

(※本報告書は英語で記述してください。ただし、産業利用課題として採択されている方は日本語で記述していただいても結構です。)

	承認日Date of Approval 2015/9/15 承認者Approver Jun-ichi Suzuki 提出日Date of Report 2015/5/27
課題番号 Project No. 2014B0054 実験課題名 Title of experiment Study on the structural change of human stratum corneum induced by the treatment of surfactant solutions using small- and wide-angle neutron scattering. Part 4 界面活性剤処理によるヒト皮膚角層の構造変化の中性子小角・広角散乱法を用いた解析(4) 実験責任者名 Name of principal investigator 久米卓志 (Takuji Kume) 所属 Affiliation 花王株式会社 解析科学研究所 (Kao Corporation)	装置責任者 Name of responsible person 鈴木淳市 (Jun-ichi Suzuki) 装置名 Name of Instrument/(BL No.) 大強度型中性子小中角散乱装置 (大観) / (BL15) 実施日 Date of Experiment 2015/3/19 10:00~2014/3/21 10:00

試料、実験方法、利用の結果得られた主なデータ、考察、結論等を、記述して下さい。(適宜、図表添付のこと)
 Please report your samples, experimental method and results, discussion and conclusions. Please add figures and tables for better explanation.

1. 試料 Name of sample(s) and chemical formula, or compositions including physical form. ・ヒト踵角層; 固体(粉末); (花王社内のポランディアの健常者の踵より取得した試料) ・ヒト皮膚角層シート(シート状、Biopredic 社より購入) ・界面活性剤(以下活性剤と表記): 重水素化ドデシル硫酸ナトリウム(d-SDS (SDS-d25)); $C_{12}D_{25}SO_4Na$ ・重水 D_2O 重水素化ドデシル硫酸ナトリウムを重水に溶解して 3%溶液を作製した。重水素化ドデシル硫酸ナトリウム溶液および重水は pH(pD)を 7 に調整し、角層試料に浸漬させるための測定用試料(溶液)とした。
--

2. 実験方法及び結果 (実験がうまくいかなかった場合、その理由を記述してください。) Experimental method and results. If you failed to conduct experiment as planned, please describe reasons. 【実験方法】 BL15(大観)にて、角層(SC) + 重水(D_2O)、角層 + 活性剤溶液(d-SDS/ D_2O)、重水および活性剤溶液の中性子散乱測定を実施した。活性剤溶液としては、3% d-SDS/ D_2O 溶液を用いた。活性剤溶液および重水は pH(pD)7 に調整した。角層試料としては、ヒト踵角層粉末および角層シートの 2 種類を用いた。 角層試料への重水および活性剤溶液の浸漬には、試料セルに厚み(光路長)2mm のタイコセルを用い、オートサンプルチェンジャーを利用して 30°C, 40°C, 50°C で測定を実施した。これまでの SPring-8・J-PARC での実験に基づき角層の変化が十分に平衡に達すると考えられる 1 時間以上の時間(実際には浸漬後 4 時間以上)経過後に測定を実施した。活性剤溶液および重水のみ測定には厚み 2mm の液体用セルを用いた。 角層粉末試料の場合はタイコセルにそのままセットして測定した。角層シート試料の場合は、タイコセルに 6 × 6mm の正方形の穴を切り抜いた 2mm 厚のシリコンゴムをスペーサとして入れ、その穴に 2 × 6mm に切り出した角層シートを約 200 枚/6mm 厚で水平に積層してセットした。なお、角層シートの積層の向きは中性子ビー

2. 実験方法及び結果(つづき) Experimental method and results (continued)

ムがエッジ方向から照射される方向とした。タイコセルには 5mm φ カドミウムマスクを設置し角層試料部分にのみビームがあたるように調整した

測定時間は、ビーム(マスク)径および今回の実験では加速器の出力が 400 MeV に増加したことを考慮して、角層粉末を用いた場合は1サンプルあたり約 2 時間相当(kicker = 170000 counts)、角層シートを用いた場合は1サンプルあたり約 3.8 時間相当(kicker = 340000 counts)、活性剤溶液および重水のみではサンプルのコントラストに合わせて約 0.7 時間相当(kicker = 60000 counts)とした。実際の測定では小角・中角・高角・背面バンクの検出器を用いているが、解析では目標としている角層のケラチン線維のマイクロフィブリル等の情報が含まれる小角バンク領域のデータのみ解析処理を実施した。(中角以上の領域では角層のH由来の非干渉性散乱により有益な構造情報を得ることが困難である。)

角層粉末を用いた測定・活性剤溶液および重水のみでの測定では、散乱が等方的であるため、円環平均により 1 次元化した散乱プロファイルを得た。積層角層シートを用いた測定では、シートの積層方向に対して垂直と平行の±10° の範囲で扇形平均により 1 次元化した散乱プロファイルを得た。

【実験結果および考察】

今回測定した小角中性子散乱測定の結果を以下に示す。Fig. 1 は活性剤溶液および重水のみでの散乱プロファイルである。これまで(2013A, 2014A 期)に実施した実験と同じく、重水素化活性剤と重水のコントラストマッチングにより、活性剤ミセル由来の散乱は現れず、活性剤溶液および重水の散乱プロファイルはほぼ一致した。従って、この後に示す角層試料への浸漬実験での散乱プロファイルにおいて、活性剤ミセル由来の散乱が角層構造由来の散乱に影響を与えていないことが確認された。

Fig. 2 に角層粉末を用いた測定の温度依存性の結果を示す。Fig. 2 (a), (c), (e)はそれぞれ角層粉末、重水を浸漬した角層粉末、活性剤溶液を浸漬した角層粉末の 30°C, 40°C, 50°Cでの測定結果である。データが重なるため、それらを適宜シフトさせて見やすくしたグラフが Fig. 2 (b), (d), (f)である。Fig. 2 (a), (b)のグラフより、乾燥した角層粉末では顕著な角層内部構造由来のピークは観測されず、また散乱プロファイルの温度変化も無かった。Fig. 2 (c)~(f)の重水および活性剤溶液浸漬の角層粉末では、 $q = 0.2 \sim 3 \text{ nm}^{-1}$ 付近に複数のピークが現れた。これらのピークは、これまでの検討により角層内のケラチンのマイクロフィブリル由来と推定している。重水浸漬よりも活性剤溶液浸漬にてピーク位置が低 q 側に移動しかつピークがブロードになっており、マイクロフィブリル構造がより膨潤し、かつより乱れていたと考えられた。この結果は以前の検討結果と同様で再現性も確認できた。また、重水浸漬、活性剤溶液浸漬それぞれのデータで温度が上昇するとわずかではあるが、さらにピーク位置が低 q 側に移動しかつピークがブロードになっていた。従って、温度上昇でさらにマイクロフィブリル構造がわずかに膨潤・乱雑に変化することが明らかになった。

Fig. 3 は今回の積層角層シートを用いた実験の測定結果である。角層内のケラチン線維のマイクロフィブリル構造および細胞間脂質の層状(ラメラ)構造は積層した際に主に平行方向に沿っていると考えられるので、これらに由来する散乱は垂直方向に強く現れると予想される。Fig. 3 (a)のグラフより、乾燥した積層角層シートでは、垂直方向の散乱プロファイルの散乱強度が強く、 $q = 0.4 \sim 2 \text{ nm}^{-1}$ 付近に2つのピークが水平方向よりも顕著に表れていた。これらは角層内部構造を反映したものと考えられた。しかしながら、活性剤溶液を浸漬した結果(Fig. 3 (b)~(d))では、30°Cではわずかに垂直方向の散乱強度が高かったが、40, 50°Cでは垂直・水平方向の散乱強度がほぼ同じとなった。また垂直方向でより顕著にピークが現れることは無かった。測定終了後にセル内の活性剤溶液浸漬の積層角層シート試料を確認したところ、角層シートが大きく湾曲していた。

2. 実験方法及び結果(つづき) Experimental method and results (continued)

今回の実験ではシリコンゴムのスペーサを使用したため、浸漬した角層が膨潤した際の空間的余裕が無かったことが原因と考えられた。なお、前回は浴比が大きかったこともありガラス濾紙をスペーサとして使用しており、膨潤の際の湾曲が抑えられたと考えられた。この大きな湾曲の影響で散乱プロファイルの異方性が消失してしまったと推定された。

Fig. 4 は前回(2014A0123)での積層角層シートを用いた実験の測定結果である。前回の結果では垂直方向の散乱プロファイルの散乱強度が強く、かつ複数のピークが水平方向よりも顕著に表れていた。 $q = 0.3 \sim 3 \text{ nm}^{-1}$ 付近に現れている複数のピークは、細胞間脂質ラメラ由来のピークおよび角層粉末実験で観測されたマイクロフィブリル由来の複数ピークと推定された。ここで界面活性剤浸漬の結果(Fig. 4 (b), (d))では、 50°C で $q = 0.6 \text{ nm}^{-1}$ と 1.3 nm^{-1} 付近に顕著なピークが出現していた。これらのピークは今回の角層粉末の温度変化の測定(Fig. 2)では観測されていない。従って、これらのピークは角層粉末(ほぼ角層細胞のみ)には無く角層シートには存在する、角層細胞周囲の細胞間脂質ラメラ構造由来と考えられ、高温と界面活性剤溶液浸漬の影響で細胞間脂質構造の変性が生じている可能性が示唆された。

これまでと今回の角層試料を用いた溶液浸漬実験から、角層内部のケラチン線維マイクロフィブリル構造および細胞間脂質ラメラ構造に対する温度と界面活性剤の影響をみることができた。さらにこれらの変化の詳細については相補的に利用している SPring-8 での実験結果との比較を行い、由来や機構を明らかにしていきたい。また、今回の積層角層シートの測定で想定外の試料の変化(膨潤)により不備が生じたが、今後それらの対策を考慮して浴比を変えた測定など、再現性確認も含めた積層角層シートでの中性子散乱実験を通してさらに詳細な解析を検討したい

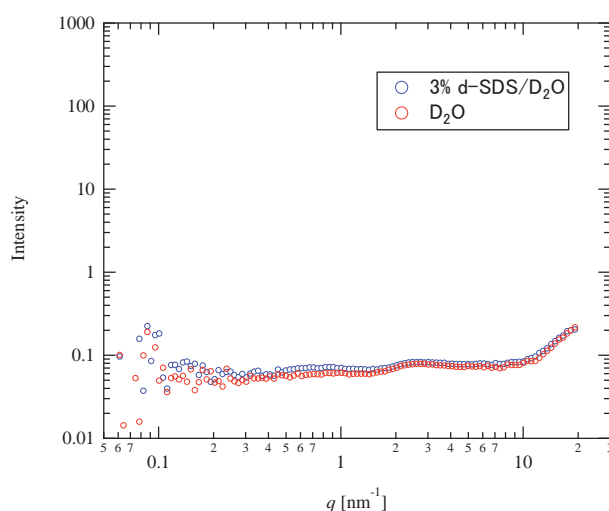


Fig. 1 SANS profiles of heavy water (D_2O ; pH 7) and surfactant solution (3 % d-SDS/ D_2O ; pH 7) at 30°C .

2. 実験方法及び結果(つづき) Experimental method and results (continued)

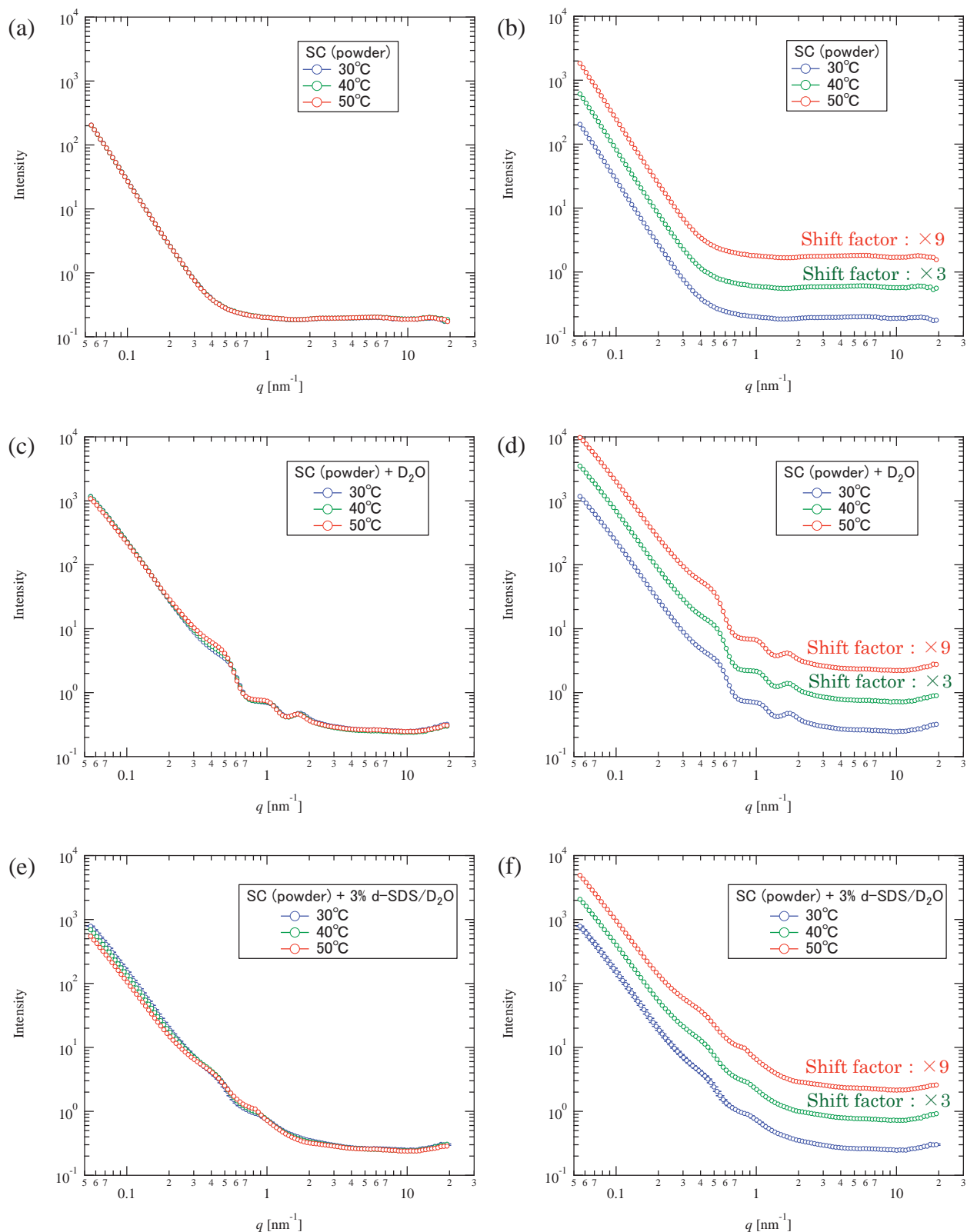


Fig. 2 SANS profiles of stratum corneum powder (a, b) without soaking, soaked with (c, d) heavy water (SC + D_2O), and (e, f) surfactant solutions (SC + 3% d-SDS/ D_2O) at pH 7. The ratios of solution to SC are all five, given by ratio = (weight of solution / weight of SC).

2. 実験方法及び結果(つづき) Experimental method and results (continued)

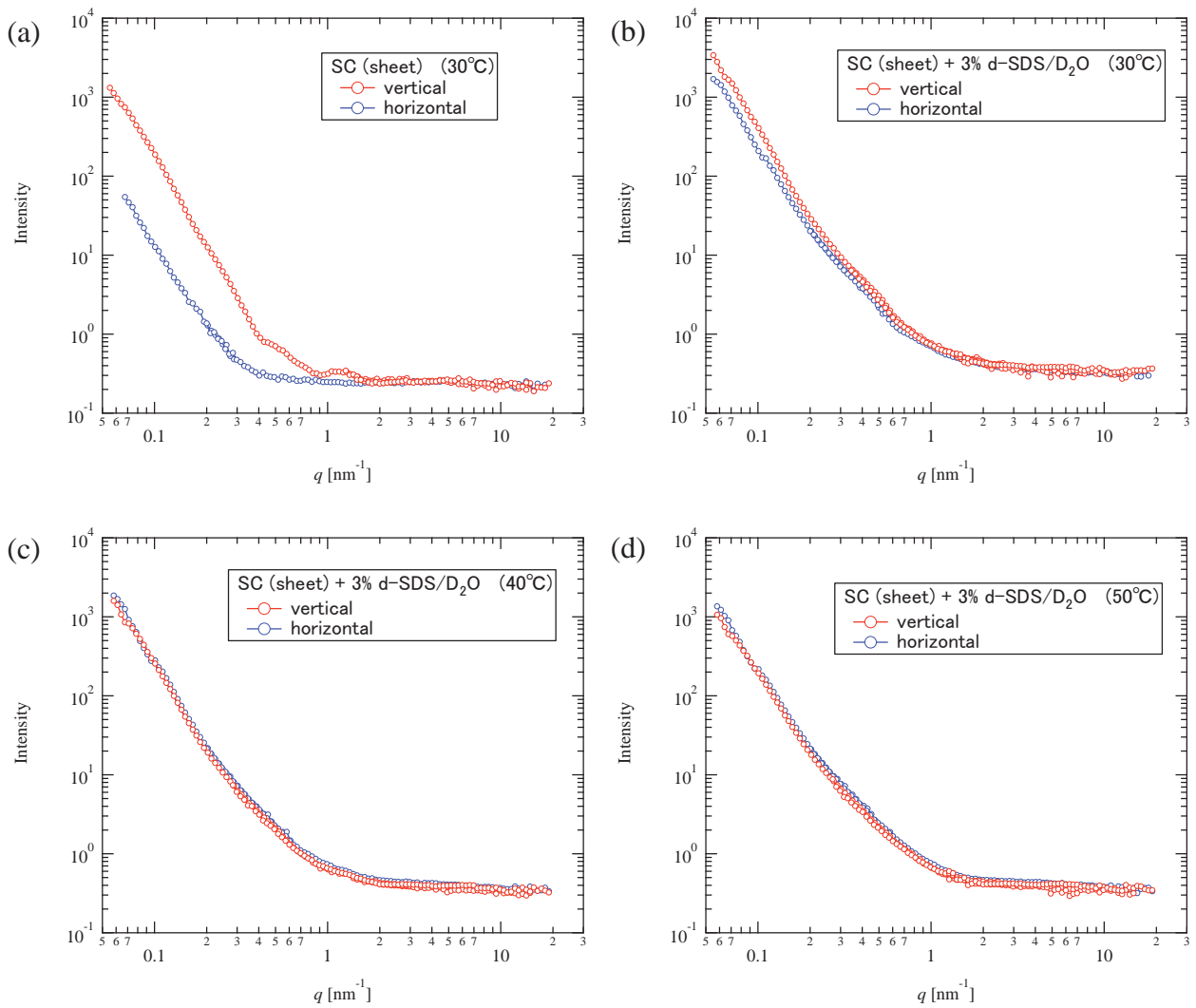


Fig. 3 SANS profiles of stacked stratum corneum sheet (a) without soaking, (b, c, and d) soaked with surfactant solution (3 % d-SDS/D₂O; pH 7). (a) and (b) were performed at 30°C. (c) and (d) were performed at 40°C and 50°C, respectively. The ratios of solution to SC are all five.

2. 実験方法及び結果(つづき) Experimental method and results (continued)

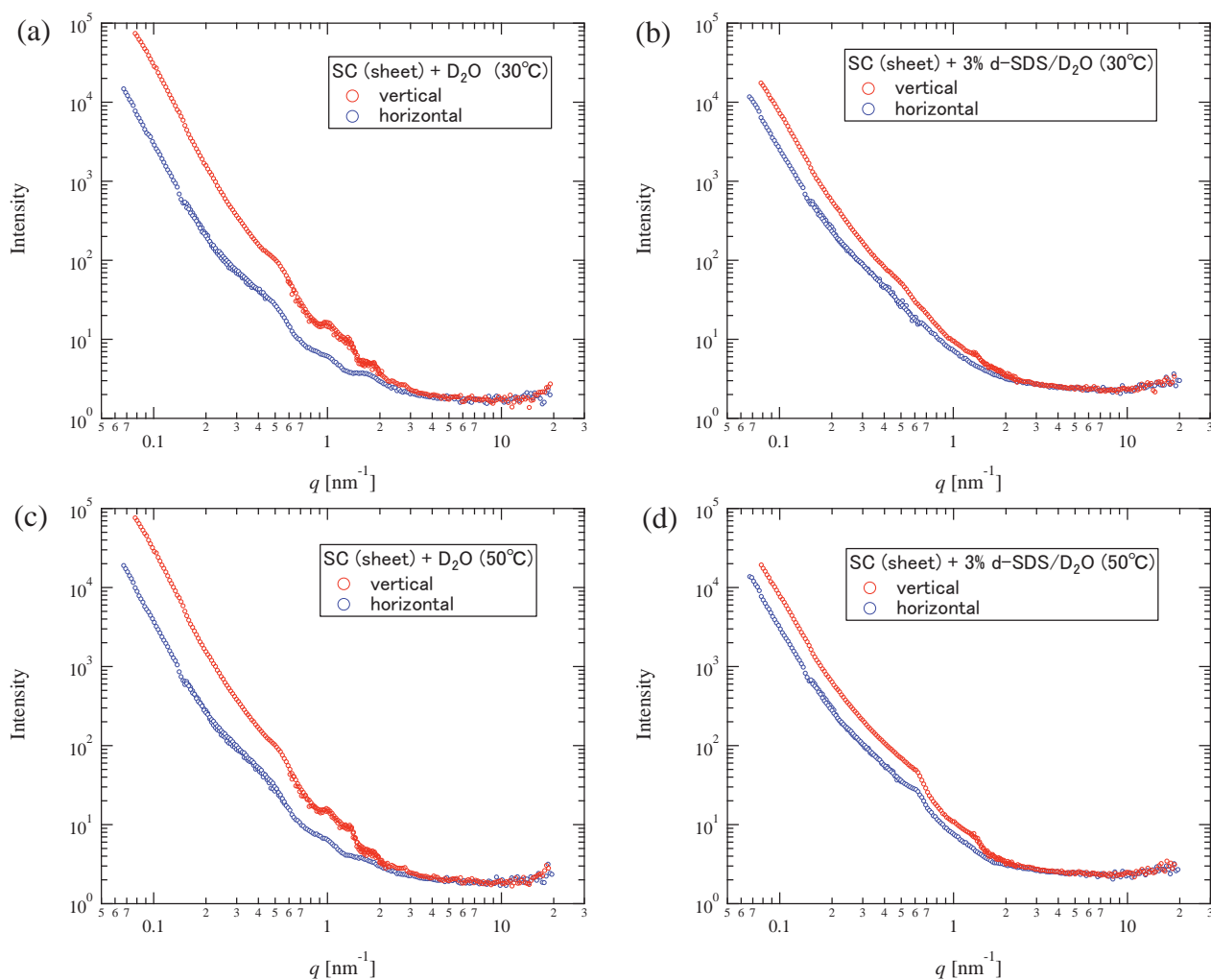


Fig. 4 SANS profiles of stacked stratum corneum sheet soaked with (a, c) heavy water (D_2O ; pH 7), and (b, d) surfactant solutions (3% d-SDS/ D_2O ; pH 7). (a) and (b) were performed at 30°C . (c) and (d) were performed at 50°C . The ratios of solution to SC are 80.