

# 紫外線による色素沈着に対する 美白効果の評価法

第4回DRCセミナー

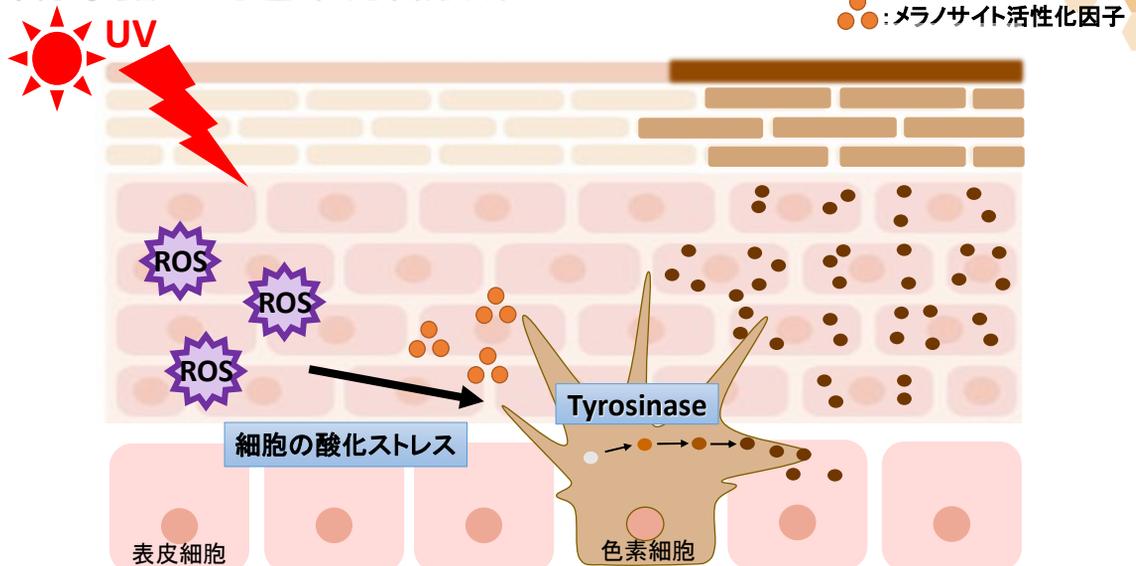
2023年10月31日 DRC株式会社



## 目次

1. 色素沈着形成の過程と美白有効成分の作用
2. 美白有効成分の前臨床評価方法について
  - ・ 単層細胞培養系を用いた評価
  - ・ 三次元培養皮膚を用いた評価
  - ・ 摘出ヒト皮膚を用いた評価
3. 美白の臨床試験方法について
4. まとめ

## 紫外線暴露による色素沈着形成のメカニズム

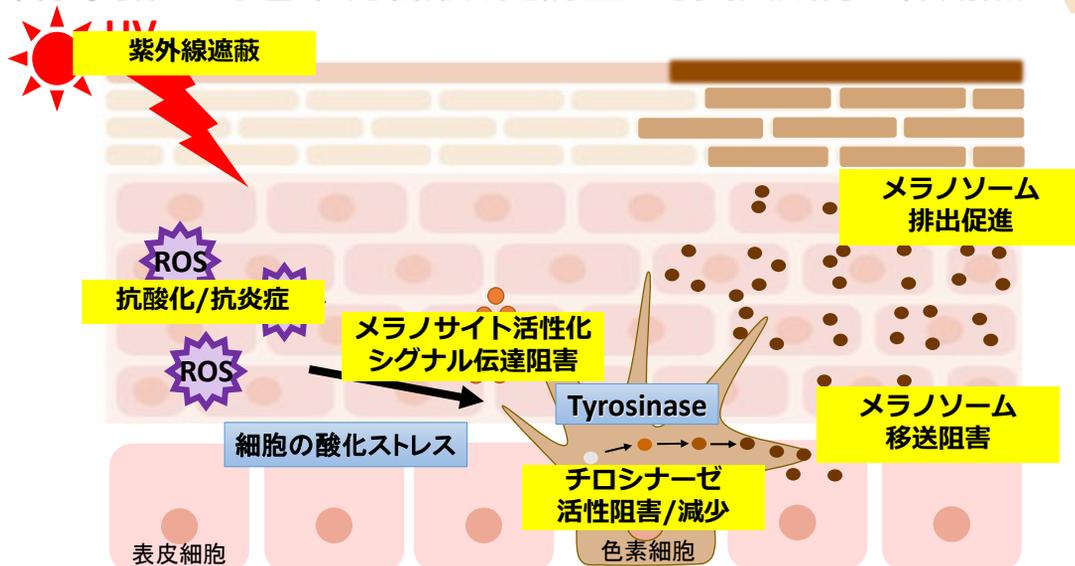


31 Oct 2023

3



## 紫外線暴露による色素沈着形成を防止する美白成分の作用点



31 Oct 2023

4



## 有効性評価の種類

- 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（臨床試験） *in vivo*評価



31 Oct 2023

5



## 細胞での有効性評価

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。



31 Oct 2023

6



## 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

31 Oct 2023

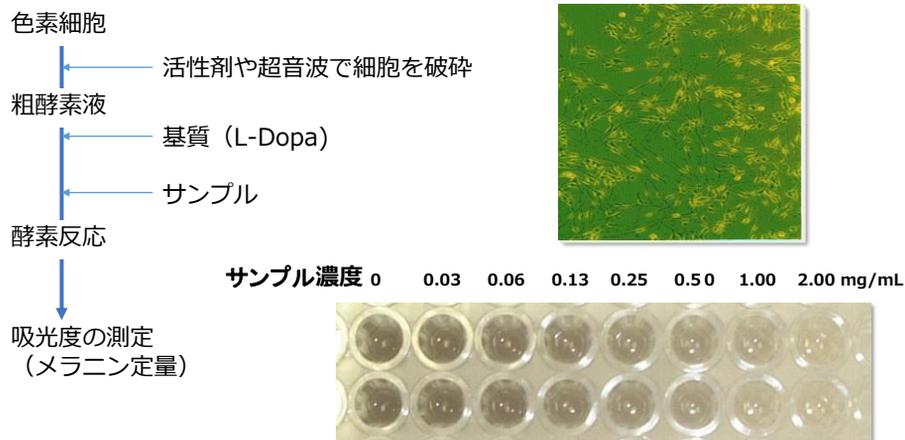
7



## 細胞由来の酵素を用いた評価事例

原料・素材

### ヒト色素細胞由来チロシナーゼ活性に対する阻害作用の評価



31 Oct 2023

8



## 色素細胞を用いた評価事例

原料・素材

## B16メラノーマ細胞のメラニン産生阻害作用の評価

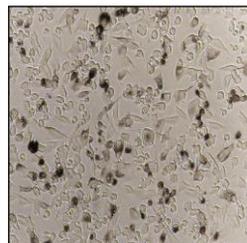
B16メラノーマ細胞

← サンプル

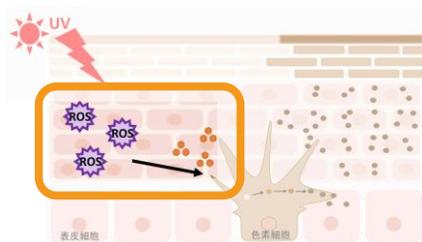
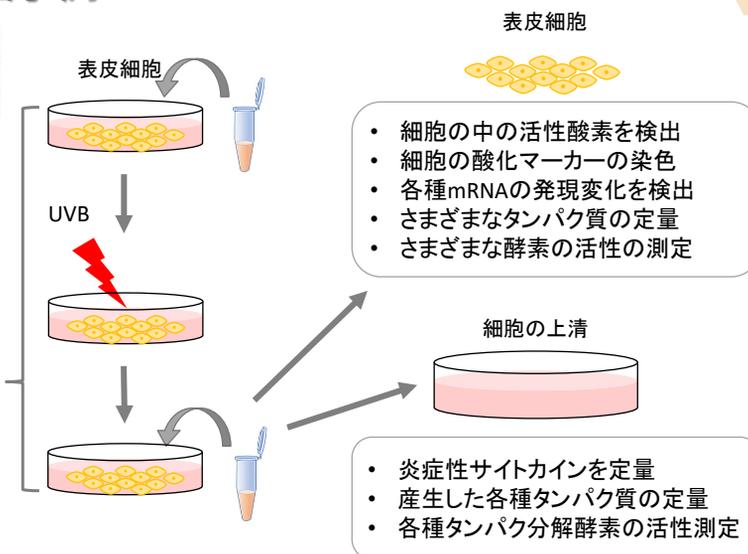
数日間の培養

← トリプシン処理して  
細胞を剥離

細胞ペレットの作成

写真撮影  
アルカリ加水分解して  
メラニン定量

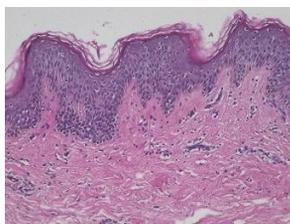
## 表皮細胞を用いた評価事例

試験品の作用機序に  
よってどこでの処理が  
適切が変わる

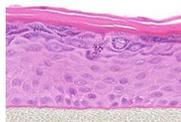
## 3次元培養モデルとは？

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



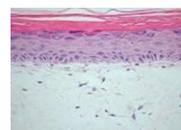
- EpiSkin (EpiSkin社製)
- RHE (EpiSkin社製)
- EpiDerm (MatTek社製)
- LabCyte EPI-MODEL (J-TEC社製)

色素細胞入り表皮モデル



- MEL (MatTek社製)
- RHPE (EpiSkin社製)

全層モデル



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

31 Oct 2023

11



## 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。
- 皮膚モデルの測色、あるいはTEWLや皮膚表面水分量を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

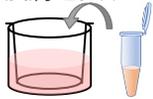
31 Oct 2023

12



## 3次元培養モデルを用いた評価事例

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

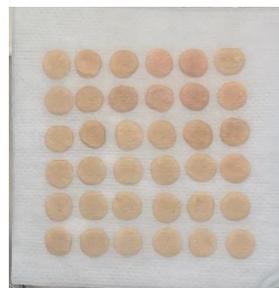


サンプル処理  
(コウジ酸)

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

## 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



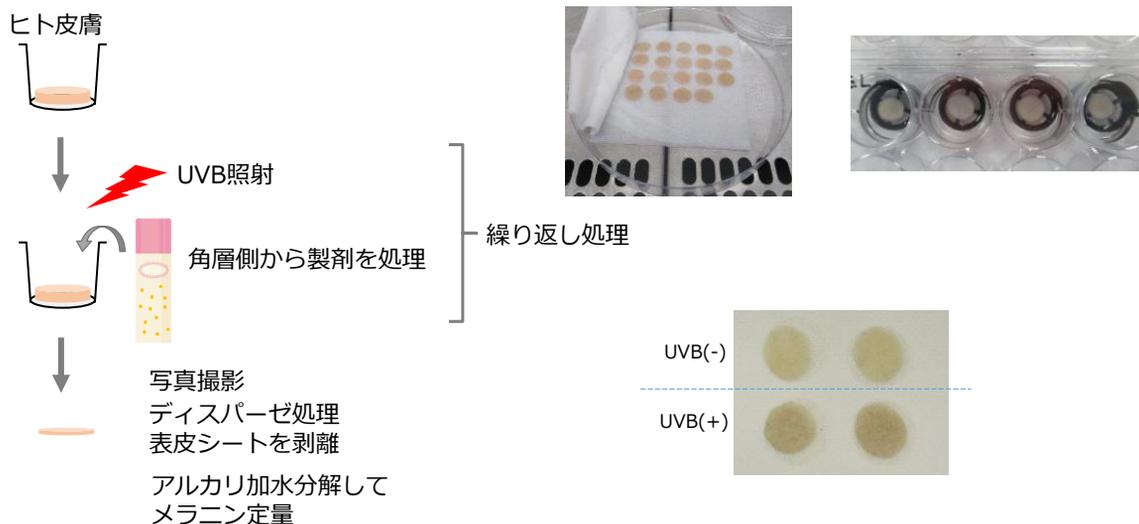
- 手術で摘出された皮膚を用いる。
- 倫理的な問題や血清学的検査で問題のないものを使用し、実験を行う。

## 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、皮膚色を測定することが可能。
- 苛酷な処理(UV照射、テープストリップ、SLS処理など)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

## 抽出したヒト皮膚を用いた色素沈着作成

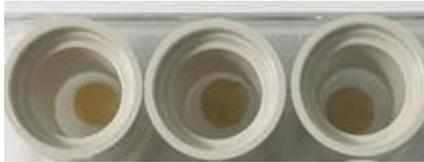


## 目視観察・表皮メラニンの定量

1群あたりn=3  
メラニン定量: n=2  
組織染色: n=1

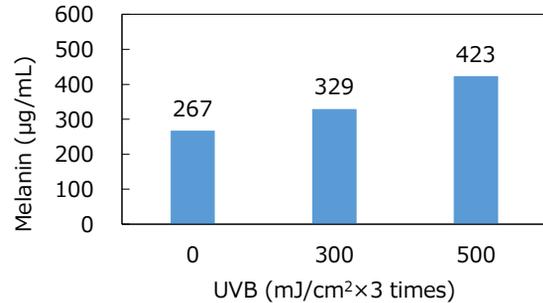
### UVB照射から72時間後

培養終了後の皮膚の様子



0                      300                      500  
UVB (mJ/cm<sup>2</sup>×3 times)

表皮中のメラニン量



UVB照射72時間後において、UVB未照射群と比べてUVB照射群は目視による黒化が観察された。

さらに、表皮中のメラニン量も増加した。

31 Oct 2023

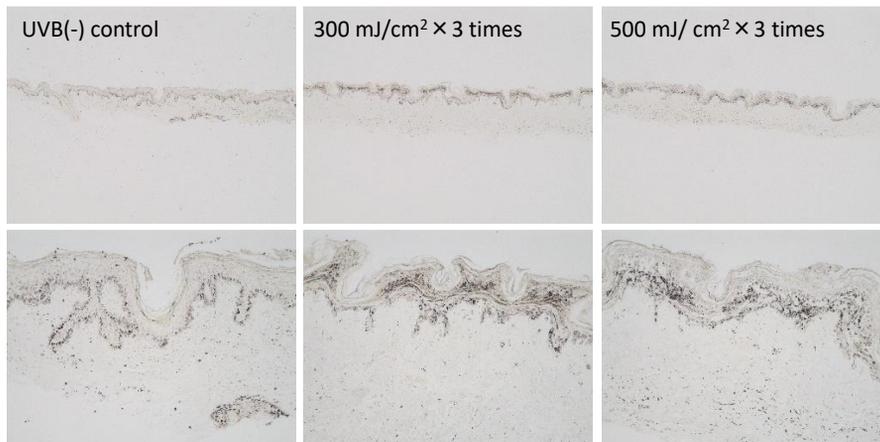
17



## 皮膚組織中のメラニンの分布

### 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。

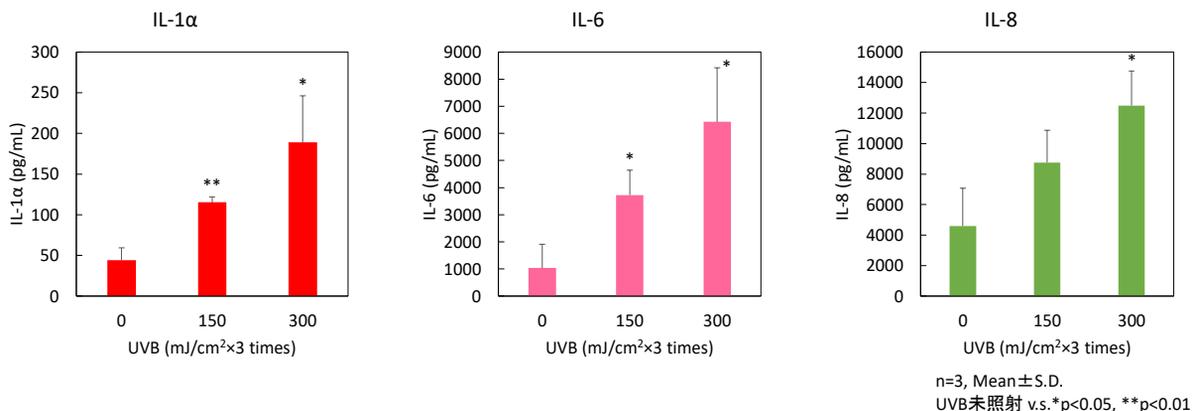
31 Oct 2023

18



## 培地中の炎症性サイトカイン量の定量

### UVB照射から72時間後



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

## In vitroとex vivoの美白評価法のまとめ

- 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

## ヒトでの美白作用の評価（臨床試験）

- 化粧品としての効果の最終確認は、人体で効果を示すことが必要
- 美白化粧品(医薬部外品)の申請には臨床試験が必須

「メラニンの生成を抑え、シミ・そばかすを防ぐ」



紫外線照射後の色素沈着を改善する効果を立証する

## 美白試験の Protokol

評価対象	紫外線照射で惹起した色素沈着 (上腕)	顔にもともと存在するシミ
評価方法	プラセボ群を設定した群間比較	・プラセボ群を設定した群間比較 ・連用前後の群内比較（経時比較）
被験者条件	条件不問（ただし、若年層の方が効果を 確認しやすい）	測定可能な大きさの薄いシミを有する被験 者
試験実施時期	紫外線の少ないシーズン（秋～春）	紫外線の少ないシーズン（秋～春）
試験実施期間	4週間～6週間程度	長期間（8週間以上）

## 紫外線照射による色素沈着の生成

紫外線照射



紅斑反応

紅斑が収まり色素沈着が始まる

明確な色素沈着が生成される

Day0

Day1

Day 4

Day7

照射前から使用がおすすめ

抗酸化剤

照射後からでOK

・メラノサイト活性化因子阻害剤・チロシナーゼ活性阻害剤

メラニン輸送阻害剤

ターンオーバー促進剤

31 Oct 2023

23

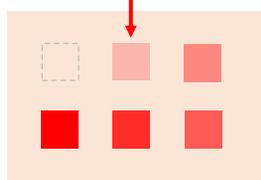


## 紫外線照射による色素沈着に対する美白試験 事前検査：スクリーニング

MED判定のための照射

MED：最少紅斑量

MED判定



きき腕

1.5MED照射

色素沈着の測色 (L\*値)

Day0

Day1

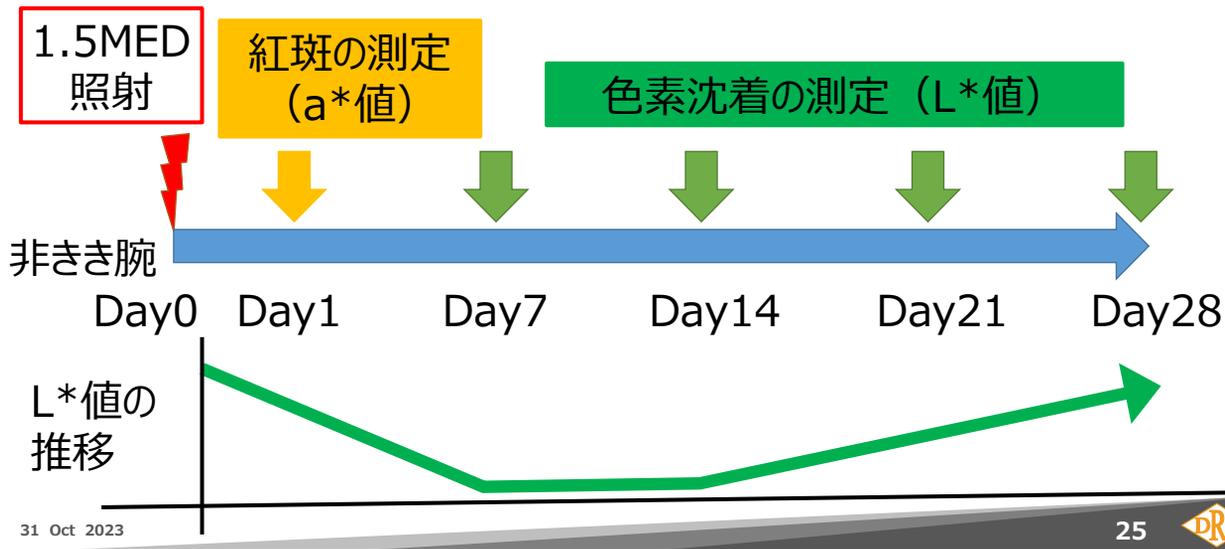
Day8

31 Oct 2023

24



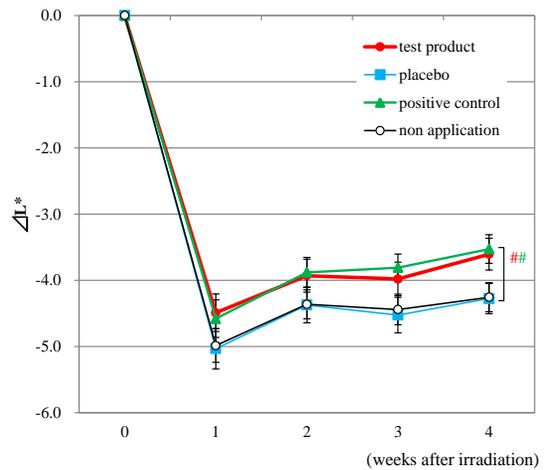
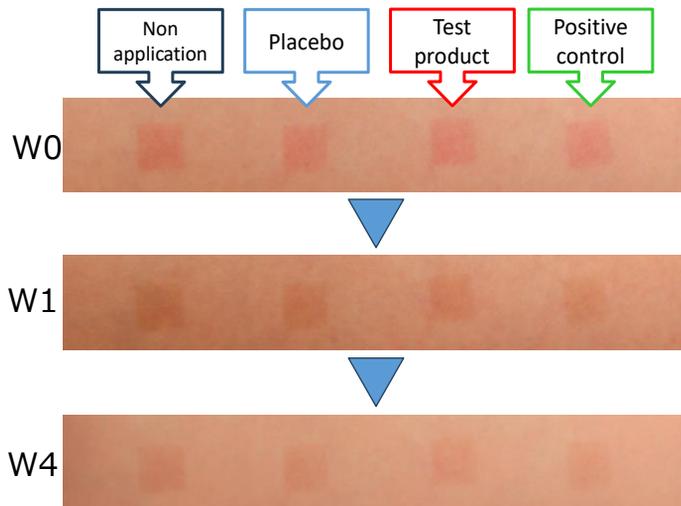
# 紫外線照射による色素沈着に対する美白試験 本試験



## 紫外線を照射して色素沈着を誘導する



## 色素沈着部位に試験品を塗布し、皮膚色を測定する



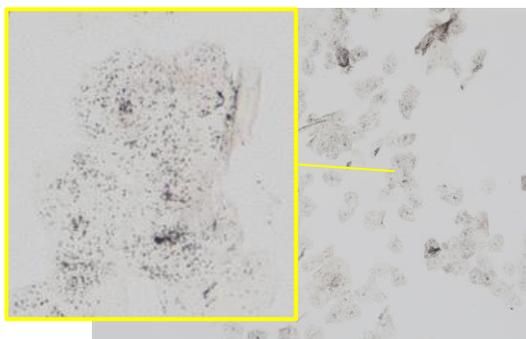
31 Oct 2023

27

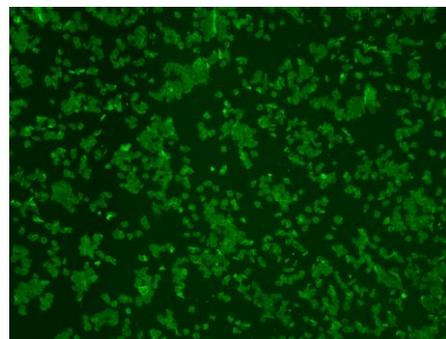


## +aの測定も可能（角層解析）

- 最終検査日にテープストリッピングを行うことで角層解析が可能



フォンタナマッソン染色  
メラニンの可視化が可能



カルボニル化タンパク染色  
酸化度の評価が可能

31 Oct 2023

28



## ヒトでの美白試験の要点

- 紫外線照射により適度な色素沈着を形成する被験者を選抜する。
- 同一被験者に均一な色素沈着を誘導するように紫外線を照射する。
- 色素沈着部位と周辺部位の皮膚色を再現性良く測定する。



適切に設計された試験計画に基づき、正確で精度の高い手技で試験を行うことにより、実際のヒトにおける試験品の有効性を立証することができる

## まとめ

- 皮膚が紫外線を浴びてから色素沈着が形成されるまでには、非常に複雑な過程が存在する。
- 単層培養細胞、三次元皮膚モデル、摘出皮膚を用いた前臨床評価により、美白有効成分がどこにどのように作用するかというメカニズムを確認することが重要。
- 前臨床試験のデータに基づいて適切に設計されたヒト臨床試験により、美白剤の有効性の最終確認が行われる。



ご清聴ありがとうございました