

皮膚角層構造の最近の研究から

名古屋産業科学研究所 八田一郎

1. 皮膚角層試料の測定法

放射光 X 線を用いた実験の特徴にはいろいろとあるが、時間変化する構造を検出すること、微量試料での実験が行えることは優れた点である。とくに生体試料の場合には微量な試料しか得られなく、輝度の強い X 線ビームでの測定は重要である（勿論、放射線損傷に対する注意は必要であるが）。また、生体試料に外部から各種の（有用な）刺激が与えられたときの構造の逐次変化の観測により有益な情報を得ることができる。

ここでは皮膚角層の小角広角 X 線散乱実験を取り上げて、具体的な説明を行う。図 1 の説明に示すように、われわれが開発したいわゆる“溶液セル”は上で挙げた 2 つの要件を満たす測定法である。説明文でも詳しく述べたが、皮膚角層試料に溶液を作用した後の皮膚角層の X 線回折像（13.5 nm の周期の長周期ラメラ構造の反射、約 6 nm の周期の短周期ラメラ構造の反射、約 1 nm のブロードなピークを持つソフトケラチン由来の反射、0.42 nm および 0.37 nm の格子定数の炭化水素鎖の充てん構造の反射）の時間変化を高時間分解能で観測できる。例えば、3 min 周期、露光時間 30 sec で測定を行うことができる。試料については、生体から取ったものには個体差があり、それを如何に克服するかが大きな課題である。医学の分野では n 数が指標である。X 線散乱実験では測定時間の問題から n 数で問題解決する訳にはいかない。せいぜい n は 2~3、多くて 5 程度である。溶液セルを用いる方法によればこの問題をある程度解決できる。仮に反射の中に弱い反射があっても溶液セルを用いた実験ではそれらの反射の変化は検出できる。個体差により反射強度が強くても、弱くても回折強度の変化は同様な振舞をするはずで、反射 X 線が観測されれば目的とする反射強度の変化を追跡できる。

以下、2 章では皮膚角層のバリア機能について簡単に触れる。3 章では角層の構造と構成成分をまとめてある。4 章では溶液セルを用いて角層を測定した実験例を示す。5 章では放射光 X 線を使って測定した長周期ラメラ構造と短周期ラメラ構造の水分量依存性を示す。また、全体の内容は文献 A から G に挙げる最近の論文によるものである。

2. 皮膚角層のバリア機能

2. 1. 皮膚角層は体外から体内への物質の浸入を防ぐ働きをする。ただし、500 Da 則として知られているように、500 Da より小さい脂溶性分子は角層中に浸入する。この機構については X 線散乱実験の解析に基づき提案された（文献 B, C 参照）。ま

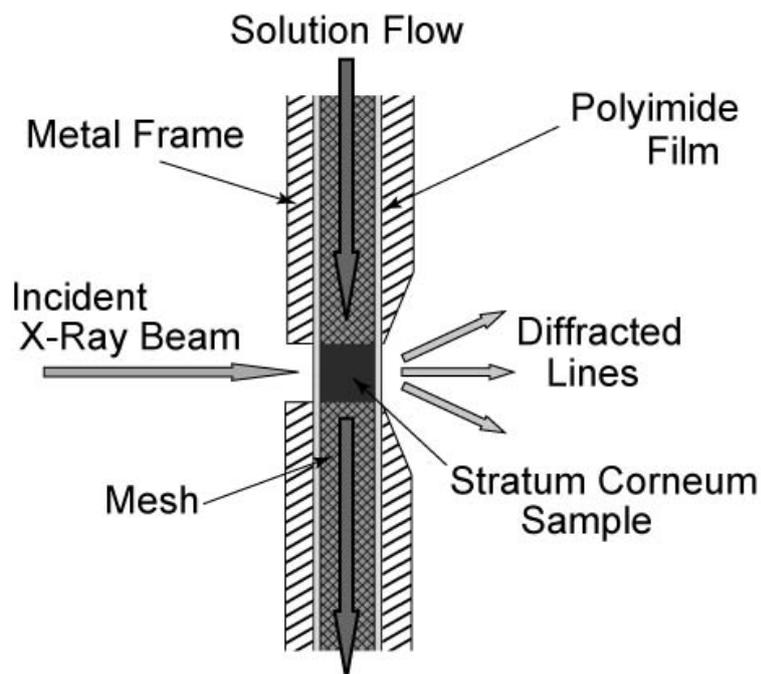


図1 溶液セル 皮膚角層試料 (Stratum Corneum Sample) に化粧品や薬剤の溶液を流した (Solution Flow) ときの X 線散乱測定を行う。図では左側から入った入射 X 線 ビーム (Incident X-Ray Beam) が試料を照射し、試料による回折線 (Diffracted Lines) が散乱される。溶液セルの窓はポリイミド膜 (Polyimide Film) から成っており、皮膚角層からの特徴的な散乱を妨げない。試料セル全体は金属枠 (Metal Frame) で支えられており、試料の周りはガラス繊維から成るメッシュ (Mesh) で取り囲まれている。これはガラス繊維から成るメッシュである。このメッシュは溶液中で試料が動かないように保持しており、かつ散乱 X 線に影響を与えない (文献 1)。われわれはメッシュとして $2 \mu\text{m}$ のガラス紙を用いているので、 $2 \mu\text{m}$ より大きな試料を保持することが可能である。

た、水は体外から体内に向けて浸入するが、通常的环境下におくと、短時間で定常状態に戻る。

2. 2. 体内から体外への水の異常な蒸発を防ぐ働きをする。水は皮膚表面から絶えず蒸散しており、定常状態にある。定常状態では、皮膚表面の水分量は一定 ($\sim 25\text{wt}\%$) に保たれている (4章参照, 文献 A, B 参照)。

3. 角層の構造と構成成分

3. 1. レンガ・モルタル・モデル

皮膚表面には厚さ約 $20\mu\text{m}$ の角層がある。角層がバリア機能を持っており、その構造はレンガ・モルタル・モデルにより表されることが多い。レンガに相当するところが角層細胞であり、モルタルに相当するところが細胞間脂質である（下図参照）。

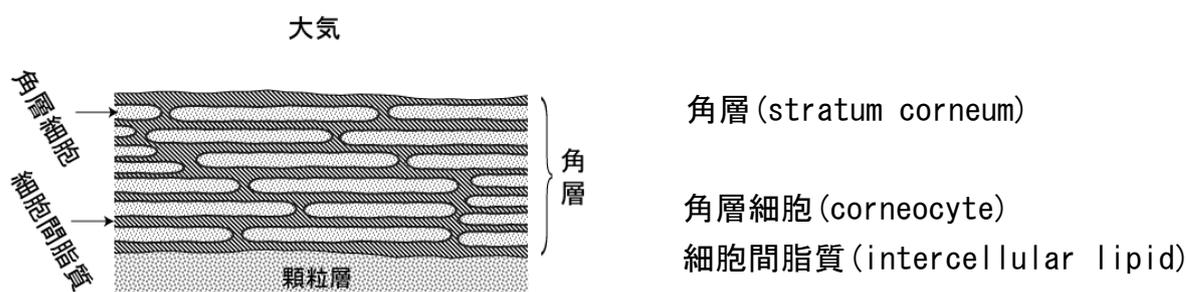


図2 角層をレンガ（角層細胞）およびモルタル（細胞間脂質）で表したモデル

3. 2. 細胞間脂質の成分

主としてセラミド、遊離脂肪酸、コレステロール（1:1:1）から成っている。セラミドは3種類の脂肪酸と4種類のスフィンゴシンで構成されており、12のサブクラスからなると言われている：脂肪酸の炭素数は広く分布しており、スフィンゴシンの炭化水素鎖も18から22まで広く分布しており、現段階では342種のセラミドが報告されている。遊離脂肪酸には炭素数が広く16から26の飽和脂肪酸が含まれており、不飽和脂肪酸も含まれている。多くを占めるコレステロールは炭化水素鎖とは非常に異なる構造をしている。にもかかわらず、これらにより形成される細胞間脂質集合体では以下に述べる規則構造が現われることが不思議であり、このことが機能発現において重要な役割を果たしているに違いない。

3. 3. 脂質がつくる構造：ラメラ構造

長周期ラメラ構造 (LLS)、短周期ラメラ構造 (SLS)、液体状態がある。

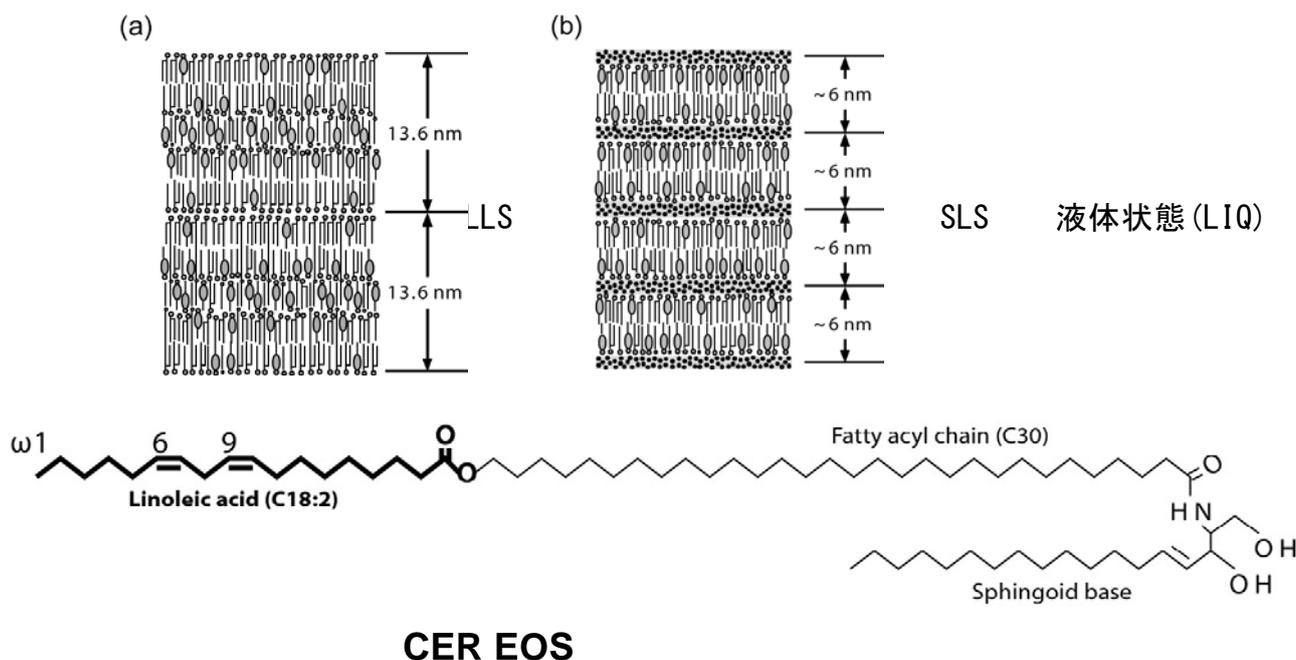
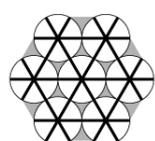


図3 上に示す分子配列の模式図はセラミド，脂肪酸，コレステロール分子を並べて描いてある．とくに下に示す長いセラミド CER EOS 分子は長周期ラメラ構造 (LLS) の形成にとって必須の分子であり，6.1 節で述べるように多くの皮膚の疾患に関わっている．短周期ラメラ構造中には水層がある (4章参照)．

3. 4. 細胞間脂質がつくる構造：炭化水素鎖の充てん構造

六方晶 (HEX)，直方晶 (ORT)，液体状態 (LIQ)



0.42nm × 3

Hexagonal



0.42nm × 2

0.37nm × 1

Orthorhombic

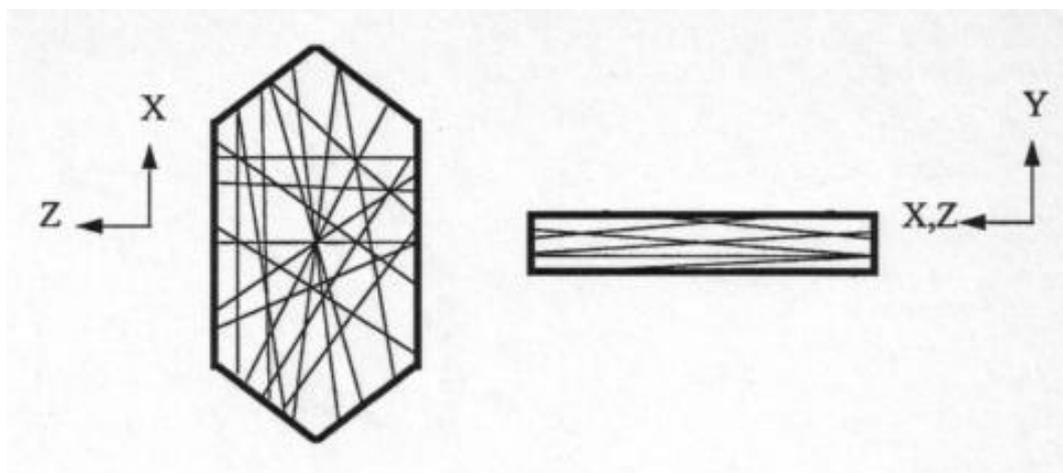
液体状態 (LIQ)

~0.46 nm

Liquid (LIQ)

図4 多量のコレステロール分子は液体状態中にあると考えられる (文献C参照)．このことは経皮吸収を考える際に考慮しなければならない．

3. 5. 角層細胞中のソフトケラチンがつくる構造.



角層細胞（ほぼ六角形板状）中にソフトケラチン（ファイバー），
NMF（アミノ酸など）がある。

図5 角層細胞の上面図および側面図

ソフトケラチン由来の構造としては ~ 1 nm, ~ 0.46 nmの大きさのものがある。前者は α ヘリックス鎖由来，後者は α ヘリックスのヘリックス周期由来の構造である。角層中の結合水はDSCにより測定により ~ 25 wt%であるが，そのほとんどは角層細胞中に存在し，わずかな水が短周期ラメラ構造の水層に浸み出している。角層細胞中に存在する水は水分保持の役割を果たしており，短周期ラメラ構造の水層は角層中の水分量制御の役割を果たしていると考えられる（文献A, B参照）。

4. 溶液セルを用いて測定した小角広角X線散乱像の例

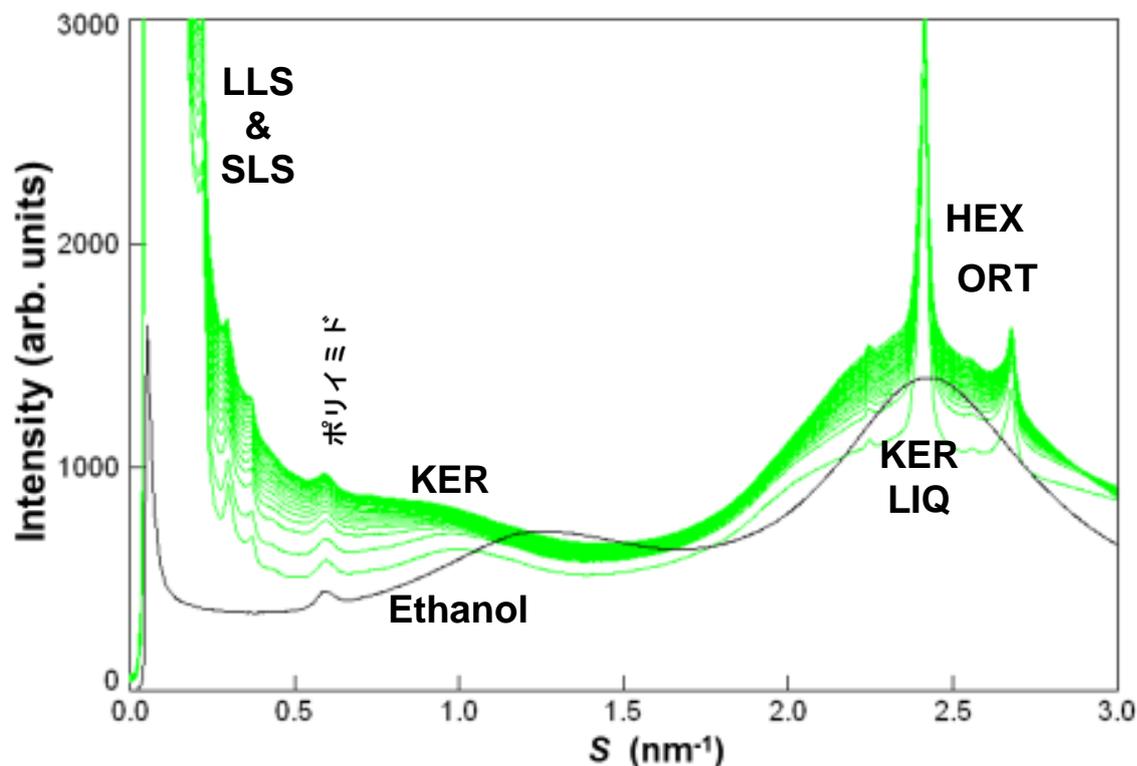


図6 エタノールを作用したときのヘアレスマウス角層における変化 ($q = 2\pi S$) (文献1参照). エタノールの散乱像を黒い曲線で描いてある. 角層の構造の変化を解析することにより, エタノールの角層への作用の仕方がわかる. 角層の散乱像の変化から分かるように溶液セルを用いることにより非常に微細な変化を検出することが出来る (文献D, E, F参照).

基本的には哺乳類の皮膚角層の構造はほぼ同等である. エタノールを作用するとヘアレスマウス角層の小角広角X線散乱像は図の緑の曲線の下方から上方へと変化する (文献1参照). 長周期ラメラ構造 (LLS), 短周期ラメラ構造 (SLS), 六方晶 (HEX), 直方晶 (ORT) のピークおよびブロードな液体状態 (LIQ), ソフトケラチン由来 (KER) のピークが観測される. 併せて, 作用したエタノールの散乱像が載せてある. 装置のポリイミド膜窓の散乱も重畳して現れ, 小角領域ではビームストッパーにより散乱X線が遮蔽されている.

5. 長周期ラメラ構造 (LLS) および短周期ラメラ構造 (SLS) の水分量依存性

(文献 A, B 参照)

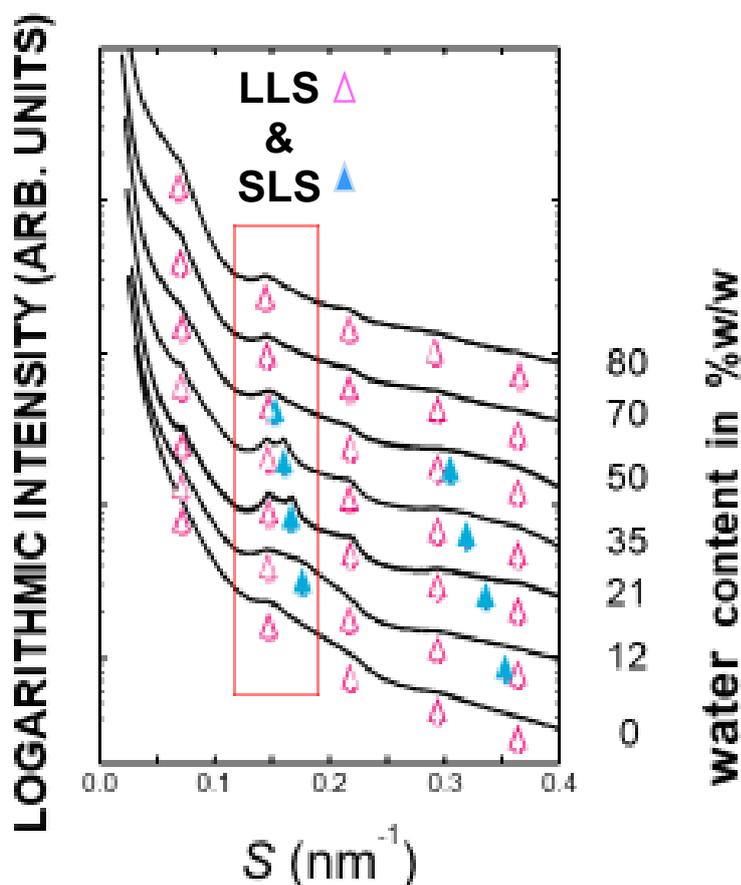


図6 ヘアレスマウス角層のX線散乱像の水分量依存性を示す。これは水分量の増加とともに小角領域の散乱像の変化の様子を示す。赤四角枠で囲んだ中には長周期ラメラ構造 (LLS) の2次反射 (赤白抜き矢印) および短周期ラメラ構造 (SLS) の1次反射 (青矢印) があり、それらの水分量変化が明瞭に観測された。水分量の増加とともに SLS の回折ピークは小角側に移動する。すなわち、SLS の周期は水分量の増加とともに長くなる。これは SLS には水層が存在し、水層に水分子が入り膨潤していることを示唆する。一方 LLS の周期は水分量に依らない。また、LLS と SLS の回折ピークは水分量 \sim 25wt%でともに鋭くなる。これらは水分量 \sim 25wt%で構造が安定化することを示唆する。同等の観測はヒト角層で行われているが、これほど明瞭な SLS および LLS のX線散乱像を得ることが出来ていない。動物の実験では角層の個体差 および部位差の問題があるので、このような問題を避けて通ることはできない (文献 A, B, H を参照)。

6. 最近の研究から(要点のみを箇条書きで示す) :

6. 1. 損傷した長周期ラメラ構造とその損傷と修復 (文献 : D, E, G 参照)

- ・ アトピー性皮膚, 乾燥肌, 冬季の肌ではセラミド EOS が不足.
- ・ 長周期ラメラ構造に損傷.
- ・ 乱れた長周期ラメラ構造の修復.

6. 2. ナノパーティクルの角層表面での振舞と薬剤の浸透 (文献 : F, H, I 参照)

- ・ リポソーム等を用いたドラッグデリバリの機構.
- ・ 皮膚表面における脂質の振舞.

6. 3. 秩序構造・無秩序構造とそれぞれの役割 (文献 : A, B, C 参照)

- ・ 秩序構造は皮膚バリア機能において重要な役割を果たしている.
- ・ 一方, 炭化水素鎖の充てん構造の中, 約 80%(Doucet et al.), 50%以上(Hatta et al.) が液体状態にある.
- ・ 乱れた構造は角層の弾力性, 経皮吸収などで重要な役割を果たしている.

文献

1. I. Hatta, H. Nakazawa, Y. Obata, N. Ohta, K. Inoue, N. Yagi, Novel method to observe subtle structural modulation of stratum corneum on applying chemical agents, *Chem. Phys. Lipids* **163**(2010)381-389.
- A. 八田一郎, 放射光を用いた角層の構造研究, *薬剤学* **78**(2018)18-24.
- B. 八田一郎: 第2章「分子レベルの構造情報に基づく角層のバリア機能の解明」(坂本一民・山下裕司編『化粧品科学へのいざない』シリーズ第3巻肌/皮膚, 毛髪と化粧品科学, 2018, 薬事日報)
- C. I. Hatta, N. Ohta, H. Nakazawa, A Possible Percutaneous Penetration Pathway That Should Be Considered, *Pharmaceutics* **9** (2017) 26, 1-9.
- D. K. Yanase, I. Hatta, Disruption of human stratum corneum lipid structure by sodium dodecyl sulfate, *Intern. J. Cosmet. Sci.* **40**(2018)44-49.
- E. K. Yanase, I. Hatta, Disruption of human stratum corneum lipid structure by sodium dodecyl sulfate, *SPRING-8 Res. Frontiers* 2017(2018)90-91.
- F. T. Fushimi, T. Uchino, Y. Miyazaki, I. Hatta, M. Asano, H. Fujino, R. Suzuki,

- S. Fujimori, D. Kamiya, Y. Kagawa, Development of phospholipid nanoparticles encapsulating 3-O-cetylascorbic acid and tocopherol acetate (TA-Cassome) for improving their skin accumulation, *Int. J. Pharm.* **548**(2018)192–205.
- G. A. Nakaune-Iijima, A. Sugishima, G. Omura, H. Kitaoka, T. Tashiro, S. Kageyama, I. Hatta, Topical treatments with acylceramide dispersions restored stratum corneum lipid lamellar structures in a reconstructed human epidermis model, *Chem. Phys. Lipids* **215**(2018)56–62.
- H. T. Suzuki, T. Uchino, I. Hatta, Y. Miyazaki, S. Kato, K. Sasaki, Y. Kagawa, Evaluation of the molecular lipid organization in millimeter sized stratum corneum by synchrotron X-ray diffraction, *Skin Res. Tech.* **24**(2018)621–629.
- I. T. Uchino, S. Kato, I. Hatta, Y. Miyazaki, T. Suzuki, K. Sasaki, Y. Kagawa, Study on the drug permeation mechanism from flurbiprofen-loaded glyceryl monooleyl ether-based lyotropic liquid crystalline nanoparticles across the skin: Synchrotron X-ray diffraction and confocal laser scanning microscopy study, *International Journal of Pharmaceutics* **555**(2019) 259-269.