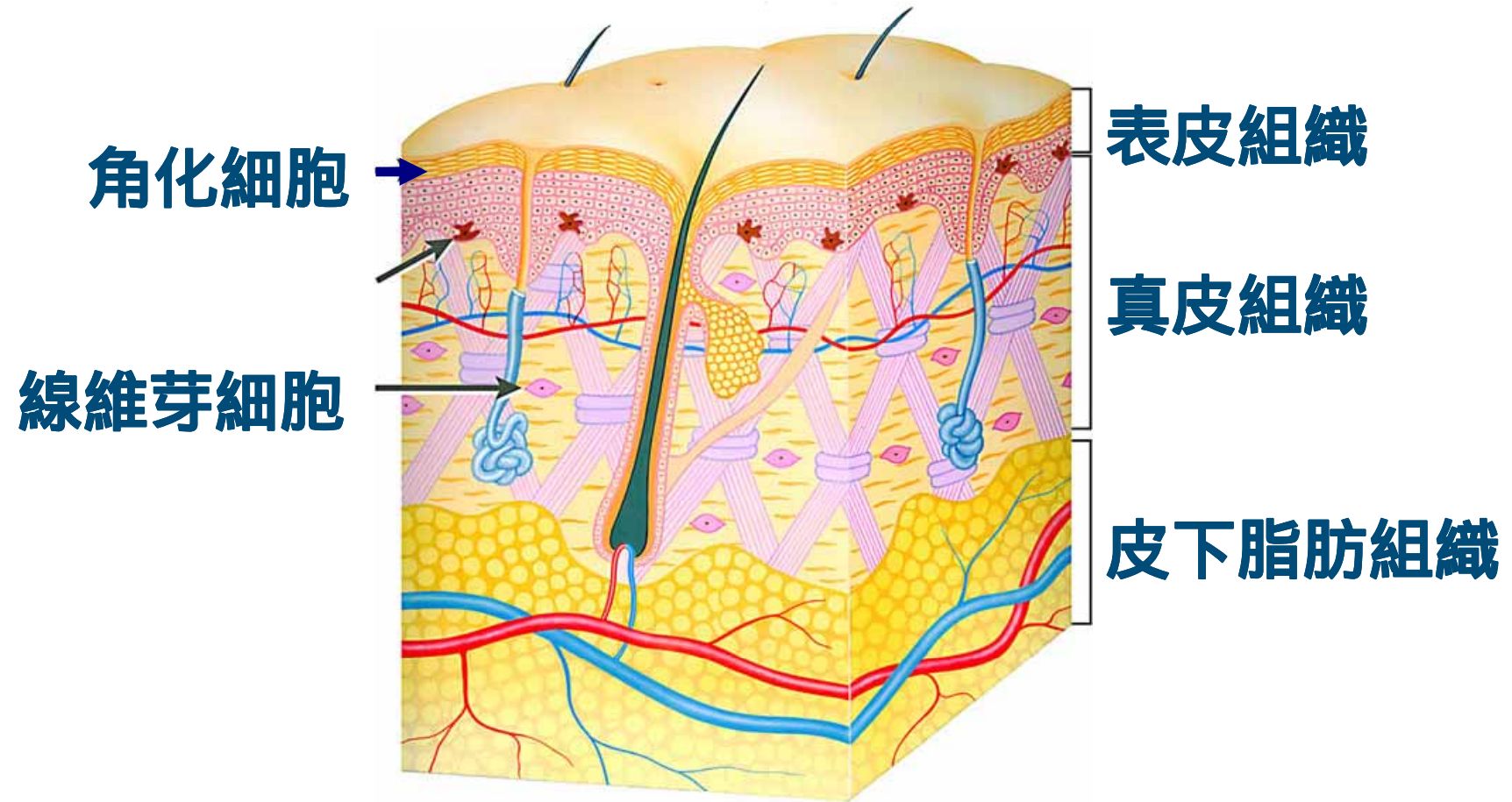


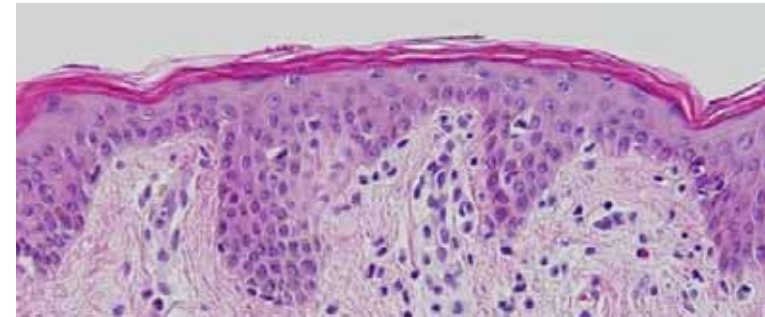
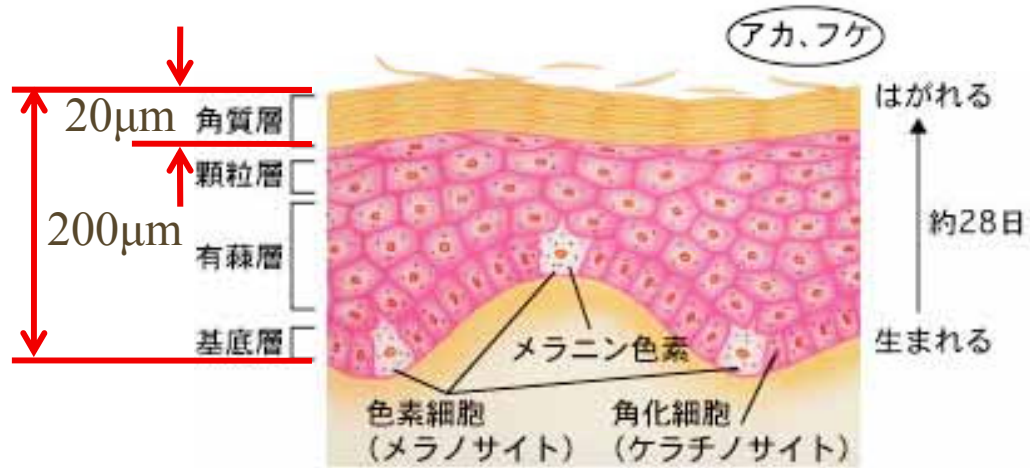
# 放射光を利用した培養皮膚モデル の評価と商品開発への応用

日本メナード化粧品(株)  
総合研究所  
坂 貞徳

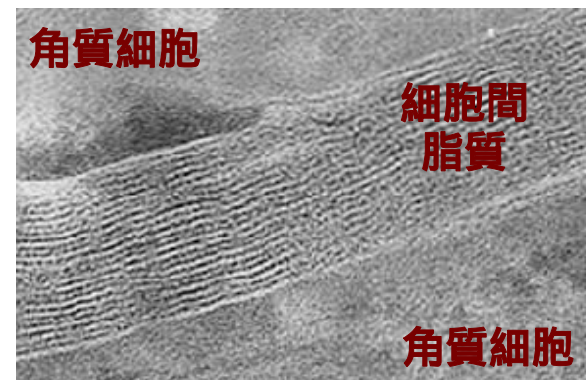
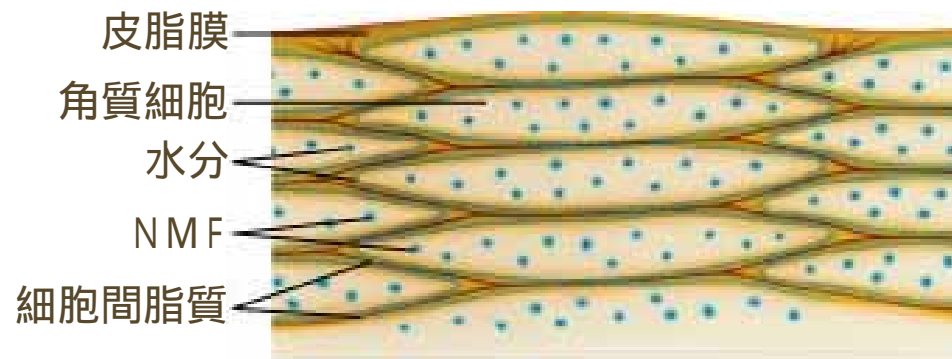
# 皮膚の構造



# 表皮の構造



# 皮膚角層の構造



100nm

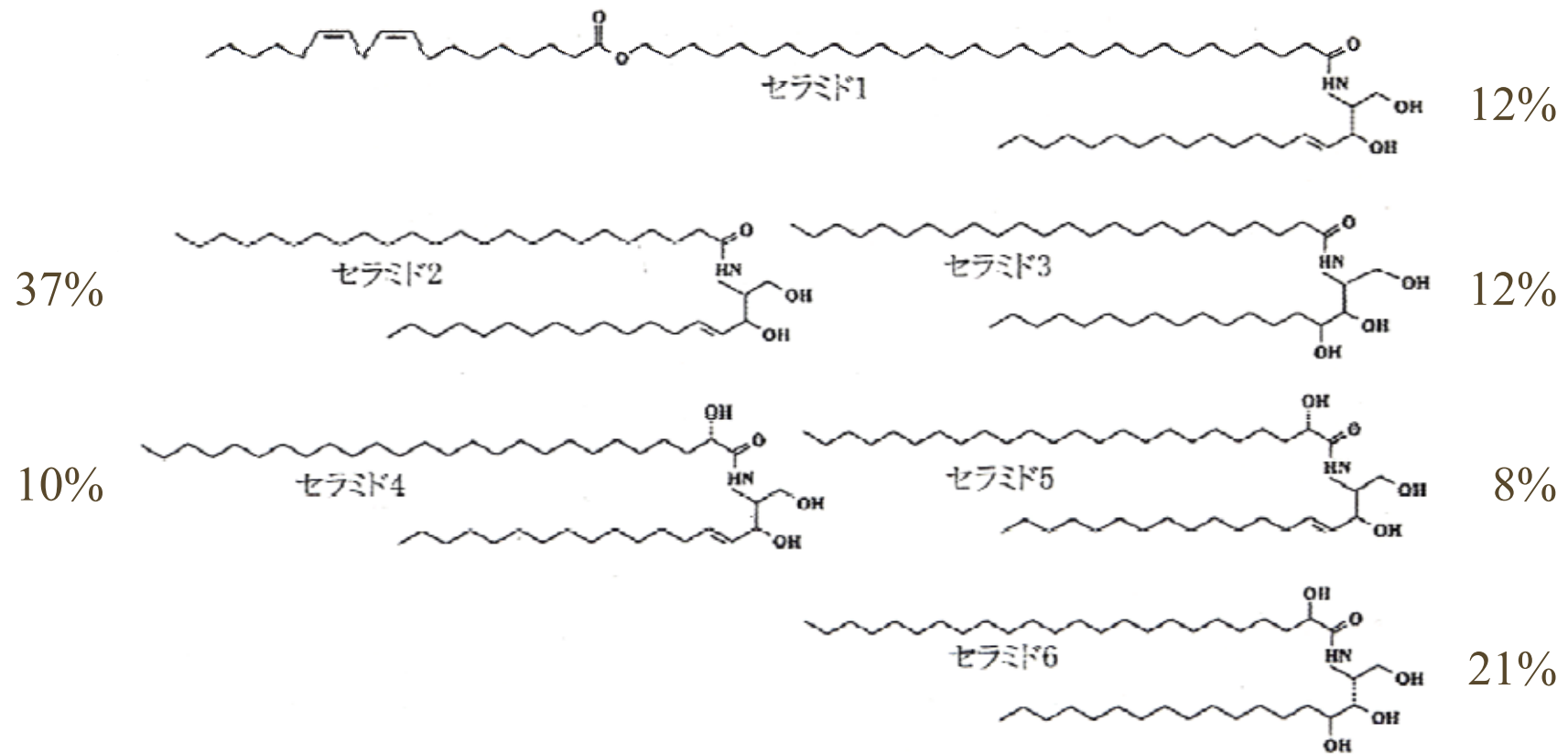
B.A.I. van den Bergh et al., 1998

# 細胞間脂質の構成成分と組成

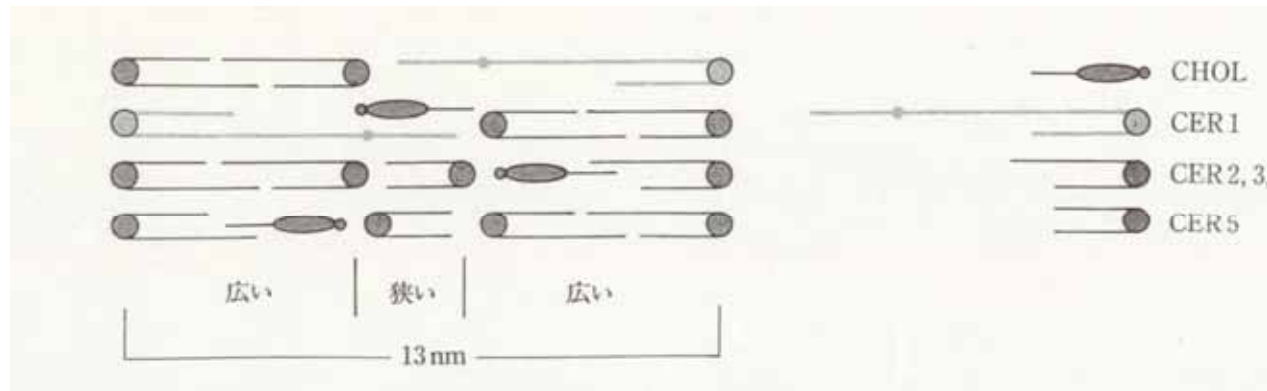
主な構成成分	(wt.%)
セラミド	41.1
セラミド誘導体	3.8
コレステロール	26.9
コレステロール誘導体	10.9
コレステロール硫酸塩	1.9
脂肪酸	9.1
その他	6.4

Wertz PW, *J Invest Dermatol*, 89(4), 419 (1987)

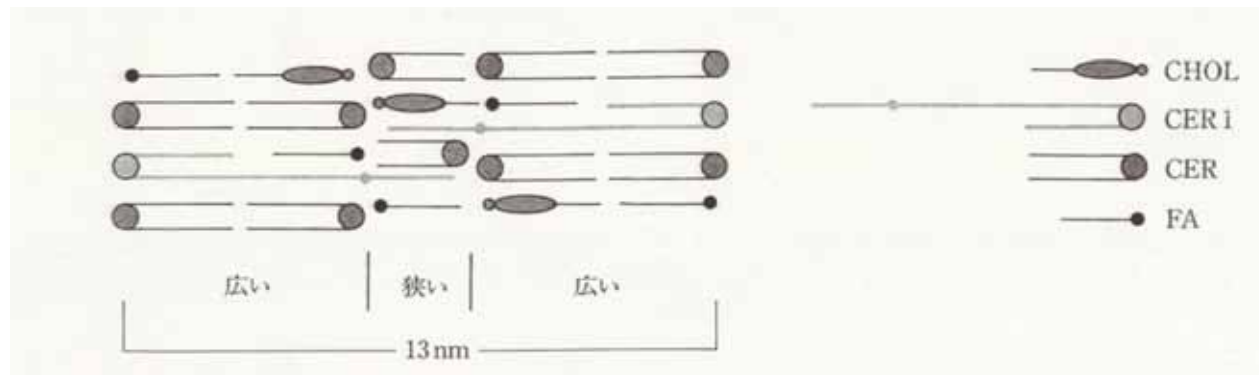
# セラミドの種類と構造



# 脂質分子集合体のラメラ構造のモデル



X線回折実験により提案されたモデル

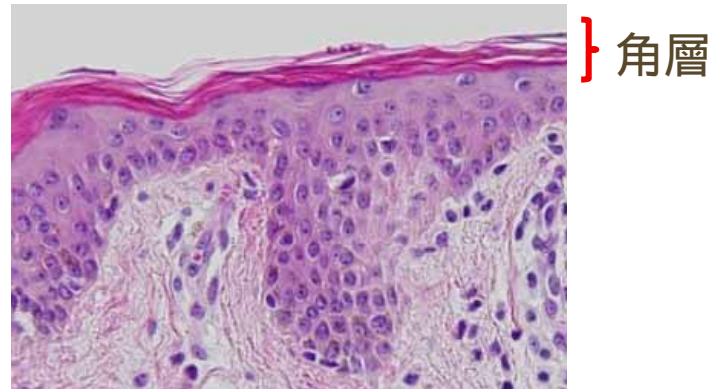


電子顕微鏡像により提案されたモデル

出典 上: J.A. Bouwstra, *Acta Dem. Venereol. Suppl.*, **208**, 23(2000)

下: D.Kuempel, *Biochem. Biophys. Acta*, **1372**, 135(1998)

# X線測定用サンプル調製



トリプシン処理により角層を回収し、乾燥



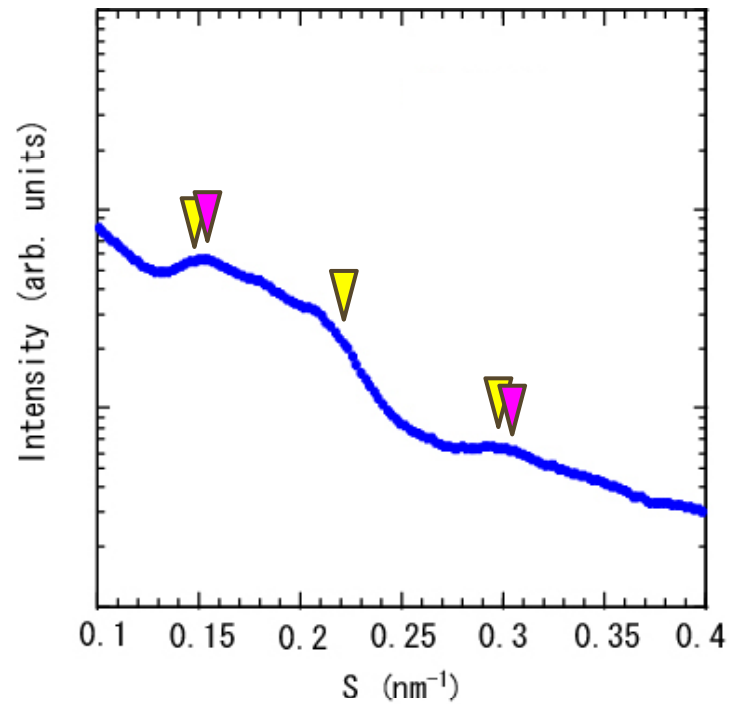
水分量を20 wt%に調整、キャピラリーに封入



X線回折による構造解析



# ~ ヒト皮膚 ~



▼ 13.5nm (長周期ラメラ構造)

S=0.147(nm<sup>-1</sup>) 2次

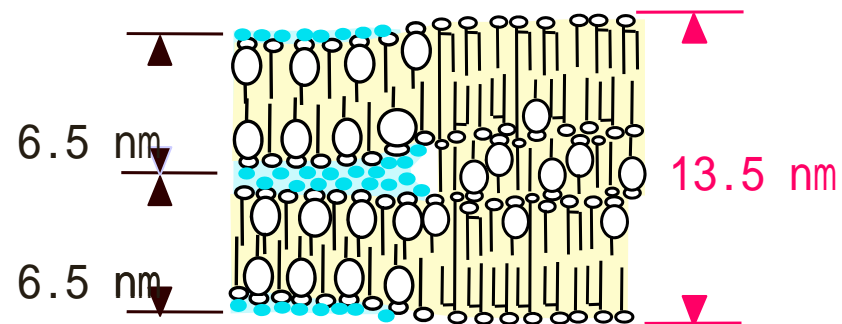
S=0.221(nm<sup>-1</sup>) 3次

S=0.297(nm<sup>-1</sup>) 4次

▼ 6.5nm (短周期ラメラ構造)

S=0.153(nm<sup>-1</sup>) 1次

S=0.306(nm<sup>-1</sup>) 2次



短周期ラメラ構造

長周期ラメラ構造

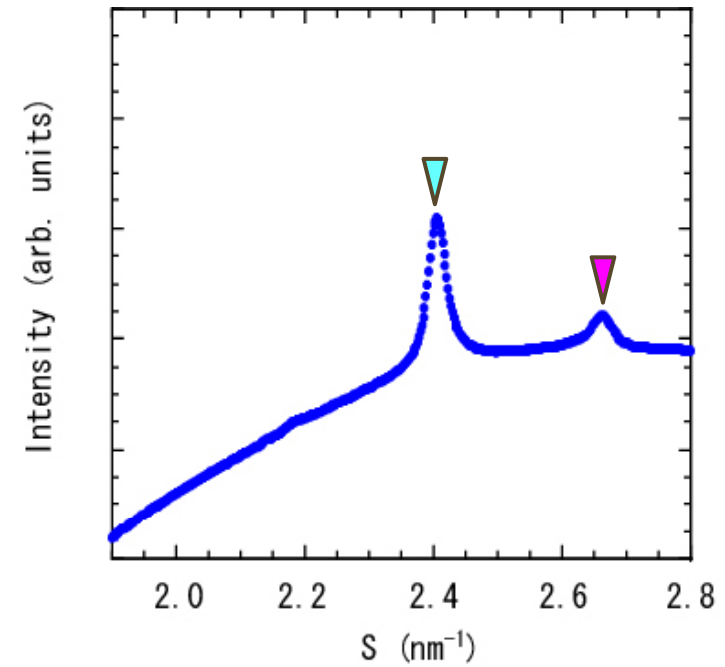
# ~ ヒト皮膚 ~

▼ 0.38nm (斜方晶)

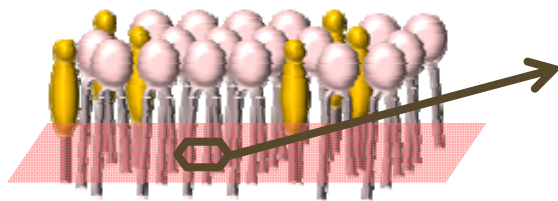
$$S=2.66(\text{nm}^{-1})$$

▼ 0.41nm (斜方晶、六方晶)

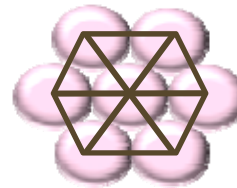
$$S=2.41(\text{nm}^{-1})$$



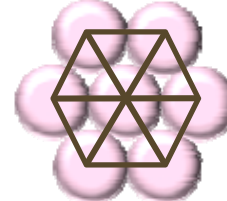
充填構造



斜方晶



六方晶



# 研究背景

**2009年3月以降**に動物実験を行った化粧品原料および動物実験を実施した成分を配合した化粧品はEU圏で販売できなくなった。

動物愛護の面からも国内での動物実験禁止の風潮でできている。

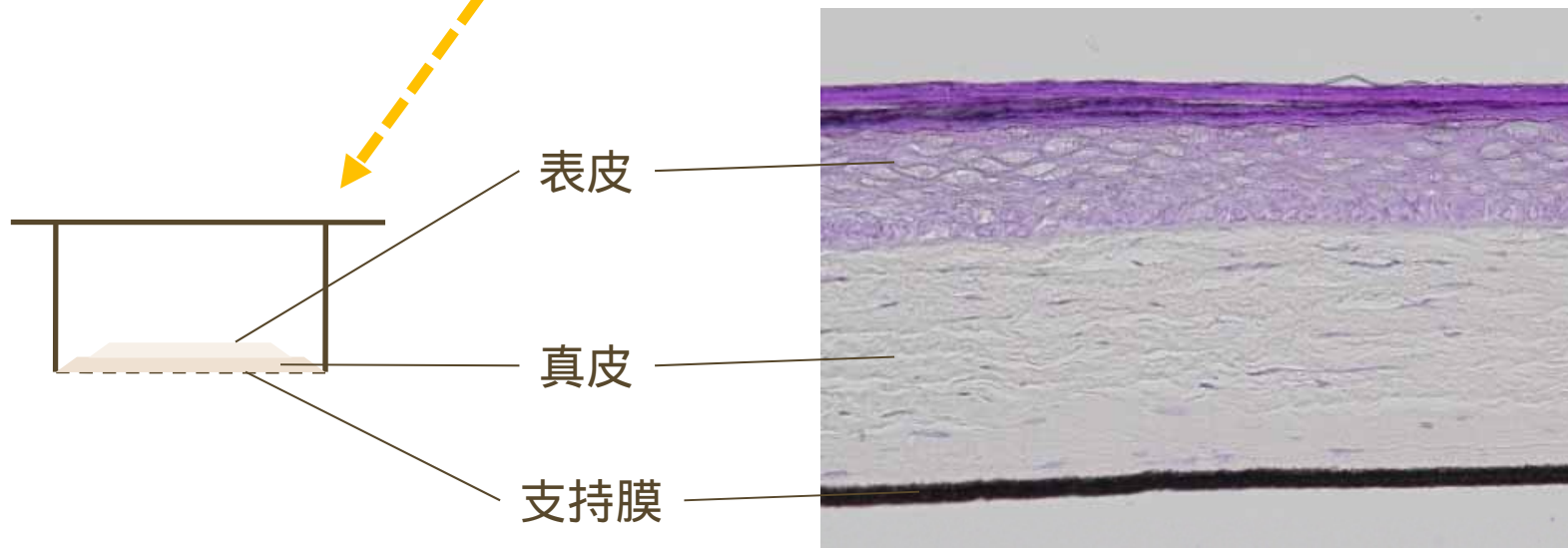


動物実験代替試験として、  
3次元培養皮膚モデルでの評価が行われている。

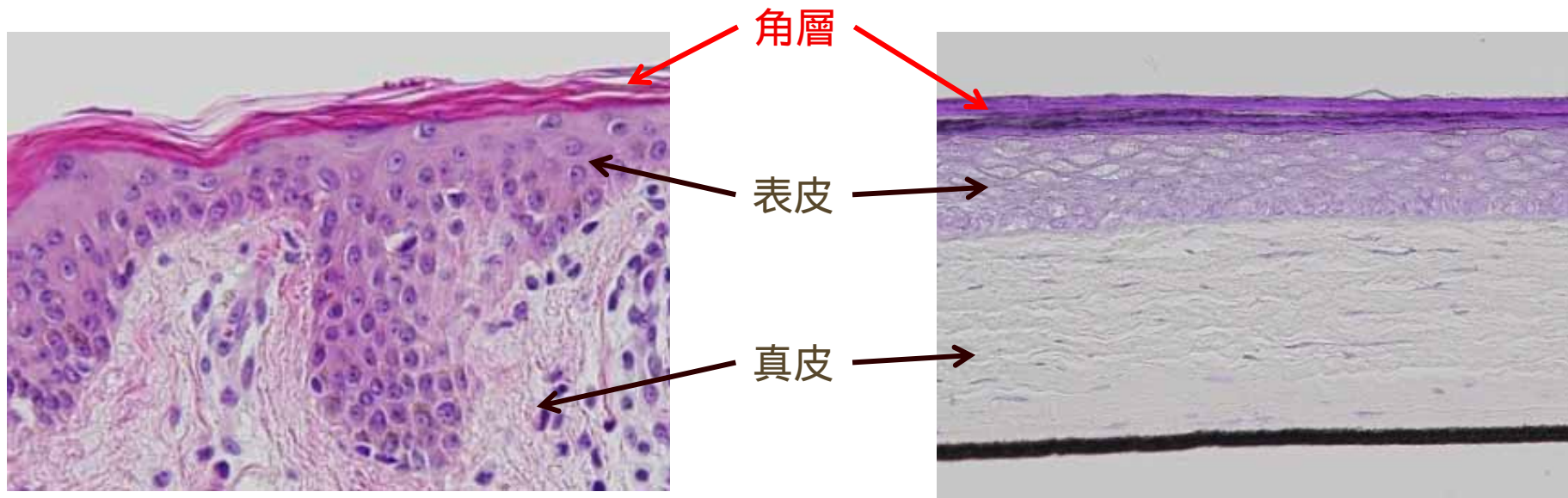
**問題点:** ヒトの皮膚と同等の評価ができない

- ・ヒト皮膚や動物皮膚に比べて物質の透過性が高い。
- ・細胞間脂質はヒトや動物に比べて不完全である。

# 培養ヒト皮膚モデル: TEST SKIN LSE-high



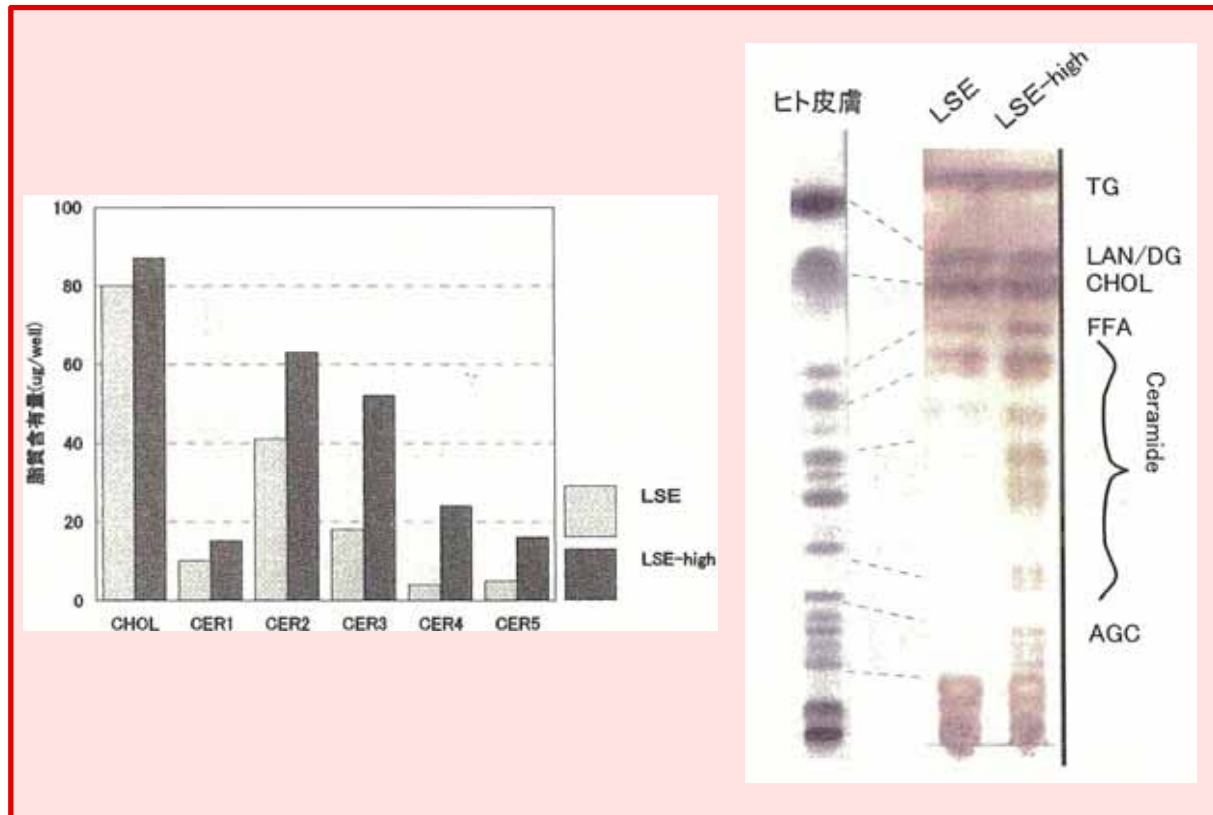
# ヒト皮膚と培養皮膚との比較



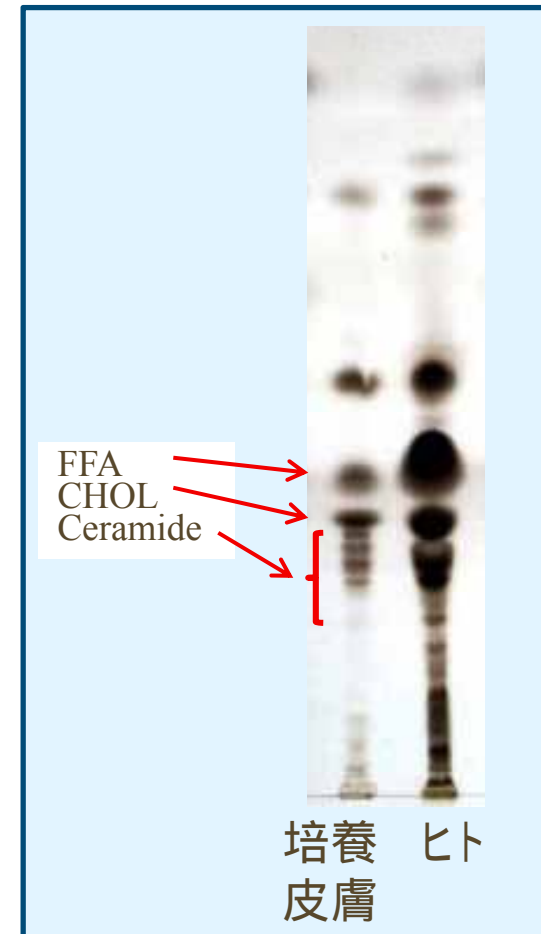
ヒト皮膚

培養皮膚

# 培養皮膚角層中の脂質分析

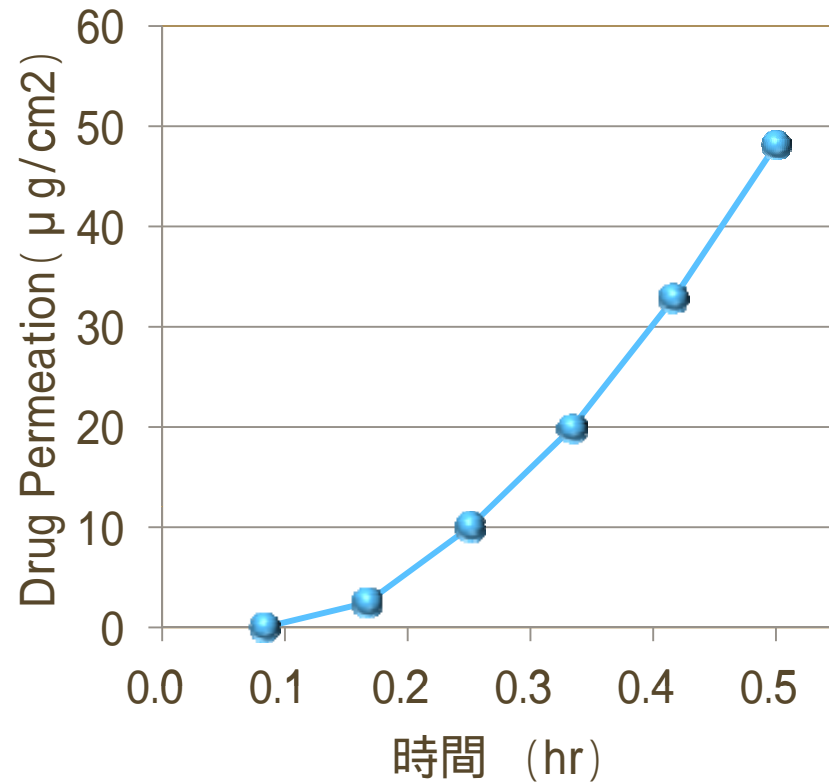


TOYOBOカタログより

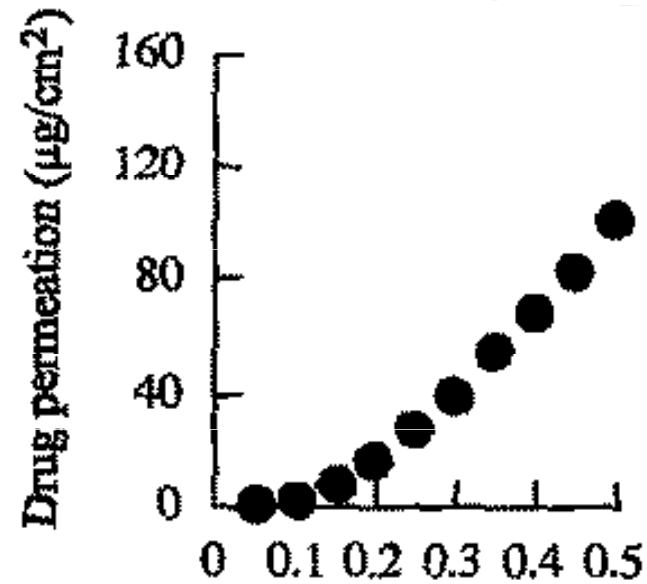


自社分析

# 培養皮膚モデルによる透過性試験例

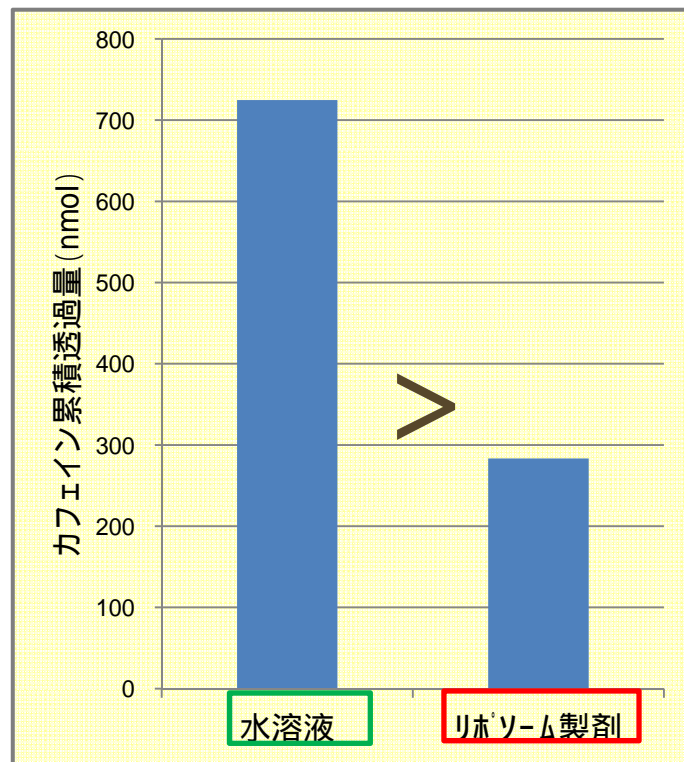
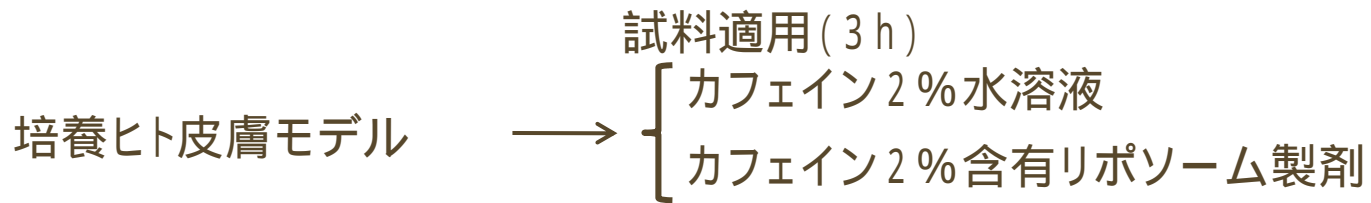


カフェイン水溶液の透過性 - 他機関 -  
(LSE-high使用)



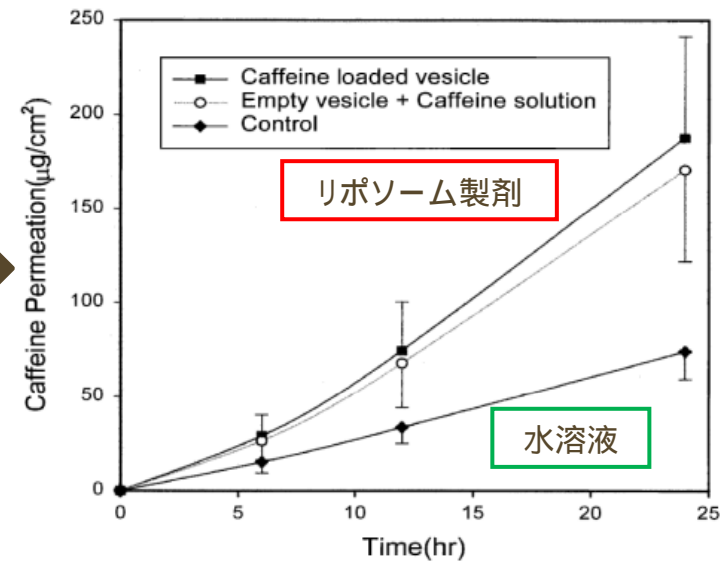
AATEX 8(1), 1-14 (2001)

# 製剤の皮膚浸透性評価



矛盾

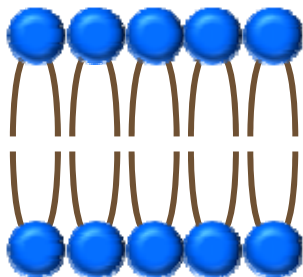
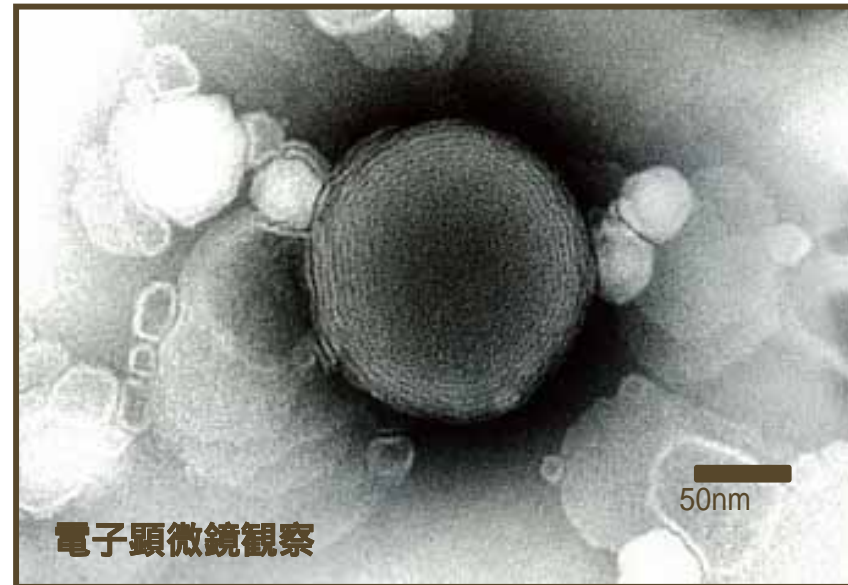
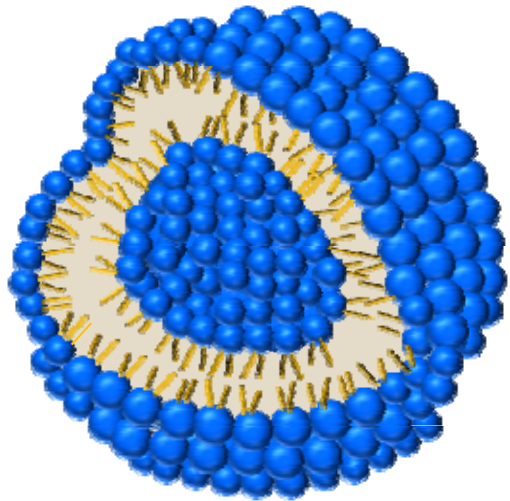
## 動物皮膚 (モルモット) での実験



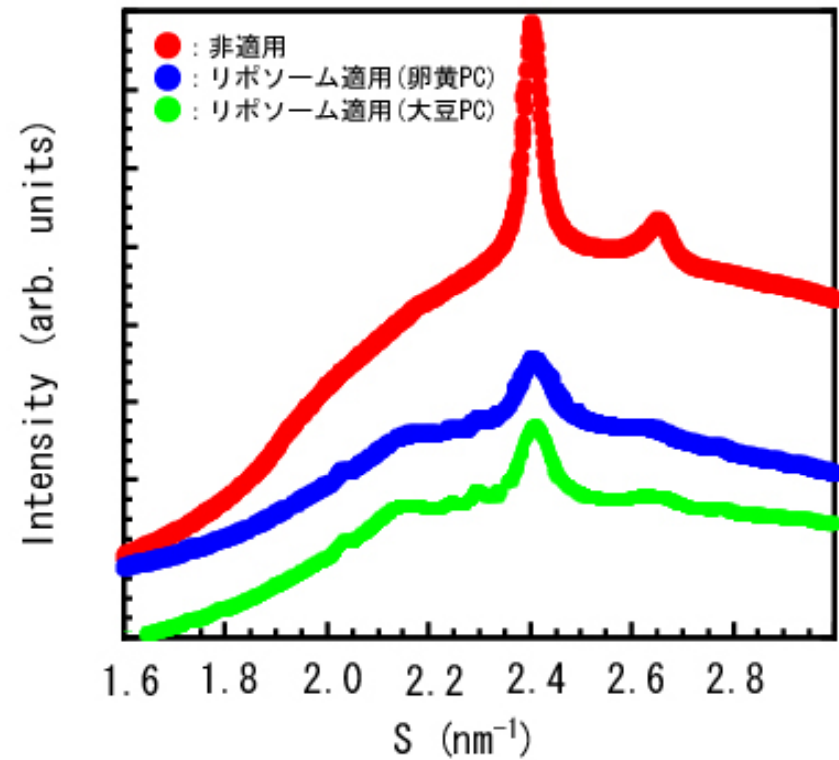
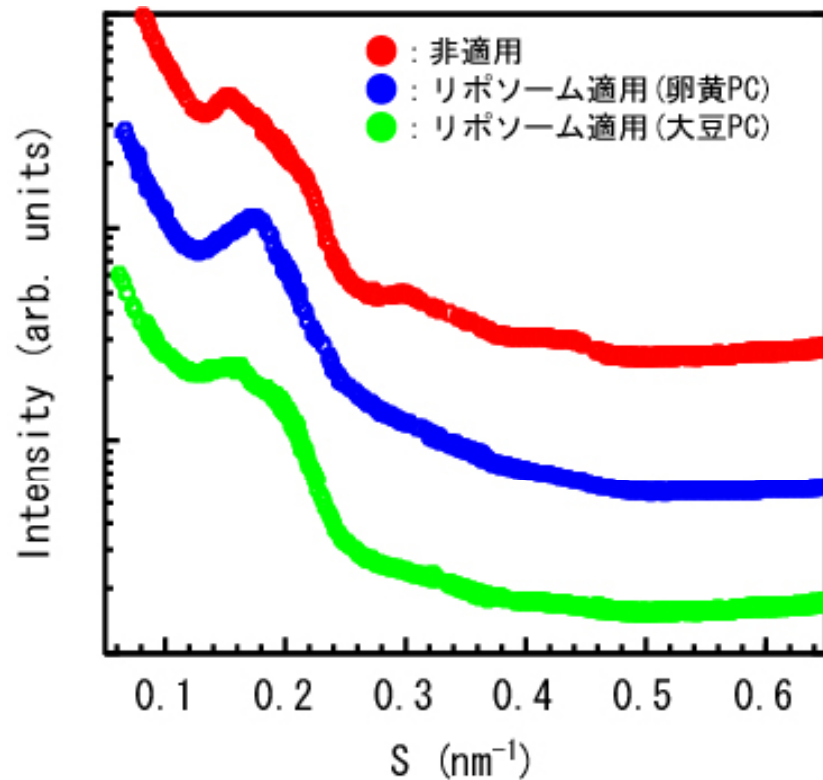
\* C. Kim, *et al.*, J. Cosmet. Sci., 53, 363(2002)



# リポソーム



# リポソーム適用によるヒト皮膚角層の評価



# 研究目的

- リポソーム適用によって、なぜ培養皮膚モデルは皮膚透過性が劣るのか？
- 動物試験の結果と異なる理由はなぜか？

# 培養皮膚に適用するリポソームの調製

組成	(重量%)
大豆PC or 卵黄PC	4%
蒸留水(注射用水)	96%

## 薄膜調製

大豆PC or 卵黄PC  
溶媒(クロロホルム)



エバポレーターによる溶媒除去



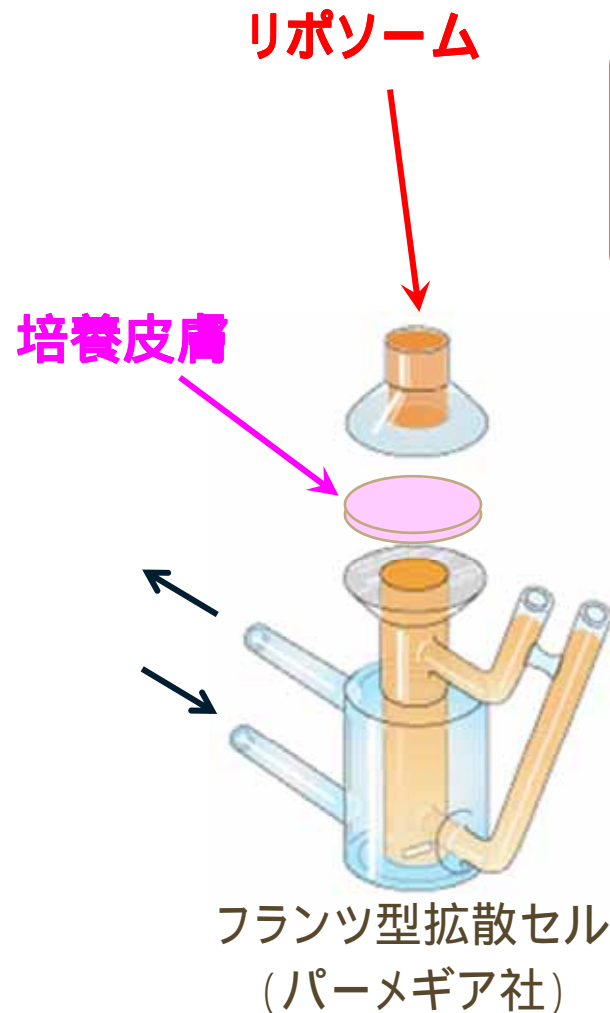
← 蒸留水

超音波処理

0.45  $\mu\text{m}$ フィルターを過す

0.22  $\mu\text{m}$ フィルターを過す

# X線測定用サンプル調製



リポソームを培養皮膚の角層側から適用



一定時間後にリポソーム除去



トリプシン処理により角層を回収し、乾燥

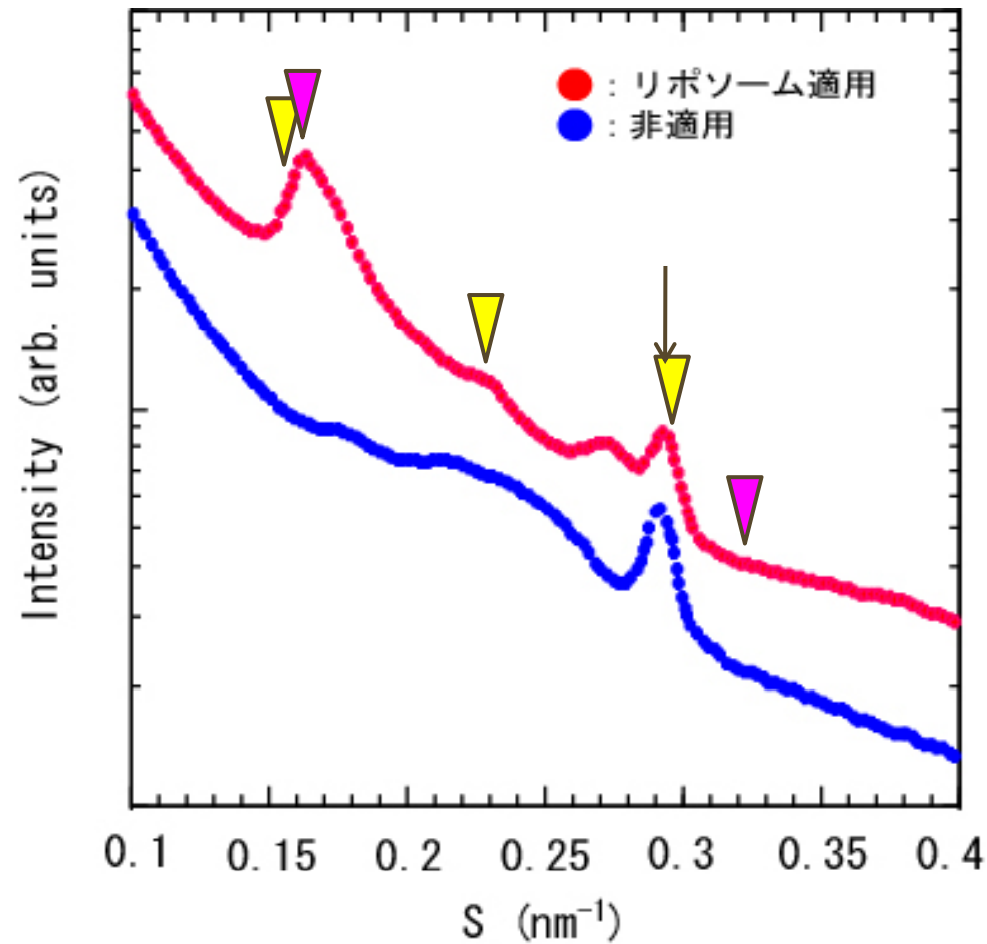


水分量を20 wt%に調整、キャピラリーに封入



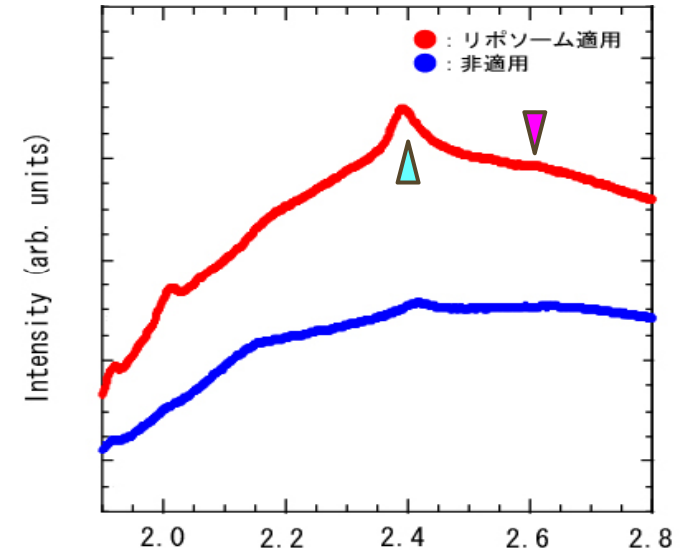
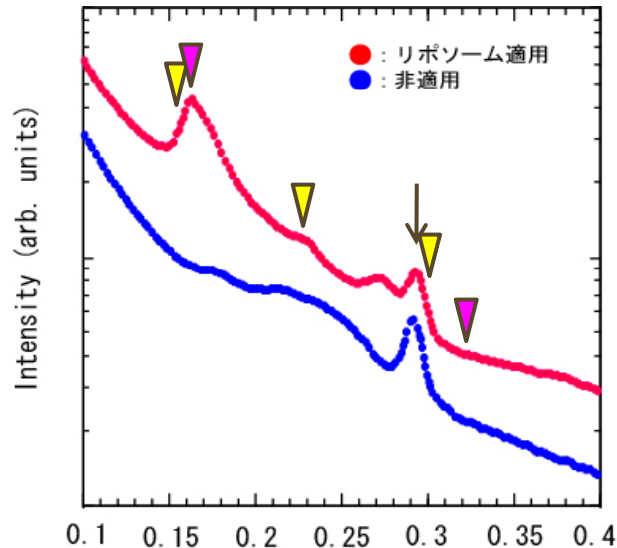
X線回折による構造解析

# 培養皮膚へのリポソーム適用効果

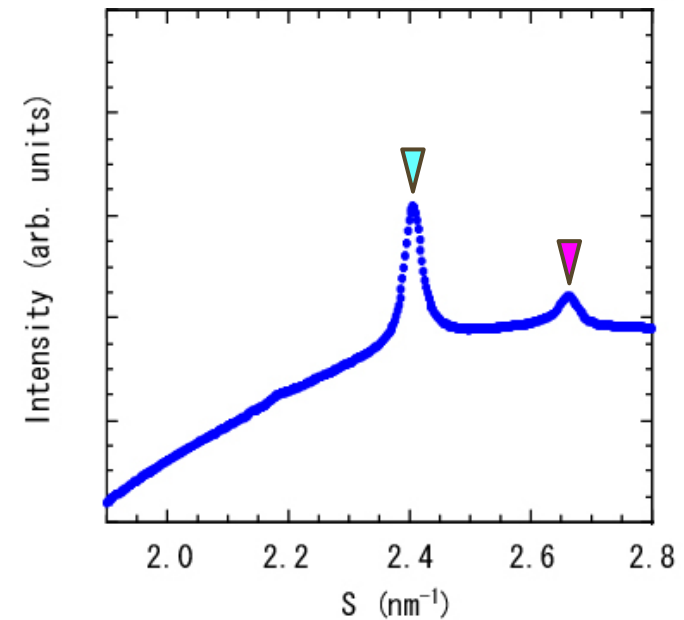
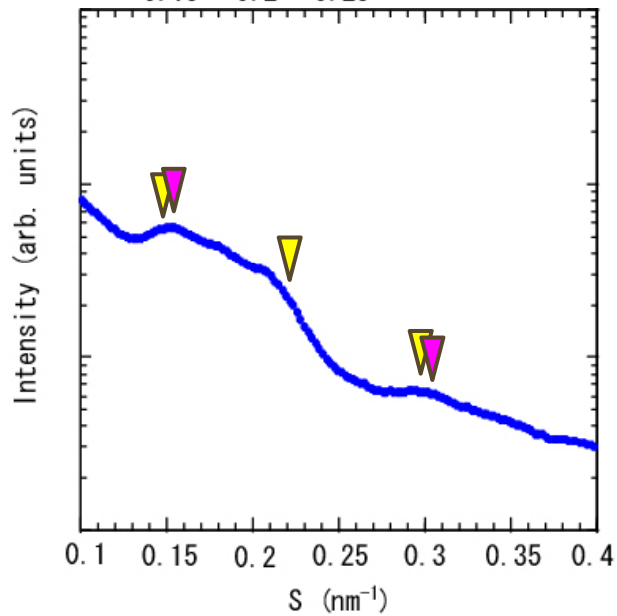


# 改善した培養皮膚とヒト皮膚の比較

改善した  
培養皮膚

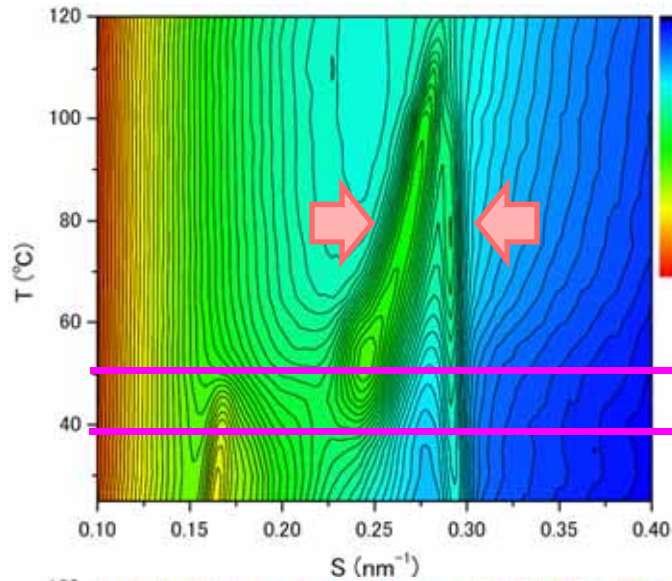


ヒト皮膚



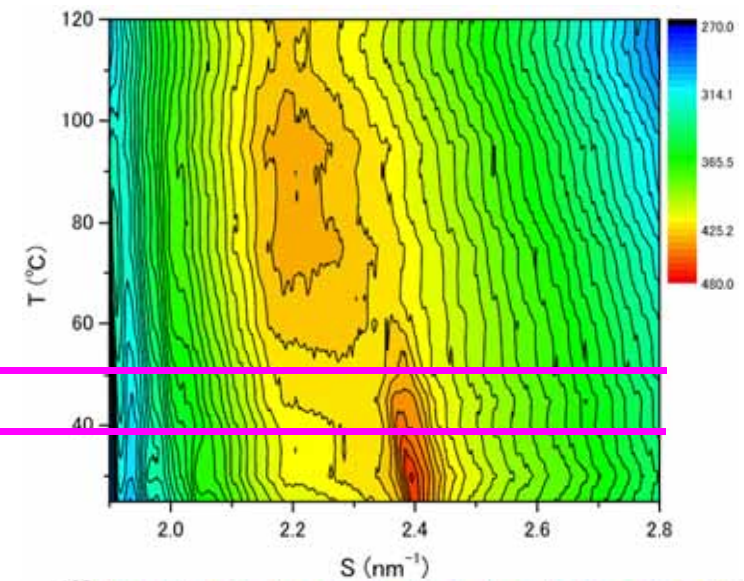
# 改善した培養皮膚とヒト皮膚の比較

改善した  
培養皮膚

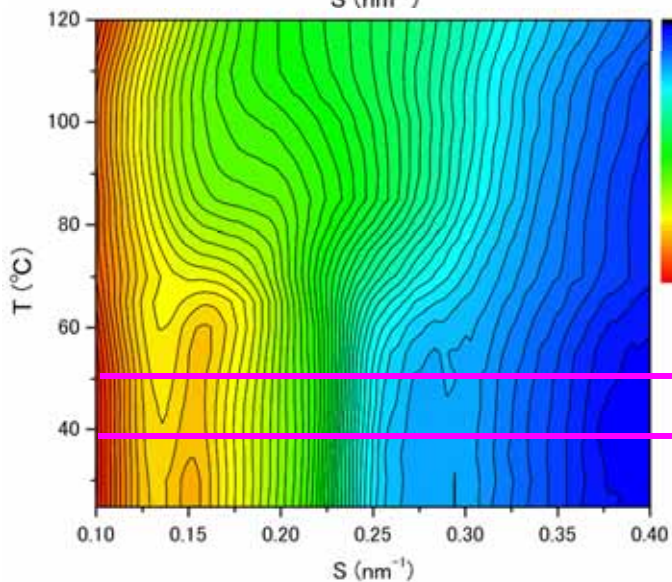


51

39

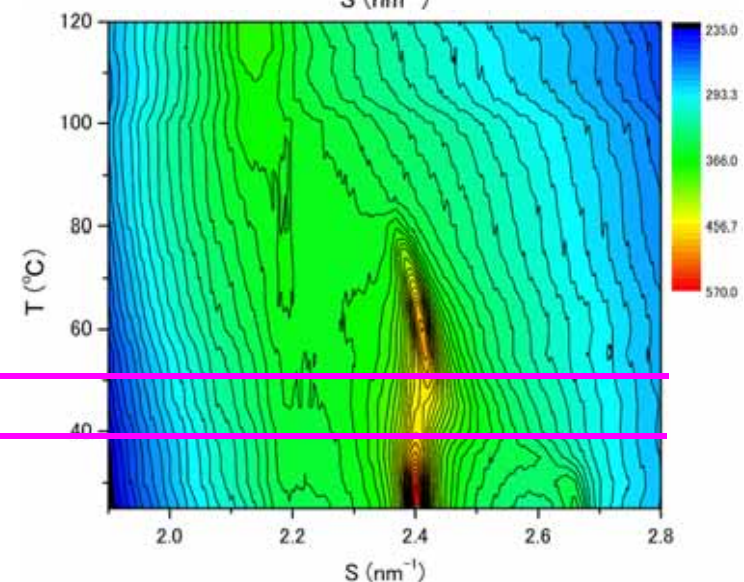


ヒト皮膚



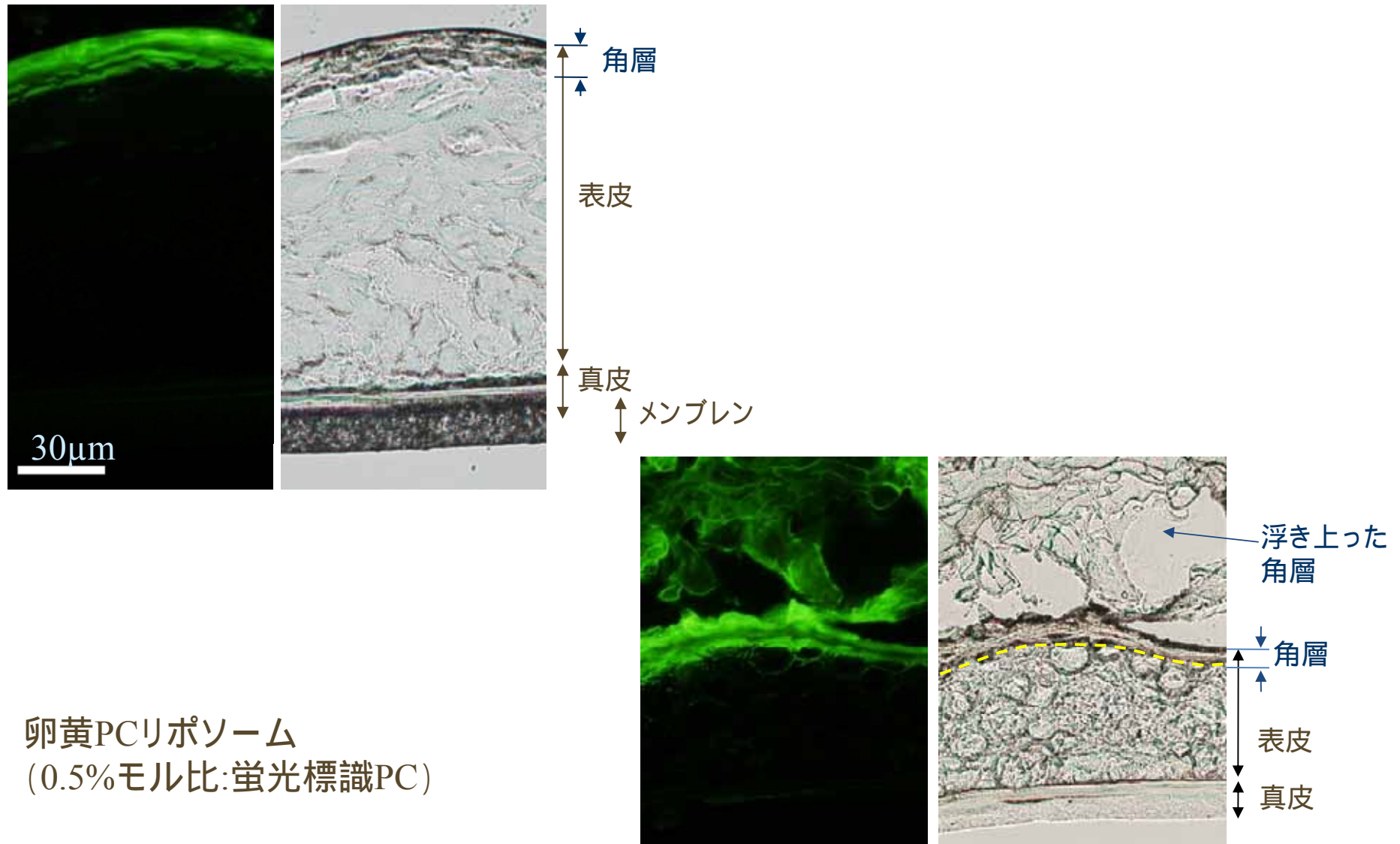
51

39





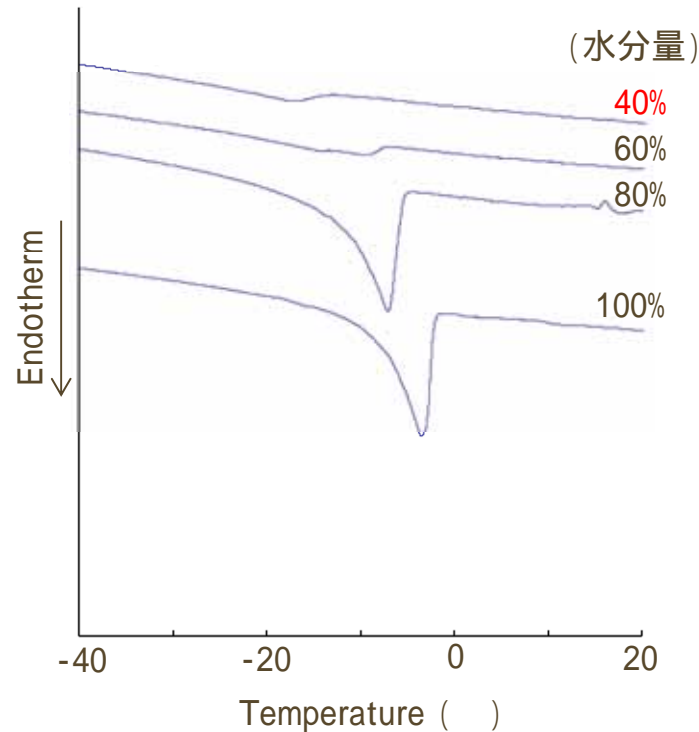
# リポソームを適用した培養皮膚の断面写真



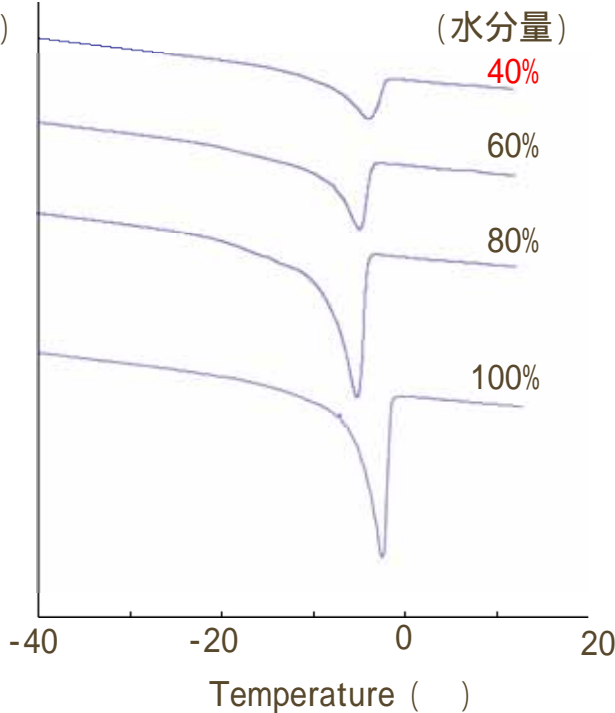
卵黄PCリポソーム  
(0.5%モル比:蛍光標識PC)

# DSCによる角層の評価

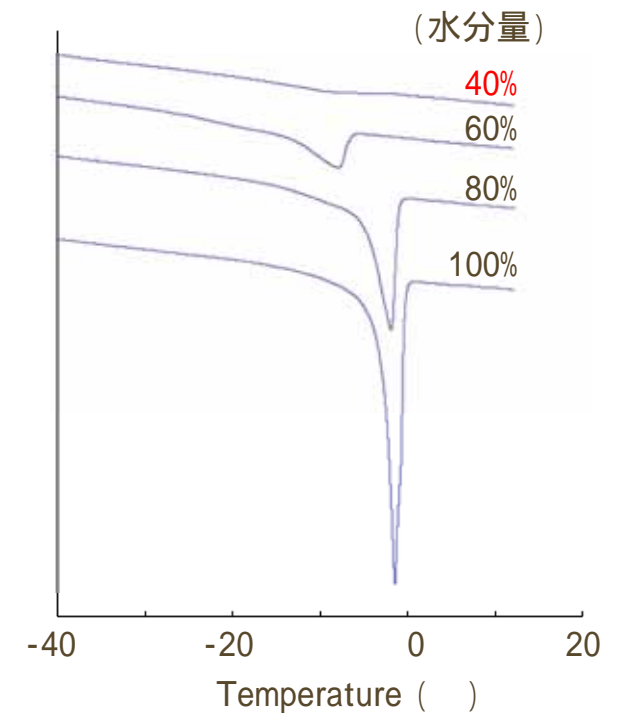
ヒト皮膚



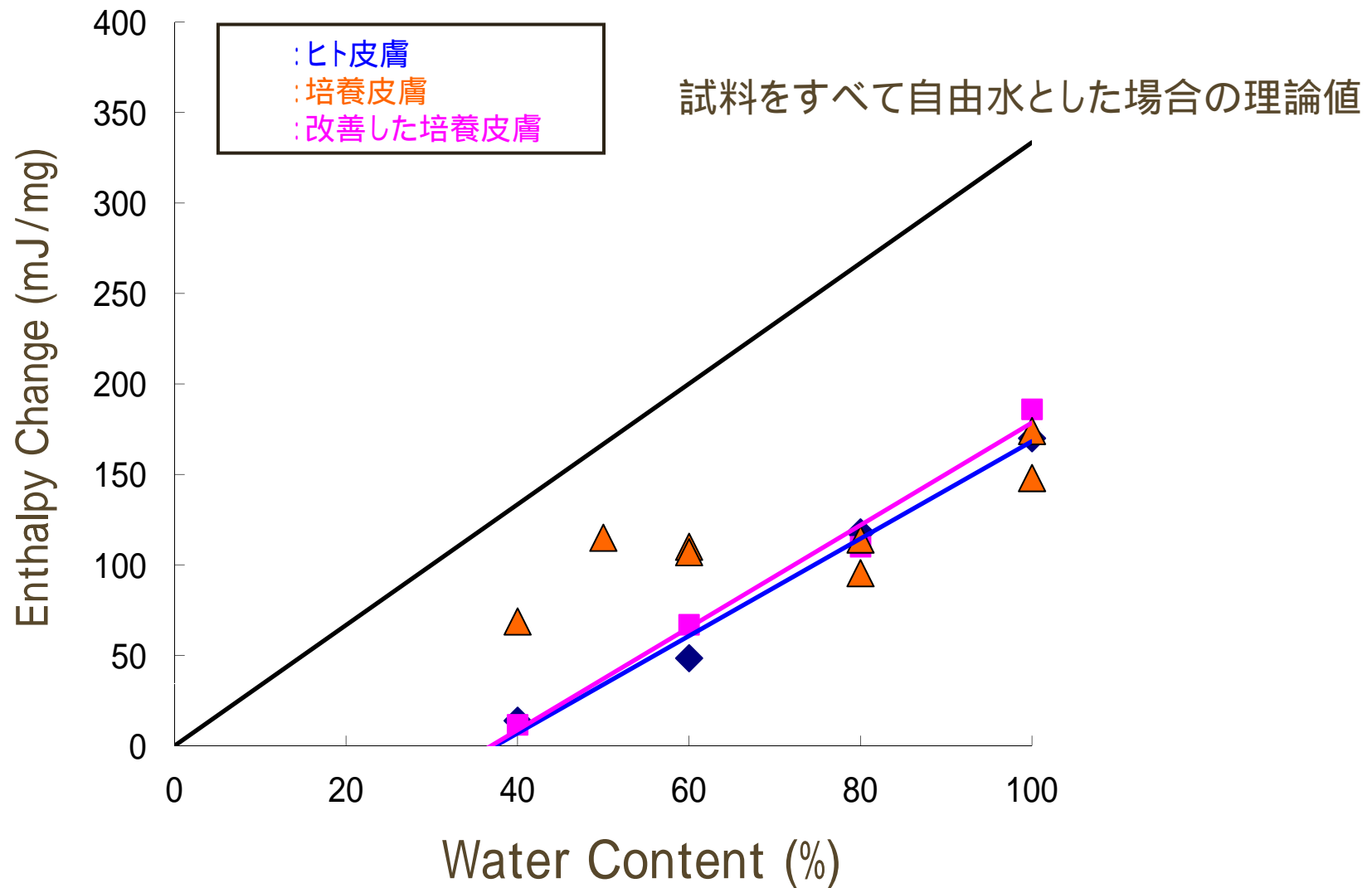
培養皮膚



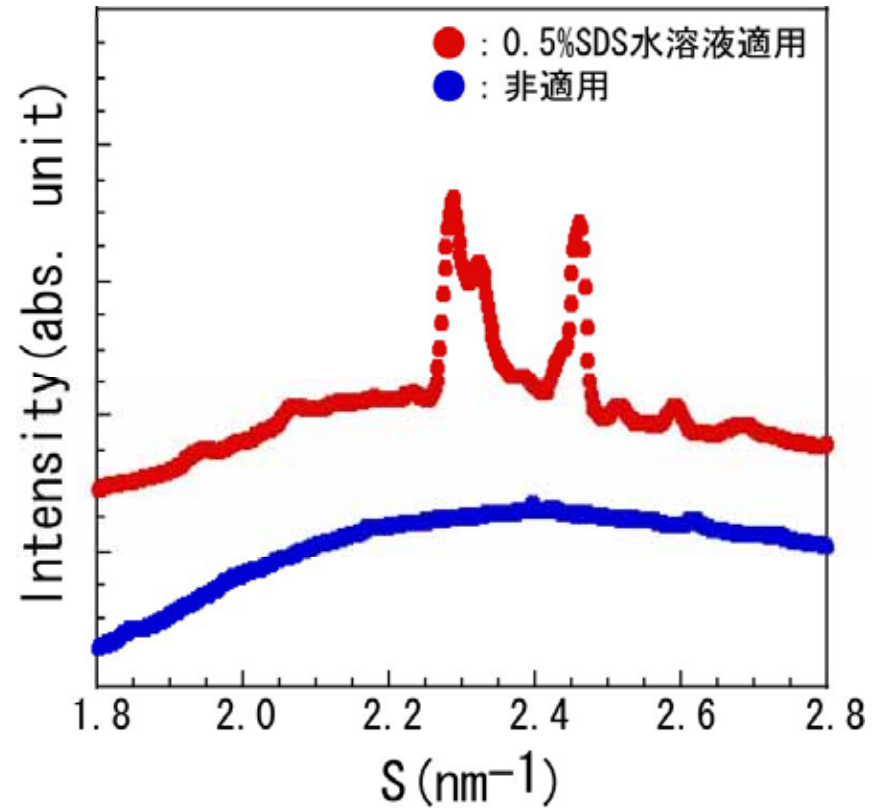
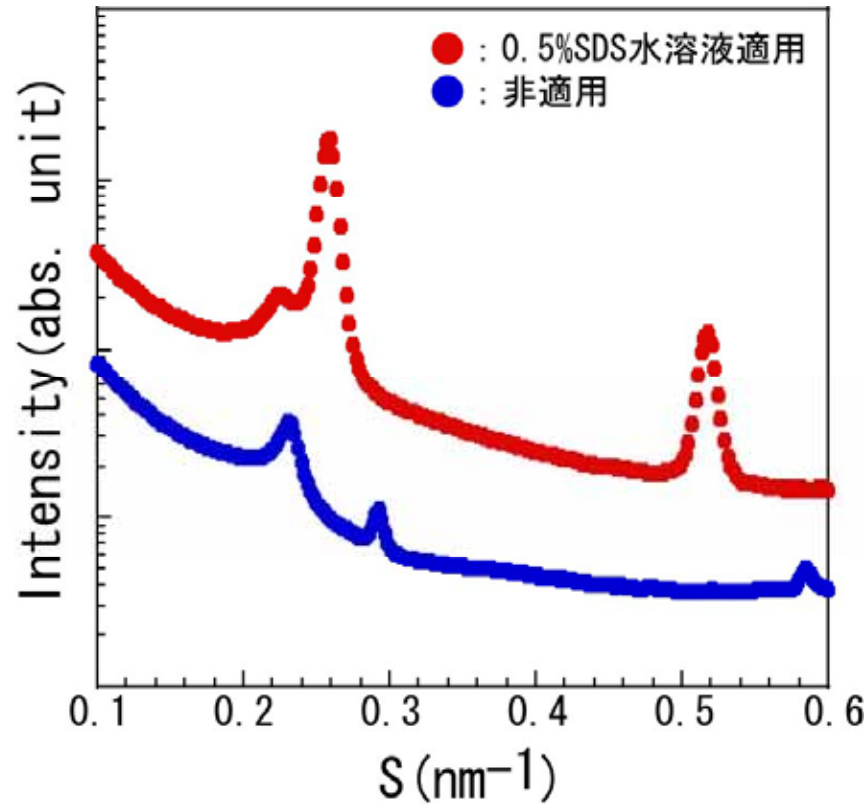
改善した培養皮膚



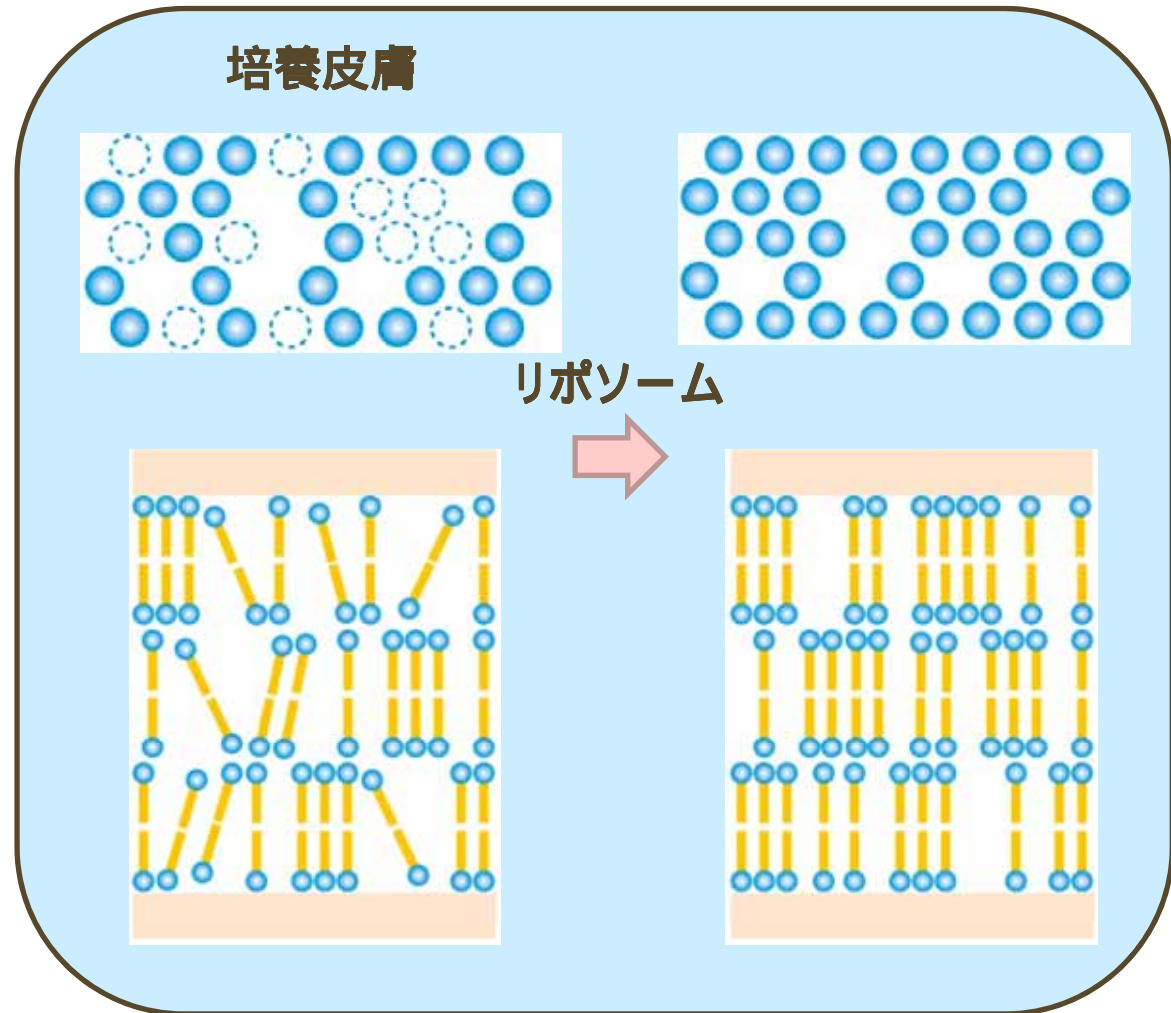
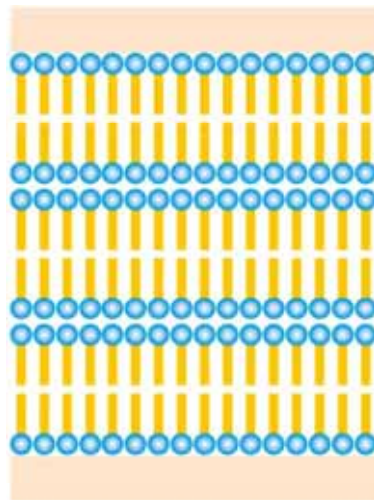
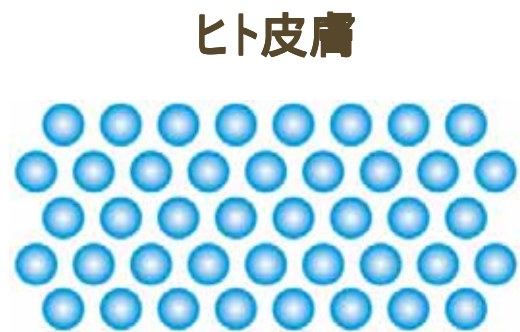
# 角層中の結合水比較



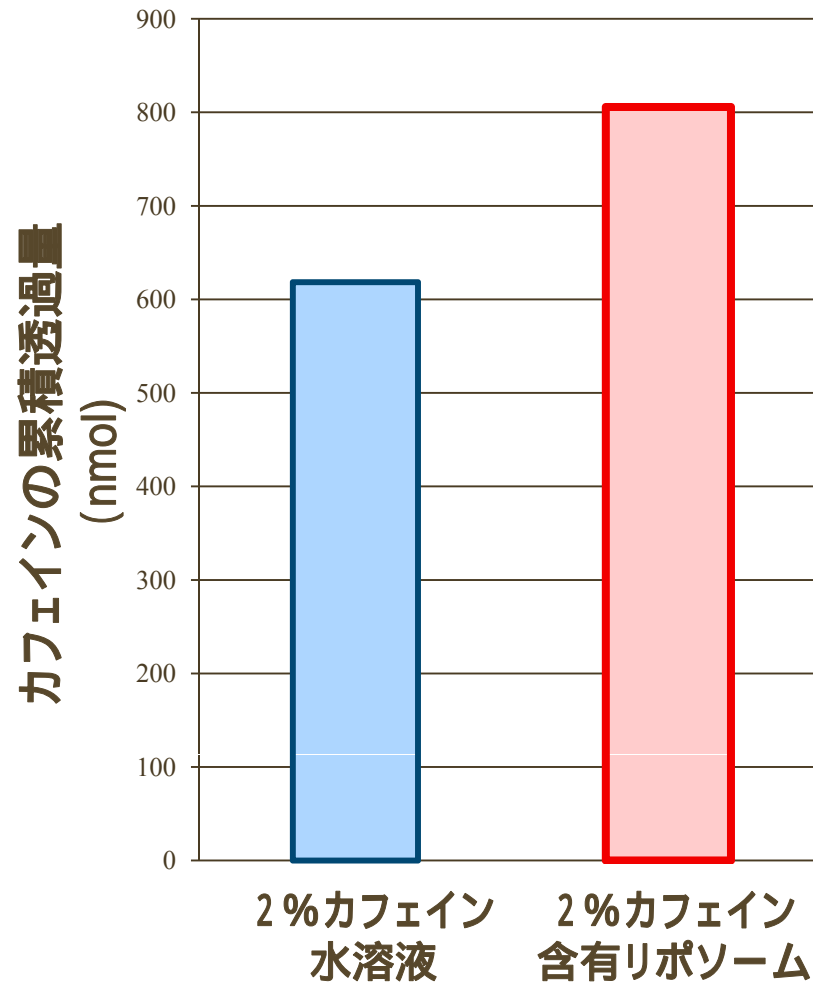
# 培養皮膚へのSDS水溶液適用



# リポソームが培養皮膚に及ぼす影響



## 改善した培養皮膚モデルを用いた皮膚浸透性試験



# 放射光を利用して得た結果は？

- 培養皮膚モデルの改善
- 有効性評価における精度の向上

# 商品開発へ応用



メナード  
プログラム30  
20,000円(税抜)



# おわりに

- ◆不完全な構造を持つ培養皮膚にリポソームを適用することにより、ヒト皮膚の構造に近づけることができた。
- ◆改善した培養皮膚モデルを用いることにより、化粧品の有効性評価の精度をより高めることができた。
- ◆人工皮膚の開発への応用が期待できる。

# 謝辞

- ❁ SPring-8/JASRI  
八田一郎(理学博士)先生  
太田 昇(工学博士)先生
- ❁ 日本メナード化粧品(株)  
田中 浩(医学博士)主幹研究員  
加藤義直主任研究員  
間嶋康夫主任研究員  
中間満雄主任研究員  
小椋彩子研究員  
足立浩章研究員  
山下真由研究員