

加齢に伴う角層の構造変化の解析と 3次元培養皮膚モデルの品質評価系への展開

坂 貞徳、小田満智子、井上 悠、長谷川靖司、足立浩章、中田 悟
日本メナード化粧品株式会社

背景・経緯

皮膚角層中の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3次元培養ヒト皮膚モデル(以下、3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、3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、培養皮膚の作製技術の向上を目指し、新しい品質評価方法の開発を目的とした。また合わせて、老化や肌荒れの評価も可能なモデル構築も試み、市販の培養皮膚に対してドデシル硫酸ナトリウム(以下、SDS)を塗布し、老化や炎症性マーカーであるIL-1 α ^{3,4)}を発現させた老化モデル培養皮膚を作製し、角層の小角・広角X線回折同時測定を行い、角層細胞間脂質の構造変化を評価した。さらに、自社にて作製した培養皮膚についても評価した。

結果

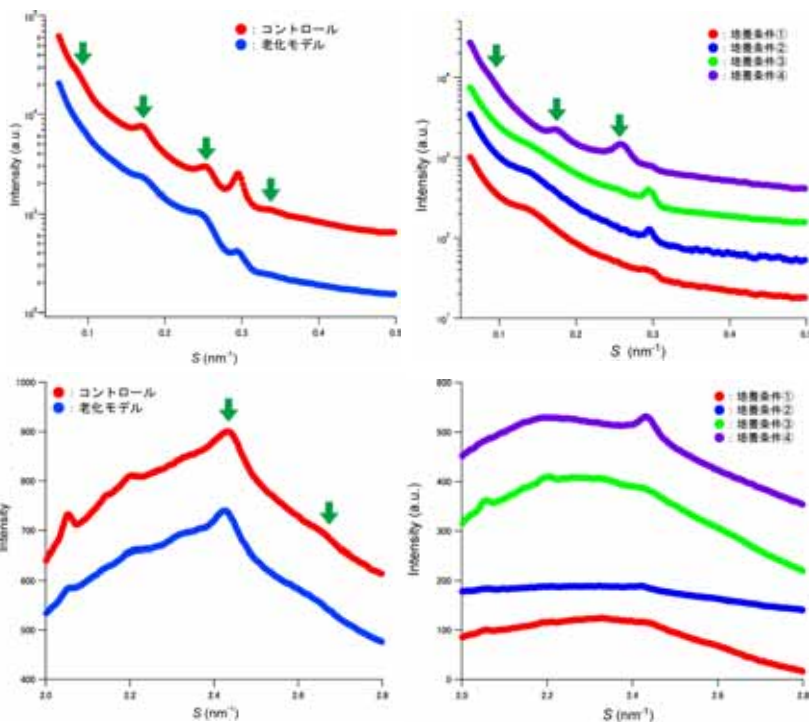


Fig. 1 培養皮膚のX線回折プロファイル
左側：市販の培養皮膚、右側：自社作製培養皮膚
(上段：小角側細胞間脂質、下段：広角側細胞間脂質)

【市販培養皮膚および培養皮膚を使った老化モデル】

コントロールは小角領域において $S=0.085 \text{ nm}^{-1}$ (11.8nm)、 $S=0.17 \text{ nm}^{-1}$ (5.9nm)、 $S=0.255 \text{ nm}^{-1}$ (3.9nm)、 $S=0.34 \text{ nm}^{-1}$ (2.9nm)にラメラ構造由来の回折ピーク(矢印)が観察され、広角領域の $S = 2.41 \text{ nm}^{-1}$ (0.415 nm)、 $S = 2.69 \text{ nm}^{-1}$ (0.372 nm)に脂質の充填構造(六方晶および斜方晶)由来の回折ピークが観察された。また、 $S=0.29 \text{ nm}^{-1}$ はコレステロールの結晶である。一方、老化モデルでは、コントロールの小角領域で見られた周期構造はブロード化していることがわかった。しかし、広角領域ではあまり変化がみられなかった。これまで小角領域と広角領域は連動して変化しているが、小角領域のみ変化している。このことから、面間隔の異なる複数のラメラ構造が存在していると考えられる。

【自社作製培養皮膚】

～ はコレステロール由来の結晶と $S=0.14 \text{ nm}^{-1}$ (7.1nm)にある脂質由来の回折ピークが見られた。広角領域にはわずかに $S=2.41 \text{ nm}^{-1}$ (0.415 nm)脂質の充填構造由来の回折ピークが観察された。

では $S=0.085 \text{ nm}^{-1}$ (11.8nm)、 $S=0.17 \text{ nm}^{-1}$ (5.9nm)、 $S=0.255 \text{ nm}^{-1}$ (3.9nm)にラメラ由来の回折ピークが見られた。広角領域の $S = 2.41 \text{ nm}^{-1}$ (0.415 nm)脂質の充填構造由来の回折ピークが観察された。

期待される効果・社会的インパクト

細胞間脂質の構造に着目することによって、培養条件の異なる自社作製培養皮膚を詳細に評価することができた。今回の結果は、従来のマーカーなどの手法とは異なる新しい培養皮膚の評価方法に活用でき、ヒトに近い培養皮膚の開発に役立つと考えられる。

【参考文献】

- 1) Watanabe T., et al., *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 (2006B)
- 3) Tanaka K., et al., *J Pharmacol Exp Ther.* 315, 624-630 (2005), 4) Newby CS., et al., *J Invest Dermatol.* 115, 292-298 (2000)
- 5) Er Rafik M., et al., *Biophys J.* 86, 3893-3904 (2004)