光学活性セラミドの開発と機能特性

石 田 賢 哉

高砂香料工業株式会社 ☎ 144-8721 東京都大田区蒲田 5-37-1 17F

(2013 年 10 月 2 日受付 ; 2013 年 10 月 19 日掲載決定)

Development and Properties of the Optically Active Ceramides

Kenya ISHIDA

TAKASAGO INTERNATIONAL CORPORATION, 5-37-1 Kamata, Ohta-ku, Tokyo 144-8721

(Received October 2, 2013 ; Accepted October 19, 2013)

The most important and principal function of the skin is to provide a protective interface between human body and external environment. Ceramides exist as main components of intercellular lipids of stratum corneum, and play an essential role of a barrier function of the skin. It is well known that natural ceramides are optically active, and consist of (2*S*, 3*R*)-configuration (*D-erythro* configuration) at the sphingosine moiety. Thus, the optically active (2*S*, 3*R*)-ceramides have been developed based on the strategy of asymmetric synthesis. In order to embody the function of the ceramides in various cosmetic products, effective and stable novel formula of the ceramides have been devised with consideration of lamellar structure of natural intercellular lipids. As a consequence of studies especially focused on stereochemistry, compositions containing the optically active ceramides showed significant recovering effect of water-holding capacity and barrier function of the skin. The following article reviews recent developments in the functional properties of the optically active ceramides as well as various formulating techniques of these materials.

KEYWORDS : optically active ceramides, nature identical configuration, asymmetric synthesis, skin care property

1. は じ め に

セラミドはスフィンゴ脂質に属し、Fig. 1 に示すように長鎖スフィンゴシン塩基と長鎖脂肪酸が酸アミド結合した両親媒性分子種であり、スフィンゴ糖脂質やスフィンゴリン脂質の基本骨格を担い広く生体に分布している。特に皮膚角層細胞間脂質の主成分として存在するセラミドは皮膚本来が持つ生体と外界とのバリアー膜としての機能維持に重要な役割を果たしている。

本稿ではセラミドの立体構造（キラリティー）に焦点を当てた天然型（光学活性）セラミドの開発とスキンケア・ヘアケア製剤への処方化技術を含めた機能特性について紹介する。

2. 角層機能とセラミド

皮膚バリアー機能を担っているのは表皮最外層を構成

する厚さわずか 20 μm 程度の角層である。角層は Elias らによってレンガとモルタルに例えられている¹⁾ (Fig. 2)。つまりレンガ状に約 15 層程に積み重なった角質細胞を細胞間脂質がモルタルのように繋ぎ止める形で強固なバリアー膜を形成しているのである。レンガ役を担う角質細胞はアミノ酸を主成分とする天然保湿因子 (Natural Moisturizing Factor) を含有し水分を保持している。

Fig. 1. (color online). General Structure of Ceramides and Sphingolipids.

Fig. 2. (color online). Schematic Representation of Structure of Stratum Corneum.

一方、モルタル役を担う角質細胞間脂質は約50%のセラミドを主成分とし、コレステロール（エステル）、脂肪酸等の両親媒性脂質から構成されており、疎水性部分、親水性部分同士が繰り返される層板構造、いわゆるラメラ構造を特徴としている（Fig. 2）。角層細胞は角層の最下層から最上層まで約2週間かけて移動し毎日1層ずつが垢として剥離していく。この動的代謝時間をターンオーバー時間といい剥離と再生のバランスは一定に保たれている。しかし、皮膚が乾燥寒冷下に長時間さらされるような外的要因やアトピー性炎症のような内的要因により乾皮症（ドライスキン）が生じた場合、ターンオーバーのバランスが崩れ角層機能の低下が引き起こされる。機能の低下した角層は水分保持能の低下と、バリア機能の低下による経表皮水分蒸散量（TEWL: Trans Epidermal Water Loss）の上昇が観られる。つまり、角層機能の低下による肌荒れを起こした皮膚はかさつくだけでなく、外界からの様々な刺激に対する防御機能が低下するのである。最近の研究でバリア機能の低下した人やアトピー性皮膚炎患者では角層中のセラミド成分の減少や組成変化が明らかになってきており^{2,3)}、バリア機能の維持、改善にセラミドが重要であることが広く認識されるようになった。

3. セラミドの分類と立体構造

ヒト角質細胞間脂質を構成するセラミドは Downing らによりスフィンゴイド塩基とアミド結合している脂肪酸の種類によって7種類の遊離セラミドに分類され、組成報告もなされた（Fig. 3）⁴⁾。最近では HPLC-(ESI)MS (/MS) を活用した分析技術の進歩により遊離セラミドは Masukawa らにより11種類（342分子種）まで同定・細分化されている（Fig. 3）⁵⁾。この分類によると本稿で紹介するジヒドロセラミド2はセラミド10（NDS）に、ジヒドロセラミド5はセラミド11（ADS）に分類されることになるが、国際化粧品機構が公表したINCI名で

Fig. 3. (color online). General Structure and composition of Ceramides in Human Stratum Corneum.

はジヒドロ体もそれぞれセラミド2, 5と同類とされているため、以降は混乱を避けるため化粧品成分表示成分名「セラミド2, 5」と記載することを承知おき頂きたい。

一方、セラミドの立体構造に着目すると、セラミドの基本骨格をなすスフィンゴシン塩基は最低二つの不斉炭素（Asymmetric carbon）を有し（Fig. 1）、理論上4種の光学異性体が存在し得る。しかし天然セラミドは“光学活性体”としてのみ存在し、その立体配置は（2*S*, 3*R*）-体（慣用名：*D*-erythro 体）で、他の異性体は見いだされていない⁶⁾。不斉炭素を有する天然成分は光学活性体として存在している場合が多く、たとえばヒトの最も普遍的な構成単位であるアミノ酸と単糖はすべて光学活性なL-アミノ酸とD-糖のみから構成されている。セラミドがL-セリンから生合成されることを考えると、他の異性体が存在しないのは当然であり、非天然型セラミドの生体系への影響は不明である。

4. 光学活性セラミドの開発

このような背景から筆者らは天然型光学活性セラミドの立体選択的製造方法の開発を行った。

4.1 合成法

本製造法はルテニウム-BINAP（2,2'-bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl）錯体触媒を用いた動力学的分割を伴うジアステレオ選択的不斉水素化反応により2個の不斉点を同時に制御することを鍵反応として開発された。すなわち、2-アセトアミノ-3-オキソアルカン酸エステル（1）を不斉水素化して（2*R*, 3*S*）-アミドエステル（2）へと導き、3位の水酸基を反転して（2*R*, 3*R*）-アミドエステル（3）とした後、エステル基の還元、アセチルアミド基の加水分解、アシル化反応により光学活性セラミド2 [(2*S*, 3*R*)-2-octadecanoyl amino octadecane-1,3-diol] の工業的製法が確立され、また、アシル化剤を α -ヒドロキシ酸に変換することによりセラミド5 [(2*S*, 3*R*)-2-(2-

Fig. 4. Synthetic Procedure of Optically Active Ceramides.

Fig. 5. Optical Resolution of Ceramide 2 by Chiral-HPLC.

hydroxyhexadecanoyl) amino octadecane-1,3-diol] の合成も可能となった (Fig. 4)。

最近では BINAP に替わる新規な不斉配位子 “SEGPHOS” (4,4'-bi-1, 3-benzodioxole)-5,5'-diyl-bis (diarylphosphine)s が開発され^{7,8)}, ルテニウム-SEGPHOS 錯体を利用することにより, 従来の BINAP よりもさらに高い立体選択性, 経済性が実現可能となった。

Fig. 5 は光学活性カラム (SUMICHIRAL OA-4600) により光学分割したセラミド 2 の HPLC クロマトグラムである。これまでのラセミ体は 4 異性体の混合物であるのに対し, 上記製造法により得られた光学活性セラミドは (2S, 3R)-体 97% と高い光学純度であることがわかる。

5. 光学活性セラミドの特性

5.1 示差走査熱量分析

得られた光学活性セラミドとそのラセミ体の特徴を示差走査熱量分析 (DSC) により比較した (Fig. 6)。光学活性体は一回目の昇温時に融点の 106℃ から結晶の融解熱に基づく吸収を示して液体となる。降温時には約 99℃ で液体から準安定相へ, 約 88℃ に準安定相から結晶相への 2 回の相転移に基づく発熱を示した。

一方, ラセミ体は一回目の昇温時に 68℃, 92℃,

Fig. 6. DSC analysis of Ceramide 2.

101℃ に転移ピークを示した。つまりラセミ体の等方性液体への転移点は 101℃ であった。降温時には 82℃ に大きな発熱と 72℃ に小さな転移ピークを認めた。つまり, 光学活性体は加熱過程に一つの転移を, ラセミ体は三つの転移を持つことが判った。これはラセミ体が 4 種類の立体異性体混合物ゆえ, 光学活性体に比べてパッキング性が低く疎な構造をとっていることを示していると考えられる。結果としてラセミ体は光学活性体より約 5℃ 融点が降下し, さらに, 冷却過程に現れる最初の相転移温度は約 17℃ 低下することが判明した。この結果から光学活性セラミドはラセミ体と比べてきわめて強い分子間力を有することが推定される。

6. 製剤化技術の開発

上述のように光学活性セラミドは強い分子間力を有し, 単独では結晶性が高くほとんどの油性/水性化粧品基剤 (溶媒) に対して著しく溶解性が低い。そのため, 親水部に水分を保持した分子集合体を形成することはできない。これは主に直鎖アルキル基 (疎水部) 同士のファンデルワールス力と立体制御されたアミドジオール骨格 (親水部) 同士の水素結合因子によりセラミド分子同士のパッキング性が著しく高まっていることを示唆している。この性質は製剤化の難しさを示すものであると同時に, 角層の本質的なバリアー機能構築に大きく寄与するための基本性能とも考えられる。

これまで光学活性セラミドの製剤化は入手の困難さから当然のことながらほとんど検討されていない。しかし, プソイド体 (合成擬似セラミド) に関しては鈴木らが興味深い研究成果を報告している⁹⁾。彼らは角層細胞間脂質に着目し, プソイド体, コレステロール, ステアリン酸の 3 成分系から形成される α -ゲル中に水分を保持できる液晶相を見だし, これを液晶乳化法に応用することにより安定なマルチラメラエマルションを調製している。残念ながら光学活性セラミドはこの組成では安定な液晶相は見いだせなかったが, この報告は処方開発

への重要な道標となった。つまり、セラミドは角質細胞間脂質中で、コレステロール（エステル）、遊離脂肪酸、コレステロール硫酸などの両親媒性分子種とともにラメラ構造を形成して機能をつかさどっている。したがって製剤化でも、細胞間脂質と同様のセラミドを含む脂質混合物によるラメラ液晶相（L.L.C.: Lamellar Liquid Crystalline phase）を見だし、この L.L.C. を利用して均一なベシクルを調製することがセラミドの安定な製剤化に最適な方法であると考えた。

Elias らのグループはセラミドやコレステロール、脂肪酸を単独で荒れ肌に塗布しても、荒れ肌の回復はむしろ遅れてしまい、これらを適当な比率で混合した場合にのみ荒れ肌の回復が促進されたことを報告しており¹⁰⁾、バリア機能がセラミドだけで発現されるのではなく、角質細胞間脂質組成に着目した配合技術がセラミド機能の具現化に重要であることを示唆していた。

6.1 コンタクト試験、バリアー膜形成能

筆者らはセラミドの親水部の立体構造を活かしつつ、疎水部の分子間力を乱して分子運動に自由度を持った角質細胞間脂質様のラメラ構造の探索としてコンタクト試験を行った。コンタクト試験法とは偏光顕微鏡視野下において2種類の被検物質を加熱溶解により接触させ、2物質の相転移状態を観測する方法である。セラミドと各種細胞間脂質成分との試験を実施した結果、セラミドとコレステロールの接触部位に液晶特有のマルターゼクロス像が観察された（Fig. 7）。

本脂質組成物を X 線回折により確認したところ、Braggs angle から求めた間隔は、41.8 Å ($2\theta=2.2^\circ$)、20.6 Å ($2\theta=4.3^\circ$)、13.4 Å ($2\theta=6.6^\circ$)、10.2 Å ($2\theta=8.6^\circ$) であり、低角側に規則性のある回折ピークが認められたことからラメラ（層状）であることが、また 4.5 Å 付近に特徴的な緩慢なハローは疎水基同士の運動性が高まった液晶相と考えられ、セラミドはコレステロールとの併用によりラメラ液晶構造を形成することが示唆された（Fig. 8）。

Fig. 7. (color online). Polarized Microphotograph of Contacting Test between Ceramide 2 and Cholesterol.

6.2 リポソーム調製法の製剤化への応用

以上の解析結果に基づきセラミド・コレステロール液晶脂質を安定に水に分散可能な製剤化を実現するため、リポソーム調製法の応用を検討した。リポソーム調製法は薄膜法をはじめ、超音波法、コール酸除去法、溶媒注入法、エクストラクター法、逆相抽出法、などが報告されているが、特殊な装置や有機溶剤、洗浄剤を使用せず実用的な方法として金子らが提案したラメラ液晶法¹¹⁾の応用を図った。Fig. 9 はセラミド、コレステロール、コレステロール硫酸からなる脂質/リン酸緩衝液（pH = 6.86）= 1/1（重量比）の相平衡図（40℃）である¹²⁾。セラミドにコレステロール硫酸が挟み込まれることにより α -gel 相が現れ、そこにコレステロールが組み込まれることにより主として疎水部のパッキング性がルーズとなってラメラ液晶、およびその分散相が形成されていくと考えられた。

Fig. 10 に偏光顕微鏡による L.L.C. 特有のマルターゼクロス像を示す。

つまり、セラミド・コレステロールに角質細胞間脂質に見いだされるコレステロール硫酸を第3成分として併用することにより水を保持した安定な L.L.C. が調製可

Fig. 8. (color online). X ray Diffraction Patterns for Ceramide 2 with Cholesterol (1/1 mol ratio).

Fig. 9. Phase Diagrams for Cer2/Chol/Cholesteryl sulfate with Phosphate buffer (pH = 6.86) system.

Fig. 10. (color online). Polarized Microscope observation of Lamellar Liquid Crystalline phase.

能であった。なお、セラミド・コレステロールに次ぐ第3成分としてコレステロール硫酸以外に、ポリグリセリン脂肪酸エステルが物理的に安定なベシクル形成能を有していた。特にポリグリセリン脂肪酸エステルは耐塩性や耐酸性に優れ、安全性も高いことから実用性が高い。

7. セラミドの機能特性

7.1 *In Vitro* 機能特性

前述の如く得られたラメラ液晶組成物 (L.L.C.) をリポソーム調製法を応用したベシクル (セラミド含有率: 3.0%) を各種セラミドについて作製し、製剤自体の水分保持性能を検証すると、(2*S*, 3*R*)-体はラセミ体やプソイド体と比較して有意に高い水分保持能を示した (Fig. 11)。ラセミ体の場合、親水部の配列が純粋な (2*S*, 3*R*)-体に比べて乱れる傾向があり、それが水和配列にも影響したものと思われ、またプソイド体はセラミドよりも約 30℃ 融点が高い (mp: 74℃) ことから窺われるように分子間力が (2*S*, 3*R*)-体に比べて弱く膜構造もルーズになっているものと推測された。

7.2 皮膚への効果

7.2.1 荒れ肌改善効果

次に、界面活性剤 (SDS: Sodium Dodecyl Sulfate) により誘発した主婦性乾燥肌モデルに対する改善効果を調べた。セラミドベシクルはポリグリセリン脂肪酸エステルを利用し、4% セラミドベシクルを得た。

SDS 処理により低下した角層水分量 (コンダクタンス値)、バリアー能 (TEWL) はともに光学活性体適用部位に顕著な回復傾向を認めた (Fig. 12, Fig. 13)。この傾向は特に TEWL 面で顕著であり、セラミドがバリアー改善により、水分保持を担っていること、および (2*S*, 3*R*)-体の優れたバリアー形成能、生体適合性を示したものと考えられた。なお、本試験は測定部位皮膚を温水にて洗浄後、被験者を 20±1℃, RH 45±5% の環境下に 30 分間順応させた後測定した結果であり、セラミドベシクルが単に皮表に残存したのではなく、角層に取り込まれ、ラメラ構造を再構築した可能性が窺えた。

Fig. 11. (color online). Water Holding Capacity of various Ceramides.

Fig. 12. (color online). Recovery ratio of Water Holding Capacity on SDS induced Dry Skin.

Fig. 13. (color online). Recovery ratio of TEWL on SDS induced Dry Skin.

7.2.2 乾燥肌に対する連用効果

さらに、上記ベシクルを水にてセラミド濃度 0.5% まで希釈した化粧水の冬季乾燥肌に対する連用効果を調べた。この試験は皮表コンダクタンス値が低下傾向にあるボランティア (n=9) を対象に実施されたが、セラミド含有化粧水適用 7 日後から有意なコンダクタンス値の向上が認められ、また、14 日後からは有意なバリアー維持能が確認された (Fig. 14, Fig. 15)。本試験は乾燥期 (1~2 月) に実施したため、プラセボ適用部の経時的な角層機能の低下が観察されたが、セラミド含有化粧水は皮膚恒常性維持に大きく貢献することが確認された。

7.3 毛髪への効果

セラミドは皮膚だけでなく毛髪の細胞膜複合体 (CMC: Cell Membrane Complex) でも約 50% を占める主

Fig. 14. (color online). Time courses of Conductance values treated with 0.5% Ceramide emulsion.

Fig. 15. (color online). Time courses of TEWL values treated with 0.5% Ceramide emulsion.

要構成成分としてキューティクル（毛小皮）とコルテックス（毛皮質）の接着に貢献しており、その組成は Type2（88%）、Type5（12%）であることが Hussler らにより報告されている¹³⁾。ヘアカラーやブリーチが日常となった現在、ヘアケア製品には「髪の潤いを保つ、ダメージを防ぐ、補修する」等の機能を訴求したものが見られ、いわゆるダメージケア分野への消費者ニーズは高まっている。本章では光学活性セラミド2に次いで開発した光学活性セラミド5 [(2*S*, 3*R*)-2-(2-hydroxy-hexadecanoyl)amino octadecane-1,3-diol] とセラミド2との併用効果についてヘアケア機能を例にあげ紹介する。

なお、著者らはセラミド5とセラミド2を併用したベシクル製剤がそれぞれのセラミド単独配合品と比較してバリア機能、水分保持能ともに向上することを確認している¹⁴⁾。これはセラミド併用によるラメラ構造の安定化を示唆するものである。

7.3.1 表面改善効果

クロロホルム・エタノール処理により誘発したダメージ毛に対するセラミド（0.5%）トリートメントの効果を表面摩擦係数（MIU）により検証したところ、溶媒処理により上昇した摩擦係数は光学活性セラミド配合トリートメント処理により回復し、その改善効果はセラミド

Fig. 16. (color online). Recovery of Hair surface as kinetic friction coefficient (MIU).

Fig. 17. SEM Images of Hair surface (×240).

Fig. 18. (color online). Recovery effect of Hair Strength.

5/セラミド2併用系がセラミド2単独配合品より高い結果を与えた（Fig. 16）。毛髪表面のSEM像からもダメージヘアのキューティクルがセラミド併用トリートメント処理によって明らかに改善されていることが確認され、摩擦係数との相関を認めた（Fig. 17）。

7.3.2 強度改善効果

また、同様のトリートメントをブリーチ処理によるダメージ毛に適用し、引っ張り破断強度（5 cm/min）を測定したところ、セラミド含有トリートメント処理により回復し、その強度改善効果はセラミド5/セラミド2併用系がセラミド2単独配合品より有意に高い結果を与えた（Fig. 18）。

以上の損傷毛髪での試験結果より、セラミド併用効果が確認され、角層のモルタル役と同様に毛髪でもセラミ

ドがC.M.C.成分様の接着因子として貢献することが明らかになった。

8. ま と め

皮膚の恒常性を保つ上で角層とそのキー成分「セラミド」が重要な役割を果たしており、本来のバリアー機能、保湿機能を維持、補充する素材として開発した光学活性セラミドの機能特性をヘアケア効果と併せて紹介した。光学活性体は従来の合成セラミド類と比較して製剤化は容易ではないが、優れたバリアー改善効果、水分保持効果を発揮したことから、その立体構造（キラリティー）がきわめて重要であることがわかってきた。

近年の皮膚科学の進歩は目覚ましく、これに伴って消費者の化粧品・医薬部外品に求める効果・効能のレベルも高まっており、この傾向はさらに加速していくものと思われる。アトピー性皮膚炎や乾皮症、あるいは老化した肌においてもセラミド量、代謝、あるいは組成の異常などが報告されていることから今後もバリアー補強剤として天然型光学活性セラミドの果たす役割は重要になってくるだろう。

文 献

- 1) P.M. Elias and D.S. Friend : J. Cell Biol. **65**, 180 (1975).
- 2) K. Akimoto, N. Yoshikawa, Y. Higaki, M. Kawashima and G. Imokawa : J. Dermatol. (Tokyo) **20**, 1 (1993).
- 3) G. Imokawa, A. Abe, K. Jin, Y. Higaki, M. Kawashima and A. Hidano : J. Invest. Dermatol. **96**, 523 (1991).
- 4) K.J. Robson, M.E. Stewart, S. Michelsen, N.D. Lazo and D.T. Downing : J. Lipid Res. **35**, 2060 (1994).
- 5) Y. Masukawa, H. Narita, E. Shimizu, N. Kondo, Y. Sugai, T. Oba, R. Homma, J. Ishikawa, Y. Takagi and T. Kitahara : J. Lipid Res. **49** : 1466 (2008).
- 6) H.E. Carter and D. Shapiro : J. Am. Chem. Soc. **75**, 5131 (1953).
- 7) T. Saito, T. Yokozawa, T. Ishizaki, T. Moroi, N. Sayo, T. Miura and H. Kumobayashi : Adv. Synth. Catal. **343**, 264 (2001).
- 8) H. Kumobayashi, T. Miura, N. Sayo, T. Saito, X. Zhang et al. : Synlett **SI**, 1055 (2001).
- 9) 鈴木敏幸, 芋川玄爾, 川俣 章 : 日本化学会誌, **1993**, 1107 (1993).
- 10) M.Q. Man, K.R. Feingold, C.R. Thornfeldt and P.M. Elias : J. Invest. Dermatol. **106**, 1096 (1996).
- 11) T. Kaneko and H. Sagitani : Colloids Surf. **69**, 125 (1992).
- 12) 金子晃久, 田中智也, 永瀬政昭 : 特開平 10-182401 (1998).
- 13) G. Hussler and G. Kaba : Int. J. Cosmet. Sci. **17**, 197 (1995).
- 14) 川田 泉, 石田賢哉 : 特開 2001-348320 (2001).