

周波数変調原子間力顕微鏡 (FM-AFM) を用いた UV 光照射による表皮細胞表面の水和層変化の観察

Observation of changes in the hydration layer on the surface of epidermal cells by UV light irradiation using frequency modulated atomic force microscopy (FM-AFM)

東理大・工(学) *志村 知奈璃 東理大・工(学) 賀東 春人 東理大(正) 佐藤 魁星

東理大・工(正) 佐々木 信也

Chinari Shimura*, Haruto Gato**, Kaisei Sato**, Shinya Sasaki*

*Tokyo University of Science, **Graduate School of Tokyo University of Science

1. 緒言

美しさの象徴である若々しい肌を保つため、肌の保湿について様々な研究が進められている。保湿は、張りやなめらかさといった肌の美しさ改善に大きく作用する。また、皮膚の保湿においては、最表面の表皮が水分を保持し、この水分量は紫外線等の外的刺激によって減少することが報告されている²⁾。特に、紫外線の中でも波長が 280-315 nm の紫外線 B 波 (ultraviolet B : UVB) は表皮に侵襲し、日焼けや皮膚がんなどを引き起こすことが知られている。先行研究では、マウスの皮膚に UVB を照射することで経表皮水分蒸散量が増加することが報告されており、皮膚の保湿に UVB が強く作用することが示唆されている³⁾。

近年、組織スケールで確認されている現象を細胞スケールから解明する取り組みに关心が寄せられている。さらに、生体を構成している物質は水和することで機能を発現していること⁴⁾から、皮膚の保湿の詳細な理解には、表皮細胞単体における水和層の理解が重要となる。しかし、溶液環境下で生きた細胞を測定する難しさから表皮細胞の水和構造、さらには UVB 照射による水和構造変化は未だ調査されていない。

本研究では、細胞培養下で UVB がケラチノサイト表面の水和構造に及ぼす影響を調査するために、ケラチノサイト表面を光学顕微鏡および溶液環境で水和構造を観察することを可能とする周波数変調原子間力顕微鏡 (FM-AFM : Frequency modulation atomic force microscope) を用いて観察を行った。

2. 実験

2.1 細胞培養

表皮細胞として、ラットのケラチノサイトを用いた。細胞は 37°C, CO₂ 濃度を 5% で培養し、実験に使用した。表 1 に細胞培養および実験に使用した試料と試薬を示す。

2.2 UV 照射

図 1 に示すグローブボックスを用いて温度を 37°C に保ち、市販の UV ライト (CSL-30AB, コスモバイオ, JP) で照射した。表 2 に照射条件を示す。

2.3 FM-AFM 測定

FM-AFM (SPM-8100FM, SHIMAZU, JP) を使用し、UVB 照射前後の培養液における細胞表面の Z-X 面での斥力分布を取得した。FM-AFM は、探針試料間の相互作用力を自励振動するカンチレバーの共振周波数変化として検出する。試料表面から感知する斥力が大きくなるとカンチレバーの共振周波数も大きくなる。測定時にカンチレバーの共振周波数が増加し続ける試料表面近傍領域を斥力層と呼ぶ。カンチレバーはシリコン製カンチレバー (PPP-NCSTAuD-10, ばね定数 C : 11 N/m, 共振周波数 f : 78-80 kHz) を使用した。表 3 に測定条件を示す。

Table 1 Details of the experimental samples

Classification	Name	Manufacturer
Cells	FRSK	JCRB Cell Bank
Culture dishes	Mulch culture dish	VWR
Culture solution	MEM	Thermo Fisher
FBS	Fetal Bovine Serum	Thermo Fisher
Antibiotics	Antibiotic-Antimycotic	Thermo Fisher

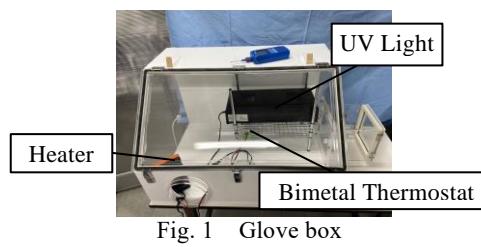


Fig. 1 Glove box

Table 2 UV irradiation condition

Temperature, °C	37
Intensity of irradiation, mW/cm ²	0.85
Wavelength, nm	312
Dosage, mJ/cm ²	800

Table 3 FM-AFM observation condition

Temperature, °C	33
Amplitude, mV	500
Resonant frequency, kHz	78-80
Scan range (Z×X), Nm	4×3
Scan speed (Z), Hz	5.0

3. 結果

3.1. 光学顕微鏡像

図2 (a) にUVB照射前の、(b) にUVB照射後の光学顕微鏡で取得した細胞の形状像を示す。照射前後において、光学顕微鏡像では形状像の違いがみられなかった。

3.2. FM-AFM測定

図3にFM-AFMで取得したUVB照射前後の細胞表面のZ-X面における斥力分布を示す。上段のZ-X面画像では、画像内で下部の方が試料に近く、明るい領域ほどカンチレバーと試料の斥力相互作用力が大きいことを示している。図3において、下段のフォースカーブは単調に増加していることが確認された。これは、深さ方向に対して、膜構造の変化がないことを示しており、細胞表面上において单一の斥力層が存在しているものと考えられる。また、斥力層は、照射前では600 nm程度、UVB照射後では400 nm程度の厚さであった。

4. 考察

ケラチノサイト細胞膜は、リン脂質やタンパク質で構成されていることが知られている⁵⁾。福間らは、リン脂質表面に、1 nm未満の水分子が吸着することを報告している⁶⁾。一方で、今回の実験結果ではケラチノサイト表面には、数百 nm程度の斥力層が存在し、リン脂質表面の水和構造とは大きく異なる界面構造を持つことが確認された。そのため、今回に実験結果における斥力層は、表面のリン脂質に吸着する水分子の影響によるものではなく、ケラチノサイト上に存在する水和したタンパク質の影響であると考えられる。

UVB照射に関して、光学顕微鏡観察ではケラチノサイトの形状に変化は見られなかった一方で、FM-AFM測定では水和層の減少が確認された。このことから、UVB照射によって、主にケラチノサイト表面近傍が構造変化すると考えられる。また、五十里らの研究では、UVB照射によってケラチノサイト表面に存在する膜貫通タンパク質が、細胞内に移行することが報告されている⁷⁾。このことから、UVB照射による水和層厚さの減少は、膜貫通タンパク質が細胞内に移行することによって表面に存在するタンパク質が減少したためと考えられる。

5. 結言

細胞培養下でUVBがケラチノサイト表面の水和層に及ぼす影響を調査するために光学顕微鏡およびFM-AFMを用いて観察を行った結果、以下の知見を得た。

- (1) 光学顕微鏡の結果より、UVB照射前後における細胞形状の違いは確認されなかった。
- (2) FM-AFMを用いて細胞表面の斥力層観察を行ったところ、UVB照射前には600 nm程度、照射後には400 nm程度の厚さの斥力層が確認された。このことは、UVB照射によって、界面構造が変化することを示唆するものである。

文献

- 1) 早川・佐藤・雜賀・高畠・森松：ブタ由来エラスチンペプチドの経口摂取によるマウス皮膚水分含量の向上、日本畜産学会報、80, 2 (2009) 215-222.
- 2) C. F. Hung, W. Y. Chen, I. A. Aljuffali, Y. K. Lin, H. C. Shih & J. Y. Fang: Skin aging modulates percutaneous drug absorption: the impact of ultraviolet irradiation and ovariectomy, Age, 37, 21, (2015).
- 3) 田中：高分子材料と水：自由水、不透水、中間水一生体親和性と高分子材料に吸着した水の構造との相関一、化学と教育, 60, 6 (2012), 250-253.
- 4) 沼田・千葉・中野・中田：細胞生物学、化学同人 (2012) 2-9.
- 5) T. Fukuda, M. J. Higgins & S. P. Jarvis, Direct Imaging of Individual Intrinsic Hydration Layers on Lipid Bilayers at Angstrom Resolution, Biophysical Journal 76, 10, (2007), 3603-3609.
- 6) 五十里：微弱紫外線による皮膚タイトジャンクションバリアの破壊機構の解明と保護化合物の探索、コスメトロジー研究報告, 28, (2020), 62-67.

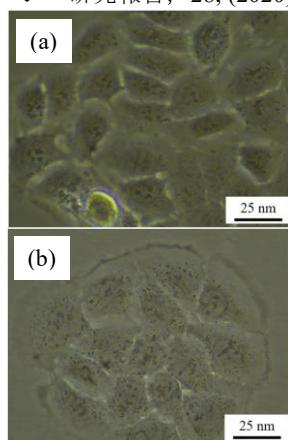


Fig. 2 Fetal rat skin keratinocyte
(a) Before and (b) After irradiation

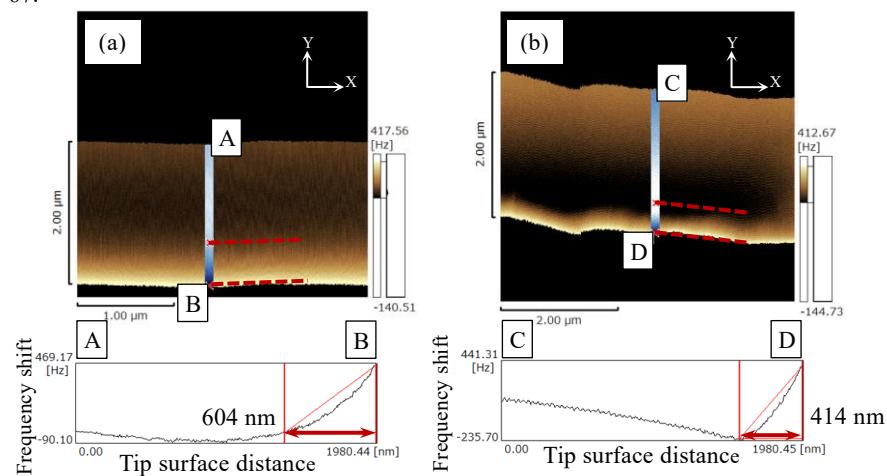


Fig. 3 Z-X measurement of surface
(a) Before and (b) After irradiation