三次元培養ヒト皮膚モデルを用いた皮膚浸透試験
Study of skin penetration using three-dimensional cultured human skin model

坂　貞徳, 中間　満雄, 小椋　彩子
Sadanori Ban, Mitsuo Nakama, Ayako Ogura

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への化粧品製剤の適用による、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、三次元培養ヒト皮膚モデルの細胞間脂質の構造はヒト皮膚と比較して不完全であるとともに、コレステロールの単一結晶が存在していることを見出した。また、皮膚モデルに化粧品製剤を適用することによってコレステロールの回折ピーク強度が強まり、さらに細胞間脂質の周期構造が現れることも見出した。これらの結果は、経皮吸収促進剤として知られている l-メントールやエタノールのヘアレスラット皮膚角層への適用によって細胞間脂質の構造が乱れる結果[1]とは異なり、化粧品製剤の三次元培養ヒト皮膚モデルへの適用によって細胞間脂質の自己組織化が起こることを示す。

キーワード：三次元培養ヒト皮膚モデル、皮膚浸透、細胞間脂質

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、コレステロールが主な構成成分として知られており、外界からの刺激に対する皮膚バリア機能において重要な役割を果たしている。化粧品を開発する上で、バリア機能を有する角層の構造が化粧品製剤の浸透によりどのように変化するかについて理解することは重要である。これまで化粧品製剤の皮膚浸透試験については、主に動物を用いた研究が行われてきたが、2009 年 3 月より EU における動物実験が禁止となった。これを受けて、動物代替試験法としての三次元培養ヒト皮膚モデルを用いた研究が盛んに行われている。

このように三次元培養ヒト皮膚モデルを用いた化粧品製剤の皮膚浸透試験を行っていくためには、皮膚モデルの構造を正しく理解することが必要である。本研究は、化粧品製剤の浸透による三次元培養ヒト皮膚モデルの角層細胞間脂質の構造変化を明らかにし、三次元培養ヒト皮膚モデルを用いた化粧品製剤の浸透試験法の適性を理解することを目的とした。

実験：

三次元培養ヒト皮膚モデルをフランツ型拡散セル(パーメギア社)に挟みこみ、24 時間後に皮膚

モデルを回収した。また、同様にフランツ型拡散セルに挟みこんだ皮膚モデルに 2 種類の化粧品製剤(製剤 1、製剤 2)をそれぞれ角層側から適用し、24 時間後に皮膚モデルを回収した。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、測定試料とした。測定試料はキャピラリーチューブ(φ1 mm; W. Muller 製)に詰め、チューブを密閉した。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 および図 2 は、三次元培養ヒト皮膚モデルの角層試料における、小角および広角 X 線回折のプロファイルを示す。

非適用試料において、図 1 に示した小角領域では細胞間脂質のラメラ構造として知られている長周期(およそ 13 nm)および短周期(およそ 6 nm)の回折ピークは見られなかった。これまでに、ヒト皮膚で見られるラメラ構造が三次元培養ヒト皮膚モデルではほとんど見られないとの報告[1]があるが、今回の試験においても同様の結果が得られた。また、0.294 nm^{-1} (3.40 nm)、0.588 nm^{-1} (1.70 nm)の回折ピークは、擬似細胞間脂質を用いた以前の研究で見られたコレステロールの周期[3]と一致することから、単一結晶化したコレステロールである。これらコレステロールのピークは製剤 1 および製剤 2 の適用によって強度が強まった。さらに製剤 1 および製剤 2 の適用によって、新たに S=0.203 nm^{-1} (4.93 nm)に回折ピークが出現した。

一方、図 2 に示した広角領域では S=2.41 nm^{-1} (0.41 nm)にわずかに回折ピークが見られ、細胞間脂質の充填構造[4]と一致した。これまでに、三次元培養ヒト皮膚モデルではヒト皮膚ほど完全ではないものの充填構造由来のピークが見られる報告[2]があるが、今回の試験においても同様の結果となった。この S=2.41 nm^{-1} (0.41 nm)のピークは製剤 1 および製剤 2 の適用によって強度が強まり、小角領域の S=0.203 nm^{-1} (4.93 nm)に出現する周期構造を裏付けることができた。また、S=1.76 nm^{-1} (0.57 nm)および 1.92 nm^{-1} (0.52 nm)にわずかに回折ピークが見られ、これらのピークはコレステロール[3]と一致した。これらコレステロールのピークは製剤 1 および製剤 2 の適用によって強度が強まり、小角領域で見られたコレステロールの回折ピーク強度が強まる現象と一致した。

三次元培養ヒト皮膚モデルにおける水の透過係数がヒト皮膚と比べて 10 倍以上大きい報告[5]があり、三次元培養ヒト皮膚モデルとヒト皮膚とでは構造上違いがあることが示唆されてきた。

本研究において、三次元培養ヒト皮膚モデルの細胞間脂質の周期構造はヒト皮膚よりも不完全であるとともに、単一結晶化したコレステロールが存在していることを見出した。また、化粧品製剤の適用によってコレステロールの回折ピーク強度が強まり、さらに細胞間脂質の周期構造が新たに出現することも見出した。これまでに経皮吸収促進剤として知られている l-メントールやエタノールのヘアレスラット皮膚角層への適用によって、細胞間脂質の構造が乱れて脂質由来の回折ピークの強度が減少することが報告されている[1]。本研究の結果はこうした報告とは異なり、化粧品製剤の適用によって三次元培養ヒト皮膚モデル中の細胞間脂質の自己組織化が起こることを示すものである。以上から、三次元培養ヒト皮膚モデルを用いた皮膚浸透試験を行う際は今回

明らかとなったヒト皮膚との構造上の違いを考慮する必要がある。

今後の課題：

本研究の結果は、三次元培養ヒト皮膚モデルへの化粧品製剤の適用によって細胞間脂質の周期構造の形成が促進されることを示唆するものである。この現象がヒト皮膚と比べて構造的に不完全である三次元培養ヒト皮膚モデル特有のものであるか、あるいはヒト皮膚でも起こり得るのかについてはさらなる検討が必要である。

参考文献：

[1] Obata. Y., et al., SPring-8 User Experiment Report No.15, 189 (2005): Effect of transdermal absorption enhancers on thermotropic transition of intercellular lipid lamellar structure of stratum corneum.

[2] 國澤直美, 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, 195: ヒト皮膚三次元培養皮膚の細胞間脂質の解析

[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, 221-223: 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] Watanabe, T., et al, Altern. Animal Test. Experiment, 8, 1-14 (2001): Utility of the three-dimensional cultured human skin model as a tool to evaluate skin penetration of drugs.

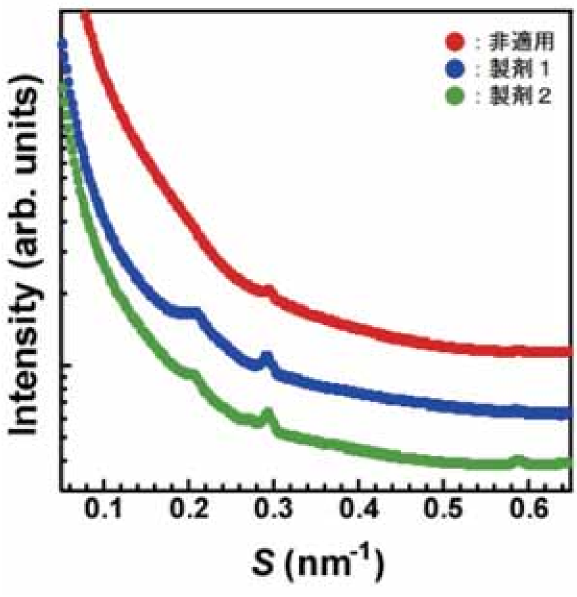

図１．小角 X 線回折プロファイル

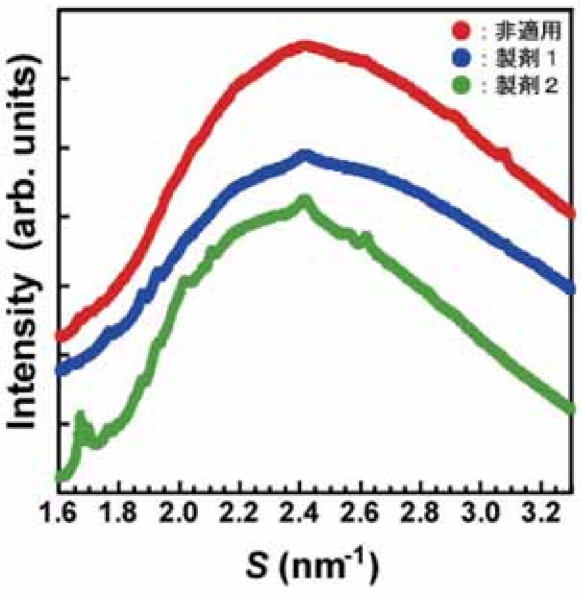

図２．広角 X 線回折プロファイル