

化粧品素材の機能性評価 ～ *in vitro*スクリーニング試験を中心に～

はじめに

昨今の化粧品市場は、昔ながらの表面を装う化粧品から、体の中からキレイにする化粧品の開発が盛んになってきています。また、いわゆる化粧品の範疇から、サビない体をつくる「アンチエイジング」の考え方もどんどん普及しており、また異業種からの参入等も含め、美容と医学・健康を絡めたビジネス発展が活況を呈しています。今回は、このような機能性化粧品素材の展開、機能性を評価するための実験系などについてご紹介します。

機能性化粧品の登場

化粧品は、昨年ようやく「シワ」に関する効能表示として「乾燥による小ジワを目立たなくする。」が可能になりました¹⁾。これまでの保湿とは、保湿成分を表皮の上から「追加」することで、肌の潤いを保っていたといえます。また、ファンデーションで小ジワを隠すといった、表面からの装いが化粧品の主な機能だったとすることができるかもしれません。

一方、今般の機能性化粧品と呼ばれるものでは、医薬品に匹敵するような開発工程を経たものも出てきています。例えば、表皮細胞に直接作用して、細胞から保湿成分であるヒアルロン酸の産生を促進することによって、体の中から保湿成分を生み出そうといったものです。

こういった機能性化粧品の中には、体の中からキレイにする「抗糖化」をターゲットに据えて、アンチエイジングを謳った製品開発が進んでいます。アンチエイジングは、元々「抗加齢」の観点から、筋肉・血管・神経・ホルモン・骨の各老化度を、免疫・酸化・心身・糖化・生活習慣といった因子に関連付けて評価しようという概念です²⁾。特に重要なものとして、酸化ストレスと糖化ストレスが挙げられています。生体内の「糖化」とは、体の中のタンパク質が、糖と非特異的に結合することから始まる過程で最終糖化産物 (Advanced Glycation Endproducts : AGEs) が産生されると、結合したタンパク質が本来の機能を失っていくものです。糖化反応は、体の様々な部位で起こり得るため、血液の異常から、皮膚老化、アルツハイマーまでいろいろな疾病の原因となります。糖化反応を起こす生理学的な要因は様々ですが、酸化ストレスが主要因として知られています。太陽光の中の紫外線や環境中の物質、タバコの煙等、また高血糖をもたらすような食事が臓器に影響を与えることによって、酸化ストレスは生じやすくなります。精神的なストレスもまた同様に生体内に過剰な活性酸素を発生させ、酸化ストレスを生じる一因になると言われています。皮膚において糖化反応を抑制することは、保湿・ハリ維持、くすみの抑制等に効果があるようです。

また、このような関与成分を見つけて配合するのみならず、関与成分を微細化(ナノ粒子化等)することで、分散性・吸収性を高め、より効果を発揮しやすい物性を持った化粧品の開発も展開されています³⁾。

化粧品の *in vitro* 機能性評価について

今や化粧品と医薬品そして食品の研究開発には垣根がなくなっている印象を受けます。生体の中から効果を及ぼすような機能性を評価するため、生化学的な実験手法によって、種々の素材の機能性を簡便・迅速に探索(スクリーニング)することが出来ます。

ただし、スクリーニング試験によって見出された効果が、そのまま生体でも発揮されるかどうかを保証することは出来ません。実際、新規成分を用いた医薬部外品の承認申請は臨床における機能性及び安全性、そして成分の安定性等、様々なエビデンス(科学的根拠)を用意する必要があります。これは、食品でのトクホ(特定保健用食品)の場合も同様です。新たに効能の範囲に認められたシワへの効能についても、「『新規効能取得のための抗シワ製品評価ガイドライン』⁴⁾に基づく試験又はそれと同等以上の適切な試験を行い、効果が確認された製品のみを標榜できる。」⁵⁾となっており、臨床試験を必須としています。

以下に、試験管レベルもしくは培養細胞系を用いた試験の概要をいくつか示します。

化粧品の *in vitro* 機能性評価の具体例^{6),7)}

1) メラノーマ細胞を用いたメラニン産生抑制試験

メラノーマ細胞をシャーレで培養すると、細胞はメラニンを産生し、細胞内に蓄積します。この培養系へ化粧品素材候補試料を添加した際のメラニンの産生量変化を、細胞中のメラニン色素の強度を測定することで比較します(図-1)。メラニン合成反応における律速酵素であるチロシナーゼに対する阻害作用、あるいは抗酸化作用によって、メラニンの産生は抑制されることが知られています。

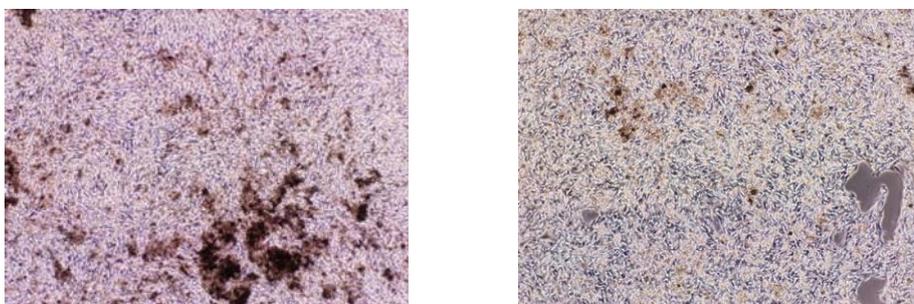


図-1 メラノーマ細胞観察像(40倍)

(左：メラニン[黒色]蓄積，右：メラニン産生抑制)

2) 表皮角化細胞を用いたヒアルロン酸産生促進試験／真皮線維芽細胞を用いた I 型コラーゲン産生促進評価試験

表皮角化細胞と真皮線維芽細胞(図-2)は、ともに皮膚を構成する細胞です。表皮角化細胞は表層に存在し、外来異物等を通過させないようバリア層である角層(角質層)を形成します。これらの細胞から産生されるヒアルロン酸は皮膚組織を乾燥から防ぎます。真皮線維芽細胞は皮膚の深部に存在し、コラーゲンやエラスチン等の線維タンパク質を産生し、肌のハリをつくります。

表皮角化細胞をシャーレで培養すると、細胞がヒアルロン酸を産生し、培地中に放出します。この培養系へ化粧品素材候補試料を添加した際のヒアルロン酸の産生量変化を、培

地中のヒアルロン酸含量を測定することで比較します。

線維芽細胞では I 型コラーゲンが産生され、培地中に放出されます。この培養系へ化粧品素材候補試料を添加した際の I 型コラーゲンの産生量変化を、培地中の I 型コラーゲン含量を測定することで比較します。

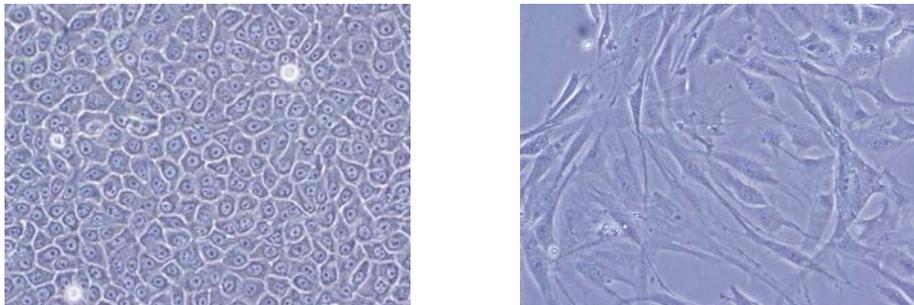


図-2 細胞観察像(200倍)
(左：表皮角化細胞，右：真皮線維芽細胞)

3) 抗糖化(AGEs 産生抑制)評価試験

試験管の中で、タンパク質(血清アルブミン)と糖(グルコース)を混ぜて加熱すると、AGEs が産生されます。この反応系へ化粧品素材候補試料を添加した際の AGEs の産生量変化を、AGEs が発する蛍光強度を測定することで比較します。

抗酸化作用を持つ成分は、抗糖化作用を持つことが多いようです。

4) 抗酸化評価試験：細胞内抗酸化活性評価試験，スーパーオキシド消去活性試験等

細胞を培養したシャーレに、フリーラジカルの量に応じて蛍光を発する物質を添加し細胞に導入します。その後、ラジカル発生誘導剤を細胞に加えると、発生したラジカル量に応じて細胞内から蛍光を発します。この培養系へ化粧品素材候補試料を添加した際のラジカルの発生量変化を、細胞内の蛍光強度を測定することで比較します(図-3)。

線維芽細胞で過剰な活性酸素が産生すると、コラーゲンの産生抑制や分解促進等に伴うシワの原因になります。

他に、生体内でも発生しているスーパーオキシドラジカルを分解する活性を試験管内の反応で測定することで、素材の抗酸化活性を評価する方法があります。加えて、DPPH 等の安定な有機ラジカルの消去能を測定する方法等も用いられています。

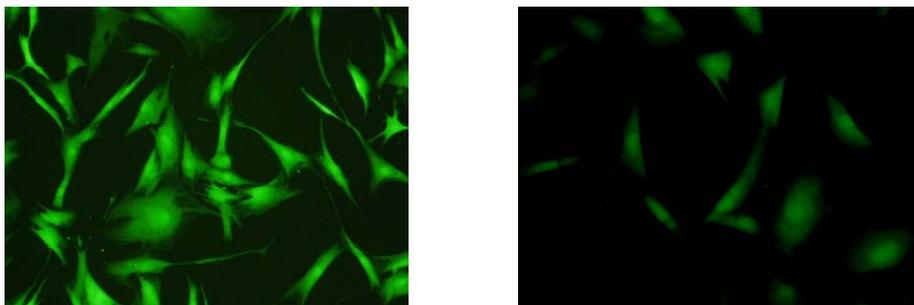


図-3 真皮線維芽細胞蛍光観察像(200倍)
(左：ラジカル過剰発生，右：ラジカル発生抑制)

化粧品開発を取り囲む状況(安全性試験について)

成分の低分子化やナノ粒子化といった分散技術の発達によって、皮膚のより深部で機能を発揮させようという試みは、反面において経皮吸収における安全性の確保がより重要ということを示しています。医薬品・食品のみならず、化粧品においても様々な安全性評価項目はありますが、こと化粧品については、動物実験代替法への潮流があります。EUにおいては、すでに、2013年07月完全施行予定の欧州化粧品規制(Cosmetics directive 76/768/EEC)に基づき、動物実験によってデータ取得した化粧品のEU域内での販売は認められなくなります。日本における医薬部外品の承認申請については、今のところはほぼ動物実験データに基づいて判断することになっていますが、いずれ日本で販売する化粧品においても、代替法の適用が義務付けられるときがやって来るものと思われれます。日本では、日本動物実験代替法検証センター(JaCVAM)が主体となり、国内での代替法移行へ向けての試験法開発及びバリデーションや国際調和を進めています。日本化粧品工業連合会「化粧品の安全性評価に関する指針」が2001年版から2008年版に改訂された際、多くの代替法が収載されました。なお、2006年には日本学術会議から、動物実験の基本理念3Rs(Replacement=置き換え, Reduction=動物数の削減, Refinement=苦痛の軽減)に基づいた「動物実験の適正な実施のためのガイドライン」が出されており、化粧品開発のみならずあらゆる分野について、動物愛護に配慮した動物実験が求められています。

おわりに

化学療法を受けるがん患者の外見変化に対して、美容ケアを施すことにより抑うつが減少し、患者のQOL向上を示したという調査結果が報告されています²⁾。

消費者意識の多様化している今、表面を装う化粧品から、体や心の健康をよくする化粧品の役割がいっそう高まっています。

繰り返しになりますが、開発中の素材が生体内で抗シワ、保湿、美白、といった効果を示すか否かについては、臨床試験によるエビデンスの取得が必要になります。しかしながら、初期の探索段階では、種々のスクリーニング試験の結果が、効果を推定する一助となります。私どもでは、種々の機能性評価の試験を行っております。ここにご紹介出来なかったものも含めて、ご相談ください。

参考資料

- 1) 化粧品の効能の範囲の改正について(薬食発 0721 第 1 号, 平成 23 年 7 月 21 日)
- 2) 第 70 回 SCCJ 研究討論会要旨 (2012)
- 3) 日経バイオテク編: 日経バイオ年鑑 2011, 日経 BP 社(2011)
- 4) 日本化粧品学会抗老化機能評価専門委員会: “化粧品機能評価法ガイドライン” 日本化粧品学会誌, **30**(4): 311-348(2006)
- 5) 化粧品の効能の範囲の改正に係る取扱いについて(薬食審査発 0721 第 1 号・薬食監麻発 0721 第 1 号, 平成 23 年 7 月 21 日)
- 6) 芋川玄爾監修: 機能性化粧品素材開発のための実験法, シーエムシー出版(2007)
- 7) 米井嘉一監修: 糖化による疾患と抗糖化食品・素材, シーエムシー出版(2010)