

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：11101
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21500410
 研究課題名（和文）
 電子スピン共鳴計測による皮膚角層の階層的複合構造の画像評価
 研究課題名（英文）
 Structural evaluation of stratum corneum investigated by electron spin resonance imaging
 研究代表者 中川 公一（NAKAGAWA KOUICHI）
 弘前大学・大学院保健学研究科・教授
 研究者番号：00244393

研究成果の概要（和文）：

皮膚角層の電子スピン共鳴(ESR)-スピンプローブ測定法により、経皮吸収剤(テルペン)による浸透効果を解析した。 α -ターピネオールを添付した角層では信号強度が約3倍増した。疾患皮膚の尋常性乾癬では、コントロールとは全く異なるスペクトルが得られ角層構造の異常が示唆された。

また、新規な皮膚用表面の検出器の開発を行い、測定感度は落ちるが、試料の水分やサイズにとらわれず表面部分の測定が可能であると示唆された。さらに、ESR イメージングの画像処理法としてのデータ処理を試みた。

研究成果の概要（英文）：

Electron spin resonance (ESR) in conjunction with a slow-tumbling simulation was utilized for defining various stratum corneum (SC) lipid structures. The α -terpineol enhanced about three times permeation of the single chain 5-DSA than that of the control. We also studied *psoriasis vulgaris* SC (pv-SC). We found that the pv-SC is less ordering of the structure than that of the control SC, indicating abnormal architecture of the pv-sc.

A 9 GHz ESR imager that is capable of the imaging surface area of thin materials has been built. More importantly, the TE₁₁₁ cavity does not require inserting the sample into the cavity and placing samples into ESR tubes. In addition, the components of the 9 GHz imager and imaging data processing are developed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：生体情報・計測

1. 研究開始当初の背景

皮膚角層は、生体に必須な水分保持と体外から有害物質の侵入を防ぐ皮膚のバリアー機能の主体である。主な角層成分であるセラミド、コレステロールおよび脂肪酸から形成される細胞間脂質は、このバリアー機能に重要な役割をしていると考えられている。これまでX線法や赤外吸収法等の手法を用いて角層細胞間脂質の構造解析が検討されてきた。

しかし、それらは細胞間脂質の状態をおおよそ把握できるものの、具体的な構造状態や疾患皮膚の構造解析には至っていない。また、画像による分子レベルの皮膚表面構造の評価法も未だ未開の領域である。

2. 研究の目的

これまで皮膚角層の深さ方向での構造性の違いを 9 GHz の電子スピン共鳴 (ESR) 計測で、はじめて数値化した。この研究をさらに発展させるため、皮膚疾患での角層構造性を明らかにし、さまざまな皮膚の構造の正確かつ高感度に画像化できる ESR イメージング装置を開発することにある。その上で、本 ESR 法が皮膚科学関連分野の基礎研究に資することにある。

3. 研究の方法

(1) 試料とスピンプローブの調整

スピンプローブは、市販の一鎖型脂肪酸である 5-DSA (5-doxylstearic acid) 及びコレステロール誘導体のプローブ CHL (3 β -doxyl-5 α -cholestane) を使用した。8 週齢のヘアレスマウスの背部皮膚の角層を、ガラス板上にシアノアクリレートを滴下し、剥離・採取した。採取した角層にスピンプローブ水溶液 (~50 mM) を滴下し、37°C の恒温で約 1 時間インキュベートした。次に、蒸留水で過剰なプローブを洗浄除去してから、水分をふき取り EPR 測定し、得られたスペクトルをシミュレーション解析した。

(2) ESR イメージング

多くの ESR イメージングは、600 MHz ESR イメージングで、試料を検出部である共振器内に挿入し試料を計測している。このため測定対象のサイズは、マウスなど共振器のサイズに限定される。今回、新たに表面(皮膜)用共振器に改良した。改良した表面(皮膜)用共振器は、測定試料を挿入するタイプとは異なる。

オープン型検出は、共振器の微小孔から出る 9 GHz のマイクロ波を試料に照射し、試料中のプローブがマイクロ波を吸収している

状態に磁場変調をかけて検出する方法とした。

現在のところ、9 GHz ESR イメージング装置で信号は、JEOL RE3X の本体で取り込んでいるためラピッドスキャンはできない。磁場勾配コイルは、JEOL 製の X、Y、Z-軸とラピッドスキャン可能なコイルを用いている。

4. 研究成果

(1) ESR スピンプローブ法

図 1 は、ヘアレスマウスの皮膚角層 (1 回目剥離) の ESR スペクトルとそのシミュレーションである。シミュレーションによって得られた 5-DSA のオーダーパラメーター (S_0 、秩序性) は、0.25 のオーダーであった。さらに、

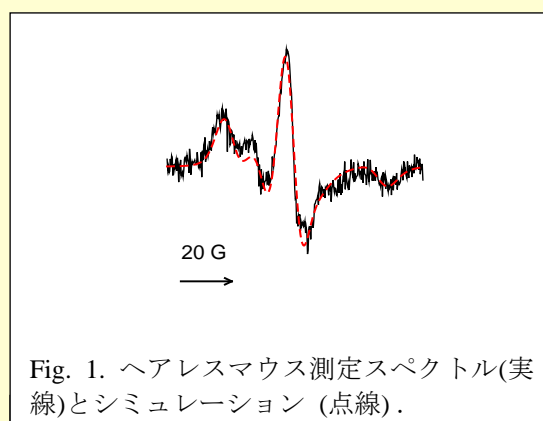


Fig. 1. ヘアレスマウス測定スペクトル(実線)とシミュレーション(点線).

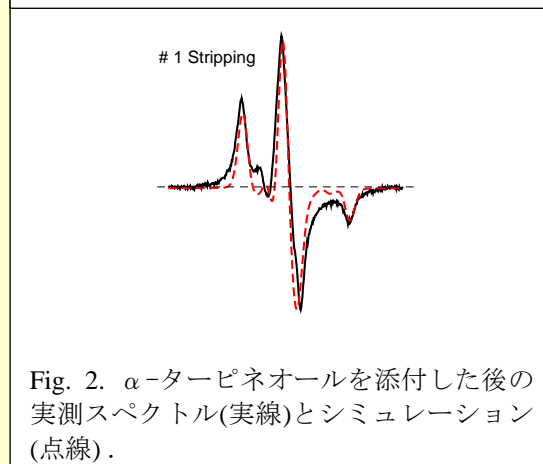


Fig. 2. α -ターピネオールを添付した後の実測スペクトル(実線)とシミュレーション(点線).

剥離回数を増やした場合では、 S_0 -値は上昇するものの、深さ方向に対する秩序性の値の大きな依存性は見られなかった。しかし、 α -ターピネオールを添付後の 1 回目剥離の ESR 信号強度と S_0 -値が増し (図 2)、5-DSA プローブの浸透増加性を示唆した。これら結果は、ヒト角層脂質の深さ浸透性への応用に有効であると思われる。

従って、今回我々は経皮吸収剤の分子構造

やプローブ分子の違いによる皮膚角層への浸透効果を ESR 法とシミュレーション法で定量的に解析することで、これまで不明であった角層脂質構造の状態変化の詳しい情報を得ることができた。さらに、このような手法は、皮膚の塗り薬などの基礎研究への貴重な知見であると考えられる。

尋常性乾癬 (psoriasis vulgaris, pv) の皮膚角層を用い市販の一鎖型脂肪酸であるスピンプローブ 5-DSA で測定した (図 3)。得られたスペクトルは、シミュレーション法で詳細解析した。

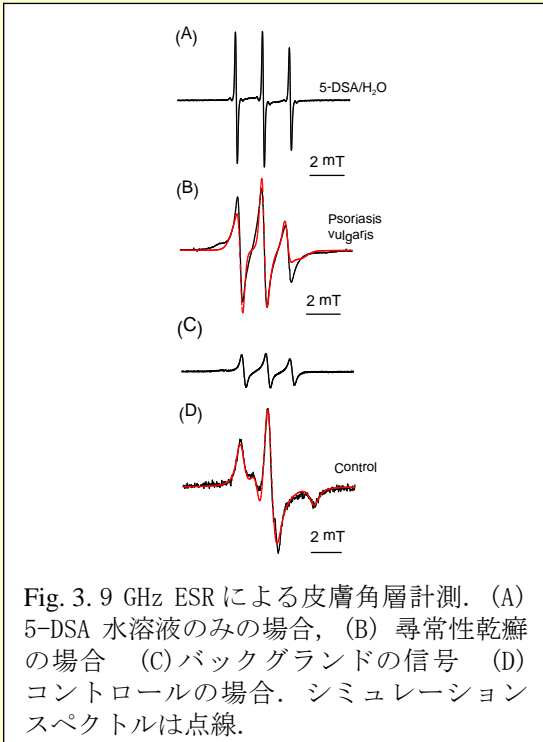


Fig. 3. 9 GHz ESR による皮膚角層計測. (A) 5-DSA 水溶液のみの場合、(B) 尋常性乾癬の場合 (C) バックグランドの信号 (D) コントロールの場合. シミュレーションスペクトルは点線.

図の (A) は脂質プローブ (5-DSA) の水溶液のスペクトルである。水溶液では、プローブ分子が自由に運動しているのでシャープな 3 本線である。(B) は尋常性乾癬の ESR のスペクトルで、ややブロードな 3 本線であった。(D) はコントロールである前腕内側部角層のスペクトルである。図から分かるように乾癬では、コントロールと全く異なるスペクトルのパターンである。また、シミュレーション法によりスペクトルを解析したところ、点線のスペクトルが得られ、角層の構造性を示す指標 (S_0 、秩序性) は、乾癬で約 0.2 となりコントロールでは約 0.5 であった。乾癬では、コントロールとは全くことなる小さな値が得られ角層構造の異常が示唆された。

(2) ESR イメージング

はじめに DPPH (2,2-Di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl) の模擬試料を作成した。模擬試料は、図 4 の左上にあるよう直線上に 4 点の DPPH を置いた。1 番目

と 2 番目は約 1 mm 間隔、2 番目と 3 番目は約 2 mm 間隔、3 番目と 4 番目は約 2 mm 間隔とした。

次に、JEOL の標準共振器を用いた DPPH の

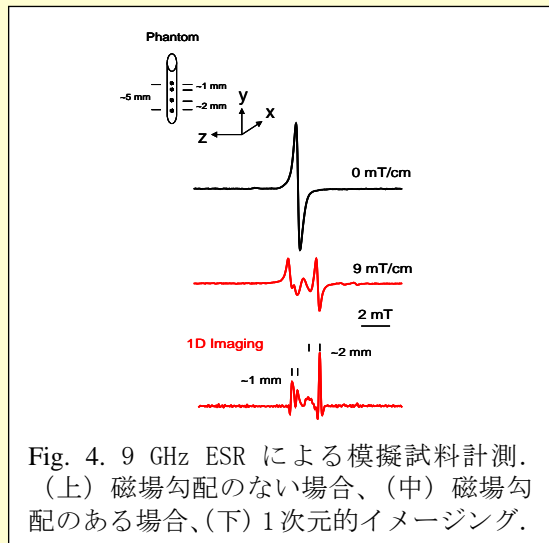


Fig. 4. 9 GHz ESR による模擬試料計測. (上) 磁場勾配のない場合、(中) 磁場勾配のある場合、(下) 1 次元的イメージング.

模擬試料の測定を試みた。黒い点が DPPH に相当する。上のスペクトルは、磁場勾配のない場合で 4 点が重なったシングルピークである。中央のスペクトルは、垂直方向に磁場勾配 (9 mT/cm) をかけた時で 4 点のプローブ信号を分離することができる。狭いピーク間が約 1.0 mm で、やや広いピーク間が約 2.0 mm 離れている場合の例である。信号は 4 つに分かれたので、個々の信号強度は小さくなる。下のスペクトルは、深さ方向の一次元的イメージング (2 次微分形) のスペクトルである。明確に 4 点の DPPH すべての信号が分かれた。また、この模擬試料を用いて磁場勾配の強さを計算したところ最大で約 9 mT/cm であった。

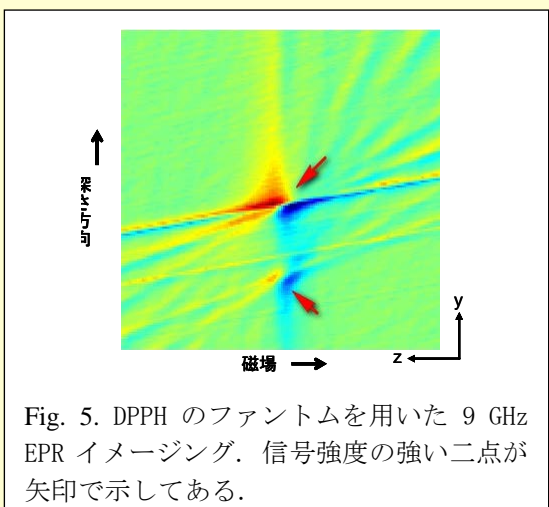


Fig. 5. DPPH のファントムを用いた 9 GHz EPR イメージング. 信号強度の強い二点が矢印で示してある.

模擬試料を用いた ESR イメージングの画像処理法として、模擬試料を用いたイメージング測定と表面測定用共振器の開発および

画像化のデータ処理を試みた(図4)。データ処理には DPPH のデータを使用した。市販の画像処理ソフトで観測データを2次元(スペクトル-空間)画像にすることができた(図5)。

この DPPH 模擬試料を用い二次元イメージングを試みた。先の模擬試料で磁場勾配を変えて行き、得られたデータを変換して二次元のイメージングをすることができた。二次元のイメージングを深さ方向(上下方向)と磁場方向から見たイメージングである。深さ方向では、2つのピークが認識できる。他のピークは、信号強度が弱く狭い間隔にあるためかデータ処理で埋もれた。斜めの線は、磁場勾配のゆがみによる影響と考える。今後、データ処理技術を高めることでより精度の高いイメージングを目指す予定である。

また、新規な皮膚用表面の検出器の開発を行った。検出用の共振器モードは TE111 とした。皮膚用共振器は、従来の測定試料を挿入するタイプとは異なるオープン検出方式とした(図6)。これまでの試料挿入タイプとは異なり、検出器は円筒状 TE111 モードで試料を載せる方式である。磁場変調コイルは、測定試料の両端にある。

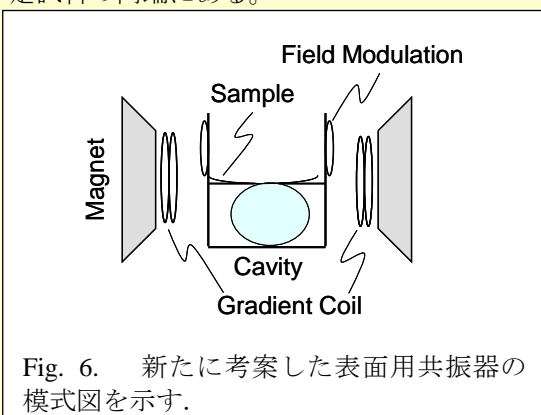


Fig. 6. 新たに考案した表面用共振器の模式図を示す。

試作の皮膚用共振器と市販の共振器を改良した TE011 モードとで測定感度の比較を行った。比較は、TEMPOL (4-hydroxy-2, 2, 6, 6-tetra methylpiperidin-1-oxyl) の 1 mM 濃度の水溶液を用いた。その結果、試作の検出器の感度は TE011 モード型より 0.3 程度低かった。皮膚用共振器の特徴は、3 mm のピンホールからのマイクロ波の漏れを利用する検出法であり従来型より測定感度は落ちるが、試料の水分やサイズにとらわれず表面部分の測定が可能である。

今後、薄膜表面を測定する場合は、上層と下層の計測に必要な磁場勾配の強さを増す

必要がある。また、効率よくかかるように試料と勾配コイルの距離を短くする必要もあると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学術雑誌論文] (計 9 件)

- ① K. Nakagawa, Y. Ohba, B. Epel, and H. Hirata, "The 9 GHz EPR Imager for Thin Materials: an Application to Surface Detection," *J. Oleo Science*, in press (2012).
- ② K. Nakagawa, S. Minakawa, and D. Sawamura, "Spectroscopic Evidence of Abnormal sStructure of *Psoriasis Vulgaris* Stratum Corneum," *Journal of Dermatological Science*, 65(3), 222-224 (2012). DOI: 10.1016/j.jdermsci.2012.01.002
- ③ K. Nakagawa and K. Anzai, "Stratum Corneum Lipid of Hairless Mouse Investigated by Electron Paramagnetic Resonance," *Appl. Magn. Reson.*, 40(4), 557-565 (2011). DOI: 10.1007/s00723-011-0238-0
- ④ K. Nakagawa, "Elucidated Lipid Structures of Various Human Stratum Corneum Investigated by EPR Spectroscopy," *Skin Research and Technology*, 17, 245-250 (2011). DOI: 10.1111/j.1600-0846.2010.00491.x
- ⑤ K. Nakagawa and K. Anzai, "Stratum Corneum Lipid Structure Investigated by EPR Spin-Probe Method: Application of Terpenes," *Lipids*, 45, 1081-1087 (2010). DOI: 10.1007/s11745-010-3479-z
- ⑥ K. Nakagawa and K. Anzai, "EPR Investigation of Radical-Production Cross Sections for Sucrose and L-Alanine Irradiated with X-ray and Heavy Ions," *Appl. Magn. Reson.*, 39(3), 285-293 (2010). DOI: 10.1007/s00723-010-0157-5

- ⑦ K. Nakagawa, “Electron Paramagnetic Resonance Investigation of Stratum Corneum Lipid Structure, *Lipids*, **45**, 91-96 (2010). DOI: 10.1007/s11745-009-3374-7
- ⑧ 中川公一, “高度な ESR 技法を用いた脂質構造とダイナミクスの研究,” *オレオサイエンス*, **10**(4), 133-139 (2010). [総説] ISSN 1345-8949
- ⑨ Y. Karakirova, K. Nakagawa, N. D. Yordanov, “EPR and UV spectroscopic investigations of sucrose irradiated with heavy-ion particles,” *Radiat. Meas.*, **45**, 10-14 (2010). doi:10.1016/j.radmeas.2009.07.003

[学会発表] (計 19 件)

- ① K. Nakagawa and S. Hamakake, “Structural Investigation of Stratum Corneum Lipid Using Electron Paramagnetic Resonance,” 34th International EPR Symposium (The 53rd Rocky Mountain Conference on Analytical Chemistry), p. 30, Aspen, Colorado, USA, 2011.
- ② Kouichi Nakagawa, “EPR Investigation of Sucrose and L-Alanine Radicals Produced by Various Irradiations,” 34th International EPR Symposium (The 53rd Rocky Mountain Conference on Analytical Chemistry), p. 43, Aspen, Colorado, USA, 2011.
- ③ 中川公一、安西和紀、EPR スピンプローブ法による皮膚角層の研究：テルペンの効果, 第 50 回電子スピンスイエンス学会年会, 仙台, 第 50 回電子スピンスイエンス学会年会講演要旨集. 258-259, 2011.
- ④ 中川公一、安西和紀、EPR(電子常磁性共鳴)法による脂質プローブの皮膚角層へのテルペンの影響. 第 63 回コロイドおよび界面化学討論会, 京都. 第 63 回コロイドおよび界面化学討論会講演要旨集. 133, 2011.

- ⑤ 谷親一郎, 岩本慎平, 宮園圭太郎, 中川公一, 末石芳巳: ESR スピンプローブ法による Triglyceride および Phosphatidylcholine から成る二重膜の微視的性質の解明, 第 50 回電子スピンスイエンス学会年会, 仙台, 第 50 回電子スピンスイエンス学会年会講演要旨集. 84-85, 2011.
- ⑥ 中川公一: 放射線照射で生ずるスクロースとアラニンのラジカルの EPR 法による研究, 第 50 回電子スピンスイエンス学会年会, 仙台, 第 50 回電子スピンスイエンス学会年会講演要旨集. 56-57, 2011.
- ⑦ Kouichi Nakagawa and Kazunori Anzai, “Elucidated Lipid Structure of Stratum Corneum Investigated by a Slow-Tumbling Simulation for Electron Paramagnetic Resonance,” The 7th Asia-Pacific EPR/ESR Symposium, p. 113, Jeju Island, South Korea, 2010.
- ⑧ Kouichi Nakagawa and Kazunori Anzai, “Investigation of Radical-Production Cross Sections for Sucrose and L-Alanine Irradiated by X-ray and Heavy-ion,” The 7th Asia-Pacific EPR/ESR Symposium, p. 132, Jeju Island, South Korea, 2010.
- ⑨ Kouichi Nakagawa, “Structural Investigation of Stratum Corneum Lipid by Electron Paramagnetic Resonance,” The 101th AOCs Annual Meeting and Expo, p. 11, Phoenix, Arizona, USA, 2010.
- ⑩ 中川公一、佐藤友香、錫谷達夫、未熟桃果実に含まれるセラミド等の皮膚角層に及ぼす効果. 第 49 回電子スピンスイエンス学会年会, 名古屋. 第 49 回電子スピンスイエンス学会年会講演要旨集. 246-247, 2010.
- ⑪ 中川公一、大庭裕範、平田拓、松本謙一郎、山内清語、9 GHz EPR イメージング装置の試作. 第 49 回電子スピンスイエンス学会年会, 名古屋. 第 49

回電子スピンスイエンズ学会年会講演要旨集. 248-249, 2010.

- ⑫ 中川公一、安西和紀、EPR スピンプローブ法による皮膚角層へのテルペンの効果. 第 49 回日本油化学会年会, 函館. 第 49 回日本油化学会年会講演要旨集. 224, 2010.
- ⑬ 中川公一、松本謙一郎、重粒子線照射によるスクロースと L-アラニンラジカルの生成断面積の検討. 平成 20 年度 HIMAC 共同利用研究成果発表会, 千葉, 19P121, 2010.
- ⑭ 中川公一、安西和紀、Howard I. Maibach、スロータングリングシミュレーション法による皮膚角層の構造解析. 第 48 回電子スピンスイエンズ学会年会, 神戸. 第 48 回電子スピンスイエンズ学会年会講演要旨集. 298-299, 2009.
- ⑮ 中川公一、安西和紀、Howard I. Maibach、EPR-スピンプローブ法による皮膚角層脂質の動的構造解析. 第 62 回コロイドおよび界面化学討論会, 岡山. 第 62 回コロイドおよび界面化学討論会講演要旨集. 42, 2009.
- ⑯ 中川公一、EPR-反転回復法による両親媒性化合物でできる膜のスピン-格子緩和時間. 第 48 回日本油化学会年会, 名古屋. 第 48 回日本油化学会年会講演要旨集. 132, 2009.
- ⑰ 中川公一、安西和紀、重粒子線照射によるスクロースと L-アラニンラジカルの生成断面積の検討. 平成 19 年度 HIMAC 共同利用研究成果発表会, 千葉, 19P121, 2009.
- ⑱ 中川公一、安西和紀、重粒子線照射によるスクロースと L-アラニンのラジカルの生成断面積の検討. 第 48 回電子スピンスイエンズ学会年会, 神戸. 第 48 回電子スピンスイエンズ学会年会講演要旨集. 212-213, 2009.

受賞講演

- ⑲ 中川公一、高度な ESR 技法を用いた脂質構造とダイナミクスの研究. 第 48 回日本油化学会年会, 名古屋. 第 48

回日本油化学会年会講演要旨集. 97, 2009.

[図書] (計 2 件)

- ① K. Nakagawa, "Lipid structures of various stratum corneum investigated by electron paramagnetic resonance," *Keratin: Structure, Properties and Applications*, Chapter 5, Renke Dullaart and Joao Mousques, Eds, Nova Science Publishers, Inc., New York, 113-131 (2012). ISBN 978-1-62100-336-6
- ② K. Nakagawa, "Structure of stratum corneum lipid studied by electron paramagnetic resonance," Chapter 70, *Textbook of Aging Skin*, Miranda A. Farage, Kenneth W. Miller and Howard I. Maibach Eds, Springer-Verlag, 725-733 (2009). ISBN 978-3-540-89655-5

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 電子スピン共鳴装置
発明者: 中川公一
権利者: 公立大学法人福島県立医科大学
種類: 特許公開
番号: 2010-163278
出願年月日: 平成 22 年 7 月 20 日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等
<http://www.hs.hirosaki-u.ac.jp/~nakagawa>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 公一 (NAKAGAWA KOUICHI)
弘前大学・大学院保健学研究科・教授
研究者番号: 00244393

(3) 連携研究者

平田 拓 (HIRATA HITOSHI)
北海道大学・大学院情報科学研究科・教授
研究者番号: 60250958