

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6591963号  
(P6591963)

(45) 発行日 令和1年10月16日(2019.10.16)

(24) 登録日 令和1年9月27日(2019.9.27)

(51) Int.Cl.		F I	
<b>A 6 1 K</b>	<b>8/99</b>	<b>(2017.01)</b>	A 6 1 K 8/99
<b>A 6 1 K</b>	<b>35/747</b>	<b>(2015.01)</b>	A 6 1 K 35/747
<b>A 6 1 P</b>	<b>17/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 17/00
<b>A 6 1 P</b>	<b>37/08</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 37/08
<b>A 6 1 P</b>	<b>29/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 29/00

請求項の数 10 (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-508215 (P2016-508215)	(73) 特許権者	514254238 グリーンテック
(86) (22) 出願日	平成26年4月15日 (2014.4.15)		フランス国 エフー63360 サン ボ ージール バイオポール クレモンーリモ ーニュ
(65) 公表番号	特表2016-523819 (P2016-523819A)	(74) 代理人	110001427 特許業務法人前田特許事務所
(43) 公表日	平成28年8月12日 (2016.8.12)	(72) 発明者	ローラン リオス フランス国 オザ ラ コンベル, シュマ ン デュ ロック ヴィドー 7, ル テ ロン
(86) 国際出願番号	PCT/FR2014/050914	(72) 発明者	ダヴィッド トロベル フランス国 ヴィック ル コント, リュ ドゥ クローニュ 67
(87) 国際公開番号	W02014/170595		
(87) 国際公開日	平成26年10月23日 (2014.10.23)		
審査請求日	平成29年4月14日 (2017.4.14)		
(31) 優先権主張番号	13/53395		
(32) 優先日	平成25年4月15日 (2013.4.15)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	フランス (FR)		
微生物の受託番号	CNCM CNCM 1-4730		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ラクトバチルス・ペントーサスの化粧品及び薬品への適用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

有効成分としてラクトバチルス・ペントーサスの培養物から得られた培養上清と細胞溶解液との混合物を含む化粧用または皮膚用の外用組成物であって、

前記培養上清は、微生物成長の定常期にある前記培養物から微生物菌体と分離されて直接得られたものであり、

前記細胞溶解液は、前記微生物菌体が溶菌され、該微生物菌体の細胞内構成成分、並びに細胞膜及び細胞壁の構成成分を含むものであり、

前記混合物中の前記細胞溶解液に対する前記培養上清の重量割合は1～50であることを特徴とする外用組成物。

【請求項 2】

請求項 1 において、

前記混合物中の前記細胞溶解液に対する前記培養上清の重量割合は5～15であることを特徴とする外用組成物。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 において、

前記有効成分の濃度は組成物の総重量に対して0.1～10%であることを特徴とする外用組成物。

【請求項 4】

請求項 1～3のうちいずれか1項において、

前記培養上清及び前記細胞溶解液は同じラクトバチルス・ペントーサスの培養物から得られたものである外用組成物。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のうちいずれか 1 項において、  
経皮水分喪失量 ( T E W L ) を減少させるために使用する外用組成物。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 4 のうちいずれか 1 項において、  
角質層のバリア機能を強化するために使用する外用組成物。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 4 のうちいずれか 1 項において、  
顔の皮膚の輝きを強化するために使用する外用組成物。

10

【請求項 8】

請求項 1 ~ 4 のうちいずれか 1 項において、  
皮膚の刺激状態または炎症状態の処置に使用するための皮膚用の外用組成物。

【請求項 9】

請求項 8 において、  
乾癬の処置に使用するための皮膚用の外用組成物。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のうちいずれか 1 項において、  
前記ラクトバチルス・ペントーサスの培養物がブタペスト条約に従って 2013 年 4 月 4 日に COLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES ( C N C M ) に提出したラクトバチルス・ペントーサス C N C M I - 4730 株の培養物である外用組成物。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ラクトバチルス・ペントーサス (Lactobacillus pentosus) 微生物の化粧品及び薬品への利用に関する。

【背景技術】

【0002】

皮膚は絶え間なく再生されている器官であり、体表を覆い、体を外的環境から分離している。皮膚は、化学的及び機械的な攻撃、温度、感染、湿気及び放射線といった外部の力からの防御を形成している。皮膚は、皮膚表面を覆う表皮と、真皮との 2 つの区分に分けられる。

30

【0003】

皮膚の全体構成は体の防御に積極的に参加しているのにも関わらず、表皮は水分及び他の構成成分の外部環境への喪失と、外部からの種々の攻撃とを防ぐために必須の役割を担っている。皮膚の主要な機能はそれ故、それらに対する物理的、化学的、生化学的及び免疫学的バリアを樹立することにより外的脅威から体を保護すると同時に、体内及び体外の間でいくつかの交換能力を維持することにある。

【0004】

表皮は真皮の直上にある基底層から顆粒層及び有棘層を通過して上層である角質層までの多層に細分化された上皮である。角質層は細胞膜も核も無い死んだ細胞で構成され、角質化膜 (又は角膜) と呼ばれる構造になっている。角質化膜は高い抵抗力を有し、構造タンパク質と脂質とで構成されている。このように、角質層は物理的なバリアの主役を担う表皮の層である。

40

【0005】

実際に、角質層は乾燥を防ぐ防水バリアを構成する。その防水機能と通常の剥離とを確保し、柔軟性を維持するために、角質層は適度に水分を含んでいなければならない。このため、表皮は自身で天然保湿因子 ( N M F ) を産生する。

【0006】

50

NMFは尿素、アミノ酸、乳酸、糖類、鉱物イオン等の多くの小分子から成っている。これらのいくつかは、水分を固定するための能力を説明する吸湿性を有している。コレステロールとして剛直且つ脆弱な膜システムに流動性及び柔軟性を付与する小分子もある。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Y. Kotani et al.: Oral intake of *Lactobacillus pentosus* strain b 240 accelerates salivary immunoglobulin A secretion in the elderly: A randomized, placebo-controlled, double-blind trial, *Immunity & Ageing* 2010, 7:11, 1-11.

【非特許文献2】SH Koizumi et al. : Essential role of Toll-like receptors for dendritic cell and NK1.1+ cell-dependent activation of type 1 immunity by *Lactobacillus pentosus* strain S-PT84, *Immunology Letters* 2008, 120, 14-19.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

NMFは角質層の乾燥重量の20～30%までを代表し、角質層が水分を取り込んだ状態を維持するのを助けている。NMFの減少によって年齢とともに、皮膚の乾燥は進む。これと同様に、NMFの成分のレベルは石鹸で皮膚を洗った後に減少する。NMFの減少は皮膚の乾燥及びバリア機能の障害につながる。皮膚の保護が小さくなると、刺激性の薬品による損傷に対してより敏感になる。NMFはこのように、表皮の恒常性の制御に必須の構成要素と考えられており、補強される必要がある。

【0009】

本発明の目的は、皮膚のバリア機能の保護し、外部からの攻撃の後でバリア機能を修復するための生物学的溶液を提供することにある。

【0010】

このように、本発明は化粧用または皮膚用の外用組成物であって、NMFを養い、保持させられる有効成分に関する。この有効成分はラクトバチルス・ペントーサスの培養液から得られる。本明細書ではラクトバチルス・ペントーサスを*L. pentosus*と略記する。

【0011】

*L. pentosus*はスパニッシュ・グリーンオリーブと呼ばれる未熟なオリーブの発酵液中に一般的に存在する乳酸菌の一種である。この善玉菌(probiotic)種はまた消化管にも存在し、免疫機構のいくつかを活性化させる能力を持つことが知られている。例えば、年配の患者において唾液中での免疫グロブリンAの分泌を促進することが報告されている(Y. Kotaniら2011)。また、*L. pentosus*がタイプ1の免疫の刺激剤として、いくつかの感染症及びアレルギーと戦う役割を与えることも報告されている(SH Koizumiら2008)。

【0012】

本発明の創作者らは*L. pentosus*の抽出液の皮膚への応用が有用な性質を持っており、そのいくつかは全く予期しないものであることを見いだした。これらは、皮膚のバリア機能の良い指標である、経皮水分喪失量(TEWL)のパラメータの決定を通じた初めての観察である。TEWLは、化学薬品、機械的攻撃または湿疹のような病理学上の状態によって起こる皮膚の損傷を見積もるのに一般的に用いられる。このパラメータは例の中で示される試験で測定され、粘着テープを用いてバリアを機械的に崩壊させた皮膚における、培養抽出物の現実のバリア機能増進機能を明らかにする。

【0013】

研究を継続することにより、著者らは、所望の性質を持たせるため、前記培養抽出物は上清及び培養した菌の溶解液を集めなければならないということに興味を持った。本発明の目的は、それ故、有効成分として*L. pentosus*の培養上清及び細胞溶解液の混合物を備えた化粧用または皮膚科用の外用組成物を提供することにある。

【0014】

著者らは、この混合物がタンパク質、ペプチド、多糖類、短鎖アミノ酸、短鎖有機酸、

10

20

30

40

50

微生物細胞を形成するより一般的な全ての組成物、及びL. pentosusの代謝物を蓄積しており、混合物中では角質層のバリア機能の増進し、またはNMFを与えることによって変化した場合の回復を加速することを見いだした。

【0015】

本発明の有効成分は異なった方法を通して得られうる。

【0016】

上清及び細胞溶解液は同じ培養液から得てもよく、この変形例によれば、それらは培養液から直接得てもよい。それ故、有効成分は上清の全部または一部及び細胞溶解液の全部または一部を混合することにより得られる。このように、有効成分は、前記培養液及び抽出物が溶解工程を受けた後の培養抽出物全体の形で現れる。しかし、溶解液に対する上清の重量割合は1より大きいことが好ましい。この溶解条件は培養液中の細胞の少なくとも一部の細胞構成成分の不活性化及び放出をもたらさなければならない。そのため、溶解は部分的であってもよいし、全体的であってもよい。これらの条件は当業者の一般的な知識にあるもので、しかし、培地の細胞全ての溶解を起こすことが有利である。別の変形例によれば、上清及び細胞溶解液は培養液から分離されていてもよく、それから、本発明の有効成分を得るためにそれらを合わせてもよい。上清か細胞溶解液のいずれか又は両方を処理することにより、所望の性質の品質を向上させるための最適化操作が含まれる。

【0017】

L. pentosusの生育に適した培地は一般的に糖類だけでなく、酵母抽出物、ペプトン、塩、無機及び有機のリン酸塩源、窒素及びカリウム等を含み、これらの培地は市販されている。この微生物の生育条件(pH、温度、エアレーション、攪拌、酸化還元電位、持続時間)は当業者によく知られた概念である。本発明によれば、L. pentosusの生育を促進するために、そのような培地は当業者によって開発されてもよく、市販の培地またはこれを改変したものをを用いてもよく、濃度及び/または前述の成分の性質を改変した培地が最もよく用いられる。

【0018】

著者らは、彼らの研究の範囲内で本発明の有効成分が顔色に輝きを与えるという付加的な利点を有することに気付いた。

【0019】

顔色の輝きは多くの要素により生じる。顔色は、肌の表面のきめの特質(例えば滑らかまたは粗い)、つや、微少循環及び色の組み合わせによっている。顔色の評価は一般的に専門家による観察により評価される。

【0020】

本発明の有効成分はまた、リポオキシゲナーゼ型の酵素を阻害する能力から生じる抗炎症活性を有している。リポオキシゲナーゼ(LOXs)は非ヘム鉄を有するジオキシゲナーゼファミリーの1つであり、多くの炎症やアレルギー疾患の病態生理において重要な役割を演じていると推定されるロイコトリエンの生合成に関わる重要な酵素である。LOXs(ヒドロペルオキシ/ヒドロキシエイコサテトラエン酸、ロイコトリエン及びリポキシリン)による触媒された酸素化から生まれた生成物は、明らかに乾癬の進展と、より一般的な皮膚の炎症に関与している。

【0021】

これらの特性から、発明の目的はL. pentosusの培養上清と細胞溶解液との混合物であり、この混合物は乾癬等の皮膚アレルギーや皮膚の炎症疾患の外用の処置に用いられることを意図されている。

【課題を解決するための手段】

【0022】

発明の他の目的は、先に明確にした、L. pentosusの培養上清と細胞溶解液との混合物の化粧品への使用にある。このように、この混合物はL. pentosusの培養物の全抽出物または公開された及び/または本明細書に記載された方法のいずれか1つによって得られたものであってもよい。化粧品分野では、当該混合物は角質層のバリア能の強化、刺激及び

10

20

30

40

50

炎症の低減及び/または顔色の輝きの増進に用いられる。表皮への外用分野では、皮膚の刺激状態または炎症状態の処置への使用が意図される。

【0023】

表皮ルートによる化粧品への適用であろうと皮膚への適用であろうと、有効成分の濃度は組成物の総重量に対して0.1~10%で変化することが有用である。

【0024】

有効成分の生産は、以下のステップを含んでいる。

【0025】

L. pentosusの最適な生産のために、微生物成長の対数期より進んだ、好ましくは定常期の段階まで培養されることが有利である。効果のある有効成分を得るのに特に適した培地はM20及びMRS培地から選ばれ、L. pentosusの生育を促進するために成分の濃度や性質を改変された培地はこれらの培地と同様に市販されている。ペレット及び上清はそれから取り戻される。取り戻しステップは従来通りに実行され、微生物学上の通常の技術が適用される。このように、上清は濾過及び遠心分離によって培養液から分離されてもよい。得られた微生物の生物体は細胞溶解液を得るために処理される。

【0026】

細胞溶解液は一般に微生物の細胞中に天然に含まれる生物学的な細胞内構成成分の放出を起こす細胞溶解現象と呼ばれる現象によって参照される。本発明の意味する範囲内で、「細胞溶解液」は以上で定義した通りの細胞溶解液全体または細胞溶解液の画分を示すために用いられ、この細胞溶解液は未精製または1つ以上の処理を経た細胞抽出液であり、これらの処理は実質的に発明の有効成分中の細胞溶解液の特性に影響を与えない。実施された細胞溶解液はそれ故、生物学的な細胞内構成成分、細胞膜及び細胞壁の構成成分の一部または全部から形成されている。発明に用いられる細胞溶解液は得られた細胞溶解液の全体で構成されていれば有利である。細胞の溶解は浸透圧ショック、熱ショック、超音波または遠心分離型の機械的ストレス等の異なる技術によって行われてもよい。

【0027】

細胞溶解液と培養上清とはその後混合される。細胞溶解液に対する上清の重量割合は好ましくは1~50まで、好ましくは5~15まで変化する。得られた有効成分は液体、粉碎されて任意の方法で凍結乾燥された、または濃縮された粉末などの異なった形で提供されてもよい。

【0028】

本発明の組成物は、投与に適したいかなるガレヌス製剤として処方されてもよい。本発明の組成物は、クリーム、ゲル、ローション、石鹸、唇用の保護スティック、ミルク、油中水型または水中油型の乳剤、溶液、軟膏、メーキャップ用のスティック及びペンシル、エアロゾル、回転塗布式剤、スティック、ボールペン、粉末、ワイプ、リポソームタイプのベクター、グリコスフェア、シクロデキストリンへの組み込み、キロミクロン、マクロ、ミクロ、ナノカプセルと同様のマクロ、ミクロ、ナノ粒子の形で処方される。また、粉末化した有機ポリマー、タルク、ベントナイト及び他の鉱物支持体に吸着されていてもよい。

【0029】

本発明の組成物は、抽出または合成した脂質、ゲル化および粘稠化したポリマー、界面活性剤、乳化剤、水性または油性の有効成分、植物抽出物、組織抽出物、海産物の抽出物、合成の活性剤だけでなく、例えば抗菌剤または香料といった化粧品分野で一般的なアジュバントまたは添加剤もまた含んでいてもよい。

【0030】

本発明の組成物は、例えば痩身効果、抗セルライト作用、引き締め効果、モイスター効果、アンチエイジング効果、(肌を)明るくする効果、皮膚の色への効果、抗菌活性、抗酸化活性、抗ラジカル活性、修復効果、締めつけ効果、抗しわ効果、キレート活性、錯体形成及び隔離活性、癒し効果、コンシーラー効果、抗発赤効果、皮膚軟化活性、ヘアコンディショナー活性、抗ふけ活性、髪の毛の成長の刺激効果、抜け毛防止効果、髪被覆効果、

10

20

30

40

50

脱毛活性、髪成長を制限する活性、細胞新生に關与する活性、炎症反応を調節する活性、卵型の顔維持するのに關する活性など他の補助的作用のために選りされた有効成分を含んでいてもよく、日焼け止め、抗刺激活性、細胞栄養、細胞呼吸、抗脂漏性処置、皮膚の浸透圧及び髪保護を行う有効成分を含んでいてもよい。

【0031】

本発明の組成物が補助的な有効成分を含んでいる場合、これらの有効成分は一般的にそれらの活性が発揮されるのに十分な高い濃度で存在している。

【0032】

本発明の組成物は好ましくは日用及び1日に1回または数回使用される。

【0033】

本発明の組成物は許容性に非常に優れ、いかなる毒性も有さず、長期間皮膚に用いた場合に全身性の影響を与えない。

【0034】

本発明はまた美容上または表皮用で外用の、*L. pentosus*の培養液に基づく有効成分の調製方法を提供する。この方法は、以下のステップを含む：

定常期までの*L. pentosus*の培養物を得る、

培養上清及び微生物菌体を得るために培養液を遠心分離する、

菌体から上清を分離する、

細胞溶解液を得るために溶菌を実行する、及び

上清と溶解液とを混合する

好ましくは、溶解液に対する上清の重量割合は1～50まで変わる。

【0035】

もちろん、いかなる補助的ステップ、例えば、本発明の有効成分を得るために、当業者に公知の上清及び/または菌体の処理が行われてもよい。

【0036】

本発明はまた、ブタベスト条約に従って2013年4月4日にCOLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES (CNCM) に提出した*L. pentosus* CNCM I - 4730株に関する。

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】図1は、刺激された再構成後の表皮によるインターロイキン8の放出及び合成 (pg/mL) の分析により、本発明の培養抽出物の抗炎症活性を説明する。

【発明を実施するための形態】

【0038】

本発明はここで、以下の実施例及び添付図面を通して説明されるが、これらに限定されない。

【0039】

図面は、刺激された再構成後によるインターロイキン8の放出及び合成 (pg/mL) の分析により、本発明の培養抽出物の抗炎症活性を説明する。

【実施例】

【0040】

実施例1：*L. pentosus* CNCM I - 4730の培養

*L. pentosus* CNCM I - 4730株は、80Lの発酵装置中表1で示された培地を用いて生産される。この培地は24時間培養した*L. pentosus* CNCM I - 4730株の培養液を3% (体積/体積) 接種される。*L. pentosus* CNCM I - 4730株の生育は30、50回転/分で攪拌し、空気を供給せず、pH調整なしで行った。培養は接種後20時間、定常期になるまで行われる。

【0041】

10

20

30

40

【表 1】

培地	
成分	培地中の濃度 (g/L)
酵母抽出物	15.00
グルコース	20.00
Tween®80	1.08
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.00
酢酸ナトリウム	5.00
クエン酸アンモニウム	2.00
MgSO <sub>4</sub>	0.20
MnSO <sub>4</sub>	0.05

*L. pentosus* CNCM I-4730 株の培養液

## 【0042】

実施例 2：発明に係る有効成分の調製

実施例 1 で記載した条件のもとで得られた培養物は、シャープルスタイプ (sharples t  
ype) の遠心分離器を用いて微生物の菌体と培養上清とを分離するために 15000 回転  
/分 で連続的に完全に遠心分離される。その後、菌体と上清は以下のように扱われる。

## 【0043】

*L. pentosus* CNCM I-4730 の細胞溶解液の調製

微生物の菌体 (21 ~ 25% の乾燥体のペレットとして 900g) は回収され、それか  
ら 5 倍量の水中で再懸濁され、4000 回転 / 分で 30 分間遠心分離される。水を除去し  
た後、菌体は回収される。このようにして洗浄された菌体は質量比が 50 / 50 の 2 M の  
硫酸中で希釈される。微生物細胞の溶解を実行するために、この調製は 100 °C に加熱し  
て 1 時間 30 分間行われる。

## 【0044】

上清の調製

上述のシャープルス遠心分離から得た 60 L の上清は濾過板上 0.2 μm で濾過される  
。濾過液は回収される。

## 【0045】

*L. pentosus* CNCM I-4730 抽出物の調製

本発明の培養抽出物を得るため、*L. pentosus* CNCM I-4730 の所定の体積の  
細胞溶解液は、体積にして 9 倍量の上清と混合される。NaOH を用いて pH は 4 に調整  
される。

## 【0046】

実施例 3：実施例 2 により得られた *Lactobacillus pentosus* CNCM I-4730 の  
抽出物に基づく有効成分の可能な剤形

実施例 2 で得られた有効成分は、重量パーセントでの以下の組成に従って pH 5.5 に  
して処方される：

水	89.39
SEPIGEL™305	2.00
LABRAFAC™CC	5.00
MICROCARE <sup>(R)</sup> PM4	1.00
SILK & CARE	0.50
<i>L. pentosus</i> 抽出物	2.00
NaOH 10%	0.09
クエン酸	0.02

10

20

30

40

50

合計 100.00

実施例4：抗炎症活性

5 - リボキシゲナーゼ (LOX - 5) の活性の阻害試験によってin vitroで評価された抗炎症活性

LOX - 5 は、アラキドン酸から炎症性のロイコトリエンが形成される炎症促進プロセスに關与する酵素である。

【0047】

実施例2で得られた本発明の培養抽出物の抗炎症活性は、LOX - 5の阻害能力によってin vitroで評価される。この測定ではリノール酸のヒドロキシペルオキシリノール酸への変換を阻害することを233nmでの吸光度測定により評価される。異なる濃度の本発明の培養抽出物のLOX - 5活性の阻害をモニターすることで、この抽出物のIC<sub>50</sub>を決定することができる。すなわち、培養抽出物の上記濃度では、LOX - 5活性の50%の阻害が誘発されなければならない。

10

【0048】

このため、2950μLのリン酸バッファー(0.1M、pH=7.4)、1000ユニットのLOX - 5酵素(10μL)及び50μMリノール酸(10μL)を含む反応溶媒(3mL)中に、種々の希釈率の30μLの本発明の培養抽出物(0.16.8 - 56 - 112mgの抽出物の乾燥体/mL)が加えられる。

【0049】

5 - リボキシゲナーゼ活性の阻害についてIC<sub>50</sub>を示すのが0.674mgの乾燥体/mLの抽出物である、というこの研究の結果により、本発明の培養抽出物の抗炎症活性を強調できる。

20

【0050】

刺激された再構成後の表皮によるインターロイキン8(IL - 8)の合成及び放出に基づいてin vitroで評価された抗炎症活性

再構成された表皮は炎症誘発剤であるフォルボール12 - ミリスレート13 - アセテート(PMA)により刺激された。24時間、0.3μg/mLのPMAによる再構成された表皮への刺激は炎症状態を引き起こし、重要なIL - 8の放出及び/または合成を生じさせる。

【0051】

IL - 8の放出及び/または合成は、以下のように再構成された表皮の培養上清に行われた酵素免疫法であるELISAによって評価された：

処理されていない表皮、

炎症状態を得るためにPMAによって処理された表皮、

10<sup>-7</sup>Mのデキサメタゾン(コントロールとなる合成糖質コルチコイドホルモン)で前処理された後にPMAで処理された表皮、

異なる濃度(0.112mg/mL、0.280mg/mL(抽出物の乾燥重量/mL))の本発明の培養抽出物で前処理された後にPMAで処理された表皮。

【0052】

デキサメタゾンをを用いた再構成された表皮のプレインキュベーションは、IL - 8の放出及び/または合成を2.4倍阻害した。

40

【0053】

実施例2で得られた0.112mg/mL及び0.280mg/mLの培養抽出物を用いた表皮のプレインキュベーションは、IL - 8の放出及び/または合成をそれぞれ1.8倍及び2.4倍阻害した。

【0054】

分析結果は図1に示される。これらの結果は、本発明に係る培養抽出物が抗炎症活性を有していることを強調する。実際に、0.112mg/mL及び0.280mg/mLの本発明に係る培養抽出物(単位は乾燥重量/mL)は、炎症誘発剤PMAによって引き起こされるIL - 8の放出及び/または合成を阻害した。その活性は、デキサメタゾンの活

50

性と近似 ( 0 . 1 1 2 m g / m L ) 及び類似 ( 0 . 2 8 0 m g / m L ) していた。

【 0 0 5 5 】

実施例 5 : 皮膚のバリア機能の保護効果

実施例 2 で調製された本発明の有効成分の前腕での皮膚バリア機能の保護効果を評価するため、8 人 ( 1 8 歳から 6 9 歳までの白人女性 ) のボランティアで人間に対する二重盲検方式の臨床試験を行った。

【 0 0 5 6 】

各ボランティアの一方の前腕に 2 重量 % ( すなわち、1 0 0 g の組成物当たり 2 g の本発明の培養抽出物 ) の濃度で上述の有効成分を含む化粧品処方 ( 本発明の培養抽出物を除いて同一の処方 ) を塗布し、他方の前腕にプラセボの化粧用処方 ( 本発明の培養抽出物を除いて同一の処方 ) を塗布した。前腕の分布はランダムに行った。これらの処方を塗布してから 1 5 分後に、粘着テープの貼付及び剥離を各 2 秒間、8 サイクル連続して行う「テープ剥がし法 ( tape-stripping method ) 」によって前腕の皮膚バリア機能を変化させる。

【 0 0 5 7 】

皮膚のバリア機能の評価は処方の塗布前とテープ剥がし法によって皮膚を侵襲してから 3 0 分後とで、Tewameter ( 登録商標 ) T M 3 0 0 ( Courage+Khazaka electronic により市販 ) を用いた経皮水分喪失量 ( TransEpidermal Water Loss; TEWL ) を測定する。TEWL を測定することにより、角質層を通じた水分蒸散の程度 (  $g \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$  ) を評価することができる。皮膚のバリア機能の変化は経皮水分喪失を引き起こし、それ故 TEWL が増加する。TEWL が低い程、バリア機能がよく保持されていることになる。

【 0 0 5 8 】

この研究結果は下記の表 2 に示される。

【 0 0 5 9 】

【表 2】

皮膚の侵襲から 3 0 分後の TEWL 変化のパーセント	
プラセボ処方	2 % の培養抽出物を含む処方
1 3 . 8 ± 4	4 ± 0 . 7

【 0 0 6 0 】

化粧用処方中に 2 % 用いられた本発明の培養抽出物は皮膚のバリア機能の保護効果を与える。実際に、皮膚の侵襲から 3 0 分後に測定された経皮水分喪失量 ( TEWL ) は、プラセボ処方の塗布を受けた被験者で 1 3 . 8 % 増加したのに対し、本発明の培養抽出物を含む処方の塗布を受けた被験者では 4 ± 0 . 7 % しか増加しなかった。

【 0 0 6 1 】

本発明の培養抽出物は皮膚のバリア機能の保護効果を示す。

【 0 0 6 2 】

実施例 6 : 皮膚のバリア機能の修復効果

本発明の有効成分の前腕での皮膚バリア機能の修復効果 ( テープ剥がし法を通して皮膚を侵襲した後 ) を評価するため、1 4 人 ( 1 8 歳から 6 9 歳までの白人女性 ) のボランティアで人間に対する二重盲検方式の臨床試験を行った。1 3 日間 ( - 7 日から + 6 日まで ) 各ボランティアは、一方の前腕に 1 日 2 回、2 重量 % ( すなわち、1 0 0 g の処方当たり 2 g の本発明の培養抽出物 ) で実施例 2 で調製された本発明の培養抽出物を含む化粧用処方を塗布し、他方の前腕にプラセボの化粧用処方 ( 本発明の培養抽出物を除いて同一の処方 ) を塗布した。前腕の分布はランダムに行った。両タイプの処方の塗布を行ってから 7 日後の D 0 に、粘着テープの貼付及び剥離を各 2 秒間、8 サイクル連続して行う「テープ剥がし法」両前腕の皮膚バリア機能は変化される。皮膚のバリア機能のチェックは D 0 の皮膚の侵襲の後、D + 1、D + 2 及び D + 6 に、Tewameter ( 登録商標 ) T M 3 0 0 ( Courage+Khazaka electronic により市販 ) を用いた経皮水分喪失量 ( TransEpidermal Water Loss; TEWL ) を測定することによって行われる。この TEWL の測定により、角質層を通じた

水分蒸散の程度 ( $\text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ ) を評価することができる。皮膚のバリア機能の変化は経皮水分喪失を引き起こし、それ故TEWLが増加する。TEWLが低い程、バリア機能がよく保持されていることになる。皮膚のバリア機能の修復効果は、皮膚の侵襲直後を基準として経時的なTEWLの変化のパーセンテージを監視することによって決定される。修復効果はこのTEWLの変化のパーセンテージの経時的な減少に一致する。

【 0 0 6 3 】

この研究結果は下記の表 3 に示される。

【 0 0 6 4 】

【表 3】

皮膚の侵襲後の経時的なTEWL変化のパーセント			
	D+1	D+2	D+6
プラセボ処方	12.9 ± 3	8.5 ± 1.3	-1.8 ± 0.3
本発明の培養抽出物を2%含む処方	5.9 ± 1.1	-1.1 ± 0.3	-5.4 ± 1.1

10

【 0 0 6 5 】

皮膚の侵襲から1日後 (D + 1) においてプラセボ処方を受けた人のTEWLの変化のパーセンテージが12.9 ± 3%であるのに比べて本発明の培養抽出物を含む処方を受けた人のパーセンテージが5.9 ± 1.1%であることから、これらの結果は本発明の有効成分が皮膚のバリア機能の保護効果を有することを確かめるものと言える。

20

【 0 0 6 6 】

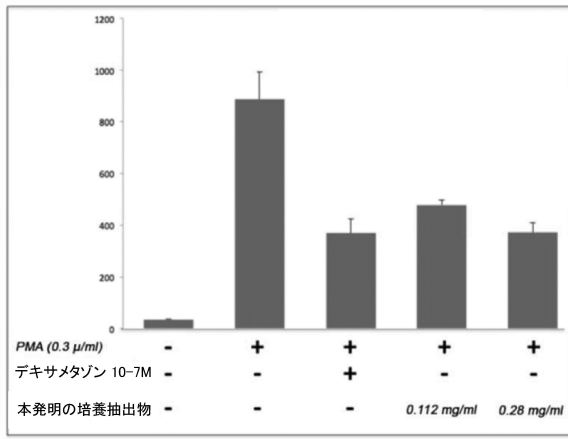
本発明の培養抽出物は皮膚のバリア機能の回復を加速及び増幅させる。実際に、皮膚の侵襲から2日後 (D + 2) からTEWLの変化のパーセンテージは負の値 (-1.1 ± 0.3%) を示した。これは、皮膚の侵襲直後の測定値 (基準値) よりもTEWLが小さいことを意味する。皮膚の侵襲から6日後 (D + 6) では、本発明の培養抽出物を含む処方を受けた人における皮膚のバリア機能の回復 (TEWLの変化のパーセンテージは -5.4 ± 1.1%) の度合いは、プラセボ処方を受けた人における同機能の回復 (TEWLの変化のパーセンテージは -1.8 ± 0.3%) に比べて2.8倍の強さであった。

30

【 0 0 6 7 】

本発明の培養抽出物は皮膚のバリア機能の回復を加速及び増幅させる。

【 図 1 】



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
A 6 1 Q	19/00	(2006.01)	A 6 1 Q	19/00
A 6 1 K	35/74	(2015.01)	A 6 1 K	35/74
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 K	35/74
C 1 2 N	1/20	(2006.01)	A 6 1 P	17/06
			C 1 2 N	1/20
				G
				A
				A

(72)発明者 ジャン - イブ アントニン ベルトン  
フランス国 ロマーニャ, リュ デ パイヤール, 42 ビス

(72)発明者 ローラン シューズマルタン  
フランス国 ヴィック ル コント, ブルパール ギュヨ ラバラン 11

審査官 岡田 三恵

(56)参考文献 特開2009-108030(JP, A)  
米国特許出願公開第2012/0231099(US, A1)  
特開2010-111670(JP, A)  
米国特許出願公開第2010/0272839(US, A1)  
特開2008-013502(JP, A)  
特表2013-521335(JP, A)  
米国特許出願公開第2013/0149342(US, A1)  
特表2013-512946(JP, A)  
米国特許出願公開第2012/0301452(US, A1)  
特開2002-191387(JP, A)  
米国特許出願公開第2009/0068161(US, A1)  
国際公開第2009/031099(WO, A1)  
特開2012-139217(JP, A)  
特開平05-201828(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 8 / 9 9  
A 6 1 Q 1 9 / 0 0  
A 6 1 K 3 5 / 7 4  
A 6 1 K 3 5 / 7 4 7  
C 1 2 N 1 / 2 0