

ISSN 2188-563X

# COSMETOLOGY

2025\_033

Annual Report of Cosmetology

コスメトロジー研究報告

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

## ごあいさつ

本財団は、1990年に株式会社コーセーの創業者小林孝三郎により設立され、コスメトロジー（化粧品科学）の確立と発展をめざして助成活動を進めてまいりました。今日までこの活動を滞りなく継続できましたのは、多くの関係者の皆さまのご理解とご協力によるものと心より感謝申し上げます。

コスメトロジーは、医学、生命科学、物理学、化学、そして心理学、社会学など幅広い学問領域が基盤となっており、これら様々な専門分野の研究者が一堂に集って高め合うことで、化粧品のサイエンスとして体系づけられてきたといえます。

本財団の使命は、そのセンターとしての役割を果たすことです。これまで助成した研究テーマは、化粧品の新素材や物性評価など工学的なテーマから、肌の健康や美容のための皮膚科学、化粧品の安全性、さらには化粧心理や化粧文化など多岐にわたります。

33冊目となる今年の研究報告書は、2022年度から2023年度に助成を受けられた研究者24名の研究報告を収載しています。また、昨年（2022年）の第35回表彰・贈呈式でコーセーコスメトロジー奨励賞を受賞された北山雄己哉大阪公立大学大学院工学研究科准教授の受賞講演録を掲載しています。

皆さまには、この研究報告書COSMETOLOGY誌をご高覧いただきまして、コスメトロジーの更なる発展に向けてご活用いただければ幸いです。

引き続き、本財団はコスメトロジー分野の独創的で発展性ある研究テーマを積極的に支援してまいります。

今後とも皆さまの温かいご理解とご協力をお願い申し上げます。

2025年9月

公益財団法人 コーセーコスメトロジー研究財団  
理事長 小林 一俊

# 目 次

## ■ごあいさつ

## ■コーセーコスメトロジー奨励賞受賞記念講演

- ・天然物由来高分子を利用した新規サンスクリーンカプセルの創出…………… 3  
大阪公立大学大学院工学研究科応用化学分野 北山 雄己哉

## ■コスメトロジー研究助成報告

### I. 素材、物性に関する分野

- ・皮膚バリア機能を促進する D-アミノ酸の酵素合成法の開発…………… 10  
日本大学生産工学部教養基礎科学系 秋田 紘長
- ・アミノ酸系高分子を基盤とするスマートゲル材料の開発…………… 15  
同志社大学理工学部機能分子・生命化学科 古賀 智之
- ・化粧品微粒子原料表面改質のための気流層型プラズマリアクターの開発…………… 21  
東海国立大学機構岐阜大学 小林 信介
- ・糖脂質型バイオサーファクタントの精密化学合成と構造機能相関による  
新規高機能性化粧品素材の創製…………… 26  
慶應義塾大学工学部 高橋 大介
- ・テラヘルツ分光による水和水の環境の分子レベルでの解明…………… 31  
東北大学大学院理学研究科物理学専攻 高橋 まさえ
- ・界面活性剤修飾ナノダイヤモンドの集積・積層化による構造色発現と、  
抗菌性チキソトロピー塗膜の開発…………… 37  
埼玉大学大学院理工学研究科 藤森 厚裕
- ・昆虫のグルーミングから学ぶマイクロコームの開発…………… 42  
国立研究開発法人 物質・材料研究機構 細田 奈麻絵
- ・界面活性剤吸着膜の相転移を応用したピッカリングエマルジョンの自発解乳化…………… 48  
広島大学大学院先進理工系科学研究科 松原 弘樹

### II. 生体作用、安全性に関する分野

- ・iPS 細胞由来顔面部真皮幹細胞誘導法の開発…………… 56  
京都大学 iPS 細胞研究所 池谷 真
- ・小型魚類を活用した皮膚老化機構の解明と抗老化因子の探索…………… 62  
大阪大学微生物病研究所 石谷 太
- ・HLA 多型の関わる接触性皮膚炎リスク評価系の基盤構築についての研究…………… 66  
千葉大学大学院薬学研究院 伊藤 晃成
- ・メラニン合成関連酵素のパルミトイル化による可逆性の皮膚色制御…………… 71  
神戸大学バイオシグナル総合研究センター分子薬理研究分野 上山 健彦
- ・チロシナーゼ酵素群の活性化に不可欠な金属獲得の分子機序の解明…………… 75  
京都大学大学院生命科学研究科 神戸 大朋
- ・皮膚幹細胞の糖鎖をターゲットとした老化制御に向けての基盤研究…………… 79  
九州大学生体防御医学研究所 佐田 亜衣子

・ 表皮のペプチドによるバリア制御機構	85
	香川大学医学部皮膚科学 大日 輝記
・ 妊娠期における皮膚リモデリング機構の解析	88
	東京科学大学総合研究院難治疾患研究所 豊島 文子
・ 表皮細胞老化において細胞膜リン脂質の果たす役割の解明	92
	東京理科大学創域理工学部 中村 由和
・ 加齢による微小血管網異常と皮膚老化の関係性を解く	96
	宮崎大学医学部血管動態生化学分野 西山 功一
・ 表皮バリア脂質の代謝異常が炎症を惹起する機序の解明	101
	公益財団法人東京都医学総合研究所 平林 哲也
・ 保湿剤を塗布された四肢による触覚の脳内表象機構の解明	106
	東京大学大学院薬学系研究科 松本 信圭
<b>Ⅲ. 精神、文化に関する分野</b>	
・ 表情ジワを用いた新たな顔貌定量法（顔貌解析アルゴリズム）の開発	116
	福岡医療短期大学歯科衛生学科 泉 喜和子
・ 化粧品の機能性を最大化する塗布動作の定量評価と提示方法の研究	122
	神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科 和泉 慎太郎
・ プロテウス効果による内発的な肌の潤い向上・保持支援システムの検討	128
	香川大学創造工学部 北村 尊義
・ 大学由来の原料を使用した化粧品開発プロジェクト ～プロジェクトマネジメント学で実践する産学連携研究～	134
	藤女子大学 和田 雅子
<b>Ⅳ. コスメトロジー研究助成を受けて</b>	140
<b>■学術集会支援助成、国際交流助成</b>	155
<b>■付 録</b>	
事業報告書	167
2024年度 研究助成を受けられた方々	169
役員一覧	172



**コーセーコスメトロジー奨励賞  
受賞記念講演**



# 天然物由来高分子を利用した 新規サンスクリーンカプセルの創出

大阪公立大学大学院工学研究科応用化学分野 准教授

北山 雄己哉

きたやま・ゆきや

- ・神戸大学工学部応用化学科卒業(2008年)、同大学院工学研究科博士課程前期課程・後期課程を経て博士(工学)取得(2012年)。日本学術振興会特別研究員(DCI・PD)、カリフォルニア大学サンタバーバラ校博士研究員を経て神戸大学大学院工学研究科助教に着任(2012年)。2020年2月から大阪府立大学(現在の大阪公立大学)に特別助教として着任し、2023年4月から現職。その間、文部科学省卓越研究員やJSTさきがけ研究員を兼任。
- ・専門分野 高分子合成化学・コロイド界面化学を基盤とした機能性高分子微粒子材料の開発と応用
- ・学術賞 日本化学会若い世代の特別講演賞(2017年)、高分子学会奨励賞(2018年)、日本接着学会奨励賞(2019年)ほか受賞。



はじめまして、大阪公立大学の北山と申します。このたびは大変名誉あるコーセーコスメトロジー奨励賞を受賞させていただくことになり、財団関係の皆様、選考に携わっていただいた先生方、本当にありがとうございました。

私は2020年にこちらのコスメトロジー研究助成をいただきました。ちょうどその年に元の所属であった神戸大学から大阪府立大学(現・大阪公立大学)に異動したタイミングであったので、新たな環境で研究を立ち上げる際の研究助成として大変ありがたかったことを覚えています。それから2年間、表題のテーマで研究をさせていただきまして、その間にまとまったデータを元に論文発表をして今回の受賞につながりました。どうもありがとうございました。

2020年も今と同じホテルで大変立派な贈呈式が開催されましたが、その年が初めて奨励賞を設けられた年だったと記憶しております。東京理科大学の阿部先生と、私も論文と一緒に書かせていただいたことがある東京大学の片岡先生と石原先生の3名の先生がご受賞されておりました。とんでもなくすばらしい研究者として活躍される先生方でしたので、私には全く関係のない賞だと思っていたのですが、今回、受賞の連絡をいただいてとても驚きました。本

当にありがとうございます。

短い時間ですが、私の研究の中身を少しご紹介させていただきます。

こちらの題目にありますように、私は高分子カプセルの研究をしております。この高分子カプセルをサンスクリーンに応用することを志向して研究を行ってきました(①)。  
積逡に説法とは思いますが、こちらの中空状の高分子微粒子、つまり中に空隙があるような高分子材料は光散乱性に富むことから、化粧品の素材としても使われる材料です。またこの中にさまざまな物質を内包した高分子カプセルとすることによって、薬物送達システムのキャリアやサンスクリーン剤などの用途に使われる材料でもあります(②)。

この中空粒子や高分子カプセルをつくるための手法にはさまざまありますが、私たちのグループでは独自の調製技術を開発してまいりました。それを界面光架橋反応と呼んでいます。原料として、こちらのようなシナモンなど植物に含まれる桂皮酸誘導体を側鎖にもつ高分子の微粒子に対して光を当てますと、このアルケン部分が架橋反応を起こしまして、溶けなくなるという反応が起こります。ここで我々が偶然に見つけた重要なポイントは、この架橋

①

Graduate School of  
Engineering,  
Osaka Metropolitan University



【2020年度コスメトロジー研究助成】

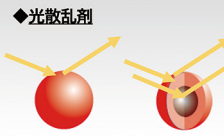
天然物由来高分子を利用した  
新規サンスクリーンカプセルの創出

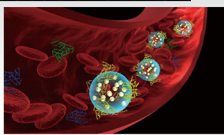
大阪公立大学大学院 工学研究科 応用化学分野  
北山雄己哉

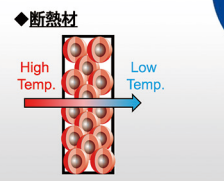
公益財団法人  
コーセーコスメトロジー研究財団

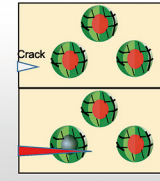
2024年11月28日(木)

② 中空高分子微粒子・高分子カプセル

◆光散乱剤  
  
*Phys. Chem. Chem. Phys.*, 18, 16293 (2016)

◆ドラッグデリバリーシステム  
  
*Angew. Chem. Int. Ed.* 59, 8173 (2020)

◆断熱材  
  
High Temp. Low Temp.  
*Adv. Mater.*, 31, 1801001 (2019)

◆自己修復材料  
  
Crack  
*Nature*, 409, 794 (2001)

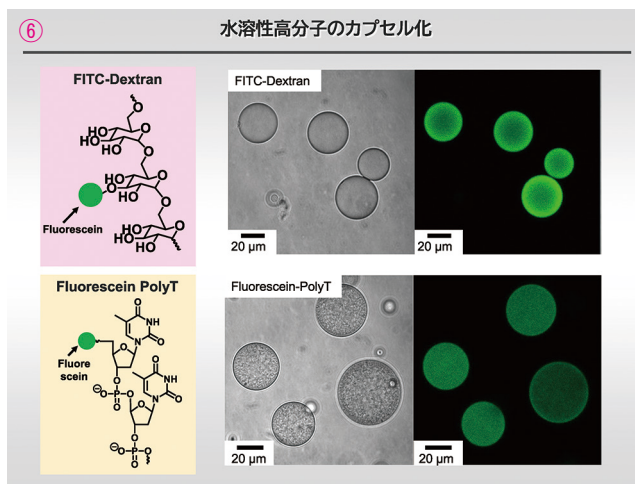
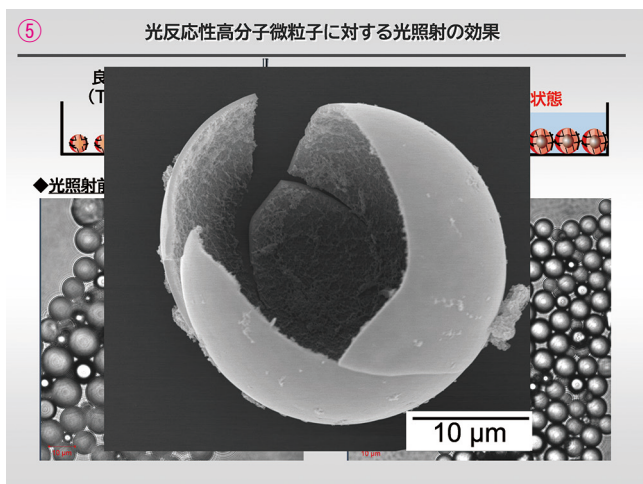
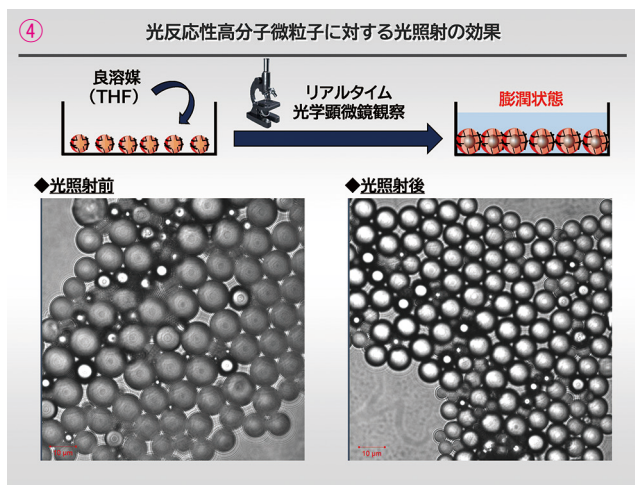
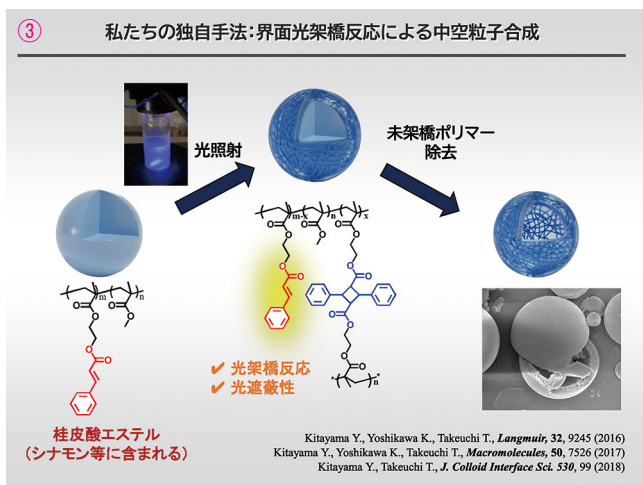
高分子カプセル

反応が微粒子の界面近傍だけで生じるという点です。つまり、この粒子にいくら光を当てても、粒子の中の分子は光架橋が進まずに未架橋の状態のまま残るといった現象を偶然に見つけました。さらにこの中に残る未反応ポリマーは簡単に洗い出すことができまして、結果的に中に空隙がある高分子中空粒子が得られるということがわかりました(③)。全体を見てみますと、調製されたことがある方はおわかりになるかとは思いますが、誰でも簡単に調製できる真球状の微粒子から、ただ光を当てて洗うという単純なプロセスで、中空粒子やカプセルをつくることのできる、そういった技術であります。

ひとつデモンストレーションを見ていただきたいと思えます。光照射を行う前の粒子と、行った後の粒子を、光学顕微鏡の観察用のディッシュの上にのせています(④)。ここに良溶媒といまして、ポリマーが溶ける溶媒を入れますとどうなるかというのを見ていただきたいと思えます。光照射前ですと、良溶媒はポリマーが溶ける溶媒なので、当然顕微鏡レベルでは見えにくいポリマーがほどけて消えてしまいます。一方、光照射を行った後のものと、こちらに少し見づらいので

すが、高分子のシェル部にはポリマーが残っておりまして、奥の粒子が透けて見えています。このことから、光を当てただけで界面近傍だけで架橋反応が進んでおり、内部が空隙であることが示唆されます。粒子の形態を走査型電子顕微鏡で確認しますと、こちらに示すように表面は非常にスムーズで、少し吸着物がありますけれど、中は確実に空隙があるような中空状の高分子微粒子が得られています(⑤)。こちらの粒子にはさまざまな物質を内包することが可能でして、たとえば水溶性のデキストランや核酸なども担持することができます(⑥)。そういった水溶性高分子だけではなく、低分子である蛍光色素ローダミンBなども安定に内包できます。

DDSの領域で高分子キャリアをつくる研究が多々ありますが、安定に担持することは意外と難しく、せつかく担持した分子が少しずつ漏れ出すというケースも散見されます。この粒子の担持安定性を確かめましたところ、24時間経過後も上澄み中にローダミンBはほぼ出ておらず、つまり安定に担持できていることがわかります。ここでは24時間までしか示していませんけれど、1週間、1ヵ月たっても安定に保持できることを確認しています。



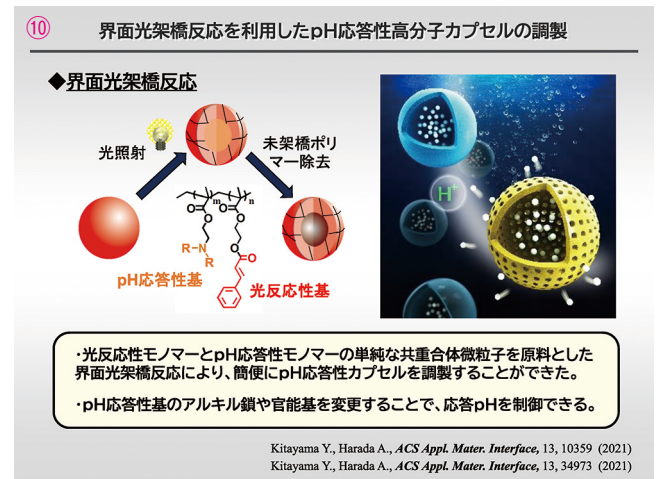
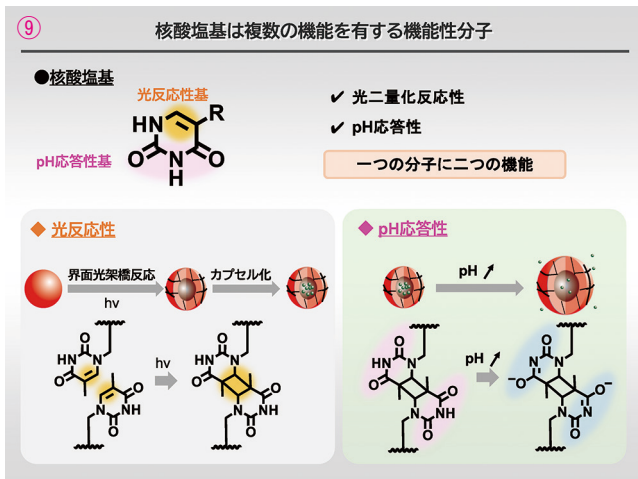
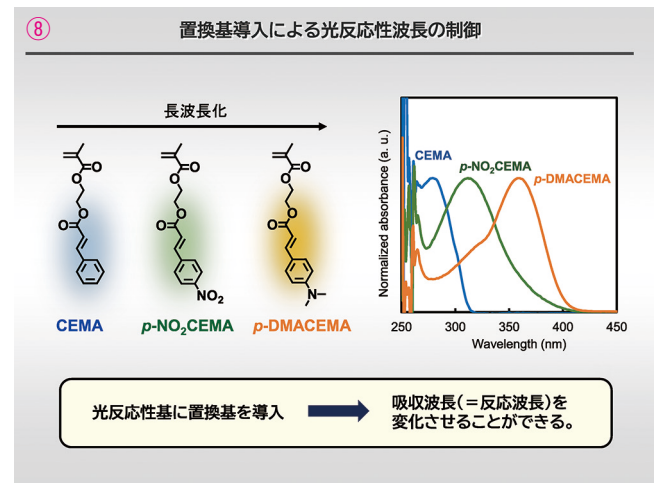
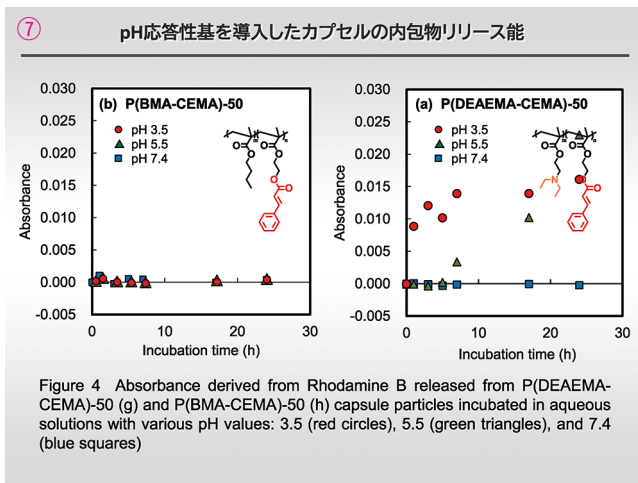
ただ安定に担持できるだけでは例えばDDSに使われるには不十分ですので、何らかの刺激に反応して内包物を出ることができるような材料にしたいと思い、ポリマーに3級アミンなどのpH応答性の官能基を加えるだけで刺激応答性が出るということを見つけました。左側はpH応答性官能基がないので、当然どんなpHにしても出てこないのですが、右側の3級アミンを入れたものは酸性側でプロトン化して水溶性が増すのでpH5.5、pH3.5で、明確に内包物をリリースできるような切れ味のいいカプセルができたということがわかりました(7)。

ところで、桂皮酸の構造は、紫外領域にしか光吸収がないので、265nm、280nm程度の波長の光を使って架橋していましたが、これは人体に対して安全な波長とは言えません。そこで、もっと反応波長を長波長化したいと考えました。桂皮酸のベンゼン環に有機化学的に置換基を入れてあげると、例えばジメチルアミノ基を入れると400nmぐらいの可視光で架橋して中空粒子やカプセルができる材料に展開することができています(8)。また桂皮酸だけでなく、例えばDNAの中に含まれる核酸塩基を用いても、界面光架橋反応による構造的機能のある高分子微粒子

材料が調製できることを確認しています。この核酸塩基のもう一つよいポイントは、光反応を示すアルケンに加えてpH応答性の官能基をもちますので、この核酸塩基の架橋反応でつくったカプセルがそのままpH応答性を示すという点です。つまり、1つの分子に2つの機能を与えることができるという分子であることも明らかにしてきました(9)。

このような研究で、刺激応答性の切れ味のいいカプセルをつくることができたのですが、実際に化粧品などに応用しようとするには難しいと感じていました。といいますのは、側鎖は確かに桂皮酸や核酸塩基といった天然物由来なのですが、主鎖はポリビニルのため環境中では分解しにくい材料です。そのため、このままですと化粧品などに応用して使いますと海洋マイクロプラスチック問題の原因になってしまうということで、ここを改善しなければならないと考えておりました。

そこで総合的にこの界面光架橋を見返しておりますと、側鎖の桂皮酸の反応が重要であって主鎖の構造には依存性がなくて、主鎖の構造は自由に変更できるのではないかとこのことを考えました(10)。コスメトロジー研究助成をい



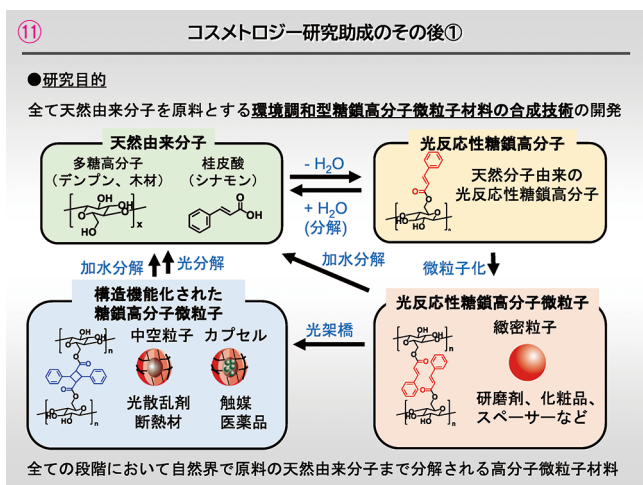
ただいた後、環境省の外郭団体である環境再生保全機構(ERCA)から研究費をいただきまして、こういったデンプンや木材から得られるような多糖高分子に桂皮酸を加水分解が可能な結合で修飾して、完全天然物由来高分子から環境調和型の糖鎖高分子カプセルをつくるというプロジェクトを行ってきました(11)。現時点で、この材料ができるということは確認しているんですが、まだまだ例えばコスメトロジー研究に応用しようとすると、私はまだ勉強不足でございまして、知識も技術もないので社会実装を目指すために本年度から日本化粧品学会に入会して勉強させていただいています。もしご協力いただける方がいましたら、ぜひ一緒に研究させていただけますと嬉しいです。よろしくお願いします。

これらに加えて、本年度から「JST さきがけ」のプロジェクトにも、より発展させた研究テーマで「材料の創製と循環」という領域で北川進先生のもとで研究を進めさせていただいています。このコスメトロジー研究助成をいただいた後、ERCAやJST さきがけのプロジェクトまで発展させることができまして、コーセーコスメトロジー研究財団にあらためて御礼申し上げたいと思います。

最後に、皆様にメッセージをと仰せつかっております。まだまだ若輩の私から申し上げるのは甚だ恐縮ですが、少ない経験からメッセージをお伝えさせていただければと思います(12)。

実験が失敗と思われることが実は宝物かもしれないと言われることですが、私の研究はまさしくそのような研究でした。本来の目的では失敗していたところからのスタートです。当初、私はクロマトグラフィー用の担体をつくるために全体が架橋した高分子の微粒子をつくりたかったのですが、熱で変性する分子を扱っていたので、光架

橋で粒子全体が架橋したものがほしかったのです。大学勤めですので学生さんと一緒に研究をしていたのですが、研究室で雑談していると学生から「先生、光架橋が全然うまく進みません」という話がありまして、当初「そんなことないやろ、もうちょっと反応時間をのばしてみ」という話をしました。電子顕微鏡写真を見ますとこういうふうに粒子がへこんでいるような写真が得られまして確かに全体が架橋しているとは思えない結果でした。非常に簡単に調製できると高をくくっていたのでショックを受けていたのですが、少し発想を変えますと、この界面だけで架橋しているのはおもしろいんじゃないか、今回お話ししたようないろいろな展開ができるんじゃないか、ということに至りました。そこから今のプロジェクトに進んでくることになったわけです。失敗だと思ったことが本当に宝物になるんだということを実感した瞬間でした。ここで一点重要なポイントとして、実は「失敗が宝物になる」ということが、意外と見過ごされがちではないかという点です。といいますのは、今回の研究の種は、学生さんと雑談しているときに教えてもらったことなので、例えば、月1回あるいは半年に1回の報告会だけでは時間が限られ、こういう(失敗と思われる)情報は埋もれてエラーしてしまうのではないかと考えています。学生さんと密にコミュニケーションを取っていると、お互いに失敗と思われるデータも含めてお互いに同じ方向を向いてポジティブに良い方向に考える癖がついておりますので、こういう実は貴重な情報をキャッチできたのではないかと考えています。なので、学生やスタッフの皆さんと一緒に楽しみながら研究を進めることも大事なのではないかと思っています。そういう経験を経て今に至っております。私もこれから頑張っていきますので、今後ともよろしくお願いいたします。



12 メッセージ

まだまだ若輩者の私から皆様に申し上げることは甚だ恐縮ですが、私の少ない経験の中から、お伝えできることを申し上げます。

実験では、「失敗」と思ふことも「宝」かも？  
研究室の学生さんやスタッフの皆さんとともに、研究を楽しんでください。

今回の私の研究も、本来の目的では失敗していたところから出発しました。

**当初計画** 本当は、光架橋反応を利用して、粒子全体が架橋した高分子微粒子を作りたい。

**学生さんから相談** どうしても凹んだ粒子しか得られない。。。

**考察と着想** 界面だけ光反応しているのでは？ 実際は、色んな展開できるのでは？

# コスメトロジー研究助成報告

- 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
- IV. コスメトロジー研究助成を受けて



## I . 素材、物性に関する分野

# 皮膚バリア機能を促進する D-アミノ酸の酵素合成法の開発

日本大学生産工学部教養基礎科学系

秋田 紘長

D-Alanine and D-aspartic acid are useful cosmetic ingredients because those D-amino acids have a skin barrier function. In this study, to develop an efficient system for enantioselective synthesis of D-alanine and D-aspartic acid through the amination of the 2-oxo acids, NAD (P)<sup>+</sup>-dependent *meso*-diaminopimelate dehydrogenase from *Thermosyntropha lipolytica* (TIDAPDH) was coupled with NADPH regeneration using NAD (P)<sup>+</sup>-dependent glucose dehydrogenase. Using this method, pyruvic acid was converted to D-alanine with an excellent yield (>98.5%). However, this method was not suitable for the synthesis of D-aspartic acid. To obtain the enzyme available for the synthesis of D-aspartic acid, TIDAPDH was used as a reference sequence in the database screening, and *meso*-diaminopimelate dehydrogenases from *Bacillus thermozeamaiae* (BtDAPDH), *Candidatus Syntrophocurvum alkaliphilum* (CsaDAPDH) and *Novibacillus thermophilus* (NtDAPDH) were identified. Among the enzymes, BtDAPDH and CsaDAPDH showed the productivities for D-alanine and D-aspartic acid, which are higher than those of TIDAPDH.

## 1. 緒言

標準アミノ酸には不斉炭素が存在するため、D-アミノ酸とL-アミノ酸の光学異性体が存在する。L-アミノ酸は生体内で様々な生理機能を持つものに対し、D-アミノ酸は細胞内には存在しないと考えられてきた。しかし、近年の分析技術の発展により、ヒトを含めた高等生物の細胞内にD-アミノ酸が微量に存在し、重要な生理機能を持つことが解明され始めている。例えば、D-アラニンとD-アスパラギン酸は皮膚バリア機能を有することが解明されており、皮膚に塗布した場合、コラーゲン繊維束の形成が促進されて、保湿性が高まる<sup>1)</sup>。これにより、D-アラニンとD-アスパラギン酸は2013年から化粧品の機能性成分として利用されている。

化粧品の機能性成分としてD-アミノ酸の需要が急速に高まる一方で、最も安価なD-アミノ酸であるD-アラニンが18万円/kgで販売されているように、D-アミノ酸は非常に高価なため利用は限られている。D-アミノ酸の主な合成法は、酵素合成法と化学合成法に大別される。化学合成法と比較して、酵素合成法は合成に必要なエネルギーと副産物の副生を抑えられるため、数種の方法が工業化されている。但し、既存の酵素合成法では原料 (DL-アミノ酸前駆体) の化学合成が必須であり、合成工程が複雑なため、合成コストが高い (図1)。そこで本研究では、一段

階反応 (2-オキソ酸のアミノ化) でD-アミノ酸を合成可能なNAD (P)<sup>+</sup>依存性 *meso*-ジアミノピメリン酸脱水素酵素 (*meso*-DAPDH) を利用して、皮膚バリア機能を促進するD-アラニンとD-アスパラギン酸を合成可能な新規酵素合成法の開発を目指した。

## 2. 方法

### 2.1. 発現ベクターの作製

合成遺伝子と発現ベクター [pET-IK (バイオダイナミクス研究所製) または pET-21a (メルク製)] を所定の制限酵素で処理し、電気泳動に供した。電気泳動後、目的鎖長のバンドを切り出し、illustra bacteria genomicPrep Mini Spin Kit (プロメガ製) を用いて精製した。DNA Ligation Kit (タカラバイオ製) を用いて精製産物をライゲーションし、得られたライゲーション産物を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  を形質転換した。最終的には、形質転換体を対象としたコロニー PCR により酵素遺伝子が導入された発現ベクターを選定し、PlasmidMini Kit (FastGene 製) を用いて発現ベクターを取得した。

### 2.2. 酵素の発現および精製

発現ベクターを用いて大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換した。次に、形質転換体を LB 培地に加え、OD<sub>600</sub> が 0.6 に達するまで振盪培養した。さらに、OD<sub>600</sub> が 0.6 に達した培養液にイソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド (Wako 製) を終濃度が 1 mM になるように加え、さらに 6 時間振盪培養した。

遠心分離により培養菌体を回収後、マルチビーズを用いて破碎した。菌体破碎液を遠心分離し、得られた上清を粗酵素液とした。熱処理 (50°C、30 分間) 後の粗酵素液を遠心分離し、得られた上清を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) で平衡化した DEAE-TOYOPEARL カラムクロマトグラ



Development of an enzymatic synthesis method for D-amino acids that promote skin barrier function

Hironaga Akita

Department of Liberal Arts and Basic Science, Nihon University

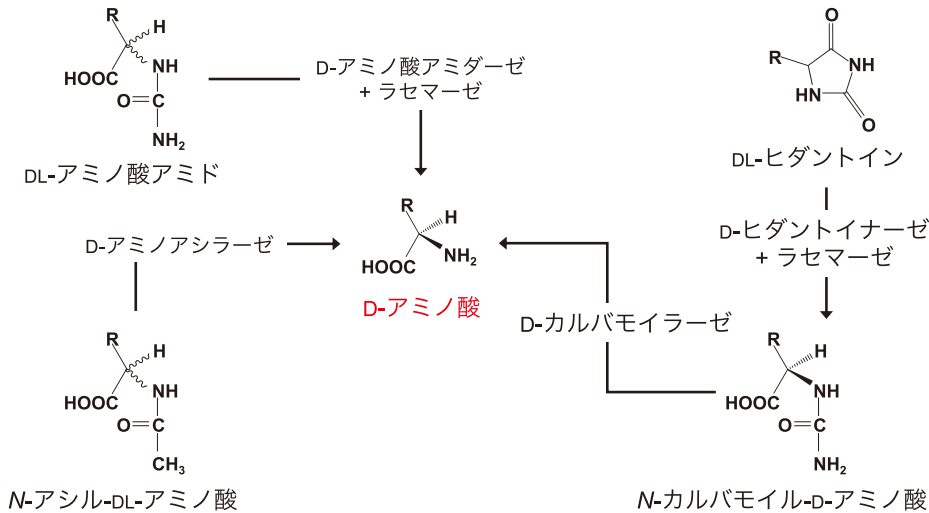


図1 既存のD-アミノ酸酵素合成法

フィー（東ソー製）に供した。その後、カラムベット容量の3倍量の同緩衝液で洗浄後、NaClを含む同緩衝液を用いて、直線濃度勾配法（0-0.5M）により活性画分を溶出した。さらに、Ni-NTA アフィニティカラムクロマトグラフィー（GEヘルスケア製）を用いて、先行研究<sup>3)</sup>と同様の方法で活性画分を取得し、10mMリン酸緩衝液（pH7.2）を用いて一晚透析した。最終的に、Amicon Ultra（メルク製）を用いて透析液を濃縮し、得られた濃縮液を精製酵素として以降の実験に利用した。

### 2.3. D-アミノ酸の酵素合成

D-アミノ酸の酵素合成は、攪拌子を含むバイアル瓶（容量：10mL）を用いて実施した。反応溶液 [100mM グリシン-KOH (pH9.0)、100mM 塩化アンモニウム (pH9.0)、70mM グルコース、20mM 2-オキソ酸、0.5mM NADP<sup>+</sup>] に精製したTIDAPDHと補酵素のカップリング反応担うNAD(P)<sup>+</sup>依存性グルコース脱水素酵素 (GDH)<sup>2)</sup>を加え、緩やかに攪拌しながら50℃で保温した。D-アミノ酸濃度は、先行研究<sup>2)</sup>と同様の方法で測定した。

### 2.4. D-アミノ酸合成活性の測定

D-アミノ酸の合成活性は、紫外可視分光光度計UV1800（島津製作所製）を用いて、2-オキソ酸のアミノ化による吸光度（Δ340）の減少量から算出した。反応溶液 [200mM グリシン-KOH (pH9.0)、200mM 塩化アンモニウム (pH9.0)、5mM 2-オキソ酸、精製酵素] を光路長1cmの石英セルに加えて50℃で3分間保温後、NADPHを終濃度が0.1mMになるように添加し、ΔA340を測定した。NADPHのミリモル吸光係数は、6.22mM<sup>-1</sup>・cm<sup>-1</sup>とした。

タンパク質濃度は、Protein Assay kit (Bio Rad製)を用いて、Bradford法により測定した。

## 3. 結果および考察

### 3.1. D-アラニンとD-アスパラギン酸の酵素合成

本研究の鍵となる *meso*-DAPDHは、補酵素を利用して、基質である *meso*-ジアミノピメリン酸のD-アミノ酸部位の脱アミノ反応を可逆的に触媒する自然界唯一の酵素である（図2）。但し、既報の酵素の補酵素・基質特異性は高く、その利用はNADP<sup>+</sup>と *meso*-ジアミノピメリン酸（アミノ化反応ではNADPHとL-2-アミノ-6-オキソピメリン酸）に限られていた。但し、*Thermosyntropha lipolytica*由来

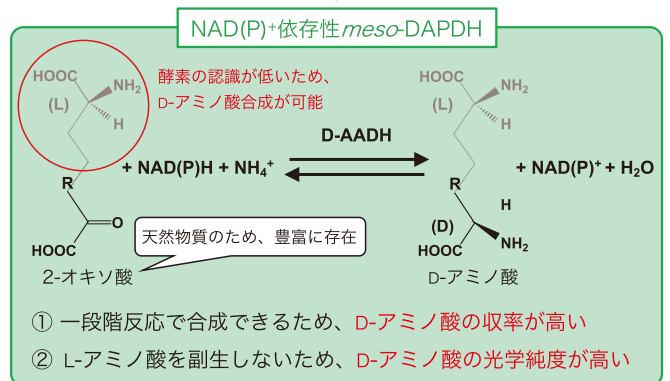
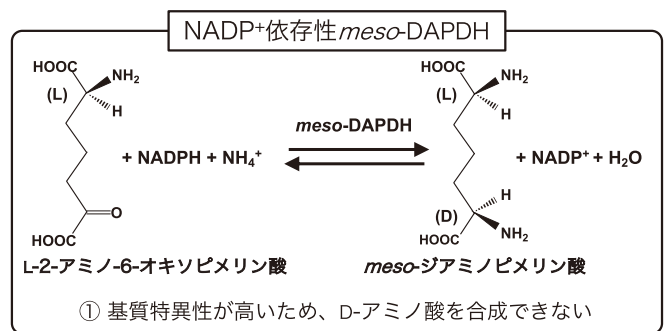


図2 *meso*-DAPDHの触媒反応

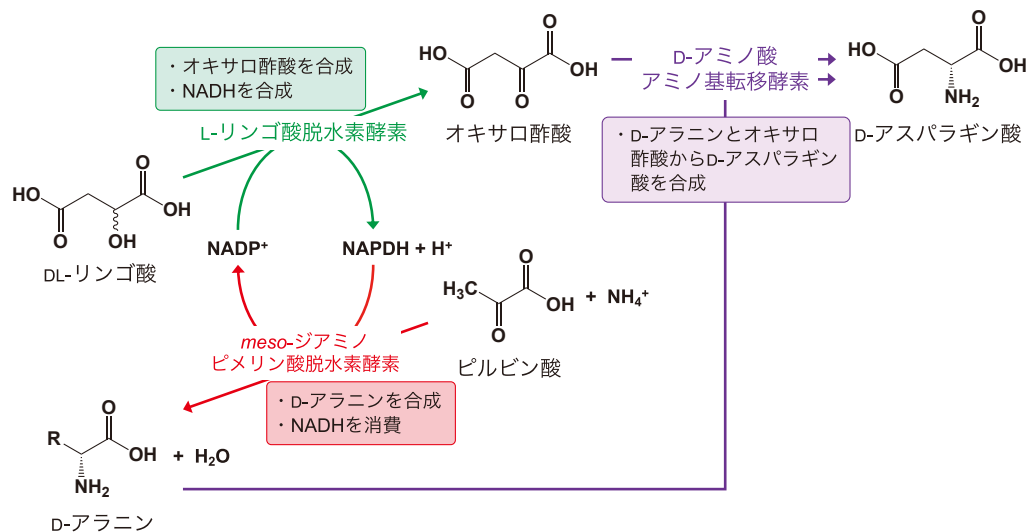


図3 申請当初のD-アミノ酸酵素合成法

*meso*-DAPDH (TIDAPDH) を含む一部の酵素は、 $\text{NADP}^+$  と  $\text{NAD}^+$  の両補酵素を利用可能な  $\text{NAD(P)}^+$  依存性酵素である。また、一段階反応 (2-オキソ酸のアミノ化) でD-アラニンとD-アスパラギン酸を合成できる。そこで本研究では、TIDAPDHを酵素合成法に利用した。本研究を申請した当初、TIDAPDHと $\text{NADP}^+$ 依存性L-リンゴ酸脱水素酵素、D-アミノ酸アミノ基転移酵素 (D-アスパラギン酸合成時のみ) を利用して、D-アラニンとD-アスパラギン酸を合成可能な酵素合成法を開発することを計画としていた (図3)。本法を開発するため、酵素量比や反応温度・pH、補酵素濃度等を検討したが、D-アラニンとD-アスパラギン酸を合成することができなかった。そこで、D-アミノ酸合成法の抜本的な見直しを図り、補酵素の再生を担う $\text{NADP}^+$ 依存性GDH利用した酵素合成法の開発に切り替えた<sup>2)</sup>。

ピルビン酸を基質に利用した場合、36時間後のD-アラニン濃度は19.7mMに達し、対原料収率は98.5%以上だった (図4)。D-アラニンを合成可能な酵素として、アラニンラセマーゼが知られているが、本酵素はL-アラニンからD-アラニンの変換反応を可逆的に触媒し、合成後にはおよそ等量のD-アラニンとL-アラニンが得られる。そのため、本酵素を酵素合成法に利用した場合、D-アラニンの光学純度が低くなる。一方、TIDAPDHは、D-アラニンを合成する際に、L-アラニンを副生しない。また高い対原料収率で合成可能なことから、産業利用上の可能性を有する。

一方、オキサロ酢酸を基質に利用した場合、D-アスパラギン酸濃度は1mM以下となった。現時点でD-アスパラギン酸が合成できなかった理由は不明だが、TIDAPDHやカップリング反応に利用した $\text{NAD(P)}^+$ 依存性GDHが、D-アスパラギン酸やオキサロ酢酸により阻害を受けた可

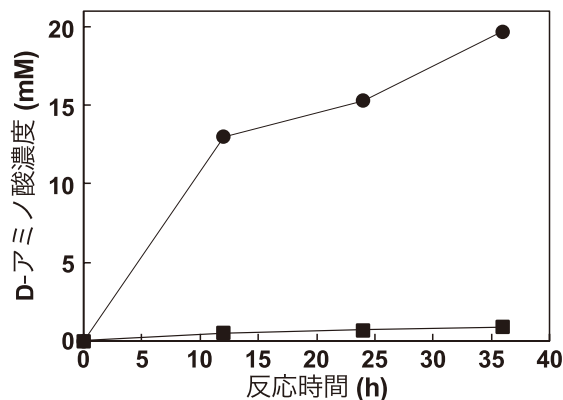


図4 D-アラニン (●)とD-アスパラギン酸 (■) 合成の経時変化

能性がある。

### 3.2. 新規 *meso*-DAPDHのスクリーニング

上述のとおり、TIDAPDHを利用した場合、D-アスパラギン酸の合成量は著しく低下した。そこで、D-アスパラギン酸の合成に利用可能な酵素を新たに取得するため、アミノ酸配列に基づいたスクリーニングを実施した。

Gaoらによると、*meso*-DAPDHは、構造的特徴と基質特異性に基づいて、2つの主要なクラスターに分類できる<sup>4)</sup>。タイプIの*meso*-DAPDHは二量体構造を有し、*meso*-ジアミノピメリン酸に対して高い特異性を示す。例えば、好熱性細菌 *Ureibacillus thermosphaericus* 由来 *meso*-DAPDH (UtDAPDH) はタイプIの酵素に分類され、可逆的な*meso*-ジアミノピメリン酸の脱アミノ反応を触媒するが、D-アミノ酸は基質として利用できない<sup>5)</sup>。

対照的に、タイプIIの*meso*-DAPDHは六量体構造を有し、低い基質特異性を示す。例えば、酵素合成に利用したTIDAPDHはタイプIIの酵素に分類され、*meso*-ジアミノピメリン酸以外に、種々のD-アミノ酸に対し

```

UtDAPDH  -----MSKIRIGIVGYGNLGRGVEAAIQNPDMELVAVFTRRDPKTVAVKSNVKVLHVD
BtDAPDH  MSEIRTERPIRVAIIGYGNIGQYALQAVEEAPDMELAGVVRQSSLEKPLPRELHGVSVV
CsaDAPDH -----MSKTKVAIVGYGNIGKFAVDINEAPDMELVGVVRASSLSQPKPSELADIPVV
NtDAPDH  -----MKNVHKIAVVGYNIGKYAVQALNRAPDMELAGVVR-ARSARDVPPELAGVPIA
          :::::*****:*: . *::: *****..* . *          :: : :

UtDAPDH  DAQSYKDEIDVMILCGGSATDLPEQGPYFAQYFNTIDSFDTHARIPDYFDAVNAAAEQSG
BtDAPDH  SDVSALGQVDVAVLCTPTRETPAIKELLARGIHTIDSFDIHQEIQVRHELDEVARAHQ
CsaDAPDH ASIKELPDVKIALLLCTPTRSVPEYASEILSLGINTVDSYDIHGDLADMKIDLDKIAKQHK
NtDAPDH  TSIDELEGVEAAILATPTRTTPEYASDILSKGIHTVDSYDIHGELADVRRKLDDIAKRHG
          .      :: * . :          :: :*:***:* * : :      :: * .

UtDAPDH  KVAIISVGWDPGLFSLNRLLEVVLPVGNTYTFWGKGVSQGHSDAIRRIQGVKNAVQYTI
BtDAPDH  AVAILAAGWDPGTDSMIRSILEFMAPYGITYTNFGPGMSMGHSAVKAIEGVKDALSITI
CsaDAPDH SVAVISAGWDPGTDAMLRCIFEMAPKGITYTNFGPGMSMGHSAVRSKDGIKNALSMTI
NtDAPDH  SVAIVSAGWDPGTDSMIRSMLEFMAPGGVYTNFGPGMSMGHSAVKAIDGVKDALSMTI
          **:::..***** : : * : * . : * * ** :* *:* *** *:: :*:*:*. : **

UtDAPDH  PIDEAVNRVRSGENPELSTREKHARECFVLEEGADPAKVEHEIKTMPNYFDEYDTTVHF
BtDAPDH  PIGTGL-----HRRMVYVELEEGADFATVKERILQDPYFVHDETHVLQV
CsaDAPDH PLGTSV-----HRRMVYVELEEGASFDKVEESIKTDSYFAKDETHVIQV
NtDAPDH  PLGTGV-----HRRMVYVECEAGADFETVKEKVLADPYFVNDETHVIQV
          *:. . :          * * :* * ** . *.:. : . : . : . : . :

UtDAPDH  ISEEELKQNHSGMPHGGFVIRSGKSDEGHKQIIEFSLNLESNPMFTSSALVAYARAAYRL
BtDAPDH  DDVKQLIDRG----HGVRMERKGVSGQTQNQLFTYEMRIN-NPALTSQVMIASARAAMRQ
CsaDAPDH DDVDNLVDMG----HGVSMERKGASGITQNQLLKFDMRIN-NPALTAQVMVSSARASLNQ
NtDAPDH  DDVQQLVDVG----HGVSMERKGVSGATHNQLFNFEMRIN-NPALTSQVLVAAARATFKQ
          . .:* :          ** : * . * . . :*: : . : . : . : ** :*: : . : . : . : . :

UtDAPDH  SQNGDKGAKTVFDIPFGLLSPKSPEDLRKELL
BtDAPDH  ----KPGAYTMIEIPIIDFLYGDRDELIRRLV
CsaDAPDH ----QPGAYTMIEIPIIDFMHGDKDKIIRDLV
NtDAPDH  ----QPGAYTMIEVPIIDFMYGDREELIKRLV
          . ** *:::~* : : . :. : : * :
    
```

図5 meso-DAPDHのアライメント  
 UtDAPDHの二量体形成ドメインに含まれるアミノ酸残基を赤字で示した。

表1 補酵素にNADPHを利用した場合のD-アミノ酸合成活性の比較

基質	D-アミノ酸	TIDAPDH ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ )	BtDAPDH ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ )	CsaDAPDH ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ )
ピルビン酸	D-アラニン	5.33	10.6	8.46
オキサロ酢酸	D-アスパラギン酸	5.70	13.5	12.2

でも活性を示す<sup>3)</sup>。また、2-オキソ酸を基質に利用した場合、D-アラニンやD-アスパラギン酸等の数種のD-アミノ酸の合成を触媒する。そこで、TIDAPDHを参照配列に用いてデータベース上で広範なスクリーニングを実施し、TIDAPDHと相同性があり、UtDAPDHの二量体形成ドメインに含まれるアミノ酸残基が保存していない、*Bacillus thermozeamaize* (BtDAPDH) と *Candidatus Syntrophocurvum alkaliphilum* (CsaDAPDH)、*Novibacillus thermophilus* (NtDAPDH) 由来の *meso*-DAPDHを選定した(図5)。

### 3.3. 新規 *meso*-DAPDHのD-アミノ酸合成活性

各種 *meso*-DAPDHを精製後、D-アミノ酸合成活性を測定した(表1)。アミノ酸配列に基づいて考えた場合、NtDAPDHは六量体構造を有すると推察できることから、基質特異性が低く、D-アミノ酸合成活性を示すことが期待された。しかしながら、NtDAPDHは *meso*-ジアミノピメリン酸の脱アミノ反応を示したが、D-アミノ酸合成活性は示さなかった。一方、BtDAPDHとCsaDAPDHの両酵素はD-アミノ酸合成活性を示し、TIDAPDHに比べて、D-アラニンとD-アスパラギン酸の合成活性が1.58倍以上高かった。

D-アラニンとD-アスパラギン酸の合成活性に優れることに加え、BtDAPDHとCsaDAPDHの有する安定性は産業利用する際の利点になる。BtDAPDHとCsaDAPDHは、精製時の熱処理で変性失活しなかったことから、既存のD-アミノ酸酵素合成法で利用されている常温菌由来の酵素と比べて高い安定性を持つと推察できる。即ち、両酵素を常温で利用した場合、長期利用が可能なることから、酵素の調製回数を削減でき、それにより合成コストを低下できる可能性がある。今後、BtDAPDHとCsaDAPDHが、D-アラニンとD-アスパラギン酸の酵素合成に利用できるか、継続して検討する。

## 4. 総括

本研究では、TIDAPDHとGDHを利用した酵素合成により、98.5%以上の高い対原料収率でD-アラニンの合成

に成功した。本研究成果を基盤に、ピルビン酸よりも安価な原料への転換や合成効率の最適化を図ることで、将来的な社会実装に繋がる可能性がある。一方、D-アスパラギン酸の酵素合成には、利用する酵素の選定等、多くの課題が残されている。今後、本研究で新たに取得したBtDAPDHとCsaDAPDHが、D-アスパラギン酸の酵素合成に利用可能か更なる検討が必要である。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、多大なるご支援を賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に心より御礼申し上げます。

## (引用文献)

- 1) Du S, Sung YS, Wey M, Wang Y, Alatrash N, Berthod A, MacDonnell FM, Armstrong DW. Roles of N-methyl-D-aspartate receptors and D-amino acids in cancer cell viability. *Mol. Biol. Rep.*, 47, 6749-6758 (2020)
- 2) Akita H, Suzuki H, Doi K, Ohshima T. Efficient synthesis of D-branched-chain amino acids and their labeled compounds with stable isotopes using D-amino acid dehydrogenase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 1135-1143 (2014)
- 3) Akita H, Nakamichi Y, Morita T, Matsushika A. Characterization of an NAD(P)<sup>+</sup>-dependent *meso*-diaminopimelate dehydrogenase from *Thermosyntropha lipolytica*. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* 1868, 140476 (2020)
- 4) Gao X, Zhang Z, Zhang Y, Li Y, Zhu H, Wang S, Li C. A newly determined member of the *meso*-diaminopimelate dehydrogenase family with a broad substrate spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, e00476-17 (2017)
- 5) Akita H, Fujino Y, Doi K, Ohshima T. Highly stable *meso*-diaminopimelate dehydrogenase from an *Ureibacillus thermosphaericus* strain A1 isolated from a Japanese compost: purification, characterization and sequencing. *AMB Express* 1, 43 (2011)

# アミノ酸系高分子を基盤とするスマートゲル材料の開発

同志社大学理工学部機能分子・生命化学科

古賀 智之

Fabricating robust shape-fix/memory hydrogels that respond to external stimuli is an important challenge in facilitating gel technology for versatile applications. In this study, we constructed novel multi-stimuli-controllable shape memory hydrogel systems from amino acid-derived vinyl polymer networks. Amino acid-derived vinyl polymers are attractive thermo-responsive materials that are easily synthesized from renewable bio-sources and are biocompatible. Upper critical solution temperature-type poly (*N*-acryloyl glycinamide) (PNAGAm) is selected in this study, as it exhibits good biocompatibility, non-toxicity to cells, and strong and reversible hydrogen bonding. By introducing cystine-derived disulfide bonds into the PNAGAm matrix, Au-nanorod could be conjugated stably into the hydrogel, resulting in a temperature/light dual-responsive shape memory hydrogel. Furthermore, temperature/pH-dual responsive hydrogel was successfully fabricated by radical copolymerization of NAGAm with *N*-acryloyl aspartic acid (NAD). The hydrogel properties, including stimuli-responsive, mechanical, and shape fix/memory behaviors, were comprehensively investigated. Integrating multiple smart functions into a single hydrogel can meet the requirements for various industrial, biomedical, and cosmetic applications.

## 1. 緒言

水を担持した高分子の三次元ネットワークからなるハイドロゲルは、工学、医用、コスメティック材料として幅広い分野で応用されている。架橋点構造を含む構成分子の種類や分子間の複雑な相互作用によりゲル特性が変化し、生体組織に類似した柔軟な粘弾性や生体適合性、物質内包性を示す。近年、ハイドロゲルの高機能化が飛躍的に進んでおり、自己修復性ゲル、高強度ハイドロゲル、インジェクタブルゲルなど多彩なスマートゲルが開発されている<sup>1-3)</sup>。中でも、初期の形状を記憶し、外部刺激に反応して形状変形(固定)、形状回復を示す形状記憶性ゲルは、薬物徐放や細胞足場材料などの医用応用だけでなく、コスメティック材料としても興味深い。一般的に、ゲルネットワークを形成する高分子主鎖と架橋点の少なくともいずれかに、可逆的かつ一時的な相互作用を導入する必要がある。1995年に疎水性アルキル側鎖の熱可逆的な結晶化を利用した形状記憶ゲルが報告されて以来<sup>4)</sup>、光/pH/温度/酸化還元等の変化に可逆的に反応する様々な形状記憶ゲルの開発が進められてきた<sup>5,6)</sup>。しかし、ハイドロゲルの特徴(利点)である高い含水性/透明性と形状固定/記憶能のトレードオフ関係をいかに両立させるかといった課題もある。また、近年SDGsの観点から、こうしたスマートゲル素材についても、環境や生態系への負荷が低く、持続可能な生産がで

きる環境調和型素材への変換が望まれている。

本研究では、ハイドロゲルの持つ優位性(柔軟性/透明性/物質内包性など)を維持しながら、異なる刺激に独立して応答して形状を自在に変形/固定でき、さらなる刺激に反応して記憶した形状に回復できるユニークな性質の新しいスマートゲル材料の開発を進めた。このような高分子ゲルシステムを設計するにあたり、我々はアミノ酸のポテンシャルに着目した。アミノ酸を利用する特徴は、(1)多様な構造(標準アミノ酸で20種)およびそれに基づく機能デザインが容易、(2)再生可能資源である、(3)環境適合性・生分解性に優れることが挙げられる。また、アミノ酸の「構造多様性」と「類似性」という一見相反するような特徴も材料設計には都合がよい。側鎖構造に基づいて、親水性/疎水性/イオン性/水素結合性など様々な性質を呈する(多様性)一方、基本骨格が同じため(類似性)、同一の化学合成戦略でビニルモノマー化でき、通常のラジカル重合やリビングラジカル重合を適用して精密に高分子化できる。複数種を共重合すれば、構造/機能のチューニングも容易である。事実、我々は種々のアミノ酸ビニルモノマーのライブラリーを構築し、アミノ酸種や末端基構造、モノマー配列などに基づいて温度応答挙動(下限臨界溶液温度(LCST)型や上限臨界溶液温度(UCST)型)や転移温度を精密に制御できることを見出している<sup>7,8)</sup>。このような背景とこれまでの知見をもとに、具体的にはUCST型アミノ酸系高分子を基盤とする多重刺激応答型の形状固定/記憶性スマートハイドロゲルの創出とその構造最適化、ゲル物性/機能評価、生体親和性評価を総合的に行った。新しいバイオ/コスメティック材料となることを期待した。



Development of Smart Hydrogels from Amino-Acid-based Polymers

Tomoyuki Koga

Department of Molecular Chemistry & Biochemistry, Faculty of Science & Engineering, Doshisha University

## 2. 方法

### 2.1. 各種アミノ酸由来ビニルモノマーの合成

本研究で用いた *N*-アクリロイルグリシンアミド (NAGAm), *N*-アクリロイルアスパラギン酸 (NAD), *N*-アクリロイルシスチン (NAC), *N*-アクリロイルシスチンジメチルエステル (NACMe) は、液相中で対応する各アミノ酸のアミノ基と塩化アクリロイルを縮合させることにより合成した。

### 2.2. P (NAGAm/NAC (Me)) ハイドロゲルの調製

NAGAm と NAC (または NACMe) を過硫酸アンモニウム (APS) を開始剤に用いて (1wt%) 水中でラジカル重合させることでハイドロゲルを調製した。厚さ 0.5mm または 1mm のシリコンゴムスペーサーを用いたガラス板 (疎水処理) 中もしくは直径 4mm のシリコンチューブ中、70℃ で 1 時間重合した後、4℃ の超純水でよく洗浄することで目的のハイドロゲルを得た。尚、P (NAGAm/NACMe) ハイドロゲルについては、NACMe が水に不溶であったため、少量の DMSO に溶解させて調製した。ここではモノマー濃度 ( $xM$ ) や架橋率 ( $y\%$ ) を変えて調製したハイドロゲルを  $xM/y\%$  と表記する。

### 2.3. P (NAGAm/NAC-AuNR) ハイドロゲルの調製

金ナノロッド (AuNR) は、シーディング法を用いて調製した。Seed 溶液は臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム (CTAB 0.273g) 水溶液 7.5mL と四塩化金 (III) 酸・四水和物 ( $HAuCl_4 \cdot 4H_2O$  1mg) 水溶液 0.25mL を混合させ、この溶液に氷浴下で調製した水素化ホウ素ナトリウム (2mg) 水溶液 0.25mL を加え、28℃ において 2 時間静置させることで調製した。Growth 溶液は CTAB (0.519g) 水溶液 14.25mL と  $HAuCl_4 \cdot 4H_2O$  (2.5mg) 水溶液 0.25mL を混合させ、この溶液に硝酸銀 (0.2mg) 水溶液 0.25mL と L-アスコルビン酸 (1.7mg) 水溶液 96 $\mu$ L を加え、10 分間攪拌させることで調製した。AuNR 溶液は Growth 溶液に Seed 溶液 63 $\mu$ L を加え、28℃ において 24 時間静置させて調製した。遠心分離を行い、上澄み溶液 (75%) を取り除き、同量の超純水を加えた。この操作を繰り返し、AuNR 水分散液を得た。AuNR 含有ハイドロゲルの調製は、上述のゲル調製法と同様の手法で、上記 AuNR 水分散液を用いることで行った。

### 2.4. P (NAGAm/NAD) ハイドロゲルの調製

NAGAm, NAD および APS を蒸留水にモノマー濃度が 1M となるように溶解させ、全量を 1mL とした。このモノ

マー溶液を試験管中で  $N_2$  雰囲気中 70℃ で 1 時間重合を行った。その後、分画分子量 1000Da の透析チューブを用いて透析を行い、凍結乾燥により目的のポリマーを得た。所定量のポリマーに蒸留水 (1mL) を加えて 90℃ に加熱して溶解させ、厚さ 1mm のシリコンゴムスペーサーを用いたガラス板 (疎水処理) 中に流し込んだ後、4℃ まで冷却することでシート状のハイドロゲルを調製した。その後、4℃ の超純水でよく洗浄した。

### 2.5. 力学特性評価

動的粘弾性測定は TA-Instruments 社製 Discover HR-1 を用いて行った。直径 20mm の平行プレートを用いた。プレートステージギャップ間は、プレートとサンプルが密着するように調整した。周波数依存性はひずみ 1% 一定で、周波数 0.1–100rad/s に変化させ、貯蔵弾性率  $G'$  (Pa) および損失弾性率  $G''$  (Pa) を測定した。引張り試験はロードセルに 50N、試験治具にねじ式平面形つかみ具を備えた島津製 EZ Graph を用い、引張り速度 1mm/s の条件で行った。試験片 (0.5mm 厚) は、高分子計器製の試験片打抜刃 7 号形ダンベル状 (JIS K 6251-7) を用いて作成した。なお、各サンプルにつき 3 回の引張り試験を同条件で行い試験結果を比較した。

### 2.6. 形状固定/記憶性評価

温度変化による評価は、ひも状 (ロッド状) のハイドロゲル ( $\theta_0=180^\circ$ ) を 70℃ (もしくは 50℃) の水中で半分に折り曲げ、4℃ の水中で 1 時間形状を固定した。固定する力を取り除き、維持した角度 ( $\theta_d$ ) を測定し、次式から形状固定率  $F$  を算出した。その後所定の温度の水中に 1 時間浸漬させ、形状が回復した角度 ( $\theta_r$ ) を測定し、以下の式から形状回復率  $R$  を算出した。pH 変化による評価は、まず、pH12.0 の水溶液 (4℃) に 1 時間浸漬させ、その後、ゲルを半分に折り曲げ固定した。この状態で、pH2.0 の水溶液 (4℃) に 1 時間浸漬させて形状固定した。その後、 $\theta_d$  を測定した。再び pH12.0 の蒸留水 (4℃) に 1 時間浸漬させたときの  $\theta_r$  を測定した。

$$\text{Shape fixing percentage } (F) (\%) = (\theta_0 - \theta_d) / \theta_0 \times 100$$

$$\text{Shape recovery percentage } (R) (\%) = \theta_r / \theta_0 \times 100$$

### 2.7. P (NAGAm/NAD) ゲルのイオン性物質取り込み実験

P (NAGAm/NAD) ゲル (NAD=0.1) を、直径 1.4cm の円形にくり抜いた。そのゲルを 1mM EosinY 水溶液 (アニオン性) または 1mM RhB 水溶液 (カチオン性) 10mL (pH7.4, 室温 (約 25℃)) に 24 時間浸漬させた。その後、ゲルを水溶液から取り出し、表面に付着した溶液をふき取った後、ゲルを PBS 緩衝溶液 (pH7.4, 室温 (約 25℃))

10mLに24時間浸漬させ、同様の操作を行い、その変化を観察した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1. 温度/光に二重応答する形状記憶水素ゲルの開発<sup>9)</sup>

UCST型アミノ酸由来ビニルポリマーであるPNAGAmを、汎用の架橋剤であるメチレンビスアクリルアミド(MBA)で化学架橋した水素ゲルが高い力学強度をもちつつ、温度に応答した可逆的水素結合形成に基づいて形状固定/記憶挙動を示すことを報告した<sup>10)</sup>。温度と光に二重応答するゲルの開発を目的に、機能的架橋点としてジスルフィド結合を有するL-システイン由来のジビニルモノマーからなる水素ゲルを調製した(図1A)。

ジスルフィド結合は酸化還元活性であり、また、AuNRに配位するため、AuNRのフォトサーマル効果を利用した形状記憶機能の発現を期待した。末端にカルボキシ基をもつ親水的なNAC(またはメチルエステル化されたNACMe)を用い、引張っても容易に破断せず、また結ぶこともできるなど、丈夫で透明な水素ゲルを得た(図1B)。P(NAGAm/NAC)およびP(NAGAm/NACMe)ゲル(1M/1%)の温度応答性(pH4.9)について膨潤率変化から検討したところ、いずれも熱可逆的に低温(4℃)で収縮し、高温(70℃)で膨潤するUCST型の温度応答性を示した(図2A)。ただし、膨潤率はNAC架橋型の方が相対的に高く、繰り返しの温度変化で若干増加した。これは、NAC架橋剤の末端構造に起因しており、イオン化したカルボキシ基の静電反発により、低温での収縮が抑制さ

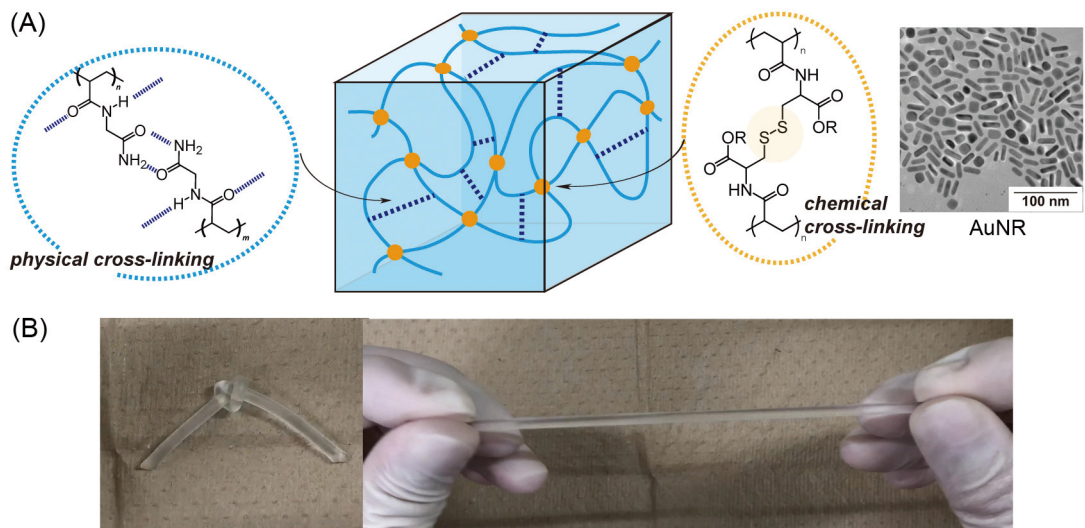


図1 (A) 金ナノロッド(AuNR)とハイブリッド化させた温度/光二重応答性形状固定/記憶性水素ゲル(R=H(NAC), CH<sub>3</sub>(NACMe))。 (B) P(NAGAm/NAC)水素ゲルの写真。

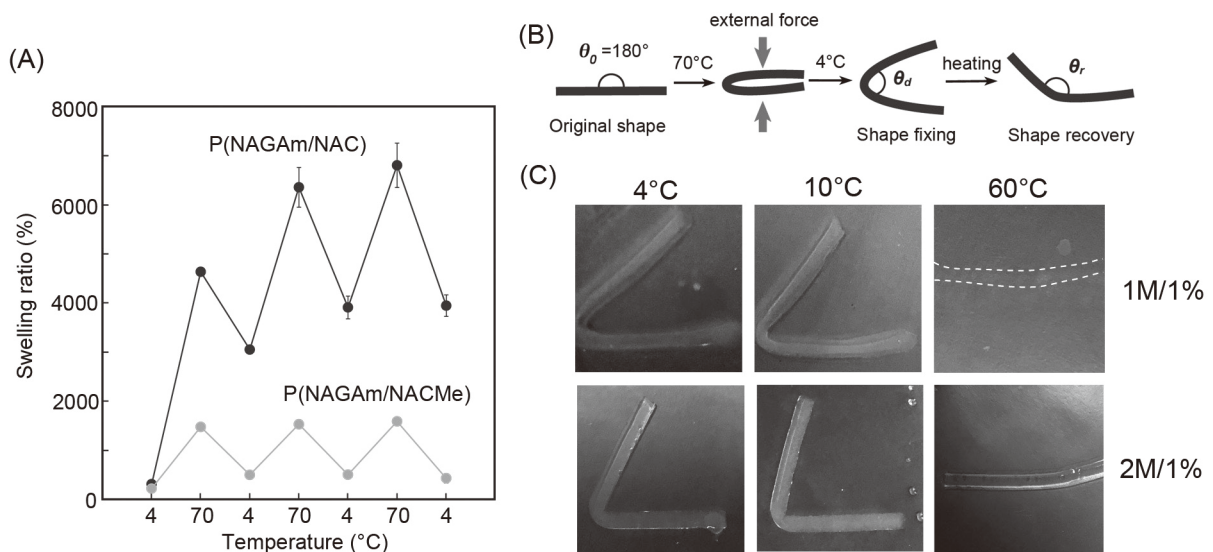


図2 (A) P(NAGAm/NAC)およびP(NAGAm/NACMe)水素ゲル(1M/1%)の水中での温度に応答した膨潤-収縮挙動。 (B, C) 温度変化を利用したP(NAGAm/NAC)ゲルの形状固定/記憶特性。

れるためである。架橋剤の構造のわずかな違いもゲル特性に反映されることを意味している。これらのゲルはこうした温度応答性に基づき形状固定/記憶性を示した。70℃でPNAGAm間の水素結合を一部解消して形状を変形させた後、4℃で水素結合を再形成させることで、形状を固定でき、再び温度を上昇させていくと元の形状に回復した(図2B, C)。形状固定率 $F$ はP(NAGAm/NAC)ゲル(1M/1%)で76%、形状回復率 $R$ はほぼ100%であった。P(NAGAm/NACMe)ゲル(1M/1%)は $F=72%$ 、 $R=ca.100%$ であることがわかった。モノマー増度の増加(2M/1%)はゲルの弾性率の増加を引き起こし、わずかに形状固定率が低下した( $F=63%$ (NAC型),  $61%$ (NACMe型))。しかしながら、いずれのゲルも良好な温度駆動型の形状固定/記憶ゲルとして機能することがわかった。

次にAuNR(平均サイズ30nm×9nm,  $\lambda_{max}=735nm$ )と複合させたハイブリッドゲルを調製した。動的粘弾性を評価したところ、P(NAGAm/NAC-AuNR)ゲルは、P(NAGAm/NAC)ゲルに比べて貯蔵弾性率( $G'$ 値)が5倍

程度大きくなった(図3A)。また、引張試験から見積もった破断エネルギーも約2.3倍高くなった。これは、AuNRがジスルフィド結合に配位したことで新たな架橋点が生じ、ポリマーネットワークがより密となったためであると推察される。事実、P(NAGAm/NAC-AuNR)ゲルもUCST型の膨潤-収縮挙動を示すものの、その変化量はAuNRフリーのP(NAGAm/NAC)ゲルの場合に比べてかなり抑制された。

次に、AuNRのフォトサーマル効果に基づく光駆動形状記憶挙動について検討した(図3B)。厚さ1mmの短冊状P(NAGAm/NAC-AuNR)ゲル(2M/1%) (元の形状)を70℃の水中で変形させ、4℃でらせん形状に固定した。キセノンランプ( $\lambda=400-1000nm$ )を使用して4℃(空气中)の一定温度のインキュベーター内で可視光照射したところ、明確な形状回復が誘発されることがわかった。一方、AuNRフリーのゲルの一時的な形状は光照射によって変化せずに保持された。すなわち、ハイドロゲルマトリックス内のAuNRが光エネルギーを熱に変換し、周囲の水素結合を部分的に破壊したことを示している。尚、この条件下では元の形状に完全に回復していないが、形状回復は局所的な領域ではなくゲル全体で発生していることがわかる。これはP(NAGAm/NAC)ハイドロゲル内にAuNRが均一に分布していることを示している。

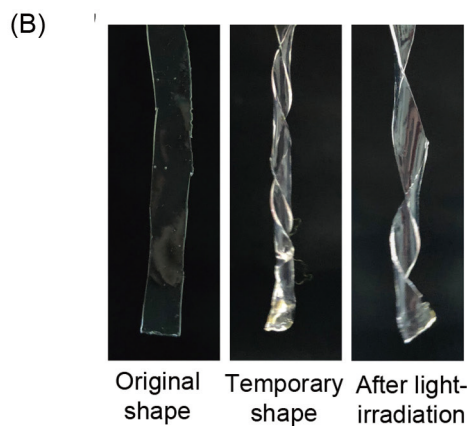
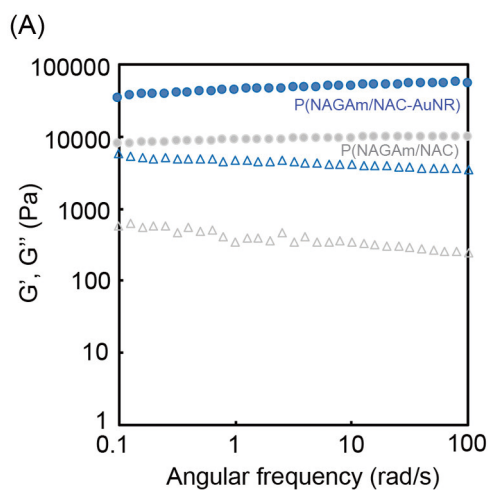


図3 (A) P(NAGAm/NAC) および P(NAGAm/NAC-AuNR) ハイドロゲル(1M/1%)の4℃での粘弾性(○:G', △:G'')。 (B) P(NAGAm/NAC-AuNR) ハイドロゲルの光による形状回復。

### 3.2. 温度/pHに二重応答する形状記憶ハイドロゲルの開発

pH応答性かつUCST型(酸性条件下)のカルボキシ基を有するアスパラギン酸(NAD)残基をコモノマーとして導入したPNAGAmコポリマー(NAD導入率10%, 20%)を調製した(図4A)。PNAGAmは側鎖の2つのアミド基に基づく高い水素結合性を有しており、高濃度条件(>2wt%)では物理ゲルを形成する<sup>11)</sup>。化学架橋剤を用いない場合、高温(約90℃)でゾル化するため、任意の型に流し込んで冷却することでゲルの成形を容易に行うことができる。

P(NAGAm/NAD)(NAD=0.1, 0.2)(1M)から、高い透明性と十分な強度を有するハイドロゲルを調製できた。これらはいずれもpHと温度の多重刺激に応答した膨潤-収縮挙動を示すことがわかった。カルボキシ基がプロトン化する酸性条件(pH2.0)において、可逆的な水素結合形成に由来するUCST型の温度応答(低温で収縮、高温で膨潤)が確認できた。膨潤率の変化量はNAD含有量にほとんど依存しなかった。一方、pH応答性はコポリマー組成に強く依存した。温度一定(4℃)の条件でpH2とpH12の水溶液にゲルを交互に浸漬させると、pH12で膨潤挙動を、pH2で収縮挙動を可逆的に示した。その際の膨潤率の変化量は、NAD=0.1に比べてNAD=0.2の場合で、2倍ほど大きくなった。NADユニットのイオン化による静

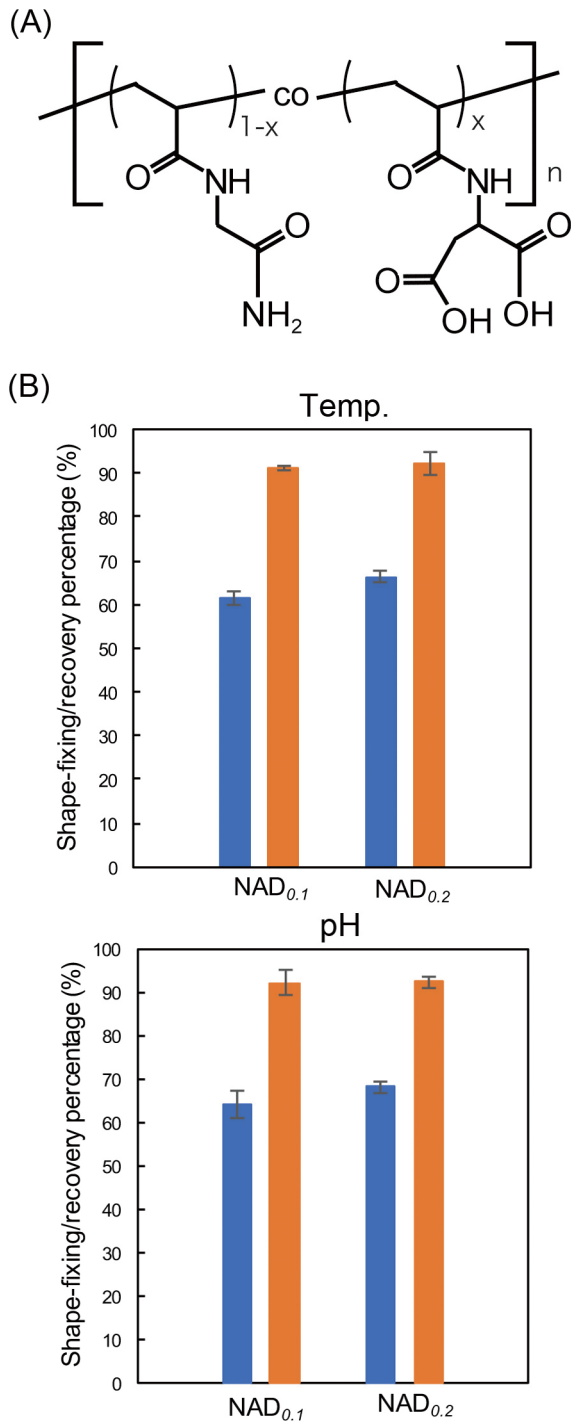


図4 (A) P(NAGAm/NAD)の分子構造.(B)温度変化およびpH変化を利用したP(NAGAm/NAD)ゲルの形状固定/記憶特性(青:形状固定率(F), オレンジ:形状回復率(R))

電反発の大きさを反映している。尚、膨潤-収縮に伴ってゲルの粘弾性も可逆的に変化した。

これらのゲルは温度変化とpH変化に応答して良好な形状固定/記憶性を示した(図4B)。上述の化学架橋型PNAGAmゲルと同様に温度変化(pH2.0一定, 50℃(変形)-4℃(固定)-50℃(回復))に対しては、形状固定率と回復率はそれぞれ $F=60-65\%$ ,  $R>90\%$ であった。一

方で、温度一定(4℃)でpH変化(pH12(変形)-pH2(固定)-pH12(回復))によっても形状記憶性を示し、 $F$ 値と $R$ 値はそれぞれ約65-70%および約95%となり、高い形状記憶性が確認された。また、pH変化によるカルボン酸ユニット間の架橋点の再形成部位が多くなるNAD<sub>0.2</sub>ゲルは若干高い形状固定性を示した。以上よりP(NAGAm/NAD)ハイドロゲルがpH/温度に二重応答し、形状記憶性を示すことが明らかになった。

PNAGAmゲルはマウス胎児由来NIH3T3細胞に対する細胞毒性を示さなかった。また、マウスマクロファージ様細胞(RAW264.7)を用いたNO Assayより細胞刺激性を評価したところ、細胞に刺激を与えるリポ多糖(LPS)のNO産生量と比べて著しく低い値を示し、細胞に刺激を与えないこともわかった。PNAGAmゲルが医用材料やコスメティック材料として有望であることを示している。

次にP(NAGAm/NAD)ハイドロゲルの物質内包性/徐放性について評価した。アニオン性のNADユニットを考慮して、薬物モデルとしてEosinY(アニオン性)およびRhB(カチオン性)を採用した。図5にP(NAGAm/NAD)ハイドロゲル(pH7.4)を1mM EosinY水溶液または1mM RhB水溶液(pH7.4)に24時間浸漬させた時の形状変形を示した。アニオン性のEosinYの場合ではゲスト分子の取り込みに伴う静電反発の増大によりゲルが若干膨潤(158%)するのに対して、カチオン性RhBの場合ではイオンコンプレックス形成に伴って著しいゲルの収縮(11%)が認められ、RhBが効率的に内包されることがわかる。このゲルをPBS緩衝溶液(pH7.4)に24時間浸漬させると、RhBが徐放され元の形状に回復(92%)することがわかった。導入するイオン性ユニットの設計は、形状記憶機能に多重応答性をもたらすだけでなく物質内包特性の精密制御に繋がる。現在、組成の異なるゲルを用いて、より詳細な構造-機能(特性)の相関性を検討している。

#### 4. 総括

本研究では、環境調和型素材であるアミノ酸を活用したスマート高分子ゲルシステムの開発を進めた。温度と光、温度とpHの2つの刺激に独立して応答するユニットを組み込むことで多重刺激応答型の形状固定/記憶性ハイドロゲル材料の開発に成功した。多様で複雑な環境/状況でのゲル使用に適応できる。近年、環境に及ぼす高分子材料の問題が取り上げられている。化粧品素材は、洗顔/洗髪などで環境への流出が避けられないため、SDGsの目標を満たす高分子素材への変換が重要である。アミノ酸ビニルモノマーライブラリーの拡張も進めており<sup>8)</sup>、構成アミノ酸の種類やその組み合わせによりゲル物性や刺激応答挙動を容易にチューニングできることも魅力である。良好な生体親和性や種々の物質の内包性がデザインできることも確認

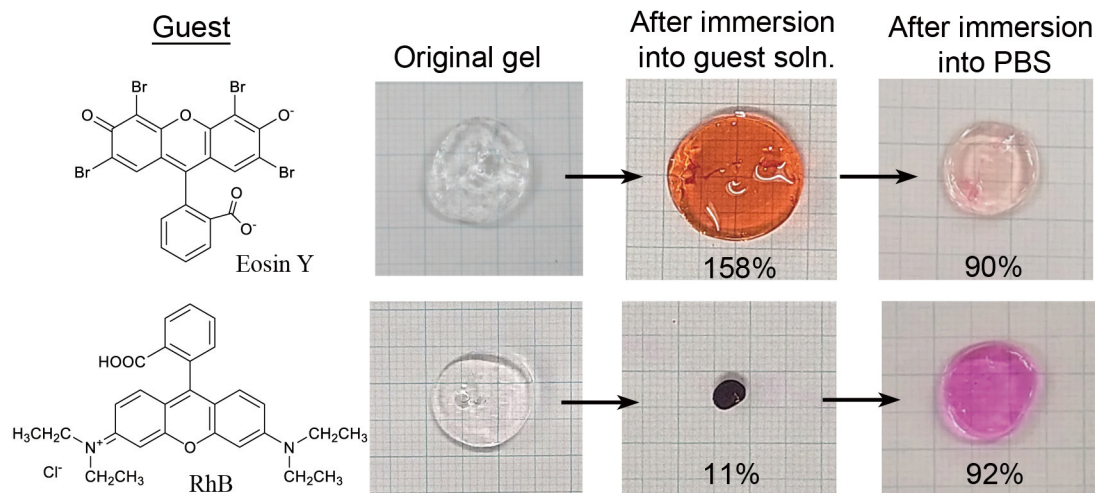


図5 P (NAGAm/NAD) ハイドロゲルのアニオン性Eosin Yおよびカチオン性RhBの取り込み/放出挙動.

された。新しいスマートゲルとしてコスメティック分野での応用が期待される。

#### 謝辞

本研究の遂行にあたり、ご支援いただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に心より感謝申し上げます。

#### (引用文献)

- 1) S. Talebian, M. Mehrali, N. Taebnia, C. P. Pennisi, F. B. Kadumudi, J. Foroughi, M. Hasany, M. Nikkhah, M. Akbari, G. Orive, A. Dolatshahi-Pirouz, Self-Healing Hydrogels: The Next Paradigm Shift in Tissue Engineering?, *Adv. Sci.* **2019**, *6*, 1801664.
- 2) P. Bertsch, M. Diba, D. J. Mooney, S. C. G. Leeuwenburgh, Self-Healing Injectable Hydrogels for Tissue Regeneration, *Chem. Rev.* **2023**, *123*, 834.
- 3) M. A. Haque, T. Kurokawa, J. P. Gong, Super Tough Double Network Hydrogels and Their Application as Biomaterials, *Polymer*, **2012**, *53*, 1805.
- 4) Y. Osada, A. Matsuda, Shape Memory in Hydrogels, *Nature* **1995**, *376*, 219.
- 5) C. Löwenberg, M. Balk, C. Wischke, M. Behl, A. Lendlein, Shape-Memory Hydrogels: Evolution of Structural Principles To Enable Shape Switching of Hydrophilic Polymer Networks, *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 723.
- 6) J. Shang, X. Le, J. Zhang, T. Chen, P. Theato, Trends in Polymeric Shape Memory Hydrogels and Hydrogel Actuators, *Polym. Chem.* **2019**, *10*, 1036.
- 7) N. Higashi, R. Sonoda, T. Koga, Thermo-responsive Amino Acid-based Vinyl Polymers Showing Widely Tunable LCST/UCST Behavior in Water, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 67652.
- 8) A. Sawamoto, S. Nishimura, N. Higashi, T. Koga, Synthesis of Amino Acid-derived Vinyl Polymers with Precisely Controlled Hydrophathy and Their Thermoresponsive Behavior in Water, *Polym. Chem.* **2023**, *14*, 2857.
- 9) Y. Yamaguchi, S. Nishimura, N. Higashi, T. Koga, Multistimuli Responsive Hydrogels with Shape Fix/Memory Capability Fabricated from Gold Nanorod-conjugated Amino Acid-based Vinyl Polymer Networks, *J. Polym. Sci.* **2024**, *62*, 3909.
- 10) T. Koga, K. Tomimori, N. Higashi, Transparent, High Strength, and Shape-memory Hydrogels from Thermo-responsive Amino Acid-derived Vinyl Polymer Networks, *Macromol. Rapid Commun.* **2020**, *41*, 1900650.
- 11) S. Nishimura, T. Yoshida, N. Higashi, T. Koga, Regulation of Cell Adhesion on Physically Crosslinked Hydrogels Composed of Amino Acid-based Polymers by Changing Elastic Modulus using Shape Fix/Memory Properties, *Adv. Mater. Technol.* **2024**, *9*, 2301598.

# 化粧品微粒子原料表面改質のための 気流層型プラズマリアクターの開発

東海国立大学機構 岐阜大学

小林 信介

Micron-sized powders are widely used in cosmetics to improve optical and tactile properties. However, their high tendency to aggregate often requires chemical dispersants, which may compromise safety and sustainability. To address this issue, we developed an air flow type plasma reactor for continuous, non-contact surface modification of particulate materials without chemical additives. This study evaluates two reactor configurations—linear and spiral—for the plasma treatment of polyethylene (PE) particles (~3 μm diameter). The spiral reactor, designed without internal electrodes, minimizes particle deposition and avoids issues like thermal melting and clogging, which were observed in the linear reactor. Surface wettability was assessed by contact angle measurements and FT-IR spectroscopy, confirming the introduction of hydrophilic functional groups such as hydroxyl (–OH) groups on the particle surface. Experimental results revealed that the particle concentration in the reactor strongly influences treatment performance. A lower particle number led to a significant decrease in contact angle, indicating enhanced hydrophilicity. However, a trade-off was found between treatment efficiency and throughput. Additionally, scanning electron microscopy showed that particles remained partially aggregated after treatment, suggesting incomplete exposure to plasma. To improve overall processing efficiency, future work will explore advanced dispersion and feeding systems, such as aerosol generators, to ensure a more uniform plasma exposure. These findings support the feasibility of plasma-based dry surface modification as an environmentally friendly alternative to conventional chemical treatments in cosmetic powder production.

## 1. 緒言

我が国は世界第3位の化粧品大国であり、日本製化粧品は高機能・高品質・安心・安全の面で国際的な競争力を有している。近年では、従来の価値に加え「アンチエイジング」や「Healthy」などの付加価値が求められ、食品素材やミネラル原料を活用した製品も台頭している。また、光科学的な観点からは、原料の微粒子化も進められており、ミクロンサイズの粒子が広く用いられるようになっている。

しかし、微粒子化に伴い粒子間の凝集性が増大し、分散性を確保するために界面活性剤などの化学添加物が必要となるというジレンマが存在する。これらの化学物質は環境負荷の観点からも課題であり、今後の化粧品開発においては、化学添加物を用いずとも高い分散性を有する安心・安全な製造技術の開発が求められている。

こうした背景を踏まえ、申請者らはこれまでに粒子のプラズマ処理が可能な噴流層型プラズマリアクターを開発し、約3 μmのポリエチレン(PE)粒子に対して表面親水化処理を実施してきた。その結果、界面活性剤を使用することなく親水性の付与が可能であることが実証された<sup>1,2)</sup>。ただし、噴流層型では粒子密度が高く、処理の均一性に課題

があるため、実用化にはさらなる装置改良が不可欠であった。

そこで本研究では、処理性能の向上を目的として、微粒子を気相中に分散させながらプラズマによる表面改質を行う「気流層型プラズマリアクター」を新たに開発した。本リアクターは、リアクター内の粒子密度(ホールドアップ)を低減し、単位時間あたりの表面処理効率を大幅に向上させることを狙いとしている。ただ、想定していた気流層型のプラズマリアクターにおいては電極加熱にともなう微粒子の溶融や閉塞が見られたことから、反応装置内に加熱源となる電極を挿入しない新しいプラズマリアクターを考案し、従来型の課題であった微粒子の溶融・閉塞の問題を解消した<sup>3)</sup>。

## 2. 方法

### 2.1. 実験装置

本研究で用いた気流層型プラズマリアクターは、粒子を気相中に分散させた状態で連続的にプラズマ処理を行うことを可能とする装置であり、直線型および螺旋型の2種のリアクターを試作・比較した(図1)。直線型リアクターは、内径6 mm、外径8 mm、長さ150 mmの石英管を反応管とし、その中心に直径3 mmの銅棒を挿入電極、外周にアルミニウムテープを巻き付けた外部電極として構成されている。これらの電極には高周波高圧電源(Kawada, TE-HVP1010K300)が接続され、入力電圧(~20 kV)、周波数(10 kHz)を制御可能である。リアクター上流にはテールフィーダー(アイシンナノテクノロジーズ社製, TF-70-CT)を設置し、微粒子を定量的に供給した。気流の駆動お



Development of an air flow type plasma reactor for surface modification of cosmetic particulate materials

Nobusuke Kobayashi

Tokai National Higher Education and Research System, Gifu University

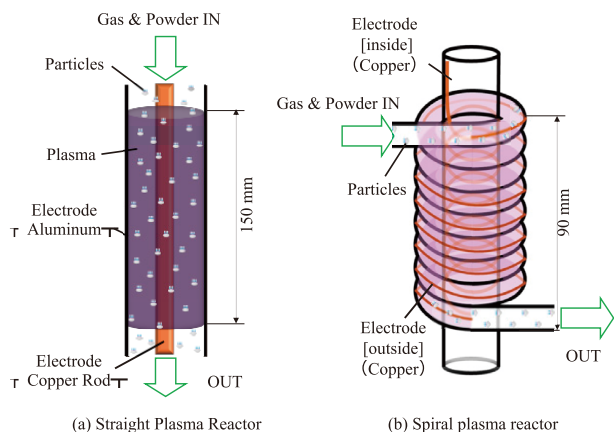


図1 直線・螺旋型リアクターの比較

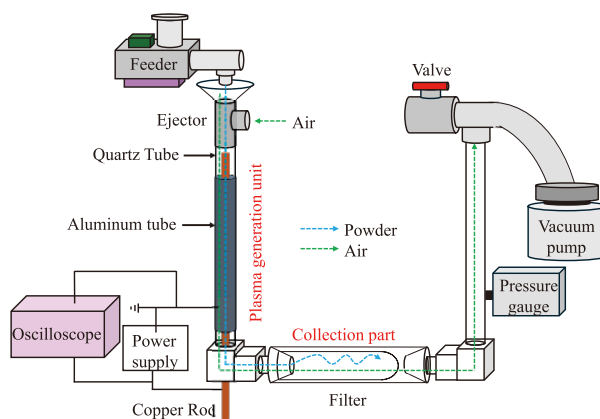


図2 微粒子用プラズマ処理装置全体図

表1 微粒子プラズマ処理条件

Conditions	Unit	Value
Treatment Powder	-	PE
Powder size	[ $\mu\text{m}$ ]	3
Feeding rate	[g/s]	0.002 - 0.04
Gas flow rate	[L/min]	4 - 10
Treatment time	[s]	0.01 - 0.08
Applied voltage	[kV]	10 - 18
Frequency	[Hz]	10

よび制御には集塵機 (RYOBI 製, C-210) を使用し、バルブ操作により管内流量を調整した。気体吸引条件下においてバルブ全閉時の流量は 19L/min であり、処理粒子のリアクター内滞留時間は約 0.01 秒と算出された。リアクター出口には粒子捕集用として円筒型ろ紙 (ADVANTEC No.84) を設置した (図 2)。

一方、螺旋型リアクターは、直線型において生じた粒子の壁面付着および電極部での溶融閉塞といった課題を解決する目的で開発した。石英管を螺旋状に加工し、外部に電極テープを巻き、中心軸に高電圧印加用導体を設置した構造とすることで、リアクター内部に電極が存在せず、粒子が電極と直接接触することなくプラズマ処理が可能となるよう設計した。石英管の直径および厚みは直線型と同様であり、粒子が通過するプラズマ照射部の長さはほぼ同じである。ただし、層内に電極が挿入されていないことから、粒子通過断面積は螺旋型の方が大きい。螺旋型リアクターにおいては、空気吸引によるプラズマ生成が難しかったことから、粒子分散にはエジェクターを導入した押し込み式供給方式を採用し、キャリアーガスにはアルゴンを用いた。

## 2.2. 実験方法

本研究では、直径約  $3\mu\text{m}$  の真球状ポリエチレン (PE) 粉末を処理対象とし、表面改質の指標として接触角の変化を評価した。粒子は一定速度でリアクターに供給され、処理後は円筒型ろ紙上で回収された。処理条件として、印加電圧 (8.6-11.6kV)、入力電力 (200-300 W)、周波数 (直線型: 40kHz、螺旋型: 10kHz) を変化させ、さらに処理時間の影響を評価するために、処理済み粒子を再度リアクターに投入し、実質的な滞留時間を段階的に延長した。本実験の条件を表 1 にまとめて示す。

処理粒子の表面改質状態は、ウォッシュバーン法により接触角  $\theta$  を測定することで評価した。具体的には、処理済み PE 粒子 200mg を直径 10mm のガラスシリンダーに充

填し、底部に配置したフィルターペーパー (JHWP04700) を通じて水またはヘキサンの浸透挙動を質量計で記録し、質量と時間の関係から接触角を算出した。ヘキサンを用いてキャピラリー定数を求めた後、水の浸透速度との比較から、対象粒子の水に対する接触角を得た。なお、リアクター内温度が PE の融点 (約  $125^\circ\text{C}$ ) を超えないように、全ての実験においてサーモグラフィカメラ (InfReC G100EX シリーズ) により温度監視を実施し、粒子の溶融や閉塞が確認された場合には、その条件での連続処理は中止した。

## 3. 結果および考察

### 3.1. 直線・螺旋型プラズマリアクターの比較

図 3 に直線型および螺旋型リアクターのプラズマ点灯の様子を示す。直線型は空気、螺旋型はアルゴンを含む空気をキャリアーガスとしているため、プラズマの発色傾向には若干の違いが見られた。ただし、いずれも電極部には均一なプラズマが生成されている。

図 4 に印加電圧に対するリアクター表面温度を示す。なお、この温度はリアクター内部の温度ではなく、伝熱にともなう表面温度を示しているので注意が必要である。いずれのリアクターにおいても印加電圧とともに表面温度が上昇する傾向は同じであるが、温度および印加電圧に対する温度上昇は大きく異なっており、螺旋型の場合、印加電

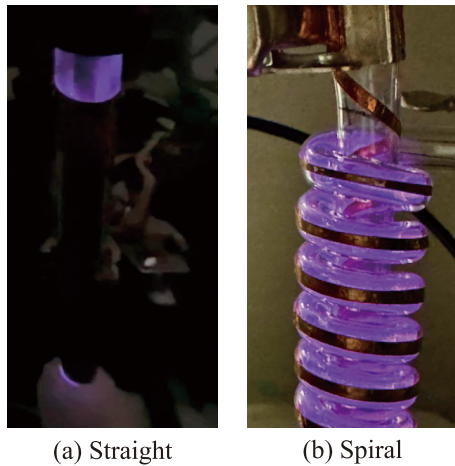


図3 各リアクターのプラズマ点灯の様子

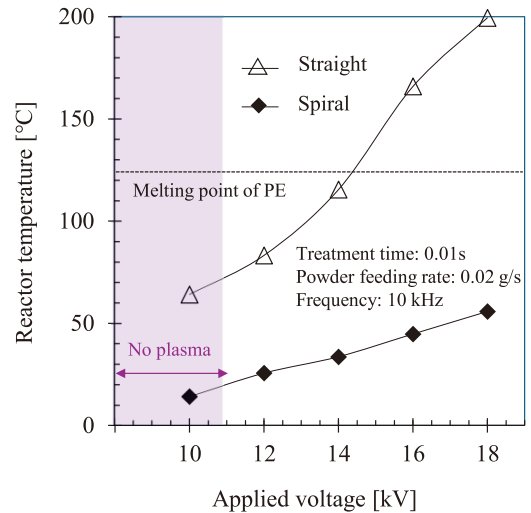


図4 各リアクターの印加電圧と表面温度

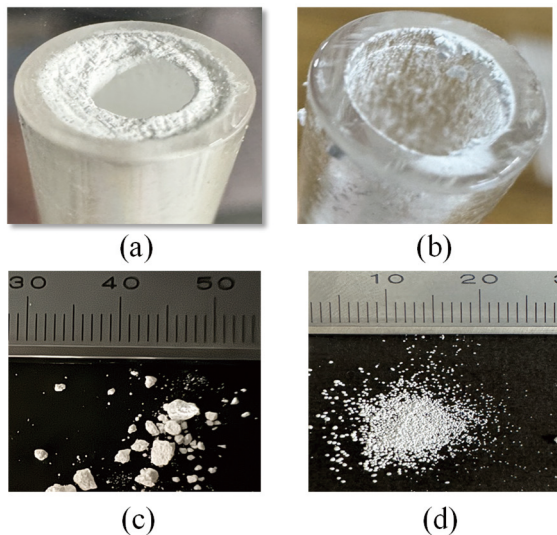


図5 プラズマ処理後のリアクター内および処理粒子の様子

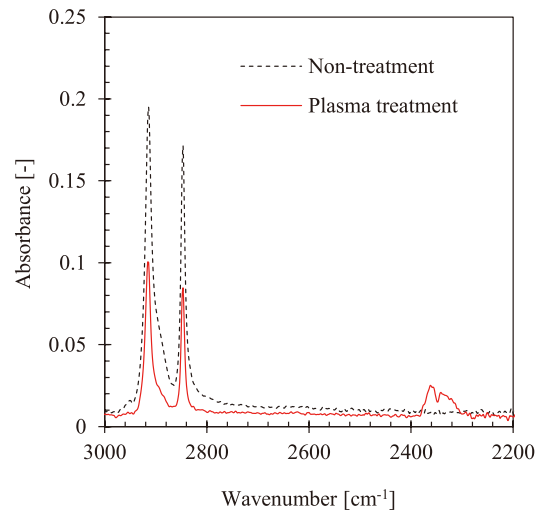


図6 プラズマ処理前後のPE吸収スペクトル

圧を最大にしても  $60^{\circ}\text{C}$  以下に保つことができた。一方で、直線型の場合、 $14\text{ kV}$  の電圧印加でPEの融点に達している。ここには示していないが、粒子の有無により表面温度は大きく変化し、気相中の粒子が抵抗となり、表面温度が急激に上昇することが明らかになっている。直線型の場合にはリアクターへの粒子堆積量が増大することから、表面温度の上昇も顕著であり、高電圧での処理が困難であった。

図5に処理後のリアクター内部および処理粒子の様子を示す。いずれの反応管でも微粒子の親水化処理は可能であった。ただし、直線型ではリアクター内に電極が存在し、粒子通過断面積が狭いため、粒子が管側面に付着・堆積し、最終的には閉塞して継続処理が困難となった。一方、螺旋型では粒子の付着はあるものの、閉塞は見られず、連続処理が可能であった。また、リアクター形状の違いにより、回収された粒子の物理状態にも差が見られた。直線型では

比較的大きな凝集体が観察されたのに対し、螺旋型では分散性の高い粒子が得られた。

### 3.2. 螺旋型プラズマリアクターにおける処理条件の影響

上述の通り、螺旋型プラズマリアクターは、高印加電圧での処理が可能であること、連続処理が担保できることから、螺旋型プラズマリアクターにおける条件変更を行い、処理粒子に与える影響について評価を行った。まず、プラズマ処理による表面改質を明らかにするため、FT-IRによりプラズマ処理前後のPE表面官能の分析を実施した。図6に処理前後のIRの吸収スペクトルを示す。処理前後において  $2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$  および  $2300\text{--}2400\text{ cm}^{-1}$  に大きな違いが見られた。 $2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$  は炭化水素に由来するCH結合を示しており、 $2300\text{--}2400\text{ cm}^{-1}$  はカルボキシ

ル基に由来するOHを表している。プラズマ処理により表面のCH結合が減少し、OH結合が増大しており、プラズマによる親水化が進んでいる。

図7に処理時間を変化させた場合の処理粒子の接触角を示す。予想の通り、処理時間が長くなるとともに、接触角は低下した。ただし、処理時間に対する接触角の減少は小さくなり、一定の処理時間以上においては接触角に変化が見られなくなった。これは、プラズマによる表面改質と改質官能基の分解が平衡状態に達しているためであると考えられ、処理時間の変化だけでは、さらなる親水化が難しいことが分かった。

接触角が処理時間により大きく変化しなかったことから、気相中における粒子分散が問題であると考え、ガス流量および粒子供給量を変化させプラズマによる微粒子の表面処理を行った。図8にガス流量に対する接触角を示す。この場合粒子供給量が一定であることからガス流量の増大と

もにガス中の粒子量は減少することになる。ただし、ガス流量の増大とともにプラズマ領域通過時間、すなわち処理時間は短くなることに注意が必要である。

ガス流量の増大により処理時間は短くなるものの、接触角はガス流量の増大とともに低下しており、予想の通り、リアクター内の粒子量が処理性能に影響していることが示唆された。そのため、粒子供給量を変化させ、プラズマ処理を実施した。図9に粒子供給量と接触角の関係を示す。粒子供給量の減少、すなわちリアクター内の粒子量の減少とともに接触角が急激に減少する傾向が見られた。粒子供給量が少ない場合ほど、顕著な表面処理が可能であることが示唆された。

ガス流量および粒子供給量、すなわちリアクター内における粒子数に応じて処理性能が異なることから、リアクター内粒子量と接触角の関係を図10に示す。横軸は対数となっていることに注意が必要である。想定の通り、リアク

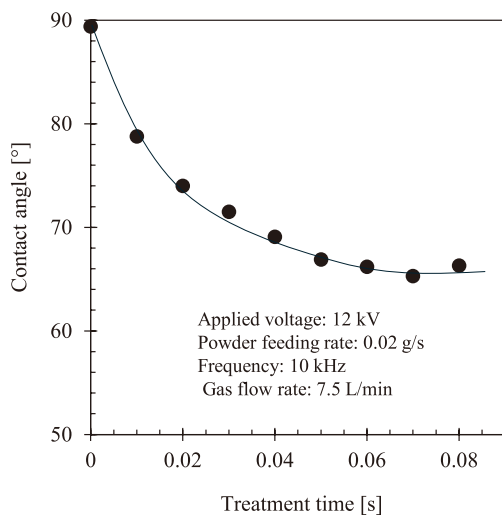


図7 処理時間に対する処理粒子接触角

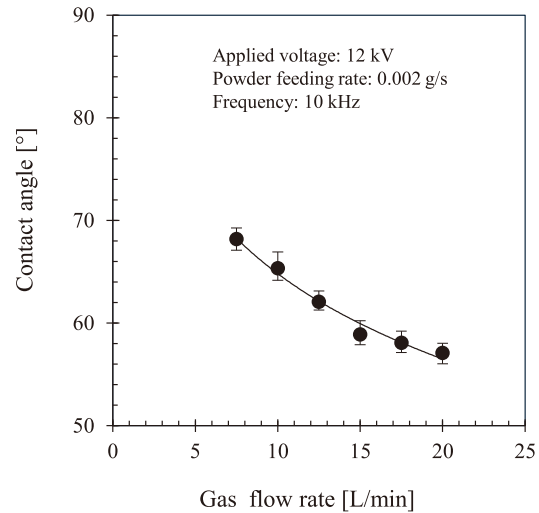


図8 ガス流量と処理粒子接触角の関係

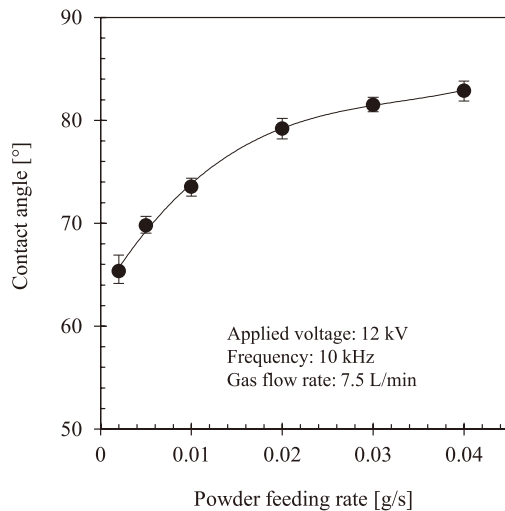


図9 粒子供給量と処理粒子接触角の関係

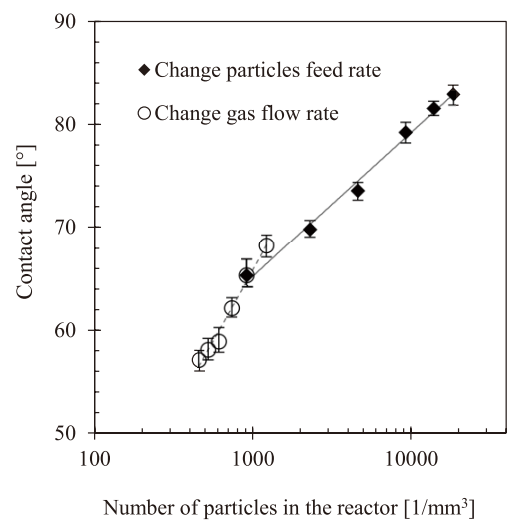


図10 リアクター内粒子数と処理粒子接触角

ター内粒子数と処理粒子の接触角には強い相関関係が見られた。ガス流量を変化させた場合と粒子供給量を変化させた場合においては、処理時間が異なっているため傾きは異なっている。リアクター内の粒子数が少なくすることにより、処理性能は大幅に向上可能であることは明らかとなったものの、供給量が少なくなると処理量は少なくなるため、微粒子の親水化処理としてはトレードオフの関係にある。そのため、この課題を解決する新たな対応策が必要となっている。

この対応策として粒子の供給・分散方法に着目している。図 11 に回収したプラズマ処理粒子の SEM 写真を示す。肉眼では微粒子は見掛け上分散しているように見えるが、それぞれの粒子を拡大すると微粒子が凝集体を形成していることがわかった。凝集体を形成していると、個々の粒子に対してプラズマによる表面改質ができない可能性がある。そのため、今後の実験においてはリアクター内に微粒子を分散した状態で供給することが重要となっており、エアロジェネレーター等による微粒子分散についての検討が必要と考えている。

#### 4. 総括

気流層型プラズマリアクターによる PE 微粒子の表面改質を実施し、以下の知見を得た。

- ・気流層型プラズマリアクターの開発により、微粒子の非接触かつ連続的な表面改質処理が可能となった。
- ・螺旋型リアクターは直線型に比べ、粒子の付着・閉塞が少なく、安定した処理が可能であることを確認した。
- ・プラズマ処理によりポリエチレン粒子表面に親水性官能基 (OH 基) が導入され、接触角が低下することが明らかとなった。
- ・リアクター内の粒子数が処理性能に大きく影響することが示され、気相中の粒子の分散状態の制御が重要であることが分かった。
- ・粒子の凝集が処理の妨げになることから、今後は粒子分散技術 (例: エアロジェネレーター) の導入が必要と考えられる。

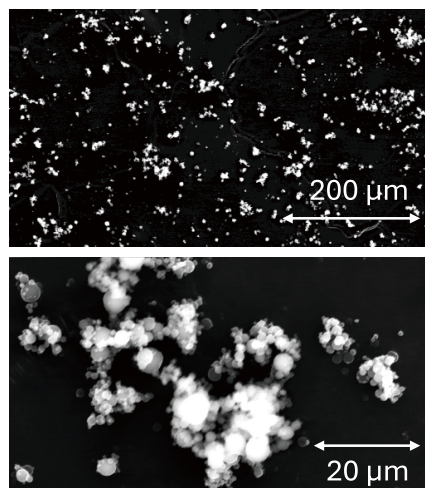


図 11 処理粒子の SEM 写真画像

- ・処理性能と処理量のトレードオフを解決するための供給方法の改良が今後の課題である。

#### (引用文献)

- 1) Fan X., Kobayashi N., Suami A., Itaya Y., Optimizing the surface modification of cohesive polyethylene powders in a vibrated plasma-spouted bed: Exploring agglomerate size impact on coarser particle addition mechanism, *Advanced Powder Technology*, 34 104274 (2023)
- 2) Fan X., Kobayashi N., Itaya Y., Suami A., Masumbuko R., Homogenous wettability modification of cohesive polyethylene powders in a plasma-enhanced spouted bed enriched by adding coarser particles and vibration, *Chemical Engineering Science*, 267, 118359 (2023)
- 3) 江口 祐基, 小林 信介, 須網 暁, “螺旋型プラズマリアクターを用いた微粒子の高速表面改質”, 第 30 回流動化・粒子プロセッシングシンポジウム (FB30) (Niigata, Dec. 11-12, 2024) p48-49. 学生優秀発表賞 受賞

# 糖脂質型バイオサーファクタントの精密化学合成と構造機能相関による新規高機能性化粧品素材の創製

慶應義塾大学理工学部

高橋 大介

Mannosylerythritol lipids (MELs) are a group of amphipathic molecules consisting of a hydrophilic 4-*O*- $\beta$ -D-mannopyranosyl-erythritol core and two hydrophobic fatty acyl chains. Our group has systematically and stereoselectively synthesized 20 variants of *S*-MEL-A-D (C6, C8, C10, C12, C14) with different fatty acid chain lengths and varying acetylation patterns at C4' and C6' of the mannose unit. In addition, we conducted a structure-activity relationship (SAR) study to evaluate their recovery effects on damaged skin cells. The findings revealed that *S*-MELs with a C10 fatty chain length demonstrated the most significant recovery effects. Here, to create potential candidates for new cosmeceuticals, we designed and synthesized four MEL analogues—*R*-MEL-A, *S*-mannosylthreitol lipid (MTL)-A, *R*-MTL-A, and  $\alpha$ -*S*-MEL-A—using our previously established boron-mediated aglycon delivery (BMAD) method along with a neighboring group-assisted glycosylation method. Among these, *R*-MTL-A exhibited the highest selective cytotoxicity against human skin squamous carcinoma cells while also exhibiting an efficient recovery effect on damaged skin cells. These results indicate that *R*-MTL-A holds promise as a lead compound for next-generation cosmeceuticals.

## 1. 緒言

マンノシルエリトリールリピッド (MEL) は、*Pseudozyma* 属酵母より生産される糖脂質型バイオサーファクタントである<sup>1)</sup>。MELの構造的特徴として、①マンノース2位および3位に2本の脂肪鎖 (鎖長:  $n=5-17$ ) を有する点、②立体選択的な構築が困難な1,2-*cis*- $\beta$ -グリコシドである $\beta$ -マンノシド構造を有する点、③マンノースの4位および6位のアセチル (Ac) 基の位置と数により MEL-A, B, C および D の4種類の構造を有する点およびエリトリール部位の水酸基の立体化学によって、*S*-MEL ([2*S*, 3*R*]-erythritol型) と *R*-MEL ([2*R*, 3*S*]-erythritol型) に分類される点、が挙げられる (Fig. 1)。一方、MELの生物活性として、がん細胞の増殖抑制活性などの生物活性のみならず、優れた界面活性および保湿効果を有することから近年、医薬品および化粧品分野などで注目を集めており、とりわけ MEL-B は化粧品素材として実用化されている<sup>2)</sup>。現在 MEL は、酵母培養法により脂肪鎖長の不均一な混合物として供給されているが、脂肪鎖長が均一な化合物として単離・精製することが困難であり、詳細な構造機能相関研究が進んでいないのが現状である。そのため、新たな高機能性サーファクタントを創出するためにも、構造が明確かつ単一構造を有する MEL およびその類縁体の合成的供給が強く求められている。しかし、MELの化学合成例は、

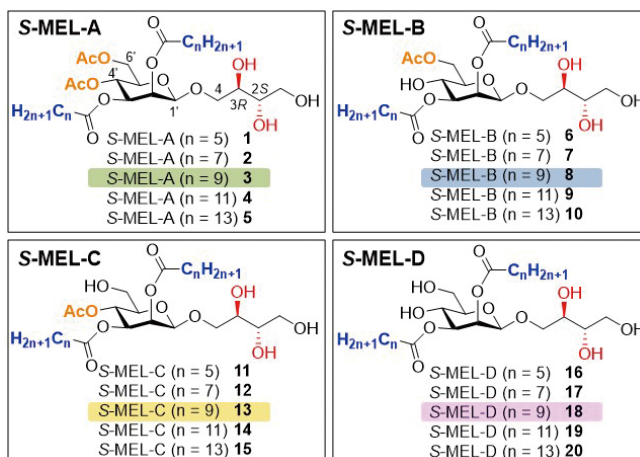


Fig. 1 S-MEL 1-20の化学構造

これまで MEL-A の1例のみであり<sup>3)</sup>、MEL-B, C および D の全合成は、未だ達成されていなかった。このような背景の中、著者は、独自に開発した立体選択的1,2-*cis*グリコシル化反応<sup>4-6)</sup>を駆使して、*S*-MEL-A-Dの種類 (4種類) と脂肪鎖長 (5種類) ( $n=4, 6, 8, 10$  および  $12$ ) が異なる計20種類の *S*-MEL 1-20の全合成と抗菌活性および肌荒れ改善活性に関する構造機能相関研究を行ってきた (Fig. 1)。その結果、脂肪鎖長および Ac化様式のわずかな違いが MELの活性発現に大きな影響を与えることを初めて見出し、特に、*S*-MEL-D 18 ( $n=8$ ) のみが、バンコマイシン耐性菌に対して抗菌活性を発現すること、および  $n=8$ の脂肪鎖を有する *S*-MEL-A ( $n=8$ ) 3、*S*-MEL-B ( $n=8$ ) 8、*S*-MEL-C ( $n=8$ ) 13、および *S*-MEL-A ( $n=8$ ) 18 が表皮に浸透することで顕著な肌荒れ改善活性を示すことを明らかにしている<sup>7-9)</sup>。そこで次に、著者らは、MELのがん細胞に対する細胞毒性に着目し、次の仮説を立てた。すなわち、ある種の MEL が、肌荒れ改善活性だけでなく、上



Precise chemical synthesis of glycolipid biosurfactants and structure-function relationships for the creation of novel highly functional cosmetic materials

Daisuke Takahashi

Faculty of Science and Technology, Keio University

皮膚がん細胞選択毒性を有するのであれば、スキンケアとがん予防を同時に可能にする新たな機能性化粧品（コスメシユーティカル）素材になるのではないかと着想した。そこで本研究では、MELを基本構造とし、肌荒れ改善活性とがん細胞選択毒性の両方の機能を併せ持つ次世代型コスメシユーティカル素材の創製を目的とした。

## 2. 方法・結果・考察

### 2.1. S-MEL-A-D (n=8) のがん細胞選択毒性評価

高い肌荒れ改善活性を示したS-MEL-A-D (n=8) **3**, **8**, **13**, および**18**のがん細胞選択毒性を評価するに際し、正常細胞としてヒト肺線維芽細胞WI-38を、上皮がん細胞としてHSC-5を選択し、MTTアッセイにより細胞増殖抑制活性を評価した。その結果、正常細胞WI-38に対しては、いずれの化合物も30mMまでの濃度において細胞増殖抑制活性を発現しなかったのに対し、上皮がん細胞

HSC-5の細胞増殖を濃度依存的に抑制することを見出し、がん細胞選択毒性を発現することを明らかにした。特に、S-MEL-A (n=8) **3**が、最も高いがん細胞選択毒性を発現したことから、**3**がコスメシユーティカル素材開発のためのリード化合物であることを見出した。

### 2.2. 新規MEL類縁体**21-24**のデザイン・合成

次に、より優れた素材の開発を志向し、S-MEL-A (n=8) **3**のエリスリトール部位とアノマー位の立体化学を変更した4種類の新規類縁体をデザイン・合成し、構造活性相関研究を行うこととした。すなわち、エリスリトールの立体化学が異なるR-MEL-A (n=8) **21**、エリスリトール部位をスレイトールに変更したS-mannosylthreitol lipid (MTL)-A (n=8) **22**、その立体反転型のR-MTL-A (n=8) **23**、およびアノマー位の立体化学を変更した $\alpha$ -S-MEL-A (n=8) **24**をデザインし、合成に着手した。まず、**21**の合成を検討した (Fig. 3A)。すなわち、ポリン酸触媒**27**を

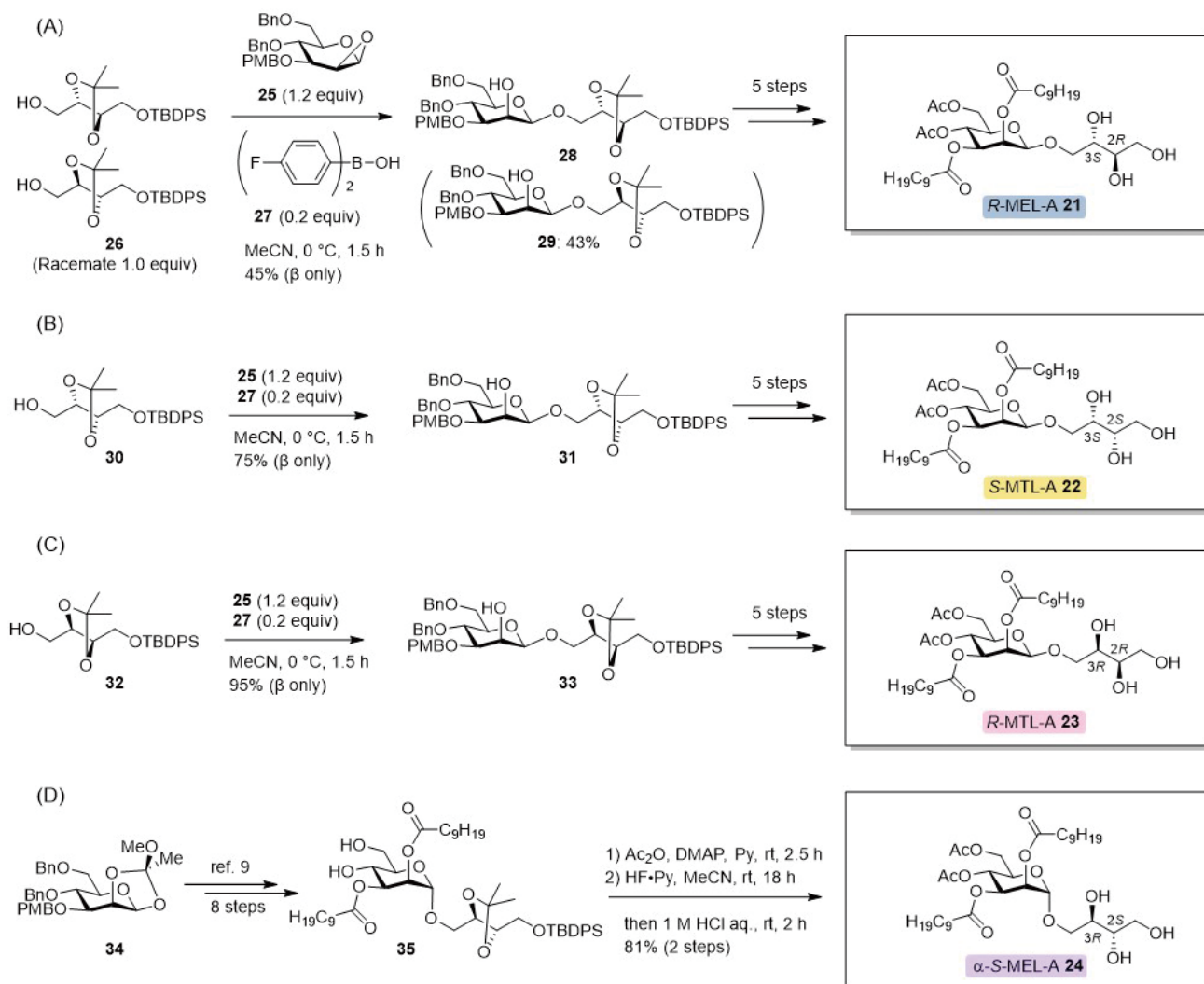


Fig. 2 MEL類縁体**21-24**の合成

用いて、1, 2-アンヒドロ糖 **25** とラセミ体のエリスリトール保護体 **26** とのBMAD反応を検討した結果、望むβ-マンノシド **28** およびその異性体 **29** を、それぞれ高収率かつ単一異性体として得た。その後、**28** から5工程を経て目的の **21** を合成した。次に、**22** および **23** の合成を同様に検討した。すなわち、BMAD反応のアクセプターとして、それぞれスレイトール保護体 **30** および **32** を用いてβ-マンノシドを得た後、5工程を経て **22** および **23** の合成を達成した (Figs. 3B, C)。最後に、**24** の合成を Fig. 3D に示す。すなわち、**34** を出発原料とし、8工程で **35**<sup>9)</sup> を合成後、マンノースC4'およびC6'位水酸基のAc化、続くアセトニド基とトプチルジフェニルシリル (TBDPS) 基の脱保護により、**24** の合成を達成した。

### 2. 3. MEL 類縁体 **21-24** のがん細胞選択毒性評価

次に、合成したMEL類縁体 **21-24** のがん細胞選択毒性を、先ほどと同様、WI-38 細胞およびHSC-5 細胞を用いてMTTアッセイにより評価した (Fig. 4)。なお、この際、ポジティブコントロールには **3** を用いた。その結果、β-マンノシド構造を有する **24** が、正常細胞に対して毒性を発現したのに対し、β-マンノシド構造を有する **21-23** は、正常細胞に対して毒性を発現せず、良好から高いがん細胞選択毒性を発現することを見出した。さらに、[2*R*, 3*R*]-スレイトール構造を有する **23** が、**3** を上回る選択毒性を発現することを明らかにした。以上の結果より、アノマー位の立体化学およびエリスリトール部位の水酸基の立体化学

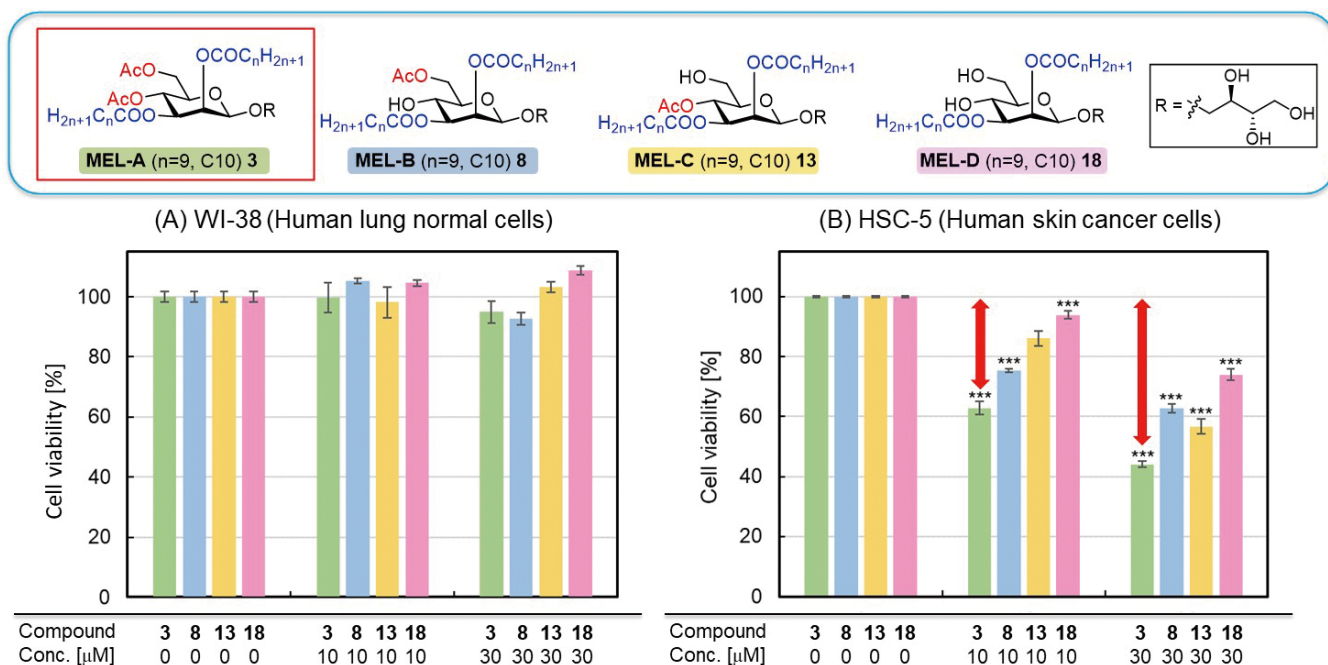


Fig. 3 S-MEL **3**, **8**, **13**, および **18** のがん細胞選択毒性

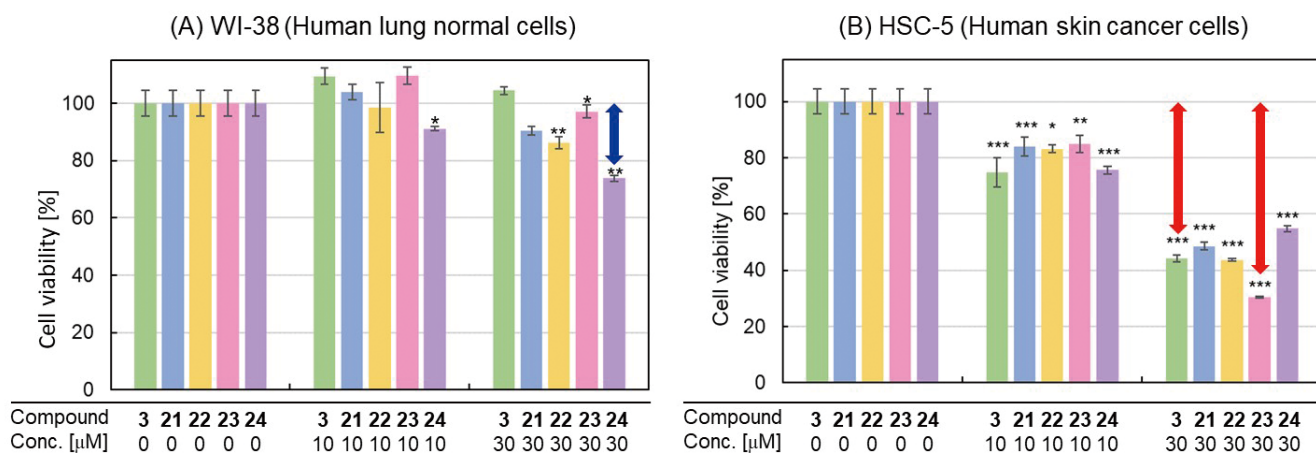


Fig. 4 S-MEL-A **3** および MEL 類縁体 **21-24** のがん細胞選択毒性

の違いが、HSC-5細胞に対する選択毒性に大きな影響を及ぼすことを見出した。

#### 2.4. MEL類縁体23の肌荒れ改善活性

次に、高いがん細胞選択毒性を発現した23の肌荒れ改善活性を、ヒト三次元培養表皮を用いて評価した。すなわち、はじめにヒト三次元培養表皮を、乾燥誘引剤である1wt%のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)で処理することで、細胞間脂質が脱脂された乾燥肌荒れ表皮を作成した。続いて、ポジティブコントロールとして選択した3または23を表皮に塗布し、24時間後の細胞生存率をMTTアッセイにより評価した。その結果、SDSのみを添加した表皮細胞は、バリア機能崩壊に伴う乾燥により、細胞生存率が約10%まで低下したのに対し、3および23が、SDSによる乾燥状態から回復効果を示し、細胞生存率がそれぞれ約50%および75%まで上昇することを見出した(Fig. 5)。以上の結果より、新たにデザイン、合成したMEL類縁体23が、3よりも優れた肌荒れ改善活性を発現することを明らかにし、肌荒れ改善活性と上皮がん細胞選択毒性を発現する新たなコスメシューティカル素材として有望であることを見出した。

### 3. 総括

本研究では、まず、先行研究で高い肌荒れ改善活性を有することを見出していたS-MEL 3、8、13、および18のがん細胞選択毒性について、正常細胞WI-38およびがん細胞HSC-5を用いて評価を行った。その結果、すべてのMELが、がん細胞選択毒性を示し、特にS-MEL-A 3が最も高い活性を有することを明らかにした。次に、MELのエリスリトール部位およびアノマー位の立体化学が異なる4種類の新規MEL類縁体(R-MEL-A 21、S-MTL-A

22、R-MTL-A 23、 $\alpha$ -S-MEL-A 24)をデザイン・合成し、それらのがん細胞選択毒性を評価した。その結果、23が3よりも優れたがん細胞選択毒性を示し、MELのアノマー位とエリスリトール部位のわずかな立体化学の違いが、がん細胞選択毒性の発現に影響を及ぼすことを初めて見出した。最後に、3および23の肌荒れ改善活性を評価したところ、人工的に合成されたMEL類縁体23が、天然型のMEL 3よりも高い肌荒れ改善活性を示すことを明らかにした。以上の結果から、23は上皮がん細胞選択毒性と肌荒れ改善活性の両方を兼ね備えた、新たなコスメシューティカル素材の有望な候補化合物であることが示された<sup>10,11)</sup>。

#### 謝辞

本研究の遂行にあたり、ご支援を賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に心より感謝申し上げます。

#### (引用文献)

- Morita, T.; Fukuoka, T.; Imura, T.; Kitamoto, D. Mannosylerythritol lipids: production and applications. *J. Oleo Sci.* **64**, 133-141 (2015).
- Kitamoto, D.; Isoda, H.; Nakahara, T. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants -from energy-saving materials to gene delivery carriers-. *J. Biosci. Bioeng.* **94**, 187-201 (2002).
- Crich, D.; de la Mora, M. A.; Cruz, R. Synthesis of the mannosyl erythritol lipid MEL A; confirmation of the configuration of the *meso*-erythritol moiety. *Tetrahedron* **58**, 35-44 (2002).
- 高橋大介, ボリン酸触媒を用いた1,2-*cis*-立体選択的グリコシル化反応の開発と天然物合成への応用, 有機合

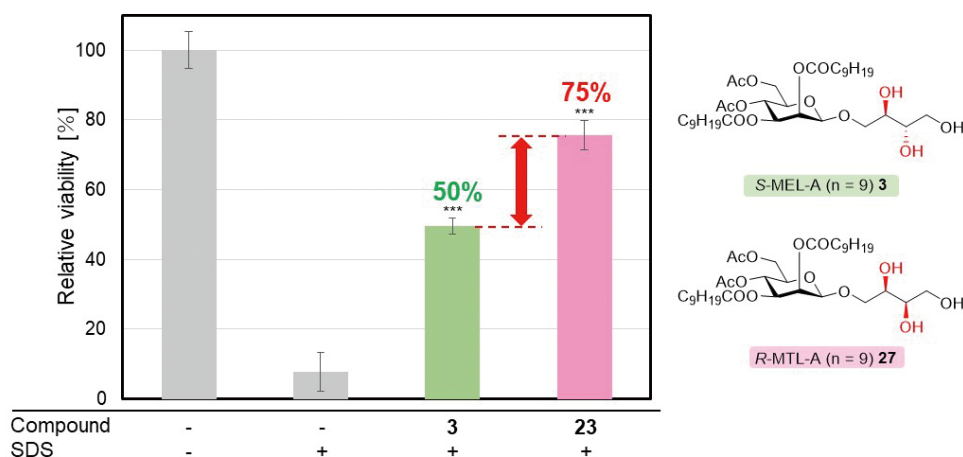


Fig. 5 S-MEL-A 3 および MEL 類縁体 23 の肌荒れ改善活性

- 成化学協会誌 **76**, 470-473 (2018).
- 5) 高橋大介, ボロン酸触媒を活用した位置および1,2-*cis*-立体選択的グリコシル化反応の開発と応用, 有機合成化学協会誌 **78**, 221-231 (2020).
- 6) Takahashi, D.; Toshima, K. Boron-mediated aglycon delivery (BMAD) for the stereoselective synthesis of 1,2-*cis* glycosides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **82**, 79-105 (2022).
- 7) Nashida, J.; Nishi, N.; Takahashi, Y.; Hayashi, C.; Igarashi, M.; Takahashi, D.; Toshima, K. Systematic and Stereoselective Total Synthesis of Mannosylerythritol Lipids and Evaluation of their Antibacterial Activity. *J. Org. Chem.* **83**, 7281-7289 (2018).
- 8) Kondo, T.; Yasui, C.; Banno, T.; Asakura, K.; Fukuoka, T.; Ushimatsu, K.; Koga, M.; Minakawa, H.; Saika, A.; Morita, T.; Takahashi, D.; Toshima, K. Self-Assembling Properties and Recovery Effects on Damaged Skin Cells of Chemically Synthesized Mannosylerythritol Lipids. *ChemBioChem* **23**, e202100631 (2022).
- 9) Kondo, T.; Yasui, C.; Miyajima, I.; Banno, T.; Asakura, K.; Fukuoka, T.; Ushimaru, K.; Koga, M.; Saika, A.; Morita, T.; Takahashi, Y.; Hayashi, C.; Igarashi, M.; Takahashi, D.; Toshima, K. Synthesis of Mannosylerythritol Lipid Analogues and their Self-Assembling Properties, Recovery Effects on Damaged Skin Cells, and Antibacterial Activity. *Chem. Eur. J.* **28**, e202201733 (2022).
- 10) Meng, J.; Yasui, T.; Shida, M.; Toshima, K.; Takahashi, D. Designed Mannosylerythritol Lipid Analogues Exhibiting both Selective Cytotoxicity against Human Skin Cancer Cells and Recovery Effects on Damaged Skin Cells. *Chem. Eur. J.* **30**, e202401319 (2024).
- 11) 孟繼坤, 戸嶋一敦, 高橋大介, 高機能性化粧品素材の創製を指向したマンノシルエリスリトールリピッド (MEL) 類縁体の合成と構造活性相関研究, オレオサイエンス, **24**, 475-481 (2024).

# テラヘルツ分光による水和水の環境の分子レベルでの解明

東北大学大学院理学研究科物理学専攻

高橋 まさえ

Terahertz (THz) spectroscopy has become an increasingly popular technique for probing the properties of a wide range of materials and compounds. Extensive inter- and intramolecular vibrations in the low-frequency THz energy region are expected in molecular crystals. The intermolecular vibrational modes in these crystals are non-localized but are of a collective (phonon-like) nature and are regarded as lattice vibrations. We have investigated the anomalous temperature-dependent upward frequency shift due to electron-phonon (e-p) polar-coupling interactions in thiamin chloride hydrochloride monohydrate crystal, focusing on the open cavities within the crystal. These open cavities are located around two methyl groups and one of two chlorine atoms that are close to each other, with the chlorine atom and one of the methyl groups connected to the hydration water. X-ray crystallography and first-principles calculations reveal that the key structure for the e-p polar-coupling interaction is an open cavity near the considered vibration. The vibrational modes assigned to temperature-dependent blue-shifted peaks exhibit large atomic displacements near the open cavity. Analysis of the temperature-dependent frequency shift proportional to the Bose-Einstein statistical factors based on the quantum mechanical description revealed that the strength of the e-p polar-coupling interaction and the frequency of the phonons interacting with the electrons were  $5.3 \times 10^{-3} \text{ cm}^{-1} \text{ K}^{-1}$  and  $76.6 \text{ cm}^{-1}$ , respectively. Interestingly, in the same crystal, the e-p interaction strength was similar for both polar coupling and multiphonon scattering. Phonon dispersion curves exhibiting LO (longitudinal optical)-TO (transverse optical) splitting confirmed that the highest frequency LO phonon participates in the polar-coupling interaction. Our results suggest that open cavities are essential for generating e-p polar-coupling interactions in crystals. The current study to interpret the temperature-dependent upward frequency shift is still preliminary, and future studies will require further accumulation of data on this phenomenon.

## 1. 緒言

テラヘルツ技術は非破壊非侵襲計測手段を提供し、テラヘルツ領域 ( $3 \sim 300 \text{ cm}^{-1}$  または  $0.1 \sim 10 \text{ THz}$ ) の振動吸収スペクトルは、分子の熱力学的特徴やナノスケール構造の研究に重要な役割を果たす<sup>1-3)</sup>。分子結晶のテラヘルツ振動は結晶中での、たとえば結晶に捕らえられた水和水イオンなどの分子の局所環境に敏感であり、振動数およびピーク形状の温度依存性に反映される。肌から浸透した角質内水分子には、結合水(または水和水)と自由水の2種類の型があり、結合水には強く結合している一次結合水とその周りの比較的弱い結合をしている二次結合水とがある。これらの水分子の違いは、従来、示差走査熱量測定により区別されてきたが、分子レベルでの解析は行われていない。

本研究では、特に、角質層の水分保持能に重要な役割を果たす二次結合水に焦点をあて、分子レベルで物性を明らかにする。多くの生物学的プロセスは水性環境で発生し、水は生命にとって不可欠な溶媒である<sup>4)</sup>。一方で、生物は、本質的に蒸留水から飽和塩溶液まで、さまざまな塩

分濃度の範囲内で生存する。本研究では、チアミン(ビタミンB1)の含イオン水和水結晶およびシアル酸の水和水結晶を調べた。チアミンの含イオン水和水結晶は一水和水を、シアル酸の水和水結晶は二水和水を形成することが知られている<sup>5,6)</sup>。本稿では、チアミンの含イオン水和水結晶の結果<sup>7)</sup>を主として報告する。

分子結晶では、温度上昇に伴う振動遷移振動数の高波数シフトはほとんど観測されないが、テラヘルツエネルギー領域での低波数シフトの観測は多数報告されている。結晶中の鋭いローレンツピークの温度依存振動数シフトは、主に振動時間スケール以下の電子格子相互作用と結晶の熱膨張によって引き起こされる。温度上昇に伴う結晶の熱膨張では、振動数の低波数シフトが生じる。結晶中の鋭いローレンツピークの温度依存高波数シフトを理解するために、弾性機構と非弾性機構によって生じる振動時間スケール以下の電子格子相互作用の基本概念を簡単に説明する。弾性機構は格子分極の電場を介したポーラーカップリング(位相緩和)であり、非弾性機構は格子構造特性に対する電子エネルギーの依存性を介した変形ポテンシャルカップリング(エネルギー緩和)である。弾性機構では、励起状態電子と縦光学(LO)フォノン間のポーラーカップリング相互作用により温度上昇とともに振動数が高波数シフトするのに対し、非弾性機構では、温度上昇に伴う振動数の低波数シフトが熱励起フォノンによる非弾性散乱によって引き起こされる(図1)。電子格子ポーラーカップリング相互作用は、鉛ハライドペロブスカイトなどの固体極性半導体にお



Elucidation of the environment of hydrated water at the molecular level using terahertz spectroscopy

Masae Takahashi

Department of Physics, Graduate School of Science, Tohoku University

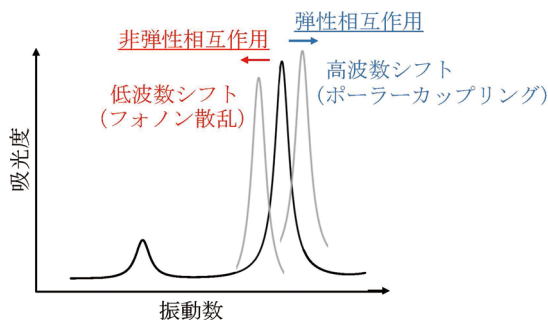


図1 弾性および非弾性相互作用による振動吸収スペクトルの振動数シフト

けるホット電荷キャリアを冷却するキャリアフォノンダイナミクスの駆動機構である。鉛ハライドペロブスカイトは、現在最も有望な低コスト、高性能の次世代光起電力デバイスであるため、結晶中のポーラーカップリング相互作用は最近大きな注目を集めている。しかし、電子格子ポーラーカップリング相互作用に関与するフォノンモードに関しては、かなりの曖昧さが存在する。また、位相緩和とエネルギー緩和の相対的な重要性は系によって大きく異なる。エネルギー緩和は非金属表面、固体中、液体中で多フォノン放出によってのみ発生することが知られており、ここでは低波数シフトが主に検出される。固体におけるフォノン媒介の高波数シフトには特別な環境が必要である。

イオンを含む分子結晶である塩化チアミン塩酸塩一水和体(図2)は、電子格子相互作用以外の温度依存振動数シフトへの寄与が最小限に抑えられており、フォノンを介した振動数シフトを調べるのに適している。電子格子ポーラーカップリング相互作用の強さと、電子と相互作用するフォノンの特性振動数を、遠赤外スペクトルおよびテラヘルツスペクトルに観測される高波数シフトを解析することで明らかにする。本稿では、分子間振動モードを、電子との相互作用に関与する非局在集団格子振動(フォノン)と見なす。第一原理計算で得られたLO-TO(横光学)分裂を示すフォノン分散曲線を使用して、電子と相互作用する光学フォノンの特性(LOまたはTO)を特定する。高波数シフトを引き起こす環境条件は、X線結晶構造データと割り当てられた振動モードとから抽出する。特に、密に詰まった結晶とは異なる分子振動環境を提供し、高波数シフトの検出を可能にする、結晶内の空隙に注目する。最近の固体第一原理計算の適用により、分子結晶内の混みあった振動ピークの対応する振動モードへの割り当ては、環境に非常に敏感な低振動数領域であっても、物理化学現象を解明する上で非常に信頼性が高いものとなっている。

## 2. 方法

### 2.1. 水和体結晶の作製

塩化チアミン塩酸塩( $C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$ )を蒸留水に溶

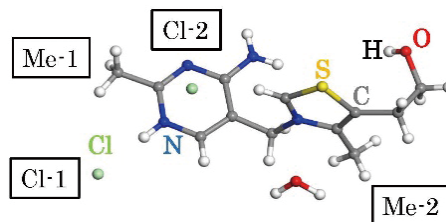


図2 塩化チアミン塩酸塩一水和体。分子内には2種のメチル基(Me-1、Me-2)と塩素原子(Cl-1、Cl-2)がある

解し、常温で蒸気拡散法により結晶化し、結晶内に水分子を取り込んだ。蒸留水を良溶媒、アセトンを貧溶媒として用いた。良溶媒と貧溶媒の比率は1:4とした。塩化チアミン塩酸塩溶液から無色の針状結晶が数日かけてゆっくりと成長した。採取された結晶は、水と水の排出を防ぐためParatone-Nオイル(凍結防止剤)を塗布し、その後の測定に供した。

### 2.2. 結晶構造解析

結晶学データは、Rigaku XtaLABminiを使用しMo K $\alpha$ 線、150Kで収集された。得られた結晶は単斜晶系の空間群 $P2_1/c$ で、単位格子に4分子含む。構造解析データから、得られた結晶は塩化チアミン塩酸塩の一水和体と確認された。

### 2.3. シンクロトロンFTIR顕微分光測定

シンクロトロンFTIRスペクトルは、SPring-8シンクロトロン放射(SR)施設のBL43IR IRビームラインで、IR線源にIR-SRを備えたBruker IFS120HR FTIR分光装置を使用して、 $2\text{cm}^{-1}$ の分解能で取得した。Paratone-Nを塗布した約2mm角の立方体結晶試料を、適切な吸収が得られる厚さにスライスした。スライスした試料をシリコン基板上に直接置き、測定のためにクライオスタットに挿入した。基板上に滴下したParatone-Nをブランクとして使用した。各ピークの振動数は、ローレンツ関数で近似し決定した。

### 2.4. テラヘルツ時間領域分光 (THz-TDS) 測定

テラヘルツ吸収スペクトルは、Tochigi Nikon RT-20,000 THz-TDSを使用して、 $0.8\text{cm}^{-1}$ の分解能で測定した。Paratone-Nを塗布した結晶試料を粉砕し、直径1mmの開口部に充填して、低温での亀裂やマウントされた試料の不均一性による光漏れを防いだ。Paratone-Nはテラヘルツスペクトル領域で吸収がないことを確認した。各ピークの振動数は、ローレンツ関数で近似し決定した。

### 2.5. 計算の詳細

振動吸収スペクトルのピーク割り当てのために、

CASTEP (2018 版) を使用して、分散補正固体第一原理計算を行った。全エネルギー計算は一般化勾配近似での平面波密度汎関数理論に基づき、交換相関汎関数は CASTEP に実装されている Perdew–Burke–Ernzerhof (PBE) を用いた。電子–イオン相互作用はノルム保存擬ポテンシャルを使用して記述した。分散補正には Tkatchenko–Scheffler 法を使用した。スカラー相対論的処理を、Koelling–Harmon 近似で実施した。価電子波動関数は、運動エネルギーカットオフ 1200 eV の平面波基底で展開した。電子的最小化においては、共役勾配法を使用してエネルギー  $10^{-13}$  eV/原子未満、各原子にかかる力  $4 \times 10^{-4}$  eV/Å 未満に収束させた。ブリルアンゾーン積分は、間隔が  $0.09 \text{ \AA}^{-1}$  未満  $2 \times 1 \times 1$  の k 点メッシュを使用して Monkhorst–Pack 法で行った。

分率座標を維持せず、格子定数と原子座標の両方について構造最適化を行った。初期構造には X 線結晶構造解析データを使用した。対称性の拘束は  $\alpha = \gamma = 90^\circ$  を除いて  $P_1$  とした。基準振動モードの振動数は、線形応答理論 (または密度汎関数摂動論) を用い、補間用 q ベクトルグリッド  $0.05 \text{ \AA}^{-1}$  を使用し、 $\Gamma$  点で、調和振動近似で求めた。虚のモードがないこと、および、3 つの振動数ゼロのフォノンモードがあることを確認した。モードの説明と割り当ては、各基準振動モードの固有ベクトル原子変位を視覚的に調べて決定した。

### 3. 結果と考察

図 3 は、テラヘルツおよび遠赤外エネルギー領域で観測された異常な温度依存の高波数シフトを示す。20–90  $\text{cm}^{-1}$  (テラヘルツ) よび 240–550  $\text{cm}^{-1}$  (遠赤外) の振動数範囲にある他の多くのピークは、結晶系では一般的

な低波数シフトを示している。測定された最低温度 (ピーク 1 は 20 K、ピーク 2–4 は 7 K) では、ピーク 1–4 の形は主にローレンツ型で、半値全幅は  $4 \sim 5 \text{ cm}^{-1}$  の範囲にある。ピーク 1 は 50 K でブロードになり、100 K からピークが分離した。分裂した 2 つのピークのうちの 1 つは通常の温度依存低波数シフトを示し、もう 1 つは異常な高波数シフトを示した。

テラヘルツおよび遠赤外スペクトルの全振動数領域にわたり観測された明確に分離したピークは、第一原理計算によってすべて各振動モードに割り当てられた。図 4 に、ピーク 1–4 に割り当てられた振動モードを示す。結晶中には、2 種のメチル基 (それぞれ 6 員環および 5 員環上の Me-1 および Me-2) と 2 種の塩素原子 (それぞれ塩酸塩およびチアミン塩化物からの Cl-1 および Cl-2) が含まれる (図 2)。ピーク 1 は、6 員環に対する Me-1 の面外変角振動を、ピーク 2 は主に 5 員環に対する Me-2 の面内変角振動を示す。ピーク 3 と 4 は、弱い水素結合を介して Cl-1 に結合した CH および  $\text{CH}_2$  基の振動モードを示す。図 5 は結晶中の空隙を示す。空隙は、2 種のメチル基 (Me-1 と Me-2) と 2 種の塩素原子のうちの Cl-1 の周囲に見られる。ピーク 1–4 の全てのモードは主として空隙内で振動し、温度依存の高波数シフトを示す可能性がある。

温度  $T$  における振動数  $\tilde{\nu}_T$  は、電子格子相互作用によるフォノン媒介振動数シフトに対し、ボーズ–アインシュタイン統計因子に比例し、以下ようになる。

$$\begin{aligned} \tilde{\nu}_T &= \tilde{\nu}_{00} \pm AT_c \left[ \frac{1}{2} + \left( \exp\left(\frac{T_c}{T}\right) - 1 \right)^{-1} \right] \\ &= \tilde{\nu}_0 \pm AT_c \left( \exp\left(\frac{T_c}{T}\right) - 1 \right)^{-1} \quad (1) \end{aligned}$$

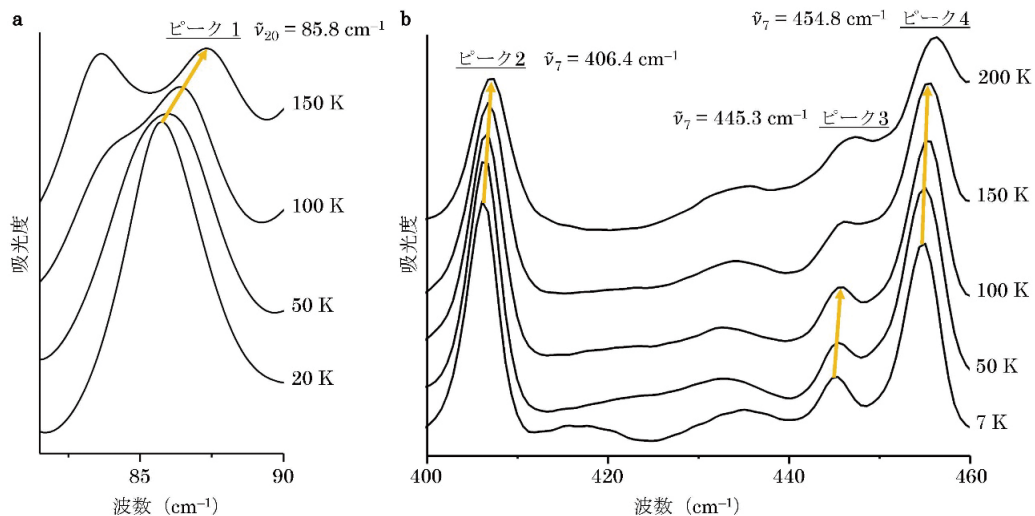


図 3 温度依存テラヘルツスペクトル(a)と遠赤外スペクトル(b)。 $\tilde{\nu}_{20}$  と  $\tilde{\nu}_7$  は、それぞれ 20 K と 7 K で観測された振動数。スペクトルは垂直方向にオフセットされている。オレンジ色の矢印は視覚用のガイド。

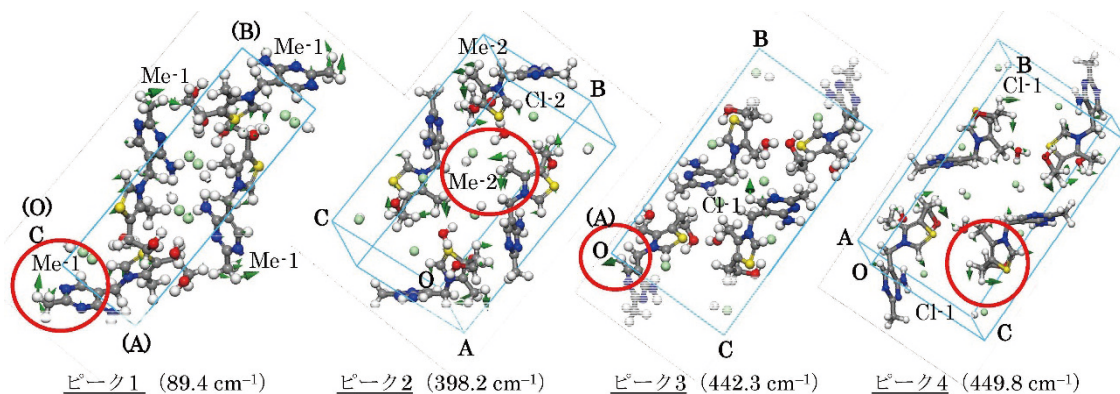


図4 ピーク1-4に割り当てられた振動モード(かっこ内は計算値)。緑矢印は、原子変位ベクトル。Me-1、Me-2、Cl-1、Cl-2は図2を参照。OA、OB、OCは、それぞれa軸、b軸、c軸。かっこ付きのO、A、Bは、軸の後ろ側を意味する。

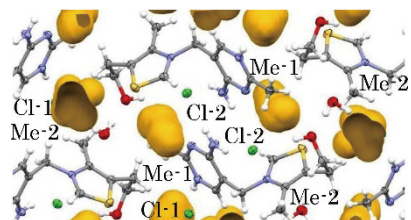


図5 黄土色で示された結晶中の空隙。

ここで、 $\tilde{\nu}_0$  は着目する振動モードの非摂動振動数、 $\tilde{\nu}_0 (= \tilde{\nu}_0 \pm (1/2) AT_c)$  は0Kでの振動数、パラメータ  $A (A > 0)$  は電子格子相互作用の強度を表す定数、 $T_c$  は温度スケールでの有効フォノンエネルギーを表す特性温度パラメータ、 $(\exp(T_c/T) - 1)^{-1}$  は平均フォノン占有数。負と正の符号(±)はそれぞれ多フォノン散乱とポーラーカップリングによる振動数シフトを示す。

ピーク1-4の温度依存ピークシフトは高波数シフトであり、式(1)の±のうちポーラーカップリング相互作用による振動数シフトである正の符号を使用する。パラメータ  $A$  はパラメータ  $\tilde{\nu}_0$  および  $T_c$  とは独立に、高温での振動数シフトから得られる。つまり、高温では、

$$\tilde{\nu}_T \approx \tilde{\nu}_0 + \frac{1}{2} AT_c + AT_c = \tilde{\nu}_0 + AT_c \quad (2)$$

となり、式(2)から、パラメータ  $A$  は高温での振動遷移の線形温度係数 ( $d\tilde{\nu}_T/dT$  (cm<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>)) として求まる。

図6は比較的明瞭なピーク1、2、4についての高温域(>100K)における温度依存の振動数シフトをプロットしたものである。線形温度係数 ( $d\tilde{\nu}_T/dT$ ) であるパラメータ  $A$  は、線形近似によって決定された。ピーク1と2についての線形近似曲線と近似式を図6に示す。決定係数 ( $r^2$ ) はそれぞれ0.79と0.95であった。決定定数がより1に近いピーク2の線形温度係数から、 $A$  は  $5.3 \times 10^{-3}$  cm<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> と求まった。これは非弾性散乱誘起低波数シフト<sup>8)</sup>で得られた値に近く、 $A$  で表される電子格子相互作用強度が、同

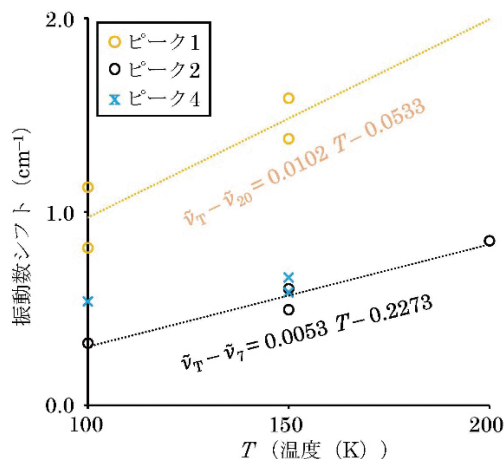


図6 温度に対する振動数シフト(ピーク1では  $\tilde{\nu}_T - \tilde{\nu}_{20}$ 、ピーク2および4では  $\tilde{\nu}_T - \tilde{\nu}_7$ )。  $\tilde{\nu}_{20}$  および  $\tilde{\nu}_7$  は、それぞれ20Kおよび7Kでの振動数。橙と黒の点線は、それぞれピーク1および2の線形近似曲線を示す。線形近似によって得られた式は、対応する曲線の近くに示す。振動数は、補正決定係数が0.998を超える高精度のローレンツ近似を使用して求められた。

じ結晶内のポーラーカップリングと多フォノン散乱の両方で同程度であることを示す。この相互作用強度は、ボルツマン定数 (0.695 cm<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>) の約0.8%である。ピーク4の振動数シフトの値は、ピーク2の線形近似曲線近傍にある。ピーク1の線形温度係数から導出された  $A$  値は、ピーク2の線形温度係数から導出された  $A$  値の約2倍である。  $A$  値の離散性は、テラヘルツエネルギー領域でピーク1に対して、多フォノン散乱で発生する多重相互作用と同様に、長寿命励起状態のために多重電子格子ポーラーカップリング相互作用が発生していることを示唆している。

パラメータ  $T_c$  は、低温での振動数シフトを含めて指数関数的に近似する代わりに、以前の研究<sup>8)</sup>の方法に従って、線形近似曲線の水平(温度軸)切片から求めた。図6のピーク2の式、 $\tilde{\nu}_T - \tilde{\nu}_7 = 0.0053 T - 0.2273$  から、温度軸切片

は42.9Kと求まった。極低温では、振動数シフトは非常に小さいため、 $\tilde{\nu}_T \approx \tilde{\nu}_0$ とみなせる。式(1)から、温度依存の振動数シフトは、 $\tilde{\nu}_T - \tilde{\nu}_0 \approx AT_c(\exp(T_c/T) - 1)^{-1}$ と表される。 $\tilde{\nu}_T - \tilde{\nu}_0$ を $T/T_c$ に対してプロットすると、 $T/T_c$ 軸切片0.390で42.9Kの温度に相当し、100~200Kの範囲で線形近似された $AT_c(\exp(T_c/T) - 1)^{-1}$ から、 $T_c$ は110.2K、対応する特性振動数 $\tilde{\nu}_c$ は $76.6\text{cm}^{-1}$ と求まった。

最後に、第一原理計算を使用して、LO-TO分裂を示すフォノン分散曲線と示さないフォノン分散曲線(図7)を求め、これらを比較して、ポーラーカップリング相互作用に関与するLOフォノンを特定した。この結晶では、単位胞に4分子含まれている。分子間相互作用をフォノンとみなすとフォノン総数は $24(=4 \times 6)$ となり、そのうち3フォノンは音響フォノン、残りの21フォノンは光学フォノンである。光学フォノンのうち、1/3はLO、残りの2/3はTOフォノンである。計7つのLOフォノンは、3方向のうちのOC方向のIR活性並進モードと、3方向の計6つのIR活性回転モードで構成される。LO-TO分裂を示すフォノン分散曲線では、LOフォノンは $\Gamma$ 点で高振動数シフトを示す。よく知られているように、振動数の高いLOフォノンほど大きなシフトを生じる。図7は、全LOフォノンを含む振動数範囲のフォノン分散曲線を示す。LO-TO分裂による振動数シフトは非常に小さい。 $\Gamma$ 点で、振動数シフトが最も大きい最高振動数LOフォノンが赤円で示され、その拡大図が挿入図に示されている。LO-TO分裂の大きさは、最高振動数LOフォノンが $\Gamma$ 点に近づく方向によって異なり、F点から $\Gamma$ 点までは $0.7\text{cm}^{-1}$ である。最も高い振動数と2番目に高い振動数のLOフォノンは、 $\Gamma$ 点ではそれぞれ $80.7\text{cm}^{-1}$ と $72.4\text{cm}^{-1}$ と計算された。計算値は実測値より最大で $4\text{cm}^{-1}$ 高くなる。従って、ポーラーカップリング相互作用に関与する実測の特性振動数 $76.6\text{cm}^{-1}$ に対応するのは、計算値 $80.7\text{cm}^{-1}$ の最高振動数のLOフォノンと推定される。共鳴多フォノンラマン散乱とテラヘルツ時間領域分光法を組み合わせ、電子格子ポーラーカップリング相互作用に寄与するLOフォノンを直接調べた研究から、CsPbBr<sub>3</sub>では単一のフォノンモードが電子格子ポーラーカップリング相互作用を支配していることが最近明らかとなった<sup>9)</sup>。我々の系でも、電子格子ポーラーカップリング相互作用を支配する単一フォノンモードを特定した。我々の系では最も振動数の高いLOフォノンであることも明らかとなった。

#### 4. 総括

アルカリハロゲン化合物水溶液中のハロゲン化物イオンは、溶媒和水によって定義される水ケージ内を動き回る。塩化チアミン塩酸塩一水和体においては、弱い水素結合ネットワーク内に取り込まれ動き回る塩素イオンが作る空隙に水

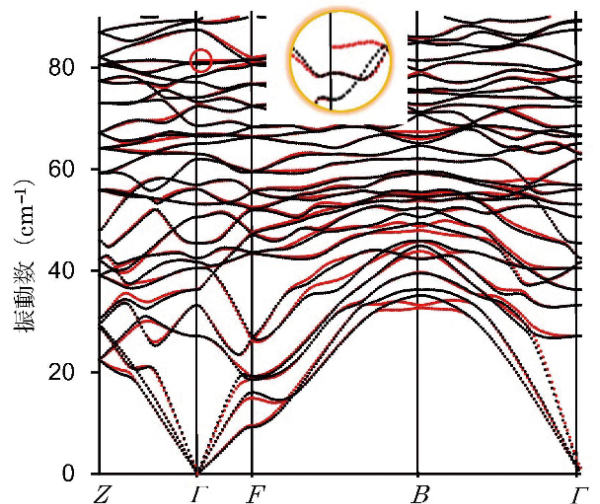


図7 LO-TO分裂を入れた場合と、入れない場合(それぞれ赤と黒の点線)の対称線に沿ったフォノン分散曲線。挿入図は、赤で囲まれた領域の9倍の拡大図。

和水が取り込まれ、水和水は溶液中の秩序パラメータ<sup>10)</sup>に近い秩序パラメータを持ち、溶液中と同じ状態で存在している。これは、角層に取り込まれる二次結合水に対応していると推定される。シアル酸二水和体については今回報告に至っていないが、結晶作製、X線構造解析、スペクトル測定などは実施済みである。比較のために無水体も調べた。無水体は単結晶が得られず、微結晶のX線回折により格子定数を決定し、第一原理分子動力学計算を用いて結晶構造を推定した。秩序パラメータの解析から、結晶に取り込まれた2種類の水分子のうち、一方は分子に強く結合し、もう一方は水溶液中の水分子の状態であることが判明した。この2種類の水分子は、一次結合水と二次結合水に対応していると推定される。今後、テラヘルツスペクトル解析など詳細な検討を進める。本研究は、一次結合水と二次結合水に対応すると考えられる水分子を分子レベルで捕らえ、人体にやさしい非破壊非侵襲計測手段であるテラヘルツ技術を利用してその特性を調べたものである。

#### (引用文献)

- 1) Ferguson, B.; Zhang, X.-C. Materials for terahertz science and technology. *Nature Mater.* **2002**, *1*, 26-33.
- 2) Johnston, M. B.; Herz, L. M.; Khan, A. L. T.; Köhler, A.; Davies, A. G.; Linfield, E. H. Low-energy vibrational modes in phenylene oligomers studied by THz time-domain spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **2003**, *377*, 256-262.
- 3) List, E. J. W.; Creely, C.; Leising, G.; Schulte, N.; Schlüter, A. D.; Scherf, U.; Müllen, K.; Graupner, W. Excitation energy migration in highly emissive

- semiconducting polymers. *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *325*, 132-138.
- 4) Rothschild, L. J.; Mancinelli, R. L. Life in extreme environments. *Nature* **2001**, *409*, 1092-1101.
- 5) Takahashi, M.; Kowada, M.; Matsui, H.; Kwon, E.; Ikemoto, Y. Temperature-dependent low-frequency vibrations of thiamine crystal containing hydrated ions. *J. Phys. Chem. A*, **2021**, *125*, 1837-1844.
- 6) Flippen, J. L. The crystal structure of  $\beta$ -D-N-acetylneuraminic acid dihydrate (sialic acid),  $C_{11}H_{19}NO_9 \cdot 2H_2O$ . *Acta Cryst.* **1973**, *B29*, 1881-1886.
- 7) Takahashi, M.; Matsui, H.; Kwon, E.; Ikemoto, Y. Upward vibrational frequency shift due to electron-phonon polar-coupling interaction in  $C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl \cdot H_2O$  crystals. *Chemical Physics Impact* **2024**, *8*, 100442.
- 8) Takahashi, M.; Kowada, M.; Matsui, H.; Kwon, E.; Ikemoto, Y. Terahertz frequency shifts due to multiphonon scattering in thiamin crystals containing hydrated ions. *Appl. Phys. Lett.* **2022**, *120*, 051104.
- 9) Iaru, C. M.; Brodu, A.; van Hoof, N. J. J.; ter Huurne, S. E. T.; Buhot, J.; Montanarella, F.; Buhbut, S.; Christianen, P. C. M.; Vanmaekelbergh, D.; de M. Donega, C.; Rivas, J. G.; Koenraad, P. M.; Silov, A. Y. Fröhlich interaction dominated by a single phonon mode in CsPbBr<sub>3</sub>. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 5844.
- 10) Errington, J. R.; Debenedetti, P. G. Relationship between structural order and the anomalies of liquid water. *Nature* **2001**, *409*, 318-321.

# 界面活性剤修飾ナノダイヤモンドの集積・積層化による構造色発現と、抗菌性チキソトロピー塗膜の開発

埼玉大学大学院理工学研究科

藤森 厚裕

The surfaces of nanodiamond particles are modified using natural castor oil-derived 12-hydroxystearic (12-OHSt) acid, which has thixotropic solvent properties. 12-Hydroxystearyl chain-modified nanodiamonds (12 OHSt-ND) are spread from a dispersion medium onto ultrapure water to afford Langmuir monolayers (a single-particle layer) of 12 OHSt-ND exhibited a two-dimensional phase transition from an expanded phase to a condensed phase. The surface morphology of the single-particle layer shows a dispersed form of aggregated particles, while the layered regularity of the multilayers shows high periodicity. The surface hydrophobicity of the single-particle layer of 12 OHSt-ND is more pronounced than that of the single-particle layer of stearic acid-modified nanodiamonds. The origin of the surface hydrophobicity of the single-particle layer of 12 OHSt-ND is predicted to be the vertical conformation of the modified chains achieved via hydrogen bonding between the modified chains. In addition, the stepwise multilayers of 12 OHSt-ND exhibit various structural colors depending on the number of layers.

Further, gel coating films comprising nanodiamonds organo-modified with 12-OHSt and stearic acids were prepared and characterized. Because molecules with 12-OHSt groups can convert solvents into thixotropic gels, Gemini-type diamide derivatives with two 12-OHSt chains were also introduced as thixotropic additives into the gel coating films. Although the 12 OHSt-NDs did not lead to solvent gelation on their own, they displayed an affinity for the thixotropic additive molecules. The 12 OHSt-NDs were localized near the surface of the nanofibers formed by the Gemini-type diamide derivative in the solvent, and the thixotropic properties of the supramolecular gel were confirmed. Nanoparticle aggregation and nanofiber crystallinity were found to be suppressed by the effect of 12-OHSt modification in the gel coating films, making them suitable for cosmetic coating applications.

## 1. 緒言

無機ナノ粒子の最外層表面を有機分子鎖によって修飾する技術は、ポリマーナノコンポジット調製時に於ける樹脂への濡れ性の向上や、有機溶媒中への均一分散化の達成を実現することが知られる<sup>1)</sup>。加えて、得られた有機修飾無機ナノ粒子を気/水界面に展開することで、Langmuir単粒子膜を得ることも可能となる<sup>2)</sup>。一方、ここ20数年に於ける化粧品開発の進歩には、無機ナノ粒子の活用が重要な役割を担ってきたが、その凝集粒子径の精密な制御は普遍的な課題であり、例えば紫外線散乱能と無機顔料としての構造色発現を同時に達成できる素材の例は、ほぼ知られていない。そこで本研究では、粒子径5nmのナノダイヤモンド<sup>3)</sup>とFe<sub>3</sub>O<sub>4</sub><sup>4)</sup>、更には粒子径15nmのTiO<sub>2</sub>をターゲットとし、2種類の長鎖脂肪酸を表面修飾剤として、単粒子膜の多層化による構造色発現と、その多色化、および安定性を、主に粒子配列と形態形成の観点から検討した。

また、チキソトロピー性添加剤分子は、種々の分子間相互作用の協奏による超分子的な形態形成により、溶媒分子

Diamide-based thixotropic additive  
Abbrev. 2C<sub>18</sub>(OH)-dA

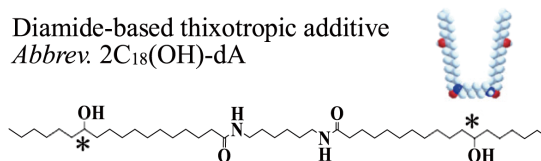


Fig. 1 Chemical structure and 3D model of 2C<sub>18</sub>(OH)-dA.

を抱き込んでゲル化するスポンジ状の組織体を形成することでその機能発現に至る<sup>5)</sup>。こうしたチキソトロピー性溶剤ゲルの利点は塗膜化可能な特性であり、塗布後に速やかにゲル状固化して、液だれを回避できる優位性がある。このようなチキソトロピー性ゲル塗膜に対する更なる機能付与の手段として、最外層表面に有機修飾を施した親油化無機ナノ粒子<sup>6)</sup>の添加が挙げられる。塗膜中に導入されたナノ粒子の凝集粒子径制御により、塗料や化粧品製剤に紫外線散乱能や構造色発色能の付与が期待できる。本研究では二鎖型ジアミド系チキソトロピー性添加剤 (Fig. 1) によって得られるゲル塗膜中に、表面を長鎖脂肪酸群で修飾した、高屈折性無機ナノ粒子 (粒子径5および15nm) を導入<sup>7, 8)</sup>して、その凝集サイズや分光学的特性、更には秩序性に関する検討を行った。

## 2. 方法

### 2.1. 構造色グラデーション積層膜の調製と評価

ナノダイヤモンド (以下, ND, ダイセル(株)提供), Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, TiO<sub>2</sub>の最外層表面に、油/水界面修飾法<sup>1-4)</sup>を用



Development of structural color by integration and layering of surfactant-modified nanodiamonds and antibacterial thixotropic coatings

Atsuhiko Fujimori

Graduate School of Science and Engineering, Saitama University

いて、ステアリン酸、および12-ヒドロキシステアリン酸による化学修飾を行った。表面修飾の達成は赤外 (IR) 分光による振動バンドの解析、並びに熱重量測定 (TG) による修飾鎖の昇温脱離挙動から確認し、更に修飾率の見積もりを行った。有機修飾無機ナノ粒子群は、それぞれ超純水上に単粒子膜展開を行い、表面圧-面積 ( $\pi-A$ ) 等温曲線の測定を行った (15°C)。また、目的に応じ、LB水槽上で二次元的な圧縮-緩和を繰り返す操作を施し、面内の粒子充填の緻密化を試みた。各単粒子膜の固体基板上への転写は、Langmuir-Blodgett (LB) 法により行った。単粒子の表面形態は、原子間力顕微鏡 (AFM) によって観察した。LB多層膜の層状秩序に関する評価は、out-of-plane X線回折 (XRD) により行い、Scherrerの式による微結晶サイズの見積もりやパラクリスタル解析による歪み値 $g$ の算出を行った。また、構造色フィルム調製時には、Fig. 2(a)のように段階的に層数を変えた階段状多層膜から色調変化を評価し、更に50°C、50時間のアニーリング前後に於ける発色変化をモニターした。

## 2.2. ゲル塗膜の調製と評価

用いた無機ナノ粒子は、2.1. 同様に粒子径5nmの爆轟法ND、並びに粒子径15nmのTiO<sub>2</sub>である。これらそれぞれの最外層表面に、Fig. 3(a)に示す表面修飾方法<sup>6,7)</sup>を用いて、R-12-ヒドロキシステアリン酸、およびステアリン酸それぞれによる化学修飾を行った。チキソトロピー性添加剤分子として、R-12-ヒドロキシステアリン酸二分子をヘキサメチレンジアミンで脱水縮合して得た二鎖型ジアミド誘導体(2C<sub>18</sub>(OH)-dA)を用いた。R-12-ヒドロキシステアリン鎖の存在が、当該分子の螺旋状ナノ繊維の成長を誘起し、これがentanglementした組織体の溶媒分子の抱込みによって、ゲル化が生じると考えられている<sup>7,8)</sup>。ゲル塗膜は、トルエン:エタノール=9:1(v/v)混合溶媒中に、各有機化無機ナノ粒子(ステアリン酸修飾ND系のみ0.05wt%, 他は0.01wt%)と2C<sub>18</sub>(OH)-dA(1.0wt%)を導入し、スパーテルで基板上に塗布することで得た(Fig. 3(b))。塗膜の表面形態観察は偏光顕微鏡(POM)、並びにAFMにより行った。塗膜の分光学的評価は、赤外(IR)分光、およびラマンスペクトルによって行った。塗膜中のナノ粒子凝集秩序は、out-of-plane XRDにより行った。

## 3. 結果と考察

### 3.1. 有機化ナノ粒子層積層による構造色発現

Figures 2(b) および (c) に、結果として得られた12-ヒドロキシステアリン酸、およびステアリン酸による表面修飾NDの階段状積層膜に於ける構造色発現の様子をそれぞれ示す。同じ粒子径のFe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>と比較しても、NDの系はより明瞭な構造色の発現に至った。2種の修飾鎖の差異に

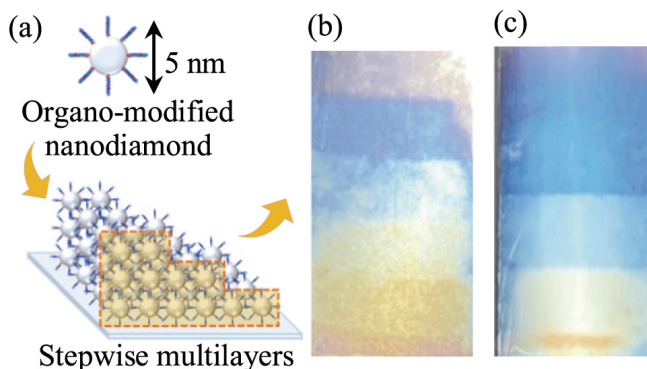


Fig. 2 (a) Schematic illustration of experimental strategy of this study. Photograph of stepwise multilayers of (b) 12-hydroxystearate modified and (c) stearate-modified NDs.

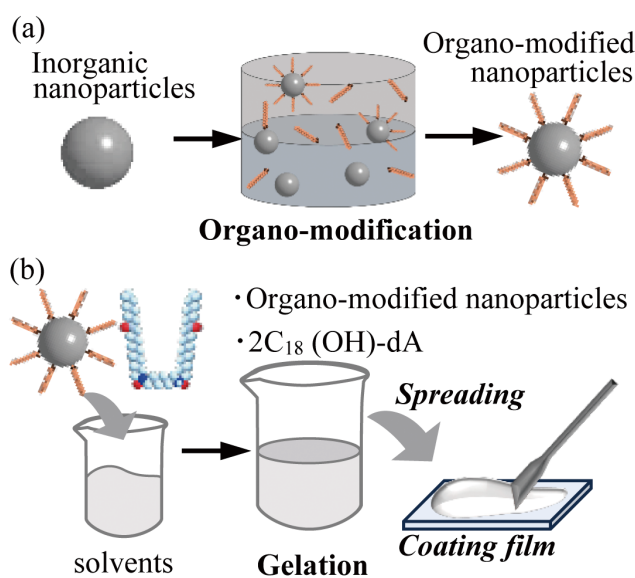


Fig. 3 Schematic illustrations of (a) organo- modification of nanoparticles surface, (b) preparation of thixotropic coating gel film.

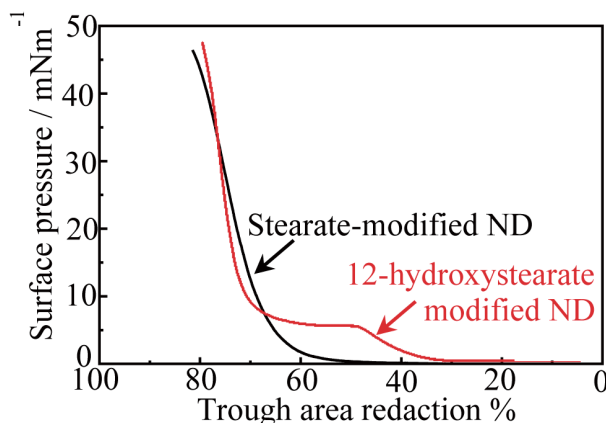


Fig. 4  $\pi$ -A isotherms of single-particle layers on the water surface of (a) 12-hydroxystearate-modified and (c) stearate-modified NDs.

ついては、Fig. 4に示すように水面上単粒子膜挙動に明瞭な差異が確認された。低表面圧域の膨張挙動は12-ヒド

ロキシステアリン酸修飾NDに特徴的であり、この条件での水酸基と水との親和性を示唆していた。高表面圧域で基板上転写を行うと、凝集粒子の存在を示す単粒子膜のAFM像 (Fig. 5), 並びにout-of-plane XRDから得られる層状周期性に (Fig. 4) 顕著な差異は見られなかった。一方で、水の接触角の値から、12-ヒドロキシステアリン酸修飾ND単粒子膜の疎水性が顕著に高く、アニーリング後の色調の維持に於いても高い安定性が示された。これは疎水鎖中、12位の水酸基の存在により、修飾鎖間水素結合が生じて、修飾鎖がより立ち上がった状態にあり、長時間にわたる高温暴露にも安定であることを示唆している。但し、両者の表面修飾率は約10%、ステアリン酸修飾時に高く、また、Fig. 6 (a), (b) のs/n比を比較すると層状秩序自身は水酸基がない系の方が高いことが予測される。ところで、ND系、 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 系に於いて、構造色の発現には、いずれも粒子充填化の前処理を必要とした。これは、水面上単粒子膜に対し、二次元的な圧縮と緩和を繰り返すことで、表面の欠陥を低減する操作に相当する。即ち、構造色の発現には単粒子膜の積層秩序のみならず、面内の粒子充填も重要なファクターであることが予測される。

一方で、こうした前処理を必要とせず、1stepの圧縮と積層化で構造色の発現が実現した例もある。Figure 7は、粒子径15nmの $\text{TiO}_2$ を使用した有機修飾無機ナノ粒子階段状積層膜の写真である。最上部の青紫色の色相が20層、最下部の赤みがかった色相が40層多層膜で、out-of-plane XRDから求めた一次周期が18nmに相当する (写真の下層に向かって膜厚が増し、厚さの範囲は約360~720nm)。粒子径が3倍程度に大きくなると、面内充填化のプロセスなく、明瞭な構造色のグラデーションが実現できた。この時の秩序性をND系と比較すると、 $g$ 値にして約3割の秩序増加が算出され、 $d_{00n}$ 高次反射も実に11次反射が確認されるに至った<sup>9)</sup>。

### 3.2. チキソトロピー性ゲル塗膜の検討

得られた有機修飾ND含有ゲル塗膜の平均膜厚は2~3 $\mu\text{m}$ であった。塗膜に対する分光学的評価の結果、ラマンスペクトル測定によって塗膜中のNDの存在が確認され、IR測定では修飾鎖の結合状態の維持が裏付けられた。ゲル塗膜に対するメゾスコピックなPOM観察に於いては、繊維状かつ樹木状に成長した $2\text{C}_{18}(\text{OH})$ -dA組織の形態が確認された。ミクロスコピックなAFM観察に於いては、 $2\text{C}_{18}(\text{OH})$ -dAナノ繊維が螺旋状に成長している様子が確認でき、更に2種の有機修飾NDの塗膜内での分布位置に明確な差異が確認された。 $R$ -12-ヒドロキシステアリン酸修飾NDは成長繊維に沿った境界位置に局在化しているのに対し、ステアリン酸修飾NDは測定領域中でほぼ均質に分布していた (Fig. 8)。これは $R$ -12-ヒドロキシ

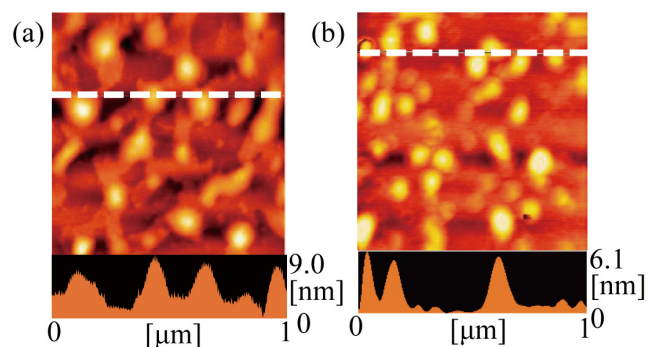


Fig. 5 AFM images of the surface of single-particle layer of (a) 12-hydroxystearate-modified and (b) stearate-modified NDs.

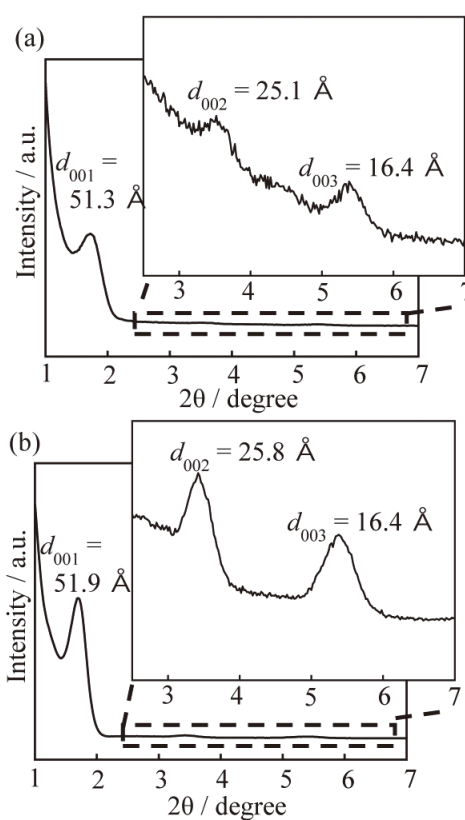


Fig. 6 Out-of-plane XRD profiles of stepwise multilayers of (a) 12-hydroxystearate modified and (b) stearate-modified NDs.

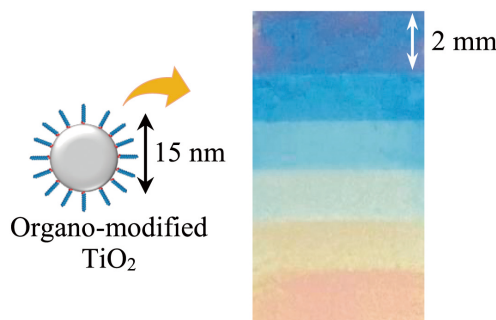


Fig. 7 Photograph of stepwise multilayers of organo-modified  $\text{TiO}_2$ .

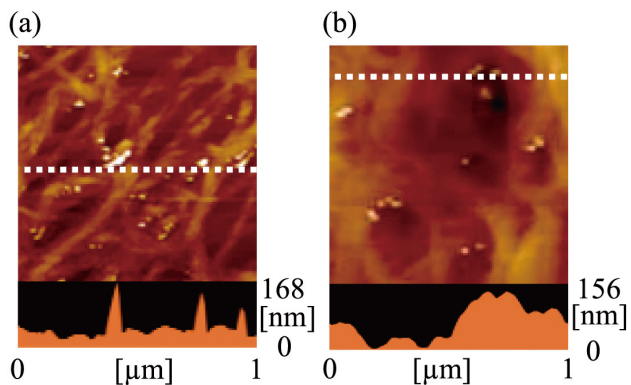


Fig. 8 AFM images of thixotropic gel coating films containing (a) 12-hydroxystearate-modified and (b) stearate-modified nanodiamonds.

テアリル鎖同士の親和性が存在位置の差異をもたらしたものと予測された。ゲル塗膜に対する out-of-plane XRD の結果、*R*-12-ヒドロキシステアリン酸修飾 ND に先鋭な結晶性反射は確認されず、6.5nm 付近に幅広いショルダーピークのみが確認された。塗膜中で密な粒子充填が回避され、大まかな粒子間距離だけが反映された結果と思われる。NDの凝集は塗料や化粧品として利用した際に、研磨効果を発現する危険性があるため、結晶性反射の欠如はゲル塗膜の実用を目指す上では好ましい。一方でステアリン酸修飾 ND では、極微小な反射ながらも約 4nm 付近に鋭い粒子充填反射が確認された (Fig. 9)。

また、Fig. 10 には粒子径 15nm の TiO<sub>2</sub> を用いた、2 種の有機修飾鎖による表面改質無機ナノ粒子含有ゲル塗膜の AFM 像を示している。この例でも前述の ND 同様、*R*-12-ヒドロキシステアリン酸修飾 TiO<sub>2</sub> が、成長繊維の boundary 付近に局在化している様子が見られた。本研究では、親油化ナノ粒子の修飾鎖をチキソトロピー性添加剤分子である 2C<sub>18</sub>(OH)-dA と同様の *R*-12-ヒドロキシステアリル鎖にすることで、ゲル塗膜の形態と秩序の差が確認された。しかしながら、本来チキソトロピー性を有する *R*-12-ヒドロキシステアリル鎖を修飾鎖として用いても、2C<sub>18</sub>(OH)-dA なしには溶媒をゲル化するまでには至らなかった。寧ろステアリン酸で修飾した場合に比べ、溶液中での分散度が下がり、相対的に低濃度での添加に留めざるを得なかった。チキソトロピー性添加剤不要で、ナノ粒子のみで溶剤ゲル化を達成するためには、分散媒中に於ける、疎水鎖中 12 位の水酸基間の水素結合の抑制が必要かも知れない<sup>10)</sup>。

#### 4. 総括

粒子径 5nm 同士の Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> と ND を比較すると、表面修飾と粒子層積層による構造色発現挙動に差異が見られた。また ND の修飾鎖を水酸基の有無で比較すると、修飾鎖間

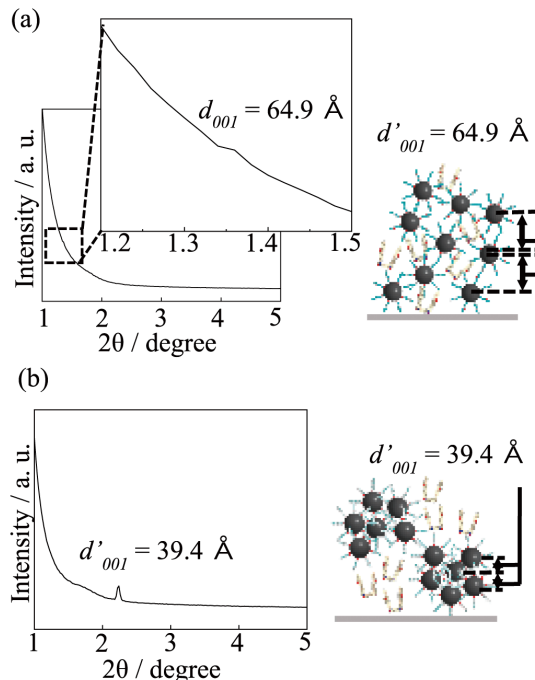


Fig. 9 Out-of-plane XRD profiles of thixotropic gel coating films containing (a) 12-hydroxystearate-modified and (b) stearate-modified nanodiamonds.

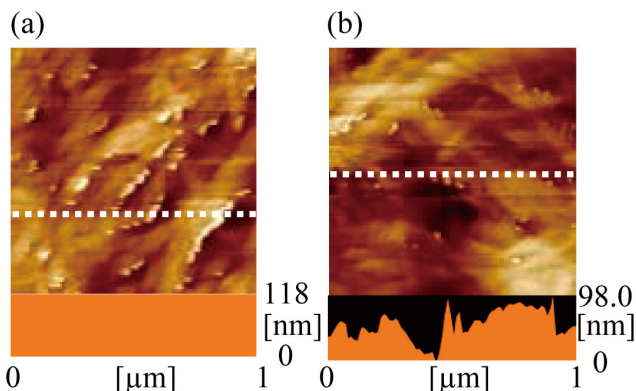


Fig. 10 AFM images of thixotropic gel coating films containing (a) 12-hydroxystearate-modified and (b) stearate-modified TiO<sub>2</sub>.

水素結合形成に基づく、単粒子膜の表面疎水性や、積層膜の構造色安定性に違いが見られた。加えて、粒子径 15nm の TiO<sub>2</sub> と比較すると、粒子径の増加は二次元面内の充填性と層状秩序に優位性をもたらし、粒子充填化の前処理なく、簡便で明瞭な構造色フィルムを得るに至った。

また、チキソトロピー性ゲル中に、紫外線散乱性ナノ粒子を導入して、塗膜化する目的から、粒子径の異なる 2 種の無機ナノ粒子と、2 種の長鎖脂肪酸系表面修飾剤分子を用いた。チキソトロピー性添加剤分子同様のキラルな修飾鎖を用いることで、ナノ粒子を繊維近傍に局在化させ、凝集抑制を果たすに至ったが、修飾ナノ粒子のみでの溶剤ゲル化は困難であった。但し、*R*-12-ヒドロキシステアリ

ン酸はヒマシ油由来の天然素材であるため、その生体適合性の良さから有効な活用も期待される。

#### (引用文献)

- 1) A. Fujimori, N. Honda, H. Iwashita, Y. Kaneko, S. Arai, M. Sumita, S. Akasaka, Formation and Structure of Fine Multi-particle Layered Organo-Modified Zirconium Dioxides Fabricated by Langmuir-Blodgett Technique, *Colloids Surf. A*, **446**, 109-117, **2014**.
- 2) A. Fujimori, Y. Kasahara, N. Honda, S. Akasaka, The Role of Modifying Molecular Chains in the Formation of Organized Molecular Films of Organo-modified Nanodiamond: Construction of a Highly-Ordered Low Defect Particle Layer, and Evaluation of Desorption Behavior of Organic Chains, *Langmuir*, **31** (9), 2895-2904, **2015**.
- 3) Y. Yamagishi, N. Kikuchi, A. Fujimori, Occurrence of Structural Color by Assembling Single-Particle Layers of Organo-Modified Nanodiamond, *Colloids Surf. A*, **677** (A), 132309, **2023**.
- 4) N. Kikuchi, Y. Yamagishi, A. Fujimori, Appearance of Structural Color by the Layering of Single-Particle Layers on a water surface of Organo-modified Magnetite with Different Particle Diameters and Its Layered Regularity, *ChemistrySelect*, **8** (42), e202300061, **2023**.
- 5) M. Iizuka, Y. Nakagawa, K. Ohmura, E. Satou, A. Fujimori, Two-dimensional Growth of Crystalline Nanofiber Fabricated from Gemini-type Amphiphilic Diamide Derivative Inducing the Thixotropic Property, *J. Colloid Interf. Sci.*, **498**, 64-75, **2017**.
- 6) A. Fujimori, K. Ohmura, N. Honda, K. Kakizaki, Creation of High-density and Low-defect Single-layer Film of Magnetic Nanoparticles by Method of Interfacial Molecular Films, *Langmuir*, **31** (10), 3254-3261, **2015**.
- 7) Y. Hasunuma, M. Maeda, Y. Mashiyama, N. Kukuchi, A. Fujimori, Characterization of Coating Films of Thixotropic Solvent Gel Containing Organo-modified Nanodiamonds." *ChemistrySelect*, **8** (25), e202300305, **2023**.
- 8) Y. Mashiyama, Y. Hasunuma, A. Fujimori, Correlation between chirality and spherical particle formation related to the loss of function of thixotropic additive molecules, *ChemistrySelect*, **7**, e202200918, **2022**.
- 9) Y. Yamagishi, S. Sakamoto, A. Yamazaki, A. Watanabe, K. Sasaki, H. Kobayashi, K. Hirai, A. Fujimori, Effective structural color generation by highly ordered and stacked nanoparticle layers of titanium dioxide modified with long-chain carboxylic acids, *Langmuir*, **41**, **2025**, in press (DOI: 10.1021/acs.langmuir.5c00503).
- 10) Y. Hasunuma, S. Sakamoto, Y. Yamagishi, A. Fujimori, Preparation and Structural Properties of Gel Coating Films Containing Lipophilized Nanocarbon Particles Functionalized with Thixotropic Chains, *J. Oleo Sci.*, **74** (1), 107-121, **2025**.

# 昆虫のグルーミングから学ぶマイクロコームの開発

国立研究開発法人 物質・材料研究機構

細田 奈麻絵

The objective of this study is to develop a cosmetic tool, designated 'microcomb', that can efficiently remove pollen from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*), Japanese cypress (*Chamaecyparis obtuse*), and other plants that adhere to skin and hair and are difficult to remove. This tool is intended as a measure against hay fever, for which there is a high social demand. Pollen from plants such as Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*), Tall goldenrod (*Solidago altissima*), and Japanese hop (*Humulus japonicus*), which are associated with the causation of hay fever, have been measured to have an approximate size of 20 to 30  $\mu\text{m}$ . Observations were made of the attachment of pollen of similar size, as well as the grooming behaviour and characteristics of the hairs (combs) used for grooming in bees (*Bombus diversus diversus*, *Apis cerana japonica*, *Apis mellifera*) and flower chafers (*Eucetonia pilifera*), and the attachment patterns and grooming methods of these were clarified. On the basis of these observations, an artificial microcomb was designed and successfully produced.

## 1. 緒言

本研究の目的は、社会的な要請が高い花粉症対策として、皮膚や毛などに付着して取り除きにくいスギ・ヒノキなどの花粉を効率的に取り除くことのできるコスメツールとして「マイクロコーム」を開発することである。その仕組みには、ミツバチが粘着性物質で付着し取り除きにくい花粉を、脚にあるマイクロコームを使いきれいに取り除くグルーミングを応用する。既存のコスメ商品には、毛を剃って花粉と一緒に除去するものがあるが、本研究は花粉のみをきれいに除去するマイクロコームの開発を目的にしている。これによりカミソリに敏感な肌にも対応でき、多様な消費者ニーズへの対応が可能となる。

ミツバチが花粉を収集・除去する「グルーミング」行動は、1970年代より詳しい調査<sup>1-3)</sup>が行われたが、その他の昆虫の詳細なグルーミング調査はあまり行われていなかった。花粉には多様なサイズや形状があり、昆虫ごとのマイクロコームの特徴と、生息環境の花形状の関係を調査することで、アレルギーを起こす特定の花粉に効果的な人工マイクロコームの開発が可能となる。花粉のサイズ(20~40 $\mu\text{m}$ )は、メイクアップ化粧品の粒子サイズと比較して大きいので、メイクアップ後の選択的な花粉除去効果も期待できる。

## 2. 方法

本研究では、対象となる昆虫と、生息環境の花を採取し、形状・サイズの特徴及び花粉を収集・除去する「グルーミング」行動を観察する。「人工マイクロコーム」は、昆虫観察の結果をもとに形状・サイズを設計し、レーザー加工で鋳型を作る手法を用いて製作する。

### 2.1. 昆虫と花粉の採取

花粉が昆虫にどのように付着し、除去されるかを調べるため、昆虫の生息環境における花粉を採取し、4種類の昆虫について花粉の着脱を観察する。

#### 2.1.1. 昆虫の採取

対象とした昆虫は、つくば市の野原に生息しているものである。①トラマルハナバチ(ハチ目(膜翅目)ミツバチ科)は、つくば市の草原(コスモスの花の上)から採取した。②ニホンミツバチ(ハチ目(膜翅目)ミツバチ科)と③セイヨウミツバチ(ハチ目(膜翅目)ミツバチ科)は、一部はコセンダングサの花の上から採取した。なお、セイヨウミツバチ及びニホンミツバチは沢辺養蜂場(つくば市)においても採取した。④ハナムグリ(甲虫目カブトムシ亜目コガネムシ科)は、牡丹園(つくば市)ならびに草原で行動観察及び採取を行なった。

#### 2.1.2. 花粉の採取

上述の昆虫の生息環境において、次の草花の花粉を採取した。①コスモス(キク科コスモス属)、②コシロノセンダングサ(キク科センダングサ属)、③セイダカアワダチソウ(キク科アキノキリンソウ属)、④カナムグラ(アサ科カラハナソウ属)、⑤スギ(スギ科スギ属)、⑥ウメ(バラ科サクラ属)、⑦シャクヤク(ボタン科ボタン属)、⑧ボタン(ボタン科ボタン属)。いずれもつくば市内で花粉を採集し、形状・サイズを観察した。



Development of microcombs learning from insect grooming

Naoe Hosoda

National Institute for Materials Science

## 2. 2. 昆虫の行動解析と電子顕微鏡観察

### 2. 2. 1. 昆虫の行動解析 (グルーミング)

昆虫が花粉を集めたり、除去したりする行動 (グルーミング) は、ハイスピードマイクロスコープ (VW-9000, 株式会社キーエンス) を用いて観察した。撮影速度は 30 fps から 230000 fps まで高速度撮影が可能である。

### 2. 2. 2. 花粉と昆虫の電子顕微鏡観察

花粉及び昆虫の毛、コーム、脚の形状観察は、走査型電子顕微鏡 (SEM) (Su-5000, 日立ハイテク) を用いて観察を行った。真空中での乾燥による変形を避けるため、SEMのステージ温度をマイナス 20℃～マイナス 30℃に冷却して観察した。

## 2. 3. 人工マイクロコームの開発

### 2. 3. 1. 人工マイクロコームの設計・試作

行動解析及びSEM観察の結果をもとに、「人工マイクロコーム」の形状とサイズを設計した。人工マイクロコームの製作は、鋳型を作成して樹脂を流し入れた。なお、鋳型

の作成は、材料にテフロン、シリコンウエハを用い、フェムト秒レーザー加工機により表面加工を行って作成した。

### 2. 3. 2. 花粉除去の評価

人工マイクロコームによる花粉除去効果は、メイクアップした人工皮膚に花粉を付着させて調べた。メイクアップした人工皮膚は、人肌ゲルを用いてファンデーションを塗布して用意した。そこにアルソトロメリアの花粉 (大きめの花粉) を付着させ、人工マイクロコームで表面を滑らせて、除去前と除去後のSEM像を比較して除去効果を調べた。

## 3. 結果及び考察

### 3. 1. 花粉の形状観察

対象昆虫の生息環境における花粉の形状観察の結果を表1にまとめた。図1には電子顕微鏡像を示す。コスモス、コシロノセンダングサ、セイダカアワダチソウなどの花粉サイズは 20µm～30µm 程度で、棘 (2µm～4µm 程度の長さ) があつた。カナムグラは測定前の乾燥による変形が生じていたが花粉サイズは直径 26µm 程度であつた。スギ

表1 花粉の形状観察結果

	長直径µm	短直径µm	球形µm	棘の高さµm	棘の幅µm
①コスモス	33.1 SE:±0.6	23.9 SE:±0.3	23.8 SE:±0.5	4.20 SE:±0.18	1.94 SE:±0.08
②コシロノセンダングサ	33.5 SE:±0.6	27.1 SE:±1.0	27.98 SE:±0.4	4.24 SE:±0.09	2.39 SE:±0.05
③セイダカアワダチソウ			19.0 SE:±0.4	2.49 SE:±0.09	2.08 SE:±0.04
④カナムグラ			25.9 SE:±1.0		
⑤スギ			30.0 SE:±0.2		
⑥ウメ	45.9 SE:±0.4	23.9 SE:±0.6			
⑦シャクヤク	45.3 SE:±0.6	22.7 SE:±0.6			
⑧ボタン	48.6 SE:±1.0	21.8 SE:±0.5			

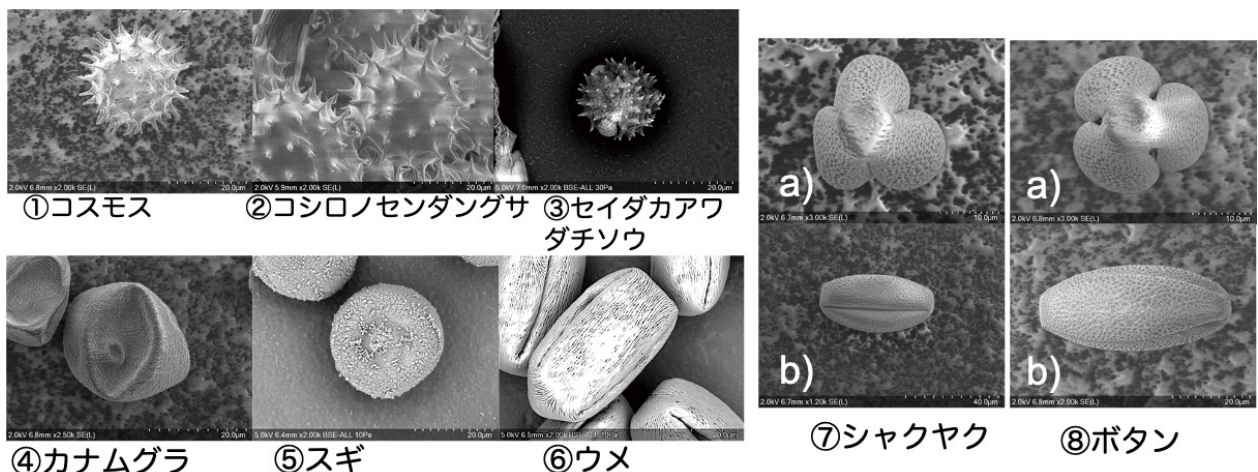


図1 花粉の電子顕微鏡

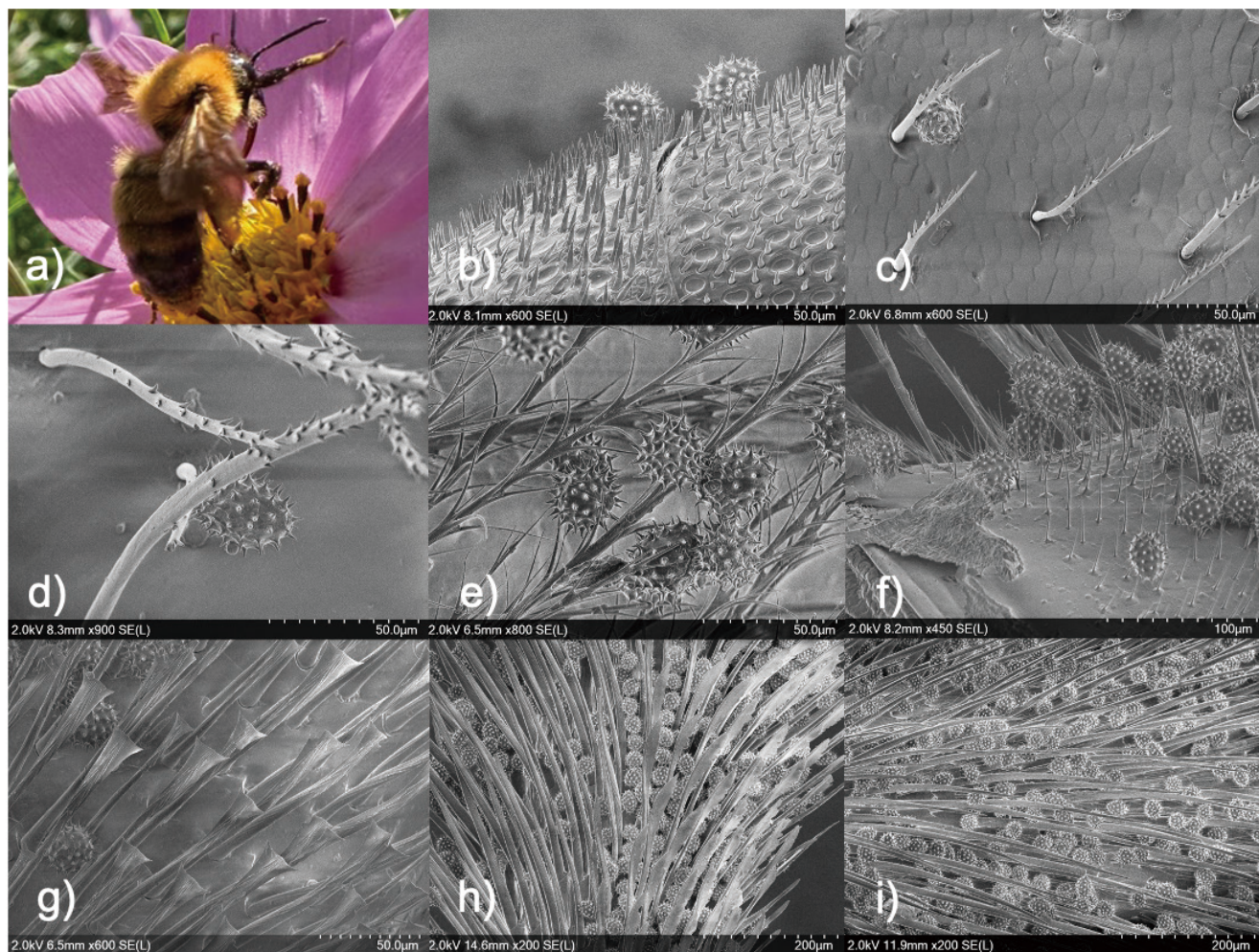


図2 花粉の電子顕微鏡

の花粉サイズは、直径 $30\mu\text{m}$ であった。ウメ、シャクヤク、ボタンの花粉サイズは、縦長方向 $45\mu\text{m}\sim 49\mu\text{m}$ 程度で断面方向は直径 $22\mu\text{m}\sim 24\mu\text{m}$ であった。

### 3. 2. 花粉の付着機構

#### 3. 2. 1. トラマルハナバチの花粉付着 (体表の様々な毛への付着)

ハチは、体表に複数の異なった形状の毛を持つ。図2に特徴的な毛の構造と花粉がついている様子を示した。図中のa)はトラマルハナバチがコスモスに留まっている様子である。b)はアンテナ表面に生えている毛で、短く針のような形状をしている。c)とd)は頭部に生えている毛で、c)は毛の片側のみに細かい毛があり、d)は細長い毛の表面に細かい棘がある構造をしている。e)は胸部に生えている毛で、枝分かれした構造をしている。枝分かれした細かい毛の先端に花粉がたくさん付着していた。f)は腿節に生えている毛で、長い毛の下に細く小さい毛が生えている。g)とh)は脛節に生えている毛で、g)の毛は先端がヘラの形状をしており、h)は先端が鳥の羽のような形状をし

ている。i)は基跗節内側に生えている毛で、くし(コム)の役割があり毛の間にたくさんの花粉を貯めている。

花粉は、毛がない場所にはあまり付着しておらず、細い毛の先端に付着している様子が見られた。細い毛につくことで接触部分を減らすことにも成功しており、花粉の回収しやすさに役立っているものと考えられる。

#### 3. 2. 2. ハナムグリの花粉付着

ハナムグリはボタンとシャクヤクの花の上での行動している様子を観察した。ハナムグリは体全体的に花粉を付着させているが、特に体の裏側に大量の花粉を付着させていた。花粉や蜜を食べた後、花粉を付着したまま花から飛んで移動するため、グルーミングの様子はハナムグリを容器に入れて観察した。脚を用いてグルーミング行動が見られた。また、飛翔と容器への衝突によって花粉がかなり落下する様子が観察された。ハナムグリの毛はハチと比べて毛の密度も低いなど、花粉が落下しやすいものと考えられる(図3)。

#### 3. 2. 3. 人毛への花粉付着

人の眉毛に付着した花粉の様子を図4a)に示した。図4b)は付着している部分を拡大したSEM像である。花粉



図3 左はシャクヤクの花の上にいるハナムグリ、右は後脚の電子顕微鏡。ハチと比べると脚の表面の毛の密度が低い。

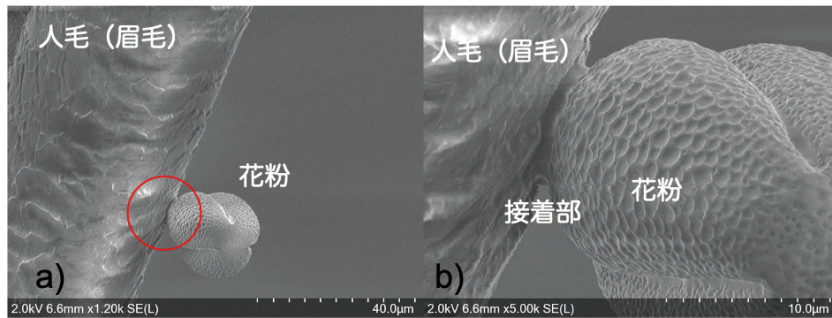


図4 a) 人毛(眉毛)に付着した様子とb) 接着部の拡大写真

と人毛が、粘性液体により固定されている様子が観察できた。

### 3.3. 花粉の収集・除去機構(トラマルハナバチのコーム形状)

昆虫は自身のコームを用いて、花粉を集めたり、除去したりしている。対象としている花粉サイズに注目して、昆虫のコームについて調べた。

#### 3.3.1. 跗節のブラシ

トラマルハナバチは、跗節に針形状の毛が生えている。基跗節の先端部は、根本が太く先端に行くほど細い形状の毛が生えている。後脚基跗節先端部分の毛は根本が平均値で直径 $29.9\mu\text{m}$ 、中間の太さが $19.8\mu\text{m}$ 長さが $301.3\mu\text{m}$ である。最先端部分の多くは破損した様子が見られた。毛の間隔は、 $19.6\mu\text{m}$ であった。隙間は、花粉サイズよりも小さいことが分かった。基跗節内側の毛は、上述の毛よりは細く、毛の中間位置の太さは直径が $14.4\mu\text{m}$ で毛の間隔は $37.1\mu\text{m}$ であり基跗節先端部の毛に比べると密度が低い。

#### 3.3.2. 脛節の内側の毛

脛節の内側の毛は、跗節に生えている毛とは異なった形状をしていた。先端がヘラのような形状のものや鳥の羽のような形状のものが存在していた。ヘラ先端の幅は $16.8\mu\text{m}$ で長さは $140.4\mu\text{m}$ で、毛と毛の間は $35.4\mu\text{m}$ であった。

#### 3.3.3. 脛節のレーキ

脛節の先端部分にはレーキと呼ばれる構造がある。根

本の太さは $31.2\mu\text{m}$ で中間位置での隙間は $22.2\mu\text{m}$ 長さは $163.6\mu\text{m}$ である。

#### 3.3.4. 前脚のアンテナクリーナー

アンテナ(触覚)クリーナーは、開口部が約 $275\mu\text{m}$ で、アンテナの直径約 $298\mu\text{m}$ (アンテナ上の毛を含めた直径)に適したサイズになっている。クリーナー先端は長方形の上が三角形の形をした構造が並んでいる(図5f)。長方形の幅は $6.8\mu\text{m}$ 、長さ $51.0\mu\text{m}$ 、隙間が $1.7\mu\text{m}$ であった。先端部分は、アンテナ上の毛のサイズに合った構造であった。

#### 3.3.5. 花粉の集取・除去行動(グルーミング)

昆虫のグルーミングは、主に跗節や脛節の内側にあるクシや脛節にあるレーキなどを使って行われている。図6にハイスピードカメラで撮影した腹部グルーミングの様子を示す。

腹部の背面のグルーミングは、後脚の跗節・脛節の内側を背側から腹側に向かって動かしている(図6)。アンテナのグルーミングは前脚の脛節と跗節でアンテナを挟み、アンテナクリーナーを使って付け根から先端へと擦ることで行われた。図5にグルーミングの様子とアンテナクリーナーの電子顕微鏡像を示した。翅のグルーミングは、腹部や後脚の跗節や脛節のブラシを使い、翅の外側を付け根側から先端へ擦っている。胸部のグルーミングは、中脚の脛節と跗節を使い、胸部を腹部側から頭部側へ繰り返し擦って行われた。脚部は同側、または両側の脚を擦り行っている。

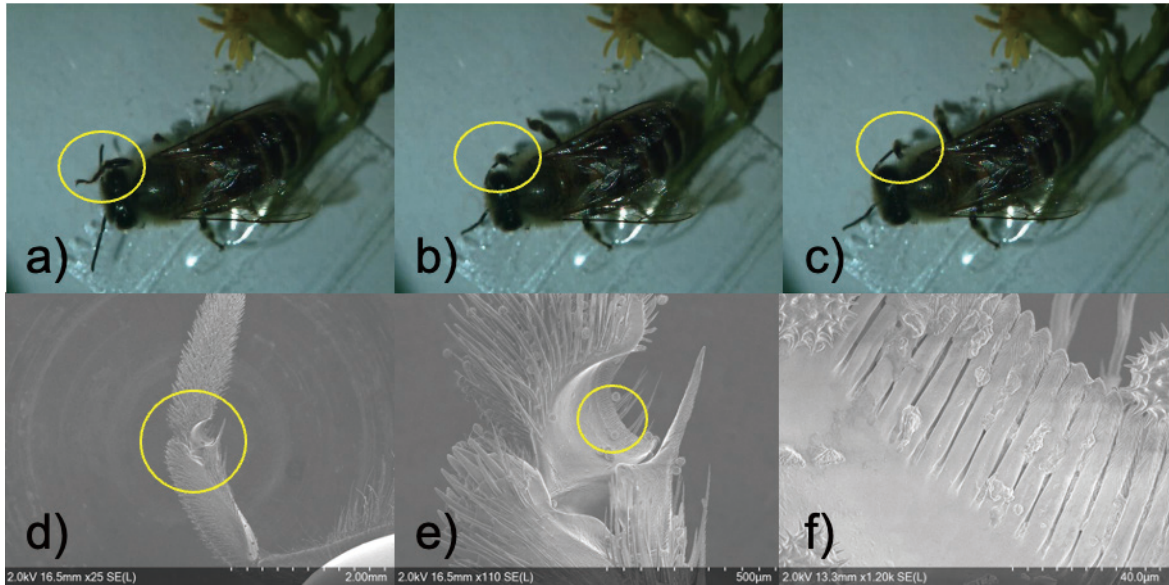


図5 アンテナのグルーミング (a-c) とアンテナクリーナー (d-f)



図6 セイヨウミツバチの腹部（背側）グルーミングの様子。後脚の跗節・脛節の内側を背側から腹側に向かって動かしている。

### 3.4. 人工コームの製作

#### 3.4.1. 設計・製作

本研究では、直径が20～30µmサイズの花粉の除去を目的として、前脚のアンテナクリーナーをモデルに人工マイクロコームを設計した。製作には、フェムト秒レーザー加工機を用いてテフロン基板及びシリコンウエハー表面を加工し鋳型を用いた。

まず、テフロン基板の上に幅20µm、長さ50µm、深さ10µmの形状を2µmの隙間を開けて加工を行ったが、テフロン基板表面の凹凸が加工の妨げとなり、樹脂を挿入しても綺麗な形状を作ることができなかった。

そこで、表面が平坦なシリコンウエハーを用いて加工を行った。この加工は、直径20µmの穴を2µmの隙間を開けて加工したが、レーザー照射によるシリコン基板温度の上昇で基板表面が粗くなる問題が生じた。この対策として、レーザーを移動させると表面の荒れが抑えられ綺麗な溝が形成されることから、線状の加工を行なった。この鋳型に樹脂を注入し、これを剥がすことで間隔20µm高さ30µmの形状の人工マイクロコームが製作できた(図7参照)。

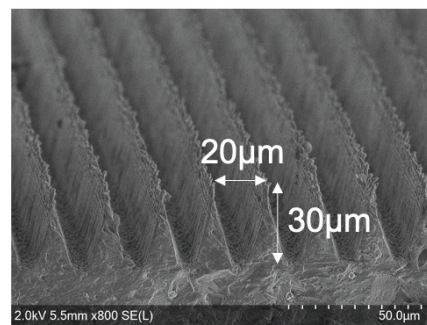


図7 人工マイクロコームの電子顕微鏡。レーザー加工した鋳型に樹脂を注入し、高さ30µm、間隔20µmの形状の人工マイクロコームが製作できた。

#### 3.4.2. 人工コームの評価

人工マイクロコームの花粉除去効果は、人工皮膚に花粉を塗布したサンプルで調べた。人工皮膚は人肌ゲルにファンデーションを塗布したものを用い、マイクロコームで表面を撫でて、除去前と除去後の電子顕微鏡像を比較して花粉の除去効果を調べた。使用した花粉は、大きいサイズに分類される市販のアルトロメリアの花粉(サイ

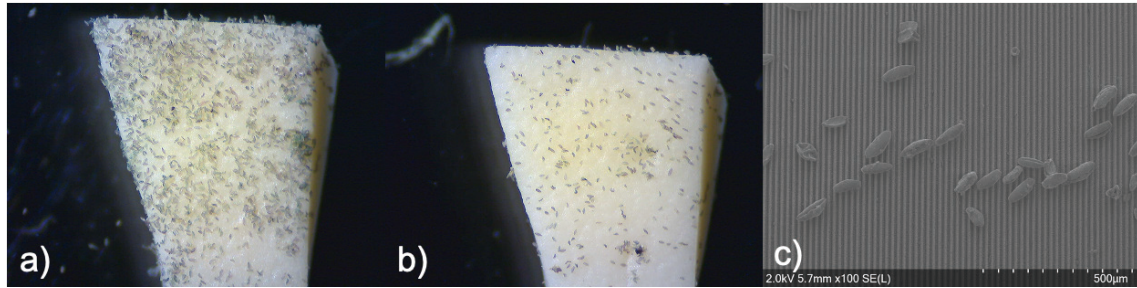


図8 人工マイクロコームによる花粉除去

- a) 花粉の除去前。人工皮膚（人肌ゲル上にファンデーション塗布）に花粉を付着。  
 b) 花粉の除去後。人工マイクロコームで表面を撫でて花粉を除去した後。  
 c) 花粉除去後の拡大SEM像。大きなサイズの花粉が確認できる。

ズ；136 $\mu\text{m}$ )を用いた。今後、直径が小さいサイズ（20～30 $\mu\text{m}$ ）の花粉についても除去効果を調べる計画である。

図8に人工マイクロコームによる花粉の除去効果を示す。図中のa)が人工皮膚上に花粉（アルソトロメリア）を付着させた状態、b)がマイクロコームで表面を撫でた後で、多くの花粉が除去されたことが確認できる。一方、一部の花粉が除去されずに残っている。図c)は残った花粉を電子顕微鏡像で拡大したものである。多くの花粉は人工マイクロコーム側に移動したが、一部が残った原因として花粉サイズがコーム構造よりも大きいことが考えられる。すなわち、花粉サイズが大きく異なる場合にも、花粉サイズに合わせて人工マイクロコームのサイズを最適化することで、特定の花粉の除去効率を高める人工マイクロコームを設計できることを示唆している。ハチの表面観察において、大きな花粉の付着が見られなかったことから、今後は、季節や花の種類の異なる環境での観察を行い花粉サイズと昆虫のグルーミング用の櫛サイズの関係性を調査することが有効であると考えられる。

## 4. 総括

### 4.1. 主な成果

昆虫が花粉を付着・除去させる形状と行動（グルーミング）に着目し、昆虫とその生息環境に存在する花粉を採集して観察を行った。この観察結果をもとに「人工マイクロコーム」を設計し、製作に成功した。主な成果は次のとおりである。

- 1) 昆虫とその生息環境の花粉を採集し、形状・サイズを調査した。昆虫が花粉を付着・除去させる行動（グルーミング）の観察をもとに「人工マイクロコーム」を設計できた。
- 2) 「人工マイクロコーム」は、レーザー加工で鋳型を作る手法で製作に成功した。花粉除去の効果を人工皮膚に対して確認した。花粉サイズに合わせた最適化も可能である。

### 4.2. 今後の計画

次のステップでは、小さいサイズの花粉除去効果について人工マイクロコームを評価する。花粉症を引き起こすスギ、カナムグラ、セイダカアワダチソウなどの花粉はサイズが20～30 $\mu\text{m}$ 程度である。このサイズに最適化した人工マイクロコームを製作する。また、人工皮膚での評価について「毛のある人工皮膚」での花粉除去効果を測定する。昆虫ごとのマイクロコームの特徴と、生息環境の花粉形状の関係についてもさらに調査したい。

本研究の成果により、社会的な要請が高い花粉症対策として、皮膚や毛などに付着して取り除きにくいスギ・ヒノキなどの花粉を効率的に取り除くことのできるコスメツールとして実現する可能性が見出された。

### 謝辞

本研究を推進するにあたり、御援助を賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深く感謝申し上げます。

### (引用文献)

- 1) Rudolf Jander, Grooming and pollen manipulation in bees (Apoidea) the nature and evolution of movements involving the foreleg, *Physiological Entomology*, 1 (3), 179–194 (1976)
- 2) Rudolf Jander and Ursula Jander, Wing grooming in bees (APOIDEA) and the evolution of wing grooming in insects, *J. of the Kansas Entomological Society*, 51 (4), 653–665, 1978
- 3) Guillermo J Amador, Marguerite Matherne, D'Andre Waller, Megha Mathews, Stanislav N Gorb and David L Hu, Honey bee hairs and pollenkitt are essential for pollen capture and removal, *Bioinspiration & Biomimetics*, 12, 026015, 2017

# 界面活性剤吸着膜の相転移を応用したピッカリングエマルジョンの自発解乳化

広島大学大学院先進理工系科学研究科

松原 弘樹

The adsorbed film of cetyltrimethylammonium chloride (CTAC) at the tetradecane (C14) – water interface undergoes a first-order surface transition from two-dimensional liquid to solid states upon cooling. In this study, we utilized this surface freezing transition to realize a spontaneous demulsification of Pickering emulsions stabilized by silica particles. In the temperature range above the surface freezing transition, the interfacial tension of silica laden oil-water interface was lower than CTAC adsorbed film, hence, stable Pickering emulsion was obtained by vortex mixing. However, the interfacial tension of CTAC adsorbed film decreased rapidly below the surface freezing temperature and became lower than the silica laden interface. The reversal of the interfacial tensions between silica laden and CTAC adsorbed films gave rise to Pickering emulsion demulsification by the desorption of silica particles from the oil-water interface. Similar behavior was also confirmed with the surface frozen film of CTAC and hexadecanol (C16OH), and fluorinated alcohols at dodecane-aqueous interfaces.

## 1. 緒言

近年、界面活性剤の代わりに微粒子で液滴表面を被覆した乳化系（ピッカリングエマルジョン）が、コロイド化学分野で精力的に研究されている。ピッカリングエマルジョンは、金属酸化物やシリカ、ラテックスなどの代表的な無機、高分子微粒子に加え、粘土鉱物、蛋白質、固体脂、食品粉末など、様々な粒子で容易に調製できることから、食品、化粧品、医薬品への応用も盛んである。

粒子の液液界面吸着の駆動力は、吸着粒子がこれらの界面を置き換えることにより界面張力（界面エネルギー）が減少することにある。微粒子の吸着膜（粒子膜）は液滴の合一を力学的に抑制するため、ピッカリングエマルジョンは界面活性剤を乳化剤とする一般的なエマルジョンに比べ極めて高い経時安定性を有する<sup>1)</sup>。しかしながら、ピッカリングエマルジョンの高い安定性は、①内包物の徐放、②ピッカリングエマルジョンを含有する廃油、廃水の処理、その低コスト化、資源再利用など、解乳化を基盤とする応用、及び、技術の構築という面では大きなデメリットもなっていた。

ピッカリングエマルジョンを解乳化するためには、乳化粒子に吸着した微粒子を自発的に液液界面から脱着させる工夫が必要である。温度応答性高分子などで粒子を化学修飾し、外部刺激（温度）で粒子の濡れ性を変化させて解乳化を促進する方法が現在の研究の主流であるが<sup>2)</sup>、この戦

略にはあらかじめ化学修飾を施した特定の粒子にしか適用できないという問題があり、したがってこの方法は上記①の解決には有効であるものの、様々な経路で混入したピッカリングエマルジョンを粒子の種類に依らずに解乳化することが求められる②の解決法にはなりえない。

そこで本研究では、筆者らが独自に見出した界面活性剤の吸着膜相転移を応用して粒子膜と吸着膜の界面張力を逆転させ、乳化粒子の表面で粒子と界面活性剤が交換することによって、ピッカリングエマルジョンを自発的に解乳化できるかについて検討を行った。

## 2. 方法

粒子膜と界面活性剤の吸着膜が交換するためには、(1) 粒子膜よりも吸着膜の界面張力が低い、すなわち、液液界面に吸着して界面のエネルギーを低下させる効果が高く、(2) 吸着膜の被覆率が十分に大きいという2つの条件を満たす必要がある。(1)の条件を満たす界面活性剤は、ポリオキシエチレン鎖を親水基にもつ非イオン界面活性剤などを使えば比較的容易に達成できるが、通常、ほとんどの界面活性剤の吸着膜は2次元液体（膨張膜）の状態であり、その界面被覆率は飽和吸着の状態でもせいぜい50%程度であることが知られている。この場合、界面活性剤に被覆されていない空間を補う形で粒子も界面に共存できるため、粒子の界面からの脱着は部分的にしか起こらないと考えられる。

したがって、本研究では、初めに四級アンモニウム塩型の陽イオン界面活性剤（塩化セチルトリメチルアンモニウム；CTAC）が降温過程で同程度の鎖長の飽和アルカン（テトラデカン）、または、飽和アルコール（ヘキサデカノール）を取り込んだ場合に形成される2次元固体膜（凝縮膜）形成を利用し<sup>3,4)</sup>、界面張力を低下させつつ100%に近い被覆率を実現した。吸着膜の相転移温度は油水界面張力の温



Spontaneous Pickering emulsion breaking by surface freezing of surfactant adsorbed films

Hiroki Matsubara

Graduate School of Advanced Science and Engineering, Hiroshima University

度変化により決定した。膨張膜状態でシリカ粒子を加えて超音波処理によりピッカリングエマルジョンを調製し、連続降温する過程で凝縮膜形成にともなって自発解乳化が起こることを目視観察した。

また、長鎖アルコールは単独で凝縮膜を形成できることが知られており<sup>5)</sup>、CTACとは異なりそれ自身には乳化能がないため、降温時によりスムーズな解乳化が実現できる可能性がある。そこで2番目の研究では、一般的な炭化水素系の飽和アルコールよりも界面張力低下能が大きいフルオロカーボン系の飽和アルコール（フルオロデカノール；FC10OH）を用いて同様の実験を行った。

本報告では便宜上、以下、界面活性剤と混合して凝縮膜を形成する飽和アルカンや飽和アルコールを界面充填剤と呼称する。

### 3. 結果と考察

#### 3.1. CTAC吸着膜の界面充填剤としてテトラデカンを用いた場合<sup>6,7)</sup>

図1にテトラデカンとCTAC水溶液の界面張力の温度

変化を示した。シリカ粒子を加えていない曲線（青）で10℃付近に現れる界面張力の折れ曲がり吸着膜の相転移点である。シリカ粒子の濃度は水相に対する重量比で0.033wt%、CTAC濃度は1.0mmol kg<sup>-1</sup>である。

シリカ粒子を加えて界面張力を測定すると（白）、相転移温度より高温では界面張力が低下することが確認され、この温度領域ではシリカ粒子が油水界面に吸着することが分かる（図中（a））。しかし、図中点（b）以下の温度では2つの界面張力曲線はシリカ粒子の有無に関わらず一致しており、シリカ粒子は油水界面から排斥され、CTACとテトラデカンの混合凝縮膜に置換されていることが分かる。

実際にシリカ粒子が油水界面に吸着できる点（a）でピッカリングエマルジョンを調製し、点（c）まで連続的に温度を下げながら観察を行うと、調製時には安定なピッカリングエマルジョンが形成されるものの、点（b）→（c）の過程でピッカリングエマルジョンが不安定化し、当初の予想通り、自発的に解乳化が起こることが確認された。

図2はCTAC濃度を一定としてシリカ粒子の重量濃度を0.0033wt%から0.050wt%まで増加した場合のピッカ

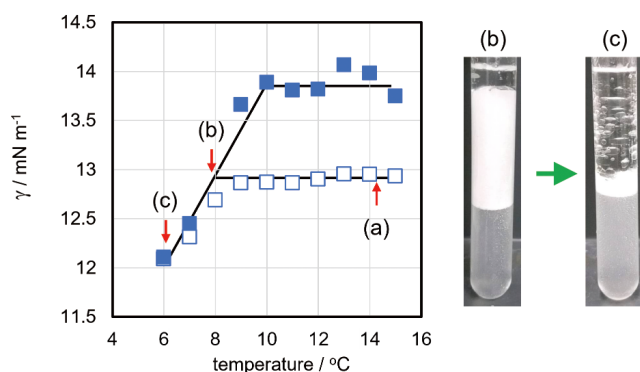


図1 水相にシリカ粒子を添加した場合（白抜き）とシリカ粒子を添加しなかった場合（青塗り）のテトラデカン-CTAC水溶液の界面張力の温度変化。右の写真は点（a）で調整したピッカリングエマルジョンを連続降温した場合に点（b）→（c）の過程で観察した解乳化の様子。

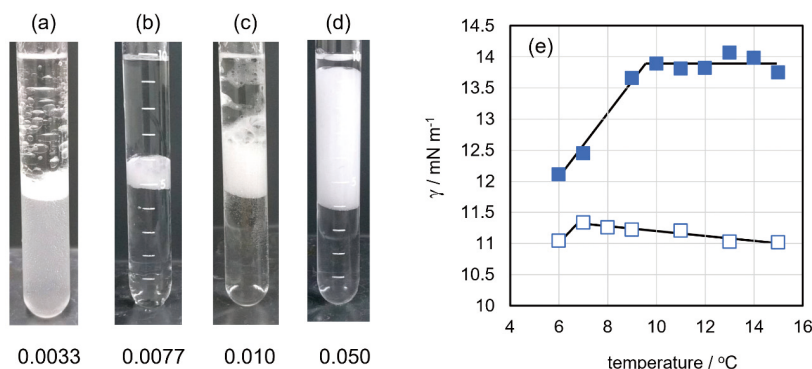


図2 CTAC水溶液濃度を1.0mmol kg<sup>-1</sup>で固定しシリカ粒子の重量濃度を0.0033wt%から0.050wt%まで増加したときのピッカリングエマルジョンの安定性。図（e）はシリカ重量濃度0.050wt%での界面張力-温度曲線。

リングエマルジョンの安定性を調べた結果である。図2 (a) - (c) の条件では図1と同様、低温領域でシリカ粒子を添加した場合と添加しなかった場合で界面張力が一致しており、連続降温をする過程で自発解乳化が確認されるが、図2 (d) の条件では自発解乳化は観察されなかった。この条件で測定した界面張力-温度曲線は吸着膜相転移の後もシリカ粒子を加えた方が界面張力が低い結果となっており、粒子膜を混合凝縮膜で完全に置換できないことが分かった(図2(e))。また、同様の結果は、シリカ粒子の濃度を一定としてCTAC濃度を低下させる過程でも見られており、これらの結果から、吸着膜相転移と連動してピッカリングエマルジョンの解乳化を誘起するためには、界面活性剤濃度と粒子濃度の相対的な割合を適切に設定することが重要であることが示唆される。

### 3. 2. CTAC吸着膜の界面充填剤としてヘキサデカノールを用いた場合

前項で述べた実験は、溶媒であるテトラデカンが界面充填剤として働くケースであったが、吸着膜相転移温度が室温よりかなり低く、室温付近で吸着膜相転移が起こる、あ

るいは、ある程度広い温度範囲で吸着膜相転移温度を制御できるような実験系を開拓することは、ピッカリングエマルジョンの解乳化法として本実験を確立する上では重要な課題であると考えられる。そこで本研究では次に、界面活性剤と同じ炭化水素鎖長をもち、それ自身が界面活性を有するヘキサデカノールを界面充填剤としてとして選び、これをドデカンに溶解させて、同様の実験を行った。

実験結果の一例として、図3にはヘキサデカノールのドデカン中での濃度を  $15\text{mmol kg}^{-1}$ 、水相中でのCTAC濃度を  $0.9\text{mmol kg}^{-1}$  としたときの界面張力の測定結果を示した。35℃で水相に0.0015wt%のシリカ粒子を分散させると、図1と同様、界面張力がシリカ粒子を加えていない青の曲線より減少する。この条件で調製したピッカリングエマルジョン図3 (b) を、界面張力が一致する25℃まで降温した状態が図3 (c) である。この場合も界面活性剤と界面充填剤の濃度を一定に保ったまま、シリカ粒子の濃度を増加させると再び低温で界面張力が一致なくなり、自発解乳化現象が消失することが明らかとなっている。

表1に示したように、吸着膜相転移温度は界面活性剤と界面充填剤の組合せによって大きく変化する。例えば、界

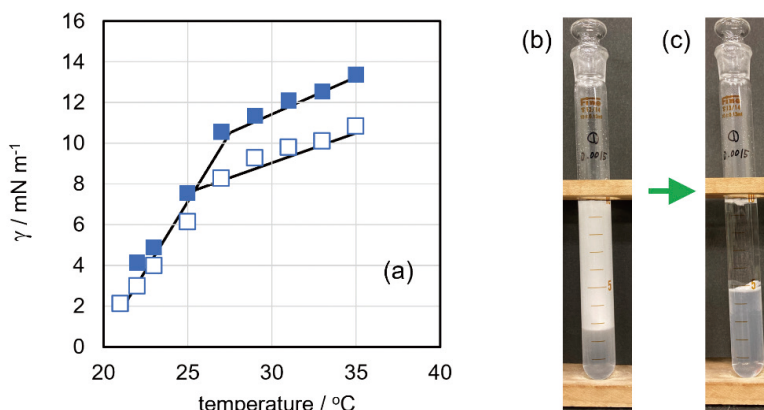


図3 水相にシリカ粒子を添加した場合(白抜き)とシリカ粒子を添加しなかった場合(青塗り)のヘキサデカノールのドデカン溶液とCTAC水溶液の界面張力の温度変化。右の写真は点 (b) が35℃、点 (c) が25℃で観察したピッカリングエマルジョンの外観。

表1 界面活性剤と界面充填剤の組合せによる吸着膜相転移温度の変化。界面活性剤の略称は本文を参照。

	界面活性剤	溶媒	界面充填剤	相転移温度	参考論文
1	CTAB	dodecane	dodecane	3 °C	8
2		tetradecane	tetradecane	12 °C	8
3		dodecane-tetradecane	tetradecane	3~12 °C	8
4		dodecane-hexadecane	hexadecane	3~8 °C	8
5		tetradecane-hexadecane	hexadecane	12~14 °C	8
6	CTAC	tetradecane	tetradecane	10 °C	3
7		dodecane	hexadecanol	20~25 °C	4
8		Isopropyl palmitate	hexadecane	13~25 °C	9
9	SHS	dodecane	hexadecanol	20~35 °C	10

面活性剤を臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB) として、界面充填剤 (溶媒) をドデカン (表中の番号 1) からテトラデカン (番号 2) に変えると相転移温度は 10℃ 程度上昇する。

番号 3～5 の例は、油相を鎖長の異なるアルカンの混合物として、その混合比を変えながら吸着膜相転移温度を測定した結果であるが、この実験では界面活性剤と鎖長に近いアルカンの溶液組成が増えるとともに吸着膜相転移温度が上昇するだけでなく、混合凝縮膜には界面活性剤と鎖長のマッチングがよいアルカンが界面充填剤として優先的に取り込まれ、鎖長のマッチングが悪いアルカンはほぼ油水界面から排斥されることも明らかとなっている。混合凝縮膜形成時に、吸着膜中で界面活性剤と充填効率のもっともよい界面充填剤が油相中から自動的に選択されるという現象は、パルミチン酸イソプロピルを主溶媒としてヘキサデカンを添加した混合油相 (モル比 9 : 1) と CTAC 水溶液の界面においても確認されている (ヘキサデカンがパルミチン酸イソプロピルを界面から排斥して CTAC と混合凝縮膜を形成する)。

化粧品などでピッカリングエマルジョンを用いる場合には、粒子とともに種々の界面活性剤、溶剤が混在している場合がほとんどである。このことを考えると、溶剤としての添加量が少ない場合でも界面活性剤と同じ鎖長の飽和アルカンや飽和アルコールが選択的に吸着膜に取り込まれて混合凝縮膜を形成するという事実は、実際的な使用環境において安定にピッカリングエマルジョンを調製するための処方を考える上でも大変重要であると考えられる。

### 3.3. フルオロデカノールによるピッカリングエマルジョンの解乳化

図 4 の黄色の曲線は、純粋なドデカンと水の界面張力で

ある。シリカ粒子を水相に分散させると界面張力は図中の緑の曲線となり、シリカ粒子がドデカン-水界面に吸着して、界面張力が低下することが分かる。青の曲線は FC10OH ドデカン溶液 (20mmol kg<sup>-1</sup>) と純水、赤の曲線は FC10OH ドデカン溶液とシリカ分散液の界面張力を表す。これまでの結果と同様、FC10OH を添加した場合はシリカ粒子の有無に関わらず界面張力が一致しており、凝縮膜形成により油水界面からシリカ粒子が排斥されることが分かる。また、FC10OH は測定した温度範囲の全てで凝縮膜を形成していることが明らかとなった。シリカ粒子の濃度は水相に対する重量濃度で 0.01wt% である。

したがって、この実験では連続降温による解乳化の観察を行う代わりに、FC10OH を加えて調製したピッカリングエマルジョンから油相が溶出する挙動を経時的に観察した。図 4 写真にあるように、FC10OH を加え 24 時間程度静置した場合、FC10OH 濃度が 30mmol kg<sup>-1</sup> に達したあたりから顕著な解乳化挙動が見られ、FC10OH 濃度 40mmol kg<sup>-1</sup> では乳化前の油相の体積のおよそ 90% に当たるドデカンが溶出していることが分かる。このことから調製時に油滴の表面にシリカ粒子が一時的に吸着し、過渡的に安定化されたピッカリングエマルジョンは、時間の経過とともにシリカ粒子とフルオロデカノールが置換されて不安定化し自発解乳化したと考えられる。

図 5 は同様の実験をカーボンブラックを用いて行った結果である。今回用いたカーボンブラックはドデカン相に分散し、WO 型のピッカリングエマルジョンを形成する。図 5 右上の写真に示したように、フルオロデカノール濃度が小さい条件では、カーボンブラックの凝集体が油水界面に吸着してしまうため、前項図 4 の緑に相当するカーボンブラックのドデカン分散液と純水との間の界面張力は測定することができなかった。しかしながら、ドデカン

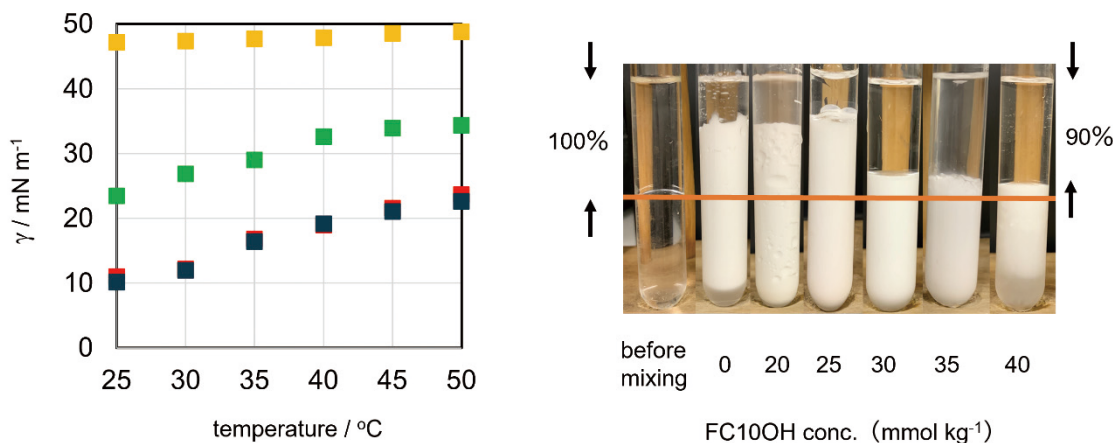


図 4 ドデカン-純水 (黄)、ドデカン-シリカ粒子分散液 (緑)、FC10OH ドデカン溶液-純水 (青)、FC10OH ドデカン溶液-シリカ粒子分散液 (赤) の界面張力-温度曲線。写真は調製後 24 時間でのピッカリングエマルジョンの外観。

中のFC10OH濃度を増加させるとカーボンブラックの液滴表面への吸着が徐々に抑制されるようになり、油相に20mmol kg<sup>-1</sup> FC10OHを添加すると、界面張力の測定が可能となった(図5上の赤の曲線)。この条件では、シリカ粒子の実験と同様、FC10OHドデカン溶液と純水の間の界面張力(青)と、ほぼ同じ界面張力が得られることから、カーボンブラックが油水界面から排斥されることが予想される。実際に、図5右下に示した写真でも、ドデカン中のFC10OH濃度が低い場合は、油相中でカーボンブラックに被覆されたWOエマルションが形成されるため上相が黒く、ドデカン相に20mmol kg<sup>-1</sup> FC10OHを添加すると、ピッカリングエマルションが解乳化して上相が透明になることが分かる。カーボンブラックを用いた場合も解乳化後はほぼ完全に油相が溶出しており、FC10OHのピッカリングエマルション解乳化剤としての性能は総じて高いように思われる。

#### 4. 総括

本研究では、ピッカリングエマルションを自発解乳化するための新しい方法論を確立すべく、油水界面吸着膜の相転移に注目した研究を行った。

陽イオン界面活性剤と飽和アルカン、飽和アルコールの混合凝縮膜形成では、吸着膜相転移より高温では粒子膜の界面張力が吸着膜の界面張力よりも低く、超音波処理によ

り安定なピッカリングエマルションが形成され、降温過程で両者の界面張力の大小関係が逆転すると転移的な解乳化が起こることが明らかとなった。また、混合吸着膜形成は、油相が様々な油剤の混合物であっても、界面活性剤と炭化水素鎖長の等しい飽和アルカンや飽和アルコールが選択的に取り込まれて起こるといふ発見は、今後、粒子と界面活性剤が共存する条件で安定にピッカリングエマルションを調製するための指標を考える上でも重要であることが結論された。また、本文中では述べなかったが混合凝縮膜は陽イオン界面活性剤に限らず、陰イオン界面活性剤(表1の番号9のヘキサデシル硫酸ナトリウム; SHS)や非イオン界面活性剤でも形成することが可能である。ただし、非イオン界面活性剤の場合は界面活性剤が油相と水相の両方に分配するため界面張力が平衡値に達する時間が長く温度変化にともなう自発解乳化剤としての応用には不向きであるかもしれない。

また、フルオロカーボンアルコールは室温よりもかなり高い温度領域でも単独で凝縮膜を可能であり、OW型、WO型の区別なく適切な濃度を加えれば、ピッカリングエマルションを解乳化できることも明らかになった。

現在は、酸化チタンなどの他の微粒子での研究を進めつつ、これに並行して、微粒子が混合した状態での解乳挙動などについても発展的な研究を継続している。

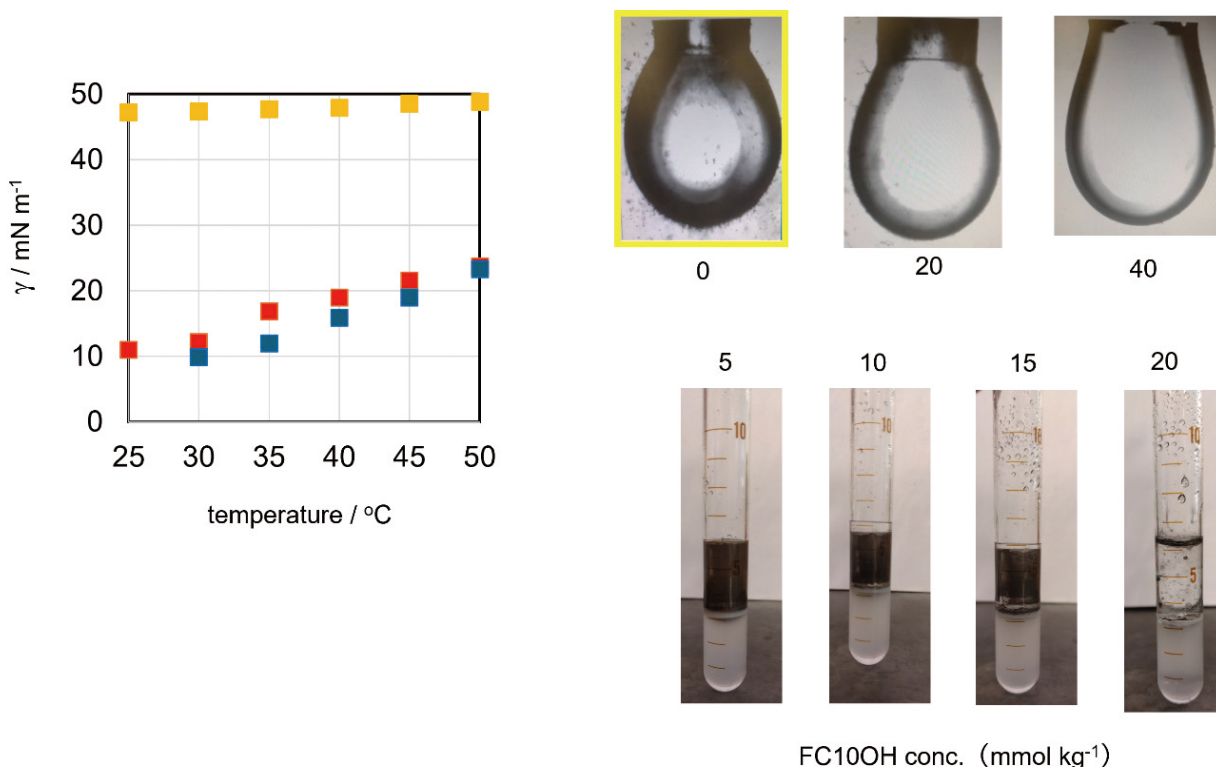


図5 ドデカン-純水(黄)、FC10OHドデカン溶液-純水(青)、カーボンブラックを分散したFC10OHドデカン溶液-純水(赤)の界面張力-温度曲線。写真上は水滴表面に吸着したカーボンブラック凝集体がFC10OH濃度の増加とともに油水界面から脱着する様子を、写真下は調製後24時間でのピッカリングエマルションの外観を示す。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご援助を賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深く感謝申し上げます。

## (引用文献)

- 1) B.P. Binks, S.O. Lumsdon, Influence of Particle Wettability on the Type and Stability of Surfactant-Free Emulsions. *Langmuir*, **16**, 8622-8631, 2000.
- 2) C.L.G. Harman, M.A. Patel, S. Guldin, G.L. Davies, Recent developments in Pickering emulsions for biomedical applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **39**, 173-189, 2019.
- 3) Y. Tokiwa, E. Ohtomi, T. Takiue, M. Aratono, C.D. Bain, H. Matsubara, Effect of Surface Phase Transition on OW Emulsion Stability. *Langmuir*, **34**, 6205-6209, 2018.
- 4) H. Sakamoto, A. Masunaga, H. Tanida, T. Uruga, K. Nitta, A. Prause, M. Gradzielski, H. Matsubara, Surface freezing of cetyltrimethylammonium chloride-hexadecanol mixed adsorbed film. *Langmuir*, **36**, 14811-14818, 2020.
- 5) T. Takiue, T. Matsuo, N. Ikeda, K. Motomura, M. Aratono, Thermodynamic Study on Phase Transition in Adsorbed Film of Fluoroalkanol at the Hexane/Water Interface. 4. Phase Transition in the Adsorbed Film of Alkanol and Fluoroalkanol Mixture. *J. Phys. Chem. B*, **102**, 4906-4911, 1998.
- 6) K. Shishida, H. Matsubara, Demulsification of silica stabilized Pickering emulsions using surface freezing transition of CTAC adsorbed films at the tetradecane-water interface. *J. Oleo Sci.*, **72**, 1083-1089, 2023.
- 7) H. Matsubara, Y. Tokiwa, A. Masunaga, H. Sakamoto, K. Shishida, K. Ohshima, A. Prause, M. Gradzielski, Surface freezing of cationic surfactant-adsorbed films at the oil-water interface: Impact on oil-in-water emulsion and Pickering emulsion stability. *Adv. Colloid Interface Sci.*, **334**, 103309, 2024.
- 8) Y. Tokiwa, H. Sakamoto, T. Takiue, M. Aratono, H. Matsubara, Effect of Alkane Chain Length and Counterion on the Freezing Transition of Cationic Surfactant Adsorbed Film at Alkane Mixture-Water Interfaces. *J. Phys. Chem. B*, **119**, 6235-6241, 2015.
- 9) H. Matsubara, H. Sakamoto, A. Prause, M. Gradzielski, Surface freezing of CTAC-hexadecane mixed adsorbed film at the isopropyl palmitate - water interface; a way to stabilize emulsions. *Colloid Polym. Sci.*, **301**, 745-752, 2023.
- 10) H. Matsubara, K. Kato, Effect of Surface Freezing of Sodium Hexadecyl Sulfate - Hexadecanol Mixed Adsorbed film on OW Emulsion Stability. *J. Oleo. Sci.*, **73**, 1289-1294, 2024.



## **Ⅱ． 生体作用、安全性に関する分野**

# iPS 細胞由来顔面部真皮幹細胞誘導法の開発

京都大学 iPS 細胞研究所

池谷 真

The dermal layer's structural integrity, maintained by collagen/elastin networks produced by dermal fibroblasts, is fundamental to skin youthfulness. However, the rarity of dermal stem cells and ethical challenges in obtaining facial-specific samples from healthy donors have severely constrained anti-aging research. This study bridges these gaps through an innovative integration of developmental biology and stem cell technology. Building upon recent advances in neural crest cells (NCCs) induction from iPSCs, we established a robust protocol to generate craniofacial-specific mesenchymal cells from human iPSCs via NCCs. Our xeno-free 3D induction system achieves the induction of HOX-negative (craniofacial) NCCs highly efficiently, overcoming the variability and line-dependency of conventional 2D methods. These cells faithfully recapitulate patterning of mandibular arch through EDN1-dependent mechanisms, forming spatially organized structures with distal DLX2+/DLX5+/HAND2+ domains and proximal DLX2+/DLX5-/HAND2- domains. The resulting maxillary organoids demonstrate physiologically relevant features including intramembranous ossification and functional SOST+ osteocyte networks by day 38.

This research creates new opportunities to develop targeted anti-aging interventions. The cells serve as ideal substrates for testing next-generation compounds, from small-molecule to biologics addressing fibroblast senescence. Furthermore, the platform's adaptability allows future incorporation of epithelial components to model complete skin organoids, potentially revolutionizing both cosmetic safety testing and regenerative therapies for craniofacial reconstruction.

## 1. 緒言

肌は「表皮層」「真皮層」「皮下組織」の3層で構成されている。中でも「真皮層」は肌の質感に直接関与する重要な層である。真皮層を構成するコラーゲンやエラスチンといった線維群は若い肌に弾力やハリを与え、またヒアルロン酸が水分を保つことで肌に潤いを与える。一方で、加齢や紫外線などの肌ダメージによってこれらの構成成分が失われると、肌にシワやたるみが生じ、顔貌全体の印象が大きく「老化」にシフトする。したがって、真皮層の研究はコスメトロジー領域の最重要研究テーマの一つであるといえる。

真皮層を構成する主な細胞は「皮膚線維芽細胞」であり、この細胞がコラーゲン、エラスチン、ヒアルロン酸などを産生する。そして、皮膚線維芽細胞のもととなるのが「真皮幹細胞」である。真皮幹細胞は皮膚に存在し、間葉系幹細胞と類似の表面抗原マーカーを保持する細胞である。ただ、生体内に存在する数が非常に少ないため、研究用材料として大量に生体から採取してくることは容易ではない。

この課題に対し、万能細胞であるiPS細胞から真皮幹細胞を大量に作成し、研究に使用することは、1つの解決策

となりうる<sup>1-3)</sup>。iPS細胞は発生過程の初期に出現する胚盤葉上層に相当すると考えられている。そのため、iPS細胞から目的細胞を誘導する方法を開発する際に、特に重要となるのが、発生学上の分化経路(細胞系譜)である。これまでの研究から、顔面部と体幹部(四肢を含む)は発生的起源が異なり、顔面部は神経堤細胞を、体幹部(と四肢)は中胚葉細胞を経由することが知られている<sup>4)</sup>。コスメトロジー領域において、顔面部皮膚の研究が特に重要な意義を持つことを鑑み、本研究ではiPS細胞から一旦神経堤細胞を誘導し、次に真皮幹細胞の特徴を持つ間葉系幹細胞を誘導し、そこからさらに皮膚線維芽細胞を誘導するという三段階の誘導法の開発を計画した(図1)。

我々はこれまでの研究で、三段階のうちの第一段階である「iPS細胞から神経堤細胞誘導法」を、すでに確立済であった<sup>5)</sup>。しかし、この方法はiPS細胞の株間による誘導効率のばらつきが大きく、一部の株では全く誘導されないという課題があった。そこで、本研究ではiPS細胞から神経堤細胞への誘導方法を根本的に見直し、株間による神経堤細胞への誘導効率にばらつきのない誘導方法の確立、および神経堤細胞から顔面部真皮幹細胞の起源の1つである



Development of a method for induction of iPS cell-derived cranial dermal stem cells

Makoto Ikeya

Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Kyoto University

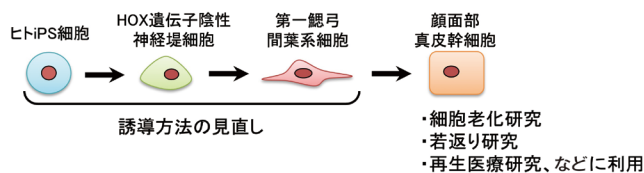


図1 本研究の概念図。HOX遺伝子陰性神経堤細胞、第一鰓弓間葉細胞、顔面真皮幹細胞という三段階の段階的誘導法の確立を目指した。

第一鰓弓間葉系細胞への誘導方法の確立、および第一鰓弓間葉系細胞の証明としてパターンニング因子に対する反応性の確認と顎骨への分化誘導を行った。以下にその方法と結果を示す。

## 2. 方法

### 2.1. ヒト iPS 細胞からの HOX 遺伝子陰性神経堤細胞の 3 次元誘導

フィーダーフリーかつゼノフリー条件で維持培養したヒト iPS 細胞株 (1231A3) を培養皿から剥離し、1 日間、ROCK 阻害剤 Y-27632 を添加した培地中で 96 ウェル V ボトム超低接着プレートを用いて 3 次元凝集体を形成した。神経外胚葉の混入を抑制するため、凝集体を BMP4 と TGF- $\beta$  阻害剤 SB431542 で 1 日間前処理した後、SB431542 と GSK3 $\beta$  阻害剤 CHIR99021 を添加して 3 日間振盪培養を行った。評価には、神経堤細胞マーカーである SOX10、CD271 (NGFR/p75NTR)、TFAP2A の抗体染色解析、CD271 のフローサイトメトリー解析、qPCR による遺伝子発現解析、RNA シークエンシングによる経時的な発現変動解析、ならびに末梢神経細胞、メラノブラスト、間葉系幹細胞への分化能にて評価を行った。なお、同プロトコルは、初期細胞密度と BMP4 濃度を最適化することで複数の細胞株において適用可能であった。

### 2.2. HOX 遺伝子陰性神経堤細胞凝集体からの第一鰓弓間葉系細胞への誘導

胚発生における第一鰓弓間葉系細胞のパターンニングに関与するシグナル因子 (FGF8、エンドセリン-1 (EDN1)、BMP4) の効果を検証するため、HOX 遺伝子陰性神経堤細胞凝集体を以下の 3 条件 ((1) FGF8 単独、(2) FGF8 + EDN1、(3) FGF8 + EDN1 + BMP4 (FEDB 条件)) で処理した。FGF8 は第一鰓弓間葉系細胞の生存・増殖を促進する因子として、EDN1 は下顎隆起特異的に分泌される DLX5/HAND2 遺伝子の活性化因子として、BMP4 は遠位領域形成促進因子として選択した。比較対照として、EDN1 シグナル阻害実験としてエンドセリン受容体 A 型 (EDNRA) アンタゴニスト BQ-123 を FGF8 と併用 (FQ 条件) した。抗体染色解析と qPCR/RNA シークエンシングによる遺伝子発現解析を実施し、第一鰓弓間葉系細胞、中でも下顎特異的マーカー (DLX5、HAND2、GSC) および非特異的マーカー (SOX10、POU3F3) の発現動態を評価した。

### 2.3. 第一鰓弓間葉系細胞を用いた後期領域パターン形成の再現

第一鰓弓間葉系細胞凝集体を 96 ウェル U 底超低接着プレートに移し、遠位キャップ構造誘導群 (BMP4 high、

EDN1、FGF2<sub>low</sub> 条件) と近位口腔構造誘導群 (FGF8、SAG、BQ-123、LDN 条件) の 2 系統に分けて培養した。遠位キャップ構造誘導では BMP4 濃度依存性を検証し、近位口腔構造誘導では Shh シグナル作動薬 SAG に加え、EDN1 阻害剤 BQ-123 と BMP 阻害剤 LDN193189 を併用した。歯原性分化能評価のため、近位口腔構造誘導体を FGF8・SHH・CHIR・ACTIVIN-A (FSCA 条件) で処理し、免疫染色、qPCR、RNA-seq、GO 解析によりマーカー発現を網羅的に評価した。

### 2.4. 3 次元培養系を用いた in vitro 顎骨様オルガノイドの作製

顎骨様オルガノイドの作製を以下の手順で行った。超低接着性 96 ウェル V ボトムプレートを用いて細胞凝集体を浮遊培養し、骨分化誘導培地 (ゼノフリー条件) で 38 日間培養した。培養過程では、振盪培養による栄養供給の最適化と、BMP4、FGF2、EDN1 などの誘導因子の濃度勾配を制御することで、膜性骨化様式を再現した。評価系として、アルカリフォスファターゼ活性測定、qPCR 解析 (SP7、PHEX、SOST などの骨関連マーカー)、RNA シークエンシングを実施し、時間経過に伴う分化段階をモニタリングした。組織学的解析には、脱灰処理後のアザン染色による骨基質可視化と、骨基質マーカー (COL1、OPN、OCN) による抗体染色を組み合わせた。

## 3. 結果

### 3.1. HOX 遺伝子陰性神経堤細胞の高効率誘導と特性解析

本研究では、iPS 細胞からの顔面部真皮幹細胞への誘導を目的とし、最初にヒト iPS 細胞から HOX 遺伝子陰性神経堤細胞を効率的に誘導する 3 次元培養系を確立した。本 3 次元培養系により、抗体染色では、SOX10 陽性、CD271 陽性、TFAP2A 陽性の多数の細胞が確認され (図 2A)、フローサイトメトリー解析では、CD271 強陽性の細胞が  $94.9 \pm 1.9\%$  という高い純度で誘導された (図 2B)。また、未分化 iPS 細胞 (OCT3/4+) や神経外胚葉 (PAX6+) の混入は極めて少ないことも確認された。qPCR 解析では、これまでに確立していた 2 次元培養系と同等のレベルで神経堤細胞マーカー (SOX10、NGFR、TFAP2A、RHOB、PAX3) を 5 日目の凝集体が発現しており、多能性マーカー POU5F1 (OCT3/4) の発現が低下していることが示された。また、神経堤細胞凝集体の前後軸方向の特性を評価するため、後方化を誘導するレチノイン酸 (RA) で処理した凝集体を陽性対照として調製し、qPCR 解析による HOX 遺伝子発現解析を行ったところ、RA 処理群と比較して、非 RA 処理群では HOXA1、HOXA2、HOXB2、HOXA3 の発現が有意に低いことが確認された (図 2C)。

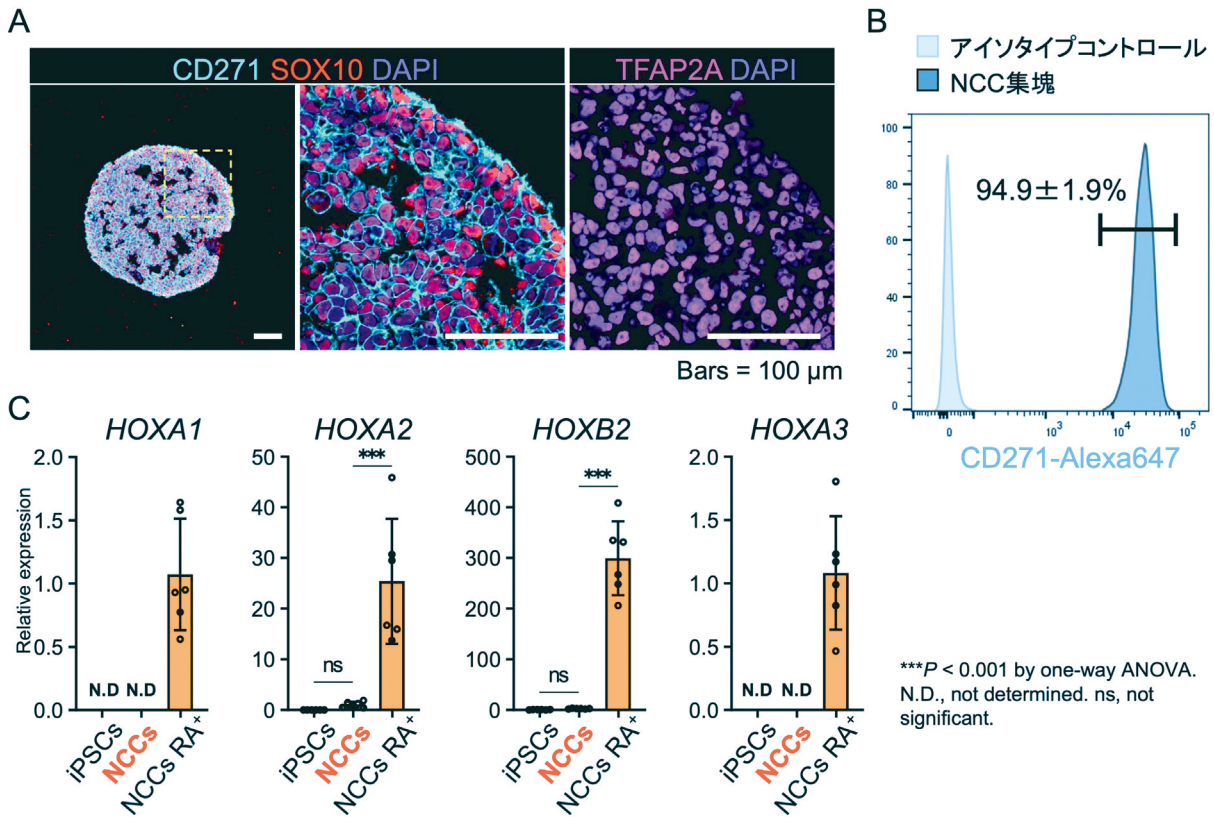


図2 HOX遺伝子陰性神経堤細胞の誘導。A. 誘導5日目の凝集体の切片の抗体遺伝子像。Bar：100μm。B. CD271によるフローサイトメトリー解析。C. qPCRによるHOX遺伝子群の発現解析。

また、RNA シークエンシングでは、iPS細胞（0日目）から神経板境界細胞を経て神経堤細胞（5日目）へと段階的に移行する過程が明らかとなった。さらに、誘導した神経堤細胞は末梢神経細胞（TUBB3/PRPH陽性；図3A）、メラノblast（TRP2/MITF陽性；図3B）、および間葉系幹細胞（CD73/CD105陽性）へと分化可能であり、多分化能を保持していることが確認された。これらの結果から、本研究で確立した3次元培養系が、HOX遺伝子陰性の神経堤細胞を高純度かつ高効率で誘導する有効な手法であることが実証された。

### 3.2. 第一鰓弓間葉系細胞の空間的パターン再現とEDN1シグナルの機能的検証

次に、HOX遺伝子陰性神経堤細胞凝集体からの第一鰓弓間葉系細胞誘導プロトコルを開発した。まず、FGF8単独処理では神経堤細胞マーカーSOX10の発現低下と間葉系マーカー（TWIST1、PRRX1）の発現誘導が確認され、間葉系への初期分化が促進された。FGF8とEDN1の併用により、第一鰓弓間葉系細胞マーカー（DLX1、DLX2）と第一鰓弓（特に下顎）間葉系特異的マーカー（DLX5、DLX3、GSC）が協調的に発現し、さらにBMP4添加（FEDB条件）で遠位マーカーHAND2が強く誘導された。RNA

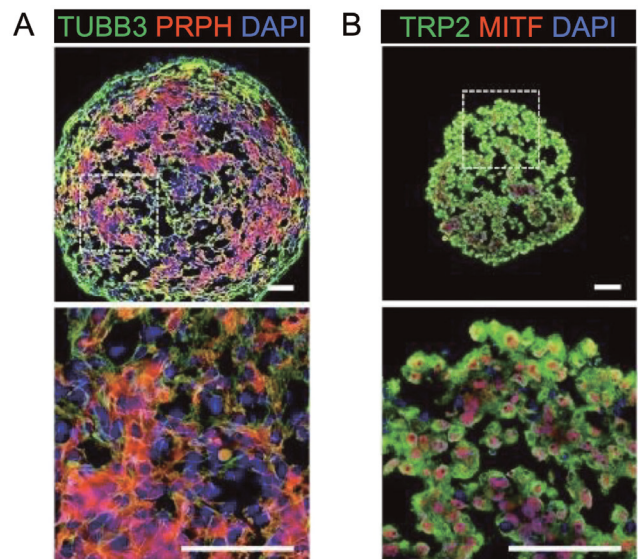


図3 誘導した神経堤細胞の分化能の検証。A. 神経誘導後の神経マーカー（TUBB3、PRPH）の発現。b. 色素細胞誘導後のメラノblastマーカー（TRP2、MITF）の発現。Bar：100μm。

シークエンシング解析では、神経系・メラノサイト系マーカーの発現が抑制され、HOX遺伝子群の低発現が維持されることで顔面部特異性が確保された。

上述の遺伝子発現は免疫染色でも確認された。FEDB処

理により SOX10 の発現は減少し、TWIST1 の発現は上昇した (図4)。また、凝集体は3層構造を示していることが分かった (図5)。中心部に DLX2 単独陽性細胞、中間層に DLX2/DLX5 二重陽性細胞、表層に DLX2/DLX5/HAND2 三重陽性細胞が分布し、第一鰓弓 (特に下顎) 間葉系細胞の近位-遠位軸パターンを忠実に再現した。一方、EDNRA 阻害 (FQ 条件) では上顎間葉系細胞マーカー (POU3F3, CYP26A1) の発現が増加し、下顎間葉系細胞マーカー発現は FEDB 条件の 30% 以下に抑制された。この結果は、EDN1 シグナルが下顎/上顎外間充織の運命決定に決定的な役割を果たすことを示唆している。

### 3.3. 第一鰓弓間葉系細胞の領域特異的パターンングと歯原性分化能

さらに、発生後期の第一鰓弓 (特に下顎) 間葉系細胞における領域特異的パターンングを再現するため、上皮シグナル因子を組み合わせた培養系を構築した。遠位キャップ構造誘導群では、BMP4 高濃度処理により HAND1 が顕著に発現上昇し、HAND2、GATA3、DKK1 などの遠位構造マーカーが協調的に発現した。抗体染色では凝集体の外側に HAND1 陽性細胞が分布し、DLX5 発現が減少するというマウス胚でのパターンが再現された。一方、近位

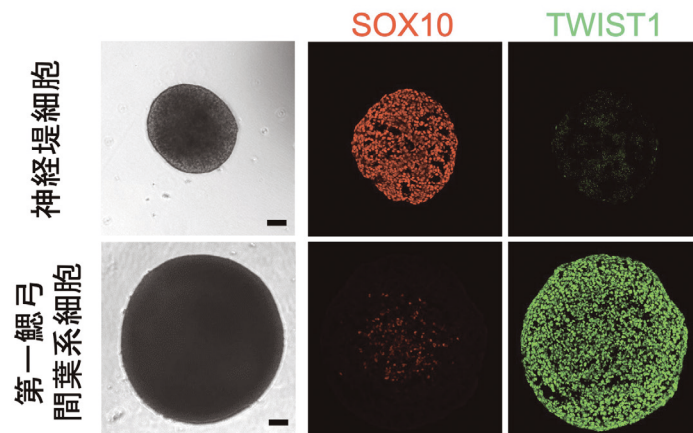


図4 第一鰓弓間葉系細胞への分化誘導。誘導5日目の神経堤細胞で発現する神経堤細胞マーカー SOX10 は誘導9日目の第一鰓弓間葉細胞で減少し、間葉系マーカーの TWIST1 は上昇する。Bar : 100μm。

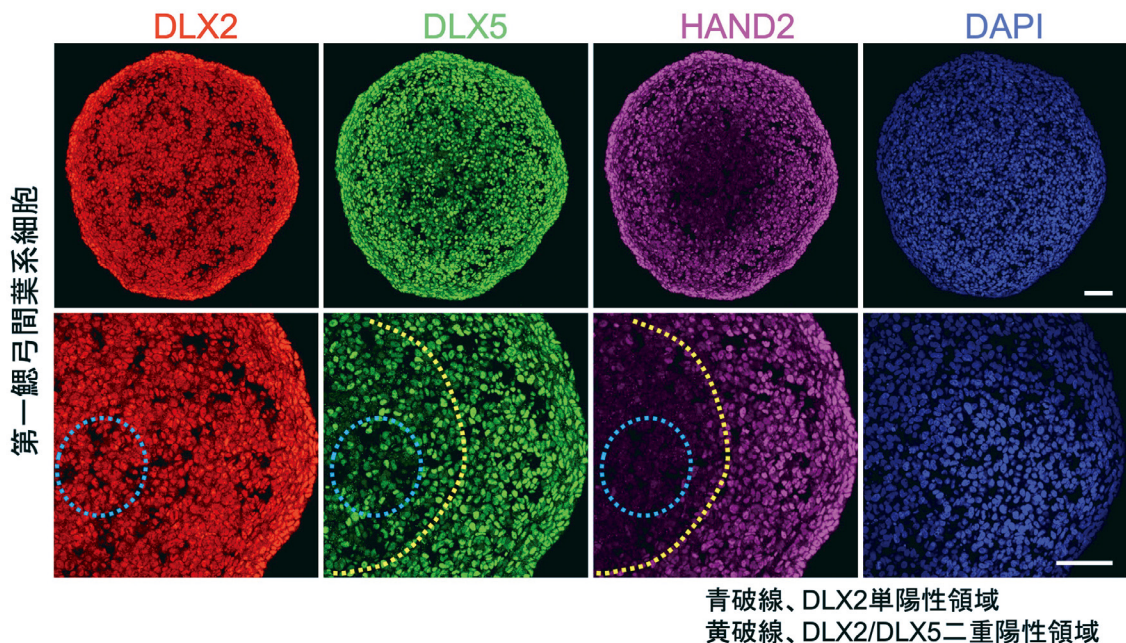


図5 第一鰓弓間葉系細胞のパターンング解析。誘導9日目の第一鰓弓間葉系細胞では、中心部に DLX2 単独陽性細胞、中間層に DLX2/DLX5 二重陽性細胞、表層に DLX2/DLX5/HAND2 三重陽性細胞が分布する。これは、第一鰓弓 (特に下顎) 間葉系細胞の近位-遠位軸パターンと類似性がある。Bar : 100μm。

口腔構造誘導群ではFOXF1、GLI1、PITX1などの口腔マーカーが誘導され、FGF8/SAG処理にEDN1/BMP阻害を加えることで発現がさらに増強された。両構造体のマーカー発現は相互排他的であり、RNA-seq解析でもこの傾向が確認された。歯原性分化評価では、FSCA処理によりTFAP2B、LHX6、PAX9などの歯間充織マーカーが誘導され、GO解析で「歯質形成」関連遺伝子が有意に濃縮された。これらの結果は、第一鰓弓(特に下顎)間葉系細胞が胚性下顎骨と同様の空間的パターンニングを示し、歯原性分化能を保持することを実証している。

### 3. 4. 第一鰓弓間葉系細胞を用いたin vitro顎骨様オルガノイドの作製

最後に、iPS細胞由来の第一鰓弓間葉系細胞を基盤とした顎骨様オルガノイド作製プロトコルを開発した。3次元培養により得られた凝集体は、38日間の培養後、直径1.0-1.5mmの白色構造体を形成し(図6A)、組織学的解析では、アリザリンレッド染色、コッサ染色陽性の石灰化組織(図6B)と、アザン染色陽性の骨様組織が観察され(図6C)、骨基質マーカーであるCOL1、OPN、OCNが基質中に豊富に分布していた(図6D)。さらにSOST陽性成熟骨細胞がFアクチン陽性の3次元樹状突起ネットワークを形成していることも観察された(図6E)。また、中心部に散在するアルシアンブルー陽性の未熟軟骨はCOL X陰性であり、膜内骨化が主要な形成機序であることが示唆された。遠位キャップ構造誘導体は近位口腔構造誘導体比

顕著な骨形成能を示し、この特性は複数のiPS細胞クローンで再現された。これらの結果は、第一鰓弓間葉系細胞凝集体から発生学的に忠実な顎骨様オルガノイドを作製可能であることを実証している。

### 4. 考察およびまとめ

本研究では、iPS細胞から顔面部真皮幹細胞を誘導するために、その発生起源となるHOX遺伝子陰性神経堤細胞および第一鰓弓間葉系細胞への新しい誘導方法を開発した。この方法はこれまでの方法と異なり、複数の株で高効率に神経堤細胞を誘導することが可能であった。また、パターンニング因子を調整することで領域特異的な間葉系細胞の誘導に成功し、さらに3次元樹状突起ネットワークを持つ顎骨様オルガノイドの作成にも成功した。

次の課題として、第一鰓弓間葉系細胞から顔面部真皮幹細胞への誘導法の確立が必要である。我々は、予備的実験ではあるが、皮膚線維芽細胞のマーカーを発現し、炎症刺激に応じて皮膚線維芽細胞特有の細胞外マトリクスの発現を上昇するような細胞が間葉系幹細胞から誘導されることを確認している。間葉系細胞と皮膚線維芽細胞の間には顔面部真皮幹細胞が存在すると考えられるため、今後はまず誘導された皮膚線維芽細胞の特性を解析し、その誘導過程を詳細に解析することで、顔面部真皮幹細胞の誘導法を確立することを目指す。

従来、真皮幹細胞は生体内に極めて少数しか存在せず、採取に侵襲を伴うため研究利用には多くの制限が存在する。

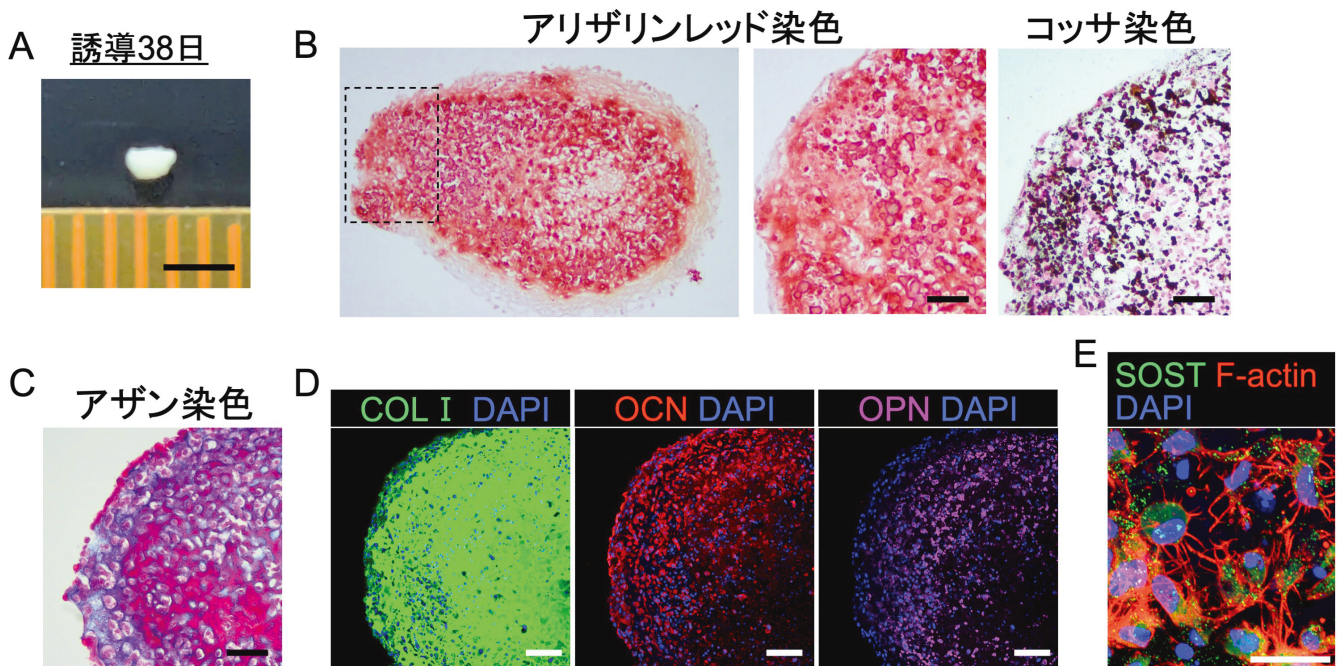


図6 in vitro顎骨様オルガノイドの作成。A. 誘導38日後の外観。B. 切片のアリザニン染色およびコッサ染色。C. 切片のアザン染色。D. 切片のCOL1、OCN、OPNの抗体染色の像。E. SOST、F-actinの抗体染色。Bar : A, 2mm、B-D, 100μm、E, 25μm。

本手法により iPS 細胞から大量の顔面部真皮幹細胞を非侵襲的に調製可能となった場合、コスメトロジー研究に画期的な進展をもたらすことが期待される。一例として、真皮幹細胞の再生能を大規模な in vitro 評価系で検証可能となった場合、新規薬剤の開発効率は飛躍的に向上する。本研究では動物成分を含まないゼノフリー培養系を構築しているため、血清などの不確定な成分を排除した実験系を構築することも大きなメリットと考えられる。またこの点は、細胞移植療法を検討する上でも重要である。さらに別の例としては、iPS 細胞バンクの遺伝的多様性（人種・性別・年齢）を活用することで、肌質の個人差に応じた「パーソナライズドコスメトロジー」研究も将来的に可能となる。また、紫外線応答遺伝子の多型を持つ個体群の細胞を比較することで日焼け耐性メカニズムを解明する研究や、あるいは口唇裂患者由来 iPS 細胞を用いることで真皮-上皮相互作用の異常機序を分子レベルで解明する研究などに活用できる可能性がある。

#### 謝 辞

本研究を力強く推進した本池総太博士に深謝いたします。また、ご支援いただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に心より感謝申し上げます。本成果は 2025 年 4 月 30 日に国際科学誌「*Nature Biomedical Engineering*」に受理されました。

#### (引用文献)

- 1) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25; 126 (4): 663-76.
- 2) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 Nov 30; 131 (5): 861-72.
- 3) Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007 Dec 21; 318 (5858): 1917-20.
- 4) Driskell RR, Watt FM. Understanding fibroblast heterogeneity in the skin. *Trends Cell Biol*. 2015 Feb; 25 (2): 92-9.
- 5) Kamiya D, Takenaka-Ninagawa N, Motoike S, Kajiya M, Akaboshi T, Zhao C, Shibata M, Senda S, Toyooka Y, Sakurai H, Kurihara H, Ikeya M\*. Induction of functional xeno-free MSCs from human iPSCs via a neural crest cell lineage. *NPJ Regen Med*. 2022 Sep 15; 7 (1): 47.

# 小型魚類を活用した皮膚老化機構の解明と抗老化因子の探索

大阪大学微生物病研究所

石谷 太

In this study, we used small fish to elucidate the mechanism of skin aging and to explore for anti-aging factors. Animal tissues, including skin, are constantly exposed to external disturbances such as environmental changes and ultraviolet light, as well as internal disturbances such as replication errors and mutations, resulting in the frequent generation of a variety of pathological cells. However, it is poorly understood how animal tissues respond to the appearance of pathological cells. Therefore, to investigate this, we used zebrafish and mice as models. As a result, we found an immune cell-independent mechanism for eliminating pathological cells. Specifically, we showed that neighboring normal cells sense the appearance of pathological cells using intercellular tension and induce cell death, and that the elimination mechanism is conserved across species. In addition, we also explored the systemic mechanisms of skin aging. In previous skin aging studies, the slow aging rate of mice, a representative experimental model, has been a bottleneck. Therefore, in this study, we used the ultra-short-lived small fish *Nothobranchius furzeri*, which ages the fastest among all vertebrates that can be kept in captivity. We revealed that signals from germ cells suppress the synthesis of activated vitamin D in the liver in males, that this control promotes skin aging, and that administration of activated vitamin D can suppress skin aging. Thus, our research using small fish revealed new mechanisms for maintaining tissue homeostasis and skin aging.

## 1. 緒言

皮膚を若く保つことは、ヒトの健康増進のみならず豊かでアクティブな社会の実現に重要である。そのためには、皮膚の老化機構の解明と抗老化因子の同定は必須である。一方で、in vivoにおける老化機構と老化制御因子を解明するためには「動物を使った実験」が重要であるが、昨今、動物愛護の考え方からマウスなどの哺乳類モデルを使った研究が徐々に困難になってきている。そこで本研究では、新たな in vivo 皮膚老化研究のモデルとして小型魚類であるゼブラフィッシュとターコイズキリフィッシュ（本報告書ではキリフィッシュと略、学名 *Nothobranchius furzeri*）を提案する。これらの新たなモデルを用いた独自のアプローチにより、ヒトの皮膚のアンチエイジングにつながる脊椎動物共通の皮膚老化機構と抗老化因子を明らかにし、コスメトロジーの発展に寄与したい。

## 2. 方法

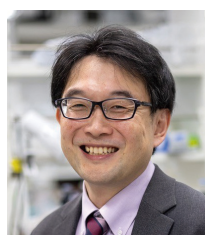
### 2.1. ゼブラフィッシュをモデルとした皮膚老化機構の解明

我々は最近、イメージングに適したモデル脊椎動物を用いた解析により、健康な皮膚組織において病的な細胞が出

現すると、隣接する正常細胞集団がその出現を感知して組織から排除することと、老化細胞が蓄積した皮膚組織ではこの排除機構が破綻することを発見した<sup>1)</sup>。そこで本研究では、この病的細胞排除機構とその破綻を理解することで皮膚老化機構に迫る。

### 2.2. キリフィッシュをモデルとした皮膚老化機構の解明

in vivoの皮膚組織の老化機構を理解するためには、加齢（自然老化）に伴う皮膚組織の機能低下とそれを制御するメカニズムを理解する必要がある。しなしながら、代表的なモデル動物であるマウスはその老化に2～3年の時間を要するため、結果、老化機構の研究に膨大な時間が必要となっている。そこで本研究では、研究室で飼育可能な脊椎動物の中で最短の寿命を持つキリフィッシュに注目する。キリフィッシュは、アフリカの半乾燥地帯に生息する魚であり、卵から孵化して数週間で一気に成体になり、その後3ヶ月程度で急速に老化し、死に至る。このため、短期間で皮膚老化機構を解析できる。また、皮膚の老化を理解するためには血液や他の臓器との連関を無視することはできないが、キリフィッシュは脊椎動物であるため、ヒトとほぼ同様の細胞・臓器を備えており、皮膚老化における臓器間連関も解析可能である。我々は2017年よりキリフィッシュの大規模飼育系・解析系を立ち上げ、独自の老化評価系・ゲノム編集系の構築に成功している<sup>2)</sup>。そこで本研究では、このキリフィッシュの特長を活かした皮膚老化機構の解明と抗老化因子の探索を行う。



Exploring skin aging mechanisms and anti-aging factors using small fish

Tohru Ishitani

Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

### 3. 結果

#### 3. 1. ゼブラフィッシュをモデルとした皮膚老化機構の解明

##### 3. 1. 1. Foxo3を介した細胞競合が病的細胞を排除する

皮膚を含む動物組織は、環境変動や紫外線などの外的攪乱や複製エラーや突然変異などの内的攪乱に常にさらされており、その結果、細胞の分化や増殖を制御するシグナルが破綻した細胞や、代謝が異常な細胞、細胞内小器官に異常が生じた細胞、染色体やDNAに異常が生じた細胞など様々な異常を持つ細胞が頻繁に生じてしまう。組織は、こうした多様な病的細胞に対してどのように対処するのだろうか？ 近年、細胞競合と呼ばれる細胞間コミュニケーションを介した病的細胞の感知・排除機構が注目されている。現在までに、Wntシグナル破綻やShhシグナル破綻、発がんシグナル活性化、リボソーム異常、多能性低下、ミトコンドリア異常を持つ細胞が隣接正常細胞によって感知・排除されることがわかっている。しかしながら、このように多様な異常に対して共通のメカニズムが働いているかはよくわかっていなかった。そこで我々は、トランスクリプトーム解析およびin situ hybridization解析を行い、排除される異常細胞において共通して発現誘導される遺伝子を探した。その結果、ゼブラフィッシュに生じたWntシグナル破綻細胞やShhシグナル破綻細胞、発がんシグナル活性化細胞、リボソーム異常細胞、マウスに生じた多能性低下、ミトコンドリア異常細胞のいずれにおいてもFoxo3遺伝子の発現が上昇することを見出した。重要なことに、Foxo3の発現上昇はこれらの病的細胞が正常細胞に囲まれた時だけに起きた。すなわち、正常細胞とのコミュニケーションの結果としてFoxo3が発現上昇することがわかった。さらに、少なくともWntシグナル破綻細胞とShh

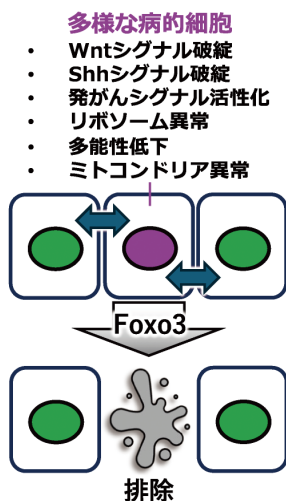


図1 Foxo3を介した細胞競合が病的細胞を排除する

シグナル破綻細胞の排除にFoxo3の発現上昇と活性化が必須であることもわかった。このように、Foxo3が魚類のみならず哺乳類でも働く細胞競合の普遍的制御因子であることがわかった(図1)<sup>3)</sup>。

##### 3. 1. 2. 病的細胞は張力を介して隣接正常細胞に感知される

続いて、隣接正常細胞が病的細胞を感知し、排除する仕組みを詳細に調べた。正常な組織構成細胞は細胞膜に局在する細胞接着因子カドヘリンを使って互いに結合しており、また、各細胞内ではカドヘリンの細胞内ドメインにアクチン-ミオシン系が連結されており、結果として細胞同士が違いを引っ張り合っている。つまり、同種の細胞が存在する組織では、細胞間の引っ張り合う力(張力)はある程度釣り合っている状態となっている(図2上段)。そこで我々はこの細胞間張力に注目し、ゼブラフィッシュをモデルとした細胞イメージング解析を行ったところ、細胞間張力が病的細胞の感知に利用されていることを見出した<sup>3)</sup>。具体的には、正常な細胞集団に病的細胞が出現すると、病的細胞において細胞接着分子カドヘリンの細胞膜局在が変化した結果としてカドヘリンに関連するアクチン-ミオシン系の活性が変化し、隣接細胞との細胞間張力が変動すること、そして、この張力変動が隣接細胞のメカノセンシティブカルシウムチャネルPIEZOを活性化し、隣接細胞内へのCa<sup>2+</sup>イオンの流入を誘導して分泌タンパク質アネキシンA1(Anxa1)の発現を誘導し、分泌されたAnxa1が病的細胞内の転写因子Smadを活性化し、活性化したSmadが活性酸素の生成と細胞死抑制因子Bcl2の分解を引き起こすことで病的細胞に細胞死を誘導することを見出した(図2)<sup>3)</sup>。

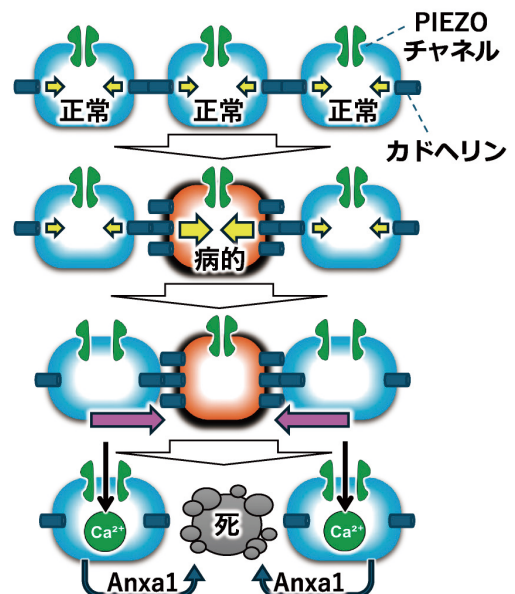


図2 病的細胞は張力を介して感知される

### 3. 2. キリフィッシュをモデルとした皮膚老化機構の解明

#### 3. 2. 1. 老化により傷の治りがおかしくなるメカニズムの解析

傷の修復能力が加齢とともに低下するのはよく知られている。しかし、そのメカニズムはよくわかっていない。そこで、短時間で加齢変化を解析できるキリフィッシュをモデルとした。まず、若齢のキリフィッシュの尾ヒレを切断すると傷が修復され2週間ほどで元の形に戻るが、老齢になると2週間経っても完全には傷が治らないことを確認した(図3)。続いて、創傷治癒を制御するWntシグナルに注目してその動態を解析した。その結果、若齢では創傷後2日後にWntシグナルが強く活性化するが、老齢になるとWntシグナルの活性化が起きにくくなるだけでなく、誤った場所でWntシグナルが活性化し(図4)、結果として、切断前の形に再生しにくくなることがわかった<sup>5)</sup>。つまり、老化により傷の治りがおかしくなるメカニズムの一端を明らかにできた。

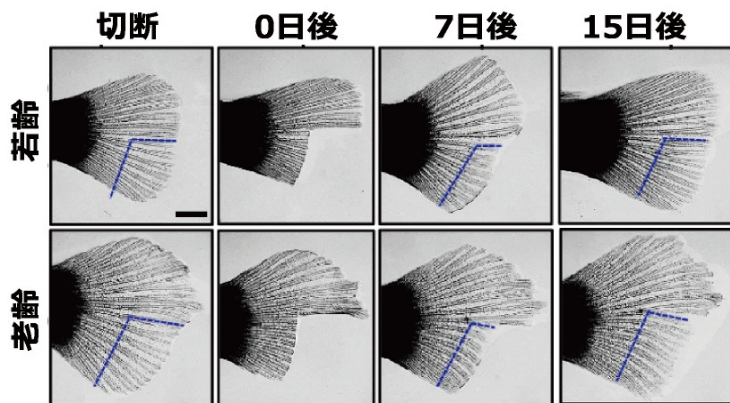


図3 加齢すると尾ヒレの創傷治癒能力が落ちる

#### 3. 2. 2. 生殖細胞とビタミンDによる皮膚の老化制御

線虫などの無脊椎動物において生殖細胞を除去すると寿命が延伸することが知られているが、脊椎動物の寿命・健康寿命と生殖細胞の関係は不明である。そこで、これを検討するために、キリフィッシュをモデルとして使った。まず、キリフィッシュのオスにおいて生殖細胞を除去したところ、寿命が13%延伸した。また、加齢に伴って減少する皮膚のコラーゲン層が、老齢になっても分厚い状態で維持された(図5)。つまり、生殖細胞が寿命・健康寿命を負に制御することがわかった<sup>6)</sup>。続いて、メカニズムを解析したところ、生殖細胞除去により肝臓における活性化ビタ

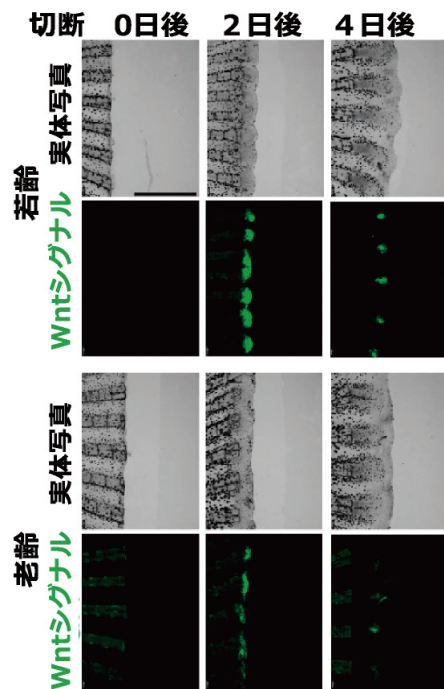


図4 加齢すると創傷治癒時のWntシグナル活性が低下する

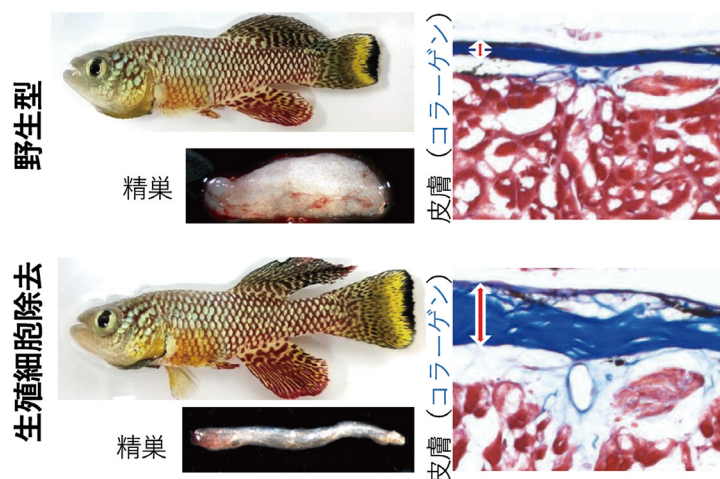
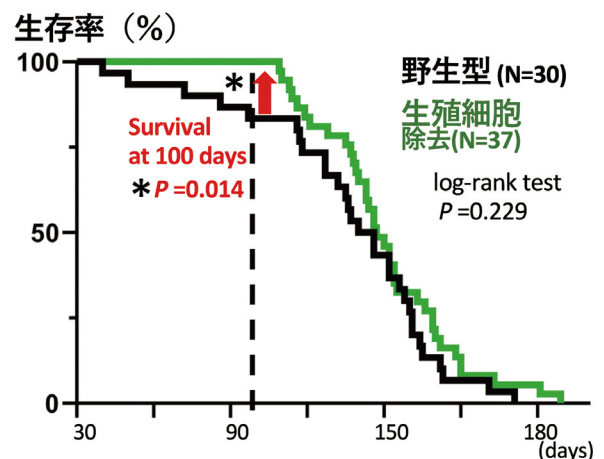


図5 生殖細胞を除去すると皮膚の老化が抑制されるだけでなく、寿命も延伸する



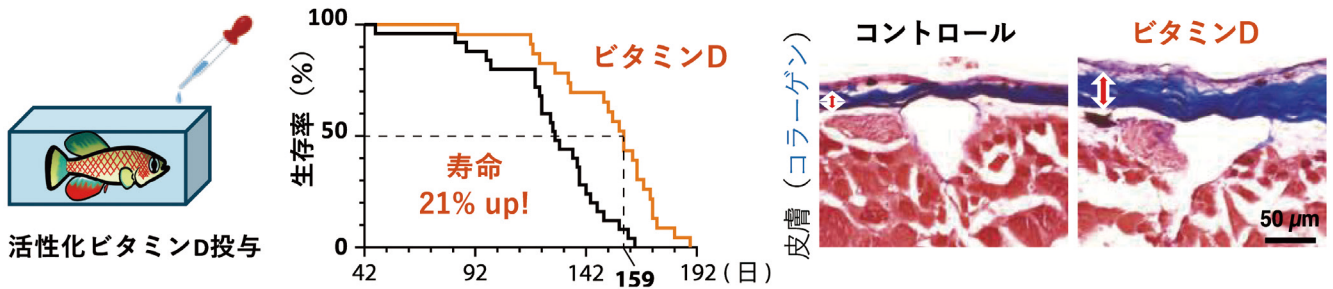


図6 活性化ビタミンDを投与すると、皮膚の老化が延命し、皮膚の老化も抑制される

ミンDの合成と、皮膚を含む多様な臓器でのビタミンDシグナルの標的遺伝子の発現増加が起きること、ビタミンDをキリフィッシュに投与すると寿命が延伸するのみならず、皮膚のコラーゲン層が老齡になっても若い状態で維持されることを発見した(図6)。すなわち、生殖細胞が肝臓での活性化ビタミンD合成を抑制しており、生殖細胞を除去するとビタミンDの合成が活性化して皮膚を含む組織の老化が抑制されることがわかった<sup>6)</sup>。

#### 4. 考 察

ゼブラフィッシュを用いた解析により、皮膚の恒常性維持の理解にも寄与する「病的細胞排除機構」の一端を明らかにすることができた。また、病的細胞排除機構を破綻させる環境ストレスを複数同定しており(未発表)、今後はストレスによって排除機構が破綻するメカニズムとその疾患・老化との関連も明らかにしていきたい。また、キリフィッシュ解析により、生殖細胞からの信号が皮膚を含む全身の老化を促進すること、ビタミンDが脊椎動物の皮膚の老化を防ぎ健康寿命を延伸させることができる抗老化物質であることを突き止めることもできた。ヒトにおいても、生殖組織を除去した男性の寿命が長いことや<sup>7)</sup>、百寿者においてビタミンD受容体遺伝子に多型が検出されることが知られており<sup>8)</sup>、この制御がヒトまで保存されている可能性も期待できる。

#### 5. 総 括

本研究により、魚を起点として皮膚の老化機構・抗老化物質を明らかにしつつある。今後は、これらがヒトでも同様に機能する機構・物質であるか、についても検証を行っていききたい。緒言で言及したように、動物愛護の考え方から動物実験代替法の導入が叫ばれており、マウスなどの哺乳類モデルを使った研究が徐々に困難になってきている。本研究を継続発展させ「魚を使ってヒトの皮膚老化予防の技術シーズを創出する」ことで「魚モデルの皮膚疾患・老化研究、化粧品開発研究における有効性」をアピールし、これにより、この課題を打破し、コスメトロジー発展に寄与したい。

#### (引用文献)

- 1) Haraoka Y, Akieda Y, Nagai Y, Mogi C, Ishitani T. Zebrafish imaging reveals TP53 mutation switching oncogene-induced senescence from suppressor to driver in primary tumorigenesis. *Nat Commun.* 13: 1417, 2022
- 2) Oginuma M, Nishida M, Ohmura-Adachi T, Abe K, Ogamino S, Mogi C, Matsui H, Ishitani T. Rapid reverse genetics systems for *Nothobranchius furzeri*, a suitable model organism to study vertebrate aging. *Sci Rep.* 12 (1): 11628, 2022
- 3) Matsumoto K, Akieda Y, Haraoka Y, Hirono N, Sasaki H, Ishitani T. Foxo3-mediated physiological cell competition ensures robust tissue patterning throughout vertebrate development *Nat Commun.* 15: 10662, 2024
- 4) Aoki K, Higuchi T, Akieda Y, Matsubara K, Ohkawa Y, Ishitani T. Mechano-gradients drive morphogen-noise correction to ensure robust patterning. *Science Adv* 10 (46), 2024
- 5) Ogamino S, Yamamichi M, Sato K, Ishitani T. Dynamics of Wnt/ $\beta$ -catenin reporter activity throughout whole life in a naturally short-lived vertebrate. *npj Aging* 10: 23, 2024
- 6) Abe K, Ino H, Niwa T, Semmy D, Takauchi A, Nishimura T, Mogi C, Uenaka M, Ishii M, Tanaka K, Ohkawa Y, Ishitani T. Sex-dependent regulation of vertebrate somatic growth and aging by germ cells. *Science Adv* 10 (24), 2024
- 7) Min KJ, Lee CK, Park HN. The lifespan of Korean eunuchs. *Curr Biol* 22 (18): R792-3, 2012
- 8) Gussago C, Arosio B, Guerini FR, Ferri E, Costa AS, Casati M, Bollini EM, Ronchetti F, Colombo E, Bernardelli G, Clerici M, Mari D. Impact of vitamin D receptor polymorphisms in centenarians. *Endocrine* 53 (2): 558-64, 2016

# HLA 多型の関わる接触性皮膚炎リスク評価系の基盤構築 についての研究

千葉大学大学院薬学研究院

伊藤 晃成

Allergic contact dermatitis (ACD) induced by cosmetic ingredients varies among individuals, and human leukocyte antigen (HLA) polymorphisms have been implicated in this variability. In the pharmaceutical field, HLA polymorphisms are well known to influence drug hypersensitivity, with HLA-B\*57:01 playing a crucial role in abacavir-induced hypersensitivity reactions. Abacavir binds directly to the peptide-binding groove of HLA-B\*57:01, altering the peptide repertoire and triggering T-cell activation. Similarly, some cosmetic ingredients have been suggested to interact with HLA-B\*57:01, but their ability to induce immune activation through the same mechanism remains unclear.

Our previous studies demonstrated that exposure to abacavir induces HLA-B\*57:01-dependent endoplasmic reticulum (ER) stress responses in keratinocytes, suggesting that ER stress may contribute to skin rash development. To understand the mechanism of HLA-mediated drug-induced hypersensitivity, it is critical to identify the stress factors that trigger ER stress in response to abacavir exposure. Misfolded proteins and aggregates accumulate in the ER, leading to the dissociation of the molecular chaperone BiP from stress sensors such as IRE1 and ATF6, activating the unfolded protein response (UPR).

This study aims to analyze the intracellular localization of HLA-B\*57:01 in keratinocytes exposed to abacavir, its interaction with BiP, and the role of ER stress in immune activation. The findings could provide insights into HLA-associated immune activation and contribute to the development of novel risk assessment methods for ACD caused by cosmetic ingredients. By understanding how HLA-B\*57:01 interacts with specific compounds, this research may facilitate the establishment of personalized safety evaluation strategies, ultimately improving consumer protection against immune-mediated adverse reactions.

## 1. 緒言

化粧品成分による接触性皮膚炎には個人差があり、その一因としてヒト白血球抗原 (HLA) 多型の関与が示唆されている<sup>1)</sup>。医薬品分野では、HLA 多型と薬物過敏症の関連が広く研究されており、特に HLA-B\*57:01 は抗 HIV 薬アバカビルによる過敏症発症に重要な役割を果たすことが明らかになっている<sup>2)</sup>。アバカビルは HLA-B\*57:01 のペプチド提示溝に直接結合し、提示されるペプチドの種類を変えることで T 細胞を活性化すると考えられている<sup>3)</sup>。一方、化粧品成分についても、in silico ならびに in vitro の実験から HLA-B\*57:01 との相互作用が示唆されているものがあるが<sup>4)</sup>、これらがアバカビルと同様の機序で HLA-B\*57:01 を介した免疫活性化を引き起こすかは不明である。

我々のこれまでの研究により、アバカビルを曝露したケラチノサイトでは HLA-B\*57:01 依存的な小胞体ストレス応答が認められており、小胞体ストレスが皮膚発症に関与する可能性が示唆されている。HLA を介した薬疹発症の機序を解明するには、HLA-B\*57:01 依存的にアバカビル

が誘導する小胞体ストレスのストレッサーとなる因子を特定することが重要である。一般に、小胞体ストレスはタンパク質のミスフォールディングや凝集によって引き起こされる。小胞体内にミスフォールドタンパク質が蓄積すると、免疫グロブリン重鎖結合タンパク質 (BiP) は小胞体ストレスセンサーである Inositol Requiring 1 (IRE1) や Activating Transcription Factor 6 (ATF6) から解離し、ミスフォールドタンパク質に結合する。BiP が解離すると、IRE1 はリン酸化されて転写因子 XBP1 を活性化し、ATF6 はゴルジ体へ移行して切断され、N 末端の断片が転写因子として核へ移行することで小胞体ストレス応答が惹起される。

アバカビル過敏症の発症機序は、HLA 上のペプチドレパートリー変化を T 細胞が異物として認識することで説明されてきた。一方で、HLA-B\*57:01 に加え、タンパク質のフォールディングやペプチドの搭載をサポートする Heat Shock Protein (HSP) 70-Hom や Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase (ERAP) 1 の遺伝子多型もアバカビル過敏症に関連することが、ゲノムワイド関連解析で示されている。これらの知見から、HLA 複合体の形成やフォールディングに関与する細胞内因子が、アバカビル過敏症の発症に影響を与えている可能性が示唆される。実際に我々は、HLA-B\*57:01 を発現した細胞にアバカビルを曝露すると、 $\beta_2$ microglobulin ( $\beta_2m$ ) やペプチドと適切な三量体を形成していない異常な構造の HLA が増加することを確認している<sup>5)</sup>。これにより、アバカビルが HLA 複合体の細胞内組み立て過程に影響を与えている可能性が示



Establishment of a Foundational Risk Assessment Model for HLA-Associated Allergic Contact Dermatitis

Kousei Ito

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

唆される。

HLA-B\*57:01 の細胞内挙動に注目することは、アバカビル過敏症の発症機序の理解だけでなく、HLA を介した免疫系の活性化に関する新たな知見をもたらす可能性がある。また、化粧品成分による接触性皮膚炎の発症機序の解明にも寄与すると考えられる。特に、化粧品成分が HLA-B\*57:01 を介してどのように免疫活性化を引き起こすのかを明らかにすることで、HLA 多型を考慮した新たな評価法の開発につながる可能性がある。

本研究では、HLA-B\*57:01 を発現するケラチノサイトにアバカビルを曝露した際の HLA の細胞内局在、HLA と BiP の結合、および細胞内でのアバカビルと HLA の相互作用について解析し、小胞体ストレスが生じる機序を探索することを目的とした。

## 2. 方法

### 2.1. 初代ケラチノサイトの単離と各種化合物曝露時の HLA と BiP の結合変化評価

生後 1 - 2 日の B\*57:01 あるいは B\*57:03 多型導入マウスから皮膚組織を回収し、抗生物質と 5 mg/mL dispase (Wako Pure Chemical; Osaka, Japan) 入りの CnT-PR 培地 (CELLnTEC ; Bern, Switzerland) 中で 4°C で 15-18 時間インキュベーションした。真皮と表皮を分離して表皮のみを回収した後、accutase を用いて表皮からケラチノサイトを単離した。ケラチノサイトを抗生物質入り CnT-PR 培地に懸濁し、コラーゲンコートした 12 ウェルプレート (Greiner Bio-One, GmbH, Germany) に  $3 \times 10^5$  cells/well で播種した。12-16 時間後に培地交換を行い、培養 6 日目に CnT-PR に溶解したアバカビル 100  $\mu$ M を曝露した。細胞を可溶化して HLA を Flag タグで免疫沈降し、共沈した BiP をウェスタンブロットで検出した。

### 2.2. 免疫染色

細胞を 4% PFA で固定 (4°C, 15 分間) した。続いて、0.01% Triton X-100/PBS で透過処理 (4°C, 15 分間) し、1% BSA/PBS でブロッキング (室温, 30 分間) した。マウス抗 FLAG mAb およびウサギ抗カルネキシン pAb と反応 (室温, 1 時間; 1% BSA/PBS で希釈) させ、続いて Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG 抗体および Alexa Fluor 546 標識抗ウサギ IgG 抗体と反応 (室温, 1 時間; 1% BSA/PBS で希釈) させた。RNaseA を加えて細胞内 RNA を消化し、TO-PRO-3 を加えて核を染色し、Fluorescent Mounting Medium で封入した。染色した細胞は、共焦点レーザー顕微鏡 Zeiss LSM 700 (Airyscan および ZEN ソフトウェアを搭載; Carl Zeiss 社製) を用いて観察した。

## 3. 結果

### 3.1. アバカビル曝露時の HLA の細胞内局在の変化の評価

アバカビルが HLA の細胞内局在に与える影響を評価した結果、B\*57:01-KC においてアバカビル曝露後に HLA の細胞内凝集体が顕著に観察された (図 1a, b)。一方、B\*57:03-KC では、アバカビル曝露の有無にかかわらず HLA の細胞内凝集体の形成はほとんど認められなかった (図 1a, b)。さらに、アバカビル曝露による HLA-B\*57:01 の細胞内凝集体の形成は、4-フェニル酪酸による前処理によって抑制された (図 1a)。

また、HLA などの糖鎖付加を阻害し、小胞体内でミスフォールドタンパク質の発現を促進するツニカマイシンを曝露すると、HLA の多型に依存せずケラチノサイトで HLA の細胞内凝集体が形成されることも確認している (data not shown)。この結果は、HLA の細胞内凝集体が、小胞体内でのミスフォールドに起因する可能性を示唆している。

次に、細胞内の HLA-B\*57:01 の局在を解析したところ、小胞体内の分子シャペロンであるカルネキシンおよび BiP と共局在していることが確認され、HLA-B\*57:01 が主に小胞体に局在することが示唆された (図 1c, d)。しかし、HLA の細胞内凝集体の多くはカルネキシンや BiP とは共局在していなかった (図 1c, d)。HLA は通常、重鎖と  $\beta_2$ m が会合した複合体を形成することから、HLA の凝集体に  $\beta_2$ m が含まれるか調べた。その結果、HLA-B\*57:01 重鎖の多くは  $\beta_2$ m と共局在した一方で、凝集体部分には  $\beta_2$ m の染色がほとんど認められなかった (図 1e)。さらに、アバカビル曝露後の B\*57:01-KC では、ATF6 の細胞内凝集体が観察され、この凝集体が HLA-B\*57:01 と共局在することも確認された (図 1f)。

### 3.2. アバカビル曝露時の HLA のミスフォールディングの評価

細胞可溶化液中の HLA を免疫沈降したところ、アバカビル曝露を受けた B\*57:01-KC では、コントロールと比較して BiP の結合量が増加していた (図 1g)。BiP は小胞体内のミスフォールドタンパクと結合する分子シャペロンであることから<sup>6,7)</sup>、この結果は、アバカビル曝露により HLA-B\*57:01 が小胞体内でミスフォールドした可能性を示唆している。一方、B\*57:03-KC では、アバカビル曝露後も HLA と BiP の結合亢進は認められなかった (図 1g)。同様の実験を HLA-Tg マウス由来の肝細胞に対して行った結果、B\*57:01-Tg 由来の肝細胞では、アバカビル曝露による HLA と BiP の結合亢進は観察されなかった (data not shown)。

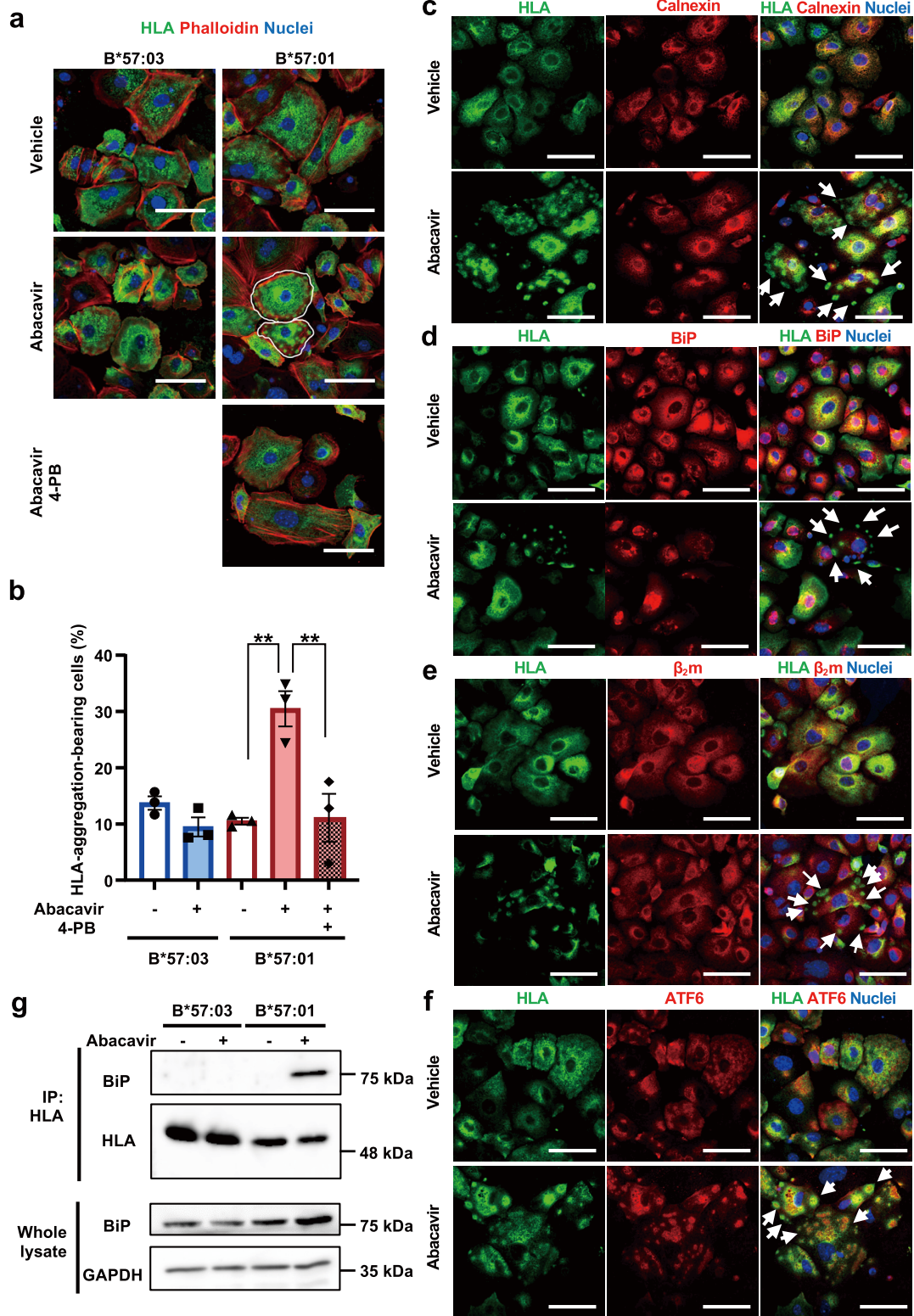


図1 アバカビルはケラチノサイトにおいてHLA-B\*57:01のミスフォールディングと凝集を誘導する

(a) HLA-B\*57:01多型導入マウス由来のケラチノサイト (B\*57:01-KC) およびHLA-B\*57:03多型導入マウス由来のケラチノサイト (B\*57:03-KC) をアバカビル (100 $\mu$ M) の有無で30分間処理した後に固定し、HLAをFLAGタグで検出した。スケールバーは50 $\mu$ m。

(b) 各実験で210~396個の細胞を観察し、図a中の白線で示すような凝集を示す細胞を計数した。c, d, e, f) B\*57:01-KCにおけるHLAと各種タンパク質の共染色。a)と同様の条件で細胞を処理したのち、抗カルネキシン (c)、抗BiP (d)、抗 $\beta_2m$  (e)、または抗ATF6 (f)抗体で染色した。さらに、抗FLAG抗体およびTO-PRO-3で染色した。矢印はFLAGタグ付きタンパク質 (HLAに相当) の凝集体を示している。スケールバーは50 $\mu$ m。g) B\*57:03-KCおよびB\*57:01-KCにアバカビル (100 $\mu$ M) 有無で30分間曝露した後に細胞を可溶化し、抗FLAG抗体でHLAを回収した後に抗BiP抗体および抗FLAG抗体で検出した。GAPDHはローディングコントロール。

## 4. 考察

ケラチノサイトにおいて、HLA 多型依存的にアバカビルが小胞体ストレス応答を誘導することが明らかとなった。小胞体ストレスは通常、タンパク質のミスフォールディングや凝集によって引き起こされる<sup>8)</sup>。アバカビル曝露後、一部のHLA-B\*57:01が細胞内で凝集体を形成し、それらには $\beta_2m$ が共局在していないことが確認された。この結果は、正常なHLA複合体の形成が阻害されていることを示唆している。さらに、ATF6の染色結果から、 $\beta_2m$ と会合していないHLAがATF6を巻き込んで凝集した可能性も考えられる。免疫沈降の結果、HLA-B\*57:01とBiPの結合が亢進しており、小胞体内でのHLAのミスフォールディングが小胞体ストレスの一因となっていることが示された。また、アバカビル存在下では、HLAがATF6とともに小胞体から出芽し、細胞内で凝集体を形成することが示唆された。小胞体から出芽したATF6が細胞内で凝集すると、ATF6シグナル伝達が阻害され、小胞体ストレスがさらに亢進する可能性がある<sup>9, 10)</sup>。しかし、この凝集体の形成メカニズムは未解明の部分が多く、詳細な解析が今後の課題となる。

HLAの成熟過程に直接的または間接的に関与する遺伝的背景が薬疹の発症に関連することが報告されている。HSP70およびプロテアソームサブユニットの変異は、薬物誘発性Stevens-Johnson症候群/中毒性表皮壊死症(SJS/TEN)の発症と関連し<sup>11, 12)</sup>、分子シャペロンHSP70-Homの変異はアバカビル過敏症と関係する<sup>13)</sup>。また、HLAに搭載される抗原ペプチドの最終プロセシング酵素であるERAP1の遺伝子変異はHLA-B\*57:01保因者におけるアバカビル過敏症と<sup>14)</sup>、ERAP2の遺伝子変異はHLA-C\*04:01保因者におけるネビラピン誘発性SJS/TENと<sup>15)</sup>関連している。これらの遺伝子はHLA複合体の安定性に関与し、その変異が薬剤誘発性のミスフォールディングを引き起こし、小胞体ストレスの亢進に寄与する可能性が指摘されている<sup>16-19)</sup>。

我々は、薬物過敏症に関連するHLA多型ではHLA重鎖と $\beta_2m$ の親和性が低く、小胞体内に蓄積しやすいことを報告している<sup>5)</sup>。これは、小胞体内でのHLAのミスフォールディングや薬物による小胞体ストレス応答が薬疹の発症に関与する可能性を示唆している。HLA複合体の安定性に影響を与える因子を明らかにすることは、HLAを介した薬物誘発性小胞体ストレス応答の解明のみならず、毒性の個人差、細胞種間の違い、組織間の特性を理解する上でも重要である。

アバカビル曝露によるHLA-B\*57:01の凝集体形成やBiPとの結合量の変化は、HLAを発現する細胞の由来組織によって異なる可能性も示唆されている。具体的には、ケ

ラチノサイトではHLA-B\*57:01とBiPの結合はアバカビル曝露により亢進したが(図1g)、同じくB\*57:01多型導入マウスから単離した初代肝細胞ではそのような変化は認められなかった(data not shown)。HLAの凝集体形成に組織差が生じる機序は現時点で不明だが、小胞体での成熟速度の違いが関与する可能性が考えられる。HLA複合体の組み立てと構造安定性は、Transporter Associated with Antigen Processing (TAP) 1、Tapasin、TAP-Binding Protein-Related (TAPBPR)などのPeptide Loading Complex (PLC)を構成するタンパク質に依存している。PLCを構成するタンパク質の発現レベルは組織や細胞種ごとに異なり、例えば、Tapasin、TAPBPR、ERAP1を含むタンパク質の発現量は、肝細胞に比べてケラチノサイトでは低いことが示唆されている(Human Protein Atlas, <https://www.proteinatlas.org/>)。この発現の違いがHLA複合体の組み立てに影響を与えている可能性がある。

アバカビルのようにHLAのペプチド結合溝にはまり込み、HLAと強く結合する化合物の報告は限られている。Schutteらは、皮膚刺激性が知られる22種類の化粧品成分を対象に、各種HLA多型とのドッキングシミュレーションを実施し、安息香酸ベンジル、サリチル酸ベンジル、桂皮酸ベンジルがHLA-B\*57:01と結合する可能性を見出した<sup>4)</sup>。さらに、これら3化合物についてHLA-B\*57:01保有者の末梢血単核球を用いたT細胞活性化試験を行い、サリチル酸ベンジルがリンパ球の増殖やサイトカイン産生を亢進させることが確認されている。しかし、これらの化合物がアバカビルと同様にHLA-B\*57:01に直接結合し、提示ペプチドを変化させるのか、また、本研究で観察されたような小胞体ストレス応答を引き起こすのかについては明らかではなく、今後の検討が必要である。

## 5. 総括

HLA-B\*57:01依存的なアバカビル曝露による小胞体ストレス応答がケラチノサイトで顕著に観察され、HLAのミスフォールディングとBiPとの結合亢進が確認された。本知見を活用することで、HLA多型に基づく化粧品成分の影響評価が可能となり、安全性評価の高度化に寄与することが期待される。

## 謝辞

本研究の一部は、PNAS Nexus, Volume 3, Issue 4, April 2024, pgae 140にて報告した。本研究の遂行に当たり、多大なご支援をいただきました公益財団法人コーセー化粧品研究財団に深く御礼申し上げます。本研究の実施にあたり多大な貢献をいただいた風岡顯良博士、青木重樹准教授をはじめとする研究室の現役ならびにOB/OGメンバーに深く感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Sieben S, Hertl M, Al Masaoudi T, Merk HF and Blömeke B: Characterization of T Cell Responses to Fragrances. *Toxicol Appl Pharmacol* 172: 172-178, 2001.
- 2) Mallal S, Nolan D, Witt C, *et al.*: Association between presence of HLA-B\*5701, HLA-DR7, and HLA-DQ3 and hypersensitivity to HIV-1 reverse-transcriptase inhibitor abacavir.
- 3) Illing PT, Vivian JP, Dudek NL, *et al.*: Immune self-reactivity triggered by drug-modified HLA-peptide repertoire. *Nature* 486: 554-558, 2012.
- 4) Schutte RJ, Zhang X, An N, Ostrov DA and Vukmanović S: Molecular docking predictions of fragrance binding to human leukocyte antigen molecules. *Contact Dermatitis* 81: 174-183, 2019.
- 5) Shirayanagi T, Kazaoka A, Watanabe K, *et al.*: Weak complex formation of adverse drug reaction-associated HLAB57, B58, and B15 molecules. *Toxicol In Vitro* 82: 105383, 2022.
- 6) Accili D, Kadowaki T, Kadowaki H, Mosthaf L, Ullrich A and Taylor SI: Immunoglobulin heavy chain-binding protein binds to misfolded mutant insulin receptors with mutations in the extracellular domain. *J Biol Chem* 267: 586-590, 1992.
- 7) Hurtley SM, Bole DG, Hoover-Litty H, Helenius A and Copeland CS: Interactions of misfolded influenza virus hemagglutinin with binding protein (BiP). *J Cell Biol* 108: 2117-2126, 1989.
- 8) Hibino M, Sugiura K, Muro Y, Shimoyama Y and Tomita Y: Cyclosporin A induces the unfolded protein response in keratinocytes | *Archives of Dermatological Research*. *Arch Dermatol Res* 303: 481-489, 2011.
- 9) Amodio G, Venditti R, De Matteis MA, Moltedo O, Pignataro P and Remondelli P: Endoplasmic Reticulum stress reduces COPII vesicle formation and modifies Sec23a cycling at ERESs. *FEBS Lett* 587: 3261-3266, 2013.
- 10) Credle JJ, Forcelli PA, Delannoy M, *et al.*:  $\alpha$ -Synuclein-mediated inhibition of ATF6 processing into COPII vesicles disrupts UPR signaling in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 76: 112-125, 2015.
- 11) Alfirevic A and Pirmohamed M: Predictive Genetic Testing for Drug-Induced Liver Injury: Considerations of Clinical Utility. *Clin Pharmacol Ther* 92: 376-380, 2012.
- 12) Nicoletti P, Bansal M, Lefebvre C, *et al.*: ABC Transporters and the Proteasome Complex Are Implicated in Susceptibility to Stevens-Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis across Multiple Drugs. *PLOS ONE* 10: e0131038, 2015.
- 13) Martin AM, Nolan D, Gaudieri S, *et al.*: Predisposition to abacavir hypersensitivity conferred by HLA-B\*5701 and a haplotypic Hsp70-Hom variant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4180-4185, 2004.
- 14) Pavlos R, Deshpande P, Chopra A, *et al.*: New genetic predictors for abacavir tolerance in HLA-B\*57:01 positive individuals. *Hum Immunol* 81: 300-304, 2020.
- 15) Carr DF, Bourgeois S, Chaponda M, *et al.*: Genome-wide association study of nevirapine hypersensitivity in a sub-Saharan African HIV-infected population. *J Antimicrob Chemother*: dkw545, 2017.
- 16) Hammer GE, Gonzalez F, Champsaur M, Cado D and Shastri N: The aminopeptidase ERAAP shapes the peptide repertoire displayed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nat Immunol* 7: 103-112, 2006.
- 17) Kim I, Kim JH, Rhee JY, *et al.*: Patient HSP70-hom TG haplotype is associated with decreased transplant-related mortality and improved survival after sibling HLA-matched hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Transplant* 24: 459-466, 2010.
- 18) Tran TM, Gill T, Bennett J, *et al.*: Paradoxical Effects of Endoplasmic Reticulum Aminopeptidase 1 Deficiency on HLA-B27 and Its Role as an Epistatic Modifier in Experimental Spondyloarthritis. *Arthritis Rheumatol* 75: 220-231, 2023.
- 19) Vitulano C, Tedeschi V, Paladini F, Sorrentino R and Fiorillo MT: The interplay between HLA-B27 and ERAP1/ERAP2 aminopeptidases: from anti-viral protection to spondyloarthritis. *Clin Exp Immunol* 190: 281-290, 2017.

# メラニン合成関連酵素のパルミトイル化による可逆性の皮膚色制御

神戸大学バイオシグナル総合研究センター分子薬理研究分野

上山 健彦

Palmitoylation is a lipid modification involving the attachment of palmitic acid to a cysteine residue, thereby affecting protein function. We investigated the effect of palmitoylation of tyrosinase, the rate-limiting enzyme in melanin synthesis, using a human 3-D skin model system and melanocyte culture. The palmitoylation inhibitor, 2-bromopalmitate (2-BP), increased melanin content and tyrosinase protein levels in melanogenic cells by suppressing tyrosinase degradation. The palmitoylation site was Cys<sup>500</sup> in the C-terminal cytoplasmic tail of tyrosinase. The non-palmitoylatable mutant, tyrosinase (C500A), was slowly degraded and less ubiquitinated than wild-type tyrosinase. Screening for the DHHC (Asp-His-His-Cys) family of proteins for tyrosinase palmitoylation suggested that DHHC2, 3, 7, and 15 are involved in tyrosinase palmitoylation. Knockdown of DHHC2, 3, or 15 increased tyrosinase protein levels and melanin content. Taken together, tyrosinase palmitoylation at Cys<sup>500</sup> by DHHC2, 3, and/or 15 regulate melanogenesis by modulating tyrosinase protein levels. Additionally, we developed a facile auto-S-palmitoylation assay for DHHC activation using NBD-palmitoyl-CoA. This assay elucidates the effect of DHHC posttranslational modification and disease-related point mutations on DHHC activation.

## 1. 緒言

パルミトイル化修飾は、脂質であるパルミチン酸が蛋白質のシステイン残基のチオール基に付加される可逆的な翻訳後修飾で、修飾を受けた蛋白質は疎水性が上昇し、細胞膜や細胞内小器官膜への親和性が上がる。これまでに2000以上の蛋白質がこの修飾を受けることが知られており、この修飾機構の破綻は神経疾患や免疫疾患、加えて、様々な癌と関連することが報告されており、ここ数年の論文数の上昇は顕著である。ヒトで3種存在するメラニン合成の律速酵素である tyrosinase, tyrosinase related protein 1 (Tyrp1), and Tyrp2 のパルミトイル化酵素 DHHC によるパルミトイル化が、これらメラニン合成酵素の発現量を調整(増減)し、メラニン合成量を可逆的に調節しているのではないかと予測した。本研究では、以下の目標達成により、メラニン合成酵素のパルミトイル化を標的とした、新たなメラニン産生制御法の確立に挑んだ。

- ①メラニン産生律速酵素 (tyrosinase, Tyrp1, Tyrp2) のパルミトイル化修飾部位特定
- ②パルミトイル化修飾がメラニン産生酵素の発現調節をする機序の解明
- ③UVや $\alpha$ MSH等の生理的刺激によるメラニン産生酵素のパルミトイル化の証明
- ④パルミトイル化酵素の自己パルミトイル化を簡便に安価



Reversible skin color control by palmitoylation of melanin synthesis-related enzymes

Takehiko Ueyama

Laboratory of Molecular Pharmacology, Biosignal Research Center, Kobe University

で検知できるアッセイ法開発

## 2. 方法

### 2.1. メラニン産生律速酵素 (tyrosinase, Tyrp1, Tyrp2) のパルミトイル化修飾部位特定

まず、ヒト表皮3次元培養モデル(ケラチノサイトとメラノサイトの両方を含む)にパルミトイル化阻害剤 2-bromopalmitate (2-BP) を処置して、皮膚色を観察した。Palmitoylation sites prediction ソフト (CSS-Palm 4.0) と蛋白質立体構造予測ソフト (CueMol 2.0) を用いて、パルミトイル化を受けるシステイン残基 (C, Cys) を予測した。パルミトイル化蛋白質は、Acyl-RAC (resin-assisted capture of fatty-acylated proteins) 法により検知した<sup>1)</sup>。Tyrosinase のパルミトイル化部位は、Halo タグ標識した野生型と予測 Cys をアラニン (A, Ala) に変換した変異型 tyrosinase を発現するプラスミドを作製し、メラノーマ不死化細胞 (MNT-1) に発現させ、回収蛋白質を用いて Acyl-RAC 法により特定した。

### 2.2. パルミトイル化修飾がメラニン産生酵素の発現調節をする機序の解明

Tyrosinase の分解速度 (半減期) 測定は、cycloheximide (CHX) を用いた。HA 標識した野生型と C500A 変異型 tyrosinase をメラノーマ不死化細胞 (HM3KO) に強制発現した後、CHX を処置 (0.5~4 時間) して HA 抗体を用いて免疫プロットングした。また、HM3KO 細胞における内在性の tyrosinase の分解速度の測定を、CHX と 2-BP を用いて同様に行った。

Tyrosinase のユビキチン化は、FLAG 標識した野生型と C500A 変異型 tyrosinase を HA 標識したユビキチン (HA-Ub) と共に HM3KO 細胞に強制発現して、FLAG 抗体で免

疫沈降後、HA抗体を用いた免疫プロットングにて解析した。

### 2. 3. UVや $\alpha$ MSH等の生理的刺激によるメラニン産生酵素のパルミトイル化の証明

メラノーマ不死化細胞 (HM3KO) を  $10\text{mJ}/\text{cm}^2$  UV と  $1\mu\text{M}$   $\alpha$ MSH で刺激後、経時的に細胞を回収し、Acyl-RAC法及びメラニン含有量測定により (見た目のペレットの黒さも)、上記の刺激とパルミトイル化、皮膚色との関連を明らかにした。

### 2. 4. パルミトイル化酵素の自己パルミトイル化を簡便に検知できるアッセイ法開発

蛍光色素NBD (nitrobenzodiazole) を標識した palmitoyl-CoA (NBD-palmitoyl-CoA) を用いた<sup>2)</sup>。

## 3. 結果

まず、ヒト表皮3次元初代培養モデルをパルミトイル化阻害剤 2-bromopalmitate (2-BP) 処置すると、コントロールと比較し処置群では、黒化が進むことが分かった (図1A)。そこで、tyrosinase がパルミトイル化されるかどうかを調べるため、メラノーマ細胞株 (HM3KO) と Acyl-RACアッセイを行うと、tyrosinase はパルミトイル化され、2-BPで抑制されることが分かった (図1B)。次に、tyrosinaseのC8, C35, C500 (C末端に近い細胞質内領域に存在) に着目して、パルミトイル化されない変異体 (Cys  $\rightarrow$  Ala 変異体) C8A, C35A, C500A を作製してMNT-1細胞に発現後、Acyl-RACアッセイを行い、C500が唯一のパルミトイル化部位であると同定した (図1C)。

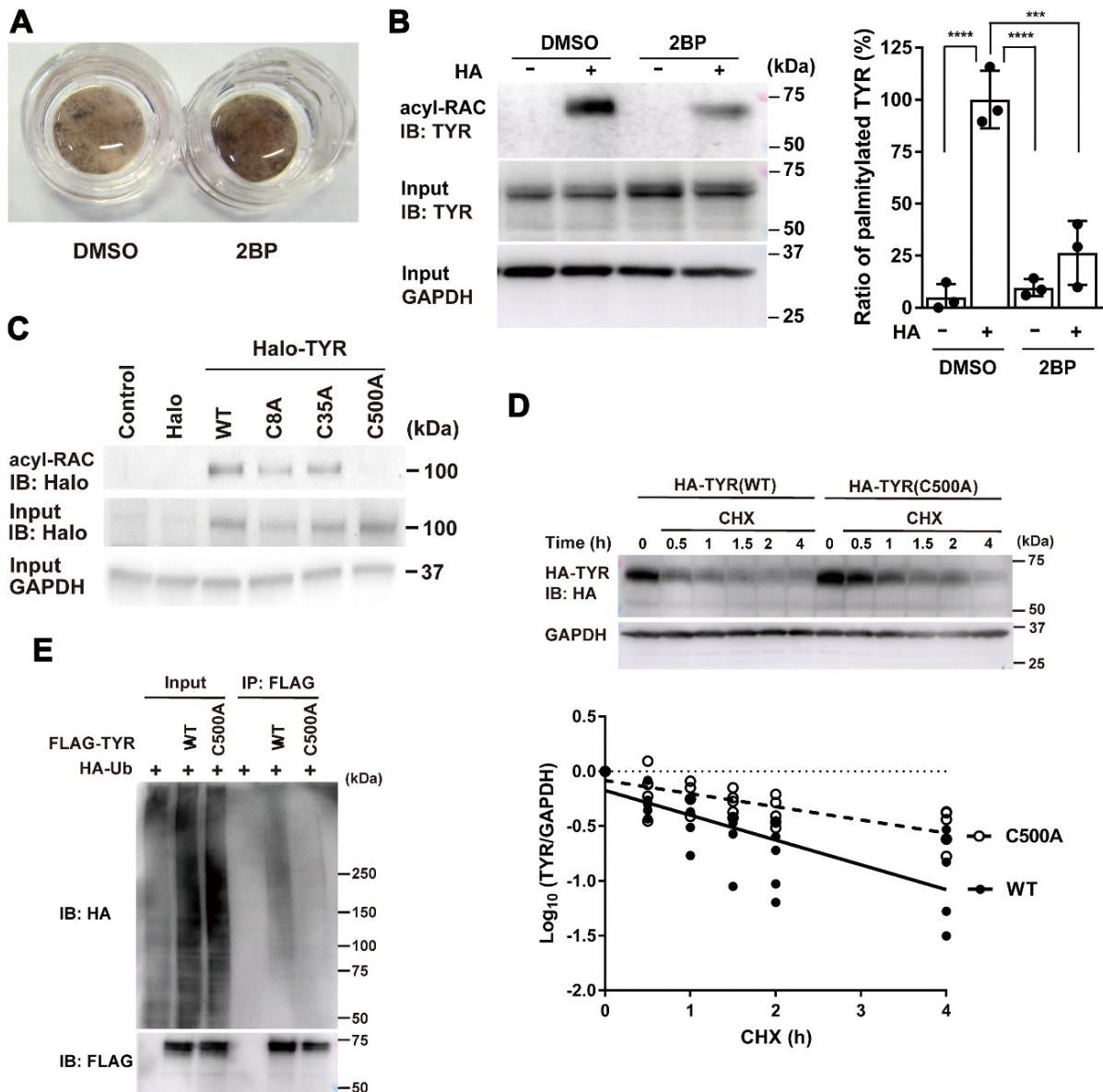


図1 Tyrosinaseのパルミトイル化に続くユビキチン化による発現制御

パルミトイル化によるtyrosinaseの機能変化を調べるため、cycloheximide (CHX) を用いてtyrosinaseの分解速度(半減期)を調べた。C500A変異体の分解速度は、野生型に比べて著明に遅くなっており(図1D)、2-BP処置によりHM3KO細胞の内在性tyrosinaseの分解速度も著明に遅くなっていた。即ち、パルミトイル化によりtyrosinaseの分解が促進されることが明らかになった。

以前に我々は、tyrosinaseがユビキチン化により分解されることを報告している<sup>3)</sup>、FLAG標識した野生型とC500A変異体tyrosinaseをHA標識したUbと共にHM3KO細胞に発現させて、ユビキチン化を定量すると、C500A変異体では明らかに低下することが分かった(図1E)。まとめると、tyrosinaseはパルミトイル化されると、ユビキチン化が促進され、tyrosinaseの分解が促進されることが明らかとなった。即ち、2-BPによるtyrosinaseパルミトイル化の阻害は、tyrosinase分解が低下(tyrosinaseが増加)し、メラノサイトでのメラニン産生量が増加し、皮膚が黒化することを明らかにした。

続いて、ヒトで23種存在するパルミトイル化修飾酵素DHHCの中で、tyrosinaseのパルミトイル化修飾に関わるDHHCのスクリーニング(HEK293細胞にDHHCとHA標識したtyrosinaseを過剰発現させ、<sup>3</sup>H-Palmitateで4時間ラベル後、<sup>3</sup>H-Palmitateでラベルされたtyrosinaseを検出する系)を行い、候補としてDHHC3, 15, 7を同定した(図2A)。DHHC15と同じサブファミリーに属するDHHC2を加えた4種(DHHC2, 15, 3, 7)のメラノサイト細胞(HM3KO)の安定過剰発現株の作製(図2B)及びノック

ダウン(図2C)により、DHHC2, 15, 3がそれぞれメラニン産生量の低下と上昇に関与することを明らかにした。

一方、上記の実験中に、簡便で低コストなパルミトイル化検知法が開発できないかを模索した。パルミトイル化修飾酵素DHHC群は、細胞内でパルミトイル-CoAを用いて、活性中心部位に存在するシステイン残基を自己パルミトイル化し、続いて基質蛋白質のシステイン残基にパルミトイル基を転移する。DHHC酵素の活性状態は、自己パルミトイル化されたDHHC酵素を検出することでモニターできるが、これまでの手法では膜貫通蛋白質であるDHHC酵素を多量に精製する必要があったことから、DHHC酵素の大半で未解析のままであった。今回我々は、HA標識した野生型もしくは変異型DHHCをHEK293細胞に過剰発現させ、HEK293細胞の膜画分を調整し、蛍光色素NBD標識palmitoyl-CoAを加え、SDS-PAGE後に蛍光イメージングする(図3)ことにより、NBD-palmitoyl-CoAで標識される自己パルミトイル化されたDHHC酵素を検知できることが分かった。この方法を用いれば、DHHC酵素の異常によって起こる疾患(具体的には、種々の癌で発見されたDHHCの変異体)が、自己パルミトイル化障害に起因するものか、DHHCがパルミトイル化する基質蛋白質との結合変化・障害などによるものかを、簡便に区別することができる<sup>2)</sup>。

#### 4. 考察

本研究により、メラニン合成律速酵素の1つであるtyrosinaseの発現量がパルミトイル化により可逆的に調整

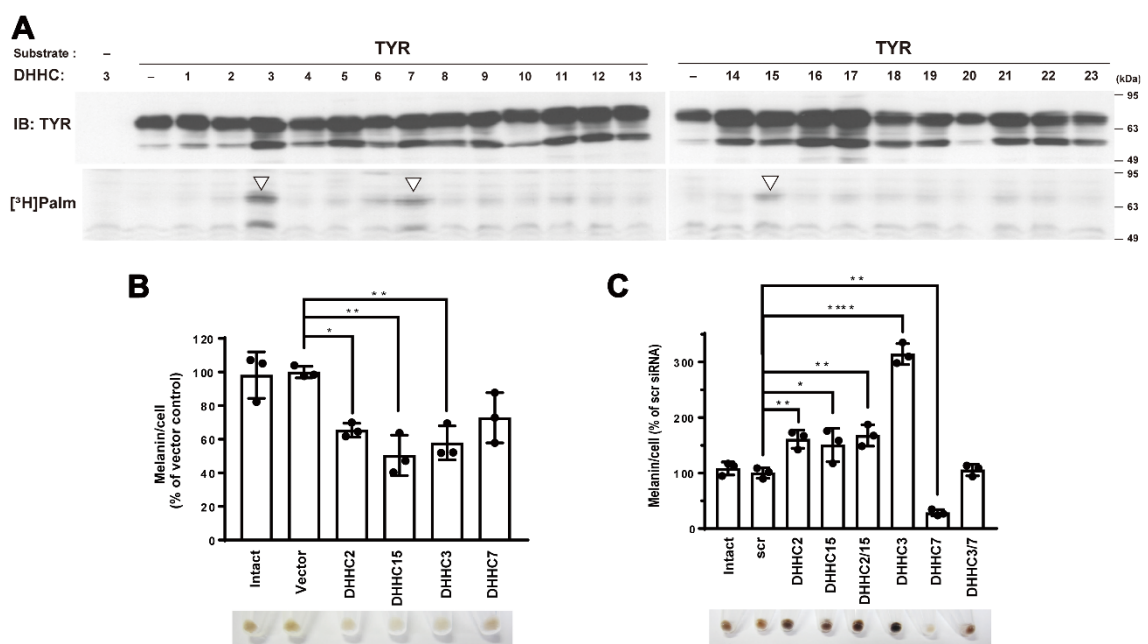


図2 Tyrosinaseをパルミトイル化する酵素DHHC2, 15, 3(A: スクリーニング, B: 過剰発現細胞, C: ノックダウン細胞)

Assay of activation of the zDHHC palmitoyl transferases

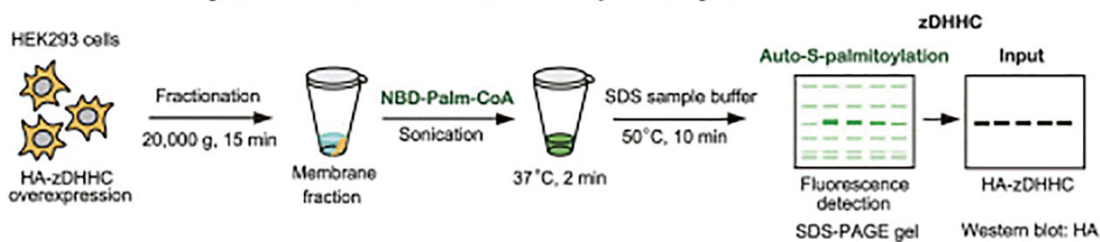


図3 簡便で低コストな自己パルミトイル化検知法

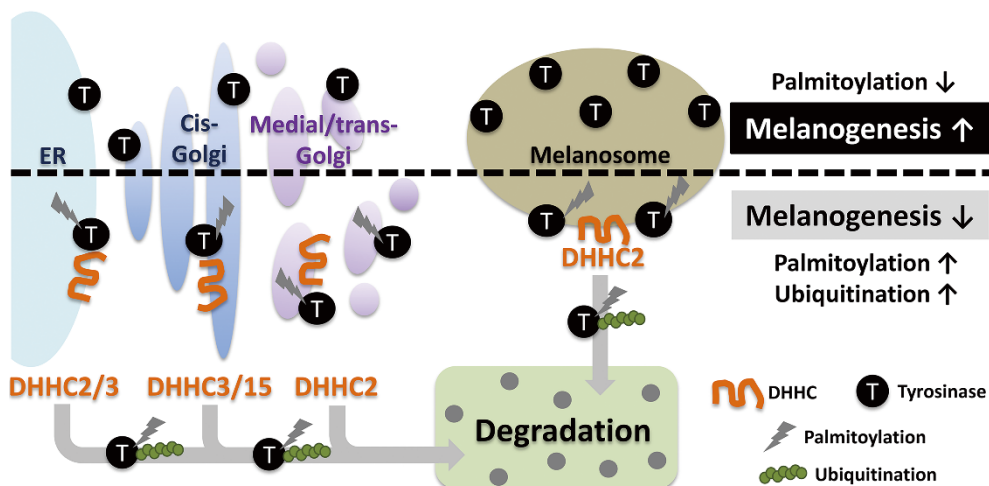


図4 Tyrosinaseのパルミトイル化による分解を利用したメラニン産生の制御

されていることを明らかにした(図4)。本研究は、メラニン合成酵素のパルミトイル化を標的とした、新たなメラニン産生制御法の確立の可能性を示唆するものである。

現在、UV + αMSHなどの生理的刺激によっても、tyrosinaseはパルミトイル化されることを明らかにしている(未報告)。また、Acyl-RACアッセイを用いて、Tyrp1はパルミトイル化されるがTyrp2はされないことを明らかにしている(未報告)。今後、Tyrp1のパルミトイル化の生理的機能を検証していく予定である。

本研究の過程で我々は、自己パルミトイル化DHHC酵素を簡便に短時間で、更に、低コストに検出する手法を開発した<sup>2)</sup>。加えて、癌患者より同定されたDHHC酵素の変異をスクリーニングしたところ、自己パルミトイル化能を完全に消失し、不活性化された変異DHHC酵素を発見した。本手法により、パルミトイル化修飾酵素DHHCタンパク質の機能解析が大きく前進し、パルミトイル化修飾が関与する様々な病因の解明が期待できる。

(引用文献)

- 1) Niki Y, Adachi N, Fukata M, Fukata Y, Oku S, Makino-Okamura C, Takeuchi S, Wakamatsu K, Ito S, Declercq L, Yarosh DB, Mammone T, Nishigori C, Saito N, and Ueyama T. S-Palmitoylation of Tyrosinase at Cysteine (500) Regulates Melanogenesis. *J Invest Dermatol.* 2023;143 (2) : 317-27 e6. doi: 10.1016/j.jid.2022.08.040. PubMed PMID: 36063887.
- 2) Adachi N, Hess DT, and Ueyama T. A facile assay for zDHHC palmitoyl transferase activation elucidates effects of mutation and modification. *J Lipid Res.* 2025;66 (2) :100743. doi: 10.1016/j.jlcr.2025.100743. PubMed PMID: 39800157.
- 3) Kageyama A, Oka M, Okada T, Nakamura S, Ueyama T, Saito N, Hearing VJ, Ichihashi M, and Nishigori C. Down-regulation of melanogenesis by phospholipase D2 through ubiquitin proteasome-mediated degradation of tyrosinase. *J Biol Chem.* 2004;279 (26) :27774-80. doi: 10.1074/jbc.M401786200. PubMed PMID: 15067002.

# チロシナーゼ酵素群の活性化に不可欠な金属獲得の分子機序の解明

京都大学大学院生命科学研究所

神戸 大朋

Melanin is an essential pigment involved in pigmentation and UV protection. Its biosynthesis depends on the tyrosinase protein family, which includes tyrosinase (TYR), tyrosinase-related protein 1 (TYRP1), and tyrosinase-related protein 2 (TYRP2). These proteins share a high sequence identity but exhibit distinct biochemical properties. TYR contains two copper ions at its active center, supplied by the copper transporter ATP7A, which is crucial for its enzymatic activity. In contrast, TYRP1 contains two zinc ions coordinated at its active center, supplied by the zinc transporter complexes ZNT5-6 and ZNT7. Despite the importance of metal coordination, the regulatory mechanisms governing these processes within cells remain unclear.

In this study, we investigated TYR activation, a key step in melanin production. We confirmed that pigmentation requires copper supplied via ATP7A by demonstrating that ATP7A-deficient cells lost TYR activity, causing cell pellets to change from black to white. Furthermore, we identified a unique sequence in the carboxyl-terminal region of TYR that is essential for its activation. These findings provide new insights into the molecular mechanisms underlying TYR activation. Understanding ATP7A-mediated copper delivery to TYR and its specific activation may contribute to further research on melanin biosynthesis and pigmentation disorders.

## 1. 緒言

メラニン色素は、メラノソーム内でチロシンを出発点とする酵素反応を経て合成される。その反応では、チロシナーゼ (TYR)、チロシナーゼ関連タンパク質1 (TYRP1)、チロシナーゼ関連タンパク質2 (TYRP2) の3つのチロシナーゼ酵素群が必須の役割を果たしている。TYRに関しては解析が進展しており、70年以上前よりTYRの活性は銅に依存すること<sup>1)</sup>、さらにその後の解析からトランスゴルジネットワーク (TGN) に局在する銅輸送体ATP7Aによって輸送された銅を活性中心に配位することが示されている<sup>2)</sup>。TYRP1やTYRP2はTYRと高い相同性を有していることから、同様の特性を有していると考えられてきたが<sup>3)</sup>、最近、我々はTYRP1の機能発現に不可欠な金属は銅ではなく亜鉛であること、さらに、この亜鉛は初期分泌経路 (小胞体やゴルジ体) に局在する亜鉛輸送体ZNT5-6 (ZNT5とZNT6のヘテロ二量体) とZNT7 (ZNT7のホモ二量体) によって輸送されることを報告した<sup>4)</sup> (図1)。実際に、ZNT5とZNT7を欠損させたメダカにおいては、TYRP1遺伝子に変異がある動物と同じように、黒色のメラニン色素がブラウン調に変化し、メラノソームが成熟化されなかった<sup>4)</sup>。TYRとTYRP1は、40%以上のアミノ酸が一致するという高い相同性を有しており、両者の活性中

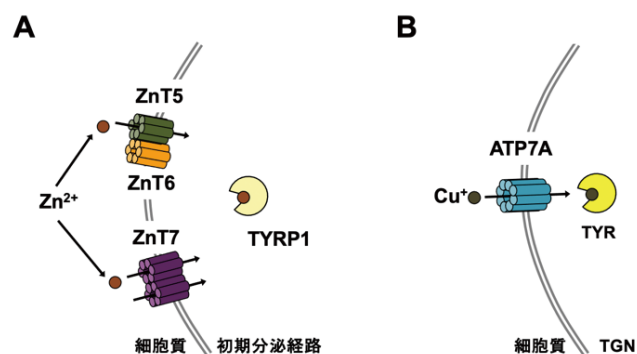


図1 TYRP1とTYRの金属による活性化のモデル  
A. 亜鉛輸送体ZNT5-6とZNT7によるTYRP1活性化機構  
B. 銅輸送体ATP7AによるTYRの活性化機構

心に金属を配位するアミノ酸残基も6つのヒスチジンで一致している<sup>3)</sup>。また、TYRとTYRP1はどちらも小胞体で生合成された後、シスゴルジ体やTGNを通過して、メラノソームに輸送されてメラニン合成に寄与する酵素である<sup>5)</sup>。すなわち、両酵素は非常に高い共通性が見出されるにもかかわらず、TYRは銅と、TYRP1は亜鉛と結合してメラニン合成に機能している。TYRとTYRP1は、どのようにして銅と亜鉛を区別し、正しくそれぞれの活性中心に配位できるのだろうか？本研究は、この謎の解明を目指して、TYRの活性化の機序に焦点を当てて解析を行った。

## 2. 方法

### 2.1. 細胞培養とトランスフェクション

ヒトメラノーマSK-MEL-2細胞の培養には、10% FCSを添加したRPMI1640培養液を使用し、5%CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で継代維持を行った。ATP7A欠損細胞およびZNT5ZNT7二重欠損SK-MEL-2細胞は、先行研究で樹



Elucidating the Molecular Mechanism of Metal Acquisition Critical for the Activation of Tyrosinase Enzymes

Taiho Kambe

Graduate School of Biostudies, Kyoto University

立していた株を使用した<sup>4)</sup>。また、ヒトメラノーマ Mewo 細胞の培養には、10% FCS を添加した EMEM 培養液を用いた。Mewo 細胞の ATP7A 欠損株は、先行研究で用いた gRNA 発現プラスミド<sup>4)</sup> を使用して樹立した。TYR、TYRP1 およびそれらの変異体を発現するプラスミドのトランスフェクションには、Lipofectamine 2000 を使用した。細胞を  $0.5 \times 10^5$  cells/well になるように 12well plate に播種し、48h 培養後にトランスフェクションに用いた。

## 2.2. 発現プラスミド構築

TYR と TYRP1 のドメイン交換変異体は、TYR と TYRP1 において組換える部位に相当する DNA 塩基配列を 15 塩基ずつ組み合わせたプライマーを合成し、2-stepPCR 法を使用して作成した<sup>6)</sup>。1 アミノ酸置換変異体の作成には、変異アミノ酸をコードする塩基に置換したプライマーを合成し、2-stepPCR 法を使用して作成した。作成した各 cDNA を pcDNA3 に挿入し、発現ベクターとした。Halo-tag や HA-TEV-tag を挿入した変異体については、それぞれのアミノ酸配列をコードするプライマーを設計し、2-stepPCR 法を使用して構築した。

## 2.3. Immunoblot 解析

全細胞抽出タンパク質を超音波処理後、20 $\mu$ g 相当量を終濃度  $2 \times$  SDS sample buffer (375mM Tris-HCl (pH6.8), 30% Glycerol, 6% SDS, 0.5M DTT, 0.1% BPB) となるように溶解し、37 $^{\circ}$ C で 15 分間反応させサンプル溶液とした。8% SDS-polyacrylamide gel を用いて電気泳動を行った後、PVDF 膜に transfer した。ブロッキングの後、一次抗体を 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させ、PBS-T で 10 分間の洗浄を 3 回行った後、二次抗体と反応させた。Immobilion<sup>TM</sup> Western Chemiluminescent HRP Substrate を用いて化学発光させ、Image Quant LAS 500 にて検出した。一次抗体には、anti-TYR (Santa Cruz Biotechnology, Inc)、anti- $\alpha$ -actin (the Developmental Studies Hybridoma Bank)、anti- $\beta$ -galactosidase (MBL) を使用した。二次抗体には、HRP 標識抗 IgG 抗体 (1:3000) を使用した。

## 2.4. L-DOPA 酸化活性測定

細胞抽出タンパク質 10 $\mu$ g 相当量の SK-MEL-2 サンプルを 1.5mL tube に取り、反応液 ((10mM phosphate buffer (pH 6.8)、4% N, N-Dimethylformamide) 100 $\mu$ L、5mM L-DOPA 50 $\mu$ L、20.7mM 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazine (MBTH) 50 $\mu$ L) を 200 $\mu$ L 添加してインキュベートした (37 $^{\circ}$ C、1h)。サンプル 190 $\mu$ L を 96 well plate にアプライし、505nm における吸光度を測定することで L-DOPA 酸化活性を評価した。

## 2.5. In Gel Zymography

調整した膜タンパク質 50 $\mu$ g 相当量に  $6 \times$  SDS buffer: DTT (-) (375mM Tris-HCl (pH6.8), 30% Glycerol, 6% SDS, 0.1% BPB) を 8 $\mu$ L 加え、37 $^{\circ}$ C で 20 分間インキュベートした。7.5% アクリルアミドゲルを用い、10mA、4 $^{\circ}$ C の条件で約 3 時間、電気泳動を行った。バッファの置換とゲルの平衡化のため、泳動後のゲルを 50mM phosphate buffer (pH6.0) で室温にて 3 時間振とうした。平衡化したゲルは基質反応液 (10mM phosphate buffer (pH6.8), 1.5mM L-DOPA, 4mM MBTH) 中において 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。TYR による L-DOPA 酸化産物である DOPA chrome のバンドの生成を褐色の色素として確認した。

## 3. 結果と考察

### 3.1. 培養細胞の色素形成におけるトランスポーター依存性の確認

TYR の ATP7A 依存性、TYRP1 の ZNT5-6, ZNT7 依存性を確認するために、培養時に濃褐色を呈色するヒトメラノーマ Mewo 細胞を用いて解析した。Mewo 細胞における ATP7A 欠損株、ZNT5 と ZNT7 の二重欠損株は、それぞれ、白色、薄い茶色を呈色し、動物において報告されている ATP7A と ZNT5-6, ZNT7 の機能消失で予想される変化と同じであった<sup>4,7)</sup> (図 2)。このことから、ATP7A が輸送した銅、ZNT5-6, ZNT7 が輸送した亜鉛が、正確に区別されメラニン生合成に関与していることが確認された。

### 3.2. 変異体を用いた TYR 活性化機構に関する解析

TYR と TYRP1 は共に小胞体で生合成され、メラノソ

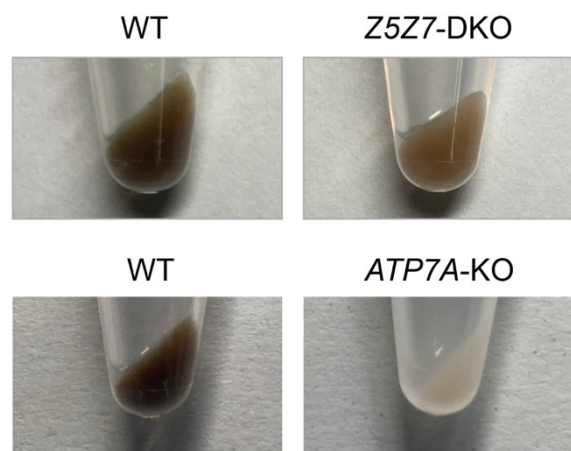


図 2 Mewo 細胞野生株、ZNT5ZNT7 二重欠損株、ATP7A 欠損株の呈色  
(上段) 野生株と ZNT5ZNT7 二重欠損株の細胞ペレットの写真  
(下段) 野生株と ATP7A 欠損株の細胞ペレットの写真

ームに輸送されるという共通点を有する。しかしながら、細胞質に存在するカルボキシ末端の配列の違いに起因するアダプタータンパク質の相違から、両者は異なる小胞輸送によってメラノソームに運ばれると考えられていた。この相違が、金属要求性の違いに関わる可能性を考え、TYRのカルボキシ末端領域を様々な長さでTYR<sub>RP1</sub>の相当する領域と交換したドメイン交換キメラ変異体を構築し(図3A)、SK-MEL-2細胞に発現させることで、TYRの活性化に関わる領域の同定を試みた。解析の当初、細胞質領域の交換によってTYRの活性が消失することを予想していたが、予想に反して、この領域の交換ではL-DOPA酸化活性およびIn Gel Zymographyで評価したTYRの活性

は全く影響を受けなかった(図3B)。次に交換する領域を徐々にTYRのアミノ末端側に広げていき、ドメイン交換変異体を作成した。結果、膜貫通領域を含む領域でTYRとTYR<sub>RP1</sub>を交換しても、TYRの活性は影響を受けなかったが、C末端のループ領域近傍でドメインを交換すると、L-DOPA酸化活性およびZymographyでのシグナルが消失した。したがって、この交換したドメインの近傍にTYRの活性化に関わる重要な領域が存在することが予想された。

同定した領域の機能について詳細に解析するため、1アミノ酸挿入変異体や1アミノ酸置換変異体を作成し、同様のトランスフェクション解析を実施した。図4Aで示し

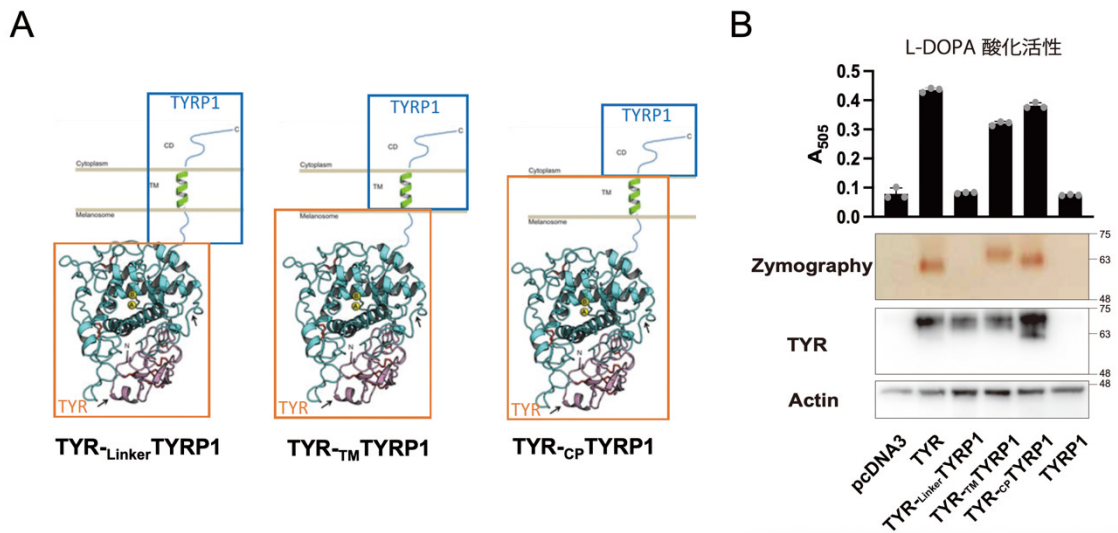


図3 TYRのドメイン交換変異体におけるL-DOPA酸化活性

- A. TYRのカルボキシ末端領域をTYR<sub>1</sub>の相当する領域と交換して作成したTYR変異体のモデル(引用論文5)の図を改変。  
 B. Aで作成したTYR交換変異体におけるTYR活性。L-DOPA酸化活性とZymographyで評価した。

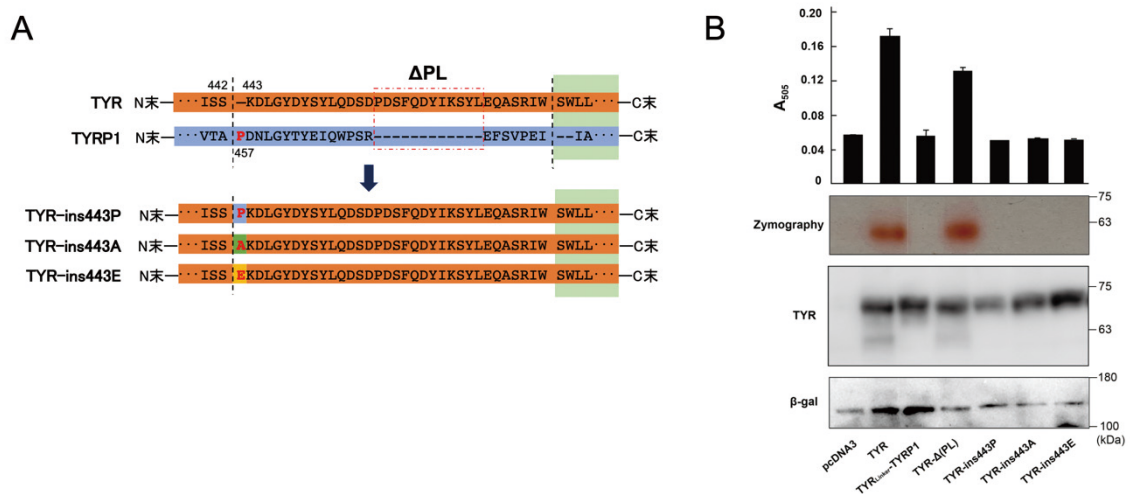


図4 TYRのドメイン交換変異体におけるチロシナーゼ活性

- A. TYRのカルボキシ末端領域に着目して作成した変異体における1アミノ酸挿入部位と削除した配列の部位の模式図。  
 B. Aで作成したTYR交換変異体におけるTYR活性、L-DOPA酸化活性とZymographyで評価した。

たように、カルボキシ末端領域でのTYRとTYRP1の顕著な違いとして、TYRP1にのみ存在するプロリン残基が見出されたため、TYRにおいて対応する部位にプロリン、またアラニン、グルタミン酸を挿入したTYR変異体を作成して解析した。3つの変異体全てにおいて、TYR活性(L-DOPA酸化活性およびIn Gel Zymography)は見出されず、この部位の重要性が確認された(図4B)。一方、TYRに特異的にみとめられる挿入配列を除去したTYR変異体( $\Delta$ PL)の活性は野生型TYRのレベルに保持されており、この配列はTYRの活性化には重要でないことが判明した。

今後は、さらに解析を進め、カルボキシ末端領域においてTYRの活性化に重要な配列を同定する予定である。

### 3.3. 培養細胞からのTYR精製法に関する検討

動物細胞で発現するTYRに配位する金属を定量的に解析するため、TYRを精製する系の構築を試みた。TYRのカルボキシ末端にHA-tagを融合させた融合タンパク質をSK-MEL-2細胞に発現させたところ、Halo-tagを融合させていない野生型TYRに比べ、そのL-DOPA酸化活性が著しく減少していた。そのため、カルボキシ末端へのタグ融合が適していないことが予想された。そこで、上記解析で配列の有無によってもTYRの活性に大きな影響が現れないことが判明した領域にHA-tagおよびTEVプロテアーゼ切断部位をコードする配列を挿入したTYR改変体(TYR-HA-TEV)を作成した。TYR-HA-TEVをSK-MEL-2細胞に発現させたところ、野生型TYRと遜色ない活性を有していた。また、TYR-HA-TEVを発現させ、TEVプロテアーゼで切断後にHA抗体で精製したTYRには、期待通りチロシナーゼ活性が保有されており、現在、高発現株の樹立を進めている。

## 4. 総括

見出したTYRの活性に重要な配列の中には、I型眼皮膚白皮症(OCA1)の発症につながるミスセンス変異が報告されている<sup>5)</sup>。したがって、本配列にはTYRの活性化に必須となる配列が含まれていることが予想される。今後は、この変異の情報を考慮しながら、新たな変異タンパク質を作成し、解析を進めることを計画している。この情報と、

作成した改変体(TYR-HA-TEV)を使用した解析で得られた金属配位に関する情報を融合させ、TYRの活性化の機序、およびTYRP1とTYR間の金属配位の違いを生む機序を明らかにしたいと考えている。

TYRとTYRP1がどのようにして銅と亜鉛を区別できるのか明らかにできれば、金属タンパク質の機能発現の機序に関する重要な知見を提示できるだけでなく、美白効果を持つ化粧品などの開発に幅広く応用されることが期待される。

### (引用文献)

- 1) Lerner AB, Fitzpatrick TB, Calkins E, Summerson WH. Mammalian tyrosinase; the relationship of copper to enzymatic activity. *J Biol Chem* **187**, 793-802 (1950).
- 2) Petris MJ, Strausak D, Mercer JF. The Menkes copper transporter is required for the activation of tyrosinase. *Hum Mol Genet*, **9**, 2845-2851 (2000).
- 3) Solano F. On the Metal Cofactor in the Tyrosinase Family. *Int J Mol Sci*, **19**, 633 (2018).
- 4) Wagatsuma T, Suzuki E, Shiotsu M, Sogo A, Nishito Y, Ando H, Hashimoto H, Petris MJ, Kinoshita M, Kambe T. Pigmentation and TYRP1 expression are mediated by zinc through the early secretory pathway-resident ZNT proteins. *Commun Biol*, **6**, 403 (2023).
- 5) Lai, X., Wichers, H. J., Soler-Lopez, M., and Dijkstra, B. W. Structure and Function of Human Tyrosinase and Tyrosinase-Related Proteins. *Chemistry* **24**, 47-55 (2018).
- 6) Takeda, T. A., Miyazaki, S., Kobayashi, M., Nishino, K., Goto, T., Matsunaga, M., Ooi, M., Shirakawa, H., Tani, F., Kawamura, T., Komai, M., and Kambe, T., Zinc deficiency causes delayed ATP clearance and adenosine generation in rats and cell culture models. *Commun Biol*, **1**, 113 (2018).
- 7) Murisier, F., Beermann, F., Genetics of pigment cells: lessons from the tyrosinase gene family, *Histol Histopathol*, **21**, 567-78 (2006).

# 皮膚幹細胞の糖鎖をターゲットとした老化制御に向けての基盤研究

九州大学生体防御医学研究所

佐田 亜衣子

The disruption of communication between epidermal stem cells and their surrounding microenvironment, including adjacent cells and their extracellular matrix (ECM), contributes to the cellular and molecular impairments associated with skin aging. Glycans modify plasma membrane proteins post-translationally and have a role in tissue homeostasis and diseases by regulating cell-cell interactions, ligand-receptor binding, and ECM function. Glycans also play a crucial role in regulating stem cells by modulating signaling pathways that control their self-renewal and differentiation. Our previous study demonstrated age-related alterations in glycosylation patterns in mouse skin, characterized by an upregulation of sialic acid and a downregulation of mannose in aged epidermal stem cells. However, the functional importance of these alterations of glycans in vivo remains still unknown. In this study, we aim to investigate the function of glycosylation in skin aging at the stem cell level. We show that the elevation of  $\alpha$ -2,6 sialylation by overexpressing glycogenes (St6gal1 and Man1a) in vivo exhibits phenotypes associated with skin aging, including hair loss, epidermal thinning, and decreased proliferative capacity of epidermal stem cells. Mass spectrometry, using membrane proteins pulled down by lectin probes, identified several potential core protein candidates modified by  $\alpha$ -2,6 sialic acid. These findings indicate that changes in glycosylation regulate epidermal stem cell aging by modifying the membrane proteins. The functional relationship between glycogenes and core proteins in regulating epidermal stem cell function is being further investigated, which may provide a molecular basis and a biomarker for skin aging.

## 1. 緒言

世界規模で急速に高齢化が進む中、加齢関連疾患の原因究明とその克服は大きな課題となっている。近年、国内外の研究により、加齢に伴い、組織幹細胞の増殖の低下・停止、分化異常、がん化、ニッチへの応答性の変化などが、単独、あるいは複合的に起こり、組織の機能低下や病変の要因となることが示されている。この現象は、幹細胞の老化（ステムセルエイジング）と呼ばれ、造血、筋肉、神経幹細胞などを中心として関連報告が増えている。皮膚においても、細胞外マトリクスの加齢性欠陥により、毛包幹細胞から表皮系譜への異所的分化や、色素や表皮幹細胞の枯渇が起こることが報告されている。しかし老化に関する知見の多くは、個々の遺伝子の機能に着目したものが多く、解析の難しいタンパク質修飾レベルでの加齢変化が、組織幹細胞や個体老化に及ぼす影響には未知な部分が多い。

タンパク質のグリコシル化は、糖鎖の段階的な付加と除去を伴い、主に糖転移酵素と糖加水分解酵素によって媒介される。糖鎖は、タンパク質の構造、安定性、局在を決定し、細胞間コミュニケーションやシグナル伝達、細胞外マトリクスとの接着を介して、発生、腫瘍形成、炎症などの

多種多様な生物学的プロセスに影響を与える。糖鎖は、幹細胞の自己複製や分化を司る Notch、BMP、Wnt、FGF などのシグナル分子を調節することで、多能性幹細胞やシヨウジョウバエの組織幹細胞の制御に重要な役割を果たす。さらに近年、ヒト三次元皮膚モデルを用い、糖鎖関連遺伝子をゲノム編集法により欠損させ、その生理機能を調べる“Glycoskin”が開発され、皮膚における糖鎖の重要性が注目されている<sup>1)</sup>。しかし、糖鎖修飾の変化と生理機能を結びつけた研究は少なく、皮膚老化プロセスにおいて糖鎖修飾の機能的役割は不明である。

我々は、糖鎖工学を専門とする館野浩章（産業技術総合研究所）との共同研究により、レクチンアレイ法を用いることで、糖鎖構造を高感度かつ迅速に検出し、加齢に伴って起こる表皮幹細胞の糖鎖変化を捉えることに成功した<sup>2)</sup>（図1）。レクチンは、様々な糖鎖構造を認識する糖鎖結合タンパク質の一種で、レクチンアレイでは、様々な糖鎖結合特異性を持つ一連のレクチンがスライドガラス上に固定化されている。この系を用い、若齢、高齢マウスの皮膚から単離した表皮幹細胞を用い、網羅的な糖鎖プロファイリングを行った。その結果、加齢に伴い、高マンノース型からシアル酸に富んだ複合型へと、表皮幹細胞の糖鎖修飾パターンが変化することを見出した。若齢、高齢の表皮幹細胞に有為に存在する糖鎖構造を認識するプローブとして、マンノース、 $\alpha$ 2-3シアル酸と結合するレクチン（rHeltuba、rGal8N）を同定し、老化バイオマーカーとしての可能性を示した。さらに、表皮幹細胞のトランスクリプトーム解析により、マンノースの分解にはたらく Man1a、およびシアル酸の付加にはたらく糖転移酵素



Division of Skin Regeneration and Aging, Medical Institute of Bioregulation  
Aiko Sada  
Kyushu University

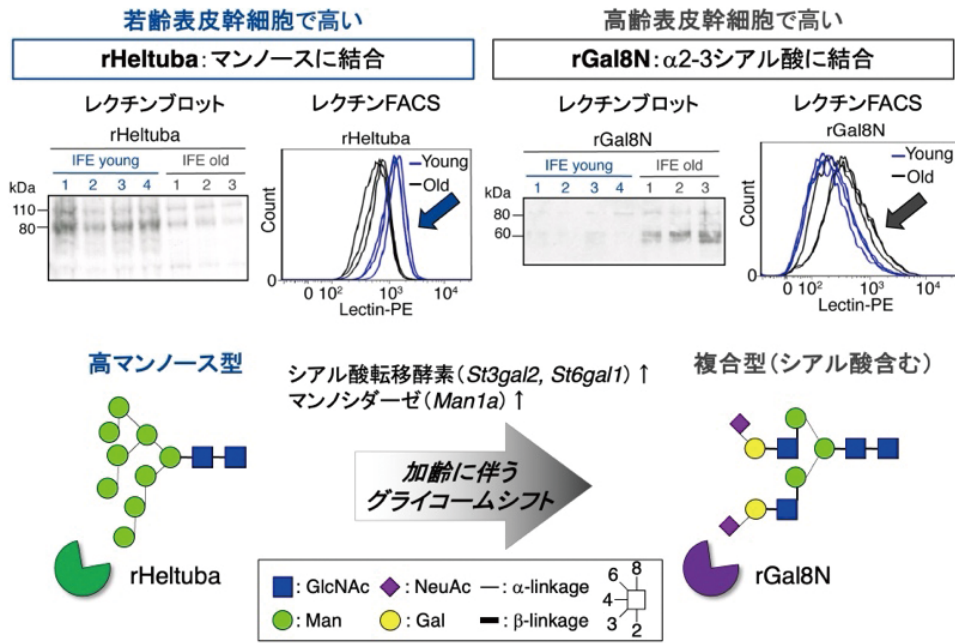


図1 加齢に伴う表皮幹細胞のグリコームシフト

(St3gal2, St6gal1) が、加齢した表皮幹細胞で有意に発現が上昇することを見出した。本研究は、これらの糖鎖遺伝子の機能に着目し、タンパク質の修飾が皮膚老化や幹細胞機能に及ぼす役割を解明することを目的として実施した。

## 2. 方法

### 2.1. 高齢型糖鎖パターンを持つ老化モデルマウスの作出と皮膚表現型解析

ドキシサイクリン依存的に糖鎖遺伝子 (St3gal2, St6gal1, Man1a) を過剰発現するトランスジェニック (Tg) マウス pTRE-Flag-St6gal1, pTRE-Flag-St3gal2, pTRE-Myc-Man1a は、熊本大学生命資源研究・支援センター (CARD) にてマイクロインジェクション法によって作製された。マウスは、熊本大学動物資源開発研究施設 (CARD) 本館および九州大学生体防御医学研究所別館において温度制御された SPF 環境下で飼育された。

Tg マウスは、Rosa-rtTA または K14-rtTA と交配し、2重トランスジェニックマウスおよびコントロールマウスを解析に使用した。ドキシサイクリンを含んだ餌 (1g doxy/1kg 餌) を、1、2、3、6、8 週間経口投与し、1 週間ごとに経過観察と体重測定を行った。眼窩静脈叢採血法を用いて採血を行い、全自動血球計数器 Celltac  $\alpha$  (日本光電株式会社) を使用し、白血球、赤血球、血小板などの血液成分を測定した。脾臓の重量は、サンプリング時に測定した。

マウス皮膚組織は、OCT コンパウンドに包埋し、組織学的解析や免疫染色に使用した。Tg の発現は、凍結皮膚組織を用いた qRT-PCR、Flag または Myc 抗体を用いた免

疫沈降、レクチンプローブ (SNA, rGal8N, rHeltuba) を用いたレクチンプロットによって確認された。

皮膚組織のホルマリン染色には、5mm  $\times$  5mm 角に切った尾部皮膚を EDTA (20mM) 溶液中で、37°C の振盪器で 2 時間反応させた後、ピンセットを用いて表皮と真皮を分離した。分離した表皮シートは、4°C の 4% PFA で一晩固定した。表皮シートは、1  $\times$  PBS で洗浄後、0.2% アジ化ナトリウム溶液で冷蔵保存した。ブロッキング溶液 (1% BSA, 2.5% NDS, 2.5% NGS, 0.8% Triton/PBS) でブロッキング処理を 3 時間行った後、1 次抗体で一晩、染色を行った。1 次抗体染色後、0.2% Tween/PBS で 1 時間、4 回の洗浄を室温で行った。2 次抗体の染色は、一晩、4°C で行った。0.2% Tween/PBS で 1 時間、4 回の洗浄を室温で行い、1  $\times$  PBS を溶媒にした Hoechst (1:1000) で 1 時間室温にて染色し、蛍光退色防止剤入りの封入剤で封入した。

RNA シークエンス (RNA-seq) 解析のため、マウス皮膚を 0.25% トリプシン/EDTA に 4°C で一晩、その後 37°C で 30 分間反応させ、スカルベリによって表皮細胞を真皮から分離した。抗体は CD34-biotin, Streptavidin-APC,  $\alpha$ 6-integrin-BUV395, Sca1-BV421 を使用した。FACS Aria フローサイトメーター (BD Biosciences) でコンペンセーションを行った後、表皮の基底細胞集団 ( $\alpha$ 6-integrin 陽性, Sca1 陽性, CD34 陰性) を Trizol 中に分取した。単離した表皮幹細胞は、つくば i-Laboratory LLP に提出し、RNA 抽出~シークエンスを行った。得られたデータは、CLC genomics ソフトウェア (Qiagen) を用いて正規化し、PCA 解析を行った。ヒートマップ・クラスター解析

には、Clustvisを用いた。発現が2倍以上変化した遺伝子を対象に、Metascapeを使用して遺伝子オントロジーエンリッチメント (GO) 解析を行った。

## 2.2. 糖鎖修飾を受けるコアタンパク質の同定

マウス初代培養ケラチノサイトに、レンチウイルスを用いて3種の糖修飾酵素 (St3gal2, St6gal1, Man1a) を単独または同時に発現させた。糖鎖遺伝子が導入された細胞を、1µg/mLの濃度でプラストサイジンを用いて選別した。

膜タンパク質を含む疎水性画分は、CelLytic MEMタンパク質抽出キット (Sigma-Aldrich) を用いて製造元のプロトコルに従って単離した。タンパク質濃度は、マイクロBCAアッセイキット (Thermo Fisher Scientific) を使用して測定した。膜タンパク質は5-20%ゲル (Perfect NT Gelシステム) を用いて分離し、ウェットトランスファーシステム (BIO-RAD) を使用してPVDF膜 (Millipore) に転写した。

レクチンプロットに使用するレクチンrGal8N ( $\alpha$ -2, 3シアル酸結合) およびrHeltuba (マンノース結合) は、館野浩章 (産業技術総合研究所) から提供された。レクチンSNA ( $\alpha$ -2, 6シアル酸結合) はSigma-Aldrichから購入した。すべてのレクチンは、HRP標識キット (同仁化学研究所) を使用して標識した。0.1% Tween/Carbo-Freeブロッキング溶液 (Vector Laboratories) でブロッキング後、HRP結合レクチンで室温1時間インキュベートした。シグナルはECL TM Western Blotting Detection Reagentで検出され、Amersham Imager 600 (GE Healthcare) で視覚化された。

レクチン沈降に使用するレクチン (rHeltuba, rGal8N, SNA) は、Biotin Labeling Kit-NH2 (同仁化学研究所) を

用いて製造元のプロトコルに従ってビオチン標識を行った。ビオチン結合レクチンは、Dynabeads M280 ストレプトアビジン (Invitrogen) に固定化され、4度で1時間ダイナビーズとインキュベートした。膜タンパク質を、レクチン結合ダイナビーズとインキュベート後、結合分画を沈降した。レクチン結合が見られたバンドを切り出し、コアタンパク質候補を質量分析 (プロメガ) により同定した。

## 3. 結果

### 3.1. 高齢型糖鎖パターンを持つ老化モデルマウスの作出と皮膚表現型解析

高マンノース型からシアル酸を含む複合型へ糖鎖修飾パターンが変化することで皮膚や表皮幹細胞の老化が加速される可能性を検討するため、加齢に伴って発現上昇する3種の糖鎖遺伝子 (St3gal2, St6gal1, Man1a) をドキシサイクリン依存的に誘導するTet-ONマウスを新たに作製した (図2)。ドキシサイクリン投与後、qRT-PCR、ウェスタンプロット、免疫染色、レクチンプロットによりトランスジーン発現とそれに伴う糖鎖変化の誘導を確認した。その結果、St6gal1とMan1a Tgマウスにおいては、mRNA、タンパク質、糖鎖変化が誘導されたが、St3gal2 TgマウスにおいてはmRNAレベルでトランスジーンが発現するものの糖鎖変化が認められなかった。よって、その後の解析は、St6gal1とMan1a Tgマウスに絞って進めることにした。

1~8週間のTg発現誘導後、皮膚および全身性の表現型を調べたところ、ドキシサイクリン依存的にシアル酸の付加に働く糖転移酵素 (St6gal1) を過剰発現するTgマウスにおいて、脱毛や皮膚炎症といった肉眼所見が観察されるとともに、炎症の指標である脾臓重量の増加や炎

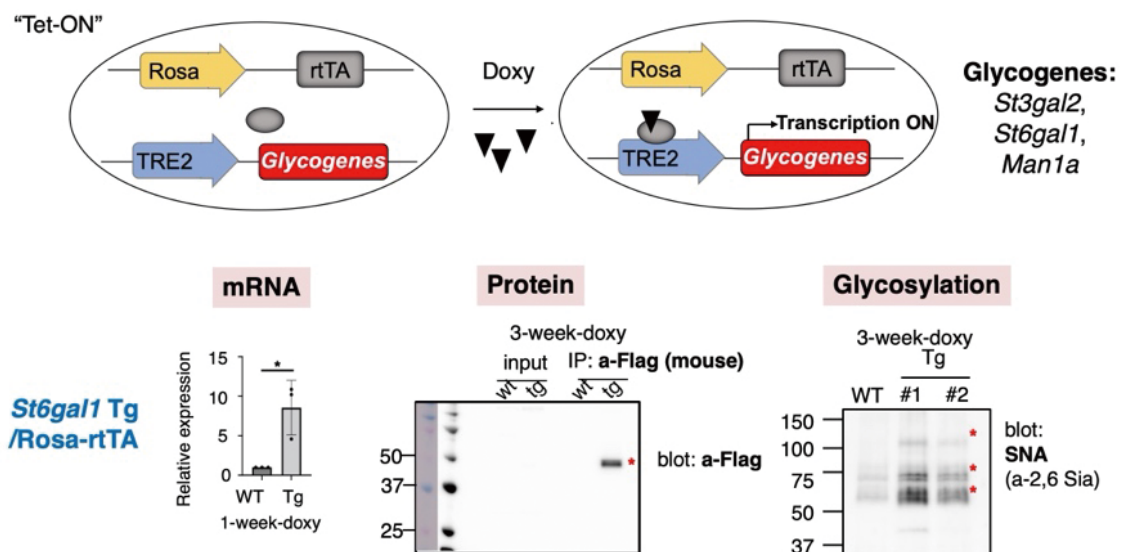


図2 高齢型糖鎖パターンを持つ老化モデルマウスの作出

症性サイトカインの発現上昇が見られた (図3)。さらに、*St6gal1* Tgマウスでは表皮幹細胞の増殖低下や表皮の菲薄化が見られた。一方、*Man1a* Tgマウスにおいては、表皮幹細胞の表現型は現れるものの炎症の所見はほとんど見られず、糖鎖修飾の違いにより影響が異なることが分かった。

*St6gal1* Tgマウスにおいて表皮幹細胞の機能低下が誘導される分子メカニズムを探るため、RNA-seq解析を行った。表皮幹細胞は、基底細胞マーカーである  $\alpha 6$ -integrin+/CD34-/Sca1+の集団を単離し、コントロール、

Tgマウス群で比較した。主成分分析を行った結果、コントロール、Tgマウス群が異なるクラスターに区別されることから、*St6gal1* の誘導は表皮幹細胞の遺伝子発現をグローバルに変化させることが分かった (図4)。*St6gal1* 誘導による分子変化の特徴を明らかにするため、発現が2倍以上変化した遺伝子群を用い、GO解析を行った。その結果、*St6gal1* Tgマウス群では、TNF (腫瘍壊死因子) と IFN (インターフェロン) を含む炎症性サイトカインが顕著に上昇しており、炎症様の表現型が分子レベルでも示された。一方、遺伝子発現が2倍以上低下した遺伝子群には、皮膚の

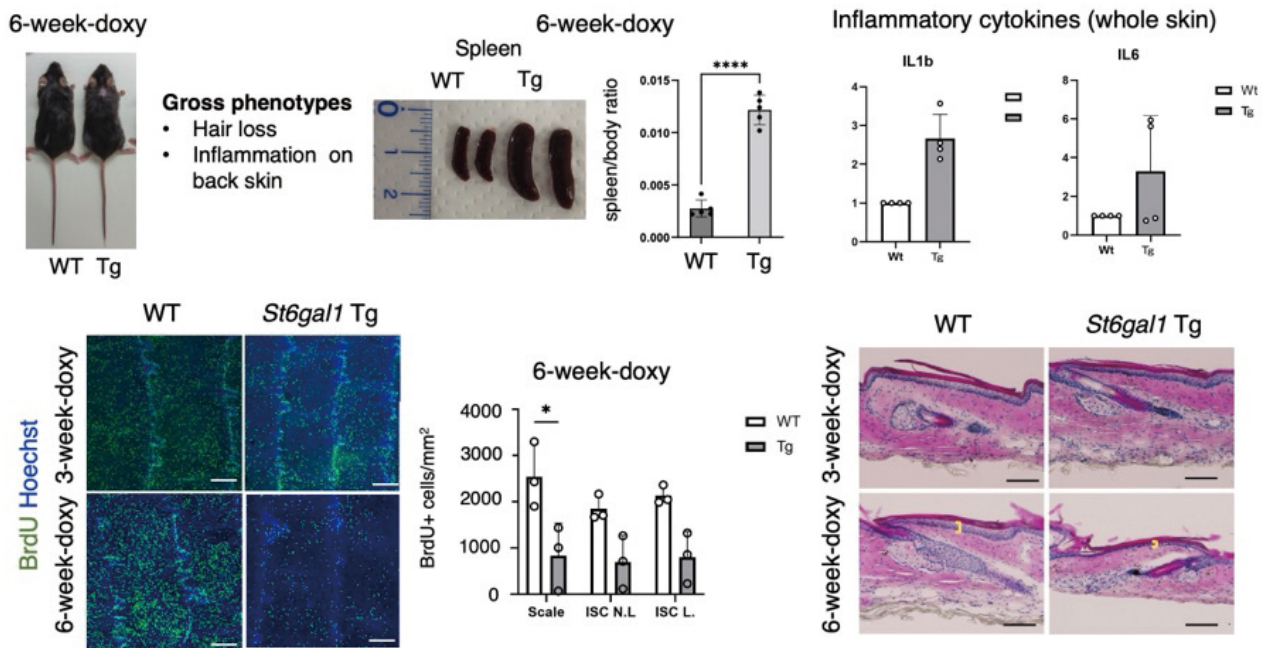


図3 *St6gal1* Tgマウスでは、表皮幹細胞の機能低下および炎症様の表現型が見れる

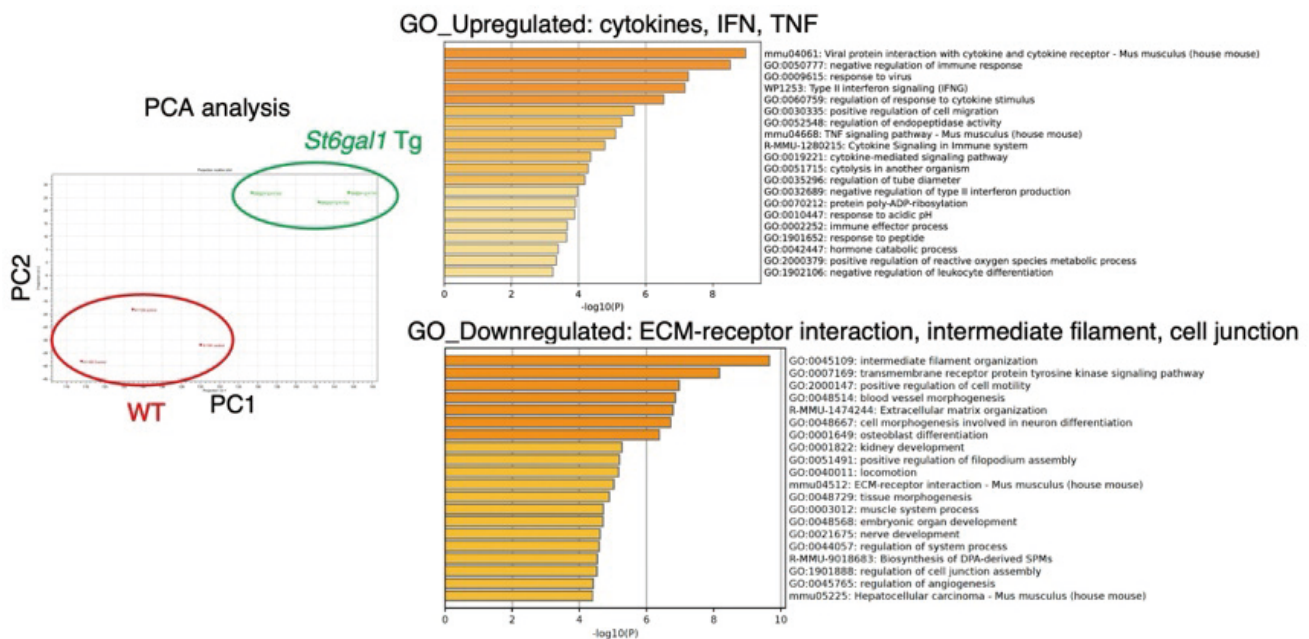


図4 *St6gal1* Tgマウスの表皮幹細胞を用いたトランスクリプトーム解析

発生や細胞接着、細胞外マトリクスに関わる因子が含まれており、表皮幹細胞の機能低下が示唆された。

### 3.2. 糖鎖修飾を受けるコアタンパク質の同定

糖鎖修飾の違いが生じるコアタンパク質を同定するため、マウス初代培養ケラチノサイトに、3種の糖鎖遺伝子 (St3gal2, St6gal1, Man1a) を、レンチウイルスを用いて単独または同時に発現させ、高齢型の糖鎖パターンを誘導した (図5)。細胞から抽出した膜タンパク質を材料にレクチンプローブを用いた免疫沈降・質量分析を行い、コアタンパク質の候補を同定した。高齢型の糖鎖  $\alpha$ 2-3 シアル酸を認識するレクチンプローブ rGal8N に対して、デスモソーム構成タンパク質 (Desmoglein, Plakoglobin, Desmoplakin) と核膜タンパク質 Lamin が結合性を示す可能性が示唆された。 $\alpha$ 2-6 シアル酸に結合する SNA を用いた免疫沈降・質量分析を行い、コアタンパク質の候補として、N型糖鎖への結合能を持ち、表皮幹細胞制御に働くイ

ンテグリンファミリータンパク質を同定し、現在機能解析を進めている。

### 4. 総括

本研究では、皮膚老化現象をステムセルバイオロジーの切り口で研究する佐田と、糖鎖科学の分野でレクチンを用いた最先端技術の開発に取り組む館野とが連携することで、世界的に見てもほとんど例がない組織幹細胞の糖鎖解析と老化プロセスにおける生理機能の解明に取り組んだ。In vivoにおいて糖鎖遺伝子を誘導することで糖鎖改変モデルマウスを作成し、細胞・分子レベルでの変化の一端を解明した (図6)。

申請者の先行研究で、老化した表皮幹細胞において、 $\alpha$ 2-3 および  $\alpha$ 2-6 シアル酸の増加と、それに対応するシアル酸転移酵素 (St3gal2 および St6gal1) の発現上昇が見られた。この結果と一致して、老化したマウスの筋肉ではシアル酸の亢進が観察される<sup>3)</sup>。シアル酸転移酵素の増

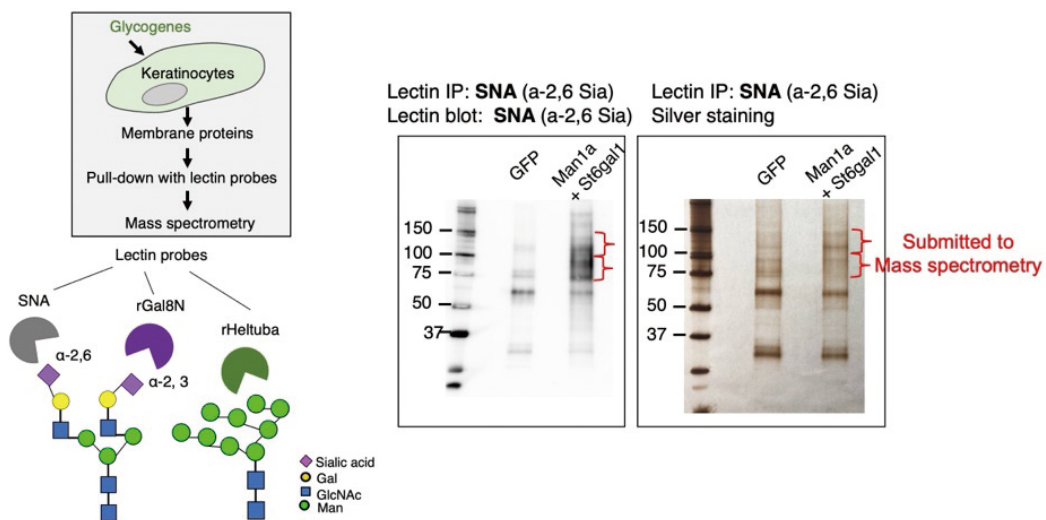


図5 糖鎖修飾を受けるコアタンパク質の同定と生化学的的特性の解明

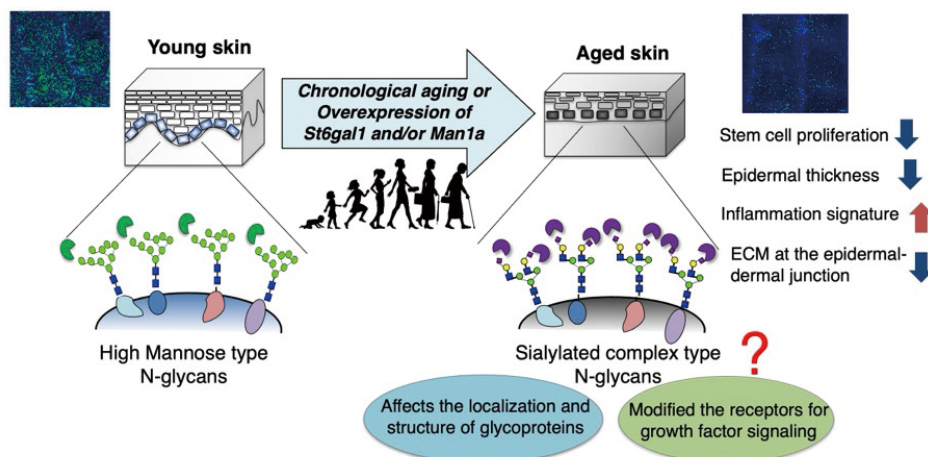


図6 総括

加は、ヒトにおける老化マーカーとして示唆されており、80歳以上の人の血漿中でSt6gal1の活性が高いことが示されている<sup>4)</sup>。また、老化した皮膚は創傷治癒能力の低下を示すが、これは表皮幹細胞と樹状突起上皮T細胞の間の相互作用が損なわれていることが一因である<sup>5)</sup>。樹状細胞を含むいくつかの免疫細胞はマンノース結合受容体を持っていることから、老化した皮膚における幹細胞と免疫細胞の相互作用と関連している可能性が考えられた。

糖鎖は、DNA、タンパク質に次ぐ「第3の生命鎖」として、老化や疾患の新たなターゲットとして期待されている。血液型や腫瘍マーカーをはじめ、糖鎖の違いは優れたバイオマーカーとして幅広く利用されてきた。近年、複雑な糖鎖構造をハイスループットで解析する技術の発展に伴い、ゲノム、遺伝子の発現情報と合わせ、より包括的にタンパク質の糖鎖修飾状態を捉えることが可能となった。糖鎖をツールとして、皮膚幹細胞の老化状態を簡便に検出し、制御することが可能となれば、老化を予防し、健康長寿を目指す糸口となるとともに、より精度の高い再生医療の実現へとつながることが期待される。

(引用文献)

- 1) Dabelsteen S et al. Essential Functions of Glycans in Human Epithelia Dissected by a CRISPR-Cas9-Engineered Human Organotypic Skin Model. *Dev Cell*. 2020; 54 (5): 669-684. e7.
- 2) Oinam L et al. Glycome profiling by lectin microarray reveals dynamic glycan alterations during epidermal stem cell aging. *Aging Cell*. 2020; 19 (8): e13190.
- 3) Hanisch F et al. Sialylation and muscle performance: sialic acid is a marker of muscle ageing. *PLoS One*. 2013; 8 (12): e80520.
- 4) Catera M et al. Identification of novel plasma glycosylation-associated markers of aging. *Oncotarget*. 2016; 7 (7): 7455-7468.
- 5) Keyes BE et al. Impaired Epidermal to Dendritic T Cell Signaling Slows Wound Repair in Aged Skin. *Cell*. 2016; 167 (5): 1323-1338. e14.

# 表皮のペプチドによるバリア制御機構

香川大学医学部皮膚科学

大日 輝記

The defense system of the skin consists of three layers: the barrier, innate immunity, and acquired immunity. The barrier is the homeostatic defense in the outermost parts of the organism. In the body surface, the epithelial-immune microenvironment (EIME) governs the induction and direction of biological defense. Epidermal keratinocytes organize barrier system of the skin. However, the precise role for keratinocytes and the molecular mechanisms that control barrier formation and induction of innate and acquired immunity against a variety of external factors remain unknown. To explore new mechanisms in the regulation of defense system of the skin, we performed transcriptome analysis of the skin of four different animal models of atopic dermatitis. We identified only one common orphan gene, *C10orf99* (human)/*2610528A11Rik* (mouse orthologue), of which expression is highly induced in the epidermis. We found that *C10orf99* peptide, a product of the orphan gene, regulates late differentiation of keratinocytes. In addition, gene expression levels of inflammatory mediators are higher in normal human epidermal keratinocytes transfected with *2610528A11Rik*-expressing plasmids than those transfected with empty plasmids. Furthermore, the results of pilot studies suggest that disulfide bonds in the N-terminus rather than conserved regions in the C-terminus in a *C10orf99* peptide are essential for its molecular function in the induction of *C10orf99*-response genes. Our results propose that when the homeostasis of skin defense is breached by external factors, cellular stress induces the expression of *C10orf99* peptide, which may be involved in the induction of the defense system of the skin and inflammation at the affected site. Thus, *C10orf99* peptide is a potential therapeutic target, as its production is a common event in inflammatory skin diseases regardless of the type of inflammation.

## 1. 緒言

申請者らは、外界に接する臓器に固有の微小環境を「上皮-免疫微小環境 (EIME)」と名付けた (Nat Immunol 2018)。皮膚の生体防御反応の新たな機序を探索するため、4つの異なるアトピー性皮膚炎モデル動物の皮膚のトランスクリプトーム解析を行った。その結果、共通して表皮で誘導性に高発現するただ1つのオルファン遺伝子、*C10orf99* (ヒト) / *2610528A11Rik* (マウスのオルソログ遺伝子) を同定した。本研究の目的は、この遺伝子がコードするペプチドを研究対象として、表皮のバリアと生体防御に対する制御機構を明らかにし、表皮を標的とした新規コンセプトを提案することである (図1)。

## 2. 方法

本研究では第1に、*C10orf99* ペプチドの分子機能を明らかにする。表皮のバリアと生体防御に対する制御機構に対する機能を明らかにし、ペプチドのどの領域に依存するのかを、合成ペプチドを作成して明らかにする。

第2に、*C10orf99* ペプチドを介した脂質代謝と免疫の

クロストークを明らかにする。脂質代謝シグナル、および表皮細胞の分化や炎症性メディエーターの発現にどう影響を与えるのかを評価し、脂質代謝と免疫の橋渡しとなる可能性を *in vitro* で検証する。

## 3. 結果

この遺伝子は、炎症のタイプに依存せず様々な皮膚炎モデルで発現を認めた。またアトピー性皮膚炎や乾癬の表皮でも強い発現がみられた (図2)。

本遺伝子を導入したヒト表皮細胞では炎症性メディエーターの発現が促進した (図3)。一方、3次元培養皮膚に本遺伝子がコードするペプチドを添加するとバリア形成が抑制された (図4)。さらに、遺伝子導入表皮細胞のRNA-Seqで脂質代謝の制御やミトコンドリアに関わる可能性も示された。

さらに、ヒト表皮細胞株のHaCaTを用いて反応遺伝子の発現をN末端領域のジスルフィド結合を無効化したペプチド、C末端の保存領域を欠失したペプチドと比較したところ、ペプチドの機能はジスルフィド結合により強く依存することが示唆された (図5)。

## 4. 考察

以上より、本遺伝子がコードするペプチドが、表皮細胞で炎症の誘導を介して皮膚の生体防御に機能する可能性、脂質代謝や角化の制御を介して皮膚のバリアに関わる可能性が示された。現在、ペプチドの機能と構造との対応関係を、合成ペプチドを用いたトランスクリプトーム解析によ



Epidermal peptides regulate barrier formation of the skin

Teruki Dainichi

Department of Dermatology, Kagawa University School of Medicine

り検討中である。

### 5. 総括

本研究課題の成果がコスメトロジーに及ぼす影響は、以

下の2点である。

第1に、本研究を通して「肌質」の秘密が明らかになれば、最適のスキンケアの提案を最適のタイミングで提案できる。肌質は、毛包間表皮および毛包脂腺系のケラチノサイトの

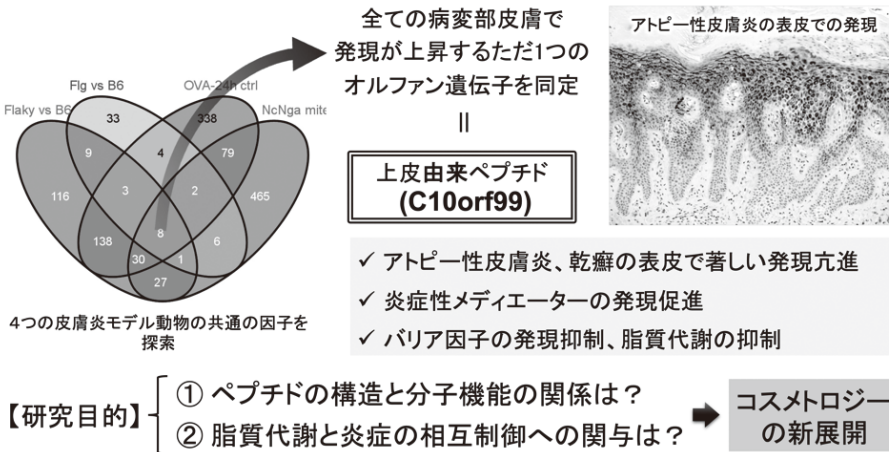


図1 C10orf99 遺伝子の同定

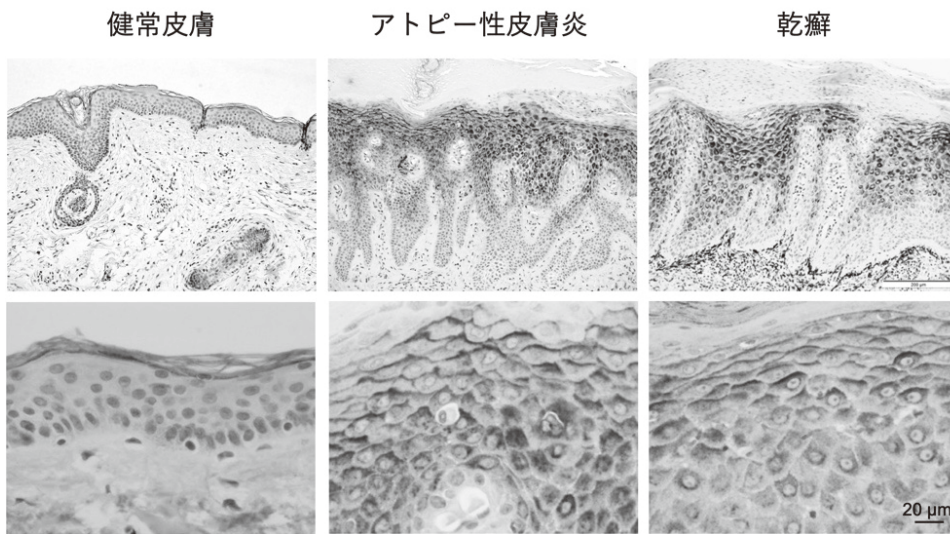


図2 C10orf99の発現はアトピー性皮膚炎と乾癬の表皮で亢進する

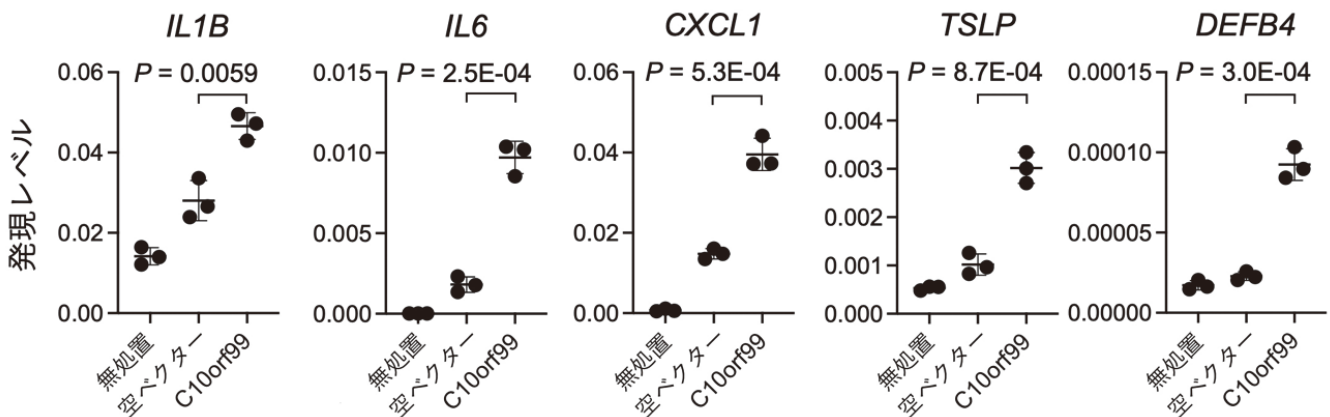


図3 表皮細胞でC10orf99の導入により炎症性因子の発現が促進する

分化と、皮膚の「上皮-免疫微小環境」の連関の恒常性により決定する。C10orf99ペプチドは、この両方の制御に関わる可能性が示された。本ペプチドの機能を客観的に評価できれば、次の戦略として、主観に頼らないスキンケアを提案できる可能性がある。

第2に、アトピー性皮膚炎や乾癬などの慢性炎症性疾患、また難治性皮膚潰瘍などの組織傷害に対して、表皮を標的とした新たな治療提案、創薬コンセプトを創出できる可能性がある。

(引用文献)

- 1) Dainichi T, Kitoh A, Otsuka A, et al. The epithelial immune microenvironment (EIME) in atopic dermatitis and psoriasis. *Nat Immunol* 19: 1286-1298, 2018.
- 2) Dainichi T, Nakano Y, Doi H, et al. C10orf99/GPR15L Regulates Proinflammatory Response of Keratinocytes and Barrier Formation of the Skin. *Front Immunol* 13: 825032, 2022.

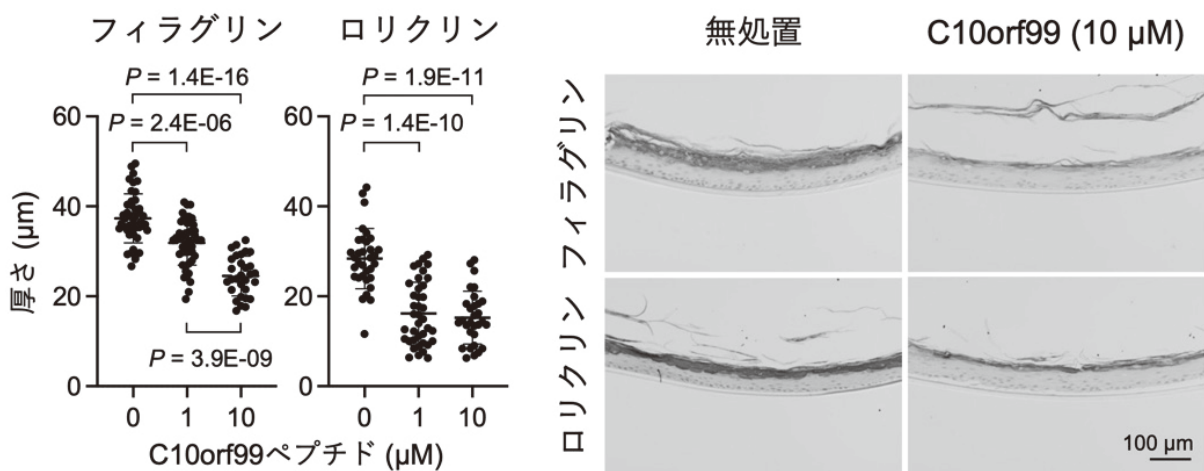


図4 C10orf99はヒト3次元培養皮膚のバリア形成を抑える

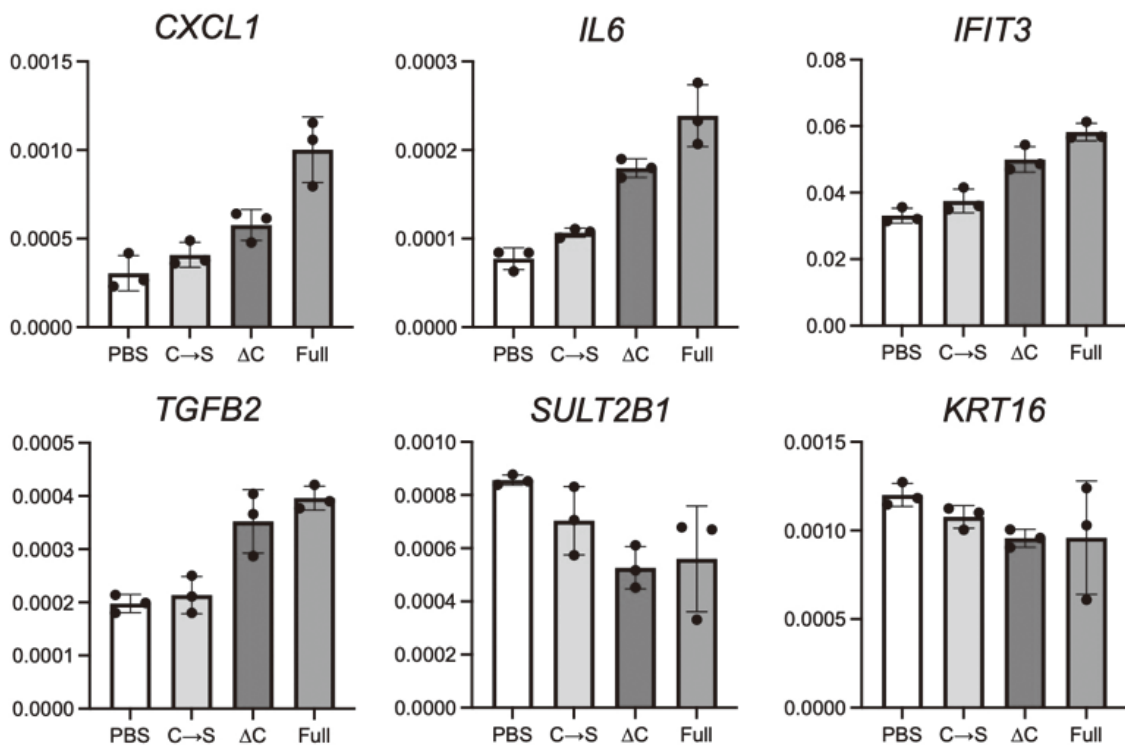


図5 C10orf99合成ペプチドによる反応遺伝子発現はジスルフィド結合に依存する

# 妊娠期における皮膚リモデリング機構の解析

東京科学大学総合研究院難治疾患研究所

豊島 文子

During pregnancy, the mother's abdominal skin expands rapidly as the fetus grows. Disruption of this mechanism is expected to induce skin diseases such as stretch marks, but the control mechanism has remained largely unexplored. We have previously found that in the abdominal skin of pregnant mice, cells with high proliferative potential appear in the epidermal basal layer. This population of cells is induced by secretory signals from the dermis. In this study, we show that dermal fibroblasts induce remodeling of extracellular matrix to increase the dermal stiffness, which is necessary for epidermal proliferation. In addition, fibroblasts transduce the stiffened matrix signal into the chemical signal via the mechano-sensing transcription factor YAP, leading to epidermal proliferation during pregnancy.

## 1. 緒言

皮膚は、ライフステージにおける体型変化に応じて、ダイナミックに拡張・収縮する。特に妊娠期には、胎児の成長に伴って母体の腹部皮膚が急速に伸展する。この腹部皮膚の伸展機構の破綻は、妊娠線などの皮膚疾患を誘発すると予想されるが、その制御機構はほとんど解明されていない。

皮膚表皮は、毛包とその周囲の毛包間表皮の領域に区分される。毛包間表皮の新陳代謝は皮膚の恒常性維持に必須であり、表皮基底層に存在する表皮基底細胞の増殖と分化のバランスに依存している。クローン系譜追跡技術と数理モデルを用いた研究により、表皮基底細胞の多様性と動態を説明するモデルが複数提唱されてきた。代表例として、表皮基底細胞が確率的に自己複製と分化を行う single type of progenitor モデル<sup>4-6)</sup>、幹細胞から前駆細胞へ段階的に分化する階層モデル<sup>1,2)</sup>、各細胞系譜を個々のマーカーや増殖能の違いによって区別できる基底細胞多様性モデル<sup>3-5)</sup>などがある。さらに、マウスとヒトの表皮における単一細胞トランスクリプトーム解析から、遺伝子発現の不均一性に基づく複数の基底細胞クラスターが明らかにされている<sup>6-9)</sup>。これらの研究は定常状態や創傷治癒をモデルとして研究されてきたが、体型変化時などの生理的な皮膚リモデリングにおける解析はなされていない。

我々はこれまでに、急速に伸展する妊娠マウスの腹部皮膚において、表皮基底層に高い増殖能を持つ細胞が出現することを見出した。この細胞群は真皮からの分泌シグナルによって誘導され、転写因子 Tbx3 依存的に増殖すること

を示した<sup>10)</sup>。また、Tbx3 陽性基底細胞は血管依存的に幹細胞性を維持する特徴があり、妊娠期には体表血管の増加に依存して出現し、出産後には血管退縮とともに分化して表皮から排出されることが分かった。さらに、皮膚に張力負荷をかけると非妊娠においても体表血管が増加し、血管に依存して Tbx3 陽性基底細胞が誘導された。また、体表血管の豊富な足底部皮膚では、Tbx3 陽性基底細胞は恒常的に存在していた<sup>11)</sup>。一方、加齢した皮膚では、体表血管の退縮による真皮の過剰な硬化が、表皮基底細胞のメカノセンサー Piezo1 の持続的活性化を介して早期分化を誘導していた<sup>12)</sup>。これらのことから、体表血管による真皮の組織内力場(剛性)の調整が皮膚の恒常性維持に重要であることが示唆された。

本研究では、妊娠期の腹部皮膚伸展における皮膚組織剛性の調整機構について、真皮線維芽細胞の観点から研究を進めた。

## 2. 方法

### 2.1. 真皮線維芽細胞の単一細胞遺伝子発現解析

非妊娠と妊娠各ステージのマウス腹部皮膚から皮下脂肪をメスで取り除き、トリプシン処理により表皮と真皮に分離した。真皮組織をコラゲナーゼ処理し真皮細胞を単一細胞に分離させた。各群の単細胞懸濁液を 10 × Chromium Controller (10 × Genomics) でバーコード化した。その後、各サンプルのバーコード化された細胞からの RNA を逆転写し、Chromium Single Cell Reagent Kit の試薬を用いて製造元の指示に従ってシーケンスライブラリーを構築し、シーケンスを実施した。10 × Genomics の Cell Ranger パイプラインを用いて各細胞の遺伝子カウントを行った。Seurat RunUMAP 関数により UMAP 解析とクラスタリングを行った。

### 2.2. 真皮線維芽細胞クラスターの空間マッピング

5つの線維芽細胞クラスターそれぞれについて、10



Skin remodeling during pregnancy

Fumiko Toyoshima

Medical Research Laboratory, Institute of Integrated Research, Science Tokyo

以上のマーカー遺伝子を選別した。各遺伝子について padlock probe を合成し、in situ seq (Hybridization-based In Situ Sequencing, HybISS 法) を用いて各遺伝子産物の皮膚切片上での空間配置を同時検出した。各線維芽細胞の核から一定距離内にある遺伝子産物の個数を定量化し、probabilistic cell typing by in situ sequencing (pciSeq) 法によって、切片上の各線維芽細胞を 5 クラスターに分類した。

### 2.3. 原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた真皮剛性マッピング

凍結切片化した皮膚サンプルを融解後 Hoechst 染色し、真皮領域に対して AFM を用いた QITM imaging (quantitative imaging; Bruker JPK Nanowizard 3) を実施した。数~数十  $\mu\text{m}$  四方の測定領域に対して高密度に測定点を設け、各点で高速の押し込み試験を行うことにより、測定領域の表面形状と剛性を同時にマッピングした。qp-BioAC cantilever B (spring constant  $\sim 0.1\text{N/m}$ ; tip radius  $< 10\text{ nm}$ ) を使用した。

### 2.4. マウス実験

すべてのマウス実験は、京都大学動物実験規程ならびに東京科学大学動物実験規定のガイドラインに従って行われた。動物実験は京都大学医生物学研究所動物実験委員会ならびに東京科学大学動物実験委員会の承認を得た。WT マウスの解析には C57BL/6J 系統を用いた。Pdgfra-CreERT2, Yap1 flox/flox, Wwtr1 flox/flox マウスは Jackson Laboratories から入手した。

## 3. 結果

### 3.1. 妊娠期における細胞外基質リモデリングを担う真皮線維芽細胞クラスターの同定

非妊娠、妊娠 4 日目、9 日目、17 日目の腹部皮膚真皮の細胞について scRNAseq 解析を実施した。このうち線維芽細胞についてクラスタリング解析し、5 クラスターに分類した。各クラスターの皮膚組織内での空間配置を特定するため、それぞれに特異的な複数マーカー遺伝子を 10 遺伝子以上選別し、HybISS によって全てのマーカー遺伝子の mRNA を同一切片上でマッピングした。次に、pciSeq 法を用いて核から一定距離内にある各 mRNA の個数を定量化することによって、切片上の各線維芽細胞を 5 クラスターに分類した。その結果、細胞数の多い二つのクラスターのうち、一つは表皮に近い真皮の上層部に存在し、もう一つのクラスターは皮下組織に多く存在していた。また、5 クラスター間での遺伝子発現を比較した結果、真皮上層部に存在する線維芽細胞では、細胞外基質関連遺伝子群 (マトリソーム) が有意に濃縮していた。さらに、このクラス

ターでは、妊娠の進行に伴い発現するマトリソームが大きく変化することが分かった。これらの結果から、妊娠期の腹部皮膚では、真皮上層部において線維芽細胞による細胞外基質のリモデリングが誘導されていることが示唆された。

### 3.2. 妊娠期における真皮剛性の変化

細胞外基質のリモデリングは、組織の剛性 (かたさ) や形状を変化させることが予想される。そこで、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた QITM imaging (quantitative imaging) を実施した。本手法は、数~数十  $\mu\text{m}$  四方の測定領域に対して高密度に測定点を設け、各点で高速の押し込み試験を行うことにより、測定領域の表面形状と剛性を同時にマッピングする手法である。非妊娠、妊娠 9 日、妊娠 17 日のマウス腹部皮膚を測定したところ、妊娠 8 日目で真皮線維が束化する現象が認められ、かたさも 1.5 倍程度上昇することが分かった。この現象は、16 日目においても同等のレベルに維持されていた。

### 3.3. 真皮線維芽細胞におけるメカノシグナルの活性化

真皮線維の形状や剛性の変化は、線維に接着している線維芽細胞のシグナル伝達を変化させる可能性がある。そこで、非妊娠と妊娠 9 日目を比較して線維芽細胞で変化のある遺伝子群の pathway 解析を実施したところ、focal adhesion pathway が妊娠 9 日目で有意に上昇していた。さらに、妊娠 9 日目で上昇する遺伝子群の上流転写因子を予測解析したところ、メカノトランスデューサーである YAP が有意に濃縮していた。また、YAP の下流遺伝子群も、妊娠の進行に伴い線維芽細胞で発現上昇することが分かった。さらに、妊娠 9 日、妊娠 17 日の腹部皮膚真皮の線維芽細胞において、YAP の核移行が誘導されていた。

YAP の活性化が基質のかたさに依存することを検証するため、非妊娠と妊娠の真皮のかたさと同等のハイドロゲルを作成し、腹部皮膚から単離・培養したプライマリー線維芽細胞を培養した。その結果、非妊娠と同等のかたさ (柔らかい) のハイドロゲル上に比べ、妊娠と同等のかたさ (かたい) のハイドロゲル上では、YAP の核移行が有意に上昇した。

以上の結果から、細胞外基質リモデリングによる真皮線維の剛性変化が、線維芽細胞において YAP の活性化を誘導することが明らかとなった。

### 3.4. メカノシグナルから化学シグナルへの転換による表皮増殖の誘導

これまでの研究で、妊娠期においては真皮からの分泌シグナルが表皮細胞の増殖を誘導することが明らかとなった。そこで、真皮線維芽細胞における YAP の活性化が表皮細胞

胞の増殖を誘導する可能性を検証した。

このため、線維芽細胞特異的にYAP/TAZをノックアウトするマウスを作出した。タモキシフェンを妊娠マウスの腹部皮膚に塗布することにより、妊娠期腹部特異的にYAP/TAZを線維芽細胞でノックアウトしたところ、妊娠期における表皮基底細胞の増殖が有意に低下した。同様の現象は、真皮上層部に存在する線維芽細胞クラスターでYAP/TAZをノックアウトした場合も認められた。

次に、YAPの下流で発現し、表皮増殖を誘導する分泌因子の同定を試みた。このため、線維芽細胞と表皮基底細胞間でのNicheNet解析を実施した。Sender(分泌因子・リガンド)とReceiver(受容体)を線維芽細胞と表皮基底細胞にそれぞれ設定し、妊娠期で発現上昇し、かつYAP/TAZノックアウトマウスで発現が低下する分泌因子を選別し結果、3種類のSender-Receiverが候補として挙げられた。そのうちの一つであるTgfb2-Tgfr2/3は、細胞の増殖や分化に関与することが報告されていた。また、YAPがTgfb2のプロモーター領域に結合することが、公共データベースChIP Atlasで示されていた。そこで、Tgfr2を表皮基底細胞でノックアウトしたところ、妊娠期における表皮基底細胞の増殖が有意に低下した。これらの結果から、真皮剛性の変化が線維芽細胞においてYAPの活性化を誘導し、YAPがTgfb2の転写を誘導することでTgfb2-Tgfr2シグナルを介して表皮基底細胞の増殖を促進することが明らかとなった。

#### 4. 考察と総括

皮膚のリモデリングには、真皮と表皮のクロストークが重要である。本研究では、妊娠期の皮膚伸展において、真皮の剛性変化が表皮への化学シグナルに変換されるメカニズムを明らかにした。この機構においては、真皮上層部に存在する線維芽細胞クラスターが主要な役割を担っていた。すなわち、妊娠中期(妊娠9日目)においてマトリソームの遺伝子発現を変化させて細胞外基質リモデリングを誘導すると共に、自らが剛性変化を感知してYAPを介した表皮へのTgfb2シグナルを分泌していた。従って、この線維芽細胞クラスターは、力場シグナルを化学シグナルへ変換する役割を果たしていることが示唆される。

真皮上層部に存在する線維芽細胞クラスターでは、妊娠9日目ですでにマトリソーム遺伝子の発現が誘導され、真皮剛性や形状も変化していた。妊娠9日目は腹囲の変化はほとんど認められないため、胎仔の成長にともなう腹部の張力負荷は増加していないと考えられる。従って、マトリソーム発現を誘導するシグナルは張力以外の要因であると予想される。妊娠期に増加するホルモンや胎仔からのシグナルなど、上流シグナルの同定が今後の課題である。これまでの研究で、妊娠期には体表血管が発達し、体表血管依存

的に表皮基底細胞の増殖が誘導されることを示した。体表血管の発達がホルモンなどの循環因子を真皮に到達させるために必要である可能性も考えられる。体表血管と真皮線維芽細胞・真皮剛性との関連を明らかにすることが、生理的皮膚リモデリングの理解につながると予想される。

妊娠線は、真皮線維の損傷が原因とされている。しかし、そのメカニズムはほとんど不明である。本研究によって、真皮線維芽細胞による細胞外基質リモデリングが、妊娠中期ですでに開始されていることが明らかとなった。妊娠の早い段階での真皮のケアが妊娠線の予防には重要かもしれない。マトリソームの発現を誘導する上流因子や体表血管を発達させる因子を特定することで、それらを標的としたスキンケアの技術開発が望まれる。

#### 謝辞

本研究は、京都大学iPS細胞研究所の山本拓也教授、京都大学医生物学研究所の牧功一郎准教授との共同研究として実施した。

#### (引用文献)

- 1) G. Mascré, S. Dekoninck, B. Drogat, K. K. Youssef, S. Broheé, P. A. Sotiropoulou, B. D. Simons, C. Blanpain, Distinct contribution of stem and progenitor cells to epidermal maintenance. *Nature* 489: 257-262, 2012.
- 2) A. Sánchez-Danés, E. Hannezo, Jean-Christophe L. M. Liagre, K. K. Youssef, B. D. Simons, C. Blanpain, Defining the clonal dynamics leading to mouse skin tumour initiation. *Nature* 536: 298-303, 2016.
- 3) C. Gomez, W. Chua, A. Miremedi, S. Quist, D. J. Headon, F. M. Watt, The interfollicular epidermis of adult mouse tail comprises two distinct cell lineages that are differentially regulated by Wnt, Edaradd, and Lrig1. *Stem Cell Reports* 1: 19-27, 2013.
- 4) E. Roy, Z. Neufeld, L. Cerone, H. Y. Wong, S. Hodgson, J. Livet, K. Khosrotehrani, Bimodal behaviour of interfollicular epidermal progenitors regulated by hair follicle position and cycling. *EMBO J* 35: 2658-2670, 2016.
- 5) A. Sada, F. Jacob, E. Leung, S. Wang, B. S. White, D. Shalloway, T. Tumber, Defining the cellular lineage hierarchy in the interfollicular epidermis of adult skin. *Nat. Cell Biol.* 18: 619-631, 2016.
- 6) D. W. M. Tan, K. B. Jensen, M. W. B. Trotter, J. T. Connelly, S. Broad, F. M. Watt, Single-cell gene expression profiling reveals functional heterogeneity of undifferentiated human epidermal cells. *Development* 140: 1433-1444, 2013.

- 7) S. Joost, A. Zeisel, T. Jacob, X. Sun, G. L. Manno, P. Lönnerberg, S. Linnarsson, M. Kasper, Single-Cell Transcriptomics Reveals that Differentiation and Spatial Signatures Shape Epidermal and Hair Follicle Heterogeneity. *Cell Syst.* 3: 221-237, 2016.
- 8) J. B. Cheng, A. J. Sedgewick, A. I. Finnegan, P. Harirchian, J. Lee, S. Kwon, M. S. Fassett, J. Golovato, M. Gray, R. Ghadially, W. Liao, B. E. P. White, T. M. Mauro, T. Mully, E. A. Kim, H. Sbitany, I. M. Neuhaus, R. C. Grekin, S. S. Yu, J. W. Gray, E. Purdom, R. Paus, C. J. Vaske, S. C. Benz, J. S. Song, R. J. Cho, Transcriptional Programming of Normal and Inflamed Human Epidermis at Single-Cell Resolution. *Cell Rep.* 25: 871-883, 2018.
- 9) A. Ghahramani, G. Donati, N. M. Luscombe, F. M. Watt, Epidermal Wnt signalling regulates transcriptome heterogeneity and proliferative fate in neighbouring cells. *Genome Biol.* 19: 3, 2018.
- 10) Ichijo, R., Kobayashi, H., Yoneda, S., Iizuka, Y., Kubo, H., Matsumura, S., Kitano, S., Miyachi, H., Honda, T., and Toyoshima, F. Tbx3-dependent amplifying stem cell progeny drives interfollicular epidermal expansion during pregnancy and regeneration. *Nat. Commun.* 8: 508, 2017.
- 11) Ichijo R, Kabata M, Kidoya H, Muramatsu F, Ishibashi R, Abe K, Tsutsui K, Kubo H, Iizuka Y, Kitano S, Miyachi H, Kubota Y, Fujiwara H, Sada A, Yamamoto T, Toyoshima F. Vasculature-driven stem cell population coordinates tissue scaling in dynamic organs. *Sci. Adv.* 7: ea2575, 2021.
- 12) Ichijo R, Maki K, Kabata M, Murata T, Nagasaka A, Ishihara S, Haga H, Honda T, Adachi T, Yamamoto T, Toyoshima F. Vasculature atrophy causes a stiffened microenvironment that augments epidermal stem cell differentiation in aged skin. *Nat. Aging* 2: 592-600, 2022.

# 表皮細胞老化において細胞膜リン脂質の果たす役割の解明

東京理科大学創域理工学部

中村 由和

Aging research has increasingly focused on molecular mechanisms, with the 2023 "Hallmarks of Aging" listing twelve key factors but omitting lipid-related contributors. The role of lipids in aging remains unclear, particularly in skin aging, which has both medical and social implications. Our study investigates the role of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate [PI(4,5)P<sub>2</sub>] in epidermal aging. We previously observed that DNA damage stress, a primary factor in extrinsic aging, reduces PI(4,5)P<sub>2</sub> levels in keratinocytes. Overexpression of PI(4,5)P<sub>2</sub>-degrading enzymes induces cellular senescence phenotypes, while increasing PI(4,5)P<sub>2</sub> synthesis enhances resistance to stress-induced senescence. However, *in vivo* evidence remained limited. Here, we generated transgenic (TG) mice expressing a PI(4,5)P<sub>2</sub>-degrading enzyme under the K15 promoter (K15::Lyn-INPP5 Ecat-GFP TG). At 9 months, these mice exhibited a reduction in hair follicles and decreased type XVII collagen expression, suggesting potential premature hair follicle aging. Additionally, *in vitro* analysis using HaCaT cells revealed that PI(4,5)P<sub>2</sub> depletion disrupted plasma membrane localization of the scaffold protein Par3, which interacts with the exocyst complex to regulate exocytosis. By expressing a plasma membrane-targeted Par3 exocyst-binding domain (Lyn-hPar3(710-1089)-V5), we partially rescued PI(4,5)P<sub>2</sub> depletion-induced cellular senescence phenotypes, including increased cell area, SA-β-gal activity, and p21 expression. Our findings suggest that PI(4,5)P<sub>2</sub> plays a critical role in cellular senescence of keratinocytes by modulating exocytosis through PAR3. While *in vivo* phenotypes were mild at 9 months, long-term studies are needed to determine the full extent of PI(4,5)P<sub>2</sub>'s role in epidermal and hair follicle aging in mice. These results highlight PI(4,5)P<sub>2</sub> as a potential target for interventions against skin aging and provide novel insights into lipid-mediated aging mechanisms.

## 1. 緒言

ホスファチジルイノシトール (PI) は生体膜を構成するリン脂質のひとつであり、グリセロール骨格にリン酸を介してイノシトール環が結合している。PIのイノシトール環の3位、4位および5位の水酸基が異なるパターンのリン酸化を受けることにより7種類のリン酸化体が存在しており、これらはPhosphatidylinositol phosphates (PIPs)と総称される<sup>1)</sup>。PIPsの一つであるホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸 [PI(4,5)P<sub>2</sub>] は、PIのイノシトール環の4位と5位の水酸基がリン酸化されたリン脂質である。我々は、以前より、PI(4,5)P<sub>2</sub>を加水分解する酵素ホスホリパーゼC (PLC)の皮膚における機能について研究を行ってきており<sup>2-5)</sup>、その過程で、PLCの基質であるPI(4,5)P<sub>2</sub>が表皮に豊富に存在することを明らかにしてきた<sup>6)</sup>。また、培養細胞を用いた解析においても、ヒト表皮細胞株HaCaT細胞には形質膜のPI(4,5)P<sub>2</sub>が豊富に存在することも確認してきた。

近年、老化の制御機構についての研究が活発に進められており、老化を規定する要因がHallmarks of Agingとし

て2023年にCell誌に報告されている<sup>7)</sup>。Hallmarks of AgingにはゲノムDNA、タンパク質、エピゲノムに関連するものなど12個の要因が挙げられているが、脂質に関する要因は含まれておらず、老化制御における脂質の役割には不明な点が多い。皮膚は加齢の影響が外観に現れるため、皮膚老化の制御は医学的観点のみでなく、社会的観点からも重要な課題であり、皮膚老化を抑制するための安全で有効な方法の開発が求められる。皮膚の老化には、加齢による内因性老化と環境因子による外因性老化がある。我々は、外因性老化の主な誘因となるDNA損傷ストレスを表皮細胞に与えた際にPI(4,5)P<sub>2</sub>の量が減少することを発見した。また、PI(4,5)P<sub>2</sub>を分解する酵素を表皮細胞に過剰発現させた際には、細胞老化に特徴的な表現型が誘導されるという結果を得ていた。さらに、PI(4,5)P<sub>2</sub>を合成する酵素を表皮細胞に過剰発現した際には、表皮細胞がDNA損傷ストレスによる細胞老化誘導に対して抵抗性を示すことを示唆する結果も得ている。これらのことから、PI(4,5)P<sub>2</sub>は表皮細胞の老化に対して抑制的に働く可能性が高く、PI(4,5)P<sub>2</sub>を増加させることは、表皮細胞の細胞老化を抑制し、皮膚老化の予防や改善に繋がる可能性が考えられる。しかしながら、これまでの知見は培養表皮細胞を用いた研究により得られたものであり、生体内においてもPI(4,5)P<sub>2</sub>の減少が表皮細胞の老化に関与するかは不明である。また、PI(4,5)P<sub>2</sub>の減少が表皮細胞老化を誘導する機構は不明である。そこで、本研究では、PI(4,5)P<sub>2</sub>がマウス個体の表皮老化の制御に関わるのかについて明らかにすることを目的とした。また、PI(4,5)P<sub>2</sub>が表皮細胞の



Elucidating the Role of Plasma Membrane Phospholipids in Cellular Senescence of Keratinocytes

Yoshikazu Nakamura

Department of Applied Biological Science, Faculty of Science and Technology, Tokyo University of Science

細胞老化に対して抑制的に働く分子機構を明らかにすることも目指した。

## 2. 方法

### 2.1. PI(4,5)P<sub>2</sub>代謝酵素トランスジェニックマウスの作成と解析

K15::Lyn-INPP5Ecat-GFP TGマウスは、毛包幹細胞で活性化するK15プロモーターの下流にLynのN末端配列およびGFPと融合させたINPP5Eの酵素活性ドメインをコードするcDNA (Lyn-INPP5Ecat-GFP) を導入した遺伝子を用いて作製した。本実験では9ヶ月齢のオスのマウスを使用し、皮膚パラフィン切片を用いたHE染色と皮膚凍結切片を用いた免疫蛍光染色を行った。

### 2.2. 形質膜標的化Par3およびPI(4,5)P<sub>2</sub>分解酵素を導入したHaCaT細胞の解析

HaCaT細胞にLyn-INPP5Ecat-GFPおよびLyn-hPar3(710-1089)-V5をレトロウイルスベクターを用いて発現させた。これらの細胞において細胞面積の測定、SA-β-gal活性を示す細胞の検出、免疫蛍光染色によるp21の検出を行った。

## 3. 結果

### 3.1. PI(4,5)P<sub>2</sub>代謝酵素遺伝子改変マウスの解析

表皮細胞におけるPI(4,5)P<sub>2</sub>の減少がマウスの表皮にどのような影響を及ぼすかは不明であった。そこで、PI(4,5)P<sub>2</sub>の5位のリン酸基を脱リン酸化できる活性を持つ酵素の酵素活性ドメインを形質膜に発現させたK15::Lyn-INPP5Ecat-GFP TGマウスを作成した。現在のところ9ヶ月齢までの飼育を行っている。これらのマウスの皮膚の

組織切片を観察し、表皮、真皮の厚さと毛包の数を調べたところ、表皮、真皮の厚さに変化は見られなかったものの、K15::Lyn-INPP5Ecat-GFP TGマウスでは毛包の数の減少が観察された(図1)。また、毛包の老化と関与することが報告されている17型コラーゲンの減少が毛包において観察された。

### 3.2. PI(4,5)P<sub>2</sub>による表皮細胞老化制御機構の解析

我々は、以前、形質膜PI(4,5)P<sub>2</sub>の減少はPI(4,5)P<sub>2</sub>結合タンパク質であるPar3の形質膜局在を抑制し、このことがPI(4,5)P<sub>2</sub>減少時の細胞形態変化に関わることを報告してきた<sup>6)</sup>。形質膜のPar3はエキソサイトーシス小胞上に存在するエクソシスト複合体と結合し、エキソサイトーシス小胞を形質膜へ係留し、エキソサイトーシスを促進する働きを持つ<sup>8)</sup>。そこで、Par3のエクソシスト複合体結合部位を形質膜に標的化して発現させることで、PI(4,5)P<sub>2</sub>分解酵素導入によるPI(4,5)P<sub>2</sub>減少に伴う細胞老化誘導を抑制できる可能性を考えた。Par3をPI(4,5)P<sub>2</sub>の量に依存せずに形質膜に発現させるために、Par3のエクソシスト複合体結合部位に形質膜標的化配列とV5タグを付加した遺伝子であるLyn-hPar3(710-1089)-V5を用いた。PI(4,5)P<sub>2</sub>分解酵素としてはPI(4,5)P<sub>2</sub>の5位のリン酸基を脱リン酸化できる活性を持つ酵素の酵素活性ドメインを形質膜に標的化したLyn-INPP5Ecat-GFPを用いた。細胞老化の特徴として細胞の扁平化に伴う細胞面積の増加が挙げられるため細胞面積について解析したところ、Lyn-INPP5Ecat-GFPのみを発現させた細胞と比較してLyn-INPP5Ecat-GFPと同時にLyn-hPar3(710-1089)-V5を発現させた細胞では細胞面積の増加が抑制されることが明

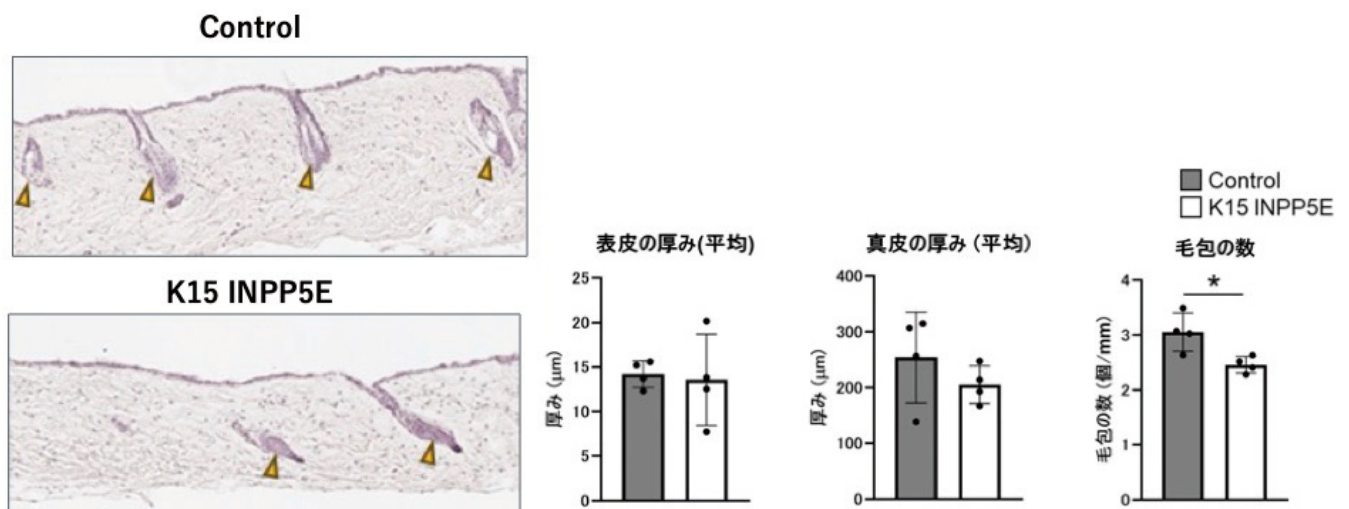


図1 毛包幹細胞におけるPI(4,5)P<sub>2</sub>分解酵素発現は毛包の数を減少させる

9ヶ月齢のK15::Lyn-INPP5Ecat-GFP TGマウス(K15 INPP5E)の背部皮膚のHE染色と真皮、表皮の厚みと毛包の数。\**p*<0.05。

らかになった。続いて細胞老化時に観察されるSA-β-gal活性を示す細胞の増加が見られるかを検討したところ、Lyn-INPP5Ecat-GFPのみを発現させた細胞と比較してLyn-INPP5Ecat-GFPと同時にLyn-hPar3(710-1089)-V5を発現させた細胞ではSA-β-gal活性を示す細胞の割合の増加が抑制されることが明らかになった。続いて、細胞老化時に発現が増加するサイクリン依存性キナーゼ阻害因子p21の検出を行ったところ、Lyn-INPP5Ecat-GFPのみを発現させた細胞と比較してLyn-INPP5Ecat-GFPと同時にLyn-hPar3(710-1089)-V5を発現させた細胞ではp21のシグナルを示す細胞の数が少ないことが明らかになった(図2)。

#### 4. 考察

毛包幹細胞にPI(4,5)P<sub>2</sub>分解酵素を発現させたK15::Lyn-INPP5Ecat-GFP TGマウスでは毛包の数の減少が観察されたが、その程度は軽度なものであった。本研究期間内では作成したマウスを長期間飼育して老齢マウスを得た上での解析にまでは至らなかったため、今後、加齢したマウスを用いた解析を行い、今回、観察された表現型がより明確に見られるようになるのかを検討する必要がある。

と考えている。

本研究では、形質膜標的化Par3のエクソシスト複合体結合部位を発現させることでPI(4,5)P<sub>2</sub>減少により誘導される細胞老化関連表現型の一部を抑制できることが示唆された。最近になり形質膜の損傷が細胞老化を誘導することが報告されている<sup>9)</sup>。興味深いことにPI(4,5)P<sub>2</sub>を減少させた細胞では、細胞膜非透過性蛍光物質の細胞外部から細胞内への侵入が増加するなど、形質膜損傷が起きていることを示唆する表現型も観察されている。また、PI(4,5)P<sub>2</sub>はPar3の形質膜局在に必要なことや、エキソサイトーシスによる膜供給が形質膜損傷の修復機構として重要であることを考えると<sup>10)</sup>、PI(4,5)P<sub>2</sub>の減少によるPar3の形質膜局在不全が形質膜損傷を介して細胞老化誘導に関わる可能性も考えられる。今後、PI(4,5)P<sub>2</sub>の減少、Par3の形質膜局在、細胞膜損傷、細胞老化の関連について解析を進める必要がある。

本研究によりPI(4,5)P<sub>2</sub>がマウス個体においても表皮の老化制御に関わることを示唆され、PI(4,5)P<sub>2</sub>による細胞老化制御にはPar3の形質膜局在に関わる可能性が示された。今後、PI(4,5)P<sub>2</sub>量の操作やPar3の形質膜移行が表皮細胞老化抑制のための標的となる可能性が考えられる。

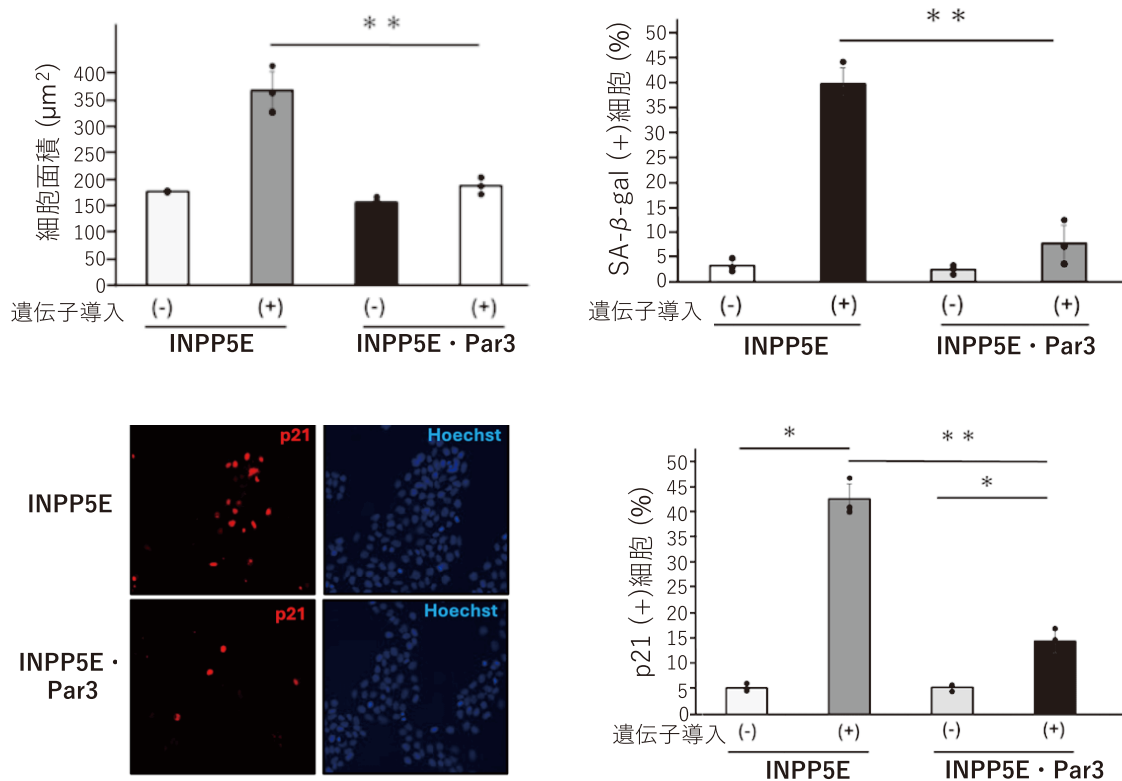


図2 形質膜標的化Par3はPI(4,5)P<sub>2</sub>分解酵素の発現による表現型を抑制する  
Lyn-INPP5Ecat-GFP単独発現(INPP5E)またはLyn-INPP5Ecat-GFPとLyn-hPar3(710-1089)-V5の同時発現(INPP5E·Par3)細胞において細胞面積、SA-β-gal活性を示す細胞の割合、p21陽性細胞の割合を測定した。同じサンプルの中の遺伝子導入がされていない細胞を(-)、遺伝子導入がされている細胞を(+))として、それぞれで測定を行った。\*p<0.05、\*\*p<0.01。

## 謝 辞

本研究の遂行にあたり貴重なご支援をいただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深く感謝を申し上げます。K15::Lyn-INPP5E-GFP TGマウスをご作製いただいた東京理科大学生命医科学研究所 小川修平先生に深く感謝いたします。

## (引用文献)

- 1) Sasaki T, Takasuga S, Sasaki J, Kofuji S, Eguchi S, Yamazaki M, Suzuki A. Mammalian phosphoinositide kinases and phosphatases. *Prog. Lipid Res.* 48, 307-343 (2009)
- 2) Nakamura Y, Fukami K, Yu H, Takenaka K, Kataoka Y, Shirakata Y, Nishikawa S, Hashimoto K, Yoshida N, Takenawa T. Phospholipase Cdelta1 is required for skin stem cell lineage commitment. *EMBO J.* 12, 2981-2991 (2003)
- 3) Nakamura Y, Ichinohe M, Hirata M, Matsuura H, Fujiwara T, Igarashi T, Nakahara M, Yamaguchi H, Yasugi S, Takenawa T, Fukami K. Phospholipase C-δ1 is an essential molecule downstream of Foxn1, the gene responsible for the nude mutation, in normal hair development. *FASEB J.* 3, 841-849 (2008)
- 4) Kanemaru K, Nakamura Y, Sato K, Kojima R, Takahashi S, Yamaguchi M, Ichinohe M, Kiyonari H, Shioi G, Kabashima K, Nakahigashi K, Asagiri M, Jamora C, Yamaguchi H, Fukami K. Epidermal phospholipase Cδ1 regulates granulocyte counts and systemic interleukin-17 levels in mice. (2012) *Nat. Commun.*, 3, 963.
- 5) Kanemaru K, Nakamura Y, Totoki K, Fukuyama T, Shoji M, Kaneko H, Shiratori K, Yoneda A, Inoue T, Iwakura Y, Kabashima K, Fukami K. Phospholipase Cδ1 regulates p38 MAPK activity and skin barrier integrity. (2017) *Cell Death Differ.* 24 (6) ,1079-1090.
- 6) Kanemaru K, Shimozawa M, Kitamata M, Furuishi R, Kayano H, Sukawa Y, Chiba Y, Fukuyama T, Hasegawa J, Nakanishi H, Kishimoto T, Tsujita K, Tanaka K, Itoh T, Sasaki J, Sasaki T, Fukami K, Nakamura Y. Plasma membrane phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate is critical for determination of epithelial characteristics. *Nat. Commun.* 13, 2347 (2022)
- 7) López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell* 186, 243-278 (2023)
- 8) Ahmed SM, Macara IG. The Par3 polarity protein is an exocyst receptor essential for mammary cell survival. *Nat. Commun.* 8, 14867 (2017)
- 9) Suda K, Moriyama Y, Razali N, Chiu Y, Masukagami Y, Nishimura K, Barbee H, Takase H, Sugiyama S, Yamazaki Y, Sato Y, Higashiyama T, Johmura Y, Nakanishi M, Kono K. Plasma membrane damage limits replicative lifespan in yeast and induces premature senescence in human fibroblasts. *Nat. Aging* 4, 319-335 (2022)
- 10) Andrews NW, Corrotte M. Plasma membrane repair. *Curr. Biol.* 28, R392-R397 (2018)

# 加齢による微小血管網異常と皮膚老化の関係性を解く

宮崎大学医学部血管動態生化学分野

西山 功一

This study aimed to clarify the relationship between age-related abnormalities in the microvascular network and skin aging. For this, we first developed a new method for quantitatively analyzing the three-dimensional microvascular network in mouse ear skin. Using this methodology, we found that induction of impairment of endothelial cell function reduced the microvascular network density and pericyte coverage. It was also suggested that the skin may begin to show some of the characteristics of aged skin tissue. We also established a mouse line (Col4a1/a2-flox mouse) that can simultaneously knock-out *Col4a1* and *Col4a2* genes in time- and cell-specific manner by crossing mouse carrying specific Cre driver and that is expected to intentionally reduce the density of the microvascular network due to impaired angiogenesis. Furthermore, by combining various *in vitro* and *in vivo* assays, we identified the Notch-TGF $\beta$ 2 signaling axis as a candidate molecular mechanism by which the impairment of vascular basement membrane formation via the action of vascular endothelium and pericytes leads to abnormalities in the microvascular network. It is hoped by developing this research further that we will be able to pioneer future academic trends in cosmetology and contribute to the development of this field. Furthermore, I believe that this will provide a scientific foundation that will contribute to the prevention and improvement of skin aging and the development of new treatments for age-related skin diseases, and that will greatly contribute to improving people's health and beauty.

## 1. 緒言

皮膚は加齢に伴い、表皮細胞の増殖能低下による表皮菲薄化、真皮の線維芽細胞減少によるコラーゲン・弾性線維の減少を介したシワやたるみ形成など、生理的老化に至る。また、頭皮の薄毛や脱毛は、毛包幹細胞の脱落により毛包がミニチュア化する、生理的な加齢変化によって生じることがわかってきた。毛髪を含む皮膚組織は、若々しさなどの“見た目”を決める重要な役割を担っている。また、外界からの刺激や外来物侵入から身を守るバリアとしても機能する。したがって、皮膚の生理的老化のしくみを十分理解し、その予防や改善、また加齢性皮膚疾患に対する医療の向上につなげ、人々の健康や美容の増進を図っていくことは、今後の重要な課題である。

体中に張り巡らされた微小血管は、ガス交換、栄養運搬、老廃物除去など、組織機能維持に重要である。加齢した皮膚では、血管密度の低下や血管形態異常など、微小血管網維持の変容が見られる。また、薄毛や脱毛は、皮膚の微小循環異常に起因する可能性が指摘されてきた。しかし、加齢で生じる微小血管網の変容が微小循環不全を来し、皮膚の生理的老化、そして、加齢性疾患に関与するか、十分わかっていない。



Unraveling the relationship between age-related microvascular abnormalities and skin aging

Koichi Nishiyama

Laboratory for Vascular and Cellular Dynamics, Faculty of Medicine, University of Miyazaki

微小血管網は、血管内皮細胞とそれを被覆するペリサイトとの相互作用、また、血流刺激下につくられる。また生理的範囲内の血管傷害では、血管新生にて修復され、微小血管網は維持される。我々は、血管新生が血流圧により抑制されることを最近見出した<sup>1)</sup>。続いて、ペリサイトは、4型コラーゲン沈着による血管基底膜形成を促進し、血流圧による血管新生抑制作用をさらに抑制的に制御することがわかってきている。一方、加齢に伴い、ペリサイトの血管被覆は低下することが報告されている<sup>2)</sup>。

したがって本研究では、3次元微小血管網の定量解析法を開発し、また微小血管網異常を誘導するマウスを樹立する。この解析系を起点として、血管内皮-ペリサイト-血流の相互作用を介した血管基底膜形成の破綻による微小血管網異常が皮膚の生理的老化に関与するのかを明らかにする。さらに、そのしくみを解き、革新的な皮膚老化の予防や改善、そして加齢性疾患の治療法開発に資する科学的基盤を提供し、人々の健康と美容の増進に貢献することを目的とした。

## 2. 方法

### 2.1. マウス耳介皮膚における3次元微小血管網の定量評価

マウス耳介背側の皮膚を実体顕微鏡下に採取し、微小血管網(毛細血管網)の内皮細胞とペリサイトをホールマント免疫染色にて同定後、共焦点レーザー顕微鏡にて3次元的可視化した(内皮細胞:CD31など;ペリサイト:DESMIN, PDGFR $\beta$ など)。同画像から、毛細血管密度とペリサイト被覆率を算出した。

## 2.2. マウスモデルを用いた微小血管網異常と皮膚老化の関係性の解析

血管内皮機能障害マウスは、既報に倣い<sup>3)</sup>、15-20週間の高脂肪食負荷および薬理的な一酸化窒素合成酵素(NOS)抑制にて誘導した。前述の方法にて、耳介皮膚の3次元微小血管網の定量評価を行うとともに、耳介皮膚の組織切片を用いて皮膚老化に特徴的な組織学的変化を定量評価し、両者の関係性を比較解析した。

## 2.3. 新規モデルマウス樹立による微小血管網異常と皮膚老化の因果関係の実証

これまでの検討から、ペリサイトとの相互作用を介した血管内皮細胞の4型コラーゲン(COL4)の発現が血管基底膜形成に重要であり、血管新生を促進することで微小血管網の形成と維持に必要であることが示唆されてきた。血管基底膜の構成成分であるマウス *Col4a1*、*Col4a2* 遺伝子は、プロモーターを共有する形で同遺伝子座に背中合わせでコードされている(図1)。したがってこれまで、*Col4a1* のエクソン1、プロモーター、そして *Col4a2* のエクソン1、2を含めて欠損させた、*Col4a1/a2* のコンベンショナルダブルノックアウトマウス(DKO)が作製されていた<sup>4)</sup>。しかし、同ノックアウトマウスは、E10.5-E11.5で胎生致死のため、成獣での解析はできない。したがって、*Col4a1* および *Col4a2* 遺伝子を同時に、細胞特異的かつ時期特異的にダブルノックアウト可能な *Col4a1/a2-flox* マウスを、新たに作製した(図1)。同 *flox* マウスでは、*Col4a1* のイントロン2および *Col4a2* のイントロン1に、LoxP配列をCRISPR-Cas9システムを用いて導入した。得られた *Col4a1/a2-flox* マウスと内皮細胞特異的に Cre recombinase を発現する Tie2-Cre マウスとを交配することで、内皮細胞特異的な *Col4a1/a2* DKO マウスを作出した。続いて、血管基底膜形成や血管新生を含めた、フェノタイプを網膜血管新生評価系にて解析した。

## 2.4. 血管内皮-ペリサイト間作用によるCOL4血管基底膜形成機序の *in vitro* 解析

血管内皮細胞(HUVECs: ヒト臍帯静脈内皮細胞)とペリサイト(hPC-PL: ヒト胎盤由来ペリサイト)を、24時間接触共培養もしくは非接触共培養(カルチャーインサートで隔離)し、セルソーターにてそれぞれ内皮細胞、ペリサイトを単離し、qPCR法で遺伝子発現を調べた。また、共培養上清中における目的タンパク質をELISA法にて定量評価した。同2次元共培養系において、必要に応じて生化学的および薬理的介入を行い、また同様に遺伝子・タンパク発現の変化を解析することで、血管内皮-ペリサイト間作用により内皮細胞における *Col4a1/a2* 遺伝子が制御される分子実体候補を探索した。次に、オンチップ血管新生モデルを用いて、2次元共培養系で得られた候補分子軸の妥当性を評価した。オンチップ血管新生は、マイクロ流路デバイス上に、ヒト肺線維芽細胞との隔離共培養下に、HUVECs 単独もしくは hPC-PL を同時に培養することで、細胞外基質内に3次的に血管新生を誘導した<sup>1)</sup>。2次元共培養系で得られた候補分子軸に生化学的・薬理的に介入し、新生血管枝の伸長度合いやCOL4基底膜形成度合いを定量的に評価した。

## 3. 結果と考察

### 3.1. マウスモデルを用いた微小血管網異常と皮膚老化の関係性の解析

内皮傷害負荷15週と20週のマウスの耳介皮膚の微小血管網(毛細血管網)変化を、同週齢のコントロールマウスと比較し、ホールマウント免疫染色による3次元評価系にて解析した。血管内皮機能障害誘導15週と20週の両方において、コントロール群と比較して、毛細血管網密度が減少し(図2)、加えて、毛細血管内皮細胞を被覆するペリサイト数が減少していることがわかった(図3)。また、血管内皮機能障害負荷20週の同部位のHE染色組織切片

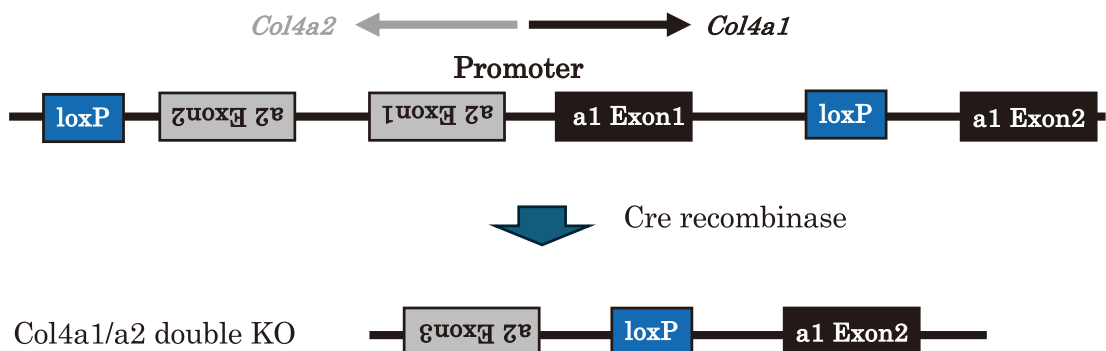
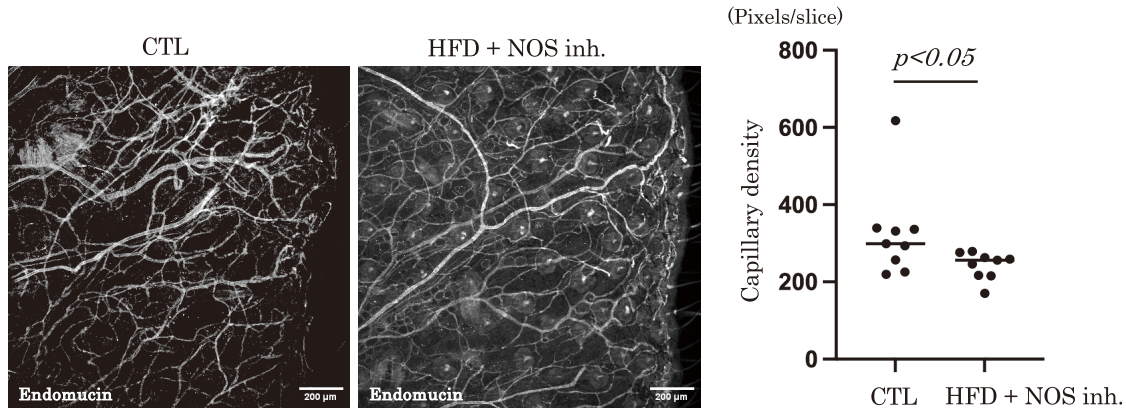


図1 マウスの *Col4a1* と *Col4a2* 遺伝子座とノックアウトストラテジー

やEVG染色組織切片において、皮膚表面構造の凹凸化や、皮膚内部のコラーゲン線維沈着の変容といった、老化皮膚の特徴を示す一部の变化が観察された(図4)。

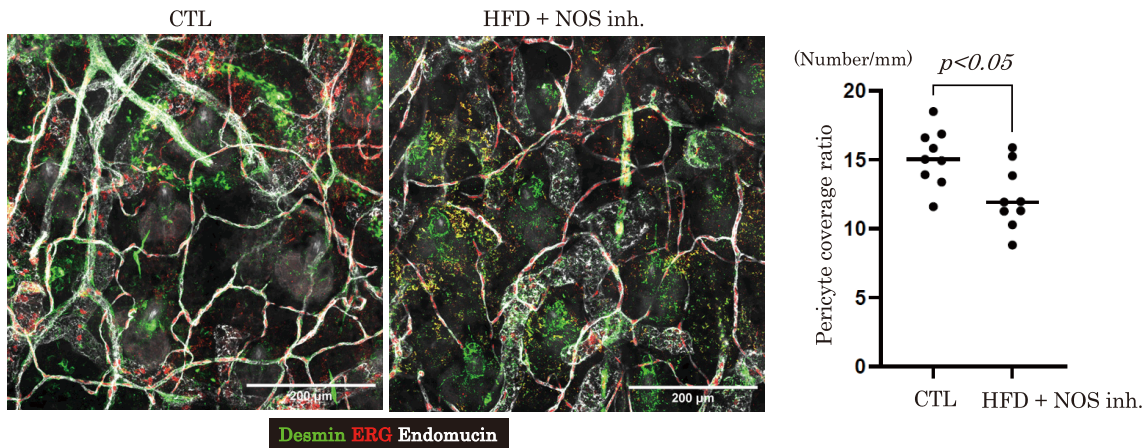
加齢に伴い、毛細血管網密度の低下や、ペリサイトの血管被覆率が低下していることが、これまで報告されている<sup>5)</sup>。今回、NOS阻害と高脂肪食負荷による血管内皮機能障害を惹起することで、加齢に伴う毛細血管網の変容が誘導さ

れた。このことは、加齢に伴う毛細血管網の変容は、内皮機能異常が一つの誘因となっていることを示唆している。では、毛細血管網密度の低下はどのような機序で起こっているのか、また、そこには血管新生不全による毛細血管網維持の破綻が関与しているのか、今後の検討が必要である。また、ペリサイトの被覆率の低下は、内皮細胞機能異常とどのように関連し、そして、どのように毛細血管密度の低



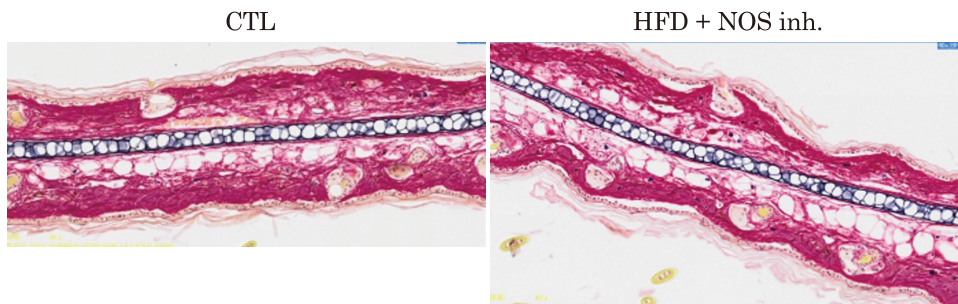
CTL : コントロール, HFD : 高脂肪食負荷, NOS inh. : 一酸化窒素合成酵素阻害

図2 内皮機能障害誘導有無でのマウス耳介皮膚における毛細血管密度



CTL : コントロール, HFD : 高脂肪食負荷, NOS inh. : 一酸化窒素合成酵素阻害

図3 内皮機能障害誘導有無でのマウス耳介皮膚毛細血管のペリサイト被覆率



CTL : コントロール, HFD : 高脂肪食負荷, NOS inh. : 一酸化窒素合成酵素阻害

図4 内皮機能障害誘導有無でのマウス耳介皮膚組織HE染色切片の典型画像

下と関連するのか、今後の課題として残されている。

今回の結果は、微小血管網異常と皮膚の加齢性変化の一部との関係性の存在を示唆する。つまり、毛細血管網機能の異常が、コラーゲンなどによる皮膚組織の支持構造の維持を脆弱化させ、老化皮膚で見られるいわゆるしわやたるみに関連している可能性がある。今後、本研究で得られた、血管内皮傷害→毛細血管網異常→線維芽細胞機能異常→コラーゲン線維異常→皮膚のたるみという一つの作業仮説は、同カスケードに関与する軸となる分子の同定、そして、その介入実験から、皮膚の硬さを測定する個体レベルでの生理学的な検討までを包括的に行い、実証していく必要がある。また、実際のマウスの加齢変化として同様なしくみの下で皮膚老化が観察されるのか、経時的な検討も必要である。

### 3.2. Col4a1/a2-flox マウス樹立による微小血管網異常と皮膚老化の因果関係の実証

上記、3.1.の微小血管網異常と皮膚老化の関係性を観察するのみでは、両者の因果関係を問うことはできない。本研究では、微小血管網密度の低下が、皮膚老化の一因となっているかどうかを実証するため、意図した時期から微小血管網密度低下の異常を人工的に惹起し、それにより皮膚老化が誘発もしくは促進されるかどうか検討することで、両者の因果関係を実証することを試みた。これまでの研究から、COL4血管基底膜の形成を阻害することで、血管新生を阻害できることがわかってきた。したがって、血管発生が終了した成獣にて、COL4をノックアウトし血管新生を阻害することで、毛細血管網の修復・維持機構が破綻し、毛細血管密度の低下が意図的に誘導できると想定した。これまで、Col4a1/a2-floxマウスを数系統樹立することに成功した。次に、同マウスの機能性を確認するため、Tie2-Creマウスと交配し、血管内皮細胞特異的なCol4a1/a2 DKOマウスを作成した。同マウスは、既報のコンベンショナルCol4a1/a2 DKOマウスとは違い胎生致死には至らなかった。したがって、生後4日目のマウスを使って、網膜血管新生への影響を観察したところ、COL4血管基底膜の形成不全に合わせて、新生血管の伸長遅延と形態異常が観察され、Col4a1/a2-floxマウスの機能性が確認された。しかしながら、内皮細胞特異的なCol4a1/a2 DKOマウスは、成長障害に加えて、週齢数の増加とともに、出血が原因と思われる死に至る個体が出現してくることがわかってきた。

今後、血管発生が終了した成獣にて血管内皮特異的にCol4a1/a2 DKOを誘導するために、Cdh5-ERT2Creマウスとの交配により、エストロゲン投与下にCol4a1/a2 DKOを誘導することを計画している。それにより、成獣にて血管新生を阻害し、毛細血管網密度の低下が誘導できるか検討する。さらに、毛細血管網密度とともに、皮膚老

化が出現するか、生理学的、組織学的解析により検討する。本Col4a1/a2-floxマウスを用いて、意図的な毛細血管密度の操作が可能になれば、毛細血管機能と組織老化との関係性のみでなく、いかに毛細血管機能が組織構築や機能の発現、そして、その恒常性の維持に関与しているかを解析する良いモデルマウスとなると考えられる。

### 3.3. 血管内皮-ペリサイト間作用によるCOL4血管基底膜形成機序の*in vitro*解析

これまで、*in vitro*の血管形成モデルを使った解析にて、血管内皮細胞とペリサイトの相互作用は、血管内皮細胞とペリサイト両者において、血管基底膜成分Col4a1およびCol4a2を発現増強させることが報告されていた<sup>4)</sup>。さらに我々のこれまでの検討から、血管新生の際の血管基底膜形成には、内皮細胞によるCol4a1/a2の発現が重要であることがわかってきた。しかし、血管内皮細胞におけるCol4a1/a2発現を制御する、血管内皮-ペリサイト間作用の分子実体は不明であった。本研究にて、内皮細胞とペリサイトとの2次元共培養を用いた検討にて、内皮細胞との相互作用を介して、ペリサイトにてTGFβ2の発現が増強し、分泌増加したTGFβ2が、内皮細胞のAlk5受容体-Smad2/3を介したシグナルを通して、Col4a1/a1の発現を増加させるしくみが示されてきた。さらに、その上流として、内皮細胞のJagged1がペリサイトにNotch3を介したシグナルを入れることで、ペリサイトのTGFβ2の発現が増強される機序もわかってきた。次に、この候補分子軸経路が、実際に血管新生におけるCol4血管基底膜形成と血管伸長に重要であるか、独自のオンチップ血管新生アッセイ系にて評価した。その結果、実際に、血管内皮-ペリサイト間相互作用として、Jagged1-Notch/TGFβ2-Alk5経路を介して、COL4血管基底膜形成を促進し、血管新生を進めていることが確認された。

本研究にて、初めて、COL4血管基底膜形成を制御する血管内皮-ペリサイト間作用を担う実働分子軸の一つである、Notch-TGFβ2分子軸が明らかとなった。同分子は、血管新生を制御可能だけでなく、毛細血管密度を制御する一つの分子標的候補であると期待される。

## 4. 総括

本研究では、新規に確立する大きく2つの解析系にて、微小血管網異常と皮膚の老化の因果関係を明らかにすることを意図した。まず、3次元微小血管網解析系を確立することで、従来の組織切片による解析では難しかった微小血管構造をネットワークレベルで捉え、かつ、ペリサイト被覆や4型コラーゲンによる血管基底膜評価など、血管の質的指標をも盛り込んだ包括的な微小血管網評価を可能にすることであった。まだその確立のための道半ばであるが、

ここまでの解析にて、血管内皮機能障害が起点となり、微小血管網密度の低下や、それを取り巻くペリサイトの被覆率の低下が生じていることがわかってきた。また、その微小血管網の異常と皮膚の加齢性変化の関連性があらためて示唆された。

2つ目として、微小血管網異常を意図的に誘導できるマウスモデルを構築し、微小血管ネットワーク異常から皮膚老化の促進に至る因果関係を直接的に証明することであった。本研究において、4型コラーゲンの血管基底膜沈着を消失させ血管新生を抑制することを通して、毛細血管密度を意図的に低下させることが期待できるCol4a1/a2-floxマウスを樹立し、その機能性を確認した。今後、この2つの方法論を駆使して、微小血管網異常に起因する皮膚老化という概念をあらためて提示し、今後のコスメトロジーの学問的潮流を先駆的に唱えることで、本領域の発展に貢献できると期待される。

さらに、血管内皮-ペリサイト作用を介した血管基底膜形成の破綻から微小血管網異常を来す分子機序として、Notch-Tgfb2シグナル軸を同定した。併せて、今後、微小血管網異常から皮膚老化が促進する分子機序を明らかにすることにより、皮膚老化の予防や改善策、加齢性皮膚疾患の新規治療法の開発に資する科学的基盤を提供し、人々の健康や美容の増進に大きく貢献できる。

#### (引用文献)

- 1) Yuge S, Nishiyama K, Arima Y, Hanada Y, Oguri-Nakamura E, Hanada S, Ishii T, Wakayama Y, Urara Hasegawa U, Tsujita K, Yokokawa R, Miura T, Itoh T, Tsujita K, Mochizuki N, Fukuhara S. Mechanical loading of intraluminal pressure mediates wound angiogenesis by regulating the TOCA family of F-BAR proteins. *Nat Commun* 13 (1): 2594, 2022.
- 2) Chen J, Sivan U, Tan SL, Lippo L, De Angelis J, Labella R, Singh A, Chatzis A, Cheuk S, Medhghalchi M, Gil J, Hollander, Marsden BD, Williams R, Ramasamy SK, Kusumbe AP. High-resolution 3D imaging uncovers organ-specific vascular control of tissue aging. *Sci Adv* 7 (6), 2021
- 3) Schiattarella GG, Altamirano F, Tong D, French KM, Villalobos E, Kim SY, Luo X, Jiang N, May HI, Wang ZV, Hill TM, Mammen PPA, Huang J, Lee DI, Hahn VS, Sharma K, Kass DA, Lavandro S, Gillette TG, Hill JA. Nitrosative stress drives heart failure with preserved ejection fraction. *Nature* 568 (7752): 351-356, 2019.
- 4) Pöschl E, Schlötzer-Schrehardt U, Brachvogel B, Saito K, Ninomiya Y, Mayer U. Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development* 131 (7): 1619-28, 2024
- 5) Horton WB, Barrett EJ. Microvascular Dysfunction in Diabetes Mellitus and Cardiometabolic Disease. *Endocr Rev* 42 (1): 29-55, 2021.

# 表皮バリア脂質の代謝異常が炎症を惹起する機序の解明

公益財団法人東京都医学総合研究所

平林 哲也

Epidermal lipids play an essential role for skin barrier function. Especially, the linoleate-containing  $\omega$ -O-acylceramide is required for formation of both corneocyte lipid envelope (CLE) and the long periodicity phase with a repeat distance of ~13 nm present in the intercellular multilamellar lipid layers of the stratum corneum. Disturbances in epidermal ceramide metabolism contribute to dry sensitive skin, dermatitis, atopic dermatitis, and ichthyosis, but how they affect skin conditions including inflammation is not yet fully understood. In the process of identifying PNPLA1 as an enzyme responsible for  $\omega$ -O-acylceramide biosynthesis, and SDR9C7 as a dehydrogenase essential for the formation of CLE, we noticed that keratinocyte activation and induced expression of proinflammatory cytokines and chemokines occur only in mice lacking the former, even though both knockout mice are models for congenital ichthyosis with significantly reduced permeability barrier function. This implies that impaired permeability barrier function does not necessarily lead to the induction of inflammatory responses, suggesting the existence of a mechanism that induces activation of keratinocytes and resident immune cells such as Langerhans cells in response to specific metabolic abnormalities of barrier lipids. In this study, we sought to identify metabolic abnormalities of epidermal barrier lipids that trigger proinflammatory responses and to elucidate the molecular mechanisms by which immune cells are activated in recognition of these metabolic abnormalities.  $\omega$ -Hydroxyceramide, a precursor for  $\omega$ -O-acylceramide biosynthesis, was accumulated in the epidermis of *Pnpla1*-deficient mice, and stimulated the keratinocyte expression of BMP7 and GM-CSF, which can facilitate the maturation and activation of epidermal Langerhans cells, consequently initiating inflammatory responses. Our findings can be applied to new skin care strategies to maintain beautiful skin by retaining moisture, strengthening barrier function and preventing from inflammation, thereby contributing to further advances in cosmetology.

## 1. 緒言

美しく健やかな肌を保つには、保湿や正常なバリア機能の維持に加えて、表皮の代謝異常や炎症応答を抑制して肌トラブルを回避する必要がある。角質細胞間脂質の主要成分であるセラミドは、保湿や透過性バリア機能に不可欠な脂質であり、化粧品やスキンケア用品へのセラミド配合は、乾燥性敏感肌や皮膚炎などの改善・予防効果が期待されている。しかしながら、表皮特有のセラミド代謝経路の乱れがどのようにして皮膚の状態に影響するかについては未だ十分に解明されているとは言えず、脂質代謝経路の制御を指向した肌質改善方法も確立していないのが現状である。

表皮に存在するセラミド分子種は、脂肪酸の鎖長、二重結合や水酸基の有無や位置などの違いにより極めて多様性に富むが、中でもスフィンゴイド塩基に超長鎖脂肪酸（炭素数28~36程度）がアミド結合し、さらにその $\omega$ 末端に必須脂肪酸のリノール酸がエステル結合したアシルセラミド（ $\omega$ -O-アシルセラミド）が皮膚バリア機能に不可欠である（図1）。この特殊な化学構造を持つ脂質の代謝経路は

非常に複雑であるが、遺伝的にアシルセラミド合成経路のいずれかの箇所に異常が生じて十分量のアシルセラミドを生合成できなくなると、バリア機能に不可欠な角層細胞間脂質の長周期ラメラ構造（~13nm）や corneocyte lipid envelope (CLE) を失い、皮膚バリア機能の障害と角層の肥厚を特徴とする皮膚疾患である先天性魚鱗癬の原因となることが知られている。

我々はアシルセラミドの生合成酵素PNPLA1や<sup>1,2)</sup>、アシルセラミドのリノール酸部分を修飾して結合型セラミド（角層細胞表面のタンパク質に共有結合するCLEの主成分）の形成に重要な酸化還元酵素SDR9C7を同定する過程で<sup>3)</sup>、両者の欠損マウスはどちらも透過性バリア機能が著しく低下するにもかかわらず、ケラチノサイトの活性化や炎症性サイトカインの誘導発現は前者の欠損マウスでのみ生じることを見出した。このことは、透過性バリア機能の低下が必ずしも炎症応答の惹起に繋がるとは限らないことを意味し、バリア脂質の特定の代謝異常に応答してケラチノサイトの活性化や免疫反応を誘導する仕組みが存在することを示唆するものである。そこで本研究では、炎症応答の引き金となる表皮バリア脂質の代謝異常を同定するとともに、その代謝異常を認識して免疫細胞が活性化する分子機序を解明することを目指した。

## 2. 方法

### 2.1. 発現量解析

マウス皮膚における発現遺伝子の網羅的解析は、Mouse



Aberrant metabolism of epidermal barrier lipids causes inflammation

Tetsuya Hirabayashi

Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science

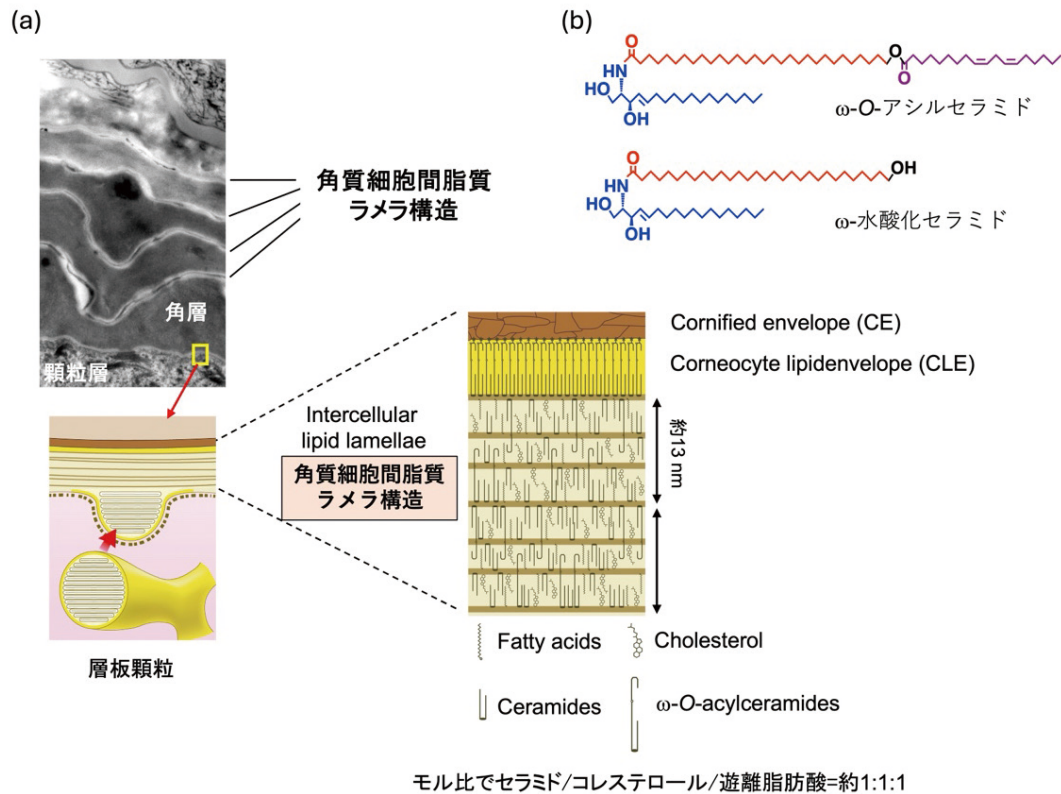


図1 皮膚バリア機能を担う角層微細構造と脂質代謝物

Gene Expression 4 × 44K v2 Microarray (G4846A, Agilent Technologies) を用いたDNA マイクロアレイ法によって行った。定量的PCRでは、細胞からtotal RNAを抽出後、ReverTra Ace qPCR RT (東洋紡) を用いてcDNAを合成し、これを鋳型として各種遺伝子の特異的に増幅するプライマーセットとTHUNDEBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡) によって遺伝子を増幅し、遺伝子発現量を解析した。ケラチノサイトの培養上清に含まれるGM-CSF量はMouse GM-CSF DuoSet (R & D systems) を用いたELISA法により定量した。

## 2.2. フローサイトメトリー

胎生19.5日のマウスの表皮および真皮を含む皮膚を剥離し、コラゲナーゼとDNase Iの存在下、37℃、2時間酵素処理することで細胞を単離した。100 μmセルストレイナーで濾過し、DAPIおよび蛍光標識抗体により染色した。得られた細胞集団をFACScelestaまたはAria II (BD Bioscience) にて解析した。

## 2.3. 細胞培養

MPEK (mouse progenitor epidermal keratinocyte) をCnT-PR培地 (CELLnTEC) によって培養し、コンフルエントになった時点でCnT-PR 2D培地 (CELLnTEC) に交

換するとともに1 mM CaCl<sub>2</sub>を添加し、3日間分化誘導した。分化ケラチノサイトに対し、各種脂質をγ-シクロデキストリン存在下で培地中に加え、細胞内に取り込ませた。

## 2.4. 脂質分析

Folch法に準じた方法で表皮から抽出した脂質画分を薄層クロマトグラフィー (TLC) プレートにスポットし、展開溶媒で展開した。5%硫酸銅溶液をスプレーして180℃に加熱することで、展開された脂質のバンドを可視化した。

## 3. 結果

### 3.1.

アシルセラミド代謝経路が障害される先天性魚鱗癬モデルマウス4系統の皮膚から抽出したRNAを用いてマイクロアレイ解析により網羅的に遺伝子発現を比較すると、ケラチノサイトの活性化と炎症性免疫応答を起こす系統 (*Pnpla1* 欠損マウス、*Abca12* 欠損マウス) と、ほとんど起こさない系統 (*Cyp4f39* 欠損マウス、*Sdr9c7* 欠損マウス) に明確に分類された (図2)。炎症応答を起こす系統においては、サイトカインの *Il1b*、*Il6*、*Il23a*、*Il33*、*Tnfa*、ケモカインの *Cxcl1*、*Cxcl5*、*Cxcl10*、およびケラチノサイト活性化マーカーである *Krt6a*、*Krt6b*、*Krt16*、*S100a8*、*S100a9*、*Tslp* などが共通に上昇して

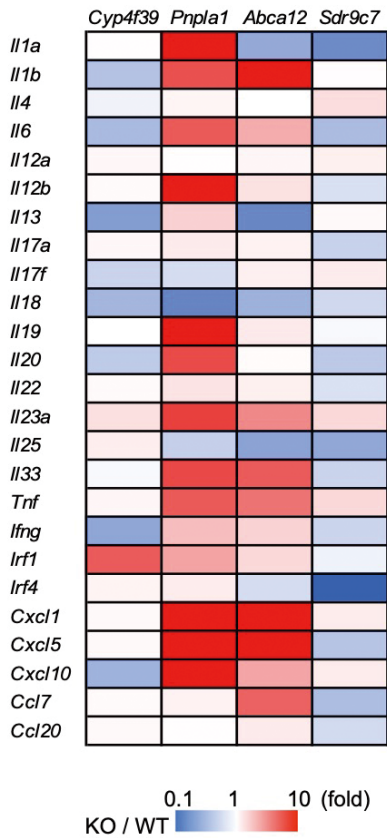


図2 先天性魚鱗癬モデルマウスの皮膚における発現遺伝子のマイクロアレイ解析

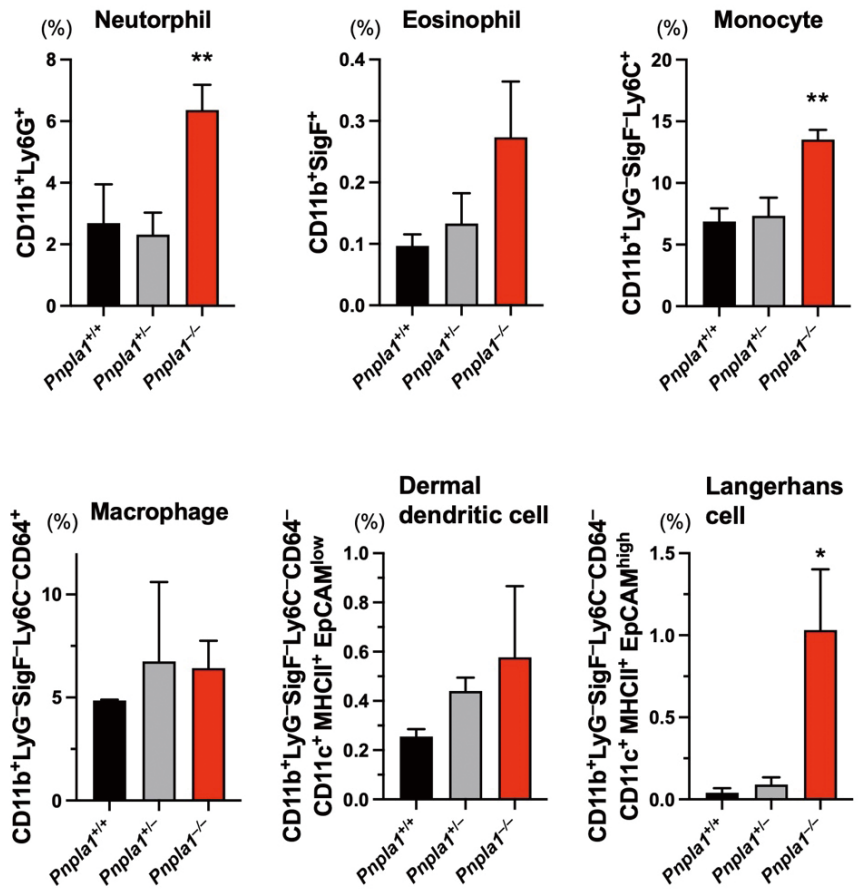


図3 *Pnpla1* 欠損マウスの皮膚における免疫細胞集団の解析

いた。一方、ケラチノサイト分化マーカーに関しては、フィラグリン類似の *Flg2* が減少するのに対し、角化細胞の周辺帯 (cornified cell envelope) の構成要素である *Lce3b*, *Lce3c*, *Sprr1a*, *Sprr1b*, *Sprr2b*, *Sprr2e*, *Sprr2g* などが増加するという特徴が見られた。

### 3.2. *Pnpla1* 欠損マウスにおける免疫系細胞集団の変化

炎症応答が最も顕著だった *Pnpla1* 欠損マウスを用いて、胎生 19.5 日齢における皮膚の免疫細胞プロファイルをマルチカラーフローサイトメトリーにて解析した。CD11b 陽性の免疫系細胞集団のうち、*Pnpla1* 欠損マウスでは好中球と単球の割合が 2 倍程度に増加していたのに対し、好酸球、マクロファージ、樹状細胞の割合には有意な変化は見られなかった (図3)。さらには、CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>EpCAM<sup>high</sup> の特徴を持つ成熟型ランゲルハンス様細胞が *Pnpla1* 欠損マウスの皮膚において顕著に増加していることが判明した。この集団の表面抗原をさらに詳細に解析すると、CD11b、CD11c、CD326 (EpCAM: 上皮細胞接着因子) に加えて成熟型ランゲルハ

ンス細胞のマーカーである CD86、F4/80、CX3CR1 などが高発現していたのに対し、好中球マーカーの Ly-6G、単球・マクロファージマーカーの CD64 (FcγRI)、樹状細胞マーカーである CD209 (DC-SIGN) の発現レベルは低かった。

### 3.3. 先天性魚鱗癬モデルマウスの表皮脂質成分の比較

*Pnpla1*、*Abhd5*、*Abca12*、*Sdr9c7* を欠損するマウスの表皮由来脂質を薄層クロマトグラフィーで展開して比較すると、*Pnpla1* 欠損マウスおよび *Abhd5* 欠損マウスでは ω-水酸化セラミド、ω-水酸化グルコシドセラミド、グルコシドセラミド、ω-水酸化脂肪酸などが顕著に増加していた。また、*Abca12* 欠損マウスではグルコシルセラミドが特に増加していた。一方、*Sdr9c7* 欠損マウスでは、アシルセラミドのリノール酸部分が 3 箇所水酸化されたトリオール型アシルセラミドが蓄積していた。これらの先天性魚鱗癬モデルマウスで変動が見られたこれらの脂質分子のうち、皮膚の炎症応答と正の相関が見られたのは 3 つの脂質クラス、すなわち ω-水酸化セラミド、ω-水酸化グルコ

シドセラミド、グルコシドセラミドであった。

### 3. 4. アシルセラミド代謝関連脂質の蓄積によるケラチノサイトの活性化

炎症応答が最も強い *Pnpla1* 欠損マウスにおいて、特に  $\omega$ -水酸化セラミド、 $\omega$ -水酸化グルコシドセラミド、グルコシドセラミドの増加が顕著であったため、これらの脂質が分化ケラチノサイトに蓄積した場合にどのような作用をもたらすかを評価した。 $\gamma$ -シクロデキストリンを担体としてケラチノサイト内に脂質を導入すると、 $\omega$ -水酸化セラミドの投与により、TGF $\beta$ ファミリーに属する Bone morphogenetic protein 7 (*Bmp7*) や *S100a9* の遺伝子発現上昇が見られた (図4)。これに対して、ケラチノサイトの最終分化マーカーであるロリクリン (*Lor*) や活性化マーカーであるケラチン 6a (*Krt6a*) の発現は、いずれの脂質の投与によっても有意な変化は見られなかった。加えて、ELISA 測定により  $\omega$ -水酸化セラミドによりケラチノサイトからの顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) の分泌が増加することが分かった。BMP7 はランゲルハンス細胞の分化誘導能を持つサイトカインであり、GM-CSF はランゲルハンス細胞の増殖や活性化を促進することから、*Pnpla1* 欠損マウスではケラチノサイト

内に蓄積した  $\omega$ -水酸化セラミドによってこれらのサイトカインの発現や分泌が増加し、その結果ランゲルハンス細胞の増殖や成熟が促進され、炎症応答が促進されている可能性が示唆された。

### 4. 考察・総括

近年の精力的な研究により、皮膚バリア機能に重要な  $\omega$ -O-アシルセラミドの生合成経路やCLEの形成のメカニズムの全容が明らかになりつつある。これらの代謝経路を担う酵素群やトランスポーターの遺伝子変異は先天性魚鱗癬の原因となるが、この皮膚疾患には先天性魚鱗癬様紅皮症状などの炎症を伴うタイプと、葉状魚鱗癬などの炎症をほとんど伴わないタイプが存在し、その違いが何に起因するかは明確になっていない。アシルセラミド代謝経路の異常によってケラチノサイトや免疫細胞がどのような応答を引き起こすかという観点での研究はこれまで非常に限られているが、本研究により先天性魚鱗癬モデルマウスである *Pnpla1* 欠損マウスの表皮では、 $\omega$ -O-アシルセラミド生合成の前駆体である  $\omega$ -水酸化セラミドなどが蓄積すること、ランゲルハンス細胞が顕著に増加すること、 $\omega$ -水酸化セラミドがケラチノサイト内に蓄積すると、GM-CSF や BMP7 の産生が促進されることなどを見出した。これ

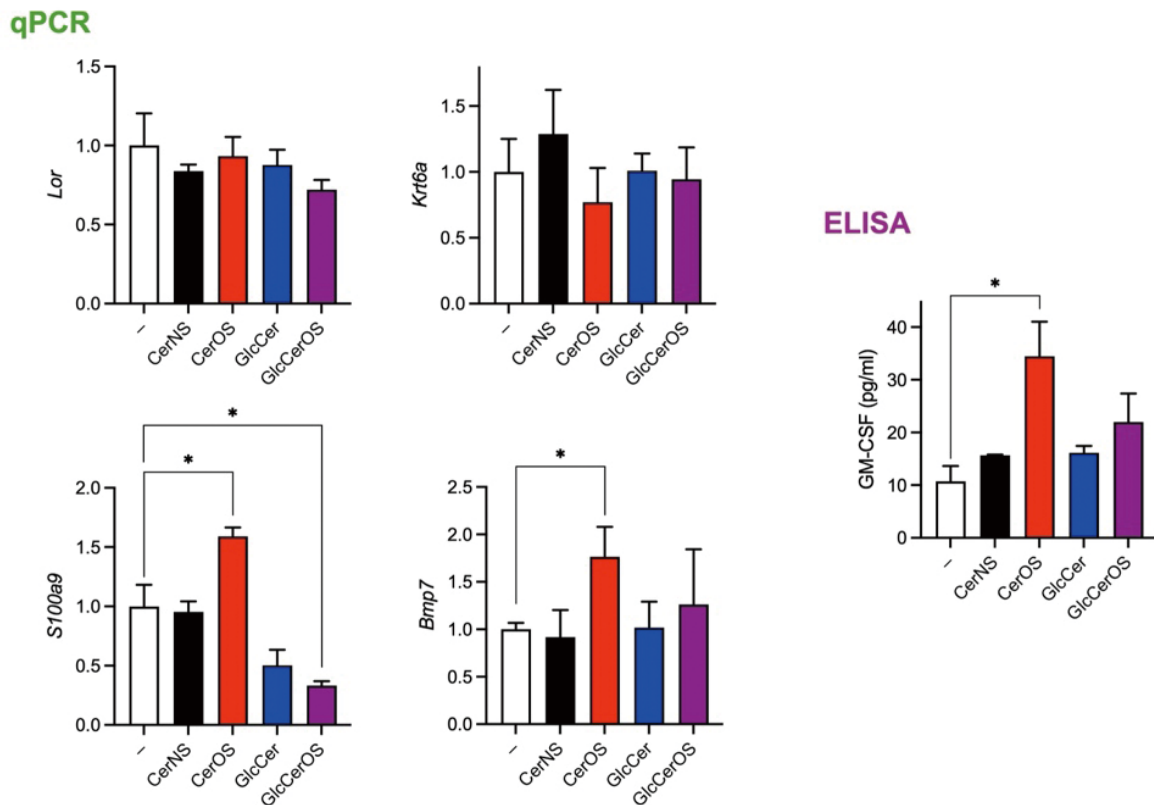


図4 アシルセラミド関連代謝物を作用させた時のケラチノサイトの応答  
 CerNS: 通常のセラミド、CerOS:  $\omega$ -水酸化セラミド、GlcCer: グルコシドセラミド、GlcCerOS:  $\omega$ -水酸化グルコシドセラミド

らのサイトカインはランゲルハンス細胞の成熟や活性化を促進する作用を持つため、今後はアシルセラミド代謝に異常が生じた際に、*in vivo*で実際にこのような分子機序によって炎症応答が促進されるか、ランゲルハンス細胞欠損マウスなどを用いて検証する必要があると考えている。

*Pnpla1* 欠損マウスの皮膚では炎症応答が亢進している一方で、抗炎症性脂質メディエーターである *N*-アシルエタノールアミンの産生に関わる細胞質型ホスホリパーゼ A2G4E<sup>4)</sup> の発現が誘導されており、加えて様々な分泌性ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> の発現量も増減していることから、炎症病態は非常に複雑であることが予想される。実際、いくつかの先天性魚鱗癬のタイプでは、皮膚におけるサイトカインの発現パターンは、Th17 応答が深く関るとされる乾癬に似ているという報告が複数なされているが、*Pnpla1* 欠損マウスの場合は炎症性角化症の 1 つである毛孔性紅色秕糠疹 CARD14 ノックインマウスと極めて類似しているもの<sup>5)</sup>、IL17 の発現誘導は非常に弱く、炎症の起点は T 細胞の活性化ではないことが示唆される。また、*Pnpla1* 欠損マウスの表皮由来の脂質成分によって骨髄由来樹状細胞のサイトカイン産生が増強されることも見出し、今後の研究の発展により炎症惹起の原因となる脂質代謝異常の責任分子とを同定できれば、皮膚の状態を評価する新しい指標となるとともに、表皮上層という局所で生じた脂質代謝異常が真皮や免疫細胞などの内層細胞に認識される分子機序についての理解も深まるであろう。本研究を契機として、アシルセラミド代謝経路の適切な制御によって皮膚バリア機能の強化と炎症の抑制を両立する方策の理論基盤を構築することができれば、その知見を炎症やアレルギーを予防して美しい肌を維持するための新たなスキンケア戦略に応用することで、コスメトロジーのさらなる進展への寄与が期待される。

## 謝 辞

本研究の遂行にあたり、ご支援を賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に心より御礼申し上げます。また多大なご助言とご協力を頂きました順天堂大学アトピー疾患研究センターの北浦次郎先生、伊沢久未先生、貝谷綾子先生、先天性魚鱗癬モデルマウスをご供与頂きました名古屋大学医学系研究科皮膚 秋山真志先生、武市拓也先生に深く感謝致します。

## (引用文献)

- 1) Hirabayashi T, Anjo T, et al. PNPLA1 has a crucial role in skin barrier function by directing acylceramide biosynthesis. *Nat Commun* 8, 14609, 2017
- 2) Hirabayashi T, Kihara A, Murakami, M. The role of PNPLA1 in  $\omega$ -O-acylceramide synthesis and skin barrier function. *Biochim. Biophys. Acta Mol Cell Biol Lipids* 1864 (6), 869-879, 2019
- 3) Takeichi T, Hirabayashi T, et al. SDR9C7 catalyzes critical dehydrogenation of acylceramides for skin barrier formation. *J Clin Invest* 130, 890-903, 2020
- 4) Liang L, Takamiya R, Miki Y, Heike K, Sugimoto N, Yamaguchi M, Shitara H, Nishito Y, Kobayashi T, Hirabayashi T, Murakami M. Group IVE cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> limits psoriatic inflammation by mobilizing the anti-inflammatory lipid *N*-acylethanolamine. *FASEB J*, 36, e22301, 2022
- 5) Yoshikawa T, Takeichi T, Hirabayashi T, Muro Y, Miyasaka Y, Ohno T, Akiyama M. Hyperactivation of the IL-17 axis and IL-36 signaling in *Card14*-mutant pityriasis rubra pilaris model mice. *J Invest Dermatol* 145 (2): 427-432, 2025

# 保湿剤を塗布された四肢による触覚の脳内表象機構の解明

東京大学大学院薬学系研究科

松本 信圭

Sensory information, particularly somatosensation, plays a crucial role in defining the boundary between the body and the external environment. Through somatosensation, animals perceive features such as roughness and temperature from the external world. Brain processing of this information is dynamically modulated by skin conditions and past experiences, a phenomenon realized through somatosensory neuroplasticity. While somatosensory input from peripheral receptors is transmitted to the primary somatosensory cortex (S1), the specific neural representation of tactile features like roughness and how this representation varies with skin conditions remain unclear. This study aims to investigate neural representation of tactile sensation through limbs coated with moisturizer. Traditional methods of neural activity analysis often involve extracting features based on frequency intensities or firing rates, which may overlook important information for decoding somatosensation. S1, representing the body surface, likely encodes tactile features across the entire cortex. To decode somatosensation accurately, it is essential to record neural activity from a broad area of S1 and employ methods to extract bias-free features. This study focuses on deep learning, which can automatically extract relevant features from vast amounts of data without human intervention. We established an experimental system where rats repeatedly experienced smooth and rough surfaces. Based on this system, an algorithm was developed to accurately detect the timing of foot-strikes on the surfaces. We then analyzed a gait of rats, whose limbs were coated with vaseline. Furthermore, we recorded local field potentials in S1 with and without vaseline. We established a deep learning algorithm to predict whether the surface was rough or smooth. We will further analyze the neural representation in S1 when the paw soles were coated with vaseline and explore the relationship between neural representation and neuroplasticity.

## 1. 緒言

生物は常に五感を通じて外界の情報を収集し、その情報により周辺の環境を分析して適切に反応している。このうち、体性感覚は外界と自身の境界を定義する重要な感覚である。動物は体性感覚を通じて、外界から粗滑度や温度などの特徴を知覚している。これらの情報に対して脳が行う処理は、皮膚環境や過去の経験に応じてダイナミックに変化している。このダイナミックな応答は、体性感覚の神経可塑性によって実現される。申請研究では、皮膚の保湿によって変化する体性感覚を検証することを目指す。

体性感覚は、生物の体表の状態や、環境との相互作用が中枢で処理されることで生じる。末梢の感覚受容器が感知した情報は、最終的に脳の一次体性感覚皮質（以後S1）に伝達される。S1はそれぞれ体の特定の部位に対応した亜領域に分けられている。しかし、体の特定の部位で感知されている「粗滑度」のような刺激の詳細な特徴が、脳内どのように表象され、その表象が皮膚の状態によってどのように区別されるのかは明らかではない。

本研究では、保湿剤を塗布された四肢による触覚の脳内



Neural representation of tactile sensation through limbs coated with moisturizer

Nobuyoshi Matsumoto

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo

表象機構の解明を目指す。

従来用いられてきた神経活動の解析手法は、各周波数帯の強度や神経細胞の発火頻度など、神経活動の変化を人間が解釈しやすい形に落とし込むことで、脳の機能の解明に貢献してきた。その反面、この特徴抽出には人間のバイアスがかかっているため、記録された神経活動から体性感覚の解読に重要な情報が捨象されている可能性がある。さらに、S1は体表面と対応しているため、粗滑のような体性感覚は皮質全体で表現されると考えられる。しかし、従来の数チャンネルでしか記録されていない神経活動の解析では不十分であり、体性感覚を高い精度で解読するためには、S1の広範囲から神経活動を記録し、バイアスフリーに必要な特徴量を取り出す手法が必要である。

そこで、本研究では、膨大な情報からバイアスフリーに特徴を抽出することを得意とする深層学習に着目した。深層学習が従来の手法と異なる点は、人の手が加わっていないデータから自動的に特徴や規則性を高次元のまま抽出できることである。

## 2. 方法

### 2.1. 実験動物

動物実験は、東京大学動物実験専門委員会の承認を得て実施した。

実験には成体雄性Wistarラットを使用し、ラットは、温度 ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) および湿度 ( $55 \pm 5\%$ ) が管理された環境で個別に飼育した。また、12時間の明暗サイクル（午前7時から午後7時まで照明が消灯）で、自由に食事と水を摂

取できる状態にした。ラットは、馴化期間の開始前に少なくとも2日間は実験者によってハンドリングを受け、その後、摂水制限をおこなった。

## 2.2. 実験装置

本研究で使用した円盤型ランニングホイールは、直径90cmの自由に回転できる円盤であり、表面には粗い紙やすりを貼った<sup>1)</sup>。給水ポートは、ラットが胴体を拘束された状態で前方に配置されており、報酬(水)はディスクの回転と同期させた。これにより、ラットは報酬を求めて自発的に運動を開始した。

## 2.3. 行動試験

ラットは、試験前に12時間の摂水制限を受け、その後、ランニングホイールでの運動と水報酬を関連付けるトレ

ニングを受けた。

訓練期間後、ラットの歩行は、ベースライン時およびワセリン処置時においてモニタリングした。ベースライン時では、ラットの体は独自に作製したのジャケットで拘束されており、ラットは自発的に8~10分間ホイール上を歩いた。その後、ラットの前足と後足にはワセリンを塗布し、再度ホイールに戻して、再び8~10分間歩行した。行動試験時には、ラットの左側からビデオが撮影され、フレームレート60Hzでラットの歩行を録画した。

## 2.4. 電気生理記録

Open Ephys社製の記録システム (<http://open-ephys.org>) およびIntan社製のRHD32チャンネルヘッドステージを使用し、30kHzのサンプリング周波数で神経活動(局所場電位)を記録した(図1)。その後、2kHzにダウンサン

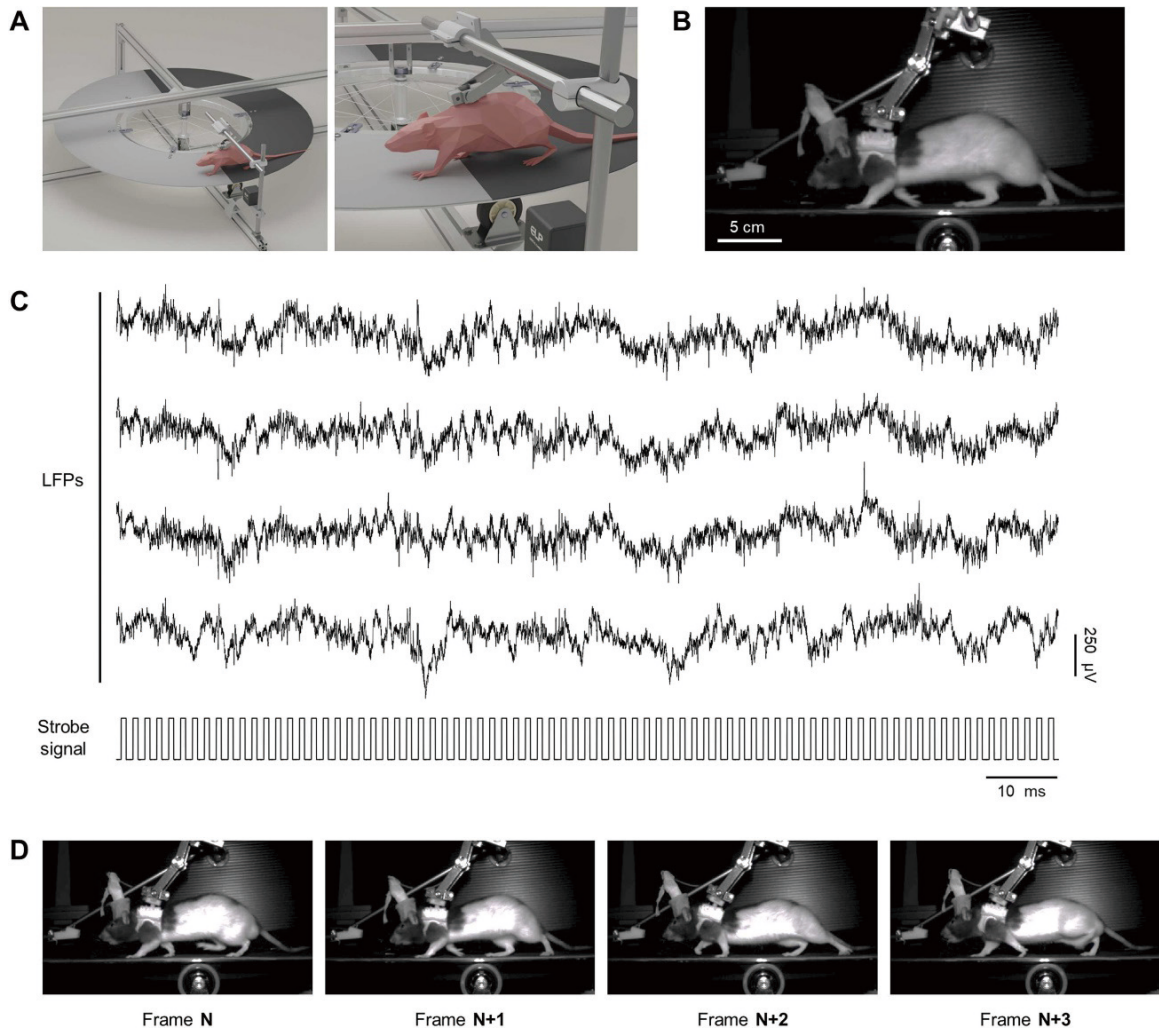


図1 ラットのLFPと運動の同時記録

- 本研究で使用した実験装置の構成を示す。左側のパネルは全体の装置の概要を示し、右側のパネルはラット周辺の具体的な配置を示す。
- 録画されたビデオからの単一フレームのスナップショット。
- S1の代表的な4つのLFPトレース(上)とカメラのストロボ信号(下)。
- 定位置に置かれたカメラで撮影した連続したフレーム。

プリングし、解析に使用した<sup>2)</sup>。同時に、USBカメラモジュールを使用して、各ビデオフレームのストロボ信号を介し、神経記録と動画を同期した。

## 2.5. データ解析

データは、Python3で作成したカスタムスクリプトを使用してオフラインで解析した。

## 3. 結果と考察

### 3.1. 接地タイミングの正確な検出

DeepLabCutと呼ばれる深層学習ベースのマーカーレス姿勢推定法を使用して、ラットの前肢の各ビデオフレームにおける関節座標を追跡した<sup>2-4)</sup>。モデルは、左前肢の肩、肘、手首を識別できるようにファインチューニングした(図2A, B)。その後、肩の座標を参照して肘と肩の座標を同定し、肘と手首の軌道には3フレームの移動平均フィルターを適用した(図2C)。前肢の足の接地開始を決定するために、肘と手首の座標の軌道を追跡した。まず、足の接地は、肘のxおよびy座標の谷と手首のx座標の谷に先行していた(図2D)。さらに、足の接地時の手首のy座標の速度変化は、二次導関数における谷として観察された(図2E)。これらの基準を用いて、足の接地開始は、肘のxおよびy座標の谷および手首のx座標の谷から5フレーム以内に位置する手首のy座標の二次導関数の谷として定義した。この方法を「座標ベースの方法」と呼び、本研究では9匹のラットから録画された1分間のビデオで接地タイミングを検出した。検出された接地タイミングの大多数は、手動でラベル付けされた接地タイミングから±1フレーム以内のずれであり、±20フレームの範囲で開始が検出されることはほとんどなかった(図2F)。したがって、検出された接地を2フレームの差以内で識別したものを「正しく検出された接地」とし、手動で検出された接地から2フレーム以上離れたものを「誤検出された接地」と分類した。また、手動で検出された接地のうち、自動化された方法で識別されなかったものは「見逃された接地」とラベル付けされた。特に、これらの見逃された接地は検出された接地の12.2%を占め、歩行パターンに似た軌道を生成するグルーミングなどの異常な行動に起因していた(図2G)。ラットがこの行動中にディスク上で静止していたことを考慮すると、「誤検出された接地」の速度は0cm/s付近に集中していた。

次に、DeepEthogramと呼ばれる、連続するビデオフレームを使用して行動の分類を行う方法を用いて、各識別された足の接地フレームに関連する信頼度を向上させた<sup>5)</sup>。本研究での実装では、モデルはビデオに「足の接地」と「歩行」の2つのラベルを付けるように訓練した(図3A)。訓練されたモデルは、各ビデオフレームに対して、各行動ラ

ベルの確率を生成した(図3B)。この方法では、足の接地開始は、「足の接地」確率にピークが検出されるフレームとして定義され、同時に「歩行」ラベルの確率が0.5以上であるという条件を満たすフレームとした(図3B)。この方法を「信頼度ベースの方法」と名付けた。信頼度ベースの方法のみで検出された足の接地開始と手動での検出を比較した結果、フレーム差はゼロ付近に集中しているものの、2フレーム以上遅れたフレームの割合が高いことが示された(図3C)。誤検出された接地時の速度分布は、手動でラベル付けされた接地の元の分布の速度分布と似ていた。その結果、誤検出された開始の割合は13.2%に達した(図3D)。開始検出の精度を高めるために、「座標ベースの方法」と「信頼度ベースの方法」の両方の基準で識別されたラベルを組み合わせた。足の接地開始を示す正確なフレームは前肢の関節座標に基づいて決定され、その後、各開始は「足の接地」と「歩行」の信頼度によって閾値処理され、接地タイミングの精度を高めた。結果として、手動でアノテーションした足の接地開始と比較して、98.8%のフレームが1フレーム以内のずれを示した(図3E)。さらに、97.2%のフレームが正しく識別された。見逃されたフレームと誤検出されたフレームの割合はそれぞれ1.6%および1.2%に限られていた(図3F)。

### 3.2. 四肢へのワセリン塗布による歩容への影響

ここまでで、四肢(特に前肢)の接地タイミングを正確に検出することが可能となった。これまでと同様に、DeepLabCutおよびDeepEthogramを使用して、肩、肘、手首の座標を正確に特定し、肩からの手首と肘の相対座標を計算した。これらの座標を使用して、ラットの状態をstance phaseとswing phaseに分類した。前足が地面に触れている間はstance phase、地面から離れている間はswing phaseとして分類した。左前足が地面に触れる瞬間と離れる瞬間はそれぞれ「着地」と「離陸」と名付けた。ワセリンがラットの歩行に与える影響を定量化するために、各サイクルで手首、肘、肩の角度を計算した。

ワセリン塗布後、サイクルごとの距離が有意に長くなったことが観察された(図4)。特にstance phaseでは、ワセリン処理期間中の距離が有意に短く、swing phaseでは距離が有意に長くなった。サイクルの各段階の長さは、ワセリン処理後に有意に短縮され、stance phaseとswing phaseの両方でラットはワセリン処理時に比べて長い時間をかけていた(図4)。

### 3.3. 四肢へのワセリン塗布時の神経活動の記録

これらの準備を踏まえ、四肢へのワセリン塗布時の神経活動の記録に移った。

S1の垂領域のニューロンは対応する体表面への触覚刺

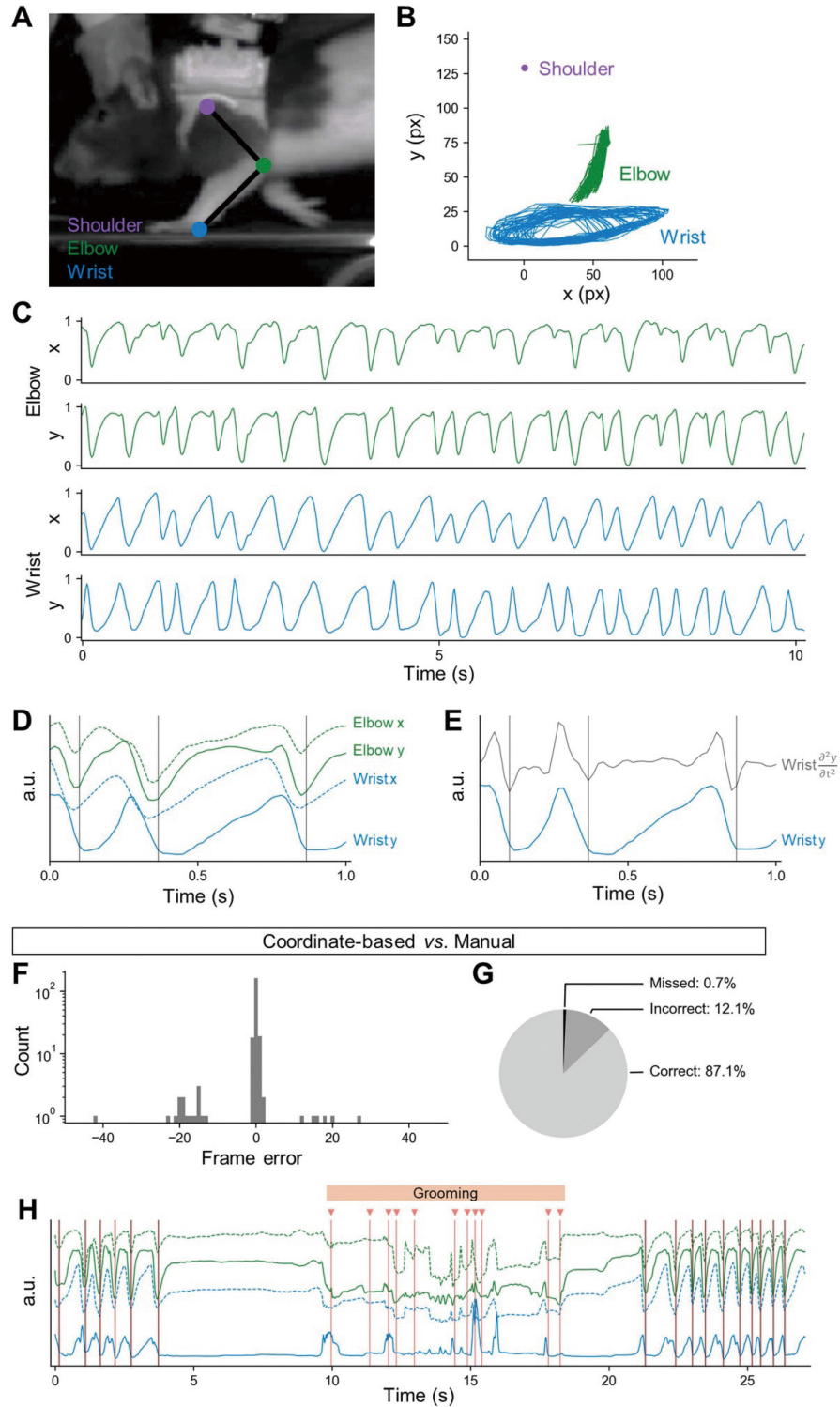


図2 前肢の関節の座標を使用した足の接地タイミングの検出

- A. ラベル付けされた関節の位置 (肩 (紫)、肘 (緑)、手首 (シアン))
- B. 10秒間の各関節の軌道の例。
- C. 経時的な肘と手首のxおよびy座標の軌道。
- D. 手動でラベル付けされた足の接地と肘および手首のxおよびy座標の整列。灰色の縦線は手動でラベル付けされた接地を示す。
- E. 手動でラベル付けされた足の接地と手首のy座標の二次導関数および元のy座標のアラインメント。灰色の縦線は手動でラベル付けされた接地タイミングを示す。
- F. 座標ベースの接地と手動でラベル付けされた接地とのフレーム差を示すヒストグラム。
- G. 前肢の関節の座標によって検出された接地の割合を示す円グラフ。
- H. 誤検出された接地を含むグルーミング期間の代表的な例。灰色の縦線は手動でラベル付けされた接地を示し、赤い縦線は前肢の関節の座標を使用して検出された接地を示す。赤い三角形は誤検出された接地を示す。

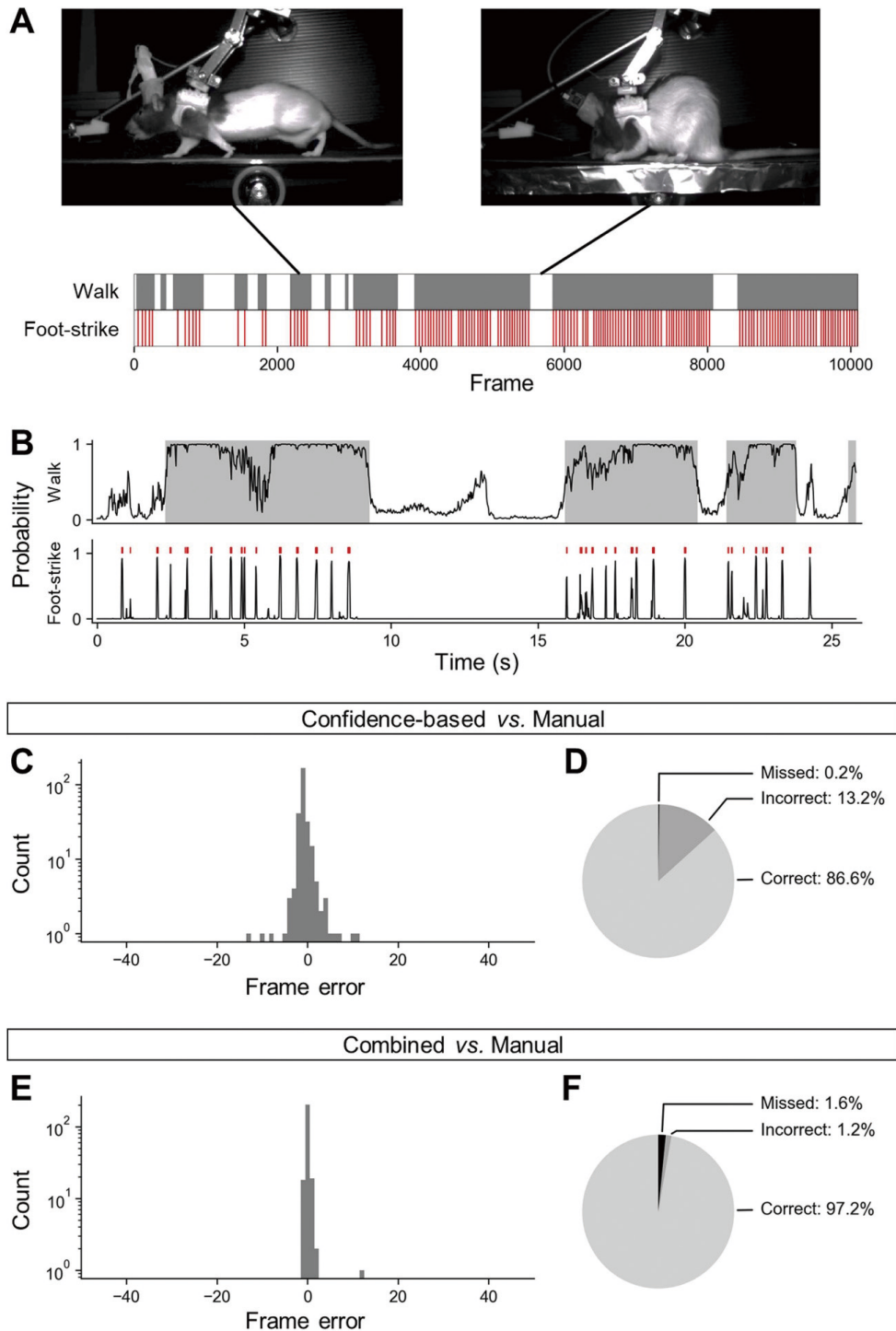


図3 行動の信頼度を使用した足の接地開始の検出

- A. 訓練データとして使用された行動ラベル。上：歩行とグルーミング行動を示す代表的なフレーム。下：灰色のラスタープロットはラットが歩行しているフレームを示し、赤色のラスタープロットは手動でラベル付けされた足の接地開始を示す。
- B. DeepEthogramからの代表的な出力。黒い線は各フレームにおける歩行行動の予測確率を示す。上：歩行行動の確率、灰色の領域は確率から導出された最終的なラベルを示す。下：各フレームにおける足の接地開始の確率、赤色のラスタープロットは検出された開始を示す。
- C. 確率（信頼度）ベースの開始と手動でラベル付けされた開始とのフレーム差を示すヒストグラム。
- D. 信頼度ベースの方法を使用して検出された開始の割合を示す円グラフ。見逃された開始フレーム（黒）、誤検出された開始フレーム（濃灰色）、正しく検出された開始フレーム（灰色）。
- E. 座標ベースの方法と信頼度ベースの方法が組み合わされたもの。この組み合わせ方法はさらに開始を検出し、これを組み合わせ検出された開始と呼ぶ。ヒストグラムは、組み合わせ検出された開始と手動でラベル付けされた開始とのフレーム差を示す。
- F. Dと同様だが、組み合わせ方法に対するもの。

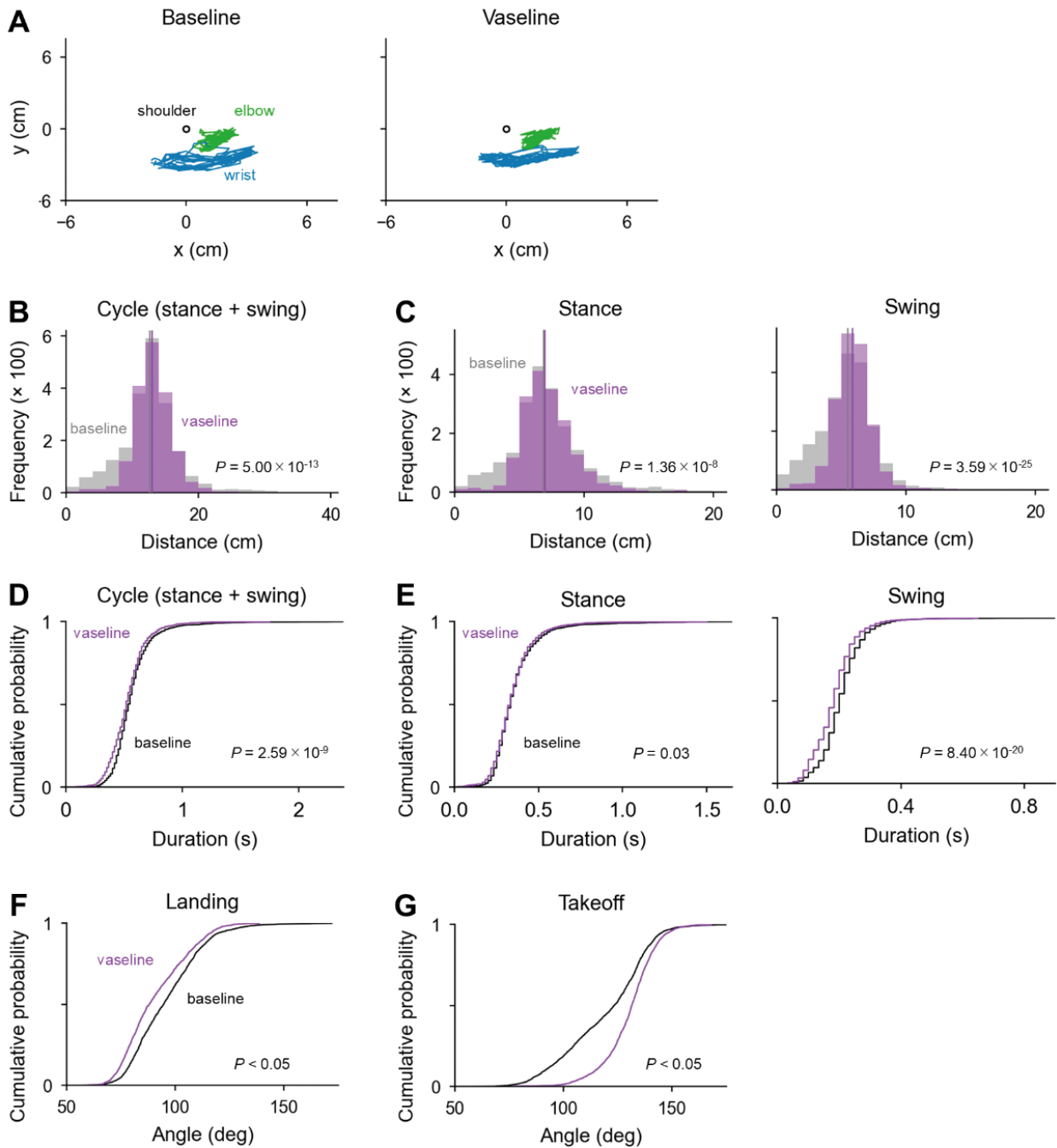


図4 歩容解析のパラメータ

- A. ベースライン (左) およびワセリン処置中 (右) 中の肘 (緑) および手首 (青) の代表的な軌道。肩 (黒) の位置はx-y座標系の原点に重ねて示されている。
- B. ベースライン (灰色) およびワセリン処置中 (紫色) 中のサイクルごとの距離のヒストグラム。縦線は中央値を示す。サイクルには stance phase と swing phase の両方が含まれる。
- C. Bと同様だが、stance (左) およびswing (右) フェーズでの距離について。
- D. ベースライン (灰色) およびワセリン処置中 (紫色) 中のサイクルごとの時間の累積確率曲線。
- E. Dと同様だが、stance (左) およびswing (右) フェーズでの距離について。
- F. Dと同様だが、着地時の角度について。
- G. Dと同様だが、離陸時の角度について。

激に対して安定した反応を示すため、記録されたLFPは検出された接地タイミングを用いてアラインした。まず、手動でラベル付けされた接地タイミングとのアラインメントにより、反対側(すなわち、記録された脳半球とは反対側)の前肢の接地タイミングを基準とした誘発反応が明らかになった(図5A)。この反応は、同側前肢の足の接地開始に整列させたLFPでは観察されず、この反応が運動によって生成されるアーチファクトに依存していないことを示している。S1の前肢に対応する重領域における32チャンネルの広範な電極留置を考慮すると、誘発反応は電極位置によって異なっていた。したがって、最も顕著な反応を示したチャンネルを今回の解析に用いた。9匹のラットについて、LFPは4つの開始検出方法(手動、座標ベース、信頼度ベースの方法、および座標ベースと信頼度ベースの方法の組み合わせ)を使用してアラインおよび平均化した(図5B)。後者の3つの方法で計算された振幅と手動でラベル付けされたフレームとの比較により、組み合わせによる方法が手動でラベル付けされた足の接地開始とほぼ同等の精度を示すことがわかった(図5C)。結果として、座標ベースと信頼度ベースの方法を統合することで、足の接地開始を完全に自動で検出できることが結論された。また、同様の方法でワセリン塗布時の神経活動の記録もおこなった(図6)。あわせて、これまでの研究をもとに<sup>6,7)</sup>LFPの波形を入力として、滑らかな床と粗い床を歩いている時の神経活動から床面を予測できる深層学習アルゴリズムのプロトタイプを構築した(図7)。

#### 4. 総括

本研究では、ラットに滑らかな床面と粗い床面を繰り返して経験させる実験系をまず構築した。その実験系をもとに、

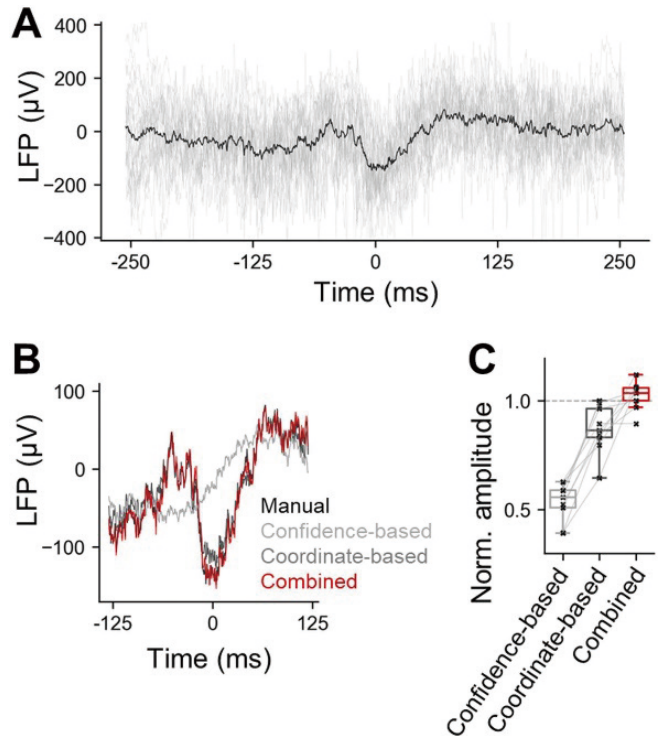


図5 足の接地で揃えたLFPの特性

- A. 1匹のラットから得られた例として、手動でラベル付けされた接地タイミングで揃えたLFPトレース。灰色の線は各ラベル付けされた接地時点での個々のLFPを示し、黒い線はすべてのLFPの平均を示す。
- B. 4つの接地検出方法を使用してそろえたLFPの平均トレース。手動(黒: n=25トレース)、信頼度ベース(灰色: n=62トレース)、座標ベース(濃灰色: n=29トレース)、および組み合わせ(赤: n=23トレース)の方法。
- C. 信頼度ベース(濃灰色)、座標ベース(黒)、および組み合わせ(赤)の方法による手動でラベル付けされた開始時点に対する正規化されたLFP振幅(n=9匹)。

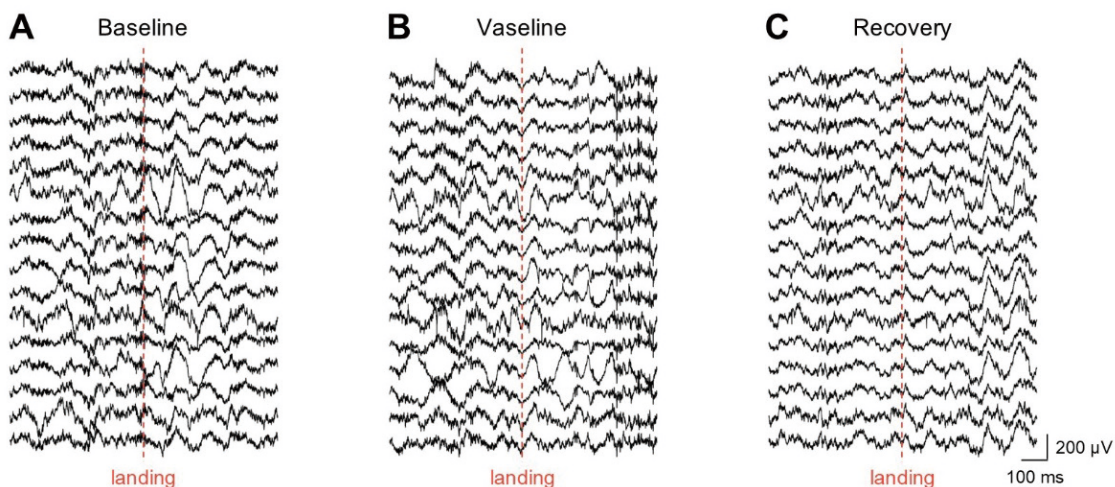


図6 ワセリン塗布時の局所場電位(LFP)

- A. ワセリンを塗布する前の一次体性感覚皮質前肢領域の16か所からの局所場電位。赤は接地タイミングを表す。
- B. A.と同じ。ただし、ワセリンを塗布されている時の波形。
- C. A.と同じ。ただし、塗布されたワセリンを拭きとった後の波形。

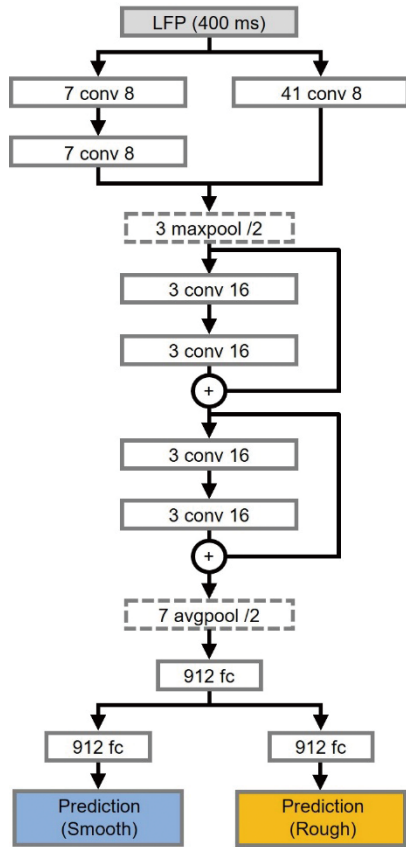


図7 LFPの波形から床面の粗滑度を分類する深層学習アーキテクチャ(プロトタイプ)

床面の接地タイミングを正確に検出するアルゴリズムを構築した。次に、床面を歩いている時の歩容と、ワセリンを四肢に塗布した際の歩容の比較をおこなった。その結果、歩容のいくつかのパラメータにおいて差が見られた。さらに、ワセリンを塗布していない時と塗布した時のS1のLFPを記録した。これらのLFPを入力し、床面が粗いか滑らかかを予測する深層学習アルゴリズムを構築した。今後は、これらの成果をもとにワセリンの塗布によるS1の神経表象について詳細な解析を進め、神経可塑性との関連にも迫っていききたい。

謝 辞

本研究の遂行に多大なるご支援を賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深く御礼申し上げます。

(引用文献)

- 1) Yamashiro K, Ikegaya Y, Matsumoto N. Automatic detection of foot-strike onsets in a rhythmic forelimb movement. *Neurosci. Res.*, **206**, 41-50 (2024).
- 2) Yamashiro K, Aoki M, Matsumoto N, Ikegaya Y. Polyherbal formulation enhancing cerebral slow waves in sleeping rats. *Biol. Pharm. Bull.*, **43**, 1356-1360 (2020).
- 3) Mathis A, Mamidanna P, Cury KM, Abe T, Murthy VN, Mathis MW, Bethge M. DeepLabCut: markerless pose estimation of user-defined body parts with deep learning. *Nat. Neurosci.*, **21**, 1281-1289 (2018).
- 4) Nath T, Mathis A, Chen AC, Patel A, Bethge M, Mathis MW. Using DeepLabCut for 3D markerless pose estimation across species and behaviors. *Nat. Protoc.*, **14**, 2152-2176 (2019).
- 5) Bohoslav JP, Wimalasena NK, Clausing KJ, Dai YY, Yarmolinsky DA, Cruz T, Kashlan AD, Chiappe ME, Orefice LL, Woolf CJ, Harvey CD. DeepEthogram, a machine learning pipeline for supervised behavior classification from raw pixels. *Elife*, **10**, (2021).
- 6) Yamashiro K, Matsumoto N, Ikegaya Y. Diffusion model-based image generation from rat brain activity. *PLoS One*, **19**, e0309709 (2024).
- 7) Takeuchi Y, Yamashiro K, Noguchi A, Liu J, Mitsui S, Ikegaya Y, Matsumoto N. Machine learning-based segmentation of the rodent hippocampal CA2 area from Nissl-stained sections. *Front. Neuroanat.*, **17**, 1172512 (2023).



### Ⅲ. 精神、文化に関する分野

# 表情ジワを用いた新たな顔貌定量法（顔貌解析アルゴリズム）の開発

福岡医療短期大学歯科衛生学科

泉 喜和子

In this study, we aim to establish a method for measuring the face by analyzing CT images taken using facial expression wrinkles. First, we focused on the cheek lines to investigate changes in face after surgery, and devised a program that can easily measure these changes. This study evaluated the changes in cheek soft tissue after orthognathic surgery using facial photographs and cephalograms. Cheek soft tissue was defined as the cheek line, which is the contour of the cheek starting from the infraorbital region and continuing to the corners of the mouth on a lateral photograph. Seventy-eight Japanese patients (48 women and 30 men) with skeletal class III underwent maxillary advancement and mandibular setback. The changes in cheek size and the position of the cheek points on the cheek line after surgery were examined experimentally using a previously proposed image analysis software program. The maxillary advancement was 4.4 mm and the mandibular setback was 4.4 mm, and there was no significant sex difference in skeletal movement. The ratio of change in cheek size increased (mean 2.7) and showed an anterior change at the points on the cheek line. The change in cheek point showed a significant sex difference; the upper cheeks were more advanced in men. Cheek changes were positively correlated only with maxillary advancement, and the upper cheek points in men was also showed a correlation. Orthognathic surgery for skeletal class III affected cheek bulge, and maxillary advancement had a greater effect on the cheek line. There were sex differences in the postoperative changes in the cheek line, with the changes in the cheek contour in women increasing radially, whereas the changes in men tended to be similar to skeletal movement.

## 1. 緒言

顔面変形（ゆがみ）に対する顔面骨へのアプローチとして、美容医療におけるコスメティックサージェリー（輪郭形成術）と顎変形症としての顎矯正手術の手法がある。両者には、治療の重点を美しい輪郭とするか、機能的な咬合（歯並び、咬み合わせ）とするかの違いがみられるが、同じ術式となることが多く、顔面骨の移動によって得られる顔貌変化に対する美しさを無視することはできない。手術は顔面骨に行くことから、顔貌を構成する皮膚組織の変化は付随的に捉えられ、術後の顔貌はX線画像に映し出される側貌の外形線をトレースして顔面骨の移動と平行に変化させるフォトサージェリーによって予測されていた。実際には、皮膚の性質として一定に変化することはなく、性別、年齢、体重など様々な個人差によって左右するため、予測の精度は期待できず、未だに顔貌変化と顔面骨の変化の関係性を示す定量評価は標準化されていない。最近では、3DスキャナーやCT画像の3Dデータによる計測が試みられているが、画像処理にはコストが高く、専門的技術を要することから、予測される術後の顔貌変化については術者の経験に委ねられるのが現状である。

本研究では、口腔外科学と工学の専門家と連携し、表情ジワ（鼻唇溝）を利用して撮影したCT画像から顔貌を構成する皮下組織を検出する新たな顔貌計測法を確立することを目指しており、まず、手術による顔貌の変化についてチークラインに注目し、簡便に測定できるプログラムを考案した。チークラインは顔貌の個性となる要素の一つであり、頬の輪郭は、顔全体の美しさと若々しさを決定する重要な要素である<sup>1-3)</sup>。頬は眼窩下と口角の間に位置し、人間の顔を横から見ると最も広く厚い部分であり、見た目に美しい顔の場合、頬の前内側領域の最も凸状の位置は、角膜の垂線の前にある<sup>1,4)</sup>。上顎欠損と骨格性クラス III の患者の多くは、特にアジア人患者で、頬の輪郭が平坦または陥没している<sup>5)</sup>。

現在、技術の進歩により、顎変形症手術後の顔面軟組織の変化について、2次元(2D)画像解析に加えて3次元(3D)画像解析が可能となっている。頬の定義自体の曖昧さと個人差のため、解剖学的根拠に基づいて頬の点を3次元的に定義することは困難である。しかし、2D画像解析は、特別な装置を使わずに頬の輪郭や美的ラインを直接評価するのに適している。本稿では、まず2D顔画像における頬領域の定義について説明する。次に、骨格性クラス III の両顎手術後の頬軟組織の変化を客観的かつ定量的に評価した実験結果を示す。

## 2. 方法

### 2.1. 対象者

研究対象は福岡歯科大学医科歯科総合病院口腔外科において2018年4月から2022年3月までに反対咬合を呈する



Development of a new method for quantifying facial morphology (facial morphological analysis algorithm) using facial wrinkles

Kiwako Izumi

Department of Dental Hygiene,  
Fukuoka College of Health Science

顎変形症（上顎後退・下顎前突）と診断されて顔面形成術（Le Fort I型骨切り術・両側下顎枝矢状分割術）を施行した患者78人とした。手術は同じ口腔外科医（著者）によって、顔面骨の下半分に相当する上下顎骨に行った。頭蓋顔面異常、口唇裂、口蓋裂、顔面外傷などの疾患のある患者は研究から除外した。本研究は、福岡学園倫理審査委員会の承認を得た（承認番号472）。

## 2.2. 術式と骨の移動量の計測

上下顎骨に行った手術はLe Fort I骨切り術（上顎）と両側下顎枝矢状分割術（下顎）である。（図1）全ての対象者について、上顎に対するLe Fort I骨切り術は梨状口側縁から水平に骨切りを行い、上顎骨片を前方に移動した。下顎に対する両側下顎枝矢状分割術は、下顎小舌上の内側骨切りと大白歯部から下顎角部に至る外側骨切りを行い、歯列を含む下顎骨片を後方に移動した。顎骨移動の手術変化量は、側方頭部X線規格写真を用いて行われるセファロ分析の計測点を利用して評価した。手術による変化量はX方向をフランクフルト平面（FH平面を略す）、Y方向をFH平面の垂線とし、上顎骨の計測点となるA点（前鼻棘の最先端と上顎中切歯間歯槽突起最前点との間の唇側歯槽骨縁

上の最深点）、下顎骨の計測点となるB点（下顎歯槽骨突起最前点とオトガイ隆起の最突出点の間の最深点）の手術前後の変化量を $\Delta A[x]$ 、 $\Delta A[y]$ 、 $\Delta B[x]$ 、 $\Delta B[y]$ として計測した（図2）。すべての計測点の識別と測定は、10年以上の経験をもつ一人の矯正歯科医師によって行われた。

## 2.3. チークラインの定義と計測法

チークラインはカメラ撮影の条件を定めた側貌写真によって描出され、本研究のために独自で開発した画像解析ソフトウェアプログラムを使用して、チークラインの形状と面積を定量的に測定した。このソフトウェアプログラム<sup>6,7)</sup>では、側貌写真に描出されるチークラインに沿って5つの固定点を指定でき、これらの5点はチーク点（C1～C5）とし、チーク点を結ぶポリラインをチークライン、チーク点を囲むチークラインの領域をチーク面積と定義した。C1は、チークラインの最上点となる下まぶたの下端とし、C2は、チークライン上のC1とC3の中点、C3は、チークラインの前方突出点、C4はチークライン上のC3とC5の中点、C5は口角の近くで終わるチークラインの最下点と定義した。このソフトウェアプログラムは、ユーザーにC1とC5をクリックするように求め、他の3点

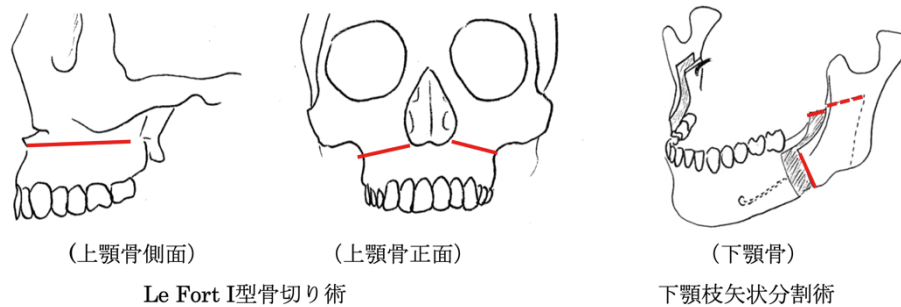
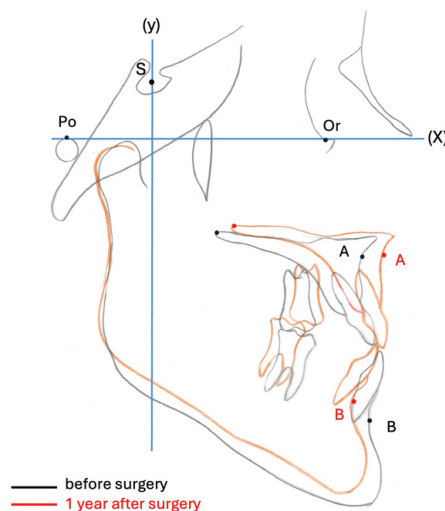


図1 Orthognathic Surgery



(x): FH plane, the horizontal reference line. (y): the vertical reference line.  
A: A point. B: B point. PNS: posterior nasal spine.

図2 Measurement of traced cephalograms in the study

(C2、C3、C4)を自動的に提供します。次に、ユーザーはC2、C3、C4の水平方向とC3の垂直方向を手動で調整して、顔の写真の頬のラインの形状の視覚化が可能となる(図3A、B)。手術による変化は手術の1か月前(T0)と手術の1年後(T1)に撮影した側貌写真を用いて、C2、C3、C4の水平位置(C2[x]、C3[x]、C4[x])、およびC3の垂直位置(C3[y])と面積がピクセル数で自動的に計算された。患者間の顔の大きさのばらつきを標準化するために、頬の大きさと頬のポイントは、それぞれ外眼角(E)とイヤード中心(Er)の間の距離と距離の二乗で除算された。手術後の頬の大きさと頬のポイントの変化は、術後の値と術前の値の比(T1/T0)で評価された。すべての手動タスクは1人の検査官によって実行された。

### 2. 4. チークラインの評価

チークラインの術後変化は、顎骨移動のほか、皮膚特性に関与する、年齢、BMI (Body Mass Index)、性別との関連性を統計的に評価した。データは、JMP ソフトウェアプログラム (Windows 版 ver.12.2.0、JMP Inc. 東京 日本) を使用して分析した。Mann-Whitney U 検定にて、顎骨とチークラインの術後変化に対する性差を分析した。チークラインの形状評価は、C2[x]、C3[x]、C4[x] を多重比較 Tukey 検定にて比較した (P<0.05)。C2[x]、C3[x]、C4[x]、C3[y] と年齢、BMI および顎骨の術後変化との関連性を調べるために、対応する各ペアについてピアソン相関検定を行った (P<0.05)。

### 3. 結果

対象患者の手術時平均年齢は25.5歳(17~45歳)、全患者の平均BMIは20.8(15.9~23.9)であった。男性30

名(25.9±5.8歳、BMI:21.0±2.5)、女性48名(25.0±8.9歳、BMI:20.7±1.9)であった。

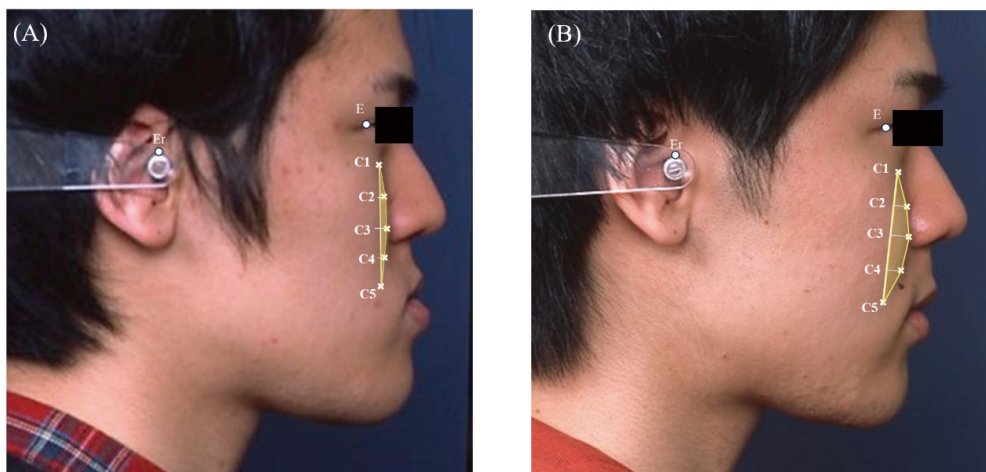
手術による顎骨とチーク点、チーク面積の変化を表に示す(表1)。

上顎骨は前方に4.4±1.7mm、上方に0±1.8mmに、下顎骨は後方に4.4±2.5mm、上方に4.1±1.9mmに変化し、有意な性差はなかった。チークラインの突出点(C3)と面積の術後変化について、C3の平均変化率を調査した。頬の大きさの比は2.7±1.5(男性:3.2±1.7、女性:2.4±1.1)で、全患者で術後に増加し、統計的に有意な性差が認められた。C3[x]とC3[y]の変化率は前方で2.0±1.6、上方で1.5±1.0であり、有意な性差は認めず、年齢とBMIとの相関もみられなかった。

チーク点(C2[x]、C3[x]、およびC4[x])の変化比は、女性よりも男性の方が増加した。前述のC3[x]比に加え、前方ではC2[x]比は3.2±2.5(男性:4.0±2.8、女性:2.4±1.9)、前方ではC4[x]比は1.9±1.4であり、C2[x]で有意な性差が認められた。男性におけるこれらの頬ポイント間の前方変化率は統計的に有意であった(図4)。チーク面積比はΔA[x]、ΔB[y]と正の相関を認めた(r=0.39、r=0.29)。C2[x]、C3[x]比はΔA[x]と(r=0.33、r=0.29)、C4[x]比はΔB[y]と正の相関を認めた(r=0.38)。

### 4. 考察

本研究で行われる顔面形成術は顔面骨の変形、位置異常によって生じる顔面変形を対象にしており、咀嚼障害、構音障害などの機能障害を伴うことが多い。患者の多くは機能回復より、顔貌が整うこと、美しくなることの方に注目する傾向にあり、術後顔貌を確実に予測することは外科医の重要な役割である。頬の輪郭は顔の美しさの要素の一つ



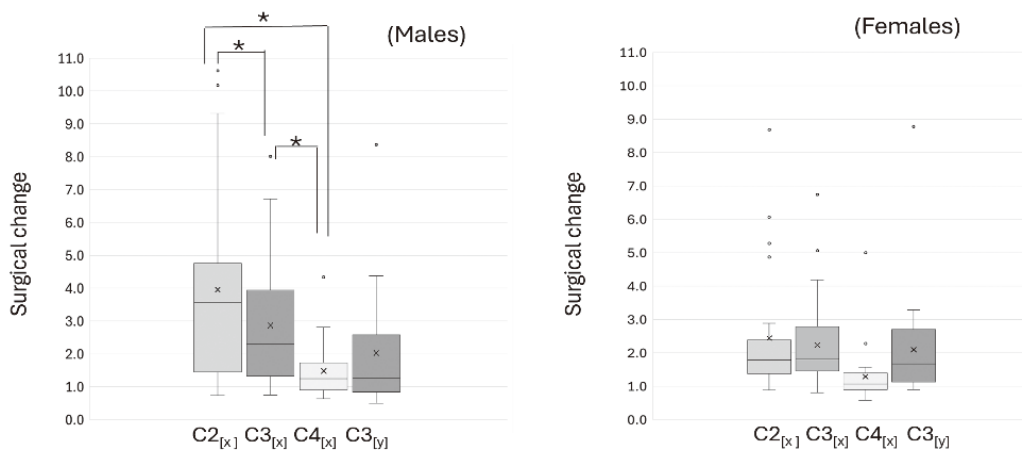
(A) before surgery (B) 1 year after surgery  
Er: center of ear rod. E: lateral canthus. C1-C5: points on the cheek line.

図3 Reference points used in the study

表1 Surgical change for the patients

Change ratios	All (n=78)	Males (n=30)	Females (n=48)	P-value
	Mean ± SD	Mean ± SD ( range )	Mean ± SD ( range )	
Cheek size	2.7 ± 1.5	3.2 ± 1.7 (1.2 ~ 6.6)	2.4 ± 1.1 (1.1 ~ 5.4)	0.049*
C2[x]	3.2 ± 2.5	4.0 ± 2.8 (0.7 ~ 10.6)	2.4 ± 1.9 (0.8 ~ 8.7)	0.048*
C3[x]	2.5 ± 1.6	2.8 ± 1.7 (0.7 ~ 8.0)	2.2 ± 1.4 (0.8 ~ 6.7)	0.319
C4[x]	1.9 ± 1.4	1.7 ± 0.9 (0.6 ~ 4.3)	1.3 ± 0.9 (0.6 ~ 5.0)	0.153
C3[y]	1.5 ± 1.0	1.7 ± 1.1 (0.8 ~ 8.4)	2.1 ± 1.6 (0.8 ~ 8.8)	0.394
Skeletal change (mm)		( range )	( range )	
ΔA[x]	4.4 ± 1.7	3.9 ± 1.7 (1.0 ~ 7.0)	4.7 ± 1.5 (1.0 ~ 7.0)	0.124
ΔB[x]	-4.4 ± 2.5	-5.2 ± 2.4 (-2.5 ~ -10.0)	-3.6 ± 2.5 (-1.5 ~ -8.0)	0.055
ΔA[y]	0 ± 1.8	0.3 ± 1.5 (-3.0 ~ 5.5)	0.3 ± 1.8 (-4.0 ~ 5.0)	0.231
ΔB[y]	4.1 ± 1.9	4.1 ± 2.0 (2.0 ~ 9.0)	4.3 ± 2.0 (1.0 ~ 7.0)	0.754

\*significant difference (P<0.05)



\*significant difference (P < 0.05).

図4 Surgical change of the cheek line

であり、Eラインと同様に扁平顔のアジア人にとっては興味深い要素となる<sup>5, 8-11)</sup>。顔貌は土台となる顔面骨(上下顎骨)と皮膚(軟組織)で構成され、表皮、真皮、皮下組織は、個人の特性、性別、栄養、年齢などのさまざまな条件下で厚みや分布が変化しており、顔面領域の軟組織変化は流動的であり、その変化を正確に予測することは困難である<sup>12, 13)</sup>。

現在、顔貌軟組織評価法は2次元(2D)および3次元(3D)画像解析が行われ、本研究では、顔貌写真(2D)を用いて計測を行った。結果が示すように、平均4.4mmの上顎前進、4.4mmの下顎後退の移動に対し、チーク面積は増加し、チークラインの前方突出点(C3)は前上方に移動した。定量的には、手術の前後で頬のサイズの平均変化率は2.7増加し、C3は前方に2.5、上方に1.5移動した。顔貌写真を用いて頬領域を計測した報告はなく、定量的比較は叶わなかったが、レントゲン画像での2D画像解析では上顎の前進と下顎の後退によるチーク点の前方移動、3D画像解析では頬の突出の前方移動と頬の面積の増加も示されており<sup>5, 14, 15)</sup>、その傾向は一致している。

軟組織に影響を及ぼすと考えられる年齢、BMI、性別について、チーク点とチーク面積との関連性では、性別に相関が観察された。手術による顔面骨移動量に性差を認めなかったが、男性のC2、チーク面積は女性より有意に増加した。顔面骨移動とチーク面積との関連性については、男女ともにチーク面積増加は上顎の前進と正の相関関係にあり、上顎前進が頬の膨らみに影響していることが示唆され、3D画像解析を用いた報告<sup>13)</sup>の結果と一致している。さらに男性のチーク面積増加は、下顎の後退とも正の相関関係にあった。顔面骨移動とチーク点との関連性については、女性では相関はみられなかったが、男性のC2とC3の前方変化と上顎前進に正の相関がみられた。下顎後退があっても、頬の余分な軟部組織は垂直方向の骨減少により前方に移動する<sup>13, 16)</sup>といわれるが、われわれの結果では、上顎の場合のように下顎の垂直方向の変化が頬の大きさや頬の位置と相関していることは示されておらず、頬のラインは前後方向の骨格の移動に影響することが推測できる。

図4では、チークライン上のチーク点の変化を示している。男女ともに、最も前方に変化したのはC2で、最も変化が少なかったのはC4であった。この結果は、上顎前進および下顎後退の手術移動によるチークラインの変化を予測する際に参考になる可能性がある。男性ではC2、C3、C4(1.7-4.0)の順に減少し、C2はC4よりも2.3倍有意に前方に移動しており、男性の頬の膨らみは女性よりも骨格の動きに追従していることを示唆している。対照的に、女性では3つのチーク点の変化に差がなく、チークラインは前方および放射状に移動することが示唆された。これまで手術後の頬表面の湾曲形状に言及した報告はない。一般に男性の皮膚は女性の皮膚よりも厚く、女性は男性よりも

皮下組織が厚く、皮膚が緩んでいる。これらは、顎矯正手術後の患者の軟部組織の状態に影響を与える要因である。本研究の結果は、これらの以前の知見<sup>13, 16-18)</sup>を支持するものであり、チークラインの形状は、より凸状に変化して頬の上部に膨らみを生じやすく、チークラインの頂点が上方に変化することを示している。

最近では、顔の複雑な3次元形状を評価するには、主に3D画像解析が用いられているが、頬の定義自体の曖昧さと個人差のため、解剖学的根拠に基づいて頬の3D点を定義することは困難である。チークラインは顔の特徴を単純化してしまうのではないかと懸念があるが、横顔の特徴を示す指標の一つであり、臨床診療で頻繁に観察される。チークラインの評価は、2D画像解析であり特別な装置を使わずに直接評価できる利点がある。実験結果では、半自動法を用いた2D画像解析によって定量的に計測された頬点の術後変化は、過去の皮膚特性に関する研究で報告されたものと一致することが示された。これは、提案手法が頬の大きさだけでなく頬の輪郭形状の定量的評価にも有効であることを示している。

#### (引用文献)

- 1) Pessa JE, Desvigne LD, et al. Changes in ocular globe-to-orbital rim position with age: Implications for aesthetic blepharoplasty of the lower eyelids. *Aesthetic Plastic Surgery* **23**, 37-42 (1999)
- 2) Linkov G, Mally P, et al. Quantification of the aesthetically desirable female midface position. *Aesthetic Surgery Journal* **38**, 23-40 (2018)
- 3) Surek CC, Beut J, et al. Pertinent anatomy and analysis for midface volumizing procedures. *Plastic and Reconstructive Surgery* **135** 818-829e (2015)
- 4) Frey ST. New diagnostic tenet of the esthetic midface for clinical assessment of anterior malar projection. *The Angle Orthodontist* **83** 790-794 (2013)
- 5) Lee HJ, Park HS, et al. Soft tissue changes and skeletal stability after modified quadrangular Le Fort I osteotomy. *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* **44** 356-361 (2015)
- 6) Moriyama T, Izumi K, et al. Quantitative Analysis of Mid-face Correction Treatment using Automated Image Analysis. *The Journal of Information Processing* 435-442 (2022)
- 7) Miyahara K, Izumi K, et al. Quantitative evaluation of the cheek area after maxillary advancement and rotation by orthognathic surgery in skeletal maxillary retrusion. *Oral Science International* **22** e1259 (2024)
- 8) Chang HP, Tseng YC, et al. Treatment of

- mandibular prognathism. *Journal of the Formosan Medical Association* **105** 781-790 (2006)
- 9) Tang EL. The prevalence of malocclusion amongst Hong Kong male dental students. *Journal of the British Orthodontic Society* **21** 57-63 (1994)
- 10) Sonogo CL, Bobrowski AN, et al. Aesthetic and functional implications following rotation of the maxillomandibular complex in orthognathic surgery: A systematic review. *International journal of oral and maxillofacial surgery* **43** 40-45 (2014)
- 11) Choi JW, Lee JY, et al. Frontal soft tissue analysis using a 3-dimensional camera following two-jaw rotational orthognathic surgery in skeletal class III patients. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* **42** 220-226 (2014)
- 12) Burstone CJ. The integumental profile. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* **44** 1-25 (1958)
- 13) Kim M, Lee DY, et al. Three-dimensional evaluation of soft tissue changes after mandibular setback surgery in Class III malocclusion patients according to extent of mandibular setback, vertical skeletal pattern, and genioplasty. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* **109** 20-32 (2010)
- 14) Tseng YC, Cheng JH, et al. The Changes of Cheek Line (Lateral) and Face Line (Frontal) after Correction of Mandibular Prognathism. *BioMed Research International* doi:10.1155/2018/4926528 (2018)
- 15) Kim BR, Oh KM, et al. Analysis of 3D soft tissue changes after 1- and 2-jaw orthognathic surgery in mandibular prognathism patients. *Oral and Maxillofacial Surgery* **71** 151-161 (2013)
- 16) Tseng YC, Chena HJ, et al. Appearance on face reading (cheek line) after orthognathic surgery. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **56** 394-400 (2018)
- 17) Kim YI, Park SB, et al. Midfacial soft-tissue changes after advancement of maxilla with Le Fort I osteotomy and mandibular setback surgery: Comparison of conventional and high Le Fort I osteotomies by superimposition of cone-beam computed tomography volumes. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **69** e225-233 (2011)
- 18) Stella JP, Streater MR, et al. Predictability of upper lip soft tissue changes with maxillary advancement. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **47** 697-703 (1989)

# 化粧品の機能性を最大化する塗布動作の定量評価と提示方法の研究

神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科

和泉 慎太郎

This study aims to develop a system that quantitatively evaluates cosmetic application techniques and provides user feedback, thereby maximizing the functionality of cosmetics, particularly UV protection products. A compact wireless motion-sensing device was embedded into a cosmetic puff to measure hand movements during application. The device captures six-dimensional data including acceleration, angular velocity, and pressure estimations through optical deformation sensing. The data are transmitted in real-time to external devices for analysis.

To validate the system, a series of experiments were conducted using artificial skin embedded with a tri-axial force sensor. UV protection performance was assessed by applying UV-reactive agents and analyzing reflectance under UV camera imaging. Motion and tactile data were synchronized with RGB video using pose estimation algorithms, enabling detailed correlation analysis between user movement and UV protection outcomes.

Results indicated that different application styles (e.g., sliding vs. tapping) led to measurable differences in pressure distribution and UV coverage. However, using motion sensors alone proved insufficient for estimating tactile forces accurately. To address this, an optical tactile sensor was developed that measures force by detecting infrared light reflection changes from the back of the hand, based on the principles of photoplethysmography (PPG). This sensor enables force estimation without obstructing natural tactile sensations.

The integrated system was validated through further experiments, showing the feasibility of simultaneously capturing motion and tactile data without interfering with the user's natural application behavior. These findings provide a foundation for intelligent cosmetic application support systems. Future work includes implementing machine learning models for real-time feedback, and exploring applications in augmented or virtual reality environments for user guidance.

## 1. 緒言

本研究の目的は、センシングデバイス、信号処理、および機械学習を組み合わせて、化粧品塗布動作の定量的評価を行い、その解析結果を使用者にフィードバックするシステムの構築である。塗布時の手の動きや触覚的要素を数値化することにより、使用者の熟練度や、対象の化粧品に適した動作が行われているかを客観的に評価できる。適切な塗布動作は、化粧品の機能性を最大限に引き出すために極めて重要である。

また、熟練者の塗布動作を収集・データベース化し、一般使用者との動作の違いを可視化・提示することで、塗布技術の向上支援にもつながる。本システムは、化粧品分野にとどまらず、障害者や高齢者、入院患者などへの支援にも応用可能であり、幅広い展開が期待される。

本研究では特にUV(紫外線防止)化粧品に着目し、その機能性を損なわない塗布動作を定量的に示すことを目指した。将来的には他の化粧品への応用も視野に入れているが、本研究では、既に一定の評価手法が確立されているUV化

粧品を初期ターゲットとした。

UV化粧品が対象とする「日焼け」は、紫外線が皮膚に照射されることで生じる炎症や色素沈着を指す<sup>1,2)</sup>。紫外線の照射によって、肌の表皮細胞がプラスミンと呼ばれる物質を生成し、それが色素細胞に流入する。このとき色素細胞内のチロシンが過剰にメラニンを生成し、そのメラニンが表皮細胞に滞留することで、色素沈着やシミ・炎症の原因となる。こうした日焼けは、人体に悪影響を及ぼすものであり、適切な紫外線対策を行わなければ、光老化や皮膚がんなどの深刻な健康被害を招くおそれがある<sup>3)</sup>。したがって、UV対策は年間を通じて重要な課題とされている。

日焼け対策としては、主に肌を覆う衣服の着用やUV化粧品の使用が挙げられる。日焼け対策の先進国であるオーストラリアでは、1980年代に「サン・スマートプログラム」が導入され<sup>4,5)</sup>、長袖シャツの着用、UV化粧品の使用、首元を保護する帽子の着用などが具体的な推奨行動として掲げられている。しかし、衣服による紫外線防御は気温や湿度の影響を受けやすく、熱中症のリスクを伴うこともあるため、年間を通じて有効な手段としてはUV化粧品の使用が現実的かつ効果的であると考えられる。

UV化粧品の効果を最大限に引き出すためには、塗布方法が極めて重要である。仮に高い紫外線防御効果を有する製品を使用している場合でも、塗布方法が不適切であればその機能を十分に発揮することはできない。現状では、塗布方法の良否は使用者の主観に依存しており、適切な塗布方法を定量的に提示する手段は確立されていない。



Quantitative Evaluation and Presentation Methods of Application Techniques to Maximize the Functionality of Cosmetics

Shintaro Izumi

Graduate School of Science, Technology and Innovation, Kobe University

そこで本研究では、化粧道具や手指に装着可能な6軸モーションセンサと無線通信機能を備えた小型計測デバイスを開発・実装し、塗布動作を可視化・数値化することで、適切なUV化粧品の塗布を支援するシステムの構築を目指した。

## 2. 方法

### 2.1. 小型ワイヤレスモーションセンサの開発と動作の可視化

本研究では、市販の化粧用パフに小型モーションセンサ、バッテリー、および無線通信ICを組み込んだセンサーデバイスを開発した。本デバイスを用いて塗布動作を計測し、その結果をリアルタイムでスマートフォンやゲートウェイに送信する。UV化粧品塗布後の紫外線防御効果は、紫外線反応剤とUVカメラを用いて評価した。最終的には、アプリケーション操作パターンと紫外線防御効果の相関を明らかにすることを目的とした。

図1に提案システムの概略図を示す。ユーザーは化粧用パフを用いてUV化粧品の塗布し、その動作情報(加速度・角速度)を、内蔵されたモーションセンサおよび無線通信機能によりPCへ送信する。将来的なアプリケーションでは、機械学習によって取得した動作データからUVカット

性能を予測し、その結果をユーザーにフィードバックする機能の実装を目指している。

紫外線防御性能の予測には、塗布動作中の速度、加速度、圧力などの多様なデータの取得が不可欠である。これにより、ディスプレイ上の視覚的な表示や触覚刺激を通じて、ユーザーに対してより適切な塗布動作を誘導することが可能となる。また、熟練者や専門メイクアップアーティストの動作をデータベース化し、それを一般ユーザーに提示するような応用も視野に入れている。

機械学習による紫外線防御性能推定の実現には、センサーデータと防御性能評価結果のペアデータが必要である。図2に示すような測定環境を構築し、データ収集を実施した。市販のパフを改造し、中央部に6軸モーションセンサ(加速度・角速度)を埋め込んだ。パフ部分は衛生面から使い捨てとし、既製品をベースに改造することで低コスト化を図った。

市販デバイスではパフ内部への実装が困難であったため、専用の小型センサーデバイス(図3)を新たに試作した。センサー回路基板の寸法は $15 \times 20 \times 30 \text{ mm}^3$ であり、パフ内部に挿入しても5mm程度の緩衝層を確保できる。複数の被験者による使用感評価の結果、使用感や操作性への影響は見られなかった。本デバイスは、モーションセンサおよび無線通信ICを内蔵し、底面から容易に取り外し可能

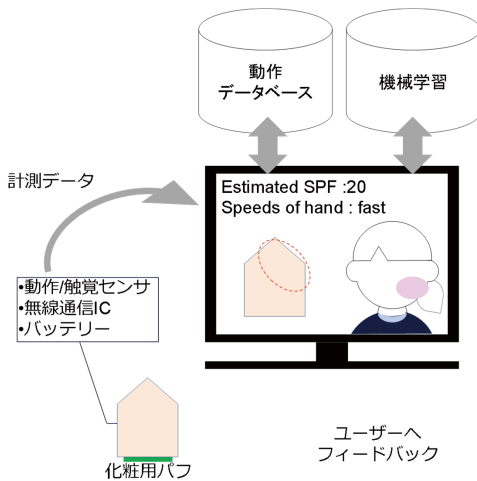


図1 提案システムの概要

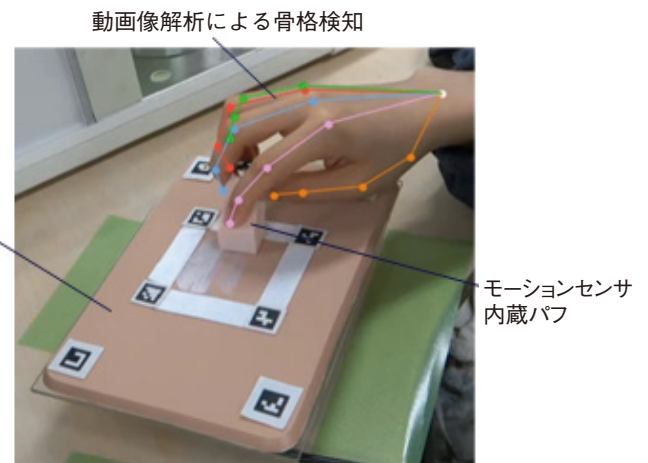


図2 測定環境

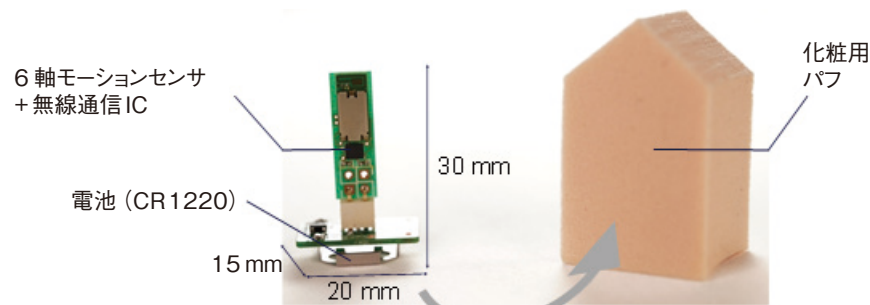


図3 モーションセンサ基板

なボタン電池を電源として使用する。センサは3軸加速度、3軸角速度、センサ周辺の温度を取得可能である。加えて、パフの変形を光学的に測定することで、皮膚にかかる圧力を推定した。これにより、合計6種類のパフ塗布データが取得可能となった。

次に、モーションセンサの出力と塗布結果との関係性を検証するための評価実験を行った。図4に評価環境を示す。本実験の目的は、人工皮膚に加わる圧力の絶対値とその変化、ならびに塗布後の紫外線防御性能の評価である。評価には、人工皮膚、紫外線照射装置、力覚センサを組み合わせたシステムを用いた。

人工皮膚には、ウレタンエラストマー製の高弾性素材を加工した厚さ10mm、硬度E22のサンプル（バイオスキン、ビューラックス株式会社製）を使用した。これを5mm厚の亚克力板に接着し、力覚センサ（SFS100YA500U6、株式会社レプリーノ）上に固定した。力覚センサは、加わる外力および回転モーメント（トルク）を3軸に分解して電気信号に変換・計測する装置であり、本実験では人工皮膚にかかる3軸方向のせん断力を定量化した。

塗布後の紫外線防御性能の評価は、紫外線カメラを用いて行った。紫外線照射中は外光を遮断した暗箱内で観察を行い、UV化粧品により反射された紫外線の画像を解析し、塗布量とそのばらつきを評価した。

以上の環境を用いて、提案システムの性能評価を実施した。評価実験の目的は、(1)リアルタイムな塗布動作の計測精度、(2)紫外線防御性能との相関を有するセンサデータの同定、(3)個人差の影響評価、の3点である。具体的には、紫外線防御性能に影響を与えられ3種類のデータ（塗布量、塗布中の加速度および角速度、人工皮膚に加わる圧力）を測定し、UVカメラで得られた紫外線防御性能の定量指標と比較した。

実験ではまず、塗布前のUV化粧品の重量を測定し、被験者がセンサーデバイスを装着したパフで、人工皮膚上にマーキングされた50×50mm<sup>2</sup>の領域へ塗布を行った。塗布中の加速度・角速度データはモーションセンサよりリア

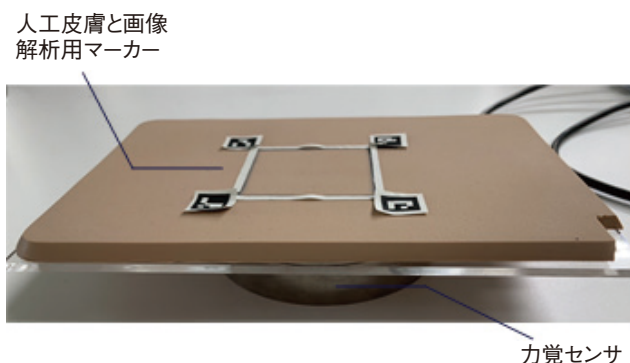


図4 リファレンスデータ計測のための人工皮膚と力覚センサ

ルタイムで無線伝送し、圧力データは人工皮膚下の力覚センサから有線で取得した。塗布後には再度化粧品の重量を測定し、使用量を記録した。

紫外線防御性能については、人工皮膚に紫外線を照射し、紫外線カメラで取得した画像をもとに画素単位で色情報を解析した。画像補正にはARUCOマーカーを用いて歪みを補正し、対象領域の正確な抽出を実施した。加えて、塗布動作をRGBカメラで撮影し、動画に対して骨格検出を行うことで手指の位置推定も実施した。

### 3. 結果

前述の評価環境において、被験者3名（いずれも23～24歳の女性）を対象に塗布実験を実施した。各被験者には、異なる2種類の塗布動作で人工皮膚にUV化粧品を塗布するよう指示した。1回目は、パフを滑らせる「スライド動作」、2回目はパフで叩くように動かす「タッピング動作」を行わせた。これらの動作の一例を図5および図6に示す。

各測定の前および終了後に、UV化粧品の包装を含む重量を測定し、その差分から塗布量を算出した。図5および図6は、それぞれスライド動作およびタッピング動作における計測結果を示している。モーションセンサおよび力覚センサのデータは、直流オフセットおよび電気的ノイズの影響を排除するため、デジタルフィルタ処理を施した。具体的には、1 Hzのカットオフ周波数を持つハイパスフィルタ、および45 Hzのカットオフ周波数を持つローパスフィルタを適用している。

パフの人工皮膚上での軌跡は、RGBカメラで撮影した動画画像に対して、深層学習に基づく骨格推定アルゴリズム<sup>6)</sup>を適用することで推定した。

使用したUV化粧品は紫外線を反射する性質を有しており、紫外線照射下で撮影した人工皮膚画像では、塗布部分が白く描出された。これらの画像に対して画像処理を実施し、人工皮膚上を10×10mm<sup>2</sup>のグリッドに分割した上で、領域ごとに平均輝度および輝度分散を評価した。

また、モーションセンサ、力覚センサ、およびRGBカメラから得られたデータは、塗布動作中の特徴的な動作タイミング（例：パフの接触や動き出し）を基準として時刻同期を行った。これにより、人工皮膚上の各位置に対応するマルチモーダルなセンサデータを高精度に対応付けることが可能となった<sup>7)</sup>。

### 4. 考察

プロトタイプを用いた実験により、提案デバイスを用いて塗布動作時の手の動き（位置と加速度）を可視化できることを示した。しかし、リファレンスの力覚センサで記録されたデータを6軸モーションセンサで記録されたデータのみで推定することは困難であった。これは、パフの変形

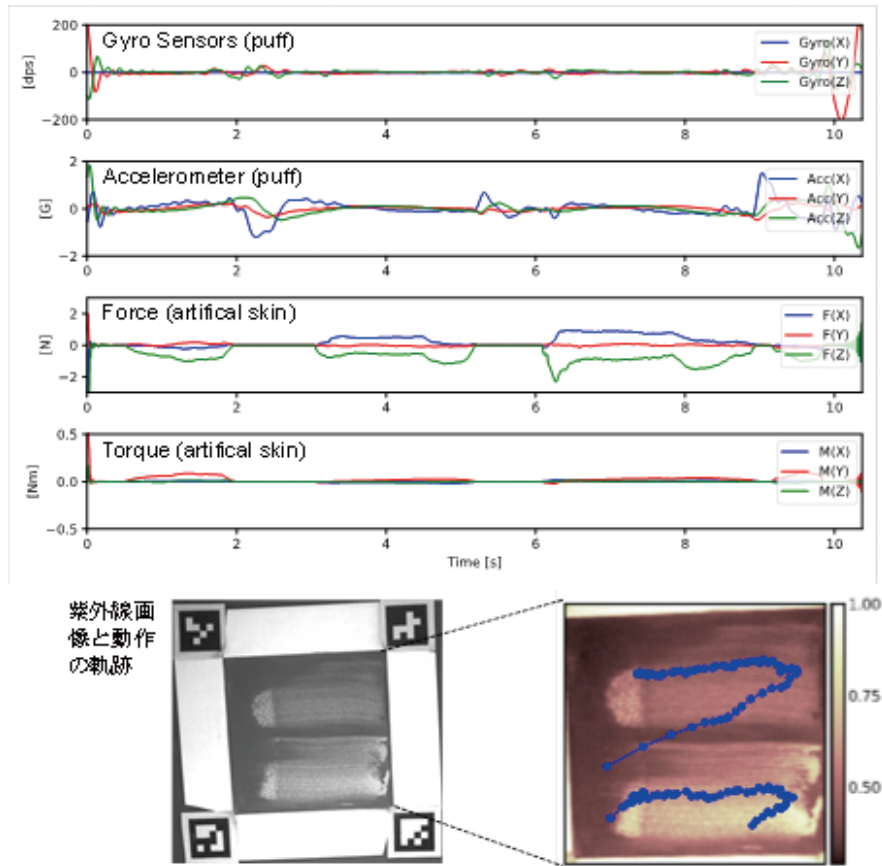


図5 スライド動作時の計測結果の一例

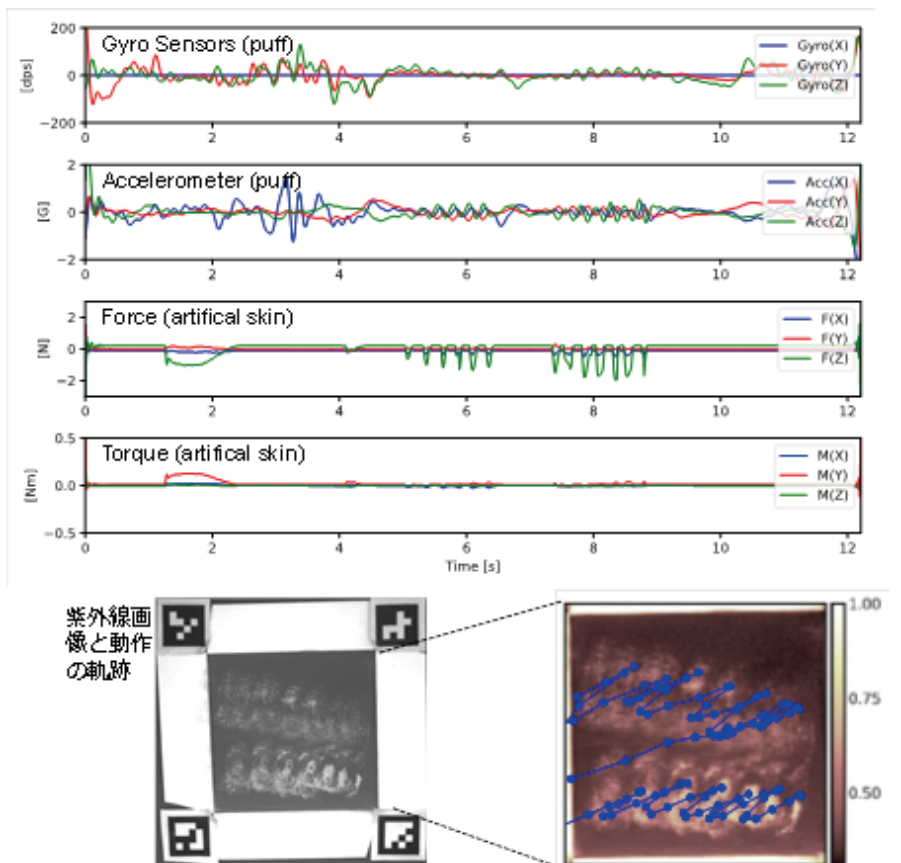


図6 タッピング動作時の計測結果の一例

や皮膚からの応力をモーショセンサだけでは推測できないことを示しており、異なるモダリティのセンサを追加し、手指の触覚を計測する必要がある。

この課題に対処するため、我々は触覚・力覚センサの新規開発を行った。既存の指に装着して触覚を計測することを目的としたセンサには様々な手法があり、そのうちの一つに、手袋型の触覚デバイス<sup>8)</sup>がある。これは、指先ではなく手のひら全体に装着し、自由に触覚刺激を提示することが可能である。しかし、この方法ではデバイスを手のひら全体に装着しているため、物体そのものに触れるといった触覚を妨害していることになる。そのため、指の触覚を妨げないセンサが求められており、指の側面や爪、手の甲のみを利用したセンサが開発されている。先行研究によると、ひずみセンサを使用することで、爪のひずみを検出し、物体に触れた際の接触力の大きさと方向を検出できる測定方法が提案されている<sup>9)</sup>。また、指や爪の色の変化を測定し、触覚を妨げずに圧力と力の方向を推定する技術も研究されている<sup>10)</sup>。

しかし、これらの技術には、いくつかの課題が存在する。まず、接触面が指の爪といった特定の部位に限定されているため、指全体の触覚情報を取得することが難しい。爪から取得できる情報はわずかであり、複雑な動作や速い動きを捉えるには、測定範囲の制限が測定精度に影響を及ぼす可能性がある。さらに、センサを指や爪に物理的に装着する必要があるため、装着による不快感が生じる場合がある。このような装着の影響により、自然な動作が妨げられる可能性があり、計測結果に影響を与えることが考えられる。これらの課題を解決するために、指の一部にとらわれず、広範囲な触覚情報を取得しながら、装着時の不快感を最小限に抑える触覚センサが求められる。

これらの課題を解決し、モーショセンサと組み合わせることで塗布動作を計測する手法として、我々は光学式力覚センサ<sup>11, 12)</sup>を開発した(図7)。提案センサは手指の内部での赤外光の反射を利用することで手の甲や指の背面に装着して力覚を計測することが可能である。指と他の物体との接触面には干渉しないため、触覚を妨害することなく触覚を



図7 新規開発中の力覚+モーショセンサ

計測できる。

センサの構造を図8に示す。本センサは、従来のひずみゲージ、つまり指の変形を直接測定するのではなく、LED (Light Emitting Diode, 赤外線発光ダイオード) とSiPD (Silicon Photodiode, シリコンフォトダイオード) を用いて指の変形を間接的に測定する。LEDから放射された光は、皮膚内外で反射や吸収、透過を行う。皮膚内で散乱して吸収されなかったLEDの光をSiPDで受光することで、センサ値に検出されるようになる。この仕組みは、PPG (Photoplethysmogram, 光電脈波法) を用いており、人体の心拍数や血圧、血中酸素飽和度などの生体情報の変化を測定することが可能である。この原理は、スマートウォッチやパルスオキシメーターなどの生体情報をモニタリングするデバイスに多く用いられている。PPGはランベルト・ベールの法則 (Lambert-Beer law) に基づいており、指の形状と血液量、および血中酸素飽和度に応じてセンサの出力値が変化する。脈拍や血中酸素飽和度を計測するときは指の形状変化はノイズとなるが、触覚・力覚を計測する目的ではその成分を利用することができる。指の形状変化はLEDからSiPDまでの光路長の変化を伴うため、複数の素子を組み合わせることで指にかかる力の方向も推定することができる。

提案する力覚センサを装着して図5、図6と同様の実験を行い、動作時に指先にかかっていた圧力を測定した。実験で得られたモーショセンサデータに対してカルマンフィルタを適用し、3次元空間上の位置を推定した結果を図9に示す。各軸は人工皮膚表面を基準面とした座標を示しており、線の色はその時計測されていた力覚センサの出力電圧を示している。キャリブレーション技術が開発中のため现阶段では圧力値を示せていないが、皮膚表面で圧力に比例するセンサ出力が大きくなっており、正しく計測できていると考えられる。さらに皮膚から離れた位置でパフにかかっていた微妙な圧力も捉えることができています。

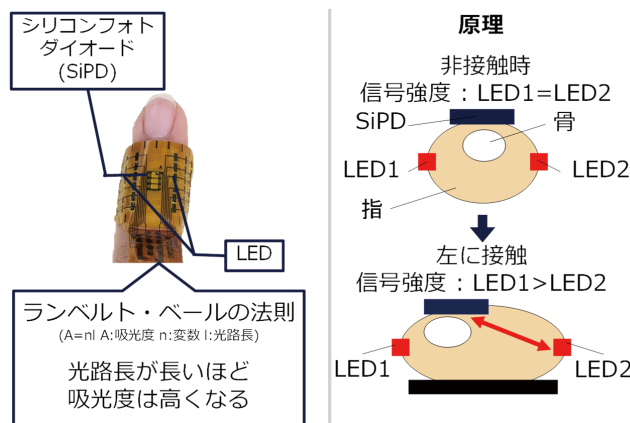


図8 光学式力覚センサの原理

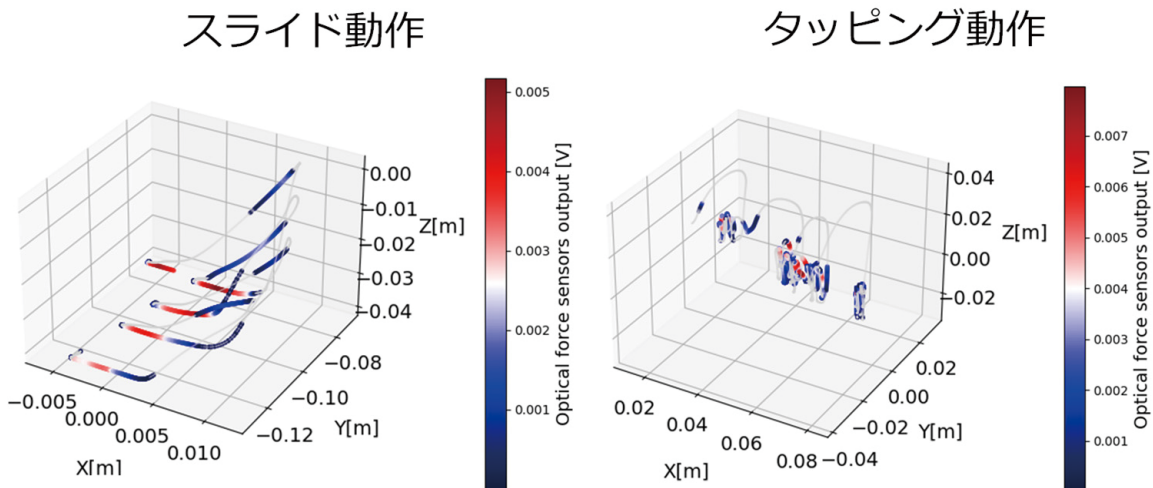


図9 3次元での動作と圧力可視化の一例

## 5. 総括

本研究では、UV化粧品の塗布動作を可視化することを目的とし、化粧用パフに埋め込み可能な計測デバイスを開発した。実験結果からモーションセンサのデータが塗布状態に影響することを確認したが、より詳細な推論のためには、時系列のセンシングデータをニューラルネットワークベースの機械学習を用いて評価する必要があると考えている。また、力覚センサの追加開発と、動画解析技術の統合、紫外線防衛性能評価環境の改善にも取り組んだ。現在開発中のシステムではパフに埋め込むことなく、手背に装着したセンサで加速度、角速度、力覚を同時計測できる手法を構築している。

本研究の成果は2件の国際学会で発表を行い<sup>7, 11)</sup>、計測技術に関する英文論文誌に採択された<sup>12)</sup>。

今後は計測結果に基づくユーザーへのフィードバック方法についても、さらなる研究が必要である。そのための手法としては、スマートフォンやPCの画面上で結果や動作パターンを提示し、バーチャルリアリティ (VR) や拡張現実 (AR) の技術と組み合わせることを検討している。触覚刺激技術の応用も考えられる。

### (引用文献)

- 1) Sánchez-Pérez, J. F., et al., Relationship between ultraviolet index (UVI) and first-, second- and third-degree sunburn using the Probit methodology. *Scientific reports*, 9 (1), 733 (2019).
- 2) Elwood, J. M., et al., Sunburn, suntan and the risk of cutaneous malignant melanoma—The Western Canada Melanoma Study. *British journal of cancer*, 51 (4), 543-549 (1985).
- 3) Brenner, M., and Hearing, V. J., The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochemistry and photobiology*, 84(3), 539-549 (2008).
- 4) Whiteman, D. C., et al., When to apply sunscreen: a consensus statement for Australia and New Zealand. *Australian and New Zealand Journal of Public Health*, 43 (2), 171-175 (2019).
- 5) Dobbins, S. J., et al., Weekend sun protection and sunburn in Australia: trends (1987-2002) and association with SunSmart television advertising. *American journal of preventive medicine*, 34 (2), 94-101 (2008).
- 6) Jiang, T., et al., RTMPose: Real-Time Multi-Person Pose Estimation based on MMPose, arXiv:2303.07399v1 (2023).
- 7) Yoshikawa, R., et al., Visualization and Evaluation Method for UV Cosmetics Application Using Motion Sensors. *The 33rd IFSCC Congress* (2023).
- 8) 家室 証, et al., GhostGlove: 手全体への力覚提示を行うグローブ型ハプティックディスプレイ. *日本バーチャルリアリティ学会第13回大会論文集*, pp. 213-214, (2008).
- 9) Maeno, T. and Sato, T., 爪のひずみを利用した触覚センサ. *日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会* (2000).
- 10) Yu Sun, Hollerbach, J. M., and Mascaro, S. A., Estimation of Fingertip Force Direction With Computer Vision. *IEEE Transactions on Robotics*, vol. 25, no. 6, pp. 1356-1369 (2009).
- 11) Kushihashi, M., et al., Analysis and Visualization of UV Cosmetics Application Using Multimodal Tactile Sensors. *The 34th IFSCC Congress* (2024).
- 12) Ando, K., et al., Flexible Optical Tactile Force Sensor to Conduct Measurements from the Back of the Hand. *IEEE Sensors Journal*, (2025). (Accepted).

# プロテウス効果による内発的な肌の潤い向上・保持支援システムの検討

香川大学創造工学部  
北村 尊義

Maintaining skin moisture is crucial for both physiological health and psychological comfort. However, many people face difficulty continuing conventional physical interventions such as moisturizers or humidifiers due to environmental or practical constraints. This study explores a novel wellness support system that uses virtual avatars resembling the user (self-avatars) to promote intrinsic motivation for skincare. Based on the Proteus Effect, which suggests that avatars can influence user behavior and perception, we developed a virtual environment that visually simulates warmth (a sauna space) and compared it to a neutral space (a library). We evaluated four conditions: with or without self-avatars in each environment. Twenty participants created their own avatars using VRoid Studio, and viewed the virtual scenes passively. Physiological changes were assessed using thermal imaging of the face, and subjective impressions of skin condition and circulation were measured via Visual Analogue Scales. Results showed that the sauna space with a self-avatar led to notable increases in facial temperature and subjective feelings of warmth and circulation. Moreover, participants who viewed their self-avatar reported a greater sense of self-identification and immersion, with many expressing that they felt physically warmer when their avatar appeared flushed. These effects were less pronounced or absent in conditions without avatars. The findings suggest that visually observing one's own self-avatar in a contextually warm environment can evoke internal bodily responses related to skincare, potentially supporting self-motivated maintenance of skin health. This research highlights the practical potential of affective interfaces using virtual representations for everyday wellness.

## 1. 緒言

皮膚（以下、肌と記す）は人体の最大の器官であり、外部環境から身体を保護するバリア機能を有している。特に肌の潤いは、このバリア機能を適切に維持するために不可欠な要素であり、健康的かつ美しい肌の基盤を形成するとされている<sup>1)</sup>。近年では、空調機器の使用や季節的な気象条件などにより、空気中の湿度が低下することで肌の乾燥が進行しやすくなっている<sup>2,3)</sup>。また、心理的ストレスや自覚的な肌の状態評価など、主観的要因も肌の健康状態に大きく影響することが報告されている<sup>4,5)</sup>。これらの課題に対しては、保湿剤の使用、加湿器の導入による湿潤環境の提供といった外的手段が主流である。しかし、保湿剤が肌に合わない、加湿器のメンテナンスが煩雑である、使用が許されない環境にあるなど、物理的対策の継続的実践が困難なケースも少なくない。その結果、肌の乾燥による不快感を抱えながらも対策が取れていない人々が存在するのが現状である。一方で、近年のヒューマンコンピュータインタラクション (HCI) の分野では、仮想空間における自己表象（アバター）を用いることによるポジティブな心理効果が注目されている。その一例として、「プロテウス効

果 (Proteus Effect)」が挙げられる。これは、ユーザーが仮想空間内で自身に似た、あるいは理想化されたアバターを用いることで、実世界での態度・行動・感情にまで変化が生じるという心理現象である<sup>6)</sup>。過去の研究では、外見が知的なアバターを使用すると認知課題の成績が向上したり<sup>7)</sup>、アバターの身体的特徴が行動に影響を与えたりすることが確認されている<sup>8)</sup>。

本研究では、このプロテウス効果に着目し、「仮想空間に存在する自己に似せたアバター（自己アバター）を観察すること」が肌の生理状態、特に潤い保持に影響を与える可能性があるという仮説のもと、新たなスキンケア支援システムの構築と評価を試みた。そのために、仮想空間内に配置された自己アバターと、その背景となる文脈的な空間（例：サウナ、図書館）との組み合わせによって、ユーザーの肌の表面温度や血行、潤い感などの生理的反応を喚起するシステムの検討を行った。

## 2. 方法

### 2.1. システム設計

本研究では、仮想空間において自己に似せて作成されたアバター（以下、自己アバター）を視覚的に観察させることで、ユーザーの生理状態、特に肌の潤い保持に関連する反応を促す支援システムの構築を試みた。仮想空間には、視覚的に温熱感を喚起する「サウナ空間」と、温熱感の少ない「図書空間」の2種類を用意し、実験では、仮想空間の種類とアバターの有無によって4つの提示条件を設定し、以下の通りに分類した。

・タイプS：サウナ空間（図1、自己アバターなし）



Enhancing and Sustaining Skin Hydration Through the Proteus Effect: Toward an Intrinsically Motivated Cosmetic Support System

Takayoshi Kitamura

Kagawa University

- ・タイプSA：サウナ空間（図2、自己アバターあり）
- ・タイプT：図書空間（図3、自己アバターなし）
- ・タイプTA：図書空間（図4、自己アバターあり）

サウナ空間においては、自己アバターの肌に赤みを帯びた加工を施し、火照り感を想起させる演出を行った。これにより、視覚情報から温熱性発汗や血行促進を喚起する効果を期待した。また、ユーザーの没入感や自己同一性を高めるため、自己アバターは参加者自身によって作成されたものを用いた。

## 2.2. アバター作成および実験環境

自己アバターの作成には、3Dアバター作成ツール「VRoid Studio<sup>10)</sup>」を使用した。各実験参加者には、10分程度で自分自身に似せたアバターを自力で作成してもらい、作成時には衣装や姿勢などを統制した。作成されたアバターは、それぞれサウナ空間または図書空間に配置し、PCディスプレイ上に提示した。実験は、外部の音や温度変化などの影響を最小限に抑えるため、大学構内の個室研究スペースにおいて実施した。室温は平均20.1℃、湿度は40.3%に保たれた。なお、実験中の映像提示にはノートPCとカラーディスプレイを用いた。

## 2.3. 実験手順

実験参加者は20名（男性9名、女性11名）であり、事前にサウナ環境への耐性や健康状態の確認を行った上で参加を依頼した。以下の手順で実験を進めた。なお、実験参加者には自己アバターを含む画面を視聴する以外の操作を行わず、受動的な観察に集中してもらった。

- ①事前アンケート：体調、肌状態、仮想環境への印象などを評価。
- ②アバター作成：VRoid Studioを用いて自己アバターを作成。
- ③導入フェーズ：白背景の中に自己アバターのみを提示し、アバターとの同期感を約5分間確認。
- ④主実験フェーズ：乱数によって提示順を決定した上で、4タイプの空間映像をそれぞれ1回ずつ提示（5分間ずつ）。
- ⑤事後アンケート：各空間の印象、肌の潤い感、血行感、システムへの満足度などを評価。

## 2.4. 評価指標と測定方法

本研究では、以下の2種類の指標に基づき、仮想空間と自己アバターが肌状態に与える影響を評価した。

### (1) 客観的指標：肌の表面温度変化

肌の表面温度の変化を定量的に把握するために、サンワサプライ製サーモグラフィカメラ（PSC-TMCM2）を使用し、各空間提示時の0分・2分30秒・5分のタイミ

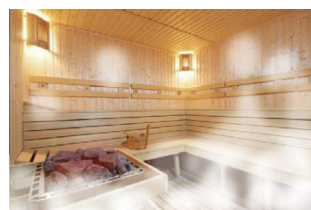


図1 タイプS：サウナ空間（自己アバターなし）<sup>9)</sup>



図2 タイプSA：サウナ空間（自己アバターあり）<sup>9)</sup>



図3 タイプT：図書空間（自己アバターなし）<sup>9)</sup>



図4 タイプTA：図書空間（自己アバターあり）<sup>9)</sup>

ングで顔を撮影した。カメラは被験者の左側1mに設置し、90度左回転して定点撮影を行った。画像内のピクセルごとにRGB値から温度を推定し、35.5℃以上のピクセル数を算出して生理的反応の指標とした。

### (2) 主観的指標：VASアンケート

肌の状態や血行感についての主観的変化を測定するため、VAS (Visual Analogue Scale) 形式のアンケートを使用した。特に、肌の潤い・油分の感覚、血行の実感、環境の快適性、局所的な不快感や発熱感について評価した。また、2次元VASを用い、水分量（Y軸）と油分量（X軸）の印象を同時に取得した。

## 3. 結果

### 3.1. 客観的評価：顔面表面温度の変化

顔面表面温度については、提示開始時（1st）、2分30秒経過時（2nd）、5分経過時（3rd）にサーモグラフィカメラにより撮影を行い、35.5℃以上のピクセル数を集計した（図5参照）。対応のある一元配置分散分析を行った結果、以下のような有意差が認められた。

- ・タイプT（図書空間、自己アバターなし）では、1st～3rd間において有意な温度上昇（ $p=0.0435$ ,  $r=0.45$ ）が確認された。
- ・タイプSA（サウナ空間、自己アバターあり）でも、1st～3rd間において有意傾向（ $p=0.0588$ ,  $r=0.45$ ）が見られた。
- ・他の条件（タイプSおよびTA）では統計的に有意な変化は確認されなかった。

以上より、自己アバターを表示したサウナ空間（SA）においては、温熱感を喚起する視覚情報と自己投影の相互作用から肌表面温度に変化が生じた可能性が示唆される結果を得た。

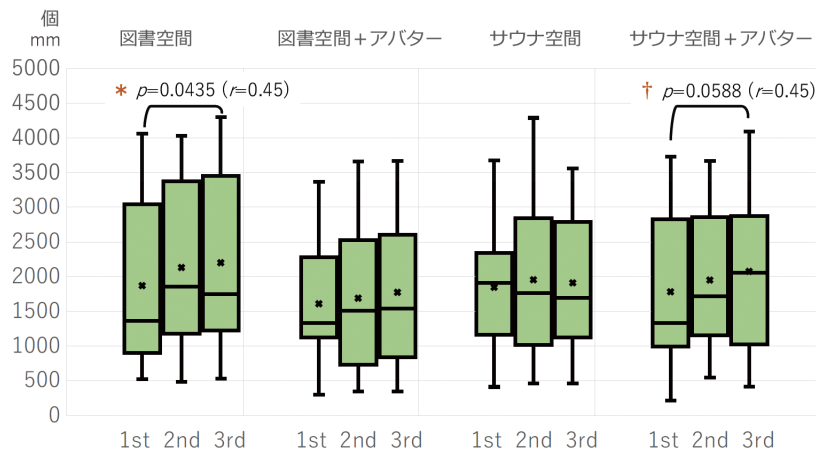


図5 35.5°C以上のピクセル数の分析結果<sup>9)</sup>

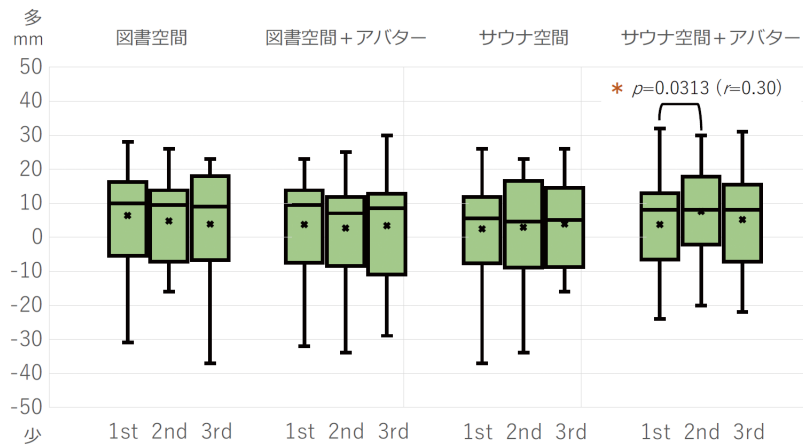


図6 主観評価による油分量の分析結果<sup>9)</sup>

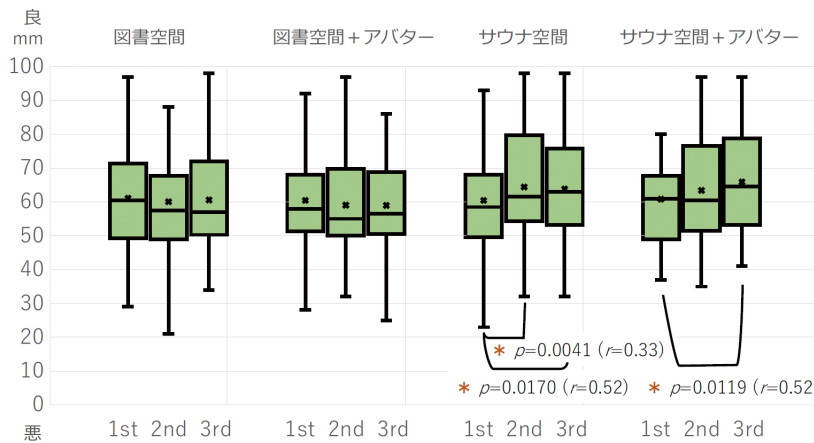


図7 主観評価による血行の分析結果<sup>9)</sup>

### 3.2. 主観的評価：血行感・潤い感の変化

VASアンケートによる主観的評価の結果から、以下のような傾向が得られた。

- ・肌の油分量に対する印象については、タイプSAにおいて1st～2nd間で有意な上昇 ( $p=0.0313, r=0.30$ ) が確認された(図6参照)。

- ・血行に関する主観的評価では、タイプSにおいて1st～2nd( $p=0.0041, r=0.33$ )および1st～3rd( $p=0.0170, r=0.52$ )間で有意な上昇が認められた。
- ・タイプSAにおいても、1st～3rd間での血行感に有意な上昇 ( $p=0.0119, r=0.52$ ) が確認された(図7参照)。
- ・水分量および快適性の評価については、いずれの条件に

においても有意な差は確認されなかった。

なお、提示中に報告された局所的不快感・発熱感に関しては以下の通りである。

- ・タイプT：喉の乾燥および目の違和感（各1名）
- ・タイプTA：右腕の違和感、肌寒さ（各1名）
- ・タイプS：右腕の違和感（2名）
- ・タイプSA：鼻周り、頬、耳、手のひら、全身の火照りなど（計16件）

この結果からも、自己アバターが提示されたサウナ空間(SA)において、身体感覚の変化が最も多く報告されたといえる。

### 3.3. 自己アバター投影方法に関する調査

実験前のアンケートでは、自己アバターを画面上に投影したいと回答した参加者は19名、実際の自身の映像を投影したいと回答した者は1名であった。アバター投影を希望した理由としては、「自分自身を見つめ続けるのは恥ずかしい」「アバターの方が客観的に見られる」といった回答が多く見られた。実験後のアンケートでは、「自己アバターを自分自身と思えた」と回答した参加者が13名、「思えなかった」が7名であった。前者の理由には「作成時に自分に近づけたから」、後者には「理想通りに作成できなかったから」などが挙げられた。システムの有効性について、「効果があると思う」と回答した者は17名、「効果がない」と答えた者は3名であり、多くの参加者が仮想空間とアバターによる影響を実感していた。自由記述には、「アバターが火照っていると、自分も暑く感じた」「空間に臨場感があった」といったコメントが寄せられた。

### 3.4. 一対比較法による提示条件の評価

参加者による提示条件ごとの印象評価については、シェッフェの一対比較法(中屋の変法)により解析を行った。6段階評価(-5~+5)に基づく結果から、最も高く評価されたのはタイプSAであり、次いでタイプTA、S、Tの順となった(図8参照)。また、自己アバターの有無による主効果は統計的に有意であり( $F=102.871, p<0.001$ )、

個人差との交互作用も有意であった( $F=5.179, p<0.001$ )。これらの結果から、視覚的に温熱感を演出する空間と自己アバターの併用が、参加者の生理的・心理的評価の両面において最も肯定的な影響を与えていたことが明らかとなった。

## 4. 考察

### 4.1. 自己アバターの存在による生理的変化の解釈

本研究において、自己アバターを提示したサウナ空間(タイプSA)では、顔面表面温度や血行感の上昇など、客観・主観両面において肯定的な変化が見られた。これは、アバターの火照り表現と背景環境が視覚的に温熱感を喚起し、ユーザー自身の身体に温熱的な知覚が生じた結果と解釈できる。さらに、自己アバターの存在は、仮想空間と自身との心理的な「同期感」(self-presence)を高める働きを持ち、それが温熱感の内受容的体験として身体に現れることで、顔面温度の変化に結びついた可能性がある。このような知覚・生理的反応の変容は、視覚刺激が感覚間相互作用(クロスモーダル知覚)を通じて身体感覚を変化させるという既存の知見とも整合的である。たとえば、Moseleyら<sup>8)</sup>は、視覚的操作によって被験者の痛覚や体温知覚が変化することを報告しており、視覚的自己表象が内受容的感覚に影響を与えるメカニズムが存在することを示唆している。また、Kilteniら<sup>7)</sup>の研究では、仮想身体の視覚情報が身体所有感や身体的反応に及ぼす影響が実験的に確認されており、アバター提示による身体感覚の変容可能性が裏付けられている。これらの知見と本研究結果を照らし合わせることで、視覚的に提示された自己アバターが身体所有感や生理的覚醒を媒介し、顔面温度や血行感といった身体反応の変化に結びついたと考えることができる。

### 4.2. 主観的評価における効果の持続性とその意義

主観評価においては、特に血行や油分量に対するポジティブな変化が、自己アバター提示条件で有意に見られた点が注目される。タイプSAでは提示後も主観評価が継続して上昇する傾向が見られたのに対し、自己アバターを提

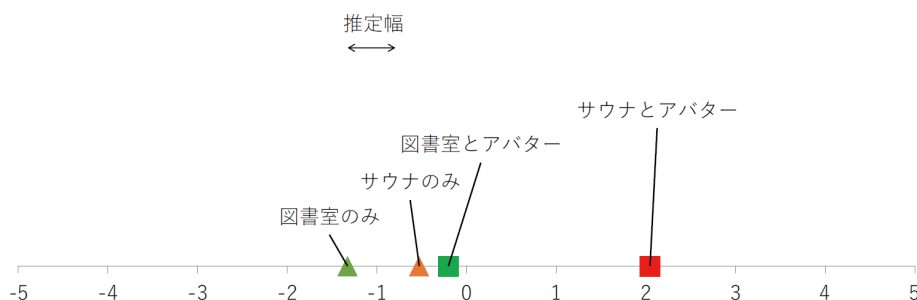


図8 シェッフェの一対比較法(中屋の変法)による結果

示しない条件(タイプS)では一時的な上昇の後に減退する傾向があった。これは、自己アバターの存在がユーザーの意識の維持や仮想空間への感情的な関与(emotional engagement)を高めたことに起因する可能性がある。このような関与の持続性は、自己効力感やセルフケア行動の継続性と密接に関連しており、Bandura<sup>11)</sup>の自己効力理論によれば、「自己が状況をコントロールしている」という感覚が動機づけの維持に重要であるとされている。仮想空間内で自らに似たアバターを通してポジティブな体験を得ることは、そのような自己効力感を強化し、結果としてスキンケアに対する内発的動機づけの促進につながったと考えられる。また、近年の研究では、没入型体験を通じた感情的共鳴が、身体的感覚の自己評価に影響を与えることが示唆されている(Takahashi et al.<sup>12)</sup>)。本研究における主観評価の持続的な上昇も、アバターを介した没入感と感情的共鳴によって説明できる可能性がある。したがって、自己アバターの提示は、単なる視覚刺激にとどまらず、ユーザーの身体意識を内側から支援する新たなインタラクション手法としての意義を持つといえる。

#### 4.3. 投影対象としての自己アバターの受容性と応用可能性

自己アバターを投影したいと考える参加者が多数派であったこと、また自己アバターに対して「自分自身と感じた」と回答した参加者が過半数を占めたことから、仮想環境におけるアバターの受容性は高いといえる。特に、外見的類似性を好ましく追求できるツール(VRoid Studioなど)を用いることで、アバターと自己の一体感が促進される点は、本システムの今後の実用化を進める上で大きな利点となる。このような仮想的自己表象の心理的影響については、先行研究でも注目されており、例えばYee and Bailenson<sup>13, 14)</sup>は「プロテウス効果」として、アバターの外見がユーザーの行動や態度にまで影響を及ぼすことを示した<sup>6)</sup>。また、Ratan and Dawson<sup>15)</sup>は、アバターへの同一視が高まることで自己効力感や感情的安定性が強化されることを報告している。これらの知見と照らし合わせても、本研究における「アバターが火照っていると自分も暑く感じた」という感覚的報告は、アバターへの投影が生理的体験に及ぼす影響を示す実証的な裏付けとなりうる。さらに、アバターを通じて身体感覚や環境印象が変容する可能性は、これまでゲームや教育といった領域で注目されてきたが、美容やスキンケアといった日常生活に近い応用例は少ない。そうした意味でも本研究は、プロテウス効果を美容ウェルネス支援の文脈に応用した初期的試みとして、新たな知見を提示したといえる。このような比較的受容されやすい仮想的自己表象を用いた介入は、将来的にスマートフォン

やミラー型ディスプレイとの連携によって家庭内でも展開可能であり、化粧品や美容機器と組み合わせた新たなユーザー体験を提供する可能性がある。

#### 4.4. 本研究の限界と今後の課題

本研究では、提示時間を5分間に制限し、短期的な変化に着目した評価を行った。一方で、肌の生理的な変化、特に角質層の水分保持やターンオーバーの改善には数週間の継続が必要であるという報告もあり、長期的な使用における効果の検証が今後の課題である。

また、アバターの没入感には個人差があり、「自分自身と感じられなかった」と回答した参加者も一定数存在した。アバターの作成支援、身体の動きとの連動、あるいは聴覚・嗅覚といった他感覚の併用などによって、自己同一性の強化を図る必要がある。さらに、今回は肌表面温度のみを生理指標として用いたが、皮膚水分量・油分量の実測値や血流センサなどを併用することで、より多面的な評価が可能となると考えられる。

### 5. 総括

本研究では、仮想空間内に提示される自己アバターの視覚的観察が、肌の潤い保持や血行感といった生理的・心理的側面にどのような影響を与えるかを検証することを目的とし、短期的な実験を通じてその有効性を評価した。その結果、自己アバターが提示されたサウナ空間(タイプSA)では、顔面表面温度の上昇や血行感の改善、肌の油分量に対する主観的な肯定的変化が確認され、視覚的な自己投影が身体感覚に働きかける可能性が示唆された。加えて、自己アバターを投影したいと考える参加者が多数を占めたことから、こうしたシステムが受容されやすいものであることが明らかとなった。本研究の成果は、従来の物理的アプローチによるスキンケアとは異なり、ユーザーの内発的動機づけを支援する新しい補助的アプローチとしての意義を持つ。特に、肌状態の改善・維持に対する自発的な意識を促進する手段として、視覚的な自己表象の活用は有望であると考えられる。

今後は、本システムの長期的な使用における肌への継続的影響を検証することに加え、アバターの個別最適化、他感覚(聴覚・嗅覚など)の統合による没入感の向上、表示メディアの小型化・モバイル化といった応用展開が求められる。また、美容機器やスキンケア製品との連携を図ることで、家庭内におけるウェルネス支援ツールとしての実装可能性も視野に入る。

最後に、本研究が美容領域における感性インタフェースや心理的アプローチの実践的可能性を広げる一助となれば幸いである。

## 謝 辞

本報告書は著者の共同研究者である、間瀬朱璃さん、荒川雅生先生、福森聡先生とでHAIシンポジウム 2023で共著発表し、最優秀発表賞を受賞した論文<sup>9)</sup>をまとめなおしたものです。氏らとの協力なくして本研究および成果は実現困難でした。ここに深謝いたします。また、本研究は、コーセーコスメトロジー研究財団によるコスメトロジー研究助成なくしては実現し得ませんでした。ここに深く感謝の意を表しますとともに、貴財団の今後ますますのご発展を心よりお祈り申し上げます。

## (引用文献)

- 1) 日本皮膚科学会編：皮膚科学、第11版、金原出版、2018、p.105.
- 2) Yano K., Hara M. : Effects of indoor humidity on skin hydration, *Skin Research and Technology*, Vol.21, pp.54-60, 2015.
- 3) 加藤明子、小川晶子：冬季における肌乾燥と空気中湿度の関連、*日本化粧品技術者会誌*、Vol.48, pp.93-98, 2014.
- 4) 高橋志保、佐々木正信：ストレスと皮膚状態の関係性に関する検討、*心理学研究*、Vol.85, pp.211-219, 2014.
- 5) Tschachler E., Morizot F., Ledger J. : Self-perception of skin condition and its psychological implications, *International Journal of Cosmetic Science*, Vol.36, pp.123-130, 2014.
- 6) Slater M., Sanchez-Vives M. V. : Enhancing our lives with immersive virtual reality, *Frontiers in Robotics and AI*, Vol.3, Article 74, 2016.
- 7) Kilteni K., Groten R., Slater M. : The sense of embodiment in virtual reality, *Presence: Teleoperators and Virtual Environments*, Vol.21, pp.373-387, 2012.
- 8) Moseley G. L., Gallace A., Spence C. : Is mirror therapy all it is cracked up to be? *Pain*, Vol.138, pp.7-10, 2008.
- 9) 間瀬朱璃、荒川雅生、福森聡、北村 尊義：自分に似せたアバターが環境情報による肌への影響を制御できるかもしれない、HAIシンポジウム 2024 (2024年3月5-6日、静岡大学浜松キャンパス).
- 10) VRoid Studio. pixiv Inc., <https://vroid.com/studio>, (参照 2025年3月1日)
- 11) Bandura A. : Self-efficacy: The exercise of control, W.H. Freeman, 1997, p.3.
- 12) Takahashi H., Watanabe K., Fujimoto R. : Emotional resonance and body self-consciousness in immersive environments, *Journal of Media Psychology*, Vol.33, pp.72-84, 2021.
- 13) Yee N., Bailenson J. N. : The Proteus Effect: The effect of transformed self-representation on behavior, *Human Communication Research*, Vol.33, pp.271- 290, 2007.
- 14) Peña J., Hancock J. T., Merola N. A. : The priming effects of avatars in virtual settings, *Communication Research*, Vol.36, pp.838-856, 2009.
- 15) Ratan R. A., Dawson M. V. : When Mii is me: A psychophysiological perspective on avatar identification, *Media Psychology*, Vol.19, pp.98-112, 2016.

# 大学由来の原料を使用した化粧品開発プロジェクト ～プロジェクトマネジメント学で実践する産学連携研究～

藤女子大学

和田 雅子

This study reports the research and development of cosmetics using materials originating from the university the author belongs to, based on the knowledge and methods of project management. Harvesting wisteria flowers from trellises at various locations around the premises of Fuji Women's Academy (including university and junior/senior high school campus), a university-original 'Wisteria Balm' was developed and produced in collaboration with a cosmetics manufacturer.

For the development and production of this product, with the 100th anniversary of the founding of the Fuji Women's Academy in 2025 in mind, a project to create original university merchandise was proposed. At that time, a student project supported by a company to produce the balm was ongoing. For this reason, this product was discussed as a potential thank-you gift for the donation to the university and this was eventually adopted. Activities in the student project included drafting the basic design, obtaining raw materials, and holding educational workshops for the product. The research team, comprised of faculty and representatives of the collaborating company, engaged in tests for commercialization and studied product development management utilizing the resources of the entire university system. Through these efforts, we expect to explore the potential of industry-academia collaborative research initiated by a social science university.

## 1. 緒言

本研究で、プロジェクトマネジメントの手法を用いて、大学由来の資源を活用した化粧品の開発を行ったので報告する。

学校法人藤天使学園は、2025年に創立100周年を迎える。これを契機に大学のオリジナルグッズを開発する機運が高まっていたところ、折しもプロジェクトマネジメントを学ぶ学生たちの発案で、大学のオリジナルグッズを開発する教育プロジェクトが動いていた。学生たちから連携企業<sup>1)</sup>にも相談し、大学のシンボルである藤の花でバームを製造することになった。本品の製品化が成功すれば、大学の寄付返礼品候補としても取り上げられることになり、最終的には製品化へと結びついた。

本産学連携研究では、学生主導の教育プロジェクトと並走して、①フジバーム製品の開発や品質管理に関する部分、②社会科学系大学でも産学連携研究を円滑に進めるための体制づくりについて検討を行った<sup>2)</sup>。



A Project to Develop Cosmetics Using  
Materials Originating from the  
University  
-Industry-Academia Collaboration  
Research Using Project Management  
Studies-

Masako Wada

Fuji Women's University

## 2. 藤の花と藤女子大学

本学の象徴である藤の花は、もともと藤天使学園の創設当初に、現在の北16条キャンパス周辺に藤の花が咲いていたところから、その名を冠した学校名となり、校章にも使用されている<sup>3)</sup>。現在は、文学部を擁する北16条キャンパスと藤中高(札幌市)、人間生活学部<sup>4)</sup>を擁する花川キャンパス(石狩市)講内で、10基程の藤棚が点在している(図1)。

長く勤務している教職員によれば、学園を象徴する藤の



図1

<sup>1)</sup> (株)The St Monicaは北海道の自然素材から自然派化粧品等の企画開発を手掛けており、今回の研究も代表の七戸と行っている。

<sup>2)</sup> ①を和田、七戸、②を和田、若狭が担当した。

<sup>3)</sup> 藤女子大学>大学概要>広報活動>シンボルマーク・校章 [https://www.fujijoshi.ac.jp/guide/pr\\_activities/emblem/](https://www.fujijoshi.ac.jp/guide/pr_activities/emblem/)

<sup>4)</sup> 2025年4月から人間生活学部はウェルビーイング学部となった。

花を使用してのグッズ作りはこれまでも話題に上ってはきたが、実現にまでは至らなかったという。今回は本学に2018年度からプロジェクトマネジメントを学ぶ専修ができ、学生たちが藤の花関連のオリジナル商品をつくりたいと企画したこと、学園創立100周年が近かったこと等の好機が合致したことで製品の誕生にこぎつけた。

プロジェクト開始当初はハンドクリームをつくる設計であったが、その後、本品が最初の商品化ということもあり、大学内で在庫を抱えること不安等が出てきたことから、七戸のアドバイスで水分量が少ないバームを200個、寄付返礼品用に製造することした<sup>5)</sup>。

### 3. 藤の花の有効成分の抽出条件の検討

ここからは製品化にむけたプロセスについて報告する。

本プロジェクトでは、バームの製品化が初めてなので、製造工程を確立することが重要であった。製品化そのものは企業が行うが、材料となる藤の花を企業に納品するまでのフローについて具体的に検討した。大学では学園内にある10基程の藤棚から、どの程度の藤の花の量をバームの原料にできるのかさえも未確認の、手探りのところからプロジェクトはスタートした。

藤の花全体の製造にむけた順番としては、①藤の花の採取→②房から分離し花びらを集める→③乾燥（自然乾燥、ドライヤー乾燥）（図2）→④脱気装置にかけて袋で保存する（図3）、という流れを確定することができた。

③では、採取した藤の花を乾燥させるのにも、房ごと乾燥したら全体に牧草臭が漂い、この方法は断念し、房から花びらを外す方法を選択した。これらのフローを確立するまで、幾度もフローを検討する試験を繰り返した。

花びらの乾燥は、40℃で乾燥機にかけ、時間を、3時間、4時間、5時間、6時間で実験したが、5時間、6時間だと乾燥しすぎることがわかり、基本、4時間をベースにした。

こちらの研究をもとに、七戸にレシピを伝え、商品製造へとつなげた。

2024年度は、結果として以下の総量が採取された（表1）。

### 4. 製品化にむけた手続き、検査

本研究では、製品化そのものにむけた手続きや品質検査等を本研究で実施した。

本品を販売するにあたっては、製品を北海道に届け出をする必要があり、こちらは連携先の企業がまとめて実施した。

製品化にむけては、一般細菌検査、負荷試験の2種類の検査を実施した<sup>6)</sup>。次に結果について報告する。

### 〈フジバーム1個10g成分表〉

ホホバ種子油、シア脂、ハチミツ、ミツロウ、ハマナスエキス、フジ花エキス、ムラサキ根エキス、BG

### 【検体】

- ・フジ花エキス(ホホバオイル抽出液) 1種類×1条件(0日)
- ・フジバーム製品(ホホバ種子油、シア脂、ハチミツ、ミツロウ、ハマナスエキス、フジ花エキス、ムラサキ根エキス、BG)

1種類×5条件(40℃:0日、30日、60日、120日、180日)の6検体

### 【試験方法】

フジ花エキス(ホホバオイル抽出液)は40℃の加速加熱なしに、そのまま生菌試験を行った。この原液100μLを寒天平板に塗布したところ、ホホバエキスにより、寒天上で吸収されずにエキスがはじかれ、均一に平板上に塗布されないため、エキスを界面活性剤で10倍希釈して寒天平板上に塗布した。寒天平板は35℃で2-3日間インキュベートし、出現したコロニー数をカウントした。



図2



図3

表1

藤の花房数(概数)	総量(採取時、生)	乾燥後
約580房	約4.5kg程度	1.3kg程度

<sup>5)</sup> 学生プロジェクトとしては別途100個製造している。

<sup>6)</sup> 本検査は、(株)The St Monica、及び(株)札幌バイオ工房が実施した。

化粧品の加速試験の方法は、化粧品・医薬部外品製造申請ガイドブックに記載の薬審第43号「医薬品の製造(輸入)承認申請に際して添付すべき安定性試験の取扱について」のガイドラインの方法を参考に以下のように設定した。

加速試験用検体(フジバーム製品)を、40℃に設定したインキュベーター(EYELA社製、SLI-700)内に静置し、加速試験を行った。加速試験0日目、30日目、60日目、120日目及び180日目に取り出し、生菌試験を実施した。

生菌試験は、日本薬局方「微生物限度試験法」に準拠した簡易寒天平板塗抹法により行った。検査の対象とした細菌は、一般細菌(標準寒天培地)、大腸菌群(デスオキシコーレイト培地)、黄色ブドウ球菌(卵黄加マンニット寒天培地)の3種とした。フジバームはそれぞれの日数加温後、検体の一部を正確に秤量し、界面活性剤を10倍量添加し可溶化処理を行い、その可溶化液100μLを無菌的に分取し寒天平板上に塗布した。寒天平板は35℃で2-3日間インキュベートし、出現したコロニー数をカウントした。

**【試験結果】**

フジバーム製品に使用したフジ花エキス原料(ホホバオイル抽出液)について、令和6年4月15日に生菌試験を行った。一般細菌、大腸菌群、黄色ブドウ球菌も全てコロニーは認められなかった(表2)。

そこで次にフジ花エキス原料を使用して作製したフジバーム製品について、加速試験を実施した。加速試験0日目(令和6年4月18日)、30日目、60日目、120日目及び180日目の検体について生菌試験を行った。全ての検体に

表2

検体名	菌種	0日後
フジ花エキス	一般大腸菌	検出せず
	大腸菌群	検出せず
	黄色ブドウ球菌	検出せず

検出せず：<100個/g

表3

検体名	菌種	加速試験日数				
		0日後	30日後	60日後	120日後	180日後
フジ花エキス	一般大腸菌	検出せず	検出せず	検出せず	検出せず	検出せず
	大腸菌群	検出せず	検出せず	検出せず	検出せず	検出せず
	黄色ブドウ球菌	検出せず	検出せず	検出せず	検出せず	検出せず

検出せず：<100個/g

ついて、一般細菌、大腸菌群、黄色ブドウ球菌のコロニーは認められなかった(表3)。

以上の結果から、生菌(一般細菌、大腸菌群、黄色ブドウ球菌)は全て検出限界以下(<100個/g)であった。

180日目までの加速試験が終了した後、全ての検体を短時間37℃に加温して、バームの状態を観察したところ、クリーム hardness には差がなかった。また異臭なども感じられなかった。

**5. 産学連携で取り組むプロジェクトと大学教育**

本研究において、製品化に伴う科学的側面からの研究を実施しつつ、社会科学系大学でも産学連携研究を円滑に進めるための体制づくりについても検討を行った。

産学連携は、近年は人文系学部においても産学連携が企業活動や地域において付加価値を創出するプロジェクトとして注目を集めはじめた。人文系大学における産学連携は、地域経済の抱える課題に対する解決策を提示する社会貢献としての役割が求められると考えられている。

文部科学省は学士課程教育の質的転換について、「学生と教員が意思疎通を図りつつ、一緒になって切磋琢磨し、相互に刺激を与えながら知的に成長する場を創り、学生が主体的に問題を発見し解を見出していく能動的学修(アクティブ・ラーニング)への転換が必要である<sup>7)</sup>」としている。能動的学修においては、知識の伝達中心の授業から脱却することが求められる。そうしたことから近年の大学教育で注目されているのが、PBL(Project Based Learning: 課題解決型学習法)教育である<sup>8)</sup>。PBLは、活動の範囲が広く構造の自由度が高い中で協働し、問題発見・解決の一連のプロセスを通じて学ぶ重要な方法である。また、学生の関心に基づいてプロジェクトを進めること、グループ(集団)での学習であること、フィールドや現場、特定の地域を対象とした学習という特徴があるとされている<sup>9)</sup>。このような特徴をもつPBLであるが、特に産学連携や時間外、教室外の活動を取り込む高次のアクティブ・ラーニン

<sup>7)</sup> 文部科学省中央教育審議会. 新たな未来を築くための大学教育の質的転換に向けて ~生涯学び続け、主体的に考える力を育成する大学~. 9. 2012

<sup>8)</sup> 辻多門. PBLによる大学生の成長とそれに伴う大学教育の在り方—山口大学と同志社大学でのアンケート結果をもとに—. 大学教育. Vol. 9. 2012. pp. 16-25.

<sup>9)</sup> 前掲論文

グはその運営難易度も高く、必ずしもうまくいっているとは言いがたく、その背景にはPBLの教育目的を果たす以前に、プロジェクト管理とその進行そのものに難しさがあると考えられている<sup>10)</sup>。そのようなことから、プロジェクトの成功率を高めるための専門的知識とは別に「プロジェクトマネジメント能力」が必要であるとの指摘があり<sup>11)</sup>、プロジェクトマネジメントの基本的な資質は、アクティブ・ラーニングが目的とする問題解決能力の育成と関連する要素が多分にあるとされている<sup>12)</sup>。

このようなことから、大学教育においてはPBLをとおりしてプロジェクトマネジメントの能力を修得させることが求められており、本学で実践してきていることは、ひとつ大きな体制づくりの好例としてあげられるだろう。

## 6. 考 察

藤女子大学では、これまで食物栄養学科を中心に食品化学、栄養学、健康科学等の領域において、食品メーカー等との産学連携が行われてきた。これらは、主に大学の教員と企業との共同研究や受託研究である。本研究の成果を踏まえ、今後は地域の産業等の状況を把握しながらPBLにつなげ、プロジェクトマネジメント教育を大学として展開していくことが求められる。

家政学を基盤とした本学科で、食品学等の、理系の要素が強い学問領域以外では、プロジェクトマネジメント領域だからこそ産学連携研究の体制が作りやすいと考えている。プロジェクトマネジメントの考えは、社会や地域に貢献し、新たな価値創造に資することを目的としており、その意味でどのような社会テーマであってもひとつのプロジェクトとして包含している。今回においても、ひとつの社会目的のためにさまざまな方策を検討し、プロジェクトに取り込み、実践していくことでゴールへと向かうという体制を作り、本学全体にオリジナルグッズの完成を通して、あらたな価値を創造することに貢献できたと考えている。今後とも誕生した大学オリジナル製品の品質や体制の改善につなげていきたい。

## 付 記

本プロジェクトは、和田雅子（藤女子大学：研究代表者）、若狭重克（藤女子大学：共同研究者）、七戸千絵（(株)The St Monica代表：共同研究者）が中心になり実施した共同研究であるが、大学オリジナルグッズの開発と製品化に至るまでには大勢の学内外の方々の協力があったことを謝辞と共に付け加えておく。

<sup>10)</sup> 本庄佳代子. PBLの課題克服に向けたプロジェクトマネジメントの有効性—文系大学での学生の態度変容とその効果—, 東洋学園大学紀要 Vol. 25, 2017, pp. 145-164.

<sup>11)</sup> 斎藤仁志. PBLによるプロジェクトマネジメント能力の育成, 長崎ウエスレヤン大学現代社会学部紀要, Vol. 14, No. 1, 2018, pp. 7-12.

<sup>12)</sup> 前掲論文



#### **IV. コスメトロジー研究助成を受けて**

## コスメトロジー研究助成を受けて

秋田 紘長

この度は、コスメトロジー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。化粧品素材の開発や化粧品成分の効能解明に関する研究が多い中、D-アミノ酸の酵素合成法に関する基礎研究をお認めくださいましたこと、財団関係者や選考委員の皆様にご心より御礼申し上げます。また、本研究が採択された年度において、研究所から大学に研究活動の場を移したこともあり、研究予算を確保できていませんでしたが、採択いただいたことで研究を進めることができました。深く感謝しております。

私が研究対象としているD-アミノ酸は、「古くから存在が知られているにもかかわらず、生理機能の多くが解明されていない」と考えられています。宇宙空間には、およそ等量のD-アミノ酸とL-アミノ酸が混在していますが、地球上ではD-アミノ酸の相対存在量が0.1%未満にまで減少します。一方、野菜や発酵・生鮮食品には数百 $\mu\text{M}$ のD-アミノ酸が存在し、ヒトのみがD-アミノ酸の甘みを認識

しています。また、ヒト脳での記憶・学習制御やヒト皮膚でのバリア機能等にD-アミノ酸の一部が作用しています。局所的ではありますが、重要な生理機能を担っていることを踏まえ、我々が発見できていないだけで、D-アミノ酸にはまだ未知の生理機能が存在する」と考えています。但し、D-アミノ酸は非常に高価なため、D-アミノ酸に関連する生理機能の多くは解明されていません。そこで、私は、「D-アミノ酸の新規酵素合成法を開発し、D-アミノ酸の安価な提供を可能にすることで、D-アミノ酸の生理機能に関連する基礎研究を促したい」と考えております。本研究で得られた成果を起点とし、新規D-アミノ酸酵素合成法を開発を引き続き進めてまいります。

末筆ではございますが、本研究の遂行にあたり、ご支援賜りましたことに改めて御礼申し上げますとともに、コーセーコスメトロジー研究財団の益々のご発展を心より祈念いたします。  
(日本大学生産工学部教養基礎科学系)

## コスメトロジー研究助成を受けて

古賀 智之

この度は、コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成に採択していただき、心より感謝申し上げます。財団並びに関係者の皆様にご御礼申し上げます。

私は高分子化学・ペプチド工学を専門としています。これまで環境に優しく多様な構造/性質を有するアミノ酸の高いポテンシャルに魅せられ、これらを素材とした自己組織性や刺激応答性のスマート高分子材料の開発を進めてきました。構成アミノ酸種の組み合わせで様々な環境応答性を容易に付与できる点や生体親和性に優れる点などから、アミノ酸系高分子のコスメトロジー分野への展開に以前から興味がありました。今回、採択のご連絡をいただいた際は大変嬉しく思いました。また、関連の分野の方々との新たなつながりを得るよい機会にもなりました。

本研究課題では、アミノ酸系高分子を基盤とする多重刺激応答型の形状固定/記憶性ハイドロゲルの開発に取り組

みました。具体的な内容は、研究報告書に記載の通りですが、温度・光、温度・pHに二重応答して形状固定/記憶性を示すハイドロゲルの設計指針や構造-機能(特性)の相関性に関する基本的な知見を得ることに成功しました。成果の一部は原著論文としてまとめることができ、さらにもう一報論文投稿に向けまとめている段階です。本ハイドロゲルシステムは、アミノ酸ユニット間の水素結合や静電相互作用などの非共有結合の可逆性を巧みに活用することが鍵であり、機能拡張性にも優れています。引き続き本成果を発展させて、社会実装とコスメトロジー研究への貢献に努めていきたいと思っております。

最後になりましたが、今回のご支援を賜りましたことに改めて御礼申し上げますとともに、貴財団の益々のご発展を心より祈念いたします。

(同志社大学理工学部機能分子・生命化学科)

2022年度 研究助成

## コスメトロジー研究助成を受けて

小林 信介

このたびは公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団より助成金を賜り、心より御礼申し上げます。本研究は、微粒子原料の分散性向上と安全性確保を目的として、界面活性剤などの化学添加剤に頼らない乾式表面改質技術の確立を目指すものであり、助成金のご支援により、新たな気流層型プラズマリアクターの試作および特性評価を遂行することができました。

研究では、従来型リアクターにおいて課題であった微粒子の付着や閉塞を、リアクター全体の形状を直線型から螺旋型へと変更することで抑制し、連続的かつ安定した処理を可能としました。さらに、プラズマ処理後の粒子において顕著な接触角の低下が観察され、親水性の付与が達成されたことは、機能性粉体材料の製造技術として高い有用性

を示しています。特に、化学薬品を使用せず物理的処理のみで表面特性を制御できる点は、微粒子利用全般における環境調和型プロセスの構築においても意義深い成果です。今後は、リアクター内における微粒子の分散状態をさらに改善し、親水化性能と処理量の両立を目指したプロセス最適化を進めてまいります。粒子の凝集を抑制し、すべての粒子が均一にプラズマ曝露されるような供給・分散技術の開発に取り組むことで、本技術の実用化への展開を加速させていく所存です。

最後に、本助成により、基礎研究から応用技術への橋渡しとなる貴重な研究機会を得られたことに、改めて感謝申し上げます。  
(東海国立大学機構 岐阜大学)

2022年度 研究助成

## コスメトロジー研究助成を受けて

高橋 大介

この度は、コーセーコスメトロジー研究財団コスメトロジー研究助成に採択いただき、誠にありがとうございます。ご審査いただきました選考委員の先生方をはじめ財団関係者の皆様に心より御礼申し上げます。

私はこれまで、生物活性糖質の精密化学合成と生物学的機能解析による構造活性相関研究を主な研究テーマの1つとして取り組んできました。今回採択いただいたテーマは、糖質型バイオサーファクタントであるマンノシルエリスリトールリピッド (MEL) 類の合成と構造活性相関研究による新規機能性化粧品素材の開発です。MELは、抗菌活性やがん細胞増殖抑制活性をはじめとする多様な生物活性を発現するだけでなく、セラミドを超える肌荒れ改善活性や優れた界面活性性を有するため、化粧品素材(保湿剤)として実用化されており、大変注目を集めています。しかし、現在、MELは酵母培養法により、脂肪鎖長が不均一かつ分離困難な混合物として供給されており、未だ、脂肪鎖長に関する詳細な構造活性相関は不明でした。このような背景の中、私たちは、MELの種類 (MEL-A、B、C、Dの4種) と脂

肪鎖長(5種)が異なる計20種類のMELを系統的に全合成し、肌荒れ改善活性に関して評価してきました。その結果、脂肪鎖長の僅かな違いが肌荒れ改善活性に大きく影響を及ぼすことを明らかにし、肌荒れ改善活性に重要な構造を特定することに成功していました。そこで、ある種のMEL類縁体が、肌荒れ改善活性だけでなく、上皮がん細胞選択毒性を発現するのであれば、スキンケアとがん予防を同時に可能とする新たなコスメシューティカル素材になるのではないかと考え、本研究に取り組みました。実際、貴財団の研究助成のお陰で、目的とした2つの機能を併せ持つ新たな人工型MEL類縁体の創出に成功し、原著論文 (cover featureに選出)、和文総説、及び学会発表を通じて、国内外に発信することができました。改めまして、貴財団からのご支援に深く感謝申し上げます。

今後も生物活性糖質の精密化学合成と生物学的機能解析を機軸として、コスメトロジー研究の発展に貢献していく所存です。末尾ではございますが、貴財団のますますのご発展を祈念いたします。  
(慶應義塾大学理工学部)

## コスメトロジー研究助成を受けて

高橋 まさえ

この度は、コスメトロジー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。私は、2022年3月に東北大学を定年退職し、本助成採択時は特任研究員として引き続き東北大学で研究を続けておりました。東北大学理学部物理で学位取得後、物理には職が得られず、化学、工学、農学と任期付き常勤研究教育職を転々とし、定年退職後に出身部局の物理に常勤職で戻りました。

物理教室に異動した最初の年は、研究費獲得に奔走しておりました。そんな折、コスメトロジー研究助成の募集案内メールが物理教室内に配信されました。ちょうど、溶液状態のまま結晶に取り込まれた水分子を発見し、そのテラヘルツスペクトルに興味深い挙動を見出したばかりの頃でした。肌の保湿という観点から水分子の特性についての研究でコスメトロジーに貢献してみようと考え応募いたしました。肌から浸透した角質内水分子には一次結合水、二次結合水、自由水があり、その中で、二次結合水が水分保持能に重要な役割を果たすことが知られています。本研究は、

水分子を結晶中に取り込み、X線結晶構造解析から秩序パラメータをもとにその状態を明らかにし、テラヘルツ分光測定により局所環境を調べ、二次結合水形成の条件を明確に示すものです。

助成期間の間には、国際誌へ論文を1報発表し、昨年9月にパース(オーストラリア)で開催された赤外ミリ波テラヘルツ国際会議(IRMMW-THz 2024)で基調講演に選出されました。水分子は、生体内の様々な場面で鍵となる役割を担っています。本研究を通じ、その一環にコスメトロジーがあることを知り興味深く思いました。助成期間終了後も、本研究課題を発展させた研究を続ける所存です。末筆になりましたが、研究費不足の苦しい時期に本助成をいただきましたこと、大変ありがたく、コーセーコスメトロジー研究財団関係各位の皆様にご心より感謝申し上げますとともに、貴財団の一層の発展を祈念いたします。

(東北大学大学院理学研究科物理学専攻)

## コスメトロジー研究助成を受けて

藤森 厚裕

私がコスメトロジー研究助成に応募するきっかけは、指導学生の言葉だった。正確には、研究室に配属したいと希望する学生にその志望動機を尋ねた際、「将来、化粧品業界に進みたいから、化粧品の研究に携わりたい」という話を聞かされたことだ。当時、我々は研究室伝統の界面化学の技術を駆使して、報文を多数報告していたが、どちらかというと機能性薄膜材料に研究が寄っていた。また、所属大学の組織改編により、従来の材料学科から応用化学に籍を移したため、学生の志向性に適合したテーマ設定を考えていた時期でもあった。加えて、貴コスメトロジー研究助成の過去の採択者に、日本化学会コロイド・界面部会でお会いする研究者が複数おられたため、「自分も是非!」と考えて、応募に至った。

研究を始める学生さんにとっては、大手化粧品会社の関係の助成金課題により、自身がテーマ設定されていることは、かなりのモチベーションになったようだった。また、

受領式の懇親会の席で、化粧品会社さんとの共同研究の話が持ち上がり、これも研究室の取り組みを化粧品研究に大きくシフトさせるきっかけとなった。

意外だった点は、受領式で伺った、他の採択者の先生方の課題の中に、殆ど界面化学的なテーマが含まれていなかった点である。どちらかというバイオ系の研究で、スキンケア化粧品に偏った採択課題に思えた。界面化学者ならば、メイクアップ化粧品や身体洗浄料などにも広がったテーマ設定が可能であると思われるため、より多くの応募者が生まれることを望んだ。

魅力としては、論文の引用回数が多い研究者が受賞する形で再度研究費を獲得していた点や、年をおいて再採択された研究者がいたことであった。頂いた研究費で愚直にいい論文を書き続け、研究を展開させることで新たなチャンスが生まれるというのは、励みになる情報だった。

当方が貴財団に謝辞を書かせて頂いた学術論文は15報

に至る。その中で3報程度は、助成金課題研究をかなり進展させた成果として報告され、学会等でも興味関心を高く惹いたように感じる。改めて採択の幸運を得られたことに

感謝し、貴財団の支援に御礼申し上げたい。ありがとうございました。  
(埼玉大学)

2023年度 研究助成

## コスメトロジーにより構想できたバイオミメティクスの新しい研究

細田 奈麻絵

本研究では、人間の皮膚や髪から花粉を取り除く「人工マイクロコム」を開発できました。ミツバチなどの昆虫が、粘着性物質で付着し取り除きにくい花粉を脚にあるマイクロコムを用いてきれいに取り除くグルーミングをモデルとしています。既存商品には毛を剃って花粉と一緒に除去するものがありますが、人工マイクロコムは花粉のみを除去できます。これによりカミソリに敏感な肌にも対応でき、多様な消費者ニーズへの対応が可能となります。

この研究手法は、生物に学ぶ「バイオミメティクス」という生物学と工学を融合したものです。本助成事業の「人々の健康的で美しく豊かな生活の実現をめざして」という視点から検討することにより新しい研究を構想することができ、人工マイクロコムの実現に繋がりました。花粉を収集・除去する「グルーミング」行動について、ミツバチは詳しい調査がありましたが、その他の昆虫は詳細に調査されていませんでした。花粉には多様なサイズや形状があ

り、昆虫ごとのマイクロコムの特徴と、生息環境の花形状の関係を調査することで、アレルギーを起こす特定の花粉に効果的な人工マイクロコムの開発が可能となります。花粉のサイズ(20~40 $\mu$ m)は、メイクアップ化粧品の粒子サイズと比較して大きいいため、メイクアップをした状態で選択的に花粉のみを除去できる効果も期待できます。

社会的な要請が高い「花粉症」の対策として人工マイクロコムが活用されるよう、今後、花粉の種類に応じた最適化などで研究を発展させる計画です。生物の機能には、肌や髪をきれいに保つグルーミング機能の他にも、発色、香りなど様々な優れた機能があり、これらをモデルとしたバイオミメティクスを推進することで、クリーンで人や環境に優しいコスメティクスの発展に寄与できると考えています。御援助を賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深く感謝申し上げます。

(国立研究開発法人物質・材料研究機構)

2022年度 研究助成

## コスメトロジー研究助成を受けて

松原 弘樹

今回報告させていただいた「ピッカリングエマルシヨンの自発解乳化」の研究は、2011年度にコーセーコスメトロジー研究財団より助成を受けた「界面活性剤と直鎖アルカンの混合吸着膜の相転移」に関する研究を発展的に継続させたものです。おかげさまでこの研究の立ち上げから10年余りで、吸着膜の相転移を界面物性のスイッチとして活用し、コロイド分散系の物性を制御する私たちの研究は、濡れ転移、泡沫・乳化系の安定性、ピッカリングエマルシヨンの研究へと大きく展開することができました。また、一連の研究を国際会議で発表するにあたっては、国際交流助成でもご支援を賜りました。研究助成と合わせ、ご支援に心より感謝申し上げます。

一方でこの間、大学では基盤校費が年々削減され、また昨今の物価高、円安などの影響も相まって、外部研究費の獲得は研究者にとってますます死活問題となっています。このような厳しい研究環境の中、コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成は、応募に関して年齢制限がなく、助成回数にも制限がないこと、研究期間、助成金額が選択できるなどの点で、大学研究者の活動を本質的な意味でサポートできる制度設計になっていると強く感じています。今後このような有意義な取り組みが他の財団の研究助成にも広がっていくことを切に願っています。

最後に私事ではありますが、一昨年に参加させていただいた第33回表彰・贈呈式では、コーセーグループにご採

用頂いた私の旧所属研究室の卒業生にも久しぶりに再会することができ大変楽しい時間を過ごすことができましたし、私自身も卒業生が活躍している姿がよい刺激になりました。残念ながら2020年に広島大学に着任してからは化粧品関連企業には卒業生を送り出していないのですが、これから

もこのような楽しい再会の機会がたくさんもてるよう研究と教育に精一杯努めたいと思っておりますので、今後ともお力添えのほどどうぞよろしくお願いいたします。

(広島大学大学院先進理工系科学研究科)

2022年度 研究助成

## コスメトロジー研究助成を受けて

池谷 真

この度は、コスメトロジー研究助成に採択いただき誠にありがとうございました。本研究を通じて、iPS細胞技術がコスメトロジー研究にもたらす可能性を改めて実感しました。

私の申請課題は、真皮幹細胞という、生体内ではごく少量しか採取できない貴重な細胞を、iPS細胞から安定的に供給できるシステムを確立することでした。そのために、中間体の細胞である頭部神経堤細胞をラインによらず高効率に誘導できる3次元培養法を開発し、また頭部神経堤細胞から第一鰓弓間葉系細胞を誘導する方法を開発しました。これらの成果は、今後の研究の礎となる重要な成果であり、基礎研究から応用開発まで幅広い分野に革新をもたらすと確信しています。特に、遺伝的背景の異なる複数のiPS細胞株から、均一な品質の細胞を調製できるようになったことは、疾患モデルの作製や、人種や個人差を考慮したパーソナライズドコスメトロジー研究など、多様な応用が期待できます。

また、ゼノフリー条件での培養系を構築したことは、誘導効率の安定化だけでなく、再生医療への展開可能性も広げました。今回は第一鰓弓間葉系細胞の証明の1つとして3次元骨様組織を作製しましたが、これは顎骨を含めた骨再生への応用可能性を示すものです。また、今後は、得られた知見を基に、顔面部真皮幹細胞への誘導方法の確立、特性解明、機能評価を進めていきます。これにより肌の健康寿命に関する研究や、効果的なアンチエイジング技術の開発などにも貢献できると期待しています。

改めまして、本研究を支援して下さったコーセーコスメトロジー研究財団に心より感謝申し上げます。今後も、iPS細胞技術と肌の健康や再生医学の架け橋となるような研究成果を出せるよう、引き続き努力して参りたいと思います。(京都大学iPS細胞研究所)

2022年度 研究助成

## コスメトロジー研究助成を受けて

石谷 太

小型魚類をモデルとして利用することでヒトの健康や幸福につながる研究を行いたい。そんな思いを持って私は研究を行っている。小型魚類モデルは、in vivoイメージングやサンプル数確保の優位さに加え、成長・再生・老化の速さなど、その種としての多様性を活用することで、他の実験生物では到達困難な「未知の生命科学への挑戦」を可能にする。事実、欧米では、動物愛護の考え方からマウスなどの哺乳類モデルを使った研究が徐々に困難になってきていることもあり、小型魚類を利用したヒト疾患研究や創薬研究がさかんに行われつつある。しかし、日本では、このアイデアを語るたびに、医学研究者には魚でヒトのことが

わかるはずがないと言われ、基礎生命科学研究者には医学寄りだと言われ、なかなか受け入れてもらえない状況が続いている。しかし、コスメトロジー研究助成に採択していただいたことで、研究が大きく進み、2024年は重要な論文を複数発表でき、その結果、新たな大型予算(AMED-CREST)を獲得することができた。このように私の研究を大きく発展させるきっかけをくださったコーセーコスメトロジー研究財団および目利きの審査員の先生方に改めて深く感謝したい。今後も本研究を継続的に発展させて「魚を使ってヒトの皮膚老化予防の技術シーズを創出する」ことで「魚モデルの皮膚疾患・老化研究、化粧品開発研究にお

ける有効性」をアピールし、皆様の考え方を少しずつ変えていきたい。これにより、コスメトロジーの発展、ひいて

は日本の科学の発展にも寄与できれば、と考えている。  
(大阪大学微生物病研究所)

2022 年度 研究助成

## コスメトロジー研究助成を受けて

伊藤 晃成

このたびは、公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団より研究助成を賜り、心より御礼申し上げます。特に印象的だったのは、コロナ禍がようやく落ち着き始めたとはいえ、まだ社会全体には自粛ムードが色濃く残っていた中、対面での授賞式を開催していただいたことです。感染対策にご配慮の上、研究者同士が直接顔を合わせる機会を設けてくださった英断に、深い敬意と感謝の意を表します。懇親会では、たまたま席を共にした他分野の研究者と交流することができ、その出会いがきっかけとなって、現在では共同研究へと発展しています。このような偶然の出会いには、対面の場合ならではの価値であり、研究の幅を広げる大きな契機となりました。また、本助成では経費の使用に一定の自由度をいただけたことも大変ありがたく、現場の実情に即した形で研究を円滑に進めることができました。こうした柔軟な支援体制は、特に若手研究者にとっても大

きな励みになると感じております。私は主に医薬品の安全性に関する研究を行っておりますが、本助成を機に化粧品原料の安全性という新たな領域に触れることができました。医薬品分野で培った知見を応用するだけでなく、化粧品分野特有の課題や視点を学ぶ貴重な機会となり、自身の研究領域を広げることにもつながっています。

今後は、化粧品と医薬品の境界領域にも関心を広げながら、学際的な研究の展開を目指してまいります。分野横断的なこうした研究支援は、異分野交流を促進し、イノベーションの土壌を育む上でも非常に重要な取り組みだと感じております。今後も、動物実験代替法の発展にも資するような研究を展開し、財団のご支援に少しでも恩返しができるよう努めてまいります。このたびは誠にありがとうございました。  
(千葉大学大学院薬学研究院)

2022 年度 研究助成

## コスメトロジー研究助成を受けて

上山 健彦

この度は、2022年度コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成に採択頂き、本当にありがとうございました。財団関係者の皆様方、審査頂きました審査員の先生方へ心より御礼申し上げます。

私は、研究室を2021年1月より立ち上げましたが、その当時、人手も資金も足らず喘いでいましたので、本当に助かりました。研究費は、研究補佐員の雇用費や研究試薬の購入に使用させて頂きました。パレスホテル東京での助成金贈呈式後、街灯に照らされた歩道を東京駅に向かって歩いて行った時の光景と意気揚々とした気持ちは、今でも脳裏にしっかり刻まれております。あの時の贈呈式は、細部にまで気が配られ、非常に手厚くもてなして頂いたのですが、凄くフランクな感じで、会話も進み、知り合った先生と共同研究を始めることもできました。人およびお金を

つないでもらった懇親の場でありました。

研究の面では、助成によって、メラニン産生の律速酵素であるチロシナーゼに可逆的脂質修飾であるパルミトイル化により発現量調節がなされること及びその機序を明らかにできました。現状、薬剤開発のステップまでは進められていませんが、メラニン産生酵素のパルミトイル化制御が、メラニン産生制御の有用な手段の一つであることは自信が持てました。今後もこの研究を成長させて、今回の助成に対するご恩返し、更には、社会貢献を見据えて精進していきたいと考えております。

最後になりましたが、コーセーコスメトロジー研究財団のますますのご発展をお祈り申し上げます。本当にありがとうございました。

(神戸大学バイオシグナル総合研究センター・分子薬理研究分野)

## コスメトロジー研究助成を受けて

神戸 大朋

この度はコスメトロジー研究助成にご採択いただき、誠にありがとうございました。私の専門は微量金属代謝研究で、特に、亜鉛輸送体や亜鉛酵素の活性化といった亜鉛に関する研究を実施しています。亜鉛の研究を進める中で、長年銅酵素だと信じられてきたチロシナーゼ関連タンパク質 1 (TYRP1) が亜鉛酵素であることを発見し、現在は、チロシナーゼファミリー分子の金属による活性化の機序解明に注力しています。亜鉛や銅といった微量金属がどのように相同性の高い酵素に区別されて結合するのか、その理解は学術的に非常に重要な研究だと認識しています。また、このように書くと、完全な基礎研究のように見えますが、TYR 活性化の機序の解明は、美白化粧品の開発など美容分野への応用にもつながるため、社会的にも発展性のある研究だといえます。

TYR の研究を始めて、動物の体色に関する論文を目にすることが増えました。例えば、アメリカグマには、黒色

だけでなく黄色がかった茶色やシナモン色の個体が存在しており、この毛色の違いは、TYRP1 の 1 アミノ酸の置換によって起こっていることがわかっています。童話やアニメで人気の「くまのプーさん」はみなさんご存知の通り黄色ですが、そのモデルで、実在した Winnie という名のアメリカグマ (American Black Bear) の体色は黒色だったそうです。プーさんの色は、作者が子どもたちから親近感を持ってもらうために選んだのかもしれませんが、生物学的にはプーさんは TYRP1 の変異を持っていたということになります。様々な視点から幅広く捉えることで、学生に研究の面白さをも感じてもらい、共に研究に邁進することを通して、今後もコスメトロジーの分野に貢献していきたいと考えています。

興味深い研究を実施するきっかけを与えてくださったコーセーコスメトロジー研究財団に改めて感謝申し上げます。  
(京都大学大学院生命科学研究所)

## コスメトロジー研究助成を受けて

佐田 亜衣子

この度は、公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団の研究助成に採択いただき、誠にありがとうございました。財団関係者の皆様、選考委員の先生方に心より感謝申し上げます。

今回の研究助成をいただいたテーマは、今から 9 年ほど前に筑波大学の助教として、糖鎖工学を専門とする館野浩章 (産業技術総合研究所) との共同研究により開始したプロジェクトになります。当初は、組織幹細胞を用いた糖鎖解析に関する先行研究なども少なく、手探り状態で研究を進めてきました。2020 年には、表皮幹細胞が加齢に伴ってダイナミックに糖鎖修飾パターンを変化させるという内容で論文発表をしましたが、その機能的な意義については不明なままであります。

私自身は、熊本大学、九州大学と所属を異動した時期でもあり、チャレンジングな状況が続いておりましたが、貴

財団のご支援により研究を発展させることができました。特に、糖鎖改変マウスの作製が成功し面白い表現型を見つけたこと、さらに糖鎖修飾を受ける可能性のあるコアタンパク質候補を見つげられたことは、大変嬉しい成果となりました。今後、プロジェクトの論文化に向けて一層努力してまいります。

糖鎖は、扱いの難しい側面もあるものの、創薬やコスメトロジーの観点から、非常に大きいポテンシャルを持つ生体分子であると考えております。基礎的なデータを積み上げながら、将来的な応用も見据え、研究を発展させていきたいと思っております。

最後に、本研究を支えてくださった貴財団のご支援に感謝申し上げますとともに、貴財団のますますのご発展を祈念いたします。  
(九州大学生体防御医学研究所)

2022 年度 研究助成

## コスメトロジーと皮膚科学の相互関係

大日 輝記

このたびは研究助成をいただきありがとうございました。2020年に香川大学に着任し、自身の研究室を主宰することになりました。立ち上げに際して研究室に必須の備品、またプロジェクトで思い切った解析などを行うことができました。ここに感謝申し上げます。

私が専門とする皮膚科学は、姿に症状があらわれる病気と戦うための実践科学です。姿の医学です。皮膚をわずらった姿から、健康な姿へと向かうベクトルが、皮膚科学の使命です。ベクトルのさらに延長線上にあるのが、姿の美しさだと考えます。姿の美しさのための手だてには、他者を思いやり慈しむための「身だしなみ」と、自らを伝え主張するための「よそおい」があります。病気、健康、身だしなみ、よそおいのそれぞれの間には明確な区分があるわけではなく、一連のスペクトラム上にあると考えます。

コスメティック(感覚的)はロジック(論理的)の対義語で

す。本来ならば相容れない手法です。姿に向きあうとき、自然科学的手法のみでは限界があります。人文科学的手法、美的手法を含めた集学的アプローチが、コスメトロジーという合成語に込められた概念が目指すものと考えます。

皮膚科学は、姿にあらわれる病気、健康、身だしなみのスペクトラムをつらぬくベクトルです。ここへ「よそおい」を加えたスペクトラムがコスメトロジーの射程とするならば、皮膚科学のベクトルはコスメトロジーの行方を示す羅針盤の役割を果たしう一方、コスメトロジーは皮膚科学に未来を提案し、皮膚科学をリードできる位置にあります。

皮膚科学とコスメトロジーは、互いを必要とする、最も親和性の高い関係にあります。一方でその関係は、ただちに何かを生み出す即物的な関係にとどまるものではありません。飽くなき相互交流により、新たな集合知の創出を目指せると期待します。(香川大学医学部皮膚科学)

2022 年度 研究助成

## コスメトロジー研究助成を受けて

豊島 文子

このたびは、2022年度コスメトロジー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。財団の皆様、選考委員の先生方に厚く御礼申し上げます。研究室の移動時期に貴重なサポートをいただきましたお陰で、途切れなく研究を推進することができました。

私たちは、ライフステージの進行に伴う生理的な皮膚リモデリング機構について研究を進めています。本助成研究では、妊娠に伴う母体腹部の皮膚伸展機構の解明に取り組みました。私たちはこれまでに、妊娠期の腹部皮膚の伸展時に、高い増殖性を持つTbx3陽性細胞が表皮基底層に出現することを見出しました。このTbx3陽性表皮細胞は、体表血管の発達に依存して出現し、出産後には体表血管が退縮すると共に分化して表皮から排出されるように運命決定された細胞でした。また、Tbx3陽性表皮細胞は、妊娠期のみならず、張力負荷によっても体表血管依存的に出現

し、また、定常状態で体表血管が多く表皮の厚い足底部皮膚ではTbx3陽性表皮細胞が恒常的に存在することを見出しました。従って、体表血管に依存して表皮細胞の増殖を促進する一般原則が存在すると予想されます。一方、張力負荷や過剰な体表血管の発達は、皮膚の炎症を誘導しますが、妊娠期には皮膚炎症は認められません。従って、妊娠期には炎症を伴わない皮膚の伸展機構が存在すると考えられます。今回ご支援をいただいた研究では、妊娠期に特徴的な、炎症を伴わない生理的な皮膚伸展機構の解明に取り組みました。その結果、真皮の細胞外マトリックスリモデリングによる組織剛性の調整が鍵となることが分かりました。この機構を明らかにすることにより、体表血管と真皮細胞外マトリックスを標的とした、コスメトロジー研究開発につなげたいと考えています。

(東京科学大学総合研究院難治疾患研究所)

## コスメトロジー研究助成を受けて

中村 由和

この度は、コスメトロジー研究助成を賜り、心より感謝申し上げます。これまで何度か貴財団に申請させていただきましたが、なかなか採択に至らず、悔しい思いをしたこともあり、今回の採択通知を受けた際の喜びは今でも鮮明に覚えております。これもひとえに、財団関係者の皆様方や審査員の先生方のご高配のおかげであり、深く感謝申し上げます。私は、イノシトールリン脂質とその代謝酵素による細胞内シグナル伝達に興味を持ち、その生理的役割についての解明を目指して研究を進めてまいりました。特に、イノシトールリン脂質代謝酵素の遺伝子改変マウスを利用した研究を通じて、これらの酵素が関与するシグナル経路が多様な加齢性疾患と関連することがわかり、老化研究へ関心を持つようになりました。皮膚はその特性から、外的

な環境因子に常に影響され、老化現象が顕著に現れるため、老化研究の重要なターゲットとして位置づけられます。また、皮膚の老化は美容や健康の分野においても高い関心を集めており、その理解は皮膚老化の治療法や予防策の開発に貢献する可能性を秘めているため社会に対する貢献も大きいと考えています。今回の助成を受けて始めた研究は、まだ初期段階ではありますが、重要な第一歩を踏み出すことができたと感じております。今後も、皮膚老化のメカニズム解明に向けてさらなる努力を重ねていきたいと考えています。最後に、貴財団の温かい支援に対し、心より感謝申し上げますとともに、今後ますますのご発展をお祈り申し上げます。  
(東京理科大学創域理工学部)

## コスメトロジー研究助成を受けて

西山 功一

この度は、コーセーコスメトロジー研究財団のコスメトロジー研究助成に採択いただき、誠に有難うございました。本研究助成を得て私どもの研究を進展させることができたこと、この場をお借りしてあらためて厚く御礼を申し上げます。

現在、我が国は超高齢化社会に突入しています。いかに、加齢性変化や老化、そして加齢性疾患に策を講じていくのか、現代社会において解決すべき喫緊の課題の一つです。皮膚は、加齢に伴い、表皮菲薄化、真皮のコラーゲン・弾性線維の減少によるシワやたるみなど、生理的老化に至ります。また、頭皮の薄毛や脱毛も、生理的な加齢変化によって生じます。毛髪を含む皮膚組織は、若々しさなどの“見た目”を決める重要な役割を担っており、コスメトロジーを考える上でも、皮膚の老化機構の理解は極めて重要な課題です。一方、体中に張り巡らされた微小血管は、ガス交換、栄養運搬、老廃物除去など、組織機能維持に重要です。加齢した皮膚では、血管密度の低下や血管形態異常など、微小血管網維持の変容が見られることが以前より報告され

ています。また、薄毛や脱毛は、皮膚の微小循環異常に起因する可能性が指摘されてきました。しかし、加齢で生じる微小血管網の変容が微小循環不全を来し、皮膚の生理的老化、そして、加齢性疾患に関与するか、その科学的根拠はあまり理解されていなのが現状です。私どもは、血管研究のスペシャリストとして、本研究での新たなマウスモデルの樹立を通して、加齢に伴う微小血管機能異常、特に血管密度の低下と皮膚老化との因果関係の証明に挑みました。また、加齢に伴い微小血管機能異常と皮膚老化に至る分子メカニズムの同定を目指しました。残念ながら、本研究助成期間において、最終目標に到達することは叶いませんでした。しかし、今後も引き続き同研究を進展させていくことを通して、革新的な皮膚老化の予防や改善、そして加齢性疾患の治療法開発に資する科学的基盤を提供し、人々の健康と美容の増進に貢献する所存です。また、機会が許せば、今後もさらなるご支援をいただけますと幸いです。

(宮崎大学医学部血管動態生化学分野)

2022年度 研究助成

## コスメトロジー研究助成を受けて

平林 哲也

この度は大変貴重なご助成を賜りまして、誠に有り難うございました。私は脂質代謝酵素の機能や活性制御を研究対象とする脂質生化学を専門としておりますが、本研究助成によるご支援を契機に皮膚免疫領域で新たな挑戦を開始することができ、これまでの皮膚バリア機能主体の研究を展開させてゆく上で大きな転機となりました。ご存知のように、皮膚のバリア機能のおかげで我々は動物として陸上で自由に活動できると同時に、健康的でキメの細かい肌はヒトの外見的魅力に繋がるわけですが、この極めて複雑かつ巧妙な仕組みで成り立つ皮膚バリアの神秘に魅了され、私はこれまでアシルセラミド代謝経路に関わる酵素群の同定と透過性バリア形成の分子機構の解明に取り組んできました。本研究助成への申請のきっかけは、これまで明らかにしてきたアシルセラミド代謝経路に関わる酵素群が欠損する先天性魚鱗癬モデルマウスを比較する中で、バリア機能が同様に障害されるのにも関わらず、炎症応答が生じる

系統と生じない系統があるという気付きでした。そこから免疫系がアシルセラミド代謝異常によって生じる特定の代謝産物や現象を検知する仕組みが皮膚に備わっているのではないかという着想に至りました。炎症応答を示す系統において実際どのような免疫細胞集団が変化しているかを調べてみると、ランゲルハンス細胞の増殖と活性化が深く関わるのが分かってきました。興味深いことに、免疫系が脂質代謝異常そのものを検知するだけでなく、ケラチノサイトのストレス応答も炎症促進に重要な役割を果たしているようです。今後は皮膚の脂質代謝異常と炎症のクロストークに関わる詳細な分子機序を解明し、コスメトロジー領域に貢献できるように精進していく所存です。萌芽的な本研究助成申請を採択して頂きました選考委員の先生方、ご支援を頂きました財団関係者の皆様に改めて深く感謝申し上げますとともに、貴財団の益々のご発展を祈念申し上げます。（東京都医学総合研究所）

2023年度 研究助成

## コスメトロジー研究助成を受けて

松本 信圭

化粧品と言えば顔や手に塗ったりよい香りがしたりするものと考えていた私にとって、貴財団の研究助成の募集を見かけた当初は「皮膚を研究しているわけでもなければ、おおいの専門家でもないし…」と考えていたことを思い出します。ただ、皮膚の専門家ではないものの、皮膚を介した体性感覚については当時少し自身の研究成果がまともつつあったので、皮膚に塗る保湿剤と神経活動の関連を調べてみたいと思い、半ばダメ元で応募しました。幸運なことに貴財団に採択され、研究を進めてみると、実験系の構築から動物の歩き方の解析まで大変なことが続き（それもまた研究の醍醐味ですが）、申請書で元々予定していた研究の目標の寸前で研究期間が終わってしまいました。助成期間が終わったら研究が終わり、というわけではないので、今後は、現状までに得られたデータを解析し、なるべく早

く世に出していきたいと考えています。

コスメトロジーとは化粧品を対象とするあらゆる学問だと私は理解していますが、改めて過去の研究報告集を拝読するにつけ、様々な分野とつながる奥深い学問だと実感しています。私はこれまで神経科学の中でも生理学や薬理学を中心に研究を進めてきましたが、「化粧品」を通して様々な学問分野と接点を持てたら嬉しいですし、今回の経験を生かして自分の研究の幅が広がられたら良いなと考えています。

本研究に多大なるご支援を賜りました、コーセーコスメトロジー研究財団に深く御礼を申し上げますとともに、貴財団のますますのご発展を心より祈念しております。ありがとうございました。（東京大学大学院薬学系研究科）

## 顔の骨格が作り出す顔の美学

泉 喜和子

この度は貴重なご助成をいただき、有難うございました。この機会のおかげで、違う方向から自分の研究を観察する意識に目覚めたように思います。

大学の医局に入局以来、顔面骨形成術(顎矯正手術)を専門としており、私の研究は執刀する術後顔貌を事前に正確に予測したいという気持ちで始まりました。顔は骨格(顔面骨)とそれを覆う皮膚で構成されますが、顔面骨形成術で顔貌はどう変化するのか、いまだに両者の関係性を示す正確なスタンダードは存在していません。なぜなら、皮膚の性質(厚み、柔らかさ)は個々によって異なり、計測し評価するには多くの難題があるからです。その一例として、本研究でも、頬(チークライン)の変化の違いに性差がある結果となり、女性の持つ皮膚の柔らかさから、骨格変化に左右されず放射状に膨らむのに対し、男性は骨格の変化に似たチークラインの膨らみを示しました。体幹の場合、体の美しさは筋肉を鍛え上げ、皮膚を潤すことで解決され、骨の形態に触れることはみられません。顔の美しさは、表情筋の訓練、皮膚の潤いのみならず、化粧による色彩、明暗が重要視され、それは顔貌の土台となる骨格

(顔の形)を考慮する必要があることを示しています。研究では、表情ジワを用いた新たな顔貌定量法を完成させ、手術による骨格変化に対する顔貌の変化量から顔貌解析アルゴリズムを完成させることを目的としています。そして将来は、個人が理想とする顔貌の骨格を予測(ビジュアル化)することを目指しています。また、“見た目重視”の傾向が無視できない今日では、顔は社会コミュニケーションの重要なツールとなっています。いつの時代も化粧する意義は大きく、最近では性別に関係なく化粧をする時代となりました。本研究により、骨格から顔貌をみる、逆に顔貌から骨格をみる、両方向のビジュアル化が可能となれば、スマホで顔写真を撮影することで、自分の顔面骨格や皮膚層の形態を表示し、定量するプログラムの作成が期待でき、自分顔に対する認知が促されるものと予想されます。これは、顔の形態を研究している医・歯学、化粧学、顔学の分野のみならず、社会学、心理学など多くの分野に貢献できると考えています。

(福岡医療短期大学・福岡歯科大学医科歯科総合病院)

## コスメトロジー研究助成を受けて

和泉 慎太郎

このたびはコスメトロジー研究助成にご採択いただき、誠にありがとうございました。私は電気電子・情報系を専門としており、主に計測技術とその生体医工学への応用に関する研究に取り組んでおります。化粧品関連分野についてはこれまで知見がなく、本研究は未知の領域への挑戦となりましたが、本助成に採択いただいたことにより、新たな研究テーマとして円滑にプロジェクトを立ち上げることができました。また、これを契機として、それまで接点のなかった化粧品分野の研究者・技術者の方々との交流が生まれ、大変貴重な経験を得ることができました。

本研究では、加速度・ジャイロセンサ、信号処理、および機械学習を組み合わせることで、化粧品の塗布動作を定量的に評価可能な計測システムの実現を目指しました。化粧用のパフやブラシ、指先などに装着可能な超小型の計測

デバイスを開発し、塗布動作を可視化できることを実験により確認いたしました。

これらの研究成果は、化粧品、触覚、計測技術の各分野に関連する複数の国内外の学会において発表する機会を得ることができました。また、助成期間の終盤には、計測技術分野で著名な英文論文誌に論文が採択されるなど、多くの成果につながりました。これらの発表を通じて、多くの研究者・技術者の方々から貴重なご意見・ご助言を頂戴し、当初は想定していなかった新たな触覚センシング技術のアイデアへと発展させることもできました。

現在は、新たに提案したセンサーデバイスの実用化を目指し、高精度化・高性能化に関する技術開発を進めているところです。キャリアレーションなどの課題は依然として残っておりますが、今後さまざまな応用への展開が期待で

きると考えております。

最後になりますが、本研究をご支援くださった貴財団の関係者の皆様に、心より御礼申し上げますとともに、貴財

団のますますのご発展をお祈り申し上げます。

(神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科)

2023年度 研究助成

## コスメトロジー研究助成を受けて 北村 尊義

このたびは、コスメトロジー研究助成を賜り、心より御礼申し上げます。本研究では、仮想空間に提示される自己アバターの視覚的観察が、肌の潤いや血行感といった生理的・心理的側面に与える影響を明らかにし、スキンケア支援に資する新たなインタラクション手法の可能性を探りました。貴助成により、複数の国内研究会・国際会議での発表機会を得ることができ、分野横断的な専門家との活発な議論を通じて、本研究の理論的基盤をより深く捉え直すことができました。中でも、認知科学・心理学の研究者との対話を通じて、「アバター提示による反応の変化は、古典的・オペラント条件づけの文脈で再解釈できるのではないか」との指摘を受け、ユーザーが繰り返しアバターを通してポジティブな身体感覚を得ることが、スキンケアに対する自発的動機の形成・維持に影響している可能性を新たに認識するに至りました。また、これらの議論を重ねる中で、当

初の研究テーマに潜在していた矛盾点や表現上の曖昧さにも気づき、仮説や実験系の再検討を行うことで、より基礎的かつ再現性のある研究へと発展させる足がかりを得ることができました。さらに、条件づけ理論に基づく継続的介入の在り方や、主観的な快・不快の形成過程と身体反応の一致・不一致に関する新たな課題も浮上し、今後の応用研究や臨床的展開への道筋が見えてきたことも本助成の大きな成果といえます。本研究は、美容と感性情報処理、認知科学の接点を見出す試みでもあり、今後の展開として、自己効力感や身体意識の変容に関する認知的側面の深掘りも視野に入れています。改めて、貴財団による厚いご支援に心より感謝申し上げますとともに、この研究が今後のコスメトロジー研究の一助となることを願っております。

(香川大学)

2023年度 研究助成

## コスメトロジー研究助成を受けて 和田 雅子

この度は、「Ⅲ. 精神、文化に関する分野」におきまして、貴財団から貴重なコスメトロジー研究助成を賜り、心から感謝申し上げます。

最近、女子大学の存在価値が問われることが多くなり、女子大学に勤務する者として、歴史と伝統を重んじながら学生の皆さんに学びの魅力を伝えることの難しさを痛切に感じていたところです。

本学本学科が2018年度からプロジェクトマネジメントの学びを導入し、学生たちのプロジェクトで学内のPRをしたいというところから化粧品開発プロジェクトは始まりました。ゼロから1を生み出すこのプロジェクトで、徐々に学内の輪も広がり、同窓会の皆様からもサポートをいただきました。まさに教職協働で、藤の花からバームを

つくりあげることができました。初めての製品化にあたり、最低限の検査を行ったり、製品としての申請に経費がかかったり、製品化にむけた実験を行ったりしましたが、それも本研究資金の裏付けがあったことで、我々も前に進むことができました。この度協働研究を行った企業の七戸社長も本学園のOGであり、また学内外の関係者の思いを背負い、本学を愛してくださる思いが製品として結実したと思っております。

寄付返礼品として完成した本品は、製品としてはまだまだ先に品質を高める遠い道のりがありますが、まずはスタートラインに立てました。あらためて貴財団からの助成に対し御礼申し上げます。

(藤女子大学ウェルビーイング学部地域創生学科)



**國際交流助成**

**學術集會支援助成**



## 国際交流報告

杉山 夏緒里

今回私は、貴財団より国際交流助成をいただき、2024年7月10日から13日にドイツ・ハンブルクで開催された国際学会International Society for Stem Cell Research 2024 (ISSCR2024)に参加した。ISSCRは、幹細胞領域では世界最大の学会であり、1年に1度開催される国際学会である。

本学会では、Identification of Label-free Biomarkers in Human Skin Stem Cellsのポスター発表を行った。ヒト皮膚では、表皮と真皮の境界面上に上皮脚や真皮乳頭と呼ばれる凹凸構造が存在し、表皮と真皮の結合を支えている。この凹凸構造は、表皮幹細胞の局在との関係や、加齢による形状変化が報告され、皮膚組織において非常に重要である。協力者の佐田らは、マウス表皮で分裂頻度の異なる2種類の幹細胞の凹凸構造での局在を解明した (Sada et al., *Nat Cell Biol*, 2016)。ヒトでも凹凸構造に基づいた細胞の遺伝子集団の報告はあるが (Ghuwalewala et al., *EMBO J*, 2022)、空間情報を保持したまま表皮幹細胞集団とその周囲を同時に研究した報告はない。

ラマン分光法とは、分子に光を照射した時に得られる散

乱光を用いて、ラベルフリーで生体成分の分子構造情報をシングルセルレベルで細胞内外同時に取得できる手法である。申請者らは、ラマンイメージングと多変量スペクトル分解を用いて、マウスとヒトの胸部大動脈瘤に特異的なマーカースペクトル成分を細胞外マトリクスであるコラーゲン成分中から同定した (Sugiyama et al., *Cell Rep Med*, 2021)。本研究は、ヒト皮膚の凹凸構造に着目した表皮幹細胞集団のラベルフリーラマンイメージングを行った。得られたスペクトルの多変量解析を行うことで、凹部と凸部で局在の異なる表皮幹細胞集団に見られる違いを同定した。今回の結果をもとに新たな幹細胞の指標を反映した皮膚モデル等が生成できれば、将来的には生体の皮膚構造を反映した新たなin vitro系の構築に貢献できる。

今回のISSCRは私にとって初めてであったが、多岐にわたる幹細胞の情報収集と参加者と自分自身の研究発表のディスカッションができて、非常に有意義であった。ご支援いただいた、コーセーコスメトロジー研究財団に厚く御礼申し上げます。(早稲田大学ナノ・ライフ創新研究機構)

## 日本ビタミン学会第76回大会報告

内藤 裕二

日本ビタミン学会第76回大会は、『何でも呑み込むビタミン・バイオフィクター学』のテーマのもと、2024年6月8日～9日の2日間、AOSSA（福井駅前）にて開催致しましたので、下記ご報告申し上げます。

### 実施内容

- 1) 特別講演  
・「戦国城下町一乗谷と医学～発掘された医師の実像～」
- 2) シンポジウム  
・「機能性食品研究とビタミン・バイオフィクター学の接点」(日本フードファクター学会 共催)  
・「酸化ストレス研究とビタミン・バイオフィクター学の接点」(日本酸化ストレス学会 共催)  
・「抗加齢医学研究とビタミン・バイオフィクター学の接点 ～ビタミンD研究の臨床的知見から～」(日本抗加齢医学会 共催)
- 3) 若手依頼講演
- 4) 一般演題
- 5) 企画・技術・活動賞 授賞講演
- 6) 奨励賞受賞講演、学会賞受賞講演
- 7) ヒューマンニュートリションセッション
- 8) ランチョンセミナー
- 9) 市民公開講座「福井から発信する Well-being 宣言！」

### 参加状況

287名

### コスメトロジーとの関連性、助成を受けた所感

日本ビタミン学会は、1949年5月に設立され、世界に

類のないビタミン学に特化した学会として発展してまいりました。13種あるビタミンの活性誘導体の発見、合成や医学への応用、生化学的・分子生物学的手法による作用機序の解明など、我が国が誇るビタミン領域での研究進展に大きく貢献して、今日に至っております。さらに、ビタミン類似の作用を持つ生理活性物質についてもバイオフィクターとして本学会で取り扱う領域にしています。コスメトロジーにおけるビタミン・バイオフィクターの接点については数多くの研究やその成果に基づいた社会実装が達成されていますが、ビタミンE、ビタミンA、ビタミンC、ユビキノンなどやこれらの誘導体が皮膚環境を最善に保つために重要なものとなっております。特に、皮膚を健やかに保つ化粧品の中にはビタミンCやその誘導体、ビタミンEなどが主要な成分として配合されている点は、よく知られているビタミン・バイオフィクターの接点としてあげられます。

今回の日本ビタミン学会第76回大会では、特別講演や一般講演、日本フードファクター学会、日本酸化ストレス学会、日本抗加齢医学会との共催シンポジウムを行い、ビタミン・バイオフィクター学とコスメトロジーとの接点を含めた幅広い研究成果を議論いたしました。今後も、本学会はコスメトロジーの発展にさらなる貢献をもたらすことができるよう、学術大会の場にて裾野の広い議論が出来るように努めて参る所存です。

(京都府立医科大学 学生体免疫栄養学講座)

# 日本家族看護学会第31回学術集会報告

井上 玲子

**会の名称：**日本家族看護学会第31回学術集会

**開催地・開催場所：**鎌倉芸術館(神奈川県鎌倉市)

**開催期間：**2024年9月14日(土)～15日(日)

**参加人数：**1,145名(会場参加940名+オンデマンド配信参加205名)

## 学術集会の実施内容、参加状況等：

日本家族看護学会第31回学術集会は2024年9月14日(土)～15日(日)の2日間にわたって、鎌倉芸術館で開催されました。

テーマは「いま、語り合おう！臨床家の実践知、研究者の探究知、そして家族の体験知～ダイナミックな融合をめざして～」とし、昨今の多様化した家族を認め、家族と専門職が共に互いを知り、協働して新たな医療・看護をめざすという意味を込めました。

初日14日(土)は、日本文化に沿う家族看護実践を探求するため、米国の地域医療を牽引するファミリーナーススペシャリストと日本の専門看護師らとの議論の場を設け、家族看護の実践知を共有するシンポジウムを用意しました。アトピー性皮膚炎の外来指導に関わる医師、栄養士、PAEやCIAなどコメディカルスタッフに関するセミナーや、産褥期から出産育児を支えるスキンケア環境に関するセミナーも用意いたしました。また、両日ともに様々なお立場から、改めて家族の原点について議論を深めるような教育講演を企画いたしました。多数の参加者にご参加いただき、活発な議論が展開されました。

2日目の15日(日)は、家族という当事者の方々为主役になれる場を準備しました。疾病、年齢、病状を問わず、あらゆる当事者家族で構成された家族会が互いに体験を語り合い、交流できる機会として日頃の活動や、ピアサポートを通じ得た体験知をご発表いただきました。

あらゆる立場の者が知恵を提案し合うことで、本学術集会が日本の家族看護学・看護実践をさらに磨きあげ、新たなステージに向かう情報交換の場となったと考えます。

医学、社会学、心理学など他分野の研究者や実践者の講

演も加え、研鑽を広げる機会となりました。また患者家族・地域住民らとの交流を通じて、健康と福祉に貢献するための実践知を養う学術集会となりました。

市民公開講座では「今、語り合おう！バトンでつながる家族と医療者とのチームワーク」と題し、2008年北京オリンピック400メートルリレーの銀メダリスト塚原直貴氏をお招きいたしました。塚原氏にはアスリートとして医療者との連携、家族間の絆についてお話しいただき、会場ではメダルをご披露いただき、市民の皆さまが身近に交流できる時間をご用意いたしました。市民公開講座を通じて、市民の皆さまにも医療者と家族の協働、それに加え未来の医療、看護について互いに理解を深めていただく良い機会になったと考えます。

本学会では、プログラム以外にも、鎌倉特産品の展示コーナーを設け、参加者の皆さまが交流できる場を設定いたしました。株式会社豊島屋、株式会社鎌倉ハム富岡商会、株式会社井上蒲鉾店、鎌倉ビール醸造株式会社、和菓子処司龍月等にご協力いただき、地元名産品を広めるとともに、参加者の皆さまの間での話題提供にも一役買ったことと考えます。

また参加者の皆さまが、茶の湯の文化に触れる機会として「呈茶会」を企画いたしました。古都鎌倉の地にて、鎌倉銘菓をいただきながら本格的な茶の湯の作法を体験いただき、プログラムのあいまに一息ついて交流する機会を提供できたのではないかと思います。

会場開催から10月31日(木)までの約1か月半、オンデマンド配信をおこないました。配信のみのセッションもあり、来場できなかった約200名および来場者約900名がオンデマンド配信でプログラムを視聴し、家族看護について学んでいただくことができました。

本学術集会を通じ、新たな知識を得、交流を深め、家族看護学の発展に寄与できたのではないかと感じております。

(東海大学大学院医学研究科看護学専攻家族看護学領域)

## 第56回日本結合組織学会学術大会を終えて

柳沢 裕美

第56回日本結合組織学会学術大会が2024年6月15日・16日につくば国際会議場にて開催された。300名を超える参加者と、米国、韓国、中国、シンガポール、英国から演者を迎え、一般演題123(口頭59題、ポスター64題)の登録をいただいた。そのうちYoung Investigator Award(YIA)応募が63題と、若い方々の熱気を感じる学術大会であった。

3つのシンポジウムと特別講演は多目的ホールで、口頭発表は第2会場で行われ、シンポジウムの大半は英語で行われた。初日のシンポジウムは「血管破綻とリモデリングにおける新たな細胞外マトリックス(ECM)の動的役割」で始まり、ランチョン特別講演では筑波大学柳沢正史先生による睡眠研究の最前線をお話いただいた。それに続くキイノートレクチャーはクリーブランドクリニックのDr. Suneel ApteによるDegradome解析を用いたマトリクス分解酵素と病態のご講演をいただいた。International Junior Investigators Forumでは韓国、英国、日本の新進気鋭の研究者から、毛包発生の分子メカニズムや概日リズムによるECMの制御など興味深い研究成果を発表いただいた。並行して第2会場では初日にYIA 5セッションがもたれ、活発な討論が行われた。夕方からのポスターセッションでは、多くの研究者でフロアーが溢れていた。

2日目のシンポジウムは学術変革領域研究(A)マルチモデルECMとの共催で、毛包発生イメージングや数理解析、

メカノバイオロジーとECMなどの新しいトピックをカバーしていただいた。マイスターレクチャーはワシントン大学のDr. Robert Mechamによる異なる血管における弾性線維の形成についての研究で、様々な角度からの研究の進め方を提示していただいた。ランチョンセミナーはカリフォルニア大学の石川善弘先生によるコラーゲンの進化学で、シンポジウム3は「コラーゲンのナノからマクロまで」をテーマにした講演がもたれた。

2024年度の日本結合組織学会大高賞の授賞式と受賞講演では、防衛医科大学の石橋勇輔先生に食道癌の増悪に関わるペリオスチンの研究についてご発表いただいた。最後のイベントであるYIA表彰式では、口頭発表とポスター発表からそれぞれ5演題の優れた研究発表が表彰された。

本大会のスローガンは、“Matrix Revival”で、2日間にわたり、新しい解析方法のデスカッションとその先に見えてくるECM研究の方向性など、様々な角度からECMを捉えることができた。皮膚科学の演題も表皮や毛包の発生から各種病態におけるECMの役割、また老化とECMの変化など、アカデミアと企業からの基礎研究者や臨床医による多くの発表をいただくことができた。本大会をご援助いただきました、コーセーコスメトロジー研究財団様に心からお礼を申し上げます。

(筑波大学生存ダイナミクス研究センター)

## 第40回日本DDS学会学術集会報告

長崎 幸夫

2024年7月9日(火)から11日(木)の3日間にわたり、茨城県つくば市のつくば国際会議場において、第40回日本DDS学会学術集会を開催いたしました。本大会には、一部オンライン参加を含め、1,077名の皆様にご参加いただき、盛況のうちに終了することができました。ご参加いただいた皆様、ご支援いただいた関係者の皆様に、心より御礼申し上げます。

初日には、バイオマテリアル・DDS研究の先駆者であり、日本の関連領域の研究者にも多大な影響を与えた米国ワシントン大学名誉教授 Allan S. Hoffman 先生のメモリアルシンポジウムを、日本バイオマテリアル学会と共同で開催いたしました。約250名の参加のもと、3件のビデオ講演と8件の講演が行われ、非常に有意義な会となりました。また、「先端研究者による教育セッション」(7セミナー)や、展示企業による「DDSのための最先端テクノロジー」(24社)のセッションも実施し、参加者の皆様から高い評価をいただきました。特に教育セッションでは、急遽座席を増設いたしましたが、それでも会場に入りきれないほどの多くの方々にご参加いただきました。

2日目・3日目は、「新たな挑戦の舞台へ」を大会テーマとして、3件の特別講演、6件のシンポジウム(31講演)、4件のワークショップ(18講演)、一般講演(101件)、ポスターセッション(92件)など、活発な議論が展開されました。今回初めて実施した英語ハイブリッドセッションでは、7件の招待講演に加え、194件に及ぶ発表が3つのハイブリッド会場で行われ、現地会場でも多くの参加者が熱心に議

論を交わす姿が印象的でした。次世代の研究者が国際的に活躍する姿を想像させる貴重な機会となりました。

また、日本DDS学会40周年を記念し、学会企画による「40周年記念シンポジウム～日本DDS学会の過去を知って将来を考える～」を開催し、7件の講演が行われました。さらに、40周年祝賀会には350名を超える方々にご参加いただき、学会の歴史と未来について語り合う場となりました。加えて、37件の企業展示や15件のランチョンセミナーも無事開催することができました。ご支援を賜りました協賛企業の皆様に、深く感謝申し上げます。

本大会では、例年の発表賞・ポスター賞に加え、新たに英語発表部門において国際誌からのご支援によるジャーナル賞を設け、優れた発表者を表彰いたしました。ご協力いただきました出版社の皆様にも、心より御礼申し上げます。謝辞

本学術集会の開催にあたり、公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団より多大なるご支援を賜りましたこと、心より御礼申し上げます。本財団のご支援により、本大会の充実したプログラムの実現が可能となり、研究者同士の貴重な交流の場を提供することができました。この場をお借りして、改めて深く感謝申し上げます。今後も、DDS研究のさらなる発展と国際的な交流の推進に貢献できるよう、尽力してまいります。引き続き、皆様のご支援・ご協力を賜りますようお願い申し上げます。

(筑波大学数理物質系)

## 第2回日本台湾国際生合成シンポジウム報告

阿部 郁朗

第2回日本台湾国際生合成シンポジウムが2024年11月14日、15日、東京大学山上会館本館（東京）にて開催された。本会議は、コスメトロジー成分を含む天然物生合成に関するあらゆるサイエンスの最新の研究成果について討論する国内最大級の会議である。今回は、2023年に引き続き、2回目の開催となった。

本会は、微生物、植物、海洋動物由来の新規天然薬用化合物の単離、構造決定、生理、生物活性評価、生合成経路解析、生合成エンジニアリング研究の討論によって、コスメトロジー成分の生合成分野の発展に大きく貢献する。

今回、招聘した、台湾Genomics Research Center, Academia Sinica, Taiwan, Tsung-Lin Li教授、アメリカNorth Carolina State 大学 Wei-chen Chang教授を含む13名の海外研究者、12名の国外研究者により、コスメトロジー成分に関する生合成、酵素化学、酵素工学、合成生物学の最先端の研究成果に関する講演が行われた。

Nature 姉妹誌を含む、インパクトの大きい植物化学関

連の原著論文を数多く発表している、Tsung-Lin Li教授の講演を中心に、本分野で活躍する多くの研究者の知的交流が行われ、アルカロイド、テルペノイド、ポリケタイド、多糖、レクチンといったコスメトロジーの材料となる化合物の生合成酵素、合成生物学に関する生合成分野のさらなる発展につながる基盤が築かれた。本基盤を元に、国境を越えた研究グループ間の人的交流や共同研究がいくつか生まれ、コスメトロジーに関する学術分野が大いに発展することが考えられる。

また、海外講演者に国内の植物化学関連の研究を行っている研究室を訪問していただき、教員、ポスドク、学生とのディスカッションを行なっていただき、大いにコスメトロジー、植物化学研究の裾野が広がった。

以上より、本助成金による海外研究者招聘は非常に有意義なものであり、コーセーコスメトロジー研究財団に厚く御礼申し上げます。（東京大学大学院薬学系研究科）

## 第88回日本生化学会中部支部例会シンポジウムを終えて 五十里 彰

この度、公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団より、2024年度学術集会支援助成をいただき、第88回日本生化学会中部支部例会・シンポジウムを岐阜薬科大学本部キャンパスにて、2024年5月25日(土)に開催しました。

新型コロナウイルス感染症の状況は落ち着きをみせ、社会は以前の姿を取り戻しつつあります。しかし、新型コロナウイルスが完全に消え去ったわけではなく、人類はこれからも共存していくことになります。今後の未曾有の事態に対応するには、我々研究者が分野を超えて課題に向き合い、解決策を導き出す必要があります。このような背景をもとに、本シンポジウムのメインテーマは、「異分野融合による生化学の新展開 ～共存と排他～」としました。キーワードとなる「共存と排他」はウイルス感染症だけでなく、体内でも常に起こっている現象になります。外部環境と接する皮膚や粘膜は複数の要素からなる多面的なバリアを構築しています。皮膚常在菌の一部にはバリア機能の増強作用があり、肌機能の維持における「微生物共存」の有用性が分子レベルで明らかになってきています。また、美肌の大敵である紫外線はシミやソバカスを増加させるだけでなく、皮膚がんの原因にもなります。近年、「細胞競合」という現象により非免疫系正常細胞によってがん細胞が排除されることが明らかになってきました。「共存と排他」は複雑なメカニズムによって調節されており、生理機能の維持と病態の予防・

改善において、その理解を深めることが重要であります。

本シンポジウムでは、「共存と排他」に関する知見を深めるため、国内のトップランナーである藤田恭之教授(京都大学)と長谷耕二教授(慶應義塾大学)の2名の先生をお迎えし、特別講演を開催しました。藤田教授には、「正常上皮細胞と変異細胞間に生じる細胞競合」という演題で、哺乳類培養細胞系やマウスモデルを用いた細胞競合現象についてご講演いただきました。また、長谷教授には、「腸内共生と疾患制御」という演題で、母体腸内細菌が胎児の発達や生後の疾患感受性に及ぼす影響についてご講演いただきました。

参加者数は約180名で、一般演題として81演題のポスター発表を行いました。全体で2時間程度の質疑応答の時間を設け、化粧品科学、医学、薬学、工学、理学、農学などを専門とする参加者が、時間をかけて議論ができるようにしました。これらの演題には、貴財団との関連の深い皮膚バリアの維持機構、経皮吸収促進剤、皮膚がんの発症メカニズムなどに関する発表があり、コスメトロジーの発展に繋がる学術集会を開催することができました。多大なるご支援をいただきました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に、重ねて心から感謝申し上げます。

(岐阜薬科大学薬学部)

## 第32回日本色素細胞学会学術大会を終えて

大沢 匡毅

2024年11月2日(土)および3日(日)に、岐阜市じゅうろくプラザにて第32回日本色素細胞学会学術大会を開催いたしました。過去3年間、新型コロナウイルス感染症の影響により、学術大会は中止またはオンライン・ハイブリッド形式での開催を余儀なくされましたが、今回は4年ぶりに通常規模での対面式開催が実現しました。

本学術大会の特徴は、基礎研究者、臨床研究者、そして美容・化粧品業界の研究者が一堂に会し、それぞれの専門領域を超えて活発に議論できる点にあります。本学術大会では「基礎と応用の架け橋」をテーマに掲げ、基礎研究、臨床応用、産業的応用の3つの分野に焦点を当てたシンポジウムを開催しました。これにより、他分野の方々との交流を深め、次世代の学際的研究分野を創出する場を提供することを目指しました。

今回の大会は、国際色も豊かでした。日本色素細胞学会の上位団体である国際色素細胞学会連合(IFPCS)から5名の理事、さらにフランスおよび韓国からそれぞれ1名、計7名の演者を国外から招待しました。加えて、日本国内からも5名の演者をお招きし、4つのシンポジウムと1つのイブニングセミナーが行われました。学術大会を通して、発表は英語で行われ、英語による活発な議論が展開されま

した。

また、コスメトロジー関連のシンポジウムでは、「Skin Pigmentation and Aging」をテーマにして、3名の招待演者が講演を行いました。このシンポジウムでは、皮膚や組織の老化の原因や、老化過程で起こる皮膚の構造変化について最新の知見が紹介されました。特に、“老化現象が間質に存在する老化途中の線維芽細胞が若返り分子の分泌を停止することによって引き起こされる”という新しい概念が提唱されました。さらに、別の演者からは、小胞体ストレスが皮膚の老化に関与しているデータが示されました。また、非侵襲的な手法を用いて老化過程の皮膚構造を観察し、コンピューターの深層学習によって、老化にともなっ皮膚真皮層の毛細血管の走行が大きく変化することが明らかにされました。これらの最先端の研究により、皮膚の老化現象に対する理解が大きく進むことが期待されます。

本大会では、多くの議論や情報交換が行われ、盛況のうちに終了しました。公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団からの多大なるご支援なくして、この成功はあり得ませんでした。心より感謝申し上げます。

(岐阜大学大学院医学系研究科)

## 第49回日本化粧品学会を終えて

小幡 誉子

日本化粧品学会は皮膚科医、薬学、基礎系の研究者と、化粧品業界の研究者が産官学一体となって化粧品や医薬部外品の有用性と安全性等について科学的に議論し、社会に貢献することを目的とした学会です。50周年という節目を目前に控え、第49回日本化粧品学会は、“皮膚から「みる」化粧品の未来予想図”をメインテーマに、2024年6月28日(金)、29日(土)の2日間、日経ホールにてハイブリッド方式で開催されました。今回の学術大会では、会頭講演、2つの特別講演、2つのシンポジウム、パネルディスカッション、一般演題32題(口頭発表20題、ポスター発表12題)と、2年に1回行われる優秀論文賞授賞式・受賞講演もあり、かなり充実した内容となりました。特別講演Ⅰの久保亮治先生(神戸大学)は皮膚に現れる模様注目し、その原因となる遺伝子変異の同定、メカニズム解明と、治療法の開発についてお話をいただきました。特別講演Ⅱの武部貴則先生(東京医科歯科大学)は、ヒトオルガノイドとデータサイエンスを融合したバイオデジタルツインによる未来の個別化医療について語られました。シンポジウムⅠでは、人を

対象とした化粧品分野の研究倫理において、法を守ることを前提に、自主的な考え方でどのように研究開発を進めるのかについて議論されました。シンポジウムⅡでは「観る」を軸に、皮膚や毛髪に関する最先端の研究をご紹介いただきました。また、国際情勢を見据えた化粧品の安全性保証に関する新たな考え方について日本化粧品工業会主催のパネルディスカッションも行われました。今大会では初の試みとして一般演題発表者を奨励すべく優秀な発表に会頭賞を授与しました。また、展示会場ではスタンプラリーの導入により、例年に比べて活発で濃密な情報交換が行われました。さらに、5年ぶりに開催された懇親会においては、各所で対面ならではの熱いディスカッションが交わされました。大会参加者数は、約520名(招待者除く)に上り、盛会裏に終了することができました。

以上の通り、貴財団のご支援を賜りコスメトロジーの発展につながる充実した有意義な学術大会を開催することができました。心より感謝申し上げます。(星薬科大学)

## 日本酸化ストレス学会関東支部会を終えて 板部 洋之

2024年11月15日に第37回日本酸化ストレス学会関東支部会を開催した。本学会は、「酸化ストレス」をキーワードとして、医療、食品、化粧品、天然物、生化学、有機化学など多方面の研究者が集まる会である。関東支部会とはいえ、東北大学から講演者をお招きし、一般演題には岐阜、京都、大阪や熊本からも参加者があり、盛会であった。

若手研究者に多く発表してもらうことも意識しており、一般演題はフラッシュトークとポスター討論を組合せた形式とした。予め4分間の口頭発表を聞いてからのポスターなので、質問者も予め関心のある演題に絞って密度の高い討論ができて、好評であった。

今回の教育講演では、東京大学大学院の内田浩二教授に「タンパク質修飾研究に魅せられて」のタイトルでご講演頂いた。内田先生は、タンパク質のカルボニル化修飾の第一人者で、その発見の経緯から、抗体を用いた検出、応用まで、広範な内容をご紹介いただいた。カルボニル化タンパク質は、非酵素的な反応で進行し、それこそ全身に見つ

かる酸化ストレスの産物であり、様々な疾患との関連性が報告されている。一般演題では「カルボニル化タンパク質の真皮線維芽細胞に与える影響」の発表があり、太陽光に暴露された真皮マトリックスタンパク質にカルボニル化修飾が蓄積することが示され、カルボニル化されたマトリックス上で培養した細胞に強い酸化ストレスが生じることが報告された。

特別招待講演では、東北大学大学院の赤池孝章教授から「超硫黄代謝シグナル研究の新展開」と題して、超硫黄分子が体内の酸化還元制御の最も重要な働きを持つというコンセプトが紹介された。あらゆる組織で超硫黄分子の還元作用が酸化ストレスのバランスを決めているならば、健康維持のためのターゲット分子として有望かもしれない。

本学術集会の開催にあたり、ご支援を賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深く感謝致します。  
(昭和大学薬学部)

# 付 録

●  
事業報告書

2024年度 表彰および助成を受けられた方々  
役 員





## 事業報告書

(自 2024 年 4 月 1 日 至 2025 年 3 月 31 日)

### 《研究助成関連》

#### [コスメトロジー研究助成]

2024	5	7	公募開始	全国 710 の大学、病院、研究機関等へ公募要領を送付し、学術雑誌 3 誌、9 学会 HP、および当財団 HP に公募要領を掲載
	7	4	公募締切	応募総数114件、各分科会ごとに選考委員による書類審査
	9	12	選考委員会第一分科会	第 1 分野の書類選考通過 10 課題の承認
	9	10	選考委員会第二分科会	第 2 分野の書類選考通過 17 課題の承認
	9	9	選考委員会第三分科会	第 3 分野の書類選考通過 5 課題の承認
	9	24	選考委員会	2024 年度コスメトロジー研究助成採択候補 32 課題の承認
	10	3	臨時理事会 (書面)	選考委員会から 2024 年度コスメトロジー研究助成候補課題の答申を受け採択者を決定
	11	28	第35回表彰・贈呈式	研究助成採択 32 課題の代表者に対し、助成金贈呈書を授与
	12	15	助成金交付	研究助成金を交付 総額 6,000 万円
2025	2	17	臨時選考委員会(書面)	2025 年度選考委員会実施計画の承認

#### [特定課題研究助成]

2024	5	7	公募開始	全国 710 の大学、病院、研究機関等へ公募要領を送付し、学術雑誌 3 誌、9 学会 HP、および当財団 HP に公募要領を掲載
	7	4	公募締切	応募総数 15 件、選考委員による書類審査
	9	24	選考委員会	2024 年度特定課題研究助成採択候補 4 課題の承認
	10	3	臨時理事会 (書面)	選考委員会からの答申を受け採択者を決定
	12	15	助成金交付	研究助成金を交付 総額 4,000 万円

#### [国際交流助成および学術集会支援助成]

2024	10	3	臨時理事会 (書面)	選考委員会で内定した国際交流助成および学術集会支援助成について採択決定
------	----	---	------------	-------------------------------------

### 《表彰事業》

#### [コーセーコスメトロジー奨励賞]

2024	3	21	趣意書発送	2018年度以降のコスメトロジー研究助成採択者167名に趣意書を発送
	8	31	受付終了	昨年度までの提出分も含めて、研究者52名から論文延べ88報の調査
	9	24	選考委員会	論文実績が優れた研究者を表彰候補者として選出
	10	3	臨時理事会 (書面)	選考委員会から提案された候補者を受賞者に決定
	11	28	第35回表彰・贈呈式	受賞者1名に対し、表彰状と副賞200万円を贈呈

### 《表彰・贈呈式》

2024	11	28	第35回表彰・贈呈式	新型コロナウイルス感染症の5類感染症移行に伴い、特段の予防対策は行わず開催
------	----	----	------------	---------------------------------------

## 《理事会関連》

2024	5	23	第一回通常理事会	2023年度事業報告および収支決算報告（含監査報告）を承認する件 任期満了に伴う選考委員の選任に関する件 任期満了に伴う理事候補者の選出に関する件 役員及び評議員の報酬並びに費用に関する規定、および選考委員会規則の一部変更に関する件
	6	24	臨時理事会（書面）	代表理事（理事長）及び業務執行理事（専務理事）の互選に関する件 事務局長の選任に関する件 常勤役員の報酬に関する件
	10	3	第二回臨時理事会（書面）	2024年度研究助成者等を承認する件 2024年度「コーセーコスメトロジー奨励賞」受賞者を承認する件
	11	28	第二回通常理事会	事務所所在地の移転に関する件 2025年度事業計画および予算案を承認する件 株主としての議決権行使について

## 《評議員会関連》

2024	6	14	定時評議員会	2024年度事業報告および収支決算報告（含監査報告）を承認する件 任期満了に伴う理事の選任に関する件 役員および評議員の報酬並びに費用に関する規程の一部変更に関する件 報告事項（第一回通常理事会、財団の活動状況）
	12	6	評議員への報告（書面）	第二回通常理事会議事等の報告

## 《その他》

### 1) 報告書発行

2024	5	1	中間報告書発行	研究業績中間報告集 第33号
	9	1	完了報告書発行	コスメトロジー研究報告 Vol. 32 (2024)

### 2) 行政届出関連

2024	6	20	内閣府	令和5年度事業報告書等の提出
	7	4	内閣府	変更の届出（理事・監事名簿、役員報酬規定変更）
2025	1	28	内閣府	変更の届出（主たる事業所の所在場所変更）
	2	25	内閣府	令和7年度事業計画書等の提出

### 3) 情報公開（当財団HP等）

2024	2	16		2024年度 事業計画等の掲載
	5	7		2024年度 コスメトロジー研究助成・特定課題研究助成公募開始
	6	26		事業報告、新役員等の掲載
	9	2		研究報告書 Vol. 32 の発行およびHPへの本文掲載
	12	1		2024年度 表彰および研究助成受賞者等の掲載
	12	2		2025年度 国際交流助成、学術集会支援助成公募開始
2025	2	25		2025年度 事業計画等の掲載

## 2024年度 表彰および助成を受けられた方々

## 1) コーセーコスメトロジー奨励賞

氏名	所属	職位	研究課題
北山雄己哉	大阪公立大学大学院工学研究科	准教授	第31回コスメトロジー研究助成受賞（2020） 天然物由来高分子を利用した新規サンスクリーンカプセルの創出

## 2) コスメトロジー研究助成（32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
赤木 友紀	東京農工大学大学院工学研究院	准教授	高分子ナノコンポジット材料のマイクロおよびマクロな物性に及ぼす混合条件の影響
岩森 巨樹	九州大学大学院農学研究院	准教授	表皮・毛包細胞系列の若返り誘導法の開発
白杵 豊展	上智大学理工学部 物質生命理工学科	教授	コラーゲン架橋アミノ酸の創製と分析
河合 里紗	奈良女子大学大学院 自然科学系化学領域	助教	環境負荷低減を目指したアミノ糖由来の新規両親媒性イオン液体の開発
興野 純	筑波大学生命環境系 地球進化科学専攻	准教授	天然ミネラルに学ぶ新たなファンデーション素材の開発
兎島 千恵	東京工業大学物質理工学院材料系	教授	PEGリボソームの免疫応答抑制のための多分岐PEG脂質の作製
高井 千加	岐阜大学工学部	准教授	時間領域核磁気共鳴（TD-NMR）を用いた中空ナノ粒子の評価
高島 克輝	近畿大学薬学部	助教	生薬由来の天然物を基盤とする安全かつ強力な育毛成分の開発研究
永 直文	芝浦工業大学工学部	教授	ナノテク化粧品を志向した多面体有機ナノ粒子の開発
村岡 雅弘	大阪工業大学工学部応用化学科	教授	外部刺激応答性超分子両親媒性物質の創製

## 第2分野：生体作用、安全性に関する分野（17名）

氏名	所属	職位	研究課題
朝比奈良太	岐阜大学高等研究院 One Medicineトランスレーショナル リサーチセンター	特任 准教授	アトピー性皮膚炎における病原性記憶T細胞の皮膚駐在メカニズムの解明
伊沢 久未	順天堂大学大学院医学研究科 アトピー疾患研究センター	特任 准教授	ケラチノサイトを起点とするヒトの皮膚炎症の新規メカニズム
井上 聡	慶應義塾大学医学部 先端医科学研究所がん免疫研究部門	専任講師	治療効果を高める皮膚resident memoryT細胞の作出
今井 啓雄	京都大学 ヒト行動進化研究センター	教授	霊長類細胞モデルを用いた色素産生制御の検討
大江 知行	東北大学大学院薬学研究科	教授	皮膚修復ペプチドによる皮膚障害性アルデヒドの補足機構解明と非侵襲的効能評価法の構築

氏名	所属	職位	研究課題
岡 泰由	名古屋大学環境医学研究所 発生遺伝分野	講師	DNA修復機構の破綻によって生じる皮膚病変の病態解明研究
岡本 安雄	川崎医科大学	教授	GPRI76を標的とした活性化皮膚線維芽細胞の正常機能回復に向けた研究
川根 公樹	京都産業大学生命科学部	准教授	上皮バリア機構を保証する、上皮細胞の終焉におけるタイトジャンクションの動態
小林 正紀	北海道大学大学院薬学研究院	教授	妊娠・授乳期を含む皮膚バリア機能を指標とした乳酸の有効性と安全性評価
柴田 彩	東京大学大学院医学系研究科 皮膚科	准教授	マイクロピノサイトーシスによる皮膚バリア機能制御機構の解明
高島 翔太	北海道大学大学院医学研究院 皮膚科学教室	助教	スプライシングによりもたらされる表皮基底膜タンパクの多様性とその意義の解明
種子島幸祐	公益財団法人 東京都医学総合研究所	主席 研究員	無機ナノ粒子と常在菌DNAによる皮膚炎症反応の分子基盤
土居 克実	九州大学大学院農学研究院 生命機能科学部門	教授	スキンケア用ファージセラピー基盤の開発
廣田 佳久	芝浦工業大学システム理工学部 生命科学科	准教授	化粧品への応用を志向した皮膚に対するビタミンK誘導体の効果
水沼 正樹	広島大学大学院 統合生命科学研究科	教授	代謝物による抗老化作用機序の解析
森下 英晃	九州大学大学院医学研究院	教授	皮膚角化細胞における細胞内破壊現象の分子基盤の解明
森田梨津子	大阪大学大学院生命機能研究科	准教授	皮膚・毛包成熟化の制御技術の開発

第3分野：精神、文化に関する分野（5名）

氏名	所属	職位	研究課題
辻村 誠一	名古屋市立大学芸術工学研究科	教授	乳幼児におけるメラノブシン細胞による脳内機能の解明:メラノブシン細胞への刺激量を考慮した新たな色彩指標の提案
津村 徳道	千葉大学大学院情報学研究院	准教授	非接触生体計測による化粧品に関する認知バイアスの計測
南 哲人	豊橋技術科学大学情報知能工学系	教授	目の大きさが表情認知に及ぼす影響 —アイメイクの心理学的効果の解明—
吉川宗一郎	順天堂大学大学院医学研究科 環境医学研究所	准教授	Well-beingがアレルギー炎症を緩和させる分子メカニズムの解明
鷺尾 絢子	九州歯科大学口腔機能学講座 口腔保存治療学分野	准教授	コスメトロジーと歯科医学の融合により新たな顔の美しさを演出する

3) 特定課題研究助成（4名）

代表研究者	所属	職位	研究課題
大庭 伸介	大阪大学大学院歯学研究科	教授	個体老化におけるBone-Skin axisの存在の検討
高山 直也	千葉大学大学院医学研究院 イノベーション再生医学	准教授	前駆細胞リプログラミング技術による皮膚老化防止への革新的アプローチ

代表研究者	所 属	職位	研究課題
中溝 聡	京都大学大学院医学研究科 先端医療基盤共同研究講座	特定 准教授	エピジェネティクスを標的とした皮膚構成細胞の老化の可逆性の研究
難波 大輔	鳥取大学医学部医学科	教授	細胞骨格を介した細胞リプログラミングによるヒト表皮幹細胞の若返り研究

## 4) 国際交流助成 (3件)

派遣者	所 属	派遣目的
内田 秀昭	帝京大学医学部皮膚科学講座	University of California, Davis、留学 (2024年4月より2年)
杉山夏緒里	早稲田大学ナノ・ライフ 創新研究機構	International Society for Stem Cell Research, Hamburg、研究発表 (2024年7月9日～14日)
松井 悠	富山大学学術研究部医学系 皮膚科学	University of Chicago、外部研究員 (2024年11月1日～2025年10月31日)

## 5) 学術集会支援助成 (9件)

実施責任者	所 属	学術集会
内藤 裕二	京都府立医科大学 生体免疫栄養学講座	日本ビタミン学会第76回大会 (2024年6月8日～9日)
井上 玲子	東海大学大学院医学研究科	日本家族看護学会第31回学術集会 (2024年9月14日～15日)
柳沢 裕美	筑波大学 生存ダイナミクス研究センター	第56回日本結合組織学会学術大会 (2024年6月15日～16日)
長崎 幸夫	筑波大学数理物質系	第40回日本DDS学会学術集会 (2024年7月9日～11日)
阿部 郁朗	東京大学大学院薬学系研究科	薬用天然物生合成国際シンポジウム (2024年11月14日～15日)
五十里 彰	岐阜薬科大学	第88回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム (2024年5月25日)
大沢 匡毅	岐阜大学大学院医学系研究科	第32回日本色素細胞学会学術大会 (2024年11月2日～3日)
小幡 誉子	星薬科大学	第49回日本化粧品学会 (2024年6月28日～29日)
板部 洋之	昭和大学薬学部	日本酸化ストレス学会関東支部第37回学術集会 (2024年11月15日)

## 役員

2025年7月現在

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	天谷 雅行	慶應義塾 常任理事・慶應義塾大学医学部 教授
理事	井上 英史	東京薬科大学 名誉教授・特命教授
理事	岩橋 楨夫	北里大学 名誉教授
理事	関根 茂	日光ケミカルズ株式会社 代表取締役名誉会長
理事	長野 哲雄	東京大学 名誉教授
理事	野口 範子	同志社大学生命医科学部 教授
理事	宮地 良樹	静岡社会健康医学大学院大学 学長・理事長、京都大学 名誉教授
監事	小林 久美	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	岡崎 勲	東日本国際大学 客員教授
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 副総長・名誉教授
評議員	仙名 保	慶應義塾大学 名誉教授
評議員	辻 勉	星薬科大学 名誉教授
評議員	中村 陽子	元 厚生省 医薬安全局安全対策課 安全対策企画官



\*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 コーセーコスメトロジー研究財団

〒104-0061 東京都中央区銀座三丁目5番12号  
サエグサビル9階

電話 03(3562)1005

コスメトロジー研究報告 Vol. 33/2025

非売品

2025年9月1日発行

編集責任者 亀山 浩一  
発行 公益財団法人 コーセーコスメトロジー研究財団  
〒104-0061 東京都中央区銀座 3-5-12  
電話 03(3562)1005  
制作 エイエム企画  
〒362-0075 埼玉県上尾市柏座 3-1-48  
電話 048(778)7943  
印刷 株式会社サンセー

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