



三次元培養皮膚の品質評価法の開発

○坂貞徳、大矢真由、小泉佑果、長谷川靖司、井上悠、足立浩章、中田悟

(日本メナード化粧品株式会社 総合研究所)

はじめに

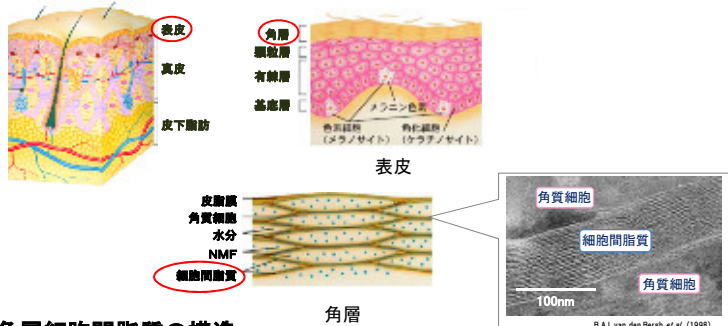
皮膚は、成人で表面積にして約1.7㎡、体重の約8%を占め、人体で最大の面積、重量を有する組織である。また、体内と外界の環境との境界にあり、人体の恒常性を維持する重要な役割を果たしている。皮膚は、おおまかに外側から表皮・真皮・皮下組織の三層構造をとっており、さらに表皮は最外層から角層・顆粒層・有棘層・基底層と分化過程の異なる層で構成されている。一方、真皮はコラーゲン線維中に線維芽細胞が分散した形状をとっている。このような皮膚組織の中で生体維持に最も重要な役割を果たしているのが皮膚の最外層に位置する「角層」である。

角層は、皮膚の最外層にある厚さ10数μmの非常に薄い膜で、角質細胞とその周りを取り巻く角層細胞間脂質から構成されている。特に角層細胞間脂質はセラミド・遊離脂肪酸・コレステロールなどの多成分から構成される脂質分子集合体であり、外界からの刺激を防ぎ体内からの水分蒸散を抑える、という皮膚バリア機能の維持において重要な役割を果たしている。そのため、皮膚の機能を評価する上で、角層細胞間脂質の構造を知ることは非常に重要である。

一方、2009年3月よりEUにおいて化粧品開発に関わる動物実験が禁止されたことを受け、動物実験代替法として三次元培養ヒト皮膚モデル(以下、三次元培養皮膚)を用いた研究が盛んに行われている。しかしこれまでに、三次元培養皮膚は物質の透過性がヒト皮膚よりも高く¹⁾、角層細胞間脂質の構造も不完全である²⁾、といった問題点が指摘されている。

そこで本課題では、試験に用いる三次元培養皮膚の品質を評価できる方法の確立を目指し、ヘアレスマウス皮膚角層と三次元培養皮膚角層についてあいちシンクロtron光センターBL8S3にて小角・広角X線回折同時測定を行い、角層細胞間脂質構造の評価を行ったので、その結果をSPring-8の測定結果と比較して報告する。

皮膚の構造とバリア機能



角層細胞間脂質の構造



皮膚角層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、それらが2つの特徴的な周期構造をつくっている。分子の長軸方向への配向により現れる周期構造(ラメラ構造)と炭化水素鎖が充填してつくる構造(充填構造)である。これまでに小角・広角X線回折実験により、ヘアレスマウス皮膚角層においてラメラ構造には6.0nmの周期をもつ短周期ラメラ構造と13.6nmの周期をもつ長周期ラメラ構造があること、また充填構造には六方晶(格子定数0.42nm)と斜方晶(格子定数0.37nmと0.42nm)があることが報告されている。これら角層細胞間脂質のつくる特徴的な構造は、皮膚バリア機能の維持において重要な役割を担っている。

結果および考察

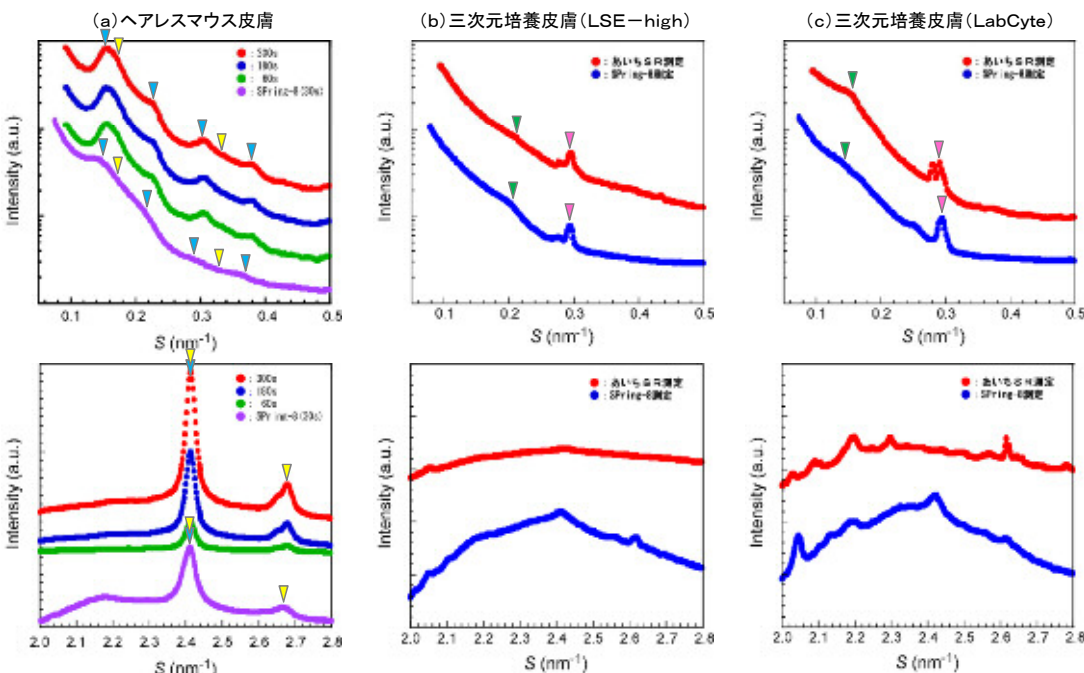


Fig. 皮膚角層から得られるX線回折プロファイル

(a):ヘアレスマウス皮膚、(b):三次元培養皮膚(LSE-high、東洋紡)、(c):三次元培養皮膚(LabCyte、J-TEC)
(上段:小角、下段:広角)

Fig. より、

(a)のヘアレスマウス皮膚では、小角領域で長周期ラメラ構造由来の回折ピーク(▽)および短周期ラメラ構造由来の回折ピーク(▽)が、広角領域で脂質の充填構造(六方晶及び斜方晶)由来の回折ピーク(▽及び▽)が観察された。一方、(b)・(c)の三次元培養皮膚では、小角領域でラメラ構造由来の回折ピーク(▽)やコレステロール単一結晶由来の回折ピーク(▽)が、広角領域で脂質の充填構造やコレステロールに由来する回折ピークが観察された。

これらの結果より、三次元培養皮膚の角層細胞間脂質はヘアレスマウス皮膚と比較して、ラメラ構造や充填構造が不完全であり、コレステロールが単一結晶化していることが確認できた。

以上より、皮膚角層細胞間脂質の構造について、あいちシンクロtron光センターにおいてもSPring-8と同等の評価を行うことが可能であるとわかった。

ただし、SPring-8と同等の評価を行うためには、照射時間180~300秒が必要であり、あいちシンクロtron光センター(BL8S3)はSPring-8(BL40B2)と比較すると1/6~1/10程度の性能である。

実験

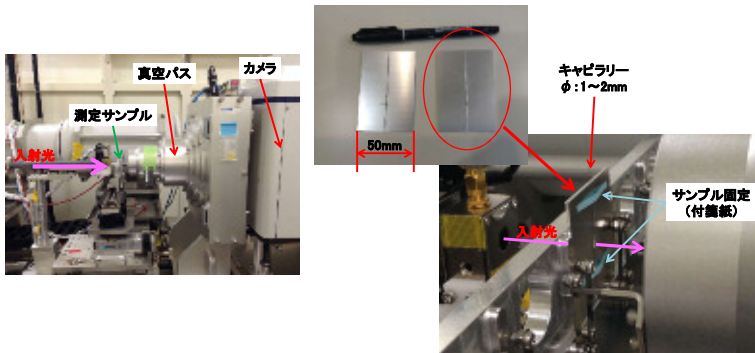
角層サンプルの調製

ヘアレスマウス皮膚(HR-1、4週齢)、および三次元培養皮膚(TESTSKIN LSE-high(東洋紡)およびLabCyte(J-TEC))からトリプシン処理により角層のみを剥離し、脱水後に水を加えて窒素ガス中にて角層水分量を20%に調整した。その後、キャピラリーチューブ(φ1mm; W. Muller製)に詰め測定試料とした。



小角・広角X線回折測定

あいちシンクロtron光センターのビームラインBL8S3において、小角・広角X線回折同時測定を行った。X線のエネルギー13.9KeV、X線の波長0.09nm、カメラ長469.98mm、照射時間300秒にて測定を行い、カメラにはRAXIS(リガク製)を用い、IPは300×300mmを使用した。また、得られた回折像はFIT2Dプログラムにて一次元化した。



期待される効果・社会的インパクト

本課題によって、動物実験代替法における三次元培養皮膚の品質向上によって実験動物の削減が期待でき、医薬品や化粧品の安全性、さらに製剤の有効性評価の信頼性向上が期待される。また、我々が開発している三次元培養皮膚についても製造方法や品質評価の見極めなど多くの情報が得られると期待しており、今後は再生医療分野においてもさらなる検討を進めていきたい。

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) 国澤直美、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(2006)