

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(3) Structural Changes of Human Stratum Corneum by Treating with the Moisturizer Aqueous Solutions in Wetting and Drying Processes (3).

羽深 朱里^a, 難波 美沙^a, 山内 加奈^a, 大畑 哲也^a, 山下 耕司^a, 山田 武^a, 八田 一郎^b
Akari Habuka^a, Misa Namba^a, Kana Yamauchi^a, Tetsuya Ohata^a, Koji Yamashita^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

^a Sakamoto Yakuhin Kogyo Co., Ltd., ^b NISRI

化粧品などの保湿剤として用いられる多価アルコールは、その種類によって保湿効果が異なり、また、組み合わせにより保湿力が向上することが知られている。本課題では、グリセリンにジグリセリンあるいは 1,3-ブチレングリコールを組み合わせた水溶液を用い、角層試料を各水溶液に浸漬し、その後乾燥した際の構造の変化を小角・広角 X 線回折測定により計測した。その結果、乾燥時の経時的な角層の構造変化の測定において、グリセリンとジグリセリンを組み合わせた水溶液に浸漬した角層では、細胞間脂質の炭化水素鎖の充填構造や角層細胞内のソフトケラチン構造の経時的な変化が、グリセリンのみやグリセリンと 1,3-ブチレングリコールを組み合わせた水溶液とは異なる振舞いを示すことが明らかとなった。

キーワード： ヒト角層、細胞間脂質、多価アルコール、小角 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多価アルコールなどの保湿剤が配合される。これまでに、多価アルコールの保湿効果の評価において、多価アルコール水溶液を塗布した肌の経時的な角層水分量の変化を静電容量法により計測し、グリセリンとジグリセリンを併用すると角層水分量が高い状態を保持することを見出している[1]。それぞれの多価アルコールが角層中の異なる構造部位に作用したことで、相乗効果が発揮されたと推測しているが、保湿の作用機構は把握できていない。

角層は、角層細胞とそれを取り巻く細胞間脂質から成り、水の大半は角層細胞内に存在すると言われている。また、細胞間脂質が形成する短周期ラメラ構造と呼ばれる脂質二重膜の親水部にも層状に水が存在していると言われている。保湿の作用機構の解明には、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。

そこで我々は、保湿の作用機構を解明するため、多価アルコール水溶液による角層構造の経時変化について X 線回折法による計測を進めている。角層細胞内の水の振舞いは角層細胞内のソフトケラチンに由来する約 1 nm の構造の変化を、細胞間脂質の水の振舞いは短周期ラメラ構造中に存在する約 6 nm の水の周期を評価し、また細胞間脂質の炭化水素鎖の充填構造 0.37, 0.42 nm の変化にも着目した。これらの内部構造について、水や多価アルコール水溶液で浸漬した角層を乾燥する際の変化の違いを経時で追跡することで、保湿の作用機構や多価アルコールが作用する部位の解明に繋がると考え、実験を進めている。

これまでに BL19B2 にて行った実験(課題番号 2017A1559)では、角層試料を測定セル中で多価アルコール水溶液へ浸漬させ、その後セル中にて窒素気流下で乾燥させた際の角層構造の経時変化を 30 秒間隔で X 線回折法により計測した。短い時間間隔での測定により、ソフトケラチンに由来する構造や細胞間脂質の充填構造の水による変化の追跡が可能となった。特に、細胞間脂質の充填構造の解析からは、多価アルコールの種類により、角層が水を含んだ状態の構造を乾燥時に保持する時間が異なることが明らかとなった。一方、小角側に検出される短周期ラメラ構造については、30 秒の測定間隔では露光時間が足りず、解析に十分な散乱強度が得られなかったため、経時的な変化の評価は難しいと考えられた。

静電容量法で肌の保湿効果に特徴を見出した多価アルコールの併用水溶液について、この手法

を用いて角層構造に及ぼす影響を評価することにより、保湿効果と水の動的な振舞いとの関係が明らかになると考えられる。そこで本課題では、グリセリンにジグリセリンや1,3-ブチレングリコールを併用した水溶液で浸漬した角層を試料に用い、乾燥時の構造変化を計測し、前課題で解析が可能であった細胞間脂質の炭化水素鎖の充填構造と併せてソフトケラチンに由来する構造に着目し、解析を行う。

実験：

試料にはヒト腹部由来の角層 (BIOPREDIC International 社) を完全に乾燥し、1 cm²に切り出したものを使用した。なお、角層のドナーによる影響を勘案し、2名のドナーから得られた角層を用いた。多価アルコール水溶液には、10 wt%グリセリン水溶液(GLY aq.)、7 wt%グリセリン + 3 wt%ジグリセリン水溶液(GLY/DiG aq.)、7 wt%グリセリン + 3 wt% 1,3-ブチレングリコール水溶液(GLY/BG aq.)を用い、比較対照は水とした。試料セルには‘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。

小角・広角 X 線回折測定は、溶液に浸漬する前の角層と溶液セルに多価アルコール水溶液を注入し浸漬してから 30 分後までの角層が湿潤する過程における角層構造の経時的な変化について 30 秒間隔で、さらに 60、120 分後の構造について実施した。その後、溶液セル内の溶液を除去し、試料の乾燥を促進するため、溶液セルに窒素ガスを流量 0.3 L/min で通気し、角層試料を乾燥した。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 秒間隔でさらに 120、180、240 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 BL19B2 において実施した。X 線のエネルギーは 18 keV (波長 0.069 nm)、検出器には PILATUS 2M を用い、カメラ長は 770 mm (ベヘン酸銀で較正) とし、露光時間を 20 秒とした。

結果および考察：

測定例として、水に浸漬し、その後乾燥した角層の散乱プロファイルの経時変化を図 1. に示す。角層プロファイルの散乱ベクトル (q) 6 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 (図 1.(c), (d))。水に浸漬することで、ソフトケラチン由来のピークは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.(e), (f) に示す。 $q = 15.3, 16.8$ 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 ($d = 0.42$ nm) と直方晶 ($d = 0.37, 0.42$ nm) に由来するピークがそれぞれ検出された。プロファイルの形状は、 $q = 20$ 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。

ソフトケラチン構造と炭化水素鎖の充填構造に由来するピークを解析し、得られたピーク位置 (q) から (式) $d = 2\pi/q$ で算出される値を求め、経時的な構造の変化を評価した。水で浸漬した角層試料の乾燥時における経時的な d 値の変化を図 2. に示す。図 2.(a) にはソフトケラチン由来の構造のピーク位置の逆数 d (nm) を示しており、乾燥により経時的に縮小し、その後、値の収束が見られた。0.42 nm の充填構造の格子定数 d (nm) は、乾燥初期に構造が縮小し、その後再び拡大して値が収束した (図 2.(b))。また、0.37 nm の充填構造の d 値の経時変化は、0.42 nm と同様の振舞いを示した。多価アルコールを用いた際のソフトケラチン由来の構造と炭化水素鎖の充填構造の乾燥時における経時的な変化は、水と同様の振舞いを示した。

角層試料の乾燥時におけるソフトケラチン由来の構造や、細胞間脂質の炭化水素鎖の充填構造の乾燥による d 値の収束は、乾燥前の水分を過剰に含んだ構造状態から、徐々に水分が減少し、完全に乾燥した状態に向かったものと考えられる。構造中の水分の保持効果に関係すると考えられたため、 d 値の変化が収束するまでの時間について、多価アルコール水溶液の種類による比較を試みた。構造の保持時間 t (s) は、ソフトケラチン構造については乾燥開始から構造の変化が収束するまでの変化量が $1/e$ となる点の時間とした。同様に、細胞間脂質が形成する炭化水素鎖の充填構造については、構造が最も縮小した点から値が収束するまでの変化量が $1/e$ となる点の時間とした。図 3. (a) に多価アルコール水溶液ごとのソフトケラチン構造の保持時間 $t_{\text{softkeratin}}$ を示す。 $t_{\text{softkeratin}}$ は、GLY aq. では 3864 秒、GLY/DiG aq. では 4680 秒、GLY/BG aq. では 1281 秒、水では 3197 秒となり、グリセリンにジグリセリンを併用することで保持時間は長くなり、1,3-ブチレングリコールの併用では短くなった。図 3. (b) に示した細胞間脂質の炭化水素鎖の充填構造である 0.42 nm の保持時間 $t_{0.42 \text{ nm}}$ は、GLY aq. と GLY/BG aq. では 993 秒、972 秒となり、水の 935 秒とほぼ同等の値を示したが、GLY/DiG aq. では 1390 秒と長くなった。また、0.37 nm の保持時間 $t_{0.37 \text{ nm}}$ につ

いては、 $t_{0.42\text{nm}}$ と同様の傾向が見られた。さらに、他ドナーに由来する角層試料についても同様の実験を行い、角層中の各構造について保持時間 t を算出した。その結果、いずれの構造についても、ドナー差による影響で保持時間の短縮が見られた。また、GLY/DiG aq. を用いた場合には、いずれの構造においても、他の溶液に比べ保持時間が長くなり、溶液種を比較した際の傾向はドナーに依らず一致した。

GLY/BG aq. に浸漬した角層試料では、乾燥時におけるソフトケラチン由来の構造の保持時間 $t_{\text{softkeratin}}$ が短くなっており、角層細胞内の水分の減少が速いことが示唆された。一方で、GLY/DiG aq. では $t_{\text{softkeratin}}$ は長くなっており、角層細胞内の水分の減少が抑制されていると考えられた。また、GLY/DiG aq. では細胞間脂質の炭化水素鎖の充填構造の保持時間 $t_{0.42\text{nm}}$, $t_{0.37\text{nm}}$ も長くなっていることから、細胞間脂質は角層細胞内の水分の保持と関係しているとも考えられる。

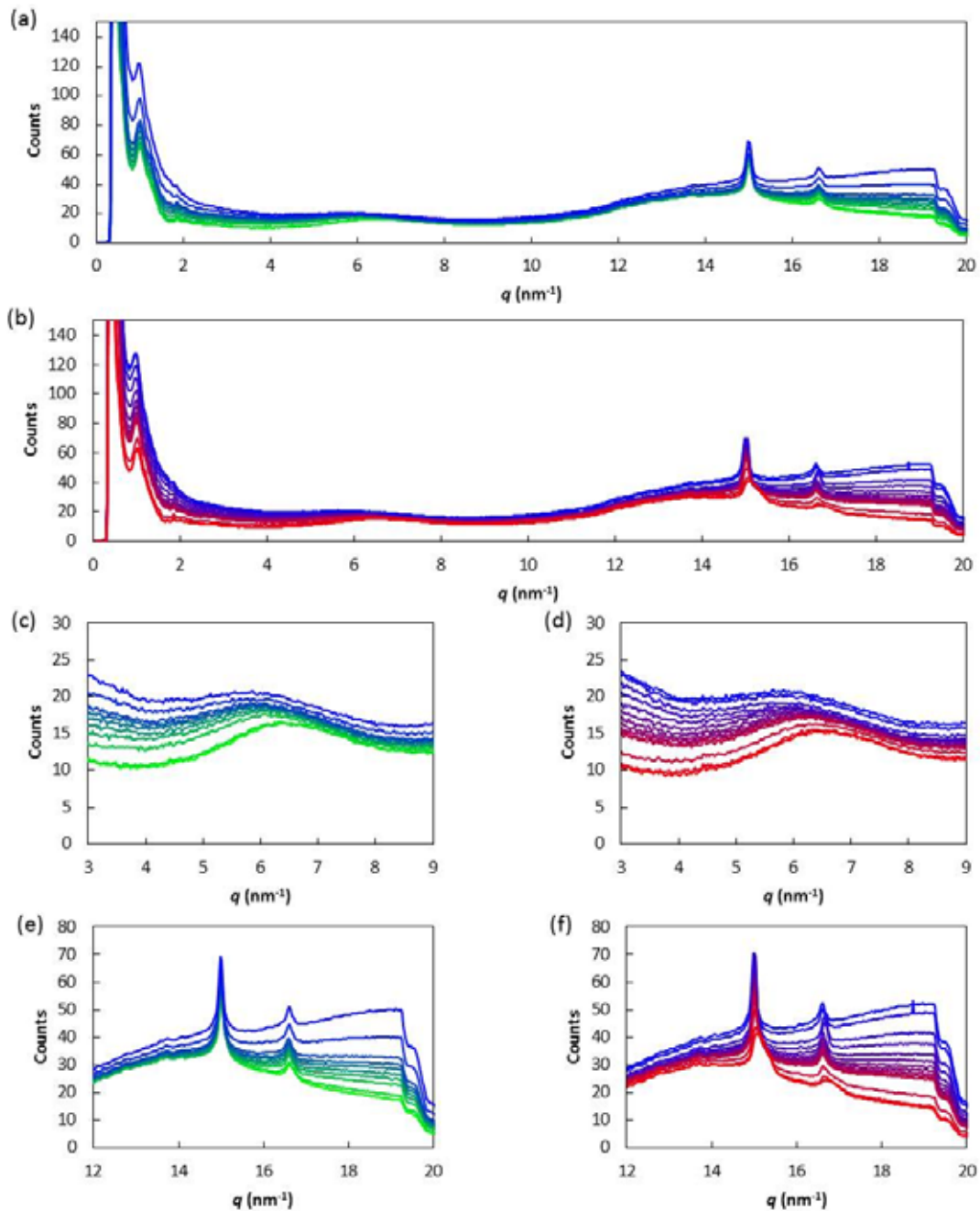


図 1. 浸漬時(緑→青、浸漬直後から 30 分後までの経時変化および 60、120 分後)、および乾燥時(青→赤、乾燥直後から 45 分後までの経時変化および、120、180、240 分後)における角層のプロファイルの経時変化
 (a) $q = 0\text{--}20\text{ nm}^{-1}$ 浸漬時、 (b) $q = 0\text{--}20\text{ nm}^{-1}$ 乾燥時、 (c) $q = 3\text{--}9\text{ nm}^{-1}$ 浸漬時、
 (d) $q = 3\text{--}9\text{ nm}^{-1}$ 乾燥時、 (e) $q = 12\text{--}20\text{ nm}^{-1}$ 浸漬時、 (f) $q = 12\text{--}20\text{ nm}^{-1}$ 乾燥時

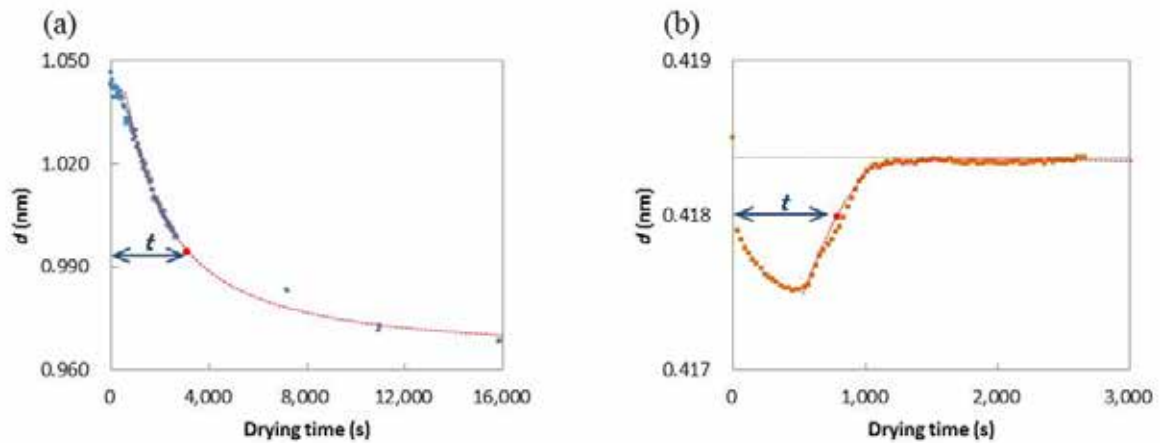


図 2. 水に浸漬した角層試料の乾燥時における d 値の経時変化
 (a) ソフトケラチン由来の構造 (1 nm)、(b) 細胞間脂質の炭化水素鎖の充填構造(0.42 nm)

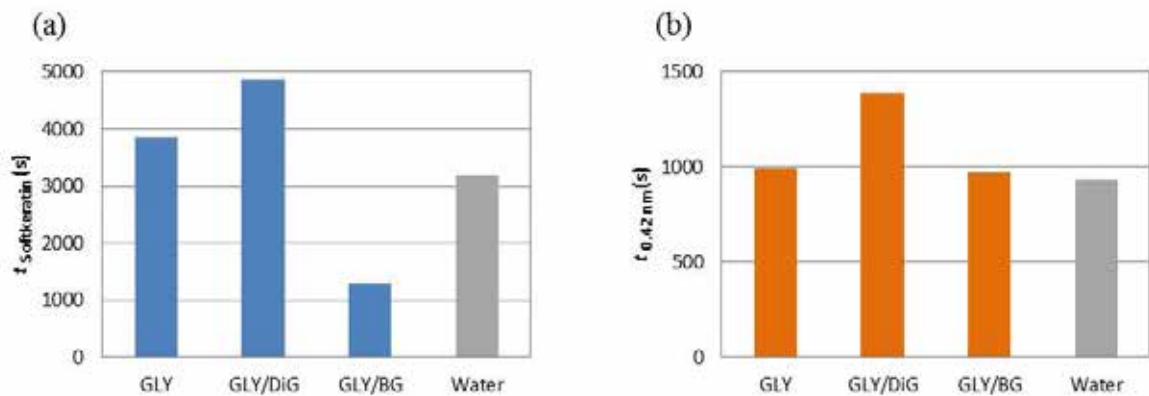


図 3. 乾燥時における角層構造の保持時間 t
 (a) ソフトケラチン由来の構造 (1 nm)、(b) 細胞間脂質の炭化水素鎖の充填構造(0.42 nm)

今後の課題：

これまで我々は、角層試料を測定セル中で多価アルコール水溶液へ浸漬させ、その後窒素気流下で乾燥させた際の角層構造の経時変化を X 線回折法により追跡し計測してきた。BL19B2 では、30 秒間隔と短い時間間隔での測定ができ、これまで変化を追うことが難しかったソフトケラチンに由来する構造や細胞間脂質の充填構造の水による変化の追跡が可能となった。本課題では、角層水分量の評価において相乗効果が見られていたグリセリンとジグリセリンを組み合わせた水溶液を用いることで、保湿効果と水の動的な振舞いとの関係を明らかにすることとした。

角層中の水分の大半が存在する角層細胞内の水の振舞いについては、グリセリンとジグリセリンを組み合わせることで、乾燥時にソフトケラチンの変化が抑制され、構造中に水を保持することが示唆された。また、細胞間脂質の充填構造の変化にも影響が見られており、細胞間脂質が保湿の重要な役割を担っている可能性が高いと考えられた。そのほか計画していた角層試料の部位差の影響については、計測に十分な時間が確保できなかったため実施できていない。

今後、細胞間脂質が形成する短周期ラメラ構造中の水の振舞いや、乾燥段階での角層の水分量についても併せて評価することで、保湿機構の解明に向けた総合的な解析が可能となると考える。

参考文献：

- [1] A. Tomiie et al., *J. Oleo Sci.*, **65**, 681-684 (2016).
- [2] I. Hatta et al., *Chem. Phys. Lipids*, **163**, 381 (2010).