

小角・広角X線回折による皮膚角層構造評価

(財) 高輝度光科学研究センター 八田一郎

1. はじめに

皮膚は階層構造をしており、大きく分けるとよく知られているように薄い表皮と厚い真皮から成っており、その下には皮下組織がある。表皮はおもにケラチノサイトと呼ばれる細胞によって形成されている。表皮の一番深いところにある基底細胞が細胞分裂し、有棘角層、顆粒細胞と分化し、扁平化した形になり、最終的には角層になる。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。角層は角層細胞と細胞間脂質から成っている。図 1 に示すように平坦化した角層細胞はラメラ構造をもつ細胞間脂質の中に埋め込まれている。角層のこの構造はレンガモルタル・モデルといわれており、角層がレンガである角層細胞とその周りを取り囲むモルタルである細胞間脂質から成っているというものである。

このような構造をもつ角層が皮膚のバリアー機能や水分保持機能において重要な役割を果たしていることは多くの研究により指摘されている。とりわけ角層のレンガモルタル・モデルのモルタルの部分に対応する細胞間脂質部分が機能において重要な役割を果たしているといわれている。ここでは、このような役割を果たす細胞間脂質集合体の構造について説明する。

2. 皮膚角層中の細胞間脂質集合体の室温における構造

細胞間脂質は多成分の脂質から成っているが、それら自己組織化により規則性をもつラメラ構造を形成することがX線回折、電子線回折や電子顕微鏡観察により報告されている。細胞間脂質集合体のラメラ構造にはいわゆる長周期ラメラ構造と短周期ラメラ構造があり、それらの模式図を図 2(a)と(b)にそれぞれ示す。^{1,2)} 細胞間脂質の成分はセラミド、脂肪酸、コレステロールから成っており、セラミドおよび脂肪酸などの脂質の組成や分量は哺乳動物の種によって多少異なる。図中、頭部を小さな丸、炭化水素鎖を線で表してある。1つの頭部と2本から成る分子はセラミド、1つの頭部と1本鎖から成る分子は脂肪酸、1つの頭部と大きな楕円状部分と尾部から成る分子はコレステロールを示す。また、図 2(b)中の小さな黒丸は水分子を示す。長周期ラメラ構造の層周期はほぼ 13 nm であり、図 1 に示すようにヘアレスマウスの皮膚角層の場合の 13.6 nm である。短周期ラメラ構造の層周期はほぼ 6 nm である。長周期ラメラ構造は細胞間脂質集合体特有の構造の一つで電子顕微鏡観察の結果と比べると、1層周期内

の電子密度はbroad-narrow-broadバンドから成っているとされている。³⁾ 図 2(a) はそれを反映して模式的に描かれている。Broad-narrow-broadバンドを形成するにあたって、炭化水素鎖の 1 本が長く伸びているセラミド 1 が重要な役割を果たしているといわれている。一方、炭化水素鎖と直交する断面内で並ぶ炭化水素鎖の充てんには図 3 に示す六方晶 (hexagonal) と斜方晶 (orthorhombic) がある。室温で六方晶の格子定数は 0.42 nm であり、斜方晶の格子定数は 0.42 nm と 0.37 nm である。六方晶の格子は図 3 に示すように 3 方向に等しくあり、斜方晶の格子は 0.42 nm の格子は 2 つの方向にあり、0.37 nm の格子は残りの 1 方向にある。

小角X線回折により長周期ラメラ構造と短周期ラメラ構造による回折像を測定できる。図 4(上)にヘアレスマウス角層の小角回折強度の温度依存性を等高線図で示すが、20°Cの温度上で散乱ベクトル $S = 0.0734 \text{ nm}^{-1}$ (13.6 nm) に長周期ラメラ構造の層周期の 1 次の回折ピークが現われ、その 2 次 ($0.0734 \text{ nm}^{-1} \times 2$), 3 次 ($\times 3$), 4 次 ($\times 4$) と 5 次 ($\times 5$) の回折ピークが現われている。⁴⁾ 長周期ラメラ構造の 2 次と 3 次の間に短周期ラメラ構造の 1 次の回折ピークがある。しかし、図 4(上)ではそのピークの存在は明確にはわからない。しかし、これは弱いから無視してよいということではなく、皮膚角層中の細胞間脂質がつくる構造を考える際の基本構造の一つである。短周期ラメラ構造の回折ピークをいかに解析するかは細胞間脂質集合体の作る構造を明らかにするうえで大きな課題である。

広角X線回折により炭化水素鎖の充てんの斜方晶と六方晶の格子による回折像を観測できる。図 4(下)にヘアレスマウス角層の広角回折強度の温度依存性を等高線図で示すが、20°Cの温度上で散乱ベクトル $S = 2.407 \text{ nm}^{-1}$ (0.415 nm) と 2.69 nm^{-1} (0.372 nm) に斜方晶の回折ピークが現われるが、 $S = 2.399 \text{ nm}^{-1}$ (0.417 nm) に六方晶の回折ピークがある。⁴⁾ 図 4(下)から分かるように散乱ベクトル $S = 2.407 \text{ nm}^{-1}$ と $S = 2.399 \text{ nm}^{-1}$ の回折ピークは重畳している。電子線回折の場合には電子線のビームが細いので、この 2 つの回折ピークの場所による入れ替わりを測定することによって識別できる。テープストリッピングにより作製した角層試料の電子線回折像において斜方晶のスポットが測定され、それとは別の部分で六方晶が存在することが報告されている。⁵⁾ これは斜方晶と六方晶の領域があることを示しており、さらにその領域の大きさは電子線のビームサイズ $1 \mu\text{m}$ より大きいことを示唆している。

3. 皮膚角層中の水分子の振舞

角層はバリアー機能とともに水分保持機能をもつが、角層中の水の存在状態を明らかにすることはその機構を解明する上で重要な課題である。角層中の水

はほぼ 25wt%まではいわゆる結合水であることが知られている。⁶⁾ これより水分量が少なくなれば皮膚角層は乾燥した状態になり、多くなれば水分過剰な状態になる。図 4(上)では短周期ラメラ構造の 1 次の鋭い回折ピークは現れなかった。一般には個体差があって、この回折ピークが鋭く強い像になる場合と弱く幅広な像になる場合がある。前者の場合、短周期ラメラ構造による回折ピークを解析できるが、後者の場合、長周期ラメラ構造の大きな 2 次と 3 次回折ピークの間埋もれてしまい解析が困難になる。前者の場合に測定が行われ、短周期ラメラ構造には図 2(b)に示すように水層があることが指摘されている。^{7,8)} 長周期および短周期ラメラ構造の層周期の角層中の水分量依存性を図 5(a)に示す。長周期ラメラ構造のspacingは○で示してある。このspacing (13.6 nm/2) は 2 次回折ピーク (図 4(上)中の $S \approx 0.15$ nm のピーク) に対するもので、実際の層周期はこの 2 倍である。図 4(上)から、長周期ラメラ構造の層周期はBouwstraら^{9,10)} の指摘どおり、角層中の水分量には依らない (膨潤を起こさない)。一方、短周期ラメラ構造のspacing (●) は水分量とともにほぼ線形に増加している。これは短周期ラメラ構造が水層をもち、水層の厚さが水分量に比例して増加していることを示唆している。しかし、短周期ラメラ構造の水層にある水の割合は、角層全体の水分量が 20wt%のときでも、5wt%よりはるかに少ない。したがって、20wt%の水のほとんどは角層細胞中にある。その角層細胞の厚さは、電子顕微鏡観察により水分量の増加とともに、角層の乾燥重量のほぼ 3 倍になるまで増加するが示されている。¹¹⁾ これは角層細胞が水分保持機能において重要な役割をしていることを意味している。また、上の電子顕微鏡観察でも報告されているが、細胞間脂質マトリックス内に紡錘形状のwater poolも存在する。まとめると、皮膚角層中の水分は角層細胞の中にほとんどあり、水分量が異常に大きくなると細胞間脂質マトリックス内のwater poolが出現するが、極く少量の水が短周期ラメラ構造中の水層中にある。以下で説明するように、その少ない水の層の存在が重要な役割を果たしている。

上で述べたように皮膚角層中の短周期ラメラ構造は小角X線回折では測定され難い点が悩ましいところである。それと比べて軽水の代わりに重水を用いて行われた小角中性子散乱測定は決定的な証拠を示す。⁸⁾ まず、重水蒸気下で角層中の水分に対して平衡にして小角中性子散乱測定を行うと、短周期ラメラ構造のみが測定される (長周期ラメラ構造には重水が取り込まれないので、小角中性子散乱では鋭いピークは観測されない)。この場合の短周期ラメラ構造の周期は 5.7 nmと見積もれている。その試料を重水の中に入れ、短周期ラメラ構造の周期の時間変化が測定されている。ほぼ 24 h後に短周期ラメラ構造の層周期 6.2 nmになる。すなわち、重水を角層中に取り込み短周期ラメラ構造の層周期について 5.7 nmから 6.2 nmに膨潤する。この結果は図 5(a)の小角X線回折測定結果

(●) と一致している。

小角X線回折および小角中性子散乱からさらに重要な結果が導かれる。図 5(b) 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。⁷⁾ Bouwstraら^{9,10)} は長周期ラメラ構造の層周期は水分量に依らないと報告しているが、同じ論文の中でその小角X線回折像の強度は 20~30 wt%より少ない水分量では弱く、反対にこれよりも多い水分量でも弱くなることを指摘している。図 5(b)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 20~30 wt%で狭くなり、水分量はそれより少なくても多くても広がることを示している。また、長周期ラメラ構造についてもBouwstraら^{9,10)} の報告に対応して小角X線回折像の半値幅は水分量 20~30 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。²⁾ 角層中の水分量が 20~30 wt%のとき水はほとんど角層細胞の中にあるが、少量の水分が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 20~30 wt%のときに狭くなることは、この水分量のとき短周期ラメラ構造が安定化することを意味している。図 5(b)から分かるように、この水分量のとき長周期ラメラ構造の小角X線回折像のspacingは変わらないが 20~30 wt%で半値幅は最も狭くなり、長周期ラメラ構造も同時に安定化することを意味している。すなわち、長周期および短周期ラメラ構造の安定化では 2 つのラメラ構造の相互作用が働いており、その相互作用は水分量が 20~30 wt%より少なくなっても多くなっても角層中の水分量を 20~30 wt%に戻すような調節機構として働いているといえる。

4. 皮膚角層の相転移とドメイン構造

皮膚角層中の細胞間脂質集合体は皮膚の表面温度や体温の辺りで相転移を示すことは興味深い。この点からも皮膚機能の温度効果は興味ある課題であるが、ここでは熱測定とX線回折結果により解析された細胞間脂質集合体がつくる構造およびドメインについて述べる。⁴⁾ 第 2 章で述べたように、細胞間脂質がつくる構造には炭化水素鎖の軸の方向に周期性をもつ長周期ラメラ構造 (図 2(a) 参照) と短周期ラメラ構造 (図 2(b)参照) があり、炭化水素鎖と直交する断面内で並ぶ炭化水素鎖の充てんには六方晶 (hexagonal) と斜方晶 (orthorhombic) がある (図 3 参照)。どちらか一方のラメラ構造がどちらか一方の炭化水素鎖の充てんに対応しているはずであるが、最近までそれらの関係はわかっていなかった。さらに、炭化水素鎖の充てんの斜方晶が六方晶 (後では高温六方晶と呼ぶ) になる相転移温度と六方晶 (後では低温六方晶と呼ぶ) が液晶になる相転移温度を分離して観測ができていなかった。われわれはヘアレスマウス皮膚角層の小角広角X線回折の温度依存性の測定を行い、熱測定の結果を使って、それらの

関係を明らかにした。⁴⁾

示差走査熱測定（DSC）の第 1 回目に測定された相転移温度を指標にして¹²⁾、ヘアレスマウス皮膚角層の小角広角 X 線回折強度の温度依存性を示したものが図 4(上)および(下)である。これから先は同種のカラー表示の図が引用文献 4 にあるので参照していただきたい。図の縦軸は温度を示し、太い横線は示差走査熱測定（DSC）の第 1 回目の加熱時に測定された相転移温度であり（多くの測定結果から相転移温度を 32°C, 39°C, 51°C, 71°C および 103°C とした）、細い横線（56°C）は相転移ではないが弱い熱異常を示す温度である。A. 小角 X 線回折で散乱ベクトル $S=0.0734 \text{ nm}^{-1}$ (13.6 nm) に現われる長周期ラメラ構造の層周期の 1 次の回折ピークは温度上昇とともに広角側に移動し、51°C 以上では弱くなる。B. それに代わって 51°C 以上では短周期ラメラ構造の回折ピークが約 0.165 nm^{-1} (6 nm) であるものが温度上昇とともに広角側に移動し、71°C では約 0.195 nm^{-1} (5 nm) 近くに達する。C. 32°C で $S=2.24 \text{ nm}^{-1}$ (0.45 nm) 辺りに出現した幅の広いピークが小角側に移動し、51°C では $S=2.19 \text{ nm}^{-1}$ (0.46 nm) 辺りになる。32°C に相転移温度があることは熱測定の結果はじめてわかったことである。¹²⁾ D. 39°C で斜方晶から六方晶（高温六方晶と呼ぶ）へ相転移し、51°C で $S=2.43 \text{ nm}^{-1}$ (0.41 nm) であったピークが 71°C では小角側の $S=2.39 \text{ nm}^{-1}$ (0.42 nm) に移動する。以上の結果から、長周期ラメラ構造は六方晶（低温六方晶と呼ぶ）から成り（A と C が対応している）、短周期ラメラ構造は斜方晶から成っている（B と D が対応している）ことが明らかになった。したがって、皮膚角層中の細胞間脂質マトリックス内には疎水性ドメイン（長周期ラメラ構造；低温六方晶）と親水性ドメイン（短周期ラメラ構造；斜方晶）の性格の違う 2 つのドメインがあることになる。このことは皮膚角層のバリアーや経皮吸収を果たしている重要な特性であろう。

ところで短周期ラメラ構造に限らず長周期ラメラ構造の小角 X 線回折像は幅が広く観測されることが多い。鋭い回折ピークを観測するために角層を 120°C まで上げ、室温に戻すことにより結晶化することが行われる。^{9,10)} ここに引用した 2 つの文献で共通していることは、未処理の角層では室温で幅が広いが短周期ラメラ構造の回折ピークが観測され、熱処理した角層では室温で鋭い長周期ラメラ構造の回折ピークが観測されている。このことから、短周期ラメラ構造が乱れたのか、あるいは、短周期ラメラ構造が消えたのかは分からないが、熱処理により長周期ラメラ構造は結晶化するように見える。しかし、図 6 の熱測定の結果から分かるように、第 2 回目の温度走査で多くの相転移温度のピークが消えていることからすると熱処理で起こっていることは単純に長周期ラメラ構造の結晶化だけではなさそうである。

以上のように 2 つのドメインの存在からすると短周期ラメラ構造は欠くべからざるものであるが、回折ピークが幅広く時には強度が小さく影の薄い存在で

ある。上で述べたように 51°C で長周期ラメラ構造の層周期の 1 次の回折ピークが弱くなり、それに代わって 51°C 以上では短周期ラメラ構造の回折ピークが顕著になる。短周期ラメラ構造において幅の広い回折ピークの存在を示すために、図 7 に小角領域（長周期ラメラ構造の 2 次、3 次および 4 次の回折ピークが現われる領域）の回折強度の温度依存性を示す。確かに高温の 50°C では長周期ラメラ構造の回折ピークが弱くなるのに代わって $S=0.174 \text{ nm}^{-1}$ (5.75 nm) 辺りに幅の広い短周期ラメラ構造の回折ピークが現われ、温度が上昇するとともに広角側に移動する。同じ現象は Bouwstra らによっても報告されている（引用文献 10 の Fig. 3 参照）。したがって、短周期ラメラ構造の回折ピークは検出し難いが常に存在することは確かであるといえる。さらに、上で短周期ラメラ構造の炭化水素鎖の充てんの格子は斜方晶であることを示したが、⁴⁾ 広角領域では常に斜方晶の格子の回折ピークが測定されるので、2 つのドメインの存在からすると短周期ラメラ構造の回折ピークは単に測定され難いだけのことであるといえる。

5. おわりに

皮膚角層中の細胞間脂質集合体の小角広角 X 線回折像の温度依存性の測定と示差走査熱測定の結果を併せ解析することにより、2 つのラメラ周期構造と 2 つの炭化水素鎖の充てんの関係を明らかにすることができる。1 つは長周期ラメラ構造が低温六方晶をもち、1 つは短周期ラメラ構造をもつことがわかった。前者では脂質層間に水層をもたず、後者は脂質層間に水層をもっている。また、前者は生体中の他ではないような長周期をもっている。このように性質の際立って異なる 2 つのドメインから細胞間脂質集合体は構成されており、これが水分制御機能やバリアー機能において重要な役割を果たしていると考えられる。このような特徴的な構造に基づき、化粧品料の製造や経皮吸収剤の開発を分子レベルで展開できることが期待される。

皮膚角層中にある細胞間脂質集合体の X 線構造解析により化粧品料や経皮吸収剤の効果を明らかにすることは重要な課題であるが、いくつかの困難がある。大きな問題の一つは個体差の問題を避けて通ることは出来ないことである。さらに、これらの化学物質を作用したときの構造変化が大きくない場合にその変化を検出することはなおさら困難である。われわれは一つの皮膚角層試料に化学物質を作用させる前と作用させた後の変化を追跡することにした。このための X 線回折実験用の液体セルを開発した。試料セルに皮膚角層試料を入れ、そこに溶液を注入し、溶液で試料の周りを満たし、溶液中の化学物質が試料中に浸透する。その結果生ずる皮膚角層中の細胞間脂質による X 線回折像の時間変化をその変化の大小はあるが観測することに成功した。これにより個体差の如何に関わらず化学物質の作用に対する構造変化の有無を観測することが可能になっ

た。さらに、構造の時間に対する変化分を検出することによって、化学物質が作用して起こる構造変化を高感度で検出することが可能になった。

文献

- 1) G. S. K. Pilgram and J. A. Bouwstra, Stratum Corneum Lipid Organization In Vitro and In Vivo as Assessed by Diffraction Methods, *Basic and Clinical Dermatology* **26**, 2004, 107-152.
- 2) I. Hatta and N. Ohta, Molecular Mechanism for Regulation of Water Content in Mammalian Skin, *Photon Factory Activity Report 2003*, #21, 2004, 49-50.
- 3) D. C. Swartzendruber, P. W. Wertz, D. J. Kirko, K. C. Madison and D. T. Downing, Molecular Models of the Intercellular Lipid Lamellae in Mammalian Stratum Corneum, *J. Invest. Dermatol.* **92**, 1989, 251-257.
- 4) I. Hatta, N. Ohta, K. Inoue and N. Yagi, Coexistence of two domains in intercellular lipid matrix of stratum corneum, *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 2006, 1830-1836.
- 5) G. S. K. Pilgram, A. M. Engelsma-van Pelt, J. A. Bouwstra and H. K. Koerten, Electron Diffraction Provides New Information on Human Stratum Corneum Lipid Organization Studied in Relation to Depth and Temperature, *J. Invest. Dermatol.* **113**, 1999, 403-409.
- 6) G. Imokawa, H. Kuno and M. Kawai, Stratum corneum lipids serve as a bound-water molecule, *J. Invest. Dermatol.* **96**, 1991, 845-851.
- 7) N. Ohta, S. Ban, H. Tanaka, S. Nakata and I. Hatta, Swelling of intercellular lipid lamellar structure with short repeat distance in hairless mouse stratum corneum as studied by X-ray diffraction, *Chem. Phys. Lipids* **123**, 2003, 1-8.
- 8) G. Ch. Charalambopoulou, T. A. Sterotis, Th. Hauss, A. K. Stubos and N. K. Kanellopoulos, Structural alterations of fully hydrated human stratum corneum, *Physica B* **350**, 2004, e603-e606.
- 9) J. A. Bouwstra, G. S. Gooris, J. A. van der Spek and W. Bras, Structural Investigations of Human Stratum Corneum by Small-Angle X-Ray Scattering, *J. Invest. Dermatol.* **97**, 1991, 1005-1012.
- 10) J. A. Bouwstra, G. S. Gooris, J. A. van der Spek, S. Lavrijsen and W. Bras, The Lipid and protein structure of mouse stratum corneum: A wide and small angle diffraction study, *Biochim. Biophys. Acta* **1212**, 1994, 183-192.
- 11) J. A. Bouwstra, A. de Graaff, G. S. Gooris, J. Nijsee, J. W. Wiechers and A. C. van Aelst, Water Distribution and Related Morphology in Human Stratum Corneum at Different Hydration Levels, *J. Invest. Dermatol.* **120**, 2003, 750-758.
- 12) I. Hatta, K. Nakanishi and K. Ishikiriyama, Thermal analysis of stratum corneum of hairless mouse with attention to phase transitions near 35 °C, *Thermochim. Acta* **431**, 2005, 94-97.

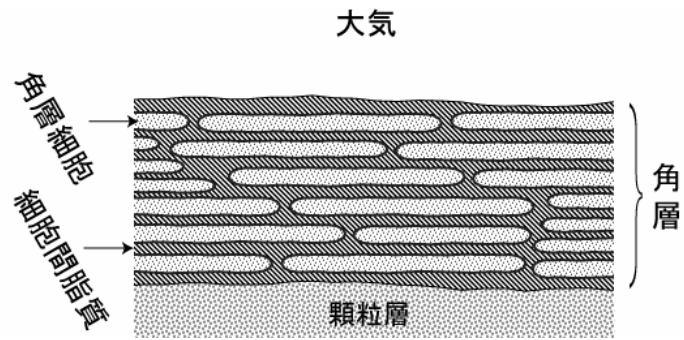


図1 皮膚角層のモデル

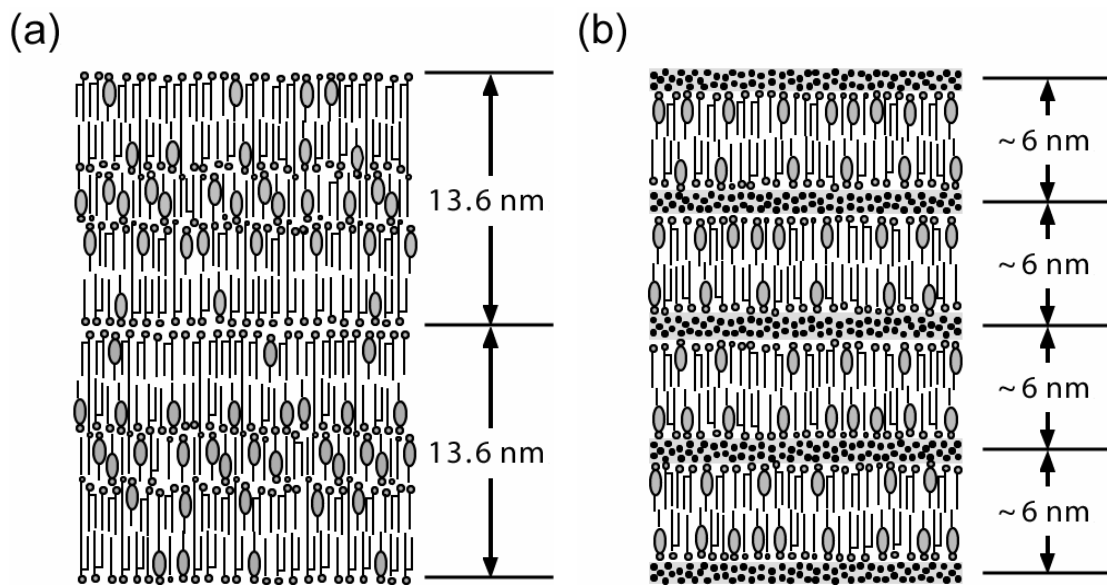


図2(a) 皮膚角層中の細胞間脂質がつくる長周期ラメラ構造のモデル. (b) 皮膚角層中の細胞間脂質がつくる短周期ラメラ構造のモデル.

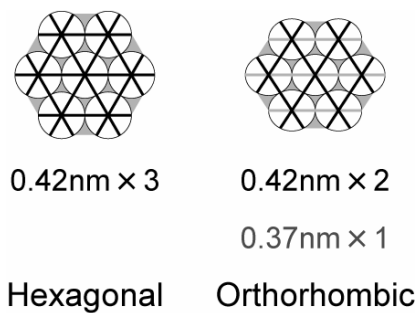


図3 皮膚角層中の細胞間脂質の充てんによる格子. Hexagonal (六方晶) と orthorhombic (斜方晶).

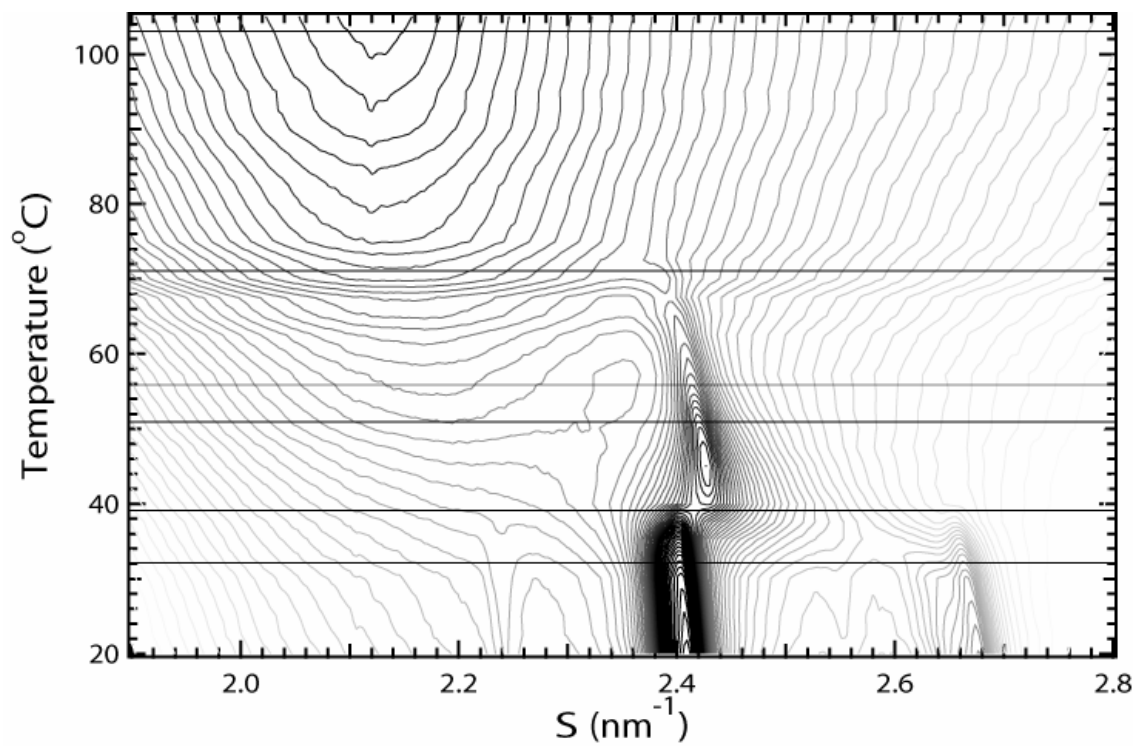
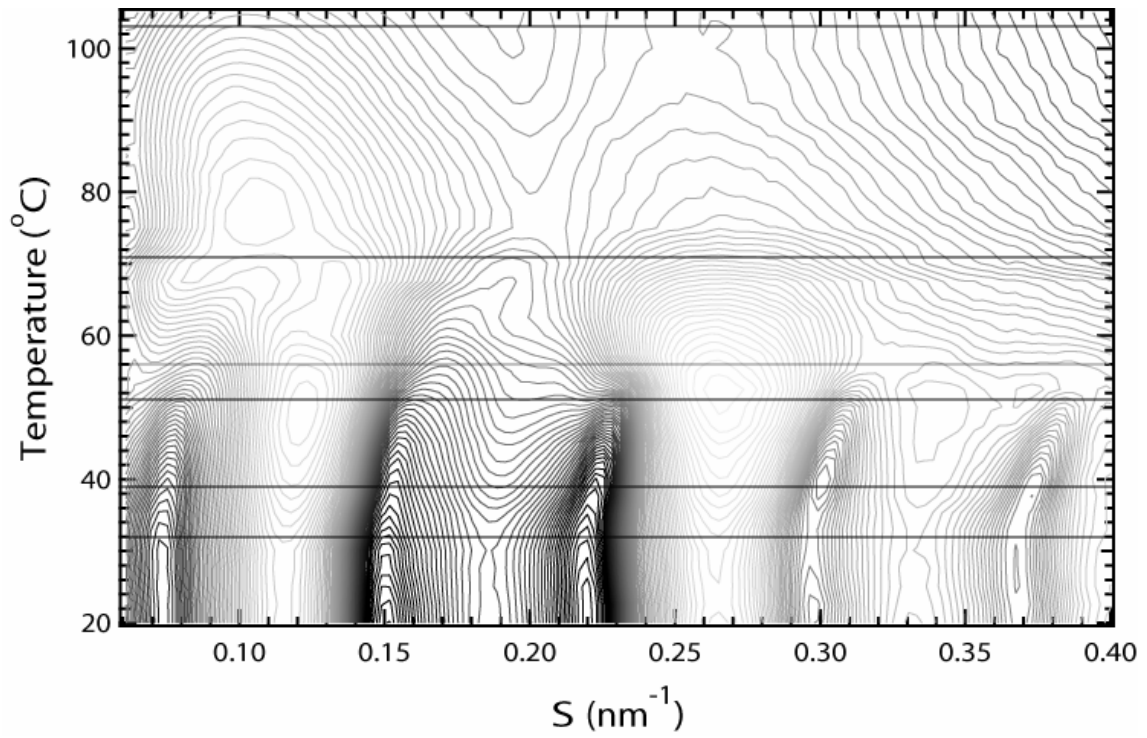


図 4(upper) ヘアレスマウスの皮膚角層の小角 X 線回折強度の温度依存性.
 (lower) ヘアレスマウスの皮膚角層の小角 X 線回折強度の温度依存性.

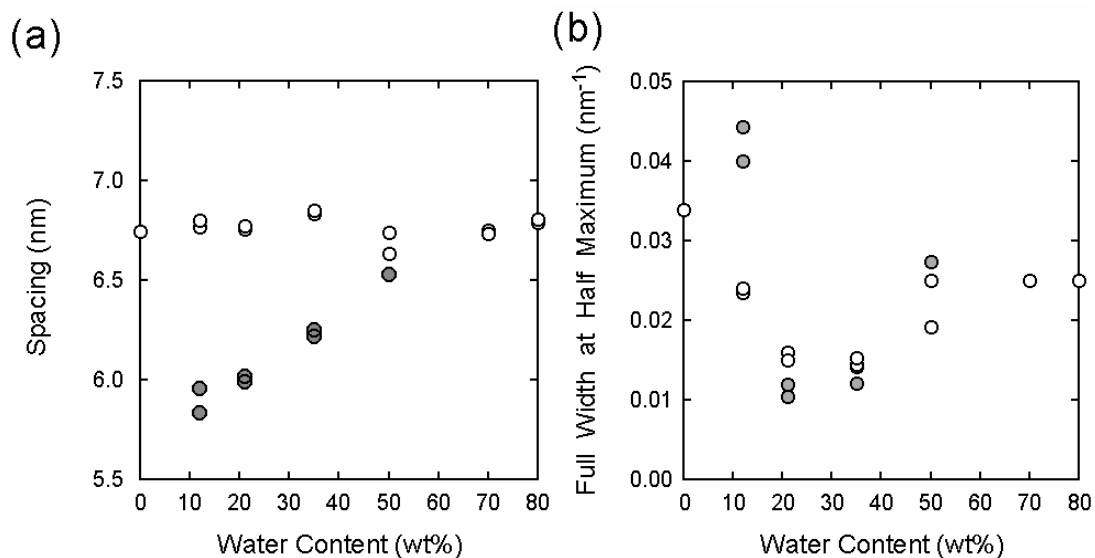


図 5(a) 長周期ラメラ構造の層周期/2 (○) と短周期ラメラ構造の層周期 (●) の水分量依存性. 長周期ラメラ構造と短周期ラメラ構造の回折ピークの半値幅の水分量依存性.

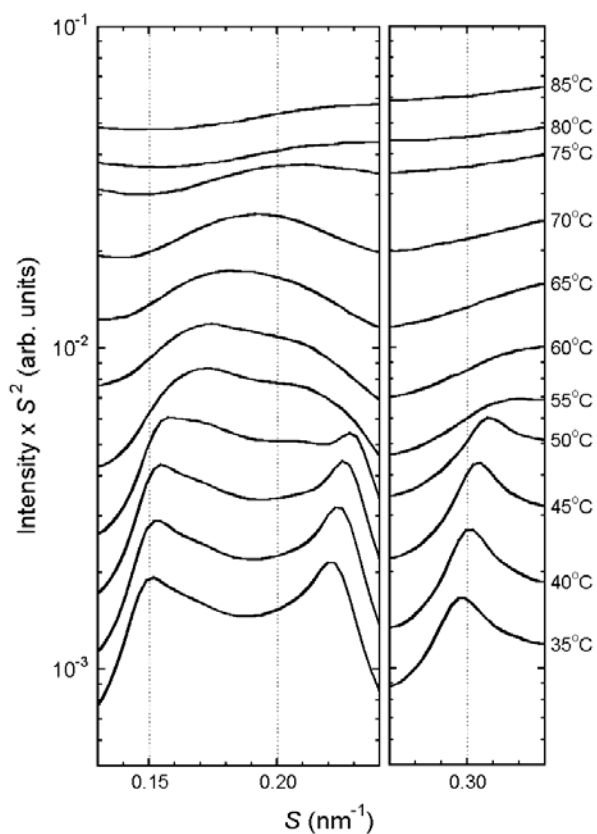


図 6 長周期ラメラ構造の 2 次, 3 次, および 4 次の回折ピークと短周期ラメラ構造の 1 次の回折ピークの辺りの X 線回折強度の温度変化.