

リポソーム製剤の皮膚浸透性に関する研究 Studies on Skin Penetration of Liposomal Formulation

坂 貞徳, 中間 満雄, 山下 真由
Sadanori Ban, Mitsuo Nakama, Mayu Yamashita

日本メナード化粧品(株)総合研究所
Research Laboratories, Nippon Menard Cosmetic Co., Ltd.

三次元培養ヒト皮膚モデルおよび摘出ヒト皮膚へのリポソーム製剤の適用による角層細胞間脂質の構造変化について、小角・広角 X 線回折実験を行った。その結果、卵黄由来フォスファチジルコリン(卵黄 PC)リポソーム製剤だけでなく、化粧品製剤に適した大豆由来フォスファチジルコリン(大豆 PC)リポソーム製剤においても、三次元培養摘出ヒト皮膚への適用により細胞間脂質の自己組織化が起り、摘出ヒト皮膚への適用により細胞間脂質の周期構造が乱れることが明らかとなった。

キーワード： 三次元培養ヒト皮膚モデル、摘出ヒト皮膚、皮膚浸透性、細胞間脂質、リポソーム

背景と研究目的：

皮膚角層中の細胞間脂質は、セラミド、脂肪酸、コレステロールを主な構成成分としており、皮膚バリア機能としての重要な役割を果たしている。化粧品開発においては、角層細胞間脂質構造が、化粧品製剤の浸透によりどのような影響を受けるのかを明らかにすることが重要である。現在、動物の代替として、三次元培養ヒト皮膚モデルや摘出ヒト皮膚を用いた皮膚浸透性試験が実施されている。これらの皮膚組織を用いた試験法を確立する上では、化粧品製剤の角層構造に及ぼす影響についての類似点、相違点を理解することが重要である。我々は、2008B 期の課題において、細胞間脂質の構造がヒト皮膚よりも不完全である三次元培養ヒト皮膚モデルへのリポソーム製剤の適用により、細胞間脂質の自己組織化が起ることを明らかにした[1]。また、2009B 期の課題において、摘出ヒト皮膚へのリポソーム製剤の適用により、細胞間脂質の周期構造が乱れることを見出した[2]。これらの結果より、リポソーム製剤の適用による細胞間脂質の構造変化は、用いる皮膚組織の細胞間脂質構造の違いにより、その挙動が異なることが示された。これまでの課題では、リポソームを構成する脂質として基本的な卵黄由来フォスファチジルコリン(卵黄 PC)を用いて実施している。しかしながら、リポソームの化粧品製剤への応用を見据えた場合、製剤の安定性や内包化合物の貯留性の向上を目指した、製剤化に適したリポソームの検討が必要であると考えられる。本課題においては、製剤化に適したリポソーム製剤の角層細胞間脂質に及ぼす影響を明らかにし、製剤開発を見据えた皮膚浸透性試験における科学的根拠となるデータを得ることを目的とした。

実験：

三次元培養ヒト皮膚モデル(TOYOBO 社)または摘出ヒト皮膚(BIOPREDIC International 社)をフランチ型拡散セル(パーメギア社)に挟みこみ、角層側から大豆 PC または卵黄 PC リポソーム製剤を適用し、24 時間後に皮膚を回収した。0.1%トリプシン溶液に浸して角層のみを剥離し、脱水後に水を加えて角層中の水分量が 20%になるように調製し、キャピラリーチューブ(φ1 mm; W. Muller 製)に詰め測定試料とした。脂質系のラメラ構造と脂質の充填構造を同時に測定するために、小角・広角 X 線回折同時測定、さらに示差走査熱量計による同時測定のできるビームライン BL40B2 を使用した。測定条件は、X 線の波長 0.1 nm、カメラ長は 500 mm で行った。カメラは RAXIS(リガク製)を用い、IP は 300×300 mm を使用した。

結果および考察：

図1は、三次元培養ヒト皮膚モデルの角層試料における X 線回折プロファイルを示す。非適用試料においては、図 1(a)に示す小角領域の $S = 0.177 \text{ nm}^{-1}$ (5.67 nm)、 $S = 0.226 \text{ nm}^{-1}$ (4.43 nm)、 $S = 0.294 \text{ nm}^{-1}$ (3.40 nm)、 $S = 0.588 \text{ nm}^{-1}$ (1.70 nm)に、図 1(b)に示す広角領域の $S = 2.41 \text{ nm}^{-1}$ (0.41 nm)にそれぞれ回折ピークが見られた。 $S = 0.177 \text{ nm}^{-1}$ と $S = 0.226 \text{ nm}^{-1}$ はそれぞれ短周期ラメラ構造の一次、長周期ラメラ構造の三次、 $S = 0.294 \text{ nm}^{-1}$ と $S = 0.588 \text{ nm}^{-1}$ はコレステロール[3]、 $S = 2.41 \text{ nm}^{-1}$ は細胞間脂質の充填構造である六方晶[4]と一致した。これまで、三次元培養ヒト皮膚モデルには、短周期および長周期ラメラ構造がほとんど見られない[1][5]と報告されてきたが、今回、初めてラメラ構造が観察された。また、卵黄 PC リポソーム製剤適用によって、小角領域および広角領域におけるこれらの回折ピークが強まった。一方、大豆 PC リポソーム製剤適用によって、小角領域における短周期と長周期ラメラ構造の回折ピークおよび広角領域における充填構造の回折ピークが強まった。

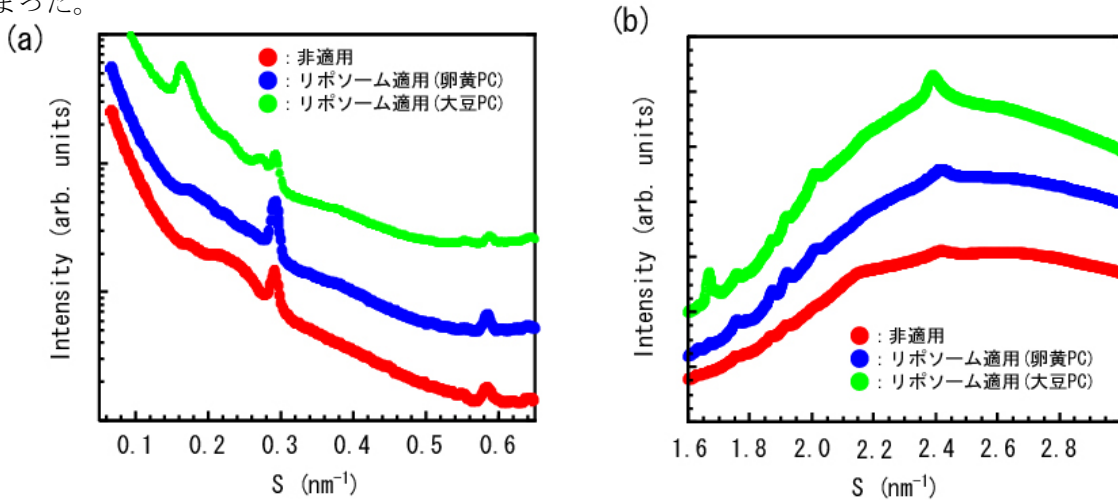


図1. 三次元培養ヒト皮膚モデル角層の X 線回折プロファイル
(a) 小角 X 線回折プロファイル、(b) 広角 X 線回折プロファイル

図2は、摘出ヒト皮膚の角層試料における X 線回折プロファイルを示す。非適用試料においては、図 2(a)に示す小角領域の $S = 0.153 \text{ nm}^{-1}$ (6.53 nm)、 $S = 0.221 \text{ nm}^{-1}$ (4.52 nm)、 $S = 0.297 \text{ nm}^{-1}$ (3.37 nm)に、図 2(b)に示す広角領域の $S = 2.41 \text{ nm}^{-1}$ (0.41 nm)および $S = 2.66 \text{ nm}^{-1}$ (0.38 nm)にそれぞれ回折ピークが見られた。 $S = 0.153 \text{ nm}^{-1}$ は短周期ラメラ構造の一次、 $S = 0.221 \text{ nm}^{-1}$ と $S = 0.297 \text{ nm}^{-1}$ は長周期ラメラ構造の三次および四次[4]、 $S = 2.41 \text{ nm}^{-1}$ と $S = 2.66 \text{ nm}^{-1}$ は細胞間脂質の充填構造とそれぞれ一致した。また、卵黄 PC および大豆 PC リポソーム製剤適用によって、これらの回折ピークは弱まった。

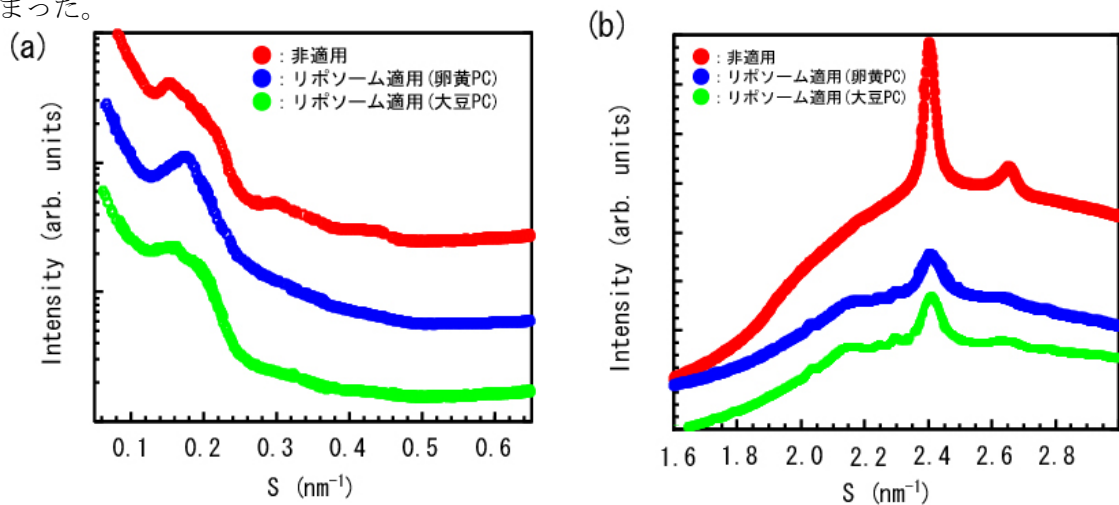


図2. 摘出ヒト皮膚角層の X 線回折プロファイル
(a) 小角 X 線回折プロファイル、(b) 広角 X 線回折プロファイル

我々は、2008B 期および 2009B 期の課題において、卵黄 PC リポソーム製剤の適用による細胞間脂質の構造変化は、用いる皮膚組織の細胞間脂質構造の違いにより、その挙動が異なることを見出している。本課題においては、化粧品製剤に適したリポソーム製剤の適用による細胞間脂質の構造変化を観察した。その結果、大豆 PC リポソーム製剤においても、三次元培養ヒト皮膚モデルへの適用により細胞間脂質の自己組織化が起こり、摘出ヒト皮膚への適用により細胞間脂質の周期構造が乱れることが示された。本研究において、化粧品製剤に適したリポソームにおいても、細胞間脂質の構造の同様な変化が見られたことから、本技術を活かしたりポソームの化粧品製剤への幅広い応用が期待される。

今後の課題：

本研究では、卵黄 PC リポソーム製剤だけでなく、大豆 PC リポソーム製剤においても、三次元培養ヒト皮膚モデルへの適用により細胞間脂質の自己組織化が起こり、摘出ヒト皮膚への適用により細胞間脂質の周期構造が乱れることが明らかとなった。しかしながら、そのメカニズムについては未だ不明な点が多い。今後は、リポソーム製剤による角層細胞間脂質の構造変化がどのようなメカニズムによって起こるのかについて検討する必要があると考えられる。

参考文献：

- [1] 坂貞徳, 平成 20 年度 SPring-8 重点産業利用課題成果報告書(2008B1895): 三次元培養ヒト皮膚モデルを用いた経皮吸収試験
- [2] 坂貞徳, 平成 21 年度 SPring-8 重点産業利用課題成果報告書(2009B1855): 摘出ヒト皮膚を用いた化粧品製剤の皮膚浸透性に関する研究
- [3] 坂貞徳, 平成 17 年度先端大型研究施設戦略活用プログラム成果報告書(2005B0905): 自己組織化された擬似(皮膚)細胞間脂質の開発
- [4] Bouwstra, J. A., et al, *J. Lipid Res*, **36**, 496-504, (1995): Characterization of stratum corneum structure in reconstructed epidermis by X-ray diffraction.
- [5] 国澤直美, 平成 18 年度先端大型研究施設戦略活用プログラム成果報告書(2006B0208): ヒト皮膚三次元培養皮膚の細胞間脂質の解析