

高い薬効と低い皮膚刺激性を有する
エタノール含有皮膚適用製剤開発のための
角層細胞間脂質の秩序構造に対する種々濃度のエタノール・水混合液の
分子レベルでの作用メカニズムに関する研究
**Study on the Molecular Mechanism of Action of Various Concentrations
of Ethanol in Water on the Ordered Lipid Intercellular Structure in the
Stratum Corneum for Development of Ethanol Containing Formulations
with High Drug Efficacy and Low Skin Irritation**

堀田 大介^a, 八田 一郎^b, 吉元 将人^c, 北尾 勇樹^c, 藤堂 浩明^c, 杉林 堅次^c
Daisuke Horita^a, Ichiro Hatta^b, Masato Yoshimoto^c, Yuki Kitao^c, Hiroaki Todo^c, Kenji Sugibayashi^c

^a(株)池田模範堂, ^b(公財)名古屋産業科学研究所, ^c城西大学
^aIkedamohando. Co., Ltd., ^bNagoya Industrial Science Research Institute, ^cJosai University

本研究では、皮膚角層の細胞間脂質構造に及ぼす種々濃度のエタノール・水混合液の影響についての解析を試みた。皮膚組織より剥離したヘアレスマウス、ヘアレスラット、ブタ角層を種々濃度のエタノール・水混合液で処理し、その角層試料は 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。ピークの強度や位置の変化を明瞭に捉えることができるヘアレスマウス角層でエタノール濃度の影響を詳しく検討したところ、エタノールの及ぼす角層構造の変化は、エタノール濃度によって異なり、その作用は一義的でないことが分かった。

キーワード： エタノール、角層、細胞間脂質、小角 X 線回折、ヘアレスマウス

背景と研究目的：

医薬品外用剤や化粧品は、薬物や有効成分の皮膚浸透性を高める働きや、塗布部の保護等を期待して使用されている。代表的な基剤成分のひとつにエタノールがあり、すでに多くの医薬品や化粧品で実用化されている。エタノール・水混合液は、経皮吸収促進、消毒、難溶性薬物の溶解性向上などの目的で、数パーセントから数十パーセントの含有率で基剤に含まれる。しかし、エタノール・水混合液の及ぼす皮膚角層、特に細胞間脂質への効果について、分子レベルで詳細に研究した報告はほとんどみられない。我々は、本研究に先立ちブタ皮膚を用いた *in vitro* 皮膚透過実験により、種々薬物の皮膚透過性に及ぼすエタノール・水混合液で前処理の影響を検討した[1]。その結果、低濃度のエタノール・水混合液処理ではこれら薬物の皮膚透過性を上昇させたものの、高濃度のエタノール・水混合液処理ではむしろこれら薬物の皮膚透過性を著しく減少させることが明らかとなった。エタノール濃度による透過性の違いは、皮膚角層の構造変化に対するエタノール・水混合液の効果に濃度依存性があることを支持している。しかしながら、その作用メカニズムは不明であった。そこで本研究では、皮膚角層の構造を分子レベルで詳細に評価できる SPring-8 の施設を利用して、皮膚角層の細胞間脂質構造やソフトケラチンのフィブリル構造に及ぼす種々濃度のエタノール・水混合液の影響についての詳細な解析を行った。

実験：

トリプシン処理により皮膚組織より剥離したヘアレスマウス、ヘアレスラット、ブタ角層を種々濃度のエタノール・水混合液(0、20、40、60、80、100%)で処理し、水分量を 20wt% に調節した後、内径 1.5 mm のガラスキャピラリーに充填した。試料は 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(λ)0.0709 nm (17.5 keV)、カメラ長 500 mm、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。標準サンプルにはベヘン酸銀(格子定数 $d = 5.838$ nm)を用いて、散乱ベクトル $S = (2/\lambda) \sin \theta$ 、 θ は散乱角)を校正した。

結果および考察：

コントロール試料として水(0%エタノール)で処理したヘアレスマウス、ヘアレスラット、ブタ角層にX線を照射すると、小角領域と広角領域に細胞間脂質の秩序構造由来の回折ピークが観測された(図1、2)。ヘアレスマウス角層では、小角領域に短周期と長周期ラメラ構造由来の回折ピーク、広角領域に炭化水素鎖の充填構造に由来する六方晶と斜方晶の回折ピークがそれぞれ観測された。ヘアレスラット角層では、小角領域にブロードなピーク、広角領域にヘアレスマウス角層と同様のピークが観測された。それらピークの強度はヘアレスマウス角層と比べて弱かった。ブタ角層では、小角領域で顕著なピークは観測されず、広角領域では六方晶に由来したピークのみが観測されたものの、その強度は非常に弱かった。

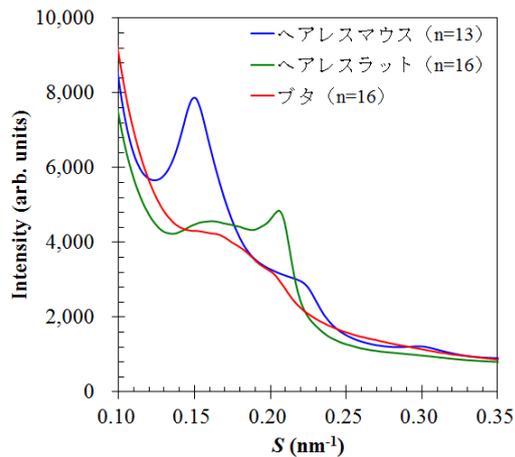


図1. 小角領域における皮膚角層の平均X線回折プロファイル

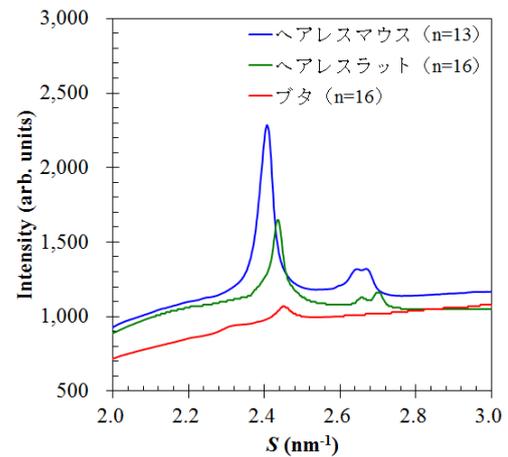


図2. 広角領域における皮膚角層の平均X線回折プロファイル

以上の結果より、ピークの強度や位置の変化を明瞭に捉えることができるヘアレスマウス角層でエタノール濃度の影響を検討した。図3、4に種々濃度のエタノール・水混合溶液を適用したヘアレスマウス角層のX線回折プロファイルを示す。小角領域のX線回折プロファイルから、エタノールの適用によって短周期ラメラに由来するピーク($S = 0.17 \text{ nm}^{-1}$ 付近)の強度が変化していることが分かった。その強度の変化はエタノール濃度によって異なっていた。一方、広角領域におけるX線回折プロファイルから、ヘアレスマウス角層の細胞間脂質の炭化水素鎖の充填構造にエタノール濃度はほとんど影響しないことがわかった。よって、エタノールは皮膚角層の細胞間脂質を構成する短周期ラメラ構造に大きく作用することが分かった。

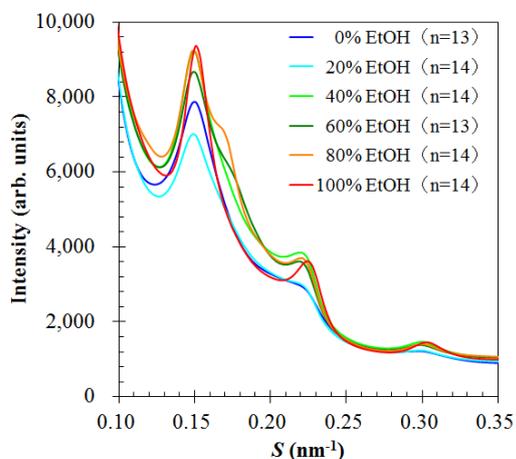


図3. 小角領域における種々濃度のエタノール・水混合液を適用したヘアレスマウス角層の平均X線回折プロファイル

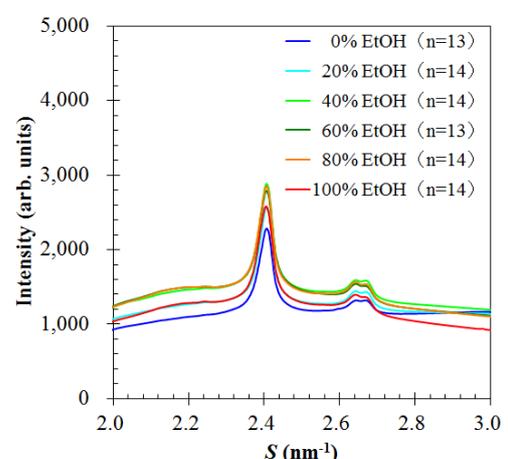


図4. 広角領域における種々濃度のエタノール・水混合液を適用したヘアレスマウス角層の平均X線回折プロファイル

さらに、小角領域で回折ピークが重なり合う部分($S = 0.12\text{-}0.25 \text{ nm}^{-1}$)において、スペクトルデータにガウシアン関数を用いてフィッティングを行い、個々の回折ピークを解析した。図 5 に 0%エタノール処理時のヘアレスマウス角層の小角領域の回折ピークに対するフィッティングの結果を示す。図 6、7、8 に種々濃度のエタノール・水混合溶液処理時における長周期および短周期ラメラ構造由来の回折ピーク位置と半値全幅値の変化を示す。エタノールは長周期ラメラ構造のピーク位置やピーク幅に大きく影響しなかった。一方、短周期ラメラ構造に対しては 20-80%(特に 60-80%)エタノールでピークが広角側に移行し、20-60%エタノールでピーク幅が広がる一方、高濃度の 100%エタノールでは、むしろピーク位置が小角側に移行し、ピーク幅においても狭まった。すなわち、エタノールは短周期ラメラ構造の形成と無秩序化の両方を引き起こす作用を持つことから、その作用は一義的でないことが分かった。

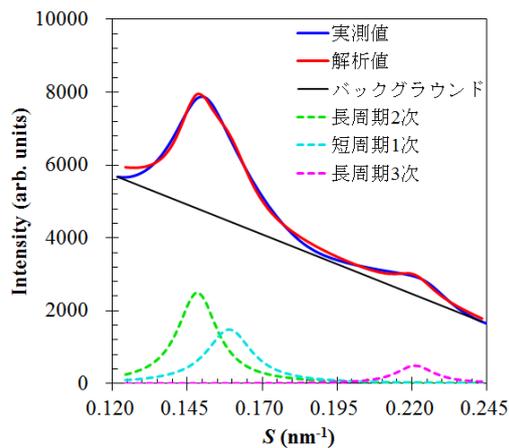


図 5. ヘアレスマウス角層のX線回折プロファイルに対するガウシアン関数のフィッティング解析

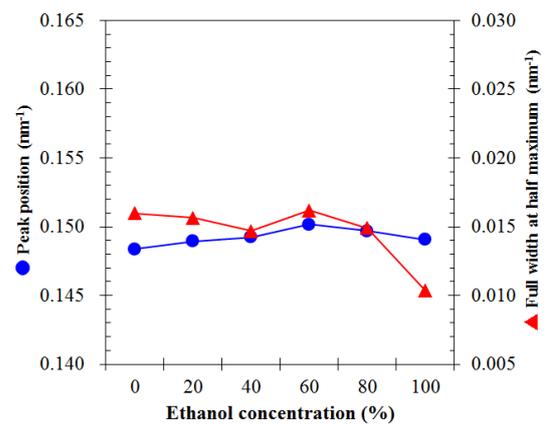


図 6. ヘアレスマウス角層の長周期ラメラ構造由来 2 次回折ピークの位置と半値全幅値に及ぼすエタノールの影響

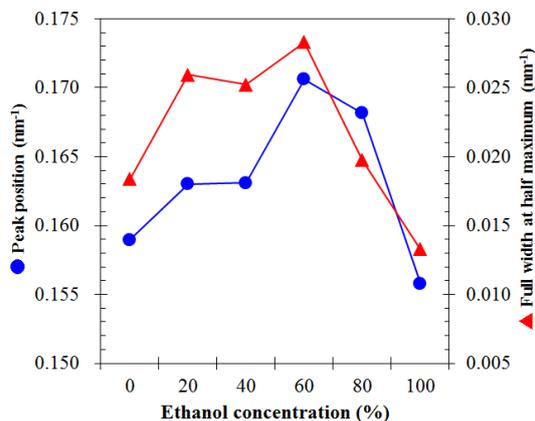


図 7. ヘアレスマウス角層の短周期ラメラ構造由来 1 次回折ピークの位置と半値全幅値に及ぼすエタノールの影響

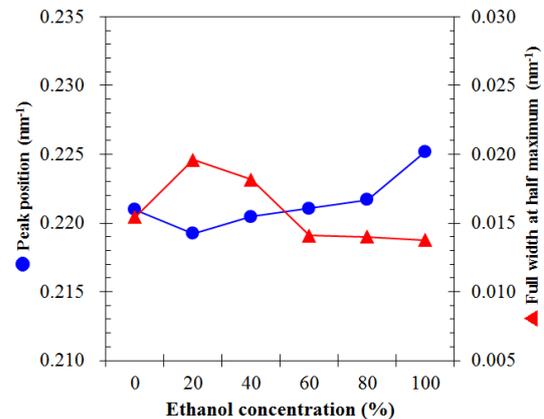


図 8. ヘアレスマウス角層の長周期ラメラ構造由来 3 次回折ピークの位置と半値全幅値に及ぼすエタノールの影響

加えて、ソフトケラチンのフィブリル構造に由来するピーク ($S = 0.98 \text{ nm}^{-1}$ 付近) について解析を行った。図 9 に種々濃度のエタノール・水混合溶液を適用したヘアレスマウス角層の X 線回折プロファイルを、図 10 にソフトケラチン由来回折ピークの位置と半値全幅値の変化を示す。エタノール濃度の上昇と共に、ピーク位置が小角側に移行し、ピークの幅は増大した。よって、エタノールは角層細胞中のソフトケラチンを構成するフィブリルのパッキングを緩ませることで構造を乱すことが分かった。

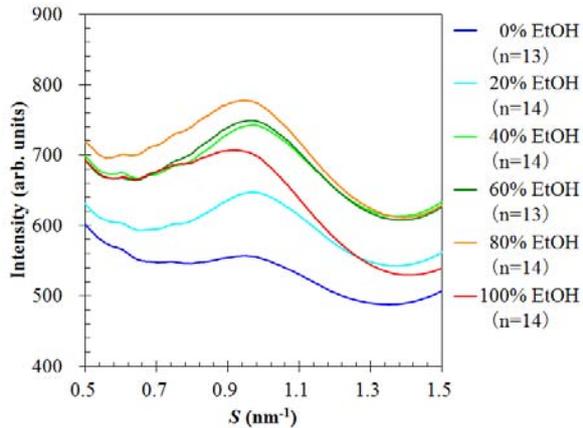


図9. 種々濃度のエタノール・水混合液を適用したヘアレスマウス角層のソフトケラチン由来の平均回折ピーク

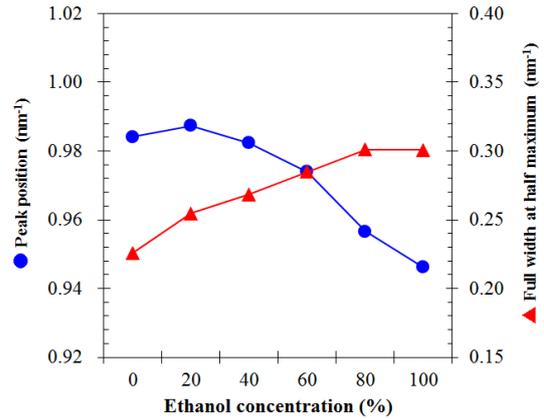


図10. ヘアレスマウス角層のソフトケラチン由来回折ピークの位置と半値全幅値に及ぼすエタノール濃度の影響

本研究により、皮膚角層の秩序構造に及ぼすエタノールの影響が明らかとなった。エタノールは角層の長周期ラメラ構造にはほとんど入り込まず、炭化水素鎖の充填構造にもほとんど影響しないが、短周期ラメラ構造やフィブリル構造に大きく影響することがわかった。エタノールがもたらす角層構造の変化は、エタノール含有外用剤を皮膚に適用した際の薬物皮膚透過性にも大きく関係することを示唆する。特に、水層を持つ短周期ラメラ構造との関連性が重要であると思われる。今回の実験結果は、高い薬効と低い刺激性を実現する製剤の開発のために有用な情報と考えている。

今後の課題：

今後はエタノール・水混合液の角層への適用に伴う角層構造変化の過程を動的に観察するなどの実験を行い、角層構造の変化に及ぼすエタノール濃度の影響が一義的ではないメカニズムを解明することは興味ある課題である。また、ヒト角層においても同様の実験を行い、製剤開発や安全性に活かすことも重要である。さらに、角層構造変化と薬物皮膚透過性の関連性について検討する必要がある。

参考文献：

[1] D. Horita, et al., *Biol. Pharm. Bull.* **35**, 1343-1348 (2012).