

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）

食品工業部

岩元彬 柘植圭介

化粧品及びその素材の美容効果を調べるため、紫外線による皮膚ダメージを生体外で定量的に評価できる生体外皮膚モデルの構築を試みた。3次元培養表皮（LabCyte EPI-MODEL24）にUVBを100 – 250 mJ/cm²の強度で照射したところ、24時間、48時間培養後に強度依存的にバリア機能の指標とされる経皮水分蒸散量が上昇することが確認され、特に125 mJ/cm²を境に有意な上昇が認められた。また、代表的な抗酸化剤として化粧品等に広く使用されているAscorbyl glucosideを添加した培養液で培養した培養表皮では、125 mJ/cm²のUVB照射による経皮水分蒸散量の上昇が抑制される傾向が見られた。従って、本研究で見出した条件で経皮水分蒸散量を測定することにより、被験サンプルの皮膚バリア機能への影響を評価できることが示唆された。

1. はじめに

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。

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、動物実験を行わない代替法による試験が世界中で強く求められている¹⁾が、安全性の評価に留まり、機能評価への応用には至っていない。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。

そこで本研究では、皮膚老化の最大環境要因である紫外線（波長10 - 400 nm）の中でも、特に強い皮膚傷害を引き起こすUVB（波長280 - 320 nmの近紫外線）を3次元培養表皮に照射することによりバリア機能が低下した状態を作り出し、被験サンプルの皮膚バリア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試みた。

2. 実験方法

2.1 紫外線照射による皮膚バリア機能の低下誘導

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、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 (J-TEC) を分注したアッセイプレートに移し、37℃のCO₂インキュベーター内で培養した。18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100-225 mJ/cm²の強度で照射した後に、新しく500 µLの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。24時間及び48時間培養後、経皮水分蒸散量 (Transepidermal water loss; TEWL) を測定し、皮膚バリア機能の評価した。

2.2 被験サンプルの皮膚バリア機能への影響評価

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もしくはAscorbyl glucoside (AG, SIGMA) 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を125 mJ/cm²の強度で照射し、新しいアッセイ培地もしくはAGを含むアッセイ培地に培養カップを移し、CO₂インキュベーター内で培養した。24時間後及び48時間培養後、経皮水分蒸散量を測定した。

2.3 3次元培養皮膚モデルの経皮水分蒸散量測定

LabCyte EPI-MODEL24を32℃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、600 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 581～600 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 生細胞率の測定

生細胞率は MTT アッセイにより評価した。まず、3 - (4,5 - Dimethyl - 2 - thiazolyl) - 2,5 - diphenyl - 2H-tetrazolium bromide (MTT, DOJINDO) をアッセイ培地に溶解し、アッセイプレートに 500 μ L ずつ分注して 37°C に加温した。これに、48 時間培養した培養カップを移し、37°C の CO₂ インキュベーター内で 3 時間反応させた。その後、培養カップ内の培養表皮をピンセットで取り出し、300 μ L のイソプロパノールに浸漬させ、冷暗所で一晩静置して色素を抽出した。抽出した色素は 96 穴プレートに移し、570 nm の吸光度を測定した。生細胞率は下記の式 (1) により算出した。

〔生細胞率 %〕 =

$$\left(\frac{[\text{サンプルの測定値平均}]}{[\text{陰性対照の測定値平均}]} \right) \times 100 \quad (1)$$

2.5 統計解析

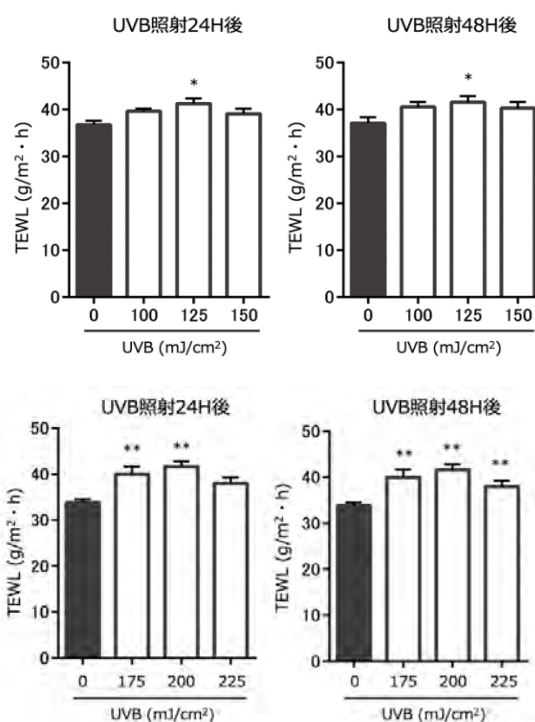
得られたデータは、GraphPad PRISM version 6.0 (GraphPad Software Inc.) を用い、one-way ANOVA で解析した。

3. 結果及び考察

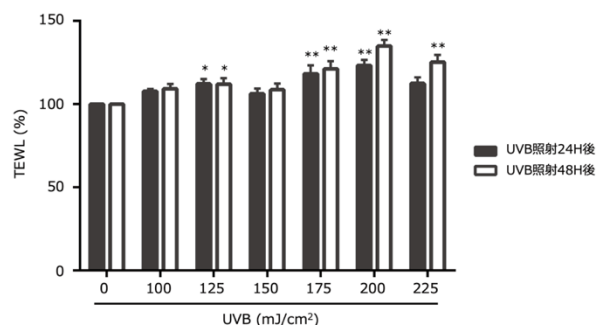
3.1 紫外線照射による皮膚バリア機能の低下誘導

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。外部環境や生化学的なダメージによりバリア機能が低下すると、外界からのアレルゲンや病原体の侵入に対し炎症が生じ、この炎症がさらに皮膚にダメージを与え、バリア機能を低下させる。その結果、皮膚の滑らかさ、柔らかさが失われ、皮膚の肥厚化や乾燥が起こる²⁾。したがって、皮膚バリア機能を一定に保つことは肌の恒常性維持に繋がる。

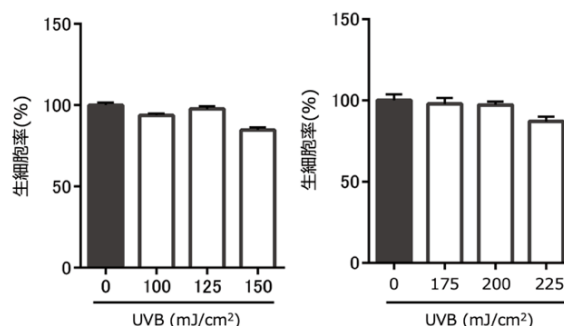
また、これまでに紫外線がヘアレスマウスの経皮水分蒸散量の上昇及び炎症反応を誘発することが報告されており、ヒトにおいても同様の反応が起きていることが示唆されている³⁻⁵⁾。



(a) 経皮水分蒸散量 (g/m²·h)



(b) 経皮水分蒸散量 (%)



(c) 生細胞率 (%)

図1 UVB照射後の経皮水分蒸散量

(a)経皮水分蒸散量 (g/m²·h). (b)経皮水分蒸散量 (%). 測定値は5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 0 mJ/cm²を示す。 (c)生細胞率。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。

本報では、LabCyte EPI-MODEL24 の経皮水分蒸散量への紫外線の影響を調べた。図 1 (a)には測定した TEWL ($\text{g}/\text{m}^2 \cdot \text{h}$)、図 1 (b)には未照射 ($0 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) の経皮水分蒸散量を 100%とした場合の TEWL (%) を示している。UVB 照射前では TEWL に有意な差は認められなかったのに対し、UVB 照射後 24 時間後、48 時間後の培養表皮では照射強度に依存して経皮水分蒸散量が上昇する傾向が確認された。特に $125 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ 以上の UVB 照射では有意な上昇が認められた。これらのモデルの生細胞数には有意な変化が認められなかった (図 1(c)) ため、経皮水分蒸散量の上昇は細胞死によるものではないと考えられた。これらの知見から、これまでに報告のある実際のヒト皮膚やマウス皮膚と同様に、LabCyte EPI-MODEL24 の培養表皮も紫外線の照射により皮膚バリア機能が低下することが示された。

3.2 紫外線照射による肌バリア機能の低下誘導

UVB 照射による LabCyte EPI-MODEL24 の培養表皮の経皮水分蒸散量の上昇を予防もしくは改善可能か、代表的な抗酸化剤である AG を用いて評価した。その結果、UVB 未照射と比べ、照射したコントロール ($125 \text{ mJ}/\text{cm}^2$) では有意に経皮水分蒸散量が増加したのに対し、AG を含む培地で培養した培養表皮においては比較的上昇量が少ない傾向にあった (図 2

(a))。また、この試験では生細胞率に有意な変化はなかった (図 2 (b))。これまでに薬剤で皮膚バリアを破壊したマウスの経皮水分蒸散量をアスコルビン酸 (ビタミン C) が低下させること⁶⁾ やアスコルビン酸含有美容液の塗布が健康女性の経皮水分蒸散量を低下させることが報告されており⁷⁾、本モデル系は実際のヒト皮膚に近い反応を反映できる可能性が示された。

4. おわりに

本研究では、紫外線による皮膚ダメージを生体外で定量的に評価するために LabCyte EPI-MODEL24 を用いて紫外線照射により皮膚バリア機能が低下する生体外皮膚モデルの構築を試みた。

$100\text{--}225 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ の UVB を照射した培養表皮の経皮水分蒸散量を調べたところ、 $125 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ 以上の照射強度で上昇する傾向が確認された。また、このモデルを用いて Ascorbyl glucoside の機能を評価したところ、UVB 照射による経皮水分蒸散量の上昇が抑制された。これらの知見は、化粧品及びその素材の機能を生体外で評価する皮膚モデルの構築に大いに役立つものであった。

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

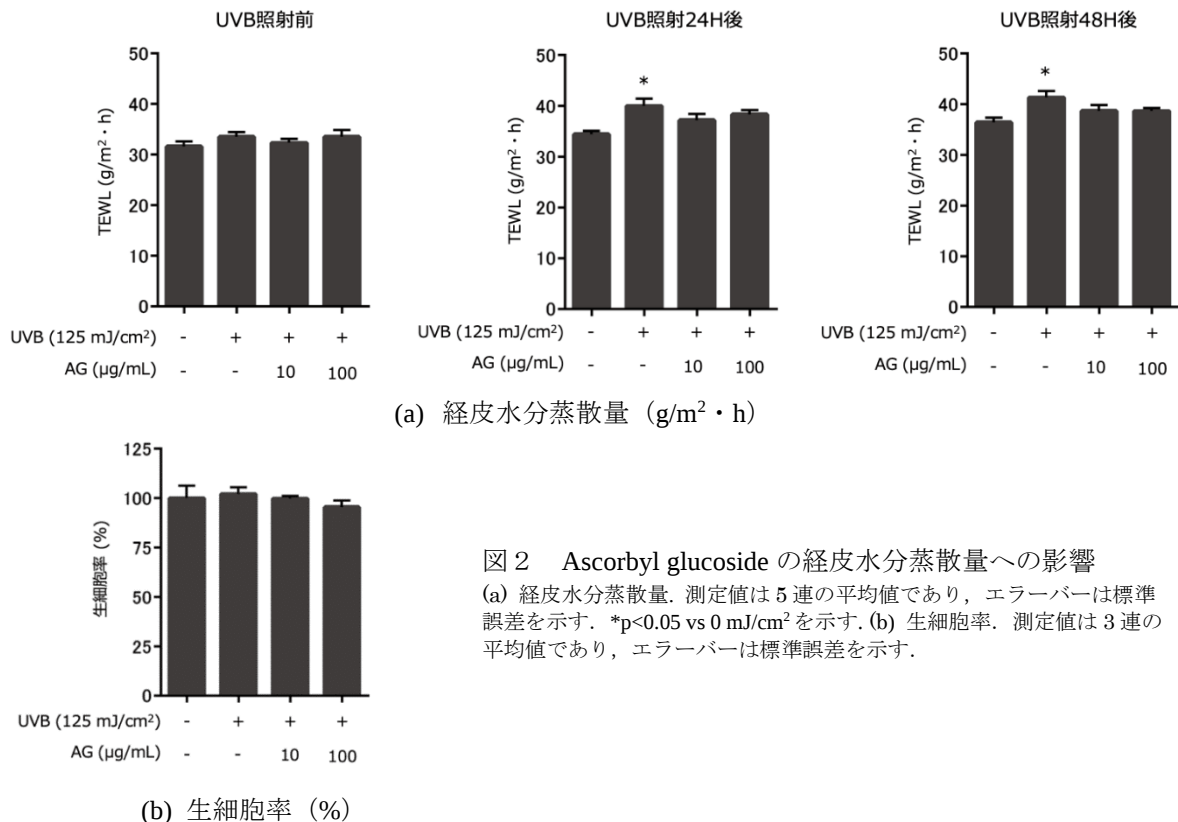


図 2 Ascorbyl glucoside の経皮水分蒸散量への影響

(a) 経皮水分蒸散量. 測定値は 5 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 $0 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ を示す。(b) 生細胞率. 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。

(Tewitro TW24) は、電源立地地域対策交付金で導入した装置である。

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
- 2) 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
- 3) Kang MC, Yumnam S, Kim SY, Oral Intake of Collagen Peptide Attenuates Ultraviolet B Irradiation-Induced Skin Dehydration In Vivo by Regulating Hyaluronic Acid Synthesis, *Int J Mol Sci*, 19(11)
- 4) Son DJ, Jung JC, Choi YM, Ryu HY, Lee S, Davis BA, Wheat Extract Oil (WEO) Attenuates UVB-Induced Photoaging via Collagen Synthesis in Human Keratinocytes and Hairless Mice, *Nutrients*, 12(2)
- 5) Choi SI, Jung TD, Cho BY, Choi SY, Sim WS, Han X, Lee SJ, Kim YC, Lee OH, Choi SI, Jung TD, Cho BY, Choi SH, Sim WS, Han X, Lee SJ, Kim YC, Lee OH, Anti-photoaging effect of fermented agricultural by-products on ultraviolet B-irradiated hairless mouse skin, *Int J Mol Med*, 44(2), 559-568
- 6) Choi SI, Jung TD, Cho BY, Choi SY, Sim WS, Han X, Lee SJ, Kim YC, Lee OH, Choi SI, Jung TD, Cho BY, Choi SH, Sim WS, Han X, Lee SJ, Kim YC, Lee OH, Anti-photoaging effect of fermented agricultural by-products on ultraviolet B-irradiated hairless mouse skin, *Int J Mol Med*, 44(2), 559-568
- 7) Nakabayashi K, Goto K, Kondo K, Hiramoto K, Ooi K, Irinotecan-Induced Skin Dryness Is Ameliorated By Orally Administered High-Dose Vitamin C In Mice, *J Exp Pharmacol*, 11, 109-114
- 8) Milani M, Hashtroody B, Piacentini M, Celleno L, Skin protective effects of an antipollution, antioxidant serum containing Deschampsia antarctica extract, ferulic acid and vitamin C: a controlled single-blind, prospective trial in women living in urbanized, high air pollution area, *Clin Cosmet Investig Dermatol*, 12, 393-399