

表皮電位を指標とした 皮膚バリア光治療法の時空間的評価

東京都立大学システムデザイン学部機械システム工学科 阿部 結奈

1. 緒言

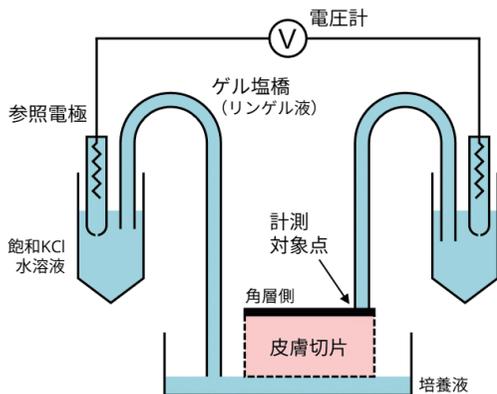
表皮ケラチノサイトは、角層を主体とする構造的な皮膚バリアを形成する一方、近年では侵害受容や温度感覚等、様々な外的刺激の伝達に参与していることが明らかになりつつある¹⁾²⁾。光刺激もまた表皮によって受容されることが示唆されている。表皮細胞には光受容分子オプシンが発現しており³⁾、可視光周辺の波長域の光が、メラニン産生、創傷治癒、コラーゲン産生等のプロセスを調節する働きを持つことが知られている⁴⁾。本研究では、先行研究⁵⁾で報告された赤色光の皮膚バリア回復促進効果に着目した。この効果には網膜度と類似した光受容経路の関与が示唆され⁶⁾、細胞レベルでは細胞形態の改善やタンパク質発現量の増大が観察されている⁷⁾。

ここで、表皮組織内にはイオンの局在が生じ、 Ca^{2+} などの濃度差が細胞増殖や分化のシグナルとして働くことが知られている⁸⁾。このような濃度差により、組織の厚み方向には表皮電位 (trans-epidermal potential difference, TEP) と呼ばれる電位差が生まれ、その大きさはヒト皮膚では部位により数十mV程度に達する⁹⁾。TEPの値は皮膚バリアの機能不全 (イオン分布の変化を伴う) により減弱することから、バリアの定量評価指標として活用できる可能性がある¹⁰⁾。一般的なバリ

ア評価指標である経皮水分蒸散量と比較すると、TEPは皮膚組織の内部状態を反映するため計測雰囲気の影響を受けにくく、オンデマンドでの評価が可能となると期待できる。既報¹¹⁾では、ブタ皮膚切片の*ex vivo*モデルを用いて、実験的なバリア破壊によりTEPが減弱し再び回復すること、適切な条件での赤色光照射がTEPの回復を促進すること等を観察した。本研究では、赤色光によるバリア治療法の確立に向けた基礎的検討として、赤色光刺激の条件による回復効果の評価を試みた。

2. 方法

計測対象としてヘアレスマウス皮膚切片 (株式会社星野試験動物飼育所、ラボスキン) を用いた。これは体毛を持たないヘアレスマウス成体 (Hos: HR-1) の背部全層皮膚であり、摘出後は凍結せずに氷冷状態で輸送し、実験まで4°Cで保管したのち、実験直前に培養液 (gibco, DMEM、フェノールレッド不含) を含む濾紙に載せて室温に戻した。TEP計測系は既報⁹⁾¹²⁾を参考に、図1に示す形に組み立てた。リング液 (大塚製薬) に4wt%のアガロース (フナコシ、Agarose I) を溶解し、シリコンチューブ (AS ONE、ラボランチューブ、内径3 mm) に充填してゲル化させ、塩橋とした。電気化学アナライザ (BAS, AL7082E、開回路電圧測定モード) の2つの測定端子にそれぞれAg/AgCl



■ 図1 皮膚切片TEP計測系模式図。電圧計の両端子に参照電極を接続し、さらに表皮組織までを電解液(飽和KCl、リンゲル液、培養液、皮膚切片内組織液)で接続した。

参照電極(イーシーフロンティア、RE-1B)を接続した。2つの電極はそれぞれ飽和KCl溶液に浸し、さらに塩橋で皮膚切片と接続した。ここで、一方の塩橋は表皮(角層)側の計測対象点に直接接触させ、もう一方は培養液を含んだ濾紙を通じて真皮側と電氣的に接続した。この系は表皮(角層)と真皮との間に生じる電位差を計測するが、真皮内に電位差が発生しないことは先行研究⁹⁾および以前の報告¹³⁾、本研究の予備実験により確認済みであり、計測された値は表皮組織の厚み(深さ)方向に沿う電位差に等しいとみなすことができる。

光照射系は既報¹¹⁾と同様とした。白色LED光源(林時計工業、LA-HDF5010)に赤色フィルター(林時計工業、R-60 φ22.5 mm)とライトガイド(林時計工業、LGC1-3L1000)を取り付け、赤色光源として用いた。ライトガイド先端を対象に近づけ、直径8 mm程度の円形の領域に赤色光が照射されるよう調整した。光パワーセンサ(日置電機、Optical Power Meter 3664、Optical Sensor 9743)で放射照度を確認し、LED光源の出力を目的の照度に合わせた。

2.1. ヘアレスマウス皮膚切片のTEP計測

皮膚切片の表皮側で計測対象点を決め、この点におけるTEPを60秒間計測した。サンプリング周期は0.1秒とした。60秒間の計測値から平均を算出し、TEPの初期値とした。計測後、計測対象点を中心とした10 mm角の範囲を、アセトン(富士フィルム和光純薬)を含ませた綿棒で拭くことで脱脂し、実験的にバリア機能不全状態を模擬した。このとき、表皮組織の機械的損傷を最小限に抑えるため、綿棒は皮膚切片表面を軽く転がすように操作した。1分間静置し、アセトンを揮発させた。

計測対象点のTEPを再度60秒間計測した。ここで、TEPが初期値の40-80%となったことを確認した。これより値が大きかった場合は、40-80%になるまでアセトン処理を繰り返した。値が40%未満となった場合は計測を中止し、この切片のデータを除外した。

2.2. 赤色光照射によるTEP変化の観察

まず2.1.と同様に、皮膚切片の表皮側で計測対象点を決め、TEPを60秒間計測した。その後アセトン処理を行い、再びTEPを60秒間計測し、電位差の大きさが初期値の40-80%となったことを確認した。

つづいて計測対象点に赤色光を照射し、各条件を比較した。照度条件の比較のため、放射照度を10、20、40 mW/cm²の3段階に設定し、各サンプルに60分間の照射を行った。このとき、照射開始から20分ごとにTEPを計測した。また、放射照度を20 mW/cm²に固定したうえで照射の持続時間を5分、1分および1秒に変更し、照射直後および照射終了後のTEPを計測した。すべての条件で照射開始から10分後、20分後に計測を行った。

また、光の効果の空間的な広がりについても検討した。放射照度を20 mW/cm²に、持続時間を20分に設定し、光照射点からの距離が異なる3点

の計測対象点をとって、照射開始から20分ごとにTEPを計測した。距離は0 mm (光照射点直下)、10 mm、20 mmとした。このとき、アセトン処理の領域は3つの計測対象点すべてが収まるよう、10 × 30 mmに広げた。

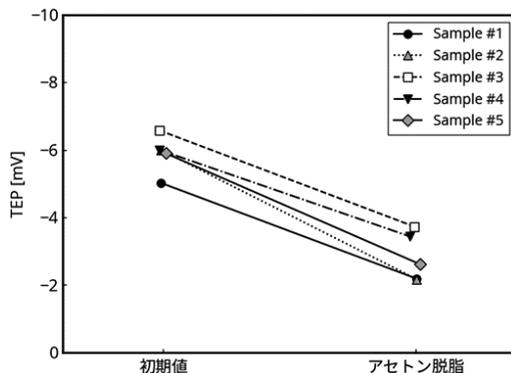
2.3. PVAゲルを用いたTEP連続計測の検討

比較的短時間に起きるTEP変化のモニタリングをめざし、連続計測の検討を行った。ここで、アセトン処理を施したヘアレスマウス皮膚の表面を覆い、水分の蒸発を妨げると、角層脂質の回復が阻害されることが報告されている¹⁴⁾。本計測系は塩橋内の電解液を介して電圧計と皮膚切片を接続するため、測定中は計測対象点が湿潤状態に保たれ、回復を阻害する可能性がある。この影響について確認するため、測定対象点を20 × 20 × 1 mmのゲル塩橋シートで覆い、この上から光を照射して10分ごとにTEPを計測した。光の放射照度は20 mW/cm²に、持続時間は10分に設定し、照射終了と同時にゲル塩橋シートを除去した。シートの材料として、従来用いていたアガロースゲルと、PVAクライオゲルの2種類を比較した。PVAクライオゲルは、25%ジメチルスルホキシド水溶液にPVA (Moiwol[®] 28-99, Sigma-Aldrich) 15wt%を加熱溶解し、凍結・融解のサイクルを3回繰り返すことで作成¹⁵⁾、純水中で洗浄したのち溶媒をリンゲル液に置換したものをを用いた。

また、皮膚切片に直接接触するチューブ充填のゲル塩橋をPVAクライオゲルに変え、1時間の連続計測を行った。計測開始から60秒後に光照射を開始し、計測終了まで照射を続けた。

3. 結果

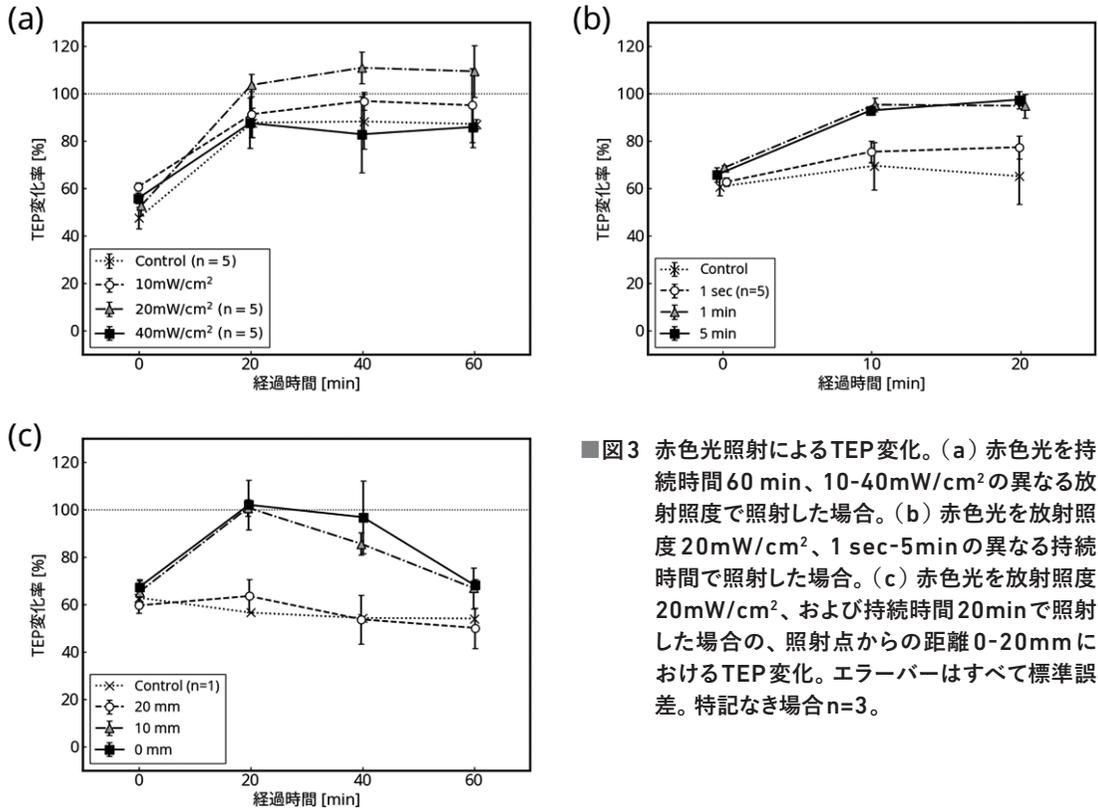
図2にヘアレスマウス皮膚片のTEP計測結果を示す。計測開始当初の状態では、各サンプルは皮膚表面(角層)側が負になる-6 mV前後の電位差を



■ 図2 マウス皮膚切片のTEP初期値、およびアセトン脱脂後のTEP。

示した。電位差の極性の向きは各先行研究^{9) 13) 16)}の報告と一致し、また電位差の大きさはヘアレスマウス皮膚の*ex vivo*¹⁶⁾および既報¹³⁾における*in vivo*計測結果の中間程度であった。アセトン塗布による脱脂処理を施すと、TEPは-2.2 mVから-3.4 mV程度の値にまで減少した。先行研究¹⁶⁾では、本研究結果よりTEP初期値の小さい(-4 mV程度)皮膚切片に対してテープストリッピングによる皮膚バリア破壊処理を施したところ、2 mV程度の電位差減少が観察された。ここで、TEPの値は部位により異なることが報告されている⁹⁾ため、以降の検討では各計測点における当初のTEPの値を100%として算出した変化率に基づき、電位差変動の傾向を比較した。アセトン処理による変動幅については先行研究¹⁶⁾を参考に、本研究では当初TEP値の40-80%に減少したサンプルを以降の実験に使用可能であると判断した。

図3(a)-(c)に光照射時のTEP計測結果を示す。なお、データの一部は図2の結果と同一のものである。脱脂処理により、TEPの値は平均して当初値の60%程度にまで減少した。その後、TEPの値は多くのサンプルで増大し元の水準に近づいたが、光照射の条件により回復の程度は異なった。



■ 図3 赤色光照射によるTEP変化。(a) 赤色光を持続時間60 min、10-40mW/cm²の異なる放射照度で照射した場合。(b) 赤色光を放射照度20mW/cm²、1 sec-5minの異なる持続時間で照射した場合。(c) 赤色光を放射照度20mW/cm²、および持続時間20minで照射した場合の、照射点からの距離0-20mmにおけるTEP変化。エラーバーはすべて標準誤差。特記なき場合n=3。

放射照度の条件について比較すると(図3(a))、10 mW/cm²および20 mW/cm²では、光を照射しない場合に比べてTEP値の回復が早まり、また、その効果は20 mW/cm²の条件のほうがより大きかった。一方、さらに放射照度が大きい40 mW/cm²では、回復の程度は光を照射しない場合とほぼ同等であった。

照射の持続時間について比較すると(図3(b))、1 minおよび5 minの条件では、照射開始後20分までに、いずれの場合も最大で100%程度にまでTEPが回復した。1 secでは、回復促進的な効果はほとんどみられなかった。照射点から空間的に離れた点での回復については(図3(c))、照射点直下の距離0 mmの点と距離10 mmの点³、特に照射終了直後の20 minの時点において同様の回復

傾向を示した。距離20 mmの点、および光を照射しなかった点では回復がほとんどみられなかった。なお、この実験では他の実験に比して全体的にTEP回復が小さい傾向がみられ、すべての条件で光照射終了後、時間経過に伴いTEPが減少していった。推測される原因については後述する。

図4(a)(b)にPVAハイドロゲル塩橋を用いたTEP連続計測の検討結果を示す。

ハイドロゲル被覆の影響を比較すると(図4(a))、いずれの条件でも10分間の被覆・光照射の直後に、TEPの値は初期値の20%程度にまで減少した。ゲルを除去した後、アガロースゲルで被覆したサンプルの回復は平均で45%程度にとどまったが、PVAゲルで被覆したサンプルは平均で90%程度にまで回復した。

PVAゲル塩橋を用いて照射中のTEP連続計測を行ったところ(図4(b))、計測開始時に40%程度であったTEP変化率は、3600秒時点で約83%にまで回復した。

4. 考察

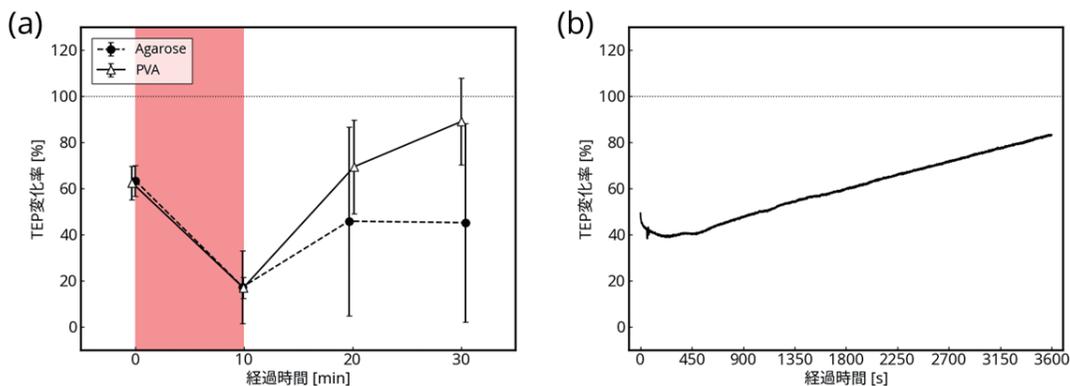
光照射によるTEP値回復促進効果は、皮膚が受け取った光エネルギーの密度(放射照度と持続時間の積、フルエンス)に対して単調な相関関係を示さなかった。放射照度については20 mW/cm²における回復効果が最も大きく、また、持続時間については1分間程度でも、60分間の連続照射に近い回復効果がみられた。

本研究以前に実施した、家畜ブタの皮膚片を用いた実験¹¹⁾では、放射照度が大きいほどより大きな回復促進効果がみられたものの、光源装置の最大照度(40 mW/cm²)を超える条件については検討できなかった。ブタ皮膚においても、さらに放射照度が大きい条件では回復効果が小さくなる傾向がみられた可能性がある。またフルエンスを考慮すると、40 mW/cm²の照度で10分間の照射を行った場合にはTEPが初期値に近いレベルまで

回復した一方、フルエンスで勝る26 mW/cm²・60分間の照射では十分に回復しないサンプルが多かった。本研究の結果と照らし合わせると、光によるTEP値回復促進効果はエネルギー量依存的に現れるものではなく、短時間であっても適切な照度の光を当て、治療的效果を誘起するプロセスがより重要であると推測される。

関連する研究例として、赤色LED照射によるマウス皮膚の創傷治癒促進法に関し、フルエンスが同一となる複数の条件で比較が行われた¹⁷⁾。この研究では、照度8 mW/cm²程度の光を約600秒/日で露光する条件でもっとも治療効果が高く、他の照度・時間の条件では効果が小さかった。治療プロセスに関与する細胞の代謝や増殖を促進するには一定以上の照度の光が必要である一方、過剰な刺激は有害な効果をもたらす治癒促進を妨げたと推測された。本研究でみられたTEP回復効果の傾向についても、同様の機序によって説明がつく可能性がある。

また、既報¹¹⁾のブタ皮膚切片を用いた実験と、本研究のマウス皮膚切片を用いた実験では、最も効果が高いとみられる光刺激の強度が異なった。



■ 図4 PVA水素ゲル塩橋を用いたTEP連続計測の検討。(a)水素ゲルで被覆しながら光を照射した場合のTEP値変化。n=3。エラーバーは標準偏差。薄赤色で塗りつぶした領域は被覆・光照射の期間を表す。(b)PVA水素ゲル塩橋を用いたTEP変化の連続計測。

ブタ皮膚切片は少なくとも 40 mW/cm^2 以上の光による刺激を必要とした一方、マウス皮膚切片ではこれより小さい 20 mW/cm^2 の照度でより大きな回復促進効果がみられた。本研究ではこの差異の原因特定に至らなかったものの、両者の皮膚構造の違いが重要な要因であると考えられる。例えば、ブタ皮膚の各組織の厚さはヒト皮膚に近とされ¹⁸⁾、表皮の厚さは平均して $100\mu\text{m}$ 程度¹¹⁾ である一方、本研究で用いたヘアレスマウスHR-1の表皮の厚さは $10\mu\text{m}$ 以下であった¹⁹⁾。このような差異は生理的特性・光学的特性の差異につながり、結果としてそれぞれ異なる光感受性を示したものと推測できる。

さらに、光照射点から離れた点での計測結果から、光刺激によるTEP回復促進効果は照射点の中心から 10 mm 程度離れた点にまで伝播することが示唆された。ブタ皮膚切片を用いた既報¹¹⁾ においては、回復効果は距離 20 mm の点にまで広がったとみられる結果が得られており、この差異も皮膚構造の違いによるものと推測される。なお、この実験ではすべての条件でTEP値の減少がみられたが、これは同一の皮膚切片上に計測対象点を3点とり、アセトン処理によるバリア破壊の面積が他の実験の3倍となったことが組織への負荷を増大させたためであると考えられ、既報¹¹⁾ でも同様の傾向が観察された。効果の伝播に関しては、先行研究²⁰⁾ において表皮組織内の生細胞に局所的なレーザー刺激を印加し、周囲の細胞で一過的な Ca^{2+} 濃度の上昇が観察された例があり、バリア破壊への応答や外的刺激のシグナル伝達との関連が推測されている。光による刺激の効果も、表皮内イオン分布の変化などを介して空間的に伝播した可能性が考えられる。

光刺激による回復促進メカニズムの解明や、最適な刺激条件の探索のために、TEPを指標としたリアルタイム評価が有用であると期待できる。先

述の通り、本研究で用いたTEP計測系では、皮膚切片サンプルがゲル塩橋内の溶媒（電解液）を介して接続されるため、計測中に皮膚が水和しバリア回復が妨げられる可能性があった。本研究では、生体親和性が高いゲル材料としてアガロースとPVAの2種類を比較し、PVAゲルでよりTEP回復阻害効果が小さくなることを確認した。PVAゲルは柔軟性に優れ、アガロースゲルより高分子の割合が大きい（含水率が低い）配合で十分なハンドリング性を示したため、皮膚に影響を与えにくい塩橋材料の有力な候補となる。本研究ではこのPVA塩橋を用い、光刺激によってTEP値が回復する様子を観測することに成功したが、その回復は非連続計測の結果と比較すると遅い傾向にあった。塩橋による皮膚表面の閉塞および水分供給の阻害の効果は小さく、光照射の回復促進効果のほうに支配的であったとみられるものの、非連続計測では10分程度で回復が頭打ちになる比較的早い変化がみられたことを考慮すると、塩橋の影響は依然として無視できない水準にある。TEPは十分に大きな内部抵抗を持つ計測器により開回路電圧として計測するため、回路の電気抵抗値の増大はある程度許容でき、したがって電解液の接触をさらに減らす余地がある。今後、生体親和性と良好な水和特性を兼ね備えた塩橋担体を検討し、組織のイオン動態を攪乱しない連続計測を実現したい。

5. 総括

本研究では、表皮バリアの健全性に伴って変わるTEPの値を指標として、ヘアレスマウス皮膚切片における赤色光の皮膚バリア回復促進効果の評価を試みた。既報¹¹⁾ のブタ皮膚切片を用いた検討の結果からは、放射照度が大きいほど回復促進効果も大きいことが示唆されたが、本研究では最大照度の条件で効果の減弱がみられ、刺激に一定の有効域があることが示唆された。表皮組織の構造

は生物種だけでなく、解剖学的部位や環境、年齢等によって異なるため、光刺激に対する感受性も変動することが予測される。したがって治療法としての確立に向けては、治療効果を個別に確認してパラメータを至適範囲に調整することが重要であり、TEPのようなオンデマンドに利用できるリアルタイム評価指標が有用である。In vivoでのTEP計測に向けては既にウェアラブルデバイスのプロトタイプを開発済みであり²¹⁾、外的刺激機能と組み合わせた新たな皮膚ヘルスケアへのアプローチ開拓が期待される。

謝辞

本研究の遂行にあたり、ご支援を賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に心より御礼申し上げます。

また多大なご助言とご協力をいただきました東北大学 西澤松彦教授、辰井裕希氏をはじめとする研究室の皆様深く感謝申し上げます。

参考文献・他

- 1) Sadler K E, Moehring F, Stucky C L. Keratinocytes contribute to normal cold and heat sensation. *Elife* 9, 1-14 (2020)
- 2) Talagas M, Lebonvallet N, Berthod F, Misery L. Lifting the veil on the keratinocyte contribution to cutaneous nociception. *Protein Cell* 11, 239-250 (2020)
- 3) Suh S, Choi E H, Atanaskova Mesinkovska N. The expression of opsins in the human skin and its implications for photobiomodulation: A Systematic Review. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 36, 329-338 (2020)
- 4) Shin D W. Various biological effects of solar radiation on skin and their mechanisms: implications for phototherapy. *Animal Cells Syst. (Seoul)*. 24, 181-188 (2020)
- 5) Denda M, Fuziwara S. Visible Radiation Affects Epidermal Permeability Barrier Recovery: Selective Effects of Red and Blue Light. *J. Invest. Dermatol.* 128, 1335-1336 (2008)
- 6) Goto M, Ikeyama K, Tsutsumi M, Denda S, Denda M. Phosphodiesterase inhibitors block the acceleration of skin permeability barrier repair by red light. *Exp. Dermatol.* 20, 568-571 (2011)
- 7) Chabert R *et al.* Evaluation of light-emitting diodes (LED) effect on skin biology (in vitro study). *Ski. Res. Technol.* 21, 426-436 (2015)
- 8) Pillai S, Bikle D D, Mancianti M -L, Cline P, Hincenbergs M. Calcium regulation of growth and differentiation of normal human keratinocytes: Modulation of differentiation competence by stages of growth and extracellular calcium. *J. Cell. Physiol.* 143, 294-302 (1990)
- 9) Barker A T, Jaffe L F, Venable J W. The glabrous epidermis of cavies contains a powerful battery. *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 242, R358-R366 (1982)
- 10) Kawai E, Nakanishi J, Kumazawa N, Ozawa K, Denda M. Skin surface electric potential as an indicator of skin condition: a new, non-invasive method to evaluate epidermal condition. *Exp. Dermatol.* 17, 688-692 (2008)
- 11) Abe Y *et al.* Red light-promoted skin barrier recovery: Spatiotemporal evaluation by transepidermal potential. *PLoS One* 14, e0219198 (2019)
- 12) Dubé J *et al.* Restoration of the Transepithelial Potential Within Tissue-Engineered Human Skin In Vitro and During the Wound Healing Process In Vivo. *Tissue Eng. Part A* 16, 3055-3063 (2010)
- 13) Abe Y *et al.* Minimally-invasive transepidermal potentiometry with microneedle salt bridge. *Biomed. Microdevices* 18, 55 (2016)
- 14) Grubauer G, Elias P M, Feingold K R. Transepidermal water loss: the signal for recovery of barrier structure and function. *J. Lipid Res.* 30, 323-333 (1989)
- 15) Terutsuki D *et al.* Totally Organic Hydrogel-Based Self-Closing Cuff Electrode for Vagus Nerve Stimulation. *Adv. Healthc. Mater.* 11, 1-9 (2022)
- 16) Denda M, Ashida Y, Inoue K, Kumazawa N. Skin Surface Electric Potential Induced by Ion-Flux through Epidermal Cell Layers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284, 112-117 (2001)
- 17) Lanzaforme R J *et al.* Reciprocity of exposure time and irradiance on energy density during photoradiation on wound healing in a murine pressure ulcer model. *Lasers Surg. Med.* 39, 534-542 (2007)
- 18) Vardaxis N J, Brans T A, Boon M E, Kreis R W, Marres L M. Confocal laser scanning microscopy of porcine skin: Implications for human wound healing studies. *J. Anat.* 190, 601-611 (1997)
- 19) Denda M *et al.* Exposure to a dry environment enhances epidermal permeability barrier function. *J. Invest. Dermatol.* 111, 858-863 (1998)
- 20) Kumamoto J, Goto M, Nagayama M, Denda M. Real-time imaging of human epidermal calcium dynamics in response to point laser stimulation. *J. Dermatol. Sci.* 86, 13-20 (2017)
- 21) Abe Y *et al.* Porous microneedle-based wearable device for monitoring of transepidermal potential. *Biomed. Eng. Adv.* 1, 100004 (2021)

Title : Spatiotemporal Evaluation of Light Treatment for Skin Barrier Based on Transepidermal Potential Difference

Author : Yuina ABE
Tokyo Metropolitan University

Abstract : As the involvement of epidermal keratinocytes in signal transduction triggered by various external stimuli attracts attention, red light irradiation has been suggested to promote the recovery process of skin barrier disorder. For its practical application as a therapy, further elucidation of the underlying mechanism and the optimum parameter of the stimuli is needed. In this study, transepidermal potential difference (TEP), the electrical voltage generated across the epidermal tissue, was utilized as a measurement indicator to evaluate the integrity of the skin barrier. TEP can be measured by a simple system with a pair of reference electrodes connected to the top and bottom of the tissue via salt bridges. The potential difference is derived from the localization of ions in the epithelial tissue, and the disturbance of normal distribution caused by damage to the skin structure decreases the potential difference. Skin specimens extracted from hairless mice were used for ex vivo measurement. The specimens showed ca. -6 mV of TEP and promoted recovery of TEP by red light irradiation after the barrier destruction by acetone. The acceleration of recovery varied depending on the radiance and the duration of the stimulation. Higher radiance showed better recovery even in short duration, but it seemed to have a “window” for maximizing the therapeutic effect and avoiding the toxic effect of high-intensity light. Then, continuous TEP measurement was carried out to observe the acute response to the irradiation. Hydrogel salt bridges composed of polyvinyl alcohol were shown as a promising material to avoid excessive hydration of the tissue during the measurement. This method will enable the *in situ* evaluation for elucidating the therapeutic effect of the light stimuli and its safe application.

※本論文は、(公財)コーセーコスメトロジー研究財団の公益事業として執筆されたものであり、論文掲載にあたり同財団のご承諾を得ております。また、財団HPでも無償公開しています。
<https://www.kose-cosmetology.or.jp/>