

ヒト角層の保湿剤水溶液への浸漬時と乾燥時における角層構造の変化(2) Structural Changes of Human Stratum Corneum by Treating with the Moisturizer Aqueous Solutions in Wetting and Drying Processes (2)

羽深 朱里^a, 難波 美沙^a, 山内 加奈^a, 大畑 哲也^a, 山下 耕司^a, 山田 武^a, 八田 一郎^b
Akari Habuka^a, Misa Namba^a, Kana Yamauchi^a, Tetsuya Ohata^a, Koji 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

皮膚外用剤には、保湿剤としてグリセリンをはじめとする多価アルコールが汎用される。我々は、多価アルコールの皮膚角層に対する作用機構を解明するため、多価アルコールの種類が角層の構造に及ぼす影響について X 線回折測定による評価を進めてきた。本課題では、角層内の細胞間脂質が形成する短周期ラメラ構造 (Short Lamellar Structure: SLS) に着目し、グリセリン水溶液に浸漬した角層を乾燥させた際の構造の変化を 30 秒間隔で測定した。その結果、SLS に由来するピークが確認されたが、その散乱強度は低く、経時的な構造変化の追跡は困難であった。

キーワード： ヒト角層、細胞間脂質、多価アルコール、小角 X 線回折

背景と研究目的：

化粧品や医薬品などの皮膚外用剤には、多価アルコールなどの保湿剤が配合される。多価アルコールの種類により皮膚角層中の水分の保持特性は異なることが知られているが、それぞれの作用機構の違いは十分に解明されていない。我々はこれまでに、多価アルコールの作用機構を解明するため、多価アルコール水溶液が角層試料の構造変化に及ぼす影響について、小角・広角 X 線回折法による計測を進めてきた。角層中には種々の構造が存在するが、その中でも細胞間脂質が形成する SLS は構造中に水層を持つため、我々は SLS が保湿に重要な役割を及ぼしていると考え、その振舞いに注目している。SPRING-8 の BL40B2 で行った実験 (課題番号 2016B1578) では、角層試料を多価アルコール水溶液に浸漬し、乾燥した際の構造変化を 3 分毎に測定し、SLS の変化は多価アルコール種により異なることを見出した。しかし、詳細を把握するためには、より短い時間間隔での測定が必要であると考えられた[1]。次に BL19B2 で行った実験 (課題番号 2017A1559) では、検出器に PILATUS-2M を用い、30 秒間隔で測定することで、浸漬する溶液が、水と多価アルコール水溶液とでは、広角領域に検出されるソフトケラチン由来の構造や、細胞間脂質の炭化水素鎖の充填構造に由来するピークの振舞いが異なることを見出した。連動して細胞間脂質が形成するラメラ構造についても振舞いが異なると推察されたが、広い q 領域について測定を行ったため小角領域のピクセル数が少なく、SLS に由来するピークについては解析することが困難であった。そこで、本課題では測定領域を小角に限定し、多価アルコール水溶液に浸漬した角層を乾燥させた際の SLS の変化を追跡することとした。得られた結果と前課題の結果をあわせて包括的に解析することにより、多価アルコールの作用機構の解明を目指した。

実験：

試料にはヒト腹部由来の角層 (BIOPREDIC International 社) を完全に乾燥し、1 cm² に切り出したものを使用した。なお、角層のドナーによる影響を勘案し、2 名のドナーから得られた角層をそれぞれ用いた。多価アルコール水溶液には、10 wt% グリセリン水溶液、10 wt% ジグリセリン水溶液、10 wt% 1,3-ブチレングリコール (1,3-BG) 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。

小角・広角 X 線回折測定は、溶液に浸漬する前の角層と、溶液セルに多価アルコール水溶液を注入し浸漬させて 30 分後までの角層が湿潤する過程における角層構造の経時的な変化を 40 秒間

隔で、さらに 60、120 分後の構造について実施した。その後、溶液セル内の溶液を除去し、試料の乾燥を促進するため、溶液セルに窒素ガスを流量 0.3 L/min で通気し、角層試料を乾燥した。窒素ガス通気直後から 45 分後までの構造の経時変化を 40 秒間隔で、および 120、180、240 分後の構造を測定した。これらの小角・広角 X 線回折測定は、BL19B2 において実施し、X 線のエネルギーは 18 keV (波長 0.069 nm)、カメラ長は 3000 mm (ベヘン酸銀で校正) とした。検出器には PILATUS-2M を使い、露光時間を 30 秒とした。得られた散乱像を一次元化したのち、バックグラウンドを除外することで回折プロファイルを得た。SLS と長周期ラメラ構造 (Long Lamellar Structure: LLS) の複合ピークの解析については、ベースラインを q^{-2} - q^{-3} で取り、ガウス関数によりフィッティングすることで解析値を得た[3, 4]。

結果および考察：

散乱ベクトル $q = 0.06$ - 3.4 nm^{-1} の領域について測定を行い、 $q = 0.5 \text{ nm}^{-1}$ 付近にブロードなピークが検出され、 $q = 1 \text{ nm}^{-1}$ 付近に SLS の一次反射、 $q = 1.3 \text{ nm}^{-1}$ 付近に検出される LLS の三次反射に由来するピークが検出された。

溶液中で浸漬する前の角層のプロファイルについて、バックグラウンドとして PEEK フィルムに由来する散乱を除去し、 $q = 0.6$ - 1.8 nm^{-1} の領域について形状を評価した (図 1(a))。これまでに実施したカメラ長 770 mm で行った実験 (課題番号 2017A1559) で得られた角層試料のプロファイルに比べ、低 q 値方向のデータ数が増加したことにより、 $q = 1 \text{ nm}^{-1}$ 付近に SLS の一次反射と LLS の三次反射からなる複合ピークを観察することができた。この複合ピークを図 1 (b)に示すようにガウス関数でフィッティングした。

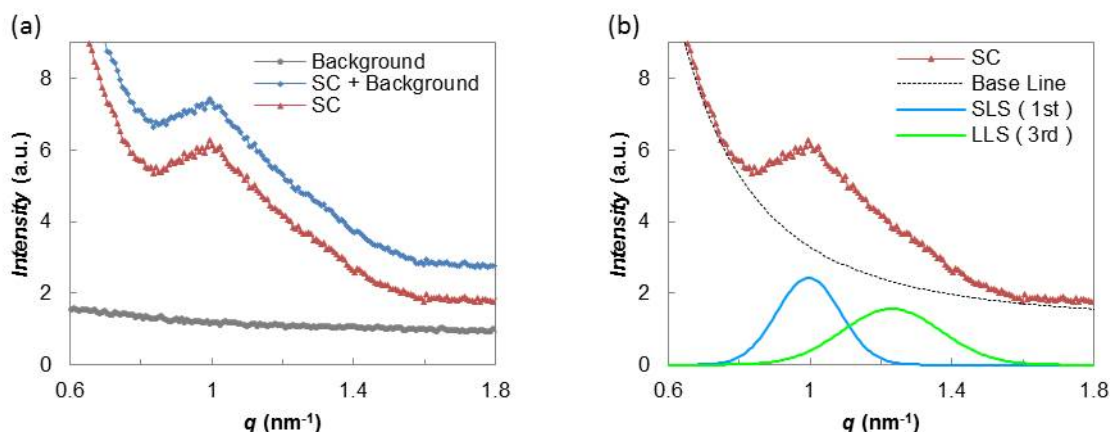


図 1. $q = 1 \text{ nm}^{-1}$ 付近の角層試料(Stratum Corneum: SC)プロファイルの形状
(a) Diffraction profiles、(b) Profile fitting

多価アルコール水溶液に角層試料を浸漬させた際の SLS の d 値の経時的な変化を図 2(a)、LLS の d 値の変化を図 2(b)に示す。SLS、および LLS はいずれの溶液中で浸漬した場合にも、経時的な変化はほとんど見られなかった。また、同一ドナーの角層を用いた異なる部位での測定やドナーの異なる角層を用いた場合にも、変化は見られなかった。先の BL40B2 での実験[1]では、角層を浸漬することで SLS の d 値が拡大することを確認しており、本課題においては何らかの原因で SLS の変化が観測できていないと考えられた。このため、浸漬後の角層試料を乾燥させた際の変化の追跡は断念した。我々は、角層構造の比較的速い変化を計測するため、短い時間間隔での測定を試みているが、生体由来のヒト角層は多成分から構成される複雑系であり、短い露光時間では十分な散乱強度が得られず、内部構造の微細な変化を追跡することができなかつたと考えられる。これらの問題は、BL19B2 よりもフラックスの高いビームラインを用いることで解決できる可能性がある。

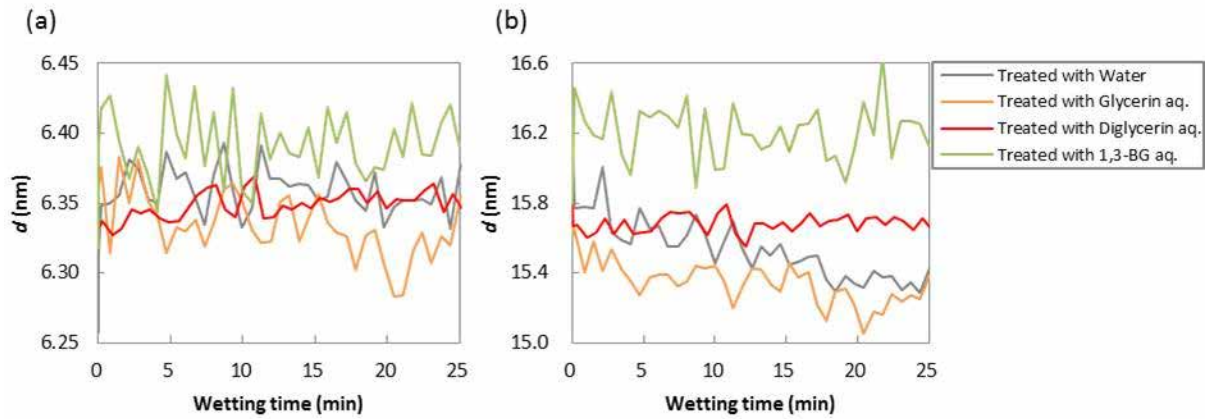


図 2. 角層試料を各種溶液に浸漬した直後から 25 分後までの角層構造の d 値の経時変化 (a) SLS、(b) LLS (溶液種: 水、10 wt% グリセリン水溶液、10 wt%ジグリセリン水溶液、10 wt% 1,3-ブチレングリコール水溶液)

図 3 に 10 wt%グリセリン水溶液に浸漬した角層試料の $q = 0.0 - 2.0 \text{ nm}^{-1}$ の領域におけるプロファイルの経時的な変化を示す。 $q = 0.5 \text{ nm}^{-1}$ 付近にブロードなピークが検出され、いずれの溶液を用いた場合にも散乱強度が増大し、乾燥により減少する変化を示した。このピークは、LLS の一次反射と角層細胞内のソフトケラチンが形成するマイクロフィブリルに由来する構造の複合ピークと言われている[5, 6]。このブロードな複合ピークの解析は非常に難しいと考えられるが、これらのピークを分離することができれば、多価アルコールによる LLS への影響を評価できる可能性がある。

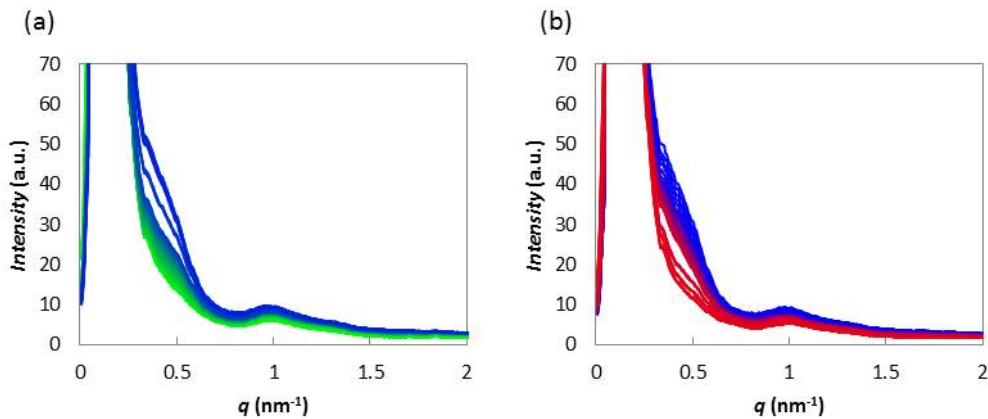


図 3. 10 wt% グリセリン水溶液による SAXS プロファイルの経時変化 (a) 浸漬 30 分間、および 60、120 分後のプロファイル (緑→青)、(b) 乾燥 45 分間、および 120、180、240 分後のプロファイル (青→赤)

以上より、多価アルコール水溶液に浸漬した角層試料の小角領域のプロファイルの経時的な変化を追跡したが、本実験の測定条件では、我々が着目していた SLS の構造変化を追跡することは困難であった。

今後の課題：

前課題 [2017A1559] において、BL19B2 にて検出器に PILATUS-2M を用いることで、短い時間間隔での構造変化の追跡が可能となった。それにより広角領域に検出される角層細胞内のソフトケラチン由来の構造と細胞間脂質の炭化水素鎖の充填構造の変化が、水と多価アルコールとでは異なることを見出した。本課題では、前課題では困難であったラメラ構造の変化を追跡すべく、小角領域に限定した X 線回折測定を実施した。しかし、構造の変化に対応した短い時間間隔の測定条件では、小角領域に限定することによってもラメラ構造の解析は困難であった。露光時間の延長による改善も考えられるが、我々の求める数十秒間隔で構造の変化を追跡することは難しいと

考えられた。小角から広角領域に検出される種々の角層構造に由来するピークの速い構造変化を同時に評価するには、よりフラックスの高いビームラインで測定する方法が有効と考える。

参考文献：

- [1] 山田武 他、SPring-8 利用研究成果集(2016B1578), **6**, 1, 129, (2018).
- [2] I. Hatta et al., *Chem. Phys. Lipids* **163**, 381 (2010).
- [3] J. Doucer et al., *J. Lipid Res.*, **55**, 11, 2380 (2014).
- [4] N. Ohta et al., *Chem. Phys. Lipids* **123**, 1 (2003).