

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
～保湿剤を併用した際の相乗効果の検証～
**Study on Effect of Moisturizer Based upon the Structural Modification of
Stratum Corneum with its Application – Verification of Synergistic Effect
by Combining Moisturizers –**

豊島 亮祐^a, 村島 健司^a, 野々部 瑛^a, 前田 航佑^a,
山下 凌^a, 設楽 大希^a, 山田 武^a, 八田 一郎^b
Ryosuke Toyoshima^a, Kenji Murashima^a, Hikaru Nonobe^a, Kosuke Maeda^a,
Ryo Yamashita^a, Hiroki Shidara^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について、グリセリン、尿素およびそれらを併用した水溶液の構造変化への影響を追跡した。これより、グリセリンおよび尿素は、角層中の直方晶の炭化水素鎖の充填構造と短周期ラメラ構造に作用し、これらが水分調整効果を発現することが示唆された。保湿剤の併用による相乗効果を明確にするためには、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、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。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。化粧品や医薬品では、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である。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。さらに、それぞれ異なる作用機構をもつ保湿剤を併用することにより、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、さらには複数の保湿剤を併用することによって、保湿能やその持続時間が漸進することを見出しており、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, 2021A1544]。その結果、グリセリンは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の収縮を抑制することで角層中の水分を保持する効果を示し、また、細胞間脂質の炭化水素鎖の充填構造を安定化することで、水分調整に寄与す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、ソフトケラチン内の 2 本の α -ヘリックス鎖間隔の収縮や細胞間脂質の短周

期ラメラ構造の振舞は、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、グリセリンと尿素を併用することで、相乗的に保湿効果が向上することが確認されており、X線回折法においても保湿剤の併用による角層構造への影響は異なる可能性がある。この単用と併用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の相違を解明できる可能性がある。

そこで本課題では、BL40B2においてPILATUS-2Mを用い、グリセリン、尿素およびそれらを併用した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、10 wt%グリセリン水溶液、10 wt%尿素水溶液および5 wt%グリセリン5 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(ベヘン酸銀で較正)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、10wt%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 $d=2\pi/q$ 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内の2本の 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。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(10 wt%尿素)に角層試料を浸漬および乾燥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。細胞間脂質の短周期ラメラ構造の周期は、浸漬時には水分の増加によって拡大し、乾燥時には水分の減少によって収縮することを示している。水溶液の出入りによる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、角層細胞中の水分の増加によって、ソフトケラチン内の2本の α -ヘリックス鎖間隔が拡大し、乾燥時には水分の減少によって構造が縮小することを示している。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の格子定数はわずかに拡大し、乾燥時には、わずかに収縮することを示している。乾燥時の振舞については図2(b)で詳しく説明をする。

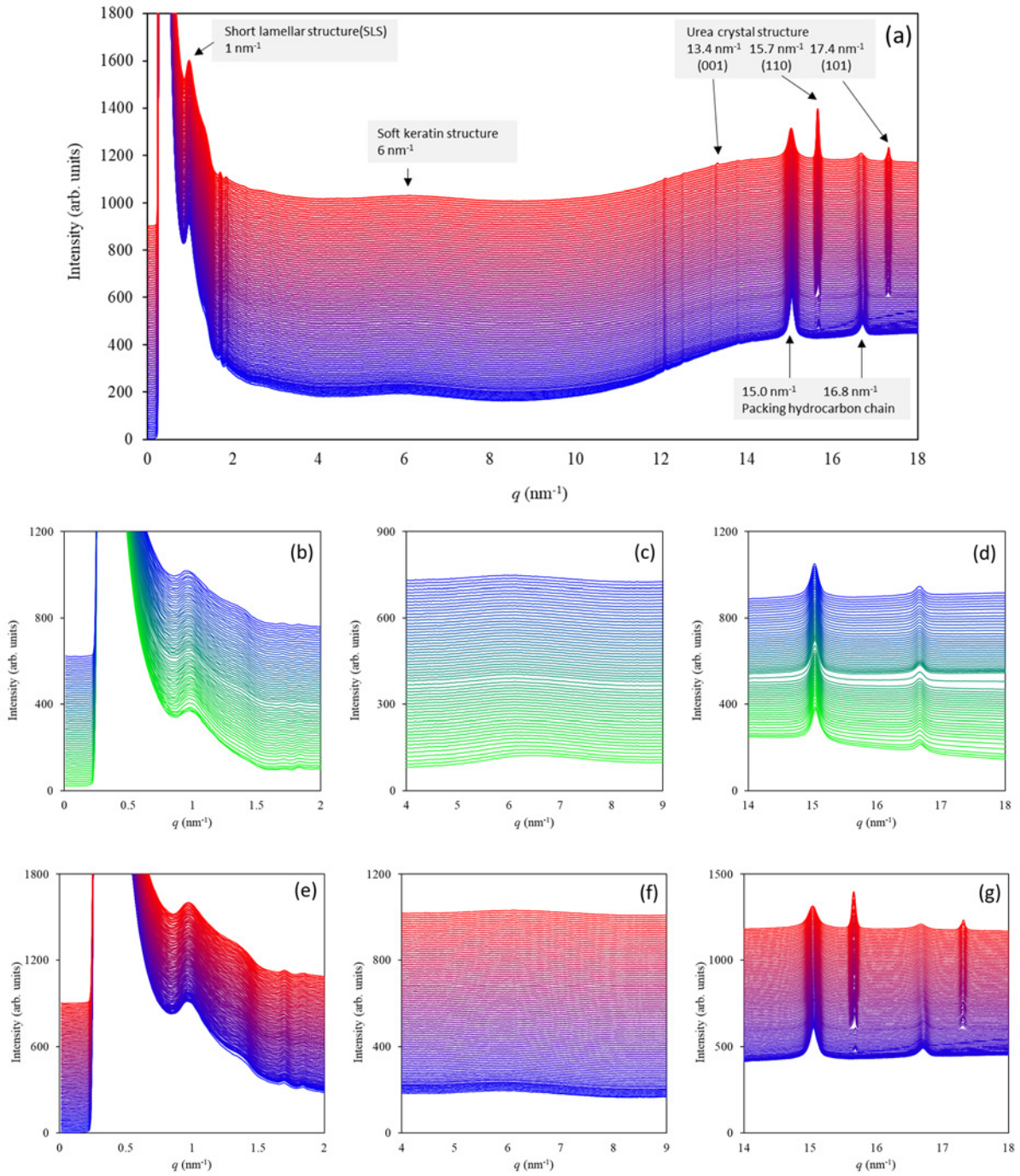


図 1.尿素(10wt%)水溶液を浸漬した角層の浸漬時(緑→青)、乾燥時(青→赤)における X 線散乱プロファイル。

- (a) $q = 0\text{--}18 \text{ nm}^{-1}$ 乾燥時(乾燥 0~45 分後, 30 秒毎)
- (b) $q = 0\text{--}2 \text{ nm}^{-1}$ 浸漬時(乾燥角層および湿潤 0~30 分後, 30 秒毎)
- (c) $q = 4\text{--}9 \text{ nm}^{-1}$ 浸漬時(乾燥角層および湿潤 0~30 分後, 30 秒毎)
- (d) $q = 14\text{--}18 \text{ nm}^{-1}$ 浸漬時(乾燥角層および湿潤 0~30 分後, 30 秒毎)
- (e) $q = 0\text{--}2 \text{ nm}^{-1}$ 乾燥時(乾燥 0~45 分後, 30 秒毎)
- (f) $q = 4\text{--}9 \text{ nm}^{-1}$ 乾燥時(乾燥 0~45 分後, 30 秒毎)
- (g) $q = 14\text{--}18 \text{ nm}^{-1}$ 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)、ソフトケラチン内の 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、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(a)に示すように、乾燥初期に過渡的な振舞が現れ、この後に短周期ラメラ構造の周期が単調に減少する。単調減少の勾配は水の場合が大きく、グリセリン、尿素およびその併用系で勾配は小さく、ほぼ同じである。これは乾燥初期においてはしばらく短周期ラメラ構造以外の角層内に自由水が残っていることが考えられる。また、その自由水の残り方が測定によって違っていることが考えられる。水の場合には約10分間自由水が残っていると考えられ、グリセリンと尿素の場合には約15分間自由水が残っていると考えられる。グリセリンと尿素の併用系の場合には、この過渡現象が明瞭には現れていない。これがこの試料だけに現れる現象か、普遍的な現象かについては現在のところ分かっていない。

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、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(b)に示すように、水、グリセリン、尿素およびその併用系のいずれも場合も、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、次に緩やかに複雑な変化を示し、さらに乾燥すると値が大きくなり、最後にほぼ平衡に達する。水の場合は過渡変化を経て約13分後に急速に平衡に達する。この格子定数が収縮する領域で直方晶の炭化水素鎖の充填構造が安定化していると考えている。一方、グリセリン、尿素およびその併用系の場合、この安定な状態が長く、乾燥を開始してから約20分後まで続いている。グリセリンと尿素、およびその併用系の場合で、安定な状態での振舞は違っており、グリセリンの場合に対して尿素を含む場合では安定な状態がより長く続いているように見える。これらの水に対する安定な状態の存在は、角層中の水分量を一定に調整することに寄与すると考えている。

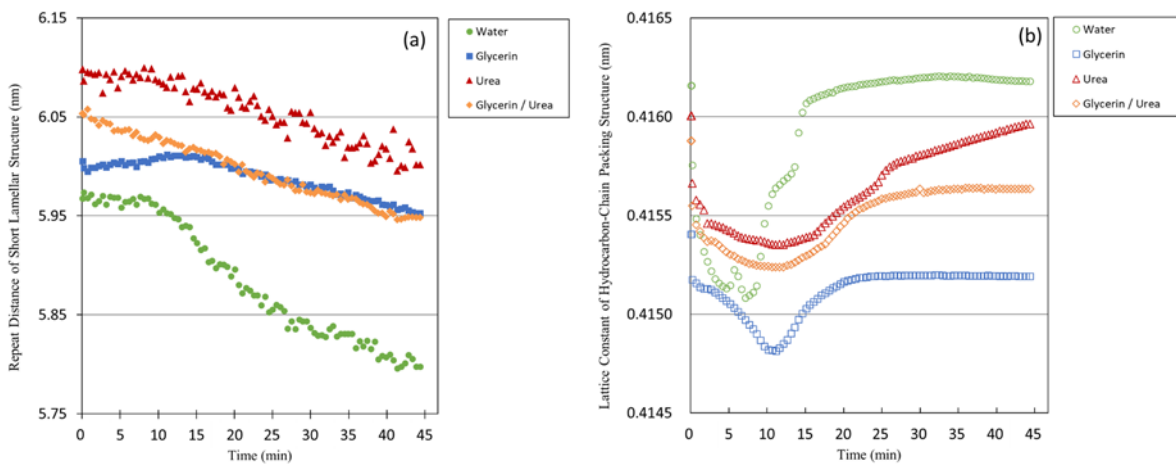


図2. 保湿剤水溶液を浸漬した角層の乾燥過程における間隔(d 値)の経時変化。

- (a) 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
- (b) 炭化水素鎖の充填構造に由来する構造(0.42nm)の変化

ここで、短周期ラメラ構造と直方晶の炭化水素鎖の充填構造に由来する構造の相関について述べる。図3に、乾燥過程において、短周期ラメラ構造の周期の勾配が変化するまでの時間と直方晶の炭化水素の充填構造が安定化している時間を示す。ここに示すように、水、グリセリン、尿素およびその併用系のいずれも場合も、短周期ラメラ構造の周期の勾配が変化する時間と直方晶の炭化水素の充填構造が安定化している時間はほぼ一致していた。以上のように、角層中の水分を調整する役割を果たすと考えられる短周期ラメラ構造と直方晶の炭化水素鎖の充填構造は強い相関を示す。

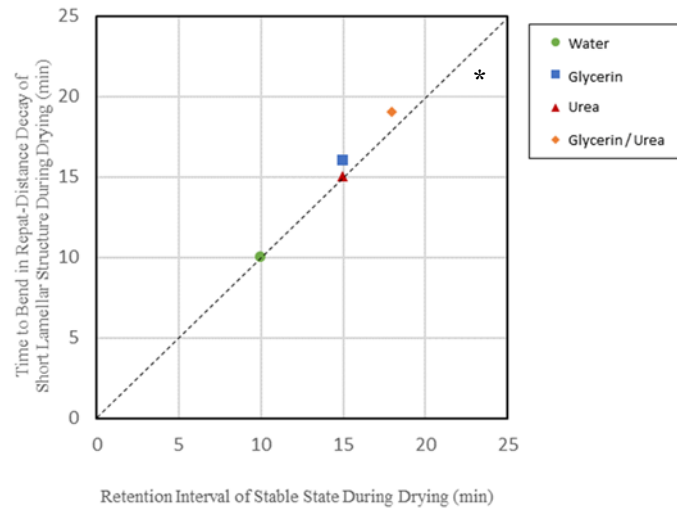


図3. 短周期ラメラ構造と直方晶の炭化水素の充填構造における乾燥時の振舞の相関性.
*図中の破線は、完全に一致する場合を示す

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組み合わせによる構造変化への影響を追跡することにより、グリセリンと尿素は角層中の角層細胞と細胞間脂質の両方に作用し、水分調整効果を示すことが示唆された。一方で、グリセリンと尿素の差異が明確に至るまでには、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。

また、グリセリンと尿素の併用による相乗効果を明確にするためには、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、角層の構造変化を総合的に解析する必要がある。加えて、グリセリンと尿素の併用比率を変えてX線回折測定することにより、併用による効果を明確にできる可能性も考えられる。

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).