

界面活性剤処理によるヒト皮膚角層の構造変化の  
小角・広角 X 線散乱法を用いた解析(第 2 報)  
**Study on the Structural Change of Human Stratum Corneum  
Induced by the Treatment of Surfactant Solutions  
Using Small- and Wide-Angle X-ray Scattering, Part 2**

山田 真爾<sup>a</sup>, 久米 卓志<sup>a</sup>, 内藤 崇<sup>a</sup>, 筒井 智恵子<sup>a</sup>, 太田 昇<sup>b</sup>, 八田 一郎<sup>b</sup>  
Shinji Yamada<sup>a</sup>, Takuji Kume<sup>a</sup>, Takashi Naito<sup>a</sup>, Chieko Tsutsui<sup>a</sup>, Noboru Ohta<sup>b</sup>, Ichiro Hatta<sup>b</sup>

<sup>a</sup>花王株式会社, <sup>b</sup>(公財)高輝度光科学研究センター  
<sup>a</sup>Kao Corporation, <sup>b</sup>JASRI

水またはドデシル硫酸ナトリウム水溶液の処理によるヒト皮膚角層の構造変化を、小角・広角 X 線散乱法により解析した。角層のソフトケラチン構造に着目し、 $q \approx 6 \text{ nm}^{-1}$  近傍に見られるプロトフィブリル由来の散乱ピークについて、溶液処理に伴うピーク位置  $q$  とピーク面積の経時変化を調べた。その結果、溶液の浸透に伴う経時的なフィブリル構造の変化と角層の膨潤には、複数の段階(過程)が存在する可能性が示唆された。

キーワード： human stratum corneum, surfactant, X-ray scattering, soft keratin, fibril structure

#### 背景と研究目的：

日々の皮膚の洗浄は、皮膚表面を清潔に保つために重要なスキンケアである。しかし、洗浄剤に含まれる界面活性剤は皮膚角層中に浸透し(角層の膨潤)、角層構成成分(主としてソフトケラチン)の構造変化や保湿成分の溶出を生じ、結果として角層機能(水分保持能等)の低下を引き起こす場合がある。そのため、界面活性剤の角層への影響を解明することは重要な課題である。

我々は、界面活性剤の皮膚への浸透とそれに伴う角層の構造変化(膨潤)の解明を目指し、特にソフトケラチンに着目した検討を行っている。ソフトケラチンはフィブリル構造を有する高次構造体であるが、界面活性剤の浸透による角層膨潤にはフィブリル構造の変化が関わると仮説を立て、小角・広角 X 線散乱法による検証を試みた。

#### 実験：

1) 試料：健常成人の踵から採取した角層粉末を試料とした。処理溶液としては、水(pH7)およびドデシル硫酸ナトリウム(SDS)水溶液(濃度：0.03, 0.3, 3 wt%, 塩酸により pH7 に調整)を用いた。

2) 実験方法：相対湿度 35%のデシケータ内に 72 時間以上保存した角層粉末を溶液セル[1]に充填し、乾燥状態における X 線散乱測定を行った。その後、処理溶液(水または SDS 水溶液)をセル内に注入し、直後(5 s 後)から 60 分まで、時分割の小角・広角 X 線散乱測定を行った。

3) 測定条件：SPring-8 の BL40B2 を利用した。X 線の波長は 0.083 nm(15 keV)、カメラ長は 500 mm とし、検出器にはイメージングプレートを用いた。散乱像を取得後、円環平均を計算して一次元散乱プロファイルデータを得た。

#### 結果および考察：

我々は 2011B 期の実験において、角層構造の界面活性剤水溶液処理による経時変化を調べるための予備検討として、溶液処理 5 分後から 5 分毎の時分割 X 線散乱測定を行った[2]。その結果、X 線散乱プロファイルは溶液処理後 5 分以内に大きく変化することがわかり、より短時間領域での時分割測定が必要であることがわかった。そこで今回の実験では、①溶液セルにシリンジポンプを接続することで溶液処理を実験ハッチ内で無人で行うこと、②3 枚のイメージングプレートを連続して使用すること、の 2 点の工夫を行い、溶液注入 5 s 後から 1 分間隔での時分割測定を行うことができた。

得られた SDS 水溶液 (0.3 wt%) 処理角層における X 線散乱プロファイルの経時変化を図 1a に示す。界面活性剤処理前の乾燥状態のプロファイル (図中で Dry と表示) には、 $q = 1.2 \text{ nm}^{-1}$ 、 $6.4 \text{ nm}^{-1}$ 、 $14 \text{ nm}^{-1}$  付近にブロードなピークが観測された。これらのピークのうち、 $q = 6.4 \text{ nm}^{-1}$  のピークはケラチタンパク質のプロトフィブリル構造によるものと考えられている [1, 3]。また、 $q = 14 \text{ nm}^{-1}$  付近のピークは、ソフトケラチンの  $\alpha$ -helix 構造のピッチ (0.51 nm) に由来すると帰属されている [4]。一方、 $q = 1.2 \text{ nm}^{-1}$  のピークについてはこれまでに帰属の報告は無いが、我々はこれがケラチンのマイクロフィブリルに由来するものと推定した [2]。

SDS 水溶液で角層を処理すると、散乱プロファイルに変化が生じた。 $q = 20 \text{ nm}^{-1}$  近傍の散乱強度が経時的に増加したが、これは角層への水の浸透を示唆している [2]。一方、 $0.7 \text{ nm}^{-1} < q < 3 \text{ nm}^{-1}$  の領域で散乱強度が経時的に増加する傾向が見られた。ピークがブロードであり定量的な解釈は困難であるが、 $q = 1.2 \text{ nm}^{-1}$  のピークがよりブロード化しながら低  $q$  側にシフトし、また  $q = 1.8 \text{ nm}^{-1}$  近傍に新たなブロードなピークが出現しているように見える。別途 SDS 水溶液の散乱プロファイルを測定したところ、 $q = 1.8 \text{ nm}^{-1}$  近傍にブロードなピークを与えることがわかり、これは SDS ミセルに由来する可能性がある。 $q = 6.4 \text{ nm}^{-1}$  のケラチンのプロトフィブリル由来のピークは、ピーク位置が低  $q$  側にシフトしながら、そのピーク面積が減少することが確認された。

我々は、ソフトケラチン構造の界面活性剤処理による経時変化に着眼している。ケラチン構造を反映すると考えられる上述の  $q = 1.2 \text{ nm}^{-1}$ 、 $6.4 \text{ nm}^{-1}$ 、 $14 \text{ nm}^{-1}$  の 3 つのブロードなピークのうち、 $q = 1.2 \text{ nm}^{-1}$  近傍のピークは剤処理により非常にブロード化すること、 $14 \text{ nm}^{-1}$  近傍のピークは浸透する水のピークが重複すること、の理由により定量的な解析が難しい。一方、 $q = 6.4 \text{ nm}^{-1}$  近傍のプロトフィブリル由来のピークは、他のピークとの重なりが無く、その形状が対称形に近い。バックグラウンドを直線近似により除去し、ガウス関数を仮定すると良好なピークフィッティングを行うことができることがわかった (図 1b)。

プロトフィブリル由来のピークの位置  $q$  とピーク面積 (界面活性剤処理前のピーク面積で規格化) の溶液処理後の経時変化をピークフィッティングにより解析した結果を、SDS 水溶液 (0.3 wt%) および水処理の場合について図 2 示す。ピーク位置  $q$  (図 2a) は、溶液処理前には  $6.43 \sim 6.45 \text{ nm}^{-1}$  であったが、SDS 水溶液または水の処理によって経時的に低  $q$  側にシフトし、どちらの処理でも処理時間  $t = 200 \sim 300 \text{ s}$  後に約  $6.0 \text{ nm}^{-1}$  で一定になった。 $q$  の変化速度は水処理の場合の方がわずかに速い傾向が見られた。一方ピーク面積 (図 2b) について見ると、水については、処理 5 s 後以降急激に減少し、 $t \approx 100 \text{ s}$  以降でほぼ一定となった。このときのピーク面積は処理前のピーク面積の約半分であった。一方 SDS 処理においては、ピーク面積は処理後約 30 s 以降で急激に減少し、 $t \approx 150 \text{ s}$  でほぼ一定 (処理前の面積の約半分) となった後、 $t \approx 1000 \text{ s}$  以降で再び減少する挙動を示した。

これまでの検討から、 $q \approx 6 \text{ nm}^{-1}$  近傍のピークは、ソフトケラチンのプロトフィブリルを円柱形構造と捉え、その粒子散乱によるものと解釈することができる [2, 5]。その考えに基づくと、ピーク位置の低  $q$  側へのシフトは、界面活性剤処理によってプロトフィブリルの直径が約 1.5 nm から 1.7 nm に増加したことに対応すると解釈できる。 $q$  の処理前の値と処理後のシフト量が SDS 水溶液と水で同等であることから、このフィブリル径の増加は水分子の作用 (水和) に関連したものと推定される。

一方、図 2b に示したピーク面積は、フィブリル構造の量、構造規則性、さらにはフィブリル構造と周囲の構造の電子密度のコントラスト等に依存し、これらは溶液の浸透によって変化すると考えられる。これらの因子の中で我々は、今回の結果においてはフィブリル構造の量がピーク面

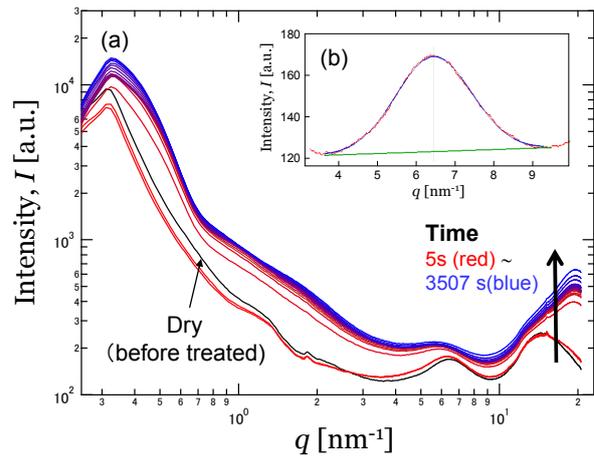


図 1. SDS 水溶液 (0.3 wt%, pH7) 処理による角層の X 線散乱プロファイルの経時変化。  
a) 小角~広角散乱プロファイル。  
b)  $q \approx 6 \text{ nm}^{-1}$  のピークのガウス関数によるフィッティング。

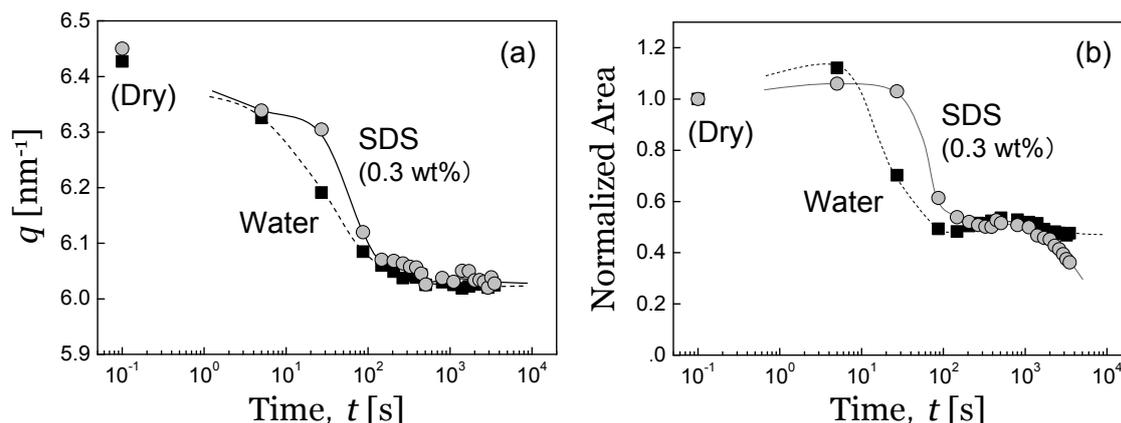


図2. 水および SDS 水溶液 (0.3 wt%) 処理によるプロトフィブリル構造由来のピークの (a) ピーク位置  $q$  および (b) ピーク面積 (Dry の値で規格化) の時間変化. (処理前の乾燥状態における値を便宜上  $t = 10^{-1}$  s の位置に示す.)

積に最も大きく影響していると考えている. SDS 水溶液または水の処理により角層は膨潤する. 今回の X 線散乱実験では, 角層試料は溶液セル内のろ紙に穴を開けてそこに充填されているが, 溶液の浸透に伴い角層はろ紙の穴を押し広げて膨潤すると考えられる. 角層が膨潤するとケラチン線維の体積密度が減少するため, X 線照射領域内に存在するケラチン線維の数が減ることになり, それが散乱強度に反映されたと考えられる. 別の実験で, SDS 水溶液で処理した 1 個の角層細胞体積の経時変化を共焦点レーザー顕微鏡により調べたところ, 角層体積は処理後数分以内に初期体積の約 2 倍に膨潤した後一定値を取り, 約 1000 s 後に再び増加する傾向を示した (図 3). 角層体積が約 2 倍で一定となる時間領域で X 線散乱のピーク面積は初期値の約半分になっており, 両者は定量的に対応している. また, その後に再び角層体積の増加が生じる時間 (約 1000 s) は, ピーク面積が再び減少を始める時間にはほぼ一致した. 水処理系についても, 共焦点レーザー顕微鏡で得られた角層細胞体積の時間依存性は, 散乱ピーク面積の経時変化と良好な対応を示した. 以上のことから, 図 2b に示したピーク面積の変化は, 主として角層粉末の体積増加 (膨潤) を反映していると考えられ, 水では経時的に一段階, SDS (0.3 wt%) では二段階の膨潤を示すことがわかった.

図 4 に, プロトフィブリル由来のピークの SDS 水溶液処理による  $q$  (図 4a) とピーク面積 (図 4b) の経時変化の SDS 濃度依存性を示す. SDS 水溶液処理前には  $q$  は  $6.43 \sim 6.49 \text{ nm}^{-1}$  の範囲にあり, 0.03, 0.3 wt% の水溶液処理によって, 約 200 s 以内に  $6.01 \sim 6.02 \text{ nm}^{-1}$  にシフトし, その後一定となった. 3 wt% 水溶液の処理では約 30 s 後に  $q = 5.96 \text{ nm}^{-1}$  にシフトした. 処理時間がそれより長くなると今後の課題で述べるように, それ以降の  $q$  の変化は現時点では解析できないが, 先に述べたようにこの変化は水分子の作用によると考えられることから, SDS 濃度は主として変化速度に影響し, 低  $q$  側へのシフトは  $q \approx 6.0 \text{ nm}^{-1}$  で収束すると推定している. すなわち, SDS の処理によってプロトフィブリル直径は約 1.5 nm から 1.7 nm に増加し, その変化速度は濃度 3 wt% で最も速いことがわかった.

一方ピーク面積については, SDS 濃度に依存して異なる変化の傾向を示した. 0.03 wt% では,  $t \approx 100$  s までにピーク面積が未処理の約半分に減少した後, ほぼ一定となった (水処理と同等の変化). 0.3 wt% は先に述べたよ

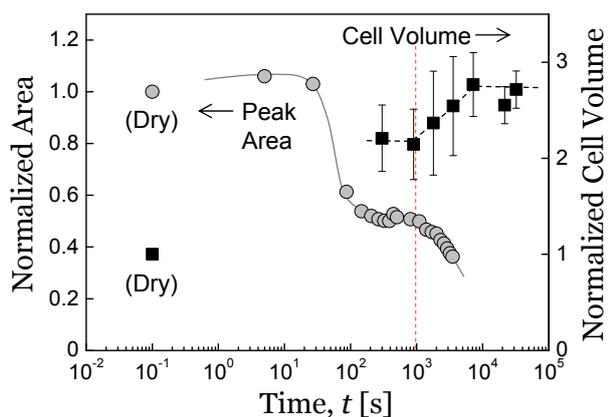


図3. プロトフィブリル構造由来のピークの面積の SDS 水溶液処理後の時間変化 (データは図 2b に対応) と, 共焦点レーザー顕微鏡法により評価した角層体積の SDS 処理後の時間変化 (処理前の体積で規格化) の比較.

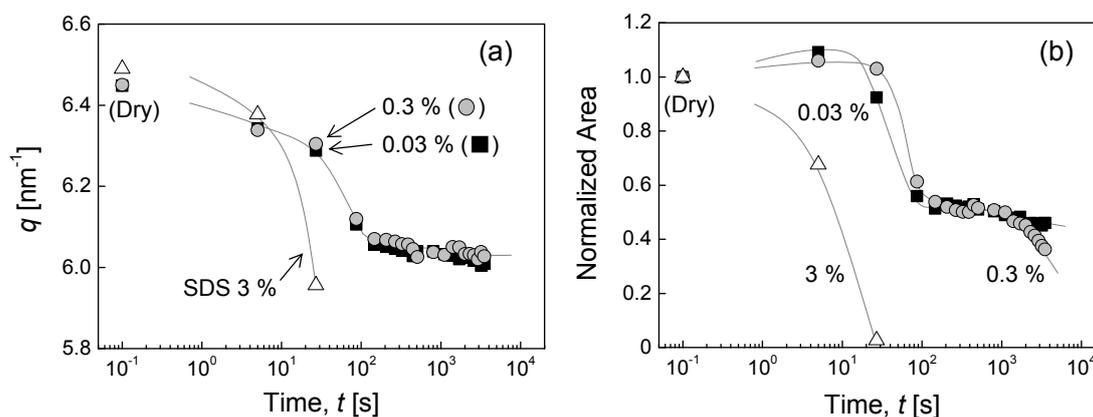


図4. 濃度の異なる SDS 水溶液(0.03, 0.3, 3%)の処理による角層プロトフィブリル構造由来のピークの a)位置  $q$  と b)ピーク面積の経時変化. 処理前の値を便宜上,  $t = 10^{-1}$  s の位置に示す(Dry と表示).

うに, 二段階の面積変化を示した. 3 wt%では,  $t \approx 30$  s までにピークはほぼ消失した. 3 wt%の処理では角層は 0.3 wt%よりもさらに大きく膨潤するが, X 線照射領域からほとんどのケラチン線維が無くなったとは考えにくい. SDS はタンパク変性能が高いことから, ケラチン線維の構造が大きく乱れた可能性がある. また, 大量の SDS 分子が角層内に浸透したことによって, ケラチン線維とその間隙の構造の間で電子密度のコントラストが小さくなったことも考えられる. このような因子がピーク面積の減少に関与していると推定している.

今回の実験から, SDS 水溶液または水処理によるケラチンのプロトフィブリル径の変化と, 溶液の浸透による角層の膨潤過程に関する知見が得られた. 後者は主としてフィブリル構造間隙への溶液の浸透を示すものと考えられるが, それは  $q \approx 1 \sim 2$  nm<sup>-1</sup> 近傍のブロードなピークの溶液処理による変化と対応する可能性があるかと推定している. 今後, この領域のピークの解釈について検討を進めたいと考えている.

#### 今後の課題:

- 1) 本報告では,  $q \approx 6$  nm<sup>-1</sup> 近傍のプロトフィブリル由来のピークのフィッティングにおいて, 直線近似によるバックグラウンド処理を行った. この方法は今回解析したほとんどの散乱プロファイルについて良好に適用できるが, 高濃度(3 wt%)の SDS 処理系では, ピークが経時的に消失した後,  $q \approx 6$  nm<sup>-1</sup> 近傍領域のベースラインはごくわずかに下に凸の形状を示した. つまり, 厳密には直線近似によるバックグラウンド処理には問題があり, 解析法の更なる検討が必要である.
- 2) 種々の界面活性剤についてプロトフィブリルの構造変化, 膨潤挙動の解析を進め, 分子構造と角層構造変化の関係を検討する.
- 3) ケラチンタンパク質の等電点は約 4.5 ~ 5.5 と言われている. 皮膚洗浄に用いられる界面活性剤の多くはアニオン性であり, ケラチンとの静電的相互作用が重要な役割を果たすと考えられる. そこで, 溶液の pH と構造変化の関係を検証する.
- 4) 今回の実験では踵から採取した粉末状の角層試料を使用した. 界面活性剤の浸透と角層膨潤の速度には試料の性状が大きく影響する. 角層細胞が細胞間脂質のラメラ構造を介して層状に堆積した「ブロック-モルタル構造」では, 界面活性剤水溶液の浸透速度が遅いと予想される. そこで, シート状の角層試料についても同様の検討を行う予定である.

#### 参考文献:

- [1] I. Hatta, et al., *Chem. Phys. Lipids* **163**, 381 (2010).
- [2] 山田 真爾, 他, SPring-8 利用研究成果集, 掲載予定.
- [3] M. J. Hey, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **540**, 518 (1978).
- [4] J. -C. Garson, et al., *J. Invert. Dermatol.* **96**, 43 (1991).
- [5] 高分子学会編「新高分子実験学 6 高分子の構造(2) 散乱実験と形態観察」共立出版 1997, p233.