

解 説

皮膚角層細胞間脂質の熱特性と 経皮吸収型製剤開発への応用

小幡 誉子

星薬科大学 薬剤学研究室

(受取日：2017年2月28日，受理日：2019年1月1日)

Thermotropic Behavior of Intercellular Lipids in Stratum Corneum and Application of Structure Analysis of Intercellular Lipids into Development of Transdermal/Topical Formulation

Yasuko Obata

Department of Pharmaceutics, Hoshi University

(Received Feb. 28, 2017; Accepted Jan. 1, 2019)

Skin is interface between inside of the body and dried environment. Stratum corneum, outermost layer of skin, maintains physical barrier to prevent dehydration and invasion of exogenous substrate. Morphology of stratum corneum sometimes compared to “brick-mortar” model. Keratinocyte corresponds to “brick” and intercellular space corresponds to “mortar”. Intercellular space is filled by lipids, such as ceramides, cholesterol and free fatty acids. Those lipids form regular arrangement, so called “lamellar structure”. Lipid lamellar structure is considered to bear the main barrier function of skin. There are two kinds of lamellar structure of intercellular lipids. The periodicity of long lamellar structure is about 13 nm and that of short lamellar structure is about 6 nm. The lateral packing of lamellar structure is known as orthorhombic and hexagonal packing. There exists several phase transition of intercellular lipids such as liquidization of orthorhombic packing, formation and liquidization of high-temperature and liquidization of long and short lamellar. Those phase transition was affected by the administration of components of topical and transdermal formulation. Change in thermotropic behavior of intercellular lipids might be a key factor of promoting activity of skin permeation enhancement of topical and transdermal formulation. To develop effective formulation, observation of phase transition is important to evaluate formulation components.

Keywords: stratum corneum, intercellular lipid, lamellar structure, lateral packing, synchrotron X-ray diffraction, transdermal drug delivery

1. はじめに

現在、薬物投与経路として内服や注射が利用される頻度が高いが、皮膚の表面に製剤を適用する方法も古くから身近な薬物投与方法として、親しまれてきた。湿布などの剤形で局所の炎症の治療を行うことは、セルフメディケーションの観点から今後も続けられていくことになるだろう。紀元前からの歴史をもつ皮膚への薬物投与は、1960年代以降、薬物を皮下の血管に直接送達して全身循環血流へと送達する「経皮吸収」の研究として発展している。「経皮吸収」は、薬物を必要な時に、必要な場所に、必要な量だけ送達することを柱とする薬物送達法 (Drug Delivery System; DDS) の一角をなしており、放出制御、ターゲティングなどとともに DDS の手法のひとつである。すでに多くの製剤が市販され、臨床現場からも高い評価を得ている「経皮吸収」は、剤形の学問である薬剤学の研究領域のなかでも次々と成果が生み出される発展著しい分野でもある。皮膚に適用して、全身への薬物送達を目標とする製剤は、「経皮吸収型製剤」と定義され、厳密には「局所」投与の製剤とは区別されている。

と定義され、厳密には「局所」投与の製剤とは区別されている。

経皮吸収型製剤の適用部位は皮膚であるが、皮膚の機能は、神経終末の分布による温冷感や触覚・痛覚などの感覚器としての作用や、汗腺からの発汗による体温調節作用、表皮のランゲルハンス細胞による免疫作用、さらには生体保護作用など多岐にわたっている。なかでも、生体と外界の境界として、生体を保護する物理的なバリア機能はもっとも重要である。正常皮膚では、一番外側に位置している「角層」が一定の周期で剥がれて順次新しいものに代わることで機械的強度を保ちながら、恒常性維持のためのバリア機能を担う仕組みになっている。それゆえに、通常の状態では生体にとって異物である薬物は、治療上必要量を皮膚から体内へと送達することは容易ではない。角層は「レンガモルタル構造」として模式化されるが、レンガに相当する角層細胞が、細胞間脂質のモルタルで埋められた構造である (Fig.1)。角層の厚さは、およそ 15 μm で、角層細胞が 20 層程度積層したものである。細胞間脂質は、角

層細胞周辺の角化不溶性膜を足場として、角層細胞の間に規則正しい配列、すなわち「ラメラ構造」を形成している。このラメラ構造は、生体保護のバリア機能を果たすと同時に、薬物の経皮吸収にとっては最大の障壁となる。

近年、皮膚バリア機能の物理的な意味での中心となっている角層細胞間脂質の変化が、バリア機能のみならず皮膚の状態にも大きな影響を及ぼしていることが明らかになってきた。

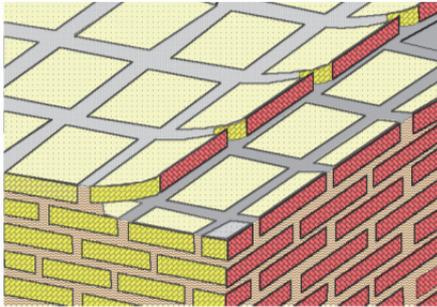


Fig.1 Schematic presentation of brick-mortar model of stratum corneum.

2. 細胞間脂質の構造と熱特性

角層細胞間脂質のラメラ構造は、約 13 nm および 6 nm の周期性を持ったラメラ (Long and/or short lamellar structure), さらに六方晶や直方晶 (Hexagonal and/or orthorhombic packing) といった一定の格子面間隔を有する充填構造が形成されている (Fig.2)。実際の X 線回折プロファイルを見ると、角層自体も抽出した脂質も同じように回折をもつ (Fig.3)。¹⁾

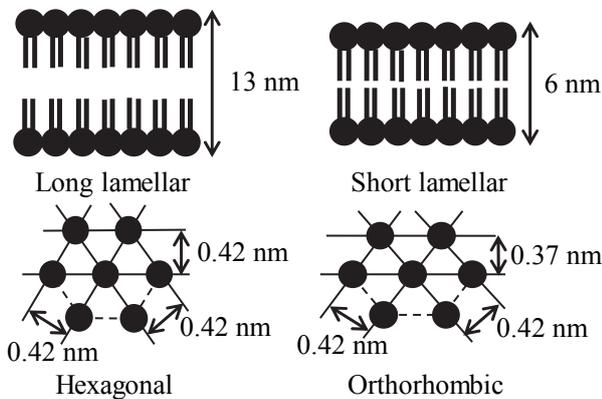


Fig.2 Lamellar structure and lateral packing of intercellular lipids in stratum corneum.

さらに、細胞間脂質はいくつかの相転移をもつ。代表的なものは約 40 °C 付近にあらわれる直方晶の融解である。温度走査しながら X 線回折により構造を観察すると、体温付近までの温度範囲では広角領域に 2 つの明確な回折 (0.42 nm および 0.37 nm) がある。温度の上昇とともに、広角側の回折は強度が減少して、40 °C を超えると完全に六方晶化する (Fig.4)。¹⁾ さらに、フーリエ変換赤外分光法 (FTIR) によって温度走査しながら、CH₂ 対称および非対称の伸縮振動の変化をみると温度上昇に伴って、吸収極大の高波数への移行やピーク形状の変化が認められている (Fig.5)。¹⁾

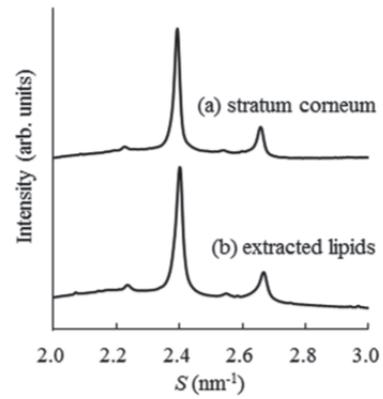


Fig.3 X-ray diffraction profiles of intercellular lipids in stratum corneum (a) and extracted lipids (b).

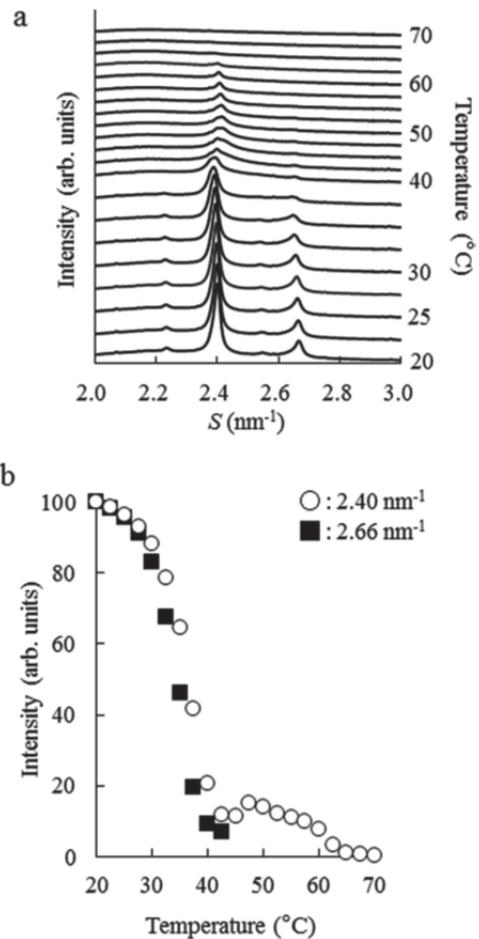


Fig.4 Change in the wide-angle X-ray diffraction properties (a) and peak intensity ratio (b).

X 線回折の広角領域の回折はヒト、マウス、ラットで共通に認められる。さらに、2 つの回折のうち、より底角側の回折 (0.42 nm) の強度は、例外なく大きい。細胞間脂質の充填構造には六方晶より直方晶が知られているのは前述のとおりであるが、もし、構造化脂質がすべて六方晶であるなら、底角側の回折のみがみえる、すなわち回折ピークはひとつだけのはずである。広角側にも回折がある、すなわち広角領域にピークが 2 つあるということは、直方晶が混在することを意味している。ただし、ブタ角層には広角

の回折ピークはひとつしかない。つまり、ブタには、直方晶が認められないようである。皮膚の厚さもヒトに近く薬物透過性も比較的ヒトに近似しているといわれ、ブタ皮膚は、経皮吸収型製剤の開発において、薬物の皮膚透過実験に繁用されている。マウスやラット角層とヒト角層の特徴が類似していることは不思議だが、これらのデータをもとに、実際の角層内の充填構造について考察してみると、**Fig.2**の格子面間隔の数(回折の多重度)の比にもとづいてすべてが直方晶であると仮定するならば、低角側の回折の積分強度は、広角側の回折の積分強度のおよそ2倍になるのではなかろうか。しかし、実際にこの値を求めてみると、これも例外なく2よりだいぶ大きく、3あるいはそれ以上になる事例も認められている。したがって、細胞間脂質の充填構造は、直方晶と六方晶の両方が混在すると考えるのが妥当である。²⁾ X線回折については位相の問題があるので、この考え方に広い理解を得るにはまだまだ努力が必要であるが、角層における製剤成分の影響を議論するうえでは、再現性よく得られるこのような変数を普遍化できれば有用である。さらに、温度を上昇させると長周期ラメラの融解や六方晶の融解、短周期ラメラの融解など細胞間脂質は次々と構造をかえる。

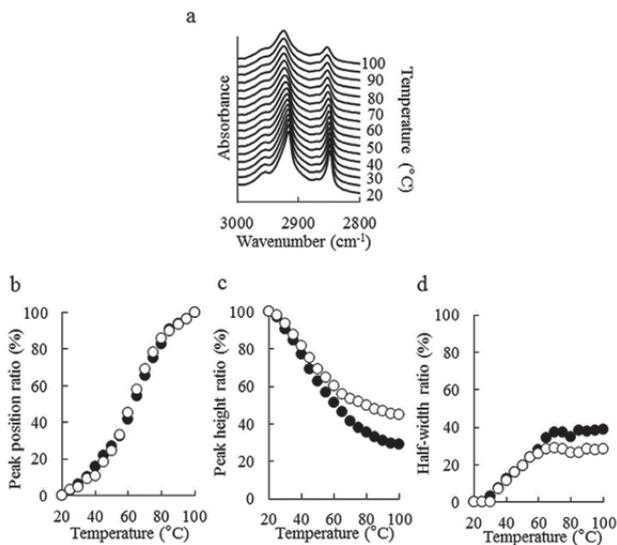


Fig.5 Thermally induced change in the peak profiles (a), peak position (b), peak height (c) and half-width (d).

長さわずか十数 nm のラメラ構造を直接観察することは容易ではないが、近年、電子顕微鏡の技術の進歩によりこれもまた可能になってきた。³⁾ 凍結角層のラメラ構造の電子密度分布の解析によれば、ラメラ周期は約 11 nm であると報告された。これは、以前よりいわれているラメラ周期より若干短い。さらに、その長さのラメラをつくるセラミド分子の配列予想は、これまでの共通認識とは異なるものであった。ラメラを形成するセラミドの2本の炭化水素鎖は、多くの論文のなかで「ヘアピン」構造として示されてきたが、あらたに「展開」構造であるとの見解が提案された。しかし、セラミドが角層中で展開構造であるかについてはまだ議論の余地があると考えられる。なぜなら、角層細胞間脂質についての分子動力学の計算をはじめにあたりセラミド分子を記述して真空中で安定化すると「V型」構造になるからである。V型構造は、ヘアピンに曲げるにしろ、炭化水素鎖を両側に開いて展開するにしろ、外部から大きな力を加える必要がある。驚くべきことは、集合体と

して平衡を保ちながら、外部環境の変化に応じて適切なバリアを形成する優れた能力を、一連の細胞間脂質が具備している点である。

3. 製剤成分の適用による細胞間脂質の構造変化

薬物の経皮吸収は、さまざまな化合物の共存によって促進され、皮膚に対する安全性が高く、より多くの薬物に適用できる化合物の探索が今日も続けられている。製剤中に薬物とともに配合することにより、薬物の吸収性を高めるような化合物が、皮膚表面に及ぼす作用については大変興味深い。

角層に薬物の経皮吸収を促進する代表的な化合物である *l*-メントールを適用して収束イオンビーム走査型電子顕微鏡 (FIB-SEM) で観察してみると、細胞間脂質の部分に *l*-メントールの液溜りのようにみえる領域が認められた (**Fig.6**)。この結果は、X線回折で、X線が照射される領域を一定とした場合に回折の強度が減少する結果と対応するものである。

また、昇華させた *l*-メントールを直接適用した角層のX線回折プロファイルからは、細胞間脂質の液晶化が示された (**Fig.7**)。⁴⁾ さらに、温度走査を行いながらX線回折プロファイルの変化を観察すると、*l*-メントールによる処理を行った角層では、60°C付近で現れる高温型六方晶の形成と考えられるピークの強度増大が、コントロールに比べて緩やかになる傾向が認められた。

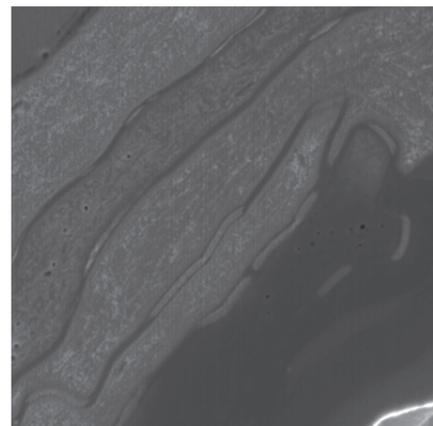


Fig.6 Cross-section of stratum corneum observed by FIB-SEM.

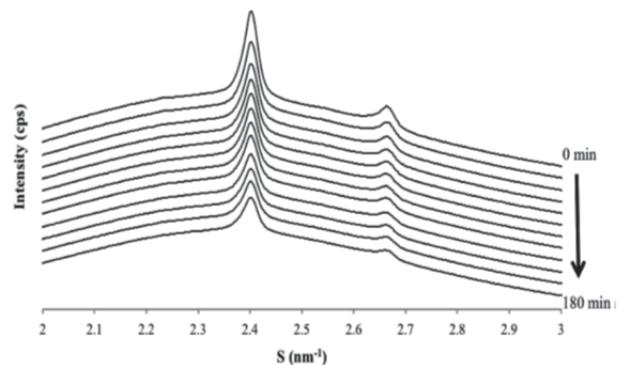


Fig.7 Change in wide-angle X-ray diffraction profiles of intercellular lipids in stratum corneum in response to administration of vaporized *l*-menthol.

4. 細胞間脂質モデルの調製と製剤開発への応用

角層細胞間脂質は、角層質量の10%程度といわれており、構造解析に際して通常の実験室レベルのX線回折測定装置では測定に長時間を要するうえ精度の高いデータを得ることは容易ではない。そこで、効率的な実験を行うには、高輝度光科学研究センター（SPring-8）や高エネルギー加速器研究機構の放射光科学研究施設（KEK-PF）の放射光X線の利用が不可欠である。これらの施設では、加速器を回る電子からつくられた強度の大きなX線を試料に照射することで、より短時間で正確なデータを得ることができる。それでもなお、その構造解析はいまだに容易とはいえない。細胞間脂質の構造解析においては、測定で得られる信号は、個体差やノイズを伴っており、たとえば適用した製剤成分の影響が弱い場合や反対に影響が強すぎて液晶化して脂質の回折が弱まった場合など、その微妙な変化を適切に表現するパラメータを考える作業が必要である。細胞間脂質の構造変化を正確に解釈するには、これまでに得られている多くの知見を併せて考察することが必要で、知識の蓄積と理解がある。実際の角層を用いた細胞間脂質の構造解析は、実験が十分に可能になった現在も、考えなければならないことが山積する現状である。

そこで、代表的な細胞間脂質を選択して細胞間脂質モデルの構築を試みた。生物物理の研究分野では、リン脂質を中心としたモデル脂質の構造解析による生体膜研究が数多く行われて、たくさんの成果をあげている。そこで、セラミドAS、コレステロール、パルミチン酸を成分として混合比を変えながら、まず蛍光異方性を指標に相図を作成した。⁵⁾ セラミドは難溶性化合物であるため、予備実験でリン脂質を使用していたものを、実際の実験でセラミドに代えると、同じ操作に対してより高度な実験手技を要求される場面もみられ、脂質モデルの利用にもまた困難がある。統計学的手法を用いて得られたデータの特徴を自己組織化マップで分類すると、4つのクラスターに分けることができた。クラスター重心の処方代表値と定めて、その特徴を調べると、実際の角層の特徴に近いクラスターを特定することができた。同一の3成分でありながら、その混合比によって出来上がる脂質モデルの特性は様々であることは、その多様性が細胞間脂質のバリア機能の本質であるように思える。環境変化に対応して、つねにバリア機能を保つためには、それぞれの成分が協同して幅広い条件でラメラ構造を形成できるように仕組まれていると推察される。実験上での最適モデルのクラスターを結論付ける一方で、実験を行ったすべての処方もまた、異物侵入を防ぐ予備軍として、十分に活躍できる力を備えている。生体膜にマイクロドメインとして脂質ラフトがあるように、角層の細胞間隙にも脂質の偏りがあり、角層細胞の角化不溶性膜を足場にラメラ構造が形成される。細胞間脂質の液晶の海に、ラメラ構造の塊が島として浮かぶ世界がバリア機能を司る皮膚表面の本当の姿なのかもしれない。この構造の地図全体が読み解かれる日はまだまだ先のことになりそうである。よく目にする模式図のなかでは、細胞間脂質は均一な層を成し、層間には水層が挟まれている。⁶⁾ しかし、最近の研究が示しているのは、この模式図のような極めて均一な層というよりも、もっと断片的な層の重なり合いになっているように想像できる。それはこの論文が発表されて以来四半世紀の間に科学が進歩した証でもあり、我々は新しい知見にもとづいて、より実践的な製剤開発を行う義務を負うものでもある。あらたに確立した脂質モデルを利用して、吸収促進剤の光学活性の違いによる作用機構の差異を明確にすることに成功し、⁷⁾ 脂質モデルでバリアに対する

影響を直接知ることができる方法を見出したことは貴重である。このようなモデルを使用して、微細構造の変化を正確に測定することができれば、皮膚透過実験の負担を減らして製剤開発ができる日がくるかもしれない。

また、これらの脂質モデルは、角層上に塗布することで、バリア機能不全を改善する製剤にもなりうるだろう。実際に、ラメラ構造を形成させたセラミドをシリカで被覆したマイクロカプセルが、角層上にラメラ構造をつくることを実験的に確認している。

さらに、アトピー性皮膚炎では、微量脂質の存在比が正常皮膚とは異なることが報告されたことから、この存在比を反映させた脂質モデルを調製したところ、正常皮膚モデルと比較して明らかに充填構造が異なることを示すことができたため、バリア機能不全の原因の一部が解明できる可能性がある。また、これまで角層内に相当量存在するにも関わらずその機能が不明であったセラミド類も、同様の手法を用いれば、バリア機能に対する寄与を調べることができる。このように脂質モデルは、その構造を解析することで製剤開発から疾患原因の解明、さらには生体の機能解明にまで広範に利用できる強力なツールでもある。

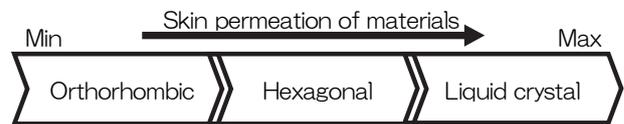


Fig.8 Relationship between skin permeation of materials and lateral packing of lipids.

現在のところ、角層細胞間脂質の構造解析はだいぶ発展しているが、まだ知見の蓄積はそれほど多くない。充填構造と薬物透過性の関係はFig.8のように推論されている。

我々はまた、全反射型フーリエ変換赤外分光法（FT-IR(ATR)）により、角層細胞間脂質の赤外吸収スペクトルを解析し、温度の上昇や経皮吸収促進剤の適用で、細胞間脂質由来の吸収ピークの極大吸収波数が高波数側へ移行する様子を明らかにした。⁸⁾ この結果から、1-メントールの適用により、角層細胞間脂質の状態は室温付近ですでに入浴時と同じ状態になっていることがわかった。物理的な外部環境としての温度上昇と吸収促進剤の適用が、細胞間脂質にとって本質的に同じ意味を持つかどうかを調べることは、これから取り組まなくてはならない課題のひとつである。製剤に使用される脂肪酸であるレプリン酸は薬物の皮膚透過を促進するものの、細胞間脂質への作用機構は1-メントールのようなテルペン系化合物とは明らかに異なることもわかってきた。⁹⁾ 構造化した脂質を液晶化するテルペン系化合物に対して、脂肪酸類は皮膚中ですでに液晶化している脂質に、より積極的に働きかける可能性がみえている。

食品用のラップフィルム1枚半程度の厚さをもつ角層のなかの割ほどの脂質は、天文学的数字の関連化合物が存在して、状況に応じて巧みに相手を選び、ラメラ構造というスクラムを組み生体を保護する役割を果たす。最近のあたらしい経皮投与製剤には、角層を経由せず直接皮下へとアプローチするようなマイクロニードルアレイのような製剤もあり、実用化も近いといわれるが、一方で経皮吸収型製剤や外用剤の発展については、やはり関心の薄れることはないだろう。

これまででは、薬物の皮膚透過促進に際して、「脂質流動性の増大」という一言で表現されていた作用機構は、角層細胞間脂質の液晶化という、より具体的な実験データとして

表現することに成功した。化合物を適用することで薬物の皮膚透過が影響を受ける現象自体は想像に難くないが、その現象が生じる原因や、その化合物に特有な現象であるのか、薬物を変えたらどうなるのか、といった疑問は尽きることがない。それらを少しでも系統的に理解して、効率よく製剤開発するためには、細胞間脂質の構造と製剤成分の関係を分子レベルで深く知ることが近道のように思える。

謝 辞

角層のX線回折実験に際しまして多大なご指導とご協力を賜りました SPring-8/JASRI の太田昇博士、群馬大学大学院の高橋浩教授、名古屋産業技術研究所の八田一郎先生に深謝いたします。

また、FIB-SEM の観察は「平成 28 年度研究設備の試行的利用課題」として実施されました。実験の実施にあたり、多くのご指導を賜りました名古屋大学エコトピア研究所超高压電子顕微鏡施設の荒井重勇特任准教授、中尾知代技術支援員および中野美恵子氏に感謝いたします。

さらに、本研究の一部は、文部科学省「私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 (2014–2018, S1411019)」の支援を受けて実施いたしました。ここに感謝いたします。

文 献

- 1) S. Utsumi, Y. Obata, and K. Takayama, *J. Drug Del. Sci. Tech.*, **35**, 200–206 (2016).
- 2) Y. Obata, I. Hatta, N. Ohta, N. Kunizawa, N. Yagi, and K. Takayama, *J. Contr. Rel.* **115**, 275–279 (2006).
- 3) I. Iwai, H. Han, L. den Hollander, S. Svensson, L. G. Ofverstedt, J. Anwar, J. Brewer, M. Bloksgaard, A. Laloeuf, D. Nosek, S. Masich, L. A. Bagatolli, U. Skoglund, and L. Norlen, *J. Invest. Dermatol.* **132**, 2215–2225 (2012).
- 4) S. Yoshida, Y. Obata, Y. Onuki, S. Utsumi, N. Ohta, H. Takahashi, and K. Takayama, *Chem. Pharm. Bull.* **65**, 134–142 (2017).
- 5) H. Watanabe, Y. Obata, Y. Onuki, K. Ishida, and K. Takayama, *Chem. Pharm. Bull.* **58**, 312–317 (2010).
- 6) B. W. Barry, *J. Contr. Rel.* **6**, 86–97 (1987).
- 7) H. Watanabe, Y. Obata, Y. Onuki, K. Ishida, and K. Takayama, *Int. J. Pharm.* **402**, 146–152 (2010).
- 8) Y. Obata, S. Utsumi, H. Watanabe, M. Suda, Y. Tokudome, M. Otsuka, and K. Takayama, *Int. J. Pharm.* **389**, 18–23 (2010).
- 9) S. Utsumi, T. Nakamura, Y. Obata, N. Ohta, and K. Takayama, *Chem. Pharm. Bull.* **64**, 1692–1697 (2016).



小幡 誉子
Yasuko Obata
E-mail: obata@hoshi.ac.jp