

DRCが提案する評価のトータルコーディネート あなたが見たいものはなんですか？

～細胞での評価からヒト摘出皮膚を使った評価まで～

DRC株式会社 試験部 *in vitro*試験グループ 真柴 里歩





機能性成分含有
商品完成！



最初にヒト試験で
評価を行おう！



*in vitro*試験で
効果が見られれ
ば、問題ない！





機能性成分含有
商品完成！



細胞などでの有用性評価で
商品の作用メカニズムを理解
する必要がある

*In vitro*試験の結果も大事だが、
ヒト評価での有用性が確認さ
れることが重要



目次

1. 化粧品開発の流れ
 - ・安全性試験
 - ・有用性試験
2. 有用性試験評価
 - ・有用性の予測
 - ・単層培養を用いた評価
 - ・3次元培養皮膚モデルを用いた評価
 - ・摘出皮膚を用いた評価
3. 安全性試験評価事例
4. まとめ

化粧品の開発の流れ



商品立案

商品の特徴、他社製品との差別化

原料開発

原料のスクリーニング

原料の安全性確認

製剤開発

製剤の使用感の決定

原料を配合した際の安全性確認

製剤の安全性評価

安全性確認

製剤の有用性評価

有用性確認

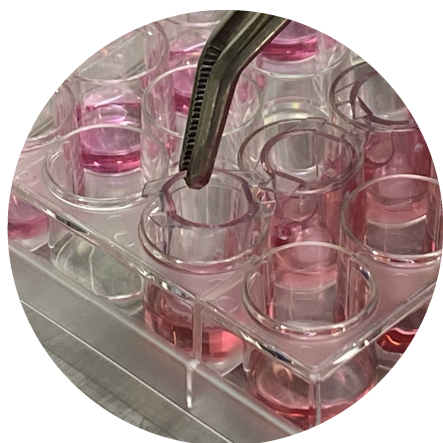
市場へ

安全性・有用性評価を確認しながら開発が進んでいく

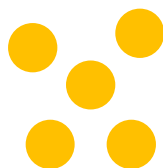
化粧品の安全性

人体に対する作用が緩和なもの

細胞での安全性



新しい
機能性原料



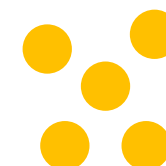
ヒトでの安全性



商品



新しい
機能性原料



ヒト試験の前に細胞での安全性を確認することが必要

化粧品の有用性評価の目的

- 製品の機能性コンセプトを、配合する原料の効能で表現したい。
- 他社製品や自社の既存品との差別化をしたい。
- 安全性が確保された古い原料の新しい機能性を評価したい。

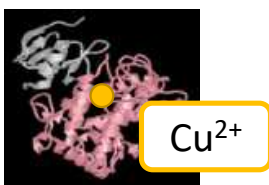
ヒト試験での
有用性評価
で確認したい

細胞での有用性や作用機序を理解した上での臨床試験系を考える必要がある

有用性効果を予測することが重要

化学構造や成分が明らかである場合

チロシナーゼは活性中心に銅を持つ金属酵素



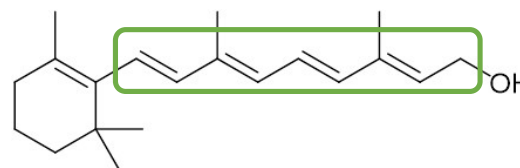
キレート作用があれば活性阻害作用が期待できる

天然由来の原料の場合

昔からあせもに効くとされた桃の葉抽出液

抗炎症作用が期待できる

レチノールと同じようなイソプレン骨格を持つ。



RXRIに結合し、表皮ヒアルロン酸産生を亢進する。

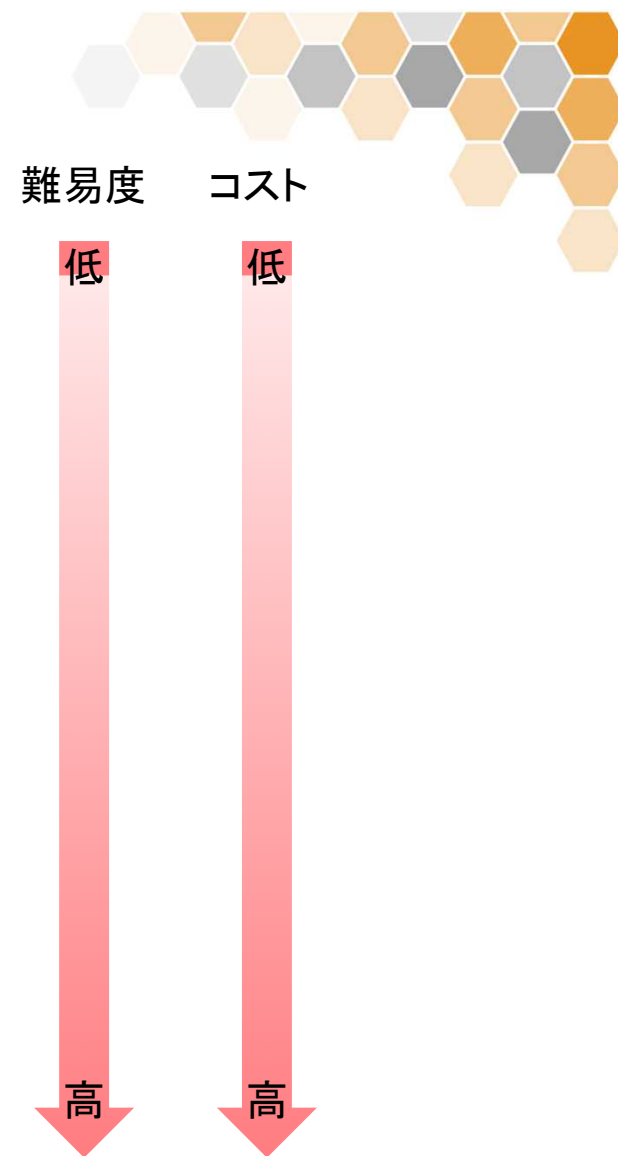
化学構造からおおよそ化学的・生化学的な作用を推測することができる

有用性評価の種類

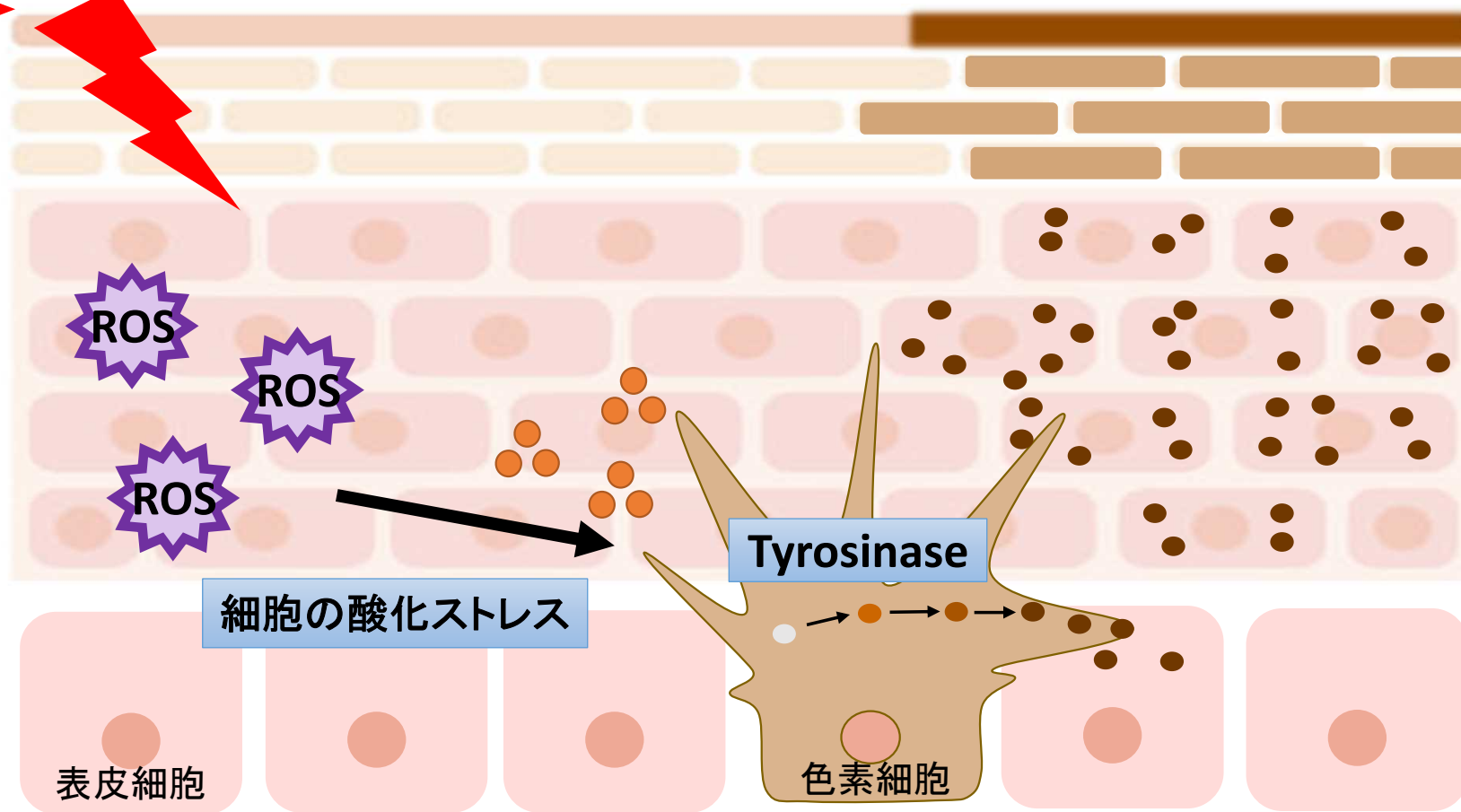
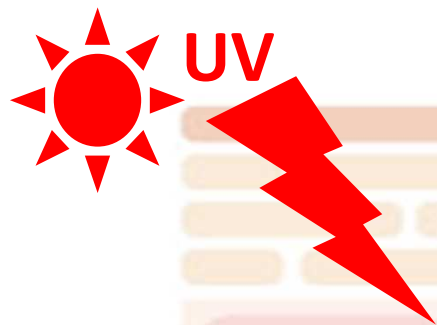
- 化学的な試薬などを用いた方法
- 市販の酵素などを用いた方法
- 細胞由来の酵素などを用いた方法
- ターゲットとなる細胞を用いた方法
- 3次元培養皮膚モデルなどを用いた方法 *in vitro*評価

- ヒトの摘出皮膚を用いた方法 *ex vivo*評価

- ヒトを用いた方法 *in vivo*評価



紫外線による色素沈着メカニズム



細胞での有用性評価



皮膚で起こっている現象（皮膚のトラブル、皮膚の老化）
について細胞を使って再現する。



- 皮膚で起こっている現象を再現した細胞を用いて、有効な原料をさがす。



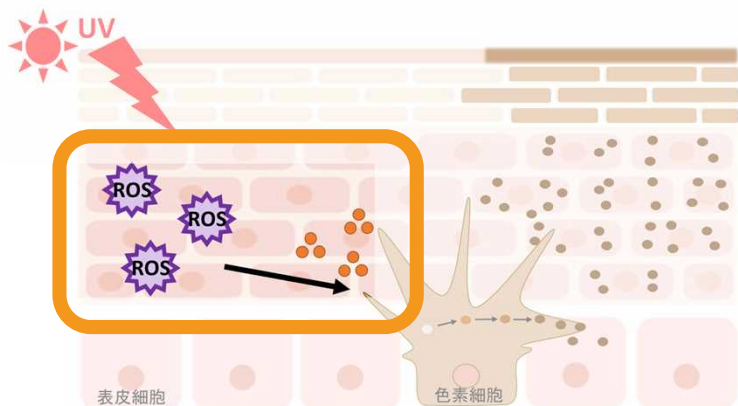
単層培養系の特徴

- 比較的安価。
- 扱いやすく、再現性が取りやすい。
- 細かい作用機序の検討が可能。
- 培養上清から細胞間クロストークの検討が可能。
- 油溶性の物質・溶解性の低い物質は評価しにくい。
- 製剤の評価はできない。

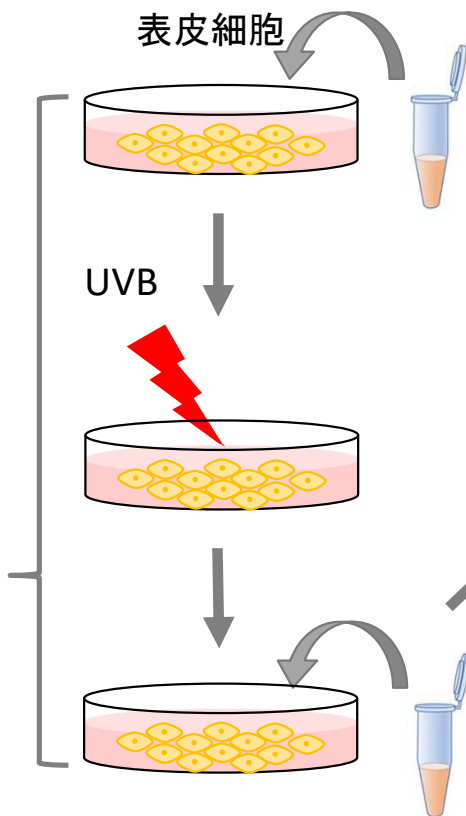
ヒト試験の試験計画に
反映することができる

物質がターゲットとなる細胞に対して直接的にどのような作用があるかを確認することができる

単層細胞試験系列（美白作用試験）



試験品の作用機序によってどこでの処理が適切かわ変わる



- 細胞の中の活性酸素を検出
- 細胞の酸化マーカーの染色
- 各種mRNAの発現変化を検出
- さまざまなタンパク質の定量
- さまざまな酵素の活性の測定

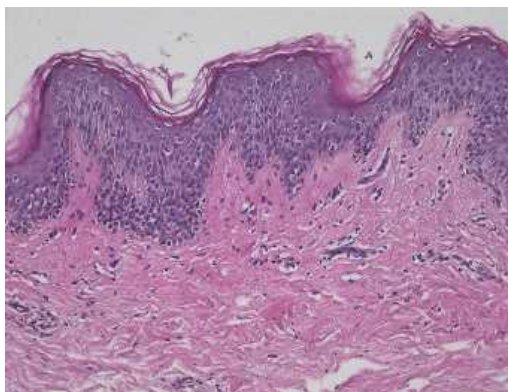


- 炎症性サイトカインを定量
- 産生した各種タンパク質の定量
- 各種タンパク分解酵素の活性測定

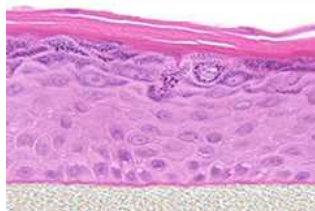
3次元培養モデルとは？

ヒト皮膚に構造が似ている人工のモデル

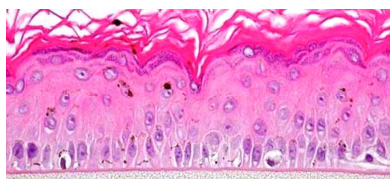
ヒト皮膚画像



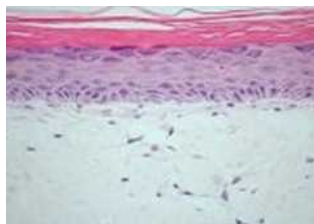
表皮モデル



色素細胞入り表皮モデル



全層モデル



- EpiSkin (EpiSkin社製)
- RHE (EpiSkin社製)
- EpiDerm (MatTek社製)
- LabCyte EPI-MODEL (J-TEC社製)

引用先: <https://www.mattek.com/mattekproduct/epiderm/>

- MEL (MatTek社製)
- RHPE (EpiSkin社製)

引用先: <https://www.mattek.com/mattekproduct/melanoderm/>

- T-Skin (EpiSkin社製)
- EFT (MatTek社製)
- LSE-high (ローマンスキンラボ社製)

引用先: <https://www.mattek.com/mattekproduct/epidermft/>



3次元培養皮膚モデルの特徴

- 単層培養細胞と同じように、mRNAの発現やタンパク発現など生化学的な評価が可能。
- 製剤を用いた評価が可能。
- 角層があるため、経皮吸収を含めた物質の作用をおおよそ確認することが可能。
- 皮膚よりも未成熟であることを利用して、バリア機能が不健全な状態での評価が可能。
- TEWLや皮膚表面水分量が測定することが可能。
- 多種類のモデルから、目的とする評価に適したモデルを選択することができる。

- 製剤での評価が可能
- 角層表面からの経皮吸収の評価が可能

3次元培養モデルを用いた美白作用試験例

色素細胞入り
3D皮膚モデル

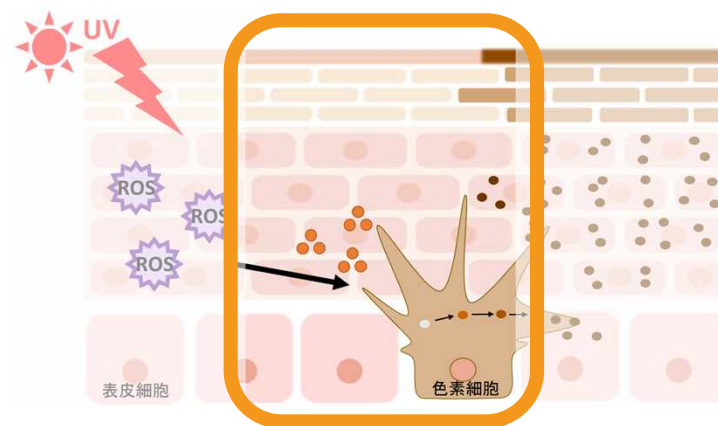


角層側からサンプル処理

数日間の培養後、写真撮影
裏面から分光測色計で測定 (L*)



表皮ディスクを剥離
アルカリ加水分解して
メラニン定量



皮膚モデル全体の写真



未処理



サンプル処理
(コウジ酸)

原料や製剤の作用メカニズムによっては確認できない場合もある

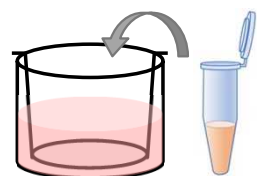
3次元培養モデルのTEWL測定

未熟な3D表皮モデル



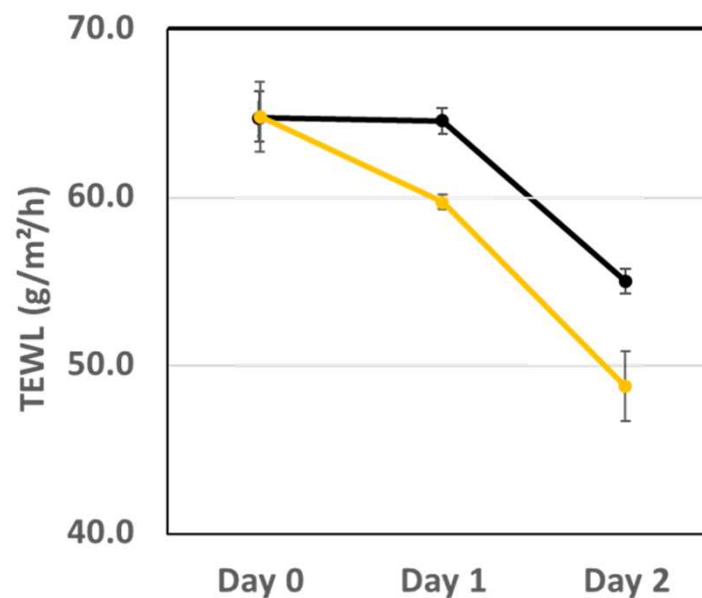
VAPO SCAN AS-VT100RS
(日本アッシュ製)

経皮水分蒸散量 (TEWL) を測定



角層側からサンプル処理

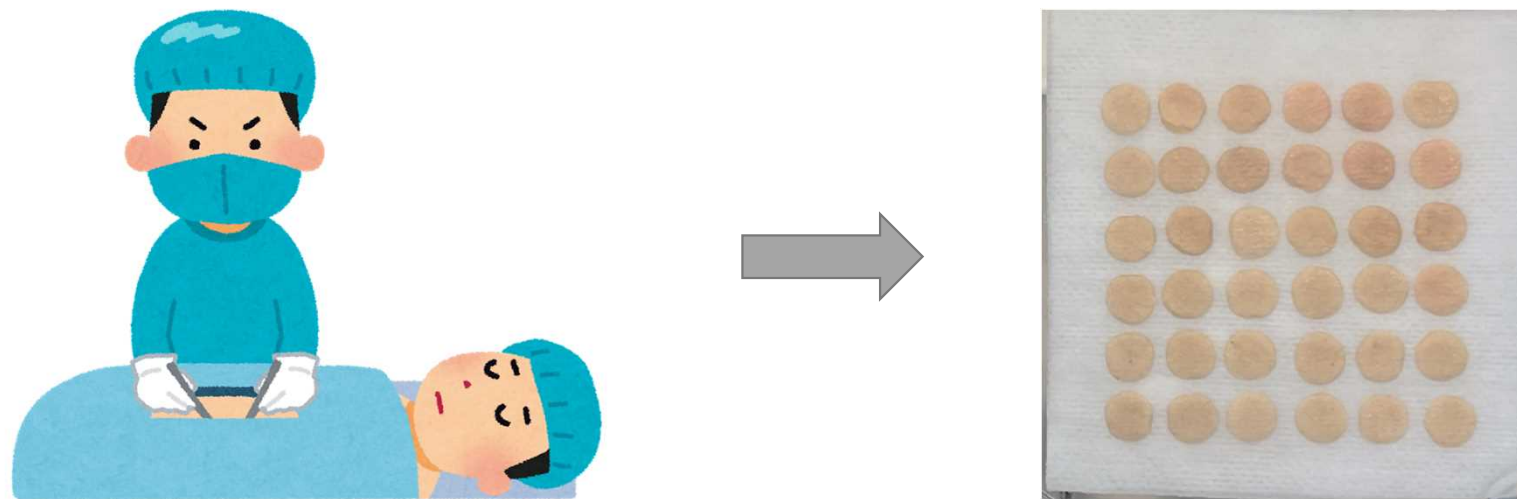
経時的にTEWLを測定



● 未処理
● サンプル処理
(バリア機能促進剤)
(n=4)

Ex vivo試験（摘出皮膚を用いた試験）とは？

ヒトの生体から直接摘出した皮膚での試験

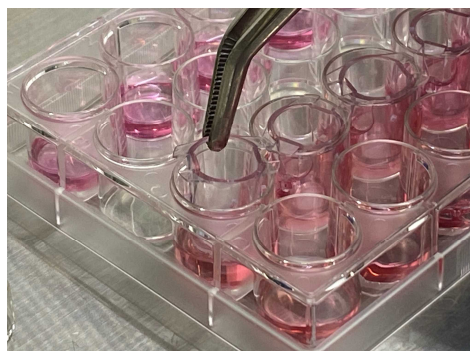


美容整形で摘出された皮膚を用いる。
倫理的な問題や血清学的検査で問題のないものを使用し、実験を行う。

Ex vivo試験の意義

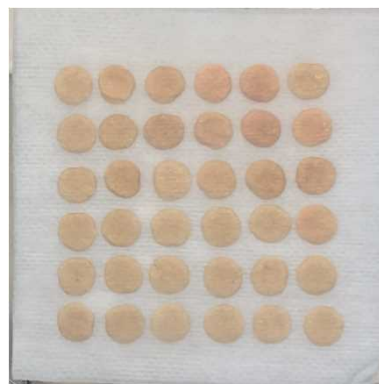


in vitro



細胞・三次元皮膚モデル

ex vivo



摘出皮膚

in vivo



ヒト試験

経皮吸収や代謝などの影響を
含めた有効性の検討

ヒト試験では倫理的・
予算的に困難なデータの取得

Ex vivo試験の特徴

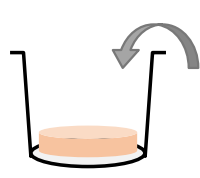
- 角層があるため、経皮吸収を含めた物質および製剤の作用を確認することが可能。
- TEWLや皮膚表面水分量が測定することが可能。
- 苛酷な処理(テープストリップやSLS処理)を実施することができる。
- 単層培養細胞と同じように、mRNAの発現やタンパク発現など生化学的な評価が可能。
- 組織染色が可能。

実際のヒト皮膚に塗布する製剤の評価、有効な濃度の評価ができる

Ex vivo 美白作用試験例①



UVB照射



角層側から製剤を処理

繰り返し処理



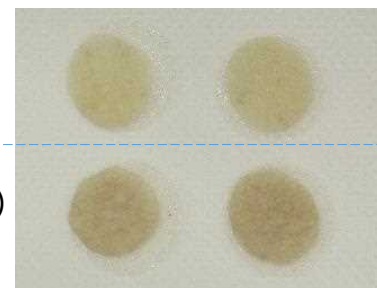
写真撮影

ディスペルゼ処理
表皮シートを剥離

アルカリ加水分解して
メラニン定量



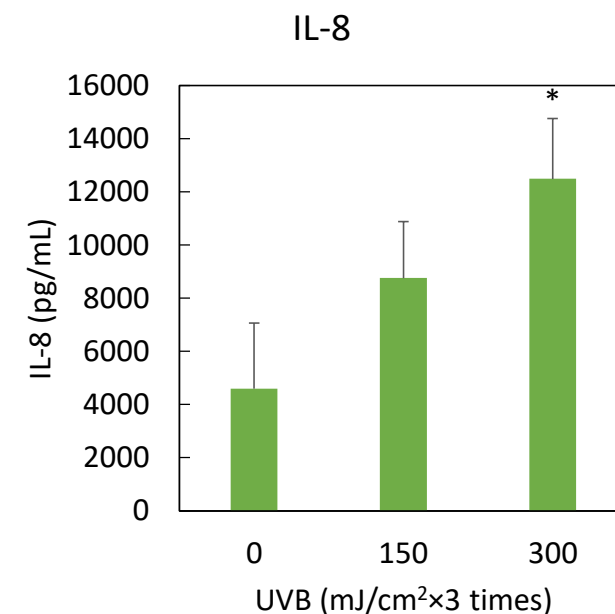
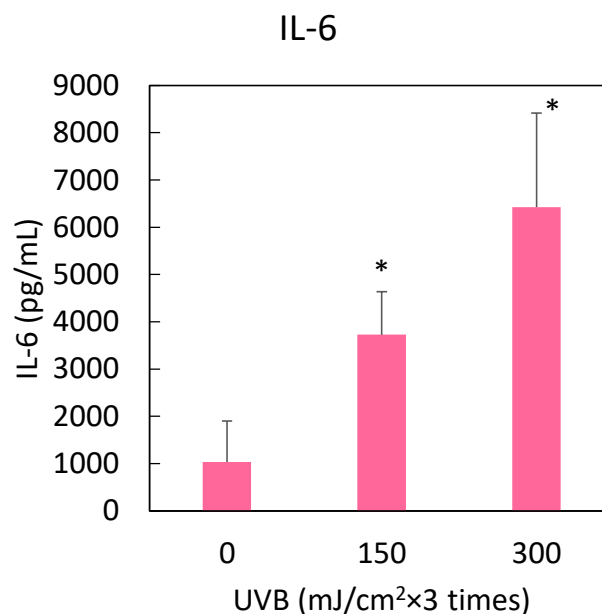
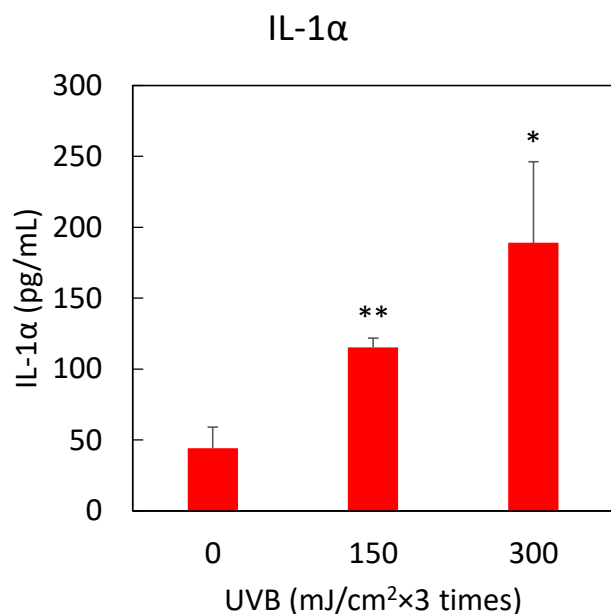
UVB(-)



UVB(+)

Ex vivo 美白作用試験例②

最後のUVB照射から72時間後



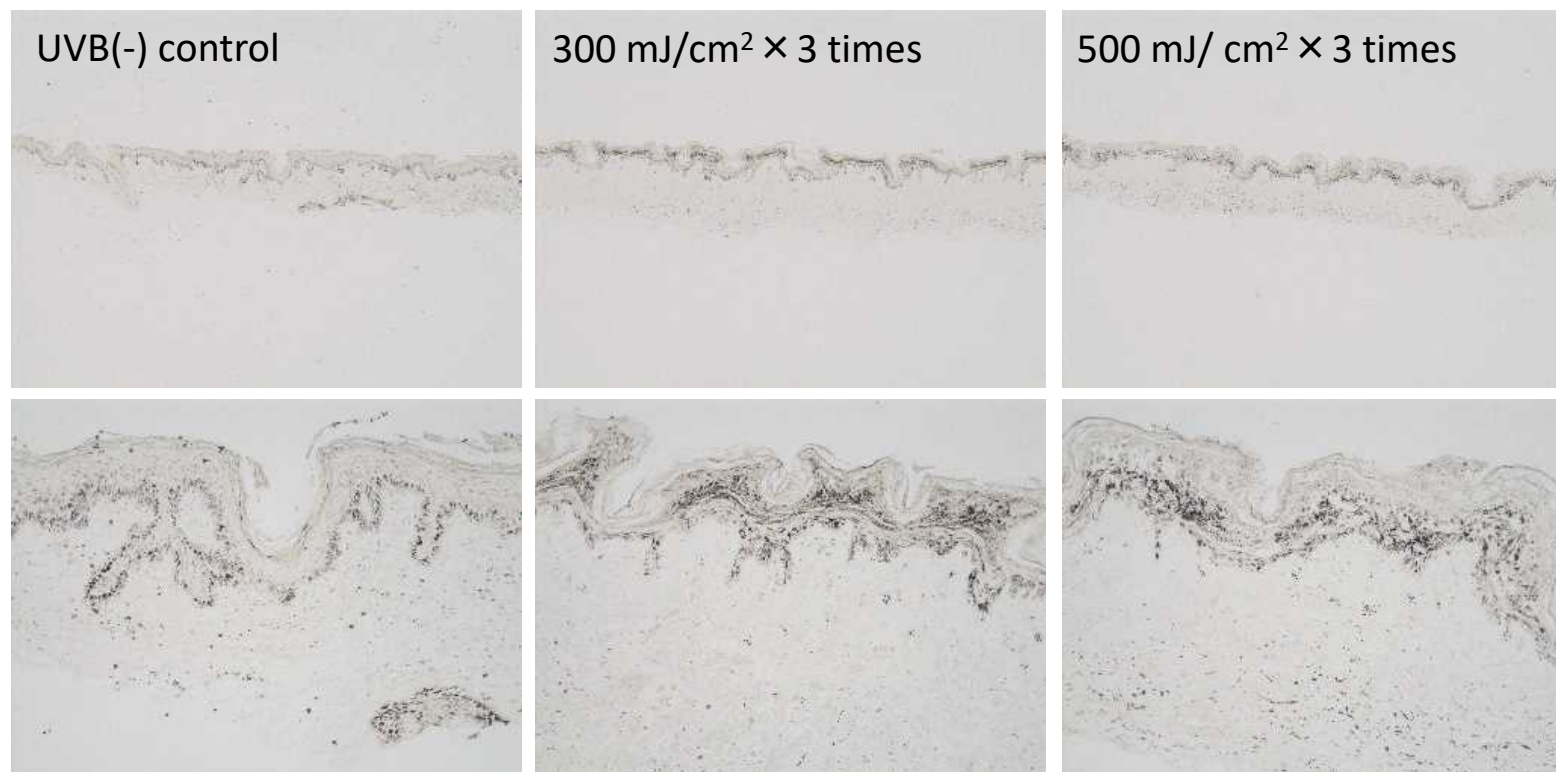
n=3, Mean \pm S.D.
UVB未照射 v.s.*p<0.05, **p<0.01

UVB照射群では、UVB未照射群と比べて、IL-1 α 、IL-6およびIL-8の分泌が亢進した。

Ex vivo 美白作用試験例③

最後のUVB照射から72時間後

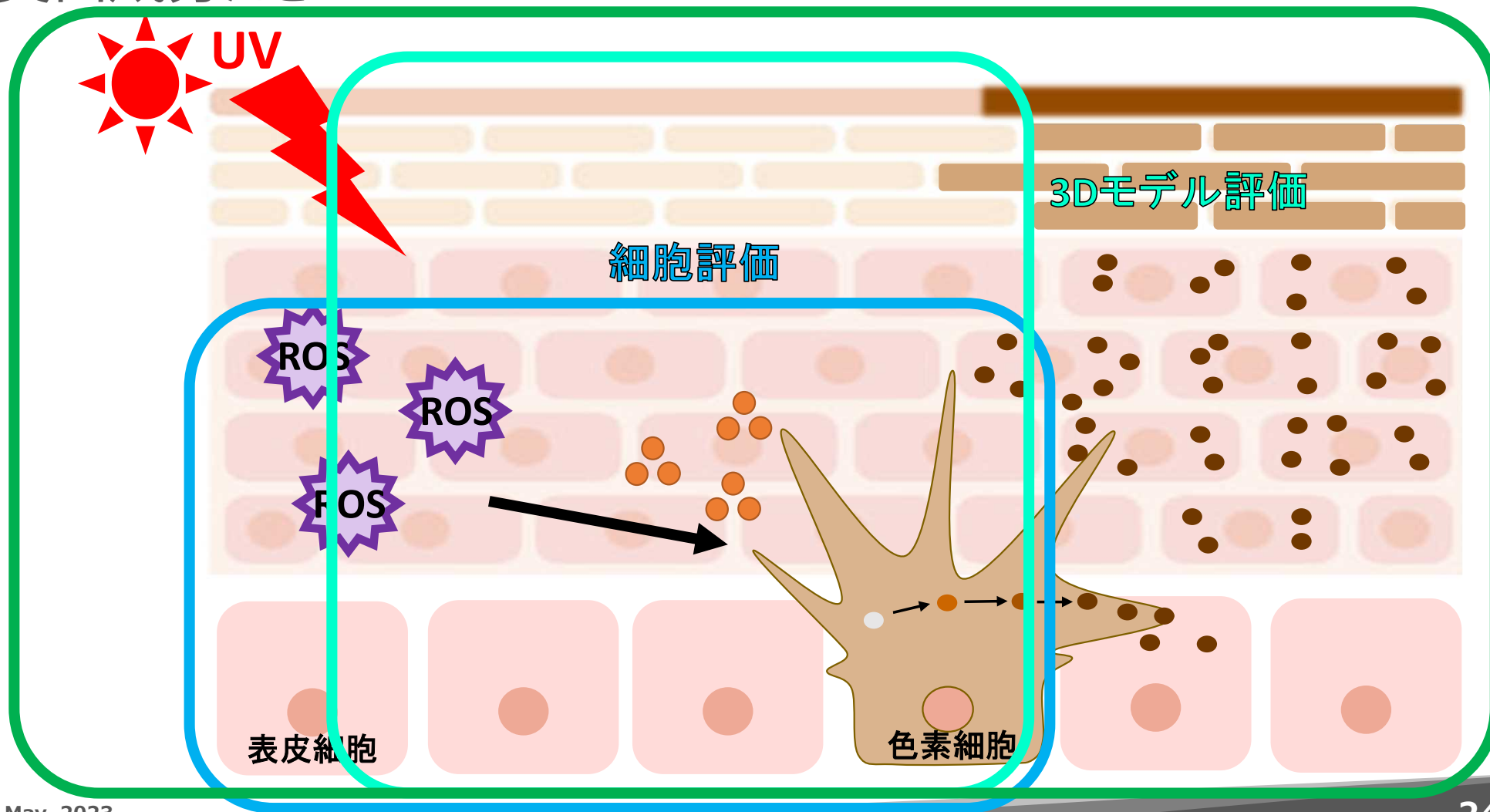
フォンタナマッソン染色



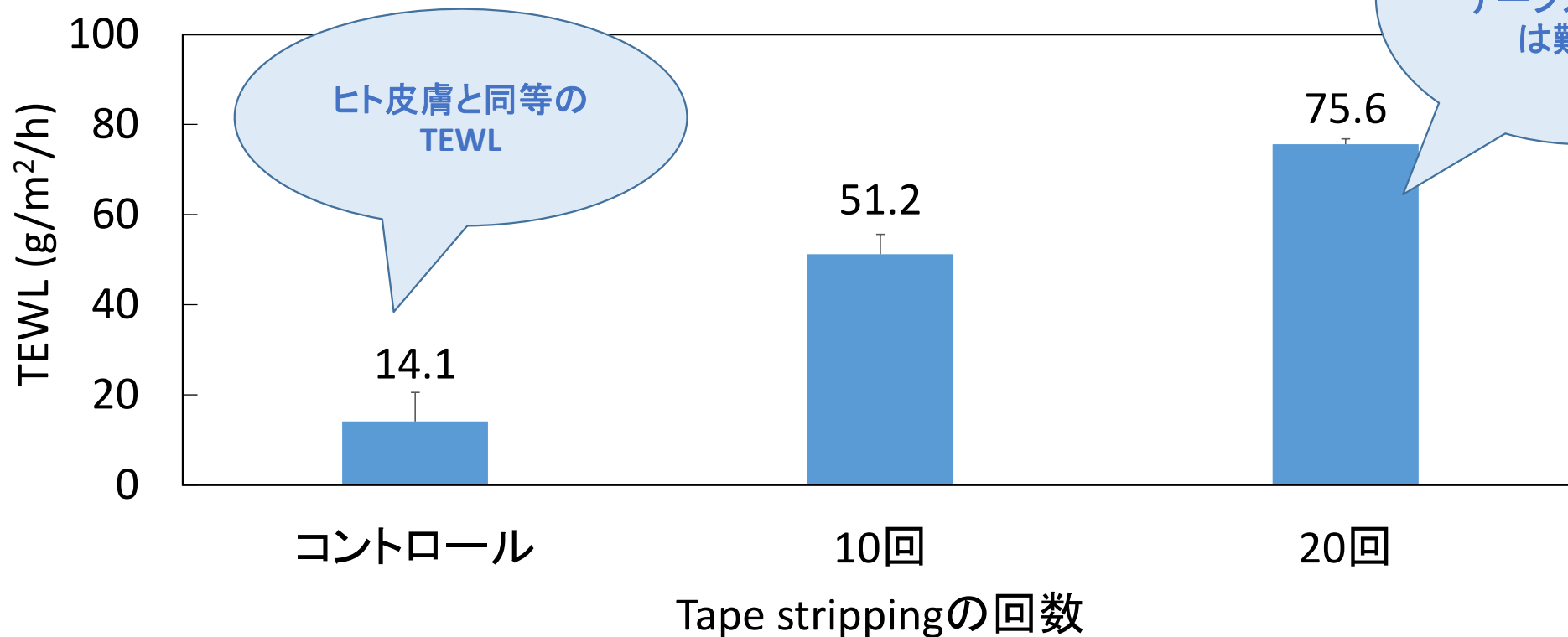
UVB照射によって、表皮中のメラニンの増加が観察された

美白成分だと...

ex vivo評価



Ex vivo テープストリッピングによるTEWL測定



安全性評価の種類

細胞などを用いたin vitro試験

- 単回投与毒性試験
- 皮膚一次刺激性試験
- 連続皮膚刺激性試験
- 感作性試験
- 光毒性試験
- 光感作性試験
- 眼刺激性試験
- 変異原性試験

ヒト試験実施可否を判断

ヒトによる最終確認

- ヒトパッチテスト

倫理審査委員会での承認

ヒトでの有用性評価確認

まとめ

- 細胞を用いた試験では、原料(物質)の作用を確認することが目的である。
- 3次元培養モデル試験では、製剤での有用性や、角層側からの経皮吸収を評価することができる。
- *ex vivo*試験では、実際のヒト皮膚に塗布する製剤での評価、有効な濃度での評価、経皮吸収からの代謝を確認することができる。
- ヒトでは難しい試験を実施することができる。

*in vitro*試験～*ex vivo*試験を段階的におさえていくことで、ヒト試験の有用性の試験方法の立案へとつなげていくことができる