

ヒト皮膚と類似な角層細胞間脂質構造を有する 三次元培養ヒト皮膚モデルの開発

Development of Three-dimensional Cultured Human Skin Model with the Intercellular Lipid Structure of Stratum Corneum Similar to Human Skin

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.

ヒト皮膚と類似な角層細胞間脂質構造を有する三次元培養ヒト皮膚モデルの開発の一環として、角層細胞間脂質の組織化に及ぼすリン脂質膜構造の違いについて検討するために、リン脂質の二分子膜粒子からなるリポソームまたは単分子膜粒子からなる脂質エマルジョンを適用し、小角・広角 X 線回折実験を行った。その結果、リポソームの適用において、脂質エマルジョンの適用と比べて角層細胞間脂質の組織化が優位に起こ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、細胞間脂質、リポソーム、エマルジョン

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、外界からの刺激に対するバリア機能の維持において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、化粧品の浸透によりどのような影響を受ける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を用いた皮膚浸透性試験が実施されているが、三次元培養ヒト皮膚モデルにおける物質の透過性がヒト皮膚よりもおよそ 10 倍高いこと[1]、その理由の一つとして、三次元培養ヒト皮膚モデルの角層細胞間脂質のラメラ構造が不完全で、脂溶性の物質が結晶化している可能性があること[2]等が報告されている。我々は、これまでの課題[3][4][5]において、三次元培養ヒト皮膚モデルへの卵黄由来フォスファチジルコリン(卵黄 PC)あるいは大豆 PC リポソームの適用によって、角層細胞間脂質のラメラ構造がヒト皮膚に近づくことを見出している。今後は、ヒト皮膚に近づけた三次元培養ヒト皮膚モデルを市場に提供することを目指し、リポソームの適用による角層細胞間脂質構造の組織化についての詳細な検討を進めていく必要があると考える。

これまでの課題においては、リン脂質の二分子膜粒子からなるリポソームを調製して三次元培養ヒト皮膚モデルへ適用し、角層細胞間脂質構造の組織化について検討した。一般にリポソームは生体膜モデルとして知られている。一方、リン脂質の単分子膜粒子である脂質エマルジョンは血漿リポタンパク質のタンパク質フリーモデルとして広く研究されている。そこで本課題においては、角層細胞間脂質構造の組織化に及ぼすリン脂質膜構造の影響について明らかにし、角層細胞間脂質構造の組織化についての詳細な検討を進めていくための科学的根拠となるデータを得ることを目的とした。

実験：

リポソームは卵黄 PC(COATSOME NC-50、日油)を用いて、リン脂質濃度が 0.5%となるように Bangham 法にて調製し、メンブランフィルター(ミリポア)を通して粒子径を調整した。脂質エマルジョンは卵黄 PC(COATSOME NC-50、日油)5%、大豆油(大豆油 YM、日清オイリオ)5%、Milli-Q 90%を高圧乳化処理して調製し、リン脂質濃度が 0.5%となるように Milli-Q で希釈して適用サンプルとした。粒子径はともに 100nm 前後となるようにした。

三次元培養ヒト皮膚モデル(東洋紡)をフランチ型拡散セル(パーメギア)に挟み込み、角層側からリポソームまたは脂質エマルジョンを適用し、24 時間後に角層を採取した。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窒素ガス中にて角層水分量を 20%に調製し、キ

ヤピラリーチューブ($\phi 1$ 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可能なビームライン BL40B2 を使用した。測定条件は、X 線の波長 0.1 nm、カメラ長 500 mm、カメラには RAXIS(リガク製)を用い、IP は 300×300 mm を使用した。また、散乱ベクトル $S = q/2\pi$, $q = 4\pi \sin\theta/\lambda$ (nm^{-1}) (λ : X 線の波長, 2θ : 散乱角)と定義した。

結果および考察：

図 1 は、三次元培養ヒト皮膚モデルへリポソームを適用した角層試料における X 線回折プロファイルを示す。非適用試料においては、小角領域の $S=0.170 \text{ nm}^{-1}$ (5.6 nm)、 $S=0.275 \text{ nm}^{-1}$ (3.6 nm)、 $S=0.294 \text{ nm}^{-1}$ (3.4 nm) に、広角領域の $S=2.41 \text{ nm}^{-1}$ (0.41 nm)、 $S=2.61 \text{ nm}^{-1}$ (0.38 nm) にそれぞれ回折ピークが見られた。 $S=0.170 \text{ nm}^{-1}$ は短周期ラメラ構造の一次、 $S=0.294 \text{ nm}^{-1}$ はコレステロール[6]、 $S=2.41 \text{ nm}^{-1}$ と $S=2.61 \text{ nm}^{-1}$ は細胞間脂質の充填構造とそれぞれ一致した。また、 $S=0.275 \text{ nm}^{-1}$ はコレステロール/脂肪酸ないしセラミド/脂肪酸と思われる回折ピークがみられた[7]。リポソームを適用した試料においては、これらの回折ピークが強まる現象が見られた。

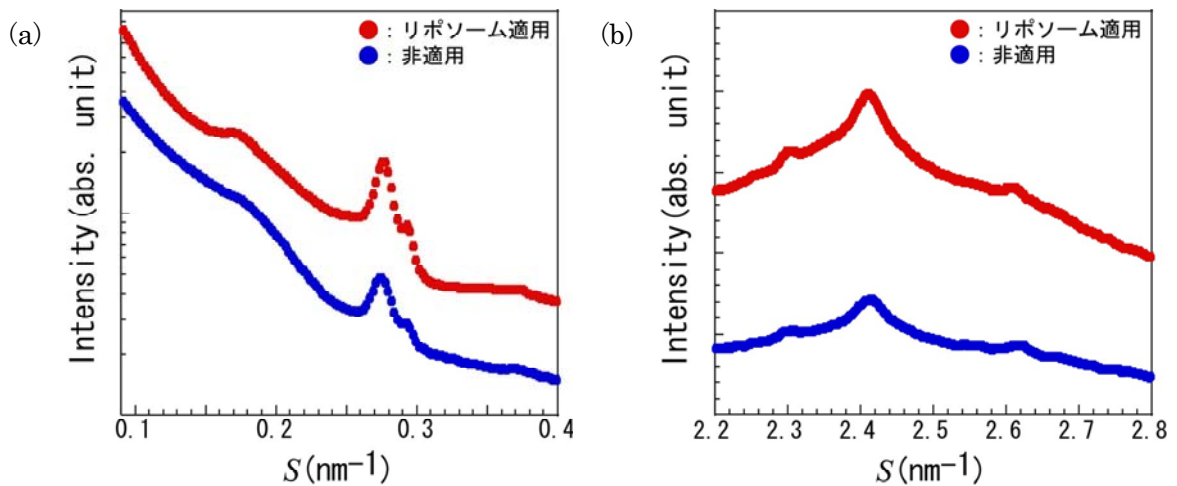


図 1. 三次元培養ヒト皮膚モデルへリポソームを適用した角層試料における X 線回折プロファイル

(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、三次元培養ヒト皮膚モデルへ脂質エマルジョンを適用した角層試料における 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 と同様な回折ピークが見られた。脂質エマルジョンを適用した試料においては、これらの回折ピークが強まる現象は見られなかった。

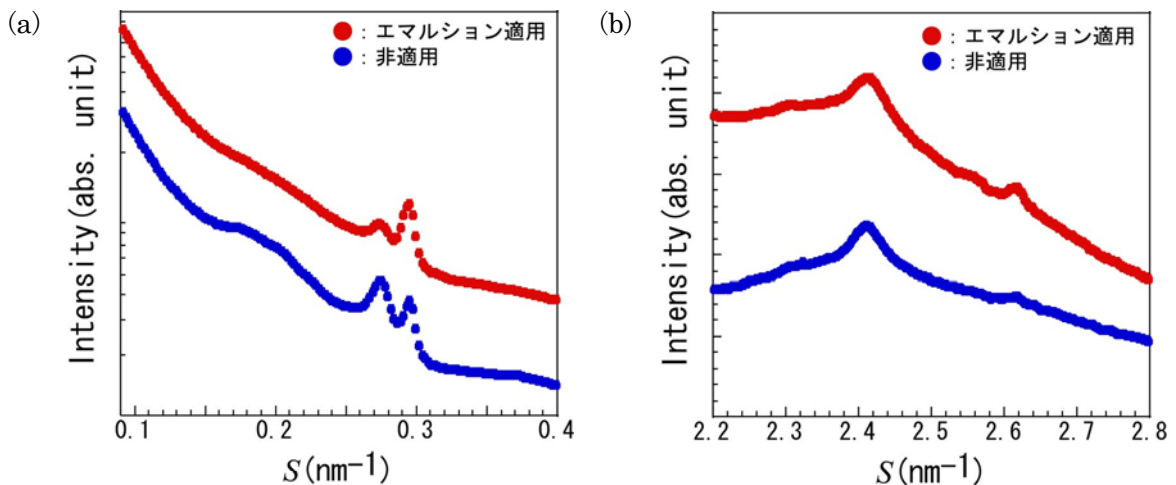


図 2. 三次元培養ヒト皮膚モデルへ脂質エマルジョンを適用した角層試料における X 線回折プロファイル

(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

本課題においては、ヒト皮膚に近づけた三次元培養ヒト皮膚モデルを市場に提供することを目指し、角層細胞間脂質構造の組織化に及ぼすリン脂質膜構造の影響について検討した。その結果、リン脂質の二分子膜粒子からなるリポソームの適用において、単分子膜粒子からなる脂質エマルジョンの適用と比べて細胞間脂質の自己組織化が優位に起こることが明らかとなった。

今後の課題：

本課題においては、リン脂質の二分子膜粒子からなるリポソームの適用において、角層細胞間脂質の組織化が優位に起こることが明らかとなった。しかしながら、リン脂質が二分子膜構造のときに角層細胞間脂質の組織化が起こる理由は未だ不明である。今後は、リン脂質と同様に他の両親媒性物質においても角層細胞間脂質の組織化が起こるのかを検討し、ヒト皮膚に近づけた三次元培養ヒト皮膚モデルの開発に向けて、角層細胞間脂質構造の組織化についてさらに詳細な検討を進めていく必要があると考える。

参考文献：

- [1] Watanabe, T., et al., "Utility of the three-dimensional cultured human skin model as a tool to evaluate skin penetration of drugs." *Altern. Animal Test. Experiment.*, **8**, 1-14, (2001).
- [2] 國澤直美, 平成 18 年度下半期先端大型研究施設戦略活用プログラム成果報告書, (2006B).
- [3] 坂貞徳, 「三次元培養ヒト皮膚モデルを用いた経皮吸収試験」, (2008B).
- [4] 坂貞徳, 「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」, (2009B).
- [5] 坂貞徳, 「リポソーム製剤の皮膚浸透性に関する研究」, (2010B).
- [6] 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, (2005B).
- [7] Bouwstra, J. A., et al., "Phase behavior of isolated skin lipids." *J. Lipid Res.*, **37**, 999-1011, (1996).