

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790805
 研究課題名（和文） 溶液環境制御セルを用いた皮膚角層細胞間脂質の構造解析
 研究課題名（英文） Structural analysis of the skin stratum corneum by solution injection cell
 研究代表者
 中沢 寛光（NAKAZAWA HIROMITSU）
 関西学院大学・理工学部・実験助手
 研究者番号：70411775

研究成果の概要：経皮吸収性の化粧品や医薬品を開発する上で、吸収する物質と、その透過経路に存在する角層細胞間脂質との相互作用を理解することは必要不可欠である。今回、当課題の研究協力者である八田一郎氏（高輝度光科学研究所 JASRI/SPring-8）らが開発した溶液環境制御セルを用いることで、経皮浸透過程における物質と角層細胞間脂質の相互作用をリアルタイムで観察することが可能となり、これを用いて有機溶媒の細胞間脂質溶出過程や、角層に対する水の吸着挙動を解析することに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	300,000	3,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：経皮吸収、皮膚、角層、細胞間脂質、化粧品、医薬品

1. 研究開始当初の背景

(1) 皮膚の最も重要な機能は、生体と外界とを隔離し生体の恒常性を維持することである。この機能を皮膚バリア機能と呼ぶが、近年の皮膚X線回折の発展により、バリア機能には皮膚角層の細胞間脂質の分子配列構造が重要であることが明らかになった。

(2) 経皮吸収性の医薬品や化粧品を開発する上で、バリア機能に重要な役割を果たす細胞間脂質の分子配列構造と製剤の相互作用を解析することは必要不可欠である。しかしながら、皮膚角層の構造には個体差や部位差が存在しており、このことが解析を難しくし

ていた。製剤塗布前後の角層の構造変化を解析するためには、試料のX線照射位置を保持しつつ、製剤を角層に塗布する必要があった。今回、当研究の研究協力者である八田一郎氏らがこれらの問題を解決しうる溶液環境制御セルを開発し、それを用いて種々の物質の経皮吸収挙動を解析することを試みた。

2. 研究の目的

(1) これまで経皮吸収に伴う角層構造変化のリアルタイム解析の報告例はなく、それゆえ、溶液環境制御セルを用いた実験系や解析手法をまず確立する必要がある。製剤がもた

らす角層の構造変化は微細であることが予測されるので、構造をドラスティックに変えうる有機溶媒を用いてデータを取得して解析手法の確立を目指す。

(2) 様々な物質の経皮吸収メカニズムを解明するためには、まず基剤として使用される物質の角層内挙動を解析しておく必要がある。そこでまず、化粧品や医薬品の基剤としてもっともよく使用される水に着目し、水分子の角層浸透動的挙動を明らかにすべく実験を行う。

3. 研究の方法

(1) ヘアレスマウスの角層を溶液環境制御セルに固定し、そこにX線を照射して回折像を取得、物質の浸透過程に伴う角層の構造変化を解析した。実験は高輝度光科学研究センター (SPring-8) のビームライン 40B2 に行った。角層細胞間脂質の側方配列構造とラメラ構造を同時に解析するため、カメラ長を 60cm 程度、X線の波長を 0.1nm に設定して実験を行った。検出器にはイメージングプレート (RAXIS-VII, Rigaku) を使用した。

(2) 溶液環境制御セルを用いることで、溶液注入後もサンプル位置が変化することなく、X線回折像を取得することが出来る。そこで、角層の構造変化を感度良く検出するため、X線散乱プロファイルの差分解析を行った。

4. 研究成果

(1) まず今回開発された溶液環境制御セルの概略図を図 1 に示す。セル中央にサンプルを固定し、内部に塗布溶液を注入してX線散乱像を取得する。



図 1 溶液環境制御セルの概略図

(2) ヘアレスマウス角層を溶液環境制御セルに固定し、クロロホルム-メタノール (2 : 1) 溶液をセル内に注入してX線回折像を取得したところ、散乱プロファイルの連続的な減衰が観察された (図 2)。図 2 は小角散乱の回折像を 1 周積算し、1 次元化して表示しており、溶液注入後の時間変化を赤色から青色へのプロファイル線の変化として表している。

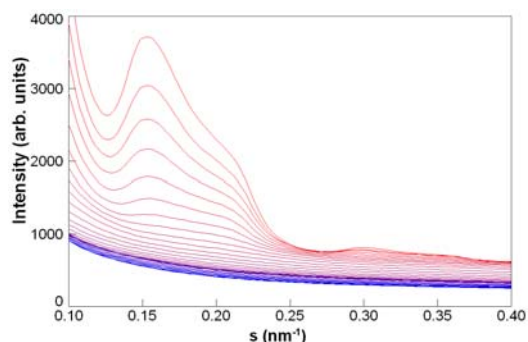


図 2 クロロホルム-メタノール溶液下においたヘアレスマウス角層の小角散乱プロファイル時間変化

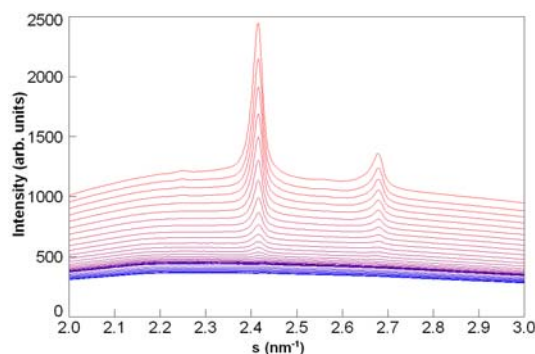


図 3 クロロホルム-メタノール溶液下においたヘアレスマウス角層の広角散乱プロファイル時間変化

図 2 において、S 値が 0.15 付近のピークは角層細胞間脂質のラメラ構造、図 3 において S 値が 2.4 付近のピークは角層細胞間脂質の側方配列構造由来のピークである。時間経過と共にピークが消失しており、細胞間脂質が溶出していることが確認できた。また、それぞれのピークの積分強度をモデル関数より算出し、減衰曲線を得たところ、細胞間脂質溶出の時定数はおおよそ 20 分程度であることがわかった。有機溶媒による細胞間脂質の溶出処理は、荒れ肌モデルとしてよく用いられるが、今回、初めてデータに基づく溶出時間が示された。

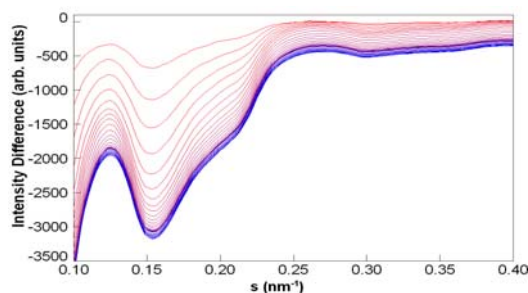


図 4 クロロホルム-メタノール溶液下においたヘアレスマウス角層の小角散乱差分プロファイルの時間変化

各散乱プロファイルから溶液注入前のプロファイルを差し引き、その差分をグラフ化することで、構造変化を感度良く検出することが可能となった(図4)。これは構造変化の幅が小さい場合には大変有効である。以下の実験ではこのような方法を用いて解析を行った。

(3) 次に水分子の角層内への浸透過程を、溶液環境制御セルを用いて解析した。図5は水の吸着過程に伴う細胞間脂質ラメラ構造の、図6は側方配列構造の差分プロファイルの時間変化を示している。図5より、水が角層内に浸透していく過程において、ラメラ構造の周期性が乱れていく様子が伺える。また図6より、ピークが小角側にシフトしていることが示唆され、細胞間脂質分子の炭化水素鎖の間隔が広がることがわかった。

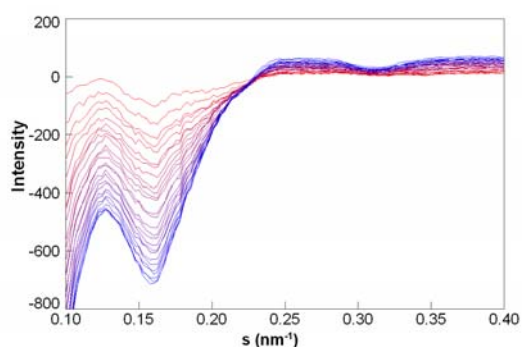


図5 水の吸着過程におけるヘアレスマウス角層の小角散乱差分プロファイルの時間変化

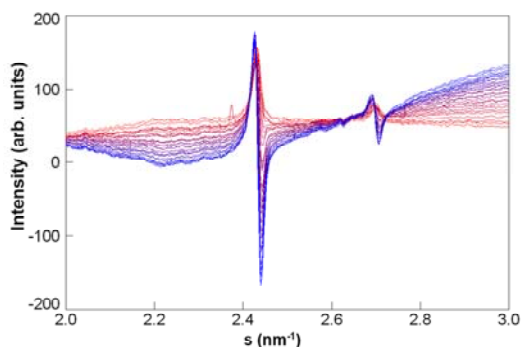


図6 水の吸着過程におけるヘアレスマウス角層の広角散乱差分プロファイルの時間変化

(4) 今後はさらに様々な製剤で解析を行い、それぞれの角層内での挙動をデータベース化することを検討している。このようにして作成したデータベースは、経皮吸収性の製剤の設計時に大いに役立つと期待される。

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 2 件)

① H. Nakazawa, A. Yamagishi, T. Imai, S. Sakai, S. Inoue, S. Kato, Study on regional differences of stratum corneum structure in human skin by electron diffraction, *Chemistry and Physics of Lipids*, 154(1) 27, 2008, 査読無し

② H. Nakazawa, I. Hatta, N. Ohta, S. Kato, Structural analysis of the skin stratum corneum by solution injection cell, *Chemistry and Physics of Lipids*, 149(1) 34, 2007, 査読無し

[学会発表] (計 11 件)

① 今井友裕、Mapping of the structural domains in the human skin stratum corneum by electron diffraction、第46回日本生物物理学会、2008年12月3日、福岡

② 中沢寛光、ヒト皮膚角層の構造に対する角層含有水分量の効果、コロイド及び界面化学討論会、2008年9月7日、福岡

③ 八田一郎、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日、東京

④ 八田一郎、皮膚角層に化学物質を作用させたときの構造変化過程、第63回日本物理学会、2008年3月24日、大阪

⑤ 中沢寛光、Structural analysis of skin stratum corneum using solution cell、2007A期 SPring-8 重点産業利用課題成果報告会、2008年2月29日、東京

⑥ 八田一郎、Highly sensitive detection of characteristic structural changes of stratum corneum after application of chemicals、第45回日本生物物理学会、2007年12月21日、横浜

⑦ 中沢寛光、Structural analysis of the skin stratum corneum by electron diffraction、第45回日本生物物理学会、2007年12月21日、横浜

⑧ 八田一郎、外部刺激に対する皮膚角層中の構造変化の評価、第60回コロイド及び界面化学討論会、2007年9月20日、長野

⑨ 中沢寛光、Structural analysis of the skin stratum corneum by solution injection cell、48th International Conference on the Bioscience of Lipids、2007年9月5日、フィンランド

⑩八田一郎、Successive tracking of x-ray diffraction profile changes in a single stratum corneum sample after addition of chemicals、Wenner-Gren Foundations International Symposium: The human skin barrier as a Biomembrane model、2007年6月28日、スウェーデン

⑪中沢寛光、溶液セルを用いた皮膚角層の構造変化過程の研究、第32回日本化粧品学会、2007年6月7日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中沢 寛光 (NAKAZAWA HIROMITSU)

関西学院大学・理工学部・実験助手

研究者番号：70411775

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者