

動的 X 線回折実験による皮膚角層の構造変化過程の解析

名古屋産業科学研究所 八田一郎

1. はじめに

皮膚の最外部にある角層は、外部からの異物の浸入を防ぎ、内部からの水分蒸散を正常に維持する役割を果たしている。洗剤で体を洗ったり、保湿剤（ヒューメクタント）を投与したりすると、その成分が角層に浸入し、角層内部の構造を変える。洗剤の成分による角層への損傷は抑えたいし、また保湿剤の成分を角層の構造に作用させ正常な水分量を長く保持するようにしたい。これらの機構の分子レベルでの解明に X 線回折実験は有力な手段である。しかし、X 線回折実験により構造変化を解析しようとする生物由来の試料では個体差の問題があり、構造変化が本質的なものなか個体差に因るものなのかを識別することが難しい。とくに、微妙な変化の場合、その検出はさらに困難になる。

生体試料に常に付きまとうこの個体差の問題は、データを解析する際の大きな課題である。多くの場合、多くのヒトや多くの部位で測定を行い、統計的な処理を行って結果を得る。いわゆる N 数を多くすることが、信頼できる結果を得るための必須条件となる。皮膚角層の X 線回折実験において、個体差の問題を後述する‘溶液セル’を用いて克服し、構造の微妙な変化を少ない試料で検出する方法を考案した。それに基づいて得た結果をここに紹介する。

皮膚角層の X 線回折実験では *in vivo* に近い状態の角層での *ex vivo* 実験が可能であり、分子レベルでの構造情報を得るために *ex vivo* 実験は欠かせない。角層（厚さ：10~20 μm ）は角層細胞と細胞間脂質から成っており、それらが構成する構造は図 1 に示すようにレンガ・モルタル・モデルで表わされている。すなわち、角層細胞はレンガ（縦：約 0.3 μm ，横：約 30 μm ）で例えられ、細胞間脂質はそれらの間を埋めるモルタル（幅：約 100 nm）で例えられている。細胞間脂質はセラミド、遊離脂肪酸、コレステロールなどの 350 を超える分子種から成っている。細胞脂質中にはそれらの分子により形成される長周期ラメラ構造（周期：13.6 nm）および短周期ラメラ構造（周期：約 6 nm）があり、その繰り返し方向と直交する面内には炭化水素鎖の充填構造である直方晶（格子定数：0.37 nm, 0.41 nm）、六方晶（格子定数：0.41 nm）がある。それらに加えて、規則構造を形成しない乱れた状態が存在する。また、角層細胞中にはソフトケラチン線維があり、角層細胞の長い辺に沿って配向している。図 2(a)に長・短周期ラメラ構造、図 2(b)炭化水素鎖の充填構造を示す。それらの構造による X 線回折像は広い波

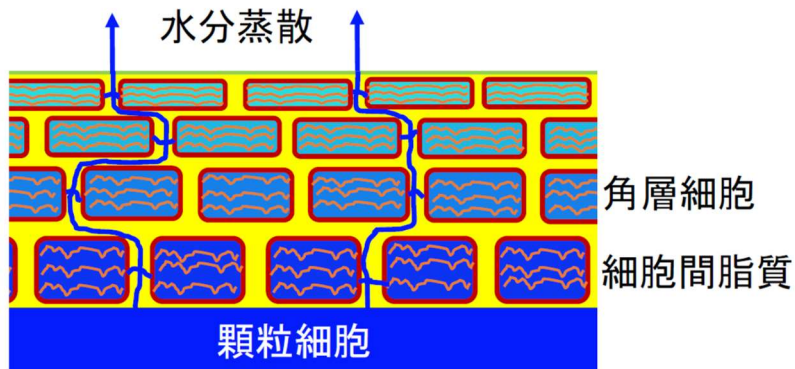


図1. 角層のレンガ（角層細胞）・モルタル（細胞間脂質）・モデル. 水が顆粒細胞（体内側）から角層に絶えず供給され、角層表面から蒸散している. すなわち、角層中では水は、細胞間脂質を透過し、かつ角層細胞に蓄えられながら定期的に移動している。（蓄積水分量は体外側へ向かうに連れて減る. したがって、角層細胞の厚さは角層表面に近づくに従い薄くなる.） [1]

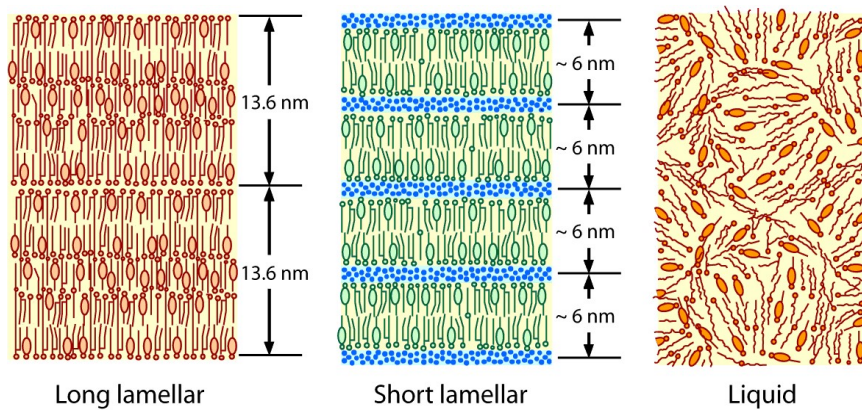


図2(a). 長周期ラメラ構造（Long lamellar）、短周期ラメラ構造（Short lamellar）、乱れた状態（Liquid）. これらの構造は多種のセラミド、多種の遊離脂肪酸、およびコレステロールなどにより形成されている. 短周期ラメラ構造には水層があり、水層（青点で示されている）はわずかではあるが膨潤する. [1]

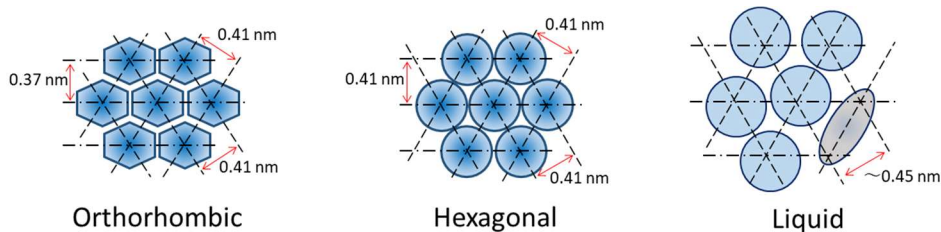


図2(b). 炭化水素の充填構造. 直方晶（Orthorhombic）、六方晶（Hexagonal）、乱れた状態（Liquid）. 乱れた状態中、コレステロール分子を灰色楕円で示す. [1]

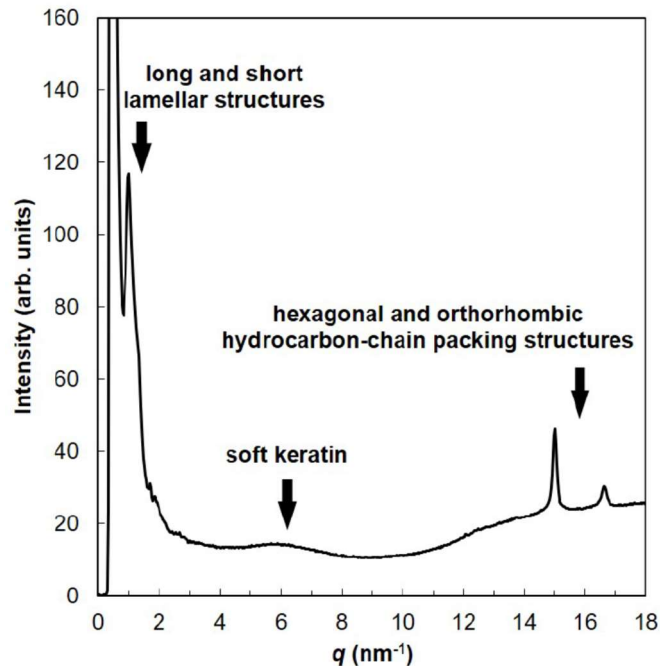


図3. ヒト皮膚角層の X 線散乱像 [2]. $q=0-0.3 \text{ nm}^{-1}$ の領域はビームストップで X 線が遮蔽され、強度は現れない。

数ベクトルに亘っている。図3にヒト角層で測定した X 線回折像の例を示す。小角領域に長・短周期ラメラ構造による回折像，広角領域に炭化水素鎖の充填構造による回折像が観測される。また，中角領域にはソフトケラチンのコイルド・コイル α ヘルックス間隔 ($\sim 1 \text{ nm}$) による幅の広いピークが観測される。

X 線回折像は角層中にある原子の電子密度分布をフーリエ変換したものに依っているため，角層中の全ての原子の電子密度分布（原子の位置）を反映している。したがって，周期性をもつ構造があれば回折ピークが観測される。図3の横軸の q は波数ベクトルと呼ばれ，散乱角 θ ，X 線の波長 λ と次の関係がある。

$$q = (4\pi/\lambda)\sin\theta \quad (\text{あるいは } S = (2/\lambda)\sin\theta) \quad (1)$$

細胞間脂質中の各成分は多くの分子種から成る複雑系であるにもかかわらず [3]，個体に依らずほぼ同じ周期の規則構造（ラメラ構造および炭化水素鎖の充填構造）が現れることは生物ならではの現象であり，これらの構造はそれぞれが機能を持っているはずである。同時に，細胞間脂質が多くの分子種から成っていることのために，試料により微妙に構造が異なっており，X 線回折像はその影響を受ける。個体差があるのは当然で洗剤や保湿剤などを作用したときの本質的な構造変化を特定することは容易ではない。

これらの問題を解決するために，‘溶液セル’を開発した [4]。この方法では，

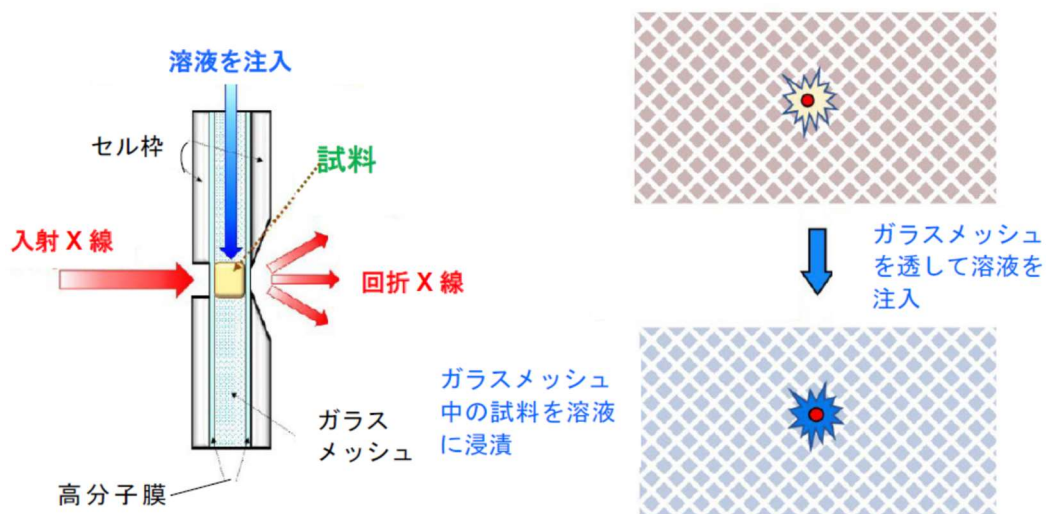


図 4. 溶液セル. 左図では溶液セルの左側から X 線を入射し、右側に回折線が出る. 溶液を注入する前から回折像を逐次検出し、注入した後の回折像を引き続き逐次検出する. このようにして溶液の注入前後の時間変化を検出できる. 右図に示すように、試料は溶液に十分に浸漬した状態で測定を行える. [2, 3]

X 線回折装置に設置した溶液セルに図 4 に示すように角層試料 3-5mg をガラスメッシュ (glass microfiber filter (grade: GMF 150), Whatman plc) に埋め込み固定した. 粒子保持能 $2.4\ \mu\text{m}$ の硼珪酸ガラス繊維から成るガラスメッシュは X 線回折像にほとんど影響を与えなく、角層試料に溶液を注入する前後で試料が動かないように固定することができる. 図 4 右に示すように、X 線ビームが当たる位置に試料を埋め込み、ガラスメッシュを介して溶液を注入する. 通常、試料量に対して周りの溶液量を十分に多い状態にすることができるので、試料を十分な溶液に浸漬した状態で時間の関数として X 線回折像の変化を測定することができる. この方法の優れている点は試料に溶液を作用するとき作用前かつ測定したい後で同じ試料で X 線回折像を追跡できることである. したがって、個体差や部位差により角層中の構造 (長・短周期ラメラ構造, ソフトケラチンの構造, 直方晶・六方晶の構造) にばらつきがあり、X 線回折強度の大小の差異があったとしても、溶液を作用したときの X 線回折像の変化を高感度で測定でき、個体差等に依らず溶液の作用によりもたらされる構造の特徴的な変化を検出できる. すなわち、変化の大きさには試料により大小があったとしても、変化が起きるかどうかは高感度で測定でき、その変化過程の詳しい解析ができる. したがって、溶液セルを用いることによって、数少ない角層試料での実験により、起こっている現象の本質に迫ることができる. 以下ではこれを用いて得た実験結果について紹介する.

2. 硫酸ドデシルナトリウム (SDS) による角層の細胞間脂質の構造の損傷

2. 1. 背景

陰イオン（アニオン）界面活性剤である SDS は泡立ちが良いこと、乳化力、可溶化力の良いことなどにより広く洗剤として用いられている。家庭用としては、皮膚の洗浄剤、シャンプー、歯磨き粉、掃除や洗濯の家庭用洗剤など、工業用としては機械の洗浄剤、例えばエンジンの油落とし、洗車用洗剤などの多く用途に使用されている。IUPAC 名であるドデシル硫酸ナトリウムはラウリル硫酸ナトリウム(SLS)と呼ばれることもある。一方、SDS を皮膚に用いたときの皮膚刺激、肌荒れ等への影響が問題になる [5]。界面活性剤を角層に作用したときの細胞間脂質の構造の損傷への影響を検討するために、典型的な界面活性剤の SDS 水溶液で角層を処理したときに起こる構造の変化過程を *ex vivo* X 線回折実験により、**図 4** の溶液セルを用いて行った。

2. 2. 実験および結果

皮膚角層試料としては水分量を 25 wt% に調製したヒト角層（乾燥質量約 4 mg）を用いた。放射光 X 線実験は SPring-8 の BL19B2 で行われ、X 線のエネルギーは 28 keV で、実験の露光時間は 30 sec、測定間隔 3 min であった。X 線回折光の検出は PILATUS-2M で行われた。同時に、SPring-8 の BL40B2 で X 線のエネルギー 15 keV、露光時間は 30 sec、測定間隔 3 min で行われた。検出器はイメージングプレートを用いて行われた。これらの実験では回折像を 129 min まで観測した。濃度 1 wt% および 10 wt% の SDS 水溶液で処理したときに細胞間脂質で起こる構造の変化過程を測定した [6, 7]。これらの実験により、SDS で角層を処理したときの処理時間および濃度の影響の検討もできた。

図 5(a, b, c) 中、pre で示す SDS 水溶液で処理する前の回折像（強度は任意単位で示す）はほぼ同じところにピークが現れている。これらはヒト角層で現れる典型的な回折像で、**図 3** で長周期ラメラ構造および短周期ラメラ構造と記した部分を横に拡大したものに相当する。 $S=0.16 \text{ nm}^{-1}$ （周期：6.3 nm）のピークは短周期ラメラ構造の 1 次反射、 $S=0.22 \text{ nm}^{-1}$ （周期：13.6 nm）のピークは長周期ラメラ構造の 3 次反射、 $S=0.29 \text{ nm}^{-1}$ の弱いのはっきりとしたピークは長周期ラメラ構造の 4 次反射によるものである。短周期ラメラ構造の 1 次反射のピークの小角側には長周期ラメラ構造の 2 次反射のピークがあるが、それは弱く短周期ラメラ構造のピークに隠れている。

図 5(c) に示すように、ヒト角層を水のみで処理したとき最初から 129 min まで、短周期ラメラ構造の $S=0.16 \text{ nm}^{-1}$ の 1 次ピークおよび長周期ラメラ構造の $S=0.22 \text{ nm}^{-1}$ の 3 次ピーク (a) はほぼ不変であった。**図 5(a)** に示すように、10 wt% SDS の水溶液で処理したとき短周期ラメラ構造の $S=0.16 \text{ nm}^{-1}$ の 1 次ピークはほぼ不変であったが、長周期ラメラ構造の $S=0.22 \text{ nm}^{-1}$ の 3 次ピーク (a) はほ

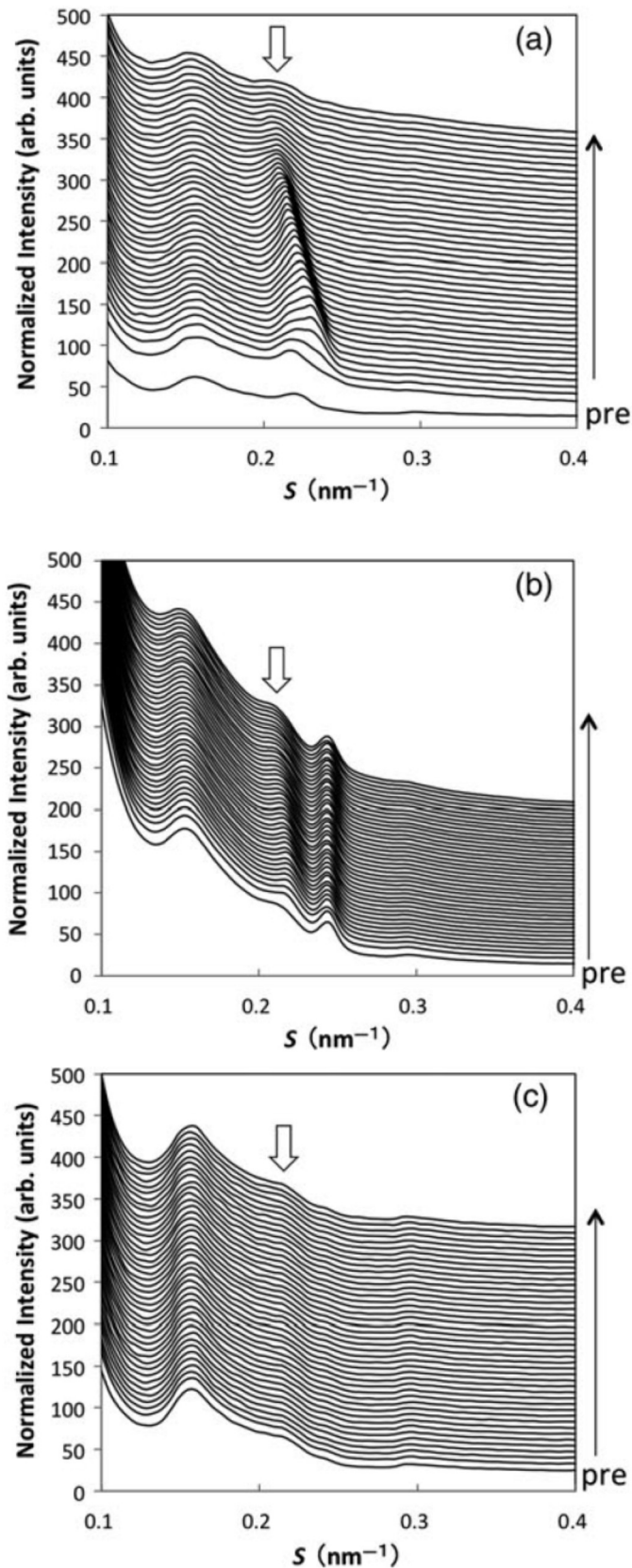


図5. 小角散乱領域 ($S=0.1-0.4 \text{ nm}^{-1}$) の回折像の時間変化. 図中preはSDS水溶液で処理する前の回折像. 右側の矢印は時間経過の方向を示す. 回折像は時間とともに上にずらして示されている. (a)10 wt%のSDS水溶液で処理したとき, (b) 1 wt%のSDS水溶液で処理したとき, (c) 水で処理したとき. (b)に示す回折像における $S=0.24 \text{ nm}^{-1}$ のピークは中性脂肪によると言われているもので [8], まれに観測される場合があるが, 問題にしている細胞間脂質による構造では無い.

ば不変あったが、長周期ラメラ構造の $S=0.22 \text{ nm}^{-1}$ の 3 次ピーク (○) は小角側に移動するとともに消失した [6]. 図 5(b) に示すように、1 wt% SDS の水溶液で処理したとき短周期ラメラ構造の $S=0.16 \text{ nm}^{-1}$ の 1 次ピークはほぼ不変あったが、長周期ラメラ構造の $S=0.22 \text{ nm}^{-1}$ の 3 次ピーク (○) は時間の経過とともに小角側に少し移動するとともに少し減衰した [6, 7]. したがって、SDS 水溶液をヒト角層に作用すると長周期ラメラ構造が変化することが分かった. また、SDS の濃度を増加すると長周期ラメラ構造の変化の度合いが大きくなった. また、広角領域に現れる $S=2.4 \text{ nm}^{-1}$ (格子定数: 0.41 nm) および $S=2.7 \text{ nm}^{-1}$ (格子定数: 0.37 nm) のピークは SDS 水溶液の処理でほぼ不変であった.

長周期ラメラ構造に対する SDS 水溶液の処理について解析するために、 $S=0.22 \text{ nm}^{-1}$ の 3 次ピークを解析した. このピークは短周期ラメラ構造の 1 次反射 ($S=0.16 \text{ nm}^{-1}$) と 2 次反射 ($S=0.32 \text{ nm}^{-1}$) の間にあるため、それらの影響を受けずに解析できる. 図 5(a) から分かるように、長周期ラメラ構造の 3 次ピークは単一のガウス関数では表わされないため、右下に下がる直線のベースラインの上に 2 つのガウス関数が載っているとして解析した. 10 wt% SDS の水溶液で処理したとき、図 6(a) に示すように、長周期ラメラ構造は長短 2 つの周期 (spacing) からなり、2 つのブランチに別れて時間変化する. ○で示す周期は溶液を作用すると直ちに小さくなり、次に次第に増大し、飽和する. ●で示す周期は時間とともに増大する. ○で示す回折ピークの積分強度は図 6(b) のように変化する: 増加し、極大値を示し、減少する. ●で示す積分強度は時間とともに減少する. 1 wt% SDS の水溶液で処理したときの長周期ラメラ構造の 3 次ピークはほぼ単一のガウス関数で表わされる. 図 7(a) に示すように、周期はは

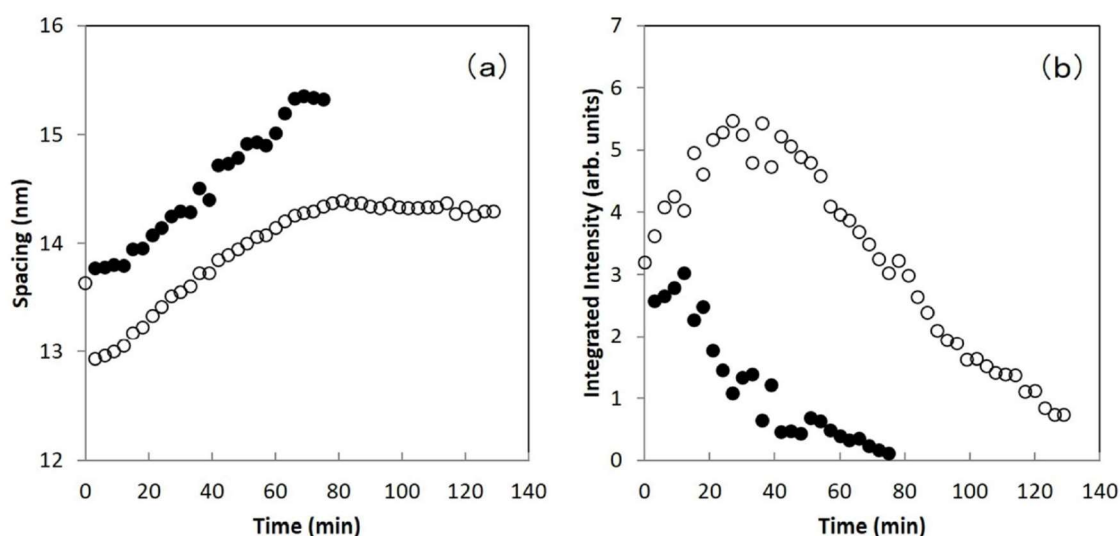


図 6. ヒト角層を 10 wt% SDS の水溶液で処理したときの、(a) 長周期ラメラ構造の周期の時間変化、(b) 積分強度の時間変化 [6]

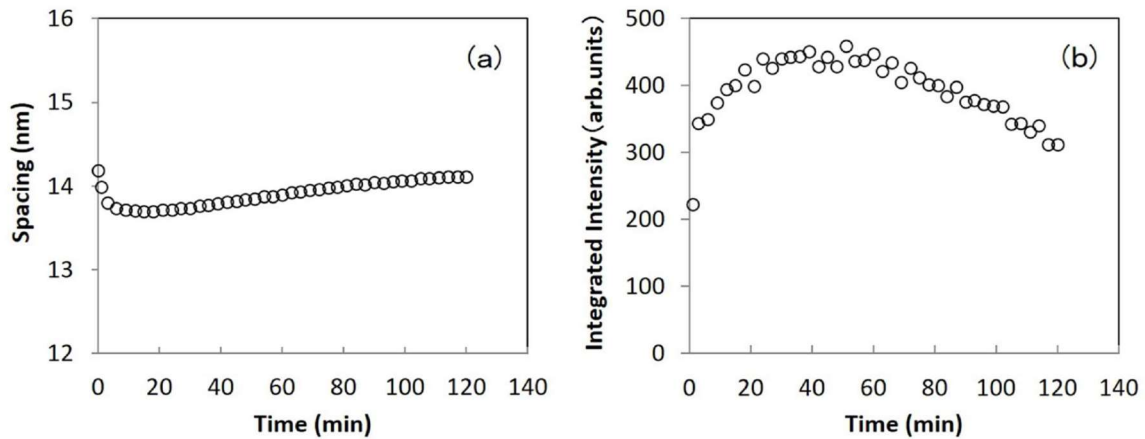


図7. ヒト角層を1 wt%SDSの水溶液で処理したときの、(a) 長周期ラメラ構造の周期の時間変化、(b) 積分強度の時間変化 [7]

じめ減少し、極小値を示し、増大する。また、図7(b)に示すように、積分強度が増加し、極大値を示し、減少する。これらの傾向は10 wt%SDSの水溶液で処理したときの○と傾向は似ている。1 wt%SDSの水溶液を作用したときの方が、変化が周期と積分強度ともに緩やかである。1 wt%SDSの水溶液で処理したときには10 wt%SDSの水溶液で処理したときの長周期ラメラ構造の3次ピーク中の強度の強い部分を反映したものが測定された。図6(a)中、○が時刻ほぼ0 minで急激に下がっているが、図7(a)では緩やかに下がっており、同じ優勢な現象を観測していると言える。2つの濃度に対する実験から、濃度に依らず界面活性剤SDSが長周期ラメラ構造中で作用する箇所は同じであり、時間変化もほぼ同じ傾向を示すが、濃度が増すとともに作用する強さが増加する。時間が経つと積分強度が消失することから、最終的には長周期ラメラ構造が崩壊する。優勢な現象の時間変化が特異的な振舞をすることはSDSが作用する箇所の違いに起因するのであろう。

2. 3. 考察

界面活性剤SDSは長周期ラメラ構造に侵入し、2つの箇所に入り、秩序構造を乱し、長周期ラメラ構造全体を崩壊すると考えられる。長周期ラメラ構造に及ぼすSDSの影響を考えるうえで、Mojumdarら[9]のセラミドEOSを含むセラミド、遊離脂肪酸、コレステロールの1:1:1から成る細胞間脂質モデル系での中性子散乱の結果は示唆に富んでいる。セラミドEOSを含む場合には周期約13 nmの長周期ラメラ構造が現れるが、重水・軽水溶液で重水8%および100%の場合に中性子散乱を測定した。それから得られた散乱長密度分布の差(X線散乱より求まる電子密度分布の差に相当)から長周期ラメラ構造中で水が局在

している場所を明らかにした。差散乱長密度分布が高い、すなわち水が多く存在する4つの異なる場所が長周期ラメラ構造中にあり、構造上2つ等価な第1高密度ピークはユニットセルの境界に、2つの等価な第2高密度ピークはユニットセルの内側にあることを示した。図8に Mojumdar ら[9]の論文の図を転載したものを示すが、これらの場所は脂質の親水性頭部の位置に対応しており、親水性頭部のある第1高密度ピークはユニットセルの中心から 65 \AA (6.5 nm) の位置にあり、また第2高密度ピークはユニットセルの中心から 21 \AA (2.1 nm) の位置にある (図2(a)中の長周期ラメラ構造を参照)。長周期ラメラ構造中の水の局在からすると、界面活性剤 SDS をヒト皮膚角層に作用したときに図6に示すような2つの構造変化過程をもたらすことは長周期ラメラ構造中の上の2か所に入ると考えるのが妥当であろう。しかも、水の多い第1高密度ピークには SDS が図6中○で示すように SDS 処理により急速に侵入し、より多量に入り、水の少ない第2高密度ピークには SDS は少量入り図6中●で示すような変化をされると考えられる。

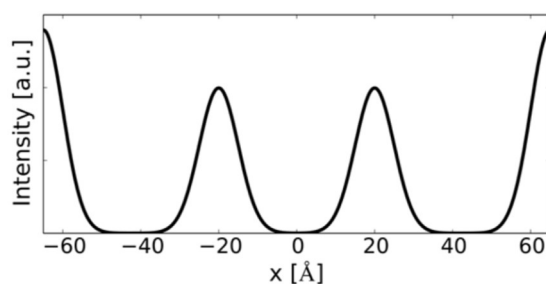


図8. Mojumdar ら論文[9]の Supporting materials に掲載されている長周期ラメラ構造中の水の分布の図を転載。

長周期ラメラ構造は皮膚のバリア機能において重要な役割を果たしていることは知られている。長周期ラメラ構造の形成において、細胞間脂質の成分であるセラミド EOS が欠かせない [10, 11]。したがって、セラミド EOS の欠損により、皮膚角層の疾患、アトピー性皮膚炎 [12]、乾癬 [13]、魚鱗癬 [14]、冬季の肌荒れ[15]など、が惹起される。界面活性剤 SDS による長周期ラメラ構造の崩壊過程の測定は、界面活性剤により引き起こされる皮膚の損傷を経皮水分蒸散量 (TEWL) の増加で評価する [8, 16-20] のに加えて、角層内の分子レベルの構造情報に基づいて解明する上で重要な役割を果たすと考えられる。さらに、界面活性剤 SDS で処理することにより長周期ラメラ構造が崩壊した角層を損傷した試料として、長周期ラメラ構造を再生する薬剤や化粧品を開発することができるであろう。実際に、界面活性剤 SDS で処理した角層にセラミド EOS を含むアシルセラミドのナノパーティクルを作用することにより長周期ラメラ構造が再生することが示されている [21]。

3. ヒューメクタントのグリセロールによる保湿機構の分子レベルでの解析

3. 1. 背景

グリセリンは典型的なヒューメクタント（角層に浸透して保湿機能を発現する水溶性分子）の一つである。グリセリンの正式化学名はグリセロールである。グリセロールは無色で粘性がある保湿剤で、水となじみやすい性質をもつ。そのため、化粧水や化粧品の基剤として広く使われている。同じヒューメクタントとして、天然保湿因子（natural moisturizing factor: NMF）がある。NMFはフィラグリンというたんぱく質が分解して生じたアミノ酸であり、またその一部は代謝を受け例えばアルギニンは尿素とオルニチンに変わる。NMFは水溶性の分子で角層細胞の中に蓄えられている。一方、グリセロールは別の2つの経路から角層中にもたらされる。アクアポリン(AQP3)で発現する場合と皮脂中のトリグリセリドの分解によって生成する場合がある。グリセロールのヒューメクタントとして効果は十分に認知されていながら、その分子レベルでの機構はNMFの場合と比べて分かっていない。むしろ、問題のある考え方が流布している状況にある。それに代わる新しい考え方を提案するのがこの研究の目的である。

グリセロールの分子レベルの保湿機能について、Froebeら[22]は細胞間脂質モデル系に基づいてその機構について提案している。この考え方の問題点を検討するうえで、その細胞間脂質モデル系での研究に至った経過を辿っておく必要がある。Elaisら[23]は細胞間脂質の2分子膜と水が交互に重なる層を形成するモデルを提案した。Lampら[24]の論文では表皮中の脂質成分の解析により、リン脂質成分は角化が進むに従い減少するが、角層中にも少し残っていると述べている。FribergとOsborne[24]はEliasのモデルに基づき、リン脂質を含む2分子膜と水が交互に重なる層から成る細胞間脂質モデルを提案した。そのモデル系に基づき、FribergとOsborne[25]は脂質が液体状態にあることが、水分の損失を防ぐために必要であることを提案した。Froebeら[22]はFribergとOsborne[25]のこの脂質の混合系にグリセロールを添加すると、低い湿度（6% RH）に置いても、液体状態から固体状態（ゲル相）への移行を阻害されることを示した。したがって、乾燥した雰囲気であってもグリセロールは細胞間脂質モデル系で液体状態から固体状態への相転移を阻害することから、グリセロールは皮膚の保湿剤として作用すると結論付けている。これがグリセロールの角層への作用機構であるという考え方が受け入れられ、Fluhr[26, 27]はじめ多くの研究者に影響を及ぼしている。

3. 2. 実験および結果

このように広く受け入れられているグリセロールの細胞間脂質モデル系における保湿機構に関する提案に対して、われわれはヒト皮膚角層そのものにおい

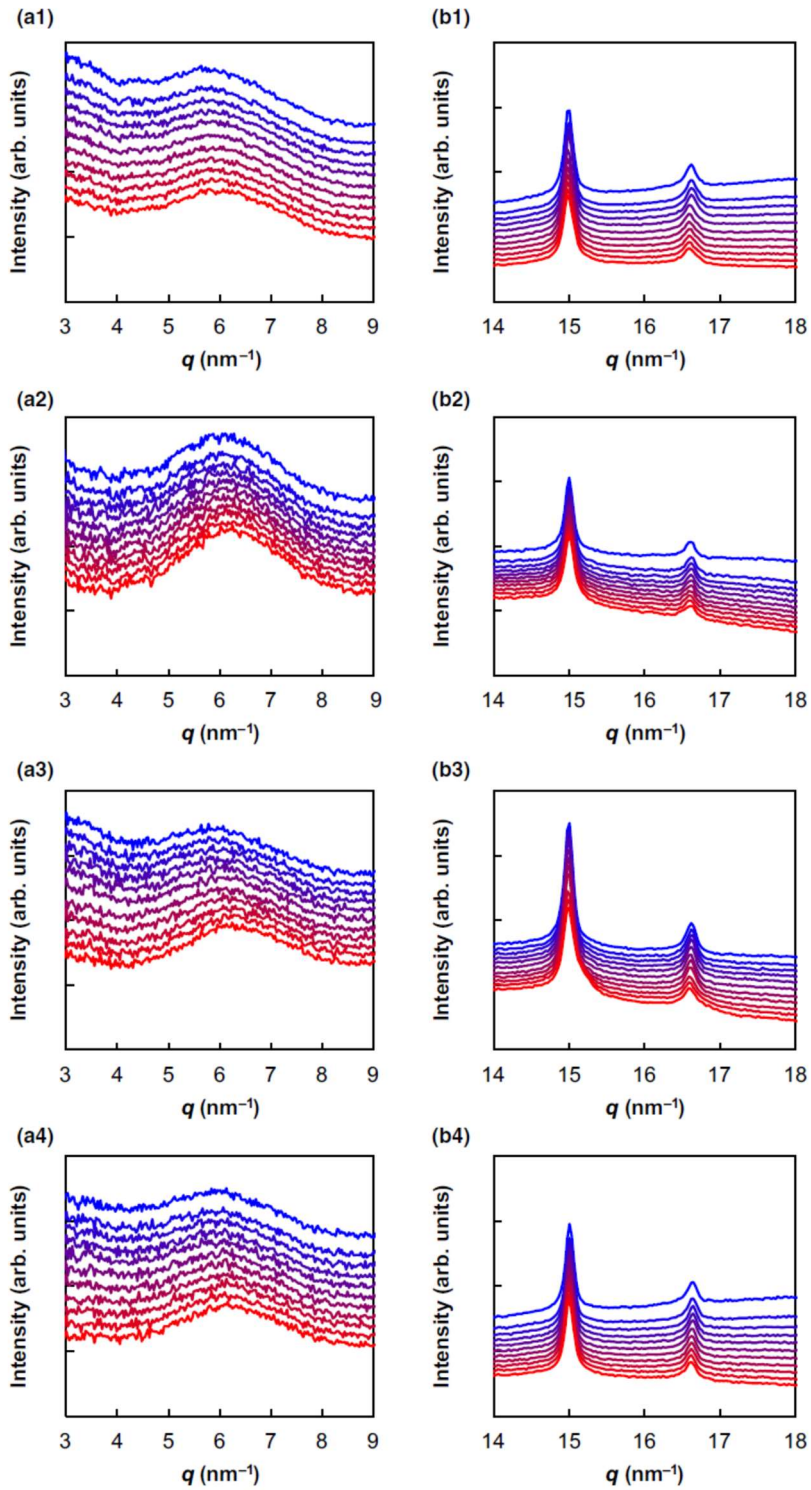


図9. ヒト角層の乾燥時のX線回折像の時間変化. a. ソフトケラチン. b. 炭化水素鎖の充填構造. 1は水, 2は10%グリセロール, 3は10%ジグリセロール, 4は7%グリセロール/3%ジグリセロール. 乾燥の始めの0 min (青線) から20 min (赤線) までの2 min 間隔での回折像の変化を上から順に下に示す.

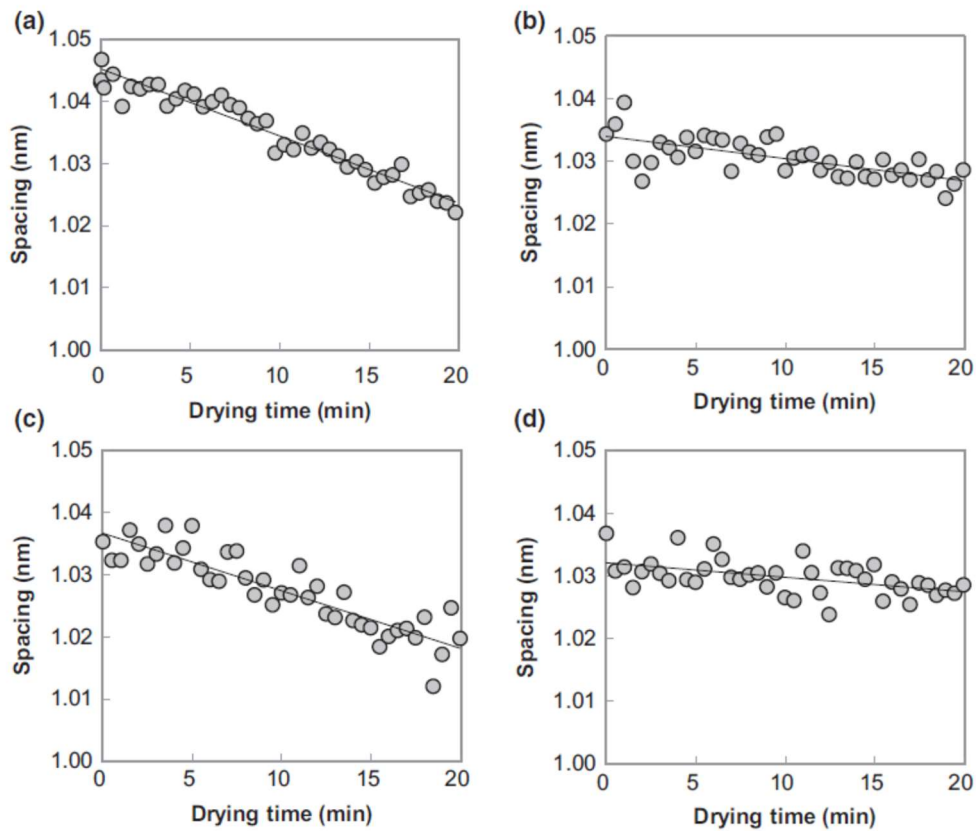


図 10. 乾燥時のソフトケラチンのコイルド・コイル α ヘリックス間隔 (Spacing) の時間変化. (a) 水, (b) 10%グリセロール水溶液, (c) 10%ジグリセロール水溶液, (d) 7%グリセロール/3%ジグリセロール水溶液.

表 1. 水, 10%グリセロール水溶液, 10%ジグリセロール水溶液, 7%グリセロール/3%ジグリセロール水溶液で処理したヒト皮膚角層における乾燥時のソフトケラチンのコイルド・コイル α ヘリックス間隔の減衰過程の勾配.

Solution	Decreasing slope (nm/min)
water	0.0011
10wt% Diglycerol	0.0009
10wt% Glycerol	0.0004
7wt% Glycerol / 3wt% Diglycerol	0.0002

て検討した。グリセロールにより乾燥雰囲気下でも液体状態から固体状態への相転移が阻害されるという提案を踏まえ、ヒト皮膚角層で乾燥時の X 線回折実験を行った。乾燥時に実験を行うことは、上の問題を再検討するのみならず、皮膚が乾燥状態に置かれたときの角層構造の損傷、さらにヒューメクタント処理による角層構造の維持機構を明らかにするうえで重要な課題であるからである。

溶液セルを用いて水、グリセロール水溶液、ジグリセロール水溶液およびグリセロール/ジグリセロール水溶液で湿潤したヒト角層の乾燥過程での X 線回折実験を行った [28, 29]。溶液セルのガラスメッシュのなかに埋め込まれた乾燥した角層は図 4 右上に示す状態にある。乾燥した角層を十分に水またはグリセロール等の水溶液に浸し、図 4 右下のような状態にする。このように湿潤した角層に外から乾燥室素ガスを流し、乾燥する。この湿潤の初めから十分に湿潤した状態の角層を乾燥し、最終的に十分に乾燥するまでの全過程において、図 4 の左に示すように角層試料に X 線を照射し、X 線回折像の時間変化を観測した。実験で用いた X 線の波長は 0.069 nm, 30 s ごとに回折像を検出し、露光時間は 20 s であった。図 9(a, b) に 1 個体について観測した：a ; ソフトケラチン, b ; 炭化水素鎖の充填構造の X 線回折像の乾燥時の時間変化を示す（乾燥開始時を青線、乾燥終了時を赤線で示す）。通常、溶液で処理して X 線回折像を別々の個体、部位で測定したときには、回折像変化は個体差や部位差に埋もれてしまい検出が難しい。溶液セルを用いることにより、1 個体、1 部位で測定した場合でも以下に示すように微妙であっても明瞭な構造の変化を検出できた。

図 9(a1-4) のソフトケラチンによる X 線回折ピークは角層細胞中のソフトケラチンのコイルド・コイル α ヘリックス間隔に由来すると考えられる。このピークをガウス関数と直線のベースラインにより成るとして解析して、コイルド・コイル α ヘリックス間隔は乾燥時間に対して図 10 のように変化することが分かった。変化の大きさは約 1-3% 程度であるが、溶液セルを用いることによって検出できた。乾燥時に α ヘリックス間隔はほぼ線形に狭まっていることを示している。後で α ヘリックス間隔と角層中の水分の関係は詳しく説明するが、各水溶液を作用したときの減衰過程の勾配を表 1 に載せる。水およびジグリセロール水溶液の場合とグリセロール水溶液およびグリセロール/ジグリセロール水溶液の場合のほぼ 2 つに分類される。前者は負の勾配が大きく、後者は小さい。したがって、グリセロールが入っている水溶液で処理した場合、乾燥時に角層に水（すなわち、結合水）がより長く保持されると推測される。

図 9(b1-4) に各水溶液で処理した場合の乾燥時の炭化水素鎖の充填構造の変化を示す。ソフトケラチンの場合と同様に、各溶液で処理したときに、X 線回折

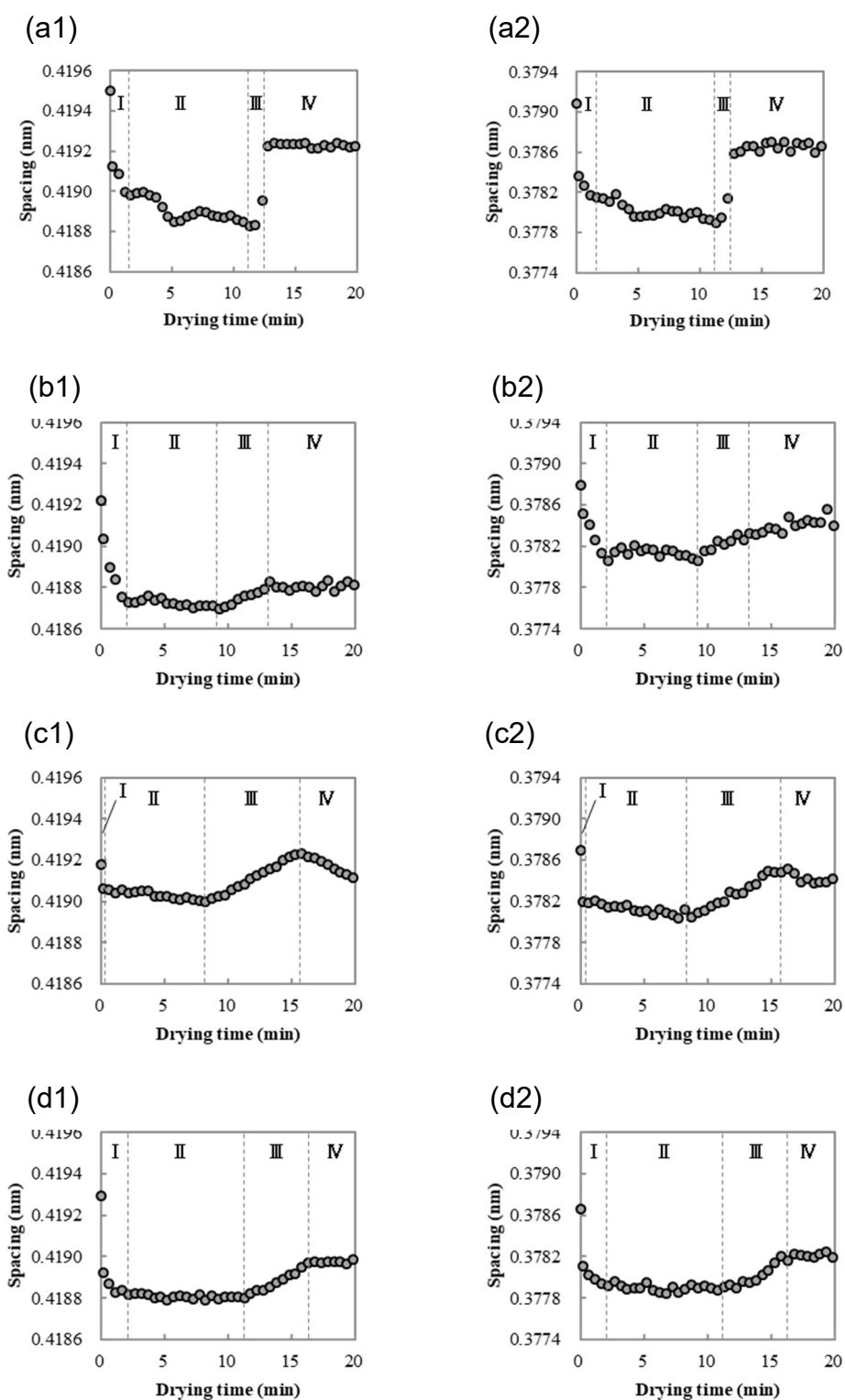


図 11. 炭化水素鎖の充填構造の格子定数 (1) 0.42 nm, (2) 0.37 nm の時間変化. (a) 水, (b) 10%グリセロール水溶液, (c) 10%ジグリセロール水溶液, (d) 7%グリセロール/3%ジグリセロール水溶液で処理した場合.

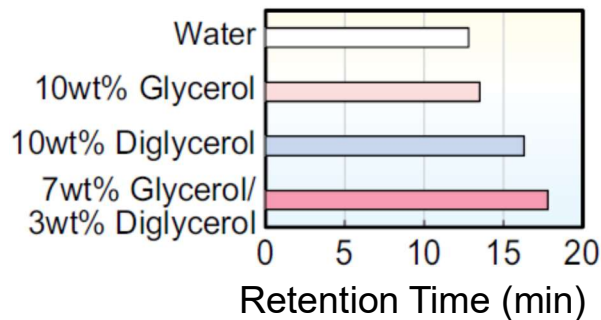


図 12. ヒト皮膚角層の炭化水素鎖の安定状態の持続時間. 水, 10%グリセロール水溶液, 10%ジグリセロール水溶液, 7%グリセロール/3%ジグリセロール水溶液で処理した場合.

像を別々の個体, 部位で測定したのでは回折像変化は個体差や部位差の中に変化が埋もれてしまい微妙な変化を検出することは難しい. このような場合, 溶液セルを用いることによって, 1 個体, 1 部位で測定した場合でも微妙な変化を検出できる. 図 9(b1-4)の格子定数 0.41 nm および 0.37 nm に相当する回折ピークをそれぞれガウス関数と直線のベースラインにより解析し, 図 11 に示す結果を得た. 図 11(a1,2)に水で処理した角層の乾燥時の 2 つの格子定数の時間変化を示す. 2 つの格子定数はほぼ同様の変化をしており, 乾燥時に直方晶が変化していることが分かる. 乾燥時に格子定数は複雑な変化をするが, 特徴的な振舞をしている. 図 11(a1)を詳しく見ると, 乾燥時の変化を 4 つの領域に分けて考えることができる. 領域 I では格子定数が急速に減少し, 領域 II では小さくほぼ一定の格子定数の値を取り, 領域 III では急速に増大し, 領域 IV では大きい値で一定になる. 図 11(b1,2; c1,2; d1,2)にあるように 10%ジグリセロール水溶液, 7%グリセロール/3%ジグリセロール水溶液で処理したヒト皮膚角層を乾燥すると, 領域 I と III が広がるが, おおむね水で処理した場合と同様な振舞をする. 格子定数の変化は 0.1-0.2%程度であるが, 溶液セルを用いることにより, 微妙な変化を検出することができた. 図 11(c1)の領域 IV で右下がりの傾向を示すが, これは変化が微細なために起こる外部の温度の変化, 試料位置のずれなどによるドリフトであると考えられる. 格子定数が領域 II で小さくなることは, 炭化水素鎖の充填が密になったことを意味し, 秩序度が高い領域になっている. すなわち, 秩序化してこの領域は構造的に安定状態にある. 領域 I は過剰水溶液下の不安定状態から安定状態への過渡状態であり, 領域 III は安定状態から過剰乾燥下の不安定状態への過渡状態と考えられる. したがって, 安定状態の部分を含む領域 I, 領域 II, 領域 III にわたる全領域が安定状態に関わっ

ており、領域Ⅰが始まる時点から領域Ⅲ終わる時点までの時間が安定状態を持続する時間といえる。図12に水、10%グリセロール水溶液、10%ジグリセロール水溶液、7%グリセロール/3%ジグリセロール水溶液で処理したときの持続時間を示す。図12で下の2つの棒グラフは長く、上の2つの棒グラフは短い。これからジグリセロールを含む場合に持続時間が長く、安定状態がより長く持続していると推測される。

3. 3. 考察

角層細胞中の NMF は保湿機能において重要な役割を果たしていることはよく知られているが、本研究において角層中にあるグリセロールは角層細胞に入り、NMF と同様な役割を果たしていることを明らかにした。表1に示すように、グリセロールは角層細胞に入ることによって、ソフトケラチンに作用し、乾燥状態においても長時間水分蓄積状態を保つ。一方、水は角層細胞に入るが、グリセロールの場合と比べて乾燥状態において水分蓄積状態時間は短くなる。また、ジグリセロール水溶液の場合は水の場合と似ていることから、ジグリセロール水溶液中の水は角層細胞中に入るもののジグリセロールは容易には入らないと考えられる。このことは次のことから推測される。グリセロールの分子量は92、ジグリセロールの分子量は166であり、NMFの平均の分子量120と比べて前者は小さく後者は大きいことから、角層細胞を包むコーニファイドエンベロープを容易に透過できる分子サイズがあり、NMFと比べて大きな分子は角層細胞に入り難いと思われる。これはNMFに代わる新しいヒューメクタントを開発する際の一つの指標になるかもしれない。

角層細胞中のグリセロールの保湿機能を考えるうえで、Jokuraら[29]の固体

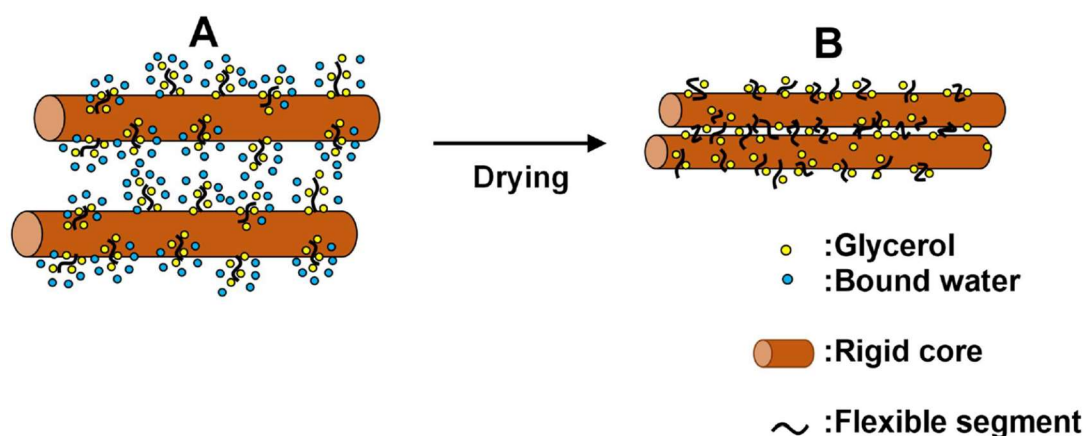


図13. グリセロールを作用したソフトケラチンの構造の乾燥時の変化. A. 結合水がある場合. B. 結合水がない場合. Flexible segment及びそれに連なる rigid core 中の filament はコイルド・コイル α ヘリックス構造より成る.

高分解能 ^{13}C -NMR による角層の柔軟化機構の研究は重要な示唆を与えてくれる。ヒト皮膚角層から脂質を抽出した試料を用いて実験を行っている。角層細胞中のソフトケラチンは **rigid core** と **flexible segment** から成っており、固体 NMR スペクトルでは図 13 に示す **rigid core** 中のカルボニル基の炭素とメチン基の α 炭素、**flexible segment** 中の脂肪族炭素によるピークが観測されている。これらのピークが高いほど運動性が小さく、ピークが低いと運動性が大きい。NMF がある場合、水分が少ないとピークが高く運動性は抑制されているが、多くなるとともにピークが低くなり運動性が增大する、水分量約 25wt% 以上ではピークの高さは低くほぼ一定になり、運動性はほとんど変わらない（水分量の定義については文献[1]を参照）。**Rigid core** 中の炭素と **flexible segment** 中の炭素の水分に対するピークの傾向は同じであるが、後者の方が変化の大きさが著しい。NMF を水で除去した後に水を入れても、ピークはあまり低くならないので、NMF がないと運動性は大きくならない。したがって、運動性を増大するうえで、NMF は不可欠である。水分量に着目すると、角層内の水の多くは角層細胞の中にあり、水分量 25wt% は結合水であるから [1]、水分量が増えると結合水が増加するとともに運動性が增大する。水分量が 25wt% を超えると、自由水が増加するが、運動性は変わらない。したがって、結合水は運動性の発現において重要な役割をしており、角層の柔軟性を担っている。

城倉ら[30]により、ブタ皮膚の角層細胞から NMF を除去した試料にグリセロール水溶液を作用したときの固体高分解能 ^{13}C -NMR によるが行われている。水に対する振舞および NMF の影響についてはヒト角層の場合と同じ結果が得られている。グリセロール水溶液処理によっても、ソフトケラチンの運動性が增大することが明らかにされた。したがって、グリセロールは角層細胞の中に入り、NMF と同様な働きをしていることが分った。さらに、この実験の重要な点として、角層細胞内にあるグリセロールに由来するピークが独立したピークとして観測でき、それからグリセロール分子自体の運動性は減少することが分かった。したがって、これは溶液中で自由に動いていたグリセロール分子はコイルド・コイル α ヘリックスの **flexible segment** と結合することによってその運動が抑制されていると考えることができる。

X 線回折実験では **rigid core** 内の 1 nm のコイルド・コイル α ヘリックス構造が観測される。**Rigid core** 中のケラチン線維は図 1 に示すソフトケラチンの広い平盤面にほぼ平行に配向しているおり、それによる回折像が得られる [31]。一方、グリセロールが結合する **flexible segment** の構造は X 線回折では観測できない。しかし、固体高分解能 ^{13}C -NMR では水分量の増加とともに **rigid core** 中の炭素と **flexible segment** 中の炭素のピークの振舞からすると同様な運動性に対する傾向を示し、しかし、後者が大きな変化を示している。このことは **flexible**

segment にグリセロールが結合して、それに水分子が作用することによって運動性を増大し、その結果、flexible segment に連なる rigid core 中の 1 nm のコイルド・コイル α ヘリックスの間隔を間接的に広げると考えられる。このようにして、X 線回折実験によりソフトケラチン中でグリセロールの果たしている役割を検討することができる。図 13A に水分量 25wt% のソフトケラチンを示す。

Flexible segment にグリセロールが結合し、その周り結合水が集まっている。図 13B に示すように、乾燥すると flexible segment 中の結合水が少なくなり、その結果、rigid core 中の 1 nm の α ヘリックス間隔が狭まり、図 13B に示すように rigid core は細くなる。この傾向はまさに本研究の乾燥時の α ヘリックス間隔の振舞を反映しており、グリセロール水溶液で処理をすると α ヘリックス間隔の減衰が抑制され、結合水が長時間蓄積されることになる。

乾燥時の炭化水素鎖の直方晶の充填構造の格子定数は特異的な振舞をしており、その変化は非常に小さい。Froebe ら[22]が細胞間脂質モデル系で指摘している相転移現象を変えるような激烈なことは角層では起こらないことを明らかになった。図 12 で示した安定状態の持続時間より、10%ジグリセロール水溶液と 7%グリセロール/3%ジグリセロール水溶液の処理では、安定状態が長く続くことは水酸基を多く持つジグリセロールの寄与があると考えられる。10%ジグリセロール水溶液よりも 7%グリセロール/3%ジグリセロール水溶液の方が長くなる理由については現在のところよくわからない。

細胞間脂質が形成する構造の水に対して現れる安定状態については、短周期ラメラ構造の水による膨潤実験でも検討されている [32, 33]。ヘアレスマウス角層において、水分量 0-80wt% にわたって水分量を変えて静的な小角 X 線回折実験が行われた [32]。長周期ラメラ構造の 1 次から 5 次まで、短周期ラメラ構造の 1 次と 2 次までの回折像が観測された。回折像の解析よりつぎのような結果が得られた。短周期ラメラ構造の周期は水分量が増加するとともに周期は 5.8 nm から 6.5 nm まで増大する。いわゆる膨潤 (swelling) が起きる。長周期ラメラ構造は水分量に対して周期はほぼ 13.5 nm に留まり顕著な変化は起こさない。さらに、短周期ラメラ構造の回折ピークは水分量約 25wt% で鋭くなる。したがって、約 25wt% でこれらの短周期ラメラ構造が安定な構造を取ることを意味している。水分量が約 25wt% から外れるとこの値に戻す働きをすることになる。すなわち、短周期ラメラ構造は水分量を安定状態に保つ制御機構の役割を果たしている。ヒト角層ではヘアレスマウス角層のような鋭い短周期ラメラ構造の回折ピークが観測されないので、詳しい解析は難しいが短周期ラメラ構造については水分量に対してヘアレスマウス角層とほぼ同様な振舞をしている [33]。さらに、この場合少し広角側で観測されるソフトケラチンのピークの解析も行われており、コイルド・コイル α ヘリックスの 1 nm の spacing は水分量

の増加とともに広がり、約 25wt%で飽和する傾向を示すことが分かった。この水分量 25wt%から 0 までの振舞は、乾燥時のソフトケラチンのコイルド・コイル α ヘリックス間隔の時間変化に対応している。一方、短周期ラメラ構造と直方晶の炭化水素鎖の充填構造は同じドメイン内のお互いに直交する構造であることに着目すると [34]、短周期ラメラ構造で起きる現象と直方晶の炭化水素鎖の充填構造で起きる現象には相関があると考えられる。独立に行われた両者の水に対する変化から、短周期ラメラ構造が約 25wt%で安定構造になることと直方晶の炭化水素鎖の充填構造が安定状態を取ることは同じ現象を別の角度から見ていることになる。これらのことから、直方晶の炭化水素鎖の充填構造の安定状態の水分量は約 25wt%であると推察される。水に対する短周期ラメラ構造と直方晶の炭化水素鎖の充填構造の変化が相関してことについては、一つの試料で同時に観測し、確証することが今後の課題である。

短周期ラメラ構造の水層の厚みは最大 1 nm であり、水分子 3 個分程度である。この層にグリセロールが入り込んで脂質の頭部に作用すると考えられる。細胞間脂質により形成される短周期ラメラ構造の水層でのグリセロールの振舞はわからないが、リン脂質 2 分子膜の水層でのグリセロールの振舞について何らかの手がかりを与えるかもしれない。炭化水素鎖の炭素数 14-18 の乾燥リン脂質をグリセロール中でインキュベートすると *interdigitated* 構造が形成されることが報告されている [35]。炭素数に因らずに起こる現象であり、グリセロールが要因となって、*interdigitated* 構造が形成される。これはグリセロールがリン脂質頭部に作用することにより炭化水素鎖の充填構造にも影響を与えることを示唆する。同じヒューメクタントである尿素についてはリン脂質で *interdigitated* 構造の形成は起こらない [36]。この両者で水層での振舞が異なることはヒューメクタントとしての両者の動作機構の違いを検討するうえでの興味ある課題である。

ところで、*in vivo* 共焦点ラマン顕微鏡による角層内の水分量測定によれば、角層表面付近では水分量はほぼ 25wt%であるの対し、深部に行くに従いほぼ線形に水分量は増加し、最深部の顆粒層付近ではほぼ 65wt%に達する [37]。さらに、皮膚表面に水を塗布すると表面付近の水分量が増加するが、10 min 程度で元の正常な状態に戻る [37]。今回の *ex vivo* X 線回折実験で、角層中の水分量がほぼ 25wt%になるように蓄積され、かつ制御され、グリセロールはそれらの状態を長く保ち、この正常な状態に維持するように働いていることが分かった。このことは、角層表面付近の水が角層の機能発現にとって重要な働きをしていることを意味する。角層表面は外界に接し、絶えず内部から外部へ水を蒸散している。この過程で角層表面において、角層細胞にほぼ 25wt%の結合水を蓄積し、短周期ラメラ構造は水分量がほぼ 25wt%になるように制御し、正常な

非平衡定常状態に保たれていると考えられる。一方、高周波電流を皮膚表面に流してコンダクタンスあるいはキャパシタンスを測定し、皮膚の水分量を評価する方法がある。これらの測定値では皮表の水分量が多いほど測定値が高くなる[38]。測定深度、再現性、ダイナミックレンジにはそれぞれ特徴があるものの測定法間の相関は高い。測定深度は明確ではないが、角層および表皮生細胞層の一部を測定していると考えられている [38]。グリセロールをはじめ多くのヒューメクタントを皮膚表面に塗布することにより、これらの値は大きくなり、より多くの水分を蓄えることが知られている [40, 41]。したがって、ヒューメクタントと言っても皮膚への作用には、皮膚表面を正常な水分量の状態に保つことと、皮膚内の深部に水を蓄えることの少なくとも2通りあると思われる。これらの関係は分かっていないが、皮膚表面で水の異常な蒸散が起こったら、それを正常な水分量 25wt%に戻すように、皮膚深部に蓄えられた水はそれを補うように働くのではなかろうか。

謝辞

ここで紹介した研究は名古屋産業科学研究所の受託研究として行われたものである。界面活性剤硫酸ドデシルナトリウムによるヒト皮膚の損傷に関する研究はクラシエホームプロダクツ株式会社の築瀬香織さんと、多価アルコールのグリセロールなどのヒューメクタントとしての働きに関する研究は阪本薬品工業株式会社の山田武さんおよび羽深朱里さんで行ったものである。この研究を完成させるにあたって、皆様と大変有益な実りある交流ができたことに心より感謝する。なお、これらの研究は SPring-8 で行われた。兵庫県が設置した「ひょうご SPring-8 賞」の第 17 回の賞を築瀬さん、第 19 回の賞を山田さんが受賞した。これらの研究では、細胞間脂質モデル系では分からなかった現象がヒト角層で実験することによってはじめて明らかにできた。ヒト角層はこれらの実験で欠かせなかった。これらの実験は BIOPREDIC International 社で調製したヒト角層を株式会社ケー・エー・シーから購入したものをを用いて行われた。

参考文献

- [1] I. Hatta, H. Nakazawa, N. Ohta, T. Uchino, K. Yanase, *J. Oleo Sci.* **70** (2021) 1181-1199. <https://doi.org/10.5650/jos.ess21159>
- [2] I. Hatta, *Dermato* **2** (2022) 79-108. <https://doi.org/10.3390/dermato2030009>
- [3] 例えば, J. van Smeden, W. A. Boiten, T. Hankemeier, T. R. Rissmann, J. A. Bouwstra, R. J. Vreeken, *Biochem. Biophys. Acta* **1841** (2014) 70-79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbaliip.2013.11.006> 中の Fig. 3 を参照。
- [4] I. Hatta, H. Nakazawa, Y. Obata, N. Ohta, K. Inoue, N. Yagi, *Chem. Phys. Lipids* **163** (2010) 381-389. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2010.02.005>

- [5] 例えば, 河合通雄, 岡本暉公彦, 日本化粧品技術者会誌 **12** [2] (1978) 36-43 を参照.
- [6] K. Yanase, I. Hatta, *Int. J. Cosmet. Sci.* **40** (2018) 44-49. <https://doi.org/10.1111/ics.12430>
- [7] K. Yanase, I. Hatta, *SPRING-8/SACLA Research Frontiers* 2017 (2018) 90-91.
- [8] C. Ribaud, J. C. Garson, J. Doucet, J. L. L  v  que, *Pharm. Res.* **11** (1994)1414-1418.
- [9] E. H. Mojumdar, G. S. Gooris, D. J. Barlow, M. J. Lawrence, B. Deme, J. A. Bouwstra, *Biophys. J.* **108** (2015) 2670–2679. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2015.04.030>
- [10] J. A. Bouwstra, F. E. R. Dubbelaar, G. S. Gooris, M. Ponc, *Acta Derm. Venereol. Suppl.* **208** (2000) 23-30.
- [11] D. Kuemle, D. C. Swartzendruber, C. A. Squier, P. W. Wertz, *Biochem. Biophys. Acta* **1372** (1998) 135-140.
- [12] G. Imokawa, A. Abe, K. Jin, Y. Higaki, M. Kawashima, A. Hidano, *J. Invest. Dermatol.* **96** (1991) 523-526.
- [13] S. Motta, M. Monti, S. Sesana, R. Caputo, S. Carelli, R. Ghidoni, *Biochim. Biophys. Acta* **1182** (1993) 147-151.
- [14] D. G. Paige, N. Morse-Fisher, J. I. Harper, *British J. Dermatol.* **131** (1994)23-27.
- [15] A. Conti, J. Rogers, P. Verdejo, C. R. Harding, A. V. Rawlings, *Int. J. Cosmet. Sci.* **18** (1996) 1-12.
- [16] H. Tagami, K. Yoshikuni, *Arch. Dermatol.* **121** (1985) 642-645. <https://doi.org/10.1001/archderm>.
- [17] J. L. L  v  que, J. de Rigal, D. Saint-L  ger, D. Billy, *Skin Pharmacol. Physiol.* **6** (1993) 111-115.
- [18] M. Fartasch, *Curr. Probl. Dermatol.* **23** (1995) 95-103.
- [19] Y. Kawasaki, D. Quan, K. Sakamoto, R. Cooke, H. I. Maibach, *Skin. Res. Tech.* **5** (1999) 96-101. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.1999.tb00122.x>
- [20] M. Gloor, B. Wasik, W. Gehring, R. Grieshaber, P. Kleesz, J. W. Fluhr, *Skin Res. Tech.* **10** (2004) 1-9. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2004.00045.x>
- [21] A. Nakaune-Iijima, A. Sugishima, G. Omura, H. Kitaoka, T. Tashiro, S. Kageyama, I. Hatta, *Chem. Phys. Lipids* **215** (2018) 56-62. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2018.05.003>
- [22] C. L. Froebe, F. A. Simon, H. Ohlmeyer, L. D. Rhein, J. Mattai, R. H. Cagan, S. E. Friberg, *J. Soc. Cosmet. Chem.* **41** (1990) 51-65.
- [23] P. M. Elias, B. E. Brown, P. Fritsch, J. Goerke, M. Gray, R. J. White, *J. Invest. Dermatol.* **73** (1979) 339-348.
- [24] M. A. Lamp, M. L. Williams, P. M. Elias, *J. Lipid Res.* **24** (1983) 131-140.
- [25] S. E. Friberg, D. W. Osborne, *J. Disp. Sci. Tech.* **6** (1985) 485-495.
- [26] J. W. Fluhr, M. Gloor, L. Lehmann, S. Lazzerini, F. Distanto, E. Berardesca, *Acta Derm. Venereol.* **79** (1999) 418-421.
- [27] J. W. Fluhr, A. Bornkessel, E. Berardesca, in *Dry Skin and Moisturizers*, 2nd edition, ed. M. Lod  n, H. I. Maibach (2006, CRC Press, Boca Raton) pp. 227-243.

- [28] T. Yamada, A. Habuka, I Hatta, *Int. J. Cosmet. Sci.* **43** (2021) 38-47. <https://doi.org/10.1111/ics.12664>
- [29] Y. Jokura, S. Ishikawa, H. Tokura, G. Imokawa, *J. Invest. Dermatol.* **104** (1995) 806-812.
- [30] 城倉洋二, 石川伸二, 山崎誠二, 芋川玄爾, *J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn* **27** (1993) 348-354.
- [31] J. Doucet, A. Potter, C. Baltenneck, Y. A. Domanov, *J. Lipid Res.* **55** (2014) 2380-2388. <https://doi.org/10.1194/jlr.M053389>
- [32] N. Ohta, S. Ban, H. Tanaka, S. Nakata, I. Hatta, *Chem. Phys. Lipids* **123** (2003)1-8.
- [33] H. Nakazawa, N. Ohta, I Hatta, *Chem. Phys. Lipids* **165** (2012) 238-243.
- [34] I. Hatta, N. Ohta, K. Inoue, N. Yagi, *Biochim. Biophys. Acta* **1758** (2006) 1830-1836. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.08.014>
- [35] H. Takahashi, N. Ohta, I. Hatta, *Chem. Phys. Lipids* **112** (2001) 93-97.
- [36] A. Nowacka, S. Douezan, L. Wadsö, D. Topgaard, E. Sparr, *Soft Matter* **8** (2012) 1482-1491. <https://doi.org/10.1039/c1sm06273e>
- [37] M. Egawa and T. Kajikawa, *Skin Res. Tech.* **15** (2009) 242-249. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2009.00362.x>
- [38] 例えば, 高橋元次, *表面科学* **35** (2014) 4-10.
- [39] P. Clarys, A. O. Barel, B. Gabard, *Skin Res. Tech.* **5** (1999) 14-20. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.1999.tb00198.x>
- [40] J. Bettinger, M. Gloor, A. Vollert, P. Kleesz, J. Fluhr, W. Gehring, *Skin Res. Tech.* **5** (1999) 21-27. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.1999.tb00199.x>
- [41] A. Tomiie, M. Shinozaki, T. Yamada, J. Kuriyama, *J. Oleo Sci.* **65** (2016) 681-684. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2009.00362.x>