

熊野灘海藻資源による合成化合物不使用スキンケア製品の研究開発

Research and Development of Skin Care Products without Synthetic Compounds made from Marine Resources in Kumano-nada, Central of Japan

松浦信男¹⁾²⁾, 苔庵泰志³⁾, 榎宏之¹⁾, 河田敏勝¹⁾, 落合穰¹⁾,
西村訓弘¹⁾, 荒木利芳⁴⁾

*Nobuo Matsuura¹⁾²⁾, Yasushi Kokean³⁾, Hiroyuki Sakaki¹⁾, Toshikatsu Kawada¹⁾,
Yutaka Ochiai¹⁾, Norihiro Nishimura¹⁾, Toshiyoshi Araki⁴⁾*

1) 三重大学大学院医学系研究科生命医科学専攻環境社会医学講座トランスレーショナル医科学

2) 万協製薬株式会社

3) 三重県工業研究所 医薬品・食品研究課

4) 三重大学大学院生物資源学研究科生物圏生命科学専攻水圏生物利用学研究室

*1) Translational Medical Science, Social and Environmental Medicine,
Graduate School of Medicine, Mie University*

2) Bankyo Pharmaceutical Co., Ltd

3) Mie Prefecture industrial Research institute

*4) Laboratory for the Utilization of Aquatic Bioresources, Department of Life Science,
Graduate School of Bioresources, Mie University*

はじめに

三重県尾鷲市は世界遺産に認定された熊野古道の入り口であり、豊かな自然に恵まれ海産物をはじめとする多くの地域資源を有している。さらに海洋深層水の取水が行われていて、それらに関連付けた地域ブランドの開発や新産業創出による地域経済の発展に期待が高まっている。特に、海洋深層水を用いて実用化されたハバノリの陸上養殖は全国初である。

さらに昨年度から三重県では、熊野灘沿岸に生育する海藻であるヒロメを地元漁協などと協力して養殖試験を開始しており、利用可能な大きさに成長させ得ることを確認している。これら地域資源を有効利用した食品などの開発に取り組むとともに、その成果を本地域の特産物として広めることで地域への経済効果を期待している。しかし、上述したような一般的な食品を目的とした生産だけでは、コストや知名度などの問題から尾鷲の地域資源(深層水、ハバノリ、ヒロメ)を全国的に展開し地域ブランドとして普及することは難しい。そこで、食品素材より付加価値を持つとされる化粧品素材への利用を考えた。一方、現在の

化粧品の多くは合成高分子化合物を使用しており、残留溶媒のヒトへの影響が懸念される。そこで、海藻から得られる高分子化合物を利用することによって、合成物を使用しないスキンケア製品を生み出すことが求められている。

そこで、食品としてだけではなく、より付加価値の高い化粧品素材への利用を考えた。また、現在の化粧品の多くは合成高分子化合物を使用しているが、昨今は粘性や保水性に優れた海藻粘質物などの天然素材を使用したスキンケアに対する要望が高まってきている。

このような研究背景を持ち、三重県で万協製薬株式会社が行なっている技術と、三重大学及び三重県工業研究所が研究を進めている本テーマについて共同で研究開発することにより、熊野灘の海藻資源を有効活用した、合成化合物不使用の天然素材スキンケア製品の開発を目的として、次のような研究開発を実施した。

1) ハバノリの細胞壁分解酵素の開発

褐藻の細胞壁はセルロースと粘質多糖であるアルギン酸およびフコイダンで構成されている。

また、褐藻の粘質多糖は食品、医薬品、化粧品などに広く利用されている。本研究ではこれら粘質多糖を素材としたスキンケア製品の開発を目的として、三重県の特産品であるハバノリとヒロメからこれら粘質多糖を効率よく抽出するための方法を検討した。

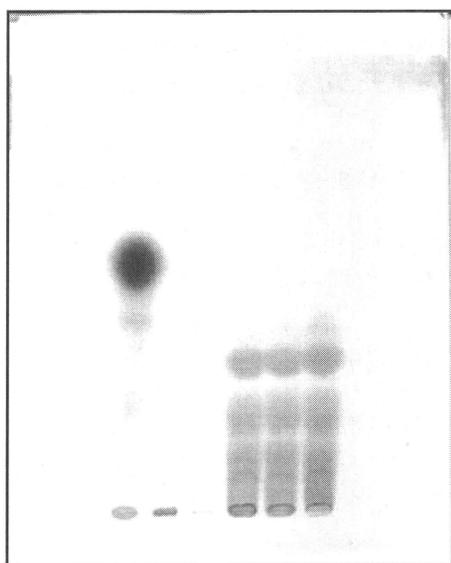


図1. アルギン酸リアーゼによるアルギン酸分解

海洋細菌 *Vibrio* sp. AL-429 株と *Vibrio* sp. MA-138 株のゲノム DNA からそれぞれアルギナーゼ (*algA*) 遺伝子とセルラーゼ (*cel8B*) 遺伝子をクローニングした。*algA* 遺伝子は 1026 bp の塩基からなり、341 残基のアミノ酸をコードし、推定分子量は 37,430Da、推定等電点は 4.73 であった。*cel8B* は 357 残基のアミノ酸をコードする 1074bp からなり、その推定分子量は 40,932Da で、糖質分解酵素(GH)ファミリー8 に属していた。両酵素遺伝子を pET システムで発現させ、酵素学的性質を調べた。組換えアルギナーゼ(rAlgA)は至適 pH が 8.0 で至適温度は 35°C、アルギン酸を脱離反応によって分解し、種々のオリゴ糖を生ずるリアーゼであることが判明した(図1参照)。

2) 酵素処理技術を活用したハバノリ・ヒロメの有効成分の効率的な抽出精製技術の開発

ヒロメ粉末からのアルギン酸抽出に関してはアルカリ抽出法が熱水抽出法より収率が高く、また粘性も高かった。ヒロメ粉末はセルラーゼで前処

理することにより粘性が増大した。ヒロメアルギン酸の濃度と粘度の関係を調べた結果、クリーム製造には約1%濃度が適していることが判明した。また、ヒロメからのフコイダンの抽出ではセルラーゼで前処理することにより、メタノールの使用量を減少させることができた。ヒロメとハバノリからフコイダンとアルギン酸の連続抽出を試みた結果、フコイダンとアルギン酸抽出には酵素前処理が効果があることが判明した。また、粗フコイダン抽出物のアルギナーゼ処理は、フコイダンの精製に効果があった(図2, 3参照)。

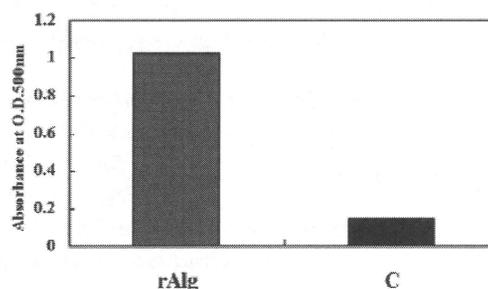


図2. アルギン酸リアーゼ反応後の活性比較

rAlg: 粗フコイダン抽出液に rAlg430F・全長を作用させた区、C: rAlg430F・全長の代わりに蒸留水を用いた区

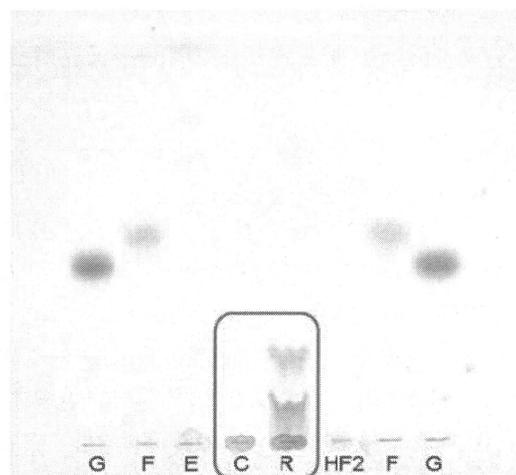


図3. フコイダン粗抽出液にアルギン酸リアーゼを作用させた時のTLC

G: グルコース水溶液 (0.1%)、F: フコース水溶液 (0.3%)、E: enzyme、C: control (無処理)、R: アルギン酸リアーゼ処理、HF2: 二回目抽出液をアルギン酸リアーゼ処理したもの

3) ハバノリとヒロメを対象とした高粘性物質抽出法の検討

(a) 海藻エキス成分の分子量分布の把握

尾鷲市産ヒロメ(平成20年5月産天然、養殖、平成20年4月産養殖)および尾鷲市産ハバノリ(平成20年4月、7月産養殖)を研究試料とし、アルギン酸ナトリウムを主な目的成分として、粘性物質を抽出した。抽出法は、一般的なアルカリ抽出法の抽出温度や、抽出後のアルギン酸ナトリウムの回収法を変更することにより、最適な抽出条件を検討した(図4参照)。抽出したアルギン酸ナトリウムの推定分子量は、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC:Size Exclusion)により分析した。抽出物の精製の判断は、FT-IR分析により、抽出前後の共雑物の吸収スペクトルの減少で判断した。

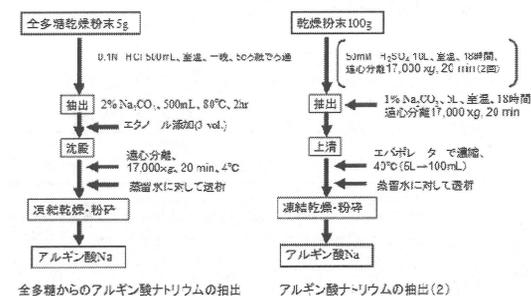
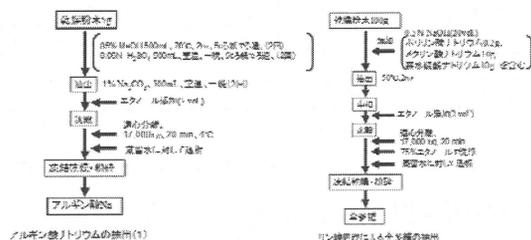


図4. アルギン酸ナトリウムを主な目的成分とする粘性物質の抽出法

抽出法に関しては、室温で18時間アルカリ抽出後に、減圧濃縮することで、効率的にしかも分子量の大きなアルギン酸ナトリウムを抽出できることが明らかとなった(改良法)。このときのアルギン酸ナトリウムの推定分子量は、養殖ハバノリ、養殖ヒロメ、天然ヒロメでそれぞれ約159、81~101、92~149kDaとなった。さらに抽出温度を80°Cに

することで、抽出時間が2時間に短縮できることも明らかとなった。

(b) 海藻エキスの物性評価

抽出したアルギン酸ナトリウムの粘度特性、乳化特性、保水性および超音波処理による物性変化を明らかにした。

抽出検討の結果得られたアルギン酸ナトリウムの粘度は、養殖ハバノリ、養殖ヒロメ、天然ヒロメ(スペクトルは図6を参照)で、それぞれ約74~82、50、130~180mPa・s(1%w/v)となった。スキンケア製品に天然ヒロメ由来アルギン酸ナトリウムを1%(w/v)添加すると、試作品の粘度は77,300mPa・sとなった。同様に養殖ハバノリ(スペクトルは図7を参照)より抽出したアルギン酸ナトリウム1%(w/v)添加では80,100mPa・sとなり、いずれも万協製薬での社内基準(50,000~200,000mPa・s)を満たす値であった。これらのことから、実際にアルギン酸ナトリウムのみ水溶液では粘度が一般的にスキンケア製品に用いられている合成増粘剤の粘度(カルボキシビニルポリマー、粘度:1%水溶液で12,000~155,000 mPa・s)より低くても、十分に製品に利用可能であり、スキンケア製品に適したアルギン酸ナトリウムの分子量は、約150万Da程度であると判断した。

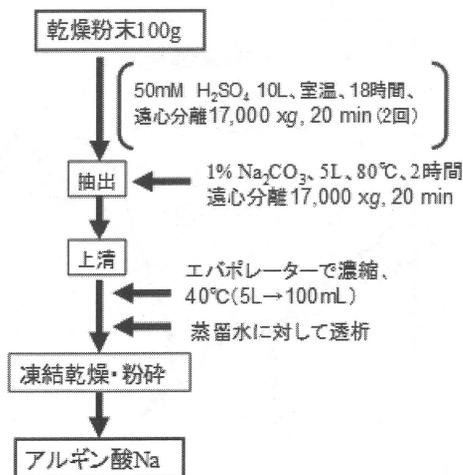


図5. アルギン酸ナトリウムの抽出

乳化性は、改良法(図5を参照)で抽出した養殖ハバノリ、養殖ヒロメ、天然ヒロメでは、それぞれ

約 94、88、88%となり、他の方法で抽出したアルギン酸ナトリウムより優れていた。乳化安定性は、原料の種類や抽出法による変化は示さなかったが、100%もしくはそれに準ずる値を示し、乳化安定剤として良好な結果となった。

アルギン酸ナトリウム溶液(1%w/v)の超音波処理では、天然ヒロメ由来アルギン酸ナトリウムの粘度は容易に減少したのに対し、養殖ハバノリ由来アルギン酸ナトリウムでは粘度低下に対して抵抗性を示した。また、天然ヒロメ由来アルギン酸ナトリウムは、粘度が低くても保水性が保持されることが明らかとなった。

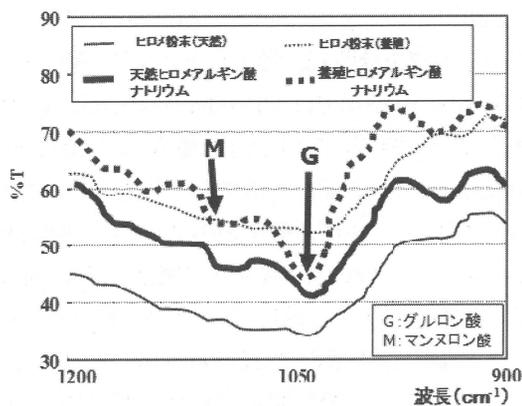


図6. アルギン酸ナトリウムの FT-IR スペクトル (ヒロメ)

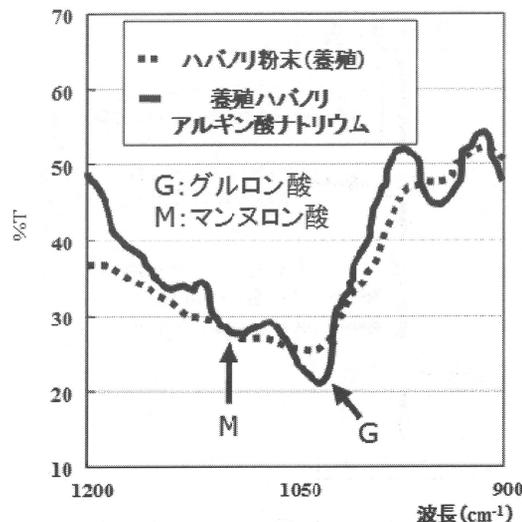


図7. アルギン酸ナトリウムの FT-IR スペクトル (ハバノリ)

4) 合成高分子化合物を使用しないスキンケア製品の開発

(a) 抽出高分子(海藻エキス)の粘度特性および乳化能の確認

ヒロメ及びハバノリ抽出液について、製品化を行なう上で、最適な粘度及び配合量を確認した。表1に示すように、アルギン酸ナトリウム(市販品)1%配合品したものは、合成高分子(カルボマー)0.2%に近い粘度を有したため、海藻抽出液も配合量1%前後が最適ラインだと考えられた。展延性は合成高分子との間に差はなく、pHも弱酸性であり、pH調製をする必要はなかった。

表1: 検討クリーム剤の粘度、pH、安定性

クリーム剤	成分	粘度(mPa·s)	展延性	pH(室温)	安定性
カルボマー単用(0.2%)	カルボマー	137,200	4.6	5.9	◎
	アルギン酸ナトリウム(市販品)1%	106,700	4.0	5.0	◎
高分子不使用品		28,000	5.0	7.5	×
天然ヒロメ抽出液1%	TU2-1	77,300	4.0	5.0	◎
天然ヒロメ抽出液1%	TU8-1	91,100	4.0	5.0	◎
天然ヒロメ抽出液0.5%	U9-1	54,800	5.0	5.5	○
天然ヒロメ抽出液1%	YJP	50,700	4.5	5.7	◎

以上から、海藻抽出液は1%~1.5%の範囲で配合を検討するのが妥当だと考えられる。次に、ヒロメ及びハバノリ抽出液について、ヒトへの短期保湿簡易評価試験を行った。

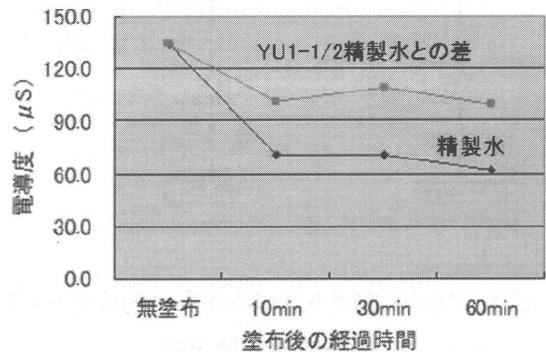


図8. ヒロメ抽出液(TU-1/2)の保湿性簡易測定

測定後、塗布部位について経過観察を行なった。その結果、紅斑や腫れは認められなかったことから皮膚への安全性が簡易的に確認された。

また図8に示すように、ヒロメ抽出物には角質水分量の低下を抑制する効果があると考えられ

る。しかしながら、無塗布時より、角質水分量が減少している。このため、高精度の結果を得るには、対象人数を増やし、最適な測定環境下での保湿評価試験が必要であると考えられた。

(b) 配合剤の安定性(安全性)確認

ヒロメ及びハバノリ抽出液について、ラットへの単回経口投与毒性試験をおこない、各抽出液を配合したクリーム剤及びローション剤については、ウサギへの連続皮膚刺激性試験をおこない、その安全性を確認した。

ハバノリ抽出物 1%溶液では投与回数を重ねるごとに皮膚反応がみられはじめたことから、ハバノリ抽出物 1%溶液は皮膚累積刺激性を有すると考えられる。また、ハバノリ入りクリームおよびヒロメ入りクリームでもともに投与回数を重ねるごとに皮膚反応の評点が継続および上昇していることから、ハバノリ入りクリームおよびヒロメ入りクリームは、皮膚累積刺激性を有すると考えられる。しかし、クリーム基剤でも同程度の皮膚反応を示していることから、ハバノリ入りクリームおよびヒロメ入りクリームでみられた皮膚反応は、クリーム基剤が引き起こした皮膚反応であると考えられる。なお、ハバノリ抽出物 1%溶液は皮膚累積刺激性を有しているにもかかわらず、ハバノリ抽出物 1%含有ローションで刺激がみられなかったが、これはローション基剤により刺激性が緩和されたことによると考えられる。

(c) パッチテストによる試作品の評価

ローション剤及びクリーム剤に関して健常人 40 名を対象とした閉塞法皮膚貼付試験を行った。

各抽出液配合品は、ベース基材(抽出物無配合品)との間に差はなく、各ベース基材も精製水との間に差は認められなかった。このことから、ハバノリあるいはヒロメ抽出液配合クリーム及び配合ローションは市場での安全性を十分に有すると考えられる。

今後は、本処方に万協製薬においてすでに実績のある、防腐設計を導入することで、より安全性の高い製品が供給できると考えられる。

(d) ハバノリ抽出物およびヒロメ抽出物及び配合剤の短期保湿評価試験

ハバノリ抽出物およびヒロメ抽出物の皮膚に対する物理的な保湿効果及び、各抽出液を配合したクリーム剤及びローション剤(図9及び図 10 参照)について、その保湿効果の差を調べるべく、健常人 20 名を対象とした短期保湿評価試験を行ない、保湿性の有無を確認した。

各測定部位、測定時間毎に被験者 20 人の平均値を算出し、 $t=0$ (塗布前)の値からの増加率を求めた。その結果、クリーム群 > ローション群 > エキス群、の順にキャパシタンスの増加率が高い結果となった。エキス群、ローション群、クリーム群ともに、ハバノリおよびヒロメ抽出物を配合した試験品とコントロールとして用いた試験品の間には差は認められなかった。

測定部位が手首に近いほうがキャパシタンスの値が大きい傾向がみられ、 $t=0$ の測定値が増加率に及ぼす影響が大きいと考えられたため、同様にして $t=0$ の値からの増加量を求めた。その結果、増加率と同じ傾向がみられ、クリーム群 > ローション群 > エキス群、の順にキャパシタンスの増加量が高かった。しかし、ハバノリ及びヒロメ抽出物を配合した試験品とコントロールとして用いた試験品に差は認められなかった。

以上のように本試験においては、剤型の違いによる保湿効果の違いは認められたものの、エキス(ハバノリおよびヒロメ抽出物)を配合した試験品とコントロールとして用いた試験品の保湿効果に違いはなかった。今回、用いた配合濃度においては両エキスには短期間での物理的な保湿効果は認められなかったものの、エキスの生物学的な作用(例えば NMF や角層細胞間脂質の増加、バリア機能の向上など)により、肌状態の改善が期待されるため、長期保湿試験において再評価する必要がある。

4) 製品イメージと今後の課題及び展望について

本研究により、前述のような研究成果を得ることができた、今後の市場展開を進める足がかりとして、県内の地域物産店や地域物産展示会な

どを利活用し、通常の化粧品とは、異なる販売ルートで情報を発信しながら、新しい販路を開拓していく予定である。

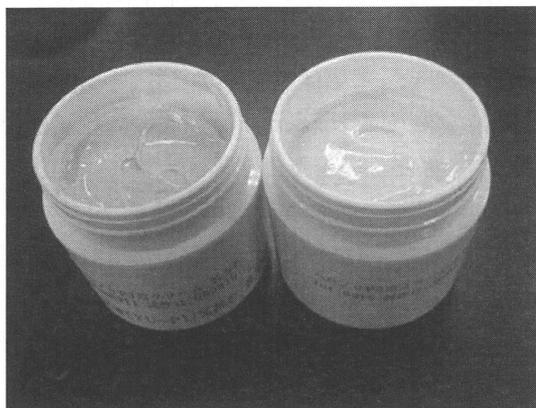


図9. 海藻抽出物配合スキンケアクリーム



図10. 海藻抽出物配合スキンケアローション

Appl. Glycosci., 54, 84-90.

4) アルギン酸の化学構造、アルギン酸塩の性質:大野正夫編著、「有用海藻誌」、内田老鶴圃、pp444-445、2004

謝辞

本研究開発では、ヒロメ及びハバノリの養殖に当たり尾鷲市新産業創造課奥村英二氏をはじめとする地元漁師並びに漁協関係者から多大なる協力を受けた。これらの方々に深く感謝を申し上げたい。また、本研究は、中部経済産業局からの委託事業として、同局からの支援を受けて実施したものであり、この縁を頂けた事に深謝します。

最後に、今回の実験及び論文の作成にあたり、多大なご指導を賜りました三重大学大学院生物資源学研究科生物圏生命科学専攻水圏生物利用学研究室、三重大学創造開発研究センター、三重県工業研究所 医薬品・食品研究課の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Tako M, Kiyuna S, Uechi S, and Hongo F (2001) Isolation and characterization of Alginic acid from Commercially Cultured *Nemacystus decipiens* (Itomozuku), Biosci. Biotechnol. Biochem., 65, 654-657.
- 2) Shiroma R, Uechi S, Taira T, Ishihara M, Tawata S, and Tako M (2003) Isolation and characterization of Fucoidan from *Hizikia fusiformis* (Hiziki), J. Appl. Glycosci., 50, 361-365.
- 3) Shiroma R, Uechi S, Tawata S, and Tako M (2007) Isolation and characterization of Alginate from *Hizikia fusiformis* and Preparation of its Oligosaccharides, J.