

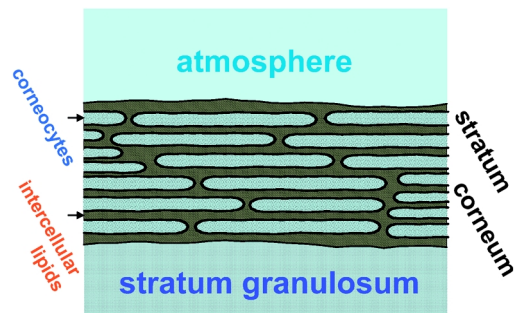
# 放射光を用いた皮膚角層の構造研究： 基礎から応用へ

八田一郎 財高輝度光科学研究センター 〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町 1-1-1  
 太田 昇 財高輝度光科学研究センター 〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町 1-1-1  
 八木直人 財高輝度光科学研究センター 〒679-5198 兵庫県佐用郡佐用町 1-1-1

**要旨** 皮膚角層の応用研究を展開するに当たって、その基礎となる分子レベルでの構造情報は欠かせない。ところが角層内の構造について現在なお数々の論争があるところである。ここでは2つの問題、角層中にある細胞間脂質分子が配列してとる2つのラメラ構造とラメラ周期と直交する面内の2つの炭化水素鎖の充填構造の関係およびラメラ構造の層間に水層が存在するか、を取り上げ、放射光X線回折実験をいかに駆使して解決したかを紹介する。さらに、角層の構造に基づいて応用研究を進めるに当たっての指針を示す。

## 1. はじめに

皮膚は人の体において、体外からの異物の侵入を防ぎ、一方、体内の水分の蒸散を防ぐという2つの重要な役割をもっており、それらはバリアー機能と呼ばれ表皮最上部にある角層が担っている。表皮中の細胞であるケラチノサイトが分化して最終的に角層が形成される。角層の厚さは場所によるがおおよそ20  $\mu\text{m}$  程度である。面の皮は結構薄い。足のかかとでは相当厚い。海水浴に行ったとき日焼けして皮膚の皮がむけることがあるが、あれが角層である。表皮最下部にある基底細胞皮膚は細胞分裂し、絶えず代謝を繰り返し、最後に表皮最上部の角層は垢となってはく離する。角層は主として角層細胞(この中には最早核はない)と細胞間脂質から成っている。それは Fig. 1 (図の説明中, stratum corneum : 角層, corneocyte : 角層細胞, intercellular lipid : 細胞間脂質, stratum granulosum : 顆粒層) に示すように平坦化した角層細胞の周りを細胞間脂質が囲んだ構造を形成している。したがって, Fig. 1 で示す角層の構造はレンガモルタル・モデルといわれ、角層細胞は細胞間脂質の中に埋め込まれている。細胞間脂質はセラミド、脂肪酸、コレステロールなどの多成分から成っている。角層細胞の中にはソフトケラチンと呼ばれるタンパク質が詰まっている。角層細胞周辺にはコーニフェイドエンヴェローブ (Fig. 1 中, corneocyte (角層細胞) の周りを取り囲む太い黒線の部分) と呼ばれる構造がある (コーニフェイドエンヴェローブはインボルクリンやロリクリンなどのタンパク質とそれに結合した脂質により構成され、タンパク質は角層細胞膜の補強の役割を果たしており、これらの結合した脂質は細胞間脂質と向き合っている)。角層



**Fig. 1** Bricks-and-mortar model of stratum corneum of skin. Corneocytes as bricks are surrounded by intercellular lipid matrix as mortar.

中のこれらの構造は機能発現においてお互いに関わりをもって働いている<sup>1)</sup>。

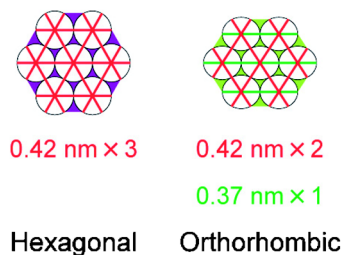
われわれが放射光 X 線を用いてかくも複雑な角層の構造解析研究を行っている原動力は次のような点にある。角層の機能を改善し高める化粧品や、皮膚を大きく傷めることなく皮膚を通して薬の投与を可能とする経皮吸収促進剤の創製において、分子レベルのエヴィデンスに基づいたそれらの開発に寄与したい。大それた夢かもしれないが、その目標の一つとして患者数が増加の一途をたどっているアトピー性皮膚炎の皮膚の乾燥した特異な性状に対処し治療に役立つような保湿剤の開発につなげることができればと願っている。そのためには分子レベルで皮膚角層内の構造に関する知見が必要である。このように応用を目指した研究をするために、それに必要な基礎研究を展開においても応用研究を絶えず念頭におき、最終目標を見失うことなく行うことが肝要であると考えている。

以上のような目標に向けて放射光 X 線の構造解析研究を進めるに当たって、ヒト角層の構造を明らかにすることが最大の目標である。それも生きている人体の皮膚上にあるヒト角層の構造を明らかにしたいところであるが、それに代わるものを用いることになる。実験に用いる角層は大きく分けて5つある。(1)ヒトの皮膚からテープストリッピングにより低侵襲で採取した角層（接着剤付のテープをヒトの皮膚に押し付け剥し、テープ上に角層を写し取ったもの）、(2)外科手術により表皮を切り出しトリプリン処理して得たヒトの角層、(3)ヒト以外で生きている哺乳動物の皮膚上にある角層、(4)ヒト以外の哺乳動物において外科手術により切り出した表皮上にある角層、(5)ヒト以外の哺乳動物において外科手術により表皮を切り出しトリプリン処理して得た角層である。これらにより生きているヒト皮膚上にある角層の構造についての特徴を明らかにすることが応用を目指すときの重要な課題である。ヒトの角層に代わるものとして培養表皮、三次元培養皮膚、再構成膜や脂質多成分系などで構造研究を行なうことができるようになればさらに深く分子さらには原子レベルの構造研究を展開できる。その場合、ヒトの角層で確立されたどの構造に着目して研究をしようとしているかに応じて、それぞれの代替物質を選んで研究を行なうことになる。ここではヒト角層に非常に近い角層内の構造をもつヘアレスマウス角層について放射光 X 線を用いた構造研究について述べる。

## 2. 細胞間脂質がつくる構造

この節では放射光小角・広角 X 線回折像の時間変化測定を行うことにより、多成分から成る細胞間脂質の集合体がつくる複雑に絡み合った構造をいかに解き明かしたかを紹介する。一般に炭化水素鎖をもつ脂質分子より成る集合体では2つの特徴的な周期構造が現れる。分子の長軸方向への配向により現れる周期構造はラメラ構造と呼ばれている。したがって、周期は分子長の2倍あるいはそれに関連するものとなる。それは数 nm から数十 nm であり、小角 X 線回折像として観測される。一方、ラメラ周期の方向に直交する横断面では炭化水素鎖が充填してつくる構造が現れる。電子密度の高い分子軸の中心部分の炭化水素鎖の配列は六方晶、斜方晶などをとる。その格子定数はほぼ0.4 nm であり、広角 X 線回折像として観測される。細胞間脂質集合体がつくる構造を解くには小角・広角同時測定が不可欠であり、温度走査して小角・広角同時測定を行い相転移挙動を明らかにすることにより構造解析をさらに推し進めることができる。

哺乳動物の細胞間脂質集合体のつくる構造については多くの研究が行なわれているが、まだ基本構造に関して定説が確立されるまでに至っていない。生きているヒトの皮膚から低侵襲で採取した角層の構造の実験としては電子線回折実験のためのメッシュを糊付けしそれに依ってテープス



**Fig. 2** Hydrocarbon-chain packing structure in intercellular lipid matrix. There are two kinds of packing: One is hexagonal and the other is orthorhombic.

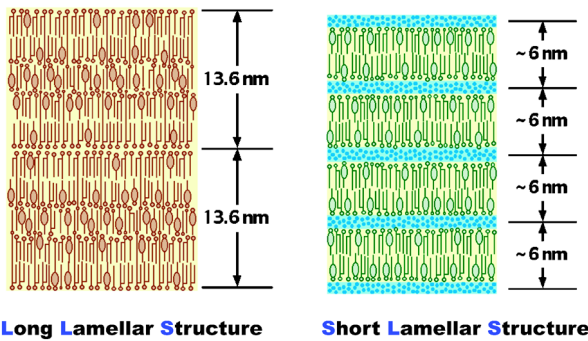
トリッピングして採取した角層についての電子線回折実験が行われている（メッシュの穴の部分に残った角層に対して実験を行う<sup>2)</sup>）。その結果、**Fig. 2**に示すように室温で細胞間脂質中の炭化水素鎖の充填格子には六方晶（格子定数は0.41 nm）と斜方晶（格子定数は0.37 nm と0.41 nm）があることが報告されている。前者と比べて後者が観測される頻度が高いことが指摘されている。そこではさらに重要な二つの実験が行われている。一つは電子線ビームの位置を動かして実験を行っていることである。もう一つは温度を変えて実験を行っていることである。これらについては後で触れる。一方、炭化水素鎖の充填格子と直交する方向の周期構造であるラメラ構造については、電子顕微鏡観察および X 線小角散乱により実験が行われている。Bouwstra ら<sup>3)</sup>は外科手術により切り取ったヒトの表皮をトリプリン処理して得た角層に対する X 線小角散乱から次のような報告をしている。ヒト角層において室温でブロードではあるが強い6.4 nm の周期をもつラメラ構造（短周期ラメラ構造）と弱い13.4 nm の周期をもつラメラ構造（長周期ラメラ構造）のピークが観測された（**Fig. 3**を参照。**Fig. 3**の説明中、ceramide：セラミド，long lamellar structure：長周期ラメラ構造，short lamellar structure：短周期ラメラ構造。後で示すように長周期ラメラ構造中には水層は無いが、短周期ラメラ構造中には水層がある）。温度を120°Cまで上げ室温に下ろすと細胞間脂質の結晶化が起こり鋭い13.4 nm の周期をもつラメラ構造の4次ピークまで観測された。その角層中の水分量を調節すると20 wt%の辺りで長周期ラメラ構造による小角領域のピークがさらに鋭くなる。一方、ピーク位置は水分量に依らない。Bouwstra らはこれ以降の研究において、長周期ラメラ構造は研究した全ての哺乳動物において現れ、これが角層の細胞間脂質がつくる特徴的な構造であって、このラメラ構造が皮膚のバリア機能においておそらく最も重要な働きをしていると主張している<sup>4)</sup>。また、RuO<sub>4</sub>で染色した皮膚角層のラメラ構造の電子顕微鏡観察では長周期ラメラ構造は観測されているが<sup>5)</sup>、短周期ラメラ構造の電子顕微鏡についての報告は現在までのところない。疑問として残っていることは、このように長周期ラメラ構造は常に観測される主たる構造であって、ヒト角層で

熱処理する前にブロードであるが強いピークとして観測されている短周期ラメラ構造は機能に直接関わりない構造であって無視して良いかということである。また、炭化水素鎖の充てん格子の六方晶と斜方晶の共通の格子定数0.41 nmはいわゆる‘多結晶’のX線回折ではデバイ・シェラー・リングが重なり識別することが難しい。さらに、電子線回折実験の結果が示すように斜方晶に比べて六方晶が出現する頻度が少なく、六方晶の存在の影が薄い。このような場合に六方晶の存在を無視してよいのかということもある。ここで強調しておきたいことは、角層中の細胞間脂質は脂質分子多成分から成っており、それがつくる構造は必ずしも鋭い回折ピークを示す規則正しい構造ばかりではないということである。また、規則正しい構造であるから機能にとって重要であるとは一概には言えない。さらに、脂質分子多成分から成る細胞間脂質の構造においてそれがつ

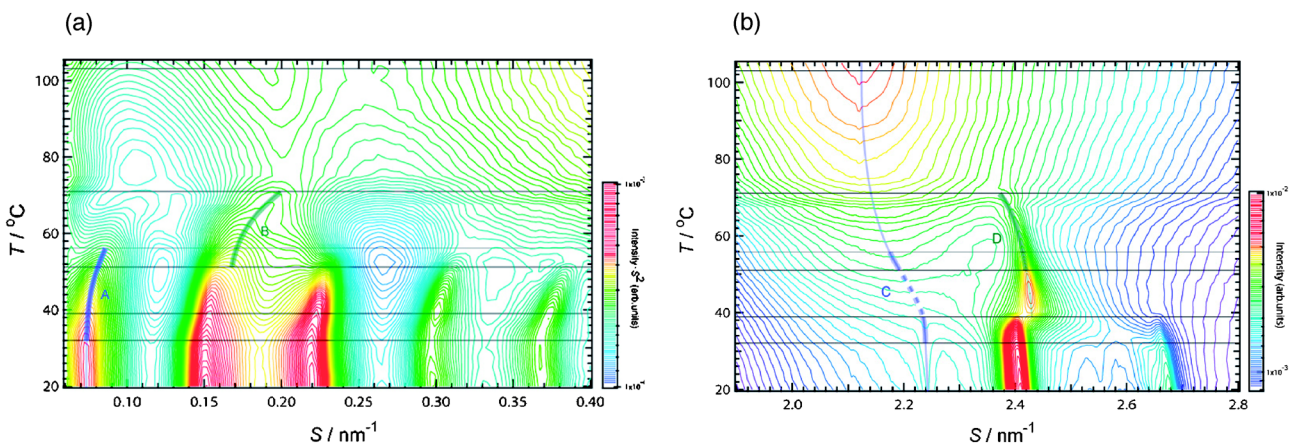
くる全ての構造がX線回折で観測される訳ではない。われわれはラメラ周期構造と炭化水素鎖の充てん格子の関係をX線構造解析と熱力学に基づいて明らかにすることによって、これらの構造における混乱している状況の一端を解きほぐした。

一般にあるものの状態が安定かどうかを検討するときに、構造と熱力学の両面からの研究が重要な役割を果たす。そこでヒト角層に非常に近い構造をもつヘアレスマウス皮膚角層の高感度示差走査熱量測定を行なった<sup>6)</sup>。その結果、32, 39, 51, 71, 103°Cに熱異常を検出し、57°Cにもサーモグラム折れ曲がりを検出した。32°Cの熱異常はわれわれが初めて見つけたものである。103°Cの熱異常はこれまでの実験で蛋白質由来する熱異常と言われている。次に放射光X線を用いて、小角・広角X線回折像測定の温度走査速度0.5°C/minで行なった<sup>7)</sup>。それぞれの等高線図の温度変化の結果をFig. 4aと4bに示す。横軸が散乱ベクトル ( $S = (2/\lambda) \sin \theta$  (nm<sup>-1</sup>),  $\lambda$ はX線の波長,  $2\theta$ は散乱角)であり、縦軸が温度(°C)である。Fig. 4aと4b中に示す横線は熱異常が観測された温度(転移温度)を示す(細い横線は57°Cの線を示す)。詳細な議論については論文<sup>7)</sup>を見ていただくことにして、ここでは要点と論文では詳しく触れなかった点について述べる。

これまで報告が無かった32°Cの相転移に着目して放射光小角・広角X線回折像の温度変化の高感度測定結果を見ると、微妙であるが確かな変化が起きている。これはこれまでのX線回折実験では分からなかったことである。Fig. 4aを見ると室温で13.6 nm(ヒト角層の場合は13.4 nm)。このように細胞間脂質のラメラ周期は哺乳動物によって多少異なるが、それは脂質成分の違いによっていわれている)の長周期ラメラ構造の1次反射から5次反射のピークが現れている。この構造は約56°Cまで残っているが、ピーク位置は32°Cを境にして広角側に折れ曲がり



**Fig. 3** Lamellar structure in intercellular lipid matrix composed of ceramides, fatty acids and cholesterol are drawn schematically. There are two kinds of lamellar structures: One is long lamellar structure in which the repeat distance is 13.6 nm and the other is short lamellar structure in which the repeat distance is around 6 nm and depends on the water content in stratum corneum. In the latter, water molecules are illustrated by blue dots.



**Fig. 4** Intensity contour plots of SAXD/WASD as a function of temperature. Horizontal lines indicate the transition temperatures obtained from DSC. The color representations for the intensity are given in the bars of the right-hand side. a: SAXD, b: WASD.

っている。すなわち、この温度を境にしてラメラ周期が急に短くなる。また、Fig. 4bを見ると32°C辺りで2.24 nm<sup>-1</sup>付近のブロードなピークの等高線が折れ曲がっており、新しいブロードなピークが出現し始める。

次に Fig. 4a と 4b を比べることにより、容易に一つの結論を下せる。Fig. 4a を見ると短周期ラメラ構造によるピークは長周期ラメラ構造の2次反射と3次反射のピークの間埋もれているが、温度を上げるに従い長周期ラメラ構造によるピークは約51°Cで消失し51~71°Cで一つのピークが残る(曲線B)。これが短周期ラメラ構造の1次反射のピークである。温度が上がるに従いピーク位置が広角側に移動しており、これは短周期ラメラ構造の周期が短くなっていることを示す。一方、Fig. 4b を見ると39°Cで斜方晶から六方晶へ明確な相転移を起こしている。前に挙げた電子線回折実験によっても斜方晶から六方晶への相転移が指摘されている<sup>2)</sup>。ここで注意すべきことは電子線回折実験では20°Cで現れている六方晶と39°C以上で現れる六方晶の関係については言及していないということである。室温では2.4 nm<sup>-1</sup>付近のピークは六方晶の約4.1 nmの格子定数と斜方晶の約4.1 nmの格子定数の重畳したものから成っている。温度を上げると39°C直下で2.40 nm<sup>-1</sup> (0.417 nm)であったピークが直上で2.44 nm<sup>-1</sup> (0.410 nm)と格子定数が小さい方向に飛んでいる。一般に温度が上昇することにより炭化水素鎖の充てんの格子定数は大きくなる。上の場合を見ると六方晶の格子定数は39°Cの直上で小さくなっているため、39°C以下と以上の六方晶はそれぞれ異なる細胞間脂質の部分に由来していると言える。一つの部分において39°Cで斜方晶から高温六方晶への明確な相転移が起こるが、別の部分にある低温六方晶はどうなったかを明らかにしなければならない。この低温六方晶が32°Cで相転移を起こし、液晶様構造になるとすると矛盾なく説明できる。高温六方晶に話を戻すと、39°C以上で現れる高温六方晶は温度が上がるに従い小角側に移動し(膨張し)、71°Cでピークが消失する(曲線D)。高温六方晶が出現する温度領域(曲線D)と短周期ラメラ構造が出現する温度領域(曲線B)が対応している。したがって、室温では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と定性的に結論できる。さらに、32°Cの相転移での振舞から残りの長周期ラメラ構造の炭化水素鎖の充てんは低温六方晶から成っていると間接的に結論される。

以上のことを定量的に解析するために、臨界充てんパラメーター<sup>8)</sup>の概念を改変した。脂質のいわゆる頭部の断面積だけでなくその厚さをも考慮し、さらに水層の厚さをも考慮した新しい臨界充てんパラメーター(ここでは改良形状因子と呼ぶ)を定義する。Fig. 5 に示すように、炭化水素鎖一本からなる脂質分子を考え、水中で脂質2分子の外側には水層があり、次に頭部があり、内側に炭化水素鎖が向き合っているのが、脂質2分子膜の基本構造である。断面積を  $a_0$  とし、Fig. 5 の2分子の上端から下端までの長

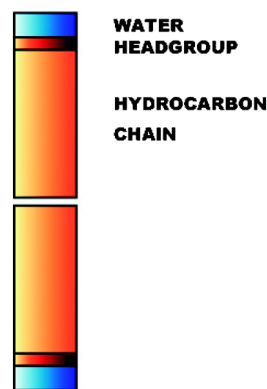


Fig. 5 A pair of lipid molecules (illustrated by orange for hydrocarbon chain and by dark orange for headgroup) with water (illustrated by blue) shown by two cylinders. Modified shape factor  $v/a_0l_c$  is given by the cross-section  $a_0$  of cylinder, the length  $l_c$  from the top to the bottom and the total volume  $v$ .

さを  $l_c$  とし、全体の体積が  $v$  であるとする、改良形状因子は

$$\frac{v}{a_0l_c}$$

と定義できる。脂質2分子膜は平板を形成するので、改良形状因子の値は1となる。すなわち、 $v = a_0l_c$  の関係が成り立つ。角層中の細胞間脂質の場合に当てはめて、炭化水素鎖の状態が脂質分子集合体の構造形成において重要な役割を果たしているとする、Fig. 5 の筒状体の断面積はほぼ炭化水素鎖の乱れによって規定され、それに伴い平板を保つように水層や頭部は変形する。したがって、ラメラ構造( $l_c$ はラメラ周期に相当する)と炭化水素鎖の充てんの格子定数(断面積  $a_0$  を見積もることができる)から  $a_0l_c$  が計算できる。一つの相の中の狭い温度領域では、ラメラ構造の周期が短くなれば反対に炭化水素鎖の充てんの格子定数は大きくなり、体積  $v$  はほぼ一定に保たれると考える。Fig. 4a の曲線BとFig. 4b の曲線Dについて、 $a_0l_c$  を計算すると、Table I (表の説明中、modified shape factor: 改良形状因子) に示す値が求まる。 $a_0l_c$  は1.10-1.17 nm<sup>3</sup> の間にありほぼ一定の値になっており、これから曲線Bが曲線Dに対応していることが定量的にも示された。詳しく見ると  $a_0l_c$  の値は温度の上昇とともに僅かではあるが減少している。現在のところこの要因については分かっていないが、ここで扱った細胞間脂質は多成分から成っており必ずしもここで提案した改良形状因子の枠組みで扱い切れないかもしれない。さらに詳しい解析をするためには単成分系で改良形状因子の考え方について厳密に検討する必要がある。曲線Cについては少し説明を要する。32°C以下では液晶様構造の核が形成され、そのピーク強度が温度の上昇とともに増大する。32°Cではほぼ全体に液晶様構造

**Table I** Analysis based upon the modified shape factor for the short lamellar structure in intercellular lipid matrix of stratum corneum. The cross-sectional area,  $a_0$ , obtained from the lattice constant of the high-temperature hexagonal structure, the lamellar repeat distance,  $l_c$ , and the calculated volume,  $a_0l_c$

Temperature (°C)	$a_0$ (nm <sup>2</sup> )	$l_c$ (nm)	$a_0l_c$ (nm <sup>3</sup> )
50	0.197	5.95	1.17
55	0.198	5.81	1.15
60	0.199	5.75	1.14
65	0.201	5.46	1.10

**Table II** Analysis based upon the modified shape factor for the long lamellar structure in intercellular lipid matrix of stratum corneum. The cross-sectional area,  $a_0$ , obtained from the lattice constant of the liquid-crystalline-like structure, the lamellar repeat distance,  $l_c$ , and the calculated volume,  $a_0l_c$

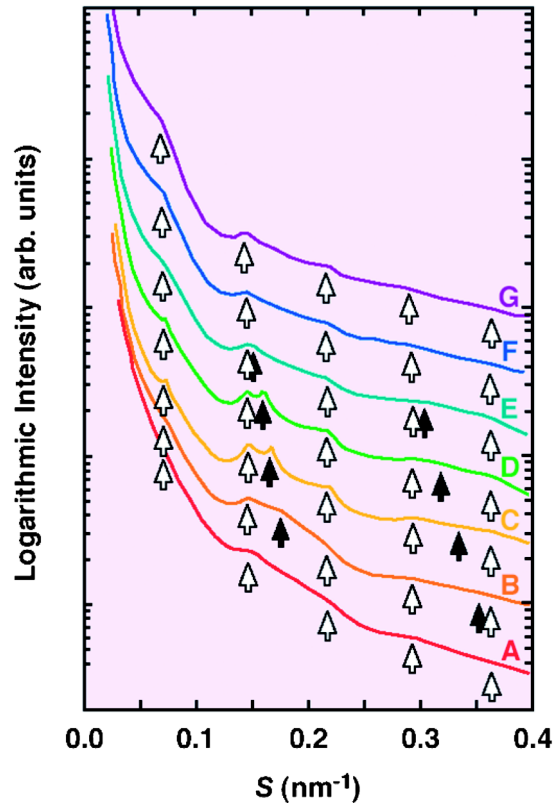
Temperature (°C)	$a_0$ (nm <sup>2</sup> )	$l_c$ (nm)	$a_0l_c$ (nm <sup>3</sup> )
35.0	0.229	13.37	3.062
52.5	0.238	12.88	3.065
55.0	0.239	12.64	3.026

になり、さらに温度が上昇するとともに液晶に近づく。それを滑らかに結んだものが Fig. 4b の曲線 C (32~56°C) である。同じ温度領域でラメラ構造のピークは Fig. 4a の曲線 A である。Fig. 4a の曲線 A と Fig. 4b の曲線 C ついて、を計算すると、Table II (表の説明中、liquid-crystalline-like structure：液晶様構造) に示す値が求まる。 $a_0l_c$  は3.026–3.065 nm<sup>3</sup> の間にありほぼ一定の値になっており、ここに曲線 A と曲線 C が対応していると言える。このように定量的な解析を行なった結果、長周期ラメラ構造の炭化水素鎖の充てんは低温六方晶であり、短周期ラメラ構造の炭化水素鎖の充てん格子は斜方晶であると結論できる。

前に示した電子線回折実験において電子線ビーム位置を動かし、炭化水素鎖の充てん格子の六方晶と斜方晶の領域の測定をしているが、これはドメインの存在を示唆している。X線回折実験で回折ピークとして観測されるためには同一の構造の繰り返しがあることを意味する。したがって、角層中の細胞間脂質はここで得られた結果も低温六方晶の炭化水素鎖の充てん格子をもつ長周期ラメラ構造と斜方晶の炭化水素鎖の充てん格子をもつ短周期ラメラ構造の2つのドメインを形成している。角層の機能発現における細胞間脂質の役割を検討するに当たり、それぞれのドメインの役割、また、ドメイン間の相互作用に着目して分子レベルの機構解明に取り組むことが次の課題となる。

### 3. 皮膚角層の水分調節機構と構造

この節では細胞間脂質集合体がつくるラメラ構造による



**Fig. 6** X-ray diffraction intensity for the stratum corneum of hairless mouse at the water content of 0 wt% (A), 12 wt% (B), 21 wt% (C), 35 wt% (D), 50 wt% (E), 70 wt% (F) and 80 wt% (G). Open arrows indicate the 1st to 5th order diffraction peaks for the long lamellar structure and closed arrows indicate the 1st and 2nd order diffraction peaks for the short lamellar structure.

小角X線回折像の精密な解析により、皮膚角層の機能において重要な保湿機能さらには水分調節機構について新しく提案した結果について紹介する。これにおいてはラメラ構造の回折像の精密な解析が不可欠であり、輝度の高い放射光X線を用いた実験によりはじめて可能となった。

角層の役割として保湿機能がある。健康な皮膚において角層中には約20 wt%の水分が蓄えられており、そのほとんどは角層細胞中にあることは知られている (Fig. 1を参照)。一方、角層へは体内から絶えず水分が供給されており角層表面から外界へは約5 mg cm<sup>-2</sup>h<sup>-1</sup>の割合で水分が蒸散している。したがって、角層中の約20 wt%の水分は供給排出を繰り返しの定常状態にあり、角層中の水分子の振舞は非平衡状態にあると言える。前に述べた Bouwstraらの長周期ラメラ構造が皮膚のバリアー機能において重要な働きをしているという主張とかれらの長周期ラメラ構造の周期は水分量に依らないということから、細胞間脂質中には水分が無いと信じている研究者が多い。このような状況下において、われわれはヘアレスマウス角層において角層中の水分量を変えて小角X線回折実験を行った<sup>9)</sup>。小角X線回折像の水分量依存性を Fig. 6 に示す。下の赤線で示

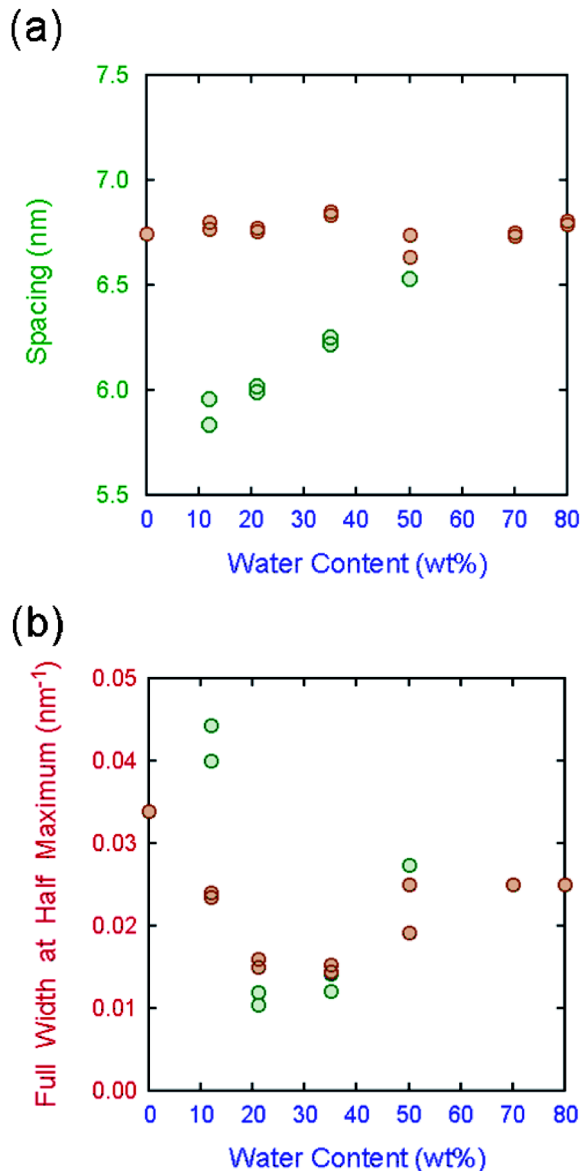


Fig. 7 (a) Spacing obtained from the 2nd order diffraction peak for the long lamellar structure and spacing obtained from the 1st order diffraction peak for the short lamellar structure as a function of the water content. (b) Full widths at the half maximum for the 2nd order diffraction peak for the long lamellar structure and for the 1st order diffraction peak for the short lamellar structure as a function of the water content.

す像 A から上の紫線で示す像 G に向かって角層中の水分量が増加している。白抜き矢印で示すピークが周期  $13.6 \text{ nm}^{-1}$  の長周期ラメラ構造による X 線回折ピークであって、5 次反射まで観測されている。黒色の矢印で示すピークが周期約  $6 \text{ nm}$  の短周期ラメラ構造による X 線回折ピークであって、2 次反射まで観測されている。短周期ラメラ構造は角層中の水分量とともに膨潤していることが分かる。散乱ベクトル  $0.15\text{--}0.17 \text{ nm}^{-1}$  付近のピークを 2 つのローレンツ関数で表し解析した。Fig. 7a は長周期ラメラ構造 (2

次反射  $13.6/2 = 6.8 \text{ nm}$ ) と短周期ラメラ構造 (1 次反射  $5.8\text{--}6.8 \text{ nm}$ ) の spacing の皮膚角層中の水分量依存性を示す。長周期ラメラ構造の周期は不変であるのに対し、短周期ラメラ構造の周期は水分量とともにほぼ直線的に膨潤していることが分かる。すなわち、短周期ラメラ構造の脂質層間に水層が入っており、角層全体の水分量の増加とともに水層の厚さが増加していると考えられる (Fig. 3 参照)。Fig. 7b に短周期ラメラ構造 (○) と長周期ラメラ構造 (●) の小角 X 線回折像の半値幅の水分量依存性を示す。この結果は短周期ラメラ構造の小角 X 線回折像の半値幅は水分量  $20\text{--}30 \text{ wt}\%$  で狭くなり、水分量がそれより少なくても多くても半値幅が広がることを示している (○)。それに伴い、長周期ラメラ構造の小角 X 線回折像の半値幅も水分量  $20\text{--}30 \text{ wt}\%$  で狭くなり、水分量がそれより少なくても多くても広がる (●)。われわれはこの現象を次のように説明している<sup>10)</sup>。角層中にある水分量の  $20\text{--}30 \text{ wt}\%$  の水のほとんどは角層細胞の中にあるが、少量の水が細胞間脂質をつくる短周期ラメラ構造の水層にしみだしている。短周期ラメラ構造の小角 X 線回折像の半値幅は角層中の水分量が  $20\text{--}30 \text{ wt}\%$  のときに狭くなることは、この水分量のときに短周期ラメラ構造が安定化することを意味している。このとき長周期ラメラ構造の小角 X 線回折像の周期は変わらないが  $20\text{--}30 \text{ wt}\%$  で半値幅は最も狭くなっており、長周期ラメラ構造と短周期ラメラ構造の間に相互作用が働いており、両構造が同時に安定化していることを意味している。その相互作用は角層中の水分量が  $20\text{--}30 \text{ wt}\%$  より少なくなっても多くなっても水分量を  $20\text{--}30 \text{ wt}\%$  に戻すような調節機構として働いているといえる。したがって、細胞間脂質は角層中の水分調節の役割を果たしている。

短周期ラメラ構造の膨潤現象も細胞間脂質の基本的な性質であるが、世界で受け入れられている訳ではない。これを支持する結果としては、軽水に代わって重水を用いたヒト角層の短周期ラメラ構造の時間変化の中性子散乱実験の報告がある<sup>11)</sup>。中性子散乱の実験の良い点は水層がある短周期ラメラ構造を際出させて観測できる点にある。Charalambopoulou ら<sup>11)</sup>は短周期ラメラ構造が膨潤していることをあまり強調していないが、本文中で角層を重水中に入れたところ時間とともに  $5.7$  から  $6.2 \text{ nm}$  にわたって周期が長くなると述べている。22 時間経つと短周期ラメラ構造による回折ピークは消えるというデータを示している。2007 年になって、Bouwstra はヒト角層を水中に入れて短周期ラメラ構造の時間変化を測定したところ、乾燥状態では周期は  $6.06 \text{ nm}$ 、3 時間後には  $6.13 \text{ nm}$ 、20 時間後には  $6.26 \text{ nm}$  になると口頭で発表している。このように短周期ラメラ構造は観測し難いところがあるが、角層と水の関係においては重要な役割をしているという認識は高まりつつあることは確実である。

X 線構造解析の結果から、角層中の水分量がほぼ  $20 \text{ wt}$

%になるように調節する機構があることを示した。これが正常な皮膚の角層中の水分量とほぼ一致していることは注目すべきことである。角層中の水分調節機構を正常な皮膚の状態に保つことにおいて重要な役割を果たしていることの分子レベルでの機構を示唆している。以上では角層内は一様な構造より成っているとして扱ってきたが、これは議論のあるところである。ここでは Warner らの皮膚の水分量の厚さ方向への変化の測定例を挙げる<sup>12)</sup>。角層中では真皮の方向に向かって水分量は15 wt%から40 wt%へ徐々に増加している（角層に真皮側から水分が供給され、外界に向かって蒸散して定常に保たれていることから、角層の構造が一様であっても水分量は勾配をもち角層中の深さに依るはずである）。角層全体をならした実験ではこの平均値を測定していると言える。注目すべきことは角層と顆粒層の間の急激な水分量の増加である。顆粒層では最終的には70 wt%程度にまで達する。顆粒層中で細胞接着に寄与している tight junction が皮膚中の水分保持機能において重要な役割を果たしているとの指摘があるが、これはまさに顆粒層によって体内と角層の水分量の大きな差を支えていることを意味する。したがって、tight junction に異常があれば、角層中の水分調節機構が最早追従できなくなり、水の角層表面からの異常な蒸散が加速され、体内の水が急激に失われ、終には死に至ることになる。

#### 4. おわりに

以上のように角層の放射光 X 線構造解析の研究は着実に進みつつあり、その重要性も認識されつつある。応用への展開もこれから飛躍的に進むと期待される。とくに、化粧品や経皮吸収促進剤の効果を角層の X 線構造解析により分子レベルで解明することは重要な課題である。現在、われわれはこれに向けての研究に取り組んでいるところである。ここで述べたように細胞間脂質のラメラ構造には長周期ラメラ構造と短周期ラメラ構造があり、炭化水素鎖の充てん格子には六方晶と斜方晶があって、これまで着目されていなかったこれらの構造それぞれへの化学物質の効果やそれぞれの構造変化間の相関を明らかにすることへと研究を展開している。また、角層に化学物質を作用させたときの構造変化を観測する方法を提案した<sup>13)</sup>。そのための試料容器に角層試料を収め、試料が動かないように保ちながら目的の溶液を外から注入し、試料の周りを溶液で満たし、溶液中の化学物質が試料の中に浸透させ、その結果生ずる角層中の細胞間脂質の構造変化を X 線回折像の時間変化の高分解能観測で行なおうというものである。生体由来の角層を用いる実験における大きな問題の一つは、同一種類の動物での実験であっても個体差の問題を避けて通る

ことは出来ないことである。この方法を用いることによって、その問題を回避できる。また、化学物質を作用したときの微小変化の観測も大きな課題の一つであるが、これも克服できる。前者は、逐次に変化する X 線回折像を解析することにより、化学物質の作用による構造の微小変化に個体差による大小の差があったとしても個体に依らず構造の変化が起きるということは検出できることによる。後者については、化学物質の作用により変化した像から作用する前の像を引くことによる強度差に着目することによって回折像の微妙な変化を検出することができる。さらに、微妙な構造変化が検出可能になったことにより、角層細胞中のソフトケラチンの構造変化の測定も可能になった。これらの成果の報告については別の機会に譲る。

#### 謝辞

本研究を進めるに当たって、坂貞徳（メナード化粧品）、井上勝晶（JASRI, 現在, DIAMOND）、中沢寛光（関学）、國澤直美（資生堂）、小幡誉子（星薬大）の皆さんには大変お世話になった。ここに謝意を表します。ここで紹介した研究成果の一部は科研費基盤研究（C）（15540397）で行なわれた。この分野の放射光利用研究の推進に当たって、SPRING-8 利用推進協議会のご支援に感謝します。

#### 参考文献

- 1) B. Forslind and M. Lindberg: *Skin, Hair, and Nails* (Marcel Dekker, New York, 2004).
- 2) G. S. K. Pilgram, A. M. Engelsma-van Pelt, J. A. Bouwstra and H. K. Koerten: *J. Invest. Dermatol.* **113**, 403 (1999).
- 3) J. A. Bouwstra, G. S. Gooris, J. A. van der Spek and W. Bras: *J. Invest. Dermatol.* **97**, 1005 (1991).
- 4) J. A. Bouwstra, F. E. R. Dubbelaar, G. S. Gooris and M. Ponc: *Acta Derm. Venereol. Supp.* **208**, 23 (2000).
- 5) S. Y. E. Hou, A. K. Mitra, S. H. White, G. K. Menon, R. Ghadially and P. M. Elais: *J. Invest. Dermatol.* **96**, 215 (1991).
- 6) I. Hatta, K. Nakanishi and K. Ishikiriyama: *Thermochim. Acta* **431**, 94 (2005).
- 7) I. Hatta, N. Ohta, K. Inoue and N. Yagi: *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 1830 (2006).
- 8) J. Israelachvili: *Intermolecular & Surface Forces*, 2nd edition (Academic Press, London, 1991).
- 9) N. Ohta, S. Ban, H. Tanaka, S. Nakata and I. Hatta: *Chem. Phys. Lipids* **123**, 1 (2003).
- 10) I. Hatta and N. Ohta: *Photon Factory Activity Report 2003 Part A, Highlights* 49 (2004).
- 11) G. Ch. Charalambopoulou, Th. A. Steriotis, Th. Hauss, A. K. Stubos and N. K. Kanellopoulos: *Physica B* **350**, e603 (2004).
- 12) R. R. Warner, M. C. Myers and D. A. Taylor: *J. Invest. Dermatol.* **90**, 218 (1988).
- 13) 八田一郎, 涌井義一: 特願2006-269164.

● 著者紹介 ●



**八田一郎**

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  
E-mail: hatta@spring8.or.jp

専門：生物物理学

**【略歴】**

1967年東京工業大学大学院理工学研究科博士課程修了(物理学専攻)理学博士。東京工業大学理学部物理学科助手，名古屋大学工学部応用物理学科助教授，名古屋大学工学部応用物理学科教授，2002年4月名古屋大学名誉教授，福井工業大学工学部教授を経て，2006年8月より現職。



**八木直人**

財団法人 高輝度光科学研究センター・  
利用研究促進部門副部門長  
E-mail: yagi@spring8.or.jp

専門：非結晶 X線回折

**【略歴】**

1975年東京大学物理工学科卒業，1980年東北大学医学部助手，1982年医学博士，1990年東北大学医学部講師，1997年財団法人 高輝度光科学研究センター・主席研究員，2007年より現職。



**太田 昇**

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  
E-mail: noboru\_o@spring8.or.jp

専門：X線回折

**【略歴】**

2003年3月名古屋大学大学院工学研究科 博士後期課程修了，2003年4月財団法人 高輝度光科学研究センター・協力研究員，2008年9月より現職。

## Synchrotron X-ray scattering study on stratum corneum of skin: Toward applied research based upon basic research

**Ichiro HATTA** Japan Synchrotron Radiation Research Institute/SPring-8  
1-1-1 Kouto, Sayo, Hyogo 679-5198, Japan

**Noboru OHTA** Japan Synchrotron Radiation Research Institute/SPring-8  
1-1-1 Kouto, Sayo, Hyogo 679-5198, Japan

**Naoto YAGI** Japan Synchrotron Radiation Research Institute/SPring-8  
1-1-1 Kouto, Sayo, Hyogo 679-5198, Japan

**Abstract** On considering the applied research on stratum corneum of skin, it is indispensable to know the structure at the molecular level. However, there is even now in a controversy among the researchers who are performing its X-ray scattering study. Here we introduce our solution for the two problems: One is the correlation between the lamellar structures and hydrocarbon-chain packings in intercellular lipid matrix and the other is the existence of water layers in the short lamellar structure. These studies have become possible for the first time by making good use of synchrotron small-angle/wide-angle X-ray diffraction. Based upon the structural evidence, we can further carry out the applied research in stratum corneum.