

平成 21 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18540411

研究課題名（和文）外部刺激による皮膚バリアー機能を司る構造の変化過程のX線回折による研究

研究課題名（英文） Study on structural change of stratum corneum by applying chemical agents

研究代表者

八田 一郎 (HATTA ICHIRO)

財団法人高輝度光科学研究センター産業利用推進室・コーディネーター

研究者番号：70016070

研究成果の概要：皮膚角層の構造を分子レベルで解明するために、皮膚角層中の細胞間脂質とソフトケラチンの構造を小角・広角X線回折実験により研究した。研究成果は主として2つからなる。1つは小角領域で観測される細胞間脂質が作る2つのラメラ構造（長周期ラメラ構造と短周期ラメラ構造）と広角領域で観測される2つの炭化水素鎖の充てん構造（六方晶と斜方晶）の間の関係を明らかにした。また1つは皮膚角層に化学物質（化粧品や経皮吸収型製剤）を作用したときの細胞間脂質およびソフトケラチンの構造変化を高感度で観測する方法を開発した。この研究に基づき、化粧品や経皮吸収型製剤の皮膚への効果の分子レベルでの開発研究を行うことができる。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2006年度 | 1,100,000 | 0 | 1,100,000 |
| 2007年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2008年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,600,000 | 450,000 | 3,050,000 |

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：物理学 ・ 生物物理 ・ 化学物理

キーワード：脂質，セラミド，細胞間脂質，ケラチン，角層，皮膚，バリアー機能

1. 研究開始当初の背景

皮膚角層中の細胞間脂質は皮膚のバリアー機能において重要な役割をしていると言われている。バリアー機能は外部から物質が入るのを防ぐとともに水分が外部に逃げないように働いている。バリアー機能が保たれる現象として、経皮吸収型製剤、化粧品の効果などがあるが、それらの作用機構を分子レベルで明らかにすることは重要な課題である。この研究において、主として細胞間脂質の構

造を分子レベルで求め、さらにソフトケラチンの構造を解析し、それに基づいて皮膚のバリアー機能の機構を明らかにし、最終的にはバリアー機能の保持、損なわれたバリアー機能の改善、経皮吸収促進の方法を分子レベルで確立することが課題である。

2. 研究の目的

細胞間脂質はラメラ構造を形成するが、哺乳動物ではラメラ周期が 13 nm と 6 nm 付近

の長短2種類のラメラ構造がある。長周期ラメラ構造は水層の無い構造であることが知られていたが、われわれは短周期ラメラ構造が水層をもつ構造であることを発見した (N. Ohta, S. Ban, H. Tanaka, S. Nakata and I. Hatta: Chem. Phys. Lipids **123** (2003) 1-8)。

細胞間脂質多重ラメラ構造の研究は電子顕微鏡観察により行われており、10層程度のラメラ構造の積み重なりから成っている。精密な構造解析のために放射光 X 線構造解析が不可欠である。われわれは放射光 X 線を用いてヘアレスマウス角質層中の細胞間脂質多重ラメラ構造の研究を行い、13.6 nm と 6 nm 付近の2種類の多重ラメラ構造があり、角質層中の水分量を増加すると、13.6 nm のラメラ構造の周期は不変であるのに対し 6 nm 付近のラメラ構造の周期は増大し、上に述べたようにいわゆる膨潤を起こすことを発見した。さらに、20-30 wt%で13.6 nm と 6 nm 付近の両ラメラ反射ピークともに鋭くなることを見出しだした。これは水分量 20-30 wt%で両ラメラ構造の歪が小さくなり、構造が安定化すると考えられる。これまで比較的の研究が進んでいる 13 nm (ヘアレスマウスの場合 13.6 nm であるが、種によって 13 nm 前後で分布している) のラメラ構造に加えて、従来の研究で着目されて来なかった 6 nm 付近のラメラ構造が機能において重要な役割を果たしていると考えられる。さらに、炭化水素鎖の充てんには2つの構造があることが報告されている。1つは六方晶であり、格子定数は 0.42 nm である。また、1つは斜方晶であり、格子定数は 0.42 と 0.37 nm である。このようにラメラ構造と炭化水素鎖の充てんについて、それぞれ独立に報告されている状況で、細胞間脂質集合体の全体像は不明のままである。現在のところ、細胞間脂質がつくる構造についての研究は少なく、解明されていない点が多い。時には、誤った推測に基づく構造モデルによって機能が論じられていることも多々ある。このような状況下にあって皮膚角質層中の細胞間脂質集合体の構造を解析し、分子レベルで構造を明らかにし、その構造に基づいて外界から働きかけによって起こる細胞間脂質集合体において機能制御機構を解明することを目標に研究を行う。

われわれは上で述べたような立場にたって、皮膚角質層中の2つの周期(13 nm と 6 nm 付近)を持つ細胞間脂質ラメラ構造と2つの炭化水素鎖の充てん構造(六方晶と斜方晶)の間の関係を明らかにすることを目的とする。この関係を先ず明らかにすることによっ

てはじめて、皮膚角質層中の細胞間脂質の分子レベルでの構造の基盤が確立する。

さらに、皮膚角質の X 線回折実験の研究において、角層の個体差による回折像の違いに悩ませられることがある。われわれがここで提案する方法では、一つの角層試料において溶液等の外部条件を変えたときの構造の変化過程を追跡することにより、外部条件の構造への影響や効果を敏感に捉えることを特徴とする。すなわち、X 線回折実験用の溶液セルを作製し、その中に角層試料を入れ、外部条件として溶液の濃度や溶液を入れてからの時間の関数として X 線回折強度の変化を測定する。これにより、動物種それぞれで普遍的に観測される回折像(それが多少弱い強度であったりまたブロードであったりと差があったとしても)を指標にしてその変化を観測することにより構造変化を求めることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 皮膚角質層中の細胞間脂質が作る2つのラメラ構造(長周期ラメラ構造と短周期ラメラ構造)と2つの炭化水素鎖の充てん構造(六方晶と斜方晶)の間の関係を明らかにするために、皮膚角質の小角・広角 X 線回折の温度変化の測定を行う。細胞間脂質集合体は各種の相転移を示すため、回折像の温度変化の解析によりこれらの関係が同定できる。

(2) 次に溶液セルを用いて、皮膚角質のバリア機能を弱める典型的な化学物質の溶液を作用したときの構造変化の小角・広角 X 線回折実験・解析を行い、化学物質に応じてバリア機能が弱められたときの構造変化の特徴を明らかにする。われわれは一つの皮膚角質試料で化学物質を作用させる前と作用させた後の変化を追跡することにした。このための X 線回折実験用の液体セルを開発した。試料セルに皮膚角質試料を入れ、試料が動かないように保ちながら目的とする溶液を入れ、溶液で試料の周りを満たし、溶液中の化学物質が試料中に拡散し、その結果生ずる皮膚角質層中の細胞間脂質による X 線回折像の時間変化を観測することに成功した。構造の時間に対する変化分を検出するので、化学物質が作用して起こる微少な構造変化を高感度で検出することが可能になった。

4. 研究成果

(1) ヘアレスマウス角質の小角・広角 X 線回折の温度変化の測定を行った。その結果を図 1(a)および(b)に示す。強度変化の振舞を等

高線で示してある。赤線で示す等高線は強度が強く、黄色、緑色、青色を経て紫色に行くに従い強度が弱くなる。この実験とは別に行ったヘアレスマウス角層の示差走査熱測定により、32, 39, 51, 71 および 103°C に相転移点があることが分かった。さらに、56°C に熱異常が観測された。図 1(a) の小角領域の振舞では 20°C で 13.6 nm の長周期ラメラ構造の 1 次, 2 次, 3 次, 4 次および 5 次反射が観測された。後で説明するが短周期ラメラ構造の反射は弱く 51°C より高温側で観測されている

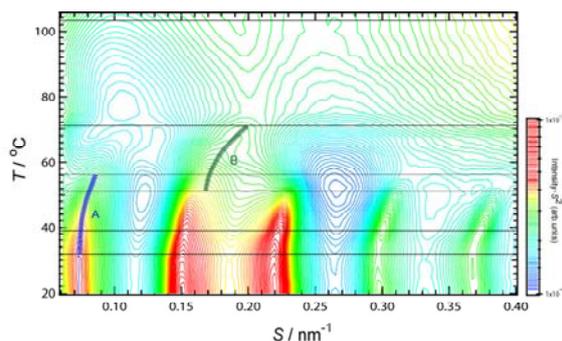


図 1(a) ヘアレスマウス皮膚角層の小角 X 線回折像の温度変化

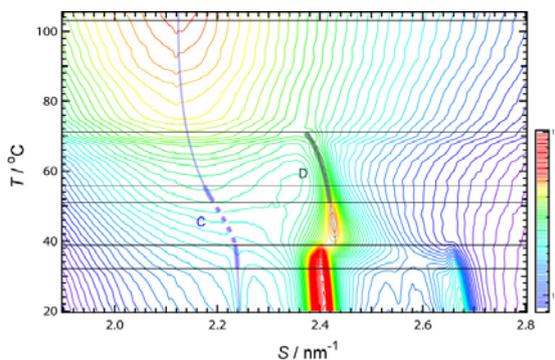


図 1(b) ヘアレスマウス皮膚角層の広角 X 線回折像の温度変化

る。上の相転移点は図 1(a) および (b) において、太い横線、細い横線 (56°C のみ) で示す。図から分かるように、熱測定で得られた相転移点で強度が変化している。X 線の回折強度だけからでは分からないような微妙な変化を捉えることが出来た。強度ピークが現れる温度領域から、強度ピーク B と D が同じ構造に依っており、強度ピーク A と C が同じ構造に依っていることが分かった。このことは改良臨界充てんパラメーターの概念を適用することにより、定量的にも証明された。この結果は、長周期ラメラ構造の炭化水素鎖の充てんは六方晶から成っており、短周期ラメラ構造の炭化水素鎖の充てんは斜方晶から成っ

ていることが明らかにされた。

(2) さらに、ヘアレスマウスおよびヒト角層試料に化学物質を角層に作用したときの細胞間脂質およびソフトケラチンの構造変化の解析をわれわれが発明した溶液セルを使って行った。この実験では、測定試料の周りを溶液で満たし、小角・広角 X 線回折像の時間変化の測定を可能にした。はじめにクロロホルム・メタノール混合液によって皮膚角層中の細胞間脂質の抽出過程における強度変化の測定を行った。その結果は図 2 に示すように広角領域で 0.42 nm (小角側のピーク) および 0.37 nm (広角側のピーク) のピーク

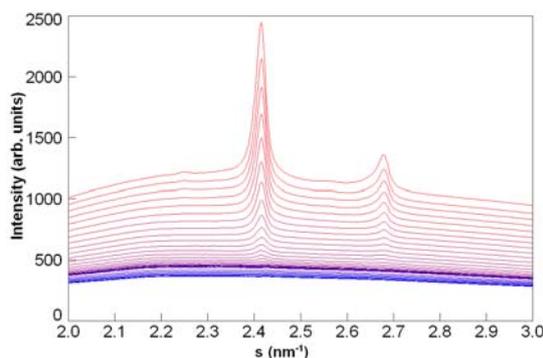


図 2 ヘアレスマウス皮膚角層にクロロホルム・メタノール混合液に作用したときの細胞間脂質の抽出過程の広角 X 線強度変化 (赤色のプロファイルから紫色のプロファイルへ変化している)

がともに減衰していることが分かる。小角側のラメラ反射のピークも同時に減衰していることが分かった。このように明らかに脂質の抽出により強度が減衰することに加えて強度のプロファイルの解析から抽出は端から次々に進行することが分かった。さらに、エタノールおよびリモネンを角層試料に作用させ、長周期ラメラ構造の反射と短周期ラメラ構造および炭化水素鎖の充填構造である六方晶と斜方晶の反射の時間変化を測定した。親水性のエタノールと疎水性のリモネンの細胞間脂質の構造への寄与は明白に異なることを明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① 八田一郎, 太田昇, 八木直人, 放射光を用いた皮膚角層の構造研究: 基礎から応用へ, 放射光 **21** (6) (2008) 297-304. 査読有.
- ② 八田一郎, ヘルスケア製品の機能評価, 機能材料 **28**(2)(2008)62-71. 査読無.

- ③ I. Hatta, N. Ohta and N. Yagi, Hydrophobic and Hydrophilic Domains in Outermost Layer of Skin that play Important Role in Barrier Function, SPring-8 Research Frontiers 2006, (2007) 45-46. 査読無
- ④ H. Nakazawa, I. Hatta, N. Ohta and S. Kato, Structural analysis of the skin stratum corneum by solution injection cell, Chem. Phys. Lipids **149S** (2007) S34-S34. 査読無.
- ⑤ 八田一郎, 太田昇, 中西加奈, 皮膚角層中の細胞間脂質集合体の構造と相転移, 熱測定 **34**(4)(2007)159-166. 査読有.
- ⑥ Y. Obata, I. Hatta, N. Ohta, N. Kunizawa, N. Yagi and K. Takayama, Combined effects of ethanol and L-menthol on hairless rat stratum corneum investigated by synchrotron X-ray diffraction, J. Controlled Release **115** (2006) 275-279. 査読有.
- ⑦ I. Hatta, N. Ohta, K. Inoue and N. Yagi, Coexistence of two domains in intercellular lipid matrix of stratum corneum, Biochim. Biophys. Acta **1758** (2006) 1830-1836. 査読有.
- ⑧ 太田昇, 八木直人, 八田一郎, マイクロビームX線を用いた毛髪キューティクル中の細胞膜複合体構造の解析, 放射光 **19**(2006) 364-370. 査読有.
- ⑨ N. Ohta, N. Yagi and I. Hatta, Structural Analysis of Cell Membrane Complex of Hair Fiber by Micro X-Ray Beam, SPring-8 Research Frontiers 2004, (2005) 28-29. 査読無. [学会発表] (計 15 件)
- ⑩ H. Nakazawa, I. Hatta, N. Ohta, F. Brée, HYDRATION AND LIPID LAMELLAR STRUCTURES IN HUMAN STRATUM CORNEUM, Skin and Formulation, 3rd Symposium & Skin Forum, 10th Annual Meeting Versailles, Mar. 9-10, 2009, Versailles, France
- ⑪ 八田一郎, 放射光を用いた皮膚角層の構造研究, 表面力セミナー, 2009年3月6日, 東北大学多元物質科学研究所, 仙台
- ⑫ I. Hatta, Structural Study on Intercellular Lipids and Corneocytes in Stratum Corneum, 9th Asian Society of Cosmetic Scientists Conference, March 2-4, 2009, Yokohama, Japan
- ⑬ 八田一郎, 生体を内外から守りバリアとして働く皮膚角層, 第4回生体分子システムの物理科学研究センター研究会, 2009年2月28日, 関西学院大学梅田キャンパス, 大阪
- ⑭ 八田一郎, 生体膜におけるコレステロールの役割, 次世代スパコン「ナノ統合拠点」連続研究会「膜, ミセル(ソフト複雑系の分子科学)」, 2009年2月10日, ホテル法華クラブ 京都
- ⑮ 八田一郎, 脂質膜におけるコレステロールの役割, 第16回 エレクトロニクス基礎研究所公開シンポジウム 原子・分子レベルでの材料創製とキャラクタリゼーション 「次世代ソフトマテリアルを考える」, 2008年12月12日, 大阪電気通信大学 エレクトロニクス基礎研究所, 大阪
- ⑯ I. Hatta, H. Nakazawa, Y. Obata, N. Ohta, K. Inoue, N. Yagi, Highly sensitive detection of characteristic structural changes of stratum corneum on applying ethanol and d-limonene, 第46回日本生物物理学会, 2008年12月3-5日, 福岡国際会議場
- ⑰ 八田一郎, 中沢 寛光, 小幡 誉子, 太田昇, 井上 勝晶, 八木 直人, 外部刺激に対する皮膚角層中の構造変化の評価II. エタノールおよびリモネン, 第61回コロイドおよび界面化学討論会, 2008年9月7-9日, 九州大学・六本松キャンパス, 福岡
- ⑱ I. Hatta and N. Ohta, Thermophysical Properties of Stratum Corneum of Mammalian Skin, 18th European Conference on Thermophysical Properties, August 31 - September 4, 2008, Univ. Pau, France
- ⑲ I. Hatta, H. Nakazawa, Y. Obata, N. Ohta, K. Inoue, N. Yagi, SAXD/WAXD study on structural change of intercellular lipid matrix in skin by applying chemicals, XXI Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography, August 23-31, 2008, Osaka, Japan
- ⑳ I. Hatta, N. Ohta, K. Inoue, N. Yagi, Temperature scanning small- and wide-angle X-ray diffraction study on stratum corneum, X-ray and Neutron Techniques for Nano-Structural Research, August 20-22, 2008, SPring-8, Japan
- ㉑ 八田一郎, 中沢 寛光, 小幡 誉子, 太田昇, 井上 勝晶, 八木 直人, 化学物質の作用による皮膚角層中の細胞間脂質および角層細胞の構造変化過程, 第33回日本化粧品学会, 2008年6月5-6日, ヤクルトホール, 東京
- ㉒ 八田一郎 皮膚・毛髪構造研究の基礎から応用へ, 第11回SPring-8シンポジウム, 2007年10月29-30日, SPring-8放射光普及棟大講堂, 兵庫
- ㉓ I. Hatta, H. Nakazawa, Y. Obata, N. Ohta, K. Inoue, N. Yagi, Highly sensitive detection of characteristic structural changes of stratum corneum after application of efficient chemicals, Gordon Research Conference on Barrier Function of Mammalian Skin, Aug. 5-10, 2007, Salve Regina University, USA
- ㉔ I. Hatta, Successive tracking of X-ray diffraction profile changes in a single stratum corneum sample by applying chemicals,

Symposium on “The Human Skin Barrier As a Biomembrane Model”, June 27-30, 2007, Wenner-Gren Center, Stockholm, Sweden

〔図書〕（計3件）

- ①八田一郎, 第23章 ヘルスケア製品の機能評価, 機能物質・材料開発と放射光—Spring-8の産業利用—, 編集:堀江一之, 古宮 聡, 高田昌樹 (シーエムシー出版, 2008) 279-292.
- ②八田一郎, 太田昇, 中西加奈, 第13章 皮膚角層のX線回折実験・評価のトラブルと対策, 現場レベルでの皮膚測定・評価〜トラブル事例・対策〜 (サイエンス&テクノロジー2007) 126-139.
- ③八田一郎, リポソーム膜の動的性質, 新しい分散・乳化の科学と応用技術の新展開 第Ⅲ編分散・乳化の新展開 第4章ベシクルの新展開 第1節, 監修古澤邦夫 (株式会社テクノシステム, 2006) 895-900.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

- ①名称: ビーム照射による軟質材料の構造解析方法およびそれに用いる軟質材料保持装置

発明者: 八田一郎, 涌井義一

権利者: 財団法人名古屋産業科学研究所

種類: 特許権

番号: 特願 2006-269164

出願日: 平成 18 年 9 月 4 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

八田 一郎 (HATTA ICHIRO)

財団法人高輝度光科学研究センター産業
利用推進室・コーディネーター

研究者番号: 70016070

(2)研究分担者

太田 昇 (OHTA NOBORU)

財団法人高輝度光科学研究センター利用
研究促進部門・研究員

研究者番号: 90353507

(3)連携研究者

なし