

皮膚角層細胞間脂質のラメラ周期に及ぼす *l*-メントールの効果 Effect of *l*-menthol on the Lamellar Periodicity of Intercellular Lipids in Stratum Corneum

小幡 誉子^a, 太田 昇^a, 吉田 真也^a, 佐野 啓^a, 八木 直人^b,
八田 一郎^b, 高山 幸三^a
Yasuko Obata^a, Noboru Ohta^b, Shinya Yoshida^a, Hiromu Sano^a, 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

角層細胞間脂質のラメラ構造の存在により、薬物の皮膚透過は通常は容易でないため治療効果の高い経皮吸収型製剤の開発には、薬物の経皮吸収を促進する製剤成分を併用する必要がある。今回は、細胞間脂質のラメラ周期の変化を指標として製剤成分の薬物吸収促進効果を調べる手法を検討した。その結果、繁用される化合物を蒸気として直接角層に適用することに成功し、細胞間脂質と製剤成分の相互作用の強弱を分子レベルで判断できる可能性が示された。

キーワード: 角層細胞間脂質、ラメラ構造、*l*-メントール、経皮吸収促進剤、製剤成分

背景と研究目的:

皮膚角層中に存在する細胞間脂質は、セラミド、コレステロールおよび脂肪酸を構成成分として、外界からの異物侵入や体内水分蒸散に対するバリアとして重要な役割を果たしている。そのため、通常の状態では治療上有効量の薬物を皮膚から体内へ吸収させることは難しい。そこで、効果の高い製剤を開発するには、製剤成分として薬物の経皮吸収作用を有する化合物を配合することが望ましい。これまでの研究から、皮膚透過実験において薬物の吸収促進効果をもち、医薬品、食品、日用品に広く用いられている *l*-メントールは、角層細胞間脂質へと働きかけて、強固なラメラ構造を液晶化する作用を持つことが明らかになっている[1]。しかしながら、*l*-メントールは室温では固体であるため、これまでは水・エタノール溶液として角層に適用してX線回折実験を行ってきた。そのような理由により、水やエタノールの効果と *l*-メントールの効果を正確に分離することが困難で、*l*-メントール自体の効果は推論の域を出ていなかった。今回は、*l*-メントールを昇華させて得られる蒸気を還流することにより、*l*-メントール自体の効果と直接調べる方法を考案し、細胞間脂質と *l*-メントールの相互作用をラメラ周期の変化を指標に分子レベルで検討した。

実験方法:

角層の剥離・処理: ヘアレスマウス腹部摘出皮膚をトリプシン溶液(0.1%)に24時間浸漬後、角層を剥離した。剥離した角層は洗浄・乾燥後、ガラスキャピラリーに充填し、*l*-メントールの昇華蒸気を還流しながら経時的にX線回折測定を行った。

X線回折測定: SPring-8 BL40B2 において小角・広角X線回折測定を行った。波長 0.083 nm、試料から検出器までの約540 mmを真空引きし、300×300 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。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。露光時間は30秒とし、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、考察:

昇華させた *l*-メントールを適用した長周期ラメラ構造の回折プロファイルの経時変化をFig.1に示した。また、長周期ラメラ構造の2次回折のピークの積分強度の変化をFig.2(a)に、ピーク位置をFig.2(b)に、さらに半値幅をFig.2(c)に示した。エタノールの適用による回折プロファイルの変化は

すでに報告されているが、*L*-メントールをエタノール溶液に溶解して得られた回折プロファイルの変化はこれと同様であった[2]。しかしながら、薬物の経皮吸収促進効果については、*L*-メントールとエタノールの協同効果が認められているため、細胞間脂質のラメラ構造変化に対して*L*-メントールの寄与は無視できないと推察された。今回の実験で得られた結果では、積分強度は時間の経過に伴って減少したことから、*L*-メントールの適用により長周期ラメラが液晶化している可能性が示唆された。このことは、薬物の皮膚透過に際して、実質的な障害物であるラメラ構造が緩むことで、薬物の拡散性が増大することを裏付けるデータである。さらに、ピーク位置は時間の経過とともに広角側へ移行し、半値幅は狭くなる傾向が認められた。これはラメラ周期が短くなることを意味している。細胞間脂質のなかで最も構成比率の大きいセラミドは、ヒトにおいて12種類が同定されているが[3]、これは化学構造の一部を分類したものであり、実際には角層が形成される過程において個々のセラミドの炭化水素鎖の長さは一定とは限らず、たくさんの同族体が存在する可能性も考えられている。このことから、長周期ラメラを構成する脂質集合体のうち、より周期の長いものから順に液晶化することで、見かけ上、ラメラ構造が短くなったようにみえるのではないかと考察した。これは、細胞間脂質のラメラ構造中に形成されている水素結合に対して、*L*-メントールがそれらを切断することで、ラメラ構造が保たれなくなる可能性を示している。なかでも、炭化水素鎖の長いセラミドはバリア機能への寄与が大きいことから、*L*-メントールの疎水性の度合いが炭化水素鎖の長いセラミドへの親和性が高いものであると考えることもできる。

また、昇華させた*L*-メントールを質量比で20%程度取り込ませた角層のDSC測定の結果をFig.3に示した。また、熱曲線から得られた相転移温度をTable 1に示した。57°C付近の長周期ラメラ構造の融解による相転移は、無処置の角層と比較して7°Cほど低下しており、*L*-メントールの適用により長周期ラメラ構造の液晶化が低い温度から始まっている可能性が示唆された。細胞間脂質の相転移は、実質的には分子内・分子間の水素結合を切断するエネルギーと考えられることから、*L*-メントールを適用することですでに切断されている水素結合もあることから結果的に相転移温度の低下が生じたものと考えられる。

また、*L*-メントールの光学活性体や類縁化合物を用いて同様の検討を予定していたが、今回の実験では、医薬品、食品、日用品に繁用されている*L*-メントールに絞って、適切な実験条件の確立と再現性の検討を行った。光学活性体の作用の違いを明確にするためには、実験条件のさらなる改善が必要と考えている。さらに、相転移温度付近での回折プロファイルの検討についても実験条件を見直す必要がある。

今後の課題：

今回の実験で、細胞間脂質のセラミドの種類や炭化水素鎖の長さにより*L*-メントールの作用の程度が異なる可能性が明らかになったことから、今後は、側鎖の長いセラミドあるいは短いセラミドを用いて脂質モデル膜を調製し、*L*-メントールの作用を検討する。また、同様の方法により、製剤成分として繁用されるアルコールや、揮発性成分を用いて、細胞間脂質との分子間相互作用の強弱を定量的に評価していきたいと考えている。

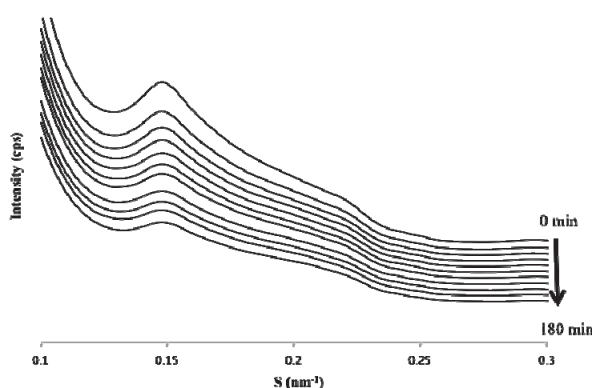


Fig.1. Change in small angle X-ray diffraction profile of hairless mouse stratum corneum.

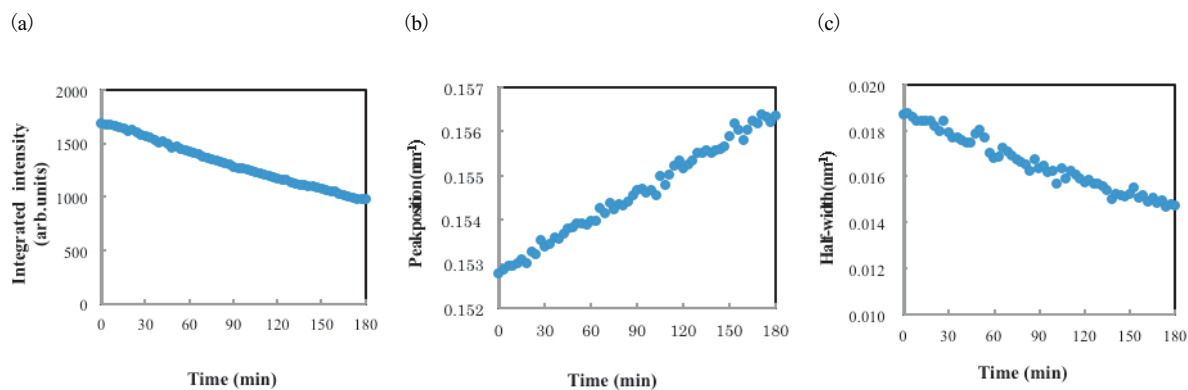


Fig.2. Change in the long lamellar structure of intercellular lipids in hairless mouse stratum corneum by applying *l*-menthol. The time course of integrated intensity (a), peak position (b) and the full width at half maximum (c) was appeared.

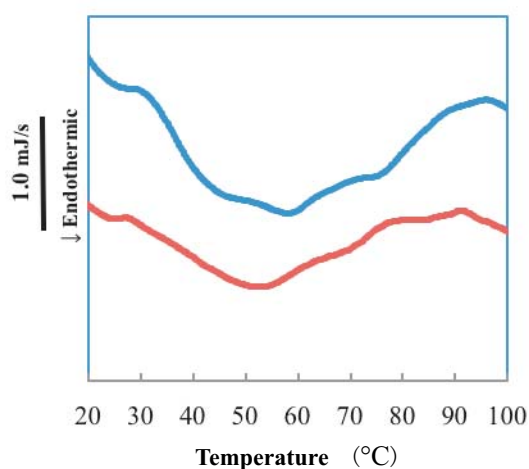


Fig.3. Endothermic curves of hairless mouse stratum corneum (blue) and applying *l*-menthol to stratum corneum (red).

Table 1. Effect of *l*-menthol on the phase transition temperature of hairless mouse stratum corneum.

| | Transition temperature (°C) | | |
|---------------------|-----------------------------|------|------|
| | ヘアレスマウス角層 | 40.6 | 56.5 |
| <i>l</i> -メントール適用角層 | 39.0 | 49.8 | 70.1 |

参考文献：

- [1] Y.Obata et al., *J.Contr.Rel.*, **115**,275-279, (2006).
- [2] I.Hatta et al., *Chem.Phys.Lipids*, **163**, 381-389, (2010).
- [3] M. Janssens et al., *J. Invest. Dermatol.*, **131**, 2136-2138, (2011).