J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn.
報 文
27(4) 589 - 596 (1994)

界面活性剤によって惹起された Scaly skin における スフィンゴ脂質および遊離アミノ酸の変化

傳田光洋, 小山純一, 高橋元次, 堀井和泉
資生堂 研究所†

Changes of Sphingolipids and Free Amino Acids in Surfactant Induced Scaly Skin

Mitsuhiro Denda, Junnichi Koyama, Motoji Takahashi
and Izumi Horii
Shiseido Research Laboratories.†

Sphingolipids are functionally important in the barrier function of the human stratum corneum. Free amino acids also play an important role in its water retention properties. To increase our understanding of the way in which these substances affect scaly skin, we investigated the change of sphingolipids and free amino acids in scaly skin induced by a surfactant, sodium lauryl sulfate (SLS). One week after the treatment, the total amount of amino acids was decreased and their composition was changed significantly. However, the total amount of sphingolipids did not differ from that in control skin. The order of the stratum corneum (SC) intercellular lipids evaluated by attenuated total reflection infrared spectroscopy (ATR-IR) did not change at all, and only the composition of five sphingolipids species changed significantly. These findings suggest that the abnormal morphology of the SC itself and the decline of amino acids are responsible for the dryness of the scaly skin.

1. 緒 言

ヒト表皮の最外部に形成される角層は、生体から水分が失われることを抑え、外部からの異物の侵入を防ぐ、皮膚のバリアー機能を担う重要な役割を果たしている。

最近の報告では、このバリアー機能が破壊された場合、表皮細胞において様々な生化学的な異常が生じ、皮膚全体の状態にも影響を及ぼすことが知られている^{1)~4)}。

このように皮膚において重要な役割を担っている角層であるが、その役割や機能についての分子レベルでの研究は未だ十分になされたとは言えない状況である。

冬期の乾燥肌、界面活性剤による肌荒れなど、表皮増殖性異常に伴う scaly skin (スケイリースキン) の場合には、この角層中の水分量は減少し、バリアー機能も低下する⁵⁾。このような角層機能の変化は皮膚の状態をさらに悪化させる。したがって有効なスキンケアを考える場合、角層のバリアー機能と水分保持機能のメカニズムを検討することが何よりも重要である。

角層は、角質細胞とそれを取り巻く細胞間脂質

† 〒223 横浜市港北区新羽町1050; 1050 Nippa-cho, Kohoku-ku, Yokohama 223 Japan

とから形成される特異な構造を有しており、その形態はレンガとモルタルで造られた構造物に例えられている⁶⁾。ここで角層の細胞間隙に存在するスフィンゴ脂質などが主要な構成物である、いわゆる細胞間脂質はモルタルに相当し、近年、角層のバリアー機能の重要な因子として注目を集めている⁷⁾。一方、角化した細胞の中に存在する遊離アミノ酸は、角層の水分保持に寄与していることが報告されている⁸⁾。この遊離アミノ酸は表皮顆粒層で形成されるケラトヒアリン顆粒の分解代謝物であり、表皮細胞の分化とも密接な関連があることが知られている^{8)~10)}。これらの脂質および遊離アミノ酸が、角層の機能や状態に深く関与していることは容易に想像できるが、各々の物質相互の関係についての報告は殆んど見られなかった。

我々は前に、テープストリッピングによって惹起したスケイリースキンについて検討し、その角層に含まれるスフィンゴ脂質の総量は正常皮膚の場合と変わらないこと、5種のスフィンゴ脂質の分子種の構成比が変化すること、そして遊離アミノ酸量が有意に減少することを報告した¹¹⁾。

今回、我々はさらにこれらの角層中物質と角層の状態および肌荒れとの関連について理解を深める目的で、界面活性剤(Sodium Lauryl Sulfate : SLS)水溶液の塗布によって惹起されたスケイリースキンについて、角層中のスフィンゴ脂質および遊離アミノ酸の分析を行なった。同時に同じ系で、脂質の分子配向についても検討した。その結果について報告する。

2. 実 験

2.1 界面活性剤によるスケイリースキン

スケイリースキンは以下の手順で惹起させた。検討部位に sodium lauryl sulfate (SLS) 5% 水溶液を4時間閉塞パッチした後、流水で、直接の摩擦を避けながらよく洗浄した。一週間後、バリアー機能の低下、角層細胞面積の減少、落屑の発生など、表皮増殖性異常を伴うスケイリースキンの様相が観察された。

2.2 角層の採取

スフィンゴ脂質および遊離アミノ酸の分析に供

する角層サンプルの採取はテープストリッピングに依った。この場合、9名の健常な男性の背部皮膚を用い、左右いずれか一方を SLS 処理部位、もう一方をコントロールとした。テープストリッピングによって採取した角層は、その目的によって、異なる溶媒でテープから剥がした。スフィンゴ脂質の分析に供する角層サンプルは n-ヘキサンで、遊離アミノ酸の分析に用いる場合はトルエンで、各々テープから剥がし、数回洗浄した後、溶媒を除去した。

2.3 スフィンゴ脂質の分析

スフィンゴ脂質の抽出、分析は前報¹¹⁾に示した手法に依った。ここでは、その概略を述べる。

得られた角層からクロロホルム-メタノール(2:1)混合溶液を用いて脂質の抽出を行なった。抽出した脂質混合物からシリカゲル固相カラムを用い、スフィンゴ脂質を分離した¹¹⁾。カラムは Bond Elut, SI (Analytichem International 社, U.S.A.)を用いた。脂質混合物をジエチルエーテルに分散し、カラムを通過させて極性の低い分画を除去した後、カラムの中に保持されたスフィンゴ脂質をクロロホルム-メタノール(2:1)混合溶液で溶出した。標準品を用いて一連の作業を検証した結果、スフィンゴ脂質の回収率は99.5%以上であった。

精製したスフィンゴ脂質の定量は島津製作所製 GC-14Aを用いたガスクロマトグラフィーで行なった。また、スフィンゴ脂質の5種の分子種の構成比を薄層クロマトグラフィーによって検討した。分析には Merck 社の HPTLC プレートを用い、展開溶媒にはクロロホルム-メタノール(19:1)混合溶液を用いた。展開後、50%硫酸をプレートに噴霧し、150°Cで10分間加熱し、呈色させた。その後、島津製作所製 TLC スキャナー CS930によって数値化した。

2.4 遊離アミノ酸の分析

乾燥した角層サンプル 1 mg を正確に秤量し、10%のスルフォサリチル酸水溶液を加えてホモジナイズした。得られた溶液を遠心分離し、その上清を高速アミノ酸分析計(日立製作所、モデル835)で分析した⁹⁾。

2.5 角層中脂質の分子配向の検討

角層中脂質分子のアルキル鎖コンフォメーションの評価を ATR-FTIR 法によって行なった。測定には、Bio Rad 製 FTS-40 を用いた。プリズムは Spectra-Tech 製、セレン化亜鉛結晶で入射角 40° のものを用いた。評価の指標には、アルキル鎖 C-H 結合の対称伸縮振動に由来するピーク (S と略記: 2850 cm^{-1} 付近) と、非対称伸縮振動に由来するピーク (AS と略記: 2920 cm^{-1} 付近) を採用した。Potts らの報告¹²⁾に拠れば、これらのピーク位置は、アルキル鎖の配向が乱れるに従って高い波数側にシフトする。

今回は、健常者における脂質分子配向と、角層バリアー機能および角層中の水分量との関連の検討と、SLS によって惹起させたスケイリースキンの場合の上記パラメーター相互の関係の変化を併せて検討した。健常な男性18名の前腕内側について ATR-FTIR 測定を行なった。同時に、バリアー機能の指標である TEWL の測定と、角層中の水分量を評価する皮表コンダクタンスの測定を行なった。さらにこの中から10名を無作為に抽出し、2.1 で示した手段で左右いずれか一方の前腕内側にスケイリースキンを惹起させた。処理の直前、および一週間後、ATR-FTIR、TEWL¹³⁾、

および皮表コンダクタンス¹⁴⁾の測定を左右前腕内側について行なった。

3. 結 果

3.1 スケイリースキンにおけるスフィンゴ脂質、遊離アミノ酸の変化

SLS処理によるスケイリースキンの角層中の、スフィンゴ脂質、および遊離アミノ酸の総量の、正常皮膚(コントロール)に対する変化を Fig.-1 に示す。

遊離アミノ酸については、スケイリースキンの場合、有意に減少した。一方、スフィンゴ脂質についてはコントロールとの間に有意な相違は認められなかった。これは前に報告した¹¹⁾テープストリッピングによるスケイリースキンの場合と同じ結果であった。

また Table-1 に5種のスフィンゴ脂質分子種の構成比の変化について検討した結果を示す。

スフィンゴ脂質の分子種の構成比には、スケイリースキンと正常皮膚との間に有意な相違が認められた。この傾向も、テープストリッピングで惹起させたスケイリースキンの場合と一致するものであった。

Fig.-2 には、アミノ酸の内のオルチニンからシ

Fig.-1 Change in total amino acids and total sphingolipids in SC 1 week after SLS treatment.

Table-1 Relative proportion of sphingolipids in normal skin and scaly skin induced by SLS treatment.

	Ceramide (%)				
	1	2	3	4/5	6
Normal skin	5.6±3.4	13.7±1.8	22.4±4.7	26.7±3.0	31.4±3.6
Scaly skin	6.0±1.8	16.8±2.0*	23.9±3.0	21.9±2.0*	31.5±4.3

Values are the mean plus standard deviation from nine subjects.

* $p < 0.05$, significance of difference between normal and scaly skin.

Fig.-2 Change in ratio of citrulline/(citrulline+ornithine) in normal skin and SLS induced scaly skin.

トルリンへの変換率に対する SLS 処理の影響を示す。

このパラメーターは表皮細胞の増殖速度を反映することが知られている⁹⁾。今回得られた結果でもシトルリンへの変換率はスケイリースキンの場合、有意に低い値を示し、これは SLS の処理によって表皮増殖性異常が生じていることを意味する。

3.2 角層の脂質分子配向

Fig.-3に、健常者の場合の S, AS 各々の IR ピークの波数と、TEWL との関係を示す。

いずれの場合も有意な正の相関が認められた。この結果は、角層中の脂質のアルキル鎖の配向が、皮膚のバリア機能と密接な関係があることを示唆するものである。

(R : Correlation coefficient)

Fig.-3 The relationship of TEWL to symmetric (S) and asymmetric (AS) stretching frequency in normal subjects.

一方、**Fig.-4**には二つの IR ピークの波数と、皮膚コンダクタンスとの相関を示す。

この場合には両パラメーターの間に相関は認められず、角層中の水分量と脂質分子の配向との間には直接関連がないことが明らかになった。

次に、SLS 処理によるスケイリースキンの場合

Fig.-4 The relationship of skin surface conductance to symmetric(S) and asymmetric (AS) stretching frequency in normal subjects.

Fig.-5 Frequencies of C-H symmetric (S) and asymmetric (AS) stretching absorbance in normal skin and SLS induced scaly skin

- a. Change of TEWL in normal skin and SLS induced scaly skin. b. Change of skin surface conductance in normal skin and SLS induced scaly skin

Fig.-6 Changes of TEWL (a) and skin surface conductance (b) in normal skin and SLS induced scaly skin.

の角層中脂質配向を正常皮膚の場合と比較した。その結果を Fig.-5 に示す。

いずれのピークについても有意な差は認められなかった。同時に TEWL、皮表コンダクタンスについての比較を Fig.-6 に示す。

スケイリースキンの場合、TEWL の上昇、コンダクタンスの低下が認められ、この場合、表皮増殖性異常に伴う皮膚バリアー機能の低下と、角層中の水分量の減少が生じていることを示している。

4. 考 察

表皮増殖性異常に伴うスケイリースキンは、バリアー機能の低下と角層中の水分量の減少によって特徴付けられる皮膚表面状態であり、界面活性剤の塗布による肌荒れ、冬期の乾燥肌など、広く観察される状態である。

我々は以前に、テープストリッピングによって惹起したスケイリースキンについて検討し、遊離アミノ酸の総量の減少、スフィンゴ脂質の分子種の構成比の有意な変化を見出し、さらにスフィンゴ脂質の総量に変化が認められないことも明らかにした¹¹⁾。今回、我々は界面活性剤の塗布によって惹起したスケイリースキンについて検討したが、この場合についても得られた結果は、前述の場合と同様に、遊離アミノ酸の総量の減少、スフィンゴ脂質の構成比の有意な変化を示した。これまでに、遊離アミノ酸については乾癬の場合⁸⁾や紫外線暴露による乾燥肌の場合¹⁵⁾にも、その角層中の総量の減少が報告されている。これらの事実は、表皮増殖性異常に伴うスケイリースキンの場合には、一般的な変化として遊離アミノ酸の減少が起きることを示唆している。同スケイリースキンについて共通して観察される角層中水分量の減少は、この遊離アミノ酸の減少に密接に関係していることが予想される。

近年、細胞間脂質の主要な構成脂質であるスフィンゴ脂質（セラミドなど）の役割や機能に関する報告がいくつかなされている^{16), 17)}。我々は今回、このスフィンゴ脂質についても、スケイリースキンとの関連を調べた。そして、テープストリ

ッピングによるスケイリースキンの場合と同様に、角層単位重量あたりのスフィンゴ脂質の総量は、正常皮膚の場合と変わらないこと、その分子種の構成比には有意な変化があることを見出した。いずれのスケイリースキンの場合にも、前に述べた角層機能の低下が観察されている。

これらの事実から、表皮増殖性異常に伴うスケイリースキンの場合の角層バリアー機能の低下や、水分量の減少はスフィンゴ脂質の総量の変化によるものではないことが確認された。スフィンゴ脂質の分子種の構成比が変化した場合の、角層の機能や性質に対する影響については未だ明らかにされていない。テープストリッピング、界面活性剤の処理によるスケイリースキンの場合には、ある程度共通した変化が観察され、その事実は表皮増殖性に伴ないスフィンゴ脂質の分子種の構成に一定の方向の異常が惹起されることを示唆している。しかし、我々はまた、若年者群に対する高齢者の角層中スフィンゴ脂質構成比の変化について検討したところ、この場合の変化が表皮増殖性異常に伴うスケイリースキンの場合とは、角層の乾燥という共通の変化が認められるにもかかわらず、異なることを報告している¹⁸⁾。したがって角層の状態とスフィンゴ脂質の分子種の構成変化との関連については、さらに検討が必要である。

細胞間脂質は角層細胞の間隙で二重膜様の構造を形成していることが知られており¹⁹⁾、さらにその特異な構造が、角層の物質透過性と密接な関係があることが報告されている⁷⁾。我々は今回、まず健常者について、脂質分子の配向と、角層バリアー機能、および角層中水分量との関連について、ATR-IR を用いて検討した。その結果、バリアー機能と脂質分子配向との間には有意な相関が認められ、細胞間脂質の特異な構造とバリアー機能との関連が確認された。一方、角層中の水分量と脂質分子の配向の間に相関は認められなかった。Bowsteraら²⁰⁾は角層細胞間脂質に水が取り込まれる場合、各々の膜層間距離は変化せず、個々の脂質分子相互の距離が広がることを報告している。したがって、もし角層中の水分の多くが脂質分子間隙に取り込まれているのであれば、IRで

評価した脂質分子配向と、角層中の水分量との間には明瞭な相関が認められはらずである。これらの事実から、角層の水分保持機能については、細胞間脂質の直接的寄与はないことが予想される。

つぎに我々は、SLS によって惹起したスケイリースキンについても、そのバリアー機能の低下、水分量の減少と、角層中脂質の分子配向との関連を調べた。SLS 処理から一週間後、顕著なバリアー機能の低下、水分量減少が観察されたにもかかわらず、脂質分子の配向には変化が認められなかった。これらの結果から SLS によって惹起したスケイリースキンの場合の角層機能の低下は、角層中の脂質分子の分子配向の変化以外の因子によるものであることが予想される。Potts ら²¹⁾は、角層の高いバリアー機能を支えているのは、角層が角質細胞と細胞間脂質からなる特異な構造を形成しているためであると主張している。界面活性剤の塗布などにより表皮増殖性異常が生じると、この高次構造は乱れを生じることも報告されている²²⁾。また Menon ら²³⁾は、脂質合成を抑制する処置をとった場合についても、角層中における脂質の膜構造には変化が認められないが、細胞間隙に空隙が形成されてバリアー機能が低下することを報告している。したがって、表皮増殖性異常を伴うスケイリースキンの場合のバリアー機能の低下は、脂質分子の配向の変化によるものではなく、これらの角層の構造の異常によるものであらうと考えられる。また、角層中の水分量に関して、脂質分子配向の変化が水分保持機能低下の原因とは考えられず、前にも述べた遊離アミノ酸の減少および角層の形態の変化などがその要因であることが予想される。

5. 総 括

健全な皮膚の角層では、角層中の脂質の分子配向が、角層のバリアー機能と密接な関連を持つことが見いだされた。一方、SLS 処理によって惹起されたスケイリースキンの場合の、バリアー機能の低下や角層中水分量の減少については、細胞間脂質の異常は主たる原因ではないと推察される。バリアー機能の低下については表皮増殖性異常に伴

う角層の構造の変化が要因であらうと考えられ、また角層中水分量の減少については、遊離アミノ酸量の低下が重要な因子であることが予想される。したがって肌荒れに対する有効なスキンケアを考えるにあたっては、保湿剤やエモリエントによるバランスのとれた角層状態の図るのと同時に、角層の遊離アミノ酸量や角層形態にも重大な影響を与える、表皮の増殖性異常そのものを治していくことが重要であると言える。

参 考 文 献

- 1) G. Grubauer, P.M. Elias, K.R. Feingold, J. Lipid. Res., **30**, 323 (1989)
- 2) G.K. Menon, P.M. Elias, S.H. Lee, K.R. Feingold, Cell Tissue Res., **270**, 503 (1992)
- 3) E. Proksch, K.R. Feingold, M. Mao-Quiang, P.M. Elias, J. Clin. Invest., **87**, 1668 (1991)
- 4) L.C. Wood, S.M. Jackson, P.M. Elias, G. Grunfeld, K.R. Feingold. *ibid.*, **90**, 482(1992)
- 5) H. Tagami, K. Yoshikuni, Arch Dermatol., **121**, 642 (1985)
- 6) P.M. Elias, J. Invest. Dermatol., **80**, 44s (1983)
- 7) P.M. Elias, G.K. Menon, "Skin lipid" p.26 (1991) Academic press, San Diego
- 8) I. Horii, Y. Nakayama, M. Obata, H. Tagami, Br. J. Dermatol **121**, 587 (1989)
- 9) J. Koyama, I. Horii, K. Kawasaki, Y. Nakayama, Y. Morikawa, T. Mitsui, J. Soc. Cosmet. Chem **35**, 183 (1984)
- 10) I. Horii, K. Kawasaki, J. Koyama, Y. Nakayama, K. Nakajima, K. Okazaki, M. Seiji, J. Dermatol., **10**, 25 (1983)
- 11) M. Denda, J. Hori, J. Koyama, S. Yoshida, R. Namba, M. Takahashi, I. Horii, A. Yamamoto, Arch Dermatol. Res., **284**, 363 (1992)
- 12) R.O. Potts, V.H.W. Mak, R.H. Guy, M.L. Francoeur, "Skin lipid" p. 173 (1991) Academic press, San Diego
- 13) G.E. Nilsson, Med. Biol. Eng., **15**, 209 (1977)
- 14) H. Tagami, M. Ohi, K. Iwatsuki, Y. Kanamaru, M. Yamada, B. Ichijo, J. Invest. Dermatol., **75**, 500 (1980)
- 15) T. Tsuchiya, I. Horii, Y. Nakayama, J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn., **22**, 10 (1988)
- 16) G. Imokawa, M. Hattori, J. Invest. Der-

- matol., **84**, 282 (1985)
- 17) G. Imokawa, A. Abe, K. Jin, Y. Hisaki, M. Kawashima, A. Hidano, *ibid.*, **96**, 523 (1991)
 - 18) M. Denda, J. Koyama, J. Hori, J. Horii, M. Takahashi, M. Hara, H. Tagami, Arch Dermatol. Res., **285**, 415 (1993)
 - 19) L. Landmann, J. Invest. Dermatol. **87**, 202 (1986)
 - 20) J.A. Bouwstra, M.A. de Vries, G.S. Gooris, W. Bas, J. Brusse, M. Ponec, J. Controlled Release **15**, 209 (1991)
 - 21) R.O. Potts, M.L. Francoeur, J. Invest. Dermatol. **96**, 495
 - 22) D.N. Menton, A.Z. Eisen, *ibid.*, **57**, 295 (1971)
 - 23) G.K. Menon, K.R. Feingold, M. Mao-Quang, M. Schaudé, P.M. Elias, *ibid.*, **98**, 209 (1992)
(1993年7月30日受理)