



化粧品原料の生物学的な有効性評価

東京都立産業技術研究センター 機能化学材料技術部 バイオ技術グループ
爲廣 響子／干場 隆志

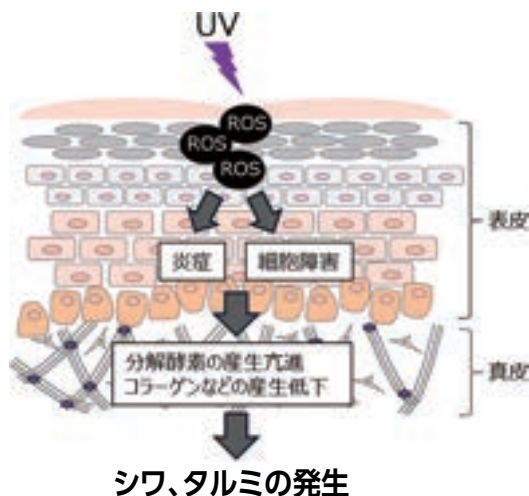
1. はじめに

公設試験研究機関（以下、公設試）の多くはJIS規格に則った試験など、物性測定を得意としているが、一部の機関においては生物学的な試験も受託している。例えば、神奈川県立産業技術総合研究所では酵素活性阻害測定や抗酸化能などの試験を、大阪産業技術研究所では培養細胞を用いた毒性評価試験などを行っている（試験の詳細や実施の可否については各機関に問い合わせいただきたい）¹⁾²⁾。東京都立産業技術研究センター（以下、都産技研）においても、化粧品原料の生物学的な有効性評価を実施している。生物学的な評価は、①試験管内での分子レベルの評価（酵素活性阻害試験、DPPHラジカル消去能などの抗酸化試験）、②培養細胞を用いた細胞レベルの評価（コラーゲンなどのタンパク質産生能や遺伝子発現解析）、③再構築組織を用いた組織レベルの評価（培養皮膚モデルを用いた評価）に分けることができる。都産技研では現在、①試験管内での分子レベルの評価と②培養細胞を用いた細胞レベルの評価を実施している。本稿では、都産技研で実施している生物学的な有効性評価のうち、特にシワやハリへ

の効果を評価する試験について紹介する。

2. シワ、タルミの発生機構

真皮に存在するコラーゲン線維やそれを支えるエラスチン線維、水分保持機能を持つヒアルロン酸は皮膚の土台となることで肌弾力やハリを作り出している。通常、これらは主に真皮に存在する線維芽細胞により産生されるが、それと同時に線維芽細胞ではコラゲナーゼやエラスターゼなどの分解酵素を産生することで、必要に応じて古くなった線維を分解し、存在量や新陳代謝を調整している。何らかの要因により線維芽細胞の機能や数が変化すると、コラーゲンやエラスチンの産生能の低下や分解亢進、あるいはその両方が生じた結果として肌の弾力低下（タルミ）やシワ発生へとつながる。これらの作用を引き起こす原因の一例を図1に示す。外的要因としては紫外線（光老化）による酸化ストレスや炎症惹起、内的要因としては加齢が挙げられる。皮膚へ紫外線が照射されると、皮膚内では活性酸素種（ROS）が発生する。ROSは高い反応性を持つことから周辺の脂質やタンパク質、DNAなどの酸化的修飾を引き起こし、タンパク質機能の変化やDNA損傷、シグ



■図1 シワ、タルミ発生メカニズム

ナル伝達阻害など、細胞にとって有害となる様々な影響をもたらす³⁾。中でもDNA損傷は細胞にとって大きな脅威となるため、損傷を受けた細胞はDNA修復を行うが、それでも十分な回復が見込めない場合は細胞死に至る。また、ROSは炎症誘発に関連するシグナル経路を活性化することが知られ⁴⁾、IL-1 β やTNF- α 、IL-6などの炎症性サイトカイン産生を亢進させる。産生された炎症性サイトカインは近傍細胞へ作用し、プロスタグランジンやケモカインなどの産生を増加させることで血管拡張や免疫細胞を誘引し、さらなる炎症反応を生む。さらにTNF- α やIL-6などのサイトカインは線維芽細胞に作用することで分解酵素の産生を亢進することが知られ⁵⁾、コラーゲンやエラスチン等の分解に寄与する。前述したものは数ある事象の中の一例に過ぎないが、このように紫外線により発生するROSをトリガーとして細胞障害や炎症が誘発されることで、その結果シワやタルミ発生につながる。つまり、これらの事象を再現した試験系を用いることで化粧品原料のシワへの有効性を知ることができる。先に述べたようにシワ発生メカニズムにも様々なルートがあるため、試験系の選択に迷うことも想定されるが、そういった場合は有効性を示したい内容に合わせ、

適切な試験系を選択することが重要となる。そのためには、各試験系の特徴（シワ発生メカニズムのどのステップに該当するのか等）を把握することが大切である。

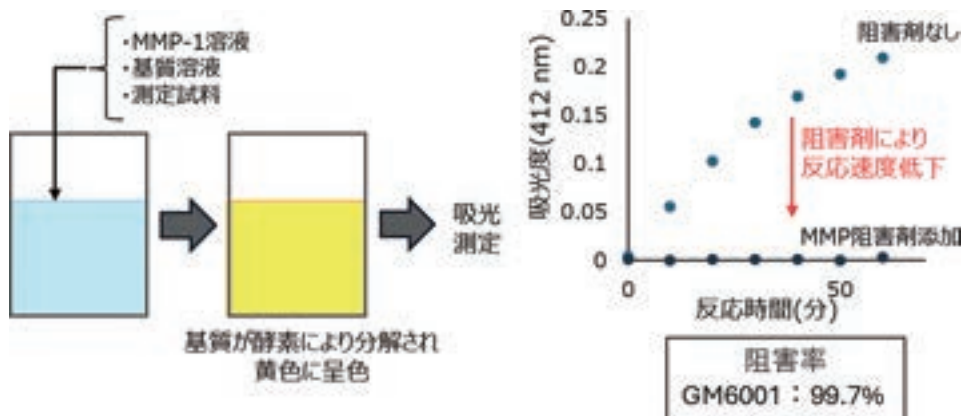
3. 試験管内での分子レベル評価

試験管内での評価は主に酵素反応を用いた試験が多く実施されており、都産技研では「シワ発生に関連する各種酵素（コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ、エラスターゼ等）の活性阻害試験」及び「抗酸化能評価」を実施している。各種酵素の活性阻害試験では真皮部分に存在するコラーゲンやヒアルロン酸、エラスチンの分解にかかわる酵素に対する阻害能を評価する際に使用される。試験管内でリコンビナントタンパク質のコラゲナーゼや、細胞から抽出したエラスターゼを人工基質と反応させ、基質分解の際の呈色を測定する。化粧品原料の存在下あるいは非存在下での基質分解速度を比較することで、酵素活性阻害率の算出ができる。このような試験は、被験物質にシワ抑制効果が期待されるかを判断するための情報を得るのに有用である（図2）。

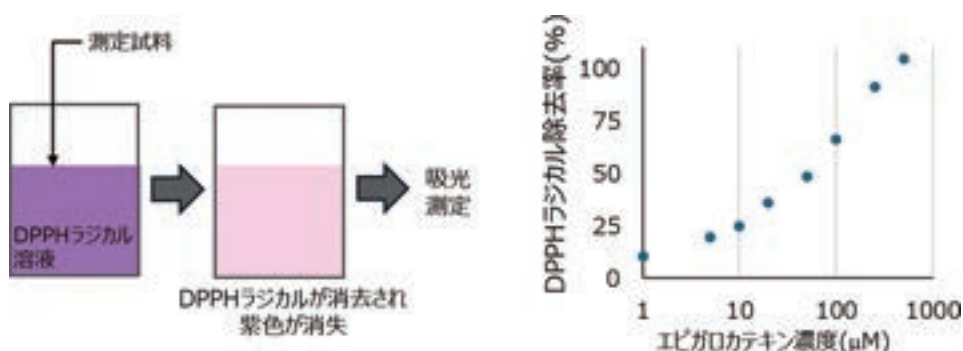
抗酸化能評価は、試験管内でROSあるいはそのモデルと評価したい化粧品原料を混合することで、化粧品原料のROSに対する消去能を評価することができる。具体的な手法としては人工的なラジカル（DPPHラジカル）や試薬を用いて発生させたスーパーオキシド（ O_2^- ）と化粧品原料を混合した際のROS残量を吸光度にて計測することで、その消去能（つまり抗酸化能）を数値化すること（図3）。同じ化粧品原料においても、対象とするROSの種類によっては異なる抗酸化能を示す場合も多くあるため、各ROSに対する試験を実施することで幅広く評価することをお勧めしている。

4. 培養細胞を用いた細胞レベルでの評価

培養細胞を用いた評価では、タンパク質産生、遺伝子発現のほか、細胞内ROS消去能評価などを実施している。タンパク質産生、遺伝子発現評



■図2 各種分解酵素活性阻害試験事例(コラゲナーゼ活性阻害試験)

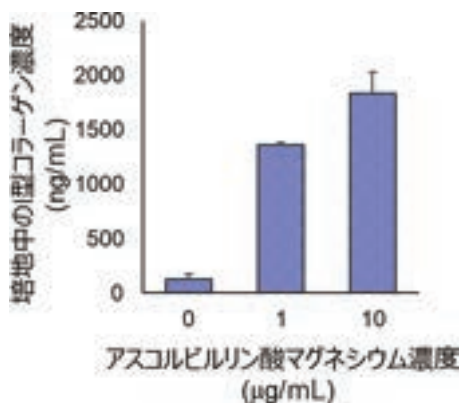


■図3 抗酸化能評価試験事例(DPPHラジカル消去能試験)

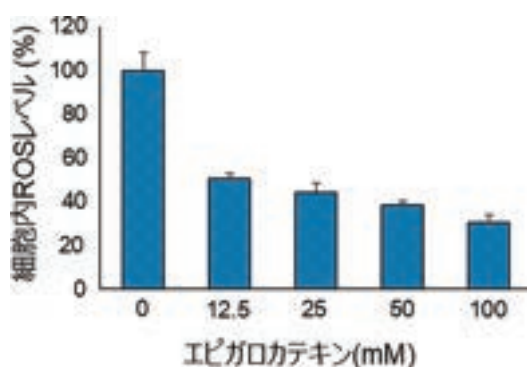
価では、主にELISA法や定量PCR法を用いた測定を行う。角化細胞や線維芽細胞など、目的に応じた細胞を培養し、化粧品原料を添加した際に、ターゲットとしたタンパク質の定量や遺伝子の発現量の比較を行うことができる(図4)。また、添加試料の濃度検討や細胞毒性を評価したい場合、事前にWST-8アッセイやニュートラルレッドアッセイを用いた細胞障害性評価を実施する場合もある。さらに、ターゲットの遺伝子に特にこだわりはないが、シワへの有効性を広く調べたいといった場合は、シワに関連する遺伝子発現変化を広範囲に解析可能なPCRアレイを弊所では実施している。基底膜の分解に関連する遺伝子、皮膚の土台(コラーゲンやエラスチン等)の分解に関連する遺伝子、真皮を構成する遺伝子など、最大21

種の遺伝子発現を調べることができ、試料添加により発現が亢進するもの、減少するものなどその発現変動を評価することが可能である。本試験では、RNA-seq法やマイクロアレイ法に比べ比較的安価に解析できるメリットがある。

細胞内ROS消去能評価は、前節で紹介したような抗酸化能を細胞内で評価する試験系である。H₂O₂などの試薬によりROSを人工的に発生させ、試料を添加した際の細胞内ROS量をROSに反応する蛍光プローブを用いて測定し、試料の抗酸化能を数値化する(図5)。試験管内での評価に比べ、培養細胞を用いることで、より生体に近い状態で評価可能といったメリットがある。実際、試験管内では抗酸化能が確認された化粧品原料においても、培養細胞を用いた試験系では同様の結果が得



■図4 ELISA法による型Iコラーゲン産生評価事例



■図5 培養細胞を用いた細胞内ROS消去能評価事例

られないケースも存在する。そのため、皮膚を構成する細胞で評価できるという点では、培養細胞を用いた試験の方が信頼度の高い結果を得ることができる。

5. おわりに

本稿ではシワやタルミの発生機構について概説するとともに、発生機構の各反応に応じた化粧品原料の有効性評価について述べた。都産技研では、①試験管内での分子レベルの評価と②培養細胞を用いた細胞レベルの評価を実施している。②に関しては、用いる細胞や培養期間などの実験条件は依頼目的により異なるため、実施したい内容を打ち合わせした上で都度適切なプロトコルを考案し、オーダーメイドな対応を行っている。仮に依

頼者が十分な実験経験や知見を持たない場合でも文献情報や過去の知見をもとに、職員が依頼者の意向を取り入れたプロトコルの作成を行うこともできるため、どのような方でも安心してご利用いただくことが可能である。このほか紹介していない評価についても職員によっては実施可能なものもあるため、ご興味のある方はまずはお相談いただければ幸いである。

【参考文献】

- 1) 神奈川県立産業技術総合研究所： <https://www.kistec.jp/> (2025年7月15日)
- 2) 大阪産業技術研究所 生物・生活材料研究部：
<https://orist.jp/kenkyu-bu/seibutu-seikatsu/lit/> (2025年7月15日)
- 3) 田中 浩ら、活性酸素の培養ヒト皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン代謝に及ぼす影響, *J.Soc. Cosmet. Chem. Jpn.*, 1994 28巻2号 172-177.
- 4) Min W. et al, *Cell Div.*, 2024 Jan 12; 19(1): 1.
- 5) Matthew P V. et al, *Arthritis Res.*, 2002; 4(3): 157-164.