

放射光 X 線回折を利用した角層細胞間脂質の構造解析に基づく
医薬品・化粧品の開発

**Development of pharmaceutical/cosmetic formulation based on
structure analysis of lipid lamellar in stratum corneum
employing synchrotron X-ray diffraction**

小幡誉子^a, 押村英子^b, 築瀬香織^c, 國澤直美^d, 笠原淳仁^e, 村越紀之^e, 坂本一民^e,
天野智史^f, 内田尚志^f, 佐野則道^g, 酒井恵^g, 野邊誠^h, 八田一郎ⁱ, 太田昇ⁱ, 井上勝晶ⁱ,
八木直人ⁱ, 渡邊大至^a, 高山幸三^a

Yasuko Obata^a, Eiko Oshimura^b, Kaori Yanase^c, Naomi Kunizawa^d, Yoshihito Kasahara^e,
Noriyuki Murakoshi^e, Kazutami Sakamoto^e, Satoshi Amano^f, Naoyuki Uchida^f, Norimichi Sano^g,
Megumi Sakai^g, Makoto Nobe^h, Ichiro Hattaⁱ, Noboru Ohtaⁱ, Katsuaki Inoueⁱ, Naoto Yagiⁱ,
Hiroshi Watanabe^a, Kozo Takayama^a

^a星薬科大学, ^b味の素(株), ^cクラシエホームプロダクツ(株), ^d(株)資生堂, ^e(株)成和化成,
^f久光製薬(株), ^gプロクター・アンド・ギャンブル・ジャパン(株), ^hユースキン製薬(株),
ⁱ(財)高輝度光科学研究センター

^aHoshi University, ^bAjinomoto Co., Inc., ^cKracie Home Products, Ltd., ^dShiseido Co., Ltd.,
^eSeiwa Kasei Co., Ltd., ^fHisamitsu Pharmaceutical Co., Inc., ^gProctor & Gamble Japan K.K.,
^hYuskin Pharmaceutical Co., Ltd., ⁱSpring-8/JASRI

ヒト皮膚の表面にある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、化粧品や経皮吸収型製剤に広く含まれている化合物が細胞間脂質の構造に及ぼす影響について、溶液セルを用いて小角・広角同時測定により検討した。予備的な実験によりヘアレスマウス角層への水の適用では短周期ラメラ周期の膨潤の回折変化が得られ、またエタノールの適用では角層細胞部の構造の変化が大きいことが観測されている。このように適用する化合物により変化を受けやすい構造や微細な変化を高感度で検出するために、溶液セルを用いることでこれらを精密に解析することが可能になった。各種化合物溶液をヒト角層に作用したときの角層中の構造変化の系統的な実験を行った。

キーワード： ヒト角層、皮膚角層細胞間脂質、ラメラ構造、ソフトケラチン、溶液セル

【目的】

近年、角層細胞間脂質が構成する規則正しい配列、すなわちラメラ構造が皮膚機能の重要な一部である生体防御機構に寄与していることが分かってきたが、水分量や化合物の適用による細胞間脂質の

構造変化については未だ不明な点も多い。化粧品や医薬品の適用により皮膚表面、すなわち角層の状態がどのように変化するかについては非常に興味のあるところである。これからの高齢化社会において、医薬品の適用により疾病を治療することのみならず、化粧品の使用によって快適な生活を確保することは、非常に重要な課題である。このように医薬品・化粧品関連の「ヘルスケア」領域では、角層の、特に細胞間脂質の機能のみならず構造についても企業の視点から関心がもたれている。現在、化粧品業界では指定成分表示に代わり全成分表示が義務付けられ、規制緩和が実現している一方で、日本化粧品学会が昨年「化粧品機能評価ガイドライン」を策定したことから、より優れた品質と機能を備えた化粧品の開発が求められるようになってきている。一方、医薬品業界では、一昨年4月に第15改正日本薬局方が施行され、製剤総則に「経皮吸収型製剤」が新規収載された。このことは、皮膚を疾病治療の製剤の適用部位として注射にかわる薬物の全身投与方法として経皮吸収型製剤はすでに医療の現場でその有用性を高く評価されていた経緯も手伝って、その効果が法的にも広く認知された結果である。薬物が皮膚を通して体内へ入る場合、その律速段階となるのが、皮膚表面の角層の透過であると考えられており、製剤の適用時に生じる皮膚表面、すなわち角層の変化は大きいと予想される。

しかしながら、これまでは細胞間脂質の重要性についての認識はあるものの、その構造について調べる手段が限られており、直接細胞間脂質の構造を明確にすることは困難であった。物質の構造を調べる手段として繁用される通常のX線回折装置による測定では、角層から得られる細胞間脂質の回折は非常に強度が小さく、製剤成分の適用による変化を議論することはできなかった。すなわち、これまで角層細胞間脂質の構造の重要性は認識されながらも、実際の実験の手法が確立されていなかったことから製品開発にはミクロな脂質構造の情報は生かされてこなかったわけである。皮膚表面の凹凸の状態、色調あるいは水分保持機能を評価する方法はいくつもあり、このようなマクロな方法を中心に製品開発が行われてきた。最近、SPring-8で行われている溶液セル¹⁾を使用した角層細胞間脂質の構造解析から多くの結果が得られている²⁻⁶⁾。放射光X線回折を用いることによって細胞間脂質の構造変化を調べれば、これまでは知ることのできなかった細胞間脂質の分子レベルでの変化についての製品評価が可能となる。従って、この手法を利用して、繁用される化合物が惹起する角層細胞間脂質の構造解析を行う産業基盤技術を確立することが急務であると考えられる。

本研究に参加した企業は化粧品や経皮吸収型製剤を開発しており、溶液セルを用いて複数の企業が一体となって皮膚角層の構造に基づき新しい製品の性能評価をするとともに、これまでの製品開発から効果があると分かっている製品についてはその作用機序の構造情報をデータベースとしてまとめて次の新製品の開発の基盤を確立する。まずは後者の測定およびデータベース化に企業が一体となって取り組むことにより、参加する企業のこの研究分野でのポテンシャルを高めることを目標とした。また、将来的に溶液セルを用いた各企業独自の製品の性能評価を行うことにより、今後製品開発に際して、製品を構成する成分を適用して生じる変化を評価するための基盤技術とすることを目標にする。

【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,

France) を洗浄・乾燥後、予め 25wt% 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、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た。

【結果、考察】

適用した化合物ならびに得られた広角領域の回折プロファイルの変化を表 1 にまとめた。

まず、化粧品の成分として重要である水を 2 時間適用した場合は、細胞間脂質由来の回折は小角、広角ともに若干強度が減少した⁷⁾。また、機能性を謳った化粧品に添加されるアミノ酸の一種であるアルギニンの塩酸塩を 10% 溶液として適用したところでは、水の適用による変化とほぼ同様の結果が得られた。広角領域の回折強度はわずかに減少したが、適用した溶液にはアルギニン以外に塩素イオンが含まれているため、このようなイオンと細胞間脂質の相互作用についても調べる必要がある。さらに、保湿成分として化粧品に繁用されるグリセリンの 50% 溶液の適用を試みたが、水のみを適用した際の回折プロファイルの変化に比べて、変化自体が緩慢になった。これは、グリセリンの濃度が高すぎることによって角層内への浸透が進行せず、結果的にグリセリン、水のどちらも角層に作用できなかったのではないかと考察した。適用濃度や適用時間について再考の余地があり、今後の課題としたい。界面活性剤に分類されるドデシル硫酸ナトリウムおよびラウリン酸ナトリウムの 10% 溶液では、小角の領域に会合体の散乱とみられるピークが出現し、これらが細胞間脂質の回折ピークに重なって経時的に変化した。ピーク全体を眺めてみればエタノールの適用で認められたような顕著な変化は認められないことから、水で得られている変化とほぼ同様といえる。したがって、皮膚刺激性があると一般的に言われている界面活性剤の適用においても、その直接作用によって細胞間脂質が大きな影響を受けている、すなわち細胞間脂質の構造が極端に乱れる可能性は小さいと考察される。

これに対して、経皮吸収型製剤の成分として重要なエタノールの適用では、適用時間の経過とともに小角、広角の領域に観察される細胞間脂質由来の回折ピークの強度は明らかに減少し、脂質の構造が変化している。一方、経皮吸収型製剤の成分として用いられるミリスチン酸イソプロピルでは、広角の強度変化はほとんどなかった。一方、強力な薬物の経皮吸収促進効果をもつ *d*-リモネンでは、広角のピークが強度減少を示したことから、細胞間脂質の充填性に影響を与える可能性が示唆された。また、市販製剤によく用いられている *dl*-カンフルは室温では固体であるため、5% エタノール溶液として適用した。細胞間脂質の回折ピークの変化はエタノールの効果とほとんど一致した。経皮吸収促進効果の評価では一般に相乗効果があるとされており、類似した化学構造を有する *l*-メントールの適用でも細胞間脂質の構造変化の報告があるが⁸⁾、今回の実験では細胞間脂質の構造変化に対する相乗効果については明確にはできなかった。

表1 種々の化合物の適用による細胞間脂質由来の広角X線回折プロファイルの変化

Chemical(s)	WAXD	
	Orthorhombic & Hexagonal (2.4 nm ⁻¹)	Orthorhombic (2.7 nm ⁻¹)
Water	Intensity : ↓	Intensity : ↓
	Position : 僅かに小角側へ移行?	Position : 僅かに小角側へ移行?
Arginine hydrochloride (10% Solution)	Intensity : ↓	Intensity : ↓
	Position : 僅かに小角側へ移行?	Position : 僅かに小角側へ移行?
Glycerol (50% Solution)	Intensity : 不変	Intensity : 不変
	Position : 不変	Position : 不変
Sodium dodecyl sulfate (10% Solution)	Intensity : ↓	Intensity : ↓
	Position : 僅かに小角側へ移行?	Position : 僅かに小角側へ移行?
Sodium laurate (10% Solution)	Intensity : ↓	Intensity : ↓
	Position : 僅かに小角側へ移行?	Position : 僅かに小角側へ移行?
Ethanol	Intensity : ↓↓	Intensity : ↓↓
	Position : 不変	Position : 不変
Isopropyl myristate	Intensity : 不変	Intensity : 不変
	Position : 不変	Position : 不変
d-Limonene	Intensity : ↓↓↓	Intensity : ↓↓↓
	Position : 不変	Position : 不変
dl-Camphor (5% in Ethanol)	Intensity : ↓↓	Intensity : ↓↓
	Position : 不変	Position : 不変

【今後の課題】

いくつかの化合物の適用において、実験条件が適切でなかった可能性があるため、得られた結果をもとに条件を改善してさらに検討を行いたい。また、今回は基礎的な化合物を中心に測定を行ったが、目的を限定して添加されるような化合物でも実験を行ってデータベースとしたい。さらに、適用する化合物の物理化学的性質と細胞間脂質の変化の割合との対応や、すでに行われている種々の実験データとの関連についても総合的に考察する必要がある。また、細胞間脂質の動的変化の割合を化合物の種類や混合比で制御することによって、有効な化粧品・医薬品の開発に結びつけることが重要である。

【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 18 年度先端大型研究施設戦略活用プログラム成果報告書 SPring-8 戦略活用プロ

グラム (2006B0116)、pp.20-22.

- 3) 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.
- 4) 中沢寛光、平成 19 年度 SPring-8 重点産業利用課題成果報告書 (2007A1955)、p.131.
- 5) 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.
- 6) 中沢寛光、平成 19 年度 SPring-8 重点産業利用課題成果報告書 (2007B1806)、pp.15-16.
- 7) N.Ohta, S.Ban, H.Tanaka, S.Nakata, I.Hatta, *Chem.Phys.Lipids*, **123**, 1-8 (2003).
- 8) Y.Obata, I.Hatta, N.Ohta, N.Kunizawa, N.Yagi, K.Takayama, *J.Contr.Rel.*, **115**, 275-279 (2006).