

(様式第5号)

実使用に則して洗浄剤を適用したヒト角層構造の評価  
Evaluation of the stratum corneum structure treated by cleansing agent  
in accordance with actual usage condition.

横田麻美<sup>1)</sup>、愛原咲季<sup>1)</sup>、徳留嘉寛<sup>2)</sup>  
Mami Yokota, Saki Aihara, Yoshihiro Tokudome

FANCL research institute, FANCL Corporation<sup>1)</sup>, Laboratory of Cosmetic Sciences,  
Regional Innovation Center, Saga University<sup>2)</sup>

## 1. 概要 (注：結論を含めて下さい)

本課題では、実使用に則した洗浄による皮膚の角層細胞間脂質構造への影響を明らかにすることを目的とし、角層細胞間脂質の結晶構造に特徴的なピークの検出方法について検討した。その結果、BL11で角層細胞間脂質構造解析が可能であることがわかった。また、実使用に則した洗浄により、角層細胞間脂質のラメラ構造が変化する傾向が認められた。

### (English)

The aim of this study was to evaluate the stratum corneum (SC) structure treated by cleansing agent in accordance with actual usage condition. In this trial use, we firstly examined whether we can detect the crystal structure derived from SC lipids and found that BL11 is suitable for the analysis. Moreover, position of the peaks attributed to lamellar structure tended to be shifted by the treatment of cleansing agent.

## 2. 背景と目的

皮膚は、外界と体内の境界に位置し、刺激や微生物の感染、体内の水分蒸散の防止等、生体のバリアとして重要な臓器である。最外面の角層は、レンガのように積層した角層細胞がモルタル様の角層細胞間脂質に埋まった特徴的な構造により、皮膚バリア機能を支配する。近年の角層研究から、アトピー性皮膚炎等のバリア機能の低下を伴う皮膚状態では、健康な皮膚とは異なる角層細胞間脂質プロファイル・結晶構造を示すことが知られている<sup>1)</sup>。

また、角層細胞間脂質は、角層に触れるスキンケア製剤によっても変化する。例えば、皮膚表面の汚れや皮脂、メイクを落とす目的で日常的に使用されている洗浄剤は、界面活性剤や油剤が比較的多く含まれるという特徴がある。皮膚に触れる時間は短いものの、皮膚表面に摩擦や温度の負荷が与えられる、という点からも、角層細胞間脂質に作用する可能性が高いと考えられる。さらに、角層細胞間脂質の構造変化は、併用成分およびその後のスキンケア成分の浸透にも影響を与えることが推察される。

以上の背景から、洗浄剤の実使用条件における角層細胞間脂質への影響を明らかにし、皮膚バリア機能への影響が少なく、しいてはスキンケア効果を有する洗浄剤を開発することが期待される。そこで、今回のトライアルでは、*ex vivo* 培養皮膚を実使用に近い方法で洗浄し、角層細胞間脂質の結晶構造への影響を評価することを目的とした。九州シンクロトロン光研究センターでは初めて測定するサンプルであるため、まずは、①角層細胞間脂質に特徴的な規則構造に帰属されるピークが検出可能か、②実使用に則した洗浄行為によりピークが変化するか、の2点について検討した。

## 3. 実験内容 (試料、実験方法、解析方法の説明)

### 試料

ヒト全層皮膚は倫理的配慮のもと、Genoskin社およびBiopredic社より購入した。それぞれ添付の培地を用い、37°C、5% CO<sub>2</sub>、95%RH条件下で培養した。①の検討を目的としたコントロールサンプル

の作製には、Genoskin社の皮膚を用いた。24時間馴化培養後、角層側より水、もしくはアセトン：メタノール (1/1, v/v) をスワブ法で20分間処理し、5日後に回収した。②の検討を目的とした洗浄サンプルの作製には、Biopredic社の皮膚を用いた。24時間馴化培養後、1日目、2日目、3日目に、1日2回皮膚表面を洗浄・水洗し、4日目に回収した。Dispase I 処理により表皮をシート状に単離後、Trypsin 処理により細胞を除き、角層シートを作成した。得られたシートを乾燥させた後、室温95%RH下で1週間以上インキュベートした。角層を直径2 mmのリンデマンガラスキャピラリーに封入し、九州シンクロトロン光研究センターのBL11にて測定した。

## 実験方法

ベヘン酸銀の粉末試料を用いてキャリブレーションを行い、カメラ角度、カメラ距離、ビームセンターを算出した。小角側はカメラ長1000 mmもしくは2000 mmにて露光時間360秒、広角側はカメラ長70 mm、200 mmにて露光時間180秒で測定した。

## 解析方法

得られた二次元散乱像をFit 2d (ESRF提供) で一次元化後、サンプルの値より空のキャピラリーの値を差し引き、入射X線強度で補正したものをExcel 2013 (Microsoft) でグラフ化した。

## 4. 実験結果と考察

### ①角層細胞間脂質に特徴的な規則構造に帰属されるピークの検出

コントロールの水処理、角層細胞間脂質脱脂作用のあるアセトン：メタノール処理いずれのサンプルにおいても、角層細胞間脂質に固有のピーク ( $q=1$  付近：短周期ラメラ構造の一次反射と長周期ラメラ構造の三次反射の重畳したピーク、 $q=17$  付近：0.37 nm の充填構造、 $q=15$  付近：0.42 nm の充填構造) が検出された。角層細胞間脂質に最適なカメラ長は、小角側 1000 mm、広角側 200 mm であった。アセトンメタノール処理を行ったサンプルにおいては、 $q=1$  付近のピークが広角側にシフトする傾向が認められたが、広角側のピークに顕著な変化は認められなかった (図 1)。

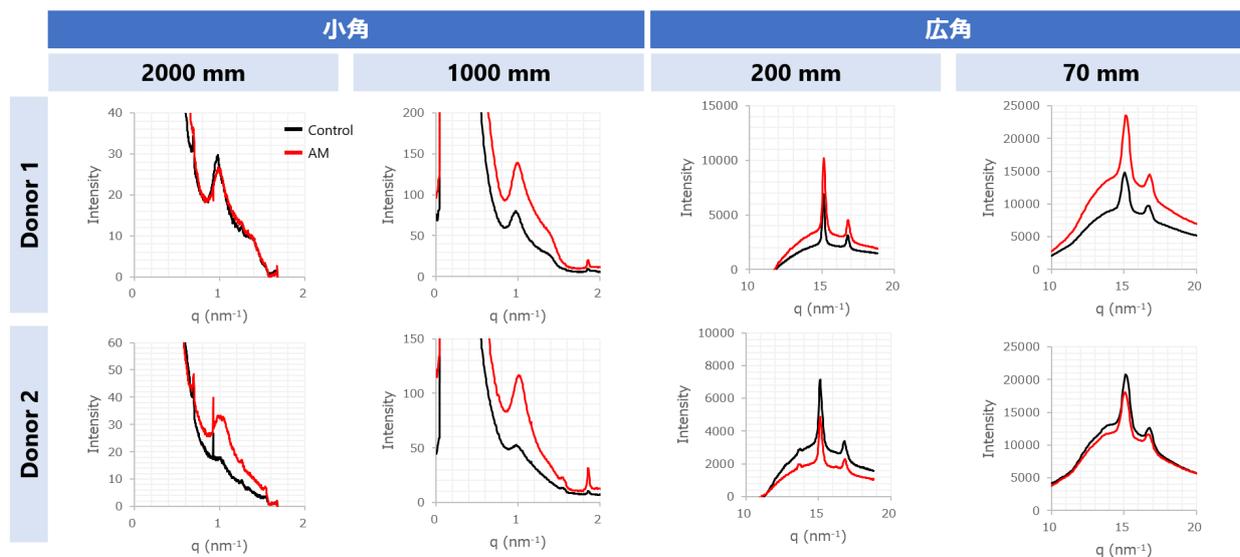


図 1 各カメラ長における角層細胞間脂質由来ピークの検出

Control : 水処理 (黒)、AM : アセトンメタノール処理 (赤)。異なる 2 ドナー由来の結果を示した。

## ②実使用に則した洗浄処理による角層細胞間脂質由来ピークの変化

洗浄による影響を評価するため、①無処理、②洗浄動作のみ、③洗浄剤 A、④洗浄剤 B 処理の 4 群を比較した。いずれの処理においても、角層細胞間脂質に固有のピークが検出された。無処理、洗浄動作のみと比較し、洗浄剤 A および B の処理により、 $q=1$  のピークがシフトする傾向が認められた。一方、広角側のピークに顕著な変化は認められなかった (図 2)。

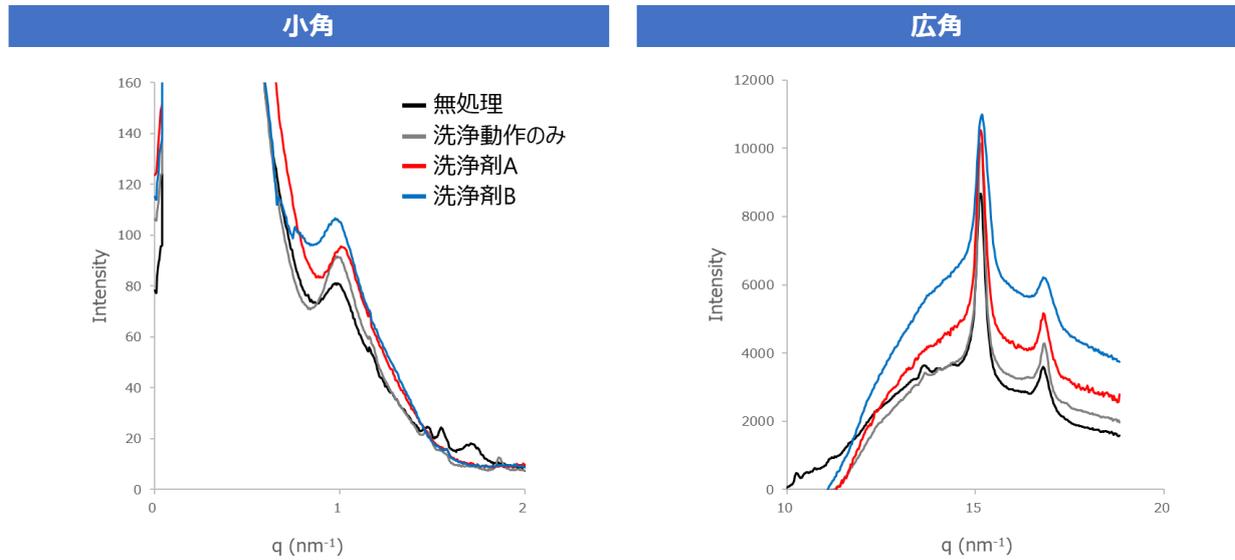


図 2 洗浄処理後の角層細胞間脂質由来ピークの検出

## 5. 今後の課題

今回、目的の構造に由来するピークを検出することができたが、キャピラリのみのバックグラウンドが高く、差のスペクトルが部分的に負の値を示す現象が認められた。測定条件の検討により改善し、ピーク位置、半値幅等を詳細に解析する必要がある。また、測定条件検討の際、同一サンプルの別位置の測定においても多少のピーク形状の違いが認められた。キャピラリー内の角層の詰まり具合に起因するものと考えられるため、皮膚への処理を行いながら角層細胞間脂質構造を測定するなど、経時的に同一部位を評価する方法も検討したい。

## 6. 参考文献

1) The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. J van Smeden, M Janssens, G S Gooris, J A Bouwstra. *Biochim Biophys Acta*. 1841(3):295-313 (2014).

## 7. 論文発表・特許 (注: 本課題に関連するこれまでの代表的な成果)

なし。

## 8. キーワード (注: 試料及び実験方法を特定する用語を 2~3)

角層細胞間脂質、ラメラ構造、充填構造、洗浄

## 9. 研究成果公開について (注: ※2に記載した研究成果の公開について①と②のうち該当しない方を消してください。)

また、論文(査読付)発表と研究センターへの報告、または研究成果公報への原稿提出時期を記入してください。提出期限は利用年度終了後 2 年以内です。例えば 2018 年度実施課題であれば、2020 年度末 (2021 年 3 月 31 日) となります。)

長期タイプ課題は、ご利用の最終期の利用報告書にご記入ください。

- |                |        |   |    |
|----------------|--------|---|----|
| ① 論文(査読付)発表の報告 | (報告時期: | 年 | 月) |
| ② 研究成果公報の原稿提出  | (提出時期: | 年 | 月) |

トライアル利用のため対象外。