

(様式第5号)

## 実使用に即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.

徳留嘉寛<sup>1)</sup>、横田麻美<sup>2)</sup>、愛原咲季<sup>2)</sup>

Yoshihiro Tokudome, Mami Yokota, Saki Aihara

1) 佐賀大学リージョナル・イノベーションセンター、2) ファンケル研究所

1) Regional Innovation Center, Saga University,

2) Research Institute, FANCL Corporation

- ※1 先端創生利用（長期タイプ）課題は、実施課題名の末尾に期を表す（Ⅰ）、（Ⅱ）、（Ⅲ）を追記してください。
- ※2 利用情報の公開が必要な課題は、本利用報告書とは別に利用年度終了後2年以内に研究成果公開（論文（査読付）の発表又は研究センターの研究成果公報で公表）が必要です（トライアル利用を除く）。
- ※3 実験に参加された機関を全てご記載ください。
- ※4 共著者には実験参加者をご記載ください（各実験参加機関より1人以上）。

### 1. 概要（注：結論を含めて下さい）

本課題では、複数のバリア破壊モデル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た。その結果、複数のドナー由来のサンプルにおいて角層細胞間脂質に固有のピークが検出でき、日常の洗浄で想定されるバリア破壊により変化する傾向が認められた。今後、外観等の状態だけでは判断のつかないような角層細胞間脂質の測定に決定的な影響を検証する必要がある。

#### (English)

The objective of this study was to evaluate the effects of multiple barrier disruption models on the stratum corneum (SC) structure. As a result, peaks specific to SC lipids were detected in multiple donor-derived samples. Moreover, position of the peaks attributed to lamellar structure tended to be shifted by the treatment of cleansing agent. In the future, it will be necessary to verify the decisive influence on the measurement of SC lipids, which cannot be determined based on appearance alone.

### 2. 背景と目的

皮膚は、外界と体内を隔てる境界に位置し、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。皮膚バリア機能を支配するのは最外面の角層であり、レンガのように積層した角質細胞がモルタル様の角層細胞間脂質に埋まった構造体である。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<sup>1)</sup>。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、皮膚に触れる時間は短いものの、界面活性剤や油剤が比較的多く含まれる製剤であり、同時に皮膚表面に摩擦や温度の負荷が与えられる。この特徴から、我々は日常的な刺激である洗浄剤の実使用による皮膚への影響に着目した。

2021年12月に実施したトライアル測定では（課題No.2109104T、2109105F）、貴センターのBL11で、角層の長周期ラメラ構造、短周期ラメラ構造、炭化水素鎖のパッキング構造（直方晶、六方晶）、ケラチンフィラメントの構造などを解析することができるのか検討し、最適化した結果、角層細胞間脂質に特徴的なラメラ構造、充填構造に帰属されるピークが検出された。さらに、摘出皮膚に対しアセトン・メタノールで脱脂処理を行ったときに、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。

2022年6月に実施した探索先導の測定では（課題No.2204026R）、複数のバリア破壊モデルを比較しながら、より日常的な刺激である洗浄剤の実使用による皮膚への影響とそのメカニズムを検証することを目的とした。しかし、目的のサンプルの角層細胞間脂質に固有のピークが適切に検出できなかった。同日に同条件で測定したコントロールサンプルは適切にピークが検出された。これらの作製ス

トップは共通しており、サンプル量も十分であり、トライアル測定時と比較してもその状態に遜色はなかった。この要因を明らかにするためには、例数を増やして統計学的な検討を行い、他試験項目と合わせて考察する必要があると考えた。

以上の背景より、本検討では①例数を増やして測定に決定的な影響を与える要因の考察をすること、②測定に複数のバリア破壊モデルを比較して、日常的な刺激である洗浄剤の実使用による皮膚への影響とそのメカニズムを検証することを目的とした。

### 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、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>、60%RH条件下で培養した。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2種類の製剤（AまたはB）で洗浄・水洗し、4日目に回収した。角層細胞間脂質構造に変化を及ぼすことが知られているSDSをポジティブコントロールとして設定し、目的の製剤と同様に処理した。

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。真空パスを用い、カメラ長300 mmにて露光時間360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

#### 複数のバリア破壊モデルの比較 1

コントロールの無処理、摩擦処理のみ、ポジティブコントロールの3群で比較した。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二次反射の重畳、 $q=17$  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。ポジティブコントロールサンプルでは、 $q=1$  付近のピークが消失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）。

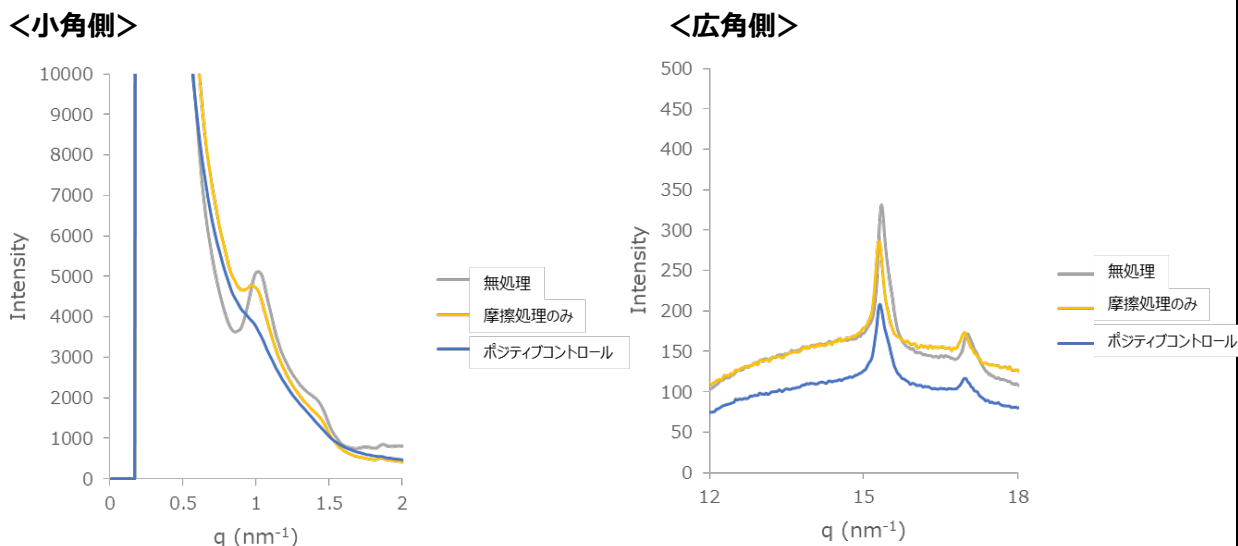


図1 複数のバリア破壊サンプルにおける角層細胞間脂質に固有のピークの検出 1

#### 複数のバリア破壊モデルの比較 2

図1で用いたサンプルとは異なるドナー由来の摘出皮膚において、複数のバリア破壊モデルとしてコントロールの無処理、摩擦処理のみ、製剤A、製剤B、ポジティブコントロールの5群で比較した。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二次反射の重畳、 $q=17$  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。ポジティブコントロールは、 $q=1$  付近、 $q=17$  付近のピークが消失する傾

向が認められた。摩擦処理のみでは  $q=1$  付近のピークがわずかに右にシフトする傾向、製剤 B 処理では  $q=1$  付近のピークが消失する傾向が認められたが、いずれも広角側のピークに顕著な変化は認められなかった (図 2)。

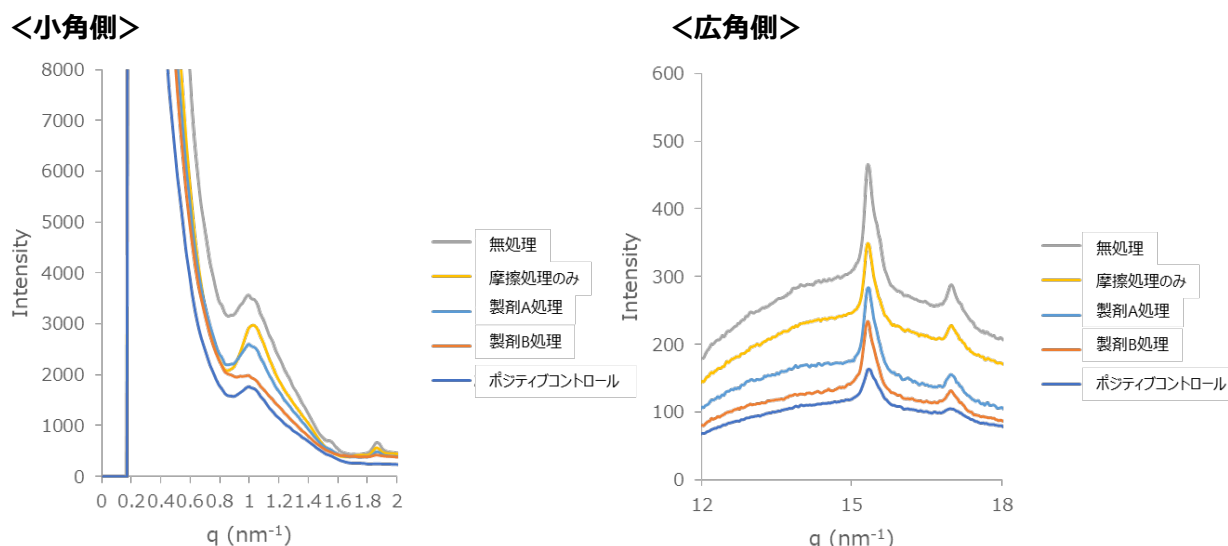


図 2 複数のバリア破壊サンプルにおける角層細胞間脂質に固有のピークの検出 2

### 5. 今後の課題

今回の検討では、複数のドナー由来のサンプルにおいて角層細胞間脂質の構造に固有のピークを検出することができ、前回の測定 (課題 No. 2204026R) のようにピークが得られないサンプルはなかった。処理によるダメージが強いと予想されるサンプルにおいてもピークは検出できていたことから、外観等の状態だけでは判断のつかない何らかの要因が角層細胞間脂質の測定に決定的な影響を与える可能性が高いと考えられる。今後は、さらに例数を増やして統計学的な検討を行い、他試験項目と合わせて考察する必要がある。

### 6. 参考文献

<sup>1)</sup>Cleansers' mildness: Stratum corneum lipid organization and water uptake after a single wash. Perticaroli S, Meyers JL, Wireko FC, Akintelure O, Webber JT, Cambron RT, Vierling S, Sealschott SR, Wei KS, Smith E, Ray PJ. Journal of Raman Spectroscopy 51.5:795-806 (2020).

### 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)

Single-cell Transcriptomics of Viable Epidermis Reveals Inflammation along the Skin Furrows of Barrier-disrupted Skin. (Mami Yokota, Mikako Katagiri, Seitaro Nomura, Saki Aihara, Yoshihiro Tokudome, Takashi Yoshino, Tetsuhito Sakurai. SID 2022 Annual Meeting(第 80 回米国研究皮膚科学会議))

### 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: 2024 年 12 月)