

保湿剤の適用による皮膚角層の構造変化に基づく作用機序の解明
～ポリグリセリンの重合度による影響の検証～
**Study on Effect of Moisturizer Based upon the Structural Modification of
Stratum Corneum with its Application—Verification of the Effect of the
Degree of Polymerization of Polyglycerol—**

豊島 亮祐^a, 村島 健司^a, 野々部 瑛^a, 高島 岬^a,
設楽 大希^a, 覚道 紀子^a, 八田 一郎^b
Ryosuke Toyoshima^a, Kenji Murashima^a, Hikaru Nonobe^a, Misaki Takashima^a,
Hiroki Shidara^a, Noriko Kakudo^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
^a Sakamoto Yakuhin Kogyo Co., Ltd., ^b NISRI

我々は、化粧品の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序の解明を進めている。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 線回折法で測定することで、一連の構造変化を解析した。その結果、グリセリンを浸漬した角層は、角層細胞内のソフトケラチン構造や細胞間脂質の炭化水素鎖の充填構造について、特徴的な振舞を示すことを明らかにし、角層中の水分を保持・調整する効果を有することを見出した。

本研究では、角層中の細胞間脂質内の短周期ラメラ構造 (SLS) および炭化水素の充填構造、角層細胞のソフトケラチン構造について、グリセリンの重合物であるジグリセリン、トリグリセリンおよびデカグリセリン水溶液の構造変化への影響を追跡した。これより、ジグリセリン、トリグリセリン、デカグリセリンはヒト角層の角層細胞には作用せず、細胞間脂質の短周期ラメラ構造の水層に存在し、水分調整に寄与していることが示唆された。これを明確にするためには、今後、異なる角層でデータを多く取ることで生体試料間の個体差の問題を克服し、角層の構造変化を総合的に解析する必要がある。

キーワード： ヒト角層、細胞間脂質、多価アルコール、グリセリン、尿素、X 線回折

背景と研究目的：

皮膚は外部影響から体を守る機能を持ち、その最外層に位置する角層に適度な水分量を保持することで、健康な状態に保たれている。グリセリンは皮脂中のトリグリセリドが分解する場合、また、アクアポリンを介して角層内に取り込まれる場合が知られており、それらが角層内に存在して水分を保つと考えられている。グリセリンは、最も汎用な保湿剤として、化粧品や医薬品などの外用剤に配合されている。グリセリンの重合物であるジグリセリンなどのポリグリセリンについても、保湿性能を示すことが知られ、保湿剤として用いられている。また、これらを組み合わせることで、より保湿効果が向上するとされている。一方で、これらを用いた際の、分子レベルの作用機構については明らかで無い。化粧品や医薬品においては、より保湿力の高い原料や組み合わせが求められており、これを達成するためには、これらの保湿成分の分子レベルでの作用機構の差異を明らかにすることが重要である。最も典型的な保湿剤であるグリセリンとその重合物であるジグリセリンなどのポリグリセリンのような、重合度の異なる保湿剤について、それぞれの角層構造への影響を放射光 X 線で解析することにより、保湿剤の分子レベルでの作用機構の微妙な違いを解明できる。これにより、保湿剤の系統的な作用機構を確立でき、高い保湿効果を有する外用剤の分子レベルでの根拠に基づいた設計が可能になることが期待される。

我々はこれまでに、電気的水分量測定装置を用いて人体に対して非侵襲でグリセリン、ジグリセリンなどのポリグリセリンの保湿能について研究を行い、配合比や組み合わせを変えることで、保湿能やその持続時間が変化することを見出している。この機構を分子レベルで検証すべく、放

射光を用いた研究を進めている。これまでの課題において、我々は BL19B2 や BL40B2 にて検出器に PILATUS-2M を使い、グリセリンおよびジグリセリンの水溶液に浸漬したヒト皮膚角層を試料とし、乾燥時に X 線回折法で角層構造の経時変化を 30 s 間隔で測定した。その結果、グリセリンを作用した皮膚角層は、角層細胞中のソフトケラチン構造の収縮を抑制する挙動を示し、角層細胞中の水分を保持する時間を長くすることを明らかとした[1]。また、グリセリンは、細胞間脂質の短周期ラメラ構造の水層に存在しており、グリセリンはそこに浸透して角層の水分調整に寄与していることが示唆された[2022A1650]。これに対して、ジグリセリンは、角層細胞中のソフトケラチン構造には強く作用せず、細胞間脂質の炭化水素鎖の直方晶の充填構造の変化を緩和する作用を示すことを明らかにした[1]。すなわち、ジグリセリンは、グリセリンと類似した分子構造であるにもかかわらず異なる挙動を示している。グリセリンとジグリセリンのヒト皮膚角層中における作用機序は、SPring-8 の高輝度 X 線放射光を用いた実験により、初めて明らかにすることができた。この発見は、リン脂質を含む脂質モデル系の実験で提案された「グリセリンによる液体状態の出現が保湿を高める」という通説[2]を覆すものである。

一方、重合度の異なるポリグリセリンを作用させた際の影響についても大変興味深い。ヒト皮膚の電気的水分量測定において、ポリグリセリンは重合度によって異なる挙動を示すことが確認されており、X 線回折法においても小角～広角構造への影響を測定する必要がある。これを実施することで、ポリグリセリンの作用部位やその機構、さらには効果の大小が明確になることが期待され、作用機構に基づく保湿外用剤の設計が可能になると考えられる。

そこで本課題では、BL40B2 において PILATUS-2M を使い、グリセリン、ジグリセリン、トリグリセリンおよびデカグリセリン水溶液にヒト角層を浸漬し、乾燥時における変化を高い時間分解能で 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、細胞間脂質の短周期ラメラ構造および炭化水素鎖の充填構造に対する保湿剤の影響を検討した。

実験：

ヒト腹部由来の角層（BIOPREDIC International 社）を重量変化が無くなるまで乾燥させることで、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。保湿剤の水溶液には、10 wt% グリセリン水溶液、10 wt% ジグリセリン水溶液、10 wt% トリグリセリン水溶液および 10 wt% デカグリセリン水溶液を用い、比較対照は水とした。試料セルとして「溶液セル」[3]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、溶液を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 min 後までの構造の経時変化を 30 s 間隔で、および 60, 120 min 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 min 後までの構造の経時変化を 30 s 間隔で測定した。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（酸化セリウムで校正）とした。検出器には PILATUS-2M を使い、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 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経時変化を示す。なお、 $q = 0.5 \text{ nm}^{-1}$ 以下では X 線はビームストッパーにより遮蔽されている。プロファイルを解析して得られたピーク位置 (q) から $d = 2\pi/q$ により算出される構造の間隔 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短周期ラメラ構造の 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のコイルド・コイル α ヘリックス鎖間隔に由来する構造 (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。

角層中の水の存在と関わっている短周期ラメラ構造の 1 次ピーク (6 nm)、ソフトケラチンのコイルド・コイル α ヘリックス鎖間隔に由来するピーク (1 nm) および炭化水素鎖の充填構造に由来するピーク (0.37 nm, 0.42 nm) から d 値の経時的な変化について解析した。

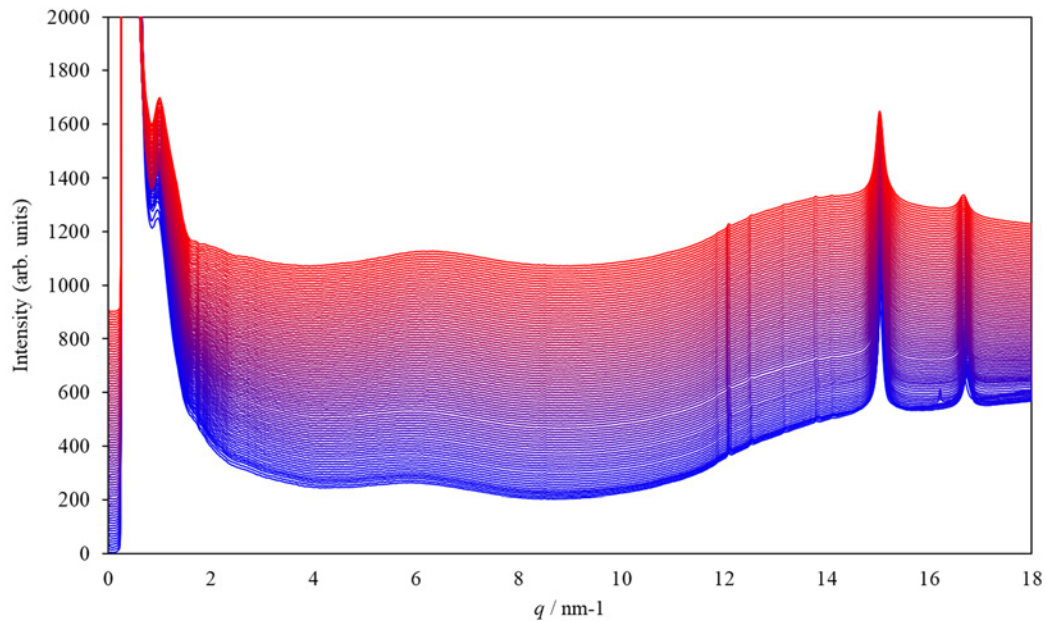


図 1.水を浸漬した角層の乾燥時(青→赤)における X 線散乱プロファイル.

図 2(a)に保湿剤水溶液に浸漬した角層試料を 45 min 間乾燥させた際の、角層細胞内のソフトケラチンのコイルド・コイル α ヘリックス鎖間隔に由来するピーク (1 nm) の変化を示す。図 2(a)に示すように、乾燥直後より構造間隔が収縮する傾向を示す。グリセリンを浸漬した場合のみ、構造の収縮は緩やかであり、水、ジグリセリン、トリグリセリンまたはデカグリセリンを浸漬した場合には傾きが急であった。これより、グリセリンは、角層細胞に作用して、水分を保持する時間を長くする効果を示す一方で、ジグリセリン、トリグリセリン、デカグリセリンは作用を示さないと考えられる。

図 2(b)に保湿剤水溶液に浸漬した角層試料を 45 min 間乾燥させた際の、細胞間脂質の短周期ラメラ構造の 1 次ピーク (6 nm) から求めた周期の変化を示す。図 2(b)に示すように、短周期ラメラ構造の周期は、乾燥初期には一定時間変化はなく、その後、単調に減少する傾向を示す。減少の傾きは水の場合は大きい、グリセリン、ジグリセリン、トリグリセリンおよびデカグリセリンでは、傾きが小さくなった。また、グリセリンの重合度による影響は見受けられなかった。これより、トリグリセリンおよびデカグリセリンは、グリセリンやジグリセリンと同様に、細胞間脂質の短周期ラメラ構造の水層に存在しており、角層の水分調整に寄与している可能性が考えられた。

図 2(c)に保湿剤水溶液に浸漬した角層試料を 45 min 間乾燥させた際の、細胞間脂質の炭化水素鎖の充填構造の格子定数 (0.42 nm) の変化を示す。図 2(c)に示すように、水、グリセリン、ジグリセリン、トリグリセリンおよびデカグリセリンのいずれも場合も、乾燥時の直方晶の格子定数は一見複雑に見えるが特徴的な振舞を示す。すなわち、乾燥直後に急速に小さな値になり、次に変化がほとんどなく一定時間安定であり、さらに乾燥すると値が急速に大きくなり、その後は格子定数が変化しなくなる。水の場合は過渡変化を経て約 8 min の後に急速に格子定数が大きくなる。この格子定数が小さいかつ一定時間安定である領域では、直方晶の炭化水素鎖の充填構造が密であり、水分調整に寄与していると考えている。グリセリンの場合は、約 11 min の後に格子定数が急速に大きくなり、水分調整に寄与している時間が長くなった。一方で、ジグリセリン、トリグリセリンおよびデカグリセリンのポリグリセリンでは、格子定数が小さいかつ一定時間安定である領域がグリセリンよりも長くなり、特にジグリセリンにおいては、約 20 min の後に格子定数が大きくなっており、水分調整に寄与する効果が大きいと考えられた。なお、データは省略するが、格子定数 0.37 nm も同様な変化を示した。

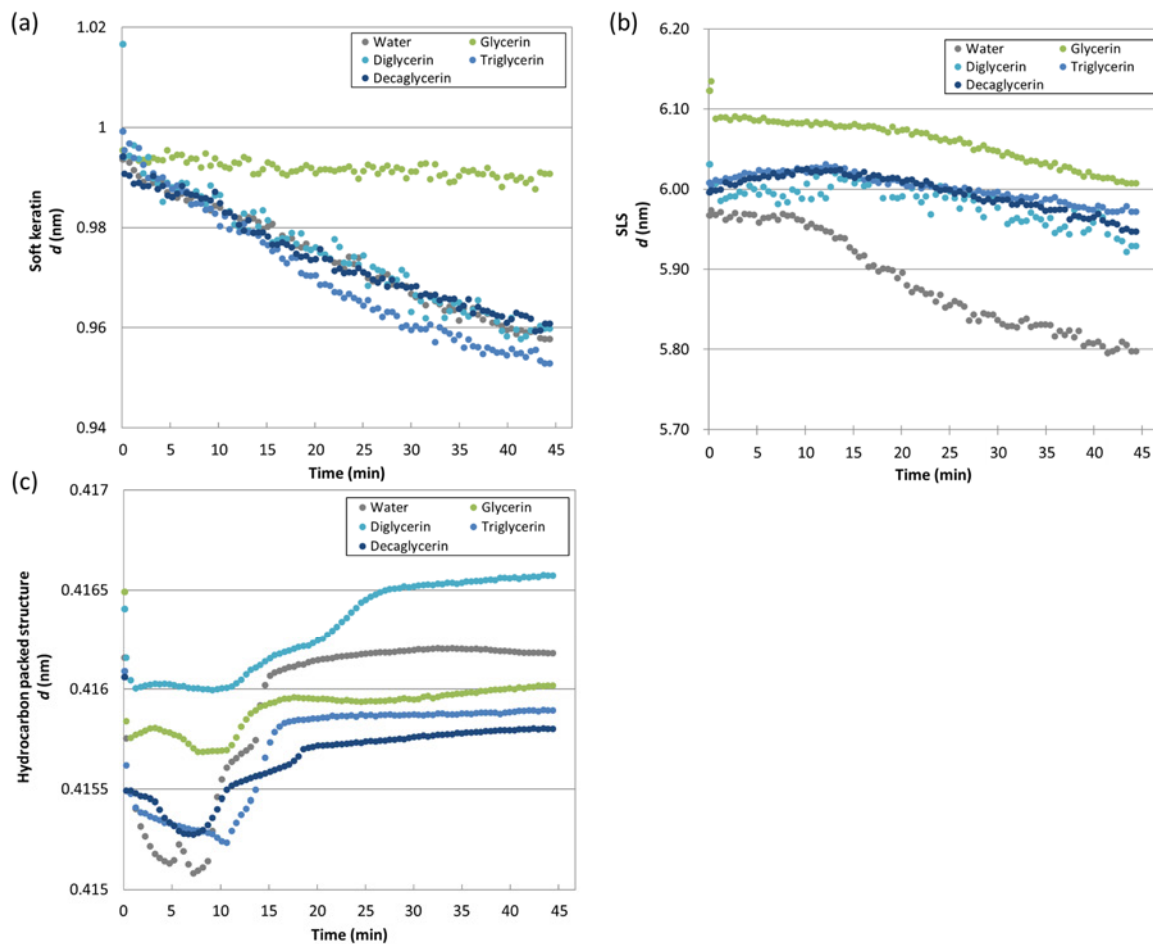


図2. 保湿剤水溶液を浸漬した角層の乾燥過程における間隔 (d 値) の経時変化.

- (a) ソフトケラチンのコイルド・コイル α ヘリックス鎖間隔に由来するピーク (1 nm)
- (b) 短周期ラメラ構造の1次ピーク (6 nm) に由来する構造の変化
- (c) 炭化水素鎖の充填構造に由来する構造 (0.42 nm) の変化

今後の課題：

角層中のそれぞれの構造について、ポリグリセリンの重合度による構造変化への影響を追跡することにより、グリセリンは角層中の角層細胞と細胞間脂質の両方に作用するのに対し、ジグリセリン、トリグリセリン、デカグリセリンでは、細胞間脂質のみに作用すること示唆された。細胞間脂質への作用では、ジグリセリンは、角層の水分調整に寄与する効果が大きいと考えられた。今後、ポリグリセリンの重合度による差異を確定にするためには、データ数を増やすことで生体試料間の個体差の問題を克服し、小角～広角領域に検出される角層の構造変化を総合的に解析する必要がある。

参考文献：

- [1] T. Yamada et al., *International Journal of Cosmetic Science* **43**, 38 (2021).
- [2] Froebe, C.L. et al., *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 41, 51 (1990).
- [3] I. Hatta et al., *Chem. Phys. Lipids*, **163**, 381 (2010).