

(1)実施課題番号  
2006B0194

(2)実施課題  
『荒れ肌モデルに向けた皮膚角層内ケラチンの構造解析』

(3)実施責任者  
株式会社ナリス化粧品、 辻恵子

(4)使用ビームライン  
BL40B2

(5)実験結果

#### 【利用目的・概要】

これまで皮膚中に存在するさまざまな微細構造が明らかになってきており、化粧品業界では皮膚角層の重要性が注目されている。中でも皮膚の細胞間脂質が持つバリア機能とその構造解析がその先駆となっている。

しかし、皮膚において重要な役割を持つものは細胞間脂質だけではなく、弾力をつかさどると考えられている真皮コラーゲン、表皮のハリや保湿を有していると考えられる表皮ケラチンが挙げられる。表皮角層ケラチンはTEM(透過型電子顕微鏡)で観察すると、正常なものではケラチンパターンと呼ばれる模様を見られることが古くから知られている。しかし、表皮ケラチン構造は通常のX線回折などの測定方法では検出しにくく、また保湿機能との関係を検討している研究は数例のみである<sup>1) 2)</sup>。さらにその実験系においても家豚角層やヘアレスマウスなどモデル皮膚を用いた例が多く、ヒト皮膚ケラチンに関するデータはまだ多くない。

我々は、ヒト皮膚角層におけるケラチン構造の基本的性質を明らかにするとともに、ケラチン構造と保湿機能の詳細な関係を明らかにすることを目的とし、実験を行った。

#### 【実験方法】

##### (1)試料作成方法

ヒト足裏から角層を採取し細分化した後、水処理を行いアミノ酸類の除去を行った。凍結乾燥により水分を完全に除去したものを前処理試料とし、これら前処理した角層試料を水分量調整し、ガラス管(1mm)に充填してX線回折測定用試料とした。

##### (2)測定方法

X線回折測定:SPring-8 ビームライン BL40B2 において小角・広角X線回折測定を行った。加熱ステージシステム(メトラ社製:FP84HT)を試料ホルダーとして使用しながら液体窒素を冷媒として温度走査を行った。検出およびデータ保存にはイメージングプレートシステム(RAXIS)を用いた。イメージングプレートは、300mm x 300 mm の面積のものを用いた。試料から検出器までの距離は400 mm で、真空パスを用いた。X線は波長 0.1nm(12keV)を用い30秒間の露光を行った。

#### 【結果および考察】

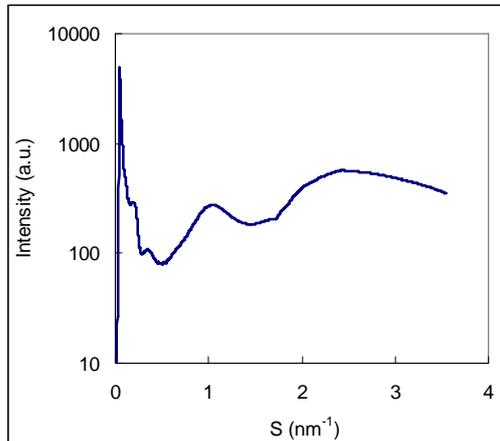
##### (1)Profile

得られた Profile を Figure1 に示す。散乱ベクトル  $S$  は以下の式から算出した。

$$S = (2/\lambda) \sin(2\theta) \quad (\lambda: X線波長, \theta: 散乱角)$$

$S = 1(\text{nm}^{-1})$  前後にケラチン由来のピークが見られたことから、ヒト足裏角層においても家豚皮膚やヘアレスマウスの皮膚同様、ケラチンがある程度の周期構造を有して存在していることが明

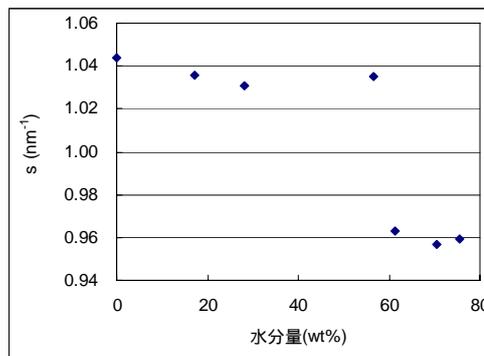
らかになった。それに対して、ヘリックスピッチ由来のピークである  $1.94(\text{nm}^{-1})$  付近およびケラチン鎖由来と考えられる  $2.41(\text{nm}^{-1})$  付近のピークは非常にブロードであり、この結果は角層シートを作成した場合に得られる結果と異なった<sup>3)4)</sup>。また、より小角側には細胞間脂質由来のピークが見られたことから、細胞間脂質の存在も確認できた。



【Figure 1】  
足裏角層を測定した際の Intensity Profile.  
(水分量 57wt%、温度 25 )

### (2) 水分量変化について

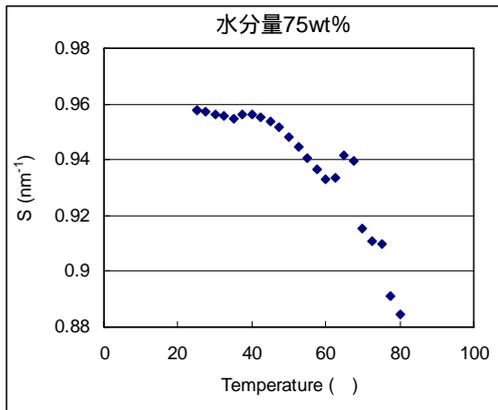
水分量を調節した試料を測定し、 $S=1(\text{nm}^{-1})$  付近に現れるピークについて解析を行った (Figure2)。結果、水分量 60wt% 付近で急激にピーク位置がシフトすることが明らかになった。つまり、水分量 60wt% 付近でケラチン間距離が急激に増加し、構造を変化させていると考えられる。



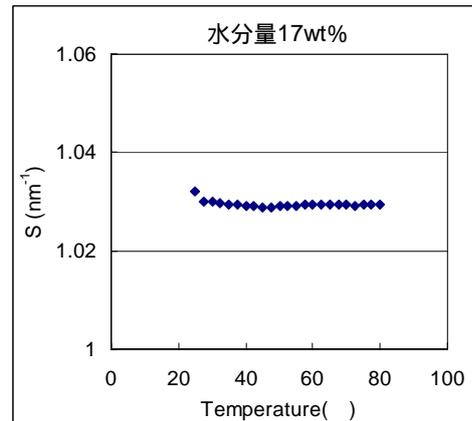
【Figure 2】  
水分量によるケラチンピーク位置の変化。  
(温度 25 )

### (3) 温度変化について

水分量が大きく異なる 2 種類の試料 (水分量 75wt% と水分量 17wt% のもの) について温度を 25 から 80 まで連続的に変化させ、その変化を追った (Figure3,4)。結果、水分量 75wt% の試料については昇温にしたがってピーク位置が低角側にシフトすることが明らかになった。それに対して水分量 17wt% の試料はピーク位置変化がほとんど見られなかった。以上の結果から、昇温により水分量の多い角層はケラチン間距離をさらに広げるが、それに対して水分量の少ない試料ではその距離をほとんど変化させないことが明らかになった。



【Figure 3】  
水分量 75wt%の角層におけるケラチンピーク位置の温度変化。(温度:25 ~ 80 )



【Figure 4】  
水分量 17wt%の角層におけるケラチンピーク位置の温度変化。(温度:25 ~ 80 )

#### 【結論】

今回の実験結果から、ヒト皮膚角層についてトリプシン処理などを施さずにそのままの状態  
で、 $1\text{nm}^{-1}$  付近のケラチン由来のピークを明確に検出できた。この結果はヒト試料からはじめて  
得られたばかりでなく、今回用いたパネラー10名の全ての角層試料から得られ、放射光X線  
を用いたヒト角層ケラチンの構造解析を行っていく上で非常に有用なデータである。

水分量変化に関する実験については、角層内ケラチンはある一定の水分量を超えると急激  
にその距離を広げることが明らかになった。また、さらにそれら試料の温度を上げると、温度上  
昇とともにさらにケラチン間距離が広がることを見出した。一方、もともとケラチン間距離が短か  
った水分量の低い試料については、温度による構造変化は殆ど見られなかった。

今回の実験によってヒト角層中のケラチンの状態およびその構造変化について新たに基礎  
的データを得ることができた。また、水分量・温度変化によってケラチン間距離が変化するとい  
う結果は、化粧品の保湿性だけでなく経皮吸収を考える上でも非常に重要なデータであると思  
えられる。よって、今後はヒト皮膚角層を用いてさらに実験をすすめ、各種保湿剤(アミノ酸・グ  
リコール類など)処理などによる角層内ケラチン構造の変化を検証し、保湿とケラチンの関係  
をより明らかにしたい。さらには、ケラチン間経皮吸収経路についても検証し、新しい理論を構築  
してより効果の高い製品開発に活かしていきたいと考えている。

#### 【参考文献】

- (1) 川田裕三ら、フレグランスジャーナル, 53-58, 2004年9月号
- (2) Yoji Jokura, J. Invest. Dermatol., 104:806-812,(1995)
- (3) Jean-Claude Garson, J. Invest. Dermatol., 96: 43-49(1991)
- (4) J. A. Bouwstra, J. Lipid Research, 36:685-695(1995)