたいと思っています。

（岡山市立オリエント美術館）

平成 28 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

西尾　美登里

近年の政策により、要介護者である家族を自宅で介護する男性が増えています。その中でも、女性である母や妻を多く介護する男性が増えており、この現象の要因は家族構成と役割の変化、政策による女性の社会進出、医療が病院から在宅へギアチェンジされたことによります。それまで社会的役割を担っていた男性が家庭で介護者役割を担うことになりました。その傾向は今後ますます進展すると感じています。

もともと社会的な評価に価値を置き、外からの援助につながりにくい傾向がある男性が、なんとか自分でうまく介護しようと努力し、うまくいかなければ自分を責め、恥と感じることが、介護の虐待の原因という仮説に基づき研究を進めています。現に介護が原因での虐待の加害者は約 7 割が男性で、被害者は約 8 割が女性です。そこで私は、男性の家庭内進出というテーマで、男性がスキンケアや料理、洗濯などができるような活動を研究と同時進行しています。

スキンケアと化粧品は母や妻を輝かせることのみならず、男性が母や妻に輝いていてほしいという思いを投影するものと考えました。実際に妻にスキンケアをしている男性は、よく妻に触れて話しかけています。当研究によりスキンケアを実施する男性の特徴が一部ではありますが明らかになりました。次点の研究は、スキンケアの実施者である男性にとって、母や妻に触れる効果を検証したいと考えます。つまり、スキンケアは実施するほうもされるほうも共に健康になるという仮説に沿って研究を進めてまいります。

今後は、男性介護者が化粧品を購入しやすいような多様性を認める社会となることを望んでいます。当研究結果は原著論文として報告できる予定です。

コスメトロジー研究振興財団から研究助成をいただき、当研究の研究を可能にしていただいたことに深く感謝いたします。

（福岡大学医学部看護学科）

平成 28 年度　研究助成

コスメトロジー雑感

眞部　寛之

この度はコスメトロジー研究振興財団の研究助成に採択していただき、誠にありがとうございました。本研究助成を得て、研究を展開することができましたことをお礼申し上げます。

嗅覚の研究は視覚系研究に比べ 30 年は遅れていると言われており、まだまだ発展途上の分野です。しかし、空気中を漂う匂い分子を認識する受容体が発見されてから約 30 年を経て、匂いを認識する機構が次々とわかってきました。そして、匂いの記憶や、匂いで我々の感情や情動を惹起される脳内機構の解明に向けた研究が本格的に展開され始めたところです。

ある香水の香りを嗅ぐと思いだす人がいたり、花の匂いで懐かしい記憶が呼びさまされたりすることがあるかと思います。この神経回路機構は全く不明でした。本研究は、前梨状皮質のニューロンが、匂いとそれに紐づく特定のシーンに応答することを明らかにしました。しかも、このようなニューロンを集めてくると、すべてのシーンに対応して応答することが分かり、梨状皮質は、匂いと、匂い経験

に伴うエピソードとを連合しているのではないかという新たな仮説を提唱することができました。これまでの嗅覚系研究は、匂いがどのように認識されるのかに焦点があてられていたため、匂い刺激に対してどう応答するかに着目し、匂い刺激に応答したニューロンが他の場面でどのように応答するかは不明でした。本研究は、匂い記憶という切り口で、梨状皮質の新たな機能を見出したと言えると思います。さらに発展させていくことで、匂い記憶の脳内情報処理機構の基本ロジックを明らかにしていきたいと思います。

神経回路を扱う我々のような研究者が、どのようにコスメトロジー分野に寄与できるのか、基礎的な研究をどう応用していくか、まだまだ模索していかなければならないことは多いかと思います。しかし、今後とも努力を続け、コスメトロジー分野の発展に寄与できればと思います。

（同志社大学研究開発推進機構）

平成 30 年度　国際交流助成

第28回日本色素細胞学会学術大会の報告

永井　宏

平成 30 年 10 月 13 日㈯～ 14 日㈰神戸商工会議所に於いて、第 28 回日本色素細胞学会学術大会を開催いたしました。

本学会は、国際的な色素細胞の研究組織である IFPCS（International Federation of Pigment Cell Societies： 国際色素細胞連合）を構成する世界の 4 大色素細胞学会 JSPCR（日本）、PASPCR（アメリカ大陸）、ESPCR（ヨーロッパ）、ASPCR（アジア）の中核として日本における色素細胞研究の推進と情報発信を担っております。

本学術大会は世界中の IFPCS メンバーに対して国際機関誌（Pigment cell melanoma research 誌）による告知を行い、海外からも PASPCR、ESPCR、ASPCR より色素細胞研究における世界的なリーダーを招聘し、より国際的なセッションを開催することで、日本の若手研究者の研究発表の場とし、さらには実質的な共同研究の発展の機会としたいと考えておりました。本学会では計 7 名を招聘し、海外講演者と中心とする「Pigmentary Disorders Workshop」を実施、また一般演題にも海外発表を加えることで、国内発表者との相互的な交流がより図れるよう工夫いたしました。本学会の公用語は原則英語となっており、休憩時、懇親会などの交流時間にも、海外講演者を交えて非常に活発に議論が行われており、参加者からも大変有意義な会であったと評価を頂きました。

結果的に全国から会員をはじめとする 130 名以上の色素細胞ならびに色素異常症の研究者・医療従事者が意見交換を行う貴重な機会となりました。

この度、公益財団法人コスメトロジー研究振興財団からのご支援により、第 28 回日本色素細胞学会学術大会を成功裡に執り行うことができました。学会の開催・運営には多額の資金が必要となるため、貴研究財団からのご支援は本当に心強く有難いものとなりました。この場を借りて、改めてお礼を申し上げます。（神戸大学大学院医学研究科）

平成 30 年度　学術集会支援助成

第50回日本結合組織学会学術大会を終えて

鍋島　一樹

平成 30 年 6 月 29-30 日（金、土）の両日、福岡大学病院メディカルホールにて第 50 回日本結合組織学会学術大会を開催いたしました。あいにくの雨模様にもかかわらず、201 名の参加を得て、99 の演題について熱のこもった発表と議論が行われ、盛会裡に終えることができました。

本学術大会では⑴目でみえること、⑵細胞・細胞あるいは細胞・マトリックスの連携、⑶臨床と基礎の連携をテーマとしました。⑴については、2 光子／多光子顕微鏡を駆使して生体内での 細胞・細胞 あるいは細胞・マトリックス連携を目に見える形で呈示して頂けるエキスパートのお 2 人、Radboudumc /MD Anderson Cancer Center の Peter Friedl 先生と自然科学研究機構生理学研究所（岡崎）の鍋倉淳一先生に、それぞれがん細胞の浸潤と脳組織における神経細胞とグリア細胞の連係について、そのメカニズムと共にご講演いただきました。⑵については、細胞・細胞連携に着目したヒアルロン酸および emmprin 研究を長年リードして来られた Medical University of South Carolina の Bryan P. Toole 先生にマイスターレクチャーとして講演いただき、長年の研究者としての経験に基づいた若い方々へのメッセージも発信していただきました。“がんにおける微小環境と相互作用”と題したシンポジウムでも 3 題の講演をいただきました。⑶については、“基礎と臨床の融合”と題したシンポジウムを企画し、弾性線維と疾患、骨格筋代謝と糖尿病、心臓における線維化の3つのテーマについて、臨床と基礎の立場それぞれより講演いただき、会場からも多くの質疑がありました。

結合組織とマトリックスバイオロジーに関わる基礎と臨床の研究者が一堂に会して、意見を交換するのがこの学会の特色ですが、今回の学術大会を契機に新たな共同研究がスタートしたとの報告も受けており、今回も十分にそれが行われたものと考えています。若手の育成のための Young investigator award（YIA）にも多数の応募をいただき、6 名の若き研究者達に賞の授与が行われました。

これも貴財団によります貴重なご支援のお蔭とこころより感謝申し上げます。　（福岡大学医学部病理学講座）

平成 30 年度　学術集会支援助成

第36回日本美容皮膚科学会総会・学術大会を終えて

尾見　徳弥

この度、2018年8月4日、5日に東京国際フォーラムで第36回日本美容皮膚科学会を開催させていただきました。

美容皮膚治療は大きな発展を示し、日本美容皮膚科学会の会員数もほぼ2,500名に達し、社会的にも「プチ整形」として消費者にも広く受け入れられています。近年ではボツリヌス菌毒素による腋窩多汗症の治療が保険適応となったり、脱毛、美顔を対象とした医療機器が厚労省から認可されるなど診療分野においての普及性も目覚ましいものがあります。

今回は、海外の最先端の知識を習得できる目的で、IMCAS代表のDr. Asher、アジア皮膚科学会のProfessor Goh、アメリカレーザー医学会のProfessor Kauverなど海外からの国際学会を代表する先生方とで共同シンポジウムを実施しました。また韓国皮膚科学会からもドクターを招へいし、日本よりも社会において一般的となっている韓国の美容皮膚科治療についてのシンポジウムも開催しました。従来の知識の補完となって、さらに一歩踏み込んだ知識の習得につなげられ、より充実した美容皮膚科領域の治療に役立てられたとの声も多数いただいています。その他、新しい知識を習得できる場として婦人科領域のRejuvenation治療など基礎のみでなく最先端の知識を導入できるように心がけました。

また、美容皮膚科施術に精通していない若手医師のために8月3日にプレセッションとして「美容皮膚科のいろはのい」として光治療の原理、レーザー・光線治療とケミカルピーリング・注入剤の3つのセミナーを実施し好評でした。

おかげさまで、学術大会の参加者は1,456名、講演者107名、展示企業99社、日本美容皮膚科学会史上最もスケールの大きな学会にすることができました。このような盛会へと貢献いただけました貴財団のご支援に対し厚く御礼申し上げます。

（クイーンズスクエアメディカルセンター）

平成 30 年度　学術集会支援助成

「第22回天然薬物の開発と応用シンポジウム」報告

塚本　佐知子

本シンポジウムは、薬用天然資源の開拓に始まり、天然薬物の化学構造、合成、生合成、薬効解析、漢方薬や民間薬の有効利用など、天然薬物全般に関する研究を対象としています。そして、薬用植物に加えて、微生物や海洋生物を医薬シーズとして創薬を目指す研究を討議の対象としております。自然豊かな我が国では天然薬用資源からの創薬研究の歴史は古く、今日まで活発な研究が行われてきました。そして、現在用いられている医薬品の多くが、天然物およびその誘導体であります。高齢化を迎えた我が国においては、健康に関する国民の関心は高く、その社会的要請に応えるためにも天然薬物からの創薬研究は今後益々重要と考えられます。

今回のシンポジウムは平成30年10月7日㈰から8日（月・祝）の2日間、熊本大学薬学部のキャンパスで開催されました。6日には台風25号の影響を受け山陽新幹線が一時運転見合わせとなり、到着するまで苦労された参加者もいたようですが、開催日の熊本は快晴の良い天気に恵まれました。

特別講演として、北海道大学大学院水産科学研究科の酒井隆一先生に「細胞表面の『生命装置』に作用する水溶性海洋天然物の探索（低分子編）」という表題で、また東北大学大学院農学研究科の山下まり先生から「中間体を基盤とした海産毒の生合成研究」という表題でご講演いただきました。また、シンポジウムとして、熊本大学薬学部の創薬研究に関する新たな取り組み「有用植物X創薬システムインテグレーション拠点推進事業」に関するシンポジウムと、天然薬物学研究の第一線でご活躍されている4名の先生方による「天然薬物学研究 ～創薬研究の礎～」と題したシンポジウムを開催しました。さらに、これら特別講演および企画シンポジウムに加え、天然薬物の開発と応用に関する幅広い関連分野から49題の一般講演とポスター発表がなされ、参加者一同にとって有意義な討論の機会となりました。

最後に、公益財団法人コスメトロジー研究振興財団には、本シンポジウムの開催にあたり、多大なご援助を賜りましたことを厚くお礼申し上げます。

（熊本大学大学院生命科学研究部）

付　　録

事業報告書
役　　員

事 業 報 告 書

（自平成 30 年 4 月 1 日　　至平成 31 年 3 月 31 日）

《研究助成関連》

2018	5	7	公募開始	全国 617 の大学、病院、研究機関等へ公募要領及び推薦書を送付、関連学術雑誌 2 誌、当財団 HP 他 12 機関 HP に公募要領を掲載
	7	9	公募締切り	応募総数120件
	7/13 ～ 8/24			各選考委員による個別審査
	9	3	選考委員会（第 3 分科会）	精神、文化に関する分野の選考
	9	5	選考委員会（第 1 分科会）	素材、物性に関する分野の選考
	9	6	選考委員会（第 2 分科会）	生体作用、安全性に関する分野の選考
	9	27	本選考委員会	各分科会の結果を総合的に判断して研究助成43課題を選考
	10	4	第二回臨時理事会（書面）	本選考委員会より答申、助成課題決定
	11	20	第29回 表彰・贈呈式	研究助成対象43課題の代表者へ、助成金贈呈書を授与
			記念講演	演題：日本人の白嗜好と、感性をつなぐ色彩 講演者：齋藤 美穂 先生　早稲田大学 常任理事
	12	10	助成金交付	採択課題に対し研究助成金を交付　総額4,500万円
2019	2	19	選考委員への承認（書面）	2019年度研究助成公募要領他

《国際交流助成関連》

2018	4	5	審査	国際交流（招聘）：第28回日本色素細胞学会学術大会
	4	25	助成金交付	国際交流助成金　50万円

《学術集会支援助成関連》

2018	2	21	審査	学術集会支援：第22回天然薬物の開発と応用シンポジウム
	4	25	助成金交付	学術集会支援助成金　50万円
	2	21	審査	学術集会支援：第36回日本美容皮膚科学会総会・学術大会
	4	25	助成金交付	学術集会支援助成金　50万円
	2	21	審査	学術集会支援：第50回日本結合組織学会学術大会
	4	25	助成金交付	学術集会支援助成金　50万円

《理事会関連》

2018	5	23	第一回通常理事会	平成29年度事業報告及び収支決算報告（含監査報告）の承認 任期満了に伴う選考委員の選任 任期満了に伴う理事候補者の選出 任期満了に伴う監事候補者の選出 株主としての議決権行使について、報告事項
	6	18	第一回臨時理事会（書面）	代表理事（理事長及び副理事長）及び業務執行理事（専務理事）の互選 事務局長の選任、常勤役員の報酬の承認、常勤役員の退職手当の承認
	10	4	第二回臨時理事会（書面）	平成30年度（第29回）研究助成者等の承認
	11	20	第二回通常理事会	平成30年度収支予算書の一部変更の承認 平成30年度の事業計画及び予算案の承認、報告事項

《評議員会関連》

2018	6	8	定時評議員会	平成29年度事業報告及び収支決算報告（含監査報告）の承認 任期満了に伴う理事の選任 任期満了に伴う監事の選任、報告事項
	11	27	評議員への報告（書面）	第二回通常理事会議決事項、表彰･贈呈式その他の報告

《その他》

1）報告書発行

2018	5	1	中間報告書	研究業績　中間報告集　第27号
	9	1	完了報告書	コスメトロジー研究報告　Vol. 26（2018)、CD版を作成

2）行政届出関連

2018	6	13	内閣府へ平成29年度事業報告書等の提出
	6	22	内閣府へ変更の届出（理事、監事の改選）
	6	25	内閣府による立入検査
2019	1	24	内閣府へ平成31年度事業計画、収支予算書の提出

3）情報公開（当財団HP）

2018	4	6	公募要領	2018年度「コスメトロジー研究」公募要領を掲載
	6	30	事業報告及び収支決算	平成29年度事業報告書及び収支決算報告書を掲載
	9	1	研究報告書	「コスメトロジー研究報告 Vol. 26（2018)」を掲載
	11	22	予算書一部修正	平成30年度予算書の一部修正
			研究助成者及び課題名	2018年度（第29回）研究助成者名及び研究課題名を掲載
2019	3	1	事業計画及び収支予算	2019年度事業計画及び収支予算書等を掲載

2018年度　助成を受けられた方々

(1) 第 28 回研究助成（43 名）

第 1 分野：素材、物性に関する分野（10 名）

氏　名	所　属	職位	研究課題
景山　伯春	名城大学理工学部 教養教育化学教室	准教授	天然スキンケア原料としてのマイコスポリン様アミノ酸：生産基盤開発と機能解明
笹井　亮	島根大学総合理工学部	准教授	機能性化粧品として期待できる皮膚ガス応答性発色素材の研究開発
下里　剛士	信州大学農学部	准教授	乳酸菌オリゴDNAによる上皮細胞の炎症制御と経皮核酸素材への展開
白神慧一郎	理化学研究所 生命医科学研究センター	基礎科学特別研究員	テラヘルツ分光で切り拓く角質中に必要な水の“質”の解明
須原　義智	芝浦工業大学システム理工学部 生命科学科	教授	β-アミノ酸から構築する人工コラーゲンの創製
中島　章	東京工業大学物質理工学院材料	教授	撥水性、抗菌・抗ウイルス性、紫外線遮蔽性を併せ持つ新規酸化物固体材料の開発
平野　智也	東京医科歯科大学 生体材料工学研究所	准教授	強紫外光が照射された部位選択的な治療を可能とする分子システムの開発
森　隆昌	法政大学生命科学部 環境応用化学科	教授	化粧品原料微粒子の液中での分散・凝集状態評価技術の開発
柳澤　実穂	東京農工大学大学院工学研究院	特任准教授	エマルション重合過程におけるミクロ生体高分子ゲルの粘弾性測定法の開発
山元　淳平	大阪大学大学院基礎工学研究科	講師	CRISPR-Cas 9 ゲノム編集技術を用いた紫外線防御剤となる多機能光回復酵素の開発

第 2 分野：生体作用、安全性に関する分野（27 名）

氏　名	所　属	職位	研究課題
足利太可雄	国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部	主任研究官	In vitro/in silico試験による皮膚感作性の毒性学的懸念の閾値（TTC）コンセプトの確立
飯島　一智	横浜国立大学大学院工学研究院 機能の創生部門	准教授	シリカナノ不織布を用いた汎用皮膚三次元モデルの開発
五十里　彰	岐阜薬科大学生命薬学大講座	教授	微弱紫外線による皮膚タイトジャンクションバリアの破壊機構の解明と保護化合物の探索
伊藤　敦	東海大学工学部原子力工学科	教授	太陽光紫外線に暴露された毛髪の酸化度のX線イメージングによる画像化
伊藤佐生智	名古屋市立大学大学院薬学研究科	准教授	黄色ブドウ球菌免疫かく乱タンパク質を介したアトピー性疾患発症・増悪機構の解明
大和田智彦	東京大学大学院薬学系研究科	教授	脂肪酸の構造ダイバーシティを活用する生理活性物質創製
押海　裕之	熊本大学大学院生命科学研究部	教授	EGFが皮膚炎に与える影響とメカニズムの解明
神沼　修	山梨大学 医学域総合分析実験センター	准教授	アトピー患者に対する化粧品の皮膚刺激性・保護作用を評価する新規皮膚炎モデルの開発
神戸　大朋	京都大学大学院生命科学研究科	准教授	メラニン色素合成の解明に向けて ～チロシナーゼ関連タンパク質の金属要求性に関する基盤研究～

氏　名	所　属	職位	研究課題
北村　秀光	北海道大学遺伝子病制御研究所	准教授	神経ペプチドシグナルを介したアレルギー発症メカニズムの解明と皮膚炎軽減効果
木原　章雄	北海道大学薬学研究院	教授	アシルCoA合成酵素ACSVL4による皮膚バリア形成機構
小暮健太朗	徳島大学大学院医歯薬学研究部（薬学域）	教授	イオン導入時の微弱電流による皮膚組織炎症への影響と安全性の検証
繁森　英幸	筑波大学生命環境系	教授	食薬用植物からの育毛活性物質の探索
島村　裕子	静岡県立大学食品栄養科学部	助教	アトピー性皮膚炎発症者に高度に定着する黄色ブドウ球菌と健常者皮膚細菌の菌種間干渉の解析
清水　重臣	東京医科歯科大学難治疾患研究所	教授	アトピー性皮膚炎における新規オートファジーの関与とそれを応用した治療法開発
田中　沙智	信州大学農学部農学生命科学科	准教授	プロシアニジンB2による皮膚炎の治療効果の検証と抗炎症作用のメカニズムの解明
徳留　嘉寛	城西大学薬学部薬科学科	教授	高分子水溶性ナノ粒子の皮膚浸透挙動を題材とした高分子化合物の皮膚浸透メカニズムの解明
中村　元直	岡山理科大学大学院理学研究科	教授	有害物侵入を最前線で防ぐ新規な皮膚細胞機構の発見と皮膚保護剤創製への応用
服部　文幸	関西医科大学医学部 iPS・幹細胞再生医学講座	研究教授	ヒトiPS細胞に由来する若齢および加齢様の性質を示す積層及び立体皮膚オルガノイドの作製
原　博満	鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科	教授	アレルギー性化合物を感知する自然免疫受容体の同定とそれを利用した感作抗原性評価系の樹立
原口　省吾	昭和大学医学部生化学講座	助教	加齢に伴う皮膚のステロイド合成系の変容が皮膚機能に及ぼす影響
廣田　豪	九州大学大学院薬学研究院	准教授	ヒト皮膚に発現する薬物トランスポーター遺伝子多型・発現解析と経皮吸収への影響
藤井　博	信州大学先鋭領域研究群 バイオメディカル研究所	教授	皮膚保湿マーカー遺伝子FABP5の発現と機能制御機構の解析
水野　雅史	神戸大学大学院農学研究科	教授	植物由来グルコシルセラミド中のスフィンゴイドジエンの構造特性と皮膚改善機能
森　英樹	大阪府立大学大学院理学系研究科	准教授	創傷治癒に関わる細胞挙動に対するソフトマテリアルによるメカノストレスの影響評価
山田　勇磨	北海道大学大学院薬学研究院	准教授	ミトコンドリアを標的とするナノカプセル型機能性化粧品の開発
若松　一雅	藤田医科大学医療科学部	特任教授	栄養補助食品として使用されているレスベラトロールならびにエクオールのチロシナーゼ酸化物によるPro-oxidant活性

第３分野：精神、文化に関する分野（６名）

氏　名	所　属	職位	研究課題
上田（石原）奈津実	名古屋大学大学院理学研究科	講師	香りが認知能力に与える影響
逢阪　美里	聖路加国際大学聖路加国際病院	看護師臨床助教授	がん薬物療法に伴う爪の変化に対する、安全なアピアランスケアの検証
竹ノ谷文子	星薬科大学薬学部 総合基礎薬学教育研究部門	准教授	桜の香りによる脳に及ぼす影響の機能生理学的解析

氏　名	所　属	職位	研究課題
廣原　志保	宇部工業高等専門学校物質工学科	教授	生物・化学と経営の異分野融合による若年層男性に求められる化粧品に関する研究
藤原　圭志	北海道大学大学院医学研究院	助教	顔面神経麻痺患者に対するメーキャップ治療の有効性の検討
山田　朋弘	九州大学大学院　歯学研究院	准教授	ハイブリッド相同モデルによるresult-orientedな顎顔面手術シミュレーション法の開発

(2) 国際交流助成（1件）

受入責任者	招聘者	招聘目的
神戸大学大学院医学研究科 永井　宏	Center for Cancer Research, NCI, NIH, USA Thomas J. Hornyak, MD, PhD	第28回日本色素細胞学会学術大会へ招聘 (2018年10月13日～同年10月14日、神戸商工会議所)

(3) 学術集会支援助成（3件）

実施責任者	所　属	助成集会
鍋島　一樹	福岡大学医学部 病理学講座	第50回日本結合組織学会学術大会 (2018年6月29日～同年6月30日、福岡大学病院メディカルホール)
尾見　徳弥	クイーンズスクエア メディカルセンター	第36回日本美容皮膚科学会総会・学術大会 (2018年8月4日～同年8月5日、東京国際フォーラム)
塚本佐知子	熊本大学大学院 生命科学研究部	第22回天然薬物の開発と応用シンポジウム (2018年10月7日～同年10月8日、熊本大学薬学部宮本記念館)

役　　員

2019 年 7 月現在

理事長	小林　保清	株式会社コーセー　名誉会長
副理事長	小林　一俊	株式会社コーセー　代表取締役社長
専務理事	亀山　浩一	（常勤）
理　事	関根　　茂	日光ケミカルズ株式会社　代表取締役名誉会長
理　事	長野　哲雄	東京大学創薬機構　客員教授
理　事	二木　鋭雄	東京大学　名誉教授
理　事	西川　武二	慶應義塾大学　名誉教授
理　事	野呂　影勇	早稲田大学　名誉教授
理　事	廣部　雅昭	東京大学　名誉教授
理　事	山﨑　幹夫	元新潟薬科大学　学長
監　事	岩渕　信夫	公認会計士
監　事	村上　　實	弁護士
評議員会長	内藤　　昇	元株式会社コーセー　常務取締役
評議員	伊藤　正俊	東邦大学　名誉教授
評議員	奥　　直人	帝京大学　薬学部教授
評議員	齊藤　　勲	元厚生省大臣官房審議官
評議員	齋藤　美穂	早稲田大学　常任理事
評議員	仙名　　保	名古屋工業大学　先進セラミックス研究所　プロジェクト教授
評議員	中村　陽子	元厚生省医薬安全局安全対策課安全対策企画官
評議員	西岡　　清	兵庫県立大学　常務理事
評議員	宮﨑　榮三	東京工業大学　名誉教授

＊本財団についてのお問い合わせは下記に
お願いいたします。

公益財団法人 コスメトロジー研究振興財団

〒104−0032　東京都中央区八丁堀三丁目 11 番 8 号
ニチト八丁堀ビル五階

電話 03（3206）7721

コスメトロジー研究報告　Vol. 27／2019　　**非売品**

2019年 9月 1日発行

編集責任者　亀山 浩一
発　　行　公益財団法人 コスメトロジー研究振興財団
〒104－0032　東京都中央区八丁堀三丁目11番 8 号
電話　03（3206）7721
制　　作　エイエム企画
〒171－0014　東京都豊島区池袋四丁目24番 7 号
電話　03（3590）5375
印　　刷　太陽印刷工業

表紙デザイン監修：株式会社コーセー　商品デザイン部デザイン室

©2019　　不許複製　禁無断転載