

角質層の異物防御に関する研究

(Spring-8 放射光 X 線を用いた皮膚角質層の解析)

静岡県立大学 大学院 薬品製造工学

伊藤嘉章, 佐塚泰之、園部尚

序論

皮膚は細菌、ウイルスなどの感染のみならず生体外の異物を排除する重要な器官である。そして、この防御機能は、皮膚最外層の角質層にて担われているが、20 回程度のテープ貼付の繰り返しにより容易に剥離され、バリア機能は簡単に消失する。バリア機能の消失は、免疫機能低下や火傷などの患者では致命傷となる。すなわち、数十 μm 程度と薄い角質層は、感染防御、異物排除にとって重要な役割を担っている。このバリア機能は、コレステロール、セラミド、脂肪酸などの細胞間脂質¹⁾により構成されている。Bouwstra ら^{2,3)}は放射光 X 線散乱を用い、角質層には短周期ラメラ相と長周期ラメラ相が存在することを示した。さらに、角質層から抽出した脂質をシートに噴霧し薬物の透過試験を行い、角質層の脂質が角質バリアの機能に重要な役割を担っていることを報告した^{3,4)}。しかし、作成したシートによる薬物透過性と Wilschut⁵⁾らのヒト皮膚透過性予測値には大きな差があり、詳細な角質層のバリア機能については明らかでない。そこで、細胞間脂質と皮膚透過性との関係を明らかとするため、分離または合成した脂質ではなく、ユカタンミニブタ皮膚の角質層を調整し、角質層中の細胞間脂質の特性について検討を行った。本研究では、放射光 X 線散乱にて、角質細胞が埋め込まれた脂質の方向性および温度の影響について検討を行った。

材料と方法

角質層はユカタンミニブタ皮膚(日本チャールズリバー)より調整した。すなわち、ユカタンミニブタ背部皮膚を 60°C のリン酸緩衝液に3分浸し、基底層付近より角質部を剥離した。さらに、1%トリプシン溶液中で1分間消化し、蒸留水にてよく洗浄後試験に用いた。試験には、調整した角質層を 64 枚程度重ね 1mm 程度にカットし、乾燥後試験サンプルとした。測定は、Spring-8 施設の BL40 B2ビームラインの小角 X 線散乱測定装置にて、波長 0.1 nm、カメラ長 1.5 m の条件にて CCD 検出器を用い実施した。なお、角質層の加温はリンク製加熱ステージ 10033 を用いた。なお、角質層は、25°C ~ 85°C の範囲で加熱し、10°C ごとに測定を行った。

結果

角質細胞が埋め込まれた脂質の方向性について検討するため、ユカタンミニブタ背部皮膚の角質シートを調整した。Figure 1は、X線の照射方向と小角X線回折ピークとの関連について示した。ユカタンミニブタ皮膚角質層は、ヒト、マウスなどと同様、長周期ラメラ構造と短周期ラメラ構造に由来する回折ピークを示し、短周期ラメラ構造の周期は 5.9~6.4nm、長周期ラメラ構造の周期は 14~16nm であった。ユカタンミニブタ角質層の短周期ラメラ構造の周期は Bouwstra が示すヒト、マウスの短周期ラメラ構造と同様であったが、長周期ラメラ構造の周期はヒト、マウスのと異なりより長い値を示した。また、ユカタンミニブタ皮膚の長周期、短周期ラメラ構造の周期は、角質層の部位により異なることが明らかとなった。なお、X線照射方向の差によるX線回折ピークには大きな差は認められなかった。

次に、リンカムステージを用い、25°Cから 85°Cまで 10°Cごとに昇温させ、ユカタンミニブタ皮膚角質層の小角 X線回折ピークの変化を検討した。Figure 2 に 25~85°Cの小角X線回折ピークを示した。X線の照射方向により回折ピークの大きな差は見られなかったため、Figure 2 には角質層と平行に照射した小角X線回折ピークを示した。長周期ラメラ、短周期ラメラ構造ともに 25~55°Cで回折ピークの大きな変化は認められなかった。しかし、55 以上では長周期ラメラ、短周期ラメラ構造ともに回折ピークの低下が見られた。

また、短周期ラメラと長周期ラメラ構造の周期と温度の関係をプロットすると Figure 3 および Figure 4に示すように、長周期ラメラ構造の周期は 25~55°Cでは変化は見られなかったが、55°C以上では、温度依存的に周期の延長が見られた。しかし、短周期ラメラ構造の周期は25~85°Cで変化がなかった。

考察

Silvaら^{7,8)}は、高速示差熱分析計にて、ヒト皮膚には0~120°Cの間に8箇所の転移点があり、これらのうち6種が体温以上であることを報告している。また、8種のピークのうち7種は、クロロホルム、メタノール混合溶液で抽出できるが、50~60°Cの転移点は抽出できず蛋白に結合している可能性を示唆している。ユカタンミニブタ皮膚角質層の温度とX線散乱強度の検討から55°C以上で、長周期、短周期のラメラ構造のピーク強度が共に低下し、熱力学的な変化が予測された。Silvaらは、高速示差熱分析計にてヒト角質層の50~60°Cおよび61~79°Cの転移点の存在を報告しており、X線散乱の55°C以上での強度低下との関連が疑われる。しかし、両者の関係については明らかでない。そのため、角質のバリア機能の解析には放射光X線による測定のみならず、熱力学的な解析も必要であり、両者の関係について明らかにする必要がある。

また、すでに示したように高速示差熱分析計による50~60°Cの転移点は、クロロホルム、メタノール溶液でさえ抽出できない。そのため、この成分が角質細胞間脂質の物理化学的特性にどのよう

な影響を及ぼしているか不明である。そのため、角質層からの抽出や合成脂質による検討のみならず、動物またはヒト皮膚から分離した角質層による検討が必須とされる。

謝辞

SPring-8 での放射光X線利用研究に関して、共同研究者の各氏および測定に協力いただいた宮崎司(日東電工)に感謝の意を表したい。また、本稿で示した研究結果は(財)高輝度光科学研究センター 2006B 萌芽的研究支援 利用研究課題 [課題番号: 2006B1689]の元で行われ、施設使用の了承をいただいた(財)高輝度光科学研究センターに感謝の意を表したい。

参考文献

1. Schurer NY, Elias PM: The biochemistry and function of stratum corneum lipids., *Adv Lipid Res* 24:27-56, 1991
2. Bouwstra JA, Gooris GS, van der Spek JA, Bras W: Structural investigations of human stratum corneum by small-angle X-ray scattering., *J Invest Dermatol* 97:1005-1012, 1991
3. Bouwstra JA, Gooris GS, van der Spek JA, Lavrijsen S, Bras W: The lipid and protein structure of mouse stratum corneum: a wide and small angle diffraction study., *Biochim Biophys Acta* 1212:183-192, 1994
4. de Jager M, Groenink W, Bielsa i Guivernau R, Andersson E, Angelova N, Ponec M, Bouwstra J: A novel in vitro percutaneous penetration model: evaluation of barrier properties with p-aminobenzoic acid and two of its derivatives., *Pharm Res* 23:951-960, 2006
5. de Jager M, Groenink W, van der Spek J, Janmaat C, Gooris G, Ponec M, Bouwstra J : Preparation and characterization of a stratum corneum substitute for in vitro percutaneous penetration studies., *Biochim Biophys Acta* 1758:636-644, 2006
6. Wilschut A, ten Berge WF, Robinson PJ, McKone TE. : Estimating skin permeation. The validation of five mathematical skin permeation models. *Chemosphere.*, Apr;30(7):1275-96, 1995
7. Silva CL, Nunes SC, Eusebio ME, Pais AA, Sousa JJ: Thermal behaviour of human stratum corneum. A differential scanning calorimetry study at high scanning rates., *Skin Pharmacol Physiol* 19:132-139, 2006
8. Silva CL, Nunes SC, Eusebio ME, Sousa JJ, Pais AA: Study of human stratum corneum and extracted lipids by thermomicroscopy and DSC., *Chem Phys Lipids* 140:36-47, 2006

Figures legends

Figures 1: Small angle X-ray diffraction pattern obtained with different angle of Yucatan miniture pig stratum corneum.

Dark dot shows the diffraction pattern to which X-rays were irradiated in parallel to the skin. Light dot shows the diffraction pattern to which X rays are irradiated from the front of skin.

Figure 2: Small angle X-ray diffraction pattern of short and long periodicity phase obtained with Yucatan miniture pig stratum corneum.

Figure 3: The temperature induced long periodicity changes in small angle x-ray diffraction pattern of Yucatan miniture pig stratum corneum.

Figure 4: The temperature induced short periodicity changes in small angle x-ray diffraction pattern of Yucatan miniture pig stratum corneum.

Figure 1

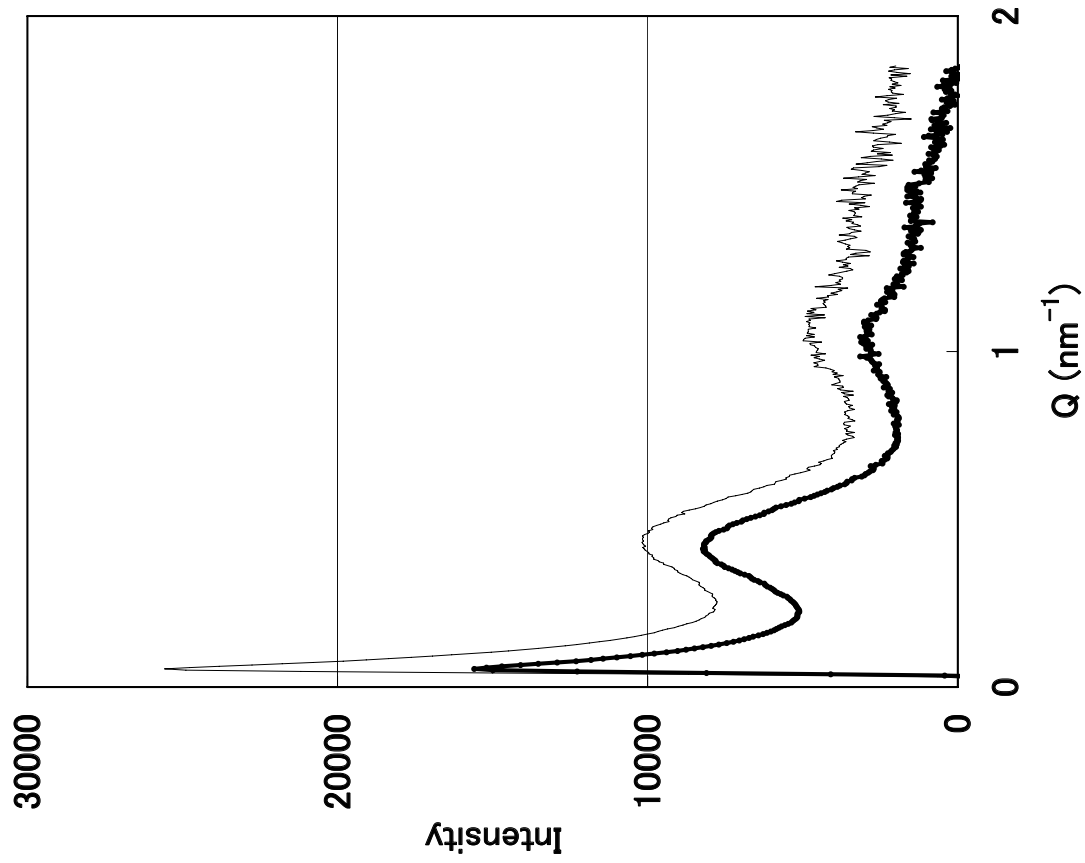


Figure 2

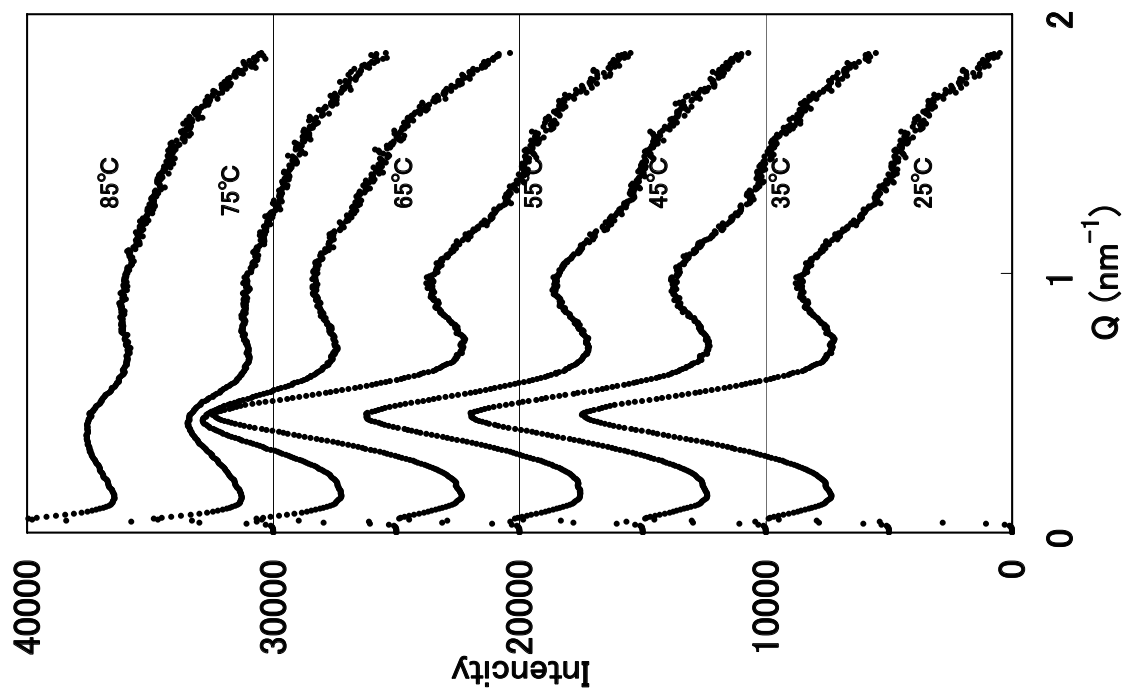


Figure 4

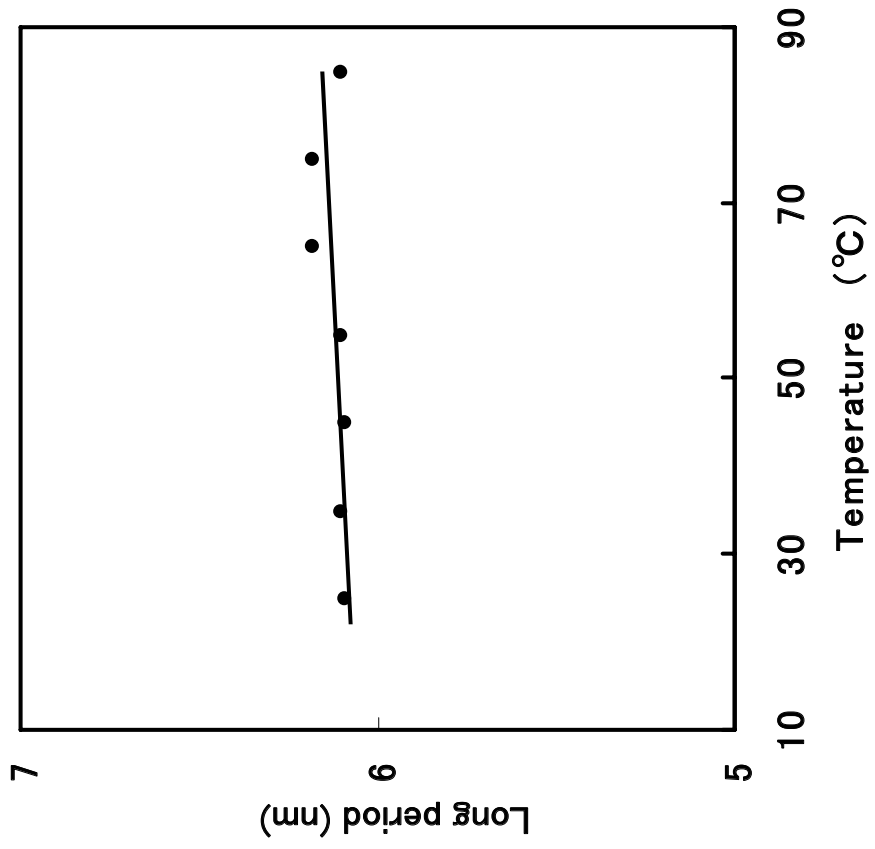


Figure 3

