

赤外顕微分光によるヒト皮膚角層の水和の研究 Study on Hydration in Human Stratum Corneum using Infrared Microspectroscopy

沖 佳祐^a, 八田 一郎^b, 猿山 靖夫^a, 八尾 晴彦^a
Keisuke Oki^a, Ichiro Hatta^b, Yasuo Saruyama^a, Haruhiko Yao^a

^a京都工芸繊維大学, ^b(公財)名古屋産業科学研究所
^aKyoto Institute of Technology, ^bNagoya Industrial Science Research Institute

ヒト皮膚角層中の水の分布と水和状態を調べるため、放射光赤外顕微分光測定を行った。その結果、水分量 45.6 wt%では HOD による OD 伸縮振動の吸収に変化が見られ、水和状態の違いが測定できることが確認できた。

キーワード： ヒト皮膚角層、ヘルスケア、水和、細胞間脂質、放射光赤外顕微分光

背景と研究目的：

皮膚の保湿機能を正常に保つことは生活の質を向上させるために重要な課題である。中でも角層はバリア機能を持っており、体内から外界への水の蒸散を防いでいる。また、角層は水分を保持するために重要な機能を持っている。角層は約 40 μm の大きさの角化細胞と、数 μm の大きさの細胞間脂質のドメインからなる。角層中の水の大部分は角化細胞の中にあり、短周期ラメラ構造には少量の水があると考えられているが、これまで角層中の水の振舞いについて多くの研究が行われているが、統一的な理解が得られるまでに至っていない。近年、皮膚の保湿機能には角層の細胞間脂質が重要な役割をしていることが明らかになってきた。細胞間脂質は、短周期と長周期のラメラ構造をとることが知られているが、20–30wt%の水分量で短周期ラメラ構造が安定化することが X 線小角回折実験で明らかになっており、ラメラ構造が角層の水分量を調節している可能性を指摘している[1]。このような経緯から、保湿機能を正常に保つ化粧品などの基盤技術として、角層中の水の振舞いを分子レベルで明らかにすることが重要であると考えている。そこで、我々はラメラ構造の相挙動と水分量の関係を詳細に調べるために、超高感度 DSC を用いて、ヒト皮膚角層の高分解能熱測定を行った[2]。その結果、従来報告されていない熱異常が 8°C 付近に観測された。この熱異常は結合水の融解によると予想される。また、65°C 付近で起こる短周期ラメラ構造の高温六方相から液晶相への相転移は、水分量が 22wt%以下では 1 つの温度で起こるのに対し、水分量が 28wt%以上では 2 つの温度に分かれることがわかった。この結果より、水分量が多いとき、短周期ラメラ構造には水分量が異なる 2 種類のドメインが共存すると予想される。そこで、角層内の角化細胞や細胞間脂質における水和状態の分布や、水分量や温度による水和状態の変化を明らかにすることを目的とし、自由水と結合水を HOD の OD 伸縮モードを測定することによって区別する方法を用い[3]、角層中の水の水和状態を空間解像度の高い放射光赤外顕微分光によって観察することを試みた。

実験：

角層は真空中で一晩程度乾燥させた後、直径 3mm の円形に打ち抜いた。厚さは 10 μm 程度、乾燥時の質量は約 0.07mg であった。軽水と重水を 95wt% : 5wt% の割合で混ぜた水で湿度を約 60 RH% に保った容器に入れて、目標の水分量 0~50wt% に到達するまで待った。BL43IR の光学用クライオスタット(Oxford Instruments, Microstat-He)は冷媒による水分の凍結を防ぐために内部を高真空にする必要があるため、真空中でも試料の水分を保つことができる試料セルを試作した。この試料セルは直径 15mm、厚さ 2mm のアルミニウム製の 2 枚のフランジに、8 μm までの赤外線透過する CaF₂ の窓板(直径 8mm、厚さ 1mm)をそれぞれ付けたもので、バイトン O リング(直径 6mm、線径 0.5mm)を挟むことによって、試料を密封することができる。これを Microstat-He の試料ホル

ダーに固定し、温度調節しながら測定した。冷媒としては液体窒素を用いた。試料と Microstat の温度調節の温度計(Si ダイオード)は離れているので、どの程度待てば試料が目標温度に達するのかが分からない。そこで、Microstat-He の予備端子を用いて、試料セル近傍に白金抵抗温度計を設置して確認できるようにし、余分な時間待たなくてもよいようにした。

水の OH 伸縮モードは他のモードと結合し解釈が難しいので、 H_2O と D_2O を混合することによって生成される HOD の OD 伸縮モードを測定することによって、自由水と結合水を区別する Hansen と Yellin の方法を用いた[3]。測定は高空間分解顕微鏡 Bruker Hyperion 2000 で、15 倍の対物鏡を用いて透過モードで行った。1 回の測定に 320 回スキャンを行った。

結果および考察：

試作した試料セルで高真空中でも試料が密封できることがわかった。10 μm 角のアーチャーで照射領域を制限しても角層が比較的厚い部分では、320 回スキャンすることにより、角層中の HOD の吸収を測定できることがわかった。観察場所を変えると、吸収の大きさは大きく変化し、角層が薄い部分では吸収は小さいことがわかった。しかし、Microstat-He を保持する XYZ ステージが不安定で数時間のスケールでは観察位置が変動するので、水和状態の分布の温度依存性の測定は行えなかった。

そこで、水分量 0wt%、25.2wt%、46.5wt%の試料をアーチャーなしで温度を-50 $^{\circ}C$ から 80 $^{\circ}C$ まで 5 $^{\circ}C$ 刻みで変化させて測定を行い、温度による赤外吸収の変化を測定した。図 1 に水分量 46.5wt%のヒト皮膚角層試料の赤外吸収を示す。-50 $^{\circ}C$ において 2430 cm^{-1} に凍結水の OD 伸縮運動による鋭いピークが見られた。-50 $^{\circ}C$ から 30 $^{\circ}C$ まで昇温させた際、このピークは-10 $^{\circ}C$ から小さくなり始め、自由水の OD 伸縮運動による 2500 cm^{-1} の幅の広いピークにシフトした。また、2220 cm^{-1} に比較的小さいピークが見られた。このピークは-50 $^{\circ}C$ から 30 $^{\circ}C$ まで昇温させた際、少しずつ小さくなりながら、30 $^{\circ}C$ では同じ波数の小さなピークと 2090 cm^{-1} で現れたピークに分かれた。続けて-30 $^{\circ}C$ まで降温させると、昇温以前と殆ど同じピークに戻った。水分量 46.5wt%の試料を 100 $^{\circ}C$ まで昇温させると、上記の 2 つのピークは消失した。更に、-30 $^{\circ}C$ まで降温させてもピークは再び現れなかった。図 2 に水分量 0wt%と 25.2wt%のヒト皮膚角層試料の赤外吸収の温度依存性を示す。OD 伸縮運動によるピークは、水分量 0wt%と 25.2wt%の試料では見られなかった。

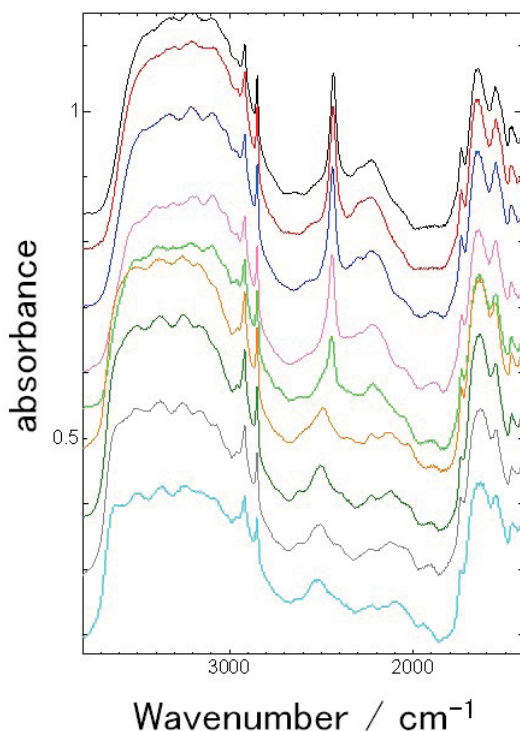


図 1. 水分量 46.5wt%のヒト皮膚角層における赤外吸収の温度依存性. 温度は上から-50 $^{\circ}C$ (黒)、-40 $^{\circ}C$ (赤)、-30 $^{\circ}C$ (青)、-20 $^{\circ}C$ (桃)、-10 $^{\circ}C$ (黄緑)、0 $^{\circ}C$ (橙)、10 $^{\circ}C$ (緑)、20 $^{\circ}C$ (灰)、30 $^{\circ}C$ (水)。

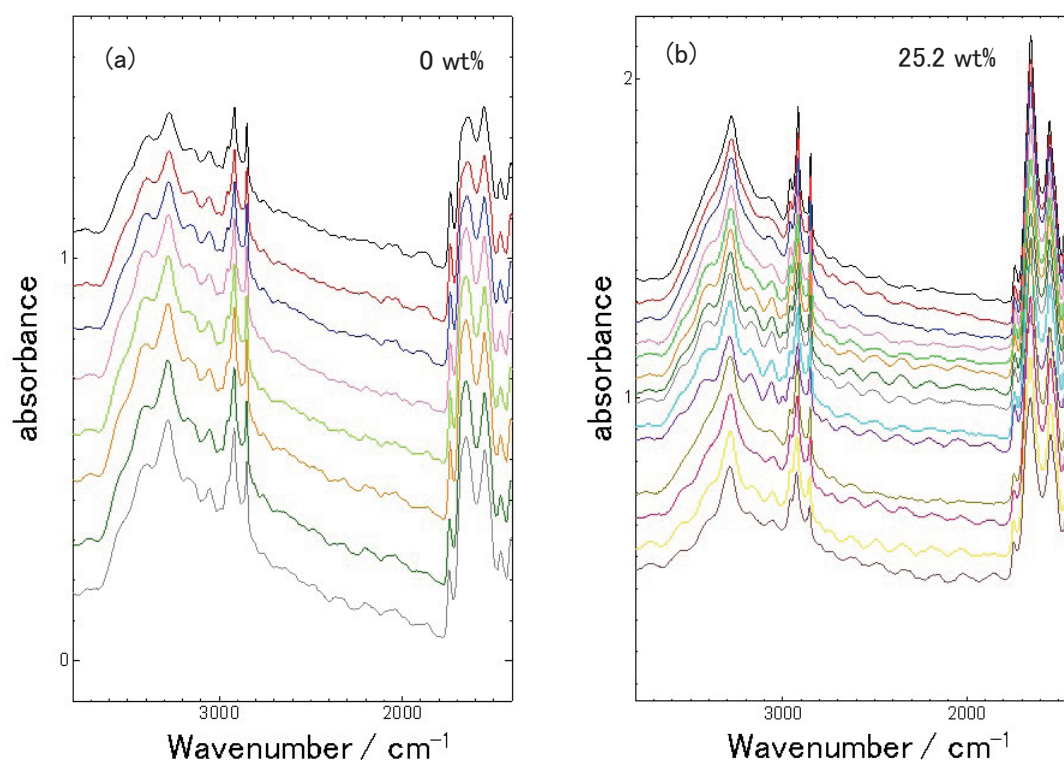


図2. ヒト皮膚角層における赤外吸収の温度依存性. (a)水分量 0wt%、(b)25.2wt%.
 温度は上から-50°C(黒)、-40°C(赤)、-30°C(青)、-20°C(桃)、-10°C(黄緑)、0°C(橙)、10°C(緑)、
 20°C(灰)、30°C(水)、40°C(紫)、50°C(鶯)、60°C(赤紫)、70°C(黄)、80°C(黒茶).

これらのピークの他に、大きい波数側では 2950cm^{-1} に CH_3 非対称伸縮、 2920cm^{-1} に CH_2 非対称伸縮、 2850cm^{-1} に CH_2 対称伸縮によるピークが見られ、小さい波数側では 1740cm^{-1} に CO 伸縮、 1650cm^{-1} にアミド基に含まれる CO の伸縮、 1550cm^{-1} にアミド基に含まれる NH の面内変角と CN の伸縮、 1470cm^{-1} に CH_2 の変角振動によるピーク等が見られた。これらは水分量によっては殆ど変化せず、昇温で少し小さくなった。

今後の課題：

角層における水分量や水和状態の分布を観察するためには、試料を角層細胞 1 個程度の一定の薄さに剥離する方法を確立する必要がある。また、これらの分布の温度依存性を測定するためには、顕微鏡の観察位置が測定中に動く問題を解決する必要がある。

参考文献：

- [1] I. Hatta, N. Ohta, N. Inoue and N. Yagi, *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 1830 (2006); H. Nakazawa, N. Ohta, I. Hatta, *Chem. Phys. Lipids* **165**, 238 (2012).
- [2] 沖佳祐、大岡みゆき、八田一郎、猿山靖夫、八尾晴彦、第 47 回熱測定討論会講演予稿集、P28 (2011).
- [3] J.R. Hansen and W. Yellin, in “Water structure at the water-polymer interface”, H.H.G.Jellinek, ed., Plenum Press, 1972, p.112.