



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 総合研究所

1. 測定実施日

2014 年 12 月 26 日 10 時 - 18 時 30 分 (2 シフト) , BL8S3

2015 年 3 月 31 日 10 時 - 18 時 30 分 (2 シフト) , BL8S3

2. 概要

3 次元培養皮膚モデル (以下、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て検討した。Interleukin-1 α (以下、IL-1 α) を発現させた培養皮膚を老化モデルとし、市販の培養皮膚および老化モデルの角層を小角・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。その結果、老化モデルでは複数のラメラ構造が存在していることが示唆された。次に、自社にて作製した培養皮膚についても同様に評価したところ、細胞間脂質の構造およびケラチン線維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。

3. 背景と研究目的

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、培養皮膚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、培養皮膚の角層細胞間脂質のラメラ構造が不完全であり、脂溶性の物質が結晶化している可能性があるこ

と²⁾、などの問題点が報告されている。昨年の課題では、過去に測定したヘアレスマウス皮膚角層、市販の培養皮膚および自社製作の培養皮膚について評価を行い、SPring-8 (BL40B2) での測定結果と比較した。その中で、あいちSRでは培養皮膚の評価ができ、十分に活用できることを見出した³⁾。

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 ^{4,5)}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。

4. 実験内容

角層サンプルの調製

市販されている培養皮膚 (EPISKIN、SkinEthic Laboratories 社)、および自社で作製した培養皮膚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 (ϕ 1 mm ; W. Muller 製) に詰め測定試料とした。

IL-1 α 発現培養皮膚の作製

事前に 24 時間培養した皮膚モデルの角質側表面から 0.1% SDS 水溶液を 24 時間処理した。PBS にて SDS を洗い流した後、この皮膚モデルを 5 日間培養したものを IL-1 α 発現培養皮膚 (老化モデル) とした。なお、皮膚モデルの培養については、付属の維持培地を使用し、37°C、5% CO₂ 環境下にて行った。培地は 1 日毎に新しいものと交換し、培養後の培地は IL-1 α 測定用にそれぞれ回収した。

小角・広角 X 線回折測定

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 13.9 keV、X 線の波長 0.09 nm、カメラ長 468 mm、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 300×300 mm 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。

5. 結果および考察

Fig.1 は、培養皮膚である EPISKIN (以下、コントロール) および 0.1%SDS 水溶液処理した EPISKIN (以下、老化モデル) の角層の X 線回折プロファイルを示す。コントロールは小角領域において $S=0.085 \text{ nm}^{-1}$ (11.8 nm)、 $S=0.17 \text{ nm}^{-1}$ (5.9 nm)、 $S=0.255 \text{ nm}^{-1}$ (3.9 nm)、 $S=0.34 \text{ nm}^{-1}$ (2.9 nm) 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。ヒトやヘアレスマウスではおよそ 13 nm の長周期構造があるのに対し、培養皮膚では 11.8 nm の周期構造であった。今回使用した培養皮膚 (EPISKIN) はヒトに比べて長周期ラメラ構造の周期が短いといえる。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 $S=0.085 \text{ nm}^{-1}$ (11.8 nm)、 $S=0.17 \text{ nm}^{-1}$ (5.9 nm)、 $S=0.255 \text{ nm}^{-1}$ (3.9 nm)、 $S=0.34 \text{ nm}^{-1}$ (2.9 nm) の周期構造はブロード化していることがわかった。しかし、広角領域では斜方晶由来の $S=2.69 \text{ nm}^{-1}$ (0.372 nm) に脂質の充填構造の回折ピークが観察がされなかった。これまでは小角領域と広角領域は連動して変化していることが多く報告されているが、Fig.1 は小角領域のみ変化している。

次に、Fig.2 は自社で作製した培養皮膚の測定結果である。これらの 4 つのサンプルは培養条件の違いによるものである。EPISKIN とは異なる結果がいくつか得られた。①~③はコレステロール由来の結晶と $S=0.14 \text{ nm}^{-1}$ (7.1 nm) 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。一方、④では $S=0.085 \text{ nm}^{-1}$ (11.8 nm)、 $S=0.17 \text{ nm}^{-1}$ (5.9 nm)、 $S=0.255 \text{ nm}^{-1}$ (3.9 nm) 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。また、広角領域のバックグラウンドが①と②および③と④と異なることがわかった。一方、皮膚角層を小角・広角 X 線回折を同時に観察すると、細胞間脂質の構造以外に角層細胞由来のケラチン線維の回折像がみられる。これは、ヒトやマウスだけでなく、培養皮膚にもみられる。そこで、Fig.3 にそれぞれのケラチン線維の X 線回折プロファイルを示し、EPISKIN の結果とともにケラチン線維構造について考察する。ケラチン線維は $S=1 \text{ nm}^{-1}$ (1 nm) にブロードな回折ピークを示し、一般には coiled coil (α -keratin helix dimers)、 α -ヘリックス構造の 2 量体間の距離を示す⁶⁾。

自社作製培養皮膚のケラチン線維のプロファイルを見ると①と②および③と④の群に分けられ、特に②は回折像がブロード化している。回折像のブロード化は2量体の並びが不規則であるため、ケラチン線維が不完全な状態であることを示している。市販品である EPISKIN のコントロールと老化モデルを比較した場合、老化モデルはわずかに規則性が劣ることがわかった。自社作製培養皮膚③と④の群は市販品のコントロールと同等であると判断できる。したがって、脂質由来の結果とケラチン線維の結果から、④の培養皮膚が秩序化した構造を持つことが分かった。①~③の中では③はケラチン線維が正常に作られており、②は不良であることがわかった。

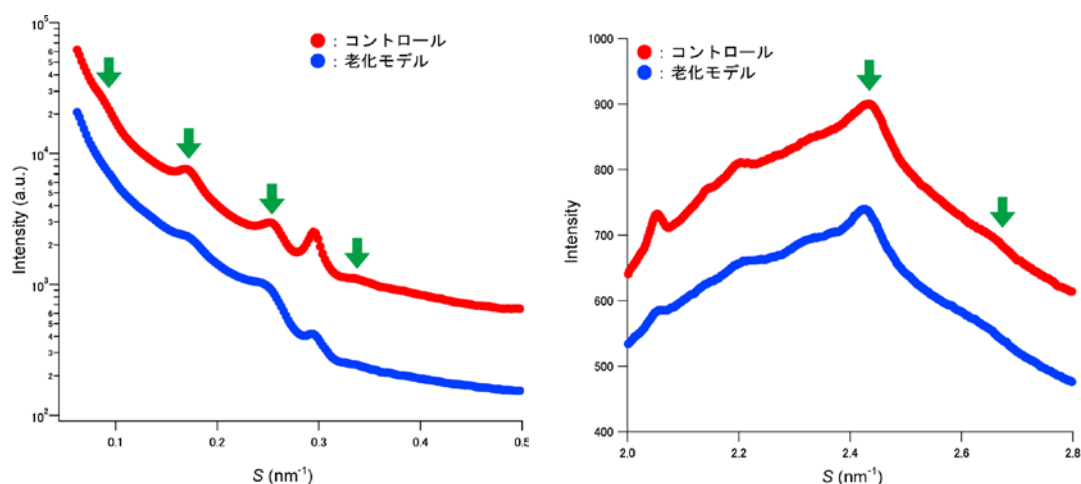


Fig.1 培養皮膚角層から得られる X 線回折プロファイル
(左側：小角 X 線回折プロファイル、 右側：広角 X 線回折プロファイル)

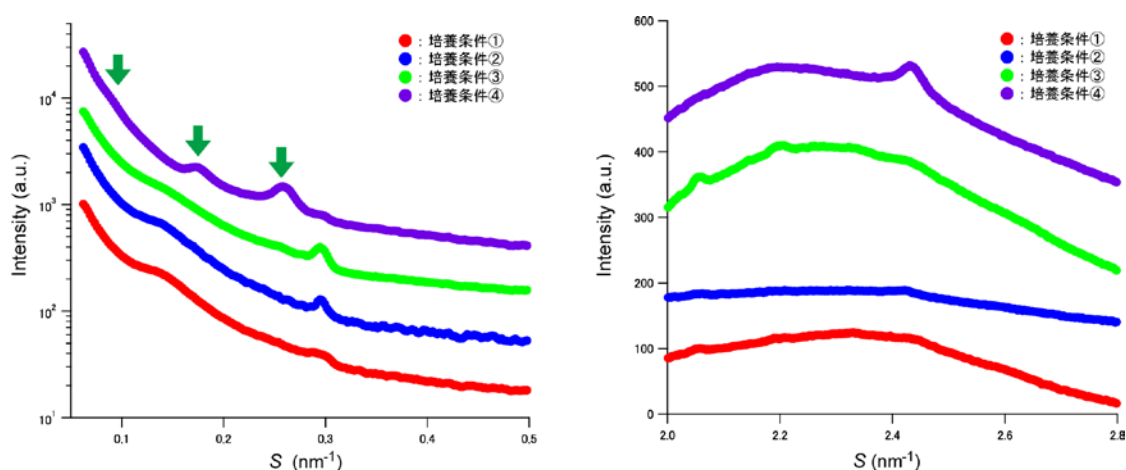


Fig.2 自社作製培養皮膚角層から得られる X 線回折プロファイル
(左側：小角 X 線回折プロファイル、 右側：広角 X 線回折プロファイル)

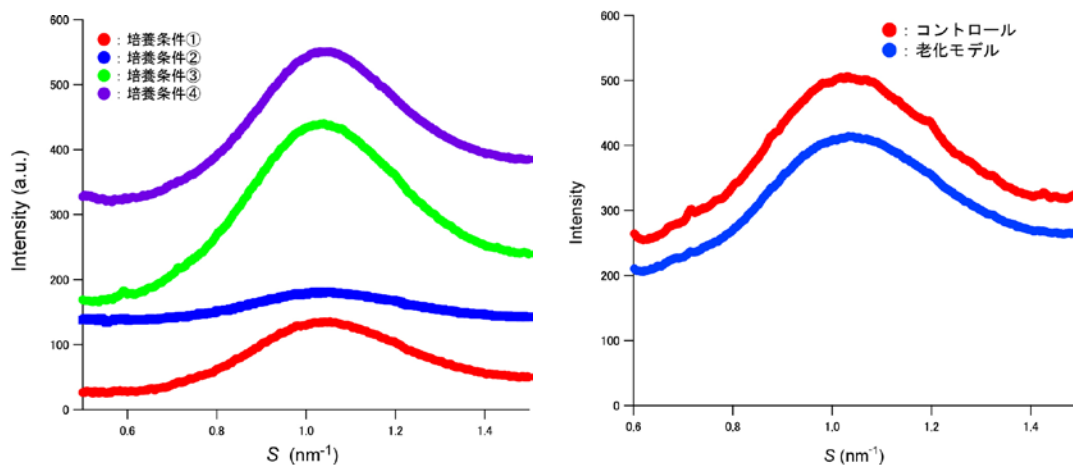


Fig.3 自社作製および市販培養皮膚角層のケラチン繊維由来
X線回折プロファイル

(左側：自社作製 X 線回折プロファイル、 右側：市販 X 線回折プロファイル)

6. 今後の課題

従来の培養皮膚の評価は細胞間脂質の周期構造および充填構造に着目してきた。しかし、未だヒトやマウスなどのレベルの構造の培養皮膚にまで至っていないことを鑑みた場合、より詳細な評価方法が必要となる。今回の結果は細胞間脂質構造だけでなく、ケラチン繊維の構造に着目し評価することによって、自社作製培養皮膚①~④の優劣をつけることができた。今後は本評価法のデータを取りながら、老化モデル等を使いヒトに近い培養皮膚の製造をめざす。

7. 参考文献

- 1) Watanabe T., et al., *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) 2013 年度 あいち S R 成果公開無償利用事業 成果報告書
- 4) Tanaka K., et al., *J Pharmacol Exp Ther.* **315**, 624-630 (2005)
- 5) Newby CS., et al., *J Invest Dermatol.* **115**, 292-298 (2000)
- 6) Er Rafik M., et al., *Biophys J.* **86**, 3893-3904 (2004)