

実験課題番号	2006B0116
実験課題名	皮膚角層脂質構造の動的変化に基づく外用剤の開発
実験責任者	星薬科大学 小幡誉子
使用ビームライン	BL40B2

【目的】

生体の恒常性維持のために、皮膚には外来異物の侵入防御や体内水分蒸散防止の機能が備わっているが、この機能の中心的役割を果たしているのは角層細胞間脂質の規則正しい配列である。第15改正日本薬局方（2006年3月31日公示）に「経皮吸収型製剤」が新規収載され、皮膚は、従来行われてきた局所治療目的の外用剤の適用部位としてだけでなく全身治療を目指した薬物の投与部位として見直され、多くの関心を集めている。しかしながら、薬物の皮膚透過は脂質の規則正しい配列すなわちラメラ構造によって制御され、通常の状態では治療上有効量の薬物を皮膚から体内へ送達することは難しい。そこで、薬物の皮膚透過を促進する化合物を併用することにより、薬物吸収性を増大させる試みが数多く行われているが、適用した化合物による効果の大小や間接的な作用機構の検討の報告例はあるものの分子レベルで作用部位の角層脂質の構造変化を直接観察した例はほとんどなかった。そこで、我々は、SPring-8の放射光X線回折を利用することにより、薬物の透過実験で繁用されるヘアレスラットの角層が、一定の周期をもつラメラ構造を有し、外用剤の製剤成分として広く用いられているエタノールや*l*-メントールの適用により角層脂質由来の回折ピークの強度が減少することを見出した^{1,2)}。さらに、*l*-メントールとエタノールの適用は、密な構造を形成する脂質量を減少させて、その結果として薬物の透過経路を拡大している可能性が示唆された^{2,3)}。また、製剤成分を適用した角層の温度走査実験の結果、高温型六方晶の出現が認められなくなった（2006A0101）。高温型六方晶は、室温～体温領域では斜方晶として存在すると考えられていることから⁴⁾、製剤成分は斜方晶に影響を及ぼす可能性がある。しかしながら、これまでは予め製剤成分を適用した角層を乾燥して構造観察を行ったため、個体の差による角層の回折プロファイルの違いに左右されて、回折プロファイルの微細な変化に基づく構造変化の議論が困難であった。そこで、溶液状態の化合物を角層に直接適用しながら経時的に回折プロファイルを得ることが可能な溶液セルが考案された。これは、皮膚表面近傍に製剤適用時の状況を再現しながらその構造変化の測定ができる画期的な方法である。本研究では、溶液セルを用いて実験を行うことにより、製剤成分が影響を及ぼす脂質構造を直接明らかにして、今後の外用剤開発に役立てることを目標とした。

【実験方法】

角層の剥離・処理：ヘアレスラット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、予め25%の水分量に調節して溶液セルに充填し、外用剤成分の溶液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0.1nm（12keV）、試料から検出器までの400mmを真空引きし、300mm×300mm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。

【結果、考察】

広角領域にあらわれる回折ピークに着目して、角層脂質の充填構造の変化を調べるため、室温では $S=2.4\text{nm}^{-1}$ に重なってあらわれる六方晶のピークと斜方晶の格子面間隔の大きい構造由来のピークをカーブフィッティングにより分離した⁴⁾。さらに、 $S=2.7\text{nm}^{-1}$ にあらわれる回折ピークの経時変化を調べ、 $S=2.4\text{nm}^{-1}$ のピークから分離した斜方晶由来のピークの変動と一致することを確認した。

まず、水の適用では、適用後2時間まで斜方晶、六方晶とも回折強度が徐々にかつ僅かな減少を示した（Fig.1(a)）。しかしながら格子面間隔を意味するピークの位置や半値幅にはほとんど変化がなかった。一方、*l*-メントールのエチルエーテル誘導体（MET）の適用では、斜方晶および六方晶のどちらも適用時間の経過に伴って徐々に減少した（Fig.1(b)）。また、*d*-リモネン（Fig.1(c)）や1,8-シネオールでは、斜方晶のピークのみが減少し、六方晶のピーク強度にはほとんど変化が認められなかった。これらの化合物は、これまで目的薬物の皮膚中での「拡散の増大」に寄与するものと考えられてきたが、角層脂質の充填構造に由来する回折ピークの強度の減少は、皮膚の透過抵抗が減少することを分子レベルで無理なく説明するものである。一方、薬物の皮膚表面への分配の増大を引き起こすといわれているオレイン酸を用いて同様の検討を行ったところ、斜方晶のピークの回折強度が僅かに増大し、また六方晶の回折強度には変化がなかった（Fig.1(d)）。これは、一般的にオレイン酸の適用により角層脂質の流動性が増大するといわれているが、X線回折で観測される斜方晶および六方晶から成る2つのドメインの回折ピークにあまり影響を及ぼさず、X線回折では観測されない乱れた構造をもつドメインにオレイン酸が入りこんで作用していることを示唆するものと考察した。オレイン酸は角層の相分離を引き起こすとの報告もあり、また、FT-IRによる測定では、オレイン酸の適用により角層脂質の「炭化水素鎖の流動性が増大する」ことが多数報告されているが、炭化水素鎖の流動性は、本来構造化していない領域にオレイン酸が入り込むことによりさらに高めている可能性もあり、経皮吸収促進剤の作用部位についての新しい知見が得られた。

以上のように、経皮吸収促進剤としての作用機構が異なる化合物の適用では、脂質充填構造への働きかけも異なっている可能性が示唆されたことから、溶液セルを用いて脂質構造の動的変化を調べ、外用剤の製剤成分の角層脂質に及ぼす影響を考慮することにより、より効果の高い経皮吸収型製剤の開発が可能になると考えられる。

【参考文献】

- 1) Y.Obata, I.Hatta, N.Ohta, K.Inoue, N.Yagi, N.Kunizawa, SPring-8 User Experiment Report No.15 (2005A), p.189.
- 2) Y.Obata, I.Hatta, N.Ohta, N.Kunizawa, N.Yagi, K.Takayama, J.Contr.Rel., **115**, 275-279 (2006).
- 3) 小幡誉子、平成 17 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 (2005B)、p.90.
- 4) I.Hatta, N.Ohta, K.Inoue, N.Yagi, Biochim.Biophys.Acta, **1758**, 1830-1836 (2006).

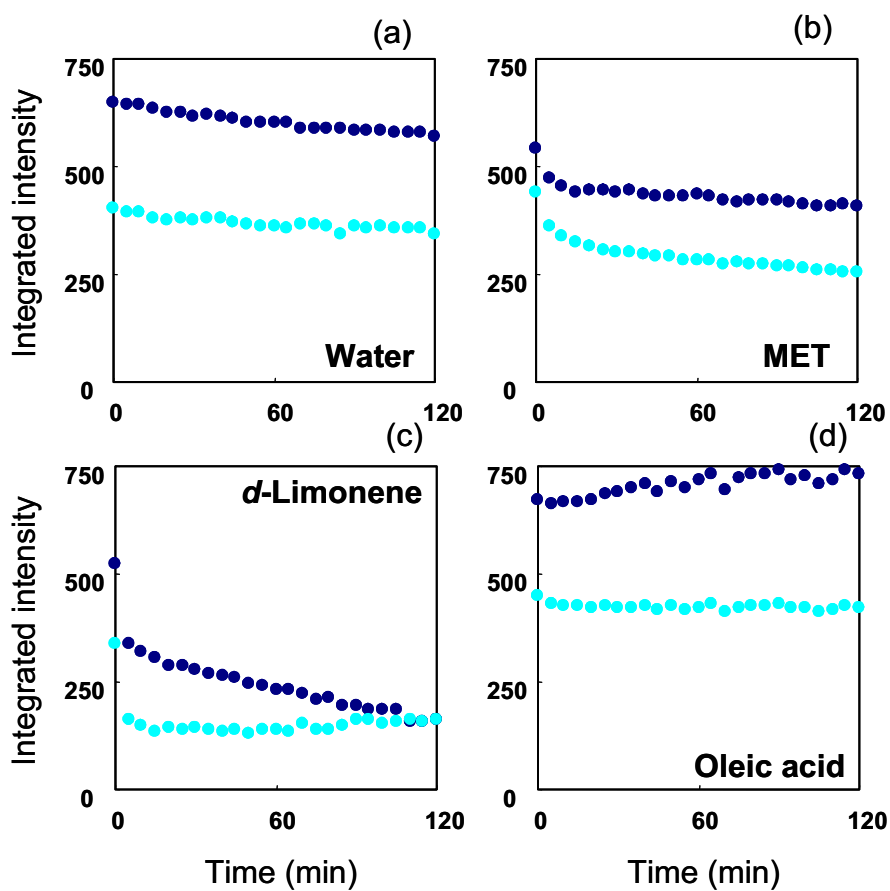


Fig.1 Effect of components of topical application form on the integrated intensity of diffractions derived from orthorhombic (●) and hexagonal (●) hydrocarbon-chain packing