

経皮吸収型製剤の製剤成分が角層細胞間脂質に及ぼす影響に関する 定量的解析

Determination of Change in Lipid Lamellar Structure in Stratum Corneum by the Administration of Components of Transdermal Formulation

小幡 誉子^a, 佐野 啓^a, 太田 昇^b, 八木 直人^b, 八田 一郎^b, 高山 幸三^a
Yasuko Obata^a, Hiromu Sano^a, Noboru Ohta^b, Naoto Yagi^b, Ichiro Hatta^b, Kozo Takayama^a

^a星薬科大学, ^b(公財)高輝度光科学研究センター
^aHoshi University, ^bSPRING-8/JASRI

ヘアレスマウス角層において、広角領域にあらわれる細胞間脂質の充填構造由来の2つの回折ピークの積分強度比は、*l*-メントールの適用3時間程度まで速やかに減少し、その後定常状態となった。積分強度比の減少は、細胞間脂質の六方晶の割合の減少と考えることができることから、*l*-メントールは適用初期の段階から六方晶に優先的に働きかける可能性が示唆された。また、それぞれの回折ピークは時間の経過とともに、強度が減少することから *l*-メントールの作用は六方晶、斜方晶どちらにも及んでいると考えられる。

キーワード： 角層細胞間脂質、ラメラ構造、*l*-メントール、経皮吸収型製剤、外用剤

背景と研究目的：

製剤から皮膚へと移行した薬物が血流にはいり全身に送達される手法は「経皮吸収」と呼ばれる。これを製剤化した「経皮吸収型製剤」は、抹消血管から直接全身循環へと薬物が移行するため、注射と同じ効果が期待できる優れた薬物投与方法である。注射のような痛みを伴わず、嚥下困難となった高齢者や乳幼児にも提供可能で、医療従事者の負担も軽減できる。したがって多くの薬物を「経皮吸収型製剤」にすることができれば、大きな社会貢献が実現する。しかしながら皮膚表面には「角層」とよばれる厚さわずか十数マイクロメートルの薄い膜が存在し、これが乾燥や異物侵入から生体を保護するバリアとして機能している。そのため、通常の状態では皮膚から薬物を体内へと送達することは容易ではない。したがって現在のところ限られた薬物のみが経皮吸収型製剤として市販されている。皮膚透過の困難な薬物の吸収性を改善する方法として、製剤成分の一部に吸収促進作用をもつ化合物(吸収促進剤)を配合する手法が簡便であり、利便性が高い。著者らは、抗リウマチ薬メロキシカムのリポソーム製剤に *l*-メントールを配合することで、メロキシカムの皮膚透過が改善されることを報告している[1]。すでに、溶液セルを用いた実験により、液状化合物が細胞間脂質に及ぼす影響については検討が行われているが、常温で固体の化合物のなかにも薬物の経皮吸収を促進する化合物が知られている。これまでの溶液セルの実験では、常温で固体の化合物については、アルコールや水に溶解して作用挙動を観察する方法をとってきた。しかしながら、角層に適用する際にはアルコールや水の影響が大きくであるため、実際にはわずかな添加量で薬物の経皮吸収を劇的に促進する *l*-メントールのような常温で固体の化合物と細胞間脂質の相互作用を分子レベルで知ることは困難であった。これまでの研究から、*l*-メントールの作用部位は細胞間脂質であり、その作用機構は、共存する薬物の皮膚表面への分配の促進と皮膚内での拡散の増大であるといわれてきた。しかしながら、これらの作用機構のうち、とくに薬物の拡散性の増大に関しては直接実験で検証する手法がなかった。そこで、放射光 X 線回折によって細胞間脂質の構造を調べ、さらに *l*-メントールを昇華させて蒸気として適用することで惹起される細胞間脂質の構造変化を追跡すれば、物質透過のバリアとして働く細胞間脂質に対する *l*-メントールの作用を直接観察できると考えた。今回は、皮膚適用製剤に繁用される化合物のうち *l*-メントールに焦点をあて、昇華させた蒸気を角層に適用することにより、細胞間脂質と *l*-メントールの相互作用を分子レベルで検討することを目的とした。

実験：

角層の剥離・処理：実験には、ヒト角層と類似したラメラ構造を有する一方で比較的細胞間脂質の回折ピークが鋭く、構造変化をより鋭敏に観察できるヘアレスマウス角層を使用した。トリプシン処理で皮膚組織より剥離した、ヘアレスマウス角層(7週齢、♂)を洗浄・乾燥後、内径1mmのガラスキャピラリーに充填した。角層の上下にガラスろ紙を少量充填し、ガラスろ紙の上部に乳鉢で粉碎したL-メントール微粉末を静置した。

放射光 X線回折実験：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 0.83 nm (15 keV)、フラックス 3×10^{10} photons/s、Vertical 38 μ rad、Horizontal 254 μ rad の入射 X線を用いた。試料から検出器までの約 500 mm を真空引きし、300 mm \times 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[2, 3]。得られた回折プロファイルをガウス関数にあてはめ、積分強度、ピーク位置、半値幅を求めた。カメラ長の較正にはベヘン酸銀($d=58.38$ nm)を使用した。

結果および考察：

ヘアレスマウス角層からは小角領域に約 13 nm および約 6 nm の長周期および短周期のラメラ構造が観察される。今回の実験では小角領域の回折はブロードで L-メントールの適用により時間の経過とともに回折強度のわずかな減少が認められた。

一方、広角領域にあらわれる細胞間脂質の充填構造由来の 2 つの回折ピーク $S (=2\sin(\theta)/\lambda)=2.4$ nm $^{-1}$ および $S (=2\sin(\theta)/\lambda)=2.7$ nm $^{-1}$ の回折ピークは時間の経過に伴って変化した(図 1)。これらのピークの積分強度を解析したところ、図 2 に示すようにいずれも強度の減少が認められた。この結果は、細胞間脂質が L-メントールの作用により充填構造を維持できなくなり液晶化することを意味している。さらに、これらの 2 つのピークの積分強度比($R_{2.4/2.7}$)は、L-メントールの適用 3 時間程度まで速やかに減少し、その後定常状態となった(図 3)。細胞間脂質の充填構造のうち、六方晶はすべての格子面間隔が 0.42 nm($S (=2 \sin(\theta)/\lambda)=2.4$ nm $^{-1}$)であるが、斜方晶は格子面間隔が 0.42 nm の面と 0.37 nm($S (=2 \sin(\theta)/\lambda)=2.7$ nm $^{-1}$)の面が 2:1 の割合となっていると推論できる。したがって、 $S (=2 \sin(\theta)/\lambda)=2.4$ nm $^{-1}$ および $S (=2 \sin(\theta)/\lambda)=2.7$ nm $^{-1}$ の割合を議論することで、適用した化合物の細胞間脂質の構造に対する効果についての定量的考察に関する手掛かりが得られる。すなわち、 $R_{2.4/2.7}$ は、細胞間脂質の六方晶/斜方晶の存在比と考えることができるためである。 $R_{2.4/2.7}$ の値は大きいほうが六方晶の割合が多いことを意味しているので、実験の結果から L-メントールは適用初期の段階から六方晶へと働きかける可能性が示唆された。加えて、それぞれの回折は時間の経過とともに、強度が減少することから L-メントールの作用は六方晶、斜方晶どちらにも及んでいると考えられるが、六方晶に優先的に働くことにより細胞間脂質の液晶化を導き、結果的に角層の物質透過性の増大を引き起こすと考えることができる。

L-メントールと同じく常温で固体である d-メントール、dl-メントールおよび dl-カンフルについても当初実験を計画していたが、ビームタイムの配分が計画よりも少なかったことから、実験実施には至らなかった。また、角層に生じる相転移(32°C、40°C、55°C)を考慮した測定を行うことも予定していたが、室温測定のみを行った。

今後の課題：

より多くの薬物について経皮吸収型製剤を開発するためには、薬物の皮膚透過を促進する技術が不可欠である。なかでも共存する薬物の皮膚透過を促進する製剤成分を配合する方法は、簡便で効果が高い。今回は、すでに皮膚適用製剤を中心に広く配合されている L-メントールに絞って検討を行ったが、この手法を用いてより広範な化合物のスクリーニングを行うことで、効果の高い製剤成分が提案可能となる。

また、繰り返しの X線照射により試料損傷が予想されるが、L-メントールの適用による細胞間脂質の構造変化は、試料損傷を大きく上回る変化として検出されていると考えている。また、角層に作用した L-メントール量を明確にすることで、細胞間脂質の変化の度合いと L-メントール量の相関関係を明らかにする実験を考えたい。

参考文献：

- [1] S. Duangjit et al., *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 1-9, (2012).
- [2] I. Hatta et al., *Chem. Phys. Lipids.*, **163**, 381-389, (2010).
- [3] Y. Obata et al., *J. Contr. Rel.*, **115**, 275-279, (2006).

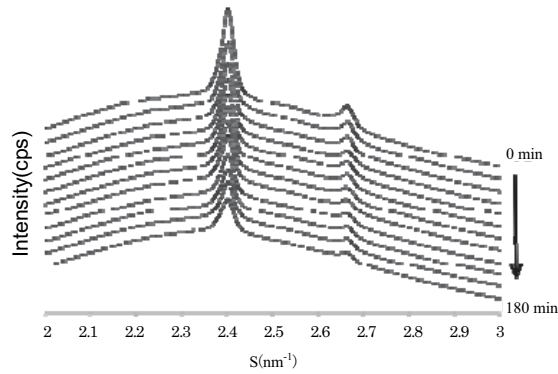


図1. *l*-メントール適用によるヘアレスマウス角層細胞間脂質 X線回折プロファイルの経時間変化

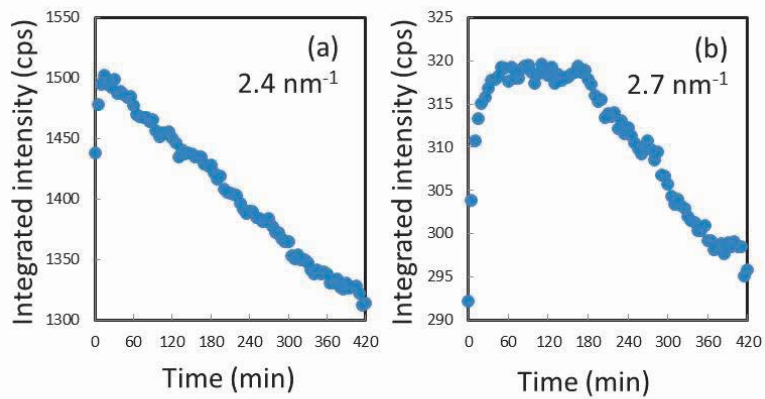


図2. 脂質充填構造由来ピークの積分強度変化

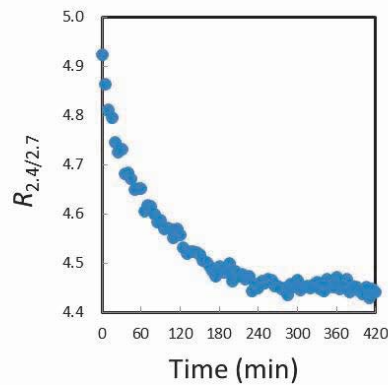


図3. 脂質充填構造由来ピークの積分強度比変化