

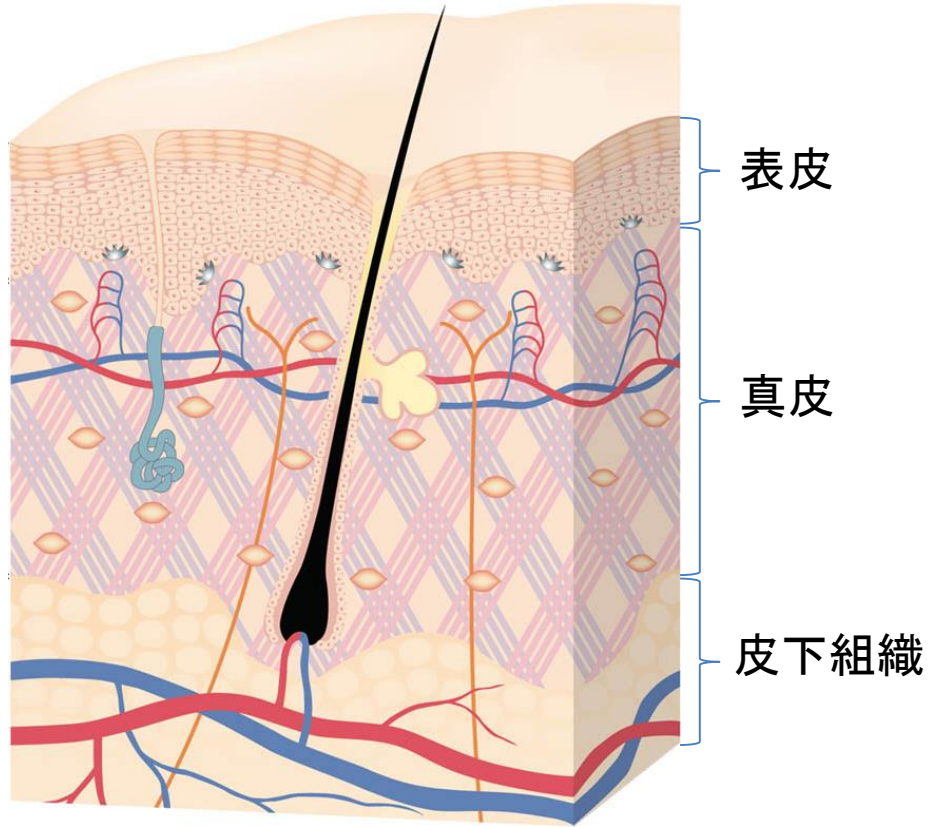
成果公開無償利用事業(2018)

X線散乱を用いた皮膚真皮構造の評価

○足立 浩章、奥野 凌輔、田中 浩、長谷川 靖司、中田 悟

日本メナード化粧品株式会社
総合研究所

皮膚



体表を覆う器官

成人 約 1.6 m^2

「人体最大の器官」とも言われる

表皮 $0.1 \sim 0.3 \text{ mm}$

真皮 $1 \sim 3 \text{ mm}$

人体において最も外側の防壁

～ 様々な刺激から

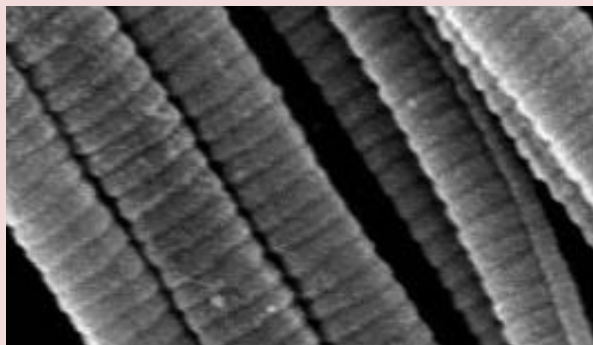
体内を守るバリア～

皮膚におけるX線散乱測定の利用

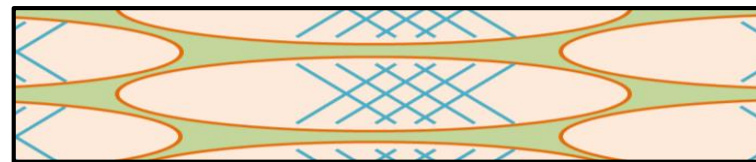
※ 毛髪 … ケラチン

角質細胞 (内部にケラチン線維)

コラーゲン線維

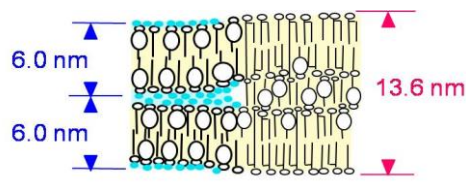
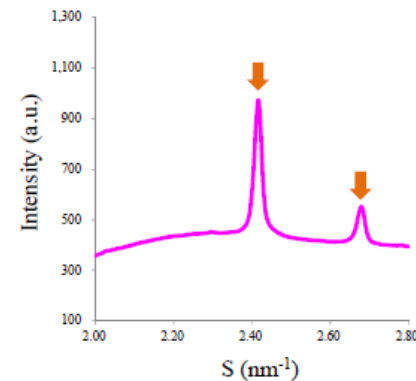
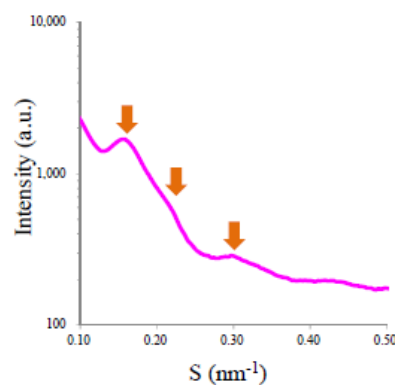


T. W. Herod et. al., Acta Biomater.
2016 Sep 15;42:296-307.より引用

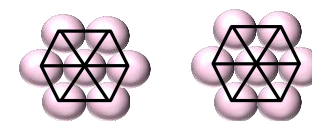


細胞間脂質

細胞間脂質

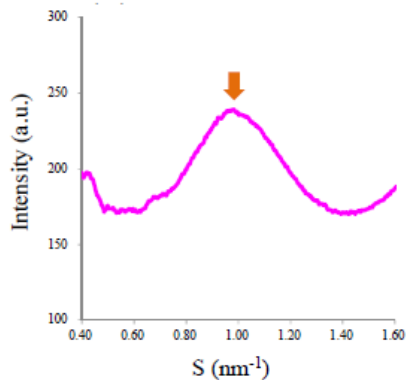


ラメラ構造



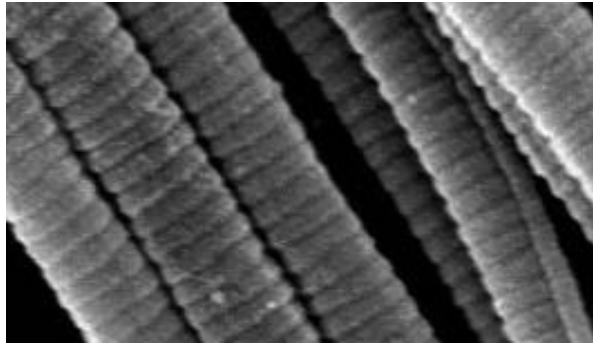
充填構造

ケラチン

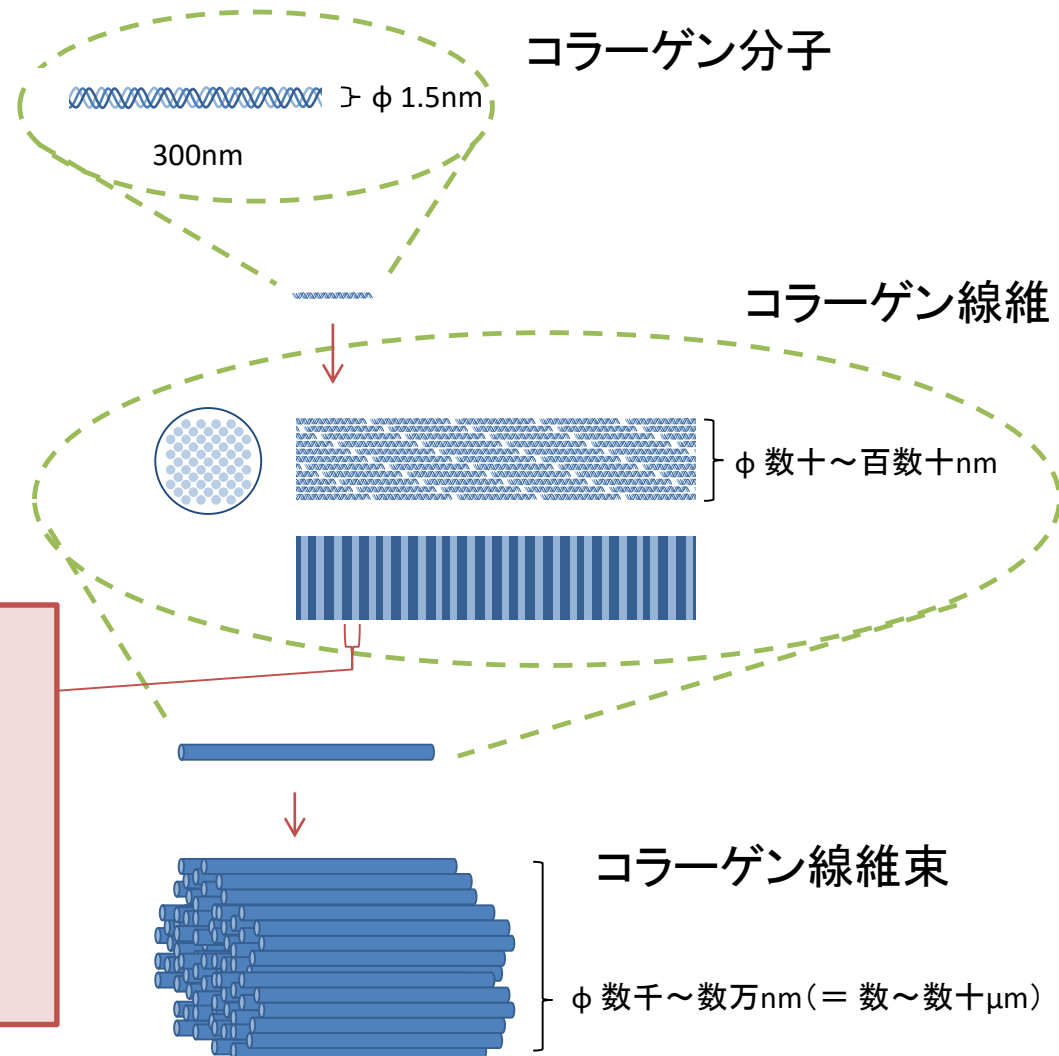


コラーゲン

主に脊椎動物の真皮、靱帯、腱、骨、軟骨などを構成するタンパク質の1つ
ヒトでは、全タンパク質のほぼ30%を占める



T. W. Herod et. al., Acta Biomater.
2016 Sep 15;42:296-307.より引用



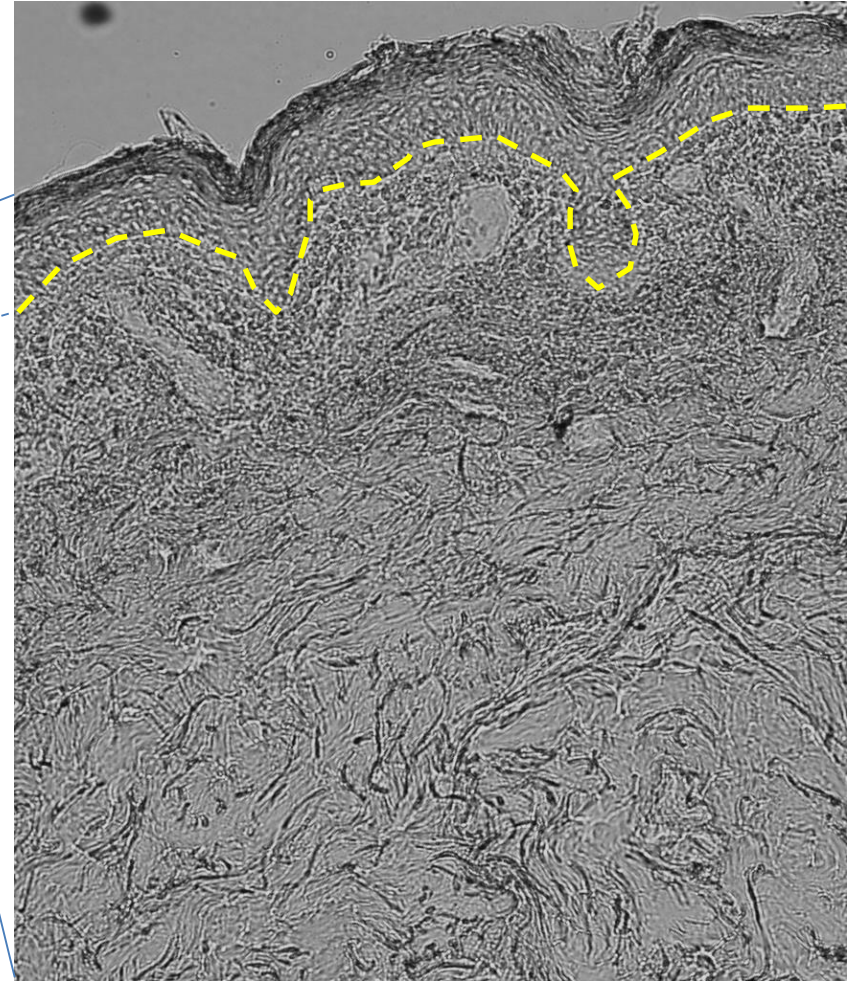
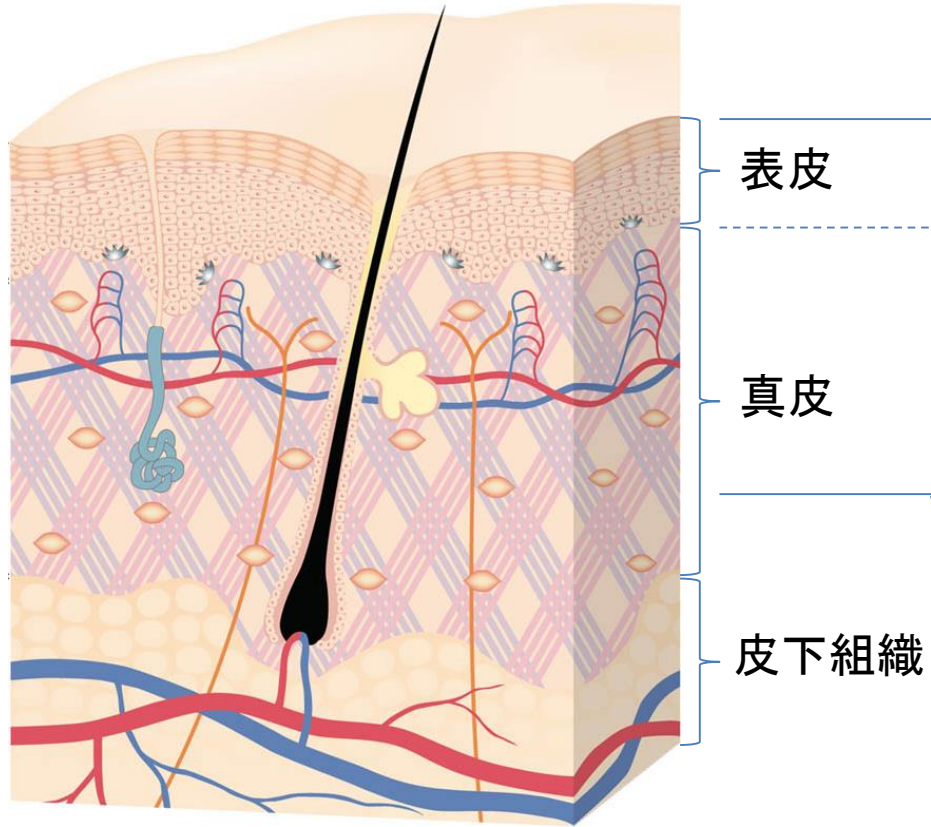
乾燥時「65 nm」、湿潤時「67 nm」の
周期性を持った構造を有する

X線散乱測定

カメラ長の校正にも利用

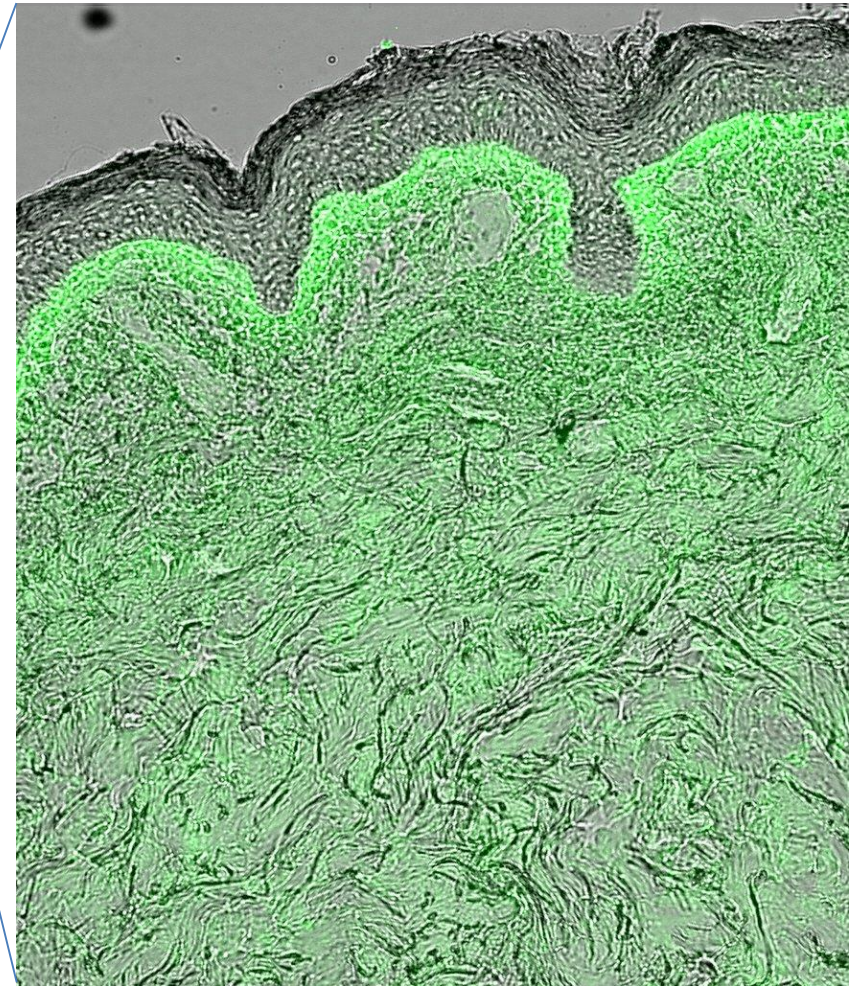
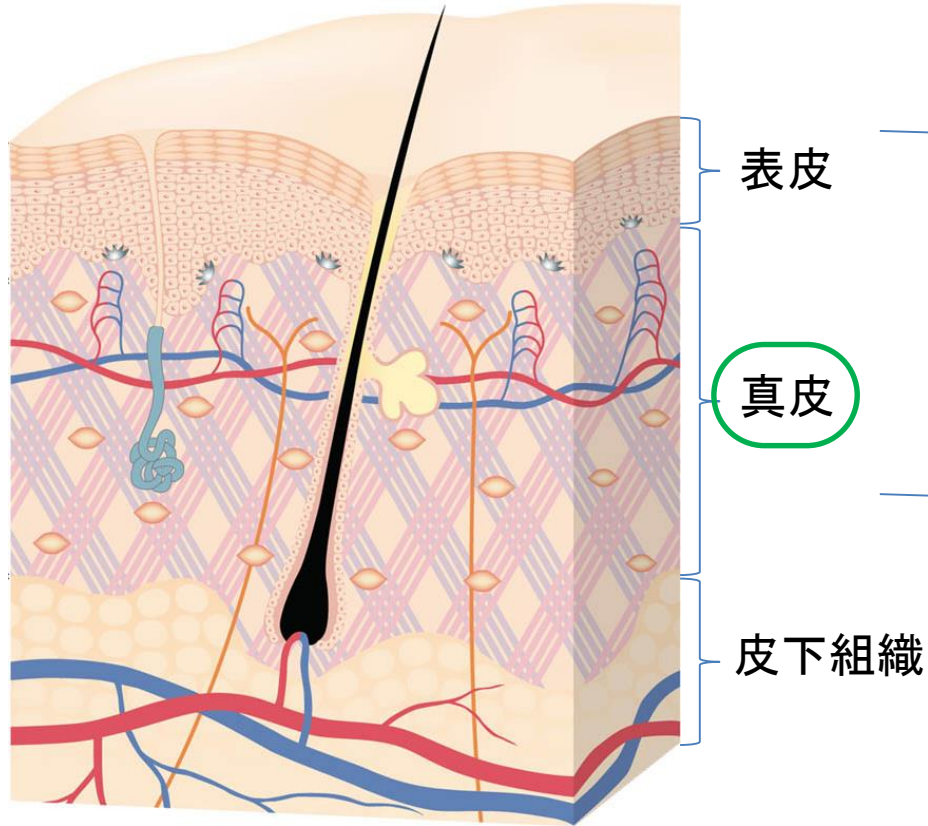
皮膚におけるコラーゲン

皮膚組織の縦断面



皮膚におけるコラーゲン

皮膚組織中のコラーゲンの局在

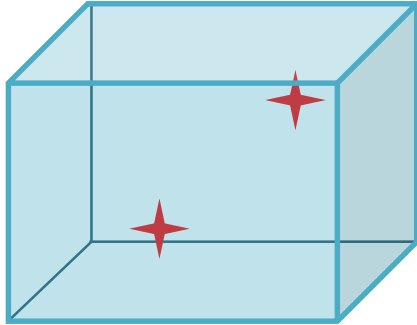


緑色:タイプ I コラーゲン

「コラーゲン」 真皮乾燥重量の約 70% を占める

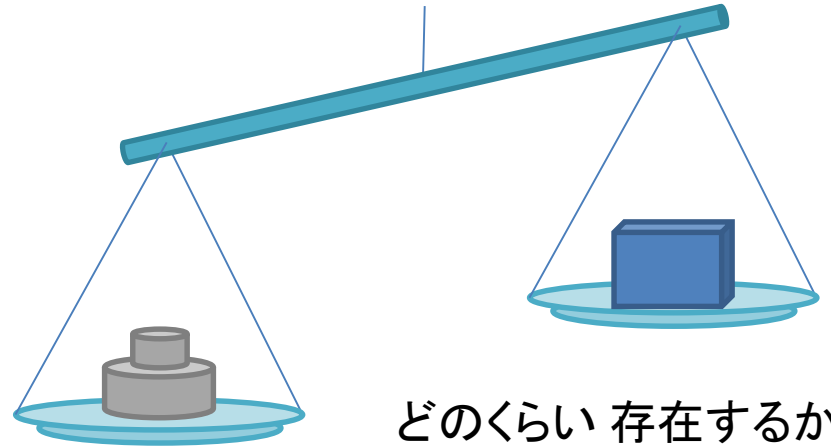
コーゲンの評価

= 位置・局在 =



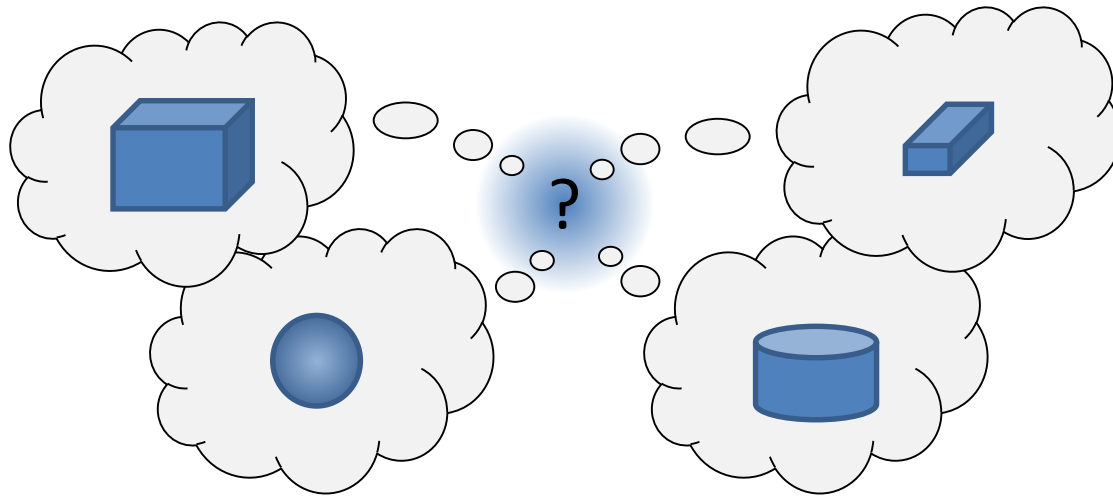
どこに存在するか？

= 量 =



どのくらい存在するか？

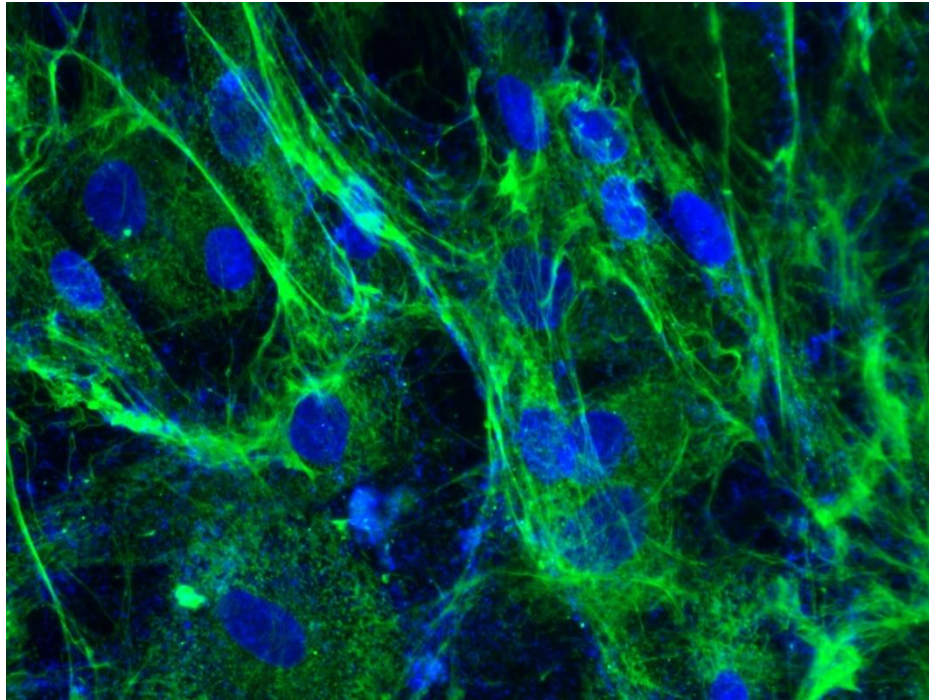
= 構造 =



どのような形をしているか？

コラーゲンの評価 = 位置・局在 =

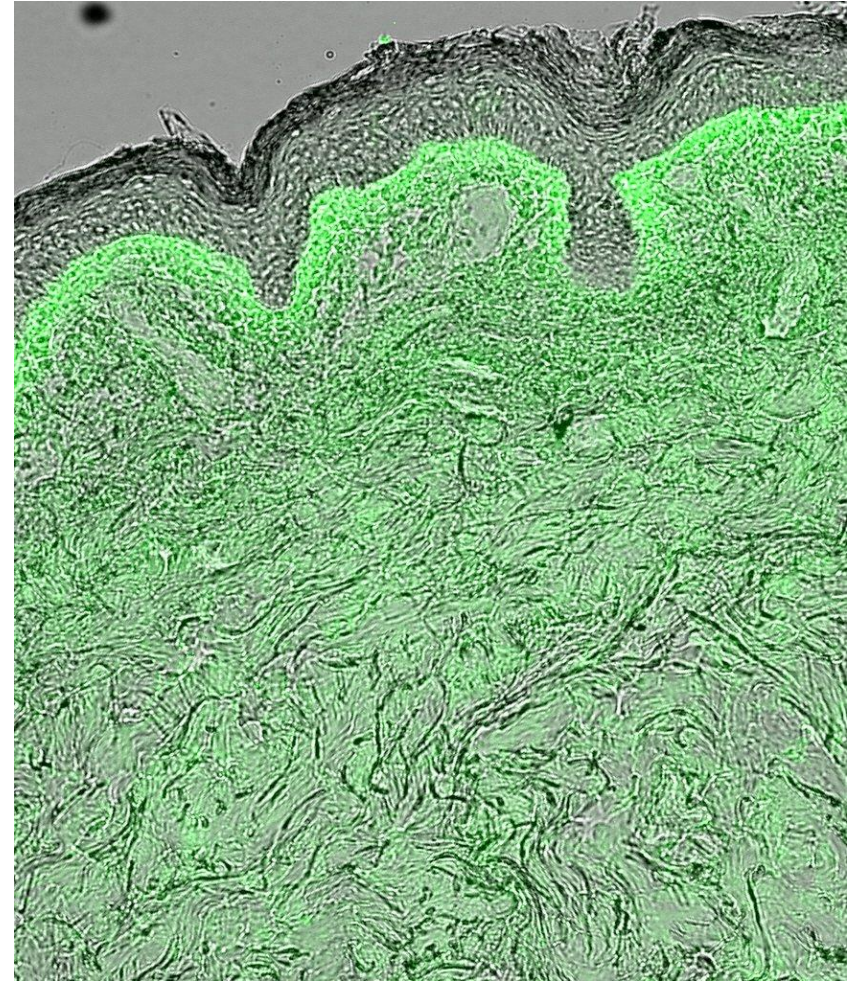
培養細胞が分泌したコラーゲン線維



青色:細胞核

緑色:タイプ I コラーゲン

皮膚組織中のコラーゲン局在



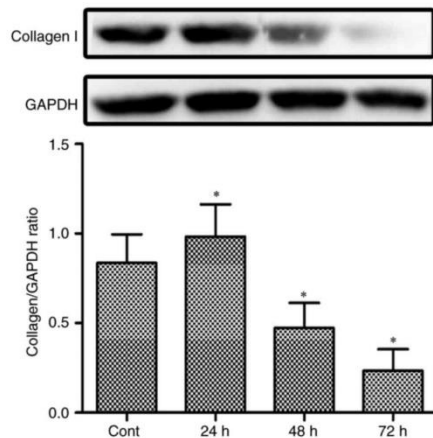
緑色:タイプ I コラーゲン

抗体や色素を利用した細胞や組織の染色、蛍光タンパク質の遺伝子導入 など

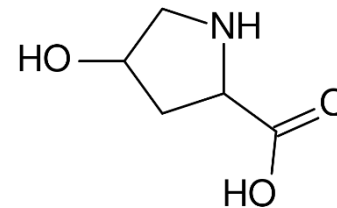
コラーゲンの評価 = 量 =

- ・抗原抗体反応を利用してタンパク質の量を定量する [・ウェスタンブロッティング法
・ELISA法
- ・コラーゲンに特異的に含まれるアミノ酸「ヒドロキシプロリン」を定量する
- ・コラーゲンに結合する色素「シリウスレッド」を利用して定量する など

ウェスタンブロッティング法



ヒドロキシプロリン

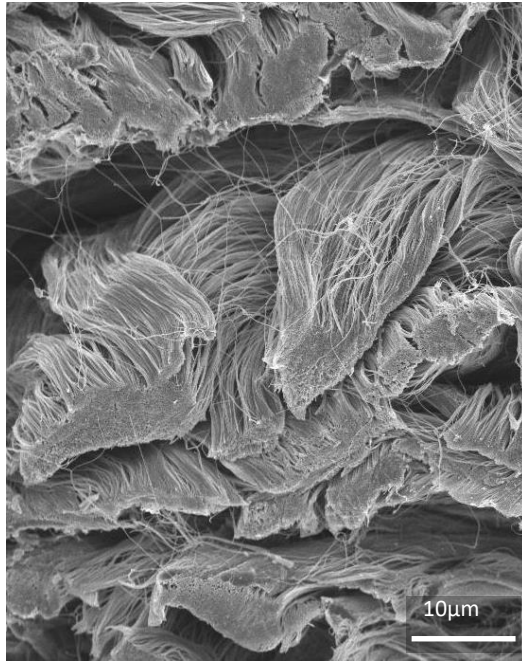


H. Jiang et. al., Exp Ther Med. 2017 Nov; 14(5): 5149–5156 より引用

抗体 や 色素 を 利用 した 定量、特異的アミノ酸 の 定量 など

コラーゲンの評価 = 構造 =

電子顕微鏡
(SEM、TEM)



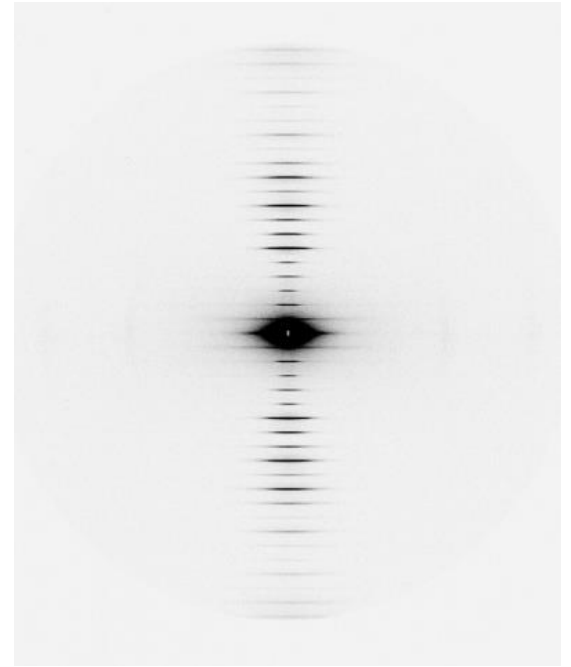
そのままの画像
(視覚的な分かりやすさ)

局所的な画像データ

サンプル形態に制限

(脱水、導電性
薄切、平滑性など)

X線散乱
(SAXS、WAXS)



構造情報が得られる

X線が当たる範囲の平均データ

サンプルの自由度は高い

(乾湿、温冷など
リアルタイムでの変化も可能)

目的

皮膚に含まれるコラーゲンについて
X線散乱測定を用いた新たな評価系を構築する

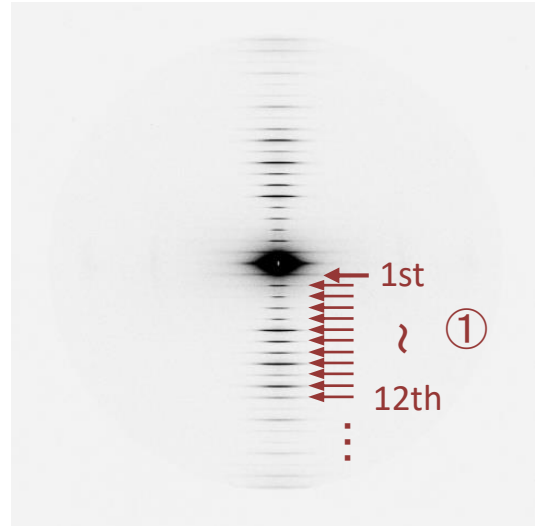
皮膚組織において

どのようなコラーゲン線維構造が観察できるか

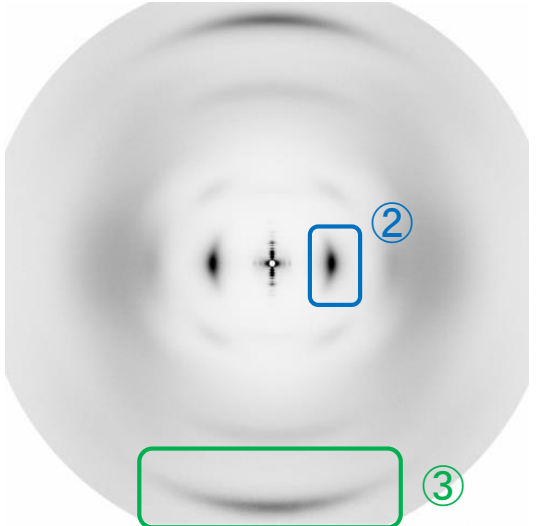
これまで

X線散乱により観察されるコラーゲン構造

ニワトリ脚腱由来コラーゲン線維



12keV 4m



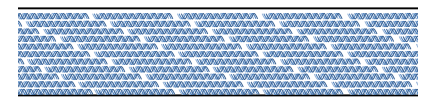
17.5keV 0.3m

③ 3重らせん構造
1ピッチの長さ
(0.28nm)

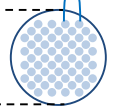
コラーゲン分子



コラーゲン分子が並ぶ



② 分子間距離
(1.1nm)

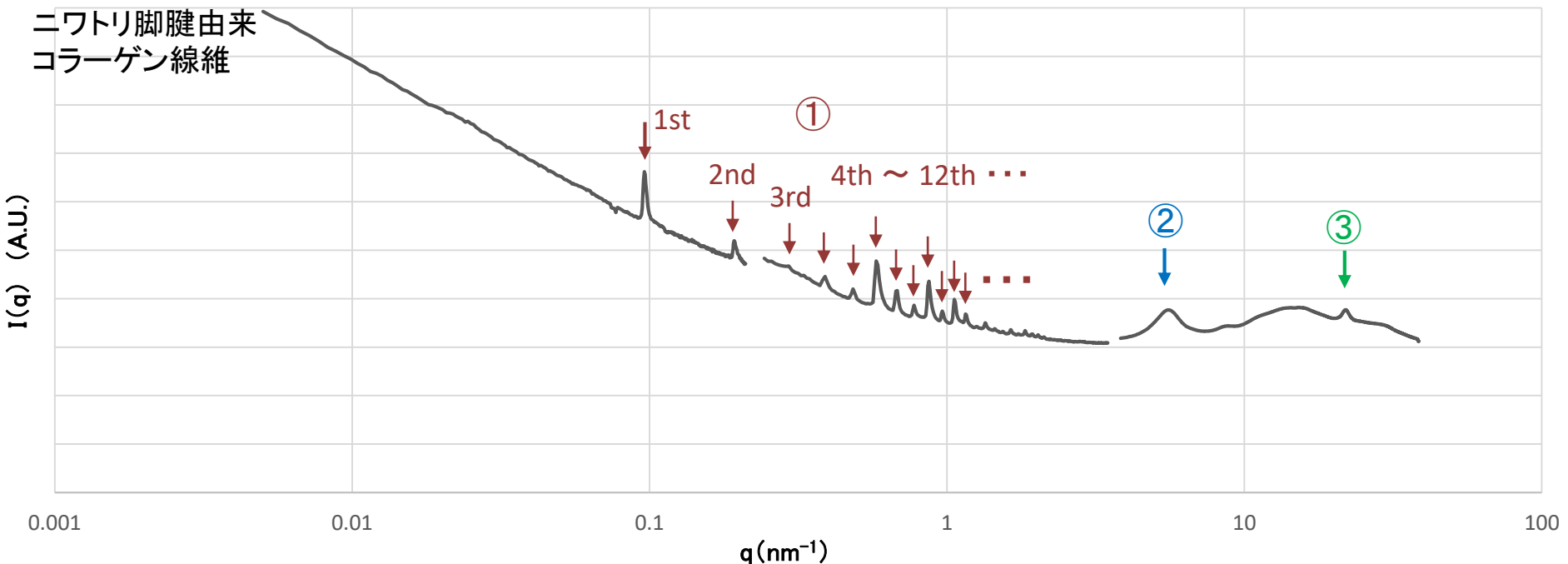


コラーゲン線維



① 65 nm 周期

ニワトリ脚腱由来
コラーゲン線維



方法

測定サンプル：ヒト皮膚組織（36歳、Caucasian、Biopredic International社）

ミクロトームを用いて厚さ100 μm に薄切

→ デシケーター内にて乾燥
→ そのまま(湿潤状態) } → キャピラリーに封入

比較対照：ニワトリ脚腱由来コラーゲン線維（乾燥）

小角 X 線散乱測定

「あいちSR BL8S3」

波長：1.5 \AA

カメラ長：約 4 m

検出器：イメージングプレート R-Axis

露光時間： ヒト皮膚 : 180秒

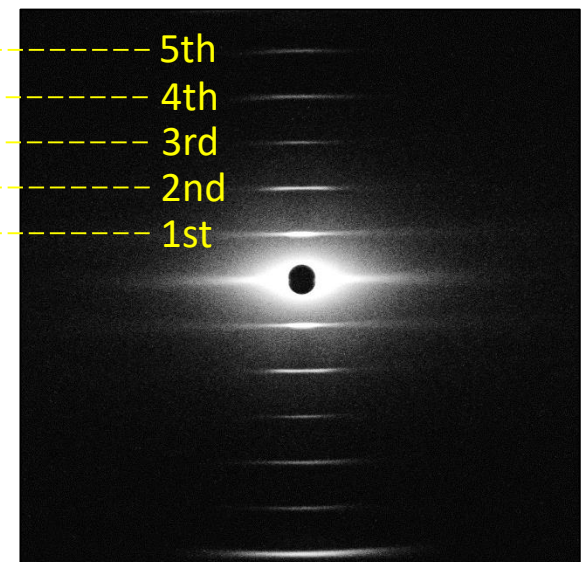
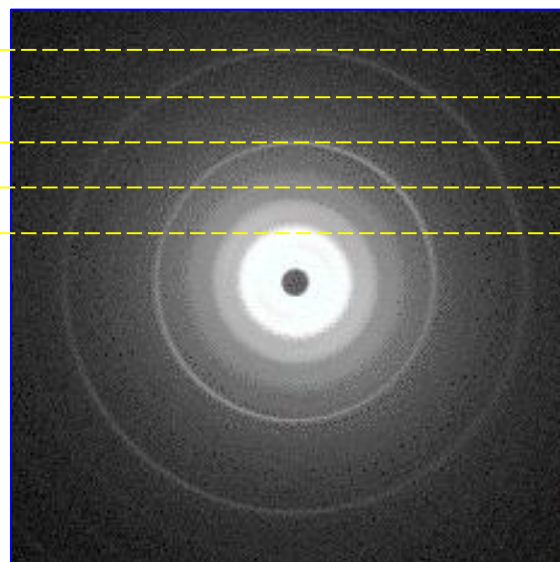
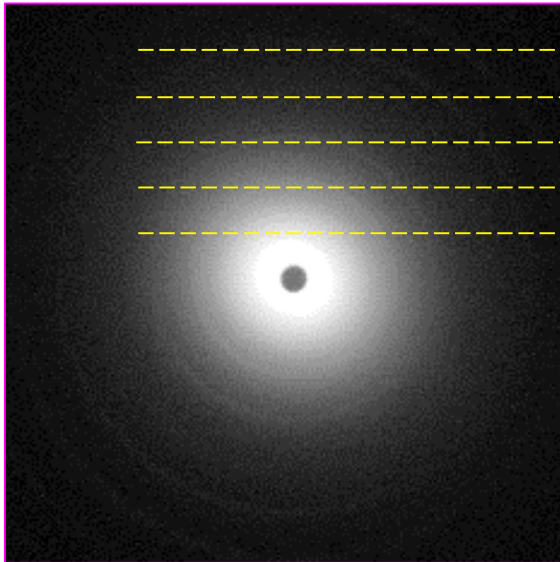
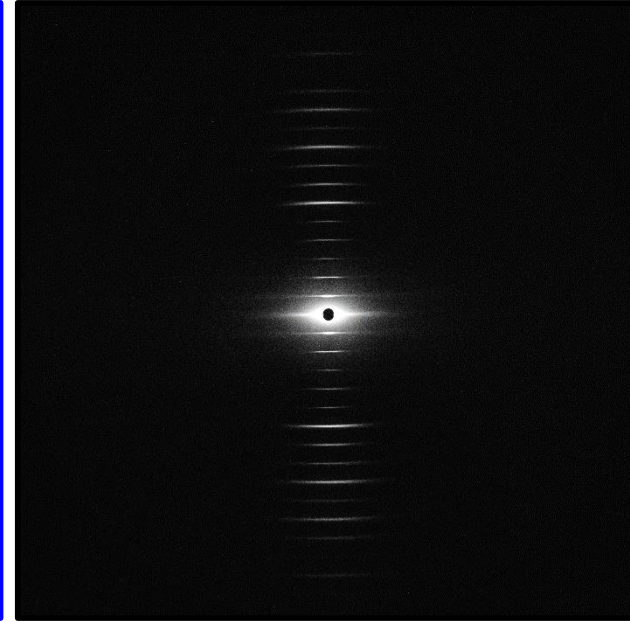
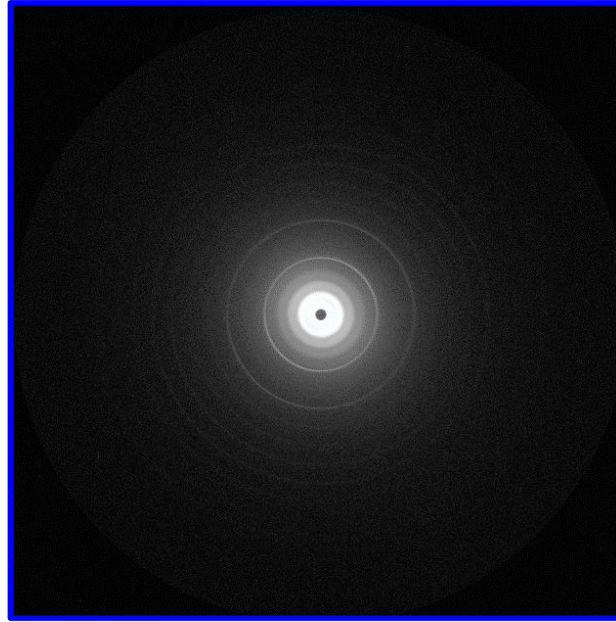
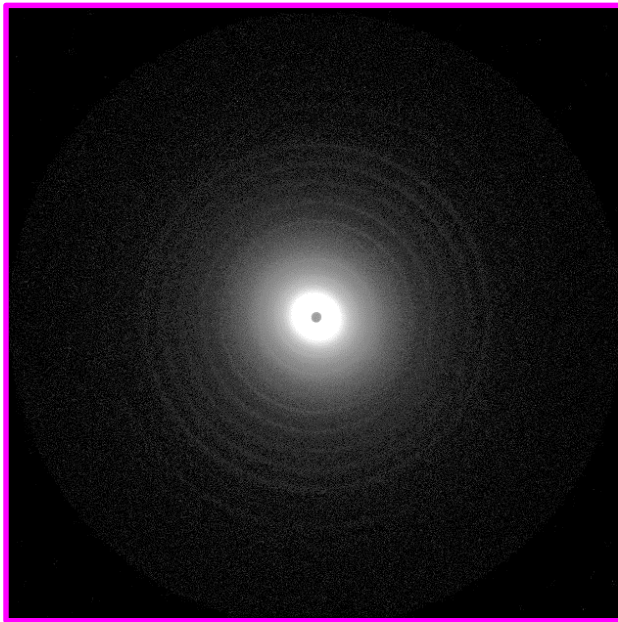
ニワトリ脚腱由来コラーゲン線維： 10秒

小角 X 線散乱像

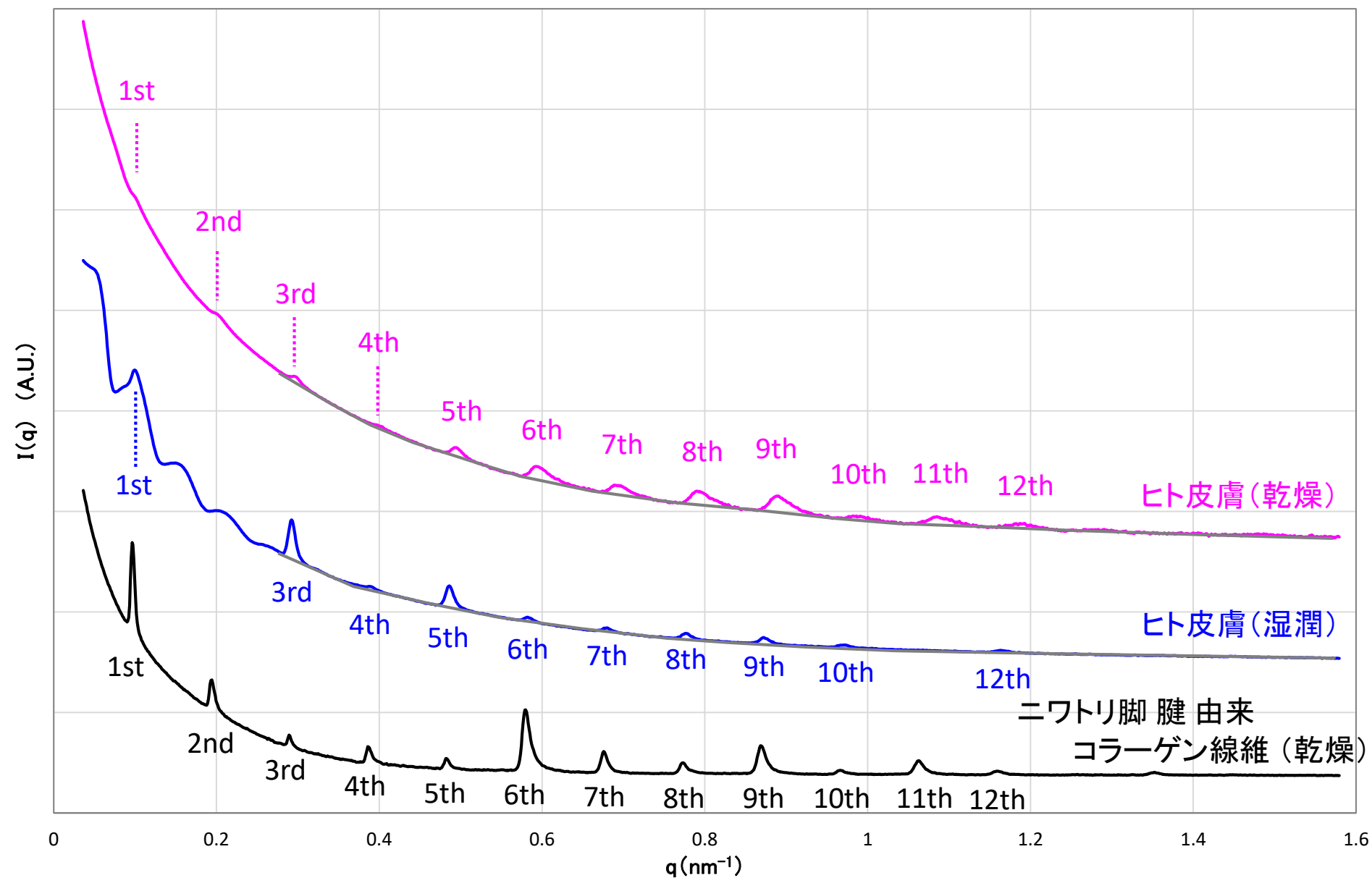
ヒト皮膚(乾燥)

ヒト皮膚(湿潤)

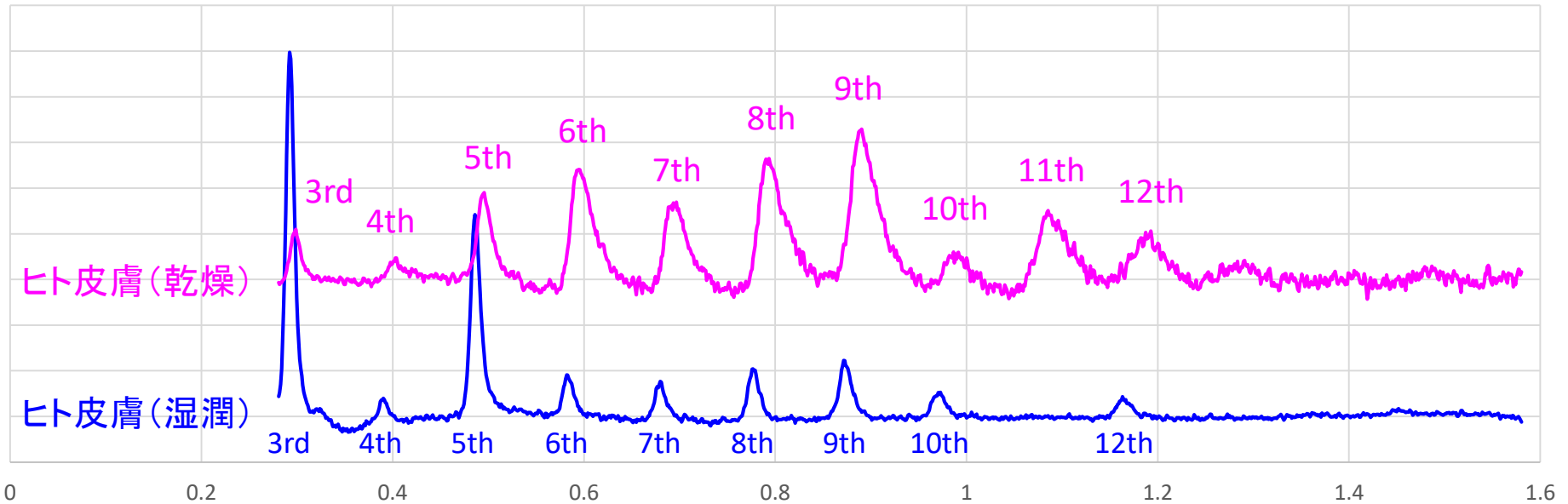
ニワトリ脚 腱 由来
コラーゲン線維 (乾燥)



小角 X 線散乱画像を円環平均して得られた一次元プロファイル



皮膚組織におけるコラーゲン線維の周期



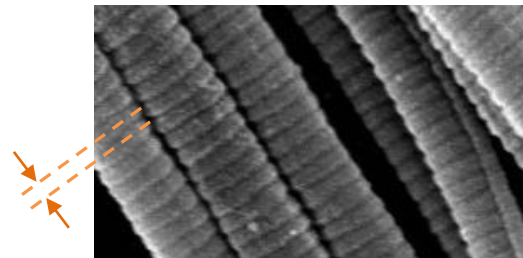
乾燥により広角側へシフト

ピーク位置 (q, nm^{-1})

	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
乾燥	0.299	0.404	0.496	0.595	0.697	0.794	0.891	0.986	1.085	1.193
湿潤	0.292	0.390	0.486	0.582	0.680	0.779	0.872	0.971	-	1.163

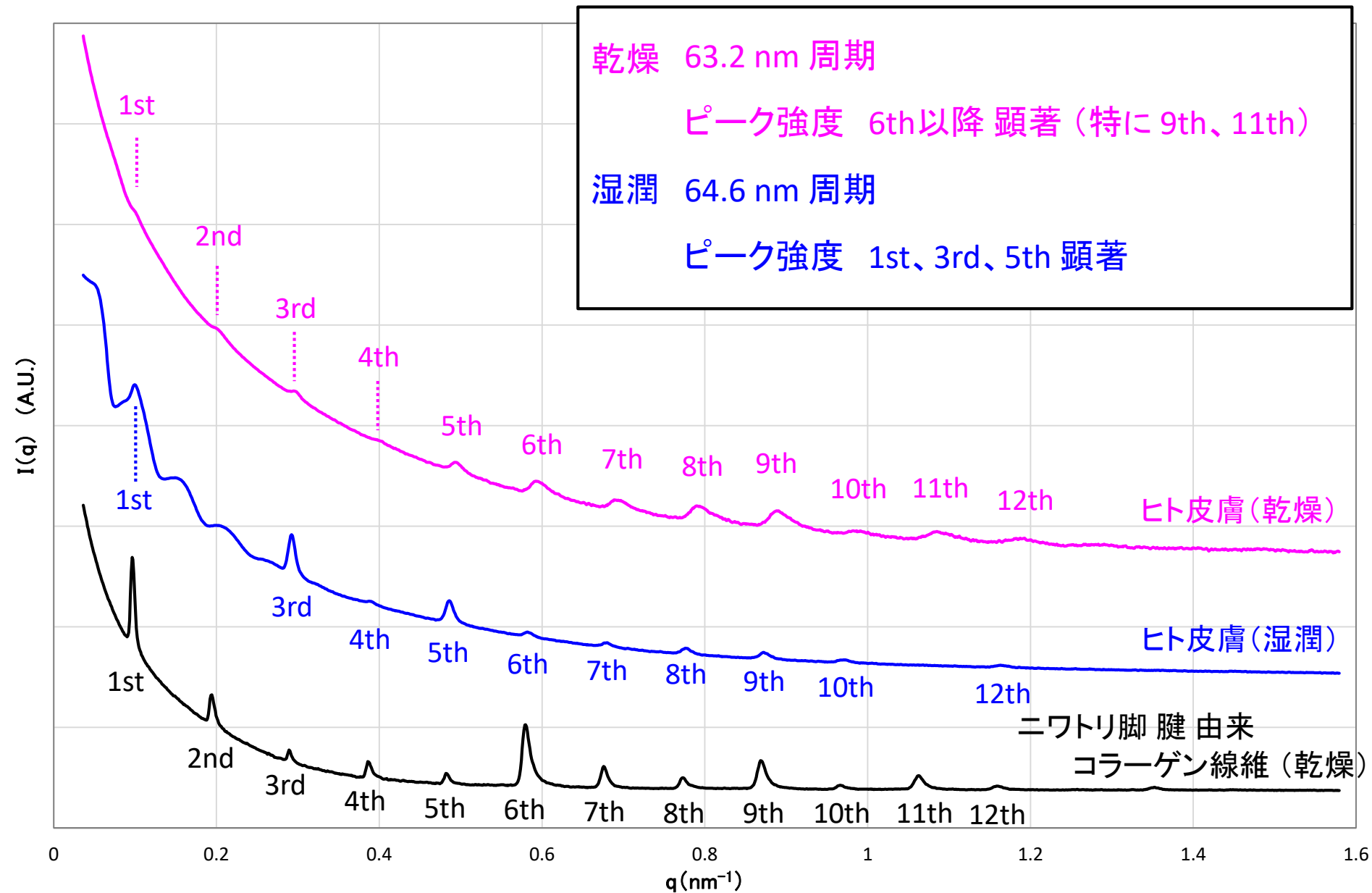
↓ 推定

1	
0.099	63.2 nm
0.097	64.6 nm

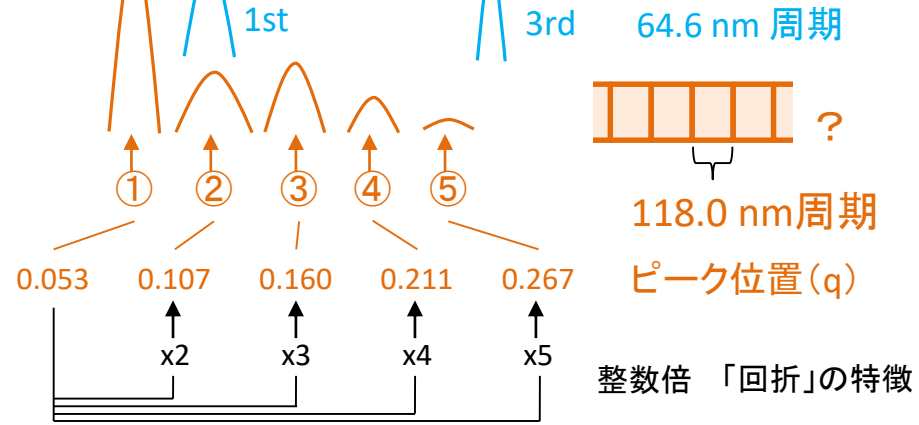
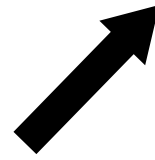
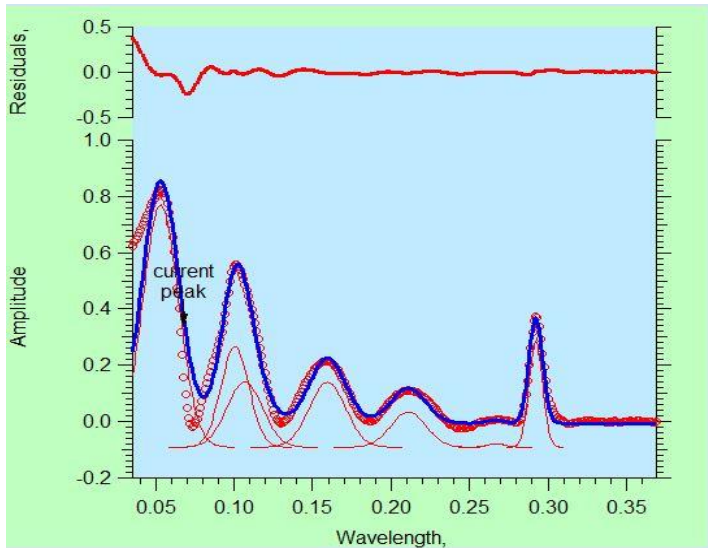
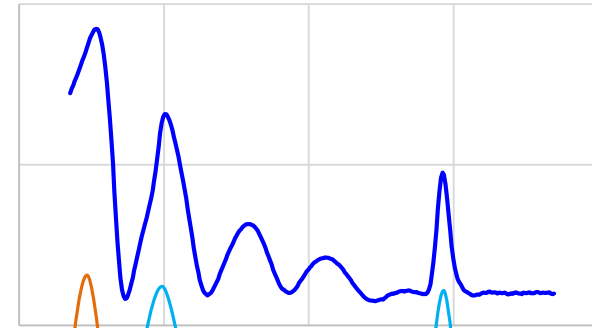
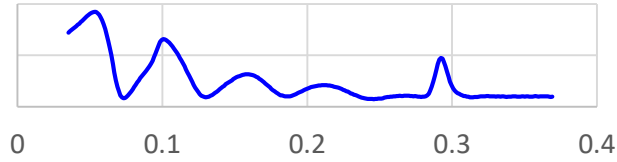
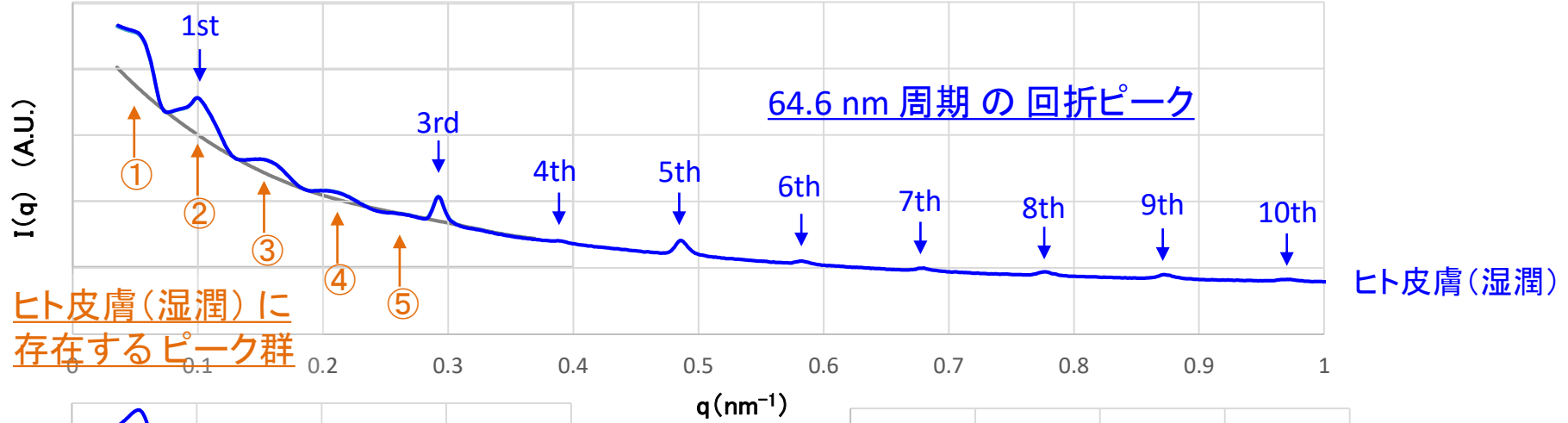


T. W. Herod et. al., Acta Biomater. 2016 Sep 15;42:296-307.より引用

小角 X 線散乱像を円環平均して得られた一次元プロファイル

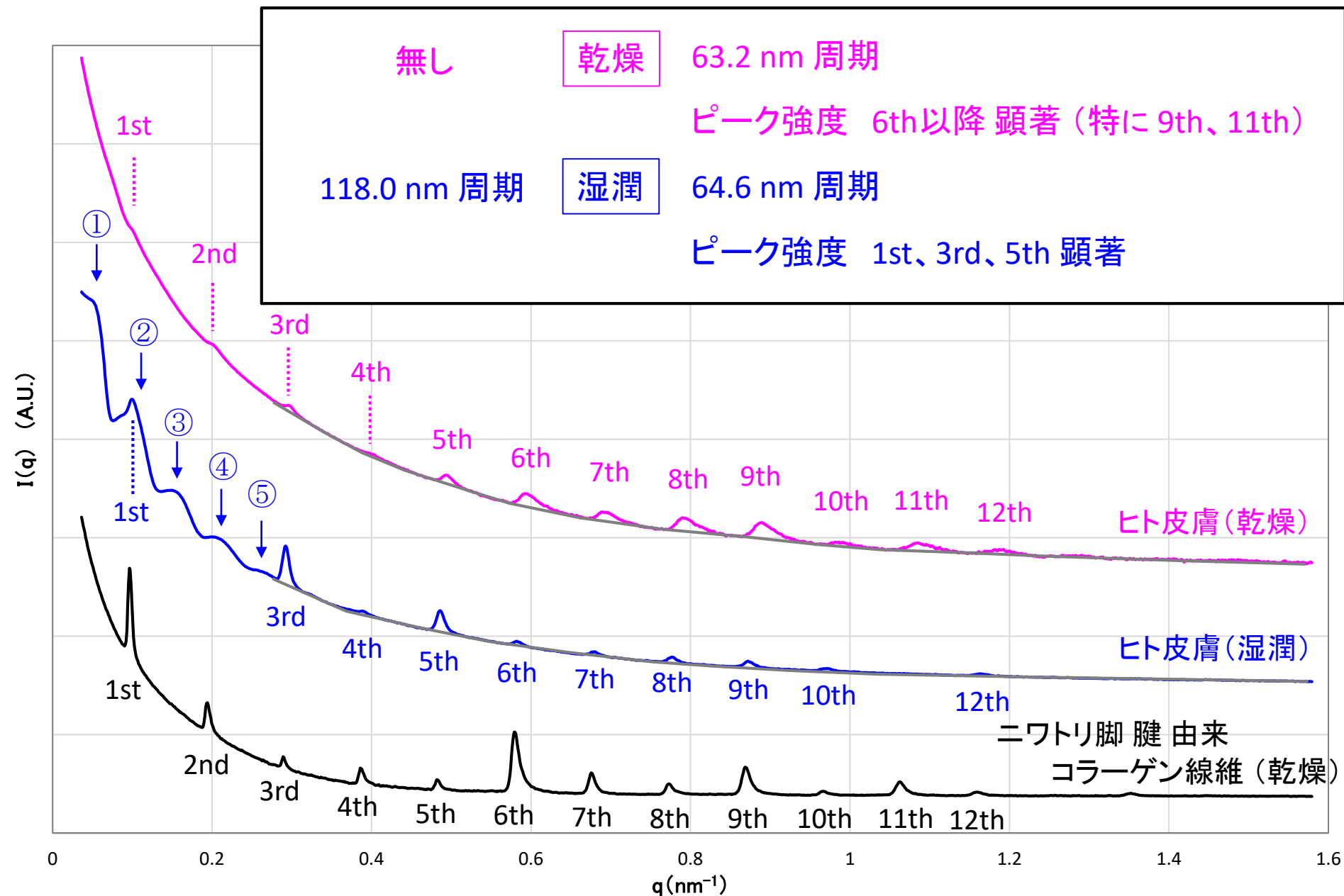


ヒト皮膚(湿潤)に存在するピーク群



※ グラフ処理ソフト「IGOR Pro」を用いてピーク分離

小角 X 線散乱像を円環平均して得られた一次元プロファイル

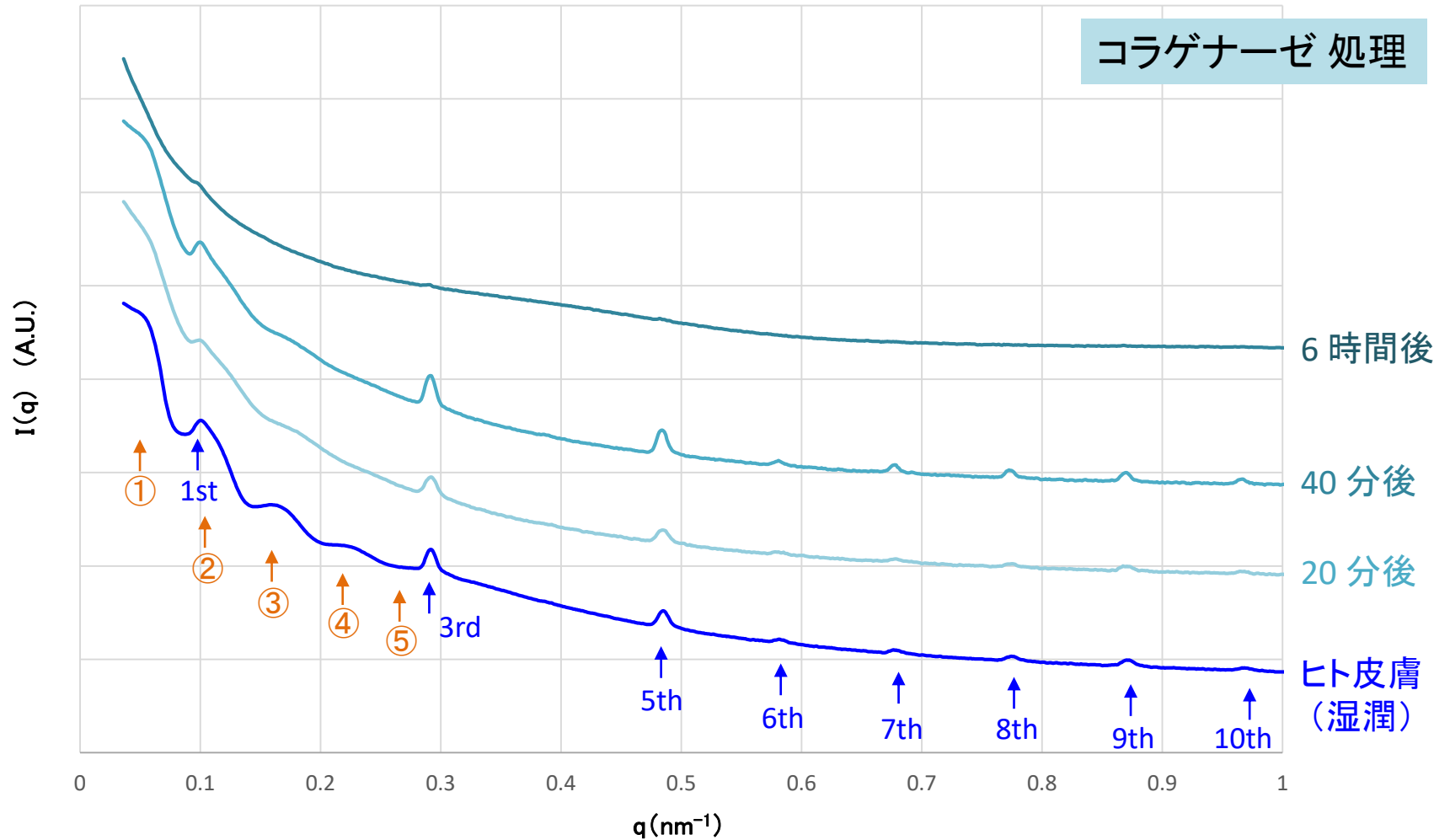


コラーゲン分解酵素処理の影響

コラーゲナーゼにより回折ピークが消失

118.0 nm

64.6 nm



まとめ

ヒト皮膚組織 × 小角 × 線散乱測定

コラーゲン線維

	湿潤時	乾燥時
周期	64.6 nm	63.2 nm
ピーク強度の比較	1、3、5次回折 顕著	6次回折以降 顕著 (特に9、11次回折)

ヒト皮膚組織(湿潤)

「118.0 nm の周期を持ち、

コラーゲン分解酵素 や 乾燥 により 消失する 構造」

の存在が示唆された

まとめ

ヒト皮膚組織 × 小角 × 線散乱測定

乾燥による組織の収縮と構造変化が示唆された

生体の真皮 = 水和した状態

「**湿潤状態**のコラーゲン線維の構造を観察・評価すること」

生体内における構造・機能の解明において

非常に重要であると考えられた