

報告書

美白/くすみ検討セット 「324eco 水素化Mg」の

B16メラノーマ細胞を用いたメラニン生成抑制
メラニン前駆体(DHICA)の黒化抑制
コラーゲンを用いた最終糖化産物(AGEs)の生成抑制
評価

試験施設

株式会社きれいテストラボ

〒135-0047 東京都江東区富岡二丁目11番6号 長谷萬ビル3F

TEL 03-6695-0144

【無断転載禁止】



試験委託	株式会社SBMplus 〒101-0031 東京都千代田区東神田1-3-6 マサヤビル2F 鈴木光代
試験受託	株式会社きれいテストラボ 〒135-0047 東京都江東区富岡2-11-18
試験実施機関	株式会社きれいテストラボ 試験センター 〒135-0047 東京都江東区富岡2-11-6 長谷萬ビル3F
試験番号	WS21070801
被験品	「324eco 水素化Mg」
試験項目	美白/くすみ検討セット ・ B16メラノーマ細胞を用いたメラニン生成抑制 ・ メラニン前駆体(DHICA)の黒化抑制 ・ コラーゲンをを用いた最終糖化産物(AGEs)の生成抑制
資料保存場所	株式会社きれいテストラボ
試験実施日	2021年8月20日
保存期間	試験終了後5年間

報告書をwebなどへ転載を希望する場合、必ず事前に株式会社きれいテストラボにご相談ください。

報告書構成

- 1 要約
- 2 試験目的
- 3 試験概要
- 4 材料と試験方法
 - 4-1 B16メラノーマ細胞を用いたメラニン生成抑制
 - 4-1-1 細胞
 - 4-1-2 培地
 - 4-1-3 被験品調製
 - 4-1-4 試験方法
 - 4-2 メラニン前駆体 (DHICA) の黒化抑制
 - 4-2-1 被験品調製
 - 4-2-2 試験方法
 - 4-3 コラーゲンをを用いた最終糖化産物(AGEs)の生成抑制
 - 4-3-1 被験品調製
 - 4-3-2 試験方法
- 5 有意差検定
- 6 試験結果
 - 6-1 B16メラノーマ細胞を用いたメラニン生成抑制
 - 6-2 メラニン前駆体 (DHICA) の黒化抑制
 - 6-3 コラーゲンをを用いた最終糖化産物(AGEs)の生成抑制
- 7 参考文献
- 8 図表

1 要約

「324eco 水素化Mg」は、

- ・ 対照と比較して、DHICA黒化率 (%) を有意に減少させた。
- ・ 対照と比較して、AGEs生成率 (%) を有意に減少させた。

上記より「324eco 水素化Mg」は、美白/くすみに対して有効な作用をもつ被験品であると考えられた。

2 試験目的

被験品の、メラニン生成抑制作用・メラニン前駆体(DHICA)黒化抑制作用・最終糖化産物(AGEs)生成抑制作用を評価し、被験品の美白作用およびくすみに対する効果を検討する。

3 試験概要

肌悩みとして上位に挙げられる「シミやくすみ」には様々な要因がかかわっている。表皮色素細胞(メラノサイト)によるメラニン生成が肌全体であるいはスポット状に過剰になる事が、くすみやシミの一因となる。また、メラニン前駆体であるDHICA(5,6-ジヒドロキシインドール-2-カルボン酸)の酸化重合も暗色なメラニン生成に必要なステップである。一方真皮においてコラーゲンが糖化すると、メラニン帰因とは異なる黄ぐすみの原因となる。

本試験セットでは、色素細胞によるメラニンの生成量、透明なメラニン前駆体DHICAの酸化重合による黒化、およびコラーゲンの酸化、これらに対する被験品の影響を評価した。これらにより、黄ぐすみを含む「美白・くすみ」に対する被験品の有用性を検証した。

4 材料と試験方法

4-1 B16メラノーマ細胞を用いたメラニン生成抑制^{1, 2)}

4-1-1 細胞

マウス由来B16メラノーマ細胞を、CO₂インキュベータ (CO₂濃度 5%、37°C) を用いて培養し、本試験を実施した。

4-1-2 培地

10.0% (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS, Cat No. SH30071.03, Hyclone, UK) および1.0% (v/v) 抗真菌剤 (Antibiotic-Antimycotic 100X, Cat No. 15240-062, Invitrogen, USA) を含むDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Cat No. 10566-016, Gibco, USA) を用いた。

4-1-3 被験品調製

100 nM α -Melanocyte stimulating hormone (α -MSH, Cat No. M4135, Sigma-Aldrich, USA) および100 μ M テオフィリン (Cat No. T1633, Sigma-Aldrich, USA)、10%FBS含有DMEMを調製し、これを試験培地とした。

試験培地によって被験品を希釈して計3濃度 (0.25%, 0.5%, 1%) を用時調製した。調製後、室温下で1時間放置して気体を発生させ、細胞へは上清を処置した。対照には試験培地を用いた。

4-1-4 試験方法

- 1) 96ウェルプレート (Cat No. 3595, Corning, USA) に1ウェルあたり 5.0×10^4 cells/mLのB16細胞を100 μ L播種し、CO₂インキュベータ内で24時間培養した。また、培養時の乾燥を防ぐため、試験に用いないウェルにPhosphate buffer saline (PBS (-), Cat No. 198601, Nissui, Japan) を200 μ L加えた。
- 2) 培養上清を除去した96ウェルプレートに被験品および対照を100 μ L添加し、CO₂インキュベータ内で72時間培養した。
- 3) 培養上清を除去した96ウェルプレートの各ウェルを、37°Cに加温したPBS (-) 200 μ Lで静かに1回洗浄した。
- 4) 無血清DMEMで10倍希釈したAlamarBlue (Cat No. DAL1025, Thermo Fisher Scientific, USA) 溶液を120 μ L加え、CO₂インキュベータ内で1時間インキュベートした。
- 5) 培養上清100 μ Lを新しい96ウェルプレート (Lot. 9017, Corning, USA) に分注し、マイクロプレートリーダー (SPARK[®] 10M, TECAN, Switzerland) を用いて570 nm (OD₅₇₀) および650 nm (OD₆₅₀) の吸光度を測定した。
- 6) 細胞培養した96ウェルプレートの各ウェルを、PBS (-) 200 μ Lで静かに1回洗浄した。
- 7) 96ウェルプレートの各ウェルに1 M 水酸化ナトリウム (CAS No. 1310-73-2, Kanto Chemical, Japan) および10%ジメチルスルホキシド (Cat No. 043-07216, Wako, Japan)含有水溶液を100 μ L加え、プレートシールをして85°Cで10分間インキュベートした。
- 8) 96ウェルプレートをプレートミキサー (NS-4P, AS ONE, Japan) を用いて270 rpmで60秒間振とうし、マイクロプレートリーダーを用いて405 nmの吸光度 (OD₄₀₅) を測定した。

- 9) 被験品、対照のOD₅₇₀、OD₆₀₀、OD₄₀₅から被験品のメラニン生成率 (%) およびメラニン生成抑制率 (%) は次式により算出した。

$$\text{メラニン生成率 (\%)} = \{SM / (S - SR)\} / \text{av.}\{CM / (C - CR)\} \times 100$$

$$\text{メラニン生成抑制率 (\%)} = 100 - \{SM / (S - SR)\} / \text{av.}\{CM / (C - CR)\} \times 100$$

CM: 対照のOD₄₀₅ C: 対照のOD₅₇₀ CR: 対照のブランクOD₆₅₀

SM: 被験品のOD₄₀₅ S: 被験品のOD₅₇₀ SR: 被験品のOD₆₅₀

CM/(C-CR): 対照ウェルあたりのメラニン生成量

av.{CM/(C-CR)}: 対照ウェルあたりのメラニン生成量の平均値

4-2 メラニン前駆体(DHICA)の黒化抑制³⁾

4-2-1 被験品調製

Phosphate buffer saline (PBS (-), Cat No. 198601, Nissui, Japan) によって被験品を希釈して計3濃度 (0.1%, 1%, 10%) を用時調製した。調製後、室温下で1時間放置して気体を発生させ、上清を処置した。対照にはPBS(-)を用いた。

4-2-2 試験方法

- 1) 96ウェルプレート (Lot. 9107, Corning, USA) の各ウェルに20 μ g/mL DHICA (D452825, Toronto Research Chemicals, USA) 溶液を100 μ L加えた後、対照および被験品を100 μ L添加した。対照にはPBS (-) を用いた。
- 2) 96ウェルプレートをプレートミキサーを用いて270 rpmで30秒間振とうし、マイクロプレートリーダーを用いて405 nmの吸光度 (OD₄₀₅) を測定した。
- 3) Quartz reaction container (Ozawa science, Japan) に96ウェルマイクロプレートを装着し、ソーラーシミュレーター (Suntest CPS+, Atlas, USA) を用いて30分間照射した。
- 4) 96ウェルプレートをプレートミキサーを用いて270 rpmで30秒間振とうし、マイクロプレートリーダーを用いて405 nmの吸光度 (OD₄₀₅) を測定した。
- 5) 照射前後の被験品、対照のOD₄₀₅から被験品のDHICA黒化率 (%) およびDHICA黒化抑制率 (%) を次式により算出した。

$$\text{DHICA黒化率 (\%)} = (S_{30} - S_0) / \text{av.}\{C_{30} - C_0\} \times 100$$

$$\text{DHICA黒化抑制率 (\%)} = 100 - (S_{30} - S_0) / \text{av.}\{C_{30} - C_0\} \times 100$$

C₃₀: 照射後の対照のOD₄₀₅ C₀: 照射前の対照のOD₄₀₅

S₃₀: 照射後の被験品のOD₄₀₅ S₀: 照射前の被験品のOD₄₀₅

C₃₀ - C₀: 照射後の対照のDHICA黒化増加量

av.(C₃₀ - C₀): 照射後の対照のDHICA黒化増加量の平均値

4-3 コラーゲンを用いた最終糖化産物(AGEs)の生成抑制⁴⁾

4-3-1 被験品調製

超純水 (CAS No.7732-18-5, Wako, Japan) によって被験品を希釈して計3濃度 (0.1%, 1%, 10%) を用いて調製した。調製後、室温下で1時間放置して気体を発生させ、上清を処置した。対照には超純水を用いた。

4-3-2 試験方法

- 1) 1.5 mLチューブ (Cat No. 0030125150, Eppendorf, Germany) に10%コラーゲン溶液、1M グルコース溶液および被験品もしくは対照を100 μ L加え、ボルテックスを用いて溶液を混合した。
- 2) 96ウェルプレート (Lot. 9107, Corning, USA)に混合した溶液を100 μ L加え、マイクロプレートリーダーを用いて、360 nmで励起させ、465 nmの蛍光強度 (a.u.) を測定した。
- 3) ヒートブロックを用いて1.5 mLチューブを100°C、60分間加熱した後、96ウェルプレートに100 μ L加え、マイクロプレートリーダーを用いて再度、蛍光強度 (a.u.) を測定した。
- 4) 加熱前後の被験品、対照の蛍光強度から被験品のAGEs生成率 (%) およびAGEs生成抑制率 (%) を次式により算出した。

$$\text{AGEs生成率 (\%)} = (S_{30} - S_0) / (C_{30} - C_0) \times 100$$

$$\text{AGEs生成抑制率 (\%)} = 100 - (S_{30} - S_0) / (C_{30} - C_0) \times 100$$

C_{30} : 加熱後の対照の蛍光強度 C_0 : 加熱前の対照の蛍光強度 (平均値)

S_{30} : 加熱後の被験品の蛍光強度 S_0 : 加熱前の被験品の蛍光強度 (平均値)

$C_{30} - C_0$: 加熱後の対照の蛍光強度増加量

av.($C_{30} - C_0$): 加熱後の対照の蛍光強度増加量の平均値

5 有意差検定

試験ごとに、対照と被験品添加群を対応のないt検定で有意差検定を実施した。検定はいずれも両側で有意水準を5%未満とした。

6 試験結果

6-1 B16メラノーマ細胞を用いたメラニン生成抑制

対照のメラニン生成率を100%として、被験品のメラニン生成率を表1および図1に示した。また、被験品のメラニン生成抑制率を表2に示した。

6-2 メラニン前駆体 (DHICA) の黒化抑制

対照のDHICA黒化率を100%として、被験品のDHICA黒化率を表2および図2に示した。また、被験品のDHICA黒化抑制率を表2に示した。

6-3 コラーゲンをを用いた最終糖化産物 (AGEs) の生成抑制

対照のAGEs生成率を100%として、被験品のAGEs生成率を表3および図3に示した。また、被験品のAGEs生成抑制率を表3に示した。

7 参考文献

- 1) S. Akiu, et al., Nihon Hifuka Gakkai Zasshi., 101(6), 609-613, 1991.
- 2) K. Ohguchi, et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 72, 1107-1110, 2008.
- 3) K. Maeda and M. Hatao, J. Invest. Dermatol., 122, 503-509, 2004.
- 4) H. Masaki, et al., Biochim. Biophys. Acta., 1428, 45-56, 1999.

8 図表

表1 吸光度(OD₅₇₀, OD₆₀₀, OD₄₀₅)およびメラニン生成率およびメラニン生成阻害率

	濃度 (%)	OD ₅₇₀			OD ₆₀₀			OD ₄₀₅			メラニン生成率 (%)						メラニン生成抑制率 (%)					
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	mean ± s.d.	1	2	3	mean ± s.d.	t-test			
対照	-	0.600	0.592	0.601	0.397	0.394	0.388	0.097	0.099	0.095	100.7	105.3	94.0	100.0 ± 5.7	-0.7	-5.3	6.0	0.0 ± 5.7	-			
	0.25	0.628	0.612	0.613	0.405	0.392	0.393	0.106	0.107	0.110	100.1	102.4	105.3	102.6 ± 2.6	-0.1	-2.4	-5.3	-2.6 ± 2.6	-			
被験品	0.5	0.609	0.609	0.619	0.394	0.396	0.406	0.114	0.114	0.111	111.7	112.7	109.8	111.4 ± 1.5	-11.7	-12.7	-9.8	-11.4 ± 1.5	-			
	1	0.596	0.606	0.602	0.407	0.415	0.410	0.103	0.104	0.104	114.8	114.8	114.2	114.6 ± 0.3	-14.8	-14.8	-14.2	-14.6 ± 0.3	-			

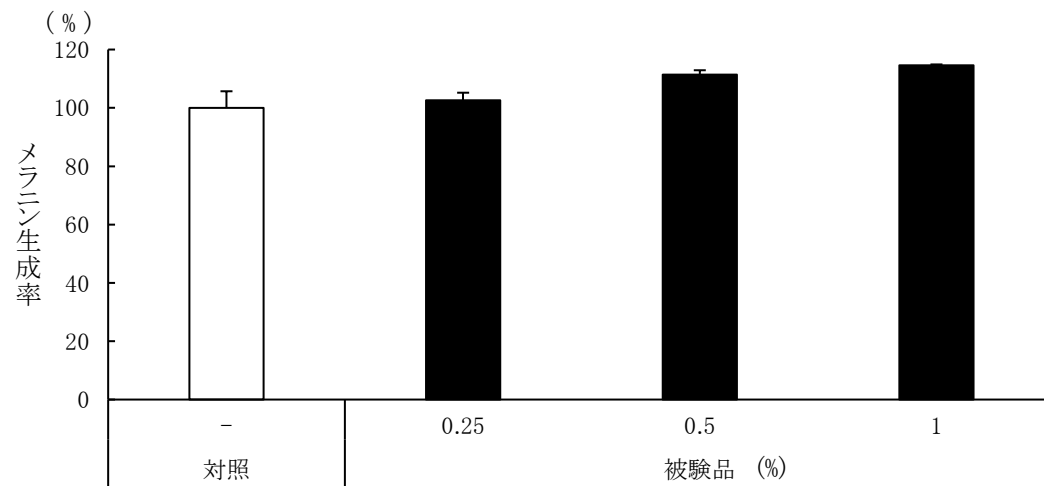


図1 被験品のメラニン生成率に与える影響

n = 3, mean ± s.d., unpaired t-test, †P < 0.1, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

s.d.: standard deviation

8 図表

表2 吸光度(OD₄₀₅)、DHICA黒化率およびDHICA黒化抑制率

	濃度 (%)	OD ₄₀₅									DHICA黒化率 (%)					DHICA黒化抑制率 (%)				
		0min			30min			30min - 0min			1	2	3	mean ± s.d.	1	2	3	mean ± s.d.	t-test	
		1	2	3	1	2	3	1	2	3										
対照	-	0.047	0.048	0.047	0.119	0.120	0.120	0.072	0.072	0.073	99.5	99.5	100.9	100.0 ± 0.8	0.5	0.5	-0.9	0.0 ± 0.8	-	
	0.1	0.048	0.048	0.049	0.129	0.130	0.129	0.081	0.082	0.080	112.0	113.4	110.6	112.0 ± 1.4	-12.0	-13.4	-10.6	-12.0 ± 1.4		
被験品	1	0.055	0.052	0.053	0.128	0.127	0.126	0.073	0.075	0.073	100.9	103.7	100.9	101.8 ± 1.6	-0.9	-3.7	-0.9	-1.8 ± 1.6		
	10	0.055	0.057	0.064	0.115	0.115	0.118	0.060	0.058	0.054	82.9	80.2	74.7	79.3 ± 4.2	17.1	19.8	25.3	20.7 ± 4.2	**	

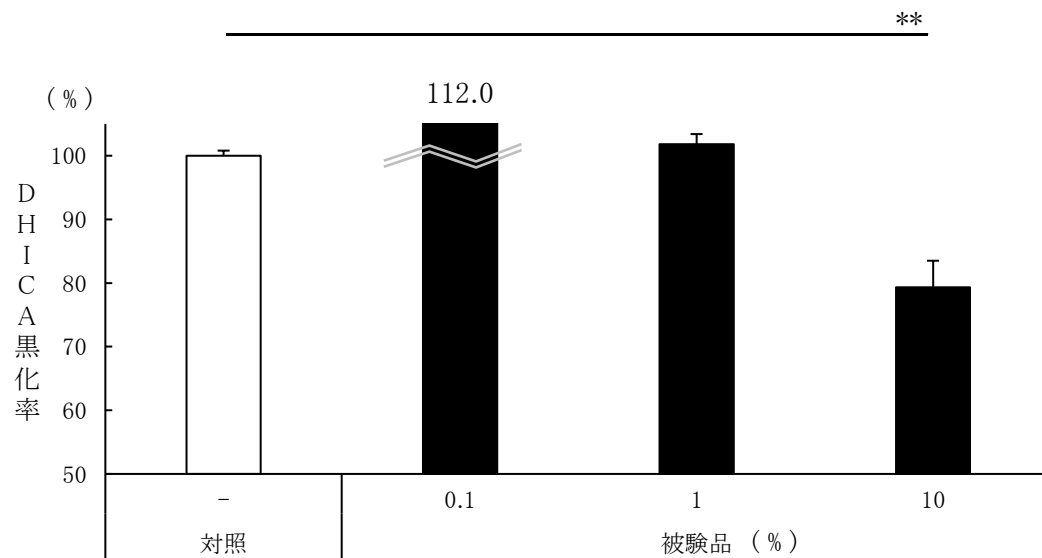


図2 被験品のDHICA黒化に与える影響

n = 3, mean ± s.d., unpaired t-test, †P < 0.1, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

s.d.: standard deviation

8 図表

表3 蛍光強度、AGEs生成率およびAGEs生成抑制率

	濃度 (%)	蛍光強度 (a.u.)									AGEs生成率 (%)					AGEs生成抑制率 (%)				
		0min			60min			60min - Ave.0min												
		1	2	3	1	2	3	2	3	1	2	3	mean ± s.d.	1	2	3	mean ± s.d.	t-test		
対照	-	10072	10159	10062	12747	12711	12697	2649	2613	2599	101.1	99.7	99.2	100.0 ± 1.0	-1.1	0.3	0.8	0.0 ± 1.0	-	
	0.1	9815	9788	9682	12112	12171	12119	2350	2409	2357	89.7	91.9	90.0	90.5 ± 1.2	10.3	8.1	10.0	9.5 ± 1.2	***	
被験品	1	9851	9944	9728	12087	12095	12235	2246	2254	2394	85.7	86.0	91.4	87.7 ± 3.2	14.3	14.0	8.6	12.3 ± 3.2	**	
	10	9843	9621	9747	11997	11799	12039	2260	2062	2302	86.3	78.7	87.9	84.3 ± 4.9	13.7	21.3	12.1	15.7 ± 4.9	**	

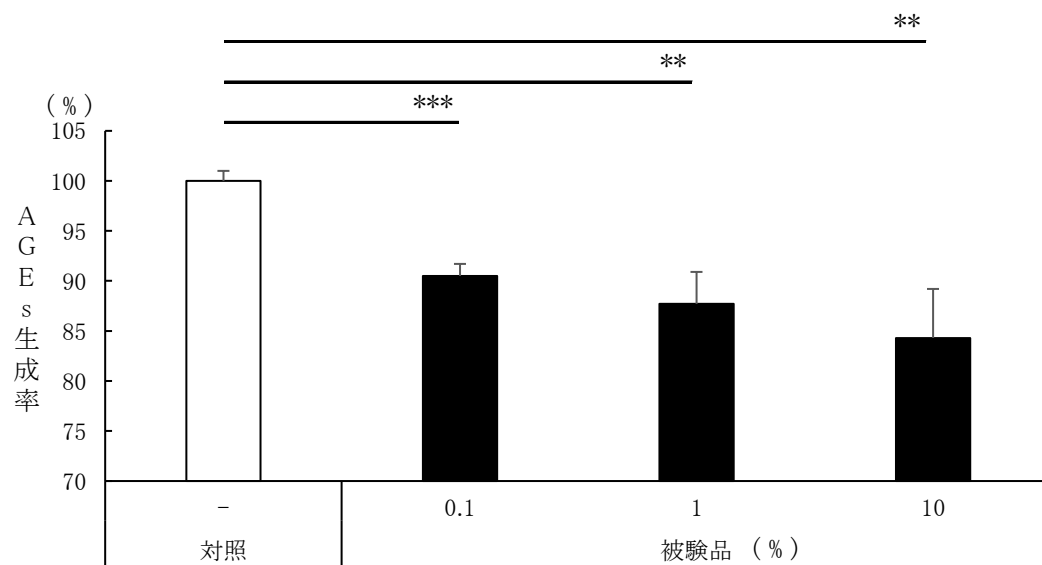


図3 被験品のAGEs生成に与える影響

n = 3, mean ± s.d., unpaired t-test, †P < 0.1, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001

a.u.: arbitrary unit, s.d.: standard deviation