

論文審査並びに最終試験の要旨及び担当者

論 文 博 士	学位申請者氏名 吉田萌生
論文題目	
角層の性状解析のための蛍光標識ポリマーを用いた新規染色法に関する研究	
Studies on novel staining methods using fluorescent polymers for characterization of the stratum corneum.	
目次	
1. 要旨	2
2. 緒論	4
3. 第 1 章 蛍光標識 PLL による角層染色挙動に関する研究	6
第 1 節 蛍光標識 PLL による角層への染色性および特性	7
第 2 節 アミン化合物による染色性の阻害	10
第 3 節 蛍光標識 PLL の染色ターゲット	11
第 4 節 蛍光標識 PLL 染色の角層部位差	12
第 5 節 蛍光標識 PLL 染色と皮膚生理指標との相関	13
第 6 節 考察	14
第 7 節 小括	16
4. 第 2 章 蛍光標識 PLL および蛍光標識 anionic Dextran による角層染色挙動の比較	17
第 1 節 蛍光標識 PLL と蛍光標識 aDex による濃度依存的角層染色	18
第 2 節 蛍光標識 PLL と蛍光標識 aDex による角層染色の pH 依存性	20
第 3 節 高塩濃度による角層染色の阻害	21
第 4 節 アルブミン吸着膜に対する染色性の検討	22
第 5 節 蛍光標識 PLL と蛍光標識 aDex による角層染色の部位差の検討	23
第 6 節 蛍光標識 PLL および蛍光標識 aDex による角層の二重染色	24
第 7 節 エタノールによるケラチン構築状態の乱れの染色性への影響	25
第 8 節 高分子 PLL による染色の検討	27
第 9 節 考察	28
第 10 節 小括	32
5. 結論	34
6. 実験方法	36
7. 謝辞	39
8. 引用文献	40
9. 論文目録	41

要旨

皮膚は表皮・真皮・皮下組織の3層構造からなる。なかでも表皮は皮膚にとって重要な2つの機能を持つことが知られている。特に表皮最外層に位置する角層は角層自身が水分を保ち柔らかさを確保する保湿機能と、体内の水分保持、異物排除および経皮吸収の制御を行うバリア機能を担う^[1]。角層は表皮角化細胞の分化により形成される角層細胞が10~20層ほど重なり、厚さ10~15 μm の角層を形成する。表皮は形態の異なる4層、すなわち、基底層・有棘層・顆粒層・角層から構成される。表皮の90%以上を表皮角化細胞が占め、基底層で増殖した表皮角化細胞が、有棘層・顆粒層に移動しつつ分化する。顆粒層から角層に移行する過程で、核、細胞内小器官、細胞膜などが消化され、細胞生物学的には死んだ角層細胞となる。角層では遺伝子発現は行われなため、顆粒層までの分化の過程で角層機能に必要なタンパク質や酵素を作り、最終的には最外層の角層は垢となって剥がれる。このように角層はターンオーバーを繰り返しながら恒常性を維持する動的な組織である。また加齢に伴い、角層の剥離酵素活性が低下すること^[2]、角層の状態によっては重層剥離を起こすことも報告されている^[3]。角層は角層細胞と細胞間脂質から構成される。角層細胞は主にケラチン線維および天然保湿因子 (NMF: Natural Moisturizing Factor) から構成され、Cornified Envelope (CE) と呼ばれる膜状の構造を持つ^[4]。この CE はロリクリンやインボルクリンといったタンパク質が多数存在し、脂質が付加されていることも知られている。また角層細胞の間隙は細胞間脂質であるセラミド・コレステロール・遊離脂肪酸で充填されている^[4]。このように角層細胞や細胞間脂質の形成状態によって、皮膚の健全性に大きく影響する角層の特性は異なってくる事が知られている^[5,6]。これら角層の特性は電気的手法、光学的手法、テープストリッピング法によって採取した角層を用いた手法により非侵襲的に評価することができる^[7-9]。特に角層を採取し顕微鏡で観察するテープストリッピング法は化粧品・美容業界で個人に合ったスキンケアの提案を目的とし、様々な角層の性状解析方法を利用してカウンセリングに応用されてきた^[10-14]。しかし、これまでに角層水分量や経表皮水分蒸散量 [transepidermal water loss (TEWL)] のような皮膚生理指標となる角層染色法は見出されてはいなかった。

そこで本研究では化粧品業界での角層性状の新しい評価法への応用および、個人に合ったスキンケア化粧品を選んでもらう一助となることを目的とし、 ϵ -poly L-lysine (PLL) に着目して研究を行った。PLL は L-lysine 残基から成り、分子量約 4,000 の直鎖状のポリマーである。このカチオン性の性質をもつ PLL を利用し、蛍光標識 PLL を用いて角層を染色した。これら PLL の角層への染色性のメカニズムを解明するため、pH 依存性、塩濃度の影響の検討、共焦点顕微鏡での観察や皮膚生理指標との相関性など検討を行った。さらに蛍光標識 PLL と同等の分子量 (3,000) でカチオン性と反対の性質であるアニオン性の蛍光標識 anionic Dextran (aDex) を用いた角層の染色性を比較した。aDex は市販の蛍光試薬であり、Alexa Fluor 488 が Dextran に結合している電荷がアニオン性に傾いている試薬である。

検討の結果、蛍光標識 PLL は角層を染色すること、そしてその染色性はイオン結合性が関与していることが示唆され、その一部には疎水性相互作用も関与しているのではないかと考えられた。また、共焦点顕微鏡での観察結果より、角層細胞内部まで染色されていることからケラチンまで染色されていることが明らかとなった。皮膚生理指標の相関性の結果では、蛍光標識 PLL で強く染色される角層細胞は角層水分量と負の相関、TEWL と正の相関を持つことが明らか

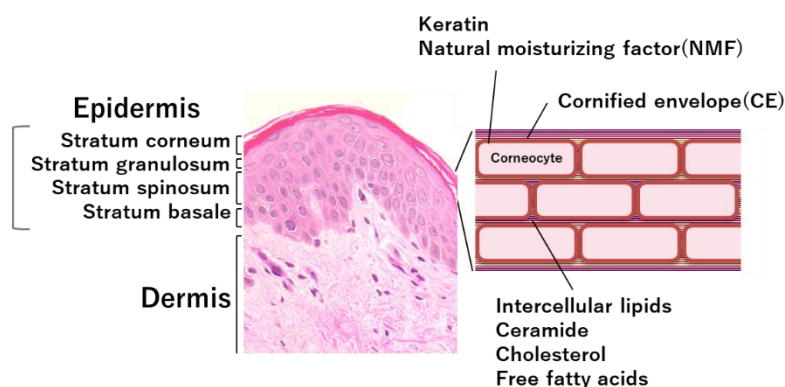
かとなった。さらに興味深いことに蛍光標識 PLL および蛍光標識 aDex との二重染色では、被験者によって染色性が変わり、角層細胞の染色の有無を観察すると①両ポリマーで染色される角層細胞、②PLL のみで染色される角層細胞、③aDex のみで染色される角層細胞、④両ポリマーで染色されない角層細胞の 4 分類にわけることができた。

これらの結果から、蛍光標識 PLL による角層染色は皮膚生理指標と関連し、被験者の皮膚性状を予想することができると考えられる。また蛍光標識 PLL と蛍光標識 aDex の角層染色メカニズムを今後解明することができれば、高度な機器を用いることなく角層染色の結果から肌状態の評価が可能となり、皮膚の多様性に関する基礎データの収集のみならず、カウンセリング場面などでの応用など、社会的な貢献が期待される。

緒論

皮膚は表皮・真皮・皮下組織の3層構造からなる。なかでも表皮は皮膚にとって重要な2つの機能を持つことが知られている。特に表皮最外層に位置する角層は角層自身が水分を保ち柔らかさを確保する保湿機能と、体内の水分保持、異物排除および経皮吸収の制御を行うバリア機能を担う^[1]。角層は表皮角化細胞の分化により形成される角層細胞が10~20層ほど重なり、厚さ10~15 μm の角層を形成する。表皮は形態の異なる4層、すなわち、基底層・有棘層・顆粒層・角層から構成される (Fig. 1)。表皮の90%以上を表皮角化細胞が占め、基底層で増殖した表皮角化細胞が、有棘層、顆粒層に移動しつつ分化する。顆粒層から角層に移行する過程で、核、細胞内小器官、細胞膜などが消化され、細胞生物学的には死んだ角層細胞となる。角層では遺伝子発現は行われなため、顆粒層までの分化の過程で角層機能に必要なタンパク質や酵素を作り、最終的には最外層の角層は垢となって剥がれる。このように角層はターンオーバーを繰り返しながら恒常性を維持する動的な組織である。また加齢に伴い、角層の剥離酵素活性が低下すること^[2]、角層の状態によっては重層剥離を起こすことも報告されている^[3]。角層は角層細胞と細胞間脂質から構成される。角層細胞は主にケラチン線維および天然保湿因子 (NMF: Natural Moisturizing Factor) から構成され、Cornified Envelope (CE) と呼ばれる膜状の構造を持つ^[1] (Fig. 1)。この CE はロリクリンやインボルクリンといったタンパク質が多数存在し、脂質が付加されていることも知られている。また角層細胞同士の間隙は細胞間脂質であるセラミド・コレステロール・遊離脂肪酸から成る結晶構造で充填されており、バリア機能の主体を担っている^[4]。このように角層細胞や細胞間脂質の形成状態によって、皮膚の健全性に大きく影響する角層の特性は異なってくるということが知られている^[5, 6]。

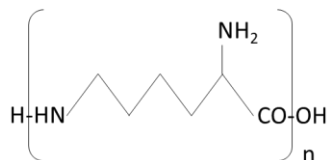
Figure 1 The structure of the skin.



角層の特性は電気的手法、光学的手法、テープストリッピング法によって採取した角層を用いた手法により非侵襲的に評価することができる。電気的手法や光学的手法についてはいずれも高度な機器を要するが^[7-9]、テープストリッピング法は角層をサンプリングし、顕微鏡によって状態を観察することが可能で、特殊な機器を必要とせずに評価できる点で有用である。これまでに皮膚の性状解析をするためにテープストリッピング法にて採取した角層を用いた染色法が複数開発されてきた。細胞面積や有核細胞・重層剥離を検出する Brilliant Green & Gentian Violet (BG) 染色^[10, 11]や、酸化ストレスの指標であるカルボニル化タンパク質を検出する Fluorescein-5-thiosemicarbazide (FTSC) 染色^[12, 13]、角層細胞の-SH 基を検出し角化不全度をみる N-(7-dimethylamino-4-methylcoumarinyl)-maleimide (DACM) 染色^[14]などが挙げられる。また実

際に昨今の化粧品・美容業界では個人に合ったスキンケアの提案を目的とし、角層を性状解析しカウンセリングに応用する場合もある。これら染色については、①観察によって簡便に角層状態の判別が行えること、②恒温恒湿室を備えた施設などが不要であり、カウンセリング場面で角層をその場で採取できること、③後日角層の状態を観察し、その結果に基づいてカウンセリングが可能なが利点として挙げられる。しかし、これまでに角層の柔軟性やキメなどに大きな影響を与える角層水分量や角層のバリア機能の指標として用いられる経表皮水分蒸散量 [transepidermal water loss (TEWL)] のような皮膚生理指標に関連する角層染色法は未だ見出されてはいなかった。上記に挙げた皮膚生理指標となるデータが角層染色の染色度合いから判別できることにより、より簡便に角層状態を把握することが可能である。

そこで今後の化粧品業界での角層性状の新しい評価法への応用および、個人に合ったスキンケア化粧品を選んでもらう一助となることを目的とし、我々はε-poly L-lysine (PLL) (Fig. 2) に着目して研究を行った。PLL は抗菌性を持つことからこれまで主に食品領域で広く利用されており、安全性が担保されている原料として知られている^[15-17]。PLL は L-lysine 残基から成り、α-カルボキシル基とε-アミノ基の間で結合している分子量約 4,000 の直鎖状のポリマーである。またカチオン性の性質をもつことから、化粧品ではヘアケア原料として利用されている。しかし、角層や毛髪への吸着メカニズムに関する報告はなかった。PLL はポリアミノ酸で構成されており、カチオン性の均等な電荷を持つため角層や毛髪のダメージ評価に応用できることが期待される。そこで本研究では PLL の角層への吸着挙動のメカニズムを解明するために、PLL を蛍光標識し、蛍光標識 PLL を用いて角層を染色することで、PLL の吸着対象を可視化でき、角層状態の新しい判別方法の可能性を見出した。さらに、蛍光標識 PLL と対照的なアニオン性高分子 (分子量 3,000) である蛍光標識デキストランを用いて、角層を二重染色することで、角層細胞毎に染色性が異なることを見出した。これらのことより新たな角層の性状解析の一助となる可能性を見出した。



n = 25 - 35

Figure 2 ε-poly-L-lysine (PLL).

第1章 蛍光標識 PLL による角層染色挙動に関する研究

PLL は L-lysine 残基から成る分子量約 4,000 の直鎖状のカチオン性のポリマーであり、これまでに食品領域や化粧品領域で広く利用されてきた原料である^[15-17]。しかし、これまでに蛍光標識した PLL を角層染色に利用したことは未だない。PLL はカチオン性の性質を持ち、pH や塩濃度などの生理学的な影響を受けやすいことが考えられた。そこで、蛍光標識 PLL が角層へ染色を示すのか、また蛍光標識 PLL の性質・および角層への染色挙動を知るために染色性について検討を行った^[18]。

角層細胞内部は主にケラチンで構成され、角層細胞の周縁には CE が存在することが知られている^[1]。CE は種々のタンパク質から構成される不溶性膜状構造で、単離後の形状評価では多様性が認められ、形状が円形の成熟 CE と不定形の未熟 CE に大きく分類されることが報告されている^[19, 20]。成熟 CE には脂質が付加されており、不定形の未熟 CE には脂質付加などがうまく行われていない。さらに成熟 CE については成熟が進む段階でロリクリンやインボルクリンといったタンパク質の他に周辺のケラチンも巻き込んで CE を形成することが報告されている^[21]。以上のように角層細胞は複雑かつ多様な構造を有することから、蛍光標識 PLL の染色ターゲットを調べる目的で、共焦点顕微鏡を用いた観察により、角層細胞内部まで PLL が染色を示すのか、また CE に対しても染色を示すのかを検討した。

さらに角層は採取部位によって角層の性質が異なることが知られている^[22-24]。特に露光部である頬部では肌荒れ様の角層モデルとして利用されており、非露光部である上腕内側や臀部などは正常な角層モデルとして利用されている。このことから、蛍光標識 PLL がどのような角層に吸着しやすいのかを検討するために、頬と上腕内側の角層について染色性の比較検討を行った。

第1節 蛍光標識 PLL による角層への染色性および特性

蛍光標識 PLL として Alexa Fluor 488-PLL (AF-PLL) を用いて、角層が染色されるか否かおよび角層への染色メカニズムを知るため、pH や塩濃度などの染色環境を変化させて検討を行った。

上腕内側の角層を使用して染色を行ったところ、AF-PLL は角層を染色することがわかった (Fig. 3)。また興味深いことに AF-PLL の染色性には強弱があり、同一人物の同じ部位から採取した角層でも、強く染色される角層細胞および弱く染色される角層細胞、ほとんど染色のされない細胞が存在することを見出した。

テープストリッピングにより非侵襲的に採取した角層に AF-PLL を作用させて、蛍光顕微鏡にて観察した。Fig. 4 に示すように、AF-PLL の濃度に依存して、角層が染色された。この染色が PLL と角層との相互作用であることを示すために、AF-PLL と同時に非標識 PLL も同時に添加して染色した。その結果、非標識 PLL の添加により AF-PLL による蛍光染色が拮抗的に阻害された (Fig. 5)。このことから、AF-PLL による角層の染色は、蛍光標識に用いた Alexa Fluor 488 ではなく、PLL と角層との相互作用によることが強く示唆された。

次に、pH 依存性と塩濃度の影響を調べた。Fig. 6 に示すように、中性からアルカリ性領域において AF-PLL による角層染色が認められたが、酸性領域においては染色が阻害された。なお、pH 9.0 の染色においては、用いる緩衝液の種類により多少の違いが認められた。塩濃度の影響を調べたところ、0.2 mol/L 以上の NaCl の添加により AF-PLL による角層の染色は阻害された (Fig. 7)。以上より、PLL の吸着の少なくとも一部には、イオン結合による相互作用の関与が示唆された。

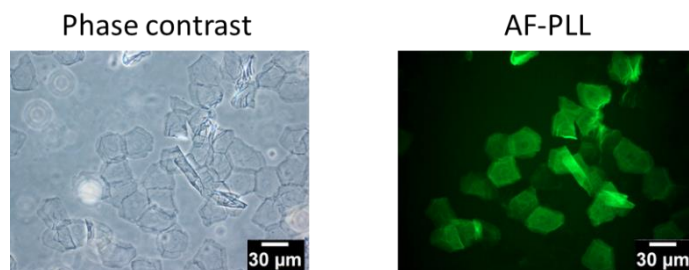


Figure 3 Staining of SC with Alexa Fluor 488-labeled PLL (AF-PLL).

Tape-stripped stratum corneum (SC) from the upper arm was stained with AF-PLL. A phase contrast image (left) and a fluorescence image (right).

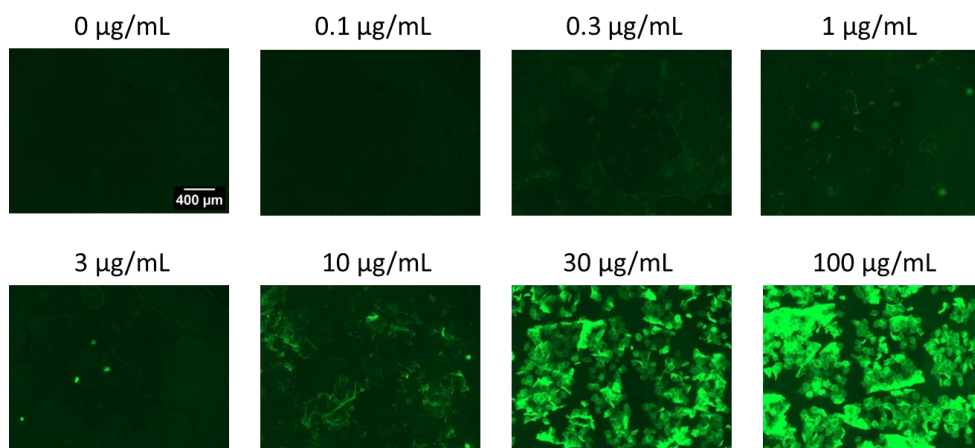


Figure 4 Dose response staining of SC with AF-PLL.

Tape-stripped SC from the upper arm was stained with various concentrations of aqueous solution of AF-PLL, followed by observation with a fluorescent microscope.

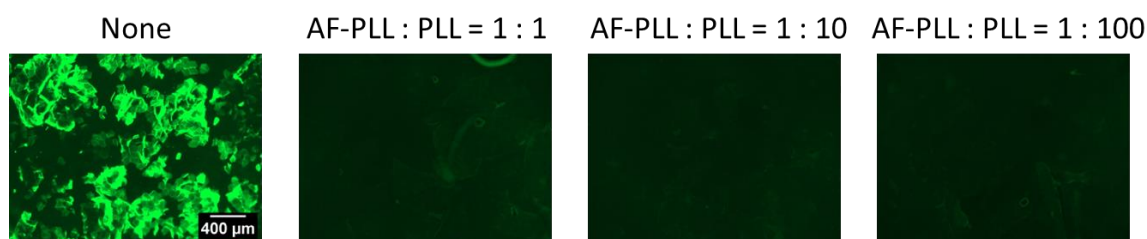


Figure 5 Inhibition of AF-PLL staining of SC by unlabeled PLL.

Tape-stripped SC from the upper arm was stained with an aqueous solution of AF-PLL in the presence of unlabeled PLL, followed by observation with a fluorescent microscope. Numbers represent the ratios of AF-PLL vs. unlabeled PLL.

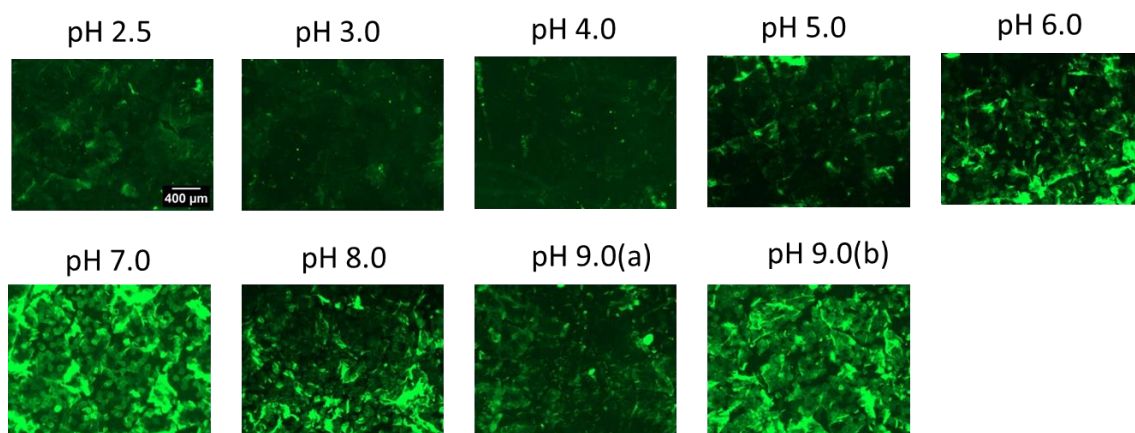


Figure 6 pH dependence of AF-PLL staining of SC.

Tape-stripped SC from the upper arm was stained with AF-PLL in buffer with various pH levels, followed by observation with a fluorescent microscope. The following buffers were used: pH 2.5 and 3.0, 50 mmol/L glycine-HCl buffer; pH 4.0 and 5.0, 50 mmol/L Na-acetate buffer; pH 6.0, 7.0, and 8.0, 50 mmol/L Na-phosphate buffer; pH 9.0 (a), 50 mmol/L diethanolamine-HCl buffer; and pH 9.0 (b), 50 mmol/L glycine-Na buffer.

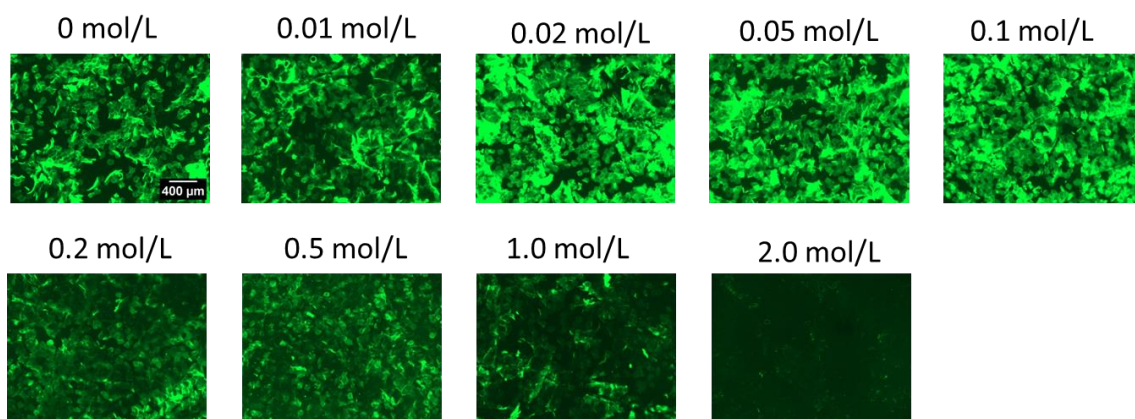


Figure 7 Inhibition of AF-PLL staining of SC by high salt concentration.

Tape-stripped SC from the upper arm was stained with AF-PLL in solutions with various concentrations of NaCl, followed by observation with a fluorescent microscope.

第2節 アミン化合物による染色性の阻害

PLLは1級アミンを有するカチオン性ポリマーで、このアミノ基が角層と相互作用している可能性が考えられる。そこで、アミノ基を有する化合物の影響を調べた。添加濃度は、PLLに含まれるアミノ基濃度に対する比率で、1倍、10倍、100倍に相当する濃度として検討した。結果をFig. 8に示した。モノマーのL-LysはAF-PLLによる角層染色を阻害しなかった。アルキルアミンでは、ヘキシルアミンよりもドデシルアミンに強い染色阻害が認められた。アルキルトリメチルアンモニウム塩について調べたところ、アルキル鎖長の長いC₁₄、C₁₆で強い染色阻害が認められた。このように、カチオン界面活性剤によりAF-PLLの角層染色が阻害されることがわかった。

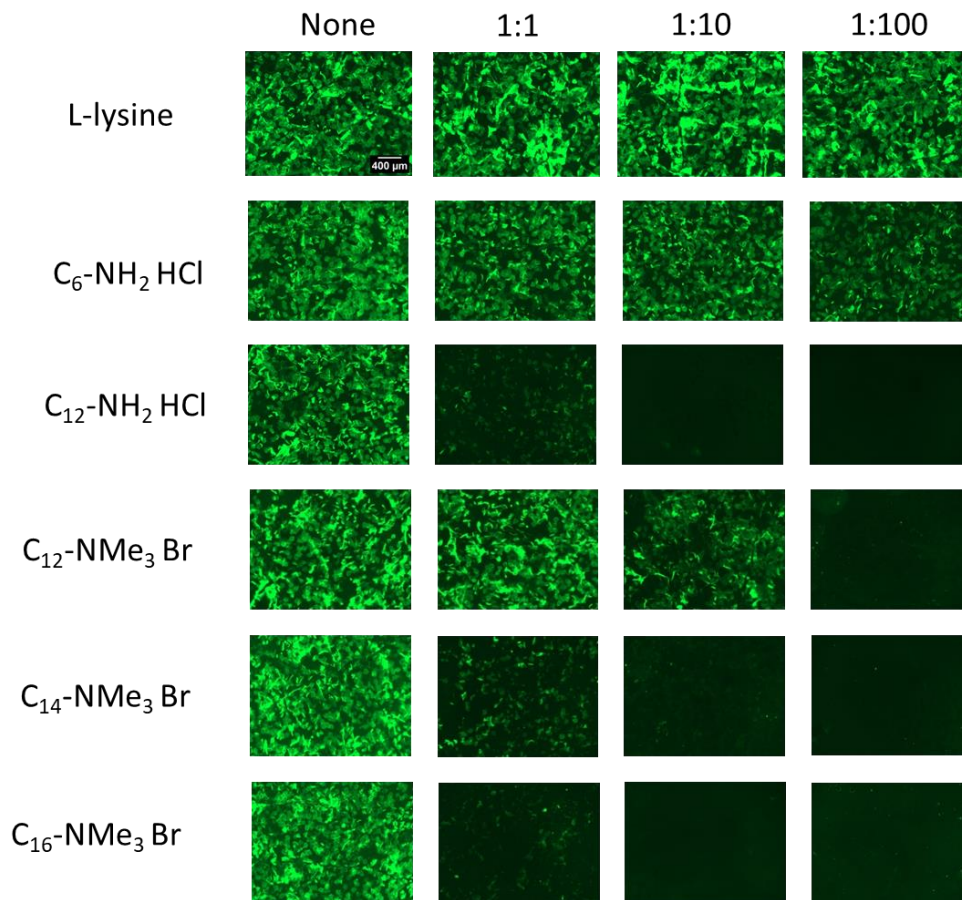


Figure 8 Effect of various amines on AF-PLL staining of SC.

Tape-stripped SC from the upper arm was stained with AF-PLL in solutions with various concentrations of amine derivatives, followed by observation with a fluorescent microscope. Numbers represent the ratios of AF-PLL vs. amine derivatives on the basis of amine moieties.

第3節 蛍光標識 PLL の染色ターゲット

次に、蛍光標識 PLL の染色ターゲットを調べるために、上腕内側の角層を使用して、共焦点顕微鏡による観察を行ったところ、Z 軸断面が染色されていることから角層細胞内部まで AF-PLL で染色されていることがわかった (Fig. 9)。また次に CE を単離して AF-PLL の染色性について評価を行った。CE に関しては角層細胞が正常に角化する際に CE が十分に構築されているものに関しては、CE を単離した際に円形の形状 (成熟 CE) であることが報告されている [19-21]。CE を角層から単離して AF-PLL 染色して観察したところ、CE についても AF-PLL は染色性を示すことがわかった (Fig. 10)。また興味深いことに形状が円形の CE については AF-PLL 吸着により染色されやすいことがわかった。

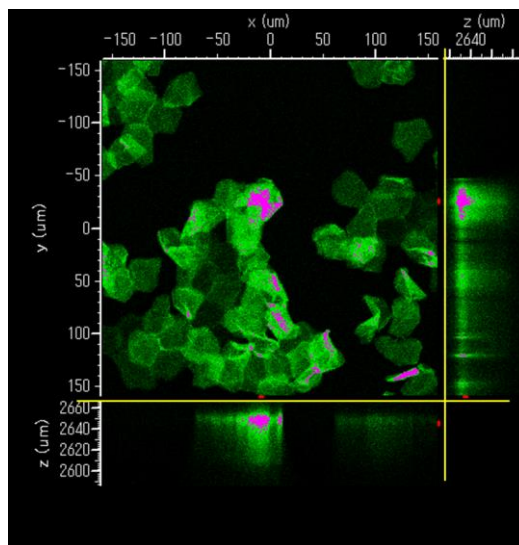


Figure 9 Confocal microscopic image of AF-PLL stained corneocytes.

Tape-stripped SC from the cheek was stained with aqueous solution of AF-PLL, followed by observation with a confocal scanning microscope.

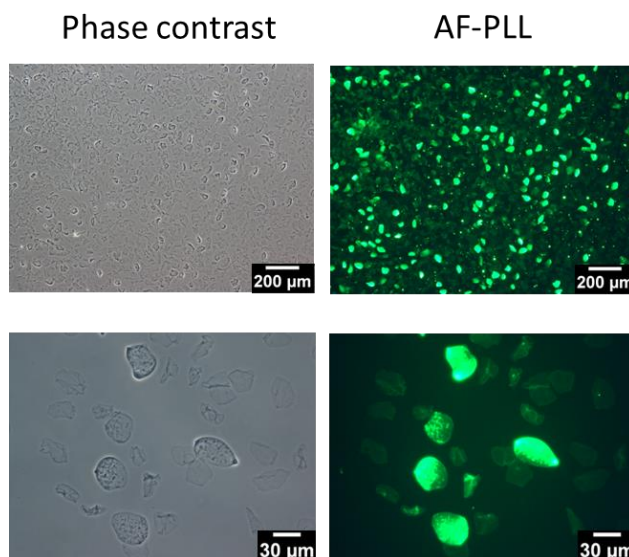


Figure 10 AF-PLL staining of cornified envelopes(CE).

CE prepared from cheek SC was stained with aqueous solution of AF-PLL, followed by observation with a confocal scanning microscope. Phase contrast images (left) and fluorescence images (right). Lower magnifications (upper) and higher magnifications (lower).

第4節 蛍光標識 PLL 染色の角層部位差

角層は採取部位によって角層の性質が異なることが知られている^[22-24]。一般的に頬の角層は露光部として比較的ダメージを受けている角層モデルとして利用され、上腕内側の角層は非露光部として比較的ダメージの少ない健全な角層モデルとして利用されている。そこで本実験では頬部と上腕内側の角層で染色性を比較した。その結果、AF-PLL は頬部において強い染色性を示すことがわかった (Fig. 11)。特に毛穴周囲や角層細胞の形状がいびつなもの、重層剥離様の細胞に対して強い染色性を示した。重層剥離様の細胞については、上腕内側部位でも強い染色性を示すことから角層細胞の構築状態として十分ではない細胞については AF-PLL が染色を示すことがわかった。

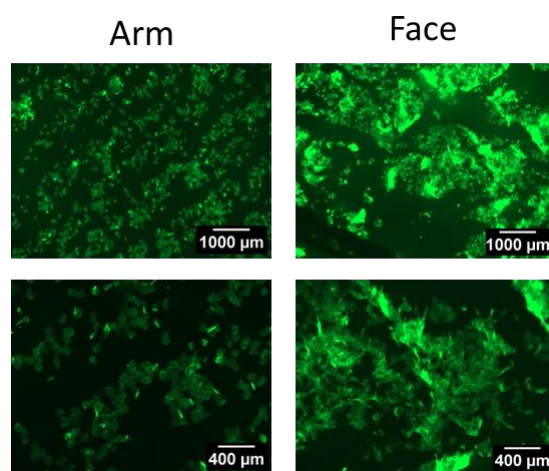


Figure 11 Regional variation of AF-PLL staining of SC.

Tape-stripped SC from inside of the upper arm or cheek was stained with aqueous solution of AF-PLL, followed by observation with a fluorescent microscope. Lower magnifications (upper) and higher magnifications (lower).

第5節 蛍光標識 PLL 染色と皮膚生理指標との相関

次に AF-PLL で強く染色される角層がどのような性状であることを目的に、頬部皮膚を対象とし、皮膚生理指標として角層水分量および TEWL を計測するとともに、テープストリッピング法にて採取した角層を AF-PLL 染色し、皮膚生理指標との関連を調べた。その結果、AF-PLL で強く染色される角層は角層水分量と負の相関を示すこと (Fig. 12)、また TEWL と正の相関を示すことがわかった (Fig. 13)。つまり、蛍光標識 PLL で染色される角層は水分を保持しにくく、バリア機能が低下して水分蒸散しやすい状態の角層であることがわかった。

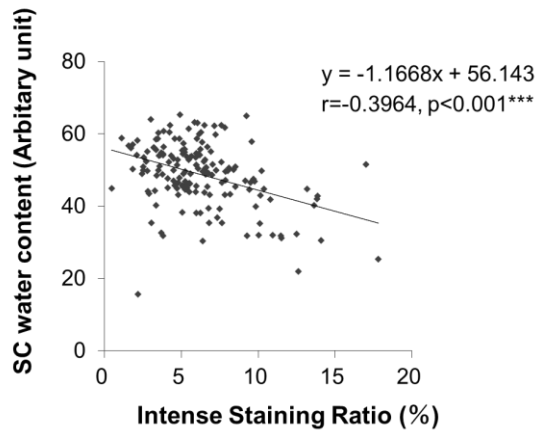


Figure 12 Negative correlation of AF-PLL intense staining ratio and SC water content.

A statistically significant negative correlation was observed (N = 169, Pearson's correlation coefficient $r = -0.3964$, $p < 0.001$).

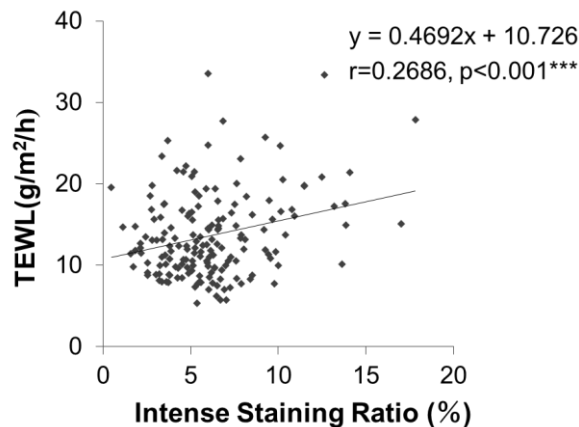


Figure 13 Positive correlation AF-PLL intense staining ratio and TEWL.

A statistically significant positive correlation was observed (N = 169, Pearson's correlation coefficient $r = 0.2686$, $p < 0.001$).

第6節 考察

第1節の結果より、蛍光標識 PLL は角層へ染色性を示すこと、また染色の多様性があることが本研究から見出された。このことから仮説として角層の性状が影響して染色性に影響を与えたことが考えられる。

AF-PLL は非標識 PLL の添加により、角層への染色性が阻害された (Fig. 5) ことから、AF-PLL の吸着には蛍光標識 AlexaFluor488 が影響しているのではなく、PLL が角層へ吸着していることが示唆された。また、pH が酸性付近で染色は阻害され (Fig. 6)、高塩濃度で染色が阻害された (Fig. 7) ことより、PLL の吸着には少なくともイオン結合が関与することが示唆された。NaCl は一般的にイオン結合をキャンセルすることが知られている。ただし、NaCl や pH の影響を角層細胞やケラチンなどのタンパク質が受けていることも考慮される。

さらに、L-Lys モノマーが AF-PLL の角層染色を阻害できないという結果 (Fig. 7) および非標識 PLL による AF-PLL の角層染色阻害の結果 (Fig. 5) から、L-Lys のポリマー形成が角層との相互作用に不可欠であることを示唆した。このことから、疎水性相互作用などの他の機構がそれらに関与しているのではないかという仮説が立てられた。

また、比較的長いアルキル鎖を持つ一部のカチオン性界面活性剤が角層の AF-PLL 染色を効果的に阻害できることを示す結果 (Fig. 8) から、アルキル鎖長が長いカチオン性界面活性剤の方が AF-PLL よりも角層に対する吸着性が高いことも考えられる (Fig. 14)。この AF-PLL の角層染色の阻害様式には、アミン部分の競合阻害や PLL と角層タンパクとの疎水性相互作用の減弱などが含まれる可能性があることが考えられる。

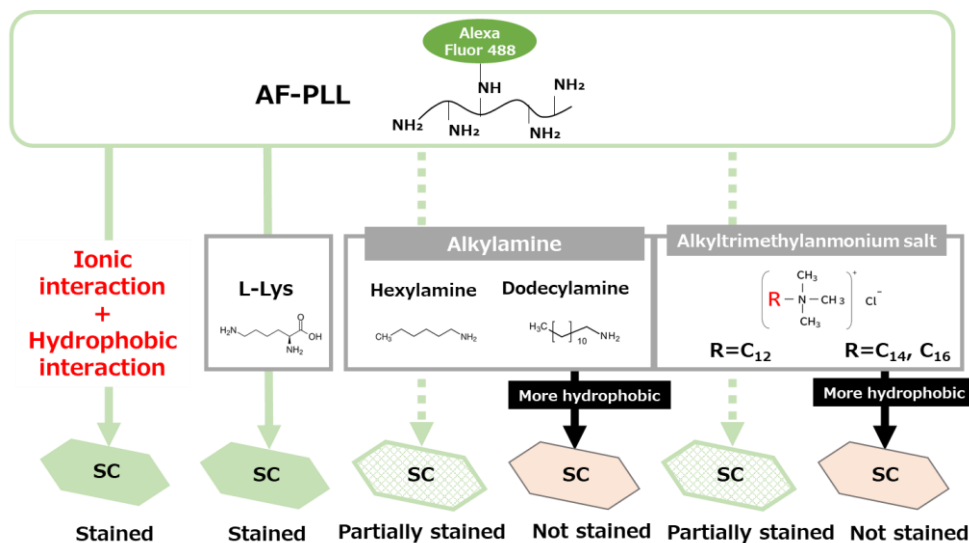


Figure 14 Proposed mechanism of inhibition mode of amine compounds.

L-lysine monomer did not inhibit the staining with AF-PLL, while cationic surfactants with long alkyl chains inhibited the staining with AF-PLL.

次に染色ターゲットを確認したところ、角層の内部まで染色されていたことから角層細胞を主に構成しているケラチンが標的となることが考えられる。さらに CE 単離後の染色結果より CE にも染色性を示すこと、および形状が丸い状態のものがよく染色されることがわかった (Fig. 10)。CE の成熟性については今回検討を行っていないが、先行研究より形状の丸い CE については成熟が進んでいる^[19, 20]ことが考えられる。成熟 CE は周縁のケラチンなどのタン

パク質を巻き込んで足場環境を作ることが知られている^[21]。これら角層細胞内部までの染色および CE の染色から、蛍光標識 PLL の染色標的はケラチンタンパク質および CE を構成するタンパク質など、角層に含まれる多様なタンパク質である可能性が推察された^[19-21]。また CE の周縁には脂質が多く結合していることも知られている^[21]ことから前述のとおりイオン結合性および疎水性相互作用の影響の関与が考えられた。

染色性の部位差に関する検討については、上腕内側の角層に比べて頬の角層が染色されやすい結果となった (Fig. 11)。上腕内側と頬の角層は一般的に非露光部・露光部の角層モデルとして扱われる。そのため、健康な人であれば上腕内側は正常な角層状態であり、頬の角層は上腕内側の角層よりもダメージを受けている角層として捉えることができる。今回の結果から、頬の角層への染色性が高いことから、蛍光標識 PLL はダメージを受けた角層細胞を染色しやすいことが考えられる。

加えて、AF-PLL による角層染色性と皮膚生理指標との関連を調べたところ、角層水分量が低い人ほど染色性が高いという負の相関、TEWL が高いほど染色性が高いという正の相関が認められた (Fig. 12, 13)。ただし、本実験で得られた相関係数が低い点については、測定時期の季節・人による測定回数の頻度が影響していることが考えられ、今後試験条件を統一し、例数を増やす必要がある。しかし、皮膚性状の部位差に関する過去の研究では、上腕よりも額あるいは頬の方が TEWL が高いと報告されている^[26-28]。すなわち、本研究で用いた頬はダメージを受けやすい部位であり、特にバリア機能が損なわれやすい角層であることが推察される。本研究では、頬と上腕内側を比較して角層水分量や TEWL との関連は調べていないが、比較的ダメージを受けていると考えられる頬の角層で角層水分量が低く TEWL が高い結果 (Fig. 12, 13) と、AF-PLL による染色性が高いという結果 (Fig. 11) ととも一致すると考えられる。

角層細胞には脂質二重膜から構成される細胞膜はなく、前述のように CE という膜状の構造を持ち、この CE の成熟が、バリア機能の指標として非常に重要であることが報告されている^[19, 20]。また、細胞内のケラチンの構築状態が悪い場合にも、水分保持能力が落ち、細胞内へ物質が通りやすくなってしまふことが考えられる。これらのことから蛍光標識 PLL で染色されやすい角層においては、水分保持機能が低く、水分蒸散性が高い (バリア機能の低い) 状態の角層であることが考えられた。皮膚生理指標と相関することから、蛍光標識 PLL による角層染色は角層状態を判別する 1 つの手法となることが考えられる。

第7節 小括

AF-PLL が角層状態を判別する手法となりうるかを探索するため、角層への染色性および染色ターゲットの解析、皮膚生理指標との相関について検討を行い、以下の結果を得た。

1. AF-PLL は非標識 PLL の添加により、角層への染色性が阻害されたことから、AF-PLL の吸着には蛍光色素 Alexa Fluor 488 が影響しているのではなく、PLL が角層へ吸着していることが示唆された。
2. AF-PLL は pH が酸性付近で染色が阻害され、高塩濃度で染色が阻害されたことより、PLL の吸着には少なくともイオン結合が関与することが示唆された。
3. AF-PLL は角層を染色し、その染色性には、よく染色される細胞と染色されにくい細胞のような多様性が存在することが明らかとなった。
4. AF-PLL は角層細胞内部、および形状の丸い CE に染色性を示すことから、ケラチンなどのタンパク質がターゲットとなることが考えられた。
5. AF-PLL による角層染色は角層水分量と負の相関、TEWL と正の相関を示すことから、皮膚状態の判別に利用できることが示唆された。

本章では、AF-PLL が角層状態の判別に利用できることを明らかにした。

第2章 蛍光標識 PLL および蛍光標識 anionic Dextran による角層染色挙動の比較

これまで第1章において、AF-PLLが角層を染色すること、その染色性には多様性があること、および皮膚生理指標との相関を示すことが明らかとなった。また、カチオン性高分子としてのPLLが角層タンパクと主にイオン結合を介して相互作用するという染色機構を示すことができた。

そこで、本章では蛍光標識PLLによる角層染色挙動についての機構をさらに解明するために、染色に用いるポリマーの種類を増やすとともに、染色対象についても種類を増やして、それらを比較検討することとした。

まず、染色に用いるポリマーとして、カチオン性のPLLとは反対のアニオン性のポリマーを候補に考えた。そこで本実験ではカチオン性ポリマーであるPLLと反対の性質をもち、ほぼ同等の分子量(3,000)であるアニオン性ポリマーのanionic dextran (aDex)を用いて、蛍光標識PLLによる染色性挙動との比較を行った。また、蛍光標識色素として、Alexa Fluor 488に加えてRhodamineを採用し、Alexa Fluor 488標識PLL (AF-PLL)、Rhodamine標識PLL (RH-PLL)、Alexa Fluor 488標識aDex (AF-aDex)、Rhodamine標識aDex (RH-aDex)の4種のポリマーによる染色挙動を対比させて検討を行った。さらに、一部の実験では、分子量30,000~70,000のFluorescein 蛍光標識 α PLLを利用して、分子量約4,000のAF-PLLによる角層染色挙動と対比させた。

一方、染色対象として、角層(頬、上腕内側)に加えてアルブミン吸着膜も用いて、4種の蛍光標識ポリマーによる角層染色が角層特異的な現象であるか否かを、pH、塩濃度の影響を調べつつ、検討した。さらに、一部の実験においては、角層への化学的ダメージとしてエタノール処理を施し、AF-PLLによる角層染色に対する影響を調べた。

さらには、蛍光標識PLLおよびaDexによる角層の二重染色を試み、角層構築状態を反映する新たな染色法としての可能性を追究した。

第1節 蛍光標識 PLL と蛍光標識 aDex による濃度依存的角層染色

蛍光標識 PLL および蛍光標識 aDex が角層への染色性を示すのか、またその染色性については、蛍光標識色素の構造ではなくポリマー本体である PLL および aDex が関与していることを明らかにするために、2種類の蛍光標識色素を用いて評価した。AF-PLL も Rhodamine 標識 PLL (RH-PLL) も角層に染色を示すことが明らかとなった (Fig. 15 (a, b))。また濃度依存的に角層を染色することも明らかとなった。AF-aDex および RH-aDex についても蛍光標識 PLL と同様の結果を示した (Fig. 15 (c, d))。また興味深いことに、蛍光標識 aDex で染色した角層についても蛍光標識 PLL と同様に、同一人物の同一部位から採取した角層において角層細胞ごとに染色のされやすさの多様性が確認された (Fig. 16)。

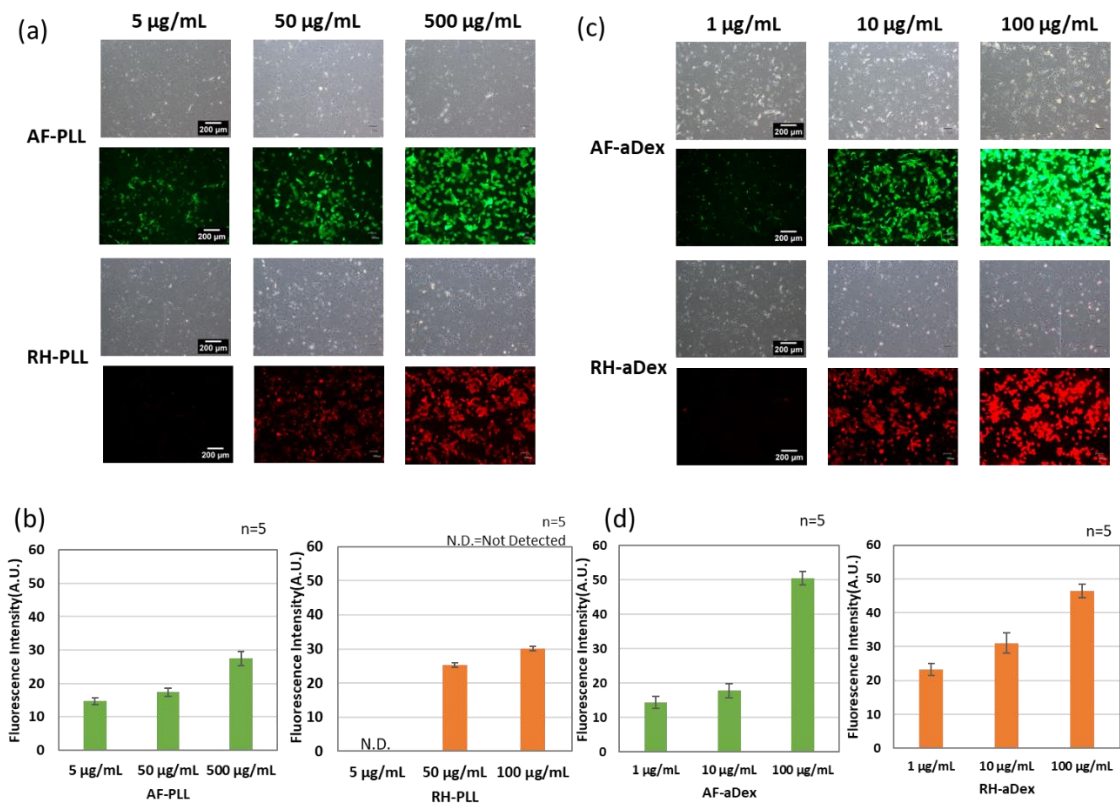


Figure 15 Does response staining of SC with fluorescent PLL and aDex.

(a) Concentration-dependent staining of SC samples from the inside of the upper arm with AF-PLL or RH-PLL. The upper row represents the phase contrast images, and the lower row represents the fluorescence images (Scale bar = 200 µm). (b) Quantification of the fluorescence intensity of AF-PLL or RH-PLL. Mean ± SD (n = 5). (c) Concentration-dependent staining of SC samples from the inside of the upper arm with AF-aDex or RH-aDex. The upper row represents the phase contrast images, and the lower row represents the fluorescence images. (Scale bar = 200 µm) (d) Quantification of the fluorescence intensity of AF-aDex or RH-aDex. Mean ± SD (n = 5).

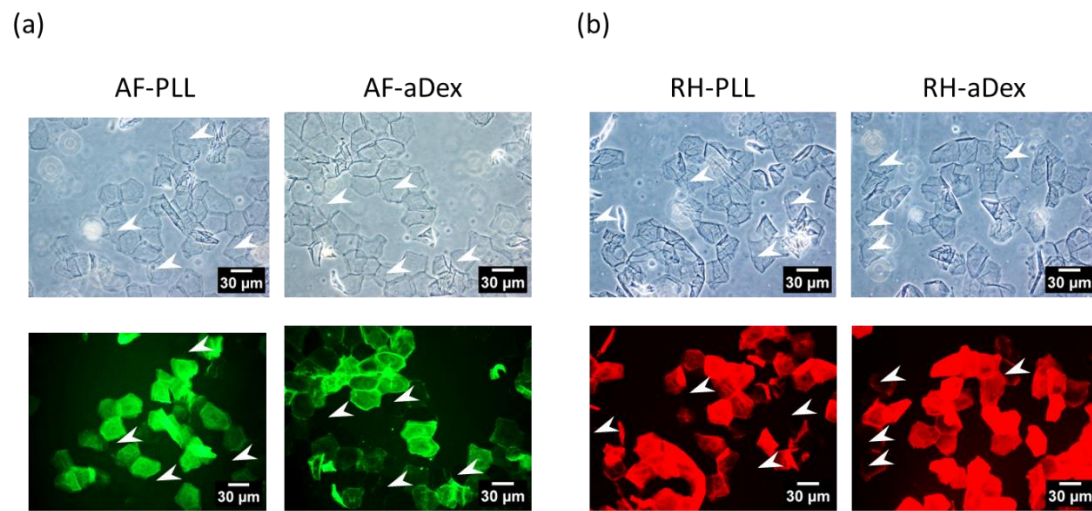


Figure 16 Heterogeneity of corneocyte staining with fluorescent PLL or aDex.

SC samples from the inside of the upper arm were stained with 50 µg/mL AF-PLL, 10 µg/mL AF-aDex (a), 50 µg/mL RH-PLL, or 10 µg/mL RH-aDex (b). The upper row shows the phase contrast images, and the lower row shows the fluorescence images. Arrowheads indicate unstained corneocytes (Scale bar = 30 µm).

第2節 蛍光標識 PLL と蛍光標識 aDex による角層染色の pH 依存性

次に、蛍光標識 PLL および蛍光標識 aDex の角層への染色性の pH 依存性を検討するために pH 条件を変更して染色の検討を行った。結果、カチオン性の AF-PLL、RH-PLL とともに中性～アルカリ性領域で角層に吸着を示し、酸性領域で染色が阻害された (Fig. 17 (a, b))。反対にアニオン性の AF-aDex および RH-aDex は酸性領域のみで染色を示し、中性～アルカリ性領域で染色が阻害された。しかし、AF-aDex のみ pH 9.0 で染色を示す結果となった (Fig. 17 (a, c))。つまり、緩衝液中での PLL のカチオン性、aDex のアニオン性と角層のアミノ酸の電荷が関与して染色性に影響していることが考えられる。

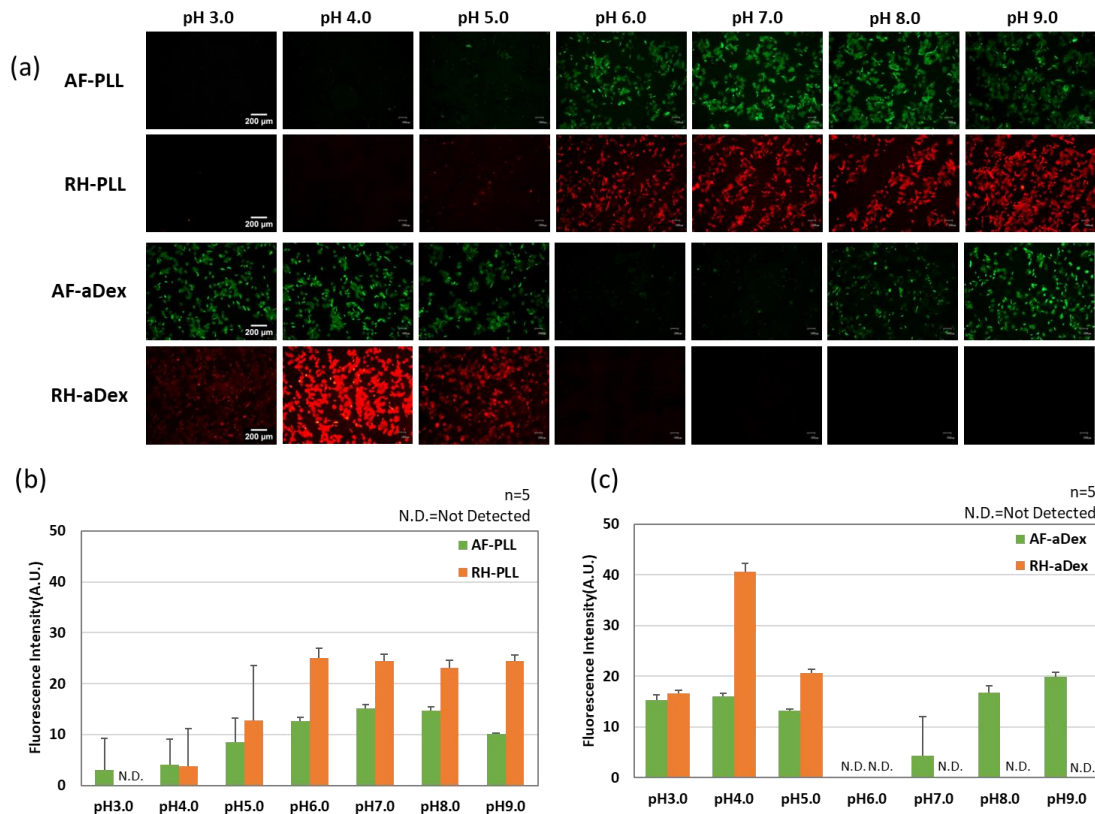


Figure 17 pH dependence of SC staining with fluorescent PLL and aDex.

(a) SC samples from the inside of the upper arm were stained with AF-PLL, RH-PLL, AF-aDex, or RH-aDex in the presence of various pH buffers adjusted to 0.05 mol/L: glycine-HCl buffer (pH 3.0), Na-acetate buffer (pH 4.0, 5.0), Na-phosphate buffer (pH 6.0, 7.0), Tris-HCl buffer (pH 8.0), and glycine-Na buffer (pH 9.0). (Scale bar = 200 μm). (b) Quantification of the fluorescence intensity of AF-PLL or RH-PLL. Mean ± SD (n = 5). (c) Quantification of the fluorescence intensity of AF-aDex or RH-aDex. Mean ± SD (n = 5).

第3節 高塩濃度による角層染色の阻害

蛍光標識 PLL および蛍光標識 aDex の角層への染色性にイオン結合性が関与するかを調査するために、種々の濃度の NaCl を共存させ、その影響について調べた。AF-PLL、RH-PLL ともに塩濃度が高くなるにつれ、染色阻害が確認された (Fig. 18 (a, b))。蛍光標識 aDex についても同様の結果となったが、蛍光標識 PLL よりも低濃度で染色阻害を受けた (Fig. 18 (a, c))。このことから、イオン結合性の寄与が蛍光標識 PLL よりも蛍光標識 aDex のほうが強いことが考えられる。

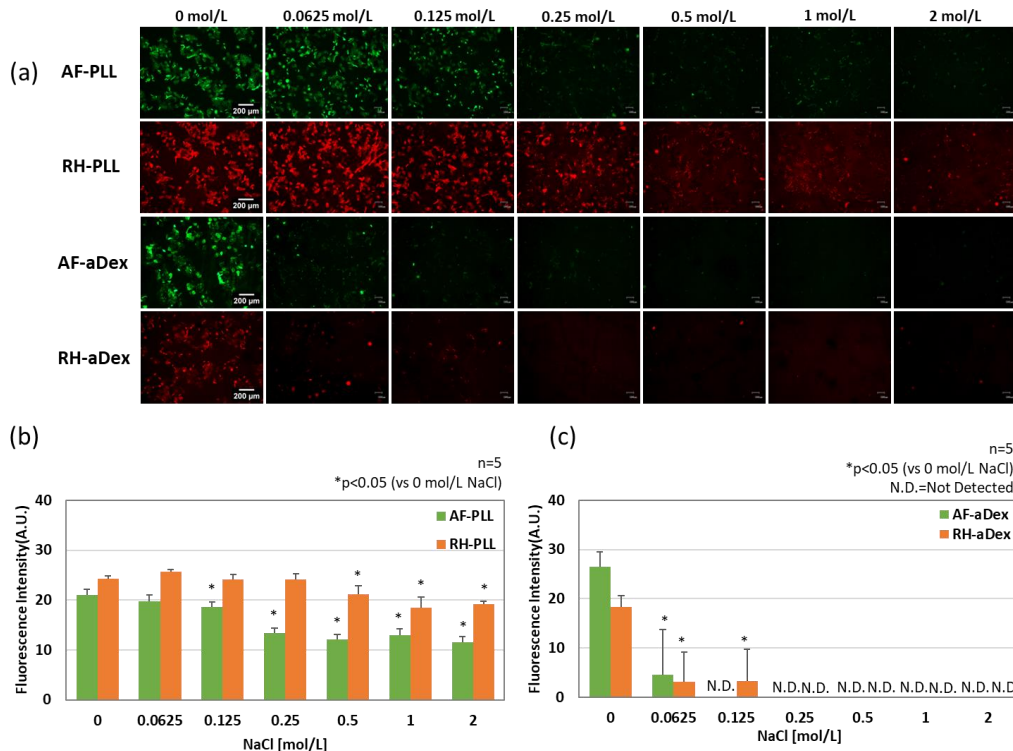


Figure 18 Inhibition of SC staining with fluorescent PLL and aDex at high salt concentration.

(a) SC samples from the inside of the upper arm were stained with AF-PLL, RH-PLL, AF-aDex, or RH-aDex in the presence of various concentrations (0–2 mol/L) of NaCl solution. (Scale bar = 200 μm). (b) Quantification of the fluorescence intensity of AF-PLL or RH-PLL. Mean ± SD (t-test, n = 5). (c) Quantification of the fluorescence intensity of SC stained with AF-aDex or RH-aDex. Mean ± SD (Student's t-test, n = 5). * p < 0.05 (vs 0 mol/L NaCl).

第4節 アルブミン吸着膜に対する染色性の検討

次に、蛍光標識 PLL および蛍光標識 aDex の角層への染色が角層特異的なものかを評価するために、アルブミン吸着膜を用いて検討を行った。その結果、蛍光標識 PLL および蛍光標識 aDex はアルブミン吸着膜にも染色性を示した (Fig. 19)。すなわち、蛍光標識 PLL および蛍光標識 aDex の角層への染色は、必ずしも角層特異的ではないことが示された。また、pH 依存性を調べたところ、PLL は中性～アルカリ性、aDex は酸性領域で染色が強まり、角層に対する染色結果 (Fig. 17) と概ね一致した。しかし、一部の結果は角層に対する結果と異なっていた。すなわち、AF-aDex は、pH がアルカリ性の場合に、角層では染色性を示したが (Fig. 17) アルブミン吸着膜においては吸着を示さなかった (Fig. 19 (c, d))。このことからアルカリ性条件下で AF-aDex が角層に対してのみ染色性を示したのは、アルカリ処理による角層の構築状態が関与していることが示唆された。

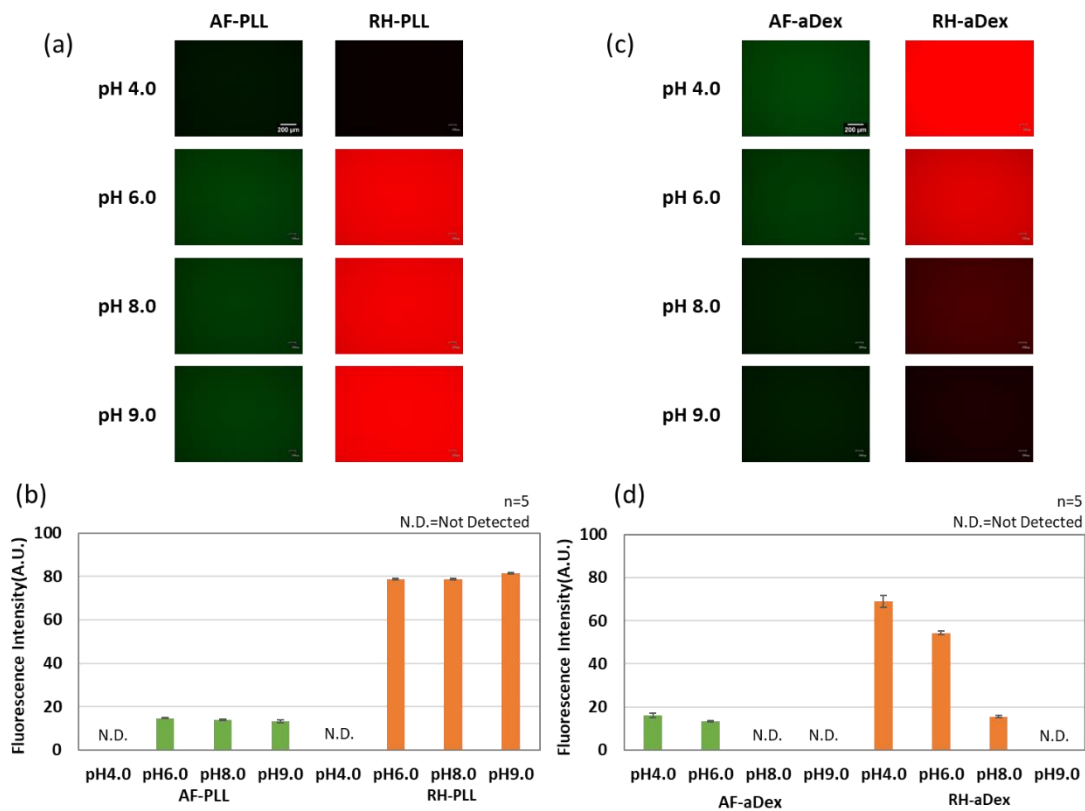


Figure 19 pH-dependent staining of BSA-adsorbed membrane with fluorescent PLL or aDex.

Membranes coated with 1% BSA were stained with fluorescent PLL or aDex at pH 4.0, 6.0, 8.0, or 9.0. (a) Fluorescent images of BSA-adsorbed membranes stained with AF-PLL or RH-PLL. (b) Quantification of the fluorescence intensity of the membranes stained with AF-PLL or RH-PLL. Mean \pm SD (n = 5). (c) Fluorescent images of BSA-adsorbed membranes stained with AF-aDex or RH-aDex. (d) Quantification of the fluorescence intensity of the membranes stained with AF-aDex or RH-aDex. Mean \pm SD (n = 5).

第5節 蛍光標識 PLL と蛍光標識 aDex による角層染色の部位差の検討

蛍光標識 PLL または蛍光標識 aDex による角層染色について、角層部位における染色性の違いの有無について検討した。PLL および aDex とともに上腕内側よりも頬部での染色性が高まった (Fig. 20)。このことから、どちらのポリマーも肌荒れ様の角層細胞の方が染色されやすいことがわかった。さらに角層細胞の形状に着目すると、重層剥離様の細胞についてどちらのポリマーも染色性が高まることが確認された。

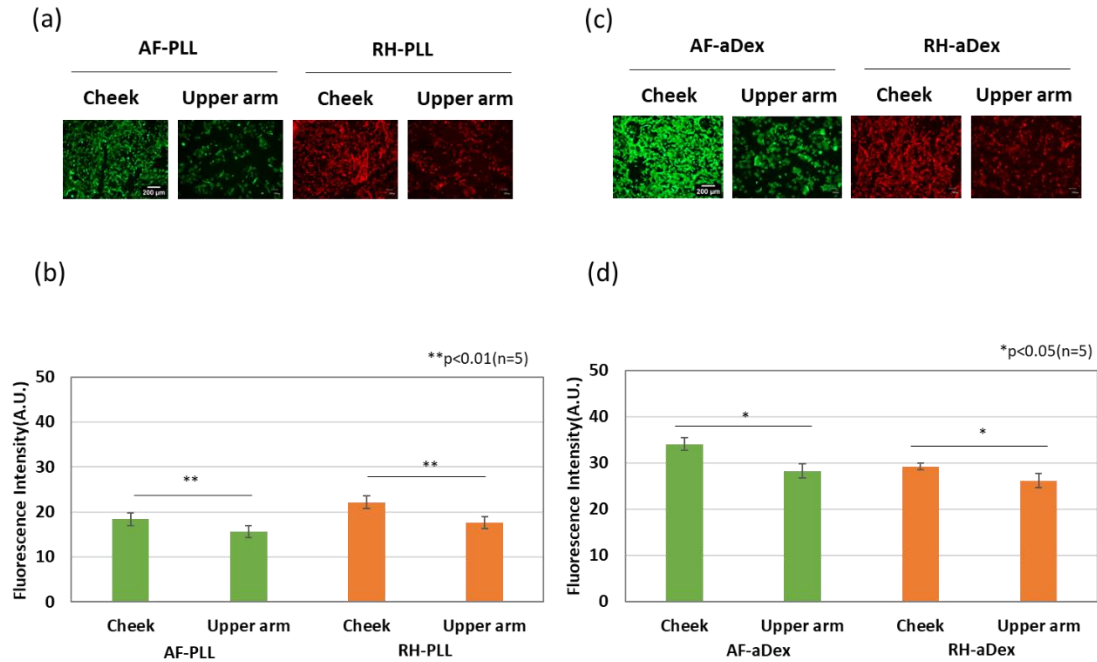


Figure 20 Regional difference in SC staining with fluorescent PLL or aDex.

(a) SC samples from the cheek and inside of the upper arm were stained with 50 μg/mL AF-PLL or RH-PLL. (Scale bar = 200 μm). (b) Quantification of the fluorescence intensity of AF-PLL or RH-PLL. (c) SC samples from the cheek and inside of the upper arm were stained with 10 μg/mL AF-aDex or RH-aDex. (Scale bar = 200 μm). (d) Quantification of the fluorescence intensity of AF-aDex or RH-aDex. Mean ± SD (Student's t-test, n = 5) * p < 0.05, ** p < 0.01.

第 6 節 蛍光標識 PLL および蛍光標識 aDex による角層の二重染色

これまでの研究で、蛍光標識 PLL および蛍光標識 aDex による角層の染色は pH や塩濃度の影響を受け、角層の染色に対して異なる性質をもつことが明らかとなった。そこで、被験者 5 名に協力いただき、RH-PLL および AF-aDex を用いて頬の角層の二重染色を検討した。結果として両ポリマーで染色される細胞、RH-PLL のみで染色される細胞、AF-aDex のみで染色される細胞、またどちらのポリマーにも染色されない細胞の 4 分類に分かれるという角層細胞の多様性が認められた (Fig. 21)。さらに、被験者毎の染色性を比較してみると、その 4 分類の割合については被験者毎に変化する傾向にあった (Fig. 22)。

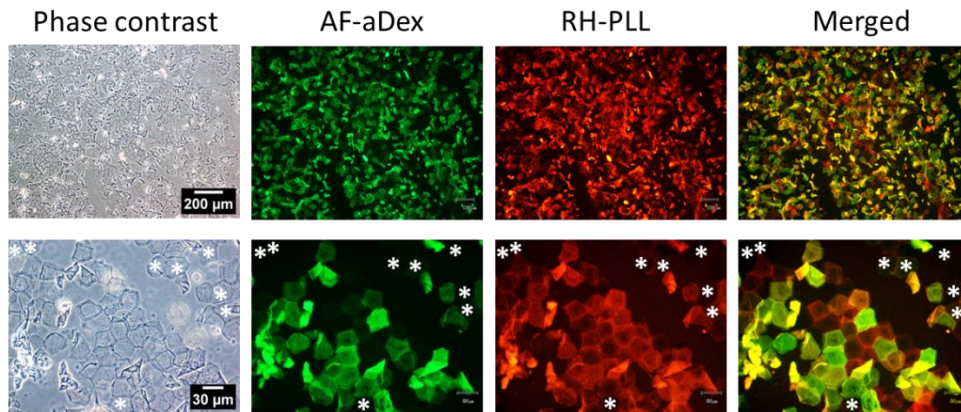


Figure 21 Double Staining of the SC with RH-PLL and AF-aDex.

SC samples from the inside of the upper arm were sequentially stained with RH-PLL and AF-aDex. From the left: phase contrast images, AF-aDex stained SC, RH-PLL stained SC, and merged images. *Unstained corneocytes (Scale bar = 200 µm in the upper row, 30 µm in the lower row).

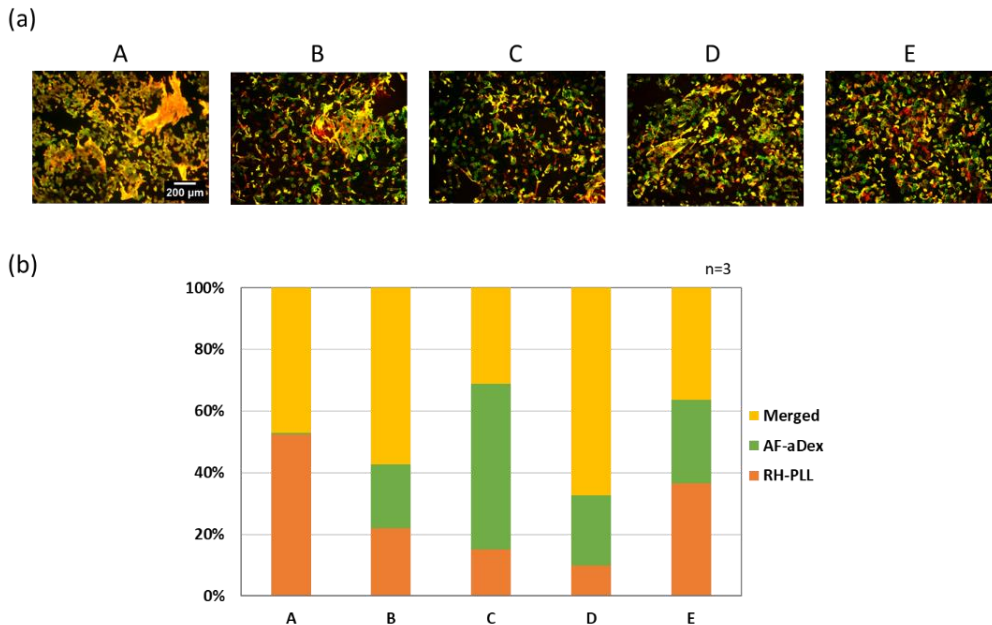


Figure 22 Heterogeneity of SC double staining with RH-PLL and AF-aDex.

SC samples from the cheek were sequentially stained with RH-PLL and AF-Dextran. (a) Merged images of samples stained with AF-aDex and RH-PLL. (Scale bar = 200 µm). (b) Proportion of the SC stained with AF-aDex, SC stained with RH-PLL, and SC stained with both AF-aDex and RH-PLL. Data were expressed as mean (n = 3). A, B, C, D, and E indicate each subject.

第7節 エタノールによるケラチン構築状態の乱れの染色性への影響

角層は有機溶媒処理や SDS 処理、またエタノール処理などで角層の構築状態が乱れることが報告されている。Acetone / Ether 処理では、バリア機能の低下 (水分蒸散量の増加) 傾向、および角層水分含量の有意な低下が報告されており^[29]、Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 処理では、角層の細胞間脂質マトリックスにあるさまざまな規則構造のうち、長周期ラメラ構造の繰り返し周期性を崩壊させることが知られている^[30]。またエタノール処理では、角層のケラチン構築状態およびラメラ構造を壊すことが報告されている^[31]。そこでどのようなダメージによって蛍光標識 PLL や蛍光標識 aDex の染色性の強弱が生まれるのか、そのメカニズム解析のために、角層ダメージモデルの作製を検討した。

角層ダメージモデルとして利用される Acetone / Ether 処理および SDS 処理、エタノール処理をテープストリッピング法にて採取した角層試料に施し、RH-PLL および AF-aDex による染色に及ぼす影響を検討した。Acetone / Ether 処理では角層採取に用いる粘着テープ (角質チェッカー) の糊部が溶解されてしまい、評価自体が困難であった。SDS 処理では残存する SDS のアニオン性の性質が影響し、蛍光標識 PLL による染色性が増す結果となったため角層の性状についての影響を調べるのが困難と判断した。エタノール処理を施した角層に関しては、微弱な染色挙動の変化が見られた。そこでエタノール処理後に減圧乾燥を行い、染色性を評価したところ、エタノールの濃度依存的に RH-PLL および AF-aDex による角層の染色が強まることが確認された (Fig. 23,)。さらに、頬の角層と上腕内側の角層と比較した際においても、エタノール処理により、角層細胞への染色が亢進されることが明らかとなった (Fig. 24)。

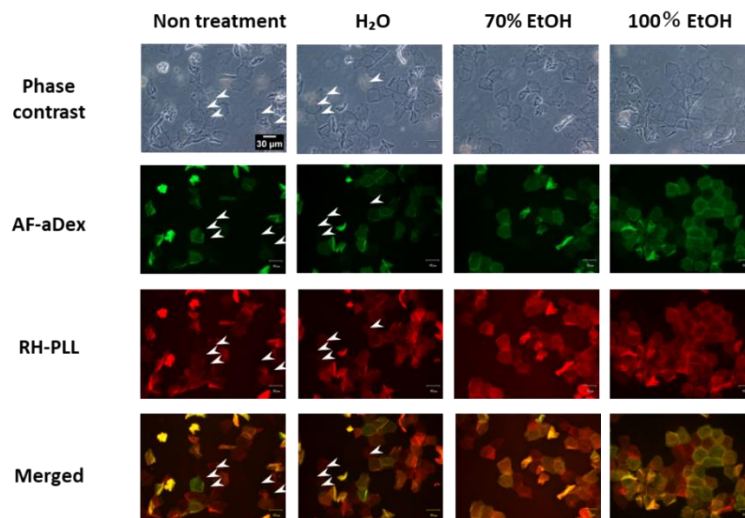


Figure 23 Enhanced staining of ethanol-pretreated SC with RH-PLL and AF-aDex.

SC samples from the inside of the upper arm were treated with deionized water, 70% ethanol, or 100% ethanol for 1 h, then dried in vacuo, and finally stained sequentially with AF-aDex and RH-PLL. Arrowheads indicate unstained corneocytes. (Scale bar = 30 μ m).

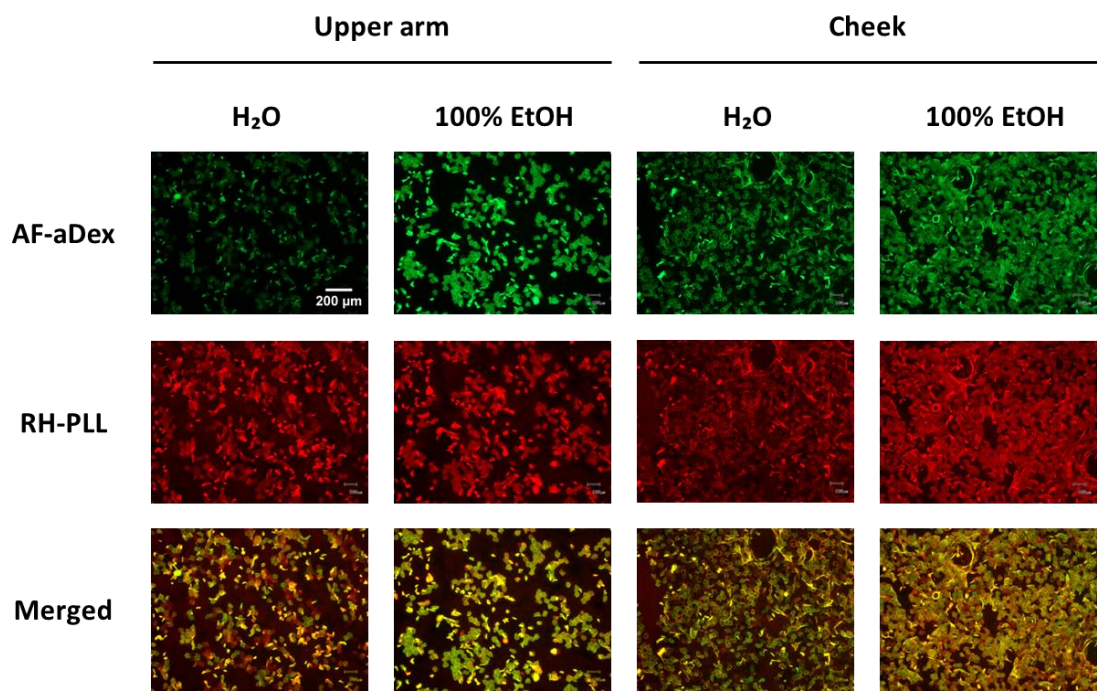


Figure 24 Enhanced staining of ethanol-pretreated SC with RH-PLL and AF-aDex.

SC samples from the cheek or the inside of the upper arm were treated with deionized water or 100% ethanol for 1 h, then dried in vacuo, and finally stained sequentially with AF-aDex and RH-PLL. (Scale bar = 200 μm). Enhanced staining occurred in ethanol-pretreated SC samples from the cheek.

第8節 高分子 PLL による染色の検討

これまでの検討で分子量約 4,000 の AF-PLL を用いて角層染色を行ってきたが、分子サイズの影響を調べるために、より高分子の蛍光標識 α PLL (分子量 30,000-70,000) を用いて比較した。

これらを用いて、前節にて用いたエタノール処理角層を染色した結果を Fig. 25 に示した。これまでに確認してきたように、AF-PLL は、角層を染色しその染色性においては多様性が見られた。しかし高分子の Fluorescein- α PLL では大部分の角層は染色されず、一部形状が折りたたまれているような角層のみが染色されていることが確認された。また、Fluorescein- α PLL では、エタノール処理角層における染色亢進は認められなかった。

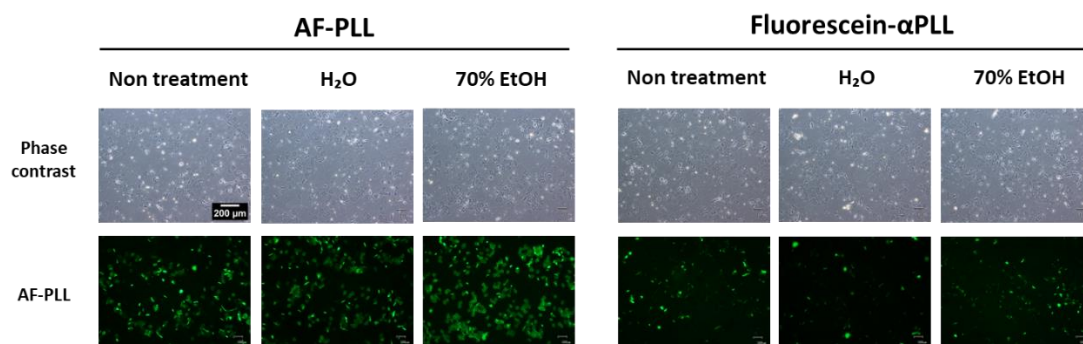


Figure 25 Effect of the molecular size of fluorescent polymers on SC staining.

SC samples from the inner side of the upper arm were pretreated with deionized water or 70% ethanol, followed by staining with AF-PLL (approx. 4,000 Da) or Fluorescein- α PLL (40,000–70,000 Da). Upper and lower panels show phase contrast images and fluorescence images of cells stained with AF-PLL or Fluorescein- α PLL, respectively. (Scale bar = 200 μ m).

第9節 考察

本章では、蛍光色素が異なる AF-PLL および RH-PLL、AF-aDex および RH-aDex を用いて角層染色挙動を比較検討した。いずれの蛍光標識ポリマーも濃度依存的に角層への染色性を示した。また蛍光色素が異なっても角層への染色性を示したこと、さらにその染色性の多様性が認められたことから、蛍光標識 PLL および蛍光標識 aDex いずれのポリマーにおいても、蛍光色素ではなくポリマー本体が角層と相互作用して角層への染色性に寄与していることが確認された (Fig.15)。

角層の主成分は不溶性ケラチン線維であり、その基本成分はケラチン I 型および II 型ポリペプチドからなるヘテロ二量体である^[32]。このケラチンポリペプチドを構成するアニオン性、カチオン性、脂肪族、芳香族側鎖を含むさまざまなアミノ酸残基がポリマーの吸着に参与する可能性がある。したがって、角層 (固相) とポリマーの間でイオン性相互作用および/または疎水性相互作用が発生する可能性が考えられた。

そこで次に、染色挙動の pH 依存性に関する結果から、角層とポリマーとの間の相互作用について考察する。本研究で用いた種々の pH 緩衝液中では PLL のカチオン性、aDex のアニオン性と角層タンパク質のアミノ酸の電荷が相互作用して染色性に影響していることが考えられる。結果として、蛍光標識 PLL が酸性条件下ではなく、中性からアルカリ性 pH 条件下で角層を染色できることが明らかとなった (Fig. 17 (a, b))。対照的に、蛍光標識 aDex は、中性からアルカリ性条件下ではなく、酸性 pH 条件下で角層を染色する結果となった (Fig. 17 (a, c))。酸性 pH 条件下では、蛍光標識 PLL は正に帯電する傾向があり、角層のタンパク質もアニオン化の抑制によって正に帯電する傾向があるため、蛍光標識 PLL と角層タンパク質の間に反発が生じ、染色されなかったと考えられる。同様に、アルカリ性 pH 条件下では、蛍光標識 aDex は負に帯電する傾向があり、角層タンパク質もカチオン化の抑制によって負に帯電する傾向があり、蛍光標識 aDex と角層タンパク質の間に反発が生じ、染色されなかったと考えられる。これを Fig. 26 に模式図として示す。ポリマーと固相の間のこれらの吸着プロファイルは、アルブミン吸着膜を使用した染色の結果によって裏付けられた (Fig. 19)。さらに高塩濃度における影響においても、蛍光標識 PLL および蛍光標識 aDex による染色は、いずれも塩濃度が高くなるにつれ阻害された (Fig. 18)。

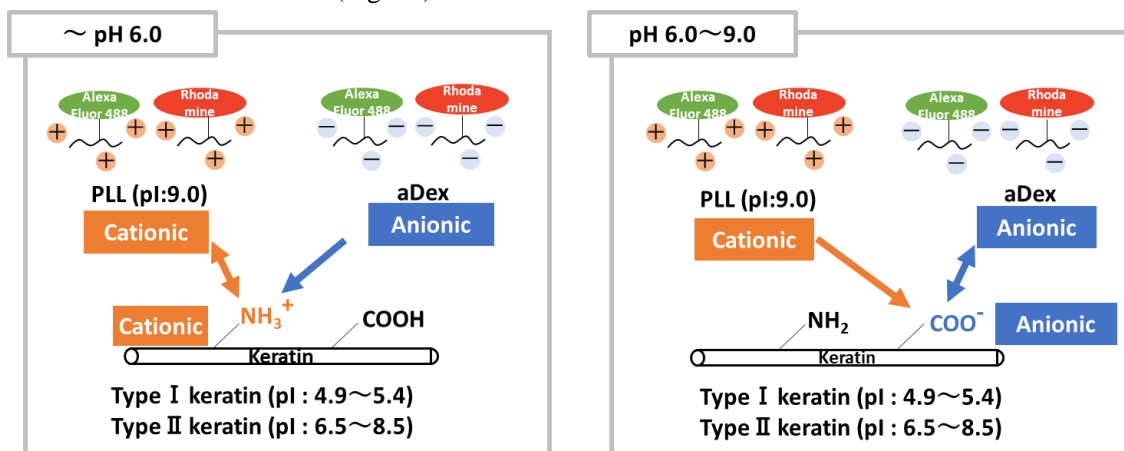


Figure 26 Assumption of effect of ambient pH on SC adsorption of cationic and anionic polymers.

Staining of the stratum corneum with fluorescent PLL and fluorescent aDex is mediated by ionic interaction between the polymers and stratum corneum proteins as a solid phase, depending on ambient pH.

これらのことから蛍光標識 PLL および蛍光標識 aDex の角層への染色にはイオン結合が関与していることが明らかとなった。興味深いことに、蛍光標識 aDex においては、蛍光標識 PLL よりも低濃度の塩で阻害を受けたことから角層タンパクとの相互作用にイオン結合がより強く関与していることが考えられる。つまり、PLL と角層タンパクとの相互作用には、イオン結合も関与するが、PLL の炭化水素鎖に由来する疎水性相互作用も少なからず寄与していると推察される。

しかし、角層へのポリマーの吸着とアルブミン吸着膜へのポリマーの吸着の間にはいくつかの異なる点があった。まず、中性 pH 条件下では、蛍光標識 PLL は角層とアルブミン吸着膜の両方に吸着されたが、蛍光標識 aDex はアルブミン吸着膜のみに吸着された (Fig. 19)。蛍光標識 PLL と蛍光標識 aDex の吸着プロファイルの違いは、固相の等電点 (pI) の違いによって説明される可能性が考えられた。角層は I 型ケラチン (pI 4.9~5.4)、II 型ケラチン (pI 6.5~8.5) の 2 つのタンパク質で構成されるが、BSA は 1 つのタンパク質で構成され、pI は 5.4 である。また、pH 8~9 では、AF-aDex はアルブミン吸着膜を染色しなかったが (Fig. 19)、角層を染色した (Fig. 17)。これに関してはポリマーと固相 (角層タンパク質あるいは BSA) 間のイオン相互作用ではなく、角層がアルカリ条件下で膨潤する^[30]可能性があることを考慮する必要があり、ケラチン線維構造などの角層構築状態が、アルカリ条件下で観察される染色特性変化に関与している可能性が考えられた。

さらに角層の部位差を比較した実験では、いずれのポリマーとも露光部である頬の角層の方がより染色を示す結果となった (Fig. 20)。一般的に上腕内側よりも頬の方が、紫外線などのダメージを受けやすいことが知られている^[23]ことから、両ポリマーともダメージや角層の構築状態が乱れている場合により強く染色することが考えられた。

次に蛍光標識 PLL および蛍光標識 aDex を用いた角層の二重染色について考察する。被験者 5 名に協力いただいた角層の二重染色の結果では、①カチオン性の PLL、アニオン性の aDex の両ポリマーで染色される角層細胞、②PLL のみで染色される角層細胞、③aDex のみで染色される角層細胞、④どちらのポリマーにも染色されない角層細胞の 4 種類が存在するという多様性が示された (Fig. 21)。さらに、被験者毎の染色性を比較してみると、その 4 分類の割合については被験者毎に異なる傾向にあった (Fig. 22)。ただし今回の検討では皮膚生理指標との関連を同実験で行っていないため、どのような皮膚の性状だったかは定かではない。しかし、角層の構築状態によって二重染色の挙動が変化する、すなわち、角層構築状態が乱れていると両ポリマーで二重染色される角層細胞が増えるのではないかと考えられた。

興味深いことに、蛍光標識 PLL および蛍光標識 aDex による角層の二重染色の観察像から角層細胞の形状を詳細に観察すると、形状がやや不定形な角層細胞が、両ポリマーで染色される場合が多いことがわかった。このことから、角層が分化する段階で角層形成が不十分である場合には角層細胞内部のケラチン構築状態が不十分であり、どちらのポリマーも角層細胞内部にまで浸透して染色されやすくなっていることが考えられる。さらに、角層は水への長時間の浸漬により水によって膨潤すること^[33]、また高齢者および乾癬の疾患を持つ方の角層では、健康者の角層よりも自由水の出入りが多いことが報告されている^[34]。これらの報告から、両ポリマーで染色される角層は水溶性物質の侵入が容易である可能性が考えられ、さらに両方のポリマーが粗構造のケラチン線維を持つ角層細胞に容易に浸透する可能性が示唆された (Fig. 27)。

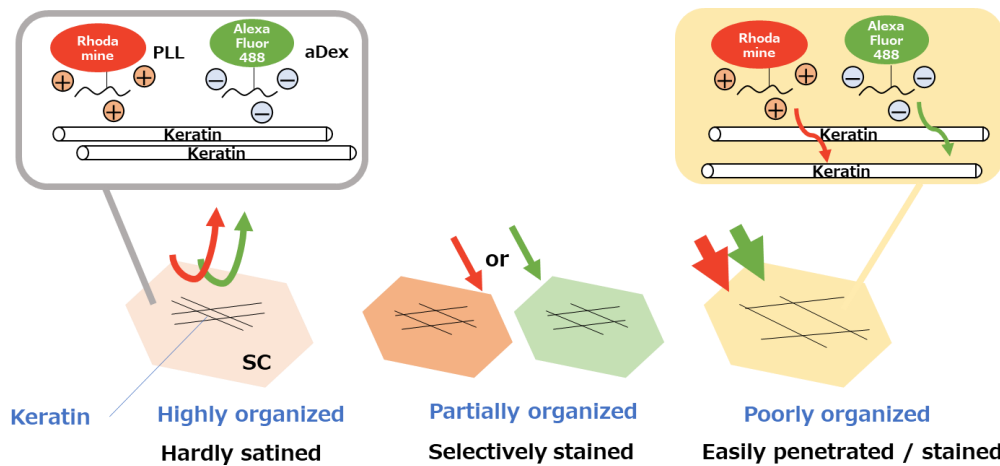


Figure 27 The state of keratin structure organization influences the penetration of both polymers.

Both polymers cannot penetrate into the stratum corneum with highly organized keratin structure. On the other hand, both polymers can easily penetrate into the stratum corneum with poorly organized keratin architecture. Staining profiles with fluorescent PLL and/or fluorescent aDex may depend on exposed basic or acidic amino acid residues in three-dimensional structure of keratins in the stratum corneum.

この仮説は、染色されていない角層細胞の存在によっても裏付けられており、これはポリマーの角層細胞への侵入を妨げる緊密に構造化されたケラチン線維と関連している可能性がある。さらに、蛍光標識 PLL と蛍光標識 aDex の両方を用いた上腕の内側からの角層サンプルよりも、頬からの角層サンプルの方が効果的な染色を示している (Fig. 20) ことは、この仮説を裏付けている。なぜなら、頬の角層は一般に未熟な角層細胞を多く含むと報告されており^[19, 35-37]、さらに、エタノールで前処理した角層の染色の増強 (Fig. 23) から、この仮説が裏付けられた。しかし、これらについては電子顕微鏡等でのケラチン構築状態の観察が必要であり、今後の研究が期待される。しかし、ケラチンの構築状態を水分子の存在を変えずに無固定・無染色で観察できる手法は現状、Cryo-TEM (CEMOVIS) のみであり^[38]、この設備を使用できる研究機関は少なく、ケラチンの構築状態については今後の研究の余地がある。

また各ポリマーのみで染色される角層細胞、および両ポリマーで染色されない角層細胞においては、染色される理由については本研究では十分に明らかにはならなかった。しかし、蛍光標識 PLL のみで染色される角層細胞、および両ポリマーで染色される角層細胞に関してはイオン結合性および疎水性相互作用が影響しており、その角層性状については第一章の研究から角層水分量が少なく、TEWL が高い (Fig. 12, 13) ことが考えられる。また蛍光標識 aDex のみで染色される角層細胞においてはイオン結合性が高く、多くのヒドロキシ基を持つ多糖類であるデキストランの性質から水に馴染みやすいことが考えられる。よって角層水分量が比較的高い角層細胞が染色されるのではないかと考えられるが、定かではない。また前述したように、ケラチン構築状態および電荷の影響も想定され、さらにはケラチン分子の立体構造の影響も受けると考えられる。すなわち、ケラチン分子のリジンやアルギニンなどの塩基性アミノ酸残基が外側に露出すると aDex で染色されやすく、グルタミン酸やアスパラギン酸が露出すると PLL で染色されやすくなる可能性も考えられる。両ポリマーで染色されない細胞に関しては、角層構築状態が良好であり角層水分量やバリア機能が十分であるため両ポリマーとも浸透できないと推察される。これらの追求に関しては、肌状態 (角層水分量、TEWL) を測定後に角層を採取して二重染色をすることで、関連性をみることで明らかになる可能性があり、今後の研究が期

待される。今後の研究により、これまでの角層染色で形状のみの判別などを行っていた BG 染色などでは得られない角層情報が得られることが考えられ、この二重染色方法による角層状態の判別方法の発展が期待される。

次に角層のダメージが蛍光標識 PLL および蛍光標識 aDex の二重染色での染色性に及ぼす影響について考察する。興味深いことにエタノールで前処理した角層において RH-PLL および AF-aDex による染色性が強まることが明らかとなった (Fig. 24)。エタノール処理は角層のケラチン構築状態およびラメラ構造を壊すことが知られている^[31]。このことから、前述したような角層形成段階の内的要因による角層ケラチンの構築状態の乱れだけでなく、エタノールなどの外的要因によって角層ケラチンの構築状態が乱れても、蛍光標識 PLL や蛍光標識 aDex により角層が染色されやすくなる可能性が考えられた。さらに、エタノール処理による角層染色の増強は、AF-PLL よりも分子サイズの大きい Fluorescein- α PLL による角層染色の場合には観察されなかった (Fig. 25)。 α PLL は ϵ -アミノ基側鎖を持つ点で PLL (ϵ -poly-L-lysine) とは異なるものの、いずれもカチオン性ポリマーで、Fluorescein- α PLL と AF-PLL の主な違いは分子サイズである。つまり、本結果は蛍光標識 PLL が、乱れたケラチン線維構造を有する損傷した角層細胞と、よく組織化されたケラチン線維構造を持つ正常な角層細胞を区別できることを示唆しており、ケラチン線維の構築状態が蛍光標識 PLL および蛍光標識 aDex による角層染色性に関与していることを間接的に証明していると考えられる。しかし、損傷した角層細胞の構造変化と蛍光標識 PLL 染色性との関連を明らかにするには、さらなる研究が必要である。

最後に、高分子 (分子量 30,000-70,000) の Fluorescein- α PLL を用い、AF-PLL による角層染色と比較したところ、Fluorescein- α PLL では角層はほとんど染色されないことが明らかとなった。このことから、分子量約 3,000-4,000 蛍光標識 PLL は角層細胞へ浸透し結果的に角層を染色しうるが、Fluorescein- α PLL においては角層のバリア機能および分子サイズによる立体障害によって角層細胞へ浸透しにくいことが考えられる。また本検討で用いた PLL はポリマー鎖のペプチド結合様式が異なっており、 ϵ PLL は α -アミノ基を側鎖に有するのに対して α PLL は ϵ -アミノ基を側鎖に有することから、角層染色性には立体障害の可能性も多少は考えられる。なお、予備的検討では非標識 α PLL (分子量 1,000-5,000, 4,000-15,000, 30,000-70,000) 共存下で蛍光標識 PLL の染色が α PLL の濃度依存的に染色が阻害されることが確認された (未発表データ)。このことから、 ϵ PLL と α PLL の構造は角層への吸着に大きく影響はしていないと考えられる。これらのことより、角層染色において分子量約 3,000-4,000 の蛍光標識 PLL および蛍光標識 aDex を用いることは、角層の形成不全やダメージ状態を染色性により評価できるという点で、妥当であると考えられた。

第 1 章では、角層の水分量やバリア機能などの皮膚状態を反映し、蛍光標識 PLL による染色に基づく新しい角層の評価法を確立した^[18]。本章では蛍光標識 PLL と蛍光標識 aDex による二重染色から、皮膚の状態に関する有用な追加情報が得られた^[39]。ただし、皮膚の状態に基づいて個別化されたスキンケアの開発をサポートするために、蛍光標識 PLL と 蛍光標識 aDex による角層の二重染色の基礎となるメカニズムはまだ十分には解明されていない。また、本章で提案した二重染色と、CE 成熟度や不全角化などの既知の角層染色との比較を行い、地域差や深さ依存性の変化などを明らかにすることが今後の課題である。

第10節 小括

カチオン性の蛍光標識 PLL とアニオン性の蛍光標識 aDex を用いて、それぞれの角層への染色性およびそのメカニズムを探索するため、pH 依存性および塩濃度の影響について検討を行った。さらに、角層の部位差における染色性の違いを明らかにすることで、どのような角層状態で染色されやすいかを検討し、以下の結果を得た。さらに、蛍光標識 PLL および aDex が角層状態を判別する手法となりうるかを探索するため、両ポリマーを利用した二重染色の検討、エタノール処理による角層ダメージ後の染色性の変化の検討、および高分子 α PLL を用いた染色との比較検討を行い、以下の結果を得た。

1. 蛍光標識 PLL および蛍光標識 aDex は角層を染色し、どちらもポリマー濃度が高いほど角層を染色することがわかった。さらに、至適濃度では角層のなかで染色される細胞と染色されにくい細胞に大別されることが明らかとなった。
2. 様々な pH 緩衝液下での染色においては、蛍光標識 PLL は中性～アルカリ性領域で染色を示し、蛍光標識 aDex は酸性領域で染色を示すことが明らかとなった。これは周辺の pH において角層タンパク質を構成するアミノ酸側鎖と各ポリマーのイオン性が変化し、その結果としてイオン結合性が影響を受けたことが原因と考えられる。
3. 高塩濃度条件下において、蛍光標識 PLL と蛍光標識 aDex の角層染色が阻害されることが明らかとなった。つまり、蛍光標識 PLL および蛍光標識 aDex による角層染色は、イオン結合が関与していると考えられる。さらに、蛍光標識 PLL よりも蛍光標識 aDex の方が低塩濃度でも染色が阻害されたことから、蛍光標識 aDex の方が、よりイオン結合性の寄与が高いことが考えられた。
4. アルブミン吸着膜の実験により、蛍光標識 PLL および蛍光標識 aDex がアルブミン吸着膜を染色したことから、両ポリマーは角層以外のタンパク質も染色すること、すなわち角層タンパクに対する特異性は低いことが明らかとなった。さらに、アルブミン吸着膜での pH における実験においては、蛍光標識 aDex のアルカリ性条件下の結果が角層での結果と異なったことから、角層ケラチン線維構築状態も染色性に関与していることが考えられた。
5. 角層の部位差 (頬・上腕内側) の検討では、蛍光標識 PLL および蛍光標識 aDex の両ポリマーとも頬の方が染色性は高くなる結果となった。つまり、比較的ダメージを受けている角層の方が両ポリマーの染色を受けやすいことが考えられた。
6. 蛍光標識 PLL および蛍光標識 aDex を用い、角層を二重染色することで以下の4パターン

の角層細胞が存在することが明らかとなった。さらにこれには個人差があり、それぞれ染色される細胞の割合は異なることが明らかとなった。

- ①カチオン性の PLL、アニオン性の aDex の両ポリマーで染色される角層細胞
- ②PLL のみで染色される角層細胞
- ③aDex のみで染色される角層細胞
- ④両ポリマーで染色されない角層細胞

7. エタノールによりケラチン構築状態を乱した場合には、蛍光標識 PLL および蛍光標識 aDex の染色性が高まることが明らかとなった。

8. 高分子 Fluorescein- α PLL を用いた染色性評価においては角層が染色されないことから、分子量約 4,000 の PLL を用いることが蛍光染色による角層状態の評価に適していることが明らかとなった。

本研究では、蛍光標識 PLL および蛍光標識 aDex を用いることで、角層の状態によってイオン性やケラチン構築状態の違いにより両ポリマーの染色性に変化が起こることを明らかにした。またこれらの結果より、蛍光標識 PLL および蛍光標識 aDex の角層のダメージ状態の判別に利用できる可能性があることを明らかにした。

結論

本研究では、蛍光標識 PLL を用いることで角層の性状を評価できること、および蛍光標識 PLL および蛍光標識 aDex を用いることで新たな角層状態の判別ができる可能性を見出した。

1. 蛍光標識 PLL は角層を染色し、その染色性にはよく染色される細胞と、染色されない細胞が存在するという多様性が認められた。さらに蛍光標識 PLL は角層細胞内部、および CE にも染色性を示すことから、ケラチンなどのタンパク質がターゲットとなることが考えられた。蛍光標識 PLL は角層水分量と負の相関、TEWL と正の相関を示すことから、皮膚状態の判別に利用できることが示された。
2. 蛍光標識 PLL および蛍光標識 aDex は角層を染色し、染色される角層細胞と染色されにくい角層細胞に大別された。高塩濃度条件下において、蛍光標識 PLL と蛍光標識 aDex の角層染色が阻害されることから、これらの染色には一部イオン結合が関与していると考えられた。
3. 角層に対して蛍光標識 PLL は中性～アルカリ性領域で染色を示し、蛍光標識 aDex は酸性領域で染色を示した。さらにアルブミン吸着膜においても同様の染色結果を示した。しかし蛍光標識 aDex のアルカリ性条件下の結果のみ角層の結果と異なり、この乖離から、角層ケラチンの立体構造も染色性に関与していることが考えられた。
4. 角層の部位差 (頬・上腕内側) の検討により、蛍光標識 PLL および蛍光標識 aDex の両ポリマーとも頬の方が染色性は高くなる結果となった。つまり、比較的ダメージを受けている角層の方が両ポリマーの染色を受けやすいことが考えられた。
5. 蛍光標識 PLL および蛍光標識 aDex を用い、角層細胞を二重染色することで以下の 4 パターンに分類可能であった。さらにこれには個人差があり、それぞれ染色される細胞の割合は異なっていた。
 - ①カチオン性の PLL、アニオン性の aDex の両ポリマーで染色される角層細胞
 - ②PLL のみで染色される角層細胞
 - ③aDex のみで染色される角層細胞
 - ④両ポリマーで染色されない角層細胞
6. エタノール処理により角層ケラチン構築状態を乱した場合には蛍光標識 PLL および蛍光標識 aDex の染色性が高まることが明らかとなった。さらに、蛍光標識高分子 α PLL を用いた染色性評価においては角層が染色されないことから、分子量約 4,000 の蛍光標識 PLL を用いることがこの染色評価法では妥当であることが明らかとなった。

以上の結果より、蛍光標識 PLL による角層の染色は、角層水分量や TEWL などの皮膚性状を反映する有用な判別法であることが明らかとなった。蛍光標識 PLL の角層染色機構として、主にイオン結合を介しており、ケラチン構築状態を反映していることが示された。さらに蛍光標識 aDex を組み合わせた二重染色は、角層性状のより詳細な新規判別法となる可能性が示された。

これまで皮膚性状を解析するために様々な計測機器が用いられてきたが、本研究が進展することにより、機器を用いることなく角層染色の結果から肌状態の評価が可能となり、皮膚の多様性に関する基礎データの収集のみならず、カウンセリング場面などでの応用、さらには皮膚の疾病の治療段階での角層状態の判別など、社会的な貢献が期待される。

実験方法

第1章

(1) 試料

ϵ -poly-L-lysine (PLL) JNC 株式会社から 25%水溶液の提供を受けた。その他は試薬グレードのものをを用いた。

(2) 角層採取および染色・観察

健康な成人女性および男性を被験者として、上腕内側あるいは頬からテープストリッピング法により角層を採取した。なお、採取にあたっては、千葉科学大学倫理委員会、あるいは武庫川女子大学研究倫理委員会にて承認された研究計画に基づいて被験者から書面による同意を得た。テープストリッピングは角質チェッカー (日本アッシュ) により行った。これに AF-PLL 50 μ g/mL 水溶液を作用させて、遮光下室温にて 2 時間染色した。水洗後に蛍光顕微鏡 EVOS-FL (Thermo Fisher Scientific)、Olympus IX71 (Olympus)、または BZ-X810 (Keyence) にて観察した。一部の実験においては、共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon C1si) にて観察した。

(3) PLL の蛍光標識

PLL (25% 水溶液) を 1 mg/mL となるように 0.1 M NaHCO₃ (pH 9.0) 溶液に希釈し、Alexa Fluor 488 5-tetrafluorophenyl ester (Thermo Fisher Scientific) 1 mg/mL dimethylsulfoxide 溶液を 1/100 容量を加えて室温・遮光下で 1 時間反応させた。反応液を遠心限外ろ過 (Amicon Ultra 3K) に供し、14,000 \times g で 10 分遠心し、精製水で洗いこみ遠心した。ろ液が無色になるまで遠心限外ろ過を繰り返して未反応の蛍光色素を除去し、Alexa Fluor 488-PLL (AF-PLL) を調製した。

(4) CE の単離・染色

テープストリッピングにより採取した角層試料から、Hirao らの方法^[19]により cornified envelope (CE) を調製した。すなわち、角層試料を dissociation buffer (2%SDS-20 mM dithiothreitol-5 mM EDTA-0.1 M Tris-HCl(pH 8.5)) にて煮沸・遠心を繰り返し、可溶性物質を除去し、その不溶残渣を CE として回収した。これをスライドグラスにアセトン固定し、AF-PLL 50 μ g/mL 水溶液を作用させて、遮光下室温にて 2 時間染色した。水洗後に蛍光顕微鏡にて観察した。

(5) 皮膚生理指標との関連

健康な日本人女性 (年齢 26 才から 59 才) 24 名に複数回 (3 回~15 回) に分けて試験にご協力いただいた。被験者は洗顔後に温度 25 \pm 1 $^{\circ}$ C、湿度 50 \pm 5%の環境下で馴化した後に、頬の角層水分量を Corneometer (Courage+Khazaka) で、経表皮水分蒸散量を TEWAmeter (Courage+Khazaka) にて測定し、角質チェッカー (日本アッシュ) により最外層角層を採取して、AF-PLL による染色に供した。この研究計画は千葉科学大学倫理委員会による承認を得て、被験者から書面による同意を取得して実施した。

(6) 画像解析

AF-PLLによる角層染色画像から、強染色率 (Intense Staining Ratio (%)) を算出した。すなわち、蛍光強度から2つの閾値を設定し、角層細胞全体の面積 A、および強染色領域の面積 B を求めた。B/A の比率を強染色率とした。画像解析はキーエンス顕微鏡付属のソフトウェア (BZ-X800 Analyzer) あるいは Image J を用いた。

第2章

(1) 試薬

ϵ -poly-L-lysine は 25%水溶液を JNC 株式会社より提供を受けた。Alexa Fluor™ 488-labelled dextran (AF-aDex)、tetramethylrhodamine-labelled dextran (RH-aDex) は Thermo Fisher Scientific より購入した。どちらの蛍光標識 aDex も分子量約 3,000 Da で、蛍光標識過程の処理によりアニオン性を示す。それぞれ DMSO に 1 mg/mL、5 mg/mL となるように溶解した。蛍光標識 poly-L-lysine (分子量 30,000-70,000 Da, Fluorescein- α PLL) は Sigma-Aldrich より購入した。Alexa Fluor 488 carboxylic acid, 2,3,5,6-tetrafluorophenyl ester, 5-isomer (Alexa Fluor 488-TFP, Molecular Probes)、5-(and 6-)carboxytetramethylrhodamine succinimidyl ester (NHS-Rhodamine, Thermo Scientific) は Thermo Fischer Scientific より購入し PLL 標識に用いた。

(2) PLL 蛍光標識

NaHCO₃ buffer (pH 9.0) にて調製した 10 mg/mL PLL に、1 mg/mL に調製した Alexa Fluor 488-TFP あるいは NHS-Rhod.amine の DMSO 溶液を 1/100 容量添加し、室温遮光条件下で 1 時間反応させた。反応液を Amicon® Ultracel-0.5 mL 3K (cut off 分子量 3,000, Merck Millipore) を用いた遠心限外ろ過に供し、未反応の色素を除去し、Alexa Fluor 488-labelled PLL (AF-PLL) または Rhodamine-labelled PLL (RH-PLL) を得た。蛍光標識 PLL は 10 mg/mL 溶液として冷蔵保存した。

(3) 角層採取

角層の採取には、2.5 cm 四方の角質チェッカー (日本アッシュ) を用い、清潔にした上腕内側および頬の角層を採取した。また、角層採取にあたっては、倫理的配慮に基づいて、武庫川女子大学研究倫理委員会の承認を得た研究計画にしたがい、20 代女性および 60 代男性の被験者からの書面による同意を得て実施した。採取した角層試料は、特に言及しない限りすぐに染色に供した。

(4) pH 依存性

角層は 50 μ g/mL AF-PLL, RH-PLL 水溶液または 20 μ g/mL AF-aDex, RH-aDex 水溶液と室温遮光条件下で 2 時間反応させた。脱イオン水にて十分に洗浄した後に、角層に吸着した蛍光ポリマーを蛍光顕微鏡 (Olympus IX71 & DP20) にて観察した。pH 依存性実験においては、0.05 M glycine-HCl buffer (pH 3.0), Na-acetate buffer (pH 4.0, 5.0), Na-phosphate buffer (pH 6.0, 7.0), Tris-HCl buffer (pH 8.0), glycine-Na buffer (pH 9.0)を用いた。Fluorescein- α PLL による染色では、10 mg/mL 水溶液を角層に反応させ、その他の条件は上述のとおりである。得られた画像は Image J により解析した。

(5) 塩濃度の影響

4 mol/L 塩化ナトリウム溶液を調製し、蛍光標識 PLL あるいは蛍光標識 aDex を 1:1 の割合で混合したときの塩化ナトリウム溶液の最終濃度が 0.125~2 mol/L になるように段階希釈をした。上腕内側の角層を角質チェッカーで採取し、各濃度の塩化ナトリウムが存在下での染色を行い評価した。

(6) アルブミン吸着膜に対する染色性の検討

Polyvinylidene difluoride 膜 (Immobilon® Transfer Membranes Immobilon-P, Millipore) をメタノール、脱イオン水、PBS の順で前処理した後に、1% ウシ血清アルブミン (Sigma-Aldrich, A6003) /PBS 溶液に浸漬させ、1 時間室温下で反応させ、脱イオン水で十分に洗浄した。このように調製したアルブミン吸着膜に、50 µg/mL AF-PLL、RH-PLL および 10 µg/mL AF-aDex、RH-aDex を室温遮光下で 2 時間反応した。PBS(-)にて 3 回洗浄し、メンブレンを静置し蛍光顕微鏡で観察を行った。

(7) PLL および aDex を用いた二重染色方法

角層に AF-PLL もしくは RH-PLL 50 µg/mL 溶液を 2 時間、室温下、遮光状態で浸漬させた。その後、脱イオン水で 3 回洗浄した。次に、前述の PLL の蛍光標識色素と対照となるように AF-aDex もしくは RH-aDex 10 µg/mL を 2 時間、室温下、遮光状態で浸漬させた。その後、脱イオン水で洗浄し、蛍光顕微鏡を用い観察・撮影を行った。

(8) エタノールによる角層ダメージモデルの作製

テープストリッピング法により得た角層試料を 70%または 100%エタノールに 1 時間浸漬し、減圧乾燥した後に染色に供した。

(9) 高分子αPLL と蛍光標識 PLL との染色性の比較

Fluorescein 標識 poly-L-lysine (分子量 30,000-70,000 Da, Sigma-Aldrich, P3069) (Fluorescein-αPLL) を用いて、分子量約 4,000 の AF-PLL との染色性の比較をした。エタノール処理による角層ダメージモデルを作製したのち、50 µg/mL の蛍光標識 PLL あるいは 50 µg/mL の Fluorescein-αPLL を用いて 2 時間染色を行った。

謝辞

本研究は、株式会社ホームイオン研究所 野本晃司様、占部博也様、蟻川仁美様、市川秀之様、秋本龍二様、JNC株式会社 佐藤淳一様、千葉科学大学 山下裕司先生、佐藤菜緒様との共同研究として、武庫川女子大学 薬学部 健康生命薬科学科 平尾哲二 前教授 (現 特任教授) のご指導のもと進めさせていただきました。試料のご提供並びに研究に対するご指導ご鞭撻を賜りましたこと、深く感謝申し上げます。また、研究をともに進めてくださいました武庫川女子大学大学院 薬学研究科 沼尻紗奈様、武庫川女子大学 薬学部 健康生命薬科学科 野谷奈央様に感謝申し上げます。本論文をまとめるにあたり、武庫川女子大学 薬学部 薬学科 中瀬朋夏教授、矢野義明教授、健康生命薬科学科 渡辺啓教授にご指導を賜りました。厚く御礼を申し上げます。また多くのご協力や激励をくださいました岡山理科大学 安藤秀哉先生ならびに日光ケミカルズ株式会社 吉本聖様、武庫川女子大学 薬学部 健康生命薬科学科 仁木洋子准教授、化粧品科学研究室、株式会社ディスカバリーの皆様に深く御礼を申し上げます。

引用文献

- [1] Hirao T. Structure and function of skin from a cosmetic aspect. In: Sakamoto K et al., editors. *Cosmetic science and technology. Theoretical principles and applications*. Amsterdam: Elsevier. (2017) 673–683.
- [2] Suzuki Y, Koyama J, Moro O, Horii I, Kikuchi K, Tanida T, Tagami H. The Mechanism of Desquamation in the Stratum Corneum and Its Relevance to Skin Care. *J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn.* (1999) 33(1):16-26.
- [3] Kashibuchi N, Muramatsu Y. Exfoliative Cytology for Morphological Evaluation of Skin. *J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn.* (1989) 23 (1):55-57.
- [4] Imokawa G. Structure and Functon of Intercellular Lipids in the Stratum Corneum. *Journal of Japan Oil Chemist's Society*. (1995) 44(10):751-766.
- [5] Imokawa G, Kuno H, Kawai M. Stratum corneum lipids serve as a bound-water modulator. *J Invest Dermatol.* (1991) 96(6):845-851.
- [6] Kim Y, Lim KM. Skin barrier dysfunction and filaggrin. *Arch Pharm Res.* (2021) 44(1):36-48.
- [7] Møss J. The effect of 3 moisturisers on skin surface hydration: Electrical conductance (Skicon-200), capacitance (Corneometer CM420), and transepidermal water loss (TEWL). *Skin Res Technol.* (1996) 2(1):32-36.
- [8] Kudo S, Nakashima S. Water adsorption with relative humidity changes for keratin and collagen as studied by infrared (IR) micro-spectroscopy. *Skin Res Technol.* (2019) 25(3):258-269.
- [9] Takahashi M. Non-invasive Methods for Efficacy Test of Cosmetic Products by Examining the Skin Physiological Conditions. *J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn.* (2017) 51(2):105-116.
- [10] Kashibuchi N, Improved Exfoliative Cytology for Morphological Evaluation of Skin. *J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn.* (1989) 23(2) 143-154.
- [11] Kashibuchi N, Ota N, Miyazawa M, Fujiwara N, Kishita A, Hirai Y. The Relationship between Sensitive Skin and Stratum Corneum Morphology. *J. Soc. Cosmet. Chem. Japan.* (1999) 33(3) 290-296.
- [12] Kobayashi Y, Iwai I, Akutsu N, Hirao T. Increased carbonyl protein levels in the stratum corneum of the face during winter. *Int. J. Cosmet. Sci.* (2008) 30(1):35-40.
- [13] Iwai I, Shimadzu K, Kobayashi Y, Hirao T, Etou T. Increased carbonyl protein level in the stratum corneum of inflammatory skin disorders: A non-invasive approach. *J. Dermatol.* (2010) 37(8):693-698.
- [14] Ogawa H, Taneda A, Kanaoka Y, Sekine T. The histochemical distribution of protein bound sulfhydryl groups in human epidermis by the new staining method. *J. Histochem. Cytochem.* (1979) 27(5):942-946.
- [15] Shima S, Matsuoka H, Iwamoto T, Sakai H. Antimicrobial Action of ϵ -poly-L-lysine. *J. Antibiot.* (1984) 37(11) :1449-1455.
- [16] Fadli M, Saad A, Sayadi S, Chevalier J, Mezrioui NE, Pages JM, Hassani L. Antibacterial activity of thymus maroccanus and thymus broussonetii essential oils against nosocomial infection - bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine.* (2012) 19:464–471.
- [17] Su RH, Li TF, Fan DM, Huang JL, Zhao JX, Yan BW, Zhou WG, Zhang WH, Zhang H. The inhibition mechanism of epsilon-polylysine against *Bacillus cereus* emerging in surimi gel during refrigerated storage. *J. Sci. Food. Agric.* (2019) 99:2922–2930.
- [18] Yoshida M, Numajiri S, Notani N, Sato N, Nomoto K, Arikawa H, Urabe H, Ichikawa H, Akimoto R, Sato J, Yamashita Y, Hirao T. Staining of stratum corneum with fluorescent ϵ -poly-L-lysine and its application to evaluation of skin conditions. *Skin. Res. Technol.* (2023) 29(1) e13245.
- [19] Hirao T, Denda M, Takahashi M. Identification of immature cornified envelopes in the barrier-impaired epidermis by characterization of their hydrophobicity and antigenicities of the components. *Exp. Dermatol.* (2001) 10(1):35-44.
- [20] Harding CR, Long S, Richardson J, Rogers J, Zhang Z, Bush A, Rawlings AV. The cornified cell envelope: an important marker of stratum corneum maturation in healthy and dry skin. *Int. J. Cosmet. Sci.* (2003) 25(4):157-167.
- [21] Steinert PM, Kartasova T, Marekov LN. Biochemical evidence that small proline-rich proteins and trichohyalin function in epithelia by modulation of the biomechanical properties of their cornified cell envelopes. *J. Biol. Chem.* (1998) 273(19):11758-11769.
- [22] Roberts D, Marks R. The determination of regional and age variations in the rate of desquamation: A comparison of four techniques. *J. Invest. Dermatol.* (1980) 74: 13–16.
- [23] Hirao T, Aoki H, Yoshida T, Sato Y, Kamoda H. Elevation of interleukin 1 receptor antagonist in the stratum corneum of sun-exposed and ultraviolet B-irradiated human skin. *J. Invest. Dermatol.* (1996) 106: 1102–1107.

- [24] Plewig G, Jansen T. Size and shape of corneocytes: variation with anatomic site and age. In: Wilhelm K-P, Elsner P, Berardesca E, Maibach HI, eds. Bioengineering of the skin: Skin surface imaging and analysis. *CRC Press*. (1997) : 181–196.
- [25] Hirao T, Takahashi M. Carbonylation of cornified envelopes in the stratum corneum. *FEBS Lett*. (2005) 579(30):6870-6874.
- [26] Dupuis D, Rougier A, Lotte C, Wilson DR, Maibach HI. In vivo relationship between percutaneous absorption and transepidermal water loss according to anatomic site in man. *J,Soc. Cosmet. Chem*. (1986) 37: 351-357.
- [27] Lotte C, Rougier A, Wilson DR, Maibach HI. In vivo relationship between transepidermal water loss and percutaneous penetration of some organic compounds in man: effect of anatomic site. *Arch Dermatol Res*. (1987) 279(5): 351-356.
- [28] Ya-Xian Z, Suetake T, Tagami H. Number of cell layers of the stratum corneum in normal skin - relationship to the anatomical location on the body, age, sex and physical parameters. *Arch Dermatol Res*. (1999) 291(10):555-9.
- [29] Jokura Y, Ishikawa S, Tokuda H, Imokawa G. Molecular analysis of elastic properties of the stratum corneum by solid-state ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Invest Dermatol*. (1995) 104(5):806-812.
- [30] Hatta I, Nakazawa H, Ohta N, Uchino T, Yanase K. Stratum Corneum Function: A Structural Study with Dynamic Synchrotron X-ray Diffraction Experiments. *J Oleo Sci*. (2021) 70(9):1181-1199.
- [31] Horita D, Hatta I, Yoshimoto M, Kitao Y, Todo H, Sugibayashi K. Molecular mechanisms of action of different concentrations of ethanol in water on ordered structures of intercellular lipids and soft keratin in the stratum corneum. *Biochim Biophys Acta*. (2015) 1848(5):1196-1202.
- [32] Steinert PM, North AC, Parry DA. Structural features of keratin intermediate filaments. *J Invest Dermatol*. (1994) 103(5 Suppl):19S-24S.
- [33] Bouwstra JA, de Graaff A, Gooris GS, Nijssse J, Wiechers JW, van Aelst AC. Water distribution and related morphology in human stratum corneum at different hydration levels. *J Invest Dermatol*. (2003) 120(5):750-758.
- [34] Takenouchi M, Suzuki H, Tagami H. Hydration characteristics of pathologic stratum corneum--evaluation of bound water. *J Invest Dermatol*. (1986) 87(5):574-576.
- [35] Mohammed D, Matts PJ, Hadgraft J, Lane ME. Variation of stratum corneum biophysical and molecular properties with anatomic site. *AAPS J*. (2012) 14:806–812.
- [36] Raj N, Voegeli R, Rawlings AV, Summers B, Munday MR, Lane ME. Variation in the activities of late stage filaggrin processing enzymes, calpain-1 and bleomycin hydrolase, together with pyrrolidone carboxylic acid levels, corneocyte phenotypes and plasmin activities in non-sun-exposed and sun-exposed facial stratum corneum of different ethnicities. *Int J Cosmet Sci*. (2016) 38:567–575.
- [37] Guneri D, Voegeli R, Gurgul SJ, Munday MR, Lane ME, Rawlings AV. A new approach to assess the effect of photodamage on corneocyte envelope maturity using combined hydrophobicity and mechanical fragility assays. *Int J Cosmet Sci*. (2018) 40:207–216.
- [38] Norlén L. Stratum corneum keratin structure, function and formation - a comprehensive review. *Int J Cosmet Sci*.(2006) 28(6):397-425.
- [39] Yoshida M, Numajiri S, Notani N, Nomoto K, Arikawa H, Urabe H, Ichikawa H, Akimoto R, Sato J, Yamashita Y, Hirao T. Novel double staining of the stratum corneum with fluorescent ε-poly-L-lysine and anionic dextran. *Int J Cosmet Sci*. (2023) 45(3):400-412.

論文目録

本学位論文は下記の論文より構成される。

1) **Yoshida M**, Numajiri S, Notani N, Sato N, Nomoto K, Arikawa H, Urabe H, Ichikawa H, Akimoto R, Sato J, Yamashita Y, Hirao T. Staining of stratum corneum with fluorescent ϵ -poly-L-lysine and its application to evaluation of skin conditions. *Skin Res Technol.* (2023) 29(1):e13245.

2) **Yoshida M**, Numajiri S, Notani N, Nomoto K, Arikawa H, Urabe H, Ichikawa H, Akimoto R, Sato J, Yamashita Y, Hirao T. Novel double staining of the stratum corneum with fluorescent ϵ -poly-L-lysine and anionic dextran. *Int J Cosmet Sci* (2023) 45(3):400-412.

参考論文の著者名、論文題目、発表雑誌、発表頁、発表年

なし

2024年 5月 20日

主査 印	副査 印	副査 印
	副査 印	副査 印