

ヒト生体環境に着目した新規皮膚細胞培養系の構築と応用（第2報）

食品コスメ部

岩元彬 吉村臣史 柘植圭介

皮膚ケア商品の有用性を評価できる試験系を構築するため、皮膚老化の最大外的要因である紫外線 UVB の3次元培養表皮への影響を調べた。UVB を3次元培養表皮に照射すると446種類の脂質が増加し、578種類の脂質が減少した。セラミドについては72種類が増加し、190種類が減少、トリグリセリドについては78種類が増加し、4種類が減少した。また、UVB照射により総脂質量は増加し、このうち総セラミド量は減少、総トリグリセリドは増加した。一方、アスパラガス抽出物添加培地で培養した3次元培養表皮では73種類の脂質が増加し、28種類が減少した。セラミドについては25種類が増加し、4種類が減少、トリグリセリドについては増加したものはなく、3種類が減少した。また、UVB照射のみを行った3次元培養表皮と比べ、アスパラガス抽出物を添加したものでは総脂質量に変化はなかったがセラミド量が増加傾向にあり、トリグリセリドが減少した。したがって、本試験条件においてUVB照射は3次元培養表皮のセラミドを減少し、トリグリセリドを増加させるが、アスパラガス抽出物の添加によりセラミドを増加し、トリグリセリドを減少することが示唆された。

1. はじめに

佐賀県では、地域創生の取り組みとして、「美と健康に関するコスメティック産業を集積させ、コスメに関連する自然由来原料の供給地となることを目指すコスメティック構想」を推進しており、当センターでも県内素材の美容効果の検証を行ってきた。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^{1,2)}、キヌアがコラーゲン産生増強効果や分解阻害効果を有すること³⁾、褐藻綱ノコギリモクが抗炎症成分 Sargahydroquinonic acid や Sargaquinonic acid を含むこと等を見出してきた⁴⁾。

このような化粧品の開発では、倫理上の配慮から、実験動物を使用せず、培養細胞等を用いた動物実験代替法の活用が世界中で重視されている。しかしながら、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。そのため、化粧品の機能評価・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。

そこで、本研究では皮膚ケア商品の機能性の検証を目指した測定技術の開発を試みる。

本報では、皮膚老化の最大外的要因である紫外線 UVB を3次元培養表皮に照射し、肌の保湿やバリア機能に関与するセラミドへの影響を評価した。また、これまでの研究で紫外線照射による経皮水分蒸散量の上昇やセラミド合成関連遺伝子の発現低下の抑制

などを確認したアスパラガス抽出物の影響についても検証した。

2. 実験方法

2.1 アスパラガス抽出物の調製

アスパラガス (JA さが) は、スチームコンベクションオープン (F.M.I 製 UNOX) 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、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 3次元培養表皮への紫外線照射

3次元培養表皮は、LabCyte EPI-MODEL24 6D (J-TEC) を使用した。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。6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 120 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。7日間培養後、培養カップから培養表皮を回収し、セラミド解析に使用した。

2.3 3次元培養表皮の脂質解析

3次元培養表皮を2 mL容マイクロチューブに入れ、メタノール：内部標準液：ギ酸 = 98.9 : 1 : 0.1 (v/v) 400 µLを加えてビーズ破砕機 (TAITEC 製µT-1, ステンレスビーズ 3 mm×3 個) にて60秒ホモジナイズし、さらにクロロホルム 400 µLを加えて30秒ホモジナイズした。ホモジネートに純水 200 µLを加え、遠心分離により上層と下層に分け、下層を回収した。上層にクロロホルム 400 µLを加えて攪拌し、遠心分離により得た下層を併せて脂質抽出液とした。内部標準液は Merck 製 SPLASH LIPIDOMIX Mass Spec Standard を用いた。

脂質抽出液をメタノールで10倍希釈し、表1に示す条件でLC-MSに供した。得られたMSのクロマトグラムについて、低分子データ解析ソフトウェア (Thermo Fisher Scientific 製 Compound Discoverer ver. 3.3, Lipidomics ワークフロー使用) によるLipidomics解析を実施した。検出されたピークのMS (MS) スペクトル情報とデータベース (Mass List, mzCloud, Metabolika, Chem Spider) とのマッチングを行い、脂質を推定した。

2.4 統計解析

得られたデータは、GraphPad PRISM 10 (GraphPad Software Inc.)を用い、student's *t* testで解析した。

3. 結果及び考察

3.1 UVB照射が3次元培養表皮に与える影響

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^{5,6)}。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⁷⁾。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。

本研究では、まずUVB照射が3次元培養表皮の脂質発現量に与える影響について調べた。図1にUVBを照射した際の脂質の変化を示す。このグラフはUVB(+)/UVB(-)での脂質量の変化を示しており、X軸が大きくなればUVB(+)¹⁾で増加したことを示している。検出された脂質のうち、UVB照射により有意に増加したものが446種類、減少したものが578種類であった。そのうちセラミドについては有意に増加したものが72種類、減少したものが190種類、トリグリセリドについては有意に増加したものが78種類、減少したものが4種類であった。また、検出ピークの面積比から3次元培養表皮の総脂質量を図2に示す。それぞれを相対的に比較したところ、UVB照射により総脂質量は増加し、総セラミド量は減少、総トリグリセリドは増加した。

3.2 アスパラガス抽出物がUVB照射3次元培養表皮に与える影響

続いて、UVB照射した後、アスパラガス抽出物を含む培地で培養した3次元培養表皮について解析した。図3に脂質およびセラミド、トリグリセリドの変化を示した。このグラフはアスパラガス添加培地/UVB(+)¹⁾での脂質量およびセラミド量、トリグリセリド量の変化を表しており、アスパラガス抽出物の添加により73種類の脂質が増加し、28種類の脂質が減少した。セラミドについては25種類が増加し、4種類が減少、トリグリセリドについては増加したものは確認されず、3種類が減少した。また、図4に示すように総脂質量を比較したところ、アスパラガス抽出物の添加により総脂質量は変化しなかったが、総セラミド量については増加傾向 ($p = 0.082$) にあり、総トリグリセリドは有意に減少した。したがって、アスパラガス抽出物はUVB照射による総セラミド量の減少及び総トリグリセリドの増加を抑制することが示された。

トリグリセリドは皮脂膜を形成する脂質であり、その分解物であるグリセロールは保湿機能に関与することが報告されている一方で、紫外線等の刺激で

表1 LC-MS条件

HPLC	装置	Vanquish UHPLC (Thermo Fisher Scientific)
	カラム	Cadenza CD-C18, φ2 x 250 mm (Imtakt Co.)
	移動相	A:Acetonitrile:Water:1 mol/L Ammonium Formate:Formic acid=60:40:1:0.1(v/v) B:2-Propanol:Acetonitrile:1 mol/L Ammonium Formate:Formic acid=90:10:1:0.1 (v/v) B;0-100% with linear gradient in 20 min
	検出	MS
	注入量	3 µL
MS	装置	Q Exactive (Thermo Fisher Scientific)
	イオン源	ESI
	極性	Positive and Negative
	検出	Orbitrap
	m/z範囲	150-2,000 m/z

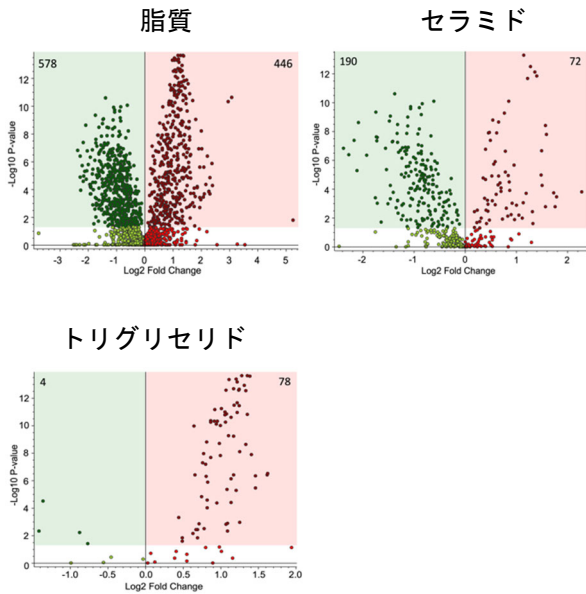


図1 UVB照射による脂質量の変化

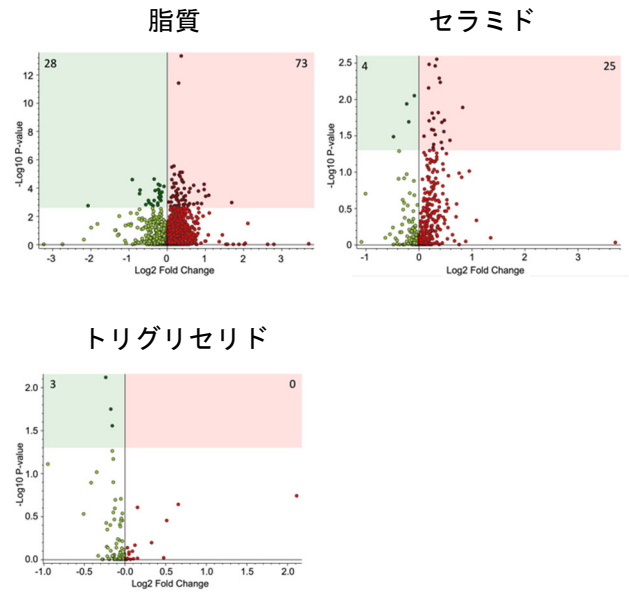


図3 アスパラガス抽出物添加による脂質量の変化

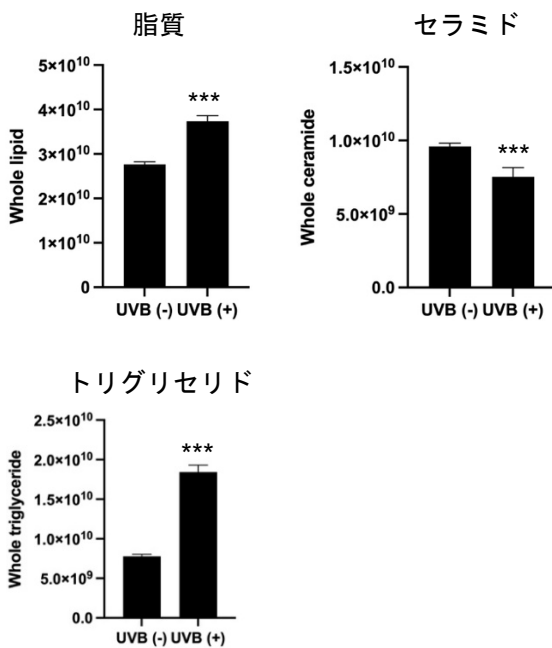


図2 各脂質量の変化

測定値 (LC-MS ピーク面積の総和) は5連の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs UVB (-) を示す。

酸化した過酸化脂質はセラミド合成を低下させることが示唆されている⁸⁾。また、皮膚常在菌のリパーゼにより分解された脂肪酸の一種は皮膚の炎症やバリア損傷を促進することが知られている⁹⁾。そのため、アスパラガス抽出物は皮膚のバリア機能や保湿に関与するセラミドの維持や、トリグリセリドの増加がもたらす皮膚炎の抑制に有用であることが示唆された。

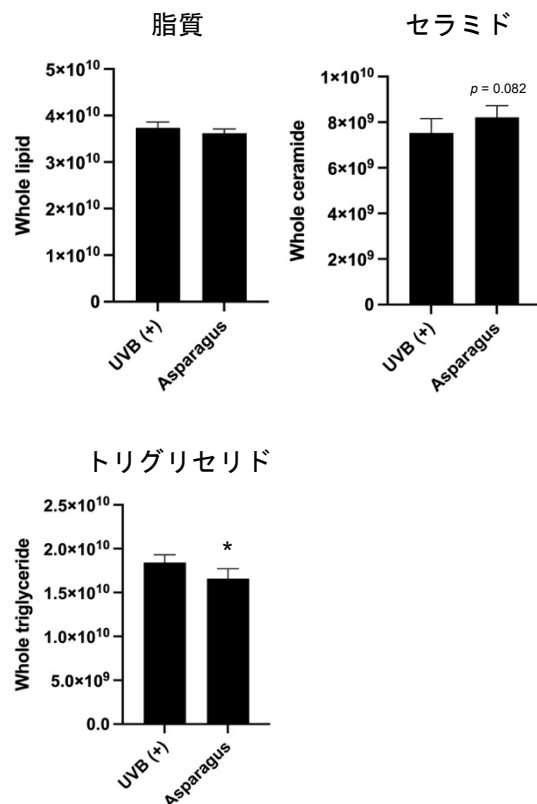


図4 アスパラガス抽出物添加による各脂質量の変化

測定値 (LC-MS ピーク面積の総和) は5連の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs UVB (+) を示す。

4. おわりに

本研究では、紫外線 UVB を照射した3次元培養表皮の脂質変化を解析し、UVB照射によりセラミド

が減少し、トリグリセリドが増加すること、またアスパラガス添加培養によりこのセラミドの減少とトリグリセリドの増加が抑制されることを明らかにした。これらの知見は、化粧品の美容機能評価およびアスパラガスの化粧品活用に有用なものであった。

なお、研究を実施するにあたって使用したイオントラップ型高速液体クロマトグラフ質量分析システムは、電源立地地域対策交付金で導入した。

参考文献

- 1) 山内良子, 岩元彬, 吉村裕美, 柘植圭介, 炎症性サイトカイン産生抑制用の組成物, 2020; 特許第 6667773 号
- 2) Iwamoto A, Yamauchi R, Oogai S, et al. Lotus root extract inhibits skin damage through suppression of collagenase production in vitro. *Cytotechnology*. 2022;74(2):309-317.
- 3) 岩元彬, 柘植圭介, 鶴田裕美, 三田かおり, コラゲナーゼ活性阻害用組成物及びコラーゲン産生促進用の組成物, 2022;特開 2022-139538
- 4) 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), 2018;平成 30 年佐賀県工業技術センター:19-31.
- 5) 久保亮治, 皮膚バリアとランゲルハンス細胞の動態, 日本臨床免疫学会会誌, 34(2),76-84(2011)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 佐藤政博, 杉山清治, 落合道夫, トリグリセリド類の光酸化物生成と皮膚刺激性および細胞毒性に関する研究, 日本化粧品技術者会誌, 1986; 20(1):35-40.
- 9) 柴垣奈佳子, 敏感肌での皮膚常在菌叢, オレオサイエンス, 2023; 11(23):569-574.