メントール関連化合物の適用による皮膚角層細胞間脂質の構造変化と冷感作用の関連
Effect of menthol related compounds on the lipid lamellar structure in stratum corneum and cooling activity

小幡誉子 [a]、八田一郎 [b]、太田昇 [b]、八木直人 [b]、髙山幸三 [a]
Yasuko Obata [a], Ichiro Hatta [b], Noboru Ohta [b], Naoto Yagi [b], Kozo Takayama [a]

[a] 星薬科大学、[b] ㈶高輝度光科学研究センター
[a] Hoshi University, [b] SPring-8/JASRI

アブストラクト
経皮吸収型製剤や外用剤の成分として繁用される *l*-メントールは、皮膚への適用により強力で一過性の冷感作用を示すが、角層への適用では細胞間脂質の高温型六方晶の形成を不明瞭にした。一方、弱い持続性の冷感作用が認められるメントール関連化合物やほとんど冷感作用を持たない *d*-リモネンでは、高温型六方晶の形成はコントロールと同様だった。したがって、細胞間脂質の構造変化に及ぼす寄与の度合いと冷感作用の間に関連がある可能性が示唆された。

Abstract
The typical component of transdermal delivery system and topical formulation, *l*-menthol, has strong and transient cooling activity. It has already clarified that *l*-menthol prevent the formation of high-temperature hexagonal packing of intercellular lipids in stratum corneum. In contrast, the formation of high-temperature hexagonal packing was not affected by the administration of *d*-limonene which excellent permeation enhancer for hydrophobic drugs or menthol related compound that has weak and sustained cooling activity. Thus, it was suggested that the cooling activity and contribution of disruption of lipid packing correlated each other.

【目的】

皮膚の表面に存在する角層内の細胞間脂質は、異物や脱水から生体を保護するために重要な役割を果たしている。細胞間脂質の成分の一部を添加した製剤の適用で、異物に対する皮膚の透過障壁能が増強されることも報告されており[1]、細胞間脂質の構造解析は医薬品や化粧料の開発への応用に留まらず慢性的な皮膚疾患の治療の可能性も含んでおり非常に興味深い。細胞間脂質は、恐らくその一部が構造化することで、約 13 nm の長周期ラメラと約 6 nm の短周期ラメラを形成し、それらの充填構造は六方晶または斜方晶である。現在までのところ、ラメラ周期と充填構造の関係は、八田らの提案[2]を除いては明確な報告がなく統一的な見解には至っていない。しかしながら、これまでに行われてきた角層のX線回折実験では、小角領域にはラメラ構造由来の比較的ブロードな回折が認められる一方で、広角領域には充填構造由来の非常に明確な回折が検出されている。そこで、充填構造に着目して細胞間脂質の熱特性と経皮吸収型製剤や外用剤に繁用される製剤成分の影響について検討が行われ、*l*-メントールが高温型六方晶の形成の妨げに関与する可能性が示されている(2009A1876)。さらに、角層の温度走査赤外分光実験の結果からは、*l*-メントールを適用した角層では 30℃ですでに斜方晶融解の相転移を超えた脂質の炭化水素鎖の振動と同程度の振動が観察された [3]。これは *l*-メントールの適用で細胞間脂質の構造が乱れることと対応し、温度の適用と同じ効果を

示すことを示唆している。そこで今回は単環モノテルペン類で疎水性薬物の皮膚透過促進効果が高いことで知られる *d*-リモネンならびに *l*-メントール同様冷感作用を持つことがわかっているメントール関連化合物を用いて、これらの化合物が細胞間脂質の熱特性に及ぼす影響を検討した。

【実験方法】

角層の剥離：ヒト組織からトリプシン処理により剥離した角層（BIOPREDIC International, Rennes, France）を実験に供した。

放射光 X 線回折実験：角層をガラスキャピラリーに充填し、示差走査熱量測定装置（FP90, Mettler）の加熱ステージを用いて、温度走査を行いながら小角・広角同時測定を行った。

【結果・考察】

まず、六方晶と斜方晶が共存する 40℃以下の温度領域で明瞭にあらわれる 2.4nm^{-1} および 2.7nm^{-1} 付近の回折を定量的に評価した。細胞間脂質の充填構造が六方晶であれば 2.4nm^{-1} に、斜方晶であれば 2.4nm^{-1} および

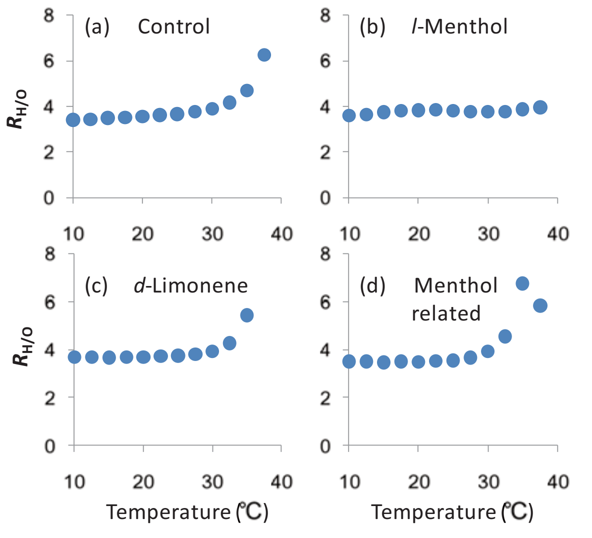

Fig.1 Change in proportion of lateral packing of lipids in stratum corneum as a function of temperature

2.7nm^{-1} に回折がある。すべての脂質が六方晶に充填されていれば 2.4nm^{-1} の回折のみであると考えることができる。しかしながら、測定を行ったすべてのヒト角層で 2.4nm^{-1} および 2.7nm^{-1} に回折が認められた。このことは細胞間脂質が斜方晶あるいは斜方晶と六方晶の混合であることを意味している。これらの 2 つの回折を利用して化合物の影響を調べるために積分強度比($R_{H/O}$ = (Integrity intensity of peak at 2.4nm^{-1}) / (Integrity intensity of peak at 2.7nm^{-1}))を定義した[4]。

Fig.1 には $R_{H/O}$ の変化を示した。$R_{H/O}$ の増大は見かけのうえでは六方晶の増大を意味するが、角層水分量を 25%に調節したコントロール(Fig.1(a))では、約 40℃の斜方晶の融解に向かって $R_{H/O}$ が増大した。これは、斜方晶の融解に伴って 2.7nm^{-1} の回折の積分強度が急激に減少することを反映している。一方、Fig.1(c)および Fig.1(d)に示すように疎水性薬物の皮膚透過を促進する *d*-リモネンや、比較的弱いが持続性の冷感作用を有するメントール関連化合物の適用でも同様の変化が観察された。これに対して、*l*-メントールの適用では $R_{H/O}$ の変化がほとんど認められなかった (Fig.1(b))。これは、*l*-メントールの適用により、すでに低温側で斜方晶が融解しているためと考えることができる。ただし測定開始の 10℃における $R_{H/O}$ は、コントロールと大きな違いがないことから、*l*-メントールは六方晶に対しても働きかけて充填構造の保持を困難にしている可能性もある。

次に 40℃より高温領域における熱挙動を解析した。40℃以上では高温型六方晶のみが存在するため、2.4nm^{-1} 付近の回折の変化を定量化した。Fig.2 に示すように、50℃付近から

積分強度が増大し、高温型六方晶の形成が認められた。*l*-メントールの適用では、他の化合物の適用に比較して明らかに高温型六方晶の形成の度合いが小さくなった。これは、*l*-メントールが本来特定の温度で高温型六方晶を形成する脂質成分と相互作用を生じることによって、それらの脂質が実質的に六方晶の形成に関与できなくなるためと考察した。今回得られた実験の結果から、細胞間脂質の構造変化に及ぼす寄与の度合いと冷感作用の間には関連性がある可能性が示唆された。現在、細胞間脂質の代表的な成分から構成したモデル脂質を用いて分子間相互作用を直接検討する試みも精力的に進められている[5,6]

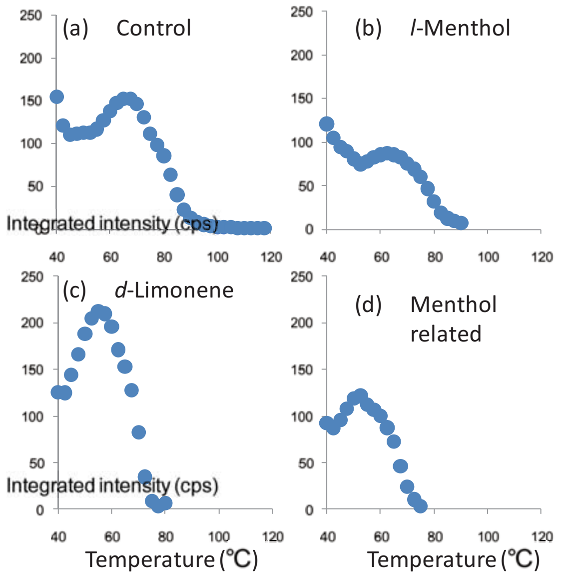

Fig.2 Change in integrated intensity of high-temperature hexagonal packing of lipids in stratum corneum as a function of temperature

また、実験に使用するヒト角層の製造番号の違いにより実験データの変動が認められた。これは角層提供者の生活環境、とくに界面活性剤の使用状況の差異が細胞間脂質の構造に影響がある可能性を示唆している。しかし温度上昇に対する変化についてはいずれの試料でもその傾向は一致したことから、化合物の適用により本質的に影響を受ける充填構造が存在すると考えることは妥当である。

冷感作用の発現強度は、体内に存在する冷感レセプター(TRPM8)と適用した化合物の親和性に依存するが、レセプター近傍に到達する化合物量は、皮膚透過量との関連性が大きいと考えられることから、角層への分配性が大きく細胞間脂質の構造を乱す効果の高い化合物、すなわち浸透性の高い化合物が結果的に強く長時間にわたる冷感作用を示す可能性が大きい。

今後の課題としては、細胞間脂質全体のなかで構造化した脂質量の同定や、斜方晶・六方晶の実験的な分離とそれぞれに対する化合物の影響の直接検討があげられる。今回の実験では、化学構造が似通っている化合物でありながらその角層内挙動や細胞間脂質への影響は異なることが明らかになり、化合物自体の構造パラメータとの比較や適用条件に関してもさらなる系統的研究が必要と考えられる。

【参考文献】

[1] Y.Obata, S.Takahashi, K.Ishida, K.Takayama, *Asian J. Pharm. Sci.*, **4**, 292-299 (2009).

[2] I.Hatta, N.Ohta, K.Inoue, N.Yagi, *Biochim.Biophys.Acta*, **1758**, 1830-1836 (2006).

[3] Y.Obata, S.Utsumi, H.Watanabe, M.Suda, Y.Tokudome, M.Otsuka, K.Takayama, *Int.J.Pharm.*, in press.

[4] Y.Obata, I.Hatta, N.Ohta, N.Kunizawa, N.Yagi, K.Takayama, *J.Contr.Rel.*, **115**, 275-279 (2006).

[5] H.Watanabe, Y.Obata, K.Ishida, K.Takayama, *Colloid. Surf. B.*, **73**, 116–121 (2009).

[6] H.Watanabe, Y.Obata, Y.Onuki, K.Ishida, K.Takayama, *Chem.Pharm.Bull.*, in press.