

第9回 SPring-8ヘルスケア研究会

「皮膚角層細胞間脂質の構造 -電子顕微鏡観察および電子線回折-」

関西学院大学・理工学部 加藤知

1. はじめに

海から陸へと進出した生物は、体表面からの水分蒸散に対してバリア能をもつ非常に薄い油性膜でからだ全体をおおった。植物のクチクラ層からヒトの角層細胞間脂質膜層まで、それぞれに工夫を凝らして環境に対応しているが、油性薄膜で体表をおおうという基本戦略はどの陸上生物でも共通している。からだの最表面に位置する皮膚は、外界と出会う場であり、単に水分蒸散に対するバリア能だけでなく、力学的外力に対する耐性、免疫機能、物質輸送など多様な機能を担う高性能なインターフェイスを構成する最大臓器である。ヒトの場合、こうした生物学的機能に加えて、美的基準や民族的アイデンティティの指標などの社会的機能もあり、皮膚の研究にはさまざまな視点があり得る。我々の視点は構造にある。構造と機能は密接な関係をもち、構造の理解は機能の理解へとつながっていくと考えて研究をしている。特に皮膚最上層にある角層の構造が重要であるが、薄皮であるため実験がむずかしい。微量試料を扱うため、放射光などの強力なプローブが必要となる。ここでは、生体試料に対する散乱能が X 線よりも格段に高い電子線を用いた構造解析を中心に、ヒト皮膚角層細胞間脂質の構造研究について紹介する。

2. 皮膚角層の構造と機能

角層は層状に敷き詰められた扁平な角層細胞の間を細胞間脂質が埋める構造をとっており、よくレンガとモルタルにたとえられる(図1)。細胞間脂質は、細胞を包む細胞膜と同じように二次元膜を構成するが、流動性は低く大部分はゲルまたは結晶様の構造をとり多層に積層している。この多層膜の積層周期には、13nm周期と6nm周期の2種類があるが、13nm周期構造は、ほかでは見られない非常に特異な構造である。細胞間脂質膜には、セラミド、コレステロール、遊離脂肪酸がほぼ等モル比で含まれている(図2)。セラミドは、水酸

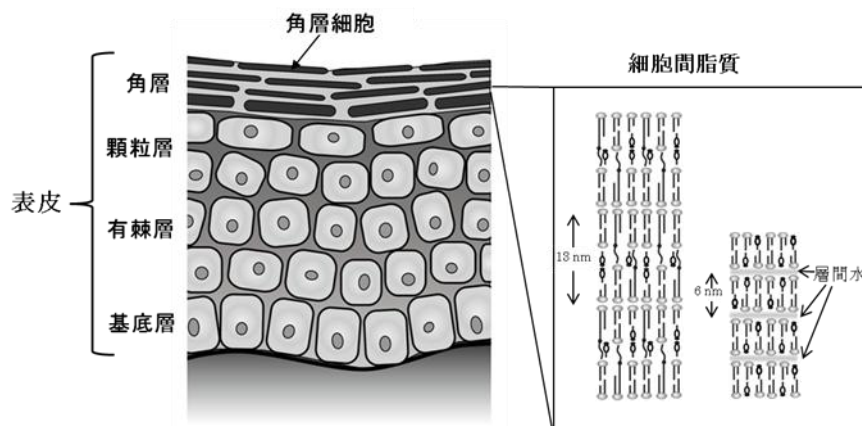


図1 ヒト皮膚表皮の構造

表皮の最上層にある角層は、扁平な角層細胞とその間を埋める多層の細胞間脂質膜から成る。細胞間脂質膜の層周期には、13nm と 6nm の 2 種類あることが知られている。

基の結合位置や炭化水素鎖の違いによって分類されている、炭化水素鎖先端に不飽和の脂肪酸が結合したセラミドは、角層細胞間脂質に特異的な13nm周期構造を作るのに必要だと考えられている。13nm周期構造の中央には、不飽和の脂肪酸が集中して流動的な状態になっているというモデルが提唱されている。このように特殊な膜構造をもった油性の細胞間脂質膜は、角層全体にわたって連続しており、皮膚を透過しようとする物質はこの脂質膜を避けて通ることができない。

膜面に垂直な方向の層周期構造だけでなく、膜内の脂質分子の炭化水素鎖側方充填構造もバリア機能と密接に関係していると考えられている。炭化水素鎖側方充填構造には、ヘキサゴナル (Hex) 構造、オーソロンビック (Ort) 構造、流動相の3種類が存在していることが知られているが、バリア機能が低下しているアトピー性皮膚炎などの皮膚病患者の皮膚角層では、これらの構造の分布が健常者の皮膚と異なることが報告されている。

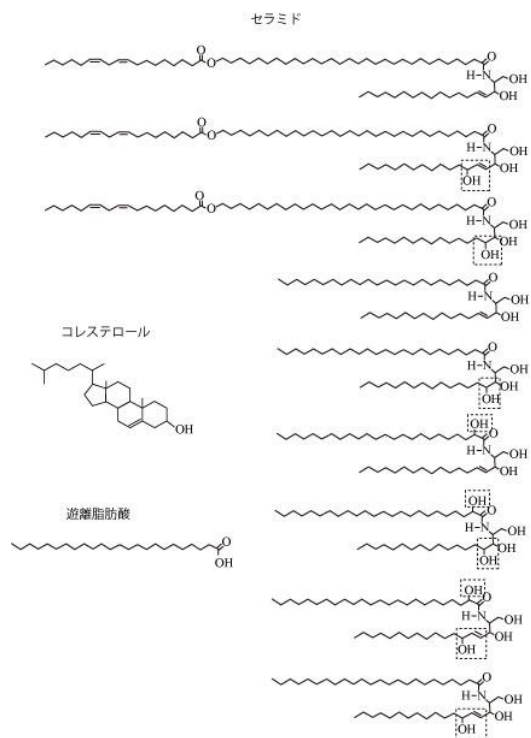


図2 ヒト皮膚角層を構成する細胞間脂質
9種類のセラミドとコレステロール、遊離脂肪酸がほぼ等モルで含まれる。

3. 電子線回折とX線回折

脂質膜の構造解析にはさまざまな手法が用いられるが、ここでは放射光を用いたX線回折と電子線回折について、それらの特徴を表1にまとめた。

| | 放射光X線回折 | 電子線回折 |
|---------|------------------------------|--------------------------------|
| 散乱能 | 低 | 高 |
| ビームダメージ | 低 | 高 |
| 試料 | 小 (侵襲的切出し) | 極小 (非侵襲的剝離) |
| 空間分解能 | > μm (3次元) | $\sim \mu\text{m}$ (2次元) |
| 時分割測定 | $\sim 1 \text{ fr/min}$ (>h) | $\sim 1 \text{ fr/s}$ (<1 min) |
| 測定条件 | 大気中、放射光施設 | 真空中、研究室 |

表1 放射光X線回折と電子線回折の特徴比較

これらの手法には一長一短があり、相互補完的に用いられる。電子線回折実験では、非侵襲的に試料採取できるためヒトの角層構造解析に有効であるが、信頼できるデータを得るためにはビームダメージが大きな障害となる。我々の研究室では、イメージングプレート (IP) やCCDカメラなどを用いて露出時間を短縮し、ビームダメージの影響を最小限に抑えて実験を行っている。

4. 人工モデル系の電子線回折

角層細胞間脂質の成分であるセラミド、コレステロール、遊離脂肪酸を組み合わせるモデル脂質膜を作製し、電子線回折実験を行った。電子顕微鏡用メッシュ上に直接脂質膜を

分散させて、試料作製した。図3に得られたセラミド膜の電子線回折像を示す。熱処理すると、Ort構造が現れるのがわかる。また、セラミドにコレステロールや遊離脂肪酸を加えても、Ort構造が現れる。

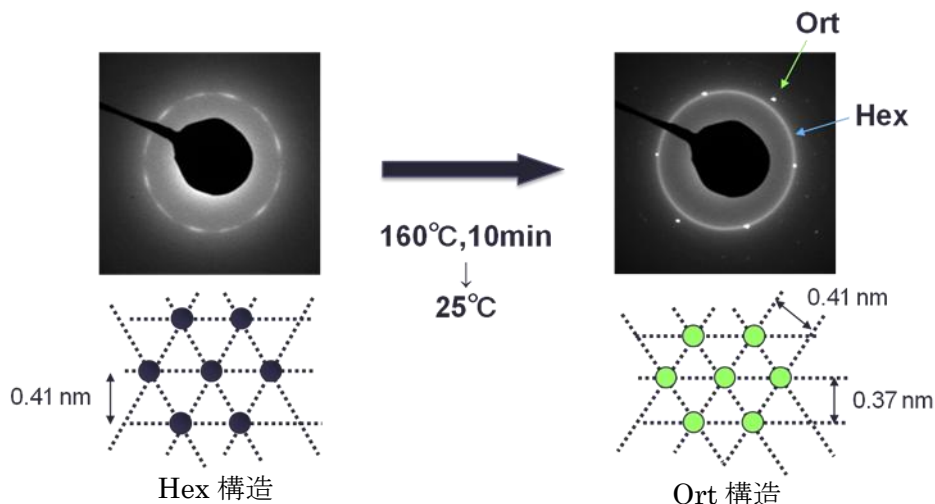


図3 セラミド膜の電子線回折

電子顕微鏡用メッシュ上に作製したセラミド膜に対して、膜面に垂直方向から電子線を入射して得られた電子線回折像。熱処理すると、Hex 構造に加えて、Ort 構造が現れた。電子線の波長 0.0038 nm、カメラ長 37cm。下図は、Hex 構造と Ort 構造における炭化水素鎖のパッキングのモデル図。

5. ヒト皮膚角層の電子線回折

5.1 試料調製

ヒト皮膚角層細胞一層をグリッドストリッピング法により電子顕微鏡用メッシュ上に採取した(図4)。厚い試料に対して電子線は透過しないため、角層細胞一層のみを採取する必要がある。採取した角層細胞に対して膜面に垂直方向から電子線を入射して、回折像を取得する。テープストリッピングと組み合わせることにより、脂質炭化水素差側方充填構造が皮膚表面からの深さに依存してどのように変化するか解析することができる。

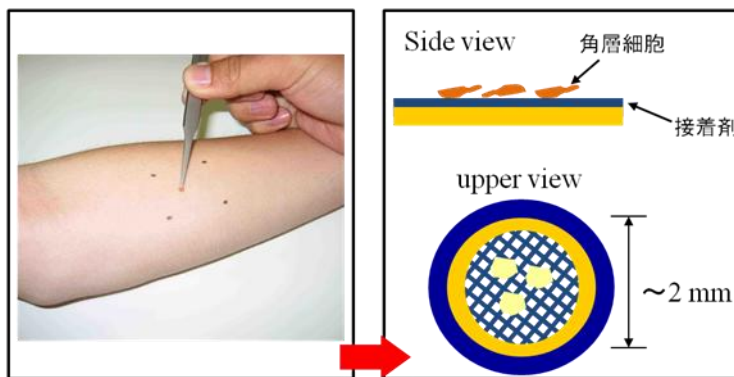


図4 グリッドストリッピング法によるヒト皮膚角層細胞の採取
接着剤を塗布した電子顕微鏡用メッシュを皮膚表面に押しつけて、一層の角層細胞を剥離する。

比較のために、SPring-8のビームラインBL40B2で得られたX線回折像と電子線回折像を図5に示す。

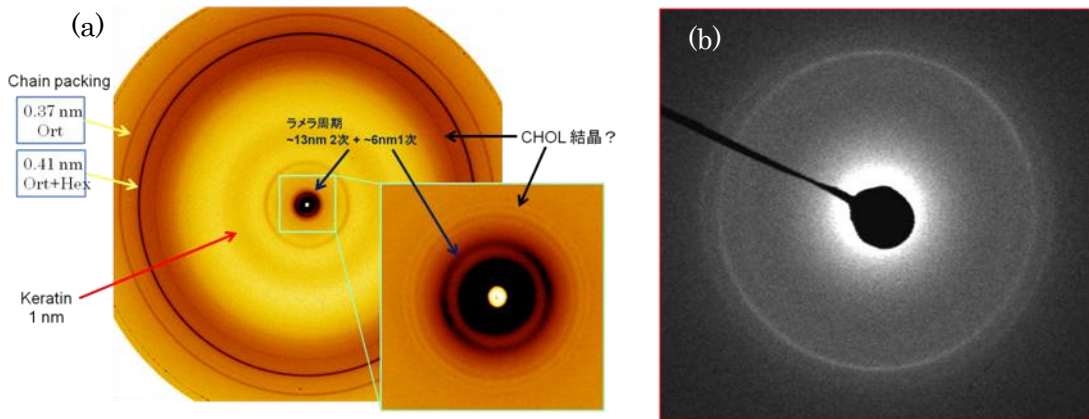


図5 角層の X 線回折像と電子線回折像

(a)の X 線回折では、試料が配向していないため脂質炭化水素差側方充填構造由来のピークと膜の積層周期由来のピーク（挿入図）が共に観測される。(b)の電子線回折像では、膜面に垂直方向から電子線を入射しているため、積層周期由来のピークは現れない。また、ビーム照射領域は、X 線では mm、電子線では μm のオーダーである。

5.2 局所構造解析 脂質構造ドメイン分布

水分蒸散と細胞間脂質構造との関係では、脂質炭化水素差側方充填構造そのものよりも構造ドメインの境界にできる格子欠陥の方が重要である可能性も考えられる。電子線回折法では、 μm オーダーの局所構造分布を解析することができる。図6に、ひとつの角層細胞表面で互いに $7\mu\text{m}$ 平行移動した場所から得られた電子線回折像を示す。 $7\mu\text{m}$ 移動しても、同じOrt構造ドメイン由来と考えられる反射ピークが観測された。図6はマウスのデータであるが、ヒト角でも同様な結果が得られている。このようにOrt構造ドメインは、比較的大きく数 μm サイズのものが多く存在していると考えられる。一方Hex構造は、電子線照射領域を小さくしてもリング状の回折像となることが多く、ドメインサイズは、Ort構造に比べ

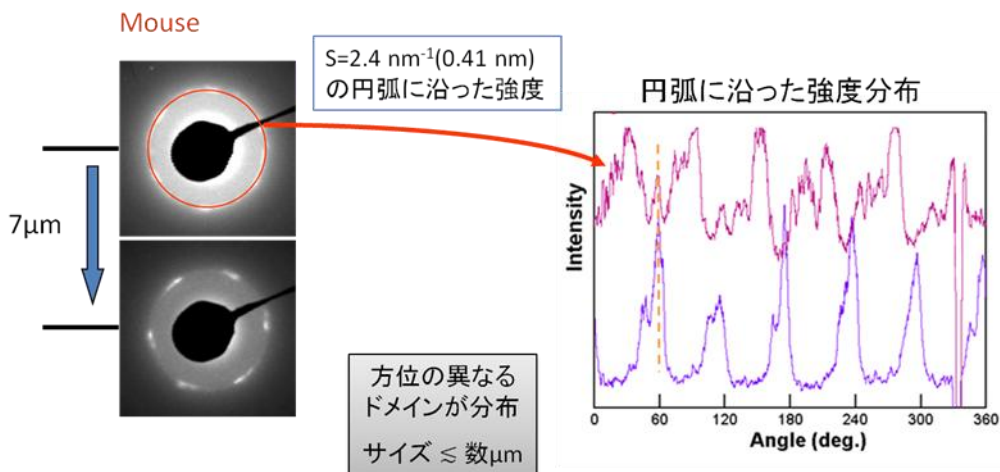


図6 脂質側方充填構造ドメインの分布

角層細胞上で $7\mu\text{m}$ 移動して得られた電子線回折強度の角度依存性（右図）を比較すると、ドメイン中の格子の方位が変わっているのがわかる。 $7\mu\text{m}$ 移動しても部分的には、同じ方位のドメインが残っている。

てかなり小さいと考えられる。

5.3 環境条件依存性

一般に、生体構造は環境応答により動的に変化する。角層構造も外部刺激に対して複数の緩和時間をもって構造変化が起こす。このため、細胞間脂質の構造は、からだの部位、季節、温度、紫外線照射、薬物塗布など多数の因子によって複合的に影響を受けると考えられる。ここでは、同一個人のからだの部位による構造の違いについて実験を行った(図7)。Ort構造に特徴的な面間隔0.37nm付近の反射ピークの積分強度 $I_{0.37}$ とOrt構造とHex構造由来の反射ピークが重なっている面間隔

0.41nm付近の積分強度 $I_{0.41}$ からOrt構造の存在比率 R_{Ort} を、

$$R_{Ort} = \frac{3I_{0.37}}{I_{0.37} + I_{0.41}}$$

として見積もった。その結果、前腕内側部から採取した試料に比べて、頬と額ではOrt構造の存在比率が小さい傾向が見られた。同時に測定した水分蒸散量は、頬と額で高かった。これらの結果は、水分蒸散量が高いアトピー性皮膚炎患者でOrt構造が少ないことと一致している。しかし、採取試料ごとの R_{Ort} とTEWLの間には明確な相関が見られず、単純にOrt構造の多寡がバリア機能と関係していると結論付けることはできない。今後さらに詳細に解析していくことが必要である。

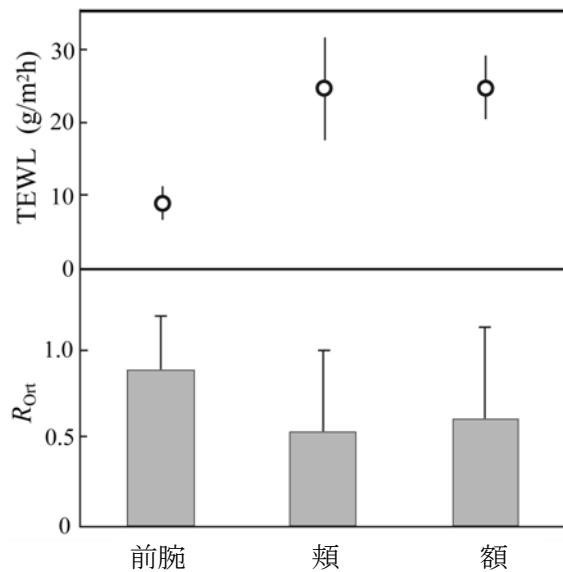


図7 ヒト角層細胞間脂質構造の部位差
Ort構造の存在比率 R_{Ort} を電子線回折のピーク積分強度から見積もった。同時に角層細胞採取場所の水分蒸散量も測定した。

5.4 経皮吸収 深さ方向の構造解析

電子線回折法では、細胞間脂質構造の皮膚表面からの深さに対する依存性を解析できる。これを利用して、経皮吸収促進剤の浸透過程について解析を行った。経皮吸収促進剤として、イソプロピルミリスチレート(IPM)とミネラルオイル(MO)を用いた。経皮吸収促進剤を塗布してから1時間放置した後、テープストリッピングと試料採取を交互に行った。テープストリッピング回数に対して、面間隔0.41nm付近の反射ピークの出現頻度 F_r 、半値幅、面間隔0.37nm付近の反射ピークとの積分強度比などを解析した。その結果テープストリッピング回数3~4回の深さ位置までは、試薬未塗布のコントロールと比べて F_r 値の低下、半値幅の増大が見られた。これらの結果は、用いた経皮吸収促進剤が13nm周期構造の中央に存在することが示唆されている流動相状態の脂質部分を浸透していくと考えることで説明できる(図8)。

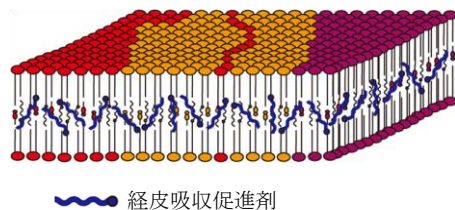


図8 経皮吸収促進剤の浸透モデル
13nm周期構造の中央部に存在すると考えられる流動相中を拡散する。