



Title	薬用化粧水の投与方法の違いが三次元培養皮膚モデルに与える影響
Author(s)	
Citation	令和3（2021）年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書．2022
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/85620
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

令和3年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな 氏 名	さい しおり 齋 しおり	学部 学科	薬学部薬学科	学年	2 年
ふりがな 共 同 研究者氏名		学部 学科		学年	年
					年
					年
アドバイザー教員 氏名	加藤寛子	所属	大学院薬学研究科 先端化粧品科学 (マンドム) 共同研究講座		
研究課題名	薬用化粧水の投与方法の違いが三次元培養皮膚モデルに与える影響				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				
研究目的 薬用化粧水は抗炎症成分やビタミン C といった、有効成分の含有によって効果を発揮する医薬部外品であり、新しい有効成分についての研究や既存の有効成分の効果を向上させる研究は盛んに行われている一方で、同じシリーズの化粧水でボトル入りタイプ(直接塗布)と含浸シート(貼付)があるように、投与方法は個人の好みに応じている。 これまでの研究では、化粧水の投与方法の観点では、含浸シート使用に関する報告は見当たらず、被験者の肌に化粧水をつけた際のコットンの有無による肌の水分量や使い心地の違いについての調査はあるものの¹、細胞レベルにおける皮膚機能への影響は不明である。貼付剤という観点では、有効成分を標的器官に到達させることを目的とした、物質の経皮吸収や拡散などは研究されているものの²、皮膚そのものを標的器官とした細胞レベルでの影響を確認した研究は少ない³。 そこで、皮膚のバリア機能や炎症に対して薬用化粧水が与える影響を、化粧水の投与方法の違いに着目して明らかにしたいと考えた。 研究方法 1.化粧水、含浸シートの作成 本実験で使用した化粧水の成分は表 1 の通りである。抗炎症性物質については、抗炎症性物質なし(001)、グリチルリチン酸ジカリウム(002)、アラントイン(003)の 3 種類を作成し、有効成分は質量%で同量含むよう調整した。化粧水は粘度が高く濾過フィルターを通らなかったため、滅菌処理は行わなかった。 含浸シートはダイワボウポリテック株式会社の、セルロース、レーヨン、ポリエチレン、ポリプロピレンを素材とした不織布を使用した。厚さ 0.3~0.5 mmの不織布を直径 6 mmの生検トレパンでくり抜き、作成後オートクレーブ滅菌(121℃、20 分)を行った。化粧水の量は、シートが完全に浸る量の 20 μl とした。					

表 1.化粧水の成分

成分名	配合量[%]
水	残部
1,3-ブチレングリコール	5.000
ジプロピレングリコール	5.000
エタノール	3.000
グリセリン	3.000
ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンデシルテトラデシルエーテル	0.100
カルボキシビニルポリマー	0.090
水酸化カリウム	0.038
フェノキシエタノール	0.150
香料	0.030
抗炎症剤（詳細は非開示）	非開示
合計量	100.000

2.三次元培養皮膚の薬用化粧水暴露

三次元培養皮膚は J-TEC の LabCyte EPI-MODEL24 を用いた。合計 3lot 分の試験をした。

投与物質 5 種類(化粧水 001、化粧水 002、化粧水 003、投与物質なし)それぞれに(i)直接投与 (ii)直接投与後 LPS で刺激 (iii)貼付で投与 (iv)貼付で投与後 LPS で刺激 の 4 条件を設定した。

3 次元培養皮膚に投与物質 20 μ l を、直接投与もしくはシートに含侵後貼付し 1 時間放置した。1 時間後化粧水を吸引もしくはシートを取り除き、10 μ g/ml LPS もしくは DPBS を 50 μ l 投与し、24 時間刺激した。その後 LPS を吸引、DPBS で洗浄した。

3.三次元培養皮膚の解析

すべてのサンプルにおいて、TEER(経内皮電気抵抗)と LDH を測定した。その後組織をインサートから切り離し、固定後組織切片を作成、染色をした。Lot3 のみ組織を半切し、半分は組織切片作成、半分は RNA を抽出し、PCR を行った。培養上清は LDH assay を用いて解析した。

組織固定にはティッシュ・テック® ユフィックスを用い、パラフィンで包埋した後に薄切した。染色はヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

TEER はイワキ株式会社の TEER(経内皮電気抵抗)測定方法⁴を参考にした。

LDH assay はプロメガの LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay Technical Manual⁵を参考にした。サンプルには培養上清を用いた。

PCR はリアルタイムサイクラーの条件を 95℃で 15 秒間、55℃で 10 秒間、75℃で 20 秒間を 40 サイクルに設定して行った。使用したプライマーは表 2 の通りである。結果は 18S で標準化を行った。

表 2. P C R プライマー配列

	Forward	Reverse
IL-1 β	CACGATGCACCTGTACGATCA	GTTGCTCCATATCCTGTCCCT
claudin1	GCGCGATATTCTTCTTGCAGG	TTCGTACCTGGCATTGACTGG

zo1	CGAGTTGCAATGGTTAACGGA	TCAGGATCAGGACGACTTACTGG
18s	CGGCTACCACATCCAAGGAA	AGCTGGAATTACCGCGGC

研究結果

図 1. 化粧水投与後の 3 次元皮膚のマクロ写真

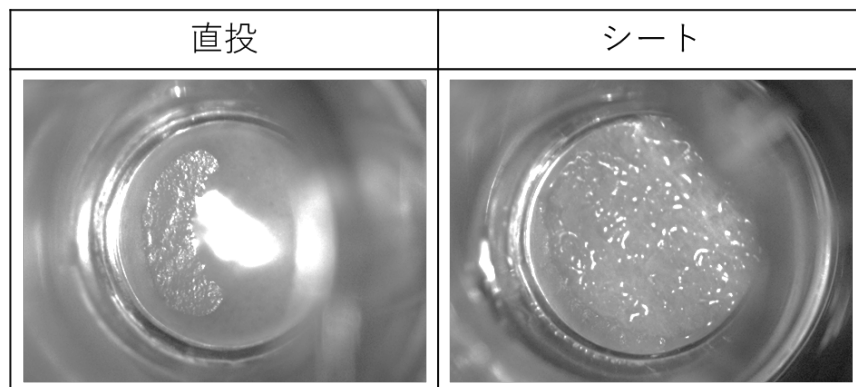


図 2.HE 染色

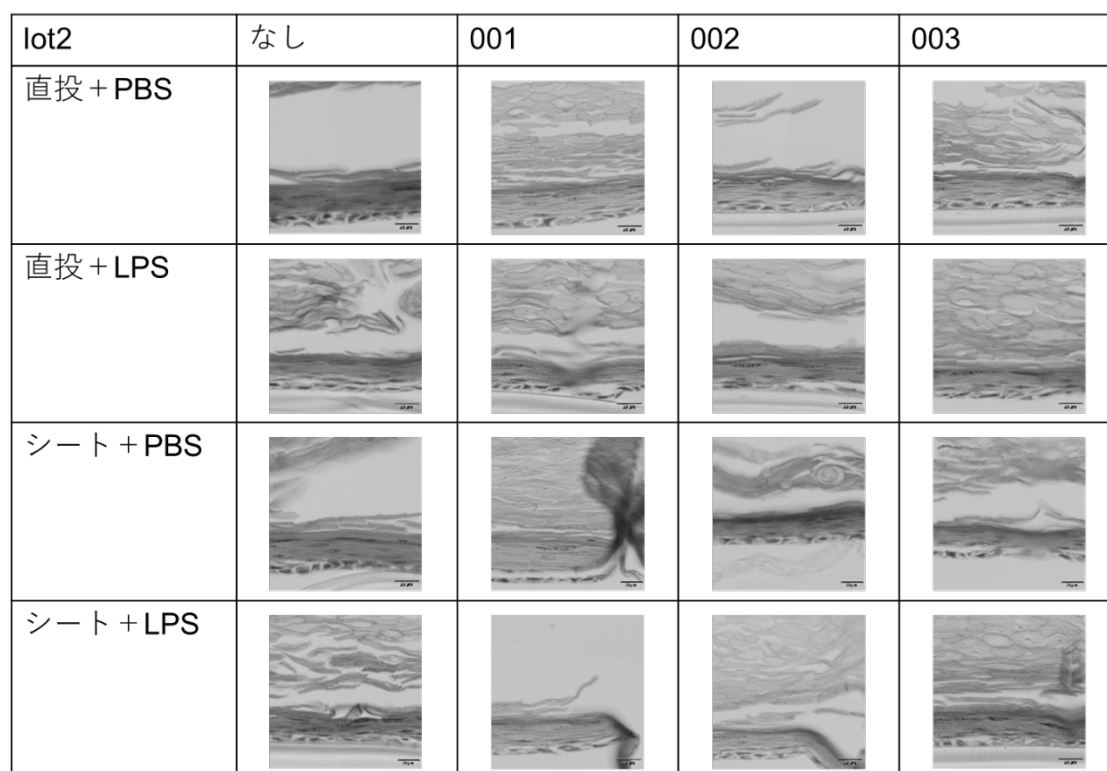


図 3. TEER 測定結果

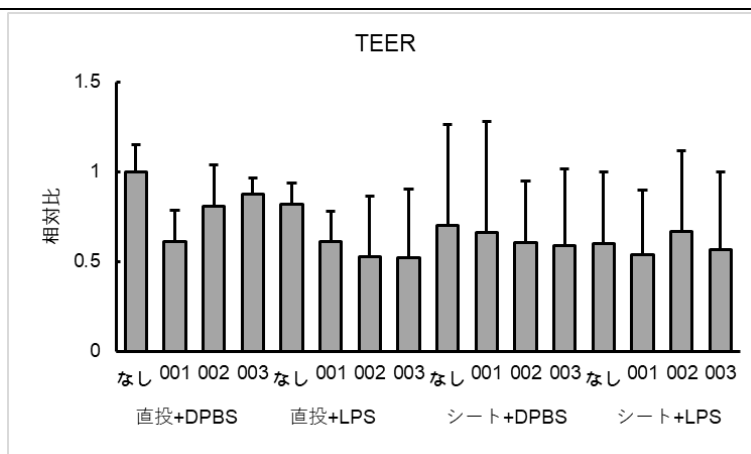


図 4. LDH assay 測定結果

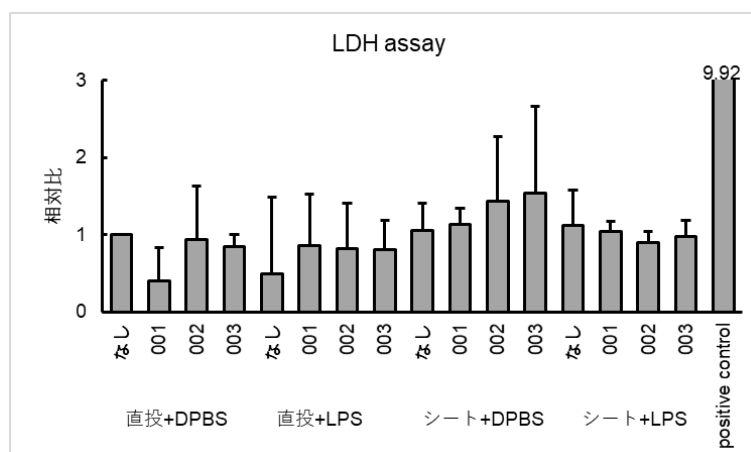
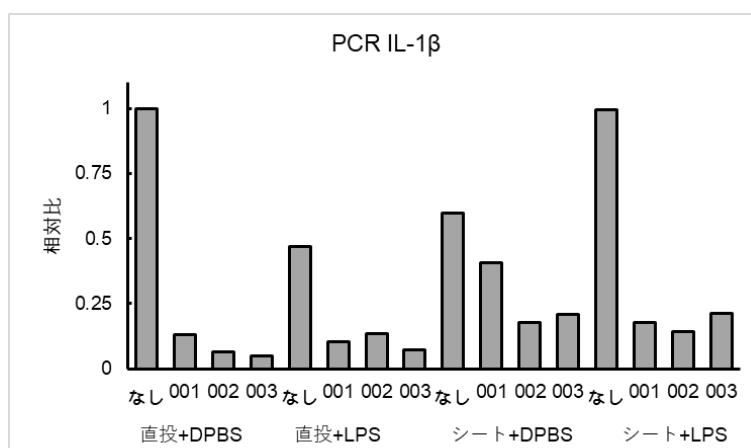
図 5. PCR 測定結果 IL-1 β 

図 6.PCR 測定結果 claudin1

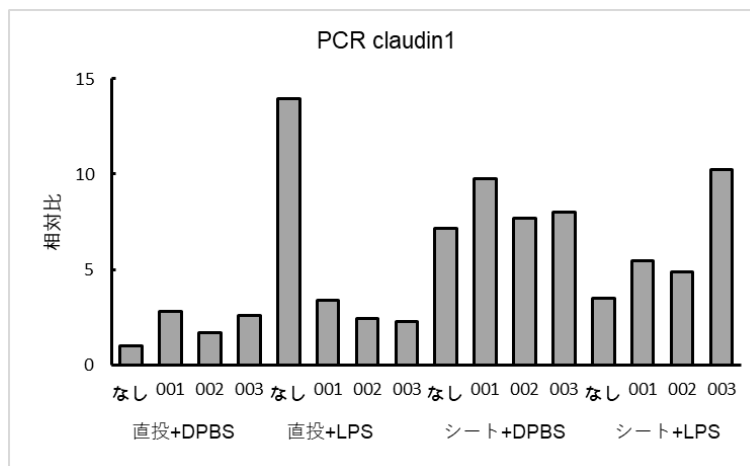


図 7.PCR 測定結果 zo1

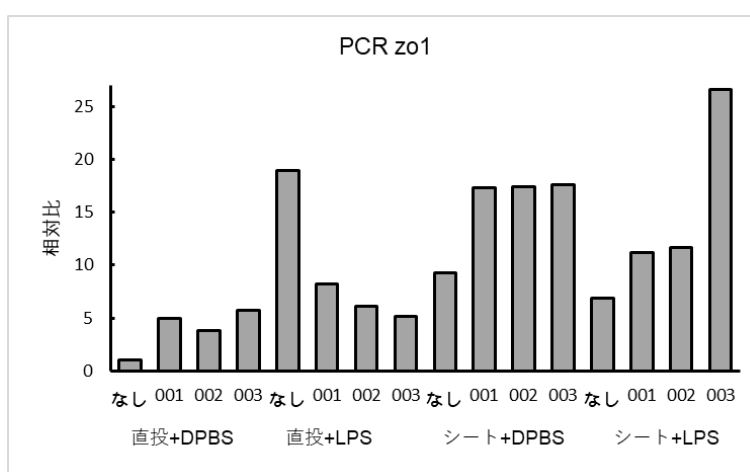


図 3-7 では「化粧水なし、直接+DPBS」の実験群の値を 1 とし、その相対比としてほかの実験群の値を示す。

考察

図 1 において、直接投与では化粧水の広がりにはむらがあるのに対し、シート貼付では化粧水が均一に広がっていることが確認された。

図 2 の HE 染色では、明らかな傾向は見られなかった。この理由は実験条件下における培養期間が 1 日間と短かったため、組織形態に明らかな変化が見られにくかったことが一因であると考えられる。

上皮細胞では、タイトジャンクションによって角質層側と基底膜側との間でイオンの透過が制限され TEER（経上皮電気抵抗）が生じる。図 3 の結果について、抵抗の大きさに傾向が見られなかったことから、TEER 測定によってタイトジャンクションによるバリア機能を評価することはできなかった。

LDH（乳酸脱水素酵素）は細胞質に存在し、通常は細胞質に留まっているが、細胞膜が傷害を受けると培地中に放出される。図 4 の結果について、傾向が見られなかったことから、LDH assay によって細胞傷害を評価することはできなかった。

図 3,4 の実験では、実験条件下における培養期間が短く、変化が見えにくかった条件であったことに加え、実験手技が未熟であり、LDH assay 時のピペッティングや混和などが不十分であったことから、安定した結果を出せなかったことが一因であると考えられる。

IL-1 β は代表的な炎症性サイトカインのひとつで、炎症反応の場に浸潤して活性化したマクロファージなどの免疫系細胞で産生・分泌される。図 5 の結果では投与物質として化粧水を用いた組織で発現が抑えられていることから、化粧水によって皮膚組織の炎症を抑制することが示唆される。直投とシートどちらの条件においても+DPBS と+LPS で発現量に大きな差がなかったのは、LPS 刺激が 24 時間であったため、IL-1 β の遺伝子の転写活性化が鎮まったことが原因と考えられる⁶。そのため、ELISA によってタンパク量を検出しようと試みたが、量が少なく検出は困難であった(データ掲載略)。また、+DPBS と+LPS どちらの条件においても直投よりシートのほうが IL-1 β の発現が大きかったのは、シートと皮膚の接する面がシートによって擦れたことが原因と考えられる。

Claudin1 はタイトジャンクションの構成蛋白質であり、クローディン分子が重合することによりタイトジャンクションが形成され、細胞間バリアが形成される。zo1 は特異的なクローディン分子の重合およびその結果生じるバリア機能を制御している。図 6,7 の結果ではどちらもシートを貼付した組織で発現量が大きい傾向がみられたことから、シートの貼付によってタイトジャンクションの形成が促進される可能性が示唆された。また、直投+LPS の条件を除いて、投与物質として化粧水を用いた組織では claudin1 と zo1 の発現量が大きくなっていたことから、化粧水により保湿を行うこと自体がタイトジャンクションの形成に有効であることを示唆している。

まとめ

本実験では、化粧水含浸シートの使用がタイトジャンクション形成によるバリア機能を亢進することが示唆された。しかし、PCR は一度しかできなかったこと、他の指標を用いたバリア機能の評価ができなかったため、TEER の測定や免疫染色を行って PCR の結果の再現性を確認したい。また、本実験では予算の関係上 LPS の濃度、時間の検討ができず、化粧水投与の回数、時間の検討も行うことができなかったが、より明らかに LPS の細胞障害性が確認できる条件を用いて、化粧水投与の検討を行うことで、化粧水の抗炎症性物質の違いによっても効果に差がでるのかを明らかにしたい。

参考文献

- 1.久留戸真奈美ら(2011)「化粧用コットンによるパッティングのスキンケア効果」『日本化粧品技術者会誌』45 巻 4 号. pp.329-333. 日本化粧品技術者会
- 2.肥後成人(2007)「Transdermal Drug Delivery System の最近の開発動向について」『YAKUGAKU ZASSHI』127 巻 4 号. pp.655-662. 公益社団法人日本薬学会
- 3.杉林堅次(2017)「経皮吸収の原理・その実際・今後の期待」『オレオサイエンス』17 巻 11 号. pp.549-558. 公益社団法人日本油化学会
- 4.「Protocol: TEER (経内皮電気抵抗) 測定方法」READY-TO-USE BBB Kit Protocol (Ver.1.0)
https://www.iwaki-kk.co.jp/dcms_media/other/RBT-24H%2C%20MBT-24H%20TEER_測定方法.pdf (閲覧日:2021 年 12 月 8 日)
- 5.「LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay」Promega Quick PROTOCOL
https://www.promega.co.jp/wp/wp-content/uploads/2021/03/protocol/draft_protocol_LDH_Glo_Cytotoxicity_Assay_manual_JP.pdf
(閲覧日:2021 年 12 月 8 日)
- 6.岩脇隆夫(2017)「インターロイキン 1 β の特性から炎症イメージングまで」『日本臨床免疫学会会誌』40 巻 5 号. pp.329-336. 日本臨床免疫学会