

# サンスクリーン剤の紫外線防御能を普く正確に *in vitro* 評価する測定方法の確立

慶應義塾大学理工学部

朝倉 浩一

Concerns have increased for the establishment of reliable and reproducible *in vitro* evaluation method of UV protection efficacies of sunscreens, since it gives results more quickly, is less expensive and is more ethical. In this study, attempts were made to establish accurate and universal *in vitro* evaluation method of UV protection efficacies of sunscreens. Two subjects, hydrophilicity of the substrate surface on which sunscreens are applied and surface roughness of the cosmetic standard PMMA UV evaluation plates, were studied to analyze their influence on the value of *in vitro* UV protection efficacies.

Corona-discharge treatment was conducted on the quartz plate, and it was succeeded to make the surface super-hydrophilic to have a contact angle of water at 0 degree. The contact angle exponentially recovered to the initial value and its half life was around 5 d. Four types of commercially available sunscreens, water gel type, mist spray type, silicone/water type, and non organic UV absorber type, were applied onto the quartz plate exhibiting different hydrophilicity. It was found that the wettability of each sample differed and the values of *in vitro* UV protection efficacies drastically changed by changing the hydrophilicity of the surface.

Surface structures were analyzed for three cosmetic standard PMMA UV evaluation plates: Helioplates HD 6 (Sa=6 $\mu$ m) and ISO plates (Ra=2 and 5 $\mu$ m). Solution of acrylsilicone resin was added dropwise onto the plates and the solvent was evaporated. The plates were cut and the cross section was analyzed using SEM-EDS. The maximum depth of penetrating of acrylsilicone resin was larger than Ra and cracks into which the acrylsilicone resin penetrated were observed. Clear solution type pseudo-sunscreen samples containing acrylsilicone resin were deposited on the plates. It was found that the addition of acrylsilicone resin drastically changed the UV transmission.

## 1. 緒言

サンスクリーン剤のSPFおよびUVA-PFを*in vitro*測定する方法<sup>1,2)</sup>、すなわち規定量のサンスクリーン剤を基板上に塗布し、その塗布層の紫外線吸光度を測定して紫外線防御効果の評価する方法の開発が、測定コストの低減および倫理的観点から世界的に期待されている。ところが、これまでに*in vitro*測定法の再現性および信頼性に対し多くの問題点が指摘されてきた<sup>3)</sup>。

そのような中、本著者らは、サンスクリーン剤の塗布の際にヴィスコスフィンギングと呼ばれる現象により空間周期パターンが塗布層に自発的に発生<sup>4,5)</sup>し、この形状により紫外線吸光度が変動することを示してきた<sup>6)</sup>。また、米国で近年導入されたBroad Spectrumの認定をするための臨界波長の測定<sup>7)</sup>に対しても影響を及ぼすことを見いだした<sup>8)</sup>。さらに、空間周期パターンの自発的発生が起らないサンスクリーン剤の塗工法を見だし、正確な*in vitro*測定法の開発に成功してきた<sup>9)</sup>。

ただし、これまでの研究では、純粋に紫外線吸収剤分子による紫外線吸収しか存在しない理想的な溶液化した擬似

サンスクリーン剤を用い、塗布層に形成された空間周期パターンが*in vitro*測定値に与える影響を検討してきたものであった。ところが、市販のサンスクリーン剤はエマルション系や無機粒子混合系など多相系である場合が多く、相間界面での屈折や反射あるいは無機粒子表面での散乱など、紫外線透過に影響を与える因子が複数となる。また、紫外線吸収剤分子は複数の相に分配平衡値に依存した濃度で分布し、この濃度分布は紫外線透過光強度の局所的な変動をもたらす。さらに、基板との親和性の問題から、塗布層の形成が困難なサンスクリーン剤も存在する。そこで、本研究では、様々な性状のサンスクリーン剤について、その紫外線防御能を普く正確に*in vitro*評価する方法の開発を目指した。また、すでにISO法となったUVA-PFの*in vitro*測定法<sup>2)</sup>ならびにBroad Spectrumの認定をするための臨界波長の測定法<sup>3)</sup>では、粗い表面構造を持つPMMAプレートに試料を塗布して紫外線透過光強度を測定する。そこで、この表面粗さが測定値に与える影響についても検討した。

## 2. 方法

### 2.1. 石英基板の親水性化ならびにその基板表面に形成されたサンスクリーン剤塗布層の紫外線遮蔽能の測定

石英基板にコロナ放電処理を施すことで、基板表面の超親水性化を試みた。また、その後その基板を放置して水の接触角の経時変化を測定した。つづいて、4種の市販のサンスクリーン剤(a: Water gel type, b: Mist spray type, c:



Establishment of accurate and universal *in vitro* evaluation method of UV protection efficacies of sunscreens

Kouichi Asakura

Department of Applied Chemistry,  
Faculty of Science and Technology,  
Keio University

Silicone/water type、d : Non organic UV absorber type) を表面の親水性が異なった石英基板に塗布し、その塗布層の構造を観察するとともに、SPFアナライザーを用いてその紫外線透過光強度を測定した。

## 2. 2. *in vitro* 紫外線遮蔽能測定用標準 PMMA 基板の表面粗さの評価

一辺の長さ 5cm の正方形の Helioplates HD6 ( $S_a=6\mu\text{m}$ ) (HD6) ならびに ISO plates ( $R_a=2$  および  $5\mu\text{m}$ ) (ISO2 および ISO5) の 3 種の *in vitro* 紫外線遮蔽能測定用標準 PMMA 基板について、その断面の SEM 観察を行った。つづいて、この表面にアクリルシリコーン樹脂の溶液を滴下し、溶媒蒸発終了後にその断面を走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察するとともに、SEM/エネルギー分散形 X 線分析装置 (EDS) 元素マッピング法を用いて Si 元素の PMMA 基板表面から深さ方向への分布を測定した。

## 2. 3. 標準 PMMA 基板の表面粗さの *in vitro* 紫外線遮蔽能測定に与える影響の評価

数種類の異なった濃度のアクリルシリコーン樹脂の溶液に同一量の紫外線吸収剤を溶解させ、これらを擬似サンスクリーン試料とした。これら試料を *in vitro* 紫外線遮蔽能測定用標準 PMMA 基板 ISO5 上に滴下し、溶媒蒸発終了後、その表面の粗い構造が試料で埋まる様子を観察するとともに、SPFアナライザーを用いてその紫外線透過光強度を測定した。また、同一量の紫外線吸収剤を含む擬似サンスクリーン試料が、標準 PMMA 基板の粗い表面を樹脂量

の差により異なった体積で埋めることで、紫外線透過光強度がどのように変動するかを検討する数値シミュレーションを試みた。

## 3. 結果と考察

### 3. 1. 石英基板の親水性化ならびにその表面に形成されたサンスクリーン剤塗布層の紫外線遮蔽能に対する影響

コロナ放電処理を石英板表面に施すとその表面上に置かれた水の接触角が  $0^\circ$  となり、表面が超親水性化されることが認められた (Fig. 1)。その後この基板を放置することで徐々に接触角は元の値へと戻り、初期値との差の半減期は約 5 日であった。したがって、表面の親水性の調整は比較的簡単であった。また、プラズマ処理によっても同様に石英板表面は超親水性化された。

このようにして作製した親水性の異なった石英板表面上に 4 種の市販のエマルジョン型サンスクリーン剤を塗布し、紫外線吸光度の測定を行った。その結果、いずれの試料の紫外線吸光度も表面の親水性に大きく影響を受け、種類によりその傾向が異なることが認められた (Fig. 2)。特に Water gel type および Mist spray type の試料は、基板がある程度以上の親水性とならないと、その紫外線吸光度が顕著に低下した。それぞれの塗布層の表面を観察したところ、これら 2 種の試料については、基板の親水性が低い場合、試料層にデイクエッティングが起り、試料で覆われておらず紫外線が全く遮蔽されない領域が出現することが認められた。

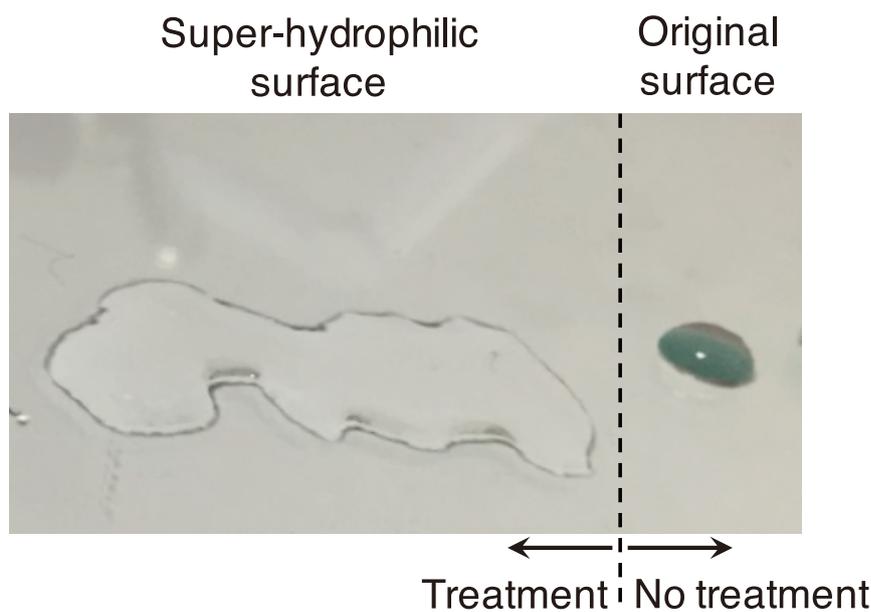


Fig. 1 Difference of the wettability by water on the original quartz surface and the super-hydrophilic quartz surface prepared by corona-discharge treatment.

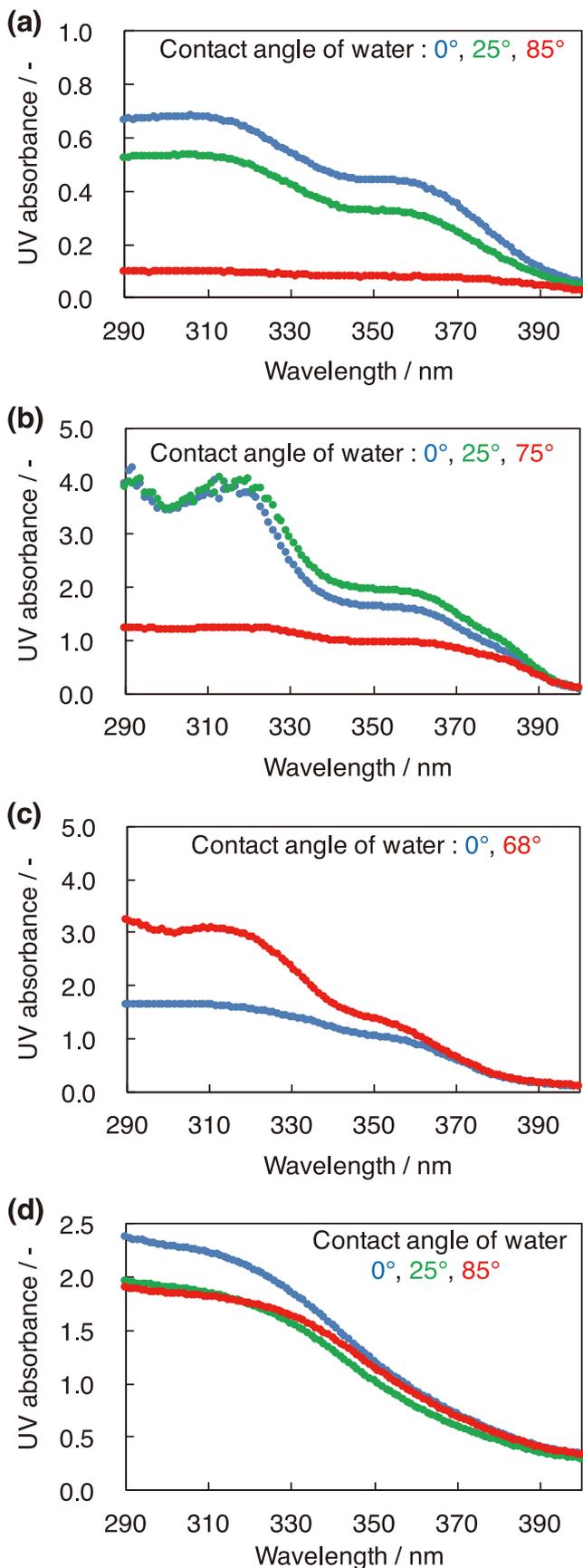


Fig. 2 UV absorbance of applied sample sunscreen layers on the quartz plate having different contact angle of water. (a) : Water gel type, (b) : Mist spray type, (c) : Silicone/water type, (d) : Non organic UV absorber type.

### 3. 2. *in vitro* 紫外線遮蔽能測定用標準 PMMA 基板の表面粗さの評価ならびにその紫外線遮蔽能測定に与える影響

3種の標準PMMA基板であるHD6ならびにISO2およびISO5について、SEM観察ではそれら表面構造の顕著な違いは認められなかったが、SEM/EDS元素マッピング法によるSi元素の基板表面から深さ方向への分布は、各基板毎に異なる様子が観察された。Fig. 3の黄色い部分はそこにSi元素が存在していることを意味しており、ISO2およびISO5は比較的単純な表面粗さを有しているのに対し、HD6は孤立してSi元素が存在している領域があり、このことは基板に亀裂がありそこへアクリルシリコーン樹脂の溶液が侵入したことを示している。そして、アクリルシリコーン樹脂の溶液を滴下し溶媒を蒸発させたHD6の断面について、表面から深さ方向の何点かにおいて、Si元素の存在量のSi、C、Oの全元素存在量に対する比を測定したところ、その値は表面から漸的に減少するのではなく、局所的にその比が高い領域が存在することが認められた(Fig. 4)。このことから、HD6の表面付近には、アクリルシリコーン樹脂の溶液が侵入し易いような亀裂が存在していることが確認された。

つづいて、数種類の異なった濃度のアクリルシリコーン樹脂の溶液に同一量の紫外線吸収剤を溶解させた擬似サンスクリーン試料を作製し、標準基板ISO5上に滴下して溶媒を蒸発させたところ、当然の結果ではあるが、試料中の樹脂量の増加に伴い標準基板表面粗さの凹部がより多く埋められていく様子が確認された(Fig. 5)。そして、これらの紫外線透過光強度を石英板を参照として測定した結果、試料に添加した紫外線吸収剤では紫外線吸収が起こらない波長においても透過光強度が減衰することが認められ、その傾向は樹脂を添加しなかった試料において極めて顕著であることが認められた(Fig. 6(a))。したがって、この透過光強度の減衰は標準基板の粗い表面における乱反射によるものであり、その度合いは試料中の樹脂量の増加に伴って低下したと判断された。そこで、試料と同量のアクリルシリコーン樹脂のみを溶解させた試料を滴下して溶媒を蒸発させた標準基板を参照として、再び紫外線透過光強度を測定した結果、これら試料の紫外線吸収度が測定されたとと言える結果が得られた(Fig. 6(b))。

そして、ここで試料1~5はいずれも同量の紫外線吸収剤が含まれているにもかかわらず、紫外線吸収度は大きく異なり、アクリルシリコーン樹脂量の減少に伴い大きく低下する傾向が見られた(Fig. 6(b))。試料中のアクリルシリコーン樹脂量が少なくなると、試料はより標準基板の表面粗さの底部に集中する傾向が観察され(Fig. 5)、したがって紫外線吸収剤がより局所的に偏在するようになると言える。これまでに本著者らは、サンスクリーン剤の塗布の際

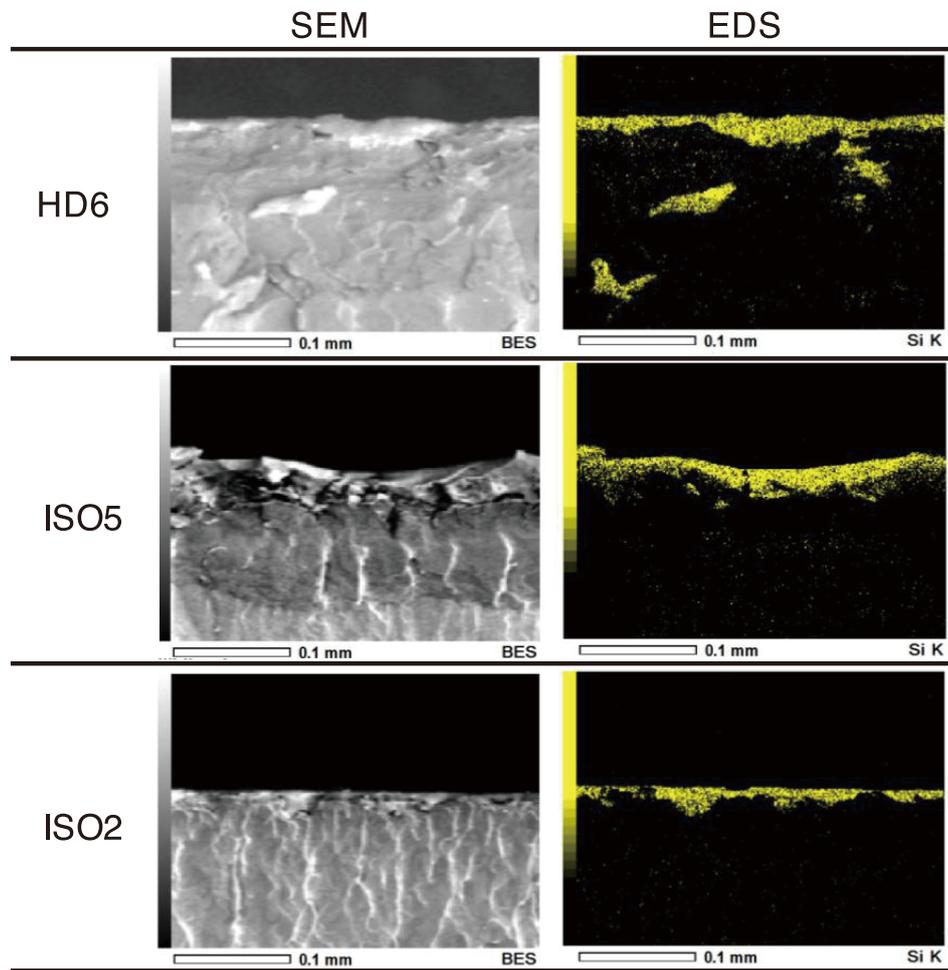


Fig. 3 SEM-EDS mapping images of the cross section of **HD6**, **ISO2**, and **ISO5** on which acrylsilicone resin was deposited. Yellow color represents the existence of Si atom. Amount of acrylsilicone resin per unit area was  $2.0 \text{ mg cm}^{-2}$ .

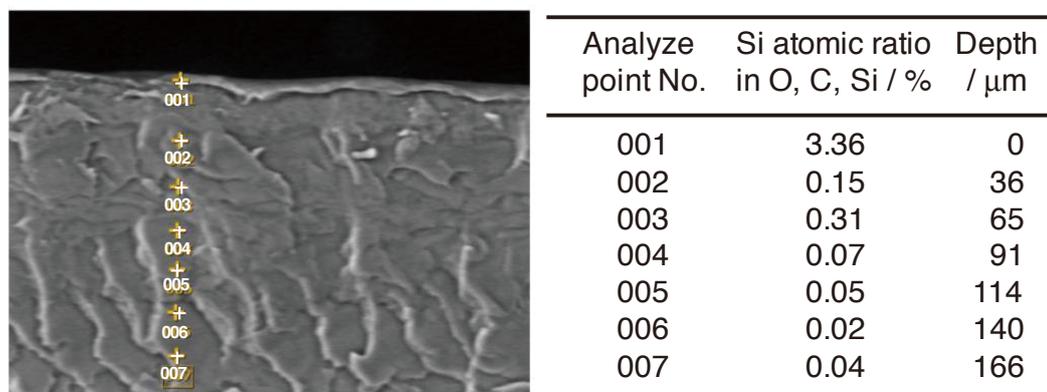


Fig. 4 SEM image of the cross section of **HD6** on which the acrylsilicone resin was deposited ( $1.3 \text{ mg cm}^{-2}$ ), and the Si atom ratio at different depth from the surface of **HD6** determined by the point analysis.

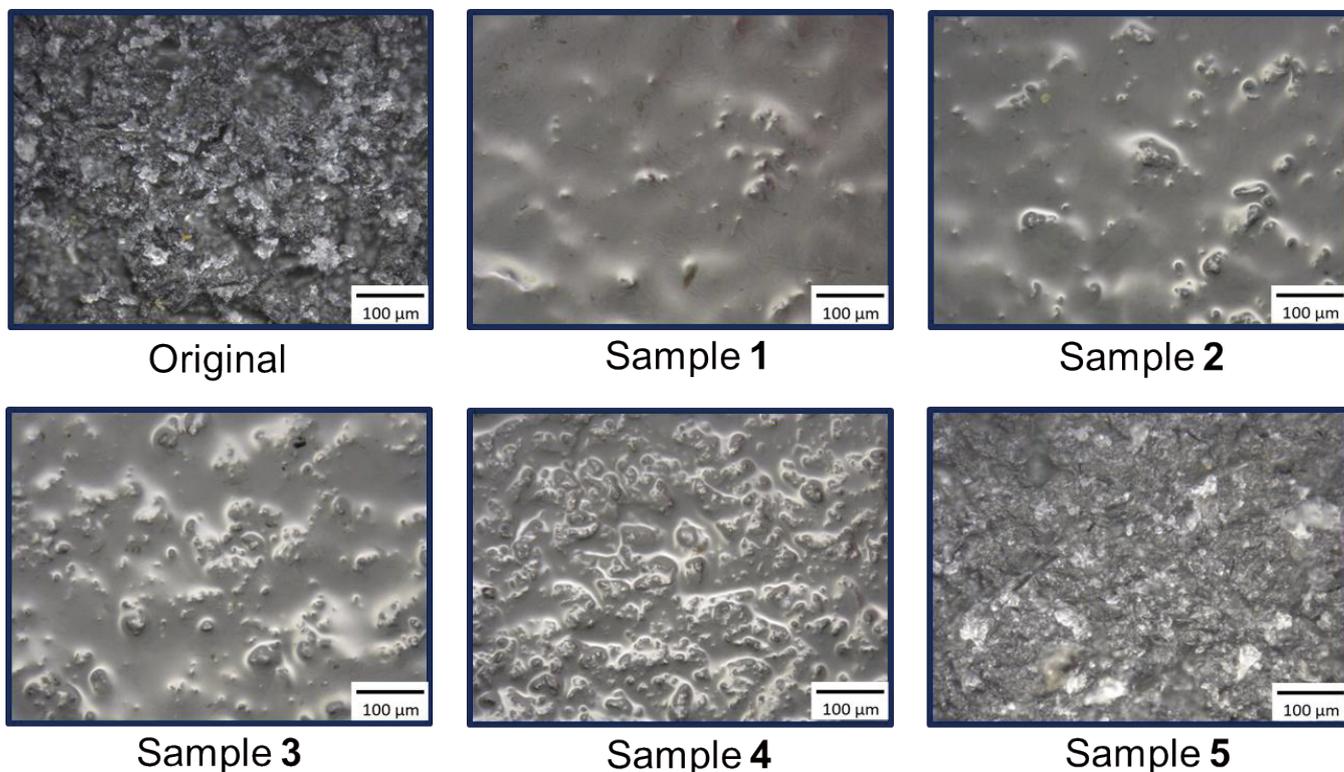


Fig. 5 Digital microscope image of the surface of **ISO5** on which pseudo-sunscreen sample was deposited. All the pseudo-sunscreen samples consisted of 1.0 mg of the same UV absorbers and 0.80 mL of hexane, while the content of acrylsilicone resin in the sample **1**, **2**, **3**, **4**, and **5** was 40, 30, 21, 11, and 0 mg, respectively.

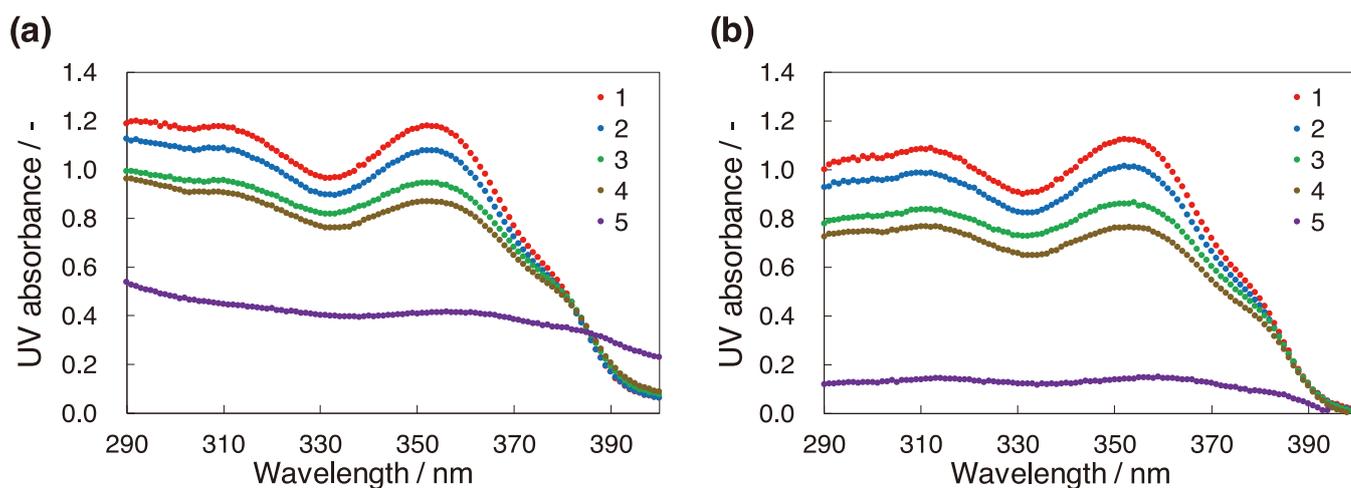


Fig. 6 Values evaluated as UV absorbance of the cosmetic standard PMMA UV evaluation plates on which pseudo-sunscreen sample was deposited. (a) : Using a flat quartz plate as a reference. (b) : Using the plates on which the identical amount of resin was deposited.

のヴィスコスフィンガリング現象により空間周期パターンが塗布層に発生すると、それに伴い紫外線吸収剤の存在量に空間的な分布が発生し、その分布の度合いが大きくなるほど紫外線吸光度が低下することを実験的に確認し、また理論的にも証明してきた<sup>6, 8)</sup>。本研究で見出された、紫外線吸収剤が同量の試料が粗い表面を持つ標準基板に塗布された際、その体積が小さくなることで紫外線吸光度が低下する現象は、この以前の研究結果と合致する。なお、本研究においても、試料体積と紫外線吸光度の関係は、理論的なシミュレーションによりほぼ再現できることが確認できている<sup>10)</sup>。

#### 4. 総括

本研究によって、実際の市販のサンスクリーン剤の紫外線遮蔽能を *in vitro* 評価するには、適切な親水性度の基板を使用する必要があることが明らかとなった。また、現在認定されている *in vitro* 性能評価用の標準PMMA基板の表面粗さについては、例えば紫外線吸収剤含有量の同じ試料であってもその体積が変動しただけで大きく測定値が変動することが確認されたため、その妥当性については検討が必要であると思われる。なお、以上の研究成果を、The Asian Conference on Oleo Science, Tokyo (Sep. 2017)、IFSCC 2017 Conference, Seoul (Oct. 2017)、IFSCC 2018 Congress, Munich (Sep. 2018)にて学会発表した。また、この間に執筆した2報の公刊論文が学術誌に掲載された<sup>11, 12)</sup>。さらに、本課題が採択される直前に出願した特許<sup>13)</sup> について、本研究の成果に基づいて優先権PCT出願し、この国際出願特許<sup>14)</sup> を日本、米国、フランス、イタリアへ各国移行申請した。今後は、本研究で得られた成果に基づいて、コスメトロジー技術に関わる諸機関との連携を強め、最終的には、サンスクリーン剤を普く正確に *in vitro* 性能評価する日本発の世界標準法の確立に繋げたい。

#### (引用文献)

- 1) COLIPA Guideline, *In vitro* method for the determination of the UVA protection factor and “critical wavelength” values of sunscreen products, 2011.
- 2) International Standards Organization, ISO 24443 Cosmetics –Sun protection test methods– Determination of sunscreen UVA photoprotection *in vitro*, 2012.
- 3) M. Rohr, E. Klette, S. Ruppert, R. Bimczok, B. Klebon, U. Heinrich, H. Tronnier, W. Johncock, S. Peters, F. Pflucker, T. Rudolph, H. Flosser-Muller, K. Jenni, D. Kockott, J. Lademann, B. Herzog, S. Bielfeldt, C. Mendrok-Edinger, C. Hanay, L. Zastrow, *Skin Pharmacol. Physiol.* **23**, 201-212 (2010).
- 4) A. Kuroda, T. Ishihara, H. Takeshige, K. Asakura, *J. Phys. Chem. B* **112**, 1163-1169 (2008).
- 5) 朝倉浩一, 黒田章裕, 武重日香里, 石原司, 特許第5283819号.
- 6) K. Fujikake, S. Tago, R. Plasson, R. Nakazawa, K. Okano, D. Maezawa T. Mukawa, A. Kuroda, K. Asakura, *Skin Pharmacol. Physiol.* **27**, 254-262 (2014).
- 7) U. S. Food Drug Administration and (FDA), Sunscreen drug products for over-the-counter human uses; Final rules and proposed rules. *Federal Register* **76**, 35623-35665 (2011).
- 8) M. Wakabayashi, K. Okano, T. Mukawa, D. Maezawa, A. Kuroda, K. Asakura, *Photochem. Photobiol.* **92**, 637-643 (2016).
- 9) 朝倉浩一, 黒田章裕, 特許第5825654号.
- 10) K. Sakai, T. Banno, N. Sato, N. Nakamura, D. Maezawa, S. Yahagi, H. Masaki, A. Kuroda, K. Asakura, Proceeding of IFSCC 2018 Congress, #P-S2-302.
- 11) K. Asakura, A. Kuroda, *IFSCC Magazine* **21**, 53-57 (2018).
- 12) A. Kuroda, K. Sakai, S. Yahagi, T. Mukawa, N. Sato, N. Nakamura, D. Maezawa, H. Masaki, T. Banno, K. Asakura, *J. Oleo Sci.* **68**, 175-182 (2019).
- 13) 朝倉浩一, 黒田章裕, 特願2016-174084.
- 14) 朝倉浩一, 黒田章裕, PCT/JP2017/3162.