

学位申請論文

皮膚角層の物性と構造特性に着目した 素材・基剤創出に関する研究

2020 年 3 月

東京理科大学大学院 薬学研究科

岡 隆史

目次

発表論文目録.....	4
略語表.....	5
序論.....	6
第1章 皮膚角層の物性に着目した素材創出に関する研究.....	10
第1節 新規保湿剤アセチル化ヒアルロン酸ナトリウムの合成と皮膚柔軟効果.....	10
1. 緒言.....	10
2. 実験方法.....	11
2.1. 使用物質.....	11
2.2. AcHA の合成方法.....	11
2.3. 角層の動的粘弾性測定.....	12
2.4. ヒト皮膚における AcHA の保湿効果の評価.....	12
2.5. ヒト皮膚への AcHA の吸着量測定.....	13
2.6. ヒト皮膚柔軟に対する 0.2% AcHA 含有ローションの効果.....	13
2.7. 乾燥肌に対する 0.2% AcHA 含有ローションの改善効果の評価.....	14
3. 結果.....	14
3.1. 角層の動的貯蔵弾性率に対する AcHA の影響.....	14
3.2. ヒト皮膚の保湿能に対する AcHA の影響.....	16
3.3. ヒト皮膚への AcHA の吸着量.....	17
3.4. 0.2% AcHA 含有化粧水のヒト皮膚に及ぼす影響.....	18
4. 考察.....	22
第2節 AcHA の皮膚柔軟化メカニズムに関する示差走査熱量測定による研究.....	25
1. 緒言.....	25
2. 実験方法.....	26
2.1. 使用物質.....	26
2.2. 空気/水界面における表面張力測定.....	27
2.3. 粉末に吸着した水分量測定.....	27
2.4. 試料中における結合水量の測定.....	27
3. 結果.....	28

3.1.	AcHA の表面張力低下能.....	28
3.2.	AcHA の吸水能.....	29
3.3.	AcHA の水和挙動.....	30
3.4.	角層の結合水分量に対する AcHA の効果.....	33
4.	考察.....	34
第2章 皮膚角層の構造特性に着目した素材創出に関する研究.....		35
第1節 ステロール界面活性剤を使用した新規化粧品基剤の開発 I		
	ステロール界面活性剤による新規乳化粒子の調製.....	35
1.	緒言.....	35
2.	実験.....	36
2.1.	使用物質.....	36
2.2.	実験方法.....	36
2.2.1.	本基剤 (O/W 型エマルジョン) の調製.....	36
2.2.2.	相平衡図の作成.....	37
2.2.3.	乳化粒子の電子顕微鏡観察.....	37
2.2.4.	小角 X 線散乱 (SAXS) 測定.....	37
3.	結果.....	37
3.1.	本乳化系の相平衡図.....	37
3.2.	本基剤中の乳化粒子の観察.....	39
3.3.	小角 X 線散乱 (SAXS) 測定による構造解析.....	40
3.3.1.	乳化時における各種組成に関する SAXS 測定.....	40
3.3.2.	ラメラ構造体構成成分の検討.....	42
3.4.	本乳化系に対する EPDME の役割.....	44
4.	考察.....	46
4.1.	本乳化系の乳化メカニズム.....	46
4.2.	層状構造を有する乳化粒子の形成メカニズム.....	47
第2節 ステロール界面活性剤を使用した新規化粧品基剤の開発 II		
	難溶性紫外線吸収剤の可溶化.....	50
1.	緒言.....	50
2.	実験.....	51
2.1.	使用物質.....	51
2.2.	実験方法.....	52
2.2.1.	相平衡図の作成.....	52

2.2.2.	フィトステロール型界面活性剤を用いた紫外線吸収剤の可溶化.....	52
2.2.3.	EPDME(14/7)が PO7/EO30-PS の可溶化能に及ぼす影響.....	52
2.2.4.	各種フィトステロール型界面活性剤による BEMT の可溶化.....	53
2.2.5.	PO7/EO30-PS 及び EPDME(14/7)の自己拡散係数の測定.....	53
2.2.6.	スピナー格子緩和時間の測定によるミセル内分子の運動性評価.....	53
3.	結果.....	54
3.1.	フィトステロール系界面活性剤－水性成分－油分の相平衡図.....	54
3.2.	フィトステロール系界面活性剤を用いた紫外線吸収剤の可溶化.....	58
3.3.	EPDME(14/7)が PO7/EO30-PS の可溶化能に及ぼす影響.....	60
3.4.	各種フィトステロール系界面活性剤による BEMT の可溶化.....	60
3.5.	PO7/EO30-PS 及び EPDME(14/7)の自己拡散係数の測定.....	61
3.6.	スピナー格子緩和時間の測定によるミセル内分子の運動性評価.....	61
4.	考察.....	62
4.1.	フィトステロール系界面活性剤を用いた紫外線吸収剤の可溶化様式.....	62
4.2.	フィトステロール系界面活性剤を用いた紫外線吸収剤 BEMT の可溶化....	63
4.3.	BEMT の可溶化に与える EPDME(14/7)の影響.....	63
4.4.	NMR測定によるフィトステロール系界面活性剤の運動性評価.....	64
総括	66
謝辞	68
参考文献	69

発表論文目録

本論文は、学術情報雑誌に掲載された次の論文を基礎とするものである。

1. Skin-softening effect of acetylhyaluronate on stratum corneum
(角層におけるアセチル化ヒアルロン酸塩の皮膚柔軟効果)
TAKASHI OKA, MASA AKI UEMURA, NORIO UENO, and TOSHIO YANAKI
Journal of Cosmetic Science, Vol. 50, p. 171-184, 1999 (1999 年 4 月)
2. Differential scanning calorimetry studies on the mechanism of skin-softening effect of sodium acetylhyaluronate
(アセチル化ヒアルロン酸塩の皮膚柔軟効果メカニズムに関する示差走査熱量測定研究)
Takashi Oka, Norio Ueno, and Toshio Yanaki
Polymer, Vol. 41 p. 6055–6059, 2000 (2000 年 7 月)
DOI: 10.1016/S0032-3861(99)00852-6
3. Development of Novel Cosmetic Base Using Sterol Surfactant. I. Preparation of Novel Emulsified Particles with Sterol Surfactant
(ステロール界面活性剤を用いた新規化粧品基剤の調製 I. ステロール界面活性剤による新規乳化粒子の調製)
Takashi Oka, Reiji Miyahara, Takashi Teshigawara, and Kei Watanabe
Journal of Oleo Science, Vol. 57, p. 567-575, 2008 (2008 年 9 月)
DOI: 10.5650/jos.57.567
4. Development of Novel Cosmetic Base Using Sterol Surfactant. II. Solubilizing of Sparingly Soluble Ultraviolet Ray Absorbers
(ステロール界面活性剤を用いた新規化粧品基剤の調製 II. 難溶性紫外線吸収剤の可溶化)
Takashi Teshigawara, Reiji Miyahara, Tadao Fukuhara, and Takashi Oka
Journal of Oleo Science, Vol. 58, p. 27-36, 2009 (2008 年 12 月)
DOI: 10.5650/jos.58.27

略語表

本論文では、以下の略語を使用した。

AcHA:	アセチル化ヒアルロン酸ナトリウム (Sodium acetylated hyaluronate)
DS:	置換度 (Degree of Substitution)
DSC:	示差走査熱量計 (Differential Scanning Calorimetry)
ΔH :	融解エンタルピー (Melting enthalpy)
EPDME:	ポリオキシエチレン・ポリオキシプロピレンランダム共重合体ジメチルエーテル (Polyoxyethylene / polyoxypropylene dimethyl ether)
E':	貯蔵弾性率 (Real elastic modulus)
E'':	損失弾性率 (Imaginary elastic modulus)
FF-TEM:	Freeze Flucture-Transmission Electron Microscope (凍結切断透過型電子顕微鏡観察)
HA:	ヒアルロン酸ナトリウム (Sodium hyaluronate)
NMF:	天然保湿因子 (Natural Moisturizing factor)
MPC:	ポリ (2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン)
EO:	エチレンオキシド (Etylene Oxide)
PO:	プロピレンオキシド (Propylene Oxide)
POE:	ポリオキシエチレン (PolyOxylEthylene)
POP:	ポリオキシプロピレン (PolyOxyPropylene)
RH:	相対湿度 (Relative Humidity)
RT:	室温 (Room Temperature)
SAXS:	小角 X 線散乱 (Small Angle X-ray Scattering)
SDS:	ドデシル硫酸ナトリウム (Sodium Dodecyl Sulfate)
TEWL:	経皮水分蒸散量 (Trans-Epidermal Water Loss)

序論

角層は皮膚の最外層に位置し、外界からの異物侵入を防御すると同時に、生体成分の漏出を防ぐ重要な役割を果たしている[0-1, 0-2]。角層の構造は角層細胞とそれらの間隙を埋める細胞間脂質から成る、いわゆる「レンガモルタル構造」を形成し、角層細胞は皮膚保湿、細胞間脂質はバリア能をそれぞれ主な機能を果たしている。

前者の角層細胞内部には Natural Moisturizing factor (NMF：自然保湿因子) が存在し、皮膚保湿のために重要な役割を担っている[0-3]。皮膚を十分に保湿させることは、健康で健やかな肌を維持するために特に重要であることから、皮膚保湿は化粧品にとって非常に重要な機能の1つであることが認識されている[0-4]。

皮膚を保湿するためには、保湿剤を外用適用するのが有効な手段である。保湿剤開発は[0-5]。一般的に、分子量 500Da 以下の低分子量物質は比較的皮膚に浸透し易いと考えられており[0-6]、グリセリンに代表される低分子保湿剤は、皮膚内部に浸透することで優れた保湿効果を発揮している。これに対して、高分子保湿剤はそれ自体が吸水能は高いものの、分子量が大きいため皮膚に極めて浸透しにくいことから、肌上、即ち角層表面で保湿剤として十分に機能させる必要がある。しかしながら、角層表面は皮脂で覆われ疎水的であるため、高分子保湿剤は優れた水分保持能を有するものの、親水性が極めて高いことから肌上で保湿効果を効果的に機能させることが困難であった。そこでこの課題を解決するために、“Anchoring humectant”という概念を導入した。即ち、高分子保湿剤への疎水基導入により角層への親和性を向上させることで、その高分子が潜在的にもつ保湿力をより皮膚に寄与させる結果、皮膚保湿効果を格段に増強できるという考え方である。この考え方のもと、高分子保湿剤の機能を高めるために疎水基の導入を試みた。

一方、研究対象とする高分子保湿剤としてはヒアルロン酸ナトリウム (HA) を選択した。HA は、軟骨、硝子体液、関節液由来の生体適合性の高い生体高分子であり、高粘性、高粘弾性、高吸水性を有することを特長とする[0-7-0-9]。このため、極めて優れた保湿効果をもつことが広く知られており、現在でも多くの化粧品に配合されている。

上述の優れた物性を有する HA に新規機能性を付与するため、これまでに各種 HA 誘導体が開発されてきた[0-10-0-14]。例えば、Song らは、HA に α コハク酸トコフェロールと臭化 (4-カルボキシブチル) トリフェニルホスホニウムを導入した誘導体 HA-TS-TPP を合成し、抗がん剤ラパチニブ (LPT) を内包したナノ粒子を調製し抗ガン性について検討している。その結果、本ナノ粒子は優れた腫瘍ターゲティング機能を有し、抗増殖能、アポトーシスの有効性、およびミトコンドリアの不安定化活性が認められたことから、細胞実験系において高い乳がんの腫瘍成長抑制効果を有することを報告している[0-15]。また Kong らは、EDC を用いてモノステアリン酸グリセリル (GMS) と HA を脱水縮合させることで、両親媒性の HA 誘導体である HA-GMS を調製し機能性を評価している[0-16]。検討の結果、

HA-GMS を界面活性剤 TWEEN80 と Span20 を用いて調製した HA ニオソームは、粒子径 40nm 程度のマルチラメラベシクルを形成し、血液適合性も良好でかつニオソーム懸濁液の分散安定性も良好であることを報告している。このように HA は生体適合性が優れている点から、新規合成の HA 誘導体は DDS キャリアとして目指した研究例が極めて多い[0-17, 0-18]。しかしながら、本論文に示すような HA 誘導体を化粧品領域へ応用される例は極めて少なく、保湿剤開発についての研究事例報告はない。

本論文の第 1 章では、「皮膚角層の物性に着目した素材創出に関する研究」として、優れた保湿剤として広く知られているヒアルロン酸ナトリウム(HA)に着目し、角層への馴染みを良くするために疎水基を導入したアセチル化ヒアルロン酸ナトリウム(AcHA)の合成、その物性と発現メカニズムについて記述した。

第 1 章第 1 節では、AcHA の合成とその特長として見出した角層柔軟効果について報告した。天然由来で生体適合性の高い HA は、極めて優れた保湿効果を有することが広く知られている。HA に新規機能性を付与するために、皮膚への親和性向上を目的として疎水基を導入した HA 誘導体 AcHA を合成し、化粧品に対する有用性を評価した。導入した疎水基としては、例えば分解しても安全性の高い酢酸の遊離となるアセチル基を選択した。その結果、皮膚に対して優れた保湿効果と柔軟効果を併せ持つことを見出した。更に、AcHA の有用性発揮メカニズムを検討するために、皮膚機能に対する AcHA の有効性について検討した。その結果、HA に比較して、AcHA は角層内の水分を著しく増加させることが明らかとなった。この理由として、AcHA と角層との間に相互作用により顕著な皮膚柔軟効果を発揮する可能性があることが示唆された。この現象と、第 2 節で示す AcHA が表面張力低下効果を持つ両親媒性高分子であるという事実と一致した。即ち、AcHA がヒト皮膚へ効率的に吸着し角層の保水能力を高めることで、顕著な皮膚柔軟効果に繋がることも示唆している。化粧品基剤に AcHA を配合した場合、0.2 w/w% AcHA を含む化粧水が乾燥肌の状態を改善していることが観察された。AcHA よりも優れた高分子保湿剤の開発例はまだ報告されていないことから、現在においても AcHA は数多くの化粧品に配合され続けている。

冒頭に述べたように、一方で角層は異物混入の防御に重要な役割を果たしているが、その本質は角層細胞の間隙に存在する細胞間脂質である。ヒトの角層細胞間脂質は、主にセラミド、コレステロール、脂肪酸がモル比約 1:1:1（重量比約 2:1:1）で構成される 13nm の長周期構造と 6nm の短周期構造を有するパッキング性の優れたラメラ構造体である。また、副格子構造としては、0.41nm の六方晶と 0.37nm と 0.41nm の直方晶とが組み合わさった側方充填構造を形成している。この緻密でリジッドな構造こそが、生体と外界とを隔する重要なバリア能を発揮する理由と考えられる。そこで、これらの細胞間脂質と構造が類似した化粧品原料を利用することで、界面膜が強固でかつ閉塞性の高くしかも角層親和性に優れた新規乳化基剤が調製できると推察された。

角層細胞間脂質を対象としてこれまでに様々な研究がなされている。非ヒドロキシおよび α -ヒドロキシスフィンゴシンベースのセラミドとそれらに対応したフィトスフィンゴ

シンベースのセラミドが形成するモデル脂質の透過性と脂質組織に及ぼす影響を検討している。モデル薬物としてエチル-p アミノ安息香酸を用いた場合、パッキング密度が低いもののヘッドグループ水素結合ネットワークを形成し易いフィトスフィンゴシンベースのモデル脂質よりも、フィトスフィンゴシンベースのモデル脂質の方がフラックスが高いことを報告している[0-19]。一方、渡辺らは、セラミド2とコレステロールから成る細胞間脂質に対する経皮吸収促進剤1-メントールの効果を検討した結果、1-メントールはラメラ構造の繰り返し距離を増加させ、六方晶炭化水素鎖パッキングの形成を抑制することを報告している[0-20]。このように、細胞間脂質モデルに関する研究が数多く報告されている。しかしながら、細胞間脂質の物性を乳化粒子の界面膜として応用した研究例は極めて少なく、界面膜の改善や可溶化剤開発に関する研究報告例はない。

本論文第2章では、「皮膚角層の構造に着目した基剤創出に関する研究」として、角層細胞間脂質のラメラ構造に着目し、構成脂質のうちスタッキング性の高いコレステロールと類似構造のフィトステロール化合物を利用した新規基剤と新規可溶化剤の開発について記述した。

第2章第1節では、これまでに我々が開発してきた、ポリオキシエチレン (POE)・ポリオキシプロピレン (POP) ランダム共重合体ジメチルエーテル (EPDME) を活用した微細乳化技術を応用し、EPDME、ステロール系活性剤、極性油分を油相として調製した新規O/W型エマルジョンの乳化粒子は、その外側に層状構造を有する極めて特徴的な形態であることが分かった。本新規乳化法により調製された乳化粒子の特徴とその乳化メカニズムを明らかにするために、小角 X 線散乱 (SAXS) 測定と相平衡図作成による検討を行った。SAXS 測定結果から、本層状構造は、油相が形成するラメラ状構造体が乳化の際に乳化粒子の外側に付着したものと考えられた。また、本ラメラ状構造体はステロール系活性剤と極性油分により形成されることが示唆された。一方、相平衡図による検討結果から、EPDME の本乳化系に対する役割として、親水性のステロール系活性剤を極性油分中に留める作用があるため、層状構造を伴う特徴的な乳化粒子が形成されたと推察された。

第2章第2節では、前節で見出した嵩高く大きな平面構造を有するフィトステロール骨格の界面活性剤を利用した難溶性物質の可溶化研究について記述した。これまで、紫外線吸収剤やインドメタシン、フィナステリドなどの薬剤に代表される難溶性物質は処方中で主に極性の高い油分に溶解した状態で用いられており、化粧水のように油分が少ない基剤に配合することは非常に困難であった。これら難溶性物質の多くは構造内に芳香族環のような平面構造を有しており、極性油中でも結晶化しやすい性質がある。そこで、ステロール骨格を有する界面活性剤は、嵩高く大きな平面構造を持っている点で、これら難溶性物質の可溶化に適していると推察し、紫外線吸収剤を被可溶化物としてフィトステロール骨格の界面活性剤を用いて検討することとした。その結果、フィトステロール骨格を有する界面活性剤を用いることにより、安定かつ効果的に紫外線吸収剤を可溶化することが明らかとなった。また、フィトステロール系界面活性剤のマイクロエマルジョンは他の活性剤と異なり、

疎水基の間に被可溶化物を取り込んだ超微細固体が、周囲をポリオキシエチレン鎖に囲まれ凝集を防ぐ特殊な構造であると推察された。更に、NMR 測定結果より、EPDME が疎水基のパッキング間に入り込み、その配列を緩めることにより紫外線吸収剤の可溶化量を高めることが示唆された。

第 1 章

皮膚角層の物性に着目した素材創出に関する研究

第 1 節

新規保湿剤アセチル化ヒアルロン酸ナトリウムの合成とその皮膚柔軟効果

1. 緒言

角層は、皮膚内への物質透過に対する主要なバリアであることは長い間認識されてきた。角層は、死んで平坦化された角層細胞が約 20 層積層された非常に丈夫で弾力性のある生体膜であることが良く知られている[1-1-1-5]。ヒト角層の脂質組成は、角層の厚さ、代謝サイクル、落屑の状態が反映されて変化し物質透過性が異なり、角層脂質は皮膚の水分保持に重要な役割を果たしている[1-6, 1-7]。正常なヒト角層には 10~20 w/w%の水が含まれており、健康な肌を維持していると同時に、水は角層の柔軟性にも影響している[1-8-1-11]。しかしながら、角層は、加齢、環境、体質、その他の要因により水分を失う傾向があり、角層水分量の減少は、乾燥肌としわの形成をもたらしてしまう。従って、保湿剤を皮膚に塗布することは、通常的水分量を維持するために非常に重要である[1-12, 1-13]。

保湿剤の中でも、ヒアルロン酸ナトリウム (HA) は、軟骨、硝子体液、及び潤滑液に由来する生体高分子であり、高粘弾性、高い曳糸性、及び高い生体適合性などの有用な物理化学的特性を示す[1-14]。例えば、HA は、水系の増粘剤として、リボソームの強化のための「コーティング剤」として、生物の埋め込み剤、カプセル剤などとして使用されている。一方、数多くの種類の HA 誘導体が合成され、有用な機能が評価されてきた。Abatangelo らは、硫酸化ヒアルロン酸誘導体はマウス線維芽細胞に対して細胞毒性効果を示さず、ヒアルロン酸鎖に沿った硫酸基の導入により高分子は酵素消化に耐性を示した、と報告している[1-15]。

本研究では、HA に高機能を付与するために、さまざまな HA 誘導体を合成し、化粧品に対する有用性を評価した。その結果、HA が潜在的に有する保湿効果を高め、角層に非常に高い皮膚柔軟効果を示す新規 HA 誘導体であるアセチルヒアルロン酸ナトリウム (AcHA) を見出した。具体的には、優れた保湿効果と皮膚柔軟効果を示す AcHA の合成方法と、乾燥肌状態に対してローションの有効成分として配合された AcHA の改善効果に関して報告する。

2. 実験方法

2.1. 使用物質

本研究で使用了物質は、化粧品グレードまたは試薬グレード品を精製することなく使用した。6週齡の雄の Hartley モルモット（日本 SLC、静岡、日本）を個別にワイヤーメッシュケージ（260 x 380 x 180 mm、日本クレア、東京）に収容し、標準的な実験動物の条件下（21～25℃の温度、40～70%の相対湿度（RH））で飼育した。部屋の空気は1時間に10～15回自動的に換気され、12時間毎の明暗サイクル（照明 07:00～19:00）が課された。モルモットには商業食（RC-4、東洋酵母工業、東京）と自動給水システムによる滅菌水を自由に与えた。動物をペントバルビタールナトリウムで深く麻酔し、皮膚を切開した。モルモットに対するケアと実験は、国立衛生研究所のガイドラインに従って適正に行われた。角層は、Christophers と Kligman によって記述された熱トリプシン処理法によって背部皮膚から除去された[1-16, 1-17]。角層シートは、シリカゲル上の真空デシケーターに保存された。本研究で使用了水は、イオン交換水浄化システムタイプ G-10B（オルガノ、東京、日本）で浄化してから用いた。

2.2. AcHA の合成方法

300 mL のガラス製コニカルフラスコに、酢酸と無水酢酸の混合物 100 mL（体積で 1 : 4 ～ 4 : 1）と、バイオヒアロ 12®（HA の分子量：約 1,200 キロダルトン、資生堂、東京）を攪拌しながら徐々に加えた。次にその混合物に、触媒として濃硫酸 3～5 mL を室温（RT）で 10～360 分間攪拌しながら滴下した[1-18]。反応溶液は粘稠になり、濁り、繊維状沈殿物を形成した。AcHA の沈殿物をチーズクロスで収集し、2000 mL の水で 2 回洗浄した後、沈殿物を 250 mL の 80 v/v% アセトン水溶液中に分散させた。50 w/w% 乳酸ナトリウム（9 g）を更に添加することで、沈殿物を穏やかに攪拌しながら完全に溶解させ、400 mL のアセトンを溶液に徐々に加えることにより、AcHA のゲル状沈殿物が出現した。デカンテーションによりゲル状沈殿物を採取した後、ホモジナイザーを使用して 10 分間 10,000 rpm でエタノール 100 mL を用いて 2 回洗浄した。更に沈殿物を減圧濾過で収集し、真空乾燥して、AcHA の白色粉末を得た。AcHA は、繰り返し 2 糖単位あたり 4 個存在する水酸基のうち、2.6～3.8 個がアセチル基で置換されており、静的光散乱測定により、AcHA の重量平均分子量は約 150 キロダルトンであることが示された。FT-IR 分析により、AcHA の分子構造に由来した下記波数の吸収ピークを得た（図 1-1）。[IR; 3440 (-OH または -NH)、1740 (-CO-), 1620 (-C=O-), 1375 (-CH₃), 1250 (-C-O-), 及び 1050 cm⁻¹ (-C-O-C-)]。得られた AcHA は、90 w/w% エタノール水溶液に溶解可能である。1.0 w/w% AcHA の表

面張力は約 $55.0 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ であり、 1.0 w/w\% HA の表面張力 ($74.0 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$) に比較して顕著に低いこと、AcHA は表面張力低下能力を示すことが分かった。

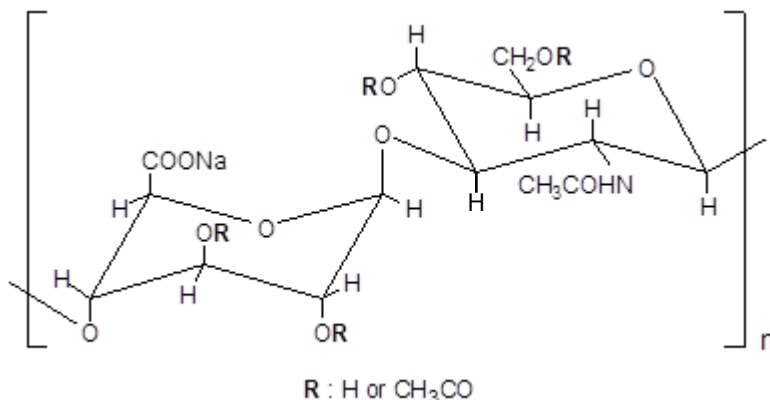


図 1-1. AcHA の化学構造

2.3. 角層の動的粘弾性測定

AcHA 及び従来の保湿剤の角層柔軟効果は、Takahashi らによって報告された方法により測定した[1-19]。即ち、角層片 ($20 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$) を 2 つのクランプで水平に予め保持し、左側のクランプには、サンプルの左端に固定振幅の正弦波応力 (振幅 $5 \mu\text{m}$ 、 30 Hz) を加えた。右のクランプには、サンプルを介して伝達された弱い応力を検出する高感度センサーを装備している。検出された応力信号は、計算により一連のデジタルデータに変換された。動的貯蔵弾性率 (E') 及び動的損失弾性率 (E'') は操作回路によって測定されるが、 E' を各角層の弾性係数とした。試験溶液 $2 \mu\text{L}$ を角層片に適用した後測定を 120 分間行い、角層柔軟効果を試験溶液適用前後の弾性係数比により評価した。

2.4. ヒト皮膚における AcHA の保湿効果の評価

HA 又は AcHA を適用したヒト皮膚の保湿効果は、皮膚表面湿度計 SKICON-200 (IBS、静岡) を用いて測定した[1-20-1-22]。5 名の健常な男性被験者 (26~44 歳) を選定した。測定の前に、皮膚表面の残留物による影響を避けるために、前腕内側の皮膚表面を石鹸水で洗浄した。被験者は、恒温恒湿室 (25°C 、 50 \%RH) に入室後 30 分間安静し、皮膚表面の含水量を反映した皮膚表面コンダクタンスをベースライン値として測定した。次に、 0.2 w/w\% HA 水溶液または 0.2 w/w\% AcHA 水溶液をそれぞれ 0.2 mL ずつ、被験者の前腕内側の $3 \times 3 \text{ cm}^2$ の面積に塗布した。塗布 1 分後、試料を美容用コットンで拭き取り、継時で皮膚表面コンダクタンスを測定した。保湿能は、皮膚表面コンダクタンスの比 $C_t/C_{t=0}$ で

評価した。ここで、 C_t は適用後の特定時間 t における、 $C_{t=0}$ は未処理における皮膚表面コンダクタンスである。

2.5. ヒト皮膚への AcHA の吸着量測定

更に考察を進め、AcHA と角質層との相互作用を調べるため、ヒト皮膚への吸着量を測定した。最初に被験者は恒温恒湿室に入室後、前腕内側部を石鹼洗浄した。30 分間安静後、前腕内側部に試料水溶液を容器で適用し、吸着平衡に到達した 3 時間後に試料溶液を回収して、Bitter-Muir 法により試料濃度を測定した。平衡吸着量は初期濃度から試料適用後の濃度を差し引くことにより算出した。

2.6. ヒト皮膚柔軟に対する 0.2% AcHA 含有ローションの効果

本実験では、10 名の健常な男性被検者（24～46 歳）が選定された。測定 30 分前に、皮膚表面を石鹼水で洗浄して、残留皮脂や皮膚破片の影響を避けた。皮膚伸長の評価（200 hPa で誘発）は、Cutometer SEM 472（Courage and Khazaka Electronic、ケルン、ドイツ）によってベースライン値として測定された[1-23]。次に、表 1-1 に示す典型的な化粧水処方を作成し、一方の前腕内側に 0.2 w/w% AcHA 含有ローションを塗布し、他方に 0.2 w/w% HA 含有ローションを塗布した。試料塗布 10 分後に、皮膚の伸長を Cutometer で測定した。皮膚柔軟効果は、適用前後の皮膚伸展長さの比によって評価した。

表 1-1. AcHA 及び HA 配合化粧水処方*

	AcHA 配合化粧水	HA 配合化粧水
AcHA	0.2	-
HA	-	0.2
グリセリン	5.0	5.0
防腐剤	0.1	0.1
クエン酸	0.03	0.03
クエン酸ナトリウム	0.12	0.12
界面活性剤	0.15	0.05
イオン交換水	全量 100 に調整	全量 100 に調整

*すべての数値は w/w% として表示している

2.7. 乾燥肌に対する 0.2% AcHA 含有ローションの改善効果の評価

4名の健康な男性被検者(26~46歳)を本実験に選定した。全測定は、恒温恒湿室(25℃、50%RH)中で行われました。測定30分前に、皮膚表面を石鹼水で洗浄して、残留皮脂や皮膚破片の影響を避けた。皮膚表面コンダクタンスと経皮水分蒸散量(TEWL)(ベースライン値)は、それぞれSKICON-200とEvaporimeter ER1(Servomed、ストックホルム、スウェーデン)を用いて、試料測定前の値を測定した。次に、エマニュエルカップ(内径:24mm)を使用して、5mLの5w/w%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)5mlで30分間適用して、人工的な肌荒れを惹起させた。処理された領域を水で洗浄しタオルで乾燥させた後、皮膚のシリコネガティブレプリカ(接着性シリコンポリマー)を用いて、試料適用前にSDSによって惹起された皮膚表面構造を転写した。一方の前腕内側を0.2w/w% AcHA含有ローションを1日1回塗布し、他方の前腕内側に0.2w/w% HA含有ローションを塗布した(表1-1)。本塗布は1週間連用した。皮膚バリア機能と保湿効果は、それぞれ適用前後のTEWL及び皮膚コンダクタンス値の比によって評価した。乾燥肌状態に対するAcHAによる改善効果を観察するために、各被検者から適用部位のレプリカも採取した。塗布前後のレプリカ画像から、被検者の皮膚に対する改善効果を評価した。

3. 結果

3.1. 角層の動的貯蔵弾性率に対する AcHA の影響

水又はAcHAの適用後の角層の動的貯蔵弾性率の経時変化を図1-2に示す。明らかに、2 μ Lの水の適用により角層は顕著に可塑化された。その後、水の蒸発に伴い徐々に初期値に戻るがわずかに超える値を示した。極小弾性率比は塗布後20分で0.45を示し、初期値への回復時間は60分程度であった。一方、アセチル基の置換度(DS)が2.6~3.8である0.2w/w% AcHAを塗布した場合、角層柔軟効果に顕著な改善が見られた。図1-2より、DSが3.0~3.5であるAcHAを適用した角層の弾性率比が塗布後100分で約0.3を維持していることを示している。本結果は、角層に対する優れた角層柔軟効果を示している。DSが3.8のAcHAを使用すると、弾性率比は塗布後100分で初期値の1.0に戻った。

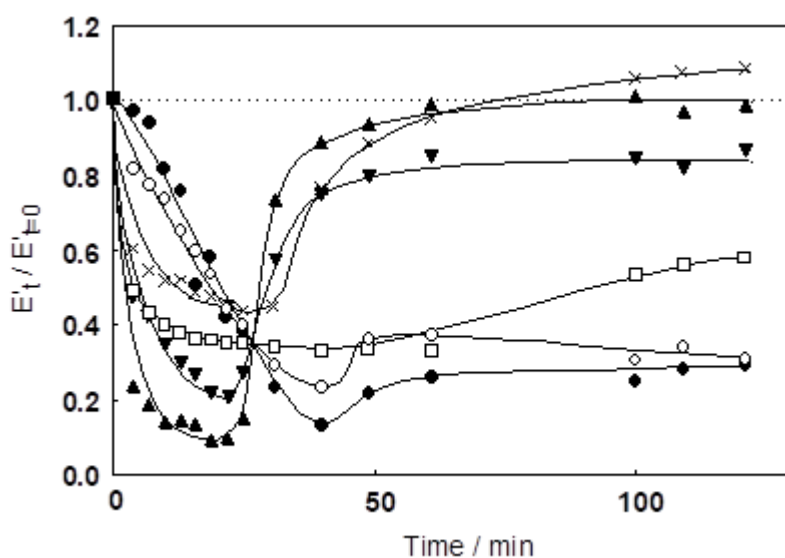


図 1-2. 水又は AcHA で処理した角層の動的貯蔵弾性率の経時変化

y 軸は動的貯蔵弾性率の比 $E'_t/E'_{t=0}$ を示す。ここで、 E'_t : 適用後の特定の時間に試験溶液で処理された角層の動的弾性率、 $E'_{t=0}$: 未処理の角質層の値、角層を $2 \mu\text{L}$ の水または AcHA 水溶液で処理した。 \times : 水で処理した角層の弾性率、 \blacktriangledown : アセチル基 (DS) の置換度が 2.6 である AcHA、 \circ : DS=3.0、 \bullet : DS=3.5、 \square : DS=3.7、 \blacktriangle : DS=3.8

図 1-3 は、試料塗布後 100 分の角層の動的粘弾性率比と AcHA の DS 値との関係を示している。図より 3.3 付近に最適な DS 値があることが分かる。

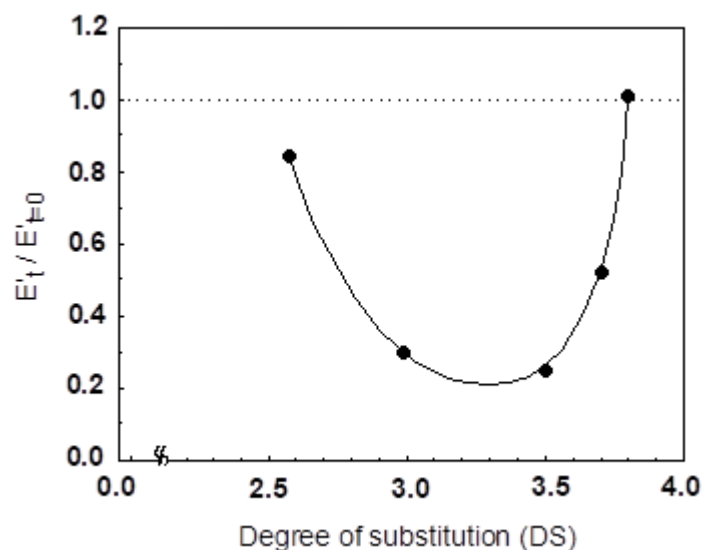


図 1-3. 塗布後 100 分における動的貯蔵弾性率比 ($E'_t/E'_{t=0}$) と AcHA の置換度 (DS) との関係

3.3 付近に最適な DS 値がある。AcHA の DS 値は、その疎水性/親水性のバランスを反映しているため、角層柔軟効果と AcHA の角層への親和性との間に関係があることが分かる。

また、図 1-4 は、各種保湿剤の組合せによる角層柔軟に対する相乗効果を示している。0.2 w/w% HA 塗布した場合、貯蔵弾性率の回復値は水よりわずかに低い数値を示した。HA は塗布後 60 分で約 0.9 に戻ったことから、HA の角層柔軟効果は低いと考えられた。一方、5 w/w% グリセリンで処理した角層は、弾性率比を約 0.7 に維持し、比較的高い角層柔軟効果を示した。HA をグリセリン併用した場合、角層柔軟化に対する相乗効果を示し、この現象は小沢らによって報告された結果と一致した。本結果と同様に、AcHA でもグリセリンと併用した場合、角層柔軟効果に対する相乗効果も示された。

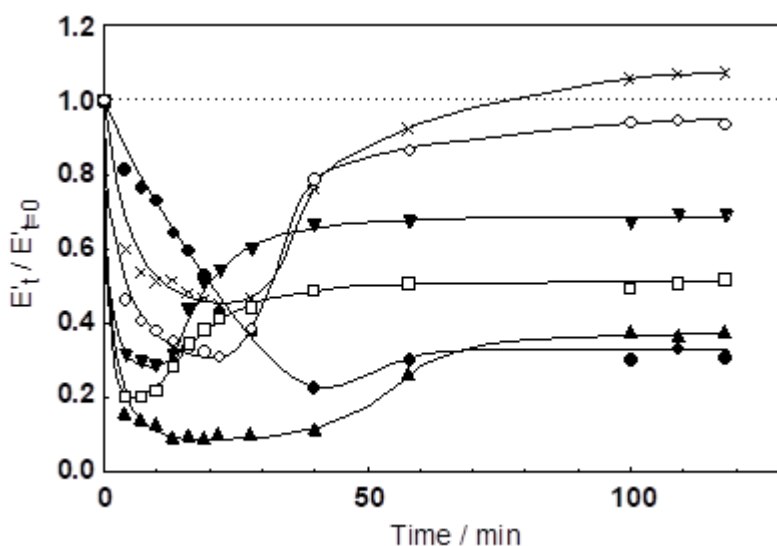


図 1-4. 様々な保湿剤の組合せで適用した角層の動的貯蔵弾性率比の経時変化
y 軸は動的貯蔵弾性率の比 $E'/E'_{t=0}$ を示す。ここで、 E'_t : 適用後の特定の時間に試験溶液で処理された角層の動的弾性率、 $E'_{t=0}$: 未処理の角質層の値、角層を 2 μL の水または AcHA 水溶液で処理した。×: 水で処理した角層の弾性率、○: 0.2% HA、▼: 5%グリセリン、□: 5%グリセリン+0.1% HA、▲: 5%グリセリン+0.1%AcHA、●: 0.2%AcHA

3.2. ヒト皮膚の保湿能に対する AcHA の影響

図 1-5 は、試料塗布前後のヒト皮膚表面コンダクタンス比の経時変化を示している。HA の適用は、測定期間にわたり皮膚コンダクタンス比について初期値をわずかに低下させた。一方、AcHA の適用は、塗布後 10 分で比率の顕著な増加を示した。その後、比率は塗布後 60 分で次第に約 1.4 に減少したが、塗布後 120 分まで同値を維持した。これらの結果から、AcHA はヒト皮膚の保水能を大幅に増加させ、塗布後 60 分間までその能力が HA よりも顕著に大きいことが示された。

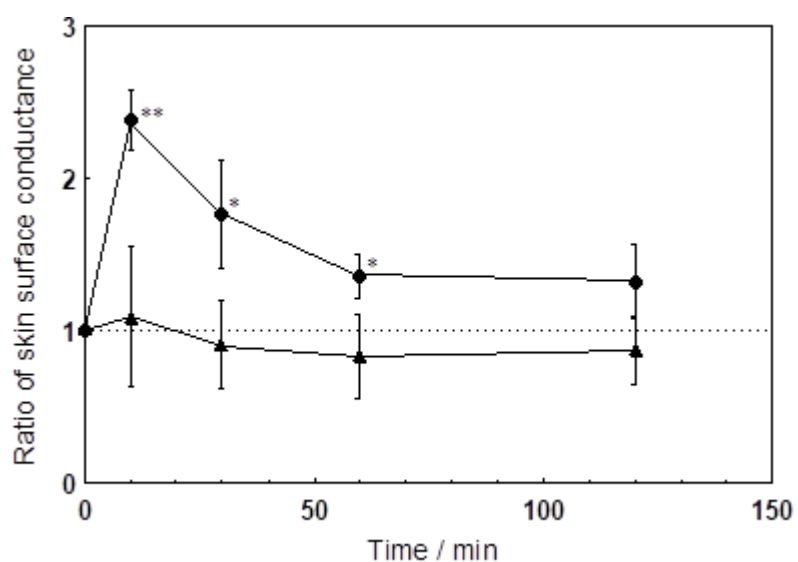


図 1-5. AcHA 及び HA のヒト皮表コンダクタンスへの影響 (N=5)

●、▲はそれぞれ AcHA と HA で処理した皮表コンダクタンス比を示す。各データポイントは、N=5 の平均を表す。エラーバーは標準偏差を示す。(**: $p < 0.01$ 、*: $p < 0.05$ 、Student-t 検定、**と*は、誤差の確率がそれぞれ 0.01 と 0.05 未満の統計的に有意であることを示す。)

3.3. ヒト皮膚への AcHA の吸着量

測定結果を図 6 に示したが、HA と比較して、AcHA は顕著に皮膚吸着量が多いことが分かる。このように、AcHA は、アセチル基を導入したことにより、親水性と疎水性を兼ね備えた両親媒性を示すようになり、結果として皮膚への親和性が向上したものと考えられる。

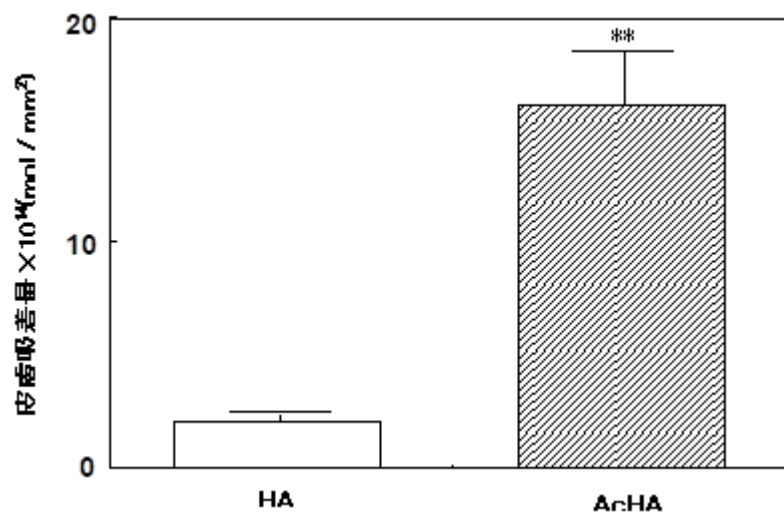


図 1-6. AcHA 及び HA のヒト皮膚への親和性 (N=4)

棒グラフは 4 名の測定値の平均を示し、エラーバーは標準偏差を示している。(**: $p < 0.01$ 、Student-t 検定、**は誤差の確率がそれぞれ 0.01 未満で統計的に有意であることを示す。)

3.4. 0.2% AcHA 含有化粧水のヒト皮膚に及ぼす影響

図 1-7 は、HA 又は AcHA 含有化粧水がヒト皮膚の柔軟化に及ぼす影響を示している。AcHA の皮膚柔軟効果は HA よりも有意に大きかった。この結果は、AcHA が化粧水中であっても強力な皮膚柔軟効果を示すことができることを示唆している。

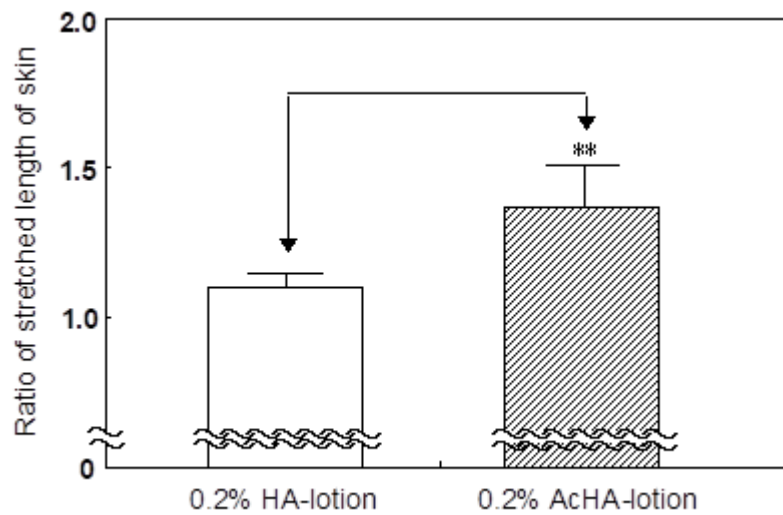


図 1-7. HA 及び AcHA 含有化粧水がヒト皮膚粘弾性に与える影響 (N=5)

棒グラフは 5 回の測定値の平均を示し、エラーバーは標準偏差を示している。(**: $p < 0.01$ 、Student-t 検定、**は誤差の確率がそれぞれ 0.01 未満で統計的に有意であることを示す。)

図 1-8 は、各種化粧水が皮膚表面コンダクタンス比率に与える影響を示している。HA または AcHA 配合化粧水を塗布した場合、いずれの場合も未処理の対照と比較して皮表水分量が顕著に増加し、平均値で比較した場合 HA よりも AcHA の方が高かったものの、有意な差は認められなかった。

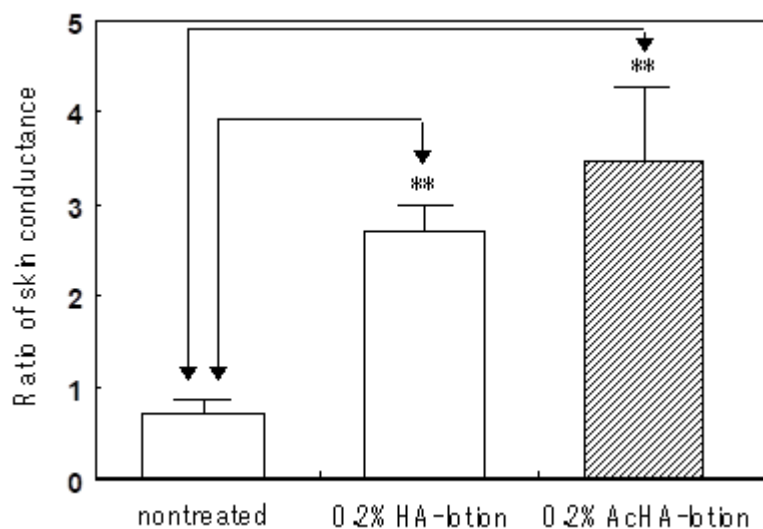


図 1-8. 0.2% HA 又は 0.2% AcHA 配合化粧水がヒトの皮表コンダクタンス比に及ぼす影響 (N=4)

棒グラフは 4 回の測定値の平均を示し、エラーバーは標準偏差を示している。(**: $p < 0.01$ 、Student-t 検定、**は誤差の確率がそれぞれ 0.01 未満で統計的に有意であることを示す。)

図 1-9 は、HA 又は AcHA 配合化粧水が TEWL に及ぼす影響、即ち皮膚のバリア機能を表している。HA または AcHA 配合化粧水を塗布した場合、いずれの場合も未処理の対照と比較して TEWL が顕著に抑制され、AcHA による TEWL の減少については有意な差は認められなかったものの、平均値で比較した場合 HA よりわずかに大きかった。これは、皮膚中における水の損失量が AcHA によって減少したことを意味する。この結果は、AcHA の皮膚における保水能が高く、化粧水中であっても皮膚からの水分蒸散を抑制したことを示している。

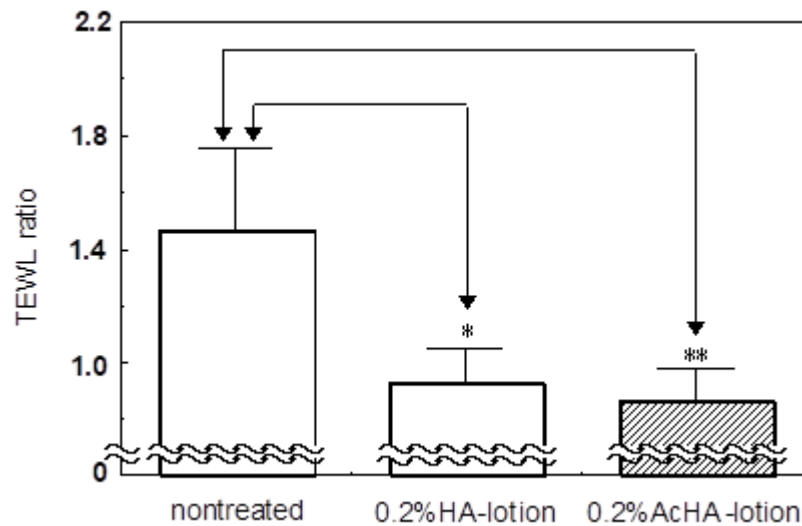


図 1-9. HA 及び AcHA 含有化粧水がヒトの経皮水分蒸散量（TEWL）に及ぼす影響
(N=4)

棒グラフは 4 回の測定値の平均を示し、エラーバーは標準偏差を示している。（**： $p < 0.01$ 、*： $p < 0.05$ 、Student-t 検定、**と*は、誤差の確率がそれぞれ 0.01 と 0.05 未満の統計的に有意であることを示す。）

図 1-10 は、HA 又は AcHA 含有化粧水を塗布した皮膚領域のシリコン樹脂を用いたネガティブ（鋳型）レプリカの写真画像（同一人の一例）を示している。AcHA 配合化粧水の 1 週間連用効果は、無塗布の対象又は HA 配合化粧水の塗布と比較して、乾燥肌の角層を顕著に改善した。無処理の対照は全く改善を示さず、HA 配合化粧水を塗布した皮膚も中程度の改善しか示さなかった。これらに対し、AcHA 配合化粧水を塗布した皮膚は、他と比較して三角形の形状（キメと呼ぶ）が細かくかつ皮溝と皮丘とが明瞭に観察できるため、顕著な改善を示すことが分かる。

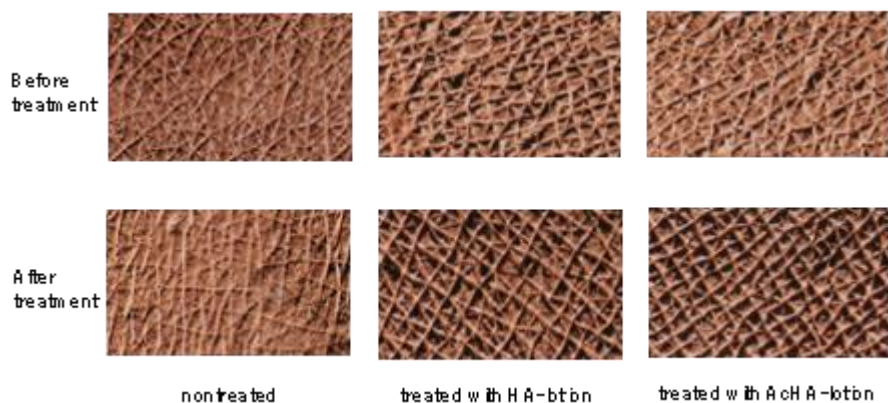


図 1-10. 無配合、HA 配合及び AcHA 配合化粧水適用前後におけるヒト皮膚表面のレプリカ写真

上段の写真は塗布前の皮膚表面、下段の写真は連用塗布後の皮膚表面。AcHA 配合ローションを 1 週間塗布すると、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）で惹起した人工肌荒れの乾燥肌表面状態が改善された

4. 考察

AcHA の皮膚柔軟効果を評価するために、高橋らによって報告された方法により、*in vitro* で角層の動的貯蔵弾性率を測定した[1-19]。彼らは、10%グリセリン水溶液適用において角層の動的貯蔵弾性率に明らかな変化があることを報告している。既報の通り、角層は純水と同程度に可塑化されたが、グリセリン水溶液で処理された角層の可塑化は水を適用した場合よりも長時間持続した。この効果は、ケラチン間を水素結合し且つ蒸発性が低いグリセリンが角層中に残留するために起こる現象と考えられている。HA 中に存在する 4 個の水酸基のうち、2.6 から 3.8 のアセチル基で置換した AcHA を使用すると、DS が 3.0~3.5 の範囲の AcHA が優れた角層柔軟効果を長時間維持することが分かった。注目すべき重要な点は、AcHA が単独で顕著な角層柔軟効果を示すことである。AcHA の角層柔軟効果は、グリセリンの効果よりも著しく効果的であった。この強力な角層柔軟効果は、HA へのアセチル基の導入後の両親媒的物性に起因すると考えられる。AcHA の DS 値はその疎水性/親水性のバランスを反映しているため、角層柔軟効果と AcHA の角層への親和性との間に関係があることが分かる。これらの結果から以後の実験は、角層柔軟効果が最も高い DS が 3.5 の AcHA を用いて実施した。さらに注目に値するのは、AcHA 及び HA とグリセリンとを併用すると、AcHA 及び HA 単独で既に観察されている角層柔軟効果が増強されたことである。小澤らは、HA は少量のグリセリンとともに併用すると、角層柔軟化の相乗効果が生じると報告している[1-13]。AcHA とグリセリンとの併用においても角層柔軟化の相乗効果もこれと同様の相乗効果が認められたが、HA の相乗効果よりも顕著に効果的であることが明らかとなった。AcHA 及び HA が角層表面にオイルシールと同様の水性膜を形成することで、グリセリン固有の角層柔軟効果を顕著に高める可能性があることが示唆された。

生体内における AcHA の保湿効果を検証するために、保水能を反映する皮表コンダクタンスを測定した。その結果、AcHA は in vivo におけるヒト皮膚に対しても極めて優れた保湿能を示し、試料塗布後 120 分でさえも HA に比較して有意な効果を示した。この保湿能向上には、AcHA と角層との間の相互作用が考えられる。AcHA による保水能向上により、その優れた角層柔軟効果を発揮するメカニズムを示唆する報告がある。Freijlarsson らは、かなりの量の両親媒性ポリマーが疎水性メチル化シリカ表面に吸着されることを示している[1-24]。この結果より、皮脂により皮膚の表面が疎水性を示すことから、AcHA は明らかに HA よりも疎水性が高いため、ヒト皮膚に吸着される AcHA の分子数は HA よりも顕著に多くなる可能性があると考えられる。ヒト皮膚に対する親和性向上の理由としては、HA へのアセチル基の導入に起因する可能性がある。上述したように、AcHA はその表面張力を低下させ、90 w/w% エタノール水溶液に溶解可能であることから、皮膚表面への親和性向上はその両親媒特性により支持されることは明らかである。

化粧品基剤における AcHA の皮膚生理機能の有効性を検証するために、配合化粧水を使用した in vivo における皮膚柔軟効果を評価した。AcHA は、化粧品基剤中においても優れた皮膚柔軟効果を示すことが確認された。角層に対する顕著な保湿効果により、AcHA は乾燥肌の改善をもたらすことが期待できる。Andrew と Gregory は、4% SDS 水溶液を適用すると、被験者の乾燥皮膚が人工的に惹起されることを報告している[1-25]。従って、乾燥肌に対する AcHA の改善効果は、SDS 惹起による乾燥肌モデルを用いて実施した。乾燥肌の状態に対する AcHA の改善効果を評価するために、5 w/w% SDS 水溶液によって惹起された乾燥肌モデル系をこの研究で用いた。実際にこの実験では、SDS 惹起性乾燥肌の水分量は、通常の皮膚水分量の約 75% まで減少したことから、このモデル系は AcHA の改善効果の評価に適していると考えられた。皮表コンダクタンスと TEWL の測定結果から、AcHA は荒れ肌に対し皮膚保水機能を改善し角層のバリア機能も向上した。この結果から、AcHA が健康な肌の維持に高い効果を発揮できることは明らかである。

AcHA の極めて優れた皮膚柔軟効果を説明するために、次のメカニズムを提案する(図 1-11)。一般的に、水分減少に伴い皮膚は硬くなる傾向があるが、保湿剤の適用により角層にしっかりと吸着し皮膚表面からの水分蒸発を防ぐことで皮膚の柔らかさを保持すると考えられている[1-13, 1-19]。従って、疎水基を導入した AcHA は、HA に比較して角層にしっかりと吸着することで、皮膚からの水分蒸散を防いでいると考えられる。このため、AcHA は皮膚を長期間乾燥から守ることにより皮膚水分量を増加させることで、優れた角層柔軟効果を発揮するものと考えられる。Wichrowski らは、フーリエ変換赤外分光法を使用した非侵襲的かつ非破壊的な測定手法により角層保湿が評価可能と報告している[1-26]。アミド I バンド (1645 cm^{-1}) とアミド II バンド (1545 cm^{-1}) の強度比と、角層の水分含量との関連性を間接的に示しており、角層水和の相対的な尺度であると想定されることが示されている。ケラチンと保湿剤間の相互作用の強度はこの手法によって評価できると考えられる。一方 Jokura らは、固体 ^{13}C 核磁気共鳴分光法を用いて検討しており、主に 10 nm のフィラ

メントで構成されるケラチンタンパク質は、ケラチン繊維間の非らせん領域を介した分子間力の減少により、水和した NMF（天然保湿因子）の助けを借りて弾性を獲得していることを示している[1-27]。AcHA の優れた皮膚柔軟効果のメカニズムの詳細を明らかにするには更なる検討が必要である。

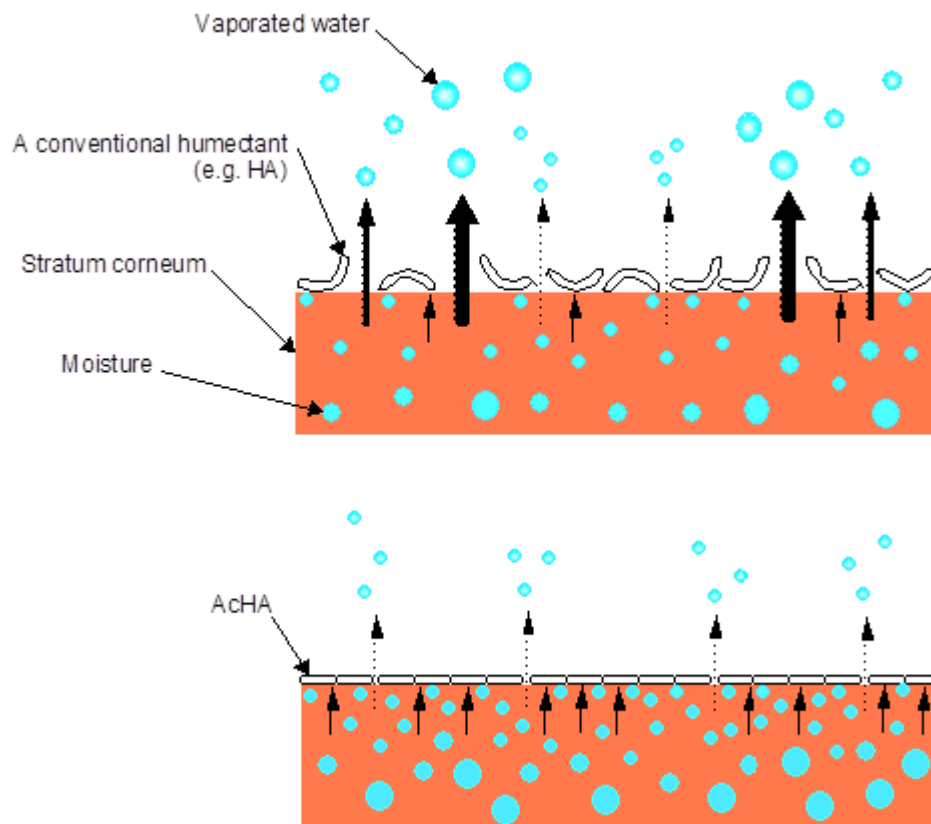


図 1-11. AcHA の皮膚柔軟効果発揮メカニズムの仮説

第 2 節

AcHA の皮膚柔軟化メカニズムに関する示差走査熱量測定による研究

1. 緒言

化粧品の研究開発の分野では、皮膚保湿は不可欠かつ重要な研究課題の 1 つである。これまでに、数多くの皮膚保湿や保湿剤の有用な効果に関する研究が報告されている[2-1-2-7]。良く知られているのは、水分と角層脂質が健康な肌を維持するのに重要な役割を果たし[2-8-2-10]、皮膚中の水分量が皮膚柔軟性に影響を与える、ということである[2-11-2-13]。しかしながら、老化、周囲の環境、体質などの要因により、角層は常に水分を失う傾向にある[2-14]。角層中の水分含量の減少は、乾燥肌およびしわの形成をもたらしてしまう。従って、角層中の正常な水分含量を維持するためには、肌に保湿剤を適用することが有用である[2-15-2-17]。

スキンケア化粧品に配合される様々な保湿剤や増粘剤には、保水性、粘弾性、曳糸性、生体適合性などの有用な物理的特性を示す物質が多い。中でも、優れた高分子保湿剤としてヒアルロン酸ナトリウム (HA) が広く用いられているが[2-18]、HA のこれらの重要な機能を更に増強するために、HA の構造中に疎水基を導入することにより新規保湿剤として合成を試みた。疎水基の導入は、HA を疎水性である皮膚に吸着し易い物性に変化できると考えられる。図 2-1 は、“Anchoring humectant” (錨型保湿剤) の概念図を示す。肌へのアンカーとしての役割を果たす疎水基が高分子保湿剤に導入される場合、保湿剤は皮脂で覆われ疎水的となっている皮膚表面に吸着される。保湿剤を皮膚に固定するというこの考え方は、親水性と疎水性とを併せ持つ両親媒性高分子の有する保湿効果は高いという事実に基づいている。新規 HA 誘導体を見出すために鋭意検討した結果、新規 HA 誘導体である AcHA を開発した[2-19]。第 1 節では、高分子保湿剤 AcHA の合成と肌に対する有用性に関して報告した。AcHA が角層に対して優れた保湿効果及び皮膚柔軟効果を有することが示された。特に、AcHA の皮膚柔軟効果は他の保湿剤と比較しても顕著に強く、その強度は HA の水酸基に対するアセチル基の置換度 (DS) に依存していた。しかしながら、角層に対する皮膚柔軟効果のメカニズムの詳細は明らかにされていない。

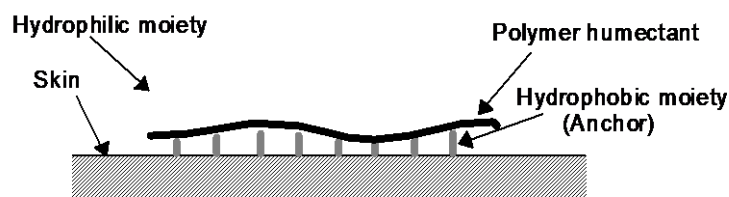


図 2-1. "Anchoring humectant" (錨型保湿剤) の概念図

一般的に、示差走査熱量測定 (DSC) は、水分量の変化に対する高分子や皮膚中における水分の存在状態を評価するために適切な測定手法である [2-20–2-23]。井上らは、角層内における水の融解挙動に関して DSC を用いた研究について報告している [2-24]。角層中に存在する水の 20～30% が角層中のタンパク質又は脂質と強く相互作用する結合水であり、残りの水 (70～80%) がアミノ酸等の水溶性成分を可溶化する自由水であることが示されている。本章では、AcHA に対する皮膚柔軟効果のメカニズムを解明するために、DSC 手法を用いて AcHA の角層における水和挙動について検討を行った。

2. 実験方法

2.1. 使用物質

本研究で使用された化学物質は化粧品グレードまたは試薬特級グレードであり、さらに精製することなく使用した。また角層シートは、前章で報告した方法によって調製され、それらは使用前までシリカゲル入りの真空デシケーター中に保存された [2-19, 2-25]。本研究で使用された水は、イオン交換浄水システム TypeG-10B (Organo、東京、日本) によって浄化された。アセチル化ヒアルロン酸ナトリウム (AcHA) は前章に報告された手順によって合成された [2-19, 2-26]。本研究では、繰り返し二糖単位あたり (即ち、置換度 DS) 2.6～3.8 のアセチル基を有する AcHA を使用した。AcHA の重量平均分子量は約 150 kDa であった (図 2-2)。本 AcHA は 90 w/w% エタノール水溶液に溶解することが可能であった。

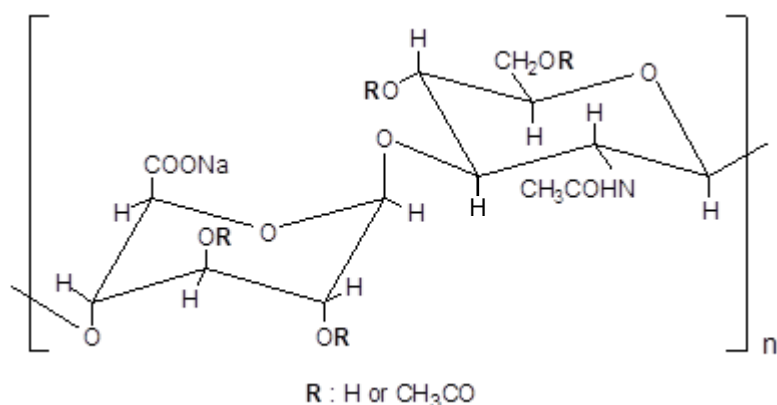


図 2-2. AcHA の化学構造

2.2. 空気/水界面における表面張力測定

HA 及び AcHA が溶解した水溶液（濃度はそれぞれ $10^{-7} \sim 10^{-0}$ g/dL の範囲）を用意した。各種濃度における表面張力を、SURFACE TENSOMETER ST-1（島津、京都）によって 25℃ の一定温度で平衡後に測定した。

2.3. 粉末に吸着した水分量測定

粉末形態の HA 又は AcHA に吸着された水分量を測定するために、試料を一定の相対湿度（32.8、52.3、75.3、又は 93.6 %）で 120 時間平衡化した。試料を秤量して湿潤重量とした後、105℃の真空オーブン中で 4 時間乾燥した後再び秤量し乾燥重量とした。各試料の吸着水量は、下記式（1）により算出した。

$$\text{吸着水 \%} = (\text{湿潤重量} - \text{乾燥重量}) / \text{乾燥重量} \times 100 \quad (1)$$

2.4. 試料中における結合水量の測定

HA 又は AcHA 中における結合水量は、示差走査熱量計 DSC-8230D（東京、リガク電子）により測定した[2-27, 2-28]。HA 又は AcHA 水溶液中の水分量は、一定濃度の水溶液を乾燥して濃縮することでその重量変化から決定した。即ち、各種含水量の試料を調製するため、DSC 測定の前に、HA 又は AcHA の溶解した 0.2 w/w% 水溶液を予め DSC 測定用アルミニウムパン（内径 5 mm、深さ 2.5 mm）に 30 μ L を入れ、シリカゲル入りのデシケーター中で各種の時間（0～6 h）で乾燥して試料濃度を調整した。一方、HA 又は AcHA で前処理した角層は、予め裁断した角層片（3×3 mm）を 0.2 %w/w HA 又は AcHA 水溶液に 24 時間浸漬し、水（5 mL）で 10 秒間すすいで調製した。各種の水和状態の角層試料を得るため

に、湿った角層試料を各種時間の間シリカゲルデシケーターで乾燥させた。湿潤した前処理角層は折りたたまれてアルミニウムパンに速やかに封入した。DSC 測定は、液体窒素で-40℃まで冷却した後、5 K/分の走査速度で 40℃まで加熱して、水の融解エンタルピー (ΔH) を測定した。 $\Delta H=0$ における総水分量は自由水が存在しないことを示し、水分は結合水としてのみ存在することを意味する。自由水量は以下の式 2 を使用して、測定で得られた ΔH 及び水の 1 グラムあたりの融解エンタルピーとから算出した。自由水を算出するための水の融解エンタルピーの値は文献値では 334 J/g だが、本研究で使用した装置で測定した自由水の ΔH は 315.6 J/g であったため、実測値に則しこの数値を採用した[2-27]。また、結合水量は下記式 3 より、総水分量から自由水量を差し引くことにより得た。

$$\text{自由水量} = \Delta H / 315.6 \quad (2)$$

$$\text{結合水量} = \text{総水分量} - \text{自由水量} \quad (3)$$

3. 結果

3.1. AcHA の表面張力低下能

AcHA が有する両親媒性を検討するため、各種濃度の水溶液の表面張力を測定した。図 2-3 は、AcHA とその比較対照としての HA の表面張力測定の結果を示している。1.0 w/w% AcHA の表面張力は約 55.0 mN/m であり、1.0 w/w% HA (74.0 mN/m) の表面張力よりも低かったため、AcHA には表面張力低下能力があると言える。本結果は、AcHA の有する両親媒性特性によってサポートされている。

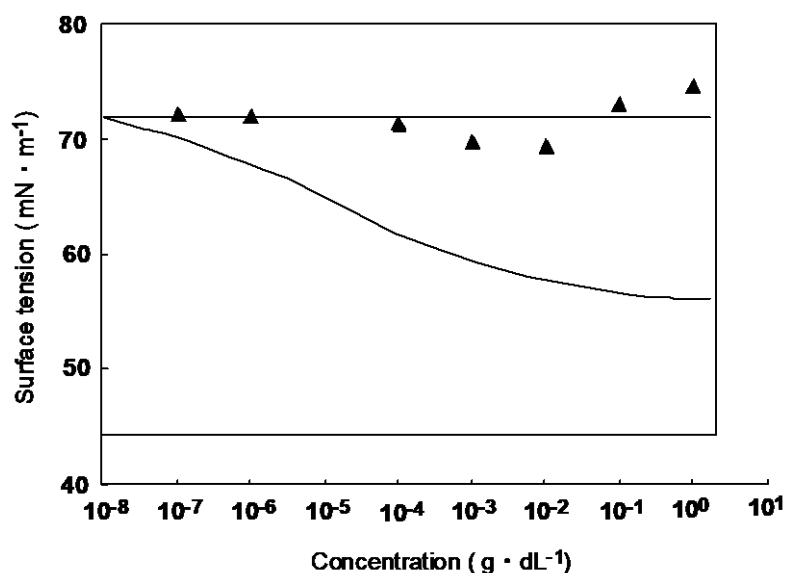


図 2-3. HA 及び AcHA の表面張力

▲: HA、●: AcHA

3.2. AcHA の吸水能

角層の柔軟性は、その水分量に依存することはよく知られている[2-6, 2-8]。AcHA の皮膚柔軟効果のメカニズムを明らかにするために、AcHA の保水能をその対照として HA の保水能と比較した。AcHA の吸湿性はその粉末原体を使用して評価した。図 2-4 は、AcHA の吸湿性が、各種相対湿度 (RH) 下で HA の吸湿性とほぼ同等であることを示している。多くの化粧品に使用されている保湿剤は、低湿度環境において皮膚を乾燥から保護するために大量の水を保持する必要があることから、AcHA の吸湿性は皮膚を保護する優れた特性と考えられる。また、保湿剤の皮膚柔軟効果は保水力に依存することから、保水能が高いほど肌を柔らかくする効果が大きくなると考えられる[2-29]。しかしながら、AcHA の強力な皮膚柔軟効果は、その吸湿性からは説明がつかない。

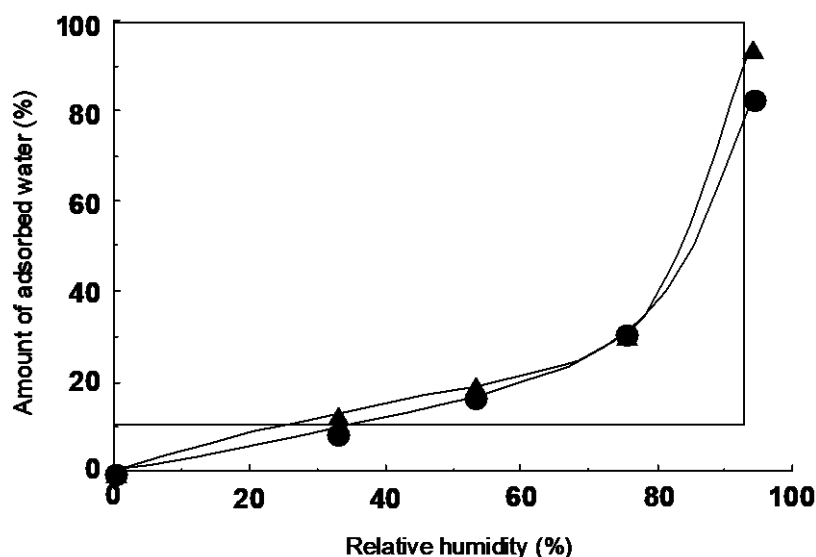


図 2-4. HA 及び AcHA 粉末原体の吸湿能

▲: HA、●: AcHA、x 軸は試料が平衡化された相対湿度 (R.H.) を示している

3.3. AcHA の水和挙動

AcHA 粉末の水和挙動を調べるために、結合水の DSC 分析を実施した。AcHA の各種の濃度の水溶液 (2.0~100 w/w%) を調製し、DSC により自由水の融解エンタルピーを測定した。図 5 は、AcHA に吸着された水の DSC 昇温曲線を示している。自由水の融解は特徴的な非対称パターンを示し、AcHA の吸着水の融解曲線 (図 2-5 に示す B~D) は純水の融解曲線 (E) よりも低温側に出現したことから、AcHA 試料中の水 (B~D) は純水と比較して低温で融解した。融解ピーク形状は含水量に応じて変化し、AcHA 濃度の上昇に伴い融解ピーク面積は小さくなった。これは、非常に少量の水が AcHA に吸着された場合に自由水の融解が観察されなかったことを意味する (A)。つまり、67.9 w/w% AcHA 水溶液では、ピークは完全に消滅し、結合水のみが試料中に存在したことを示している。

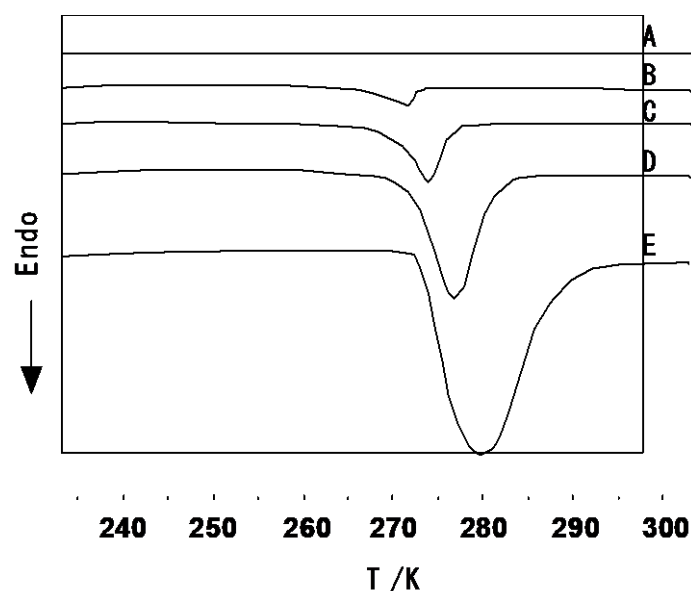


図 2-5. 各種濃度の AcHA 水溶液の DSC 曲線

DSC 曲線は、A: AcHA 水溶液濃度 69.9%、B: 33.6%、C: 15.2%、D: 5.8% E: 純水をそれぞれ示す

高分子保湿剤に吸着された水は、しっかりと吸着した結合水、またははるかに緩く吸着した自由水として存在することはよく知られている。一般に、結合水は高分子にしっかりと吸着しているため結合水は 0°C 以下でも凍結しない。従って、DSC によって得られた水の融解エンタルピー (ΔH) は、自由水のみが示される[2-28]。自由水含量は、 ΔH 値と水 1g 当たりの融解熱から計算される (315.6 J ; 式 (3))。総水分量から自由水量を差し引くことにより、結合水量が得られる。そこで、HA 粉末及び AcHA 粉末中に存在する総水分量に対する自由水量と結合水量の変化を比較した (図 2-6 及び図 2-7)。縦軸は自由水量又は結合水量を示す。完全に乾燥した粉末が水分を吸着した場合、粉末中の水は理論的には結合水としてのみ存在する。一方、自由水は結合水で飽和した後にのみ出現する。AcHA の水和能は、自由水が存在し始める直前の最大結合水量を用いて HA と比較した。その結果、いずれの粉末についても同様のパターンを示し、最大結合水分量は HA と AcHA も粉末 1g 当たり同量の 0.89 g であった。この結果から、AcHA と HA は同量の最大結合水量を保持できるため、AcHA の皮膚柔軟効果の優位性はその最大結合水量を保持する能力では説明できない。

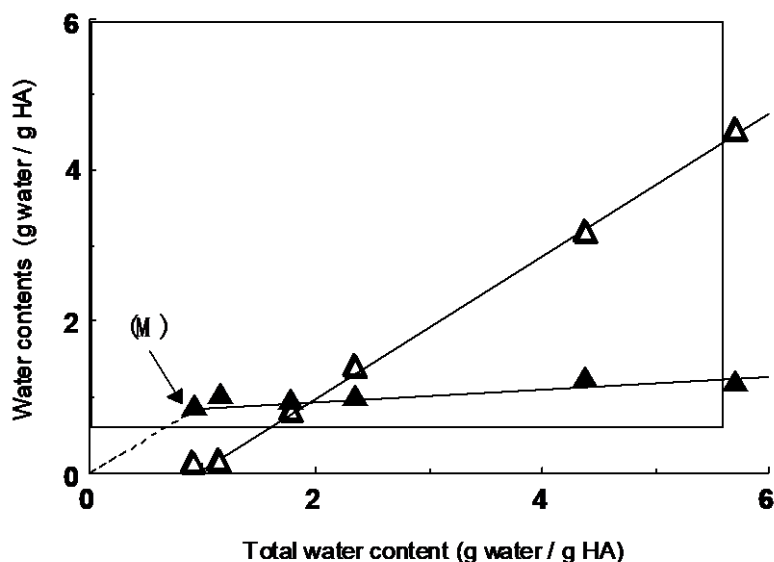


図 2-6. 各種水分含量の HA の結合水量と自由水量の変化

△: ΔH と純水 1 g 当たりの融解熱 (315.6 J/g) から計算された自由水量を示す。▲: 総水分量から自由水量を差し引いて計算された結合水量。実線は自由水と結合水量の回帰直線を示す。破線は自由水が現れる前の結合水が増加する理論直線を示している。HA に束縛された結合水の回帰直線が現れ始める点 M は、自由水が無い場合の最大結合水量を示す

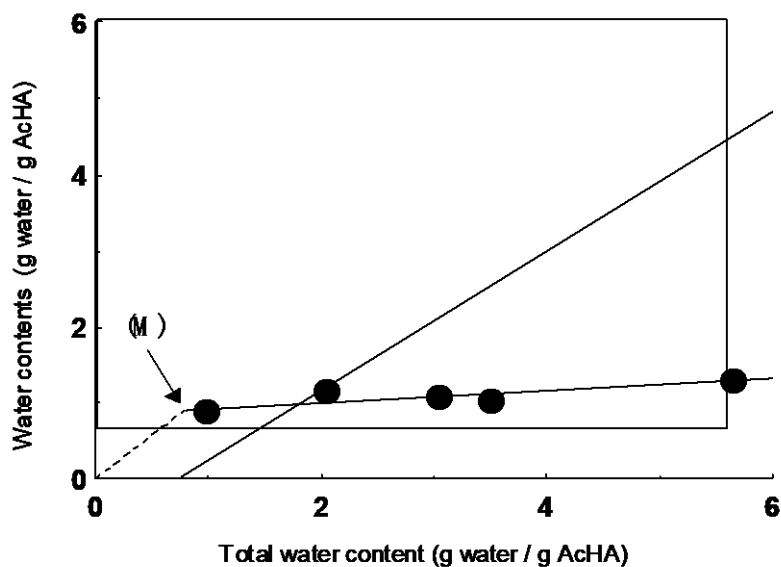


図 2-7. 各種水分含量の AcHA の結合水量と自由水量の変化

○: ΔH と純水 1 g 当たりの融解熱 (315.6 J/g) から計算された自由水量を示す。●: 総水分量から自由水量を差し引いて計算された結合水量。実線は自由水と結合水量の回帰直線を示す。破線は自由水が現れる前の結合水が増加する理論直線を示している。AcHA に束縛された結合水の回帰直線が現れ始める点 M は、自由水が無い場合の最大結合水量を示す

3.4. 角層の結合水分量に対する AcHA の効果

AcHA で処理した角層の結合水分量を評価するために、上記 3.3 と同様に DSC 測定を実施し最大結合水量を算出した。図 2-8 は、乾燥角層 100 mg 当たりの最大結合水量が、AcHA 処理により 12 mg から 44 mg に増加したことを示している。この 32 mg の増加は、HA の場合の増加である 24 mg よりも大きかった。この結果は、AcHA が自由水を増加させることなく角層の結合水量を増加したことを示している。この増加効果は HA の効果よりも優れており、角層の水分保持に対する結合水の重要性を示唆している。

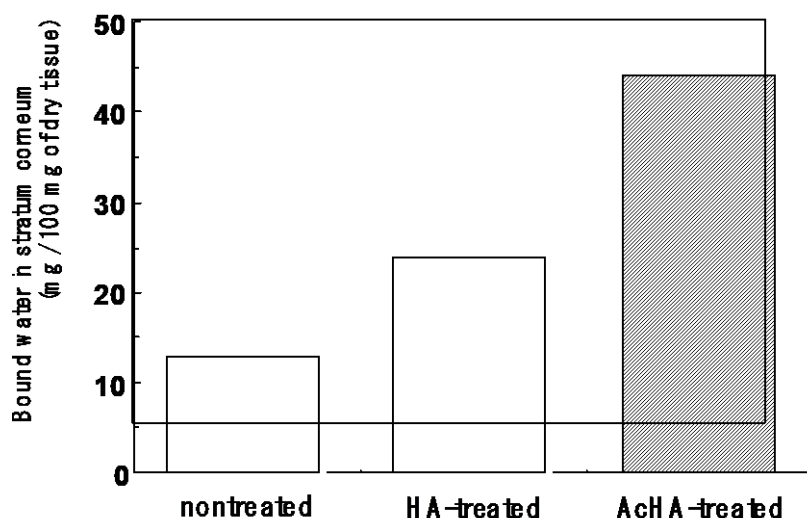


図 2-8. 未処理、HA 及び AcHA で浸漬処理した角層中の結合水量

さらに、結合水量に対する AcHA のアセチル基の置換度 (DS) の影響を調べるために、角層の結合水量を各種 DS 値の AcHA で処理した。図 2-9 に、角層の結合水量と AcHA の DS 値の関係を示す。角層の結合水量は DS 値が約 3.3 の場合に最大値を示した。前節で、肌を柔らかくする効果は角層の結合水量に依存し、3.3 付近に最適な DS 値があることを報告した[2-19]。これらの結果は、皮膚柔軟効果が角層中の結合水量に依存することを示唆している。AcHA の DS 値は高分子自体の疎水性/親水性バランスを反映していることから、角層の水分保持能と AcHA の角層への親和性にも関係があると考えられる。

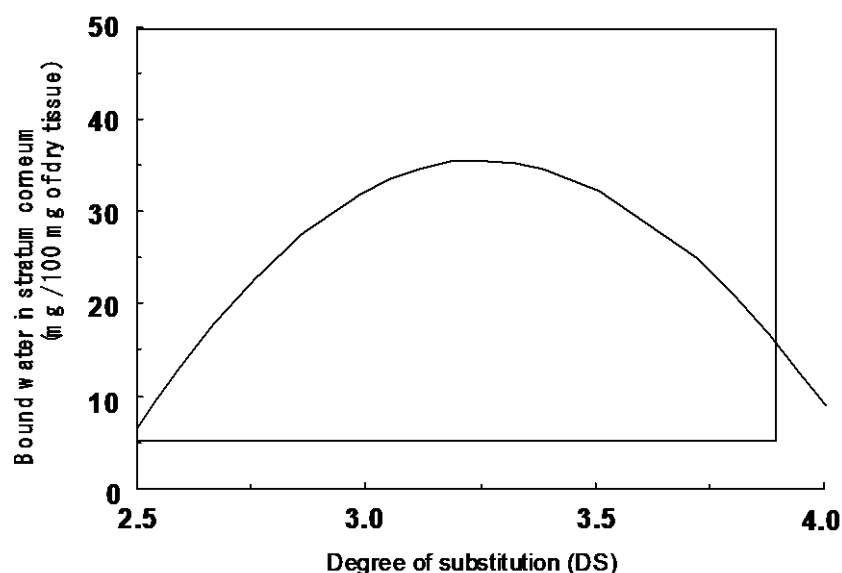


図 2-9. 各種置換度 (DS) の AcHA で浸漬処理した角層の結合水量との関係

実線は DS 値と結合水量との回帰曲線を示しており、DS=3.3 付近に最適な DS 値がある。AcHA の DS 値はその疎水性/親水性のバランスを反映しているため、角層の結合水量と AcHA の角層への親和性との間に関連性があると考えられる。

4. 考察

以上の結果から、AcHA の強力な角層柔軟効果を説明するために、次のメカニズムが提案できる。即ち、保湿剤は角層に吸着、皮膚表面からの水分の蒸発を防ぐが、水分減少に伴い自然に硬くなる傾向がある。従って、AcHA は角層にしっかりと吸着することで、皮膚からの水分損失を防ぐと同時に優れた保湿能を発揮する。AcHA は角層を十分柔らかくするのに役立ち、角層は長時間その水分増加を維持させることができると考えられる。以上まとめると、角層の結合水量を増加し、HA と比較して強力な皮膚柔軟効果を生むことにより、両親媒性高分子 AcHA が保湿効果を示すと結論付けることができる。AcHA の開発により、本節の冒頭で提案した高分子保湿剤の概念 (図 2-1) が妥当であることが示された。黒田らは、角層機能に対するポリ (2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン) (MPC) の効果とその応用が報告されている [2-30, 2-31]。正常な皮膚にポリ (MPC) を塗布すると、角層の水分量が増加すると同時に水分損失が減少し、皮膚表面コンダクタンスが改善されることが示されている。ポリ (MPC) のこれらの多機能特性は、通常両親媒性高分子に見られる現象である。AcHA の皮膚柔軟効果のメカニズムを明らかにするにはさらなる研究が必要と考えられる。今後このプロセスをさらに解明していく予定である。

第 2 章

皮膚角層の構造特性に着目した素材創出に関する研究

第 1 節

ステロール界面活性剤を使用した新規化粧品基剤の開発 I

ステロール界面活性剤による新規乳化粒子の調製

1. 緒言

ポリオキシエチレン・ポリオキシプロピレンランダム共重合体ジメチルエーテル（以下、EPDME と略す）は、ポリオキシエチレン（以下、POE と略す）とポリオキシプロピレン（以下、POP と略す）の付加モル数をコントロールすることにより、分子の極性を自由に設計することができることを特長とする化合物である[3-1]。EPDME の主な溶液物性としては、界面活性剤としての機能を殆ど示さない点、また、流動パラフィン、イソステアリン酸セチルなどの非極性油には溶解せず、トリ（2-エチルヘキサン酸）グリセリル、コハク酸ジ（2-エチルヘキシル）などの高極性油分と水には無制限に相溶するという特長が挙げられる。一方、EPDME はランダム共重合体であるため、水中でミセルなどを形成するブロック共重合体と異なり、単独で自己組織体を形成しない[3-2-3-6]。

これまで我々は、上記 EPDME を活用した微細乳化法を開発してきた[3-7, 3-8]。本法における乳化メカニズムとしては、EPDME 分子が POE 型非イオン性界面活性剤の親水基と化学構造が類似しているため、POE 型非イオン性界面活性剤の親水基と相互作用して Co-Surfactant として機能することで、界面活性剤の会合数を低下させるため、超微細エマルションが簡便に調製できると示唆された。

一方、近年、ステロール骨格を有する POE 型非イオン性界面活性剤に関する研究が盛んに行われている[3-9-3-15]。例えば Folmer らは、POE フィトステリル水溶液の物性挙動を研究した結果、POE 鎖が 10 モル以上付加した界面活性剤はロッド状のミセル領域を与え、その CMC は低く POE 鎖長と負の相関性を示した。また、POE 鎖が短い疎水性界面活性剤に対しては広いラメラ領域が出現するのに対し、POE 鎖が長い親水性活性剤に対してはキュービックとヘキサゴナル構造が出現し、それらは 100°C まで安定であることを報告し

ている[3-16]。また佐藤らは、水/POE コレステリル（以下、ChEO_nと略す）系の相挙動と自己組織体に関して研究した結果、ChEO_n は水中で各種自己組織体を形成し、典型的な非イオン性界面活性剤系と比較して、リボン相（R_I）領域がかなり広いことを見出している。このように特異な相挙動を示す理由は、嵩高く硬いコレステリル基に由来すると考えられている[3-17, 3-18]。従って、POE 鎖を有するステロール系界面活性剤の物理化学的性質に対しても、EPDME は影響を及ぼすことが考えられる。

我々は、このような特徴的な会合体を形成するステロール系界面活性剤に着目し、EPDME を活用した微細乳化法による O/W 型エマルジョン（以下、本基剤と略す）の調製を試みた。その結果、本基剤の乳化粒子は、その外側に層状構造を伴った極めて特徴的な形態を有することを見出した。本章では、本新規乳化法により調製された乳化粒子の特徴とその乳化メカニズムに関して言及する。

2. 実験

2.1. 使用物質

EPDME は EPDME (14/7) (POE 14 モル、POP 7 モル、Mw.1000、日油(株)製)、ステロール系活性剤はポリオキシエチレン (30 モル) フィトステリル (以下、POE30PS と略す、HLB=18.0、日本サーファクタント(株)製)、極性油分はイソステアリン酸 (高級

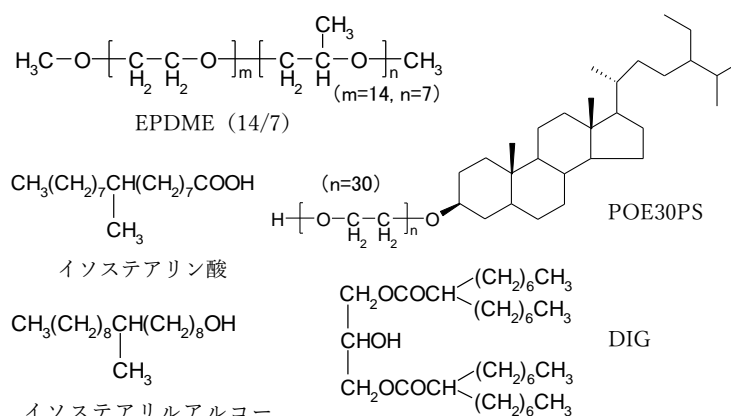


図 3-1. 使用物質の化学構造式

ステアリルアルコール (高級アルコール工業(株)製)、ジイソステアリン酸グリセリル (以下、DIG と略す、太陽化学(株)製) をそのまま用いた (図 3-1) [3-19]。また、水はイオン交換水を用いた。

2.2. 実験方法

2.2.1. 本基剤 (O/W 型エマルジョン) の調製

イソステアリン酸：イソステアリルアルコール：DIG を重量比 10：12：5 で混合した組

成（以下、極性油分 1 と略す）を予め調製した。次に 70℃において、EPDME（14/7）、POE30PS、極性油分 1 を重量比 30：6：27 で混合溶解した組成中に、ホモジナイザーで攪拌しながら 70℃の水を重量比 30 加えた後、室温で冷却することにより、微細な O/W 型エマルション（本基剤）を得た。

2.2.2. 相平衡図の作成

乳化温度 70℃において {POE30PS+極性油分 1} -EPDME（14/7）-水の擬似 3 成分系相平衡図、25℃において DIG-POE30PS-50wt%EPDME（14/7）の擬似 3 成分系相平衡図、DIG-POE30PS-水の 3 成分系相平衡図、DIG-EPDME（14/7）-水の 3 成分系相平衡図をそれぞれ作成した。テフロンシール付きネジ口試験管に各成分を入れ十分に攪拌した後各温度に対して状態に変化が無いことを確認した上、必要に応じて遠心分離し溶存状態を確認した。また、I 相領域における光学的異方性は偏光板を用いて確認した。

2.2.3. 乳化粒子の電子顕微鏡観察

乳化粒子の電子顕微鏡観察は Freeze Fracture -TEM（以下、FF-TEM と略す）の手法により観察を行った。試験試料の凍結切断レプリカを作製し、透過型電子顕微鏡 H-7000（Hitachi 社製）により観察した。凍結切断レプリカは BAF400（Balzers 社製）により作製した。凍結サンプルは高真空下-140℃で切断され、白金及び炭素を角度 30° で蒸着した[3-20-3-22]。

2.2.4. 小角 X 線散乱（SAXS）測定

各組成の構造解析を行うため、25℃において高輝度 SAXS 装置 SAXSess（Anton Paar 社製）を用いて SAXS 測定を実施した。

3. 結果

3.1. 本乳化系の相平衡図

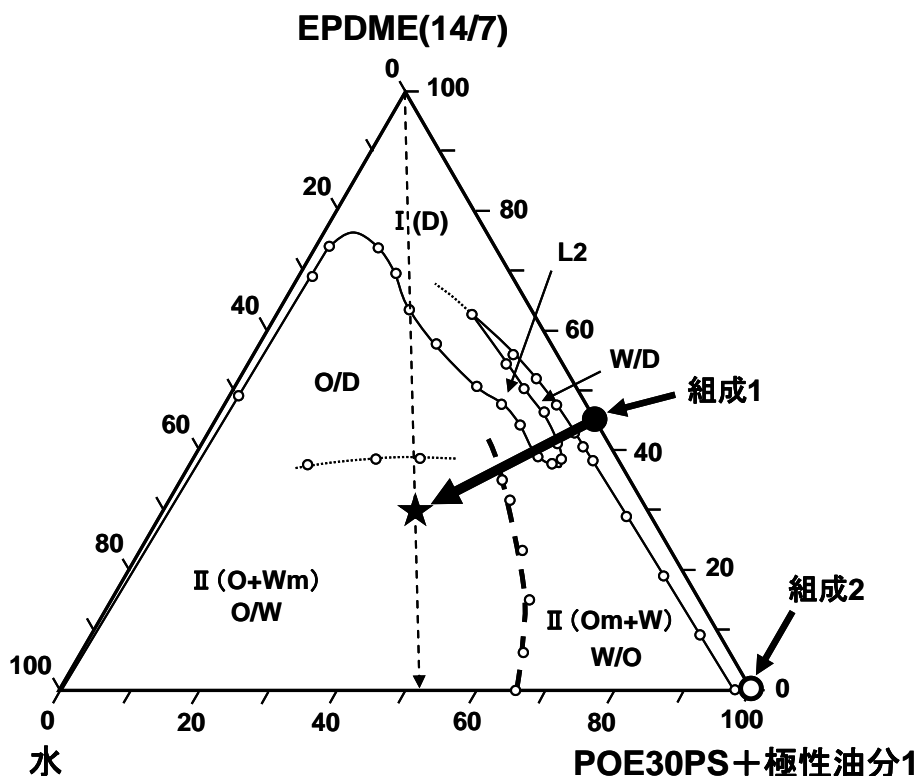


図 3-2. [POE30PS+極性油分 1]－EPDME (14/7)－水の擬似 3 成分系相平衡図 (70 °C)

●、○、及び★はそれぞれ組成 1 (本基剤の油相成分：EPDME：POE30PS：イソステアリン酸：イソステアリルアルコール：DIG=30：6：10：12：5)、組成 2 (POE30PS：イソステアリン酸：イソステアリルアルコール：DIG=6：10：12：5)、本基剤 (水：EPDME：POE30PS：イソステアリン酸：イソステアリルアルコール：DIG=30：30：6：10：12：5) を、太線矢印は本基剤の乳化過程をそれぞれ示す。ここで、Wm はマイクロエマルジョン相 (ミセル水溶液)、Om は逆ミセル溶液、D はバイコンティニユア界面活性剤相、L2 は逆ミセル水溶液、I は 1 相領域、II は 2 相領域をそれぞれ示す

図 3-2 に乳化温度 70°Cにおける {POE30PS+極性油分 1}－EPDME (14/7)－水の擬似 3 成分系相平衡図を示す。本基剤の乳化過程を矢印で示すが、乳化温度 70°Cにおいて、組成 1 (図中●) の油相中に攪拌しながら水を添加する際に、乳化型が W/O 型から O/W 型に変化する転相ライン (図中太点線) を通過することが分かった。この転相点から更に水を添加して O/W 型エマルジョン領域に移行することにより、安定性の良好な本基剤 (図中★) が得られることが分かった。

3.2. 本基剤中の乳化粒子の観察

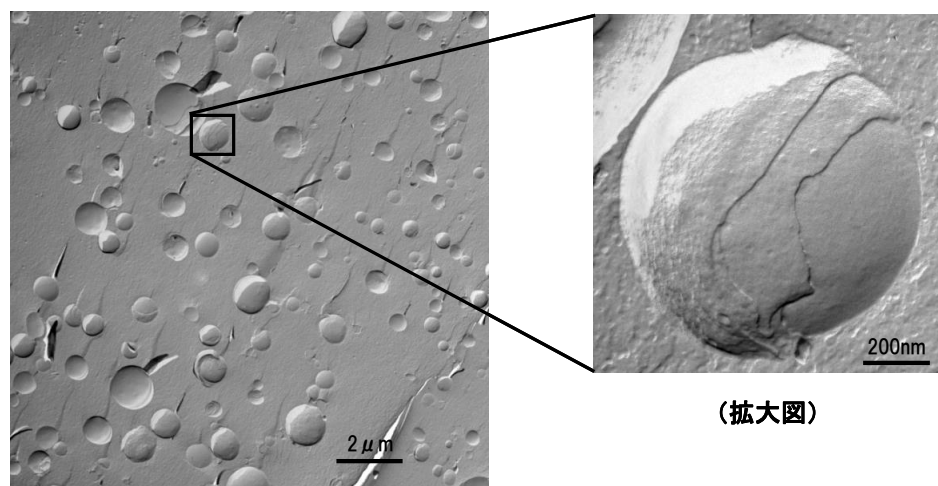


図 3-3. 本基剤の FF-TEM 写真（左）と乳化粒子の拡大図（右）

本基剤の乳化粒子は微細であるため、乳化粒子の形態観察は電子顕微鏡を用いて行った。図 3-3 に本基剤の乳化粒子に関する凍結レプリカの FF-TEM 写真を示す。乳化粒子径は $0.5 \sim 1 \mu\text{m}$ 程度であるが、外側に 2～3 層の層状構造を伴った特徴的な形態を有する乳化粒子が多数観察された。

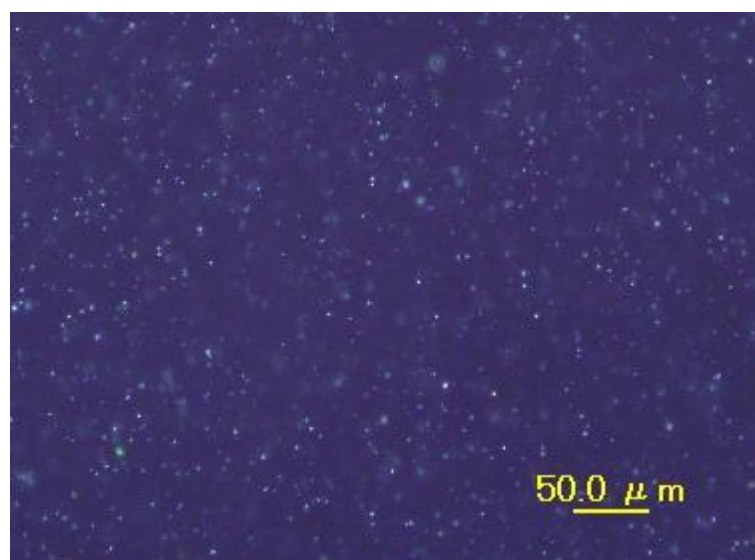


図 3-4. 6 ヶ月間室温保存後における本基剤水希釈系の偏光顕微鏡写真（ $\times 100$ ）

一方、図 3-4 に本基剤を 4.65wt%の割合で水に希釈した O/W 型エマルジョンの 6 ヶ月

間室温保存後における偏光顕微鏡写真を示す。偏光下観察で乳化粒子が輝いていたことから、本基剤の水希釈系でも乳化粒子が光学的異方性を持つことが確認された。

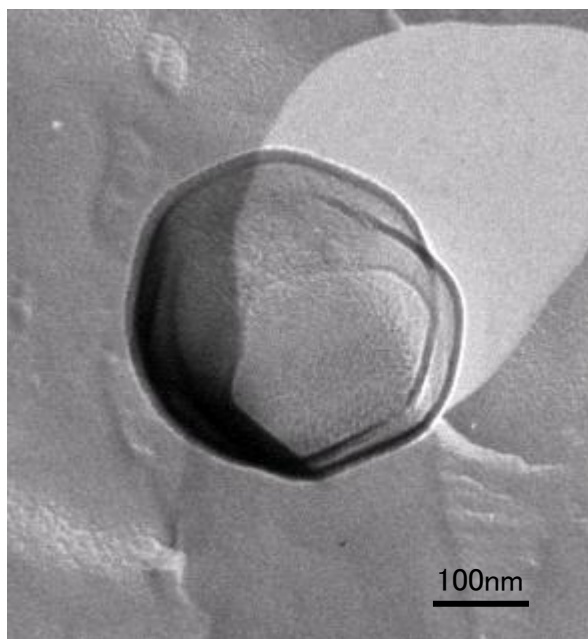


図 3-5. 本基剤の水希釈系の FF-TEM 写真

また、図 3-5 に本基剤の水希釈系の FF-TEM 写真を示す。図 3-3 の本基剤と比較して、乳化粒子の外側に存在する層状構造が不明瞭であり、乳化粒子の概形が若干歪んでいるものの、本基剤と同様に層状構造の存在が確認できた。

以上の結果から、本基剤の水希釈系であっても、擬似安定系として層状構造が保たれていることが確認された。

3.3. 小角 X 線散乱 (SAXS) 測定による構造解析

3.3.1. 乳化時における各種組成に関する SAXS 測定

本基剤の調製に関連した各組成に関して構造解析を行うため、SAXS 測定を行った。

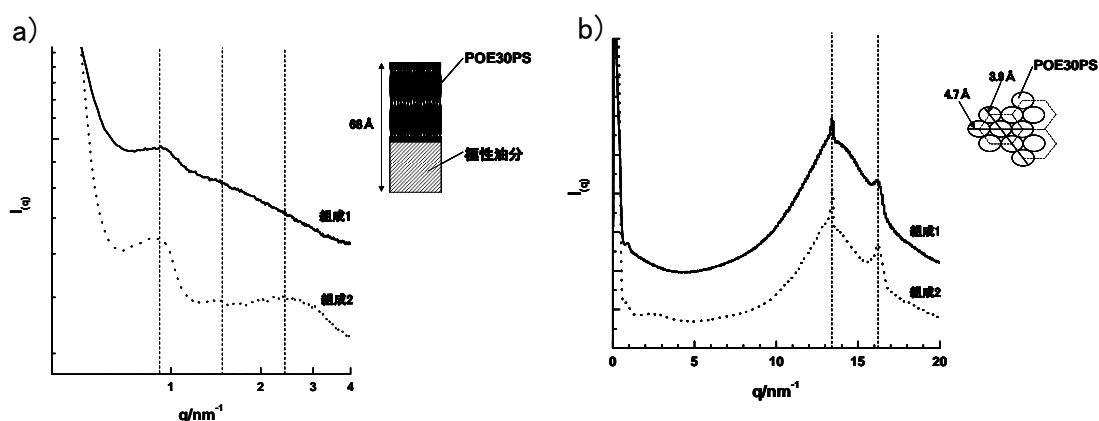


図 3-6. 組成 1、2 の SAXS の測定結果と層状構造のモデル図

a) 小角側、b) 広角側 ここで、実線：組成 1、点線：組成 2 をそれぞれ示す

図 3-6 の a) に、組成 1、2 に関する小角側の SAXS 測定結果とその結果から推測されるラメラ構造のモデル図を示す。組成 1（本基剤の油相）の SAXS プロファイルより、極性油分 1 を取り込んだ POE30PS のラメラ構造の繰り返し単位（ $q=0.92$ 、面間隔： $d=68\text{Å}$ ）に由来する 1～3 次反射の回折ピークが認められた。この結果から、本基剤の油相は 25°C でラメラ構造体を形成することが示唆された。この結果から、乳化粒子の外側に α ゲル層が形成されることで強固な界面膜が形成されるため、優れた乳化安定性を示すことが示唆された。一方、組成 1 から EPDME（14/7）を抜去した組成 2 も、組成 1 と同位置に同様の回折ピークが観測されたことから、本ラメラ状構造体は POE30PS と極性油分 1（イソステアリン酸、イソステアリルアルコール、DIG）により構成されており、EPDME（14/7）はラメラ状構造体の繰り返し構造に影響を及ぼさないことが示唆された。

また、図 3-6 の b) に、組成 1、2 に関する広角側の SAXS 測定結果とその結果から推測される lateral packing のモデル図を示す。組成 1 の SAXS プロファイルより、POE30PS の lateral packing に関して β 結晶構造（ $q=13.4$ ：面間隔 $d=4.7\text{Å}$ 、 $q=16.1$ ：面間隔 $d=3.9\text{Å}$ ）に由来する 2 つの回折ピークが認められた。一方、組成 2 も組成 1 と同位置に同様の回折ピークが観測されたことから、 β 結晶構造の形成は、POE30PS と極性油分により構成されており、EPDME（14/7）はその lateral packing にも影響を及ぼさないことが示唆された。

一方、本基剤（O/W 型エマルジョン）を SAXS 測定した結果、上記ラメラ構造及び β 結晶構造由来の明確な回折ピークは認められなかった。

3.3.2. ラメラ構造体構成成分の検討

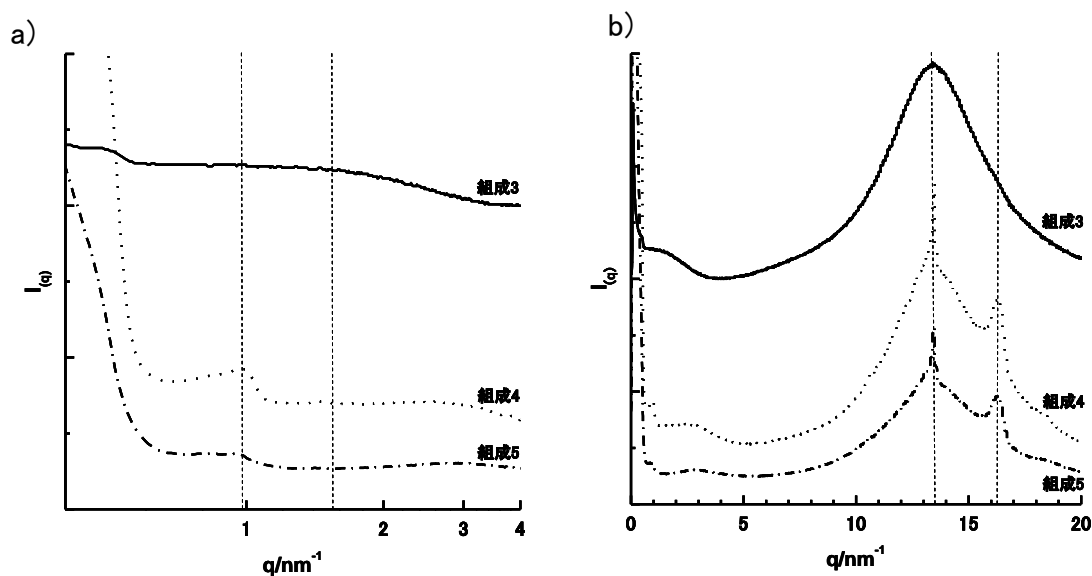


図 3-7. 組成 2 より各極性油分を抜去した組成の SAXS 測定結果

a) 小角側、b) 広角側 ここで、組成 3 は DIG 抜去系、組成 4 はイソステアリルアルコール抜去系、組成 5 はイソステアリン酸抜去系をそれぞれ示す

上記ラメラ状構造体の構成成分を検討するために、組成 2 から各極性油分をそれぞれ抜去した組成 3 (DIG 抜去系)、組成 4 (イソステアリルアルコール抜去系)、組成 5 (イソステアリン酸抜去系) について SAXS 測定を行った。図 3-7 の a) 及び b) に、組成 3~5 の小角側、及び広角側 SAXS 測定結果をそれぞれ示す。図より、DIG 抜去系である組成 3 のみが、小角側に出現したラメラ構造由来の回折ピークと、広角側に出現した β 結晶構造由来の回折ピークの両方が消失したことが分かる。この結果から、ラメラ状構造体の形成には DIG が必須であることが示唆された。

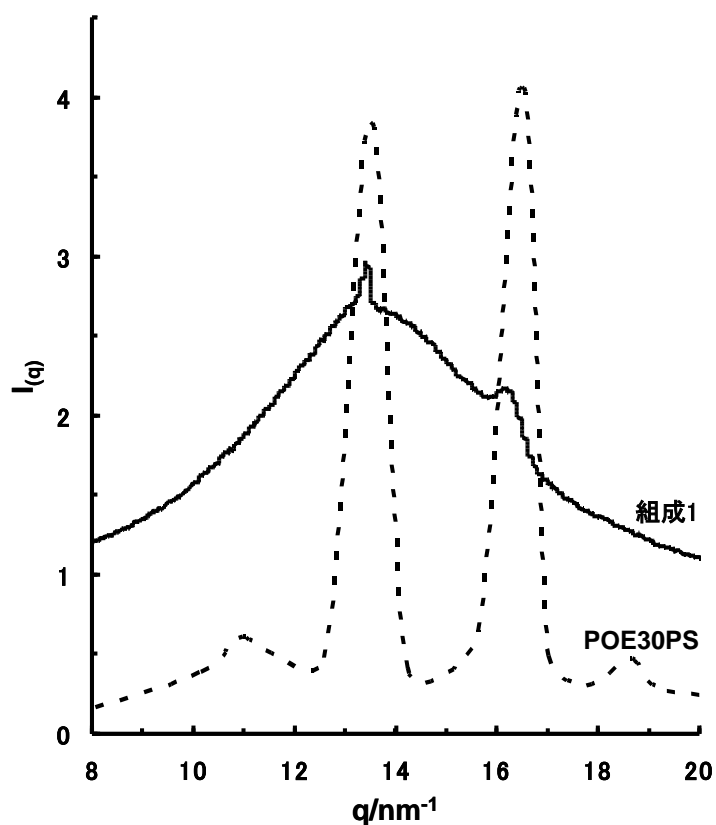


図 3-8. 組成 1（本基剤の油相）と POE30PS の広角側 SAXS 測定結果

更に、本ラメラ状構造体の由来をつきとめるために、POE30PS の SAXS 測定を行った。図 3-8 には組成 1（本基剤の油相）と POE30PS の広角側の SAXS 測定結果を示す。両者の β 結晶構造に由来した回折ピーク位置が一致したことから、ラメラ構造体の由来は POE30PS であることが確認された。

以上の結果から、本基剤のラメラ状構造体は界面活性剤 POE30PS と極性油分 DIG により形成されていることが明らかとなった。

3.4. 本乳化系に対する EPDME の役割

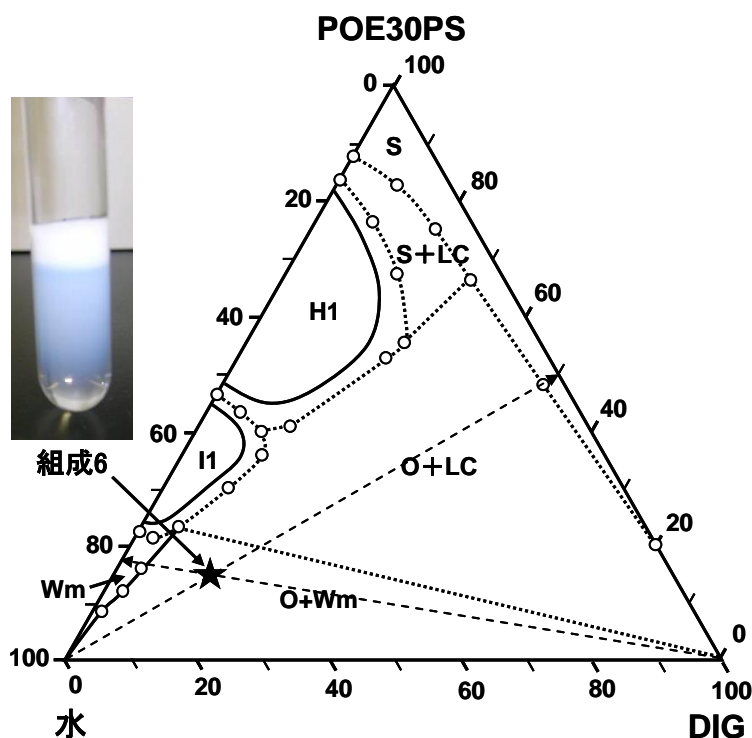


図 3-9. DIG/POE30PS/水 3 成分系相平衡図 (25°C) と組成 6 の外観 (写真)

ここで、S：結晶相、Wm：マイクロエマルジョン相（ミセル水溶液）、LC：液晶相、I1：キュービック相、H1：ヘキサゴナル液晶相をそれぞれ示す

単純系の相平衡図を作成して、本乳化系における EPDME (14/7) の役割を検討した。図 3-9 に 25°C における DIG/POE30PS/水 3 成分系相平衡図を示す。上述したラメラ状構造体を形成する重量比 DIG : POE30PS=1 : 1 混合物中に 70wt% 水を加えた組成 6 では、写真に示すように 2 層に分離し、下層は白濁した水相が認められたことから、水中に界面活性剤 POE30PS により極性油分 DIG 滴が分散した O/W エマルジョン相が形成したことが示唆された。

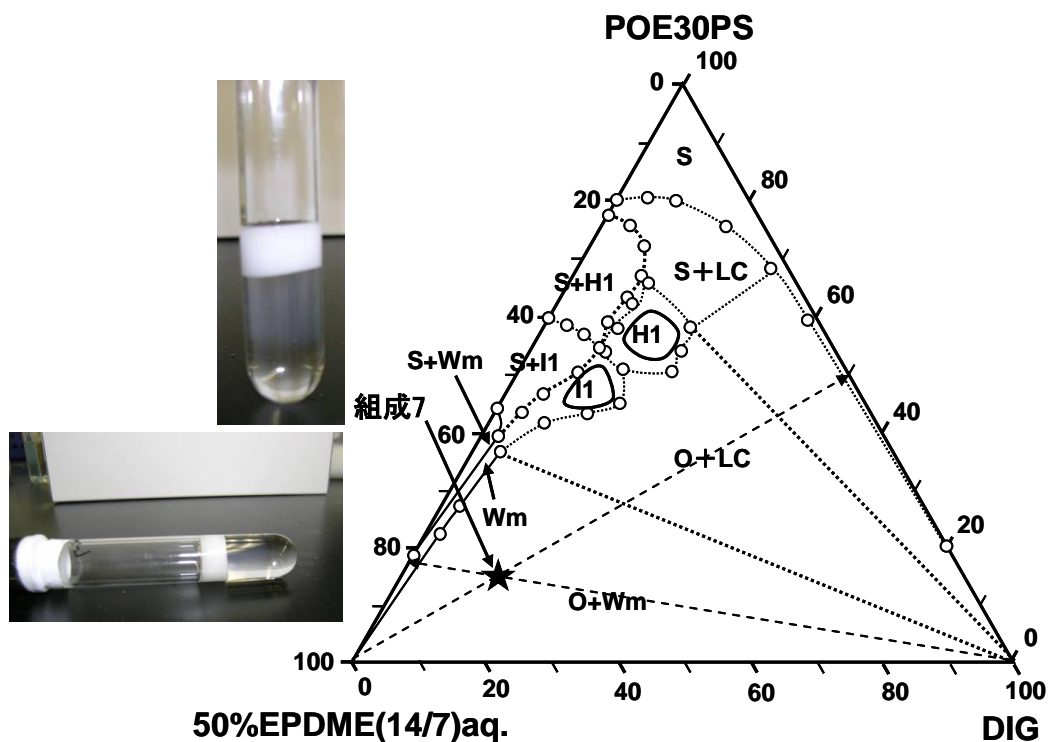


図 3-10. DIG/POE30PS/50wt%EPDME (14/7) 水溶液擬似 3 成分系相平衡図 (25°C) と組成 7 の外観 (写真)

ここで、S：結晶相、Wm：マイクロエマルジョン相（ミセル水溶液）、LC：液晶相、I1：キュービック相、H1：ヘキサゴナル液晶相、をそれぞれ示す

一方、図 3-10 に 25°Cにおける DIG/POE30PS/50wt%EPDME (14/7) 水溶液系擬似 3 成分相平衡図を示す。図 3-9 の相平衡図上の左頂点である水が、図 3-10 では 50wt%EPDME (14/7) 水溶液に変更されている。図 3-9 の組成 6 に対応した組成 7 に関して、上層及び下層に溶解している EPDME (14/7) の存在により、写真に示すように上層は試験管を倒しても流動しない硬い油相が形成され、下層は組成 6 とは異なり無色透明の水相が形成されることが分かった。また、POE30PS は 50wt%EPDME (14/7) 水溶液中で白濁し、針状結晶を生成した。以上の結果から、EPDME (14/7) の存在により、POE30PS と DIG が上層に移行していることが分かった。

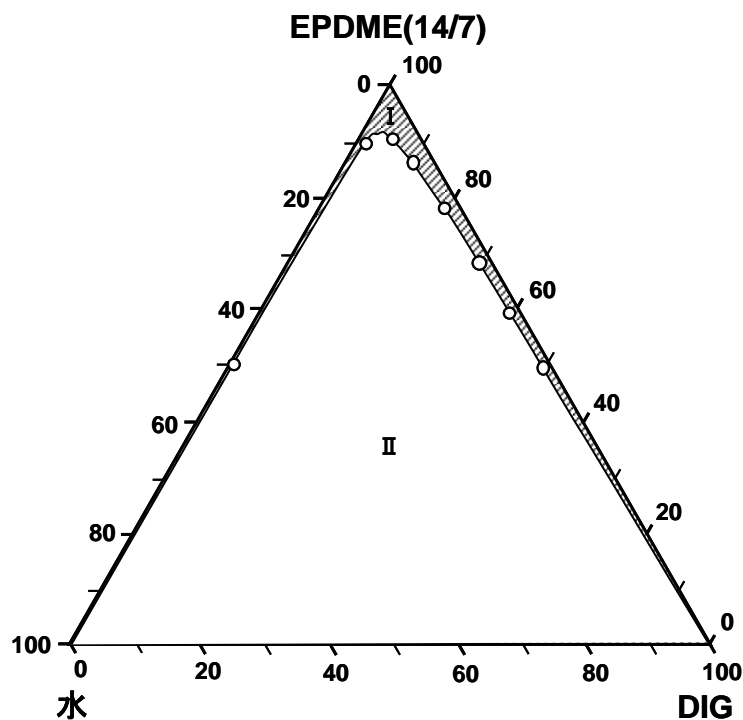


図 3-11. DIG/EPDME (14/7) /水 3 成分系相平衡図 (25 °C)

I : 1 相領域、II : 2 相領域

また、図 3-11 に 25°Cにおける DIG/EPDME (14/7) /水 3 成分系相平衡図を示すが、DIG と EPDME (14/7) の混合物中に少量の水が溶解する 1 相領域（図斜線部）が存在することから、EPDME (14/7) は極性油分である DIG 中に水を分配させる作用があることが分かった。

4. 考察

4.1. 本乳化系の乳化メカニズム

図 3-2 に本乳化系の乳化温度 70°Cにおける相平衡図を示したが、本基剤を得る乳化過程において、油相中にホモジナイザーで攪拌しながら水を添加する際に、界面張力が最も低くなる転相ラインを通過するため乳化粒子が微細化したと考えられる。また、本乳化過程において、乳化粒子の外側に α ゲル層が形成されることで強固な界面膜が形成され、且つこの転相点から更に水を添加して O/W 型エマルション領域に移行することで、安定性の良好な本基剤が得られたと考えられた。

一方、測定データは示さないが、DSC の測定結果から、本乳化系における EPDME(14/7) の配合濃度の上昇に伴い、本基剤の転相に由来した吸熱ピーク温度が低下したことから、

EPDME (14/7) は転相温度を乳化温度付近まで低下させることにより、乳化を容易にする効果があると推察された。

4.2. 層状構造を有する乳化粒子の形成メカニズム

図 3-8 で本基剤の油相（乳化温度 70℃においては D 相を形成）において 25℃でラメラ構造体の形成が確認されたことから、乳化時に油相が形成するラメラ状構造体が乳化粒子の外側に付着して層状構造を形成したものと推察された。

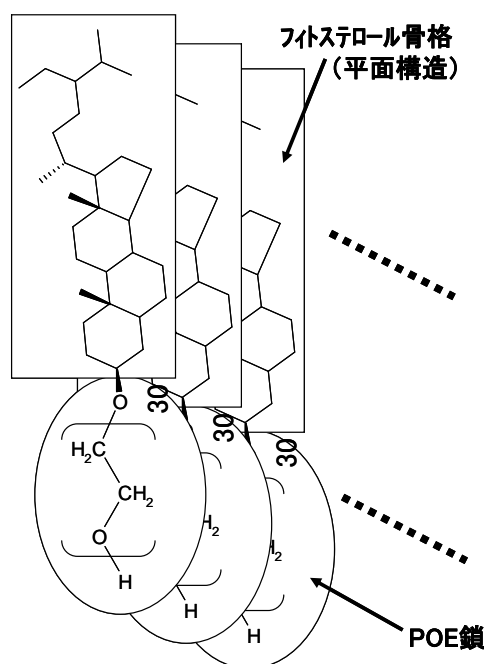


図 3-12. POE30PS のスタッキング構造のモデル図

図 3-12 に POE30PS のスタッキング構造のモデル図を示す。図 3-8 より、このラメラ状構造体の本体は β 結晶構造を形成する POE30PS であるが、POE30PS は嵩高くスタッキング性の高いフィトステロール骨格を有するため β 結晶構造を形成し易いと推察された。また、図 3-7 より本基剤の油相中では β 結晶構造形成には DIG が必須であり、図 3-6 から EPDME (14/7) は、本ラメラ状構造体の充填構造に対して何ら影響を及ぼさないことも分かった。

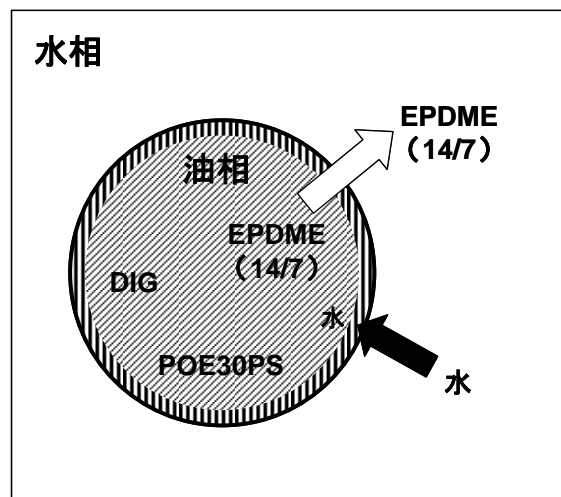


図 3-13. 層状構造形成のメカニズム

相図を用いた検討結果より、EPDME (14/7) を添加したことで下層の水相中に分散していた DIG の油滴が消失したことから、本乳化系における EPDME (14/7) の役割として、親水性界面活性剤である POE30PS を上層の極性油分 DIG 中に移行させる作用があると推察された。

以上の結果から、本乳化系における層状構造形成のメカニズムは以下のように考えることができる。即ち、図 3-13 に示すように、EPDME (14/7) は、極性油分である DIG 中に少量の水を分配させることにより、親水性界面活性剤である POE30PS を極性油分中に留める作用があるため、油/水界面である乳化粒子の外側にラメラ状構造体が形成されたと推察された。また、油相中に存在する EPDME (14/7) は水相中に溶解、拡散し、乳化粒子を構成する油相の融解温度を上昇させ、温度安定性の良好な乳化粒子を形成すると考えられた。

一方、本基剤の乳化粒子の内部構造を解析するため、本基剤を SAXS 測定した結果、上記ラメラ構造及び β 結晶構造由来の明確な回折ピークは認められなかった。この理由としては、乳化粒子形成により、ラメラ状構造体が乳化粒子の外側に球形に形成されたことでその異方性を失ったうえ、ラメラ状構造体の層数が少なく散乱強度が弱いことによると推察された。

近年、 α ゲル、液晶、ラメラ構造など細胞間脂質と類似構造を形成する製剤は肌荒れ改善効果に優れていたという報告例が散見される[3-23-3-30]。曾根らは、一連の飽和脂肪酸モノグリセリドが単独で閉じたラメラ構造（ラメラ型液晶）を形成し、これらをヒト皮膚に塗布すると角層水分含有量の上昇が見られたことを報告している[3-23]。また、高木は、ラットにセラミドのジアミド誘導体を 2 週間塗布した結果、無塗布においては明瞭なラメラ構造が観察されづらいが、ジアミド誘導体を塗布することにより、明瞭なラメラ構造が再び確認されるようになり、有意な TEWL の減少が認められた。また、乾燥性の低バリア肌にジ

アミド誘導体を連続塗布することにより、同濃度のワセリン塗布と同等のバリア補強効果を伴う肌改善を示したことを報告している[3-24]。一方、金は、水素添加大豆レシチン及びフィトステロールを主体とした液晶形成剤を用いると、容易に液晶エマルションが調製でき、この液晶エマルションが角層細胞間脂質に類似している構造をもっているため、皮膚に塗布した際に持続的な TEWL 低下効果を示したことを報告している[3-29]。

しかしながら層状構造形成製剤と肌荒れ改善効果との相関性を明らかにした報告例は無く、大変興味深い研究課題と思われる。本基剤の皮膚への作用メカニズムを含め、今後検討していきたいと考えている。

第 2 節

ステロール界面活性剤を使用した新規化粧品基剤の開発 II

難溶性紫外線吸収剤の可溶化

1. 緒言

近年、コレステロールを疎水基とする界面活性剤の研究が盛んに行われている[4-1-4-6]。Folmer らは、POE フィトステリルで研究を行った結果、POE 鎖が短い場合には広いラメラ相領域が出現し、POE 鎖が長い場合にはキュービック相とヘキサゴナル相が出現し、これらの液晶相は 100°C まで安定であることを報告している[4-7]。また、佐藤らは水/POE コレステリルの相挙動に関する研究を行った結果、POE コレステリルは、様々な自己組織体を水中で形成し、従来の非イオン型界面活性剤と比較して、リボン相領域が広いことを見出している。更に、前節でフィトステロールを疎水基とする界面活性剤を用いることにより、乳化粒子の外側に層状構造を伴う特殊なエマルションが得られることを報告した。これらの特殊な自己組織体の構造はステロール骨格特有の嵩高く大きな平面構造に由来していると推察される[4-8-4-11]。

一方、紫外線吸収剤やインドメタシン、フィナステリドなどの薬剤に代表される水難溶性物質は処方中で主に極性の高い油分に溶解した状態で用いられており、化粧水のように油分が少ない基剤に配合することは非常に困難であった。これら難溶性物質の多くは構造内に芳香族環のような平面構造を有しており、極性油中でも結晶化しやすい性質がある。今回、ステロール骨格を有する界面活性剤が嵩高く大きな平面構造を持っている点で、これら難溶性物質の可溶化に適しているのではないかと推察し[4-12]、紫外線吸収剤を被可溶化物としてフィトステロール骨格の界面活性剤を用いて検討することとした。

更に、Sabatini らはポリオキシエチレン系ノニオン界面活性剤の親水基と疎水基の間にポリオキシプロピレン基を導入すると可溶化量上がることを報告している[4-13]。このことから、本研究においても可溶化力を上げる目的でポリオキシプロピレン基を有するステロール系界面活性について検討し、ポリオキシエチレン(14 モル)・ポリオキシプロピレン(7 モル)ランダム共重合体ジメチルエーテル (以下、EPDME(14/7)と略す) を co-surfactant として用いることにより、非常に分子量の大きな紫外線吸収剤を更に多く可溶化させることができた。併せて、この特殊な可溶化現象についても考察した。

2. 実験

2.1. 使用物質

2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone、2-Ethylhexyl p-methoxycinnamate、4-t-Butyl-4'-methoxybenzoylmethane（以上、Givaudan Roure Co., France 製）、2-Ethylhexyl-2-ciano-3,3-dimethylacrylate(DSM Nutritional Products, Belgium 製)、2,4-Bis-[{4-(2-ethylhexyloxy)-2-hydroxy}-phenyl]-6-(4-methoxyphenyl)-1,3,5-triazine(以下,BEMT と略す)(CIBA Specialty Chemicals Inc., Switzerland 製)、2,4,6-Trianilino-p-(carbo-2'-ethylhexyl-1'-oxy)-1,3,5-triazine(BASF Co., Germany 製)は、それぞれそのまま用いた。これらの紫外線吸収剤の構造式をそれぞれ図 4-1 に示した。可溶化する界面活性剤としては図 4-2 に示すようなポリオキシプロピレン(m モル) ポリオキシエチレン(n モル)フィトステリル(以下、POm/EOn-PS と略す)を日光ケミカルズ(株)から提供を受け、それぞれそのまま用いた。相平衡図の作成には油分としてジイソステアリン酸グリセリル(以下、DIG と略す、太陽化学(株)、日本製)をそのまま用いた。EPDME(14/7)は日油(株)日本製のものをそのまま用いた。水はイオン交換水を用い、重水はAldrich 社、アメリカ製のものをを用いた。

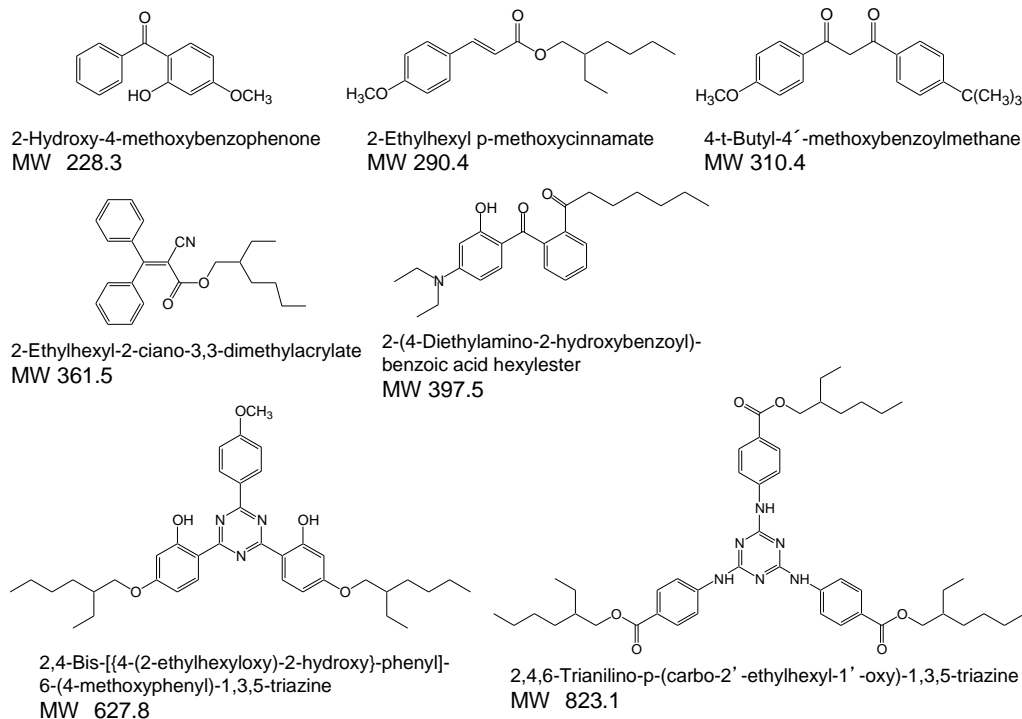


図 4-1. 紫外線吸収剤の化学構造式

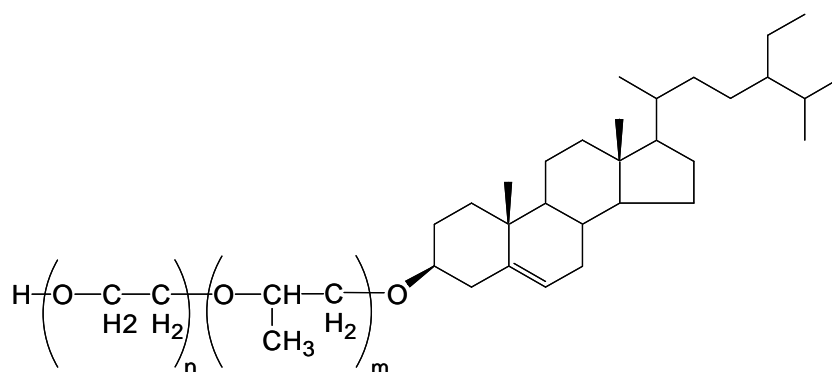


図 4-2. ポリオキシプロピレン (m mol) /ポリオキシエチレン (n mol) フィトステリル (POm / EO_n-PS) の化学構造式

2.2. 実験方法

2.2.1. 相平衡図の作成

EO30-PS-水-DIG、EO30-PS-50wt%EPDME(14/7)水溶液-DIG、PO7/EO30-PS-水-DIG について、それぞれ 25°Cにおける相平衡図を作成した。スクリュキャップ付試験管に界面活性剤と DIG の混合物を任意の割合で取り、80°Cに加熱して均一に溶解させたものと水を任意の割合で混合しサンプルとした。各サンプルはペンシルミキサーによる混合と遠心分離 (3000rpm) を繰り返し、完全に均一にし、25°Cに保存した。相状態の同定は、偏光板と目視、X 線回折により行った。X 線回折は高輝度 SAXS 装置 SAXSess(Anton Paar, Graz, Austria 製)を用いて行った。

2.2.2. フィトステロール型界面活性剤を用いた紫外線吸収剤の可溶化

親水鎖の異なる各種フィトステロール型界面活性剤としては EO30-PS, PO7/EO20-PS, PO7/EO30-PS, PO20/EO25-PS 及び PO20/EO30-PS をそれぞれ比較した。界面活性剤及び紫外線吸収剤をそれぞれ 80°Cで加熱溶解し、透明均一に溶解した。攪拌しながら常温の水に添加し可溶化液を得た。界面活性剤 0.4wt%、紫外線吸収剤 0.1wt%になるように調製し、試験試料とした。紫外線吸収剤の可溶化水溶液は目視による判定と Gretag Macbeth 社 (製)、Color-Eye 7000A 型色差計を用い、明度指数 (L 値) を測定して評価した。

2.2.3. EPDME(14/7)が PO7/EO30-PS の可溶化能に及ぼす影響

宮原らは、EPDME がポリオキシエチレン型非イオン界面活性剤のポリオキシエチレン

鎖に分配されることにより co-surfactant として機能し、マイクロエマルジョンの粒子径を小さくすることを報告している[4-14, 4-15]。そこで、EPDME(14/7)、PO7/EO30-PS と各量の BEMT を予め 80°C で加熱溶融し、最終濃度が EPDME(14/7) 2wt%、PO7/EO30-PS 0.4wt%、BEMT 0.1~0.4wt% となる様に調製した。EPDME(14/7) を含まない試料を対照とした。それぞれの試験試料について目視による判定と Gretag Macbeth 社（製）、Color-Eye 7000A 型色差計を用い、明度指数（L 値）を測定して評価した。

2.2.4. 各種フィトステロール型界面活性剤による BEMT の可溶化

親水鎖の異なる各種フィトステロール型界面活性剤としては EO30-PS, PO7/EO20-PS, PO7/EO30-PS, PO20/EO25-PS 及び PO20/EO30-PS をそれぞれ比較した。EPDME(14/7) 1g、界面活性剤 0.05~1g、BEMT 0.1g をそれぞれ 80°C で加熱溶融し、イオン交換水に加えて 10g とした。試験試料の最終濃度は EPDME(14/7) 10wt%、界面活性剤 0.5~10wt%、BEMT 1wt% である。それぞれの試験試料について目視による判定と Gretag Macbeth, Regensdorf, Switzerland（製）、Color-Eye 7000A 型色差計を用い、明度指数（L 値）を測定して評価した。

2.2.5. PO7/EO30-PS 及び EPDME(14/7) の自己拡散係数の測定

BEMT を可溶化した PO7/EO30-PS と EPDME(14/7) との相互作用を検討する目的で、PO7/EO30-PS のポリオキシプロピレン基及び EPDME(14/7) の末端メチル基の自己拡散係数をそれぞれ測定した[4-16, 4-17]。PO7/EO30-PS 0.4g、BEMT 0.1g、EPDME(14/7) 0.1g を 80°C で加熱溶融し、重水 7.9g 溶液中に添加してサンプルとした。また、PO7/EO30-PS 0.4g と BEMT 0.1g を同様に加熱融解して重水 8.0g に添加した試験試料と EPDME(14/7) 0.1g を重水 8.4g に溶解した溶液も同様に調製し、それぞれ比較対照とした。それぞれのサンプルを内径 5mm のサンプルチューブに入れ 25°C における自己拡散係数を日本電子（株）、東京製 JEOL JNM ECP-400 で測定した。

2.2.6. スピナー格子緩和時間の測定によるミセル内分子の運動性評価

EPDME(14/7) の添加による PO7/EO30-PS 分子のフィトステリル基及びミセル内分子のポリオキシプロピレン基（PO7/EO30-PS と EPDME(14/7) のポリオキシプロピレン基）の運動性に与える影響について、スピナー格子緩和時間の測定によって評価した。PO7/EO30-PS 0.4g、BEMT 0.1g、0.1~2.0g の EPDME(14/7) を 80°C で加熱融解し、水に添加して全量 8.5g としてサンプルとした（最終的な EPDME(14/7) 水溶液の濃度は 1.18 ~ 23.53 wt%）。それぞれのサンプルを内径 5mm のサンプルチューブに入れ、25°C におけるフ

イトステリル基とポリオキシプロピレン基のスピンー格子緩和時間を JEOL JNM ECP-400 で測定した。

3. 結果

3.1. フィトステロール系界面活性剤－水性成分－油分の相平衡図

EO30-PS－水－DIG、EO30-PS－50wt%EPDME(14/7)水溶液－DIG の 25°Cにおける相平衡図をそれぞれ図 4-3 及び図 4-4 に示した。図 4-3 で EO30-PS と DIG の混合物は広い範囲で固体(S)であり、X 線回折測定により β 型の結晶構造を有していることがわかった。また、広い範囲でヘキサゴナル液晶相とキュービック液晶相が認められたが、マイクロエマルジョンの領域は狭く、可溶化できる DIG 量も少ないことがわかった。これに対して、図 4-4 の相平衡図では、EO30-PS は 50wt%EPDME(14/7)水溶液中で白濁し、顕微鏡で観察した結果、針状結晶が認められた。また、DIG を含まない組成物はヘキサゴナル液晶とキュービック液晶中にも針状結晶が認められ(図 4-5)、DIG を含む組成物では消失した。

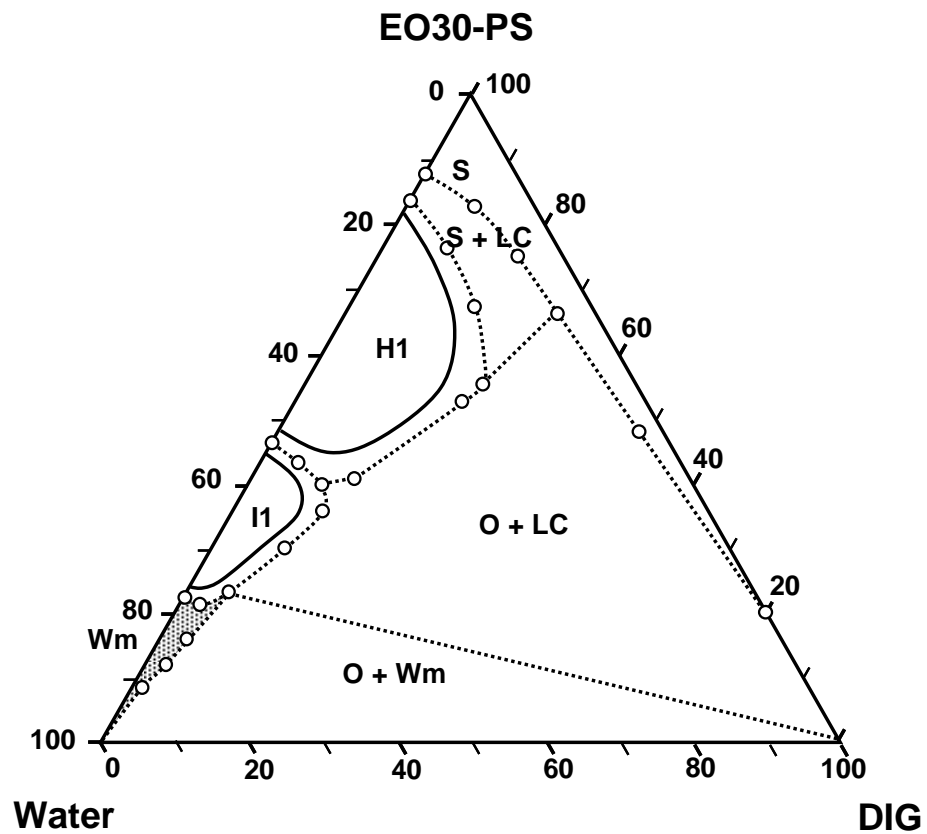


図 4-3. ポリオキシエチレン (30 mol) フィトステリル-水-グリセリルジイソステアレート系の相平衡図 (25 °C)

点線の領域はマイクロエマルジョン相を表す。次の略語が使用される。Wm: マイクロエマルジョン相 (ミセル水溶液)、S: 固相、H1: 六方晶液晶相、I1: 立方相、O: 油相、LC: 同定されていない液晶相との多相領域

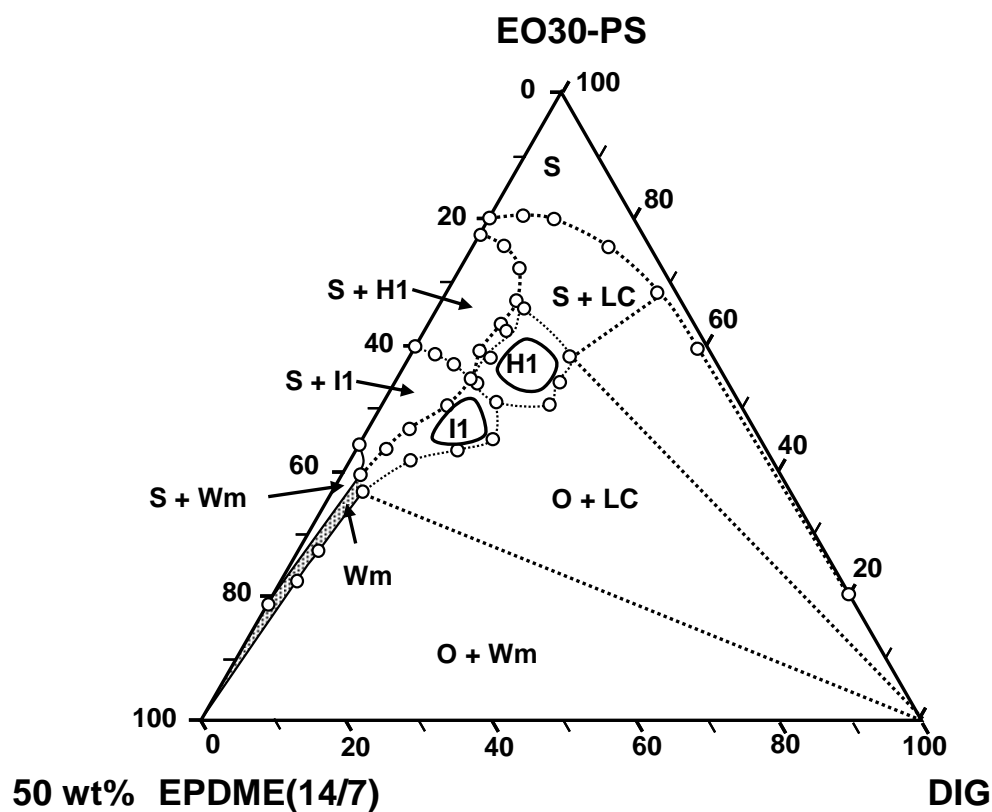


図 4-4. ポリオキシエチレン (30 mol) フィトステリル-50wt% ポリオキシエチレン (14 mol) / ポリオキシプロピレン (7 mol) ジメチルエーテル水溶液-グリセリルジイソステアレート系の相平衡図 (25 °C)

点線の領域はマイクロエマルジョン相を表す。次の略語が使用される。Wm: マイクロエマルジョン相 (ミセル水溶液)、S: 固相、H1: 六方晶液晶相、I1: 立方相、O: 油相、LC: 同定されていない液晶相との多相領域

次に、PO7/EO30-PS-水-DIG の相平衡図を図 4-6 に示した。PO7/EO30-PS は EO30-PS (図 4-3) に比較して、マイクロエマルジョン相の領域が広く、可溶化できる DIG の量も多いことがわかった。また、結晶領域は狭くなり、ヘキサゴナル液晶相とキュービック液晶相の領域は界面活性剤低濃度側にシフトした。

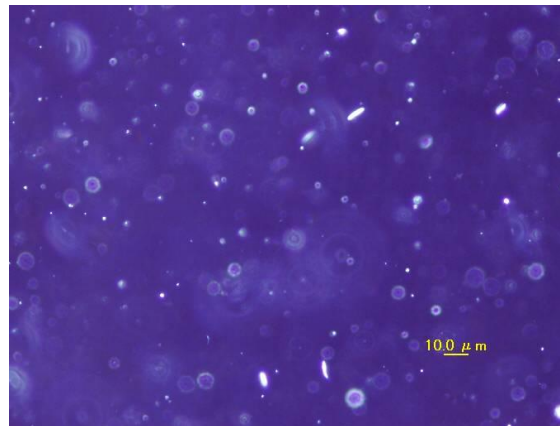


図 4-5. 立方相の顕微鏡写真：ポリオキシプロピレン (7 mol) / ポリオキシエチレン (30 mol) フィトステリル-50wt%ポリオキシエチレン (14 mol) / ポリオキシプロピレン (7 mol) ジメチルエーテル水溶液 (50:50) (×400)

顕微鏡写真は、交差偏光子によって撮影された。

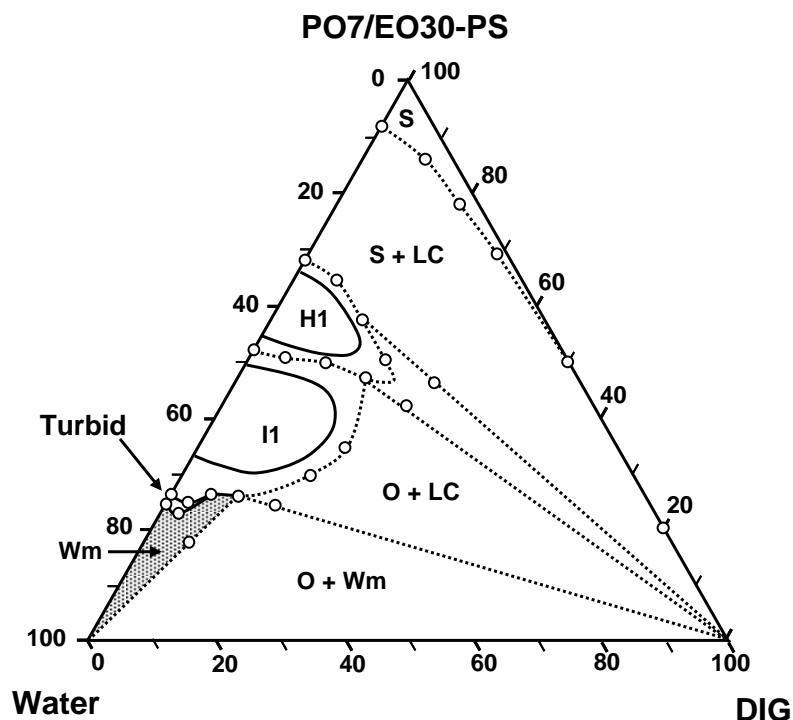


図 4-6. リオキシプロピレン (7 mol) /ポリオキシエチレン (30 mol) フィトステリル-水-グリセリルジイソステアレート系の相平衡図 (25 °C)

点線の領域はマイクロエマルジョン相を表す。次の略語が使用される。Wm: マイクロエマルジョン相 (ミセル水溶液)、S: 固相、H1: 六方晶液晶相、I1: 立方相、O: 油相、LC: 同定されていない液晶相との多相領域

3.2. フィトステロール系界面活性剤を用いた紫外線吸収剤の可溶化

様々なポリオキシプロピレン/ポリオキシエチレン鎖を親水基とするフィトステロール型界面活性剤による紫外線吸収剤の可溶化結果を表 4-1 に示した。表 4-1 から、PO20/EO30-PS では、各種紫外線吸収剤の可溶化能は概して高いことがわかった。また、紫外線吸収剤では、BEMT を可溶化した場合の L 値はどの界面活性剤を用いても高くなり、可溶化しやすいことがわかった。目視での可溶化の判定結果を記号で示したが、ステロール系界面活性剤にポリオキシプロピレン鎖を導入することにより、概して可溶化能が上がるが、その傾向は紫外線吸収剤の構造により変わることがわかった。また、非常に興味深いことに、油状の紫外線吸収剤である 2-Ethylhexyl-2-ciano-3,3- dimethylacrylate においても、可溶化限界を超えると白色～淡黄色の沈澱が析出することがわかった (表 4-1 の×、図 4-5)。

表 4-1. Solubilizing power of PO/EO - Phytosteryls with various PO/EO chain against UV absorbers

Solubilized UV Absorbers	PO/EO Chain of PO/EO-Phytosteryls				
	EO30	PO7/EO20	PO7/EO30	PO20/EO25	PO20/EO30
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone	6 (x)	93 (O)	9 (x)	23 (x)	39 (x)
2-Ethylhexyl p-methoxycinnamate	7 (x)	97 (◎)	17 (x)	41 (x)	90 (◎)
4-t-Butyl-4'-methoxybenzoylmethane	60 (x)	12 (x)	48 (x)	6 (x)	30 (x)
2-Ethylhexyl-2-ciano-3,3-dimethylacrylate	6 (x)	16 (x)	12 (x)	48 (Δ)	68 (Δ)
2-(4-Diethylamino-2-hydroxybenzoyl)-benzoic acid hexylester	6 (x)	6 (x)	5 (x)	76 (O)	74 (O)
2,4-Bis-[[4-(2-ethylhexyloxy)-2-hydroxy]-phenyl]-6-(4-methoxyphenyl)-1,3,5-triazine	90 (O)	86 (O)	95 (◎)	77 (O)	95 (◎)
2,4,6-Trianiino-p-(carbo-2'-ethylhexyl-1'-oxy)-1,3,5-triazine	7 (x)	7 (x)	38 (x)	58 (x)	42 (x)

*Numbers and parenthesis represent Lightness values and states, respectively.
◎, O, Δ, and x represent transparent, semitransparent, turbid, and precipitate, respectively.



図 4-7. 2-エチルヘキシル-2-シアノ-3,3-ジメチルアクリレート 0.1 wt%およびポリオキシエチレン (30 mol) フィトステリル 0.9 wt%で構成されたミセル溶液の写真

3.3. EPDME(14/7)が PO7/EO30-PS の可溶化能に及ぼす影響

表 4-2 から、明らかな様に、予め EPDME(14/7)を用いることにより BEMT の可溶化量は著しく増大し、PO7/EO30-PS 0.4wt%で 0.3wt%の BEMT をほぼ透明に可溶化できることが分かった。

表 4-2. Influence of EPDME(14/7) on solubilizing power of PO7/EO30-Phytosteryl

Solution	Concentration of 2,4-Bis-[[4-(2-ethylhexyloxy)-2-hydroxy]-phenyl]-6-(4-methoxyphenyl)-1,3,5-triazine			
	0.1 wt%	0.2 wt%	0.3 wt%	0.4 wt%
0.4 wt% PO7/EO30-PS with 2 wt% EPDME(14/7)	99 (◎)	94 (◎)	94 (◎)	79 (○)
0.4 wt% PO7/EO30-PS without 2 wt% EPDME(14/7)	99 (◎)	8 (△)	—	—

*Numbers and parenthesis represent Lightness values and states, respectively.
◎, ○, and △ represent transparent, semitransparent, and turbid, respectively.

3.4. 各種フィトステロール系界面活性剤による BEMT の可溶化

結果を表 4-3 に示した。3.2.項で述べた様に BEMT はどの親水鎖の界面活性剤に対しても可溶化できることがわかった。また、PO7/EO30-PS が最も BEMT の可溶化能が高く、2 wt%の PO7/EO30-PS で 1wt%の BEMT をほぼ透明に可溶化できることが分かった。

表 4-3. Solubilizing power of PO/EO - Phytosteryls against 2,4-Bis-[[4-(2-ethylhexyloxy)-2-hydroxy]-phenyl]-6-(4-methoxyphenyl)-1,3,5-triazine

Surfactants	Concentration of surfactant (wt%)					
	10.0	5.0	3.0	2.0	1.0	0.5
EO30-PS	99 (◎)	97 (◎)	93 (○)	14 (△)	3 (△)	3 (△)
PO7/EO30-PS	99 (◎)	98 (◎)	96 (◎)	92 (○)	3 (△)	4 (△)
PO20/EO30-PS	98 (◎)	97 (◎)	91 (○)	4 (△)	3 (△)	3 (△)
PO7/EO20-PS	98 (◎)	95 (◎)	92 (○)	85 (○)	11 (△)	3 (△)
PO20/EO20-PS	98 (◎)	97 (◎)	94 (○)	89 (○)	5 (△)	3 (△)

*Numbers and parenthesis represent Lightness values and states, respectively.
◎, ○, and △ represent transparent, semitransparent, and turbid, respectively.

3.5. PO7/EO30-PS 及び EPDME(14/7)の自己拡散係数の測定

BEMT を可溶化した PO7/EO30-PS のポリオキシプロピレン鎖の自己拡散係数は、EPDME(14/7)の有無に係わらず、ほぼ同じ値であった(表 4-4)。なお、PO7/EO30-PS と EPDME(14/7)を混合した場合は2つの化合物のポリオキシプロピレン鎖のケミカルシフト値に差がないため、PO7/EO30-PS と EPDME(14/7)のポリオキシプロピレン鎖の平均の自己拡散係数値を記載した。

一方、EPDME(14/7)の末端メチル基の自己拡散係数は EPDME(14/7)単独の水溶液では $4.1 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{sec}$ であったが、BEMT を可溶化した PO7/EO30-PS と共存することにより、 $2.5 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{sec}$ まで低下し、ポリオキシプロピレン鎖の自己拡散係数とほぼ同じ値になることがわかった。以上のことから、EPDME(14/7)の拡散速度が BEMT を可溶化した PO7/EO30-PS と共存することにより、低下してミセルの拡散速度とほぼ同じになることが示唆された。

表 4-4. Self-diffusion coefficient of polyoxypropylene (POP) groups at 25°C

Solutions		Self-diffusion coefficient ($\text{m}^2/\text{sec.}$)	
		POP chain of PO7/EO30-PS	Methyl end of EPDME(14/7)
PO7/EO30-PS*	with EPDME(14/7)	2.2×10^{-10}	2.5×10^{-10}
	without EPDME(14/7)	2.1×10^{-10}	—
EPDME(14/7) alone		—	4.1×10^{-10}

*: PO7/EO30-PS which solubilizes 2,4-Bis-[[4-(2-ethylhexyloxy)-2-hydroxy]-phenyl]-6-(4-methoxyphenyl)-1,3,5-triazine

3.6. スピナー格子緩和時間の測定によるミセル内分子の運動性評価

EPDME(14/7)量の増加に伴って、フィトステロール部分とポリオキシプロピレン鎖のスピナー格子緩和時間は上がり、5.88wt% EPDME(14/7)で最大となった(図 4-6)。スピナー格子緩和時間の上昇はミセル内分子の運動の上昇を意味するので、EPDME(14/7)によって、ミセルを構成する PO7/EO30-PS の分子内の運動性が高くなったことを意味している。EPDME(14/7)の濃度が更に高くなるとフィトステロール部分のスピナー格子緩和時間は大きく変わらないが、ポリオキシプロピレン鎖のスピナー格子緩和時間は低下し、EPDME(14/7)単独水溶液のスピナー格子緩和時間の値に近づくことがわかった。このことは、EPDME(14/7)の濃度が高くなるとミセルを構成する PO7/EO30-PS の分子内の運動性が高くなるために、フィトステロール部分のスピナー格子緩和時間は上がるが、ポリオキシプロピレン鎖に関しては、PO7/EO30-PS のポリオキシプロピレン鎖以外に水溶液中に単独で存在する EPDME(14/7)のポリオキシプロピレン鎖と平均化されるので、極大値を持つ

た上で EPDME(14/7)単独水溶液のスピンー格子緩和時間の値に近づくと推察された。

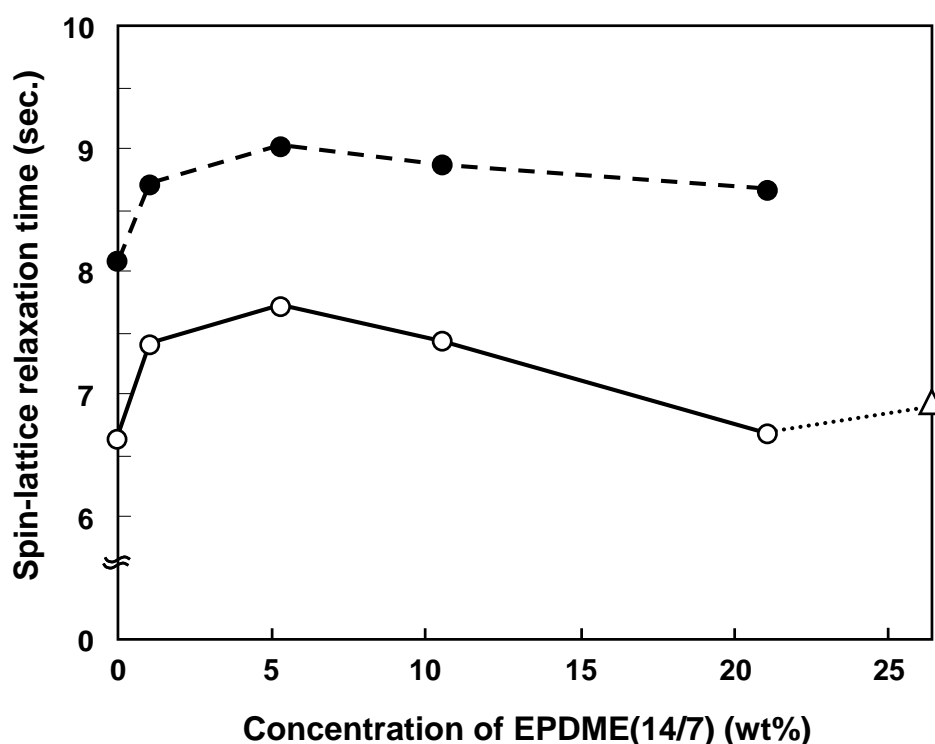


図 4-8. フィトステロールおよびポリオキシプロピレン基のスピン格子緩和時間

●、○及び△は、フィトステロール、ポリオキシプロピレン基、および EPDME (14/7) 単独をそれぞれ表す

4. 考察

4.1. フィトステロール系界面活性剤を用いた紫外線吸収剤の可溶化様式

図 4-3 に示す相図を見ることにより、EO30-PS のミセルが持つ形態を推測することが可能である[4-9]。HLB の高い多くのアルキル活性剤は水との 2 成分系において、活性剤高濃度の状態ではラメラ液晶が形成されるが、EO30-PS の場合は EO30-PS 90wt% 水 10wt% において結晶状態であり、液晶状態を取らなかった。このことは X 線回折によっても示唆された。EO30-PS は疎水基のパッキングする力が他の活性剤比べて非常に高いと考えられた。また、EO30-PS のようなフィトステロール骨格を有する活性剤が作るミセルは球状ではなく楕円状であるという報告がある[4-18]。

従来のアルキル活性剤のミセルはアルキル鎖が運動をしており、高濃度になった場合にも液晶状態を取るが、EO30-PS を用いたミセルは、ステロールのパッキングが強いことから疎水基が運動せず固体状態になっており、その周りをポリエチレングリコールが取り囲んだ微細固体分散状態になっていると考えられた。液状油分である 2-Ethylhexyl-2-ciano-

3,3-dimethylacrylate を用いて EO30-PS により可溶化を試みた場合、液状分離物ではなく固形物の分離が見られた(Fig.7)。これは EO30-PS の疎水基の間に 2-Ethylhexyl-2-ciano-3,3-dimethylacrylate がパリセード型に入り込み、微細に固体化していると考えられた(図 4-9 - (a))。

以上のように EO30-PS のマイクロエマルションは他の活性剤と異なり、疎水基の間に被可溶化物を取り込んだ超微細固体が、周囲をポリオキシエチレン鎖に囲まれて凝集を防がれた特殊な超微細エマルション様のものと推察した。前節において、DIG と EO30-PS を用いて層状構造を有する微細なエマルションを FF-TEM で確認している[4-9]が、フィトステロール基の結晶性の高さがこのような特殊な現象を起こしていると推察された。

一方、親水基と疎水基の間にポリオキシプロピレン鎖 7 モルを導入した PO7/EO30-PS の相図では、固体領域、ヘキサゴナル液晶相、キュービック液晶相の領域は狭くなった(図 4-3, 4-6)。これに関しては、ポリオキシプロピレン鎖の導入によって、疎水基の結晶性が下がったためと推察した。また、一般的な界面活性剤の場合にも、ポリオキシプロピレン鎖を導入することによって、マイクロエマルション相が広がることが報告されている[4-13]が、ステロール系界面活性剤についても DIG の可溶化領域は広がった。

4.2. フィトステロール系界面活性剤を用いた紫外線吸収剤(BEMT)の可溶化

BEMT は、平面構造の分子であり、また分子量が非常に大きいことから水中に可溶化することが困難である。フィトステロール系界面活性剤の場合には無色～青白色の透明な溶液が得られた(表 4-1)。これに関しては、フィトステリル基が平面構造の疎水基であることから、同じ平面構造の BEMT の間に入り込みやすく、可溶化力が高いものと推察した。また、ポリオキシエチレン鎖の短いもの(PO7/EO20-PS や PO20/EO25-PS)では、BEMT の可溶化力は EO30-PS より低くなったが、これに関しては界面活性剤の親水性が足りないためと推察した。しかしながら、全ての紫外線吸収剤が BEMT のようにうまく可溶化できるわけではなく、紫外線吸収剤の構造と可溶化に適したフィトステロール系界面活性剤の構造の関係は明確にはわからなかった。

EO30-PS に対してフィトステリル基とポリオキシエチレン基の間にポリオキシプロピレン基を付加した PO7/EO30-PS は殆どの紫外線吸収剤の可溶化力が高くなった。更に、PO20/EO30-PS では各紫外線吸収剤に対して最も高い可溶化力を示した。これに関してはポリオキシプロピレン基の挿入により、分子内に占める疎水基の割合が大きくなり、より多くの疎水の物質を可溶化可能になったためと推察した。

4.3. BEMT の可溶化に与える EPDME(14/7)の影響

BEMT に対して PO7/EO30-PS が 4 倍量あれば溶液は透明になるが、2 倍量になると白

濁し BEMT を可溶化することができなかった。一方、EPDME(14/7)と PO7/EO30-PS/BEMT を溶融させてから、水中に添加すると BEMT に対して PO7/EO30-PS が非常に少ない量 (4/3 倍量程度) で青白い透明な可溶化溶液を得ることが可能であった(表 4-2)。このことにより、EPDME(14/7)には PO7/EO30-PS が有する BEMT の可溶化力をさらに増大させる効果があることが示唆された。似た例として、油分の可溶化量を高めるために、ポリオキシエチレン・ポリオキシプロピレンブロック共重合体をブースターとして利用した報告がある[4-19, 4-20]。

更に、各種フィトステロール系界面活性剤について EPDME(14/7)を用いる調製方法で BEMT を可溶化させた結果、PO20/EO20-PS の様に親水性が最も低い界面活性剤でも EO30-PS よりも高い可溶化力を示した(表 3)。4.2.項で述べた親水性の低い界面活性剤が BEMT の可溶化力低いことと考え併せると、EPDME(14/7)がフィトステロール系界面活性剤の co-surfactant として機能して、BEMT の可溶化力を上げていることが示唆された。

4.4. NMR 測定によるフィトステロール系界面活性剤の運動性評価

3.5.項で EPDME(14/7)の末端メチル基の自己拡散係数は、EPDME(14/7)単独水溶液にくらべ PO7/EO30-PS の可溶化ミセルを含んだ EPDME(14/7)水溶液中での値の方が小さく、動きが制限されていることが示唆された(表 4)。またミセル (PO7/EO30-PS) 中の POP 基の示す自己拡散係数と EPDME(14/7)の自己拡散係数がほぼ同じ値であることから、ミセルと EPDME(14/7)は同じ動きをしている、つまりミセルの外側を EPDME(14/7)が覆うような構造をしていると考えられた。

3.6.項で PO7/EO30-PS の BEMT 可溶化ミセルに、EPDME(14/7)を添加するとスピナー格子緩和時間が長くなる傾向が見られた。スピナー格子緩和時間の上昇はミセル内分子の運動の上昇を意味するので、上記と併せて考えると EPDME(14/7)の添加によって、PO7/EO30-PS と BEMT の平面構造の配列間に EPDME(14/7)が入り込み、疎水基 (ポリオキシエチレン基、フィトステリル基) の運動性を上昇させていることが示唆された。更に、EPDME(14/7)が過剰に配合されると水相に溶解した EPDME(14/7)量が増えるので、EPDME(14/7)水溶液の示すスピナー格子緩和時間と近い値になると考えられた。

4.1.項でフィトステロール系界面活性剤のマイクロエマルションは他の活性剤と異なり、疎水基の間に被可溶化物を取り込んだ超微細固体が、周囲をポリオキシエチレン鎖に囲まれて凝集を防がれた特殊な超微細エマルション様のものと推察した(図 4-9-(a))。NMR 測定結果より、EPDME(14/7)は疎水基のパッキングの間に入り込み、その配列を緩めることにより、可溶化能を高めていることが示唆された(図 4-9-(b))。更に、ポリオキシエチレン鎖は、浸透圧によりエマルション油滴の凝集を防いでいることが報告されている[4-21]が、フィトステロール系界面活性剤のマイクロエマルションが超微細エマルション様のものであることを考えると、EPDME(14/7)は co-surfactant として親水基の密度を上げ

てこのマイクロエマルションの凝集とそれに続く沈殿を防いでいると推察された。

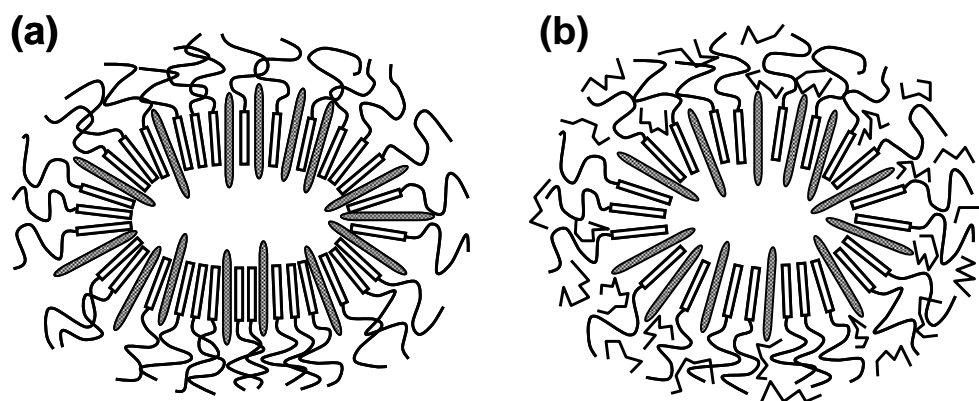


図 4-9. フィトステリル界面活性剤を使用した可溶化紫外線吸収剤の提案されたミセル構造モデル

ジグザグ線 ($\wedge\wedge\wedge$), ジグザグ線のある正方形 ($\square\text{---}\wedge\wedge\wedge$), 点線のバー (---) は、ポリオキシエチレン (14 mol) /ポリオキシプロピレン (7 mol) ジメチルエーテル、フィトステリル界面活性剤、紫外線吸収剤をソレゾレ表す

総括

本論文第1章では、「皮膚角層の物性に着目した素材創出に関する研究」として、優れた保湿剤であるヒアルロン酸にアセチル基を導入した新たな誘導体の合成に成功し、その物性とそれらが発揮するメカニズムについて検討を行った。本研究結果をまとめると、下記のように結論付けることができる。即ち、

(a) 両親媒性高分子 AcHA は、HA と比較して、優れた保湿効果と角層柔軟効果を示す。

(b) AcHA は疎水基が導入されたことにより、皮膚表面に効率的に吸着することで、強力な皮膚柔軟効果を発揮することが示唆された。本物理化学的特性から、皮表コンダクタンスの増加と同時に TEWL の減少をもたらしていると考えられる。

(c) 0.2% AcHA 配合化粧水の連用塗布試験結果から、AcHA が SDS で惹起された人工的な乾燥肌状態を改善できることが示された。

また、AcHA の強力な角層柔軟効果を説明するために、次のメカニズムが提案できる。即ち、

(i) 一般的に、保湿剤は角層に吸着し皮膚表面からの水分の蒸発を防ぐが、水分減少に伴い硬くなる傾向がある。しかしながら、AcHA は角層にしっかりと吸着することで、皮膚からの水分損失を防ぐと同時に優れた保湿能を発揮する。

(ii) AcHA は角層を十分柔らかくするのに役立ち、角層は長時間その水分増加を維持させることができると考えられる。

以上のことから、角層の結合水量を増加し、HA と比較して強力な皮膚柔軟効果を生むことにより、両親媒性高分子 AcHA が保湿効果を示すと結論付けることができる。本 AcHA の開発により、本節の冒頭で提案した高分子保湿剤の概念（図 2-1）が妥当であることが示された。

AcHA は、スキンケア製品の有効成分として価値があるだけでなく、肌を過度の乾燥から保護するサンケア製品にも役立つと考えられる。一方、ヘアケア製品では、AcHA はドライヤーや化学物質を使用した時に生じる枝毛等の髪へのダメージを改善することが可能である。また、メイクアップ用途の場合、AcHA は優れた保湿コーティング材料として働き、乾燥を減らし、多くのメイクアップ製品の性能を向上させることであろう。現在までに、AcHA は「スーパーヒアルロン酸」と称して、国内外を問わず現在でも 3,000 品以上の化粧料に配合されている。

一方、第2章では「皮膚角層の構造に着目した基剤創出に関する研究」として、閉塞性の高い角層細胞間脂質のラメラ構造に着目し、EPDME、ステロール系活性剤、極性油分を油相として調製した O/W 型エマルジョンの乳化粒子は、その外側に上記同様の層状構造を有する極めて特徴的な形態を有する O/W 型エマルジョンを調製できることを見出した。この特殊な自己組織体の構造はステロール骨格特有の嵩高く大きな平面構造に由来していると

推察される。本研究結果をまとめると、下記のように結論付けることができる。即ち、EPDME (14/7)、ステロール系界面活性剤、極性油分を油相として調製した O/W 型エマルションは、乳化粒子の外側に層状構造を伴った特徴的な形態であることを見出した。また、小角 X 線散乱 (SAXS) 測定結果から、本層状構造は、油相が形成するラメラ状構造体が乳化の際に乳化粒子の外側に付着したものと考えられた。また、本ラメラ状構造体は POE30PS と DIG により形成されることが示唆された。更に、EPDME (14/7) の本乳化系に対する役割として、親水性界面活性剤である POE30PS を極性油分中に留める作用があるため、層状構造を伴う特徴的な乳化粒子が形成されたと推察された。

これまで、従来紫外線吸収剤のように分子量が大きく、結晶性の高い水難溶性物質を油分の少ない可溶化系に配合することは非常に困難であった。これら難溶性物質の多くは構造内に芳香族環のような平面構造を有していることから、同様に嵩高く大きな平面構造であるステロール骨格を有する界面活性剤を用いることにより、安定かつ効果的に紫外線吸収剤を可溶化することが明らかとなった。本乳化系は他とは異なり、疎水基の間に被可溶化物を取り込んだ超微細固体が、周囲をポリオキシエチレン鎖に囲まれて凝集を防がれた特殊なものであると推察された。本微細個体は周囲をポリオキシエチレン鎖に囲まれて凝集を防がれた特殊な構造を有し、ポリオキシエチレン・ポリオキシプロピレンランダム共重合体ジメチルエーテルが疎水基のバックリングの間に入り込み、その配列を緩めることにより、紫外線吸収剤の可溶化量を高めることが示唆された。本知見によって、難溶性物質（紫外線吸収剤や医薬品成分等）を可溶化することにより、新しい機能を持った可溶化製剤の開発にも繋がっていけると考えている。

謝辞

著者らは、DSC 実験に関する有益なアドバイスを戴いた畠山立子博士、凍結レプリカ作製に多大な協力戴いた藤田技官、SAXS 測定に多大な協力戴いた荒牧賢治博士に心から感謝する。

参考文献

- 0-1 尾澤達也、保湿剤と皮膚保湿-最近の進歩、フレグランスジャーナル、14、pp. 43-54 (1975)
- 0-2 Blank, I., H., Factors which influence the water content of the stratum corneum, J. Invest. Dermatol., 18, pp. 433-440 (1952)
- 0-3 K, Laden, and R. Spitzer, Identification of a natural moisturizing agent in skin, J. Soc. Cosmet. Chem., 18, pp. 351-360 (1967)
- 0-4 Gaul, L. E. and Underwood, G. B. Relation of dew point and barometric pressure to chapping of normal skin. J. Invest. Dermatol. 19, pp. 9-19 (1952)
- 0-5 鹿子木 宏之、大森 隆司、「最近の保湿研究と保湿剤の開発動向--保湿剤開発の歴史をふまえて」フレグランスジャーナル 33(10), pp. 14-19 (2005)
- 0-6 Bos, J. D., and Meinardi, M. M. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. Exp. Dermatol., 9, pp. 165-169 (2000)
- 0-7 赤坂日出道、瀬戸進、柳光男、福島正二、光井武夫、Streptococcus zooepidemicus によるヒアルロン酸の工業生産に関する研究、日本化粧品技術者会誌、22(1)、p35 (1988)
- 0-8 Marta Calvo Catoira, Luca Fusaro, Dalila Di Francesco, Martina Ramella, and Francesca Boccafroschi, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 30, pp. 115-124 (2019)
- 0-9 Vinod B. Damodaran, Divya Bhatnagar, and N. Sanjeeva Murthy, An Overview. In: Biomedical Polymers. SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology. Springer, Cham Biomedical Polymers, pp1-22 (2016)
- 0-10 Carole E. Schantéa, Guy Zuber, Corinne Herlinb, Thierry F. Vandammea, Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications, Carbohydrate Polymers, 85, pp. 469-489 (2011)
- 0-11 Hyemin Kim, Hyeonseon Jeong, Seulgi Han, Songeun Beack, Byung Woo Hwang, Myeonghwan Shin, Seung Soo Oh, Sei Kwang Hahn, Hyaluronate and its derivatives for customized biomedical applications, Biomaterials, 123, pp. 155-171 (2017)
- 0-12 Corinne Eenschooten, Fanny Guillaumie, Georgios M. Kontogeorgis, Erling H. Stenby, Khadija Schwach-Abdellaoui, Preparation and structural characterisation of novel and versatile amphiphilic octenyl succinic anhydride-modified hyaluronic acid derivatives, Carbohydrate Polymers, 79, pp. 597-605 (2010)
- 0-13 Hyemin Kim, Myeonghwan Shin, Seulgi Han, Woosung Kwon, and Sei Kwang Hahn, Hyaluronic Acid Derivatives for Translational Medicines, Biomacromolecules,

- 20, pp. 2889-2903 (2019)
- 0-14 Gangliang Huang, and Junrong Chen, Preparation and applications of hyaluronic acid and its derivatives, *International Journal of Biological Macromolecules*, 125, pp. 478–484 (2019)
- 0-15 Song Yi Lee, and Hyun-Jong Cho, Mitochondria Targeting and Destabilizing Hyaluronic Acid Derivative-Based Nanoparticles for the Delivery of Lapatinib to Triple-Negative Breast Cancer, *Biomacromolecules*, 20, pp. 835-845 (2019)
- 0-16 Kong M. et al ., Construction of hyaluronic acid niosome as functional transdermal nanocarrier for tumor therapy *Carbohydrate Polymers*, 94, pp. 634-641 (2013)
- 0-17 Jonghwan Mun, Jee won Mok, Sanghoon Jeong, Seonghwi Cho, Choun-Ki Joo, and Sei Kwang Hahn, Drug-eluting contact lens containing cyclosporineloaded cholesterol-hyaluronate micelles for dry eye syndrome, *RSC Adv.*, 2019, 9, 16578–16585
- 0-18 Laura Mayola, Marco Biondia, Luisa Russoc, Birgitte M. Malled, Khadija Schwach-Abdellaouid, Assunta Borzacchiello, Amphiphilic hyaluronic acid derivatives toward the design of micellesfor the sustained delivery of hydrophobic drugs, *Carbohydrate Polymers*, 102, pp. 110– 116 (2014)
- 0-19 L.E. Uche, G.S. Gooris, C.M. Beddoes, and J.A. Bouwstra, New insight into phase behavior and permeability of skin lipid models based on sphingosine and phytosphingosine ceramides, *BBA – Biomembranes*, 1861, pp. 1317–1328 (2019)
- 0-20 HiroshiWatanabea, Yasuko Obataa, Kenya Ishidab, and Kozo Takayamaa, Effect of l-menthol on the thermotropic behavior of ceramide 2/cholesterol mixtures as a model for the intercellular lipids in stratum corneum, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 73, pp. 116–121 (2009)
- 1-1 Mackenzie I. C., "The Cellular Architecture of the Stratum Corneum," in *Stratum Corneum*, Marks R. and Plewig G., Eds. (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1983), pp. 146-152
- 1-2 Marks R., and Barton S. P., "The Significance of the Size and Shape of Corneocytes," in *Stratum Corneum*, Marks R. and Plewig G., Eds. (Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1983), pp. 161-170
- 1-3 Plewig G., Scheuber E., B. Reuter, and Waidelich W., "Thickness of Corneocytes," in *Stratum Corneum*, Marks R. and Plewig G., Eds. (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1983), pp. 171-174
- 1-4 Rook A., D. Wilkikson S., and Ebling F. J. G., *Textbook of Dermatology* (Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne, 1972), pp. 249-255

- 1-5 Tagami H., Iwase Y., Yoshikuni K., Inoue K., and Yamada M., "Water Sorption-Desorption Test of the Skin Surface In Vivo," in *Stratum Corneum*, Marks R. and Plewig G., Eds. (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1983), pp. 248-251
- 1-6 Schurer N. Y. and Elias P. M., "The Biochemistry and Function of Stratum Corneum Lipids," in *Advances in Lipid Research*, Elias P. M., Ed. (Academic Press, San Diego, 1991), 24, pp. 27-56
- 1-7 Elias P. M., Epidermal lipids, barrier function and desquamation, *J Invest. Dermatol.*, 80, pp. 44-49 (1983)
- 1-8 Anderson R. L., Cassidy J. M., Hansen J. R., and Yellin W., Hydration of stratum corneum, *Biopolymers*, 12, pp. 2789-2802 (1973)
- 1-9 Blank I. H., Factors which influence the water content of the stratum corneum, *J. Invest. Dermatol.*, 18, pp. 433-440 (1952)
- 1-10 Park A. C., and Baddiel C. B., Rheology of stratum corneum II: A physico-chemical investigation of factors influencing the water content of the corneum. *J Soc. Cosmet. Chem.*, 23, pp. 13-21 (1972)
- 1-11 Tregear R. T., *Physical Function of Skin* (Academic Press, London, New York, 1966), pp. 53-72
- 1-12 Imokawa G., Kuno H., and Kawai M., Stratum Corneum Lipids Serve as a Bound-Water Modulator, *J Invest. Dermatol.*, 96, pp. 845-51 (1991)
- 1-13 Ozawa T., Nishiyama S., Horii I., Kawasaki K., Kumano Y., and Nakayama Y., Humectants and their effects on the moisturization of skin, *Skin Res.*, 27, pp. 276-288 (1985)
- 1-14 Tonooka N., Water-holding property of sodium hyaluronate, *Skin Res.*, 27, pp. 296-302 (1985)
- 1-15 Abatangelo G., Barbucci R., Brun P., and Lamponi S., Biocompatibility and enzymatic degradation studies on sulfated hyaluronic acid derivatives, *Biomaterials*, 18(21), pp. 1411-1415 (1997)
- 1-16 Christophers E. and Kligman A. M. Visualisation of the cell layers of the stratum corneum, *J. Invest. Dermatol.*, 42, pp. 407-409 (1964)
- 1-17 Kligman A. M., and Christophers E., Preparation of isolated sheets of stratum corneum, *Arch. Dermatol.*, 88, pp. 702-5 (1963)
- 1-18 Tanghe L. J., L. Genung B., and Mench J. W., "Acetylation of Cellulose," in *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Whistler R. L., Ed. (Academic Press, New York, 1963), 3, pp. 193-198
- 1-19 Takahashi M., Yamada M., and Machida Y., A new method to evaluate the softening effect of cosmetic ingredients on the skin, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 35, pp. 171-181 (1984)

- 1-20 Hatzis J., and Marks R., "The Relationship Between Conductance and Capacitance Measurements and Skin Surface Contour During Hydration of the Stratum Corneum," in *Stratum Corneum*, Marks R. and Plewig G., Eds. (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1983), pp. 257-261
- 1-21 Tagami H., Ohi M., Iwatsuki K., Kanamaru Y., M. Yamada, and B. Ichijo, Evaluation of the skin surface hydration in vivo by electrical measurement, *J. Invest. Dermatol.*, 75, pp. 500-507 (1980)
- 1-22 Tagami H., Ohi M., Iwatsuki K., and Yamada M., "Electrical Measurement of the Hydration State of the Skin Surface In Vivo," in *Stratum Corneum*, Marks R. and Plewig G., Eds. (Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1983), pp. 252-256
- 1-23 Cua A. B., Whilhelm K. P., and Maibach H. I., Elastic properties of human skin: relation to age, sex, and anatomical region, *Arch. Dermatol. Res.*, 282, pp. 283-288 (1990)
- 1-24 Freijlarsson C., Nylander T., Jannasch P., and Wesslen B., Adsorption behaviour of amphiphilic polymers at hydrophobic surfaces—Effects on protein adsorption, *Biomaterials*, 17(22), pp. 2199-2207 (1996)
- 1-25 Andrew W. F., and Gregory J. K., Stratum Corneum Lipid Abnormalities in Surfactant-Induced Dry Scaly Skin. *J Invest. Dermatol.*, 86, pp. 598-602 (1986)
- 1-26 Wichrowski K., Sore G., and Khaiat A., Use of infrared spectroscopy for in vivo measurement of the stratum corneum moisturization after application of cosmetic preparation, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 35, pp. 171-181 (1984)
- 1-27 Jokura Y., Ishikawa S., Tokuda H., and Imokawa G., Molecular analysis of elastic properties of the stratum corneum by solid-state ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J. Invest. Dermatol.*, 104, pp. 806-812 (1995)
- 2-1 Chernosky M. E., Clinical aspects of dry skin, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 27, pp. 365-376 (1976)
- 2-2 Rawlings A. V., Scott I. R., and Bowser P. A., Stratum corneum moisturization at the molecular level, *J. Invest. Dermatol.*, 103, pp. 731-740 (1994)
- 2-3 Imokawa G, and Hattori M., A possible function of structural lipid in the water holding properties of the stratum corneum, *J. Invest. Dermatol.*, 84, pp. 282-284 (1985)
- 2-4 Yamamura T., and Tezuka T., The water-holding capacity of the stratum corneum measured by ¹H-NMR. *J. Invest. Dermatol.*, 93, pp. 160-164 (1989)
- 2-5 Denda M, Kitamura K, Elias P. M., and Feingold K. R., trans-4-(Aminomethyl) cyclohexane carboxylic acid (T-AMCHA), an anti-fibrinolytic agent, accelerates barrier recovery and prevents the epidermal hyperplasia induced by epidermal injury in hairless

- mice and humans, *J. Invest. Dermatol.*, 109, pp. 84–90 (1997)
- 2-6 Blank I. H., Further observations on factors which influence the water content of the stratum corneum, *J. Invest. Dermatol.*, 21, pp. 259–271 (1953)
- 2-7 Foreman M. I., A proton magnetic resonance study of water in human stratum corneum, *Biochim. Biophys. Acta*, 437, pp. 591–603 (1976)
- 2-8 Blank I. H., Factors which influence the water content of the stratum corneum, *J. Invest. Dermatol.*, 18, pp. 433–440 (1952)
- 2-9 Park A. C., and Baddiel C. B., Rheology of stratum corneum II: A physico-chemical investigation of factors influencing the water content of the corneum. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 23, pp. 13–21 (1972)
- 2-10 Takenouchi M., Suzuki H., and Tagami H., Hydration characteristics of pathologic stratum corneum - Evaluation of bound water, *J. Invest. Dermatol.*, 87(5), pp. 574–576 (1986)
- 2-11 Denda M., Koyamma J., Namba R., and Horii I., Stratum corneum lipid morphology and transepidermal water loss in normal skin and surfactant-induced scaly skin, *Arch. Dermatol. Res.*, 286, pp. 41–46 (1994)
- 2-12 Andrew W. F., and Gregory J. K., Stratum Corneum Lipid Abnormalities in Surfactant-Induced Dry Scaly Skin. *J. Invest. Dermatol.*, 86, pp. 598–602 (1986)
- 2-13 Elias P. M., Epidermal lipids, barrier function and desquamation, *J. Invest. Dermatol.*, 80, pp. 44–49 (1983)
- 2-14 Cua A. B., Wilhelm K. P., and Maibach H. I., Elastic properties of human skin: relation to age, sex, and anatomical region, *Arch. Dermatol. Res.*, 282, pp. 283–288 (1990)
- 2-15 Imokawa G., Kuno H., and Kawai M., Stratum Corneum Lipids Serve as a Bound-Water Modulator, *J. Invest. Dermatol.*, 96, pp. 845–51 (1991)
- 2-16 Ozawa T., Nishiyama S., Horii I., Kawasaki K., Kumano Y., and Nakayama Y., Humectants and their effects on the moisturization of skin, *Skin Res.*, 27, pp. 276–288 (1985)
- 2-17 Kumano Y., Moisturizing effect of skin moisturizing and beauty essence, *Fragrance J.*, 79, pp. 64–71 (1986)
- 2-18 Tonooka N., Water-holding property of sodium hyaluronate, *Skin Res.*, 27, pp. 296–302 (1985)
- 2-19 Oka T., Uemura M., Ueno N., and Yanaki T., Skin-softening effect of acetylhyaluronate on stratum corneum, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 50, pp. 171–84 (1999)
- 2-20 Walkley K., Bound water in stratum corneum measured by differential scanning calorimetry., *J. Invest. Dermatol.*, 59, pp. 225–227 (1972)

- 2-21 Jacobi O. T., and Pro Si Sect, About the mechanism of moisture regulation in the horny layer of the skin, *Proc. Sci. Sect. Toilet Goods Assoc.*, 31, pp. 22–24 (1959)
- 2-22 Bulgin J. J., and Vinson I. J., The use of differential thermal analysis to study the bound water in stratum corneum membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, 136, pp. 551–560 (1967)
- 2-23 Middleton J. D., The mechanism of water binding in stratum corneum, *Br. J. Dermatol.*, 80, pp. 437–450 (1968)
- 2-24 Inoue T., Tsujii K., Okamoto K., and Toda K., Differential calorimetric studies on the melting behavior of water in stratum corneum, *J. Invest. Dermatol.*, 86(6), pp. 689–693 (1986)
- 2-25 Kligman A. M., and Christophers E., Preparation of isolated sheets of stratum corneum, *Arch. Dermatol.*, 88, pp. 702–705 (1963)
- 2-26 Tanghe L. J., Genung L. B., and Mench J. W., "Acetylation of Cellulose," in *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Whistler R. L., Ed., Academic Press, New York (1963), 3, pp. 193–198
- 2-27 Nakamura K., Hatakeyama T., and Hatakeyama H., Relationship between hydrogen bonding and bound water in polyhydroxystyrene derivatives, *Polymer*, 24, pp. 871–876 (1983)
- 2-28 Hatakeyama T., Yoshida H., and Hatakeyama H., A differential scanning calorimetry study of the phase transition of the water-sodium cellulose sulphate system, *Polymer*, 28, pp. 1282–1286 (1987)
- 2-29 Takahashi M., Yamada M., and Machida Y., A new method to evaluate the softening effect of cosmetic ingredients on the skin, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 35, pp. 171–181 (1984)
- 2-30 Ishihara K., Ueda T., and Nakabayashi N., Preparation of Phospholipid Polymers and Their Properties as Polymer Hydrogel Membranes, *Polym J.*, 22(5), pp. 355–360 (1990)
- 2-31 Ishihara K., and Nakabayashi N., Specific interaction between water - soluble phospholipid polymer and liposome, *J Polym Sci Part A*, 29, pp. 831–835 (1991)
- 3-1 Ohmori T., Yamamura Y., Nakayama K., Miyahara R., Hosokawa K., Maruyama K., Okamoto T., and Kakoki H., Development of Novel Multifunctional Cosmetic Row Materials and Their Applications. I. Characterization of a Random Copolymer of Polyoxyethylene/Polyoxypropylene Dimethyl Ether, *J. Oleo Sci.*, 55, pp. 365–375 (2006)
- 3-2 Allgair J., Poppe J., Willner L., and Richter D., Synthesis and Characterization of Poly[1,4-isoprene-b-(ethyleneoxide)] and Poly[ethylene-co-propylene-b-(ethylene oxide)] Block Copolymers, *Macromolecules*, 30, pp. 1582–1586 (1997)

- 3-3 Jakobs B., Sottmann T., and Stray R., Amphiphilic Block Copolymers as Efficiency Boosters for Microemulsions, *Langmuir*, 15, pp. 6707-6711 (1999)
- 3-4 Byelov D., Frielinghaus H., Holderer O., Allgaier J., and Richter D. Microemulsion Efficiency Boosting and the Complementary Effect.1. Structural Properties, *Langmuir*, 20, pp. 10433-10443 (2004)
- 3-5 Bates F. S., Maurer W. W., Lipic P. M., Hillmyer M. A., Almdal K., Mortensen K., Fredrickson G. H., and Lodge T. P., Polymeric Bicontinuous Microemulsion, *Phys. Rev. Lett.*, 79, pp. 849-852 (1997)
- 3-6 Poppe A., Wülfner L., Allgaier J., Stellbrink J., and Richter D., Structural Investigation of Micelles Formed by an Amphiphilic PEP-PEO Block Copolymer in Water, *Macromolecules*, 30, pp. 4762-7471 (1997)
- 3-7 Miyahara R., Watanabe K., Ohmori T., and Nakama Y., Development of Novel Multifunctional Cosmetic Row Materials and Their Applications. II. Novel Emulsifying Method with Random Copolymer of Polyoxyethylene/Polyoxypropylene, *J. Oleo Sci*, 55, pp. 403-411 (2006)
- 3-8 Miyahara R., Watanabe K., Ohmori T., and Nakama Y., Development of Novel Multifunctional Cosmetic Row Materials and Their Applications. III. Effect of Random Copolymer of Polyoxyethylene/Polyoxypropylene on Self-organizing Structures of Nonionic Surfactants, *J. Oleo Sci*, 55, pp. 473-482 (2006)
- 3-9 Schrader K., Use of phytosterols in cosmetic products, *Drug & Cosmetic Industry*, 133, pp. 34-35 (1983)
- 3-10 Schrader, K. The use of phytosterols as emulsifiers in cosmetic products. *Prodotto Chimico & Aerosol Selezione*, 19, pp. 22-26 (1982)
- 3-11 Mueller-Goymann C., Liquid crystals in emulsions, creams, and gels containing ethoxylated sterols as surfactant, *Pharmaceutical Research*, 4, pp. 154-158 (1984)
- 3-12 Svensson M., "Novel Surfactants: Preparation, Applications and Biodegradability" (K. Holmberg, Ed.), 179, Dekker, New York, (1988)
- 3-13 Baade, S., and Mueller-Goymann, C. C. Lidocaine and soyasterole-PEG-16-ether – investigations on the interaction between an amphiphilic drug and a nonionic surfactant in aqueous solution, *Colloid Polym. Sci.*, 272, pp. 228-235 (1994)
- 3-14 Lundmark L., Chun H., and Melby A., Soya Sterols: Functional Plant-Driven Ingredients for Toiletries – Part I, *Soap Cosmet. Chem. Spec.* Vol. Dec., pp. 33-40 (1976)
- 3-15 Lundmark L., Chun H., and Melby A., Soya Sterols: Functional Plant-Driven Ingredients for Toiletries – Part II, *Soap Cosmet. Chem. Spec.* Vol. Jan., pp. 33-36 (1977)
- 3-16 Folmer B. M., Svensson M., Holmberg K. and Brown W., The Physicochemical Behavior of Phytosterol Ethoxylates, *J. Colloid and Int. Sci.*, 213, pp. 112-120 (1999)

- 3-17 Sato T., M. Hossain K., Acharya D. P., Glatter O., Chiba A., and Kunieda H., Phase Behavior and Self-Organized Structures in Water/Poly(oxyethylene) Cholesteryl Ether Systems, *J. Phys. Chem. B*, 108, pp. 12927-12939 (2004)
- 3-18 Takahashi S., Ikkai Y., Rodriguez-Abreu C., Aramaki K., Ohsuna T., and Sakamoto K., Application of a Water Soluble Alkoxysilane for the Formation of Mesoporous Silica from Nonionic Surfactant Micelles Bearing Cholesterol, *Chemistry Letters*, 36 (1), pp. 182-183 (2007)
- 3-19 Karlström G., A New Model for Upper and Lower Critical Solution Temperatures in Poly (ethylene oxide) Solutions, *J. Phys. Chem.*, 89, pp. 4962-4964 (1985)
- 3-20 Imae T., Iwamoto T., Platz G., and Thunig C., Electron microscopic and light scattering observation on a system with two iridescent phases, *J. Colloid and Polym. Sci.*, 272, pp. 604-611 (1994)
- 3-21 Jahn W., and Stray R., Microstructure of Microemulsions by Freeze Fracture Electron Microscopy, *J. Phys. Chem.*, 92, pp. 2294-2301 (1992)
- 3-22 Watanabe K., Noda A., Masuda M., Kimura T., Komatsu K., and Nakamura K., Bicontinuous Microemulsion Type Cleansing Containing Silicone Oil, II. *J. Oleo Sci.*, 53, pp. 547-555 (2004)
- 3-23 SONE T., HANAMIZU T., YOSHIKAWA S., ICHIKAWA M., and YOKOKURA T., Moisturizing Effect of Lipids Forming Lamellar Structures, *J. Japan Cosmet. Sci. Soc.*, 18 (4), pp. 186-192 (1994)
- 3-24 Takagi Y., The reinforcement of epidermal permeability barrier in Atopic Dermatitis, *Fragrance J.*, 31 (6), pp. 34-39 (2003)
- 3-25 Inoue S., Strategy and development of a new serine derivative, β -galactosyl-L-serine-diamide for cosmetic use, *Fragrance J.*, 31, No. 11, pp. 31-35 (2003)
- 3-26 Takagi Y., Okada J., Water holding function and application of ceramide to skin care products, *Fragrance J.*, 33 (10), pp. 42-50 (2005)
- 3-27 Kaise C., and Kaneko T., Stabilization and Application of Liposomal Structures Containing Sphingomyelin, *J. Soc. Cosmet. Chem. Japan*, 40 (4), pp. 269-277 (2006)
- 3-28 Sano T., The recent progress of formulation technologies, *Fragrance J.*, 34(9), pp. 44-52 (2006)
- 3-29 Kim I., A new mimic structure of intercellular lipids based on O/LC/W emulsions for highly strengthening skin barrier function, *Fragrance J.*, 35 (1), pp. 84-86 (2007)
- 3-30 Urayama T., Development of vesicle formulation containing ceramides, *Fragrance J.*, 35 (4), pp. 58-64 (2007)
- 4-1 Schrader K., Use of phytosterols in cosmetic products, *Drug & Cosmetic Industry*,

- 133, pp. 34-35 (1983)
- 4-2 Schrader K., The use of phytosterols as emulsifiers in cosmetic products, *Prodotto Chimico & Aerosol Selezione*, 19, pp. 22-26 (1982)
- 4-3 Mueller-Goymann C., Liquid crystals in emulsions, creams, and gels containing ethoxylated sterols as surfactant, *Pharmaceutical Research*, 4, pp. 154-158 (1984)
- 4-4 Svensson, M. *Novel Surfactants: Preparation, Applications and Biodegradability* (Holmberg, K. Ed.), Dekker, New York, pp.179, (1988)
- 4-5 Baade, S., Mueller-Goymann, C. C., Lidocaine and soyasterole-PEG-16-ether investigations on the interaction between an amphiphilic drug and a nonionic surfactant in aqueous solution, *Colloid Polym. Sci.*, 272, pp. 228-235 (1994)
- 4-6 Lundmark L., Chun H., and Melby A., Soya Sterols: Functional Plant-Driven Ingredients for Toiletries – Part I, *Soap Cosmet. Chem. Spec.*, Vol. Dec., pp. 33-40 (1976)
- 4-7 Lundmark L., Chun H., and Melby A., Soya Sterols: Functional Plant-Driven Ingredients for Toiletries – Part II, *Soap Cosmet. Chem. Spec.* Vol. Jan., pp. 33-36 (1977)
- 4-8 Folmer B. M., Svensson M., Holmberg K. and Brown W., The Physicochemical Behavior of Phytosterol Ethoxylates, *J. Colloid and Int. Sci.*, 213, pp. 112-120 (1999)
- 4-9 Oka T., Miyahara R., Teshigawara T., and Watanabe, K., Development of novel cosmetic base using sterol surfactant. I. Preparation of novel emulsified particles with sterol surfactant. *J. Oleo Sci.* 57, pp. 567-575 (2008).
- 4-10 Sato T., M. Hossain K., Acharya D. P., Glatter O., Chiba A., and Kunieda H., Phase Behavior and Self-Organized Structures in Water/Poly(oxyethylene) Cholesteryl Ether Systems, *J. Phys. Chem. B*, 108, pp. 12927-12939 (2004)
- 4-11 Takahashi S., Ikkai Y., Rodriguez-Abreu C., Aramaki K., Ohsuna T., and Sakamoto K., Application of a Water Soluble Alkoxysilane for the Formation of Mesoporous Silica from Nonionic Surfactant Micelles Bearing Cholesterol, *Chemistry Letters*, 36 (1), pp. 182-183 (2007)
- 4-12 Söderlind, E. Patent WO/2003/039511
- 4-13 Sabatini, D. A. Advanced Surfactant Microemulsions: Technology Development / Application. Abstracts, *The 45th Annual Meeting of the Japan Oil Chemists' Society*. Noda. p.53 (2006)
- 4-14 Miyahara R., Watanabe K., Ohmori T., and Nakama Y., Development of Novel Multifunctional Cosmetic Raw Materials and Their Applications. II. Novel Emulsifying Method with Random Copolymer of Polyoxyethylene/Polyoxypropylene, *J. Oleo. Sci.*, 55, pp. 403-411 (2006)
- 4-15 Miyahara R., Watanabe K., Ohmori T., and Nakama Y., Development of Novel

- Multifunctional Cosmetic Row Materials and Their Applications. III. Effect of Random Copolymer of Polyoxyethylene/Polyoxypropylene on Self-organizing Structures of Nonionic Surfactants, *J. Oleo. Sci.*, 55, pp. 473-482 (2006)
- 4-16 Saito, H., Yokoi, M., and Yoshioka, Y., Effect of hydration on conformational change or stabilization of (1 → 3) b-Dglucans of various chain lengths in the solid state as studied by high-resolution solid state ¹³C-NMR spectroscopy, *Macromolecules*, 22, pp. 3892-3898 (1989)
- 4-17 Jerschow, A., and Müller, N., Diffusion-separated nuclear magnetic resonance spectroscopy of polymer mixtures. *Macromolecules*, 31, pp. 6573-6578 (1998)
- 4-18 Folmer B. M., Svensson M., Holmberg K., and Brown W., The Physicochemical Behavior of Phytosterol Ethoxylates, *J. Colloid and Int. Sci.*, 213, pp. 112-120 (1999)
- 4-19 Jakobs B., Sottmann T., and Stray R., Amphiphilic Block Copolymers as Efficiency Boosters for Microemulsions, *Langmuir*, 15, pp. 6707-6711 (1999)
- 4-20 Byelov D., Frielinghaus H., Holderer O., Allgaier J., and Richter D. Microemulsion Efficiency Boosting and the Complementary Effect.1. Structural Properties, *Langmuir*, 20, pp. 10433-10443 (2004)
- 4-21 Kondo, T. Surface Chemistry. Sankyo Publishing Co. Ltd. Tokyo. pp.121 (2001)