

顕微ラマン分光法を用いた皮膚角質層の評価法 および透過性スクリーニング法の構築

明治薬科大学

藤井 美佳、深水 啓朗

In this study, lipid structural change was monitored using Raman spectroscopy during heat treatment, along with the impact of lipid states on the structural and physical properties during the preparation process of the intercellular lipid model (MODEL) in stratum corneum. Moreover we demonstrated the availability of the MODEL for an evaluation of skin permeation mechanisms for skin permeation enhancers. The lipid states in preparation process was monitored by valuable temperature (VT)-Raman spectroscopy and differential scanning calorimetry. The Raman spectra were analyzed by perturbation correlation two-dimensional correlation spectra. The microstructure of MODELS prepared different temperatures and the structural changes of MODELS after application of skin permeation enhancers (vesicle and micelle solution) were detected by small angle X-ray scattering and powder X-ray diffraction measurements. The microstructures of the MODEL changed depending on the melting of lipid ingredients in the preparation process. It was recognized that VT-Raman spectroscopy is a useful and attractive tool for the sensitive monitoring of lipid state changes and lipid melting. These results suggested that monitoring lipid structural changes during the heating step is important to precisely prepare target MODEL. The MODEL structure changed after application of skin permeation enhancers. Especially the vesicle solution that promote skin permeation of low molecular weight compounds rather than micelle solution, was made the model structure disorder. It is expected that the MODEL would apply for the elucidation of skin permeation mechanisms.

1. 緒言

皮膚の最外層に存在する角層は、生体内への病原体・異物の侵入抑制および生体内からの水分蒸散抑制における重要な役割を担っている。特に角層細胞間脂質は低分子化合物の経皮吸収における主な経路となることが知られており、化合物の経皮吸収メカニズムの解明には、化合物と細胞間脂質の相互作用評価が重要である。しかしながらヒト角層は、採取する部位、被験者の年齢、性別および人種による構造および組成のばらつきが大きく、由来の異なる角層検体間での評価結果を単純に比較することが難しい。また2009年以降、EUにおいて動物実験を実施した化粧品の販売が禁止され、化粧品開発においては動物皮膚の使用も難しい状況にある。このような背景から、ヒトおよび動物の角層細胞間脂質の代替として、構造や組成の偏差が少ない細胞間脂質モデル (MODEL) が注目されており、様々なMODELが開発されている^{1,2)}。MODELの組成や調製条件の違いは、その構造および物性に大きく影響するため、望ましい構造またはプロファイルを示すMODELをデザインするためには、調製過程における構成脂質の構造変化を詳細に理解することが重要と考えられる。

本検討では、セラミド (CER)、パルミチン酸 (PA) およ

びコレステロール (CHOL) を構成脂質としたMODEL^{3,4)}について、調製過程における脂質の構造変化をラマン分光法でモニターし、調製温度が及ぼすMODEL構造への影響を調べた。また、経皮吸収促進剤の適応によるMODELの構造変化を観察し、皮膚透過性評価におけるMODELの有用性を検証した。

2. 方法

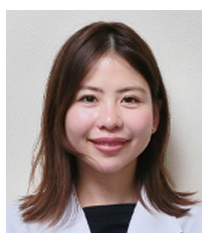
2.1. 材料

CERとして(2S,3R)-2-(2-Hydroxyhexadecanoyl) amino octadecane-1,3-diol (Takasago International Corporation, Tokyo, Japan) を使用した。PA (PALMAC 98-16) およびCHOLは、Acidchem International Sdn Bhd (Penang, Malaysia) およびFUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation (Osaka, Japan) からそれぞれ購入して使用した。

経皮吸収促進剤として、イソステアрилグリセリルエーテル (Penetol[®] GE-IS, Kao, Tokyo, Japan, 以下, GE-IS) およびポリオキシエチレン (60) 硬化ひまし油 (HCO-60, Nikko Chemicals, Tokyo, Japan, 以下, HCO-60) を用いた。

2.2. 細胞間脂質モデル (MODEL) の調製

まずCER/CHOL/PA (42 : 15 : 43, w/w) の物理混合物を調製した。これらの物理混合物をクロロホルム/メタノール溶液 (2 : 1) に溶解後、ガラスプレートに滴下した。32℃で溶媒を揮発させ、脂質膜 (LM) を得た。MODEL 80は、LMを80℃で30min加熱した後、室温まで冷却して調製した。同様にMODEL 120は、LMを120℃で30min加熱した後、室温まで冷却して調製



Construction of evaluation method for human stratum corneum and screening method for percutaneous adsorption by Raman spectroscopy
Mika Y. Fujii, Toshiro Fukami
Meiji Pharmaceutical University

した。

2.3. 脂質膜 (LM) および MODEL の物性評価

2.3.1. 示差走査熱量計 (DSC)

示差走査熱量計 (DSC) は Mettler Toledo DSC1 (Mettler Toledo International Inc.) を用いた。LM を 20℃ から 80℃ または 120℃ まで、5℃/min (40mL/min, N₂ 環境下) の速度で昇温する過程の熱量変化を測定した。

2.3.2. 温度可変顕微ラマンスペクトル測定

温度可変顕微ラマンスペクトル測定は、顕微ラマン分光装置 (Work Station™, Kaiser Optical Systems Inc., Ann Arbor, MI, USA) および 10083 (Linkam Scientific Instruments Ltd., UK) を用いた。ヒートステージ上に LM をセットし、20℃ から 120℃ まで昇温した。昇温速度は 10℃/min とし、10℃ 毎に 2min 間保持した後にラマンスペクトルを測定した。ラマン分光装置は、照射レーザー波長 785nm, 積算回数 3 回, 露光時間 30s, 測定範囲 300–3500cm⁻¹, 100 倍の対物レンズを用いて測定した。得られたラマンスペクトルは、2Dshige version 1.3 を使用して、摂動相関二次元相関スペクトル (PC2D) を得た。各温度のラマンスペクトルは、ガラス基板に由来する 1698.6cm⁻¹ のピーク強度が一定になるように規格化した。

2.3.3. 粉末 X 線回折 (PXRD)

PXRD は、MiniFlex600 (Rigaku Corporation, Tokyo, Japan) を使用した。2θ 側測定範囲 2–28°, ステップサイズ 0.02°, スピード 4°/min, X 線出力 管電圧 40kV, 管電流 15mA, 線源 Cu-Kα (λ=1.5418Å) で測定した。

2.3.4. 小角 X 線散乱 (SAXS)

SAXS は、SAXS space (Anton paar, Graz, Austraria) を使用した。露光時間 1min, 積算回数 4 回, 線源 Cu-Kα

(λ=1.5418Å) で真空下にて測定した。Repeat distance (d) は、 $d=2\pi/q$ より算出した (q: 散乱ベクトル)。

2.4. 経皮吸収促進剤による MODEL 構造の変化

経皮吸収促進剤には、5wt% GE-IS / 5wt% HCO-60 によるベシクル溶液, 5wt% HCO-60 によるミセル溶液を用い、溶媒にはそれぞれ 50mM クエン酸緩衝液を使用した。MODEL (10.5mg) に、各溶液を 20μL 滴下し、室温で 24h 静置後、SAXS で測定した。

3. 結果および考察

3.1. 調製過程における LM 中脂質構造のダイナミクス

ラマン分光法は脂質炭化水素鎖の C-C 結合や CH₂ 結合等、対称性の高い振動モードの検出を得意とし、ラマンスペクトルの変化から炭化水素鎖の周辺環境の変化を検出できる。加熱過程における LM の構造変化をより詳細に調べるために、20℃ から 120℃ まで LM の温度を変化させ、その過程をラマン分光法でモニターし、PC2D で解析した。PC2D は、摂動に対するスペクトル変化を捉えることが可能であり、スペクトル強度の変曲点を把握するのに有効である⁵⁾。

昇温過程における LM 中脂質のラマンスペクトル変化および熱挙動を Figure 1 に示す。DSC 曲線では、58.6℃ の吸熱に続いて、71.2℃ および 81.4℃ の吸熱ピークが認められた。ラマンスペクトルでは、脂質炭化水素鎖の C-C 伸縮振動に由来する 1061cm⁻¹ あるいは 1128cm⁻¹ のピーク強度が 70–80℃ で低下した。これらのピークは、脂質炭化水素鎖の運動性を示していることから⁶⁾、DSC 曲線で認められた 81.4℃ の吸熱ピークはゲル–液晶相転移を示

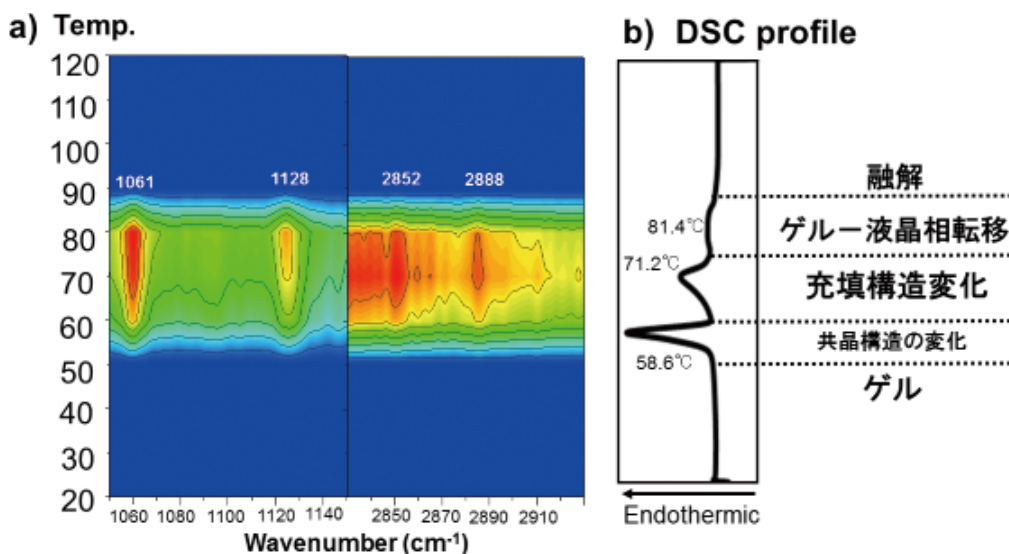


Figure 1 昇温過程における LM の PC2D スペクトル a) および DSC 曲線 b)

していると考えられる。また、 2852cm^{-1} の CH_2 対称伸縮振動のピーク強度は $70\text{--}80^\circ\text{C}$ 、 2888cm^{-1} の CH_2 逆対称伸縮振動のピーク強度は 70°C で急激に低下することが明らかとなった。これらのピークは細胞間脂質の充填構造の情報を反映することが知られており⁷⁾、DSC曲線で認められた 71.2°C の吸熱ピークは、充填構造の変化に起因すると推察される。一方、DSC曲線で吸熱ピークが観察された 58.6°C では、ラマンスペクトルに大きな変化は認められなかった。このピークは構成脂質単独の吸熱ピークとは一致しないことから(data not shown)、共晶の構造変化による吸熱ピークと考えられる。また、ラマンスペクトルのピーク強度は 90°C 付近で一定となることが明らかとなり、約 90°C でLMが完全に融解したと考えられる。

3.2. MODELの周期構造解析

ラマンスペクトル(Figure 1)の結果から、調製温度の違いによってMODEL形成までに経験する構造変化が異なることが示唆された。そこで 80°C または 120°C で得られた各MODELについて、ラマン分光法では得ることができないより長距離の周期構造をPXRDおよびSAXSを用いて評価した。

LM, MODEL 80およびMODEL 120のPXRDおよびSAXSパターンをFigure 2に示す。LMおよびMODEL 80のPXRDパターンから、直方晶および六方晶を示す約 21.5° および 23.8° の回折ピークが認められた。またこれらの充填構造に加え、約 19.6° 、 23.5° および 24.6° に回折ピークが認められたことから、複数の複格子構造が混在すると考えられる。一方、MODEL 120ではこれらのピークは消失し、直方晶および六方晶のみが認められた。LMおよびMODEL 80のSAXSパターンでは、 $4.32\text{--}4.38\text{nm}$ のd値を有する構造(i)および、 3.60nm のd値を有する構造(PA)が観察された。PAの単斜晶は約 3.60nm のd値を有することから⁸⁾、当構造はPAが単独で形成する結晶によると考えられる。ヒト角層では、CER：脂肪酸：CHOLはおよそ当モル比で存在することから⁹⁾、当MODELはPAの配合量が多いことが分かる。つまり、過剰に存在するPAが単独で結晶構造を構築したと考えられる。一方、構造iはCER、PAおよびCHOLの共晶によるピークと推察される。MODEL 120では 4.60nm (I)、 4.00nm (II)および 3.60nm (PA)のd値を有する構造が認められた。 3.6nm は、PAの結晶由来と推察され、PA結晶は調製温度に因らず、当MODEL中に存在することが明らかとなった。構

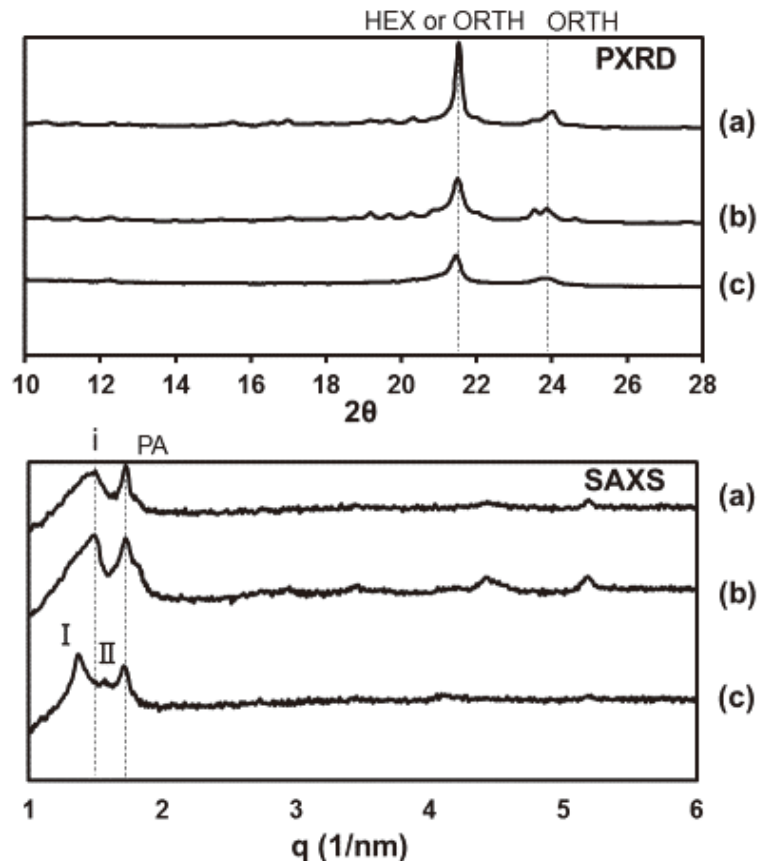


Figure 2 LM (a), MODEL 80 (b) および MODEL 120 (c) のPXRD および SAXS パターン (HEX: 六方晶, ORTH: 直方晶, PA: パルミチン酸の結晶)

造 I および II は CER, PA および CHOL の共晶による構造と考えられるが, 特に構造 I の構造は CER のヘアピン構造による結晶であると推察される (CERヘアピン構造の分子長: 約 2.1-2.3nm). 以上の結果より MODEL の構造は調製温度によって異なり, 特に共晶構造および充填構造は MODEL 80 と MODEL 120 で大きく異なることが分かった. Figure 1 より, 調製過程において構成脂質は 90℃ 以上で完全に融解することが明らかとなっており, 調製過程の脂質の融解状態が MODEL 構造に影響すると推察される. ヒト角層細胞間脂質の充填構造は六方晶と直方晶から成ると考えられている¹⁰⁾. そこで, 六方晶および直方晶を充填構造として有していると考えられる MODEL 120 を使用し, 経皮吸収促進剤の適応によるモデルの構造変化を評価した.

3.3. 経皮吸収促進剤による MODEL 構造の変化

ベシクル溶液, ミセル溶液および 50mM クエン酸緩衝液を適応した MODEL の SAXS patterns を二次微分した

ピークトップを Table 1 に示す.

当研究で使用したベシクル溶液はミセル溶液と比較して, 低分子化合物の皮膚透過量を 1.5-3 倍向上させることが明らかとなっている (data not shown). Table 1 より, 50mM クエン酸緩衝液適応後の MODEL は, 4.48, 3.98, 3.58 および 2.26nm の d 値を有しているが, ベシクル溶液の適応により, Second peak (3.98nm 付近) が消失した. ミセル溶液においてもピーク強度は減少したが, その構造は完全には消失しないことが明らかとなった (Figure 3). また PXR D 測定の結果から, ベシクル溶液を適応した MODEL の広角側に, ハローパターンが認められ (Figure 3), MODEL が非晶質化したことが示唆された. これより, 細胞間脂質の構造が一部乱されたことが, ベシクル溶液による低分子化合物の皮膚透過性促進作用の機序の一つであると考えられる.

4. 総括

本研究では先ず, 調製過程における MODEL 構成脂質の

Table 1 各製剤を適応した MODEL 120 の d 値 (nm)

	50 mM citric acid buffer	Vesicle	Micell
First peak	4.48	4.51	4.48
Second Peak	3.98	-	3.96
Third Peak	3.58	3.59	3.57
Forth peak	2.26	2.25	2.27

Each data was gained by second derivative of SAXS patterns (Figure 3).

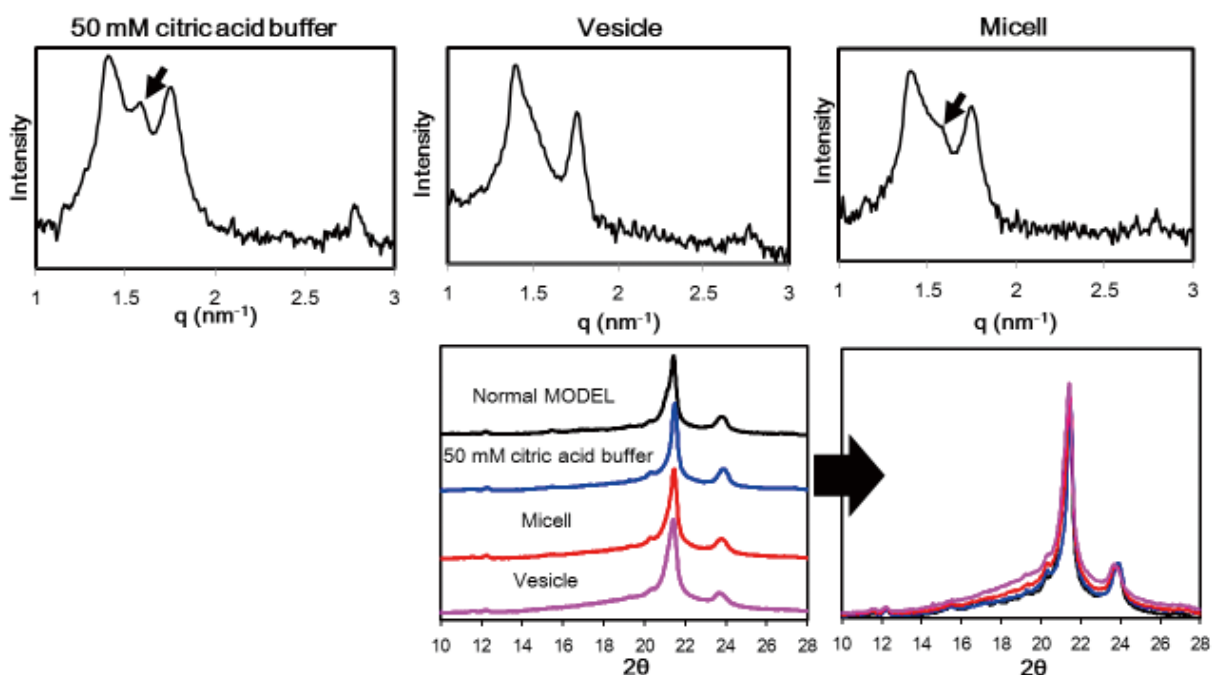


Figure 3 各溶液を適応した MODEL の SAXS および PXR D パターン

状態変化を温度可変ラマン分光法でモニターし、調製温度が及ぼすMODEL構造への影響を調べた。調製過程でLMを完全に融解することで、ヒト角層細胞間脂質に類似した充填構造を有するMODELを調製できることが明らかとなった。加熱過程におけるLMの構造変化を分子レベルで理解することは、適切なMODELを調製するうえで必要不可欠であり、温度可変ラマン分光法はその構造変化を *in situ* モニタリングできる有効なツールであることが示された。次に、当MODELに経皮吸収促進剤であるベシクルおよびミセル溶液を適応し、MODELの構造変化を評価した。低分子化合物の皮膚透過性を亢進させる、ベシクル溶液を適応すると、MODELの構造が一部消失し、非晶質化することが示唆された。経皮吸収促進剤がMODELに与える影響については、更に詳細な検証が必要とされるものの、本MODELは経皮吸収促進剤等の浸透促進メカニズムの解明に応用が期待される。

(引用文献)

- 1) D. Groen, *et al.*, *Langmuir*, **26**, 4168-4175 (2010).
- 2) A.P. Ramos, M. Lafleur, *Langmuir*, **31**, 11621-11629 (2015).
- 3) H. Watanabe, *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, **58** (3), 312-317 (2010).
- 4) X. Wang, *et al.*, *Coll. Surf. B*, **78**, 92-100 (2010).
- 5) M. Thomas, H. H. Richardson, *Vib. Spectrosc.* **24**, 137-146 (2000).
- 6) A. N. C. Anigbogu, *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **125**, 265-282 (1995).
- 7) R. Koynova, M. Caffrey, *Biochim. Biophys. Acta*, **1255**, 213-236 (1995).
- 8) X. Wang, *et al.*, *Coll. Surf. B*, **78**, 92-100 (2010).
- 9) A. Weerheim, M. Ponec, *Arch. Derm. Res.*, **292**, 191-199 (2001).
- 10) S. Ramakrishnan, *et al.*, *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* EXS-A H6. 2. 1. (2004).