

令和元年6月10日現在

機関番号：34504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K05253

研究課題名(和文) 皮膚角層の構造と溶液吸収特性の関係解明に関する研究-電場及び超音波の影響の解明-

研究課題名(英文) The cutaneous penetration studies of the human stratum corneum under an electric and ultrasound field using a new method.

研究代表者

中沢 寛光 (Nakazawa, Hiromitsu)

関西学院大学・理工学部・教育技術主事

研究者番号：70411775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々人体の最外層に位置する皮膚角層は、皮膚バリア機能に対して重要な役割を發揮する。角層は生体の恒常性の維持には必須の器官であるが、経皮吸収性の薬剤に対しては大きな障壁となるため、より吸収性に優れた経皮吸収薬の開発には、角層と薬剤の相互作用の解析が重要となる。本研究では、申請者が独自に開発した角層の構造と角層間を透過する物質を同時に計測することができる試料保持装置(特許出願番号：2012-071442)を使用し、角層内を透過する水の透過特性や、角層表裏に形成された電場などの外部刺激が角層内を透過する物質に与える影響を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚疾患に対する外用薬(塗り薬)やスキンケアなどの分野における薬剤、経皮吸収促進剤等の開発分野においては、薬剤と角層との相互作用や、それに対する非侵襲的な外部刺激の影響に関する情報が強く求められている。本研究により、実用的な経皮吸収性評価手法が確立され、角層の構造と機能の関係が明らかになれば、吸収性に優れた外用薬や化粧品の効率的な研究開発が期待される。また、アトピー性皮膚炎等の病変皮膚における構造変化やアレルゲンの吸収特性の解明にも寄与できる。

研究成果の概要(英文)：Stratum corneum (SC), the outermost layer of the human skin, plays a crucial role for the skin barrier. Because the SC also serves as a physicochemical barrier to percutaneous absorption of drugs, so in order to develop drugs with more effective absorption properties, it is important to clarify the interaction between the SC and drugs at the molecular level. In this study, by using the sample holder designed for the simultaneous analysis of the SC structure and skin permeation that the author developed alone, the behavior of water molecules in SC and the effect of external treatment such as electric field on the skin permeability were clarified.

研究分野：皮膚科学

キーワード：経皮吸収 角層 細胞間脂質 X線構造解析 ソフトマター バリア機能

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

皮膚の最も重要な役割は、体内に外界から異物が侵入するのを防ぐこと、いわゆる皮膚バリア機能を発揮することであり、それには皮膚の最表層に位置する“角層”が重要な役割を担うことが知られている。角層は主にケラチンを主成分とする“角質細胞”と、その周りを取り囲む“細胞間脂質”の領域から構成される。近年の放射光技術の発展により、角層内の細胞間脂質が高秩序化構造を形成していること[1]、さらにアトピー性皮膚炎などのバリア機能が低下した角層では、この高秩序化構造に乱れが生じていることなどが見い出されており[2]、徐々に細胞間脂質とバリア機能の関係性が明らかになりつつある。

一方でこの角層の高秩序化構造は、経皮吸収性の薬剤の体内への吸収に対しては大きな障壁となりうる。よって、より吸収性に優れた製剤を開発するためには、製剤と角層の相互作用を分子レベルで明らかにすることが重要になるが、角層のどの構造体が、どのような物質の吸収に対して、どのように影響するかという基本的な情報がほとんど得られていないのが現状である。

これまで申請者らは、角層の基礎特性を明らかにすべく、放射光 X 線回折法による角層内への溶液吸収を高感度に測定する手法を開発してきた[3, 4]。これらの実験では X 線の散乱強度を稼ぐため、多量の角層を圧縮して一つの塊にして実験に供していたが、最近、大型放射光施設 SPring-8 に高強度なビームライン (BL03XU) が設置され、シート状の角層 1 枚での構造解析が可能となった。そこで申請者は、入射 X 線に対して斜めに角層を保持し、試料の表裏の環境を自在に設定して X 線回折像を取得することができる試料セル (斜入射セル、特開: 2013-205077) を独自に開発し、これを用いて様々な実験を実施することを試みた[5]。

2. 研究の目的

本研究では、この試料セルの特長を活かして、角層の構造と角層間を通過する水の同時温度変化解析を実施し、さらに板状の電極を試料セル内に組み込むことで、経皮吸収促進効果が謳われるイオン導入やエレクトロポレーションと同様の環境を実現し、外部刺激による物質の浸透特性の変化を X 線回折法により評価した。これにより、角層の構造と機能 (バリア/吸収特性) の関係性に対する、外部刺激 (電場、超音波) の効果を明らかにすることを目指した。外部刺激下にある角層構造のリアルタイム解析は、申請者が知る限りこれまで実施された例はない。また、角層の構造やその温度特性には個体差や部位差が存在し、さらに温度処理によるヒステリシスもあるため、よって、これらの測定は同一試料で同時に実施されることが必要不可欠となる。

3. 研究の方法

(1) 角層試料は美容外科手術により生じた廃棄皮膚より角層だけを分離抽出したものを購入して用いた (Biopredic 社、フランス)。同社において、皮膚の摘出後に表皮層が剥離され、トリプシンなどの酵素処理で角層直下の細胞を分解した後、水洗して角層のみを精製している[4]。採取された皮膚を実験に用いることについて、被験者よりインフォームドコンセントが得られており、法令に基づいて皮膚が採取されていることなどが、同社において確認されている。さらに、関西学院大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究安全倫理審査委員会においても、当角層試料の実験使用が、問題ないことが承認されている。

(2) 開発した斜入射セルの概略図を図 1 に示した。角層のようなシート状の試料を入射 X 線に対して 45° 程度傾けて設置することで、試料の表裏の環境を自在に制御しつつ、同時に X 線回折等による構造解析が実施可能となった。また試料の支持台にペルチェ素子を連結することで、試料の温度変化解析にも対応させた。また試料の上下に板状の電極を組み込むことで、電場刺激下における角層の構造変化解析も可能にした。

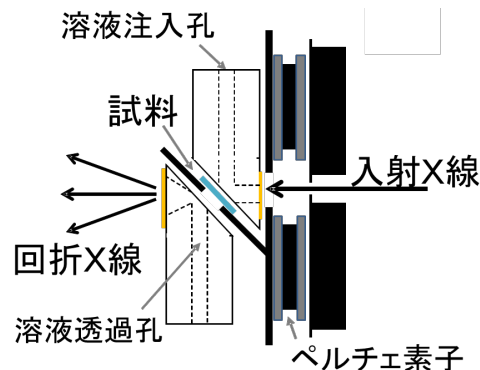


図 1. 斜入射セルの概略図

(3) 角層を自重に対して 25 wt% になるように水和し、試料セルの下部を水で満たして (体の内部環境を想定)、また上部に開放型の経皮水分蒸散量 (TEWL) 測定装置 Tewameter

(Courage+Khazaka 社, ドイツ) を接続し、TEWL と角層構造の同時温度変化解析を実施した。
 (4) 放射光 X 線回折実験は SPring-8 の BL03XU (第2ハッチ) で実施した。X 線のエネルギーを 15 keV、カメラ長を 50 cm 程度に設定し、小広角同時 X 線散乱実験を実施した。さらに補足的に SPring-8 BL40B2、KEK-PF BL6A でも実験を実施した。

4. 研究成果

まず、当試料セルに試料を設置し、セルの下層を水で満たし、さらにセルの上部に TEWA 装置を接続して、試料の温度を連続的に変化させながら水分蒸散量を測定したところ、温度上昇とともに水分蒸散量が増加していく様子が確認された。さらにこの水分蒸散量の温度変化曲線は、試料を濾紙にした場合は直線的に増加するが、角層にした場合は非線形的に変化することが分かり、当試料セルによる水分蒸散量の測定が有効であることが確認された。

次に角層の構造と水分蒸散量の関係性を明らかにするため、上記のような水分蒸散量の測定と放射光 X 線による構造解析を同時に実施したところ、角層細胞間脂質の相転移温度付近で、水分蒸散量に擾乱が生じる様子が観察された(図2)。図2の上図では角層細胞間脂質の側方配列周期をプロット点(○、●、*)で、水分蒸散量を実線で、さらに下図は水分蒸散量の微分値を、それぞれ横軸を温度として示したが、まず 40 手前で生じる細胞間脂質のオーソロンビク構造からヘキサゴナル構造への相転移温度付近で TEWL 値に小さなピークが生じることが確認された。さらに高温のヘキサゴナル構造へと転移する 50 付近から TEWL 値の微分曲線が折れ曲がるのがわかり、細胞間脂質の相や相転移が水分蒸散に影響していることが示唆された。

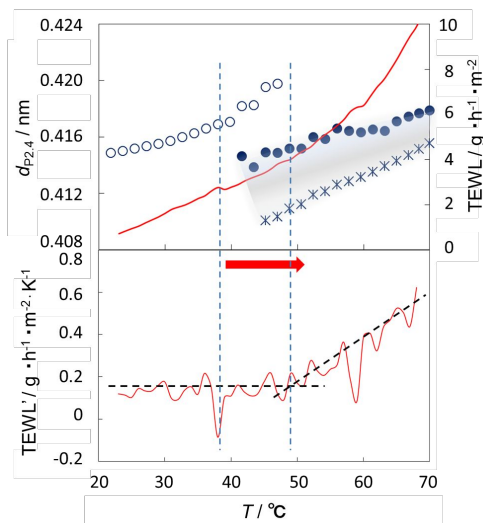


図2. 角層の構造と水分蒸散量 (TEWL) の同時解析

また角層試料間に電極を設置し、角層に浸透性の物質を塗布して、電場のありなしで角層の構造変化の様子を解析したところ、物質の浸透性を示す角層構造の変化の時定数が、電場のありなしで変化することも分かった。溶液塗布の実験には、その塗布量や保持性を厳密にコントロールする難しさが伴うものの、当試料セルにより電場の経皮吸収促進効果解析が可能であることが示された。今後はこれらの点について試料保持装置を改良し、電場の形状や印加の方法、周波数などが経皮吸収促進作用にどのように影響するのかを詳細に解析していく予定である。

< 引用文献 >

- [1] Bouwstra J. A. et al. (1991) *J Invest. Dermatol* 97(6), 1005-1012.
- [2] Pilgram G. S. K. et al. (2001) *J. Invest Dermatol* 117, 710-717.
- [3] Hatta I., Nakazawa H. et al. (2010) *Chem Phys Lipids* 163 (4-5) 381-389.
- [4] Nakazawa H. et al. (2012) *Chem Phys Lipids* 165 238-243.
- [5] Nakazawa H. et al. (2019) *Polymers* 11(5), 829.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

1. H. Nakazawa, T. Imai, M. Suzuki, N. Akakabe, I. Hatta, Simultaneous measurements of structure and water permeability in an isolated human skin stratum corneum sheet. *Polymers* 査読あり, 11 (5), 2019, 829.
2. I. Hatta, N. Ohta, H. Nakazawa, A possible percutaneous penetration pathway that should be considered. *Pharmaceutics* 査読あり, 9 (3), 2017, 26-34.

3. Y. Nakagawa, H. Nakazawa, S. Kato, Effect of solvent dielectric constant on the formation of large flat bilayer stacks in a Lecithin/hexadecanol hydrogel. *Langmuir*. 査読あり, 32, 2016, 6806-6814.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. N. Akakabe, H. Nakazawa, T. Uchida, T. Sano, S. Kato, Development and analysis of model lipid membrane designed for the examination of skin barrier. The 30th Conference of the European Colloid and Interface Society, 2018.

2. 中沢 寛光, 赤下部奈月, 加藤知, ヒト角層モデル膜の開発と経皮吸収試験への応用. SPring-8 フロンティアソフトマター開発専用ビームライン第8回研究発表会, 2018.

3. N. Akakabe, H. Nakazawa, Development of model lipid membranes based on non-hydroxy phytosphingosine for the studies of skin barrier properties. The 29th Conference of the European Colloid and Interface Society, 2017.

4. 赤下部 奈月, 中沢 寛光, 角層細胞間脂質モデル膜を用いたセラミド分子種の特性解析. 日本薬学会第137年回, 2017.

5. 中沢 寛光, 外部環境制御セルを用いたヒト皮膚角層の物質透過性の解析. 第7回化粧品開発アカデミックフォーラム, 2017.

6. Y. Nakagawa, H. Nakazawa, S. Kato, The effect of solvent on the hydrogel composed of a hydrogenated lecithin and fatty alcohol. The 28th Conference of the European Colloid and Interface Society, 2016.

7. S. Maeda, H. Nakazawa, S. Kato, Effect of external factors on the human skin corneocyte morphology. The 28th Conference of the European Colloid and Interface Society, 2016.

8. I. Hatta, H. Nakazawa, N. Ohta, Regulation Mechanism of Water Content in Stratum Corneum - Skin Forum 15th Annual Meeting, 2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 敏感肌の評価方法

発明者: 内田 崇志、中沢 寛光、加藤 知

権利者: 花王株式会社

種類: 特許

番号: 特開 2017-161328(P2017-161328A)

出願年: 2016

国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。