

東京工科大学
博士学位論文

紫外線吸収剤の皮膚に対する傷害性を
抑えた日焼け止め化粧料の開発

2021 年 9 月

山口 和弘

目次

第1章 皮膚および日焼け止めによる紫外線からの皮膚保護の知見.....	6
1-1 はじめに	6
1-2 皮膚	7
1-2-1 皮膚の全体像.....	7
1-2-2 皮膚の表面形状	9
1-2-3 紫外線 (UV) とは	9
1-2-4 紫外線の皮膚内部への侵入度.....	10
1-2-5 紫外線曝露による急性反応	11
1-3 紫外線曝露に対する皮膚細胞の変化.....	15
1-3-1 紫外線による DNA 損傷と皮膚癌発症	15
1-3-2 ROS の種類.....	16
1-3-3 皮膚内における ROS の生成.....	16
1-3-4 角層表面における ROS の生成.....	18
1-4 日焼け止め化粧品	18
1-4-1 日焼け止め化粧品の光老化抑制効果	18
1-4-2 日焼け止め化粧品の構成	19
1-4-3 紫外線吸収剤のメリットとデメリット	20
1-4-4 紫外線散乱剤のメリットとデメリット	22
1-4-5 日焼け止め化粧品に配合されている紫外線吸収剤の現状	22
1-4-6 日焼け止め化粧品の紫外線防御能評価.....	25
1-5 日焼け止め化粧品の課題.....	28
1-5-1 紫外線吸収剤による皮膚傷害懸念.....	28
1-5-2 紫外線吸収剤の光劣化による紫外線吸光能低下	31
1-5-3 塗布膜不均一性による紫外線吸光能低下	35
1-6 本研究の目的	39

第2章 UVB 吸収剤 BP3 は UVA 吸収剤 BMDM のスーパーオキシドアニオンラジカルを抑制する.....	41
2-1 緒言	41
2-2 実験.....	44
2-2-1 試薬	44
2-2-2 UVA および UVB 吸収剤の光劣化	44
2-2-3 細胞培養	46
2-2-4 紫外線吸収剤の光毒性	46
2-2-5 ESR (電子スピン共鳴) スピントラッピング方法により評価した紫外線照射時の紫外線吸収剤から生成するラジカルの定量.....	47
2-2-6 統計解析	48
2-3 結果.....	49
2-3-1 紫外線吸収剤の吸光度の光劣化	49
2-3-2 BP3 の BMDM 光劣化抑制作用機序の解明.....	51
2-3-3 照射紫外線吸収剤から生成するラジカル種の同定.....	53
2-3-4 紫外線吸収剤の光毒性	57
2-4 考察	58
2-5 結論.....	62
第3章 オルガノクレイの配合は疑似皮膚プレート上に塗布した日焼け止め化粧料の紫外線吸光能を高める.....	63
3-1 緒言	63
3-2 実験方法	66
3-2-1 試薬	66
3-2-2 油相および日焼け止め化粧料試料.....	66
3-2-3 増粘剤を含む油相の粘度測定.....	68
3-2-4 化粧料塗布膜の吸光度の測定.....	69
3-2-5 蛍光輝度による SMS 上の日焼け止め化粧料塗布膜厚の均一性の比較 ..	70
3-2-6 共焦点レーザー顕微鏡による日焼け止め化粧料膜厚の測定	70
3-2-7 統計解析	71

3-3 結果.....	72
3-3-1 増粘剤を含む油相の粘度測定.....	72
3-3-2 増粘剤の種類の違いによる吸光度測定.....	74
3-3-3 蛍光輝度による SMS 上の丘領域と溝領域における膜厚均一性.....	76
3-3-4 共焦点レーザー顕微鏡による日焼け止め化粧品塗布膜の断面プロファイル、膜厚および紫外線吸光度.....	77
3-3-5 増粘剤の有無、塗布量や濃度の違いによる日焼け止め化粧品塗布膜吸光度の比較.....	80
3-4 考察.....	82
3-5 結論.....	87
第 4 章 総括.....	88
参考文献.....	92

略語一覽

AGEs: advanced glycation end products

ATP: adenosine triphosphate

BMDM: butyl methoxydibenzoylmethane ;

4-*tert*-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane

BP3: oxybenzone; 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone

Cyr61: cysteine-rich angiogenic inducer 61

COX: cyclooxygenase

DHNB: diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate ;

hexyl 2-(diethylamino)-2-hydroxybenzoylbenzoate

DMSO: dimethyl sulfoxide

DNA: deoxyribonucleic acid

DT: delayed tanning

ESR: electron spin resonance

ET-1: endothelin-1

EtOH: ethanol

FDA: food and drug administration

INCI: international nomenclature for cosmetic ingredients

ISO: international organization for standardization

MMP: matrix metalloprotease

NMF: natural moisturizing factor

NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

$^1\text{O}_2$: singlet oxygen

$^3\text{O}_2$: triplet oxygen

$\cdot\text{OH}$: hydroxyl radical

OCR: octocrylene ; 2-ethylhexyl 2-cyano-3,3-diphenylacrylate

OMC: octyl methoxycinnamate ; 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate

PEG: polyethylene glycol

PGE₂: prostaglandin E₂

ROS: reactive oxygen species
PAR-2: protease activated receptor-2
PMMA : poly methyl methacrylate
PPD: persistent pigment darkening
SC: stratum corneum
SCF: stem cell factor
SMS: skin-mimicking substrate
SPF: sun protection factor
SOD: superoxide dismutase
TNF- α : tumor necrosis factor- α

第1章 皮膚および日焼け止めによる紫外線からの皮膚保護の知見

1-1 はじめに

日焼け止め化粧品は皮膚の老化に関わることが広く認知されたため、紫外線の皮膚への曝露を防ぐという意識の高まり、より多くの人々が日焼け止め化粧品を日常的に使うようになった。日差しの強い季節には SPF50+が表示された高 SPF 値を有する日焼け止め化粧品を毎日使用する人も増えている。一方で、日焼け止め化粧品塗布時に紫外線曝露により生じる光毒性・光感作性のような皮膚傷害が一部の使用者に発生することが知られている。それは、主に日焼け止め化粧品に高濃度で配合される紫外線吸収剤が原因であると考えられている。

このことから日焼け止め化粧品中の紫外線吸収剤の配合濃度を下げることができれば、皮膚傷害リスクを低減させることができる可能性が高いと考えられる。しかし、単に紫外線吸収剤濃度を下げるとは紫外線防御能の低下を意味し、消費者の紫外線を防御したいというニーズを満たせない。この相反する 2 つの要素である「皮膚障害リスクを低減させること」と「紫外線防御能の維持あるいは向上」の両立は日焼け止め化粧品を開発する上での重要な問題である。

現在の日焼け止め化粧品が抱える以下の 2 つの技術課題の解決が、この問題解消につながると考えられた。

- ・日光の曝露中に、配合紫外線吸収剤の吸収効果が低下する「光劣化」と呼ばれる課題

- ・皮膚に塗布する際に日焼け止め化粧品の塗布膜厚が不均一となることによる紫外線吸収剤本来の防御能を十分発揮できていない課題。

日焼け止め化粧品の処方最適化によりこれらの課題を解決しようと、本研究では紫外線吸収剤自体の適切な組み合わせの評価、および、化粧品塗布時の日焼け止め化粧品塗布膜の不均一性を改善する基剤特性の探索を行った。

1-2 皮膚

1-2-1 皮膚の全体像

皮膚は生体と外部環境との境界に位置し、さまざまな外因性刺激から生体を保護する機能（バリア機能）を発揮することにより生体の恒常性維持を担う重要な器官である。皮膚は、最外層より角層、顆粒層、有棘層、基底層からなる表皮、さらに基底膜を境界として、真皮、皮下組織からなる層状の構造を有する（Fig. 1-1）。表皮は、基底膜上の基底細胞の分裂によって生じた娘細胞が分化（角化）することにより形成される。表皮細胞（ケラチノサイト）はこの分化の過程においてバリア機能を獲得し、最終的には死細胞である角層細胞となって、厚さ 10～20 μm の最外層である角層を形成する。角層では、角層細胞、セラミドやコレステロール、および遊離脂肪酸からなる角層細胞間脂質のラメラ構造体や、NMF が皮膚の水分保持に重要な役割を果たしている [1, 2]。表皮全体の厚さは部位によって違いはあるが 100～300 μm 程度である。真皮は皮膚の大部分を占め、細胞成分（線維芽細胞、肥満細胞）とそれによって産生されたコラーゲン線維、エラスチン線維等の線維成分と細胞間物質（ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸等をからなるプロテオグリカン）によって構成されている。

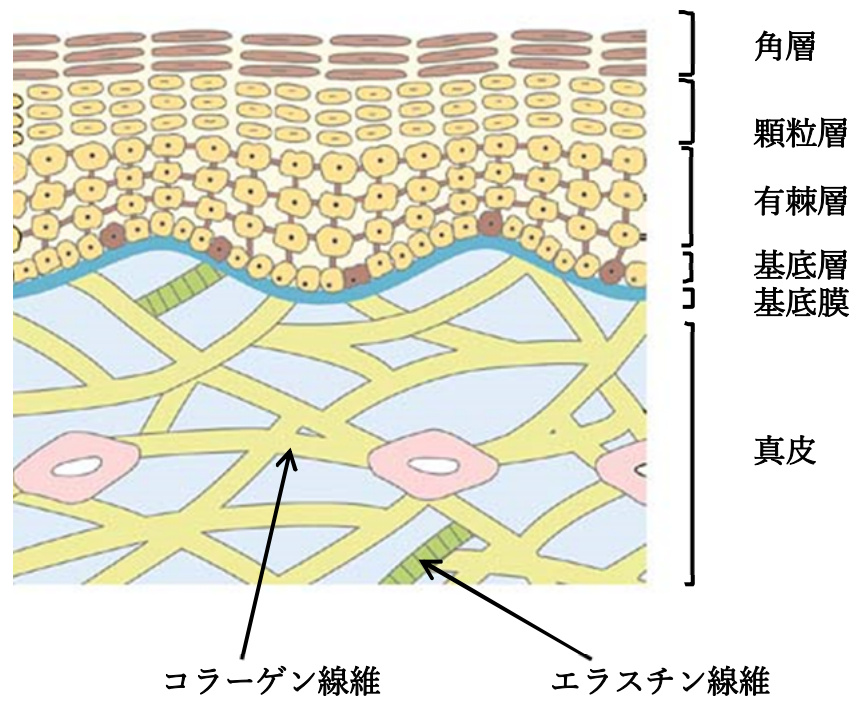


Fig. 1-1 Skin structure

1-2-2 皮膚の表面形状

皮膚の表面には毛穴および汗孔があり、毛穴の凹みを中心に放射状に延びる溝により形成される肌理（キメ）とよばれる凹凸が存在する。

肌理の状態は、肌の審美的印象に影響を及ぼす。一般的に肌理が規則正しい皮膚表面であることが「美しい肌である」と評価される傾向にある。肌理の凸部は皮丘（crista cutis）と呼ばれ、凹部は皮溝（sulcus cutis）と呼ばれる（Fig. 1-2）。肌理は、全身の皮膚表面に存在し、部位によって差はあるが、三角形の皮丘を形成する規則正しい凹凸の繰り返しとなっている。この凹凸の深さや幅、皮溝の密度は個人や部位によって差があり、年齢や外部の環境因子によっても変わる[3-5]。ヒトの背中における皮溝の計測例として、溝の深さ 50~100 μm 、溝の幅約 100 μm 、皮溝は 1 mm の幅のうちに 1~2 本存在することが報告されている[6]。

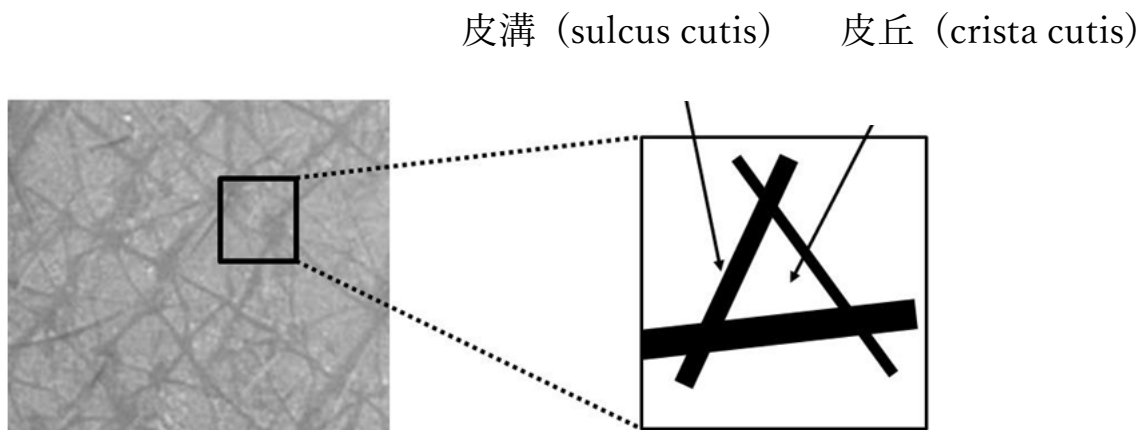


Fig. 1-2 A representative image of the skin surface and its "kime"

1-2-3 紫外線（UV）とは

地上に降り注ぐ太陽光線は紫外線（UV: ultraviolet）、可視光線（visible light）、赤外線（IR: infrared light）の3つに分かれる。その内、紫外線は可視光より短い波長の電磁波の総称であり、皮膚への影響の違いから皮膚科学の分野では、200 nm~280 nm の短波長領域の紫外線を UVC、280 nm~320 nm の中波長領域の紫外線を UVB、320 nm~400 nm の長波長領域の紫外線を UVA と呼んで

いる。290 nm よりも短い波長は大気圏のオゾン層に吸収されて地上まで届かないため、地上で人間が浴びる紫外線は UVB の一部と UVA であり、波長 290 nm ~400 nm である。地表に降り注ぐ太陽光線中の各領域の光線の割合は、UVB は 0.2%、UVA は 5.8%、可視光線は 52%、赤外線は 42% を占める [7, 8]。

1-2-4 紫外線の皮膚内部への侵入度

紫外線は皮膚の内部まで到達するが、波長の違いによって光の拡散率が違うことから、UVA と UVB では皮膚内部への侵入度が異なる。波長の短い UVB は皮膚の深度 100 μm まで 2~8% 程度の透過であり、ほぼ表皮までしか到達しない。一方、UVA は皮膚の深度 100 μm まで 50~60%、500 μm で 7%、1000 μm では 0.5% と低下しながらも真皮にまで到達する (Fig. 1-3) [9, 10]。そのため UVA の長時間かつ慢性的な曝露は皮膚内部の線維芽細胞に多大な影響を及ぼすことが知られている。

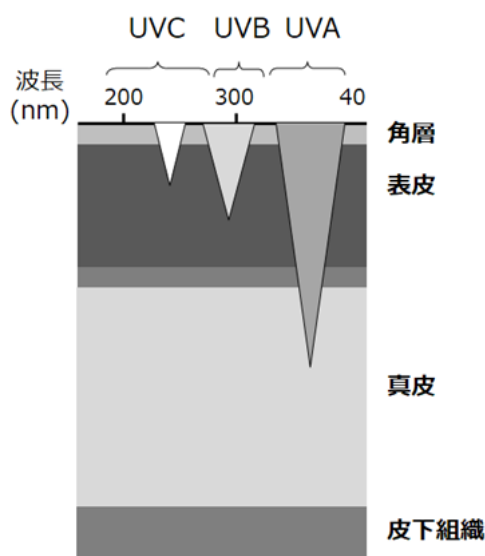


Fig. 1-3 Wavelength dependent permeation of sun light into the skin

1-2-5 紫外線曝露による急性反応

日光曝露による急性反応の最も典型的な反応は皮膚が炎症を起こして赤くなる紅斑反応であり、サンバーンと呼ばれる。この紅斑消褪後には、皮膚が黒くなる遅延型黒化 (DT: delayed tanning) を生じ、サントーンと呼ばれる。「日焼け」は一般に太陽光を浴びた後に起き、このような急性皮膚反応である紅斑反応と黒化反応のことを言う。

各波長の紅斑反応への寄与を表したものが紅斑作用スペクトル (erythema action spectrum) である (Fig. 1-4) [11, 12]。太陽光線の放射スペクトルから紅斑効果曲線 (effective spectrum) が得られる。このように、300 nm~320 nm の中波長領域の UVB が紅斑に強く影響を及ぼすことが示されている。

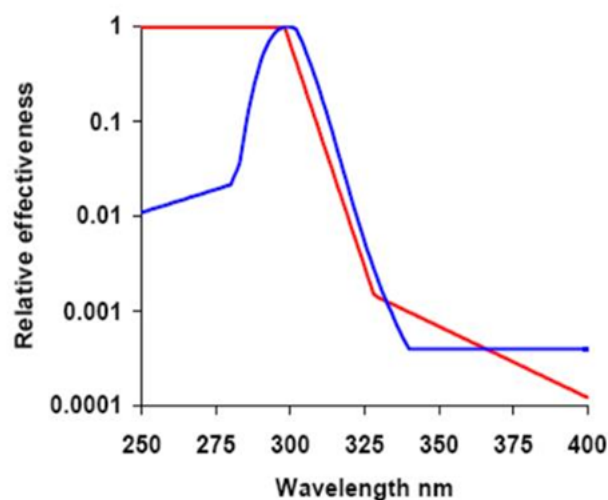


Fig. 1-4 The CIE (1987) reference action spectrum for erythema in human skin (red) and the estimated CIE (2000) action spectrum for human squamous cell carcinoma (blue) based on mouse studies
SCCP "Opinion on Biological effects of ultraviolet radiation relevant to health with particular reference to sunbeds for cosmetic purposes (2006)"より転載

さらに黒化反応には UVA および低波長可視光線曝露による生じる即時黒化 (IPD: immediate pigment darkening) があり、曝露エネルギーが大きい場合には、即時黒化が持続する持続型即時黒化 (PPD: persistent immediate pigment darkening) が生じる。また、紫外線に対する皮膚の反応には個人差があるが、

反応性を表す目安として紅斑反応と黒化反応からタイプ分けした Fitzpatrick のスキントイプの定義がある (Table 1-1) [13]。

Table. 1-1 The Fitzpatrick skin types [13]

スキントイプ	紫外線に対する反応性
I	非常に赤くなりやすいが、決して黒くならない
II	容易に赤くなり、わずかに黒くなる
III	赤くなった後、いつも黒くなる
IV	あまり赤くならず、すぐ黒くなる
V	滅多に赤くならないが、非常に黒くなる
VI	決して赤くならず、非常に黒くなる

アジア人の多くはスキントイプ II～III であり、15～20 分間程度の日光曝露により紅斑反応が顕著になる。紅斑反応は PGE₂ の合成に参与する COX の阻害剤によって抑制されること、RNS (reactive nitrogen species) の一種である NO[•] の合成阻害剤 NG-monomethyl-L-arginine によっても抑制されることから PGE₂ と RNS によって引き起こされると考えられている [14]。

UVA 照射によって皮膚に惹起される IPD [14] は、UVA と可視光線の照射で、照射直後に出現する茶灰色の皮膚色変化である。これは夏季など炎天下で活動しているとほとんど人の皮膚で起こるが、曝露部すべてが薄く黒化して、なおかつ屋内に入るなど太陽紫外線にさらされなくなると、急速に消えて薄くなるため気がつかない場合が多い。しかし、UVA の曝露エネルギーが強くなると茶色い変化となり、もとの皮膚色に戻ることなく持続した黒化となる。この皮膚応答が PPD である。これは 2004 年に表皮中一部のメラニンの前駆体に起きる UVA による重合反応が原因であると報告された [15]。

DT は、最も一般的に認識されている紫外線色素沈着と呼ばれている黒化であり、メラノサイトで過剰に合成されるメラニンにより出現する。

色素沈着は、メラノサイト内のメラニンが蓄積したメラノソームが、メラノサイトの樹枝状突起の先端から周辺の表皮細胞へ移送されることにより肉眼的に確認できるようになる (Fig. 1-5)。UVB 照射は、メラノサイトのチロシナーゼ活性が高まり、メラノソームの数の増加に伴うメラニンの過剰な合成を引き起こす。さらに、メラノソームの表皮細胞への移送に関与している PAR-2 の発現を亢進させ、メラノソームの表皮内への拡散を高める [16]。表皮細胞に移送されたメラノソームは核が帽子をかぶったように核上部に配置される。このことによりメラニンが紫外線を吸収し、核 DNA を紫外線から保護している。よって、この皮膚黒化反応は生体防御反応であると考えられている。DT は UVB 曝露量によってその色素沈着が数カ月以上も続く場合がある。しかし、皮膚のターンオーバーとともにメラニンは排出されて減少するため、皮膚色の黒化は時間とともに回復する可逆的な変化である。

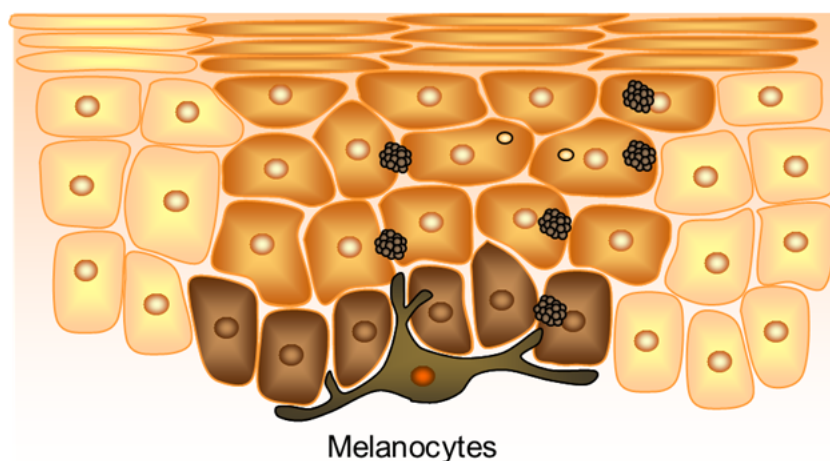


Fig. 1-5 The process of skin pigmentation

紫外線の慢性的な曝露は、皮膚の色調の変化（老人性色素斑、光線性花卉状色素斑）、しわやたるみといった形態変化（弾力性の変化：項部菱形皮膚）、悪性皮膚癌（日光角化症、基底細胞癌、有棘細胞癌、メラノーマ）などの発症を引き起こし、これら皮膚変化は不可逆的な変化である。さらに、日光曝露部位におけ

る色調変化および形態変化は、加齢とともに生じるこれらの皮膚変化を加速することが知られている。よって、加齢による色調変化および形態変化は自然の老化 (chronological aging) と定義され、一方で日光曝露部位における加速された色調変化および形態変化は光老化 (photoaging) と呼ばれている [17]。

色調変化の典型例は、老人性色素斑の高頻度での出現である。老人性色素斑は、主として顔面、手背、前腕伸側などに現れる大小の褐色色素斑である。組織学的には老人性色素斑の部分は正常皮膚に比較して、表皮肥厚および表皮突起の伸長が観察され、さらにメラノサイトおよびメラノソームの数が増加している。老人性色素斑部位では、チロシナーゼ陽性のメラノサイトの増加、ET-1 の高い分泌と TNF- α の分泌を示す表皮細胞が観察されている [18]。これらのことから、ET-1 がメラノサイトの増殖とメラニン合成刺激シグナルの増加に関与しているとされている [19-21]。

一方、シワやたるみなどの形態変化は、主に皮膚構造の支持体としての役割を担う真皮マトリックス構造の変化によるものと考えられている [22]。シワやたるみの部位では、真皮の大部分を占めるコラーゲン線維の減少と、その線維構造の崩壊が観察され [23, 24]、基底膜に対して垂直に伸びた弾性線維の細線維であるオキシタラン線維の消失、真皮中層での過剰なエラスチン線維の凝集体の存在が観察されている [22, 25]。また、表皮と真皮の境界に存在する基底膜には、断裂像や断裂部位が修復されたと思われる二重構造が観察される [26]。また、これら真皮マトリックス構成成分には、真皮上層から中層にかけて真皮内での高い酸化状態の証拠としてカルボニル化タンパクの存在が観察され [27]、真皮中層に凝集体として存在するエラスチン線維には糖化反応最終生成物 (AGEs) の蓄積が観察されている。このことから、シワやたるみの出現には皮膚内の高い酸化ストレス状態が大きく関与していると考えられている [28]。

シワやたるみなどの皮膚形態変化の発生原因の 1 つとなるコラーゲン線維の減少は、線維芽細胞のコラーゲンタンパク鎖の合成低下と表皮細胞や線維芽細胞からのコラーゲン分解を担う MMP 類の分泌増加によるコラーゲンの分解の亢進が考えられている [29]。一方、オキシタラン線維の消失は、紫外線による炎症過程において真皮組織内に血管やリンパ管から浸潤してくる好中球のエラスターゼやマクロファージの MMP-12 により切断されることが原因として考えられている [30, 31]。また、肥満細胞由来トリプターゼが MMP-9 の活性化を促して基底膜のタイプ IV コラーゲンを分解することも報告されている [32]。

1-3 紫外線曝露に対する皮膚細胞の変化

1-3-1 紫外線による DNA 損傷と皮膚癌発症

日光曝露の皮膚細胞への影響が解明されたのは 1970 年以降である。その初期段階においては、皮膚癌の疫学調査や動物実験から UVB が皮膚癌の発症に強く関与していることが明らかになった [2]。例えば DNA 損傷修復酵素を遺伝的に欠いたモデルマウスへ UVB を照射すると、紅斑反応が起こりやすく、皮膚腫瘍の多発が認められた [33-35]。

紫外線による細胞傷害の 1 つに核内 DNA の損傷が挙げられる。DNA は紫外線波長域 (260 nm) に吸収を持ち、紫外線によりシクロブタン型ピリミジン 2 量体あるいは (6-4) 光産物を生成することが知られている [36]。また、UVA によって生成される ROS によってグアニン塩基が酸化された 8-OHdG (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) の生成も発癌リスクを高める [37, 38]。損傷した DNA が修復されずに残ることにより、誤った DNA が複製され、さらには細胞の増殖促進や抑制に関与する遺伝子に誤りが生じ、細胞の癌化が起こるとされる。

また、皮膚への紫外線の曝露は、皮膚免疫機能の低下を惹起することから、慢性的な紫外線の曝露による皮膚免疫機能の低下と皮膚癌発症の関係性が注目されている [39, 40]。

太陽光曝露に由来する皮膚癌には、主に表皮内に発生する癌として有棘細胞癌と基底細胞癌がある。有棘細胞癌は扁平上皮癌とも呼ばれ、露光部における日光角化症に続いて生じることが多く、表皮角化細胞が悪性増殖したものである。基底細胞癌は皮膚癌の中では最も頻度が高く、かつ、最も悪性度が低い癌と言われている。さらに、皮膚癌にはメラノサイトが癌化した悪性黒色腫がある。悪性黒色腫は、若年層から高齢者まで幅広い年齢層で発症し、多くの場合、濃淡のある黒色のあざとして見えるので一般人は見落としやすい黒色腫である。悪性黒色腫は進行して他臓器へ転移し、死に至らしめる最も悪性度の高い皮膚癌である。白色人種においては日光曝露部位の悪性黒色腫発生率が特に高く、欧米では紫外線による最も重篤な傷害として認知されている。

1-3-2 ROSの種類

ROSは生体内のシグナル伝達物質であると同時に、過剰生成されると生体に有害な影響を与えることが知られている [41-43]。酸素 (O_2) 分子は2つの不対電子を有し、他の分子から電子を奪う性質を有する。ROSは、この O_2 分子の性質によって生成する反応性の高い酸素種のことであり [44]。

ROSは、ラジカルと非ラジカルに分類することができる。前者としてスーパーオキシドアニオンラジカル (superoxide anion radical; $\cdot O_2^-$)、ヒドロキシルラジカル (hydroxyl radical; $\cdot OH$)、アルコキシラジカル (alkoxy radical; $LO\cdot$)、ペルオキシラジカル (peroxyl radical; $LOO\cdot$)、ヒドロペルオキシラジカル (hydroperoxyl radical; $HOO\cdot$)、後者としては、一重項酸素 (1O_2)、過酸化水素 (H_2O_2)、脂質ヒドロペルオキシド (LOOH) などが挙げられる。また、RNSとして一酸化窒素ラジカル ($NO\cdot$)、二酸化窒素ラジカル ($NO_2\cdot$) などが挙げられる。

1-3-3 皮膚内における ROS の生成

皮膚で生成される ROS には、生体代謝過程において生成されるものと、太陽光線のような外環境因子によって生体内の成分が光増感剤として働くことにより生成されるものがある。

細胞内において、ROSはさまざまな酵素反応によっても生成される。ミトコンドリアの呼吸鎖の電子伝達系において ATP 合成過程で $\cdot O_2^-$ が生成されることは良く知られている [45, 46]。また、キサントキシンオキシダーゼ [47] や NADPH オキシダーゼ [48, 49] の酵素反応により $\cdot O_2^-$ が、アラキドン酸代謝におけるシクロオキシゲナーゼ (COX)、およびリポキシゲナーゼが関与する経路においては、 $\cdot OH$ が生成される [50]。

外環境因子としては紫外線が ROS 生成源として働くが、その波長により生成される ROS は異なり [51]、UVB と UVA はともに、 $\cdot O_2^-$ と $\cdot OH$ の生成に関わるが [50-52]、UVA は 1O_2 の生成に関与する [49]。

UVB および UVA は表皮細胞内で、細胞内カルシウム濃度の増加に由来する NADPH オキシダーゼの活性化により $\cdot\text{O}_2^-$ の生成を増加させる [53-55]。さらに細胞内で生成された $\cdot\text{O}_2^-$ は、細胞内で自発的な変換あるいは SOD による不均化反応により H_2O_2 に変換され、 H_2O_2 は Fe^{2+} 、 Cu^+ の存在下、フェントン反応によりさらに傷害性の高い $\cdot\text{OH}$ となる [56]。

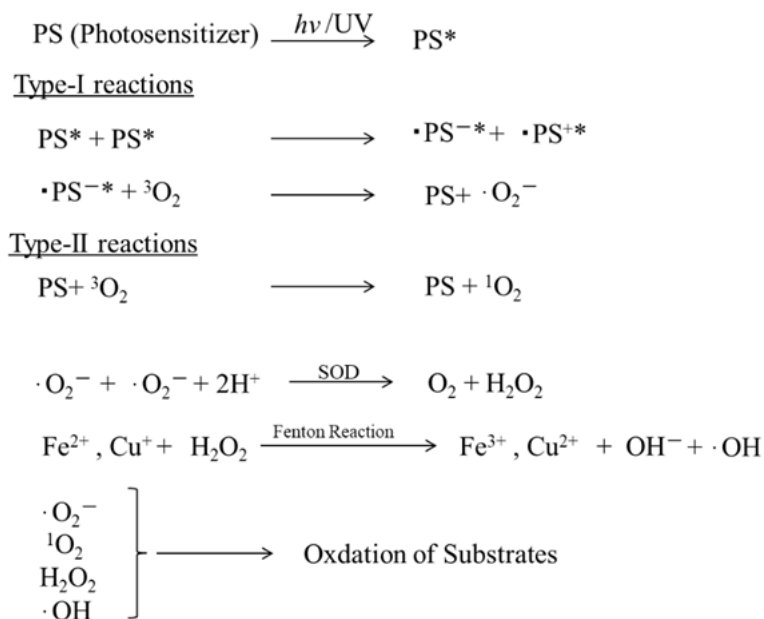


Fig. 1-6 Photosensitizing reaction and oxidation

一方、UVA は Type-II 光増感反応による ${}^1\text{O}_2$ を生成する。UVA の光エネルギーは皮膚に存在するフラビンやポルフィリンなどの光増感物質に吸収され、これらの励起が起こる。次に、この励起した光増感物質が、酸素分子にそのエネルギーを移動することによって基底状態にある ${}^3\text{O}_2$ を励起させ ${}^1\text{O}_2$ が生成する。また、クロモフォアの種類によっては酸素分子へのエネルギー移動ではなく、電子移動を行い Type-I 光増感反応により $\cdot\text{O}_2^-$ を生成させる (Fig. 1-6) [57]。例えば柑橘類に含まれるソラレン (soralen) は Type-II 型増感剤であり、UVA 照射により ${}^1\text{O}_2$ を生成することが確認されている [58]。また、紫外線領域に吸収を有し光毒性を有することが知られた抗炎症剤ケトプロフェンやインドメタシン、リボフラビンなどは Type-I および Type-II 光増感反応を同時に生じ、UVA 照射により ${}^1\text{O}_2$ や $\cdot\text{O}_2^-$ が生成することが確認されている [59]。

1-3-4 角層表面における ROS の生成

UVA は、Type-I 光増感反応により皮膚表面に存在する皮脂を酸化させる [60]。皮膚常在の通性嫌気性菌であるアクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) の産生するポルフィリン系化合物であるコプロポルフィリンもクロモフォアとして働くため、UVA 曝露により皮膚表面においても $^1\text{O}_2$ が生成され、皮脂成分であるスクワレンや不飽和脂肪酸を酸化して脂質ペルオキシドを産生する。さらに脂質ペルオキシドは酸化的な開裂反応によりアルデヒド化合物を生成し、タンパク質のアミノ基とシッフ塩基を形成する反応からカルボニル化タンパクを生成することが分かっている [61-63]。カルボニル化タンパク質は、長波長 UVA からブルー領域の可視光を吸収して Type-I 光増感反応を介して酸素分子へ電子移動を起こして $\cdot\text{O}_2^-$ を生成することが報告されている [60, 64-67]。また、角層に存在する糖化反応最終生成物 (AGEs) もカルボニル化タンパク質と同様に UVA の光増感剤として働き Type-I 光増感反応を介して酸素分子へ電子移動を起こして $\cdot\text{O}_2^-$ を生成することが報告されている [68, 69]。

このように、紫外線に起因する ROS の生成を抑制することにより、皮膚の光老化抑制につながることは多くの研究により確かめられている。そのため、日焼け止め化粧品使用とその効果を最適化することは光老化抑制のために重要であると考えられる。

1-4 日焼け止め化粧品

1-4-1 日焼け止め化粧品の光老化抑制効果

UVA の慢性曝露によって皮膚の光老化に ROS が関与することが解明されるのと並行して、日焼け止め化粧品の光老化抑制効果が明らかにされてきた。1987 年には、日焼け止め化粧品による皮膚の紫外線照射ダメージ抑制効果が示され [8, 70]、1991 年には、マウスを用いた実験によって UVA 吸収剤を 0.75% 含む日焼け止め化粧品が皮膚の弾性線維過形成とコラーゲン損傷を抑制することが報じられた [71]。また、ヒトの皮膚に日焼け止め化粧料を連用する試験についても、新規 UVA 吸収剤開発の過程で、UVA 吸収剤を配合した日焼け止め化粧料が光老化を抑制することが明らかにされた。1998 年には UVA 吸収剤を含む日焼け止め化粧料の塗布によりリゾチームと alpha-1 トリプシンの増加を防ぐ

効果を認め、光老化の初期に見られる変化の抑制が報告された [72]。さらにはリゾチームや MMP-2 mRNA の発現亢進をモニターする方法で、2000 年から 2010 年の長期にわたって数回のヒト連用試験が行われ、日焼け止め化粧品による光老化抑制効果が確認された [73-75]。2010 年には UVB 防御能が SPF 8、UVA 防御能を示す UVAPF が 7 という、UVB から UVA まで広く防ぐブロードスペクトラムサンスクリーンが提案され、この日焼け止め化粧品を使用した 4 週間連用テストを通じて、日焼け止め化粧品の日常的な使用による皮膚ダメージ抑制効果が確認された [76, 77]。

1-4-2 日焼け止め化粧品の構成

日焼け止め化粧品とは紫外線を吸収あるいは散乱する紫外線防御剤を含み、皮膚上に薄膜を形成し、紫外線が皮膚内部への到達を防ぐ皮膚外用剤のことである。市場において日焼け止め化粧品はさまざまな剤型で提供されている。その剤型は粘度や組成により分類できるが、主に粘度数十～数百 mPa・s の低粘度液体であるローション、数百～数千 mPa・s の中粘度液体である乳液、粘度数千～数万 mPa・s の半固形であるクリーム、ワックスなどで固形にしたスティック、液化ガスに溶解・分散したスプレーなどが数多く市場に提供されている。

その多くは主効果成分である紫外線防御剤を乳化混合した乳化組成物である。紫外線防御剤は、大きく有機化合物である紫外線吸収剤と無機化合物で紫外線散乱剤（紫外線散乱粉末ともいう）の 2 種類に分けられ、それぞれメリットとデメリットがあるため、製品特徴に応じて使い分けて日焼け止め化粧品に配合されている。

紫外線防御剤以外の成分としては、紫外線防御剤を溶解または分散する媒体として油や水が配合される。水の多量配合は清涼感につながるため、暑い時期に使用されることの多い日焼け止め化粧品に好まれるが、油を多く配合すると油っぽさ、べたつく感触につながるため、使用者からは嫌われる傾向にある。さらには油と水を安定に乳化状態に保つための乳化剤、乳化状態を維持するとともに皮膚に塗りやすくするための増粘剤、長期保存のための防腐剤などが配合される。

1-4-3 紫外線吸収剤のメリットとデメリット

紫外線吸収剤は、紫外線のエネルギーを吸収するとその分子の最高被占軌道 (highest occupied molecular orbital; HOMO) を占める電子の一つがエネルギーレベルの高い最低空軌道 (lowest unoccupied molecular orbital; LUMO) に遷移し、一重項励起状態となる。この一重項励起状態の分子は不安定なため、三重項励起状態を経て吸収したエネルギーを熱、蛍光あるいはりん光などに変換、放出して再び基底状態に戻る。このような分子反応サイクルを繰り返して紫外線を吸収し続ける有機化合物が日焼け止め化粧品に使用される紫外線吸収剤である。紫外線吸収剤は化学構造から、i) ベンゾフェノン系紫外線吸収剤、ii) ジベンゾイルメタン系紫外線吸収剤、iii) サリチル酸系紫外線吸収剤、iv) ケイ皮酸系紫外線吸収剤、v) トリアジン系紫外線吸収剤に大別される。紫外線吸収剤は、一般的に常温で液状や固体状のものなどさまざまだが、いずれも比較的容易に oil in water (O/W) 乳化系、water in oil (W/O) 乳化系に配合することが可能である。また、紫外線吸収剤は特定の波長を吸収するので、吸収波長により UVA 吸収剤、UVB 吸収剤に分けられる。現在の日焼け止め化粧品には、太陽から降り注ぐ紫外線に幅広く対応できるよう、UVA 吸収剤と UVB 吸収剤が組み合わせて配合されている。

一方、紫外線吸収剤のデメリットとして挙げられるのが、皮膚に対する傷害性のリスクである。紫外線吸収剤は多くの日焼け止め化粧品に 3~10wt% と比較的高い濃度で配合されているが、その配合濃度の高さから、光接触皮膚炎や光アレルギー性皮膚炎などの皮膚傷害につながるということが知られている [59, 78-96]。そのため、世界各国で日焼け止め化粧品への紫外線吸収剤の配合について、配合可能な紫外線吸収剤とその配合上限が制限されている。現在、日本国内では、化粧品基準のポジティブリストに 32 種の紫外線吸収剤が収載されており、安全性の観点から各成分の配合上限量が定められている (Table 1-2)。

もう 1 つの紫外線吸収剤のデメリットは、一部の紫外線吸収剤に見られる現象で、紫外線吸収能が日光曝露中に低下する「光劣化」である。紫外線吸収剤に光劣化が生じた場合、日焼け止め化粧品使用者は高い効果の日焼け止め化粧料を塗布して紫外線から防御したつもりでも、時間とともにその効果が低下するので、無自覚な状態で紫外線に曝露されてしまう。これは紫外線散乱剤には

ないデメリットであり、使用者が皮膚傷害を負ってしまうリスクとなるため、日焼け止め化粧品開発にとって大きな課題である。

Table. 1-2 Approved UV absorbers and their maximum concentrations in Japan

成分名	主な吸収帯	最大配合量 (w t %)
4-(2-β-グルコピラノシロキシ)プロポキシ-2-ヒドロキシベンゾフェノン	UVB	10
サリチル酸オクチル	UVB	10
サリチル酸ホモメンチル	UVB	10
2-シアノ-3、3-ジフェニルプロパー-2-エン酸 2-エチルヘキシルエステル (別名オクトクリレン 略号：OCR)	UVB	10
2,5-ジイソプロピルケイ皮酸メチル	UVB	10
2-[4-(ジエチルアミノ)-2-ヒドロキシベンゾイル]安息香酸ヘキシルエステル	UVA	10
シノキサート	UVB	5
ジパラメトキシケイ皮酸モノ-2-エチルヘキサノ酸 グリセリル	UVB	10
ジヒドロキシジメトキシベンゾフェノン	UVB	10
ジヒドロキシジメトキシベンゾフェノンジスルホン酸ナトリウム	UVB	10
ジヒドロキシベンゾフェノン	UVB	10
ジメチルジエチルベンザルマロネート	UVB	10
1-(3,4-ジメトキシフェニル)-4,4-ジメチル-1,3-ペンタンジオン	UVB	7
ジメトキシベンジリデンジオキソイミダゾリジプロピオン酸 2-エチルヘキシル	UVB	3
テトラヒドロキシベンゾフェノン	UVB	10
テレフタリリデンジカンフルスルホン酸	UVA	10
2,4,6-トリス[4-(2-エチルヘキシルオキシカルボニル)アニリノ]-1,3,5-トリアジン	UVB	5
トリメトキシケイ皮酸メチルビス (トリメチルシロキシ) シリルイソペンチル	UVB	7.5
ドロメトリゾ-ルトリシロキサン	UVB	15
バラアミノ安息香酸及びそのエステル	UVB	4
パラジメチルアミノ安息香酸アミル	UVB	10
パラジメチルアミノ安息香酸 2-エチルヘキシル	UVB	10
パラメトキシケイ皮酸イソプロピル・ジイソプロピルケイ皮酸エステル混合物	UVB	10
パラメトキシケイ皮酸 2-エチルヘキシル (略号：OMC)	UVB	20
2,4-ビス-[<4-(2-エチルヘキシルオキシ)-2-ヒドロキシ>-フェニル]-6-(4-メトキシフェニル)-1,3,5-トリアジン (別名：オクチルトリアジン)	UVB・UVA	3
2-ヒドロキシ-4-メトキシベンゾフェノン (略号：BP3)	UVB	5
ヒドロキシメトキシベンゾフェノンスルホン酸及びその三水塩	UVB	10
ヒドロキシメトキシベンゾフェノンスルホン酸ナトリウム	UVB	10
フェニルベンズイミダゾールスルホン酸	UVB	3
フェルラ酸	UVB	10
4-tert-ブチル-4'-メトキシジベンゾイルメタン (略号：BMDM)	UVA	10
2,2'-メチレンビス(6-(2H-ベンゾトリアゾール-2-イル)-4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール	UVB・UVA	10

1-4-4 紫外線散乱剤のメリットとデメリット

日焼け止め化粧品には、紫外線散乱剤として酸化チタンや酸化亜鉛などの金属酸化物が使用されている。酸化チタンは UVB 領域に吸収を有し、酸化亜鉛は UVA から UVB まで幅広い吸収を有する。

その紫外線防御能は、金属酸化物が有する高い屈折率による光散乱・反射による効果と、バンドギャップエネルギーに応じた紫外線の吸収によって発揮される。酸化チタン、酸化亜鉛のバンドギャップはそれぞれ 3.0 eV、3.2 eV であり、紫外線照射されると電子は価電子帯から伝導帯に励起され、そのバンドギャップエネルギーに応じた波長の紫外線を吸収する [97, 98]。酸化チタンの場合、短波長側の 320 nm 以下を吸収するため、UVB 防御機能が発揮される。一方、酸化亜鉛は 375 nm 以下の紫外線を吸収し、UVA と UVB の防御機能が発揮される。

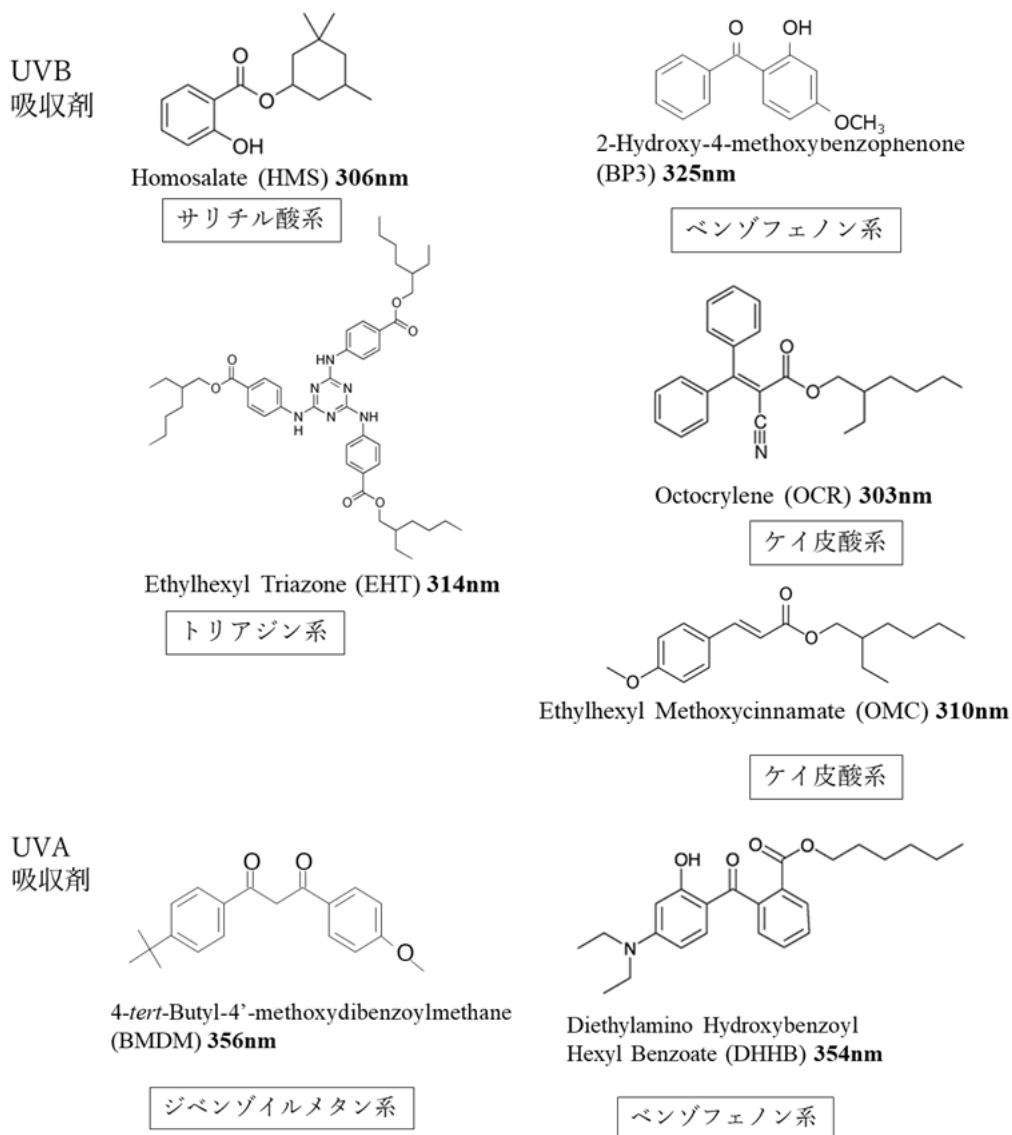
紫外線散乱剤の利点として、10 nm～150 nm の粉体として配合可能な点があげられる。一時、微粒子の経皮浸透が懸念されたが、皮膚内部へは浸透しないことが証明され、その懸念は払拭された [99]。そのため、紫外線吸収剤と比較して、皮膚傷害を引き起こしにくいという点で優れている。一方、紫外線散乱剤の欠点は、紫外線吸収剤に比較して配合濃度当たりの紫外線防御能が劣ることである。例えば、酸化亜鉛の UVA 防御能は、同じ wt% 濃度で吸光度を比べると、代表的な UVA 吸収剤 4-*tert*-ブチル-4'-メトキシジベンゾイルメタン (BMDM) の UVA 防御能の 1/4 以下である。そのため、日焼け止め化粧品で十分な効果を得るためには、酸化亜鉛は 10wt%～25wt% 程度と比較的多く配合する必要がある。また、紫外線散乱剤の高配合は、塗布時に皮膚色が白く見えてしまうという外見上の欠点や、皮膚が乾燥したように感じるという使用感触上の欠点もある。

1-4-5 日焼け止め化粧品に配合されている紫外線吸収剤の現状

日焼け止め化粧品中に配合されている紫外線吸収剤の種類は各化粧品メーカーが独自に配合しているためさまざまであるが、汎用されている紫外線吸収剤は約 17 種類である。日本国内では、2004 年から 2007 年に東京都内に流通し、東京都健康安全センターにて調査された 891 品目の結果では、メトキシケイ皮

酸エチルヘキシル (OMC：ケイ皮酸系) が最も多く使用されており、次いで BMDM (ジベンゾイルメタン系)、2-ヒドロキシ-4-メトキシベンゾフェノン (BP3：ベンゾフェノン系)、サリチル酸ホモメンチル (サリチル酸系)、オクチルトリアゾン (トリアジン系) であった。特に UVB 吸収剤で最も使用されているのが、OMC であり、UVA 吸収剤として最も使われているのは BMDM であった[100]。これらが多く使用される理由としては、UVB 吸収剤の OMC は室温で液状であり、一方、UVA 吸収剤の BMDM は室温で固体であるが、油への溶解度が高く、少量の油でも均一に溶解するため、どちらも乳化物に高濃度配合しやすく、油っぽい不快感が少ないためであると考えられる。

次頁に代表的な紫外線吸収剤の構造式と INCI (international nomenclature of cosmetic ingredient) 名、最大吸収波長を示した (Fig. 1-7)。



INCI name : International Nomenclature Cosmetic Ingredient

Fig. 1-7 Typical UV absorbers
INCI name (Abbreviation), Maximum absorption wavelength

1-4-6 日焼け止め化粧料の紫外線防御能評価

現在、日焼け止め化粧料の紫外線防御能は、UVB 防御能 (SPF: sun protection factor) と、UVA 防御能 (UVAPF: UVA protection factor) が分けて測定されている。日本では日焼け止め化粧料の紫外線防御能の測定は、法的規制ではなく日本化粧品工業連合会の自主基準として実施されており、それぞれ国際標準として ISO24444 と ISO24442 としてガイドライン化された *in vivo* 測定法が採用されている [101, 102]。

その測定法は、ヒト皮膚に人工光源であるキセノンアークランプを光源とするソーラーシミュレーター (疑似太陽光源) を用いてそれぞれ SPF、UVAPF 測定に該当する波長域の紫外線を照射し、その時に生じる皮膚反応を指標としている。指標とする皮膚反応は、SPF の場合は紅斑反応であり、UVAPF の場合は持続型即時黒化反応である。

具体的には、被験者の背中の皮膚に訓練された測定者が 2 mg/cm^2 で被験試料を均一に塗布し、1.25 倍ずつの比率で 5 段階の強度でエネルギー量を変えた該当波長域の紫外線を、疑似太陽光源を用いて照射する。各紫外線の照射エネルギーは、あらかじめ個々の被験者の無塗布部皮膚へ該当する紫外線を照射し、皮膚の紅斑あるいは黒化が生じる最小エネルギーを基準として決定される。

最小エネルギーは、紅斑の場合は最小紅斑量 (MED: minimal erythema dose)、黒化の場合は最小持続型即時黒化量 (MPPDD: minimal persistent pigment darkening dose) として定義されている。SPF 値および UVAPF 値は被験試料塗布部位に皮膚反応を惹起させた MED あるいは MPPDD を無塗布部位に皮膚反応を惹起させた MED あるいは MPPDD で除した値である。

$$\text{SPF} = \text{日焼け止め化粧料塗布部位の MED} / \text{日焼け止め化粧料無塗布部位の MED}$$

$$\text{UVAPF} = \text{日焼け止め化粧料塗布部位の MPPDD} / \text{日焼け止め化粧料無塗布部位の MPPDD}$$

しかし、このような *in vivo* の SPF および UVAPF 測定は、ヒト皮膚へ紫外線を照射することから、将来において照射部位に皮膚傷害が発症する危惧があり、被験者保護の観点から *in vivo* 測定法の継続に対する懸念が提唱されている。そこで、近年では *in vivo* の SPF 値および UVAPF 値を再現する *in vitro* 測定法の

開発が重点的に行われており、現在では UVA 防御能を評価する *in vitro* 測定法として ISO24443 が国際標準としてガイドライン化されている [103]。しかし、ISO24443 においても *in vivo* SPF 値を UVAPF 値算出に使用することから、完全な *in vitro* 法とは言い難い。*in vitro* 測定法の原理は、日焼け止め化粧料を支持体に塗布し、形成した塗布膜を透過する紫外線量で紫外線防御能を評価することである。この測定法において、重要となるのは皮膚の代わりに日焼け止め化粧料を塗布する支持体（塗布プレート）である。ISO24443 では、polymethyl methacrylate (PMMA) 樹脂製のプレート表面にサンドブラスト処理により凹凸を作成したもの（schoenberg plate, HELIOPATE™ HD6）が用いられている [103]。しかし、ISO24443 に採用されているプレート表面形状は、ヒト皮膚表面の肌理の形状とは大きく乖離していることから、得られる *in vitro* SPF 値で *in vivo* の SPF 値を再現することは困難である。これが、ISO においても *in vivo* の SPF 測定法がガイドライン化されていない原因である。その問題を解消するため、ヒト皮膚表面の肌理を再現した疑似皮膚 PMMA プレート（SMS: skin-mimicking substrate）が 2012 年に三浦らによって開発された [104]。SMS には表面に肌理に似せた溝が付けられている（Fig. 1-8）。この SMS では、従来の *in vitro* SPF 測定用樹脂プレートでは不均一になってしまっていて塗布できなかった *in vivo* SPF 測定時の塗布量である 2.0 mg/cm² の量を塗布することができることが示された [105]。また、この SMS 表面に塗布された日焼け止め塗布膜の吸光度から計算された *in vitro* の SPF 値は、*in vivo* の SPF 値と高い相関性を示すことが報告されている [104, 106]。この事実は、*in vivo* の SPF 値を *in vitro* で再現する、つまり、ヒトの皮膚における日焼け止め化粧料の *in vitro* 性能評価には、塗布する支持体の表面形状が重要であることを示唆している。

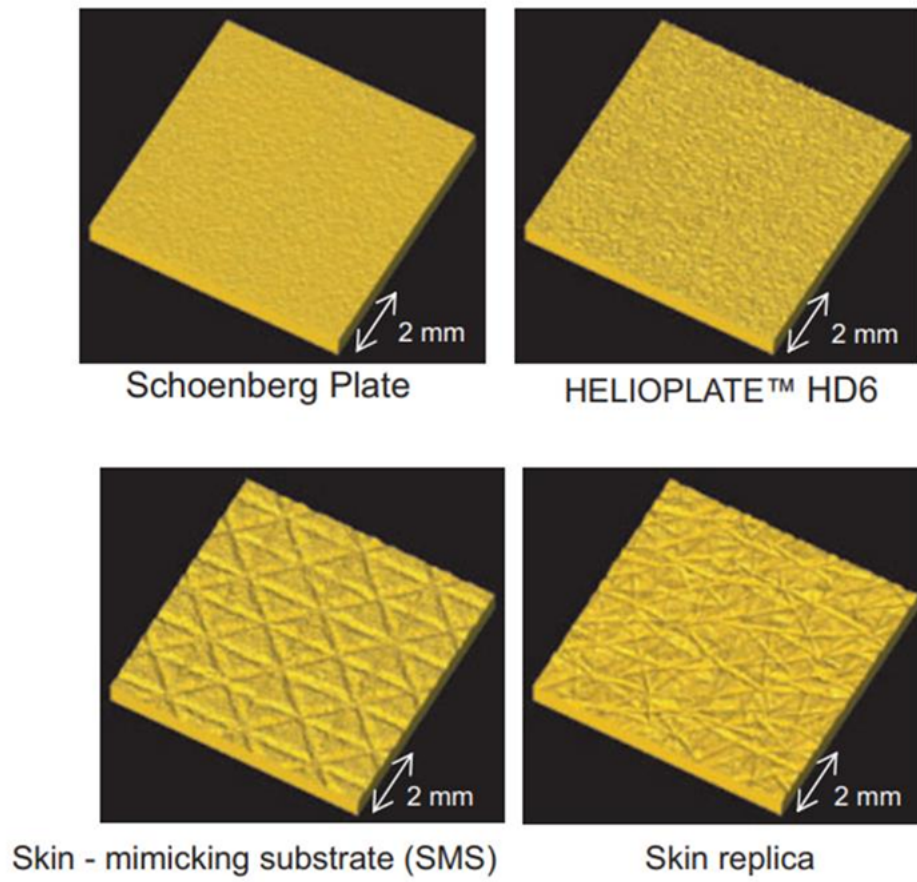


Fig. 1-8 Comparison of SMS, commercially available application plate for SPF measurement and human skin replica [105] Miura *et al.*, 2008

1-5 日焼け止め化粧料の課題

本論文の冒頭で触れたように日焼け止め化粧料には、紫外線曝露時に生じる光毒性・光感作性のような皮膚傷害の懸念があるため、皮膚傷害を与える紫外線吸収剤を極力少なく塗布することが重要である。つまり、極力低い紫外線吸収剤配合濃度で高い紫外線防御能を与えるための紫外線防御能の最適化は、日焼け止め化粧料の皮膚傷害問題回避のための一つの方法である。本研究では、紫外線防御能の最適化を目的とした 2 つのアプローチを試みた。配合紫外線吸収剤の光劣化抑制と、皮膚に塗布した際の膜不均一性改善である。ここでは、皮膚傷害の懸念の背景、および 2 つの研究アプローチの背景について述べる。

1-5-1 紫外線吸収剤による皮膚傷害懸念

紫外線が皮膚に及ぼす害が知られるにつれ、消費者は高い紫外線防御能を有する日焼け止め化粧料を日常的に使うようになった。高い防御効果の日焼け止めには紫外線吸収剤が高配合される。紫外線吸収剤に起因する皮膚傷害はすべての使用者に起こるわけではないが、日常的に使う上で日焼け止め化粧料の問題の一つとなっている。

紫外線吸収剤の歴史的な背景としては、1980 年代より多くの皮膚傷害の症例が報告されたことにより、多くの安全性試験が行われた。その結果、各国で配合濃度に制限が設けられるようになった。しかし、SPF25 以下の日焼け止めが一般的だった 1990 年初頭と比べると、現在では SPF は 50 を超え、かつ、高い UVA 防御効果を有する日焼け止め化粧料が一般的な日焼け止め化粧料の機能となっている。また、有機化合物である紫外線吸収剤は、角層から細胞間脂質を透過して皮膚内に浸透することから [89, 107-109]、皮膚内部での皮膚傷害発生が懸念される。Table 1-3 に示したように 2004 年以前は紫外線吸収剤の皮膚傷害についての臨床報告と経皮吸収抑制の研究が主であったが、動物実験禁止に伴う *in vitro* 安全性試験法の開発とともに 2005 年以降、その紫外線吸収剤の皮膚傷害の発症機構の研究も行われるようになった。一例として、2009 年には BMDM がラジカル分解した際に生成するアリアルグリオキサールが光感作物質の一つであることが示された [93]。

Table. 1-3 Studies related to sunscreen safety and skin penetration

年	著者	内容	参考文献
1986	Hanssmann et al.	サンスクリーンの光接触感作について臨床例	79
1986	Schander et al.	メトキシベンゾイルメタンの光接触感作臨床例	80
1987	Groot et al.	イソプロピルジベンゾイルメタンの接触感作	81
1988	Schander et al.	イソプロピルジベンゾイルメタンや BMDM の光接触感作症例報告	82
1995	Parry et al.	BMDM の光接触感作について報告	83
1997	Itoh et al.	OMC の接触皮膚炎症例報告	84
1997	Schauder et al.	15 年にわたるサンスクリーンの安全性研究について報告	85
1998	Schmidt et al.	BMDM, BP3, OMC,メチルベンジリデンカンファーを組み合わせて配合した場合の光接触感作	86
1999	Abe et al.	1991-1996 に報告されたサンスクリーンの接触皮膚炎について	87
2004	Simeoni et al.	シクロデキストリンによる BMDM の経皮吸収抑制	88
2005	Hayden et al.	サンスクリーンの経皮吸収と表皮における毒性	89
2006	Varvaresou et al.	日焼け止めの基剤による経皮吸収性の違いを観察	96
2006	Hanson et al.	OMC, OCR, BP3 塗布により ROS が増加することをジヒドロローダミン発光により観察	90
2006	Onoue et al.	UV 吸収する 26 種の薬剤の ROS 生成量をリノール酸の光酸化で評価	59
2008	Onoue et al.	in vitro 光毒性を ROS 生成量からポテンシャル評価	91
2008	Lannucelli et al.	合成ポリマーによるカプセル化により BMDM の経皮吸収抑制	92
2009	Karlsson et al.	光劣化した BMDM の分解物の同定および光接触感作性	93
2013	Gaspar et al.	NR による in vitro 光毒性試験によっても BMDM 単独の光毒性の可能性を評価	94
2014	Nash et al.	サンスクリーン製品の光安定性と安全性の関係についての総論	95

これらの紫外線吸収剤の皮膚傷害リスクを避けるためにモル吸光係数を高める紫外線吸収剤の分子設計や、経皮吸収を抑制する高分子型紫外線吸収剤など、新しい紫外線吸収剤の開発もされている [110]。しかし、新規紫外線吸収剤をポジティブリストへ収載するには、動物実験を伴う多くの安全性試験が必要となる。2013年に実施されたEU化粧品指令第7次改正に伴い、化粧品および化粧品用途原料に関して動物実験が禁止されたことから、新規紫外線吸収剤を開発することは事実上困難になった。

実際、世界で最も許可基準が厳しいとされるアメリカ食品医薬品局 (FDA) において、1990年以降に許可されたUVA吸収剤はメチルアンスラニレートとBMDMの2種のみであり、それ以降、新しいUVA吸収剤は新たに登録されていない。この事例のように、FDAに限らず、紫外線吸収剤を新規開発して化粧品配合許可を取得する事が難しいことは明白である。

このような背景において、配合が既承認されている紫外線吸収剤を活用し、規制濃度以下のできる限り少ない配合濃度で効率よく紫外線から皮膚を保護する技術開発の重要性がますます高まっている。

1-5-2 紫外線吸収剤の光劣化による紫外線吸光能低下

紫外線吸収剤 2 つ目の問題点が、一部の紫外線吸収剤の光劣化によって意図せず過剰な紫外線に曝露されてしまうことである。このために、紫外線吸収剤の光劣化の抑制は日焼け止め化粧料の重要課題であり、これまでも紫外線吸収剤の光劣化抑制に関する研究が行われてきた。

紫外線吸収剤の中でも光劣化を生じる顕著な例が BMDM であり、その発生メカニズムは紫外線エネルギー吸収による分子の異性化と分解の 2 つであることが過去の研究で解明されている [111-115]。

BMDM はプロトン移動によりケト/エノール互変異性化が起こり、室温溶液中では主にエノール体として存在している。理論上、エノール型 BMDM が 360 nm 付近の紫外線を吸収すると、ene 部位に *Z/E* 異性化が可逆的に起こり、吸収した紫外線のエネルギーを熱として放出することにより UVA 吸収剤として働くと考えられている (Fig. 1-9)。しかし、長時間の UVA 曝露により、一部のケト体が短時間でエノール体に戻らないため、ケト体の増加により吸収極大波長が低波長側へシフトし、UVA 領域の吸光度の低下による UVA 吸収剤としての吸光能が低下する。2013 年、山地らは、BMDM のケトエノール互換異性体とその励起エネルギー順位について解き明かしている [115]。

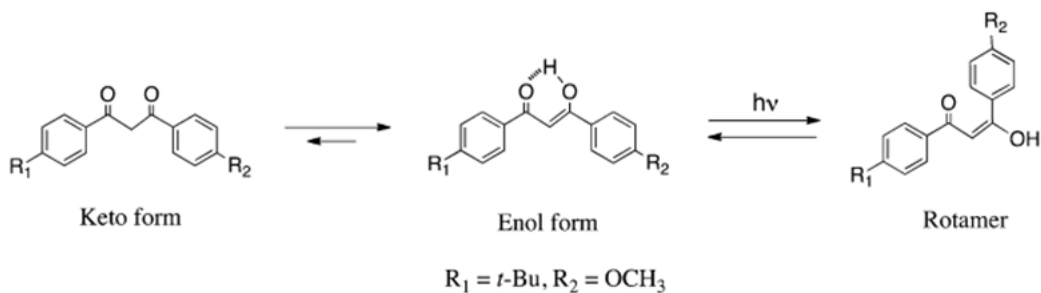


Fig. 1-9 BMDM keto-enol tautomerization and enol *Z/E* isomerization

さらに、長時間 UVA を BMDM へ曝露した場合、ケト体はノリッシュ I 型反応 (Norrish type I reaction) を介して光分解し、4-メトキシベンズアルデヒド、4-メトキシ安息香酸、および 4-*tert* ブチルアセトフェノンを生じるとともに、分解の過程でラジカルを生成する機構が分解物の分析同定結果から予測・提案されている (Fig. 1-10) [114]。

このような光劣化により生成するラジカル種によって開始されるラジカル連鎖反応と分解生成物が皮膚傷害を惹起させる可能性があり、接触皮膚炎につながる懸念があることが報告されている [93, 114, 116]。

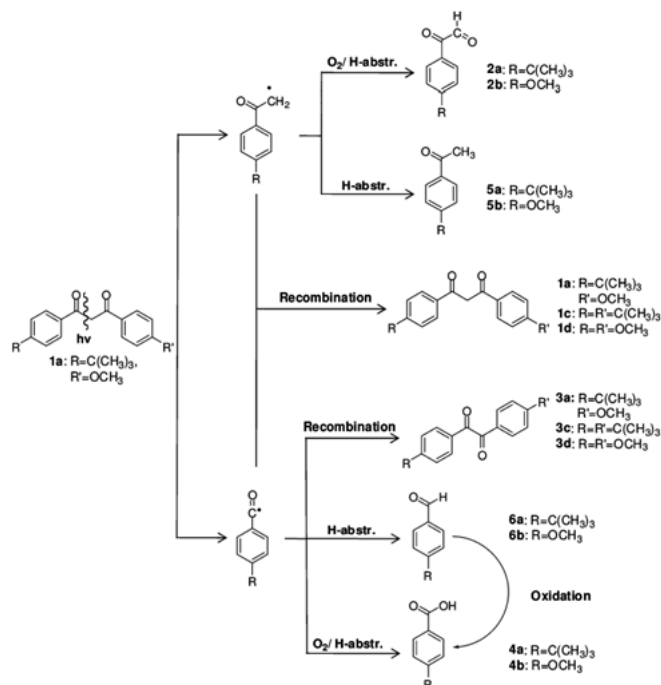


Fig. 1-10 Degradation scheme of BMDM [93] Karlsson et al. 2009

他の吸収剤との組み合わせで BMDM の光劣化抑制を試みた例がある。具体的には、メトキシケイ皮酸エチルヘキシル、ビスエチルヘキシルオキシフェノールメトキシフェニルトリアジン、オクトクリレン、ジエチルアミノヒドロキシベンゾイルヘキシルベンゾイルベンゾエート、オクチルトリアゾン、ジオクチルブタミドトリアゾンの 6 種類の UVB 吸収剤を選び、BMDM との組み合わせによって BMDM の光劣化が抑制できることを報告している [117]。

また、酸化防止剤との組み合わせによる BMDM の光劣化抑制についても報告されている。DMSO 溶液中、ビタミン E、ビタミン C、ユビキノンを添加することにより、BMDM の光劣化を抑制した例である [118]。

OMC と BMDM を組み合わせた時の光劣化抑制メカニズムについて、小口らは以下のように報告している [119]。BMDM と OMC 共存下へ UVA 照射した際に OMC の励起エネルギーに起因するりん光 (phosphorescence) が確認された。つまり、BMDM に吸収された UVA のエネルギーが OMC へ移動することが確認された (Fig. 1-11)。

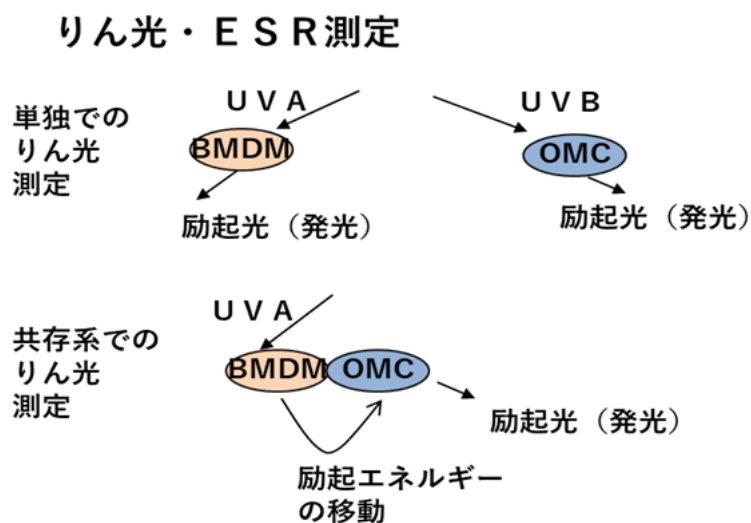


Fig. 1-11 Mechanism for stabilizing BMDM by OMC [119]

さらに小口らは 2012 年に Fig. 1-12 のような構造の新規の UVB 吸収剤 Di-2-ethylhexyl 4-methoxybenzylidenemalonate を合成し、この新規吸収剤と BMDM の組み合わせることにより BMDM の光劣化を抑制することを報告した [120]。

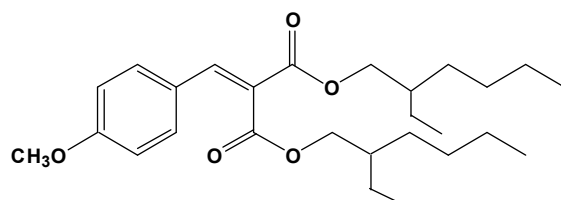


Fig. 1-12 Di-2-ethylhexyl 4-methoxybenzylidenemalonate

本学科の研究においても、2015 年、UVB 吸収剤オクトクリレンおよびその類似構造物質メトキシオクトクリレンと BMDM を組み合わせた場合の光劣化抑制効果が報告されている [121]。また、この際に BMDM のラジカル光分解の可能性も報告された [121]。しかし、ラジカル種の同定や 2 つの吸収剤を組み合わせた際のラジカル生成についてまで研究されておらず、残された課題となっていた。

次頁に BMDM の光劣化機構解明研究についてまとめた。

Table. 1-4 Studies related to photodegradation mechanism

年	著者	内容	参考文献
2001	Asai et al.	BMDM の光分解物についての報告	116
2008	Miura et al.	光劣化を評価する <i>in vitro</i> SPF 測定アルゴリズムの提案	105
2009	Mendrok-Edinger et al.	BMDM 開発メーカー研究員による UVB 吸収剤組み合わせによる光劣化抑制研究報告	135
2009	Paris et al.	トリアジン系 UVB 吸収剤による BMDM の安定化研究	112
2009	Kikuchi et al.	励起状態の BMDM の EPR (electron paramagnetic resonance) 測定	113
2010	Lhiaubet-Vallet et al.	UVB 吸収剤 6 種との組み合わせによる BMDM 安定化研究とメカニズム考察	117
2011	Marine et al.	BMDM ジケト型に Fix した誘導体による溶媒効果	138
2011	Kikuchi et al.	BMDM から OMC への triplet-triplet エネルギー移動	120
2012	Oguchi et al.	2-Ethylhexyl 4-methoxybenzylidenemalonate による BMDM の光劣化抑制	121
2012	Kockler et al.	BMDM 含む紫外線吸収剤の光劣化 (光安定化) と分解生成物	114
2013	Yamaji et al.	アセトニトリル溶媒下の BMDM の安定化メカニズムと遷移エネルギー測定	115
2014	Kikuchi et al.	BMDM に OCR と OMC が共存する時の triplet-triplet エネルギー移動	119
2014	Afonso et al.	Antioxidants による光劣化抑制の試み	118
2015	Sumida et al.	BMDM と OCR 共存下の基礎的検討	122

1-5-3 塗布膜不均一性による紫外線吸光能低下

日焼け止め化粧料の 2 つ目の課題は均一性の高い塗布膜形成である。日焼け止め化粧料は指または手のひらを用いて皮膚表面に塗布される。この塗布方法と皮膚表面の凹凸を考えると、この操作で均一性の高い塗布膜が形成される可能性は低いと考えられる。塗布膜の紫外線防御能は照射した紫外線が塗布膜を透過する量、あるいは塗布膜が吸収する光量を用いて評価でき、この際用いられる経験則がランベルト・ベールの法則 (Lambert-Beer law) である。ランベルト・ベールの法則は以下の数式で表される。

$$A = -\log (I_1/I_0) = \varepsilon c l$$

(照射した光の強度〔放射照度〕を I_0 、長さ(光路長) l の媒質を透過した後の光の強度を I_1)

(A : 吸光度, ε : モル吸光係数、 c : モル濃度、 l : 光路長)

塗布膜に吸収されるエネルギーを吸光度とした場合、吸光度は吸収帯の厚さ(l : 光路長) と、吸収帯に存在する光を吸収する物質の濃度 (c : モル濃度) と、その固有の係数 (ε : モル吸光係数) の積となる。

ε と c は日焼け止め化粧料に配合される紫外線吸収剤の種類と濃度により決まるパラメーターである。しかし、 l は皮膚に塗布した日焼け止め化粧料の膜厚により決定されるパラメーターであり、皮丘、皮溝により構成される凹凸のある皮膚表面では膜厚の不均一性は避けられない。塗布膜の厚さが薄い部分は紫外線吸光度が低下し紫外線が多く透過してしまうため、均一性の高い膜厚の紫外線防御能に比較して膜厚の不均一性が増すに従い紫外線防御能は低下することが考えられる。このことをランベルト・ベールの法則に従って簡易的なモデル図で計算したものを Fig. 1-13 に示した。図中の 1 つの灰色のブロックが吸光度 1.0 を持つ膜とすると、100 の量の光がブロック 1 枚を透過すれば光を吸収されて 1/10 に、2 枚を透過すれば 1/100 に、3 枚を透過すれば 1/1000 になる。なお、6 つのブロックに総量 600 の量の光が曝露される例を Fig. 1-13 のモデル図上で計算すれば、厚さが均一性の低い膜では透過する光は 22.2、均一性の高い膜では 6.0 が透過することになる。

ここから吸光度を概算すれば、不均一膜の吸光度は $-\log(22.2/600) = 1.43$ 、均一膜のそれは $-\log(6.0/600) = 2.00$ となる。2つを比べると、完全に均一な膜を形成した場合に比べて均一性の低い膜では71.6%に吸光度が低下する計算となる。

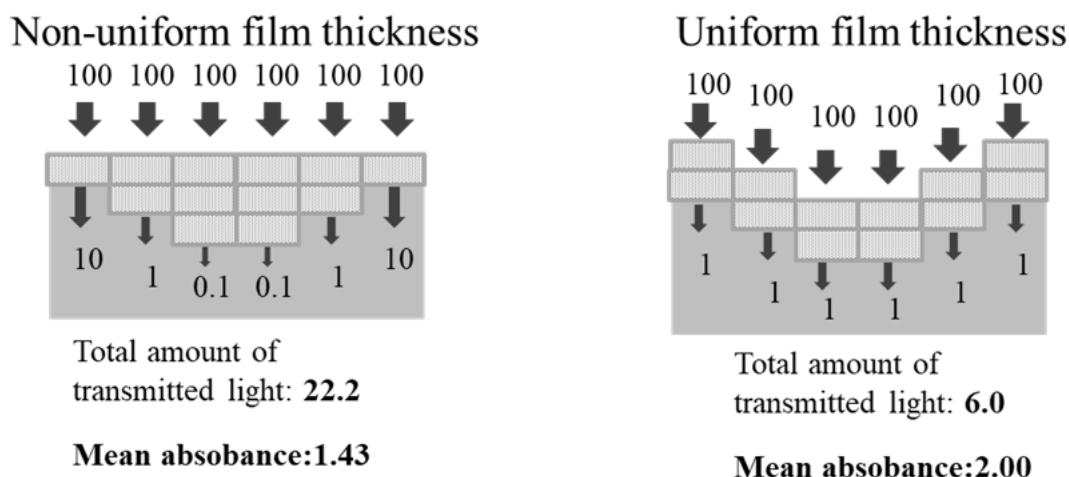


Fig. 1-13 Schematic illustration of the sunscreen Non-uniform / uniform film thickness and transmittances

実際にいくつかの研究で、日焼け止め化粧料の防御能は、塗布膜の不均一性に影響され、同じ吸収剤配合濃度であっても均一膜を形成した場合よりも均一性の低い膜を形成した場合の方が、紫外線防御能が低くなることが報告されている [119-121]。

日焼け止め化粧料の塗布膜の均一性と紫外線防御能の関係を考察するには、皮膚上の塗布膜の厚さを測定する必要があるが、それは測定技術の面で難しいことから研究例は非常に少ない。

塗布膜の均一性の紫外線防御能への影響を示唆する初期の報告は2004年Lademannらによるもので、石英板に挟んで調製した日焼け止め化粧料の膜を透過した紫外線を実際に皮膚に照射し、皮膚に塗布した日焼け止め化粧料の膜との間で、SPF値に差があることが報告された [122]。この研究では、石英板に挟んだ日焼け止め化粧料膜の場合とヒトの皮膚に塗った日焼け止め化粧料の場合では前者のSPFが高くなることが示されているが、皮膚上の塗布膜の厚さに関しては言及されていない。

2016年には、ビスコスフィガリング（塗布時のゆらぎ）により不均一塗布膜が形成されると紫外線防御能が低下することが、石英板上の膜厚の測定によって示され、日焼け止め化粧料がヒトの指または手のひらで皮膚表面に塗布される場合、塗布膜の厚さが均一にならず、紫外線防御能に影響することが示された [123]。この研究では、高い精度で塗布膜の膜厚が計測されている。しかし、平滑な石英板上に形成された凹凸膜であったため、凹凸のあるヒト皮膚上とは塗布状態に乖離があると考えられる。

また、2014年 Sohn らによって、同じ紫外線吸収剤を同量の 17wt% 配合した 5 つの基剤で *in vivo* SPF 値と塗布膜厚との関連性を検証している [124]。

彼らは、まったく同じ紫外線吸収剤配合の O/W クリーム、O/W スプレー、W/O 乳液、ゲル、アルコール溶解スプレーの 5 タイプの日焼け止め化粧料を豚の角層シートを貼付した石英板上に塗布し、白色干渉顕微鏡を用いることでその塗布膜の膜厚を測定した。白色干渉顕微鏡は、干渉縞のコントラスト変化や位相変化を解析することで、厚さなど高さ方向の距離を測定する機器である。それぞれの *in vivo* SPF 測定値と塗布膜の吸光度測定から見積った *in vitro* SPF 測定値と膜厚との関連性を議論している。その結果、W/O クリームとジェルが 5 タイプの製剤の中で最も均一な厚さの塗布膜を形成したにもかかわらず、それぞれの *in vivo* SPF 値は 19.5 および 19.4 と低く、それほど膜厚均一性の高くない塗布膜を形成した O/W クリームの *in vivo* SPF 値が 38.8 と最も高かったこと、*in vitro* SPF 値と平均膜厚に正の相関関係があることを報告している。この事実は、膜厚の均一性は *in vivo* SPF 値と相関しないことを示唆している。また、最も均一な塗布膜を形成した W/O クリームの *in vitro* SPF 値は異常に高い 72 を示したが、この値は例外的な値であったと考察し、その原因については解明されていない。以上のことから、膜厚均一性と紫外線防御能に相関性は証明されていないのが現状である。

その理由としては、豚の角層を貼付した石英板の塗布膜の状態が、実際のヒトの皮膚に塗布した状態と乖離していたことが考えられた。ヒト皮膚の皮溝の深さは 50~100 μm になるが [6]、石英板上に薄く貼付した豚の角層では、その凹凸の程度が十分ではなかったことが推察された。また、豚皮は柔軟であるため、塗布時に動いてしまい測定値に誤差が生じたことも考えられた。

これらのように、過去の研究で日焼け止め化粧料の塗布膜の厚さと紫外線防御能の関係については報告されているが、塗布膜の高精度な膜厚分布の測定は

困難であったため膜厚の均一性と紫外線防御能との相関性は十分に解明できていなかった。

in vitro SPF 測定法の開発過程において開発された SMS は、表面に肌理を模した凹凸があり、さらに日焼け止め化粧品塗布膜に対する紫外線透過光測定、塗布膜の状態維持が可能であると考えられる [104-106]。

生田らは SMS 上に塗布した日焼け止め化粧品塗布膜をイオンビームで切断した断面を凍結乾燥電子顕微鏡 (Cryo SEM) を用いて計測し、その皮丘部分の塗布膜厚さが $0.5\ \mu\text{m}\sim 2\ \mu\text{m}$ 、皮溝部分の塗布膜厚さが $7\ \mu\text{m}\sim 10\ \mu\text{m}$ であることを報告した [125, 126]。

しかし、SEM による測定では視野が数十 μm の範囲の塗布膜の厚さを測定するのが限界であり、広範囲の塗布膜の膜厚や膜厚の不均一性に関する情報を得ることは難しい。

また、膜厚さを計る手段として白色干渉計を用いる方法もあるが、数十 μm の凹凸面上の厚さを計ることに白色干渉計は適さないことを踏まえ (株式会社日本レーザー ‘レーザー顕微鏡と白色干渉計の違い’ 技術情報. https://www.japanlaser.co.jp/technology/sensofar_methods-differences/, 2021年5月28日アクセス)、申請者らは2017年、「水に応答する塗布膜を有する新しい日焼け止め化粧品」について報告している。この予備検討において共焦点レーザー顕微鏡を用い、SMS 上の塗布膜厚さを観察した (Fig. 1-14) [127]。

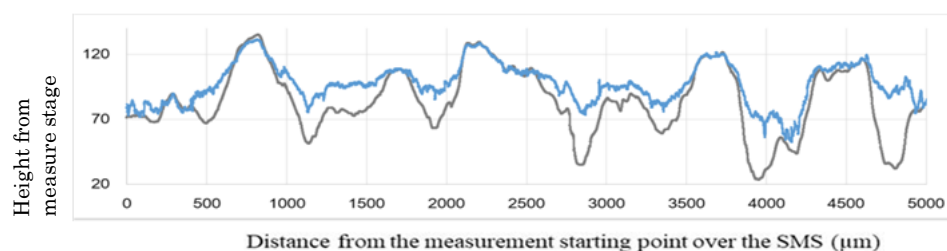


Fig. 1-14 Film formation of sunscreen on SMS [127] S.Yamaki et al. 2017

しかし、この研究は塗布膜の厚さが水によって変化することを明らかにすることを目的としており、日焼け止め化粧品のどのような物性的要因が膜の均一性に寄与するかについての情報は明らかになっていない。

均一性の高い厚さになるよう平滑面に塗布する塗料などと異なり、日焼け止め化粧品は指や手のひらで、皮溝・皮丘という凹凸を有するヒトの皮膚に塗布す

るものである。そして、これの過去知見は日焼け止め化粧料の塗布膜の厚さは均一でないこと、および、膜厚の不均一性が紫外線防御能に関わる要因であることを示唆している。よって、上記のような塗布膜厚さの均一性と紫外線防御能の関連性についての知見は、効率の良い日焼け止め化粧料の開発には重要であると考えられる。

1-6 本研究の目的

日焼け止め化粧料に配合されている紫外線吸収剤によって皮膚傷害が発生することが報告されている。この皮膚傷害は紫外線吸収剤が高濃度に配合されていることが影響している。さらに同種、同濃度の紫外線吸収剤を配合した日焼け止め化粧料において、必ずしも同程度の紫外線防御能を示さないことも経験的に知られている [122-124]。

また、同種、同濃度の紫外線吸収剤を配合した日焼け止め化粧料の紫外線防御能の違いは、紫外線吸収剤の光劣化の程度の違いと日焼け止め化粧料塗布膜の不均一性に起因している可能性が考えられる。

現在まで、より安全で且つ機能性の高い日焼け止め化粧料の研究開発を行うため以下のような研究がなされてきた。

- ・ 皮膚傷害の原因として考えられる「光劣化メカニズム」の解明
- ・ 日焼け止め化粧料の塗布膜と紫外線防御能との関連性についての研究

しかし、ROS発生を抑えながら光劣化による吸光度低下を抑制する研究や皮膚表面上における塗布膜均一性に影響する要因を明らかにした研究は行われていなかった。

そこで本研究は、日焼け止め化粧料の紫外線吸収剤濃度を低く抑えながら、できるだけ高い紫外線防御能を得ることを目的に、2つのアプローチを試みた。1つ目は、一般にUVA吸収剤と組み合わせて用いられるUVB吸収剤との組み合わせの中で、光毒性にも配慮しながらUV照射時のBMDMの光劣化を抑制する組み合わせを見出すことである。光劣化を抑制し、塗布直後の紫外線防御能を長時間維持できれば、結果的に紫外線吸収剤濃度が低くても紫外線ダメージを減らすことができるからである。その際に紫外線曝露時に生成されるROSに

についても考慮した。2つ目は、日焼け止め化粧品中の紫外線防御剤以外の成分である「基剤」、特に油分の粘度に着目し、塗布膜の不均一性を改善することによって低い紫外線吸収剤濃度でありながら高い紫外線防御能を実現するための製剤上の基盤的知見を得ることとした。

本研究は、日焼け止め化粧品の紫外線吸収剤濃度を低く抑えながらできるだけ高い紫外線防御能を得るために行った、光劣化抑制、膜厚の不均一性改善の2つの研究で構成される。第2章では紫外線曝露時のBMDMの光劣化を抑制する紫外線吸収剤の組み合わせを研究することで、紫外線曝露中の紫外線防御能低下を抑制し、高い紫外線防御能を維持する研究を行った。第3章では、化粧品基剤の物理特性が膜厚の均一性と紫外線防御能に与える影響について、油相の粘性に着目して研究を行った。紫外線吸収剤の配合濃度を低く抑えながら、高い紫外線防御能が得られる日焼け止め化粧品を得るため、塗布時の膜厚不均一性を解消する研究を行った。

第2章 UVB 吸収剤 BP3 は UVA 吸収剤 BMDM のスーパーオキシドアニオンラジカルを抑制する

2-1 緒言

紫外線は、光老化と呼ばれる皮膚老化の過程を加速させる大きな要因であることが広く認識されている [128, 129]。UVB への過剰曝露は紅斑反応として認識しやすいが、UVA への過剰曝露は目に見える顕著な皮膚反応を引き起こさないため、気づかないうちに高い量の UVA に曝露されている可能性がある。さらに、UVA は真皮の深くまで到達できるため、皮膚への慢性的曝露は真皮マトリックスの変化を引き起こし、皮膚老化を加速する重要な因子であると考えられている。

UVA は、フラビントキソタンパク質などの細胞内クロモフォアに吸収されることにより光増感反応を介して一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) を生成する [51, 130]。さらに、UVA は、細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇に起因する NADPH オキシダーゼの活性化を通じて、スーパーオキシドアニオンラジカル ($\cdot\text{O}_2^-$) の生成を促進する [49]。このように UVA により皮膚細胞内で生成される ROS が以下に示した作用により真皮マトリックス変化の原因であることは過去の研究において検証されている。ROS は、コラーゲンの合成抑制にかかわる Cyr61 の発現量を亢進すると同時に、コラーゲン分解酵素である MMP-1 の発現量も亢進するので、真皮のコラーゲン量が減少する [131]。さらに、ROS は好中球の遊走化因子である IL-8 の分泌を亢進し、好中球エラスターゼにより真皮乳頭層の弾性線維が分解される [132]。これら紫外線により生成される ROS がコラーゲンの減少につながるという事実は、皮膚における光老化進行を抑制するために、細胞内 ROS を低下させることが重要であることを示している [64, 133]。

前述の通り、紫外線照射によって皮膚内部において生成する ROS は皮膚傷害の大きな一因となるため、日常的に紫外線から皮膚を防御することが重要である。この点において、日焼け止め化粧品は皮膚の光老化防止に大きな役割を果たしている。1990 年頃までは、日本国内ではレジャー時のサンバーンの防止が日焼け止め化粧品の主な目的であった。その後、シワやたるみの原因の 1 つが UVA であることが消費者に知られるようになり、1996 年に UVA からの防止

効果が日焼け止め化粧品に明記されるようになると、一般消費者も UVA 防御能を重要視するようになってきた。

日焼け止め化粧品の有効成分である紫外線吸収剤は、ある特定の紫外線波長を化学的に吸収することで皮膚を紫外線から防御する化合物である。紫外線吸収剤の中には光毒性や光感作性を有するものがあるため [95]、安全性の観点から世界各国で配合濃度が制限されている。汎用されている紫外線吸収剤の中で、BMDM は安全性が比較的高い UVA 吸収剤として世界中で日焼け止め化粧品に使用されている。BMDM は、幅広い吸光スペクトルと高いモル吸光係数を有することから、BMDM 配合日焼け止め化粧品は UVA から皮膚を効果的な保護が可能である。これが、BMDM が日焼け止め化粧品に最も汎用されている理由であり、紫外線吸収剤の中でも重要な UVA 吸収剤であると言える。

一方、BMDM には欠点もある。日光への長時間曝露中に徐々に UVA 吸収能が低下することである [116, 117]。これは一般に「光劣化」と呼ばれ、その反応過程で、BMDM から皮膚傷害につながる化学種が生成されることが確認されている。例えば、BMDM はニュートラルレッド取り込み光毒性試験 (OECD 432) 評価により、光毒性の可能性があることが示されている [94]。また、BMDM の光分解により生成するアリアルグリオキサールは感作性物質であることが示されている [114]。

BMDM を配合した日焼け止め化粧品は、BMDM の光劣化により UVA 防御能が低下し、使用者が気づかないうちに過剰に UVA を曝露されてしまう可能性があり、日焼け止め化粧品の重要な問題点の一つと考えられている。その欠点を改善すべく、BMDM の光劣化反応について数多くの研究が行われてきた [112, 113, 117, 134]。また、光劣化の程度が低い DHHB (2-(4-Diethylamino-2-hydroxybenzoyl)-benzoic acid hexyl ester) などの UVA 吸収剤の開発も行なわれたが、それらの多くは 310 nm~390 nm まで吸収できる BMDM と同じ広い吸収領域を有さず、用途を満足させるものは開発されていない。また、DHHB は FDA の承認がまだ得られていないので、米国において DHHB を日焼け止め化粧品へ配合することはできない。

一方、BMDM を他の紫外線吸収剤と組み合わせることによって光劣化を抑制する研究も行われている。例えば、BMDM は OMC や OCR と組み合わせることにより光劣化が抑制され、そのメカニズムは BMDM に吸収されたエネルギーが OMC あるいは OCR へのエネルギー遷移であることが報告されている

[117-121]。しかし、いずれも光劣化を防ぐことにフォーカスされており、BMDM と他の UVB 吸収剤を組み合わせた場合の紫外線照射時のラジカル生成、光毒性に関する研究は行われていなかった。

そこで本章では、UVB 吸収剤との組み合わせによる紫外線照射した BMDM の UVA 吸収の低下抑制作用について検討し、BMDM と UVB 吸収剤との適切な組み合わせを見出すことを目的に研究を行った。また、その際に BMDM からの UV 照射時の ROS 生成と *in vitro* 光毒性の増減についても考慮した。

2-2 実験

2-2-1 試薬

本研究に用いた試薬は以下から入手した。

INCI 名 ; 化学名 (本研究表記名;入手先) で記載した。INCI 名のない試薬は化学名 (本研究表記名;入手先) で記載した。

tert-Butyl Methoxydibenzoylmethane ;
4-*tert*-Butyl-4'-methoxydibenzoylmethane (BMDM ; DSM Nutritional Products, Heerlen, Nederland)、 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone;
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone (BP3; Merck, Darmstadt, Germany)、
Ethylhexyl Methoxycinnamate;2-Ethylhexyl p-methoxy-cinnamate (OMC;
Merck, Darmstadt, Germany)、 Octocrylene;2-cyano-3, 3-diphenyl-2-propenoic acid 2-ethylhexyl ester (OCR; Merck, Darmstadt, Germany)、 Triethylhexanoate ;
Glyceryl tri-2-ethylhexanoate (トリエチルヘキサノイン; 日光ケミカルズ, 東京, 日本)、ワセリン;Petrolatum ; (ワセリン; 小城製薬株式会社, 大阪, 日本)、
5, 5-Dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO; 東京化成工業株式会社, 東京, 日本) 、 Superoxide dismutase (SOD; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、
Neutral red (NR; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM; 日水製薬株式会社, 東京, 日本)、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 PBS (-) (PBS; 日水製薬株式会社, 東京, 日本)、Hanks' balanced salt solution with Ca²⁺ and Mg²⁺ (HBSS; 日水製薬株式会社, 東京, 日本)、Fetal bovine serum (FBS; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)、
Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA; ナカライテスク株式会社, 京都, 日本)、 Trypsin from bovine pancreas suitable for protein sequencing, lyophilized powder (トリプシン; ナカライテスク株式会社, 京都, 日本)。

2-2-2 UVA および UVB 吸収剤の光劣化

グリセリル トリ-2-エチルヘキサノエート/ワセリン 75 : 25 の割合で調製した混合オイルゲルに紫外線吸収剤を 0.1 wt%の濃度で、80°Cに加熱しながら溶解し、紫外線吸収剤含有オイルゲルを得た。これを、厚さ 58 μm のスぺーサーを

用いて石英プレート（厚さ 1 mm）の間に挟んだ。各オイルゲルの紫外線吸収スペクトルを紫外線照射前後に V - 550 UV-Visible spectrophotometer（日本分光株式会社，東京，日本）で測定した。1 mW/cm² の照射強度で、60 分間 SPF MASTER（資生堂，東京，日本）の光源を用いて紫外線照射を行った [104-106]。SPF MASTER の光源は、複数のバンドフィルターを用いて ISO 24444 の *in vitro* SPF テスト法における relative cumulative erythema effectiveness (RCEE) を満たすように調整された疑似太陽光 (NS light) である。そのスペクトルデータを Fig. 2-1 に示した。

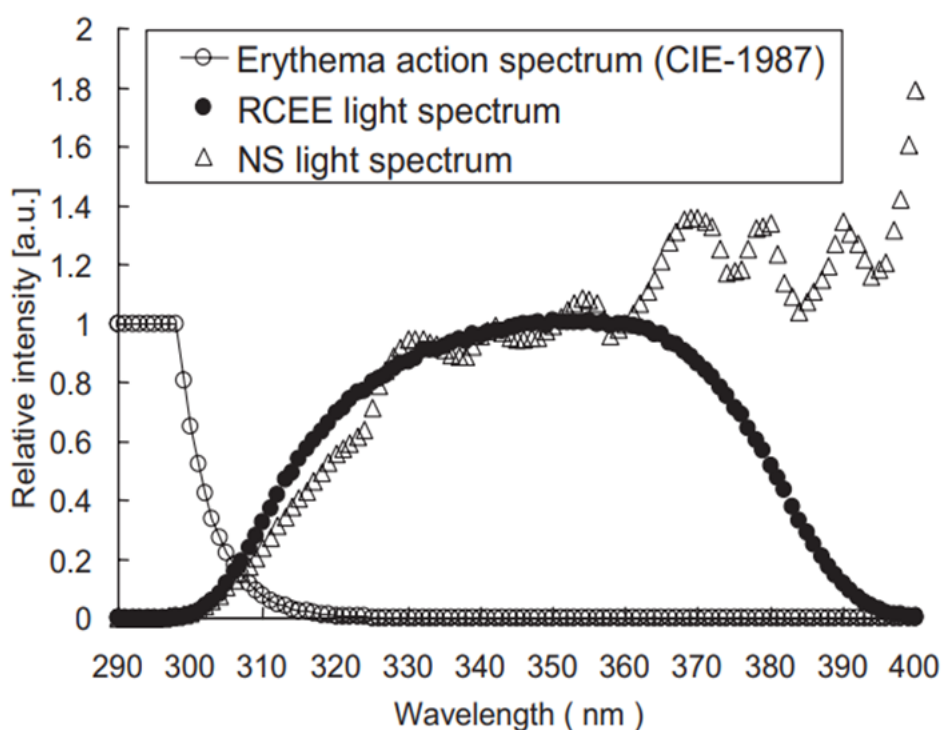


Fig. 2-1 Comparison of erythema action spectrum, RCEE light spectrum and NS light spectrum

文献 [106] Miura *et al.*(2012)より改変して転載

照射エネルギーは紫外線 X-36 ラジオメーター（UVA モード）で測定した。各紫外線吸収剤の最大吸収波長における吸光度を用いて、以下の式で光劣化率を算出した。

光劣化率：Photodegradation rate (%) = (ABS pre - ABS post) × 100 / ABS pre

ABS pre：照射前の吸光度

ABS post：照射後の吸光度

2-2-3 細胞培養

HaCaT ケラチノサイトは藤田保健衛生大学（現藤田医科大学）の赤松浩彦教授より提供された。その培養は、5% FBS を含む DMEM 中で、5% CO₂ の環境下、37°C で培養した。継代培養は 0.25% トリプシンおよび 0.02% EDTA を含有する PBS を用いて細胞を剥離して行った。

2-2-4 紫外線吸収剤の光毒性

予備実験を行い、光照射をしない場合において、HaCaT ケラチノサイトの生存率に影響を及ぼさない紫外線吸収剤濃度を求めた結果、各紫外線吸収剤濃度は 0.5 µg/ml であったため、以下、この濃度で光毒性実験を行った。HaCaT ケラチノサイトを 5% FBS を含む DMEM 中で 3.5×10^4 細胞/ウェルの密度で 96 ウェルプレートに播種した。24 時間後、細胞を HBSS に分散し、紫外線吸収剤の非存在下または存在下で 10 J/cm² の強度の UVA に曝露した。使用した UVA ランプは FL20s BLB ランプ（東芝株式会社，東京，日本）であり、照射エネルギーは紫外線 X - 36 ラジオメーター（Analytik Jena US 社，CA，USA）の UVA モードで測定した。UVA 照射後、細胞を 5% FBS を含有する DMEM 中でさらに 24 時間培養し、次いで、50 µg/mL の NR を含有する DMEM 中でさらに 2 時間培養した。PBS で洗浄後、NR をメタノール:水:酢酸溶液（50:49:1 の比率）で抽出し、この溶液の吸光度（測定波長: 550 nm, 参照波長: 650 nm）をマイクロプレートリーダー（Spectra Max Gemini, Molecular Devices, CA, USA）で測定した。細胞生存率は紫外線吸収剤を含有しない 5% FBS 含有の DMEM で培養した細胞の生存率に対する相対値として算出した。また光毒性は以下に示した指数を光毒性指数として表した。

細胞生存率 (%) = (紫外線曝露したサンプル NR 吸光度) /
(紫外線曝露しないサンプルの NR 吸光度)

光毒性指数 = 紫外線吸収剤を添加しないで UVA に曝露された細胞生存率 /
紫外線吸収剤を添加して UVA に曝露された細胞生存率

2-2-5 ESR (電子スピン共鳴) スピントラッピング方法により評価した紫外線照射時の紫外線吸収剤から生成するラジカルの定量

各紫外線吸収剤を 0.1wt% DMSO 含有 PBS 中に 0.01wt% の濃度で溶解し、1:1 の比率で 90 mM DMPO 水溶液と混合した。得られた溶液を ESR 石英フラットセル (Flash Point 社, 東京, 日本) に移した。光照射は、光源としてソーラーシミュレーター (DRC 株式会社, 大阪, 日本) を用い、96 mW/cm² のエネルギーで 5 分間 UVA+UVB の紫外線を試料溶液が入った ESR 石英フラットセルへ照射した後、ESR (electron spin resonance) スペクトルを RFR - 30 ラジカルアナライザーシステム (日本電子株式会社, 東京, 日本) を用いて以下の条件で測定した [135]。

Table. 2-1 ESR スペクトル測定の測定条件

Items	Value
modulation frequency	9.43GHz
modulation amplitude width	1.25mT
scanning field	336.5 ± 7.5mT
receiver gain	250
sweep time	0.5min
output power	4mW

紫外線照射時間は、DMPO 酸化によるラジカルをモニターしながら、96 mW/cm² の固定紫外線エネルギーのもとで段階的に 30 秒から 10 分の範囲の照射を変化させて DMPO 酸化によるラジカルが生成しないエネルギー量として決定し、5 分間とした。照射エネルギーは紫外線 X - 36 ラジオメーター (UVA モード) で測定した。ESR 測定における照射中に生成するラジカルの強度は、Fig. 2-2 のように紫外線照射下で生成するラジカルの信号高さ と外部基準である MnO の高さの比率である相対強度である S/M として表した。S/M の計算には 336.5 mT 付近の主要ピーク信号を用いた。

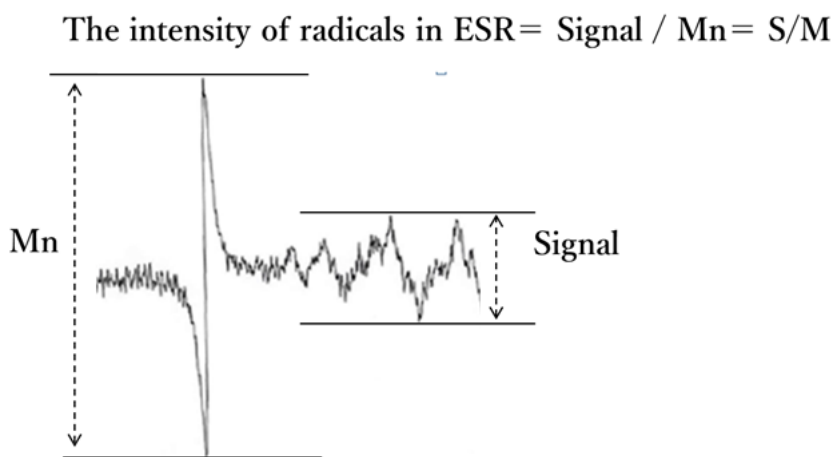


Fig. 2-2 The intensity of radicals in ESR spin trapping method

2-2-6 統計解析

測定値は平均値±標準偏差で表し、Student の *t* 検定によって有意差検定を行った。*p* 値 0.05 未満を統計学的に有意とした。記載は以下である。

p* < 0.05, *p* < 0.01, N.S. : 有意ではない

2-3 結果

2-3-1 紫外線吸収剤の吸光度の光劣化

石英プレート間に挟んだ紫外線吸収剤を含むオイルゲルへ、太陽光紫外線にシミュレートした SPF マスターの光源を照射した。紫外線照射前後の各紫外線吸収剤の最大吸光波長の吸光度を測定し、その低下率から光劣化挙動を調べた。BMDM ($41.0 \pm 0.8\%$) および OMC ($44.0 \pm 11.2\%$) の光劣化率は、BP3 ($17.9 \pm 6.2\%$) および OCR ($13.4 \pm 4.6\%$) の光劣化率に対して有意に高かった (Fig. 2-3a)。これはすでに過去の報告例でも同様の結果が得られており、この実験の正しさを示していた [114,117]。一般に日焼け止め化粧品中には複数の紫外線吸収剤が配合されており、過去の研究においても BMDM と他の吸収剤を組み合わせた際に BMDM の吸光度低下を抑制する効果が観察されている [112, 113, 117, 134]。そこで、BMDM の光劣化に対する BP3 および OCR の影響を、BMDM の吸収極大波長である 360 nm における吸光度の変化で確認した。その結果、BMDM と BP3 または OCR の組み合わせは、いずれも BMDM の光劣化を BMDM : OCR = 1 : 1 で 40.9 から 16.2 に、BMDM : BP3 = 1 : 1 で 40.9 から 15.6 に有意に抑制した (Fig. 2-3b)。次に、BP3 と BMDM の組み合わせについて、BMDM に対する BP3 の配合割合を 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 と変化させたときの BMDM の光劣化挙動を評価した。BMDM の光劣化率は BP3 の配合割合が 1 : 0.5 で 22.5%, 1 : 1 で 15.3%, 1 : 2 で 12.8%, 1 : 4 で 11.6% であり、配合依存的な抑制を示した。また、BMDM と BP3 の配合割合が 1 : 0.5 の場合においても有意な光劣化の抑制が確認された (Fig. 2-3b)。以上の結果から BP3 が BMDM の光劣化を抑制することが確かめられた。

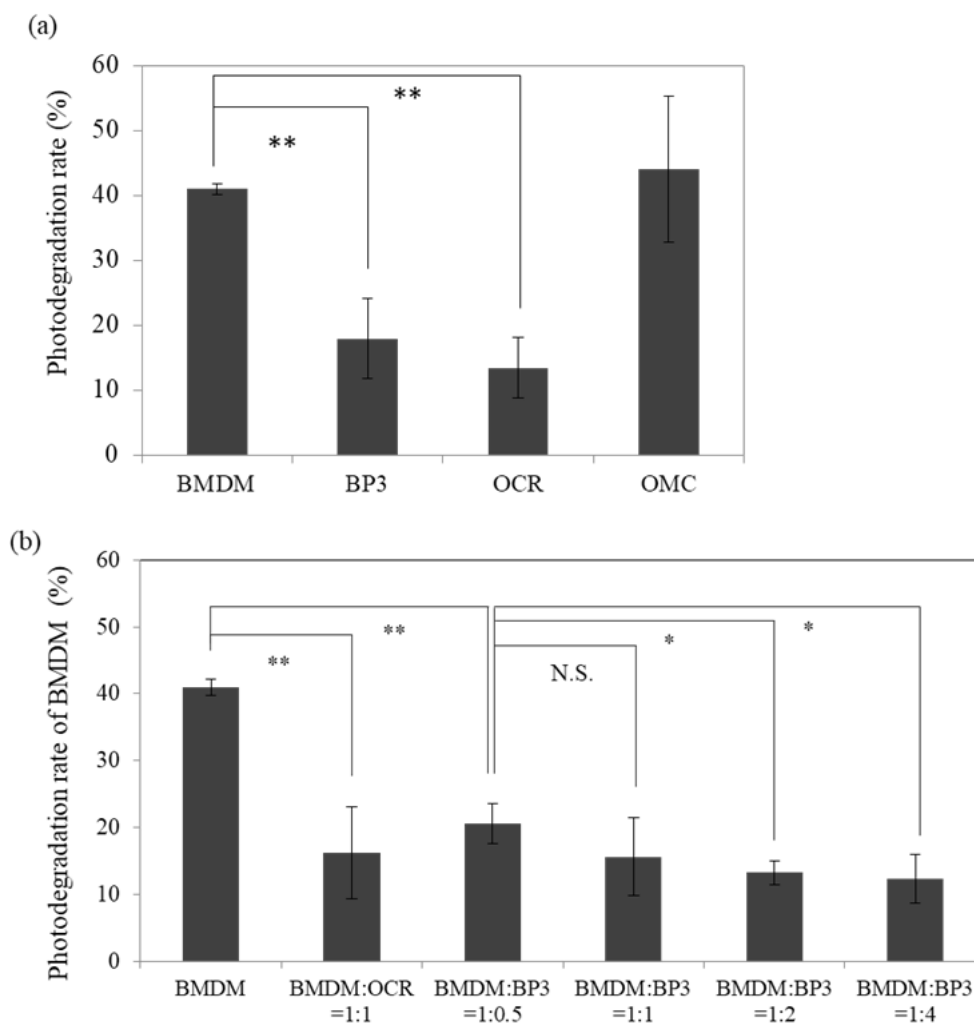


Fig. 2-3 Photodegradation of UV absorbers during irradiation with UV.

UV absorbers were dissolved in a mixture of glyceryl tri-2-ethylhexanoate and petrolatum, and oil gels containing UV absorbers were sandwiched between quartz plates. The UV spectrum of each oil gel was measured with a V-550 UV-visible spectrophotometer before and after irradiation with simulated solar UV light using a SPF Master. a) Photodegradation rate of each UV absorber, b) Photodegradation rate of BMDM combined with other UV absorbers. The photodegradation rate for (a) is expressed as a percentage of the difference in absorbance at the maximal wavelength for each UV absorber, and for (b) is expressed a percentage of the degradation in absorbance at the maximal wavelength of BMDM. Data are expressed as means \pm standard deviation in triplicate examinations. Significance; ; Student t-test *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, N.S.: not significant.

2-3-2 BP3 の BMDM 光劣化抑制作用機序の解明

OCR が他の紫外線吸収剤の光劣化を抑制することはこれまでも報告され、BMDM の光劣化のメカニズムについても光分解物の分析などから提案されている [114, 117]。しかし、本研究で明らかとなった BP3 の BMDM 光劣化抑制作用のメカニズムに関する知見はない。そこで、BP3 による BMDM の光劣化の抑制作用メカニズムを明らかにするため、Fig. 2-4 に示したように石英板に BMDM および BP3 を挟み込んだ膜の組み合わせによる BMDM の光劣化挙動評価を行った。BMDM を BP3 の上に配置した (b) の BMDM の光劣化は、予想通り BMDM 単独に疑似太陽光を照射した光劣化率 (a) と同じであった。BP3 を BMDM の上に配置した (c) の BMDM の光劣化も疑似太陽光照射した BMDM の光劣化率 (a) と有意差は確認されなかった。一方、BP3 を BMDM と混合し、分子同士の相互作用が可能な状態 (d) で疑似太陽光照射した場合の光劣化率は有意に抑制された。

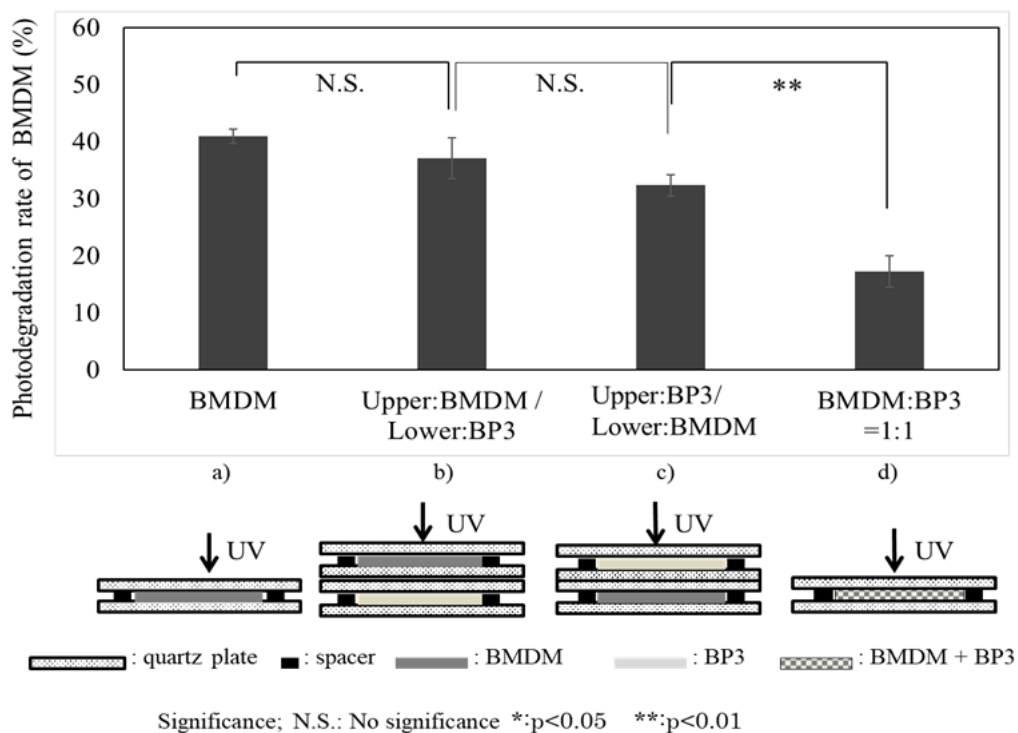


Fig. 2-4 Effects of BP3 on the photodegradation of BMDM.

BMDM with or without BP3 was dissolved in a mixture of glyceryl tri-2-ethylhexanoate and petrolatum and was sandwiched between quartz plates with a spacer. Each sandwiched plate was stacked as follows: upper side/bottom side, a) BMDM, b) BMDM/BP3, c) BP3/BMDM, d) quartz plate/BMDM+BP3. The plates were irradiated with UV from the upper side. The UV spectrum of each sandwiched plate was measured with a V-550 UV-visible spectrophotometer before and after irradiation with simulated solar UV light using a SPF Master. The photodegradation rate.

2-3-3 照射紫外線吸収剤から生成するラジカル種の同定

ESR スピントラッピング方法を用いて紫外線照射中に各紫外線吸収剤から生じるラジカルの ESR スペクトルを測定した。検討した紫外線吸収剤の中で、BMDM は BP3 (0.10 ± 0.06) および OCR (0.41 ± 0.03) と比較して 0.63 ± 0.03 と高いラジカル生成を示した (Fig. 2-5)。その ESR シグナルパターンを日本電子株式会社‘アプリケーションノート ER070002 活性酸素消去能評価法’、(<https://www.jeol.co.jp/applications/detail/1342.html/>, 2021 年 7 月 11 日アクセス) を参考として解析したところ、近接する N 原子およびその β 位の H 原子、 γ 位の H 原子の影響により 12 本に分裂した ESR シグナルが観察された。このシグナルパターンから DMPO-OOH (DMPO の superoxide anion radical 付加体) と同定された (Fig. 2-6a)。

また、先行研究において AGEs に UV 照射すると $\cdot O_2^-$ が生成すること、生成した $\cdot O_2^-$ から、その系に SOD を加えると $\cdot O_2^-$ が分解され、 H_2O_2 を経て $\cdot OH$ が生成することが確認されている [68]。その ESR シグナルパターンである Fig. 2-6c と比較したところ類似していた。さらに、SOD (150 units/mL) を添加したところ、文献[68]の同様に $\cdot O_2^-$ に由来するシグナルは消失し (Fig. 2-6a, b, c, d)、そのラジカル強度は有意に低下した (Fig. 2-5)。これらから、UV 照射時に BMDM は I 型光増感反応を介して $\cdot O_2^-$ を生成したことが示唆された。

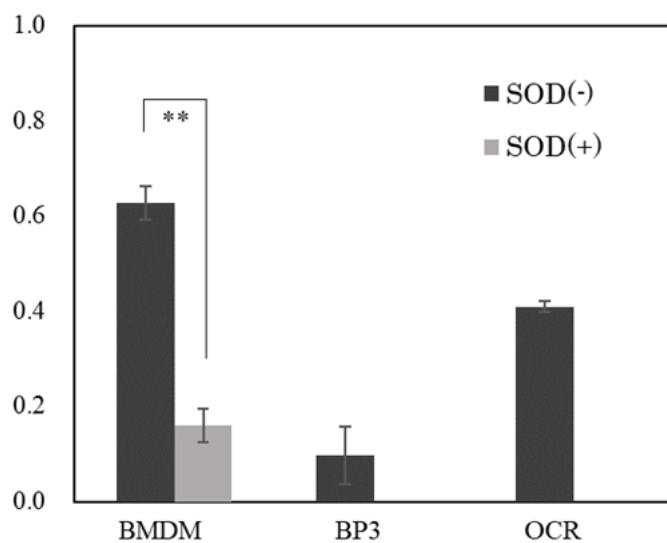


Fig. 2-5 Radical generation from UV absorbers during UVA irradiation. Radical intensity of UV absorbers irradiated with UV. UV absorbers were solubilized containing 0.1% DMSO with DMPO. The resulting solutions were transferred into ESR quartz flat cells and their ESR spectra under irradiating solar simulated light. Data are expressed as means \pm standard deviation in triplicate examinations. Significance; Student t-test **: $p < 0.01$.

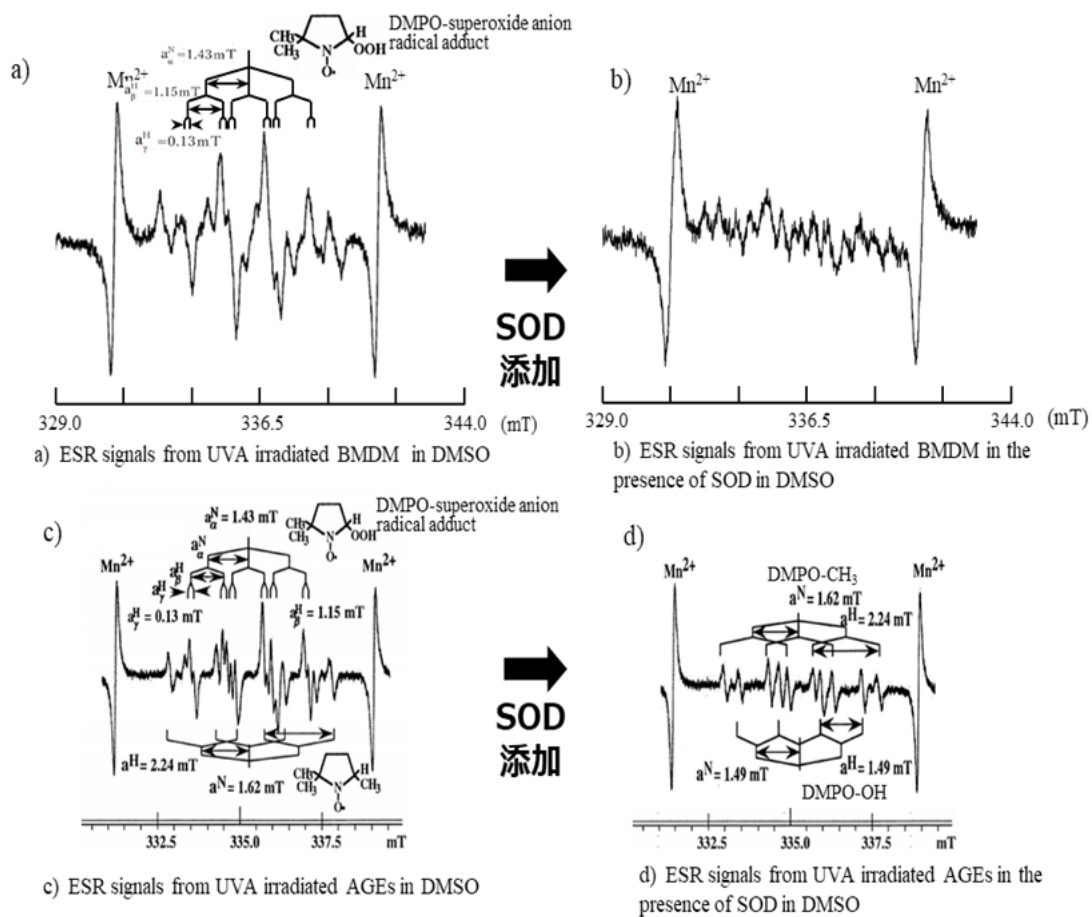


Fig. 2-6 ESR signals of radicals generated from BMDM and AGEs during UVA irradiation

c),d)は文献[68]より転載

また、光劣化を抑制したことから UVB 吸収剤の BP3 と OCR を、紫外線照射中の BMDM からの $\cdot\text{O}_2$ の生成を抑制させることを期待して BMDM に組み合わせ、その効果を測定した。その結果、BMDM に OCR を加えるとラジカル強度は変化がほとんどなかったが、BP3 を加えるとラジカル強度が有意に低下した (Fig. 2-7)。

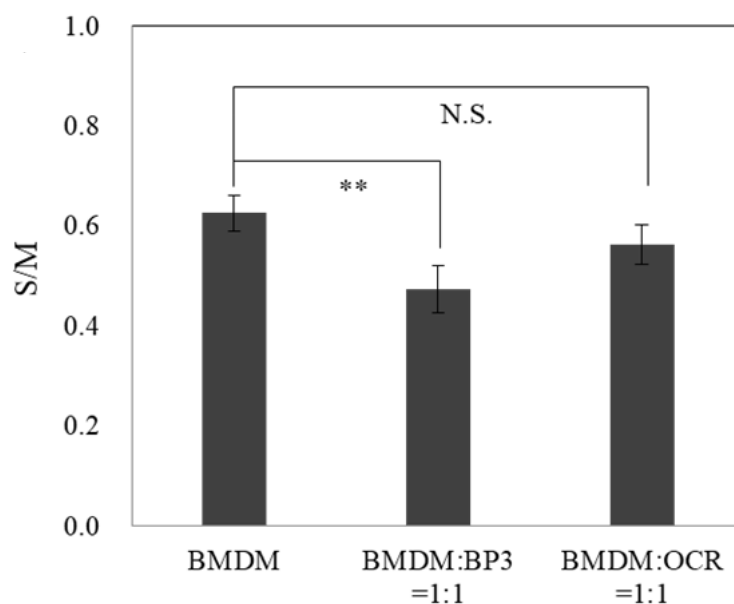


Fig. 2-7 Radical generation from UV absorbers during UVA irradiation. Radical intensity of BMDM irradiated with UV in the presence of another UV absorber. UV absorbers were solubilized containing 0.1% DMSO with DMPO. The resulting solutions were transferred into ESR quartz flat cells and their ESR spectra under irradiating solar simulated light. Data are expressed as means \pm standard deviation in triplicate examinations. Significance; Student t-test **: $p < 0.01$, N.S.: not significant.

2-3-4 紫外線吸収剤の光毒性

UVA に曝露された HaCaT ケラチノサイトの生存率を紫外線吸収剤の有無に分けて Table2-2 に示した。紫外線吸収剤非存在下で UVA に曝露した HaCaT ケラチノサイトの生存率を、紫外線吸収剤存在下で UVA に曝露した HaCaT ケラチノサイトの生存率で除した光毒性指数 (phototoxicity index) を算出した。

結果として、実験を行った紫外線吸収剤の中で BMDM 添加して UVA に曝露された HaCaT ケラチノサイトの生存率は低く、光毒性指数は 11.1 と非常に高い毒性が認められた。BP3 と OCR の光毒性指数は、それぞれ 1.1 および 1.2 と BMDM の光毒性指数より有意に低く、この 2 つの値に有意差はなかった。興味深いことに BMDM への OCR の添加により光毒性指数は 8.5 に、また、BMDM への BP3 の添加により 2.7 まで低下した。

Table. 2-2 Phototoxicity index

UV absorber	Absence of UV absorber [#] (%)	Presence of UV absorber [†] (%)	significance	phototoxicity index
BMDM	84.8 ± 6.9	7.6 ± 1.0	***	11.1
BP3	88.3 ± 5.9	72.8 ± 1.9	**	1.2
OCR	88.7 ± 2.9	79.8 ± 5.1	*	1.1
BMDM:BP3=1:1	73.8 ± 3.6	27.3 ± 1.4	***	2.7
BMDM:OCR=1:1	92.8 ± 1.8	11.0 ± 1.5	***	8.5

HaCaT keratinocytes were exposed to UVA at a density of 10 J/cm² in the presence or absence of a UVA absorber. Cell viability was determined by the incorporation of neutral red. The phototoxicity index is expressed as the ratio of # and †. Data are shown as means ± standard deviation for quintuplicate examinations. Significance between # and † ; *: *p* < 0.05, **: *p* < 0.01, ***: *p* < 0.001

2-4 考察

BMDM は非常に有効な UVA 吸収剤の 1 つであり、日焼け止め化粧品に広く使用されている。しかし、紫外線曝露を受けると徐々にその紫外線吸収能が低下するという欠点があった。この紫外線吸収能の低下は、光劣化と呼ばれる。BMDM の光劣化メカニズムとして、EZ 異性化、BMDM の三重項ジケト型の生成、および紫外線エネルギー吸収に起因する励起化合物の光分解の関係などが提唱されている [114, 115, 117-121]。このように、紫外線吸収剤の光劣化に関する研究は行われてきたが、紫外線曝露時の紫外線吸収剤からの ROS の生成と、その結果生じる皮膚損傷のリスクについてはほとんど注目されてこなかった。ROS は光老化を引き起こす主要因子である。紫外線吸収剤が角層に容易に浸透することが、生体内共焦点ラマン分光法を用いた最近の研究で明らかにされている [88, 92, 109]。これらの結果を考え合わせると、紫外線のエネルギーを吸収した紫外線吸収剤により皮膚内部で生成されるラジカルや ROS が、光毒性や光感作性などの皮膚傷害を引き起こし、さらに光老化を促進する潜在的リスクがあると考えられる。

本研究は、紫外線照射された BMDM の光劣化を抑制するために他の紫外線吸収剤との適切な組み合わせを見出すことを目的に行った。また、その際に ROS 生成と光毒性についても観察した。

その結果、BP3 は紫外線照射時の BMDM の光劣化を濃度依存的に抑制した。そのため、BMDM と BP3 の組み合わせの日焼け止め化粧品への応用は、一般に BMDM 安定剤として知られている OCR 同様に、効果的に皮膚への UVA ダメージ抑制できる日焼け止め化粧料を提供できると考えられる。

そして BP3 が BMDM のラジカル生成と光劣化を抑制するメカニズム検討として、BMDM の光劣化を誘発する波長を BP3 が吸収することによって BMDM の光劣化が抑制されたという仮説を考えた。仮説の検証のため、Fig. 2-4 のような実験により BP3 を光フィルターとした場合の BMDM の光劣化への影響を確認した。その結果、BP3 のフィルター膜を透過した紫外線光は、直接紫外線光に曝露した BMDM と同程度の光劣化を引き起こした。よって BMDM の光劣化抑制の主な原因が上記仮説であることは否定された。次に、BMDM と BP3 の化学的相互作用が原因であるという仮説を考えた。BP3 をオイルゲル中に BMDM と混合すると BMDM の光劣化が有意に抑制された (Fig. 2-5)。過去の

文献でも、OCR が BMDM の紫外線励起エネルギーの受容体として機能し、BMDM を安定化することが知られている [117]。さらに、OMC は、光によって励起されて三重項励起状態となった BMDM からの三重項エネルギー受容体となることによって、BMDM 光劣化を防止することが報告されている [115, 119, 120]。本研究の結果から、BP3 も紫外線に曝露された BMDM の励起エネルギーの受容体として働いている可能性があると考えられた。

次に紫外線照射の際に生ずる BP3 や OCR による光毒性の変化について確認した。紫外線吸収剤の ESR 測定実験は、BMDM が他の紫外線吸収剤と比較して紫外線照射により多量のラジカルを生成することを示した (Fig. 2-5)。そのラジカル種はシグナルパターンからスーパーオキシドアニオンラジカル ($\cdot\text{O}_2^-$) と推定されたため、SOD がラジカル強度に及ぼす影響を検討した。SOD は信号強度を大きく低下させたことから、生成したラジカルは $\cdot\text{O}_2^-$ と同定された。通常、細胞内で自発的な変換あるいは SOD による不均化反応により H_2O_2 に変換され、さらに H_2O_2 は Fe^{2+} 、 Cu^+ の存在下、フェントン反応によりさらに傷害性の高い $\cdot\text{OH}$ となる (Fig. 1-6)。そして $\cdot\text{OH}$ は高頻度で細胞を傷害することが知られているため、紫外線照射された BMDM から生成した $\cdot\text{O}_2^-$ に起因して HaCaT ケラチノサイト内で $\cdot\text{OH}$ が生成し、それによる細胞死が起きていることが推測された。今回の知見として、BMDM の $\cdot\text{O}_2^-$ 生成経路は、励起した BMDM からの I 型光増感反応を介した電子移動に起因するものだということが示唆された (Fig. 2-8)。

また、UVA 照射中の紫外線吸収剤による細胞傷害実験を行った。BMDM 単独の存在下で UVA に曝露した HaCaT ケラチノサイトは、他の紫外線吸収剤と比較して有意に低い細胞生存率を示した。興味深いことに、UVA で照射された BMDM からの $\cdot\text{O}_2^-$ 生成は BP3 の共存により抑制された (Fig. 2-7)。また、BMDM と BP3 が共存した場合、BMDM 単独では低下した UVA 曝露中の細胞生存率は回復した (Table 2-1)。この 2 つの結果から、BMDM は $\cdot\text{O}_2^-$ 生成に起因して光毒性を誘発するが、BMDM と BP3 を併用すると、このリスクは抑制されると考えられた。

本研究で得られた BP3 と OCR の組み合わせ効果の結果を簡単に Table 2-3 にまとめた。

Table. 2-3 Comparison of effects of BP3 / OCR on BMDM

	BP3 との組み合わせ	OCR との組み合わせ
BMDM の光劣化	抑制	抑制
BMDM の ROS 生成	抑制	抑制効果認められず
BMDM の光毒性	抑制	抑制

結果を比べると、ROS 生成に関して OCR と BMDM の組合せでは抑制効果が認められなかったことから、ROS の抑制をしながら光劣化を抑制する BP3 と BMDM の組み合わせは、紫外線照射時の BMDM 光劣化抑制のための最適な組み合わせの一つであるといえる。また、BP3 は濃度依存的に BMDM の劣化を抑制し、同時に紫外線照射時の BMDM に起因する ROS 生成と光毒性も抑制した。これらのことは本研究で初めて明らかにされた事象である。

また、BMDM と BP3 の組み合わせによる ROS 生成の抑制度合いは、SOD の存在下や BP3 単独の場合と比較すると小さなものであったにもかかわらず (Fig. 2-5)、BP3 の共存下において BMDM に起因する光毒性の著しい抑制が認められた (Table 2-2)。この理由の 1 つとして、BP3 共存下の BMDM からの ROS 生成が毒性発生の閾値濃度より低い濃度であった可能性が挙げられる。H₂O₂ による細胞死においては閾値濃度があることが知られており [136]、細胞毒性においても閾値濃度が存在することが予想される。

また、度合いは小さなものであったとはいえ BP3 は紫外線照射時の BMDM からの ROS 生成を抑制したが、OCR は BMDM からの ROS 生成を抑制しなかった。それにもかかわらず BMDM の光毒性は抑制した (Fig. 2-7, Table 2-2)。過去の報告において、BMDM の紫外線照射時の光劣化はエノール型の EZ 異性化とジケト異性化により起こることが実証されており [114, 115]、UVB 吸収剤による光劣化の抑制は三重項励起エネルギーの移動による安定化や、溶媒和によるエノール体の安定化 [121, 137] が関与することが知られている (Fig. 2-8)。

さらに、BP3 と OCR の BMDM に対する ROS 生成抑制能に差が見られたが、2つの励起エネルギー受容体としての特性と溶媒和の特性の両方が関与する可能性が考えられる。さらに、先行研究において、紫外線曝露により励起した BMDM に起因する光分解生成物であるベンジル誘導体が細胞毒性を有することが確認されている [93]。このことから、光毒性には励起した BMDM の光分解生成物の発生も関与しており、BP3 と OCR の組み合わせで BMDM の光分解物に違いが生じた可能性がある。以上のように、さまざまな可能性が考えられるが、詳細については今後さらなる研究が必要である。

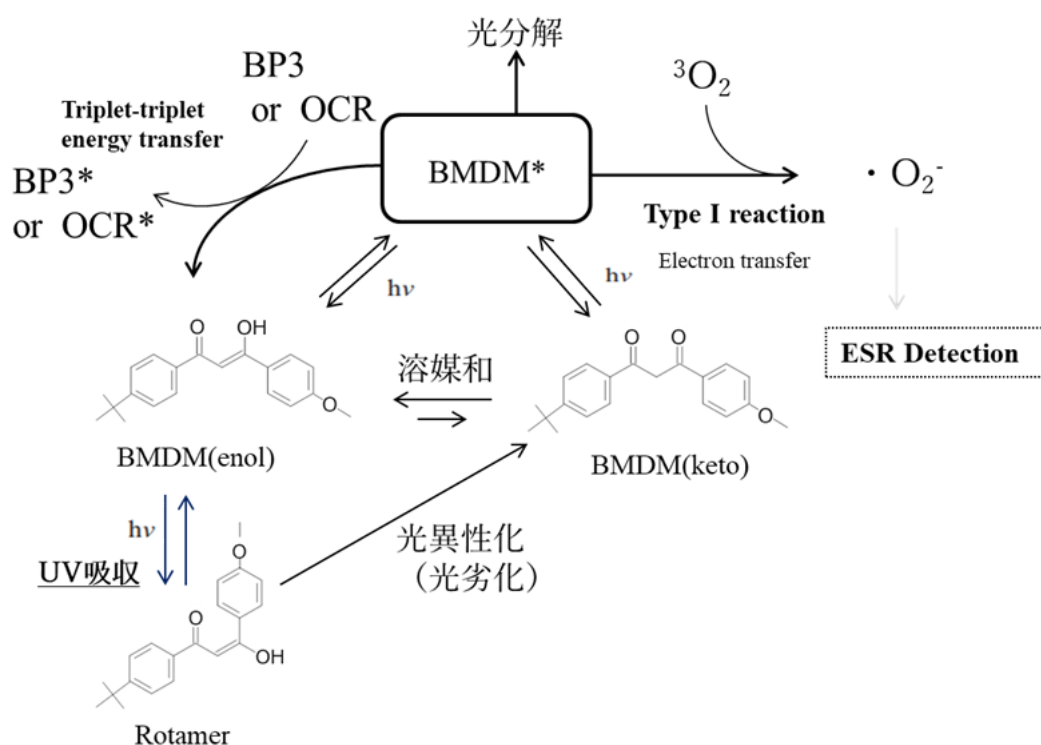


Fig. 2-8 A hypothetical scheme: superoxide anion radical generation and stabilization with UVB absorber

2-5 結論

本研究では、化粧品の日焼け止め化粧料で最も広く使用されている UVA 吸収剤である BMDM の光劣化を抑制するための有効な解決策として、BMDM と BP3 の組み合わせが有効であることを初めて明らかにした。また、BMDM の紫外線曝露時の $\cdot\text{O}_2$ 生成と細胞毒性を確認した。

そして、本研究で提案した組み合わせは、紫外線照射を効果的かつ安全に遮断するため、皮膚老化を遅らせることが期待されるものであり、今後の日焼け止め化粧料開発においても重要な知見である。

第3章 オルガノクレイの配合は疑似皮膚プレート上に塗布した日焼け止め化粧料の紫外線吸光能を高める

3-1 緒言

日焼け止め化粧料の皮膚傷害リスクを抑制するためには、その原因となる日焼け止め化粧料中の紫外線吸収剤濃度を下げることが有効であると思われる。しかし、そのような日焼け止め化粧料であっても高い紫外線防御能の維持が求められる。

日焼け止め化粧料の紫外線防御能は、*in vivo* 評価試験方法を用いて評価されが、同じ紫外線吸収剤組成と配合量にもかかわらず、日焼け止め化粧料の示す SPF 値は、製剤処方の違いによって変化する例が複数報告されている [124, 127, 138]。このような日焼け止め化粧料の SPF 値の変動要因は、SPF 試験法 (ISO24444: cosmetics-sun protection test methods-*in vivo* determination of the sun protection factor) [101] の中では塗布量と塗布方法が定められているため、紫外線吸収剤の化学的特性および日焼け止め化粧料の塗布量や塗布方法以外のパラメーターであると考えられる。こうした現状にもかかわらず、日焼け止め化粧料の紫外線防御能に影響する塗布量や塗布方法、および配合する紫外線吸収剤種以外のパラメーターについての体系的な研究は十分ではなかった。

最近の研究では、紫外線吸収剤の光劣化 [114]、皮膚浸透 [107]、日焼け止め化粧料中での紫外線吸収剤の不均等な分散 [6, 122, 139, 140]、皮膚塗布後の塗布膜の厚さの均一性 [123, 124, 138, 141] が紫外線防御能に影響することが明らかになっている。日焼け止め化粧料の塗布膜の厚さに関する研究では、紫外線吸収剤が効果的に機能するためには皮膚上の膜厚が均一でなければならないことが報告されている。しかし、ヒトの皮膚は皮丘と皮溝からなる凹凸表面を有するため、手で塗布すると日焼け止め化粧料が皮溝に流れ込み、結果として、皮丘の領域は日焼け止め化粧料の塗布膜が薄くなることが避けられず、均一性の高い膜を形成することは非常に困難である。実際、皮膚への紫外線の透過と日焼け止め化粧料の紫外線防御能が、日焼け止め化粧料が塗布膜均一性に影響されることが報告されている [123]。さらに、キサントガムのような水溶性増粘剤を含まない粘度の低い水中油型溶剤は SPF 値が低くなることが報告されている [124]。したがって、日焼け止め化粧

料の物性、特に粘度は日焼け止め化粧料の紫外線防御能に影響を及ぼしていると推察される。

一方、広く使用されている有機紫外線吸収剤は親油性分子であり、通常、日焼け止め化粧料の油相に溶解するため、日焼け止め化粧料を皮膚に塗布した場合、配合されている揮発成分が揮発後に形成される膜は、主には有機紫外線吸収剤の溶解した油膜である。そこで本章においては、油相粘度を増加させることが紫外線防御能に影響を与えるという仮説を立てた。工業用途や塗料分野では増粘剤添加による油のレオロジー変化とその特性の研究が多くなされている [142-145]。特に粘土鉱物は塗料の増粘剤として配合され、むら防止に必要なレベリング性と再増粘によるたれ落ち防止をゲル塗膜のチクソトロピー性により両立するために用いられている。また、化粧品分野でも油増粘剤の物性制御により化粧料の広がりや使用感触、仕上がりの外観をコントロールする研究も行われている [146-150]。本研究では、これら過去知見が適用可能なオルガノクレイ、シリル化シリカ、ワセリン、パルミチン酸デキストリンの4つの油増粘剤を日焼け止め化粧料に配合し、油相のチクソトロピー性が日焼け止め化粧料の凹凸面上の塗布膜に与える影響、紫外線防御能へ与える影響の観察を試みた。また、日焼け止め化粧料への油増粘剤添加に関しては、特許文献 [151] においてパルミチン酸デキストリンの添加が日焼け止め化粧料の皮膚への均一塗布を容易にすることは述べられている。しかし、目視にて均一性を観察したのみで、油相粘度と膜厚の関係性については言及されていない。これは、ヒトの皮膚表面に形成された塗布膜の均一性の測定が困難であったことに起因すると考えられる。

一方、ヒト皮膚表面を模倣した SMS (skin-mimicking substrate) を用いることにより測定した日焼け止め化粧料の *in vitro* SPF 値が *in vivo* SPF 値と高い相関を示すことが報告されている [104-106]。この結果は、SMS 上で日焼け止め化粧料が形成する塗布膜の状態がヒト皮膚表面上に近く、SMS が化粧料塗布膜を評価するのに適したプレートである可能性を示唆している。

本章では、紫外線防御能を高める手段として日焼け止め化粧料の膜厚均一性に注目して処方最適化の方向性を明らかにすることを目的とした。そして、SMS 上に塗布した日焼け止め化粧料の塗布膜の厚さ均一性および紫外線防御能を計測することにより、日焼け止め化粧料の油相粘性が日焼け止め化粧料塗布膜の厚さ均一

性にどのように影響し、日焼け止め化粧膜の紫外線吸収能をどの程度変化させるかを明らかにした。

3-2 実験方法

3-2-1 試薬

本研究に用いた試薬は以下から入手した。INCI 名 ; 化学名 (本研究表記名;商品名;入手先) で記載した。

2-(4-Diethylamino-2-hydroxybenzoyl)-benzoic acid hexyl ester; 2-(4-Diethylamino-2-hydroxybenzoyl) -benzoic acid hexyl ester (DHHB; Uvinul™ A+; BASF Japan, 東京, 日本)、Quaternium-18 hectorite ; Ion-exchange addition product, Dimethyldioctadecylammonium chloride with hectorite clay (Organoclay; BENTONE® 38V CG; Elementis Specialties, East Windsor, NJ, USA)、Silica silylate; amorphous silica, reaction products with trimethylsilane; (シリル化シリカ ;DOWSIL™ VM - 2270; ダウ株式会社, USA)、Petrolatum ; (ワセリン; 小城製薬株式会社, 大阪, 日本), Dextrin palmitate (パルミチン酸デキストリン; Rheopearl™ KL2; 千葉製粉株式会社, 千葉, 日本)、PEG-10 Dimethicone ; Silicones and siloxanes, dimethyl, hydropoly (oxy-1, 2-ethanediyl methyl, trimethylsilyl terminated) (10 mol EO average molar ratio) (PEG-10 ジメチコン; KF6017; 信越化学工業株式会社, 東京, 日本), Cyclopentasiloxane ; Decamethylcyclopentasiloxane (デカメチルシクロペンタシロキサン; 信越化学工業株式会社, 東京, 日本)、Glyceryl tri (2-ethylhexanoate) (トリエチルヘキサノイン; Trifat™ S-308; 日光ケミカル株式会社, 東京, 日本)、Sodium chloride; sodium chloride (塩化ナトリウム; 塩化ナトリウム; ナカライテスク株式会社, 京都, 日本)。

3-2-2 油相および日焼け止め化粧品試料

第2章においては、汎用性の観点から UVA 吸収剤として BMDM を配合した日焼け止め化粧品を用いたが、第3章においては、吸光度および膜厚均一性を光劣化の影響を排除して評価するため、光劣化の程度が極めて小さい UVA 吸収剤、DHHB (Hexyl 2-(4-N,N-diethylamino-2-hydroxybenzoyl)-benzoate) を 2wt% 濃度で用いた。本章では、光劣化の影響を排除するために、紫外線吸収剤として光劣化が極めて少ない DHHB を選択した [117]。そして化粧品成分として一般的に使用される

増粘剤を含有した油を使用して試料を調製した。増粘剤としてはパルミチン酸デキストリン（両親媒性化合物）、ワセリン（有機非極性ポリマー）、シリル化シリカ（微細固体粒子）、オルガノクレイ（粘土鉱物）を用いた。

各増粘剤の添加により増粘した油相は以下のように調製した：2 g の DHHB を含む 18 g のトリエチルヘキサノイン、および 4 g の乳化剤、PEG-10 ジメチコンを各増粘剤 0.5 g, 1.0 g, 2.0 g と混合し、HM-300 ホモミキサー（AS ONE, 東京, 日本）を用いて 80°C で 3 分間、回転数 2000 rpm で分散した。さらに、それぞれ吸収剤を含まないオイルゲルを調製し、紫外線吸収剤を含まない状態では紫外線吸収がないことを確認した。

油中水型乳化中の DHHB を含む 10 種類の日焼け止め化粧品サンプルを調製した。処方 Table 3-1 に示す。トリエチルヘキサノイン、DHHB、PEG - 10 ジメチコン、および各増粘剤を混合し、80°C で 2 分間加熱して可溶化した。デカメチルシクロペンタシロキサンと塩化ナトリウムを含有するイオン交換水の添加後得られた混合物を、HM-300 ホモミキサーを用いて 80°C で 3 分間、回転数 2000 rpm で乳化した。

Table. 3-1 Sunscreen formulations used in this study

Ingredient	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample	Sample
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	without UV-filter
	Composition (wt%)												
Organoclay	-	0.5	1.0	2.0	-	-	-	-	-	-	-	2.0	4.0
Silica Silylate	-	-	-	-	1.0	2.0	-	-	-	-	-	-	-
Petrolatum	-	-	-	-	-	-	1.0	2.0	-	-	-	-	-
Dextrin palmitate	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	2.0	-	-	-
DHHB	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	1.0	1.0	-
PEG-10 dimethicone	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
Triethylhexanoin	18.0	18.0	18.0	18.0	18.0	18.0	18.0	18.0	18.0	18.0	19.0	19.0	20.0
Decamethylcyclopenta siloxane	37.0	36.5	36.0	35.0	36.0	35.0	36.0	35.0	36.0	35.0	37.0	35.0	72.0
Deionized water	38.5	38.5	38.5	38.5	38.5	38.5	38.5	38.5	38.5	38.5	38.5	38.5	-
Sodium chloride	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	-

The sample without UV filter was confirmed to have an absorbance of 0.01 or less, and no absorption was observed in materials other than DHHB, such as organoclay.

3-2-3 増粘剤を含む油相の粘度測定

日焼け止め化粧料の *in vitro* SPF 測定では、プレートにサンプルを 60 秒間指で塗り広げた。*in vitro* SPF 測定の条件下におけるサンプルの状態を模倣するため、塗り広げた後の油相の粘度を、シアレート制御の方法で行った [152, 153]。試料をレオメーターのサンプル台に 1.0 g 乗せて 50 mm 平行板で挟み、指で塗り広げる動作の模倣として 100 s^{-1} の一定ずり速度で 60 秒間せん断応力を与えた後、続けてすぐに平行板回転レオメーター (MCR 102; アンTONパール GmbH, オーストリア, グラーツ; 50 mm 平行プレート、隙間サイズ = 0.5 mm) で 0.01 s^{-1} ~ 1000 s^{-1} までずり速度を変えて粘度測定した。測定中サンプル台の温度は $25.0^\circ\text{C} \pm 0.1^\circ\text{C}$ を保った。

3-2-4 化粧品塗布膜の吸光度の測定

日焼け止め化粧料の試料を SMS (SPF MASTER® PA - 01, 50 mm×50 mm × 0.8 mm; 資生堂イリカテクノロジー, 京都, 日本) に塗布して 25.0°C±1.0°Cの部屋で 30 分の乾燥後、日焼け止め化粧品塗布膜の紫外線吸光度を測定した。

SMS は Ishikubo らの研究[6]に基づいてヒトの背中の皮膚表面の皮溝の幅、深さ、頻度の測定結果をもとに V 字型の溝を片方の表面に付けた PMMA 製のプレートである。

Table. 3-2 Several measured designed values for SMS based on the grooves on skin surfaces

	Measured values	Designed values
Depth	50–100 μ m	76 μ m
Width	about 100 μ m	200 μ m
Frequency	1–2 line/mm	vertical : 1 line/mm horizontal : 0.5 line/mm diagonal : 0.5 line/mm

[6], Ishikubo *et al.*(2003)より転載

V 字型の溝に加えてサンドブラスト加工による表面処理により不規則な凹凸を与えていること、V 字型の斜めの面があるため概算とはなるが、皮丘に当たる部分と皮溝に当たる部分の面積比は約 2 : 1 に設計されている。

日焼け止め化粧料の 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/cm² の塗布は、マイクロシリンジを用いて SMS の表面に迅速に滴下し、ニトリルゴム製指サックを装着した指先で凹凸のある不均等な表面上に国際 SPF 試験方法に従って滴下した試料を塗り広げた [101]。SMS は室温で 30 分間乾燥させた。日焼け止め化粧品中の揮発成分の蒸発を SMS 重量の変化により確認したが、30 分後に SMS の重量にさらなる変化はなかった。

紫外線可視分光光度計 (V-550; Jasco, 東京, 日本) を用いて 352 nm での吸光度を測定した。日焼け止め化粧料を塗布した SMS の吸光度から SMS のベースラインの吸光度を差し引いて、日焼け止め化粧料の吸光度を求めた。1 つの試料につき 2 枚の SMS に塗布し、1 枚につきそれぞれ中心、中心より 1 cm 左、中心より 1 cm 右の 3 か所を測定して平均し、合計 6 点の値の平均値を求めた。

3-2-5 蛍光輝度による SMS 上の日焼け止め化粧料塗布膜厚の均一性の比較

試料を塗布した SMS を、蛍光剤を含む白色紙 (コクヨ上質普通紙 KPC-P1015, コクヨ株式会社, 大阪, 日本) 上に置いて、紫外線ランプ (FPL27BLB; 三共電気, 神奈川, 日本) を照射し、デジタル顕微鏡 (VHX - 7000; キーエンス株式会社, 大阪, 日本) を用いて反射蛍光の画像を得た。デジタル顕微鏡像から溝領域と丘領域の反射蛍光輝度値 (5 点平均) を求め、次式を用いて溝と丘の輝度比を算出した。

皮丘と皮溝の反射蛍光輝度比 = 溝領域の平均輝度/丘領域の平均輝度

3-2-6 共焦点レーザー顕微鏡による日焼け止め化粧料膜厚の測定

SMS に塗布した日焼け止め化粧料の膜厚を算出するために、レーザー波長 408 nm、出力 0.9 mW、対物レンズの倍率 50×、深さ 10 nm の解像度を設定した三次元レーザー走査共焦点顕微鏡 (VK-9700; キーエンス株式会社, 大阪, 日本) を用いて画像を得た [154-156]。SMS の画像は、日焼け止め化粧料の塗布の 30 分後に測定した。SMS の中心から長さ 4 mm の範囲を走査しながら 17 枚の画像としてスキャンし、その後イメージ結合アプリケーションソフト (VK - Assembler; キーエンス株式会社, 大阪, 日本) を用いて組み合わせて、塗布膜厚を計算し、日焼け止め化粧料の塗布の有無による SMS 表面の断面プロファイルを得た。日焼け止め化粧料の膜厚は、日焼け止め化粧料塗布の有無による SMS 表面の断面プロファイルの差として数値化した。概要を Fig. 3-1 に記した。

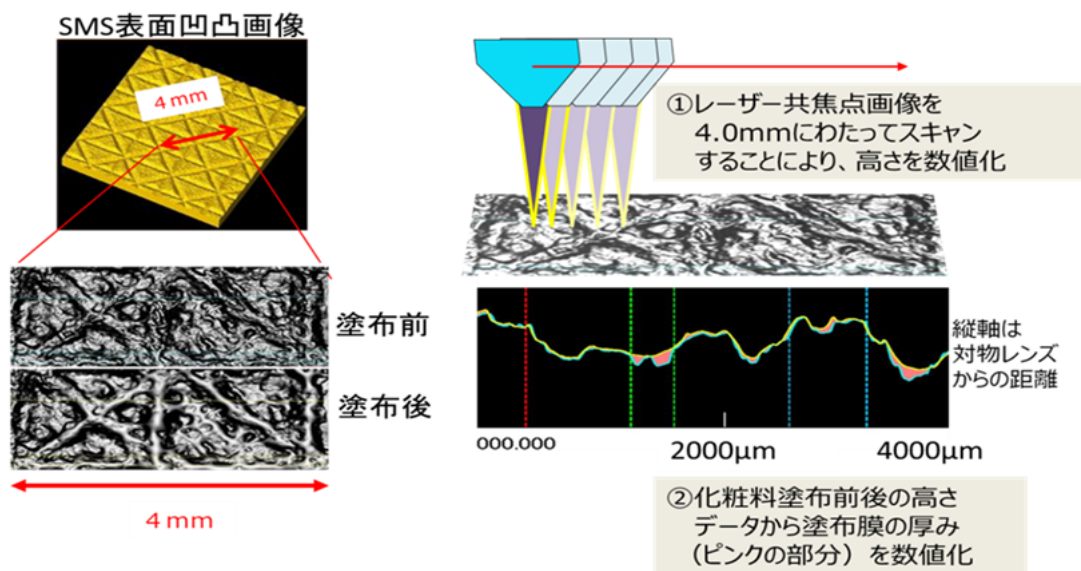


Fig. 3-1 Sunscreen film thickness measurement method using a confocal laser scanning microscope

3-2-7 統計解析

測定値は平均値 \pm 標準偏差で表し、Studentの t 検定によって有意差検定を行った。 p 値 0.05 未満を統計学的に有意とした。記載は以下の通りである。

* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、N.S.: not significant

3-3 結果

3-3-1 増粘剤を含む油相の粘度測定

最初に、日焼け止め化粧品に使われる代表的な4種の油増粘剤の増粘挙動を観察した。増粘剤を含有する油相のシアレート制御粘度測定の結果から、オルガノクレイやシリル化シリカを油に分散して配合すると、ワセリンやパルミチン酸デキストリンよりも低ずり速度域で油相の粘度が高くなることが明らかになった (Fig. 3-2)。製剤中に2.0wt%の増粘剤と24.0wt%の油を含む日焼け止め化粧品が乾燥した後に残存する26.0wt%の油相中の増粘剤濃度は7.7wt%である。そこで、7.7wt%の増粘剤配合の油相濃度について、測定結果の最も低いずり速度域 0.01 s^{-1} の粘度を比べると、オルガノクレイ増粘油相の粘度が最も高く、次いでシリル化シリカ増粘油相であった (Fig. 3-2)。ずり速度 0.01 s^{-1} において、オルガノクレイ7.7wt%増粘油相は、ワセリンの198倍の粘度を示した (Fig. 3-2)。

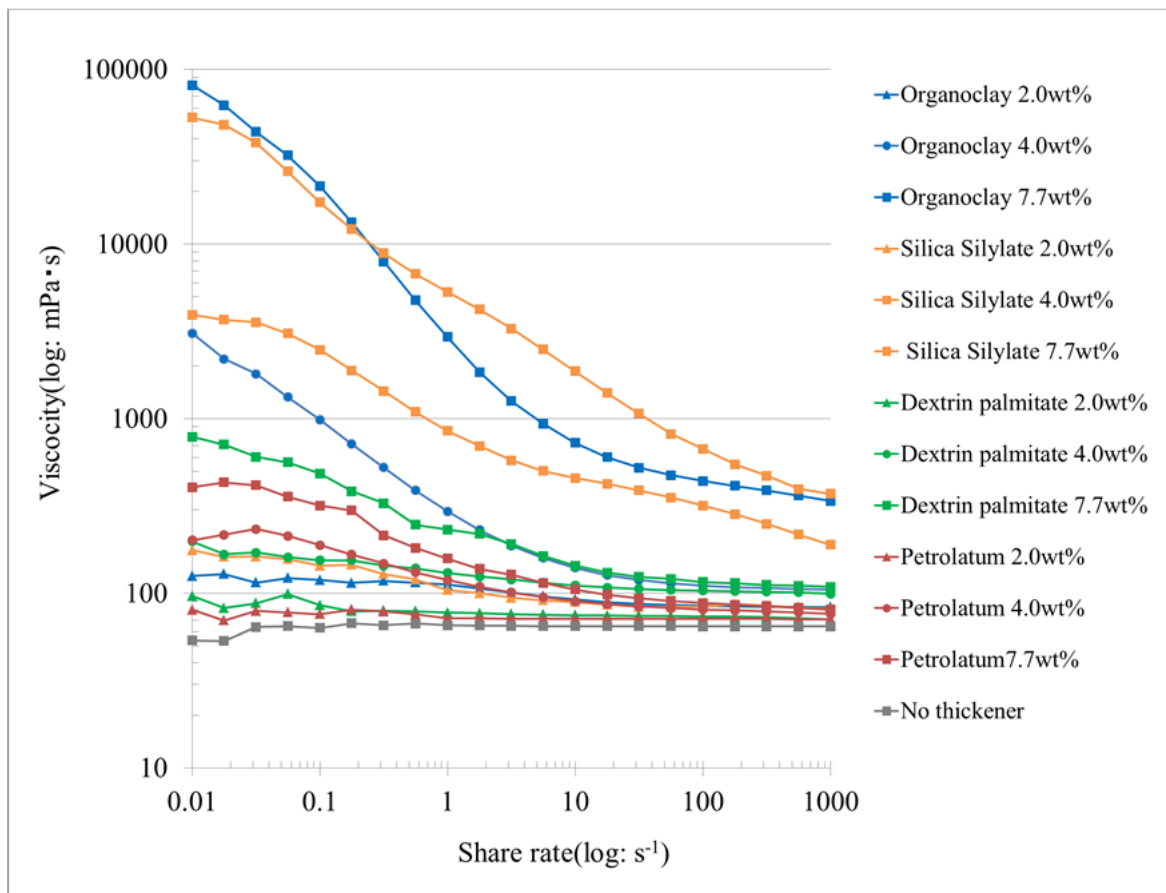


Fig. 3-2 Thickening efficiency of oil thickeners. The viscosity of the oil-phases containing 2.0, 4.0, and 7.7wt% of each thickener (0.5, 1.0, and 2.0g of each thickener, respectively, with 2.0g DHHB, 18.0g triethylhexanoin, and 4.0g PEG10 dimethicone) was compared using a parallel-plate rotational rheometer. The shear rate-dependent rheology of the oil phase containing thickeners was measured at a shear rate of 0.01–1000 s⁻¹ under 25° C ± 0.1° C, after steady shearing (shear rate 100 s⁻¹) for 60 s.

3-3-2 増粘剤の種類の違いによる吸光度測定

最初に、平滑な石英プレート上に Sample 1 と 4 種の増粘剤をそれぞれ 2.0wt% 配合した Sample 4, 6, 8, 10 のサンプルを 1.0 mg/cm² の塗布量で塗布して吸光度を測定した (2.0 mg/cm² の塗布量では吸光度が 3.5 を超え、計測不可能であった)。結果、5 つのサンプル間で吸光度に有意な差は見られなかった (Fig.3-3)。

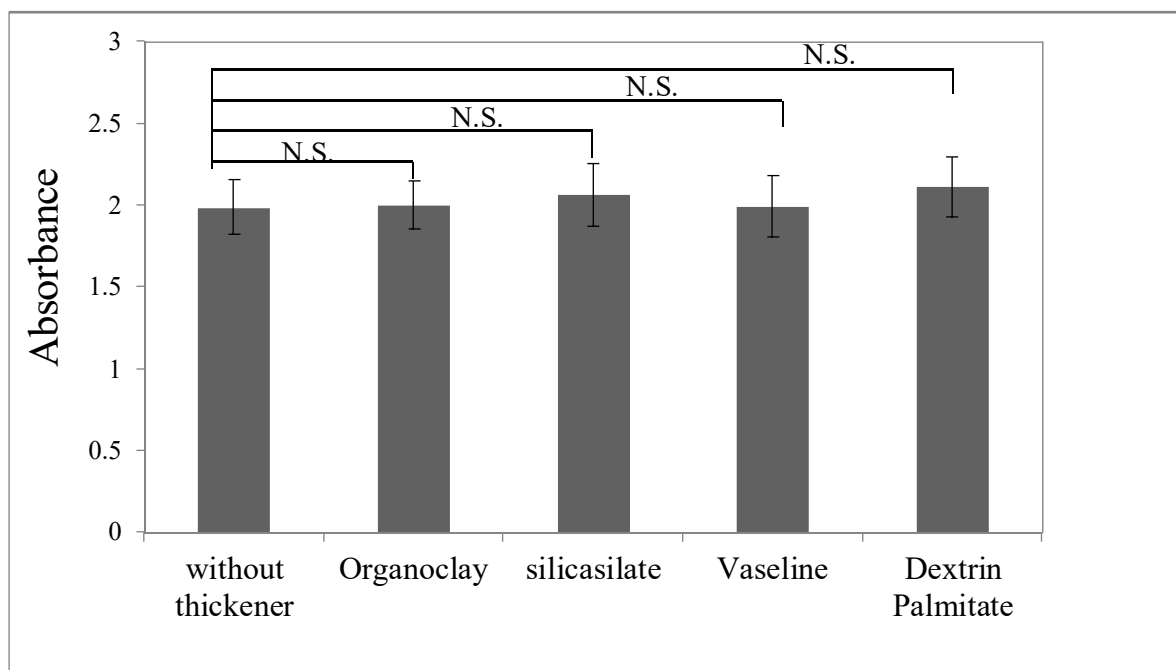


Fig. 3-3 Absorbance of sunscreen with various thickeners on flat quartz plates. Vertical axis: 352nm absorbance of each sample measured spectrophotometrically after 30 min of drying. Student's t-test N.S.: not significant.

次に種々の増粘剤 (1.0wt%または 2.0wt%) を含み、かつ、2.0wt%の DHHB を配合した (Table 3-1 の Sample 1, 3~9) 日焼け止め化粧料の吸光度測定を行った (Fig. 3-4)。

SMS に 2.0mg/cm² の塗布量で各種日焼け止め化粧料試料を塗布して吸光度を比較した。ワセリンやパルミチン酸デキストリンを含む日焼け止め化粧料塗布膜の吸光度は、増粘剤が増えてもわずかな増加であった。しかし、オルガノクレイやシリ

ル化シリカを含む日焼け止め化粧品塗布膜の吸光度は、増粘剤の量が 1.0wt%から 2.0wt%に増えると有意に増加した。

1.0wt%オルガノクレイ、2.0wt%オルガノクレイ、1.0wt%シリル酸シリカ、2.0wt%シリル酸シリカを含む日焼け止め化粧品塗布膜の吸光度は、増粘剤を含まない日焼け止め化粧品塗布膜 (0.80) の吸光度と比較して、それぞれ 1.24, 1.64, 1.20, 1.58 にそれぞれ増加した。

これらの結果は、今回検討した増粘剤の中でオルガノクレイが、最も日焼け止め化粧品の紫外線防御能を高めることができる油増粘剤であることを示している。

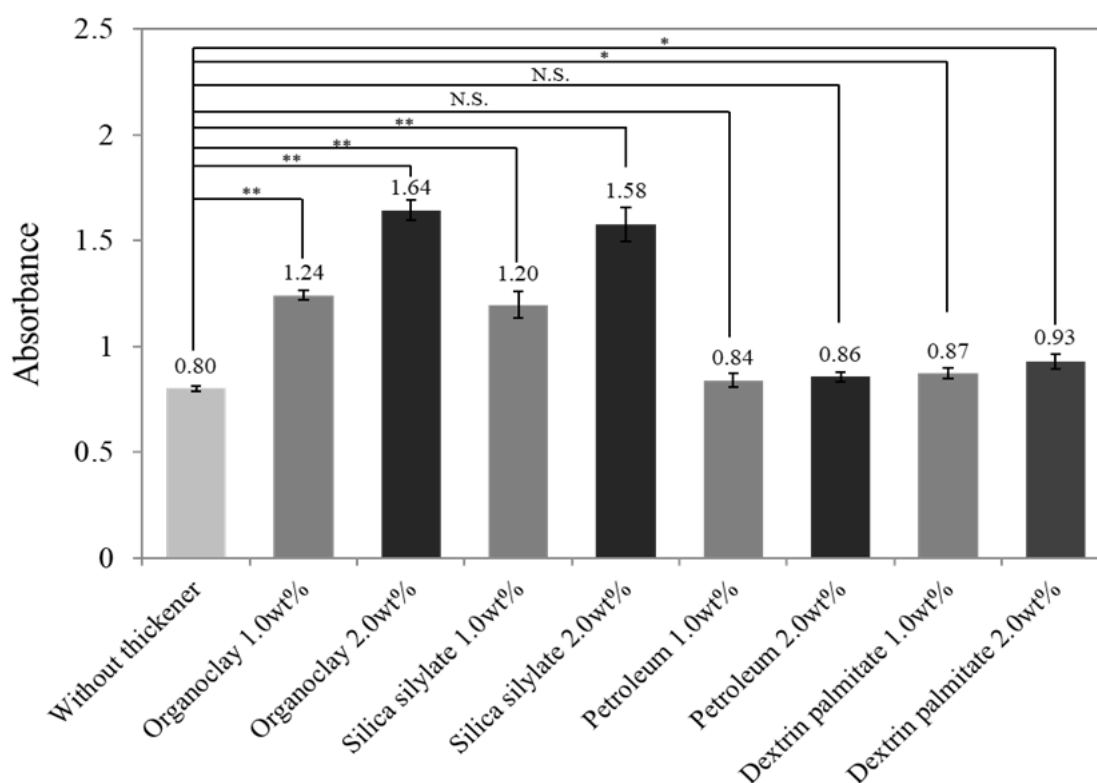


Fig. 3-4 Absorbance of sunscreen with various thickeners on the skin-mimicking substrate (SMS). Vertical axis: 352nm absorbance of each sample measured spectrophotometrically after 30 min of drying. Student's t-test *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, N.S.: not significant.

3-3-3 蛍光輝度による SMS 上の丘領域と溝領域における膜厚均一性

2.0wt% オルガノクレイ、2.0wt% シリル化シリカ、2.0wt% ワセリン、2.0wt% デキストリンパルミテートを配合した各日焼け止め化粧料を塗布した SMS の溝部と丘部の蛍光の輝度比は、それぞれ 0.87、0.85、0.75、0.77 であった (Table 3-2)。輝度比が低いことは膜厚が均一でないことを示し、1.0 に近い高い輝度比は均一性の高い膜厚であることを示す。この結果はオルガノクレイやシリル化シリカを配合した日焼け止め化粧料がワセリンやパルミチン酸デキストリンを配合した日焼け止め化粧料よりも SMS 上で均一性の高い膜厚を形成したことを示唆している。それぞれの塗布膜の吸光度も Table 3-3 に併記した。

Table 3-3 Brightness ratio of the hills and the groove

	Sample1	Sample4	Sample 6	Sample 8	Sample 10
Thickener	No thickener	Organoclay 2.0wt%	Silica silicate 2.0wt%	Petrolatum 2.0wt%	Dextrin palmitate 2.0wt%
Absorbance	0.80±0.032	1.63±0.121	1.58±0.078	0.86±0.046	0.93±0.075
Brightness ratio of the hills and the groove	0.69±0.013	0.87±0.036	0.85±0.015	0.75±0.032	0.77±0.032
Significance	-	**	**	N.S.	*

Brightness ratio of the hills and the groove

$$= \text{Average brightness of the groove area} / \text{Average brightness of the hill area}$$

The low brightness ratio indicates non-uniform thickness, and the high brightness ratio close to 1.0 indicates relatively uniform thickness in the table.

3-3-4 共焦点レーザー顕微鏡による日焼け止め化粧品塗布膜の断面プロフィール、膜厚および紫外線吸光度

オルガノクレイ無配合日焼け止め化粧品 Sample 1 と、2.0wt%のオルガノクレイ配合日焼け止め化粧品 Sample 4 を 2 mg/cm^2 で SMS に塗布した塗布膜の断面を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した断面プロフィールを Fig. 3-5 に示した。2.0wt%のオルガノクレイを含む日焼け止め化粧品と比較すると、オルガノクレイを配合していない日焼け止め化粧品はその多くが SMS の溝領域に流れ込んで厚い膜を形成し、SMS の丘領域には薄い膜が形成されていることが観察された。さらに、一部の領域では、膜厚がゼロから負の値であった (Fig. 3-5b, d)。膜厚の負の値は共焦点レーザー顕微鏡による測定と計算によって誤差が生じたものと考えられる。負の値を示す部分は塗布膜で覆われていない領域であると仮定し、膜厚ゼロとして平均膜厚や標準偏差を計算した。

さらに、オルガノクレイを 0.5wt%, 1.0wt%を含む Sample 2 および Sample 3 の日焼け止め化粧品を同様に 2 mg/cm^2 で SMS に塗布した塗布膜の共焦点レーザー顕微鏡により計測した日焼け止め化粧品塗布および無塗布の SMS の平均膜厚と標準偏差を計算し、Table 3-4 の中段と下段に示した。Sample 1~4 の膜厚の平均値にほとんど違いは見られなかったが、塗布膜厚の標準偏差はオルガノクレイ濃度依存的にそれぞれ 3.33, 2.66, 2.50, 2.31 μm と減少した。塗布膜厚の標準偏差の減少は日焼け止め化粧品塗布膜の厚さが均一になることを示しており、オルガノクレイ配合濃度が高まるに従い日焼け止め化粧品塗布膜の厚さが均一になることが確認された。

また、Sample 1~4 の日焼け止め化粧品を 2 mg/cm^2 量で SMS に塗布した塗布膜紫外線吸光度測定結果を Table 3-4 の上段に示した。オルガノクレイ配合濃度が 0.0wt%, 0.5wt%, 1.0wt%, 2.0wt% と増加すると、日焼け止め化粧品塗布膜の吸光度は配合濃度に依存して増加した (それぞれ、0.80, 1.00, 1.24, 1.63)。2.0wt%のオルガノクレイ配合日焼け止め化粧品 Sample 4 は、オルガノクレイ無配合日焼け止め化粧品 Sample 1 よりも 2.04 倍高い吸光度を示した。

以上の結果をまとめると、日焼け止め化粧品塗布膜厚の標準偏差が減少するにつれて日焼け止め化粧品塗布膜の紫外線吸光度は増加した。塗布膜厚の標準偏差と紫

外線吸光度との間で線形近似計算を行ったところ、重相関係数は 0.78 であり、高い負の相関が認められ、日焼け止め化粧品塗布膜の紫外線吸光度は、その膜厚の均一性に依存することが確認された。

Table. 3-4 Absorbance and film thickness of sunscreen containing different amounts of organoclay

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
Organoclay content	0wt%	0.5wt%	1.0wt%	2.0wt%
Absorbance	0.80±0.032	1.00±0.007	1.24±0.04	1.63±0.121
Mean thickness	3.97 μm	4.09 μm	4.01 μm	4.13 μm
Standard deviation of thickness	3.33 μm	2.66 μm	2.50 μm	2.31 μm

Absorbance: absorbance of each sample at 352 nm and absorbance measured spectrophotometrically after drying for 30 min.

Mean thickness: The mean film thickness at 4, 825 points in the range of 0–4, 000 μm, as obtained by measurement using a confocal laser microscope.

Standard deviation of thickness: Standard deviation of film thickness at 4, 825 points

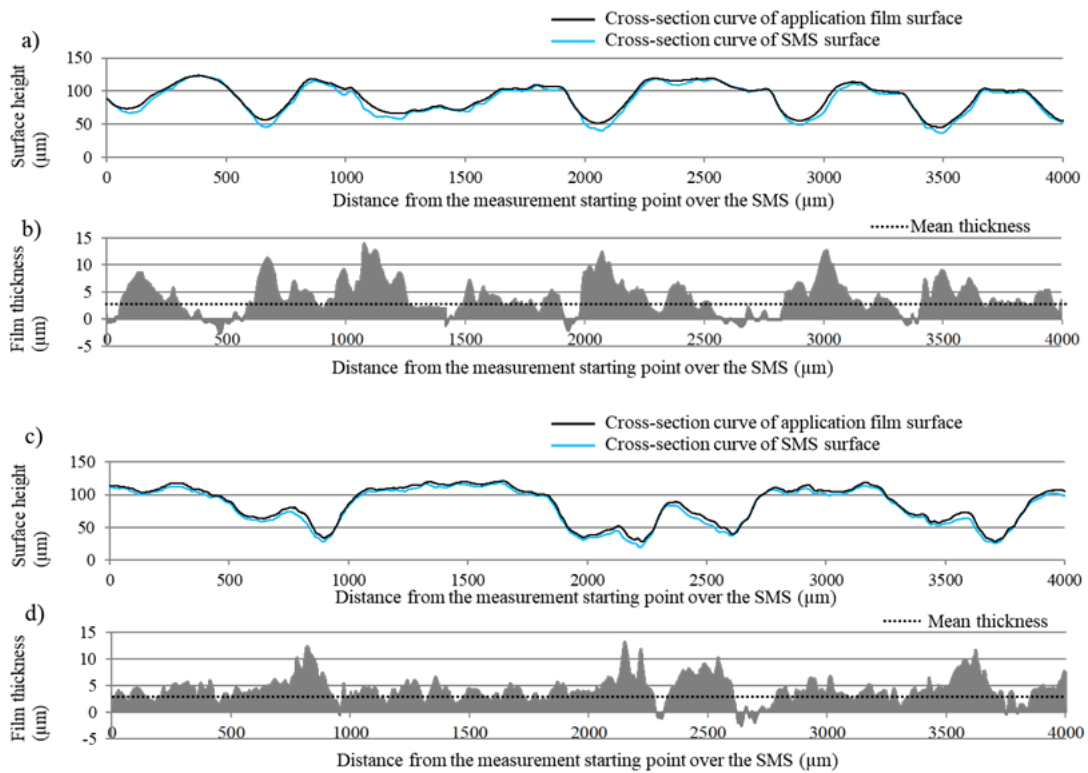


Fig. 3-5 Film formation of sunscreen on the skin-mimicking substrate (SMS)

a) Cross-sectional curve of the sunscreen film without organoclay on the skin-mimicking substrate (SMS)

b) Film thickness of sunscreen without organoclay on the SMS

c) Cross-sectional curve of the sunscreen film containing 2.0wt% organoclay on the SMS

d) Film thickness of sunscreen containing 2.0wt% organoclay on the SMS Surface

cross-sectional curves of the SMS and the sunscreen films are shown. Black line: surface cross-sectional curves of the sunscreen film Gray line: surface cross-sectional curves of the SMS The film thickness was calculated from the height of the SMS surface obtained by confocal laser microscopy and the surface height of the sunscreen film. The dashed line is the mean film thickness.

3-3-5 増粘剤の有無、塗布量や濃度の違いによる日焼け止め化粧品塗布膜吸光度の比較

日焼け止め化粧品塗布量が紫外線吸光度に及ぼす影響について、日焼け止め化粧品 Sample 1, 4, 9, 10 (Table 3-1) を用いて、塗布量と DHHB の半量配合について検討した。塗布量の増加 (0, 0.5, 1.0, 2.0 mg/cm²) に伴う吸光度の増加は、オルガノクレイを含まないサンプルの紫外線吸光度の増加が僅かであったのに対して、(Fig. 3-5) オルガノクレイを含む日焼け止め化粧品サンプルの吸光度は、顕著な増加を示した。紫外線吸光度を比べると、オルガノクレイを含まない 2.0wt% DHHB 配合日焼け止め化粧品 Sample を 2.0 mg/cm² 塗布したときの紫外線吸光度が 0.80 であるのに対し、オルガノクレイを配合した 1.0wt% DHHB 配合日焼け止め化粧品 Sample は 2.0 mg/cm² 塗布した場合に同程度の 0.81、オルガノクレイを配合した 2.0wt% DHHB 配合日焼け止め化粧品はその半量の 1.0 mg/cm² 塗布にもかかわらず 1.10 と有意に高い紫外線吸光度を示した(Fig. 3-5)。この結果は、オルガノクレイを配合し油相粘度を高めることにより、紫外線吸収剤濃度の減少、あるいは塗布量の減少した条件下でも高い紫外線吸光度を得ることができることを示している。

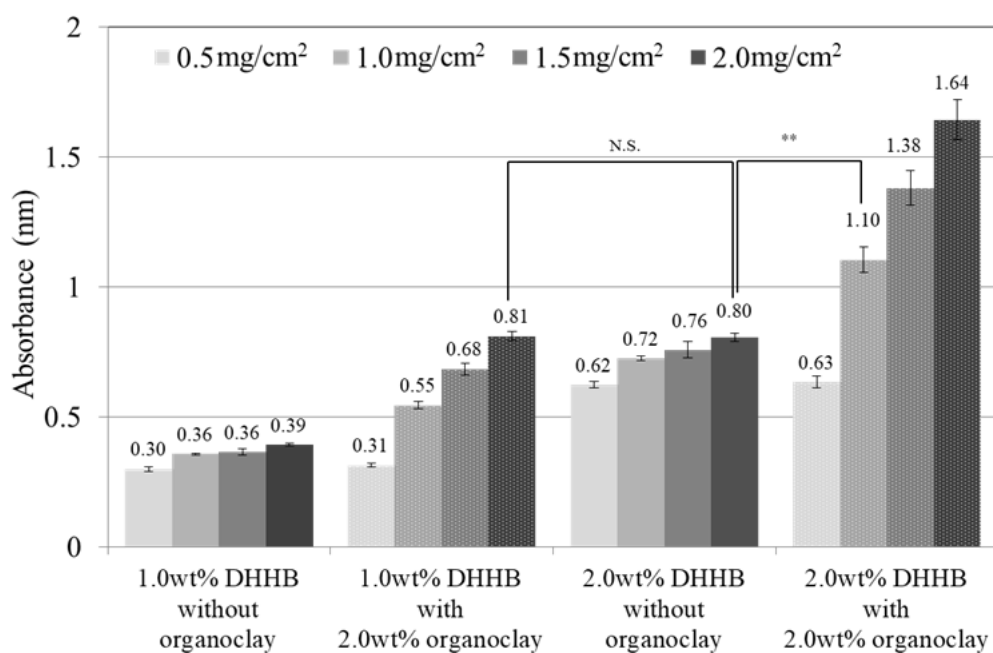


Fig. 3-6 Absorbance of sunscreen with various thickeners on the skin-mimicking substrate (SMS). Vertical axis: 352 nm absorbance of each sample measured spectrophotometrically after 30 min of drying. Student's t-test *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, N.S.: not significant.

3-4 考察

ヒトの皮膚は、「肌理（キメ）」と呼ばれる皮丘と皮溝から成る凹凸のある表面形状を持っている。したがって、日焼け止め化粧料を塗布する際、均一性の高い塗布膜を形成することは困難である。また、ヒトの皮膚表面は、分泌される皮脂量によって程度の差はあるものの基本的には疎水的である。ヒトの皮膚と性質の近い乾燥した豚皮の表面上での水の接触角は 81.8° 、PMMA 製のプレート表面の水の接触角も $72.3\sim 99.7^\circ$ であり [157]、今回用いた PMMA 製の SMS 表面も接触角 84° である [104]。このため、外相が水である水中油型乳化基剤では塗布時に基剤が PMMA プレート表面になじまずに不連続膜となりやすいが、本研究では外相が油である油中水型乳化基剤の日焼け止め化粧料で実験したため、概ね連続な塗布膜が形成された。ただし、連続な塗布膜ではあるが、厚さには薄い部分と厚い部分が観察された (Fig. 3-5)。この「塗布膜厚さの不均一性」により、第 1 章の Fig. 1-13 の簡易モデル計算で示したように、完全に均一な厚さの塗布膜の紫外線防御効果に比較して皮膚表面に塗布した日焼け止め化粧料の塗布膜の紫外線防御能は低下する。日焼け止め化粧料塗布前と塗布後の顕微鏡画像を Fig. 3-7 に、塗布膜形成の過程を描いた模式図を Fig. 3-8 に示した。塗布膜は水と揮発性化合物の揮発後に形成され、皮膚表面には不揮発性の油相が残ることになる。よって、紫外線防御効果を得るためには、油相に含まれる紫外線吸収剤が皮溝に流入して皮溝に偏在しない皮膚表面に均一性の高い厚さの塗布膜を形成することが不可欠である。

本研究では、日焼け止め化粧料中の皮膚表面に塗布膜として残る油相成分の粘度を上げることが、日焼け止め化粧料に配合されている紫外線吸収剤の皮溝への流入を抑制し、膜厚均一性の高い紫外線吸収剤含有塗布膜を作り出すアプローチであると仮定した。序章の Fig. 1-13 の簡易モデル計算はこの仮説の妥当性を説明している。

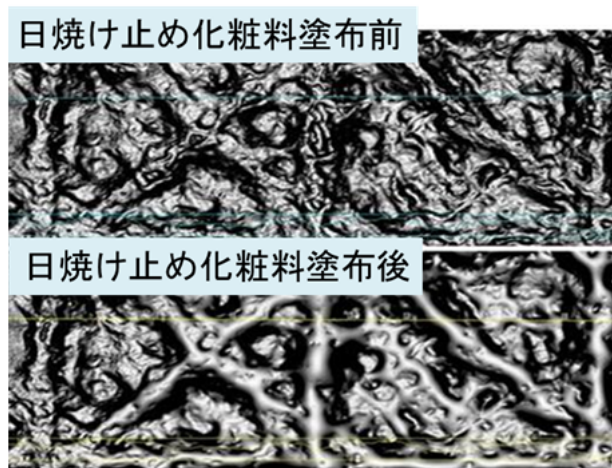


Fig. 3-7 Application state of sunscreen on SMS microscopic image

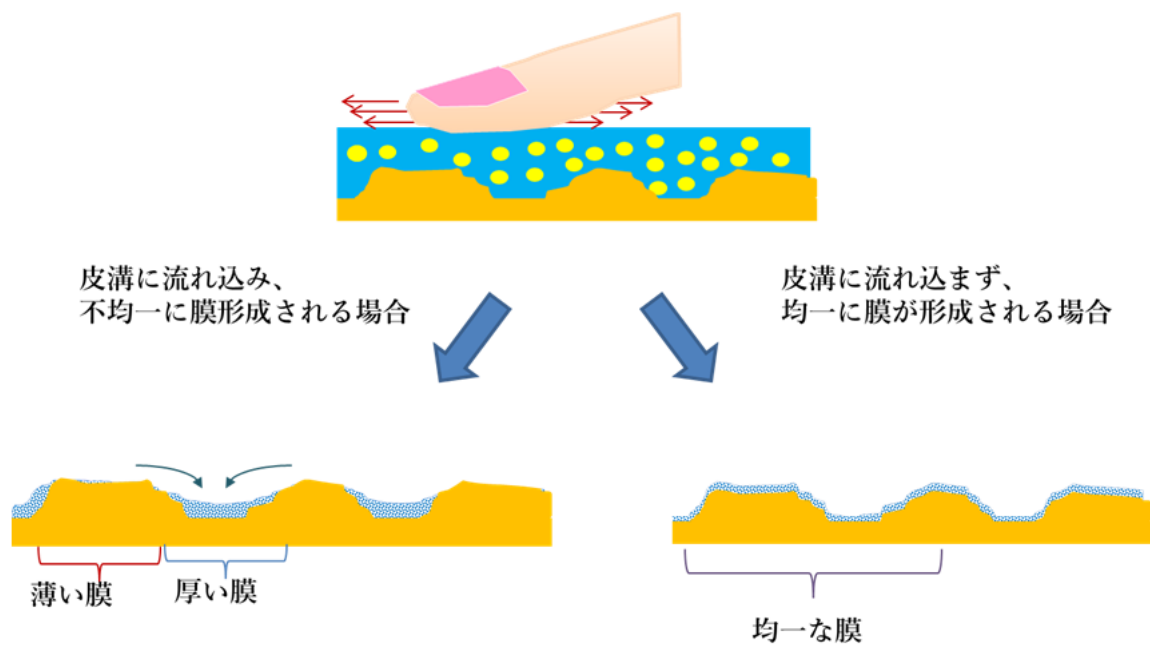


Fig. 3-8 Schematic diagram showing that there is a difference in film uniformity between sunscreen formulation with fingers and drying.

最初に、油相増粘剤（オルガノクレイ、シリル化シリカ、ワセリン、パルミチン酸デキストリン）をそれぞれ配合した日焼け止め化粧料を SMS に塗布した塗布膜の紫外線吸収能を測定し、油相粘度と紫外線吸収能との関連性を調べた。その結果、オルガノクレイやシリル化シリカは皮膚表面への塗布を想定したストレスをかけた後であっても、 0.01 s^{-1} の低ずり速度域の粘度が高いことが分かった（Fig. 3-2）。塗料分野では 0.01 s^{-1} のような低ずり速度の粘度が高い液体は、塗膜の流動性が低くなることはよく知られており、垂れ落ちや沈降防止のために低ずり速度の粘度が高い液体は応用されている。しかし、凹凸面を埋めて平坦な表面になるように塗布することが多い塗料の分野では、凹凸面に沿って均一な厚さの塗布膜を作るというニーズがないために、「数十 μm の溝を有する面上の膜厚均一性」と「低ずり速度粘度」の関係性の解析は十分ではなかった。また、そのような数十 μm の溝を有する面上の塗布膜の厚さ分布や、そのような凹凸面上に形成された日焼け止め化粧料塗布膜の厚さ分布と吸光度変化についての研究は行われてこなかった。

本研究では、塗布された後の低ずり速度域粘度が高い増粘剤の配合により、日焼け止め化粧料の紫外線吸収能が高まることを明らかにした（Fig. 3-4, 3-6）。以下に詳細を述べる。

まず、4つの油相増粘剤を加えても平坦なプレート上では日焼け止め化粧料塗布膜の吸光度に有意な差が生じず、増粘剤そのものが吸光度に影響しないことを確認した（Fig. 3-3）。その上で各種油相増粘剤を配合した日焼け止め化粧料塗布膜の SMS 上における吸光度変化を観察した。結果、ワセリンとパルミチン酸デキストリンは、2.0wt%（油相中 7.7wt%）の濃度で日焼け止め化粧料の低ずり速度域の油粘度をわずかに上昇させたが、いずれも紫外線吸光度を高めることはできなかった（Fig. 3-4）。この原因としては、 100 s^{-1} のせん断を与えた後における低ずり速度域の粘度が低かったことが挙げられる。対照的に、オルガノクレイとシリル化シリカはいずれも、油相が低ずり速度域の油粘度を大きく上昇させた（Fig. 3-2）。したがって、それらの塗布膜は低ずり速度においてワセリンおよびパルミチン酸デキストリンよりも高い油相粘度となる。次いで指で塗り広げた直後における SMS プレート上の油相の流動を妨げ、Fig. 3-8 のように、より均一性の高い膜厚を形成したと考えられる（Table 3-3, Table 3-4）。また、オルガノクレイを含む日焼け止め化粧料塗布膜は、シリル化シリカを有する日焼け止め化粧料塗布膜よりもずり速度 0.01

s⁻¹において高い粘度を示し (Fig. 3-2)、SMS 上で均一になり、より高い紫外線吸光度を示した (Table 3-4)。オルガノクレイは非イオン性界面活性剤と複合体を形成し [158, 159]、油中水型乳化物を安定化することが知られている [160-162]。そのため、日焼け止め化粧品への活用も容易であることも考慮し、詳細な日焼け止め化粧品塗布膜厚測定は、油相増粘剤としてオルガノクレイを用いて行った。そして、油相粘度と紫外線吸収能の関係性、そして SMS 上に塗布した日焼け止め化粧品塗布膜厚均一性との関連性を調べた。

日焼け止め化粧料を 2.0 mg/cm² の SMS に塗布すると、オルガノクレイ濃度依存的に紫外線吸光度が増大した (Table 3-4)。さらに、低ずり速度での油相粘度についてもオルガノクレイ濃度につれて増大し (Fig. 3-1)、オルガノクレイを油相増粘剤として使用した場合、紫外線吸収と正の相関を示した。

一方で、SMS の表面に形成された日焼け止め化粧品塗布膜の平均の厚さは、総油分量は同程度であることからオルガノクレイの配合濃度による違いは確認されなかった。しかし、塗布膜厚さの標準偏差の差はオルガノクレイの配合濃度依存的に減少を示した (Table 3-4)。膜厚の標準偏差は、皮丘部および皮溝部への油相の分布に由来することが考えられる。実際、標準偏差の大きなオルガノクレイ無配合日焼け止め化粧料の断面プロフィールは丘部分が薄く、溝部分に厚く油相が多く分布していることが観察され、膜の厚さが不均一であると確認された (Fig. 3-5a)。

2.0wt%のオルガノクレイを配合した日焼け止め化粧料の塗布膜は、オルガノクレイ無配合日焼け止め化粧料の塗布膜とは異なり、SMS の丘領域を油相が覆っていた (Fig. 3-4)。これらの結果は、オルガノクレイを配合することにより低ずり速度域の油相粘度を増加させると、均一性の高い塗布膜が生じることを示唆している。

また、低ずり速度で油相粘度を増加させると、紫外線吸光度が高まることが明らかとなった (Fig. 3-1、Table 3-4)。同じ紫外線吸収剤配合濃度にもかかわらず、2.0wt%のオルガノクレイ配合日焼け止め化粧料によって形成された塗布膜の紫外線吸光度は、オルガノクレイ無配合日焼け止め化粧料によって形成された塗布膜の2倍以上になった (それぞれ、1.64 および 0.80)。

さらに、DHHB 半量濃度や塗布量の半減についても評価した。2.0wt% オルガノクレイ配合、1.0wt% DHHB 配合日焼け止め化粧料は、2.0 mg/cm² で SMS 上に塗布した場合、オルガノクレイ無配合、2.0wt% DHHB 配合日焼け止めとほぼ同等

の紫外線吸光度を示した (Fig. 3-6)。加えて、2.0wt% オルガノクレイ配合 2.0wt% DHHB 配合日焼け止め化粧料を 1.0 mg/cm^2 の量で塗布して形成された塗布膜の吸光度は、オルガノクレイ無配合 2.0wt% DHHB 配合日焼け止め化粧料を 2.0 mg/cm^2 の量で塗布した場合と同等の紫外線吸光度を示した (Fig. 3-6)。

ただし、 0.5 mg/cm^2 の量で日焼け止め化粧料を塗布した際には、紫外線吸光度におけるオルガノクレイの配合効果は確認されなかった (Fig. 3-6)。実証することは困難であるが、 0.5 mg/cm^2 日焼け止め化粧料の塗布量は SMS 表面全体を覆うには不十分な量であった可能性が示唆された。

本研究で得られた知見をまとめると、日焼け止め化粧料へのオルガノクレイの添加は、低ずり速度に対する油相粘度を増加させることにより、凹凸のある SMS 表面への日焼け止め化粧料塗布時の紫外線吸収剤の分布を均一にする塗布膜を形成する。その結果、効率の高い紫外線防御能を維持することが可能となることが明らかとなった。

3-5 結論

本研究では、日焼け止め化粧料の紫外線吸収剤配合濃度が低濃度の場合、あるいは日焼け止め化粧料の塗布量が少ない場合であっても、一定の紫外線防御能を得ることを目的として、紫外線吸収剤を含む油相の粘度と紫外線吸収能、塗布膜の均一性との関連を検討した。

油相の増粘剤であるオルガノクレイの油相への配合は、低ずり速度域の油相粘度を増加させた。さらに、日焼け止め化粧料を SMS に塗布した塗布膜の紫外線吸光度とオルガノクレイ配合量には正の相関が認められ、SMS 上の塗布膜厚の均一性とも正の相関が認められた。よって、オルガノクレイは低ずり速度域の油相粘度を増加させ、皮溝への流れ込み抑制によって膜厚の均一性を高めることにより凹凸のある SMS 表面上の日焼け止め化粧料塗布膜の紫外線吸光度を高めることを明らかにした。

この事実は、油相粘度の増加は、一定の紫外線防御能を得るために皮膚への日焼け止め化粧料の塗布量を減らすことができる、もしくは、日焼け止め化粧料への紫外線吸収剤の配合濃度を低くすることができることを示唆した。

第4章 総括

日焼け止め化粧料は、紫外線吸収剤の種類や配合濃度が同じであっても、光劣化や塗布膜の不均一性の問題により、同一の紫外線防御能を示さない。また、紫外線吸収剤配合濃度と皮膚傷害性（安全性）、紫外線防御能は、密接に関係している。そのため、既存の紫外線吸収剤を用いた防御能向上と皮膚傷害性抑制の両立は、紫外線吸収剤の光傷害から皮膚の保護する、および光老化の進行を抑制する上で重要と考えられる。「既存の」紫外線吸収剤としたのは、世界的に起きている化粧品に関わる動物実験禁止の流れが、新規の紫外線吸収剤開発を困難にしているという背景があり、既存紫外線吸収剤を用いた技術開発が求められているからである。こうしたことから、研究テーマを紫外線吸収剤の組み合わせによる光劣化の抑制と、日焼け止め化粧料の油相の粘度に着目した塗布膜不均一性の改善による日焼け止め化粧料の紫外線吸光度の上昇とした。

よって、本研究は、日焼け止め化粧料の紫外線吸収剤濃度を低く抑えながら、できるだけ高い紫外線防御能を得ることを目的に、2つのアプローチを試みた。1つ目は、UVA吸収剤とUVB吸収剤との組合せの中で、UV照射時の「BMDMの光劣化を抑制する組み合わせ」を見出すことである。光劣化を抑制し、塗布直後の紫外線防御能を長時間維持できれば、結果的に紫外線吸収剤濃度を抑えることができる。その際に紫外線曝露時に生成されるROSについても考慮した。2つ目は、日焼け止め化粧料中の紫外線防御剤以外の成分である「基剤」、特に油分の粘度に着目し、塗布膜の不均一性を改善することによって低い紫外線吸収剤濃度でありながら高い紫外線防御能を実現するための製剤上の基礎知見を得ることである。

第2章では、紫外線防御能を高める1つ目のアプローチとして紫外線照射したBMDMのUVA吸収の低下（光劣化）を抑制するとともに、BMDMからのラジカル生成、細胞傷害性を改善するUVB吸収剤との組み合わせを見出すことを目的に研究を行った。

BMDMは、皮膚の光老化の進行を防止できる非常に効果的なUVA吸収剤として世界中で広く使用されている。しかし、日光への長時間曝露中にUVAを吸収する能力が低下する「光劣化」と呼ばれる欠点があることについても知られている。BMDMの光劣化を克服するために過去にも多くの研究が行われてきたが、紫外線

曝露時に BMDM から生成するラジカルが皮膚にどのように影響するかについては検証が不十分であった。そこで、まず HaCaT ケラチノサイトを用いた *in vitro* 細胞毒性試験を行った。ESR 測定と SOD 処理を用いて、BMDM の紫外線曝露により生成するラジカルはスーパーオキシドアニオンラジカル ($\cdot\text{O}_2^-$) であることが示された。BMDM の存在下で UVA 曝露した HaCaT ケラチノサイトには細胞生存率の有意な低下が認められ、BMDM から生成されるラジカル種が皮膚に傷害を及ぼす可能性が示された。同時に UVA 曝露は BMDM の UVA 吸光度の低下をもたらした。

次に BMDM の紫外線曝露によるラジカル生成、細胞傷害性および光劣化を抑制できるソリューションを提案すべく、BMDM に等量の BP3 あるいは OCR を添加して、2 種の紫外線吸収剤組み合わせ効果を検証した。結果として、UVA を照射された BMDM の細胞傷害性と光劣化は BP3 や OCR の共存によって抑制された。BP3 は、BMDM の UVA 曝露から生じるラジカル生成も抑制した。

以上、第 2 章では日焼け止め化粧料で最も広く使用されている UVA 吸収剤であるが光劣化という欠点を有する BMDM に対して、BP3 の組み合わせ配合が、紫外線曝露中に引き起こされる BMDM の皮膚傷害性の抑制と同時に、光劣化を抑制することを見出した。さらに、BMDM は $\cdot\text{O}_2^-$ の生成およびラジカル種より引き起こされることが考えられる強い細胞傷害性が認められた。過去にも BMDM の光劣化による吸光度低下の研究や OCR との組合せによる抑制、そのメカニズム解明、光分解生成物などの研究は行われてきたが光劣化の際に発生するであろう ROS については研究されてこなかった。本研究では過去に研究例がなかった BP3 と BMDM の組み合わせが、紫外線照射時の BMDM 光劣化抑制のための最適な組み合わせの一つであることを明らかにした。また、BP3 は濃度依存的に BMDM の劣化を抑制し、同時に紫外線照射時の BMDM に起因する ROS 生成と光毒性も抑制した。これらのことは本研究で初めて明らかにされた知見である。

第 3 章では、低い紫外線吸収剤配合量でより高い紫外線防御能を有する日焼け止め化粧料を得るための 2 つ目のアプローチとして、日焼け止め化粧料中の油相粘度が皮膚に塗布時に形成される塗布膜厚の均一性に与える影響と塗布膜の紫外線防御能に与える影響を評価した。

日焼け止め化粧料の紫外線防御能は、塗布時に皮膚表面に形成される膜を透過する紫外線量をどれだけ減らすことができるかにかかっており、言い換えれば塗布膜の紫外線吸光度が紫外線防御能の指標となる。塗布膜の紫外線吸光度を高めるには、皮溝と皮丘という凹凸のある表面に均一性の高い塗布膜を形成することが重要である。均一性の高い塗布膜の形成には日焼け止め化粧料の油相の粘度を高めることが重要であるとする仮説を基に研究を行った。仮説の根拠は以下である。

日焼け止め化粧料は、紫外線吸収剤・紫外線散乱剤以外に油分、水分、保湿剤や増粘剤から構成される。また、紫外線吸収剤の多くは親油性であり油相成分に溶解されて日焼け止め化粧料中に存在する。皮膚表面に形成される日焼け止め化粧料の塗布膜は揮発性成分が揮発後に残る紫外線吸収剤が溶解した油膜である。よって、油相の粘度を高めることにより、紫外線吸収剤が溶解している油が皮溝に流れ込み、偏在化することを抑制すれば均一性の高い塗布膜が形成されるという仮説を立てた。ヒトの皮膚上では塗布膜の均一性測定および塗布膜の紫外線吸光度の測定が難しく測定・数値化が困難であったため、本研究では実験にあたって、ヒトの皮膚表面形態を模した樹脂製プレート（SMS）を用いた。SMSを用いることにより、日焼け止め化粧料塗布膜の厚さの分布を測ることが可能となった。また、第2章においては、汎用性の観点からUVA吸収剤としてBMDMを配合した日焼け止め化粧料を用いたが、第3章においては、吸光度および膜厚均一性を光劣化の影響を排除して評価するため、光劣化の程度が極めて小さいUVA吸収剤、DHHB (hexyl 2-(4-N,N-diethylamino-2-hydroxybenzoyl)-benzoate)を2wt%濃度で用いた。

まず、油増粘剤の濃度と日焼け止め化粧料の紫外線吸収能との関連を調べた。検討した全ての増粘剤（ワセリン、パルミチン酸デキストリン、シリル化シリカ、およびオルガノクレイ）の中で、オルガノクレイとシリル化シリカの2つは油相の低速度域の粘度を上昇させ、SMSに塗布した日焼け止め化粧料塗布膜の紫外線吸光度を濃度依存的に増加させた。さらに、油相へオルガノクレイを配合することにより塗布膜厚のばらつきである標準偏差は減少し、SMSに均一な塗布膜が形成されていることが確認された。

以上より、第3章では増粘剤の配合により油相粘度を高めることが日焼け止め化粧料塗布膜の紫外線吸光度を高め、紫外線防御能を向上させることを明らかにした。

従来から粘度が塗布膜の厚さに影響することは知られていたが、数十 μm の凹凸がある面上における塗布膜の厚さの分布や、そのような厚さ分布が塗布膜吸光度に与える影響、そして日焼け止め化粧料の紫外線防御能を高める可能性についての知見は本研究で初めて得られたものである。また、この結果は、油相の低ずり速度域の粘度を高めることが日焼け止め化粧料の紫外線防御能を改善するための有効な手段になるという日焼け止め化粧料開発の方向性を示した。この方法は油溶性の紫外線吸収剤であれば、紫外線吸収剤の種類を問わない普遍的な改善策であると思われる。

本研究は、①紫外線吸収剤 BMDM の紫外線照射下での皮膚傷害性および光劣化を改善する紫外線吸収剤 2 種の適切な組み合わせと、②日焼け止め化粧料中で紫外線吸収剤を効果的に機能させうる特性の 1 つが油相の低ずり速度域の粘度であることの 2 点を明らかにした。前者は BP3 との組み合わせであり、後者は油増粘剤であるオルガノクレイを配合し油相の低ずり速度域の粘度を高めることである。これらの知見は、高い紫外線防御能を維持しながら日焼け止め化粧料への紫外線吸収剤配合濃度を低く抑えることにつながる。

本研究の成果は、紫外線吸収剤の皮膚傷害のリスクを抑制したより安全性の高い日焼け止め化粧料の製剤化技術の進歩に貢献するものと期待される。

参考文献

- [1] A. V. Rawlings and C. R. Harding, "Moisturization and skin barrier function," *Dermatologic therapy*, vol. 17, pp. 43-48, 2004.
- [2] P. M. Elias, "Epidermal lipids, barrier function, and desquamation," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 80, 1983.
- [3] 高橋元次, "基礎化粧品と皮膚 (I)," *色材協会誌*, vol. 62, no. 7, pp. 430-438, 1989.
- [4] 福屋安彦, "皮膚の張力と表面レリーフの変化," *昭和医学会雑誌*, vol. 46, no. 6, pp. 797-808, 1986.
- [5] 水越興治, 及川みどり, and 松本克夫, "顔面頬部位立体形状の加齢変化," *日本化粧品技術者会誌*, vol. 43, no. 3, pp. 177-184, 2009.
- [6] A. Ishikubo, T. Okamoto, A. Noda, H. Nakajima, T. Yanaki, and M. Yamaguchi, "A Novel In Vitro Method for Evaluating the Photoprotective Efficacy of Sunscreens," *Journal of Society of Cosmetic Chemists of Japan*, vol. 37, no. 1, pp. 10-16, 2003.
- [7] 佐々木政子, "絵とデータで読む太陽紫外線," http://www-cger.nies.go.jp/publication/M018/all_M018.pdf, 2006.
- [8] M. A. Pathak, "Sunscreens and their use in the preventive treatment of sunlight - induced skin damage," *The Journal of dermatologic surgery and oncology*, vol. 13, no. 7, pp. 739-752, 1987.
- [9] W. G. Bruls, H. Van Weelden, and J. C. Van Der Leun, "Transmission of UV-radiation through human epidermal layers as a factor influencing the minimal erythema dose," *Photochemistry and photobiology*, vol. 39, no. 1, pp. 63-67, 1984.
- [10] 秋山純一 *et al.*, "ヒト皮膚培養線維芽細胞に対する紫外線 (UVA) 照射が不定期 DNA 合成および Collagen 合成に対する影響に関する検討-年齢別の細胞応答," *吉備国際大学保健科学部研究紀要*, no. 11, pp. 59-67, 2006.
- [11] A. R. Young, G. I. Harrison, C. A. Chadwick, O. Nikaido, J. Ramsden, and C. S. Potten, "The similarity of action spectra for thymine dimers in human epidermis and erythema suggests that DNA is the chromophore for erythema," *Journal of investigative dermatology*, vol. 111, no. 6, pp. 982-988, 1998.
- [12] B. L. Diffey, "The consistency of studies of ultraviolet erythema in normal human skin," *Physics in Medicine & Biology*, vol. 27, no. 5, p. 715, 1982.
- [13] S. Sachdeva, "Fitzpatrick skin typing: Applications in dermatology," *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*, vol. 75, no. 1, p. 93, 2009.

- [14] L. E. Rhodes *et al.*, "The sunburn response in human skin is characterized by sequential eicosanoid profiles that may mediate its early and late phases," *The FASEB Journal*, vol. 23, no. 11, pp. 3947-3956, 2009.
- [15] K. Maeda and M. Hatao, "Involvement of photooxidation of melanogenic precursors in prolonged pigmentation induced by ultraviolet A," *Journal of investigative dermatology*, vol. 122, no. 2, pp. 503-509, 2004.
- [16] M. Seiberg, "Keratinocyte–melanocyte interactions during melanosome transfer," *Pigment Cell Research*, vol. 14, no. 4, pp. 236-242, 2001.
- [17] L. H. Kligman, "Photoaging: manifestations, prevention, and treatment," *Dermatologic Clinics*, vol. 4, no. 3, pp. 517-528, 1986.
- [18] G.-E. Costin and V. J. Hearing, "Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress," *The FASEB journal*, vol. 21, no. 4, pp. 976-994, 2007.
- [19] G. Imokawa, "Autocrine and paracrine regulation of melanocytes in human skin and in pigmentary disorders," *Pigment cell research*, vol. 17, no. 2, pp. 96-110, 2004.
- [20] H. Hattori, M. Kawashima, Y. Ichikawa, and G. Imokawa, "The epidermal stem cell factor is over-expressed in lentigo senilis: implication for the mechanism of hyperpigmentation," *Journal of investigative dermatology*, vol. 122, no. 5, pp. 1256-1265, 2004.
- [21] A. Hachiya, A. Kobayashi, Y. Yoshida, T. Kitahara, Y. Takema, and G. Imokawa, "Biphasic expression of two paracrine melanogenic cytokines, stem cell factor and endothelin-1, in ultraviolet B-induced human melanogenesis," *The American journal of pathology*, vol. 165, no. 6, pp. 2099-2109, 2004.
- [22] J. L. Contet-Audonneau, C. Jeanmaire, and G. Pauly, "A histological study of human wrinkle structures: comparison between sun-exposed areas of the face, with or without wrinkles, and sun-protected areas," *British Journal of Dermatology*, vol. 140, no. 6, pp. 1038-1047, 1999.
- [23] C. Edwards, A. Pearse, R. Marks, Y. Nishimori, K. Matsumoto, and M. Kawai, "Degenerative alterations of dermal collagen fiber bundles in photodamaged human skin and UV-irradiated hairless mouse skin: possible effect on decreasing skin mechanical properties and appearance of wrinkles," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 117, no. 6, pp. 1458-1463, 2001.
- [24] J. H. Chung *et al.*, "Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin in vivo," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 117, no. 5, pp. 1218-1224, 2001.

- [25] K. Kadoya *et al.*, "Fibulin - 5 deposition in human skin: decrease with ageing and ultraviolet B exposure and increase in solar elastosis," *British Journal of Dermatology*, vol. 153, no. 3, pp. 607-612, 2005.
- [26] S. Inomata *et al.*, "Possible involvement of gelatinases in basement membrane damage and wrinkle formation in chronically ultraviolet B-exposed hairless mouse," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 120, no. 1, pp. 128-134, 2003.
- [27] C. S. Sander *et al.*, "Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 118, no. 4, pp. 618-625, 2002.
- [28] K. Mizutani, T. Ono, K. Ikeda, K.-i. Kayashima, and S. Horiuchi, "Photo-Enhanced Modification of Human Skin Elastin in Actinic Elastosis by N ϵ -(Carboxymethyl) lysine, One of the Glycooxidation Products of the Maillard Reaction," *Journal of investigative dermatology*, vol. 108, no. 5, pp. 797-802, 1997.
- [29] L. Rittié and G. J. Fisher, "UV-light-induced signal cascades and skin aging," *Ageing research reviews*, vol. 1, no. 4, pp. 705-720, 2002.
- [30] B. Starcher and M. Conrad, "A role for neutrophil elastase in the progression of solar elastosis," *Connective tissue research*, vol. 31, no. 2, pp. 133-140, 1995.
- [31] U. Saarialho-Kere *et al.*, "Accumulation of matrilysin (MMP-7) and macrophage metalloelastase (MMP-12) in actinic damage," *Journal of investigative dermatology*, vol. 113, no. 4, pp. 664-672, 1999.
- [32] A. Iddamalgoda, Q. T. Le, K. Ito, K. Tanaka, H. Kojima, and H. Kido, "Mast cell tryptase and photoaging: possible involvement in the degradation of extra cellular matrix and basement membrane proteins," *Archives of dermatological research*, vol. 300, no. 1, pp. 69-76, 2008.
- [33] C. C. Long and R. Marks, "The response to ultraviolet radiation and delayed hypersensitivity in Celts with skin cancer," *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, vol. 6, no. 1, pp. 20-26, 1996.
- [34] F. Afaq and H. Mukhtar, "Effects of solar radiation on cutaneous detoxification pathways 皮膚の解毒経路に対する日射の影響," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 63, no. 1-3, pp. 61-69, 2001.
- [35] J. M. Sheehan and A. R. Young, "The sunburn cell revisited: an update on mechanistic aspects," *Photochemical & Photobiological Sciences*, vol. 1, no. 6, pp. 365-377, 2002.
- [36] P. Wolf, D. B. Yarosh, and M. L. Kripke, "Effects of sunscreens and a DNA excision repair enzyme on ultraviolet radiation-induced inflammation, immune suppression, and

- cyclobutane pyrimidine dimer formation in mice," *Journal of investigative dermatology*, vol. 101, no. 4, pp. 523-527, 1993.
- [37] B. C. Beehler, J. Przybyszewski, H. B. Box, and M. F. Kulesz-Martin, "Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine within DNA of mouse keratinocytes exposed in culture to UVB and H₂O₂," *Carcinogenesis*, vol. 13, no. 11, pp. 2003-2007, 1992.
- [38] S. Shibutani, M. Takeshita, and A. P. Grollman, "Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG," *Nature*, vol. 349, no. 6308, pp. 431-434, 1991.
- [39] I. Kurimoto and J. W. Streilein, "cis-urocanic acid suppression of contact hypersensitivity induction is mediated via tumor necrosis factor-alpha," *The Journal of Immunology*, vol. 148, no. 10, pp. 3072-3078, 1992.
- [40] J. W. Streilein *et al.*, "Relationship Between Ultraviolet Radiation--Induced Immunosuppression and Carcinogenesis," *Journal of investigative dermatology*, vol. 103, no. 5, pp. 107-111, 1994.
- [41] K. J. Trouba, H. K. Hamadeh, R. P. Amin, and D. R. Germolec, "Oxidative stress and its role in skin disease," *Antioxidants and Redox Signaling*, vol. 4, no. 4, pp. 665-673, 2002.
- [42] H. Kamata and H. Hirata, "Redox regulation of cellular signalling," *Cellular signalling*, vol. 11, no. 1, pp. 1-14, 1999.
- [43] T. G. Polefka, T. A. Meyer, P. P. Agin, and R. J. Bianchini, "Cutaneous oxidative stress," *Journal of cosmetic dermatology*, vol. 11, no. 1, pp. 55-64, 2012.
- [44] T. Fujita, "Formation and removal of reactive oxygen species, lipid peroxides and free radicals, and their biological effects," *JOURNAL-PHARMACEUTICAL SOCIETY OF JAPAN*, vol. 122, no. 3, pp. 203-218, 2002.
- [45] G. Lenaz, "The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology," *IUBMB life*, vol. 52, no. 3 - 5, pp. 159-164, 2001.
- [46] C. Richter *et al.*, "Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, vol. 1271, no. 1, pp. 67-74, 1995.
- [47] D. A. Parks and D. N. Granger, "Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology," *Acta physiologica Scandinavica. Supplementum*, vol. 548, pp. 87-99, 1986.
- [48] I. A. Gamaley and I. V. Klyubin, "Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions," *International review of cytology*, vol. 188, pp. 203-255, 1999.

- [49] H. Masaki, Y. Izutsu, S. Yahagi, and Y. Okano, "Reactive oxygen species in HaCaT keratinocytes after UVB irradiation are triggered by intracellular Ca²⁺ levels," *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, vol. 14, 1, pp. 50-52, 2009.
- [50] J. T. Coyle and P. Puttfarcken, "Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders," *Science*, vol. 262, no. 5134, pp. 689-695, 1993.
- [51] H. Masaki, "Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects," *Journal of dermatological science*, vol. 58, no. 2, pp. 85-90, 2010.
- [52] H. Masaki, T. Atsumi, and H. Sakurai, "Detection of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation," *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 206, no. 2, pp. 474-479, 1995.
- [53] H. Masaki, S. Sakaki, T. Atsumi, and H. Sakurai, "Active-oxygen scavenging activity of plant extracts," *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 18, no. 1, pp. 162-166, 1995.
- [54] B. A. Jurkiewicz and G. R. Buettnerf, "EPR Detection of Free Radicals in UV - Irradiated Skin: Mouse Versus Human," *Photochemistry and photobiology*, vol. 64, no. 6, pp. 918-922, 1996.
- [55] M.-A. Takahashi and K. Asada, "Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 226, no. 2, pp. 558-566, 1983.
- [56] A. Valencia and I. E. Kochevar, "Nox1-based NADPH oxidase is the major source of UVA-induced reactive oxygen species in human keratinocytes," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 128, no. 1, pp. 214-222, 2008.
- [57] K. Plaetzer, B. Krammer, J. Berlanda, F. Berr, and T. Kiesslich, "Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects," *Lasers in medical science*, vol. 24, no. 2, pp. 259-268, 2009.
- [58] M. A. Pathak and P. C. Joshi, "Production of active oxygen species (1O₂ and O₂⁻) by psoralens and ultraviolet radiation (320–400 nm)," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, vol. 798, no. 1, pp. 115-126, 1984.
- [59] S. Onoue and Y. Tsuda, "Analytical studies on the prediction of photosensitive/phototoxic potential of pharmaceutical substances," *Pharmaceutical research*, vol. 23, no. 1, pp. 156-164, 2006.
- [60] A. Ryu, K. Arakane, C. Koide, H. Arai, and T. Nagano, "Squalene as a target molecule in skin hyperpigmentation caused by singlet oxygen," *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 32, no. 9, pp. 1504-1509, 2009.

- [61] P. A. Grimsrud, H. Xie, T. J. Griffin, and D. A. Bernlohr, "Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 32, pp. 21837-21841, 2008.
- [62] S. Adams *et al.*, "Reactive carbonyl formation by oxidative and non-oxidative pathways," *Front Biosci*, vol. 6, pp. A17-A24, 2001.
- [63] I. Dalle-Donne, R. Rossi, D. Giustarini, A. Milzani, and R. Colombo, "Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress," *Clinica chimica acta*, vol. 329, no. 1-2, pp. 23-38, 2003.
- [64] K. Chiba, K. Kawakami, T. Sone, and M. Onoue, "Characteristics of skin wrinkling and dermal changes induced by repeated application of squalene monohydroperoxide to hairless mouse skin," *Skin Pharmacology and Physiology*, vol. 16, no. 4, pp. 242-251, 2003.
- [65] T. Mizutani, T. Mizutani, C. Imamura, Y. Okano, and H. Masaki, "A Novel Image Analysis Method to Evaluate Carbonylated Proteins in the Stratum Corneum," *JOURNAL OF JAPANESE COSMETIC SCIENCE SOCIETY*, vol. 41, no. 2, pp. 101-105, 2017.
- [66] T. Mizutani, H. Sumida, Y. Sagawa, Y. Okano, and H. Masaki, "Carbonylated proteins exposed to UVA and to blue light generate reactive oxygen species through a type I photosensitizing reaction," *Journal of dermatological science*, vol. 84, no. 3, pp. 314-321, 2016.
- [67] T. Mizutani and H. Masaki, "Anti - photoaging capability of antioxidant extract from *Camelia japonica* leaf," *Experimental dermatology*, vol. 23, pp. 23-26, 2014.
- [68] H. Masaki, Y. Okano, and H. Sakurai, "Generation of oxygen species from AGE during ultraviolet light A (UVA) irradiation and a possible mechanism for cell damage," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1428, pp. 45-56, 1999.
- [69] H. Masaki, T. Mizutani, N. Ogawa, H. Suzuki, Y. Okano, and H. Akita, "Carbonylated proteins contribute to the darkness around facial pores," *Journal of dermatological science*, vol. 89, no. 3, pp. 299-301, 2018.
- [70] 福田実, 長沼雅子, and 中嶋啓介, "パルソール A の UVA 防止効果に関する実験的研究," *西日本皮膚科*, vol. 49, no. 1, pp. 88-94, 1987.
- [71] J. A. Harrison, S. L. Walker, S. R. Plastow, M. D. Batt, J. L. Hawk, and A. R. Young, "Sunscreens with low sun protection factor inhibit ultraviolet B and A photoaging in the skin of the hairless albino mouse," *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*, vol. 8, no. 1, pp. 12-20, 1991.

- [72] S. Séite *et al.*, "Mexoryl® SX: a broad absorption UVA filter protects human skin from the effects of repeated suberythemal doses of UVA," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 44, no. 1, pp. 69-76, 1998.
- [73] A. Fourtanier, D. Moyal, and S. Seité, "Sunscreens containing the broad - spectrum UVA absorber, Mexoryl® SX, prevent the cutaneous detrimental effects of UV exposure: a review of clinical study results," *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*, vol. 24, no. 4, pp. 164-174, 2008.
- [74] S. Seite *et al.*, "A full - UV spectrum absorbing daily use cream protects human skin against biological changes occurring in photoaging," *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*, vol. 16, no. 4, pp. 147-155, 2000.
- [75] S. Seité and A. M. A. Fourtanier, "The benefit of daily photoprotection," *Journal of the American Academy of Dermatology*, vol. 58, no. 5, pp. S160-S166, 2008.
- [76] S. Seite, A. Fourtanier, D. Moyal, and A. R. Young, "Photodamage to human skin by suberythemal exposure to solar ultraviolet radiation can be attenuated by sunscreens: a review," *British Journal of Dermatology*, vol. 163, no. 5, pp. 903-914, 2010.
- [77] S. Seite *et al.*, "A broad - spectrum sunscreen prevents cumulative damage from repeated exposure to sub - erythemal solar ultraviolet radiation representative of temperate latitudes," *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, vol. 24, no. 2, pp. 219-222, 2010.
- [78] 皆本景子, "化粧品, 医薬部外品成分中の皮膚感作性物質と接触皮膚炎," *日本衛生学雑誌*, vol. 65, no. 1, pp. 20-29, 2010.
- [79] A. Haussmann and D. Kleinhans, "Allergic contact eczema caused by a UV radiation filter in a sunscreen cream--2 case reports," *Zeitschrift fur Hautkrankheiten*, vol. 61, no. 22, pp. 1654-1656, 1986.
- [80] S. Schauder and H. Ippen, "Photoallergic and allergic contact dermatitis from dibenzoylmethanes," *Photo-dermatology*, vol. 3, no. 3, pp. 140-147, 1986.
- [81] A. C. de Groot and J. W. Weyland, "Contact allergy to butyl methoxydibenzoylmethane," *Contact Dermatitis*, vol. 16, no. 5, p. 278, 1987.
- [82] S. Schauder and H. Ippen, "Photoallergic and allergic contact eczema caused by dibenzoylmethane compounds and other suncreening agents," *Der Hautarzt: Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*, vol. 39, no. 7, pp. 435-440, 1988.
- [83] E. J. Parry, D. Bilslund, and W. N. Morley, "Photocontact allergy to 4-tert. butyl-4'-methoxy-dibenzoylmethane (Parsol 1789)," *Contact dermatitis*, vol. 32, no. 4, pp. 251-252, 1995.

- [84] M. Itoh, "A case of photocontact dermatitis due to Parsol MCX," *Environ Dermatol*, vol. 4, pp. 146-150, 1997.
- [85] S. Schauder and H. Ippen, "Contact and photocontact sensitivity to sunscreens: Review of a 15 - year experience and of the literature," *Contact dermatitis*, vol. 37, no. 5, pp. 221-232, 1997.
- [86] T. Schmidt, J. Ring, and D. Abeck, "Photoallergic contact dermatitis due to combined UVB (4-methylbenzylidene camphor/octyl methoxycinnamate) and UVA (benzophenone-3/butyl methoxydibenzoylmethane) absorber sensitization," *Dermatology*, vol. 196, no. 3, pp. 354-357, 1998.
- [87] N. Abe *et al.*, "Contact dermatitis due to sunscreen products from 1991 through 1996," *Environmental dermatology: the official journal of the Japanese Society for Contact Dermatitis*, vol. 6, no. 3, pp. 142-147, 1999.
- [88] S. Simeoni, S. Scalia, and H. A. E. Benson, "Influence of cyclodextrins on in vitro human skin absorption of the sunscreen, butyl-methoxydibenzoylmethane," *International journal of pharmaceuticals*, vol. 280, no. 1-2, pp. 163-171, 2004.
- [89] C. G. J. Hayden, S. E. Cross, C. Anderson, N. A. Saunders, and M. S. Roberts, "Sunscreen penetration of human skin and related keratinocyte toxicity after topical application," *Skin pharmacology and physiology*, vol. 18, no. 4, pp. 170-174, 2005.
- [90] K. M. Hanson, E. Gratton, and C. J. Bardeen, "Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 41, no. 8, pp. 1205-1212, 2006.
- [91] S. Onoue *et al.*, "In vitro phototoxic potential and photochemical properties of imidazopyridine derivative: a novel 5-HT₄ partial agonist," *Journal of pharmaceutical sciences*, vol. 97, no. 10, pp. 4307-4318, 2008.
- [92] V. Iannuccelli, G. Coppi, S. Sergi, M. Mezzena, and S. Scalia, "In vivo and in vitro skin permeation of butyl methoxydibenzoylmethane from lipospheres," *Skin pharmacology and physiology*, vol. 21, no. 1, pp. 30-38, 2008.
- [93] I. Karlsson, L. Hillerstrom, A.-L. Stenfeldt, J. Mårtensson, and A. Borje, "Photodegradation of dibenzoylmethanes: potential cause of photocontact allergy to sunscreens," *Chemical research in toxicology*, vol. 22, no. 11, pp. 1881-1892, 2009.
- [94] L. R. Gaspar, J. Tharmann, P. M. B. G. M. Campos, and M. Liebsch, "Skin phototoxicity of cosmetic formulations containing photounstable and photostable UV-filters and vitamin A palmitate," *Toxicology in vitro*, vol. 27, no. 1, pp. 418-425, 2013.

- [95] J. F. Nash and P. R. Tanner, "Relevance of UV filter/sunscreen product photostability to human safety," *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*, vol. 30, no. 2-3, pp. 88-95, 2014.
- [96] A. Varvaresou, "Percutaneous absorption of organic sunscreens," *Journal of cosmetic dermatology*, vol. 5, no. 1, pp. 53-57, 2006.
- [97] 菅原智, "紫外線防御剤のスキンケアへの応用 (特集 紫外線の防御とケア)," *フレグランスジャーナル*, vol. 30, no. 7, pp. 16-22, 2002.
- [98] 田中巧, "酸化セリウムの紫外線防止効果と化粧品への応用 (特集 紫外線防御試験法の国際的動向と紫外線防御剤の開発の課題)," *フレグランスジャーナル*, vol. 36, no. 10, pp. 65-69, 2008.
- [99] K.-P. Wilhelm, P. Elsner, E. Berardesca, and H. I. Maibach, *Bioengineering of the skin: skin imaging & analysis*. CRC press, 2006.
- [100] 宮本道子 *et al.*, "化粧品に含有される紫外線吸収剤の検査結果 (平成 16~ 19 年度)," *化学生物総合管理*, vol. 6, no. 1, pp. 51-57, 2010.
- [101] *ISO24444: Cosmetics-Sun protection test methods-In vivo determination of the sun protection factor (SPF)*, ISO, 2010.
- [102] *ISO24442: Cosmetics-Sun protection test methods- In vivo determination of sunscreen UVA protection*, 2011.
- [103] *ISO 24443:Specifies an in vitro procedure to characterize the UVA protection of sunscreen products*, 2012.
- [104] Y. Miura, T. Hirao, and M. Hatao, "Influence of application amount on sunscreen photodegradation in in vitro sun protection factor evaluation: proposal of a skin - mimicking substrate," *Photochemistry and photobiology*, vol. 88, no. 2, pp. 475-482, 2012.
- [105] Y. Miura *et al.*, "Algorithm for in vitro sun protection factor based on transmission spectrum measurement with concomitant evaluation of photostability," *Photochemistry and photobiology*, vol. 84, no. 6, pp. 1569-1575, 2008.
- [106] Y. Miura, S. Suzuki, T. Hirao, and M. Hatao, "Light source spectrum strongly influences the in vitro estimation of sun protection factor," *Photochemistry and photobiology*, vol. 88, no. 4, pp. 1005-1011, 2012.
- [107] P. Treffel and B. Gabard, "Skin penetration and sun protection factor of ultra-violet filters from two vehicles," *Pharmaceutical research*, vol. 13, no. 5, pp. 770-774, 1996.
- [108] K. A. Walters and M. S. Roberts, "Percutaneous absorption of sunscreens," *BASIC AND CLINICAL DERMATOLOGY*, vol. 21, pp. 465-482, 2002.

- [109] V. K. Tippavajhala, T. de Oliveira Mendes, and A. A. Martin, "In vivo human skin penetration study of sunscreens by confocal Raman spectroscopy," *AAPS PharmSciTech*, vol. 19, no. 2, pp. 753-760, 2018.
- [110] 藤岡賢大, "最近の化粧品用途紫外線吸収剤," *オレオサイエンス*, vol. 7, no. 9, pp. 357-362, 2007.
- [111] F. Wetz, C. Routaboul, A. Denis, and I. Rico-Lattes, "A new long-chain UV absorber derived from 4-tert-butyl-4'-methoxydi6benzoylmethane: Absorbance stability under solar irradiation," *Journal of cosmetic science*, vol. 56, no. 2, pp. 135-148, 2005.
- [112] C. Paris, V. Lhiaubet - Vallet, O. Jiménez, C. Trullas, and M. A. Miranda, "A blocked diketo form of avobenzone: Photostability, photosensitizing properties and triplet quenching by a triazine - derived UVB - filter," *Photochemistry and photobiology*, vol. 85, no. 1, pp. 178-184, 2009.
- [113] A. Kikuchi, N. Oguchi, and M. Yagi, "Optical and electron paramagnetic resonance studies of the excited states of 4-tert-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane and 4-tert-butyl-4'-methoxydibenzoylpropane," *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 113, no. 48, pp. 13492-13497, 2009.
- [114] J. Kockler, M. Oelgemöller, S. Robertson, and B. D. Glass, "Photostability of sunscreens," *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, vol. 13, no. 1, pp. 91-110, 2012.
- [115] M. Yamaji and M. Kida, "Photothermal tautomerization of a UV sunscreen (4-tert-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane) in acetonitrile studied by steady-state and laser flash photolysis," *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 117, no. 9, pp. 1946-1951, 2013.
- [116] M. Asai, A. Kawada, Y. Aragane, T. Yudate, R. Isogai, and T. Tezuka, "Contact dermatitis due to octyl methoxycinnamate and butyl methoxydibenzoylmethane with photoaggravation," *Environmental dermatology: the official journal of the Japanese Society for Contact Dermatitis*, vol. 8, no. 1, pp. 28-30, 2001.
- [117] V. Lhiaubet-Vallet, M. Marin, O. Jimenez, O. Gorchs, C. Trullas, and M. A. Miranda, "Filter-filter interactions. Photostabilization, triplet quenching and reactivity with singlet oxygen," *Photochemical & Photobiological Sciences*, vol. 9, no. 4, pp. 552-558, 2010.
- [118] S. Afonso *et al.*, "Photodegradation of avobenzone: Stabilization effect of antioxidants," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 140, pp. 36-40, 2014.

- [119] A. Kikuchi, N. Oguchi - Fujiyama, K. Miyazawa, and M. Yagi, "Triplet-Triplet Energy Transfer from a UV - A Absorber Butylmethoxydibenzoylmethane to UV - B Absorbers," *Photochemistry and photobiology*, vol. 90, no. 3, pp. 511-516, 2014.
- [120] N. Oguchi-Fujiyama, K. Miyazawa, A. Kikuchi, and M. Yagi, "Photophysical properties of dioctyl 4-methoxybenzylidenemalonate: UV-B absorber," *Photochemical & Photobiological Sciences*, vol. 11, no. 10, pp. 1528-1535, 2012.
- [121] 角田聖, 鈴木千裕, 佐川由葵, 水谷多恵子, and 正木仁, "UV 吸収剤の光安定化に関する基礎的検討," *日本化粧品技術者会誌*, vol. 49, no. 3, pp. 204-210, 2015.
- [122] J. Lademann, A. Rudolph, U. Jacobi, H.-J. Weigmann, H. Schaefer, and W. Sterry, "Influence of nonhomogeneous distribution of topically applied UV filters on sun protection factors," *Journal of biomedical optics*, vol. 9, no. 6, pp. 1358-1362, 2004.
- [123] M. Wakabayashi *et al.*, "Problems on the Evaluation of the Critical Wavelength of Sunscreens for "Broad Spectrum" Approval Brought on by Viscous Fingering During Sunscreen Application," *Photochemistry and photobiology*, vol. 92, no. 4, pp. 637-643, 2016.
- [124] M. Sohn, A. Hêche, B. Herzog, and G. Imanidis, "Film thickness frequency distribution of different vehicles determines sunscreen efficacy," *Journal of biomedical optics*, vol. 19, no. 11, p. 115005, 2014.
- [125] 佐々木一貴 and 山口和弘, "紫外線防御剤の塗布膜均一性と最新の塗布膜観察技術 (特集 紫外線防御の新基準: 処方技術, 測定法)," *Fragrance journal*, vol. 41, no. 8, pp. 18-23, 2013.
- [126] 生田香織, 佐々木一貴, 島谷真由, and 吉川徳信, "Cryo FIB-SEM を利用したサンスクリーンの塗布膜構造観察とケミカルイメージング," *第72回 SCCJ 研究討論会予稿集*, pp. 20-21, 2013.
- [127] 八巻悟史, 山口和弘, 吉川徳信, 福原忠雄, and 中江郁青, "水に応答する自律性塗布膜の開発とサンスクリーンへの応用 (特集 スポーツを楽しむためのスキンケア)," *Fragrance journal: Research & development for cosmetics, toiletries & allied industries= フレグランスジャーナル: 化粧品科学研究開発専門誌*, vol. 45, no. 5, pp. 18-23, 2017.
- [128] D. A. Gunn *et al.*, "Why some women look young for their age," *PloS one*, vol. 4, no. 12, p. e8021, 2009.
- [129] L. H. Kligman, "Photoaging: manifestations, prevention, and treatment," *Clinics in geriatric medicine*, vol. 5, no. 1, pp. 235-251, 1989.

- [130] J. Baier, T. Maisch, M. Maier, E. Engel, M. Landthaler, and W. Bäumlner, "Singlet oxygen generation by UVA light exposure of endogenous photosensitizers," *Biophysical journal*, vol. 91, no. 4, pp. 1452-1459, 2006.
- [131] T. Hirao, M. Denda, and M. Takahashi, "Identification of immature cornified envelopes in the barrier - impaired epidermis by characterization of their hydrophobicity and antigenicities of the components," *Experimental dermatology*, vol. 10, no. 1, pp. 35-44, 2001.
- [132] Y. Li, W. Xia, Y. Liu, H. A. Remmer, J. Voorhees, and G. J. Fisher, "Solar ultraviolet irradiation induces decorin degradation in human skin likely via neutrophil elastase," *PLoS One*, vol. 8, no. 8, p. e72563, 2013.
- [133] H. Sakurai, H. Yasui, Y. Yamada, H. Nishimura, and M. Shigemoto, "Detection of reactive oxygen species in the skin of live mice and rats exposed to UVA light: a research review on chemiluminescence and trials for UVA protection," *Photochemical & Photobiological Sciences*, vol. 4, no. 9, pp. 715-720, 2005.
- [134] C. Mendrok-Edinger, K. Smith, A. Janssen, and J. Vollhardt, "The quest for avobenzone stabilizers and sunscreen photostability," *Cosmetics and toiletries*, vol. 124, no. 2, 2009.
- [135] Y. Noda, K. Anzai, A. Mori, M. Kohno, M. Shinmei, and L. Packer, "Hydroxyl and superoxide anion radical scavenging activities of natural source antioxidants using the computerized JES - FR30 ESR spectrometer system," *Iubmb Life*, vol. 42, no. 1, pp. 35-44, 1997.
- [136] R. H. Burdon, "Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation," *Free Radical Biology and Medicine*, no. 4, pp. 775-794, 1995.
- [137] M. Marin, V. Lhiaubet-Vallet, C. Paris, M. Yamaji, and M. A. Miranda, "Photochemical and photophysical properties of dibenzoylmethane derivatives within protein," *Photochemical & Photobiological Sciences*, vol. 10, no. 9, pp. 1474-1479, 2011.
- [138] M. Pissavini, B. Diffey, S. Marguerie, T. Carayol, and O. Doucet, "Predicting the efficacy of sunscreens in vivo veritas," *International journal of cosmetic science*, vol. 34, no. 1, pp. 44-48, 2012.
- [139] D. L. Lott, J. Stanfield, R. M. Sayre, and J. C. Dowdy, "Uniformity of sunscreen product application: a problem in testing, a problem for consumers," *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*, vol. 19, no. 1, pp. 17-20, 2003.
- [140] B. L. Diffey, "Sunscreens and UVA Protection: A Major Issue of Minor Importance," *Photochemistry and photobiology*, vol. 74, no. 1, pp. 61-63, 2001.

- [141] J. Schulz *et al.*, "Distribution of sunscreens on skin," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 54, pp. S157-S163, 2002.
- [142] C. A. Cody and W. W. Reichert, "Studies of fundamental organoclay rheological relationships," *NLGI spokesman*, vol. 49, no. 10, pp. 437-447, 1986.
- [143] T. R. Jones, "The properties and uses of clays which swell in organic solvents," *Clay Minerals*, vol. 18, no. 4, pp. 399-410, 1983.
- [144] B. Gherardi, A. Tahani, P. Levitz, and F. Bergaya, "Sol/gel phase diagrams of industrial organo-bentonites in organic media," *Applied clay science*, vol. 11, no. 2-4, pp. 163-170, 1996.
- [145] B. Merad, K. Bekkour, and M. Gareche, "Rheological and structural characterization of organo- Hectorite dispersions: influence of the organoclay loading," *Applied Clay Science*, vol. 184, p. 105321, 2020.
- [146] 柴田雅史, "研究開発情報 最近の口紅持続技術," *ファインケミカル*, vol. 37, no. 8, pp. 47-54, 2008.
- [147] 柴田雅史, "口唇化粧品における安定性と感触の両立技術 (特集 化粧品の商品設計と品質保証)," *Fragrance journal*, vol. 40, no. 1, pp. 59-64, 2012.
- [148] 増渕祐二, "ワックスオイルゲルのナノ構造制御と口紅の高機能化," *オレオサイエンス*, vol. 13, no. 2, pp. 79-85, 2013.
- [149] 藤野秀之, "フェームドシリカ," *色材協会誌*, vol. 88, no. 8, pp. 279-281, 2015.
- [150] 坂貞徳, 佐藤眞直, 太田昇, 李雷, and 中田悟, "パルミチン酸デキストリンと流動パラフィンの 2 成分系オルガノゲルの構造解析," *日本化粧品技術者会誌*, vol. 50, no. 3, pp. 194-200, 2016.
- [151] S. Takahashi, M. Orita, and H. Odashima, "Jpn. Pat. 6238561," Japan, 2013.
- [152] 久留戸真奈美, "スキンケア化粧品の官能評価および塗布動作の計測," *トライボロジスト*, vol. 65, no. 4, pp. 202-208, 2020.
- [153] 石窪章, 野田章, "化粧品基剤の塗布中における摩擦挙動の解析と「なじみ感」の定量評価法の開発," *トライボロジスト = JOURNAL OF JAPANESE SOCIETY OF TRIBOLOGISTS*, vol. 53, no. 1, pp. 58-64, 2008.
- [154] F. L. Melquiades *et al.*, "Titanium dioxide determination in sunscreen by energy dispersive X-ray fluorescence methodology," *Analytica chimica acta*, vol. 613, no. 2, pp. 135-143, 2008.
- [155] L.-P. Sung, J. Jasmin, X. Gu, T. Nguyen, and J. W. Martin, "Use of laser scanning confocal microscopy for characterizing changes in film thickness and local surface

- morphology of UV-exposed polymer coatings," *JCT research*, vol. 1, no. 4, pp. 267-276, 2004.
- [156] R. Rezakhaniha *et al.*, "Experimental investigation of collagen waviness and orientation in the arterial adventitia using confocal laser scanning microscopy," *Biomechanics and modeling in mechanobiology*, vol. 11, no. 3, pp. 461-473, 2012.
- [157] M. Sohn, C. Malburet, L. Baptiste, and Y. Prigl, "Development of a synthetic substrate for the in vitro performance testing of sunscreens," *Skin pharmacology and physiology*, vol. 30, no. 3, pp. 159-170, 2017.
- [158] J. W. Jordan, "Organophilic bentonites. I. Swelling in organic liquids," *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 53, no. 2, pp. 294-306, 1949.
- [159] J. W. Jordan, B. J. Hook, and C. M. Finlayson, "The Organophilic Bentonites. II. Organic Liquid Gels," *The Journal of Physical Chemistry*, vol. 54, no. 8, pp. 1196-1208, 1950.
- [160] M. Yamaguchi, "Inclusive Reactions by Swellable Clay Minerals. II Inclusion of Nonionic Surfactants by Organophilic-Montmorillonite and Its Gelation in Oil," *Journal of Japan Oil Chemists' Society*, vol. 39, no. 2, pp. 100-104, 1990.
- [161] M. Yamaguchi, Y. Kumano, and S. Tobe, "Inclusive Reaction by Swellable Clay Minerals. III Water in Oil Type Emulsification by Inclusion Compound Composed of Nonionic Surfactant and Organophilic-Montmorillonite," *Journal of Japan Oil Chemists' Society*, vol. 40, no. 6, pp. 491-496, 1991.
- [162] M. J. Hato, K. Zhang, S. S. Ray, and H. J. Choi, "Rheology of organoclay suspension," *Colloid and Polymer Science*, vol. 289, no. 10, pp. 1119-1125, 2011.

謝 辞

本研究の実施において、終始丁寧なご指導とご鞭撻を賜りました東京工科大学応用生物学部 岩渕徳郎教授、研究初期段階から5年間にわたり、日焼け止め研究のご指導を賜りました東京工科大学応用生物学部 前教授の正木仁先生に心から感謝いたします。また、光毒性実験に当たり HaCaT 細胞を提供いただきました藤田医科大学の赤松浩彦教授に感謝いたします。各章の実験に携わって下さった東京工科大学光老化研究室の卒業研究生である角田聖様、鈴木千裕様、大塚里沙様、金子小雪様、崔盛閔様、前田正寛様に感謝いたします。東京工科大学における研究の機会を与えて下さいました株式会社資生堂の吉田克典様、株式会社日本色材工業研究所の南孝司様に御礼申し上げます。実験を実施する上で支えて下さった東京工科大学光老化研究室の卒業研究生、皆様に感謝いたします。そして、社会人でありながら大学院に通学することを理解し、支えてくれた妻に感謝します。