

赤外顕微鏡を用いたヒト三次元皮膚モデルに浸透する成分の可視化 Visualization of Penetrating Compounds into Three-dimensional Human Tissue Culture Models by an Infrared Microscopic Mapping Method

伊藤 廉^a, 有路 千奈美^b, 清水 健司^b, 栗原 浩司^c, 渡邊 紘介^a,
鈴田 和之^a, 前田 貴章^a, 吉田 大介^b
Len Ito^a, Chinami Arijji^b, Kenji Shimizu^b, Kouji Kurihara^c, Kousuke Watanabe^a,
Kazuyuki Suzuta^a, Takaaki Maeda^a, Daisuke Yoshida^b

^a(株)ミルボン, ^b(株)コスモステクニカルセンター, ^c(株)ニコダームリサーチ
^aMilbon Co., Ltd., ^bCosmos Technical Center Co., Ltd., ^cNikoderm Research Inc.

一般的に、動物を使った評価は厳しく規制される方向に進んでおり、動物実験の代替となる試験法の確立がされつつある。その試験法の一つとして、ヒト三次元皮膚モデルは安全性評価、基礎研究、製品開発、製品の効能効果の実証などの観点において、有用な標準ツールとして広く認知され、更にこれを用いた様々な実験系の確立が急務となっている。このような現状の中、本実験では赤外顕微鏡を用いたヒト三次元皮膚モデルに浸透する成分の評価系の構築を目的に実験を行った。

キーワード： ヒト三次元皮膚モデル、赤外顕微鏡、炭化水素

背景と研究目的：

高齢化が進む日本において、美容と健康に対する関心は日々高まっており、これらの分野で使用される製品においては、安全性と有用性が重要なファクターとなっている。正確な安全性、有用性のデータを取ることは、新製品の開発において必要不可欠となっており、その重要性は今後、より一層高まることになると考えられる。

さらに、化粧品、医薬部外品のみならず、皮膚に触れるすべての化学製品、天然由来原料や合成原料による一次刺激やその他の身体的影響などの評価も求められるようになっており、特に、皮膚や眼に対する影響の評価方法については、三次元皮膚モデルを用いた安全性試験が多く用いられるようになってきている。

これまでヒト三次元皮膚モデルを構成する成分の可視化には、蛍光色素などを用いて観察される例はあったが[1]、この従来法は操作が煩雑で多くの分析時間を要すといったデメリットがあった。今回、SPring-8の高輝度な赤外光を用いることで、無染色、短時間、高精度、且つ直接的に成分そのものを捉えることができると考え、実験に着手した。前課題にて、ヒト三次元皮膚モデルの固定条件、切り出し条件出しが終わり、本課題ではその条件を用いて化粧品や医薬品で使われる原料の成分浸透の可視化を試みた。

実験と結果および考察

ヒト三次元皮膚モデル(SkinEthic RHE)を用い、馴化培養後に各々の調整を行った。未固定状態で凍結ブロックにし、切り出しを10 μmに設定し切片化を行った。この切片をフッ化バリウムの測定ステージに貼付し、赤外顕微鏡ステージに置き、透過測定を行った。測定はマッピングステージを使用して5 μm×5 μm単位で行い、各測定点に対して4000–600 cm⁻¹の範囲で波数分解能4 cm⁻¹にて赤外吸収スペクトルを得た。この時のアパーチャーサイズは6 μm×6 μmとし、積算回数は64とした。ヒト三次元皮膚モデルに浸透する成分として、化粧品や医薬品業界で頻繁に使用されているインドメタシン、レシチン、およびスクワランを使用した。これらの成分に由来する2920 cm⁻¹付近に現われるC-Hの伸縮振動から検出した[2]、2950–2900 cm⁻¹おける吸収ピークの面積値を算出し、ヒト三次元皮膚モデルの厚みの影響を除くためにアミドII(N-H)結合吸収[3]を基準としてC-Hの強度面積を補正し、各成分の濃度分布図を作成した。

インドメタシン、レシチン共に処理溶液濃度や暴露時間に関わらず、浸透を可視化することが

できなかった。一方で、図のようにスクワランは未処理(図 A)に比べ、有意に浸透していることを確認した(図 B)。

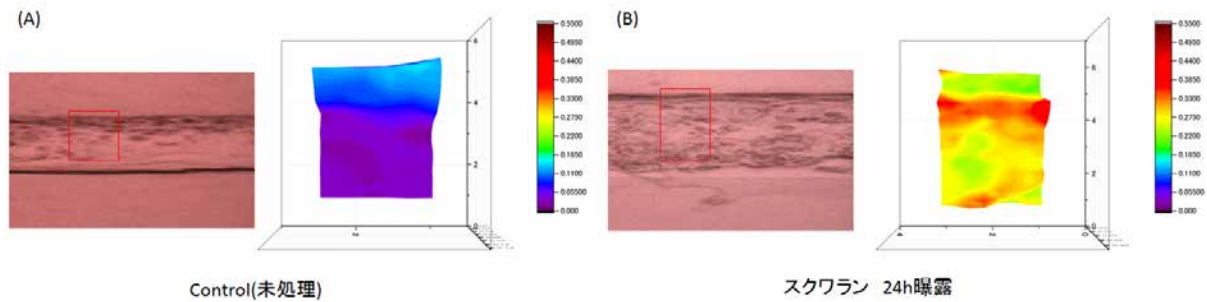


図. ヒト三次元皮膚モデルを構成する脂質を含む炭化水素の濃度分布

今後の課題：

種々の成分の浸透について 2015B 期のビームタイムにて検討を行ったが、現在のところスクワラン以外の成分に関しては、クロマト定量を反映するようなイメージデータの取得には至っていない。このような結果を踏まえ 2016A 期のビームタイムでは、スクワランの濃度、塗布時間など条件を絞った検討を行い、継続して研究を進めていく予定である。

参考文献：

- [1] D. C. Rodger et al., *Mutat. Res.*, **607**, 192 (2006).
- [2] S. Inamasu et al., *Fragrance J.*, **40**, 39 (2012).
- [3] C. Dubief, *Cosmetics & Toiletries*, **107**, 95 (1992).