

九州シンクロトロン光研究センター 県有ビームライン利用報告書

課題番号：2204026R

BL番号：BL11

(様式第5号)

実使用に則して洗浄剤を適用したヒト角層構造の評価
Evaluation of the stratum corneum structure treated by cleansing agent in
accordance with actual usage condition.

徳留嘉寛¹⁾、横田麻美²⁾、愛原咲季²⁾

Yoshihiro Tokudome, Mami Yokota, Saki Aihara

¹⁾ 佐賀大学リージョナル・イノベーションセンター、²⁾ ファンケル研究所

¹⁾Regional Innovation Center, Saga University,

²⁾Research Institute, FANCL Corporation

- ※1 先端創生利用（長期タイプ）課題は、実施課題名の末尾に期を表す（Ⅰ）、（Ⅱ）、（Ⅲ）を追記してください。
- ※2 利用情報の公開が必要な課題は、本利用報告書とは別に利用年度終了後2年以内に研究成果公開（論文（査読付）の発表又は研究センターの研究成果公報で公表）が必要です（トライアル利用を除く）。
- ※3 実験に参加された機関を全てご記載ください。
- ※4 共著者には実験参加者をご記載ください（各実験参加機関より1人以上）。

1. 概要（注：結論を含めて下さい）

本課題では、前回のトライアル測定で課題の検証とともに、複数のバリア破壊モデルの角層細胞間脂質への影響を明らかにすることを目的とした。その結果、コントロールサンプルの角層細胞間脂質に固有のピークは検出できたが、バリア破壊モデルのサンプルのピークは適切に検出することができなかった。今後、検出感度を向上させる必要がある。

(English)

This study aimed to validate the previous problem and evaluate the stratum corneum (SC) structure treated with stressors which would induce barrier disruption of SC. We were able to detect the peak contributed to SC structure in the control sample. In contrast, we were not able to detect it in the barrier disrupted model. In the future, it is necessary to improve the detection sensitivity.

2. 背景と目的

皮膚は、外界と体内を隔てる境界に位置し、刺激や微生物の感染、体内の水分蒸散の防止等、生体のバリアとして重要な臓器である。皮膚バリア機能を支配するのは最外面の角層であり、レンガのように積層した角質細胞がモルタル様の角層細胞間脂質に埋まった構造体である。角層細胞間脂質は角層に触れるスキンケア製剤によっても変化する。例えば、皮膚表面の汚れや皮脂、メイクを落とす目的で日常的に使用されている洗浄剤は、皮膚に触れる時間は短いものの、界面活性剤や油剤が比較的多く含まれる製剤であり、同時に皮膚表面に摩擦や温度の負荷が与えられる。この特徴から、我々は日常的な刺激である洗浄剤の実使用による皮膚への影響に着目した。

2021年12月に実施したトライアル測定では(課題 No.2109104T, 2109105F)、貴センターのBL11でこれまで実績のない角層の長周期ラメラ構造、短周期ラメラ構造、炭化水素鎖のパッキング構造(直方晶、六方晶)、ケラチンフィラメントの構造などを解析することができるのか検討した。カメラ長、照射時間などの条件を最適化した結果、角層細胞間脂質に特徴的なラメラ構造、充填構造に帰属されるピークが検出され、BL11で角層構造解析ができることが示唆された。さらに、摘出皮膚に対しア

セトン・メタノールで脱脂処理を行ったときに、角層細胞間脂質のラメラ構造が変化する傾向が認められた。また、洗浄剤による角層細胞間脂質への影響について予備的な検討を行った結果、ピークがシフトする傾向が認められた。

一方、トライアル測定では、広角測定のキャピラリのみバックグラウンドが高く、差のスペクトルが部分的に負の値を示す現象が認められた。この課題を解決するためには、さらなる条件検討の必要性があると考えられた。

以上の背景より、①広角測定のバックグラウンドの検討をするとともに、②トライアル測定の成果を基に、複数バリア破壊モデルを比較しながら、より日常的な刺激である洗浄剤の実使用による皮膚への影響とそのメカニズムを検証することを目的とした。

3. 実験内容（試料、実験方法、解析方法の説明）

試料

ヒト全層皮膚は倫理的配慮のもと、Genoskin社およびBiopredic社より購入した。それぞれ添付の培地を用い、37°C、5% CO₂、95%RHあるいは60%RH条件下で培養した。角層細胞間脂質に特徴的なピークが検出可能か確認する目的で、コントロールサンプルを設定した。コントロールサンプルの作製には、Genoskin社の皮膚を用いた。24時間馴化培養後、角層側より水、もしくはアセトン：メタノール（1/1, v/v）をスワブ法で20分間処理し、5日後に回収した。複数のバリア破壊サンプルの作製には、Biopredic社の皮膚を用いた。24時間馴化培養後、1日目、2日目、3日目に、1日2回皮膚表面を洗浄・水洗し、4日目に回収した。Dispase I 処理により表皮をシート状に単離後、Trypsin処理により細胞を除き、角層シートを作成した。得られたシートを乾燥させた後、室温95%RH下で1週間以上インキュベートした。角層を直径2 mmのリンデマンガラスキャピラリに封入し、九州シンクロトロン光研究センターのBL11にて測定した。

実験方法

ベヘン酸銀の粉末試料を用いてキャリブレーションを行い、カメラ角度、カメラ距離、ビームセンターを算出した。小角側はカメラ長1000 mmにて露光時間360秒、広角側はカメラ長200 mmにて露光時間180秒で測定した。

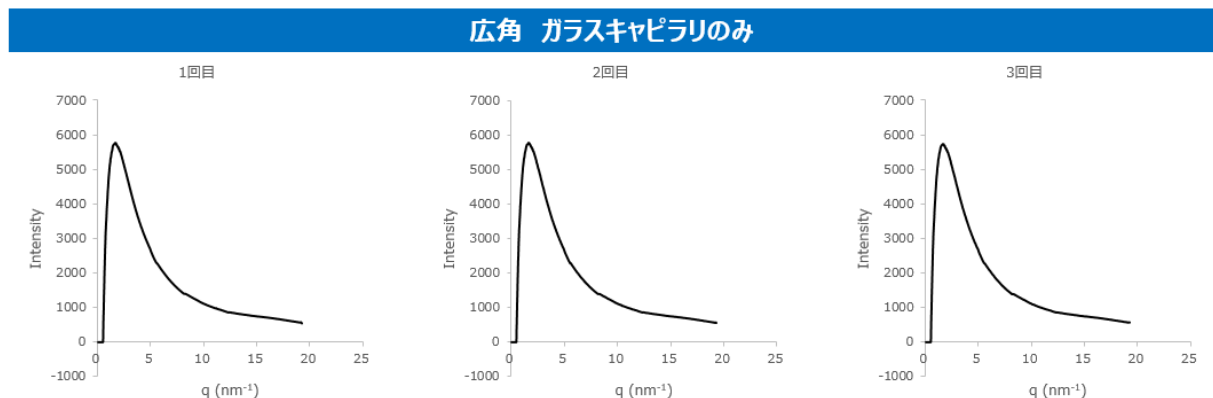
解析方法

得られた二次元散乱像をFit 2d（ESRF提供）で一次元化後、サンプルの値より空のキャピラリの値を差し引き、入射X線強度で補正したものをExcel 2013（Microsoft）でグラフ化した。

4. 実験結果と考察

①広角側のガラスキャピラリのみバックグラウンドのピークの検出

サンプルを含まないガラスキャピラリを3回連続で測定した。結果、いずれも $q=1.8$ 付近にピークが認められた。3回の測定間でばらつきはなかった。トライアル測定の際のピークと比較して、その形状に違いは認められなかった（図 1）。以上のことから、前回の測定でバックグラウンドが高く補正值が負の値となった原因は、特定のガラスキャピラリのスペクトルによるものや測定条件によるものではないと考えられた。



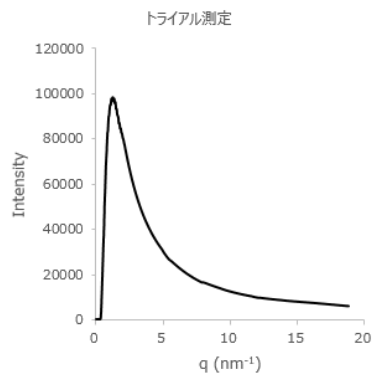


図1 広角側のガラスキャピラリのみバックグラウンドのピークの検出

②角層細胞間脂質に特徴的な規則構造に帰属されるピークの検出

95%RH、60%RH 条件下、コントロールの水処理、角層細胞間脂質脱脂作用のあるアセトン・メタノール処理の4群で比較を行った。いずれのサンプルにおいても、角層細胞間脂質に固有のピーク ($q=1$ 付近：短周期ラメラ構造の一次反射と長周期ラメラ構造の二次反射の重畳、 $q=1.4$ 付近：長周期ラメラ構造の三次反射、 $q=17$ 付近：0.37 nm の充填構造、 $q=15$ 付近：0.42 nm の充填構造) が検出された。アセトン・メタノール処理を行ったサンプルにおいては、長周期ラメラの一次反射に帰属される $q=0.5$ 付近のピークが消失する傾向が認められた (黒矢印) が、広角側のピークに顕著な変化は認められなかった (図 2)。予想に違わず、乾燥条件下、脱脂したサンプルにおいて長周期ラメラ構造が消失していたことから、本測定条件にて角層細胞間脂質構造の変化を評価可能であると判断した。

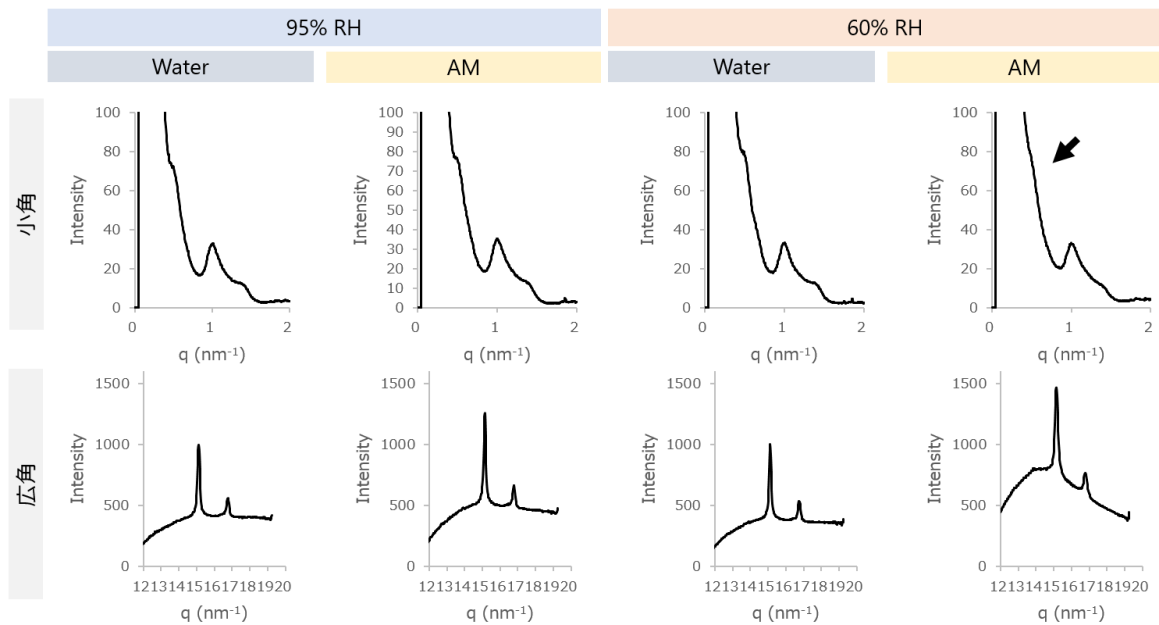


図2 コントロールサンプルにおける角層細胞間脂質に固有のピークの検出

③複数のバリア破壊モデルの比較のためのサンプルの検証

複数のバリア破壊モデルを比較するために、無処理群のピークを確認した。60%RH の無処理群サンプルにおいては緩やかに角層細胞間脂質に固有のピーク ($q=1$ 付近：短周期ラメラ構造の一次反射と長周期ラメラ構造の二次反射の重畳、 $q=1.4$ 付近：長周期ラメラ構造の三次反射) が検出されたが、95%RH の無処理群サンプルではほとんど検出されなかった。今回の測定全体のコントロールサンプル (同一サンプルを連続して3回測定) と比較すると、バリア破壊モデルの無処理群はピークが明瞭ではなかった (図 3)。なお、処理群のサンプルのデータは取得したが、解析に値する精度で測定できていないことがわかったため、データは未掲載とした。また、トライアル測定の際に変化がないことを確認したため、広角側のデータは未掲載とした。

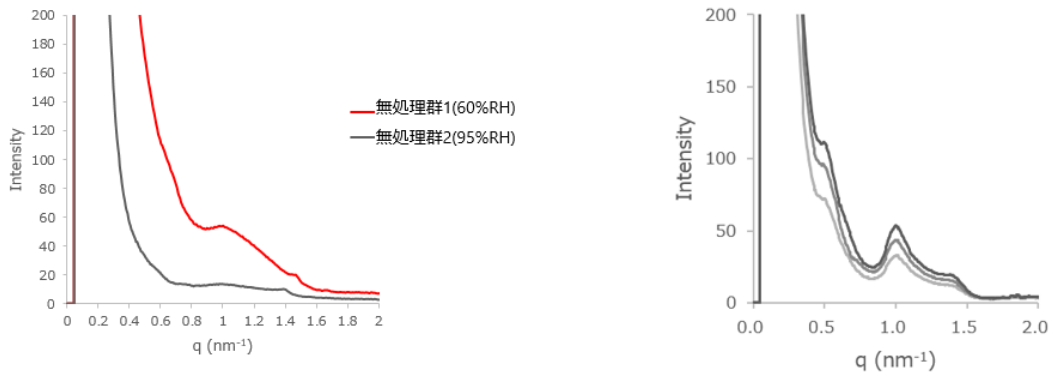


図3 複数のバリア破壊モデルの比較のためのサンプルの検証

5. 今後の課題

前回のトライアル測定でのガラスキャピラリのみの測定時の課題について検証した結果、測定上の異常は認められなかった。一方で、一部のサンプルでは依然として、差のスペクトルが部分的に負の値を示す現象が認められた。ただし、角層細胞間脂質に固有のピークは検出できており、これらのピークの輝度との関係性はみられなかった。今後、測定条件の改善が必要である。

目的とした複数のバリア破壊モデルの比較のためのサンプルで、角層細胞間脂質に固有のピークが適切に検出できなかった。同日に同条件で測定したコントロールサンプルでは検出できていることから、測定上の問題は考えにくい。これらのサンプルの作製ステップは共通しており、いずれもサンプル量は十分であったが、ドナーは異なっていた。即ち、ドナーの違いが角層細胞間脂質の測定に決定的な影響を与える可能性が高い。今後、新たな真空管を導入することで検出感度を向上し、ドナーによらず解析できるよう検討したい。

6. 参考文献

¹⁾Cleansers' mildness: Stratum corneum lipid organization and water uptake after a single wash. Perticaroli S, Meyers JL, Wireko FC, Akintelure O, Webber JT, Cambron RT, Vierling S, Sealschott SR, Wei KS, Smith E, Ray PJ. *Journal of Raman Spectroscopy* 51.5:795-806 (2020).

7. 論文発表・特許 (注：本課題に関連するこれまでの代表的な成果)

Single-cell Transcriptomics of Viable Epidermis Reveals Inflammation along the Skin Furrows of Barrier-disrupted Skin. (Mami Yokota, Mikako Katagiri, Seitaro Nomura, Saki Aihara, Yoshihiro Tokudome, Takashi Yoshino, Tetsuhito Sakurai. SID 2022 Annual Meeting(第80回米国研究皮膚科学会議))

8. キーワード (注：試料及び実験方法を特定する用語を2～3)

角層細胞間脂質、ラメラ構造、充填構造、洗浄

9. 研究成果公開について (注：※2に記載した研究成果の公開について①と②のうち該当しない方を消してください。また、論文(査読付)発表と研究センターへの報告、または研究成果公報への原稿提出時期を記入してください。提出期限は利用年度終了後2年以内です。例えば2018年度実施課題であれば、2020年度末(2021年3月31日)となります。)

長期タイプ課題は、ご利用の最終期の利用報告書にご記入ください。

① 論文(査読付)発表の報告

(報告時期：2024年12月)