(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7486235号
(P7486235)

(45)発行日　令和6年5月17日(2024.5.17)

(24)登録日　令和6年5月9日(2024.5.9)

(51)国際特許分類

Ａ６１Ｋ　35/08　(2015.01)	Ａ６１Ｋ	35/08	ＺＮＡ	
Ａ６１Ｋ　33/12　(2006.01)	Ａ６１Ｋ	33/12		
Ａ６１Ｋ　33/42　(2006.01)	Ａ６１Ｋ	33/42		
Ａ６１Ｐ　17/00　(2006.01)	Ａ６１Ｐ	17/00		
Ａ６１Ｐ　17/02　(2006.01)	Ａ６１Ｐ	17/02		

ＦＩ

請求項の数　13　（全22頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-571685(P2022-571685)
(86)(22)出願日　令和3年12月24日(2021.12.24)
(86)国際出願番号　PCT/JP2021/048218
(87)国際公開番号　WO2022/138923
(87)国際公開日　令和4年6月30日(2022.6.30)
審査請求日　令和5年6月20日(2023.6.20)
(31)優先権主張番号　特願2020-217526(P2020-217526)
(32)優先日　令和2年12月25日(2020.12.25)
(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)
早期審査対象出願

(73)特許権者　598086316
株式会社エー・アイ・システムプロダクト
愛知県春日井市坂下町３－４５０
(74)代理人　100183461
弁理士　福島 芳隆
(72)発明者　岡島 眞裕
愛知県春日井市坂下町３－４５０ 株式会社エー・アイ・システムプロダクト内
(72)発明者　池田 満雄
愛知県春日井市坂下町３－４５０ 株式会社エー・アイ・システムプロダクト内
(72)発明者　山本 博之
埼玉県北足立郡伊奈町小室１０２８１
学校法人都築学園日本薬科大学内
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　セラミド合成促進剤

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ケイ素及びリンを含有するミネラル塩を含む水溶液を電気分解して得られたアルカリイオン水を有効成分として含むセラミド合成促進剤であって、

前記アルカリイオン水中に、ケイ素、リン及びカリウムが含まれる、セラミド合成促進剤。

【請求項２】

前記アルカリイオン水中に、前記ケイ素が０．４～４００ｍａｓｓ　ｐｐｍ、前記リンが４００～８００ｍａｓｓ　ｐｐｍ、及び前記カリウムが５～３０００ｍａｓｓ　ｐｐｍ含まれる、請求項１に記載のセラミド合成促進剤。

【請求項３】

前記アルカリイオン水中に、さらに、カルシウム、ナトリウム、及びマグネシウムからなる群より選ばれる少なくとも一種のミネラルが含まれる、請求項１又は２に記載のセラミド合成促進剤。

【請求項４】

前記アルカリイオン水中に、さらに、塩素が含まれる、請求項１～３の何れか一項に記載のセラミド合成促進剤。

【請求項５】

前記アルカリイオン水のｐＨが１０～１２．５である、請求項１～４の何れか一項に記載のセラミド合成促進剤。

【請求項６】

前記アルカリイオン水の表面張力が５５～６８ｍＮ／ｍである、請求項１～５の何れか一項に記載のセラミド合成促進剤。
【請求項７】
前記アルカリイオン水が、ケイ素及びリンを含有するミネラル塩と水とを含む水溶液を電気分解する電気分解工程、及び、前記工程で得られた陰極側のアルカリ水と、ケイ素及びリンを含有するミネラル塩とを混合して混合液を得、該混合液に電子を供給する電子供給工程により得られたものであり、前記アルカリイオン水中に、ケイ素、リン及びカリウムが含まれる、請求項１～６の何れか一項に記載のセラミド合成促進剤。
【請求項８】
前記セラミド合成促進剤が、セラミド合成遺伝子発現促進剤である、請求項１～７の何れか一項に記載のセラミド合成促進剤。
【請求項９】
前記セラミド合成遺伝子発現促進剤が、ＥＬＯＶＬ４遺伝子発現促進剤、ＥＬＯＶＬ７遺伝子発現促進剤、ＣｅｒＳ３遺伝子発現促進剤、及びＳＰＴＬＣ２遺伝子発現促進剤からなる群より選ばれる少なくとも１種の遺伝子発現促進剤である、請求項１～８の何れか一項に記載のセラミド合成促進剤。
【請求項１０】
請求項１～９の何れか一項に記載のセラミド合成促進剤を含有するセラミド合成促進用医薬品。
【請求項１１】
請求項１～９の何れか一項に記載のセラミド合成促進剤を含有するセラミド合成促進用皮膚外用剤。
【請求項１２】
請求項１～９の何れか一項に記載のセラミド合成促進剤を含有するセラミド合成促進用化粧料。
【請求項１３】
請求項１～９の何れか一項に記載のセラミド合成促進剤を含有するセラミド合成促進用飲食品組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、セラミド合成促進剤に関する。
【背景技術】
【０００２】
皮膚のセラミドは、表皮角化細胞において、アミノ酸の一種Ｌ－セリンとパルミチン酸とを出発原料としてスフィンゴシン骨格が作られ、その後種々の酵素反応を経て生合成される。セラミドの代謝は、加齢、紫外線曝露、乾燥肌、荒れ肌、アトピー性皮膚炎、老人性乾皮症、乾癬等によって、健全な状態が損なわれる。その結果、各層中のセラミド量が減少し、例えば、皮膚の保湿機能及びバリア機能の低下が引き起こされる。また近年、セラミドのω－水酸基にリノール酸が結合した構造を有し、脂肪酸の鎖長がＣ２８以上であるアシルセラミドが、非常に疎水性が高く、皮膚バリア機能に必須であることが報告されている（非特許文献１）。
【０００３】
このように、セラミド、特にアシルセラミドの産生を促進することにより、皮膚バリア機能の改善又は正常化が促進されることが期待される。
【０００４】
最近、皮膚外用剤、飲食物等に使用し得るセラミド、特にアシルセラミドの産生を促進する物質に関する研究開発が活発に進められているが、十分であるとはいえず、安全で効果的なセラミド合成促進作用を有する成分の開発が望まれている。
【先行技術文献】

【非特許文献】
【０００５】
【文献】YAKUGAKU ZASSHI 137(10) 1201-1208 (2017)
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００６】
本発明は、新規なセラミド合成促進剤を提供することを目的とする。
【課題を解決するための手段】
【０００７】
本発明者らが新規なセラミド合成促進剤を開発すべく鋭意検討した結果、特定の製造方法により製造されたアルカリイオン水に、セラミド合成に関与する遺伝子の発現促進作用があり、このアルカリイオン水を用いることでセラミド合成が促進されることを見出した。本発明は、このような知見に基づき完成されたものである。
【０００８】
すなわち、本発明は、以下のとおりである。
項１．
ケイ素及びリンを含有するミネラル塩を含む水溶液を電気分解して得られたアルカリイオン水を含むセラミド合成促進剤。
項２．
前記アルカリイオン水中に、前記ケイ素が０．４～４００ｍａｓｓ　ｐｐｍ、及びリンが２～８００ｍａｓｓ　ｐｐｍ含まれる、上記項１に記載のセラミド合成促進剤。
項３．
前記アルカリイオン水中に、さらに、カルシウム、カリウム、ナトリウム、及びマグネシウムからなる群より選ばれる少なくとも一種のミネラルが含まれる、上記項１又は２に記載のセラミド合成促進剤。
項４．
前記アルカリイオン水中に、さらに、塩素が含まれる、上記項１～３の何れか一項に記載のセラミド合成促進剤。
項５．
前記アルカリイオン水のｐＨが１０～１２．５である、上記項１～４の何れか一項に記載のセラミド合成促進剤。
項６．
前記アルカリイオン水の表面張力が５５～６８ｍＮ／ｍである、上記項１～５の何れか一項に記載のセラミド合成促進剤。
項７．
前記アルカリイオン水が、ケイ素及びリンを含有するミネラル塩と水とを含む水溶液を電気分解する電気分解工程、及び、前記工程で得られた陰極側のアルカリ水と、ケイ素及びリンを含有するミネラル塩とを混合して混合液を得、該混合液に電子を供給する電子供給工程により得られたものである、上記項１～６の何れか一項に記載のセラミド合成促進剤。
項８．
前記セラミド合成促進剤が、セラミド合成遺伝子発現促進剤を含む、上記項１～７の何れか一項に記載のセラミド合成促進剤。
項９．
前記セラミド合成遺伝子発現促進剤が、ＥＬＯＶＬ４遺伝子発現促進剤、ＥＬＯＶＬ７遺伝子発現促進剤、ＣｅｒＳ３遺伝子発現促進剤、及びＳＰＴＬＣ２遺伝子発現促進剤からなる群より選ばれる少なくとも１種の遺伝子発現促進剤を含む、上記項１～８の何れか一項に記載のセラミド合成促進剤。
項１０．
前記セラミド合成促進剤が、ＥＬＯＶＬ４遺伝子発現促進剤を含む、上記項１～９の何れか一項に記載のセラミド合成促進剤。

項１１．
前記セラミド合成促進剤が、ＥＬＯＶＬ７遺伝子発現促進剤を含む、上記項１～９の何れか一項に記載のセラミド合成促進剤。
項１２．
前記セラミド合成促進剤が、ＣｅｒＳ３遺伝子発現促進剤を含む、上記項１～９の何れか一項に記載のセラミド合成促進剤。
項１３．
前記セラミド合成促進剤が、ＳＰＴＬＣ２遺伝子発現促進剤を含む、上記項１～９の何れか一項に記載のセラミド合成促進剤。
項１４．
上記項１～１３の何れか一項に記載のセラミド合成促進剤を含有する医薬品。
項１５．
上記項１～１３の何れか一項に記載のセラミド合成促進剤を含有する皮膚外用剤。
項１６．
上記項１～１３の何れか一項に記載のセラミド合成促進剤を含有する化粧料。
項１７．
上記項１～１３の何れか一項に記載のセラミド合成促進剤を含有する飲食品組成物。
項１８．
上記項１～１３の何れか一項に記載のセラミド合成促進用飲食品組成物。
【０００９】
項１９．
ケイ素及びリンを含有するミネラル塩を含む水溶液を電気分解して得られたアルカリイオン水の、セラミド合成促進のための使用。
項２０．
前記アルカリイオン水中に、前記ケイ素が０．４～４００ｍａｓｓ　ｐｐｍ、及びリンが２～８００ｍａｓｓ　ｐｐｍ含まれる、上記項１９に記載の使用。
項２１．
前記アルカリイオン水中に、さらに、カルシウム、カリウム、ナトリウム、及びマグネシウムからなる群より選ばれる少なくとも一種のミネラルが含まれる、上記項１９又は２０に記載の使用。
項２２．
前記アルカリイオン水中に、さらに、塩素が含まれる、上記項１９～２１の何れか一項に記載の使用。
項２３．
前記アルカリイオン水のｐＨが１０～１２．５である、上記項１９～２２の何れか一項に記載の使用。
項２４．
前記アルカリイオン水の表面張力が５５～６８ｍＮ／ｍである、上記項１９～２３の何れか一項に記載の使用。
項２５．
前記アルカリイオン水が、ケイ素及びリンを含有するミネラル塩と水とを含む水溶液を電気分解する電気分解工程、及び、前記工程で得られた陰極側のアルカリ水と、ケイ素及びリンを含有するミネラル塩とを混合して混合液を得、該混合液に電子を供給する電子供給工程により得られたものである、上記項１９～２４の何れか一項に記載の使用。
【００１０】
項２６．
セラミド合成を促進する方法であって、
ケイ素及びリンを含有するミネラル塩を含む水溶液を電気分解して得られたアルカリイオン水を使用する方法。
項２７．

前記アルカリイオン水中に、前記ケイ素が０．４～４００ｍａｓｓ　ｐｐｍ、及びリンが２～８００ｍａｓｓ　ｐｐｍ含まれる、上記項２６に記載の方法。
項２８．
前記アルカリイオン水中に、さらに、カルシウム、カリウム、ナトリウム、及びマグネシウムからなる群より選ばれる少なくとも一種のミネラルが含まれる、上記項２６又は２７に記載の方法。
項２９．
前記アルカリイオン水中に、さらに、塩素が含まれる、上記項２６～２８の何れか一項に記載の方法。
項３０．
前記アルカリイオン水のｐＨが１０～１２．５である、上記項２６～２９の何れか一項に記載の方法。
項３１．
前記アルカリイオン水の表面張力が５５～６８ｍＮ／ｍである、上記項２６～３０の何れか一項に記載の方法。
項３２．
前記アルカリイオン水が、ケイ素及びリンを含有するミネラル塩と水とを含む水溶液を電気分解する電気分解工程、及び、前記工程で得られた陰極側のアルカリ水と、ケイ素及びリンを含有するミネラル塩とを混合して混合液を得、該混合液に電子を供給する電子供給工程により得られたものである、上記項２６～３１の何れか一項に記載の方法。
【００１１】
項３３．
セラミド合成促進剤の製造方法であって、
ケイ素及びリンを含有するミネラル塩を含む水溶液を電気分解する工程を備える、セラミド合成促進剤の製造方法。
項３４．
前記アルカリイオン水中に、前記ケイ素が０．４～４００ｍａｓｓ　ｐｐｍ、及びリンが２～８００ｍａｓｓ　ｐｐｍ含まれる、上記項３３に記載のセラミド合成促進剤の製造方法。
項３５．
前記アルカリイオン水中に、さらに、カルシウム、カリウム、ナトリウム、及びマグネシウムからなる群より選ばれる少なくとも一種のミネラルが含まれる、上記項３３又は３４に記載のセラミド合成促進剤の製造方法。
項３６．
前記アルカリイオン水中に、さらに、塩素が含まれる、上記項３３～３５の何れか一項に記載のセラミド合成促進剤の製造方法。
項３７．
前記アルカリイオン水のｐＨが１０～１２．５である、上記項３３～３６の何れか一項に記載のセラミド合成促進剤の製造方法。
項３８．
前記アルカリイオン水の表面張力が５５～６８ｍＮ／ｍである、上記項３３～３７の何れか一項に記載のセラミド合成促進剤の製造方法。
項３９．
前記アルカリイオン水が、ケイ素及びリンを含有するミネラル塩と水とを含む水溶液を電気分解する電気分解工程、及び、前記工程で得られた陰極側のアルカリ水と、ケイ素及びリンを含有するミネラル塩とを混合して混合液を得、該混合液に電子を供給する電子供給工程により得られたものである、上記項３３～３８の何れか一項に記載のセラミド合成促進剤の製造方法。
【００１２】
　なお、現時点で、上記セラミド合成促進剤、遺伝子発現促進剤、医薬品、皮膚外用剤、

化粧料及び飲食品組成物は、物の構造を完全に特定することが不可能又はおよそ実際的ではない程度に困難であるため、プロダクトバイプロセスクレームによって、それぞれの物の発明を記載している。

【発明の効果】

【００１３】

本発明によれば、ケイ素及びリンを含有するミネラル塩を含む水溶液を電気分解して得られたアルカリイオン水を含むセラミド合成促進剤を提供することができる。ケイ素及びリンを含有するミネラル塩を含む水溶液を電気分解して得られたアルカリイオン水は、セラミド、特にアシルセラミドの合成に関与するＥＬＯＶＬ４遺伝子発現促進効果、ＥＬＯＶＬ７遺伝子発現促進効果、ＣｅｒＳ３遺伝子発現促進効果、及びＳＰＴＬＣ２遺伝子発現促進効果を有していることから、セラミドの合成を促進することができる。よって、本発明のセラミド合成促進剤は、セラミドの減少によって誘発される皮膚障害の予防又は治療に有効である。

【図面の簡単な説明】

【００１４】

【図１】図１は、アルカリイオン水を製造する装置を説明する模式図である。

【図２】図２は、ヒトのＥＬＯＶＬ４の遺伝子配列（配列番号１）を示す図である。

【図３】図３は、ヒトのＥＬＯＶＬ７の遺伝子配列（配列番号２）を示す図である。

【図４】図４は、ヒトのＣｅｒＳ３の遺伝子配列（配列番号３）を示す図である。

【図５Ａ】図５Ａは、ヒトのＳＰＴＬＣ２の遺伝子配列（配列番号４）を示す図である。

【図５Ｂ】図５Ｂは、ヒトのＳＰＴＬＣ２の遺伝子配列（配列番号４）を示す図であり、図５Ａの続きを示している。

【図６】図６は、アルカリイオン水のＥＬＯＶＬ４ｍＲＮＡ発現量を示す図である。

【図７】図７は、アルカリイオン水のＥＬＯＶＬ７ｍＲＮＡ発現量を示す図である。

【図８】図８は、アルカリイオン水のＣｅｒＳ３ｍＲＮＡ発現量を示す図である。

【図９】図９は、アルカリイオン水のＳＰＴＬＣ２ｍＲＮＡ発現量を示す図である。

【図１０】図１０は、ＥＬＯＶＬ４及びＣｅｒＳ３のタンパク質の発現変動をウエスタンブロット法により評価した結果を示す図である。

【図１１】図１１は、薄層クロマトグラフィにより評価した結果を示す図である。

【図１２】図１２は、図１１における各濃度のＧｌｃＣｅｒ領域の発色強度増加率を示すグラフである。

【図１３】図１３は、図１１における各濃度のＣｅｒ領域の発色強度増加率を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【００１５】

本発明のセラミド合成促進剤は、ケイ素及びリンを含有するミネラル塩を含む水溶液を電気分解して得られたアルカリイオン水（以下、単に「アルカリイオン水」ということもある。）を含むことを特徴とする。ケイ素及びリンを含有するミネラル塩を含む水溶液を電気分解して得られたアルカリイオン水は、セラミド合成に関与する遺伝子の発現を促進する作用を有し、セラミドの合成を促進することができるので、本発明のセラミド合成促進剤は、セラミドの減少によって誘発される皮膚障害の予防又は治療に有効である。

【００１６】

ケイ素及びリンを含有するミネラル塩を含む水溶液を電気分解して得られたアルカリイオン水には、ケイ素及びリンが含まれる。具体的には、前記アルカリイオン水中に、ケイ素（Ｓｉ）が０．４～４００ｍａｓｓ　ｐｐｍ（ｍｇ／Ｌ）程度、好ましくは０．８～３９０ｍａｓｓ　ｐｐｍ程度、より好ましくは１．０～３８０ｍａｓｓ　ｐｐｍ程度、及びリン（Ｐ）が２～８００ｍａｓｓ　ｐｐｍ程度、好ましくは４～７８０ｍａｓｓ　ｐｐｍ程度、より好ましくは１０～７７０ｍａｓｓ　ｐｐｍ程度含まれる。なお、元素分析は、誘導結合プラズマ（ＩＣＰ）発光分光分析法（日立ハイテクサイエンス株式会社製　SPECTRO ACROSII）により行った。

【００１７】
ケイ素及びリンを含有するミネラル塩を含む水溶液を電気分解して得られたアルカリイオン水は、リン及びケイ素以外の他の元素を含んでもよく、例えば、カルシウム（Ｃａ）を０．０００１～９００ｍａｓｓ　ｐｐｂ程度、好ましくは０．００１～８００ｍａｓｓ　ｐｐｍ程度、より好ましくは０．０１～７００ｍａｓｓ　ｐｐｍ程度、カリウム（Ｋ）を０．０００５～３０００ｍａｓｓ　ｐｐｍ程度、好ましくは１～２９００ｍａｓｓ　ｐｐｍ程度、より好ましくは５～２８００ｍａｓｓ　ｐｐｍ程度、マグネシウム（Ｍｇ）を０．０００１～３００ｍａｓｓ　ｐｐｂ程度、好ましくは０．００１～２５０ｍａｓｓ　ｐｐｍ程度、より好ましくは０．０１～２００ｍａｓｓ　ｐｐｍ程度、ナトリウム（Ｎａ）を３４～８０００ｍａｓｓ　ｐｐｍ程度、好ましくは４０～７９００ｍａｓｓ　ｐｐｍ程度、より好ましくは５０～７８００ｍａｓｓ　ｐｐｍ程度等含んでいてもよい。また、ケイ素及びリンを含有するミネラル塩を含む水溶液を電気分解して得られたアルカリイオン水中には、塩素（Ｃｌ）が含まれていてもよく、例えば、塩素（Ｃｌ）を１．５～４５０ｍｇ／ｋｇ程度、好ましくは１．５～４４０ｍｇ／ｋｇ程度、より好ましくは１．５～４３０ｍｇ／ｋｇ程度含まれていてもよい。
【００１８】
前記アルカリイオン水に含まれるケイ素は、ケイ酸イオン、例えば、$H_3SiO_4^-$、$H_5Si_2O_7^-$、$H_5Si_3O_9^-$等の状態で存在することができる。
【００１９】
前記アルカリイオン水に含まれるリンは、リン酸イオン、例えば、$H_2PO_4^-$、$H_3P_2O_7^-$、$H_4P_3O_{10}^-$等の状態で存在することができる。
【００２０】
ケイ素及びリンを含有するミネラル塩を含む水溶液を電気分解して得られたアルカリイオン水のｐＨは、通常、１０～１２．５程度である。表面張力は、通常、７０ｍＮ／ｍ以下であり、好ましくは５０～６９ｍＮ／ｍ、より好ましくは５５～６８ｍＮ／ｍ程度である。さらに、前記アルカリイオン水には、物理的に電子が過剰に含まれている。
【００２１】
本発明で使用するアルカリイオン水は、ケイ素及びリンを含有するミネラル塩と水とを含む水溶液を電気分解する電気分解工程、及び、前記工程で得られた陰極側のアルカリ水と、ケイ素及びリンを含有するミネラル塩とを混合して混合液を得、該混合液に電子を供給する電子供給工程により得ることができる。ケイ素及びリンを含有するミネラル塩としては、例えば、海水から得られるケイ素及びリンを含有する電解質を用いることができる。海水は、特に限定なく使用することができ、例えば、日本の海水を用いることができる。ケイ素及びリンを含有するミネラル塩は、使用する水の量の０．００１～３質量％程度添加すればよい。
【００２２】
前記アルカリイオン水の製造方法は、上記の工程に加えて、ケイ素及びリンを含有するミネラル塩と水とを含む水溶液を脱酸素処理して溶存酸素濃度を１ｐｐｍ以下にする脱酸素工程、及び前記陰極側のアルカリ水と、ケイ素及びリンを含有するミネラル塩との混合液に１ｋｇ／ｃｍ^2～１２ｋｇ／ｃｍ^{2}の圧力をかける安定化工程を備えることが好ましい。ここで、陰極側のアルカリ水と混合されるケイ素及びリンを含有するミネラル塩は、前記電気分解工程で使用するケイ素及びリンを含有するミネラル塩と同じものを使用することができ、例えば、日本の海水から採取されたものを用いることができる。
【００２３】
以下、アルカリイオン水の製造方法について説明する。
第１工程は、ケイ素及びリンを含有するミネラル塩と水とを含む水溶液を電気分解する電気分解工程である。
【００２４】
原料となる水としては、純水、イオン交換水等を用いることができる。水には、支持電解質として海水から得られるケイ素及びリンを含有するミネラル塩等を溶解させる。水と

して、脱酸素処理を行って水中の溶存酸素の濃度を１ｐｐｍ以下に低下させたものを使用することが好ましい。脱酸素処理として、物理的処理方法と化学的処理方法とがあり、従来、化学的処理方法単独か、あるいは物理的処理方法と化学的処理方法とを併用する方法が採られている。物理的処理方法としては、加熱脱気装置、膜脱気装置等による脱気処理が挙げられる。化学的処理方法としては、脱酸素剤として、ヒドラジン、亜硫酸ナトリウム、糖類（グリコース等）を添加する方法等が挙げられる。脱酸素処理として、例えば、水に前記酸素除去剤を添加することができる。

【００２５】

電気分解は、電解槽等の密閉空間で行われることが好ましい。電解槽内は、窒素、二酸化炭素等の不活性雰囲気であることが好ましい。また、水として、予め脱酸素処理を行って溶存酸素濃度を１ｐｐｍ以下に低下させたものを用いる代わりに、又は、予め脱酸素処理した水を使用することに加えて、電気分解を電解槽中で行う際に、電解槽中に脱酸素剤を投入することも可能である。電気分解で印加される電気エネルギーは１０００Ｗ～３０００Ｗであることが好ましい。

【００２６】

第２工程は、前記第１工程で得られた陰極側のアルカリ水と、ケイ素及びリンを含有するミネラル塩とを混合して混合液を得、該混合液に電子を供給する電子供給工程である。

【００２７】

電気分解で得られた陰極側のアルカリ水は、電解槽から取り出され、混合槽に供給されることが好ましい。混合槽には、海水から得られるケイ素及びリンを含有するミネラル塩を供給する手段と、アルカリ水に電気を供給する電子供給手段とが設けられていることが好ましい。

【００２８】

ケイ素を含有する原材料（又はケイ素を含有するミネラル塩）としては、ケイ酸ナトリウム、ケイ酸カリウム等のケイ酸アルカリ金属塩；ケイ酸カルシウム等のケイ酸アルカリ土類金属塩；ケイ酸マグネシウム等が挙げられる。混合液に含まれるケイ素の含有量は、混合液全量を１００質量％としたときに、０．００５～５質量％程度とすることが好ましく、０．０１～１質量％とすることがより好ましい。

【００２９】

リンを含有する原材料（又はリンを含有するミネラル塩）としては、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム等のリン酸アルカリ金属塩；リン酸カルシウム等のリン酸アルカリ土類金属塩；リン酸マグネシウム等が挙げられる。混合液に含まれるリンの含有量は、混合液全量を１００質量％としたときに、０．００５～５質量％程度とすることが好ましく、０．０１～１質量％とすることがより好ましい。

【００３０】

アルカリ水に添加されるケイ素を含有するミネラル塩とリンを含有するミネラル塩との質量比は、１：０．５～１．５であることが好ましい。

【００３１】

電子供給手段として、例えば、陰極端子が挙げられる。電気分解で得られた陰極側のアルカリ水に、陰極端子を接触させることにより、電子を供給することができる。陰極電子から電子が放電されて、アルカリ水に多くの電子が供給される。

【００３２】

陰極端子には、直流電流が印加されることが好ましい。陰極端子に印加される直流電流の電圧は、例えば、１０～１０００Ｖであり、５０～３００Ｖであることが好ましく、１００～３００Ｖであることがさらに好ましい。混合液に電子が供給されることにより、製造されたアルカリイオン水は、セラミド合成遺伝子の発現作用を効果的に発揮できると考えられる。

【００３３】

混合槽には、電圧が１００～３００Ｖの直流電流を印加し、陰極電子から放出される電気量は１０００～３０００Ｗであることが好ましい。

【００３４】
混合槽には、１ｋｇ／ｃｍ^2～１２ｋｇ／ｃｍ^2（９８～１１７７ｋＰａ）の圧力をかけることが好ましく、２ｋｇ／ｃｍ^2～６ｋｇ／ｃｍ^2（１９６～５８８ｋＰａ）がより好ましい。圧力をかけることで、アルカリイオン水の安定性が向上する。
【００３５】
混合槽内は、窒素、二酸化炭素等の不活性雰囲気であることが好ましい。また、混合槽中に脱酸素剤を投入することも可能である。混合槽は、周囲の温度によって影響を受けないように、断熱手段によって周囲の温度から断熱するとともに、温度調整手段によって、混合槽の内部が－５℃～２５℃の範囲に調整することが好ましい。混合液の温度は０℃～１０℃とすることが好ましい。
【００３６】
混合槽は、外気雰囲気と隔離した隔離槽内に配置することが好ましく、隔離槽内には、窒素又は二酸化炭素を充填することが好ましい。これにより、アルカリイオン水の変質を防止することができるので、長期にわたり性能を維持することができる。
【００３７】
アルカリイオン水を、上記混合槽内で２４～３６時間安定化させることにより、最終生成物であるアルカリイオン水が得られる。得られたアルカリイオン水は、アルカリイオン水出口から直接に取り出すことができる。あるいは、アルカリイオン水にアルコールを混合して、混合アルカリイオン水出口から取り出すこともできる。アルコールとしては、水との相溶性の大きなアルコールを用いることが好ましく、例えば、メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール等が挙げられる。
【００３８】
以下、アルカリイオン水を製造する際に使用することができる製造装置について説明する。
アルカリイオン水を製造する装置を説明する模式図を図１に示す。アルカリイオン水製造装置１０１は、電解槽１と混合槽１１とを備えており、電解槽１と混合槽１１とはアルカリ水導出管９で連結されている。電解槽１には、導水管２が接続されており、この導水管２によって原料水（ケイ素及びリンを含有するミネラル塩と水とを含む水溶液）が供給される。電解槽１は、隔膜３によって区画された陽極室４及び陰極室５を有している。陽極室４には陽極６が設けられ、陰極室５には陰極７が設けられている。両電極に電解電流を通電して、陽極室４に接続された酸性水排出管８より酸性水を取り出し、陰極室５に接続されたアルカリ水導出管９よりアルカリ水を取り出す。アルカリ水は、アルカリ水導出管９を通る間に、冷媒を循環した冷却管を設けた冷却装置１０によって冷却して混合槽１１に導入する。
【００３９】
混合槽１１は、前記アルカリ水導出管９、原料液貯槽１２、及び出口管１６と接続されている。混合槽１１には、原料液貯槽１２から流入量調整装置１３を介して原料液を供給する。原料液の供給量は、通電した電気量等によって調整する。原料液としては、日本の海水から採取されたケイ素及びリンを含有するミネラル塩が用いられる。混合槽１１内には、攪拌装置１４を設け、アルカリイオン水と原料液とが均一に混合されるようにする。
【００４０】
混合槽１１の中には陰極端子１００を配置する。陰極端子１００には、２００Ｖの直流電流が印加されている。陰極端子１００から放出される電気量は１０００Ｗ～３０００Ｗであることが好ましい。
【００４１】
混合槽１１は、周囲の温度によって影響を受けないように、断熱手段１５によって断熱され、温度調整手段（図示せず）によって内部の温度を１５℃～２５℃程度に調整する。混合槽１１の温度は、０℃～１０℃程度にすることが好ましい。
【００４２】
混合槽１１から導出するアルカリイオン水のｐＨは、出口管１６に設けられたｐＨ測定

手段１７によって測定する。混合槽１１から取り出すアルカリイオン水のｐＨは、１０～１２．５程度であることが好ましい。

【００４３】

混合槽１１に接続された出口管１６は、アルカリイオン水出口管１８、及び混合アルカリイオン水出口管２１に分枝している。アルカリイオン水出口管１８からは混合槽１１内のアルカリイオン水が直接取り出される。アルカリイオン水は、アルコールと混合されて混合アルカリイオン水とすることも可能である。この場合、アルコール貯槽１９からアルコールが注入されるアルコール混合槽２０においてアルカリイオン水とアルコールとを混合し、混合アルカリイオン水出口管２１から混合アルカリイオン水として取り出してもよい。アルカリイオン水と混合するアルコールは、水との相溶性の大きなアルコール、例えば、メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール等を用いることができる。

【００４４】

上述したアルカリイオン水製造装置１０１は、隔離室２２に収容されることにより外気と隔離される。隔離室２２は、窒素で置換されているか、又は二酸化炭素、酸素除去剤等を充填した通気装置によって外気雰囲気と結合されている。隔離室２２内にアルカリイオン水製造装置１０１を設けることによって、アルカリイオン水の変質を防止することができ、長期にわたり性能を維持することができる。

【００４５】

ケイ素及びリンを含有するミネラル塩を含む水溶液を電気分解して得られたアルカリイオン水は、市販品を使用することができる。市販品として、商品名Ｓ－１００及びＳ－１００Ｇ（いずれも株式会社エー・アイ・システムプロダクト製）が挙げられる。

【００４６】

上述した製造方法により得られたアルカリイオン水は、優れたセラミド合成遺伝子発現促進作用を有し、セラミド合成遺伝子発現促進剤として利用することができる。

【００４７】

ケイ素及びリンを含有するミネラル塩を含む水溶液を電気分解して得られたアルカリイオン水は、セラミド合成、特にアシルセラミド合成に関する遺伝子発現促進作用を発揮する。具体的には、表皮に多く存在するＣ２８以上の脂肪酸の合成に必須であるＥＬＯＶＬ（極長鎖脂肪酸伸長酵素）４遺伝子の発現を促進する作用（ＥＬＯＶＬ４遺伝子発現促進作用）、Ｃ１６、Ｃ１８、及びＣ２０脂肪酸を合成するステップで中心的な役割を担うＥＬＯＶＬ７遺伝子の発現を促進する作用（ＥＬＯＶＬ７遺伝子発現促進作用）、及び長鎖塩基にアシルＣｏＡを結合させてセラミドを合成する酵素であるセラミド合成酵素のうち、超長鎖アシルＣｏＡに活性を示すＣｅｒＳ３遺伝子の発現を促進する作用（ＣｅｒＳ３遺伝子発現促進作用）を発揮する。また、表皮角化細胞においてセラミドの合成に関与する酵素であるセリンパルミトイルトランスフェラーゼ（ＳＰＴ）のサブユニットであるＳＰＴＬＣ２遺伝子の発現を促進する作用（ＳＰＴＬＣ２遺伝子発現促進作用）を発揮する。よって、ケイ素及びリンを含有するアルカリイオン水は、ＥＬＯＶＬ４遺伝子発現促進剤、ＥＬＯＶＬ７遺伝子発現促進剤、ＣｅｒＳ３遺伝子発現促進剤、及びＳＰＴＬＣ２遺伝子発現促進剤として利用することができる。

【００４８】

本発明のセラミド合成促進剤は、単独でも使用することができるが、添加剤を含むことができる。添加剤として、例えば、塩化ナトリウム、各種ビタミン剤、ブドウ糖等が挙げられる。本発明のセラミド合成促進剤は、医薬品、医薬部外品、飲食品、化粧料等の種々の組成物に配合することにより、セラミドの合成促進作用を有する組成物を得ることができる。

【００４９】

本発明のセラミド合成促進剤を含有する飲食品の形態は、特に限定されない。具体的な飲食品の形態として、例えば、一般食品、一般飲料、サプリメント、健康食品、機能性表示食品、特定健康食品等の保険機能食品及び特定用途食品、清涼飲料水、茶飲料、ドリンク剤、ワイン等のアルコール飲料、菓子、米飯類、パン類、麺類、総菜類、調味料等が挙

げられる。
【００５０】
本発明のセラミド合成促進剤を含有する医薬品又は医薬部外品の形態は、特に限定されない。具体的な形態として、例えば、内用剤、外用剤等が挙げられ、皮膚外用剤として用いることが好ましい。
【００５１】
本発明のセラミド合成促進剤を含有する化粧料又は医薬部外品の形態は、特に限定されない。具体的な剤形として、例えば、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤、液剤等が挙げられる。
【００５２】
本発明のセラミド合成促進剤の投与量は、患者の年齢、性別、体重、用法、用量等を考慮して決定することができる。用法としては、塗布、経口投与、血管注射（点滴）等が挙げられる。
【００５３】
例えば、塗布の場合、ケイ素化合物及びリン化合物を０．００１～１．５質量％含むアルカリイオン水を皮膚に塗布することができる。本発明のセラミド合成遺伝子発現促進剤を経口投与する場合の投与量は、ケイ素化合物及びリン化合物を０．００１～１．５質量％含むアルカリイオン水を１００～２００ｍＬ／日程度が好ましい。本発明のセラミド合成遺伝子発現促進剤を血管注射する場合の投与量は、ケイ素化合物及びリン化合物を０．００１～１．５質量％含むアルカリイオン水を１００～５００ｍＬ／日程度が好ましい。
【００５４】
本発明のセラミド合成促進剤を含む医薬品等の組成物は、セラミド合成遺伝子の発現を促進することにより、セラミド合成を促進する効果が高いことから、皮膚炎の予防又は治療、皮膚損傷部位の改善等に有効である。本発明のセラミド合成促進剤を含有する医薬品又は医薬部外品は、例えば、アトピー性皮膚炎、ニキビ、火傷、創傷、壊疽（えそ：gangrene）、褥瘡（じょくそう：bedsore）、疥癬（かいせん）、膿皮症、帯状疱疹、頭皮湿疹、表皮膿腫、単純ヘルペス、水痘、皮膚悪性腫瘍、水虫等の予防又は治療剤として用いることができる。本発明のセラミド合成促進剤を含有する化粧料は、皮膚保湿剤、皮膚乾燥防止剤、肌荒れ防止剤、日焼け修復剤、美白剤等として用いることができる。
【００５５】
なお、本発明には、ケイ素及びリンを含有するミネラル塩を含む水溶液を電気分解して得られたアルカリイオン水の、セラミド合成促進のための使用が含まれる。
また、本発明には、セラミド合成を促進する方法であって、ケイ素及びリンを含有するミネラル塩を含む水溶液を電気分解して得られたアルカリイオン水を使用する方法が含まれる。
また、本発明には、セラミド合成促進剤の製造方法であって、ケイ素及びリンを含有するミネラル塩を含む水溶液を電気分解する工程を備える、セラミド合成促進剤の製造方法が含まれる。
【実施例】
【００５６】
以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。
【００５７】
（実施例１）
上述したアルカリイオン水製造装置１０１を用いて、以下のようにアルカリイオン水を製造した。
原料水として、イオン交換水を準備した。イオン交換水は、イオン交換樹脂（サムソン社製）を用いて、水道水から不純物を除去することにより製造した。イオン交換水に日本の海水から採取されたケイ素及びリンを含有するミネラル塩を１質量％添加した水溶液を、導水管２を通じて電解槽１に導入し、陽極６及び陰極７に電気を流した。電気分解の条

件は、電圧２００Ｖ、電気エネルギー２５００Ｗとした。イオン交換水が電気分解され、陽極室４では酸性水が生成し、陰極室５ではアルカリ水が生成した。陽極室４で生成された酸性水は、酸性水排出管８から排出された。陰極室５で生成されたアルカリ水はアルカリ水導出管９に導出され、アルカリ水導出管９を通るアルカリ水は冷却装置１０により冷却されて、混合槽１１に導入された。

【００５８】

混合槽１１において、冷却されたアルカリ水と、原料液貯槽１２から供給された日本の海水から採取されたケイ素及びリンを含有するミネラル塩とが、攪拌装置１４によって混合された。原料液貯槽１２内の日本の海水から採取されたケイ素及びリンを含有するミネラル塩は、混合槽１１内の混合液中の日本の海水から採取されたケイ素及びリンを含有するミネラル塩の含有量が、０．３質量％となるように流入量調整装置１３で調整して供給した。混合液を、圧力２９４ｋＰａ、温度４±３℃で２４時間保存した。保存中、混合液には、陰極端子１００から電子が放出された。

その後、アルカリイオン水は、出口管１６から導出され、ｐＨ測定手段１７によりアルカリイオン水のｐＨを測定した後、アルカリイオン水出口管１８から取り出された。

【００５９】

アルカリイオン水出口管から取り出された実施例１のアルカリイオン水を、ＩＣＰ発光分光法（製造会社：日立ハイテクサイエンス株式会社、製品名：ＳＰＥＣＴＲＯ　ＡＲＣＯＳＩＩ）を用いて、元素分析した。

その結果、ケイ素が１００ｍａｓｓ　ｐｐｍ、及びリンが７６０ｍａｓｓ　ｐｐｍ含まれていることがわかった。なお、さらに、詳細には、ナトリウムが７５００ｍａｓｓ　ｐｐｍ、カリウムが２７００ｍａｓｓ　ｐｐｍ、カルシウムが０．２ｍａｓｓ　ｐｐｍ、マグネシウムが０．１ｍａｓｓ　ｐｐｍ以下含まれていることがわかった。

【００６０】

また、上記ＩＣＰ発光分光法では、塩素等のガスを検出できないことから、別途、電解水出口管から取り出された実施例１のアルカリイオン水（試料１）を、一般財団法人日本食品分析センターにて、下記の燃焼－電量滴定法を用いて測定した。

燃焼－電量滴定法としては、日東精工アナリテック株式会社製、塩素・硫黄分析装置ＴＳＸ－１０型を用いて、上記試料１約１０ｍｇを燃焼させ、電量適定により塩化物イオンの濃度を算出した。この測定により有機塩素、無機塩素を問わず試料中の塩素量が求められる。有機塩素量は、トータル塩素量から無機塩素量を差し引いた値を用いた。無機塩素量は、試料５ｇを熱水抽出し、抽出液中の塩素イオンをイオンクロマトグラフ法により測定して求めた。

その結果、実施例１のアルカリイオン水中に、塩素が４１０ｍｇ／ｋｇ含まれていることがわかった。

【００６１】

＜ｐＨの測定＞

実施例１で得られたアルカリイオン水のｐＨを、ｐＨメーター（株式会社堀場製作所製、HORIBA F-74SPを用いて測定したところ、ｐＨの値は１２であった。

【００６２】

＜表面張力の測定＞

実施例１で得られたアルカリイオン水の表面張力を、Ｗｉｌｈｅｌｍｙ法を用いて測定した。

その結果、実施例１で得られたアルカリイオン水の表面張力は、約６５．４１ｍＮ／ｍ（２０℃）であった。同様の方法で、精製水の表面張力を測定したところ、約７２．９６ｍＮ／ｍ（２０℃）であったことから、本発明で用いるケイ素及びリンを含有するミネラル塩を含有するアルカリイオン水の表面張力は、精製水の表面張力に比べて、約７．５５ｍＮ／ｍ低かった。

【００６３】

（実施例２）

ケイ素及びリンを含有するミネラル塩の原料を日本の海水から沖縄県の海水に代えた以外は、実施例１と同様の方法で、アルカリイオン水を製造した。

得られたアルカリイオン水について、実施例１と同様に、ＩＣＰ発光分光法を用いで元素分析を行った結果、ケイ素が３７０ｍａｓｓ　ｐｐｍ、及びリンが４５０ｍａｓｓ　ｐｐｍ含まれていることが分かった。なお、さらに、詳細には、ナトリウムが６９００ｍａｓｓ　ｐｐｍ、カリウムが１ｍａｓｓ　ｐｐｍ以下、カルシウムが０．９ｍａｓｓ　ｐｐｍ、マグネシウムが０．３ｍａｓｓ　ｐｐｍ以下含まれていることがわかった。

さらに、実施例２で得られたアルカリイオン水に含まれる塩素を、実施例１と同様に、一般財団法人日本食品分析センターにて、燃焼－電量滴定法を用いて測定した結果、実施例２のアルカリイオン水中に塩素が４１０ｍｇ／ｋｇ含まれることがわかった。

【００６４】

（試験例１）

実施例１で製造したアルカリイオン水について、セラミド合成に関連する酵素の遺伝子の発現への影響を調べた。なお、実際の肌の上では、アルカリイオン水が角化細胞に到達するまでに肌の皮脂又は汗により中和され、又は角層にて捕集されるため、試験例１では実施例１のアルカリイオン水を２０倍に希釈し、この濃度を基準（１００％）としたアルカリイオン水で評価を行った。試験例２及び３においても同様である。

【００６５】

セラミド合成に関連する酵素のうち、超長鎖脂肪酸伸長酵素４（ＥＬＯＶＬ４）、超長鎖脂肪酸伸長酵素７（ＥＬＯＶＬ７）、セラミド合成酵素３（ＣｅｒＳ３）、及びセラミド合成酵素（ＳＰＴＬＣ２）の発現変動を評価した。対象となる遺伝子のプライマー設計はヒトのRT-PCRで報告のある配列（Shirakura et al. : Lipid in Health and Disease, 11,108 (2012).）を参考に、プライマーを設計した。

【００６６】

プライマーは、ヒトのＥＬＯＶＬ４、ＥＬＯＶＬ７、ＣｅｒＳ３、及びＳＰＴＬＣ２について、それぞれフォワードプライマーとリバースプライマーを合成した。プライマーは、株式会社ファスマックにＰＣＲプライマーの合成を委託した。図２には、ヒトのＥＬＯＶＬ４の遺伝子配列（配列番号１）を示した。図３には、ヒトのＥＬＯＶＬ７の遺伝子配列（配列番号２）を示した。図４には、ヒトのＣｅｒＳ３の遺伝子配列（配列番号３）を示した。図５Ａ及び図５Ｂには、ヒトのＳＰＴＬＣ２の遺伝子配列（配列番号４）を示した。表１に、ＥＬＯＶＬ４のプライマーのフォワードプライマーの配列（配列番号５）及びリバースプライマーの配列（配列番号６）、ＥＬＯＶＬ７のプライマーのフォワードプライマーの配列（配列番号７）及びリバースプライマーの配列（配列番号８）、及びＣｅｒＳ３のプライマーのフォワードプライマーの配列（配列番号９）及びリバースプライマーの配列（配列番号１０）、ＳＰＴＬＣ２のプライマーのフォワードプライマーの配列（配列番号１１）及びリバースプライマーの配列（配列番号１２）、β－アクチン（内在性コントロール）のプライマーのフォワードプライマーの配列（配列番号１３）及びリバースプライマーの配列（配列番号１４）を示した。ＰＣＲ反応では、フォワードプライマー及びリバースプライマーの相補鎖にプライマーが結合し、両者間でＰＣＲ反応によりＤＮＡ断片が増幅される。図２～図５Ａ及び図５Ｂにおいて、各配列中の太字黒枠部分は、プライマーが結合する配列（フォワードプライマーとリバースプライマーの相補鎖）であり、下線部は、ＰＣＲ反応で増幅する配列を示す。

【００６７】

【表１】

表１	プライマー塩基配列	
増幅遺伝子	フォワードプライマー	リバースプライマー
ＥＬＯＶＬ４	5’-CATGTGTATCATCACTGTACG-3’	5’-AAAGGAATTCAACTGGGCTC-3’
ＥＬＯＶＬ７	5’-TTCCATCATACCATCATGCC-3’	5’-CCCAATGCAGAAAGTCCATA-3’
ＣｅｒＳ３	5’-ACATTCCACAAGGCAACCATTG-3’	5’-CTCTTGATTCCGCCGACTCC-3’
ＳＰＴＬＣ２	5’-CCAGACTGTCAGGAGCAACCATTA-3’	5’-TCGTGTCCGAGGCTGACCATA-3’
β－アクチン	5’-AGTCCTGTGGCATCCACGAAAC-3’	5’-GCAGTGATCTCCTTCTGCATCC-3’

【００６８】

＜試薬＞

・ホルマザン（MTT）：同仁化学社製

・細胞培養用マイクロテストプレート：96well平底低蒸発タイプ、FALCON社製

・ウシ胎児血清（Fetal Bovine Serum：FBS）：Biosera社製

・ダルベッコ改変イーグル培地（Dulbecco’s Modified Eagle Medium：DMEM）：WAKO社製

・TriPure Isolation Reagent（TriPure Reagent）：タカラバイオ社製

・Random Primer：タカラバイオ社製

・Reverse Transcriptase：RevatraAce, TOYOBO社製

・THUNDERBIRD（登録商標）SYBR qPCR Mix ：TOYOBO社製

＜装置＞

・Microplate Reader：WALLAC社製のARVO MX1420 MULTIABEL COUNTERを使用した。

・Real Time PCR：Thermo Fisher Scientific社製のStep One Real Time PCR （48well）を使用した。

【００６９】

＜ＤＮＡの調製＞

正常ヒト表皮角化細胞（Normal Human Epidermal Keratinocytes：ＮＨＥＫ）は６ウェルプレートに１ウェル当たり１×１０^{5}細胞の密度で撒き、２４時間培養した。その後、各ウェルに１０％、２０％、又は１００％（ｖ／ｖ％）のアルカリイオン水及び１０％ＦＢＳを含むＤＭＥＭを加え、７２時間培養を行った。対照として、アルカリイオン水を含まないＤＭＥＭ（１０％ＦＢＳを含む）を使用した。７２時間培養した後、タカラバイオ社のＴｒｉＰｕｒ　Ｒｅａｇｅｎｔを用い、添付文書に従ってｔｏｔａｌ　ＲＮＡを抽出した。調製したｃＤＮＡを用いてＲｅａｌ　Ｔｉｍｅ－ＰＣＲ法にてＥＬＯＶＬ４、ＥＬＯＶＬ７、ＣｅｒＳ３、及びＳＰＴＬＣ２のｍＲＮＡを定量した。内在性コントロールとしてβ－アクチンを使用した。データー解析にはＣｏｍｐａｒａｔｉｖｅΔΔＣｔ法を用いた。

【００７０】

＜測定条件＞

Real Time-PCRはStep One (Thermo Fisher Scientific)により実施した。また、Real time-PCRはTOYOBO社THUNDERBIRD (登録商標)SYBR qPCR Mixを用いて行った。

【００７１】

アルカリイオン水によるＥＬＯＶＬ４のｍＲＮＡ発現の結果を図６に示し、ＥＬＯＶＬ７のｍＲＮＡ発現の結果を図７に示し、ＣｅｒＳ３のｍＲＮＡ発現の結果を図８に示し、及びＳＰＴＬＣ２のｍＲＮＡ発現の結果を図９に示す。なお、ｍＲＮＡ発現量は、β－アクチンの発現量を１とした場合の相対値で示した。

【００７２】

図６より、アルカリイオン水は、ＥＬＯＶＬ４のｍＲＮＡ発現を促進したことがわかる。図７より、ＥＬＯＶＬ７のｍＲＮＡの発現も観測された。図８より、アルカリイオン水

は、ＣｅｒＳ３のｍＲＮＡの発現を促進したことがわかる。図９より、アルカリイオン水は、ＳＰＴＬＣ２のｍＲＮＡの発現を促進したことがわかる。

【００７３】

（試験例２）

ＥＬＯＶＬ４及びＣｅｒＳ３のタンパク質の発現変動を、特異抗体を用いたウエスタンブロット法により評価した。

詳細には、正常ヒト表皮角化細胞（Normal Human Epidermal Keratinocytes：ＮＨＥＫ）は６ウェルプレートに１ウェル当たり１×１０^{5}細胞の密度で撒き、２４時間培養した。その後、各ウェルに１０％、２０％、又は１００％（ｖ／ｖ％）のアルカリイオン水及び１０％ＦＢＳを含むＤＭＥＭを加え、７２時間培養を行った。対照として、アルカリイオン水を含まないＤＭＥＭ（１０％ＦＢＳを含む）を使用した。７２時間培養した後、リン酸緩衝液で洗浄した。その後、細胞溶解液（50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM EDTA, pH 7.4）で細胞を回収し、遠心分離（10,000 rpm, 10分間, ４℃）を行い、上清をタンパク質抽出液とした。タンパク質抽出液は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動）にてタンパク質を分離した後、ニトロセルロース膜にタンパク質を転写し、２％スキムミルクを含むリン酸緩衝液にてブロッキングした。ＣｅｒＳ３の検出にはウサギ抗ＣｅｒＳ３抗体（Cusabio社、2,000倍希釈）を用い、ＥＬＯＶＬ４の検出にはウサギ抗ＥＬＯＶＬ４抗体（Cusabio社、1,000倍希釈）を用い、β-アクチンの検出にはマウス抗β-アクチン抗体（和光純薬、3,000倍希釈）を用い、ニトロセルロース膜と反応させた。ニトロセルロース膜はリン酸緩衝液で十分に洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギＩｇＧ抗体（KPL社、5,000倍希釈）、又はペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスＩｇＧ抗体（ジャクソン社、3,000倍希釈）にて標的タンパク質をペルオキシダーゼで標識した。検出は発光試薬（イムノスターLD、WAKO純薬）を用い、ルミノグラフ（アトー）にて撮影した。

結果を図１０に示す。

【００７４】

図１０より、アルカリイオン水は、濃度依存的にＣｅｒＳ３タンパク質の発現を促進したことがわかる。

【００７５】

（試験例３）

アルカリイオン水が、実際にセラミド（Ｃｅｒ）及びグルコシルセラミド（ＧｌｃＣｅｒ）の合成を促進できるかどうかを、薄層クロマトグラフィ（ＴＬＣ）により評価した。

詳細には、正常ヒト表皮角化細胞（Normal Human Epidermal Keratinocytes：ＮＨＥＫ）は６ウェルプレートに１ウェル当たり１×１０^{5}細胞の密度で撒き、２４時間培養した。その後、各ウェルに１０％、２０％、又は１００％（ｖ／ｖ％）のアルカリイオン水及び１０％ＦＢＳを含むＤＭＥＭを加え、７２時間培養を行った。対照として、アルカリイオン水を含まないＤＭＥＭ（１０％ＦＢＳを含む）を使用した。４８時間培養した細胞をリン酸緩衝液で洗浄した後、細胞中の脂質をクロロホルム：メタノール（１：２，ｖ／ｖ）抽出液で１時間振とうし、上清を回収した。その後、残った残渣にクロロホルム：メタノール：水（１：２：０．５，ｖ／ｖ）抽出液を加え、上清を回収した。抽出した試料に２．５％（ｗ／ｖ）の塩化カリウム水溶液を加え、遠心分離（５分間、９００ｘｇ、室温）した後、下層を新しいチューブに回収した。上層に残った脂質はクロロホルムを加えて攪拌した後、遠心分離（５分間、９００ｘｇ、室温）した下層を採取することで回収した。脂質画分は遠心エバポレーターにて乾固し、クロロホルム：メタノール（２：１，ｖ／ｖ）で溶解した後、分析まで－２０℃にて保存した。

薄層クロマトグラフィは以下の順番で展開した。（１）クロロホルム：メタノール：水（４０：１０：１，ｖ／ｖ）で試料を添加したところから２ｃｍのところまで展開した後、薄層板を乾燥させた。（２）クロロホルム：メタノール：水（４０：１０：１，ｖ／ｖ）で試料を添加したところから５ｃｍのところまで展開した後、薄層板を乾燥させた。（３）クロロホルム：メタノール：酢酸（４７：２：０．５，ｖ／ｖ）で薄層板の先端から

１．５ｃｍのところまで展開した後、薄層板を乾燥させた。（４）ヘキサン：ジエチルエーテル：酢酸（６５：３５：１，ｖ／ｖ）で薄層板の先端から０．５ｃｍのところまで展開した後、薄層板を乾燥させた。展開した薄層板上の脂質は、３％（ｗ／ｖ）硫酸銅を溶解した８％（ｖ／ｖ）リン酸水溶液で十分にスプレーした後、１８０℃のホットプレートで加熱することにより検出した。

結果を図１１に示す。なお、図１１中のＶＬＣは、very long chain（一般に、２０炭素より長い炭素鎖）を示し、ＵＬＣは、ultra long chain（一般に、２６炭素以上の炭素鎖）を示す。

【００７６】

次に、図１１におけるＧｌｃＣｅｒ領域及びＣｅｒ領域の主要なスポットのＲｆ値を表２に示す。

【００７７】

【表２】

表２	アルカリイオン水（%）	0	10	20	100
Ｒｆ値	GlcCer領域	0.2	0.2	0.2	0.21
	Cer領域	0.52	0.52	0.53	0.63

【００７８】

各領域の発色強度は、撮影装置ＬｕｍｉＣｕｂｅ（ルミキューブ）（株式会社リポニクス製）で画像を取得したのち、画像処理ソフトウェアＩｍａｇｅＪ（ＮＩＨ）を用いて測定した。

アルカリイオン水０％のとき（アルカリイオン水を加えない培地（ＤＭＥＭ）で培養したとき）のＧｌｃＣｅｒ領域の発色強度を１とした場合のＧｌｃＣｅｒ領域の発色強度増加率を表３及び図１２に、アルカリイオン水０％のときのＣｅｒ領域の発色強度を１とした場合のＣｅｒ領域の発色強度増加率を表３及び図１３に示す。

【００７９】

【表３】

表3	GlcCer		Cer	
アルカリイオン水（%）	発色強度	増加率	発色強度	増加率
0	10.6	1.0	206.6	1.0
10	188.8	17.8	392.4	1.9
20	232.1	21.8	444.2	2.1
100	238.9	22.5	979.3	4.7

【００８０】

図１１から、アルカリイオン水の濃度が高いほうが、ＧｌｃＣｅｒ領域、及びＣｅｒ領域（特にＣｅｒ（ＵＬＣ）領域）のスポットの大きさが大きく、色も濃くなることが確認できた。さらに、表３には、アルカリイオン水の濃度が高いほうが、ＧｌｃＣｅｒ領域及びＣｅｒ領域の発色強度増加率が高いことが示されている。これらの結果は、アルカリイオン水の濃度が高いほうが合成されたセラミドの量が多いことを示しており、アルカリイオン水が濃度依存的にＧｌｃＣｅｒ及びＣｅｒの合成を促進させ、ＧｌｃＣｅｒ及びＣｅｒの細胞内含量を増加させたことがわかる。

【００８１】

また、図１１及び表２から、アルカリイオン水の濃度が高いほうが、ＧｌｃＣｅｒ領域、及びＣｅｒ領域（特にＣｅｒ（ＵＬＣ）領域）のスポットのＲｆ値が大きくなる（展開

距離が長くなる）ことが確認できた。表３には、アルカリイオン水の濃度が高いほうが、ＧｌｃＣｅｒ領域及びＣｅｒ領域の発色強度増加率が高いことが示されている。これらの結果は、アルカリイオン水の濃度が高いほうが、炭素鎖長が長い脂肪酸の合成を促進させ、脂肪酸の長さが長くなると脂溶性が高く（疎水性が大きく）なるために、展開距離が延びて、スポットがより上に検出されることを示している。

以上より、アルカリイオン水は、角化細胞で超長鎖脂肪酸から構成されるセラミド（アシルセラミド）の合成を促進することが示唆された。

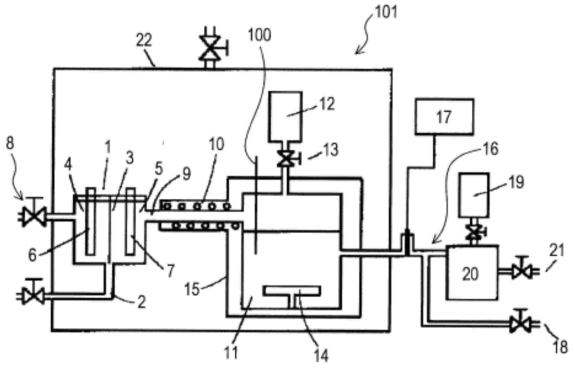
【符号の説明】

【００８２】

１　電解槽
２　導水管
３　隔膜
４　陽極室
５　陰極室
６　陽極
７　陰極
８　酸性水排出管
９　アルカリ水導出管
１０　冷却装置
１１　混合槽
１２　原料液貯槽
１３　流入量調整装置
１４　攪拌装置
１５　断熱手段
１６　出口管
１７　ｐＨ測定手段
１８　アルカリイオン水出口管
１９　アルコール貯槽
２０　アルコール混合槽
２１　混合アルカリイオン水出口管
２２　隔離室
１００　陰極電子
１０１　アルカリイオン水製造装置

【図面】

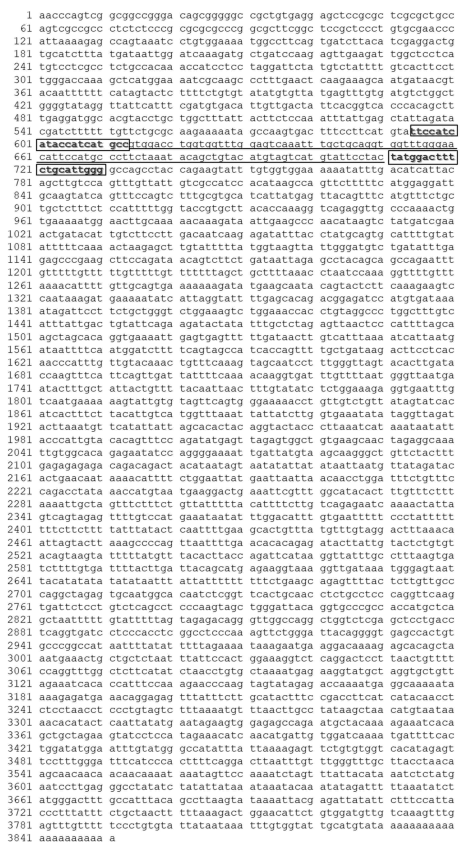
【図１】



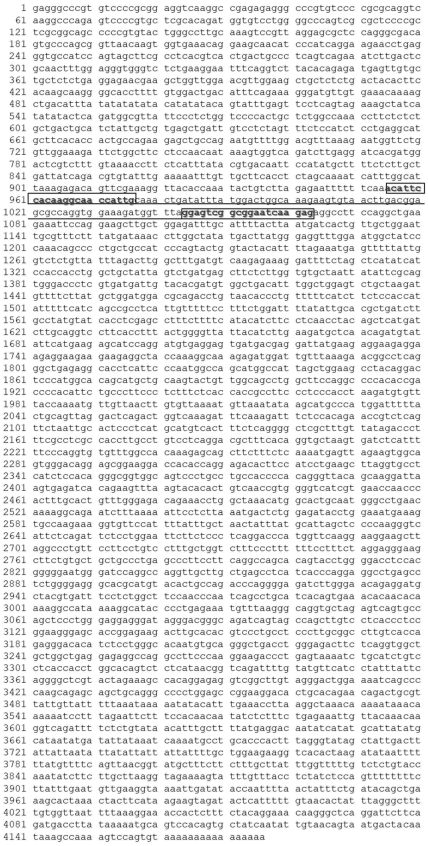
【図２】

```
   1 gcagactggt gcagcgcact gtgctggcgg ctgggcctcc tccacctcct cgtctttctc
  61 ccgggaacct tgacgacgcc ttccgcttgg ccctgccttc tgccgcatcc ccgccgccgc
 121 ggcgccttga ggagcaggag aagacgcagc cgggccgccg ccgttagagg ggttcccggc
 181 cgccgctcgc cccgtcggcc gccaccgcct ccggggtcag ccctctctct gggtctccgc
 241 tttctcctgc cgccagcgcc cgctcatcgc cgcgatgggg ctcctggact cggagccggg
 301 tagtgtccta aacgtagtgt ccacggcact caacgacacg gtagagttct accgctggac
 361 ctggtccatc gcagataagc gtgtggaaaa ttggcctctg atgcagtctc cttggcctac
 421 actaagtata agcactcttt atctcctgtt tgtgtggctg ggtccaaaat ggatgaagga
 481 ccgagaacct tttcagatgc gtctagtgct cattatctat aattttggga tggttttgct
 541 taacctcttt atcttcagag agttattcat gggatcatat aatgcgggat atagctatat
 601 ttgccagagt gtggattatt ctaataatgt tcatgaagtc aggatagctg ctgctctgtg
 661 gtggtacttt gtatctaaag gagttgagta tttggacaca gtgtttttta ttctgagaaa
 721 gaaaaacaac caagtttctt tccttcatgt gtatcatcac tgtacgatgt ttaccttgtg
 781 gtggattgga attaagtggg ttgcaggagg acaagcattt tttggagccc agttgaattc
 841 ctttatccat gtgattatgt actcatacta tgggttaact gcatttggcc catggattca
 901 gaaatatctt tggtggaaac gatacctgac tatgttgcaa ctgattcaat tccatgtgac
 961 cattgggcac acggcactgt ctctttacac tgactgcccc ttccccaaat ggatgcactg
1021 ggctctaatt gcctatgcaa tcagcttcat atttctcttt cttaacttct acattcggac
1081 atacaaagag cctaagaaac caaaagctgg aaaaacagcc atgaatggta tttcagcaaa
1141 tggtgtgagc aaatcagaaa aacaactcat gatagaaaat ggaaaaaagc agaaaaatgg
1201 aaaagcaaaa ggagattaaa ttgaactggg ccttaactgt tgttgacagt gaggaaaaac
1261 tcccatatca tataaaattt cagggaaaac agaagcaaag gagagcttgg gggtggggag
1321 aaaagacaaa tgtgctctat gtcctagtaa ctcttagact gagtaaagtg ttaataccat
1381 acccagatgt tttatttatg aagtttttat tttaaacatt ttttttaaaa attagccttg
1441 atattctcca gaccaaagca atcattaagt gactttgggg attctccccc tgttcacatc
1501 cagttgtcta aaggatgaga ttttttcatgt atcttatagt cactcattct tcggtctgaa
1561 ttttagacga tcacagaaac ggtctttatg aattattttg ataaattact aattatctta
1621 tctactgact gaaatcagtg gtgttacatt ttcttgtcca aagctgaaaa tgtgtataca
1681 cttaaacttg cacatttgaa ttcatttgct gaccggaatg gtcaaatctc tccacctcta
1741 gtcagagtat aattttggtt gtaattaaat ttttaaaatc tgctgatctc tgtagaatct
1801 tagaggcttg atgatgatgg tgttggtgaa aataagaaag aattgcagta aagtcttgtc
1861 tggtgaccca gagatcacca tgacttgagg cacaaatcac tgtggggaaa caatttttg
1921 tgatgaaaag gcagcatttg aatactcctg ttagtagcag aaatatatta tgaaaattaa
1981 gattattgtc tgattgaaac atgaaacaac tcatgtcttt attagtaaca tcataagata
2041 gttacattta tgtgctgtta gaatatgttg atttttatca ggctttcctt gttttgattt
2101 atggctgttc ctgatttttc atatgtggaa atatacctac ctcttccgtt ggaaagaaca
2161 tttaaaatta aataaatttt aattaaaaaa tcaaggagtc ttctaatgta aattttaatg
2221 ttaactttca aatccactag tatttttttt gcttttatga caaatagcat acaccaaaca
2281 tttctgtgaa actatccttc tctttcaatg tgtttaattt tggagtaacg ttttccttgt
2341 gactaagttg caagatctta tttattaact aggtatgaag tataaaccca ttttggtgca
2401 atattcttga ctccttggtg ctaaagattg ttaaattcaa tgcttgatgt tacaaggtgt
2461 tgttaaaaca caaaatgaat aaaagtgaga gtagtcagaa ctataacatt caatttgcta
2521 tttacaaatg aagtatttca tgtaatataa gtgaacaact ggaaataaag taggaaagaa
2581 tttgtatcat gttttactac ataggttaat tttttaaggg atgttgcaaa gggattacta
2641 gagaaagaca aaatgtgacc aaaaaaaagc atgaatattt cttaagtatc tcaacaacat
2701 gtcaaagctg catgtgtagg atgtatgctg tttgtacaaa ctatttcaga atattttgta
2761 agctataaca tatttattgt gcattaaaat taaatacttt ttccccaaag gcatgcagtc
2821 atgagaatta cagaaaattt gcaacatata aagtagtttg atctaagagg attcaacacc
2881 tttgttttgt tgctcagtgt gtaatgactg agatttgtaa atctttgtga acattctgta
2941 ctggttccca agagctattc attccctgct acctgatttc agcacaataa atatacttct
3001 gctgtgggaa aaa
```

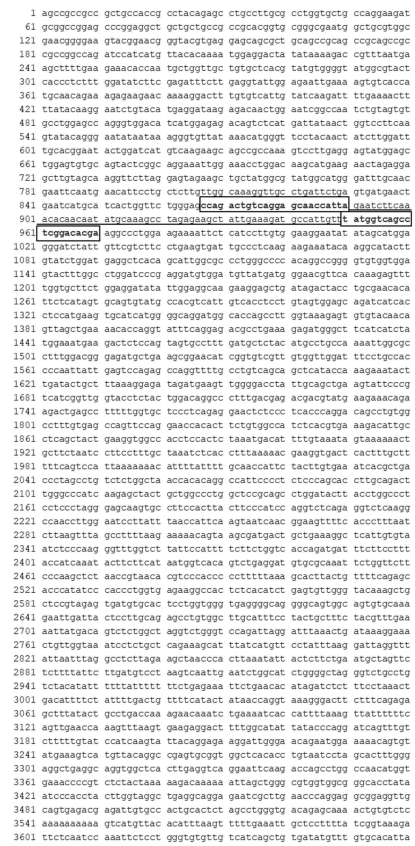
【図３】



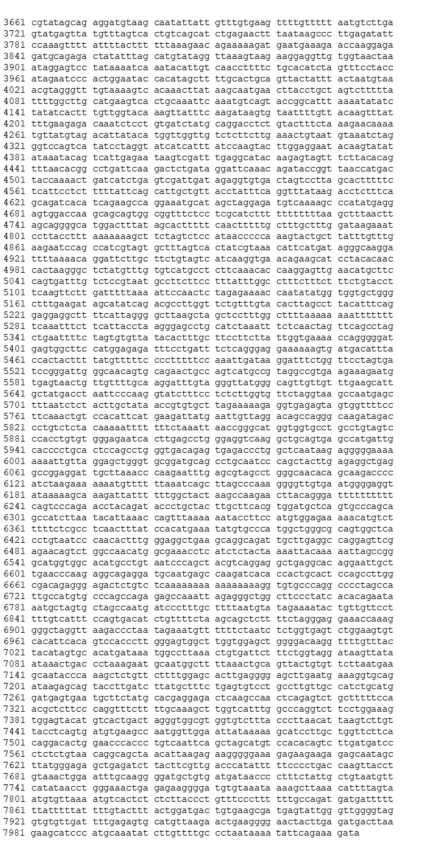
【図４】



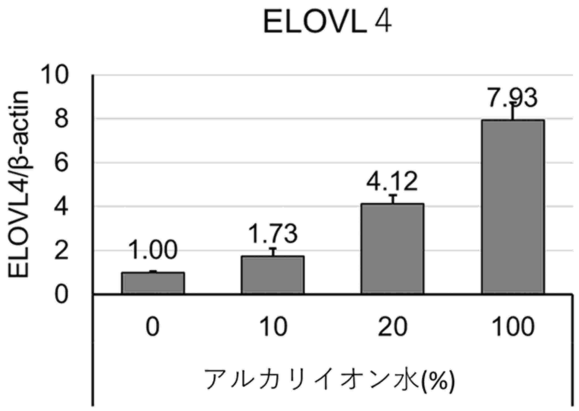
【図５Ａ】



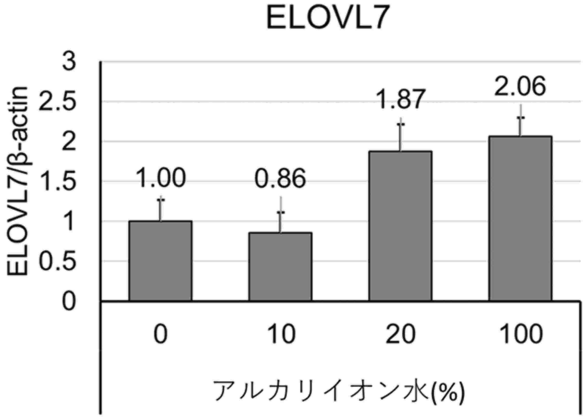
【図５Ｂ】



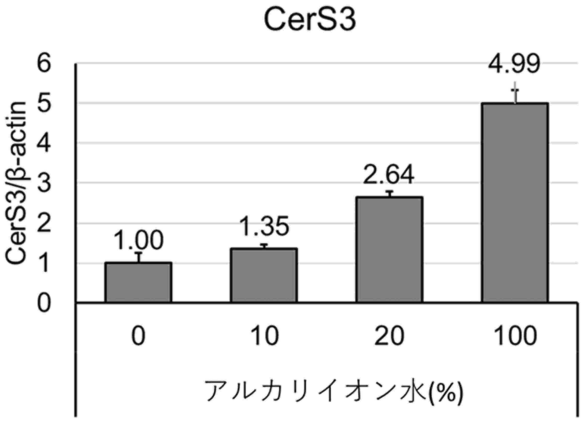
【図６】


ELOVL 4
ELOVL4/β-actin
10
8
6
4
2
0
1.00
1.73
4.12
7.93
0
10
20
100
アルカリイオン水(%)

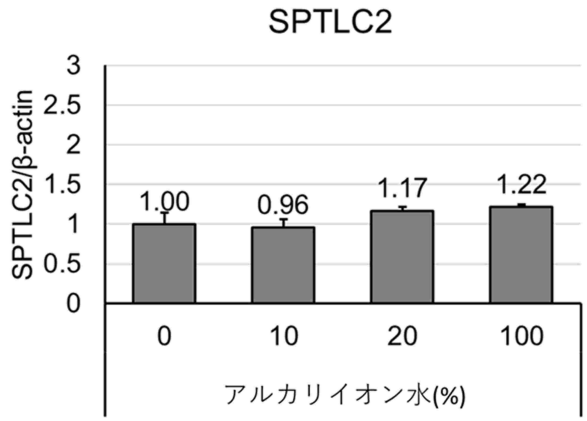
【図７】


ELOVL7
ELOVL7/β-actin
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
1.00
0.86
1.87
2.06
0
10
20
100
アルカリイオン水(%)

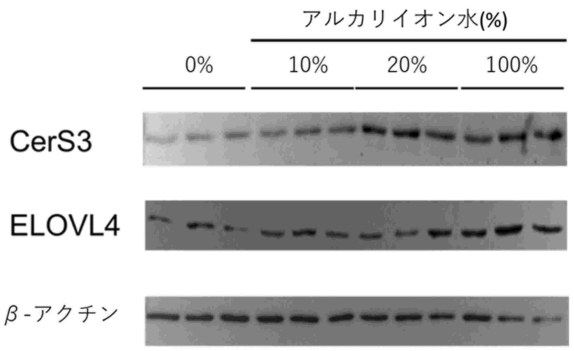
【図８】


CerS3
CerS3/β-actin
6
5
4
3
2
1
0
1.00
1.35
2.64
4.99
0
10
20
100
アルカリイオン水(%)

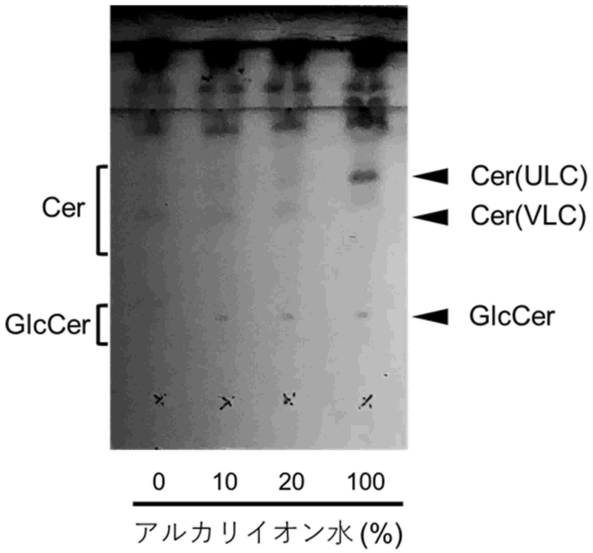
【図９】


SPTLC2
SPTLC2/β-actin
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
1.00
0.96
1.17
1.22
0
10
20
100
アルカリイオン水(%)

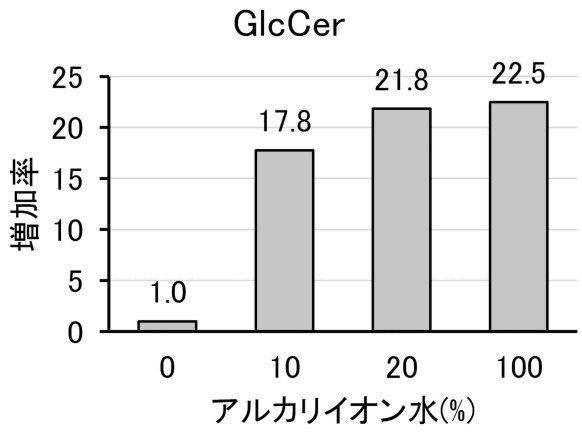
【図１０】



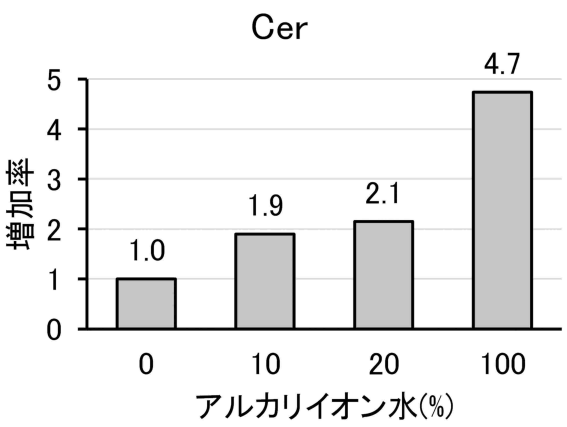
【図１１】



【図１２】



【図１３】



【配列表】

0007486235000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI		
A61P	*17/10*	*(2006.01)*	A61P	17/10	
A61K	*8/24*	*(2006.01)*	A61K	8/24	
A61K	*8/25*	*(2006.01)*	A61K	8/25	
A61Q	*19/00*	*(2006.01)*	A61Q	19/00	
A23L	*33/10*	*(2016.01)*	A23L	33/10	
A23L	*2/52*	*(2006.01)*	A23L	2/00	F
A23L	*2/00*	*(2006.01)*	A23L	2/00	V

審査官　佐々木 大輔

(56)参考文献

特開２０１０－１００６０６（ＪＰ，Ａ）
特開２０１６－０６９３２３（ＪＰ，Ａ）
SHU, T., et al.，The treatment effect of the atopic dermatitis by electrolyticreduction ion water lotion，Drug Discoveries & Therapeutics，2010年，Vol.4, No.6，pp.499-503
YAMAMOTO, H., et al.，Electrolytic-reduction ion water induces ceramide synthesis in human skin keratinocytes，Drug Discoveries & Therapeutics，2021年10月27日，Vol.15, No.5，pp.248-253，DOI: 10.5582/ddt.2021.01091

(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)

Ａ６１Ｋ　３５／００－３５／７６８
Ａ６１Ｋ　３３／００－３３／４４
Ａ６１Ｋ　８／００－　８／９９
Ａ２３Ｌ　３３／００－３３／２９
Ａ２３Ｌ　２／００－　２／８４
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）