

赤外顕微鏡によるヒト三次元皮膚モデルを構成する成分の可視化 Visualization of the Component of Three-dimensional Human Tissue Culture Models by Using an Infrared Microscopic Mapping Method

伊藤 廉^a, 藤代 美有紀^b, 清水 健司^b, 栗原 浩司^c, 渡邊 紘介^a,
鈴田 和之^a, 前田 貴章^a, 吉田 大介^b

Len Ito^a, Miyuki Fujishiro^b, Kenji Shimizu^b, Kouji Kurihara^c, Kousuke Watanabe^a,
Kazuyuki Suzuta^a, Takaaki Maeda^a, Daisuke Yoshida^b

^a(株)ミルボン, ^b(株)コスモステクニカルセンター, ^c(株)ニコダームリサーチ

^aMilbon Co., Ltd., ^bCOSMOS TECHNICAL CENTER CO., LTD., ^cNikoderm Research Inc.

一般的に、動物を使った評価は厳しく規制される方向に進んでおり、動物実験の代替となる試験法の確立がされつつある。その試験法の一つとして、ヒト三次元皮膚モデルは安全性評価、基礎研究、製品開発、製品の効能効果の実証などの観点において、有用な標準ツールとして広く認知され、更にこれを用いた様々な実験系の確立が急務となっている。このような現状の中、本実験では赤外顕微鏡を用いたヒト三次元皮膚モデルの測定条件の構築を目的に実験を行った。その結果、現在のところ最適と考えられる条件を導き出し、ヒト三次元皮膚モデルを構成する成分の可視化を行えることを確認した。

キーワード： ヒト三次元皮膚モデル、赤外顕微鏡、炭化水素

背景と研究目的：

高齢化が進む日本において、美容と健康に対する関心は日々高まっており、これらの分野で使用される製品においては、安全性と有用性が重要なファクターとなっている。正確な安全性、有用性のデータを取ることは、新製品の開発において必要不可欠となっており、その重要性は今後、より一層高まることになると考えられる。

さらに、化粧品、医薬部外品のみならず、皮膚に触れるすべての化学製品、天然由来原料や合成原料による一次刺激やその他の身体的影響などの評価も求められるようになっており、特に、皮膚や眼に対する影響の評価方法については、三次元皮膚モデルを用いた安全性試験が多く用いられるようになってきている。

これまでヒト三次元皮膚モデルを構成する成分の可視化には、蛍光色素などを用いて観察される例はあったが[1]、この従来法は操作が煩雑で多くの分析時間を要すといったデメリットがあった。今回、SPring-8の強いエネルギーの赤外光を用いることで、無染色、短時間、高精度、且つ直接的に成分そのものを捉えることができると考え、実験に着手した。

実験：

ヒト三次元皮膚モデル(SkinEthic RHE)を用い、順化培養後に各々の調整を行った。固定剤の影響を検討するために、未固定、ホルマリン固定、パラフィン固定を行った後、凍結ブロックにし調整を行った。また、調整した凍結ブロックの切り出し厚を検討するために、切り出し条件を5 μm , 10 μm , 15 μm , 20 μm に設定し、各ブロックに対する切り出し条件の検討を行い、最適な測定条件の検討を行った。

測定は、切り出した切片をフッ化バリウムの測定ステージに貼付し、赤外顕微鏡ステージに置き、透過測定を行った。測定はマッピングステージを使用して5 μm ×5 μm 単位で行い、各測定点に対して4,000 – 600 cm^{-1} の範囲で波数分解能 4 cm^{-1} にて赤外吸収スペクトルを得た。この時のアパーチャーサイズは6 μm ×6 μm とし、積算回数は64とした。ヒト三次元皮膚モデルを構成する脂質を含む炭化水素のイメージマッピングデータは、2930 cm^{-1} に付近に現われるC-Hの伸縮振動から検出した[2]、2950 – 2900 cm^{-1} おける吸収ピークの面積値を算出し、ヒト三次元皮膚モデルの厚みの影響を除くためにアミド II(N-H)結合吸収[3]を基準としてC-Hの強度面積を補正し、ヒト三次元皮膚モデルを構成する脂質を含む炭化水素のイメージマッピングデータを構築した。

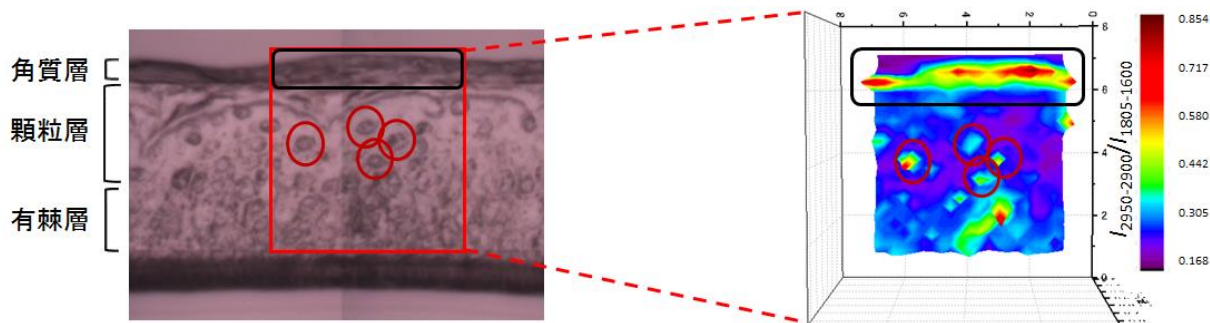


図 1. ヒト三次元皮膚モデルを構成する脂質を含む炭化水素のイメージマッピング
赤枠, 顆粒; 黒枠, 角層

結果および考察：

ホルマリン、パラフィンによって固定したブロックから得られた切片と、未固定のものを比較検討した結果、上記固定剤がヒト三次元皮膚モデル由来の成分ピークと重なり、今後成分浸透などを検討する際の阻害要因になると考えられ、未固定の条件を採用した。また、切片の厚さを変化させたところ、15 μm 以上の厚膜でアミド I ピークの飽和を確認した。今後の浸透成分評価を考慮するとできるだけ膜厚を稼ぐ必要があると考えられ、10 μm の切り出し条件を採用した。

ヒト三次元皮膚モデルのタンパク質由来のアミド I (C=O) の吸収ピーク (1805-1600 cm^{-1}) と、炭化水素基 (C-H) の吸収ピーク (2950-2900 cm^{-1}) の面積値を算出し、モデルの厚みの影響を除くためにアミド I の吸収を基準として C-H の面積を補正し、イメージマッピングした結果、顆粒に多くの脂質成分由来の炭化水素ピークを確認し、角層においても炭化水素のピークを確認し、ヒト三次元皮膚モデルを構成する成分を色の違いで可視化することに成功した(図 1)。

今後の課題：

本測定より最適と考えた条件を用いて、内部に浸透する成分の可視化や、様々な分子生物学的な情報を組み合わせることで、有用な実験手法が確立できるものと考えられる。今後、継続して研究を進めていく予定である。

参考文献：

- [1] Rodger D.C., et al., *Mutat. Res.* **607**, 192-204 (2006).
- [2] Inamasu S. et al., *Fragrance J.* **40**, 39-43 (2012).
- [3] Dubief C., *Cosmetics & Toilettries*, **107**, 95-102 (1992).