

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2～
**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 II –**

松生 大輝^a, 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
Daiki Matsuike^a, 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。今回の測定では、前回測定した角層と別固体のものを用いて行ったが、前回の測定と同様の結果が得られ、生体試料間の個体差はなく、角層の構造変化には再現性があることが示された。また、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、ポリグリセリンでは細胞間脂質のみに作用することが示唆された。一方で、ポリグリセリンの重合度の違いについてはもう少し検討が必要である。今後は、浸漬する保湿剤濃度などの条件を検証し、ポリグリセリン重合度の違いによる角層構造の差異について明らかにしていく。これらの微細な差異が再現性のあるものであるかどうかを確認し、その背後にある要因を明らかにするために、新しい観点からの実験と解析を実施する必要がある。この検証プロセスにより、保湿機構へのさらなる理解を深め、信頼性の高い結果を得ることができる。

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、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正常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。我々は、角層表面の水分量が異常に減少すると、角層内に蓄えられた水がそれを補填することにより、皮膚が適正な保湿状態に保たれていると考えている。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て使用することで、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、角層中の水分保持やその持続時間を調節してい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 秒間隔で測定した。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品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、水、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% 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 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 秒とした。得られたデバイ・シェラー環を円環平均して一次元化したのち、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。SAXS の散乱曲線にローレンツ因子による補正を行い、ガウスフィッティングにより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。また、それぞれのパラメータから炭化水素の充填構造の面積や短周期ラメラ構造の体積を計算し、より統一的な視点での保湿剤の経時的な影響について考察した。

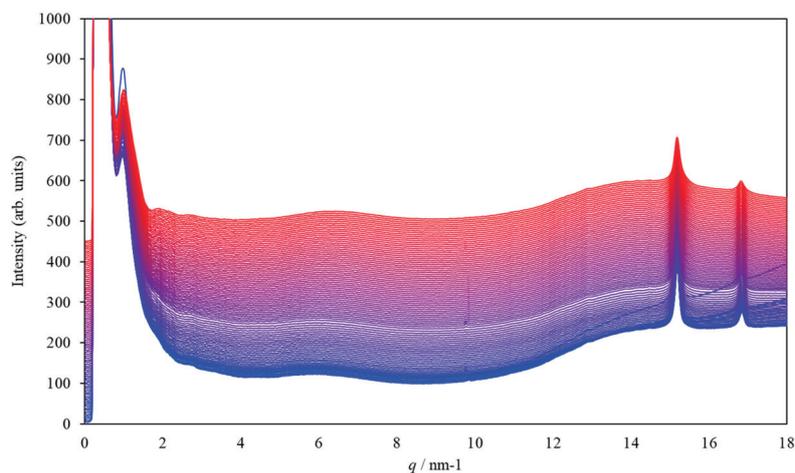


図 1. 水を浸漬した角層の乾燥時(青→赤)における X 線散乱プロファイル

図 2(a)に保湿剤水溶液に浸漬した角層試料を 45 分間乾燥させた際の、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。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おいて、同じような収縮傾向であった。一方で、グリセリンを浸漬した場合には、構造の収縮は緩やかであった。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、デカグリセリンはほとんど作用を示さないと考えられる。これは小さな分子であるグリセリンだけが角質細胞内に入り込みソフトケラチンに作用し水分を保持している可能性を示唆している。

図 2(b)に保湿剤水溶液に浸漬した角層試料を 45 分間乾燥させた際の、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、水を浸潤した場合では、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。一方で、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を浸潤した場合では、水と比べて顕著に緩やかな減少を示す。また、グリセリンの重合度の違いによる影響は見受けられなかった。これより、ジグリセリン、トリグリセリンおよびデカグリセリンは、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入り角層の水分量の調整に寄与している可能性が考えられた。

図 2(c, d)に保湿剤水溶液に浸漬した角層試料を 45 分間乾燥させた際の、細胞間脂質の炭化水素鎖の充填構造の格子定数(0.42 nm, 0.37 nm)の変化を示す。図 2(c, d)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、乾燥時の炭化水素鎖の充填構造の格子定数 0.42 nm と格子定数 0.37 nm は同様の挙動を示した。もう少し変化を俯瞰的に捉えるために、図 2(e)に保湿剤水溶液に浸漬した角層試料を 45 分間乾燥させた際の、細胞間脂質の炭化水素鎖の充填構造の格子定数(0.42 nm, 0.37 nm)から計算した直方晶の炭化水素鎖 1 本当たりの断面積の変化を示す。炭化水素の充填構造の断面積は、乾燥初期には変化が大きく、乾燥後期ではほぼ一定となった。また、図 2(f)に保湿剤水溶液に浸漬した角層試料を 45 分間乾燥させた際の、短周期ラメラ構造の体積(炭化水素の充填構造の面積 \times 短周期ラメラ構造の周期)の変化を示す。水で浸潤した場合には、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し、保湿剤で浸潤した場合には、ほぼ一定で変化がみられなかった。

図 2(b-f)をまとめると次のことが考察される。充填構造の振舞の傾向が変化する時間と短周期ラメラ構造の周期の収縮が始まる時間は、相関があると考えられ、同じドメイン内の構造であると考えられる。また、この時間を境に乾燥過程における変化は、乾燥初期と乾燥後期に分けられる。乾燥初期では、水と保湿剤を浸潤させたどちらの場合においても、炭化水素の充填構造の格子定数の振舞は変化が大きいにもかかわらず、短周期ラメラ構造の体積は一定である。一方で、乾燥後期では、水を浸潤させた場合でのみ、体積の減少がみられる。これらのことから、乾燥初期では炭化水素鎖の乱れによる炭化水素鎖の収縮が起きるが、乾燥後期では炭化水素鎖の収縮が落ち着き、短周期ラメラ構造の周期の収縮が起こる。これは乾燥により水分が抜け、主に水層部分が収縮するからと考えられる。保湿剤で浸潤した場合は、この水層部分に保湿剤が作用し収縮を抑制することで、短周期ラメラ構造の体積の変化が起きないのではないかと示唆される。つまり細胞間脂質において保湿剤は、短周期ラメラ構造の水層部分に保持され、角層中の水分量を調節している可能性が示唆された。

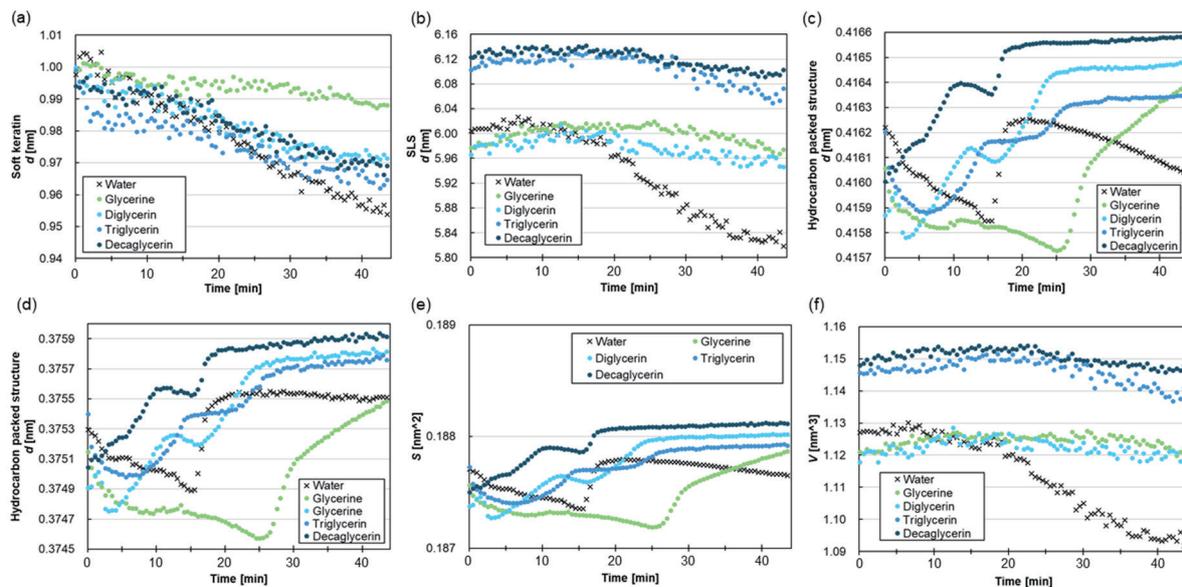


図 2. 保湿剤水溶液を浸潤した角層の乾燥過程における構造の経時変化

- 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)
- 短周期ラメラ構造の周期
- 炭化水素の充填構造の格子定数(0.42nm)
- 炭化水素の充填構造の格子定数(0.37nm)
- 炭化水素の充填構造の直方晶の断面積
- 短周期ラメラ構造の体積

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が示唆された。また、細胞間脂質への作用に関しても新たな可能性が示された。細胞間脂質の炭化水素の充填構造の挙動に違いがみられ、ジグリセリン、トリグリセリン、デカグリセリン独自の新たな水分調整機能としての役割の可能性が示唆されたが、明確な重合度の違いはみられなかった。今後はポリグリセリンの濃度を低くするなどして、保湿剤の重合度による違いをより細かく調べる必要がある。また、他の多価アルコールでも同様に検証し、ポリグリセリンの保湿機能との違いについても今後明らかにしていく。

参考文献：

- [1] T. Yamada et al., *International Journal of Cosmetic Science* **43**, 38–47 (2021).
- [2] Froebe, C.L. et al., *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **41**, 51-65 (1990).
- [3] I. Hatta et al., *Chem. Phys. Lipids*, **163**, 381 (2010).