



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

1. 測定実施日

2015年12月26日 10時 - 18時30分 (2シフト) , BL8S3

2016年1月7日 10時 - 18時30分 (2シフト) , BL8S3

2. 概要

現在、3次元培養皮膚モデル（以下、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その安定的な供給が望まれる。この場合、培養皮膚の品質を正確かつ簡便に評価する方法が必要であり、この課題に対して我々はこれまでに、あいちSRを活用した培養皮膚の角層構造を解析する技術の確立を進めてきた（2013年・2014年 成果公開無償利用事業課題）。今回の課題では、これまでに確立した小角・広角 X 線回折測定法を応用した、培養皮膚の角層構造の解析技術を用いて、培養皮膚の製造過程における角層の出来栄や、SDS や紫外線などの外的刺激を与えた場合の角層の構造変化について評価した。その結果、培養日数の経過とともに、小角領域にラメラ構造由来、またケラチン繊維由来の回折ピークが見られはじめ、これらのピークは、角層の形成過程を示していると示唆された。さらに、培養皮膚に対して、SDS や紫外線などの外的刺激を与えて同様な解析を行ったところ、先に確認された回折ピークが減弱または消失することを確認した。これらの回折ピークの変化は、病理学的評価の結果とも一致していたことから、本評価法は、培養皮膚の角層の状態を見極める評価法として有用であると考えられた。

3. 背景と研究目的

近年、ティッシュ・エンジニアリング技術の進歩により、培養皮膚の作製が可能になった。現在、このような培養皮膚は、ヒトの皮膚を再現したモデルとして、化粧品や医薬品の安全性や有効性の評価に用いられている。また、近年

では、再生医療への適用も開始され、その需要は益々高まっている。しかしながら、現在のモデルは、ヒトの皮膚に比べると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や、物質の透過性がヒトの皮膚よりもおよそ10倍高いことなど、幾つかヒトの皮膚と異なる点も報告されている^{1), 2)}。今後、培養皮膚を医療や創薬に活用していくためにも、よりヒトの皮膚に近いモデルの開発と安定的な供給体制を整える必要がある。

現在行われている培養皮膚の状態や品質を評価する方法としては、病理学的な観察（目視）による評価が一般的である。しかし本方法は、病理染色に費やす時間や特殊な技術が必要となり、簡便な評価方法とは言えない。そこで我々は、あいちSRを用いた培養皮膚の小角・広角X線回折同時測定を試み、より簡便な、培養皮膚における角層構造の状態を客観的、且つ定量的に評価できる技術の開発を進めてきた³⁾。

本研究では、これまでに確立した評価法を用いて、培養皮膚の作製過程における経時的な角層の形成や、外的刺激（SDS、紫外線）による角層の構造変化について解析し、同時に病理学的な評価も行うことで、我々が確立した評価法が角層の構造変化を捉えているか確認した。

4. 実験内容

培養皮膚の作製（自社培養皮膚）

培養皮膚の作製過程における角層の構造変化を評価するために、自社にて培養皮膚を作製した。具体的には、市販の3次元培養皮膚作製キット（CELLnTEC社製）を用いて、添付のプロトコールに従い、37℃、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。

X線回折測定試料（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）、また上記で作製した培養皮膚（自社培養皮膚）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（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（SDS、紫外線）を与えた培養皮膚を試料とし、それぞれ角層の構造変化について評価した。

培養皮膚の病理学的評価

先の角層サンプルと同じ正常ヒト皮膚および培養皮膚（自社培養皮膚）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た。その後、定法に従いパラフィンブロックを作製し、ミクロトームにて薄切を行い、ヘマトキシリン・エオシン染色（以下、H. E. 染色）を実施した。顕微鏡下において角層の状態について確認した。

小角・広角 X 線回折測定

先に調製した測定試料を、あいち SR ビームライン (BL8S3) にて小角・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、I P 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、X 線回折プロファイルとしてグラフに示した。なお、小角領域、広角領域における実際の X 線回折プロファイルの変化から、各領域において変動がみられたピーク（最も高い値）について、これまでに確認されている、ラメラ構造、コレステロール、脂質の充填構造（六方晶および斜方晶）、またケラチン繊維由来の回折ピークと照らし合わせ、解析した³⁾。

5. 結果および考察

Fig. 1 に、ヒト皮膚組織（以下、ヒト角層）の病理学的な観察像（H. E. 染色）と X 線回折プロファイルを示した。病理学的な観察より、ヒト角層において扁平化した角質細胞が重層している様子が確認された (Fig. 1 上段)。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周期構造を形成していることが知られている。このヒト角層の X 線回折測定を行った結果、小角領域において $S = 0.15 \text{ nm}^{-1}$ (6.7 nm)、 $S = 0.22 \text{ nm}^{-1}$ (4.5 nm)、 $S = 0.29 \text{ nm}^{-1}$ (3.4 nm) にラメラ構造由来の回折ピーク ($S = 0.29 \text{ nm}^{-1}$ (3.4 nm) に関してはコレステロール由来の回折ピークを含む) が観察され、 $S = 1.0 \text{ nm}^{-1}$ (1.0 nm) 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 (Fig. 1 a-b)。また、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確認された (Fig. 1 c)。

一方、自社培養皮膚について、培養 7 日目、10 日目、15 日目の角層の状態について先と同様な評価を行ったところ、病理学的な観察より、培養 10 日目より明確な角層の形成が認められ、培養 15 日目では十分な角層の形成が確認できた (Fig. 2 上段)。さらに、X 線回折測定の結果から、角層の形成に伴い、 $S = 1.0 \text{ nm}^{-1}$ (1.0 nm) 付近に見られるケラチン繊維由来の回折ピークが大きくなっている

ことが明らかとなった (Fig. 2 b)。故に、本回折ピークの大きさは、角層の重層化を反映していると予測された。しかしながら、今回の測定では、ヒト角層の小角領域で見られた回折ピークは、 $S=0.164\text{ nm}^{-1}$ (6.1 nm)、 $S=0.29\text{ nm}^{-1}$ (3.3nm) に弱いピークが見られるのみであり、且つ広角領域では、明確な回折ピークが観察がされなかった (Fig. 2 a, c)。

故に、自社培養皮膚の角層は、見た目はヒト角層と類似しケラチン繊維も十分形成されていると考えられるが、角層細胞間脂質の状態は、ヒト角層とは大きく異なっていると予測された。これまでも、多くの培養皮膚においてヒト角層に比べると角層細胞間脂質のラメラ構造が不完全であることが報告されており¹⁾、今後、よりヒトに近い培養皮膚の開発を進める上で X 線回折測定は、角層の状態を客観的、且つ定量的に知る重要な解析技術になると考えられた。

さらに、自社培養皮膚 (培養 15 日目) に対して、外的刺激 (SDS、紫外線) を与えた場合の角層の構造変化について解析した。SDS 水溶液 (0.4 %、1.0 %) を暴露させた場合、濃度依存的な角層の崩壊が確認され (Fig. 3 上段)、且つ X 線回折測定においても、暴露前に見られた小角、ケラチン、広角領域の回折ピークが減弱または消失した (Fig. 3 a-c)。SDS は、皮膚の炎症を誘起させる皮膚刺激性物質として公知であり、その作用は、角層の崩壊 (皮膚バリア機能の低下) や細胞死をもたらすことによるものである^{4,5)}。今回の解析結果から、小角、ケラチン、広角領域に見られていた回折ピークの減弱または消失は、角層の崩壊を示唆しており、SDS による直接的な角層へのダメージを現わした反応であると考えられた。

これに対して、紫外線照射 (UVB 10 mJ、20 mJ) を施した培養皮膚では、大きな角層の構造変化は見られず (Fig. 4 上段)、X 線回折測定においても、若干のピークの減弱は確認されるものの、大きな変化は見られなかった (Fig. 4 a-c)。紫外線も、SDS と同様に皮膚の炎症を誘起させる要因として公知であるが、その作用は、SDS とは異なる^{5,6)}。一般的に、紫外線は細胞や遺伝子にダメージを与えることで細胞死を誘起させ、それに伴い、炎症性サイトカインの生成が促されることで皮膚の炎症が助長される。故に、SDS のような直接的な角層の崩壊をもたらすものではなく、細胞死による新陳代謝 (ターンオーバー) の乱れが、角層の状態を変化させる。今回の解析結果においても、各領域の回折ピークに大きな変化は見られなかったことから、紫外線照射の直接的な角層へのダメージは小さいことが予測された。

以上の結果より、本評価法は、培養皮膚の製造過程における角層の形成や、外的刺激による角層の構造変化を捉えることができる有用な評価法であると確認できた。

6. 今後の課題

あいちSRを活用した培養皮膚の本評価法において、小角・広角領域の回折ピークは、角層細胞間脂質のラメラ構造や脂質の充填構造の状態を示し、また、ケラチン繊維由来の回折ピークは、角層の重層化の状態を現わしていることが示唆された。さらに、本評価法により、自社培養皮膚はヒト角層に比べると、角層細胞間脂質のラメラ構造や脂質の充填構造が不完全であることがわかった。今後は本評価法を活用し、さらにデータを収集しつつ、よりヒトに近い培養皮膚の製造を目指したい。

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 年度および 2014 年度 あいちSR成果公開無償利用事業 成果報告書
- 4) Lee CH. and Maibach H., *Contact Dermatitis.* **30**, 271-275 (1994)
- 5) Yan-yu W., et al., *Cutan Ocul Toxicol.* **30**, 263-271 (2011)
- 6) Kim K., et al., *Toxicol Res.* **31**, 97-104 (2015)

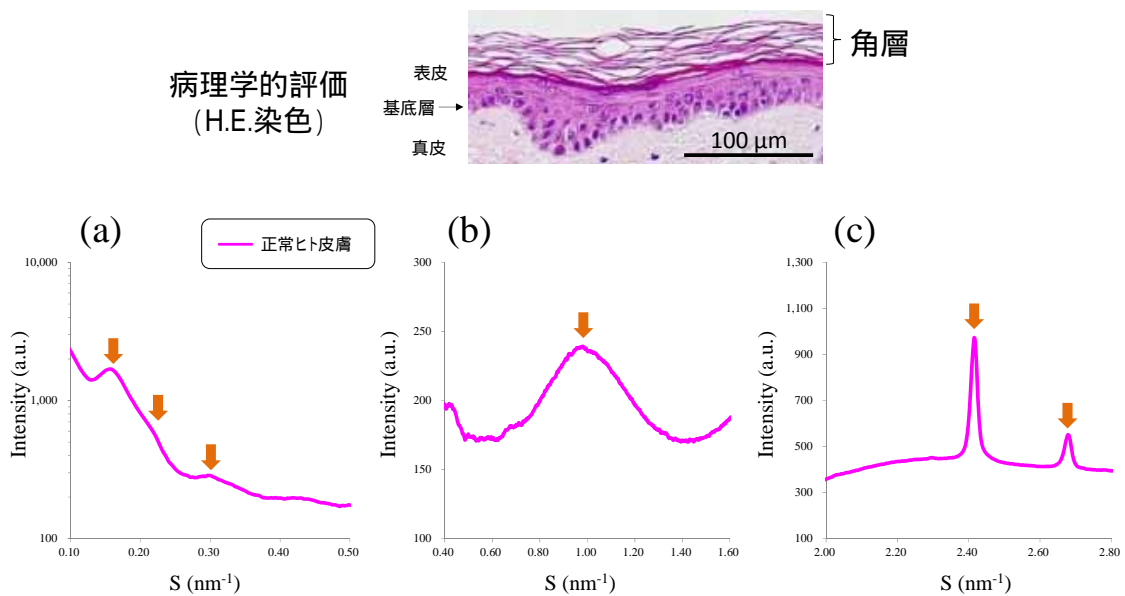


Fig. 1 正常ヒト皮膚（角層）の病理学的観察と X 線回折プロファイル

正常ヒト皮膚（角層）の状態について、病理学的な観察を行うとともに、X 線回折測定を実施した。

（上段：H.E. 染色像、下段：(a) 小角、(b) ケラチン、(c) 広角 X 線回折プロファイル）

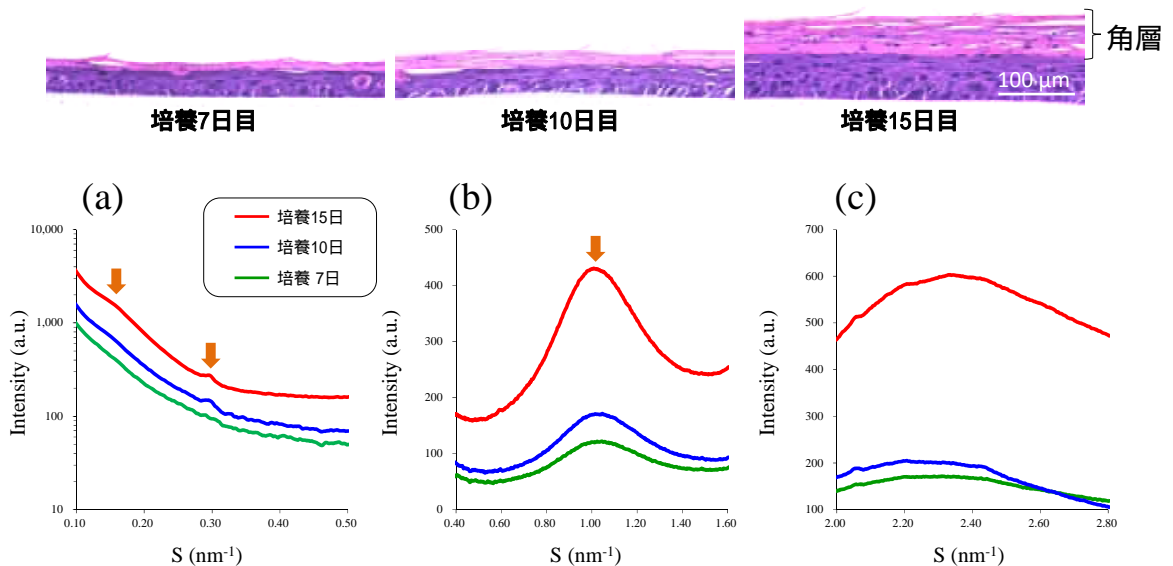


Fig. 2 自社培養皮膚の製造過程における角層の病理学的観察と X 線回折プロファイル

自社培養皮膚の製造過程における、培養 7 日目、10 日目、15 日目の角層の状態について、病理学的な観察を行うとともに、X 線回折測定を実施した。

（上段：H.E. 染色像、下段：(a) 小角、(b) ケラチン、(c) 広角 X 線回折プロファイル）

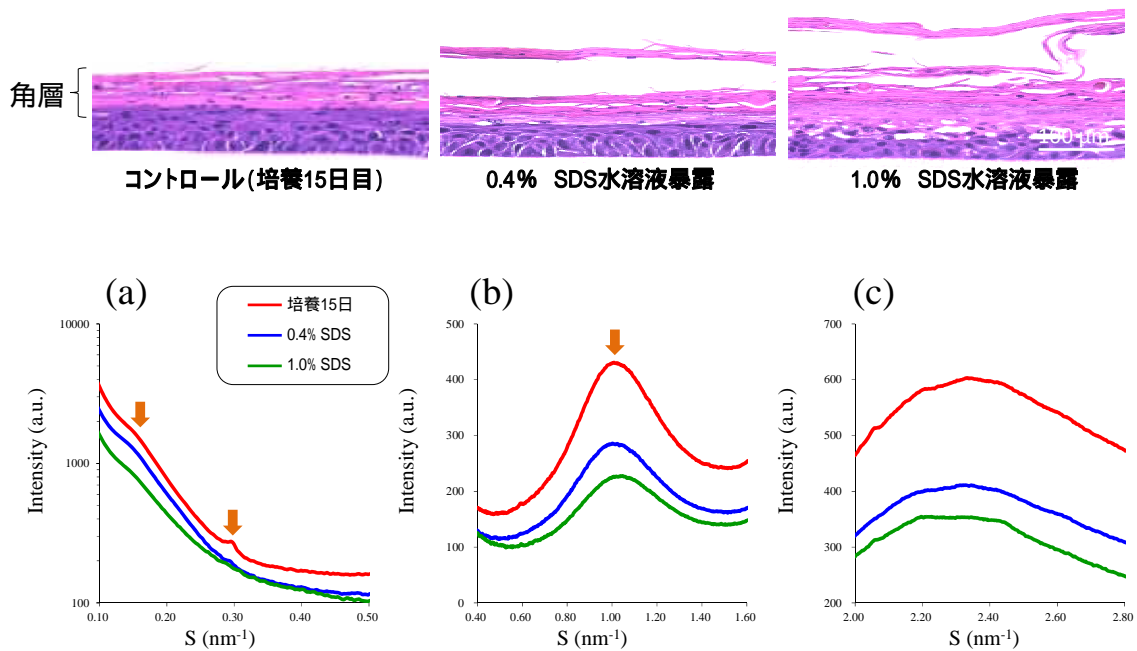


Fig. 3 自社培養皮膚（角層）に対する SDS の影響について

自社培養皮膚（培養 15 日目）に対する SDS 水溶液（0.4 %，1.0 %）暴露にともなう角層の構造変化について、病理学的な観察を行うとともに、X 線回折測定を実施した。
（上段：H.E. 染色像、下段：(a) 小角、(b) ケラチン、(c) 広角 X 線回折プロファイル）

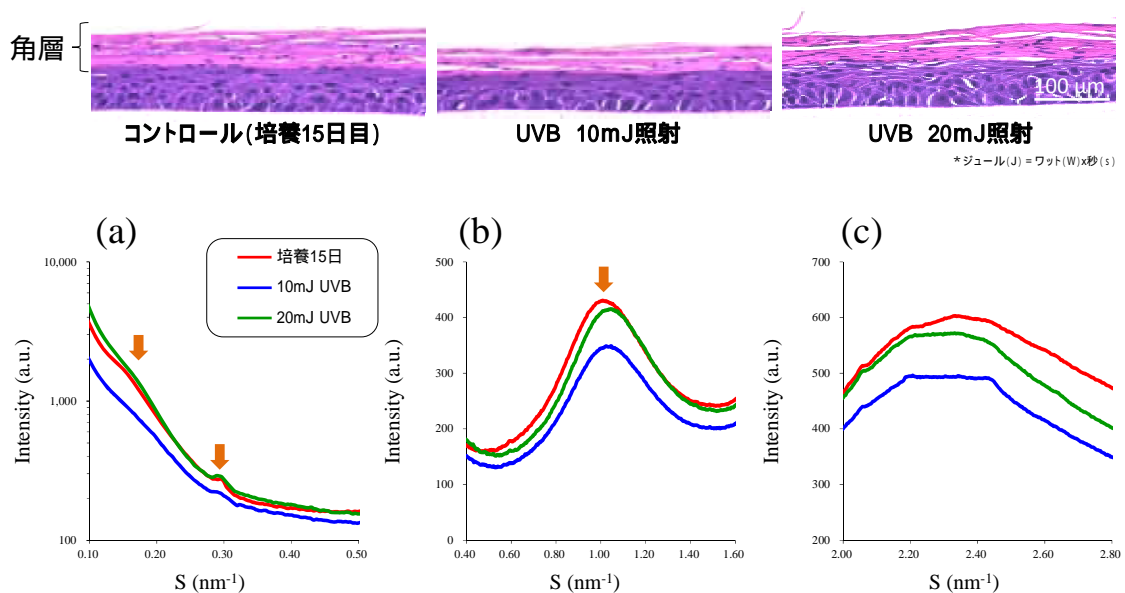


Fig. 4 自社培養皮膚（角層）に対する紫外線の影響について

自社培養皮膚（培養 15 日目）に対する紫外線（UVB 10 mJ，20 mJ）照射にともなう角層の構造変化について、病理学的な観察を行うとともに、X 線回折測定を実施した。
（上段：H.E. 染色像、下段：(a) 小角、(b) ケラチン、(c) 広角 X 線回折プロファイル）