

帯電微粒子水を含むミストによる肌バリア機能の改善

Physiological Effect of Mist Containing Electrostatic Atomized Water

立田 茂* · 尼木 実知子* · 長田 光司*
 Shigeru Tatsuta · Michiko Amaki · Koji Osada

ミスト中でコロナ放電を行うことで生成される帯電微粒子水を含んだミストが生体に及ぼす作用を評価するため、3次元表皮モデルに対してこのミストを施術した結果、肌バリア機能が改善するとともにセラミドや遊離脂肪酸などの細胞間脂質が増加することを見いだした。

また、肌バリア機能の改善に関与する遺伝子発現の解析を行った結果、セラミド生成にかかわる一連の遺伝子発現量の増加が確認され、肌バリア機能の改善効果を裏づけることができた。

In order to evaluate the physiological effects of the mist containing electrostatic atomized water generated by corona discharge in the mist, the mist was applied to a 3-dimensional model of human epidermis and found improvements of the skin barrier function as well as an increase in intercellular lipids such as ceramide and free fatty acids.

In addition, the analysis of gene expression related to improvements of skin barrier function has been confirmed through an increased expression of the series of genes contributing to ceramide generation, thereby supporting the improvement effect of the skin barrier function.

1. ま え が き

角質層に存在して皮膚の水分蒸散を抑える細胞間脂質が減少し、肌バリア機能が低下することが乾燥肌の原因の一つとして考えられている。この乾燥肌の一般的な対処方法としては、保湿剤を肌に塗布することによって角質層からの水分蒸散量を抑えることが有効である。一方、肌荒れ処理を行ったマウスに対し、電極で皮膚表面をマイナスに帯電させることにより角質層や顆粒層中の脂質が増加して肌バリア機能が改善したという報告がある¹⁾。

そこで筆者らは、皮膚表面をマイナスに帯電させて肌バリア機能を改善させる方法として、帯電微粒子水（粒径5～20 nm）を含んだミストに着目する。このミストが肌に付着することにより肌表面をマイナスに帯電させることができるため、既述の報告と同様の効果が期待できることから以下で検討する。

2. 帯電微粒子水を含んだミストの生成

2.1 生成方法

帯電微粒子水を含んだミストの生成方法の概略を図1に示す。ボイラで発生させたスチームにアーク放電を行うこ

とで微細化されたミストが形成され、このミストにコロナ放電を行うことにより、帯電微粒子水を含んだミストが生成される。

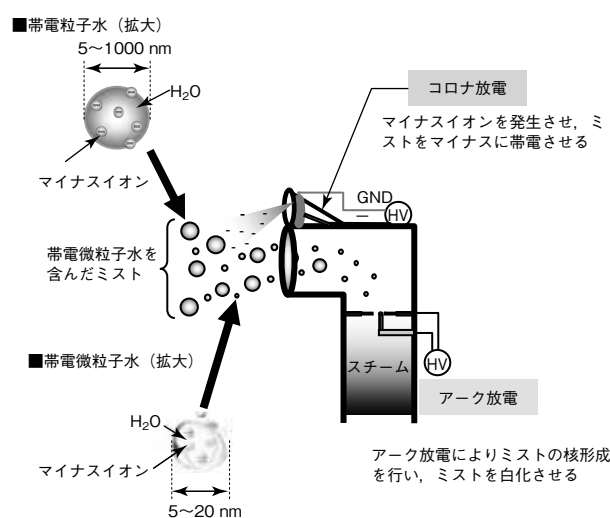


図1 帯電微粒子水を含んだミストの生成方法

2.2 静電霧化方式との比較

帯電微粒子水の生成方法として、前述の生成方法以外に

* 電器事業本部 電器R & Dセンター Research & Development Center, Home Appliances Manufacturing Business Unit

静電霧化方式がある。この方式で生成される帯電微粒子水は、粒径が5～20 nmで、OHラジカルを含んだ弱酸性のミストである。そこで、今回提案する方式で生成されるミストが、静電霧化方式で生成される帯電微粒子水を含んでいることを検証するとともに、その生成量について比較を行う。

2.2.1 アプローチ

比較に際しては、1～100 nmの粒径ミストはDMA（ワイコフ科学社製）、100～10000 nmの粒径ミストはレーザー回折式粒度分布計測装置（シスメックス社製）をそれぞれ用いて測定する。また、ミスト中に含まれるOHラジカルについては、電子スピン共鳴分析装置（Bruker社製）で測定する。

2.2.2 結果

その結果を図2に示す。粒径が10～20 nmの間と、100～1000 nmの間にそれぞれミスト量のピークが存在することが確認され、前者は静電霧化方式で生成される帯電微粒子水のピークと一致している。

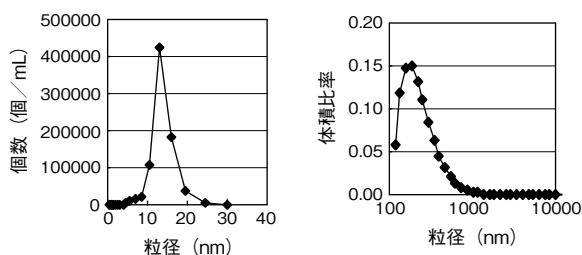


図2 ミスト粒径分布

また、このミストの物性値を表1に示す。帯電微粒子水の生成量は静電霧化方式に比べて約50倍であり、本方式によるOHラジカルは静電霧化方式で生成される量とほぼ同等レベルであり、pHは弱酸性を示している。なお本方式でpHが中性に近いのは、ポイラから発生する大量のミストで希釈されるためと考えられる。

表1 ミストの物性比較

項目	本方式	静電霧化方式
OHラジカル量	6×10^{13} 個/s	1×10^{14} 個/s
ミスト生成量	粒径 10～20 nm	1×10^6 個/s
	粒径 100～1000 nm	ピーク存在
pH	6.3	4.6

以上の結果から、本方式で生成されるミストは、静電霧化方式で生成される帯電微粒子水を含んでいることが検証され、その生成量も静電霧化方式の約50倍であることが確認された。

3. 生体への作用

3.1 肌バリア機能の改善

3.1.1 アプローチ

肌バリア機能改善効果を検証するため、ヒト正常表皮細胞を重層培養して作製した3次元表皮モデル（J-TEC製）を用いる。これはヒトの皮膚と比較して構造的、生理学的にもきわめて類似しているうえ、ロット間のばらつきが少なく、高い再現性を得ることができる。

この3次元表皮モデルに対し、無施術、ミスト（帯電微粒子水を含まない）施術、および帯電微粒子水を含んだミスト施術の3条件で、それぞれ10分間行う。施術前と施術3時間後に、水分蒸散計（アサヒバイオメッド社製、AS-CT1）を用いて3次元表皮モデルの水分蒸散量を測定する。

ここで、帯電微粒子水を含んだミスト施術は図1の装置から生成したものを使用する。なお、3次元表皮モデルに施術するミスト量は、ミスト施術と帯電微粒子水を含んだミスト施術ともに同量である。

3.1.2 結果

施術前後における水分蒸散量の差を図3に示す。無施術群では3時間経過しても水分蒸散量にほとんど変化は認められないが、ミスト施術群では施術3時間後に水分蒸散量が減少し、無施術群に対して水分蒸散量の減少傾向が確認される（ $p = 0.097$ ）。さらに、帯電微粒子水を含んだミスト施術群はもっとも水分蒸散量が減少し、無施術群やミスト施術群に対して水分蒸散量は有意に減少している（それぞれ、 $p = 0.011$, $p = 0.039$ ）。

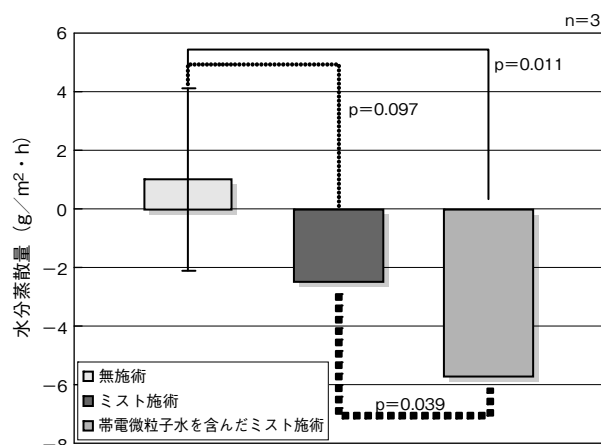


図3 水分蒸散量の変化

以上の結果から、ミストのみよりも帯電微粒子水を含んだミストを施術するほうが水分蒸散量を抑制し、肌バリア機能を改善すると考えられる。

3.2 細胞間脂質の生成

帯電微粒子水を含んだミストを施術することで、肌バリア機能の改善効果が認められることから、この機能に関与する細胞間脂質の増加が期待される。

そこでこれを検証するため、3次元表皮モデルを用いて評価を行う。

3.2.1 アプローチ

3次元表皮モデルに対し、3.1.1項と同じ3条件で施術して施術3時間後の細胞間脂質の定量を行う。これは、3次元表皮モデル全量をホモジナイズし、細胞間脂質成分をクロロホルムで抽出した後に、薄層クロマトグラフィー法によりセラミドI、遊離脂肪酸、コレステロールをそれぞれ定量分析するものである。

3.2.2 結果

施術3時間後における各細胞間脂質の定量結果を図4に示す。

セラミドIについては、帯電微粒子水を含んだミスト施術群はミスト施術群に対して有意差は認められないが、無施術群に対しては有意な増加傾向が認められる ($p = 0.063$)。遊離脂肪酸については、帯電微粒子水を含んだミスト施術群はミスト施術群、無施術群ともに有意な増加が認められる (それぞれ、 $p = 0.018$, $p = 0.043$)。またコレステロールについては、帯電微粒子水を含んだミスト群はミスト施術群に対して有意差が認められないが、無施術群に対しては有意な増加傾向が認められる ($p = 0.040$)。

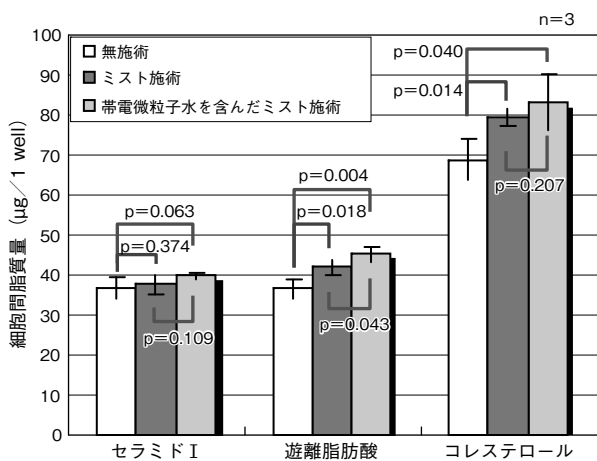


図4 細胞間脂質量

以上の結果から、帯電微粒子水を含んだミストを施術することで、セラミドI、遊離脂肪酸、コレステロールなどの細胞間脂質が増加すると考えられる。

3.3 細胞間脂質生成にかかわる遺伝子発現

肌バリア機能が維持されるためには、顆粒細胞への脂質取込み、脂質合成や修飾、ラメラボディーの形成、細胞外でのセラミド生成など、多様なステップを経て生成される

細胞間脂質が必要である。

そこで、肌バリア機能の改善効果が認められた帯電微粒子水を含んだミストが、これらの細胞間脂質生成にかかわる遺伝子発現に与える影響を検討する。

3.3.1 アプローチ

3次元表皮モデルに対し、3.1.1項と同じ3条件で施術して5時間後に全量をホモジナイズし、発現した遺伝子を専用試薬 (RNeasy Mini Kit) で抽出する。その後、TaqMan Gene Expression Assay を用いて Real Time PCR で mRNA の発現量を評価する。図5に表皮細胞における脂質代謝経路とそれにかかわる遺伝子を示す²⁾。その遺伝子のなかから以下に示す代表的な10遺伝子を選び、解析する。

- (1) APOE: 脂質の運搬にかかわる遺伝子
- (2) CD36: 脂質受容体遺伝子
- (3) SCARB1: コレステロールの取込みにかかわる遺伝子
- (4) UGCG: 表皮細胞内で脂質 (セラミドの前駆体) 合成にかかわる遺伝子
- (5) HMGCR: コレステロールの合成にかかわる遺伝子
- (6) AGPAT1: 燐脂質 (細胞膜構成分子) の合成にかかわる遺伝子
- (7) ACACA: 脂質の合成にかかわる遺伝子
- (8) ABCA12: 角質層への脂質分泌にかかわる遺伝子
- (9) GBA, SMPD1: 角質層でのセラミド生成にかかわる遺伝子

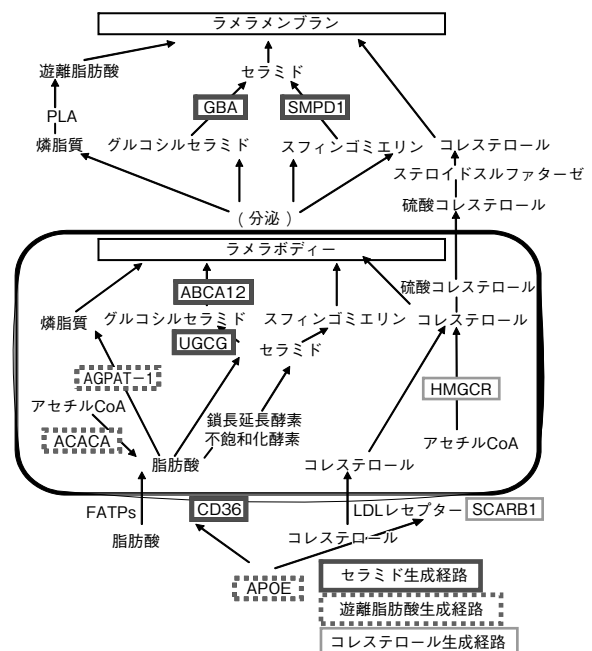


図5 細胞間脂質量の代謝経路

3.3.2 結果

施術5時間後の遺伝子発現の結果を図6に示す。図は無施術群の各遺伝子発現量を1としたときの、ミスト施術群、

帯電微粒子水を含んだミスト施術群の各比率を示している。ミスト施術群は CD36 や GBA で無施術群に対して発現量は増加したものの、それ以外の遺伝子に対してはほとんど変化は認められない。しかし、帯電微粒子水を含んだミスト施術群は CD36, UGCG, HMGCR, ABCA12, GBA, SMPD1 などの遺伝子において、その発現量は増加傾向にある。

以上のことから、帯電微粒子水を含んだミストを施術することにより、細胞内への脂質取込み、細胞内でのセラミド合成、ラメラボディーの分泌、角質層でのセラミド合成など、図5で示したセラミド生成にかかわる一連の遺伝子発現量の増加が確認できる。

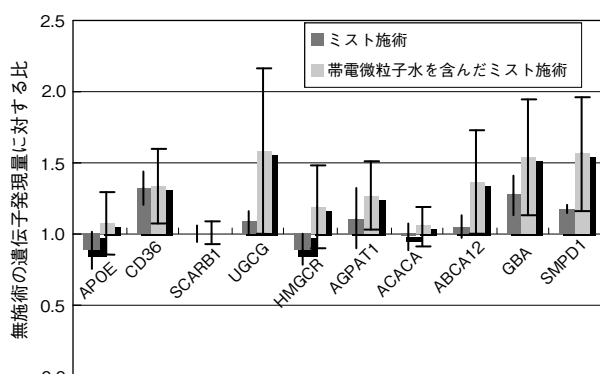


図6 脂質代謝経路にかかわる遺伝子発現の増量

3.4 遺伝子発現の網羅的解析

ヒトの遺伝子をほぼすべて網羅的に解析することで、セラミド合成などにかかわる遺伝子全体の動きを把握できるため、この方法を用いて帯電微粒子水を含んだミストが遺伝子発現全体に与える影響を検討する。

3.4.1 アプローチ

3次元表皮モデルにこれまでと同様の3条件で施術を行う。施術5時間後に全量をホモジナイズし、発現した遺伝子を専用試薬 (RNeasy Mini Kit) で抽出した後にマイクロアレイを用いてヒトの遺伝子のほぼすべてである約4万種類の発現量について網羅的に解析を行う。

3.4.2 結果

この解析結果を図7に示す。帯電微粒子水を含んだミスト施術群において、無施術群に対して発現量が増加した遺伝子は、グラフの原点を通る太い線よりも上側にプロットされている。上側の細い破線は、無施術に対して遺伝子の発現量が2倍増加したことを、また下側の細い破線は1/2に減少したことを意味している。薄い色の四角で示すセラミド生成にかかわる遺伝子は、帯電微粒子水を含んだミスト施術群のほうが一般的に増加することが確認される。なかでも、顆粒細胞の分化をコントロールして角質層のターンオーバーを促すリポオキシゲナーゼ³⁾の発現が顕著に増加することを確認している。

以上のことから、帯電微粒子水を含んだミストを施術することで、セラミド生成・分泌・合成にかかわる遺伝子の発現が全般的に増え、細胞間脂質の生成に有効であることが示唆される。さらに、顆粒細胞の分化にかかわる遺伝子の発現が増加することから、肌のバリア機能の長期的な上昇が期待される。

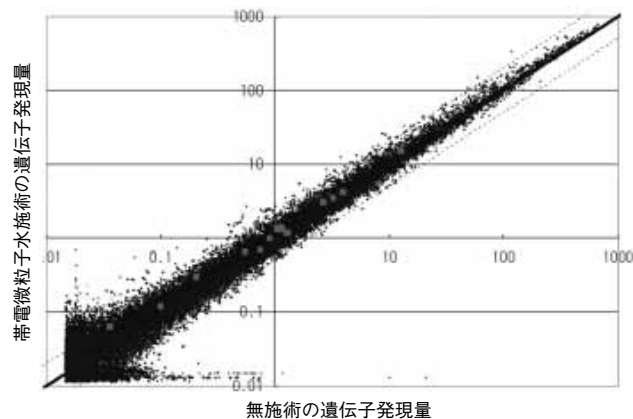


図7 マイクロアレイを用いた遺伝子発現量の解析

4. あとがき

ミスト中でコロナ放電を行うことで生成される帯電微粒子水を含んだミストが生体に及ぼす作用を評価するため、3次元表皮モデルに対してこのミストを施術した結果、肌バリア機能が改善するとともにセラミドや遊離脂肪酸などの細胞間脂質が増加することを見いだした。

また、肌バリア機能の改善に関与する遺伝子発現の解析を行った結果、セラミド生成にかかわる一連の遺伝子発現量の増加が確認され、肌バリア機能の改善効果を裏づけることができた。

最後に、本研究に協力いただいた甲南大学 フロンティアサイエンス学部 西方 敬人 教授、ならびに中野 沙希氏に深く感謝いたします。

*参考文献

- 1) Mitsuhiro Denda, Noriyuki Kumazawa : J. Investigative Dermatology, 118(1), p. 65-72 (2000)
- 2) Kenneth R. Feingold : The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. J. Lipid Res., 48, p. 2531-2546 (2007)
- 3) Brash AR, Yu Z, Boeglin WE, Schneider C. : The hepxilin connection in the epidermis, FEBS J. 2007 Jul, 274(14), p. 3494-3502

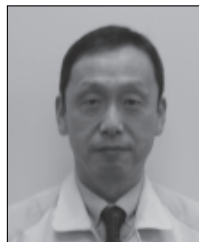
◆執筆者紹介



立田 茂
電器 R & D センター



尼木 実知子
電器 R & D センター



長田 光司
電器 R & D センター