

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 31 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650247

研究課題名(和文)皮膚疾患に見られる角層の機能異常の検出とその識別化

研究課題名(英文)Detection and analyses of unusual structure of stratum corneum

研究代表者

中川 公一(Nakagawa, Kouichi)

弘前大学・保健学研究科・教授

研究者番号：00244393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、連続波(CW)および9 GHzの電子常磁性共鳴(EPRあるいは電子スピン共鳴ESR)イメージングを用いて、スピンプローブの動きに関連して疾患を含む様々なタイプの皮膚の構造を調べた。スピンプローブ(5-ドキシルステアリン酸、5-DSA)は、尋常性乾癬の角層(PV-SC)の構造性を調べるために用いた。PV-SCのスペクトルパターンは、コントロールSCのものとは全く異なっていた。EPRの結果は、スピンプローブ5-DSAが容易にPV-SCに浸透することができることを示した。本研究の結果は、コントロールSCよりも低い構造を有することを示唆し、予備的な画像もPVの低い構造性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：We investigated skin structure in relation to spin probe motions in various types of skin using continuous wave (CW) electron paramagnetic resonance (EPR) and 9 GHz EPR imaging. Spin probe (5-doxyl stearic acid) was used to investigate structural aspects of psoriasis vulgaris stratum corneum.

研究分野：総合領域

キーワード：生体情報 生体計測 皮膚角層 電子スピン共鳴 イメージング スピンプローブ

1. 研究開始当初の背景

皮膚角層の細胞間脂質は、角層のバリア機能として重要な役割をしていると考えられていて、これまで研究してきた。皮膚角層は、赤外吸収法やX-線法等の手法を用いて角層の細胞間脂質の構造解析が検討されてきた。しかし、具体的な分子レベルでの皮膚構造状態の解析には至っていないし、皮膚疾患の角層の構造的知見は極めて少ないのが現状である。

2. 研究の目的

我々は、新たに皮膚疾患である乾癬について研究を着手した。尋常性乾癬は、表皮が角化し口ウヘン現象をきたす皮膚疾患である。皮膚乾癬の角層の構造的な疾患特性を知るために、EPR(電子常磁性共鳴、あるいは電子スピン共鳴)-スピンプローブ法やイメージング法で詳細を研究した。コントロール(正常)と疾患皮膚の EPR 測定により、得られた結果の詳細を比較検討した。

3. 研究の方法

あらかじめ倫理委員会の承認を得て、共同研究者から提供のあった尋常性乾癬 (psoriasis vulgaris, pv)の皮膚角層を測定した。スピンプローブは、一鎖型脂肪酸である 5-DSA(5-doxylstearic acid)を使用した。シアノアクリレートで皮膚角層をガラス板に貼り付けた。次に、約 60 μM のスピンプローブ液を採取角層に滴下し 37 °C の恒温で約 60 分インキュベーション後、蒸留水で過剰なスピンプローブを洗浄除去し、EPR 測定を実施した。尋常性乾癬の結果は、健常者の値と比較検討した。

4. 研究成果

図 1 の上の EPR スペクトルは、インキュベーションに用いた脂溶性プローブ(5-DSA)の水溶液のスペクトルである。水溶液では、5-DSA 分子が自由に運動しているのでシャープな 3 本線となった。これまでの研究から尋常性乾癬の EPR のスペクトルでは、ややブロードな 3 本線で、特徴的な窒素の 3 本線が得られた。この結果から、インキュベーションの過程で一部の 5-DSA は、皮膚を通過している可能性が示唆された。

一時的に治療薬を用いる前の検体でも、皮膚疾患である乾癬のスペクトルは角化異常により角層脂質構造が秩序的な状態にあるため、プローブ分子を取り込みコントロールに類似した異方性を示すものと考えられる。また、実験から治療薬を用いる前の皮膚乾癬の角層のスペクトルは、コントロールと似たスペクトルパターンであった。これは、治療薬を一時的にやめた場合で、すでにスペクトルは正常のものと類似しており、構造的に正常値と近いと考えられた(図 1 の(-))。

一方、治療後の皮膚サンプルでは、角層脂質構造の正常化により、コントロール(正常)



図 1. (5-DSA)上のスペクトルは、皮膚試料に用いる溶液である。(-)治療薬を用いる前の皮膚乾癬の角層のスペクトル。(+)治療薬を用いる前の皮膚乾癬のスペクトル。(Control)正常な皮膚角層のスペクトル。

の皮膚角層に類似した異方性スペクトルが得られた(図 1 の(+))。従って、この実験の尋常性乾癬では、コントロールと類似のスペクトルが得られ、乾癬の角層脂質構造の回復が示唆された。

このように、皮膚角層の構造的な EPR-スピンプローブ法でスペクトル的に構造的な違いを明らかにできたが、皮膚試料から得られたスペクトルで分からないラジカル分布などの詳細なラジカル情報を得る目的で、EPR イメージングを試みている。現在、予備的な実験段階であるが、得られた結果を以下に示す。

共同研究者から得た Lithium

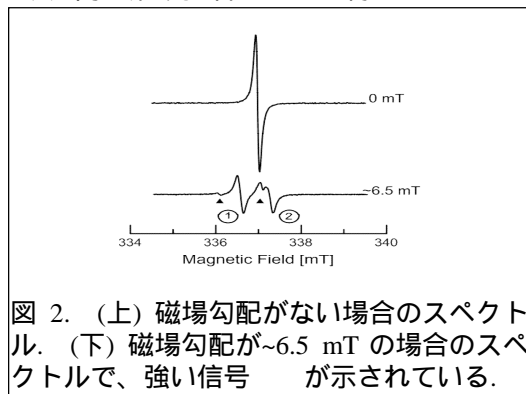


図 2. (上) 磁場勾配がない場合のスペクトル。(下) 磁場勾配が~6.5 mT の場合のスペクトルで、強い信号 ① ② が示されている。

phthalocyanine (LiPC)で作成したファントムを用いたイメージングの予備実験を行った。このファントムの准二次元のイメージングを試みた。LiPC は、線幅が狭く磁場勾配が比較的弱くてもきれいな画像が得られやす

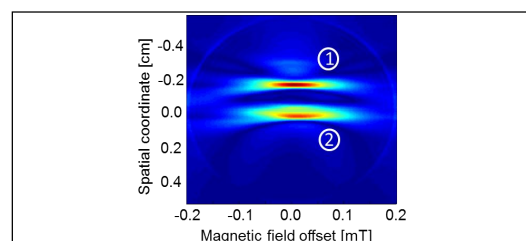


図 3. 図 2 のスペクトルデータの准二次元(スペクトル-空間)の画像。信号の ① ② がこの画像の ① ② に相当する。

い。図 2 にファントムの EPR スペクトルを示す。図 2 のデータをもとに処理し得られた画像を図 3 に示してある。強度の強い 2 mm 間隔の 2 点が得られた。

今後、画像法でデータ処理の高速化に向けた技術的向上を目指し、また、皮膚の新しい表面検出法を開発し皮膚測定に応用する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. K. Nakagawa, Y. Karakirova, N. D. Yordanov, "Heavy-ion induced sucrose radicals investigated using EPR and UV spectroscopy," *J. Radiation Research*, 2015, in press. 査読有  
doi: 10.1093/jrr/rru108
2. K. Nakagawa and H. Hara, "Investigation of radical locations in various sesame seeds by CW EPR and 9 GHz EPR imaging," *Free Radical Research*, 49(1), 2015, 1-6. 査読有  
doi: 10.3109/10715762.2014.967691
3. K. Nakagawa and B. Epel, "Locations of radical species in black pepper seeds investigated by CW EPR and 9 GHz EPR imaging," *Spectrochimica Acta Part A, Molecular & Biomolecular Spectroscopy*, 131, 2014, 342-346. 査読有  
DOI: 10.1016/j.saa.2014.04.100
4. K. Nakagawa, "Effects of Low Dose X-ray Irradiation of Eggshells on Radical Production," *Free Radical Research*, 48(6), 2014, 679-683. 査読有  
DOI: 10.3109/10715762.2014.900174
5. K. Nakagawa, K. Kobukai, and Y. Sato, "ESR Investigation of Sucrose Radicals Produced by 0.25-4.5 Gy Doses of X-ray Irradiation," *J. Radiation Research*, 55(4), 2014, 726-729. 査読有  
doi: 10.1093/jrr/rru018
6. 中川 公二, "In Vivo Oxygen Imaging Workshop 2014 参加報告," *電子スピンスイェンス*, 12, 2014, 113-114. 査読無
7. Y. Sato, K. Nakagawa, and T. Takahashi, "Low dose dependence of sucrose radical generation," Proceeding of the 5<sup>th</sup> International Symposium on Radiation Emergency, 2014, 39-41.
8. K. Nakagawa, S. Minakawa, and D. Sawamura, "Stratum corneum structure of *psoriasis vulgaris* investigated by EPR spin-probe method," *Appl. Magn. Reson.*, 44, 2013, 941-948. 査読有  
DOI: 10.1007/s00723-013-0453-y
9. K. Nakagawa, S. Minakawa, and D. Sawamura, "EPR spectroscopic investigation of psoriatic finger nails," *Skin Research and Technology*, 19, 2013, 450-453. 査読有  
Doi: 10.1111/srt.12068
10. 中川 公二, "関東支部 第 2 回油化学セミナー弘前," *オレオサイエンス*, 13(10), 2013, 502-503. 査読無

〔学会発表〕(計 32 件)

1. K. Nakagawa, "Effects of 0.10-10 Gy X-ray Irradiation on Eggshell Radical Production," The 9th Asia Pacific EPR/ESR Symposium (APES2014), 11/11-11/15, 2014, Nara Culture Center, Nara, Japan.
2. K. Nakagawa, "EPR Spin Probe Investigation of Surface Structure Analyses of Skin," The 9th Asia Pacific EPR/ESR Symposium (APES2014), Nara, Japan, 11/11-11/15, 2014, Nara Culture Center, Nara, Japan.
3. 中川公二、皆川智子、澤村大輔: 電子スピン共鳴(ESR)法による皮膚乾癬の研究、第 78 回日本皮膚科学会東部支部学術大会、10/4-10/5、2014、ホテル青森(青森県、青森市)。
4. 川村優太、中川公二、皆川智子、澤村大輔: 電子スピン共鳴(ESR)法を用いた乾癬の角層構造の薬効に関する研究、第 78 回日本皮膚科学会東部支部学術大会、10/4-10/5、2014、ホテル青森(青森県、青森市)。
5. 中川公二、佐藤 譲、小武海 拳、低線量 X-線照射で生ずるスクロースラジカルの ESR 法の研究、平成 26 年度 化学系学協会東北大会、2014、9/19-20、山形大学工学部(山形県、米沢市)。
6. Kouichi Nakagawa and Boris Epel, "EPR Imaging determines locations of radical species in black pepper seeds," 1<sup>st</sup> Asian Conference on Oleo Science, p. 140, 9/7-9/10, 2014, Royton Sapporo, Sapporo city, Hokkaido.
7. 中川公二、皆川智子、澤村大輔、ESR-スピンプローブ法による皮膚角層の構造に関する研究、日本油化学会第 53 回年会、日本油化学会第 53 回年会講演要旨集、p. 108、9/10-9/11、2014、ロイトン札幌(北海道、札幌市)。
8. Kouichi Nakagawa, "Detection and Analyses of Structural Changes of Various Stratum Corneum," The 3rd International Conference and Exhibition on Cosmetology & Trichology, p.61, 7/21-7/23, 2014, Las Vegas, USA. (Invited Lecture)
9. Kouichi Nakagawa, Satoko Minakawa, and Daisuke Sawamura, "Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Investigation of Skin Structure of

- Psoriasis Vulgaris," The 3rd International Conference and Exhibition on Cosmetology & Trichology, p. 78, 7/21-7/23, 2014, Las Vegas, USA. (招待講演)
10. Kouichi Nakagawa, Satoko Minakawa, and Daisuke Sawamura, "Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Investigation of Skin Structure of Psoriasis Vulgaris," The 3rd International Conference and Exhibition on Cosmetology & Trichology, p. 78, L p. 78, 7/21-7/23, 2014, Las Vegas, USA
  11. K. Nakagawa, "Effects of Low Dose X-ray Irradiation (0.10-10 Gy) of Eggshells on Radical Production," 3PM-7, p. 42, The 2nd Awaji International Workshop on Electron Spin Science and Technology: Biological and Material Science oriented Application (2nd AWEST 2014) 6/15-6/17, 2014, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji Island, Hyogo, Japan.
  12. K. Nakagawa, S. Minakawa, and D. Sawamura, "EPR Spin Probe Investigation of Skin Structure," P-8, p. 60, The 2nd Awaji International Workshop on Electron Spin Science and Technology: Biological and Material Science oriented Application (2nd AWEST 2014) 6/15-6/17, 2014 Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji Island, Hyogo, Japan.
  13. 箱田優也、田中佳祐、油井研一、酒井健一、酒井秀樹、阿部正彦、橋本悟、中川公一、坂本一民、角層細胞間脂質モデルの構造と特性、第39回日本化粧品学会、p. 23、6/5-6/6、2014、有楽町朝日ホール(東京都、千代田区)。
  14. 中川公一、9 GHz ESR 法による皮膚疾患と皮膚の構造解析、第74回分析化学討論会、p. 162、5/24-5/25、2014、日本大学工学部(福島県、郡山市)。
  15. Kouichi Nakagawa, Satoko Minakawa, and Daisuke Sawamura, "Structure and Dynamics of Spin Probes in Intercellular Lipids of Skin," 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International (SFRR 2014), p. 70, 3/23-3/26, 2014, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan.
  16. 中川公一、9 GHz EPR イメージング法の医科学への応用: 皮膚疾患と皮膚構造の解析、分子研研究会「先端スピン計測技術による分子性物質研究の現状と展望」、p. 14、12/18-12/1、2013、自然科学研究機構 分子科学研究所(愛知県、岡崎市)
  17. 中川公一、ESR 法による皮膚角層脂質の構造解析、分析化学と化学分析の青森フォーラム 2013、p. 4、11/28、2013、弘前大学(青森県、弘前市)。(依頼講演)
  18. 中川公一、皆川智子、澤村大輔、EPR-スピンプローブ法による乾癬の皮膚構造の研究、第52回電子スピンサイエンス学会年会、SEST2013 第52回電子スピンサイエンス学会年会講演要旨集、p. 38-39、10/24-10/26、2013、大宮ソニックシティ(埼玉県、さいたま市)。
  19. 中川公一、佐藤謙、高橋拓斗、スクロースへの低線量 X-線と重粒子線照射で生ずるラジカルの EPR 解析、第52回電子スピンサイエンス学会年会、SEST2013 第52回電子スピンサイエンス学会年会講演要旨集 p174-175、10/24-10/26、2013、大宮ソニックシティ(さいたま市、埼玉県)。
  20. Kouichi Nakagawa, Satoko Minakawa, Daisuke Sawamura, "9 GHz EPR INVESTIGATION OF SKIN STRUCTURE OF PSORIASIS VULGARIS," 2013 Biennial Meeting of Society for Free Radical Research Asia, Biennial Meeting of Society for Free Radical Research Asia, Program Book p142, 10/16-10/19, 2013, Tao-Yuan, Taiwan.
  21. Kouichi Nakagawa, Ken Kobukai, Yuzuru Sato, Takuto Takahashi, "ESR Investigation of Sucrose Radicals Produced by Low Dose X-ray Irradiation" International Symposium for the 70<sup>th</sup> Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan, p. 273, 9/28-9/30, 2013, Tohoku University, Sendai, Miyagi, Japan.
  22. 中川公一、皆川智子、澤村大輔、ESR 法による皮膚乾癬の皮膚構造に関する研究、日本油化学会第52回年会、日本油化学会第52回年会講演要旨集、p. 191、9/3-9/5、2013、東北大学(宮城県、仙台市)。
  23. K. Nakagawa, K. Kobukai, Y. Sato, T. Takahashi, "Sucrose Radicals Induced by Low Dose Irradiation with X-ray," 55th ANNUAL ROCKY MOUNTAIN CONFERENCE ON MAGNETIC RESONANCE, Denver, Colorado, USA. 55th ANNUAL ROCKY MOUNTAIN CONFERENCE ON MAGNETIC RESONANCE, p. 49, 7/28-8/1, 2013, Denver, Colorado, USA.
  24. K. Nakagawa, S. Minakawa, D. Sawamura, "Skin Structure of Psoriasis Vulgaris Investigated by EPR Spin-Probe Method," 55th ANNUAL

- ROCKY MOUNTAIN CONFERENCE ON MAGNETIC RESONANCE, Denver, Colorado, USA. 55th ANNUAL ROCKY MOUNTAIN CONFERENCE ON MAGNETIC RESONANCE, p33, 7/28-8/1, 2013, Denver, Colorado, USA.
25. K. Nakagawa, S. Minakawa, and D. Sawamura, "9 GHz EPR Investigation of Skin Surface," 3AM-4, p. 30, The 1<sup>st</sup> Awaji International Workshop on Electron Spin Science and Technology: Biological and Material Science oriented Application (1<sup>st</sup> AWEST 2013) 6/18-6/19, 2013, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji Island, Hyogo, Japan.
  26. 中川公一、皆川智子、澤村大輔、尋常性乾癬の ESR 法による構造的解析、第 66 回日本酸化ストレス学会学術集会、p.93、6/13-6/14、2013、ウインクあいち（愛知県、名古屋市）。
  27. K. Nakagawa, Y. Ohba, "Skin Lipid Structure Investigated by EPR Spin-probe Method and a Possible EPR-Imaging Application, World Congress on Oleo Science and 29<sup>th</sup> ISF Congress, 0-46, 9/30-10/4, 2012, Arkas Sasebo, Sasebo city, Nagasaki.
  28. 中川公一、濱欠慎司、皆川智子、澤村大輔、EPR 法による皮膚乾癬の研究、第 51 回電子スピンサイエンス学会年会、pp. 82-83、11/1-11/3、2012、北海道大学(北海道、札幌市)。
  29. 小武海 拳、中務 孝一、弘中 輝、中川公一、さまざまなスクロースへの重粒子線と X-線照射で生ずるラジカルの EPR 解析、第 51 回電子スピンサイエンス学会年会、pp. 192-193、11/1-11/3、2012、北海道大学(北海道、札幌市)。
  30. 中川公一、小武海 拳、放射線照射で生ずるスクロースラジカルの EPR 法による研究、平成 24 年度 化学系学協会東北大会、9/15-9/16、2012、秋田大学（秋田県、秋田市）。
  31. Kouichi Nakagawa, Yasunori Ohba, Boris Epel, and Hitoshi Hirata, "A 9 GHz EPR Imager: A Possible Application to Skin," The 2<sup>nd</sup> International Symposium on Electron Spin Science (ISESS 2012), p 76, 7/23-7/25, 2012, Hotel Taikanso, Matsushima, Miyagi, Japan.
  32. 中川公一、大庭裕範、Boris Epel、平田拓、皮膚用 9 GHz ESR イメージング装置の試作、第 65 回日本酸化ストレス学会学術集会、6/7-6/8、2012、あわぎんホール(徳島県、徳島市)。

〔図書〕(計 1 件)

1. K. Nakagawa and D.

Sawamura, "Psoriasis vulgaris investigated by electron paramagnetic resonance," *Psoriasis: Types, Triggers and Treatment Strategies*, Chapter 5, Phillip B. Smith and Nathan C. Johnson Eds, Nova Science Publishers, Inc., New York, Chapter 5, 2013, 143-164.  
ISBN 978-1-62618-584-5

〔産業財産権〕

取得状況(計 1 件)  
 名称：電子スピン共鳴装置  
 発明者：中川 公一  
 権利者：同上  
 種類：特許  
 番号：特許第 5481651 号  
 出願年月日：平成 22 年 7 月 20 日  
 取得年月日：平成 26 年 2 月 28 日  
 国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等  
 ・研究室のホームページ(中川リサーチグループ)  
<http://www.hs.hirosaki-u.ac.jp/~nakagawa>  
 ・researchmap (JST)  
<http://researchmap.jp/read0186203/>  
 Kouichi Nakagawa (Google scholar)  
<http://scholar.google.co.jp/citations?user=wqcm6r8AAAAJ&hl=ja>  
 ・弘前大学大学院保健学研究科  
[http://www.hs.hirosaki-u.ac.jp/kouhou/hg/web/gakubu/teacher\\_detail02.html?id=56](http://www.hs.hirosaki-u.ac.jp/kouhou/hg/web/gakubu/teacher_detail02.html?id=56)

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
- (2)研究分担者  
 澤村 大輔 (SAWAMURA DAISUKE)  
 弘前大学・大学院医学研究科・教授  
 研究者番号：60196334