

角層細胞間脂質の構造変化の解析 を利用した製剤の開発

Development of pharmaceutical and cosmetic formulations based upon analysis of structural change of lipid lamellar in stratum corneum

小幡誉子^a, 押村英子^b, 池田直哲^b, 築瀬香織^c, 國澤直美^d, 佐野則道^e,
酒井恵^e, 八田一郎^f, 太田昇^f, 八木直人^f, 渡邊大至^a, 高山幸三^a

Yasuko Obata^a, Eiko Oshimura^b, Naoaki Ikeda^b, Kaori Yanase^c, Naomi Kunizawa^d, Norimichi Sano^e,
Megumi Sakai^e, Ichiro Hatta^f, Noboru Ohta^f, Naoto Yagi^f, Hiroshi Watanabe^a, Kozo Takayama^a

^a星薬科大学, ^b味の素㈱, ^cクラシエホームプロダクツ㈱, ^d㈱資生堂,

^eP&G イノベーション合同会社, ^f高輝度光科学研究センター

^aHoshi University, ^bAjinomoto Co., Inc., ^cKracie Home Products, Ltd.,

^dShiseido Co., Ltd., ^eProctor & Gamble Japan K.K., ^fSPRING-8/JASRI

角層細胞間脂質のラメラ構造は、体内水分蒸散抑制や異物侵入のバリアとして機能している。本課題では、化粧品や医薬品（外用剤）に含まれる化合物が角層成分に及ぼす影響について、溶液セルを用い小角・広角 X 線回折同時測定により検討した。水/エタノール混合溶液においては、その混合比によって角層成分の構造に対する影響が一義的ではないことが明らかとなった。このような定量的評価を重ねていくことにより、求められる製剤特性に合わせた配合量の決定が可能になる。

キーワード： ヒト角層、角層細胞間脂質、ラメラ構造、充填構造、溶液セル

【背景と研究目的】

角層細胞間脂質はその一部が構造化してラメラ構造を形成し、生体を脱水や異物侵入から保護している。しかしながら、この生体保護の物理的仕組みは、たとえば薬物を皮膚から体内へと送達する経皮吸収型製剤の開発にとって第一に克服するべき問題となっている。そこで製剤の開発研究においては、薬物の皮膚透過を促進する手法が数多く試みられてきたが、なかでも薬物の吸収を増大させる化合物を併用する方法は簡便で応用性も高いため、世界中から様々な化合物の可能性が提案されてきた。提案された化合物の一部は、非常に効果が高いことが明らかになっており、その作用機構についてもたくさんの研究が行われている。一方で、薬物の吸収を増大させる化合物を皮膚に適用した際の変化に関する研究は、顕微鏡での観察や示差走査熱量測定、電子スピン共鳴あるいは赤外分光など様々な方法が試みられてきたが、いずれも定性的・間接的な方法が多かった。とくに異物透過の障壁として重要な角層細胞間脂質の構造に対する影響を直接調べた研究例は非常に少ない。角層細胞間脂質は、角層質量の約 10%程度にすぎないうえに、実験に使用する角層自体は非常に少量となる。このため、

通常の実験室レベルの測定機器では S/N 比の優れたデータを得ることは困難だった。そこで、SPring-8 の放射光 X 線回折を利用して角層細胞間脂質の構造についての研究が行われ、ラメラ構造の周期や充填構造について次々に明らかになった。さらに、化合物を角層に直接適用しながら回折変化を観察可能な溶液セルが開発され[1]、いくつもの成果をあげている[2-5]。とくに細胞間脂質に限らず、角層全体の構造情報も時系列変化として捉えることが可能となったことは大きな進歩である。このような角層細胞間脂質および角層成分の構造変化を追跡することはまた、皮膚を適用部位とする化粧料の開発にとっても不可欠な情報源となる。化粧料開発においては、経皮吸収型製剤に使用される化合物に比較すると作用の程度が穏やかである可能性も大きいため、なおさらその変化を定量的に捉えることは難しい。今回はとくに製剤に繁用されるアルコール類のなかから、エタノールを選択し、水との混合系において生じる細胞間脂質の変化に着目し解析を行った。

【実験方法】

角層の剥離・処理：トリプシン処理により皮膚組織より剥離したヒト角層 (BIOPREDIC International, Rennes, France) を洗浄・乾燥後、予め 25% の水分量に調節して溶液セルに充填し、種々の化合物をセル内に注入して直ちに測定を開始した。X 線回折測定：SPring-8 ビームライン BL40B2 において小角・広角 X 線回折測定を行った。波長 0.83nm (15keV)、試料から検出器までの約 500 mm を真空引きし、300 mm×300 mm のイメージングプレートを用いて回折像を取得し解析を行った。データ解析：得られた回折像を一次元化してから、それぞれの回折ピークをガウス関数にフィッティングして解析した。また、詳細な変化を追跡する目的でそれぞれの回折プロファイル間での差分解析を行った。

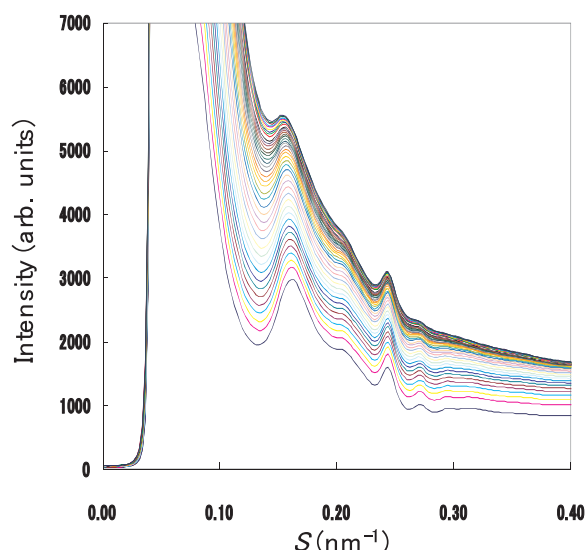


図1 エタノールの適用によるヒト角層小角X線回折プロファイル

(各プロファイルを識別するためにカラー表示した。時間の経過に伴ってプロファイルは上方へと移行した。)

【結果および考察】

まず、図1にはエタノールを適用した際のヒト角層小角 X 線回折プロファイルを示した。適用直後より 3 分に 1 回測定を行い 40 回の測定結果を重ねて表示した。一番下の曲線が適用直後、一番上が適用 2 時間後のプロファイルである。 $S=0.16 \text{ nm}^{-1}$ 付近のピークは短周期ラメラ(約 6.25nm)由来の回折で、時間の経過とともに明らかにピーク強度が減少した。これは、さきに報告した水の場合と明らかに異なっており[4]、エタノールにより細胞間脂質が大きく影響を受けたことを意味している。一方、図2

に示した広角回折プロファイルにおいては、適用直後にベースラインが大きく増大し時間の経過とともにさらに増大を続けた。

エタノールの添加量を段階的に変化させて回折プロファイル調べたところ、ラメラ周期由来の回折があらわれる小角領域の回折プロファイルの変化においては、水の適用で見られたようなベースラインの増大は、エタノールが75%程度と高濃度になっても観察された。これは図1の100%エタノールを適用したプロファイルにおいても同様であった。一方、広角領域においても水の適用により、ベースラインが増大することが明らかになっているが、

この変化はエタノール濃度が25%程度までで、それ以上高濃度のエタノールの適用では認められなくなった。これに対して、エタノールの適用により特徴的に観察された $S=2.4\text{nm}^{-1}$ 付近のベースラインの増大はエタノールが角層細胞内に流入したためではないかと考えられる。エタノール添加量が50%以上では、この現象が顕著で100%エタノールの適用とほぼ同様の挙動を示した。これらの結果から、角層細胞間脂質はエタノールによって構造が変化する一方で、角層細胞内に広範に存在するソフトケラチンの構造は、エタノールにより大きく影響を受ける部位と比較的影響の小さい部位があると考えられる。水/エタノール混合溶液においては、その混合比によって角層成分の構造に対する影響が一義的ではないことが明らかとなった。これらの効果についての定量的評価を重ねていくことにより、求められる製剤特性に合わせた配合量の決定が可能になる。

【今後の課題】

単独の化合物を適用した際の構造変化より混合溶液を適用した際の構造変化をいわゆる加法性によって推測することはできないことが分かった。したがって、これまでに得られた基礎的な知見を踏まえて、化粧品等の標準的な処方をそれぞれの場合に実際に適用して構造変化を評価する必要がある。さらに、実際の製品の使用方法に則した実験方法を検討することも重要である。

【参考文献】

- [1] 特願 2006-269164: 発明者:八田一郎、涌井義一。
- [2] 小幡誉子、平成 19 年度 SPring-8 重点産業利用課題成果報告書(2007A1888)、pp.9-10.
- [3] 小幡誉子他、平成 19 年度 SPring-8 重点産業利用課題成果報告書(2007B1803)、pp.12-14.
- [4] 小幡誉子他、平成 20 年度 SPring-8 重点産業利用課題成果報告書(2008A1784)、pp.48-52.
- [5] 小幡誉子他、平成 20 年度 SPring-8 重点産業利用課題成果報告書(2008B1855)、pp.25-28.

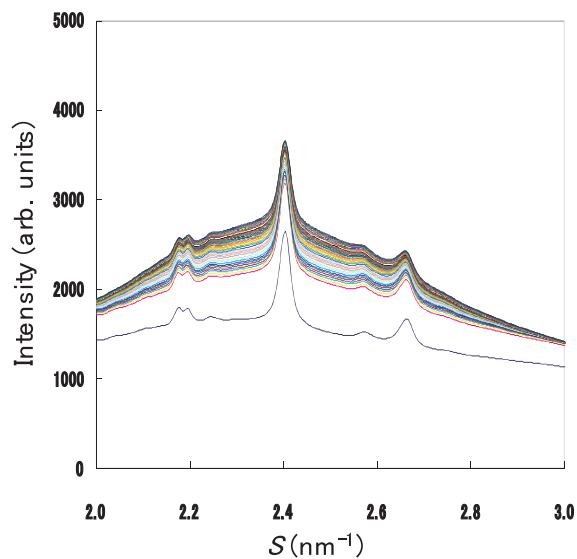


図2 エタノールの適用によるヒト角層広角X線回折プロファイル

(各プロファイルを識別するためにカラー表示した。時間の経過に伴ってプロファイルは上方へと移行した。)