

細胞間脂質及びケラチン繊維の同時測定による 3次元培養皮膚モデルの品質評価法の確立

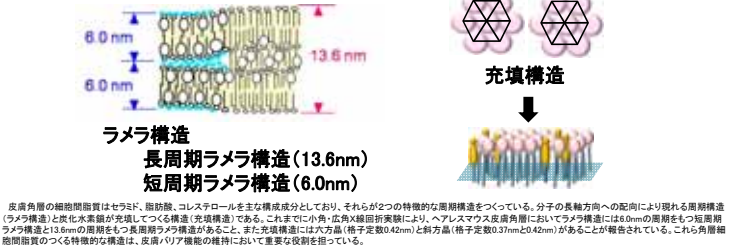
○長谷川 靖司、井上 悠、坂 貞徳、中田 悟
日本メナード化粧品株式会社 総合研究所

背景・経緯

我々は、あいちSRを用いて3次元培養皮膚(以下、培養皮膚)の小角・広角X線回折測定を試み、特に、皮膚のバリア機能に重要な角層細胞間脂質の構造を簡便に評価できる技術の開発を進めてきた(2014年度 成果公開無償利用課題)。本評価技術は、培養皮膚の状態や品質を評価する方法として大いに期待できる。

そこで本研究では、改めてこれまでに確立してきた評価法を用いて、培養皮膚の製造過程における角層の状態変化や、外的刺激(SDS、紫外線など)による角層の構造変化について、病理学的な評価も合わせて確認した。

角層細胞間脂質の構造



培養皮膚の作製(自作作製モデル)

市販の3次元培養皮膚作製キット(CELLnTEC社製)を用いて、添付のプロトコルに従い、37°C、5% CO₂環境下にて培養皮膚を培養・製造した。なお、培養は最長で15日間まで行った。

角層サンプルの調製

正常ヒト皮膚(30代女性、アステランド社より購入)、および上記で作製した培養皮膚(自作作製モデル)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。なお、今回は、培養7日目、10日目、15日目の培養皮膚、また各種刺激に暴露した培養皮膚(SDS、紫外線)を試料とし、それぞれ角層の変化について評価した。

培養皮膚の病理学的評価

先と同様に作製した培養皮膚の一部を採取し、4%パラホルムアルデヒド水溶液にて組織を固定し、定法に従いパラフィンブロックを作製し、マイクロームにて薄切を行い、ヘマトキシリン・エオシン染色(H.E染色)を実施した。顕微鏡下において、培養皮膚の観察を行い、角層のでき具合などを確認した。

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。

結果・考察

病理学的評価 (H.E染色)

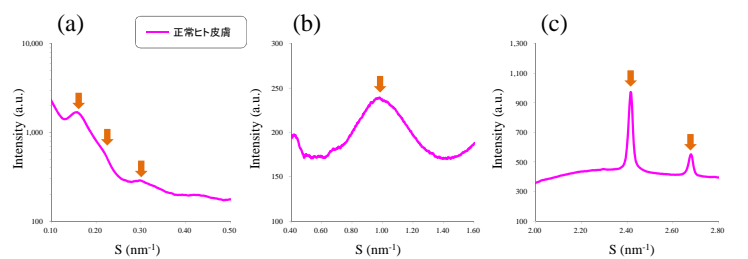
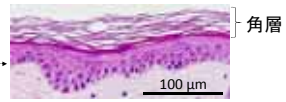


Fig. 1 正常ヒト皮膚のX線回折プロファイル [(a)小角、(b)ケラチン、(c)広角]
病理学的評価により、正常ヒト皮膚における角層の状態を観察した。扁平化した角質細胞が脂肪層している様子が確認された。一般的に、角層は固い角質(ケラチン繊維)が積み重なり、各細胞間はセラミド、脂肪酸、コレステロールなどが特徴的な層構造を形成している。
このX線回折測定を行った結果、(a)小角領域において、 $S=0.15\text{nm}^{-1}$ (6.7nm)、 $S=0.22\text{nm}^{-1}$ (4.5nm)、 $S=0.29\text{nm}^{-1}$ (3.4nm)にラメラ構造由来の回折ピークが観察された($S=0.29\text{nm}^{-1}$ に関しては、コレステロール由来の回折ピークも重なっていると予測される)。(b) $S=1.0\text{nm}^{-1}$ (1.0nm)付近にブロードなケラチン繊維由来の回折ピークが観察された。(c)広角領域において、 $S=2.41\text{nm}^{-1}$ (0.415nm)、 $S=2.69\text{nm}^{-1}$ (0.372nm)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。

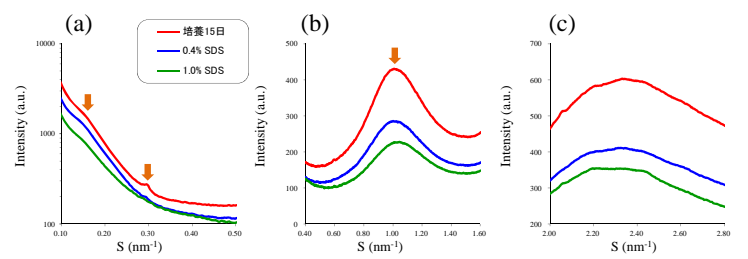
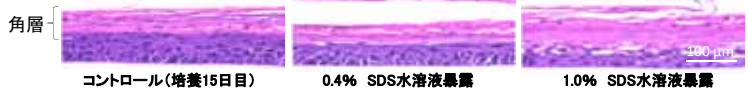


Fig. 3 培養皮膚(角層)に対するSDSの影響について [(a)小角、(b)ケラチン、(c)広角]
自社培養皮膚(培養15日目)に対してSDS水溶液(0.4%、1.0%)を暴露し、角層の形態変化について病理学的な評価を行った。その結果、SDS水溶液の暴露濃度に依存して、角層の前壊が確認された。
この時、X線回折測定を行った結果、(a)小角領域において、培養15日目で見られていた回折ピークが、ブロード化または消失していった。(b) $S=1.0\text{nm}^{-1}$ 付近に見られたケラチン繊維由来の回折ピークもブロード化していった。以上より、培養皮膚(角層)に対するSDS水溶液の暴露によって、角層の前壊が起こり、X線回折測定においても、その現象を捉えることが可能であると示唆された。

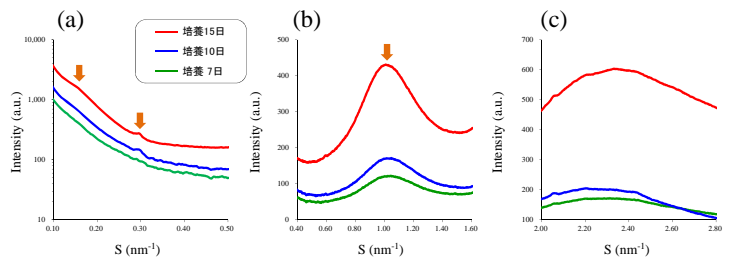
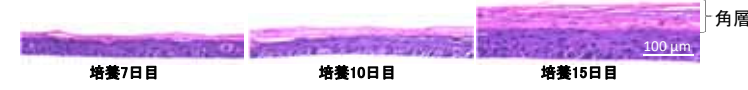


Fig. 2 自社培養皮膚のX線回折プロファイル [(a)小角、(b)ケラチン、(c)広角]
病理学的評価により、自社培養皮膚の製造過程における、角層の状態を観察した。培養7日目では十分な角層が形成されておらず、培養10日目より明確な角層の形成が見られ、15日目において十分な角層の形成が確認された。
この時、X線回折測定を行った結果、(a)小角領域において、 $S=0.164\text{nm}^{-1}$ (6.1nm)、 $S=0.29\text{nm}^{-1}$ (3.3nm)に回折ピークが観察された。(b) $S=1.0\text{nm}^{-1}$ (1.0nm)付近にブロードなケラチン繊維由来の回折ピークが観察された。(c)広角領域においては、明確な回折ピークが見られなかった。以上の結果より、自社培養皮膚の角層は、培養10日目以降に形成され、15日目において十分な角層が見られるものの、ヒト皮膚の角層(Fig.1)に比べると、そのでき具合は、まだ未熟であると示唆された。

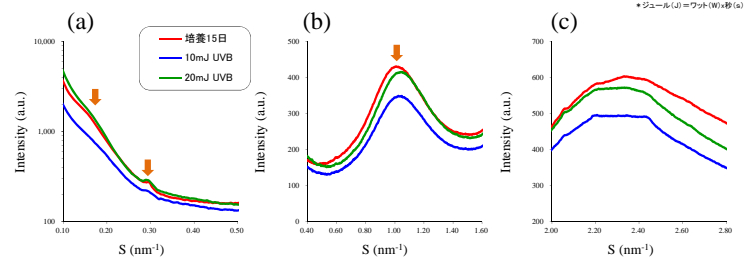
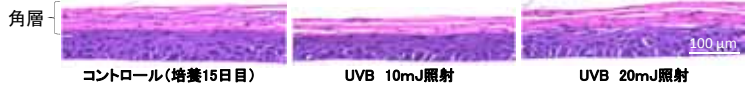


Fig. 4 培養皮膚(角層)に対する紫外線の影響について [(a)小角、(b)ケラチン、(c)広角]
自社培養皮膚(培養15日目)に対して紫外線(UVB 10、20mJ)を照射し、角層の形態変化について病理学的な評価を行った。その結果、今回の紫外線照射では、角層の構造に対する影響は低かった。
この時、X線回折測定を行った結果、培養15日目に見られた、(a)小角領域の回折ピーク、(b)ケラチン繊維由来の回折ピークともに若干のブロード化は見られるものの、大きな変化は見られなかった。以上より、培養皮膚(角層)に対する紫外線の影響は低く、これまでの知見から、紫外線は角層よりも、細胞の遺伝子などに対する影響の方が大きいと考えられた。また、X線回折測定においても、その状態をよく支持するプロファイルが確認できた。

期待される効果・社会的インパクト

現在、培養皮膚は、医薬品や化粧品の安全性と有効性を評価するためのツールとして活用されている。また近年では、再生医療への展開も見せており、産業として大きな市場になりつつある。しかしながら、その品質には今のところバラツキが見られることから、より高品質な培養皮膚の製造と提供を考えた場合、その品質を簡便かつ正確に評価する方法が必要である。この課題に対して、あいちSRを活用した本評価技術は、培養皮膚の品質を簡便に評価できるものと期待している。今後、さらに検証を進め、培養皮膚の技術革新と産業としての活性化に貢献したい。