

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3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 3**

山田 真爾^a, 久米 卓志^a, 内藤 崇^a, 筒井 智恵子^a, 小野尾 信^a, 太田 昇^b, 八田 一郎^b
Shinji Yamada^a, Takuji Kume^a, Takashi Naito^a, Chieko Tsutsui^a, Makoto, Onoo^a, Noboru Ohta^b,
Ichiro Hatta^b

^a花王株式会社, ^b(公財)高輝度光科学研究センター
^aKao Corporation, ^bJASRI

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。界面活性剤溶液の浸透と角層膨潤の速度には試料の形態が大きく影響すると思われる。そこで、前回(課題番号 2012A1253)は踵から採取した粉末状の角層試料を使用した。今回はシート状の角層試料を用いた検討を実施した。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、溶液処理に伴うフィブリル構造の変化を反映しているピーク位置とピーク面積の経時変化を調べた。その結果、前回の踵角層粉末試料の場合と同様に、界面活性剤が高濃度(3 wt%)の場合にとくに変化が早い傾向があった。一方で、踵角層粉末と角層シートについて変化の時間依存性を比較してみると、今回の角層シートでの処理のほうが全体的に変化は遅かった。これは、個々の角層細胞のほぼ周囲全体から溶液が浸透可能な踵角層粉末とは異なり、実際の皮膚中の角層構造、すなわち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」を保持している角層シートでは、溶液が浸透しにくいためと考えられた。

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

背景と研究目的：

化粧品・香粧品には、目的に応じて種々の界面活性剤が配合されている。界面活性剤はその種類や処理条件によっては、角層の様々な組織・スケールでの構造変化や成分溶出等を引き起こし、結果として角層機能(保湿やバリア機能)の低下を招く恐れがある。本研究では、界面活性剤水溶液の処理に伴うヒト皮膚角層の経時的な構造変化について、特に角層細胞を構成するケラチンタンパク質に注目し、小角・広角 X 線散乱法による解析を行った。

実験：

- 1) 角層と処理溶液：ヒト腹部由来の角層シート(Biopredic 社より購入)を試料とした。処理溶液としては、水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%)を用いた。溶液は全て、水酸化ナトリウムを用いて pH7 に調整した。
- 2) 実験方法：相対湿度 30%のデシケータ内に 72 時間以上保存した角層シートを溶液セル[1]にランダムに充填し、乾燥状態における小角・広角 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、注入直後(5 秒後)から 90 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)、カメラ長は約 500 mm(正確にはベヘン酸銀により校正した値を使用)とした。検出器にイメージングプレートを用いて散乱像を取得し、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：

角層シートの X 線散乱プロファイルの測定結果の例を図 1a)に示す。溶液処理前の乾燥状態における散乱プロファイル(図中で Dry と表示)には、 $q \approx 1.1 \text{ nm}^{-1}$, 6.5 nm^{-1} , 14.1 nm^{-1} 付近に3つのブロードなピークが、また $q \approx 15.1, 16.8 \text{ nm}^{-1}$ に2つのシャープなピークが観測された。(乾燥状態におけるプロファイルにおいて、 $q \approx 19.3 \text{ nm}^{-1}$ に見られたシャープなピークは、そのピーク位置から NaCl と同定された。この由来は明らかではないが、角層試料調製時のコンタミネーション、あるいは元々角層中に存在する NaCl が析出した等の可能性が考えられる。)我々はこれまでに、踵から採取した角層試料(粉末形態)に対して X 線散乱実験を行っているが(課題番号 2012A1253)、上述の3つのブロードなピークは踵角層においても同様に観測されている。このうち $q \approx 14.1 \text{ nm}^{-1}$ のブロードなピークは、ソフトケラチンの α -helix 構造のピッチ(0.51 nm)に由来するとの報告があるが[2]、本実験では溶液セルの窓材として用いた非晶性ポリエーテルエーテルケトン(PEEK)フィルム由来のピークもこの付近に現れるため[3]、このブロードなピークの評価は困難であると考えられた。また、このブロードなピークに重なる位置にある2つのシャープなピーク($q \approx 15.1, 16.8 \text{ nm}^{-1}$)は、細胞間脂質ラメラ層のアルキル鎖充填構造に由来することがわかっている[1]。一方、 $q \approx 1.1 \text{ nm}^{-1}$, 6.5 nm^{-1} の2つのピークについては帰属の報告が無いが、我々は、それぞれがソフトケラチン線維のマイクロフィブリル、プロトフィブリルの孤立(粒子)散乱によるものと推定していた[4,5]。

図 1a)には、角層シートを SDS 水溶液(0.3 wt%)で処理したときの X 線散乱プロファイルの経時変化を、処理直後(5 秒後)から 90 分までの範囲で示してある。 $q \approx 20 \text{ nm}^{-1}$ 近傍の散乱強度が増加していることが、角層試料への水の浸入を示唆している(水の散乱プロファイルは $q \approx 20 \text{ nm}^{-1}$ 近傍にブロードなピークを与える)。ソフトケラチン線維の構造に注目すると、マイクロフィブリル、プロトフィブリル由来のピークと推定している $q \approx 1.1 \text{ nm}^{-1}$, 6.5 nm^{-1} のピークが小角側にシフトしていることが確認された。 $q \approx 6.5 \text{ nm}^{-1}$ のピークについては、ピーク強度(面積)の明らかな減少も観測された。今回は $q \approx 6.5 \text{ nm}^{-1}$ のピークの経時変化を定量的に調べるため、バックグラウンドを直線近似によって処理後にガウス型関数によるフィッティングを行い、ピーク位置 q およびピーク面積を算出した(図 1b)。

図 2 に、 $q \approx 6.5 \text{ nm}^{-1}$ のプロトフィブリル構造由来のピークの位置 q (図 2a)および面積(図 2b；未処理におけるピーク面積で規格化したもの)の溶液処理時間依存性を示す。水および SDS 水溶液(3 種類の濃度条件)に対する解析結果となっている。溶液処理前には $q \approx 6.5 \text{ nm}^{-1}$ であり、これはフィブリルを円柱形と仮定したとき、その直径が約 1.53 nmであることを示している。溶液処理を行うと、処理後の時間経過と共にピーク位置は低 q 側にシフトした。水および低濃度の SDS 水溶液(0.03, 0.3 wt%)の処理では、 q の時間変化プロファイルはほぼ重なった。処理直後から約 200 秒後までは急激に減少し、その後は変化が緩やかになり、約 6.1 nm^{-1} (直径 1.64 nm に対応)で一定となった。SDS 濃度が 3 wt% の場合には、 q の変化速度は一桁程度速かった。

図 2b)には、ピーク面積の時間変化を示す。ピーク面積は溶液処理時間と共に減少した。面積減少速度は水処理の場合に最も遅く、SDS 水溶液においては、SDS 濃度の増加と共に面積減少速度は速くなった。SDS 濃度が 3 wt% の条件では、処理後約 200 秒後にはピークがほぼ消失した。ピーク面積の減少曲線は、水処理においては $t \approx 800 \text{ s}$ 、SDS 濃度 0.03 および 0.3 wt% では $t \approx 500 \text{ s}$ において屈曲しているように見える。この時間は図 2a)において q がほぼ一定値に達する時間と対応していた。

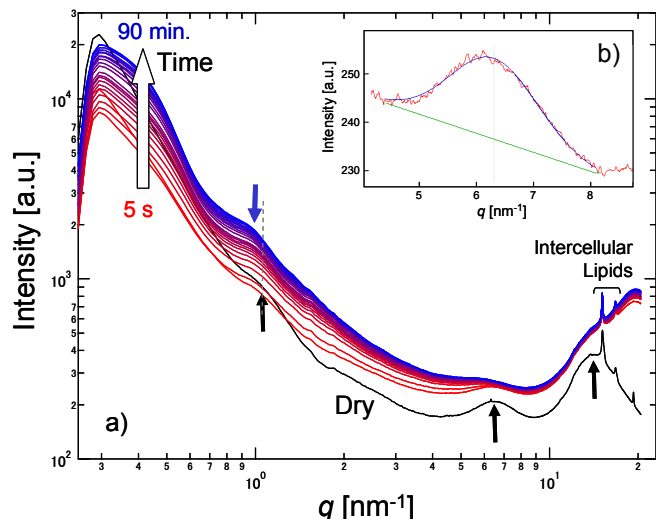


図 1. SDS 水溶液(0.3 wt%, pH7)処理による角層シートの X 線散乱プロファイルの経時変化。
a) 小角~広角散乱プロファイル
b) $q \approx 6 \text{ nm}^{-1}$ のピークのガウス関数によるフィッティング

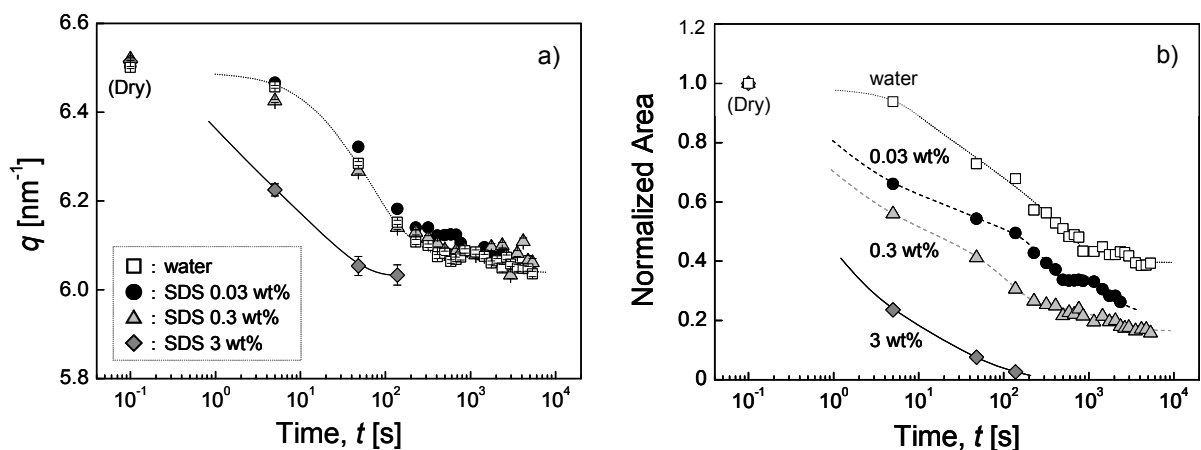


図2. 水および SDS 水溶液(0.03, 0.3, 3 wt%) 処理によるソフトケラチンのプロトフィブリル構造由来のピークの(a)ピーク位置 q および(b)ピーク面積(Dry の値で規格化)の時間変化。(処理前の乾燥状態における値を便宜上 $t = 10^{-1}$ s の位置に示す。)

また、これらの変化を前回(課題番号 2012A1253)の踵角層粉末を試料とした場合の結果と比較してみると、水および低濃度の SDS 水溶液処理に比べてとくに高濃度の SDS 3 wt% の場合に変化が早いという傾向は同様であった。

一方で、踵角層粉末と角層シートで変化の時間依存性を比較してみると、今回の角層シートでの処理のほうが全体的に遅い変化であった。例えば、SDS 濃度が 3 wt% の場合には、踵角層粉末では 30 秒程度までにピークが消失したのに対し、角層シートでは上述のとおり 200 秒程度でピークが消失していた。さらに、水および低濃度 SDS 水溶液の場合には、踵角層粉末ではピークの位置 q およびピーク面積の変化は共に 100 秒程度で一定もしくは緩やかな変化となっていたのに対し、今回の角層シートでは上述のとおりピークの位置 q は約 200 秒後で変化が緩やかになり、ピーク面積の変化は $t \approx 500 \sim 800$ s で屈曲し変化が緩やかになっているようであった。

これらの変化の違いは、試料の形態の差に起因するものであると考えている。すなわち、踵角層粉末では処理溶液が個々の角層細胞のほぼ周囲全体から浸透可能であるのに対し、角層シートでは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」を形成しておりシートの上方向から徐々に浸透していくために、角層シートでは変化が遅かったものと思われる。

小角領域の $q \approx 1.1 \text{ nm}^{-1}$ のピークについては、ピークフィッティングを用いた詳細な解析は難しい。また、SDS 濃度が 3 wt% の場合、SDS ミセル由来の大きなピークが重なるため、さらに解析は困難になる。しかし、図 1a) のプロファイルから、未処理から SDS 水溶液(0.3 wt%) の 90 分間の処理によってピークの位置は小角側にシフトしている様子は明らかである。目視によりピーク位置を求めると、未処理では $q \approx 1.1 \text{ nm}^{-1}$ 、90 分後には $q \approx 0.98 \text{ nm}^{-1}$ であり、これはマイクロフィブリル構造が膨潤していることを示唆する。マイクロフィブリルはプロトフィブリルが 10 本程度集合した高次のケラチン線維構造であるが、その構造スケールが溶液処理後に増加した今回の結果は妥当と考えられる。

さらに、我々は現在この $q \approx 1 \text{ nm}^{-1}$ 付近の小角領域の解析のため、中性子散乱を用いた検討を始めている。重水素化溶液を用いるコントラストマッチング法により、高濃度の SDS 水溶液中でのミセル由来の散乱ピークによる妨害をキャンセルできる可能性が見出された(J-PARC 課題番号 2012B0154)。これまでの SPring-8 での検討の報告(課題番号 2011B1754, 2012A1253)では上述の $q \approx 1.1 \text{ nm}^{-1}$ 付近のピークはソフトケラチン線維のマイクロフィブリルの直径由来と想定していた。しかし、中性子散乱での検討からはこの $q \approx 1.1 \text{ nm}^{-1}$ 付近のピークはマイクロフィブリル間の周期(間隔)に起因する干渉性散乱のピークである可能性を示唆する結果が得られている。また、水処理よりも SDS 水溶液処理のほうが角層中のマイクロフィブリルの周期が増大している(より膨潤している)ことを示唆する結果も得られている。

今後の課題：

- 1) 種々の界面活性剤についてケラチン線維構造の経時変化挙動の解析を進め、分子構造と角層構造変化の関係を検討する。
- 2) ケラチンタンパク質の等電点は約 4.5 ～ 5.5 と言われており、一方で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る。従って、ケラチン線維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ので、洗浄剤溶液の pH がケラチン線維構造の変化に及ぼす影響を検討する。
- 3) ソフトケラチン線維のミクロフィブリル構造の情報が得られると考えられる $q \approx 1 \text{nm}^{-1}$ 付近の小角領域について、X 線散乱法 (SPring-8) と中性子散乱法 (J-PARC) による相補的な解析を用いて詳細を検討する。

参考文献：

- [1] I. Hatta, et al., *Chem. Phys. Lipids* **163**, 381 (2010).
- [2] J. -C. Garson, et al., *J. Invert. Dermatol.* **96**, 43 (1991).
- [3] 太田昇, 八木直人, SPring-8 年報 2010 年度, p89 (2011).
- [4] 山田真爾, 他, SPring-8 利用研究成果集, **1** (1), B-1, 2011B1754 (2012)
- [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, p233 (1997).