



## 三次元培養皮膚の品質評価法の開発

Development of the quality evaluation method of three-dimensional cultured human skin model

坂貞徳、小泉佑果、大矢真由  
Sadanori Ban, Yuka Koizumi, Mayu Oya

日本メナード化粧品株式会社 総合研究所  
Research Laboratories, Nippon Menard Cosmetic Co., LTD.

### 1. 測定実施日

2014年2月25日 10時 – 18時30分 (2シフト), BL8S3  
2014年2月26日 10時 – 18時30分 (2シフト), BL8S3  
2014年2月27日 10時 – 18時30分 (2シフト), BL8S3

### 2. 概要

皮膚角層中の細胞間脂質の構造を評価することで、各種試験に用いる三次元培養ヒト皮膚モデル（以下、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、小角・広角 X 線回折同時測定を行った。その結果、市販されている三次元培養皮膚はヘアレスマウス皮膚と比較して角層細胞間脂質の構造が不完全であることが確認され、自社作製の三次元培養皮膚についても同様であった。

### 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<sup>1)</sup>、その理由の一つとして、三次元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<sup>2)</sup>、などの問題点が報告されている。

そこで本課題では、三次元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する。ここでは、ヘアレスマウス皮膚角層、市販されている三次元培養皮膚角層および自社にて作製した三次元培養皮膚角層について小角・広角 X 線回折同時測定を行い、角層細胞間脂質の構造を評価した。また、その結果を SPring-8 での測定結果と比較した。

#### 4. 実験内容

##### 角層サンプルの調製

ヘアレスマウス皮膚 (HR-1、4 週齢)、市販されている三次元培養皮膚 (LabCyte、J-TEC)、および自社で作製した三次元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 ( $\phi 1\text{mm}$ ; W. Muller 製) に詰め測定試料とした。

##### 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 13.9KeV、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。

#### 5. 結果および考察

Fig.1 は、あいち SR 及び SPring-8 にて測定したヘアレスマウス皮膚角層の X 線回折プロファイルを示す。(あいち SR で測定した回折プロファイルについては、照射時間 60 秒、180 秒、300 秒それぞれの結果を示す。) ヘアレスマウス皮膚では、小角領域の  $S = 0.156 \text{ nm}^{-1}$  (6.41 nm)、 $S = 0.227 \text{ nm}^{-1}$  (4.41 nm)、 $S = 0.305 \text{ nm}^{-1}$  (3.08 nm)、 $S = 0.380 \text{ nm}^{-1}$  (2.63 nm) に長周期ラメラ構造由来の回折ピークが、 $S = 0.167 \text{ nm}^{-1}$  (5.99 nm)、 $S = 0.342 \text{ nm}^{-1}$  (2.92 nm) に短周期ラメラ構造由来の回折ピークが観察され、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。

一方、Fig.2 は、あいち SR 及び SPring-8 にて測定した市販されている三次元培養皮膚角層(LabCyte(J-TEC))の X 線回折プロファイルを示す。LabCyte では、小角領域においてラメラ構造由来の回折ピークや  $S=0.295\text{ nm}^{-1}$  (3.39 nm) のコレステロール単一結晶に由来する回折ピークがみられ、広角領域において  $S=2.42\text{ nm}^{-1}$  (0.413 nm) の脂質充填構造由来の回折ピークや複数のコレステロールに由来する回折ピークが観察された。

以上の結果より、市販されている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された。

また、Fig.3 は、自社で作製した三次元培養皮膚角層の X 線回折プロファイルを示す。小角領域で  $S=0.165\text{ nm}^{-1}$  (6.06 nm) にラメラ構造由来の回折ピークが、広角領域で  $S=2.43\text{ nm}^{-1}$  (0.412 nm) に脂質の充填構造由来の回折ピークが観察されたが、市販されている三次元培養皮膚と同様に、ヘアレスマウス皮膚と比較して角層細胞間脂質のラメラ構造や充填構造が不完全であることが明らかとなった。

以上より、市販されている三次元培養皮膚はヘアレスマウス皮膚と比較して角層細胞間脂質の構造が不完全であることが確認され、自社作製の三次元培養皮膚についても同様であることが明らかとなった。

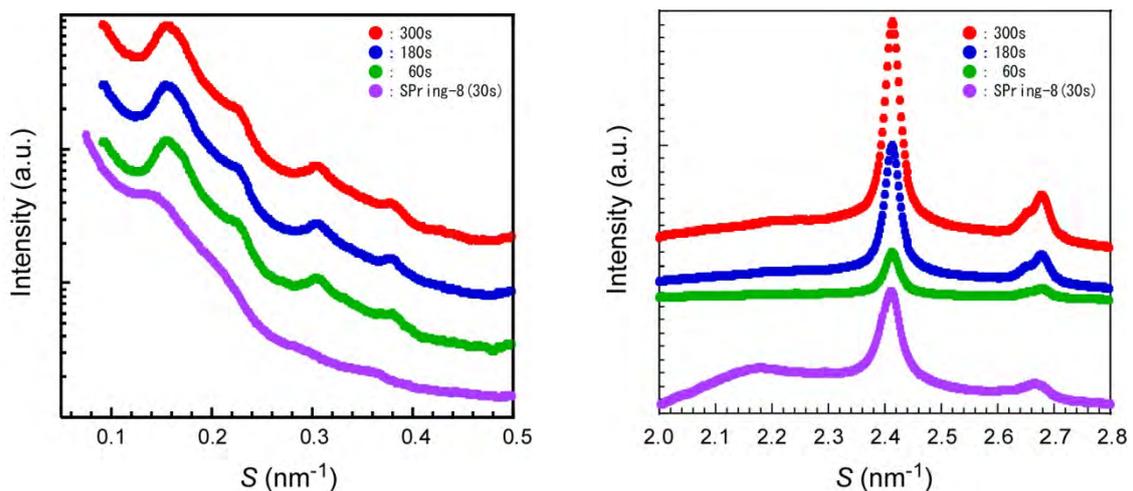


Fig.1 ヘアレスマウス皮膚角層から得られる X 線回折プロファイル  
(左側：小角 X 線回折プロファイル、 右側：広角 X 線回折プロファイル)

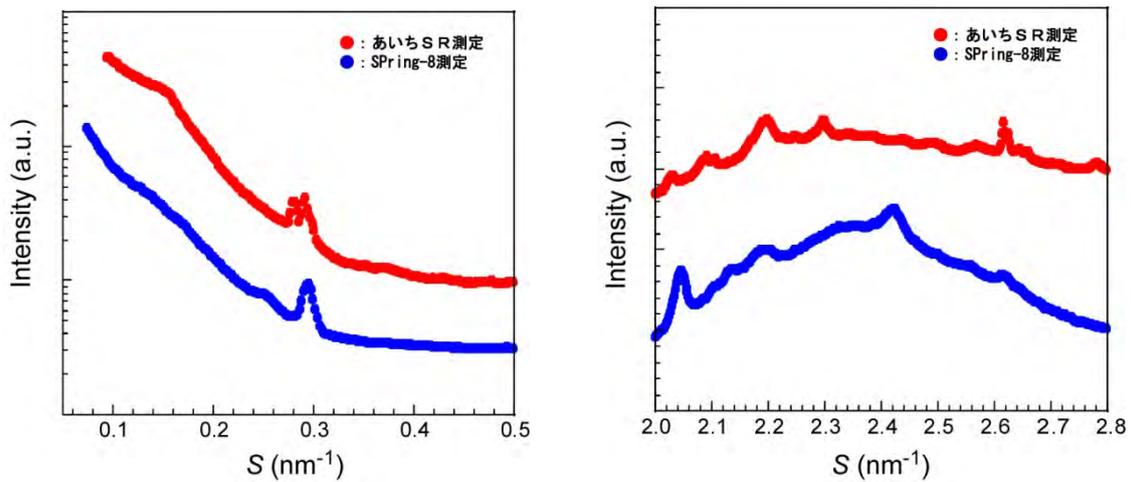


Fig.2 市販されている三次元培養皮膚角層 (LabCyte、J-TEC) から得られる X 線回折プロファイル  
(左側：小角 X 線回折プロファイル、 右側：広角 X 線回折プロファイル)

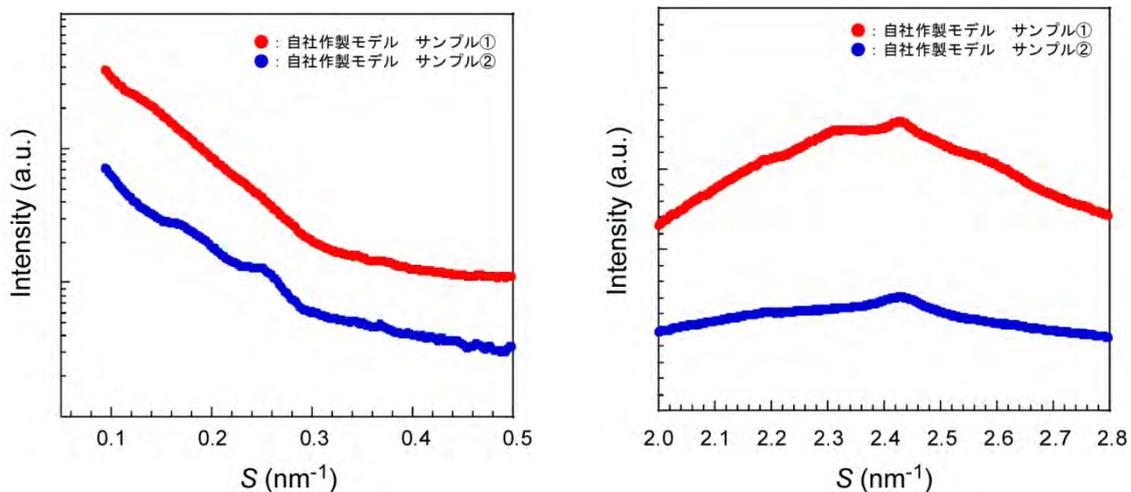


Fig.3 自社作製の三次元培養皮膚角層から得られる X 線回折プロファイル  
(左側：小角 X 線回折プロファイル、 右側：広角 X 線回折プロファイル)

## 6. 今後の課題

今後は、我々が開発している三次元培養皮膚を、医薬品や化粧品の安全性評価や有効性評価においてより信頼性の高いモデルにしていくため、培養皮膚の製造方法についてさらなる検討を行うと同時に、製造方法や品質の見極めについて X 線回折によりさらなる情報の蓄積を行いたい。

将来的には、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るほか、自社における三次元培養皮膚の作製技術を再生医療分野へと応用する

ことが可能であろう。

## 7. 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 (2006B)