J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn.
報 文
27(3) 432 — 440 (1993)

BIO-MELANIN (微生物メラニン)^{†1}

——新しい化粧品原料として——

本多伸吉^{†2}, 竹越与一郎^{†3}, 中野裕美子^{†3}, 新井陽一郎^{†3}

協和醗酵工業株式会社 化粧品センター^{†2}

協和醗酵工業株式会社 筑波研究所^{†3}

BIO-MELANIN^{†1}

(As a new Cosmetic Raw Material)

Shinkichi Honda^{†2}, Yoichiro Takekoshi^{†3}, Yumiko Nakano^{†3}

and Yoichiro Arai^{†3}

Kyowa Hakko Kogyo Co., LTD Cosmetics Center.^{†2}

Kyowa Hakko Kogyo co., LTD Tukuba Research Laboratories.^{†3}

Recently a great deal of attention has been paid to the prevention of photo-aging, many kinds of UVA, UVB-absorbents and micro fine powders have been developed as new cosmetic raw materials. We have recently developed a new type of melanin, "BIO-MELANIN" which is produced by microorganism *Streptomyces* sp.

(1) BIO-MELANIN is obtained at high purity without protein contamination after simple purification techniques.

(2) BIO-MELANIN has been shown to be very safe in the following tests; acute lethal toxicity test, photocontact sensitivity test and human closed patch test.

(3) BIO-MELANIN showed protective effects on cultured mouse fibroblast cells (L929) against UVB irradiation.

(4) BIO-MELANIN is alkaline soluble natural UV-absorber and is suited for use in new cosmetic powders and BIO-MELANIN-coated powders (TiO₂, sericite, mica etc.).

(5) This type of cosmetic powder (BIO-MELANIN-coated powder) has dual function and reflection and can be used in the production of FOUNDATION, LIPCREAM, EYE LINER and SKIN CARE PRODUCTS.

(6) We found the sun cut cream containing BIO-MELANIN-coated powder had a high SPF value.

1. 緒 言

最近ではフロンガスによるオゾンホール の 生 成, 二酸化炭素による地球温暖等の環境破壊の進 行により, 紫外線の皮膚への影響についてさまざ まな角度から研究がなされてきている。特に, 化 粧品分野においては, 紫外線による皮膚の光加齢

^{†1} 第17回 IFSCC 横浜大会 ('92年10月)で口頭発表

^{†2} 〒100 東京都大手町 1-6-1; 6-1 ohtemachi, 1- chome, chiyoda-ku, Tokyo 100, Japan

^{†3} 〒305 茨城県つくば市御幸が丘 2; 2, Miyukiga- oka, Tukuba-shi, Ibaraki-ken, 305, Japan

をいかに防止するかが最大のテーマの1つとなっており、機能性を高めた紫外線吸収剤や微粒子粉体の開発が相次いでいる^{1),2)}。

メラニンとは生体が作り出す天然の紫外線吸収剤であり、また抗酸化剤でもある^{3),4)}。

特に皮膚の光防御の中心的役割をメラニンが果たしていることが最近の研究により明らかになってきた。これまでも化粧品原料としてのメラニンについては、イカ墨や人毛由来のものが検討されてきたが^{5),6)}、酸・アルカリに不溶であり、また混入する蛋白質が多く高純度のものが得られにくいという問題点があった。

我々は、天然メラニンの中でも特にある種の微生物が生産するメラニンがアルカリ易溶であり、また高純度品が多量に得られることを見出したので、本メラニン（以下バイオメラニン、B-MELと呼ぶ）の化粧品原料としての可能性を検討した結果を以下報告する。

2. 実験

2.1 バイオメラニンの発酵法による生産

菌株は、*Streptomyces* 属の変異株を用い約2週間培養後、菌体外に蓄積したB-MELをアルカリ及び酸処理により粗精製品を得、さらに6N塩酸による除蛋白処理により精製品を得た⁷⁾ (Fig.-1)。

Fig.-1 Purification procedure of BIO-MELANIN

2.2 バイオメラニンの物性

B-MEL 及び合成メラニン (Sigma 社製) の 0.01%メラニンアルカリ溶液を調製し、本溶液の吸収スペクトルを測定した (機種 U-best 30, 日本分光社製)。

また、元素分析 (機種 CHN CORDER MT-5 型, 柳本社製) を行った。

2.3 バイオメラニンの抗酸化力

メラニンの抗酸化力を調べる方法として、ここではヒドロペルオキシドの還元能を測定するデタミナ-LPO キット (協和メデックス社製) を用いた。

測定サンプルとしては、B-MEL, アスコルビン酸, dl- α -トコフェロール, BHA, BHT 及び植物抽出液を測定した。0.1g の B-MEL 及び水酸化ナトリウム 0.1g に精製水を加えて 100ml にした後、塩酸にて pH 7 に調製後検液とした。dl- α -トコフェロールは、0.1g をエタノールに加えて溶解し検液とした。

2.4 UVB に対するバイオメラニンの細胞保護作用 (マウス繊維芽細胞系)⁸⁾

2.4.1 L929 繊維芽細胞の UVB 照射による生存曲線

6穴マイクロプレート (マイクロプレート, 岩城ガラス社製) に牛胎児血清を10%添加した ME

M 培地 2 ml とともに、マウス由来 L929 繊維芽細胞を 2×10^4 cells/穴 に播種し、5 % CO₂ インキュベーター中、37°C で 3 日間培養、培養後 MEM 培地を除去し PBS(−) で細胞を洗浄し、新たに PBS(−) 1 ml を分注し UVB (波長: 300nm) の強度を変えて照射した。UV 強度は、紫外線強度計 (UVR-1, 東京光学機械) で測定した。PBS (−) 除去後、新たに MEM 培地を 2 ml 添加し 5 % CO₂ インキュベーター中 37°C で 3 日間培養して蛋白質量を測定し生存率を算出した。

換算式生存率

$$\text{生存率(\%)} = \frac{\text{UV照射した細胞の蛋白質}}{\text{UV未照射区細胞の蛋白質}} \times 100$$

なお、蛋白質量は 0.05 % トリプシン処理により細胞をプレートから浮遊させ、マイクロチューブで 1 ml PBS(−) 存在下、超音波処理により破碎し、遠心分離後上清内の蛋白をプロテインアッセイキット (バイオラッド社製) を用い定量した。

2.4.2 バイオメラニン含有フィルムのUVB吸収効果

B-MEL 0.1g, 水酸化ナトリウム 0.1g, アクリルレジン 10g にエタノールを加えて 100g とする。この溶液 10g を 6 穴プレートのフタに均一に流し込む 45°C で一晩乾燥させプレート上に B-MEL フィルムを形成させる。また対照として同上組成で B-MEL を含有しないフィルムを作成した。L929 繊維芽細胞条件で培養、PBS(−) で除去後、新たに PBS(−) を 1 ml 分注、6 穴プレートに B-MEL フィルムのフタを上上面より UVB を照射、照射後 MEM 培地を加え前記条件で培養し、生存率を求めた。

2.4.3 バイオメラニン存在下 UVB 照射実験

B-MEL 1g, 水酸化ナトリウム 1g に精製水を加えて 100ml にし溶解後、PBS 錠 (宝酒造社) 1 個を溶かし塩酸にて pH 7 に調製、オートクレーブ (120°C, 15分) 滅菌を行い B-MEL/PBS 液を調製する。L929 繊維芽細胞を前記条件で 3 日間培養後 MEM 培地を除去し、PBS(−) で細胞を洗浄、B-MEL/PBS 液を PBS(−) で適宜希釈し、最終的に 1 ml/穴 になるように分注した。

細胞の生存率が 4 %, 50 % になるよう UVB を照射する。照射後 PBS(−) で 2 回洗浄し前記と同様に培養し生存率を求めた。

また、対照として UVB 未照射でメラニンを添加した細胞についての生存率を求めた。

2.4.4 UVB照射細胞に対するバイオメラニンの影響

B-MEL 1g, 水酸化ナトリウム 1g に精製水を加えて 100ml とし溶解後、塩酸にて pH 7 に調製オートクレーブ (120°C, 15分) 滅菌を行い B-MEL 水溶液を調製する。

L929 繊維芽細胞を前記条件で培養、PBS(−) で洗浄後、新たに PBS(−) を 1 ml 分注し、細胞の生存率が 50 %, 80 % になるように UVB を照射する。

PBS(−) 除去後、B-MEL 水溶液を 2 倍濃度の MEM 培地で適宜希釈し最終的に 2 ml/穴 になるように分注、前記条件で 3 日間培養し生存率を算出した。又対照として UVB 未照射で同様にメラニンを添加した細胞についての生存率を求めた。

2.5 バイオメラニンの被覆粉体の調製

アルカリに易溶で、酸には不溶の性質を利用す

Fig.-2 Procedure for preparation of the BIO-MELANIN coated powder.

れば各種粉体の表面上に B-MEL を被覆することが可能である。B-MEL の希アルカリ溶液 (0.1 N 水酸化ナトリウム液) を調製し、その中に二酸化チタン、セリサイト、タルク等の粉体を加え、攪拌する。この溶液を 0.1N 塩酸で中和した後遠心分離し、得られた粉体を洗浄、乾燥し目的物の B-MEL 被覆粉体を得た (Fig.-2)。

2.5 バイオメラニン含有クリーム of SPF 測定

B-MEL 被覆粉体 (二酸化チタン、タルク被覆率 2%) を含有する日焼け止めクリームを調製し (Table-1), 日本化粧品工業会の新基準に準じた測定法による SPF の測定を財団法人、日本食品分析センターに委託し測定した。対照として、同一処方では B-MEL 非被覆粉体を配合したクリームと B-MEL 5% 含有の水溶液を用いた。

2.6 安全性試験

B-MEL の安全性試験として、ヒトクローズドパッチテスト (48hr), 単回経口投与毒性試験、及び皮膚光感作性試験をおこなった。

3. 結果及び考察

3.1 バイオメラニンの製造法及び物性

文献上ある種の微生物がメラニンを生産することは知られていたが^{9), 10)}, 生産量としては工業的見地からは不十分であった。

我々は、放線菌の一種 (*Streptomyces* 属) が多量のメラニンを生産することを見出した。

本メラニンの特徴は、アルカリには易溶で酸に不溶な点である。この性質を利用して培養液より容易に精製することが可能となった。

さらに混入蛋白質は通常の酸加水分解処理 (6 N 塩酸) により除去可能であり、高純度の評品を

Table-1 Formulation of "SUN CUT CREAM"

Oil phase	
1) stearic acid	1.0%
2) cetanol	0.5
3) shea butter	0.05
4) methyl polysiloxane	1.0
5) liquid paraffin	1.0
6) natural vitamin E	0.05
7) polyoxyethylene sorbitan trioleate (20E.O.)	0.2
8) 2-ethylhexyl p-dimethylamino benzoate	3.0
9) 4-tert-butyl-4'-methoxy-dibenzoylmethane	2.0
Pigment	
10) TiO ₂ (0 or 2% BIO-MELANIN treatment)	2.4%
11) Talc (0 or 2% BIO-MELANIN treatment)	1.2
12) soybean phospholipid	0.2
13) castor oil	0.7
14) 1,3-butylene glycol	4.2
15) glyceryl monostearate, lipophilic	1.0
Water phase	
16) methyl parahydroxybenzoate	0.2%
17) N-acetyl-L-glutamine	0.01
18) distilled water	72.64
19) triethanolamine	0.7
20) carboxyvinylpolymer	0.2
21) alcohol	7.0
22) plant extract	0.7
23) collagen extract	0.05

得ることが出来た。

また、元素分析の結果、本メラニンはイオウを含まない型である事が判明した (Table-2)。

Table-2 Elementary composition of BIO-MELANIN

Sample	elementary composition (%)				The amount of contaminated protein (w/w%)
	C	H	N	S	
BIO-MELANIN (crude)	60.5	7.84	4.85	≤0.2	18.85
BIO-MELANIN (purified① ^a)	68.75	7.99	1.26	≤0.2	1.08
BIO-MELANIN (purified② ^b)	67.72	8.24	1.04	≤0.2	<0.02

^a: 6N HCl hydrolysis for 24hrs at 11°C

^b: 6N HCl hydrolysis for 120hrs at 110°C

B-MEL の吸収スペクトルは、そのアルカリ溶液を測定したところ、対照である合成メラニン (Sigma 社製) と同様に紫外部から可視部まで広範囲の波長にわたることが判明した (Fig.-3)。

3.2 バイオメラニンの抗酸化力測定

ヒドロペルオキシドの還元能を指標として、B-MEL と各種抗酸化剤や植物抽出液 (市販化粧品原料) の抗酸化能を測定した結果が (Fig.-4) である。

Fig.-3 UV absorption spectra of BIO-MELANIN and synthetic melanin

Fig.-5 Survival curve of the mouse fibroblast L929 against UVB irradiation

B-MEL はアスコルビン酸、dl- α -トコフェロールには及ばないが化粧品原料として汎用される BHT, BHA などの抗酸化剤とほぼ同程度の過酸化物の消去能を有していることがわかった。このことは、皮膚内でのメラニンの役割が単なる紫外線吸収剤としてだけではなく、従来より指摘されていた抗酸化剤として活性酸素及び過酸化物などの消去を行っており、皮膚の光防御の中心的役割を果たしていることを示唆するものである。

3.2 UVB に対するバイオメラニンの細胞保護効果

UVB 照射に対する L929 繊維芽細胞の生存曲線を (Fig.-5) に示す。

Fig.-4 Antioxidative activity of BIO-MELANIN

Fig.-6 Protective effect dependent on the UVB absorption function of BIO-MELANIN

UVB 強度の増加と共に細胞生存率は減少してゆき、 $55\text{mJ}/\text{cm}^2$ で細胞は全死に至り、 LD_{50} の UVB 強度は約 $25\text{mJ}/\text{cm}^2$ であった。

メラニンの紫外線吸収能を調べる目的で、本評価系において、メラニン含有フィルムを貼ったフタの上から UVB を照射し細胞の生存率を求めたが (Fig.-6) である。対照が71.6%, 9%の生存率を示す紫外線量を照射した場合、それぞれ95.9%, 72.9%という高い生存率を示し、明らかに紫外線吸収能に基く細胞の保護効果を有することが分かった。

一方、細胞培養液中に B-MEL を直接添加した後に UVB 照射した系での結果を (Fig.-7) に示した。

系内に 0.025% の B-MEL が共存すれば50%および4%生存率を与える UVB を照射した場合、それぞれ90%, 80%以上の細胞が生存することが分かった。また後者の場合、細胞のダメージの程度を実体顕微鏡で観察した結果が (Fig.-8) である。

UV 照射を受けた培養繊維芽細胞は (写真中央), 明らかにダメージを受けてその形は伸びき

って細胞数も大幅に減少しているが、0.025% の B-MEL を添加した系は細胞の数, 形が UV 未照射区の場合と殆ど変わらない事が分る。

さらに, UVB照射 (80%生存率) 後に B-MEL

Fig.-7 Survival curve of the mouse fibroblast L929 against UVB irradiation in the presence of BIO-MELANIN

Fig.-8 UVB irradiation on the mouse fibroblast (UV-, UV+, UV+0.025% BIO-MELANIN).

を添加した実験系において興味深い結果が得られた (Fig.-9)。すなわち、B-MEL の添加濃度を上げてゆくと UVB の細胞ダメージは軽減されてゆき、0.005%の B-MEL を添加した場合には、ほぼ未照射区と同等の生存率 (95%) を示すことが分かった。この結果は、B-MEL の紫外線吸収作用ではなく、抗酸化力 (Fig.-4 参照) の為で、UVB 照射により生じた活性酸素や各種過酸化物を消去したためと考えられる。

3.3 バイオメラニン被覆粉体

酸化チタン、タルク、セリサイト、ナイロンパウダー等の粉体表面に B-MEL を吸着させ色調を

色彩色差計 (CR-200型 ミノルタ社製) で測定した (Table-3)。

B-MEL は合成メラニンに近い色調を示し、黒酸化鉄、カーボンブラックの示す漆黒とは違う温かみのある自然な色合いを呈した。また、B-MEL で被覆した顔料は単純な混合分散させた系より高発色、高彩度という特徴がある。粉体外観色は (Fig.-10) に示す様に、粉体の種類を選ぶことにより顔料の色調を変化させることが可能である事が分かった。

次に、被覆粉体の反射スペクトル (UV 2200 型、島津社製) を測定した結果、粉体表面に吸着

Fig.-9 Protective effect of BIO-MELANIN in the case of adding of BIO-MELANIN and UVB irradiation in the reverse order.

Fig.-10 1% BIO-MELANIN coated powder.

Table-3 Colour of the test sample contained BIO-MELANIN coated powder.

Sample (coated powders)	hue	BIO-MELANIN/powder w/w%			non coated powder
		0.5	1.0	2.0	
TiO ₂	L	45.1	42.5	40.3	94.2
	a	8.7	9.1	9.1	-0.9
	b	10.8	11.3	11.7	1.7
sericite	L	43.7	41.0	36.3	91.4
	a	11.5	11.6	11.0	-1.19
	b	14.5	14.2	13.1	3.03
talc	L	40.2	37.3	32.2	59.3
	a	10.3	9.9	9.9	18.6
	b	10.9	10.4	10.4	4.0

* coated powder absorbance mesured by spectrophotometer(integrating sphere)

Fig.-11 Reflection spectra of the BIO-MELANIN coated powders.

Table-4 SPF value of BIO-MELANIN coated powder.

volunteer (age)	BIO-MELANIN LOTION			BIO-MELANIN CREAM		CONTROL CREAM
	MED	MED	SPF	MED	SPF	
34	1.02	1.91	1.87	28.60	28.04	12volunteer
34	1.22	2.29	1.88	21.80	17.87	
34	1.28	3.66	2.86	26.01	20.32	
35	1.02	3.05	2.99	26.78	26.25	
38	1.28	3.06	2.39	27.94	21.83	
21	1.02	2.04	2.00	34.10	33.43	
49	1.22	2.30	1.89	26.01	21.32	
AVE.	—	—	2.27	—	24.15	13.49
S.D.	—	—	0.18	—	2.03	0.84

* measured by solar simulator following new standard of the Japan Cosmetic Industry Association ('92); Japan Food Research Laboratories

したメラニンによる紫外外部吸収効果が測定された (Fig.-11)。

3.5 バイオメラニン含有クリームの SPF 測定
5 % B-MEL 水溶液, 2 % B-MEL 被覆粉体を 3.6 % 含む日焼け止めクリーム, 対照クリームこの 3 点の SPF を測定した。

Table-4 より, B-MEL 水溶液では SPF 値は約 2 という値であったが 2 % B-MEL 被覆粉体を含むクリームでは同組成で B-MEL を含まない

対照クリームに比べて約 2 倍の SPF 値を示し B-MEL 被覆粉体を含む化粧料は紫外線防止効果に非常に優れていることが判明した。

3.6 安全性試験

Table-5 に示す通り単回経口投与毒性試験 2000 mg/kg 以上, ヒトクロズバッチテスト (38hr) 陰性, 皮膚光感作性試験陰性という結果であり, バイオメラニンは安全な化粧品原料であるといえる。

Table-5 Safety of BIO-MELANIN

SAFETY TESTS	RESULT
Acute toxicity test ^a	LD ₅₀ >2000mg/kg
Photocontact sensitivity test ^b	(-)
Closed patch test (48hr) ^c	(-)

^a: mouse CD-1 (ICR)^b: guinea pig Hartley

test sample contained DIO-MELANIN (5w/w% in glycerin)

^c: human male 24, female 20

4. 総 括

バイオメラニンの化粧品原料としての可能性を検討してきたこれまでの結果をまとめると次のようになる。

(1) 放射菌 *Streptomyces* の一種が生産するバイオメラニンはアルカリ易溶で、かつ酸には不溶である。蛋白の混入は殆ど無い高純度品が多量に得られる。

(2) バイオメラニンは、紫外線吸収能とともに抗酸化能（過酸化物の消去能）を有する。

(3) 培養細胞を用いた UVB 照射実験において、バイオメラニンは UVB の細胞ダメージを軽減し、細胞保護効果を示した。

(4) 安全性については、単回経口投与毒性試験、ヒトクローズドパッチテスト(48hr)、皮膚光感作用試験などで確認している。

(5) 各種粉体にバイオメラニンを被覆することが可能で、粉体の種類を選ぶことにより顔料の色

調を変化させることが可能である。

(6) バイオメラニン被覆粉体は、紫外線の吸収と散乱両方の効果を有する。

(7) バイオメラニン被覆粉体を配合したクリームは対照クリームに比べ約2倍近い SPF 値を示した。

Reference

- 1) Takeshi Horio, Fragrance J., (Japan), 9, 15 (1991)
- 2) Kazuyuki Baba, Fragrance J., (Japan), 6, 35 (1992)
- 3) Nicolaus, R. a., "Melanin" (1968) Herman, Paris
- 4) Yasushi Tomita, Fragrance J., (Japan), 6, 20 (1990)
- 5) 藤沼好守, 坂本興彦, 秋山靖子, 桂 博二: 特公昭55-53211
- 6) ジャン-フランソワグロリエール: 特公平1-92273
- 7) Lisa Zeise, Brown L. Murr, Miles R. Chedel, Pigment Cell Research, 5, 132 (1992)
- 8) S. Kondo, A. Mamada, J. Yamaguchi, S. Fukuro, Photodermatol Photoimmunol Photomed., 7, 173 (1990)
- 9) Yasuyuki Kubo, Trans. Mycol. Soc. Japan, 27, 487 (1986)
- 10) R. Baumann and H.P. Kocher, "Genetics of *Streptomyces Glauceus* and Regulation of Melanin Production". "Proceedings of Second International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms (1974)" edited by K.D. Macoolvacd, Academic Press 535 (1976)

(1993年3月5日受理)