

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6286646号  
(P6286646)

(45) 発行日 平成30年3月7日 (2018.3.7)

(24) 登録日 平成30年2月16日 (2018.2.16)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 D 407/12 (2006.01)

A 6 1 K 31/375 (2006.01)

A 6 1 P 3/02 (2006.01)

A 6 1 P 17/02 (2006.01)

A 6 1 P 39/06 (2006.01)

C O 7 D 407/12 C S P

A 6 1 K 31/375

A 6 1 P 3/02 1 O 7

A 6 1 P 3/02 1 O 9

A 6 1 P 17/02

請求項の数 9 (全 73 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-188214 (P2014-188214)  
 (22) 出願日 平成26年8月25日 (2014.8.25)  
 (65) 公開番号 特開2016-44171 (P2016-44171A)  
 (43) 公開日 平成28年4月4日 (2016.4.4)  
 審査請求日 平成28年2月25日 (2016.2.25)

(73) 特許権者 314010843  
 株式会社 I T O R E S E R C H  
 東京都武蔵野市中町 1 - 1 1 - 1 6 - 1 2  
 O 7  
 (74) 代理人 100064908  
 弁理士 志賀 正武  
 (74) 代理人 100108578  
 弁理士 高橋 詔男  
 (74) 代理人 100094400  
 弁理士 鈴木 三義  
 (72) 発明者 中村 浩之  
 東京都豊島区北大塚 2 - 3 3 - 2 2  
 (72) 発明者 伊東 忍  
 東京都武蔵野市中町 1 - 1 1 - 1 6 - 1 2  
 O 7

最終頁に続く

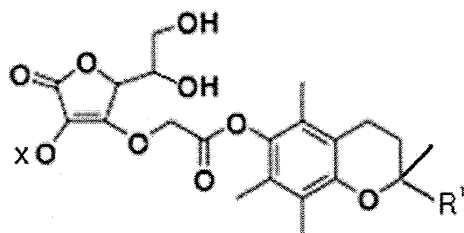
(54) 【発明の名称】新規化合物及びその配合組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記の一般式 [ 化 1 ] で示される化合物。[ 化 1 ] において X は、水素又は、アルカリ金属又はアルカリ土類金属から選択される金属原子である。R<sup>1</sup> は、-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(-CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(-CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(-CH<sub>3</sub>)-CH<sub>3</sub> 又は、-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH=C(-CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH=C(-CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH=C(-CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH=C(-CH<sub>3</sub>)-CH<sub>3</sub> のいずれかである。

【化 1】



【請求項 2】

5,6-イソピデンアスコルビン酸と、ハロゲン化アセチル化合物を、DMFの溶媒に溶解し、塩基として炭酸水素カリウムの存在下で反応させる製造工程を含む、請求項 1 記載の化合物の製造方法。

【請求項 3】

請求項 1 記載の化合物を配合したことを特徴とする外用組成物。

【請求項 4】

請求項 1 記載の化合物を配合したことを特徴とする経口用組成物。

【請求項 5】

請求項 1 記載の化合物を配合したことを特徴とするラジカル疾患治療薬。

【請求項 6】

請求項 1 記載の化合物を配合したことを特徴とする細胞培養組成物。

【請求項 7】

請求項 1 記載の化合物を配合したことを特徴とする抗ストレス用組成物。

【請求項 8】

請求項 1 記載の化合物を配合したことを特徴とする液晶乳化組成物。

10

【請求項 9】

請求項 1 記載の化合物から選択される一種以上の単独又は複合化合物と、以下のグループAから選択される一種以上の単独又は混合化合物と、以下のグループBから選択される一種以上の単独又は混合化合物と、以下のグループCから選択される一種以上の単独又は混合化合物と、以下のグループDから選択される一種以上の単独又は混合化合物と、を同時に含有する液晶乳化組成物。

(界面活性剤:グループA)

ココイルグルタミン酸Na、ココイルグルタミン酸K、ココイルグルタミン酸Na、ココイルグルタミン酸TEA、ココイルグルタミン酸TEA、ラウロイルアスパラギン酸Na、ラウロイルグルタミン酸Na、ミリストイルグルタミン酸Na、パーム脂肪酸グルタミン酸Na、フォスファチジルコリン、リン脂質及びこれらの塩類。

20

(水溶性物質:グループB)

グリセリン、ジグリセリン、トリグリセリン、ポリグリセリン、メチルブタンジオール、ブチレングリコール、イソブレングリコール、ポリエチレングリコール、ペンタンジオール、ヘキサジオール、プロピレングリコール、ジプロピレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール、ジエチレングリコール、ネオペンチルグリコール、ポリエチレングリコール、ソルビトール、キシリトール、ピロリドンカルボンナトリウム、ヒアルロン酸、カラギーナン、アルギン酸、寒天、フコイダン、ペクチン、ローカストビーンガム、キサントガム、トラガントガム、グアーガム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、アクリル酸・メタクリル酸共重合体、ポリグルタミン酸。

30

(脂質:グループC)

ミネラル油、スクワラン、スクワレン、パルミチン酸イソプロピル、ミリスチン酸イソプロピル、ミリスチン酸イソオクチル、ミリスチン酸イソトリデシル、ミリスチン酸オクタデシル、ミリスチン酸オクチルドデシル、イソステアрилコレステリルエステル、2-エチルヘキサン酸トリグリセリド、2-エチルヘキサン酸セチル、パーム油、ヒマワリ油、オリーブ油、ホホバ油、ツバキ油、流動パラフィン、グレープシード油、アボガド油、マカダミアナッツ油、アーモンド油、天然ビタミンE油、米胚芽油、丁字油、オレンジ油、トウヒ油、ステアリン酸及びパルミチン酸。

40

(抗酸化剤:グループD)

コウジ酸、アルブチン、アスコルビン酸リン酸エステルナトリウム、アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム、アスコルビン酸メチル、アスコルビン酸エチル、アスコルビン酸硫酸エステルナトリウム、アスコルビン酸グルコシド、アスコルビン酸リン酸パルミテートナトリウム、トコフェリルリン酸ナトリウム、(アスコルビル/トコフェリル)リン酸K、アスコルビルマレイン酸トコフェリル、カプリリルグリセリルアスコルベート、ヘキシルグリセリルアスコルベート、ミリスチルグリセリルアスコルベート、グリセリルアスコルベート、ビスグリセリルアスコルベート、ジグリセリルアスコルベート、イソステアрилアスコルビルリン酸ナトリウム、ステアリン酸アスコルビル、パルミチン酸アスコルビル、ジパルミチン酸アスコルビル、エラゲ酸、レゾルシノール、ブチルレゾルシ

50

ノール、カミツレ抽出物、ソウハクヒ抽出液、ユキノシタ抽出液、米糠抽出物、ジアセトキシ安息香酸、アセトキシヒドロキシ安息香酸、胎盤抽出物、アスタキサンチン、カロチン、酢酸レチノール、パルミチン酸レチノール、レチノイン酸、トコフェリルリン酸Na、トコフェリルアセテート、トコフェリルニコチネート、トコフェリルリノレート、トコフェロール、ジイソプロピルアミンジクロロアセテート、アミノヒドロキシ酪酸、ブチルヒドロキシアニソール、ブチルヒドロキシトルエン、没食子酸プロピル。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、 $(R^5 - C(=O) - CH_2 -)$ のアセチルエステル構造を有する化合物と、その製造法、及びその用途に関する。本化合物を有効成分として本発明の化合物を含有することで従来より強い美白作用、フリーラジカル抑制作用、抗シワ作用、抗ニキビ作用、保湿作用、皮膚及び粘膜のバリア機能増強作用、紫外線由来炎症抑制作用、抗褥瘡作用を発揮する。本発明は、安定でかつ安全性が高い組成物に関し、化粧品、医薬部外品、医薬品、動物用薬品、水生動物用薬品を含むヒト及び動物の外用組成物として利用することができる。

10

【背景技術】

【0002】

ビタミンC（L-アスコルビン酸）は、抗壊血病剤であり、またしみ、そばかすなどの原因であるメラニン色素の沈着を抑え、さらに最近では抗ガン作用があると言われている。また、ビタミンE（ $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ -トコフェロール及びトコトリエノール及びその光学異性体であるD及びL体）は、抗酸化作用を有し、また近年白内障に有効であることが示唆されている。ビタミンE自体は水に不溶性であり、油に溶けるが、ビタミンCは水溶性であるという特徴がある。ビタミンCの誘導体には多くの種類が知られており以下の公知の特許文献などが存在する（特許文献1～5）。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】特願平3-250458

【特許文献2】特願平3-250458

【特許文献3】特開平5-39280

【特許文献4】特願平5-61364

【特許文献5】特願平6-13667

30

【0004】

一方、ビタミンEには $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ の4種が存在する。現在皮膚科領域で最も汎用されているのは $\alpha$ -ビタミンEとその誘導体である。 $\alpha$ -型が利用されている理由は臓器の多くで $\alpha$ -型の存在比が高くペルオキシラジカルに対する反応性が高い（ $\alpha > \gamma > \beta > \delta$ の順）ためである（非特許文献1）。

ビタミンEは脂溶性であり、生体では皮脂層や細胞膜内で抗酸化物質として働き、皮膚に深刻なダメージを与える脂質過酸化の連鎖反応の拡大を防止する（非特許文献）（非特許文献2）。ビタミンEは、タンパクやDNAの酸化障害を抑制するだけでなく紫外線（UV）吸収剤（極大吸収：292nm）としての機能があり（非特許文献3）、さらに皮膚免疫障害抑制効果（非特許文献4）（非特許文献5）やDNA損傷抑制効果も報告されている。（非特許文献6）。ビタミンEの紫外線防御メカニズムは、真皮のSOD活性を増加させることで、UV照射による表皮グルタチオンペルオキシダゼやSODの減少を抑制し、同時に皮膚のグルタチオンレベルやビタミンCレベルを上昇させることにより、皮膚の抗酸化ネットワークをコントロールしてUV照射傷害を抑制するものである（非特許文献7）。皮膚等の一部の組織で $\alpha$ -型ビタミンEの含有比が高いことが確認され、 $\alpha$ -型の生体での役割を再評価する動きが起こっている（非特許文献8）。ヒトの表皮のビタミンEの構成については、 $\alpha$ -ビタミンE：87%、 $\beta$ -ビタミンE：9%、 $\gamma$ -T o

40

50

e : 3 %、 $\alpha$ -Tocopherol : 1 %の含有比であることが報告されており、 $\alpha$ -型のみならずトコトリエノール (Tocopherol) の役割についても議論され始めている (非特許文献 9)。Tocopherol は、UV 障害を抑制すると共に、アクネ治療などに用いられるベンゾイルペルオキシドの脂質過酸化も抑制することが知られている (非特許文献 10)。及び ビタミン E についても DNA のチミジンダイマ - 形成を抑制することが報告されている (非特許文献 11)。以外の  $\gamma$ -型についてはメラニン生成抑制作用が顕著であるという報告もある (非特許文献 12)。

従来より dl- $\alpha$ -ビタミン E の酢酸やニコチン酸エステルが末梢循環障害の改善を目的として医薬品や化粧品などに使用されてきた (非特許文献 13)。ビタミン E とビタミン C がリン酸エステルで結合した EPC には、虚血による酸化障害抑制作用が報告されている (非特許文献 14)。

10

#### 【0005】

【非特許文献 1】Yoshida, et al., Chem Phys Lipids. 123 (1): 63 - 75, 2003

【非特許文献 2】Niki, Chem. Phys. Lipid., 44, 227 - 253, 1987)。

【非特許文献 3】Fryer., 58 (2): 304 - 312, 1993

【非特許文献 4】Yuen, Photo Vitamin E Chem Photobiol. 65 (3): 587 - 92, 1997

【非特許文献 5】Halliday, et al., Mutat Res. 422 (1): 139 - 45, 1998

20

【非特許文献 6】McVean, Carcinogenesis. 18 (8): 1617 - 22, 1997

【非特許文献 7】Lopez-Torres, et al., Br J Dermatol, 138 (2): 207 - 215, 1998

【非特許文献 8】Jiang, et al., Am J Clin Nutr. 74 (6): 714 - 22, 2001

【非特許文献 9】Fuchs, et al., Free Radic Biol Med. 34 (3): 330 - 336, 2003

【非特許文献 10】Weber, et al., Free Radic Biol Med, 34 (2): 170 - 6, 2003

30

【非特許文献 11】McVean, Mol Carcinog. 24 (3): 169 - 76, 1999

【非特許文献 12】亀井、他、ビタミン類のメラニン合成阻害、フレグランスジャーナル臨時増刊号、No. 18、56 - 63, 2003

【非特許文献 13】原平文子、臨床栄養、vol. 84, No. 1, p13, 1994

【非特許文献 14】Hirose, et al., a new radical scavenger., 68 (4): 369 - 73, 1997

#### 【0006】

しかし、これらの公知文献に記載されたビタミン C 及びビタミン E 誘導体には、二つの重大な問題が存在する。即ち、ビタミン C - 2 - リン酸エステルの塩類 (特許文献 6)、ビタミン C - 2 - リン酸 - 6 - パルミチン酸エステルの塩類のようなビタミン C - 2 - リン酸の高級脂肪酸エステル誘導体 (特許文献 7) やビタミン C - 2 - マレイン酸トコフェリル (特許文献 8) などは、ビタミン C とリン酸又はビタミン C とマレイン酸の化学結合が弱い為に速やかに非酵素的にビタミン C に変換されてしまう。このため、製剤中で分解され着色や異臭の発生などの問題を引き起こす。これらの誘導体は、生体酵素でも速やかに分解されるがビタミン C への変換速度が早すぎるため組織中ビタミン C 濃度が高まりすぎてビタミン C ラジカルなどのプロオキシダントを生じやすいという問題もある。

40

#### 【0007】

一方、ビタミン C - 2 - 硫酸の塩類、L - アスコルビン酸 - 2 - O - リン酸 -  $\alpha$ -トコ

50

フェロールジエステル（特許文献 9）、ビタミン C - 2 - グルコシド（特許文献 10）及びその高級脂肪酸エステルの塩（特許文献 11）などは、2つの分子をエステルで結合させたビタミン C は、これらのエステル類のビタミン C への結合が強い為に非酵素的に分解されにくいばかりでなく、生体中の酵素でも分解されるのに極めて 24 時間以上の長い時間を要する。これらの、ビタミン C 及びビタミン E 誘導体に限らず水溶性ビタミン及び脂溶性ビタミン誘導体に対するビタミン単体へ変換するエステラーゼなどの酵素活性は、酵素の立体特異性や酵素の存在する組織や細胞の種類などにより、誘導体の分子構造から酵素の反応速度を含む誘導体の変換速度を推測することは事実上出来ず、臨床試験、実際の組織を使用した試験、細胞試験又は実際の酵素を使用した反応試験により初めて明らかとなる。

10

#### 【0008】

従って、例えば皮膚組織に投与しても皮膚通過中の 3 から 6 時間ではビタミン C に変換されず、血流で他の組織へ拡散したタ-ゲット組織である皮膚組織でのビタミン C 濃度が上昇せず十分な効果を発揮できない。そして一度拡散したビタミン C とビタミン E は主に肝臓で代謝され大部分が体外へ排出され再利用されない。培養細胞では 24 時間以上培養しないと効果を発揮できず、これでは実際の皮膚に塗布した場合と実験条件が異なるため意味を持たない。

このように、従来のビタミン C とビタミン E を結合させた誘導体は、エステル結合が強すぎるか、又は弱すぎるため投与組織で十分な効果を発揮できないという問題が存在した。我々はこの問題を解決する為に、ビタミン C との化学結合が弱すぎず、又は強すぎないエステル構造をもつ分子の探索を行い、その結果 -O-C(=O)-CH<sub>2</sub>-構造がもっとも優れた効果を発揮できることを見いだした。この構造は、ビタミン C の酸素と R-O-C(=O)-CH<sub>2</sub>-構造がエステルで結合するために、本発明者らはこれをアセチルエステル結合型ビタミン C 誘導体と名付けた。さらに、アセチルエステル結合型ビタミン C 誘導体にアルキルやアルコールなどの炭化水素を結合させることによりアセチルエステル結合型ビタミン C 誘導体に疎水性を増加させて、皮膚浸透性や細胞浸透性を高める工夫を行ったところ、脂溶性のビタミン E を結合させることが、毒性や効果の点から最も優れていることを見いだした。この構造は、ビタミン C の酸素とビタミン E-O-C(=O)-CH<sub>2</sub>-構造が 2つのエステルで結合するために、本発明者らはこれをアセチルエステル結合型ビタミン CE 誘導体と名付けた。

20

30

#### 【先行技術文献】

##### 【特許文献】

##### 【0009】

【特許文献 6】特許第 2589761

【特許文献 7】特開 2005-187466

【特許文献 8】特許 4179809

【特許文献 9】特願 2000-580631

【特許文献 10】特許 2832848

【特許文献 11】特開平 11-286497

##### 【0010】

40

そもそも、従来のビタミン C とビタミン E を結合させた誘導体は、前述のアスコルビン酸 - 2 - マレイン酸トコフェロ-ルように結合が弱く速やかに炭化水素がビタミン C から遊離して細胞浸透性が十分発揮できないものや、アスコルビン酸 - 2 - リン酸 - 6 - パルミチン酸塩の様に強い界面活性作用から細胞毒性を発揮し細胞にダメージを与えてしまう誘導体がほとんどであり、良好な皮膚バリア透過性や細胞膜透過性を有していてもそのメリットが十分に行かされない問題が存在した。

従来よりビタミン C とビタミン E を併用するとそれぞれの単独使用に比較しそれを遥かに凌駕する相乗効果が報告されており、ビタミン C とビタミン E を結合させた誘導体の試作が従来から行われてきた。ビタミン C とビタミン E の併用塗布は、単独塗布よりも紅斑とサンバ-ンセル形成や DNA のチミジンダイマ-形成により高い保護作用を示すという

50

報告もあり（非特許文献15）、ビタミンCとEとの併用は効果的であると考えられる。外用だけでなく経口投与の併用も効果的である。ビタミンCとビタミンEを同時に8日間経口投与すると紫外線による紅斑反応が鈍化した（非特許文献16）。ビタミンCを単独で大量摂取すると逆に活性酸素を発生させることがあるが、天然物のポリフェノールはビタミンCのプロオキシダント化を抑制することも知られており（非特許文献17）ビタミンCやEを他の天然の抗酸化剤と併用することもビタミンCやEの効果を高める上で重要であることが指摘されていた。この為にビタミンC誘導体に修飾する炭化水素の代わりに、細胞の膜の酸化防止に効果のあるビタミンEをビタミンCに修飾する試みが従来よりなされている。また、ビタミンEはその分子内に炭化水素鎖を持つ為にビタミンCと結合させた場合に適度な疎水性を持たせることができるためこれらの誘導体では細胞膜透過性や皮膚バリア透過性が良くなることが考えられる。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【非特許文献15】Lin, Pinnell, et al. J Am Acad Dermatol. 48(6): 866-874, 2003

【非特許文献16】Eberlein-König, J Am Acad Dermatol, 38(1): 45-48, 1998

【非特許文献17】MARIAN, et al., Nature 405, 903-904, 2000

20

【0012】

しかし、ビタミンCは水溶性であり、ビタミンEは粘性の高い水飴状の脂溶性である為に、併用使用することは困難であり、ビタミンEを脂に混ぜて粘度を低下させ乳化などの方法で水に溶かしてビタミンCと併用する方法が取られたが、両者は強力な還元剤である為に酸化分解されやすく、褐変や異臭の発生、プロオキシダントによる細胞毒性や刺激の問題が発生するという問題があった。安定化させたビタミンC誘導体とビタミンE誘導体を併用するという方法もあるが、2つの誘導体を同時に添加するにはコスト高になるという問題と、それぞれの誘導体に側鎖が修飾されている為に一定のビタミン量を確保する為に多くの量を添加しなければならないという問題もあり、異なる2誘導体の安定なpHや水に対する溶解性、疎水性がそれぞれ異なるという問題などから混合した製剤に沈殿や分離、力価低下が見られるという問題が発生した。そこで、ビタミンCとビタミンEを一つの誘導体にまとめてしまおうという試みがなされた。ビタミンCとビタミンEを結合させた誘導体として、既にビタミンEとビタミンCとの水溶性リン酸ジエステル化合物が知られている【特許文献12】【特許文献12】。また、ビタミンC, Eの溶解性を互いに補うものとして、トコフェロール/トコトリフェノール-L-ビタミンC-6-ジカルボン酸ジエステルが報告されている【特許文献14】。

30

また、ビタミンCとビタミンE誘導体として、-トコフェリ-ルグリセリルビタミンCが知られている【特許文献15】。さらに、L-ビタミンC-2-O-マレイン酸-トコフェロ-ルジエステルが【特許文献16】により開示されている。

しかし、前述のように、ビタミンEとビタミンCとの水溶性リン酸ジエステル化合物【特許文献17】、【特許文献18】、及びトコフェロール/トコトリフェノール-L-ビタミンC-6-ジカルボン酸ジエステル【特許文献19】及び、ビタミンCとビタミンE誘導体として、-トコフェリ-ルグリセリルビタミンC【特許文献20】は、エステル結合が強すぎて酵素的に加水分解されにくいためタ-ゲット組織中でビタミンCを効率的に放出できない。一方で、L-ビタミンC-2-O-マレイン酸-トコフェロ-ルジエステル【特許文献21】は、エステル結合が弱すぎて、酵素が全く存在しない水中でも速やかに分解される為に誘導体としての効果が十分に発揮できないという問題があった。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0013】

50

【特許文献 1 2】特公平 2 - 4 4 4 7 8  
 【特許文献 1 3】特公平 5 - 2 3 2 7 4  
 【特許文献 1 4】特開昭 6 2 - 1 8 7 4 7 0  
 【特許文献 1 5】特開平 5 - 3 3 1 1 6 6  
 【特許文献 1 6】国際公開番号：W O 0 1 / 0 4 1 1 4  
 【特許文献 1 7】特公平 2 - 4 4 4 7 8  
 【特許文献 1 8】特公平 5 - 2 3 2 7 4  
 【特許文献 1 9】特開昭 6 2 - 1 8 7 4 7 0  
 【特許文献 2 0】特開平 5 - 3 3 1 1 6 6  
 【特許文献 2 1】国際公開番号：W O 0 1 / 0 4 1 1 4  
 【0 0 1 4】

10

即ち、これらの問題は、ビタミンC又はビタミンE誘導体のエステル構造の酵素的結合力の問題に起因するものであり、ここではリン酸エステルに対する生体酵素分解力に起因する。即ち、生体酵素に対して理想的な安定性と分解性をコントロールできるエステル構造分子が見いだせればこの問題を解決できる。

このような状況下、本発明者らは、のビタミンCとE誘導体に関し鋭意研究を進めてきた結果、 $-O-C(=O)-CH_2-$ のアセチルエステル構造を持つ化合物であるビタミンC誘導体又はビタミンE誘導体であれば、エステル結合が弱すぎず、また強すぎず、前述のような従来の問題点を解決できる事を認めた。即ち、本発明のアセチルエステル結合型ビタミンCE誘導体を含む化合物の合成に成功しその効果を調べたところ、アセチルエステル構造が、適度な分解効率を持つことを見だし本発明を完成させた。さらにこれら化合物が優れた抗酸化作用、ラジカルスカベンジャ-作用および抗炎症作用を有することを発見し、すぐれた組織タ-ゲット性能を持つビタミンCとビタミンE活性を有する理想的なビタミンCとビタミンE結合型誘導体であることを見だし本発明に到達した。

20

一方、本発明者は、特許文献 2 2 においてアスコルビン酸-2-リン酸トコフェロールなどの両親媒性物質を化粧品などに添加する場合、乳化安定性、微粒子形成能力、分散性の点から液晶構造を有する乳化物を作る事が好ましいことを見いだした。さらに液晶組成物の化粧品への応用は、皮膚の保湿性能などを向上することが見いだされ複数の特許が出願されている。又、これらの液晶構造の確認方法として偏光顕微鏡を使用したマルターゼクロス像の観察が行われている。即ち、液晶組成物は、偏光顕微鏡での観察で、ラメラ液晶に独特の形状であるマルターゼクロス像が確認できる。また、樹脂泡埋超薄切法や凍結切片法による透過型電子顕微鏡(T E M)で液晶構造を確認することもできる。特許文献 2 3 , 特許文献 2 4 , 特許文献 2 5 , 特許文献 2 6 、特許文献 2 7 。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0 0 1 5】

【特許文献 2 2】特願 2 0 0 5 - 3 8 0 8 8 7  
 【特許文献 2 3】特願 2 0 0 7 - 2 3 7 4 8 1  
 【特許文献 2 4】特願 2 0 0 8 - 2 3 4 2 9 3  
 【特許文献 2 5】特願 2 0 1 0 - 6 4 4 0  
 【特許文献 2 6】特願 2 0 1 2 - 4 8 9 5 2  
 【特許文献 2 7】特許第 4 8 5 4 1 9 4 号

40

本発明は、のビタミンCとE誘導体、すなわちトコフェロールとビタミンCが $-O-C(=O)-CH_2-$ を介して結合したビタミンCE誘導体を含む化合物を提供するものである。さらに、本化合物の目的は、これら化合物を含有する化粧品、医薬品、飼料添加物、食品添加物、抗酸化剤を提供するものである。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 1 6】

即ち、従来のビタミンC又はビタミンEの誘導体問題点は、以下の点に集約される。

50

### 1) 強過ぎるエステル結合を持つビタミンCとビタミンE結合型誘導体

結合が強すぎる場合は、物理的に安定であるが、タ-ゲット組織においてビタミンCとトコフェロ-ルに分離しにくくビタミンC活性とトコフェロ-ル活性が低いという問題がある。アスコルビン酸-2-グルコシドを分解する酵素は皮膚では極端に少なく、またアスコルビンの硫酸エステルやアルキル誘導体などは、生体中で加水分解酵素がほとんどないためにビタミンC活性が極めて低いという問題がある。

### 2) 弱過ぎるエステル結合を持つビタミンCとビタミンE結合型誘導体

弱過ぎる結合を持つ場合は、ビタミンCとビタミンEが速やかに遊離してしまうため、ビタミンCとビタミンEが速やかに酸化分解されてしまい製剤中の安定性に大きな問題がある。弱すぎる結合を持つ誘導体の代表であるビタミンC-2-リン酸NaやビタミンC-2-リン酸Mg及びビタミンC-2-リン酸-6-パルミチン酸Na、ビタミンC-2-マレイン酸トコフェリルなどを1%以上含む水溶液は、40℃で2ヶ月で、褐変、異臭、分離、沈殿、力価低下のうち一つ以上の経時変化を生じる。さらに、遊離したビタミンCが一時的に大量に遊離するとプロオキシダントとなりやすく毒性を発揮してしまう問題がある。プロオキシダントは、活性酸素種の一つであり細胞毒性や炎症などの毒性発現の原因となる。そのため新しい誘導体には低い毒性と高い効果を同時に実現しなければならないという問題がある。

3) すぐれた細胞膜通過性を有する脂肪酸などの炭化水素側鎖を有するビタミンC誘導体は、その高い界面活性作用の為に細胞膜破壊性を有し高い細胞毒性を有する。又、脂肪酸エステルのビタミンC誘導体などが皮膚に炎症を発生させることが報告されており(非特許文献18)、毒性を発現する脂肪酸を持たない疎水性の側鎖を採用する必要がある。ビタミンCに修飾する疎水基としてビタミンEが優れている点がいくつか存在する。最大の理由はビタミンCから生体内で遊離した後、ビタミンEとして有効利用されるという点である。さらに、ビタミンC存在下では、ビタミンEはたとえラジカルをスカベンジング後にビタミンEラジカルになったとしてもリサイクルされるためプロオキシダントの問題が発生しにくいというメリットもある。ビタミンCの側鎖が脂肪酸であった場合は、遊離後有効利用されるのは難しく、むしろ脂質過酸化物質となり細胞にダメージを与える物質の一つに変化する危険性が高いという問題が残る。

### 4) 製造上の問題

さらに、ビタミンCとビタミンEを-O-C(=O)-CH<sub>2</sub>-構造により結合させた誘導体を合成するには、ビタミンCが水溶性であり、ビタミンEなどが脂溶性であるため、誘導体合成反応が進みにくく、収率が低く、コスト的に高つくという問題がある。さらに、ビタミンCとビタミンEが酸化しやすいため反応中に分解し、収率がさらに低くなる。特にビタミンCは、水酸基が4つもあるために特定の場所に反応させることが困難であり、ビタミンCの特定の炭素の位置に側鎖を修飾することが極めて困難であるという問題がある。本発明では低コストで効率よく特定の炭素の位置、特にビタミンCの反応性の最も強力な2位と3位にビタミンEを選択的に修飾する製造方法の開発技術が求められた。

### 5) 効果の問題

上記の1) 2) 3)の問題は、効果の発現にも極めて大きく関ってくる問題とも言える。ビタミンCとビタミンEが弱い結合の場合は、製剤中での安定性が悪い為に、流通途中や製品の保存中に酸化分解される可能性が高く実際に使用する時に力価の低下が避けられない。強い結合の場合は、生体中での酵素分解効率が低くなり、タ-ゲット組織に到達してもビタミンCとビタミンEに変換される前に拡散してしまい、タ-ゲット組織で濃度を上昇させることができない。さらに、脂肪酸などビタミンCに遊離してから脂質過酸化物質の原因物質となるような場合は、細胞毒性を高めて本来の効果を低下させてしまうなどの問題を伴う為である。これらの効果を下げてしまう問題点を抜本的に解決しなければ高い効果が得られるビタミンCとビタミンEの誘導体は得られない。

このような状況下、本発明者らは種々検討を重ねた結果、本発明のアセチルエステル結合型ビタミンCE誘導体は、その結合が弱過ぎず、又強過ぎずその為に生理活性が高く且つ安定性に優れていて、安全性が高く、組織タ-ゲット性能を持つことを見出し、さらに製造上の多くの問題を解決して本発明を完成させた。



## 【課題を解決するための手段】

【0017】

ビタミンCとビタミンEを併用させるメリットは極めて大きく、色素沈着症、紫外線照射障害、虚血性再かん流疾患などの様々なラジカル疾患などにその併用効果が広く認められているため、ビタミンCとビタミンEを結合させた誘導体が他の脂肪酸などと組み合わせたビタミンC誘導体に比較し遥かに効果的な優位性を持つことが期待されたが、問題はその適度な結合力であった。本発明は、その結合力を $-O-C(=O)-CH_2-$ 構造にすることにより極めて理想的な形とすることに成功し、さらに、その合理的な製造方法を見いだすに至り本発明を解決することができた。

アセチルエステル結合型ビタミンC誘導体のうち、ビタミンCと結合させる炭化水素がビタミンEではなく脂肪酸の場合では、ビタミンCが攻撃されやすく、プロオキシダントを生じやすく紫外線照射下などのラジカル大量発生組織では細胞毒性を上昇させることが判明した。又、アルキル基では、ビタミンC分離後に栄養素やメリットのある物質に変換されにくいいためほとんどが生体外異物として代謝されるしかない。

一方本発明のアセチルエステル結合型ビタミンCE誘導体の場合、生体内エステラゼで分解された後、ビタミンCとビタミンEの2種類の抗酸化剤が共存するために、プロオキシダント化が抑制され毒性が低い状態でビタミンCの効果を発揮できることが判明した。

又、本発明のアセチルエステル結合型ビタミンCE誘導体の結合は、ビタミンC-2-リン酸やビタミンC-2-リン酸-6-パルミチン酸塩などよりも強い結合の為に、製剤中での安定性が劇的に向上した。さらに、生体中ではアセチルトランスフェラゼなどの生体内アセチル基転移酵素などによりビタミンCとビタミンEに分離することが推定され、実際に生体内利用性能がビタミンCのアルキル誘導体よりも驚く程向上した。

製造方法については、5,6-イソプロピリデンビタミンCと、ハロゲン化アセチル化合物を、前記化合物と反応生成物を生成しないアルカリ触媒、酸触媒及び相間移動触媒から選ばれる触媒の存在下、反応させ、得られた5,6-イソプロピリデンアセチルエステル結合型ビタミンCE誘導体の5,6-イソプロピリデンを加水分解して、5,6-イソプロピリデンアセチルエステル結合型ビタミンCE誘導体が見いだした。

本発明の5,6-イソプロピリデンアセチルエステル結合型ビタミンCE誘導体も、安定した抗酸化力を持つ事が確認され、酵素分解に置ける従来の問題点も持たない事から、化粧品、医薬品、食品添加物、飼料添加物として利用することが可能である。

さらに、5,6-イソプロピリデンビタミンCと、ハロゲン化アセチル化合物を、前記化合物をDMSO, THF,  $CH_2Cl_2$ , DMFから選択される極性の高い溶剤の一種以上の溶媒に溶解し、 $t-BuOK$ , ピリジン,  $KHCO_3$ ,  $K_2CO_3$ ,  $Na_2CO_3$ ,  $NaHCO_3$ ,  $CsCO_3$ から選ばれる一種以上の塩基の存在下で反応させ、得られた5,6-イソプロピリデンアセチルエステル結合型ビタミンCE誘導体の5,6-イソプロピリデンを加水分解することにより本発明のアセチルエステル結合型ビタミンCE誘導体が見いだした。

ビタミンCの2, 3位の水酸基のpKaはそれぞれ4.2, 11.8であり、生体内では主としてモノアニオンとして存在している。ビタミンCの2位の水酸基は3位の水酸基よりも反応性が高く、ラジカルに2位の水酸基から電子または水素を供与してラジカルを速やかに安定化し、自身はモノアニオンラジカルビタミン $CH\cdot$ となる。モノアニオンラジカルは二分子不均化反応によりモノアニオンとデヒドロビタミンCになる。

2位と3位が保護されていないビタミンCは2位と3位の両方でラジカルを補足することが可能である(非特許文献19)。2位のビタミンCラジカルは酸素と反応しやすく、ス-パ-オキシドを発生する反応系が知られており(非特許文献20)、生体中のpHでは、2位のビタミンCラジカルは、3位のビタミンCラジカルに比較しより酸化反応を促進する可能性が高いと考えられる。ビタミンC-2-Gluの方がよりチミン分解抑制効果が高くなると推定される。ビタミンCリン酸塩(ビタミンC-2-P)など多くのビタミンC誘導体は2位のみが保護され、3位には還元性のO-が残っているために、酵素的加水分解によるビタミンCへの変換がなくともスカベンジャーとしての効果を発揮できると考えられる。さらにビタミンC-2-リン酸のようなビタミンC誘導体は、2位がエステル修飾されることにより酸化反応を誘

10

20

30

40

50

導するビタミンCの欠点（自らがプロオキシダントとなり酸化反応を促進する）を補ってくれる。また、生体内では本誘導体は酵素分解を受けて徐々にビタミンCに変換され、生体内においてビタミンCの除放性能を持つためビタミンCのような投与時の高濃度化を避けることができることも大きなメリットのひとつである。ちなみに、ビタミンC-2-グルコシドはヒト血清中で酵素的加水分解を受けにくい性質を持っている。

#### 【0018】

[非特許文献18] Swinnen I. and Goossens A., Contact Dermatitis, 64, 237~244 (2011)

[非特許文献19] Farhataziz Ross A. B., Selected Specific rates of reactions of transients from Water in Aqueous Solutions. III. Hydroxyl Radical and Peroxyhydroxy Radical and Their Radical Ions. NSRDS-NBS 59 Washington (1977)

[非特許文献20] Antunes F., Salvador A. et al., Free Radic. Biol Med. 21 (7), 917~943 (1996)

従って、安定性の良好な2位のアセチルエステル結合型ビタミンCE誘導体だけを得る為には、2位のアセチルエステル結合型ビタミンCE誘導体を効率的に生産できる反応系が必要である。又は、2位と3位の混合アセチルエステル結合型ビタミンCE誘導体の中から2位だけの誘導体を効率的に選択分種しなければならない。

従来の、ビタミンCE誘導体の合成方法では、2位と3位の混合ビタミンCE誘導体の中から2位だけの誘導体を得る為にクロマト分離などの方法を用いて分離していたため製造が煩雑で効率が悪かった。又、2位の誘導体を得る合成反応も多数存在していたがいずれも収率が悪く問題があった。

そこで、本発明者らは多くの検討を重ねた結果、5,6-イソプロピリデンビタミンCと、ハロゲン化アセチル化合物を、ジメチルスルホキシド (DMSO)、ジメチルホルムアミド (DMF) THF、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ などの極性の高い溶媒に溶解し、塩基として $\text{KHCO}_3$ の存在下で反応させる製造工程を含む、5,6-イソプロピリデンビタミンCの3位の炭素位置のみが高収率でアセチル化合物で修飾されたビタミンCアセチルトコフェリルジエステル誘導体の製造方法を見いだした。

5,6-イソプロピリデンビタミンCと、ハロゲン化アセチル化合物を、前記化合物を以下ジメチルスルホキシド (DMSO)、ジメチルホルムアミド (DMF) THF、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ などの極性の高い溶媒から選択される一種以上の溶媒に溶解し、塩基として $t\text{-BuOK}$ の存在下で反応させる製造工程を含む、5,6-イソプロピリデンビタミンCの2位の炭素位置のみが高収率でアセチル化合物で修飾されたビタミンCアセチルトコフェリルジエステル誘導体の製造方法を見いだした。

既存のラジカル疾患治療薬は製剤化中での安定性に問題があり、特に患部に到達する前に他の臓器で反応、失活してしまうためデリバリーシステム上の問題があった。また、上記の他の医薬品成分は体内に投与すると頭痛、吐気、嘔吐、食欲不振、悪心、発疹、筋痙攣等の副作用を伴うという問題があった。

#### 【発明の実施の態様】

#### 【0019】

本発明は、以下の項目から構成される。

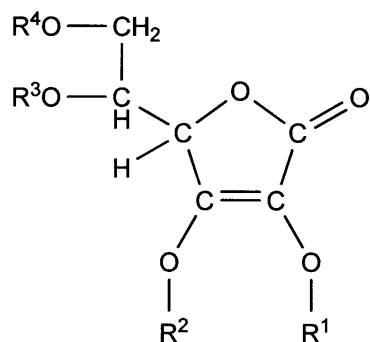
#### (1)

下記の一般式[化1]又は[化2]で表されることを特徴とする $(\text{R}^5-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-)$ のアセチルエステル構造を持つ化合物又はその薬理学的に許容できる塩。式中、 $\text{R}^1 \text{R}^2$ は、H、又は $\text{R}^5-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-$ であり、ここで $\text{R}^5$ は、炭化水素、溶媒可溶性炭化水素、ベンゼン環、クロマン環、ベンゾピラン、ビタミンE及びそれらの塩であり、 $(\text{R}^5-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-)$ 構造中の $\text{R}^5$ が $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-$ と結合する $\text{R}^5$ 側の原子は酸素ではない。但し、 $\text{R}^1 \text{R}^2$ は同時にHではない。さらに、 $\text{R}^3 \text{R}^4$ は、同時にHか、又は $\text{R}^3 \text{R}^4$ は同時に一つのイソピリデン基を構成する炭化水素である。尚、 $\text{R}^5$ がビタミンEの場合、ビタミンEのクロマン環の6位の炭素が、[化3]の通り $(\text{R}^5-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-)$ の $\text{R}^5$ と接触する酸素と結合する。

R<sup>6</sup> は、

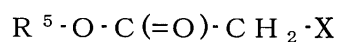
-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(-CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(-CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(-CH<sub>3</sub>)-CH<sub>3</sub> 又は、 -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH=C(-CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH=C(-CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH=C(-CH<sub>3</sub>)-CH<sub>3</sub> のいずれかである。

【化 1】



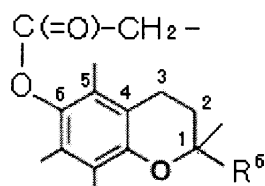
10

【化 2】



式中、Xはハロゲン。

【化 3】



20

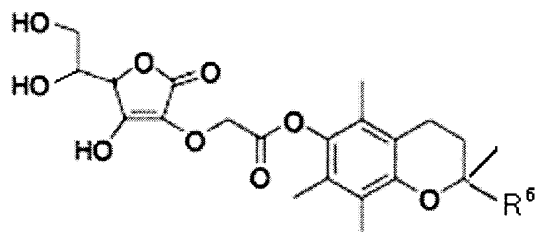
( 2 )

下記的一般式【化 4】ビタミンC-3-アセチルエステルビタミンE、【化 5】ビタミンC-2-アセチルエステルビタミンEから選択される 1 種又は 2 種以上の混合物である ( 1 ) の化合物。【化 4】及び【化 5】において R<sup>6</sup> は、

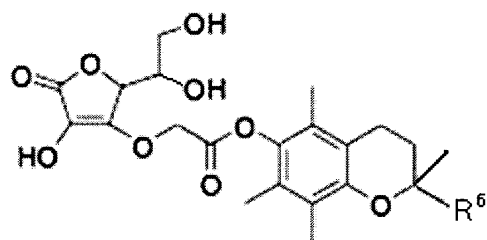
-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(-CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(-CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH(-CH<sub>3</sub>)-CH<sub>3</sub> 又は、 -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH=C(-CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH=C(-CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH=C(-CH<sub>3</sub>)-CH<sub>3</sub> のいずれかである。

30

【化 4】



【化 5】



40

( 3 )

ハロゲンアセチルビタミンEと5,6-イソプロピリデンビタミンCを、DMSO、THF、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、DMFの 4 種の溶媒から選択される一種以上の単独又は混合溶媒に溶解し、t-BuOK、ピリ

50

ジン、 $\text{KHCO}_3$ 、 $\text{K}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{NaHCO}_3$ 、 $\text{CsCO}_3$ の7種の物質から選ばれる一種以上の単独又は混合塩基の存在下で反応させた後、5,6-イソプロピリデンアセチルエステル結合型ビタミンC誘導体の5,6-イソプロピリデンを加水分解する工程を有することを特徴とする(2)の化合物の製造方法。ここで、DMSOはジメチルスルホキシド、DMFは、ジメチルホルムアミド、THFはテトラヒドロフラン、t-BuOKはカリウムターシャリーブトキシドである。

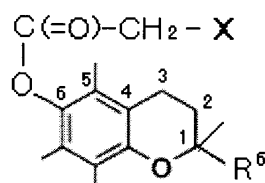
(4)

以下構造式[化6]で示されるハロゲンアセチルビタミンEから選択される一種又は2種以上の混合物である(1)の化合物。[化6]でXは、ハロゲン原子を表す。

R<sup>6</sup>は、

$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(-\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(-\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(-\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 又は、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}(-\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}(-\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}(-\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ のいずれかである。

【化6】



(5)

ビタミンEを可溶化溶媒に溶解し、アルカリ触媒、酸触媒及び相間移動触媒から選択される一種以上の単独又は混合触媒とハロゲン化アセチルを加えて反応させる製造工程を含む(4)の化合物の合成法。

(6)

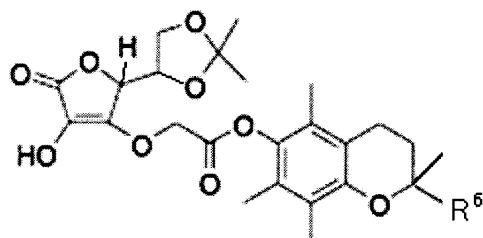
下記の一般式[化7]で示される化合物から選択される1種または2種以上の混合物である5,6-イソプロピリデン-ビタミンC-3-アセチルエステルビタミンEである(1)の化合物。

R<sup>6</sup>は、

$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(-\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(-\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(-\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 又は、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}(-\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}(-\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}(-\text{CH}_3)-\text{CH}_3$

のいずれかである。

【化7】



(7)

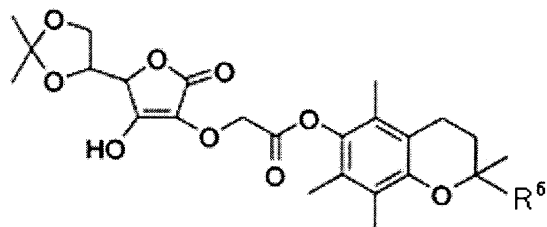
5,6-イソプロピリデン-ビタミンCと、ハロゲン化アセチル化合物を、前記化合物をDMFの溶媒に溶解し、塩基として炭酸水素カリウムの存在下で反応させる製造工程を含む、(6)の5,6-イソプロピリデン-ビタミンC-3-アセチルエステルビタミンEの製造方法。

(8)

下記の一般式[化8]で示される化合物から選択される1種または2種以上の混合物であることを特徴とする(R<sup>5</sup>-C(=O)-CH<sub>2</sub>-)構造を有するイソプロピリデンビタミンC-2-アセチルエステルビタミンEである(1)の化合物。このときR<sup>6</sup>は、

$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(-\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(-\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(-\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 又は、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}(-\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}(-\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}(-\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ のいずれかである。

## 【化 8】



( 9 )

5,6-イソプロピリデンアスコルビン酸と、ハロゲノアセチルエステルビタミンEをDMSO、THF、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、DMFから選択される一種以上の単独又は混合溶媒に溶解し、塩基としてt-BuOKの存在下で反応させる製造工程を含む、( 8 )の5,6-イソピリデンビタミンC-2-アセチルエステルビタミンEの製造方法。

10

( 1 0 )

( 1 )記載の化合物を配合したことを特徴とする外用組成物。

( 1 1 )

( 1 )記載の化合物を配合したことを特徴とする経口用組成物。

( 1 2 )

( 1 )記載の化合物を配合したことを特徴とするラジカル疾患治療薬。

( 1 3 )

( 1 )記載の化合物を配合したことを特徴とする細胞培養組成物。

20

( 1 4 )

( 1 )記載の化合物を配合したことを特徴とする抗ストレス用組成物。

( 1 5 )

( 1 )記載の化合物を配合したことを特徴とする液晶乳化組成物。

( 1 6 )

( 1 ) 記載の化合物から選択される一種以上の単独又は複合化合物と以下のグループAから選択される一種以上の単独又は混合化合物とグループBから選択される一種以上の単独又は混合化合物と以下のグループCから選択される一種以上の単独又は混合化合物とグループDから選択される一種以上の単独又は混合化合物を同時に含有する液晶乳化組成物。

30

( 界面活性剤:グループA )

ココイルグルタミン酸Na、ココイルグルタミン酸K、ココイルグルタミン酸Na、ココイルグルタミン酸TEA、ココイルグルタミン酸TEA、ラウロイルアスパラギン酸Na、ラウロイルグルタミン酸Na、ミリストイルグルタミン酸Na、パーム脂肪酸グルタミン酸Na、フォスファチジルコリン、リン脂質及びこれらの塩類

( 水溶性物質:グループB )

グリセリン、ジグリセリン、トリグリセリン、ポリグリセリン、メチルブタンジオール、ブチレングリコール、イソブレングリコール、ポリエチレングリコール、ペンタンジオール、ヘキサンジオール、プロピレングリコール、ジプロピレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール、ジエチレングリコール、ネオペンチルグリコール、ポリエチレングリコール、ソルビトール、キシリトール、ピロリドンカルボンナトリウム、ヒアルロン酸、カラギーナン、アルギン酸、寒天、フコイダン、ペクチン、ローカストビーンガム、キサンタンガム、トラガントガム、グアーガム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、アクリル酸・メタクリル酸共重合体、ポリグルタミン酸。

40

( 脂質:グループC )

ミネラル油、スクワラン、スクワレン、パルミチン酸イソプロピル、ミリスチン酸イソプロピル、ミリスチン酸イソオクチル、ミリスチン酸イソトリデシル、ミリスチン酸オクタデシル、ミリスチン酸オクチルドデシル、イソステアリルコレステリルエステル、2-エチルヘキサン酸トリグリセリド、2-エチルヘキサン酸セチル、パーム油、ヒマワリ油、オ

50



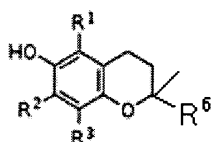
することができる。以下に本発明で利用できるトコフェロールとトコトリエノールの構造を示す。

本発明のアセチルエステル構造を持つ化合物の合成に使用可能なビタミンEの塩とは、ビタミンEの持つHO-のHがナトリウム塩やカリウム塩などのアルカリ金属塩およびカルシウム塩やマグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩に置き換わったものであり、上記以外のアンモニウム塩などの塩であっても薬理的に許容できる塩であればいずれのものであってもよい。さらに、本発明の合成に利用できるビタミンEは、旋光性が異なる d型 (dextro-rotatory = 右旋性 (+))、及びl型 (levo-rotatory = 左旋性 (-)) のどちらも使用できる。加えて、グリセルアルデヒドに対応させることで名づけるD/L 表記法のD型及びL型のいずれの立体異性体も使用できる。更にそれらの混合物であるラセミ混合物 (rac-として表記) やDL型 (DL-として表記) も本発明の製造原料として使用することができる。

10

【 0 0 2 1 】

【 化 9 】



ビタミンE

20

上記ビタミンEのR<sub>6</sub>が  
 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(-\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(-\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(-\text{CH}_3)-\text{CH}_3$   
 であるとき、トコフェロールの構造を示す。また、R<sub>6</sub>が又は、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}(-\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}(-\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}(-\text{CH}_3)-\text{CH}_3$   
 であるとき、トコトリエノールの構造を示す。以下、同様な式でR<sub>6</sub>をビタミンEを構成する炭化水素と称するが、具体的には、R<sub>6</sub>は、  
 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(-\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(-\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(-\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 又は、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}(-\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}(-\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}(-\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ のいずれかである。

上記トコフェロール及びトコトリエノールの構造式において、R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>は、その、  
 、 の各タイプにより次の化学構造を有する。即ち、型：R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>、R<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub>、R<sub>3</sub>=CH<sub>3</sub>  
 。 型：R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>、R<sub>2</sub>=H、R<sub>3</sub>=CH<sub>3</sub>。 型：R<sub>1</sub>=H、R<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub>、R<sub>3</sub>=CH<sub>3</sub>。

30

型：R<sub>1</sub>=H、R<sub>2</sub>=H、R<sub>3</sub>=CH<sub>3</sub>である。

本発明のビタミンCとは、L-アスコルビン酸とD-アスコルビン酸であるが、生物活性の問題からL-アスコルビン酸が望ましい。

【 0 0 2 2 】

本発明のアセチルエステル構造を持つ化合物に使用できるビタミンEは、上記に記載された全てのビタミンEを使用することができる。本発明に使用できるビタミンEの例として具体的には、トコフェロール及びトコトリエノールであり、それぞれについて の4種の全てが使用できる。即ち、D- トコフェロール、D- トコフェロール、D- トコフェロール、D- トコフェロール、D- トコトリエノール、D- トコトリエノール、D- トコトリエノール、D- トコトリエノール、L- トコフェロール、L- トコフェロール、L- トコトリエノール、L- トコトリエノール、L- トコトリエノール、L- トコトリエノール、及びこれらの混合タイプである、DL- トコフェロール、DL- トコフェロール、DL- トコフェロール、DL- トコフェロール、DL- トコトリエノール、DL- トコトリエノール、DL- トコトリエノール、DL- トコトリエノールであり、これらの中から選択される1種又は2種以上の混合物でもよい。

40

【 0 0 2 3 】

本発明の薬理的に許容できる塩としては、たとえばナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩およびカルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、アンモニウム塩が例示される。これら以外の塩であっても薬理的に許容できる塩であればいず

50

れのものであっても適宜に使用することができる。

【 0 0 2 4 】

本発明のアセチルエステル構造を持つ化合物は、例えば次の合成法により、またはこれに準じて適宜合成することができる。

本発明の製造方法を以下に記載するが、ビタミンCの5,6位の水酸基の保護基としては、以下のイソプロピリデン基に限定されず、例えばベンジリデン基などのアシル基でも可能であるが、イソプロピリデン基が一般的である。これらの保護基は、反応液を酸性とすることにより容易に離脱させることができる。酸性とすることにあたっては、例えば塩酸、リン酸、硫酸などの無機酸または酢酸、クエン酸などの有機酸などの一般的な酸性化合物を用いることができる。

10

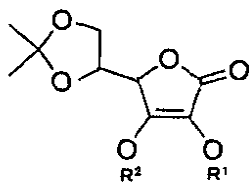
【 0 0 2 5 】

窒素雰囲気化、L ( + ) - ビタミンCをアセトンなどビタミンCを溶媒重量に対して10 %重量以上の溶解可能な溶媒に溶解し、塩化アセチルなどのハロゲン化アセチル化合物を加えて室温で3時間攪拌する。その後固体をろ別し、得られた固体をアセトンなどビタミンCを溶媒重量に対して10 %重量以上の溶解可能な溶媒で洗浄後、乾燥させ白色個体である以下化学式8の5, 6 - イソプロピリデンビタミンCを得た(ここで $R^1 R^2$ は、同時にHである)。

さらに、請求項1記載の $R^3 R^4$ が、同時に一つのイソピリデン基を構成するとは以下の化学式8に示される(ここで $R^1 R^2$ は、同時にHでない。 )。

【 化 1 0 】

20



【 0 0 2 6 】

窒素雰囲気などの無酸素状態で、ビタミンEを塩化メチレンなど5 %重量以上溶解できる溶媒に溶解し、ピリジンなどのアルカリ触媒、酸触媒及び相間移動触媒とプロモアセチルプロミドなどのハロゲン化アセチルを加えて室温で攪拌する。反応終了後、クロロホルムや酢酸エチルなどを加えて薄め、有機層を水と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、硫酸ナトリウムをろ過などで除去する。無水硫酸ナトリウムで乾燥しないで抽出溶媒を留去した残渣に1-プロパノールまたは1-プロパノールと前記のn-ヘキサン、シクロヘキサン、石油エーテルなどの1種以上の有機溶媒との混液を添加し、本化合物を結晶化後に溶媒を留去し、得られた残留物をカラムクロマトグラフィ-などで精製し[化6]で示されるハロゲン化ビタミンEアセチルモノエステルを油状物として得ることができる。ハロゲン化アセチルがプロモアセチルプロミドを使用して反応させた場合は、[化6]のXは、Br ( 臭素 ) となる。

30

ビタミンC-3-アセチルエステルビタミンEの製造方法は以下の通りである。5,6-イソプロピリデンビタミンCとハロゲン化ビタミンEアセチルモノエステルをジメチルスルホキシド(DMSO、Dimethyl sulfoxide)、ジメチルホルムアミド(DMF、N,N-dimethylformamide)、テトラヒドロフラン(THF、tetrahydrofuran、Oxolane)、 $CH_2Cl_2$ などの極性の高い溶剤に溶解し、炭酸水素カリウム、炭酸ナトリウムや炭酸カリウムなどの炭酸アルカリ化合物を加えて攪拌し、この反応混合物に水を加え、クロロホルムや酢酸エチルなどを加えて薄め、有機層を水と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、硫酸ナトリウムをろ過などで除去する。無水硫酸ナトリウムで乾燥しないで抽出溶媒を留去した残渣に1-プロパノールまたは1-プロパノールと前記のn-ヘキサン、シクロヘキサン、石油エーテルなどの1種以上の有機溶媒との混液を添加し、本化合物を結晶化させてもよい。得られた残留物をカラムクロマトグラフィ-などで精製し以下[化11]で示される5,6-イソプロピリデンビタミンC-3-アセチルエステルビタミンEを固体として得ることができる。

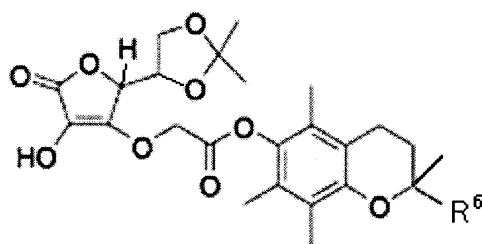
40

50



このとき  $R^6$  は、ビタミンEを構成する炭化水素である。

【化 1 1】



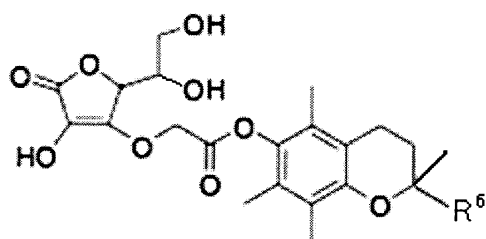
10

5,6-イソプロピリデンビタミンC-3-アセチルエステルビタミンEをメタノールなどの適当な溶媒に溶解し、塩酸などの前記記載の一般的な酸性化合物を加えて加温して反応撹拌する。その後ろ過し固体を集め、クロロホルムや酢酸エチルなどを加えて薄め、有機層を水と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、硫酸ナトリウムをろ過などで除去する。無水硫酸ナトリウムで乾燥しないで抽出溶媒を留去した残渣に1-プロパノールまたは1-プロパノールと前記のn-ヘキサン、シクロヘキサン、石油エテルなどの1種以上の有機溶媒との混液を添加し、本化合物を結晶化させてもよい。

溶媒を留去し、ろ過によって集めた固体とあわせ、得られた残留物をカラムクロマトグラフィ-などで精製しビタミンC-3-アセチルエステルビタミンEを固体として得ることができる。このとき  $R^6$  は、ビタミンEを構成する炭化水素である。

20

【化 1 2】



【0 0 2 7】

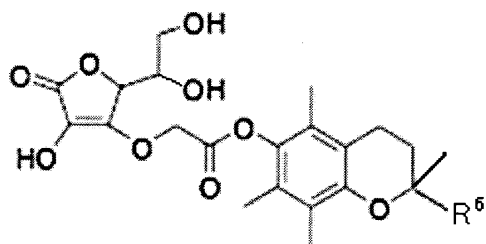
本発明のビタミンC-2-アセチルエステルビタミンEの製造方法は以下の通りである。低酸素状態で、t-BuOK (カリウムターシャリーブトキシド、potassium tert-butoxide、potassium 2-methylpropan-2-olate) をDMSO、DMF、THF、 $CH_2Cl_2$ などの極性の高い溶剤から選ばれる1種以上の溶媒に懸濁させて冷却し、5,6-イソプロピリデンビタミンCを溶解させた前記極性の高い溶媒を滴下した。その後、ハロゲン化ビタミンEアセチルモノエステルの前記極性の高い溶媒を加えて撹拌する。HClなどの前記記載の一般的な酸性化合物と水を加え、クロロホルムや酢酸エチルなどを加えて薄め、有機層を水と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、硫酸ナトリウムをろ過などで除去する。無水硫酸ナトリウムで乾燥しないで抽出溶媒を留去した残渣に1-プロパノールまたは1-プロパノールと前記のn-ヘキサン、シクロヘキサン、石油エテルなどの1種以上の有機溶媒との混液を添加し、本化合物を結晶化させてもよい。

30

ろ過後に溶媒を留去し、得られた残留物をカラムクロマトグラフィ-などで精製し5,6-イソプロピリデンビタミンC-2-アセチルエステルビタミンEを個体として得ることができる。このとき  $R^6$  は、ビタミンEを構成する炭化水素である。

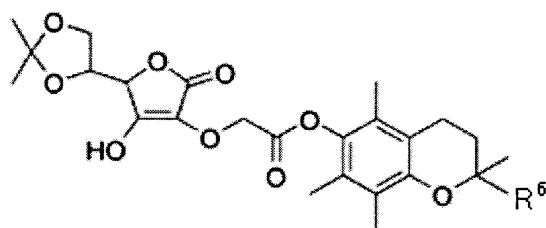
40

## 【化 1 3】



5,6-イソプロピリデンビタミンC-2-アセチルエステルビタミンEをアルコールなどの適当な溶媒に溶解し、HClなどの前記記載の一般的な酸性化合物を加えて攪拌反応させる。反応混合物に水を加えクロロホルムや酢酸エチルなどを加えて薄め、有機層を水と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、硫酸ナトリウムをろ過などで除去する。無水硫酸ナトリウムで乾燥しないで抽出溶媒を留去した残渣に1-プロパノールまたは1-プロパノールと前記のn-ヘキサン、シクロヘキサン、石油エーテルなどの1種以上の有機溶媒との混液を添加し、本化合物を結晶化させてもよい。乾燥剤をろ過した後に溶媒を留去し、得られた残留物をカラムクロマトグラフィなどで精製しL-ビタミンC-2-アセチルエステルビタミンEを個体として得ることができる。このときR<sup>6</sup>は、ビタミンEを構成する炭化水素である。

## 【化 1 4】



## 【0028】

このようにして得られた本化合物は、公知の方法により、薬理学的に許容できる塩として得てもよい。塩への変換は、一旦反応液から単離した後に行ってもよく、反応液から単離することなく行ってもよい。

## 【0029】

本化合物は、ラジカル消去作用、活性酸素消去作用、抗炎症作用、抗アクネ作用を有しているので紫外線による炎症である紅斑抑制、紫外線による日焼け防止方法、美肌や美白（しみ、そばかすなどの原因であるメラニン色素の沈着防止など）および抗シワを目的とし、さらにコラーゲン産生作用を有するため創傷治癒剤やその他の化粧品成分の安定化（抗酸化）を目的として、クリーム剤、ロション剤や化粧水などの化粧品や医薬品に適宜添加することができる。

## 【0030】

さらに、本発明の化合物を含む医薬品や医薬部外品、化粧品、飼料添加物、食品添加物、抗酸化剤の処方には必要に応じて以下の成分を同時配合することができる。それらの成分としては、例えば、ニコチン酸、ニコチン酸アミド、ニコチン酸ベンジル等のニコチン酸類、レチノール、酢酸レチノール、ビタミンA油等のビタミンA類、リボフラビン、酢酸リボフラビン、フラビンアデニンジヌクレオチド等のビタミンB2類、塩酸ピリドキシン、ピリドキシンジオクタノエーテル等のビタミンB6類、L-ビタミンC、L-ビタミンC-2-硫酸ナトリウム、L-ビタミンCジパルミチン酸エステル等のビタミンC類、パントテン酸カルシウム、パントテニルエチルエーテル、D-パントテニルアルコール、アセチルパントテニルエチルエーテル等のパントテン酸類、コレカルシフェロール、エルゴカルシフェロール等のビタミンD類、α-トコフェロール、酢酸トコフェロール、ニコチン酸d1-α-トコフェロール、コハク酸d1-α-トコフェロール等のビタミンE類、

その他のビタミン類；グリシン、アラニン、フェニルアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニン、アスパラギン、アスパラギン酸、アスパラギン酸塩、グルタミン、グルタミン酸、グルタミン酸塩、リジン、メチオニン、システイン、シスチン、アルギニン、ヒスチジン、トリプトファン、プロリン、ヒドロキシプロリン等のアミノ酸、N - ヤシ油脂肪酸 - L - グルタミン酸ナトリウム、N - パルミトイル - L - アスパラギン酸ジェチル等のN - アシル酸性アミノ酸塩、ラウロイルメチル - アラニンナトリウム、ヤシ油脂肪酸サルコシントリエタノールアミン等のアシル中性アミノ酸塩、ピロリドンカルボン酸及びその塩、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油モノピログルタミン酸モノイソステアリン酸ジエステル、ヤシ油脂肪酸 - L - アルギニンエチルエステル - d 1 - ピロリドンカルボン酸塩等のアミノ酸誘導体、米ぬか油、落花生油、バ - ム油、牛脂、アボガド脂、ホホバ脂、ラノリン、流動パラフィン、スクワラン、カルナウバロウ、イソステアリルアルコール、パルミチン酸イソステアリル、トリ - 2 - エチルヘキサン酸グリセロール等の油類、グリセリン、ソルビトール、マンニトール、1, 3 - プチレングリコール等の多価アルコール、ポリエチレングリコール等の多価アルコールエーテル、コラ - ゲン、ヒアルロン酸ナトリウム、コンドロイチン硫酸ナトリウム、デキストラン硫酸ナトリウム等の粘性多糖類、パラヒドロキシアニソール、エリソルビン酸ナトリウム等の酸化防止剤、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース等のセルロース誘導体、ステアリル硫酸ナトリウム、セチル硫酸ジエタノールアミン、セチルトリメチルアンモニウムサッカリン、イソステアリン酸ポリエチレングリコール、ジグリセリルジイソステアレート、リン脂質等の界面活性剤、エチルパラベン、プロピルパラベン、ブチルパラベン等の保存剤、ヒノキチオール、サリチル酸誘導体、グリチルリチン酸誘導体、グリチルレチン酸誘導体、アラントイン、酸化亜鉛等の消炎剤、その他pH調節剤、緩衝剤、香料および着色剤等が挙げられる。

#### 【0031】

さらに、本発明の化合物を含む医薬品や医薬部外品、化粧品、飼料添加物、食品添加物、抗酸化剤の処方には必要に応じて以下の成分を同時配合することができる。ナトリウムL - ビタミンC - 2 - リン酸、マグネシウムL - ビタミンC - 2 - リン酸、L - ビタミンC - 2 - グルコシド、ナトリウムL - ビタミンC - 2 - リン酸 - 6 - パルミチン酸、ナトリウムL - ビタミンC - 2 - リン酸 - 6 - イソパルミチン酸、L - ビタミンC - 2, 3, 5, 6 - テトラヘキシルデカン酸、L - ビタミンC - 3 - エチル、ビタミンC - 3 - グルコシド、ナトリウムトコフェリルリン酸、ナトリウムトコフェリルジメチルグリシン、レチノイン酸トコフェリルから選択される一種以上の化合物を同時に含有することができる。

#### 【0032】

本発明の化合物は、以下の疾患に効果のある医薬品や医薬部外品、化粧品に使用することができる。ラジカル疾患、成人病、脳梗塞、心筋梗塞、循環器障害、鎮痛効果、炎症、壊死、糖尿病、色素沈着症、ニキビ、脂漏症、しわ、たるみ、肥満、むくみ、脱毛、毛穴拡大、肌荒れ、創傷、成長障害、ストレス。

上記ラジカル疾患の具体例としては、皮膚の老化、色素沈着、皴、癌、脂漏症、日焼け、癌、アクネ、やけど、皮膚のたるみ、肥満、脱毛、ストレス、精神病、痴呆症、パーキンソン病、HIV、風邪、インフルエンザ、感染症、心筋梗塞、虚血性心疾患、心不全、狭心症、不整脈、動脈硬化症、肝臓脂質代謝障害、高脂血症、本態性高血圧、高血圧症、動脈硬化症、冠動脈硬化症、血栓症、閉塞性動脈硬化症、血管障害、抹消血管障害、胆汁うつ滞症、高コレステロール血症、脾障害、臓器不全、急性慢性肝炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、潰瘍性大腸炎、消化器障害胆嚢症、糖尿病、関節炎治療剤、リュウマチ、肝不全、肝障害、虚血性肝障害、肝臓脂質代謝障害、胆嚢障害、臓器移植障害、糖尿病、中毒症、臓器移植障害、虚血性再灌流障害、虚血性疾患である。

これらのラジカル疾患が、ラジカルに起因又はその原因因子の一つが生体内ラジカルであることは、(非特許文献21)及び(非特許文献22)に引用された文献等により既知である。即ち、本発明の化合物が生体内でラジカルを消去することのできるビタミンCやトコフェロールに変換される為にこれらの疾患に対して効果を発揮すると考えられる。

## 【 0 0 3 3 】

【非特許文献 2 1】「活性酸素と病態」井上編、学会出版センタ - 、 1 9 9 2 及び「抗酸化物質」二木他編、学会出版センタ - 、 1 9 9 4

【非特許文献 2 2】「現代医療」v o l . 2 5 , N o . 1 0 , 1 9 9 3

## 【 0 0 3 4 】

本発明に関わるラジカル疾患の具体例としては、以下の疾患も含まれる。即ち、本発明のレドックス制御組成物の薬の対象となるラジカル疾患には、組織を交換するために行われる臓器移植時の臓器不全及び組織障害がある。即ち、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、胆嚢、胸腺、胃、肺、腸、皮膚等の臓器移植手術、冠動脈再疎通術等の血管及びそのバイパス手術及び以下に記載する疾病や事象により細胞や組織に流入する血流が停止または遅滞することに伴う臓器障害及びこれらの血流停止後の再灌流時又はその後に発生する細胞や組織の損傷、弊死や臓器不全に対する障害などを挙げることができ、これらの疾患にも本発明は、効果がある。また、本発明は、血管の血栓症、貧血症、阻血症、血管硬化症、血管収縮症、出血（O B A Y A S H I , P R O C . S O C . E X P . B I O L . W E D . , 1 9 6 6 , 1 9 6 , 1 6 4 - 1 6 9 , 1 9 9 0）等起因する血流速度の物理的低下や停止に伴う細胞や組織の損傷、弊死や血管を含む臓器の疾患及び不全などが挙げられ、これらにも効果がある。本発明のレドックス制御組成物は、血管内の酸素圧低下等起因する酸欠及び農薬や一酸化炭素中毒症等の化学物質による細胞又は組織の酸欠障害組織の一時的酸欠等も含むことができ、この後の輸血等の適当な処置又は事象により血流が再び正常又はそれに近い状態で細胞や組織に送り込まれたときに見出される細胞や組織の損傷、弊死や血管を含む臓器の疾患及び不全などを挙げることができ、これらにも効果がある。本発明のレドックス制御組成物は、虚血性再灌流疾患類にも効果があり、その例としては、虚血再灌流心筋障害（N A R I T A , W . J , J . L A B . C L I N . M E D . , 1 1 0 , 1 5 3 - 1 5 8 , 1 9 8 7、S m i t h , L . L . P h i l . T r a n s . R . S o c . L o n d . , 3 1 1 , 6 4 7 - 6 5 7 , 1 9 8 5）、虚血再灌流肝臓障害（I N O U E , M , I N M U C O S A L I M M U N O L O G Y , 5 2 7 - 5 3 0 , E L S E V I E R , A M S T E R D A M , 1 9 9 0、中浜、肝臓, 3 2 : 1 1 1 0 - 1 1 2 3 , 1 9 9 1、竹川、肝臓, 3 0 : 4 5 9 - 4 6 7 , 1 9 8 9、白杉、日消外会誌、2 6 : 3 5 8 , 1 9 9 3）虚血再灌流腎臓障害、虚血再灌流脾臓障害（I S A J I , S . : M I E M E D . J . , 3 5 : 1 0 9 - 1 2 3 , 1 9 8 5）、虚血再灌流胆嚢障害（T A O K A , G A S T R O E N T . J P N . , 2 6 : 6 3 3 - 6 4 4 , 1 9 9 1）、虚血再灌流循環器障害、虚血再灌流消化器障害（岩井、日消会誌, 8 7 : 1 6 6 2 - 1 6 6 9 , 1 9 9 0、N A I T O , Y . , F R E E R E D . R E S . C O M M S . , 1 6 : 1 3 . 5 , 1 9 9 2）、虚血再灌流筋障害、虚血再灌流血管障害、虚血再灌流眼障害等の虚血再灌流皮膚障害などにも効果がある。本発明のレドックス制御組成物は、活性酸素により誘発する以下のような各種障害にも効果がある。その具体例としては、ベ - チェット病、放射線障害、抗ガン剤の副作用、細菌性ショック、悪液質、自己免疫疾患、火傷、ヘルペスウイルス、成人 T 細胞白血病、チオレドキシン症候群、外傷性ショック、菌萎縮性側索硬化症、無性心筋梗塞等である。さらに、本発明は、ヒト表皮角化細胞用無血清培地に添加してヒト表皮角化細胞を増殖させるための、又は、やけど、創傷若しくはアザの治療のための、前記記載のヒト表皮角化細胞増殖及び組織形成促進用組成物を含むものである。

本発明の医薬品が治療の対称とするラジカル疾患には、以下の炎症が含まれる。これは、これらの炎症にはヌ - パ - オキシドアニオンなどのラジカルが発生しており、これらのラジカルを抑制することは炎症の抑制につながる為である。

本化発明の治療対象となる具体的炎症性疾患としては、痔疾、慢性関節リウマチ、変形性リウマチ、変形性脊椎症、変形性関節症、腰痛症、痛風症発作、急性中耳炎、膀胱炎、前立腺炎、歯痛、結膜炎、角膜炎、虹彩毛様体炎、葡萄膜炎、副鼻腔炎などが挙げられる。

## 【 0 0 3 5 】

本化合物は、医薬として、経口的にあるいは非経口的に適宜に使用される。製剤の形態と

10

20

30

40

50

しては、たとえば錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤等の固形製剤または注射剤や点眼剤等の液剤などいずれの形にも公知の方法により調製することができる。これらの製剤には通常用いられる賦形剤、結合剤、増粘剤、分散剤、再吸収促進剤、緩衝剤、界面活性剤、溶解補助剤、保存剤、乳化剤、等張化剤、安定化剤やpH調整剤等の各種添加剤を適宜使用してもよい。

本化合物の抗炎症剤には、本発明の目的に反しない限り、その他の抗炎症剤または別種の薬効成分を適宜含有させてもよい。

#### 【0036】

また、本発明の例えば、やけど、創傷又はアザ等に対する治療を特異目的として用いることができる。また、投与方法は非経口により行い、その投与形態としては、クリーム剤、軟膏、パップ剤、マスク剤等が挙げられる。

#### 【0037】

本発明の医薬品、医薬部外品、化粧品、動物用医薬品の具体的な形態の一つとして、組織吸収促進性医薬品、及び化粧品がある。これらの製品は、処方や製品に吸水性高分子組成物を含有し、長時間水分蒸発を抑制する物質が含まれる。これらの製剤は長時間水でぬれた状態を保持できるのでその間に水に溶解、分散した主成分を組織に浸透させ続けることができ、薬剤の組織への移行量を大幅に増加させることができる。このとき、ソニケーションやウルトラソニケーションデバイス、レザなどの光でパイスを用いて浸透性をより高めることができ、さらに、その水に塩などのイオン性物質がとけ込んでいると、電気を通すことにより、イオントフォoresisやエレクトロポレーションなどのデバイスを用いてより効果的に組織への薬剤浸透性を増加させることができる。

#### 【0038】

即ち、本発明の化合物を含む吸水性高分子組成物を含有する医薬品や医薬部外品、化粧品、飼料添加物、食品添加物、抗酸化剤の処方には必要に応じて以下の成分を同時配合することができる。本発明で用いられる水吸収性高分子は水分を吸収し保持する能力があれば特に特に限定されない。本発明に使用できる高分子としては、従来から化粧品や医療用に用いられていた高分子組成物として使用されてきたもののいずれも使用可能であり、例えば、ポリグリコール酸(PGA)、ポリ乳酸(PLA)、ポリ(α-ヒドロキシ酸)系高分子、ポリ(β-ヒドロキシ酪酸(PHB)、ポリ(α-ヒドロキシアルカノエ-ト)系高分子、ポリ(ε-カプロラク톤(PCL)、ポリ(α-ヒドロキシアルカノエ-ト)、ポリブチレンサクシネ-ト(PBS)、ポリエチレンサクシネ-ト(PES)、ポリアルキレンアルカノエ-ト、ポリエステル系高分子、ポリプロピレン系高分子、ポリアミド系高分子、ポリテトラフルオロエチレン系高分子、PGA-PLA系高分子、ポリジオキサノン系高分子、キチン・キトサン系高分子、エチレン-メタクリル酸共重合体アイオノマ-、エチレン-アクリル酸共重合体アイオノマ-、プロピレン-メタクリル酸共重合体アイオノマ-、プロピレン-アクリル酸共重合体アイオノマ-、ブチレン-アクリル酸共重合体アイオノマ-、エチレン-ビニルスルホン酸共重合体アイオノマ-、スチレン-メタクリル酸共重合体アイオノマ-、スルホン化ポリスチレンアイオノマ-、フッ素系アイオノマ-、テレケリックポリブタジエンアクリル酸アイオノマ-、スルホン化エチレン-プロピレン-ジエン共重合体アイオノマ-、水素化ポリペンタマ-アイオノマ-、ポリペンタマ-アイオノマ-、ポリ(ビニルピリジウム塩)アイオノマ-、ポリ(ビニルトリメチルアンモニウム塩)アイオノマ-、ポリ(ビニルベンジルホスホニウム塩)アイオノマ-、スチレン-ブタジエンアクリル酸共重合体アイオノマ-、ポリウレタンアイオノマ-、スルホン化スチレン-2-アクリルアミド-2-メチルプロパンサルフェイトアイオノマ-、酸-アミンアイオノマ-、脂肪族系アイオネン、芳香族系アイオネン、ポリエチレン-ポリアミドグラフト共重合体(PE-PA-GP)、ポリプロピレン-ポリアミドグラフト共重合体(PP-PA-GP)等が挙げられる。また、アルコキシ基、アミノ基、メルカプト基、ビニル基、エポキシ基、アセタ-ル基、マレイン酸基、オキサゾリン基及びカルボン酸基からなる群から選ばれる少なくとも1種の基を含み、メルトフロ-レートが1以上の低粘度の共重合体高分子が挙げられ、具体的には、メチルメタクリレ-ト-ブ

タジエン - スチレン樹脂、アクリロニトリル - ブタジエンゴム、EVA・PVC・グラフト共重合体、酢酸ビニル - エチレン共重合体樹脂、エチレン - オレフィン共重合体、プロピレン - オレフィン共重合体、水添スチレン - イソプロピレン - ブロック共重合体、ポリアミノ酸系高分子、ポリ糖鎖系高分子、ポリ核酸系高分子、ヒドロキシアパタイト系高分子、リン酸カルシウム系高分子、セルロース、ヒドロキシメチル及びヒドロキシプロピルセルロース、ヒアルロン酸、アルギン酸、ガム類、脂肪族ポリエステル系水吸収性樹脂、ポリグリコール酸(PGA)、ポリ乳酸(PLLA)等のポリ(ヒドロキシ酸)；ポリ(ヒドロキシ酪酸(PHB))等のポリ(ヒドロキシアルカノエート)；ポリ(カプロラクトン(PCL))等のポリ(ヒドロキシアルカノエート)；ポリブチレンサクシネート(PBS)、ポリエチレンサクシネート(PES)等のポリアルキレンアルカノエート等、ポリエチレンテレフタレート(PET)、ポリブチレンテレフタレート(PBT)、ポリエチレンナフタレート(PEN)、ポリエチレンテレフタレートの共重合体、ポリブチレンテレフタレートの共重合体、ポリエチレンナフタレートの共重合体等のポリエステル系樹脂；ナイロン系樹脂；スチレン系樹脂；ポリエチレン、ポリプロピレン等のポリオレフィン系樹脂が挙げられる。ポリエチレンには、極低密度ポリエチレン、低密度ポリエチレン、線状低密度ポリエチレン、中密度ポリエチレン、高密度ポリエチレンが含まれる。高分子の含有により、水吸収性高分子の脆さ等の実用上の問題が改善される。特にポリオレフィン系樹脂を含有させると、疎水的効果が得られ、水吸収性高分子の耐加水分解を向上させることができる。

10

#### 【0039】

20

本発明にはこれらの高分子を相溶化させるための相溶化剤を常法により含有させることもでき、その例としては、アイオノマ樹脂、オキサゾリン系相溶化剤、エラストマ系相溶化剤、反応性相溶化剤、及び共重合体系相溶化剤などがあるがこれに限定されない。相溶化剤の含有により、水吸収性高分子とそれ以外の高分子との相溶性が向上し、高分解性高分子の作用がより効果的になる。

#### 【0040】

これらの高分子組成物には必要によりイオンを配合することもできる。

例えば、 $Li^+$ 、 $Na^+$ 、 $K^+$ 等のアルカリ金属イオン、 $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Sr^{2+}$ 、 $Ba^{2+}$ 等のアルカリ土類金属イオン、 $Zn^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Co^{3+}$ 、 $Fe^{3+}$ 、 $Cr^{3+}$ 等の遷移金属イオンが用いられる。また、陽イオンホスト高分子に対しては、 $Cl^-$ 、 $Br^-$ 、 $I^-$ 等の陰イオンを配合することもできる。

30

#### 【0041】

本発明の高分子組成物には必要により反応性相溶化剤を添加することもでき、その具体例としては、二重結合、カルボキシル基、エポキシ基、イソシアネート基などを有する化合物(低分子化合物又は高分子)であって、成形加工工程で相溶化させようとする高分子の一方または両方と反応してグラフトまたはブロック構造に基づく界面活性剤的な働きをして相溶化剤として機能するものである(参考文献：「高分子ロイ」基礎と応用、高分子学会編、1993年発行)。本発明に使用できる反応性相溶化剤としては、例えば、エチレングリシジルメタクリレート共重合体(E-GMA；共重合重量組成、例えばE/GMA = 100/6 ~ 12)、エチレングリシジルメタクリレート - ビニルアルコール共重合体(E-GMA-VA；共重合重量組成、例えばE/GMA/VA = 100/3 ~ 12/8 ~ 5)、エチレングリシジルメタクリレート - メタクリレート共重合体(E-GMA-MA；共重合重量組成、例えばE/GMA/MA = 100/3 ~ 6/30)等が挙げられる。具体的には、住友化学製、ボンドファーストE、ボンドファースト2C；日本ポリオレフィン製、レクスパールRA、レクスパールET、レクスパールRC、エチレン無水マレイン酸エチルアクリレート共重合体(E-MAH-EA；住友化学製、ボンダイン)、エチレングリシジルメタクリレート - アクリロニトリルスチレン(EGMA-AS；共重合重量組成、例えばEGMA/AS = 70/30)、エチレングリシジルメタクリレート - ポリスチレン(EGMA-PS；共重合重量組成、例えばEGMA/PS = 70/30)

40

50

エチレングリシジルメタクリレ - ト - ポリメチルメタクリレ - ト ( E G M A - P M M A 、例えば E G M A / P M M A = 7 0 / 3 0 ) 、酸変性型ポリエチレンワックス ( A P E W ; 三井化学製、ハイワックス ) 、 C O O H 化ポリエチレングラフト高分子、 C O O H 化ポリプロピレングラフト高分子、イソシアネ - ト基を 5 ~ 3 0 % 重量含むポリイソシアネ - ト。具体的には、デグサ ( d e g u s s a ) 社製、 V E S T A N A T T 1 8 9 0 ) が挙げられる。これら反応性相溶化剤のうちの 1 種のみを用いてもよく、必要に応じて 2 種以上を混合して用いてもよい。

また、本発明の処方、製剤には市販の細菌除去用のメンブランフィルタ - のような直径 1 n m から 1 m m の細かな穴又は空間が存在する多孔質な構造をとることにより、より多くの抗炎症因子、フリ - ラジカル消去因子、細胞成長因子、抗感染症因子、組織形成誘導因子から選択される単体又はその複合物分子を取り込むことができるために有効である。本発明が繊維の場合は中空繊維構造のものがより多くの抗炎症因子、フリ - ラジカル消去因子、細胞成長因子、抗感染症因子、組織形成誘導因子から選択されるの単体又はその複合物分子を取り込むことができるために有効である。

#### 【 0 0 4 2 】

本発明の化合物には、次の増粘剤やフィルム形成材料を併用することもできる。例えば、カチオンポリマ - 、アニオンポリマ - 、ノニオンポリマ - 系の増粘剤を使用することもでき、カルシウムハイドライド、カルシウムサルフェ - ト、ポリビニルピロリドン ( P V P ) ( 平均分子量 = 4 0 , 0 0 0 ) 、ナトリウムポリメタクリレ - ト、 ( 平均分子量 = 6 0 0 0 ) 、ナトリウムポリメタクリレ - ト、 C M C ( カルボキシメチルセルロ - ス ) 、ヒドロキシプロピルメチルセルロ - ス、ヒドロキシエチルセルロ - ス、複合ヒドロキシプロピル、ヒドロキシプロピルセルロ - ス、ポリアクリル酸およびその誘導体、ポリアクリルアミドおよびその誘導体、カラギ - ナン、キサンタンガム、グア - ガム、カラヤガム、寒天、ロ - カストビ - ンガム、ペクチン、ガティガム、ポリエチレンイミン類、カラギ - ナン、複合カラギ - ナン、その他の天然ガム類がある。具体的商品名としては、例えば、ポリビニルアルコ - ルフィルム M O N O S O L ( ミネソタ州セントポ - ルのフラ - 株式会社 ) がある。

#### 【 0 0 4 3 】

これらの吸水性高分子には安定剤として無機塩類や有機酸などを添加することができ、それらの安定剤の例としては次のものがある。 Z n O 、 M g O 、 M n O 、 C a O 、水酸化カルシウム、酸化アルミニウム、水酸化アルミニウム、アルミニウム塩、酢酸亜鉛、グルカン、ゼラチン、第四級アンモニウム塩、エタノ - ルアミン類、アルギン酸、セチルトリメチルアンモニウムブロミド、アルギン酸カルシウム、酸化カルシウム、アルギン酸、アルギン酸 / 亜鉛、アルギン酸ナトリウム塩、昆布エキス、塩化亜鉛、水酸化カルシウム、酸化亜鉛、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、アルギン酸アンモニウムカルシウム、複合アルギン酸アンモニウムカルシウムなどである。

本発明にはこれらの吸水性高分子の粘度を変化させる架橋剤なども添加でき、その具体的例としては、は、 K y m e n e 5 ( デラウェア州ウィルミントンのハ - キュリ - ズ社から入手可能 ) などがある。

#### 【 0 0 4 4 】

本発明の化合物には、次の還元剤を品質保持剤として併用することもできる。例えば、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウムおよび亜ジチオン酸ナトリウム等の亜硫酸塩、チオ - ルを含むチオ - ル、アルコ - ル ( 例えば、 2 - メルカプトエタノ - ル、ジチオスレイト - ル及びジチオエリトリト - ル ) 、メルカプト酢酸、チオグリコ - ル酸ナトリウム、チオ乳酸、チオグリコアミド、グリセロ - ルモノチオ、水素化ホウ素 ( 例えば、水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素リチウム ) 、三級アミン、例えば、チオシアン酸ナトリウム等のチオシアン酸塩、チオ硫酸ナトリウムなどのチオ硫酸塩、例えばシアン化ナトリウムのようなシアン化物、例えばナトリウムチオなどチオホスフェ - ト、例えば、亜ヒ酸ナトリウムなどの亜ヒ酸、トリフェニルホスフィンなどのホスフィン類、フェノ - ル類等チオフェノ - ル及び p - ニトロフェノン、ベタイン、水素化リチウムアルミニウム、塩化アル

10

20

30

40

50

ミニウム、グアニジン塩酸塩、塩化第一スズ、ヒドロキシルアミン。

【0045】

本発明の化合物には、化粧品や医薬品原料として汎用されている以下の原料を添加することもできる。例えば、ペントナイト粘土、又はモンモリロナイト粘土のような粘土材料、ヒュ - ムドシリカ、カオリン、アラントイン、水酸化アルミニウムゲル、カラミン、カカオバター、ジメチコ - ン、タラ肝油、グリセリン、カオリン、ワセリン、ラノリン、鉱油、サメ肝油、白色ワセリン、タルク、デンプン、酢酸亜鉛、炭酸亜鉛、酸化亜鉛、酵母エキス、アルジオキサ、酢酸アルミニウム、微孔性セルロ - ス、コレカルシフェロ - ル、コロイド状オ - トミ - ル、塩酸システイン、d e x p a n t h a n o l、ペル - パルサム油、タンパク質加水分解物、r a c e m e t h i o n i n e、重炭酸ナトリウム、ビタミン

10

A、ショ糖脂肪酸エステル、ポリエチレングリコ - ルおよびその誘導体、脂肪酸エステル系、アルキルエトキシレ - ト型、脂肪酸エステルエトキシレ - ト、脂肪アルコ - ル類、ポリシロキサン類、プロピレングリコ - ル及びその誘導体、グリセリンおよびその誘導体、グリセリド、アセトグリセリド、エトキシル化グリセリドを含む脂肪酸、トリエチレングリコ - ル及びその誘導体、鯨ろう又は他のワックス、脂肪酸、脂肪アルコ - ルエ - テル、ステアリン酸などの12 ~ 28個の炭素原子を有する脂肪酸、プロポキシル化脂肪アルコ - ル、脂肪酸エステルポリヒドロキシアルコ - ル、ラノリン及びその誘導体、セチルアルコ - ル、ステアリルアルコ - ル、ベヘニルアルコ - ル、エタノ - ル、カルナウバ、オゾケライト、蜜蝋、カンデリラ、パラフィン、セレシン、エスパルト、o u r i c u r i、r e z o w a xなどのワックスがある。

20

【0046】

本発明に使用される吸水性高分子組成物が生分解性高分子である場合には、創傷の癒合後に吸収されるため、体内異物として残存しないことが生体にとって好ましいときに特に適している。

本発明の化合物には、多孔性材料に含有させて使用することもできる。本発明で利用できる多孔性材料の例としては、繊維性構造体を含むポリオレフィン、P E T、セルロ - ス、およびセルロ - ス系繊維、並びに網状発泡体、セルロ - ススポンジ、ポリウレタンフォーム、およびH I P Sのような多孔性、開放気泡発泡体を含む発泡体を使用することができる。

【0047】

本発明において、水吸収性高分子材料には、さらに他の添加剤、例えば、有機又は無機フィラ - 、難燃剤、アンチプロッキング剤、結晶化促進剤、ガス吸着剤、老化防止剤（エステル、アミド等）、酸化防止剤、オゾン劣化防止剤、紫外線吸収剤、光安定剤、粘着付与剤、可塑剤（ステアリン酸、オレイン酸等の脂肪酸又はそれらの金属塩等）、軟化剤（鉱物油、ワックス、パラフィン類等）、安定剤、滑剤、離型剤、帯電防止剤、変性剤、着色剤、カップリング剤、防腐剤、防カビ剤等の添加剤を適宜配合してもよい。

30

【0048】

水吸収性高分子、水吸収性高分子以外的高分子、相溶化剤を含む水吸収性高分子材料を常法により成形して各種成形品とする。また、前記水吸収性高分子材料にさらに必要に応じて添加剤を加えて、被覆材料、コ - ティング材料又は接着材料とすることも可能である。

40

前記水吸収性高分子材料からの各種成形品は、常法の成形法により製造することができる。例えば、押出成形品、射出成形品、ブロー成形品、Tダイから押出成形されたシート或いはフィルム、インフレーションフィルム、溶融紡糸法による繊維、糸、紐、ロープ、マルチフィラメント、モノフィラメント、フラットヤ - ン、ステ - ブルファイバ - 、スパンボンド不織布、フラッシュ紡糸不織布等の繊維状構造物、各種発泡成形品が得られる。

【0049】

本発明の化合物は、以下のビタミン誘導体と併用することもできる。ナトリウムL - ビタミンC - 2 - リン酸、マグネシウムL - ビタミンC - 2 - リン酸、L - ビタミンC - 2 - グルコシド、ナトリウムL - ビタミンC - 2 - リン酸 - 6 - パルミチン酸、ナトリウム

50



L - ビタミン C - 2 - リン酸 - 6 - イソパルミチン酸、L - ビタミン C - 2 , 3 , 5 , 6 - テトラヘキシルデカン酸、L - ビタミン C - 3 - エチル、ビタミン C - 3 - グルコシド、ナトリウムトコフェリルリン酸、ナトリウムトコフェリルジメチルグリシン、レチノイン酸トコフェリル。

また、本発明の化合物を含む処方や製剤には、一般に医薬品、医療材料、化粧品に用いられる成分を本発明の効果を損なわない量で配合することができる。本発明の製造に添加可能な材料例（例えば、油分、高級アルコール、脂肪酸、紫外線吸収剤、粉体、顔料、界面活性剤、多価アルコール・糖、高分子、生理活性成分、溶媒、酸化防止剤、香料、防腐剤等）を以下に列挙するが、もちろん本発明はこれらの例に限定されるものではない。本発明に配合可能な成分としては、特に限定されるものではないが、たとえば、以下の〔特許文献 12〕に記載の成分が挙げられる。

【0050】

【特許文献 12】特開 2005 - 343880

【0051】

本発明の細胞増殖及び組織形成促進用組成物およびそれを含む医薬品、化粧品は、使用時に皮膚と接触させて用いるものであればどのような剤型、形態であってもよく、皮下脂肪の代謝を所望する部位近傍の皮膚と接触させて用いるものがより好ましい。具体的には、たとえば、スキンミルク、スキนครリーム、ファンデーションクリーム、マッサージュクリーム、クレンジングクリーム、シェービングクリーム、クレンジングフォーム、化粧水、ロション、パック、口紅、頬紅、アイシャドウ、マニキュア、石鹸、ボディシャンプー、ハンドソープ、シャンプー、リンス、ヘアトニック、トリートメント、ヘアクリーム、ヘアスプレー、育毛剤、養毛剤、染毛剤、整髪料、脱毛剤、ふけ防止剤、歯磨、義歯接着剤、うがい剤、パーマネントウェーブ剤、カラーリング剤、スタイリング剤、軟膏剤、パップ剤、テップ剤入浴剤、制汗剤、日焼防止剤、等が広義には含まれ、使用時に皮膚に接触させるものなら種類を問わないが、特に化粧科として使用できる形態であることが好ましい。また使用者の性別、老若を問わない。さらには人の他に、動物類の皮膚に接触させるものも含む。また、本発明の細胞増殖及び組織形成促進用組成物およびそれを含む化粧品は、どのような形状であってもよく、固体、液体、半固体、気体のほか、粉体、顆粒、錠形、ゲル状、泡状など多数の形態が挙げられるが、特にこれに限定されるものではない。なお、本発明の化粧品は、上述したその他の成分のうち、一般に化粧品として使用可能なものを用いることができ、これらに加えて既存の化粧品原料をさらに使用することもできる。たとえば、化粧品原料基準第二版注解、日本公定書協会編、1984（薬事日報社）、化粧品原料基準外成分規格、厚生省薬務局審査課監修、1993（薬事日報社）、化粧品原料基準外成分規格追補、厚生省薬務局審査課監修、1993（薬事日報社）、化粧品種別許可基準、厚生省薬務局審査課監修、1993（薬事日報社）、化粧品種別配合成分規格、厚生省薬務局審査課監修、1997（薬事日報社）、化粧品原料辞典、平成3年（日光ケミカルズ）及び新しい化粧品機能素材300、2002（シ・エムシ・出版）等に記載されている全ての化粧品原料を使用することができる。本発明の細胞増殖及び組織形成促進用組成物および化粧品は、上述した成分を、所定の含有量となるように用いて、その態様に応じ常法に従い、溶解、混合あるいは分散等することにより製造することができる。

【0052】

本発明の細胞増殖及び組織形成促進用組成物を非経口投与する場合、安定剤、緩衝剤、保存剤、等張化剤等の添加剤を含有させることもできる。

本化合物を化粧品、医薬部外品や医薬品の外用剤用途として用いる場合や、パック、パッチ、テップ剤などの外用剤として用いる場合は、その化合物の種類、配合しようとする化粧品の種類や配合目的などによっても異なるが、通常0.001～50（w/w）%程度配合するのがよい。粉末剤の場合は、100（w/w）%原末を使用することもできる。

本発明の投与量は、患者や対象動物の体重や年齢、対象とする疾患の種類やその状態お

10

20

30

40

50

よび投与方法などによっても異なるが、たとえば注射剤の場合60kg体重の場合1日1回約1mg～約50g程度、内服剤及び経口投与剤の場合は、60kg体重の場合1日数回、1回量約1mg～約50g程度投与するのがよい。また、点眼剤の場合は、60kg体重の場合1日数回、1回数滴、濃度が約0.001～1(w/v)%の点眼剤を投与するのがよい。本発明の適切な希釈剤及び薬理学的に使用し得る担体との組成物として投与される有効量は、0.001～1g/cm<sup>2</sup>皮膚/日であり、1日1回から数回に分けて2日以上投与される。マスク剤とは、色素沈着やシワ、ニキビケアなどを目的に、顔面やその他の皮膚上に、吸水物質で構成されたバインダ-に水とともに本発明の物質を吸着させてパッチするものである。本化合物を化粧品及び外用剤や経口剤としての製品への添加量としては、その化合物の種類、配合しようとする製品の種類や配合目的などによっても異なるが、通常約0.001～5(w/w)%、好ましくは約0.005～2(w/w)%程度配合するのがよい。

10

#### 【0053】

本発明請求項13のラジカル疾患とは、不整脈、動脈硬化、虚血性心疾患、心不全、心筋梗塞、肝障害、虚血性肝障害、消化器官障害、血管障害、膵障害、胆嚢障害、臓器移植障害、糖尿病、高血圧、臓器不全などの成人病及び生活習慣病であるが、その中でも基本原因又はその原因因子の一つに生体内フリーラジカル又は活性酸素に起因する疾病である。基本原因又はその原因因子の一つに生体内フリーラジカル又は活性酸素であることが指摘されている疾患が記述されている文献としては、以下の参考文献がある。過酸化水素は、フリーラジカルではないが活性酸素であるので、活性酸素が病因として関連する疾患について本発明のラジカル疾患の中に含まれる。これは、本発明の請求項1の化合物が、フリーラジカルだけでなく活性酸素も消去できる活性を持つためである。

20

#### 【0054】

【非特許文献】活性酸素と病態、井上編、学会出版センター、1992

【非特許文献】抗酸化物質、二木他、学会出版センター、1994、

【非特許文献】活性酸素、医学のあゆみ、247巻9号2013年11月30日

【非特許文献】薬理と治療 42/6 2014年6月号、ライフサイエンス出版、発刊日：2014-06-20

【非特許文献】病気を退治する奇跡の治療法、MT企画出版、寺沢充夫、青木昭文、発刊日：2014-05-31

30

【非特許文献】抗酸化素材の開発と市場、シーエムシー出版、山下栄次、後藤浩文、高橋有志、渡辺純、若木学、石川(高野)祐子、李昌一、菊?泰枝、太田好次、福澤健治、相澤宏一、立藤智基、生田智樹、谷央子、福原潔(著)、発刊日：2014-05-20

【非特許文献】腎と透析、76/4、2014年4月号、東京医学社、AKI診療の進歩、発刊日：2014-04-25

【非特許文献】血圧 21/3 2014年3月号、先端医学社、アンチエイジングと血圧

【非特許文献】Diabetes Strategy 4/1 2014年Winter、先端医学社、糖尿病診療の食事療法を考える、発刊日：2014-02-10

【非特許文献】実験医学別冊 直伝! フローサイトメトリー、羊土社、発刊日：2014-02-01

40

【非特許文献】日本薬理学雑誌、142/6、2013年12月号、日本薬理学会

【非特許文献】統合失調症治療薬創製のためのターゲットバリデーション戦略、発刊日：2013-12-01

【非特許文献】長寿回路をONにせよ! 見えてきた抗老化薬、シーエムシー出版、デイヴィッド・スティップ(著)、寺町朋子(訳)、発刊日：2012-06-30

#### 【0055】

本発明の化合物は、液晶構造を持つ乳化組成物にすることにより、さらに安定性を向上させることができ、又、経皮吸収性を高め、皮膚の保湿性能を向上させることが出来る。

#### 【0056】

50

本発明の化合物の配合したことを特徴とする液晶構造を持つ乳化組成物は、偏光顕微鏡によるマルチゼクロス像の観察によりその存在を容易に確認することが出来る。また、樹脂泡埋超薄切法や凍結切片法による透過型電子顕微鏡（TEM）で液晶構造を確認することもできる。

【発明の効果】

【0057】

本発明では、本発明の化合物をはじめとした生理活性成分を含有しており、強力な美白作用、フリーラジカル抑制作用、抗シワ作用、抗ニキビ作用、保湿作用、バリア機能増強作用、紫外線由来炎症抑制作用、抗褥瘡作用などを発揮するもので、且つ、低刺激で安全性が高く、化粧品、医薬部外品、飼料添加物、食品添加物、医薬品、動物用薬品、水生動物用薬品として有用な外用組成物が提供できる。

10

特に好ましい態様では、本発明の化合物であるアスコルビン酸誘導体を有効成分として含有することを特徴とする強力な美白作用、フリーラジカル抑制作用、抗シワ作用、抗ニキビ作用、保湿作用、バリア機能増強作用、紫外線由来炎症抑制作用、抗褥瘡作用を有し、安定でかつ低刺激で安全性が良く、化粧品、医薬部外品、医薬品、動物用薬品、水生動物用薬品を含む外用組成物を提供することができる。

本発明の化合物は、力価変化、組織への吸収性、皮膚組織ホモジネート液の酵素分解性及び抗酸化活性、及び皮膚刺激性の結果をまとめた総合的な評価で従来の既存のビタミンCとビタミンEを持つ誘導体に比較しいずれも経時的な力価変化、安全性、組織への吸収性、皮膚組織ホモジネート液の酵素分解性及び抗酸化活性、及び皮膚刺激性のいずれの評価においてきわめて優れた性能を持つことが確認された。これらの複合的な作用により従来の既知のビタミンC及びビタミンE誘導体に比較し産業上極めて有用な作用を発揮する。

20

さらに以下記載の実施例の効果試験と皮膚刺激性試験の結果より、本発明の化合物の製剤中濃度は0.000001～0.1重量%の範囲が適当であることがわり、この本発明の化合物の製剤中の有効濃度範囲は、従来の色素沈着抑制剤のコウジ酸、アルブチン、L-アスコルビン酸リン酸Na、L-アスコルビン酸メチル、L-アスコルビン酸エチル、L-アスコルビン酸-2-グルコシド、L-アスコルビン酸-2-リン酸-6-パルミテート3Na、イソステアリルアスコルビルリン酸2Na、エラグ酸、レゾルシノール、L-システイン、ハイドロキノン、トラネキサム酸の製剤有効濃度が0.1～10.0重量%の範囲であることと比較すると100倍から100000倍に相当し驚異的に強い効果を持つ。

30

本発明のその他の目的、特徴、優秀性及びその有する観点は、以下の記載より当業者にとっては明白であろう。しかしながら、以下の記載及び具体的な実施例等の記載を含めた本件明細書の記載は本発明の好ましい態様を示すものであり、説明のためにのみ示されているものであることを理解されたい。本明細書に開示した本発明の意図及び範囲内で、種々の変化及び/又は改変（あるいは修飾）をなすことは、以下の記載及び本明細書のその他の部分からの知識により、当業者には容易に明らかであろう。本明細書で引用されている全ての特許文献及び参考文献は、説明の目的で引用されているもので、それらは本明細書の一部としてその内容はここに含めて解釈されるべきものである。

【発明を実施するための形態】

40

【0058】

次に、製造例、実施例（処方例）及び試験例を掲げ、本発明をさらに具体的に説明するが、これらは単に本発明の説明のため、その具体的な態様の参考のために提供されているものである。これらは本発明の特定の具体的な態様を説明するためのものであるが、本願で開示する発明の範囲を限定したり、あるいは制限することを表すものではない。本発明では、本明細書の思想に基づく様々な実施形態が可能であることは理解されるべきである。全ての製造例、実施例（処方例）及び試験例は、他に詳細に記載するもの以外は、標準的な技術を用いて実施したもの、又は実施することのできるものであり、これは当業者にとり周知で慣用的なものである。なお、以下に於いて、部はすべて重量部を、また%はすべて重量%を意味する。

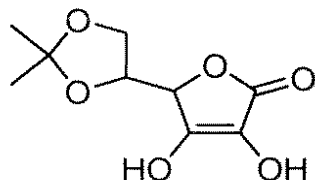
50

## 【実施例】

## 【0059】

ビタミンCとして和光純薬社製L-アスコルビン酸(55mmol)をアセトンに溶解し、塩化アセチル(15mmol)を加えて3時間撹拌した。固体をろ別し、得られた固体をアセトンで洗浄後、乾燥させ既知の化合物である化学式12の5,6-イソピデンビタミンC(別名:5,6-イソピデンアスコルビン酸)(44.2mmol)を白色個体として得た。

## 【化12】



10

## 【0060】

MP Biomedicals社製のD-α-トコフェロール(50%重量)、MP Biomedicals社製のD-β-トコフェロール(5%重量)、関東化学社製のrac-α-トコフェロールトコフェロール(5%重量)、関東化学社製のD-α-トコフェロール(5%重量)、関東化学社製のrac-α-トコフェロールトコフェロール(5%重量)、MP Biomedicals社製のD-γ-トコフェロール(5%重量)、Sigma-Aldrich社製のD-α-トコトリエノール(5%重量)、Sigma-Aldrich社製のD-β-トコトリエノール(5%重量)、Sigma-Aldrich社製のD-γ-トコトリエノール(5%重量)、ITO社製のD-α-トコフェロール(5%重量)を混合してビタミンE混合油とした。

20

## 【0061】

前項で作成したビタミンE混合油(10mmol)を塩化メチレンに溶解し、ピリジン(12mmol)とプロモアセチルプロミド4(12mmol)を加えて室温で撹拌した。反応終了後、酢酸エチルを加えて薄め、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。硫酸ナトリウムをろ過した後に溶媒を留去し、得られた残留物をカラムクロマトグラフィ-(ヘキサン:酢酸エチル=80:1)で精製し、本発明の請求項4の一種であるプロモアセチルビタミンEを無色の油状物として得た。この化合物の<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, IR, HPLCは次の通り。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, D<sub>2</sub>O):

30

4.05(2H, s), 2.58(2H, t, J=6.8Hz), 2.07(3H, s), 2.05(3H, s), 2.00(3H, s), 1.81-1.71(2H, m), 1.57-1.05(24H, m), 0.88-0.84(12H, m), <sup>13</sup>C NMR(100MHz, CDCl<sub>3</sub>): 170.5, 166.6, 149.5, 147.7, 139.7, 126.6, 125.0, 123.3, 120.8, 117.4, 110.5, 75.8, 75.1, 74.2, 66.8, 65.2, 39.3, 37.5, 37.1, 32.6, 32.5, 31.1, 27.8, 26.1, 25.2, 24.6, 24.4, 22.67, 22.58, 20.8, 20.4, 19.5, 19.5, 12.8, 11.8, 11.5。IR(NaCl) 3301, 2929, 2872, 1774, 1702, 1453, 1381, 1338, 1250, 1181, 1151, 1071 cm<sup>-1</sup>。HPLC: カラム: SUPELCOSIL-TM ABZ+PLUS 4.6mm i.d. x 150mm, 5μm(SUPELCO社製), 移動相: MeOH:H<sub>2</sub>O=89:11, 流量: 1.0mL/min, 検出波長: UV285nm, 蛍光ex. 285nm, em. 330nm, 注入量: 20μLで測定したとき、標品として, α-Toc, β-Toc, γ-Toc, δ-Tocを同時定量すると、本発明のプロモアセチルビタミンEは、HPLCリテンションタイム15minで検出され、α-Toc、β-Toc、γ-Tocと重ならず、δ-Toc、ε-Tocの間に検出さ

40

50

れることにより確認できた。

【0062】

5, 6 - イソピデンビタミンC (0.778 g, 3.6 mmol) と前項で作成したプロモアセチルビタミンE (2 g, 3.6 mmol) をDMF (10 ml) に溶解し、炭酸水素カリウム (0.37 g, 3.7 mmol) を加えて室温で一晩撹拌した。反応混合物に水を加え、酢酸エチルで抽出し、有機層を水と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。硫酸ナトリウムをろ過した後に溶媒を留去し、得られた残留物をカラムクロマトグラフィ - (ヘキサン：酢酸エチル = 5 : 1) で精製し、本発明の[請求項6]の5, 6 - イソピリデン - ビタミンC - 3 - アセチルジエステルビタミンE (1.47 g, 2.13 mmol) を白色個体として得た。この化合物の<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, IRは次の通り。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5.42 (1H, bs), 5.26 (2H, q, J = 16.8, 11.6), 4.69 (1H, d, J = 4.4), 4.30 (1H, dt, J = 6.4, 2), 4.20 (1H, dd, J = 8.8, 8.4), 4.06 (1H, dd, J = 6.8, 6.4), 2.60 (2H, t, J = 6.8 Hz), 2.07 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.97 (3H, s), 1.83 - 1.73 (2H, m), 1.59 - 1.02 (30H, m), 0.88 - 0.82 (12H, m)。<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 169.0, 167.5, 150.4, 145.3, 138.8, 135.6, 124.5, 122.1, 120.1, 118.1, 76.1, 75.1, 73.0, 70., 66.4, 65.9, 63.1, 39.3, 38.1, 37.4, 37.2, 33.1, 31.9, 30.5, 30.2, 28.1, 24.2, 24.0, 23.1, 21.9, 20.9, 20.4, 19.5, 19.3, 12.4, 11.9, 11.0、IR (NaCl) 3395, 2925, 2866, 1759, 1680, 1461, 1085 cm<sup>-1</sup>。

【0063】

前項で作成した5, 6 - イソピリデン - ビタミンC - 3 - アセチルジエステルビタミンE (0.04 g, 0.058 mmol) をメタノール (5 ml) に溶解し、2N HCl (0.1 ml) を加えて50℃で2時間撹拌した。反応混合物に水を加え、酢酸エチルで抽出し、有機層を水と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。硫酸ナトリウムをろ過した後に溶媒を留去し、得られた残留物をカラムクロマトグラフィ - (ヘキサン：酢酸エチル = 1 : 1) で精製し、本発明[請求項2]のビタミンC - 3 - アセチルジエステルビタミンE (0.022 g, 0.033 mmol) を白色個体として得た。この化合物<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, IRは次の通り。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5.63 (1H, d, J = 16.8), 5.04 (1H, d, J = 17.2), 4.80 (1H, s), 4.13 (1H, dt, J = 5.6, 4.8), 3.87 (1H, dd, J = 7.2, 7.6), 3.75 (1H, dd, J = 11.2, 12.4), 2.57 (2H, bt), 2.08 (3H, s), 2.02 (3H, s), 1.97 (3H, s), 1.82 - 1.72 (2H, m), 1.55 - 1.05 (24H, m), 0.87 - 0.83 (12H, m)、<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 169.8, 167.8, 149.5, 145.5, 138.9, 135.7, 125.3, 123.2, 120.2, 117.5, 76.0, 75.0, 72.4, 69.4, 66.5, 66.0, 62.7, 39.2, 37.40, 37.38, 37.1, 32.5, 32.4, 30.5, 30.1, 27.7, 24.4, 24.2, 22.6, 22.4, 20.8, 20.4, 19.4, 19.5, 12.5, 11.9, 11.5; IR (NaCl) 3380, 2925, 2866, 1753, 1680, 1461, 1425, 1372, 1319, 1205, 1158, 1085 cm<sup>-1</sup>。

【0064】

窒素雰囲気下、t - BuOK (0.951 g, 8.48 mmol) をDMSO / THF (3 : 2) (5 ml) に懸濁させて - 10℃に冷却し、5, 6 - イソピデンビタミンC (0.917 g, 4.24 mmol) のDMSO / THF (3 : 2) (5 ml) 溶液を滴下した。その後、前項記載のプロモアセチルビタミンEの化合物 (2.57 g, 4.66 mmol) を加えて室温で一晩撹拌した。反応混合物に水を加え、酢酸エチルで抽出し、有機層を水と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。硫酸ナトリウムをろ過した後に溶媒を留去し、得られた残留物をカラムクロマトグラフィ - (ヘキサン：酢酸エチル = 5 : 1) で精製し、本発明の[請求項6]の5, 6 - イソピリデン - ビタミンC - 3 - アセチルジエステルビタミンE (1.47 g, 2.13 mmol) を白色個体として得た。この化合物の<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, IRは次の通り。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5.42 (1H, bs), 5.26 (2H, q, J = 16.8, 11.6), 4.69 (1H, d, J = 4.4), 4.30 (1H, dt, J = 6.4, 2), 4.20 (1H, dd, J = 8.8, 8.4), 4.06 (1H, dd, J = 6.8, 6.4), 2.60 (2H, t, J = 6.8 Hz), 2.07 (3H, s), 2.01 (3H, s), 1.97 (3H, s), 1.83 - 1.73 (2H, m), 1.59 - 1.02 (30H, m), 0.88 - 0.82 (12H, m)。<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 169.0, 167.5, 150.4, 145.3, 138.8, 135.6, 124.5, 122.1, 120.1, 118.1, 76.1, 75.1, 73.0, 70., 66.4, 65.9, 63.1, 39.3, 38.1, 37.4, 37.2, 33.1, 31.9, 30.5, 30.2, 28.1, 24.2, 24.0, 23.1, 21.9, 20.9, 20.4, 19.5, 19.3, 12.4, 11.9, 11.0、IR (NaCl) 3395, 2925, 2866, 1759, 1680, 1461, 1085 cm<sup>-1</sup>。

o 1) の DMSO / THF (3 : 2) (5 ml) 溶液を滴下し、5 分間攪拌し、室温で 8 時間攪拌した。1 N HCl (4.3 ml) と水を加え、酢酸エチルで抽出し、有機層を水と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。硫酸ナトリウムをろ過した後に溶媒を留去し、得られた残留物をカラムクロマトグラフィ - (ヘキサン : 酢酸エチル = 1 : 1) で精製し、本発明の 5, 6 - イソピリデン - ビタミン C - 2 - アセチルジエステルビタミン E (1.34 g, 1.96 mmol) を無色の油状物として得た。この化合物のこの化合物の  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, IR は次の通り。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ; 9.49 (1H, bs), 4.83 (2H, q,  $J = 17.6, 11.6$ ), 4.66 (1H, d,  $J = 3.2$ ), 4.35 (1H, dt,  $J = 6.8, 3.2$ ), 4.16 (1H, dd,  $J = 7.2, 6.8$ ), 4.09 (1H, dd,  $J = 6.4, 6.8$ ), 2.60 (2H, t,  $J = 6.8$  Hz), 2.10 (3H, s), 1.99 (3H, s), 1.95 (3H, s), 1.86 - 1.75 (4H, m), 1.57 - 1.05 (28H, m), 0.87 - 0.83 (12H, m)、 $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 171.8, 168.5, 160.4, 150.1, 139.4, 126.1, 124.4, 123.4, 121.3, 117.4, 110.1, 75.1, 74.3, 73.5, 68.4, 65.0, 39.0, 37.38, 37.31, 37.1, 32.2, 32.5, 30.8, 27.8, 25.7, 25.2, 24.7, 24.3, 22.4, 22.3, 20.7, 20.2, 19.3, 19.5, 12.7, 12.0, 11.4 ; IR (NaCl) 2925, 2865, 1770, 1680, 1460, 1376, 1334, 1252, 1206, 1144, 1065  $\text{cm}^{-1}$

10

20

#### 【0065】

前項で作成した本発明の 5, 6 - イソピリデン - ビタミン C - 2 - アセチルジエステルビタミン E (0.069 g, 0.1 mmol) をメタノール (5 ml) と THF (2 ml) に溶解し、2 N HCl (0.16 ml) を加えて 50 で 1 時間攪拌した。反応混合物に水を加え、酢酸エチルで抽出し、有機層を水と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。硫酸ナトリウムをろ過した後に溶媒を留去し、得られた残留物をカラムクロマトグラフィ - (塩化メチレン : メタノール = 10 : 1) で精製し、本発明 [請求項 2] のビタミン C - 2 - アセチルジエステルビタミン E (0.051 g, 0.079 mmol) を白色個体として得た。この化合物のこの化合物の  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, IR は次の通り。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ; 4.92 (2H, q,  $J = 16.8, 15.2$ ), 4.71 (1H, s), 4.04 (1H, bs), 4.75 (2H, bs), 2.54 (2H, bt), 2.05 (3H, s), 1.95 (3H, s), 1.91 (3H, s), 1.72 (2H, bs), 1.55 - 1.05 (24H, m), 0.87 - 0.83 (12H, m)、 $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 170.5, 170.4, 161.0, 149.5, 140.0, 126.7, 125.0, 124.0, 120.7, 117.5, 76.0, 75.7, 69.5, 67.7, 63.0, 39.9, 37.3, 37.0, 33.1, 32.4, 31.5, 28.1, 24.7, 24.4, 22.3, 22.4, 21.0, 20.5, 19.4, 19.9, 13.2, 12.2, 11.6 ; IR (NaCl) 3365, 2953, 2925, 2870, 1757, 1669, 1468, 1375, 1333, 1202, 1155, 1113, 1071, 1046  $\text{cm}^{-1}$

30

40

#### 【0066】

ChromaDex, Inc. 社製の DL - トコフェロールを塩化メチレンに溶解し、ピリジン (12 mmol) とプロモアセチルブロミド 4 (12 mmol) を加えて室温で攪拌した。反応終了後、酢酸エチルを加えて薄め、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。硫酸ナトリウムをろ過した後に溶媒を留去し、得られた残留物をカラムクロマトグラフィ - (ヘキサン : 酢酸エチル = 80 : 1) で精製し、本発明のプロモアセチル - DL - トコフェロールを無色の油状物として得た。この化合物のこの化合物の  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, IR は次の通り。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, CD

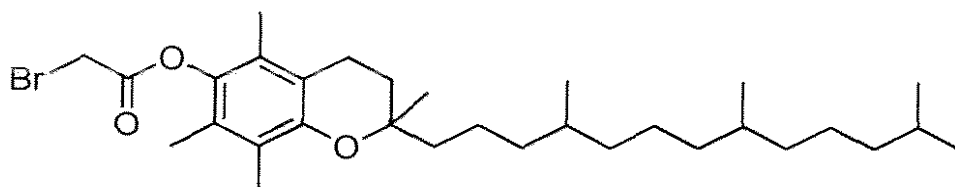
50

$\text{C1}_3$ ); 4.07 (2H, s), 2.59 (2H, t,  $J = 6.8 \text{ Hz}$ ), 2.09 (3H, s), 2.04 (3H, s), 2.00 (3H, s), 1.82 - 1.72 (2H, m), 1.56 - 1.05 (24H, m), 0.88 - 0.83 (12H, m),  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 170.4, 166.6, 149.3, 147.7, 139.6, 126.5, 125.0, 123.1, 120.7, 117.4, 110.2, 75.9, 75.0, 74.5, 66.9, 65.2, 39.2, 37.4, 37.2, 32.6, 32.5, 31.0, 27.8, 26.0, 25.4, 24.6, 24.4, 22.68, 22.59, 20.9, 20.5, 19.6, 19.6, 12.7, 11.9, 11.6; IR (NaCl) 3300, 2930, 2870, 1775, 1700, 1455, 1380, 1340, 1253, 1180, 1152, 1070  $\text{cm}^{-1}$

10

【0067】

【化13】



20

【0068】

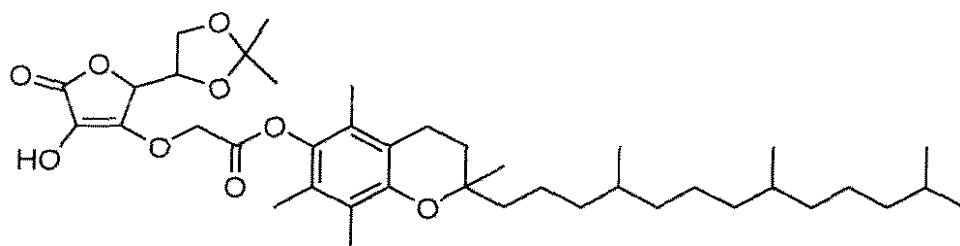
化学式12の化合物(0.778 g, 3.6 mmol)と化学式13の化合物(2 g, 3.6 mmol)をDMF(10 ml)に溶解し、炭酸水素カリウム(0.37 g, 3.7 mmol)を加えて室温で一晩撹拌した。反応混合物に水を加え、酢酸エチルで抽出し、有機層を水と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。硫酸ナトリウムをろ過した後に溶媒を留去し、得られた残留物をカラムクロマトグラフィ-(ヘキサン:酢酸エチル=5:1)で精製し、以下の化学式14で示される本発明のビタミンC誘導体である5,6-イソピリデンL-アスコルビン酸-3-アセチルジエステル-DL-トコフェロール(1.47 g, 2.13 mmol, 59%)を白色個体として得た。この化合物の $^1\text{H NMR}$ ,  $^{13}\text{C NMR}$ , IRは次の通り。 $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 5.43 (1H, bs), 5.28 (2H, q,  $J = 16.8, 11.6$ ), 4.70 (1H, d,  $J = 4.4$ ), 4.31 (1H, dt,  $J = 6.4, 2$ ), 4.19 (1H, dd,  $J = 8.8, 8.4$ ), 4.07 (1H, dd,  $J = 6.8, 6.4$ ), 2.59 (2H, t,  $J = 6.8 \text{ Hz}$ ), 2.09 (3H, s), 2.02 (3H, s), 1.98 (3H, s), 1.83 - 1.73 (2H, m), 1.59 - 1.03 (30H, m), 0.88 - 0.83 (12H, m),  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 172.3, 169.1, 160.3, 150.2, 138.8, 126.0, 124.3, 122.9, 120.8, 117.3, 110.2, 75.2, 73.9, 74.1, 68.3, 65.2, 39.1, 36.9, 37.3, 37.2, 33.0, 32.1, 30.6, 27.5, 26.1, 25.1, 24.6, 23.8, 22.3, 22.2, 20.6, 19.9, 19.2, 19.4, 13.6, 12.1, 10.9; IR (NaCl) 2931, 2866, 1765, 1674, 1454, 1368, 1337, 1251, 1202, 1150, 1061  $\text{cm}^{-1}$

30

40

【0069】

## 【化 1 4】

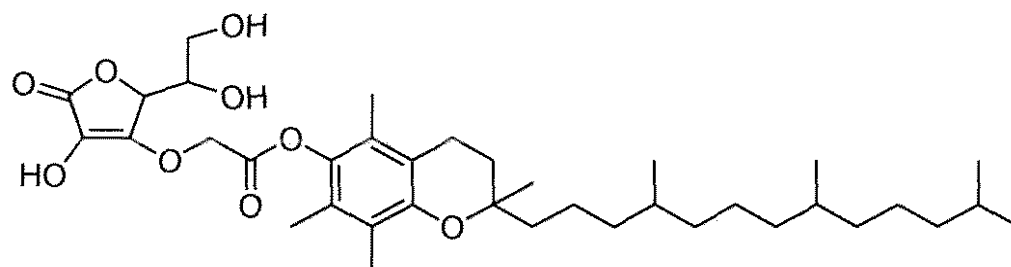


前項で作成した化学式 1 4 の化合物 ( 0 . 0 4 g , 0 . 0 5 8 m m o l ) をメタノール ( 5 m l ) に溶解し、2 N H C l ( 0 . 1 m l ) を加えて 5 0 ℃ で 2 時間攪拌した。反応混合物に水を加え、酢酸エチルで抽出し、有機層を水と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。硫酸ナトリウムをろ過した後に溶媒を留去し、得られた残留物をカラムクロマトグラフィ - (ヘキサン：酢酸エチル = 1 : 1) で精製し、以下の化学式 1 5 で示される本発明のビタミン C 誘導体である L - アスコルビン酸 - 3 - アセチルジエステル - D L - - トコフェロール ( 0 . 0 2 2 g , 0 . 0 3 3 m m o l ) を白色個体として得た。この化合物の  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, IR, 元素分析値は次の通り。 $^1\text{H}$  NMR ( 4 0 0 M H z ,  $\text{CDCl}_3$  ) : 5 . 6 3 ( 1 H , d , J = 1 6 . 8 ) , 5 . 0 4 ( 1 H , d , J = 1 7 . 2 ) , 4 . 8 0 ( 1 H , s ) , 4 . 1 3 ( 1 H , d t , J = 5 . 6 , 4 . 8 ) , 3 . 8 7 ( 1 H , d d , J = 7 . 2 , 7 . 6 ) , 3 . 7 5 ( 1 H , d d , J = 1 1 . 2 , 1 2 . 4 ) , 2 . 5 7 ( 2 H , b t ) , 2 . 0 8 ( 3 H , s ) , 2 . 0 2 ( 3 H , s ) , 1 . 9 7 ( 3 H , s ) , 1 . 8 2 - 1 . 7 2 ( 2 H , m ) , 1 . 5 5 - 1 . 0 5 ( 2 4 H , m ) , 0 . 8 7 - 0 . 8 3 ( 1 2 H , m ) 、  $^{13}\text{C}$  NMR ( 7 5 M H z ,  $\text{CDCl}_3$  ) : 1 6 9 . 8 , 1 6 7 . 8 , 1 4 9 . 5 , 1 4 5 . 5 , 1 3 8 . 9 , 1 3 5 . 7 , 1 2 5 . 3 , 1 2 3 . 2 , 1 2 0 . 2 , 1 1 7 . 5 , 7 6 . 0 , 7 5 . 0 , 7 2 . 4 , 6 9 . 4 , 6 6 . 5 , 6 6 . 0 , 6 2 . 7 , 3 9 . 2 , 3 7 . 4 0 , 3 7 . 3 8 , 3 7 . 1 , 3 2 . 5 , 3 2 . 4 , 3 0 . 5 , 3 0 . 1 , 2 7 . 7 , 2 4 . 4 , 2 4 . 2 , 2 2 . 6 , 2 2 . 4 , 2 0 . 8 , 2 0 . 4 , 1 9 . 4 , 1 9 . 5 , 1 2 . 5 , 1 1 . 9 , 1 1 . 5 ; IR ( N a C l ) 3 3 8 0 , 2 9 2 5 , 2 8 6 6 , 1 7 5 3 , 1 6 8 0 , 1 4 6 1 , 1 4 2 5 , 1 3 7 2 , 1 3 1 9 , 1 2 0 5 , 1 1 5 8 , 1 0 8 5  $\text{cm}^{-1}$

元素分析値 :  $\text{C}_{37}\text{H}_{58}\text{O}_9 \cdot \text{H}_2\text{O}$  として理論値 ( % ) = C , 6 6 . 8 4 : H , 9 . 1 0 。実測値 ( % ) = C , 6 6 . 7 6 : H , 9 . 0 7 。

## 【 0 0 7 0 】

## 【化 1 5】



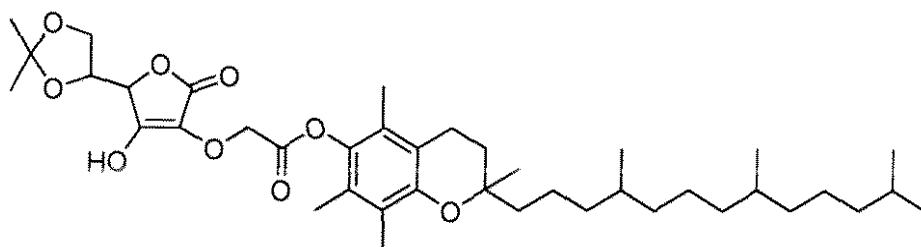
## 【 0 0 7 1 】

窒素雰囲気下、t - B u O K ( 0 . 9 5 1 g , 8 . 4 8 m m o l ) を D M S O / T H F ( 3 : 2 ) ( 5 m l ) に懸濁させて - 1 0 ℃ に冷却し、5 , 6 , - イソピリデンアスコルビン酸 ( 0 . 9 1 7 g , 4 . 2 4 m m o l ) の D M S O / T H F ( 3 : 2 ) ( 5 m l ) 溶液を滴下した。その後、プロモアセチル - D L - - トコフェロール ( 2 . 5 7 g , 4 . 6 6 m m o l ) の D M S O / T H F ( 3 : 2 ) ( 5 m l ) 溶液を滴下し、5 分間攪拌し、室温で 8 時間攪拌した。1 N H C l ( 4 . 3 m l ) と水を加え、酢酸エチルで抽出し、有



機層を水と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。硫酸ナトリウムをろ過した後に溶媒を留去し、得られた残留物をカラムクロマトグラフィ - (ヘキサン：酢酸エチル = 1 : 1) で精製し、以下の化学式 16 で示される本発明のビタミン C 誘導体である 5, 6 - イソピリデンアスコルビン酸 - 2 - アセチルジエステル - DL - - トコフェロール (1.34 g, 1.96 mmol) を無色の油状物として得た。この化合物の  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, IR は次の通り。  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ; 9.49 (1H, bs), 4.83 (2H, q,  $J = 17.6, 11.6$ ), 4.66 (1H, d,  $J = 3.2$ ), 4.35 (1H, dt,  $J = 6.8, 3.2$ ), 4.16 (1H, dd,  $J = 7.2, 6.8$ ), 4.09 (1H, dd,  $J = 6.4, 6.8$ ), 2.60 (2H, t,  $J = 6.8$  Hz), 2.10 (3H, s), 1.99 (3H, s), 1.95 (3H, s), 1.86 - 1.75 (4H, m), 1.57 - 1.05 (28H, m), 0.87 - 0.83 (12H, m),  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 171.8, 168.5, 160.4, 150.1, 139.4, 126.1, 124.4, 123.4, 121.3, 117.4, 110.1, 75.1, 74.3, 73.5, 68.4, 65.0, 39.0, 37.38, 37.31, 37.1, 32.2, 32.5, 30.8, 27.8, 25.7, 25.2, 24.7, 24.3, 22.4, 22.3, 20.7, 20.2, 19.3, 19.5, 12.7, 12.0, 11.4; IR (NaCl) 2925, 2865, 1770, 1680, 1460, 1376, 1334, 1252, 1206, 1144, 1065  $\text{cm}^{-1}$

【化 16】



【0072】

窒素雰囲気下、t-BuOK / ピリジン /  $\text{KHCO}_3$  /  $\text{K}_2\text{CO}_3$  /  $\text{NaCO}_3$  /  $\text{NaHCO}_3$  /  $\text{CsCO}_3$  (4 : 1 : 1 : 1 : 1) (0.951 g) を DMSO / THF /  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  / DMF (6 : 2 : 1 : 1) (5 ml) に懸濁させて -10 に冷却し、5, 6 - イソピリデンアスコルビン酸 (0.917 g, 4.24 mmol) の DMSO / THF /  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  / DMF (6 : 2 : 1 : 1) (5 ml) 溶液を滴下した。その後、プロモアセチル - DL - - トコフェロール (2.57 g, 4.66 mmol) の DMSO / THF /  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  / DMF (6 : 2 : 1 : 1) (5 ml) 溶液を滴下し、5 分間攪拌し、室温で 8 時間攪拌した。1N HCl (4.3 ml) と水を加え、酢酸エチルで抽出し、有機層を水と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。硫酸ナトリウムをろ過した後に溶媒を留去し、得られた残留物をカラムクロマトグラフィ - (ヘキサン：酢酸エチル = 1 : 1) で精製し、本発明のビタミン C 誘導体である 5, 6 - イソピリデンアスコルビン酸 - 2 - アセチルジエステル - DL - - トコフェロール (1.2 g) を無色の油状物として得た。この化合物の  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, IR を測定したところ前項と同様な結果が得られ前項と同じ 5, 6 - イソピリデンアスコルビン酸 - 2 - アセチルジエステル - DL - - トコフェロールであることが確認された。

【0073】

前項で作成した 5, 6 - イソピリデンアスコルビン酸 - 2 - アセチルジエステル - DL - - トコフェロール (0.069 g, 0.1 mmol) をメタノール (5 ml) と THF (2 ml) に溶解し、2N HCl (0.16 ml) を加えて 50 で 1 時間攪拌した。反応混合物に水を加え、酢酸エチルで抽出し、有機層を水と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。硫酸ナトリウムをろ過した後に溶媒を留去し、得られた残留

10

20

OCC(O)C1=CC(OC(=O)COc2cc(C)c3c(c2)OC(CC4CCCC(C)CC4)CC5=C(C)C6=CC=CC=C5C6)C(=O)O1

30

30

40

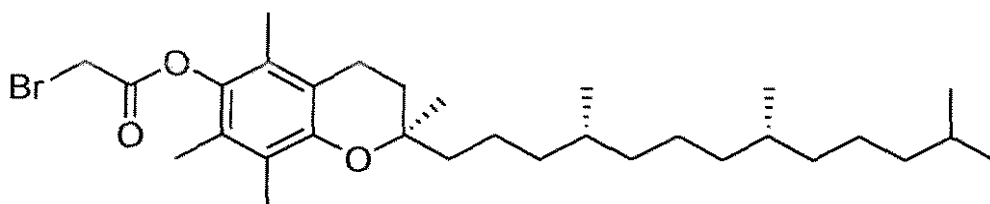
O=C1C(=O)C(O)C(O)C1[C@H]2OC(C)(C)OC2

50

以下化学式 19 で示される本発明のプロモアセチル D - - トコフェロ - ル ( 3 . 23 g , 5 . 86 mmol , 59% ) を無色の油状物として得た。この化合物の  $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR、及び IR の値は以下の通り。 $^1\text{H}$  NMR ( 400 MHz ,  $\text{CDCl}_3$  ) : 4 . 07 ( 2 H , s ) , 2 . 59 ( 2 H , t ,  $J = 6 . 8 \text{ Hz}$  ) , 2 . 09 ( 3 H , s ) , 2 . 04 ( 3 H , s ) , 2 . 00 ( 3 H , s ) , 1 . 82 - 1 . 72 ( 2 H , m ) , 1 . 56 - 1 . 05 ( 24 H , m ) , 0 . 88 - 0 . 83 ( 12 H , m ) ;  $^{13}\text{C}$  NMR ( 100 MHz ,  $\text{CDCl}_3$  ) : 165 . 9 , 149 . 8 , 140 . 3 , 126 . 6 , 124 . 9 , 123 . 3 , 117 . 5 , 75 . 2 , 39 . 5 , 37 . 54 , 37 . 51 , 37 . 49 , 37 . 4 , 32 . 9 , 32 . 8 , 31 . 1 , 28 . 0 , 25 . 1 , 24 . 9 , 24 . 5 , 22 . 8 , 22 . 7 , 21 . 1 , 20 . 6 , 19 . 84 , 19 . 75 , 12 . 9 , 12 . 0 , 11 . 9 ; IR ( NaCl ) 2950 , 2926 , 2866 , 1754 , 1459 , 1414 , 1376 , 1268 , 1241 , 1213 , 1157 , 1103 , 1065  $\text{cm}^{-1}$

【 0077 】

【 化 19 】

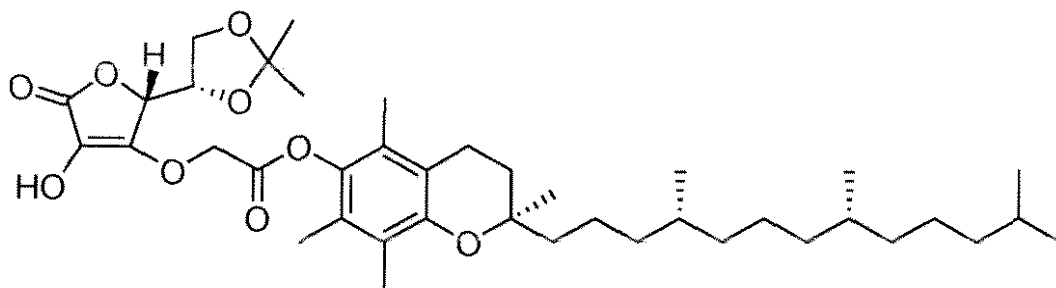


【 0078 】

5 , 6 - イソピリデンアスコルビン酸 ( 0 . 726 g , 3 . 36 mmol ) とプロモアセチル D - - トコフェロ - ル ( 1 . 56 g , 2 . 8 mmol ) を DMF ( 10 ml ) に溶解し、炭酸水素カリウム ( 0 . 336 g , 3 . 36 mmol ) を加えて室温で一晩撹拌した。反応混合物に水を加え、酢酸エチルで抽出し、有機層を水と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。硫酸ナトリウムをろ過した後に溶媒を留去し、得られた残留物をカラムクロマトグラフィ - ( ヘキサン : 酢酸エチル = 5 : 1 ) で精製し、化学式 20 の本発明のビタミン C 誘導体である 5 , 6 - イソピリデンアスコルビン酸 - 3 - アセチルジエステル - D - - トコフェロ - ル ( 1 . 06 g , 1 . 54 mmol ) を白色個体として得た。この化合物の  $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR、IR は次の通り。 $^1\text{H}$  NMR ( 400 MHz ,  $\text{CDCl}_3$  ) : 5 . 55 ( 1 H , s ) , 5 . 32 ( 1 H , d ,  $J = 16 . 4 \text{ Hz}$  ) , 5 . 28 ( 1 H , d ,  $J = 16 . 8 \text{ Hz}$  ) , 4 . 70 ( 1 H , d ,  $J = 4 . 4 \text{ Hz}$  ) , 4 . 31 ( 1 H , dt ,  $J = 4 . 4 , 6 . 8 \text{ Hz}$  ) , 4 . 19 ( 1 H , dd ,  $J = 6 . 8 , 8 . 8 \text{ Hz}$  ) , 4 . 07 ( 1 H , dd ,  $J = 6 . 4 , 8 . 8 \text{ Hz}$  ) , 2 . 59 ( 2 H , t ,  $J = 6 . 8 \text{ Hz}$  ) , 2 . 09 ( 3 H , s ) , 2 . 02 ( 3 H , s ) , 1 . 98 ( 3 H , s ) , 1 . 83 - 1 . 73 ( 2 H , m ) , 1 . 57 - 1 . 01 ( 30 H , m ) , 0 . 87 - 0 . 83 ( 12 H , m ) ;  $^{13}\text{C}$  NMR ( 100 MHz ,  $\text{CDCl}_3$  ) : 170 . 6 , 166 . 8 , 149 . 8 , 147 . 9 , 139 . 8 , 126 . 6 , 125 . 0 , 123 . 3 , 120 . 8 , 117 . 6 , 110 . 3 , 76 . 1 , 75 . 2 , 74 . 9 , 67 . 0 , 65 . 4 , 39 . 4 , 37 . 5 , 37 . 3 , 32 . 8 , 32 . 7 , 31 . 1 , 28 . 0 , 26 . 0 , 25 . 5 , 24 . 8 , 24 . 5 , 22 . 75 , 22 . 65 , 21 . 0 , 20 . 6 , 19 . 8 , 19 . 7 , 12 . 9 , 12 . 0 , 11 . 8 ; IR ( NaCl ) 3298 , 2927 , 2868 , 1771 , 1703 , 1457 , 1378 , 1340 , 1254 , 1183 , 1153 , 1070  $\text{cm}^{-1}$

【 0079 】

## 【化 20】



10

## 【0080】

前項で作成した化学式 20 の化合物 ( 1 . 0 6 g , 1 . 5 4 m m o l ) をメタノール ( 1 5 m l ) に溶解し、2 N H C l ( 2 . 5 m l ) を加えて 5 0 ° で 2 時間撹拌した。桐山口 - トを用いたろ過により固体を集め、ろ液を酢酸エチルで抽出し、有機層を水と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。硫酸ナトリウムをろ過した後に溶媒を留去し、ろ過によって集めた固体とあわせ、得られた残留物をカラムクロマトグラフィ (ヘキサン : 酢酸エチル = 1 : 1) で精製し、化学式 21 の本発明のビタミン C 誘導体である L - アスコルビン酸 - 3 - アセチルジエステル - D - α - トコフェロール ( 0 . 8 3 g , 1 . 2 8 m m o l ) を白色個体として得た。この化合物の  $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR、IR 及び比旋光度の値、元素分析値は以下の通り。

$^1\text{H}$  NMR ( 4 0 0 M H z ,  $\text{CDCl}_3$  ) : 5 . 6 3 ( 1 H , d ,  $J = 1 6 . 8 \text{ Hz}$  ) , 5 . 0 4 ( 1 H , d ,  $J = 1 6 . 8 \text{ Hz}$  ) , 4 . 8 0 ( 1 H , d ,  $J = 2 \text{ Hz}$  ) , 4 . 1 4 ( 1 H , d d d ,  $J = 1 . 6 , 4 . 8 , 7 . 2 \text{ Hz}$  ) , 3 . 8 8 ( 1 H , d d ,  $J = 7 . 2 , 1 1 . 2 \text{ Hz}$  ) , 3 . 7 6 ( 1 H , d d ,  $J = 4 . 8 , 1 1 . 2 \text{ Hz}$  ) , 2 . 5 8 ( 2 H , t ,  $J = 7 . 2 \text{ Hz}$  ) , 2 . 0 9 ( 3 H , s ) , 2 . 0 2 ( 3 H , s ) , 1 . 9 8 ( 3 H , s ) , 1 . 8 1 - 1 . 0 3 ( 2 6 H , m ) , 0 . 8 8 - 0 . 8 3 ( 1 2 H , m ) ;

$^{13}\text{C}$  NMR ( 7 5 M H z ,  $\text{CDCl}_3$  ) : 1 7 0 . 1 , 1 6 8 . 3 , 1 5 0 . 0 , 1 4 6 . 5 , 1 3 9 . 6 , 1 3 5 . 8 , 1 2 5 . 5 , 1 2 3 . 6 , 1 2 0 . 6 , 1 1 7 . 7 , 7 6 . 2 , 7 5 . 3 , 7 2 . 6 , 6 9 . 6 , 6 6 . 6 , 6 6 . 1 , 6 2 . 9 , 3 9 . 4 , 3 7 . 4 4 , 3 7 . 4 1 , 3 7 . 3 , 3 2 . 8 , 3 2 . 7 , 3 0 . 9 , 3 0 . 3 , 2 8 . 0 , 2 4 . 8 , 2 4 . 4 , 2 2 . 7 , 2 2 . 6 , 2 1 . 0 , 2 0 . 5 , 1 9 . 7 , 1 9 . 6 , 1 2 . 9 , 1 2 . 0 , 1 1 . 8 ;

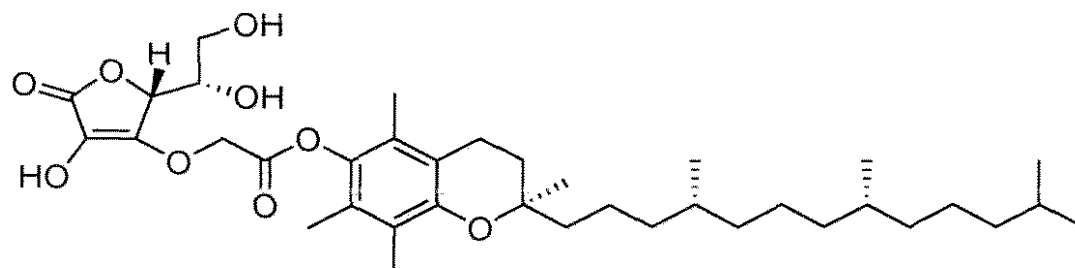
IR ( NaCl ) 3 3 8 3 , 2 9 2 6 , 2 8 6 7 , 1 7 5 4 , 1 6 8 2 , 1 4 6 2 , 1 4 2 7 , 1 3 7 5 , 1 3 2 1 , 1 2 0 8 , 1 1 6 0 , 1 0 8 7  $\text{cm}^{-1}$  ;  $[\alpha]_D^{25}$  (  $c = \text{g} / 100 \text{ ml}$  , solvent ) ,  $[\alpha]_D^{25} + 79 . 1$  (  $c = 0 . 5 4$  ,  $\text{CHCl}_3$  ) 。元素分析値 :  $\text{C}_{37}\text{H}_{58}\text{O}_9 \cdot \text{H}_2\text{O}$  として理論値 ( % ) = C , 6 6 . 8 4 ; H , 9 . 1 0 。実測値 ( % ) = C , 6 6 . 7 7 ; H , 9 . 0 8 。

20

30

## 【0081】

## 【化 21】



40

## 【0082】

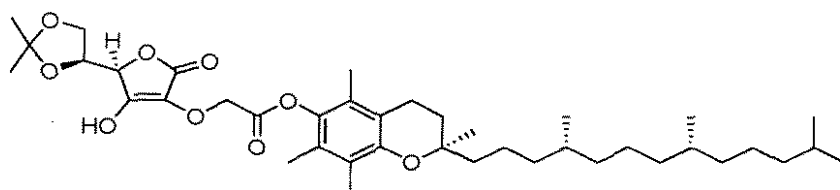
窒素雰囲気下、t - B u O K ( 0 . 6 1 7 g , 5 . 5 m m o l ) を D M S O / T H F ( 3

50

：2) (10 ml) に懸濁させて -10℃ に冷却し、化学式18の化合物 (0.595 g、2.75 mmol) の DMSO/THF (3:2) (10 ml) 溶液を滴下した。その後、化学式19の化合物 (1.67 g, 3.03 mmol) の DMSO/THF (3:2) (10 ml) 溶液を滴下し、5分間攪拌し、室温で一晩攪拌した。1N HCl (2.75 ml) と水を加え、酢酸エチルで抽出し、有機層を水と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。硫酸ナトリウムをろ過した後に溶媒を留去し、得られた残留物をカラムクロマトグラフィ - (ヘキサン：酢酸エチル = 1:1) で精製し化学式22の本発明のビタミンC誘導体である5,6-イソピリデン-アスコルビン酸-2-アセチルジエステル-D- - トコフェロール (0.696 g, 1.01 mmol) を黄色固体として得た。この化合物の  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, IR は次の通り。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 9.57 (1H, bs), 4.88 (1H, d,  $J = 17.6$  Hz), 4.85 (1H, d,  $J = 17.6$  Hz), 4.66 (1H, d,  $J = 3.2$  Hz), 4.35 (1H, dt,  $J = 3.2, 6.8$  Hz), 4.17 (1H, dd,  $J = 6.8, 8.4$  Hz), 1.09 (1H, dd,  $J = 6.4, 8.4$  Hz), 2.60 (2H, t,  $J = 6.4$  Hz), 2.10 (3H, s), 1.99 (3H, s), 1.95 (3H, s), 1.84 - 1.74 (2H, m), 1.56 - 1.03 (30H, m), 0.88 - 0.84 (12H, m);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 172.0, 168.7, 160.5, 150.0, 139.7, 126.2, 124.6, 123.5, 121.6, 117.7, 110.4, 75.3, 74.7, 73.7, 68.5, 65.2, 39.4, 37.44, 37.39, 37.3, 32.8, 32.7, 30.9, 28.0, 25.9, 25.5, 24.8, 24.4, 22.7, 22.6, 21.0, 20.6, 19.8, 19.7, 12.9, 12.1, 11.8; IR (NaCl) 2927, 2869, 1770, 1683, 1457, 1378, 1337, 1255, 1209, 1147, 1068  $\text{cm}^{-1}$

【0083】

【化22】



【0084】

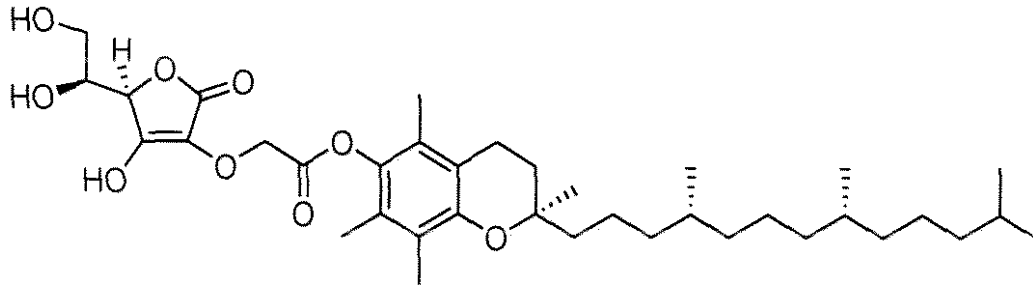
化学式22の化合物 (0.696 g, 1.01 mmol) をメタノール (15 ml) に溶解し、2N HCl (1.62 ml) を加えて50℃ で1時間攪拌した。反応混合物に水を加え、酢酸エチルで抽出し、有機層を水と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。硫酸ナトリウムをろ過した後に溶媒を留去し、得られた残留物をカラムクロマトグラフィ - (塩化メチレン：メタノール = 10:1) で精製し、化学式23の本発明のビタミンC誘導体であるL-アスコルビン酸-2-アセチルジエステル-D- - トコフェロール (0.43 g, 0.66 mmol) を褐色個体として得た。この化合物のこの化合物の  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, IR, 及び比旋光度の値、元素分析値は次の通り。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 4.94 (1H, d,  $J = 16.8$  Hz), 4.91 (1H, d,  $J = 16.8$  Hz), 4.76 - 4.73 (1H, m), 3.83 (1H, dt,  $J = 1.2, 6.8$  Hz), 3.58 (2H, d,  $J = 6.8$  Hz), 2.52 (2H, t,  $J = 6.8$  Hz), 1.98 (3H, s), 1.91 (3H, s), 1.87 (3H, s), 7.13 - 1.68 (2H, m), 1.48 - 0.97 (24H, m), 0.79 - 0.75 (12H, m);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 170.4, 170.3, 160.9, 149.7, 139.8, 126.5, 124.9, 123.2, 120.3, 117.6, 76.3, 75.2, 69

. 8 , 6 7 . 7 , 6 3 . 1 , 3 9 . 4 , 3 7 . 5 , 3 7 . 3 , 3 2 . 8 , 3 2 . 7 , 3 1 . 0 , 2 8 . 0 , 2 4 . 8 , 2 4 . 5 , 2 2 . 7 , 2 2 . 6 , 2 1 . 0 , 2 0 . 5 , 1 9 . 8 , 1 9 . 6 , 1 2 . 9 , 1 2 . 0 , 1 1 . 8 。 IR ( NaCl ) 3 3 6 1 , 2 9 5 1 , 2 9 2 6 , 2 8 6 8 , 1 7 5 8 , 1 6 8 1 , 1 4 6 1 , 1 3 7 7 , 1 3 3 7 , 1 2 0 4 , 1 1 5 2 , 1 1 1 0 , 1 0 7 4 , 1 0 4 5  $\text{cm}^{-1}$  ;  $[\alpha]_D^{25}$  (  $c = \text{g} / 100 \text{ml}$  , solvent ) ,  $[\alpha]_D^{25} + 27.9$  (  $c = 0.54$  ,  $\text{CHCl}_3$  ) 。 元素分析値 :  $\text{C}_{37} \text{H}_{58} \text{O}_9 \cdot \text{H}_2\text{O}$  として理論値 ( % ) = C , 6 6 . 8 4 : H , 9 . 1 0 。 実測値 ( % ) = C , 6 6 . 7 9 : H , 9 . 0 9 。

【 0 0 8 5 】

【 化 2 3 】

10



【 0 0 8 6 】

20

以下上記で合成された本発明の化合物を以下の通り略号で表記する。5 , 6 - イソピロデンビタミン C - 3 - アセチルジエステルビタミン E : IP - AA - 3 - VE 。 ビタミン C - 3 - アセチルジエステルビタミン E : AA - 3 - VE 。 5 , 6 - イソピリデンビタミン C - 2 - アセチルジエステルビタミン E : IP - AA - 2 - VE 。 ビタミン C - 2 - アセチルジエステルビタミン E : AA - 2 - VE 。 5 , 6 - イソピリデンアスコルビン酸 - 3 - アセチルジエステル - DL - - トコフェロ - ル : IP - AA - 3 - DL - - Toc 。 L - アスコルビン酸 - 3 - アセチルジエステル - DL - - トコフェロ - ル : AA - 3 - DL - - Toc 。 5 , 6 - イソピリデン - アスコルビン酸 - 2 - アセチルジエステル - DL - - トコフェロ - ル : IP - AA - 2 - DL - - Toc 。 L - アスコルビン酸 - 2 - アセチルジエステル - DL - - トコフェロ - ル : AA - 2 - DL - - Toc 。 5 , 6 - イソピリデン - アスコルビン酸 - 3 - アセチルジエステル - D - - トコフェロ - ル : IP - AA - 3 - D - - Toc 。 L - アスコルビン酸 - 3 - アセチルジエステル - d - - トコフェロ - ル : AA - 3 - D - - Toc 。 5 , 6 - イソピリデン - アスコルビン酸 - 2 - アセチルジエステル - D - - トコフェロ - ル : IP - AA - 2 - D - - Toc 。 L - アスコルビン酸 - 2 - アセチルジエステル - D - - トコフェロ - ル : AA - 2 - D - - Toc 。

30

さらに、コントロールに使用した既存のビタミン C 誘導体群の物質名とそ略号は以下の通りとする。

アスコルビン酸 - 2 - リン酸 Na : AA - 2 - P

アスコルビン酸 - 2 - グルコシド : AA - 2 - G

40

アスコルビン酸 - 2 - 硫酸カリウム : AA - 2 - S

アスコルビン酸 - 3 - メチル : AA - 3 - M

アスコルビン酸 - 2 - リン酸 - 6 - パルミチン酸 Na : AA - 2 - P - 6 - Pal

アスコルビン酸 - 2 - リン酸トコフェロ - ル K : AA - 2 - P - Toc

アスコルビン酸 - 2 - マレイン酸トコフェロ - ル Na : AA - 2 - M - Toc

本発明の液晶構造を持つ乳化物 ( 以下、液晶乳化物と略す ) は、以下の方法により製造された。

表 1 記載の 1 2 種類の本発明の化合物 5 g 、グリセリン 2 0 g を電動ミキサーで良く混合し、これを A とする。あらかじめ 8 0 に加熱してコレステロール 5 g を溶解させたホホバオイル 2 0 g を B とする。A に B を少量ずつ添加しながら電動ミキサーで良く混合する

50

。12種類の本化合物を10重量%含む淡黄色のペースト状混合物50gを得た。これを以下、液晶乳化物用ペーストと略す。この液晶乳化物用ペースト50gを精製水450gに良く混合し、超音波処理を15分行い、次に0.45 $\mu$ m穴のエクストルーダーを通して白色の乳化物を得た。これを精製水で適当な濃度に希釈し、偏光顕微鏡で観察したところ、特徴的な十字構造のマルターゼクロス像を確認した。これにより、これらの12種類の乳化物が液晶構造を持つことを確認した。

# 【0087】

(安定性試験)

前記合成された12種類の本発明の化合物と、前記で作成された12種類の本発明の化合物を10重量%含有した液晶乳化物用ペーストと、前記記載の既存のアスコルビン酸誘導体であるコントロールに使用した7種類の既存のビタミンC誘導体及びビタミンCとビタミンEの単体を、ITO社製ジェル基材(組成内容は、グリセリン:34.45%、カルボマー:1.13%、ポリアクリル酸Na:0.38%、水:63.92%、メチルパラベン:0.09%、プロピルパラベン:0.03%からなる。)に1重量%で混合し分散体を得た。このとき、液晶乳化物用ペーストについては、10重量%で混合し本発明の液晶乳化物を得た。この液晶乳化物12種を適宜精製水で希釈し偏光顕微鏡で観察したところ、マルターゼクロス像を得た。偏光顕微鏡観察時のマルターゼクロス像の有無の結果を表1に記した。これによりこの12種類の乳化物が液晶構造を有する乳化物であることを確認した。得られた各被験物質を、40℃で6ヶ月間保存してそれぞれの力価を高速液体クロマトグラフィで3回測定し平均値を求め0ヶ月を100%として6ヶ月後の力価を%重量で測定し、その結果95%以上が残存していたものには○、95%未満90%以上が残存していたものには△、90%未満の残存であったものには×で以下表1に示した。

# 【0088】

【表1】

	被験物質名	残存率	評価	液晶乳 化物の 残存率	評価	偏光顕微 鏡による マルター ゼクロス 像の有無
本発明 の化合 物	IP-AA-3-VE	92%	○	96%	◎	有
	AA-3-VE	94%	○	99%	◎	有
	IP-AA-3-VE	93%	○	98%	◎	有
	AA-3-VE	92%	○	96%	◎	有
	IP-AA-2-VE	94%	○	98%	◎	有
	AA-2-VE	93%	○	96%	◎	有
	IP-AA-3-dl- $\alpha$ -Toc	92%	○	97%	◎	有
	AA-3-dl- $\alpha$ -Toc	94%	○	99%	◎	有
	IP-AA-2-dl- $\alpha$ -Toc	94%	○	98%	◎	有

	AA-2-d 1- $\alpha$ -Toc	93%	○	95%	◎	有
	IP-AA-3-d- $\alpha$ -Toc	93%	○	97%	◎	有
	AA-3-d- $\alpha$ -Toc	92%	○	98%	◎	有
	IP-AA-2-d- $\alpha$ -Toc	94%	○	97%	◎	有
	AA-2-d- $\alpha$ -Toc	94%	○	99%	◎	有
コント ロール	AA-2-P	62%	X			
	AA-2-G	96%	○			
	AA-2-S	98%	○			
	AA-2-P-6-Pal	55%	X			
	AA-3-M	95%	○			
	AA-2-P-Toc	94%	○			
	AA-2-M-Toc	45%	X			
	ビタミンC	12%	X			
	ビタミンE	79%	△			

10

20

## 【0089】

上記の結果より、本発明の12種の全ての化合物は、90%以上が残存しであり、本発明の化合物を含む液晶乳化物は、全て95%以上が残存したのに対して、コントロールでは、AA-2-PとASA-2-P-6-PalとASA-2-M-Toc、及びビタミンCとビタミンEの単体の安定性が悪く80%以下であった。AA-2-PとASA-2-P-6-PalとASA-2-M-Toc及びビタミンCの3種類のコントロールのビタミンC誘導体はHPLCにおける測定値が低だけでなく、異臭を伴う褐色に変色した溶液となっており、実用に耐えなかった。さらに、ASA-2-P-6-PalとASA-2-M-Tocの2種類のコントロールには、粒状の沈殿が発生しさらに実用に耐えない状態であった。ルールの安定性の悪い種類の化合物は、安定性が悪く実用に耐えないという判断から、以下の試験においてはコントロールから除くことにした。尚、で示したものは、淡茶色に変色し、異臭が発生しており、これらの変色や異臭は、化粧品、食品、医薬品、飼料などの商品価値を低下させるものであった。さらに、Xで示したものは、茶褐色に酷く変色し、砂糖を焦がしたような異臭が発生しており、これらの変色や異臭は、これらが含有された商品の価値をを目覚ましく低下し使用不能にさせるものであり、これに対し本発明の化合物は、これらの皮膚吸収性が高く化粧品や外用医薬品などの外用組成物、ヒト用や動物用のラジカル疾患治療薬、抗酸化組成物としての商品価値を高め、その有用性及び有効性を証明するものであった。

30

40

## 【0090】

(皮膚組織への吸収性の比較)

前記合成された12種類の本発明の化合物群と、上記の安定性試験で安定性が確保できなかった3種類のビタミンC誘導体を除いた3種類を除く4種類のコントロールのビタミンC誘導体、及びビタミンCとビタミンEの単体を使用して皮膚組織への経皮吸収性を測定した。本発明の12種類のビタミンC誘導体と4種類のコントロールのビタミンC誘導体をITO社製ポリアクリル酸系ジェル基材に1重量%で混合し分散体を得た。これらのジ

50



ジェル分散体を角層及び角質層を有するヒト3次元表皮モデルに1平方cm当たり0.1gを塗布し、これを37℃で3時間培養した後に、ジェル分散体を除去しPBSで5回洗浄した後、塗布部の組織を切り取り、10倍量のPBSとともにホモジナイズし、2%メタリン酸で除タンパクした後、上澄み液中のアスコルビン酸誘導体量を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により測定した。前記の実験で安定性が99%と最も高かった本発明のビタミンC誘導体AsA-2-d- $\alpha$ -TocのHPLC検出量を100%として、他の誘導体の検出量を%で表示して以下の表2にまとめた。また、結果をわかりやすくするために経メラニン抑制率が90%以上であったものに○を、70-90%で合ったものに△、70%以下であったものにXを付けた。

【0091】

【表2】

本発明 の化合 物	IP-AA-3-VE	95%	○
	AA-3-VE	94%	○
	IP-AA-3-VE	94%	○
	AA-3-VE	95%	○
	IP-AA-2-VE	97%	○
	AA-2-VE	98%	○
	IP-AA-3-dl- $\alpha$ -Toc	94%	○
	AA-3-dl- $\alpha$ -Toc	95%	○
	IP-AA-2-dl- $\alpha$ -Toc	96%	○
	AA-2-dl- $\alpha$ -Toc	97%	○
	IP-AA-3-d- $\alpha$ -Toc	95%	○
	AA-3-d- $\alpha$ -Toc	94%	○
	IP-AA-2-d- $\alpha$ -Toc	98%	○

コント ロール	AA-2-d- $\alpha$ -Toc	100%	○
	AA-2-G	69%	X
	AA-2-S	45%	X
	AA-3-M	75%	△
	AA-2-P-Toc	95%	○
	ビタミンC	31%	X
	ビタミンE	88%	△

上記の経皮吸収性の実験結果より本発明の12種類の全ての誘導体は優れた経皮吸収性を示したが、コントロールのAsA-2-G、AsA-2-S、AsA-3-M、ビタミンC、ビタミンEは経皮吸収性が明らかに本発明のビタミンC誘導体に比較し劣っていた。安定性試験の結果と経皮吸収性の2つの結果を総合すると、本発明のビタミンC誘導体と同等の性能を持つ既存のコントロールはAsA-2-P-Tocのみが残った。従ってこれらの○やXで示されたコントロールの化合物は、これらが含有された商品の価値

を目覚ましく低下し使用不能にさせるものであり、これに対し本発明の化合物は、これらの皮膚吸収性が高く化粧品や外用医薬品などの外用組成物、ヒト用や動物用のラジカル疾患治療薬、抗酸化組成物としての商品価値を高め、その有用性及び有効性を証明するものであった。

# 【 0 0 9 2 】

(色素細胞を使用したメラニン産生抑制作用)

前記合成された12種類の本発明の化合物群とコントロールのビタミンC誘導体4種類の内、上記の皮膚組織への吸収性試験で吸収性が悪かったコントロールの3種類のビタミンC誘導体を除いた1種類のコントロールのビタミンC誘導体を使用してB16メラノーマ細胞を使用したメラニン産生抑制試験を実施した。

10

メラニン産生に対する抑制効果試験にはマウスB16マウスメラノーマ4A5細胞(B164A5)を用いた。B16メラノーマ4A5を48ウェルマイクロプレートに播種し、10%FBS含有DMEM培地にて37、5%CO<sub>2</sub>の条件下で24時間培養後、100μmol/L相当のアスコルビン酸誘導体(本発明及びコントロールのアスコルビン酸誘導体)と1mmol/Lのテオフィリンを添加した10%FBS含有DMEM培地(同上)に交換し、37、5%CO<sub>2</sub>の条件下で72時間培養を行った。培養終了後、培地を除去して精製水に置換し、超音波にて細胞を破碎した後、メラニン定量用とタンパク定量用に2分割した。メラニン定量は細胞破碎液を1mol/L NaOHに60、30分間可溶化し、吸光光度計にて405nmの吸光度を測定した。タンパク定量はPierce BCA protein assay kitを用いて37、30分間処理した後、分光光度計(同上)にて570nmの吸光度を測定した。この様にして得たメラニンとタンパクの吸光度を除算し、単位タンパク辺りあたりのメラニン量としてメラニン産生抑制率の計算に供した。メラニン産生抑制率を求める計算式は、テオフィリンと各化合物を含む培地の吸光度をML<sub>s</sub>、テオフィリンのみを含む培地の吸光度をML<sub>c</sub>、テオフィリンも各化合物も含まない培地の吸光度をML<sub>n</sub>と表すと、以下のような計算式で示される。

20

メラニン産生抑制率(%) =  $\left( \left( \frac{ML_c - ML_s}{ML_c - ML_n} \right) - 1 \right) \times 100$

他のコントロールの誘導体とメラニン産生抑制率を比較するために、この実験において本発明ビタミンC誘導体の中でメラニン産生抑制率が72%と最も効果の高かったASA-2-d-Tocのメラニン抑制率を100%として、他の誘導体の検出量を%で表示して以下の表3にまとめた。また、さらに結果をわかりやすくするために経メラニン抑制率が90%以上であったものに○を、70-90%で合ったものに△、70%以下であったものにXを付けた。

30

# 【 0 0 9 3 】

【表 3】

本発明の化合物	IP-AA-3-VE	91%	○
	AA-3-VE	95%	○
	IP-AA-2-VE	94%	○
	AA-2-VE	93%	○
	IP-AA-3-dl- $\alpha$ -Toc	93%	○
	AA-3-dl- $\alpha$ -Toc	96%	○
	IP-AA-2-dl- $\alpha$ -Toc	97%	○
	AA-2-dl- $\alpha$ -Toc	96%	○
	IP-AA-3-d- $\alpha$ -Toc	95%	○
	AA-3-d- $\alpha$ -Toc	97%	○
	IP-AA-2-d- $\alpha$ -Toc	98%	○
	AA-2-d- $\alpha$ -Toc	100%	○
コントロールの誘導体	AA-3-M	55%	X
	AA-2-P-Toc	62%	X

10

20

## 【0094】

上記の実験結果より本発明の12種類の全ての誘導体は優れたメラニン産生抑制率を示したが、コントロールのAA-3-M、AA-2-P-Tocの2種はメラニン産生抑制率が明らかに劣っていた。誘導体から分離されたフリーのビタミンCやビタミンEが細胞に存在すればメラニン産生抑制作用を発現することは既に良く知られていることから、これらのXで示されたコントロールの化合物は、メラニン抑制を目的とした化粧品や外用医薬品などの外用組成物、食品添加物や飼料添加物の経口用組成物の商品価値を目覚ましく低下し使用不能にさせるものであり、これに対し本発明の化合物は、メラニン産生抑制率

30

。以上

以上の安定性試験、皮膚組織吸収性試験、メラニン産生抑制試験の3つの試験により、明らかに従来のコントロールのアスコルビン酸誘導体に比較し本発明のアスコルビン酸誘導体は、優れた効果を発揮することが確認された。AA-2-Mのメラニン産生抑制作用が本発明のビタミンC誘導体より低かったのは、皮膚への吸収性の結果がであり明らかに本発明の誘導体より劣っていたためと考えられ、これはAA-3-メチルの側鎖の分子量が明らかに小さく極性が低いために両親媒性能が本発明のビタミンC誘導体よりも低く脂溶性と水溶性バリアの複層からなる皮膚バリアを透過する性能が本発明のビタミンC誘導体の方が高かったためと考えられる。さらに既存のAA-2-P-Toc誘導体よりもメラニン産生抑制作用が本発明の誘導体が高かったのは、リン酸を介したジエステル誘導体は、安定性が極めて高いためでなく、皮膚組織内のフォスファターゼによる加水分解作用を極めて受けにくいことがわかっており、生体中でのアスコルビン酸活性が本発明の誘導体に比較し低かったことが推定された。

40

## 【0095】

(メラニン産生細胞に対する毒性試験)

前記合成された12種類の本発明の化合物群とコントロールの美白剤を使用してメラニン産生細胞に対する毒性試験を実施した。

50

メラニン産生細胞に対する毒性試験にはマウスB16メラノ-マ4A5細胞(B164A5)を用いた。B16メラノ-マ4A5を48ウェルマイクロプレートに播種し、10%FBS含有DMEM培地に37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で24時間培養後、1mmol/L相当の本発明のアスコルビン酸誘導体と比較対象の既存のビタミンC誘導体以外の美白剤及び培地成分のみの無添加コントロールに対して10%FBS含有DMEM培地(同上)に交換し、37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で72時間培養を行った。

培養終了後、培地を0.5mg/mL MTTを含む10%FBS含有DMEM培地(同上)に交換し、3時間培養後に0.04mol/L N H C l / I P Aに交換して細胞を溶解した。細胞溶解液を吸光度計を用いて570nmの吸光度を測定し、細胞増殖率を計算した。細胞増殖率は、サンプルを処理した細胞の吸光度をMTTsとし、サンプルを処理していない無添加コントロールの細胞の吸光度をMTTcで表すと、以下の計算式で示される。

$$\text{細胞増殖率(\%)} = ((\text{MTTs} / \text{MTTc}) - 1) \times 100$$

他のコントロールの誘導体と細胞増殖率を比較するために、この実験において本発明ビタミンC誘導体の中で美白剤無添加コントロールに対して細胞増殖率が正の値のものは、細胞に対する毒性は陰性として評価し、細胞増殖率が0又は負の値であるもの(細胞が全く増殖しないか、逆に細胞が斃死して減少しているもの)については、細胞増殖抑制作用があるとして細胞毒性を陽性として評価した。

【0096】

実験結果を、以下の表4にまとめた。

【表4】

本発明の ビタミンC 誘導体	IP-AA-3-VE	陰性
	AA-3-VE	陰性
	IP-AA-3-VE	陰性
	AA-3-VE	陰性
	IP-AA-2-VE	陰性
	AA-2-VE	陰性
	IP-AA-3-d $\alpha$ -Toc	陰性
	AA-3-dl- $\alpha$ -Toc	陰性
	IP-AA-2-d $\alpha$ -Toc	陰性
	AA-2-d $\alpha$ -Toc	陰性
	IP-AA-3-d $\alpha$ -Toc	陰性
	AA-3-d $\alpha$ -Toc	陰性
	IP-AA-2-d $\alpha$ -Toc	陰性
	AA-2-d $\alpha$ -Toc	陰性
コント ロール	茶カテキン	陽性
	ハイドロキノン	陽性
	レスベラトロール	陽性
	リンゴポリフェノール	陽性
	ソウハクヒポリフェノール	陽性
	ラズベリーケトン	陽性
	コウジ酸	陽性
	ブドウポリフェノール	陽性
	アントシアニン	陽性

【0097】

上記の結果より、本発明の化合物は、色素細胞に対してもメラニン抑制作用はあるものの細胞死促進作用などの色素細胞に対する毒性が認められなかったことから、高い安全性が確認された。一方、既存の天然フェノール類を含む美白剤は色素細胞抑制作用が少な

らず認められ、明らかに色素細胞に対する安全性が本発明の化合物に比較し劣っていた。誘導体から変換されたフリー体のビタミンC及びビタミンEは、細胞毒性軽減効果が知られている。これらの陽性で示されたコントロールの化合物は、色素細胞に対して高い毒性を示すことから、皮膚組織に紅斑や白斑を発生させる確率が高くなる為に、これらが含有された商品の価値を目覚ましく低下させるものである。これに対し本発明の化合物は、色素細胞に対しても毒性が低く、細胞内に効率的に取り込まれて高率でビタミンC及びビタミンE活性を発現することが示され、化粧品や外用医薬品などの外用組成物、食品添加物や飼料添加物などの経口用組成物、ヒト用や動物用のラジカル疾患治療薬、細胞増殖促進組成物、抗酸化組成物としての商品価値を高め、その有用性及び有効性を証明するものであった。。

10

## 【0098】

(細胞に対する増殖効果)

凍結した正常ヒト線維芽細胞NHDF(NB)を解凍後、NHDFを96ウェルマイクロプレ-トに播種し、10%FBS含有DMEM培地にて37、5%CO<sub>2</sub>の条件下で2日間培養後、300μmol/L相当の本発明の化合物及び同量のコントロールの誘導体を添加し3日間培養後、培地を0.5mg/mLMTTを含む10%FBS含有DMEM培地(同上)に交換し、3日間培養後に0.04mol/LNHCl/IPAに交換して細胞を溶解した。細胞溶解液を吸光度計を用いて570nmの吸光度を測定し、細胞増殖率を計算した。細胞増殖率は、サンプルを処理した細胞の吸光度をMTTsとし、サンプルを処理していない無添加コントロールの細胞の吸光度をMTTcで表すと、以下の計算式で示される。

20

$$\text{細胞増加率}(\%) = ((\text{MTTs} / \text{MTTc}) - 1) \times 100$$

結果として、コントロールに対する3日後の細胞増加率を測定算出し、30%以上細胞数が増加したのものには、10%以上30%未満の増加が認められものにはを10%未満か、減少したものにはxを付けて表5に示した。比較として、既存の誘導体及びビタミンCをコントロールの誘導体として使用した。無添加コントロールに比較し本発明のビタミンC誘導体を常法の細胞培養条件で3日間培養すると最低でも30%以上に細胞数が無添加コントロールに比較して増加することが判明した。誘導体から変換されたフリー体のビタミンC及びビタミンEは、細胞増殖率を増加させることが知られている。これらのXで示されたコントロールの化合物は、細胞増殖率が極端に低いことから、これらが含有された商品の価値を目覚ましく低下させるものであり、これに対し本発明の化合物は、細胞増殖率が高く、細胞内に効率的に取り込まれて高率でビタミンC及びビタミンE活性を発現することが示され、化粧品や外用医薬品などの外用組成物、食品添加物や飼料添加物などの経口用組成物、ヒト用や動物用のラジカル疾患治療薬、細胞増殖促進組成物、抗酸化組成物としての商品価値を高め、その有用性及び有効性を証明するものであった。。

30

## 【0099】

同様な実験をヒト表皮角化細胞、毛母細胞、心筋細胞、肝細胞、腎細胞、肺上皮細胞、腸粘膜細胞、グリア細胞、血管内皮細胞、脂肪細胞、幹細胞、造血幹細胞、多能性幹細胞、基底層幹細胞、ES細胞、iPS細胞の複数の細胞についても行ったが、本発明の表5の化合物は、いずれもであり、対象区の表5のコントロールの誘導体は、いずれもXであった。

40

## 【0100】

## 【表5】

	被験物質	細胞増加率 (%)	評価
本発明の化合物	IP-AA-3-VE	31	◎
	AA-3-VE	35	◎

50

	IP-AA-2-VE	34	◎
	AA-2-VE	38	◎
	IP-AA-3-d1- $\alpha$ -Toc	37	◎
	AA-3-d1- $\alpha$ -Toc	36	◎
	IP-AA-2-d1- $\alpha$ -Toc	37	◎
	AA-2-d1- $\alpha$ -Toc	37	◎
	IP-AA-3-d- $\alpha$ -Toc	38	◎
	AA-3-d- $\alpha$ -Toc	36	◎
	IP-AA-2-d- $\alpha$ -Toc	39	◎
	AA-2-d- $\alpha$ -Toc	37	◎
コントロールの誘導体	AA-2-P	6	X
	AA-2-G	9	X
	AA-2-S	1	X
	AA-2-P-6-Pal	5	X
	AA-3-M	7	X
	AA-2-P-Toc	3	X
	AA-2-M-Toc	7	X
	ビタミンC	1	X

## 【0101】

上記の実験結果より本発明の12種類の全ての誘導体に比較し、コントロールのAA-3-M、AA-2-P-Tocの2種は細胞増殖率が明らかに劣っていた。これは細胞中でのビタミンCへの変換率が、本発明では従来の安定性の良好なビタミンC誘導体に比較し優れていることを示唆している。従来品のビタミンC誘導体は安定性が良好である反面、細胞中でのビタミンC変換率が劣るものと考えられる。誘導体から変換されたフリー体のビタミンC及びビタミンEは、細胞増殖率を増加させることが知られている。これらのXで示されたコントロールの化合物は、細胞増殖率が極端に低いことからこれらが含有された商品の価値を目覚ましく低下させるものであり、これに対し本発明の化合物は、細胞増殖率が高く、細胞内に効率的に取り込まれて高率でビタミンC及びビタミンE活性を発現することが示され、化粧品や外用医薬品などの外用組成物、食品添加物や飼料添加物などの経口用組成物、ヒト用や動物用のラジカル疾患治療薬、細胞増殖促進組成物、抗酸化組成物としての商品価値を高め、その有用性及び有効性を証明するものであった。。

## 【0102】

以上の安定性試験、皮膚組織吸収性試験、メラニン産生抑制試験、細胞増殖率促進試験の4つの試験により、明らかに従来のコントロールのアスコルビン酸誘導体に比較し本発明のアスコルビン酸誘導体は、優れた効果を発揮することが確認された。AA-2-Mの細胞増殖率が本発明のビタミンC誘導体より低かったのは、皮膚への吸収性の結果であり明らかに本発明の誘導体より劣っていたためと考えられ、これはAA-3-メチルの側鎖の分子量が明らかに小さく極性が低いため両親媒性能が本発明のビタミンC誘導体よりも低く脂溶性と水溶性バリアの複層からなる皮膚バリアを透過する性能が本発明のビタミンC誘導体の方が高かったためと考えられる。

## 【 0 1 0 3 】

さらに既存の A A - 2 - P - T o c 誘導体よりも細胞増殖率が本発明の誘導体により高かったのは、リン酸を介したジエステル誘導体は、安定性が極めて高いためでなく、皮膚組織内のフォスファタ - ゼによる加水分解作用を極めて受けにくいことがわかっており、生体中でのアスコルビン酸活性が本発明の誘導体に比較し低かったことが推定された。アスコルビン酸と酵素的に加水分解される一部のビタミン C 誘導体には、線維芽細胞において高いコラ - ゲン産生能力が知られており、その能力は F G F ( 線維芽細胞増殖因子 ) よりも高いという報告もある。本発明の化合物は、既存のビタミン C 誘導体に比較し安定性が高く、かつ A A - 2 - P - T o c のような酵素的加水分解作用の低いリン酸ジエステル構造を持たないために A A - 2 - P - T o c よりも高いメラニン産生抑制能と線維芽細胞増殖作用を持ったと推定された。

10

また、本発明の化合物は、線維芽細胞増殖性において促進作用はあるものの抑制作用は認められなかったことから、高い安全性が認められた。

## 【 0 1 0 4 】

## ( 臨床試験 )

本発明の表 6 に示す化合物のニキビ、シワ及び毛穴に対する効果を調べるために、被験者に対して十分に説明し、研究への参加について自由意思による同意を得たものに対してのみ、本発明の A A - 2 - d l - - T O C の臨床試験を行った。試験は、I T O 社製ジェル基材に対して表 6 に示す本発明の化合物を 0 . 1 % 配合したジェル製剤とコントロールとして表 6 のコントロールの誘導体及びビタミン C をそれぞれ同量添加したジェル基材及びプラセボのジェル基材の 3 区で行った。1 区当たり 7 名の被験者に対して朝晩 1 日 2 回洗顔後に全顔に塗布し、1 ~ 2 ヶ月試験を行った。評価方法としては、顔面画像解析装置 ( V I S I A 及びロボスキャンアナライザー ) によりニキビ数を試験開始時と 1 カ月後の試験終了時の 2 回行い、実験スタート時から何パーセント改善したかについての改善率について比較を行った。結果は、 $( ( \text{試験区のニキビ数} / \text{無添加コントロールのニキビ数} ) \times 100 ) - 100 = \text{細胞増殖率} ( \% )$  による計算式で細胞増殖率 ( % ) を算出し比較した。

20

## 【 0 1 0 5 】

結果として、30 % 以上改善したものには、10 % 以上 - 30 % 未満の改善が認められものには、を、10 % 未満のものには x を付けて表 6 に示した。その結果、ニキビ数の測定において、プラセボのジェル基材区及びコントロールの誘導体を同量添加したジェル基材区に比較し本発明のビタミン C 誘導体及びビタミン C は全ての試験項目において 30 % 以上改善し本発明のビタミン C 誘導体の効果を確認することができた。同様の解析を顔面画像解析装置 ( V I S I A 及びロボスキャンアナライザー ) を使用して赤み面積、ポルフィリンスポット数、毛穴数及びシワ数についても行ったが、本発明の表 6 の化合物は、いずれもであり、対象区の表 6 のコントロールの誘導体は、いずれも X であった。本結果より本発明の化合物は、臨床効果が高く、細胞内に効率的に取り込まれて高率でビタミン C 及びビタミン E 活性を発現することが示され、化粧品や外用医薬品などの外用組成物、ヒト用や動物用のラジカル疾患治療薬、細胞増殖促進組成物、抗酸化組成物としての商品価値を高め、その有用性及び有効性を証明するものであった。。ニキビ、シミ、シワの増加は、表皮の脂質過酸化の促進によることも報告されており、ラジカル疾患の範疇であり、更にこのような脂質過酸化を誘導体から変換されたフリー体のビタミン C やビタミン E などの抗酸化組成物により抑制できることから本発明の化合物の使用により良好な臨床結果となったと考えられる。

30

40

## 【 0 1 0 2 】

【表 6】

	被験物質	改善率 (%)	評価
本発明の化合物	IP-AA-3-VE	43	◎
	AA-3-VE	32	◎
	IP-AA-2-VE	47	◎
	AA-2-VE	49	◎
	IP-AA-3-dl- $\alpha$ -Toc	51	◎
	AA-3-dl- $\alpha$ -Toc	37	◎
	IP-AA-2-dl- $\alpha$ -Toc	50	◎
	AA-2-dl- $\alpha$ -Toc	48	◎
	IP-AA-3-d- $\alpha$ -Toc	53	◎
	AA-3-d- $\alpha$ -Toc	59	◎

10

20

	IP-AA-2-d- $\alpha$ -Toc	52	◎
	AA-2-d- $\alpha$ -Toc	54	◎
コントロール の誘導体	AA-2-P	6	X
	AA-2-G	5	X
	AA-2-S	-11	X
	AA-2-P-6-Pal	7	X
	AA-3-M	4	X
	AA-2-P-Toc	6	X
	AA-2-M-Toc	4	X
	ビタミンC	-5	X

30

## 【0106】

(温度ストレス細胞死抑制作用)

凍結した正常ヒト真皮線維芽細胞を融解後、ヒト真皮線維芽細胞用無血清培地で3日間培養し、さらに2回継代した。そして、3回目の継代前に45℃3時間の高温ストレスを付加した後、300  $\mu$ mol/L相当の本発明の化合物及び同量のコントロールの誘導体を添加し3日間培養後、培地を0.5 mg/mL MTTを含む10% FBS含有DME M培地(同上)に交換し、3日間培養後に0.04 mol/L N HCl / IPAに交換して細胞を溶解した。細胞溶解液を吸光度計を用いて570 nmの吸光度を測定し、細胞増殖率を計算した。細胞増殖率は、サンプルを処理した細胞の吸光度をMTTsとし、サンプルを処理していない無添加コントロールの細胞の吸光度をMTTcで表すと、以下の計算式で示される。

40

$$\text{細胞増加率}(\%) = ((\text{MTTs} / \text{MTTc}) - 1) \times 100$$

## 【0107】

50



結果として、無添加コントロールに比較し30%以上細胞数が増加したものには、30%未満の増加が認められたものには○を、増加が認められないか、減少したものには×を付けて表7に示した。比較として、既存の誘導体及びビタミンCをコントロールに用いた。無添加コントロールに比較し表7で示された本発明の化合物を1  $\mu\text{mol/L}$  濃度で添加して3日間培養後、細胞をそれぞれの細胞に適した既存培地で培養すると30%以上細胞数が無添加コントロールに比較して増加することが判明した。無添加コントロールでは、温度ストレスにより細胞数は逆に減少した。同様な実験をヒト表皮角化細胞、毛母細胞、心筋細胞、肝細胞、腎細胞、肺上皮細胞、腸粘膜細胞、グリア細胞、血管内皮細胞、脂肪細胞、幹細胞、造血幹細胞、多能性幹細胞、基底層幹細胞、ES細胞、iPS細胞についても行ったが、本発明の表7の化合物は、いずれも○であり、対象区の表7のコントロールの誘導体は、いずれも×であった。本結果より本発明の化合物は、温度ストレスに対する効果が高いことが示されたことにより、抗ストレス用の食品添加物や飼料添加物として高い効果が期待できることが証明された。さらにビタミンCやビタミンEは細胞の温度ストレスを低減させることが既に知られていることから、本結果から、本発明の化合物が細胞内に効率的に取り込まれて高率でビタミンC及びビタミンE活性を発現することが示され、化粧品や外用医薬品などの外用組成物、食品添加物や飼料添加物などの経口用組成物、ヒト用や動物用のラジカル疾患治療薬、細胞増殖促進組成物、抗酸化組成物としての商品価値を高め、その有用性及び有効性を証明するものであった。

【0108】

【表7】

	被験物質	細胞増加率 (%)	評価
本発明の化合物	IP-AA-3-VE	32	◎
	AA-3-VE	31	◎
	IP-AA-2-VE	31	◎
	AA-2-VE	35	◎
	IP-AA-3-dl- $\alpha$ -Toc	34	◎
	AA-3-dl- $\alpha$ -Toc	33	◎
	IP-AA-2-dl- $\alpha$ -Toc	34	◎
	AA-2-dl- $\alpha$ -Toc	34	◎
	IP-AA-3-d- $\alpha$ -Toc	35	◎
	AA-3-d- $\alpha$ -Toc	33	◎
	IP-AA-2-d- $\alpha$ -Toc	34	◎
	AA-2-d- $\alpha$ -Toc	32	◎
コントロールの誘導体	AA-2-P	5	X
	AA-2-G	8	X
	AA-2-S	4	X
	AA-2-P-6-Pal	3	X
	AA-3-M	3	X
	AA-2-P-Toc	2	X

	AA-2-M-Toc	5	X
	ビタミンC	-21	X

## 【実施例 A】

## 【0109】

P G A系高分子からなる縫合糸である D a v i s & G r e c k 社製、商品名「D e x o n」の 1 . 0 g を表 8 に示した本発明の 1 % 重量濃度の水溶液溶液で浸漬した後、取り出した。風乾後、本発明の本発明に使用される吸水性高分子組成物の実施例である縫合糸を得た。比較として、本発明の化合物を浸漬しないもの及び既存の L - アスコルビン酸 - 2 - グルコシドを同量配合したものを比較対象に用いた。

10

次に、10 週齢のモルモットの背部を毛刈りし、背部正中線に垂直な方向にメスで長さ 2 c m の切創を作成した。各実施例、比較例の糸を用いて、この切創部を等間隔で 5 ケ所本発明に使用される吸水性して傷を修復させた。この処置の 1 週間後にモルモットをエ - テル麻酔下で、切創中央部から左右に 1 c m 幅の短冊状の皮膚組織を切除しレオメ - タ - を用いて切創部の耐抗張力 ( g / c m ) を測定した。それぞれの実施例および比較例について 10 匹のモルモットを用いて行い、耐抗張力 ( g / c m ) はこれらモルモットについて得られた値の平均値を取った。

結果は、 $( ( \text{試験区の耐抗張力} / \text{無添加コントロールの耐抗張力} ) \times 100 ) - 100 = \text{増加耐抗張力率} ( \% )$  による計算式で増加した耐抗張力率 ( % ) を算出し比較した。増加耐抗張力率 ( % ) が 20 % 以上増加したものには、10 % 以上 20 % 未満の増加が認められものには を、10 % 未満の増加が認められたものには x を付けて表 8 に示した。比較として、表 8 の既存のコントロールの誘導体及びビタミン C を同量配合したものを比較対象コントロールに用いた。

20

## 【0110】

## 【表 8】

	被験物質	増加耐抗張力率 (%)	評価
本発明の化合物	IP-AA-3-VE	33	◎
	AA-3-VE	36	◎
	IP-AA-2-VE	31	◎
	AA-2-VE	34	◎
	IP-AA-3-dl- $\alpha$ -Toc	35	◎
	AA-3-dl- $\alpha$ -Toc	33	◎
	IP-AA-2-dl- $\alpha$ -Toc	34	◎
	AA-2-dl- $\alpha$ -Toc	32	◎

30

40

	IP-AA-3-d- $\alpha$ -Toc	35	◎
	AA-3-d- $\alpha$ -Toc	36	◎
	IP-AA-2-d- $\alpha$ -Toc	35	◎
	AA-2-d- $\alpha$ -Toc	34	◎
コントロールの誘導体	AA-2-P	6	X
	AA-2-G	3	X
	AA-2-S	2	X
	AA-2-P-6-Pal	6	X
	AA-3-M	5	X
	AA-2-P-Toc	3	X
	AA-2-M-Toc	6	X
	ビタミンC	3	X

10

20

## 【0111】

以上の結果より本発明の化合物では、耐抗張力が大きく上昇したことが確認された。本結果より本発明の化合物は、耐抗張力が大きく上昇したことが示されたことにより、コラーゲン合成が良好に進み組織の細胞増殖が亢進し創傷治癒効果が発現されたと考えられる。組織の、耐抗張力の増加による創傷治癒効果は、本発明の化合物を経口投与した場合にも認められ食品添加物や飼料添加物として高い効果が期待でき、さらにビタミンCやビタミンEは組織の創傷治癒を亢進することが知られていることから、本結果より、本発明の化合物が組織内に効率的に取り込まれて高率でビタミンC及びビタミンE活性を発現することが示された。従って本発明の化合物は細胞増殖による創傷治癒効果を有する化粧品や外用医薬品などの外用組成物、食品添加物や飼料添加物などの経口用組成物、ヒト用や動物用のラジカル疾患治療薬、細胞増殖促進組成物、抗酸化組成物としての商品価値を高め、その有用性及び有効性を証明するものであった。

30

## 【実施例8】

## 【0112】

細胞増殖による創傷治癒効果を有する細胞増殖促進組成物の以下に示す。以下表9に示した本発明の化合物それぞれ0.1重量部に対し、ポリブチレンサクシネートPBS（ビオノレ1001、昭和高分子製）84重量部、ポリエチレンテレフタレートPET（ダイヤナイトPA-500、三菱レイヨン製）10重量部、及びエチレングリシジルメタクリレート共重合体E-GMA（反応性相溶化剤、ボンドファーストE、住友化学製）1重量部をそれぞれ加え、2軸押出機（株式会社テクノベル製、KZW15-30MG）を用いて、240にて常法にて溶融混練し、約3mmの直径で水中に押し出し・固化し、次いで3mm長に切断し、それぞれの樹脂チップを得た。この際の押出条件は以下の通りであった。

40

## 【0113】

【表 9】

本発明の化合物	IP-AA-3-VE
	AA-3-VE
	IP-AA-2-VE
	AA-2-VE
	IP-AA-3-dl- $\alpha$ -Toc
	AA-3-dl- $\alpha$ -Toc
	IP-AA-2-dl- $\alpha$ -Toc
	AA-2-dl- $\alpha$ -Toc
	IP-AA-3-d- $\alpha$ -Toc
	AA-3-d- $\alpha$ -Toc
	IP-AA-2-d- $\alpha$ -Toc
	AA-2-d- $\alpha$ -Toc

10

## 【0114】

## &lt;押出条件&gt;

温度設定：フィード180、混練部240、ヘッド180、回転数：60rpm

得られたそれぞれのチップをプレス成形（プレス成形機：株式会社神藤金属工業所製）し  
それぞれの本発明の本発明に使用される吸水性高分子組成物の実施例である大腿骨補強材  
材料及び骨折修復用ビスを作製した。

20

## &lt;プレス成形条件&gt;

180のプレス温度で、10MPaで1分間加圧した後に、20MPaで2分間加圧し  
た。その後、冷却プレスにて3分間冷却した。

## 【実施例】

## 【0115】

細胞増殖による創傷治癒効果を有する細胞増殖促進組成物の以下に示す。1重量%のアル  
ギン酸ナトリウム水溶液と前項の表10に記載された本発明の化合物をそれぞれ1重量%  
含む水溶液に、スプレードライにより粒径50 $\mu$ m程度に調製した水酸アパタイト（HA  
）を10重量%になるようにように混合し、均一なスラリーとした。このスラリーを、1  
重量%の塩化カルシウム水溶液に3 $\mu$ lずつ滴下することにより、球状に成形した。上記  
のように成型した球状HAを60で12時間乾燥した後、1250で1時間焼結する  
ことにより、直径0.8 $\pm$ 0.2の多孔質球状骨材粒子を得た。この多孔質球状骨材  
粒子を真空減圧し超純水に前記実施例で作成したそれぞれの水性乳化分散剤を10%重  
量で溶解した水溶液を0.2 $\mu$ mのメンブランフィルタで滅菌ろ過したものを1:1で  
添加した後、凍結乾燥し本発明の化合物が含有された本発明の本発明に使用される吸水性  
高分子組成物の実施例である骨修復用の多孔質球状骨材粒子を得た。

30

一方、第四リン酸カルシウム（TeCP）と第二リン酸カルシウム（DCP）を等モルず  
つ混合したものに10%重量の前記実施例で作成したそれぞれの水性乳化分散剤を含む  
超純水で練和することにより本発明の本発明に使用される吸水性高分子組成物の実施例  
である骨修復用の自己硬化型リン酸カルシウムセメントペストを調製した。

40

## 【0116】

次いで、上記自己硬化型リン酸カルシウムセメントペストに上記骨材粒子を80vol  
%になるように混合したものを、ペスト内に気泡を取り込むように練和し、骨欠損部の  
CTデータを基に作製された骨欠損部位形状の印象型に充填し、大気中、室温で24時間  
放置して、骨欠損部位形状のセメント硬化体とした。上記方法により本発明の本発明に使  
用される吸水性高分子組成物の実施例である骨欠損部位形状のリン酸カルシウム多孔体  
を得ることができた。このリン酸カルシウム多孔体内には100 $\mu$ m程度のマクロポアと数  
ミクロンのミクロポアが分布していた。また、上記マクロポアは、隣接する骨材粒子内の

50

ミクロボアにより結合しており、連通孔ネットワークを形成していた。モルモット骨欠損モデルで試験したところ無添加コントロール同素材と比較した結果骨形修復スピードが従来物より数倍速く治癒した。結果として、無添加コントロールに比較し骨形修復スピードが2倍以上早く治癒したのものには、1倍以上増加が認められものにはを、治癒のスピードが向上しなかったものには×を付けて表10に示した。比較として、表10の既存のコントロールの誘導体及びビタミンCを同量配合したものを比較対象コントロールに用いた。

【0117】

【表10】

本発明の化合物	IP-AA-3-VE	◎
	AA-3-VE	◎
	IP-AA-2-VE	◎
	AA-2-VE	◎
	IP-AA-3-dl- $\alpha$ -Toc	◎
	AA-3-dl- $\alpha$ -Toc	◎
	IP-AA-2-dl- $\alpha$ -Toc	◎
	AA-2-dl- $\alpha$ -Toc	◎
	IP-AA-3-d- $\alpha$ -Toc	◎
	AA-3-d- $\alpha$ -Toc	◎
	IP-AA-2-d- $\alpha$ -Toc	◎
	AA-2-d- $\alpha$ -Toc	◎
	コントロールの誘導	比較対象1
		X

体	比較対象2	○
---	-------	---

以上の結果より本発明の化合物では、治癒スピードが大きく向上したことが分かる。この結果より本発明の化合物が細胞増殖による創傷治癒効果を有する細胞増殖促進組成物としての商品価値を高め、その有用性及び有効性を証明するものであった。

【0118】

実施例．食用兼飼料添加用植物油およびその製造方法

本発明のIP-AA-3-VE、AA-3-VE、IP-AA-2-VE、AA-2-VE、IP-AA-3-dl- $\alpha$ -Toc、AA-3-dl- $\alpha$ -Toc、IP-AA-2-dl- $\alpha$ -Toc、AA-2-dl- $\alpha$ -Toc、IP-AA-3-d- $\alpha$ -Toc、AA-3-d- $\alpha$ -Toc、IP-AA-2-d- $\alpha$ -Toc、AA-2-d- $\alpha$ -Tocの12種類の化合物それぞれ0.001kgを10リットルの食用大豆油に加えた。溶液を振盪し、濾過した。大豆油をビン詰めし、密封し、貯蔵し12種類の大豆油を得た。得られた12種類の大豆油は成人病予防の健康食品として使用できる。この食用油は、ヒトストレス軽減作用を有することからヒト用だけでなく有用な家畜である牛、馬、ニワトリ、豚、魚、えび、かに、あわび、カイコ、かえる、犬、猫、熱帯魚、モルモット、マウス、サル、ミミズ、ビール酵母、パン酵母の経済動物及び経済微生物の増産にも使用できた。

【0119】

実施例．ビスケット型栄養強化用食品兼動物用飼料およびその製造方法

小麦粉100kgに対してマ-ガリン15kg、香味料添加物4.5kg、砂糖7.0k

g、塩 2.3 kg、食用ソ - ダ 0.58 kg、カ - ボン - アンモニウム塩 4 kg、クエン酸 0.021 kg、澱粉 5 kg、および本発明の IP - AA - 3 - VE、AA - 3 - VE、IP - AA - 2 - VE、AA - 2 - VE、IP - AA - 3 - dl - Toc、AA - 3 - dl - Toc、IP - AA - 2 - dl - Toc、AA - 2 - dl - Toc、IP - AA - 3 - d - Toc、AA - 3 - d - Toc、IP - AA - 2 - d - Toc、AA - 2 - d - Toc の 12 種類の化合物それぞれ 0.01 kg 添加して良く混合した。続いてこの混合体を振盪し、ビスケットの形に成形してから電気オーブンで 5 分焼き 12 種類のビスケット型栄養強化用食品兼動物用飼料を製造した。

#### 【0120】

化粧品および皮膚用外用組成物の例

10

実施例、頭皮ケア用化粧品

表 11 記載の本発明の化合物を含む 12 種類の頭皮ケア用化粧品は以下の % 重量の組成体 % 重量を有する様に調製された：約 10 % のイソプロピルパルミチン酸エステル、レシチン入りの約 3 % (以下重量 %) の濃縮フォスファチド、約 3 % のベントナイトクレ - 、約 2 % のケラチン加水分解物、約 2 % のシリコンワックス、約 0.5 % の - トコフェロールのオイルエッセンス、約 0.5 % の芳香剤、および表 11 記載の本発明の 12 種類の化合物それぞれを 0.1 % 及びサ - ファクチン 1 % 配合の乳化水溶液、約 0.5 % の保存剤であり、残りは水分である。得られた 12 種類全ての頭皮ケア用化粧品の成人男子 8 人 (試験区域は局所除毛を行った) に対する一ヶ月間の使用は毛髪伸長率及び睫毛伸長率において上記処方の育毛剤における本発明の化合物の無添加製剤に比較し有意に高い毛髪伸長率と睫毛伸長率を示した。毛髪伸長率 (%) = ( (試験開始から一ヶ月後の毛髪長さ (mm) / 試験スタート日の毛髪長さ) - 1 ) x 100。睫毛伸長率 (%) = ( (試験開始から一ヶ月後の睫毛長さ (mm) / 試験スタート日の睫毛長さ) - 1 ) x 100。その結果を表 11 に示すが、本発明の化合物の無添加製剤に比較し有意に高い値を示したものには

20

を、有意差が無かったものは X を示した。本発明の化合物配合の頭皮ケア用化粧品は皮膚を健康にし、毛髪の成長を促進し、毛髪を蘇生し、ふけを解消した。ビタミン C やビタミン E は毛髪の伸長効果が知られている。又、本発明の組成物を経口投与したところ、同様に毛髪の伸長が認められたことから、毛髪伸長用経口用組成物としても有効であることがわかった。本結果より、本発明の化合物が毛表皮から皮膚組織内に効率的に取り込まれて高率でビタミン C 及びビタミン E 活性を発現することが示され、化粧品や外用医薬品などの外用組成物、食品添加物や飼料添加物などの経口用組成物、ヒト用や動物用のラジカル疾患治療薬、細胞増殖促進組成物、抗酸化組成物としての商品価値を高め、その有用性及び有効性を証明するものであった。

30

#### 【0121】

【表 1 1】

	被験物質	評価
本発明の化合物	IP-AA-3-VE	◎
	AA-3-VE	◎
	IP-AA-2-VE	◎
	AA-2-VE	◎
	IP-AA-3-dl- $\alpha$ -Toc	◎
	AA-3-dl- $\alpha$ -Toc	◎
	IP-AA-2-dl- $\alpha$ -Toc	◎
	AA-2-dl- $\alpha$ -Toc	◎
	IP-AA-3-d- $\alpha$ -Toc	◎
	AA-3-d- $\alpha$ -Toc	◎
	IP-AA-2-d- $\alpha$ -Toc	◎
	AA-2-d- $\alpha$ -Toc	◎
コントロールの誘導体	AA-2-P	X

	AA-2-G	X
	AA-2-S	X
	AA-2-P-6-Pal	X
	AA-3-M	X
	AA-2-P-Toc	X
	AA-2-M-Toc	X
	ビタミンC	X

## 【0122】

実施例．日焼けに対する効果

長時間日光（紫外線照射）に曝された皮膚の治療に冠し、以下の組成（％重量）を有する12種類の軟膏を調製した：約2％のアスパラギン酸のマグネシウム塩、約5％のカミツレ花抽出物の水-アルコール液、約1％のビタミンA、B1、D、E、C、PP、約4％のレシチン、約1％の硫酸マグネシウム、約2％の乳酸ナトリウム、および本発明の表12記載の12種類の化合物それぞれを0.1％配合し、5％のグリセリン、0.5％のフェノキシエタノール、1％のサーファクチン、そして残りは水分である。得られた12種類全ての美白及び紫外線ケア化粧品の成人男子8人（試験区は病変の無い顔面中央付近に統一）に対する夏場の一ヶ月間の使用は紫外線による紅斑率及び色素沈着率において上記処方本発明の製剤は本発明の化合物の無添加製剤に比較し両者共に有意に低い値を示した。紅斑率（％）＝（（試験開始から一ヶ月後の色差計のa値／試験スタート日の色差計のa値）－1）×100。色素沈着率（％）＝（（試験スタート日の色差計のL値／試験

開始から一ヶ月後の色差計のL値) - 1) × 100。その結果を表12に示すが、本発明の化合物が添加された製剤の効果の結果は、本発明の化合物の無添加製剤に比較し2つの指標が同時に有意に低い値を示したのものには、2つの指標が同時に有意に低くなかったものはXで示した。本発明の製剤の一日2回の0.5gの顔面への塗布により紅斑率と色素沈着率は、有意に低い値を示した。その結果を表12に示す。その結果、本発明の組成物は全てとなり、比較のコントロールの誘導体は全てXであった。

【0123】

【表12】

	被験物質	評価
本発明の化合物	IP-AA-3-VE	◎
	AA-3-VE	◎
	IP-AA-2-VE	◎
	AA-2-VE	◎
	IP-AA-3-dl-α-Toc	◎
	AA-3-dl-α-Toc	◎
	IP-AA-2-dl-α-Toc	◎
	AA-2-dl-α-Toc	◎
	IP-AA-3-d-α-Toc	◎
	AA-3-d-α-Toc	◎
	IP-AA-2-d-α-Toc	◎
	AA-2-d-α-Toc	◎
コントロールの誘導体	AA-2-P	X
	AA-2-G	X
	AA-2-S	X
	AA-2-P-6-Pal	X
	AA-3-M	X
	AA-2-P-Toc	X
	AA-2-M-Toc	X
	ビタミンC	X

ビタミンCやビタミンEは日焼けに対する予防、治療効果が知られている。又、日焼けにおいては多くのフリーラジカルが産生し皮膚の皮脂の酸化が亢進することが知られており、これらの酸化された皮脂は脂質酸化物なり、細胞にダメージを与える。又、本発明の組成物を経口投与したところ、同様に日焼けに対する予防、治療効果が認められたことから、日焼け用経口用組成物としても有効であることがわかった。本結果より、本発明の化合物が皮膚組織内に効率的に取り込まれて高率でビタミンC及びビタミンE活性を発現する



ことが示され、化粧品や外用医薬品などの外用組成物、食品添加物や飼料添加物などの経口用組成物、ヒト用や動物用のラジカル疾患治療薬、細胞増殖促進組成物、抗酸化組成物としての商品価値を高め、その有用性及び有効性を証明するものであった。

#### 【0122】

化粧品や外用医薬品などの外用組成物の例を以下に示す。

水溶性薬剤及び化粧水の例（以下%重量で示す。）

グリセリン6%，ベタイン1%，1，3-ブチレングリコール：5%，フェノキシエタノール0.5%，本発明のIP-AA-3-VE、AA-3-VE、IP-AA-2-VE、AA-2-VE、IP-AA-3-dl-Toc、AA-3-dl-Toc、IP-AA-2-dl-Toc、AA-2-dl-Toc、IP-AA-3-d-Toc、AA-3-d-Toc、IP-AA-2-d-Toc、AA-2-d-Tocの12種類の化合物それぞれを0.01%添加し、最後に精製水を加えて100%とした。

10

#### 【0123】

乳液状薬剤及び乳液の例

(1)ポリオキシエチレン(10E.O.)ソルビタン1.0モノステアレート：0.5，(2)ポリオキシエチレン(60E.O.)ソルビット0.5テトラオレレート：0.5，(3)グリセリルモノステアレート：1.0，(4)F3：0.1，(5)ベヘニルアルコール：0.5，(6)スクワラン：8.0，(7)カルボキシビニルポリマ：0.1，(8)フェノキシエタノール：0.5%、及び本発明のIP-AA-3-VE、AA-3-VE、IP-AA-2-VE、AA-2-VE、IP-AA-3-dl-Toc、AA-3-dl-Toc、IP-AA-2-dl-Toc、AA-2-dl-Toc、IP-AA-3-d-Toc、AA-3-d-Toc、IP-AA-2-d-Toc、AA-2-d-Tocの12種類の化合物それぞれを0.01%添加し、最後に精製水を加えて100%とした。

20

#### 【0124】

軟膏製剤及びクリーム及びパック剤の例

(1)ポリオキシエチレン(10E.O.)ソルビタン1.0モノステアレート：0.5，(2)ポリオキシエチレン(60E.O.)ソルビット0.5テトラオレレート：0.5，(3)グリセリルモノステアレート：1.0，(4)F3：0.1，(5)ベヘニルアルコール：0.5，(6)スクワラン：8.0，(7)カルボキシビニルポリマ：1.0%，(8)フェノキシエタノール：0.5%、本発明のIP-AA-3-VE、AA-3-VE、IP-AA-2-VE、AA-2-VE、IP-AA-3-dl-Toc、AA-3-dl-Toc、IP-AA-2-dl-Toc、AA-2-dl-Toc、IP-AA-3-d-Toc、AA-3-d-Toc、IP-AA-2-d-Toc、AA-2-d-Tocの12種類の化合物それぞれを0.01%添加し、残分は精製水で100%であった。

30

#### 【0125】

リキッドファンデーションの例。

(1)ラノリン：7.0，(2)流動パラフィン：5.0，(3)ステアリン酸：2.0，(4)セタノール：1.0，(5)ヒマワリ油\*1：1.0，(6)グリセリン：5.0，(7)トリエタノールアミン：1.0，(8)カルボキシメチルセルロース：0.7，(9)マイカ：15.0，(10)タルク：6.0，(11)酸化チタン：3.0，(12)着色顔料：6.0，(13)F5：0.5，(14)トルメンチラ抽出物\*3：0.5，(15)1，3-ブチレングリコール：0.02，(16)フェノキシエタノール：0.5，及び本発明のIP-AA-3-VE、AA-3-VE、IP-AA-2-VE、AA-2-VE、IP-AA-3-dl-Toc、AA-3-dl-Toc、IP-AA-2-dl-Toc、AA-2-dl-Toc、IP-AA-3-d-Toc、AA-3-d-Toc、IP-AA-2-d-Toc、AA-2-d-Tocの12種類の化合物それぞれを0.01%添加し、残分は水分であった

40

50

。

## 【実施例 18】

## 【0126】

外用洗浄剤、洗顔料、ボディークリーム等の例。

(処方)(%)

(1)ステアリン酸：10.0，(2)パルミチン酸：8.0，(3)ミリスチン酸：12.0，(4)ラウリン酸：4.0，(5)オレイルアルコ-ル：1.5，(6)精製ラノリン：1.0，(9)フェノキシエタノール：0.2，(10)グリセリン：18.0，及び本発明のIP-AA-3-VE、AA-3-VE、IP-AA-2-VE、AA-2-VE、IP-AA-3-dl-Toc、AA-3-dl-Toc、IP-AA-2-dl-Toc、AA-2-dl-Toc、IP-AA-3-d-Toc、AA-3-d-Toc、IP-AA-2-d-Toc、AA-2-d-Tocの12種類の化合物それぞれを0.01%添加し、残分は水分であった。

10

## 【実施例 19】

## 【0127】

本発明の上記実施例の本発明の化粧水と、本発明の化粧水から本発明の12種の化合物を除いた対象区の化粧水を作成し、40℃、6ヶ月間の安定性試験を行った。安定性試験の評価は製剤の色の变化と沈殿の発生、及び臭気の発生を以下のスコアで評価してその平均点を求めて比較した。評価は20歳から50歳までの男女それぞれ10人が個別に評価してその平均点を求めた。

20

(スコア)

色の变化：全く変化しない0点、変化が認められる2点、激しい変化が認められる3点  
 沈殿の発生：全く発生しない0点、沈殿が認められる2点、激しい沈殿が認められる3点  
 臭気の変化：全く変化しない0点、変化が認められる2点、激しい変化が認められる3点  
 その結果本発明の処方においては、色の变化と沈殿の発生、及び臭気の変化の全てにおいて経時変化は認められず0点であったが、保存安定剤、非イオン界面活性剤、アセチルジエステル結合型ビタミンC誘導体、紫外線防御剤の全てを除いた対照区の処方の化粧品では平均点で0点は存在せず2点から3点であり、この結果から本発明の処方の優れた安定性が証明された。

## 【0128】

30

表13に示す本発明の化合物それぞれ1gを512ccの医薬用生理食塩水に完全に溶解した後、注射液製造用除菌フィルター及びパイロジェン排除フィルターで濾過し、本発明の液薬として501ccのそれぞれの本発明の化合物荷対応する注射溶液12種類を製造した。さらに、前記で製造した12種類の液薬を100ccずつ取り、これを一つに混合して12種類の本発明の化合物が含有された液薬1200ccを製造した。この液薬は、イオン導入用及びエレクトロポレーション用及びメソセラピー用の外用組成物、ラジカル疾患治療用組成物、細胞増殖促進組成物、抗酸化組成物として使用できる。ラジカル疾患治療用組成物の場合は、ヒト及び動物用注射薬として、使用することもできる。

## 【0129】

40

【表 13】

本発明の化合物	IP-AA-3-VE
	AA-3-VE
	IP-AA-2-VE
	AA-2-VE
	IP-AA-3-dl- $\alpha$ -Toc
	AA-3-dl- $\alpha$ -Toc
	IP-AA-2-dl- $\alpha$ -Toc
	AA-2-dl- $\alpha$ -Toc
	IP-AA-3-d- $\alpha$ -Toc
	AA-3-d- $\alpha$ -Toc
	IP-AA-2-d- $\alpha$ -Toc
	AA-2-d- $\alpha$ -Toc

10

## 【0130】

(効果試験) 前記、実施例で作成した本発明の12種の化合物からなる試験区(以下試験区注射液という)とL-アスコルピン酸-2-リン酸Naを0.1%配合する前記と同様な製法で作成した対照区の注射液(以下対象区注射液という)を使用し、本発明のラジカル疾患治療薬の効果を以下の実験により比較確認した。

20

## 【0131】

(心疾患に対する効果試験)

ラットを開胸し、左冠動脈前下行枝を15分間結紮した後血流を再開した。あらかじめ試験区として冠動脈閉塞24時間前に5mg(合計化合物重量)/kg・体重の本発明の医薬用組成物である試験区注射液をラットに静脈内投与し、対照区として、対象区注射液を試験区と同様に注入した。実験前に冠動脈閉塞後の抹消血中のフリーラジカルラジカル依存性化学発光をケミカルルミネセンスで測定したところ、再灌流直後より有意なラジカルの上昇が確認された。冠閉塞中は心電図モニター上明確な不整脈はみられなかったが、血流再開すると数秒以内に対照区のみ心疾患の指標である明確な不整脈が発現した。しかし、本発明の試験区注射液を静脈内投与した区では、対照区にみられた不整脈は明確に抑えられ、対象区に比較し有意なフリーラジカルの低下が認められた本発明のラジカル疾患用治療薬の心疾患に対する効果が証明された。

30

## 【0132】

(肝障害に対する効果試験)

ラット門脈及び冠動脈を20分間遮断後に60分間血流を再開後、肝臓をグルタルアルデヒドで灌流固定し電子顕微鏡で観察した。また、実験前より抹消血中のラジカル依存性化学発光をケミカルルミネセンスで測定したところ血流再開直後より有意なラジカルの上昇が確認された。あらかじめ試験区としてラット門脈及び冠動脈遮断24時間前に5mg(合計化合物重量)/kg・体重の本発明の試験区注射液をラットに静脈内投与し、同様に対照区として対象区注射液を試験区と同様に注入した。電子顕微鏡観察の結果、対照区ではDisse腔、肝細胞間隔及び微小胆管が著名に拡大し、細胞内に多数の空胞が認められ明らかに肝臓細胞に病態が認められたが、本発明の試験区注射液を投与した試験区の電子顕微鏡観察では、肝臓の組織構築は正常に保たれており、本発明のラジカル疾患用治療薬の効果が証明された。

40

## 【0133】

(脾疾患に対する効果試験)

ラット冠動脈を20分間遮断後に60分間血流を再開した後、脾疾患モデルを作成し冠動脈遮断前及び血流再開後4時間目の血液中のアミラーゼを測定した。実験前より抹消血中のラジカル依存性化学発光をケミカルルミネセンスで測定したところ血流再開直後より有

50

意なラジカルの上昇が確認された。あらかじめ試験区としてラット冠動脈遮断 24 時間前に 5 mg (合計化合物重量) / kg・体重の本発明のフリーラジカル関与性疾病薬である試験区注射液をラットに静脈内投与し、対照区として対象区注射液を試験区と同様に注入した。血中アミラーゼ測定の結果、対照区では血中アミラーゼレベルは遮断前のレベルに比べ優位に高く最大 7000 U / dl の個体が認められ、明らかに膵疾患の病態が認められたが、本発明の化合物を投与した試験区の血中アミラーゼレベルは最大個体で 1100 U / dl であり、遮断前の正常な状態に比較し若干のアミラーゼの上昇傾向が認められたが、対照区に比較し優位に低く、本発明のラジカル疾患治療薬に対する効果が証明された。

#### 【0134】

(腎障害に対する効果試験)

ラット冠動脈を 20 分間遮断後に 60 分間血流を再開した後、腎臓組織に障害を与えた腎疾患モデルを作成し、冠動脈遮断前及び血流再開後 5 日間の平均尿中蛋白を測定した。実験前より抹消血中のラジカル依存性化学発光をケミカルルミネセンスで測定したところ、血流再開直後より有意なラジカルの上昇が確認された。あらかじめ試験区としてラット冠動脈遮断 24 時間前に 5 mg (合計化合物重量) / kg・体重の試験区注射液をラットに静脈内投与し、対照区としてリンゲル液のみを試験区と同様に注入した。再灌流後 5 日間の平均尿中蛋白測定の結果、対照区では尿中蛋白レベルは遮断前のレベルに比べ優位に高く明らかに腎疾患の病態が認められたが、本発明の試験区注射液を投与した試験区の尿中蛋白レベルは、遮断前の正常な状態に比較し若干の尿中蛋白の上昇傾向が認められたが、対照区に比較し優位に低く、本発明のラジカル疾患用治療薬に対する効果が証明された。

#### 【0135】

(臓器不全症に対する効果試験)

ラット冠動脈閉塞モデルによって全身虚血を 5 分間加え、その後血流を再開した。実験前より抹消血中のラジカル依存性化学発光を昭和電工製ケミカルルミネセンスで測定したところ、血流再開直後より有意なラジカルの上昇が確認された。あらかじめ試験区としてラット冠動脈遮断 24 時間前に 5 mg (合計化合物重量) / kg・体重の本発明の試験区注射液をラットに静脈内投与し、対照区として対象区注射液のみを試験区と同様に注入した。血流再開後も本発明のフリーラジカル関与性疾病薬を同量 5 日間、毎日 1 回注入し 10 日後に解剖し、心臓、肝臓、腎臓、膵臓、胆嚢の細胞壊死指数を  $^{45}\text{Ca}$  オートラジオグラフィ / イメージアナライザーにより求めた。その結果、対照区のラットでは虚血後各臓器で多数の細胞が壊死する遅発性細胞死が認められたが、本発明のラジカル疾患用薬剤を注入したネズミ (1 群 8 匹) では、各細胞の壊死が顕著に防止されていることが確認され、本発明のラジカル疾患用治療薬に対する効果が証明された。

#### 【0136】

(臓器不全症に対する比較効果試験)

ラット冠動脈閉塞モデルによって、全身虚血を 5 分間加えその後血流を再開した。実験前より抹消血中のラジカル依存性化学発光をケミカルルミネセンスで測定したところ、血流再開直後より有意なラジカルの上昇が確認された。あらかじめ試験区としてラット冠動脈遮断 24 時間前に 5 mg (合計化合物重量) / kg・体重の本発明の試験区注射液をラットに静脈内投与し、対照区としてヒト Cu - Zn 型 SOD を配合したリンゲル液を試験区と同様に注入した。血流再開後も本発明の前記の医薬用組成物を同量 5 日間、毎日 1 回注入し 10 日後に解剖し、心臓、肝臓、腎臓、膵臓、胆嚢の細胞壊死指数を  $^{45}\text{Ca}$  オートラジオグラフィ / イメージアナライザーにより求めた。その結果、対照区のラットでは、 $^{45}\text{Ca}$  オートラジオグラフィ / イメージアナライザーで見ると、虚血後各臓器で多数の細胞が壊死する遅発性細胞死が認められたが、本発明のラジカル疾患用注射・点滴薬剤を注入したネズミ (1 群 8 匹) では、各細胞の壊死が顕著に防止されることが確認され、本発明のラジカル疾患用治療薬に対する効果が証明された。

#### 【0137】

動物用経口用組成物の例を以下に示す

コーン 75% (以下%は重量百分率)、大豆粉 (C P 45%) 20%、リン酸カルシウム 1.5% 及び適量の無機物混合物、酵母、アスコルビン酸類とビタミン E 類を除いた総合ビタミン混合物が配合された組成物に、本発明の化合物をこの組成物に対し、それぞれ 100 ppm の割合になるようにそれぞれ配合し、十分に攪拌したものを通常のペレッターマシンで加熱 (最高温度 100 ) 成形し、これを乾燥し (最高温度 82 )、本発明のストレス緩和用経口組成物を作成した。これを以下試験区飼料という。この組成物は、犬、猫などのペット類、熱帯魚、金魚などの観賞用魚類、豚、牛、馬、羊などの家畜類、ニワトリ、ウズラなどの家禽類、ハマチ、タイ、ふぐ、ヒラメ、マグロ、鰹、鰻、マス、鮎、鯉などの養殖用魚類、エビ、蟹などの甲殻類、貝類などの飼料用添加物又は飼料に代表される経口用組成物として使用できる。

10

#### 【0138】

(比較用飼料組成物の作成)

上記とは別に、本発明の動物用ストレス反応緩和剤に代えて、飼料添加物として市販されている L - アスコルビン酸 - 2 - リン酸塩類 (DSM 社製ステイ C) を試験区飼料と同様の配合と製造法で調整した飼料を実施例 2 と同じ方法で作成した。即ちコーン 75% (以下%は重量百分率)、大豆粉 (C P 45%) 20%、リン酸カルシウム 1.5%、L - アスコルビン酸ナトリウム 0.5% 及び適量の無機物混合物、酵母、アスコルビン酸類を除いた総合ビタミン混合物を添加し、よく攪拌したものを通常のペレッターマシンで加熱成形し、これを乾燥して対照区飼料とした。飼料の加熱成形処理、乾燥は飼料効率の改善、飼料中の雑菌の低減、畜舎ダストの低減のために行ったが、その条件はペレッター中の品温の最高温度約摂氏 70 度であり乾燥条件は 50 度で 20 分行いその後室温環境に放置した。これを対象区飼料とした。

20

#### 【0139】

(豚に対する効果)

豚に対する動物用ストレス反応緩和剤の血漿 LDH、MDH、AspAT 及び血中ストレスプロテインの上昇抑制効果を確認するために上記の試験区用飼料と飼料組成物及び対象区飼料を使用し、以下の実験を行い本発明の効果を確認した。ランドレース x ヨークシャ種の 30 日齢雄豚 100 頭を、10 頭ずつ 10 組に分け (体重をそろえた 2 組 20 頭を 1 試験区として 5 試験区を設定した。) 本発明の試験製剤 5 種の試験を行った。1 試験区の 1 組 10 頭に対し、試験区飼料を与え、他の 1 組 10 頭に対し対照区飼料を与えて飼育した。これらの豚は、乳期及び離乳期を除く 23 日齢まで同じビタミン C 類無添加の市販飼料で飼育した。

30

#### 【0100】

試験区には、一日に体重 1 kg 当たり、本発明の化合物 0.02 ミリモル (総合計) を経口投与するように、試験区飼料を、毎朝一回、無添加一般飼料に配合し給飼した。体重測定は一週間に一度行い含有飼料の添加量の調整を行った。一方、対照区には、前記の既存の L - アスコルビン酸 - 2 - リン酸塩 0.02 ミリモル (総合計) を経口投与するように、試験区飼料を、給飼し飼育した。試験開始日にはストレッサーとして、豚を別の豚舎に移動させ、また同一時に体重をそろえるため編成変えを行った。この移動及び編成変え作業は豚にストレスとなり、増体重の減少などの問題が過去の事例から確認されている。試験開始日から 60 日間それぞれ試験区、対照区の飼料で飼育し、61 日後にそれぞれの豚から血液を採取し、血液中の血漿 LDH、MDH、AspAT 及び血中ストレスプロテイン、増体重を以下の方法で測定した。

40

#### 【0101】

(LDH、MDH、AspAT の測定方法)

採取した血液を、温度 4、2,000 rpm で遠心分離によって血漿を分離し、得られた上清画分を酵素測定用の標品とした。尚、酵素活性は 30 における NADH の 340 nm での吸光度の変化を分光学的に測定することによって決めた。酵素反応液の全量は 3.0 ml で、全体構成は次のとおりである。

(1) LDH 及び MDH の場合; 200 mM トリス緩衝液, 1.0 ml (最終濃度, 67

50

mM), 5 mM NADH, 0.1 ml (0.17 mM), 30 mM KCl, 0.1 ml (1 mM), 30 mM 2-メルカプトエタノール (2-ME), 0.1 ml, 基質 (LDHではビルビン酸; MDHではオキザロ酢酸) 0.3 ml (十分量、5 - 10 mM), 水 1.3 ml 及び血漿標品 0.1 ml を加えて全体を 3.0 ml とする。

(2) AspAT の場合; 200 mM トリス緩衝液 1.0 ml, 5 mM NADH, 0.1 ml, 30 mM KCl, 0.1 ml, 30 mM 2-ME, 0.1 ml、20 mM - ケトグルタレート 0.3 ml, 補助酵素 (MDH) 0.1 ml, 50 mM アスパラギン酸 0.3 ml、水 0.9 ml 及び血漿標品 0.1 ml を加えて全体を 3.0 ml とする。ここで酵素活性は初速度で決定した。

#### 【0102】

(ストレスプロテイン測定法) 血漿中のストレスタンパク質の分子量や分子種の数及び各分子種の存在量は主に SDS-PAGE を行ったゲルをタンパク染色した泳動図を用いて測定した。特に、各々のたんぱく質の存在量は、ゲルスキャナーを用い、その吸光度から相対比を求めた。SDS-PAGE の泳動条件をいろいろの動物から血漿標品の種類によって変えない範囲で電気泳動を行い、相互に比較検討した。血液中の LDH、MDH、AspAT、ストレスプロテイン、体重の増加率の平均値とそれに対応するそれぞれの対象区の値を求め、以下の式で本発明の対象区に対する比率を求め効果を比較した。

(本発明のストレス緩和剤投与区の LDH、MDH、  
AspAT またはストレスプロテインの平均値)

— × 100

(対照区の L-アスコルビン酸類投与の LDH、MDH、  
AspAT またはストレスプロテインの平均値)

その結果、本発明の試験区飼料投与の血液中の LDH、MDH、AspAT、ストレスプロテインの平均値は、対照区のそれに比較し 11.9% 以上有意に低下し、本発明の効果を確認できた。

#### 【0103】

(増体重比)

対照区、試験区共に、試験開始時の体重を測定し、試験開始後 60 日後の増体重の値として以下の計算式で求めた値を比較した体重増加比 = (対照区の試験終了時の体重 - 対象区の試験開始時の体重) / (試験区の試験終了時の体重 - 試験区の試験開始時の体重) × 100

その結果、本発明の試験区飼料投与の体重増加比は、対象区飼料投与の動物に比較し体重が 6.1% 以上有意に増加し飼料効率の改善も見られた。

#### 【0104】

(牛に対する効果)

牛に対する本発明の効果を確認するために以下の実験を行いその効果を確認した。ホルスタインの 53 日齢雄牛を、(試験区飼料) 25 頭、(対象区飼料) 25 頭、計 50 頭使用した。この牛は、乳期及び離乳期を除く 53 日齢まで、同じビタミン C 類無添加の市販飼料で飼育された牛を使用した。

フスマ 30% (以下%は重量百分率)、大麦粉 20%、米糠 44%、大豆粕 5%、食塩 0.5% 及び適量の無機物混合物、アスコルビン酸類を除いた総合ビタミン混合物の飼料に、試験区飼料を上記飼料に対し 1% 重量添加し、十分に攪拌したものを通常のペレッタマシンで加熱成形し、これを乾燥して本発明のストレス緩和飼料組成物とした。これとは別に、試験区のストレス用経口組成物に代えて、対象区飼料を上記と同じ製法と組成で作成した。

試験区分は、試験開始時に試験区、及び対照区の牛をトラックで 500 km 以上陸上輸送し、その後 60 日間にわたり、各飼料を自由給餌した。この飼養状態で 60 日間飼育し、61 日後にそれぞれの牛から血液を採取し、血液中の血漿 LDH、MDH、AspAT 及び血中のストレスプロテイン、増体重を前記実施例と同様の方法で測定した。測定結果は

各区ごとに平均値を求め前記と同様の計算式に従い、対照区との比率を算出した。その結果、本発明の経口用組成物の投与区の血液中のLDH、MDH、AspAT、ストレスプロテインの平均値は、対照区のそれに比較し12.3%以上有意に低下し抗ストレス効果を確認できた。また、増体重の改善も見られた。

#### 【0105】

(犬に対する効果試験)

平均体重8.7kgの純種ビーグル犬、雌6頭雄6頭、合計12頭を、雌雄3頭ずつ試験区飼料と対照区飼料の2区に分け(1区雄3頭雌3頭)、試験区には試験区飼料が一般のビーグル犬飼料に1%重量添加されたストレス緩和用飼料組成物が与えられ自由給餌された。対照区には前記対照区飼料が一般のビーグル犬用飼料に1%重量添加され自由給餌された。試験は、夏場の高温期に野外に設置された解放畜舎による30日間の飼育で実施された。この飼養状態で30日間飼育し31日後にそれぞれのビーグル犬から血液を採取し血液中の血漿LDH、MDH、AspAT及び血中ストレスプロテイン、増体重を前記と同様の方法で測定した。測定結果は各区ごとに平均値を求め前記と同様の計算式に従い対照区との比率を算出した。その結果、夏場の高温ストレス下で飼育されたにもかかわらず、本発明の経口組成物区の血液中のLDH、MDH、AspAT、ストレスプロテインの平均値は、対照区のそれに比較し9.8%以上有意に低下し、本発明の経口用組成物の効果を確認できた。また、増体重も5.9%以上の有意な改善が見られた。

#### 【0106】

(水産動物に対する効果)

魚粉60%、イカミール10%、グルテン12.5%、タラ肝油1.5%、ベータカロチン0.1%、リン酸二水素ナトリウム1%、リン酸水素ナトリウム1.5%、ビタミンCを除いたビタミンプレミックス1.4%、エトキシキン0.02%、前記試験区飼料を1%重量及び残分にコーングルテンを添加して100%とし、この原料を粉碎後にミキサーで十分混合した後、ペレットミルによりニジマス、鮎、鯉、鯛、鮭、鰻、ハマチ、フグ、ヒラメ、マグロ、アジ、車エビ用の水産動物用飼料を作成した。

対照区の処方は、前記対象区飼料を同様な組成で1%重量添加し同じ製造方法で製造した。これらの飼料を養殖されているニジマス、鮎、鯉、鯛、鮭、鰻、ハマチ、フグ、ヒラメ、マグロ、アジに投与し、100日間にわたって飼養試験を実施し、101日後にそれぞれの動物の20固体を無作為に抽出して各水産動物の生残率を測定し水産動物に対する有効性を調べた。その結果、試験区の生残率は対象区の生残率に比較し7.8%以上有意に増加し、本発明の経口用組成物の水産動物に対する効果が確認された。

#### 【0107】

(液晶乳化組成物)

表14記載の12種類の本発明の化合物をそれぞれ0.4gとグリセリン15.2gを入れ、電動ミキサーで良く混合し、これを混合物Aとする。あらかじめ80℃に加熱したホホバオイル15gにコレステロール5gを溶解させ、これに混合物Aを少量ずつ添加し、電動ミキサーで少量添加の都度3分間混合する。ここの操作を数回繰り返し合計混合時間が10分以上になるようにする。このようにして12種類の本化合物を含む薄褐色のペースト状混合物Aを得た。

比較対象として、ホホバオイル15gとコレステロール5gを80℃で溶解させ、これに表14記載の12種類の本発明の化合物をそれぞれ0.4gとグリセリン15.2gを一度に添加して、電動ミキサーで3分間のみ混合する。3分間のみの混合では、混合が不十分のため液晶化用のペーストが作れない。これを以下、12種類の本発明の化合物を含有した非液晶乳化物ペーストA'と略す。

【表 1 4】

本発明の化合物	IP-AA-3-VE
	AA-3-VE
	IP-AA-2-VE
	AA-2-VE
	IP-AA-3-dl- $\alpha$ -Toc
	AA-3-dl- $\alpha$ -Toc
	IP-AA-2-dl- $\alpha$ -Toc
	AA-2-dl- $\alpha$ -Toc
	IP-AA-3-d- $\alpha$ -Toc
	AA-3-d- $\alpha$ -Toc
	IP-AA-2-d- $\alpha$ -Toc
	AA-2-d- $\alpha$ -Toc

10

表 1 5 記載の 1 2 種類の本発明の化合物をそれぞれ 0 . 1 g と以下記載の界面活性剤グループの界面活性剤をそれぞれ 0 . 1 g 混合し、さらにココイルグルタミン酸 Na を添加して全量で 5 g とし電動ミキサーで 3 分間良く混合し、これに水溶性物質グループの水溶性物質をそれぞれ 0 . 1 g 混合し、更にグリセリンを添加して全体を 2 0 g とし電動ミキサーで 3 分間良く混合しこれを混合物 B とする。

20

以下の脂質グループの脂質をそれぞれ 0 . 1 g とり 8 0 に加熱してコレステロール 5 g を混合溶解させこれにホホバオイルを添加して全量で 2 0 g の脂質混合物とする。混合物 B に対してこの脂質混合物を少量ずつ添加し、その都度電動ミキサーでそれぞれ 3 分間混合する。この操作を何回も繰り返し合計混合時間が 1 0 分以上になるようにする。このようにして、界面活性剤グループと水溶性物質グループと脂質グループと抗酸化剤グループを添加した液晶乳化物用ペースト B を得た。

30

表 1 5 記載の 1 2 種類の本発明の化合物をそれぞれ 0 . 1 g と以下記載の界面活性剤グループの界面活性剤をそれぞれ 0 . 1 g 混合し、さらにココイルグルタミン酸 Na を添加して全量で 5 g の界面活性剤混合物を得た。別に水溶性物質グループの水溶性物質をそれぞれ 0 . 1 g 混合し、更にグリセリンを添加して全体を 1 5 g としこれを水溶性物質混合物とした。別に、以下の脂質グループの脂質をそれぞれ 0 . 1 g とり 8 0 に加熱してコレステロール 5 g を混合溶解させこれにホホバオイルを添加して全量で 2 0 g の脂質混合物とした。上記で作成した、界面活性剤混合物 5 g と水溶性混合物 1 5 g と脂質混合物 2 0 g を一度に電動ミキサーに投入し 3 分間混合し比較対象の非液晶乳化物用ペースト B ' を得た。

( 界面活性剤グループ )

40

ココイルグルタミン酸 Na、ココイルグルタミン酸 K、ココイルグルタミン酸 Na、ココイルグルタミン酸 TEA、ココイルグルタミン酸 TEA、ラウロイルアスパラギン酸 Na、ラウロイルグルタミン酸 Na、ミリストイルグルタミン酸 Na、パーム脂肪酸グルタミン酸 Na、フォスファチジルコリン、リン脂質及びこれらの塩類

( 水溶性物質グループ )

グリセリン、ジグリセリン、トリグリセリン、ポリグリセリン、メチルブタンジオール、ブチレングリコール、イソブレングリコール、ポリエチレングリコール、ペンタンジオール、ヘキサジオール、プロピレングリコール、ジプロピレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール、ジエチレングリコール、ネオペンチルグリコール、ポリエチレングリコール、ソルビトール、キシリトール、ピロリドンカルボンナトリウム

50



、ヒアルロン酸、カラギーナン、アルギン酸、寒天、フコイダン、ペクチン、ローカストビーンガム、キサンタンガム、トラガントガム、グアーガム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、アクリル酸・メタクリル酸共重合体、ポリグルタミン酸。

(脂質グループ)

ミネラル油、スクワラン、スクワレン、パルミチン酸イソプロピル、ミリスチン酸イソプロピル、ミリスチン酸イソオクチル、ミリスチン酸イソトリデシル、ミリスチン酸オクタデシル、ミリスチン酸オクチルドデシル、イソステアрилコレステリルエステル、2-エチルヘキサン酸トリグリセリド、2-エチルヘキサン酸セチル、パーム油、ヒマワリ油、オリーブ油、ホホバ油、ツバキ油、流動パラフィン、グレープシード油、アボガド油、マカダミアナッツ油、アーモンド油、天然ビタミンE油、米胚芽油、丁字油、オレンジ油、トウヒ油、ステアリン酸及びパルミチン酸。

10

(抗酸化剤グループ)

コウジ酸、アルブチン、アスコルビン酸リン酸エステルナトリウム、アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム、アスコルビン酸メチル、アスコルビン酸エチル、アスコルビン酸硫酸エステルナトリウム、アスコルビン酸グルコシド、アスコルビン酸リン酸パルミテートナトリウム、トコフェリルリン酸ナトリウム、(アスコルビル/トコフェリル)リン酸K、アスコルビルマレイン酸トコフェリル、カプリリルグリセリルアスコルベート、ヘキシルグリセリルアスコルベート、ミリスチルグリセリルアスコルベート、グリセリルアスコルベート、ビスグリセリルアスコルベート、ジグリセリルアスコルベート、イソステアрилアスコルビルリン酸ナトリウム、ステアリン酸アスコルビル、パルミチン酸アスコルビル、ジパルミチン酸アスコルビル、エラゲ酸、レゾルシノール、ブチルレゾルシノール、カミツレ抽出物、ソウハクヒ抽出液、ユキノシタ抽出液、米糠抽出物、ジアセトキシ安息香酸、アセトキシヒドロキシ安息香酸、胎盤抽出物、アスタキサンチン、カロチン、酢酸レチノール、パルミチン酸レチノール、レチノイン酸、トコフェリルリン酸Na、トコフェリルアセテート、トコフェリルニコチネート、トコフェリルリノレート、トコフェロール、ジイソプロピルアミンジクロロアセテート、アミノヒドロキシ酪酸、ブチルヒドロキシアニソール、ブチルヒドロキシトルエン、没食子酸プロピル。

20

【0108】

(液晶乳化物の作成と安定性試験)

30

上記で作成した、本発明の液晶乳化物用ペーストAとB，と比較対象の非液晶乳化物用ペーストA'とB'にそれぞれ精製水を加えて100gとし泡が立たないように電動式ハンドミキサーで10分間攪拌して完全に分散させ、これをマイクロフルイタイザー処理した後フィルター処理で滅菌処置を施し平均粒子直径が500nmの本発明の液晶乳化組成物AとB及び比較対象で作成した非液晶乳化物A'とB'を得た。

これらの乳化物を偏光顕微鏡で観察したところ、本発明の液晶乳化組成物AとBでは、液晶構造に特有なマルターゼクロス像が得られ、この乳化組成物が多層カプセル構造(ベシクル構造)を有する液晶乳化物であることが確認された。一方、非液晶乳化物A'とB'では、マルターゼクロス像は観察されなかった。

これらの乳化組成物を、40℃で1ヶ月間保存したところ、非液晶乳化物B'では乳化組成物は黄色く変色し、異臭を発生し、又、非液晶乳化物A'とB'では酷く2層に分離し、商品価値が無くなっていた。本発明の液晶乳化組成物では問題は認められず、本発明の液晶乳化組成物A，Bの安定性が、非液晶乳化物に比較し格段に良好であることが確認された。

40

【0109】

(液晶乳化組成物)

表15記載の本発明の化合物5g、グリセリン20gを電動ミキサーで良く混合し、これをAとする。あらかじめ80℃に加熱してコレステロール5gを溶解させたホホバオイル20gをBとする。AにBを約5gずつ添加しながら電動ミキサーで10分間良く混合する。この操作を何回か繰り返しAとBを全て混合する。このようにして12種類の本化合

50

物を 10 重量%含む淡黄色のペースト状混合物各 50 g を得た。これを以下、12 種類の本発明の液晶乳化物用ペースト C と略す。

比較対象として、表 15 記載の 12 種類の本発明の化合物 5 g、グリセリン 20 g を電動ミキサーで良く混合し、これを A とする。あらかじめ 80 に加熱してコレステロール 5 g を溶解させたホホバオイル 20 g を B とする。A と B とを一度に全て混合し電動ミキサーで 10 分間良く混合する。本発明の液晶乳化物用ペーストの作成時のように徐々に加えて混合しないと液晶構造体は作成できない。これを以下、12 種類の本発明の化合物を含有した非液晶乳化物用ペースト C' と略す。

【表 15】

本発明の化合物	IP-AA-3-VE
	AA-3-VE
	IP-AA-2-VE
	AA-2-VE
	IP-AA-3-dl- $\alpha$ -Toc
	AA-3-dl- $\alpha$ -Toc
	IP-AA-2-dl- $\alpha$ -Toc
	AA-2-dl- $\alpha$ -Toc
	IP-AA-3-d- $\alpha$ -Toc
	AA-3-d- $\alpha$ -Toc
	IP-AA-2-d- $\alpha$ -Toc
	AA-2-d- $\alpha$ -Toc

上記表 15 の 12 種類の本発明の化合物をそれぞれ 2 g (合計 24 g) と以下の界面活性剤グループの界面活性剤をそれぞれ 0.1 g を電動ミキサーで良く混合し、これを 1 とする。脂質グループをそれぞれ 0.1 g とり 80 に加熱して混合溶解させ、最後にホホバオイルを加えて合計 28 g としこれを 2 とする。

1 に 2 を約 5 g ずつ添加しながら電動ミキサーで 10 分間良く混合する。この操作を繰り返し 1 と 2 を全て混合しする。これを 7 種類の既存誘導体配合の液晶乳化物用ペースト D と略す。

(界面活性剤：グループ A)

ココイルグルタミン酸 Na、ココイルグルタミン酸 K、ココイルグルタミン酸 Na、ココイルグルタミン酸 TEA、ココイルグルタミン酸 TEA、ラウロイルアスパラギン酸 Na、ラウロイルグルタミン酸 Na、ミリストイルグルタミン酸 Na、パーム脂肪酸グルタミン酸 Na、フォスファチジルコリン、リン脂質及びこれらの塩類

(水溶性物質：グループ B)

グリセリン、ジグリセリン、トリグリセリン、ポリグリセリン、メチルブタンジオール、ブチレングリコール、イソブレングリコール、ポリエチレングリコール、ペンタンジオール、ヘキサジオール、プロピレングリコール、ジプロピレングリコール、ポリプロピレングリコール、エチレングリコール、ジエチレングリコール、ネオペンチルグリコール、ポリエチレングリコール、ソルビトール、キシリトール、ピロリドンカルボンナトリウム、ヒアルロン酸、カラギーナン、アルギン酸、寒天、フコイダン、ペクチン、ローカストビーンガム、キサンタンガム、トラガントガム、グアーガム、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、アクリル酸・メタクリル酸共重合体、ポリグルタミン酸。

(脂質：グループ C)

ミネラル油、スクワラン、スクワレン、パルミチン酸イソプロピル、ミリスチン酸イソプロピル、ミリスチン酸イソオクチル、ミリスチン酸イソトリデシル、ミリスチン酸オク

タデシル、ミリスチン酸オクチルドデシル、イソステアリルコレステリルエステル、2 - エチルヘキサン酸トリグリセリド、2 - エチルヘキサン酸セチル、パーム油、ヒマワリ油、オリーブ油、ホホバ油、ツバキ油、流動パラフィン、グレープシード油、アボガド油、マカダミアナッツ油、アーモンド油、天然ビタミン E 油、米胚芽油、丁字油、オレンジ油、トウヒ油、ステアリン酸及びパルミチン酸。

(抗酸化剤：グループ D)

コウジ酸、アルブチン、アスコルビン酸リン酸エステルナトリウム、アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム、アスコルビン酸メチル、アスコルビン酸エチル、アスコルビン酸硫酸エステルナトリウム、アスコルビン酸グルコシド、アスコルビン酸リン酸パルミテートナトリウム、トコフェリルリン酸ナトリウム、(アスコルビル/トコフェリル)リン酸 K、アスコルビルマレイン酸トコフェリル、カプリリルグリセリルアスコルベート、ヘキシルグリセリルアスコルベート、ミリスチルグリセリルアスコルベート、グリセリルアスコルベート、ビスグリセリルアスコルベート、ジグリセリルアスコルベート、イソステアリルアスコルビルリン酸ナトリウム、ステアリン酸アスコルビル、パルミチン酸アスコルビル、ジパルミチン酸アスコルビル、エラゲ酸、レゾルシノール、ブチルレゾルシノール、カミツレ抽出物、ソウハクヒ抽出液、ユキノシタ抽出液、米糠抽出物、ジアセトキシ安息香酸、アセトキシヒドロキシ安息香酸、胎盤抽出物、アスタキサンチン、カロチン、酢酸レチノール、パルミチン酸レチノール、レチノイン酸、トコフェリルリン酸 Na、トコフェリルアセテート、トコフェリルニコチネート、トコフェリルリノレート、トコフェロール、ジイソプロピルアミンジクロロアセテート、アミノヒドロキシ酪酸、ブチルヒドロキシアニソール、ブチルヒドロキシルエン、没食子酸プロピル。

【0110】

界面活性剤グループの物質をそれぞれ 0.1 g ずつ取り電動式ハンドミキサーで 10 分間よく練り水溶性物質グループの物質と水溶性の抗酸化物質グループをそれぞれ 0.1 g ずつ取り、最後にグリセリンを加えて 20 g としグリセリン乳化剤混合物を作る。脂質グループと脂溶性の抗酸化物質グループの物質をそれぞれ 0.1 g を混合し最後にホホバオイルを加えて 20 g の混合油とし、この混合油を先に作ったグリセリン乳化剤混合物に対して 5 g ずつ添加して電動式ハンドミキサーで 5 分間よく練りペースト状にした。最終的にペースト状混合物を 50 g を得るまでこの混合油の添加操作と混合操作をくり返した。このペースト状混合物を、既存の乳化剤オイルペースト E という。

上記で作成した、12 種類の本発明の液晶乳化物用ペースト C と、12 種類の本発明の化合物を含有した非液晶乳化物用ペースト C' と 7 種類の既存誘導体配合の液晶乳化物用ペースト D と、12 種類の本発明の液晶乳化物用ペースト C に既存の乳化剤オイルペースト E を同量加えて二倍量にして、20 分間電動ミキサーで良く混合したものを既存乳化剤配合の本発明の液晶乳化物用ペースト F とした。

【0111】

この C, C', D, F の計 43 種類のペーストにそれぞれ精製水を加えて 100 g とし泡が立たないように電動式ハンドミキサーで 10 分間攪拌して完全に分散させて本発明の乳化組成物を得た。この乳化組成物をマイクロフレイタイザー処理し平均粒子直径が 500 nm の乳化組成物を得た。さらに 45 μm 穴のメンブランフィルターで滅菌し滅菌バイアルに密封した。この乳化組成物を偏光顕微鏡で観察すると液晶構造に特有なマルターゼクロス像が得られ、この乳化組成物が多層カプセル構造を有することが確認された。

これらの、43 種類の乳化組成物を、40℃ で 1 ヶ月間保存したところ、L - アスコルビン酸 - 2 - リン酸 - 6 - パルミテート 3 Na、(アスコルビル/トコフェリル)リン酸 K、6 - ステアリン酸アスコルビル、6 - パルミチン酸アスコルビル、2, 6 - ジパルミチン酸アスコルビルの 5 種類を含む乳化組成物は黄色く変色し、異臭を発生し、HPLC による力価調査でも 90 % を下回ったため、次の試験に使用できなかった。又、12 種類の本発明の化合物を含有した非液晶乳化物用ペーストで作成した乳化剤は、HPLC による力価の低下は、認められなかったが、酷く 2 層に分離し、商品価値が無くなっていた。

その結果を、以下表 16 に示す。試験結果は、偏光顕微鏡で観察すると液晶構造に特有

なマルターゼクロス像が認められたものには、 を認められなかったものにはXを記した。臭いの結果では、臭いが大いに認められたものにはXを、それ以外には を記した。分離の結果では、明確に乳化の分離が認められたものにはXを、それ以外には を記した。HPLCによる力価試験の結果では、90%以上残存していたものには、 をそれ以外にはXを記した。液晶乳化物安定性試験の総合評価として、全てのものには、 をそれ以外にはXを記した。

【0112】

【表16】

	被験物質名	マルターゼクロス像	臭い	分離	力価	液晶乳化物安定性試験の総合評価
本発明の液晶乳化物	IP-AA-3-VE	○	○	○	○	○
	AA-3-VE	○	○	○	○	○
	IP-AA-3-VE.	○	○	○	○	○
	AA-3-VE	○	○	○	○	○
	IP-AA-2-VE	○	○	○	○	○

	AA-2-VE	○	○	○	○	○
	IP-AA-3-d 1- $\alpha$ -Toc	○	○	○	○	○
	AA-3-d1- $\alpha$ -Toc	○	○	○	○	○
	IP-AA-2-d 1- $\alpha$ -Toc	○	○	○	○	○
	AA-2-d 1- $\alpha$ -Toc	○	○	○	○	○
	IP-AA-3-d- $\alpha$ -Toc	○	○	○	○	○
	AA-3-d- $\alpha$ -Toc	○	○	○	○	○
	IP-AA-2-d- $\alpha$ -Toc	○	○	○	○	○
	AA-2-d- $\alpha$ -Toc	○	○	○	○	○
本発明の非液晶乳 化物	IP-AA-3-VE	x	○	x	○	x
	AA-3-VE	x	○	x	○	x
	IP-AA-3-VE	x	○	x	○	x
	AA-3-VE	x	○	x	○	x
	IP-AA-2-VE	x	○	x	○	x
	AA-2-VE	x	○	x	○	x
	IP-AA-3-d 1- $\alpha$ -Toc	x	○	x	○	x
	AA-3-d1- $\alpha$ -Toc	x	○	x	○	x
	IP-AA-2-d 1- $\alpha$ -Toc	x	○	x	○	x
	AA-2-d 1- $\alpha$ -Toc	x	○	x	○	x
	IP-AA-3-d- $\alpha$ -Toc	x	○	x	○	x
	AA-3-d- $\alpha$ -Toc	x	○	x	○	x
	IP-AA-2-d- $\alpha$ -Toc	x	○	x	○	x
	AA-2-d- $\alpha$ -Toc	x	○	x	○	x
既存誘導体配合の 液晶乳化物	L-アスコルビン酸-2-リン酸-6- パルミテート 3Na	○	x	○	x	x
	dl- $\alpha$ -トコフェリルリン酸ナト リウム	○	○	○	○	○
	(アスコルビル/トコフェリル) リン酸 K	○	x	○	x	x
	イソステアリルアスコルビルリ ン酸 2Na	○	○	○	○	○
	6-ステアリン酸アスコルビル	x	x	x	x	x
	6-パルミチン酸アスコルビル	x	x	x	x	x
	2,6-ジパルミチン酸アスコルビ ル	x	x	x	x	x
既存乳化剤配合の 本発明の液晶乳化 物	IP-AA-3-VE	○	○	○	○	○
	AA-3-VE	○	○	○	○	○
	IP-AA-3-VE	○	○	○	○	○
	AA-3-VE	○	○	○	○	○
	IP-AA-2-VE	○	○	○	○	○

10

20

30

40

	AA-2-VE	○	○	○	○	○
	IP-AA-3-d1- $\alpha$ -Toc	○	○	○	○	○
	AA-3-d1- $\alpha$ -Toc	○	○	○	○	○
	IP-AA-2-d1- $\alpha$ -Toc	○	○	○	○	○
	AA-2-d1- $\alpha$ -Toc	○	○	○	○	○
	IP-AA-3-d- $\alpha$ -Toc	○	○	○	○	○
	AA-3-d- $\alpha$ -Toc	○	○	○	○	○
	IP-AA-2-d- $\alpha$ -Toc	○	○	○	○	○
	AA-2-d- $\alpha$ -Toc	○	○	○	○	○

10

## 【0113】

本発明の表17に示す化合物のニキビ、保湿に対する効果を調べるために、ニキビに悩む成人男子の被験者に対して十分に説明し、研究への参加について自由意思による同意を得てから、前記の40で1ヶ月間保存した乳化物の中で安定性が全て良好であったものについて臨床試験を行った。

被験者に対して朝晩1日1回洗顔後に、前項で作成した以下表17の乳化物をITO社製不織布マスクシートに5cc添加してそれを全顔に貼付け、15分間放置した。これを月曜から金曜の5日間行い、土日の2日は、行わず、28日間試験を行った。評価方法としては、顔面画像解析装置(VISIA及びロボスキャンアナライザー)によりニキビ数を試験開始時と29日後の2回行い、顔面の保湿に対する効果は、皮膚水分測定装置を使用して皮膚水分量を計測した。それぞれ実験スタート時から何パーセント改善したかについての改善率について比較を行った。ニキビの結果は、 $((\text{実験開始時のニキビ数} / \text{実験終了時のニキビ数}) \times 100) - 100 = \text{ニキビ改善率}(\%)$ による計算式でニキビ改善率(%)を算出し比較した。皮膚水分の測定結果は、 $((\text{実験終了時の皮膚水分量} / \text{実験開始時の皮膚水分量}) \times 100) - 100 = \text{皮膚水分増加率}(\%)$ による計算式で皮膚水分増加率(%)を算出し比較した。一試験区の被験者数は8名であった。その結果、一試験区ごとに平均値を求め、ニキビ改善率と水分増加率がそれぞれ10%以上有意に改善した場合はとして効果ありとし、そうでない場合はXを記した。その結果を表17に示す。

20

30

## 【0114】

【表17】

	被験物質名	ニキビ	保湿	臨床試験の総合評価
本発明の液晶乳化物	IP-AA-3-VE	○	○	○
	AA-3-VE	○	○	○
	IP-AA-3-VE	○	○	○
	AA-3-VE	○	○	○

40

	IP-AA-2-VE	○	○	○
	AA-2-VE	○	○	○
	IP-AA-3-dl- $\alpha$ -Toc	○	○	○
	AA-3-dl- $\alpha$ -Toc	○	○	○
	IP-AA-2-dl- $\alpha$ -Toc	○	○	○
	AA-2-dl- $\alpha$ -Toc	○	○	○
	IP-AA-3-d- $\alpha$ -Toc	○	○	○
	AA-3-d- $\alpha$ -Toc	○	○	○
	IP-AA-2-d- $\alpha$ -Toc	○	○	○
	AA-2-d- $\alpha$ -Toc	○	○	○
	AA-2-d- $\alpha$ -Toc	○	○	○
既存誘導体の 液晶乳化物	dl- $\alpha$ -トコフェリルリン 酸ナトリウム	x	○	x
	イソステアリアルアスコル ビルリン酸 2Na	x	○	x
既存乳化剤配 合の本発明の 液晶乳化物	IP-AA-3-VE	○	○	○
	AA-3-VE	○	○	○
	IP-AA-3-VE	○	○	○
	AA-3-VE	○	○	○
	IP-AA-2-VE	○	○	○
	AA-2-VE	○	○	○
	IP-AA-3-dl- $\alpha$ -Toc	○	○	○
	AA-3-dl- $\alpha$ -Toc	○	○	○
	IP-AA-2-dl- $\alpha$ -Toc	○	○	○
	AA-2-dl- $\alpha$ -Toc	○	○	○
	IP-AA-3-d- $\alpha$ -Toc	○	○	○
	AA-3-d- $\alpha$ -Toc	○	○	○
	IP-AA-2-d- $\alpha$ -Toc	○	○	○
	AA-2-d- $\alpha$ -Toc	○	○	○
	AA-2-d- $\alpha$ -Toc	○	○	○

10

20

30

この結果、既存の誘導体を添加した液晶乳化物に比較して、本発明の液晶乳化物は、臨床試験において全て良好な結果となった。

#### 【0115】

さらに、本発明の液晶乳化物と既存乳化剤配合の本発明の液晶乳化物について、さらに過酷な条件で経時安定性の試験を行った。即ち、各乳化物を40℃で10ヶ月保存しHPLCによる力価試験の結果では、90%以上残存していたものには、○をそれ以外にはXを記した。その結果を表18に示す。

#### 【0116】

40

【表 18】

	被験物質名	力価
本発明の液晶乳化物	IP-AA-3-VE	x
	AA-3-VE	x
	IP-AA-3-VE	x
	AA-3-VE	x
	IP-AA-2-VE	x
	AA-2-VE	x
	IP-AA-3-dl- $\alpha$ -Toc	x
	AA-3-dl- $\alpha$ -Toc	x
	IP-AA-2-dl- $\alpha$ -Toc	x
	AA-2-dl- $\alpha$ -Toc	x
	IP-AA-3-d- $\alpha$ -Toc	x
	AA-3-d- $\alpha$ -Toc	x
	IP-AA-2-d- $\alpha$ -Toc	x
	AA-2-d- $\alpha$ -Toc	x
既存乳化剤配合の本発明の液晶乳化物	IP-AA-3-VE	○
	AA-3-VE	○
	IP-AA-3-VE	○
	AA-3-VE	○
	IP-AA-2-VE	○
	AA-2-VE	○
	IP-AA-3-dl- $\alpha$ -Toc	○
	AA-3-dl- $\alpha$ -Toc	○
	IP-AA-2-dl- $\alpha$ -Toc	○
	AA-2-dl- $\alpha$ -Toc	○
	IP-AA-3-d- $\alpha$ -Toc	○
	AA-3-d- $\alpha$ -Toc	○
	IP-AA-2-d- $\alpha$ -Toc	○
	AA-2-d- $\alpha$ -Toc	○

10

20

30

上記の結果より、既存乳化物を添加した本発明の液晶乳化物は、添加しなかったものに比較し非常に高い安定性を示した。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0117】

( $R^5 - C(=O) - CH_2 -$ ) 構造を有する化合物を有効成分として含有することを特徴とする強力な美白作用、フリーラジカル抑制作用、抗シワ作用、抗ニキビ作用、保湿作用、バリア機能増強作用、紫外線由来炎症抑制作用、抗褥瘡作用を有し、かつ低刺激で安全性が高く、化粧品、医薬部外品、医薬品、動物用薬品、水生動物用薬品を含む外用組成物を提供する。本発明は、前述の説明及び実施例に特に記載した以外も、実行できることは明らかである。上述の教示に鑑みて、本発明の多くの改変及び変形が可能であり、従ってそれらも本件添付の請求の範囲の範囲内のものである。

40



---

 フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 6 1 K	8/67	(2006.01)	A 6 1 P	39/06	
A 6 1 Q	19/00	(2006.01)	A 6 1 K	8/67	
C 1 2 N	5/02	(2006.01)	A 6 1 Q	19/00	
C 0 7 B	61/00	(2006.01)	C 1 2 N	5/02	
			C 0 7 B	61/00	3 0 0

審査官 黒川 美陶

- (56)参考文献 欧州特許出願公開第 0 0 4 1 1 1 8 3 ( E P , A 1 )  
 特開平 0 6 - 2 7 9 4 3 9 ( J P , A )  
 Kazuo Morisaki, et al., Bull. Chem. Soc. Jpn., 1 9 9 6 年, Vol.69, No.3, pp.725-734

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
 C 0 7 D , A 2 3 K , A 6 1 K , A 6 1 P , A 6 1 Q , C 1 2 N , C 0 7 B  
 C A p l u s / R E G I S T R Y ( S T N )