

放射光X線を用いた皮膚角層の最近の構造研究から —化粧品・薬品の作用機序解析に向けて—

名古屋産業科学研究所

八田 一郎

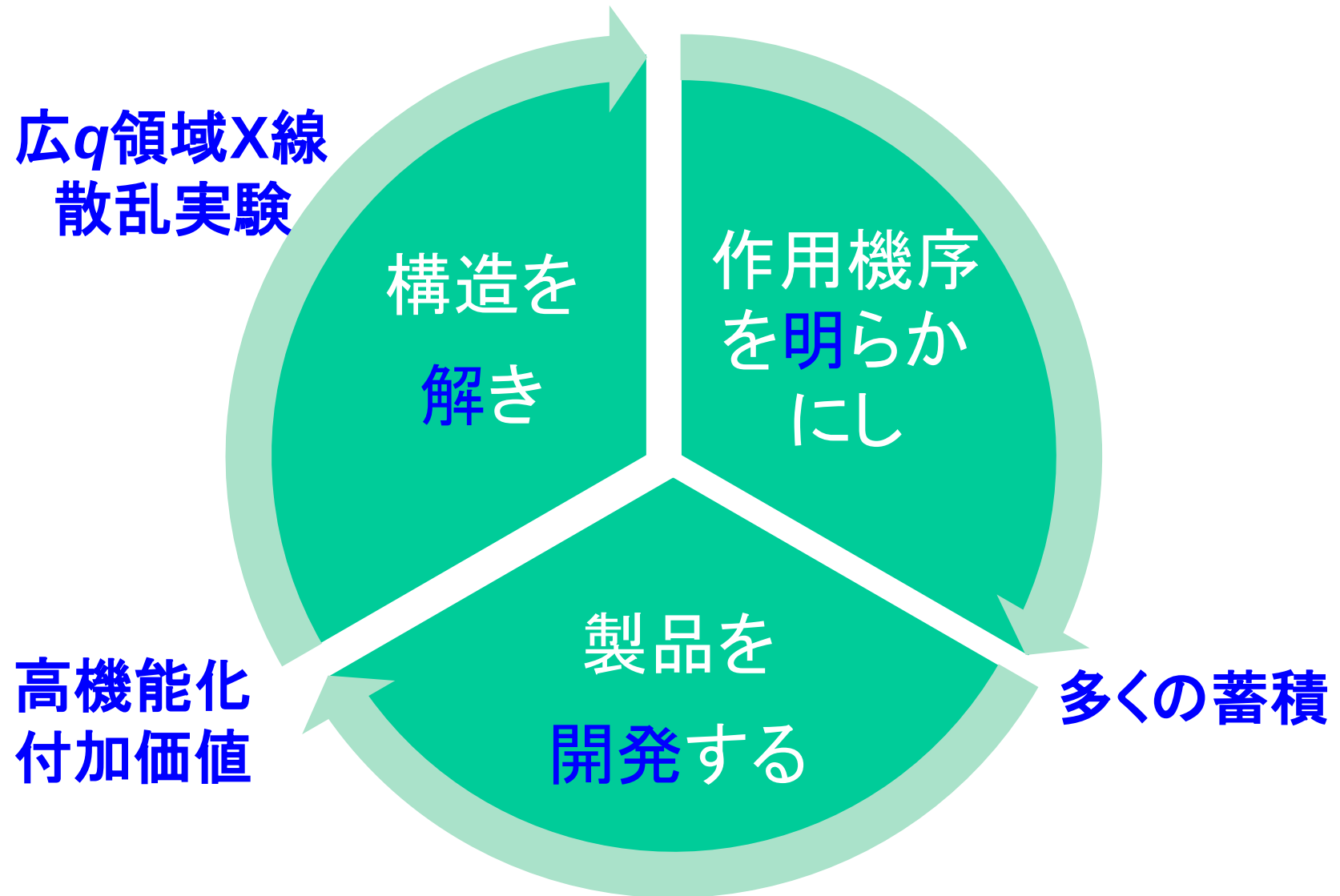
hatta@nisri.jp

はじめに

SPring-8では角層研究が精力的に行われている。

これまでの化粧品作用機序・経皮吸収機構の分野の伝統的な考え方を，分子レベルの構造研究の成果の基づいて，再検討することが必要ではないか！

分子レベルでの構造の解明から製品開発へ

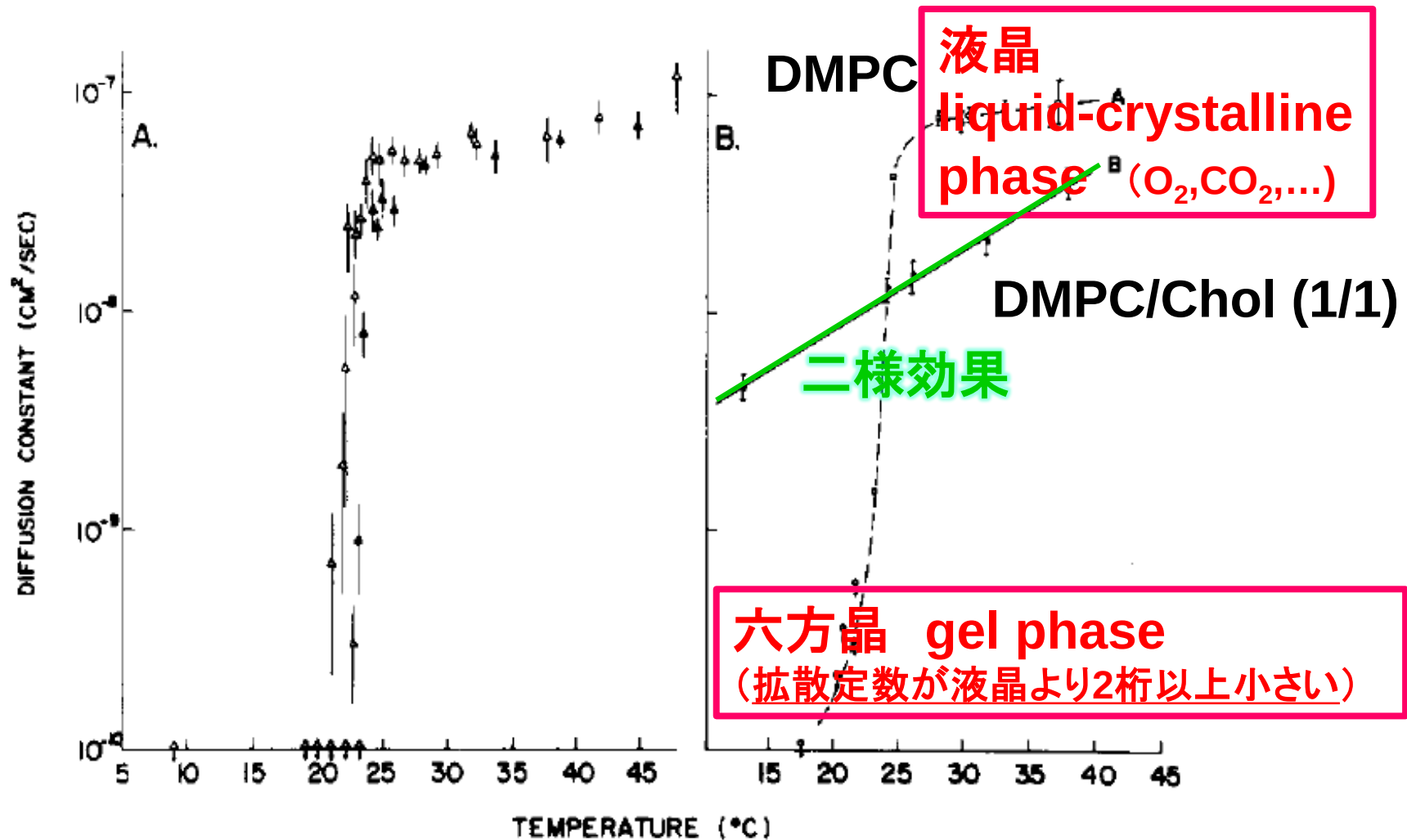


皮膚は最大の臓器である

($\sim 1.8 \text{ m}^2$)

以下, この講演で使ったスライド中
著作権, 未発表論文などに関わる
部分が掲載されていませんが, そ
れに関する情報は示してある引用
資料をご覧ください.

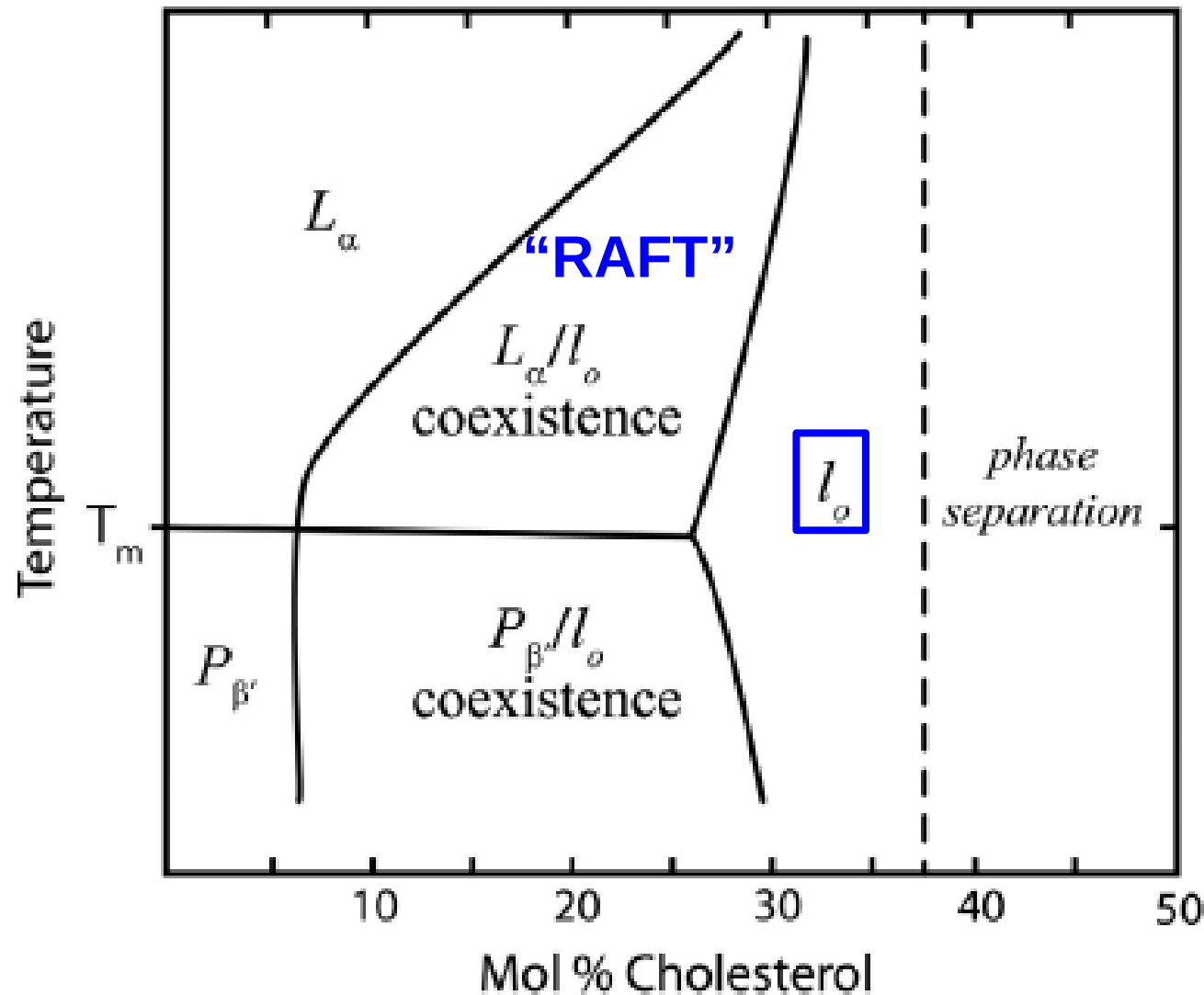
脂質2分子膜中のコレステロールの振舞



角層では六方晶の割合が‘乱れ’の指標として使われている。しかし、脂質膜では液晶でも小さな非極性のO₂, CO₂・・・以外の極性や大きな分子は透過しない。これをどう考えるか！

Wu, Jacobson & Papahadjopoulos, *Biochem.* **16** (1977) 3936.

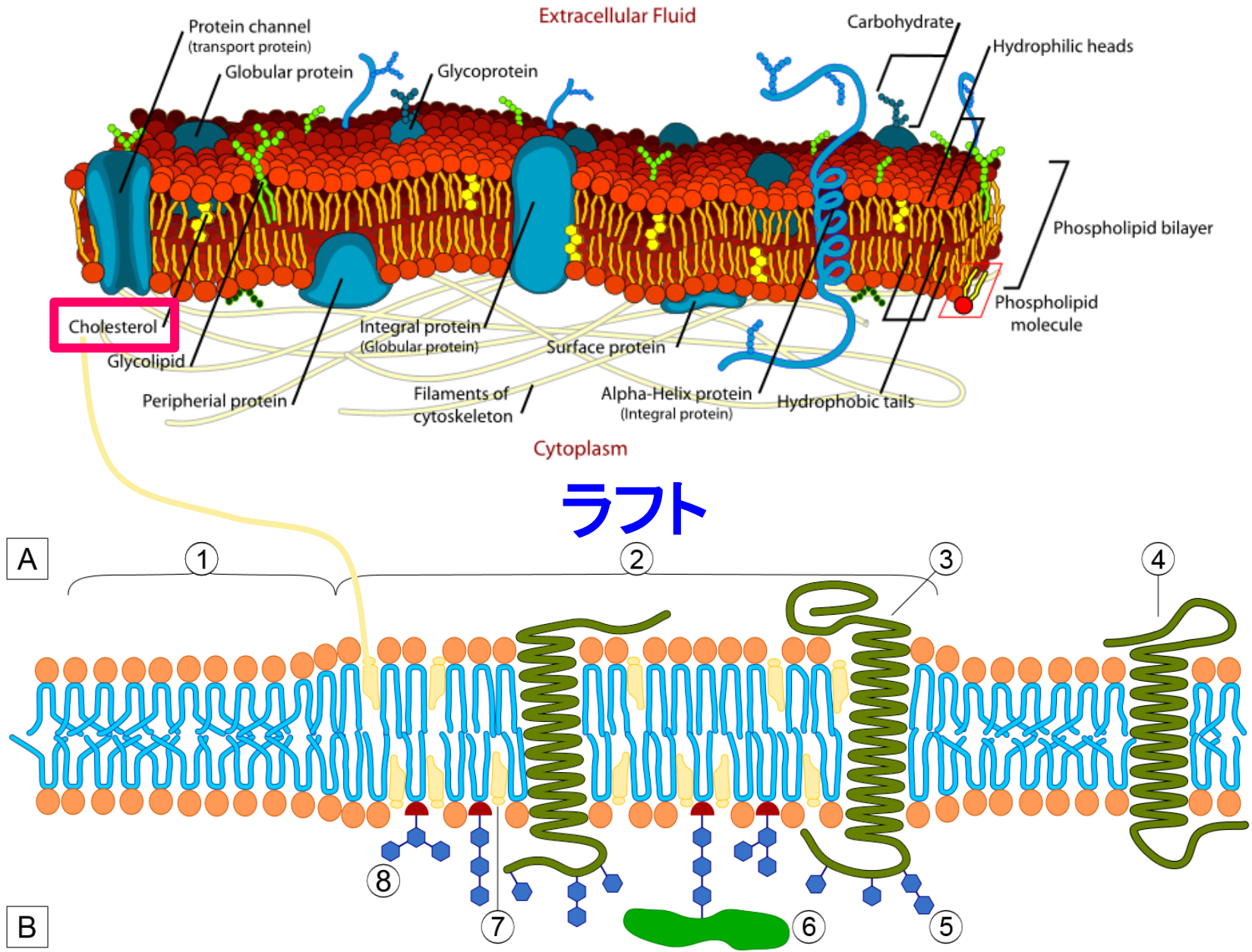
秩序液体相 (ℓ_o : Liquid-Ordered Phase) “ラフト”



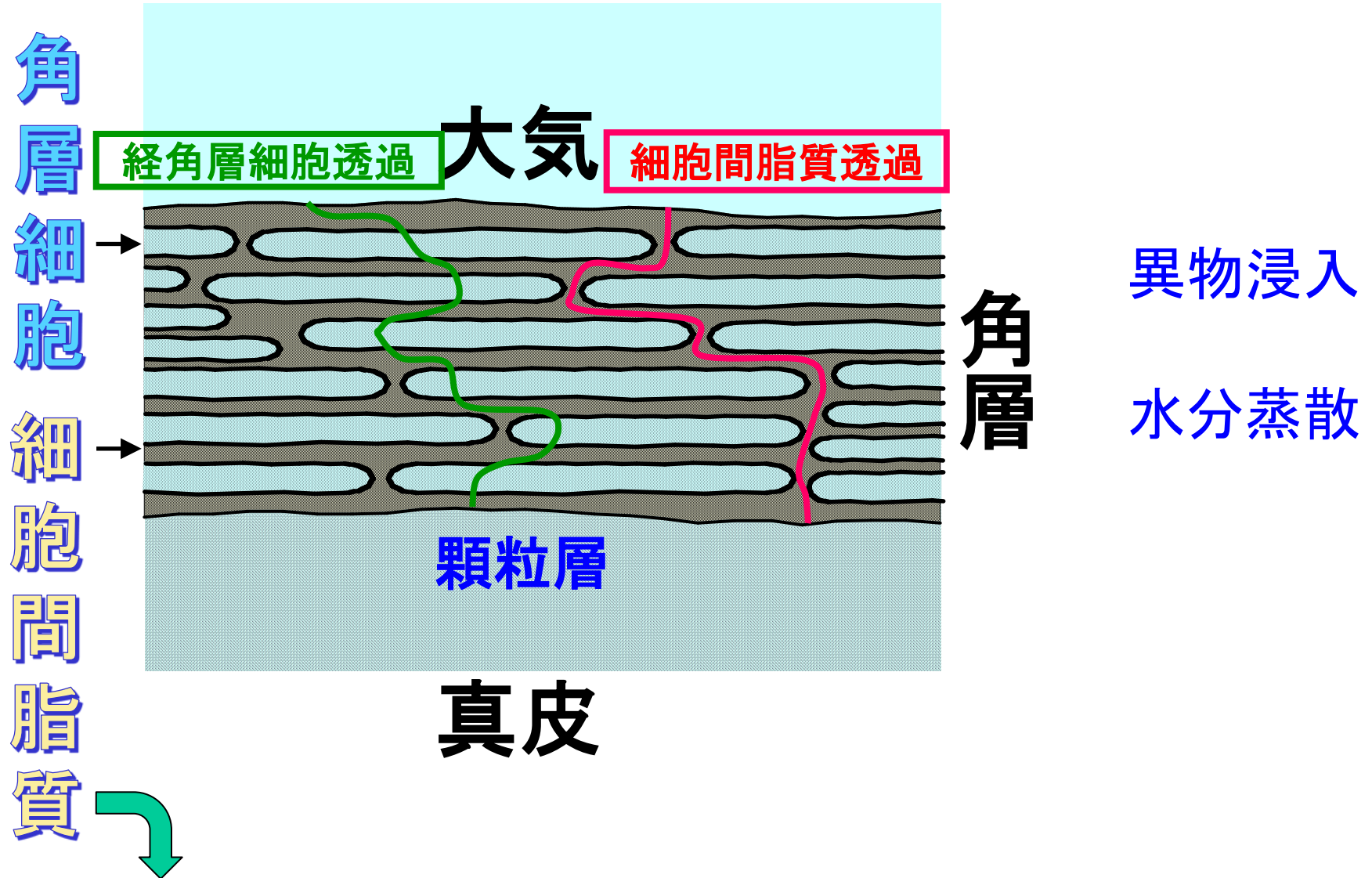
Rheinstädter &
Mouritsen, to be
published in *Cur.
Op. Colloid &
Interface Sci.*

流動モザイクモデル

生体膜のモデル

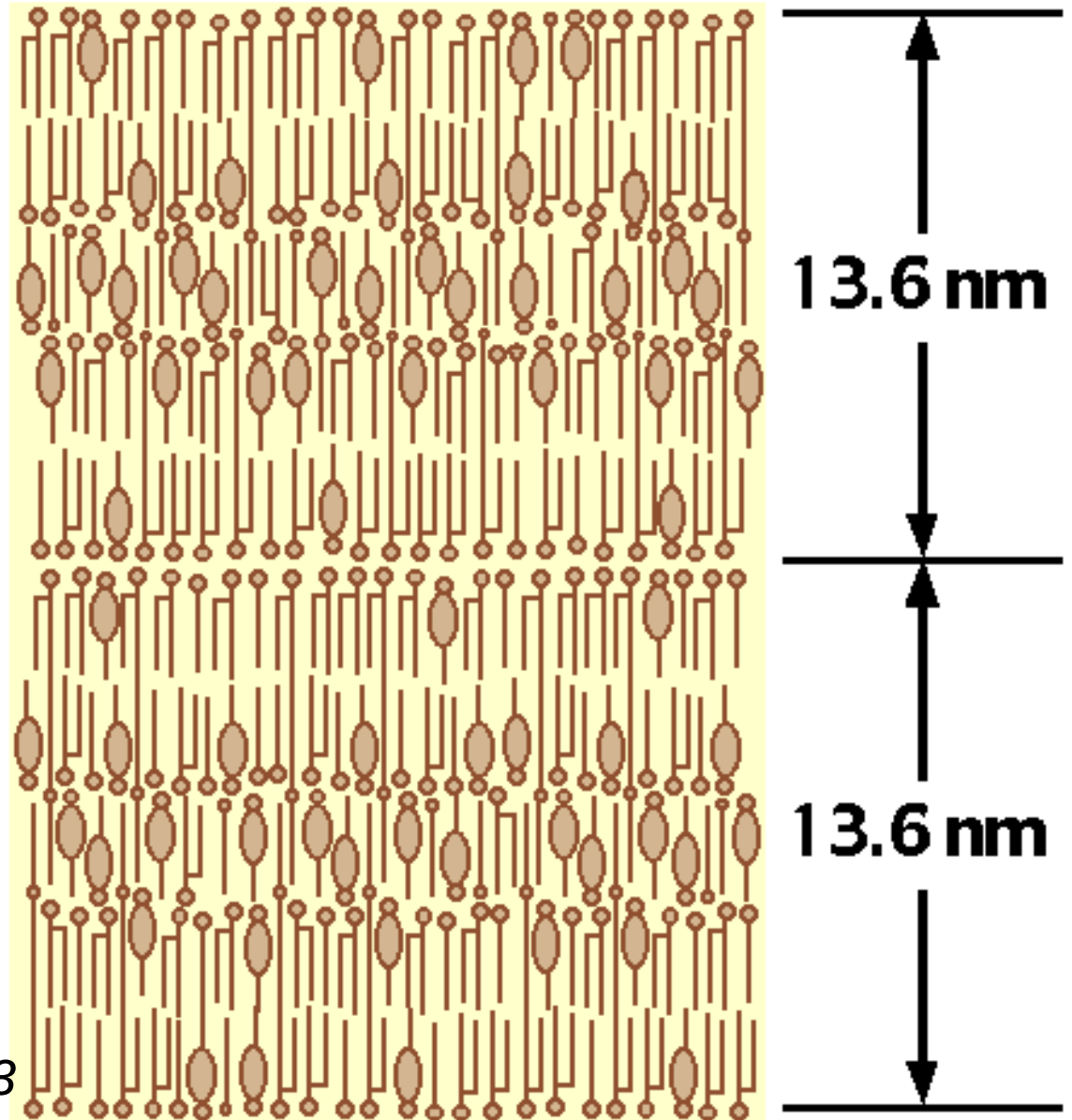


皮膚角層(Stratum Corneum)/バリア機能 レンガ-モルタル・モデル



長周期 ラメラ構造

脂質膜
(セラミド,
脂肪酸,
コレステロール)

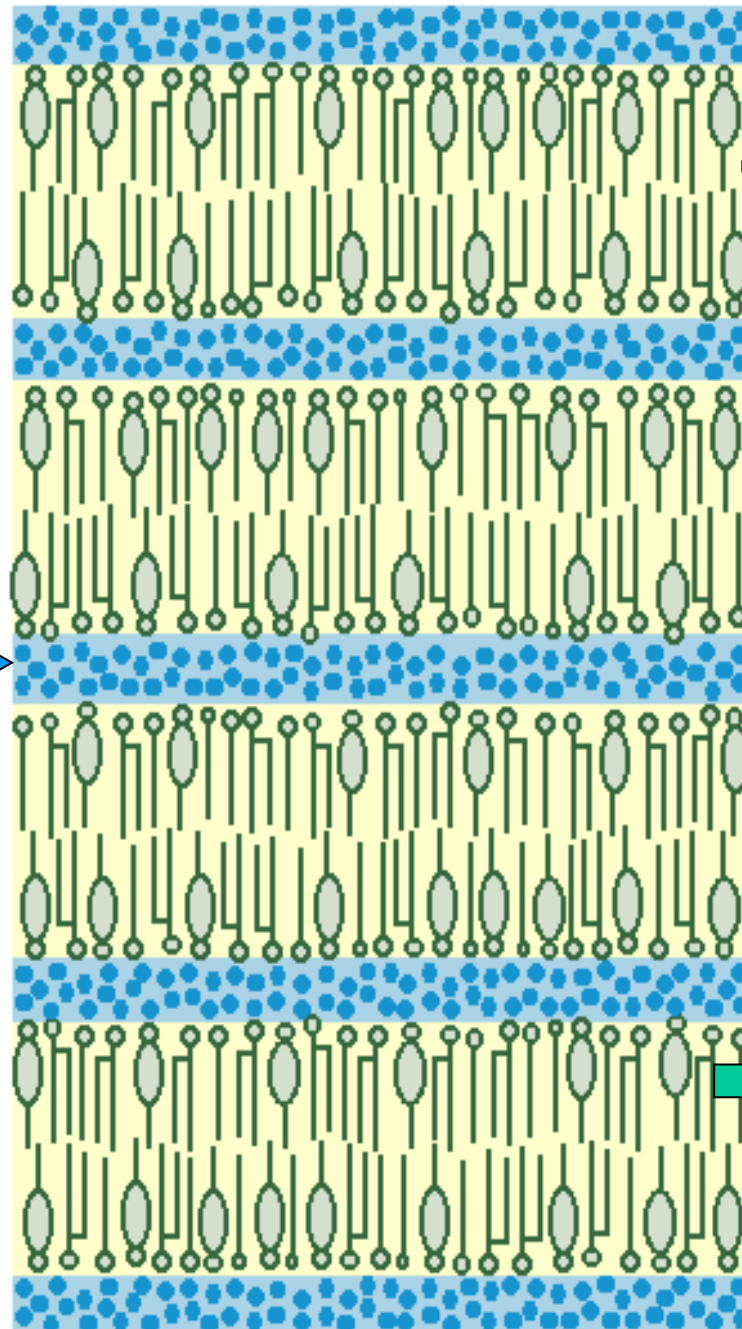


I. Hatta & N. Ohta, *Photon
Factory Activity Report 2003
Part A, Highlight* (2004) 49.

短周期 ラメラ構造

水層

脂質膜
(セラミド,
脂肪酸,
コレステロール)



~ 6 nm

~ 6 nm

~ 6 nm

~ 6 nm

I. Hatta & N. Ohta, *Photon
Factory Activity Report 2003
Part A, Highlight* (2004) 49.

炭化水素鎖の充てん構造

— 斜方晶, 六方晶, 液晶 —

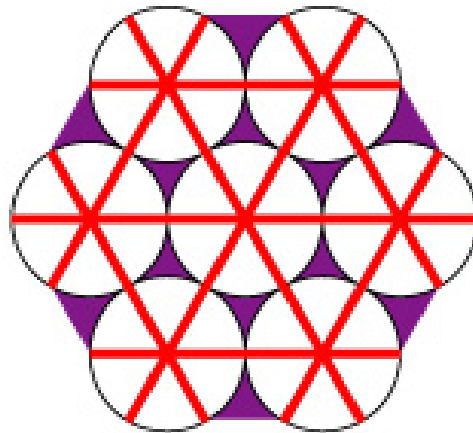
液晶

(セラミド,
脂肪酸
コレステロール)

0.46 nm

Liq.

六方晶(ゲル)

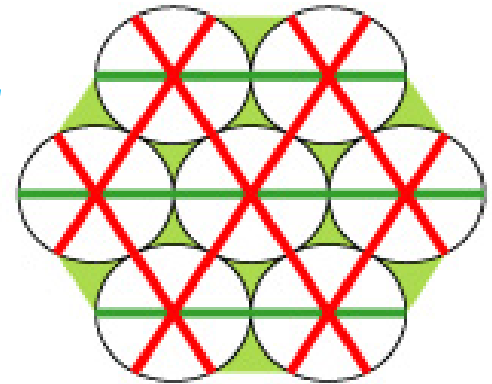


0.42 nm × 3

Hexagonal

脂質の充
てん構造
(セラミド,
脂肪酸)

斜方晶(固体)



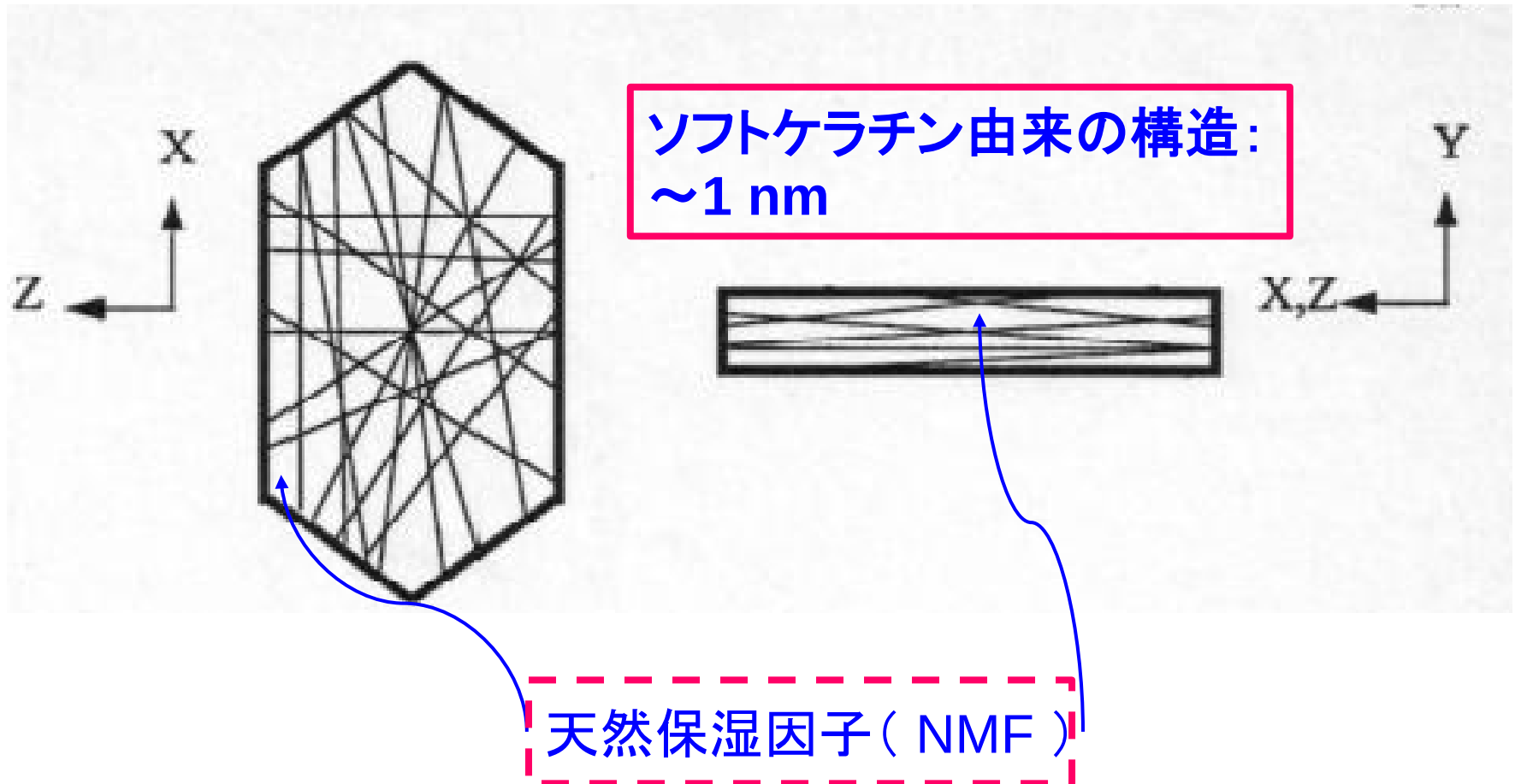
0.42 nm × 2

0.37 nm × 1

Orthorhombic

角層細胞とソフトケラチン

水分保持において重要な役割を果たしている



その他の付属器官

汗線,

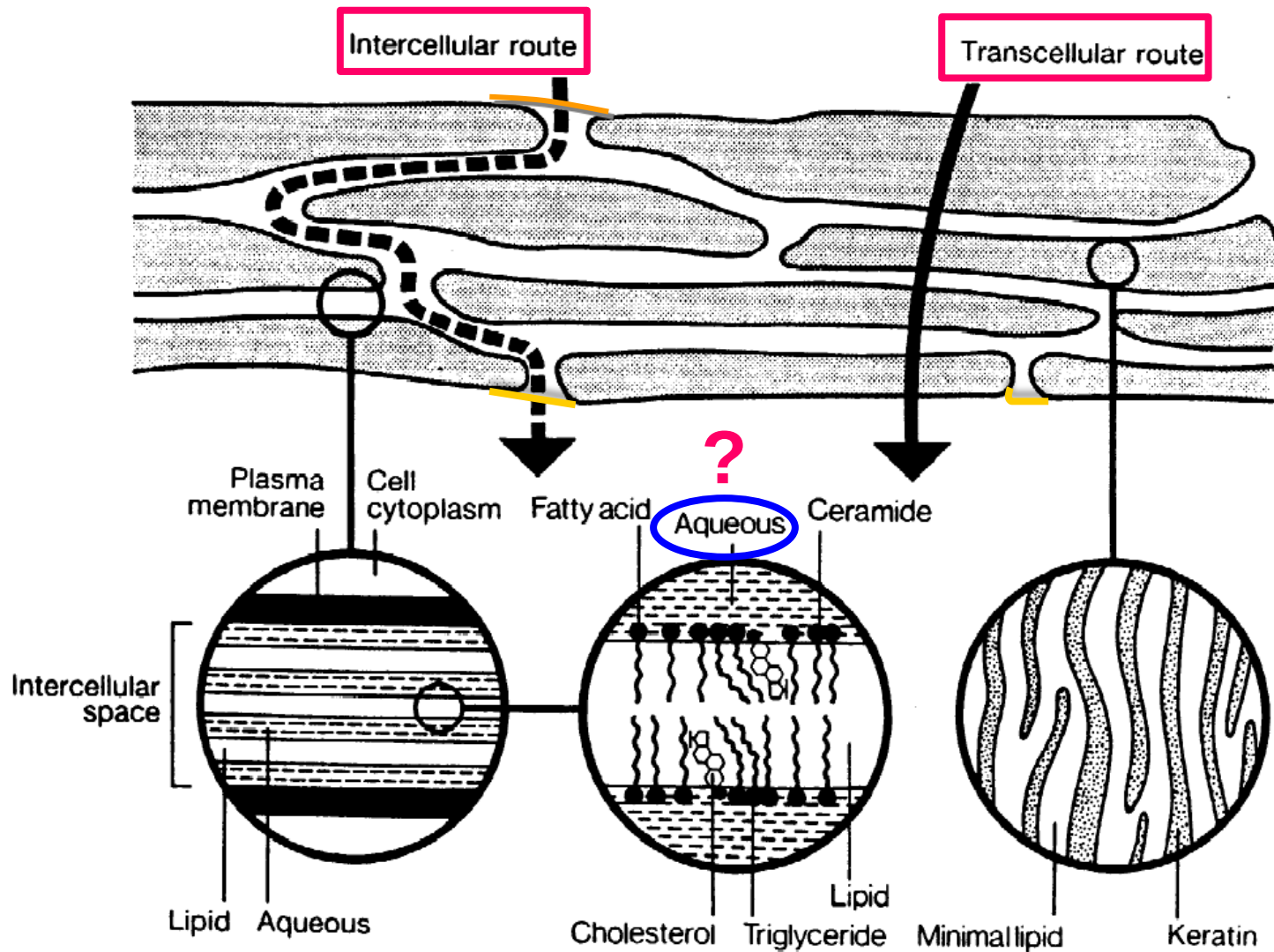
皮脂線,

...

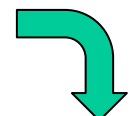
角層中の物質透過の経路

‘細胞間脂質透過(or 細胞間隙透過)’
と
‘経角層細胞透過(or 経細胞内透過)’
があると言われている。

細胞間脂質透過と経角層細胞透過



Suhonen, Bouwstra & Urtti, *J. Control. Rel.* **59** (1999) 149.



角層のバリア機能と物質の透過

物質の角層透過において、現在は、経角層細胞透過よりむしろ細胞間脂質透過の方が重要であると考えられている。・・・「化粧品・医薬品の経皮吸収」・・・ブローナー／メイバック編著 杉林監訳（フラグナンスジャーナル社、2005）—これは次に述べる研究手法につながっている—

一方、角層中の水は主として角層細胞中に蓄えられており、絶えず体内から体外へ角層を介して(透過して)蒸散(TEWL)している(水は親油性部分を透過しない)。さらに、水は経皮吸収促進剤として働く。

細胞間脂質透過機構に関する研究 —構造の立場から—

角層中の細胞間脂質のin vivoおよび
in vitro構造研究



培養皮膚角層中の細胞間脂質の
構造研究



再構成膜(角層脂質モデル系)の構造研究(角層細胞無)

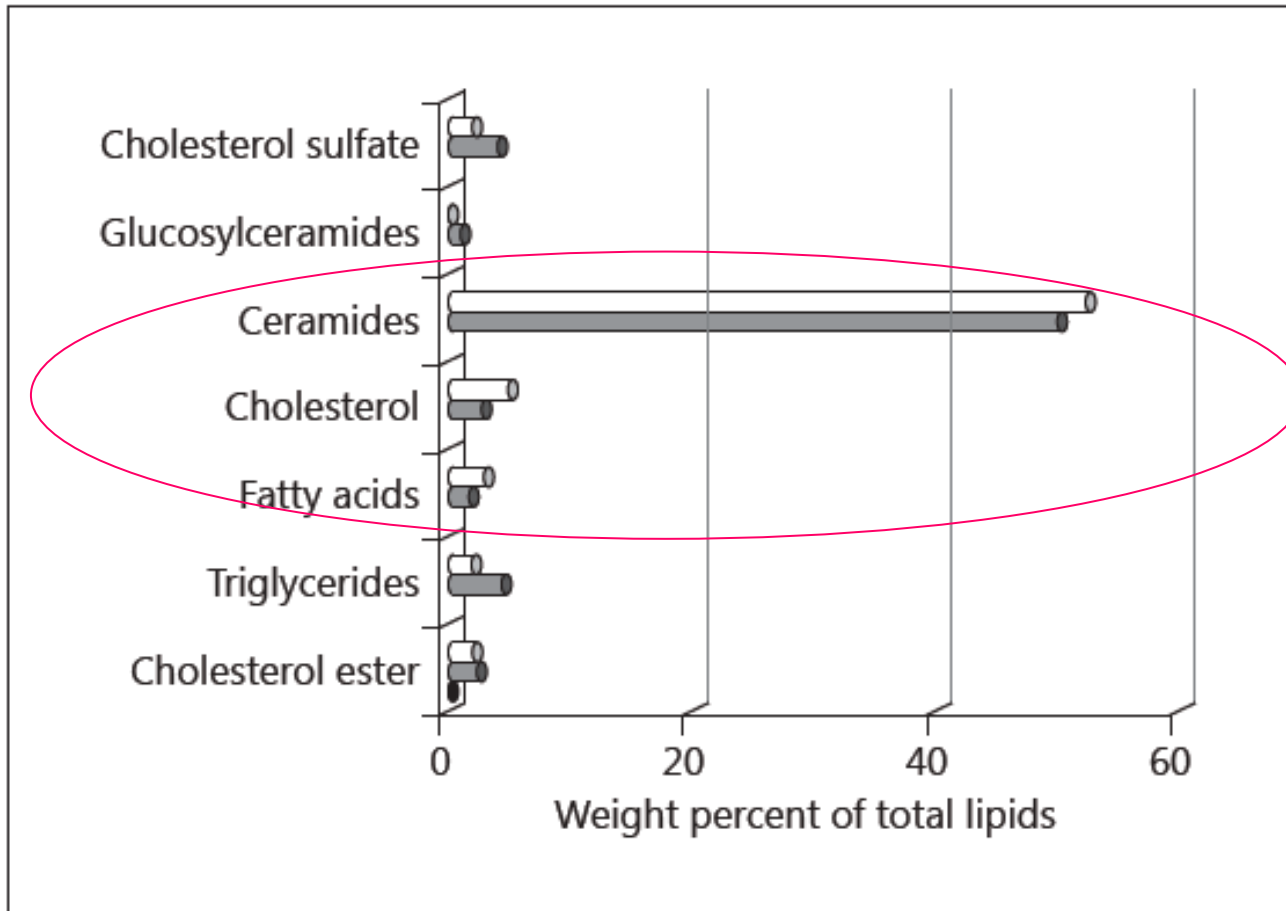


脂質3成分系(モデル系)の構造研究(角層細胞無)

化粧品・薬剤開発につなげるという考え方があるが、...

一方、生体膜のX線構造研究については、生体膜そのものの精密構造解析が出来ないので、モデル系での研究が中心となっている。
生体膜の研究とは事情が違うようである。Raft, ドラック・デリバリ...

角層中の脂質成分

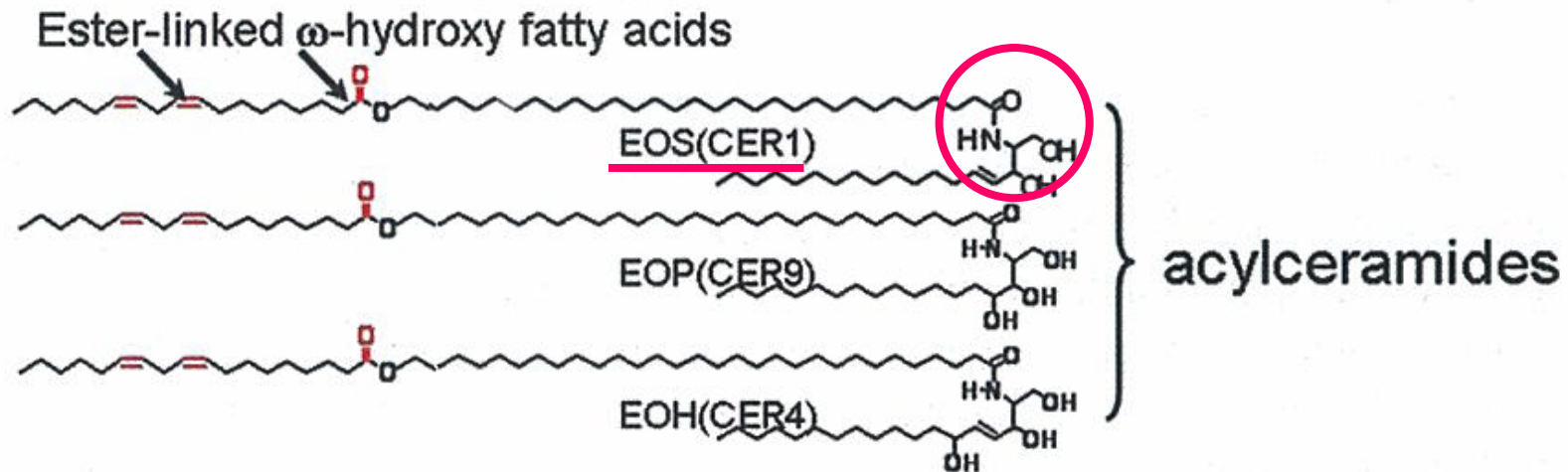


セラミド
脂肪酸
コレステロール

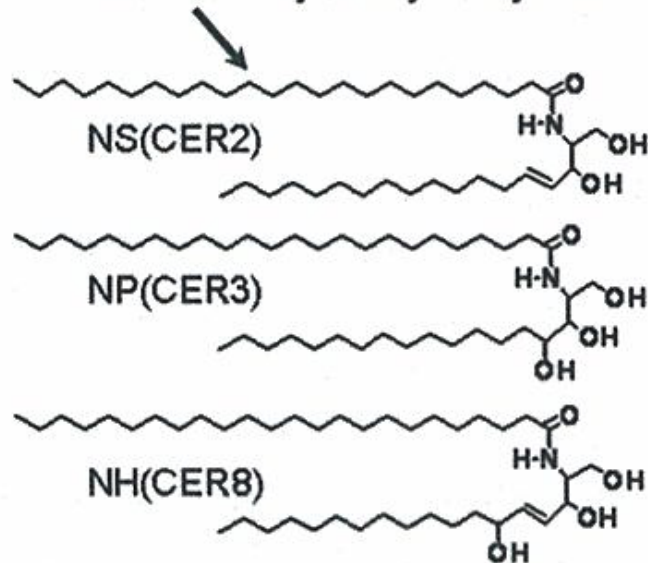
Fig. 1. Compositions (weight percent) of lipids from pig (grey bars) and human (white bars) stratum corneum (based on data from Wertz and Downing [18]).

P. W. Wertz, *Skin Pharm. Physiol.* **26** (2013) 217.

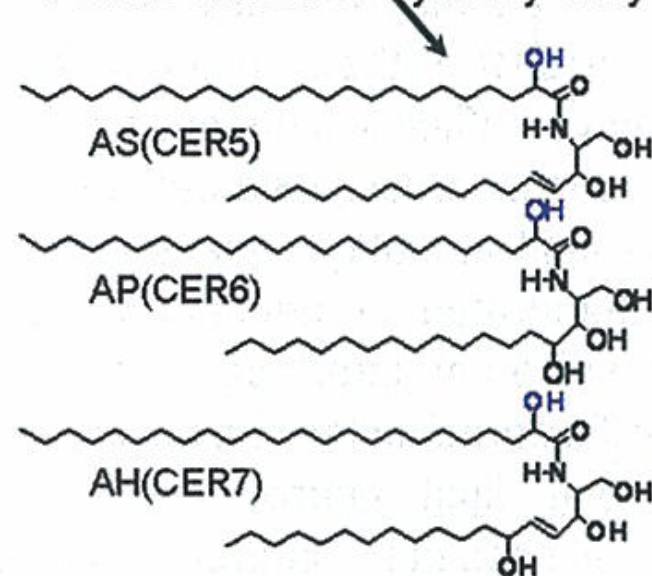
細胞間脂質中のセラミド



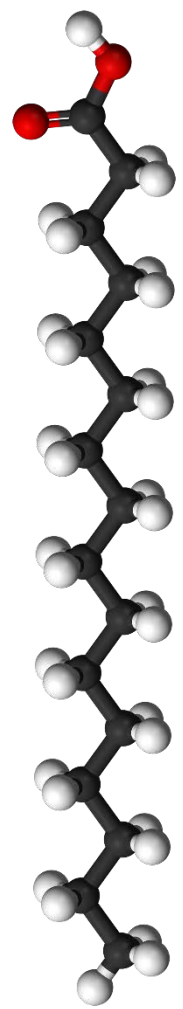
Amide-linked non-hydroxy fatty acids



Amide-linked α -hydroxy fatty acids



脂肪酸

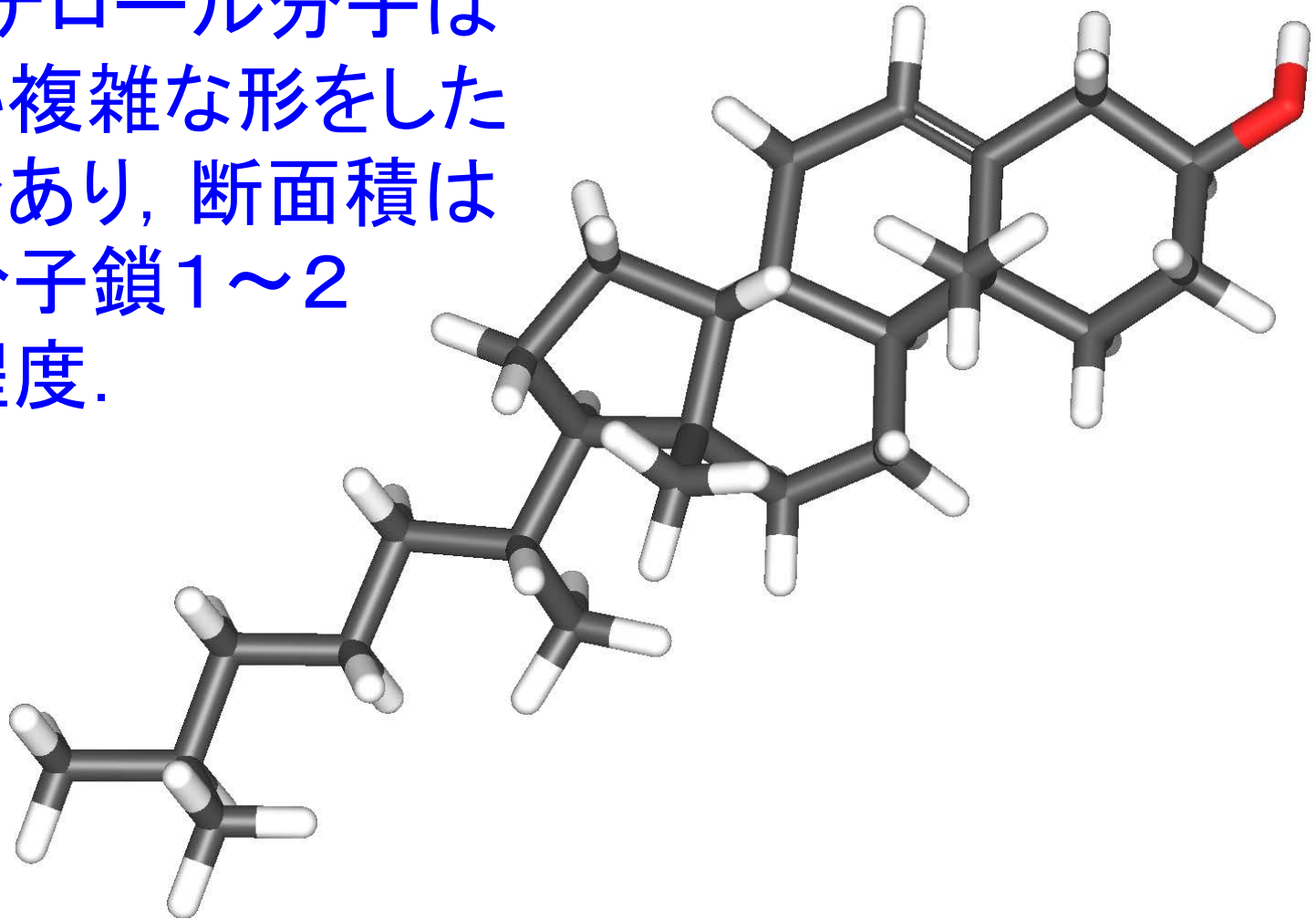


C#	Free Fatty Acids			
	Abdomen	Leg	Face	Plantar
14:0	3.8	10.9	1.4	0.3
16:0	36.8	36.2	27.9	10.5
16:1	3.6	16.6	6.5	1.2
18:0	9.9	10.0	16.3	20.1
18:1	33.1	17.7	23.5	18.8
18:2	12.5	1.4	11.9	6.5
20:0	0.3	2.6	2.4	6.1
20:1	tr	1.1	0.1	1.5
20:2		tr	0.1	
20:3		tr		3.1
20:4		tr	3.5	
22:0	tr	3.5	4.4	9.6
22:1			2.0	5.8
22:0				16.5
24:1				
26:0				
Total	100.0	100.0	100.0	100.0

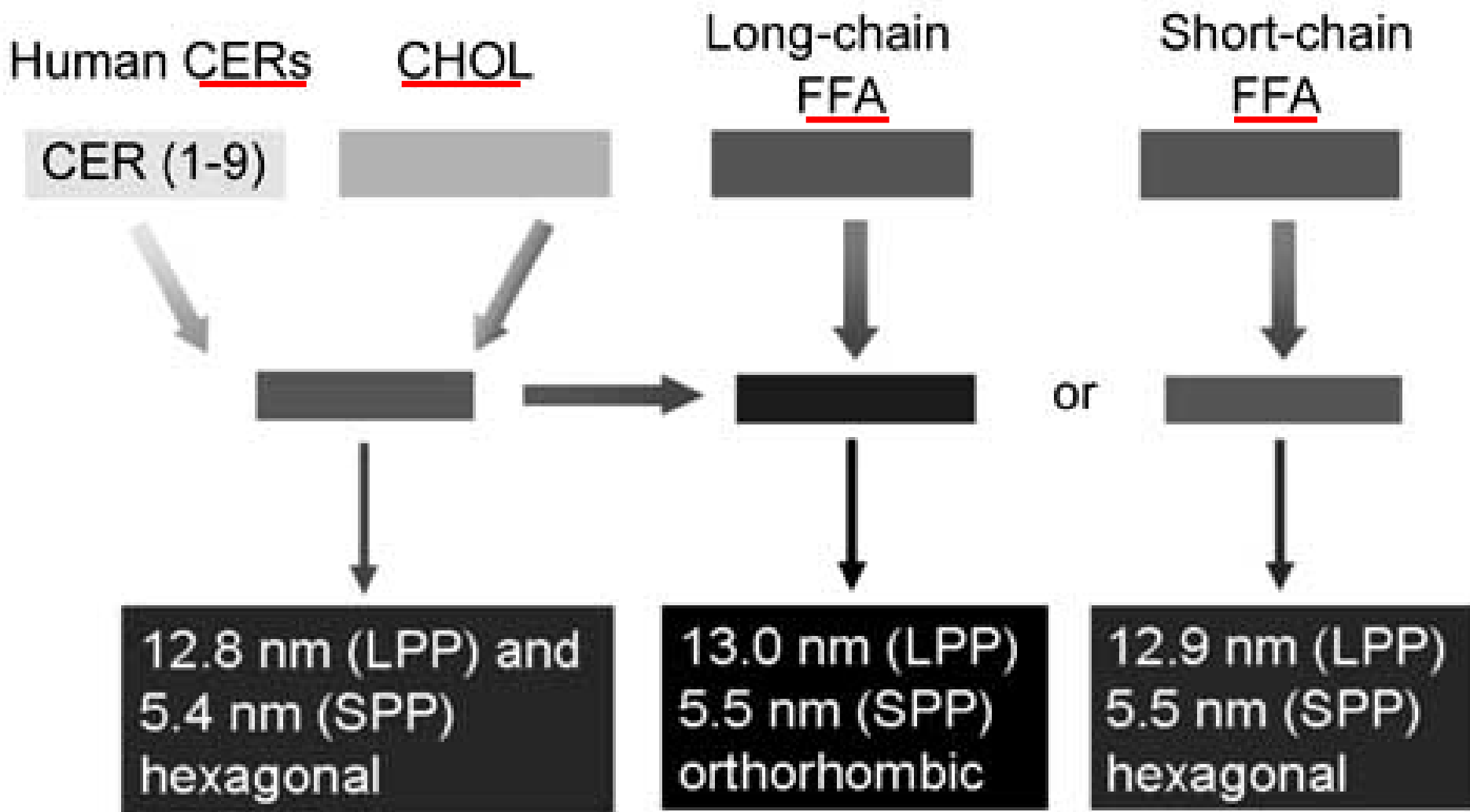
Lampe et al., *J. Lipid Res.* **24** (1983) 120.

コレステロール

コレステロール分子は
細長い複雑な形をした
分子であり、断面積は
脂質分子鎖1～2
本分程度.



再構成膜（角層脂質モデル）



Bouwstra & Gooris, *Open Dermatol. J.* 4 (2010) 10.

モデル系では角層の細胞間脂質の構造は再現できていない.

室温で高い透過性 を持つ液晶相が 存在する

Hex: 六方晶

Ortho: 斜方晶

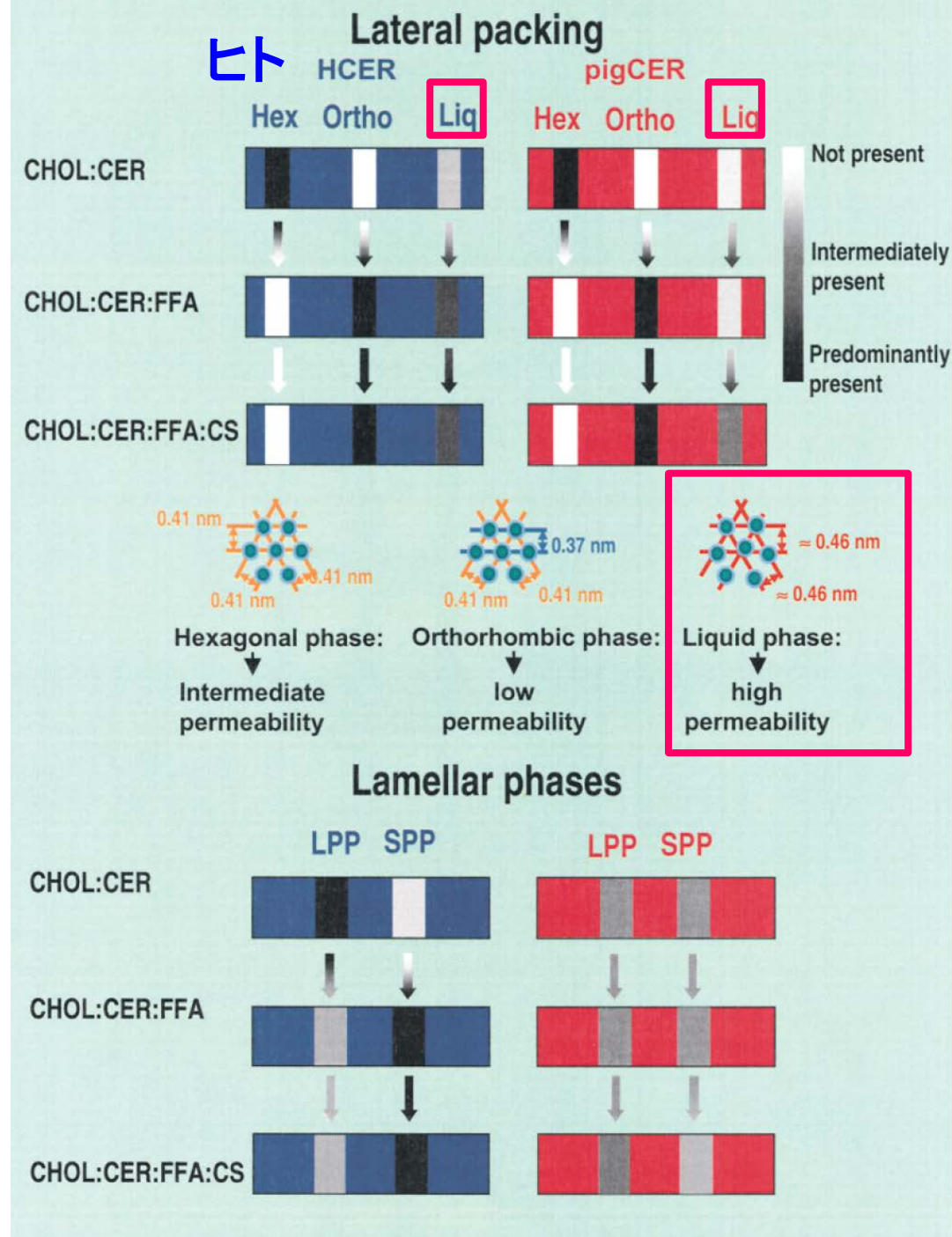
Liq: 液晶

LPP: 長周期ラメラ構造

SPP: 短周期ラメラ構造

Liq: スメクチック液晶

Bouwstra, Gooris, Dubbelaar
& Ponec, *J. Lipid Res.* 42
(2001) 1759.



角層中の細胞間脂質が作る構造

分子の長軸方向：

長周期ラメラ構造

短周期ラメラ構造（水層）

液晶（スメクチック相）

分子の短軸方向：

六方晶（低温，高温）

斜方晶

液晶（乱れた炭化水素鎖の充てん構造）

これらの構造はお互いに無関係（独立に存在する）か？

室温（低温）六方晶と高温六方晶は成分が異なる構造に由来する。

角層中に存在する 2つのドメイン (3つのドメイン?)

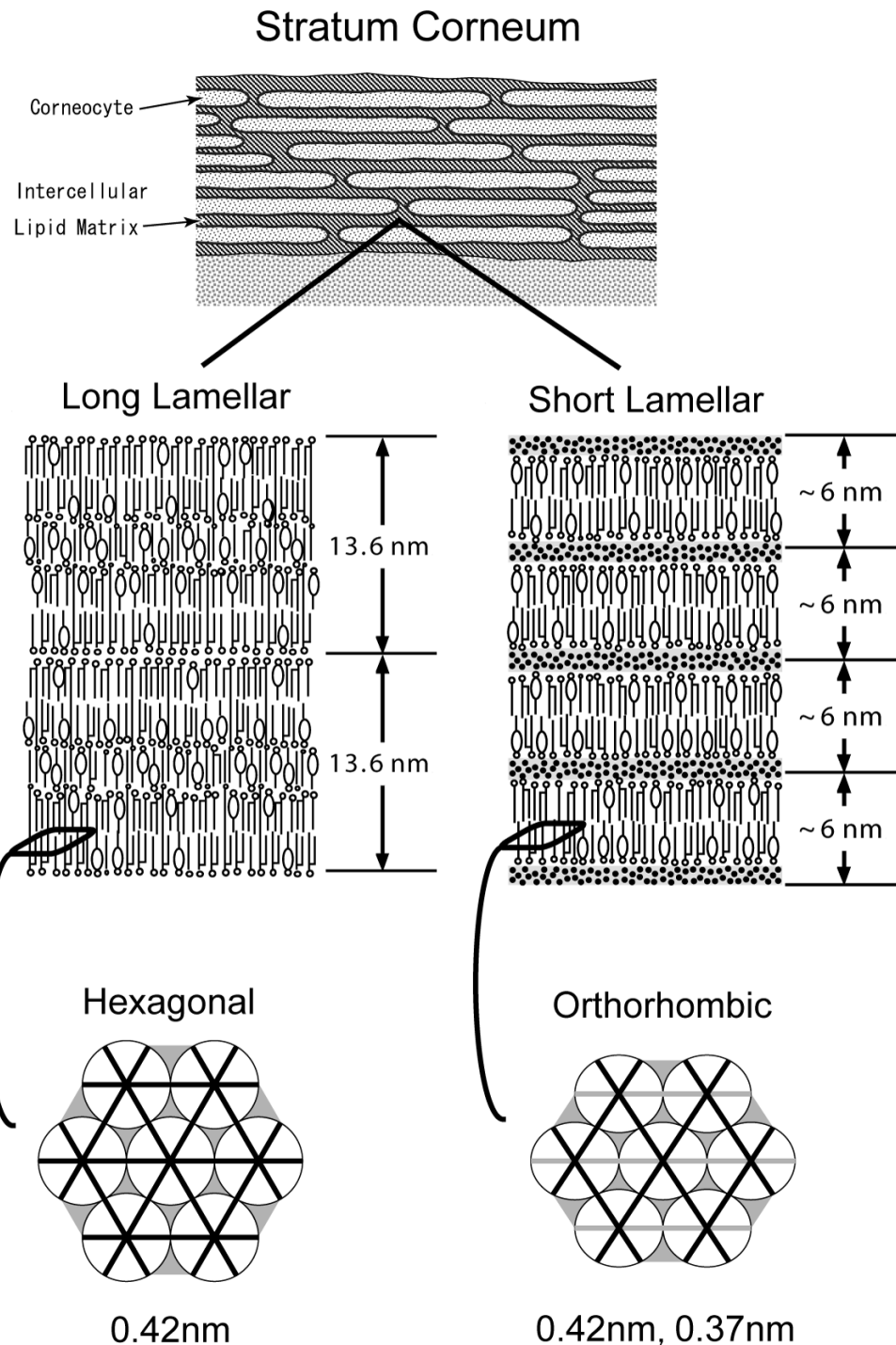
70°Cで短周期ラメラ構造のピークが消失し、ほぼ同じ温度で高温六方晶(室温では斜方晶)のピークが消失する。

Hatta et al.,
*Biochim.
Biophys.
Acta* **1758**
(2006) 1830.

Liquid crystalline

乱れた構造

0.46 nm

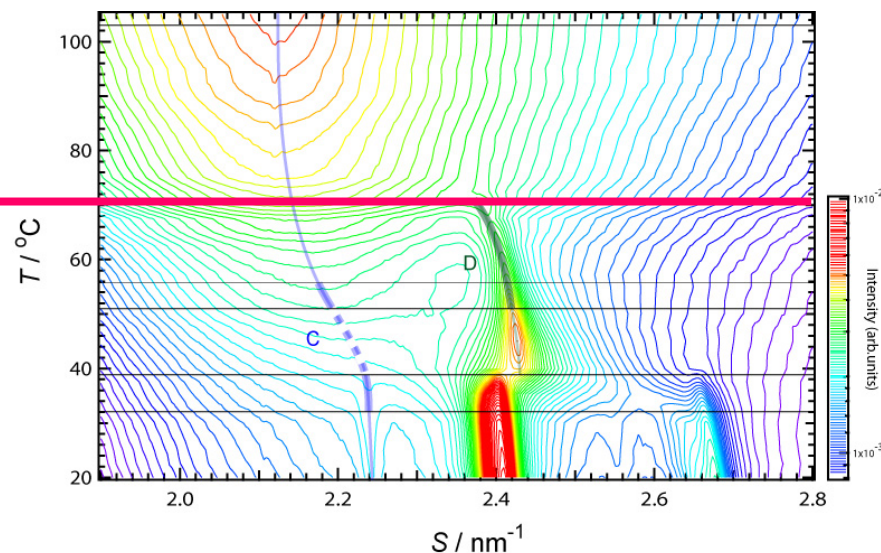
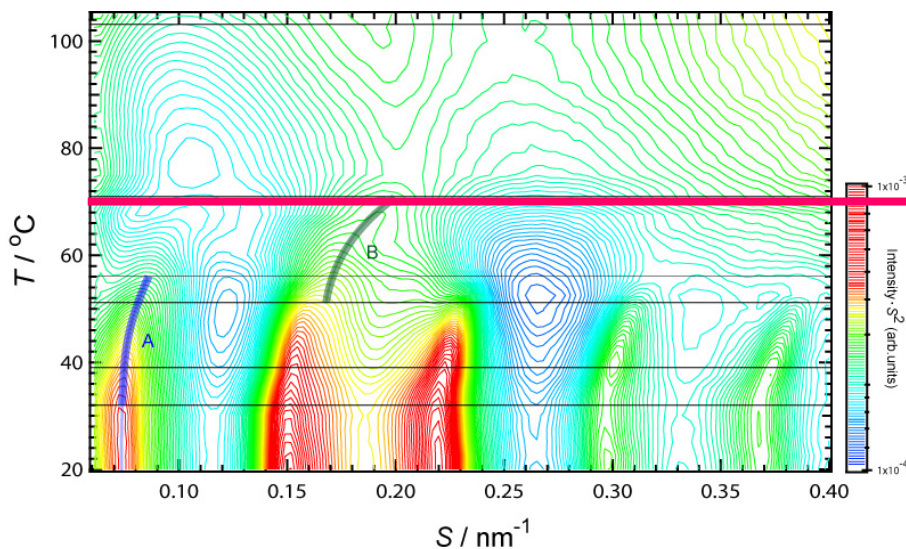


70°Cの相転移と短周期ラメラ構造／ 斜方晶ドメイン

(ヘアレスマウス角層)

小角散乱(ラメラ構造)

広角散乱(炭化水素鎖
の充てん構造)

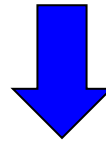


長周期ラメラ構造／ 六方晶ドメイン

(100°Cで0.46 nm辺りに液晶構造が明瞭に見える)

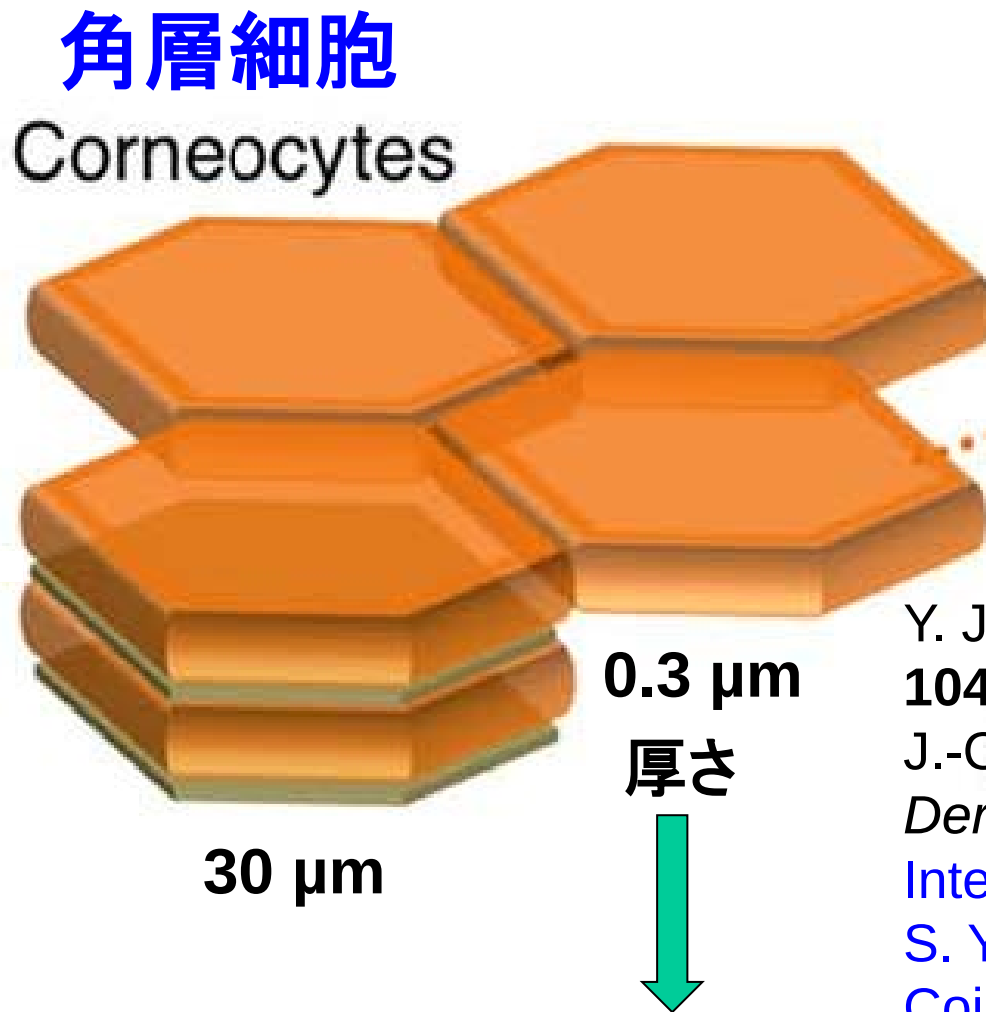
経角層細胞透過機構に関する研究 —構造の立場から—

角層細胞中のソフトケラチン構造研究
&
短周期ラメラ構造の構造研究



2つの構造間の相互作用
親水性物質の透過過程, 律速過程
角層中の水の振舞
保湿作用

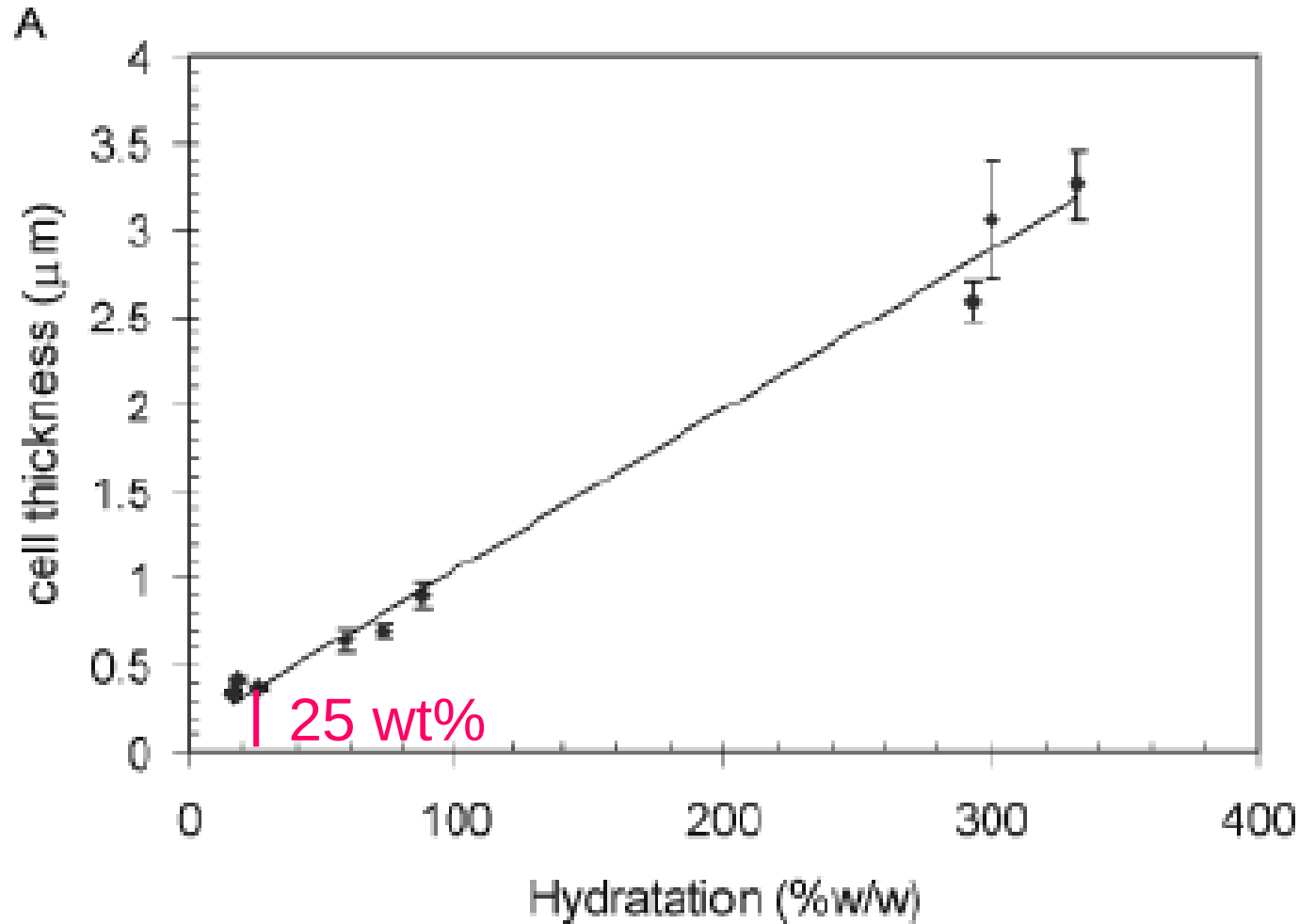
ソフトケラチン由来の散乱



ソフトケラチン
Keratin filaments

Y. Jokura et al., *J. Invest. Dermatol.*
104 (1995) 806. (このモデル図が載っている)
J.-C. Garson, et al., *J. Invest.*
Dermatol. **96** (1991) 43.
Inter α -helix distance : ~ 0.95 nm;
S. Yamada, T. Kume et al.
Coiled coils (protofibril)

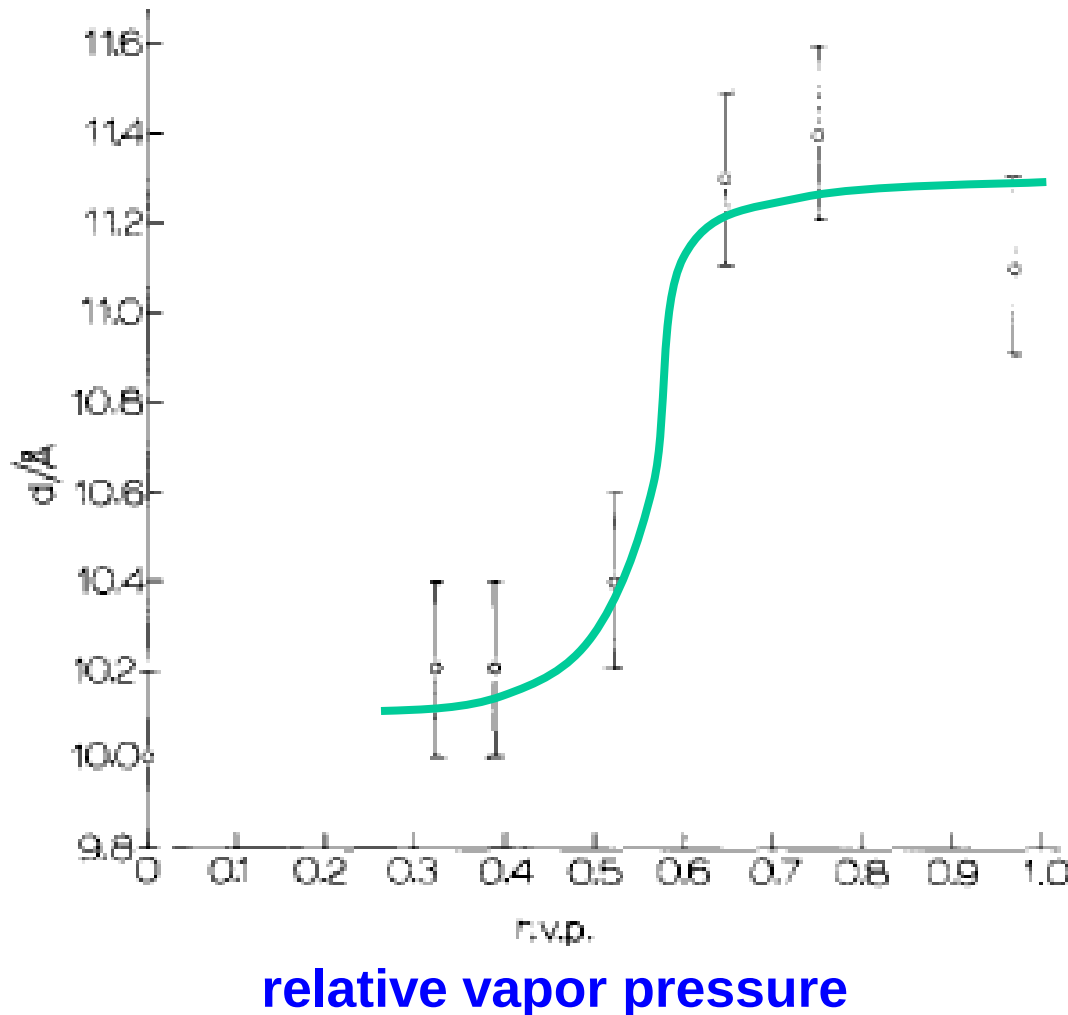
角層細胞の厚さと水分量



J. A. Bouwstra, A. de Graaf, G. S. Gooris, J. Nijssse, J. W. Wiechers & A. C. van Aelst, *J. Invest. Dermatol.* **120** (2003) 750.

ソフトケラチン由来の構造の膨潤 I

(ヒト踵)

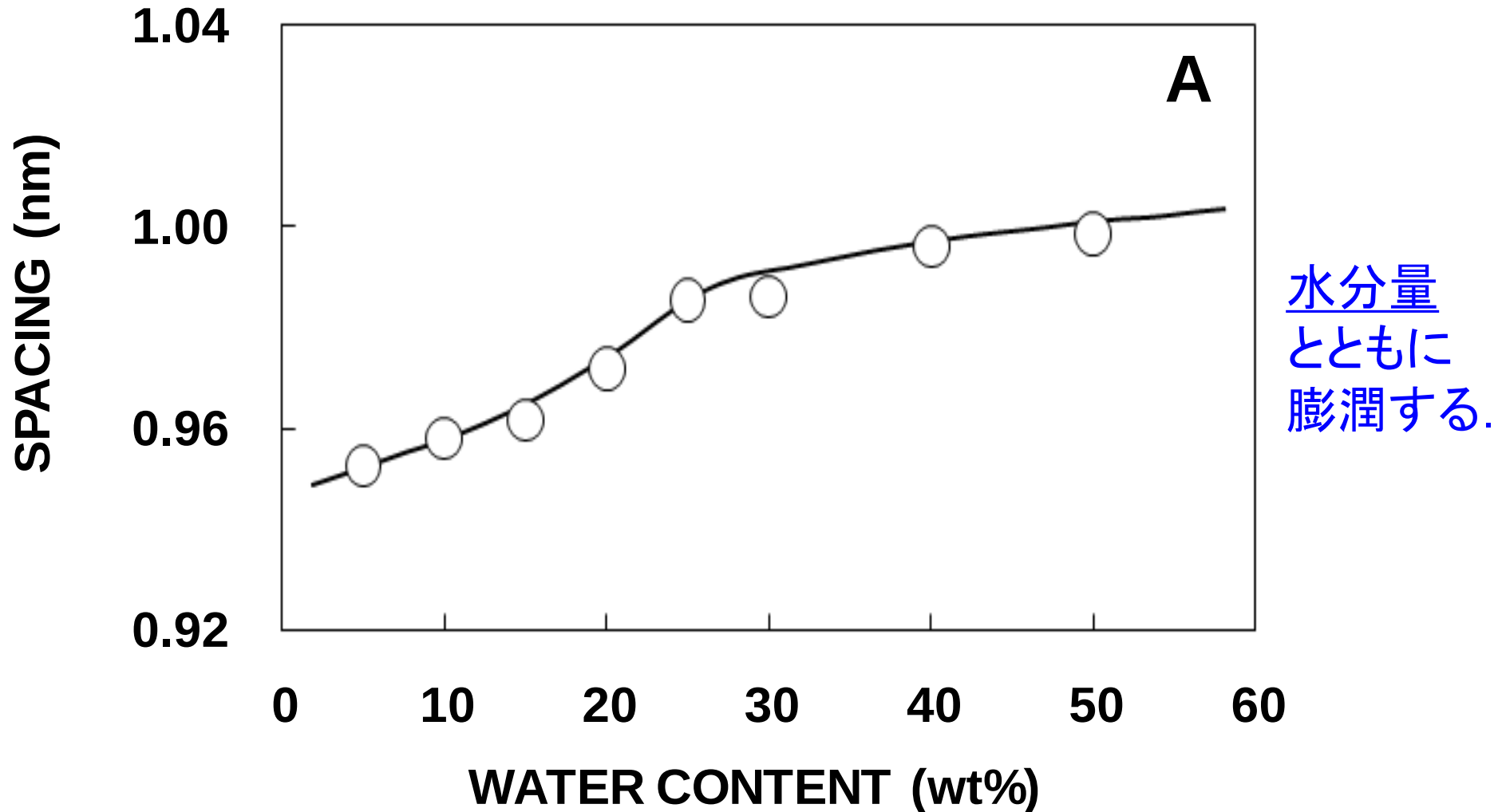


水を取り込むことにより膨潤している。ただし、角層中の水分量？

M. J. Hey, D. J. Taylor and W. Derbyshire, *Biochim. Biophys. Acta*, **540** (1978) 518.

ソフトケラチン由来の構造の膨潤 II

(ヒト角層)



**SPring-8では
角層細胞中のソフトケラチンに着目した
研究が盛んに行われている
(ヒト角層, ヒト踵)**

ソフトケラチン由来の構造(1 nm) I

**先駆的な実験:
2006B0194/2007A1943
ナリス 辻恵子**

ソフトケラチン由来の構造(1 nm) II

2010B1331 /2011A1451 /2012B1864
クラシエ 築瀬香織

ソフトケラチン由来の構造(1 nm)Ⅲ

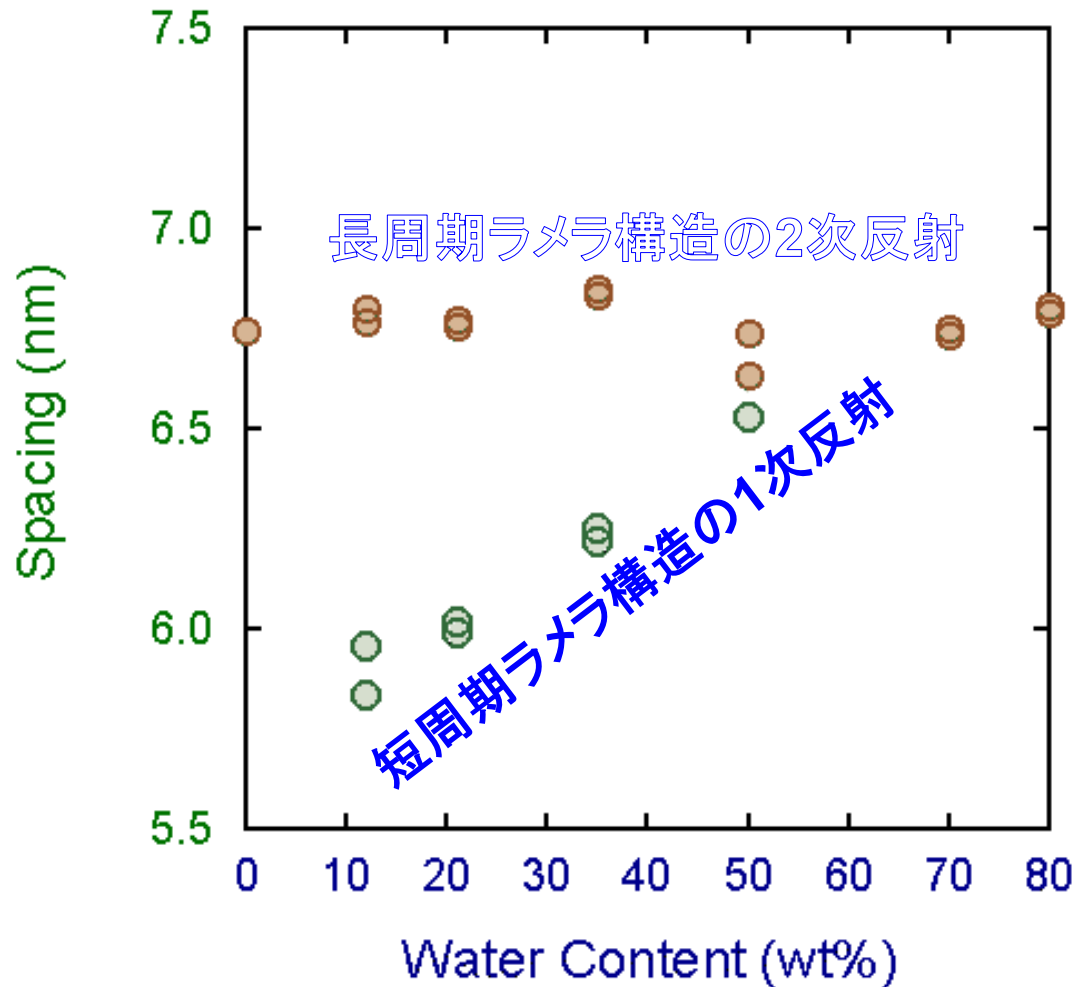
2011B1754 /2012A1253 /2012B1232

花王 山田真爾・久米卓志

角層中の水の振舞

日本で、ソフトケラチンの構造に加えて、
短周期ラメラ構造に関する研究も積極的
に行われている。

(a)

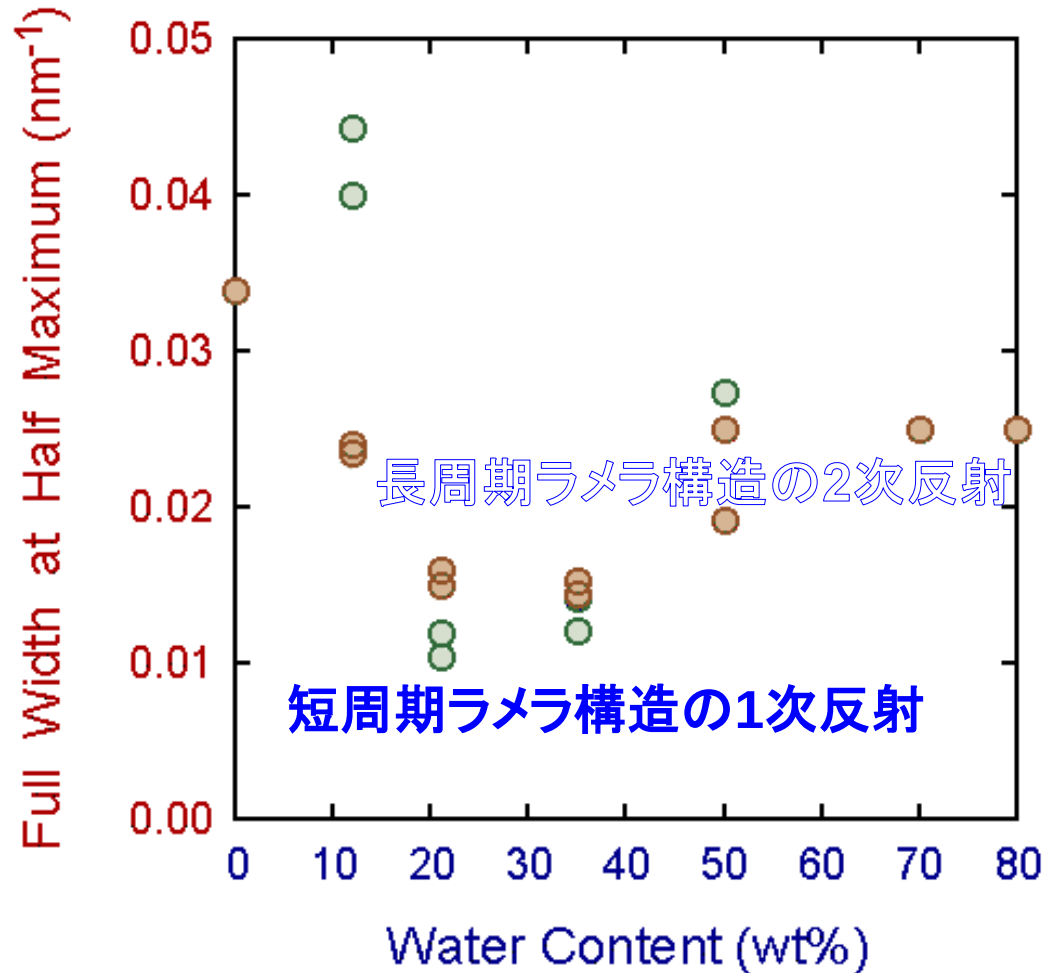


短周期ラメラ構造 のラメラ周期の 水分量依存性 (ヘアレスマウス角層)

水分量: 0~60 wt%
ラメラ周期: 5.6~6.6 nm
水層の厚さ: 0~1 nm

N. Ohta, S. Ban, H. Tanaka, S. Nakata & I. Hatta, *Chem. Phys. Lipids* **123** (2003) 1. (角層中の細胞間脂質に水層があることを示した初めての実験)

(b)



短周期ラメラ構造
の回折ピークの
半幅値の
水分量依存性
(ヘアレスマウス角層)

半値幅の解析より水分
量 20-30 wt% で構造が
安定化する.

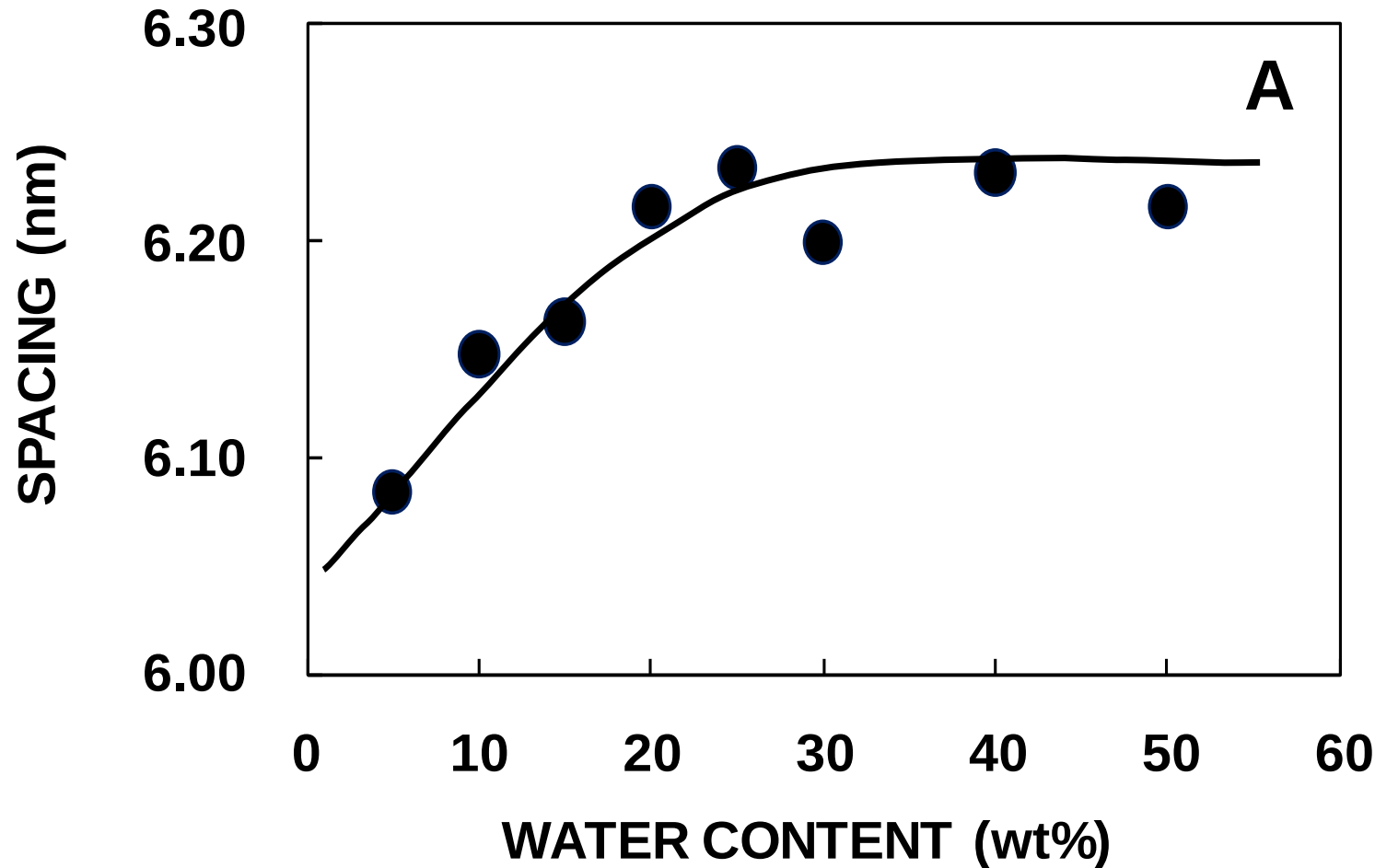
短周期ラメラ構造の水分量依存性 — 重水を用いた中性子散乱実験 — (ヒト角層)

短周期ラメラ構造のラメラ周期: 5.7~6.2 nm
相対湿度 100% RH: 0~22 hours

Indeed moving from 100% RH to excess D₂O conditions results in an increase of the repeated characteristic distance from 5.7nm ($Q = 1.1\text{nm}^{-1}$) to 6.2nm ($Q = 1.0\text{nm}^{-1}$).

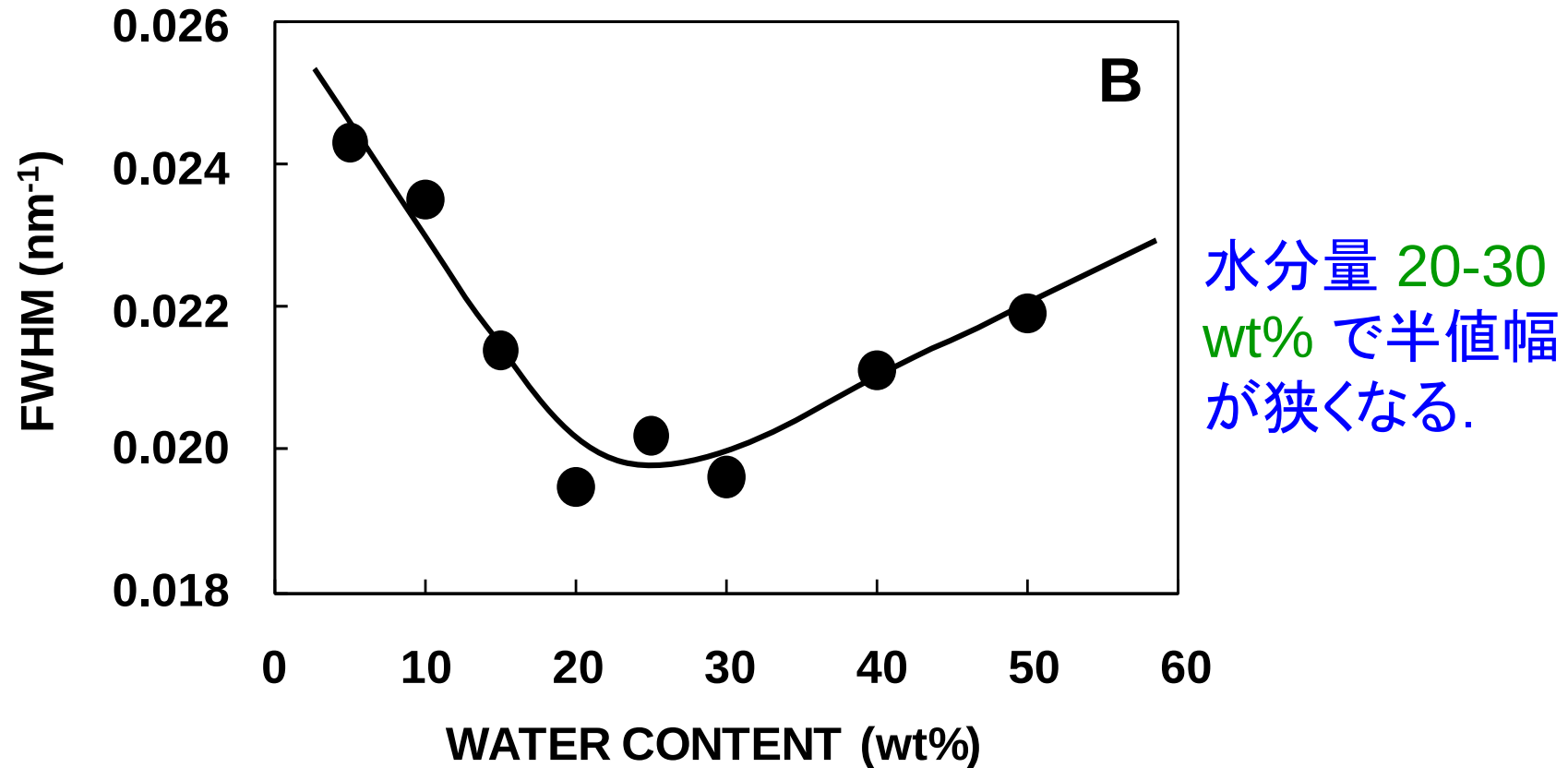
G. Ch. Charalambopoulou, Th. A. Steriotis, Th. Hauss, A. K. Stubos & N. K. Kanellopoulos, *Physica B* **350** (2004) e603.

短周期ラメラ構造の周期の水分量依存性 (ヒト角層)



短周期ラメラ
構造
が膨潤する.

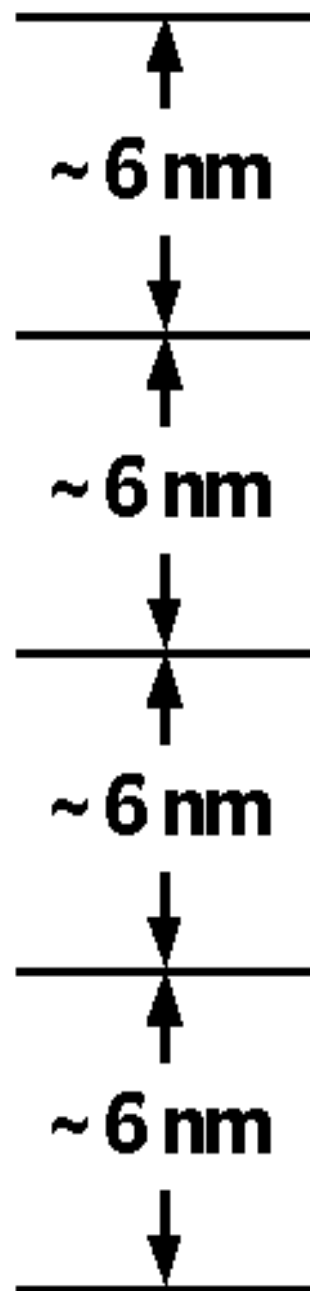
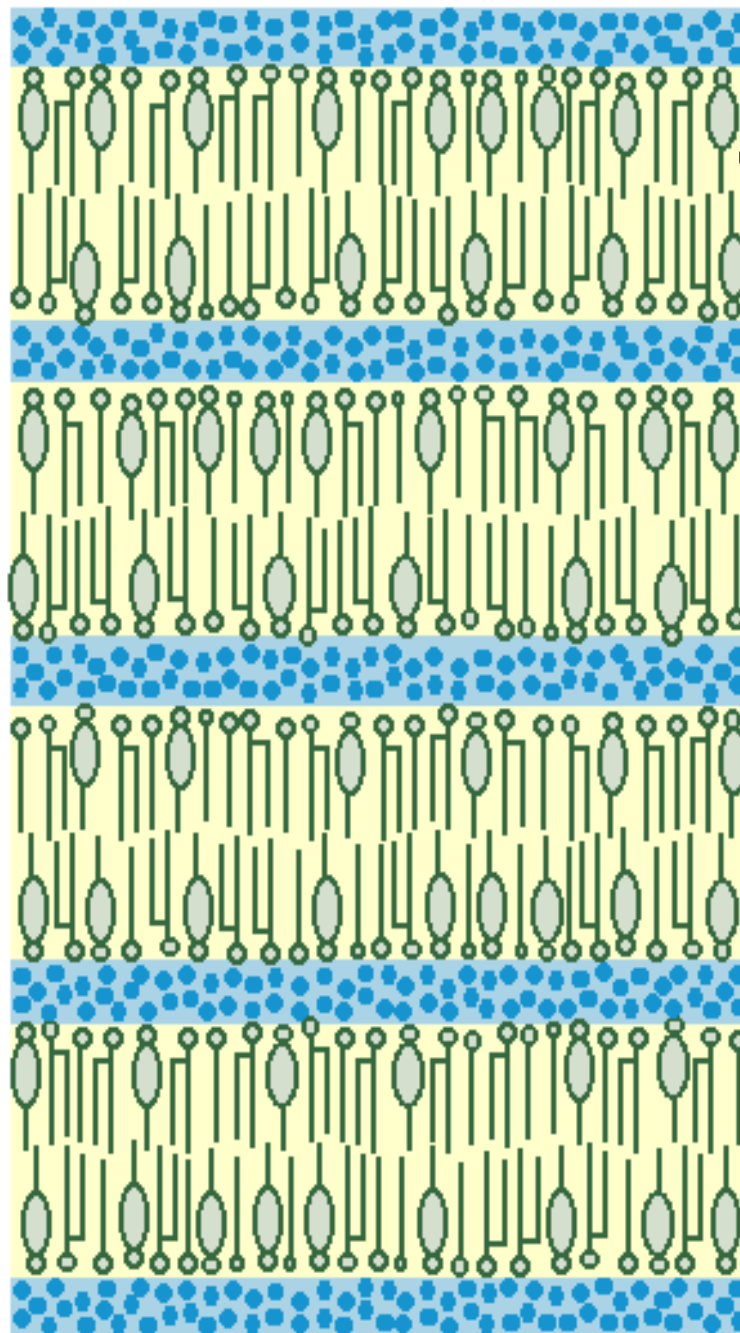
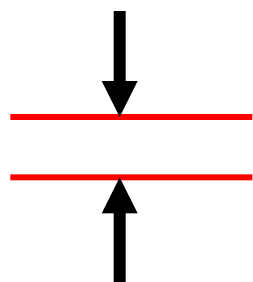
短周期ラメラ構造の幅の水分量依存性 (ヒト角層)



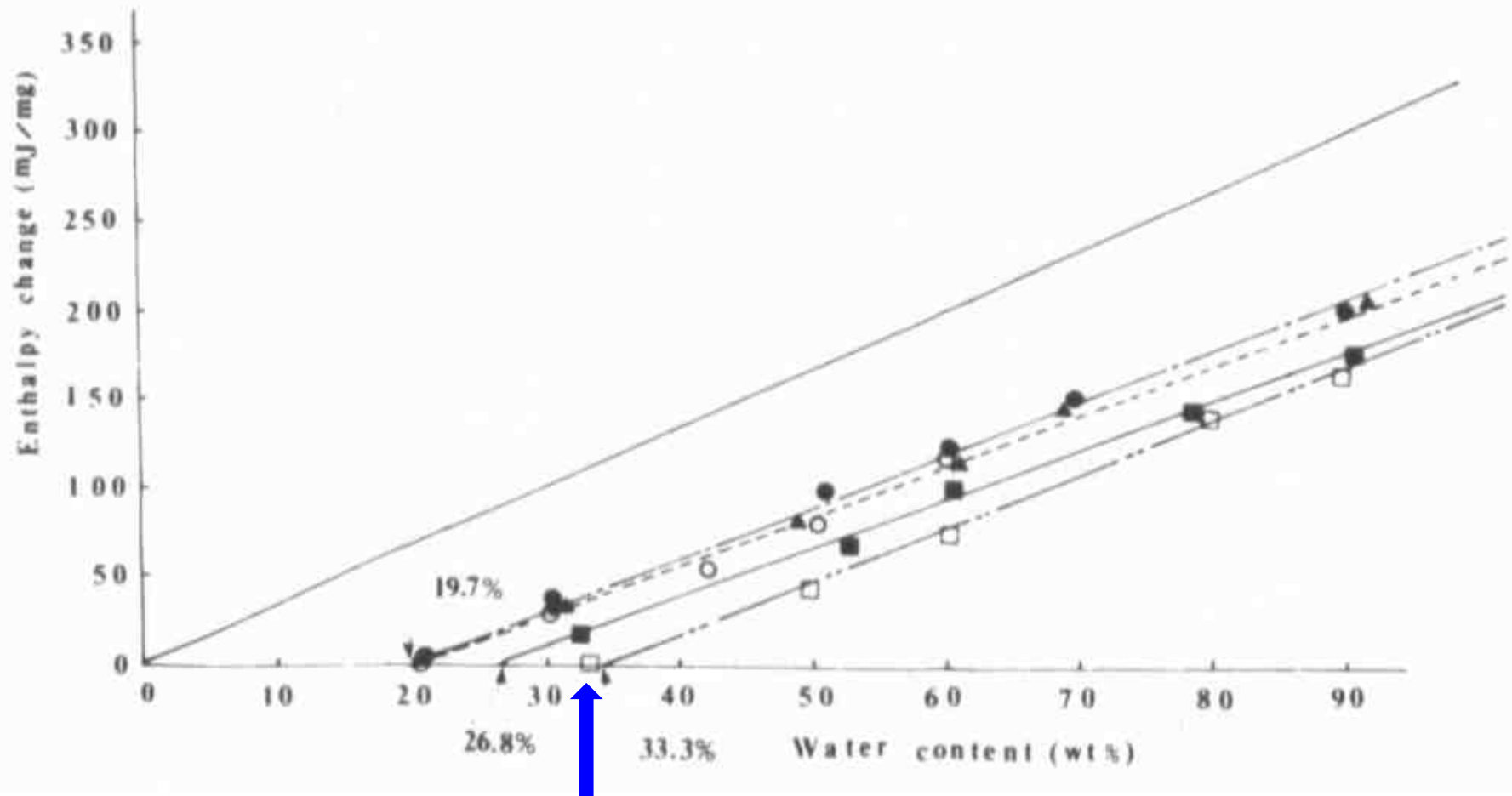
短周期 ラメラ構造中 の水層

0~1 nm

0.5 nmで
構造安定
化



角層中の結合水量



25 wt%

角層中の水分量を一定に保つ2つの因子

- 角層細胞:

水を取り込む $\Rightarrow$ 20~30 wt% が結合水の状態

- 短周期ラメラ構造:

水層が入る(律速) $\Rightarrow$ 20~30 wt% で構造が安定化

エタノール・水混合液 I

(ヘアレスマウス角層)

短周期ラメラ構造の振舞 ($n=13-14$)

2012B1255 池田模範堂 堀田大介

構造の揺らぎが極大を示す

エタノール・水混合液Ⅱ

(ヘアレスマウス角層)

ソフトケラチン由来の構造の振舞 ($n=13-14$)

2012B1255 池田模範堂 堀田大介

膨潤する

経皮吸収 促進剤

表1 経皮吸収促進剤の種類と主な促進メカニズム
経皮吸収促進剤 吸収促進メカニズム

1	溶媒	
	水	水和, ケラチンの膨潤
	アルコール	
	低級アルコール	脂質の抽出
	高級アルコール	脂質2重層の破壊
	ジメチルスルフォキシド	脂質の抽出, 角質細胞同士の剥離
2	界面活性剤	
	アニオン性界面活性剤	タンパク質相互作用
	カチオン性界面活性剤	タンパク質との結合
	ノニオン性界面活性剤	膜の流動性の増加, 溶解性の向上
		脂質の抽出
3	脂肪酸および脂肪酸エステル	
	オレイン酸	脂質相互作用
	ミリスチン酸イソプロピル	脂質相互作用
4	生分解性促進剤	
	アルキルエステル	脂質流動性の増加
	ϵ -アミノカプロン酸	皮膚との相互作用
5	その他	
	アミノ酸	ケラチンの解離
	テルペン類	脂質部位の破壊, 分配の増加
	ピロリドン類	皮膚の水和, タンパク質相互作用
	尿素	角質層の水和構造変化
	リン脂質	界面活性作用

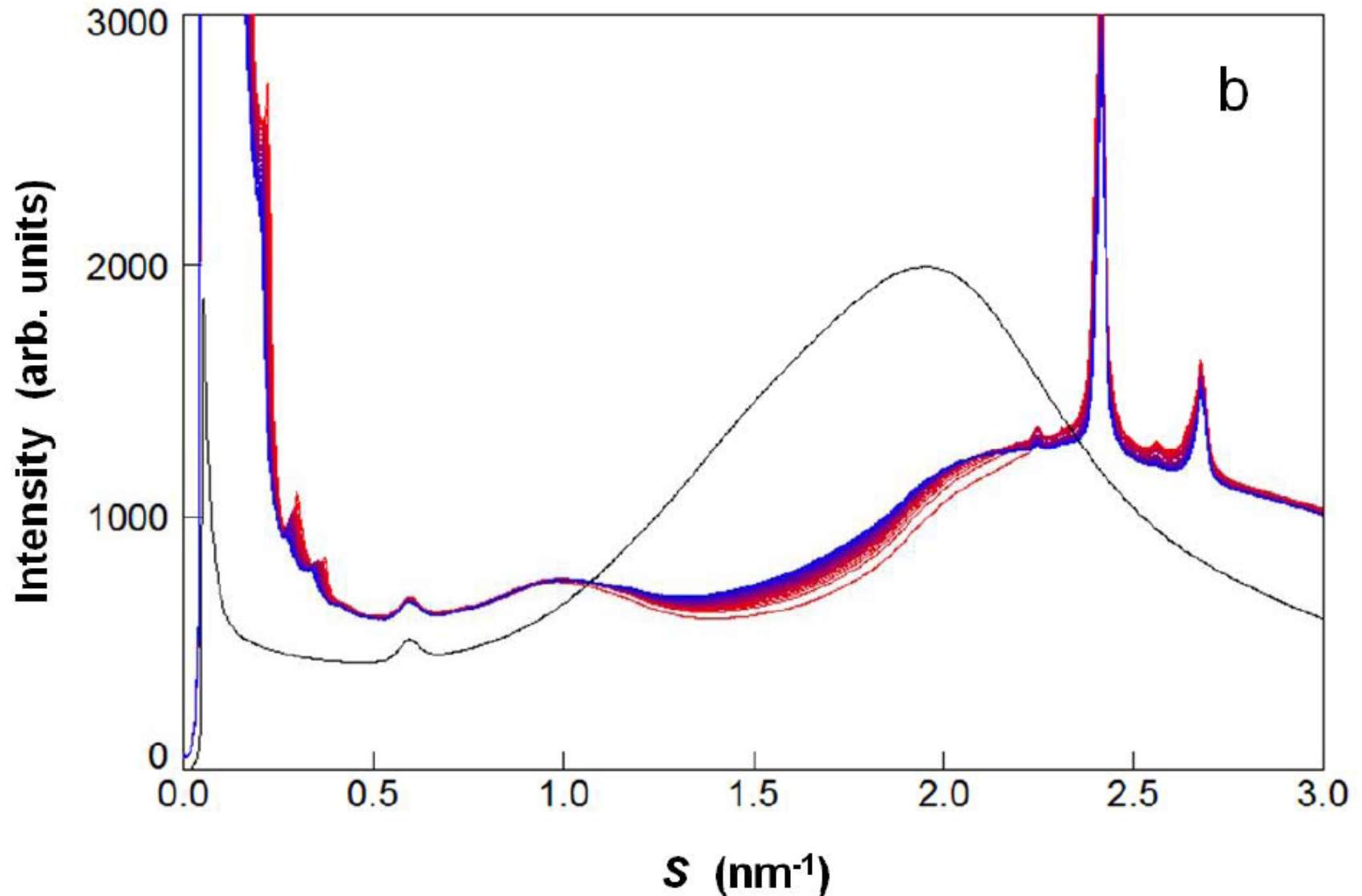
鈴木正人監修, 機能性
化粧品の開発, 第3巻
(2007, シーエムシー)
pp.286.

**‘溶液セル’を用いた角層に
溶液を作用したときの
広 q 領域X線散乱実験に基づいた
細胞間脂質透過と経角層細胞透過の検討**

(ヘアレスマウス角層)

I. Hatta, H. Nakazawa, Y. Obata, N. Ohta, K. Inoue and N. Yagi,
Chem. Phys. Lipids **163** (2010)381.

リモネン(テルペン類)



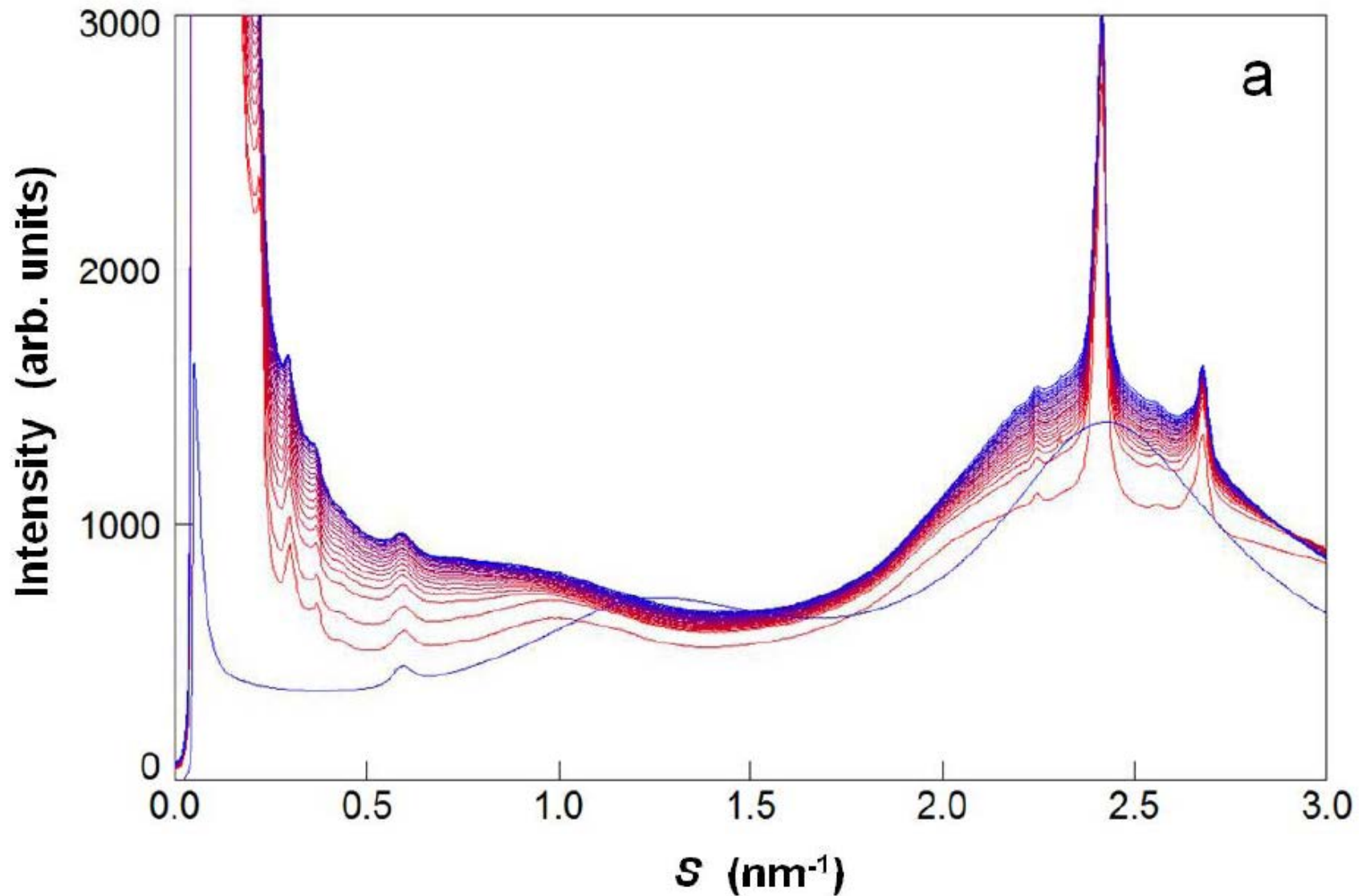
I. Hatta, H. Nakazawa, Y. Obata, N. Ohta, K. Inoue and N. Yagi, *Chem. Phys. Lipids* **163** (2010)381.

細胞間脂質透過経路

In *Skin Bioscience*, ed. T.
Imae, Pan Stanford Pub. *in*
press.

I. Hatta, H. Nakazawa, Y. Obata, N. Ohta, K. Inoue and N. Yagi, *Chem. Phys. Lipids* **163** (2010)381.

エタノール(低級アルコール)



I. Hatta, H. Nakazawa, Y. Obata, N. Ohta, K. Inoue and N. Yagi, *Chem. Phys. Lipids* **163** (2010)381.

經角層細胞透過經路

In *Skin Bioscience*, ed. T.
Imae, Pan Stanford Pub. *in*
press.

I. Hatta, H. Nakazawa, Y. Obata, N. Ohta, K. Inoue and N. Yagi, *Chem. Phys. Lipids* **163** (2010)381.

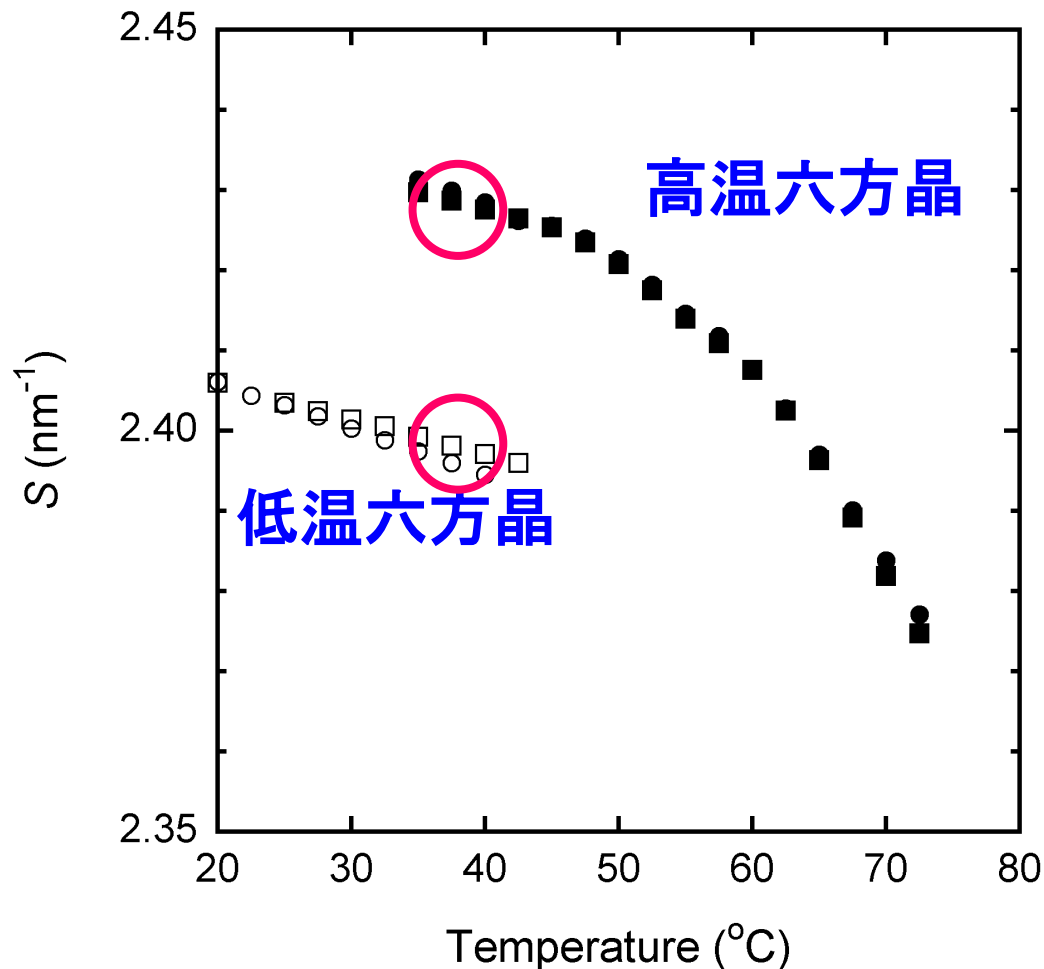
炭化水素鎖の充てん構造と 物質の角層透過

(ヒト角層)

室温で斜方晶から高温六方晶に変わるか？

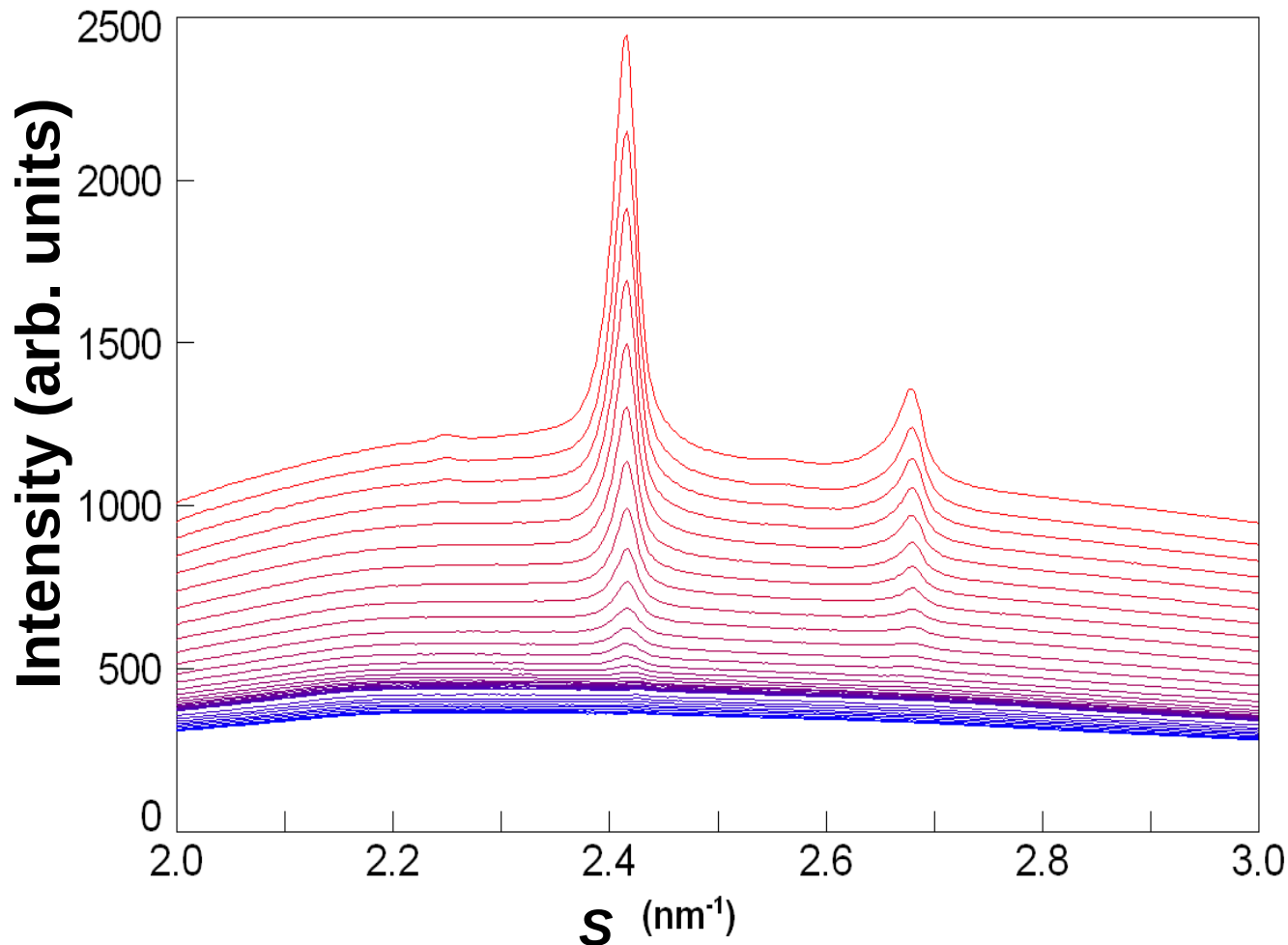
室温(低温)六方晶では透過性が高まるか？

低温六方晶と高温六方晶は異なる脂質成分で構成されている



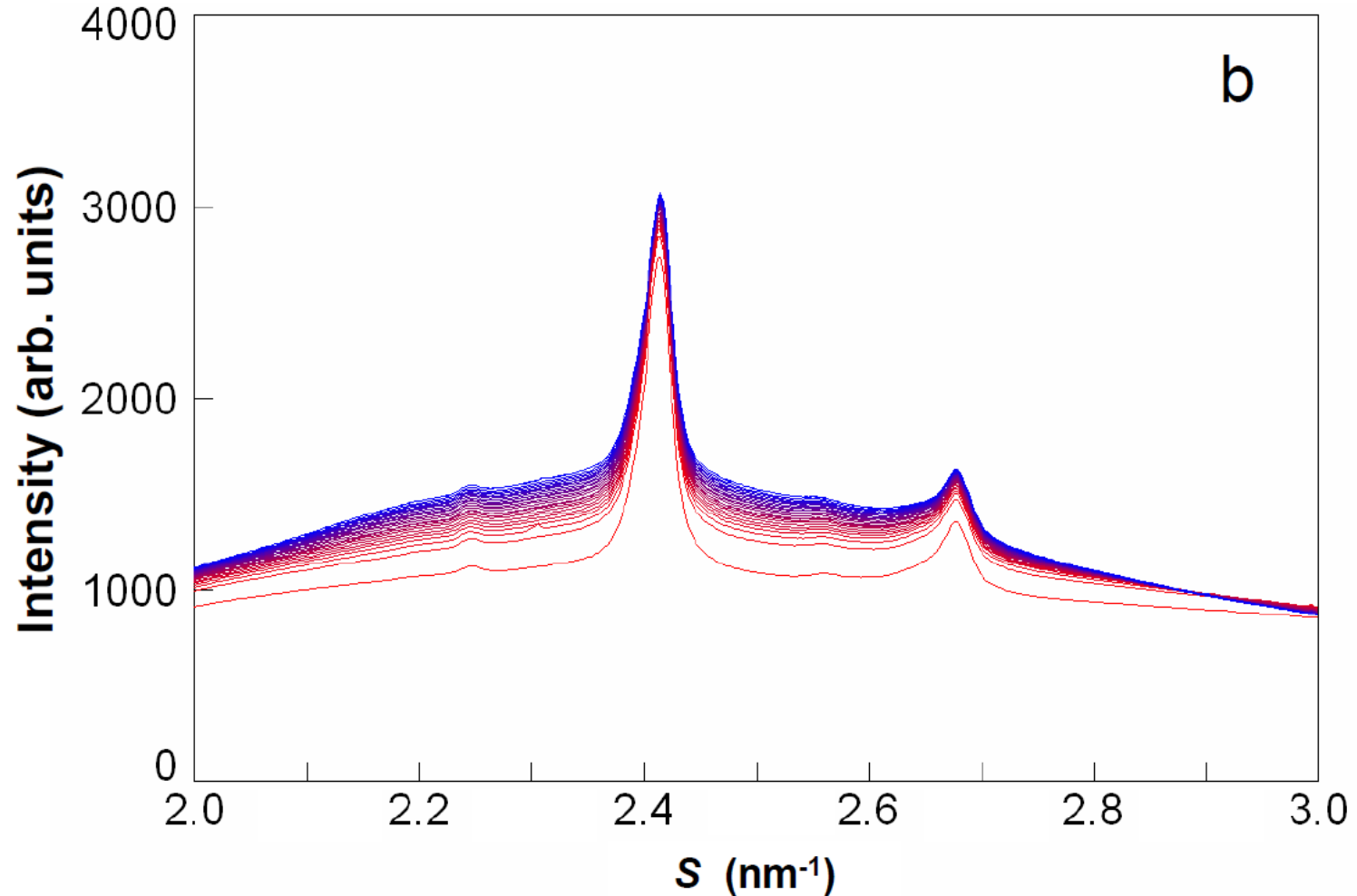
42°C前後で炭化水素鎖の充てん構造の‘六方晶’の格子定数は大⇒小へ変化. これは2つの六方晶は異なるドメインに属することを意味する.

広角X線回折実験 I (クロホルム・メタノール)



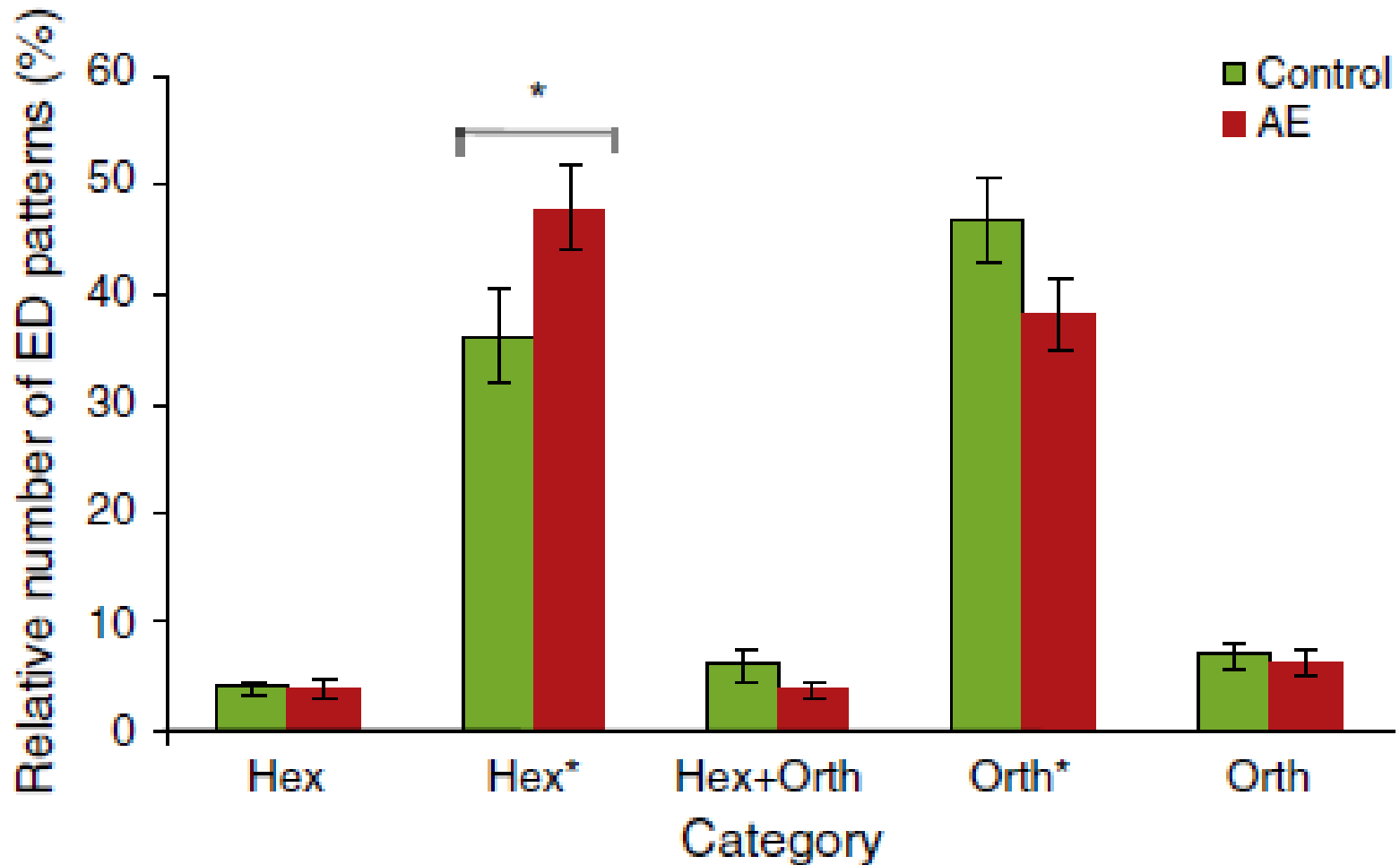
I. Hatta, H. Nakazawa, Y. Obata, N. Ohta, K. Inoue and N. Yagi, *Chem. Phys. Lipids* **163** (2010)381.

広角X線回折実験 II (エタノール)



I. Hatta, H. Nakazawa, Y. Obata, N. Ohta, K. Inoue and N. Yagi, *Chem. Phys. Lipids* **163** (2010)381.

(室温)六方晶と斜方晶 電子線回折



M. Janssens et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1828**(2013)1814.

液晶の存在

3番目のドメイン:

(1) 斜方晶, (2) 室温六方晶, (3) 液晶

炭化水素鎖の充填密度を考えると
最も乱れた構造を持つ液晶の存在を
考慮することが必要ではないか？

室温で液晶が存在する

エタノール, アセトンの作用前・後の炭化水素鎖の充てん構造の割合

Before treatment

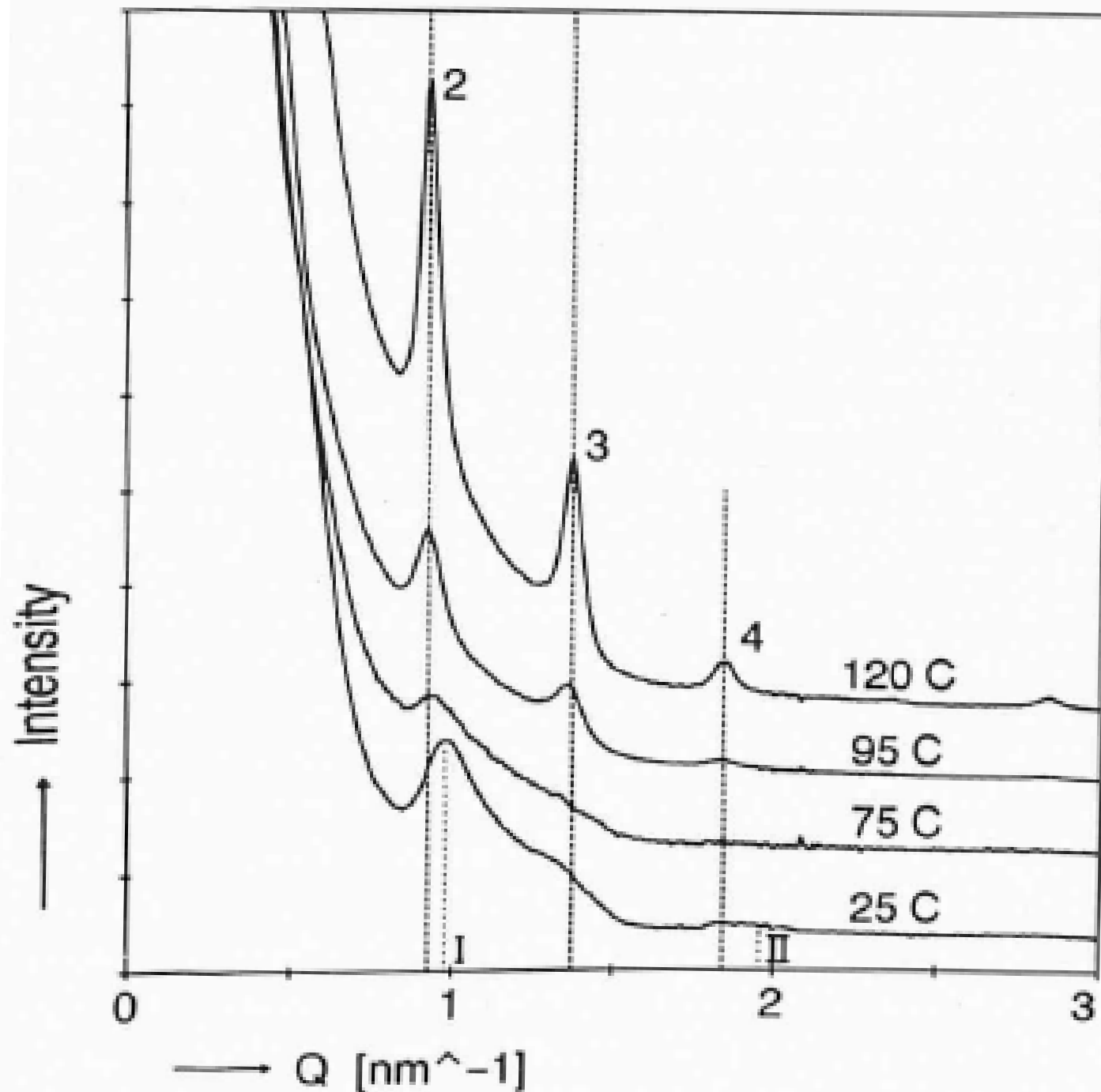
ORTHORHOMBIC	HEXAGONAL	LIQUID- CRYSTALLINE
--------------	-----------	------------------------

After treatment

ORTHORHOMBIC	HEXAGONAL	LIQUID -CRYSTALLINE
--------------	-----------	------------------------

熱処理 効果 I

(ヒト角層)



Bouwstra et al.,
J. Invest.
Dermatol. **97**
(1991) 1005.

熱処理効果Ⅱ

Before heat treatment

LONG LAMELLAR	SHORT LAMELLAR	LIQUID- CRYSTALLINE
------------------	-------------------	------------------------

After heat treatment

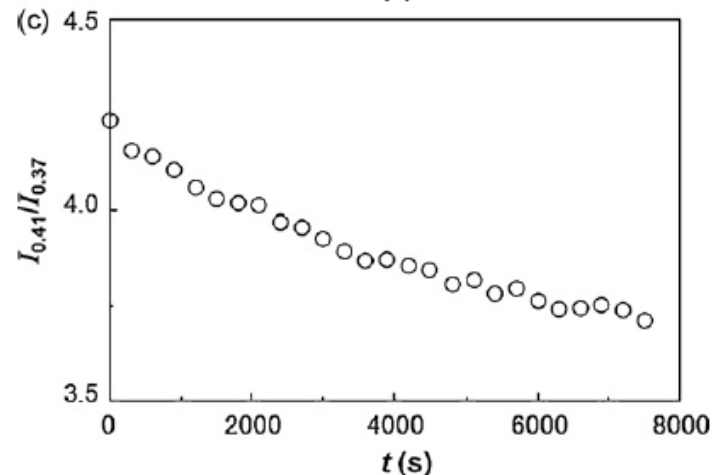
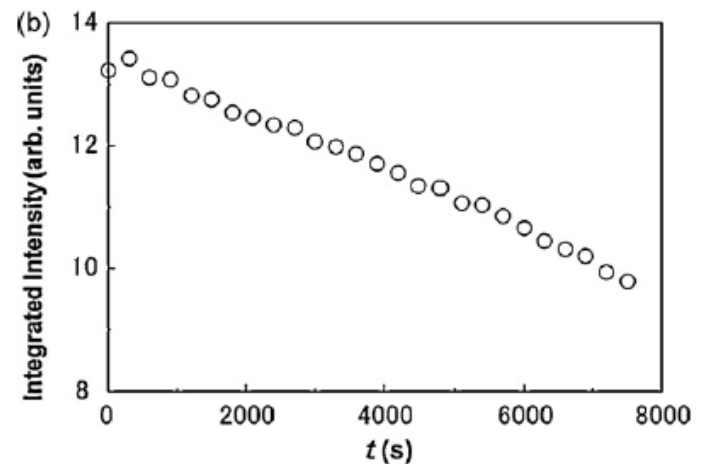
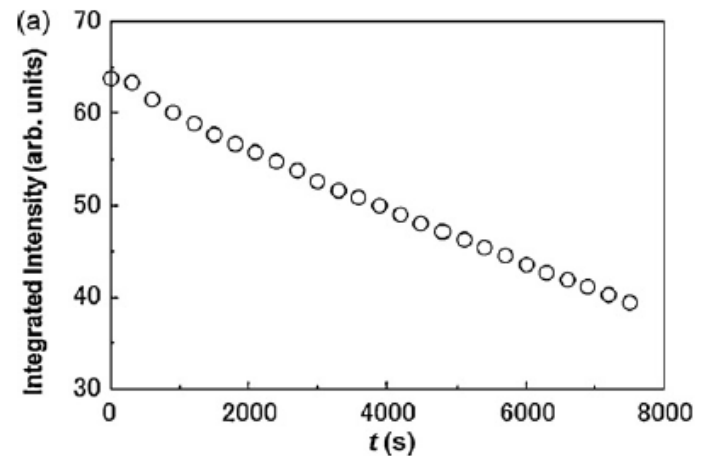
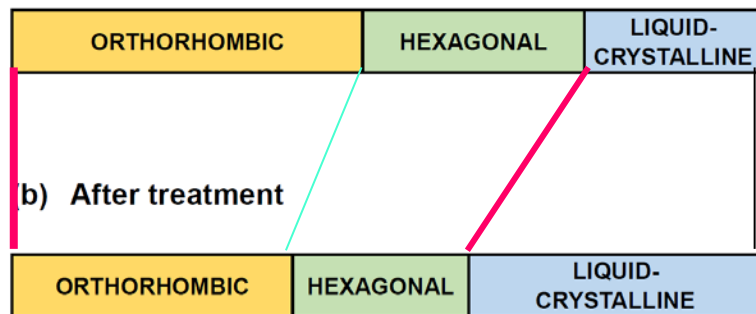
LONG LAMELLAR	SHORT LAMELLAR	LIQUID- CRYSTALLINE
------------------	-------------------	------------------------

ヘアレスマウス角層 にリモンンを作用した ときの広角領域の 振舞

$$R = \frac{I_{0.41}}{I_{0.37}} = \frac{I_{0.41}^O + I_{0.41}^H}{I_{0.37}^O} = \frac{I_{0.41}^O}{I_{0.37}^O} + \frac{I_{0.41}^H}{I_{0.37}^O}$$

六方晶の割合, R は何を意味するか？

(a) Before treatment



I. Hatta, H. Nakazawa, Y. Obata, N. Ohta, K. Inoue and N. Yagi, *Chem. Phys. Lipids* **163** (2010)381.

まとめ

角層中の機能性部位が化粧品の効果，経皮吸収等で重要な働きをする．官能基，乱れた構造（スフィンゴ基，不飽和炭化水素鎖部，コレステロール…）に着目した研究の必要性．

ソフトケラチン，短周期ラメラ構造の研究をさらに進めることにより，安全で効果の高い洗剤，保湿剤の開発へ！

炭化水素鎖の充てん構造と他の長周期ラメラ構造等との相関を調べることの重要性．