

テラヘルツ分光で切り拓く角質中に必要な水の“質”の解明

理化学研究所生命医科学研究センター

白 神 慧一郎

Although the moisture content in the skin is of major interest in cosmetology and dermatology, the roles and functions of water are yet to be understood at a molecular level. Over more than half a century, physicochemical and biophysical studies have emphasized the importance of hydration water that surrounds biological macromolecules to prompt their native functions, but such a “quality” of water has been overlooked in biological samples due to experimental difficulty in characterizing the free/hydration water content in vivo. To settle this issue, in this study we constructed a homebuilt terahertz time-domain attenuated total reflection spectroscopy system and developed a theoretical algorithm to derive the depth profile of free water in living skin. Our results showed that the free water content in the stratum corneum of a hairless mouse is kept at particularly low level, but applying pure water and a cosmetic lotion substantially increases the population of free water albeit temporarily. Interestingly, the cosmetic lotion (sekkisei) was found to have a greater ability in retaining free water for a longer period, compared to pure water.

1. 緒 言

“Water is life's matter and matrix, mother and medium. There is no life without water.” — 1937 年にノーベル生理学賞を受賞した Szent-Györgyi 博士が語ったように、水は生命を維持する媒質として古くから重要性が認識されていた¹⁾。水の中で誕生した生命が約 3 億 6 千万年前に陸上に進出して以降、気相環境に適応できる体表面の上皮構造の変化が進んだことで²⁾、我々ヒト表皮の最外殻に位置する角質層は体内の乾燥を防ぐ最後の砦として身体内の恒常性を維持する役割を担っている³⁾。またそれと同時に、角質層の保湿は健全な皮膚機能を維持するために不可欠であるため、適当量の水を供給・保持することで柔軟性に富んだ美しい肌を保つことが化粧品製剤のもつ大きな意義となっている³⁾。そのため、これまでに角層内に存在する水や角質層から受動的に拡散喪失する水の“量”を評価する技術によって保湿状態が定義されてきたものの、角層水分量と経皮水分蒸散量の間に整合性が認められない例も報告されており⁴⁾、これは水の“量”的観点だけでは不十分であることを示唆している。

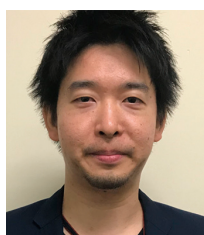
液体の水分子はピコ (10^{-12}) 秒という極めて短い時間スケールで絶えず揺らぎ続けている一方で、タンパク質のような生体分子の表面に位置する水分子は界面に特有の作用を受けることでその動態が著しく遅くなることが明らかになっている⁵⁾。このように生体分子の束縛を受けることで、

通常の水(自由水またはバルク水)とは異なる挙動を示すようになった水分子を水和水(または結合水や生体水)と呼び、水和水は様々な高分子の機能発現や自己組織化に積極的に関与していることが見出されている。このことは、自由水／水和水という“質”的に異なる水の状態が生命機能を織りなす場として機能していることを示唆しており、皮膚表皮内においても“量”にとどまらず水の“質”の観点から議論することで保湿の本質的理解に至れる可能性がある。

しかし細胞や組織中では数多の物質が不均一に分布する複雑環境であることから、生体中における自由水／水和水の質的評価を行った例は報告されていなかった。周波数 0.1~10 THz (10^{11} ~ 10^{13} Hz) で定義されるテラヘルツ波は近年の技術発展が著しい電磁波帯であり、可視光に比べて 1000 倍以上も光子エネルギーが小さい安全な光として生物を対象とした応用開拓が進められている。テラヘルツ波のもつエネルギーは自由水のピコ秒揺らぎと一致するため、テラヘルツ帯の分光スペクトルは自由水の動的状態を直接的に反映する一方で、水和水や生体高分子の吸収は自由水に比べて圧倒的に小さいため、テラヘルツ帯は自由水のみを選択的に観測できる電磁波帯であることが近年明らかになってきた。そこで本研究では、皮膚表皮中の水の自由水／水和水評価に向けたテラヘルツ測定系を構築し、化粧水が皮膚表皮中の水の“質”に及ぼす影響の定量評価を行った。

2. 方 法

吸収の大きい試料のスペクトルを測定する手法として、サブ波長程度の深さに局在するエバネッセント光と試料の相互作用を観測する全反射減衰 (Attenuated total reflection, ATR) 測定は赤外分光で広く用いられている。エバネッセント光の電場強度はプリズムからの距離に応じて指数関数的に減少し、光強度が $1/e^2$ に減衰する深さ d_p は周波数 ν の関数として



“Quality” of water in stratum corneum investigated with terahertz spectroscopy

Keiichiro Shiraga

RIKEN Center for Integrative Medical Sciences

$$d_p(\nu) = \frac{c}{\sqrt{2\pi\nu}} \left[\sqrt{(\epsilon_p \sin^2 \theta - \epsilon'(\nu))^2 + \epsilon''(\nu)^2} + (\epsilon_p \sin^2 \theta - \epsilon'(\nu)) \right]^{-1} \quad (1)$$

で与えられる^{6,7)}。ここで、 c : 真空中の光の速度、 θ : 入射角、 ϵ_p : ATRプリズムの誘電率実部であり、測定試料の複素誘電率を $\hat{\epsilon}(\nu) = \epsilon'(\nu) - i\epsilon''(\nu)$ としている。ATR分光はテラヘルツ帯で大きな吸収をもつ水の分光測定においても高い実用性が報告されており、高抵抗シリコン単結晶($\epsilon_p = 11.7$)をプリズムに用いると周波数 $\nu = 1$ THzでは $d_p \approx 25 \mu\text{m}$ となる。この深さは角層厚みと同程度であるため、テラヘルツ帯のATR分光では角層中の自由水を選択的に観測できると期待される。そこで本研究では、中心波長780nmのフェムト秒ファイバーレーザー (FemtoFerb780, トプティカフォトニクス株式会社) を励起光に用いてダイポール型光伝導アンテナ (G10620-11, 浜松ホトニクス株式会社) でテラヘルツパルスの発生・検出を行う全反射減衰テラヘルツ時間領域 (Terahertz time-domain attenuated total reflection, THz TD-ATR) 分光測定系を構築した⁸⁾。

本手法ではATRプリズム近傍に局在する近接場の分光情報を得るため、本研究では高い密着性を期待してヘアレスマウスの腹部 ($20 \times 30 \text{ mm}$) を対象としてTHz TD-ATR測定を行った。実験に使用したマウスは顆粒層SG1で特異的に発現するSkin aspartic protease 遺伝子をヘテロで有するヘアレスマウスであり、電気伝導率測定計ASA-M3 (日本アッシュ株式会社) を用いた予備測定では野生型と同程度の角層水分量をもつことがわかっている。そこで、全身麻酔を投与したマウスの左腹部と右腹部をそれぞれ交互に3回ずつ測定を行い、その平均値を定常状態のマウスの測定値、そして標準誤差を測定の不確かさとみなした。また、その後にマウスの左腹部と右腹部に純水と化粧水 (薬用雪肌精, 株式会社コーセー) をそれぞれ1mLずつ塗布し、その1分後に表面の残留成分を軽く拭き取ってから左腹部 (純水) → 右腹部 (化粧水) → 左 → … と左右交互に3回ずつ測定を行い、塗布後1分目と11分目にTHz

TD-ATR測定を実施した。なお、塗布物の中に含まれる自由水の影響を把握するために、THz TD-ATR分光で純水と化粧水 (雪肌精) のテラヘルツ帯スペクトルも測定した。

3. 結果および考察

3.1. 化粧水中の水和状態評価

本研究で構築したTHz TD-ATR系を用いて純水と化粧水を測定した結果を図1左に示す。どちらの試料にも共通して、バックグラウンド測定 (試料がない場合) に比べてテラヘルツパルスの振幅が減少し、またピーク位置が後方に遅延していることが認められる。これは、全反射時にエバネッセント光として試料内部にもぐり込んだテラヘルツ波が試料と相互作用し、吸収や位相遅延が起きていることを表している。また純水 (図中青色実線) と化粧水 (赤色実線) を比較すると、特に吸収に由来する振幅減少は化粧水に比べて純水の方でより顕著であった。緒言で述べたようにテラヘルツ波は試料中の自由水とのみ相互作用することを鑑みれば、化粧水中には水以外にも様々な基剤が含まれているうえ、一部の水分子は水和水としてそれらの基剤を取り巻いているため、自由水のみからなる純水に比べてテラヘルツ波の吸収が小さくなっていると考えられる。次に、THz TD-ATR測定で得たテラヘルツパルスの電場波形をFourier変換し、吸収の大きさを表す複素誘電率の虚部 (誘電損失スペクトル, $\epsilon''(\nu)$) を求めた結果を図1右に示す。純水の誘電損失スペクトル $\epsilon''(\nu)$ は0.2~3.0 THzの周波数領域において単調減少する傾向が認められたが、これは本測定帯域が $\sim 20 \text{ GHz}$ に位置する自由水の巨大な吸収ピークの高周波裾野に対応していることに起因する。赤外分光や核磁気共鳴とは異なり明瞭なピーク構造が見られず特徴に欠けるスペクトルであるように思えるが、この吸収の大きさそのものがピコ秒の時間スケールで揺らぐ自由水の量を反映している。また図1右では、化粧水も純水と類似したスペクトル形状を示しているが、これはテラヘル

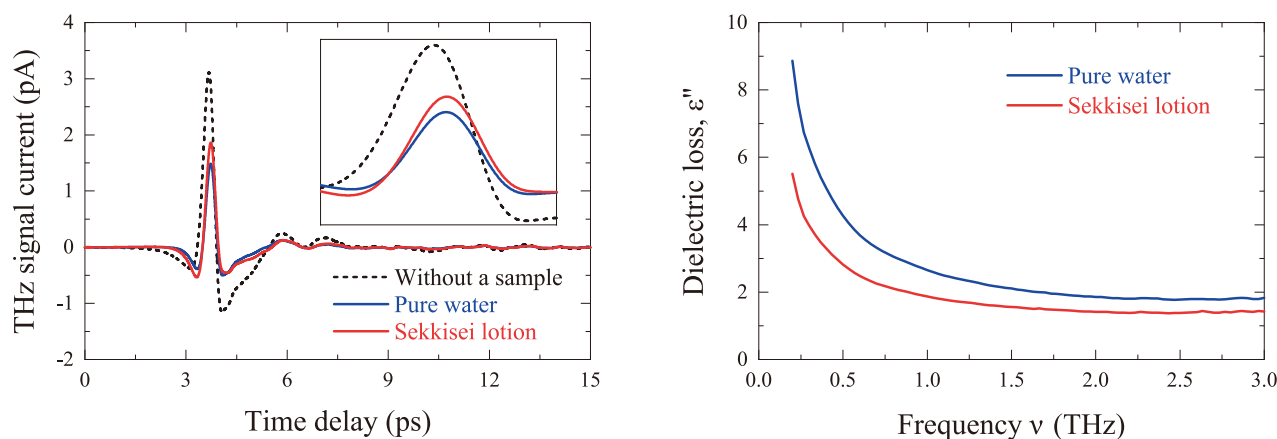


図1 (左) THz TD-ATR測定で得られたテラヘルツパルスの電場波形。挿入図はパルスピーク付近の拡大図。
(右) 32°Cにおける純水と化粧水 (雪肌精) の誘電損失スペクトル。

ツ帯では化粧品基剤に特有の吸収ピークが現れず、化粧水中の自由水だけが誘電損失スペクトル $\varepsilon''(\nu)$ に寄与していることを表している。したがって、純水に対する化粧水の吸収の比率は化粧水中に含まれる自由水量比に他ならず、本THz TD-ATR測定ではその値が $66.1 \pm 0.05\%$ であると見積もられた。しかしこの値は、赤外領域に見られるH-O-H変角振動ピーク強度から推定した水分量比(89.9%)よりも有意に小さい。ここで、H-O-H変角振動は化粧水中に含まれる全ての水分子(自由水+水和水)を観測しているのに対し、テラヘルツ帯の誘電損失スペクトル $\varepsilon''(\nu)$ には自由水しか寄与を及ぼしていないため、そもそも同一の水を見ているわけではない。ここで両水分量比を比較すると、化粧水中ではその差分に相当する23.8%(=89.9 - 66.1)の水分子が水和水となりテラヘルツ波と相互作用しなくなっていることがわかる。

3. 2. 定常状態におけるマウス皮膚中の自由水量評価

上記の解析手法は自由水のみがテラヘルツ帯の吸収に寄与していることを前提としているが、これまでの研究では水以外の角質構成成分がテラヘルツ帯でほとんど吸収を示さないことが報告されている。そのため純水や化粧水に限らず、ヘアレスマウスの誘電損失スペクトル $\varepsilon''(\nu)$ から角質層内の自由水量を定量解析することも可能であると考えられる。そこで、塗布物を適用する前に測定した定常状態のマウス皮膚のTHz TD-ATR測定結果を図2左に示す。ヘアレスマウスの誘電損失スペクトル $\varepsilon''(\nu)$ は純水のそれと類似した形状を示しているものの、その値は非常に小さいことがわかった。また、挿入図に示すように純水に対するマウスの吸収比率は周波数依存性があり、周波数の増加に応じて自由水量が減少している傾向が見出された。周波数ごとに自由水量が異なるという結果には違和感を感じるが、これは式(1)で記述したようにエバネッセント光の局

在深さ d_p が周波数 ν に依存していることが原因に挙げられる。式(1)を用いて実際にエバネッセント光の局在深さ $d_p(\nu)$ を計算すると、 $\nu=0.5$ THzでは $d_p=50.0\mu\text{m}$ 、 $\nu=1.0$ THzでは $d_p=25.6\mu\text{m}$ 、 $\nu=2.0$ THzでは $d_p=12.5\mu\text{m}$ となり、高周波側では局在深さが小さい、すなわちマウス表皮の浅い領域のみを観測していることが理解できる。したがって、周波数ごとに(マウス)/(純水)の吸収比率が異なるという結果は、マウス表皮内の深さ方向における自由水量の勾配を反映していると考えられる。

吸収の大きい媒質のATR分光を行ったとき、プリズム表面から深さ z までの領域が全体の吸収に占める寄与率 C_{0z} は

$$C_{0z}(\nu) = 1 - \exp\left(-\frac{2z}{d_p(\nu)}\right) \quad (2)$$

で与えられる^{6,7)}。そのため、詳細は省くが式(1)および(2)を用いた理論解析計算を行うことで、誘電損失スペクトル(図2左)からマウス皮膚中における自由水量の深さプロファイルを求めることができる。その結果、図2右に示すようにヘアレスマウス皮膚表層 $10\mu\text{m}$ から $15\mu\text{m}$ にかけて自由水量が急激に増加し、その後 $50\mu\text{m}$ までなだらかな増加を経てさらに深い領域では約30%で一定に達していることがわかった。

これまで角層水分量は静電容量や導電率を測定する電気的手法や共焦点ラマン分光を用いた評価が行われてきたが、これらの測定方法では原理的に自由水と水和水を識別することができないため、それらの総和(全水量)を出力値として得ている。ここで、 3300cm^{-1} 付近に位置するOH伸縮共焦点ラマンスペクトルを用いてヒト前腕の全水量プロファイルを求めた先行研究結果⁹⁾も図2右に示す。今回のTHz TD-ATR測定ではヘアレスマウス腹部を測定しているため両者の定量的な比較は困難であるが、共焦点ラマン分光で得た全水量がどの深さにおいても自由水量を大き

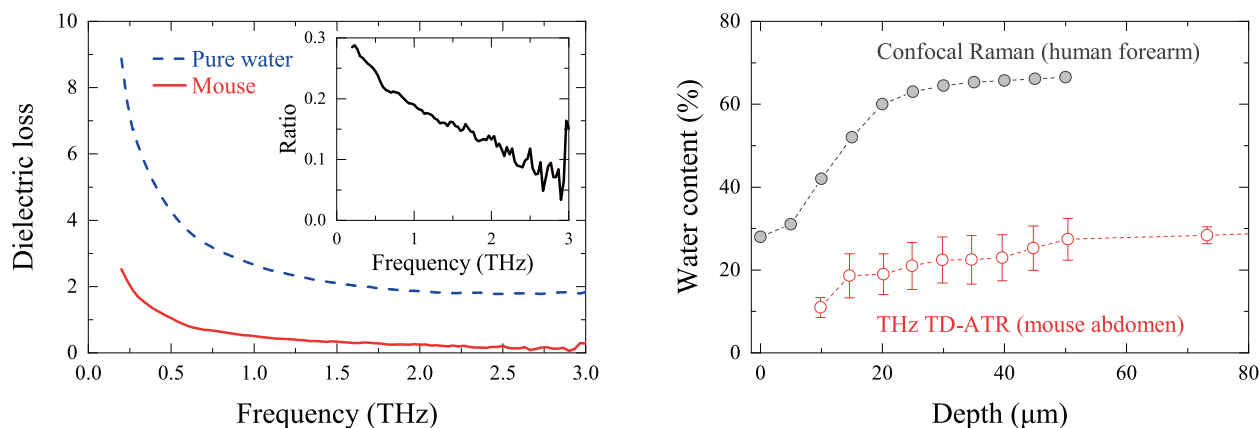


図2 (左) 純水とヘアレスマウス腹部の誘電損失スペクトル。挿入図は純水に対するヘアレスマウスの誘電損失の比。(右) マウス腹部におけるバルク水量の深さプロファイル。参照用データとしてヒト前腕の共焦点ラマン測定結果⁹⁾も示している。

く上回っていることが定性的に理解できる。全水量と自由水量の差は水和水量に相当するため、図2右に示した両プロットの差は皮膚表皮内に存在する水和水の量を反映する。概して言えば、20 μm 以下ではバルク水に対して水和水の割合が特に多いのに対し、20 μm を超えるとバルク水の割合が徐々に増えて、深さ50 μm では水和水：バルク水の比率がおおよそ3：2程度に収束している。上述のように、ここでは異なる皮膚試料を比較しているため厳密な議論を行うことはできないものの、本結果は顆粒層より深部に存在する生細胞中では細胞内水の約6割程度が水和水として存在しているのに対し、角質層中では自由水割合がさらに減少して相対的に水和水の比率が高くなっていることを示唆している。生体分子に束縛されている水和水に対して自由水の方が高い蒸気圧を示すことを鑑みれば、タイトジャンクションの外側に位置する角質層内では気化を妨げるバリアが存在しないため自由水量が低下するという傾向は直感的にも納得できるものである。

3. 3. 純水・化粧水塗布後におけるマウス皮膚中の自由水量評価

次に、定常状態のヘアレスマウスに純水と化粧水（雪肌精）をそれぞれ1mLずつ塗布したときの自由水量変化を図3右に示す。塗布後1分目の時点では、純水（上段）と化粧水（下段）ともに著しい自由水量の増加が認められ、その影響は特に表面付近で顕著であった。しかし塗布後11分経過では、純水を塗布したマウス皮膚中の自由水量が塗布直前と同程度まで減少しているのに対し、化粧水塗布では自

由水量が有意に高いレベルに保たれていることが見出された。ここで自由水量の増加割合を評価するために、定常状態（塗布前）に対する塗布後の自由水量の比に相当する“相対自由水量”の深さプロファイルを求めた結果を図3右に示す。1分後の時点では純水塗布と化粧水塗布で酷似した相対自由水量のプロファイルを示し、角質層（深さ20 μm 以下）では一時的に自由水量がおおよそ3倍にまで増加するものの、観測領域が深くなるにつれて自由水量の相対値が1.5倍程度に収束していることがわかる（化粧水における深さ10 μm の異常値は皮膚表面でふき取れずに残留していた化粧水の影響であると考えられる）。また純水・化粧水塗布に共通して、塗布直後1分目の時点において50 μm より深い領域で相対自由水量が50%も増えているということは、皮膚表面に晒された自由水は角質層のバリアをくぐり抜けて急速に深部へ到達していることを示唆している。

塗布直後には純水と化粧水が同様の自由水量プロファイルを示すものの、その10分後には両者の間に有意な差が認められる。純水塗布時には相対自由水量が1、すなわち塗布前の定常状態にまで戻っているが、この原因としては(i)塗布した水が蒸発によって失われたこと、また(ii)塗布した水が水和水に変化したこと、の2点が考えられる。ただしTHz TD-ATR測定と並行して実施した電気伝導率測定では、塗布前($5.8 \pm 2.3 \mu\text{S}$)と塗布後11分目($5.8 \pm 0.8 \mu\text{S}$)で全水量に有意差が見られないという結果が得られていることを踏まえれば、可能性(ii)は排除でき、塗布した水が全て蒸発したという(i)のシナリオが妥当であると考えられる。その一方で、化粧水を塗布した場合は深さ

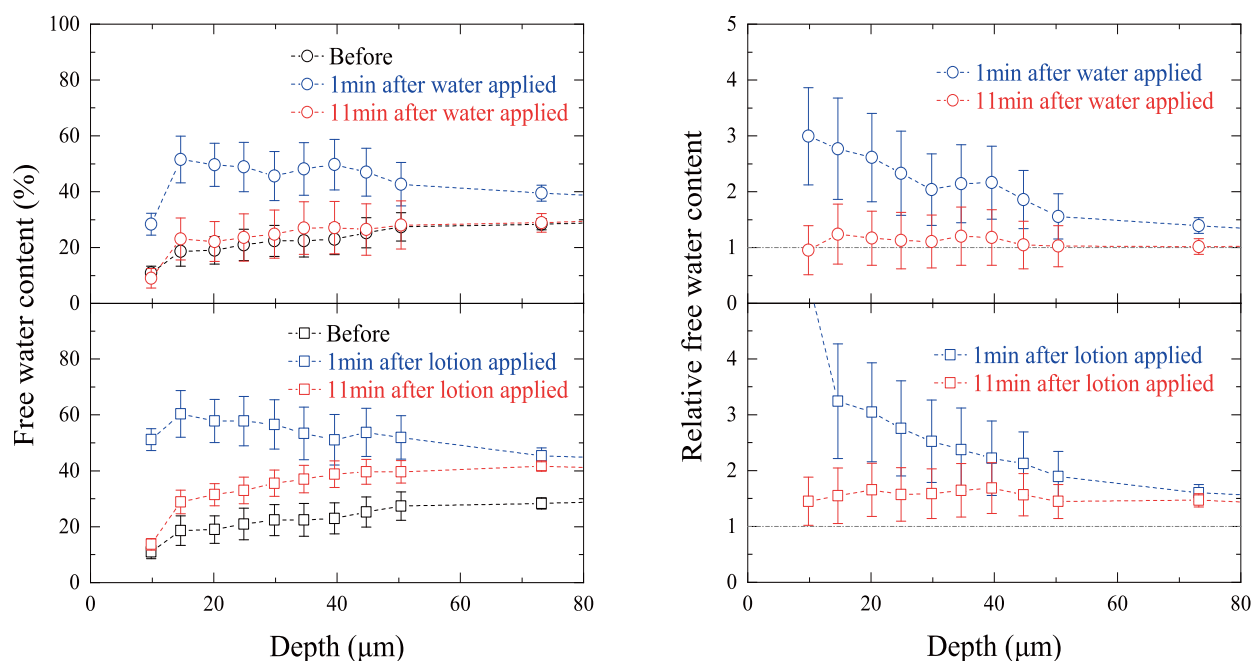


図3 (左) マウス腹部におけるバルク水量の深さプロファイルと塗布後の経時変化。上段：水を適用した場合、下段：化粧水を適用した場合。(右) 塗布前に対するバルク水量の相対比。

にかかわらず一様に相対自由水量が50%程度増加していることが見出された。化粧水中の約1/3は自由水ではない成分(溶質基剤ならびに水和水)で占められているにもかかわらず、純水に比べて化粧水の方がより高い“自由水の保湿能力”を有していることは非常に興味深い。

4. 総 括

本研究ではTHz TD-ATR測定を用いて皮膚表皮内の“自由水”深さプロファイルを定量的に評価することに成功した。ヘアレスマウスを用いた実証実験では、角質層内の水の大半は水和水として存在し、自由水の比率は低い値に保たれていることが明らかになった。また、皮膚に純水と化粧水(雪肌精)を塗布すると、適用直後は両者ともに特に皮膚表面で自由水量が著しく増加したのに対し、化粧水塗布の場合のみ10分以上経過した時点でも効果的に“自由水の保湿”が行われていることが見出された。これまで水溶液レベルでは示差走査熱量測定(Differential scanning calorimetry, DSC)などを用いて実験的に自由水/水和水の割合を評価する研究は行われていたが、in vivoで水の“質”を評価する研究はほとんど行われていなかった。そのため、生体侵襲性の低いテラヘルツ波を用いてin vivoで皮膚中の自由水量を求めるという本技術は従来の水分量評価技術とは一線を画していると考えられる。今後は共焦点ラマン分光などを用いた全水量測定との融合を図りつつ、THz TD-ATR測定系の最適化を進めることで本質的な意味で保湿の重要性を明らかにすることができる可能性がある」と期待している。

謝 辞

本研究の実施にあたって技術的な御指導、御協力をいただいた松井毅博士と横尾里佳氏に感謝申し上げます。また、

本研究を助成対象課題として採択していただいた公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) 上平恒, 多田羅恒雄, 「水の分子生理」メディカル・サイエンス・インターナショナル(1998).
- 2) 松井毅, 陸上脊椎動物の皮膚の適応進化と内在性レトロウイルス. ウイルス, **66**, 31-38, (2016).
- 3) 安部隆, 皮膚と水. 油化学, **34**, 413-419, (1985).
- 4) T. Matsui *et al.*, SASPase regulates stratum corneum hydration through profilaggrin-to-filaggrin processing. *EMBO Mol. Med.* **3**, 320-333, (2011).
- 5) B. Baguchi, Water dynamics in the hydration layer around proteins and micelles. *Chem. Rev.* **105**, 3197-3219, (2005).
- 6) N. J. Harrick, Electric field strengths at totally reflecting interfaces. *J. Opt. Soc. Am.* **55**, 851-857, (1965).
- 7) K. Ohta and R. Iwamoto, Experimental proof of the relation between thickness of the probed surface layer and absorbance in FT-IR/ATR spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* **39**, 418-425, (1985).
- 8) M. Nagai *et al.*, Terahertz time-domain attenuated total reflection spectroscopy in water and biological solution. *Int. J. Infrared Milli. Waves* **27**, 505-515, (2006).
- 9) S. Bielfeldt *et al.*, Assessment of human stratum corneum thickness and its barrier properties by in-vivo confocal Raman spectroscopy. *IFSCC Magazine* **12**, 9-15, (2009).