

# 三次元皮膚モデルによる機能性素材の美白効果評価

誌名	長野県工業技術総合センター研究報告 = Research reports of Nagano Prefecture General Industrial Technology Center
ISSN	18813119
著者名	水谷,智洋 蟻川,幸彦
発行元	長野県工業技術総合センター
巻/号	12号
巻号補足	
掲載ページ	p. 154-156
発行年月	2017年10月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



# 三次元皮膚モデルによる機能性素材の美白効果評価\*1

水谷智洋\*2 蟻川幸彦\*3

## Evaluation of Whitening Effect using a Three-Dimensional Skin Model

Tomohiro MIZUTANI and Yukihiko ARIKAWA

長野県内農産物等の化粧品への応用を目指して、農産物等に含まれていることが知られている既知成分等の美白効果の検討を行った。三次元皮膚モデルを用いることで、皮膚への浸透性も含めて評価した。その結果、プロトカテク酸は、細胞を損傷することなくメラニン生成を抑制することが見出された。そのため、プロトカテク酸を多く含む農産物等は、化粧品への応用が期待できることが示唆された。

キーワード：三次元皮膚モデル，メラニン，プロトカテク酸

### 1 緒言

皮膚における過剰なメラニン生成は、シミやソバカスの原因となることが知られている。メラニン生成は皮膚のメラノサイトと呼ばれる細胞内で行われる。紫外線などによってメラノサイトが刺激されると、メラニン生成に関わるチロシナーゼが活性化し、その結果、大量のメラニンが合成される。そのため、美白剤として、チロシナーゼ阻害剤の探索が広く行われている。しかしながら、チロシナーゼが存在するメラノサイトは皮膚の奥にあるため、試験管レベルのアッセイやメラノサイトのみを用いた培養細胞でチロシナーゼ阻害効果があるからといって、実際に有効性があるとは限らない。この問題を解決するため、近年、皮膚の細胞を三次元的に培養することで、皮膚への浸透性も含めて評価できる三次元皮膚モデルが開発され、利用が広まっている。

メラニン生成とは別に、皮膚で起きる糖化反応もくすみの原因となることが知られている。糖化反応とは、還元糖とタンパク質などが非酵素的な反応で、終末糖化産物(AGEs)が生成する。このAGEsが皮膚に蓄積するとくすみにつながる。当センターでは、栗渋皮抽出物は、生体内におけるAGEsの蓄積を抑制することを動物実験により見出した<sup>1)</sup>。

そこで本研究では、栗渋皮抽出物の化粧品への応用を目指して、抗糖化効果以外に、メラニン生成抑制効果もあるか三次元皮膚モデルを用いて検討した。また、県内農産物等に含まれると考えられる機能性成分に関しても同様の検討をしたので報告する。

### 2 実験方法

#### 2.1 抽出物の調製

試料を80℃で乾燥させた後、粉末化し、10倍量の水を加えて室温で4時間抽出した。抽出液を凍結乾燥して得られた粉末を抽出物とした。

#### 2.2 チロシナーゼ阻害試験

40 μl の 40 units/ml チロシナーゼ，60 μl の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH6.8)，50 μl の 2.5 mM L-DOPA を混合し反応溶液とした。これに 50 μl の被験物質を加え、25℃、10 分間インキュベートした。対照は、反応溶液にリン酸緩衝液のみを加えたものとした。各々のブランクには、チロシナーゼを添加していない反応溶液を用いた。インキュベート後、490 nm の吸光度を測定し、相対的なチロシナーゼ活性を求めて評価した。チロシナーゼ活性は次式により求めた。

$$\text{チロシナーゼ活性(\%)} = (A - B) / (C - D) \times 100$$

A = 被験物質を添加した反応液の吸光度  
B = 被験物質を添加したブランク反応液の吸光度  
C = 被験物質を添加していない反応液の吸光度  
D = 被験物質を添加していないブランク反応液の吸光度

#### 2.3 三次元皮膚モデルによる評価

(株)J-TEC の LabCyte MELANO-MODEL を使用した。角層側から被験物質を 50 μl 添加して、2 週間 37℃で培養した。被験物質及び培地は 2 日に 1 回交換した。被験物質は PBS に溶解して添加した。スコボレチンおよびスルフォラファンは 1% DMSO に溶解して添加した。培養終了後、基底層側からの顕微鏡写真を撮影した。また、メラニン生成率及び生細胞率を求めて評価した。

#### 2.4 プロトカテク酸の定量

Waters 社製 HPLC (ACQUITY UPLC) を用いて表 1 の条件で分析した。

\*1 H25特別研究

\*2 食品バイオ部(現 加工食品部)

\*3 食品バイオ部(現 部門長)

表1 分析条件

カラム	InertSustain C18 (4.6×250 mm, 3 μm)
溶離液	A: 0.1%ギ酸 B: 0.1%ギ酸アセトニトリル
流速	0.5 ml/min
検出波長	260 nm
グラジエント	0-10 min; A/B(90/10) 10-30 min; A/B(90/10) → A/B(60/40)

### 3 結果及び考察

図1に、栗渋皮水抽出物のチロシナーゼ阻害活性を示した。栗渋皮水抽出物は、用量依存的にチロシナーゼ活性を阻害し、試験管レベルでは、メラニン生成を阻害することが示された。

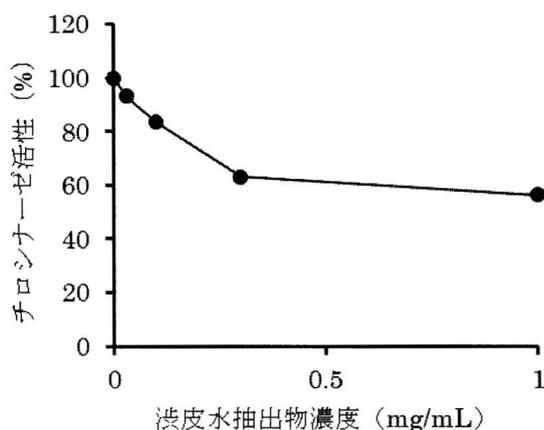


図1 チロシナーゼ阻害活性

次に、皮膚への浸透性も含めてメラニン生成阻害能を検討するために、三次元皮膚モデルに栗渋皮抽出物を投与して評価した。その結果、表皮細胞に抽出物由来の色素が沈着してしまい、メラニン定量が妨げられ、評価ができなかった (Data not shown)。そのため、抽出物による評価は困難と考え、抽出物に含まれることが予想され、チロシナーゼ阻害活性や、メラノサイト単独培養でメラニン生成抑制が報告されている成分<sup>2-4)</sup>を用いて評価を行った。さらに、栗以外に関しても、同様の報告がされている県内の主要農産物等に含まれる成分<sup>5) 6)</sup>を用いた評価も行った。

図2に、三次元皮膚モデルに各成分を与えた培養後の基底層側の顕微鏡写真を示した。栗渋皮に含まれることが予想されるプロトカテキ酸、スコボレチン、スコポリンおよび没食子酸の内、プロトカテキ酸はメラニン生成を抑制していることが示された。なお、スコボレチンおよびスコポリンは溶解度が低く、これ以上の高濃度による評価はできなかった。没食子酸は抽出物を投与した時

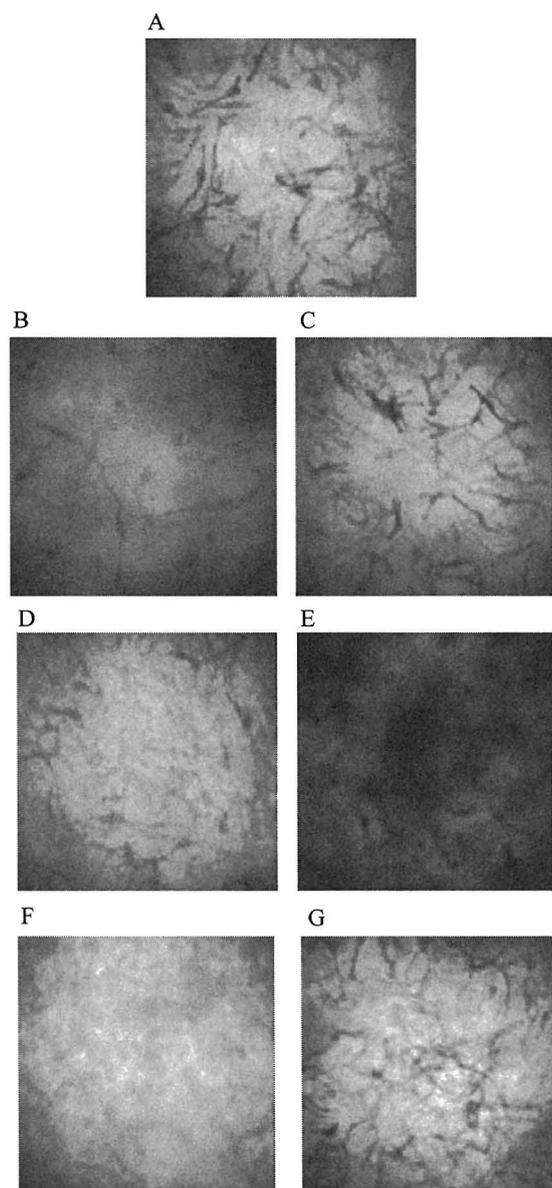


図2 基底層側顕微鏡写真

(A)コントロール, (B)プロトカテキ酸 3000 μg/mL, (C)スコボレチン 100 μg/mL, (D)スコポリン 1000 μg/mL, (E)没食子酸 3000 μg/mL, (F)スルフォラファン 100 μg/mL, (G)エルゴチオネイン 3000 μg/mL。

と同様に、色素が沈着して評価することが出来なかった。また、プロトカテキ酸投与時における生細胞率は 93.8%であったため、メラニン生成抑制効果は細胞障害性によるものではないことが示された。ケールなどに多く含まれるスルフォラファンは、100 μg/mL の低濃度でメラニン生成を抑制した。しかしながら、この時の生細胞率は 5.7%であり、メラニン生成抑制効果は細胞障害性によるものだった。したがって、より低濃度で評価することが必要であると考えられる。キノコ類に多く含まれているエルゴチオネインには、メラニン生成抑制効果は認めら

れなかった。

図3に、三次元皮膚モデルにプロトカテク酸を投与した際の、メラニン生成量および生細胞率を示した。プロトカテク酸は、用量依存的にメラニン生成を抑制し、細胞障害性も示さなかった。

次に、栗渋皮抽出物中のプロトカテク酸量をHPLCで定量したところ、0.03 µg/mgであり、微量しか含まれていなかった。

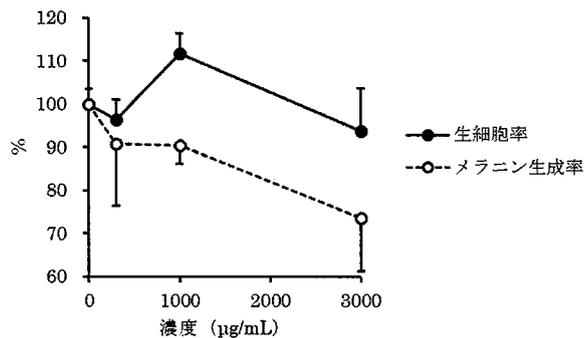


図3 プロトカテク酸によるメラニン生成抑制

#### 4 結 論

三次元皮膚モデルを用いて、県内主要農産物等に含まれる成分の美白効果を評価した結果、プロトカテク酸に美白効果があることが示された。栗渋皮抽出物に含まれているプロトカテク酸は、微量であったが、野菜や果物

など多様な植物に含まれる成分であるため、プロトカテク酸を多く含む素材を探索することで、化粧品への応用が期待される。

#### 参考文献

- 1) Mizutani T., et al.. "Anti-glycation activity of Japanese chestnut (*Castanea crenata*) inner skin extract is beneficial for Type 2 Diabetes in a rat model" *Anti-Aging Medicine* 10(6), 112-19(2014)
- 2) Chou TH., et al.. "Inhibition of melanogenesis and oxidation by protocatechuic acid from *Origanum vulgare* (oregano)" *J. Nat. Prod.* 73(11), 1767-74(2010)
- 3) Su TR., et al.. "Inhibition of melanogenesis by gallic acid: possible involvement of the PI3K/Akt, MEK/ERK and Wnt/β-catenin signaling pathways in B16F10 cells" *Int. J. Mol. Sci.* 14(10), 20443-58(2013)
- 4) Masamoto Y., et al.. "Inhibitory effects of esculetin on melanin biosynthesis" *Biol. Pharm. Bull.* 27(3), 422-25(2004)
- 5) Shirasugi I., et al.. "Sulforaphane inhibited melanin synthesis by regulating tyrosinase gene expression in B16 mouse melanoma cells" *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74(3), 579-82(2010)
- 6) Motohashi N., et al.. "Inhibitory Effects of Sulfur Compounds on Melanin Formation Reaction by Tyrosinase" *Chem. Pharm. Bull.* 39(1), 142-45(1991)