

「皮膚角層の X 線構造解析の最近の研究から II」

八田一郎 (JASRI)

第 I 回の報告を 2006 年 11 月に行ったので,* それ以降の 3 年間の報告ということになる。はじめに, その中のパワーポイントからいくつかを抜粋し示す:

「経皮吸収の研究の展開」と題して次の紹介をした。

第十五改正日本薬局方(平成 18 年 4 月 1 日)

新薬局方の製剤総則の主な改正点の一つ:

新たな剤型として, 経皮吸収型製剤が追加された。

これは有効成分が皮膚を通して全身循環血流に送達すべく設計された製剤である。

最後に「まとめ」として

- ・ 哺乳動物での実験の重要性(経皮吸収; 2009 年からは EU で化粧品の試験のために動物を使用することが禁止; …)。細胞間脂質の基本構造の研究は? 機能の研究は?
- ・ ヒト角層での実験法の開発
- ・ 再構成膜および培養皮膚の作成とそれによる実験
- ・ 角層中の細胞間脂質のみならず, 角層細胞の役割. 角層中での水の振舞…

を挙げて, 次の皮膚角層の X 線回折実験における課題を示した。

その後, 皮膚角層の構造や機能については各種の分析機器を用いて研究が精力的に行われている。さて, 角層は大きく分けて細胞間脂質と角層細胞から成っており, 細胞間脂質が作るラメラ構造には少なくとも長周期ラメラ構造と短周期ラメラ構造があり, その炭化水素鎖の充填構造には六方晶と斜方晶がある。また, 角層細胞の中にはソフトケラチンがあり, いわゆる天然保湿因子が入っている。さらに, 細胞間脂質中に埋め込まれている角層細胞の表面はコーニファイド・エンベロープで囲まれている。これだけ複雑な系(システム)となると, X 線回折を使った構造解析をするとともに他の実験から得た結果を合わせて総合的に検討することによってはじめて事の本質に迫ることが出来る。角層および細胞間脂質において分子レベルでの構造形成を明らかに出来る X 線回折実験に限っても多くの研究が行われているが, 主要な部分に関して論争中のものが多々ある。

本研究会では第 II 回の報告として皮膚角層をめぐる X 線(中性子散乱を含む)構造解析に関する最近の状況を紹介し, 今後の皮膚角層を用いた X 線回折実験のストラテジーを立てていただ

* SPring-8 産業利用推進室(産業利用支援グループ)ホームページ: <http://support.spring8.or.jp/>> イベント情報> ワークショップ> ヘルスケア

くことを目指す:

- ・ Kiselev や Neubert らのグループの中性子散乱によるセラミド/コレステロール/硫酸コレステロール系の実験について紹介する.
- ・ Bouwstra グループの再構成膜のX線回折実験について紹介する. とくにX線回折の結果から実空間における電子密度を求める方法(位相決定法)について説明する. これについてはすでに行った研究会のテキストにもあるので是非参照していただきたい(「両親媒性脂質分子集合体のX線構造解析」高橋 浩(群馬大学), 2006/11/09 開催の高輝度光科学研究センター主催のワークショップのテキスト). * なお, SPring-8 利用推進協議会主催の「ヘルスケア研究会」の方のテキストも順次掲載していく予定ですので, ご参照ください. **
- ・ 三番目に, われわれが開発した“溶液セル”を使った実験結果から何が導き出せるかについて例を挙げて説明する. また, SPring-8 で行った他の最近の研究成果については添付する資料:「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, 太田, 八木, 放射光 21[6](2008)297)を参照してください.
- ・ 最後に重点産業利用課題の産業基盤共通の計画について紹介する.

*重点産業利用課題の公募の分類から

・「新領域」・・・

・「産業基盤共通」(民間 2 社以上参加必須):それぞれの産業分野に共通する課題を解決する目的、あるいは産業利用に有効な手法の共同開発を目的として、複数の企業を含むグループが一体となって取り組むもので、“新計測技術の確立、共通課題のデータベース化等”を図る研究を指します。申請代表者が複数の企業を含むグループを取りまとめて、1つの課題として申請して頂きます。ここでいう「複数の企業」とは、それぞれ参加する企業が同等かつ独立に成果を利用できる関係にあることを想定しています。また、産学官連携の研究グループによる利用の場合には、学と官は「複数の企業」とはカウントされません。

・「先端技術開発」・・・

以下に講演のパワーポイントおよび参考資料を掲載する.

* SPring-8 産業利用推進室(産業利用支援グループ)ホームページ: <http://support.spring8.or.jp/>> イベント情報>ワークショップ>ヘルスケア

** SPring-8 利用推進協議会ホームページ: <http://www.spring8.or.jp/ext/ja/iuss/>> 研究会と最近の活動>SPring-8 ヘルスケア研究会

皮膚角層のX線構造解析の研究動向Ⅱ

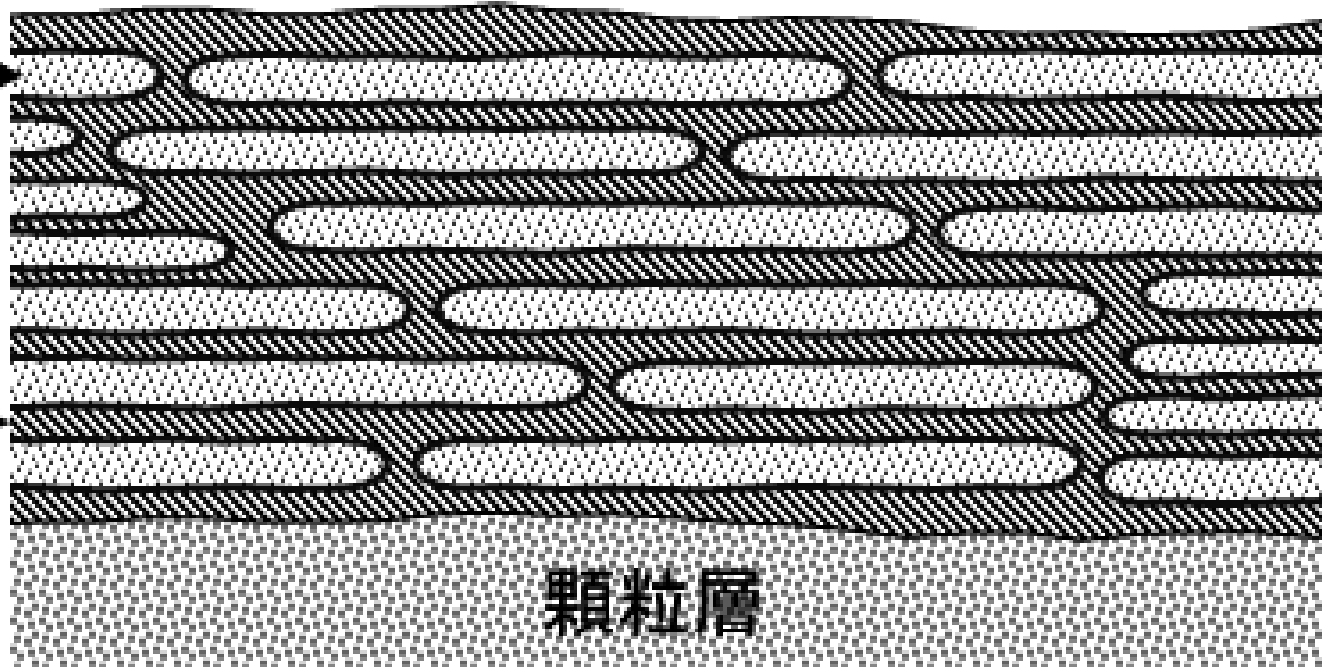
2009.12.22., 東京主婦会館

八田一郎 (JASRI)

皮膚角層 I (レンガ・モルタル・モデル)

大気

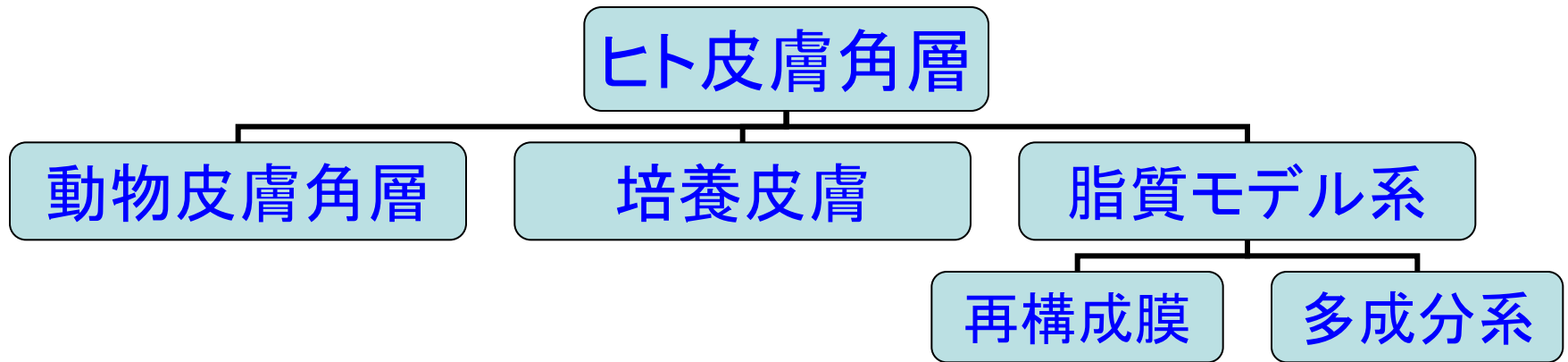
角層細胞
細胞間脂質



角層

顆粒層

皮膚角層を用いた研究のストラテジー



- ヒト皮膚角層：生体，テープストリッピング（低侵襲），切除（Biopredic International社のヒト皮膚角層を(株)ケー・エーシー から入手可能）
- 培養皮膚（よりヒト皮膚角層に近いものを目指して）
- 角層細胞（保湿効果は重要な課題）
- セラミド結晶の構造解析（単一成分系）

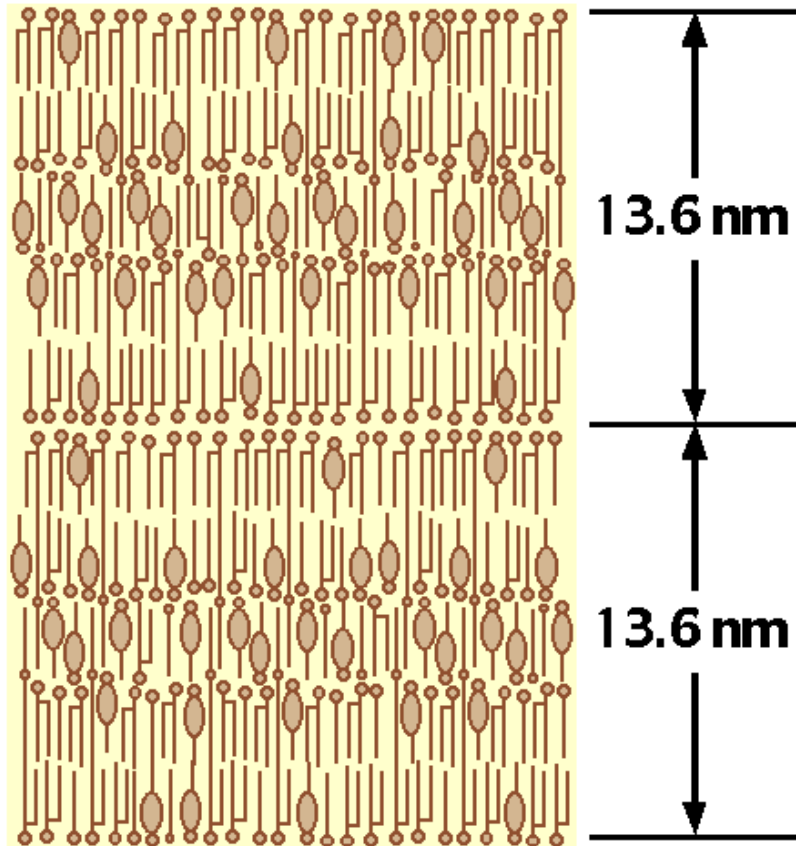
経皮吸収の研究の展開（I から抜粋）*

- 第十五改正日本薬局方（平成18年4月1日）
新薬局方の製剤総則の主な改正点の一つ：
新たな剤型として、**経皮吸収型製剤**が追加された。
これは有効成分が皮膚を通して全身循環血流に送達すべく設計された製剤である。

*<http://support.spring8.or.jp/>> イベント情報 >
ワークショップ > ヘルスケア

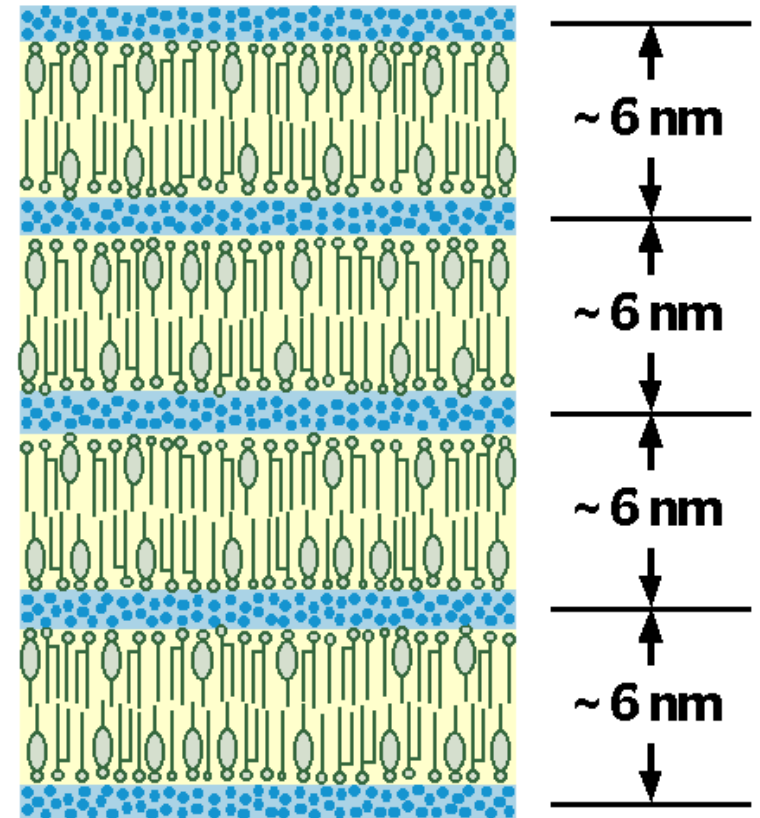
皮膚角層Ⅱ（細胞間脂質：ラメラ構造）

(a)



長周期ラメラ構造

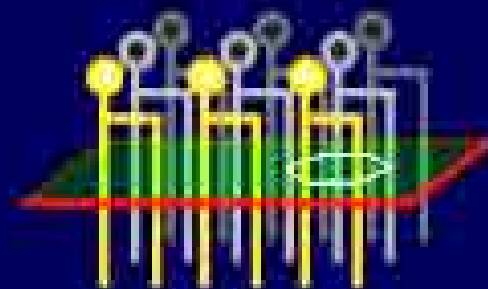
(b)



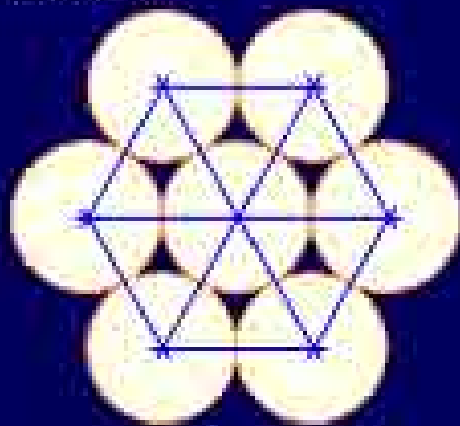
短周期ラメラ構造

皮膚角層 II (細胞間脂質: 炭化水素鎖充填構造)

Hydrocarbon chain packing



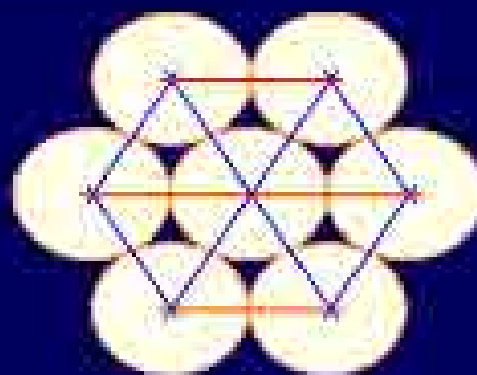
Hexagonal



$0.42 \text{ nm} \times 3$

六方晶

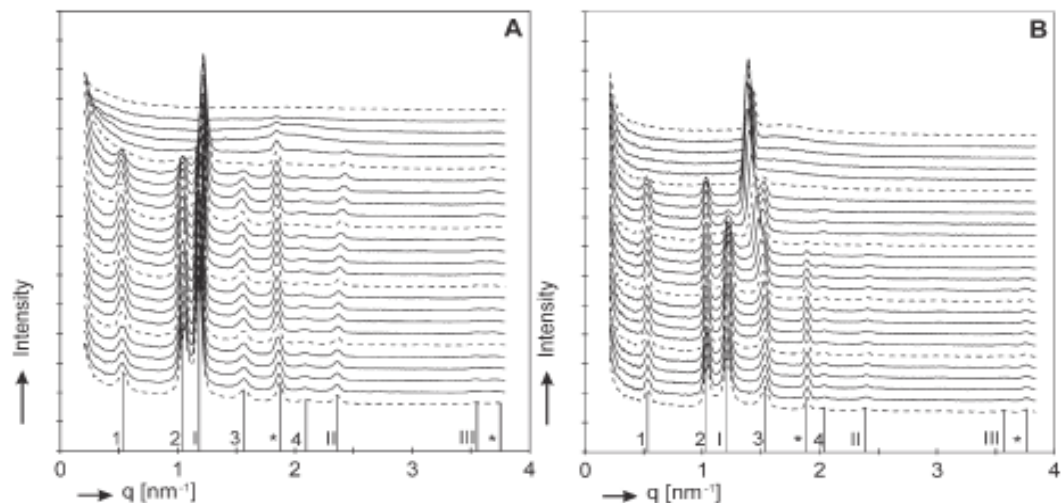
Orthorhombic



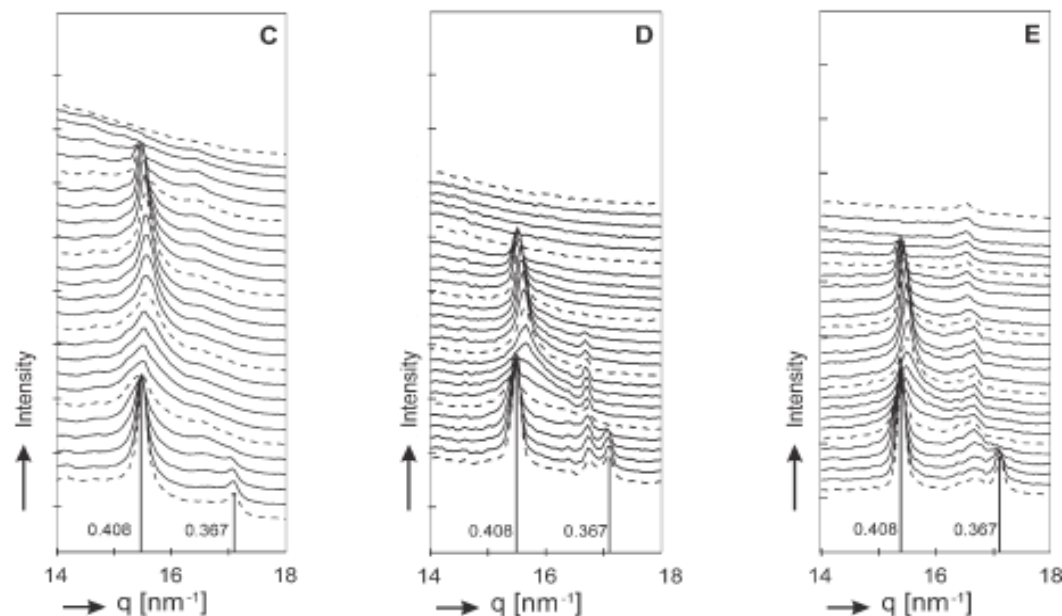
$0.42 \text{ nm} \times 2$
 $0.37 \text{ nm} \times 1$

斜方晶

Bouwstra's group, 再構成膜 (I から抜粋)



小角回折/
ラメラ構造



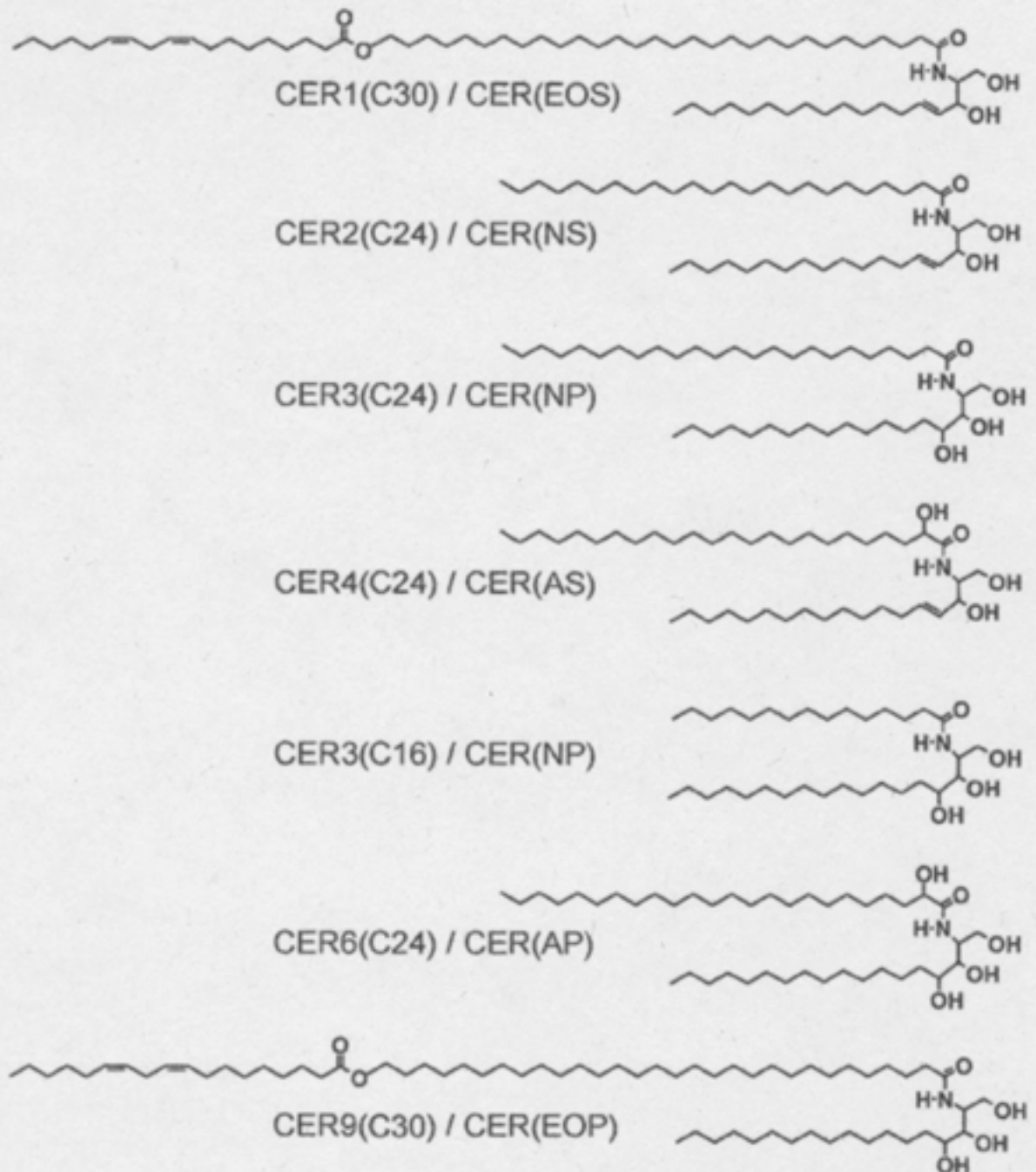
広角回折/
炭化水素鎖
充填構造

代替細胞間脂質(水分有(B,D)無(A,C))の小角・広角回折 / 12.2 nm, 5.4 nm; 0.408 nm, 0.367 nm

まとめ(I から抜粋)

- 哺乳動物での実験の重要性(経皮吸収; 2009年からはEUで化粧品の試験のために動物を使用することが禁止;...). 細胞間脂質の基本構造の研究は? 機能の研究は?
- ヒト角層での実験法の開発
- 再構成膜および培養皮膚の作成とそれによる実験
- 角層中の細胞間脂質のみならず, 角層細胞の役割. 角層中での水の振舞...

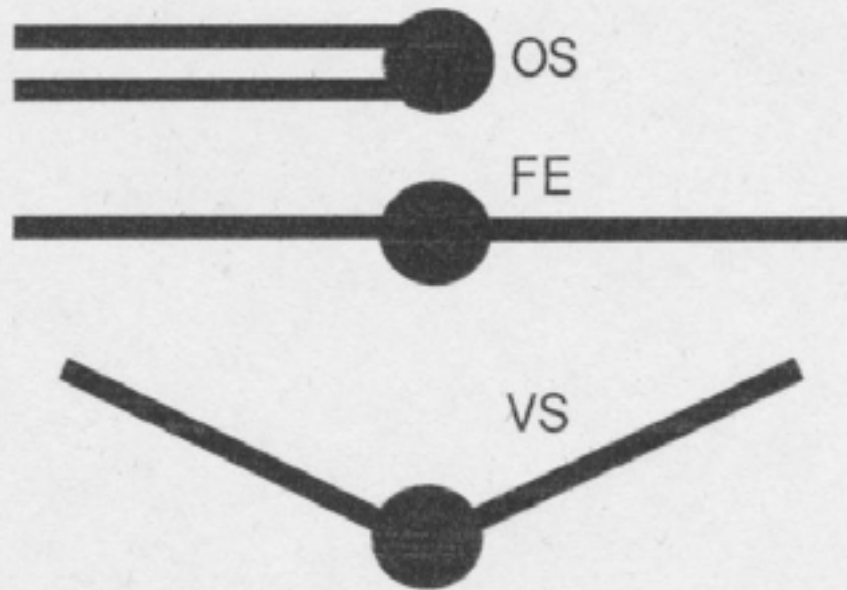
合成セラミドの 分子構造 /Mottaの表記 名



D. Groen,
G. S. Gooris
and J. A. Bouwstra,
Biophys. J. **97**
(2009)2242.

4成分(CER6/Ch/PA/ChS)系の構造 I

—CER6が取る構造—



B. Dahlén & I. Pascher,
Moleculararrangements
in sphingolipids-crystal
Structure of N-tetra-
cosanoylsphingosine,
Acta Cryst. B28
(1972)2396.

Fig. 8 Three possible conformations of CER6 inside the multi-layer: one-sided shape (*OS*), fully extended shape (*FE*) and V shape (*VS*)

M. A. Kiselev et al., Eur. Biophys. J. **34** (2005)1030.

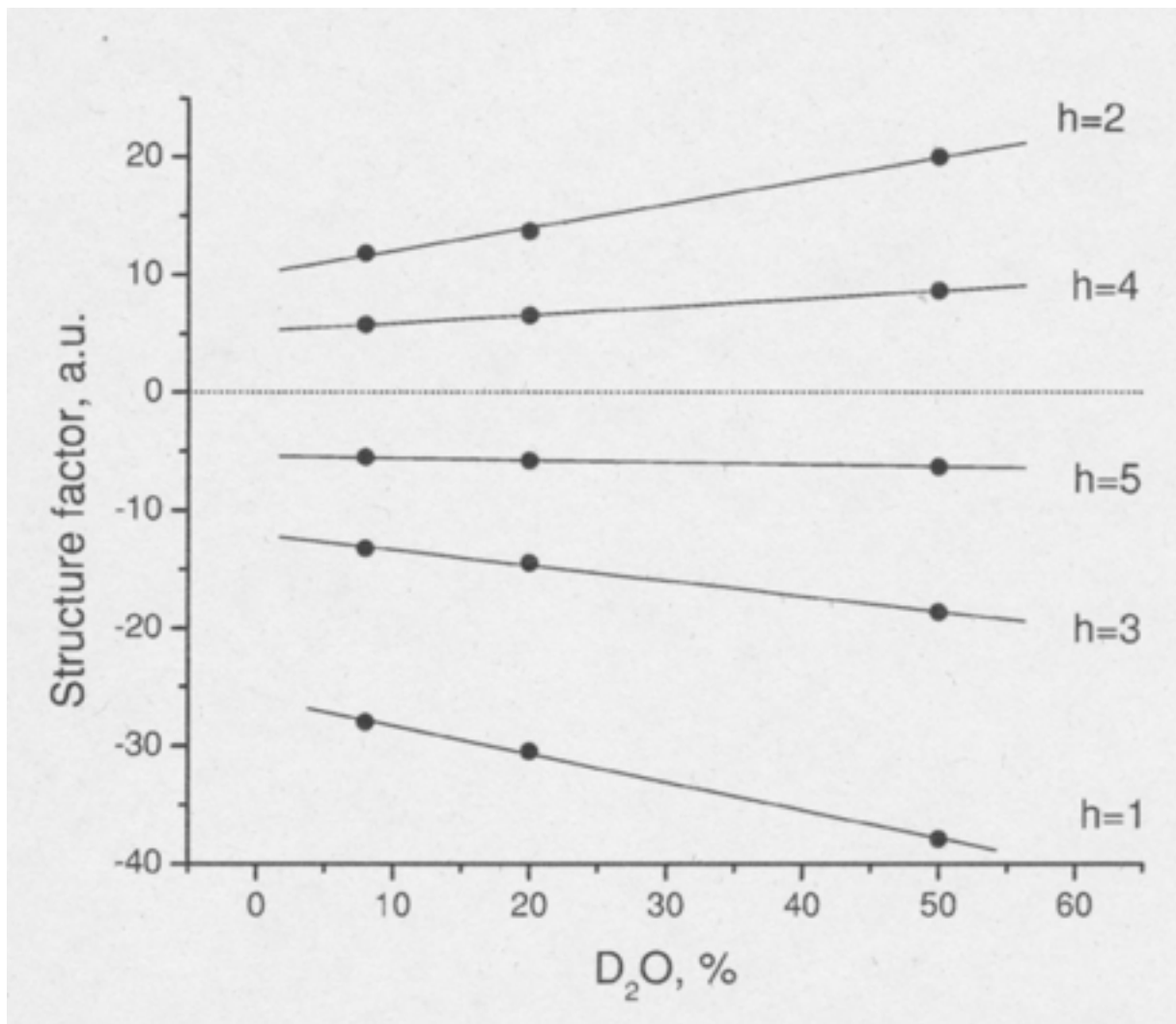
M. A. Kiselev, Crystallography Reports **52**(2007)549.

D. Kessner et al., Skin Pharm. & Physiol. **21**(2008)58.

4成分(CER6/Ch/PA/ChS)系の構造Ⅱ

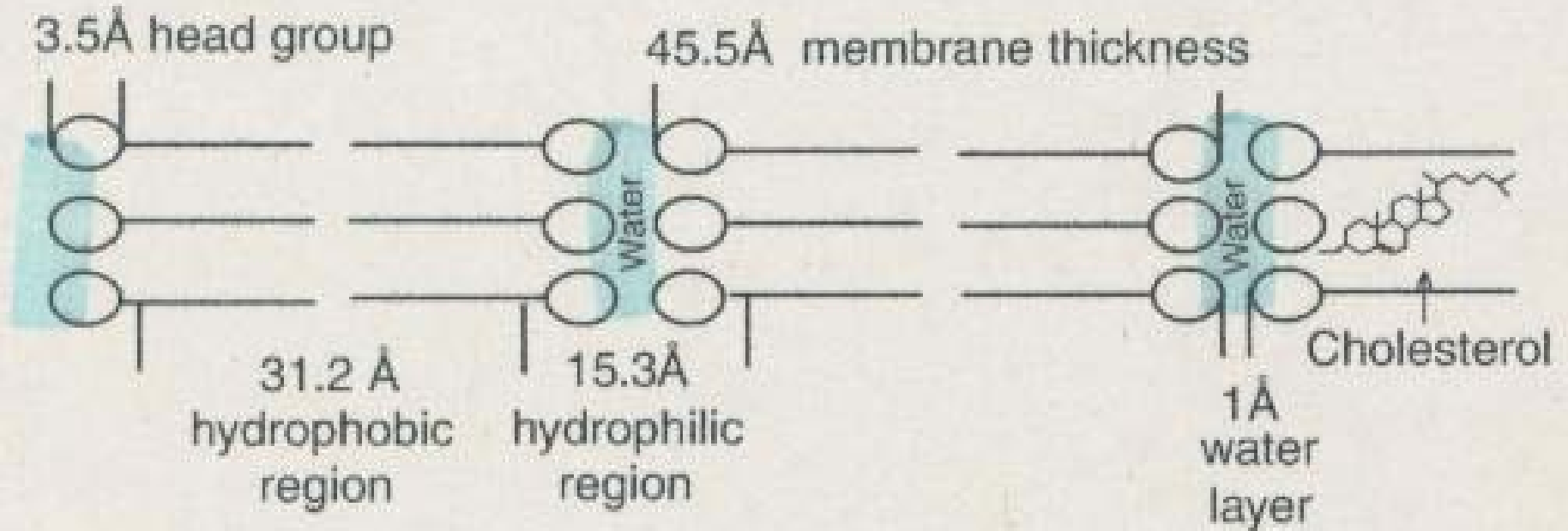
55: 25: 15: 5, weight ratio

—中性子散乱—



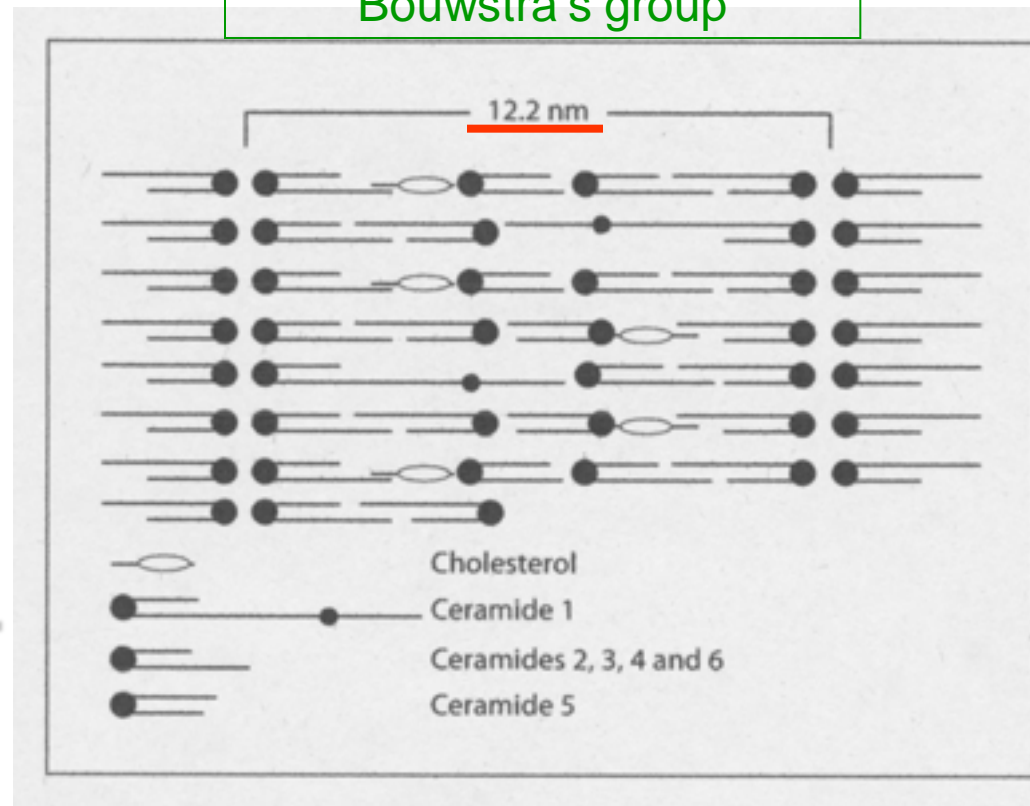
4成分(CER6/Ch/PA/ChS)系の構造Ⅲ

—飽和水和状態—



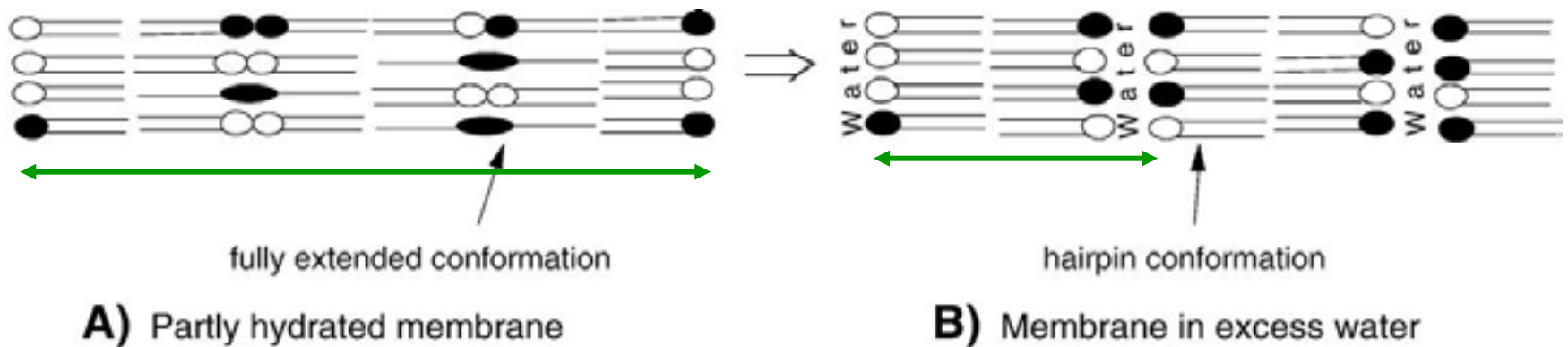
4成分(Cer6/Ch/PA/ChS)系の構造IV

Bouwstra's group



長周期ラメラ構造 ・短周期ラメラ構造

Neubert/Kiselev's group



50th International Conference on the Bioscience of Lipids,
1-5 September 2009, Regensburg, Germany における討論

再構成膜の電子密度分布 I

—試料調製—

成分	水和	処理温度(°C)	ラメラ周期(nm)
CerA/Chol/FFA 1:1:1	pH 5	70	12.3
CerA/Chol/FFA 1:1:1	pH 5	70	12.4
CerA/Chol/FFA 1:1:1	pH 5	70	12.1
CerA/Chol/FFA: ChSO4 1:1:1:0.1	pH 5	70	12.4
PigCER/Chol/FFA 1:1:1	No	60	12.8
PigCER/Chol/FFA 2:1:1	pH 5	60	13.0
PigCER/Chol/FFA/ISIS 2:1:1:1	pH 5	60	13.0
PigCER/Chol/FFA/IPIS 2:1:1:1	pH 5	60	13.4
PigCER/Chol/FFA/GMIS 2:1:1:1	pH 5	60	13.8
15% synthCER1+HCER[2..9]/Chol/FFA 1:1:1	pH 5	70	13.5
30% synthCER1+ HCER[2..9]/Chol/FFA 1:1:1	pH 5	70	13.4
CerA/Chol/FFA 1:1:1	pH 5	70	12.3

再構成膜の電子密度分布Ⅱ-1

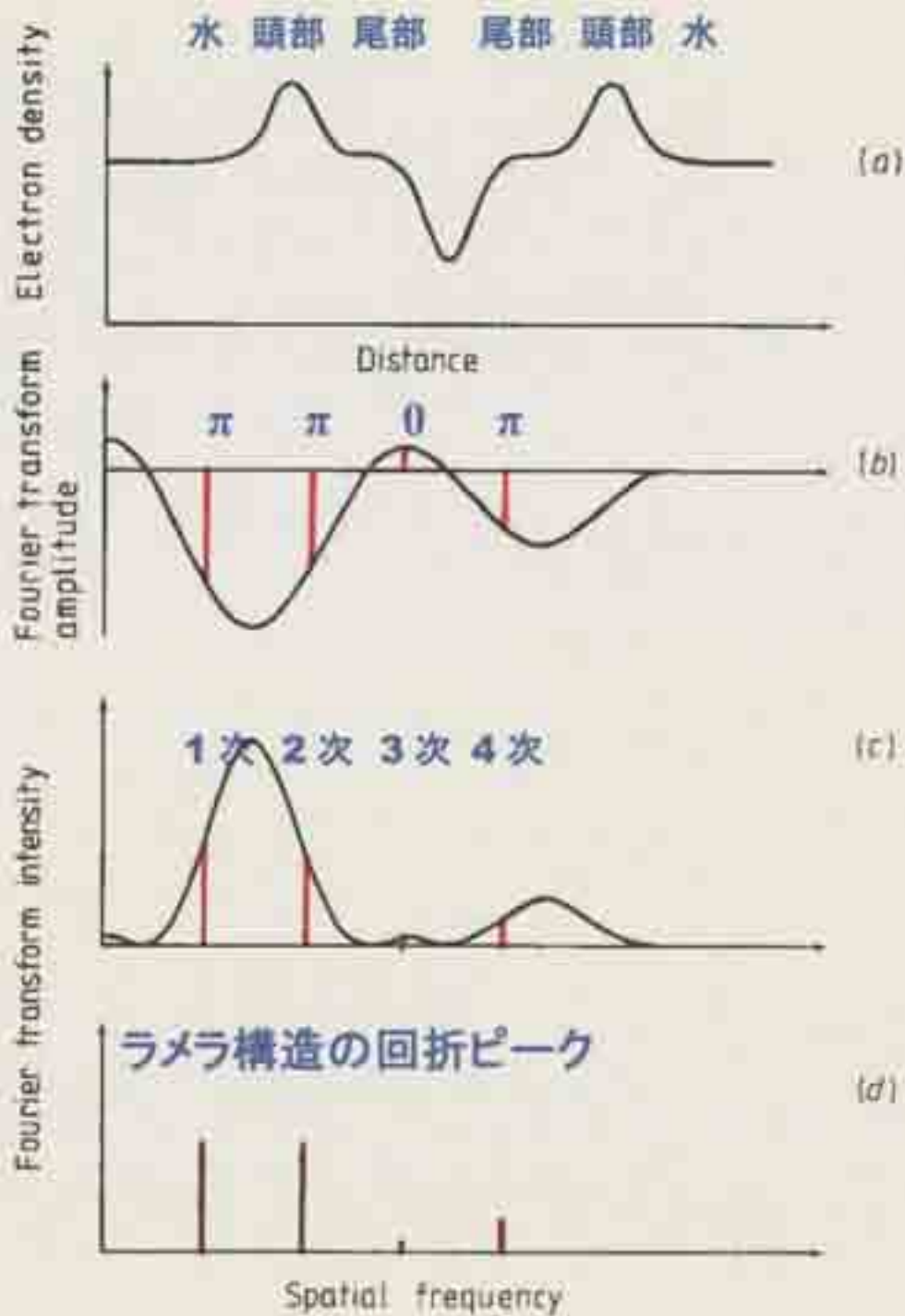
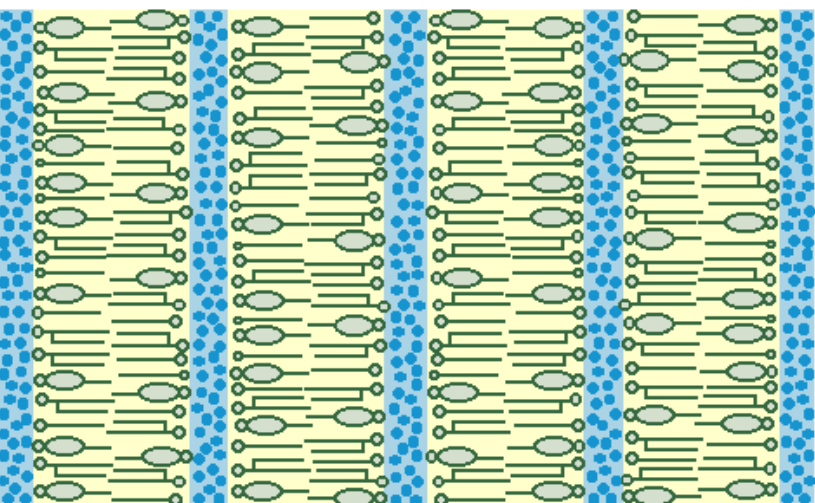
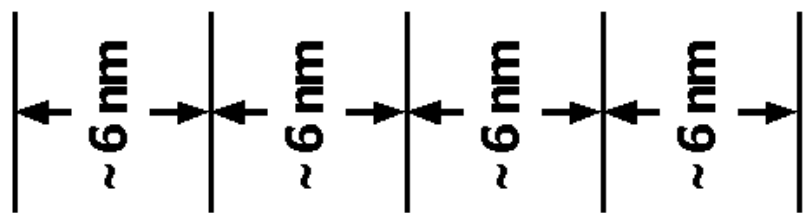
脂質ラメラ構造の電子密度分布の解析： Swelling method

「両親媒性脂質分子集合体のX線構造解析」*

高橋 浩(群馬大学)を参照

*<http://support.spring8.or.jp/>> イベント情報 >
ワークショップ > ヘルスケア

再構成膜の 電子密度分布Ⅱ-2 —位相を決める方法—

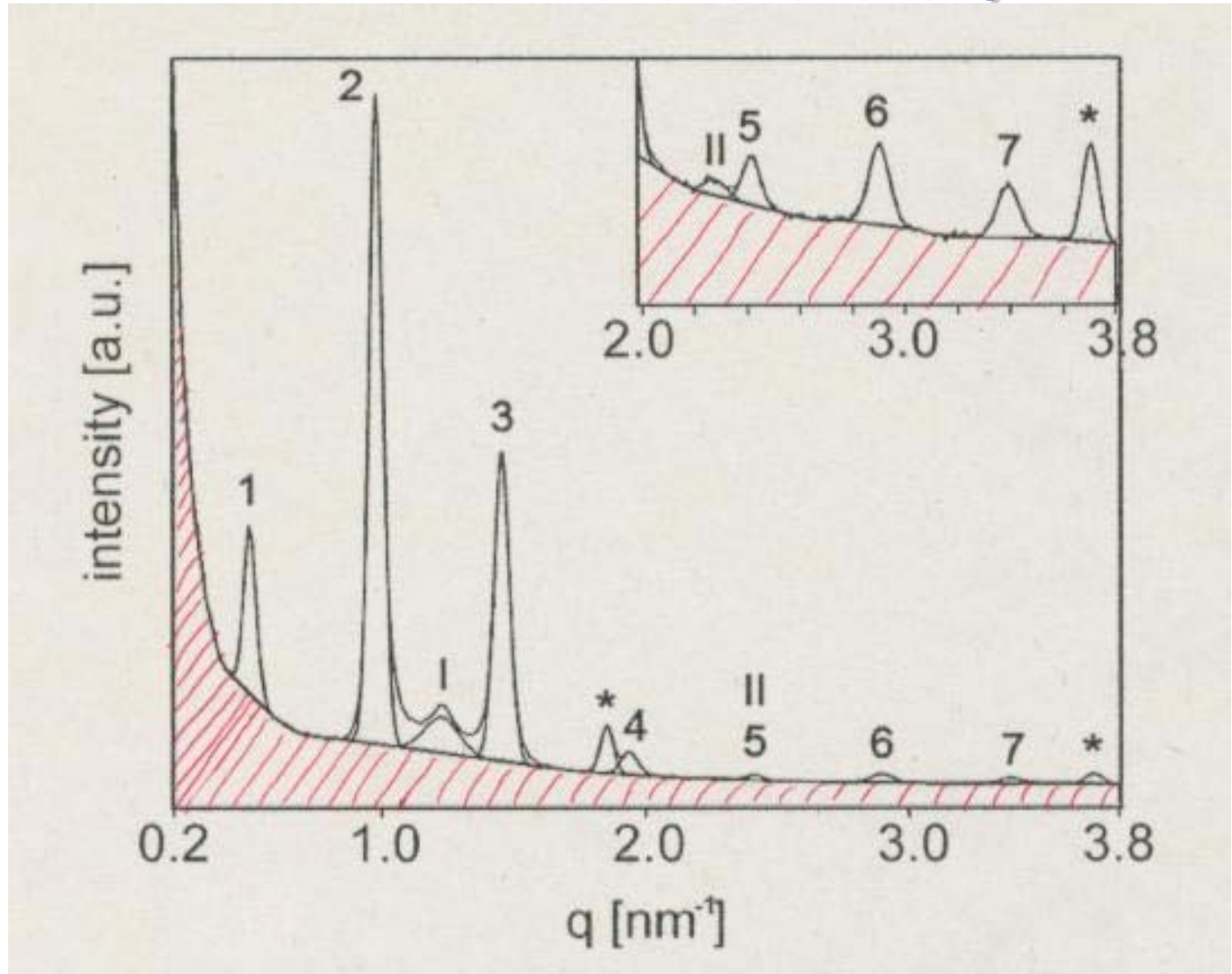


再構成膜の電子密度分布Ⅲ

中心対称のある脂質ラメラ構造 における位相 (0, π)

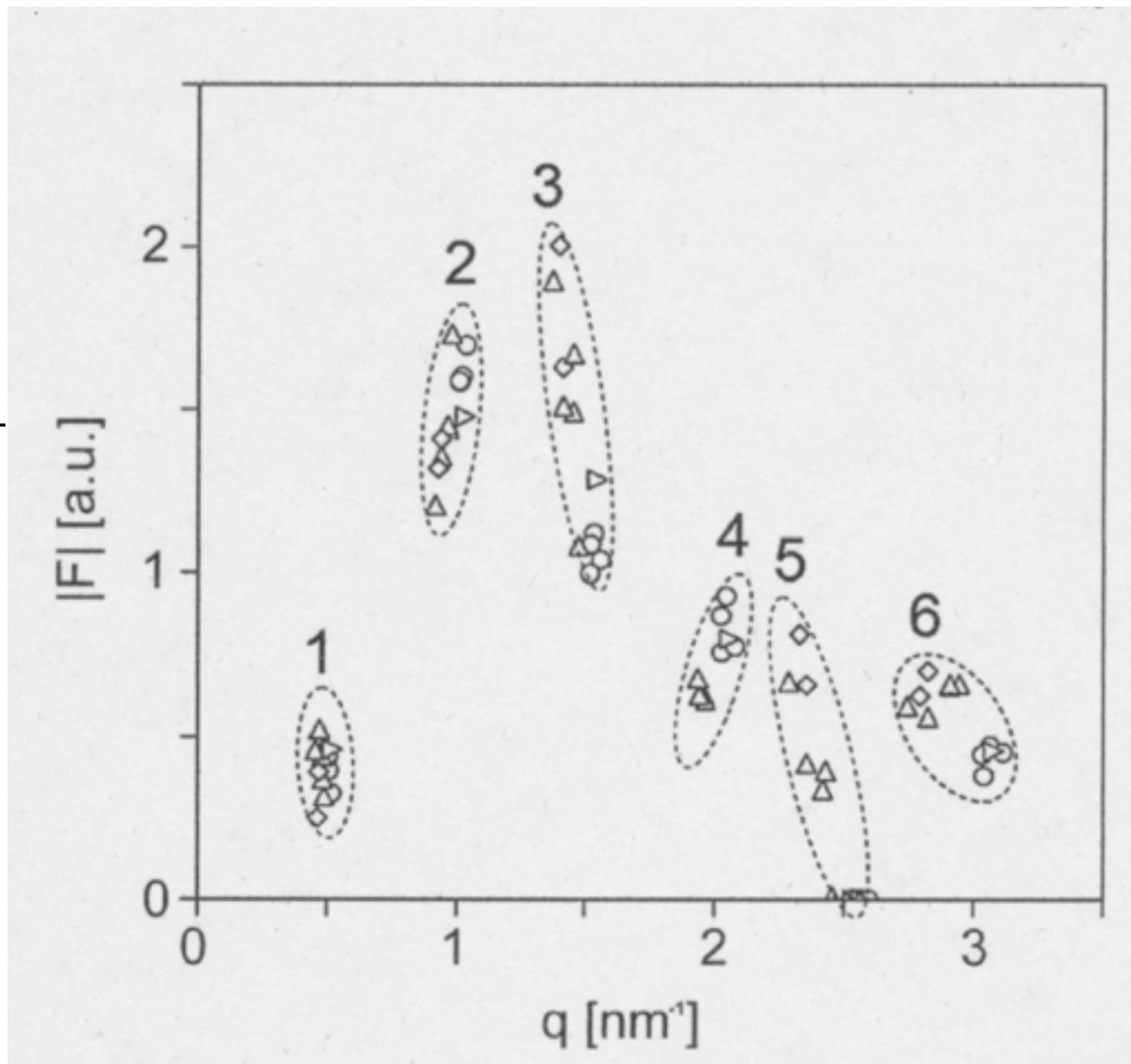
$$\begin{aligned}\pi &\rightarrow e^{\pi i} = -1 \rightarrow - \\ 0 &\rightarrow e^{0i} = +1 \rightarrow +\end{aligned}$$

再構成膜の電子密度分布Ⅳ —ラメラ反射(1,2,3,4,5,6,7)—



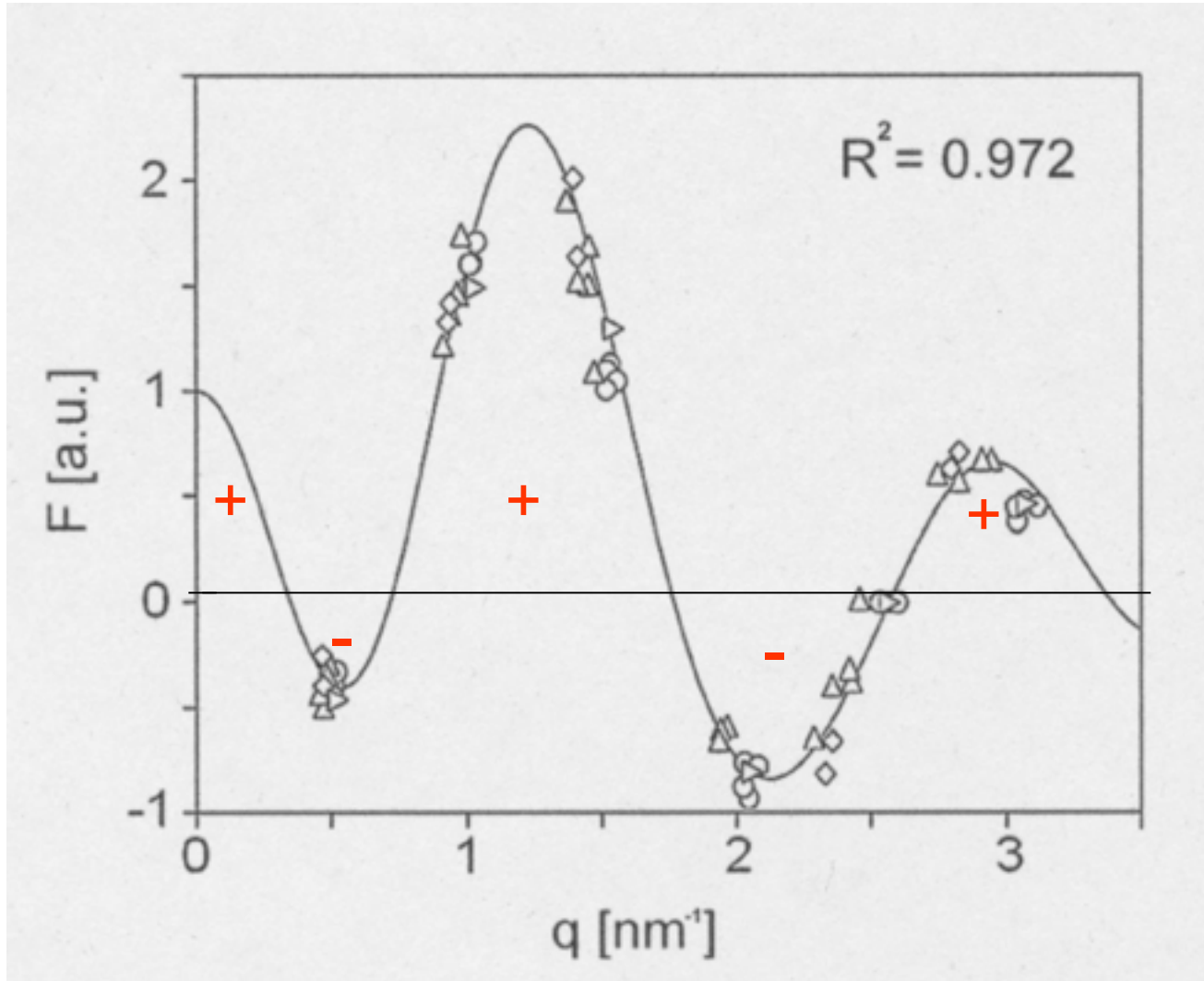
再構成膜の 電子密度分 布 V

$$\sqrt{\text{Intensity}} \times h^2$$



再構成膜の電子密度分布VI

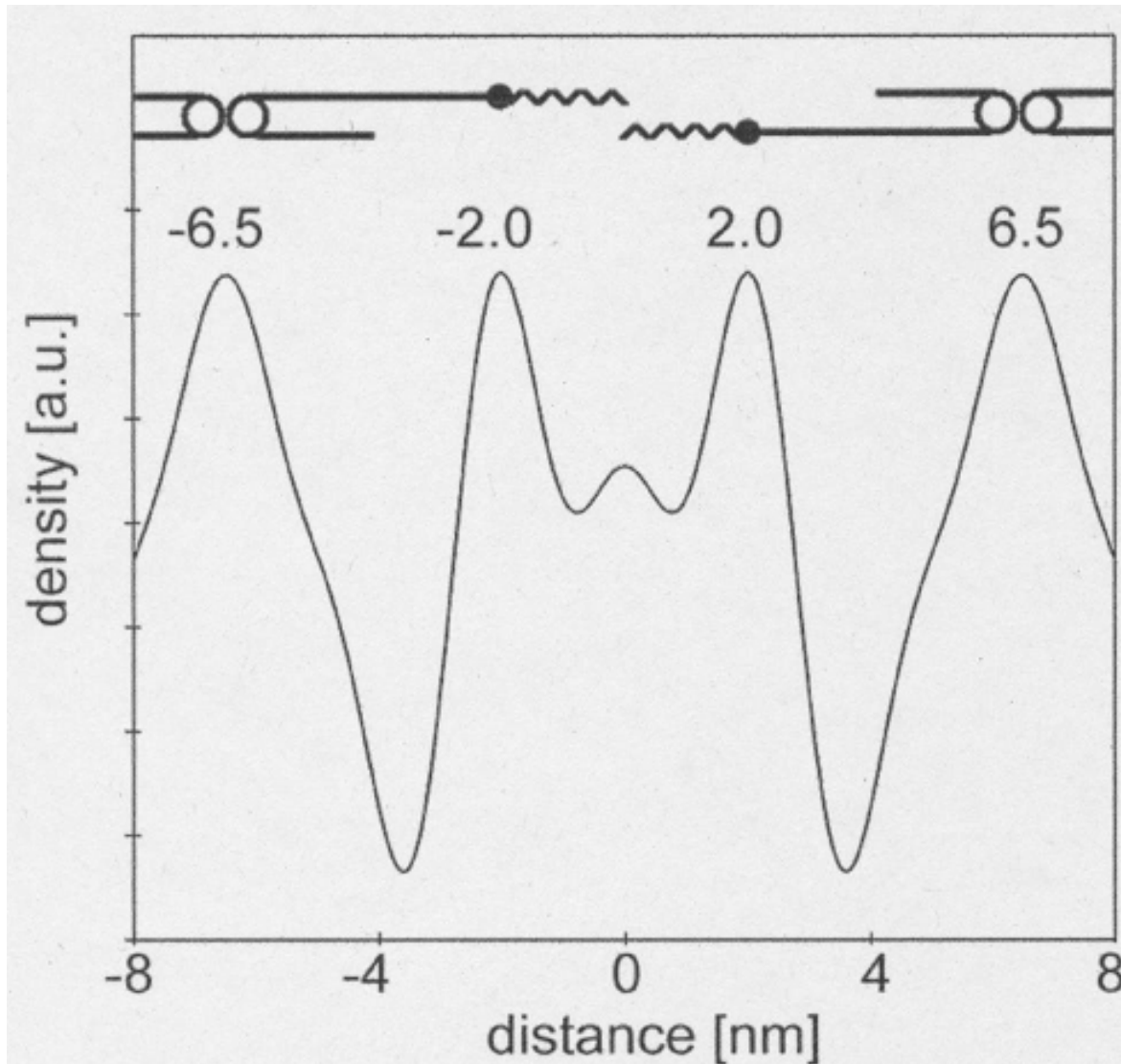
—再構成膜における位相決定—



位相

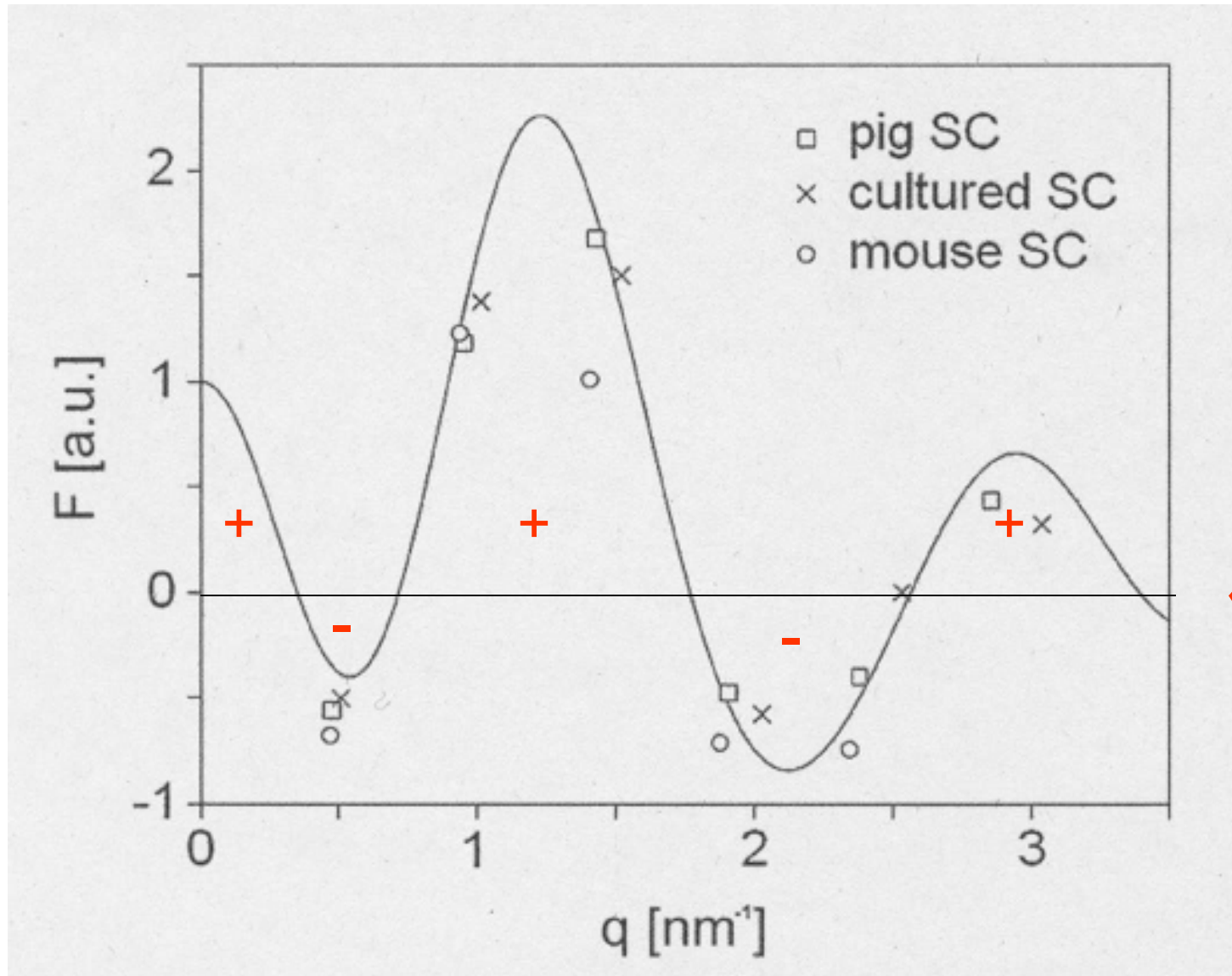
再構成膜の電子密度分布Ⅶ

—PigCER/CH/FA in 2:1:1—



再構成膜の電子密度分布Ⅷ

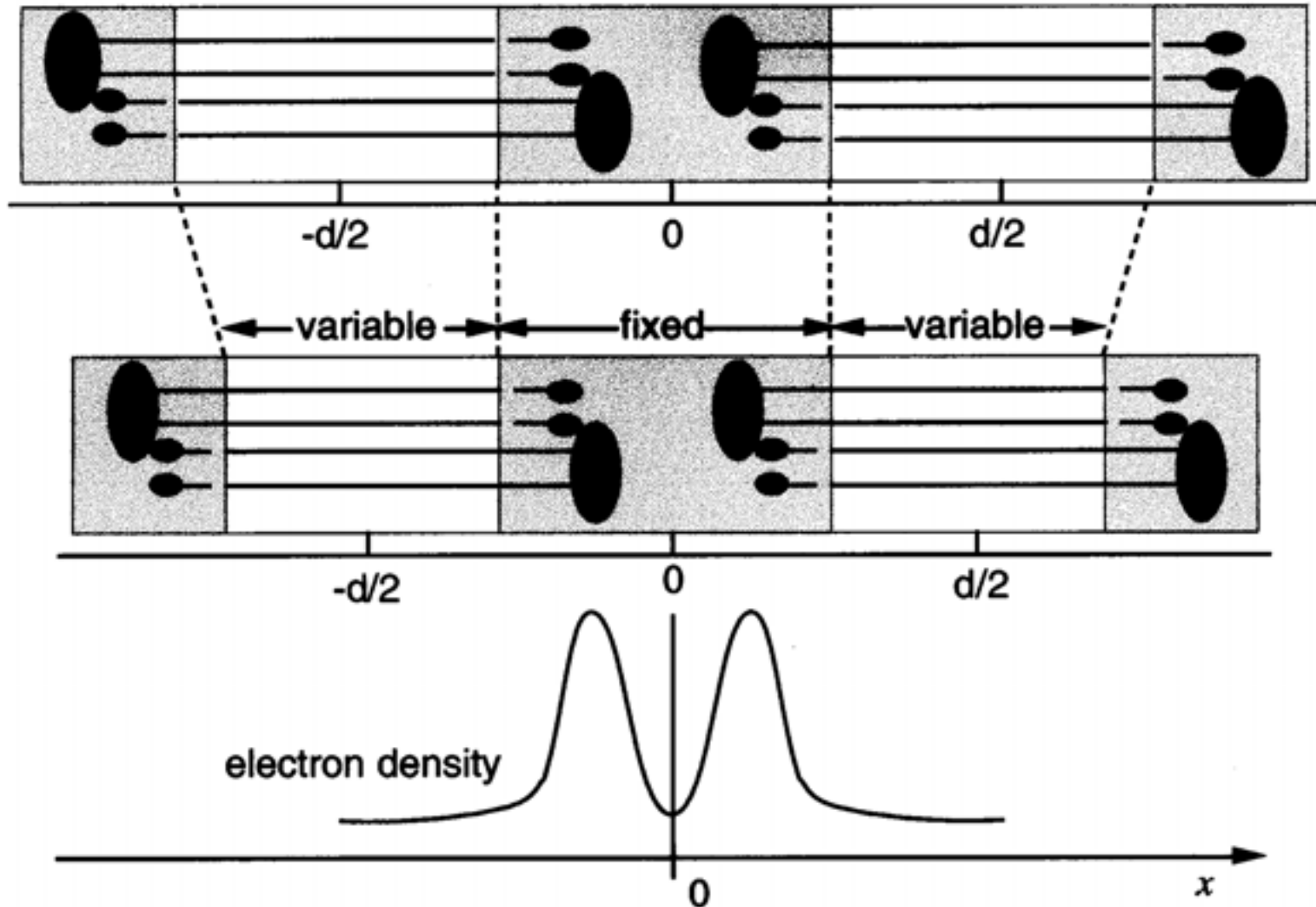
—ブタ, 培養(6次!), マウスにおける位相決定—



位相

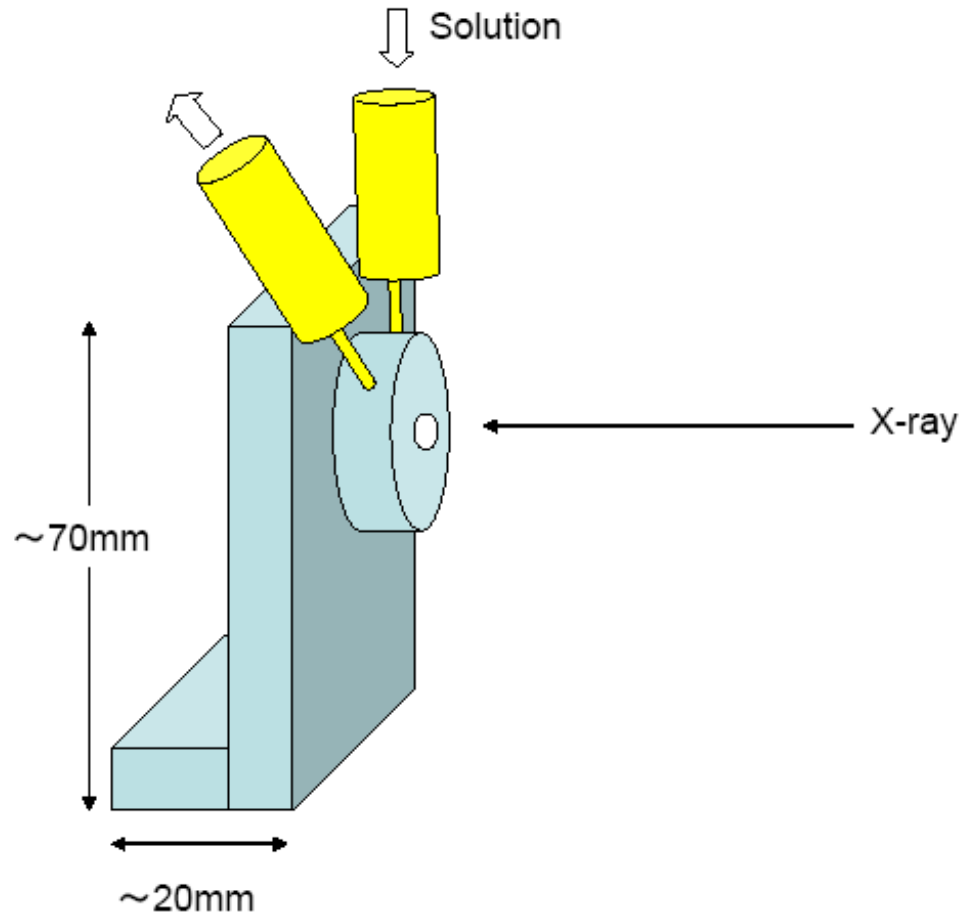
再構成膜の電子密度分布区

—炭化水素鎖部分を調節することによる方法—



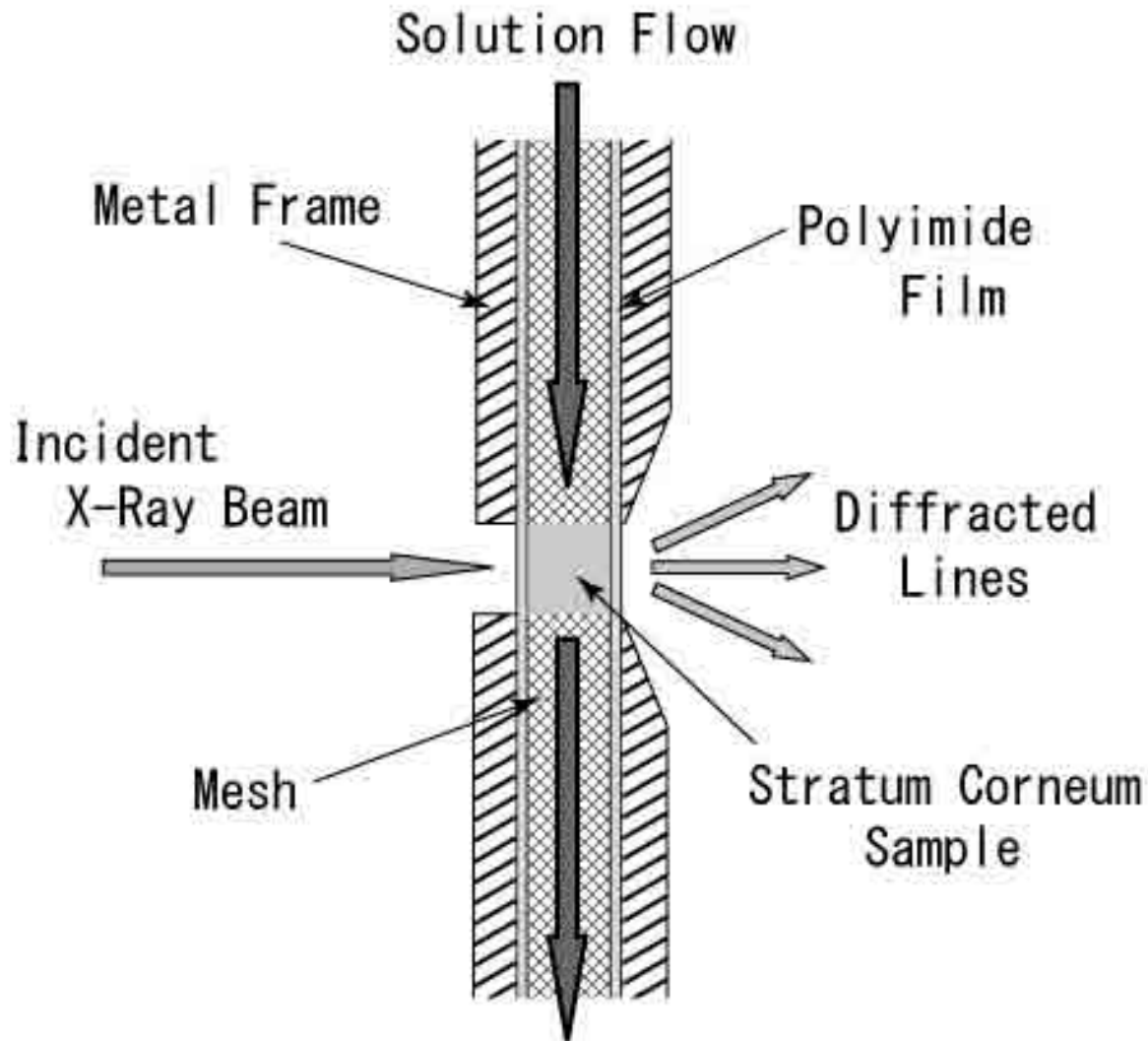
T. Adachi, Chem. Phys. Lipids **107**(2000)93.

“溶液セル”による実験*(I から抜粋)1



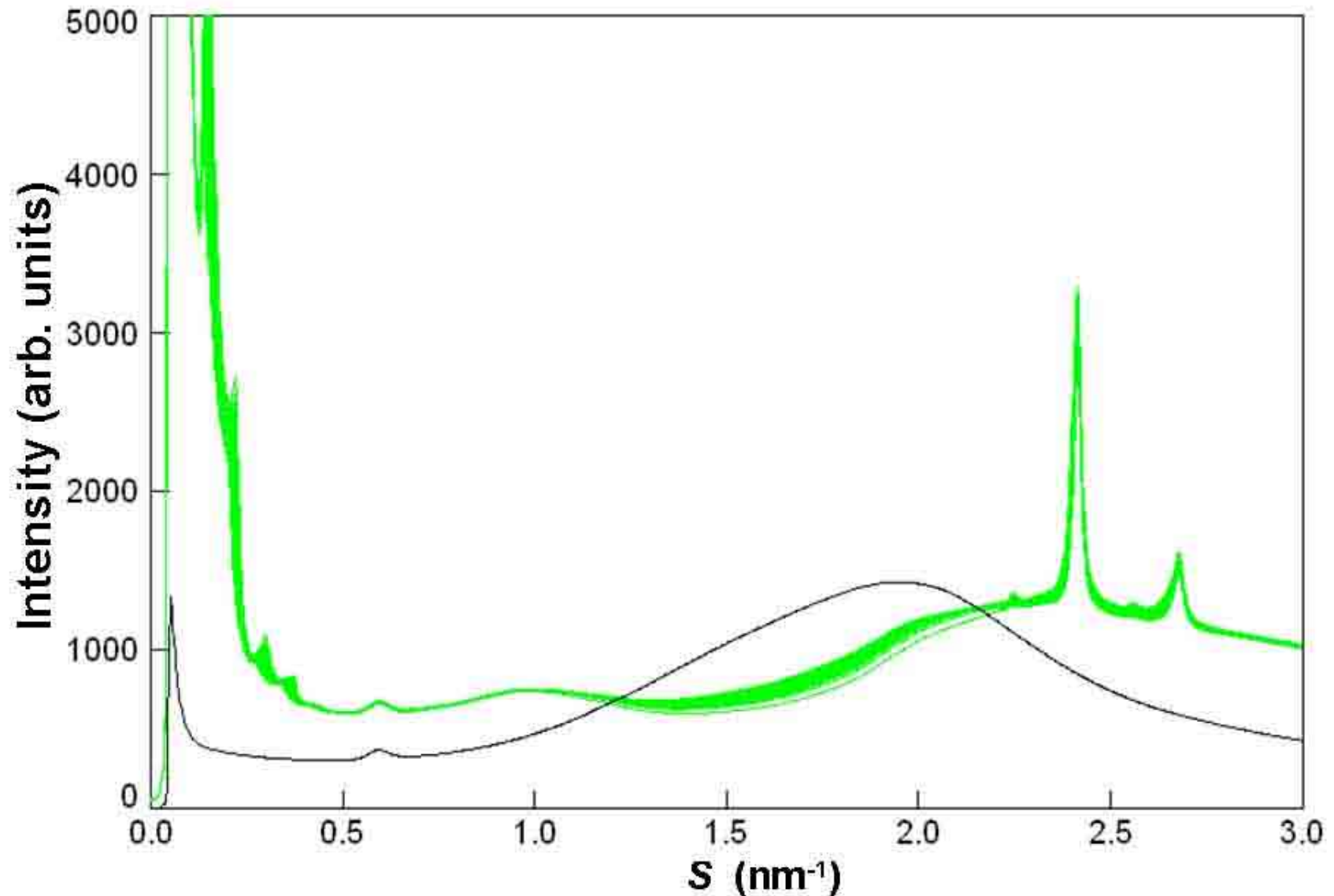
*八田, 涌井(特願2006, 公開2008)
販売先: スプリングエイトサービス(株)

“溶液セル”による実験2(断面図)

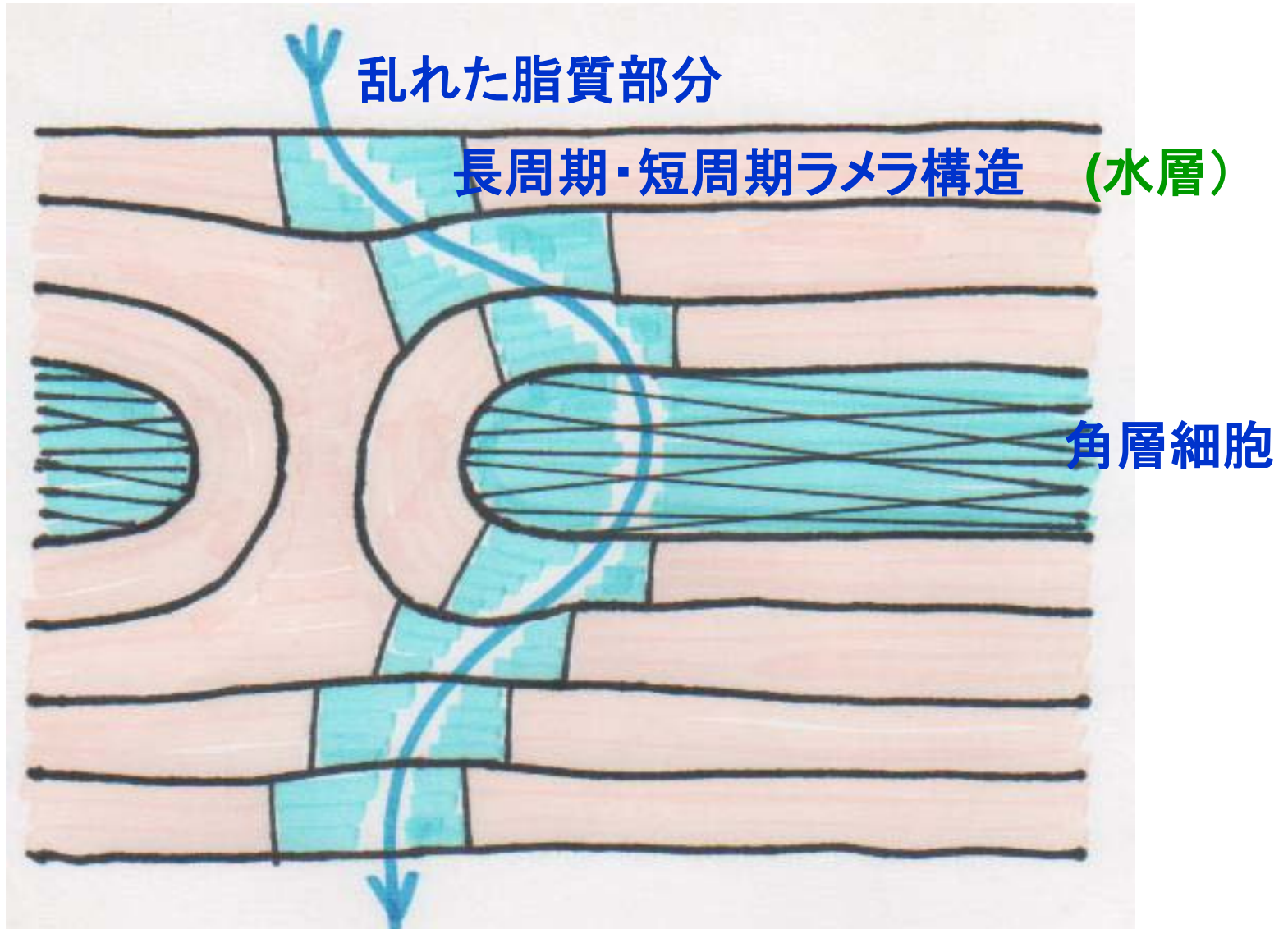


“溶液セル”による実験3

(リモンネンを作用したときの小角・中角・広角回折強度)

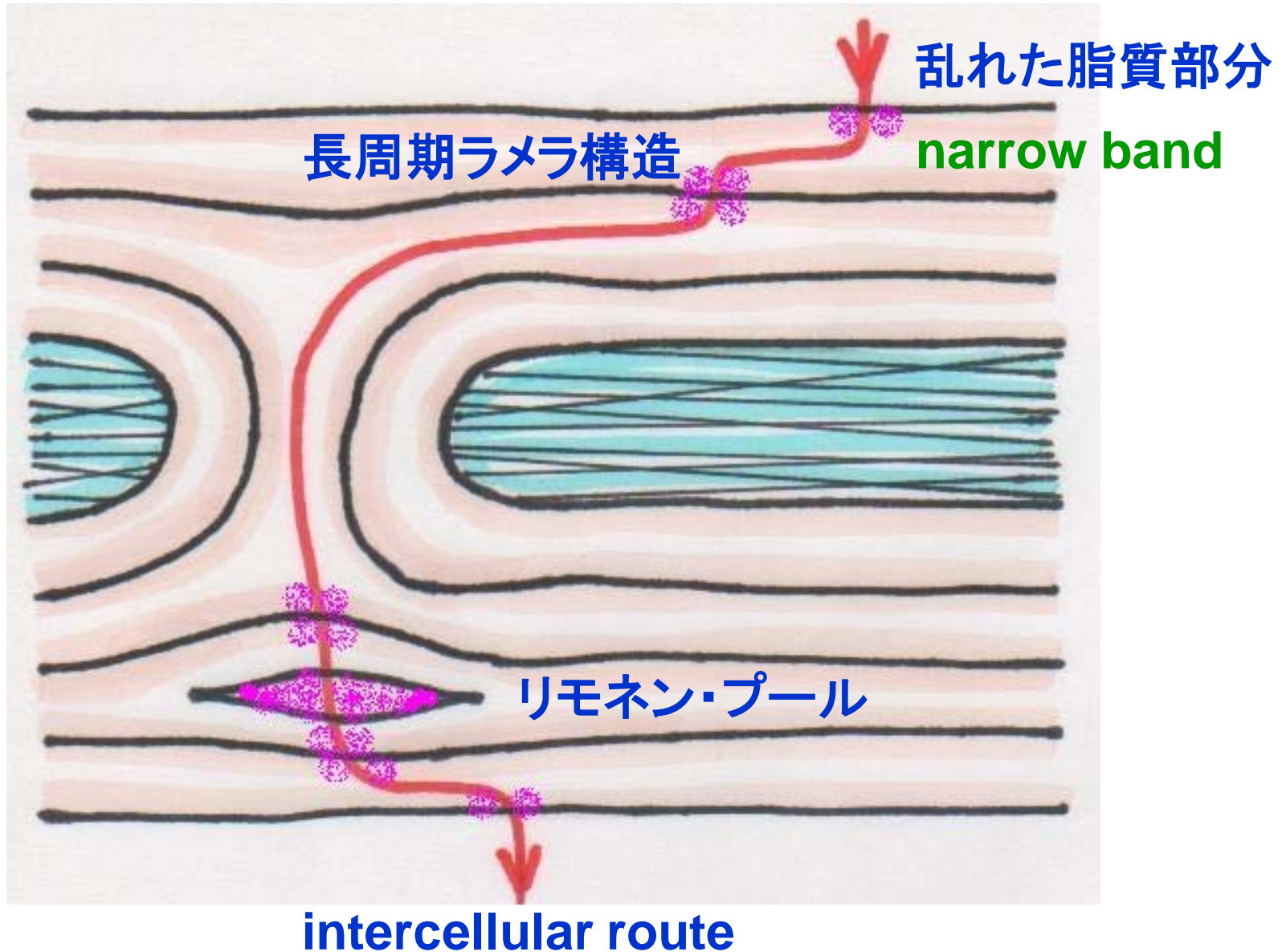


“溶液セル”による実験4 (エタノールの浸透経路)



transcellular route

“溶液セル”による実験5 (リモネンの浸透経路)



重点産業利用課題：産業基盤共通

1. 放射光X線回折を利用した角層細胞間脂質の構造解析に基づく医薬品・化粧品の開発

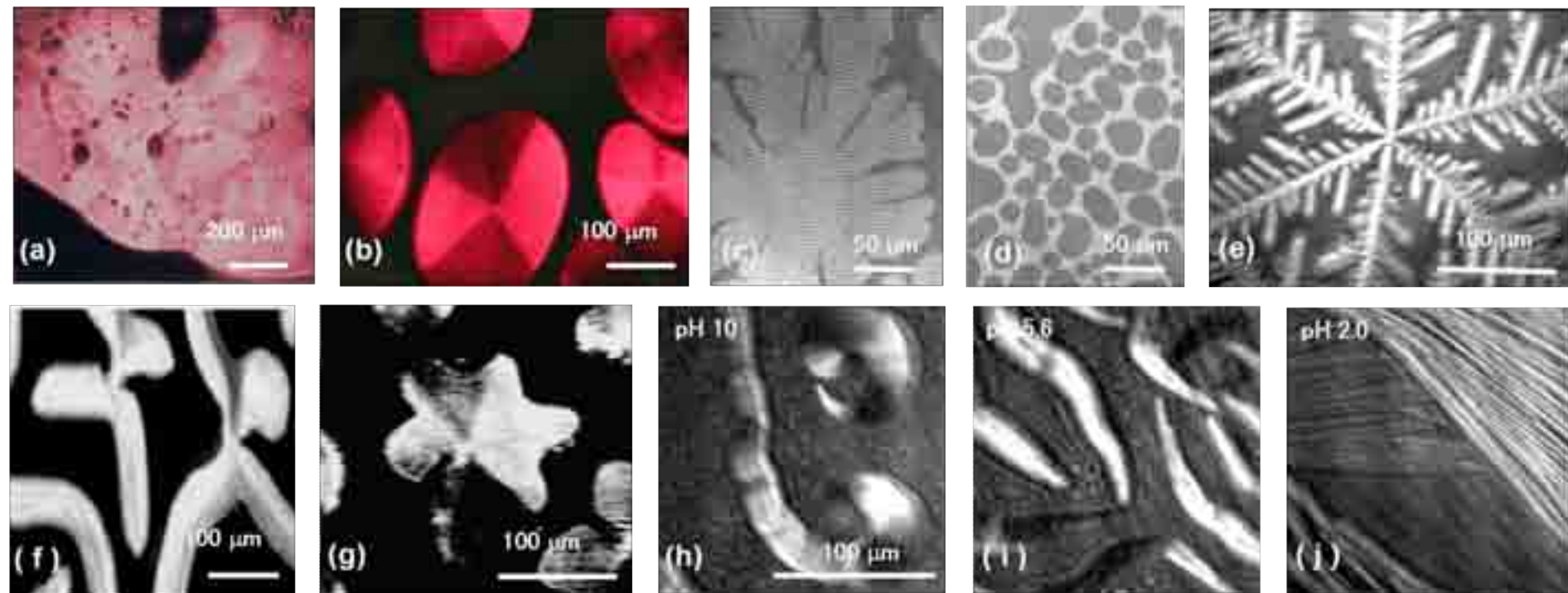
- ・星薬科大学 代表者：高山先生，世話人：小幡先生
- ・味の素(株)，クラシエホームプロダクツ(株)，(株)資生堂，(株)成和化成，久光製薬(株)，プロクター・アンド・ギャンブル・イノベーション合同会社，ユースキン製薬(株)

2. 気／水界面上の界面活性剤のGIXDによる評価

- ・宇都宮大学 代表者：飯村先生(進行中)

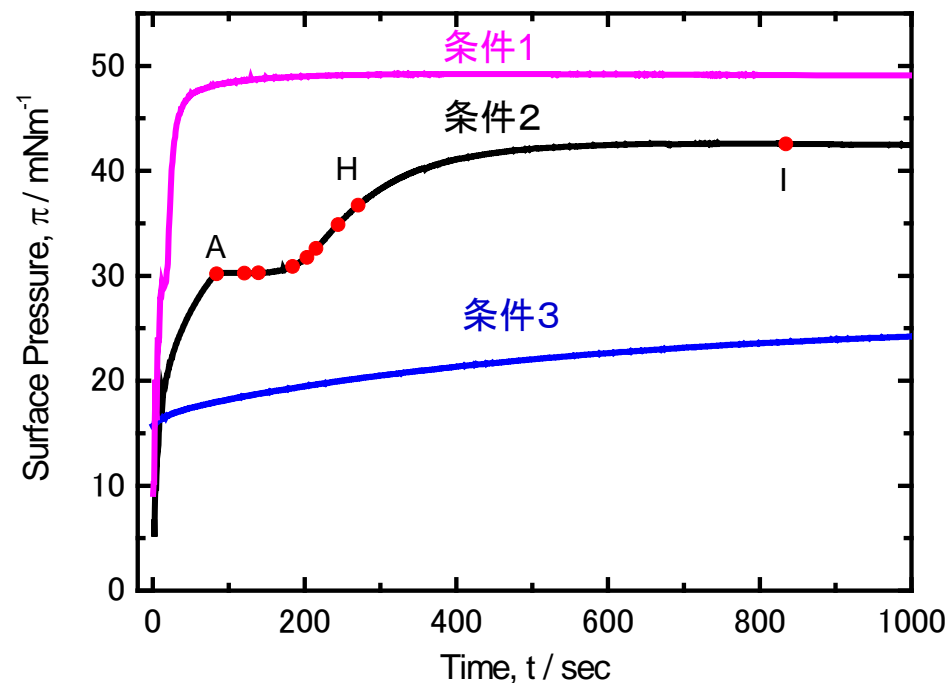
連絡先：emlak@cc.utsunomiya-u.ac.jp

水面上単分子膜における自己組織化構造： ブリュースター角顕微鏡(BAM)イメージ

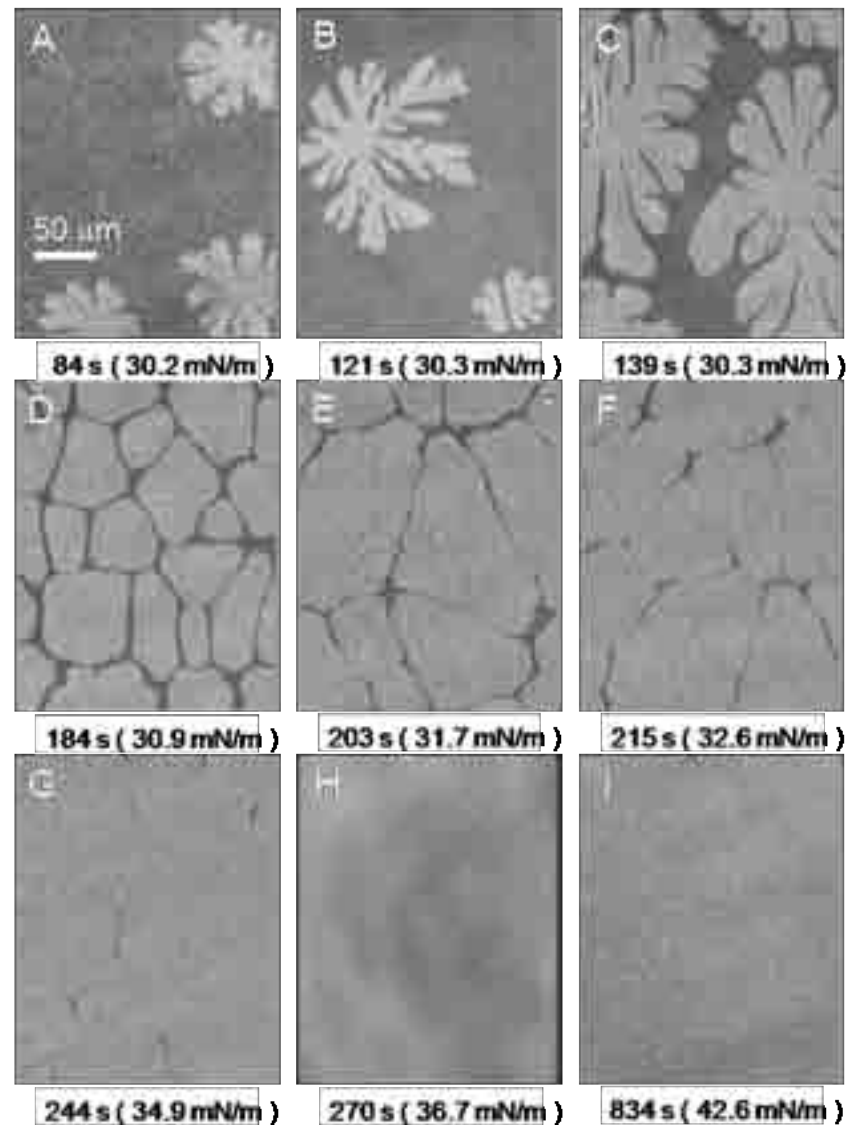


上の写真は、膨張相－凝縮相の共存領域で観察されたものです。水面上単分子膜では実に様々な二次元の組織化構造体が形成されています。GIXDでは、それらの構造体における分子配列・配向を調べることができます。また、GIXDと、上図のような形態観察や他の分析法を組み合わせると、膜の構造や性質などについて、非常に有用な情報を得ることができます。

界面活性剤水溶液の表面に形成される吸着単分子膜 —表面圧と膜形態の時間変化—



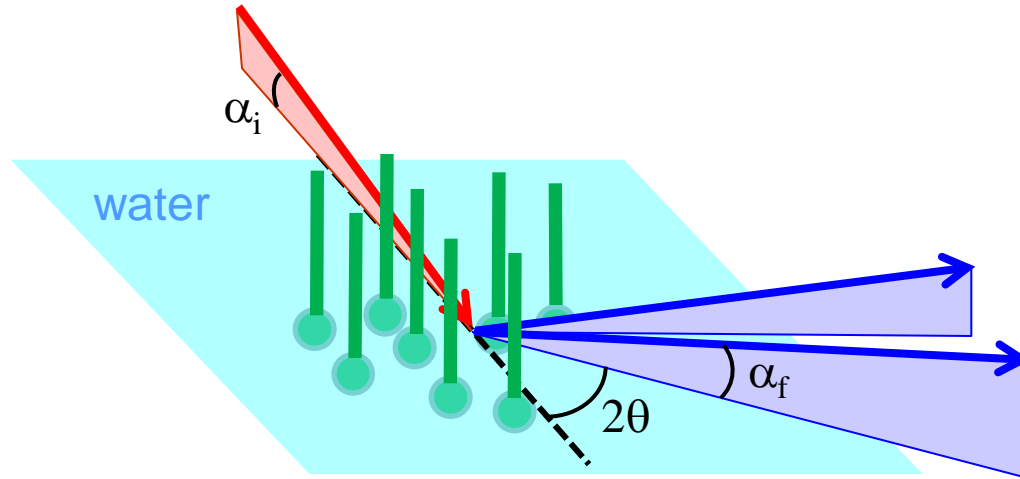
BAM images



条件2では、表面圧-時間曲線に液体相から凝縮相への相転移が見られます。この相転移に伴って、膜の表面には凝縮相ドメインが形成され(A→H。C→Dで形態緩和)、やがて水面はこの凝縮相によって覆われます。条件1では、非常に短い相転移時間を経て、凝縮相が形成されています。条件3では、凝縮相は形成されず、膨張相(二次元液体相)です。

気／水界面のGIXDとは？

Grazing Incidence X-ray Diffraction (GIXD)



- ・ 水面にすれすれの角度(全反射臨界角以下)でX線を入射したときに、界面活性剤や脂質などによる単分子膜における二次元分子結晶により回折されるX線を検出する。
- ・ 有機分子を対象としていることに加え、水面の揺らぎなどの影響により、回折X線の強度は非常に弱い。
⇒ 放射光を使う必要がある。

GIXDによって何がわかるのか？

水面上単分子膜における二次元の**分子結晶構造**

⇔ **界面物性**、**界面での分子間相互作用**

⇔ **界面活性剤製品の機能** と相関

- ・ 膜の結晶性
- ・ 分子配列・配向
- ・ 結晶相の弾性率

- ・ 多成分混合による構造変化、分子レベルでの混和性、会合体形成
- ・ 温度変化による構造変化
- ・ 他成分の膜への吸着による構造変化 など

重点産業利用課題(産業基盤共通)で 何をを目指すのか？

界面活性剤の**分子構造**と、単分子膜における**分子配列・配向**、**気／水界面物性**、**分子間相互作用**、**機能**の相関を明らかにする。

⇒ 製品開発へフィードバック

- ・ 系統的に分子構造が異なる界面活性剤を用いて、分子構造と膜構造を調べ、データベース化
- ・ 多成分混合、温度変化、他成分吸着などによる膜構造変化を明らかにする

まとめ

- ヒト皮膚角層での実験法の確立（切除，テープストリッピング）。
- 皮膚角層の実験に適した（ヒト皮膚角層と同等の構造を持つ）培養皮膚の作製。
- セラミド単結晶の構造解析。
- 皮膚浸透型化粧品開発における化粧品と皮膚角層の相互作用の分子レベルでの検証。
保湿剤の開発においては角層細胞の寄与がとくに重要である。