

保湿性・抗菌性を有するバイオベースの新しいスキンケア素材の開発

国立研究開発法人 産業技術総合研究所 機能化学研究部門

佐藤 俊

Skin care products are now widely used not only by women but also by men of all ages. They require skin-care products with versatile effects like moisturizing, anti-aging, and antimicrobial functions. Also, due to growing consumers' demands for safer chemical materials, skin care products made from natural and/or bio-based materials are preferred. Thus, novel bio-based materials with moisturizing function and antimicrobial activity are necessary for the application to cosmetic products. In this study, characteristics of glyceric acid, which is a phytochemical and can be mass produced from glycerol by acetic acid bacterial fermentation, were investigated. It was observed that water-retention ability of glyceric acid sodium salt in agar gels were comparable to that of glycerol, which is a practical skin hydration reagent. In addition, glyceric acid sodium salt showed no effect on the recovery of sodium dodecyl sulfate-treated human skin cells by using three-dimensional cultured human skin model. It was also found that glyceric acid as well as other short chain fatty acids like acetic, propionic, and lactic acids inhibited growth of *Propionibacterium acnes*, which is one of normal skin bacteria and causes inflammatory acne by their overgrowth, on agar medium. These results suggest that glyceric acid possesses a potential in use as a cosmetic ingredient with moisturizing function and antimicrobial effect.

1. 緒言

みずみずしく健康的な美しい素肌へ導くためのスキンケア化粧品は、現在では男性向け市場の拡大もあり、ニーズの多様化に応える特徴ある製品が求められている。また、ニキビや肌荒れ等に効果のある成分を配合させることで、より高いスキンケア効果を持つ製品の開発も重要である。そのためには、スキンケア化粧品の基本機能である保湿効果に加えて、抗菌性や美白効果等、複数の機能を有する高機能素材の開発が鍵となる。

グリセリンは、高い保湿効果を有する天然素材としてスキンケア製品に広く利用されているが、ニキビの原因菌である *Propionibacterium acnes* のグリセリン資化能から、増殖を促進する効果が指摘されている¹⁾。また、酢酸やプロピオン酸等の有機酸は、一般に抗菌作用が知られているが、乳酸菌の生産する培養液中の有機酸が *P. acnes* の増殖を阻害することも報告されている²⁾。そこで、両者の効果を兼ね備えた新しい素材として、筆者はグリセリンの酸化誘導体：グリセリン酸に注目した(図1)。グリセリン酸は、植物に微量含まれる有機酸の一種で、天然由来の安全性の高い化合物と考えられる³⁾。しかし、化学触媒によるグリセリンの酸化反応では、多段階の酸化反応制御が難しく、グリセリン酸の量産技術は確立されていなかった。そ



図1 グリセリン(A)およびグリセリン酸(B)の化学構造

のため、グリセリン酸の詳細な物性評価や化粧品素材としての機能性評価は、現在でも十分に行われていない。

近年、Habeらは、食酢の醸造で用いられる酢酸菌と同種の菌株を用いたグリセリン酸の量産化技術の開発に成功した⁴⁾。この技術では、有害な金属触媒や有機溶剤を用いることなく、グリセリンを特異的にグリセリン酸へと変換することが可能である。例えば、*Gluconobacter frateurii* NBRC103465株を用いた場合、5L容ジャーファーメンターでのpH制御法による流加培養で、培養6日目に発酵液中のグリセリン酸濃度は136g/Lに達した。また、グリセリン酸には、2位の炭素に不斉が存在するが、酢酸菌株の種類を選択することで、D体をエナンチオマー過剰率99%以上で生産できるプロセスも開発されている。そのため、天然由来の化合物であり、かつ、食酢製造で利用されている酢酸菌類を用いた光学活性なバイオ生産物であるという点で、化粧品等に応用可能な新しいバイオ素材として魅力的である。

そこで本研究では、グリセリン酸に期待される保湿効果や抗菌性等の機能性を評価・検証し、新しいバイオベースのスキンケア素材の開発を行うことを目的とした。まず、グリセリン酸が保湿性および抗菌性を有するかどうかを評価するための手法を検討し、グリセリンや乳酸等、現在化粧品等に配合されている化合物と比較した。さらに、ヒト皮膚再構築モデルを用いて、脱脂処理を施した皮膚細胞に対するグリセリン酸の影響を評価した。



A novel bio-based material with moisturizing function and antimicrobial activity

Shun Sato

Research Institute for Sustainable Chemistry, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

2. 実験

2.1. 試薬

2 mol/L DL-グリセリン酸は、東京化成工業(株)製のものを用いた。ナトリウム塩への変換は、1当量の1 N水酸化ナトリウム(和光純薬工業製)を添加して中和し、pH試験紙を用いて溶液のpHが約8付近であることを確認した。加えた水酸化ナトリウム水溶液の量から、グリセリン酸ナトリウム水溶液の濃度を算出した。プロピオン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、50%乳酸ナトリウム、グリセリン、寒天、およびドデシル硫酸ナトリウム(SDS)は、和光純薬工業製のものを用いた。大腸菌の培養には、LB培地(Difco)を、*Propionibacterium acnes*の培養には、GAMブイヨン「ニッスイ」(日本製薬株式会社製)を用いた。固体培地の作製には、寒天(和光純薬工業製)を1.5 wt%となるように加えた。試薬の溶解および培地の調製には、1次イオン交換水を用いた。液体および固体培地の滅菌は、オートクレーブ(121℃、20分)を用い、培地に添加する試薬類の滅菌は、0.2 μmポアサイズのフィルターを用いて滅菌したものを使用した。生細胞数測定にはCell Count Reagents SF(ナカライテスク社製)を用いた。

2.2. 寒天ゲルを用いた水分保持能の評価

グリセリン酸の保湿性評価として、試験薬を含有する寒天ゲルの重量変化から、重量減少率を指標に評価した。直径3 cmのガラスシャーレに、加熱溶解させた1 wt%の寒天水溶液を2 mLと、等量の試験薬水溶液を80℃に加熱したホットプレート上で混合し、室温で冷却した。ゲル化した寒天の重量を測定し、濃硫酸100 mLを入れて調湿した3 L容のガラスデシケーターに寒天シャーレを静置した。デシケーターを25℃の恒温槽に入れて24時間経過後、寒天の重量差から、下記の式(1)に従い、添加した試験薬の水分保持能を評価した。

$$\text{Weight loss (\%)} = [(W_{t=24} - W_{t=0}) / W_{t=0}] \times 100 \quad (1)$$

ここで、 $W_{t=0}$ は、寒天ゲルの初期重量、 $W_{t=24}$ は、デシケーター内で24時間静置後の寒天ゲルの重量である。

2.3. ヒト皮膚再構築モデルを用いたグリセリン酸の皮膚細胞への影響評価

グリセリン酸の水分保持能評価の一つとして、脱脂された肌における皮膚細胞に対する影響を、ヒト皮膚再構築モデルを用いて評価した。三次元培養皮膚モデルLSE-high(東洋紡)の組織頂上部表面を、森田らの方法に従い、1 wt% SDS水溶液で脱脂した⁵⁾。SDSを表面から除去洗浄したのち、1 wt% グリセリン酸ナトリウム水溶液を塗布

し、キット添付のLSEアッセイ培地で37℃、5% CO₂下で24時間培養した。その後、Cell Count Reagents SFを培地の1/10量添加して、37℃で4時間インキュベートした。培地中に生成したホルマザン色素生成量は、450 nmの吸光度測定により評価した。生細胞数の評価は、SDS処理していない条件を対照とし、コントロールを100%とする相対値で示した。また、SDS処理後に水のみを塗布した条件も並行して行った。

2.4. 細菌株および培養条件

大腸菌DH5α株(タカラバイオ株式会社)は、グリセロールストック溶液から1白菌耳LB寒天培地に植菌し、37℃で一晩培養し、コロニーを形成させた。1コロニーをLB液体培地5 mLを含む試験管に植菌し、37℃、200 strokes/minで振とう培養した。*P. acnes* NBRC107605株は、30%スキムミルクで懸濁した培養液の-80℃ストック溶液から、GAMブイヨン「ニッスイ」固体培地上に植菌し、嫌気培養用アクロネパックおよびアクロネバックジャー(三菱ガス化学)を用いて37℃で培養した。固体培地上に形成されたコロニーは、継代培養および液体培養で用いた。液体培養は、10 mLのニッスイ培地を含む試験管に1コロニーを植菌し、嫌気ジャー中で静置して37℃で培養した。培養経過後2-3日で、試験管の底部に増殖した菌が沈降していることが観察された後、ピペッティングにより沈殿している菌を分散させた培養液100 μLをGAMブイヨン「ニッスイ」固体培地上に播種し、37℃、嫌気ジャー内で培養した。

2.5. 細菌に対する増殖阻害効果の評価

グリセリン酸の抗菌性の評価方法として、大腸菌および*P. acnes*の増殖阻害効果を、固体培地上に播種した細菌の増殖阻害によりグリセリン酸を染み込ませたる紙ディスク周縁にできるハローで評価した。固体培地上に培養液100 μLを塗り広げ、表面を乾燥させた後、滅菌した桐山ロート用ろ紙ディスク(φ=8 mm)に10 μLの試験薬を滴下し、所定の温度で1-7日培養した。培養後、ディスク周縁にできたハローの大きさを観察し、コントロールとして用いた滅菌水の場合と比較した。

3. 結果

3.1. グリセリン酸の水分保持能評価

グリセリン酸がグリセリン様の保湿性能を有するかどうかを検証するため、0.5 wt%の寒天ゲルから蒸散する水分量を抑制する能力での評価を試みた。図2には、寒天のみ、グリセリン、グリセリン酸ナトリウム、および乳酸を10 wt%添加して作製したゲルの24時間に損失した重量減少量を、初期重量に対して%で表示したものである。寒天

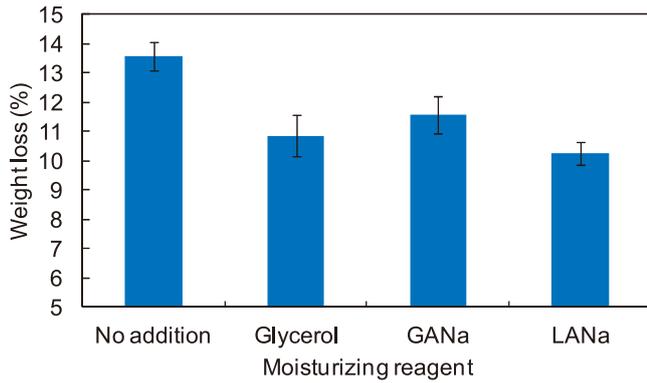


図2 保湿剤を含有する0.5 wt%寒天ゲルの重量減少量の評価。調湿したデシケーター内、24時間、25°Cで静置した寒天ゲルの重量減少を、初期重量に対して相対的に示した。デシケーター内の相対湿度は、 $57 \pm 3\%$ 。データは、3回の平均および標準偏差を示した。No addition、無添加（コントロール）；GANa、グリセリン酸ナトリウム；LANa、乳酸ナトリウム。

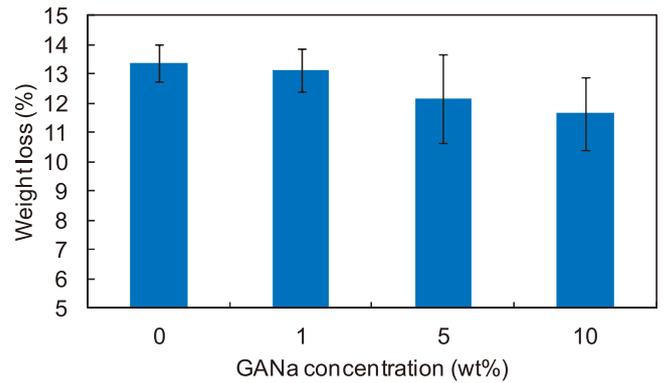


図3 グリセリン酸ナトリウムを含有する0.5 wt%寒天ゲルの重量減少量の評価。調湿したデシケーター内、24時間、25°Cで静置した寒天ゲルの重量減少を、初期重量に対して相対的に示した。デシケーター内の相対湿度は、 $51 \pm 3\%$ 。データは、3回の平均および標準偏差を示した。GANa、グリセリン酸ナトリウム。

のみの場合、ゲル重量に対して13.6 wt%の水分が24時間で損失されているのに対し、10 wt%のグリセリンを添加した場合は、損失量が約2.7 wt%減少することが分かった。添加しているグリセリンが10 wt%であることから、減少した水分量の約1割は、添加したグリセリンによって初期の寒天ゲル中の水が減少した分として考慮することができる。そのため、約1.3%程度の水分が、グリセリン添加によってゲル中に保持されたことが示唆された。この条件において、同様にグリセリン酸ナトリウムでの試験を行った。グリセリン酸を10 wt%添加したゲルでは、グリセリンと同様に損失した水分量が2 wt%、無添加の場合に比べて減少していた。また、乳酸を同濃度で添加した場合、最も重量減少が抑制され、無添加に比べて水分の減少量が3.3 wt%低下した。

一方で、水分保持効果におけるグリセリン酸ナトリウムの濃度の効果を検討した(図3)。グリセリン酸ナトリウムの濃度の増加に伴い、水分の減少量が低下している傾向が見られ、5 wt%のグリセリン酸ナトリウムを添加した場合は、無添加と比べて2.2 wt%、10 wt%添加では2.7 wt%、水分の減少が抑制された。一方で、同じ炭素数3の脂肪酸であるプロピオン酸ナトリウムを同濃度で添加した場合、添加することで1 wt%程度の水分減少量の抑制が見られたものの、その効果に濃度依存性は見られなかった(data not shown)。

3.2. 肌荒れ状態の皮膚細胞に対するグリセリン酸の影響評価

上記3.1より、グリセリン酸ナトリウムが水分保持能を有していることが示唆された。そこで、グリセリン酸の保湿能をさらに評価するため、ヒトの皮膚構成を再構築した三次元皮膚培養モデルを用いて、脱脂された状態の皮膚に

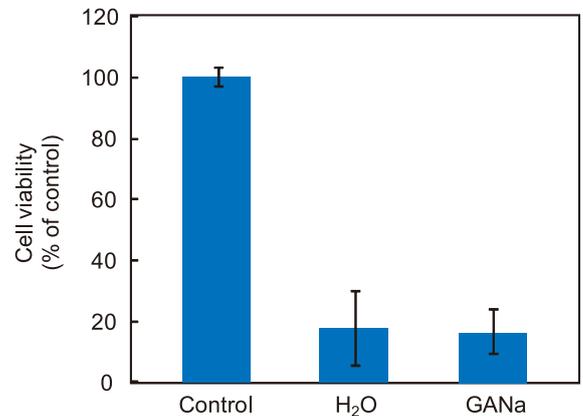


図4 三次元皮膚培養モデルを用いたグリセリン酸の保水性能の評価。ドデシル硫酸ナトリウム処理したヒト皮膚モデルに1 wt%グリセリン酸ナトリウム水溶液を塗布し、24時間後の生細胞数をCell Count Reagent SFを用いて評価した。ドデシル硫酸ナトリウム処理していない条件(Control)を100%として相対的に示した。データは、3検体の平均および標準偏差を示した。H₂O、水のみ；GANa、1 wt%グリセリン酸ナトリウム水溶液。

におけるグリセリン酸が皮膚細胞に与える影響を24時間後の生細胞数により評価した。森田らの方法を参考に、SDS処理した三次元培養細胞モデルの頂上部表面に1 wt%グリセリン酸ナトリウム水溶液を塗布して培養した。その結果、SDS処理をしていない条件に比べて、生細胞数は80%以上減少していることが示唆された(図4)。しかし、SDS処理後に水のみを塗布したものと比較しても生細胞数の違いは見られなかったことから、グリセリン酸には脱脂処理された細胞に対する賦活性は見られないと考えられた。

3.3. グリセリン酸の抗菌活性評価

グリセリン酸による微生物の増殖阻害効果を評価するた

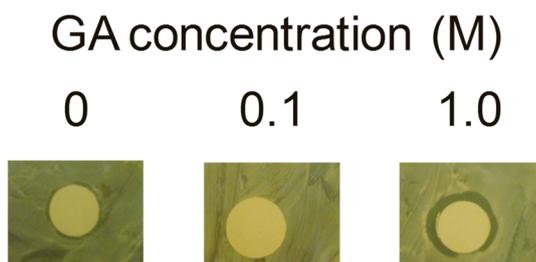


図5 *P. acnes* の増殖に対するグリセリン酸の効果。グリセリン酸を含むディスク周囲にできるハローの存在で、増殖抑制の効果を評価した。*P. acnes* は GAM 寒天培地上で嫌気ジャー内、37°C、3日間培養した。GA、グリセリン酸。

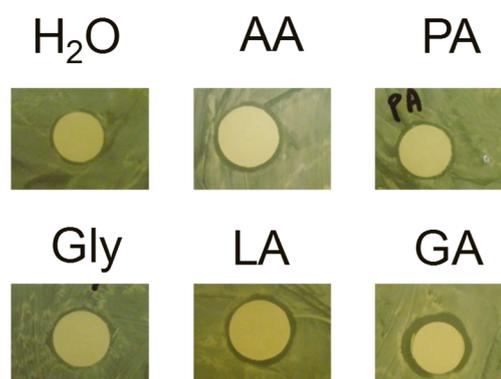


図6 *P. acnes* の増殖に対する有機酸類の効果。1 Mの各試験薬を含むディスク周囲にできるハローの存在で、増殖抑制の効果を評価した。*P. acnes* は GAM 寒天培地上で嫌気ジャー内、30°C、3日間培養した。AA、酢酸；PA、プロピオン酸；Gly、グリセリン；LA、乳酸；GA、グリセリン酸。

め、初めに、大腸菌K株由来であるDH5α株および短鎖の有機酸を用いて、薬剤ディスク周囲にできるハローでの評価を検討した。LB寒天培地上に一晩振とう培養して増殖した菌液を播き、その上に各試験薬を染み込ませたディスクを置き、培養経過に伴う菌の増殖を観察した。その結果、水および何も染み込ませなかったディスクには、ディスクの周囲まで菌が増殖していたが、酢酸やプロピオン酸など、増殖阻害効果が知られている有機酸類では、ディスク周囲に菌が増殖していないハローが見られた(data not shown)。そこで、この手法を用いて*P. acnes* に対するグリセリン酸の増殖阻害効果の評価を試みた。*P. acnes*が増殖した培養液100μLを播種したGAM寒天培地上に、グリセリン酸を所定濃度染み込ませたディスクを静置し、37°Cで培養した。培養3日後では、プレート全面に*P. acnes*の増殖が認められ、コントロールとした滅菌水を染み込ませたディスクの縁まで菌の増殖が認められた(図5)。一方で、グリセリン酸濃度0.1Mのディスクでは、コントロールの場合と同様に菌が増殖していたが、1.0Mのディスク周辺には、菌が増殖していない領域が1-2mm認められた。また、この領域は、7日間培養した後でもはっきり残っており、周囲に増殖した*P. acnes*の炭素源として消費される等により、グリセリン酸濃度が低下せず、増殖阻害効果を維持していることが示唆された。

また、グリセリン酸と同じ濃度において、短鎖有機酸類およびグリセリンを用いて比較実験を行った。図6に示すように、グリセリン酸を含む有機酸類(酢酸、プロピオン酸、および乳酸)では、ディスクの周辺に*P. acnes*が増殖していない領域が数mm観測された。一方、グリセリンを染み込ませたディスクの周囲には同様のクリアな領域が観察されず、コントロールとした滅菌水のディスクと同様に*P. acnes*が周囲まで増殖していた。また、類似の構造の有機酸類の場合でもハローが認められ、*P. acnes*の増殖を阻害することが分かった。一方、グリセリン酸のナトリウム塩では、同濃度での試験において、*P. acnes*の増殖阻害は

見られなかった。

4. 考察

グリセリン酸は、グリセリンの片末端のヒドロキシ基が酸化された化合物である(図1)。そのため、グリセリンに見られるポリオールとしての性質、および、カルボン酸に由来する有機酸としての性質の両方が期待される化合物である。グリセリンは、古くから保湿剤として化粧品等で利用されており、一方で、有機酸は、微生物の増殖を阻害する効果から食品等でその効果を発揮している。そのため、本研究では、グリセリン酸に関する双方の機能について検証した。

保湿剤としての性能は、寒天ゲルに保持されている水分量を比較することで、水分保持能として評価した。その結果、グリセリン酸は、グリセリンや乳酸など化粧品等で保湿剤として用いられている低分子の糖アルコールやヒドロキシ酸と同様に、水分保持能を有していることが明らかになった。また、プロピオン酸の比較実験から、水分保持効果においては、ヒドロキシ基の存在が重要であることが分かった。さらに、ヒト皮膚の再構築モデルを用いて、界面活性剤処理により脱脂した皮膚の細胞に対する影響を評価した結果からは、試験した条件下での細胞賦活性は見られず、グリセリン酸に期待される保湿能は検証できなかった。

一方、微生物の増殖阻害効果は、ニキビの原因菌である*P. acnes*を用いて、その効果を検証した。グリセリン酸は、対照として用いた短鎖の有機酸類と同様に、*P. acnes*の増殖を阻害できることが分かった。また、この効果は同濃度のグリセリンには見られず、グリセリンとは異なる性質を有していることが確認された。また、ナトリウム塩では同

様の増殖阻害が見られなかったことから、グリセリン酸は培地中のpHを低下させることで、抗菌性を発揮しているものと推測された。

以上から、グリセリン酸は、保湿性と有機酸に認められる抗菌性を兼ね備えたバイオベース素材であることが明らかになった。今後は、グリセリン酸の保湿性および抗菌性の定量的な評価によって、スキンケアに有効なバイオベース素材であることを実証するとともに、種々の皮膚細胞に対する賦活性等、新たな機能が見いだされることによって、多機能なスキンケア素材としてのグリセリン酸の応用展開が期待される。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、公益財団法人コスメトロジー研究振興財団によりご援助いただきましたことに深謝いたします。

(参考文献)

- 1) Gribbon EM, Cunliffe WJ, Holland KT.: Interaction of *Propionibacterium acnes* with skin lipids in vitro, J. Gen. Microbiol., 139, 1745-1751, 1993.
- 2) Kang MS, Oh JS, Lee SW, Lim HS, Choi NK, Kim SM.: Effect of *Lactobacillus reuteri* on the proliferation of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis*, J. Microbiol., 50, 137-142, 2012.
- 3) Habe H, Fukuoka T, Kitamoto D, Sakaki K.: Biotechnological production of D-glyceric acid and its application, Appl. Microbiol. Biotechnol., 84, 445-452, 2009.
- 4) Habe H, Shimada Y, Yakushi T, Hattori H, Ano Y, Fukuoka T, Kitamoto D, Itagaki M, Watanabe K, Yanagishita H, Matsushita K, Sakaki K.: Microbial production of glyceric acid, an organic acid that can be mass produced from glycerol, Appl. Environ. Microbiol., 75, 7760-7766, 2009.
- 5) Morita T, Kitagawa M, Suzuki M, Yamamoto S, Sogabe A, Yanagidani S, Imura T, Fukuoka T, Kitamoto D.: A yeast glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, shows potential moisturizing activity toward cultured human skin cells: the recovery effect of MEL-A on the SDS-damaged human skin cells, J. Oleo Sci., 58, 639-642, 2009.