

化粧品の機能性を評価するための 生体外皮膚モデルの構築および高機能素材の探索（第3報）

食品コスメ部

岩元彬 柘植圭介

これまでに化粧品及びその素材の美容効果を調べるため、皮膚ダメージを定量的に評価できる生体外皮膚モデルの検討を行ってきた。その結果、3次元培養表皮に紫外線 UVB を照射し、経皮水分蒸散量 (TEWL) を指標とすることで被験試料の保湿・バリア機能への影響を評価可能な生体外皮膚モデルを構築した。本報では、生体外皮膚モデルを用いてアスパラガス抽出物の評価を行った。その結果、UVB を照射した3次元培養表皮では TEWL が上昇したのに対し、アスパラガス抽出物を添加したものは TEWL の上昇が抑制された。続いて、タイトジャンクション形成因子への影響を調べたところ、アスパラガス抽出物は UVB 照射による Claudin1 発現量の低下を有意に抑制した。また、同様にセラミド合成関連因子を解析したところ、アスパラガス抽出物は CerS3 及び SMS2, SPT2 発現の低下を有意に抑制した。したがって、アスパラガス抽出物は Claudin1 や CerS3, SMS2, SPT2 といった生体因子の発現低下を抑えることにより UVB 照射による TEWL の上昇を抑制していることが示唆された。

1. はじめに

近年の化粧品市場では、紫外線などの外的要因や加齢などの内的要因で起こる皮膚ダメージやトラブルの改善・解消効果を訴求した高機能化粧品が市場を急成長させている。このような化粧品の開発では、動物実験を行わずに3次元培養表皮等を用いる代替法による試験が世界中で強く求められているが、現状は安全性の評価に留まり、機能評価への応用に至ったケースは少ない¹⁾。このような背景から、高機能化粧品の開発にはヒト皮膚の反応を忠実に再現した生体外皮膚モデルの構築が望まれている。

表皮は皮膚の最外層として外界と接し、体内の水分の蒸散や異物等から人体を防御する機能を有している。この表皮を構成する細胞の95%は角化細胞であり、成熟に伴い上層に移行していき、深部から基底層、有棘層、顆粒層、角層を構成している。皮膚のバリア機能や保湿には顆粒層のタイトジャンクションや角層の形成脂質であるセラミドが重要な役割を果たしていることがよく知られ、これらの生体因子の発現が皮膚のバリア機能や保湿性に影響を与えることが多くの研究で示されている²⁻⁶⁾。

そこで筆者らは、皮膚老化の最大環境要因である近紫外線(波長200-400nm)の中でも、特に強い皮膚傷害を引き起こすUVB(波長280-320nmの近紫外線)を3次元培養表皮に照射することにより保湿

機能やバリア機能が低下した状態を作り出し、被験試料の皮膚機能への影響を定量的に評価可能な生体外皮膚モデルの構築を行ってきた。その結果、UVBの照射強度に依存して経皮水分蒸散量(Transepidermal water loss; TEWL)が上昇し皮膚バリア性が低下すること、またUVBの照射によるTEWLの上昇が代表的な抗酸化剤であるAscorbyl glucoside (AG)により抑制されることを報告してきた²⁾。加えて、本試験系ではTEWLとタイトジャンクション形成因子やセラミド合成関連因子発現の相関性が極めて高く、これらの生体因子の変動をTEWLに忠実に反映する可能性を明らかにしてきた³⁾。

一方、佐賀県では「さがフード&コスメラボ」や「唐津コスメティック構想」など、県内の農林水産資源を活用したコスメティック素材の開発支援の取り組みが活発に行われている。当センターでも、これまでに化粧品・健康食品としての佐賀県未利用素材の活用を目指して研究を行ってきた。その結果、レンコンポリフェノールが炎症性サイトカインやコラゲナーゼ産生を抑制することや⁷⁾、褐藻綱ノコギリモクが抗炎症成分 Sargahydroquinic acid や Sargaquinic acid を含むことを明らかにしてきた⁸⁾。また、アスパラガス成分中の糖脂質とリン脂質がアレルギーの予防・緩和に有用である可能性を報告し

てきた⁹⁾。

本報では、佐賀県を代表する農作物であるアスパラガス（収穫量全国2位（令和2年））の新産業活用を目指し、生体外皮膚モデルを用いて TEWL 及びタイトジャンクション形成因子、セラミド合成関連因子への影響を評価した。

2. 実験方法

2.1 アスパラガス抽出物の調製（前処理）

アスパラガス（JA さが）は、スチームコンベクションオーブンをを用いて、100°Cの水蒸気で7分間加熱処理した後に、凍結乾燥させた。得られた乾燥物は粉碎し、アスパラガス粉末試料とした。続いて、このアスパラガス粉末試料に80%（v/v）エタノール水溶液を加え、室温で4時間攪拌した。これを遠心分離（12,000×g, 30分間）し、得られた上澄み液をアスパラガス抽出物とした。

2.2 被験試料の3次元培養表皮への影響評価

3次元培養表皮は、ヒト表皮角化細胞を用いて作製された LabCyte EPI-MODEL24（J-TEC）を使用した。LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験は経済協力開発機構（OECD）テストガイドライン439に記載されており、その LabCyte EPI-MODEL24 は皮膚刺激性の評価に適した培養表皮モデルとされている。

まず、LabCyte EPI-MODEL24 の培養カップを500 μL のアッセイ培地を分注したアッセイプレートに移し、CO₂ インキュベーター内で培養した。18時間培養後、培養カップをアッセイ培地またはアスパラガス抽出物を含むアッセイ培地を分注したアッセイプレートに移し、CO₂ インキュベーター内で培養した。4時間培養後、これにUVB（280-320 nm, ランプ：Toshiba SH1002MA, フィルター：Asahi spectra SH0325）を150 mJ/cm²の強度で照射した後に、新しく1.0 mL のアッセイ培地またはアスパラガス抽出物を含むアッセイ培地を分注したアッセイプレートに培養カップを移し、インキュベーター内で培養した。2日間及び8日間培養後、TEWL を測定した。また、2日間培養表皮の mRNA 発現量を RT-qPCR 法により評価した。

2.3 3次元培養表皮モデルの経皮水分蒸散量測定

LabCyte EPI-MODEL24 を32°Cに保った HIENAI MAT（コスモ・バイオ）上で5分間フタを空けて静置した。その後、Tewitro TW24（Courage+Khazaka）をセットし、これが入る W340×H320×D275 mm の箱を覆いかぶせ、900 秒間経皮水分蒸散量を測定し

た。解析には測定値が安定する881~900秒の20秒間の経皮水分蒸散量を使用した。なお、これらの操作は、テーブルコーチ（興研）を用いた無菌環境下で行った。

2.4 RT-qPCR 法による遺伝子発現の検討

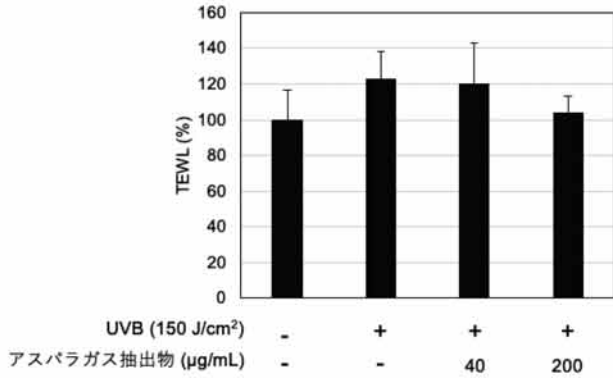
培養表皮の mRNA 発現量の変化を調べるため、培養表皮をバイオマッシャーII を用いて破碎後、TRIzol[®] Reagent（Thermo）を用いて総 RNA を抽出し、PrimeScript[™] RT Master Mix（Takara）により cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として、TB Green[®] Premix EX Taq[™]（Takara）を用いてリアルタイム PCR を行うことにより、遺伝子発現量を比較した。評価に使用した遺伝子は claudin1, claudin4, ceramide synthase 3（CerS3）, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）, sphingomyelin synthase 1（SMS1）, SMS2, serine palmitoyltransferase 1（SPT1）, SPT2 であり、使用したプライマーは表1に示した。得られたデータは、BIO-RAD CFX Manager version 3.1 を用いて GAPDH を内部標準として比較 CT 法により解析した。これらの操作は製造プロトコールに従って行った。

2.5 MTT アッセイによる生細胞率の測定

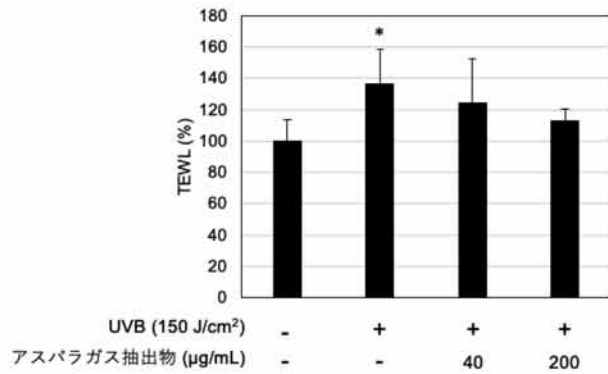
3次元培養表皮の生細胞率は MTT アッセイに従って評価した。まず、24 ウェル培養プレートにアッセイ培地で0.5 mg/mL に調製した3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide（MTT, Dojindo）を500 μL ずつ分注し、CO₂ インキュベータ

表1 プライマーリスト

プライマー	配列 (5'-3')
Claudin1 sense	5'-GAAGTGTATGAAGTGCTTGG-3'
antisense	5'-GGGTCATAGGGTCATAGAAT-3'
Claudin4 sense	5'-TATGGATGAACTGCGTGGTG-3'
antisense	5'-GATGATGVTGATGATGACGAG-3'
CerS3 sense	5'-CCAGGCTGAAGAAATTCAG-3'
antisense	5'-AACGCAATTCAGC AACAGT-3'
GAPDH sense	5'-CTTCGCTCTCTGCTCCTCCTG-3'
antisense	5'-CGCCCAATACGACCAATCCG-3'
SMS1 sense	5'-CAACATTGGCGTAGACAT-3'
antisense	5'-TAGGAGGTACTCGTTCGTG-3'
SMS2 sense	5'-ACTACTCTACTGTGCCTGG-3'
antisense	5'-AGCAGCCAGCAGATTAATG-3'
SPT1 sense	5'-GCGCGCTACTTGGAGAAAGA-3'
antisense	5'-TGTTCCACCGTGACCACAAC-3'
SPT2 sense	5'-AGCCGCCAAAGTCCTTGAG-3'
antisense	5'-CTTGTCAGGTTTCCAATTTCC-3'



(a) 2日間培養



(b) 8日間培養

図1 アスパラガス抽出物の TEWL への影響
測定値は 6 連の平均値であり、エラーバーは標準誤差を示す。
*p<0.05 vs UVA (-) アスパラガス抽出物 (-)を示す。

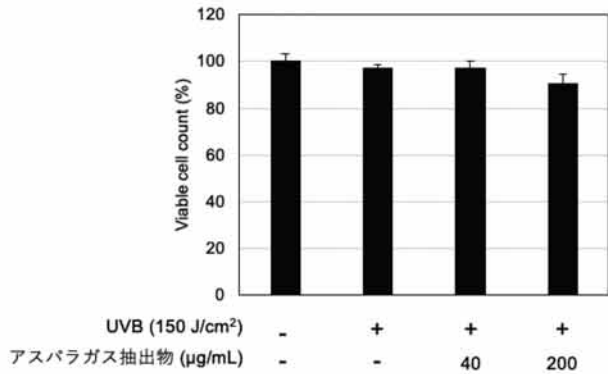
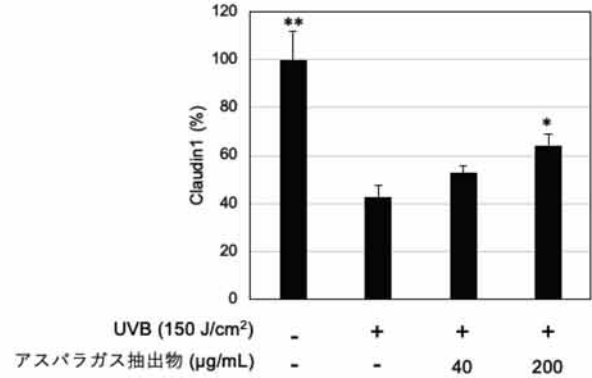
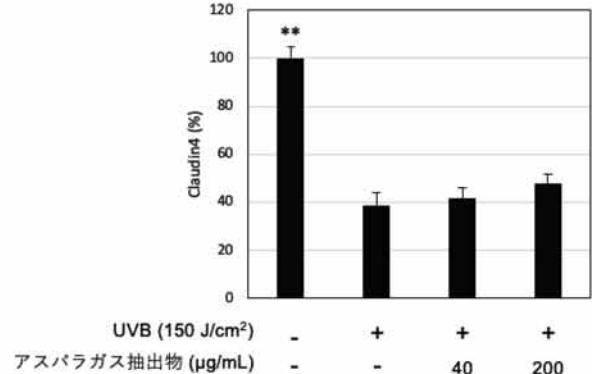


図2 アスパラガス抽出物の生細胞率への影響
測定値は 6 連の平均値であり、エラーバーは標準誤差を示す。

一内で加温した。これに培養カップを移し、CO₂ インキュベーター内で静置した。4 時間反応後、培養カップから培養表皮を回収し、0.04 mol/L の塩酸 (Fujifilm) を含むイソプロピルアルコール (Fujifilm) に浸漬させ、室温で 16 時間色素を抽出した。その後、抽出液を 96 ウェルマイクロプレートに移し、570-650 nm の吸光度を測定することにより、生細胞率を算出した。



(a) Claudin1 発現量



(b) Claudin4 発現量

図3 アスパラガス抽出物のタイトジャンクション形成因子への影響

測定値は 3 連の平均値であり、エラーバーは標準誤差を示す。
*p<0.05, **p<0.01 vs UVA (+) アスパラガス抽出物 (-)を示す。

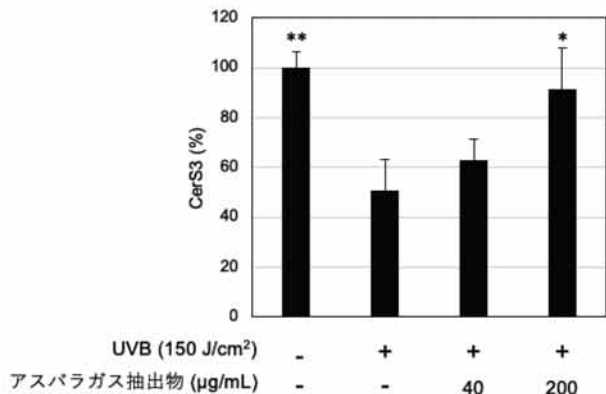
2.6 統計解析

得られたデータは、Statcel4 (OMS Publishing Inc.) を用い、Turkey-kramer 法で解析した。

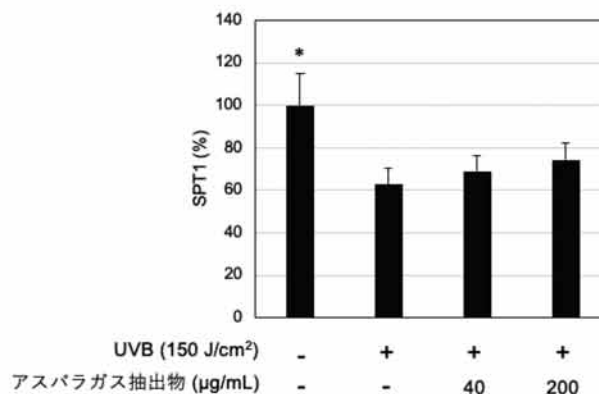
3. 結果及び考察

3.1 アスパラガス抽出物の経皮水分蒸散量への影響

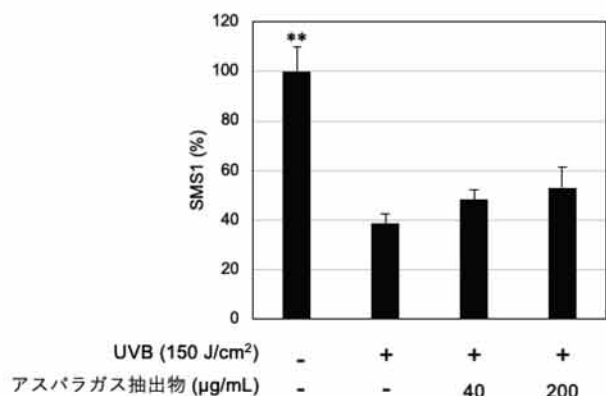
アスパラガス抽出物の 3 次元培養表皮への影響は、経皮水分蒸散量 (TEWL) を測定することにより評価した。図 1 (a) に UVB 照射 2 日後の 3 次元培養表皮の TEWL を示した。UVB を照射したものでは未照射のものに比べ TEWL が上昇するのに対し、200 µg/mL のアスパラガス抽出物を添加したものについては、TEWL の上昇が抑制される傾向にあった。さらに、8 日間培養後の 3 次元培養表皮では、UVB 照射による有意な TEWL の上昇がアスパラガス抽出物の添加により、著しく抑制されることが確認された (図 1 (b))。なお、MTT アッセイを行った結果、アスパラガス抽出物は生細胞率には影響を及ぼさないことを確認している (図 2)。これらの結果から、



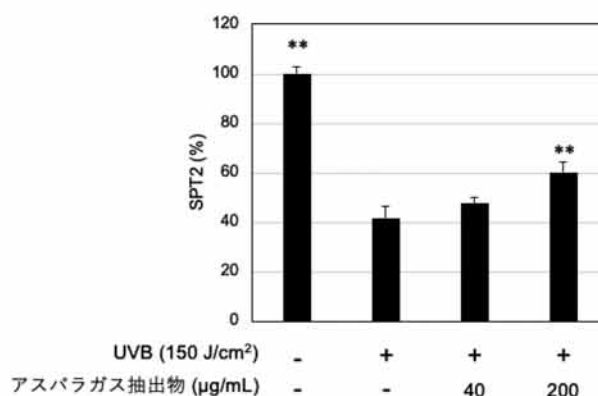
(a) CerS3 発現量



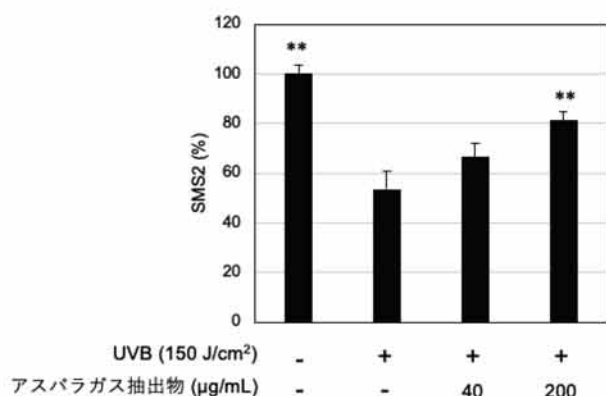
(d) SPT1 発現量



(b) SMS1 発現量



(e) SPT2 発現量



(c) SMS2 発現量

図4 アスパラガス抽出物のセラミド合成関連因子への影響

測定値は3連の平均値であり、エラーバーは標準誤差を示す。
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs UVB (+) アスパラガス抽出物 (-)を示す。

ある。このタイトジャンクションを形成する因子としては Claudin や Occludin などが知られており、特に Claudin については、ノックアウトマウスの真皮に注射した色素が角層まで浸透することや経費水分蒸散が亢進され体重を維持できないことなどが報告されており、バリア機能の形成に重要な因子であることが明らかになっている^{4,5)}。

そこで、アスパラガス抽出物の Claudin1 への影響を調べたところ、UVB 照射した3次元培養表皮では発現量が低下したのに対し、アスパラガス抽出物添加培地で培養したものは、発現量の低下が抑制された(図3 (a))。また、この傾向は Claudin4 でも同様に確認された(図3 (b))。そのため、アスパラガス抽出物は Claudin の発現量低下を抑制することにより、タイトジャンクションの低下を緩和し、最終的に TEWL の上昇を抑制している可能性が示された。

アスパラガス抽出物は TEWL に密接に関係する皮膚バリア機能や保湿機能に影響を及ぼして、TEWL の上昇を抑制していることが示唆された。

3.2 タイトジャンクションへの影響

皮膚は、外界と生体を隔てる最大の臓器であり、外部からの刺激や異物の侵入、体内の水分等の漏出を防ぐバリア機能を有している。皮膚のバリア機能の維持には、表皮の顆粒層表面に存在する脂肪表面タンパク質が結合したタイトジャンクションが重要で

3.1 セラミド合成関連因子への影響

皮膚の保湿にはセラミドや天然保湿因子が重要な役割を果たしている。特にセラミドは角層脂質重量の30~40%を占め、皮膚の保湿やバリア機能に重要な細胞間脂質であることが報告されている^{4,5)}。また、角層中のセラミドレベルが低下するとバリア機能が低下することが報告されている⁶⁾。そのため、セラミドの摂取や合成の誘導は皮膚の保湿に重要であると考えられており、その関連性について研究が活発に行われている。

そこで、アスパラガス抽出物のセラミドの合成関連酵素の遺伝子発現量を評価したところ、UVBを照射した3次元培養表皮と比べ、アスパラガス抽出物を含む培地で培養した培養表皮では、CerS3, SMS2, SPT2の発現量が有意に増加した(図4(a)(c)(e))。表皮のセラミドの合成には、様々な酵素が関与しており、まずSPTがセラミド合成の第一段階であるセリンとパルミトイル-CoAの縮合を触媒し、CerS3が脂肪酸のN-アシル化によりセラミドの基本構造(セラミド前駆体)を形成する。ここからセラミドを合成する経路は二つあり、一つはセラミド前駆体からGCSとGBAの働きによりグルコシルセラミドを合成、分解を経由してセラミドができる経路、もう一つはSMSとAcid sphingomyelinase (SMase)によりスフィンゴミエリンを介する経路である。

本研究では、アスパラガス抽出物の添加により、SPT2及びCerS3, SMS2発現量が増加したことから、少なくともセリン+パルミトイル Co-A/セラミド前駆体/スフィンゴミエリン/セラミド経路での角層セラミド合成が活性化されたことが示唆された。アスパラガス抽出物がセラミド合成を促進することについては、ヒトケラチノサイトのSMaseが活性化されることが報告されているが、それ以上の知見はなかった¹⁰⁾。そのため、本法で見出したアスパラガスのSPT及びCerS, SMS合成の活性化に関する機能は新たな知見であった。

4. おわりに

本研究では、3次元培養表皮に紫外線UVBを照射し、経皮水分蒸散量(TEWL)を指標とすることで被験試料の保湿・バリア機能への影響を評価可能な生体外皮膚モデルを構築した。

本報では、3次元培養表皮を用いた生体外皮膚モデルを用いて、UVB照射によるTEWLの上昇をアスパラガス抽出物が抑制することを初めて見出した。続いて、タイトジャンクション形成因子のmRNA発

現を調べた結果、アスパラガス抽出物がUVB照射によりClaudin1発現量の低下を抑えることを確認した。また、同様にセラミド合成関連因子のmRNA発現の解析では、CerS3とSMS2, SPT2発現の低下がアスパラガス抽出物の添加により緩和されることを明らかにした。そのため、アスパラガス抽出物はこれらタイトジャンクション形成因子やセラミド合成関連因子の発現低下を抑えることにより、TEWLの上昇を抑制している可能性が示された。

本研究で構築した生体外皮膚モデルや新たに見出したアスパラガスの美容・健康機能に関する知見が、佐賀県の産業振興に繋がることが期待される。

なお、研究を実施するにあたって使用した紫外線照射装置及び培養細胞用経皮水分蒸散量センサーTewitro TW24)は、電源立地地域対策交付金で導入した。

参考文献

- 1) 岩崎泰夫, 化粧品 of 将来と課題, 化学と生物, 46(5), 346-351(2008)
- 2) 岩元彬, 柘植圭介, 化粧品の機能性を評価するための生体外皮膚モデルの構築および高機能素材の探索(第1報), 令和元年佐賀県工業技術センター, 33-36(2019)
- 3) 岩元彬, 柘植圭介, 化粧品の機能性を評価するための生体外皮膚モデルの構築および高機能素材の探索(第2報), 令和2年佐賀県工業技術センター, 31-35(2020)
- 4) 久保亮治, 皮膚バリアとランゲルハンス細胞の動態, 日本臨床免疫学会誌, 34(2), 76-84(2011)
- 5) 下豊留芳枝, 辻村久, 石川准子, 藤村努, 北原隆, 日本人女性の角層セラミドプロファイルの部位差解析, 日本化粧品学会誌, 38(1), 3-8(2014)
- 6) Imokawa G, Abe A, Jin K, Higaki Y, Kawashima M, Hidano A, Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: An etiologic factor in atopic dry skin? *J Invest Dermatol*, 96(4), 523-526(1991)
- 7) Iwamoto A, Yamauchi R, Oogai S, Tsuruta Y, Tsuge K, Nagata Y, Yanagita T. Lotus root extract inhibits skin damage through suppression of collagenase production in vitro, *Cytotechnology*, 74, 309-317 (2022)
- 8) 柘植圭介, 岩元彬, 鶴田裕美, 山内良子, 藻類の産業利用に関する可能性研究(第2報), 平成30

年佐賀県工業技術センター, 19-31(2018)

- 9) Iwamoto A, Hamajima H, Tsuge K, Tsuruta Y, Nagata Y, Yotsumoto H, Yanagita T. Inhibitory effect of green asparagus extract, especially phospholipids, on allergic responses in vitro and in vivo, *J Agric Food Chem*, 68(51), 15199-15207(2020)

- 10) 特許第 4601088 号「セラミド合成促進剤、及びそのセラミド合成剤を含む化粧品、医薬部外品、皮膚外用剤」

※本研究は令和3年度に実施しましたが、知的所有権取得のため掲載を遅らせて令和6年度の報告書に掲載しました。