

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-101541

(P2015-101541A)

(43) 公開日 平成27年6月4日(2015.6.4)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A61K 8/64 (2006.01)	A 61 K 8/64	4 C083
A61K 36/06 (2006.01)	A 61 K 35/72	4 C084
A61P 43/00 (2006.01)	A 61 P 43/00	105
A61P 17/00 (2006.01)	A 61 P 17/00	
A61K 38/00 (2006.01)	A 61 K 37/02	

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-240554 (P2013-240554)	(71) 出願人	000113470 ポーラ化成工業株式会社 静岡県静岡市駿河区弥生町6番48号
(22) 出願日	平成25年11月21日 (2013.11.21)	(72) 発明者	倉沢 真澄 神奈川県横浜市戸塚区柏尾町560番地 ポーラ化成工業株式会社 横浜研究所内
		(72) 発明者	中西 類子 神奈川県横浜市戸塚区柏尾町560番地 ポーラ化成工業株式会社 横浜研究所内
		F ターム (参考)	4C083 AA031 AA032 AB032 AC122 AC172 AC482 AD092 AD411 AD412 CC02 DD23 DD27 EE12 FF01 4C084 AA02 BA44 MA63 NA14 ZA892 ZC192 4C087 AA01 AA02 BB64 CA11 CA16 MA63 NA14 ZA89 ZC19

(54) 【発明の名称】皮膚関連酵素活性化剤

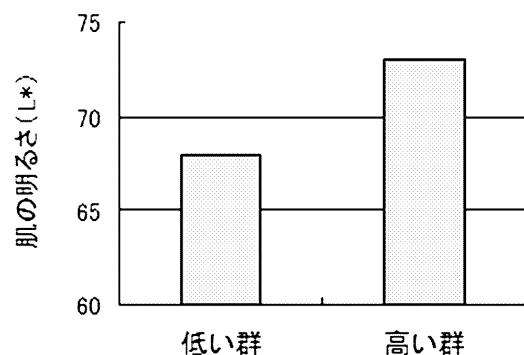
(57) 【要約】 (修正有)

【課題】肌状態に関連する酵素活性を向上させ、肌状態を改善する皮膚関連酵素活性化剤の提供。

【解決手段】酵母抽出物からなる皮膚外用剤で、該酵母抽出物がヒートショックプロテイン及び/又はヒートショック因子を含有する皮膚外用剤。

【選択図】図1

カリクレインー5活性と肌の明るさ



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

酵母抽出物からなる皮膚関連酵素活性化剤

【請求項 2】

前記酵母抽出物がヒートショックプロテイン及び/又はヒートショック因子を含有することを特徴とする請求項1記載の皮膚関連酵素活性化剤

【請求項 3】

請求項1又は2記載の皮膚関連酵素活性化剤を含有することを特徴とする皮膚外用剤

【請求項 4】

化粧料であることを特徴とする請求項3記載の皮膚外用剤

10

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は肌状態を改善する効果を有する皮膚関連酵素活性化剤に関する。

【背景技術】**【0002】**

皮膚の角層中には、様々な酵素が存在し、これらの酵素は皮膚の状態と関連することが報告がされている。例えば、特許文献1では、角層中のトリプシン様酵素活性とキモトリプシン様酵素活性が、肌荒れと関係を有することが示唆されている。

その他、角層形成、NMF産生に関する酵素として、カスパーゼ-14（例えば、非特許文献1、2参照）、過酸化水素の分解に関わり老化に伴い減少する酵素としてカタラーゼ（例えば、非特許文献2、3参照）、エネルギー産生に関わる酵素としてNADHデヒドロゲナーゼ（例えば、非特許文献4参照）、角層細胞の皮膚における接着に関わり、角層剥離に関する酵素としてカリクレイン-5（例えば、非特許文献5参照）が知られている。

【0003】

一方、ヒートショックプロテインは、細胞が熱や紫外線等のストレスにさらされた時に発現し、細胞を保護するタンパク質の一群であり、その分子量によりそれぞれの分子の名前がつけられており、例えばHSP60、70、90はそれぞれ分子量60、70、90kDaのタンパク質を指す。ヒートショックプロテインに関しては、ヒートショックプロテインおよびヒートショックプロテイン因子を産生させる酵母抽出液を含む皮膚外用剤により、紫外線、熱などの外的刺激から皮膚を保護し、損傷を受けた皮膚を修復し、改善することが報告されている（例えば、特許文献2参照）。しかしながら、保湿作用、肌老化、肌荒れに効果があるとの記述があるが、保湿性やサンバーンセルの障害の改善のみが記載されており、具体的にしわ、肌荒れを改善したデータはない。化粧料等の皮膚外用剤で求められる効果としては、肌の凹凸や毛穴等の肌の表面の改善、老化や外部からの物理的刺激によるダメージによるしわ等の真皮組織の変性の改善、予防があり、このような具体的な肌状態を改善する効果を達成するための技術が求められていた。

【先行技術文献】**【特許文献】****【0004】**

【特許文献1】特開平8-68791号公報

30

【特許文献2】特開2004-331602号公報

【非特許文献】**【0005】**

【非特許文献1】NatureCell Biology 2007(6) p666-674

【非特許文献2】機能性化粧品素材開発のための実験プロトコール集（シーエムシー出版）

【非特許文献3】Experimental Gerontology 2007(42) p924-929

【非特許文献4】J Cosmet Dermatol.2012 (11)No.1 p3-8

40

50

【非特許文献 5】Biol.Chem.2008 (389) No.6p669-680

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、このような状況下なされたものであり、肌状態に関連する酵素活性を向上させる皮膚関連酵素活性化剤を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、肌状態に関連する酵素活性を向上させる皮膚関連酵素活性化剤を提供すべく研究を進め、意外にも、酵母抽出物が紫外線等による酵素の変性を抑制、修復し、酵素活性の低下を改善し、角層中の酵素の活性を向上させ、肌状態を改善することを見出し、本発明を完成させた。すなわち、本発明は以下に示すとおりである。

<1> 酵母抽出物からなる皮膚関連酵素活性化剤

<2> 前記酵母抽出物がヒートショックプロテイン及び/又はヒートショック因子を含有することを特徴とする<1>記載の皮膚関連酵素活性化剤

<3> <1>又は<2>記載の皮膚関連酵素活性化剤を含有することを特徴とする皮膚外用剤

<4> 化粧料であることを特徴とする<3>記載の皮膚外用剤

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】カリクレイン-5活性と肌の明るさの関係を示すグラフである。

【図2】カリクレイン-5活性と毛穴スコアの関係を示すグラフである。

【図3】カリクレイン-5活性としわの数の関係を示すグラフである。

【図4】カリクレイン-5活性と肌の凹凸の関係を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0009】

以下、本発明の皮膚関連酵素活性化剤について説明する。

【0010】

(1) 本発明の皮膚関連酵素活性化剤である酵母抽出物

本発明の皮膚関連酵素活性化剤は、その必須成分として酵母抽出物を含有する。このような酵母抽出物としては、角層中の酵素の活性を向上するもので皮膚外用剤に使用できるものであれば特段限定されないが、具体的にはヒートショックプロテイン及び/又はヒートショック因子を含有する酵母抽出物を用いることができる。ヒートショックプロテイン及び/又はヒートショック因子を含有する酵母抽出物は、42~44にて10~40分間熱ストレスを与え培養し、その後、培養液を遠心分離し、沈殿物を粉碎後、極性溶媒にて抽出した抽出物を用いることが出来る。前記極性溶媒としては、水、1,3ブチレングリコール、グリセリン、ポリプロピレングリコールなどが例示できる。

抽出物を乾燥し粉末にしたもの、及び抽出物、乾燥物等をカラムや溶液間の分配により精製し、有効成分を高めたもの等を酵母抽出物として用いることもできる。

【0011】

皮膚関連酵素としては、カリクレイン-5、カスパーゼ14、カタラーゼ、及びNADHデヒドロゲナーゼ、ヒスチジンアンモニアリアーゼ、トランスグルタミナーゼが例示でき、より好ましくはカリクレイン-5、カスパーゼ14、カタラーゼ、及びNADHデヒドロゲナーゼが例示できる。

酵素活性の測定は、例えば、市販の粘着テープ等にて採取された角層細胞から酵素をバッファーにて抽出し、得られた酵素液の酵素活性の変化量を常法に従い測定する方法が挙げられる。角層採取部位は特に限定されない。

前記酵素からなる群から選択される少なくとも1種の酵素活性が向上した場合、肌状態が改善したと判断できる。

【0012】

10

20

30

40

50

(2) 本発明の皮膚外用剤

本発明の皮膚外用剤は、皮膚関連酵素活性化剤を含有する。本発明の皮膚関連酵素活性化剤は、皮膚外用剤全量に対し、0.0001質量%～10質量%、より好ましくは、0.001質量%～5質量%、さらに好ましくは、0.015質量%～3質量%含有することが好ましい。これは、下限未満では本発明の皮膚関連酵素活性化剤が有する肌状態の改善効果が発揮されず、上限を超えると効果が頭打ちになり、安定性等の問題が生じ、皮膚関連酵素活性化剤を含有した皮膚外用剤として使用する場合、自由度を損なう場合が存するためである。

本発明の皮膚外用剤の使用前後で、酵素活性がどのように変化するかを測定することで、酵素活性が向上するか否かの判断は行うことができる。

10

【0013】

さらに、本発明の皮膚外用剤にはその効果を損なわない範囲において、通常皮膚外用剤で用いられる、任意成分を含有することができる。かかる任意成分としては、例えば、ポリエチレングリコール等の多価アルコール類、ピロリドンカルボン酸ナトリウム、乳酸、乳酸ナトリウム等の保湿成分類、グアガム、クインスシード、カラギーナン、ガラクタン、アラビアガム、ペクチン、マンナン、デンプン、キサンタンガム、カードラン、メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、メチルヒドロキシプロピルセルロース、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、グリコーゲン、ヘパラン硫酸、ヒアルロン酸、ヒアルロン酸ナトリウム、トラガントガム、ケラタン硫酸、コンドロイチン、ムコイチン硫酸、ヒドロキシエチルグアガム、カルボキシメチルグアガム、デキストラン、ケラト硫酸、ローカストビーンガム、サクシノグルカン、カロニン酸、キチン、キトサン、カルボキシメチルキチン、寒天、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、ポリアクリル酸ナトリウム、ポリエチレングリコール、ベントナイト等の増粘剤、1,3ブタンジオール、グリセリン、ジグリセリン等の本発明のアルカンジオール以外の多価アルコール、表面処理されていても良い、マイカ、タルク、カオリン、合成雲母、炭酸カルシウム、炭酸マグネシウム、無水ケイ酸(シリカ)、酸化アルミニウム、硫酸バリウム等の粉体類、表面処理されていても良い、酸化コバルト、群青、紺青、酸化亜鉛の無機顔料類、表面処理されていても良い、酸化鉄二酸化チタン焼結体等の複合顔料、表面処理されていても良い、平均一次粒径が100μm以下の微粒子二酸化チタン、微粒子酸化亜鉛、表面処理されていても良い、雲母チタン、魚鱗箔、オキシ塩化ビスマス等のパール剤類、レーキ化されていても良い赤色202号、赤色228号、赤色226号、黄色4号、青色404号、黄色5号、赤色505号、赤色230号、赤色223号、橙色201号、赤色213号、黄色204号、黄色203号、青色1号、緑色201号、紫色201号、赤色204号等の有機色素類、ポリエチレン末、ポリメタクリル酸メチル、ナイロン粉末、オルガノポリシロキサンエラストマー等の有機粉体類、エタノール、イソプロパノール等の低級アルコール類、アスコルビン酸、アスコルビン酸誘導体等の水溶性ビタミン等が例示される。

20

【実施例】

【0014】

<実施例1>

(本発明の皮膚関連酵素活性化剤)

30

熱ストレス条件下(44℃)にて40分間熱ストレスを与え、ヒートショックプロテイン及びヒートショック因子を増加させ、その後、培養液を遠心分離し、沈殿物を粉碎後、水にて抽出した酵母抽出物1を調製した。同様に熱ストレス処理を行わず同様の過程で調製した酵母抽出物2を調製した。

40

【0015】

<実施例2>

表1に示す处方にしたがって本発明の皮膚外用剤を調製した。

表1の成分(イ)を攪拌しながら60℃に加熱した。これに成分(ロ)を常温にて攪拌混合したものを添加し、次に(ハ)を加え攪拌し続け均一溶液とした。次に、成分(ホ)を

50

加え攪拌混合し、均一となるまで攪拌を続け本発明の皮膚外用剤を得た。なお表中成分(イ)~(ホ)における数字は質量%を表す。

【0016】

【表1】

成分		実施例1
イ	1,3ブチレングリコール	5
	メチルパラベン	0.3
	純水	10
ロ	グリセリン	15
	フェノキシエタノール	0.5
	純水	60
ハ	酵母抽出物1	0.1
	カルボキシビニルポリマー	0.1
	純水	8.55
ホ	水酸化カリウム	0.05
	純水	0.4
合計		100.0

10

20

30

40

50

以下に試験例を挙げて本発明について詳細に説明する。

【試験例】

【0017】

<試験例1>

(角層中酵素の抽出)

健常人1名について、顔部をダブル洗顔した後(メーク落とし・洗顔)、テープストリッピング法により、顔部の角層細胞を採取した。

採取した角層は酵素抽出液(0.1M Tris-HCl(pH7.5)+0.14M NaCl+0.1%Tween20)にてホモジナイズし、15000rpmで遠心した上清を酵素液とした。

酵素活性の算出に必要な蛋白濃度は、前記酵素液を、Protein Assay Kit(同仁化学)を用い測定した。

本試験においては、角層中の酵素として、カリクレイン-5、カスパーゼ-14、カタラーゼ、及びNADHデヒドロゲナーゼを選択し、各酵素の酵素活性を以下のように測定した。

【0018】

(角層中酵素活性の測定)

カリクレイン-5は、以下の方法にて測定した。すなわち、MCA基質(Boc-Val-Pro-Arg-MCA、同仁化学)(0.2mM)20μL、アッセイバッファー(50mM HEPES(pH7.5)+60mM NaCl+0.01%Chaps+5mM EDTA+2mM DTT+1.5mMクエン酸ナトリウム)130μL、酵素抽出液(酵素を含まない)30μLを小試験管中で10分間37においてインキュベートしブランクとし、同様に、MCA基質(0.2mM)20μL、アッセイバッファー(50mM HEPES(pH7.5)+60mM NaCl+0.01%Chaps+5mM EDTA+2mM DTT+1.5mMクエン酸ナトリウム)130μL中に酵素液30μLを加え小試験管中で10分間37においてインキュベートし、サンプルとした。

ブランク、サンプルとともに 0.1M モノクロロ酢酸ナトリウム溶液 (pH 4.3) で反応を停止し、蛍光強度 (EX 370 nm, EM 460 nm) を測定し、酵素活性を算出した。

【0019】

カスパーゼ-14は、以下の方法にて測定した。すなわち、MCA基質 (0.2 mM) 20 μL、アッセイバッファー (50 mM HEPES (pH 7.5) + 60 mM NaCl + 0.01% Chaps + 5 mM EDTA + 2 mM DTT + 1.5 mM クエン酸ナトリウム) 160 μLを小試験管中で10分間37においてインキュベートしブランクとし、同様に、MCA基質 (0.2 mM) 20 μL、アッセイバッファー (50 mM HEPES (pH 7.5) + 60 mM NaCl + 0.01% Chaps + 5 mM EDTA + 2 mM DTT + 1.5 mM クエン酸ナトリウム) 160 μL中に酵素液 30 μLを加え、小試験管中で10分間37においてインキュベートし、サンプルとした。
10

ブランク、サンプルとともに 0.1M モノクロロ酢酸ナトリウム溶液 (pH 4.3) で反応を停止し、蛍光強度 (EX 370 nm, EM 460 nm) で測定し、酵素活性を算出した。

【0020】

カタラーゼは、以下の方法にて測定した。すなわち、試験管に 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.2) 300 μL に 0.1M Tris-HCl (pH 7.5) + 0.14M NaCl + 0.1% Tween 20 の 300 μL を混合しブランクとした。同様に、リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.2) 300 μL 中に酵素液 300 μL を混合し、サンプルとした。試験管内で調整した上記の各試料液に対し、31 mM 過酸化水素水 300 μL を加え 25 で反応させた後、0~4分間の過酸化水素に由来する 240 nm の吸光度の減少を追跡し、1分間あたりの吸光度の減少量を算出した。240 nm における過酸化水素の分子吸光度係数 (1 μmol / mL = 0.036) により酵素活性 (μmol / min / g) を求めた。
20

【0021】

NADH デヒドロゲナーゼは以下の方法にて測定した。すなわち、基質である NADH 0.2 mM を含む 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) 2.8 mL を 25 で 5 分間予備加温後、1.2 mM の 2,6-ジクロロフェノールインドフェノール (DCIP) 水溶液を 0.1 mL 添加し、次いで、予め、酵素希釈液 (200 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5)) で希釈した酵素液 0.1 mL を加え、反応を開始し、25 で 20 秒毎に 600 nm の吸光度の減少を 4 分間測定した。
30

盲検として上記において、NADH デヒドロゲナーゼ溶液 0.1 mL の代わりに酵素希釈液 0.1 mL を加え、上記同様に操作を行って反応を開始し、25 で 20 秒毎に 600 nm の吸光度の減少を 4 分間測定する吸光度を測定した。

【0022】

前記酵素液の酵素にダメージを与えるため、紫外線 (UVB) を 100 mJ / cm² となるように照射したのち、実施例の酵母抽出物 1 または酵母抽出物 2 を表 2 の濃度 (w/v) となるように添加し、3 時間後のカリクレイン-5、カスパーゼ-14、カタラーゼ、及び NADH デヒドロゲナーゼの酵素活性を測定した。コントロールを 100% としたときの各サンプルの酵素活性を算出し % で表示した。また、紫外線を照射しない場合の各酵素の活性はコントロールに対し 170~180% であった。
40

【0023】

【表2】

	酵母抽出物	濃度(%)
コントロール	なし	0
サンプル1	酵母抽出物1	0.10%
サンプル2	酵母抽出物2	0.10%

10

【0024】

表3の結果より、酵母抽出物を添加したサンプル1及び2では、コントロールに比べ、紫外線ダメージによる酵素の活性低下が抑制された。更に、熱ストレス処理を行ったサンプル1はヒートショックプロテイン及びヒートショック因子を増加したものであり、これらの増加により紫外線による酵素の変性を顕著に抑制、修復し、酵素活性の低下を改善したと考えられる。

【0025】

【表3】

(%)	カリクレイン-5	カスパーゼ-14	カタラーゼ	NADHデヒドロゲナーゼ
コントロール	100	100	100	100
サンプル1	141	156	149	154
サンプル2	112	115	118	116

20

【0026】

<試験例2>

(酵素と肌状態の関連性)

皮膚関連酵素であるカリクレイン-5の酵素と肌状態の関連性を把握するため、前記のように、60名の健常者の顔部の角層細胞を採取し、酵素活性を測定し、酵素活性の高さから低中高群を設定し、低い群、高い群で肌の明るさ、毛穴の目立ち、しわ、及び肌の凹凸(ムラ)に差が認められるか観察した。

肌の明るさは、洗顔後(メーク落とし・洗顔)、室温 22 ± 2 、湿度 $50 \pm 5\%$ の条件下にて安静にし、右の頬下部を分光測色計CM-2600d(コニカミノルタオプティクス株式会社)にてL*値を測定し、5回測定を行い、平均値を求めた。

毛穴の目立ち、しわ、及び肌の凹凸は、前記と同様に洗顔を行い、前記条件下で安静にした後、顔正面および左右斜めの3部位について、VISIA Evolution(Canfield Scientific Ltd.)を用いて、毛穴スコア、凹凸及びシワの個数を測定した。

【0027】

図1~4に酵素活性が低い群、高い群における、肌の明るさ(L*値)、毛穴の目立ち(毛穴スコア)、しわの数、及び肌の凹凸(ムラ)の結果を示す。酵素活性が高い群は低い群に比べ、肌が明るく、毛穴スコアが低く毛穴が目立ちにくく、しわの数が少なく、凹凸が少ないことが観察された。従って、酵素活性の向上が肌状態の改善に繋がることが判った。また、カスパーゼ-14、カタラーゼ、及びNADHデヒドロゲナーゼにおいても同様に、酵素活性の向上が、肌状態の改善に繋がることが確認された。

30

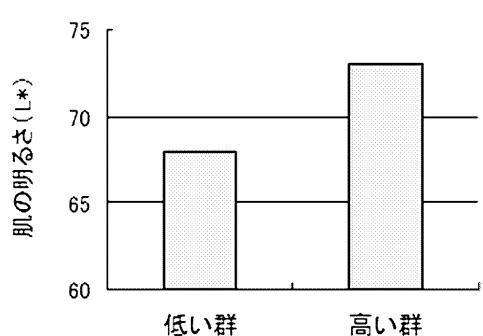
【産業上の利用可能性】

【0028】

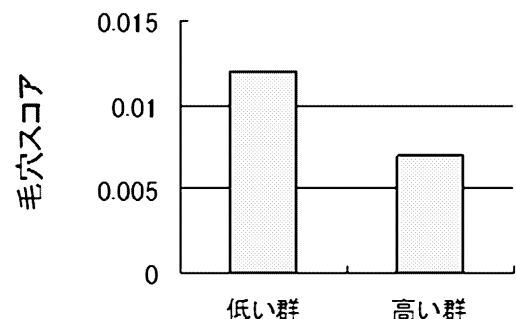
肌状態を改善する効果を有する皮膚関連酵素活性化剤を提供することができる。

40

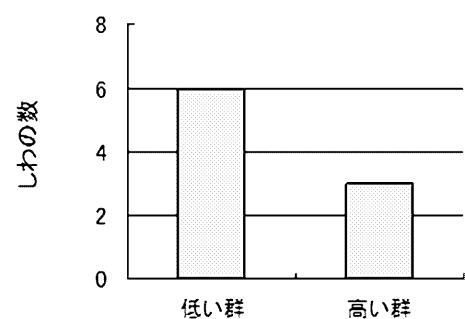
【図1】
カリクレインー5活性と肌の明るさ



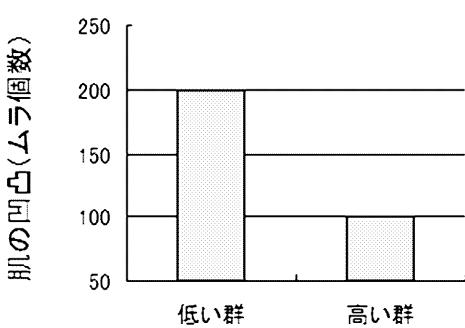
【図2】
カリクレインー5活性と毛穴スコア



【図3】
カリクレインー5活性としわの数



【図4】
カリクレインー5活性と肌の凹凸



フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 Q 19/08 (2006.01)	A 6 1 Q 19/08	
A 6 1 Q 19/00 (2006.01)	A 6 1 Q 19/00	
A 6 1 K 8/99 (2006.01)	A 6 1 K 8/99	