

動物代替試験を目的としたヒト三次元培養皮膚モデルを用いた
物質の吸収マッピング法の確立
New Alternatives to Animal Testing Methods using Infrared Microscopy
at SPring-8

吉田 大介^{a,b}, 有路 千奈美^a, 栗原 浩司^b, 渡邊 紘介^c, 伊藤 廉^c
Daisuke Yoshida^{a,b}, Chinami Arijii^a, Kouji Kurihara^b, Kousuke Watanabe^c, Len Ito^c

^aニッコールグループ(株)コスモステクニカルセンター,
^bニッコールグループ(株)ニコダームリサーチ,^c(株)ミルボン
^aNikkol Group Cosmos technical Center Co. Ltd.,
^bNikkol Group Nikoderm Research Inc., ^cMilbon Co. Ltd.

ヒト三次元培養皮膚モデルに化粧品成分として汎用される油剤(極性油：モノカプリル酸プロピレングリコール、非極性油：スクワラン)を適用し、赤外顕微鏡を用いて炭化水素のスペクトルから皮膚切片上の吸収マッピング画像を作成した。この可視画像より、非極性油よりも極性油の方が皮膚深部に浸透しやすい傾向が認められた。

キーワード： ヒト三次元培養皮膚モデル、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得することは、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、一層高まると考えられる。また、化粧品、医薬部外品、医薬品のみならず、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の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、これまでのような動物を使った評価は厳しく規制される方向に進み、特に化粧品業界では動物実験の代替となる試験法の確立が急務となっている。さらに、皮膚に使用する化粧品、医薬部外品、医薬品の安全性や有用性は、その成分の吸収性を確認することが非常に重要であり、配合成分の皮膚切片の吸収マッピングができれば、消費者にもよりわかりやすいデータが得られると考えられる。

これまでヒト培養皮膚モデルを配合成分の可視化には、蛍光色素などを用いて観察される例はあったが[1]、この従来法は評価したい成分そのものを評価するのではなく、類似した蛍光物質を用いて疑似的な画像の取得になることがデメリットであった。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。本課題では、化粧品添加剤として汎用されている極性の異なる2種の油剤(極性油：モノカプリル酸プロピレングリコール、非極性油：スクワラン)の経皮吸収差を、ヒト三次元培養皮膚モデルを用いた切片の吸収マッピングにて比較した。

実験：

ヒト三次元培養皮膚モデル(SkinEthic™ RHE)を用い、馴化培養後に、モノカプリル酸プロピレ

ングリコールおよびスクワランをそれぞれ 15 分、6 時間適用後、未固定状態で凍結ブロックにし、10 μm の皮膚切片を作成した。この切片をフッ化バリウム板に貼付し、赤外顕微鏡ステージ(Bruker Hyperion2000)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(図 1)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。得られたスペクトルから、この成分に由来する 2920 cm^{-1} に付近に現われる C-H の伸縮振動から検出した[2]、2950–2900 cm^{-1} における吸収ピークの面積値を算出し、ヒト三次元培養皮膚モデルの厚みの影響を除くためにアミド I (C-O)結合吸収[3]を基準として C-H の強度面積を補正し、各適用時間から得られた各測定点の強度の平均値を算出した。また、OriginPro 2017 を用いて皮膚モデルに浸透した油剤のマッピング画像を作成した。

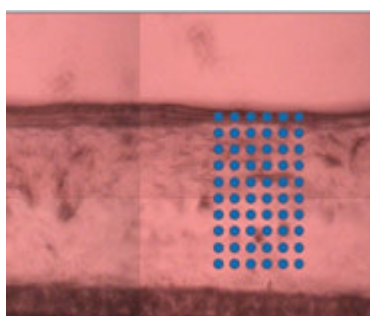


図 1. 皮膚切片画像と測定点の例

結果および考察：

皮膚切片上における全測定ポイントの炭化水素強度平均値を図 2 に示した。モノカプリル酸プロピレングリコールは blank に比べて、15 分および 6 時間後で高い強度面積が認められた。スクワランは、blank に比べて 6 時間後もほとんど強度面積が変化しなかった。代表的なマッピング画像の例を図 3 に示した。油剤適用 6 時間後のマッピング画像からも、スクワランよりモノカプリル酸プロピレングリコールの方が、皮膚深部に浸透しやすい傾向が認められた。

以上より、配合成分の皮膚モデルへの吸収の可視化は、C-H の伸縮振動による強度面積をアミド I (C-O)結合の強度面積で補正した値を皮膚切片上にマッピングすることで、評価が可能であった。

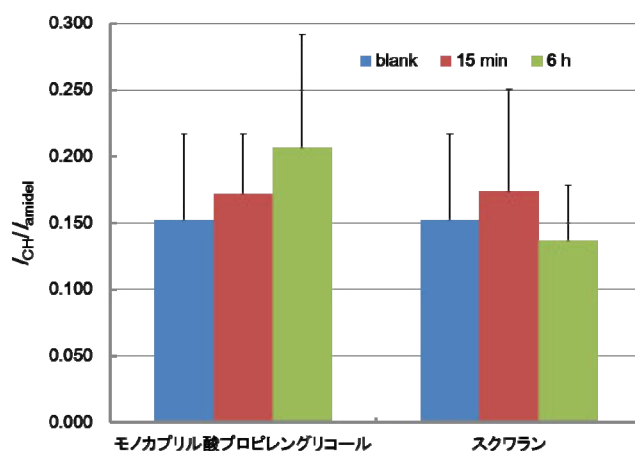


図 2. 皮膚モデルへの各油剤の吸収強度
(各測定点の平均値)

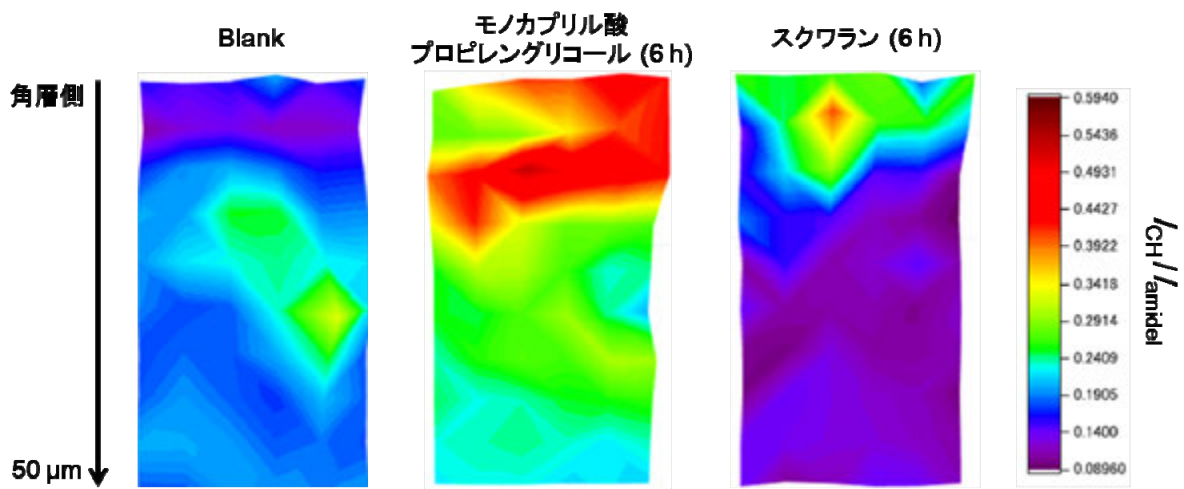


図 3. 各油剤の皮膚モデル吸収マッピング画像

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).