

平成 29 年度
戦略的基盤技術高度化・連携支援事業
戦略的基盤技術高度化支援事業

「再生医療研究による富山湾海洋深層水等張液を利用した研究用
細胞培養液開発および高機能性化粧品開発」

研究開発成果等報告書

平成 30 年 3 月

担当局	中部経済産業局
補助事業者	公益財団法人富山県新世紀産業機構 五洲薬品株式会社
間接補助事業者	国立研究開発法人成育医療研究センター 国立大学法人徳島大学 国立大学法人富山大学 学校法人立命館 公立大学法人名古屋市立大学

目 次

第1章 研究開発の概要

1－1 研究開発の背景・研究目的及び目標	1
1－2 研究体制	6
1－3 成果概要	11
1－4 当該研究開発の連絡窓口	13

第2章 本論

【1. 培養再現性の向上、作用機序の解明課題への対応】	15
【1－1】ヒト幹細胞での細胞成育効果・培養再現性の検証	15
【1－2】成熟細胞、腫瘍細胞での細胞成育効果・培養再現性の検証	17
【1－3】富山湾海洋深層水等張液中生理活性物質の細胞成育過程への作用機序解明	21
【1－4】生理活性物質と細胞成育過程への作用機序の相関確認	24
【2. 天然資源活用による量産化課題への対応】	26
【2－1】多段式電気透析装置による富山湾海洋深層水等張液利用 研究用細胞培養液の開発とその量産化	26
【3. 天然資源活用による皮膚疾患治癒化粧品の商品化と安全性評価課題への対応】	27
【3－1】高機能性化粧品の開発	27
【3－2】高機能性化粧品の有用性、安全性評価	28

第3章 全体総括

【3－1】 研究開発成果	32
【テーマ1：研究用細胞培養液】	32
【テーマ2：高機能性化粧品】	33
【3－2】 研究開発後の課題・事業化展開	34
【テーマ1：研究用細胞培養液】	34
【テーマ2：高機能性化粧品】	34

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

(1) 研究開発の背景

川下分野である再生医療の周辺産業においては、動物血清を用いた有血清細胞培養液や生物由来成分を含まない無血清細胞培養液など各種の合成型、半合成型、天然型の細胞培養液が市販されている。しかし複雑な組成のため、細胞培養液に使用する動物由来の成分（血清、代替血清、その他抽出物）のロット間差が原因で細胞培養結果の再現性が低い課題があり、ヒトの細胞育成過程（増殖、未分化の維持、保存）に関する培養再現性を向上させたいニーズがある。また、動物由来であるゆえに危惧されるBSEやウィルス等に関する安全性確保の問題がある。

一方、化粧品業界においては、化粧品組成中の化学物質や人工物による健康被害報告の増大から、安全性や高機能性（天然由来成分配合化粧品のアンチエイジング等）のエビデンスを十分に有する商品が求められている。

五洲薬品株式会社は、これまで地域資源である富山湾海洋深層水に関するさまざまな研究を行い、製品化に成功してきた。これらの知見を活かし、天然の栄養素を含む富山湾海洋深層水等張液を研究用細胞培養液に利用するため、細胞育成をコントロールする富山湾海洋深層水等張液中の生理活性物質をオミックス情報の解析と高感度分析により明らかにすることで、細胞育成過程への作用機序の相関について研究を進め、培養再現性の高い研究用細胞培養液を開発する。また、その細胞培養への効果を背景とした富山湾海洋深層水配合高機能性化粧品の開発を併せて行う。

【再生医療の周辺産業からの具体的ニーズ】

ヒトiPS細胞を代表とする我が国の再生医療研究は、細胞作製技術や分化誘導技術開発では世界を牽引する立場にあるが、ヒトiPS細胞研究による先行技術や経験に基づく基盤技術やノウハウの蓄積が乏しいため、英米に比べてヒト幹細胞の産業応用のための環境整備が遅れている。その中で、従来の研究用細胞培養液は、基礎培地にウシ等の生物由来血清が活性物質として添加され使用してきた。このような生物由来の添加物は、ウィルスなどの感染や異種の生物由来物質が含まれるため、純粋なヒト細胞培養にならないなどの問題を抱えていた。近年、再生医療の実現を加速するため無血清培養液や生物由来物質を使わない培養液等の開発が行われているが、細胞種ごとに専用の培養液を利用するものや、外国製の高価なものが多く、次世代を担う再生医療研究で世界にリードするためには、日本オリジナルの動物血清抽出成分を含有しない研究用細胞培養液、または専用添加液（代替血清、纖維芽細胞因子等）の開発が強く求められている。また、産業レベルでの使用など大量の培養液を必要とするため、量産化の課題がある。富山湾海洋深層水は五洲薬品のある富山県の天然資源であり、豊富な資源であるため、国産で安価な富山湾海洋深層水等張液を研究用細胞培養液へ使用することは経済的価値が大きい。産業レベルで使用

できる細胞培養液の条件は、細胞培養再現性が高いことである。細胞成育過程に寄与する海洋深層水等張液中の生理活性物質の同定は、オミックス情報を解析しスクリーニングを行い、理化学的高感度分析することで押し進められ、細胞培養再現性の高い、大量生産が可能な世界初のオリジナルの研究用細胞培養液開発の実現性が高まる。

【化粧品産業からの具体的ニーズ】

近年、我が国を始めとする先進国では、化学物質や人工物に対する健康被害が多数報告され、世界的に天然志向が強まっている。直接身体に触れることとなる化粧品の業界では、天然由来成分配合化粧品への志向が強く、「ナチュラル（安全性）」や「アンチエイジング、美白効果（高機能性）」という言葉が市場で大きなアドバンテージを生んでおり、消費者はどの成分がどのようなメカニズムで効果を発揮しているかに関する情報を必要としている。本研究により、細胞培養研究で培った知見を活用した、さらに高機能性と安全性のエビデンスに基づく国産の天然素材高機能性化粧品の開発につなげる。

【これまでの取り組み】

現在、多段階式電気透析装置を擁し、既に海洋深層水利用飲料水、にがり水、海洋深層水塩等を開発し、製品化に成功している。これまでの产学研官での取り組みとしては、次のとおりである。

①平成 19 年に「地域資源活用型研究開発事業」に採択。テーマ名「海洋深層水分離加工技術より製した分離水による創傷ケア製品開発」

→研究に基づき、富山湾海洋深層水等張液を創傷治癒促進の外用剤に用いる用途特許を取得（第 5207048 号 海洋深層水を原料とする外用剤（平成 25 年））

②富山湾海洋深層水等張液にはアミノ酸等が確認され、製造方法について特許を取得（第 5476049 号 ヤアミノ酪酸を含む海洋深層水由来組成物の製造方法（平成 26 年度）

③富山湾海洋深層水等張液を用いて洗浄液を製品化（製品名：メディウォッシュ）。褥瘡患者等に効果が見られる。

また富山県畜産試験場では、平成 13 年にクローン牛の受精卵（幹細胞）の培養液として効果が確認されている。

前回の地域資源活用型研究開発事業において、富山湾海洋深層水等張液が、細胞や組織の恒常性を維持する機能（ホメオスタシス維持能）を有していることを見出した。また、富山湾海洋深層水等張液には従来知られていたミネラル成分以外に、種々のアミノ酸やジペプチドなどの低分子物質が多数含まれていることを明らかにし、皮膚を構成するさまざまな細胞（表皮角化細胞、線維芽細胞他）を用いて、アミノ酸やジペプチドなどの非ミネラル成分がミネラル成分と協調して細胞のホメオスタシス維持や増殖、活性化に関与している可能性を示唆する重要な基礎データを集積した。これらの基礎研究データより、富山

湾海洋深層水等張液は国産の新規研究用細胞培養液の開発など将来のバイオ研究を支える素材として開発が期待される。同時に、国内発、地域発の先端バイオ素材を産業界に応用した、「より裾野の広い展開」への活用も急務となっている。

今回の研究では、富山湾海洋深層水等張液の細胞培養液としての有効性やそのメカニズムについて、さらに複合的な方法で検証を加え、国内発、地域発の細胞培養液として開発を進める、さらに、その効果を市場でさらに大きく発展させるため、天然由来の高機能性化粧品素材への波及を計画している。

富山湾海洋深層水等張液に含まれるどの成分がこれまで見出されたような生理活性を有しているのか検証することは非常に重要である。富山湾海洋深層水等張液は現段階では「有効成分が含まれている未知の物質の複合体」であり、その用途は等張液全体を利用することで、細胞成育過程における汎用型の研究用細胞培養液とすることが考えられる。一方、生理活性物質（単一の場合も、複数の場合もあるが）と細胞成育過程の相関が検証された場合は、その有効性を科学的エビデンスとして利用でき、事業展開に大きなアドバンテージとなる。さらに、富山湾海洋深層水等張液内に含まれる有効成分によって、どのようなメカニズムで細胞の分化増殖やホメオスタシス維持能が制御されているかを明らかにするための網羅的な探索も必要である。

（2）研究目的及び目標

○研究目的

【富山湾海洋深層水中生理活性物質とその作用機序の解明】

海洋深層水は、生命誕生の太古の海の組成構造に似ていると言われ、健康飲料や食品、医薬品などの分野で広く注目されているが、含有成分と効果の検証は殆ど実施されていない。その理由は、

- ①これまでの海洋深層水では含有ミネラルの研究が主として行われており、非ミネラル成分については、ほとんど注目されてこなかった。
- ②アミノ酸やジペプチドに代表される非ミネラル成分は含有量が非常に少なく、従来技術では同定や定量化が困難であった。

そこで、本研究では、最新の高感度かつ高精度な超高速液体クロマトグラフィー質量分析法（UHPLC-M S）を駆使し、海洋深層水中の生理活性物質をターゲットとしたオミックス情報解析を実施する。それにより、今まで未知とされてきた海洋深層水の新たな非ミネラル成分情報を取得し、培養研究の詳細な作用機序の解明へつなげられるものとする。併せて、他地域の海洋深層水と富山湾海洋深層水との差異検討も行い、富山湾海洋深層水の特性も見出す。

更に、非ミネラル成分（混合物）を濃縮抽出し添加することで細胞培養に対する影響を評価する。

○研究目標

本研究では富山湾海洋深層水等張液の各種ヒト細胞への培養効果検証及び海洋深層水中の生理活性物質と培養効果との相関に関するオミックス解析により、培養再現性が高く量産化できる研究用細胞培養液の開発及び有効性・安全性エビデンスに基づく国産の天然素材高機能性化粧品の開発を行う。

この目標を達成するため、次の目標値を設定し、研究に取り組んだ。

【1. 培養再現性の向上、作用機序の解明課題への対応】

【1－1】ヒト幹細胞での細胞成育効果・培養再現性の検証

既存研究用細胞培養液から富山湾海洋深層水等張液を用いた研究用細胞培養液への置換えすることで、ヒト幹細胞（iPS細胞）での培養再現性を既存品より向上させる。

【1－2】成熟細胞、腫瘍細胞での細胞成育効果・培養再現性の検証

既存研究用細胞培養液から富山湾海洋深層水等張液を用いた研究用細胞培養液への置換えすることで、成熟細胞（上皮初代培養細胞）、腫瘍細胞（ヒト癌細胞）での培養再現性の向上を図る。

【1－3】富山湾海洋深層水等張液中生理活性物質の細胞成育過程への作用機序解明

【1－4】生理活性物質と細胞成育過程への作用機序の相関確認

細胞成育過程（増殖、分化、保存、修復）に関与する富山湾海洋深層水中の生理活性物質との作用機序をオミックス解析により網羅的に分析し生理活性物質と細胞成育過程の作用機序の相関について解明する

【2. 天然資源活用による量産化課題への対応】

【2－1】多段式電気透析装置による富山湾海洋深層水等張液利用研究用細胞培養液の開発とその量産化

細胞培養の検証及びオミックス解析による生理活性物質の同定により得られる情報をもとに、研究用細胞培養液の商品化、量産化目標を日産5トンとして製造条件を設定する。

【3. 天然資源活用による皮膚疾患治癒化粧品の商品化と安全性評価課題への対応】

【3－1】高機能性化粧品の開発

【3－2】高機能性化粧品の有用性、安全性評価

富山湾海洋深層水等張液を配合した皮膚疾患治癒を速める高機能性化粧品の組成を構築するとともに、オミックス解析結果に基づいた科学的エビデンスの構築、製品

評価を川下企業と行う。さらに皮膚疾患患者への使用テストにより対照品との有意差比較評価を行い、差別化を図り、安全性を担保する。

(3) 実施結果等

【1. 培養再現性の向上、作用機序の解明課題への対応】

代替血清の代わりとなる生理活性成分や細胞成育因子成分が富山湾海洋深層水に含有していることを確認し、これを用いた培養再現性に相関があることを確認した。

【2. 天然資源活用による量産化課題への対応】

最適な細胞培養液の商品形態として濃縮液を考え、代替血清に代わる可能性のある海洋深層水中の生理活性物質を濃縮する技術を開発することで、集積度を高め小規模の施設でも量産化ができる手法を構築した。また、この技術の安定性（再現性）についても確認した。

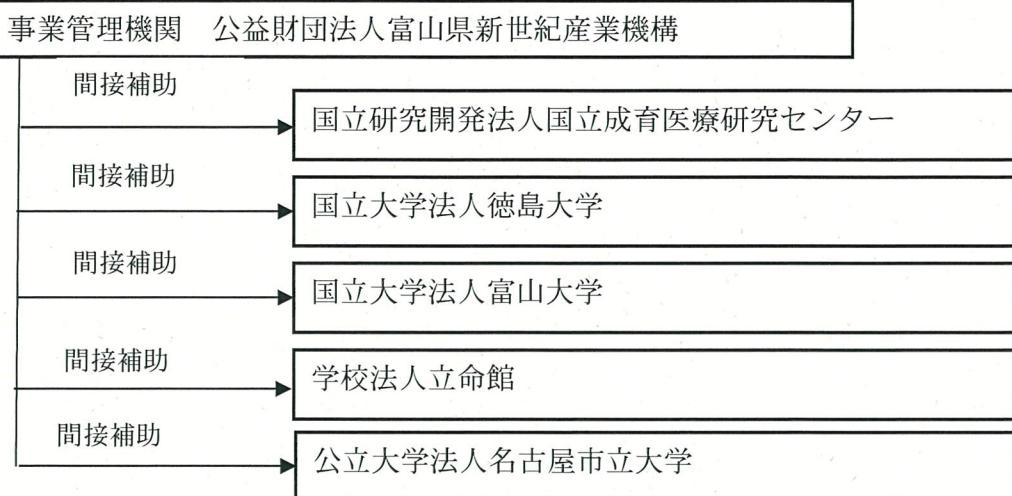
【3. 天然資源活用による皮膚疾患治癒化粧品の商品化と安全性評価課題への対応】

さらに商品価値を高めるべく化粧品処方を改良し、医薬部外品の承認を得るとともに、先述の化粧品と同様に機能性や安全性について評価を行った。

1 - 2 研究体制

(1) 研究組織・管理体制

①研究組織



事業管理機関 五洲薬品株式会社

総括研究代表者 (PL)

所属：五洲薬品株式会社
役職：代表取締役社長
氏名：藤井 侃

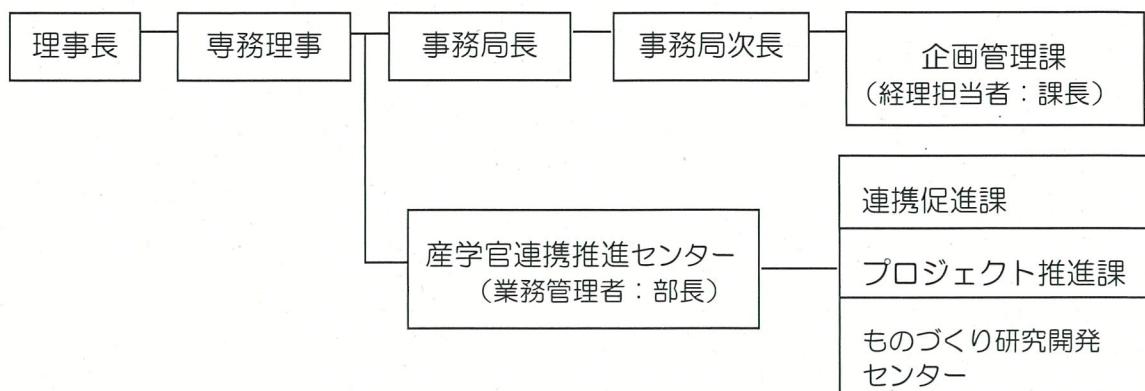
副総括研究代表者 (SL)

所属：五洲薬品株式会社
役職：研究開発部長
氏名：佐伯 行紀

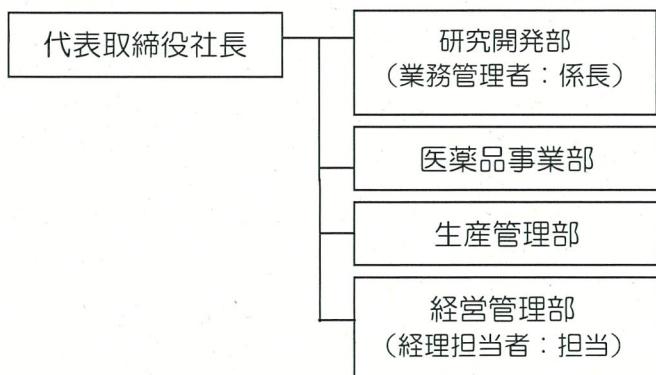
②管理体制

②-1 事業管理機関

- ・公益財団法人富山県新世紀産業機構

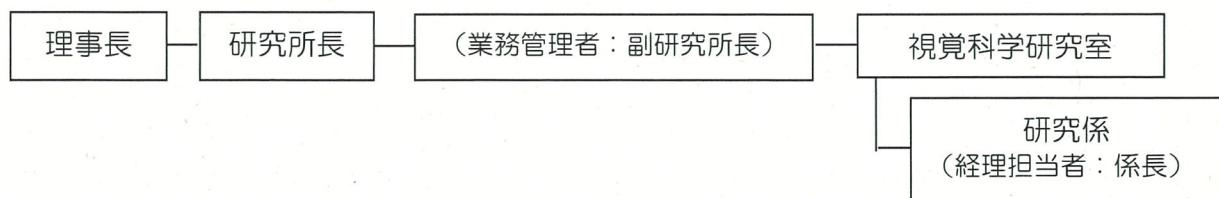


- ・五洲薬品株式会社

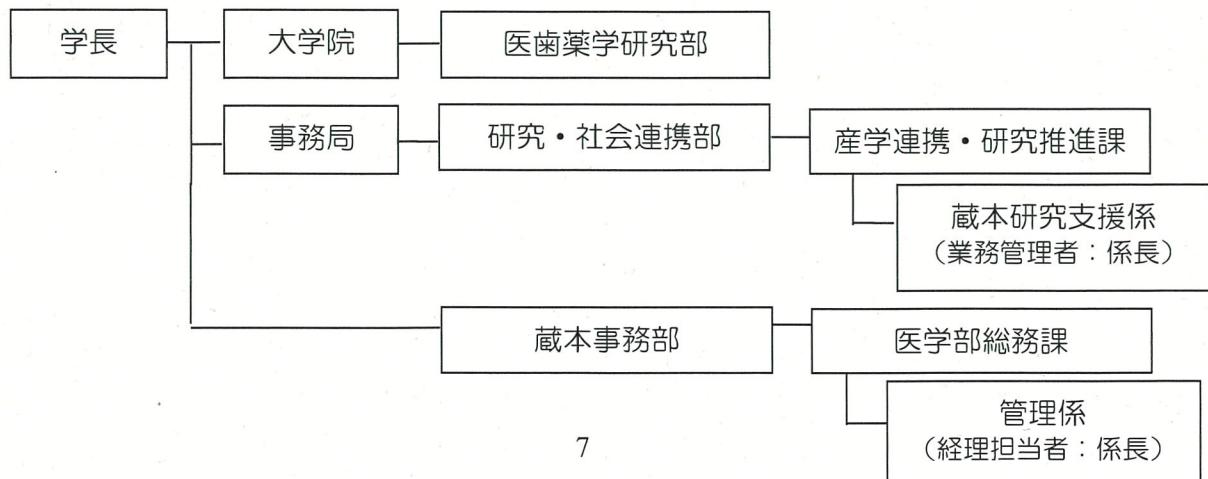


②-2 研究開発機関

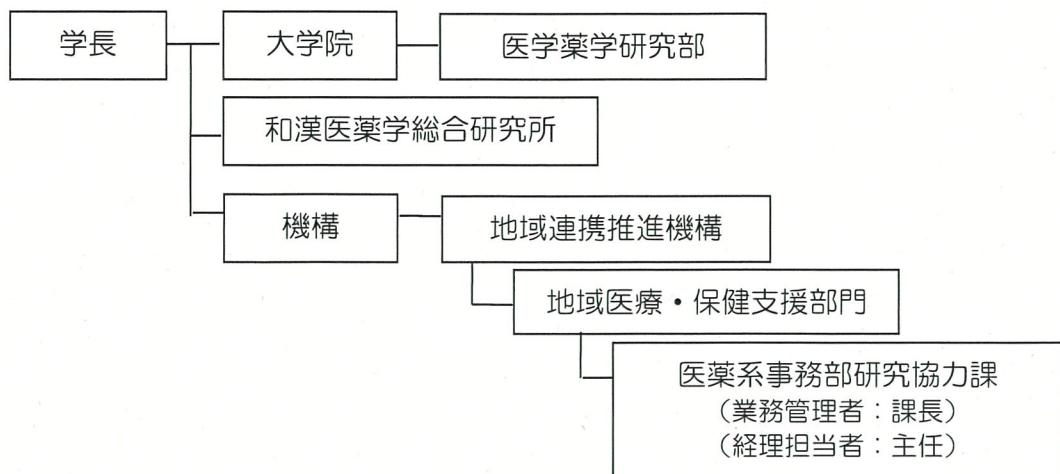
- ・国立研究開発法人国立成育医療研究センター



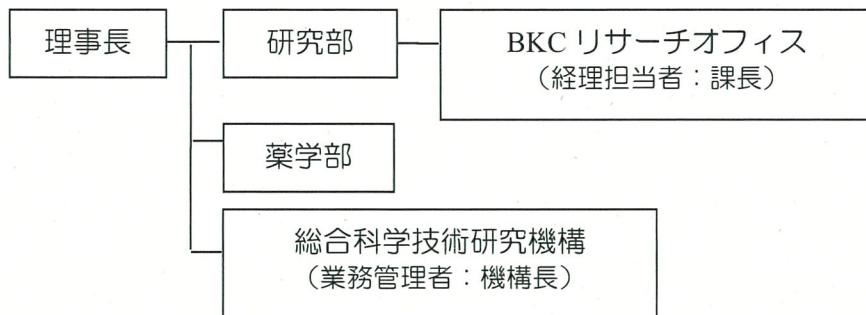
- ・国立大学法人徳島大学



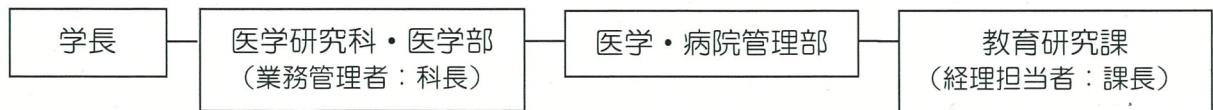
・国立大学法人富山大学



・学校法人立命館



・公立大学法人名古屋市立大学



(2) 研究者氏名、協力者

【事業管理機関】

- ・公益財団法人富山県新世紀産業機構

管理員

氏名	所属・役職
角崎 雅博	産学官連携推進センター 部長
土肥 義治	産学官連携推進センター 次長
駒城 真人	産学官連携推進センター プロジェクト推進課長補佐
市田 聰	産学官連携推進センター プロジェクト推進課 主任
片桐 寛之	産学官連携推進センター プロジェクト推進課 主事

- ・五洲薬品株式会社

管理員

氏名	所属・役職
佐伯 行紀	研究開発部 部長
溝口 訓弘	研究開発部 係長

研究員

氏名	所属・役職
佐伯 行紀	研究開発部 部長
北山 隆一	医薬品事業部 部長
土合 寛之	研究開発部 課長
溝口 訓弘	研究開発部 係長
寺島 将太	研究開発部 研究開発課 研究員
吉田 大駿	研究開発部 研究開発課 研究員
塩澤 舞	研究開発部
吉田 有希	生産管理部
青木 友佳子	研究開発部

【研究開発機関】

- ・国立研究開発法人国立成育医療研究センター

研究員

氏名	所属・役職
東 範行	眼科・視覚科学研究室 医療・室長
田中 卓	視覚科学研究室所属 研究員
松坂 恵美子	視覚科学研究室所属 研究員

- ・国立大学法人徳島大学

研究員

氏名	所属・役職
常山 幸一	大学院医薬学研究部疾患病理学分野 教授
小川 博久	大学院医薬学研究部疾患病理学分野 准教授
常松 貴明	大学院医薬学研究部疾患病理学分野 助教

- ・国立大学法人富山大学

研究員

氏名	所属・役職
八田 秀樹	大学院医学薬学研究部病理診断学講座 技術専門職員
小泉 桂一	和漢医薬学総合研究所漢方診断学分野 准教授

- ・学校法人立命館

研究員

氏名	所属・役職
井之上 浩一	薬学部 薬学科 准教授

- ・公立大学法人名古屋市立大学

研究員

氏名	所属・役職
赤津 裕康	大学院医学研究科 地域医療教育学 特任教授

・協力者（アドバイザー）

氏名	所属・役職
大塚 環	杏林製薬株式会社 ヘルスケア事業本部長
加藤 行広	杏林製薬株式会社 ヘルスケア事業本部 ヘルスケア新商品開発グループ次長
檜垣 誠吾	ダイワボウノイ株式会社 (信州大学先端纖維研究部門特別顧問)

1－3 成果概要

【1. 培養再現性の向上、作用機序の解明課題への対応】

【1－1】ヒト幹細胞での細胞成育効果・培養再現性の検証

- ①海洋深層水等張液と生理食塩水
- ②海洋深層水等張液+塩除去培地と市販培地
- ③海洋深層水等張液+塩除去培地+海洋深層水濃縮液と海洋深層水等張液+塩除去培地

を用いて iPS 細胞の培養効果について比較検証を行った。①においては、生理食塩水に比べ多くの細胞が生存していることを確認した。②においては、市販培地に比べて細胞の接着性が良く、コロニーが大きく形成していた。③においては、代替血清、増殖因子を添加しない場合で、海洋深層水濃縮液を用いた群で iPS 細胞の未分化維持、コロニーの均一性の保持に対して有効性を示すことが確認された。

【1－2】成熟細胞、腫瘍細胞での細胞成育効果・培養再現性の検証

- ①海洋深層水等張液と生理食塩水（成熟細胞、腫瘍細胞を用いて検証）
- ②海洋深層水等張液+塩除去培地と市販培地（腫瘍細胞を用いて検証）
- ③海洋深層水等張液+塩除去培地+海洋深層水濃縮液と海洋深層水等張液+塩除去培地
(成熟細胞、腫瘍細胞を用いて検証)

を用いて各細胞種での培養効果について比較検証を行った。①においては、成熟細胞では生理食塩水に比べ細胞のアポトーシスを抑制する傾向が示唆された。また、腫瘍細胞では細胞形態が正常な形状を保っていた。②においては、市販培地と同等の培養効果が確認できた。③においては、海洋深層水濃縮液を添加した場合、各細胞種が有意に増加した。また、海洋深層水濃縮液の添加量についての検討を行い、最適な添加量を見出した。さらに細胞に対する酸化ストレスの軽減効果を有することが示された。

【1－3】富山湾海洋深層水等張液中生理活性物質の細胞成育過程への作用機序解明

富山湾海洋深層水等張液中の生理活性物質の探索のため、高塩濃度下での低濃度アミン類の分

析手法を開発した。本手法を用いて、富山湾海洋深層水、富山湾表層水、駿河湾海洋深層水、尾鷲海洋深層水をサンプルとして、メタボロミクスに基づくスクリーニングを行った。その結果、各地域に特徴のある成分の存在が示唆された。

また、各細胞培養で良好な結果が得られた海洋深層水濃縮液について成分分析を進めた。さらに新たな知見を得ることを目的として、アミノ酸類の評価やノンターゲット分析も行った。この結果、天然保湿成分のアミノ酸の検出と海洋深層水の多角的解析が実施できた。

【1－4】生理活性物質と細胞成育への作用機序の相関確認

各研究機関より得られたオミックスデータに基づき、海洋深層水中の生理活性物質と細胞育成への作用機序の相関関係を検証した。

【2．天然資源活用による量産化課題への対応】

【2－1】多段式電気解析装置による富山湾海洋深層水等張液利用研究用細胞培養液の開発とその量産化

富山湾海洋深層水等張液の濃度調整、浸透圧調整を行い、富山湾海洋深層水等張液を基本成分とした基礎培地を調整した。更に、海洋深層水の濃縮法を検討し、その手法を開発した。

【3．天然資源活用による皮膚疾患治癒化粧品の商品化と安全性評価課題への対応】

【3－1】高機能性化粧品の開発

海洋深層水等張液を約8割配合し（乾燥による小ジワを目立たなくする）機能を持った高機能化粧品を開発した。さらに、処方を改良しホワイトニングの要素を付与した医薬部外品の薬用化粧水を開発した。

【3－2】高機能性化粧品の有用性、安全性評価

開発した高機能性化粧品においては抗シワ評価試験、美白評価試験を実施し有用性を確認した。さらに対照品との使用感テストを行い、良好な結果が得られた。

また、アレルギー試験による安全性、防腐・防カビ試験による保存効力、サイクル試験による安定性などの検証を行い、良好であることを確認した。

また、皮膚形成段階における海洋深層水由来成分による影響の解析を、ヒト表皮モデル作成キットを用いて行った。定性的に海洋深層水の有用性をヒト表皮モデルでも確認できた。

これらの検証結果により、高機能性化粧品における有用性、安全性のエビデンスを得ることができた。これらのエビデンスは事業展開に大きなアドバンテージとなる。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

(1) 事業管理者

法人名	公益財団法人富山県新世紀産業機構 (代表者 理事長 山崎 康至)
住所	〒930-0866 富山県富山市高田529番地
連絡担当者、所属役職名	角崎 雅博 産学官連携推進センター部長
TEL・FAX	TEL : (076)444-5691 FAX : (076)444-4207
e-mail	kado@tonio.or.jp

(2) 総括研究代表者 (PL)

氏名	藤井 優
組織名	五洲薬品株式会社
所属役職名	代表取締役社長
TEL・FAX	TEL : (076)424-2661 FAX : (076)422-4571
e-mail	fujii@goshu.co.jp

(3) 副総括研究代表者 (SL)

氏名	佐伯 行紀
組織名	五洲薬品株式会社
所属役職名	研究開発部部長
TEL・FAX	TEL : (076)424-2661 FAX : (076)422-4571
e-mail	saeki@goshu.co.jp

(4) 研究実施者

研究実施機関	代表者役職 氏名	連絡先
五洲薬品株式会社	代表取締役社長 藤井 健	〒939-8201 富山県富山市花園町 1-1-5 TEL : (076) 424-2661 FAX : (076) 422-4571
国立研究開発法人 国立成育医療研究センター	理事長 五十嵐 隆	〒157-8535 東京都世田谷区大蔵 2-10-1 TEL : (03) 3416-0181 FAX : (03) 5494-7909
国立大学法人徳島大学	学長 野地 澄晴	〒770-8503 徳島県徳島市蔵本町 3-18-15 TEL : (088) 633-7065 FAX : (088) 633-7067
国立大学法人富山大学	学長 遠藤 俊郎	〒930-0887 富山県富山市五福 3190 TEL : (076) 434-7235 FAX : (076) 434-5016
学校法人立命館	理事長 森島 朋三	〒604-8520 京都府京都市中京区西ノ京 東梅尾町 8 TEL : (077) 561-5838 FAX : (077) 561-5838
公立大学法人 名古屋市立大学	理事長 郡 健二郎	〒467-8601 愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町 字川澄 1 TEL : (052) 851-5511 FAX : (052) 853-8527

第2章 本論

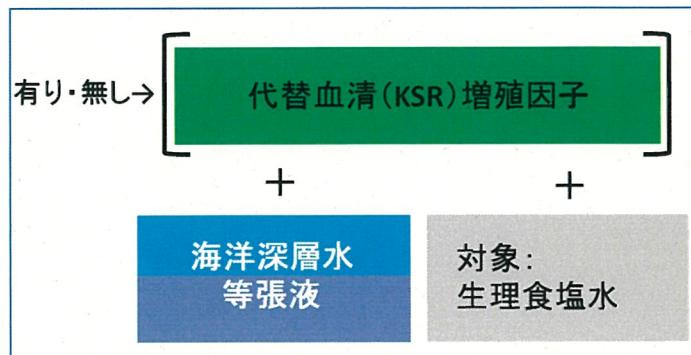
(1) 補助事業の具体的研究内容及び研究成果

【1. 培養再現性の向上、作用機序の解明課題への対応】

【1-1】ヒト幹細胞での細胞育成効果・培養再現性の検証

iPS細胞の培養に対する海洋深層水等張液の効果（増殖、未分化能維持）を検証した。

- ① iPS細胞を用いて、海洋深層水等張液と生理食塩水の細胞培養効果を比較検証した。また増殖因子を含む系と含まない系についても検討した。これにより、iPS細胞の生存能力を比較し潜在能力を検証した。



(結果)

海洋深層水等張液群は生理食塩水群と比較して iPS細胞コロニーが多く生存していることを確認した。

- ②前項の検討に基づき、海洋深層水等張液に不足する栄養成分を補給した場合の細胞培養への効果を検証した。方法としては、iPS細胞を用いて、海洋深層水等張液と塩を除去した基礎培地（塩除去培地）と、対照である基礎培地で細胞培養効果を検討した。また、増殖因子を含む系と含まない系についても検討することで、海洋深層水に代替血清・細胞増殖因子様の機能があるかを検証した。



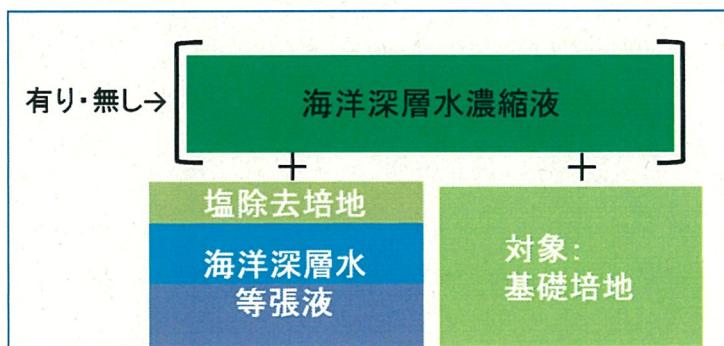
(結果)

海洋深層水等張液と塩除去培地の方が、接着性が良く iPS細胞コロニーが大きく形成していた。

KSR・bFGF（代替血清・細胞増殖因子）の有無で比較すると、海洋深層水等張液と塩除去培地の方が、接着性が向上し、iPS 細胞コロニーの形状が維持されており、コロニー数が増加し、染色が強くみられた。このことから、海洋深層水には代替血清や増殖因子の様な生理活性物質や細胞増殖因子が含まれる可能性が示唆された。

※KSR：代替血清であり、栄養成分である基礎培地に細胞増殖因子の bFGF と共に加え細胞培養を行う試薬。（インシュリン、トランスフェリン、プロゲステロン等の生理活性物質の混合物で、成分が未公開である製品が多い。）

③海洋深層水中の生理活性物質を濃縮・抽出した海洋深層水濃縮液を②項で検討した培地（海洋深層水等張液+塩除去基礎培地）に添加させ、増殖能向上、未分化能維持があるかについて検証した。なお海洋深層水濃縮液は、本研究にて開発した 3 種類の濃縮法（Fmoc 濃縮法、限外濾過膜による濃縮法（分子量により 2 種の濃縮液）、加熱によるニガリ経由濃縮法）により得られた 4 種類の濃縮液を用いて検討した。



(結果)

1. Fmoc 濃縮液（低分子成分）、海の LPS 濃縮液を培地に加えた場合の効果

基礎培地（20%KSR、bFGF を加えた培地）の増殖状態をコントロールとする。

KSR、bFGF を加えない培養ではコロニーが見られないことから、増殖は大きく低下した。Fmoc 濃縮液（低分子成分）や海の LPS 濃縮液を加えた場合、KSR、bFGF があるとコロニー数がコントロールに比べ減少したことから、増殖能は抑制された。しかしこロニーが確認されたことから、Fmoc 濃縮液（低分子成分）や海の LPS 濃縮液には、KSR、bFGF と同様の性質があることが推定された。更に、海の LPS 濃縮液の添加量を増加させた場合、コロニーが大きくなる傾向がみられた。

以上のことから、Fmoc 濃縮液（低分子成分）、海の LPS 濃縮液には、KSR や bFBF と同様な働きをするが、KSR、bFBF との共存では負の相互作用が起こる傾向がみられた。

2. DSW（ニガリ）濃縮液を培地に加えた場合の効果

基礎培地（20%KSR、bFGF を加えた培地）の増殖状態をコントロールとする。

KSR、bFGF を加えない培養でもコロニーの数は大きく低下したがコロニーが見られた。

DSW（ニガリ）濃縮液を加えた場合、KSR、bFGFがあるとコロニー数がコントロールに比べ減少したことから、増殖能は抑制された。

KSR、bFGFを加えない場合、DSW（ニガリ）濃縮液を添加するとコロニーが確認されなかった。

3-①. 海のLPS未含有濃縮液を培地に加えた場合の効果

基礎培地（20%KSR、bFGFを加えた培地）の増殖状態をコントロールとする。

コントロールと海洋深層水等張液+塩除去培地に、海のLPS未含有濃縮液を加えても未分化能、増殖能に特異な差は見られなかった。

3-②. 海のLPS未含有濃縮液を培地に加えた場合の効果

基礎培地（20%KSRを加えた培地）の増殖状態をコントロールとする。

海のLPS未含有濃縮液を添加しKSRがある場合には、コントロールに比べ、iPS細胞の増殖能は抑制された。

KSR、bFGF非存在下でもコロニーは若干小さいが、未分化能が強く残存しており、かつコロニーの均一性が保たれていることから、iPS細胞として最も望まれる形態で培養できた。また、その添加濃度は培養効果への相関が示唆された。

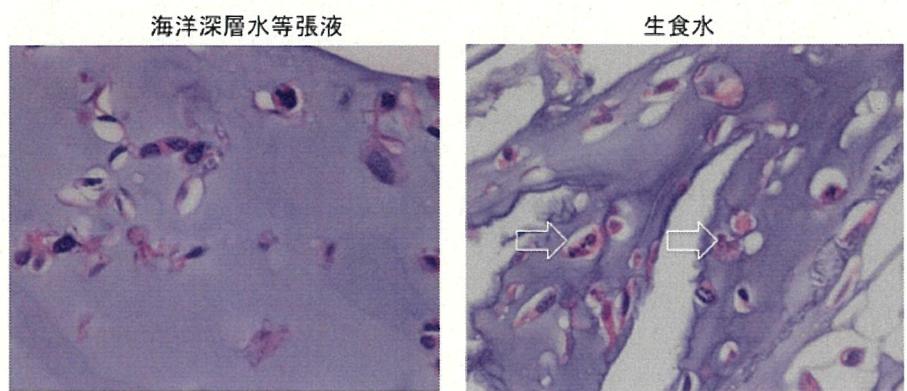
【1-2】成熟細胞、腫瘍細胞での細胞成育効果・培養再現性の検証

①腫瘍細胞や成熟細胞を用いて、海洋深層水等張液と生理食塩水の細胞培養効果を比較検証した。また血清（FBS）を含む系と含まない系についても検討した。これにより、腫瘍細胞や成熟細胞の生存能力を比較し潜在能力を検証した。



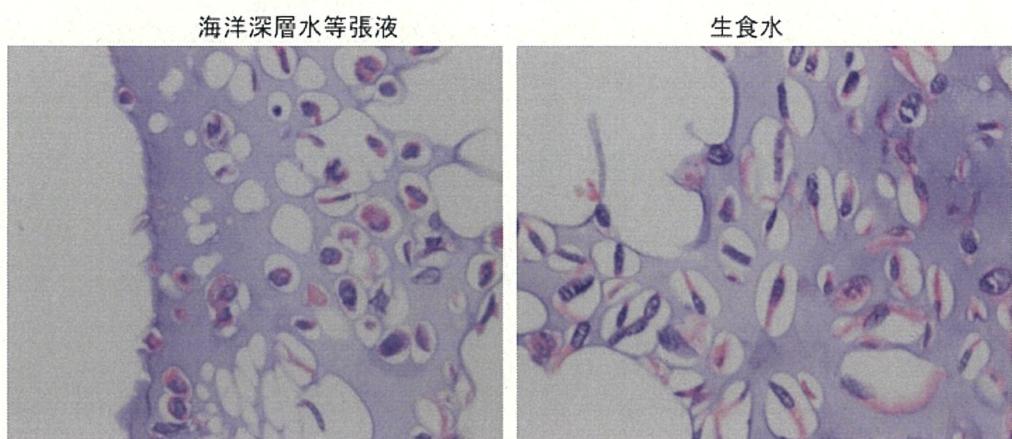
(結果)

成熟細胞を海洋深層水等張液、生理食塩水でそれぞれ培養した。その結果、培地中に栄養分が含まれないため、細胞は増殖せず、次第に剥離・浮遊状態となった。



トリプシンで剥離してセルブロックを作成し、HE 染色を作成。細胞形態では、海洋深層等張液に比して生理食塩水では細胞の核の変性像が目立った。アポトシスマーカー (cleaved caspase-3, M30 cytodeath) では、M30 cytodeath において生理食塩水の方が陽性率が高く、海洋深層水等張液の方がアポトーシスに陥りにくいと考えられた。

腫瘍細胞を海洋深層水等張液、生理食塩水でそれぞれ培養した。その結果、培地中に栄養分が含まれないため、細胞はほとんど増殖せず、次第に剥離・浮遊状態となった。

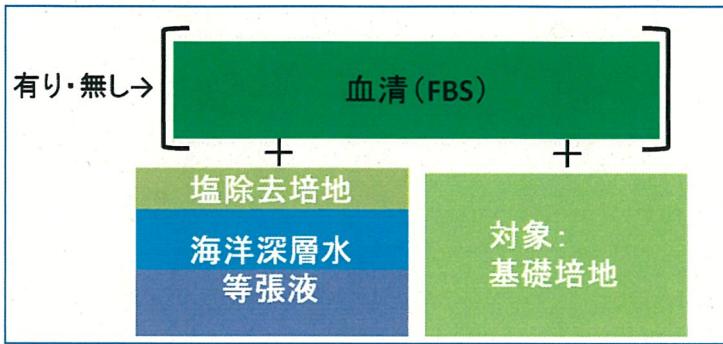


トリプシンで剥離してセルブロックを作成し、HE 染色を実施した。海洋深層水等張液の方が肉眼的に明らかに接着性が強かった。細胞形態では、海洋深層水等張液は細胞が類円形を保っているのに対し、生理食塩水では殆どが紡錘形を示していた。アポトシスマーカー (cleaved caspase-3, M30 cytodeath) では、いずれも殆ど陽性像が無く、腫瘍細胞ではアポトーシスの誘導は少数と考えられた。

海洋深層水等張液は生理食塩水より増殖活性の指標である Ki-67 labeling index が高く、大きな差が認められた。

以上より、腫瘍細胞では、海洋深層水等張液の方が生理食塩水に比して細胞接着性が保たれており、細胞の形態も正常な類円形を維持し、細胞増殖能も保たれていた。成熟細胞では海洋深層水等張液の方が生理食塩水に比して細胞の変性が少なく、アポトーシスにも耐性を有していた。

②前項の検討に基づき、海洋深層水等張液に不足する栄養成分を補給した場合の細胞培養への効果を検証した。方法としては、腫瘍細胞を用いて、海洋深層水等張液+塩除去培地と、対照である基礎培地で細胞培養効果を検討した。また、増殖因子を含む系と含まない系についても検討した。



(結果)

海洋深層水等張液+塩除去培地あるいは基礎培地でそれぞれ培養した。培養された細胞数を吸光度で比較した結果、同等な細胞増殖効果が確認された。同時再現性についても、共にばらつきが小さく同等であった。これは、共に基盤栄養及び既存の増殖因子を加えた条件での培養であり、良好に増殖したためと考えられる。

FBS 未配合の場合、増殖の程度は海洋深層水等張液+塩除去培地で若干低い傾向がみられたが、細胞形態や増殖活性には殆ど差が見られなかった。FBS 配合の場合、どちらの培地も細胞形態や増殖活性に殆ど差が見られなかった。

以上の結果から、海洋深層水に培養細胞の増殖能を高める効果ははっきりとしなかったが、細胞の変性を防ぎ、“死ににくさ”をサポートする物質が含有している可能性があると考えられる。

③海洋深層水濃縮液を、海洋深層水等張液+塩除去培地に添加した場合に、細胞増殖能向上や再現性向上があるかについて、腫瘍細胞（ヒト乳癌細胞（MCF7））及び成熟細胞（ヒト正常細胞皮膚ケラチノサイト（HaCaT））により検証した。

腫瘍細胞、成熟細胞を用い、基礎培地、海洋深層水等張液+塩除去培地のいずれかに、2種類の海洋深層水濃縮液（DSW 濃縮液、海の LPS 未含有濃縮液）のいずれかを添加し、濃縮液の添加がないものと培養効果を比較検討した。濃縮液の添加に効果が認められたことから、添加する際の至適濃度を探査した。また、有効性の検証のため、海洋深層水の酸化ストレス抑制効果を検証した。

(結果)

FBS なしの状態で、基礎培地に海の LPS 未含有濃縮液を投与すると、腫瘍細胞でも成熟細胞でも細胞の増殖が有意に增加了。一方、DSW 濃縮液ではその効果は認められなかった。以上より、海の LPS 未含有濃縮液の中に、細胞の増殖に関する何らかの成分が含まれていると考えられた。

一方、FBS なしの海洋深層水等張液 + 塩除去培地では、上記で見られた増殖効果が認められなかった。海洋深層水等張液 + 塩除去培地にはすでにその成分が十分量含まれているためと考えられた。

FBS ありの状態で、海の LPS 未含有濃縮液を添加しても、FBS なしの状態で見られた効果は認められなかった。このことから、FBS 中に含まれている細胞増殖に有効な成分と同様のものが海の LPS 未含有濃縮液に含まれている可能性が示唆された。

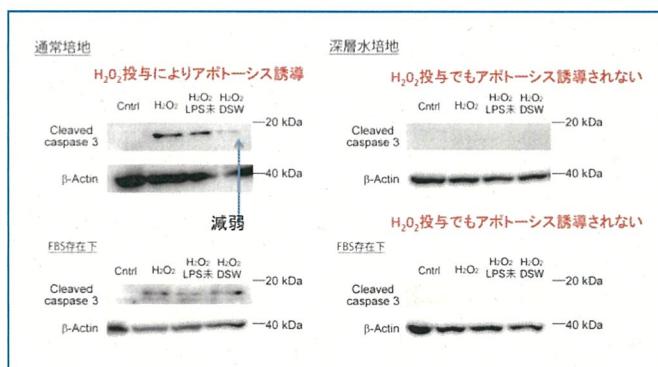
腫瘍細胞、成熟細胞を基礎培地で培養し、2種類の海洋深層水濃縮液 (DSW 濃縮液、海の LPS 未含有濃縮液) のいずれかを種々の濃度で添加して増殖能を比較した。

海の LPS 未含有濃縮液は 0.2% 添加が最も有効性が高く、元々の深層水の含有量に近い濃度が至適濃度と考えられた。DSW 濃縮液は細胞の増殖を抑制することが再確認された。

腫瘍細胞に H_2O_2 を投与して酸化ストレスを誘導し、2種類の海洋深層水濃縮液 (DSW 濃縮液、海の LPS 未含有濃縮液) のいずれかを添加してアポトーシスの程度を観察した。培地は基礎培地と、海洋深層水等張液 + 塩除去培地を用いた。

腫瘍細胞に H_2O_2 を投与すると、アポトーシスの指標である cleaved caspase-3 が出現し、DSW 濃縮液の添加によって軽減した。一方、海洋深層水等張液 + 塩除去培地では H_2O_2 を投与しても酸化ストレスによるアポトーシスが見られなかった。

DSW 濃縮液の投与により、酸化ストレスが軽減されている可能性が示唆された。

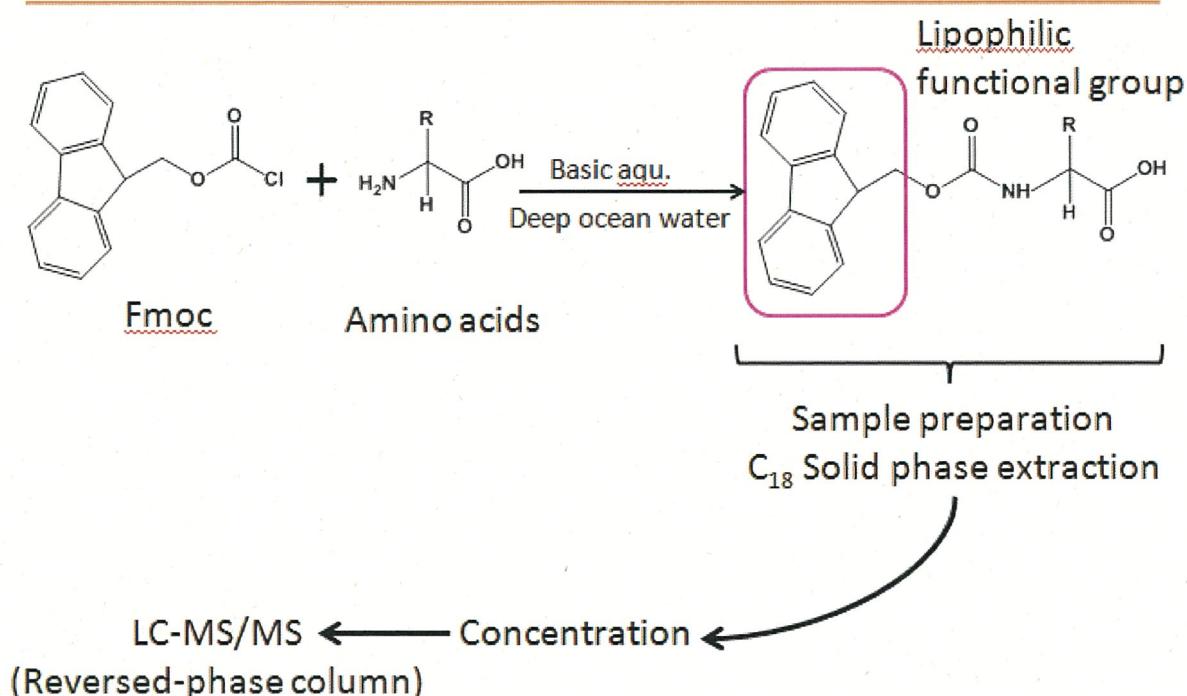


【1－3】富山湾海洋深層水等張液中生理活性物質の細胞成育過程への作用機序解明

①海洋深層水原水、または海洋深層水等張液といった高塩濃度下での極微量アミノ酸の定量分析を行うため、低分子有機化合物の前処理による回収率向上を検討した。その結果、生理活性物質の探索のための新手法（Fmoc-LC/MS 法）を確立した。その妥当性について確認を行ったところ、これまで課題であった高塩濃度下での低濃度アミン類の分析が可能となった。

以下に、Fmoc-LC/MS 法の概要、回収率検証の一例を示す。

F-moc derivatization of amino acids in deep ocean water

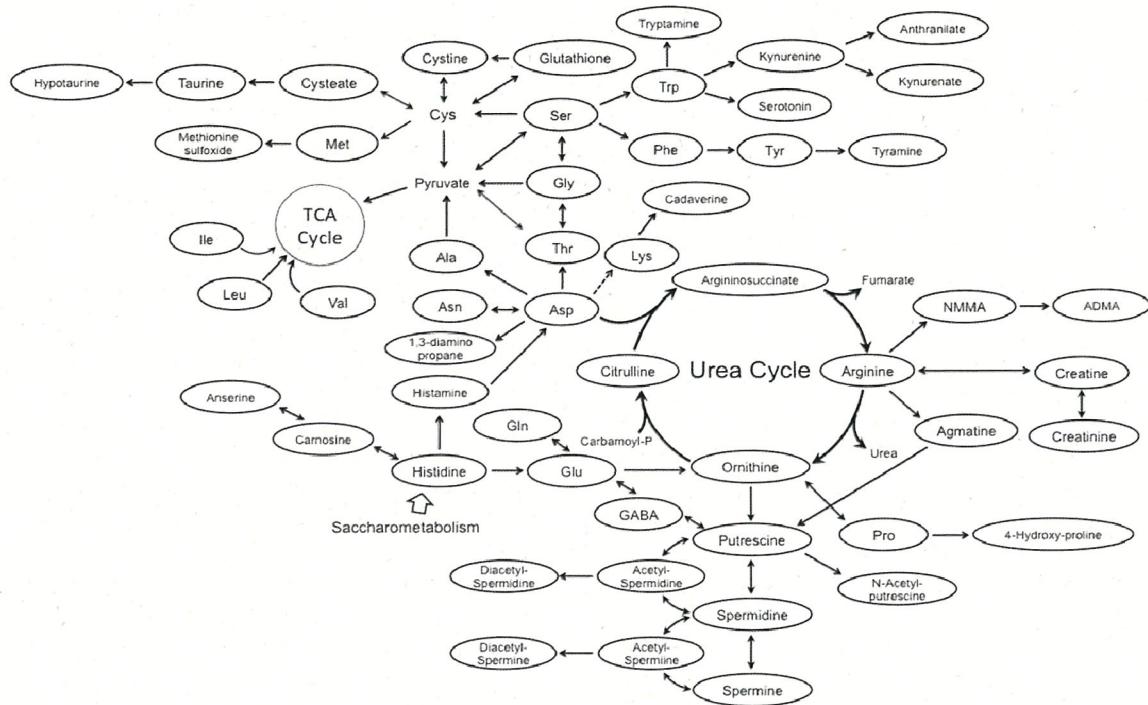


添加回収の結果

対象物	0.005 ng/mL	0.01 ng/mL	0.02 ng/mL
グルタミン酸	113.0±15.7%	98.4±5.0%	104.0±3.0%
グルタミン	95.5±2.4%	97.3±0.9%	97.2±1.8%
GABA	112.0±11.7%	101.0±6.1%	105.0±3.2%

(n=3)

添加回収試験の結果のとおり、低濃度アミン類の分析が可能となった。本手法を用いることで各種の生理活性物質をピックアップし、海洋深層水に含まれているかについて分析を実施した。



(結果)

海洋深層水 3 地域（富山湾海洋深層水、静岡県焼津海洋深層水、三重県尾鷲海洋深層水）、富山湾海洋表層水をサンプルとして、メタボロミクスに基づくスクリーニングを行った。

富山湾海洋深層水には他地域の海洋深層水、表層水にはない特徴のある成分の存在が示唆された。

②各細胞培養で良好な結果が得られた海洋深層水濃縮液について成分分析 (Fmoc-LC/MS 法、LC-TOF/MS) を進めた。検討した濃縮液は次のとおりである。

No. 1 : DSW 濃縮液

No. 2 : DSW 濃縮液

No. 3 : 海の LPS 未含有濃縮液

No. 4 : 表層水濃縮液 (SW ニガリ濃縮液 200)

No. 5 : 深層水濃縮液 (DSW ニガリ濃縮液 200)

(結果)

海洋深層水濃縮液の Fmoc-LC/MS 法を用いた成分分析を進めた結果、天然保湿因子のアミノ酸が検出できた。

LC-TOF/MS を用いたノンターゲット分析の検出ピークを主成分解析 (PCA) した結果、海洋深層水濃縮液 No. 1 及び 2、No. 4 及び 5 に類似した成分パターンを見出した。また、一部にジ・トリペプチドが含有している可能性が見出された。

これにより、海洋深層水の濃縮液に対する多角的解析が達成できた。

Sample (1-5) N=3

- Each of 10 μ L was diluted with MeCN
Meanwhile, quality control sample(QCs) was prepared as mixed solution of all samples

Subjected to UPLC - High resolution MS (I-Class/Xevo-Q-ToF G2 XS; Waters)

Conditions

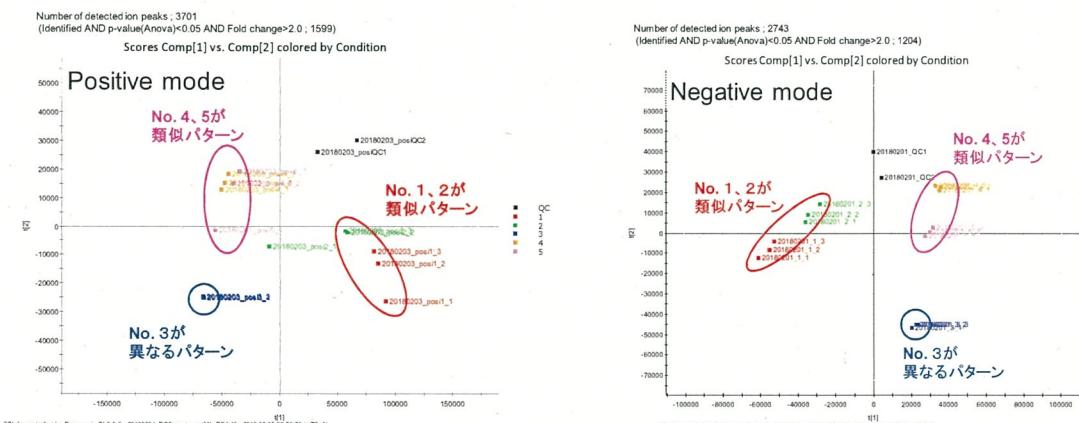
Column; Tskgel Amide 80 (2.0 μ m, 2.1*100 mm; TOSOH)
Mobile Phase; Pos)A=10 mM HCOONH₄/B=MeCN

Neg)A=10 mM CH₃COONH₄/B=MeCN
 Gradient; B%(min)=98(initial)-98(0.5)-75(20.5)-Wash and equilibration(30min)
 Capillary voltage; 3.0 kV Sampling cone; 20 Scan time; 0.5 sec
 Range of m/z; 50-1000 collected by Leu/Enk (+556.2771/-554.2621)

Peak analysis and Statistical analysis

Software; Progenesis QI and Ezinfo throughout peak picking, alignment, deconvolution and identification of metabolites

LC-TOF/MS によるノンターゲット解析のプロトコール



海洋深層水調整液のノンターゲット分析による主成分解析（PCA）プロット



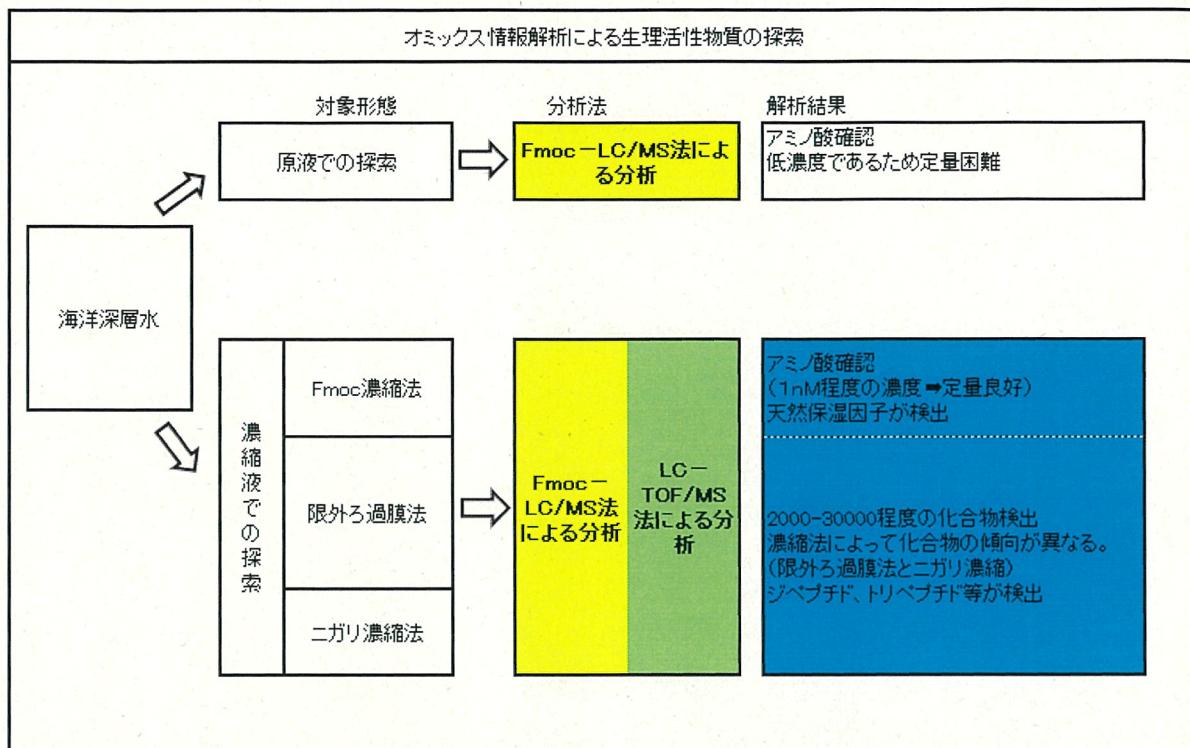
海洋深層水濃縮液の含有する可能性あるペプチド類の同定解析

【1-4】生理活性物質と細胞成育への作用機序の相関確認

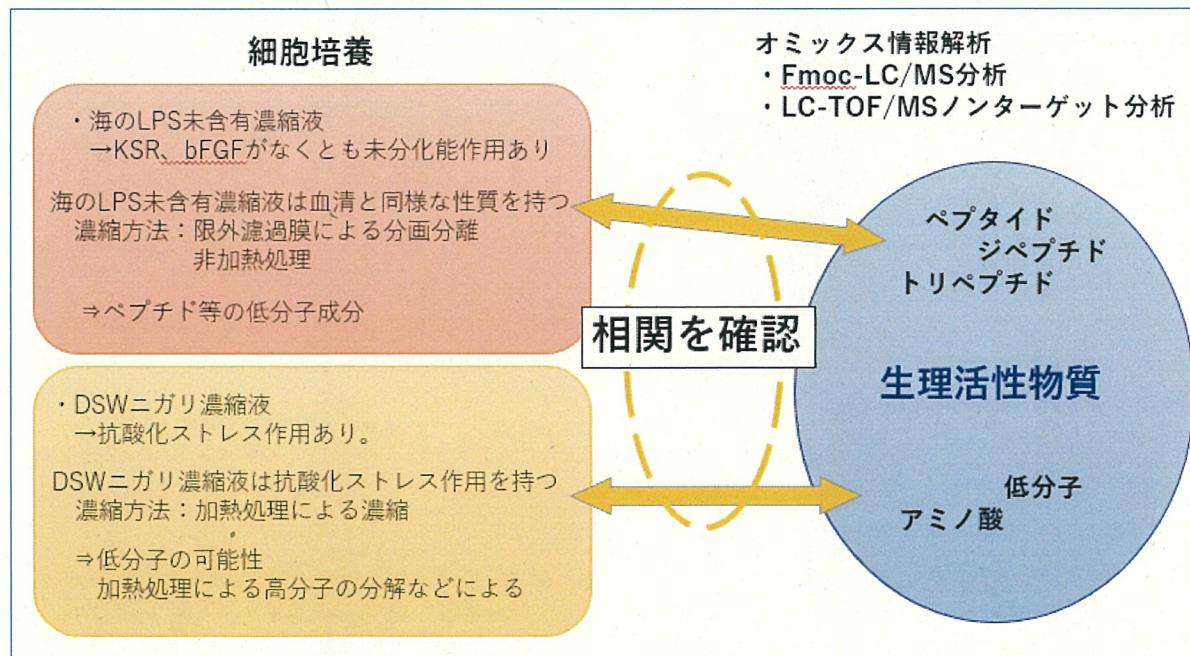
海洋深層水の成分と細胞への影響の相関関係を以下の図に示す。

細胞培養効果	培養形態	効果
iPS細胞の培養 (増殖能弱い)	生理食塩水のみでの培養	基盤栄養無 (飢餓状態) 増殖できず死滅
	海洋深層水等張液のみでの培養	海洋深層水等張液群は生理食塩水群と比較して存命作用があることが示唆された。
	海洋深層水等張液 + 塙除去培地 対象: 基礎培地 ※KSR, bFGF 有無で比較	接着性向上。 iPS細胞 コロニーの形状維持。 コロニーが大きく、未分化が強く見られた。 海洋深層水にはKSR, bFGFの様な生理活性物質や細胞増殖因子が含まれる可能性が示唆された。
	海洋深層水等張液 + 塙除去培地 + 海洋深層水濃縮液(海のLPS未含有濃縮液) 対象: 海洋深層水等張液 + 塙除去基礎培地 ※KSR, bFGF 有無で比較	KSR, bFGF無でも、コロニーは若干小さいが、未分化能が強く残存しており、iPS細胞として最も望まれる形態であることを確認した。(添加濃度の培養への相関を確認した。) 代替血清と同様な生理活性作用が示唆された。
海洋深層水等張液 + 塙除去培地 + 海洋深層水濃縮液(海のLPS含有濃縮液) 対象: 海洋深層水等張液 + 塙除去基礎培地 ※KSR, bFGF 有無で比較	コロニーの増殖は抑制 濃度に応じてコロニーの数が増加(添加濃度の培養への相関を確認した。) KSR, bFGF無でも、コロニーは増殖する 代替血清と同様な生理活性作用が示唆された。	
海洋深層水等張液 + 塙除去培地 + 海洋深層水濃縮液(DSW二ガリ濃縮液) 対象: 海洋深層水等張液 + 塙除去基礎培地	KSR, bFGF有: コントロール培養に比べ、増殖能は抑制された。 KSR, bFGF無: コロニーの形成が無かったことから、KSR, bFGFの作用は乏しいことを確認した。	

細胞培養効果	培養形態	効果
正常皮膚細胞 腫瘍細胞 の培養(増殖能強い)	生理食塩水のみでの培養	基盤栄養無 (飢餓状態) 細胞は増殖せず、次第に剥離、浮遊状態となった。 細胞接着性が弱い。 細胞形態は纺錐形をしていた。 アポトーシスマーカーの陽性率が高かった。
	海洋深層水等張液のみでの培養	細胞は増殖せず、次第に剥離、浮遊状態となった。 細胞接着性が強い、細胞増殖能保持。 細胞形態は正常な類円形を維持。 アポトーシスに耐性を有していた。
	海洋深層水等張液 + 塙除去培地 対象: 基礎培地 ※FBS 有無で比較	海洋深層水等張液 + 塙除去培地と基礎培地は基盤栄養があるため、ともに良好に増殖したため、差はなかった。 FBS有無とともに差はほぼ見られなかった。
	海洋深層水等張液 + 塙除去培地 + 海洋深層水濃縮液(海のLPS未含有濃縮液) 対象: 海洋深層水等張液 + 塙除去基礎培地 ※FBS 有無で比較	FBS無の状況でどちらの細胞の増殖が有意に増加した。 FBS有の状況ではFBS無の状況で見られた増殖能は認められなかった。 このことからFBS中に含まれている細胞増殖に有効な成分と同等のものが含まれている可能性が示唆された。 海のLPS未含有濃縮液0.2%添加時が最も有効性が高い。
海洋深層水等張液 + 塙除去培地 + 海洋深層水濃縮液(DSW二ガリ濃縮液) 対象: 海洋深層水等張液 + 塙除去基礎培地 ※FBS 有無で比較	FBS無の状況ではどちらの細胞も増殖は認められなかった。 腫瘍細胞では酸化ストレスによるアポトーシスは見られなかった。 DSW二ガリ濃縮液の投与により酸化ストレスが緩和されている可能性が示唆された。	



生理活性物質と細胞成育への作用機序の相関図



【2. 天然資源活用による量産化課題への対応】

【2-1】多段式電気透析装置による富山湾海洋深層水等張液利用研究用細胞培養液の開発とその量産化

①培地製造を検討するに当たり、調整技術や品質管理が重要となる。培養液製造に関する検討及び製造手順、品質管理手順を確認し、各種培地の調整法、製造法を検討した。

(結果)

海洋深層水等張液、生理食塩水、海洋深層水等張液+塩除去培地の培地について調整法、製造法を確立した。これら培地は各種分析機器を用い品質を確認したのち、共同研究実施機関へ提供した。また、スケールアップ検討を行い、培地製造の量産化への目途がたった。



製造した各種培地の一部

②さらに最適な細胞培養液の商品仕様について検討し、海洋深層水中の生理活性物質を濃縮することでハンドリング性を高め、より高付加価値のある商品開発を目指した。

(結果)

海洋深層水中の生理活性物質の濃縮技術 (Fmoc 濃縮法) や脱塩加熱濃縮法、限外濾過膜を用いた濃縮法を開発した。本濃縮法を用いて、次の濃縮液を製造、調整し、共同研究実施機関に提供した。

- ・ Fmoc 濃縮液 (Fmoc 濃縮法)
- ・ DSW ニガリ濃縮液 (脱塩加熱濃縮法)
- ・ 海の LPS 含有濃縮液、海の LPS 未含有濃縮液 (限外濾過膜を用いた濃縮法)

この濃縮液を市販の細胞培養液に添加する手法を用いることで、ハンドリング性の向上、高付加価値商品の開発が可能となった。また、この濃縮液を用いることで、微量成分の解析検討、細胞培養への効果確認が容易となる。

【3. 天然資源活用による皮膚疾患治癒化粧品の商品化と安全性評価課題への対応】

【3-1】高機能性化粧品の開発

①開発する高機能性化粧品に配合する有用成分の定性、定量を行い、海洋深層水等張液をベースとした試作品組成の設計を行った。試作品組成の構築は、アドバイザーからの助言により消費者視点に立った高機能性化粧品のアウトプットとして、次の方向性で開発を行った。

- 1) 皮膚リペア化粧品として「フェイスマスク型化粧品」
- 2) ナチュラルエイジング化粧品・飲料として「口腔ケア化粧品」

(結果)

海洋深層水等張液をマスク型に切り取った不織布に含浸させ、顔面に密着させることで海洋深層水等張液に含まれる有効成分を皮膚表面に効果的に取り込み、かつ皮膚表面の乾燥を防ぐフェイスマスク型化粧品を開発することができた。

口腔ケア化粧品は、海洋深層水等張液に含まれる成分を口腔内粘膜から吸収することで、口腔内からのナチュラルエイジングを図った。この評価では1分間洗口し吐き出した後でもほどよい滞留感を感じることができ、歯茎の引き締め効果が1～2時間程度維持することができた。

②アドバイザーの協力と川下企業からのニーズを組み入れ、高機能性化粧品（化粧液）の開発を進めた。

(結果)

海洋深層水を8割配合した化粧水を開発し、機能性や安全性に関する各種評価を進めた。

③開発した化粧水について、さらに商品価値を高めるため、エイジングケア（抗シワ）に加え、ホワイトニングの2大要素を兼ねた医薬部外品の薬用化粧水として改良した。

(結果)

医薬部外品として使用可能な、医薬部外品原料規格、日本薬局方、別紙規格等に適用するよう、一部の処方変更を実施、海洋深層水等張液を約8割配合した医薬部外品製造販売承認申請を行い、承認取得した。機能性として抗シワの他に美白効果を訴求できる内容とした。

<p>医薬部外品製造販売承認書</p> <p>氏名及社名等 玉洲製品株式会社</p> <p>平成 30 年 8 月 25 日付で申請のあった医薬部外品の製造販売を医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律(昭和 36 年法律第 145 号)第 14 条第 1 項の規定により、承認申請書のとおり承認する。</p> <p>平成 30 年 8 月 25 日</p> <p>厚生労働大臣 方田 真尋 印鑑</p> <p>E122000932639</p>	<p>医薬部外品製造販売承認申請書</p> <table border="1"> <tr> <td>名 称</td> <td>一般的な名称</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>販売名</td> <td>薬用化粧水W</td> </tr> <tr> <td colspan="3">成分及び分量又は本質</td> </tr> <tr> <td colspan="3">製造方法</td> </tr> <tr> <td colspan="3">用法及び用量</td> </tr> <tr> <td colspan="3">効能又は効果</td> </tr> <tr> <td colspan="3">貯藏方法及び有効期間</td> </tr> <tr> <td colspan="3">規格及び試験方法</td> </tr> <tr> <td>製造販売する品目</td> <td>名 称</td> <td>規 格</td> <td>許可区分又は認定区分</td> <td>許可番号又は認定番号</td> </tr> <tr> <td>製造所</td> <td>名 称</td> <td>所 在 地</td> <td>許可区分又は認定区分</td> <td>許可番号又は認定番号</td> </tr> <tr> <td>原薬の製造所</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>備考</td> <td colspan="4"></td> </tr> </table> <p>上記により、医薬部外品の製造販売の承認を申請します。</p> <p>平成30年 8月25日 住 所 富山県富山市花園町1丁目1番5号 氏 名 玉洲製品株式会社 代表取締役 藤井 伸 厚生労働大臣 方田 真尋 印 29.8.25 29.8.26</p>	名 称	一般的な名称			販売名	薬用化粧水W	成分及び分量又は本質			製造方法			用法及び用量			効能又は効果			貯藏方法及び有効期間			規格及び試験方法			製造販売する品目	名 称	規 格	許可区分又は認定区分	許可番号又は認定番号	製造所	名 称	所 在 地	許可区分又は認定区分	許可番号又は認定番号	原薬の製造所					備考				
名 称	一般的な名称																																												
	販売名	薬用化粧水W																																											
成分及び分量又は本質																																													
製造方法																																													
用法及び用量																																													
効能又は効果																																													
貯藏方法及び有効期間																																													
規格及び試験方法																																													
製造販売する品目	名 称	規 格	許可区分又は認定区分	許可番号又は認定番号																																									
製造所	名 称	所 在 地	許可区分又は認定区分	許可番号又は認定番号																																									
原薬の製造所																																													
備考																																													

開発品の医薬部外品製造販売承認書（鑑）

【3-2】高機能性化粧品の有用性、安全性評価

- ①開発した化粧液について次の評価を実施した。
 - 1) 有用性試験（抗シワ評価試験、ホームユーステスト）
 - 2) 安全性試験（パッチテスト、アレルギー試験、保存効力試験）

（結果）

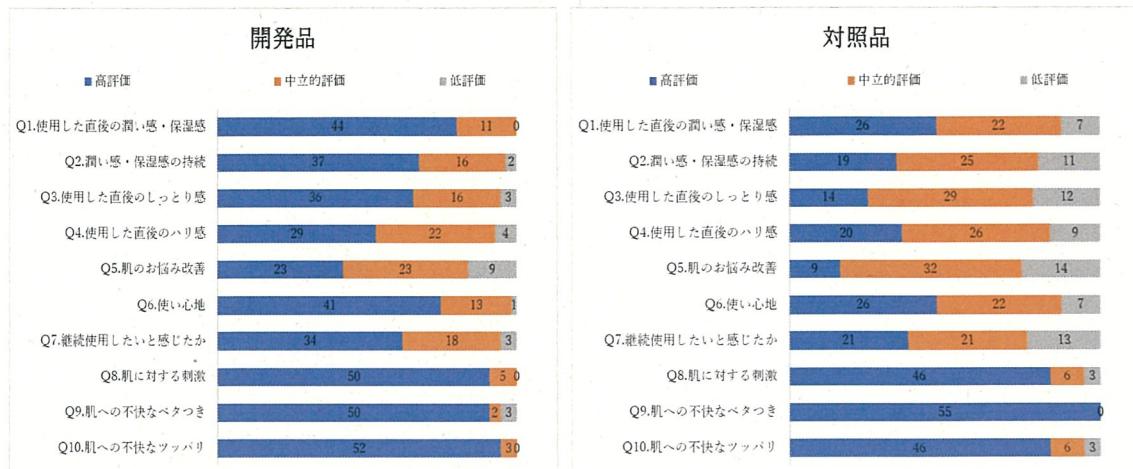
開発した化粧液の有用性、安全性評価を客観的な評価を得るため外部試験機関にて実施した。

- 1) 有用性試験（抗シワ評価試験、ホームユーステスト）

抗シワ評価試験の結果、抗シワ改善効果が確認された。また、ホームユーステストでは 55 名を対象としたモニタリングを実施したところ、対照品と対比して 183% の高評価を得られた。



開発した化粧液のサンプル



ホームユーステストの結果

2) 安全性試験（パッチテスト、アレルギー試験、保存効力試験、保存安定性試験）

パッチテスト、アレルギー試験（累積刺激及び感作試験）を実施した結果、有害な皮膚反応を認めなかった。本試験において、開発品は皮膚アレルギー感作性を認めず、アレルギー症状を生じにくい製品と判定された。

保存効力試験の結果、保存期間中、良好な防腐・防カビ効力を示した。

表1. 接種採取時の菌数値

接種体	pH	菌数値 (個/g)	
		細菌	真菌
深蒸水配合美容液	4.8	<10 ¹	<10 ¹

表2. 接種菌数

接種菌	接種菌液の菌数値 (個/mL)	接種体中の菌数値 (個/g)
標準細菌混合菌	1.9×10 ⁶	1.9×10 ⁶
排水混合菌	3.6×10 ⁷	3.6×10 ⁶
真菌混合菌	2.5×10 ⁷	2.5×10 ⁶

表3. 接種後接種体の菌数経時変化

接種体	接種菌	菌数値 (個/g)		
		7日	14日	21日
深蒸水配合美容液	標準細菌混合菌	4.2×10 ²	<10 ¹	<10 ¹
	排水混合菌	4.4×10 ³	1.2×10 ²	<10 ¹
	真菌混合菌	1.4×10 ⁴	6.1×10 ³	4.6×10 ³

防腐・防カビ試験の結果

保存安定性試験（サイクル試験）の結果、良好な状態を維持し、開発化粧水の安定性が確認された。

②開発した医薬部外品の薬用化粧水について次の評価を実施した。

1) 有用性試験（抗シワ評価試験、美白評価試験、ホームユーステスト）

2) 安全性試験（パッチテスト、アレルギー試験、保存効力試験、保存安定性試験）

(結果)

開発した医薬部外品の薬用化粧水の有用性、安全性評価を客観的な評価を得るため外部試験機関にて実施した。

1) 有用性試験（抗シワ評価試験、美白評価試験、ホームユーステスト）

抗シワ評価試験、美白評価試験の結果、抗シワ改善効果、皮膚のメラニン量の減少が確認された。また、ホームユーステストでは 54 名を対象としたモニタリングを実施した。

以下に、ホームユーステストの内容と結果を示す。

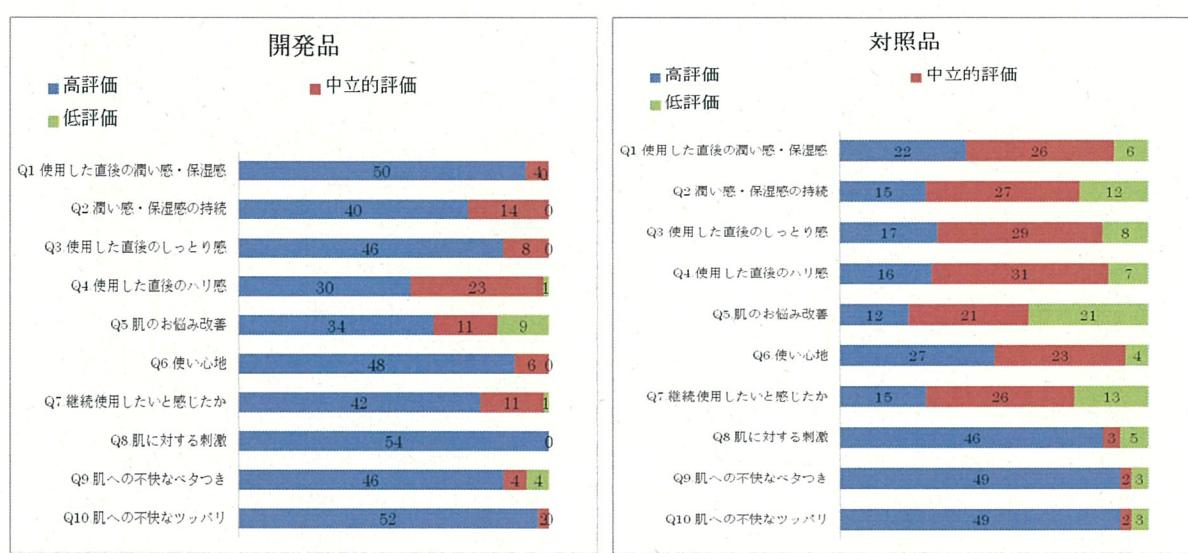
調査内容：本研究における開発品と対照品（エイジングケア表現の化粧水）の使用感

※ブラインドテスト クロスオーバー評価

対象者：1 都 3 県在住のお肌にお悩みのある女性 54 名（30~40 代：30 名、50 代以上：24 名）

使用期間：各 3 日

対象者 54 名による客観的使用感評価において、対照品との比較試験で各評価項目を〔高評価 +1、中立的評価 0、低評価 -1〕としてポイント化し総スコアで 23.0 % の高評価を得ることができた。



感想：

「改善あり」の回答

しっとりして潤う感じで化粧のりがよかったです。（69 歳）

潤いが感じられ乾燥が防げた（42 歳）

肌の乾燥が押さえられた（30 歳）

潤いがアップし、ハリが出た（49 歳）

乾燥がなくなり翌朝までしっとり感が残っていました。（45 歳）

肌に馴染みやすく乾燥をやわらげてくれた。（32 歳）

乾燥肌が、しっとりとした感じに保湿された。（47 歳）

ほうれい線が目立たなくなったりました。（46 歳）

保湿効果があり、以前は一日中乾燥していましたが改善されました。（35 歳）

乾燥を防げて、キメが整った感じ（59歳）

保湿の上に、肌がとても細かく柔らかい肌になりました。（54歳）

以上のとおり、項目評価ならびにモニターの感想においても高い評価を得られた。

2) 安全性試験（パッチテスト、アレルギー試験、保存効力試験、保存安定性試験）

パッチテスト、アレルギー試験（累積刺激及び感作試験）を実施した結果、有害な皮膚反応を認めなかった。本試験において、開発品は皮膚アレルギー感作性を認めず、アレルギー症状を生じにくい製品と判定された。

保存効力試験の結果、保存期間中、良好な防腐・防カビ効力を示した。

表1. 検体受取時の菌数値

検体	pH	菌数値（個/g）	
		細菌	真菌
薬用美白化粧水	6.0	<10 ¹	<10 ¹

表2. 接種菌数

接種菌	接種菌液の菌数値（個/mL）	検体中の菌数値（個/g）
標準細菌混合菌	1.3×10 ⁶	1.3×10 ⁶
排水混合菌	3.4×10 ⁷	3.4×10 ⁵
真菌混合菌	2.6×10 ⁷	2.6×10 ⁵

表3. 接種後検体の菌数経時変化

検体	接種菌	菌数値（個/g）		
		7日	14日	21日
薬用美白化粧水	標準細菌混合菌	3.4×10 ²	<10 ¹	<10 ¹
	排水混合菌	<10 ¹	<10 ¹	<10 ¹
	真菌混合菌	2.1×10 ²	<10 ¹	<10 ¹

防腐・防カビ試験の結果

③皮膚形成段階における海洋深層水由来成分による影響について、ヒト表皮モデル作成キットを用いて試験を行った。評価方法についてはヘマトキシリソジン染色（HE染色）で形態学的観察、さらに皮膚マーカーの抗体染色を行った。

（結果）

HE染色、抗体染色の結果より、定性的に海洋深層水の有用性をヒト表皮モデルでも確認できた。

①、②、③の検証結果により、高機能性化粧品における有用性、安全性のエビデンスを得ることができた。これらのエビデンスは販売するうえでも役立つものとなり、開発化粧水の上市の目途が立った。

最終章 全体総括

3-1 研究開発成果

【テーマ1：研究用細胞培養液】

本事業で開発した以下の研究用細胞培養液を用いて、iPS 細胞及び成熟細胞、腫瘍細胞に対する海洋深層水の培養効果を検証した。

- ・海洋深層水等張液と生理食塩水
- ・海洋深層水等張液+塩除去培地と市販培地

海洋深層水等張液は生理食塩水に比べて、各細胞は生存を維持し、アポトーシスを抑制する傾向がみられた。また、調整した海洋深層水等張液+塩除去培地は市販培地と比べて、iPS 細胞の接着性向上、コロニーサイズの増大が確認された。

これらの結果より、海洋深層水中に何らかの培養に関する生理活性物質の存在が示唆された。海洋深層水等張液中の生理活性物質の探索のため、高塩濃度下での低濃度アミン類の分析手法を開発した。本手法を用いて、各地域の海洋深層水をメタボロミクスに基づくスクリーニングにより、各地域で特徴のある成分の存在を見出した。

そこで海洋深層水中の生理活性物質の濃縮技術を開発した。以下の調整した濃縮液は各種細胞培養時に添加し、培養効果の検証を行った。

- ・Fmoc 濃縮液 (Fmoc 濃縮法)
- ・DSW ニガリ濃縮液 (脱塩加熱濃縮法)
- ・海の LPS 含有濃縮液、海の LPS 未含有濃縮液 (限外濾過膜を用いた濃縮法)

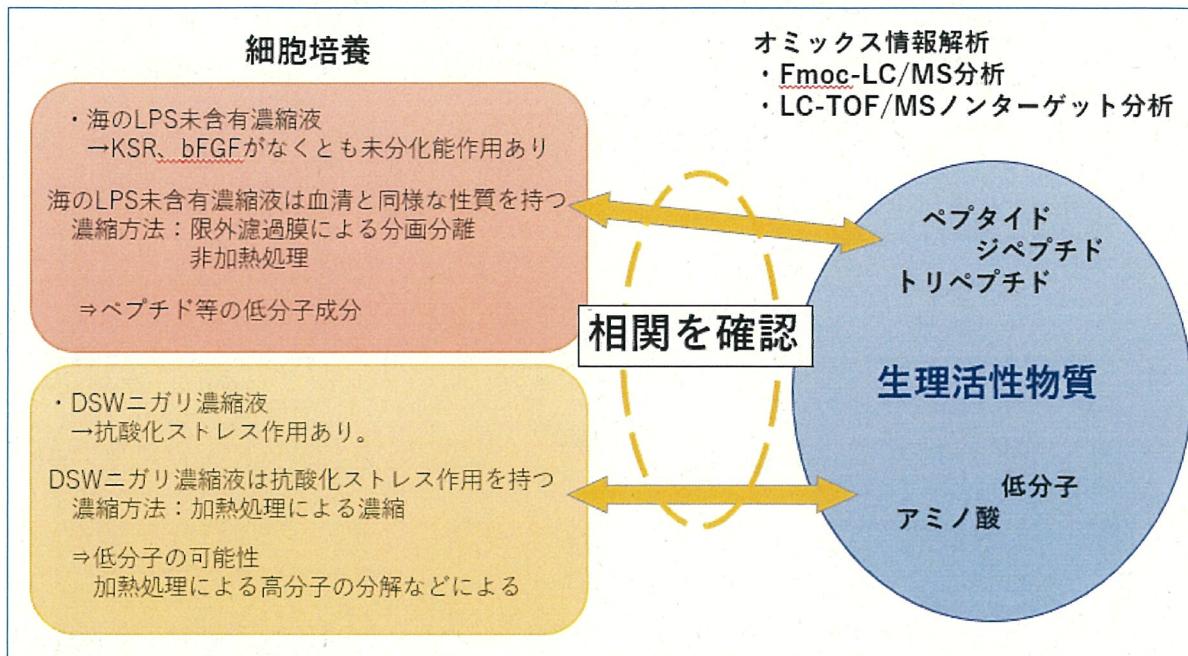
濃縮液を用いた検証において、iPS 細胞の培養に重要な要素である未分化維持、コロニーの均一性の保持に対して有効性を示した。これにより細胞の品質を保ち、かつ目的の細胞への分化をスムーズに行うことが期待できる。

成熟細胞、腫瘍細胞での検証においては、海洋深層水濃縮液を添加した場合、各細胞種が有意に増加した。また、海洋深層水濃縮液の添加量についての検討を行い、最適な添加量を見出した。さらに細胞に対する酸化ストレスの軽減効果を有することが示された。

また、各細胞培養で良好な結果が得られた海洋深層水濃縮液について、アミノ酸類の評価やノンターゲット分析を行った結果、天然保湿成分のアミノ酸の検出と海洋深層水の多角的解析が実施できた。

以上の細胞培養効果、成分分析の結果について相関関係をまとめると次のとおりである。

生理活性物質と細胞成育への作用機序の相関図



【テーマ2：高機能性化粧品】

細胞培養研究シーズをベースに化粧水の大半を占める水分を海洋深層水で調製し、高い安全性と天然由来コンセプトをあわせ持つ化粧品を開発した。

本開発化粧品のうち2品目を日本香粧品学会ガイドライン準拠の抗シワ機能評価試験を実施し、坑シワにおける有用性を確認した。あわせて、保存料以外の化粧品の機能成分を配合しないほぼ全量を海洋深層水由来成分のみとした化粧水を試作し、同様に坑シワ機能評価試験を実施し有効性を確認した。

特筆すべき点として、保湿機能成分を配合しない海洋深層水での坑シワ評価試験で有効な結果を得られたことは、海洋深層水自体が坑シワに対する有用性を裏付けるものである。

また、ホワイトニング効果に関するエビデンスとして、美白機能評価試験を実施し、美白に関する効果を確認した。外部モニターによる客観的使用感評価では、対照品との比較試験で各評価項目やモニターからの感想において高評価を得ることができた。あわせて、累積刺激試験、防腐・防カビ試験、安定性評価など、すべての項目で良好な結果を得られた。

本細胞培養研究で培った知見を活用した科学的、さらに有効性・安全性エビデンスに基づく国产の天然素材高機能性化粧品という目的通りの研究開発品が完成した。また、本開発品の1つは医薬部外品の薬用化粧水として承認を得ることができた。

3-2 研究開発後の課題・事業化展開

【テーマ1：研究用細胞培養液】

これまでの研究内容を踏まえ、研究目的はおおむね達成したと判断しているが、今後の事業応用を考え際には次のような補完研究が必要と考えている。

今回の研究開発事業を通じ、将来的には代替血清としての試薬・サプリメントとして、大学や医療研究機関等をターゲットとした展開である。具体的には、本事業で調製した海洋深層水の生理活性物質を濃縮した濃縮液は、培養の際の血清代替物や培養サプリメント製品の可能性を見出した。濃縮液の形態にすることで、市場流通へのハンドリング性向上、利用者の利便性や保存性向上が期待できる。また、プラスワンの使用形態であれば、ベースとなる培養液の切替えに比べ、試していただきやすく、多様性を持ち普及させやすいものになると考えられる。あわせて、基礎培地そのものに比べ集積度が高く、より付加価値が得られる。

今後、追加で安定性・再現性の研究をさらに進めていき、各研究機関で既にスタンダードされている培養方法に、プラスワンするだけで、アニマルフリーで且つ、未分化の機能・再現性の向上を図れるような製品に仕上げ、細胞培養市場における画期的なものとしたい。

【テーマ2：高機能化粧品】

化粧品市場としては、全体で2兆5000億円という大きな市場を持つ（富士経済 2017年）。このうち、エイジングケア：7,080億円（4.4%増）で高齢化社会の進行を背景に市場の拡大が続くとされ、ホワイトニング：2,712億円（2%増）でインバウンド需要で増加していると発表されている。

本事業で開発した薬用化粧品は、高齢化社会の進行を背景に市場の拡大が続くエイジングケアとして期待される坑シワに対する効果の実証を得るとともに、あわせて、インバウンド需要ならびに、アジア市場で望まれるホワイトニング（美白）効果の化商品の二大ニーズにおいて、良好な実証結果が得られた。

そして、効能効果を明示できる医薬部外品（薬用化粧水）の承認を得ることができたことから、大きな市場カテゴリーのターゲットユーザーに対して、付加価値性を明確に訴求ができる高機能化粧品に仕上がった。

今後の展開としては、自社ブランドのラインナップとあわせ、ODM 展開を図り早期の事業化を予定している。同時に、化粧品市場が拡大されている東南アジア市場では、ホワイトニング化粧品が望まれており、輸出向け展開を目指していく。

本事業で構築した機能化粧品の開発手法と、本年度技術開発した成分濃縮技術を用い、より付加価値性の高い美容液や、オールインワン製品、フェイスパック製品のアイテムを追加し、機能化粧品事業として拡大を図っていく。

(4) 成果（試作品）の無償譲渡や無償貸与特になし。

6. 補助事業の成果に係る知的財産権等について

(1) 知的財産権の出願及び取得並びに論文掲載の有無

●知的財産権の出願及び取得：進行中

※特許取得、学会発表、又は報文化に向けてのルールを作成した、

本研究開発事業に係る知的財産の取り扱いについて

➤ 「知的財産に関わるガイドライン」を作成

《目的》

本事業の成果に基づく知財（特許）について、共同研究機関内において独占排他的に実施するのではなく、実績を記録として残す手段や、次のグラント事業に繋げる手段したい。一方、論文化や研究発表などの成果公表も必要である。

しかし、特許出願前に公表となると、基本的に特許化できないため、特許出願と成果公表の両立を図るために本ガイドラインを定める。

《公表までの手順（要約）》

①公表に関わる研究機関の代表研究者は、「研究成果に係る公表申請書」に記入し、取りまとめ機関（五洲薬品）に提出。

②取りまとめ機関は、公表の60日前までに、本事業に係る研究機関・事業管理機関へ周知する。

③本事業に係る研究機関・事業管理機関から異議が無ければ、取りまとめ機関から代表研究者へ公表可の連絡を行う。意義があった場合、取りまとめ機関が調整を行う。

➤ 「知的財産に関わるガイドライン」のつづき

【特許出願について（要約）】

公表内容が「発明等」に係る場合、関係する研究機関は、属する研究機関の「発明規則に類する文書」「特許共同出願契約書に類する書類」に基づき、各自手続きを行った後、出願する。

【公表について】

特許出願後に「研究成果に係る公表申請書」で申請した内容を公表する。特許出願に時間がない場合、特許出願を公表の後に行うことが出来る。ただし、特許出願は、公表後、速やか（6ヶ月以内）に行う。

【用語】

公表：学士・修士・博士等の学位発表およびそれに付随する論文、学会発表、論文、メディア発表。機関内での業務等報告会（第3者が同席する場合、守秘契約が必要）は除外。

➤ 「特許出願候補テーマ」

①海洋深層水中の微量成分を疎水化による分析手法の確立

②海洋深層水中の微量成分を限外濾過膜による濃縮

③海洋深層水中の微量成分を利用した細胞培養

（☆iPS細胞、☆腫瘍細胞や皮膚細胞、☆人工皮膚細胞）

●学会発表：有

日本薬学会において立命館大学が発表（2018年3月27日、金沢）

(2) ライセンス契約等による事業展開

特になし。