

ヒト角層の保湿剤水溶液への浸漬時と乾燥時における角層構造の変化(8) Structural Changes of Human Stratum Corneum by Treating with the Moisturizer Aqueous Solutions in Wetting and Drying Processes (8)

豊島 亮祐^a, 村島 健司^a, 野々部 瑛^a, 大畑 哲也^a, 梶 あおい^a,
前田 航佑^a, 山田 武^a, 八田 一郎^b
Toyoshima Ryosuke^a, Kenji Murashima^a, Hikaru Nonobe^a, Tetsuya Ohata^a,
Aoi kaji^a, Kosuke Maeda^a, Takeshi Yamada^a, Ichiro Hatta^b

^a阪本薬品工業 (株) , ^b (公財) 名古屋産業科学研究所
^aSakamoto Yakuhin Kogyo Co., Ltd., ^bNISRI

我々は、化粧品保湿剤として用いられる多価アルコールや天然保湿因子 (NMF) について、皮膚角層への作用機構を解明するため検討を進めている。これまで、角層試料を多価アルコール水溶液に浸漬し、その後に乾燥させた際の角層細胞および細胞間脂質の構造の変化を X 線回折法で測定し、構造変化を解析している。その結果、グリセリン水溶液に浸漬した角層は、水のみ浸漬した角層と比較して細胞間脂質の短周期ラメラ構造 (SLS) や角層細胞内のソフトケラチン構造の収縮を抑制し、細胞間脂質の炭化水素の充填構造の保持時間が長くなることを確認しており、角層中の水分を保持する効果を有することを見出している。

本課題では、保湿剤の分子構造による影響を確認するため、NMF の尿素について、ソフトケラチンに由来する構造や SLS に及ぼす影響を解析した。その結果、尿素水溶液に浸漬した角層では、乾燥による SLS の収縮やソフトケラチン構造の収縮が水のみ浸漬した場合よりも抑制されることを確認した。これは、グリセリンを浸漬した場合と同様の傾向であり、尿素はグリセリンと同様に、角層中の水分を保持する効果を有することが示唆された。

キーワード： ヒト角層、細胞間脂質、多価アルコール、尿素、X 線回折

背景と研究目的：

化粧品や医薬品などの皮膚外用剤には、皮膚角層に水分を保つ目的で NMF の一種である尿素や多価アルコールのグリセリンが配合されている。これらの保湿剤は、いずれも分子中に極性基を有する化合物であり、尿素は分子中に 2 つのアミノ基を有し、グリセリンは分子中に 3 つの水酸基を有する。尿素とグリセリンは、いずれも角層中の水分と結合することにより保湿効果を発現するが、分子構造の違いや角層中での存在位置の違いなどから、保湿効果や作用機構が異なると考えられる。

グリセリンや尿素などの保湿に関する作用機構を解明するには、角層試料を保湿剤水溶液に浸漬した後の乾燥時における角層構造の変化を追跡し、角層内の水の動的な振舞いを把握することが重要と考える。これまでの課題 (2017A1559, 2017B1607) において、我々は BL19B2 や BL40B2 にて検出器に PILATUS 2M を用い、多価アルコールが角層構造に及ぼす影響について、短い時間間隔で測定を進めてきた。その結果、乾燥時における角層細胞内のソフトケラチンに由来する構造、細胞間脂質の SLS および炭化水素の充填構造の振舞いが、水とグリセリン水溶液で異なることを明らかにした[1]。

一方で、前課題 (2019B1720) において、尿素水溶液に浸漬した角層の内部構造の変化について測定し、グリセリン水溶液に浸漬した場合と同様に、乾燥によるソフトケラチン構造の収縮が抑制されることを確認した。さらに、炭化水素の充填構造に由来するピーク (0.37, 0.42 nm) は、乾燥過程において、水、グリセリン水溶液、尿素水溶液でそれぞれ異なる振舞いを示し、グリセリンと尿素で作用機構が異なる可能性が示唆された。しかし、測定時のビーム強度が不安定であったことや角層試料の部位差による影響で、ラメラ構造に及ぼす影響を十分に解析出来なかった。また、前課題で用いた角層は 1 種類のドナー由来であり、ソフトケラチン由来の構造や炭化水素の充填構造の影響についても普遍的な結果であるとは言えない。

そこで本課題では、BL40B2にてPILATUS 2Mを用い、異なるドナー由来の角層に対してグリセリン水溶液または尿素水溶液に浸漬し、乾燥時における変化を短い時間間隔でX線回折測定することで、角層細胞内のソフトケラチンに由来する構造、細胞間脂質のSLSおよび炭化水素鎖の充填構造に対する保湿剤の分子構造による影響を解析することとした。

実験：

ヒト腹部由来の角層（BIOPREDIC International社）を重量測定より水分量0 wt%に調製し、1 cm²に切り出したものを角層試料として用いた。浸漬する保湿剤の水溶液には、10 wt%グリセリン水溶液、10 wt%尿素水溶液を用い、比較対照は水とした。試料セルとして‘溶液セル’[2]を用い、PEEKフィルムで覆われた試料部にガラス製のろ紙を用いて角層試料を保持した。

X線回折測定は、溶液に浸漬する前の角層と、溶液セルに保湿剤の水溶液を注入直後から30分後までの構造の経時変化を30秒間隔で、および60、120分後に測定を行った。その後、角層試料を乾燥するため、溶液セル内の溶液を除去し、窒素ガスを流量0.3 L/minで通気した。窒素ガス通気直後から45分後までの構造の経時変化を30秒間隔で、および120、180、260分後の構造を測定した。これらの小角・広角X線回折測定は、SPRing-8のビームラインBL40B2において実施し、X線のエネルギーは15 keV（波長0.083 nm）、カメラ長は570 mm（ベヘン酸銀で校正）とした。検出器にはPILATUS 2Mを用い、露光時間を20 sとした。得られた散乱像を一次元化したのち、PEEKフィルム等に由来する散乱をバックグラウンドとして除き、回折プロファイルを得た。

結果および考察：

図1(a)に、水に浸漬した角層試料を乾燥した際のX線散乱プロファイルの全体像を示す。プロファイルを解析して得られたピーク位置(q)から(式) $d=2\pi/q$ で算出される構造の大きさ d (nm)を求め、それぞれの構造を帰属した。角層プロファイルの小角領域($q=1\text{ nm}^{-1}$ 付近)には、細胞間脂質が形成するSLSの1次ピーク(約6 nm)が検出された。 $q=6\text{ nm}^{-1}$ 付近には、角層細胞が形成するソフトケラチンに由来する構造(約1 nm)のブロードなピークが検出された。 $q=15.0, 16.8\text{ nm}^{-1}$ 付近には、細胞間脂質の炭化水素鎖の充填構造である六方晶($d=0.42\text{ nm}$)と直方晶($d=0.37, 0.42\text{ nm}$)に由来するピークがそれぞれ検出された。

小角領域のプロファイルの経時変化を図1(b),(e)に示す。水に浸漬することで、短周期ラメラ構造の一次構造に由来するピークが経時的に小角側へシフトし、乾燥時には経時的に広角側へシフトして浸漬前と同等のピーク形状を示した。中角領域のプロファイルの経時変化を図1(c),(f)に示す。水溶液に浸漬することで、ソフトケラチン構造に由来するピークが経時的に小角側へシフトし、乾燥時には経時的に広角側へシフトして浸漬前と同等のピーク形状を示した。広角領域のプロファイルの経時変化を図1(d),(g)に示す。水溶液に浸漬することで、炭化水素鎖の充填構造に由来するピークはわずかに小角側へシフトし、シャープな形状を示した。また、乾燥時には、経時的にピーク形状がブロードとなり、浸漬前と同等のピーク形状を示した。プロファイルの形状は、 $q=20\text{ nm}^{-1}$ 付近に検出される水に由来するブロードなピークによる影響で、散乱強度が浸漬時には増大、乾燥時には減少した。

SLSの1次ピーク(6 nm)、ソフトケラチン構造に由来する構造(1 nm)および炭化水素の充填構造に由来する構造(0.37 nm, 0.42 nm)の d 値の経時的な変化を検討した。図2(a)に水および保湿剤の水溶液に浸漬した角層試料を45分間乾燥させた際の、SLSの1次ピークの変化を示す。水に浸漬した角層は、乾燥5分付近までは d 値に変化はないが、その後は縮小する傾向を示した。これに対し、グリセリン水溶液または尿素水溶液に浸漬した角層では、いずれも乾燥45分まで d 値はほとんど変化しなかった。これより、グリセリンと尿素は乾燥時において、いずれも細胞間脂質に含まれる水分を保持する作用があることが示唆された。

図2(b)に水および保湿剤の水溶液に浸漬した角層試料を45分間乾燥させた際の、ソフトケラチンに由来する構造の変化を示す。水に浸漬した角層は、乾燥10分付近までは d 値に変化はないが、それ以降は急激に d 値が縮小する傾向を示した。これに対し、グリセリン水溶液または尿素水溶液に浸漬した角層では、いずれも乾燥45分まで緩やかに d 値が縮小する傾向を示した。これより、グリセリンと尿素は乾燥時において、いずれもソフトケラチン構造中に含まれる水分を保持していることが示唆された。なお、本結果は角層のドナーが異なる前課題(2019B1720)と同様であり、グリセリンと尿素の水分保持効果は普遍的なものであると言える。

一方で、炭化水素の充填構造に由来するピーク (0.37 nm , 0.42 nm) は、乾燥過程において、水、グリセリン水溶液、尿素水溶液でそれぞれ異なる振舞を示し、グリセリンと尿素で作用機構が異なる可能性が示唆された (データは省略)。しかし、同一の溶液に浸漬した試料間においても差異が大きいことから、さらに測定点数を増やし、傾向を確認する必要がある。

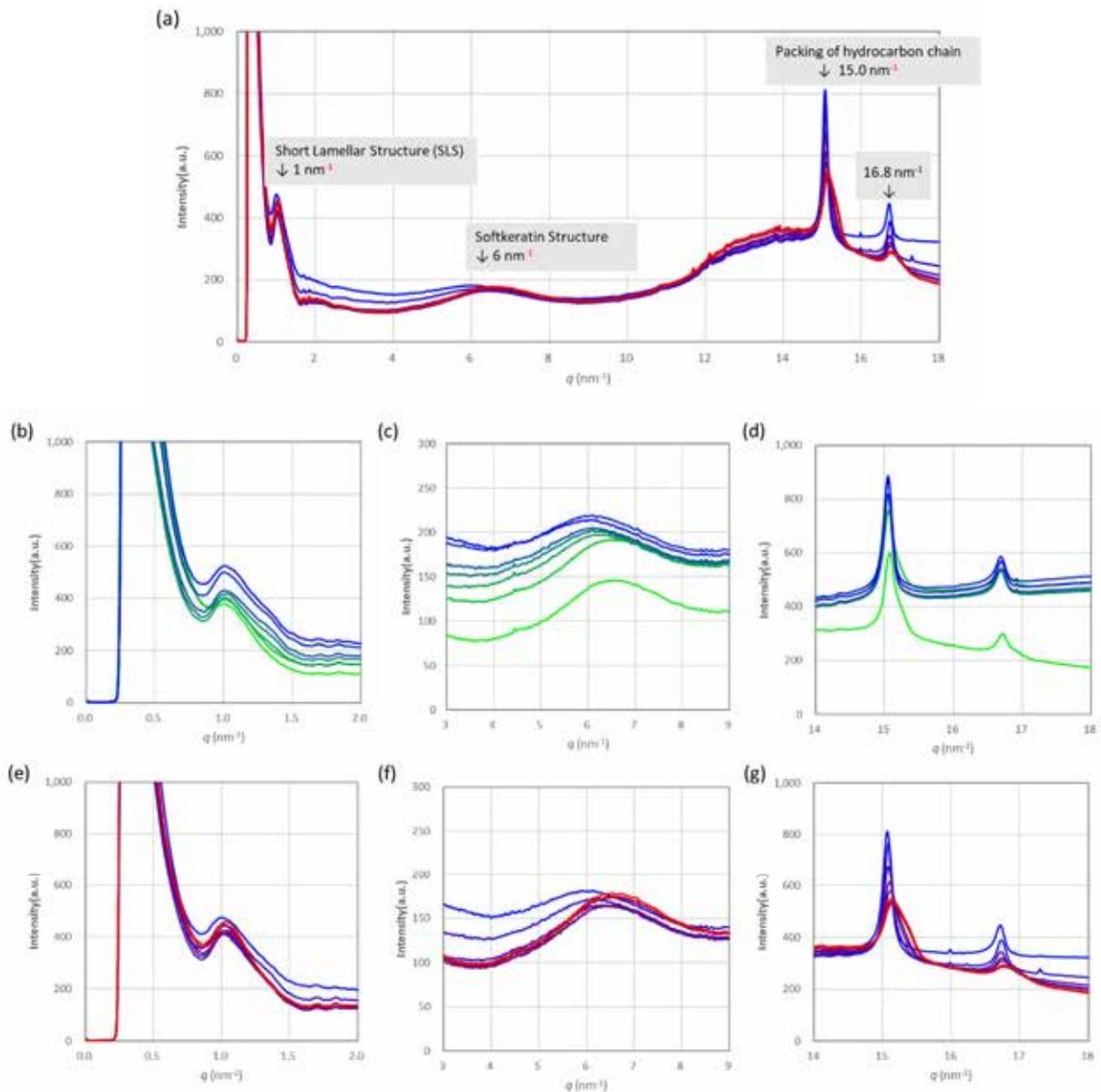


図 1. 水に浸漬した角層の浸漬時 (緑→青) および乾燥時 (青→赤) における X 線散乱プロファイル

- (a) $q = 0\text{--}20\text{ nm}^{-1}$ 乾燥時 (乾燥 0, 10, 20, 30, 40, 120, 180, 260 分後)
- (b) $q = 0\text{--}2\text{ nm}^{-1}$ 浸漬時 (浸漬前, 湿潤 0, 10, 20, 30, 60, 120 分後)
- (c) $q = 3\text{--}9\text{ nm}^{-1}$ 浸漬時 (浸漬前, 湿潤 0, 10, 20, 30, 60, 120 分後)
- (d) $q = 14\text{--}18\text{ nm}^{-1}$ 浸漬時 (浸漬前, 湿潤 0, 10, 20, 30, 60, 120 分後)
- (e) $q = 0\text{--}2\text{ nm}^{-1}$ 乾燥時 (乾燥 0, 10, 20, 30, 40, 120, 180, 260 分後)
- (f) $q = 3\text{--}9\text{ nm}^{-1}$ 乾燥時 (乾燥 0, 10, 20, 30, 40, 120, 180, 260 分後)
- (g) $q = 14\text{--}18\text{ nm}^{-1}$ 乾燥時 (乾燥 0, 10, 20, 30, 40, 120, 180, 260 分後)

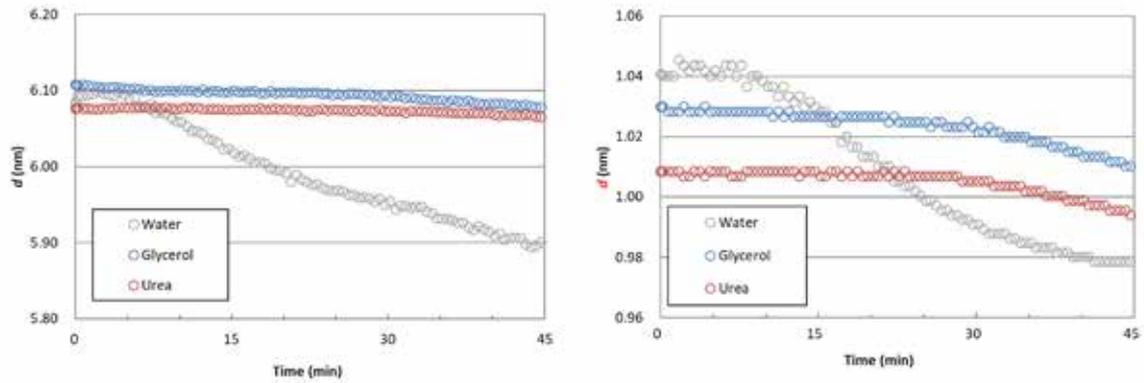


図2. 保湿剤水溶液に浸漬した角層の乾燥過程における経時変化

- (a) SLSの1次ピーク (6 nm)
 (b) ソフトケラチンに由来する構造 (1 nm)

今後の課題：

角層中のそれぞれの構造について、保湿剤の種類による構造変化への影響を追跡することにより、グリセリンと尿素がヒト角層の細胞間脂質および角層細胞中の水分を保持する効果を示すことを見出した。しかし、グリセリンと尿素の保湿効果の違いについては、十分に解析できていない。本検討では、保湿剤の濃度を10wt%に固定していることから、濃度による影響を検証することで、保湿剤による差異を明らかにできる可能性がある。一方で、グリセリンと尿素では、細胞間脂質の炭化水素の充填構造に及ぼす影響が異なる可能性が示唆されているが、同一の溶液に浸漬した試料間においての差異が大きく、普遍的な結果であるとは言えないため、測定データを増やしたい。小角から広角にわたる領域に検出される角層の構造変化を総合的に解析することで、保湿剤の分子構造や角層中での存在位置の違いによる影響を解明できると考えられる。

参考文献：

- [1] T. Yamada et al., *International Journal of Cosmetic Science* **43**, 38–47 (2021).
 [2] I. Hatta et al., *Chem. Phys. Lipids*, **163**, 381 (2010).