

分光測定に基づくヒト表皮水分の評価

江川 麻里子

2017 年 2 月

筑波大学審査学位論文

博士（工学）

分光測定に基づくヒト表皮水分の評価

江川 麻里子

筑波大学数理物質科学研究科審査

目次

第 1 章 序論	1
1.1 本論文の背景	1
1.2 本論文の目的	2
1.3 本論文の構成	3
第 2 章 皮膚の水分特性	4
2.1 皮膚の構造と機能	4
2.2 皮膚の水分特性	5
2.3 皮膚の水分測定法	6
第 3 章 皮膚の水分量深さ分布の解明	9
3.1 緒言	9
3.2 目的	10
3.3 方法	10
3.3.1 皮膚の自発ラマン散乱スペクトルの取得	10
3.3.2 皮膚の水分量深さ分布の評価	11
3.3.3 皮膚疾患部位の測定	14
3.4 結果	15
3.4.1 皮膚の自発ラマン散乱スペクトル	15
3.4.2 みかけの角層厚の評価	16
3.4.3 水分量深さ分布の加齢・季節変化	25
3.4.4 水付加後の水分量深さ分布の変化	28
3.4.5 水分量深さ分布とヒトの感覚	31
3.4.6 皮膚状態による水分量深さ分布の特徴	33

3.5	考察	36
3.6	結論	42
第 4 章	皮膚の近赤外拡散反射スペクトルの特徴評価	43
4.1	緒言	43
4.2	目的	44
4.3	方法	44
4.3.1	皮膚の近赤外拡散反射スペクトルの取得	44
4.3.2	投光・受光ファイバー配置の検討	45
4.3.3	近赤外拡散反射スペクトルからの皮膚水分量の算出	47
4.3.4	皮膚水分量の部位差の評価	48
4.4	結果	49
4.4.1	皮膚の近赤外拡散反射スペクトル	49
4.4.2	ファイバー配置と測定深さ	52
4.4.3	皮膚水分量の部位差と角層厚との関係	55
4.5	考察	60
4.6	結論	65
第 5 章	近赤外分光イメージングによる表皮水分量面分布の評価	67
5.1	緒言	67
5.2	目的	69
5.3	方法	69
5.3.1	モンテカルロ法による波長別測定深度シミュレーション	69
5.3.2	全顔の表皮水分量イメージング法の検討	71
5.3.3	狭領域の表皮水分量イメージング法の検討	73
5.3.4	皮膚の水分量面分布の特徴評価	74

5.4 結果	75
5.4.1 波長別測定深度	75
5.4.2 全顔の表皮水分量イメージング	76
5.4.3 狭領域の表皮水分量イメージング	83
5.4.4 環境湿度・季節の変化に伴う顔の水分量面分布の変化	86
5.4.5 肌状態による水滴のなじみパターンの解析	92
5.5 考察	96
5.6 結論	105
第 6 章 結論	107
6.1 結論	107
6.2 今後の展望	108
謝辞	109
引用文献	110
付録	120
本論文に関わる査読付き学術論文	120

第 1 章 序論

1.1 本論文の背景

皮膚は人体の身体の最外層を占める最大の臓器である。古来より顔色を見れば、その人の健康状態がわかると言われてきたように、皮膚状態は身体状態や外部環境により大きく変化する。そのため、美容科学・皮膚科学領域では、皮膚は最大の研究ターゲットである。

美しい皮膚を保つための美容習慣として、肌を良好な状態を保つための「スキンケア化粧品」が使用され始めたのは、1914年に開始した第一次世界大戦頃と言われている [1]。第一次世界大戦終戦後の1930年代には、欧米における女性の社会進出が活発になったこともあり、化粧品の種類がさらに増えた。特に、皮膚を保水（保湿ともいう）する油分と水分が混合されたエマルジョンの形態の「クリーム状化粧品」の使用頻度が拡大した。日本では、大正時代の女性の社会進出とともに化粧品が普及し始めた。まずは、顔の見栄えを良くするために色を付加する「メーキャップ化粧品」のバリエーションが広がり、多色白粉・顔料・染料を配合した唇用のメーキャップ化粧品である「棒状口紅」も開発された。また、クリーム状化粧品的一种である「コールドクリーム」や「乳液」など、皮膚に水分を保つスキンケア化粧品も販売され始めた。このように、大正から昭和にかけて日本の化粧文化は西洋化していった [2]。欧米の化粧品と同じように見える日本の美容習慣であるが、皮膚の水分を保つために外用塗布する「モイスチャライザー」のカテゴリーの中で、欧米ではより油分を多く含む「乳液」や「クリーム」といったクリーム状の製剤が好まれるのに対して、日本では水が主成分の「化粧水」という製剤が好まれる。この嗜好性の違いは、欧米に比べて比較的高温多湿である日本の気候的特徴が背景にあると考えられる。このような水に対する嗜好性のためか、日本の美容科学研究では、皮膚の水の挙動が注目されてきた。

1980年代に入ると、皮膚科医である現東北大学名誉教授の田上氏が工学系の研究者と共同開発した、非侵襲的に皮膚表面の電気伝導度を測定することができる機器により、アトピー性皮膚炎などの皮膚疾患の皮膚水分量の研究が進められた [3,4]。皮膚の水分（＝うるおい）を保つことが、アトピー性皮膚炎により脆弱になった皮膚のバリア機能を改善し、症状緩和や悪化防止に寄与することが報告された。田上氏らの研究により、皮膚科学領域においても、皮膚の水分特性が注目されたのである。健常な皮膚においても、皮膚のバリア機能が損なわれると、体内の水分が損失して皮膚が乾燥しやすくなりカサカサした外観になるため、美容科学上も研究ターゲットとなる [5]。皮膚の水分特性は、次第に、美容と皮膚科両領域が乗り入れる研究ターゲットとなっていった。今日では、美容皮膚という美容科学と皮膚科学の融合領域も大きな存在に成長している。

このように、皮膚の水分量を適切に保つことで、皮膚の外観や皮膚疾患の症状改善に効果をもたらすことが、徐々に明らかにされてきた。しかしながら、コールドクリームや乳液の開発から100年以上経過した今日においても、皮膚の保水に関する技術開発は、他の科学技術の進歩のスピードと比べて非常に遅い状態である。未だに皮

膚の乾燥は化粧品が改善すべき重要なターゲットのままであり，その解決策は古典的な保水成分に頼っている．また，アトピー性皮膚炎の皮膚の保護には不揮発性の油分であるワセリンを皮膚表面に塗布する方法が一般的であるままである．このように，皮膚の保水に対する画期的な改善策が開発されていないことは，皮膚の水分を非侵襲で測定する手法の開発が進まなかったこと，古典的な保水成分の効果が非常に高いため新たなものを開発する必要がなかったことも要因であると考えられる．しかしながら，美容科学領域の研究者の一部が経験的に認識しているように，今までの保水に対する美容科学的対処法では，平均的な皮膚タイプには有効であっても，同じものを使用しても効果が出ない中央値から外れるタイプの皮膚には有効でない．さらに，近年の成熟した美容ビジネスにおいて，消費者の嗜好性の個人差にも対応した皮膚の保水対策も望まれている．

皮膚の保水メカニズムを更に詳細に解き明かすために，化粧品開発における皮膚の水分研究のニーズは大きかったが，1980年代から2000年頃までは，皮膚の電気特性を測定する以外の実用レベルの非侵襲的な水分測定法は存在しなかったため，詳細な研究は行われてこなかった．そのため，皮膚の水分特性の詳細な解明は，皮膚を保水するための化粧品・医薬品の効果を検証し，より効果のある製剤・薬剤開発に役立つだけでなく，皮膚そのものが年齢や疾患でどのような状態であるかを科学的に検証しうるきっかけと成り得ると考えられる．

本研究は，皮膚の非侵襲分光計測技術の基盤が整いつつあった2006年頃から進めた皮膚の水分量深さ分布の解明，及び2010年頃に市販化された2次元アレイ型センサにより可能となった吸収係数の大きい1920 nmの水のOH基のバンドを用いた近赤外分光イメージングによる皮膚の水分量面分布の評価を目的とした．さらに，得られた研究知見や評価法を美容科学・皮膚科学分野へ応用することも目指した．本知見は，分光測定を用いて非侵襲的に皮膚の水分特性を包括的に明らかにし，美容科学・皮膚科学研究分野に応用した最初の研究である．

1.2 本論文の目的

本論文の目的は，ヒトの皮膚の最外層に位置する表皮水分量の分布を分光測定に基づき評価することにより，表皮の水分特性についての包括的な知見を得て，美容科学や皮膚科学研究に応用できる評価法と基礎知見を得ることである．

表皮の水分特性としては，(1)水分量の深さ分布，(2)水分量の面分布，(3)水の存在状態，の3つが考えられるが，本論文では主に水分量の深さ分布と面分布に注力して検討を行った．具体的には，まず，自発ラマン散乱分光法を用いて皮膚の水分量の深さ分布の特徴を解明した．次に，皮膚水分量の簡便評価に向けて，皮膚の近赤外拡散反射スペクトルの特徴を詳細に検討した．その後，両検討結果を基に，近赤外分光イメージングによる表皮水分量面分布の評価を進めた．最後に，分光測定に基づく表皮水分量の深さ分布と面分布について，皮膚状態との関係を包括的に考察した．

1.3 本論文の構成

第 1 章 (本章) で序論を述べた後、第 2 章では、皮膚の水分に関する公知情報について述べる。まず、皮膚の特徴的な構造とその機能を述べ、その後、皮膚の水分特性に関する公知の知見を述べる。最後に、先行研究となる皮膚の水分量測定法をまとめて説明し、本研究の位置付けを明確にする。

第 3 章から第 5 章では、本論文オリジナルの研究として、表皮水分量の深さ分布及び面分布の研究知見を述べる。

まず、第 3 章では、自発ラマン散乱分光法を用いて皮膚水分量の深さ分布の特徴を明らかにする。具体的には、自発ラマン散乱スペクトルから算出した皮膚水分量の深さ分布の季節・年齢による違いの特徴、及び、皮膚への水付加時の水分量変化過程や疾患皮膚における皮膚状態の違いによる皮膚の水分量深さ分布の特徴を抽出する。このような取り組みから、皮膚水分量の深さ分布に関する新たな知見を示す。

第 4 章と第 5 章では、近赤外分光法を用いて表皮の水分量面分布を評価する。まず、第 4 章では、皮膚の近赤外拡散反射スペクトルの特徴を精査する。具体的には、皮膚の近赤外拡散反射スペクトル測定時における投光／受光ファイバー間隔による測定深さの最適化について述べた後に、様々な部位の皮膚の近赤外拡散反射スペクトルの特徴を示す。最後に、皮膚の近赤外拡散反射スペクトルから予測される皮膚水分量値を、測定深さと角層厚から考察し、第 5 章の近赤外分光イメージングによる表皮水分量面分布の評価の基礎となる知見を示す。第 5 章では、近赤外分光イメージングによる表皮水分量の面分布の評価について述べる。具体的には、まず、第 3 章で得られた皮膚水分量の深さ分布の特徴を反映したモンテカルロ光伝播シミュレーションにより近赤外光領域の波長による測定深度を予測し、その結果を基に表皮水分量イメージングの最適波長帯域を提案する。そして、美容科学・皮膚科学研究のために最適な、全顔の表皮水分量イメージング、及び、挟領域の表皮水分量イメージングの 2 つの評価系を提案する。最後に、本評価系を用いて、外部環境による顔の表皮水分量面分布の変化パターンや、水分付加後の液滴の広がり状態の動的変化の評価から、新たな肌質評価指標の可能性を提案する。

最終章である第 6 章では、本研究の総合考察及び今後の展望について述べる。

なお、本研究で実施したヒトを対象とした試験については、特に記載が無い場合は全て、資生堂の倫理審議会へ申請し、倫理的に問題無いという判断で実施許諾を得たものである。全ての測定は、資生堂グローバルイノベーションセンター (都筑区, 横浜) で実施した。

第 2 章 皮膚の水分特性

2.1 皮膚の構造と機能

皮膚は、外界と体内との境界に位置し、外界からの刺激を防御する役割を果たすために重要な最大の臓器であり、延べ面積約 1.6 m^2 、重さは体重の約 16 % を占めている。その構造は、最外層の「表皮」、その下層の「真皮」、「皮下組織」の 3 層構造を基本としており、それ以外に、毛髪、爪、汗腺、皮脂腺などの皮膚付属器官から構成される [6]。各層の厚さは、身体の部位によって異なるが、顔面の頬部においては、「表皮」は $100 \mu\text{m} \sim 300 \mu\text{m}$ 程度、「真皮」は $1 \text{ mm} \sim 3 \text{ mm}$ 程度である。

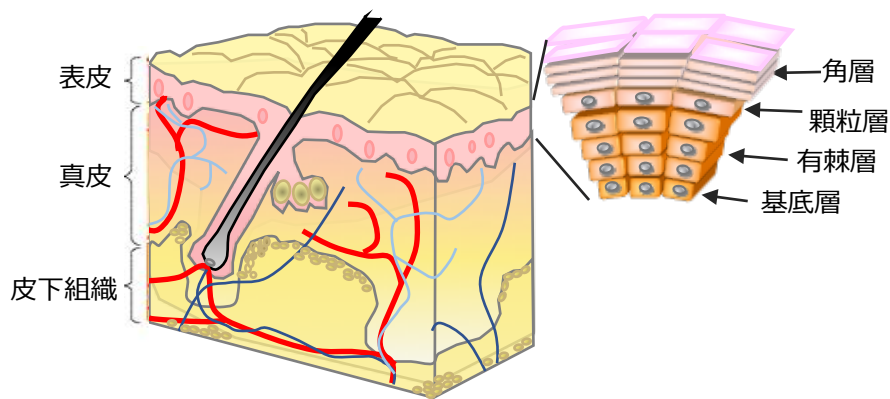


図 2-1. 皮膚の構造.

表皮は、皮膚の表面から奥に向かって、角層・顆粒層・有棘層・基底層、真皮は、乳頭層・網状層と細かく分類することができ、これらの層は皮膚表面に対して水平の層状配列である (図 2-1)。皮膚の各層を構成する細胞の種類や形態、あるいは層の構成成分は異なり、その機能も多様である。表皮は、複数の細胞種から構成されているが、主な細胞種はケラチノサイトである。他に少量のメラノサイト、免疫を司るランゲルハンス細胞などが存在する。ケラチノサイトは、表皮の中で層により異なる分化形態を示す。ケラチノサイトは、表皮の中で唯一基底層でのみ増殖し、表皮全体の土台を作る。その後、有棘層から顆粒層を経て角層までの間では、分化して様々な細胞の性質の変化を示す。色素細胞であるメラノサイトは、基底層に存在し、有害な紫外線から肌を防御する機能を有するメラニン顆粒を産生する。真皮では、線維芽細胞が産生するコラーゲン、エラスチン線維などの細胞外マトリックスが生成され、皮膚の弾力に寄与する。このような特徴を有する皮膚の各層では、老化や紫外線などの内的・外的要因による構造変化や機能低下の状況が異なるため [7-10]、これらの層によって異なる変化を詳細に評価する上で、皮膚を層別に測定する必要がある。

皮膚の各層の中で、表皮は特に重要な機能を担っている。表皮自体は、常に新陳代謝（ターンオーバー）を繰り返す特徴のある動的な組織である。すなわち、基底層で細胞分裂により増殖したケラチノサイトが、有棘層・顆粒層と押し上げられて移行する過程でさらに分化し、最終的に角層になる過程で脱核して細胞死に至る。死細胞の集合体である角層の最外層においては、不要となった死細胞が自然に垢として剥がれていく。表皮の中で、特にドラスティックな変化が起こる深さ位置は、顆粒層から角層の間であると考えられる。わずか 3 層程度しかない顆粒層において、ケラチノサイトの細胞核が消失し、角層に到達する間に細胞内にはケラチンという繊維状のタンパクが充満する。角層に到達した細胞内には、ケラチン線維に加えて、主に角層最下層でフィラグリンというタンパクの分解で生成され则认为られている保水効果を有する天然保湿因子 (Natural moisturizing factors (NMF)) と総称される遊離アミノ酸などの水溶性低分子が存在する [11,12]。一方、角層のそれぞれの細胞間の隙には、セラミド、コレステロール、脂肪酸を主成分とする細胞間脂質と呼ばれる脂質が結晶構造で存在し、角層機能に重要な役割を担っている [13,14]。そのために、皮膚の水の研究において、角層は表皮の中でも最も重要なターゲット組織である。

腕や頬では、角層の厚さはわずか十数 μm で、死細胞層が 10 層~20 層積み重なっている [15]。角層厚や層数は身体の部位により異なり、掌や踵では特に厚い。角層は、死細胞から構成される単なる垢ではなく、皮膚にとって重要な「バリア機能」や「保水 (保湿) 機能」という機能を有する。バリア機能とは、体内の水の体外への蒸散を防ぐとともに、外界の異物の侵入を防ぐ働きである。皮膚は医薬品の外用剤の適用部位でもあり、様々な薬物を皮膚局所に作用させるだけでなく、血液循環を介して全身に分散させることもできる。薬剤を効果的に皮膚内に浸透させるためには、日常生活では必須の角層のバリアを突破して、どのように内部まで浸透させるのかが課題の一つである。そのために、薬物の皮膚への浸透挙動に関しては、多くの研究が行われている。保水機能とは、外界という体内と比べて極めて乾燥した環境との界面に存在するために水分が消失しがちな角層において、角層自体が水を保持して柔軟性を保つ働きであり、乾燥によるバリア機能低下を防ぐ役割を有する。この働きには、角層に存在する遊離アミノ酸、細胞間脂質、汗などが関与すると考えられている。

美容科学の観点では、角層の保水機能の評価と改善は、重要な研究ターゲットである。カサカサした状態として観察されるいわゆる「ドライスキン」では、角層の水分量が低下するが、スキンケア化粧品の塗布によって、水や保水成分を補うことで改善できると考えられている。そのために、皮膚の水分量測定法の開発は、スキンケア化粧品の効果を評価し、より効果のあるスキンケア製剤を開発するという観点において、美容科学領域で着目されてきた。さらに、皮膚の水分特性の解明は、今まで明らかにされていなかった角層の水の量や存在状態と、皮膚状態や個人の嗜好性と関連する肌感覚との間の新しい関係性の解明につながることで、興味を持たれている [5]。

2.2 皮膚の水分特性

皮膚の性状は身体の部位により大きく異なり、その上個人差も大きい [16]。皮膚の外観に最も影響するのは最外部に位置する角層であり、その水分量は皮膚状態と大

きく関わるといわれている [17,18]. 例えば, 乾燥により「肌荒れ」が起こると, 角層水分量は低下し, 皮表のキメと呼ばれる多角形の紋様は不明瞭になり, ひどい場合には白くカサカサする鱗屑の症状も見られることもある. また, 角層水分量が低下すると皮膚は硬い感触になる. このような外部環境による影響だけでなく, 加齢に伴って発生する皮膚の変化も大きいため, 美容科学領域において皮膚状態改善のための解決策の潜在ニーズは大きい. 特に, 角層を含む表皮の水分量は, 皮膚状態を詳細に評価する上で, 美容科学及び皮膚科学の両領域において重要な指標である.

皮膚の水分特性を包括的に理解するためには, まず角層の水分量についての理解が必要である [19,20]. 体内の生細胞層の水分量は約 60% ~70% であるが, 皮膚の外部環境はそれに比較して乾燥した低湿度環境であるため, 界面である角層最表面の水分量は通常 20~30% 程度である. それゆえ, 角層では表面付近で少なく, 奥に向かって多くなる水分量の濃度勾配が存在する. この濃度勾配を初めて発見したのは Warner らであり, 1988 年のことである [21]. Warner らは, 踵から切り出した角層を用いて水分量の濃度勾配を確認し, 皮膚表面は 10 wt%, 角層最下層で 65 wt% であると推定した. しかしながら, 角層の厚さは身体の部位によって大きく異なり, 踵では mm 単位, 掌では数百 μm 程度, 顔や腕では十数 μm 程度である. このため, 踵と違い角層厚が非常に薄く 10 μm 程度と推測される顔や腕の水分量の濃度勾配は, Warner らが報告した踵の水分量の濃度勾配とは異なることも考えられる. しかしながら, Warner らの手法では深さ方向の検出分解能との兼ね合いで, ミリ単位の厚みを有する踵の角層サンプルでの測定しか出来なかったこと, 皮膚を切り出す手法であるために顔や腕の測定は倫理的なハードルが高く追試が困難であったこと, などから, その後の水分量濃度勾配と皮膚状態との関係を追試する報告はなく, 水分量深さ分布の研究の進展はなかった. これ以降 2000 年になるまで, 角層の水分量深さ分布の研究は, Warner らの研究が唯一の参考知見であった. 皮膚の水分特性の研究は, 10 年以上しばしば停滞したのである.

2.3 皮膚の水分測定法

皮膚状態の評価は, 皮膚表面の外観の観察により目視で行われる場合も多い. しかしながら, 皮膚性状を詳細に理解するためには, 外観だけでは判断できない皮膚の内部状態の評価が重要である. そのために, 切除した皮膚の組織化学的な観察や皮膚の成分の分析が行われてきた. しかし, 皮膚の切除は倫理的な制約があり, 多くの症例を集めることは出来ない. さらに, 水分量評価に関しては, 一旦皮膚を切除すると, 切除した皮膚サンプルを保管する環境湿度により切除面からの水の消失速度が異なるため, 生体内での現象を正確に再現して評価することは困難である. そこで, 皮膚を傷つけない非侵襲的な水分量測定手法の開発が要望されてきた.

皮膚の非侵襲計測技術は, 前述の電気伝導度の評価 [3,4] や皮膚からの水分の蒸散量評価といった簡便な計測法の開発が先行した [22]. 筆者も, 非侵襲測定手法による皮膚からの極微弱発光検出による酸化度の評価 [23], 皮膚生理指標の評価 [24,25], 皮膚表面の動摩擦係数の評価 [26-29] などに取り組んできた. 一方, 近年の光計測技術の進歩により, 近赤外光領域の中で特に “生体の窓” (図 2-2) と呼ばれる生体成

分の吸収強度が極めて低い 800 nm～1000 nm の領域の光を用いた生体計測手法が、医用計測領域で活用されている [30,31]. 美容科学・皮膚科学領域においても、光計測などの非侵襲計測技術を用いて、皮膚の物理特性や構造を非侵襲的に取得することが可能になってきた [22,32].

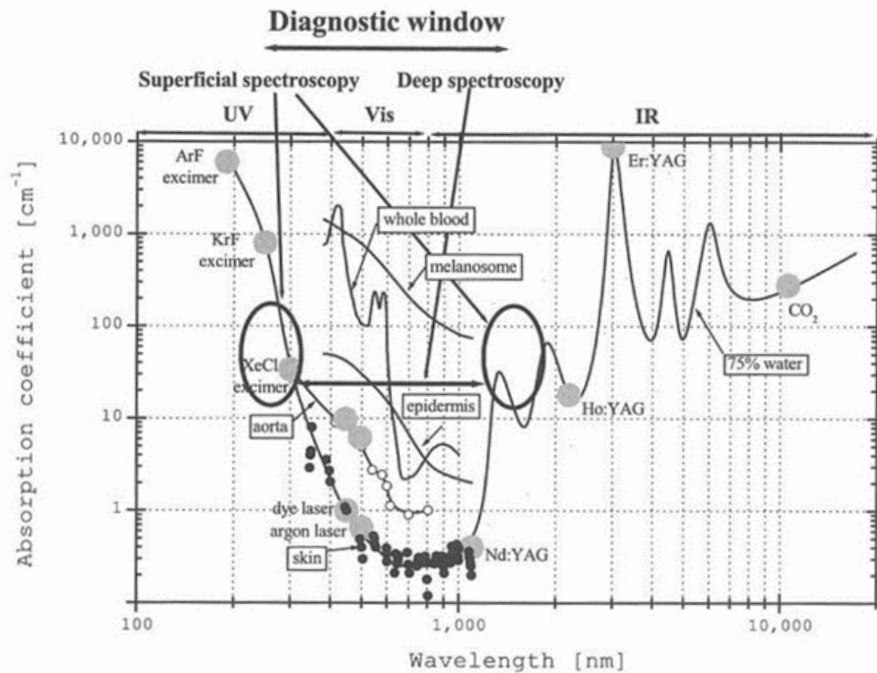


図 2-2. 皮膚及び組織の主要成分の吸収スペクトル [30].

本論文での研究ターゲットである皮膚の水分量測定においても、非侵襲測定法の開発が検討されてきた。皮膚の水分量測定は、角層の水分保持機能の評価の観点から重要な指標となる。1980年代には、水分量の増減により皮膚の電気特性が変化することを利用した間接的な測定法が国内外で次々と提案され [3,4,33], 皮膚の乾燥度合いの評価 [34-40] や皮膚外用剤の効果評価 [41-43] に活用されてきた。どれもプローブの先端を皮膚表面に接触させて、皮膚上の狭い領域 (約 1 mmφ～10 mmφ) の電気特性値を数値で計測するものであるが、簡便で素人でも容易に操作できるために汎用化が非常に進んだ。主な機器としては、日本では電気伝導度を測定する Skicon® (アイ・ビー・エス株式会社, 浜松), 欧州では静電容量を測定する Corneometer® (Courage+Khazaka Electronic GmbH, Cologne, Germany) が人気である。特に, Corneometer® は、美容科学領域において、化粧品の保水効果評価のための標準機器として世界的な販売シェアを占めるだけでなく、外資系の化粧品会社の店頭での肌検査や、皮膚科・美容皮膚科における肌診断でも活用されている。しかしながら、これら電気的手法では、測定値は皮表に存在する水以外の電解質や電極と皮表との接触面積などの影響を受けるといった問題点がある。また、層状構造である皮膚のどこの部分の水分量を測定しているかについて、詳細には言及できない。理論的には、Skicon® は同心円の電極間距離により測定深度が変わるため、測定深度に対する議論は研究と

しては報告されている [39]. しかしながら、実用の現場においては、全て角層水分量の測定値として使用されているのが現状である. そのため、研究に使用するというよりは、あくまで簡便に使えるというメリットを生かした汎用機器としての活用がほとんどである.

このような電気特性を活用した間接的な水分量評価以外にも、直接水分子をターゲットにする方法も検討されてきた. 1990年代には、マイクロ波時間領域反射法、核磁気共鳴法、赤外分光法、近赤外分光法を用いた皮膚の水分測定事例が報告された [44,45]. しかしながら、どの手法においても測定深度コントロールは難しく、上述の電気特性値の測定と同様に、皮膚の層状構造のどの部分を測定しているかについて、踏み込んだ議論のないまま数値比較が行われてきた. 2000年代に入ると、1988年の角層水分量の濃度勾配の発見 [21] に続く、皮膚の水分研究を大きく変える研究成果が報告された. オランダの Puppels らは、光学部品や励起レーザーを選択して作り込んだ皮膚測定に特化した反射型の自発ラマン散乱分光計を開発し、皮膚水分量や角層成分量の深さ分布の評価に成功したのである [46-48]. 彼らは、ターゲットサンプルを皮膚に特化し、皮膚からの自家蛍光だけでなく、光軸上に位置するフィルター類からの蛍光も検出波長帯域に影響しないような考慮をして、バックグラウンド蛍光を減少させた. その後市販された皮膚に特化した自発ラマン散乱分光計は、*in vivo* (サンプルを切り取らずそのままの状態) でヒトの皮膚の特定深さの水分量を測定できることから、分光法に詳しくない美容科学・皮膚科学領域の研究者にも注目された. 現在においても更なる応用研究が進んでいる. ただし、自発ラマン散乱分光法を用いるため、測定時間は 1 スポット当たり数秒から十数秒必要である. そのために、水分量のイメージングを行う場合には、レーザーの走査が必要であり、*in vivo* で複数の被験者の皮膚の水分量をイメージングできるほどの短時間測定はできない. このように、本研究開始時の 2005 年頃における皮膚の水分量測定法の開発状況は、非侵襲で皮膚の水分量を測定する手法の開発は進んできたが、皮膚の水の分布状態の特徴を明らかにするところまで踏み込んだ包括的な研究は不十分であった. さらに、より簡便な実用レベルの水分量評価法開発まで進んでいない状況であった.

第 3 章 皮膚の水分量深さ分布の解明

3.1 緒言

2000 年頃に Puppels らの研究グループが S/N の高い皮膚の自発ラマン散乱スペクトルの取得に成功したこと [46], 得られたスペクトルから皮膚の水分量や角層成分量の評価 [47,48], 皮膚への薬剤浸透量の評価 [49] の可能性を示したことは, 皮膚の水分量深さ分布の解明への大きなきっかけとなった. 彼らの報告より以前にも, 分光測定を含めた種々の非侵襲的手法による皮膚の水分量測定のトライアルは行われてきたが, 主な測定ターゲットである非常に薄い角層の水分量の深さ分布まで測定できる手法は存在しなかった.

自発ラマン散乱分光法は, ターゲット物質に光を照射したときに, 分子内振動により発生する官能基固有のラマン散乱光を分光計測する構造解析法である [50]. ある物質に光を照射すると, 入射光と等しい波長を有するレイリー散乱光以外に, 入射光とは異なる波長の極めて弱いラマン散乱光が発生する. 入射光とラマン散乱光との振動数差 (ラマンシフト) は, 官能基に固有な値をとる. このラマンシフトを測定することにより, サンプル中にどのような物質が存在するかを予測することが可能である.

自発ラマン散乱分光法は, 以前より分析手法の 1 つとして多くの研究に活用されてきたが, 皮膚を測定対象とした場合にはいくつかの課題があった. 例えば, 市販の自発ラマン散乱分光計でよく用いられる 532 nm のレーザーは, 短波長で高エネルギーであるために皮膚にダメージを与える懸念があること, 一方, 励起レーザーが長波長すぎると発生したラマン散乱光が 1050 nm 程度まで検出可能なシリコン (Si) 素子の検出可能波長範囲外になること, 皮膚へ照射される光によって皮膚自身が励起されて発生する自家蛍光がラマン散乱光の検出波長帯域に重複して高いバックグラウンドとなること, などである. また, 反射光学系を用いて *in vivo* で皮膚からの非常に弱いラマン散乱光を検出する場合には, 光路に存在するフィルター素材から発生する蛍光もバックグラウンド上昇による皮膚のラマン散乱光の検出感度の低下につながる. Puppels らは, これら光学系の問題に対処して, $400\text{ cm}^{-1}\sim 2200\text{ cm}^{-1}$ の指紋領域を励起レーザー波長 785 nm を用いて, $2600\text{ cm}^{-1}\sim 4700\text{ cm}^{-1}$ の高波数領域を励起レーザー波長 671 nm を用いて, 皮膚測定を行なった [47,48]. その結果, 皮膚の自発ラマン散乱スペクトルを, 深さ分解能 $2\text{ }\mu\text{m}\sim 3\text{ }\mu\text{m}$ 程度で取得することができたと報告した. 1988 年に Warner らの切り出した踵を用いた角層水分量の濃度勾配の発見 [21] から約 15 年弱の歳月を経て, 角層水分量の濃度勾配を非侵襲的に測定できるようになったのである. 美容科学・皮膚科学分野においても, それまでは電気特性値の変化から間接的にしか評価できなかった皮膚の水分量を, 分光法によって水の OH 基を直接検出できるようになっただけでなく, 共焦点光学系を用いた深さ分布の評価という皮膚の層状構造を考慮した研究を行える可能性がでてきたのである.

3.2 目的

本章の目的は、自発ラマン散乱分光法を用いて、非侵襲的に身体の様々な部位の皮膚の水分量の深さ分布を明らかにすることで、ヒト表皮水分量分布評価の基盤となる皮膚の水分量の深さ分布に関する新たな知見を得ることである。具体的には、年齢・季節による水分量深さ分布、及び、水付加からの水分量減少過程や疾患皮膚といった皮膚状態の違いによる皮膚の水分量の深さ分布の特徴を見出すことである。

3.3 方法

3.3.1 皮膚の自発ラマン散乱スペクトルの取得

皮膚表面からの深さごとの自発ラマン散乱スペクトルは、共焦点ラマン分光計 (Model 3510, River Diagnostics BV, Rotterdam, The Netherlands) [46-48] を用いて、皮膚表面から奥に向かって深さ $2\ \mu\text{m}$ ごとに取得した。システムの概略を図 3-1 に示した。

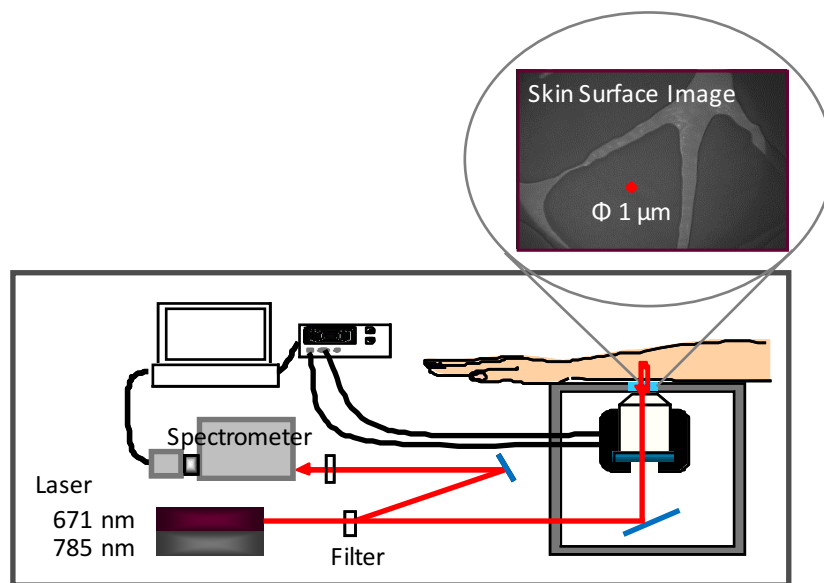


図 3-1. 共焦点ラマン分光計の概略。

皮膚を測定アタッチメントウィンドウの上に乗せ、対物レンズの焦点位置を上下に移動させることにより、皮膚の異なる深さ位置の自発ラマン散乱スペクトルを取得した。サンプルポイントにおけるレーザースポットの大きさは、直径約 $1\ \mu\text{m}$ である。 $400\ \text{cm}^{-1}\sim 2200\ \text{cm}^{-1}$ 領域のラマン散乱スペクトルは、励起波長 $785\ \text{nm}$ (Diode Laser,

15 mW～20 mW at sample point, Model: I0785SL0050PA-PT, Innovative Photonic Solutions, NJ, USA), 2600 cm⁻¹～4700 cm⁻¹ 領域は, 励起波長 671 nm (Diode Pumped Solid-state Laser, 20 mW～30 mW at sample point, Model: Ignis 671 nm, Laser Quantum, Cheshire, UK) を用いて取得した. 積算時間は, 400 cm⁻¹～2200 cm⁻¹ は 15 秒間, 2600 cm⁻¹～4700 cm⁻¹ は 1 秒間とした. 皮膚の各測定について, 2 回～5 回の深さ分布測定を行った.

3.3.2 皮膚の水分量深さ分布の評価

皮膚の水分量 (mass-%) は, 自発ラマン散乱スペクトルの高波数領域における, 水の OH 伸縮振動 (3100 cm⁻¹～3700 cm⁻¹) とタンパク CH₃ 伸縮振動 (2910 cm⁻¹～2965 cm⁻¹) の比率から算出した. 具体的には, 組織全質量 (m_w+m_p) 当たりの水の質量 (m_w) の割合として, 水のバンドの積算値 (W : 3350 cm⁻¹～3550 cm⁻¹) とタンパクのバンドの積算値 (P : 2910 cm⁻¹～2966 cm⁻¹) の比 (式 3-1) に, 既報告の係数 (R : 2±15 %) を乗算した式 (式 3-2) によって算出した [47].

$$\frac{W}{P} = \frac{m_w R}{m_p} \quad (3-1)$$

$$\text{Water content (\%)} = \frac{m_w}{m_w + m_p} = \frac{W/P}{W/P + R} \times 100 \quad (3-2)$$

身体の部位あるいは年齢による皮膚の水分量深さ分布の比較については, 合計 33 名の健常な日本人ボランティア被験者を用いた. 具体的には, 6 名の男性被験者 (年齢 34 歳～54 歳, 平均年齢 43.2 歳) と 27 名の女性 (年齢 23 歳～76 歳, 平均年齢 56.3 歳) である. 身体部位は, 図 3-2 に示した 5 箇所 (頬, 前腕屈側部, 上腕内側部, 手の甲, 掌 (親指のつけ根の膨らみ)) について, 15 名の被験者 (上記の男性被験者全員, 及び 23 歳～49 歳の女性; 平均年齢 35.4 歳) で比較した. また, 後述する「みかけの角層厚」の加齢変化については, 上記の女性被験者全員の頬と前腕内側部について比較した. 全ての被験者には皮膚疾患歴は無く, また試験期間中に服薬履歴はなかった.

測定部位は, 測定 1 時間前に保湿成分を含有しない固形石鹸 (サボンドール, 資生堂, 東京) で 1 回洗浄した. 頬については, メーキャップ製品を塗布している場合には, メーキャップ化粧品を除去するためのクレンジングオイルを用いた洗顔の後に, 上述の固形石鹸での洗顔を実施した. 全ての測定は, 温度 23.5 °C～24.5 °C, 相対湿度 57%～65% で実施した. データの解析には, MATLAB (Version 7.0.4 (R14), The MathWorks, Inc., Natick, USA) を用いた.

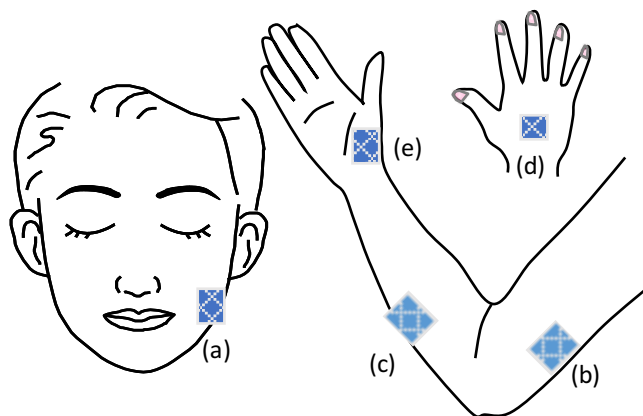


図 3-2. 測定部位.

(a) 頬, (b) 上腕, (c) 前腕, (d) 手の甲, (e) 掌. 頬は耳たぶと口角の midpoint, 上腕と前腕は屈側部, 掌は親指付け根の膨らみの部分.

さらに, 皮膚の水分量深さ分布の変化挙動を詳細に比較するために, 水分量深さ分布の年齢による違い, 季節変化, 皮表からの水付加の後の変化を, 健常な日本人ボランティア被験者合計 45 名 (男性 14 名, 女性 31 名) を用いて実施した.

表 3-1. 試験期間中の室内外の温湿度.

	Date	Indoor		Outdoor	
		Temperature (°C)	Relative humidity (%)	Temperature (°C)	Relative humidity (%)
Age					
Old	12~14 September, 2005	23.8 ± 0.2	64.3 ± 0.6	26.8 ± 0.9	74.7 ± 0.6
Young	2 August ~6 September, 2006	22.4 ± 0.4	63.4 ± 5.0	26.5 ± 1.7	74.5 ± 5.9
Season					
Winter	9 December, 2005 ~12 January, 2006	22.8 ± 0.5	38.6 ± 1.9	5.0 ± 1.6	43.5 ± 9.7
Spring	20 March ~10 April, 2006	22.2 ± 0.5	39.3 ± 2.1	11.0 ± 1.9	52.3 ± 15.3
Summer	2 August ~6 September, 2006	22.4 ± 0.4	63.4 ± 5.0	26.5 ± 1.7	74.5 ± 5.9
Autumn	23 October ~2 November, 2006	23.7 ± 0.3	44.2 ± 4.5	17.5 ± 1.6	73.5 ± 8.3

年齢による違いの比較は, 上述の全ての女性被験者 (若年群 13 名: 22 歳~40 歳, 平均年齢 32 歳; 高齢群 18 名: 59 歳~76 歳, 平均年齢 67 歳) を用いた. 季節変化は, 14 名の男性被験者 (年齢 25 歳~53 歳, 平均年齢 39 歳) と 13 名の女性被験者 (年齢 22 歳~40 歳, 平均年齢 32 歳) を用いた. 測定は, 頬と前腕内側

部について実施した。水分量の対照測定法として、自発ラマン散乱分光法による測定の直前に、Corneometer® (CM825, Courage+Khazaka Electronic GmbH) を用いた皮膚の水分量測定も実施した。前腕・頬の各測定位置について 3 回ずつ測定を行い、その平均値を該当部位における測定値とした。さらに、春・夏・秋には、“最近皮膚が乾燥していると感じるか？”という項目についてのアンケートによる質問を実施して、皮膚の水分量を含む各成分量と肌感覚との関係も比較した。各測定日時の測定室内及び外気の温湿度は、表 3-1 に示した。

皮表からの水分付加については、5 名の被験者（男性 2 名，年齢 34，37 歳；女性 3 名，年齢 29 歳～36 歳，平均年齢 33 歳）を用いた。皮膚表面に、120 μ L の蒸留水を含浸させた 6 mm 角のコットンパットをのせ、水分の蒸発を防ぐためにコットンの上を絆創膏で覆い、5，15，50，90 分間水付加を行った。水付加前後での皮膚の水分量深さ分布を測定した。図 3-3 には、水付加の様子イメージ図を示した。測定部位は、測定 1 時間前に保湿成分を含有しない固形石鹼（サボンドール，資生堂）で 1 回洗浄した。測定は、温度 23.0 $^{\circ}$ C，相対湿度 40 % で実施した。統計解析は、Statview 5.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いた。2 つの異なる年齢群間，2 つの異なる部位間，感覚との対応の検定は，two-tailed student's t-test を用いた。4 つの季節間の比較の検定は，post hoc Tukey-Kramer test を用いた。全て $p < 0.05$ を有意な差とした。

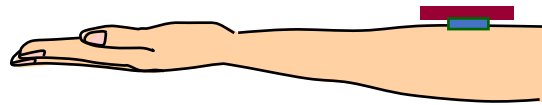


図 3-3. 水付加の様子イメージ図。
皮表に蒸留水を含浸させた 6 mm 角のコットンパットをのせ、水分の蒸発を防ぐためにコットンパットの上を絆創膏で覆い、水付加を実施。

さらに、日常的に美容領域で行われている美容手技をモデル化した皮膚への水の塗布方法による皮膚の水分量深さ分布の変化についても検証した。図 3-4 には、コットンパットによる水付加のイメージ図を示した。5 mL のモデル化粧水（3 wt% グリセリン水溶液，2 wt% エタノール水溶液）を含ませた 2×3 cm のコットンパットを、室温（22 $^{\circ}$ C）及び加温（32 $^{\circ}$ C）条件下で、5 分間皮表にのせて皮膚を水和させた。その後、コットンパットを除去して皮膚を開放 30 秒後に、皮膚表面の余分な水分をティッシュペーパーで除去し、開放から 1，5，10 分後の皮膚の水分量の深さ分布を測定した。加えて、水の粒子径の影響を検討するために、ナノスチーマー（ナノケア，パナソニック株式会社，大阪）を用いて、皮膚に加温スチームを 5 分間あてた前後での皮膚の水分量の深さ分布も測定した。

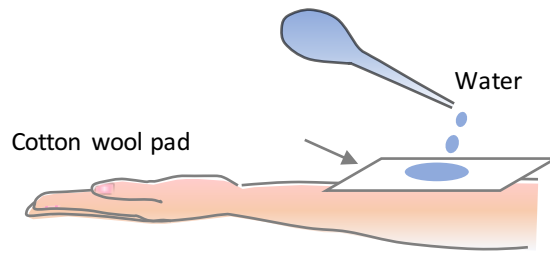


図3-4. コットンによる水付加のイメージ図.
5 mL のモデル化粧水を含浸させた 2×3 cm のコットンパットを 5 分間皮表にのせて、皮膚を水和させた。

最後に、水分量の深さ分布の変化を、ヒトが肌感覚として感じとれるかどうかについて、一般女性 11 名を用いて、洗顔 5 分後に市販の化粧水をコットンパットで頬部に塗布することで検討した。6×7 cm のコットンパットに市販の化粧水 3 mL を含浸させて頬部の皮表にのせ、1 分間、あるいは 20 分間皮膚を水和させた。その後、コットンパットを除去して皮膚を開放してから 30 秒後に皮膚表面の余分な水分をティッシュペーパーで除去し、開放から 1 分後の皮膚の感覚のアンケート評価を実施した。アンケート項目は、みずみずしい (water-rich), うるおう (hydrate), さっぱり (refresh), やわらかい (soft), 弾力のある感じ (resilient), ふっくらする (plump), 吸い付く感じ (sticky), 水が浸透する感じ (water-penetration), ひんやり感 (cooling feelings) の各項目に対して、6 段階評価とした。評価の際に比較とする対照の感覚は、”日常生活において化粧水を塗布した後に感じる感覚”とした。さらに、水分量深さ分布と皮膚感覚とを比較するため、同一塗布条件での水分量の深さ分布測定を、自発ラマン散乱分光計を用いて別の被験者の頬部で実施した。感覚アンケート及び自発ラマン散乱スペクトル測定は、温度 22.8 ± 0.7 °C, 相対湿度 54 ± 7 % で実施した。

3.3.3 皮膚疾患部位の測定

皮膚疾患の一種である乾癬の皮疹部と無疹部の皮膚の測定は、6 名の日本人男性のボランティア乾癬患者 (23 歳～53 歳, 平均年齢 39 歳) を用いた。皮疹部は、日本大学医学部所属の皮膚科医が active phase と定義した羅漢部位とした。無疹部は、同皮膚科医により見た目には健常部位と観察された、皮疹部に隣接する無疹部とした。皮疹部の症状は、3 つの異なる評価項目 (Infiltration (I), Erythema (E), Scale (S)) 及びトータルスコア (Severity scores) について、5 名の皮膚科医が別々に、0～4 の 5 段階 (0: 穏やか, 1: やや穏やか, 2: ややシビア, 3: シビア, 4: 非常にシビア) で評価した。測定は、保湿成分を含有しない固形石鹼 (サボンドール, 資生堂) を用いて該当部位を 1 回洗浄した 30 分後に、温度 22.3 °C～ 23.9 °C で実施した。自発ラマン散乱分光計による水分量深さ分布測定の他に、光干渉断層計 (OCT, SkinDex300, ISIS optronics GmbH, Mannheim, Germany) により取得した皮膚の縦断面画像における一定間隔毎の 10 ラインの平均値から算出した、平均角層厚及び平均表皮厚も評価指標とした。なお、OCT 測定において、皮膚組織の屈折率 n は、1.4 を代入した。

本試験は、疾患患者を用いた試験のため、資生堂の倫理審議会と共に、日本大学医学部の倫理審議会の両審議会の承諾を得て実施した。

3.4 結果

3.4.1 皮膚の自発ラマン散乱スペクトル

図 3-5 及び図 3-6 には、角層表面付近から表皮生細胞層まで、深さ 2 μm 毎の皮膚の自発ラマン散乱スペクトルを示した。図の凡例 0 μm は皮表付近でのスペクトルを示し、14 μm は皮表から 14 μm 皮膚内部のスペクトルを示す。図 3-5 には、高波数領域の皮膚の自発ラマン散乱スペクトルを示した。高波数領域においては、主に 2850 cm^{-1} に CH_2 対称伸縮振動、2930 cm^{-1} に CH_3 対称伸縮振動、3068 cm^{-1} に aromatic CH 伸縮振動、3320 cm^{-1} ~3360 cm^{-1} に NH_2 伸縮振動、3200 cm^{-1} ~3600 cm^{-1} に OH 伸縮振動が観察された。皮表から内側に向けて、3200 cm^{-1} ~3600 cm^{-1} の OH 伸縮振動のブロードなバンドが増大していることが観察された。図 3-6 には、指紋領域の皮膚の自発ラマン散乱スペクトルを示した。1672 cm^{-1} にケラチンのアミド I, 1298 cm^{-1} にアミド III, 1003 cm^{-1} にフェニル基のバンドが観察された [50]。これらのバンドは皮表近くで顕著に観察された。さらに、皮表に近い深さ位置でのみ、500 cm^{-1} 付近に、角層のケラチン繊維由来のジスルフィド結合と推定されるバンドも観察された。

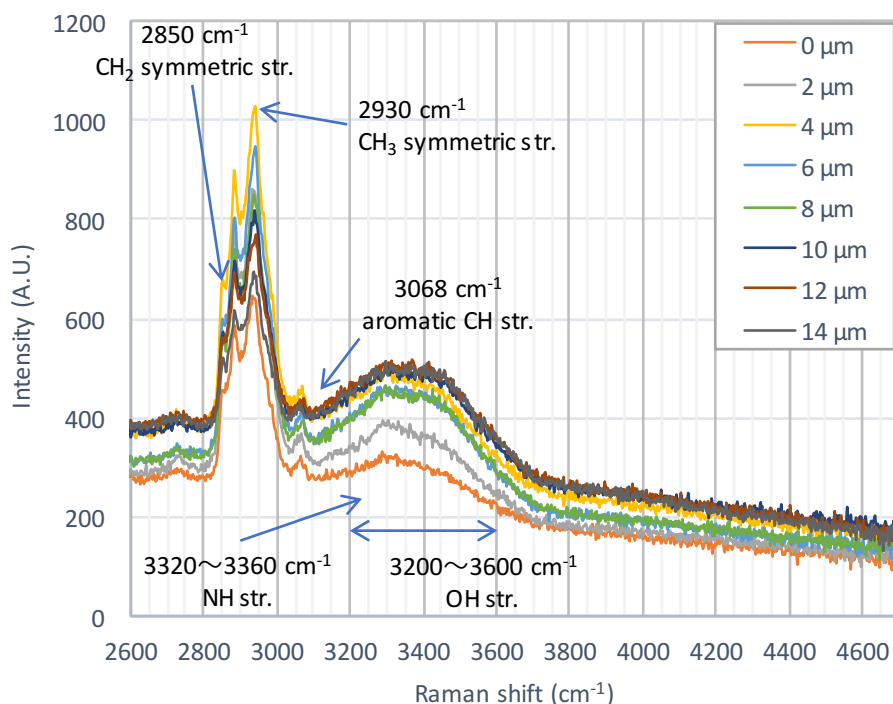


図 3-5. 高波数領域の表皮の自発ラマン散乱スペクトル。

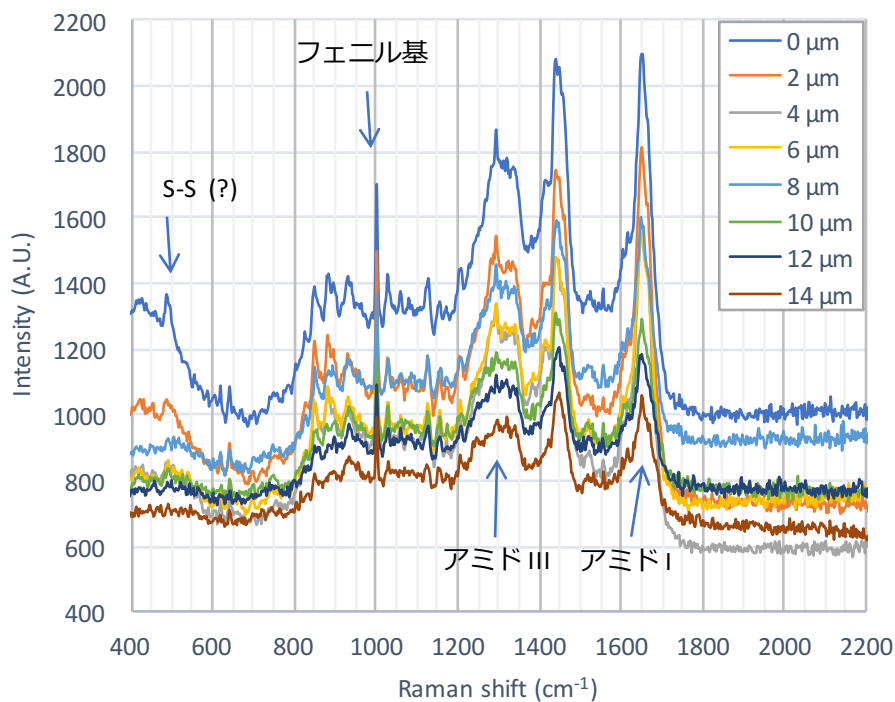


図 3-6. 指紋領域の表皮の自発ラマン散乱スペクトル.

3.4.2 みかけの角層厚の評価 [51]

図 3-7 には、(式 3-2) で算出した、頬、上腕、前腕、手の甲、掌における皮膚の水分量の深さ分布を示した。縦軸は水分量 (mass-%)、横軸は皮膚表面からの深さ (μm) である。頬、上腕、前腕、手の甲の皮膚の水分量は、皮表付近で 20%~40% であり、深くなるにつれて徐々に増加し、65%~70% のほぼ一定値に到達した。一方で、掌の皮膚の水分量は、皮膚表面付近で 20%~30% であり、ゆっくりと 35% まで増加して、一旦、皮膚表面からの深さ 50 μm ~200 μm の間は同じ水分量が続いた。その後 55%~70% の一定値に到達した。掌では、最終的に一定となった皮膚水分量の個人差は、水分量値で 15% 以上と、他の部位と比べて大きかった。

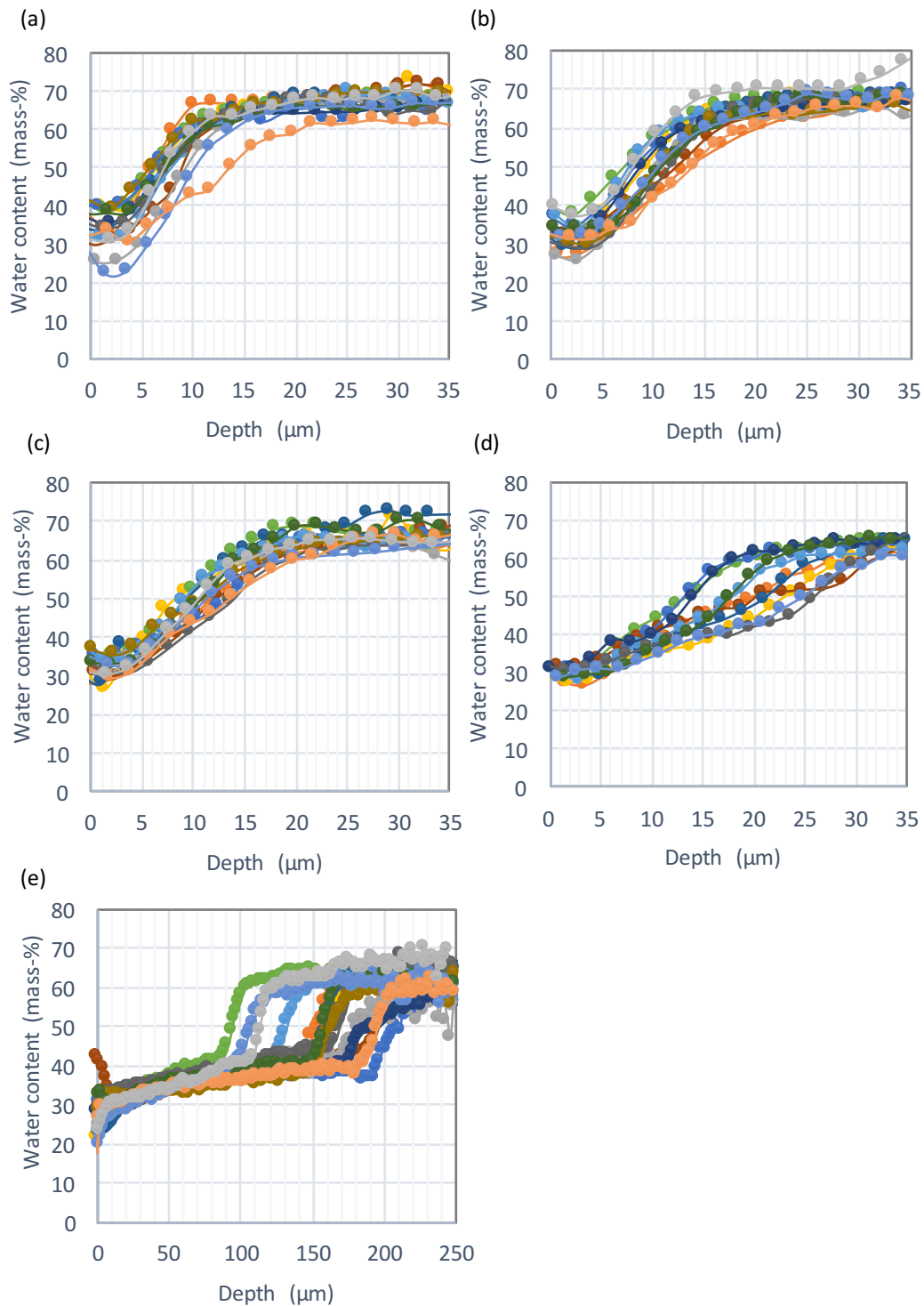


図 3-7. 皮膚の水分量深さ分布の部位差.
 (a) 頬, (b) 上腕, (c) 前腕, (d) 手の甲, (e) 掌. 横軸は皮膚表面からの深さ (μm).

次に、皮膚の水分量深さ分布曲線を用いて、角層厚の変化を評価できる簡易指標の算出を検討した。図 3-8 に示したように、皮表から皮膚深部に向かう水分量深さ分布曲線 Wc がほぼ一定値に到達した位置までの厚さを、角層と一部の生細胞層を含む厚さとして「みかけの角層厚 (Stratum Corneum Apparent Thickness : SCAT)」と定

義した.

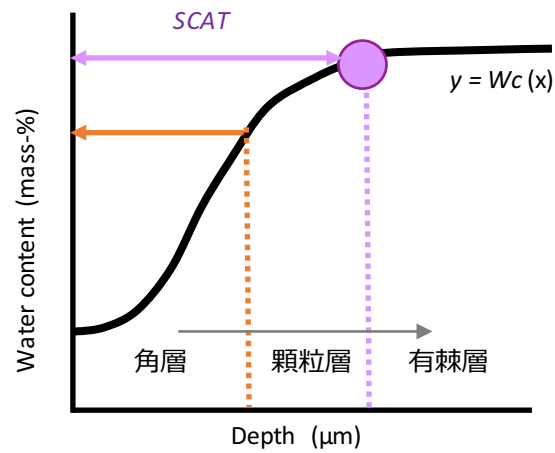


図 3-8. みかけの角層厚 (SCAT).
皮表から皮膚深部に向かう水分量深さ分布曲線 W_c がほぼ一定値に到達した位置までの厚さを, 角層と一部の生細胞層を含む厚さとして「みかけの角層厚 (SCAT)」と定義.

図 3-9 には, 頬と掌における SCAT の算出例を示した. SCAT は, 図 3-9 (a),(b) の矢印で示した深さ, すなわち, 水分量深さ分布曲線の一次微分値が最大値を示した後の減少過程において, 最初に 0.5 (掌以外) 未満 (式 3-3), あるいは 0.1 (掌) 未満 (式 3-4) を示した皮膚表面からの深さと定義した.

$$d[W_c]/dx < 0.5 \quad (3-3)$$

$$d[W_c]/dx < 0.1 \quad (3-4)$$

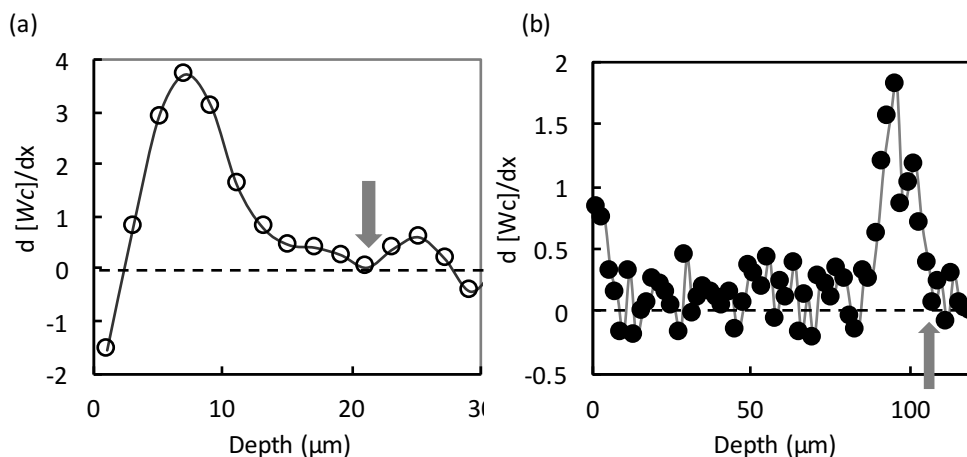


図 3-9. 水分量深さ分布の1次微分曲線とみかけの角層厚算出位置.
(a)頬, (b)掌.

ここで、本当の角層最下面は、水分量深さ分布曲線においてどの深さ位置に相当するのかについて、2つの手法を用いて検証した。検証には、*in vivo* 測定において、被験者の動きが少なく安定した自発ラマン散乱スペクトルを取得可能である前腕の測定結果を用いた。

まず、皮膚の自発ラマン散乱スペクトルを、角層に存在する遊離アミノ酸、ピロリドンカルボン酸、乳酸、尿素、トランスウロカニン酸、コレステロール、セラミド、ケラチン、水、及び、光路上の光学素材で最小二乗近似して、ケラチンあたりの相対量としてフィッティングさせる Caspers らの方法 [48] を用いて、角層最下面を推定することにより検証した。具体的には、フィッティングにより算出した角層成分の中で、一般的に角層に特異的に存在するといわれている遊離アミノ酸量 [11,12] の深さ分布曲線と水分量深さ分布曲線とを比較した。遊離アミノ酸は、角層のみに存在するため、本成分量の深さ分布曲線がベースラインになる深さ位置が角層最下面と推定できる。図 3-10 には、20代～30代女性5名の前腕屈側部の自発ラマン散乱スペクトルから算出した水分量の深さ分布及び遊離アミノ酸量の深さ分布を示した。遊離アミノ酸量がベースラインになる深さ、すなわち角層最下面と推測される深さは、図 3-10(b) に示したように、皮膚表面から 12 μm 付近であった。その深さ位置での水分量は、図 3-10(a) に示したように 55%～60% であった。水分量深さ分布曲線において、この深さ位置には傾きの変曲点が存在した。もし、身体の中の部位においても、皮膚の水分量深さ分布曲線に、図 3-10(a) に示したような明らかな変曲点が観察できるのであれば、本変曲点を用いれば角層最下面の深さを算出できる。しかしながら、*in vivo* 皮膚測定、特に動きやすい頬での測定の場合には、得られる水分量深さ分布曲線には、身体の動きや呼吸によるばらつきが含有されるため、図 3-10(a) に示したような滑らかな曲線を描くデータの安定的な取得は難しい。そのため、水分量深さ分布曲線の変曲点で角層厚を算出することは、実用的には困難であると考えられた。

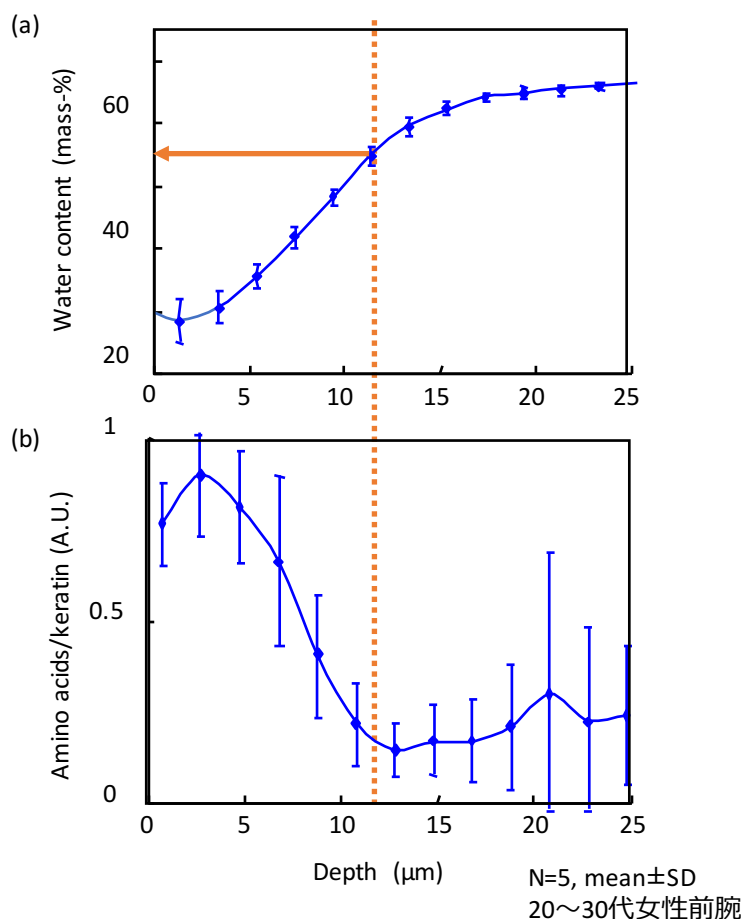


図 3-10. 水分量と遊離アミノ酸量の深さ分布.
遊離アミノ酸量は Caspers らの方法に則り算出 [48].
(a) 水分量, (b) 遊離アミノ酸量.

次に、角層のケラチン繊維において特徴的に検出されると考えられる 500 cm^{-1} 付近のジスルフィド結合のバンドの皮膚内での深さ方向の変化を用いて、角層最下面が検出可能かどうかを検証した。図 3-11 には、図 3-10 で取得した皮膚の深さごとの指紋領域の自発ラマン散乱スペクトルの中で、20 代女性 1 名 (図 3-11(a)), 30 代女性 1 名 (図 3-11(b)) から取得した指紋領域のスペクトルを示した。それぞれのスペクトルの凡例に示した深さは、図 3-10 で Caspers らの方法 [48] により角層成分を最小自乗近似によりフィッティングさせた時の、ケラチンの深さ分布から算出した皮膚表面からの深さ位置である。ジスルフィド結合と推測される 500 cm^{-1} 付近のバンドは、図 3-11(a) の被験者においては皮膚表面から $7.55\text{ }\mu\text{m}$ 、図 3-11(b) の被験者においては皮膚表面から $9.02\text{ }\mu\text{m}$ よりも皮膚表面に近い位置でのみ観察された。一方、本深さ位置よりも深い位置では 500 cm^{-1} 付近のバンドの形状は変化した。このことより、皮膚表面からの深さ $10\text{ }\mu\text{m}$ 付近で細胞層のジスルフィド結合を有する成分の大きな変化が生じていると推定された。すなわち、先述の遊離アミノ酸量の深さ分布から推定した皮膚表面からの深さ $10\text{ }\mu\text{m}$ 付近が角層最下面であるという考察をサポートすると考えられた。しかしながら、*in vivo* で皮膚の指紋領域の自発ラマン散乱スペクトルを取得するために必要な積算時間は、本研究で使用した自発ラマン散乱分光計では、高波数領域に比べて 15 倍であり、1 つの深さ位置で 1 スペクトル

ルを取得するために 15 秒程度である．この測定時間内で被験者が動いてしまうと正確なスペクトルは取得できない．また， 500 cm^{-1} 付近のジスルフィド結合と推測されるバンドは非常に弱く，自家蛍光の弱い皮膚のメラニン色素が少ない色白の被験者では検出できるが，自家蛍光が強いメラニン色素の多い皮膚を有する被験者や露光部である顔においては，S/N が悪くて検出困難な場合も存在した．

以上，2 つの手法による検証により，前腕における角層最下面は，皮膚表面からの深さ $10\text{ }\mu\text{m}$ 付近と考えられた．しかしながら，実用レベルの *in vivo* 皮膚測定においては，これらの指紋領域のラマン散乱スペクトルを用いる 2 つの手法を用いた角層最下面の検出による角層厚の算出は困難であると判断した．そのため，本論文では本当の角層厚の代わりに簡易評価指標として，*SCAT* を用いることにした．

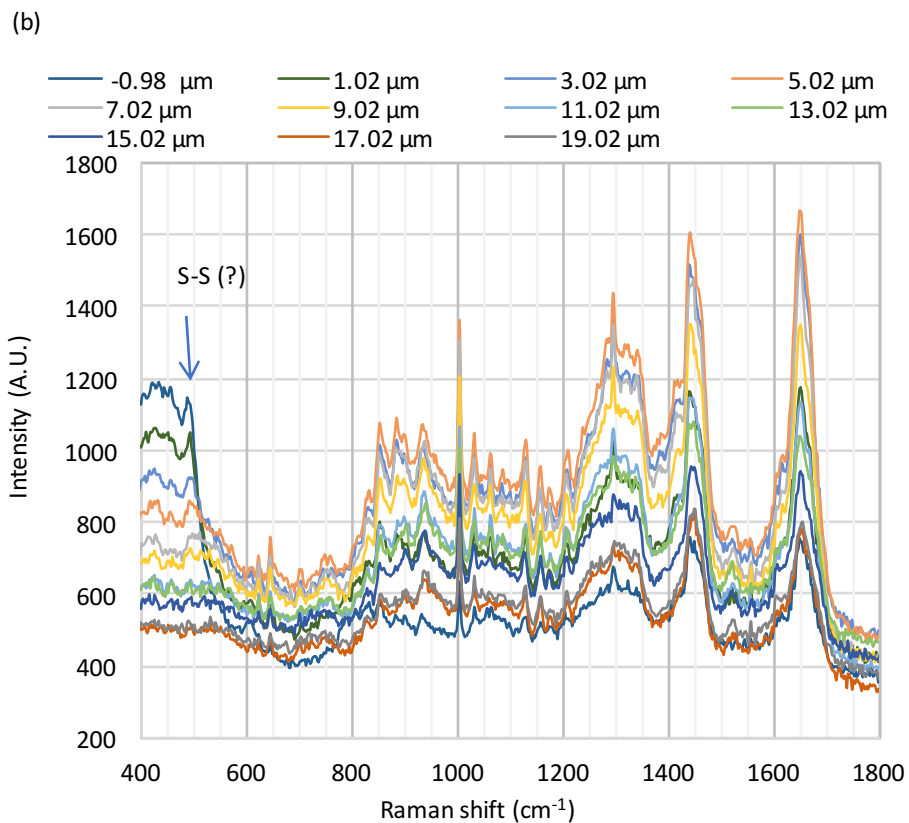
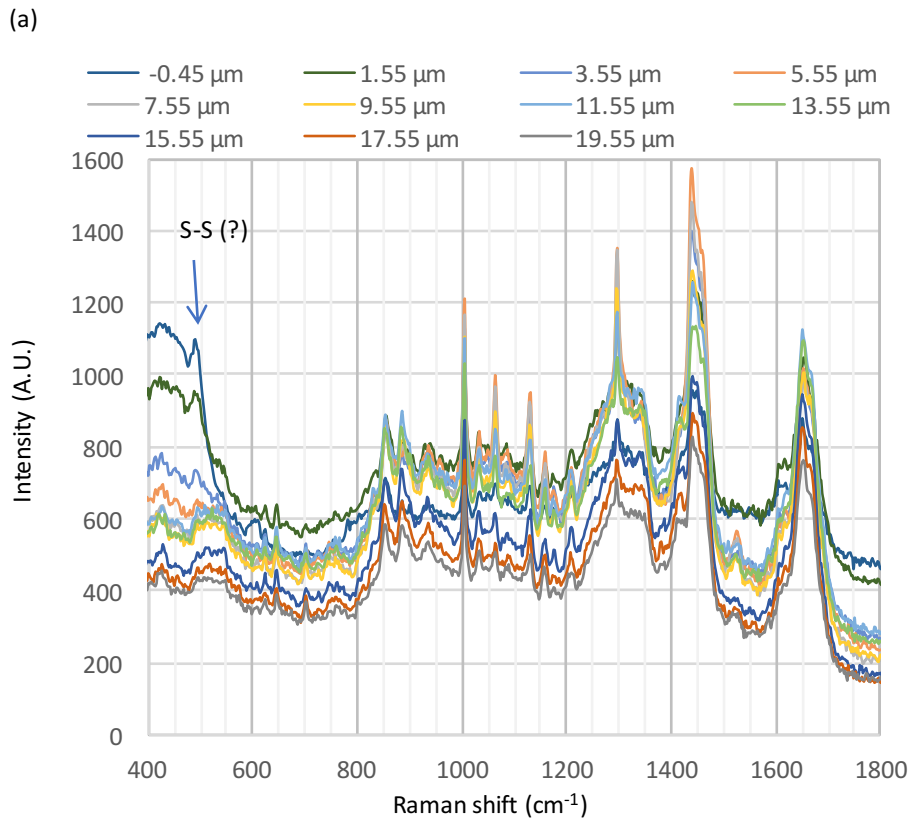


図 3-11. 皮膚の指紋領域のラマン散乱スペクトルにおけるジスルフィド結合のバンドの深さ方向の変化。

(a) 20代女性, (b) 30代女性. 凡例は皮膚表面からの深さ. ジスルフィド結合と推測される 500 cm^{-1} 付近のバンドは皮膚表面に近い深さでのみ観察された.

表 3-2 には、頬・上腕・前腕・手の甲・掌における SCAT の部位差を示した。数値は、被験者 13 名～15 名の平均値と標準偏差である。SCAT の平均値は、頬で 16.8 μm と最も薄く、手の甲は 29.3 μm と若干厚めであり、掌は 173.0 μm と最も厚かった。掌と頬、掌と上腕、掌と前腕、掌と手の甲の SCAT 値の間には、student's t-test における有意差 ($p<0.05$) が存在した。本結果においては、 $p<0.001$ を示す強い有意差を示した。

表 3-2. みかけの角層厚の部位差.

	Number of subjects	Mean	SD
Cheek	15	16.8	2.84
Upper arm	15	21.8	3.63
Forearm	14	22.6	4.33
Back of hand	13	29.3	6.84
Palm	15	173.0	36.96

Significant differences ($p<0.001$, student's t-test) between the palm and cheek, palm and upper arm, palm and forearm, and palm and back of hand were seen.

引き続き、SCAT 値の加齢変化を解析した。図 3-12 に示したように、23 歳～76 歳の女性被験者においては、SCAT 値の加齢によるばらつきは、頬よりも前腕の方が大きかった。すなわち、前腕においては高齢群で SCAT 値が大きい被験者が増加していた。全年齢で比較すると、前腕の SCAT 値と年齢の間には弱い正の相関関係 ($r=0.3782$) がある一方で、頬では年齢との相関は観察されなかった。

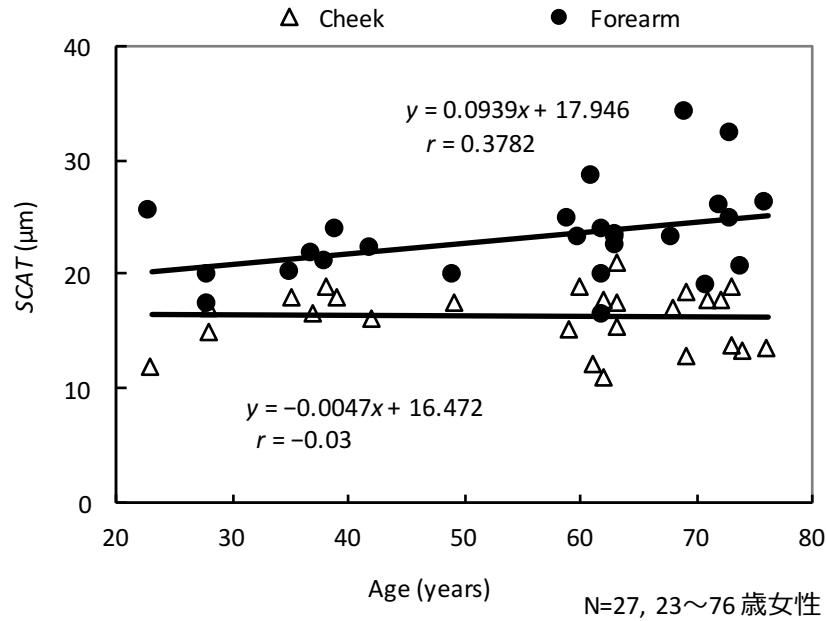


図 3-12. みかけの角層厚の加齢変化.

さらに，水の膨潤により角層の厚さを変化させた時の SCAT の挙動を精査するために，コットンパットを用いた皮膚への水付加前後での水分量深さ分布を比較した．図 3-13 に示したように，皮膚表面への 50 分間の水付加による水分量の増加は，皮膚表面からの深さ 12 μm までの角層全層で観察された．付加後においては，水分量が一定になる深さが深部へシフトした．そこで，水付加前後での SCAT を算出して比較した．

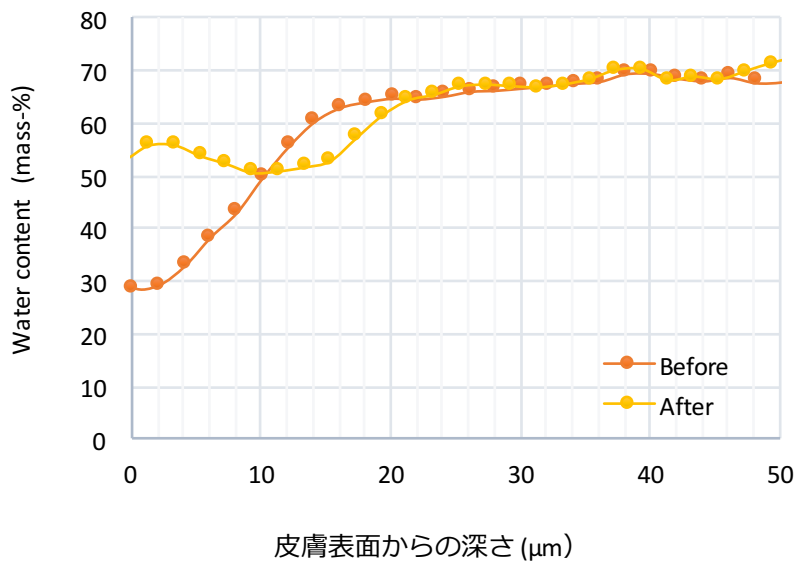


図 3-13. 50 分間の保水処理前後の水分量深さ分布の変化.
コットンパットを用いて皮膚へ水を付加した後の水分量の深さ分布曲線では，皮膚表面からの深さ 12 μm までの領域で水分量の増加が観察.

表 3-3 には、コットンパットによる15, 50, 90 分間の水付加前後での SCAT 値の変化を、算出値及び水付加前に対する比で示した。90 分間の水付加により、SCAT は水付加前の 18.7 μm の約 2 倍の 36.6 μm まで増加した。一方で、15, 50 分間の水付加では、SCAT の増加は、90 分間の水付加条件よりも小さかった。このように、SCAT を指標とすることで、簡便に角層厚に相応する厚さの変化を評価できた。

表 3-3. コットンパットによる皮膚の保水前後のみかけの角層厚の変化。
Ratio = 保水後のみかけの角層厚 / 保水前のみかけの角層厚。

Hydration period (min)	Initial (μm)	After hydration (μm)	Ratio
15	18.4	19.1	1.04
50	18.1	25.3	1.40
90	18.7	36.6	1.95

3.4.3 水分量深さ分布の加齢・季節変化 [52]

さらに、水分量の深さ分布の挙動を明らかにするために、加齢変化と季節変化について精査した。加齢による水分量の深さ分布の違いは、31 名の女性被験者を 2 群 (若年群: 22 歳~40 歳, 高齢群: 59 歳~76 歳) に分けて比較した。図 3-14 には、皮膚の水分量深さ分布の年齢による違いを、前腕 (図 3-14(a)) と頬 (図 3-14(b)) に分けて示した。前述の SCAT の年齢による違いを比較した場合と同様に、前腕屈側部の水分量の深さ分布は、若年群と高齢群で異なっていた。各深さ位置における水分量の標準偏差から判断すると、前腕では、若年群と比べて高齢群では個人による深さ分布のばらつきがより大きかった。また、前腕において、皮表から 10 μm ~30 μm の深さの皮膚の水分量は、若年群と比べて高齢群で低かった。一方で、このような年齢による違いは、頬では観察されなかった。加齢による水分量の深さ分布は、頬と前腕とで異なることが示された。

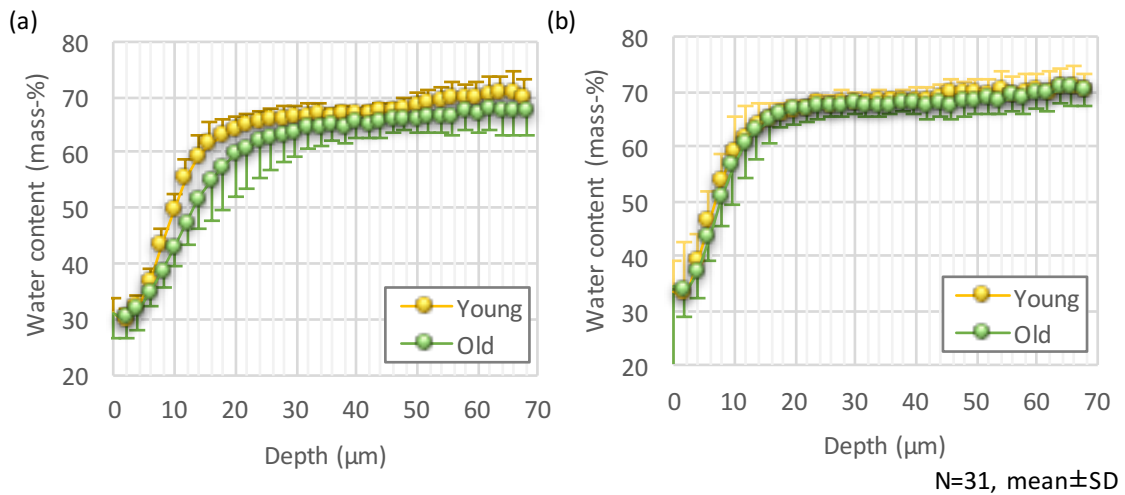


図 3-14. 皮膚の水分量深さ分布の年齢による違い.
 (a) 前腕, (b) 頬. 若年群は 13 名, 高齢群は 18 名の平均値.

次に, 日常生活で影響を受ける外部環境変化の 1 つである季節による皮膚の水分量深さ分布の変化挙動について検討した. 図 3-15 には, 前腕及び頬における皮膚の水分量深さ分布の季節変化を示した. 測定を実施した横浜エリアでは, 表 3-1 に示したように, 季節により屋外の温湿度が大きく変化した. しかしながら, 図 3-15 に示したように, 自発ラマン散乱スペクトルから算出した水分量の深さ分布曲線には, 季節による顕著な変化は見出せなかった.

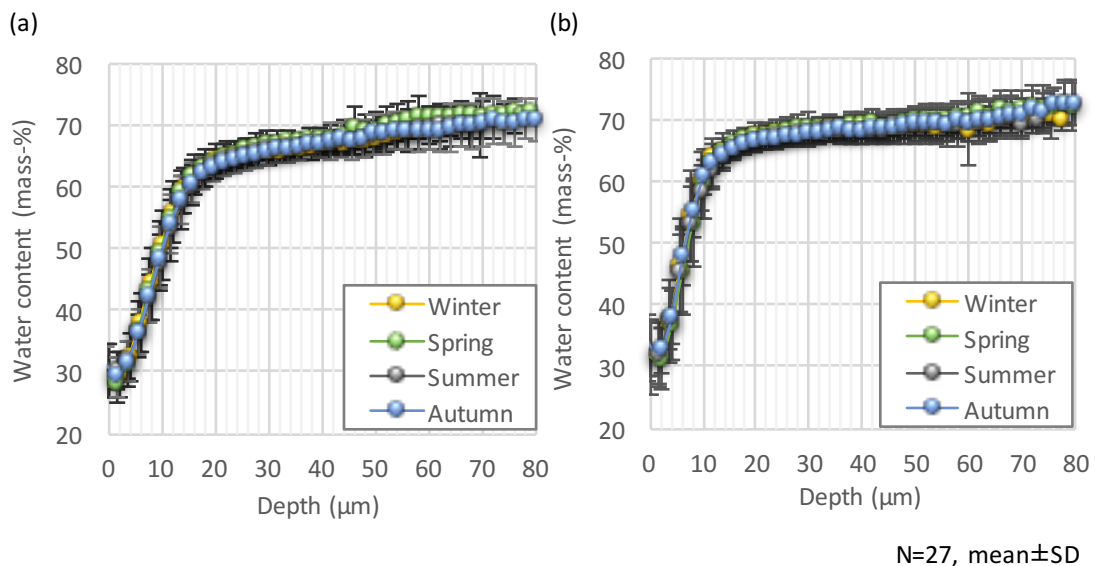


図 3-15. 皮膚の水分量深さ分布の季節変化.
 (a) 前腕, (b) 頬.

一方で、同時に測定を実施した皮膚の静電容量値は、図 3-16 に示したように、腕と頬どちらも夏に有意に高い ($p<0.05$), すなわち水分量が多い, という結果を示した。これは、自発ラマン散乱分光法により算出した皮膚の水分量とは異なる結果であった。

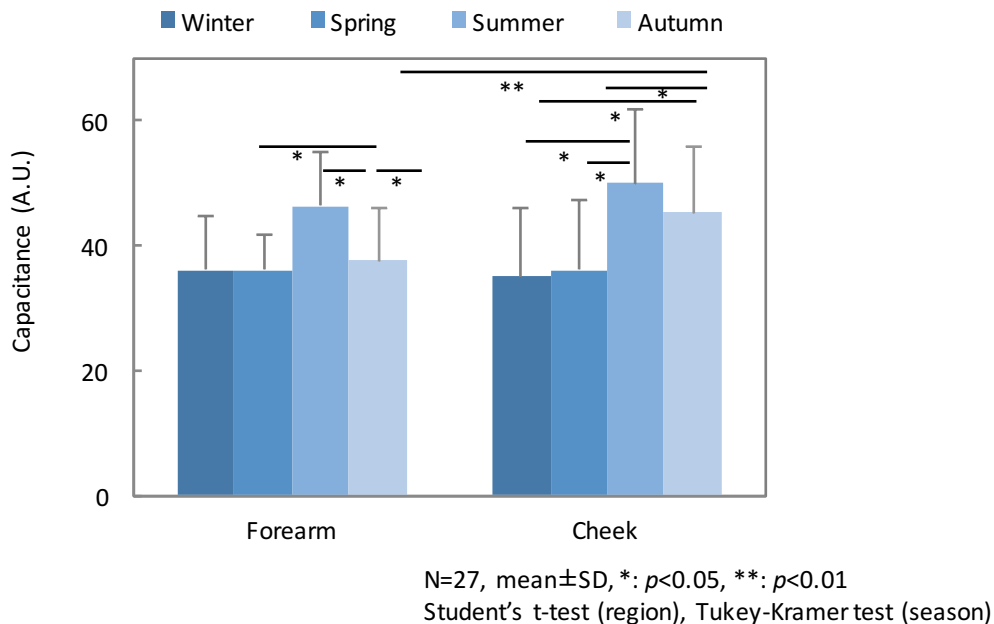


図 3-16. 皮膚の静電容量値の季節変化。

さらに、美容科学領域では重要な各個人の肌感覚に対する主観評価と、皮膚の水分量に関する物理量との関係を比較した。同一人を用いた季節変化測定において、皮膚測定と共に取得したアンケートによる主観評価を用いた。その結果、“最近乾燥感を感じる”群と“感じない”群との間の群間で、自発ラマン散乱スペクトル及び静電容量法から算出した皮膚の水分量には違いは認められなかった。一方で、角層に存在する保水成分の一種である遊離アミノ酸は、“最近乾燥感を感じる”群と“感じない”群との間で群間差が存在した (図 3-17)。特に、秋においては、“最近乾燥感を感じる”群 7 名は、“感じない”群 20 名に比べて、有意に角層中の遊離アミノ酸量が少なかった。なお、他の角層成分量と主観評価との関係は、水分量との関係と同様に認められなかった。

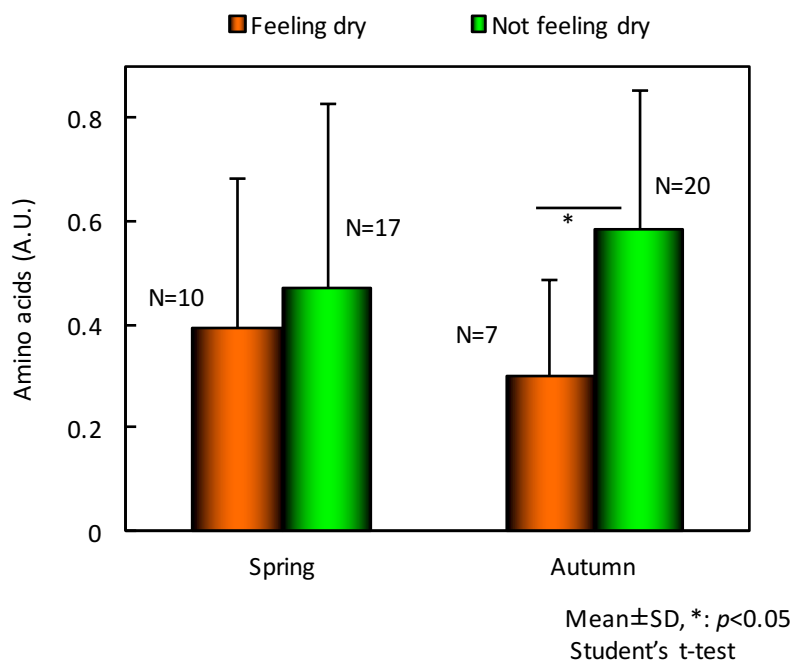


図 3-17. 本人の感じる“乾燥感”の有無による角層中の遊離アミノ酸量.

3.4.4 水付加後の水分量深さ分布の変化 [53]

水を含浸させたコットンパットで皮膚を一定時間閉塞して水和させ、開放後の水分量深さ分布の経時変化の挙動について 30 分後～90 分後まで測定した。図 3-18(a) は 1.5 分間、図 3-18(b) は 15 分間、図 3-18(c) は 50 分間、図 3-18(d) は 90 分間の水和処理前後の皮膚の水分量深さ分布のグラフである。グラフ内の黄色で表示したプロットは、水和前の水分量深さ分布曲線であり、その他の色はそれぞれ水和後開放してからの経過時間における水分量の深さ分布曲線である。図 3-18 に示したように、1.5、15、50、90 分間の水和時間の増加に依存して、より角層深層まで水分量が増加することを観察した。また、開放後に水は角層表層から徐々に放出されて、やがて処理前の状態に戻る過程も捉えることができた。例えば、図 3-18(b) に示したように、15 分間の閉塞水和により、水和完了 3 分後においても、皮表から 12 μm 下まで、付加前に比べて水分量の増加が観察された。さらに、塗布部位を空气中に開放したままにしておくと、皮表付近から徐々に水分量が減少し、水付加前の状態に戻るまでには 30 分間を要した。このような水和による水分量深さ分布の変化は、図 3-18(c), (d) に示したように、水付加時間が長い条件下で顕著であった。さらに、図 3-18(d) に示した 90 分間という長時間の水和では、角層直下の生細胞層と推定される深さ 12 μm ～18 μm の深部まで水分量の増加が観察されたこと、角層中下層に相当する皮膚表面からの深さが 8 μm ～12 μm の水分量は放出されにくかったことなど、新たな知見を得た。

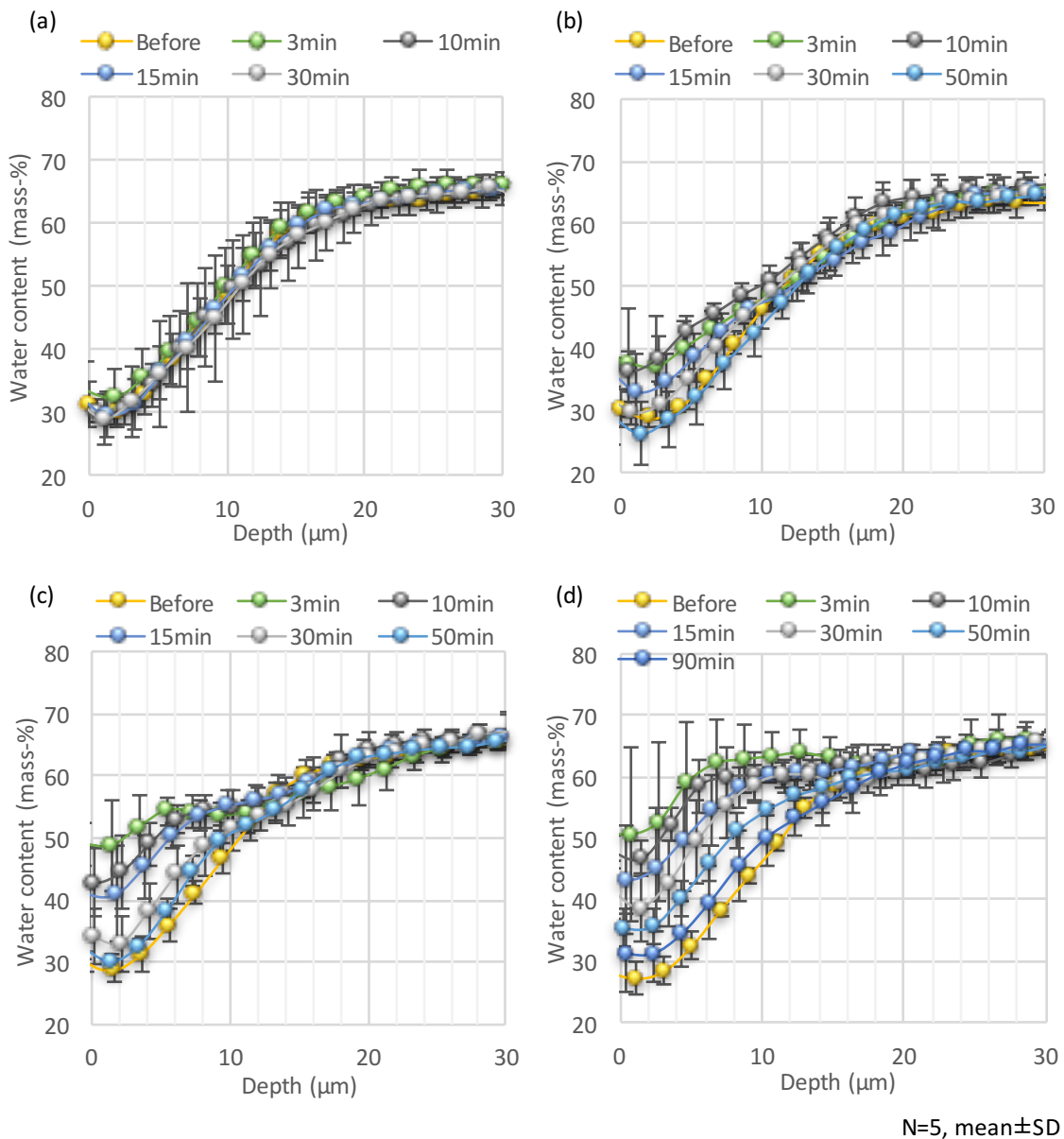


図 3-18. コットンパットを用いた皮膚への水付加前後の水分量深さ分布の変化。
 (a) 1.5 分間塗布, (b) 15 分間塗布, (c) 50 分間塗布, (d) 90 分間塗布. 凡例は, コットンパットを除去してから測定を実施するまでの経過時間. それぞれの水付加時間ごとに, コットンパットを除去してから, 3 分~90 分後までの水分量深さ分布を測定.

さらに, 日常の美容施術をイメージした実験系での水分量の深さ分布の変化を検証した. 本実験には, より美容施術に近づけるために, 水ではなくて, スキンケア化粧品の中の保湿剤の一種である化粧水をモデルとして保湿成分を配合した「モデル化粧水」を用いた. 前述の実験よりも, より美容施術に近い 1 分~20 分間という短い時間, モデル化粧水をコットンパットにより皮膚に付加した前後で, 皮膚の水分量深さ分布を測定した. 具体的には, 水分付加終了後にコットンパットを剥がし, その 30 秒後に皮表に存在する余剰な水分をティッシュペーパーで除去, 水分付加終了から 1 分後に, 皮膚の水分量深さ分布を測定した. その結果, 図 3-19 に示したように, 日常の美容施術で想定される短時間の水分付加条件においても, 1, 3,

5, 10, 15, 20 分間の水の付加により, 皮表から 5 μm ~10 μm の深さまで水分量の増加が観察された. 水分量が増加した深さは, 水分付加時間の増加に伴い, 皮表からの深さが 0 μm ~4 μm 程度の角層上層から, 徐々にその下の 5 μm ~10 μm の角層中下層まで変化した. すなわち, 水分付加時間が長いほど角層の奥まで水分量が増加した.

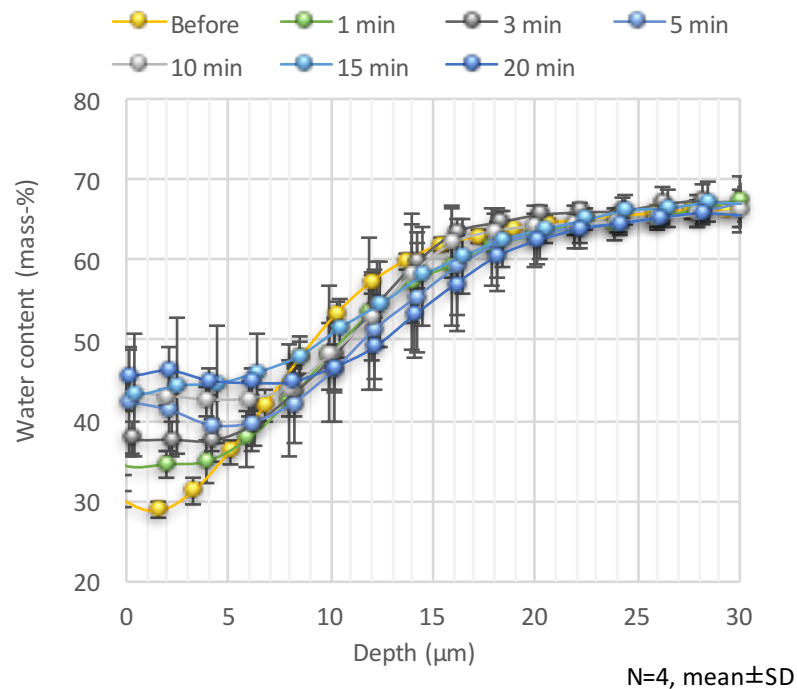


図 3-19. コットンパットを用いた皮膚へのモデル化粧水付加前後の水分量深さ分布の変化.
凡例は, 水の付加時間. それぞれの付加時間ごとに, 塗布後コットンパットを除去してから 1 分後に水分量深さ分布を測定.

また, 美容施術で想定される皮膚の水和における加温の影響を, コットンパットを用いた 5 分間の水和の実験系で検証した. 図 3-20(a) には, 水付加を室温 22 $^{\circ}\text{C}$ で行った場合, 図 3-20(b) には, 32 $^{\circ}\text{C}$ に加温して行った場合の, 付加終了 1, 5, 10 分後の皮膚の水分量深さ分布を示した. 同じ 5 分間の水和であっても, 室温 22 $^{\circ}\text{C}$ (図 3-20(a)) に比べて 32 $^{\circ}\text{C}$ に加温した方 (図 3-20(b)) が, 角層上層での水分量の増加が大きく, さらに, より角層の深部まで水分量が増加した. また, 加温した方 (図 3-20(b)) が, 付加終了 5, 10 分後においても, 角層中下層の水分量が多い状態のままで維持された. さらに, 図 3-20(c) には, 水を加温スチーム状態にして付加して, 皮膚を水和させた前後での皮膚の水分量の深さ分布の変化を示した. 加温スチームで皮膚を水和させた後の水分量の深さ分布は, 3 つの付加条件の中で最も大きく変化した. 特に, 水和 1 分後では, 角層上層の水分量は 50 % を超え, 皮膚表面からの深さ 10 μm 程度奥深くまで皮膚の水分量の増加が観察された. また, 水和完了 5, 10 分後においても, 皮膚表面からの深さ 5 μm ~10 μm の角層中下層での水分量の増加が維持された.

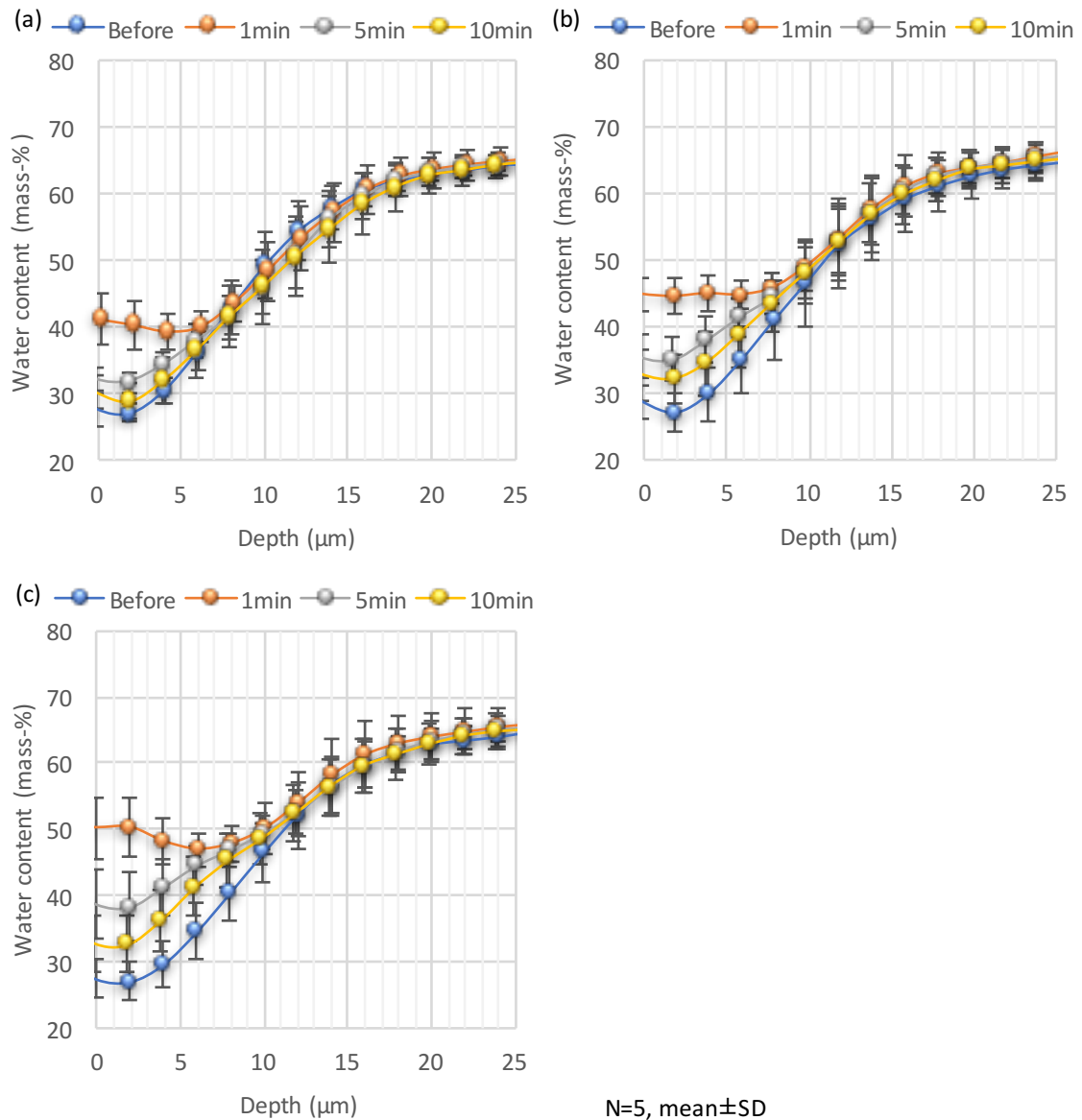


図 3-20. 水分量深さ分布への温度の影響。
 (a) 常温, (b) 加温, (c) ナノスチーム. 凡例は, 水の付加した後に測定を実施した時間.
 すなわち, 付加終了 1, 5, 10 分後に測定した.

3.4.5 水分量深さ分布とヒトの感覚 [53,54]

次に, ヒトは角層中下層の水分量の増加を感覚として感じ取れるかどうかについて検討した. 図 3-21(a) には, 1 分間あるいは 20 分間の水付加の 1 分後の頬の水分量深さ分布を, 付加前の平均曲線と共に示した. 20 分間の水付加では, 皮膚表面から 6 μm の深さまで水分量が増加した. 一方で, 1 分間の水付加では, 皮表近くの

水分量の僅かな上昇は観察されたが、その変化は極めて小さく、付加前に近い水分量深さ分布を示した。図 3-21(b) には、1 分間の水付加の 1 分後の頬の官能評価値、図 3-21(c) には、20 分間の水付加の 1 分後の頬の官能評価値を示した。さっぱり (refresh) 以外の全ての項目について、付加時間 20 分間の方が高い官能評価値を示した。特に、みずみずしい (water-rich)、うるおう (hydrate)、水が浸透する感じ (water-penetration) は、高い評価値であった。また、水分量の増加が大きかった 20 分間付加 (図 3-21(c)) では、吸い付く感じ (sticky) の評価値が正であったのに対して、1 分間付加 (図 3-21(b)) では、負の値を示すという大きな差を観察された。このように、ヒトは水分量の深さ分布の違いを肌感覚として感知できることが推測された。しかしながら、図 3-21(a) において、水分量の変化が少ない 1 分間の水付加条件においても、図 3-21(b) に示したように、水に関連する官能評価値の変化が観察されたことより、水分量に関係するヒトの感覚には、水分量以外にも関与する因子が存在することが考えられた。

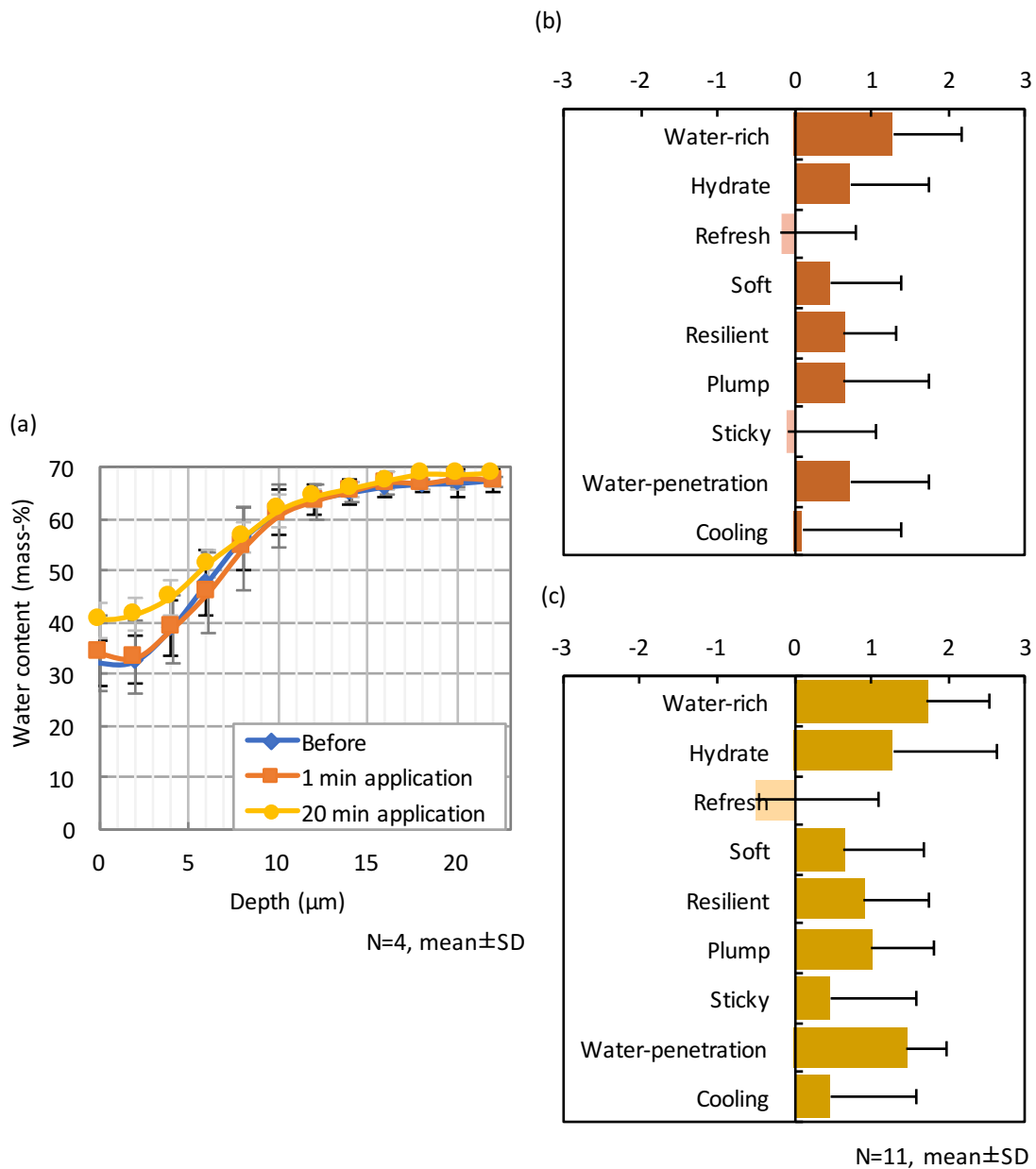


図 3-21. 1 分間あるいは 20 分間の化粧水付加 1 分後の頬の水分量深さ分布と官能評価値. (a) 水分深さ分布, (b) 1 分間水付加の官能評価値, (c) 20 分間水付加の官能評価値. 全て化粧水を付加した 1 分後に測定.

3.4.6 皮膚状態による水分量深さ分布の特徴 [55]

図 3-22 には, 乾癬の被験者の腕の皮疹部と無疹部の測定部位の写真を示した. 皮疹部では明らかな紅斑あるいは紅斑跡が観察された. 無疹部は, 皮疹部に近い症状の見られない部位を皮膚科医が選択したため, 写真での視感では正常に近い様子が観察された.



図 3-22. 測定した非疹部と無疹部の外観写真.
無疹部は、皮疹部に近い症状の見られない部位を皮膚科医が選択.

表 3-4 には、図 3-22 の被験者 01～06 の皮疹部を、5 名の皮膚科医が視感により評価した、浸潤、紅斑、鱗屑、総合スコアの平均値を示した。被験者の乾癬の症状は、スコア値 1～2.4 であり、重篤な症状ではなかった。今回の被験者の中では、被験者 03 が最も軽度の症状、被験者 04 が最も重度の症状であった。

表 3-4. 皮疹部の医師視感スコア.

No.	Infiltration (I)	Erythema (E)	Scale (S)	Severity score
01	2.4 ± 0.9	2.4 ± 0.5	1.0 ± 0.7	1.5 ± 0.4
02	1.8 ± 0.4	2.0 ± 0.7	1.2 ± 1.1	1.7 ± 0.6
03	1.2 ± 0.4	1.4 ± 0.5	1.0 ± 0	1.2 ± 0.3
04	2.2 ± 0.4	2.0 ± 0.7	2.4 ± 0.5	2.2 ± 0.3
05	2.2 ± 0.8	1.8 ± 0.4	1.0 ± 0	1.7 ± 0.3
06	2.2 ± 1.1	1.8 ± 0.8	1.0 ± 0	1.7 ± 0.6

N=5, mean±SD

図 3-23 には、皮疹部と無疹部の皮膚の水分量の深さ分布の平均曲線と被験者の個別曲線を示した。図 3-23(b) の被験者ごとの水分量深さ分布を見ると、severity-score の高い群（被験者 04, 05, 06）の皮疹部では、皮表から 0 μm～80 μm の深さ位置の水分量が少なかった。また、図 3-23(a) に示したように、無疹部の水分量深さ分布の平

均曲線と皮疹部の水分量深さ分布の平均曲線とを比較すると、どの深さ位置でも皮疹部の方が水分量は少なかった。水分量が一定になる深さ (SCAT) は、無疹部の方が短いことから、皮疹部では角層が肥厚していることが示唆された。

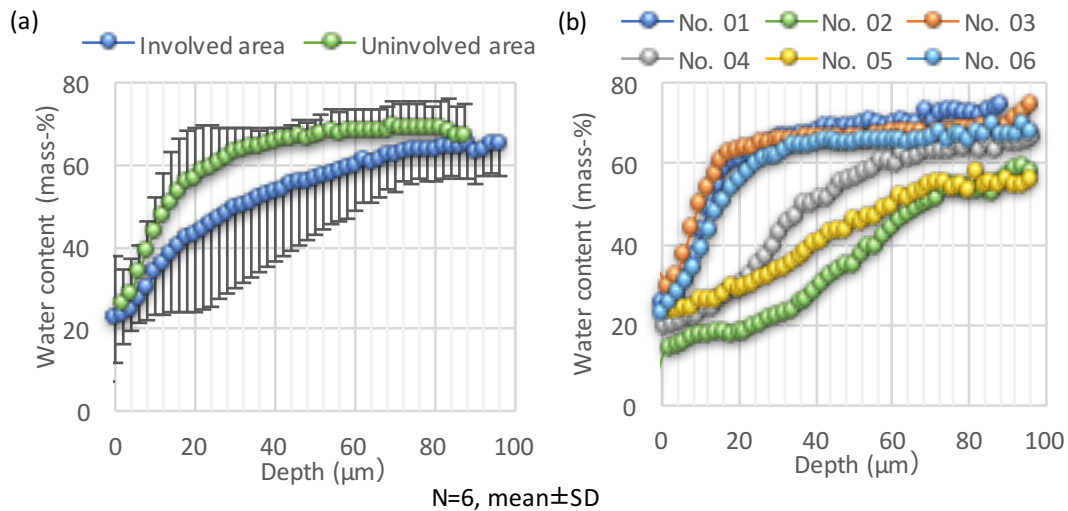


図 3-23. 皮疹部と無疹部の水分量深さ分布の違い。
 (a) 平均値, (b) 各被験者の皮疹部.

さらに, 図 3-24 に示した被験者 03 の OCT による皮膚の縦断面画像においても, 皮疹部における角層, 表皮層全体, 真皮上層の肥厚が観察された。

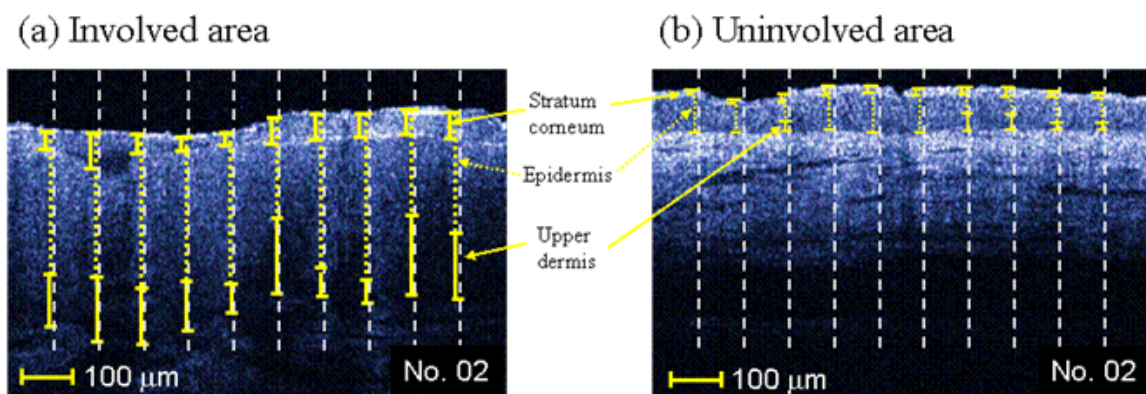


図 3-24. 被験者03の非疹部と無疹部の光干渉断層像。
 (a) 皮疹部, (b) 無疹部.

被験者 03 は, 医師の視感スコアでは, 今回の被験者の中で最も軽度な症状であると推測されたが, 皮膚の内部の状態は変化していた。さらに, 皮疹部 (図 3-24(a)) で,

表皮と真皮界面の境界部位の基底膜が鮮明には観察されなかった。おそらく、皮疹部における炎症に伴う水分量増加により、表皮と真皮界面の検出力に影響したのであろう。これらの結果は、自発ラマン散乱分光法による水分量測定が、疾患皮膚の状態変化の観察にも活用できることを示唆していると考えられる。

3.5 考察

ヒト皮膚の水分特性を理解する上では、皮膚の水分量の高精度な評価が必要である。そのために、筆者は、まず水分量の深さ分布について基礎知見を得る方針を選択した。本研究の開始時は、自発ラマン散乱分光法を用いることで、非侵襲的に皮膚の成分量を測定できることが報告され始めた時期であった。そのため、今まで電気特性値だけで論じられてきた皮膚の水分量について、詳細な研究が開始できる可能性が高まっていた。このタイミングで皮膚の水分量の深さ分布、特に表皮にターゲットを絞り、他研究者に先駆けて様々な基礎知見を蓄積した。初期検討の時点では、1988年に Warner らが報告 [21] した踵での結果が、皮膚の水分量の深さ分布の唯一の知見であったため、自発ラマン散乱分光法を用いて測定した皮膚の水分量深さ分布が、本当に正しいのかどうかは検証する方法が存在しなかった。そこで、侵襲手法を用いて検討が進んでいた角層厚の加齢変化や水和後の水分量の変化の過去の知見と比べて妥当性を検証した。

本手法で得られた皮膚水分量の深さ分布の特徴は、美容科学領域で推測されていた水分量の深さ分布の特徴とは大きく異なっていた。美容領域においては、モイスチャライザーを皮膚表面に短時間付加しただけで、直ちに角層の最下層まで水分量が増加すると考えられていた。しかしながら、実際に得られた結果は異なっていた。1分程度コットンパットで水を閉塞付加した場合では、皮表から僅か 5 μm 程度までの深さ位置の水分量が増加した程度であった。それまでの美容領域での一般的なイメージ、すなわち、短時間のモイスチャライザー塗布であっても角層の最下層の 12 μm 程度の深さまでその下の生細胞と同じ水分量レベルまで十分に水分量が増加する、という事実は存在しなかったのである。さらに、角層最下面よりも奥でも、水分量はさらに増加する深さ分布を示すことを明らかにした。すなわち、顆粒層と推定される層では、水分量は有棘層以下の生細胞層よりも少ない状態であり、顆粒層にも水分量の濃度勾配が存在する可能性があることを示した。当時の皮膚科学領域の研究者とのディスカッションでは、顆粒層では水分量は生細胞層レベルで維持されており、また、外から付加した水分は角層より奥の顆粒層には到達しないと考えられていた。そのため、本論文の知見が本当に皮膚の水分量深さ分布を表しているのかどうか、筆者が所属する企業の社内で研究結果が受け入れられるまでには、外部の他の研究者の研究結果 [56-59] が出るまで時間を要した。現在では、他の研究者の後続研究が報告されていること、それらが本論文の結果をサポートしていることより、理解されている。

本論文では、皮膚水分量の深さ分布から角層厚と同じパターンで変化すると考えられる SCAT を算出、SCAT の身体部位差を評価し、皮膚科医が実施した粘着テープで角層を剥がしてその枚数を数える研究などで報告された皮膚や角層枚数の部位差の知見 [60-64] と比較した。その結果、本論文で皮膚の水分量深さ分布から算出し

た SCAT の部位差は、角層枚数の部位差と類似しており、SCAT が角層厚評価の簡便な代替法として使える可能性を示した。SCAT を用いると、当時 OCT [65,66] など、他の手法では深さ分解能の問題で評価できなかった、極めて薄い頬などの角層の厚さを評価できた。Warner らの切り取った踵の皮膚の水分量深さ分布の結果 [21] からは、水分量深さ分布曲線の傾きには変曲点があり、その深さ位置が角層最下面であると推測できた。しかしながら、自発ラマン散乱分光計で *in vivo* で皮膚を測定する場合には、身体の状態や脈拍などで、測定アタッチメント面への皮膚の押し付け圧力がばらつき、測定中に深さ位置がずれることもある。多くの被験者を短時間で測定しなければならないヒト測定から得られる水分量の深さ分布曲線では、小さな変曲点を自動算出できるレベルの S/N の水分量深さ分布曲線を得ることは困難である。そこで、厳密には角層厚ではないが、角層厚とほぼ同じような加齢変化や部位差を示す、角層と一部の生細胞層を含む「みかけの角層厚」を自動算出することにした。その結果、部位差や年齢差といった多数の被験者を測定する実験での検証を実施することができたのである。

続けて、皮膚の水分量深さ分布に関して、年齢による違い、季節変化についての詳細な検討、さらに、水付加後の水分放出過程の追跡、ヒトが感じる感覚との対応、など多くの基礎知見を得た。その後の他の研究者らの学術発表・講演での結果 [56,58,59] は、筆者が先行して発表した結果を支持するものであった。

自発ラマン散乱スペクトルから算出した皮膚の水分量と静電容量値の季節変化が異なる挙動を示したことについては、皮膚のラマン散乱スペクトル取得時に注意すべきことを示唆している。第 2 章に記載したように、静電容量法についてもプローブと皮膚との接触面積や電解質の影響を受けるため、厳密に皮膚の水分量を測定できているとは言えない。しかしながら、実はこれらのアーティファクトは、水分量が多くなる皮膚状態において、より水分量が多く算出される方向に動く。すなわち、皮膚、特に皮膚表面付近の水分量が多くなると、皮表が水分によって柔らかくなり、プローブを押し付ける圧力で皮表に存在する皮溝が広がり、よりプローブとの接触面積が大きくなる。その結果として水分量の増加をより感度良く検出できている可能性がある。さらに、皮膚の水分量が少なくなると、皮表はカサカサし、ミクロな範囲では皮膚がめくれ上がる状況が発生する。この状態では、プローブと皮膚との接触面積は少なくなり、その結果、より水分量が少なく算出される可能性がある。一方で、自発ラマン散乱分光法の解析においては、水分量の算出時に、タンパク当たりの水分量として補正するため、皮表状態の変化による接触面積の違いの影響を受けない。そのため、水分量の変化が僅かな場合には、2 つの手法で差異が発生した可能性もある。

また、自発ラマン散乱分光測定においては、接触面積の影響は受けないが、*in vivo* 皮膚測定における被験者のコントロールにおいては、別の注意が必要である。すなわち、被験者の呼吸による微動の影響の軽減、測定位置合わせの迅速化、顔固定法の工夫などである。これらのコントロールを上手に行うことにより、測定アタッチメントで皮膚内部からの水分蒸散を閉塞することに伴う角層表面付近の水分量の増加を防ぐことができると考えられる。皮膚の水分量の変化がより大きく検出されると推定される静電容量法では季節変化は観察されたが、一方で自発ラマン散乱分光法では観察されなかったことより、皮膚の水分量深さ分布の季節変化は、角層の極めて上層の部分で起こっている可能性が高いと考えられた。奥の生細胞層から絶えず水分が蒸散される *in vivo* 皮膚のようなサンプルでの水分量測定では、接触測定のアーティファクトを全て除去することは難しいため、複数の計測手法で測定し、包括的に考察するこ

とが重要であると考えられた。さらに，被験者自身の主観評価（“最近乾燥感を感じる”，“最近乾燥感を感じない”）との対応の解析結果から，水分量に関する皮膚の感覚には皮膚の水分量以外に水の存在する場，すなわち水分保持力に関する水以外のタンパクや脂質などの状態，も関与する可能性も考えられた。ヒトの感覚は機器測定よりずっと敏感なのであろう。

さらに，自発ラマン散乱分光法を用いた皮膚測定を， $400\text{ cm}^{-1}\sim 2000\text{ cm}^{-1}$ の指紋領域で観察される様々な官能基のバンドを用いた水以外の角層内成分の評価でも活用した。水以外の角層成分量評価への活用は，Puppels らの研究グループが，角層内に存在する遊離アミノ酸や細胞間脂質などを，皮膚のラマン散乱スペクトルに角層内成分を含む標準物質のスペクトルを最小自乗近似法でフィッティングさせることにより単位ケラチンタンパク当たりの相対量として算出するアルゴリズムを提案 [48] した後，研究が進んだ。本論文で示したように，ラマン分光法により算出した水分量を評価指標とすると，季節による水分量の深さ分布の明確な変化は観察されなかったが，図 3-25 に示したように，他の角層成分量は季節で変化した。例えば，汗由来の成分と推定される乳酸・尿素や，細胞間脂質の成分と考えられるセラミド・コレステロールが夏期に増加することを確認できた [52,54,55]。これらの成分量の夏期における増加は，夏期の良好な皮膚状態の維持に関与していると考えられる。

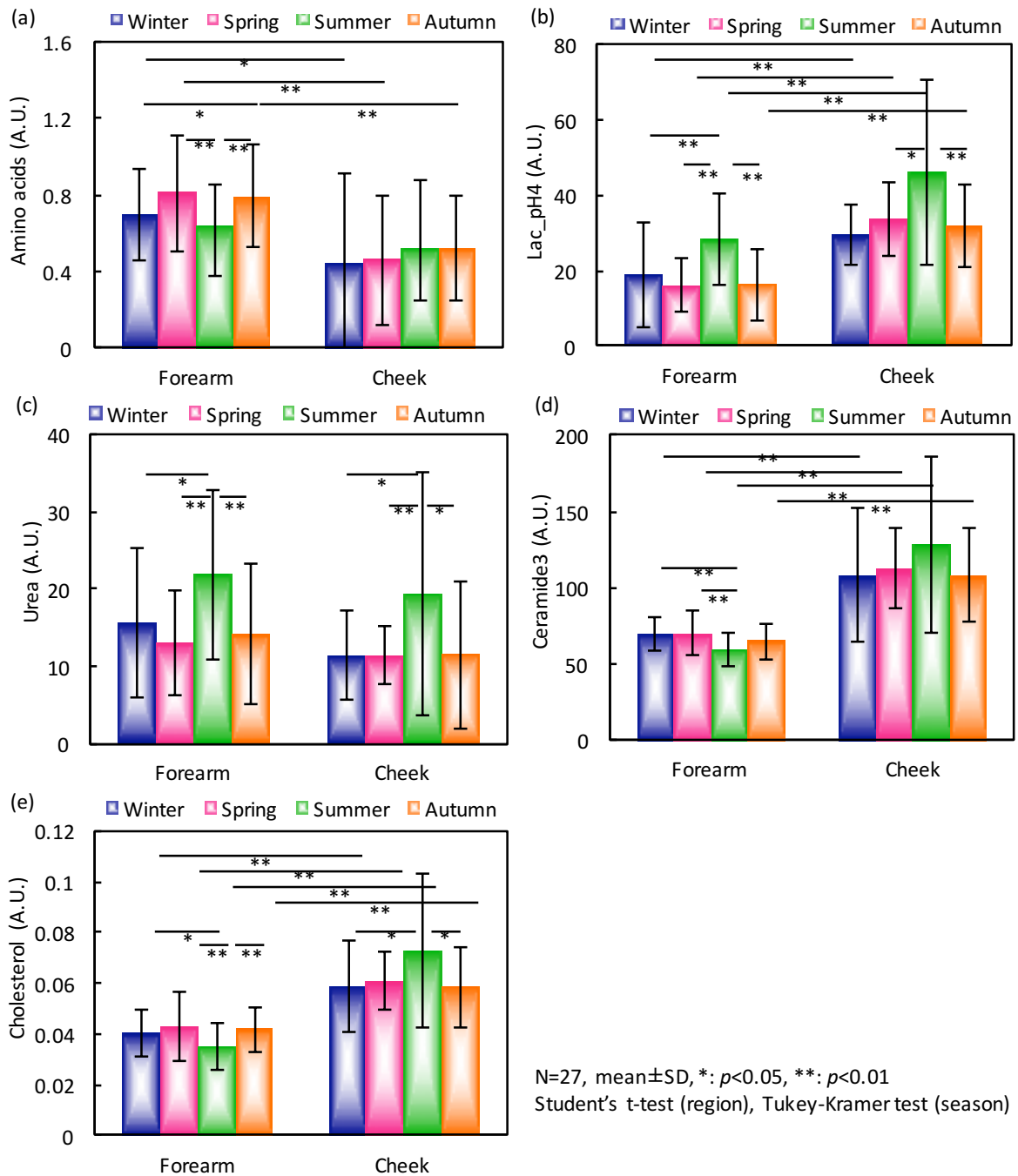


図3-25. 角層成分量の季節変化。
(a)遊離アミノ酸, (b)乳酸, (c)尿素, (d)セラミド, (e)コレステロール。それぞれ角層における平均量。

一方で、欧米の化粧品会社では、皮膚表面に塗布した薬剤がどの深さまで浸透するか、すなわち、薬剤の経皮吸収の挙動の評価、に対して、自発ラマン散乱分光法を活用する動向があった [67-71]。筆者も、保水効果が非常に高く医薬品の皮膚外用剤に配合されている尿素を含有した保水クリームを、皮膚に塗布した後の皮膚への尿素の皮膚への浸透・存在挙動の評価へも活用した。

尿素は保水力が高く皮膚の水分量保持に有効な薬剤であるが、一度溶解させても粉末が析出しやすいという欠点も有する薬剤である。尿素を配合させる製剤の種類によって、この再粉末化の度合いが異なるため、尿素を溶解型と粉末型に分けて皮膚内の存在量を評価できる手法は、より長時間保水効果を維持する尿素含有の皮膚外用剤を開発する上でメリットがある。そのため、尿素を溶解型と粉末型に分けた評価にも活用した。図 3-26(a) には粉末尿素有、図 3-26(b) には溶解型尿素有、図 3-26(c),(d) には尿素含有クリーム製剤 2 種類の自発ラマン散乱スペクトルを示した。粉末型尿素には、 1010 cm^{-1} に CN 対称伸縮振動と帰属されるバンドが観察された。本バンドは、溶解型尿素においては、 1004 cm^{-1} にシフトして観察された。尿素含有クリーム製剤中の CN 対称伸縮振動のバンドは、溶解型尿素に近い波数で検出された。このバンドを用いて、皮膚内で存在する尿素の存在型の違いを検出し、塗布後の尿素の析出度合いを評価する解析法を提案した [72]。

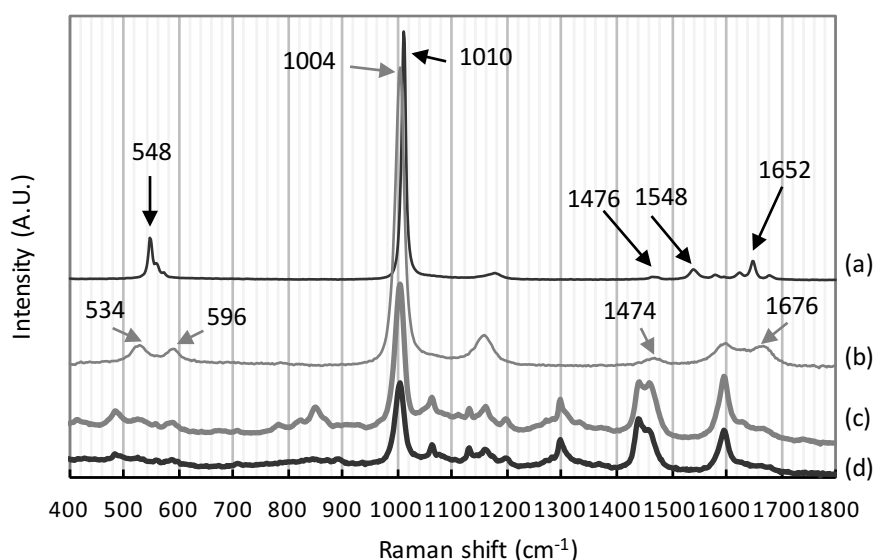


図 3-26. 尿素及び尿素製剤の自発ラマン散乱スペクトル。
(a) 尿素粉末, (b) 溶解型尿素, (c) クリーム製剤R, クリーム製剤F. 各スペクトルの縦軸は見やすいように適宜水平方向にずらして表示した。

図 3-27 には、2 種類の尿素クリーム製剤 R と F を塗布した後の、角層中の尿素存在量を、粉末型と溶解型に分けて示した。各測定前には、皮表の余剰の製剤はティッシュペーパーで除去している。その結果、製剤の違いにより、溶解型と粉末型の深さ分布パターンが異なることが示された。クリーム製剤 R の方が、塗布 15 分後及び 30 分後どちらにおいても、粉末型尿素の存在量が多いことが示された。すなわち、クリーム製剤 R の方が、尿素が析出しやすい刺激の強い製剤である可能性が示された。

最後に、皮膚の自発ラマン散乱スペクトル測定を、健常皮膚だけでなく、基底層でのケラチノサイトの増殖異常が関係する乾癬の皮膚の特徴評価へも活用し [55]、皮膚科学領域へアプローチしたことについても再度触れたい。皮膚疾患については、表皮の異常が関係する 2 大疾患の 1 つであるアトピー性皮膚炎の角層のアミノ酸量

の低下が報告されている [73]. 筆者らが明らかにした, 2 大疾患のもう 1 つの疾患である乾癬皮膚での角層内成分量の特徴も, 皮膚科医が分光法による非侵襲表皮特性評価に興味をもつことに貢献したと考えている [74,75]. さらに, 指紋領域の角層成分量評価への活用として, ウロカニン酸異性体比を指標とした低量紫外線照射に伴う皮膚ダメージの評価指標も開発した [76,77]. シスウロカニン酸は, 免疫反応にも関係する可能性 [78] もあることから, 今までは煩雑なサンプル処理が必要な侵襲的手法により研究が行われてきた [79-83]. しかし, 侵襲的手法では同一部位の経時変化の測定は困難であり, 紫外線照射後の変化過程の詳細な検討の報告は少なかった. トランスとシスを分離して非侵襲で測定できる本評価系の提案は, ヒトを対象とした試験系を組む場合に有効であると考えられる. さらに, 近年は他の研究グループと連携して, 自発ラマン分光法と誘電分光法とで, 同じような皮膚の水分量の深さ分布を示す知見も得ており, 自発ラマン分光法での皮膚の水分量評価の妥当性を裏付けた [84]. これら分光測定を用いて見出した表皮水分量の深さ分布などの新知見は, 美容科学・皮膚科学分野における表皮機能の研究の進展に大きく貢献した.

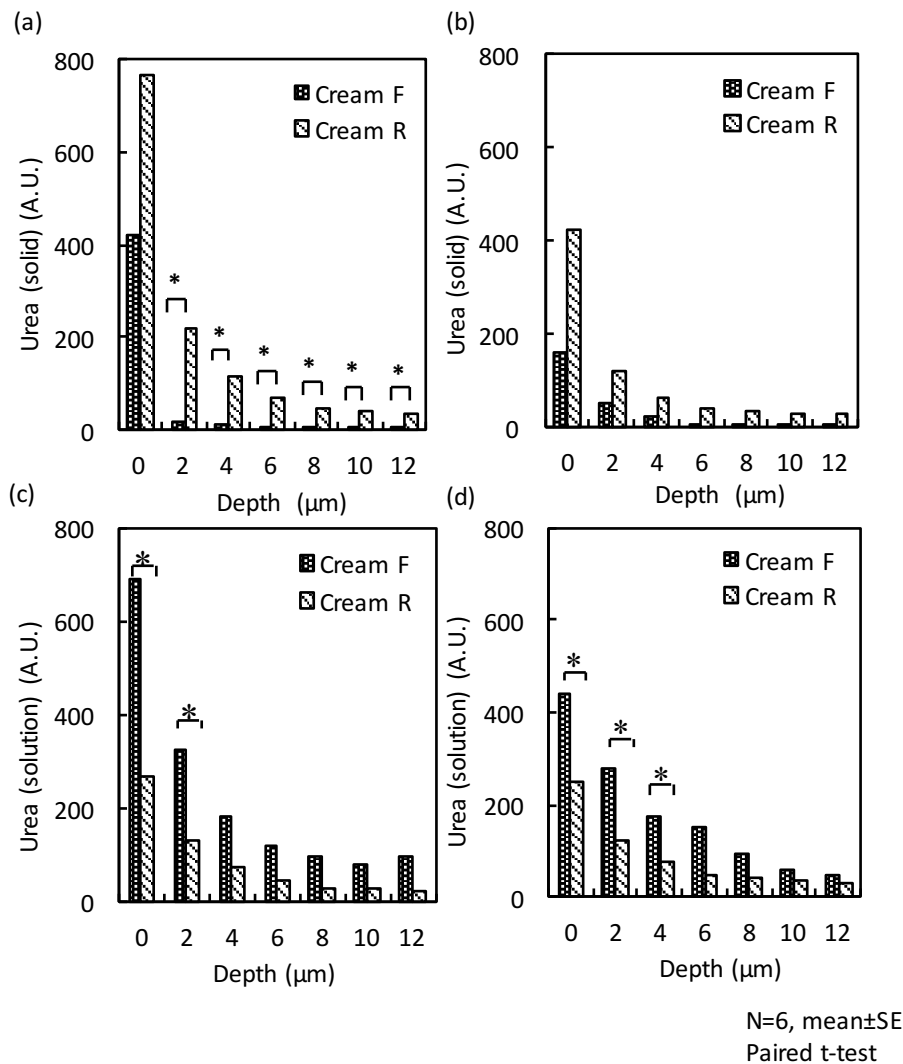


図 3-27. 角層への尿素浸透量の比較.

(a),(b) 粉末型尿素, (c),(d) 溶解型尿素, (a),(c) 塗布 15 分後, (b),(d) 塗布 120 分後.

3.6 結論

本章では，自発ラマン散乱分光法により，今まで未知であったヒトの皮膚の水分量の深さ分布の特徴を明らかにした．

最初に，頬，上腕，前腕屈側，手の甲，掌といった身体の部位による水分量の深さ分布の違いを比較して評価した．その結果，角層が厚いと考えられる掌では，薄いと考えられる頬や腕とは異なる水分量の深さ分布を示すことを明らかにした．さらに，水分量の深さ分布から，既存の手法では非侵襲で評価できなかった角層厚に代わり，「みかけの角層厚」という新たな簡便指標を提案し，身体の部位や疾患による角層厚の違いの評価に活用可能であることを見出した．

さらに，東京近郊での季節変化，加齢変化，皮表からの水付加による皮膚水分量の深さ分布の変化の測定へ応用し，皮膚の水分量深さ分布の特徴の基礎知見を得た．ここで得られた水分量の深さ分布の知見は，今まで美容科学領域で考えられていたものとは異なり，外部環境によって変化するのは，皮表に近い部分の水分量であった．ヒトが感じる水分量に関係する皮膚感覚は，物理量としての水分量以外にも，水の周辺の環境に存在するタンパク・遊離アミノ酸・脂質の存在量や構造が関わる可能性も示唆された．これらの皮膚の水分量深さ分布に関する詳細な検討結果は，自発ラマン散乱分光法で皮膚成分測定が初めて報告された後の 2000 年代において，他研究者を先行するアプリケーション知見となり，その後の美容科学・皮膚科学領域の研究の参考になったと考えられる．

共焦点光学系を組み合わせた自発ラマン散乱スペクトル計測による水分量の深さ分布測定は，皮膚の水分特性の研究に新たな局面を作り出した．本章の結果から，日常生活環境下では，角層の中下層より深部の水分量はほぼ定常状態にあり，日常的に変化する深さ位置は，皮膚表面に近いごく浅い部分であることが示唆された．このことを理解した時に，皮膚の水分特性を解明するには，水分量の深さ分布の評価だけでは不十分であると考えた．また，環境条件によって変化しやすい水分量の変化を正しく抽出するには，環境温湿度をコントロールした実験条件下で測定可能な持ち運び可能なタイプの測定システムが必要であると考えた．そこで，筆者は，近赤外分光法を用いた水分量面分布の評価系開発へと進んだ．近赤外分光法を用いて水分量イメージングを行うためには，近赤外分光法での皮膚の水分量検出の可能性を検討する必要がある．そこで，次の第 4 章では，皮膚の近赤外拡散反射スペクトルの特徴を評価して，その次の第 5 章で検討する近赤外分光イメージングによる水分量面分布の評価の基礎となる知見を取得する．

第 4 章 皮膚の近赤外拡散反射スペクトルの特徴評価

4.1 緒言

近赤外光は、波長帯域では、可視光と赤外光の間に挟まれる 800 nm～2500 nm の人間の目には見えない光である。近赤外分光法は、サンプル中に存在する物質の官能基の分子内振動による近赤外光の吸収を利用して、分子の状態を測定する分光法である [85]。近赤外領域で観察されるバンドは、赤外光で観察される分子の基準振動の第一倍音、第二倍音、結合音などによるものである。観察されるバンドは、赤外光領域に比べて非常に微弱であり、OH 基・CH 基・NH 基など水素を含む官能基のバンドが多い、倍音や結合音に由来する複数のバンドがオーバーラップする、分子間の相互作用によってバンドの波長シフトが起こる、などの特徴を有する。特に、複数のバンドがオーバーラップすることは、赤外分光法やラマン分光法で用いられてきた古典的なピーク処理に基づく解析法を適用しにくくしていた。一方で、近赤外分光法は、1980 年代後半から 2000 年代にかけてアプリケーション開発が成功し、まず食品・農業分野で実用レベルの活用が進んだ [86,87]。これは、多変量データに対して数学的手法・統計解析手法を適用して解析するケモメトリックスと呼ばれる手法が活用され、主成分分析 (PCA) などの定性分析や、Partial Least Square (PLS) 回帰分析などの定量分析による定量モデルが開発されたためである。近赤外光のエネルギー強度は小さいため、非破壊で測定できることも利点である。ヘルスケア領域においては、脳血流評価 [88,89]、血糖度評価 [90-93]、肺ガン評価 [94] への活用が検討されてきた。

皮膚科学領域においては、1400 nm～1500 nm 領域の水の OH 基のバンドを用いた水分量評価への活用が進められた。近赤外光領域における水の吸収による最も大きなバンドは、1920 nm 付近に存在する OH 基のバンドである。このバンドを測定ターゲットにする場合、測定対象を水分の含有量の多い皮膚とすると、拡散反射測定において検出器に戻ってくる光量が少なくなりすぎるため検出限界に近くなる。そのため、比較的吸収係数が小さいために反射光強度が大きく検出しやすい 1400 nm～1500 nm の領域を用いた研究が多かった。皮膚と異なり簡単に切り出したサンプルを扱える毛髪 [95-97] や爪 [98,99] といった皮膚付属器官については、水分量を比較的精度良く評価できる。一方で、これらの皮膚付属器官に対しては、近赤外分光法を用いなくても、破壊法では、カールフィッシャー法・核磁気共鳴 (NMR) 法、非破壊法では、重量変化・電気伝導度法を用いて水分量を評価できるため、現在においても近赤外分光法の活用は限定されている。皮膚については、皮膚の水分量や皮膚そのものの状態の違いによる近赤外拡散反射スペクトルの変化の解析が報告された [100-103]。その後、2001 年には Woo らが、1100 nm～1750 nm 領域の近赤外拡散反射スペクトルと電気特性による既存の皮膚の水分量測定値とを PLS 法で対応させた皮膚水分量定量モデルを提案した [104]。一方、皮膚に存在する水の束縛度合については、束縛度に依存するピークシフトが観察される 1920 nm 付近の水のバンドを用いた研究も報告されている。例えば、Martin らは、1993 年と 1998 年に束縛状態の異なる水の 4 つの種類バンド、すなわち、1875 nm (脂質 2 重層と関係する水)、1890 nm (角層より下のバルクの水)、1909 nm (角層のタンパクに 2 次結合した水)、1923 nm (角層のタンパクに 3 次結合した水)、を皮膚の近赤外拡散反射の 2 次微分スペクトルから帰属したと報告した [102,103]。2003 年に Wiechers らは、皮膚の近赤外拡散反射スペクトルは部位、性別、年齢、喫煙習慣によって異なることを報告した [104]。彼らの報告によると、1920 nm 付近の水のバンドの束縛度の違いによるピーク波長シフ

トは、皮膚状態や外部環境によって異なり、そして、1460 nm 付近の水のバンドよりも 1920 nm 付近の水のバンドの方が、角層中の水分子の状態をよく示す指標となると報告している。しかしながら、2000 年代前半に自発ラマン散乱分光法を用いて明らかになったように、*in vivo* の皮膚における角層水分量には深さ方向に濃度勾配が存在し、それは外部環境などにより変化する [47,48]。上述の近赤外拡散反射法を用いた皮膚の水分に関する先行研究では、測定深度を精密にコントロールすることが難しいにも関わらず、得られたスペクトルが皮膚のどの深さのものであるか、を考察しているものは多くない。そもそも、簡便法として汎用されている電気的手法も測定深度を精度良くコントロールできていないため、近赤外拡散反射法による皮膚の水分測定法も、簡便法としての活用であれば良いのかもしれないが、水の束縛度などの詳細解析については深さ方向の考察が必要であろう。Martin らの報告 [103] においては、実験的に近赤外拡散反射光がどこまで到達するか検討された。Wiechers らの報告 [104] においても、厚みを様々にしたポリスチレン層を用いて測定深度の評価にトライしている。どちらの報告においても、水の吸収係数の違い [85] による波長による測定深度の違いまでは考慮されていなかった。さらに近赤外拡散反射法における測定深度に影響する因子としては、Woo らが報告 [105] したファイバースコープと皮表との空気層のギャップ距離、Chen らが報告 [106] した表面反射、なども考えられる。さらに重要な事は、深さ方向に水分量に変化する層である角層の厚さは身体の部位により大きく異なるため、近赤外分光測定において、身体の部位による比較は、皮膚の異なる層の水の情報の比較になってしまう可能性があることである。

本章では、第 3 章で明らかにした皮膚の水分量の深さ分布を考慮して、第 5 章で実施する近赤外分光イメージングのために重要な皮膚の近赤外拡散反射スペクトルの特徴を、深さ方向の測定深度を含めて評価した。

4.2 目的

本章の目的は、皮膚の近赤外拡散反射スペクトルの特徴を明らかにして、次章で検討する近赤外分光イメージングによる表皮水分量面分布の評価のための基礎知見を得ることである。具体的には、皮膚の様々な部位の近赤外拡散反射スペクトルの特徴を評価した後に、投光/受光ファイバー間隔の違いによる測定深さコントロールについて述べる。最後に、取得した皮膚の近赤外拡散反射スペクトルから予測される皮膚の水分量値を測定深さと角層厚の違いから考察する。

4.3 方法

4.3.1 皮膚の近赤外拡散反射スペクトルの取得

近赤外光の中で、1250 nm～2300 nm ($8000\text{ cm}^{-1}\sim 4348\text{ cm}^{-1}$) 領域の皮膚の近赤外拡散反射スペクトル測定には、タングステンハロゲンランプ、フッ化カルシウム製ビームスプリッタ、インジウムガリウムヒ素 (Indium Gallium Arsenide (InGaAs)) 検出器、を有するフーリエ変換近赤外 (FT-NIR) 分光計 (VIR-9600, 測定波長: 1250 nm～2300

nm, 波数分解能: 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 cm^{-1} , 日本分光株式会社, 東京) を用いた. 本近赤外分光計に, 拡散反射測定用のファイバースプロブを組み合わせて, 測定時の波数分解能: 8 cm^{-1} , 積算回数: 32 回でスペクトルを取得した.

近赤外分光スペクトルデータの取得と解析には, Spectra manager (Version 1.53.01, 日本分光株式会社) を使用した. 2 次微分スペクトルは, Savitzky-Golay 微分関数, Quadratic 関数のフィッティングには 19 点の波数データを使用した.

4.3.2 投光・受光ファイバー配置の検討

皮膚の拡散反射スペクトルは, 図 4-1 に示したような, シングルファイバー 9 本で構成されるファイバースプロブを用いて取得した. 受光ファイバーは中心部に 1 本, 投光ファイバーは受光ファイバーの外周に 8 本配置した.

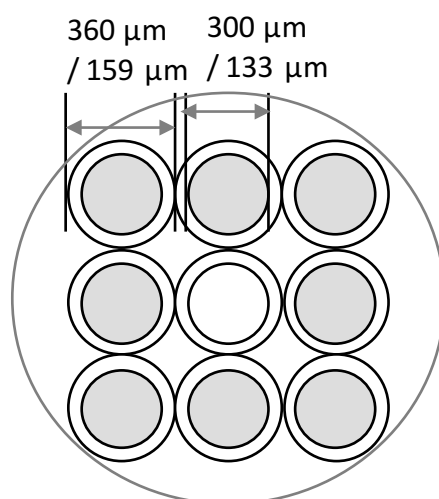


図 4-1. ファイバーの断面配置図.

光トポグラフィなどの近赤外分光研究領域において, 投光・受光ファイバー間の距離が短いほど, 検出深度が浅くなることが報告されている [89]. 第 3 章で述べたように, 表皮の中で日常生活の外部環境影響で水分量に変化する深さ位置は, 角層, それも皮膚表面に近い角層上層である. そのため, なるべく浅い位置からの情報を多く含む近赤外拡散反射スペクトルを取得することが重要であると考えられる. そこで, 本章の実験では, 以前の研究 [98,99] において, 爪の近赤外拡散反射測定で用いた直径 300 μm のシングルファイバー 9 本 (各ファイバーの周囲にはファイバー径の 1/10 の厚さの 30 μm ガード付与) から成るファイバースプロブとともに, 日本分光株式会社に特注した直径 133 μm のシングルファイバー 9 本 (各ファイバーの周囲にはファイバー径の 1/10 の厚さの 13 μm ガード付与) から成るファイバースプロブの 2 種類のファイバースプロブを使用した.

本章の研究開始時においては、近赤外拡散反射測定で用いられるファイバークローブは、一般的には投光・受光ファイバーが数 10 本から 100 本程度ランダムに配置されたものが多かった。サンプルの様々な深さからの近赤外拡散反射スペクトルを均等に感度良く取得するには良い方法であるが、皮膚という層状構造のサンプルにおいては、S/N の向上よりもどの層からのスペクトル情報を検出しているのかを明確にすることが重要なため、本研究ではシングルファイバーを用いた。図 4-2 には、ファイバークローブ先端の外観写真を示した。接触測定には、図 4-2(a) に示したファイバークローブのコア部分の先端を直接皮膚に接触させた。非接触測定には、図 4-2(b) に示したように、ファイバークローブ先端と皮表との間に 300 μm の間隔をあけるために、コア部分の外側に専用ガードを取り付けて使用した。

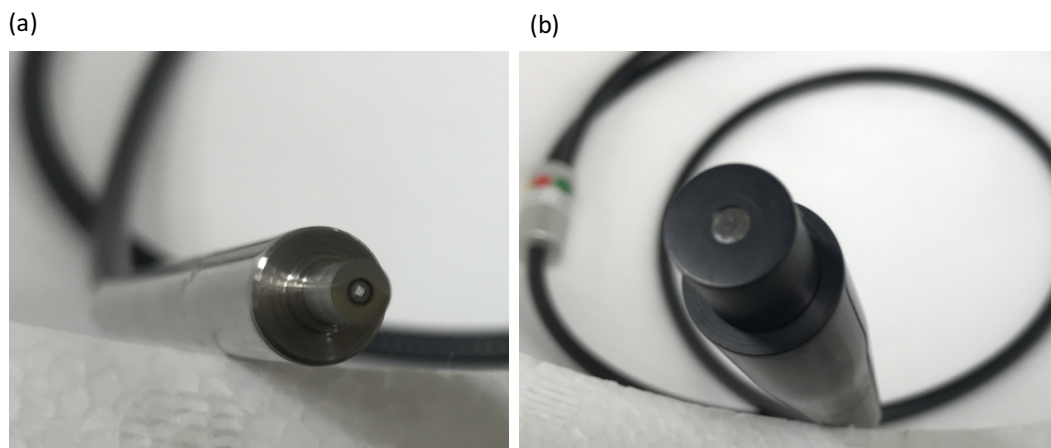


図 4-2. ファイバークローブ先端の外観写真。
(a) 接触測定用, (b) 非接触測定用に接触測定プローブに専用ガードを取り付けたもの。

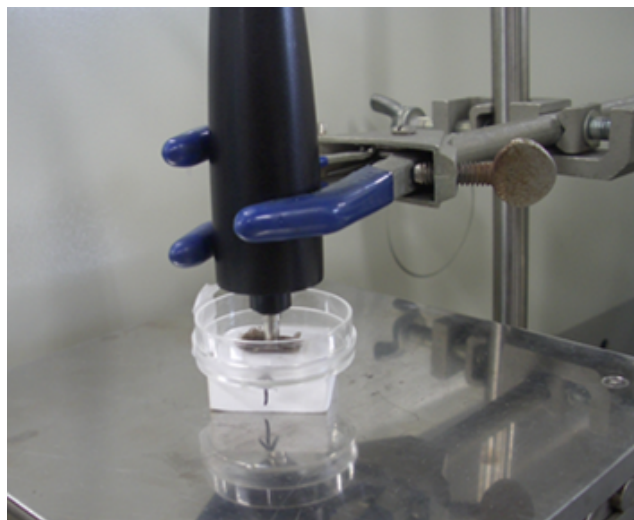


図 4-3. 角層シートを用いた測定深度の実測。

表皮の水分量測定に最適なファイバー直径の選定には、直径 300 μm と 133 μm の 2 種類のファイバー径で、同じ受光 1 本、投光 8 本を配置した (図 4-1) ファイバークプローブ 2 種類を用いた。具体的には、角層シートを重ね合わせて厚みを変えて比較する *in vitro* 実験、及び、数値シミュレーションの 2 つの方法で検討した。

In vitro 角層シート実験では、図 4-3 に示したように、日焼け後に剥離したシート状のヒト角層を、硫酸バリウムの上に設置した使い捨てシャーレの上に何枚も層状に重ね、角層シートの上から近赤外透過反射スペクトルを測定した。角層の下の使い捨てシャーレの特徴スペクトルの有無から、測定深度を実測した。各角層シートの厚さは、あらかじめノギス (ABS ソーラー式デジマチックキャリパ、株式会社ミットヨ、川崎) を用いて測定した。

数値シミュレーションは、モンテカルロ法による光伝播シミュレーションを用いた。皮膚は高散乱媒質であるため、一般的に皮膚の光計測を実施する際には、皮膚内での光の伝播経路を捉えて考察することが行われている。入射光は皮膚内での光の散乱によって様々な経路を伝播するために、実効光路長にばらつきが出ることや、皮膚の計測領域を確定できないことなどが問題となると言われている。しかしながら、皮膚内での散乱係数や吸収係数など光学定数は実測できないものが多いため、皮膚組織をモデル化して光伝播経路をシミュレーションで推定する手法が用いられている [89,93]。皮膚は数種類の細胞から成り立ち、深さ方向にも層状構造というヘテロな組織ではあるが、皮膚組織全体を 1 つの高散乱媒質として大きく捉えて算出した場合でも、皮膚の非侵襲測定においては十分に参考になる情報を得ることができると考えられている。シミュレーションの中で、光を光子の集まりとして捉え、組織の光学特性値と乱数を用いて個々の光子の挙動を計算する手法であるモンテカルロ法による光伝播シミュレーションは、脳機能測定のための光トポグラフィ [89] や血中のグルコース測定 [93] における計測領域のシミュレーションにも活用されている。以下、本章でのシミュレーションの設定条件を記載する。皮膚は 3 レイヤー (角層 20 μm 、表皮生細胞層 300 μm 、真皮 3 mm) と設定した。吸収の強さを与える吸収係数 μ_a (mm^{-1}) は、第 3 章で得られた皮膚の水分量深さ分布より、角層表面で 10%、最下層で 80% とし、その間にはニアに増加すると仮定して数値補間を行った。表皮及び真皮は、80% の一定値と仮定して代入した。散乱の度合いを与える散乱係数 μ_s (mm^{-1})、散乱強度の方向分布を特徴づける異方散乱パラメーター g は文献値 [30,107,108] を水分量と波長を考慮して補正した値、媒質の屈折率 n は全ての層で 1.37 を代入した。光子数は 100000~1000000 で実施した。

4.3.3 近赤外拡散反射スペクトルからの皮膚水分量の算出

皮膚の水分量の増加に伴う近赤外拡散反射スペクトルの変化を観察するために、市販のブタ皮膚をトリプシン処理して単離した角層シートを用いた。単離した角層シートは、室温 25 $^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 41, 50, 63, 81 %RH の環境下で十分に馴化させた。その後各角層シートを、99% 拡散反射板 (CSTM-SRS-05 Reflectance Standard, Labsphere Inc., North Sutton, NH, USA) の上に置き、上述の FT-NIR 分光計に直径 300 μm のファイバークプローブを取り付けて、ファイバークプローブと角層シートを接触させた状態で、角層シート上部から近赤外透過反射スペクトルを取得した。

4.3.4 皮膚水分量の部位差の評価

7名の日本人の健常ボランティア被験者（男性1名，女性6名，年齢21歳～29歳）を用いた．図4-4に示すように，測定対象部位は，額・頬・顎・肘・前腕・掌・踵の7箇所とした．被験部位は，被験者自身が，保湿成分を含有しない固形石鹸（サボンドール，資生堂）を用いて，測定1時間前に洗浄した．

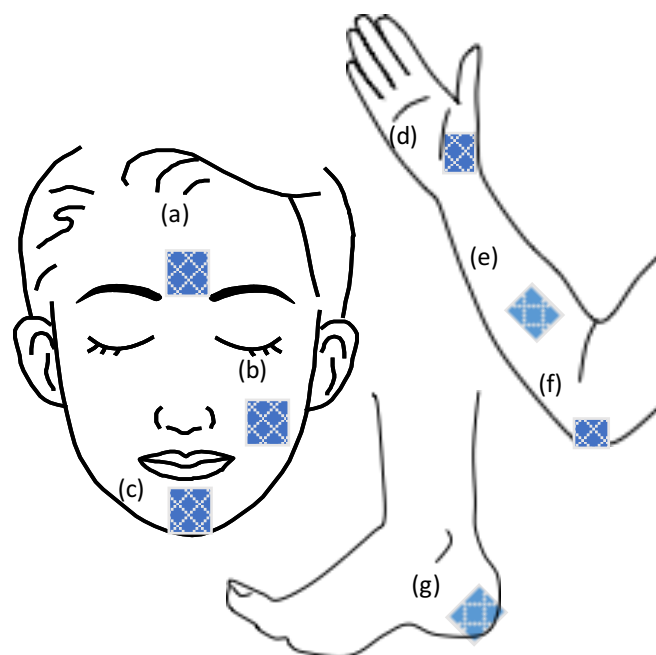


図4-4. 測定部位.

(a)額, (b)頬, (c)顎, (d)掌, (e)前腕, (f)肘, (g)踵. 額は眉間の中央, 頬は目尻と小鼻の交点, 掌は親指付け根の膨らみの部分, 前腕は屈側部.



図4-5. 皮膚の測定風景 (接触法).

具体的には，温度 23 ℃～26 ℃，相対湿度 40 %～50 % の環境下で，図 4-5 に示したように，ファイバープローブを皮表に軽く接触させて近赤外拡散反射スペクトルを取得した．皮膚との接触の度合いについては，プローブと皮膚は接触するが，皮膚に圧力はかからない程度の強さとした．

4.4 結果

4.4.1 皮膚の近赤外拡散反射スペクトル [109,110]

図 4-6 には，接触法で測定した前腕屈側部と踵の *in vivo* 近赤外拡散反射スペクトル，及び，環境温湿度 25 ℃，63 %RH におけるブタ角層シートの *in vitro* 近赤外透過反射スペクトルを示した． R は反射率を示す．

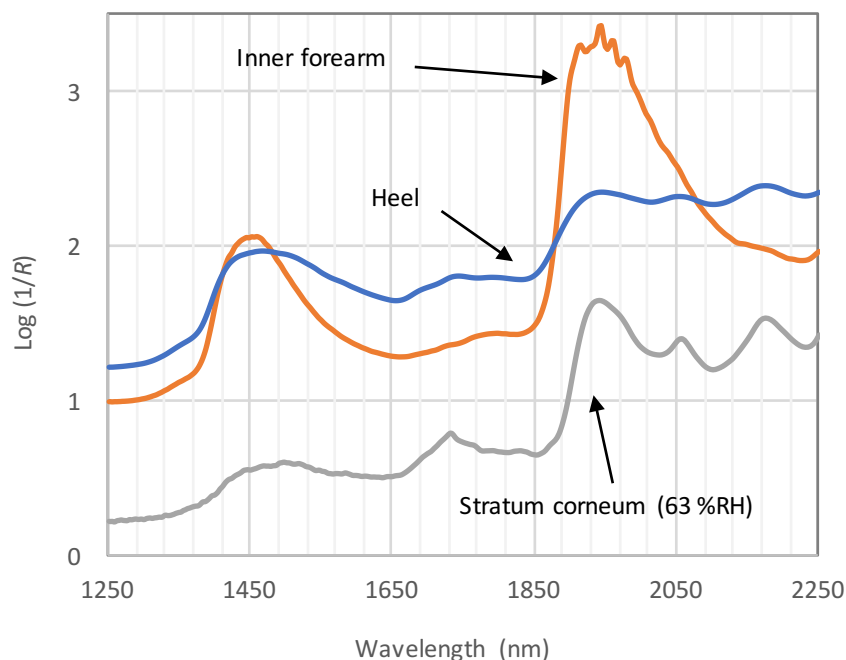


図 4-6. 皮膚及び角層シートの近赤外拡散反射スペクトル (接触法).

踵の近赤外拡散反射スペクトルと角層シートのスペクトルは類似しており、水・タンパク・脂質の複数のバンドが観察された。すなわち、1460 nm と 1920 nm 付近には、水の OH 基由来のバンドが存在した。1400 nm～1550 nm 領域には、水の OH 基由来のバンドの他に、タンパクのバンドがオーバーラップして存在した。タンパクのバンドは、1400 nm と 1500 nm 付近に、それぞれ CH 伸縮振動と CH 変角振動の結合音、及び、NH₂ 伸縮振動の 1 次倍音、の 2 種類が存在する。また、1700 nm～1800 nm 領域には、CH₃ と CH₂ 伸縮振動の 1 次倍音が観察された。2050 nm～2175 nm 領域に存在する 2 つのバンドは、それぞれ NH 伸縮振動とアミド II の CONH₂ の結合音、及び、アミド I とアミド II の CONH と CONH₂ の結合音に帰属すると考えられる [85]。一方で、前腕の近赤外拡散反射スペクトルは、角層シートや踵のスペクトルとは大きく異なった。すなわち、主に大きな 1460 nm と 1920 nm の水のバンドが観察され、その他の官能基のバンドは非常に小さかった。

次に、水分量が増加した場合の近赤外拡散反射スペクトルの変化を詳細に比較するために、角層シートを様々な湿度環境に馴化させた後の近赤外透過反射スペクトルを測定した (図 4-7)。相対湿度 41 %RH においては、角層シートの水分量は少なく、アミドのバンド (2050, 2175 nm) 及び CH₃ 基と CH₂ 基のバンド (1700 nm～1800 nm) は、どれもはっきりと観察された。一方で、相対湿度 81 %RH の高湿度環境下では、主に 1460 nm 及び 1920 nm に水の 2 つの強い吸収バンドが観察された。このスペクトルは、in vivo 測定において、前述の図 4-6 に示した前腕の近赤外拡散反射スペクトルと類似した。

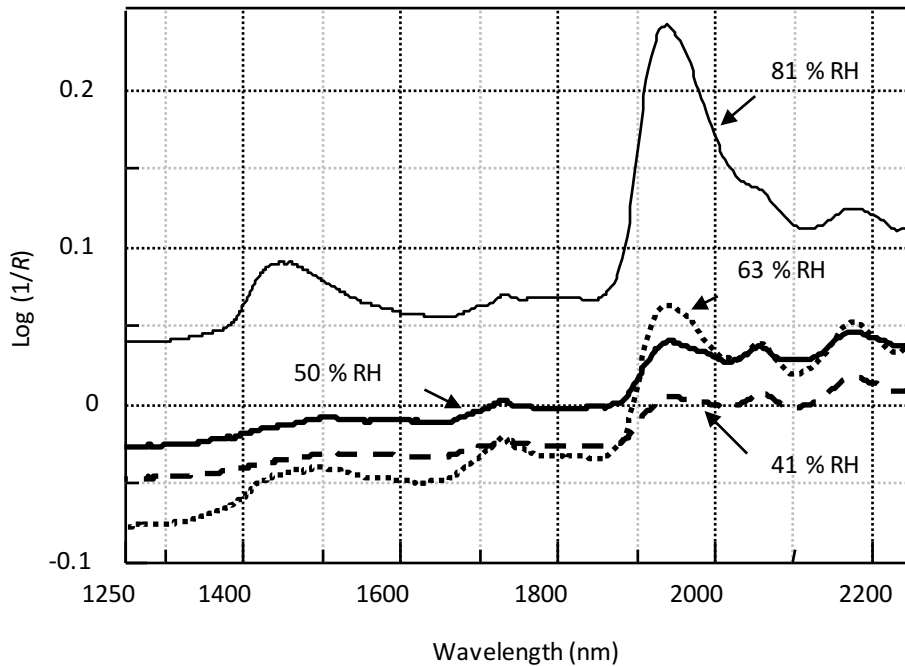


図 4-7. 様々な湿度環境での角層シートの近赤外透過反射スペクトル (接触法).
湿度条件は, 41, 50, 63, 81%RH.

図 4-8 には, 図 4-7 に示した近赤外拡散反射スペクトルの 2 次微分スペクトルを示した. 近赤外拡散反射スペクトルの吸収バンドは, 2 次微分スペクトルでは, 下に凸のバンドとして観察される. 図 4-8 に示したように, 1920 nm の水の OH 基のバンドのピーク強度は, 相対湿度の上昇とともに増大した, すなわち, 水分量が増加していることが示された. さらに, 1920 nm の水の OH 基のバンドのピーク波長は, 相対湿度の上昇と共に, 短波長側に移動し, 高湿度環境下の角層シートの方が 1900 nm に近づいた. これらより, 1920 nm の水の OH 基のバンドの評価から, 角層シートの水分量の増加に伴い, 水の分子内 OH 結合の束縛力が弱くなる方向に変化したことが示唆された.

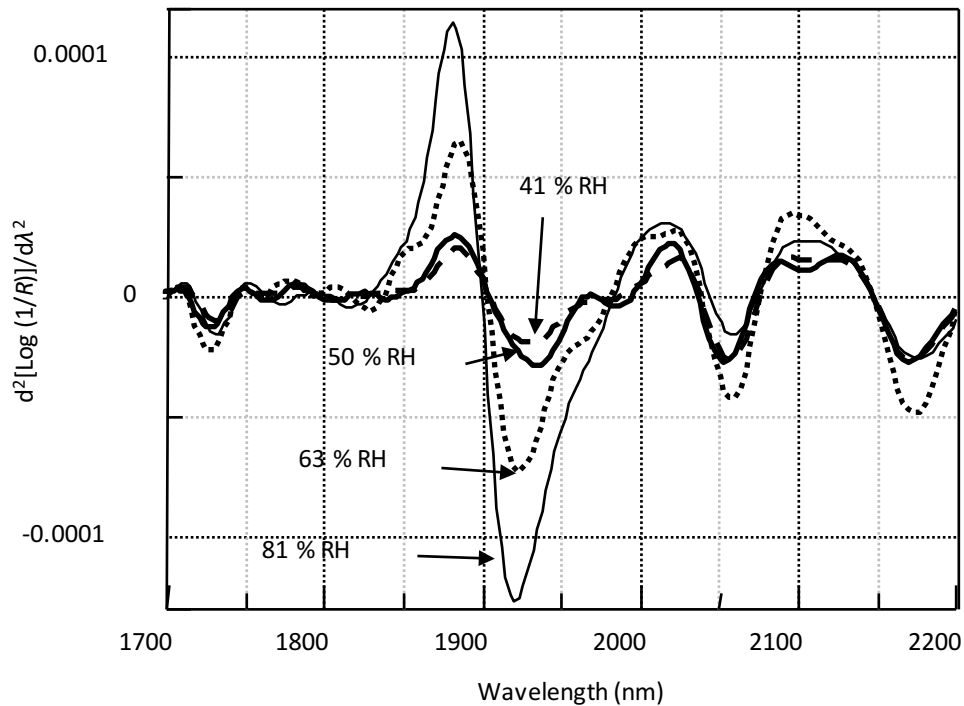


図4-8. 図4-7に示した角層シートの近赤外透過反射スペクトルの2次微分スペクトル.

4.4.2 ファイバー配置と測定深さ

直径 $300\ \mu\text{m}$ と $133\ \mu\text{m}$ の 2 種類のファイバークローブの測定深さの比較は、まず、角層シートを重ね合わせた *in vitro* 実験で検討した。図 4-9 には、角層シートを重ね合わせた総厚さによる近赤外透過反射スペクトルの変化を示した。角層シートの下に配置した使い捨てシャーレには、角層シートの特徴バンドと重ならない固有の特徴バンドが $1683\ \text{nm}$ に観察された。本バンドの検出強度によって、測定深さを大まかに推測した。バンドの検出強度 I は、 $1683\ \text{nm}$ における強度 I_{1683} と、ベースラインとした $1300\ \text{nm}$ における強度 I_{1300} との差分とした (式 4-1)。

$$I = I_{1683} - I_{1300} \quad (4-1)$$

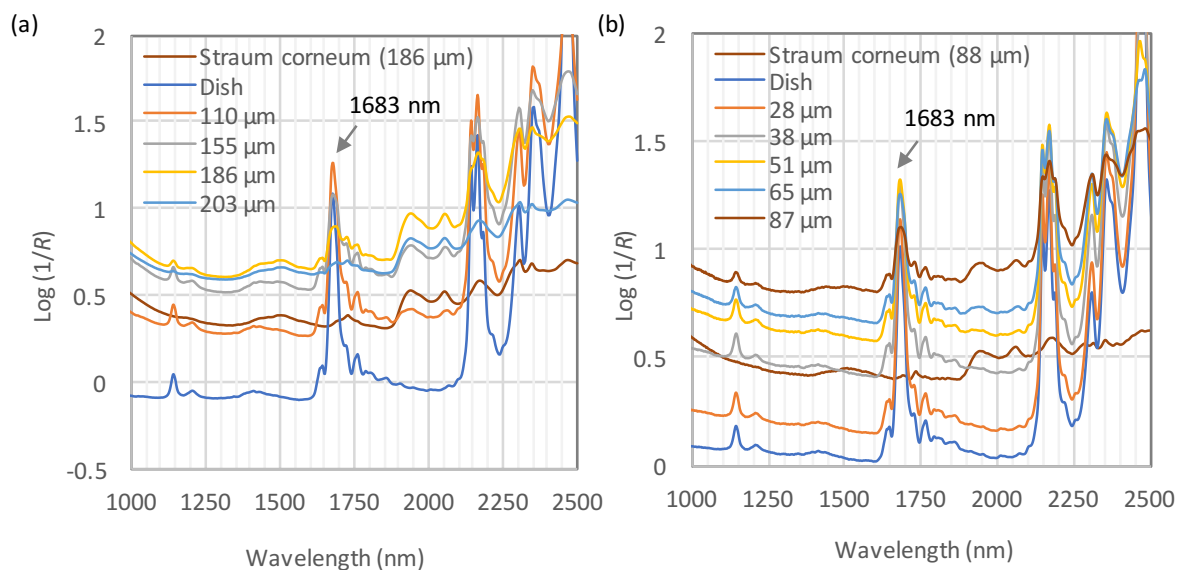


図 4-9. 角層シートを重ね合わせた厚さによる近赤外透過反射スペクトル.
 (a) ファイバー直径 300 μm , (b) ファイバー直径 133 μm .

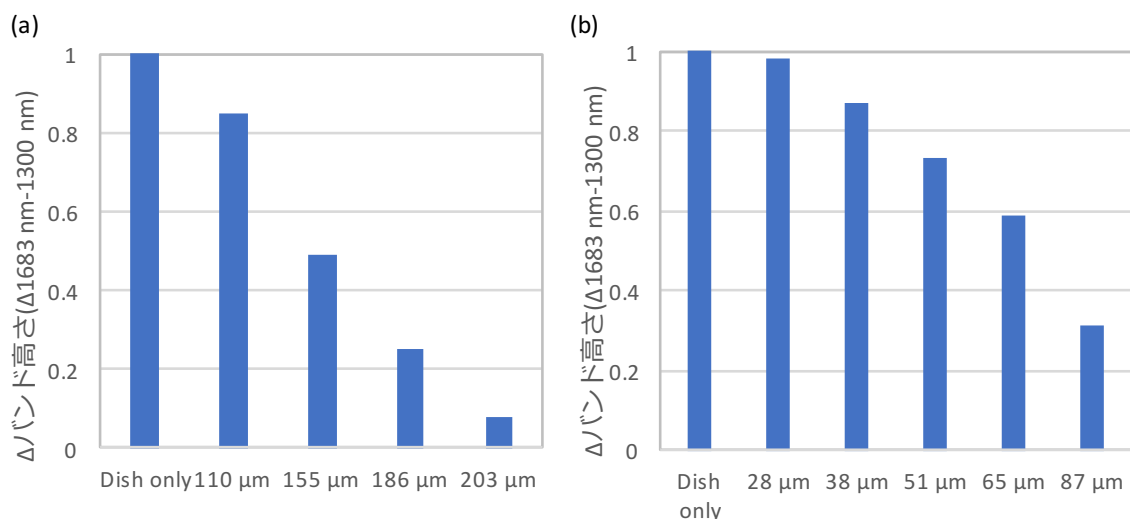


図 4-10. 角層シートの厚さによる 1683 nm のバンド強度.
 (a) ファイバー直径 300 μm , (b) ファイバー直径 133 μm .

その結果，図 4-10(a) に示したように，直径 300 μm のファイバークローブを用いた測定では，ベースライン補正を行なった後の 1683 nm のバンド強度の 1/2 に相当する角層シートの厚さは，155 μm であった．一方，直径 133 μm のファイバークローブを用いた測定では，その厚さは 65 μm ～87 μm であった．これより，皮膚のより浅い位置からの近赤外拡散反射スペクトルを取得するためには，ファイバークローブを狭くしたファイバークローブの配置が望ましいと推定された．しかしながら，第 3 章の結果より，室内で馴化した角層シートの水分量は 20%～30% と推定されるため，角層シート同士が隙間無く重ね合っている状態は考え難い．そのため，本 *in vitro* 実

験系のみで測定深度を論じることは不十分と考え、モンテカルロ法による数値シミュレーションも併用することにした。

ファイバー間の距離を変えた場合の測定深度を、モンテカルロ法による散乱媒質中の光伝播シミュレーションで比較した。シミュレーションには、1460 nm の水のバンドでの光学定数を代入した。図 4-11(a,c) には投光ファイバーから皮膚に入射した光子の吸収分布、図 4-11(b,d) には皮膚に入射した光子の中で受光ファイバーに戻ってきた光子吸収分布のみを表示した [110]。白く表示された部分は、吸収強度が強いことを示す。

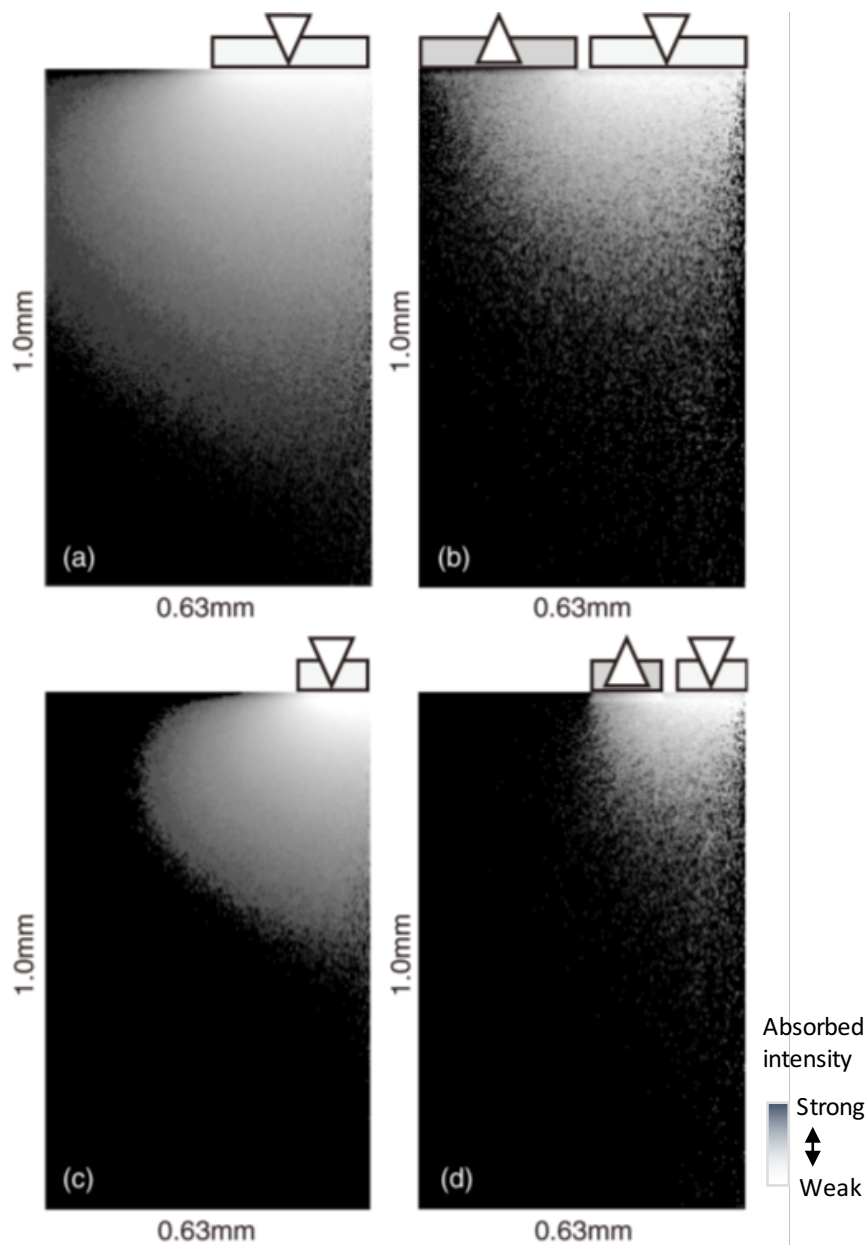


図 4-11. ファイバープローブによる測定深度の違い [110].
(a), (b) 直径 300 μm , (c), (d) 直径 133 μm . (a), (c) は皮膚に入射した光子の吸収分布,
(b), (d) は検出ファイバーに戻ってきた光子吸収分布のみを表示。

ファイバー間の距離の選定には、投光ファイバーから皮膚に入射した光子の中で、受光ファイバーに戻り検出した光子を、測定深度の算出に有効な光子として扱った図 4-11(b,d) の結果を用いた。図 4-11(b,d) に示したように、シミュレーションにおいても、直径 300 μm のファイバークローブ (図 4-11(b)) の方が、133 μm (図 4-11(d)) に比べて、皮膚の深い位置までのスペクトル情報を取得していることが示唆された。すなわち、より皮膚の浅い位置を測定するためには、直径 300 μm と 133 μm では、133 μm のファイバーを用いる方が効果的であることが示された。

以上、*in vitro* 角層シート実験、及び、モンテカルロ法によるシミュレーションの結果より、角層のスペクトル情報をより多く含む近赤外拡散反射測定のために、直径 300 μm と 133 μm では、133 μm のファイバークローブを用いることとした。

4.4.3 皮膚水分量の部位差と角層厚との関係 [111]

まず、*in vivo* での皮膚の近赤外拡散反射スペクトルの測定条件の最適化を検討した。具体的には、ファイバークローブの先端を皮膚に接触させる“接触法”と 300 μm の空気層のギャップをつける“非接触法”のどちらが適するかについて、比較検討した。図 4-12 には、非接触法で測定した近赤外拡散反射スペクトルの身体部位の部位差を示した。非接触法では、部位による近赤外拡散反射スペクトルの形状の違いが非常に大きかった。すなわち、1920 nm と 1460 nm の水の OH 基のバンドの強度は、額・頬・顎では同じ程度であったのに対して、前腕と掌では 1920 nm の方が大きく、一方、踵では 1920 nm の方が小さかった。特に、額や踵においては、近赤外拡散反射スペクトルの吸収バンドが潰れた形状を示しており、測定時の皮膚表面の粒子系などの影響によるバックグラウンドの変化の影響が危惧された。

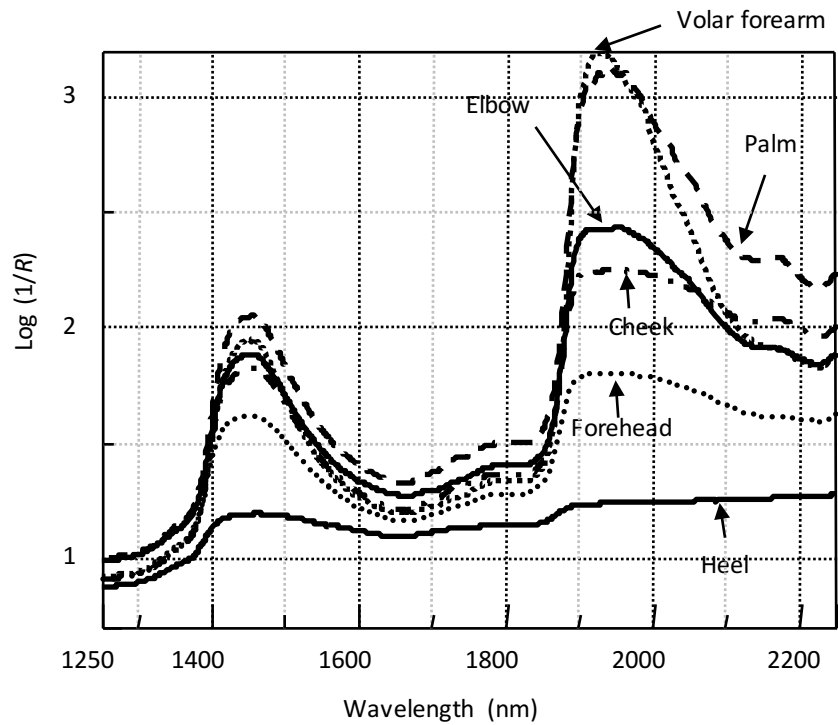


図4-12. 近赤外拡散反射スペクトルの部位差 (非接触法).

一方で、図 4-13 に示したように、接触法では非接触法に比べて、1920 nm と 1460 nm のバンドの大きさの部位による違いは小さかった。具体的には、肘において 1920 nm と 1460 nm の水のバンドの強度は同程度であったが、他の部位では全て 1920 nm の方が大きかった。また、接触法での踵のスペクトルは、角層シートとのスペクトルと類似していた。以上の接触法と非接触法での近赤外拡散反射スペクトルの比較から、以降の皮膚の水分量の部位差の比較には、皮表での正反射光の影響を受けにくいと推定される接触法を用いることとした。

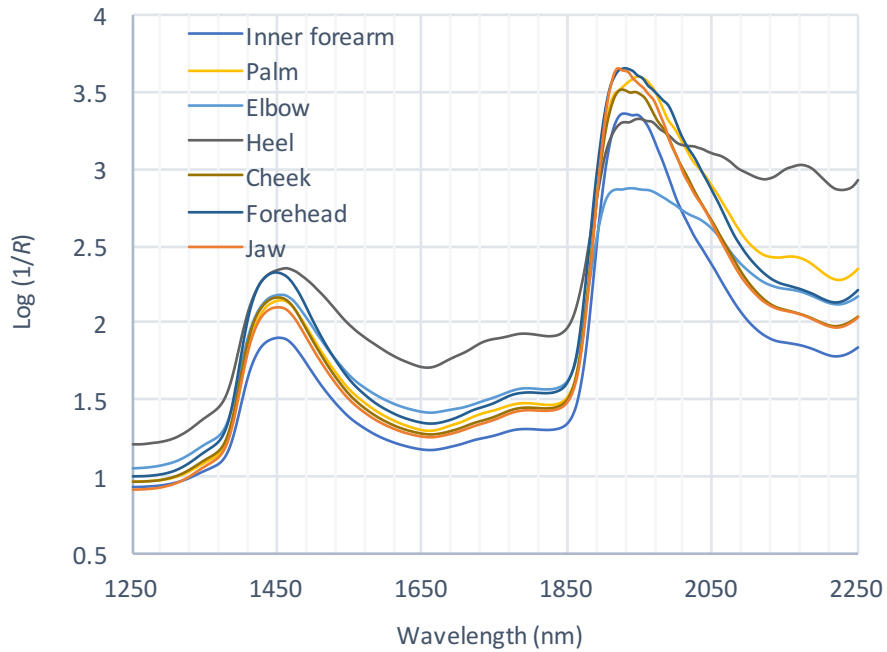


図 4-13. 近赤外拡散反射スペクトルの部位差 (接触法).

皮膚の水分量の部位差の比較は，接触法で取得した近赤外拡散反射スペクトル ($\text{Log}(1/R)$) の 2 次微分スペクトル ($d^2[\text{Log}(1/R)]/d\lambda^2$) を用いた．図 4-14 には，図 4-13 に示した身体の部位ごとの 1750 nm～2250 nm 領域の近赤外拡散反射スペクトルの 2 次微分スペクトルを示した．1920 nm の水の OH 基のピーク強度は，部位によって異なり，踵や肘で小さかった．さらに，本バンドのピーク波長にも部位差が存在した．

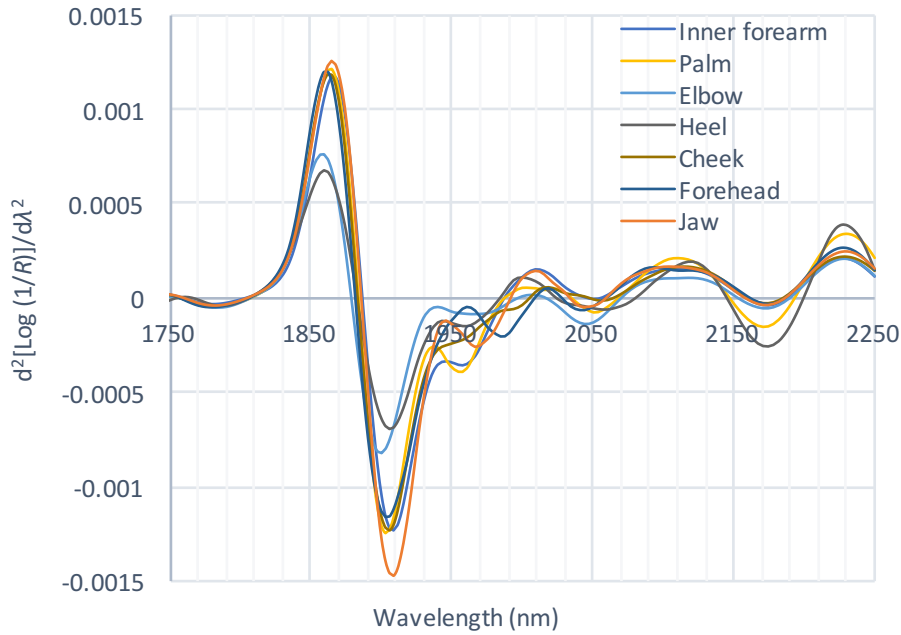


図 4-14. 1750 nm～2250 nm 帯域の 2 次微分スペクトル.

水分量の比較には，1920 nm の水の 2 次微分スペクトルのバンド強度を，同 2175 nm のアミド I とアミド II の CONH 基と CONH₂ 基の結合音のピーク強度で除算した，タンパク当たりを基準化した相対水分量 Wr を使用した (式 4-2). なお，ピーク強度については，ピーク波長の波長シフトも確認されるため，2 次微分スペクトルの該当バンドにおける絶対値の最大値とした.

$$Wr = \frac{d^2[\text{Log}(\frac{1}{R})]/d\lambda^2_{1920}}{d^2[\text{Log}(\frac{1}{R})]/d\lambda^2_{2175}} \quad (4-2)$$

図 4-15 には，7 名の被験者の相対水分量の部位差を示した. 部位差の検定には，Fisher's LSD の両側検定を用い， $p < 0.05$ を有意差とした. その結果，部位による相対水分量値の顕著な違いが観察され，その違いは 3 つのグループに分類できた. すなわち，相対水分量が少ない部位 (掌・肘・踵)，中間的な値をとる部位 (前腕・肘)，そして多い部位 (額・頬・顎) である. 第 3 章の SCAT の部位差と合わせて比較すると，相対水分量が少なかった部位は全て角層が厚い部位であり，多かった部位は全て角層が薄い顔の部位であった.

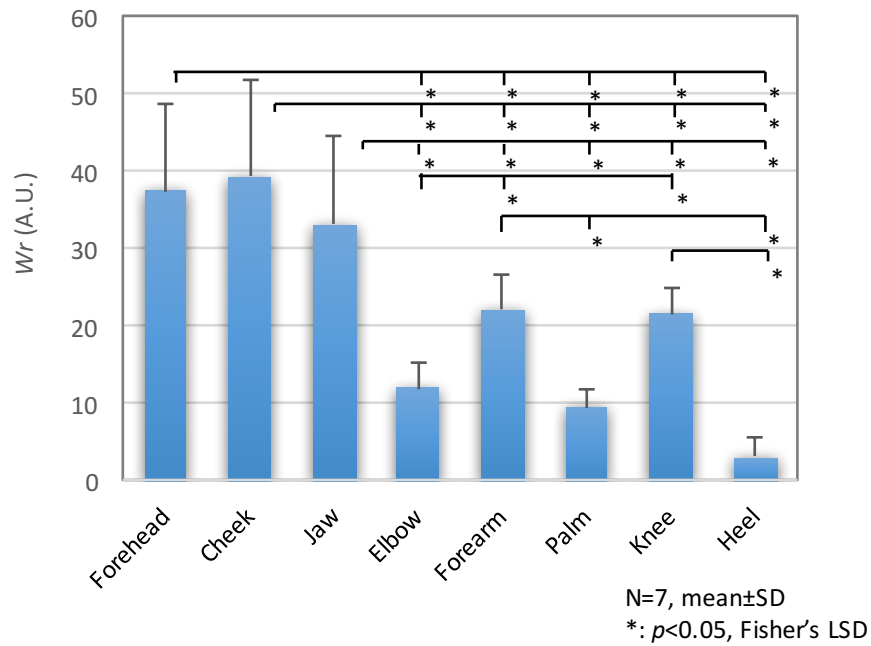


図 4-15. 2 次微分スペクトルから算出した皮膚の相対水分量の部位差.

さらに、2 次微分スペクトルの 1920 nm の OH 基のバンドのピーク波長を比較することにより、OH 基の分子内結合の束縛度を比較した。その結果を、図 4-16 に示した。どの部位においても、ピーク波長の個人差が存在したが、特に踵で著しかった。水分量と部位差の結果とは異なり、一概に水分量が多い部位（額・頬・顎）でピーク波長が短波長側にシフトしているわけではなかった。明らかに角層が厚い踵や肘と薄い顎や前腕の部位では、近赤外拡散反射スペクトルから算出する生細胞層の情報を含む、相対水分量値は平均値で有意な差が存在した（図 4-15）。それにも関わらず、1920 nm の OH 基のバンドのピーク波長の平均値は、部位による大きな差違は観察されなかった。両結果より、水分量の大小以外にも、水の束縛度合いに影響する因子が存在することが示唆された。

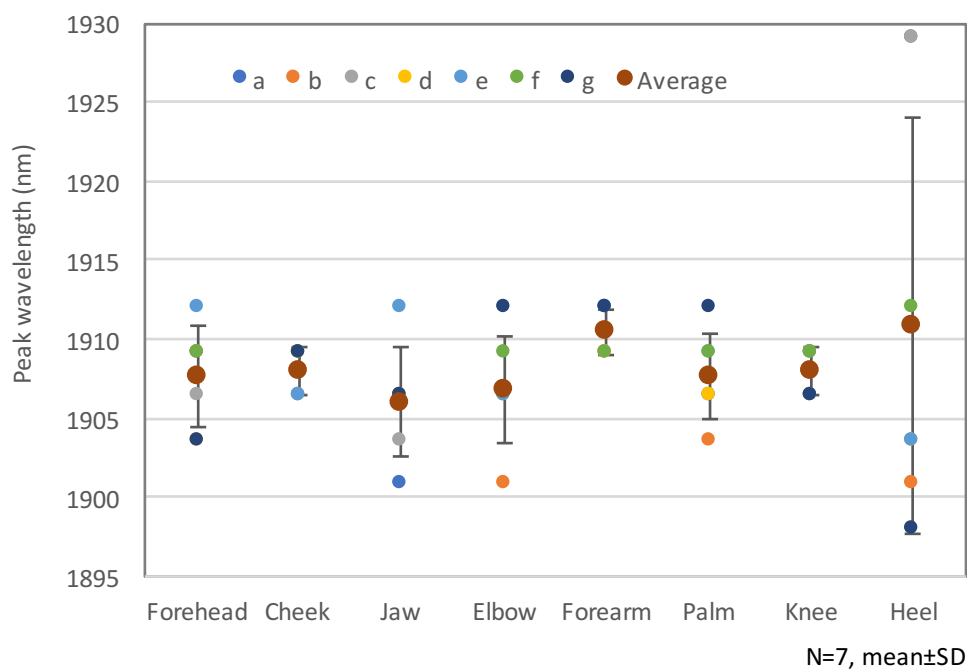


図4-16. 1920 nmのOH基のバンドの2次微分ピーク波長の部位差.

4.5 考察

1990年代より、近赤外拡散反射スペクトルを用いた皮膚の水分特性の研究には興味を持たれており、複数の研究者が皮膚の水分量評価法としての開発のために基礎検討を進めてきた。しかしながら、測定深度を考慮したものは少なく、その結果、理論的な考察は進まず実用化には至っていない。近赤外拡散反射測定における測定深度は、プローブと皮膚との接触、プローブのファイバー配置、選択波長、皮膚の吸収係数、角層の細胞の形状に関連する散乱係数の変化、など様々な因子の影響を受けると考えられる。層状構造である皮膚の水分量の絶対値を *in vivo* で測定する対照となる標準法は存在しないため、測定深度を *in vivo* 測定のみで推定するのは困難である。そこで、*in vitro* 実験と数値シミュレーションを組み合わせて推定した。そこから、今まで、そして現在も行われている皮膚の近赤外拡散反射測定では、測定深度は、角層だけでなくその下の生細胞層の情報も含む深さまで達することが推定された。

そのため、皮膚最外層の極めて薄い角層の情報をより多く含む近赤外拡散反射スペクトルを取得するために、ファイバープローブのファイバーの直径や配置を調整した。モンテカルロ光伝搬シミュレーションから、ファイバーを細くして、投光ファイバーと受光ファイバーの間隔を短くすれば、より皮膚の浅い部分からのスペクトルを取得できることが示された。しかしながら、近赤外拡散反射スペクトルを取得するための機器の感度の問題もあり、本章で準備した細い方の $133\ \mu\text{m}$ のファイバーを用いたファイバープローブでは、水の束縛度を解析するためのターゲットバンドである 1920

nm 付近の信号強度は極めて小さかった．これより，実際のヒト測定においては，133 μm のファイバーでは，受光信号強度が弱すぎて実用化できないと判断された．そのため，身体部位差の比較検討には，太い方の 300 μm のファイバーから構成されるファイバースコープを用いて，生細胞からの信号を含んだ近赤外拡散反射スペクトルとして扱った．

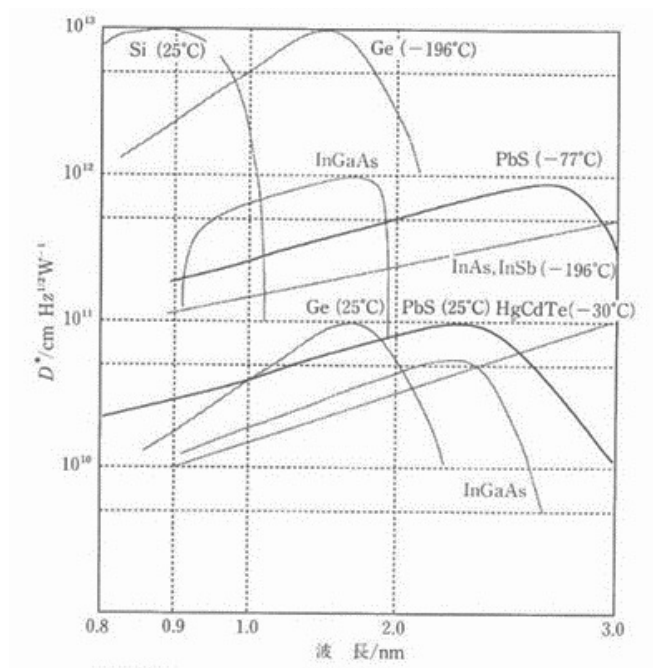


図 4-17. 近赤外光電検出器の分光感度特性 [112].
 実線は光誘電型：PbS, PbSe, HgCdTe, 波線は光起電力型：Ge, InAs, InSb, InGaAs, HgCdTe.

本章の検討において，測定に用いる近赤外分光計についても，将来の実用場面での活用を考えた時に操作性が良い仕様での装置選定に拘った．すなわち，検出素子は液体窒素での冷却を必要としないこと，が第一条件であった．2005 年当時，近赤外分光法に用いる主な素子は，図 4-17 に示したように，PbS, InGaAs, InSb であったが [112]，その中で InGaAs を選択した．検出感度を上げるために液体窒素で冷却しながら測定する手法もあるが，筆者の最終ターゲットはいかに簡便な測定が出来るかどうかであったため，液体窒素冷却は行わなかった．さらに，電子冷却の選択もあったが，ベースとなる分光計がフーリエ変換タイプであり，振動の影響を受ける可能性があるため，冷却無しの常温で使用する仕様とした．常温の InGaAs 素子を用いた FT-NIR 計，ファイバー直径 300 μm という制限の中で，測定深度をより浅くするために，まず，皮表とファイバースコープ先端との間にギャップを設け，皮膚に入射させる光量自体を減らし，一方で皮表での正反射を増やし受光部での光量を増やして，より浅い部分のスペクトル情報を素子の検出感度内で取得するという非接触法を試した．しかしながら，皮表のマイクロな形状，すなわちキメの整いパターン，皮丘の高さ，皮溝の深さ，には部位や皮膚のうるおいの状態による差異が存在した．この違い

は、近赤外拡散反射スペクトルに対して、ベースラインの変動を与えると考えられた。また、特に 1920 nm の水の OH 基のバンドに対して、バンドの形が歪むという影響も出現した。この歪みの原因は考察しきれていない。最終的に、皮膚の近赤外拡散反射スペクトルから、ラマン分光法で実現したような皮膚内の深さごとの水分量の分布を精密に測定するのは困難という結論に達した。

今まで報告された近赤外拡散反射法による皮膚の水分量に関する論文は、ラマン分光法による皮膚の水分量深さ分布の研究が報告され始める以前のものが多い。そして、たとえその後であっても、皮膚の層状構造に伴う水分量の深さ分布の違いや測定深度について熟考されていなかった。皮膚の水分量測定において、測定深度は非常に重要な条件である。踵のように角層が数 mm 程度の厚さを有する部位であれば、本章で用いたファイバースコープ測定で、角層のみの近赤外拡散反射スペクトルを取得できると考えられる [113]。角層のみのスペクトルを取得できる踵を測定対象とすれば、皮膚状態や塗布物による角層の水分量の変化や水の束縛状態を検証することができる。

そこで、角層のみの水分量評価のアプリケーションとして、踵を用いた尿素含有クリームの評価を行なった。皮膚外用剤の中で、尿素が含有されているクリームは、塗布後に角層の水分量を増加させるだけでなく、皮膚の感触としてなめらかに、柔らかくなるといった変化をもたらす。尿素含有クリームは通常踵に使用することより、近赤外拡散反射法を用いた水分量と尿素量の評価から、クリーム塗布後の皮膚の状態の考察に活用できるかどうかについても検討した。クリーム塗布後の測定については、皮膚表面に残存する余剰なクリームを、ティッシュペーパーで除去した後に実施した。

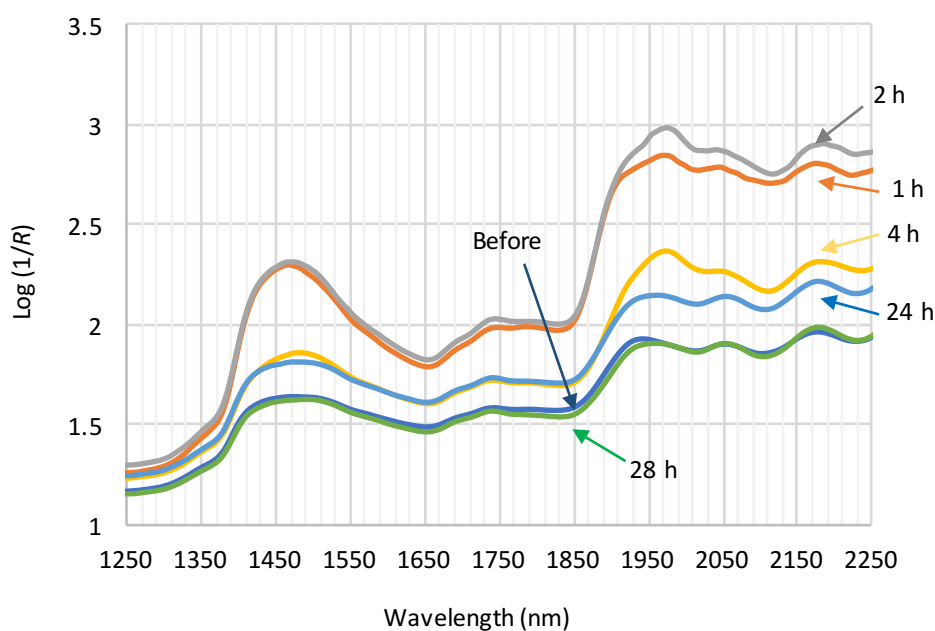


図 4-18. 尿素クリーム塗布前後の踵の in vivo 近赤外拡散反射スペクトル。

図 4-18 には、尿素含有クリームを塗布する前、1、2、4、24、26 時間後における、300 μm のファイバースコープを用いて *in vivo* で取得した踵の近赤外拡散反射スペクトルを示した。踵の *in vivo* 近赤外拡散反射スペクトルは、図 4-6 に示した角層シートの近赤外拡散反射スペクトルと酷似していた。すなわち、OH 基の 2 つのバンド以外にも複数のバンドが観察された。尿素含有クリームを塗布した後においては、皮膚の 1920 nm の OH 基のバンドの長波長側の 1970 nm~2010 nm 領域に、クリームに含まれる尿素の NH_2 primary amine の NH 伸縮振動と NH 変角振動が観察された。 NH_2 primary amine 由来のバンドは、クリーム塗布 4 時間後まで観察された。4 時間後から 24 時間後の間には、被験者は帰宅し入浴やシャワーを行なったため、クリームと共に尿素が洗い流された可能性が高い。そのため、クリームの効果を厳密に評価するためには、さらに測定条件をコントロールする必要が発生するが、本検討においても、尿素含有クリームを塗布した後 4 時間後まで、角層中に尿素が残存していることは示されている。

図 4-19 には、1850 nm~2250 nm 領域の 2 次微分スペクトルを示した。1920 nm の水の OH 基のバンドのピーク波長は、塗布前は 1926 nm 付近であった。尿素含有クリームを塗布して 1、2 時間後においては、塗布前に比べて短波長側の 1900 nm 付近にシフトした。そして、塗布 4、24、28 時間後においては、ピーク波長は、再び 1926 nm 付近を示した。図 4-18 の近赤外拡散反射スペクトルにおいては、尿素の NH_2 primary amine 由来のバンドは、尿素含有クリーム塗布 4 時間後まで観察されているにも関わらず、1920 nm の水の OH 基のバンドのピーク波長の短波長側へのシフトは、2 時間後では観察されたが、4 時間後では観察されなかった。これは、この被験者については、クリーム塗布 4 時間後においては、尿素自体は存在するが、水の OH 基の束縛状態へは影響していないということを示唆する可能性がある。

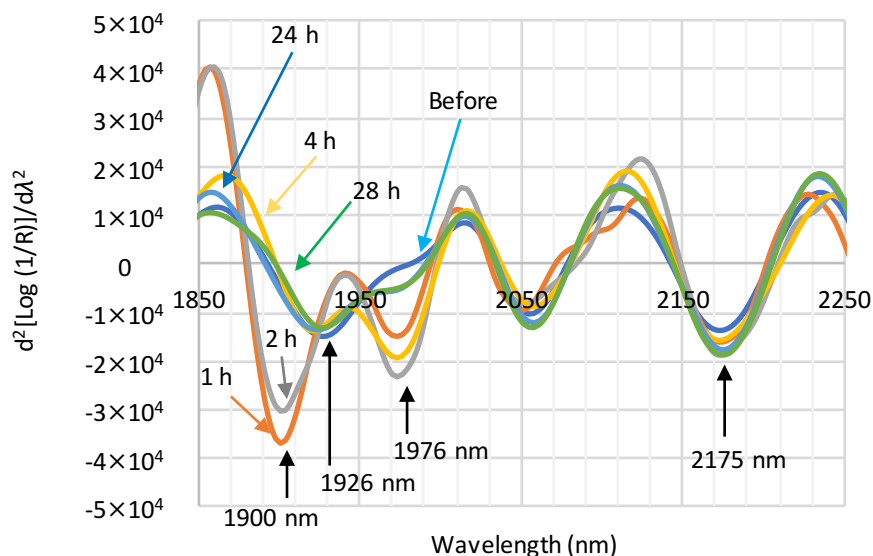


図 4-19. 図 4-18 の 1850 nm～2250 nm 帯域の 2 次微分スペクトル.

図 4-20 には、尿素含有クリーム塗布に伴う 1920 nm の水の OH 基のバンドのピーク波長を、尿素含有クリーム塗布部位と無塗布部位とで比較した結果を、被験者 5 名の平均値で示した。塗布部位では、塗布 1, 2, 4 時間後に、無塗布部位あるいは塗布前と比べて、1920 nm の OH 基のバンドのピーク波長の短波長側への有意なシフトが認められた。前述 (図 4-18, 図 4-19) の 1 名の被験者でのスペクトルの観察では、短波長側へのシフトは、2 時間後までしか観察されなかったが、5 名の平均値では 4 時間後まで観察された。ここに、被験者の皮膚による個人差が存在することが示唆された。

このように、踵のような角層の厚い部位においては、ファイバープローブを用いた近赤外拡散反射スペクトルの測定により、角層のみの水分量を評価できると考えられた。近赤外分光法を用いて角層中に存在する水だけを測定できれば、角層の水分量だけでなく、角層の水の束縛状態の変化をも *in vivo* で評価できる可能性がある。しかしながら、踵と異なり、身体他の多くの部位では角層厚は 10～20 μm 程度と薄い (表 3-2)。そのために、踵以外の部位では、近赤外分光法を用いて *in vivo* で角層の水だけを選択的に測定することは難しいと考えられた。皮膚測定において、近赤外分光法の大きなメリットは、水の存在状態の測定と簡便測定であると考えられる。上述のように、角層のみの水分測定が困難であることが明らかになったことより、近赤外分光法を美容科学・皮膚科学分野で活用するには、日常生活で水分量に変化する部分は角層上層であるという前提のもと、皮膚の水分量の動的変化の簡便評価をターゲットとすることが望ましいと考えられた。

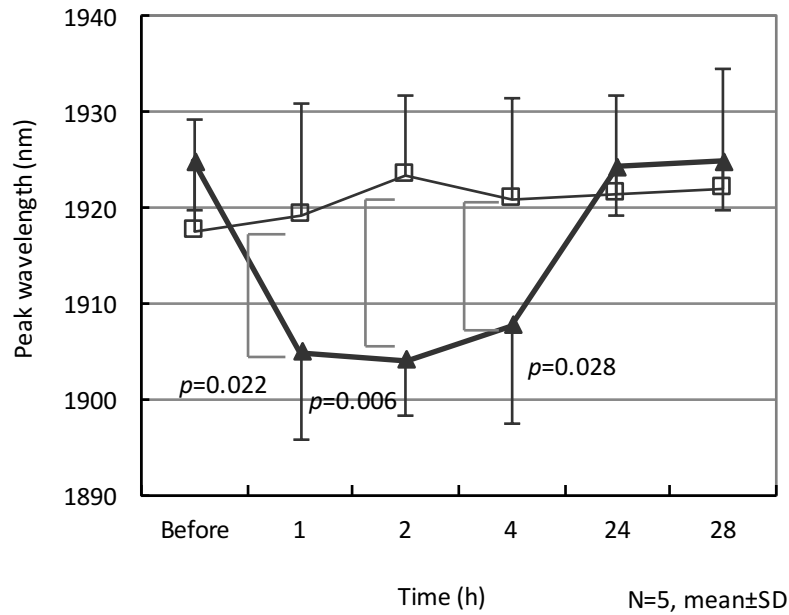


図 4-20. 尿素クリーム塗布後の 1920 nm のピーク波長の変化。
▲：塗布部位, □：無塗布部位.

4.6 結論

本章では，皮膚の近赤外拡散反射スペクトルの特徴を明らかにして，近赤外分光法を用いて皮膚の水分量測定を行う場合の問題点を，測定深度を考慮して抽出した．本結果は，次の第 5 章で実施する近赤外分光イメージングで表皮水分量の面分布を評価するための基礎知見となった．

角層シートを用いた *in vitro* 実験により，水分量の違いによる角層シートの近赤外透過反射スペクトルにおける，水の OH 基の 1460 nm と 1920 nm の 2 つのバンドの挙動を明らかにした．角層シートの水分量が少ない場合は，水以外のタンパクや脂質のバンドも観察されたが，多くなると主に上述の 2 つの水のバンドのみが観察されることが明らかになった．また，水分量の違いにより 1920 nm の水のバンドのピーク波長は短波長側にシフトすることも明らかにした．

皮膚の近赤外拡散反射スペクトルが，皮膚のどの深さ位置からの情報を含むのかについて，*in vitro* 角層シート実験及びモンテカルロ法による数値シミュレーションで推定した．その結果，直径 300 μm のファイバースコープの方が測定深度は深くなり，本当に測定したい角層の情報量は少なくなるが，直径 133 μm のファイバースコープでは受光可能な拡散反射光の光量が少なすぎて，本章で用いた FT-NIR 計ではターゲットとする 1920 nm の水のスペクトルの S/N が著しく悪くなりすぎた．また，ファイバースコープを皮表に接触させた方が測定深度は深くなってしまいが，一方で，非接触と比べて皮表での正反射光の影響を受けにくいと考えられた．これらの結果から，最終的に *in vivo* での皮膚測定は，直径 300 μm のファイバースコープを用い

た接触法で実施した．この測定条件で身体の様々な部位の 1920 nm の水のバンドを用いた相対水分量と水の束縛度の解析を実施した．両者ともに部位差が観察されたが，これは部位による角層厚の違いによる測定した皮膚の層の違い，すなわち皮膚の層による水分量の違い，の影響が大きいと考えられた．

各層で水分量が異なる層状構造である皮膚組織を測定対象とした場合，波長によって吸収係数が異なることで光の到達深さが変化するために，共焦点光学系を導入できない吸収分光法の活用には限界がある．近赤外分光法は，大掛かりな装置の必要がなく，将来的に小型化の可能性のある有望な測定法として皮膚領域でも注目を浴び，今までいくつかの研究発表がなされてきた [100-106]．しかしながら，共焦点系と組み合わせた自発ラマン散乱分光計で皮膚の水分量の深さ分布が評価できることが明らかになった今，時間分解法などと組み合わせてある程度測定深度をコントロールしたとしても，水分量の測定精度としては自発ラマン散乱分光法にかなうことはないと考えられた．本章の結果から，皮膚をターゲットとした場合，近赤外分光法は，高精度測定ではなく簡便法としての活用を検討する方向が適していると考えられた．そこで，次章の第 5 章では，皮膚の水分量研究で非常に興味をもたれる顔の中の水分量面分布の測定のための，近赤外分光法の簡便法としての活用を提案する．本章の結果から，近赤外分光法を用いた水分量の面分布測定においては，第 3 章で明らかになった日常生活環境下で変化する角層上層部の水分量だけを選択的に検出することは難しいと推定された．そこで，第 5 章では，皮膚上層の情報を多く含む水分量イメージングのためのセットアップを提案し，外部環境変化による水分量面分布の変化を高感度に評価することを目標に検討を進める．

第 5 章 近赤外分光イメージングによる表皮水分量面分布の評価

5.1 緒言

第 4 章にて、皮膚の近赤外拡散反射スペクトルの特徴を抽出し、近赤外拡散反射スペクトルを用いた皮膚の水分量の評価を実施した。800 nm～2500 nm の近赤外光領域には、OH 基、CH 基などの官能基の倍音や結合音の吸収が存在するため [112]、理論的には水分や油分を直接測定することが可能である。さらに、近赤外分光法では非接触測定も可能であることから測定時の皮膚への影響もほとんどなく経時変化の測定も可能である。化粧品塗布後の変化や発汗など、秒単位で刻々と変化する皮膚の水分の状態を評価する美容科学・皮膚科学領域で活用するためには、プローブの皮膚への接触の影響を少なくするために非接触系であること、リアルタイムで皮膚の状態を測定することが重要である。さらに、皮膚上における水分量の面分布状態を評価するために、皮膚全体を面として測定できることが望ましい。その理由は、美容領域における“肌の分類”が関係する。美容領域において、化粧品会社の販売店頭などでは、個人による肌の状態の違いを簡易的に分類するために、4 分類の「肌質」を使用する事が多い。これは、鏡の前で被験者本人が自分の頬部を“うるおい”と“脂っぽさ”を軸として視感及び触感で評価したアンケート結果をもとに分類する分類法である。具体的には、(1) 普通肌（うるおいを感じるが脂っぽさは感じない）、(2) 脂性肌（うるおいも脂っぽさも両方感じる）、(3) 乾燥肌（乾燥を感じる）、(4) 混合肌（乾燥を感じるが同時に脂っぽさも感じる）、の 4 分類である。この分類や判定部位は、化粧品メーカーによって若干異なることもあるが、“うるおい”と“脂っぽさ”を官能評価の軸にしていることは共通である。これに対応するように、客観的な機器による皮膚測定においても、第 2 章で述べたような電気的手法での頬部の水分量測定 [37-40] や、皮脂の紙への接着による透過率変化を用いた皮脂量測定 [114] が用いられてきた。しかしながら、皮膚の状態は顔の部位により異なるため、ある 1 点での測定結果から顔全体の状態を評価出来ないであろうという問題が議論されてきた [16]。そのために、美容科学領域において、水分量の面分布測定のニーズは非常に大きい。

2000 年代前半から今日まで、国内外の研究者らにより、900 nm～1600 nm 帯域付近に感度特性を有する InGaAs 素子を用いた検出器を有する近赤外カメラを用いて皮膚の近赤外分光画像を取得する試みが検討されてきた [115-120]。例えば、前腕での化粧品の保水効果の可視化 [116]、電気特性値との対応 [117]、顔面の水分量の可視化 [118,119] である。これらの研究では、1460 nm 付近の水の OH 基の吸収バンドが用いられていたが、図 5-1 に示したように、皮膚の近赤外拡散反射スペクトルにおける最も強い水の吸収波長は 1920 nm 付近の OH 基のバンドである。2010 年頃までは、市販品として購入可能な近赤外カメラの検出可能波長領域は 1700 nm よりも低波長帯域に限られていたため、結果として、1460 nm での皮膚の水分量イメージングの研究が先行して進められた。近赤外分光イメージングにより、非接触で水分量を測定できるため、電気的手法では測定が難しかった凹凸のある目や口まわりの測定の可能性が存在した。しかし、この 1460 nm の水の OH 基を用いた評価系では、

1920 nm の OH 基ほど水の吸収係数が大きくないため、皮膚の水分量の僅かな差を検出するためには検出感度が不十分であること、先行研究では皮膚測定専用の光学系を詳細には検討していなかったこと、などの理由から、現在においても、1460 nm の OH 基を用いた皮膚の水分量イメージングは実用化には至っていない。

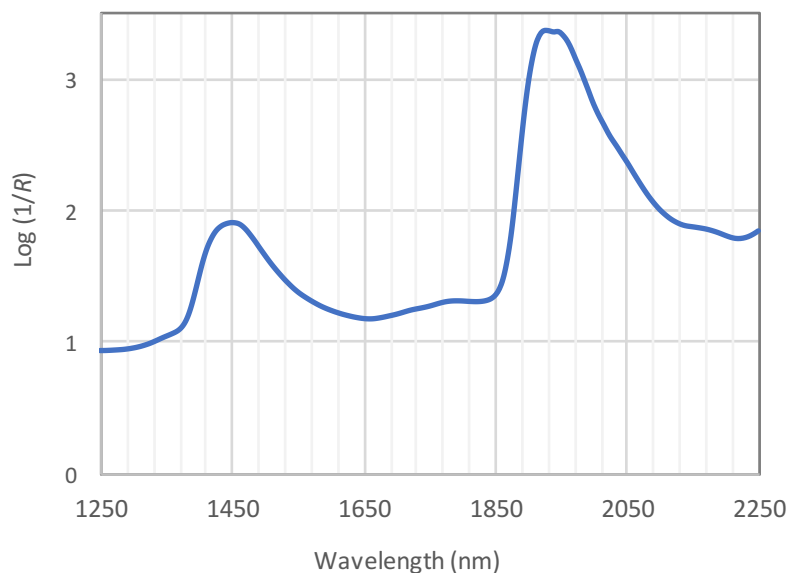


図 5-1. 前腕の近赤外拡散反射スペクトル。
直径 300 μm のファイバースコープを用いた接触法で取得 (第 4 章参照)。

一方、近赤外分光画像を取得する手法としては、天文・食品などの他分野で用いられているスペクトラルイメージングも選択可能である。スペクトラルイメージングを用いた場合 [121]、近赤外全領域のスペクトルデータを用いた多変量解析による成分量の推定が行えるという利点があるが、皮膚の水分量イメージングを想定した場合には、特有の問題が存在する。顔面を対象とした場合は、本論文執筆時においても、顔全体のラインスキニングには 10 数秒程度の時間を要する。秒単位で変化する皮膚の水分量を評価する手法として実用化するためには、さらなる短時間化が必要である。

筆者は、第 3 章や第 4 章の研究を進めながらも、他研究者による 1460 nm の OH 基を用いた水分量イメージングの研究動向に注目していた。しかしながら、2000 年代後半までは、市販品として使用可能な InGaAs 素子を有した市販の近赤外カメラの検出感度では、実用レベルの皮膚の水分量イメージングはできないと考え静観していた。そのような中、2010 年頃に近赤外光領域の長波長側にも感度特性を有する 2 次元アレイ型センサを有した近赤外カメラが開発された [122]。これをきっかけに、第 3 章の皮膚の水分量深さ分布の解明や第 4 章の皮膚の近赤外拡散反射スペクトルの特徴評価の研究成果を応用し、吸収係数のより大きい 1920 nm の OH 基のバンドをターゲットとした近赤外分光イメージングによる表皮水分量の面分布の評価の研究を開始した。さらに、2011 年末にロシアの LED Microsensor NT 社が開発した

近赤外光から赤外光領域の様々な領域での発光ダイオード (LED) 光源が、2014 年春に日本市場でも市販化された。この LED 光源の出現は、近赤外分光イメージングの光学系に新たな可能性を持たせることになった。本研究においても、ハロゲンランプ以外の発熱しない光源として、LED を用いた新たな光学系での評価系の開発も進めた。

本章の最終目的は、実用レベルの皮膚の水分量面分布のリアルタイム評価である。第 4 章で述べたように、皮膚の近赤外拡散反射スペクトルで観察されるバンドは、特に角層が薄い顔や腕などの部位では水の多い生細胞層の情報も多く含むため、主に OH 基である。そのため、複数のバンドの重複の影響は少ないこと、皮膚の水分量の対照となる基準測定法がないことから、他の分野で検討されているような教師データを用いた多変量解析が必ずしも有効ではないと考えられる。10 数秒かけてハイパースペクトル情報を取得するよりも、安価な数種類のバンドパスフィルターを用いた分光イメージングの方が、美容科学・皮膚科学分野での活用の可能性が大きいと判断し、本章での検討を推進した。すなわち、皮膚の水分量面分布を、バンドパスフィルターを用いた 1920 nm の OH 基をターゲットとした近赤外分光イメージングにより評価した。まず、顔面の全領域に均一に光を照射することができるハロゲンランプベースの専用拡散照明を組み合わせた全顔の表皮水分量面分布の評価を検討した。次に、狭領域の表皮水分量イメージングについて、ハロゲンランプからの熱の影響を考慮し、熱を発生しない光源として、連続で広帯域なレーザー光であるスーパーコンティニューム (Supercontinuum : SC) 光、あるいは LED を用いた光学系のセットアップを用いた評価を検討した。

5.2 目的

本章の目的は、近赤外分光イメージングにより表皮水分量の面分布を評価することである。具体的には、まず、モンテカルロ法による光伝播シミュレーションにより予測した測定深度をベースに、表皮水分量イメージングの最適波長帯域を選択した。次に、全顔の表皮水分量イメージングの評価系、及び狭領域の表皮水分量イメージングの評価系を提案した。最後に、本評価系を用いて、顔の水分量面分布の低湿度環境や季節での変化、外部からの水分付加後の水の広がり、動的変化を評価することによる新たな肌質評価指標の提案の可能性を検討した。

5.3 方法

5.3.1 モンテカルロ法による波長別測定深度シミュレーション

第 3 章での検討より、皮膚の水分量は、日常生活においては角層の表層のわずか 5 μm ~10 μm の領域が変化するという知見を得た。そのため、近赤外分光イメージングにおいても、なるべく皮膚の表層の情報を含むことが望ましい。それゆえに、近赤

外分光画像が皮膚の一体どこの部分の情報を多く含んでいるのか，明らかにする必要がある．しかしながら，皮膚は奥の生細胞層から絶えず水が供給されているために，皮膚を切り出すとすぐに水分が蒸発し，生体内での状況を反映しなくなる．そのため，第 4 章においてもファイバー配置による測定深度予測に用いたモンテカルロ法による散乱媒質中の光伝播シミュレーションにより，近赤外分光イメージングにおける波長による測定深度の違いを推定することにした．本章では，シミュレーションの精度をより上げるために，文献値に第 3 章で得られた皮膚の水分量の深さ分布を反映させて補正した光学定数の代入と，皮膚の層状構造を反映させた多層モデルでのシミュレーションを実施した．

表 5-1. モンテカルロシミュレーションに用いた光学定数.

L : レイヤー番号, n : 屈折率, μ_a : 吸収係数, μ_s : 散乱係数, g : 異方散乱パラメーター.

1300 nm					1460 nm					1920 nm				
L	n	μ_a	μ_s	g	L	n	μ_a	μ_s	g	L	n	μ_a	μ_s	g
1	1.37	0.709	160.6	0.90	1	1.37	17.7	114.4	0.86	1	1.36	71.7	80.6	0.84
2	1.37	0.652	175.7	0.90	2	1.37	16.3	125.2	0.86	2	1.36	66.0	88.2	0.84
3	1.37	0.586	193.6	0.90	3	1.37	14.6	137.9	0.86	3	1.36	59.2	97.2	0.84
4	1.37	0.537	206.6	0.90	4	1.37	13.4	147.2	0.86	4	1.36	54.3	103.7	0.84
5	1.37	0.514	212.8	0.90	5	1.37	12.8	151.6	0.86	5	1.36	51.9	106.8	0.84
6	1.37	0.532	208.0	0.90	6	1.37	13.3	148.2	0.86	6	1.36	53.8	104.4	0.84
7	1.37	0.561	200.4	0.90	7	1.37	14.0	142.7	0.86	7	1.36	56.7	100.6	0.84
8	1.37	0.624	183.3	0.90	8	1.37	15.6	130.6	0.86	8	1.36	63.1	92.0	0.84
9	1.37	0.693	165.0	0.90	9	1.37	17.3	117.5	0.86	9	1.36	70.1	82.8	0.84
10	1.37	0.743	151.5	0.90	10	1.37	18.5	108.0	0.86	10	1.36	75.1	76.1	0.84
11	1.37	0.767	145.2	0.90	11	1.37	19.1	103.4	0.86	11	1.36	77.5	72.9	0.84
12	1.37	0.792	138.4	0.90	12	1.37	19.8	98.6	0.86	12	1.36	80.1	69.5	0.84
13	1.37	0.807	134.4	0.90	13	1.37	20.1	95.7	0.86	13	1.36	81.6	67.4	0.84
14	1.37	0.816	132.0	0.90	14	1.37	20.4	94.1	0.86	14	1.36	82.5	66.3	0.84
15	1.37	0.825	129.6	0.90	15	1.37	20.6	92.3	0.86	15	1.36	83.4	65.1	0.84
16	1.37	0.832	127.6	0.90	16	1.37	20.8	90.9	0.86	16	1.36	84.2	64.1	0.84
17	1.37	0.847	123.8	0.90	17	1.37	21.1	88.2	0.86	17	1.36	85.6	62.1	0.84
18	1.37	0.847	123.7	0.90	18	1.37	21.1	88.1	0.86	18	1.36	85.7	62.9	0.84
19	1.37	0.841	125.3	0.90	19	1.37	21.0	89.3	0.86	19	1.36	85.1	63.1	0.84
20	1.37	0.840	125.6	0.90	20	1.37	21.0	89.5	0.86	20	1.36	84.9	61.5	0.84

シミュレーションの設定値の詳細を以下に述べる．グリッドサイズは $2 \mu\text{m}$ とし，水平及び深さ方向共に 500 グリッド，すなわち 総長 1 mm に設定した．吸収係数 $\mu_a (\text{mm}^{-1})$ 及び散乱係数 $\mu_s (\text{mm}^{-1})$ は，1300, 1460, 1920 nm の各波長における水の文献値の吸収係数に共焦点ラマン分光計で測定した皮膚の水分量深さ分布を掛け合わせた補正值，異方散乱パラメーター g ，屈折率 n は文献値を用いた．なお，文献値の μ_s [22,107,108] は，全て生細胞層での水分量 70% における値と仮定した．そして，水分量 100% での皮膚の μ_s を 0 とみなし，水分量 70% までの間の値は直線で補間した．グリッド上部には，角層に相応する 10 グリッド $20 \mu\text{m}$ の層（光学定数の組み合わせは表 5-1 のレイヤー番号 1~10）を用いた．その下には，レイヤー番号 11~20 に示す光学定数の組み合わせの，顆粒層に相応する 10 グリッド $20 \mu\text{m}$ の層（光学定数の組み合わせは表 5-1 のレイヤー番号 11~20）を配置させ

た. その下には, 有棘層に相応する 1 グリッド 75 μm の層, 基底層に相応する 1 グリッド 15 μm の層, 真皮に相応する 1 グリッド 870 μm の層を設定した. 合計のレイヤーは 23 レイヤーとした. レイヤー 1 から 20 までに代入した光学定数は, 表 5-1 に示した. 光子数は, 各計算 500000 個で行った.

5.3.2 全顔の表皮水分イメージング法の検討

全顔の表皮水分イメージングは, 高帯域近赤外カメラ (1100 nm~2200 nm, 住友電気株式会社, 大阪), 専用拡散照明から構成されるセットアップで実施した. 概略は図 5-2 に示した. 電子冷却タイプの近赤外カメラは, 感度領域: 1100 nm~2200 nm, 画素数: 320 \times 256, フレームレート: 30 Hz (NTSC), の特性を有し, これに近赤外領域で十分な透過率を有した 25 mm レンズ (f/1.4; 焦点距離 25 mm, FUJINON, 東京) を組み合わせて使用した. 画像は 8 bit のビットマップ画像として取得した. 表示画像サイズは 640 \times 480 pixels, 画像解像度は, 1 pixel=0.24 mm である. 本カメラは, 住友電工が開発した InGaAs/GaAsSb タイプ II 量子井戸構造のセンサ [122] を搭載したものであり, 図 5-3 に示すように, 今までの近赤外カメラの主流である InGaAs センサを有する近赤外カメラでは実現できなかった 1920 nm の OH 基のイメージングが可能となることが想定された.

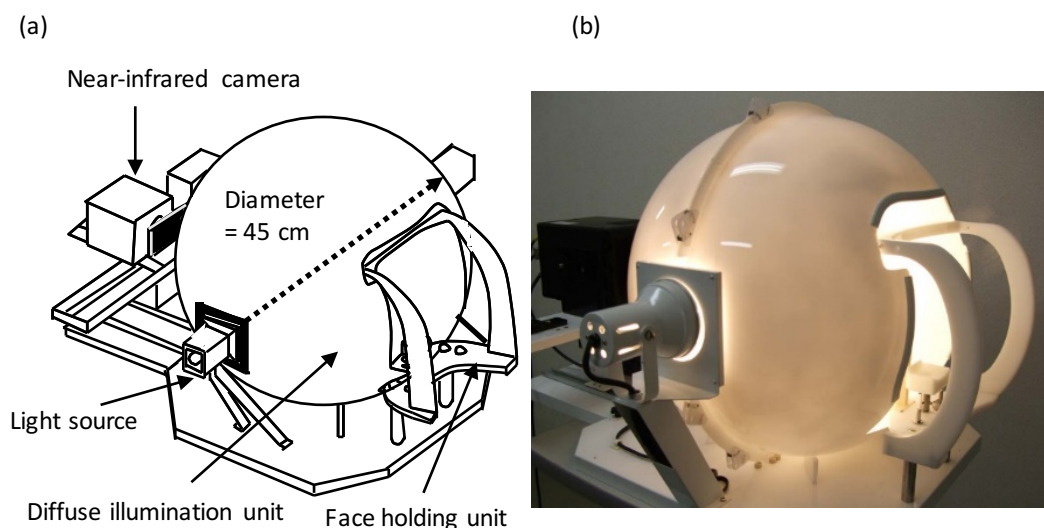


図 5-2. 全顔の近赤外イメージングのためのセットアップ.
(a) 模式図, (b) 外観写真.

ここで, 近赤外領域に対応するセンサについて, 以下文献を引用して説明する [122]. 近赤外領域用のセンサには, 光導電型素子 (PbS, PbSe など) と光起電力型素子 (Ge, InAs, InSb, HgCdTe, InGaAs など) が存在する. 一般的に, 光起電力型素子の方が,

光導電型素子よりも応答速度が速く，光強度に対する感度の直線性に優れている．その中でも InP 基板に格子整合する InGaAs は暗電流が低いうえに高感度である．InGaAs は，量産技術が進み 2 次元アレイ型センサも市販されているが，カットオフ波長が $1.7\ \mu\text{m}$ であるため近赤外領域で最も大きな $1920\ \text{nm}$ の OH 基の吸収を検出できない．InGaAs の In 組成を増やすことでカットオフ波長を $2.6\ \mu\text{m}$ 程度まで長くすることが可能であるが，InP に対して格子整合させることができず，結晶欠陥に起因した暗電流が大きくなる．一方で，通常の半導体バルク材料では実現できないカットオフ波長の長波長化と低暗電流の両立が可能な材料系としてタイプ II 量子井戸構造が注目されていた． $2\ \mu\text{m}$ 帯の赤外センサである InGaAs/GaAsSb タイプ II 量子井戸構造では，InGaAs も GaAsSb も共に InP 基板に格子整合するため，格子不整による結晶欠陥の発生を抑制でき，低暗電流が期待できる上，量子井戸を構成する各層の厚みを変えることによりカットオフ波長を調節することが可能となる．住友電工が開発した画素数 320×256 の 2 次元アレイ型センサは，1 画素当たりの受光サイズが，一辺 $18\ \mu\text{m}$ ，画素 $30\ \mu\text{m}$ ピッチであり，検出可能波長は，タイプ II 量子井戸構造の実効的なバンドギャップに対応する $2.35\ \mu\text{m}$ までであったと報告されている．

専用拡散照明は，照明内での光の反射率を上げるための内部塗装，およびレンズ取り付け位置 1 ヶ所，及び，光源取り付け位置 2 ヶ所に遮光板をつけた球状の筐体，紫外・赤外線カットフィルタ (Schott AG, Mainz, Germany) を照明の前面に取り付けた 2 灯のハロゲンランプ ($110\ \text{V}$ ， $50\ \text{W}$ ，岩崎電気株式会社，東京)，バンドパスフィルタ (Spectrogon AB, Taby, Sweden)，色票 (5%，Labsphere Inc, NH, USA)，顔固定台，で構成される．バンドパスフィルタの選定の際には， $1100\ \text{nm}\sim 2500\ \text{nm}$ の領域に存在する皮膚の成分を考慮した．具体的には， $1460\ \text{nm}$ と $1920\ \text{nm}$ 付近の水， $1750\ \text{nm}$ 付近の油の吸収である．すなわち，分光画像取得用のバンドパスフィルタ (Spectrogon AB) としては，バックグラウンド画像用に $1300\pm 40\ \text{nm}$ ，水の画像用に $1462\pm 15\ \text{nm}$ ，及び $1950\pm 56\ \text{nm}$ を使用した．

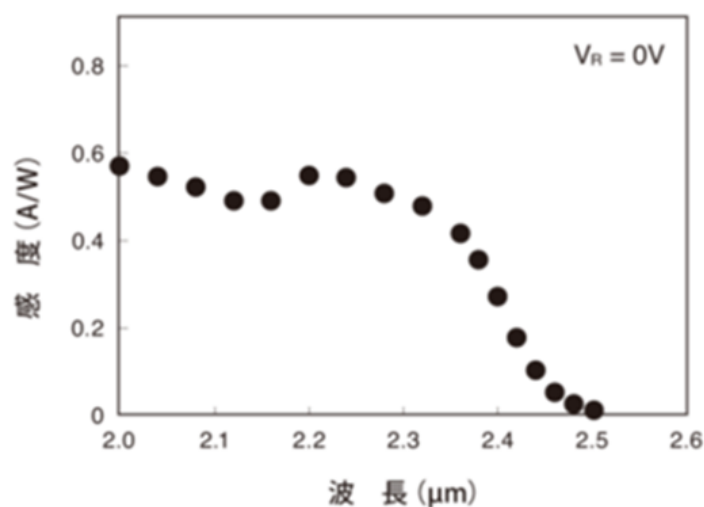


図 5-3. 近赤外カメラに搭載された InGaAs/GaAsSb タイプ II 量子井戸構造のセンサの分光感度特性 [122].

次に，全顔の表皮水分量イメージング法が，日常生活での皮膚の水分量の変化を検出できる感度を有しているかどうかについて検証した．まず，皮膚に外部から水を付加した時の皮膚の水分量の違いによる 1920 nm の OH 基の分光画像の輝度値の変化を比較した．具体的には，蒸留水を 400, 500, 700, 900, 1100 μL 浸した 20 \times 20 mm のコットンパット（フェイシャルコットン，資生堂）を用いて，皮膚に水を付加した前後の皮膚の 1920 nm の OH 基の分光画像を取得して，塗布部位の画像の輝度値の平均値を算出した．次に，実用により近い系として，モイスチャライザーの保水効果を評価した．図 5-4 には，モイスチャライザーに多く含有される水，保湿剤（グリセリン），油（スクワラン）の近赤外透過反射スペクトルを示した．1920 nm の OH 基を検出するための 1950 \pm 56 nm のバンドパスフィルターを用いることで，保湿剤や油の吸収バンドの重なりが少ない，ほぼ OH 基だけの吸収の変化を検出できると推定された．市販のモイスチャライザーをコットンパットに 2 mL 含浸させ，皮膚になじませて塗布した前後の，皮膚の 1920 nm の OH 基の分光画像を塗布 30 分後まで取得して比較した．

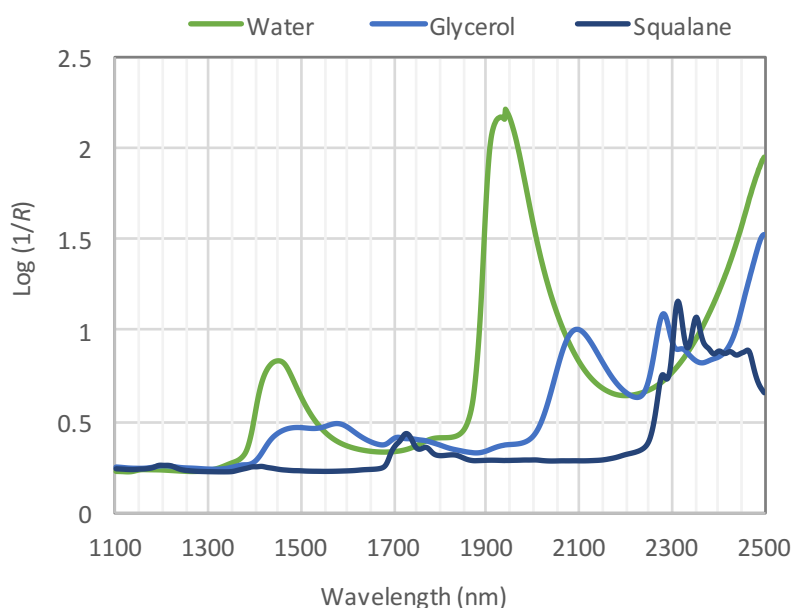


図 5-4. 保水成分の近赤外透過反射スペクトル.

5.3.3 狭領域の表皮水分量イメージング法の検討

狭領域の表皮水分イメージングのための装置の概略は，図 5-5 に示した．図 5-5(a) には外観写真を，図 5-5(b) には光学系模式図を示した．カメラ部分は，前述の広帯

域近赤外カメラの後継機 (Compovision: 住友電気株式会社, 感度領域: 1000 nm~2350 nm, 画素数: 320×237 pixels) に, 近赤外領域で十分な透過率を有した 25 mm レンズ (f/10.5, magnification of 1.42, 株式会社モリテックス, 埼玉) を組み合わせた. 光学系は, SC 光 (住友電気株式会社) あるいは LED 光 (LED Microsensor NT) を光源とした専用のリング照明の光学系を製作した. SC 光を用いる場合には, SC 光の出力からリング照明までの間に, 1300±40 nm, 1462±15 nm, 1950±56 nm のバンドパスフィルター (Spectrogon AB) を組み込んだ. 表示画像サイズは 640×480 pixels である. 各近赤外分光画像は, フレームレート 60 fps で取得した.

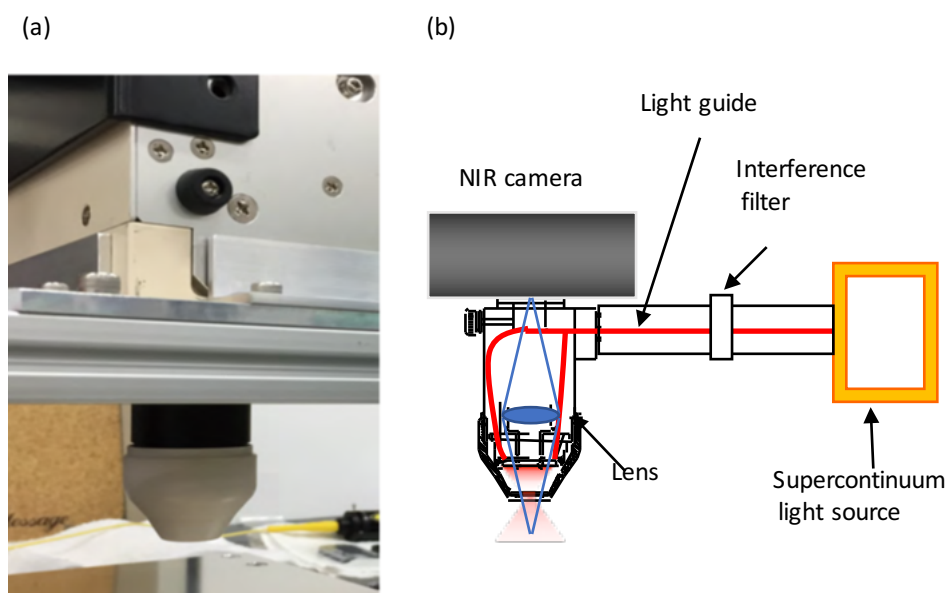


図5-5. 狭領域の近赤外イメージングのためのセットアップ.
(a) 外観写真, (b) 光学系模式図.

5.3.4 皮膚の水分量面分布の特徴評価

全顔の表皮水分量イメージングによる皮膚の特徴評価として, 2 つの試験を実施した. まず, 低湿度環境下 (21.0 ± 2.0 °C, 10.0 ± 5.0 %RH) における顔の水分量面分布の変化を評価した. 本試験は, 15 名の健常人の女性被験者 (年齢 40 歳~54 歳, 平均年齢 49.1 歳) を用いて実施した. 具体的には, クレンジングジェル (Perfect Gel, 資生堂) でのメイク落とし, それに引き続く洗顔石鹸 (Mild Cake, 資生堂) での洗顔後, 素肌のまま 20 分間低湿度の室内にて馴化した後, 1 回目の測定を実施した. 引き続き, さらに 85 分間低湿度環境下で過ごした後, すなわち洗顔 105 分後に, 2 回目の測定を実施し, 入室 20 分後から 105 分後までの水分量の変化を解析した.

次に, 顔の水分量面分布の季節変化を測定した. 本試験は, 26 名の健常人の女性被験者 (年齢 25 歳~52 歳, 平均年齢 38.8 歳) を用いて, 東京近郊での標準的な季節に相応する期間, すなわち, 冬 (2011 年 2 月 1 日~7 日), 春 (2011 年 4 月

4 日～5 月 12 日), 夏 (2011 年 7 月 26 日～8 月 10 日), 秋 (2011 年 10 月 21 日～11 月 7 日) の 4 季節で比較測定した. 測定期間の外気の平均温度, 相対湿度, 絶対湿度は, 冬 (7.1 °C, 48.8 %RH, 1.56 g/m³), 春 (17.7 °C, 73.6 %RH, 11.13 g/m³), 夏 (26.6 °C, 80.1 %RH, 20.2 g/m³), 秋 (17.8 °C, 68.7 %RH, 10.45 g/m³) であった. 測定は, 専用の恒温恒湿室にて, 全て 22.0 °C, 45.0 %RH で実施した. 具体的には, メーククレンジングオイル (エリクシールシュブリエール メーキャップクレンジングオイル, 資生堂) でのメーク落とし, それに引き続く固形石鹸 (サボンドール, 資生堂) での洗顔の 30 分後に, 近赤外分光画像を取得した. 引き続き洗顔 40 分後に, 対照測定として静電容量法による水分量測定を行なった. 水分量測定は, Corneometer[®] (CM825, Courage+Khazaka Electronic GmbH) を用いて, 頬で 2 か所測定した. それぞれ 3 回測定ずつ測定し, その平均値を算出して各場所での測定値とした.

次に, 狭領域の表皮水分量イメージングによる皮膚の特徴評価として, 外からの水分付加後の皮膚表面での液滴の広がりパターンの動的変化の評価による新たな肌質評価法の可能性について検討した. 1 μL のモイスチャライザーをマイクロピペットで前腕屈側部の皮膚表面に滴下させた後, 液滴を含む皮膚の狭領域の 1920 nm の OH 基の分光画像を経時測定し, 液滴の大きさ, 円形度などの形状変化を解析した. その後, 液滴の形状変化パターンと, 皮膚状態との関係を比較した. 皮膚状態の評価には, 汎用機器を用いた. すなわち, 皮膚水分量は Corneometer[®] (CM825, Courage+Khazaka Electronic GmbH), 経皮水分蒸散量は VapoMeter[®] (Delfin Technologies Ltd., Kuopio, Finland) を用いた. 一般的には, Corneometer[®] で得られる皮膚水分量値は, 数値が大きいと水分量が多く, 皮膚状態が良いと評価される. 経皮水分蒸散量は, 皮膚表面の一定面積からの一定時間内での水分蒸発量であり, 皮膚のバリア機能の指標として美容科学・皮膚科学領域において用いられている. 一般的には, 水分蒸散量の数値が大きい方が, 皮膚からの水分損失が大きいため, 皮膚のバリア機能が劣る, すなわち皮膚状態が悪いと評価される. 本試験は, 7 名の健常人の男女被験者 (年齢 30 代～50 代) に対して, それぞれ 3 種類のモイスチャライザー (M1, M2, M3) を適用して実施した. 3 種類のモイスチャライザーの主成分は, 油分と保湿剤であるが, 保湿剤量が最も少ないものは, モイスチャライザー M3 である. また, モイスチャライザー M1 と モイスチャライザー M2 は親油性の保湿剤を若干含有するという特徴を有する.

5.4 結果

5.4.1 波長別測定深度 [123]

図 5-6 には, モンテカルロ法による光伝搬シミュレーションにおいて, 入射させた光子パケットの中で, 皮膚内で散乱して皮表に戻ってきた光子パケットのみの吸収強度の深さ分布を示した.

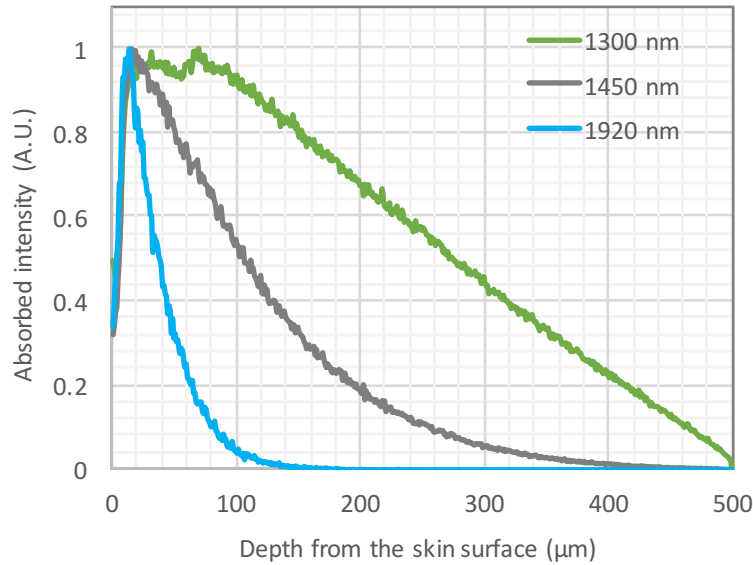


図 5-6. 皮膚内で散乱して皮表に戻った光子の吸収強度の深さ分布.

この表示法では，皮表に戻ってきた光子のみを示しているため，波長による光の到達深度を比較できる．その結果，1920 nm の吸収分布は，皮膚表面からほぼ 50 μm 深さまで，1460 nm や 1300 nm では 200 μm～300 μm まで広範囲に局在した．具体的には，近赤外光の到達深度は，1920 nm では半値幅で約 50 μm 弱，1460 nm では半値幅で 100 μm を超え，1300 nm では半値幅で 200 μm を超えた．これより，測定深度が浅く，角層の水分の情報を最も多く含む近赤外分光画像を得るためには，1460 nm ではなくて，1920 nm の OH 基の分光イメージングが最適であると推定された．1460 nm の OH 基を用いる分光イメージングにおいては，顆粒層以下の表皮生細胞層や真皮の水分量の情報が多く含まれるため，結果として日常生活環境下で変化する角層の水分量の検出感度は下がると考えられた．

5.4.2 全顔の表皮水分量イメージング [124-128]

図 5-7 に，全顔の水分量イメージングのための拡散照明の調整の過程を，得られた近赤外分光画像とともに示した．積分球様の拡散照明の製作 (図 5-7(1)→(2))，カメラ取り付け位置，及び，ハロゲンランプ取り付け位置の内側の遮光板の大きさと位置の調整 (図 5-7(2)→(3)) により，最終的に皮膚表面での正反射の少ない近赤外分光画像を取得できた．

図 5-8 には，最終試作品の拡散照明を用いて取得した，モイスチャライザーを皮膚に塗布した前後の 1920 nm の OH 基の近赤外分光画像を示した．図 5-8(a) に示したように，顔面の 1920 nm の近赤外分光画像は，正反射の少ない画像であった．

また, 図 5-8(b) に示したように, 頬部にモイスチャライザーを塗布することにより, 四角い塗布領域において, 水分量の増加に伴う輝度値の低下を鮮明に観察できた. 近赤外分光画像では, 近赤外拡散反射法と同様に照射した光の中で皮膚内において吸収された波長の光はカメラで検出されないため, 吸収された波長の画像は輝度が小さくなる. すなわち, カメラの明るさ及びコントラストを理想的に調整できた場合, 皮膚に過剰量の水が存在しカメラ側に光が全く戻ってこない場合には, 理論的には, 1920 nm の分光画像の輝度値は 0 となる. 一方, 皮膚に全く水が存在しない場合には, 8 bit 画像で輝度値は 255 となる.

今まで用いられてきた 1460 nm の水の OH 基の分光画像では, OH 基の吸収バンドが 1920 nm に比べて小さく, 保湿剤やタンパクの官能基のバンドと一部重なるため, 水分量の増加を正確に鋭敏に検出することが難しかった. 一方, 1920 nm 付近では, 他の官能基との重複が比較的少ないこと, OH 基の吸収が非常に大きいことにより, 非常に高感度での水分帯域の近赤外画像の検出できたと考えられた. この 1920 nm の表皮水分量イメージングにより, 電気的手法では測定が困難な皮膚が柔らかい目まわり, 頬骨下, 口元などの水分量を評価できた.

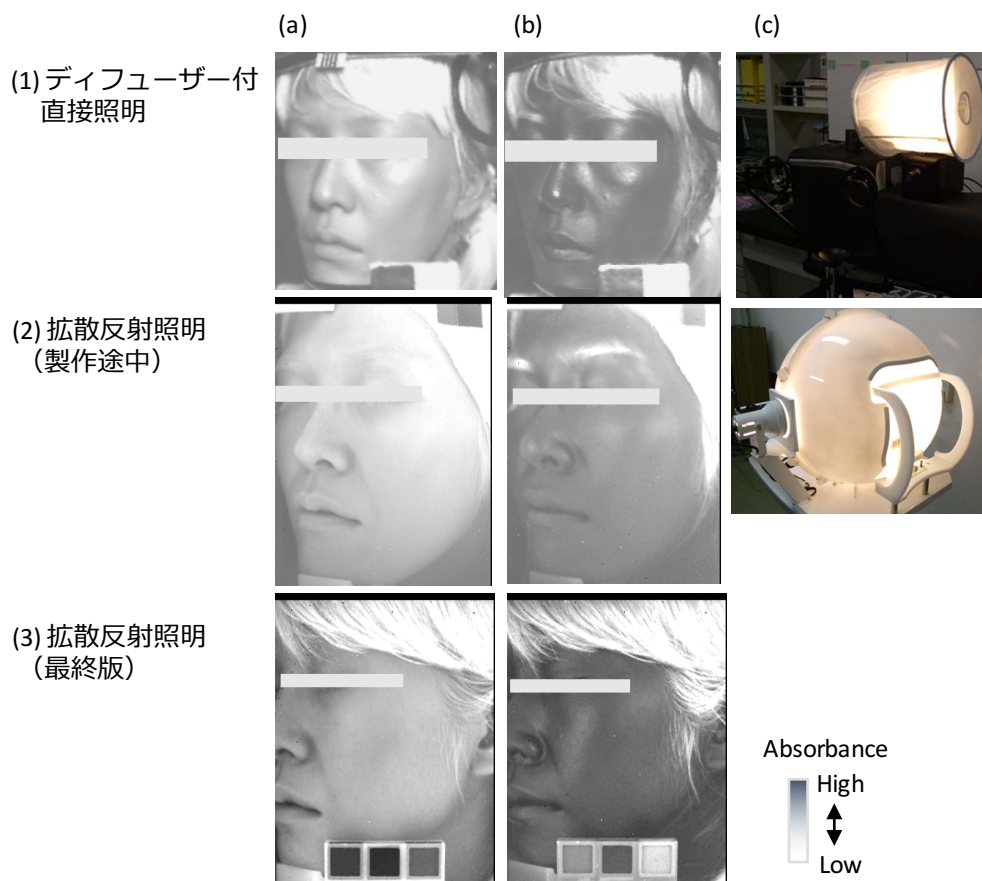


図 5-7. 照明系の調整ステップ.
 (a) 1300±40 nm のバンドパスフィルタを用いて撮影, (b) 1950±56 nm のバンドパスフィルタを用いて撮影, (c) 照明外観写真.

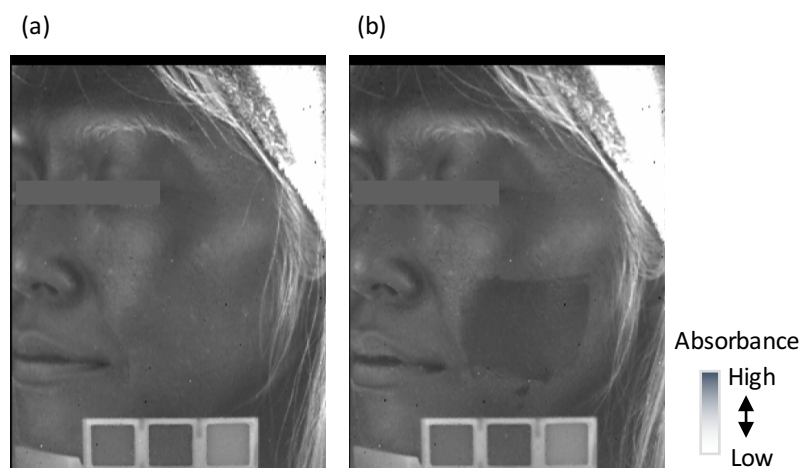


図5-8. モイスチャライザー塗布後の1920 nmのOH基の近赤外分光画像の変化。
 (a) 塗布前, (b) 頬の四角形領域にモイスチャライザーを塗布直後.

引き続き, 本セットアップを用いて, 実用レベルの表皮水分量の評価が可能かどうかについて検討を進めた. 図5-9には, 皮膚に水を $1.00 \mu\text{L}/\text{cm}^2 \sim 2.75 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ の範囲で付加した前後の, 1920 nmのOH基の近赤外分光画像の輝度値の変化を示した. なお, $1.00 \mu\text{L}/\text{cm}^2 \sim 2.75 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ は, 日常生活で想定される皮膚上での水分量の変化の範囲内である. 付加した水分量の増加に伴い, 1920 nmの画像の輝度値は, 相関係数 $r = -0.9730$ で直線的に減少した. すなわち, 付加した水分量の増加に伴い, 近赤外分光画像の輝度値は直線的に低下した. この結果より, 本評価系は, 皮膚に外から付加した水による表皮水分量の変化を検出するのに十分な感度を有すると考えられた.

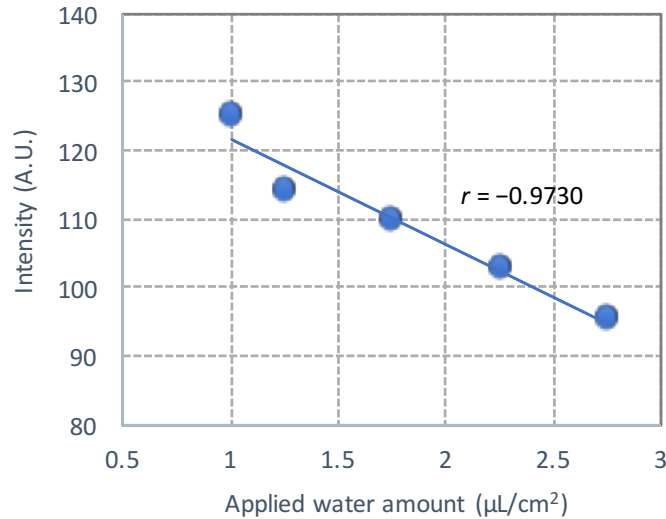


図 5-9. 皮膚に塗布した水分量と 1920 nm の OH 基の近赤外分光画像の輝度値との関係.

図 5-10 には、皮膚へのモイスチャライザー塗布による保水効果を評価するための、1920 nm の OH 基の近赤外分光画像を用いた水分量疑似カラー表示解析ステップを示した。解析ステップは、塗布前後での位置補正、色票による輝度補正、水とバックグラウンド帯域との波長差分画像作成、塗布前後の差分画像作成、そして、疑似カラー画像作成の手順からなる画像処理ステップで構成される。 $I_{b_{\text{raw}}}$ はモイスチャライザー塗布前、 I_{raw} はモイスチャライザー塗布後の 8 bit のビットマップ raw 画像である。

色票による輝度補正は、顎置き台の前に配置した 5% 拡散反射板の画像の輝度値が 155 (1920 nm の OH 基の近赤外分光画像の場合) になるように、画像全体を直線補正した。補正後の画像は、 $I_{b_{\text{cor}}}$ (モイスチャライザー塗布前)、及び I_{cor} (モイスチャライザー塗布後) である。その後、顔の凹凸補正のため、同様に補正したバックグラウンドの 1300 nm の近赤外分光画像 ($I_{b_{\text{basecor}}}$, I_{basecor}) と 1920 nm の画像との差分画像 ($I_{b_{\text{dif}}}$, I_{dif}) を算出する。続いて、凹凸補正後のモイスチャライザー塗布前後の近赤外分光画像の差分画像、すなわち解析画像 $I_{A_{\text{ana}}}$ を算出する (式 5-1)。最後に、任意の ROI 領域の輝度値に対して、表示のための輝度拡大処理を行った後に、任意の疑似カラーを当てはめることで、水分疑似カラー画像 $I_{F_{\text{ana}}}$ を算出した。

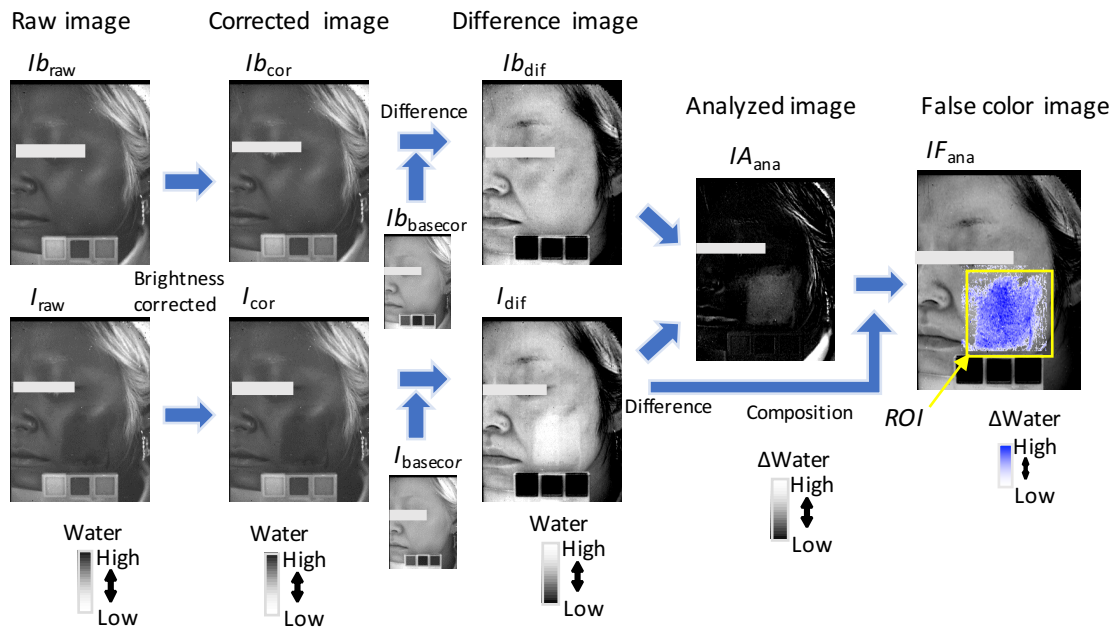


図 5-10. モイスチャライザー塗布前後での水分量擬似カラー表示解析ステップ.

$$I_{A_{ana}} = (I_{basecor} - I_{cor}) - (I_{basecor} - I_{cor}) \quad (5-1)$$

$I_{A_{ana}}$: 解析画像

$I_{basecor}$, $I_{basecor}$: 輝度補正済みバックグラウンド画像

I_{cor} , I_{cor} : 輝度補正済み画像

図 5-11 には、本解析ステップを用いて、モイスチャライザー塗布 30 分後までの水分変化量を、5 段階の擬似カラー表示させた例を示した。図 5-11(a) には解析画像 I_{ana} 、図 5-11(b) には擬似カラー画像 $I_{F_{ana}}$ を示した。図 5-11 に示したように、実用レベルのモイスチャライザーの効果評価のための実験系において、塗布直後では、四角い塗布領域全体の水分量が増加していること、経時的な水分量の面分布の変化を検出できていることが示された。さらに、図 5-11(b) に示したように、8 bit 画像を用いた擬似カラー表示処理を行なっても、変化量を検出できることが示された。

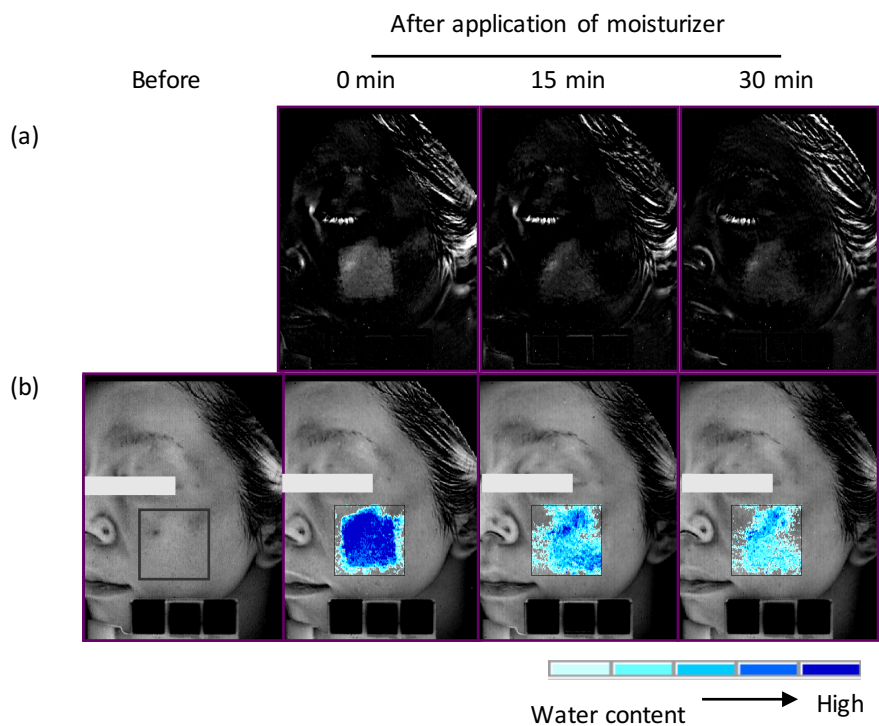


図 5-11. モイスチャライザー塗布後の水分増加量の擬似カラー表示画像.
 (a) 塗布前後の輝度差分表示, (b) 塗布後における水分増加量の擬似カラー表示.

次に、化粧品の効果評価で使われる数値での比較についても検証した。図 5-12 には、評価に用いた市販のモイスチャライザー（化粧水 2 種類（Lotion A, Lotion B）、乳液 2 種類（Emulsion A, Emulsion B））の近赤外透過反射スペクトルを示した。化粧水に比べて、乳液では配合されている油分に由来する 1700 nm 付近の CH 基のバンドが観察されたが、どのモイスチャライザーでも水を多く含むため、OH 基のバンドが最も強く観察された。これらの化粧水および乳液を皮膚上に塗布した前後の 1920 nm の OH 基の近赤外分光画像を、塗布直後、5、10、30、60、90 分後まで測定した。

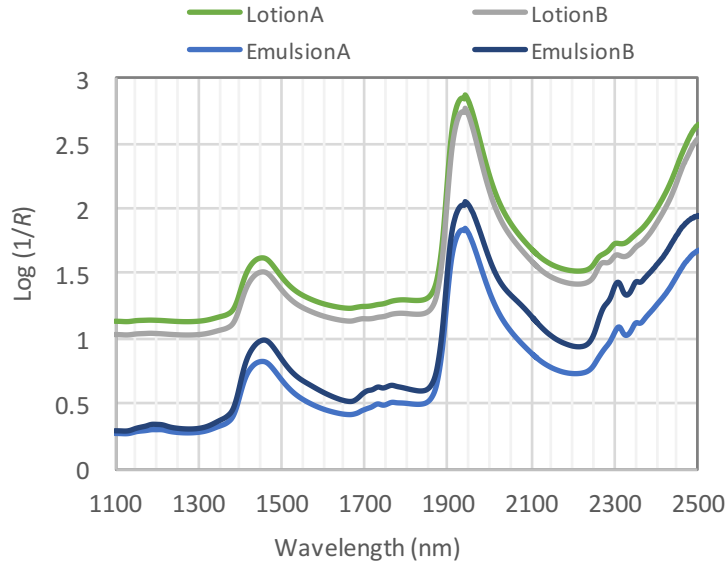


図 5-12. 化粧水 A, 化粧水 B, 乳液 A, 乳液 B の近赤外透過反射スペクトル.

図 5-13 には, 塗布前からの水分増加量を, 解析画像 I_{ana} の ROI における輝度値としてグラフで示した.

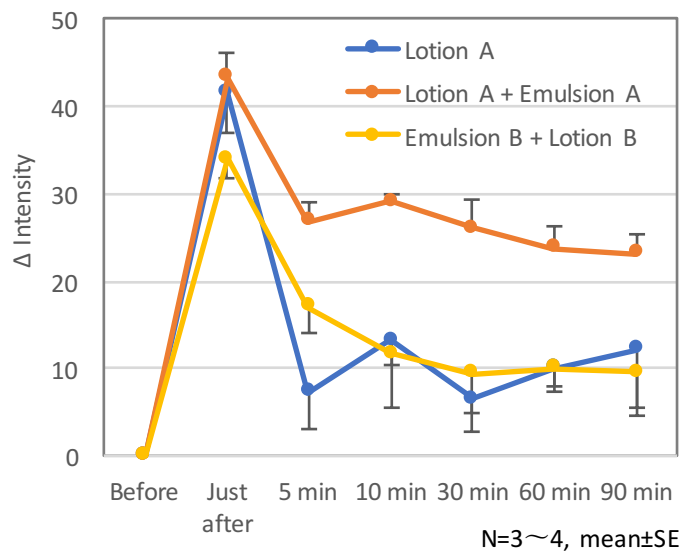


図 5-13. モイスチャライザー塗布後の 1920 nm の分光画像の ROI の平均輝度値の経時変化.

塗布直後では, 化粧水 A, 化粧水 A + 乳液 A, 乳液 B + 化粧水 B, のどのモイスチャライザーの組み合わせでも, 皮膚に塗布した後は 1920 nm の近赤外分光画像

の輝度変化量は増加，すなわち塗布前に比べて水分量が増加した．その後の経時変化は，モイスチャライザーの組み合わせにより異なった．すなわち，化粧水 A では 5 分後の時点で，乳液 B + 化粧水 B では 10 分後以降に，徐々に塗布前の値に近づいたが，化粧水 A + 乳液 A では，90 分後でも塗布前に比べて高い数値，すなわち，水分量が高い状態を維持していた．このように，モイスチャライザーの種類の違いによる水分量の経時変化のパターンを，数値データとしても比較評価可能であることが示された．

5.4.3 狭領域の表皮水分量イメージング [127,129]

図 5-14 に，SC 光を用いた皮膚の狭領域の表皮水分量イメージングの様子（図 5-14(a)）と取得した分光前の近赤外全領域のカメラ画像（図 5-14(b)）を示した．

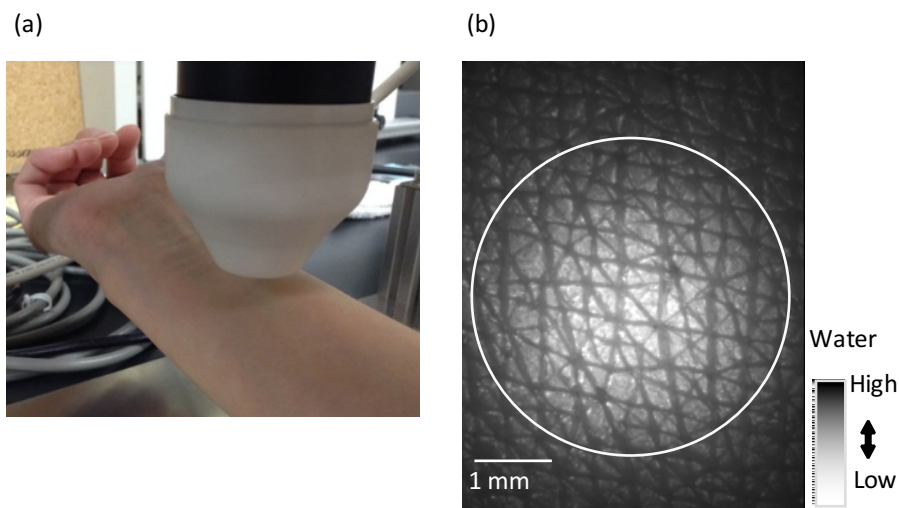


図5-14. 皮膚測定の様子.
(a) 外観写真, (b) 近赤外全領域のカメラ画像.

本セットアップでは，皮膚の表面の存在する肌理が観察できる倍率の近赤外分光画像が得られる．ただし，光学系の調整で，円状に形成されるほぼ均一照明領域を最大域取得するために，均一照明領域に外接する長方形で視野を設定したため，境界領域は影が生成された．本画像を取得する際に用いた SC 光の波長特性を図 5-15 に示した [130]. 1920 nm の OH 基のバンド付近では，安定した光量を確保できることが推定された．

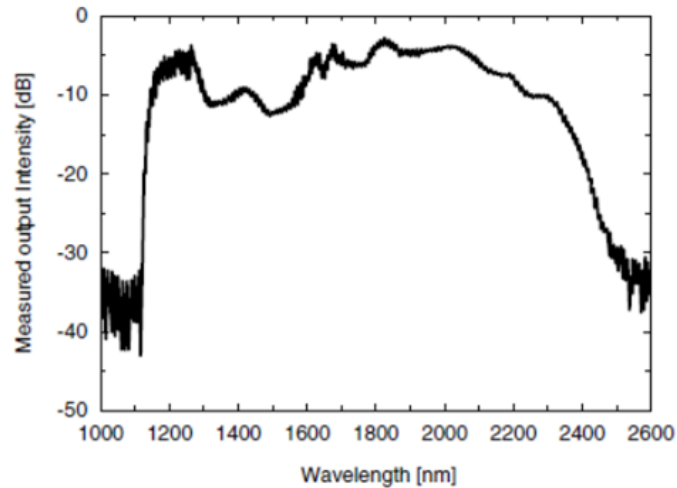


図 5-15. 光源の波長特性 [130].

図 5-16 には、本セットアップを用いて、皮膚に水滴を滴下した前後の皮膚の狭領域の近赤外全領域のカメラ画像を示した。

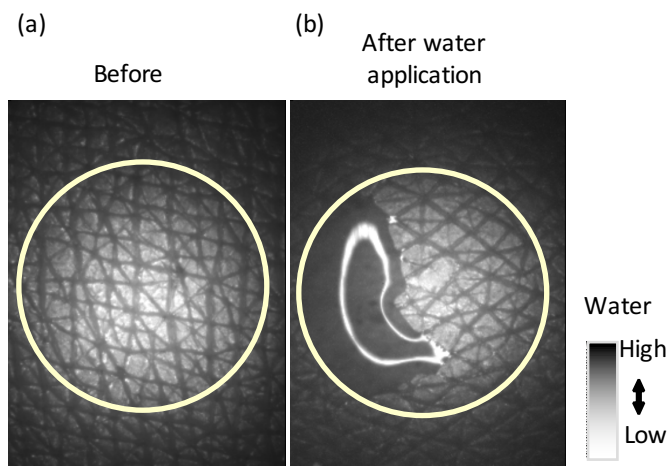


図 5-16. 水滴下前後の近赤外全領域のカメラ画像.
(a) 滴下前, (b) 滴下後.

SC 光を用いた皮膚の微領域の表皮水分量イメージングでは、図 5-16(b) に示したように、皮膚表面に存在する皮丘、皮溝の紋様と共に、滴下した水分滴の様子が観察された。しかしながら、図 5-16(b) の水滴画像の中央部にリング照明の皮膚表面での正反射光と推測される輝度値の高い領域が観察された。液滴の皮膚へのなじみ度合いを評価する際には、水の吸収で反射光が減少した黒い画像を評価することとなるが、その際に、正反射光による輝度値の増加（白色の画像）は、水分量が少ない方向に作用

するアーティファクトとして影響する．この正反射光を除去するにはクロスニコル偏光をかける必要があると考えられる．しかしながら，使用している SC 光の強度では，偏光フィルター 2 枚を通した場合の光量低下が著しく，解析可能な感度の近赤外分光画像を取得できなかつた．そこで，偏光フィルター無しの，リング照明由来の正反射光を含んだ画像で，液滴の皮膚へのなじみ度合いを評価することにした．

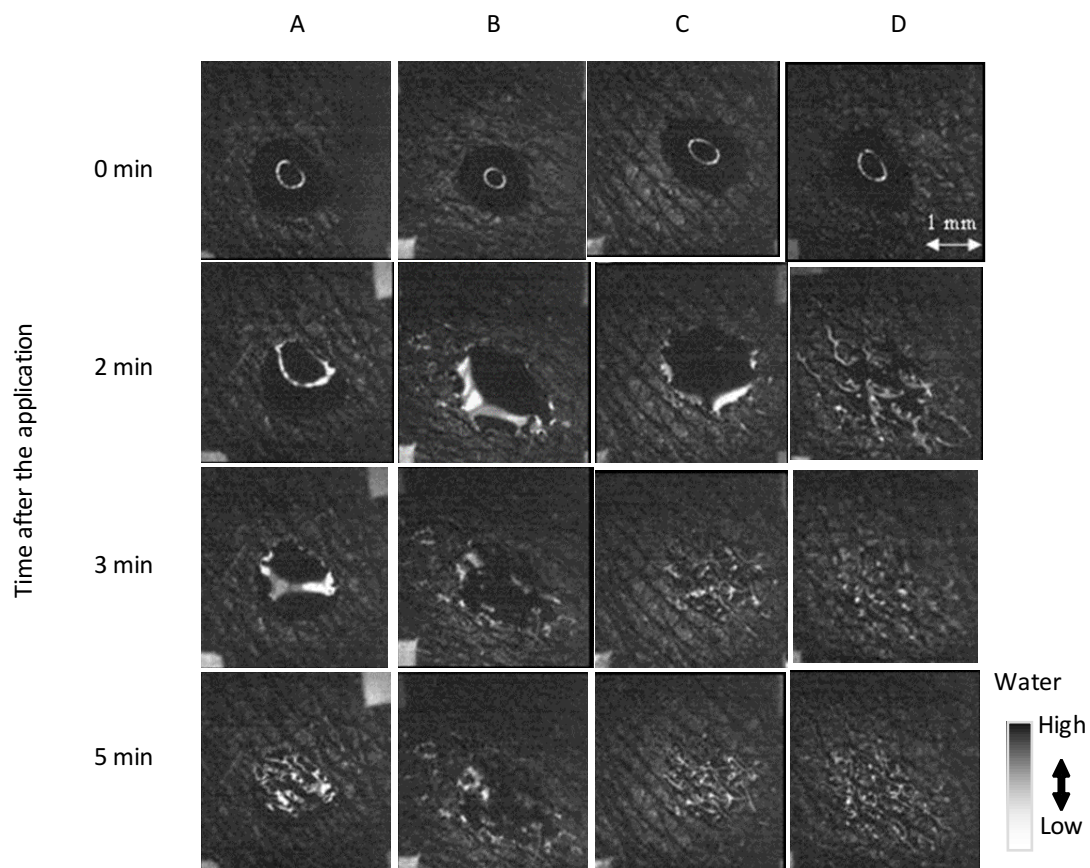


図5-17. モイスチャライザー滴下後の 1920 nm のOH 基の近赤外分光画像の変化．モイスチャライザーの違い (A, B, C, D) により塗布後の液滴の広がり状態が異なつた．

図 5-17 には，A, B, C, D の 4 種類のモイスチャライザー滴下後の 1920 nm の OH 基の近赤外分光画像の変化挙動を，同一人の腕で，0, 2, 3, 5 分後に観察した結果を示した．モイスチャライザーの違い (A, B, C, D) により塗布後の液滴の広がり状態が異なつた．具体的には，モイスチャライザー A は，液滴の大きさはあまり変化せず，5 分後に急激に表面に存在する量が減少したような画像であつた．一方，モイスチャライザー B は，0 分後と 2 分後を比較すると，2 分後で液滴の表面積が大きくなり，その後 3 分後から表面存在量が減少している様子を示した．さらに，モイスチャライザー D は 2 分後において，皮膚表面存在量が極めて減少している様子が観察された．このように，可視光領域で透明であるために観察できなかつた皮膚表面付近での液滴の形状変化の挙動を観察できることは，モイスチャライザ

一の効果評価や、液滴の形状変化パターンからの皮膚状態の推定評価に有効である可能性があると考えられた。

5.4.4 環境湿度・季節の変化に伴う顔の水分量面分布の変化 [127,131]

環境湿度や季節変化による顔の中における水分量面分布の特徴を，測定した被験者全員の平均値で評価するために，顔をメッシュに区切った解析を実施した．図 5-18 には，水分量面分布の解析ステップを示した．

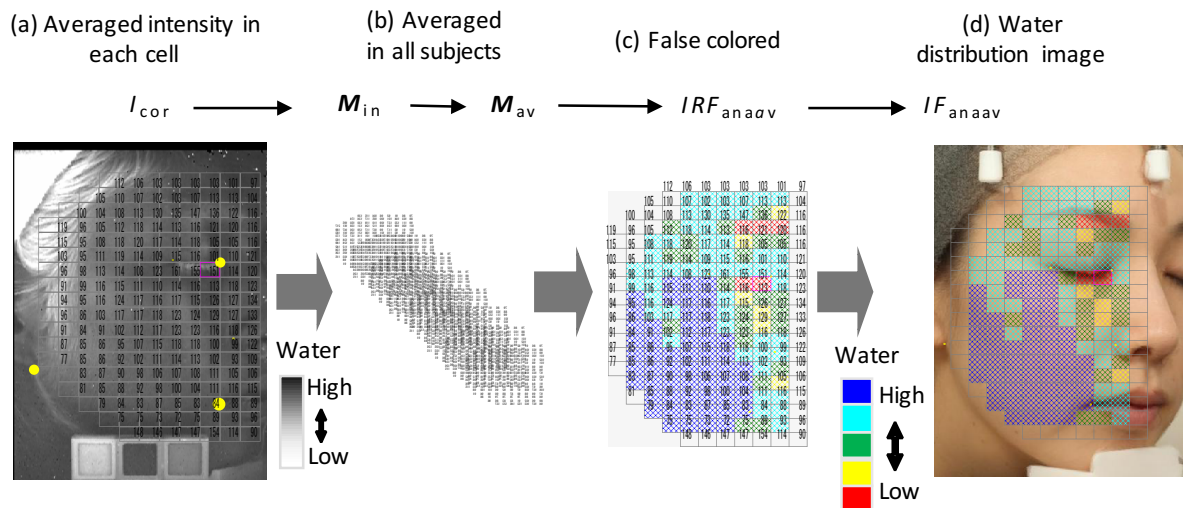


図5-18. 水分量面分布の解析ステップ.

具体的には，全顔の表皮水分量イメージングにより取得した 1920 nm の OH 基の 8 bit のビットマップ Raw 画像に対し，まず，5.4.2 項で述べた 5% 拡散反射板の平均輝度値による輝度補正を適用した．得られた輝度補正済み画像 I_{cor} に対して，顔の特徴点（目尻 $Po(x,y)$ ，目頭 $Pi(x,y)$ ，耳たぶ下 $Pe(x,y)$ ，口角 $Pm(x,y)$ ，小鼻の膨らみ $Pn(x,y)$ ）を画像ごとに目視で指定した．その後，被験者毎に異なる大きさの四角のメッシュ幅 Lw 及びメッシュの高さ Lh を，それぞれ (式 5-2)，(式 5-3) により算出した．

$$Lw = (Pi(x) - Pe(x)) / 9 \quad (5-2)$$

$$Lh = (Pi(y) - Pm(y)) / 9 \quad (5-3)$$

輝度補正済みの近赤外分光画像 I_{cor} に対して、目頭 $Pi(x,y)$ を基準位置として、縦 17、横 9 メッシュを当てはめ、メッシュごとに、輝度平均値 $M_{in}(x,y)$ を算出した。その後、 n 人の全被験者の平均値を算出するために、同一メッシュ位置の被験者平均輝度 $M_{av}(x,y)$ を算出した (式 5-4)。

$$M_{av}(x,y) = \left(\sum_{in=1}^n M_{in}(x,y) \right) / n \quad (5-4)$$

最後に、5 段階の疑似カラーを当てはめることで、疑似カラー画像 IRF_{anaav} を作成、ベースの顔画像に重ね合わせることで、複数の被験者での顔の水分面分布の平均画像である解析画像 IF_{anaav} を作成した。

図 5-19 に、85 分の間、10 %RH の低湿度環境に滞在した間の顔の水分量面分布の変化を、15 名の被験者の平均値を用いた疑似カラーメッシュ画像で示した。疑似カラーのメッシュ画像は、15 名の被験者平均のベース画像 (1300 nm と 1950 nm の差分画像) の平均画像の上に表示させた。低湿度環境の室内に入室 20 分後から 105 分後にかけて、水分減少量が大きい順に、赤 (輝度値変化量: +40~+7)、黄色 (+7~+1)、緑 (+1~0)、水色 (0~-4)、青 (-4~-15) の疑似カラーで表示した。ここで、水分量が減少した場合には、水の吸収による輝度値低下と逆方向の変化が起こるため、1920 nm の OH 基の分光画像の輝度値は大きくなる。緑は、低湿度環境での滞在時に水分量の変化がほぼ無い状態、黄色と赤は水分量が減少した状態、水色と青は水分量が増加した状態を示す。その結果、短時間の低湿度環境下の滞在において、他の部位に比べて目まわりや頬下部の水分量がより減少したことが明らかになった。

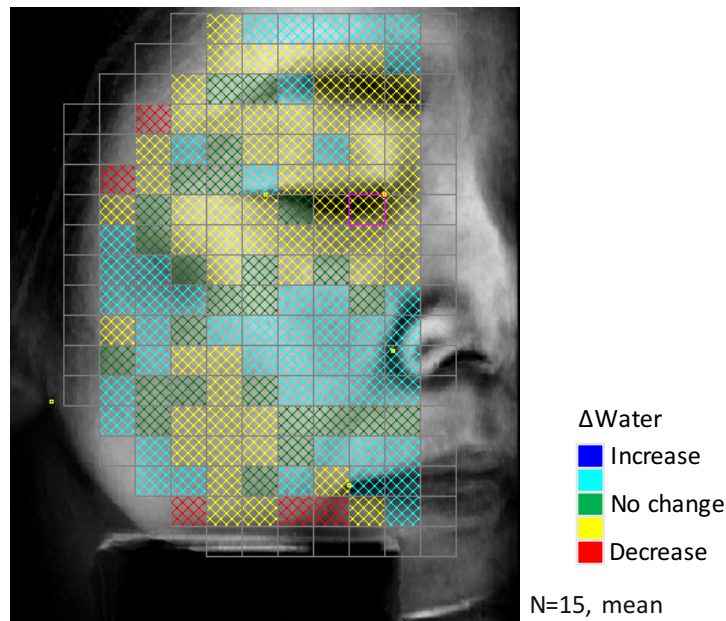


図 5-19. 85 分間の低湿度環境滞在での水分量面分布の変化.
 入室 20 分後から 105 分後までの 1920 nm の近赤外分光画像の各メッシュの変化量に対して被験者全員の平均値を算出し、255 階調の輝度変化量を 5 色の擬似カラーで表示。擬似カラー輝度値閾値は、青色：-4~-15，水色：0~-4，緑色：1~0，黄色：7~1，赤色：40~7。水分量が多いと 1920 nm の近赤外分光画像の輝度値は小さくなるため、マイナスの変化量は水分量が増加したことを示す。

次に、季節による顔の水分量面分布の変化を解析した。図 5-20 には、26 人の被験者における水分量面分布の季節変化を、全員の平均値としてメッシュ画像で示した。擬似カラーメッシュは、26 名の被験者の中の 4 名のデジタルカメラ画像の平均顔画像の上に重ね合わせて表示させた。なお、平均顔画像作成において、4 名以上の顔画像を平均すると、被験者個人の顔の特徴は残らないため、個人情報保護ができると考えられた。図 5-20(a) は春、図 5-20(b) は夏、図 5-20(c) は秋、図 5-20(d) は冬における顔の水分量面分布である。1920 nm の OH 基の近赤外分光画像から解析した各メッシュの平均輝度値により、青 (5~75)、水色 (75~80)、緑 (75~80)、黄 (88~95)、赤 (95~200) の擬似カラーで表示した。その結果、他の季節に比べて秋において、目の近傍及び頬の上部の水分量が少なかった。秋における水分量の減少は、東京エリアでは、秋に湿度の急激な減少が起こることが要因の 1 つと考えられた。このように、顔の水分量の面分布解析により、顔の部位による単回の乾燥環境下での水分量の変化のパターン、あるいは長期的な季節での水分量面分布パターンの違いを捉えることが可能になった。

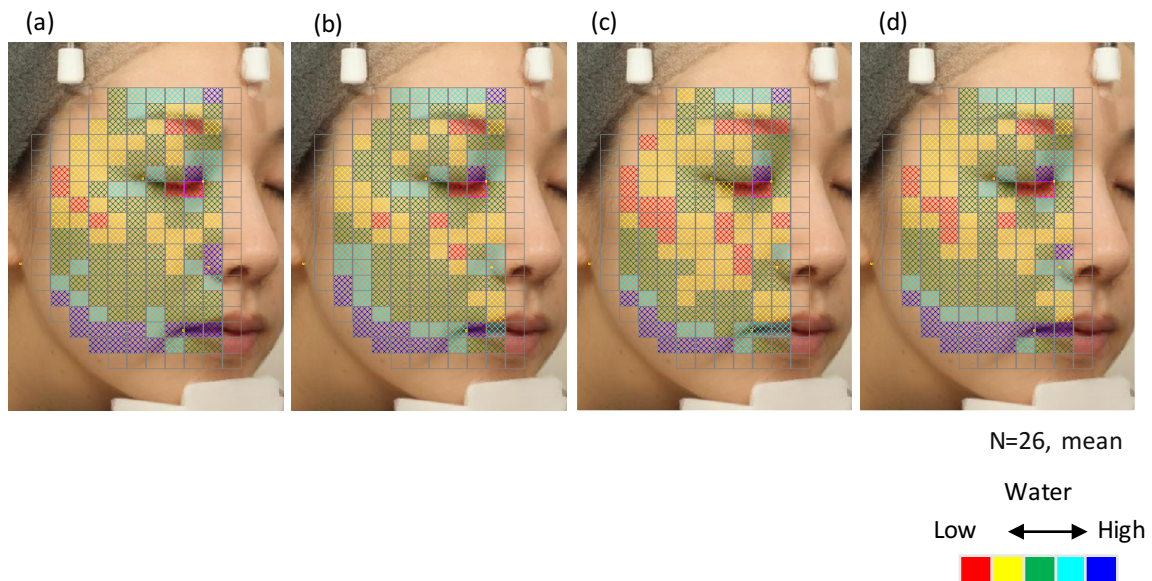


図 5-20. 顔の水分量面分布の季節変化.

(a) 春, (b) 夏, (c) 秋, (d) 冬. 1920 nm の近赤外分光画像の各メッシュの被験者全員の平均値を算出し, 255 階調の輝度値を 5 色の擬似カラーで表示. 擬似カラー輝度値閾値は, 青色: 5~75, 水色: 75~80, 緑色: 80~88, 黄色: 88~95, 赤色: 95~200. 水分量が多いと 1920 nm の近赤外分光画像の輝度値は小さくなる.

さらに, 季節変化については, 既存法として使用されている Corneometer[®] を用いた静電容量法での比較測定も実施した. 具体的には, 図 5-21 に示した右頬の 2 ヶ所について, 静電容量値の測定を行い, 該当位置の近赤外分光画像からの平均輝度の算出による解析結果と比較した.

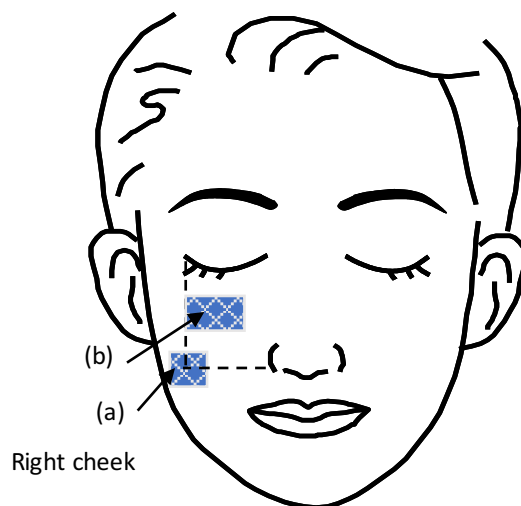


図 5-21. 静電容量法による水分量測定の測定位置.

選定した比較部位は，美容科学・皮膚科学分野における顔の測定で一般的に使用される，目尻 $Po(x,y)$ と小鼻の膨らみ $Pn(x,y)$ の交点位置 (a)，及び，頬骨が平らで静電容量法で安定した測定が可能な目の下の位置 (b) の 2 箇所である．図 5-22(a) には領域 a，図 5-22(b) には領域 b における静電容量値の季節変化を示した．静電容量値が高いことが，水分量が多いことを示す．領域 b での静電容量値は，春において，秋 ($p=0.017$) や冬 ($p=0.0019$) に比べて有意に高かった．領域 a については季節の変化による有意な差はなかったが，秋で最も静電容量値が低かった．

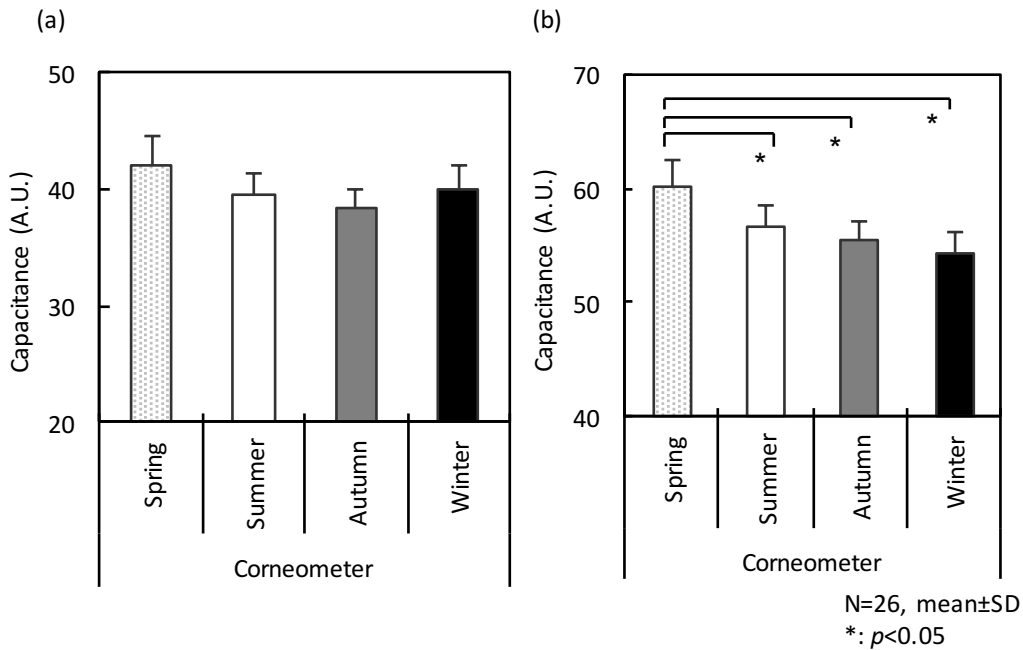


図 5-22. 静電容量値の季節変化.
(a) 領域 a, (b) 領域 b.

比較のために，同じ 2 か所について，近赤外分光画像についても平均輝度値の季節変化を算出した．図 5-23(a) には領域 a，図 5-23(b) には領域 b の，1920 nm の近赤外分光画像の平均輝度値の季節変化を示した．1920 nm の輝度値が高いことは，皮膚からの反射光が多いことであり，すなわち撮影対象物である皮膚の水分量が少ないことを示す．領域 a における輝度値は，他の季節に比べて秋において有意に高く，すなわち，水分量が少なかった．領域 b においては，秋において最も輝度値が高かったが，有意差は存在しなかった．これより，選定した 2 ヶ所における近赤外分光画像の輝度の平均値の季節変化を数値化で比較すると，秋で最も少ないという静電容量値と同じ傾向の変化を示した．しかしながら，26 名の被験者の 4 季節の全データについて，1920 nm の OH 基の近赤外分光画像の輝度値と静電容量値との関係を 1 対 1 でプロットすると，図 5-24 に示したように，僅かな負の相関，すなわち輝度値が低い時に静電容量値が大きい，は存在するが，明確な相関関係を確認できる相関係数ではなかった．これは両手法における測定に影響するアーティファクトの違いではないかと考えている．例えば，静電容量法は，水分量以外にプローブと皮膚との接触面積や接触圧力が測定値に影響すること，近赤外分光イメージング法は，顔への光の照射のコントロールが重要であり，顔を置く角度が影響すること，とそれぞれ異なる

るため、1対1比較での相関関係は高くなかったのではないかと考えられた。

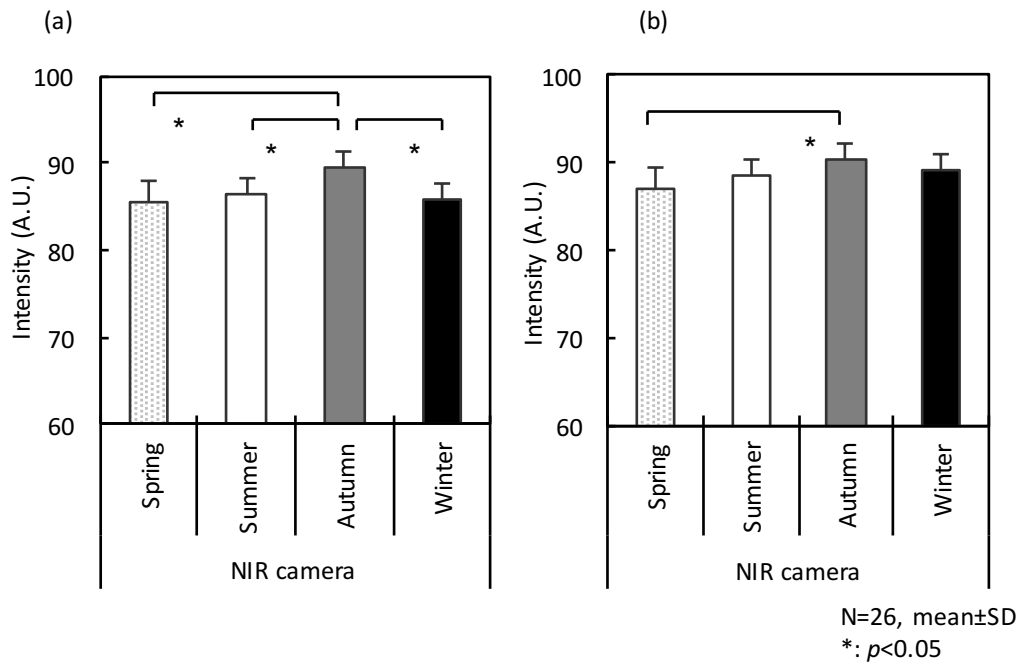


図 5-23. 1920 nm の近赤外分光画像平均輝度値の季節変化.
(a) 領域 a, (b) 領域 b.

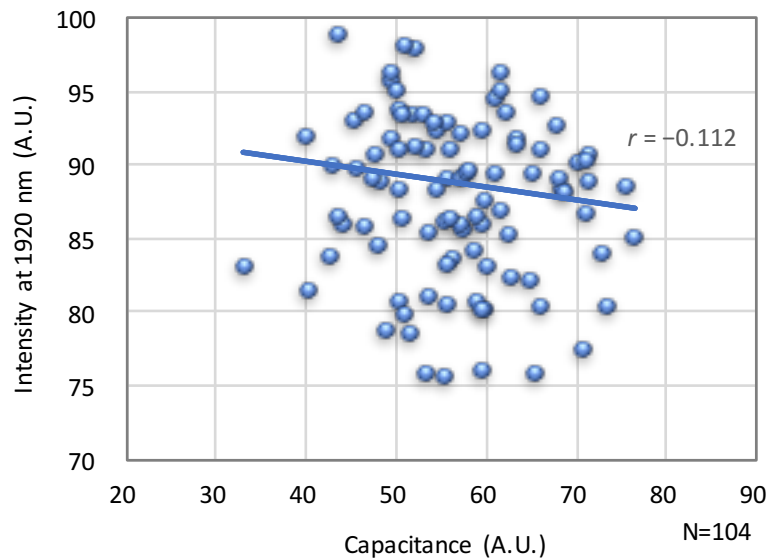


図 5-24. 1920 nm の近赤外分光画像輝度値と静電容量値との関係.

5.4.5 肌状態による水滴のなじみパターンの解析 [127,130]

次に，狭領域の近赤外分光イメージングのセットアップを用いて，液滴の皮膚へのなじみパターンを数値で評価した．図 5-25 には，液滴を滴下した皮膚の領域を示した．弱い粘着力のある紙製のテープの $3\text{ mm}\times 4\text{ mm}$ の領域を切り抜き，滴下ターゲットマーカーとして皮膚表面に貼り付けて使用した．液滴の滴下ターゲットの大きさは，取得画像とほぼ同じ大きさである $3\text{ mm}\times 4\text{ mm}$ 程度とした．

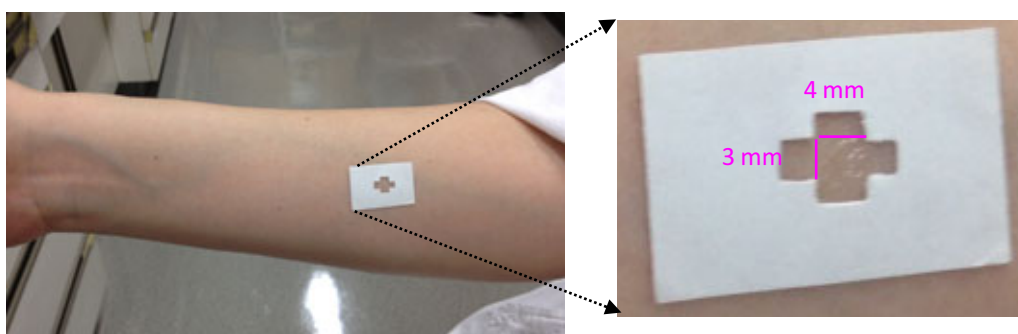


図 5-25. 皮膚表面への液滴の滴下時の位置決めの様子.

図 5-26 には，モイスチャライザーを皮表に塗布した後，液滴が皮膚になじむ過程における，0，60，90，105，120 秒後の 1920 nm の OH 基の近赤外分光画像の経時変化を示した．取得画像において，液滴の水の吸収強度は大きいため，黒い領域として表示される．図 5-26(a) に示したように，滴下直後は液滴の形状は円形であるが，その後皮溝に沿って広がったりしながら，120 秒後には皮膚になじんだ状態として観察された．このなじみ過程での画像の変化を表現するために，液滴の面積 $Area_t$ (A.U.) となじむまでの時間 ET (s) を算出した．例えば，図 5-26 においては，黄色い破線で示した領域の面積を $Area_t$ とし，この画像の場合の $ET=120$ である．

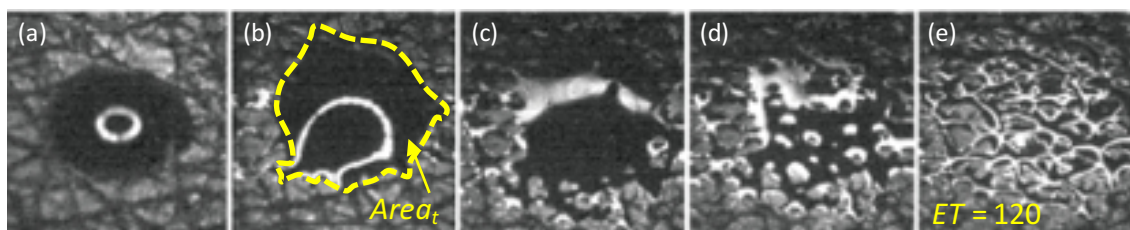


図 5-26. 皮膚表面へのモイスチャライザー滴下後の経時変化.
(a) 0 秒後, (b) 60 秒後, (c) 90 秒後, (d) 105 秒後, (e) 120 秒後.

図 5-27 には，3 種類のモイスチャライザー (M1, M2, M3) を 7 名の被験者の前腕に塗布した後の，皮膚になじむまでの時間 ET (s) を示した。

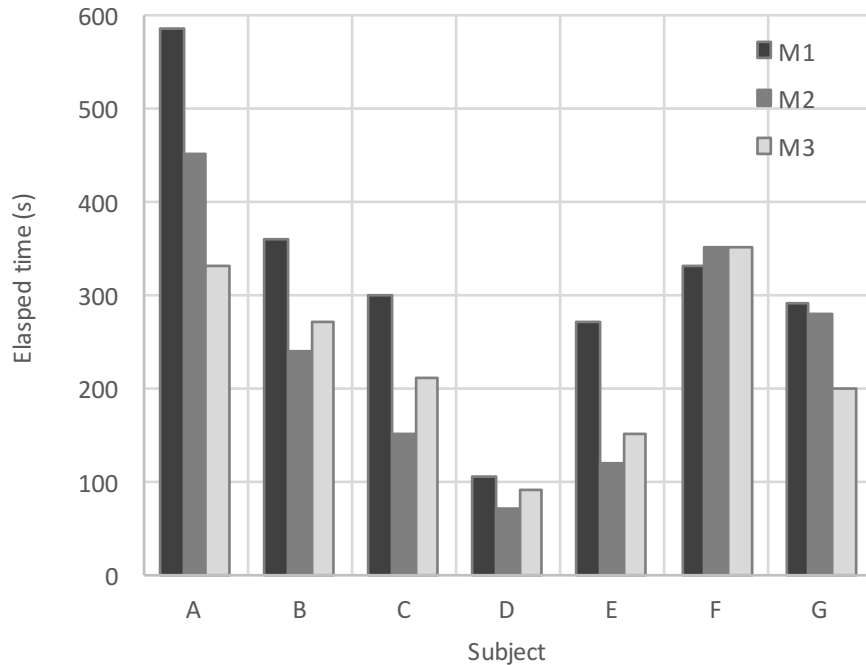


図5-27. 被験者によるモイスチャライザー (M1, M2, M3) の皮膚へのなじみ時間の違い.

なじむまでの時間 ET の違いは，モイスチャライザーの種類よりも被験者の違いに大きく依存した．例えば，被験者 D は，7 名の被験者の中で 3 種類の全てのモイスチャライザーで最も ET が小さかった．一方で，被験者 A は，全てのモイスチャライザーで ET が大きかった．更に，モイスチャライザーの種類の違いについて評価すると，3 つのモイスチャライザーの中で，M1 はなじむまでの時間 ET が長かったが，M2 と M3 の傾向はクリアではなかった．

図 5-28 には，被験者による滴下後のモイスチャライザーの表面積比 $Area$ の経時変化の違いを示した．各時間における表面積比 $Area(t)$ は，各時間における表面積 $Area_t(t)$ の，滴下直後の表面積 $Area_0$ に対する比で示した (式 5-5)．

$$Area(t) = \frac{Area_t(t)}{Area_0} \quad (5-5)$$

図 5-28 (a) はモイスチャライザー M1，図 5-28 (b) はモイスチャライザー M2，図 5-28 (c) はモイスチャライザー M3 を示す．A～G の 7 つのラインは，それぞれ被験者 A～G に対応する．

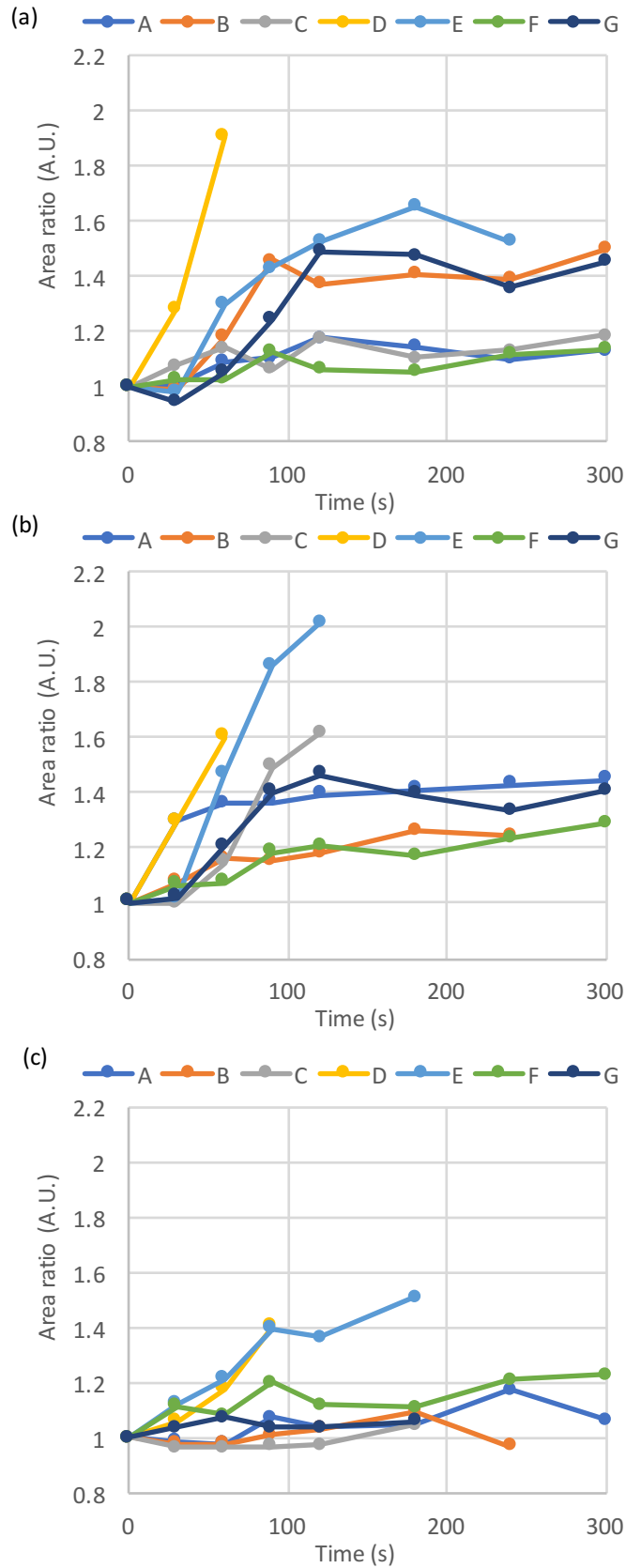


図 5-28. モイスチャライザー滴下後の表面積比の経時変化の違い。
 (a, b, c) はそれぞれモイスチャライザー M1, M2, M3 を示す。A~G はそれぞれの被験者のデータを示す。

なじむまでの時間 ET と同様に、表面積比 $Area$ もモイスチャライザーの種類よりも被験者による差異が大きかった。 ET が最も短かった被験者 D は、 $Area$ の変化が最も速かった。 $Area$ が速く変化することは、すなわち、皮表でモイスチャライザーの液滴が素早く広がることを意味する。一方で、 $Area$ のゆっくりとした変化は、液滴が長時間同じ大きさを維持することを意味する。全体として、なじむまでの時間 ET が小さい被験者は、表面積比 $Area$ の変化が大きかった。

なじみ過程での液滴の動的变化と被験者の皮膚の特徴を考察するために、液滴がなじむまでの時間 ET 、液滴の表面積比 $Area$ と、皮膚の静電容量値に基づく水分量 $Water$ 、経皮水分蒸散量 $TEWL$ との関係性を比較した。表 5-1 には、皮膚特性値 ($Water$, $TEWL$) となじみパラメーター ($Area$, ET) との相関係数を示した。水分量が多い皮膚ではモイスチャライザーのなじみが速い方向であった。また、液滴の表面積比と皮膚水分量との関係を見ると、水分量が多い皮膚ではモイスチャライザーの広がりも速かった。同様に、液滴の表面積比と経皮水分蒸散量との関係を見ると、経皮水分蒸散量が小さい場合にはモイスチャライザーの広がりが大きかった。経皮水分蒸散量は皮膚のバリア機能を示すため、モイスチャライザーの皮膚へのなじみには、角層の細胞構造の均一性も関係がある可能性も考えられた。なお、相関係数を算出するためのサンプル数は 7 であり、全て有意差は認められなかった。これより、液滴のなじみパラメーターと皮膚状態との関係性を結論付けるためには、さらにサンプル数を追加した詳細な検討が必要であると考えられた。

表 5-1. 皮膚の特性 (水分量・経皮水分蒸散量) となじみパラメータ (表面積・なじみ時間) との相関係数.

	$Water$	$TEWL$
ET	-0.567	0.055
$Area$	0.144	-0.389

N=7

表 5-2 には、液滴がなじむまでの時間 ET と皮膚水分量 $Water$ 、液滴の表面積比 $Area$ と皮膚水分量 $Water$ 、液滴の表面積比 $Area$ と経皮水分蒸散量 $TEWL$ との相関係数を示した。皮膚になじむまでの時間と皮膚水分量との関係は、モイスチャライザーの種類によらず、全て正の相関係数を示した (相関係数 $r=0.414\sim 0.583$)。一方で、液滴の表面積比と皮膚水分量との関係は、モイスチャライザーの種類に関係して、相関係数の符号が変化した。すなわち、最も保水効果の高いモイスチャライザー M1 は、皮膚水分量が多い皮膚で速く広がったが、M1 と比べて保水効果が低い M2 や M3 は、皮膚水分量が多い皮膚での広がりが遅かった。さらに、液滴の表面積比と経皮水分蒸散量との関係についても、モイスチャライザーの種類に影響された。全ての相関係数に有意差はなかったが、モイスチャライザーを滴下した後の挙動を解析することにより、静止状態の皮膚の特性評価からでは抽出できなかった新たな皮膚の特徴を評価できる可能性が示唆された。

表 5-2. 液滴のなじみパラメータと皮膚特性値との相関係数.

	<i>ET vs Water</i>	<i>Area vs Water</i>	<i>Area vs TEWL</i>
Moisturizer M1	-0.583	0.555	-0.521
Moisturizer M2	-0.581	-0.430	-0.151
Moisturizer M3	-0.414	-0.559	0.710

N=7

5.5 考察

顔の中で水分量に面分布があるのか、どの部分が乾燥しやすいのかについては、美容科学・皮膚科学領域において常に興味の対象となってきた。それと同時に、美容科学領域においては、顔面での水分量や皮脂量 [132-134] が、個人が感じる肌の感触や実感と関係あることも類推され、アンケートによる官能評価をベースとした肌質分類が行われてきた。一般的には、日常生活においては、口元・目まわりなどが乾燥しやすいと感じると考えられている。しかしながら、既存の電気的手法は、皮膚への接触圧や接触面積の影響を受けるため、測定部の奥にプローブをホールドする骨が存在しない脂肪が多い頬などの部位は苦手とすること、秒単位で変化する皮膚の水分に対して 1 点計測の測定法では全顔の水分量面分布の正確なデータを取得することができないこと、などの理由もあり、顔の水分量面分布についての詳細な検討は行われていなかった。さらに、近赤外分光イメージングについては、どの深さ位置の皮膚の水分量を検出しているのかについて考慮されなかったため、詳細な研究には活用されていなかった。

1460 nm の OH 基を用いて水分量イメージングを行った先行研究では、モイスタライザーを含ませたコットンを皮膚に長くのせた後での水分量の大幅な増加についての輝度値の変化は検出できたが、日常生活での水分量面分布評価への応用は行われなかった。日常生活で変化する皮膚の水分量は、第 3 章のラマン分光法を用いた検討の結果、皮表に近い数ミクロンの領域での変化と推測され、非常に僅かと類推できた。本章で実施したモンテカルロ光伝搬シミュレーションの結果では、1460 nm を用いた水分量イメージングに比べて、1920 nm での水分量イメージングにおいては、スペクトル情報に含まれる角層からの信号強度の割合が大きいため、先行研究と比べて角層水分量の検出力が向上し、日常生活環境下での僅かな水分量の変化も検出できたと考えられた。また、検討を進める中で、1300 nm の近赤外分光画像には、真皮の更に奥までの情報も含まれることが推測された。多くの被験者を測定する中で、頬部の脂肪量が多いと推測される被験者（ふっくらした被験者）と少ないと推測される被験者（痩せている被験者）では、スペクトル上は成分の吸収バンドのない 1300 nm の近赤外分光画像の輝度値が、前者の方が高いという感触を得た。実測において

は、1300 nm 付近の光は真皮の下の脂肪層付近まで到達しているのかもしれないと考えられた。あるいは、脂肪量が多いと考えられる被験者と少ない被験者の間では、真皮の物質密度や粒子系と関係する構造が異なり、拡散反射に影響を及ぼしているのかもしれない。

本章での検討においては、先行研究よりも、角層の水分量の変化を感度良く検出できる水分量イメージングを具現化できたからこそ、水分量の変化が少ない日常生活での顔面の水分量面分布の変化を評価できた。目のまわりはヒトの感覚としては乾燥しやすいと考えられる場所である。それは、他の皮膚生理指標 [132] から予測されるものであった。すなわち、田上らが、テープストリッピング法で各部位の角層の層数を評価した結果、目のまわりの層数が少なかったため、皮膚としての体内からの水分蒸散に対するバリア機能が低いと報告していたからである。本章では、約 100 分間低湿度環境下に滞在するだけで、目のまわりの水分量が減少することを初めて実証した。さらに、東京エリアでの季節変化は、電気的手法を用いた 1 点測定での先行研究においても、夏と冬の 2 季節の比較がほとんどであったため、大きく変化する季節の抽出までは至らなかった。本章の結果では、水分量が大きく減少する変曲点は冬 (2 月前半) ではなくて秋 (10 月後半～11 月前半測定) であることを明らかにした。川尻らが実施した、東京エリアの幼児と大人を 4, 6, 10, 12 月の 4 季節で比較した研究 [135] では、Skicon-100 (アイ・ビー・エス株式会社) による頬部の電気伝導度値は、4, 6 月に比べて 10, 12 月で統計差のある有意差は無かったものの平均値では少なかった。本章での結果では、特に水分量の大きな変化が観察された部位は目のまわりであったため、頬部だけを測定した他の研究では見出すことが出来なかった、部位特異的な季節による水分量の変化を抽出できたのだと考えられた。

さらに、低湿度環境や季節変化で水分量が減少しやすい目の周辺部位を、ヒトが乾燥感として認識しているのかどうかについての検討も進めた。図 5-29 には、洗顔 30 分後のヒトが感じる乾燥感の面分布を示した。乾燥感の面分布は、本章で用いた水分量面分布のメッシュ擬似カラー表示と対応させるために、肌感覚の面分布をメッシュ状のアンケートで取得した結果を、水分量面分布と同様のステップで擬似カラー表示させたものである。この結果より、洗顔 30 分後というアンケート取得条件下では、被験者は、目まわりよりも頬骨上で乾燥感を強く感じていた。これより、水分量に関わる肌感覚は、水分量という物性値以外の影響も受ける可能性があることも推測された。

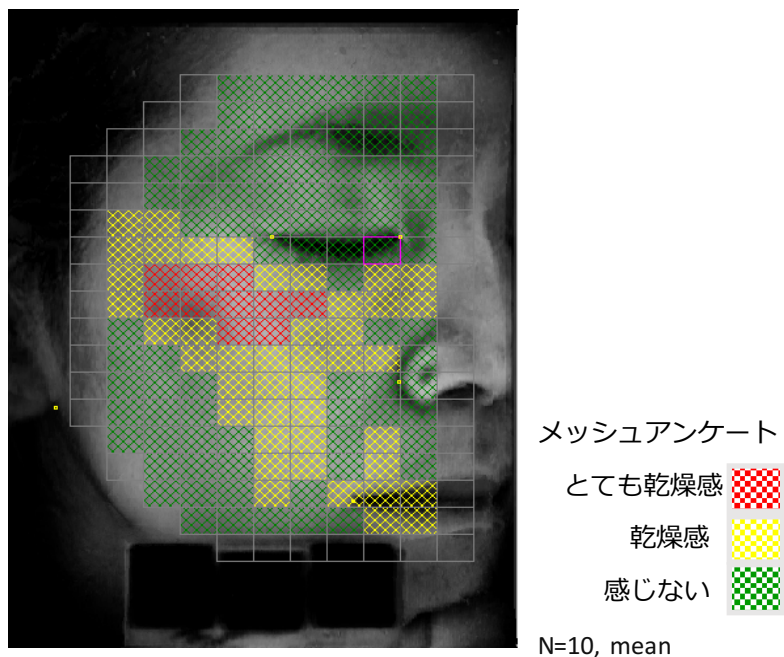


図 5-29. 洗顔 30 分後の乾燥感の面分布.
20 代～50 代女性 10 名に対して, 洗顔後 15℃, 60%RH 環境下に 30 分間
滞在後に 5 段階 (とても潤いを感じる, うるおいを感じる, どちらとも
感じない, 乾燥を感じる, とても乾燥を感じる) のメッシュアンケート
を取得した平均値を疑似カラーで表示.

1920 nm の水の OH 基を用いた近赤外分光イメージングは, 皮膚への応用だけに
留まらず, 毛髪への活用も可能であった. 通常の照明では, 毛髪の表面の正反射が非
常に大きく, 水分量イメージングは難しい. 筆者が顔用に製作した拡散反射照明は毛
髪の水分量イメージングにおいても, 毛髪表面での正反射光を抑え, 毛髪水分量評価
にも活用できることが示された [136].

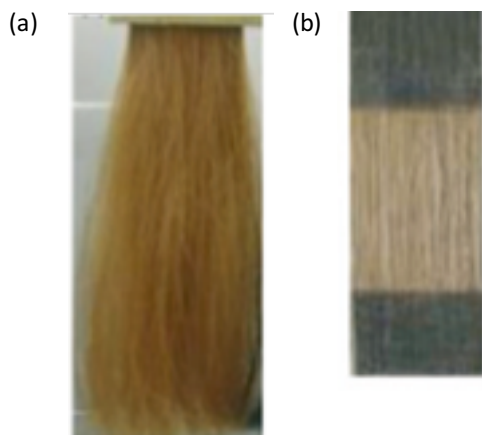


図 5-30. 2 種類の実験用毛束の外観写真.
(a) 環境湿度変化実験用, (b) 保水実験用.

健康毛髪 7.8 g を，幅 5 cm に等間隔に並べた長さ 19 cm の実験用毛束（図 5-30(a)）を用いて，恒温恒湿室にて温度一定下で相対湿度を変化させたときの毛髪水分量の変化を，1920 nm の OH 基の近赤外分光画像で評価した．結果は，図 5-31 に示した．図 5-31(a) に示したように，相対湿度の上昇に伴う毛髪の輝度値の低下，すなわち水分量の増加，が観察された．さらに，図 5-31(b) に示したように，相対湿度の変化に伴う毛髪水分量の変化を擬似カラー画像でも判別表示可能であった．

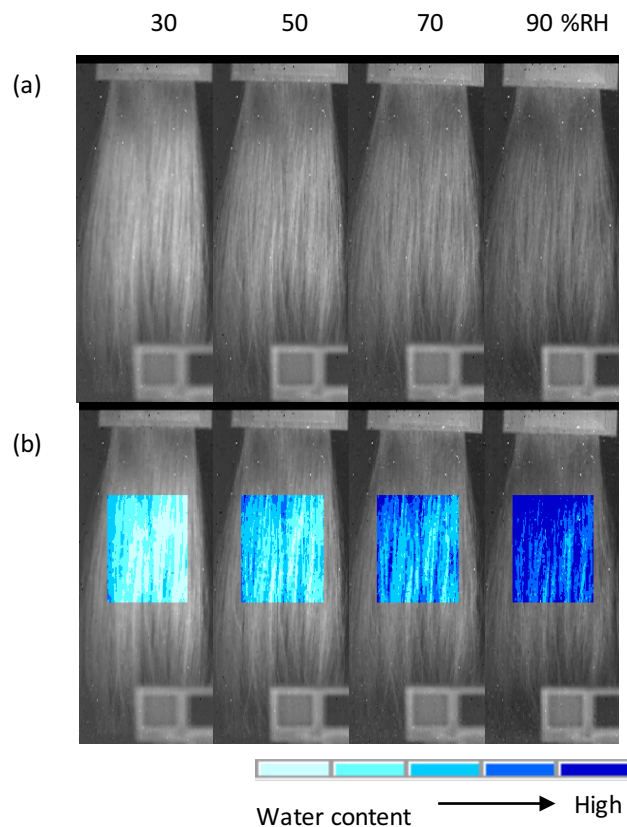


図 5-31. 相対湿度 30, 50, 70, 90 % 環境下での毛髪の 1920 nm の近赤外分光画像。
(a) 1920 nm の分光画像，(b) ROI 領域を擬似カラー画像に置き換え．

図 5-32 には，各相対湿度環境下での毛髪水分量を，1920 nm の OH 基の近赤外分光画像の ROI 領域の平均輝度値（図 5-32(a)）及び，既存手法の電気抵抗値（図 5-32(b)）の数値で比較した．既存手法（図 5-32(b)）と同様に，本近赤外分光画像からの数値変化（図 5-32(a)）においても，相対湿度の増加に伴う 1920 nm の近赤外分光画像の輝度値の低下，すなわち水分量の増加を確認した．

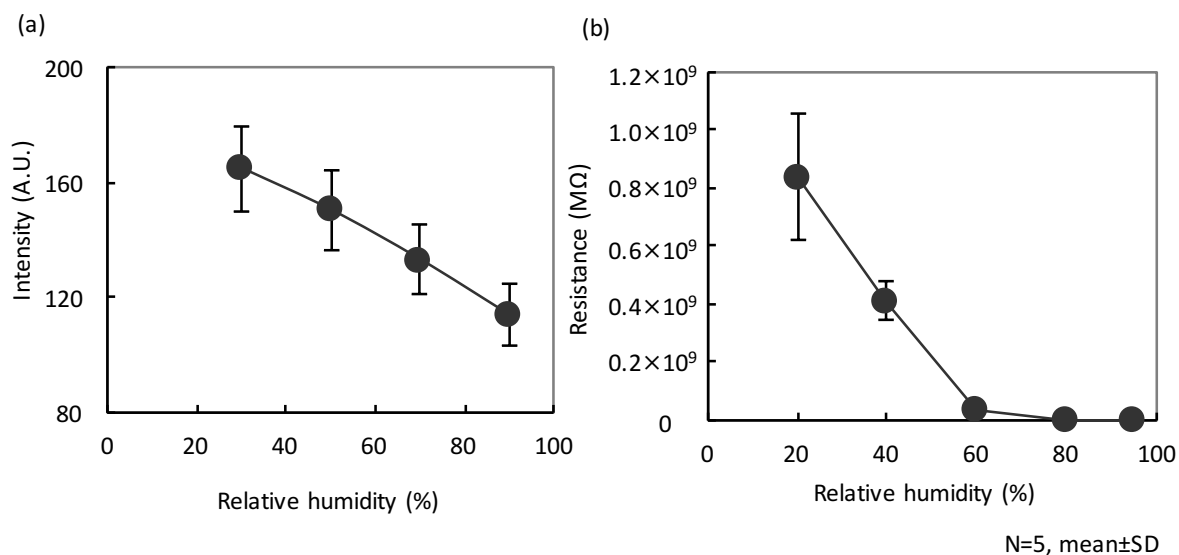


図5-32. 相対湿度 30, 50, 70, 90% 環境下での毛髪水分量の変化.
 (a) 1920 nm の近赤外分光画像の ROI 領域の平均輝度値, (b) 電気抵抗値.

さらに、皮膚と同様に、毛髪についても保水成分の効果評価にも活用可能であることを示すデータも取得した。保水成分の効果評価への活用は、美容領域においてニーズのあるアプリケーションである。一例として、ヘアケア製品に配合されている保水成分であるソルビトールを評価した。図 5-33 には、毛髪の近赤外拡散反射スペクトル、及び、水・ソルビトールの近赤外透過反射スペクトルを示した。1460 nm の OH 基のバンド付近には、ソルビトールの吸収の一部も重なるが、1920 nm の OH 基のバンド付近には重ならなかった。これより、1920 nm の OH 基の近赤外分光画像を用いることにより、保水成分の吸収バンドに影響されずに毛髪の水分量を評価できると考えられた。

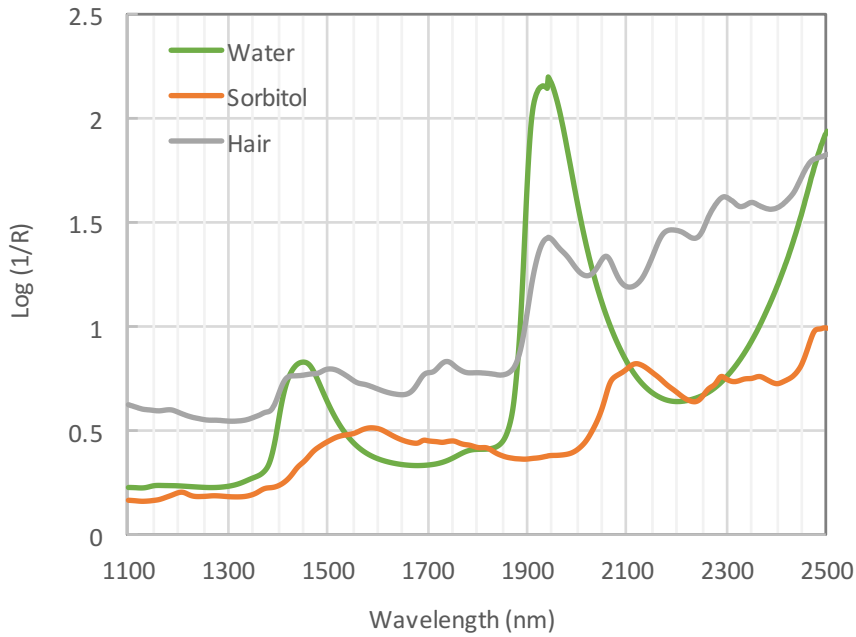


図 5-33. 毛髪近赤外拡散反射スペクトル, 及び, 水・ソルビトールの近赤外透過反射スペクトル.

図 5-34 には, 毛髪をソルビトール水溶液に浸して取り出し, 表面の余剰な水分を除去した後に実験室内に放置した後の毛髪水分量の変化を疑似カラー画像で示した. 本実験には, 図 5-30(b) の実験用毛束を用いた. 7%(w/w) ソルビトール水溶液に浸漬した毛束では, 水に浸漬した毛束に比べて, 経時での水分量の減少は緩やかであった. これは, ソルビトールの保水効果を示すものであると考えられた. このように, 毛髪を対象とした場合においても, 保水効果を疑似カラー画像で評価することができた.

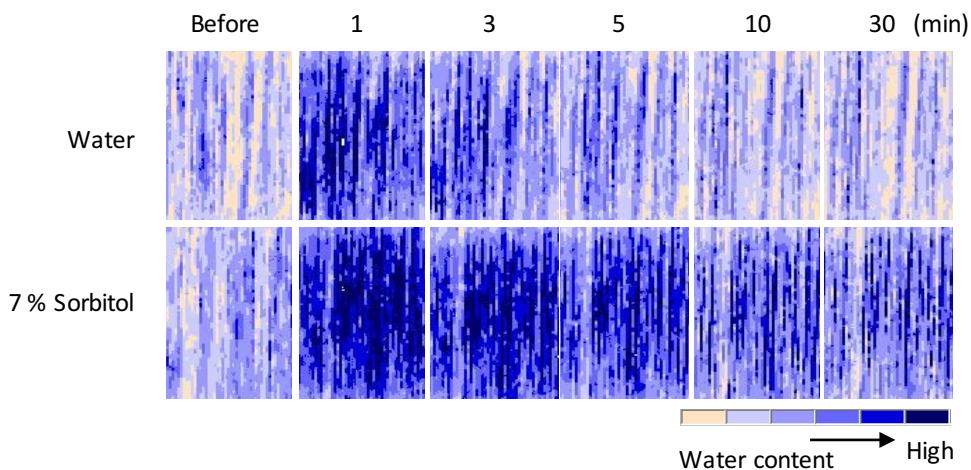


図 5-34. 水・ソルビトール水溶液処理後の毛髪 1920 nm の水分疑似カラー画像.

図 5-35 には, 水, 及び, ソルビトール水溶液で処理した毛髪水分量の変化を 1920 nm

の OH 基の近赤外分光画像の輝度値の変化で示した。図 5-35(b) に示した既存の電気抵抗値測定と同様に，近赤外分光画像を用いた場合においても，数値での保水効果の評価が可能であると考えられた。今まで，美容科学研究における毛髪的水分関係の評価は，構造解析 [137,138] や水分量の数値評価であった。本章で示した近赤外分光画像を用いた水分量評価系は，多くの製品が市販されているヘアケア製品の保水効果をビジュアルと数値の両方で示すことができる有益な評価法法になりうると考えられた。

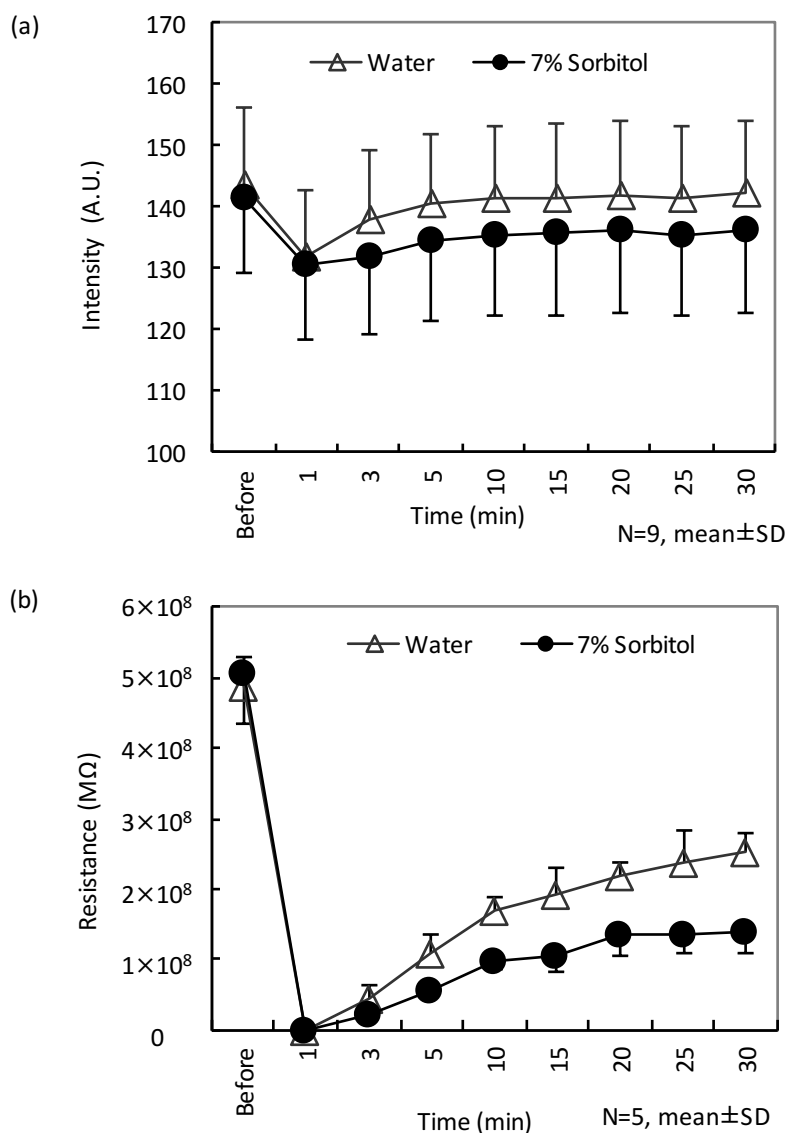


図 5-35. 水・ソルビトール水溶液処理後の毛髪水分量の変化。
(a) 1920 nm の近赤外分光画像における ROI 領域の平均輝度値，(b) 電気抵抗値。

本章で検討した近赤外分光画像を用いた水分量イメージングには，光測定ではよくある問題である“ターゲット部位に均一に光を照射できているか”についての課題が

残されている。本章では、運搬可能な安価で簡便なビデオレート水分量イメージングを目標としたため、全顔の表皮水分量イメージングで用いた照明系の筐体の顔を入れるための部分の開口部は大きく、また、ハロゲンランプはカメラと被写体に対して直角方向に 2 か所配置しているなど、完全に均一な拡散反射が顔に照射されているわけではない。筐体の切り出しは手作業で実施したため、mm 単位での位置合わせが実現できていない。そのために、顔を入れる開口部の水平位置における照度のばらつきも存在する。加えて、顔の表面には、鼻・目・頬骨・唇などの形状に由来する凹凸が存在するため、顔の各部位での輝度値のばらつきに対して影響する。すなわち、顎付近では、光量が低下することによる検出輝度値の低下の可能性も含まれるため、みかけ上水分量が多いと評価されるアーティファクトを含む可能性もある。さらに、頬骨上では、ある程度正反射光を軽減させている拡散照明系を用いても、全ての正反射光を除去できない故の、正反射光由来の輝度値の増加によるみかけ上の水分量低下の可能性もある。そのため、現在のセットアップでの水分量面分布の評価においては、ある変化過程における前後差などの動的変化での考察が必要だと考えている。現在、照度ムラを軽減すべく、照明球の素材、強度、開口部の微調整を施した 2 号機の製作を実施しているが、将来的には、光源とサンプル表面との距離の自動認識による光量の距離補正などと組み合わせることが、照度補正の問題を解決する 1 案になると考えている。

さらに、狭領域の表皮水分量イメージングでは、動的変化を観察する評価系を検討することで、今までとは異なる皮膚の反応を見出す可能性を提案した。すなわち、皮表のキメの皮丘や皮溝を観察できる画像において、外から滴下したモイスチャライザーの液滴のなじみパターンから、滴下した皮膚そのものの状態を評価しようとする試みである。同じモイスチャライザーを滴下しても、被験者ごとの皮膚状態の違いにより、滴下後のなじみパターンが異なった。これは、たとえ同じモイスチャライザーであっても、その皮膚上での動態が被験者により異なることを意味する。このような動的変化パターンを追跡することで評価できる皮膚の状態は、今までの定常状態での評価よりも、さらに精密に個人の違いを反映しうる可能性があるものと考えられる。現在、狭領域の表皮水分量イメージングについても、更なる改良を続けている。具体的には、LED 光を用いた光量アップと簡便システム化、正反射を減少させるためのクロスニコル偏光の導入、などである。

図 5-36 には、改良した狭領域の表皮水分量イメージングシステムの LED 照明配置を示した。近年市販化した近赤外領域の LED を用いることで、より小型で光量を調整可能な、ハンドリングが容易なシステムを構築できた。また、LED の多数配置により光量の増強も実現できたため、偏光フィルターを用いた正反射光の除去などの工夫も組み入れることができた。

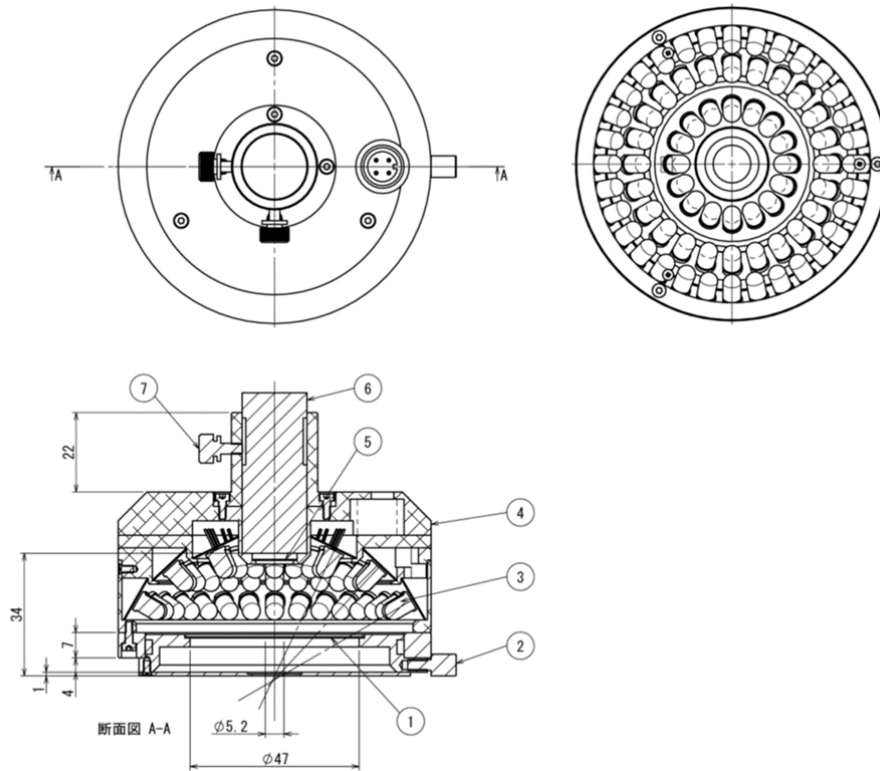


図 5-36. 狭領域の近赤外イメージング法の改良.
LED を照明に組み込み光量増強と偏光フィルタ挿入可能な光学系に改造.

図 5-37 には, LED 光を組み込んだ改良後の光学系を用いて皮膚を測定している様子を示した.

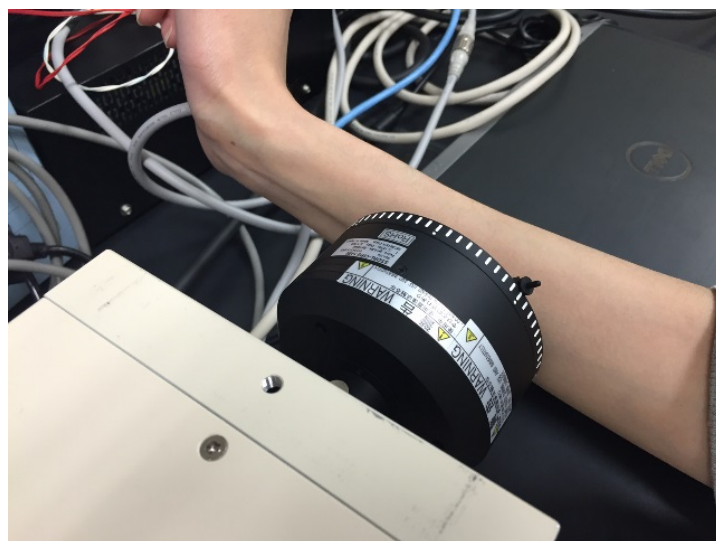


図 5-37. LED 照明を用いたヒト皮膚測定の様子.

図 5-38 には、本改造後のシステムを用いて、皮膚の 1460 nm の OH 基の近赤外分光画像を取得した画像例を示した。図 5-38(a) は素肌の 1460 nm の OH 基の近赤外分光画像，図 5-38(b) は水を滴下後の皮膚の画像である。両画像とも，偏光モード（直交）で撮影したため，照明由来の正反射光の写り込みが発生しない，よりマットな画像を取得可能であった。今後は，より操作性の良いシステムや解析ソフトを構築し，光学分野の研究者でない幅広い分野の人々が簡便に使用できるレベルまで簡便化したいと考えている。簡便化により，美容科学・皮膚科学分野における汎用機器として，さらに活用先が広がる可能性もあると考えている。

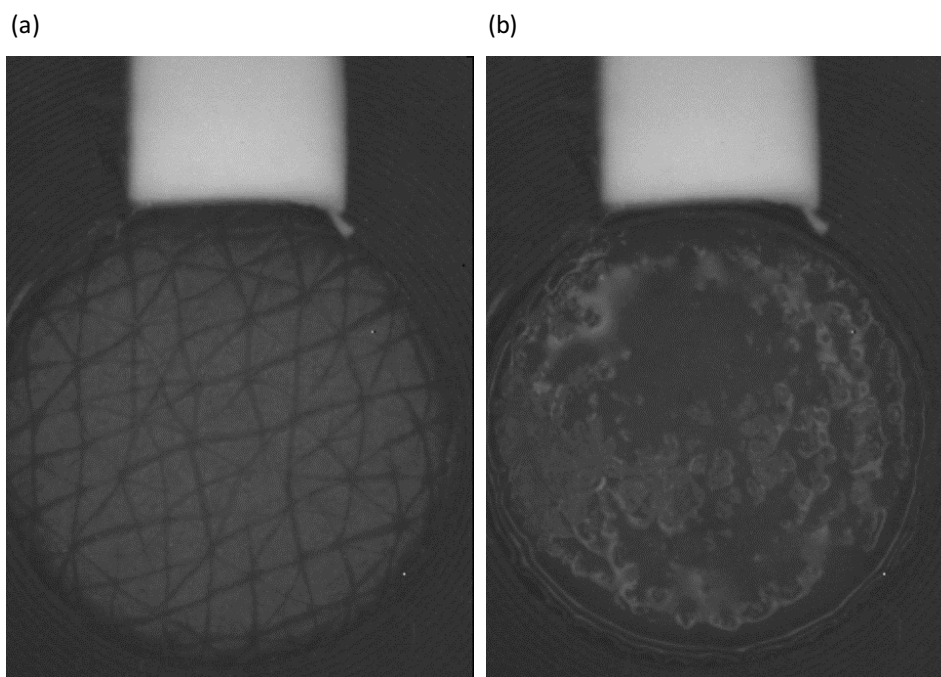


図 5-38. LED 照明を用いた 1450 nm の OH 基の近赤外分光画像。両画像とも偏光モード（直交）で撮影。 (a) 素肌, (b) 水を滴下後。

5.6 結論

本章では，近赤外分光イメージングにより表皮水分量面分布を評価した。表皮水分量の変化をより感度良く検出するために，モンテカルロ法による光伝播シミュレーションにより波長による測定深度を推定して，日常生活で水分量が変化する角層の情報量を多く含むように，1920 nm の OH 基のイメージングを選定した。

全顔の表皮水分量イメージングによりモイスチャライザー塗布後に皮膚の水分量が増加する様子を画像で評価できることから，本手法が皮膚外用剤開発時の評価ツールになりうることを示した。さらに，乾燥環境や季節による顔の部位による水分量面

分布の変化も捉えることができた。低湿度環境下においては、顔面の目の周辺の水分量が低下することを明らかにした。季節変化については、東京エリアにおいては、特に秋に目のまわりの水分量が低下しやすいことを明らかにした。本評価法は、皮膚だけでなく、毛髪的水分量イメージングとしても活用できることを示した。さらに、挟領域の表皮水分量イメージングにより、皮膚への水付加後に、液滴が広がり、皮膚へなじんでいく動的变化を評価することで、新たな肌質評価指標を提案できる可能性を示した。

このように、近赤外分光画像を用いて表皮水分量の面分布を評価することにより、市販の電気特性測定による数値化では困難であった水分量の面分布の評価が可能になった。また、本技術は非接触で測定できるため、塗布物存在下での経時変化の観察が可能であることから、皮膚外用剤の評価にも適すると考えられた。

第 6 章 結論

6.1 結論

本論文では，自発ラマン散乱分光法と近赤外分光法の 2 つの分光測定に基づき，表皮水分量の深さ分布と面分布の測定を通じて，皮膚の水分特性を評価した。

まず，第 3 章では，水分量の深さ分布を解明するために，自発ラマン散乱分光法を用いた皮膚の評価を行った。今まで明らかにされていなかった皮膚の水分量の深さ分布の部位差を明らかにし，角層厚の違いの簡易評価に活用できる指標として「みかけの角層厚」を提案した。以前，そして現在においても，美容科学領域では皮表から水を付加すると簡単に角層最下層の水分まで増加すると考えている人は多い。しかしながら，本研究により，皮表から塗布した水は簡単には角層の最下層まで到達しないことを解明した。コットンパットを用いて時間をかけて水和させて初めて，角層の下層の水分量も増加することを実証した。また，季節変化については，角層の中下層の水分量は変化しないことを明らかにした。このことより，日常生活において，水分量が増加するのは角層上層であると考えられた。角層のバリア機能のための存在意義を考えれば当然ではあるが，美容科学領域での角層の水分量に関するイメージとは大きく異なる知見であった。本研究の論文発表後に，多くの研究者が追試しており，現在では，本研究で得られた新知見は美容科学・皮膚科学領域において広く共有化される知見となった。

次に，第 4 章では，皮膚の近赤外拡散反射スペクトルの特徴を詳細に検討した。角層シートを用いて，水分量の変化に伴う 1460 nm と 1920 nm の OH 基のバンドの変化の挙動について精査し，2 次微分スペクトルにおける 1920 nm の OH 基のバンドのピーク強度やピーク波長が，水分量や水の束縛状態と関係することを示唆する結果を得た。近赤外拡散反射スペクトルから算出した皮膚の相対水分量は身体の部位によって異なったが，その違いは各測定部位の角層厚の違いに関係している可能性があることが示唆された。共焦点光学系を用いることができない近赤外分光法では，層状構造により水分量や存在状態も異なる皮膚の水分測定に対して，変化差分量での比較などの工夫が必要であることが示唆された。

最後に，第 5 章では，皮膚の近赤外拡散反射スペクトルの特徴を考慮した近赤外分光イメージングによる表皮水分量面分布の評価系を構築し，皮膚の表皮水分量面分布の動的変化を評価した。顔の中の部位によって皮膚状態が異なることは，人の感じる肌感覚や皮脂腺・汗腺の分布などから予想はされていた。しかしながら，水分量の面分布を画像で測定する非接触評価法がなかったために，今までは検証が出来ていなかった。本研究では，モンテカルロ法による光伝搬シミュレーションにより測定深度が浅いと推定された 1920 nm の OH 基のバンドを用いた表皮水分量イメージングによる顔面の水分量面分布の評価から，乾燥しやすい部位が目まわりであることを明らかにした。さらに，本手法を用いると，美容科学・皮膚科領域で使用される皮膚外用剤の水分保持効果の評価が可能であること，皮膚の水分量評価だけでなく毛髪の水分量評価にも活用可能であることが示された。また，挟領域の表皮水分量イメージン

グを用いて、皮膚の外から水を付加した後の液滴の皮膚へのなじむ過程の形状変化パターンを評価することにより、皮膚自体の状態の違いを評価できる可能性を示した。このように、近赤外分光イメージングを用いて表皮水分量の面分布を評価することにより、皮膚の電気特性評価による点測定では難しかった水分量の部位差の評価が可能になったことは大きいと考えられた。さらに、皮膚への水付加後に液滴が皮膚になじんでいく動的変化を評価することにより、新たな肌質評価指標の提案できる可能性を示すことが出来たことも、非接触評価法ならではの活用先の提案になったと考えられた。

表皮水分量の深さ分布や面分布については、*in vivo* で測定できる対照となるスタンダードな汎用的手法が存在しないことより、解明されていなかった研究領域であった。この課題に対して、本研究では分光手法という物理的手法を用いて、ヒト表皮の水分量を深さ分布と面分布の両方の視点から初めて包括的に評価したことで、美容科学・皮膚科学分野の研究の発展に貢献する評価法の提案と基礎知見を得ることができた。

6.2 今後の展望

本研究を通じて、表皮の水分特性を様々な視点で精査してきた中で、水分特性の変化は表皮に存在する水以外の状態、すなわち皮膚の各層におけるタンパクや脂質の状態に違いが出た結果として現れたものであるという認識を強く持った。表皮の水分特性のさらなる解明へは、水の存在する場の評価が必要であると考えられる。Bouwstraらは、角層の水分量の違いにより、水が角層の細胞のどの位置に蓄積されるのかについて、電子顕微鏡を用いて報告した [139]。電子顕微鏡での観察は、真空以外で観察するトライアルもされているが [140]、基本は組織を真空あるいは真空に近い状態で観察する必要がある。また、サンプル製作技術にノウハウと熟練が必要な電子顕微鏡を用いての研究においては、観察結果の正確さはサンプル作成者のスキルにも依存するため、気軽に様々な皮膚を比較するという研究が出来ないため、非侵襲手法での水の存在位置の測定も興味深い。そして、皮膚状態を考えるときは、どうしても皮膚最外層に存在する角層に注目してしまうが、最終的に状態の良い角層が出来ることが重要であり、角層が生成される過程の表皮の生細胞層における分化状態もキーとなる部分であろう [141,142]。筆者は、新たにこの角層ができる表皮の分化過程での細胞内モルフォロジーの変化について、非線形光学手法を用いて 3次元画像で評価している [143]。表皮の細胞の分化状態の良し悪しが角層の水分にどう関わっているのかについて、より理解を深めたいと考えている。今後は、本研究で取り扱わなかった他の測定技術 [144,145] も含めて、皮膚の水を非侵襲で測定可能な技術と皮膚科学研究との融合により、皮膚の水分保持のメカニズムをさらに解明していきたい。

謝辞

初めに、本論文の審査にあたり、ご多忙にもかかわらず、主査を引き受けて頂き丁寧なご指導とご助言を賜りました筑波大学 数理物質系 服部利明 教授に、心より感謝申し上げます。筑波大学 数理物質系 加納英明 准教授，同 安野嘉晃 講師，筑波大学 生命環境系 源川拓磨 助教，食品産業技術総合研究機構 食品研究部門 池羽田晶文 博士には、ご多忙にもかかわらず、副査を引き受けて頂き丁寧なご助言を賜りました。心より感謝申し上げます。

筑波大学 数理物質系 理工学域長 佐々木正洋 教授には、本学位審査の受け入れにあたり、お世話になりました。深く感謝致します。

産業技術総合研究所 電子光技術研究部門 有本英伸 博士には、光学と皮膚測定との融合研究を行うきっかけから今日に至るまで、企業としての共同研究の有無に関わらず良い研究連携をさせて頂きました。自分自身がオプティクスに関わるきっかけとなり、また、企業における厳しい研究環境においても学術視点で連携していただいたこと、深く感謝申し上げます。

関西学院大学 副学長 尾崎幸洋 教授には、分光光学に携わるきっかけを与えて頂き、そのおかげで研究を進める上で重要な人脈を広げることができました。また、企業での開発研究活動ではない学術的な研究活動を応援して頂きました。先生からのコメントにより、いつも前向きになれました。深く感謝致します。

本論文に記載されている研究は、主に資生堂グローバルイノベーションセンターにて行ったものです。株式会社資生堂の同僚の方々には多大な支援を頂きました。お礼申し上げます。

最後に、本論文の執筆にあたり、応援してくれた家族に心から感謝を伝えたいと思います。

2017 年 2 月 江川 麻里子

引用文献

- [1] 春山行夫, "東洋, 西洋における化粧の文化史", 皮膚と化粧品科学 (編集: 石原勝, 森川藤風), 南山堂, pp1-19 (1982).
- [2] <http://www.jcia.org/n/pub/info/a/>, "化粧の文化史", 日本化粧品工業連合会 (参照日: 2016年12月25日).
- [3] H Tagami, M Ohi, K Iwatsuki, Y Kanamaru, M Yamada, B Ichijo, "Evaluation of the skin surface hydration in vivo by electrical measurement," *J Invest Dermatol* **75(6)**, 500–507 (1980).
- [4] H Tagami, "Impedance measurements for evaluation of the hydration state of the skin surface," In: *Cutaneous Investigation in Health and Disease, Noninvasive Methods and Instrumentation* (JL Le've`que, ed.) Marcel Dekker: New York, pp79–111 (1989).
- [5] JL Le've`que, G Grove, J de Rigal, P Corcuff, AM Kligman, D Saint Leger, "Biophysical characterization of dry facial skin," *J Soc Cosmet Chem* **82**, 171–177 (1987).
- [6] K Asou, In: *Handbook of dermatology (3A)* (Y Yamamura, J Kuboki, eds.) Nakayama-Shoten Co. Ltd: Tokyo (1982).
- [7] ML Thomson, "Relative efficiency of pigment and horny layer thickness in protecting the skin of Europeans and Africans against solar ultraviolet radiation," *J Physiol* **127(2)**, 236–246 (1955).
- [8] RG Freeman, EG Cockerell, J Armstrong, JM Knox, "Sunlight as a factor influencing the thickness of epidermis," *J Invest Dermatol* **39(4)**, 295–298 (1962).
- [9] M Takahashi, H Watanabe, H Kumagai, Y Nakayama, "Physiological and morphological changes in facial skin with aging (II)," *J Soc Cosmet Chem* **23(1)**, 22–30 (1989).
- [10] J Lock-Andersen, J Therkildsen, F de Fine Olivarius, M Gniadecka, K Dahlstrøm, T Poulsen, et al., "Epidermal thickness, skin pigmentation and constitutive photosensitivity." *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **13**, 153–158 (1997).
- [11] J Koyama, I Horii, K Kawasaki, Y Nakayama, Y Morikawa, T Mitsui, H Kumagai, "Free amino acids of stratum corneum as a biochemical marker to evaluate dry skin," *J Soc Cosmet Chem* **35(4)**, 183–195 (1984).
- [12] I Horii, Y Nakayama, M Obata, H Tagami, "Stratum corneum hydration and amino acid content in xerotic skin," *Br J Dermatol* **121(5)**, 587–592 (1989).
- [13] S Motta, S Sesana, M Monti, A Giuliani, R Caputo, "Interlamellar lipid differences between normal and psoriatic stratum corneum," *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* **186**, 131–2 (1994).
- [14] H Farwanah, K Raith, RH Neubert, J Wohlrab, "Ceramide profiles of the uninvolved area in atopic dermatitis and psoriasis are comparable to those of healthy skin," *Arch Dermatol Res* **296(11)**, 514–521 (2005).

- [15] Z Ya-Xian, T Suetake, H Tagami, "Number of cell layers of the stratum corneum in normal skin relationship to the anatomical location on the body, age, sex and physical parameters," *Arch Dermatol Res* **291(10)**, 555–559 (1999).
- [16] S Marrakchi, HI Maibach, "Biophysical parameters of skin: map of human face, regional, and age-related differences," *Contact Dermatitis* **57(1)**, 28–34 (2007).
- [17] K Kikuchi, H Kobayashi, I Le Fur, E Tschachler, H Tagami, "The winter season affects more severely the facial skin than the forearm skin: comparative biophysical studies conducted in the same Japanese females in later summer and winter," *Exog Dermatol* **1(1)**, 32–38 (2002).
- [18] AV Rawlings, CR Harding, "Moisturization and skin barrier function," *Dermatologic therapy* **17(s1)**, 43-48 (2004).
- [19] M Stockdate, "Water diffusion coefficient versus water activity in stratum corneum: a correlation and its implications," *J Soc Cosmetic Chemists* **29**, 625–639 (1978).
- [20] T von Zglinicki, M Lindberg, GM Roomans, B Forslind, "Water and ion distribution profiles in human skin," *Acta Derm Venereol (Stockh)* **73**, 340–343 (1993).
- [21] RR Warner, MC Myers, DA Taylor, "Electron probe analysis of human skin: determination of the water concentration profile," *J Invest Dermatol* **90**, 218–224 (1988).
- [22] 高橋元次, 効能評価と皮膚測定, 株式会社じほう (2016).
- [23] M Egawa, Y Kohno, Y Kumano, "Oxidative effect of cigarette smoke on the human skin," *Int J Cosmet Sci* **21(2)**, 83–98 (1999).
- [24] M Egawa, M Oguri, T Kuwahara, M Takahashi, "Effect of exposure of human skin to a dry environment," *Skin Res Technol* **8(4)**, 212–218 (2002).
- [25] L Yang, M Egawa, M Akimoto, M Miyakawa, "An imaging colorimeter for noncontact skin color measurement," *Optical Review* **10(6)**, 554–561 (2003).
- [26] M Egawa, M Oguri, T Hirao, M Takahashi, M Miyakawa, "The evaluation of skin friction using a frictional feel analyzer," *Skin Res Technol* **8(1)**, 41–51 (2002).
- [27] 江川麻里子, "摩擦感テスターを用いた皮膚摩擦測定", *皮膚科診療プラクティス 14 機器を用いたスキンケアクリニック* (編集: 田上八朗, 宮地良樹, 瀧川雅浩), 文光堂, pp32–33 (2002).
- [28] M Egawa, T Hirao, M Takahashi, "Skin surface friction and sensory evaluation," *J Soc Cosmet Chem Jpn* **37(3)**, 187–194 (2003).
- [29] M Egawa, M Takahashi, "Skin friction evaluation by unidirectional stress using a friction tester (Chp 27)," In: *Handbook of NON-INVASE METHODS and the SKIN, 2nd Edition* (J Serup, G Jemec, eds.) Taylor & Francis Group, Book Division: Boca Raton, pp225–232 (2006).
- [30] Valery Tuchin, In: *Tissue Optics Light scattering methods and instruments for medical diagnosis, second edition*, SPIE press: Bellingham, Washington (2007).
- [31] Y Yasuno, VD Madjarova, S Makita, M Akiba, A Morosawa, C Chong, T Sakai, KP

Chan, M Itoh, T Yatagai, "Three-dimensional and high-speed swept-source optical coherence tomography for in vivo investigation of human anterior eye segments," *Optics Express* **13(26)**, 10652–10664 (2005).

[32] M Rajadhyaksha, M Grossman, D Esterowitz, RH Webb, RR Anderson, "In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin: melanin provides strong contrast," *J Invest Dermatol* **104(6)**, 946–952 (1995).

[33] V Rogiers, MP Derde, G Verleye, D Roseeuw, "Standardized conditions needed for skin surface hydration measurements," *Cosmet Toiletries* **105**, 73–82 (1990).

[34] M Loden, M Lindberg, "The influence of a single application of different moisturizers on the skin capacitance," *Acta Derm Venereol* **71(1)**, 79–82 (1991).

[35] J Serup, "A three-hour test for rapid comparison of effects of moisturizers and active constituents (Urea)," *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* **177**, 29–33 (1992).

[36] AO Barel, P Clarys, "In vitro calibration of the capacitance method (Corneometer CM825) and conductance method (Skicon-200) for the evaluation of the hydration state of the skin," *Skin Res Technol* **3(2)**, 107–113 (1997).

[37] E Berardesca, "EEMCO guidance for the assessment of stratum corneum hydration: electrical methods," *Skin Res Technol* **3(2)**, 126–132 (1997).

[38] P Clarys, AO Barel, B Gabard, "Non-invasive electrical measurement for the evaluation of the hydration state of the skin: Comparison between three usual equipments, the Corneometer, the Skicon and the Nova DPM," *Skin Res Technol* **5(1)**, 14–20 (1999).

[39] JW Flur, M Gloor, SL Lazzerini, P Kleesz, R Grieshaber, E Berardesca, "Comparative study of five instruments measuring stratum corneum hydration (Corneometer CM820 and CM 825, Skicon-200, Nova DPM 9003 and Dermalab). Part I. In vitro," *Skin Res Technol* **5(3)**, 161–170 (1999).

[40] JW Flur, M Gloor, SL Lazzerini et al., "Comparative study of five instruments measuring stratum corneum hydration (Corneometer CM820 and CM 825, Skicon-200, Nova DPM 9003 and Dermalab). Part II. In vivo," *Skin Res Technol* **5(3)**, 171–178 (1999).

[41] H Miettinen, G Johansson, S Gobom, G Swanbeck, "Studies on constituents of moisturizers: water-binding properties of urea and NaCl in aqueous solutions," *Skin Pharmacol Physiol* **12(6)**, 344–351 (1999).

[42] Rim JH, Jo SJ, Park JY, Park BD, Youn JI, "Electrical measurement of moisturizing effect on skin hydration and barrier function in psoriasis patients," *Clin Exp Dermatol* **30(4)**, 409–413 (2005).

[43] M Loden, "Urea as a moisturizing and barrier-enhancing ingredient," In: *Skin moisturization, 2nd edn* (AV Rawlings, JJ Leyden, eds.) Informa Plc: London, UK, pp335–346 (2009).

[44] 江川麻里子・高橋元次, "保湿に関する評価法", *老化防止・美白・保湿相互メカニズムと機能性化粧品 第3編 第3章* (監修:鈴木正人), シーエムシー出版, pp162-180 (2001).

[45] 高橋元次・江川麻里子, "乾燥と保湿の評価法", *アンチ・エイジングシリーズ 2*

皮膚の抗老化最前線 (編集: 有限会社ブッカーズ), 株式会社エヌ・ティー・エス, pp114-137 (2006).

[46] PJ Caspers, GW Lucassen, R Wolthuis, HA Bruining, GJ Puppels, "In vitro and in vivo Raman spectroscopy of human skin," *Biospectroscopy* **4**, S31-S40 (1998).

[47] PJ Caspers, GW Lucassen, HA Bruining, GJ Puppels, "Automated depth-scanning confocal Raman microspectrometer for rapid in vivo determination of water concentration profiles in human skin," *J Raman Spectrosc* **31(8/9)**, 813-818 (2000).

[48] PJ Caspers, GW Lucassen, EA Carter, HA Bruining, GJ Puppels, "In vivo confocal Raman microspectroscopy of the skin: noninvasive determination of molecular concentration profiles," *J Invest Dermatol* **116(3)**, 434-442 (2001).

[49] PJ Caspers, AC Williams, EA Carter, HGM Edwards, BW Barry, HA Bruining, GJ Puppels, "Monitoring the penetration enhancer dimethyl sulfoxide in human stratum corneum in vivo by confocal Raman spectroscopy," *Pharm Res* **19(10)**, 1577-1580 (2002).

[50] 濱口宏夫・岩田耕一, ラマン分光法, 分光法シリーズ 1 (日本分光学会), 講談社 (2015).

[51] M Egawa, T Hirao, M Takahashi, "In vivo estimation of stratum corneum thickness from water concentration profiles using confocal Raman spectroscopy," *Acta Derm Venerol* **87(1)**, 4-8 (2007).

[52] M Egawa, H Tagami, "Comparison of the depth profiles of water and water-binding substances in the stratum corneum determined in vivo by Raman spectroscopy between the cheek and volar forearm skin: effects of age, seasonal changes, and artificial forced hydration," *Br J Dermatol* **158(2)**, 251-260 (2008).

[53] M Egawa and T Kajikawa, "Change in the depth profile of water in the stratum corneum treated with water," *Skin Res Technol* **15(2)**, 242-249 (2009).

[54] 江川麻里子, "角層成分の深さ分布の測定 -ラマン分光法の最新知見-", *日本化粧品学会誌* **33(3)**, 191-197 (2009).

[55] M Egawa, T Yamamoto, K Sakamoto, N Kunizawa, H Tagami, T Hirao, T Terui, "In vivo characterization of the structure and components of lesional psoriatic skin from the observation with Raman spectroscopy and optical coherence tomography," *J Dermatol Sci* **57(1)**, 66-69 (2010).

[56] M Förster, MA Bolzinger, G Montagnac, S Briançon, "Confocal Raman microspectroscopy of the skin," *European Journal of Dermatology* **21(6)**, 851-863 (2012).

[57] M Ashtikar, C Matthäus, M Schmitt, C Krafft, A Fahr, J Popp, "Non-invasive depth profile imaging of the stratum corneum using confocal Raman microscopy: first insights into the method" *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **50(5)**, 601-608 (2013).

[58] E Boireau-Adamezyk, A Baillet-Guffroy, GN Stamatias, "Age-dependent changes in stratum corneum barrier function," *Skin Res Technol* **20(4)**, 409-415 (2014).

[59] C Eklouh-Molinier, V Gaydou, E Froigneux, P Barlier, V Couturaud, M Manfait, O Piot, "In vivo confocal Raman microspectroscopy of the human skin: highlighting of spectral

markers associated to aging via a research of correlation between Raman and biometric mechanical measurements," *Analytical and bioanalytical chemistry* **407(27)**, 8363–8372 (2015).

[60] WFW Southwood, "The thickness of the skin," *Plast ReconstrSurgery* **15(5)**, 423–429 (1955).

[61] KA Holbrook, GF Odland, "Regional differences in the thickness (cell layers) of the human stratum corneum: an ultrastructural analysis," *J Invest Dermatol* **62(4)**, 415–422 (1974).

[62] P Therkildsen, M Hædersdal, J Lock-Andersen, F de Fine Olivarius, T Poulsen, HC Wulf, "Epidermal thickness measured by light microscopy: a methodological study," *Skin Res Technol* **4(4)**, 174–179 (1998).

[63] J Sandby-Möller, T Poulsen, HC Wulf, "Epidermal thickness at different body sites: relationship to age, gender, pigmentation, blood content, skin type and smoking habits," *Acta Derm Venereol* **83(6)**, 410–413 (2003).

[64] S Nouvearu-Ricard, M Monot, P Bastien, O de Lacharrière, "In vivo epidermal thickness measurement: ultrasound vs. confocal imaging," *Skin Res Technol* **10(2)**, 136–140 (2004).

[65] A Pagnoni, A Knuettel, P Welker, M Rist, T Stoudemayer, L Kolbe, I Sadiq, AM Kligman, "Optical coherence tomography in dermatology," *Skin Res Technol* **5(2)**, 83–87 (1999).

[66] J Welzel, M Bruhns, HH Wolff, "Optical coherence tomography in contact dermatitis and psoriasis," *Arch Dermatol Res* **295(2)**, 50–55 (2003).

[67] L Chrit, P Bastien, GD Sockalingum, D Batisse, F Leroy, M Manfait, C Hadjur, "An in vivo randomized study of human skin moisturization by a new confocal Raman fiber-optic microprobe: assessment of a glycerol-based hydration cream," *Skin Pharmacol Physiol* **19(4)**, 207–215 (2006).

[68] L Chrit, P Bastien, B Biatry, JT Simonnet, A Potter, AM Minondo, F Flament, R Bazin, GD Sockalingum, F Leroy, M Manfait, C Hadjur, "In vitro and in vivo confocal Raman study of human skin hydration: assessment of a new moisturizing agent, pMPC," *Biopolymers* **85(4)**, 359–369 (2007).

[69] PDA Pudney, M Melot, PJ Caspers, A van der Pol, GJ Puppels, "An in vivo confocal Raman study of the delivery of trans-retinol to the skin," *Appl Spectrosc* **61(8)**, 804–811 (2007).

[70] JM Crowther, A Sieg, P Blenkiron, C Marcott, PJ Matts, JR Kaczvinsky, AV Rawlings, "Measuring the effects of topical moisturizers on changes in stratum corneum thickness, water gradients and hydration in vivo," *Br J Dermatol* **159(3)**, 567–577 (2008).

[71] GN Stamatias, J de Sterke, M Hauser, O von Stetten, A van der Pol, "Lipid uptake and skin occlusion following topical application of oils and adult and infant skin," *J Dermatol Sci* **50(2)**, 135–142 (2008).

[72] M Egawa, Y Sato, "In vivo evaluation of two forms of urea in the skin by Raman spectroscopy after application of urea-containing cream," *Skin Res Technol* **21(3)**, 259–263

(2015).

[73] S Kezic, PM Kemperman, ES Koster, CM de Jongh, HB Thio, LE Campbell, AD Irvine, WH McLean, GJ Puppels, PJ Caspers, "Loss-of-function mutations in the filaggrin gene lead to reduced level of natural moisturizing factor in the stratum corneum," *J Invest Dermatol* **128**(8), 2117–2119 (2008).

[74] 平尾哲二・江川麻里子・山下豊信, "皮膚測定技術の最新動向", *表面科学* **35**(1), 17–22 (2013).

[75] 山下豊信・江川麻里子・原祐輔, "先端の光学技術を駆使した新しい皮膚の評価法", *オレオサイエンス* **15**(1), 17–23 (2015).

[76] M Egawa, H Iwaki, "In vivo evaluation of protective capacity of sunscreen by monitoring urocanic acid isomer in the stratum corneum using Raman spectroscopy," *Skin Res Technol* **14**(4), 410–417 (2008).

[77] M Egawa, J Nomura, H Iwaki, "The evaluation of the amount of cis-, trans-urocanic acid in the stratum corneum by Raman spectroscopy," *Photochem Photobiol Sci* **9**(5), 730–733 (2010).

[78] HP Baden, MA Pathak, "The metabolism and function of urocanic acid in skin," *J Invest Dermatol* **48**(1), 11–17 (1967).

[79] G Kavanagh, J Crosby, M Norval, "Urocanic acid isomers in human skin: analysis of site variation," *Br J Dermatol* **133**(5), 728–731 (1995).

[80] A Kammeyer, S Pavel, SS Asghar, JD Bos, BM Teunissen, "Prolonged increase of cis urocanic acid levels in human skin and urine after single total-body ultraviolet exposures," *Photochem Photobiol* **65**(3), 593–598 (1997).

[81] F de Fine Olivarius, HC Wulf, P Therkildsen, T Poulsen, J Crosby, M Norval, "Urocanic acid isomers: relation to body site, pigmentation, stratum corneum thickness and photosensitivity," *Arch Dermatol Res* **289**(9), 501–505 (1997).

[82] EM Gil, TH Kim, "UV-induced immune suppression and sunscreen," *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **16**(3), 101–110 (2000).

[83] CT Janse'n, K Lammintausta, P Pasanen, K Neuvonen, E Varjonen, K Kalimo, P Ayräs, "A non-invasive chamber sampling technique for HPLC analysis of human epidermal urocanic acid isomers," *Acta Dermatol Venereol(Stockh)* **71**, 143–145 (1991).

[84] S Sato, Y Maruyama, H Kamata, S Watanabe, R Kita, N Shinyashiki, S Yagihara, M Egawa, N Kunizawa, "Evaluation of Water Measurement Techniques for Human Skin by Dielectric Spectroscopy and Confocal Raman Spectroscopy," *Trans Mat Res Soc Jpn* **40**(2), 133–136 (2015).

[85] Y Ozaki, "Application in chemistry," In: *Near-infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications* (HW Siesler, Y Ozaki, S Kawata, HM Heise, eds.), Wiley-VCH: Weinheim, Germany, pp179–211 (2002).

[86] P Geladi, D MacDougall, H Martens, "Linearization and scatter-correction for near-infrared reflectance spectra of meat," *Appl Spectrosc* **39**(3), 491–500 (1985).

- [87] P Williams, K Norris, "Near-Infrared Technology in agricultural and food industries", In: *Agricultural and Food Industries*, Amer Assn of Cereal Chemists, St. Paul, Minn, p330 (1987).
- [88] HM Heise, "Clinical Applications of Near- and Mid-Infrared Spectroscopy," In: *Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials* (HU Gremlich and B Yan, eds.), Marcel Dekker: NY (2000).
- [89] Y Hoshi, M Tamura, "Dynamic multichannel near-infrared optical imaging of human brain activity," *J Appl Physiol* **75(4)**, 1842–1846 (1993).
- [90] RJ McNichols, CL Cote', "Optical glucose sensing in biological fluids: an overview," *J Biomed Opt* **5(1)**, 5–16 (2000).
- [91] H Arimoto, M Tarumi, Y Yamada, "Temperature-insensitive measurement of glucose concentration based on near infrared spectroscopy and partial least squares analysis," *Opt Rev* **10(2)**, 74–76 (2003).
- [92] H Arimoto, M Tarumi, Y Yamada, "Instrumental requirements for non-invasive blood glucose measurement using NIR spectroscopy," *Opt Rev* **10(3)**, 161–165 (2003).
- [93] K Iino, K Maruo, H Arimoto, K Hyodo, T Nakatani, Y Yamada, "Monte carlo simulation of near infrared reflectance spectroscopy in the wavelength range from 1000nm to 1920 nm," *Opt Rev* **10(6)**, 600–606 (2003).
- [94] H Zeng, M Petek, MT Zorman, A McWilliams, B Palcic, S Lam, "Integrated endoscopy system for simultaneous imaging and spectroscopy for early lung cancer detection," *Opt Let* **29(6)**, 587–589 (2004).
- [95] Y Ozaki, T Miura, K Sakurai, T Matsunaga, "Nondestructive analysis of water structure and content in animal tissues by FT-NIR spectroscopy with light-fiber optics. Part I: Human hair," *Appl Spectrosc* **46(5)**, 875–878 (1992).
- [96] Y Miyamae, Y Yamakawa, Y Ozaki, "Evaluation of physical properties of human hair by diffuse reflectance near-infrared spectroscopy," *Appl Spectrosc* **61(2)**, 212–217 (2007).
- [97] M Takeyama, R Kikuchi, M Kumagai, T Amano, T Ozeki, K Fujiwara, N Ogawa, "Measurement of the water vaporization enthalpy in hair with portable near infrared spectrometer," *Bunseki Kagaku* **58(8)**, 667–673 (2009).
- [98] M Egawa, T Fukuhara, M Takahashi, Y Ozaki, "Determing water content in human nails with a portable near-infrared spectrometer," *Appl Spectrosc* **57(4)**, 473–478 (2003).
- [99] M Egawa, Y Ozaki, M Takahashi, "In vivo measurement of water content of the fingernail and its seasonal change," *Skin Res Technol* **12(2)**, 126–32 (2006).
- [100] PL Walling, JM Dabney, "Moisture in skin by near-infrared reflectance spectroscopy," *J Soc Cosmet Chem* **40(3)**, 151–171 (1989).
- [101] J Rigal, MJ Losch, R Bazin, C Camus, C Sturelle, V Descamps, JL Le'veque, "Near-infrared spectroscopy: a new approach to the characterization for dry skin," *J Soc Cosmet Chem* **44**, 197–209 (1993).
- [102] KA Martin, "Direct measurement of moisture in skin by NIR spectroscopy," *J Soc*

Cosmet Chem **44**, 249–261 (1993).

[103] KA Martin, "In vivo measurements of water in skin by near-infrared reflectance," *Appl Spectrosc* **52(7)**, 1001–1007 (1998).

[104] JW Wiechers, M Snieder, NAG Dekker, WG Hansen, "Factors influencing skin moisturization signal using near-infrared spectroscopy," *IFSCC Magazine* **6(1)**, 19–26 (2003).

[105] YA Woo, JW Ahn, K Chun, HY Kim, "Development of a method for the determination of human skin moisture using a portable near-infrared system," *Anal Chem* **73(20)**, 4964–4971 (2001).

[106] W Chen, R Liu, K Xu, RK Wang, "Influence of contact state on NIR diffuse reflectance spectroscopy in vivo," *J Phys D Appl Phys* **38(15)**, 2691–2695 (2005).

[107] WF Cheong, SA Prahl, AJ Welch, "A review of the optical properties of biological tissues," *IEEE J Quant Electron* **26**, 2166–2185 (1990).

[108] TL Troy, SN Thennadil, "Optical properties of human skin in the near infrared wavelength range of 1000 to 2200 nm," *J Biomed Opt* **6(2)**, 167–176 (2001).

[109] H Arimoto, M Egawa, "Non-contact skin moisture measurement based on near-infrared spectroscopy," *Applied Spectrosc* **58(12)**, 1439–1446 (2004).

[110] H Arimoto, M Egawa, Yukio Yamada, "Depth profile of diffuse reflectance near-infrared spectroscopy for measurement of water content in skin," *Skin Res Tech* **11(1)**, 27–35 (2005).

[111] M Egawa, H Arimoto, T Hirao, M Takahashi, Y Ozaki, "Regional difference of water content in human skin studied by diffuse-reflectance near-infrared spectroscopy – consideration of measurement depth–," *Appl Spectrosc* **60(1)**, 24–28 (2006).

[112] 尾崎幸洋, 近赤外分光法, 分光法シリーズ 2 (日本分光学会), 講談社 (2015).

[113] M Egawa, "In vivo simultaneous measurement of urea and water in the human stratum corneum by diffuse-reflectance near-infrared spectroscopy," *Skin Res Technol* **15(2)**, 195–199 (2009).

[114] K O'goshi, "Optical measurement of sebum excretion using opalescent film imprint. The Sebumeter," In: *Handbook of Non-Invasive Methods and the Skin*, CRC press, pp841–846 (2006).

[115] EM Attas, TPB Schattka, MG Sowa, H Mantsch, SL Zhang, "Long-wavelength near-infrared spectroscopic imaging for in vivo skin hydration measurements," *Vibrat Spectrosc* **28(1)**, 37–43 (2002).

[116] EM Attas, MG Sowa, TB Posthumus, BJ Schattka, HH Mantsch, SL Zhang, "Near-IR spectroscopic imaging for skin hydration: The long and the short of it," *Biopolymers* **67(2)**, 96–106 (2002).

[117] SL Zhang, CL Meyers, K Subramanian, TM Hancewicz, "Near infrared imaging for measuring and visualizing skin hydration. A comparison with visual assessment and electrical methods," *J Biomed Opt* **10(3)**, 031107 (2005).

- [118] H Iwasaki, K Miyazawa, S Nakauchi, "Visualization for moisture of human face by spectroscopic imaging using two near-infrared bands," *Proc Optics Japan*, 40–41 (2005).
- [119] H Iwasaki, K Miyazawa, S Nakauchi, "Visualization of the human face skin moisturizing ability by spectroscopic imaging using two near-infrared bands," In: *Electronic Imaging 2006. International Society for Optics and Photonics*, pp606203-606208 (2006).
- [120] H Arimoto, "Estimation of water content distribution in the skin using dualband polarization imaging," *Skin Res Technol* **13(1)**, 49–54 (2007).
- [121] K Kobayashi, Y Matsui, Y Maebuchi, T Toyota, S Nakauchi, "Near infrared spectroscopy and hyperspectral imaging for prediction and visualization of fat and fatty acid content in intact raw beef cuts," *J Near Infrared Spectroscopy* **18(5)**, 301–315 (2010).
- [122] 猪口康博・森大樹・右田真樹・永井陽一・稲田博史・藤井慧・石塚貴司・秋田勝史, "低ノイズ・広帯域の近赤外 2次元センサ開発", *SEI テクニカルレビュー* **182**, 103–106 (2013).
- [123] H Arimoto, M Egawa, "Imaging wavelength and light penetration depth for water content distribution measurement of skin," *Skin Res Technol* **21(1)**, 94–100 (2015).
- [124] M Egawa, M Yanai, K Kikuchi, Y Masuda, "Extended range near-infrared imaging of water and oil in facial skin," *Appl Spectrosc* **65(8)**, 924–930 (2011).
- [125] 江川麻里子, "皮膚の水分油分の高感度可視化", *日本医用画像工学会* **30 (特集号)**, 17–21 (2012).
- [126] 江川麻里子, "高感度近赤外カメラシステムによる水分分布の可視化", *日本産業皮膚衛生協会会誌* **2014-8**, 31-35 (2014).
- [127] M Egawa, M Yanai, H Arimoto, M Hagihara, K Kikuchi, Y Masuda, K Nakamura, T Hirao, "Visualization of water distribution in facial skin using novel high-sensitive water imaging systems," *IFSCC Magazine* **17(1)**, 3–6 (2014).
- [128] 勝田雄治・江川麻里子, "皮膚のバリア機能と水分量の可視化", *色材協会誌* **88(12)**, 412–415 (2015).
- [129] H Arimoto, M Yanai, M Egawa, "Analysis of absorption and spreading of moisturizer on the microscopic region of the skin surface with near-infrared imaging," *Skin Res Technol* **22(4)**, 505–512 (2016).
- [130] 奥野俊明・平野正晃・中西哲也・大西正志, "高非線形光ファイバおよびその応用技術", *SEI テクニカルレビュー* **168**, 48–54 (2006).
- [131] M Egawa, M Yanai, N Maruyama, Y Fukaya, T Hirao, "Visualization of water distribution in the facial epidermal layers of skin using high-sensitivity near-infrared (NIR) imaging," *Appl Spectrosc* **69(4)**, 481–487 (2015).
- [132] WJ Cunliffe, S Shuster, "The rate of sebum excretion in man," *Br J Dermatol* **81(9)**, 697–704 (1969).
- [133] H Kumagaya, H Watanabe, T Kozu, H Noguchi, M Takahashi, "Physiological and

Morphological Changes in Facial Skin with Aging (I) -Age-related changes in the skin of Japanese women-," *J Soc Cosmet Chem Japan* **23(1)**, 9–21 (1989).

[134] W Pratchyapruit, K Kikuchi, P Gritiyarangasan, S Aiba, H Tagami, "Functional analyses of the eyelid skin constituting the most soft and smooth area on the face: contribution of its remarkably large superficial corneocytes to effective water-holding capacity of the stratum corneum," *Skin Res Technol* **13(2)**, 169–175 (2007).

[135] Y Kawajiri, S Suyama, Y Ohara, H Yamada, K Morosawa, K Yamatmoto, "Physiological Properties of Infants' Skin I," *J Pediat Dermatol* **12(1)**, 77–81 (1993).

[136] M Egawa, M Hagihara, M Yanai, "Near-infrared imaging of water in human hair," *Skin Res Technol* **19(1)**, 35–41 (2013).

[137] F Briki, B Busson, L Kreplak, P Dumas, J Doucet, "Exploring a biological tissue from atomic to microscopic scale using synchrotron radiation: Example of hair," *J Cellular and Molecular Biology* **46(5)**, 1005–1016 (2000).

[138] N Ohta, T Oka, K Inoue, N Yagi, S Kato, I Hatta, "Structural analysis of cell membrane complex of hair fiber by micro-beam X-ray diffraction," *J Appl Cryst* **38(2)**, 274–279 (2005).

[139] JA Bouwstra, A de Graaff, GS Gooris, J Nijse, JW Wiechers, AC van Aelst, "Water distribution and related morphology in human stratum corneum at different hydration levels," *J Invest Dermatol* **120(5)**, 750–758 (2003).

[140] I Iwai, H Han, L den Hollander, S Svensson, L Ofverstedt, J Anwar, J Brewer, M Bloksgaard, A Laloef, D Nosek, S Masich, LA Bagatolli, U Skoglund, L Norlén, "The human skin barrier is organized as stacked bilayers of fully extended ceramides with cholesterol molecules associated with the ceramide sphingoid moiety," *J Invest Dermatol* **132(9)**, 2215–2225 (2012).

[141] J Nakanishi, M Yamamoto, J Koyama, J Sato, T Hibino, "Keratinocytes synthesize enteropeptidase and multiple forms of trypsinogen during terminal differentiation," *J Invest Dermatol* **130(4)**, 944–952 (2010).

[142] M Yamamoto-Tanaka, T Makino, A Motoyama, M Miyai, R Tsuboi, T Hibino, "Multiple pathways are involved in DNA degradation during keratinocyte terminal differentiation," *Cell Death Dis* **5**, e1181 (2014).

[143] M Egawa, K Tokunaga, J Hosoi, S Iwanaga, Y Ozeki, "In situ visualization of intracellular morphology of epidermal cells using stimulated Raman scattering microscopy," *J Biomed Opt*, **21(8)**, 086017 (2016).

[144] B Querleux, "Nuclear magnetic resonance (NMR) examination of the epidermis in vivo," In: *Handbook of non-invasive methods and the skin* (J Serup, GBE Jemec, eds.), CRC Press: Boca Raton, pp133–139 (1995).

[145] E Pickwell, BE Cole, AJ Fitzgerald, M Pepper, VP Wallace, "In vivo study of human skin using pulsed terahertz radiation," *Phys Med Biol* **49(9)**, 1595–1607 (2004).

付録

本論文に関わる査読付き学術論文

1. Mariko Egawa, Hidenobu Arimoto, Tetsuji Hirao, Motoji Takahashi, Yukiriho Ozaki, "Regional difference of water content in human skin studied by diffuse-reflectance near-infrared spectroscopy: consideration of measurement depth," *Appl Spectrosc* **60(1)**, 24–28 (2006).
2. Mariko Egawa, Tetsuji Hirao, Motoji Takahashi, "In vivo estimation of stratum corneum thickness from water concentration profiles using confocal Raman spectroscopy," *Acta Dermatol Venerol* **87**, 4–8 (2007).
3. Mariko Egawa, Hachiro Tagami, "Comparison of the depth profiles of water and water-binding substances in the stratum corneum determined in vivo by Raman spectroscopy between the cheek and volar forearm skin: effects of age, seasonal changes, and artificial forced hydration," *Br J Dermatol* **158**, 251–260 (2008).
4. Mariko Egawa, "In vivo simultaneous measurement of urea and water in the human stratum corneum by diffuse-reflectance near-infrared spectroscopy," *Skin Res Technol* **15(2)**, 195–199 (2009).
5. Mariko Egawa, Tomoko Kajikawa, "Change in the depth profile of water in the stratum corneum treated with water," *Skin Res Technol* **15(2)**, 242–249 (2009).
6. Mariko Egawa, Takako Yamamoto, Kumiko Sakamoto, Naomi Kunizawa, Hachiro Tagami, Tetsuji Hirao, Tadashi Terui, "In vivo characterization of the structure and components of lesional psoriatic skin from the observation with Raman spectroscopy and optical coherence tomography," *J Dermatol Sci* **57**, 66–69 (2010).
7. Mariko Egawa, Motohiro Yanai, Kumiko Kikuchi, Yuji Masuda, "Extended range near-infrared imaging of water and oil in facial skin," *Appl Spectrosc* **65(8)**, 924–930 (2011).
8. Mariko Egawa, Fumihito Hagihara, Motohiro Yanai, "Near-infrared imaging of moisture in human hair," *Skin Res Technol* **19(1)**, 35–41 (2013).
9. Mariko Egawa, Motohiro Yanai, Hidenobu Arimoto, Motofumi Hagihara, Kumiko Kikuchi, Yuji Masuda, Koichi Nakamura, Tetsuji Hirao, "Visualization of water distribution in facial skin using novel high-sensitive water imaging systems," *IFSCC Magazine* **17(1)**, 3–6 (2014).
10. Hidenobu Arimoto, Mariko Egawa, "Imaging wavelength and light penetration depth for water content distribution measurement of skin," *Skin Res Technol* **21(1)**, 94–100 (2015).
11. Mariko Egawa, Yasuhiro Sato, "In vivo evaluation of two forms of urea in the skin by Raman spectroscopy after application of urea-containing cream," *Skin Res Technol* **21(3)**, 259–263 (2015).
12. Mariko Egawa, Motohiro Yanai, Nao Maruyama, Yukitaka Fukaya, Tetsuji Hirao, "Visualization of water distribution in the facial epidermal layers of skin using

high-sensitivity near-infrared (NIR) imaging," *Appl Spectrosc* **69(4)**, 481–487 (2015).

13. Hidenobu Arimoto, Motohiro Yanai, Mariko Egawa, "Analysis of absorption and spreading of moisturizer on the microscopic region of the skin surface with near-infrared imaging," *Skin Res Technol* **22(4)**, 505–512 (2016).

以上