

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
～保湿剤の種類および濃度による相違に着目して～
**Study on Effect of Moisturizer Based upon the Structural Modification of
Stratum Corneum with its Application -With Paying Attention to the
Difference of Moisturizers and its Concentration-**

豊島 亮祐^a, 村島 健司^a, 野々部 瑛^a, 大畑 哲也^a,
前田 航佑^a, 山下 凌^a, 山田 武^a, 八田 一郎^b
Toyoshima Ryosuke^a, Kenji Murashima^a, Hikaru Nonobe^a, Tetsuya Ohata^a,
Kosuke maeda^a, Ryo 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

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、濃度の異なるグリセリンおよび尿素水溶液を用いて、角層細胞のソフトケラチン構造、細胞間脂質の短周期ラメラ構造 (SLS) および炭化水素鎖の充填構造に及ぼす影響を解析した。グリセリンと尿素の濃度が 5、10 wt% では、保湿剤の種類による振舞の差異は少なく、角層細胞中の水分を保持する効果が認められた。一方で、グリセリン、尿素の濃度が 20、30 wt% と高い場合には、保湿剤の種類によって乾燥工程におけるヒト角層の構造に及ぼす影響が異なることを見出し、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。

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。保湿のための外用剤にはグリセリンあるいは尿素が配合されることが多いが、それらの特性の差、特に分子レベルの作用機構の違いについては解明されていない。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、まず典型的な保湿剤の分子レベルの作用機構を明らかにすることが重要と考えられる。水酸基を持つグリセリンとアミノ基を持つ尿素のように、官能基が異なる保湿剤について、それぞれの角層構造への影響を比較することにより、保湿剤の分子レベルでの作用機構を把握することができると思われる。

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および尿素の保湿能について研究を行い、保湿剤の分子構造や適用濃度を変えることで、保湿能やその持続時間が変化することを見出しており、この機構を検証すべく放射光を用いた研究を始めている。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 を用い、グリセリンおよび尿素が角層構造に及ぼす影響について、経時的な変化の測定を進めてきた[2017A1559, 2017B1607, 2019B1720, 2020A0813]。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 および炭化水素鎖の充填構造の振舞いが、グリセリン水溶液では水と比較して構造の変化が緩やかになることを明らかにした[1]。また、尿素水溶液に浸漬した角層では、乾燥によるソフトケラチン構造の収縮や細胞間脂質の SLS の振舞は、グリセリン処理と類似した挙動を示した。これらより、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。一方で、グリセリンと尿素の角層構造に対する作用については、炭

化水素の充填構造の振舞に相違が示唆されているものの、十分に検証できておらず、保湿剤の分子構造による影響の把握には至っていない。前述したように、ヒト皮膚の電気的水分量測定からは、保湿効果は保湿剤の濃度による影響が大きいことが確認されており、X線回折法においても保湿剤の濃度による角層構造への影響は異なる可能性がある。この違いを解析することで、グリセリンと尿素の角層への作用度合いおよび相違を解明できる可能性がある。

そこで本課題では、BL40B2にてPILATUS-2Mを用い、濃度の異なるグリセリンまたは尿素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、5、10、20、30 wt%グリセリン水溶液および5、10、20、30 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（酸化セリウムで校正）とした。検出器にはPILATUS-2Mを用い、露光時間を20秒とした。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、5 wt%の尿素水溶液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。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 (式) $d = 2\pi/q$ で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 ($d = 0.42 \text{ nm}$) と立方晶 ($d = 0.37, 0.42 \text{ nm}$) に由来するピークがそれぞれ検出された。また、尿素水溶液に浸漬した角層では、乾燥によって、 $q = 13.4, 15.7, 17.3 \text{ nm}^{-1}$ 付近に尿素の結晶構造 (正方晶系の反射(001)、(110)、(011)) に由来するピークがそれぞれ検出された。

水溶液に角層試料を浸漬時の小角領域のプロファイルの経時変化を図1(b), (e)に示す。浸漬することで、SLS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た。また、乾燥時には経時的に広角側へシフトし、その結果、浸漬前と同等のピーク形状となった。中角領域のプロファイルの経時変化を図1(c), (f)に示す。浸漬時には、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、乾燥時には広角側へシフトし、その結果、浸漬前と同等のピーク形状となった。広角領域のプロファイルの経時変化を図1(d), (g)に示す。浸漬時には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、乾燥時にはピークがわずかに広角側へシフト、形状がブロードとなり、その結果、浸漬前と同等の形状となった。

なお、尿素水溶液に浸漬した試料では、乾燥中に尿素の結晶構造に由来するシャープなピークが現れた。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。

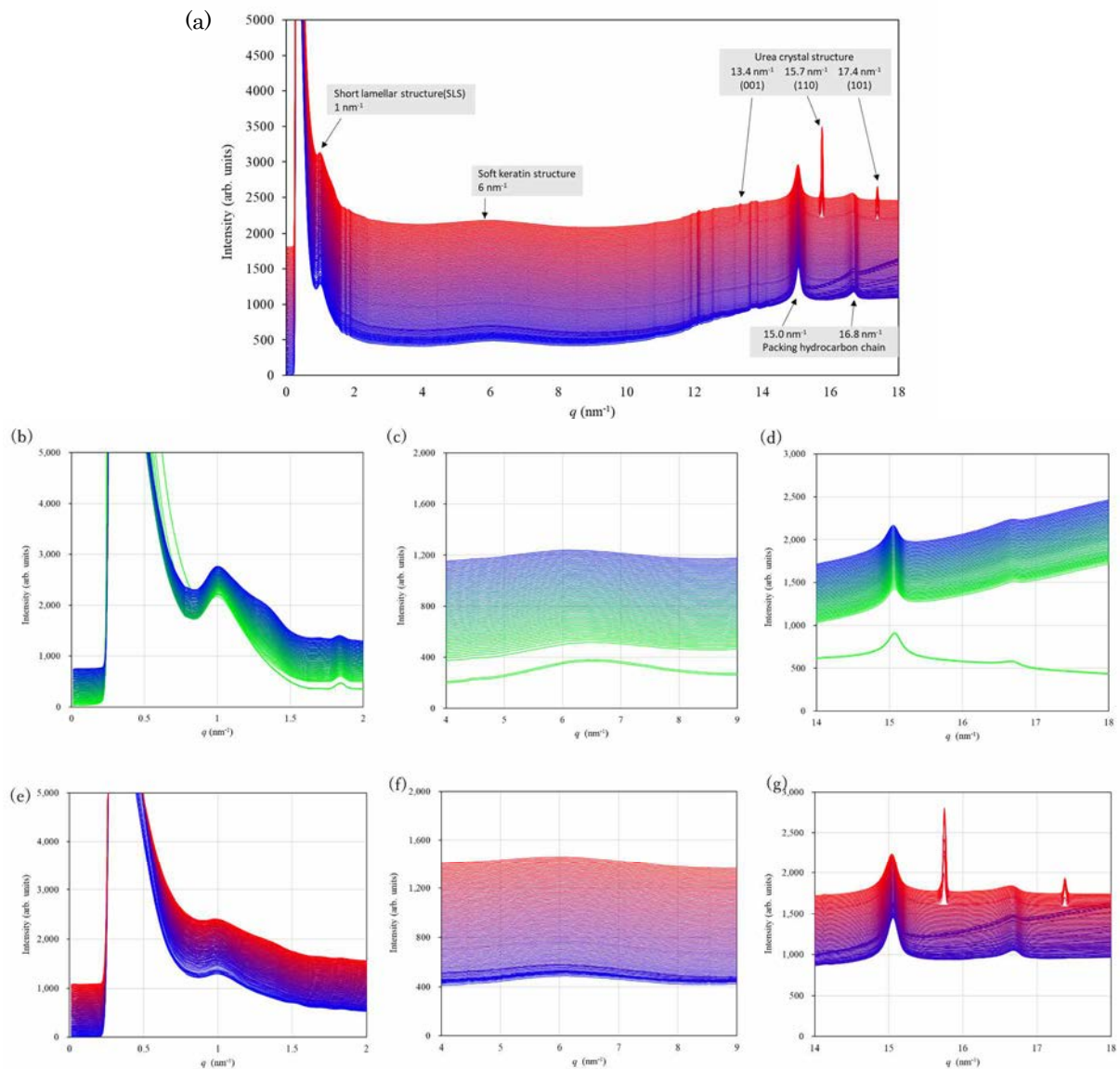


図 1. 水を浸漬した角層の浸漬時（緑→青）および乾燥時（青→赤）における X 線散乱プロファイル。

- (a) $q = 0-20 \text{ nm}^{-1}$ 乾燥時（乾燥 0-45 分後, 30 秒毎）
- (b) $q = 0-2 \text{ nm}^{-1}$ 浸漬時（乾燥角層および湿潤 0-30 分後, 30 秒毎）
- (c) $q = 4-9 \text{ nm}^{-1}$ 浸漬時（乾燥角層および湿潤 0-30 分後, 30 秒毎）
- (d) $q = 14-18 \text{ nm}^{-1}$ 浸漬時（乾燥角層および湿潤 0-30 分後, 30 秒毎）
- (e) $q = 0-2 \text{ nm}^{-1}$ 乾燥時（乾燥 0-45 分後, 30 秒毎）
- (f) $q = 4-9 \text{ nm}^{-1}$ 乾燥時（乾燥 0-45 分後, 30 秒毎）
- (g) $q = 14-18 \text{ nm}^{-1}$ 乾燥時（乾燥 0-45 分後, 30 秒毎）

短周期ラメラ構造の 1 次ピーク（6 nm）、ソフトケラチンに由来する構造（1 nm）および炭化水素鎖の充填構造に由来する構造（0.37 nm, 0.42 nm）の d 値の経時的な変化について解析した。図 2(a)に水およびグリセリン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。水に浸漬した試料は、乾燥直後から d 値が縮小する傾向を示した。これに対し、5、10 wt%グリセリン水溶液に浸漬した試料は、乾燥直後の d 値の変化が抑制され、その後緩やかに低下する傾向を示した。一方で、20、30 wt%グリセリン水溶液に浸漬した場合は、乾燥時の d 値の変化を長く抑制したが、その後は急激に d 値が低下した。図 2(b)に水および尿素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。5, 10, 20 wt%の尿素水溶液に浸漬した試料では、乾燥直後の d 値の変化が抑制され、その後緩やかに低下する傾向を示した。一方で、30 wt%の尿素水溶液に浸漬した試料では、乾燥直後の d 値の変化を抑制している時間が短くなり、その後は d 値が早く減少した。尿素水溶液に浸漬した試料において、尿素結晶に由来するピークを解析したところ、尿素的濃度が高いものほど、ピーク強度も大きくかつ出現する時間も早い傾向を示し、角層試料中での結晶化が進行しやすくなること示唆された。したがって、30 wt%の尿素水溶液に浸漬した試料では、乾燥時に尿素が結晶化することで尿素と水の界面の表面積が著しく低下し、角層試料中で水と相互作用する尿素が減少した可能性が考えられる。

短周期ラメラ構造 SLS のピークは、5、10 wt%グリセリン水溶液に浸漬した試料では、水と比較して d 値の低下が緩やかになる傾向を示した。一方で、20, 30 wt%グリセリン水溶液に浸漬した場合は、乾燥時の d 値の変化を一定時間抑制し、その後は急激に低下した。また、尿素水溶液に浸漬した試料では、濃度によって d 値の低下を抑制する時間や、その傾きが異なった（データは省略）。炭化水素鎖の充填構造に由来するピーク (0.37 nm, 0.42 nm) は、30 wt%グリセリン水溶液に浸漬した試料では、乾燥時の d 値の変化を一定時間抑制し、その後は急激に d 値が低下した。一方で、30wt%尿素水溶液に浸漬した試料は乾燥直後から急激に d 値が低下し、保湿剤の種類によって振舞が異なったことから、作用機構が異なる可能性が示唆された（データは省略）。

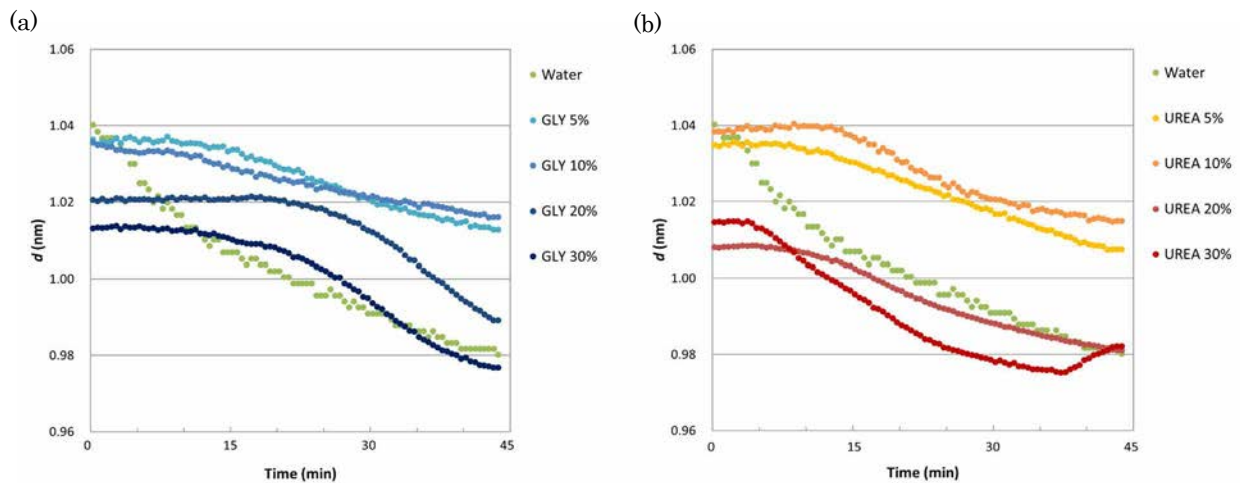


図 2. 乾燥時におけるソフトケラチンに由来する構造 (1 nm) の間隔 (d 値) の経時変化。

- (a) グリセリンの濃度による影響 (水, 5, 10, 20, 30 wt%)
- (b) 尿素的濃度による影響 (水, 5, 10, 20, 30 wt%)

今後の課題：

角層中のそれぞれの構造について、保湿剤の種類および濃度による構造変化への影響を追跡することにより、保湿剤の濃度が 20、30 wt%と高い場合に、乾燥工程におけるヒト角層の構造に及ぼす影響が異なることを見出し、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。しかしながら、保湿剤の濃度を変えた場合に、角層構造への振舞が変化した要因については、十分に解析できていない。この要因を明らかにするために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ことで、保湿剤の効果について角層内の分子構造に基づいて解明したい。

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).