

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012 年 6 月 21 日(21.06.2012)

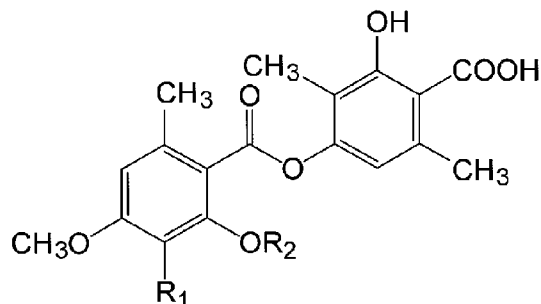


(10) 国際公開番号
WO 2012/081370 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 31/216 (2006.01) *A61Q 19/02* (2006.01)
A61K 8/37 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/077060
- (22) 国際出願日: 2011 年 11 月 24 日(24.11.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2010-277001 2010 年 12 月 13 日(13.12.2010) JP
特願 2010-277002 2010 年 12 月 13 日(13.12.2010) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 花王株式会社(Kao Corporation) [JP/JP]; 〒1038210 東京都中央区日本橋茅場町一丁目 14 番 10 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大場 剛史 (OHBA, Tsuyoshi) [JP/JP]; 〒3213497 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内 Tochigi (JP). 村瀬 大樹 (MURASE, Daiki) [JP/US]; 45214 オハイオ州シンシナティ市スプリンググローブ通り 2 5 3 5 番地 花王ブランド・カンパニー内 Ohio (US). 杉山 充 (SUGIYAMA, Mitsuru) [JP/JP]; 〒3213497 栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2 6 0 6 花王株式会社研究所内 Tochigi (JP).
- (74) 代理人: 飯田 敏三, 外 (IIDA, Toshizo et al.); 〒1050004 東京都港区新橋 3 丁目 1 番 10 号 石井ビル 3 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロシヤ (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: INHIBITOR OF ACTIVITY OF ENDOTHELIN, AND SKIN WHITENING AGENT

(54) 発明の名称: エンドセリン作用抑制剤及び美白剤



(1)

(57) Abstract: An inhibitor of the activity of endothelin and a skin whitening agent, each of which contains a compound represented by general formula (1) or a salt thereof as an active ingredient. (In the formula, R₁ represents a formyl group or an alkyl group having 1-4 carbon atoms; and R₂ represents a hydrogen atom or an alkyl group having 1-4 carbon atoms.)

(57) 要約: 下記一般式 (1) で表される化合物又はその塩を有効成分として含有するエンドセリン作用抑制剤および美白剤。(式中、R₁はホルミル基又は炭素数 1~4 のアルキル基を表す。R₂は水素原子又は炭素数 1~4 のアルキル基を表す。)

WO 2012/081370 A1

明 細 書

発明の名称：エンドセリン作用抑制剤及び美白剤

技術分野

[0001] 本発明は、エンドセリン作用抑制剤及び美白剤に関する。また、本発明は、これらの剤に好適に用いるベオミセス酸を高含有するムシゴケ抽出物の製造方法に関する。

背景技術

[0002] エンドセリンは、内皮細胞由来のペプチドホルモンで、受容体を通して種々の細胞や組織に作用する。例えば、血管平滑筋細胞等において細胞内カルシウム濃度上昇を引き起こすことが知られている（非特許文献1）。

近年、エンドセリンが表皮メラノサイト（メラニン細胞）に対し細胞内カルシウム濃度上昇を促し、細胞内のシグナル伝達系を介して細胞増殖を促進するとともに、メラニン合成の律速酵素であるチロシナーゼの活性を増強することが報告されている（非特許文献2参照）。また、エンドセリンは表皮角化細胞（ケラチノサイト）が産生するメラノサイト活性化因子の1つであること（非特許文献3）、紫外線誘導性色素沈着や老人性色素斑形成の重要な要因であることが報告されている（非特許文献4、5）。

このようなエンドセリンの生体作用から、エンドセリンの作用を抑制する物質はメラニン生成や色素沈着等の改善や予防に有用であることが十分予想される。

[0003] ムシゴケ（学名：Thamnia vermicularis又はThamnia Subuliformis）は、中国高地などに生息する地衣類の一種である。脂肪分解効果等のダイエット効果があるといわれ、日本でも茶などとして広く飲用されている。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Hirata Y. et al. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 154, 868-875

非特許文献2 : Yada et al. (1991) J. Biol. Chem. 266, 18352-18357

非特許文献3 : Imokawa et al. (1992) J. Biol. Chem. 267, 24675-24680

非特許文献4 : Imokawa et al. (1995) J. Invest. Dermatol. 105, 32-37

非特許文献5 : Kadono et al. (2001) J. Invest. Dermatol. 116, 571-577

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、エンドセリンの作用を効果的に抑制するエンドセリン作用抑制剤を提供することを課題とする。また、本発明は、エンドセリンの作用を抑制しメラニン生成を抑制しうる美白剤を提供することを課題とする。

さらに本発明は、これらの剤の有効成分の1つであるベオミセス酸を高濃度で含有するムシゴケ抽出物の製造方法を提供することを課題とする。

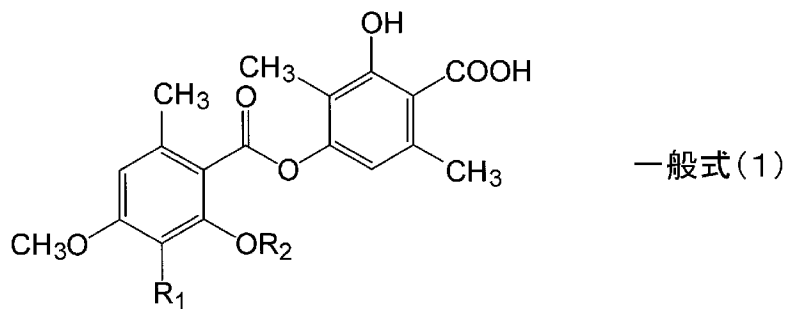
課題を解決するための手段

[0006] 本発明者等は上記課題に鑑み、エンドセリンの作用を抑制する新規物質を探索すべく鋭意検討を行った。その結果、下記一般式(1)で表される化合物が、エンドセリンの作用によって引き起こされるメラノサイト内のカルシウム(イオン)濃度上昇を効果的に抑制することを見出し、該化合物が新規の美白成分として有用であるとの知見を得た。さらに本発明者らは、ムシゴケ抽出物の美白成分を高濃度に含有しうる抽出方法について鋭意検討を行った。その結果、ムシゴケを特定の抽出溶媒で抽出することにより、得られた抽出物中のベオミセス酸濃度が有意に増加することを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成するに至ったものである。

[0007] 本発明によれば、以下の手段が提供される：

<1> 下記一般式(1)で表される化合物又はその塩を有効成分として含有するエンドセリン作用抑制剤。

[0008] [化1]



[0009] (式中、 R_1 はホルミル基又は炭素数1～4のアルキル基を表す。 R_2 は水素原子又は炭素数1～4のアルキル基を表す。)

[0010] <2>前記一般式(1)で表される化合物又はその塩を有効成分として含有する美白剤。

<3>前記一般式(1)で表される化合物又はその塩を皮膚に適用することを含む、エンドセリン作用を抑制する方法。

<4>前記一般式(1)で表される化合物又はその塩を皮膚に適用することを含む、美白方法。

<5>エンドセリン作用抑制効果を有する医薬品の製造のために用いられる、前記一般式(1)で表される化合物又はその塩の用途。

<6>美白効果を有する医薬品の製造のために用いられる、前記一般式(1)で表される化合物又はその塩の用途。

<7>エンドセリン作用の抑制において使用するための前記一般式(1)で表される化合物又はその塩。

<8>美白において使用するための前記一般式(1)で表される化合物又はその塩。

<9>ムシゴケを、アルコールを60v/v%以上含有するアルコール溶液、環状エーテル類及び酸素原子を2個以上有するエーテル類、並びに総炭素数3～6のエステル類からなる群より選ばれる少なくとも1種の溶媒を用いて抽出する工程を含むベオミセス酸高含有ムシゴケ抽出物の製造方法。

<10>前記抽出工程により得られた抽出物のベオミセス酸濃度が、濃度5

0 v / v %アルコール溶液を用いて抽出した抽出物中のベオミセス酸濃度と比べて2倍以上であることを特徴とする、前記<9>項記載の製造方法。

<11>前記アルコールが、総炭素数1~4のアルコールであることを特徴とする、前記<9>又は<10>項記載の製造方法。

<12>前記エーテル類が、テトラヒドロフラン、ジオキサン、ポリエチレングリコール、及びポリオキシエチレンメチルグルコシドからなる群より選ばれることを特徴とする、前記<9>又は<10>項記載の製造方法。

<13>前記エステルが酢酸エチルであることを特徴とする、前記<9>又は<10>項記載の製造方法。

<14>前記溶媒が、総炭素数3~6のエステル類とアルコール溶液との混合溶媒であることを特徴とする、前記<9>又は<10>項記載の製造方法。

<15>前記<9>~<14>項のいずれか1項記載の製造方法により得られたベオミセス酸高含有ムシゴケ抽出物を有効成分として含有するエンドセリン作用抑制剤。

<16>前記<9>~<14>項のいずれか1項記載の製造方法により得られたベオミセス酸高含有ムシゴケ抽出物を有効成分として含有する美白剤。

発明の効果

[0011] 本発明のエンドセリン作用抑制剤は、優れたエンドセリン作用抑制効果を奏し、エンドセリンによるメラノサイト内のカルシウム濃度上昇を効果的に抑制することができる。また、本発明の美白剤は、メラノサイトに対するエンドセリンの作用を抑制し、メラニン生成を抑制することができる。さらに、本発明は、これらの剤の有効成分の1つであるベオミセス酸を高濃度に含有するムシゴケ抽出物の製造方法を提供する。

本発明のエンドセリン作用抑制剤及び美白剤は、医薬品、医薬部外品、化粧品等に用いることができる。

[0012] 本発明の上記及び他の特徴及び利点は、適宜添付の図面を参照して、下記の記載からより明らかになるであろう。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]実施例1の参考例において、ジャーマンカミツレ抽出物を添加した系での細胞内カルシウム濃度上昇率（相対値％）を示す図である。

[図2]実施例2において、ベオミセス酸を添加し培養した皮膚シートの写真である。

[図3]実施例2において、ベオミセス酸を添加した皮膚シート中のメラニン量（相対値％）を示す図である。

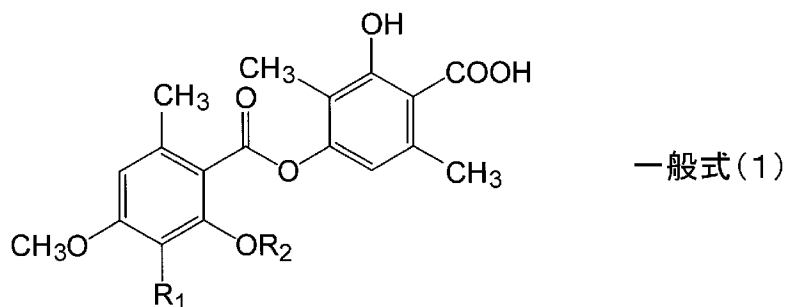
発明を実施するための形態

[0014] 以下、本発明を詳細に説明する。

1. 一般式（1）で表される化合物

本発明のエンドセリン作用抑制剤及び美白剤は、下記一般式（1）で表される化合物又はその塩を有効成分として含有する。後述の実施例で実証するように、当該化合物は優れたエンドセリン作用抑制効果及びメラニン産生抑制効果を有する。

[0015] [化2]



[0016] 一般式（1）中、 R_1 はホルミル基又は炭素数1～4のアルキル基を表す。

R_2 は水素原子又は炭素数1～4のアルキル基を表す。炭素数1～4のアルキル基としては、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、*i*-ブチル基、*sec*-ブチル基、*t*-ブチル基が挙げられる。

R_1 としては、ホルミル基又は炭素数1～2のアルキル基（メチル基、エチル基）が好ましく、ホルミル基又はメチル基がより好ましい。

R_2 としては、水素原子又は炭素数1～2のアルキル基（メチル基、エチル

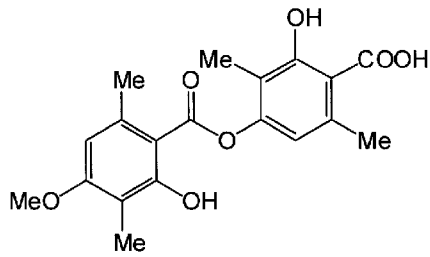
基)が好ましく、水素原子又はメチル基がより好ましい。

本発明のエンドセリン作用抑制剤及び美白剤は、前記一般式(1)で表される化合物の塩を有効成分としてもよい。塩としては特に限定されないが、例えば、リチウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩、トリメチルアミン、トリエチルアミン等のアルキルアミン塩及び4級アンモニウム塩、トリエタノールアミン、ジエタノールアミン、モノエタノールアミン等のアルカノールアミン塩、又はリジン、ヒスチジン、アルギニン等のアミノ酸塩などが挙げられ、好ましくは、アルカリ金属塩、アルカノールアミン塩、アミノ酸塩である。(以下、「一般式(1)で表される化合物又はその塩」を纏めて、単に一般式(1)で表される化合物ともいう。)

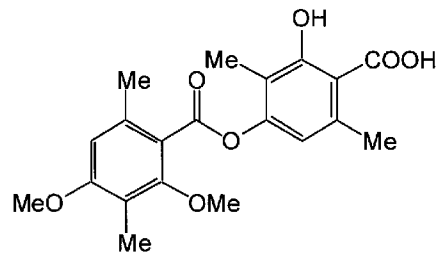
[0017] 以下に前記一般式(1)で表される化合物の具体例を挙げるが、本発明はこれらにより限定されるものではない。なお、下記の例示化合物においてMeはメチル基を表す。

[0018]

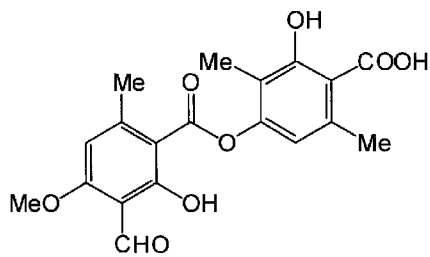
[化3]



バルバチン酸



ジフラクタ酸



ベオミセス酸

[0019] 本発明のエンドセリン作用抑制剤又は美白剤においては、有効成分として前記一般式（１）で表される化合物を単独で用いてもよく、また２種以上混合して用いてもよい。

[0020] 後述の実施例で実証しているように、前記一般式（１）で表される化合物は、エンドセリンによるメラノサイトのカルシウム濃度上昇を効果的に抑制することができる。さらに、当該化合物は、メラノサイトに対するエンドセリンの作用を抑制することでメラニン生成を抑制しうするため、美白効果を奏する。なお、本発明において「美白（作用）」とは、メラニン色素の生成を抑え、余分なメラニンのない本来の透明な肌色に戻すこと、または皮膚の黒化若しくはシミ・ソバカス等の色素沈着を防止、抑制することを意味する。

[0021] 前記一般式（１）で表される化合物は、化学合成により製造することも、天然物由来の材料から抽出・精製等して得ることもできる。また、市販の試薬としても入手可能である。

[0022] 前記一般式(1)で表される化合物を化学合成する方法としては、例えば、Australian Journal of Chemistry (1975), 28(5), 1113-1124、薬学雑誌(1936), 56, 237-258、薬学雑誌(1932), 52, 991-993等に記載の方法が挙げられる。

市販の試薬等から入手する場合は、例えば、ナミキ商事株式会社などから入手可能である。

[0023] 植物等の天然素材から抽出・単離する方法としては、特に限定されないが、例えば、植物を適当な溶媒を用いて抽出し、得られた植物抽出物からクロマトグラフィー等の手法により前記一般式(1)で表される化合物を単離する方法が挙げられる。植物としては、例えば、ムシゴケ(和名はセツチャ、雪茶、学名: *Thamnia vermicularis*)を用いることができる。抽出溶媒としては、植物成分の抽出に通常用いられるものを使用でき、例えば、水；メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール等のアルコール類；エチレングリコール、プロピレングリコール、グリセリン、ブチレングリコール等の多価アルコール類；アセトン、メチルエチルケトン等のケトン類；酢酸メチル、酢酸エチル等のエステル類；テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル等の鎖状及び環状エーテル類；ポリエチレングリコール等のポリエーテル類；ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素等のハロゲン化炭化水素類；ヘキサン、シクロヘキサン、石油エーテル等の炭化水素類；ベンゼン、トルエン等の芳香族炭化水素類；ピリジン類；超臨界二酸化炭素；油脂、ワックス、その他オイル等が挙げられ、これらは単独で又は2種以上を組み合わせ使用できる。また抽出条件も通常の条件を適用でき、一例として、植物を0～100℃で数分間～数週間程度浸漬又は加熱還流することが挙げられる。

[0024] 2. ベオミセス酸高含有ムシゴケ抽出物の製造方法

一般式(1)で表される化合物の1つであるベオミセス酸は、抽出溶媒として、アルコール含有率60%以上のアルコール水溶液、環状エーテル類及び酸素原子を2個以上有するエーテル類、並びに総炭素数3～6のエステル

類からなる群より選ばれる少なくとも１種を用いて、原料であるムシゴケを抽出して製造することが好ましい。当該方法によって得られたムシゴケ抽出物は、他の抽出溶媒を用いたムシゴケ抽出物と比べてベオミセス酸を高濃度で含有する。

[0025] [原料]

原料として用いるムシゴケとは、学名Thamnia vermicularis (和名はセツチャ)、又は、学名Thamnia Subuliformis (和名はトキワムシゴケ)であるムシゴケ科ムシゴケ属の地衣類をいう。ムシゴケ抽出物には、タムノール酸、スクアマト酸、ベオミセス酸等のデプシド類と呼ばれる化合物が含有されることが知られている(日本食品化学学会誌 Vol.14(2), 2007, P63～69参照)。ムシゴケの抽出物は、メラニン生成抑制作用を有するとの報告もある(特開2006-182731号公報参照)。また、ベオミセス酸については、血管拡張作用やスリム化作用等を有することが報告されている(特開平2-223577号公報、及び米国特許出願公開第2004-0146359号明細書参照)。

本発明においては、上記属に属する類縁地衣類を用いることもできる。これらは市販品として入手可能である。

原料として、セツチャとトキワムシゴケとを混合して用いてもよく、単独で用いてもよい。好ましくは、セツチャを用いる。また、ムシゴケの任意の部位(全体、全草、地衣体、枝状体、葉状体、子実体等)を用いることができ、各部位を複数組み合わせ用いてもよい。好ましくは、地衣体、枝状体を用いる。

抽出に用いるムシゴケは生のままでもよく、抽出効率を高めるために、乾燥、細断、粉碎などの処理を施したものであってもよい。

[0026] [抽出溶媒]

抽出溶媒は、アルコールを60%以上含有するアルコール溶液(アルコールとして具体的には、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール等のアルコール類; プロピレングリコール、ブチレングリコール等の多価ア

ルコール類が挙げられ、総炭素数 1～4 のアルコールが好ましい)、環状エーテル類(例えば、テトラヒドロフラン、ジオキサン)、酸素原子を 2 個以上有するエーテル類(具体的には、ポリエーテル類が挙げられ、例えば、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレンメチルグルコシド等が挙げられる)、及び総炭素数 3～6 のエステル類(例えば、酢酸メチル、酢酸エチル)から選択することができる。本発明では、これらの溶媒を単独で用いても、2 種以上を組み合わせ用いてもよい。また、いずれかの溶媒で抽出後、他の溶媒に置き換えてもよい。本発明の製造方法では抽出溶媒として、濃度 60% 以上のアルコール水溶液、又は酢酸エチルを用いることが好ましく、濃度 70% 以上のアルコール水溶液を用いることがより好ましく、濃度 90% 以上のアルコール水溶液(好ましくはエタノール)を用いることがさらに好ましく、濃度 95% 以上のアルコール水溶液(好ましくはエタノール)を用いることが特に好ましい。なお、本明細書において溶媒濃度は特に限定がない限り容量(v/v)基準である。

抽出溶媒の使用量は、抽出原料のムシゴケに対し質量比で 1～200 倍量であることが好ましく、1～100 倍量であることがより好ましく、1～50 倍量であることがさらに好ましく、5～40 倍量であることが特に好ましく、5～30 倍量であることが最も好ましい。

[0027] [抽出方法]

ムシゴケの抽出方法・条件は、地衣類や植物の抽出に用いられる通常の方法・条件を適用することができ、特に制限はない。例えば、ムシゴケを 0～100℃ で数分間～数週間浸漬又は加熱還流するのが好ましく、室温付近の温度で 1 時間～3 週間程度浸漬することが特に好ましい。また、抽出効率を上げる為、併せて攪拌を行ったり、溶媒中でホモジナイズ処理を行ってもよい。

また、抽出工程の後、必要に応じて更に適当な分離手段、例えばゲル濾過、クロマトグラフィー、精密蒸留等により活性の高い画分を分画してもよい。

本発明の製造方法により得られる抽出物には、このようにして得られた各種抽出物、その希釈液、その濃縮液、その精製物又はそれらの乾燥末等が含まれる。

[0028] 本発明の製造方法により得られるムシゴケ抽出物は、ベオミセス酸を高含有する。具体的には、本発明のベオミセス酸高含有（高濃度含有）ムシゴケ抽出物は、同量のムシゴケを同量の濃度50%アルコール水溶液を用いて同じ抽出条件（抽出時間、抽出温度等）で抽出した場合と比べて、得られたムシゴケ抽出物中のベオミセス酸濃度が2倍以上であることを特徴とする。本発明のムシゴケ抽出物中のベオミセス酸濃度は、抽出物の全質量に対して、300ppm以上であることが好ましく、400ppm以上であることがより好ましく、800ppm以上であることがさらに好ましい。なお、本明細書においてppmは、特に限定がない限り質量基準である。

本発明の製造方法により得られるムシゴケ抽出物はベオミセス酸を高濃度で含有し、後述の実施例で実証されているように、従来のムシゴケ抽出物と比べて一段と高い美白効果を奏する。したがって、当該方法により得られたムシゴケ抽出物を本発明のエンドセリン作用抑制剤又は美白剤に用いれば、一段と優れたエンドセリン作用抑制効果及び美白効果を期待できる。

[0029] 3. エンドセリン作用抑制剤、美白剤

本発明において、前記一般式（1）で表される化合物又は本発明の方法により得られるベオミセス酸高含有ムシゴケ抽出物は、そのままエンドセリン作用抑制剤又は美白剤として用いてもよい。また、当該化合物又は抽出物に、例えば酸化チタン、炭酸カルシウム、蒸留水、乳糖、デンプン等の適当な液体または固体の賦形剤または増量剤を加えて用いてもよい。この場合、剤中に含有される前記一般式（1）で表される化合物の量は特に制限されないが、前記一般式（1）で表される化合物が0.00001～5質量%含まれることが好ましく、0.00001～3質量%含まれることがより好ましく、0.0001～3質量%含まれることが特に好ましい。また、剤中に含有される上記ムシゴケ抽出物の量は特に制限されないが、当該抽出物が0.0

0.01～50質量%含まれることが好ましく、0.001～20質量%含まれることがより好ましく、0.01～10質量%含まれることが特に好ましい。

[0030] 本発明の美白剤には、前記一般式（1）で表される化合物又は本発明の方法により得られるベオミセス酸高含有ムシゴケ抽出物に加え、他の薬効成分を加えてもよい。例えば、その他の美白剤、保湿剤、酸化防止剤、紫外線吸収剤、界面活性剤、増粘剤、色材種等を加えることができる。他の薬効成分とともに組成物として用いる場合、美白剤中に含有される前記一般式（1）で表される化合物の量は特に制限されないが、前記一般式（1）で表される化合物が0.00001～5質量%含まれることが好ましく、0.0001～5質量%含まれることがより好ましく、0.0001～3質量%含まれることが特に好ましい。また、美白剤中に含有される当該抽出物の量は特に制限されないが、当該抽出物が0.0001～50質量%含まれることが好ましく、0.001～20質量%含まれることがより好ましく、0.01～10質量%含まれることが特に好ましい。

[0031] 本発明のエンドセリン作用抑制剤及び美白剤は、皮膚外用剤の形態で使用する事ができる。「皮膚外用剤」とは、皮膚化粧品、外用医薬品、外用医薬部外品等として皮膚に適用されるものを意味し、その剤型も水溶液系、可溶化系、乳化系、粉末系、ゲル系、軟膏系、クリーム、水－油2層系、水－油－粉末3層系など、幅広い形態をとり得る。例えば、洗顔料、化粧水、乳液、クリーム、ジェル、エッセンス（美容液）、パック、マスク、ファンデーション、軟膏、シート状製品等の形態が挙げられる。

皮膚外用剤の形態で使用する場合には、前記一般式（1）で表される化合物又は本発明の方法により得られるベオミセス酸高含有ムシゴケ抽出物の他、通常の皮膚外用剤に用いられる成分、例えば界面活性剤、油性物質、高分子化合物、防腐剤、前記以外の薬効成分、紛体、紫外線吸収剤、色素、香料、乳化安定剤、pH調整剤等を適宜配合できる。また、前記一般式（1）で表される化合物又は前記ベオミセス酸高含有ムシゴケ抽出物を含有する皮膚外

用剤の使用量は、有効成分の含有量により異なるが、例えばクリーム状、軟膏状の場合、皮膚面 1 cm^2 当たり $0.1 \sim 5\text{ }\mu\text{g}$ 、液状製剤の場合、同じく $0.1 \sim 10\text{ }\mu\text{g}$ 使用するのが好ましい。

実施例

[0032] 以下、本発明を実施例に基づきさらに詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。以下の試験例及び実施例では、ムシゴケとしてセツチャ (*Thamnoia vermicularis*) を用いた。

[0033] 製造例

(製造例1) ペオミセス酸

セツチャ (新和物産社製) 41.6 g に 95% エタノール水溶液 1 L を加え、 30°C で 30 日間抽出後、ろ過し、ろ紙上のセツチャを 95% エタノール水溶液 200 mL で洗浄し、最初のろ液に加え、セツチャ抽出物 1100 mL (固形分 2.98 g) を得た。この抽出物 56 mL (固形分 151.7 mg) を HPLC で分画し、ペオミセス酸 28.00 mg (収率 18.5%) を得た。

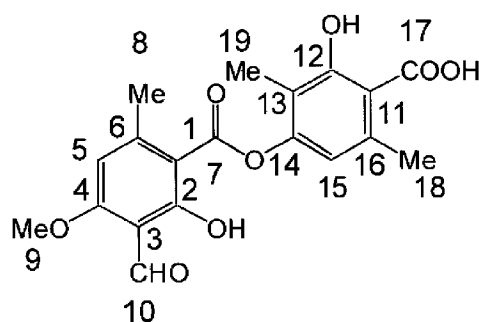
単離成分の構造解析は、NMR により行った。単離成分の NMR スペクトルデータが文献で報告されているペオミセス酸 (日本食品化学学会誌 (日食化誌) Vol.14(2), 2007 参照) のスペクトルデータとほぼ一致したことから、単離された成分はペオミセス酸であると同定した。NMR による構造解析の結果を表 1 に示す。なお、表中の Me はメチル基を表す。

[0034]

[表1]

表 1

	¹³ C-NMR(ppm)		¹ H-NMR(ppm)	
	単離品	ベオミセス酸(文献)	単離品	ベオミセス酸(文献)
1	113.59	113.30		
2	160.90	160.70		
3	108.33	108.10		
4	163.33	163.10		
5	104.94	104.70	6.72	6.71
6	149.19	149.00		
7	164.17	163.90		
8	21.24	21.00	2.47	2.47
9	56.84	56.60	3.96	3.95
10	194.01	193.70	10.22	10.21
11	112.06	111.50		
12	161.81	161.30		
13	116.04	115.90		
14	152.06	152.00		
15	115.68	115.80	6.6	6.62
16	139.21	139.00		
17	173.27	173.10		
18	23.05	22.80	2.48	2.48
19	9.33	9.00	2.04	2.04



ベオミセス酸

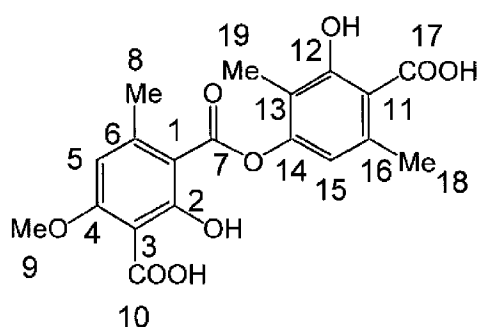
[0035] (参考例1) スクアマト酸

製造例1で得られたセツチャ抽出物24mL(固形分65.04mg)をHPLCで分画したところ、スクアマト酸5.6mg(収率8.61%)が得られた。単離成分の構造解析は、NMRにより行った。単離成分のNMRスペクトルデータが文献で報告されているスクアマト酸(Yunnan Zhiwu Yanjiu, 24(4), 525-530(2002))のスペクトルデータとほぼ一致したことから、単離された成分はスクアマト酸であると同定した。NMRによる構造解析の結果を表2に示す。なお、表中のMeはメチル基を表す。

[0036] [表2]

表2

	¹³ C-NMR(ppm)		¹ H-NMR(ppm)	
	単離品	スクアマト酸(文献)	単離品	スクアマト酸(文献)
1	114.6	114.6		
2	166.9	166.9		
3	104.7	105.1		
4	162.4	162.5		
5	105.2	105.4	6.50	6.55
6	144.9	144.3		
7	163.3	163.0		
8	21.4	21.4	2.60	2.62
9	56.1	56.5	3.85	3.90
10	176.1	176.0		
11	112.7	112.6		
12	164.1	164.1		
13	116.8	117.1		
14	153.2	153.5		
15	116.2	116.5	7.03	7.02
16	140.6	140.8		
17	173.5	173.5		
18	23.9	24.0	2.84	2.81
19	9.9	9.9	2.59	2.57



スクアマト酸

[0037] (製造例2) バルバチン酸

試薬として市販されているバルバチン酸（ナミキ商事株式会社より入手）を、後述の活性評価に使用した。

[0038] (製造例3) ジフラクタ酸

試薬として市販されているジフラクタ酸（ナミキ商事株式会社より入手）を、後述の活性評価に使用した。

[0039] (参考例2) ジャーマンカミツレ抽出物

ジャーマンカミツレ（和名：カミツレ、新和物産（株）より入手）の花部

40 g に、50%エタノール含有水溶液400 mLを加え、室温で14日間抽出後、濾過し、ジャーマンカミツレ抽出物(221 mL)を得た(蒸発残分2.63%)。

[0040] 実施例1 エンドセリン作用抑制効果の検証

上記で製造した各化合物及び抽出物について、下記の評価系を用いてエンドセリン作用抑制効果を検証した。

(1) 評価系

正常ヒト新生児表皮由来メラノサイト(NHEMs; クラボウ社)を、蛍光検出用の96穴プレートに 3×10^4 cells/well (200 μ L/well)で播種し、5%CO₂下にて37°Cで培養した。培地には、PMA(一)の増殖用添加剤(HMGS)を含むMedium 254を用いた。

3日間培養後、培養プレートからデカントで培地を除去し、細胞内Ca²⁺⁺測定試薬Fluo4-AMを含むアッセイバッファーに置換し、37°Cで1時間インキュベートした。次に、FDSS(Functional Drug Screening System)機器において測定開始20秒後に所定濃度の上記化合物を1分間前処理した後、リガンドであるエンドセリン(ET-1、終濃度100 nM)を添加し、Fluo4-AMの蛍光をEx. 480 nm/Em. 540 nmの測定波長で測定開始から5分後まで経時的に検出した。

コントロールにおけるFluo4-AMの蛍光増加比(Max ratio - Min ratio)を100とした場合の相対値(%)で、各化合物の細胞内カルシウム(カルシウムイオン)濃度上昇率(%)を算出し、エンドセリン作用抑制効果を評価した。なお、コントロールとして、エタノール又は10~95 v/v%の含水エタノール溶液を終濃度0.1~0.5 v/v%で添加したものを用いた。

[0041] (2) 参考例: ジャーマンカミツレ抽出物の評価

ポジティブコントロールとして、上記で調製したジャーマンカミツレ抽出物(蒸発残分2.63%、50%EtOH溶媒)を用いた。ジャーマンカミツレ抽出物はエンドセリンの作用によるメラノサイトのCa濃度上昇を抑制

し、メラニン産生を抑制することが知られている。

ジャーマンカミツレ抽出物を、0.5 v/v%及び1.0 v/v%の終濃度で前処理して上記評価系に供し、エンドセリン刺激によるカルシウム (Ca) 濃度上昇率を算出した (N=6)。結果を図1に示す。

図1から明らかなように、ジャーマンカミツレ抽出物を添加した系では、濃度依存的なCa濃度上昇抑制作用が確認された。特に濃度が1 v/v%の系では、20%以上もCa濃度上昇が抑制され、優れたエンドセリン抑制作用が確認された。

[0042] (3) 本発明の化合物の評価

上記にて調製した化合物を、表3に示す終濃度で前処理して上記評価系に供し、エンドセリン刺激によるCa濃度上昇率を算出した (N=6)。結果を表3に示す。

[0043] [表3]

表3

化合物	濃度 (μM)	細胞内Ca濃度 上昇率 (%)	備考
ベオミセス酸	50	52.7	本発明
スクアマト酸	50	95.9	参考例
バルバチン酸	50	38.4	本発明
ジフラクタ酸	50	28.0	本発明

[0044] 表3から明らかなように、ベオミセス酸、バルバチン酸、ジフラクタ酸を添加した系ではいずれも、濃度50 μMにおいて、エンドセリン刺激による細胞内Ca濃度上昇が45%以上も抑制されることが確認された。すなわち、前記一般式(1)で表される化合物は、優れたエンドセリン抑制作用を有し、その抑制効果は公知の美白成分であるジャーマンカミツレ抽出物以上のものであることがわかった。

一方、スクアマト酸を添加した系では、濃度50 μMにおいては、細胞内Ca濃度上昇は約4%程度抑制されるにとどまった。

[0045] 実施例2 メラニン産生抑制作用の検証

上記で製造したベオミセス酸を用いて、皮膚におけるメラニン産生の抑制作用について検証した。

メラノサイトを含む3次元培養皮膚モデル（MEL300A；クラボウ社）を、メラノサイト活性化因子であるエンドセリン-1（ET-1）とSCF（幹細胞増殖因子）とを終濃度10nMで添加したEPI-100-NMM113培地を用いて、37℃、5%CO₂条件下にて培養した。培養初日より、ベオミセス酸を終濃度50μMで添加した（N=2）。培地交換は3日に一度行った。14日後に、皮膚モデルをPBSにて洗浄し、写真撮影を行った。結果を図2に示す。その後、アラマブルー試薬を用いて細胞呼吸活性を測定し、上記終濃度が細胞毒性を示さない濃度であることを確認した（結果は図示せず）。

続いて皮膚モデルカップをPBSで洗浄し、ピンセットで皮膚シートを剥離してチューブに移し、PBSで3回洗浄した。50%エタノールで3回、100%エタノールで2回洗浄した後、室温で一晩放置し、完全に乾燥させた。2M NaOHを200μL加えた後100℃で溶解させ、遠心分離によって得られた上清について405nmの測定波長で吸光度を測定し、メラニン量を算出した。結果を図3に示す。メラニン量は、コントロールのメラニン量を100とした場合の相対値（%）で示した。なお、コントロールとして、エタノール又は10～95v/v%の含水エタノール溶液を終濃度0.1～0.5v/v%で添加したものを用いた。

[0046] 図2から明らかなように、ベオミセス酸を添加した系では、コントロールの系に比べて皮膚の色が明るく、メラニン産生による皮膚の黒化が抑えられていた。また、図3に示すように、ベオミセス酸を添加した系では、細胞毒性を示さない添加濃度において、コントロールの系に比べて皮膚組織中のメラニン量が40%以上も低下していた。

上述のように、エンドセリンはメラノサイトに作用してカルシウム濃度を上昇させ、メラニン産生を増加させることが知られており（Yada et al.

(1991) J. Biol. Chem. 266, 18352-18357、Imokawa et al. (1992) J. Biol. Chem. 267, 24675-24680参照)、エンドセリンの当該作用を抑制する物質は美白成分として有用である。本発明の上記実施例でも、メラノサイトに対するエンドセリンの作用を抑制する物質が、メラニン産生を効果的に抑制できることが実際に確認された。したがって、前記一般式(1)で表される化合物が、細胞内カルシウム濃度の上昇を促すエンドセリンの作用を効果的に抑制することで、メラニン産生を抑制でき、美白剤として有用であることがわかった。

[0047] 続いて、上記で単離したスクアマト酸を用いて、上記と同様にメラニン産生抑制作用について検証した。スクアマト酸を添加した系では、ベオミセス酸のような有意なメラニン量の低下は見られなかった。

[0048] したがって、ムシゴケに含まれるベオミセス酸は、エンドセリン作用による細胞内Ca濃度上昇を抑制し、皮膚におけるメラニン産生を顕著に抑制することがわかった。一方、同じムシゴケに含まれる成分であっても、スクアマト酸はエンドセリン作用抑制効果及びメラニン産生抑制効果はほとんど見られなかった。

[0049] 実施例3-1

セツチャ(新和物産(株)より入手、中国産)5.0gに60%エタノール溶液100mLを加え40℃で一週間抽出後、ろ過し、セツチャ抽出物75.9g(蒸発残分0.45(w/v)%)を得た。

[0050] 実施例3-2

セツチャ(新和物産(株)より入手、中国産)5.0gに70%エタノール溶液100mLを加え40℃で一週間抽出後、ろ過し、セツチャ抽出物74.6g(蒸発残分0.52(w/v)%)を得た。

[0051] 実施例3-3

セツチャ(新和物産(株)より入手、中国産)5.0gに80%エタノール溶液100mLを加え40℃で一週間抽出後、ろ過し、セツチャ抽出物72.6g(蒸発残分0.50(w/v)%)を得た。

[0052] 実施例 3-4

セツチャ（新和物産（株）より入手、中国産）5.0 g に 90% エタノール溶液 100 mL を加え 40℃ で一週間抽出後、ろ過し、セツチャ抽出物 71.7 g（蒸発残分 0.46（w/v）%）を得た。

[0053] 実施例 3-5

セツチャ（新和物産（株）より入手、中国産）5.0 g に 95% エタノール溶液 100 mL を加え 40℃ で一週間抽出後、ろ過し、セツチャ抽出物 69.3 g（蒸発残分 0.52（w/v）%）を得た。

[0054] 実施例 3-6

セツチャ（新和物産（株）より入手、中国産）5.0 g に 99.5% エタノール溶液 100 mL を加え 40℃ で一週間抽出後、ろ過し、セツチャ抽出物 67.5 g（蒸発残分 0.47（w/v）%）を得た。

[0055] 参考例 3-1

セツチャ（新和物産（株）より入手、中国産）5.0 g に 10% エタノール溶液 100 mL を加え 40℃ で一週間抽出後、ろ過し、セツチャ抽出物 80.0 g（蒸発残分 0.69（w/v）%）を得た。

[0056] 参考例 3-2

特開 2006-182731 に記載の方法と同様にして、セツチャ（新和物産（株）より入手、中国産）5.0 g に 50% エタノール溶液 100 mL を加え 40℃ で一週間抽出後、ろ過し、セツチャ抽出物 77.6 g（蒸発残分 0.51（w/v）%）を得た。

[0057] ベオミセス酸濃度の測定（1）

上記実施例 3-1～3-6 及び参考例 3-1 及び 3-2 で得られた各セツチャ抽出物のベオミセス酸含有量を、HPLC を用いて下記の条件で分析した。測定に用いた装置及び測定条件は下記のとおりである。結果を表 4 に示す。

測定機器：日立 HPLC マルチシステムソフトウェア Z30ZL200、日立 HPLC マネー

ジャーD-7000、日立HPLC用オートサンプラーL-7200、日立HPLC用カラムオーブンL-7300、日立HPLC用紫外可視検出器L-7420、日立HPLCポンプL-7100

<HPLC分析条件>

流速：0.75mL/min

使用したカラム：Inertsil ODS-3 5 μ m(GL Science), 3.0I.D. $\times$ 150mm

カラム温度：40℃

移動相：0.1%トリフルオロ酢酸含有水溶液：0.1%トリフルオロ酢酸含有メタノール=30:70（ベオミセス酸リテンションタイム 9.06min）。

検出波長：254nm

[0058] [表4]

表 4

セツチャ 5.0g使用	参考例 3-1 10% エタノール	参考例 3-2 50% エタノール	実施例 3-1 60% エタノール	実施例 3-2 70% エタノール	実施例 3-3 80% エタノール	実施例 3-4 90% エタノール	実施例 3-5 95% エタノール	実施例 3-6 99.5% エタノール
収量(g)	80.0	77.6	75.9	74.6	72.6	71.7	69.3	67.5
蒸残(%)	0.69	0.51	0.45	0.52	0.50	0.46	0.52	0.47
ベオミセス 酸濃度 (ppm)	0	154	346	520	661	925	1181	1167

[0059] 表4の結果から明らかなように、抽出溶媒のアルコール濃度が50%以下の場合、抽出物中のベオミセス酸濃度は一様に低い値を示した。一方、抽出溶媒のアルコール濃度が60%以上になると抽出物中のベオミセス酸濃度が急に増加することがわかった。

[0060] 実施例4-1

セツチャ（新和物産（株）より入手）2.5gに60%エタノール溶液100mLを加え40℃で一週間抽出後、ろ過し、セツチャ抽出物79.8g（蒸発残分0.26（w/v）%）を得た。

[0061] 実施例4-2

セツチャ（新和物産（株）より入手）2.5 gに70%エタノール溶液100 mLを加え40℃で一週間抽出後、ろ過し、セツチャ抽出物78.6 g（蒸発残分0.27（w/v）%）を得た。

[0062] 実施例4-3

セツチャ（新和物産（株）より入手）2.5 gに80%エタノール溶液100 mLを加え40℃で一週間抽出後、ろ過し、セツチャ抽出物75.8 g（蒸発残分0.28（w/v）%）を得た。

[0063] 実施例4-4

セツチャ（新和物産（株）より入手）2.5 gに90%エタノール溶液100 mLを加え40℃で一週間抽出後、ろ過し、セツチャ抽出物74.0 g（蒸発残分0.30（w/v）%）を得た。

[0064] 実施例4-5

セツチャ（新和物産（株）より入手）2.5 gに95%エタノール溶液100 mLを加え40℃で一週間抽出後、ろ過し、セツチャ抽出物72.6 g（蒸発残分0.34（w/v）%）を得た。

[0065] 実施例4-6

セツチャ（新和物産（株）より入手）2.5 gに99.5%エタノール溶液100 mLを加え40℃で一週間抽出後、ろ過し、セツチャ抽出物70.7 g（蒸発残分0.30（w/v）%）を得た。

[0066] 参考例4-1

セツチャ（新和物産（株）より入手）2.5 gに10%エタノール溶液100 mLを加え40℃で一週間抽出後、ろ過し、セツチャ抽出物86.2 g（蒸発残分0.36（w/v）%）を得た。

[0067] 参考例4-2

セツチャ（新和物産（株）より入手）2.5 gに50%エタノール溶液100 mLを加え40℃で一週間抽出後、ろ過し、セツチャ抽出物81.7 g（蒸発残分0.29（w/v）%）を得た。

[0068] ベオミセス酸濃度の測定（2）

前記ベオミセス酸濃度の測定（１）と同様にして、実施例４－１～４－６及び参考例４－１及び４－２で得られた各抽出物中のベオミセス酸濃度を測定した。結果を表５に示す。

[0069] [表５]

表 5

セツチャ 2.5g使用	参考例 4-1 10% エタノール	参考例 4-2 50% エタノール	実施例 4-1 60% エタノール	実施例 4-2 70% エタノール	実施例 4-3 80% エタノール	実施例 4-4 90% エタノール	実施例 4-5 95% エタノール	実施例 4-6 99.5% エタノール
収量 (g)	86.2	81.7	79.8	78.6	75.8	74.0	72.6	70.7
蒸残 (%)	0.36	0.29	0.26	0.27	0.28	0.30	0.34	0.30
ベオミセス 酸濃度 (ppm)	0	113	284	420	642	893	1085	1063

[0070] 表５の結果から明らかなように、抽出溶媒のアルコール濃度が５０％以下の場合、抽出物中のベオミセス酸濃度は一様に低い値を示した。一方、抽出溶媒のアルコール濃度が６０％以上になると抽出物中のベオミセス酸濃度が急に増加することがわかった。また、表４の結果との比較から、アルコール濃度の変化に伴うベオミセス酸濃度の上昇は、溶媒量に対するセツチャの使用量が少ないほど顕著であることがわかった。

[0071] 実施例５－１

セツチャ（新和物産（株）より入手）５．０ｇに１００％１，３－ブタンジオール１００ｍＬを加え４０℃で一週間抽出後、ろ過し、セツチャ抽出物８６．９５ｇ（蒸発残分０．２６（ｗ／ｖ）％）を得た。

[0072] 参考例５－１

セツチャ（新和物産（株）より入手）５．０ｇに５０％１，３－ブタンジオール１００ｍＬを加え４０℃で一週間抽出後、ろ過し、セツチャ抽出物８６．０７ｇ（蒸発残分０．３５（ｗ／ｖ）％）を得た。

[0073] ベオミセス酸濃度の測定（３）

前記ベオミセス酸濃度の測定（１）と同様にして、実施例５－１及び参考例５－１で得られた各抽出物中のベオミセス酸濃度を測定した。結果を表６

に示す。

[0074] [表6]

表 6

	参考例 5-1 50%B _G	実施例 5-1 100%B _G
収量(g)	86.07	86.95
蒸発残分(%)	0.35	0.26
ペオミセス酸 濃度 (ppm)	86	594

B_G=1,3-ブチレングリコール

[0075] 表6から明らかなように、溶媒として50%1,3-ブチレングリコールを用いた抽出物ではペオミセス酸濃度が低いのに対し、100%1,3-ブチレングリコールを用いた抽出物ではペオミセス酸濃度が非常に高い値を示した。

[0076] 実施例6-1

セツチャ（新和物産（株）より入手）2.5gにテトラヒドロフラン100mLを加え40℃で一週間抽出後、ろ過し、セツチャ抽出物75.3g（蒸発残分（w/v）0.32%）を得た。

[0077] 実施例6-2

セツチャ（新和物産（株）より入手）2.5gに1,4-ジオキサン100mLを加え40℃で一週間抽出後、ろ過し、セツチャ抽出物93.4g（蒸発残分0.32（w/v）%）を得た。

[0078] 実施例6-3

セツチャ（新和物産（株）より入手）2.5gにポリエチレングリコール（PEG200）を100mL加え、40℃で一週間抽出後、ろ過し、セツチャ抽出物100.1gを得た。

[0079] 実施例6-4

セツチャ（新和物産（株）より入手）2.5gにセツチャにポリエチレングリコール（PEG400）を100mL加え、40℃で一週間抽出後、ろ

過し、セツチャ抽出物 100.0 g を得た。

[0080] 実施例 6-5

セツチャ（新和物産（株）より入手）2.5 g にポリエチレングリコール（PEG 600）を 100 mL 加え、40℃で一週間抽出後、ろ過し、セツチャ抽出物 98.1 g を得た。

[0081] 実施例 6-6

セツチャ（新和物産（株）より入手）2.5 g にポリオキシエチレンメチルグルコシド（商品名：グルカム E-10，ノベオン（Novelon）社製）を 100 mL 加え、40℃で一週間抽出後、デカンテーションにより、抽出物とセツチャを分離し、セツチャ抽出物 74.4 g を得た。

[0082] 実施例 6-7

セツチャ（新和物産（株）より入手）2.5 g にポリオキシエチレンメチルグルコシド（商品名：グルカム E-20，ノベオン（Novelon）社製）を 100 mL 加え、40℃で一週間抽出後、デカンテーションにより、抽出物とセツチャを分離し、セツチャ抽出物 111.3 g を得た。

[0083] 参考例 6-1

セツチャ（新和物産（株）より入手）2.5 g にジエチルエーテル 100 mL を加え 40℃で一週間抽出後、ろ過し、セツチャ抽出物 60.7 g（蒸発残分 0.03（w/v）%）を得た。

[0084] 参考例 6-2

セツチャ（新和物産（株）より入手）2.5 g にパルミチル-1,3-ジメチルブチルエーテル 100 mL を加え 40℃で一週間抽出後、ろ過し、セツチャ抽出物 70.5 g を得た。

[0085] ベオミセス酸濃度の測定（4）

前記ベオミセス酸濃度の測定（1）と同様にして、実施例 6-1～6-7 及び参考例 6-1 及び 6-2 で得られた各抽出物中のベオミセス酸濃度を測定した。結果を表 7 に示す。

[0086]

[表7]

表 7

	参考例 6-1 ジエチル エーテル	参考例 6-2 パルミチル- 1,3-ジメチル ブチル エーテル	実施例 6-1 THF	実施例 6-2 1,4- Dioxane	実施例 6-3 PEG200	実施例 6-4 PEG400	実施例 6-5 PEG600	実施例 6-6 グルカム E-10	実施例 6-7 グルカム E-20
収量(g)	60.7	70.5	75.3	93.4	100.1	100.0	98.1	74.4	111.3
蒸発残 分(%)	0.03	—	0.32	0.32	—	—	—	—	—
ベオミセ ス酸 濃度 (ppm)	265	5	1690	1625	1590	1396	1497	859	759

[0087] 表 7 の結果から明らかなように、溶媒として酸素原子数が 1 の鎖状エーテルを用いた抽出物（参考例 6-1、6-2）ではベオミセス酸濃度が低いのに
対し、環状エーテル及び酸素原子数が 2 以上のエーテルを用いた抽出物（
実施例 6-1～6-7）ではベオミセス酸濃度が非常に高い値を示した。

[0088] 実施例 7-1

セツチャ（新和物産（株）より入手）2.5 g に酢酸エチル 100 mL を
加え、40℃で一週間抽出後、ろ過し、セツチャ抽出物 81.3 g（蒸発残
分 0.14（w/v）%）を得た。

[0089] 実施例 7-2

セツチャ（新和物産（株）より入手）2.5 g に、酢酸エチル 50 mL と
99.5%エタノール 50 mL との混合溶媒を加え、40℃で一週間抽出後
、ろ過し、セツチャ抽出物 76.2 g（蒸発残分 0.34（w/v）%）を
得た。

[0090] 実施例 7-3

セツチャ（新和物産（株）より入手）2.5 g に、酢酸エチル 50 mL と
95%エタノール水溶液 50 mL との混合溶媒を加え、40℃で一週間抽出
後、ろ過し、セツチャ抽出物 77.2 g（蒸発残分 0.37（w/v）%）
を得た。

[0091] 実施例 7-4

セツチャ（新和物産（株）より入手）2.5 gに、酢酸エチル50 mLと50%エタノール水溶液50 mLとの混合溶媒を加え、40℃で一週間抽出後、ろ過し、セツチャ抽出物80.1 g（蒸発残分0.44（w/v）%）を得た。

[0092] 参考例 7-1

セツチャ（新和物産（株）より入手）2.5 gにクロロホルム100 mLを加え、40℃で一週間抽出後、ろ過し、セツチャ抽出物132.6 g（蒸発残分0.04（w/v）%）を得た。

[0093] 参考例 7-2

セツチャ（新和物産（株）より入手）5.0 gにヘキサン100 mLを加え、40℃で一週間抽出後、ろ過し、セツチャ抽出物51.8 g（蒸発残分0.02（w/v）%）を得た。

[0094] 参考例 7-3

セツチャ（新和物産（株）より入手）2.5 gにトルエン100 mLを加え、40℃で一週間抽出後、ろ過し、セツチャ抽出物70.9 g（蒸発残分0.01（w/v）%）を得た。

[0095] ベオミセス酸濃度の測定（5）

前記ベオミセス酸濃度の測定（1）と同様にして、実施例7-1～7-4及び参考例7-1～7-3で得られた各抽出物中のベオミセス酸濃度を測定した。結果を表8に示す。

[0096]

[表8]

表 8

	参考例 7-1 クロロホルム	参考例 7-2 ヘキサン	参考例 7-3 トルエン	実施例 7-1 酢酸エチル	実施例 7-2 酢酸エチル 99.5%EtOH	実施例 7-3 酢酸エチル 95%EtOH	実施例 7-4 酢酸エチル 50%EtOH
収量(g)	132.6	51.8	70.9	81.3	76.2	77.2	80.1
蒸発残分 (%)	0.04	0.02	0.01	0.14	0.34	0.37	0.44
ベオミセス酸 濃度 (ppm)	214	0 (検出限界以下)	21	1148	1509	1619	1748

[0097] 表 8 から明らかなように、炭化水素溶媒やハロゲン系溶媒を用いた抽出物ではベオミセス酸濃度が低いのに対し、酢酸エチル及びその混合溶媒を用いた抽出物ではベオミセス酸濃度が非常に高い値を示した。

[0098] 実施例 8 エンドセリン作用抑制効果の検証

1. セツチャ抽出物

上記実施例 1 の評価系を用いて、上記実施例 3 で得られたセツチャ抽出物のエンドセリン作用抑制効果を検証した。

評価サンプルとして、実施例 3-1、3-2、3-3、3-5、3-6 あるいはその希釈品、及び参考例 3-1、3-2 で得られた抽出物を用いた。これらの抽出物を下記表 9 に示す評価濃度で前処理して上記評価系に供し、エンドセリン刺激による Ca 濃度上昇率を算出した ($N=6$)。なお、各抽出物は、溶媒を DMSO に置換後、上記試験において 0.6 v/v % 添加して評価を行った。コントロールとしては、DMSO を 0.6 v/v % 添加したものをを用いた。結果を表 9 に示す。

[0099] 2. ジャーマンカミツレ抽出物

上記参考例 2 で得られたジャーマンカミツレエキスを、0.5 v/v % の終濃度で前処理して上記セツチャ抽出物と同様の評価系に供し、エンドセリン刺激によるカルシウム (Ca) 濃度上昇率を算出した ($N=6$)。結果を表 9 に示す。

[0100] [表9]

表 9

試料		ベオミセス酸 濃度 (ppm)	細胞内Ca濃度 上昇率 (%)	備考
1	10%エタノール 抽出エキス	0	100	参考例 3-1
2	50%エタノール 抽出エキス	154	95	参考例 3-2
3	60%エタノール 抽出エキス	346	85	実施例 3-1
4	70%エタノール 抽出エキス希釈品	425	84	実施例 3-2 希釈品
5	70%エタノール 抽出エキス	520	78	実施例 3-2
6	80%エタノール 抽出エキス希釈品	625	76	実施例 3-3 希釈品
7	95%エタノール 抽出エキス	1181	63	実施例 3-5
8	99.5%エタノール 抽出エキス	1167	58	実施例 3-6
9	ジャーマンカミツレ 抽出エキス	-	82	参考例 2

[0101] 表9から明らかなように、アルコール濃度50%以下の溶媒で抽出した抽出物を添加した系（試料1及び2）では、細胞内Ca濃度上昇率はほとんど変化しなかった。これに対し、アルコール濃度60%以上の溶媒で抽出した抽出物を添加した系（試料3～8）では、エンドセリン刺激による細胞内Ca濃度上昇率が有意に低下していた。また、試料3～8の細胞内Ca濃度上昇抑制作用は、公知の美白成分であるジャーマンカミツレエキス（試料9）と同程度、或いはそれ以上のものであった。

以上の結果から、特定の抽出溶媒を用いて得られた本発明のムシゴケ抽出物は、優れたエンドセリン抑制作用を有していることがわかった。

[0102] (処方例)

前記製造例1～3で得られた化合物を有効成分として、下記に示す組成のローション、乳液、美容液及びクリームを常法により各々調製した。

[0103] 1. ローションの調製

(組成)	(配合：質量%)
1, 3-ブチレングリコール	8.0
グリセリン	5.0
エタノール	3.0
ベオミセス酸	0.0001
カミツレエキス	3.0
キキョウエキス	1.0
チョウジエキス	1.0
キサントガム	0.1
ヒアルロン酸	0.1
リン酸二ナトリウム	0.1
リン酸二水素ナトリウム	0.1
アスコルビン酸2-グルコシド	2.0
精製水	残部
香料	適量
防腐剤	適量

[0104] 2. 乳液の調製

(組成)	(配合：質量%)
バルバチン酸	0.001
カミツレエキス	1.0
キキョウエキス	1.0
アルテアエキス	2.0
スクワラン	3.0
オリブ油	3.0
グリセリン	5.0
ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油	
(エチレンオキサイドの付加モル数：40)	1.0
カルボキシビニルポリマー	0.2

水酸化カリウム	0. 1
キサンタンガム	0. 2
エデト酸二ナトリウム	0. 0 2
精製水	残部
防腐剤	適量

[0105] 3. 美容液の調製

(組成)	(配合：質量%)
ジフラクタ酸	0. 0 0 1
カミツレエキス	1. 0
キキョウエキス	1. 0
チョウジエキス	1. 0
カルボキシビニルポリマー	0. 2
アクリル酸・メタクリル酸アルキル共重合体	0. 2
水酸化カリウム	0. 2
キサンタンガム	0. 1
ヒアルロン酸	0. 2
クエン酸ナトリウム	0. 1 5
クエン酸	0. 0 3
グリセリン	1 0. 0
1, 3-ブチレングリコール	5. 0
エデト酸二ナトリウム	0. 0 5
精製水	残部
防腐剤	適量
香料	適量

[0106] 4. 美容液の調製

(組成)	(配合：質量%)
ベオミセス酸	0. 0 0 1
カミツレエキス	1. 0

チョウジエキス	1. 0
キキョウエキス	1. 0
キサントガム	0. 2
カルボキシメチルセルロース	0. 2
カルボキシビニルポリマー	0. 2
水酸化カリウム	0. 1
クエン酸	0. 0 3
クエン酸ナトリウム	0. 1 5
グリセリン	5. 0
プロピレングリコール	3. 0
ポリエチレングリコール（分子量 1 5 0 0）	1. 0
モノステアリン酸ポリエチレングリコール	0. 5
精製水	残部
防腐剤	適量

[0107] 5. クリームの調製

（組成）	（配合：質量％）
ジフラクタ酸	0. 0 0 1
カミツレエキス	2. 0
キキョウエキス	2. 0
チョウジエキス	2. 0
メチルポリシロキサン	3. 0
スクワラン	2. 0
ジカプリン酸ネオペンチルグリコール	3. 0
ステアリルアルコール	1. 5
セタノール	1. 0
ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油	
（エチレンオキサイドの付加モル数：60）	0. 5
アクリル酸・メタクリル酸アルキル共重合体	0. 3

水酸化カリウム	0.15
キサンタンガム	0.1
エデト酸二ナトリウム	0.05
精製水	残部
防腐剤	適量
香料	適量

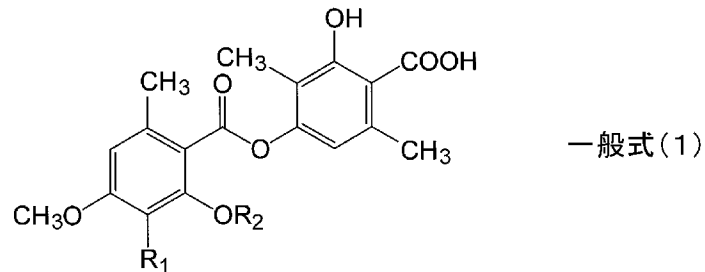
[0108] 本発明をその実施態様とともに説明したが、我々は特に指定しない限り我々の発明を説明のどの細部においても限定しようとするものではなく、添付の請求の範囲に示した発明の精神と範囲に反することなく幅広く解釈されるべきであると考え。

[0109] 本願は、2010年12月13日に日本国で特許出願された特願2010-277001、及び2010年12月13日に日本国で特許出願された特願2010-277002に基づく優先権を主張するものであり、これらはいずれもここに参照してその内容を本明細書の記載の一部として取り込む。

請求の範囲

[請求項1] 下記一般式（１）で表される化合物又はその塩を有効成分として含有するエンドセリン作用抑制剤。

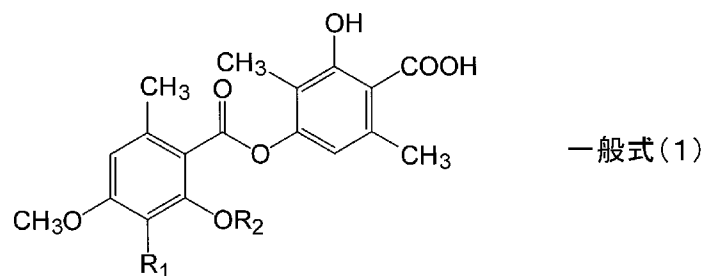
[化1]



（式中、 R_1 はホルミル基又は炭素数１～４のアルキル基を表す。 R_2 は水素原子又は炭素数１～４のアルキル基を表す。）

[請求項2] 下記一般式（１）で表される化合物又はその塩を有効成分として含有する美白剤。

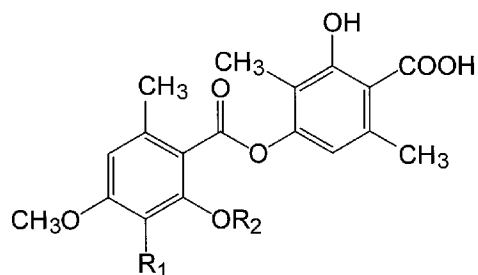
[化2]



（式中、 R_1 はホルミル基又は炭素数１～４のアルキル基を表す。 R_2 は水素原子又は炭素数１～４のアルキル基を表す。）

[請求項3] 下記一般式（１）で表される化合物又はその塩を皮膚に適用することを含む、エンドセリン作用を抑制する方法。

[化3]

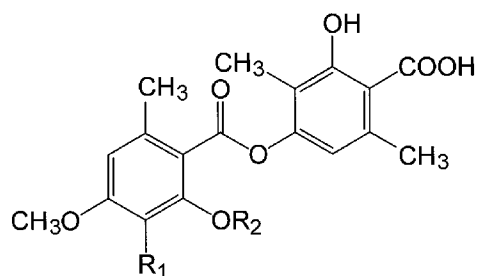


一般式(1)

(式中、R₁はホルミル基又は炭素数1～4のアルキル基を表す。R₂は水素原子又は炭素数1～4のアルキル基を表す。)

[請求項4] 下記一般式（１）で表される化合物又はその塩を皮膚に適用することを含む、美白方法。

[化4]

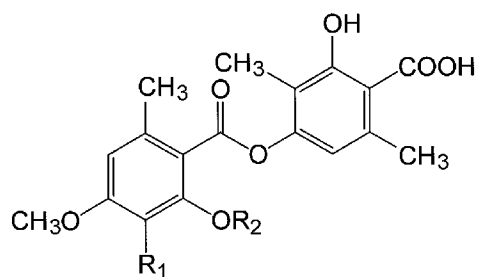


一般式(1)

(式中、R₁はホルミル基又は炭素数1～4のアルキル基を表す。R₂は水素原子又は炭素数1～4のアルキル基を表す。)

[請求項5] エンドセリン作用抑制効果を有する医薬品の製造のために用いられる、下記一般式（1）で表される化合物又はその塩の用途。

[化5]



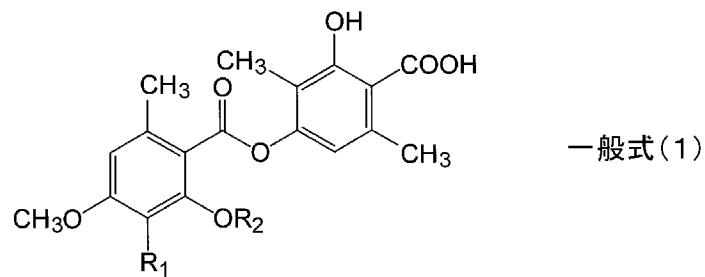
一般式(1)

(式中、 R_1 はホルミル基又は炭素数1～4のアルキル基を表す。 R

₂は水素原子又は炭素数 1 ～ 4 のアルキル基を表す。)

[請求項6] 美白効果を有する医薬品の製造のために用いられる、下記一般式 (1) で表される化合物又はその塩の用途。

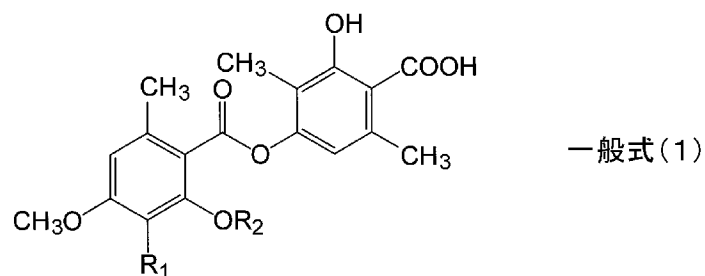
[化6]



(式中、 R_1 はホルミル基又は炭素数 1 ～ 4 のアルキル基を表す。 R_2 は水素原子又は炭素数 1 ～ 4 のアルキル基を表す。)

[請求項7] エンドセリン作用の抑制において使用するための下記一般式 (1) で表される化合物又はその塩。

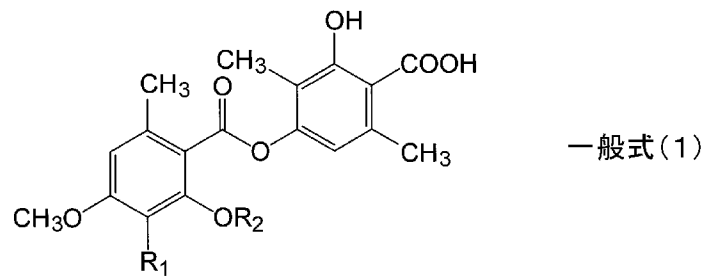
[化7]



(式中、 R_1 はホルミル基又は炭素数 1 ～ 4 のアルキル基を表す。 R_2 は水素原子又は炭素数 1 ～ 4 のアルキル基を表す。)

[請求項8] 美白において使用するための下記一般式 (1) で表される化合物又はその塩。

[化8]



(式中、 R_1 はホルミル基又は炭素数1～4のアルキル基を表す。 R_2 は水素原子又は炭素数1～4のアルキル基を表す。)

[請求項9] ムシゴケを、アルコールを60 v / v %以上含有するアルコール溶液、環状エーテル類及び酸素原子を2個以上有するエーテル類、並びに総炭素数3～6のエステル類からなる群より選ばれる少なくとも1種の溶媒を用いて抽出する工程を含むベオミセス酸高含有ムシゴケ抽出物の製造方法。

[請求項10] 前記抽出工程により得られた抽出物のベオミセス酸濃度が、濃度50 v / v %アルコール溶液を用いて抽出した抽出物中のベオミセス酸濃度と比べて2倍以上であることを特徴とする、請求項9記載の製造方法。

[請求項11] 前記アルコールが、総炭素数1～4のアルコールであることを特徴とする、請求項9又は10記載の製造方法。

[請求項12] 前記エーテル類が、テトラヒドロフラン、ジオキサン、ポリエチレングリコール、及びポリオキシエチレンメチルグルコシドからなる群より選ばれることを特徴とする、請求項9又は10記載の製造方法。

[請求項13] 前記エステルが酢酸エチルであることを特徴とする、請求項9又は10記載の製造方法。

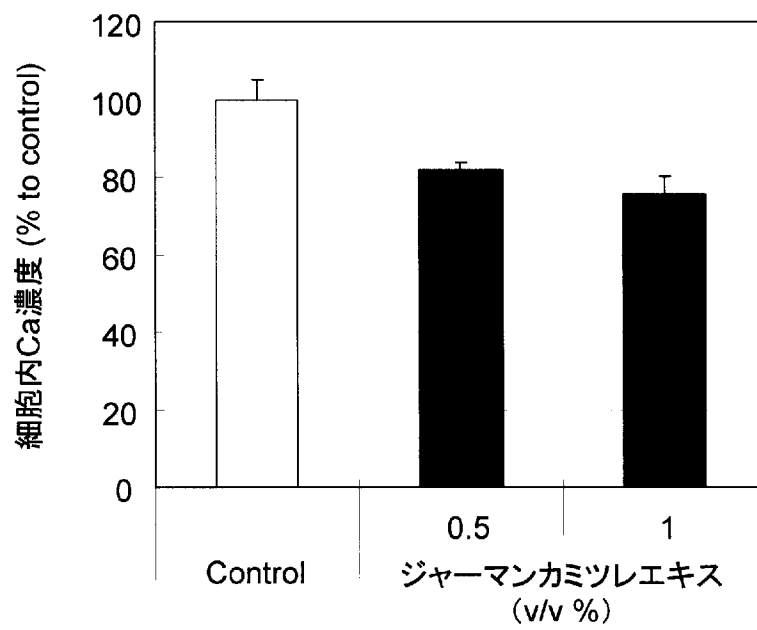
[請求項14] 前記溶媒が、総炭素数3～6のエステル類とアルコール溶液との混合溶媒であることを特徴とする、請求項9又は10記載の製造方法。

[請求項15] 請求項9～14のいずれか1項記載の製造方法により得られたベオミセス酸高含有ムシゴケ抽出物を有効成分として含有するエンドセリ

ン作用抑制剤。

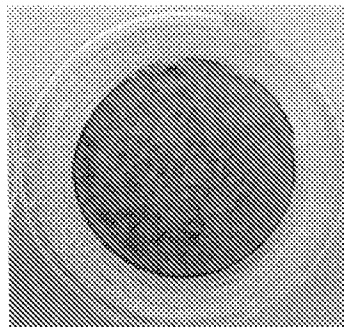
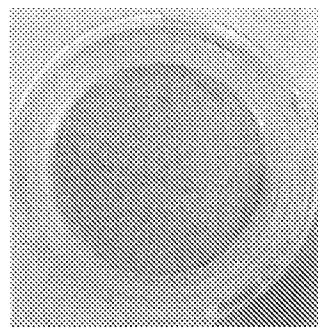
[請求項16] 請求項9～14のいずれか1項記載の製造方法により得られたベオミセス酸高含有ムシゴケ抽出物を有効成分として含有する美白剤。

[図1]

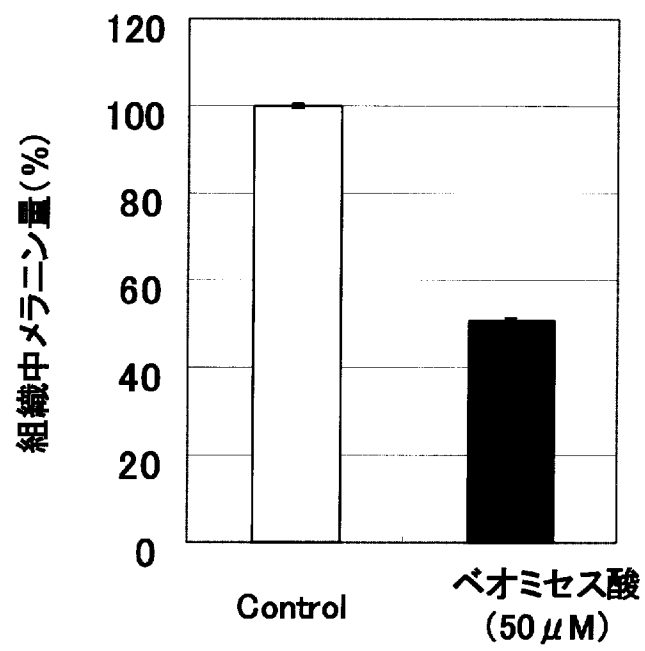


[図2]

Control

ベオミセス酸
(50uM)

[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/077060

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/216(2006.01)i, A61K8/37(2006.01)i, A61Q19/02(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K31/216, A61K8/37, A61Q19/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2012

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN) ,

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	JP 2012-6853 A (Kansai University), 12 January 2012 (12.01.2012), claims; examples (Family: none)	1-2, 5-8
X	JP 2-223517 A (Kao Corp.), 05 September 1990 (05.09.1990), page 2, upper right column, lines 2 to 10 (Family: none)	7-8
X	JP 7-69882 A (Nippon Paint Co., Ltd.), 14 March 1995 (14.03.1995), examples (Family: none)	7-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
30 January, 2012 (30.01.12)Date of mailing of the international search report
14 February, 2012 (14.02.12)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/077060

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Nobuo KAWAHARA et al., "Yukicha-chu no Seibun ni Tsuite", Abstracts of Annual Meeting of Pharmaceutical Society of Japan, 2005, 125, 3, 159	7-8 1-2, 5-6
X Y	JP 2006-182731 A (Ichimaru Pharcos Co., Ltd.), 13 July 2006 (13.07.2006), claims; test 2; prescription example 2 (Family: none)	9-16 1-2, 5-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/077060

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 3-4
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 3 to 4 involve methods for treatment of the human body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K31/216(2006.01)i, A61K8/37(2006.01)i, A61Q19/02(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K31/216, A61K8/37, A61Q19/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 2 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 2 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 2 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTplus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
P X	JP 2012-6853 A (学校法人関西大学) 2012.01.12, 特許請求の範囲, 実施例 (ファミリーなし)	1-2, 5-8
X	JP 2-223517 A (花王株式会社) 1990.09.05, 2 頁右上欄 2 行 ~ 1 0 行 (ファミリーなし)	7-8
X	JP 7-69882 A (日本ペイント株式会社) 1995.03.14, 実施例 (ファミリーなし)	7-8

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

3 0 . 0 1 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

1 4 . 0 2 . 2 0 1 2

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

福 井 悟

4 C

9 1 6 0

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 1

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	川原信夫等, 雪茶中の成分について, 日本薬学会年会要旨集, 2005, 125, 3, 159	7-8 1-2, 5-6
X Y	JP 2006-182731 A (一丸ファルコス株式会社) 2006.07.13, 特許請求の範囲, 試験2, 処方例2 (ファミリーなし)	9-16 1-2, 5-6

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求項 3 - 4 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項 3 - 4 は、治療による人体の処置方法を含むものである。
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であって P C T 規則 6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。