

三次元培養皮膚を利用したスキンケア化粧料用素材の連用適用による 角層微細構造変化の解析

Effect of Continuous Application of Skincare Cosmetic Materials on Nano-structural Changes in 3-dimensional Cultured Skin Stratum Corneum

大成 宏樹^a, 関谷 匡俊^a, 小幡 誉子^b
Hiroki Onari^a, Masatoshi Sekiya^a, Yasuko Obata^b

^a株式会社コーセー, ^b星薬科大学
^aKOSÉ Corporation, ^bHoshi University

皮膚角層は生体からの水分蒸散を抑える上で重要なバリアである。角層がターンオーバーにより成熟する過程での保湿剤の連用適用の意義を理解し、角層微細構造に与える影響を把握することが可能になれば、化粧料の適用によるバリア能向上を達成できる。しかしながら、角層微細構造の詳細解析には、高い S/B 比を有するデータが必要である。そこで、ヒト由来の三次元培養皮膚を用いて、化粧料用素材の連用適用により生じる構造変化を、放射光 X 線散乱法の小角・広角同時測定により解析した。その結果、保湿剤の連用適用は、細胞間脂質の充填構造への影響が小さい一方で、ケラチン繊維の形成には大きな影響を与えている可能性が示唆された。また、温度走査による低温域の降温過程では角層微細構造は大きく変化しないことが示唆された。

キーワード： 皮膚角層、三次元培養皮膚、ケラチン、細胞間脂質、小角・広角 X 線散乱測定

背景と研究目的：

皮膚角層は角層細胞と細胞間脂質から形成され、水分蒸散や外因性物質に対するバリア能を発揮して、生体を保護している。角層細胞にはケラチン繊維が充填されており、 α ヘリックス構造や β シート構造を形成していることが知られている。これらの構造は、物理的にも化学的にも強固であり、皮膚の機械的強度の主体をなす。また、細胞間脂質のラメラ構造は、長周期、短周期の規則的配列と、側方配列の充填構造として直方晶、六方晶が認められている。さらに、充填構造を示さない液晶相の存在も無視できない。一般に、角層はターンオーバーにより成熟し、角層細胞および細胞間脂質に変化が生じていると考えられるが、ターンオーバーの過程での化粧料連用による影響については十分な検討は行われていない。

三次元培養皮膚（以下、培養皮膚）は、培養日数を増やしていくことで角層が形成され、角層の形成やターンオーバーの過程で薬剤の連用適用を評価することが可能な特性を有している。これまでに培養皮膚を用いた実験から、培養日数の増加によりケラチン繊維由来の回折ピークが変化することが示されている[1]。また、培養皮膚の細胞間脂質の側方配列充填構造は六方晶、液晶相優位になっており、外因性物質の侵入に対するバリア能が低下した状態と似通っていることが明らかになっている。

そこで、本実験では培養皮膚に、化粧料に汎用されている、グリセリンやアミノ酸、ヒアルロン酸のような保湿剤の連用適用の効果を検討した。

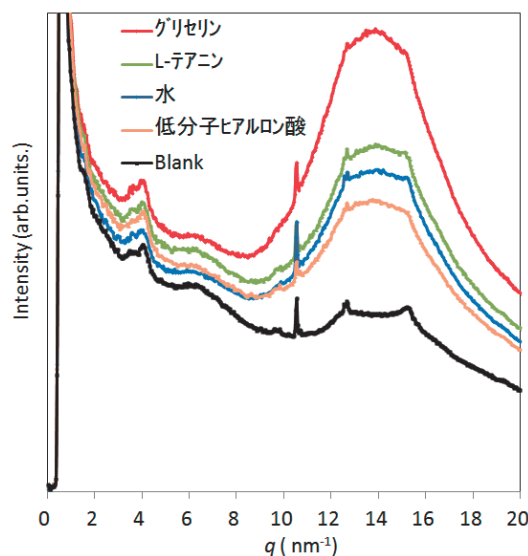


図 1. 化粧料用素材の連用適用による培養皮膚角層 X 線散乱プロファイルの変化

実験：

角層および化粧品用素材溶液： 培養皮膚（自社培養）に、培養 11 日目から処理溶液を 2 日間連用適用し、その後トリプシン処理により得た角層シートを $2.0 \times 3.0 \text{ mm}^2$ に切り出し、5 枚積層して X 線散乱測定用試料とした。化粧品用素材溶液には、水およびグリセリン溶液（10 wt%）、L-テアニン溶液（2 wt%）、低分子ヒアルロン酸溶液（1 wt%）を用いた。

単回照射実験： 温度制御セルに乾燥積層角層シートを設置して小角・広角 X 線散乱測定を行った。

温度走査実験： 乾燥積層角層シートを用いて、 $23 \text{ }^\circ\text{C}$ から $3 \text{ }^\circ\text{C}$ 毎に小角・広角 X 線散乱測定を行いながら $5 \text{ }^\circ\text{C}$ まで冷却し、その後、 $98 \text{ }^\circ\text{C}$ まで $3 \text{ }^\circ\text{C}$ 毎に小角・広角 X 線散乱測定を行いながら昇温した。温度走査速度は $3 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ とした。

装置および測定条件： SPring-8 の BL19B2 において、X 線の波長は 0.050 nm （25 keV）、カメラ長は 771 mm （ベヘン酸銀で較正）とした。検出器には PILATUS-2M を用い、露光時間は 120 s として 2 次元散乱像を取得した。

結果および考察：

図 1. に示すように、乾燥積層角層シートの X 線回折プロファイルでは、 $q = 6.28 \text{ nm}^{-1}$ （ 1.0 nm ）付近にケラチン繊維のプロトフィブリルの α ヘリックス構造の間隔由来（ 0.96 nm ）[2]と考えられるブロードな回折が、 $q = 14.0 \text{ nm}^{-1}$ （ 0.45 nm ）付近にケラチン繊維の β シート構造（ 0.465 nm ）由来[2]と推察されるブロードな回折が観察された。広角領域では $q = 10.459 \text{ nm}^{-1}$ （ 0.6 nm ）、 $q = 12.673 \text{ nm}^{-1}$ （ 0.50 nm ）、 $q = 15.203 \text{ nm}^{-1}$ （ 0.413 nm ）にそれぞれ回折が観察され、 $q = 15.203 \text{ nm}^{-1}$ はすでに報告されている細胞間脂質の六方晶の充填構造の回折の位置と一致した。 $q = 4.0 \text{ nm}^{-1}$ 付近に観察される回折は窓材であるポリイミド膜由来である。

グリセリンや L-テアニン、ヒアルロン酸といった保湿を目的とする化粧品用素材溶液を連用適用した際に、 $q = 15.2 \text{ nm}^{-1}$ 付近の六方晶由来の回折には大きな変化は観察されないものの、 $q = 14.0 \text{ nm}^{-1}$ （ 0.45 nm ）付近に観察されるケラチン繊維の β シート構造由来と考えられるブロードな回折の強度は著しく増大した。以上の結果から保湿剤を培養皮膚に連用適用した際に、細胞間脂質の充填構造には影響が小さい一方で、ケラチン繊維の形成に影響を与えている可能性が示唆された。また、回折プロファイルの変化から、保湿剤の連用により、ケラチン繊維の量が増大し、結果的に、より機械的強度の高い角層が形成されると考えられる。

次に、未成熟で充填構造が整っていない、すなわち液晶の割合が多いといわれる培養皮膚の細胞間脂質において、液晶から充填構造が形成される様子を観察する目的で、温度走査実験を行った。図 2 (a) に示すように、細胞間脂質は冷却によって、 $q = 15.2 \text{ nm}^{-1}$ 付近の六方晶由来の回折に変化は観察されなかった。この結果は、細胞間脂質の充填構造の形成は、温度のような外的因子の影響のみならず、培養皮膚の角化過程が重要であることを示している。また、より長時間低温状況下に置くことで、充填構造の形成が観察できる可能性がある。一方、図 2 (b) に示すように、

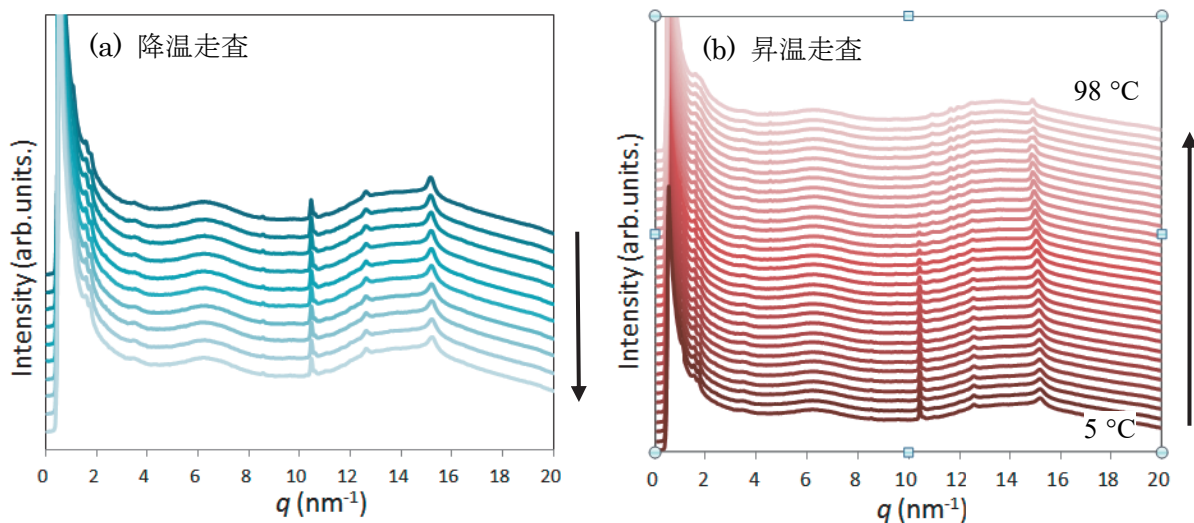


図 2. 温度走査による培養皮膚角層 X 線散乱プロファイルの変化: (a) 降温走査 (b) 昇温走査

昇温過程においては、 $q = 15.2 \text{ nm}^{-1}$ 付近の六方晶由来の回折ピークは 39 °C 付近から回折ピークの強度が減弱することが確認された。

参考文献：

- [1] 長谷川靖 他, 2015 年度 あいち S R 成果公開無償利用事業 成果報告書 (2015PB013)
- [2] L.Kreplak, Biophys J, **87**(1), 640-647 (2004).