

平成 21 年 6 月 26 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2006 年度 ～ 2008 年度
 課題番号：18590039
 研究課題名（和文） 放射光 X 線を利用した皮膚角層脂質に及ぼす外用剤製剤成分の作用機構
 解明
 研究課題名（英文） Synchrotron X-ray diffraction study to elucidate promoting activity
 of components of topical administration form
 研究代表者
 小幡誉子 (OBATA YASUKO)
 星薬科大学・薬学部・助教
 研究者番号：20260979

研究成果の概要：皮膚角層細胞間脂質の放射光 X 線回折実験から、マウス、ラット、ヒトでは長周期・短周期のラメラ構造が六方晶あるいは斜方晶に充填していることが明らかになった。外用剤成分として繁用される *t*-メントールで前処理した角層では、無処理角層に比べて六方晶の割合が減少したことから、*t*-メントールが密に充填した角層細胞間脂質の構造を液晶化することにより、薬物の透過障壁を減少させ薬物の皮膚透過を促進している可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,100,000	0	1,100,000
2007 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,300,000	660,000	3,960,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：経皮吸収型製剤、放射光 X 線回折、皮膚角層、細胞間脂質、ラメラ構造、六方晶、斜方晶、外用剤、*t*-メントール

1. 研究開始当初の背景

皮膚表面に存在する厚さわずか $10\mu\text{m}$ の角層は、角層細胞と角層細胞間脂質から構成されており、角層細胞間脂質の一部が構造化することで、生体保護のための物理的障壁が形成されている。角層細胞間脂質は、約 13nm の長周期ラメラおよび約 6nm の短周期ラメラが六方晶あるいは斜方晶に充填しており、この構造が障壁の本体と考えられている。

経皮吸収型製剤の開発において、角層の障壁能は、まず最初に取り組みなければならない課題である。これは角層の障壁能によって、通常の状態では治療上有効量の薬物を皮膚から体内へと送達することは困難なためである。そこで、薬物の経皮吸収を促進する化合物を製剤成分として併用する方法が、応用性も高く注目されている。とくに、食品や医薬

品に繁用されている *t*-メントールは、安全性も高く、薬物の経皮吸収を促進することが知られている。

これまでに薬物の経皮吸収を促進する化合物の吸収促進作用機構については薬剤学の分野で数多くの研究が報告されてきた。薬物の皮膚表面への分配性の増大や皮膚中での薬物の拡散性の増大がおもな作用機構といわれているが、たとえば *t*-メントール等の化合物を適用した際に皮膚表面で生じる変化を直接調べた研究はほとんどなかった。皮膚の最も外側にある角層と *t*-メントールの相互作用を知ることは、今後の経皮吸収型製剤の開発にとって不可欠な研究である。

2. 研究の目的

本研究では、角層の物理的障壁の本体であ

るといわれている細胞間脂質と *l*-メントールの相互作用を、放射光 X 線回折の手法を中心として分子レベルで調べることに、今後の製剤開発の基盤情報とすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 角層の示差走査熱量測定 (DSC) : 動物あるいはヒト角層 (BIOPREDIC INTERNATIONAL, Renne, France) を精製水あるいは製剤成分を添加した溶液に浸漬し、所定時間後に質量調整を行ってアルミパンに充填して測定試料とした。

(2) 角層の赤外吸収スペクトル (FT-IR) 測定 : 角層を所定条件で処理して測定試料とした。

(3) 細胞間脂質モデルの調製と評価 : 光学活性を有するセラミド 2 およびコレステロールを所定の割合で混合し、DSC および X 線回折測定を行った。

(4) 角層の放射光 X 線回折測定 : 動物あるいはヒト角層 (BIOPREDIC INTERNATIONAL, Renne, France) を精製水あるいは製剤成分を添加した溶液に浸漬し、所定時間後に質量調整を行って X 線回折測定試料とした。放射光 X 線回折実験は 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。

4. 研究成果

(1) 種々の動物における角層熱特性と外用剤成分の効果 : 製剤開発の初期段階で皮膚透過実験に繁用されるヘアレスラット角層では、体温から 100°C 付近までの温度走査で 4 つの相転移が認められ、これらの相転移は最も高温の相転移を除いて、細胞間脂質の構造変化によるものであった。またこれらの相転移温度は、エタノールや *l*-メントールの適用で低下する傾向を示し、相転移に伴う吸熱量もこれらの化合物の適用で変動した。一方、ブタ角層で同様の実験を行った結果、38°C 付近の相転移は認められなかった。これは X 線回折実験の結果で示されるようにブタ角層では 2.7nm⁻¹ 付近に回折が認められない、すなわち細胞間脂質の充填構造が六方晶のみであるため、斜方晶の融解に相当する相転移がないためと考えられる。さらに、ブタ角層においてもエタノールや *l*-メントールの適用で相転移温度の低下傾向が認められ、これらの化合物が細胞間脂質の構造に影響を及ぼす可能性が示唆された。加えて、ブタ角層では 100°C 付近に現れるタンパク変性によると考えられる相転移の吸熱量が、エタノールや *l*-メントールの適用で著明に減少したことから、細胞間脂質だけでなくそのほかの角層構成成分の構造変化に対するこれらの化合物の影響も無視できないものと推測される。

(2) 角層の赤外吸収特性と外用剤成分の影

響 : 角層由来の IR スペクトルには、CH₂ 逆対称伸縮、CH₂ 対称伸縮、Amide I および Amide II の 4 種類の大きな吸収が認められ無処置の角層では、温度上昇に伴って Amide II を除きピークの頂点は高波数シフトした。これは、温度上昇とともに脂質分子内の振動が増大していることを意味している。これに対して、*l*-メントールを適用した角層では低温領域から無処置角層に比べてピークの頂点は高波数シフトし、およそ 75°C 以上では無処置角層同様にほぼ定常状態となった。従って、*l*-メントールを適用することにより低温で脂質分子間の水素結合の減弱が生じると予想され、これにより薬物の透過経路が拡大して経皮吸収促進作用を示していると考えられた。

(3) 光学活性型セラミド含有脂質混合物における吸収促進剤 *l*-メントールの効果 : DSC を用いた熱挙動の比較から、*l*-メントールの適用によりセラミド・コレステロール混合物の転移ピークは小さくブロードとなり、相転移自体が不明瞭となった。また、コレステロールの割合が多い系ほどエンタルピーの減少率は大きくなった。このことは、*l*-メントールはセラミドと比べてコレステロールとより強い相互作用を起こすことを意味している。さらに放射光 X 線回折測定の結果から、調製したセラミド・コレステロール混合物は、角層細胞間脂質に類似した特徴的なラメラ構造ならびに脂質充填構造を形成していることが明らかとなった。さらに温度走査 X 線回折測定から、これらの構造は、温度上昇に伴う相転移に対応した構造変化を示すことが明らかとなった。また、*l*-メントールはセラミド・コレステロール混合物の形成する特徴的なラメラ構造、炭化水素鎖の充填構造を乱し、より低温側から構造変化を導くため、結果的に温度上昇による構造変化を緩和にした。このことから、*l*-メントールの適用は、角層細胞間脂質に構造変化を生じることで秩序だった脂質構造の規則性を乱す可能性が示唆された。

(4) 皮膚角層細胞間脂質の熱特性と製剤成分の適用による構造変化 : ヘアレスラット角層の放射光 X 線回折実験により、ヘアレスラットの角層細胞間脂質が、これまでに報告されているヘアレスマウスやヒトと同様に、長周期・短周期のラメラ構造が、六方晶あるいは斜方晶に充填していることが明らかになった。一方、薬物の透過性がヒト皮膚と類似していることから、こちらも透過実験によく用いられるブタ角層では、斜方晶の存在が認められなかったことから、皮膚全体の透過性を評価するうえではブタの使用は有用であるものの、細胞間脂質に関する検討を行う際には注意を要する可能性が示唆された。*l*-メントールで前処理を行った角層では、六方晶の

割合が減少する、すなわち、*l*-メントールが六方晶に働きかけてその一部を液晶化していることが明らかになった。これにより、*l*-メントールが細胞間脂質の充填構造に影響を及ぼし薬物の皮膚透過を促進する可能性が示唆された。*l*-メントールの適用では皮膚表面温度付近では低温型六方晶を液晶化し、さらに、高温型六方晶の形成を抑制した。斜方晶は 40℃付近で一度融解してさらに高温側で高温型六方晶に転移することがわかっているため、*l*-メントールは体温付近では斜方晶の液晶化に寄与しているのではないかと考えられる。

次にヒト角層を用いて温度走査を行いながらX線を照射して回折プロファイルの変化を観察したところ、角層細胞間脂質の充填構造である六方晶と斜方晶の回折が重なって表れている $S=2.4\text{nm}^{-1}$ 付近のピークの積分強度は、斜方晶の融解である 39℃付近の相転移にかけて温度上昇とともに減少した。さらに温度を上昇させると 50℃付近であらたに高温型六方晶の形成に由来すると考えられるピークが出現することにより積分強度の増大が認められた。また、このピークは 70℃付近で完全に消失した。これに対して 2% *l*-メントール/40%エタノール溶液で 2 時間処理を行った角層においては、温度上昇とともに積分強度が減少し 50℃付近では強度の減少率は緩やかになったものの、さらに 70℃に向かってく引き続き強度が減少した。ピーク位置はいずれの角層でも 39℃に向かってくやや小角側へと変化したことから温度上昇にもなって充填構造が緩くなっている可能性が示唆された。一方、ピークの半値幅は *l*-メントールを含む溶液での処理により明らかにブロードになったが、温度上昇に対する半値幅の変化は、*l*-メントールを適用していない角層と同様の傾向を示した。次にこのピークを分離して、六方晶と斜方晶のそれぞれに対する温度上昇や *l*-メントールの寄与を明らかにすることを試みた。*l*-メントールを適用していない角層では斜方晶が優位であり、温度上昇にあわせて積分強度は減少しピーク位置は小角側へと変化した。半値幅の変化は小さかった。一方、六方晶は相転移に向かって緩やかに強度が減少し、またピーク位置や半値幅の変化は斜方晶と同じであった。この解析の結果が妥当であるかを検証するために、 $S=2.7\text{nm}^{-1}$ 付近にあらわれる斜方晶固有の回折ピークの変化について同様の検討を行った。その結果、斜方晶固有の回折ピークの変化は前述の解析で得られた斜方晶の $S=2.4\text{nm}^{-1}$ 付近のピークの動向ときわめてよく対応した。このことは提案しているピーク分離の手法が有用であることを示している。以上の結果から、皮膚表面温度付近では、*l*-メントールの適用により、細胞間脂質の充填

構造のうち斜方晶が影響を受け液晶となることにより透過障壁としての機能が低下し、薬物の皮膚透過が促進される可能性が示唆された。化合物を直接角層に適用しながら回折プロファイルの変化を追跡した実験からは、吸収促進の作用機構として皮膚中での薬物の「拡散」に寄与することが予想される化合物は、細胞間脂質の充填構造由来の回折への影響が大きく、また、ヘアレスラット角層の温度走査実験からはとくに高温型六方晶の形成を妨げるという知見が得られており、このことから体温付近では斜方晶への影響が大きいと推察してきた。一方、類似の化合物であっても低温側ですでに斜方晶に大きく影響を与える化合物もあることから、脂質に影響を与えると考えられる化合物のなかでも、作用の度合いや影響をおよぼす脂質の構造には差異があり、化合物の物理化学的性質がこれらに影響を与える可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

① Y.Obata, Y. Maruyama and K. Takayama, The mode of promoting activity of *O*-ethylmenthol as a transdermal absorption enhancer, *Pharm. Res.*, **23**, 392-400 (2006), 査読有.

② Y.Hiruta, Y.Hattori, K.Kawano, Y.Obata and Y.Maitani, Novel ultra-deformable vesicle entrapped with bleomycin and enhanced to penetrate rat skin, *J. Contr.Rel.*, **113**, 146-154 (2006), 査読有

③ Y.Obata, I.Hatta, N.Ohta, N.Kunizawa, N.Yagi and K.Takayama, Combined effects of ethanol and *l*-menthol on hairless rat stratum corneum investigated by synchrotron X-ray diffraction, *J. Contr.Rel.*, **115**, 175-179 (2006), 査読有.

④ 山本理恵、小幡蒼子、高山幸三、多次元スプレイン補間を用いた白癬治療薬ビフォゾールクリーム処方最適化、製剤機械技術研究会誌、**15**、5-16 (2006), 査読有.

⑤ 小幡蒼子、皮膚角層細胞間脂質の構造と定量解析、*COSMETIC STAGE*、**2**, 22-26 (2006), 査読無.

⑥ H.Watanabe, Y.Obata, K.Ishida, K.Takayama, Effect of *l*-menthol on the thermotropic behavior of ceramide 2/cholesterol mixtures as a model for the intercellular lipids in stratum corneum, *Colloid and Surface B*, in press, (2009) 査読有.

〔学会発表〕(計 36 件)

1. 小幡蒼子、八田一郎、太田昇、八木直人、高山幸三、放射光 X 線回折による経皮吸収促進剤の作用機構解明、第 31 回日本化粧品学会学術大会、2006 年 6 月 9 日、ヤクルトホール (東京)
2. 野本悟志、小幡蒼子、高山幸三、非麻薬性鎮痛薬トラマドールの経皮吸収型製剤の開発、日本薬学会第 127 年会 2007 年 3 月 28-30 日 (富山)
3. 渡邊大至、小幡蒼子、石田賢哉、高山幸三、光学活性セラミド含有角層脂質モデルの熱挙動に及ぼす *l*-Menthol の影響、日本薬学会第 127 年会 2007 年 3 月 28-30 日 (富山)
4. 井川尚紀、小幡蒼子、高山幸三、角層脂質に及ぼす経皮吸収促進剤 *l*-メントールの影響、日本薬学会第 127 年会 2007 年 3 月 28-30 日 (富山)
5. 内海俊一、小幡蒼子、須田将史、徳留喜寛、大塚誠、高山幸三、角層脂質の分子配列に及ぼす *l*-Menthol の効果、日本薬学会第 127 年会 2007 年 3 月 28-30 日 (富山)
6. 小幡蒼子、八田一郎、太田昇、井上勝晶、八木直人、高山幸三、放射光 X 線回折を利用した角層脂質構造に及ぼす吸収促進剤の効果と作用機構の関連の解明、日本薬学会第 127 年会 2007 年 3 月 28-30 日 (富山)
7. 小幡蒼子、八田一郎、太田昇、井上勝晶、八木直人、高山幸三、経皮吸収促進剤が引き起こす角層脂質構造の動的変化と吸収促進機構の関連第 32 回日本化粧品学会、2007 年 6 月 7-8 日、ヤクルトホール(東京)
8. 小幡蒼子、八田一郎、太田昇、井上勝晶、八木直人、高山幸三、経皮吸収促進剤が引き起こす角層脂質構造の動的変化と促進機構の関連、第 32 回日本化粧品学会、2007 年 6 月 7 日、ヤクルトホール(東京)
9. 小幡蒼子、「皮膚角層の小角広角 X 線回折による経皮吸収機構の解折」、SPRING-8 ヘルステア研究会、2007 年 7 月 19 日、キャンパスイノベーションセンター (東京)
10. Y.Obata, H.Watanabe, S.Utsumi, I. Hatta, N. Ohta, K.Inoue, N. Yagi, K. Takayama, Involvement of the dynamics of lipid lamellar structure in stratum corneum for development of transdermal delivery system, Gordon Research Conference-Barrier function of mammalian skin, 2007 年 8 月 5 日-10 日, Salve Regina University (USA)
11. 小幡蒼子、角層細胞間脂質の構造と薬物透過性、FJ セミナー、2007 年 8 月 30 日、ベルサール九段 (東京)
12. 八田一郎、中沢寛光、小幡蒼子、太田昇、井上勝晶、八木直人、外部刺激に対する皮膚角層中の構造変化の評価、第 60 回コロイドおよび界面化学討論会、2007 年 9 月 22 日、信州大学 (長野)
13. 高山幸三、小幡蒼子、角層脂質の構造解析に基づく疼痛治療のための経皮吸収型製剤の開発、第 1 回日本緩和医療薬学会年会プログラム・要旨集、p.37、2007 年 10 月 20 ~21 日、東京
14. I. Hatta,H. Nakazawa,Y. Obata, N. Ohta,K. Inoue, N. Yagi, Highly sensitive detection of characteristic structural changes of stratum corneum after application of chemicals,第 45 回日本生物物理学会年会、2007 年 12 月 21 日~23 日、パシフィコ横浜(神奈川県)
15. 小幡蒼子、経皮吸収型製剤の開発における皮膚角層脂質ラメラ構造の動的変化の利用、2007A 期 SPRING-8 重点産業利用課題成果報告会、2008 年 02 月 29 日、日本科学未来館 7 階 みらいCANホール (東京)
16. 小幡蒼子、八田一郎、太田昇、井上勝晶、八木直人、高山幸三、種々の動物の角層細胞間脂質構造解析と製剤成分適用による変化、日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月 28 日、パシフィコ横浜(神奈川県)
17. 海老名俊範、小幡蒼子、高山幸三、角層細胞間脂質の流動性に及ぼすオレイン酸の効果と熱力学的活動度の関連、日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月 26 日、パシフィコ横浜(神奈川県)
18. 渡邊大至、小幡蒼子、石田賢哉、高山幸三、角層細胞間脂質モデルCeramide5/Cholesterol脂質混合物の熱特性に及ぼす *l*-Menthol の影響、日本薬学会第128年会、2008年3月26日、パシフィコ横浜(神奈川県)
19. 内海俊一、小幡蒼子、須田将史、徳留喜寛、大塚誠、高山幸三、*l*-Menthol 適用による角層細胞間脂質の赤外吸収スペクトル変化、日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月 26 日、パシフィコ横浜(神奈川県)
20. 星野大伍、小幡蒼子、高山幸三、経皮吸収促進剤が引き起こす角層細胞間脂質の熱挙動変化、日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月 26 日、パシフィコ横浜(神奈川県)
21. 小幡蒼子、八田一郎、太田昇、井上勝晶、八木直人、高山幸三、皮膚角層細胞間脂質の熱特性と製剤成分適用による構造変化、日本薬剤学会第 23 年会、2008 年 5 月 20 日、札幌コンベンションセンター (北海道)
22. 渡邊大至、小幡蒼子、高山幸三、光学活性セラミド含有脂質混合物における吸収促進剤 *l*-メントールの効果、2008 年 5 月 20 日、札幌コンベンションセンター (北海道)
23. 八田一郎、中沢寛光、小幡蒼子、太田昇、井上勝晶、八木直人、化学物質の作用による皮膚角層中の細胞間脂質および角層細胞の構造変化過程、第 33 回

日本化粧品学会、2008年6月5日、ヤクルトホール（東京）

24. 小幡 蒼子、八田一郎、太田昇、井上勝晶、八木直人、高山幸三、製剤成分適用により生じる角層構成成分の動的変化、第33回日本化粧品学会、2008年6月5日、ヤクルトホール（東京）

25. 星野大伍、小幡 蒼子、高山幸三、角層細胞間脂質の熱挙動および構造に及ぼす経皮吸収促進剤の影響、2008年6月5日、ヤクルトホール（東京）

26. 渡邊大至、小幡 蒼子、石田賢哉、高山幸三、光学活性型 ceramide5 含有角層細胞間脂質モデルに及ぼす l-menthol の影響、2008年6月5日、ヤクルトホール（東京）

27. 大竹佑季、小幡 蒼子、高山幸三、向精神薬プロクロルペラジンの経皮吸収型製剤の開発、第24回日本 DDS 学会、2008年6月30日、六本木アカデミーヒルズ(東京)

28. 小幡 蒼子、角層細胞間脂質ラメラ構造解析と医薬品・化粧品開発への応用、第24回日本 DDS 学会、2008年6月30日、六本木アカデミーヒルズ(東京)

29. 八田一郎、中沢寛光、小幡 蒼子、太田昇、井上勝晶、八木直人、外部刺激に対する皮膚角層中の構造変化の評価Ⅱ. エタノールおよびリモネン：第61回コロイドおよび界面化学討論会、2008年9月7日～10日（福岡）

30. 小幡 蒼子、薬物吸収改善からみた角層のバリア機能、第131回 FJ セミナー、2008年10月24日、アルカディア市ヶ谷(東京)

31. 小幡 蒼子、放射光X線回折を利用した皮膚角層の構造解析と製剤開発への応用、放射光産業利用セミナー、2008年11月7日、サンメッセ鳥栖（佐賀）

32. 足高有里子、小幡 蒼子、高山幸三、実験計画法によるオンダンセトロン経皮吸収型製剤の処方最適化、日本動物実験代替法学会 21 回大会、2008年11月13日、埼玉会館（埼玉）

33. I. Hatta, H. Nakazawa, Y. Obata, N. Ohta, K. Inoue, N. Yagi, Highly sensitive detection of characteristic structural changes of stratum corneum on applying ethanol and α -limonene, 第46回日本生物物理学会年会、2008年12月3日～5日(福岡)

34. 星野大伍、小幡 蒼子、高山幸三、角層細胞間脂質の熱挙動に及ぼす l-Menthol の影響、日本薬学会第129年会、2009年3月26日、国立京都国際会館（京都）

35. 大竹佑季、小幡 蒼子、高山幸三、向精神薬プロクロルペラジンの経皮吸収型製剤の調製と評価、日本薬学会第129

年会、2009年3月26日、国立京都国際会館（京都）

36. 小幡 蒼子、八田一郎、太田昇、八木直人、高山幸三、皮膚角層細胞間脂質の熱特性と製剤成分適用による変化、日本薬学会第129年会、2009年3月28日、国立京都国際会館（京都）

〔図書〕(計 1 件)

小幡蒼子、高山幸三、最新・経皮吸収製剤～開発の基礎から申請のポイントまで～、第1部 第2章 経皮吸収型製剤の製剤設計、pp.41-64、情報機構（2008）

〔産業財産権〕

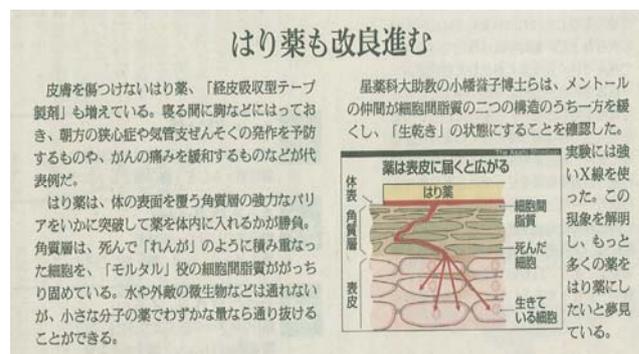
○出願状況(計 1 件)

プロクロルペラジン外用剤組成物

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

朝日新聞日曜版「Be」(2008年3月16日号)に掲載



6. 研究組織

(1)研究代表者

小幡蒼子(OBATA YASUKO)

星薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：20260979