

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5642353号
(P5642353)

(45) 発行日 平成26年12月17日(2014.12.17)

(24) 登録日 平成26年11月7日(2014.11.7)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 K 36/18 (2006.01)

A 6 1 K 35/78

C

A 6 1 K 8/97 (2006.01)

A 6 1 K 8/97

A 6 1 K 8/49 (2006.01)

A 6 1 K 8/49

A 6 1 P 17/16 (2006.01)

A 6 1 P 17/16

A 6 1 Q 19/02 (2006.01)

A 6 1 Q 19/02

請求項の数 20 外国語出願 (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2009-58381 (P2009-58381)
 (22) 出願日 平成21年3月11日(2009.3.11)
 (65) 公開番号 特開2009-221200 (P2009-221200A)
 (43) 公開日 平成21年10月1日(2009.10.1)
 審査請求日 平成24年3月7日(2012.3.7)
 (31) 優先権主張番号 0851642
 (32) 優先日 平成20年3月13日(2008.3.13)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(73) 特許権者 508066212
 エル、ベ、エム、アッシュ、ルシエルシュ
 L V M H RECHERCHE
 フランス国サン、ジャン、ド、ブライエ、
 アブニュ、ド、ベルデュン、185
 (74) 代理人 100075812
 弁理士 吉武 賢次
 (74) 代理人 100091487
 弁理士 中村 行孝
 (74) 代理人 100094640
 弁理士 紺野 昭男
 (74) 代理人 100107342
 弁理士 横田 修孝
 (74) 代理人 100111730
 弁理士 伊藤 武泰

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ブラソカトレア・マーセラ・コス (Brassocattleya marcella Koss) のラン抽出物および皮膚脱色素剤としてのその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ブラソカトレア・マーセラ・コス(Brassocattleya marcella Koss)品種の茎と葉の混合物を、極性溶媒または極性溶媒の混合物により抽出することによって得られる、ブラソカトレア・マーセラ・コスのラン抽出物。

【請求項 2】

極性溶媒が、水、C₁ - C₄ アルコール、グリコール、および、それらの混合物から選択される、請求項 1 に記載の抽出物。

【請求項 3】

C₁ - C₄ アルコールがエタノールである、請求項 2 に記載の抽出物。

【請求項 4】

グリコールが、エチレングリコール、グリセロール、ブチレングリコールおよびプロピレングリコールの中から選択される、請求項 2 に記載の抽出物。

【請求項 5】

極性溶媒が、水 - アルコール混合物である、請求項 2 に記載の抽出物。

【請求項 6】

水 - アルコール混合物が、水 - エタノール混合物である、請求項 5 に記載の抽出物。

【請求項 7】

水 - エタノール混合物が、50 - 50 (v/v) の比の水 - エタノール混合物である、請求項 6 に記載の抽出物。

10

20

【請求項 8】

活性薬剤として、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の抽出物と、少なくとも 1 種類の化粧上許容可能な賦形剤とを含んでなる、化粧組成物。

【請求項 9】

抽出物が、組成物の 0 . 0 0 1 ~ 5 重量 % の範囲の比率で含まれる、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

抽出物が、組成物の 0 . 1 ~ 1 重量 % の範囲の比率で含まれる、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 11】

ボルジンまたはジアセチルボルジンから選択される、少なくとも 1 種類の他の活性薬剤をさらに含む、請求項 8 ~ 10 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 12】

化粧組成物におけるまたは化粧組成物の調製における、活性な皮膚脱色素剤としての、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の抽出物の使用。

【請求項 13】

抽出物が請求項 8 ~ 11 のいずれか一項に記載の化粧組成物に組込まれている、請求項 12 に記載の使用。

【請求項 14】

化粧組成物が、皮膚の色素斑点または色素過剰となった皮膚部分の着色を修正しまたは弱め、白斑 (leukoderma) によって生じた脱色素部分の端を弱め、前記皮膚着色の均質性を向上させ、または肌色を明るくすることを目的とする、請求項 12 または 13 に記載の使用。

【請求項 15】

皮膚の色素斑点または色素過剰となった皮膚部分の着色が、様々な皮膚のしみを含むものである、請求項 14 に記載の使用。

【請求項 16】

身体または顔の皮膚の少なくとも 1 箇所の色素過剰となった部分に、請求項 8 ~ 11 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 種類の化粧組成物の有効量を適用して、皮膚の色素斑点または色素過剰となった部分の着色を修正しまたは弱め、白斑 (leukoderma) によって生じた脱色素部分の端を弱め、または前記皮膚部分の色素沈着を均質化しまたは肌色を明るくすることを含んでなる、化粧ケアの方法 (但し、ヒトの医療行為のための方法を除く)。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の抽出物からなる、活性な皮膚脱色素剤。

【請求項 18】

請求項 17 に記載の活性な皮膚脱色素剤を含んでなる、請求項 8 ~ 11 のいずれか一項に記載の化粧組成物。

【請求項 19】

皮膚の色素斑点または色素過剰となった皮膚部分の着色を修正しまたは弱め、白斑 (leukoderma) によって生じた脱色素部分の端を弱め、前記皮膚着色の均質性を向上させ、または肌色を明るくすることを目的とする、請求項 18 に記載の化粧組成物。

【請求項 20】

皮膚の色素斑点または色素過剰となった皮膚部分の着色が、様々な皮膚のしみを含むものである、請求項 19 に記載の化粧組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ブラソカトレア・マーセラ・コス (Brassocattleya marcella Koss) 品種のランの抽出物、並びに皮膚を脱色素する、特に肌色を明るくしまたは皮膚の血色の均一性を

10

20

30

40

50

改善し、または皮膚の斑点または皮膚の色素過剰となった部分を修正しまたは弱めることを目的とする化粧組成物のような組成物におけるその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

ヒトでは、色素沈着は、皮膚、毛胞または毛髪におけるメラニン色素の合成および分布によって生じる。これは、多数の内部または外部要因によって調節される。

【0003】

皮膚の色素過剰(hyperpigmentation)は、身体の様々な部分における皮膚断片、特にヒトにおける手の甲、顔、襟足または頭部における褐色または着色斑点の出現によって示されるよく見られる疾患である。

10

【0004】

紫外線への暴露のような外部要因、または老化または突然のホルモン変化のような自然状況は、これらの皮膚の色素沈着欠陥を引き起こすことができる。

【0005】

従って、これらの斑点の出現に対処するには、これらの不快な徴候を弱めることができる手段による色素沈着の制御が、化粧品、特に皮膚化粧品の分野での重要な努力目標である。

【0006】

色素沈着した斑点の修正は、液体窒素の塗布(寒冷療法)またはレーザーの使用のような手法であって、常に満足のいくものとは限らない手法、または脱色素物質の使用を伴う可能性がある。

20

【0007】

従って、これらの脱色素物質および手法は、特に

美的または化粧目的で、皮膚の色の均一性を改善しまたは肌色を明るくすることを目的とする組成物に、

皮膚の色素斑点、特に様々な皮膚のしみ、特に光皮膚症(photodermatoses)の皮膚への影響、接触皮膚症または薬剤によって誘発される光皮膚症、黒皮症、角化症、例えば、老人性または光線性角化症、老人性黒子(老人斑点)、光線性黒子、日焼けまたは他の皮膚損傷のような火傷の長続きする影響、または癬痕、アレルギーまたは光毒性反応による斑点、皮膚炎または他の類似の小さな色素沈着した損傷からなるものを修正しまたは弱め、または白斑(vitiligo)のようなある種の白斑(leukoderma)によって引き起こされる脱色素した部分の端を修正しまたは弱める目的で用いられる。

30

【0008】

知られている脱色素物質は、詳細にはヒドロキノンおよびその誘導体、アスコルビン酸およびその誘導体、胎盤エキス、コウジ酸、アルブチン、イミノフェノール(WO 99/22707号)、カルニチンとキノンとの配合物(ドイツ国特許第9806947号)、アミノフェノールアミド誘導体(フランス国特許第2 772 607号明細書)、およびベンゾチアゾール(WO 99/24035号)である。これらの物質は、不安定であり、高濃度での使用が必要であり、それらの作用様式に関して特異性を欠いており、または細胞毒性または刺激活性を有するといったある種の欠点を有することがある。

40

【0009】

従って、新たな有効で毒性のない脱色素物質の探求が、化粧品に求められている。

【0010】

850の属に分布している25,000種を包含するオルキダセアエ(Orchidaceae)科のランは、それらの抽出物の化粧特性について最も広く研究されている植物である。

【0011】

例えば、特開2004-067549号公報には、カトレア(Cattleya)およびブラソカトレア(Brassocattleya)属のランの化粧組成物における漂白脱色素剤としての使用が開示されている。

【0012】

50

2種類の天然ランの属であるブラサボラ(Brassavola)属とカトレア(Cattleya)属を交雑すると、亜属である「ブラソカトレア(Brassocattleya)」の植物が生じる。これらの中で、ブラソカトレア・マーセラ・コス(Brassocattleya marcella Koss)品種であってピンク・マーヴェル(Pink marvel)(商標)と呼ばれるランは、その花の美しさと色について以前から知られており、その装飾品質を目的として栽培されている。化粧品目的でのこの属の特性は、研究では特に評価されてはいない。

【発明の概要】

【0013】

しかしながら、本発明者らはその研究において、ブラソカトレア・マーセラ・コス(Brassocattleya marcella Koss)品種のラン抽出物が、

10

- 初期段階では、遺伝子の生成物がメラニンの合成およびメラノソームの形成に關与している遺伝子のレベルで、

- 後期段階では、遺伝子の生成物がメラノソームのケラチノサイトへの輸送に關与している遺伝子について

の2つのレベルでメラニン産生に重要な遺伝子の発現を阻害することができることを研究において明らかにした。

【0014】

この二重機構により皮膚色素の合成を特に効果的に阻害することができ、この阻害は皮膚の色素沈着の欠損を弱めまたは肌色を明るくするための化粧組成物のような組成物における活性剤として特に有益な活性を誘発する。

20

【0015】

本発明によって特許請求される第一の目的は、ブラソカトレア・マーセラ・コス(Brassocattleya marcella Koss)品種の少なくとも一部を、極性溶媒または極性溶媒の混合物により抽出することによって得られるラン抽出物である。

【発明の具体的説明】

【0016】

本発明による抽出物を得る植物材料としては、全植物または植物の一部を挙げることができ、特に葉、花、茎、根、果実、または植物のこれらの様々な部分によって形成される混合物を含むことができる。

【0017】

30

好ましくは、本発明のランの部分は、ブラソカトレア・マーセラ・コス(Brassocattleya marcella Koss)ランの茎または葉から選択される。更に好ましくは、本発明のランの部分は、ブラソカトレア・マーセラ・コス(Brassocattleya marcella Koss)ランの茎と葉との混合物である。

【0018】

植物または選択された植物の部分は、場合によっては乾燥しおよび/または粉碎することができる。

【0019】

本発明の好ましい態様によれば、植物材料は乾燥して粉碎した状態である。

【0020】

40

植物抽出物は、当業者に知られている様々な抽出方法によって調製することができる。

【0021】

好都合には、抽出は、選択した植物材料を極性溶媒または極性溶媒の混合物と接触させることによって行われる。本発明によれば、「極性溶媒」という用語は溶媒の極性指数値が4以上の値であることを意味する。極性指数は、分子が多少極性を示す(溶解度および状態の変化の)熱力学的量に基づいて計算される量である。溶媒の極性指数については、L.R. SNYDERの文献「一般の液体の溶媒特性の分類」; Journal of Chromatography, 92(1974), 223-230を参照することができ、上記文献の内容は、その開示の一部として本明細書に引用されている。

【0022】

50

極性溶媒は、好都合には水、エタノールのような $C_1 - C_4$ アルコール、エチレングリコール、グリセロール、ブチレングリコールおよびプロピレングリコールのようなグリコール類、およびそれらの混合物から選択される。

【0023】

本発明の好ましい方法によれば、抽出は、水 - アルコール混合物、特に水 - エタノール混合物、好ましくは水 - エタノールの混合物であって、好都合には50 - 50 (v/v)の比のものをを用いることによって行われる。

【0024】

本発明のもう一つの変化態様によれば、抽出は、半結晶状の極性溶媒で行う方法によって行うこともでき、上記溶媒は好都合には半結晶状の水である。

10

【0025】

抽出は、場合によっては部分的にまたは完全に脱色しまたは精製することを目的とする抽出物の処理からなる追加段階を含むこともある。

【0026】

抽出は、抽出溶媒を部分的にまたは完全に除去する段階によって完了することができる。

【0027】

抽出溶媒を部分的に除去する場合には、抽出物は、通常は有意な量の有機溶媒を含まない水性濃度が得られるまで濃縮される。これらの溶媒を完全に除去する場合には、乾燥残渣が得られる。

20

【0028】

あるいは、抽出段階の生成物を凍結乾燥または噴霧し、粉末の形態とすることができる。

【0029】

粉末は、本発明による化粧組成物のような組成物にそのまま用いることができ、または溶媒または溶媒混合物に分散させることができる。

【0030】

一般に、抽出段階の生成物は、溶媒または溶媒の混合物に溶解または分散させ、本発明の組成物における活性薬剤として用いることができる。

【0031】

30

抽出物を溶解または分散させる溶媒または溶媒の混合物は、抽出に用いたものと同一であってもまたは異なるものであってもよい。

【0032】

本発明の抽出物は、ナイロン粉末、多孔性または非多孔性粉末、および雲母または任意の層状無機物質から好都合に選択される支持体上に吸着させることもできる。

【0033】

この場合には、用いられる抽出物は好ましくはブチレングリコールの抽出物または水性抽出物である。

【0034】

本発明によって特許請求される第二の主題は、活性薬剤として上記で定義したようなブラソカトレア・マーセラ・コス(*Brassocattleya marcella* Koss)品種の抽出物、および化粧上許容可能な賦形剤のような少なくとも1種類の賦形剤を含んでなる組成物、好都合には化粧組成物である。

40

【0035】

上記組成物は、所望な効果を得るため本発明によるラン抽出物の有効量を含む。

【0036】

本発明によるラン抽出物は、組成物の0.001 ~ 5重量%、好ましくは組成物の0.1 ~ 1重量%の範囲の比率で組成物に活性薬剤として好都合に含まれる。

【0037】

本発明による組成物は、好都合には局所使用を目的とするものである。

50

【 0 0 3 8 】

本発明による組成物は、例えば血清、ローション、スプレー、フォーム、溶液、粉末、ボマード、ミルク、エマルジョン、ティンテド・クリームまたはヒドロゲル、好ましくはパックであってもよく、またはスティックまたはパッチの形態であってもよい。

【 0 0 3 9 】

本発明によるラン抽出物を含む組成物は、好都合には化粧上許容可能な少なくとも1種類の他の活性薬剤を好都合に含む。

【 0 0 4 0 】

従って、本発明によるラン抽出物を含む組成物は、脱色素活性または皮膚明化活性を有する物質、重量減損活性を有する物質、水和活性を有する物質、鎮静、慰撫または弛緩活性を有する物質、特に顔の肌色の明るさを改善するための皮膚微小循環刺激活性を有する物質、油性皮膚のケアのための皮脂調節活性を有する物質、皮膚を清掃または浄化を目的とする物質、ラジカル防止活性を有する物質、皮膚老化の影響、特に皮膚構造の保持を促進しおよび/または真皮および表皮の表面層の細胞外マトリックスの崩壊を制限しおよび/または皮膚保護、矯正または再構築効果を得ることを目的とする活性によって皺の形成を弱めまたは遅らせることを目的とする物質、および抗炎症活性を有する物質から選択することができる1種類以上の多の活性薬剤を含むこともできる。

【 0 0 4 1 】

本発明のラン抽出物と、

- 細胞再生を促進する精製分子または抽出物、例えば、ビタミンA、レチノールまたはレチノールエステル；果実の酸、リンゴ酸、グリコール酸、クエン酸または乳酸のような または - ヒドロキシ酸（AHA）、サリチル酸またはそのエステル、ゲンチシン酸またはそのエステル、特にゲンチシン酸トコフェロール、

- エクジステロイド、エクジステロン、トルケステロンまたはカルシウム誘導体、またはビタミンD前駆体のような表皮分化を調節する、精製分子または抽出物、

- 化粧品に典型的に用いられるハメリス抽出物またはマッシュルーム抽出物のような毛穴を収縮させる、精製分子または収斂性抽出物、

- ベンゾフェノン - 4ブチルメトキシジベンゾイルメタン、メトキシ桂皮酸エチルヘキシル、オクトクリレン、サリチル酸エチルヘキシル、フェニルベンズイミダゾールスルホン酸、ホモサレートのような、単独でまたは酸化チタンと組み合わせたまたは組み合わせていない、抗UV AおよびUV B放射線フィルター、

- コウジ酸B、カンゾウの根の抽出物、アルブチン、パンテテインスルホン酸カルシウム、ボルジン、ジアセチルボルジン、ビタミンCの安定な誘導体、ユリ抽出物、特にリリウム・カンディドゥム（*Lilium candidum*）、および特に球根抽出物、大豆抽出物のような色素沈着に作用する、精製分子または抽出物、

- 抗ラジカルまたは抗炎症性分子、カワラヨモギ（*Artemisia capillaries*）の抽出物、ワレモコウ（*Sanguisorba officinalis*）の抽出物、レスベラトロールおよびその誘導体、エルゴチオネインおよびその誘導体、チオタウリン、ブドウ種子ポリフェノールのような、精製分子またはラジカル防止抽出物、

- 表皮および真皮レベルでのヒアルロン酸合成を促進し、十分に水和して一層滑らかな皮膚を生じる分子または抽出物、特にビワ（*Eriobotrya japonica*）の抽出物、またはヒアルロン酸の小断片

から選択される活性薬剤と組み合わせるのが特に好ましい。

【 0 0 4 2 】

本発明の好ましい態様によれば、組成物は、本発明によるラン抽出物の他に、好ましくはボルジンまたはその化粧上許容可能な誘導体の1つ、特にジアセチルボルジン、および/またはリリウム・カンディドゥム（*Lilium candidum*）球根抽出物、および/またはアデノシンのなどの群から選択される少なくとも1種類の他の活性薬剤を含む。

【 0 0 4 3 】

好ましくは、組成物は、本発明によるラン抽出物の他に、ボルジン（boldine）を含む

10

20

30

40

50

。

【 0 0 4 4 】

好ましくは、組成物は、本発明によるラン抽出物の他に、ジアセチルボルジンのようなボルジン誘導体を含む。

【 0 0 4 5 】

好ましくは、組成物は、本発明によるラン抽出物の他に、ボルジンまたはジアセチルボルジン、並びにリリウム・カンディドゥム(Lilium candidum)球根抽出物を含む。これら3種類の化合物の混合物は、好都合には総組成物の0.5～10重量%、更に好都合には2～5重量%の比率で用いられる。

【 0 0 4 6 】

好ましくは、組成物は、上記の3種類の化合物の他に、アデノシンを含む。これら4種類の化合物の混合物は、好都合には総組成物の0.5～10重量%、更に好都合には2～5重量%の比率で用いられる。

【 0 0 4 7 】

特に好ましい組成物は、組成物の0.3～4重量%の比率で含まれている本発明によるラン抽出物と組成物の0.2～6重量%の比率のボルジンまたはジアセチルボルジンを組み合わせたものである。

【 0 0 4 8 】

好都合には、ランおよびボルジンまたはジアセチルボルジン混合物は、最終組成物の0.5～10重量%の比率で、好ましくは2～5重量%の比率で用いられる。

【 0 0 4 9 】

本発明による組成物は、好都合には少なくとも1種類の化粧上許容可能な賦形剤を含み、この賦形剤は、ポリマー、界面活性剤、レオロジー調節剤、芳香剤、電解質、pH調節剤、酸化防止剤、防腐剤、染料、真珠母貝、色素、およびそれらの混合物から好都合に選択される。

【 0 0 5 0 】

本発明によって特許請求される第三の主題は、上記ラン抽出物の、好都合には化粧組成物における、活性な皮膚脱色素剤としての使用である。

【 0 0 5 1 】

本発明は、活性脱色素剤のような化粧組成物を調製する目的で上記したラン抽出物の使用にも関する。

【 0 0 5 2 】

この抽出物は、特に上記したような化粧組成物における活性薬剤として用いられる。

【 0 0 5 3 】

実施例3～6のような下記の実施例は、皮膚色素沈着の均質化に用いるように特にデザインされた処方物を提供する。

【 0 0 5 4 】

具体的態様では、本発明は、上記のブラソカトレア・マーセラ・コス(Brassocattleya marcella Koss)品種のランの抽出物の化粧組成物または化粧組成物の調製における使用に関し、上記組成物は、皮膚の斑点または色素過剰となった皮膚部分を修正しまたは弱め、白斑(leukoderma)によって引き起こされる脱色素した部分の端を弱め、皮膚の色の均一性を改善し、または肌色を明るくすることを目的とする。

【 0 0 5 5 】

本発明の特徴によれば、この抽出物は、皮膚の色素斑点または色素過剰となった皮膚部分の着色、特に様々な皮膚のしみなどのもの、特に

- 光皮膚症(photodermatoses)の皮膚への影響、
- 接触皮膚症または薬剤によって誘発される光皮膚症、黒皮症、角化症、例えば、老人性または光線性角化症、
- 老人性黒子(老人斑点)、光線性黒子、
- 損傷または火傷から生じる色素斑点、または

10

20

30

40

50

- アレルギーまたは光毒性反応によって引き起こされる色素斑点を修正または弱める目的で化粧組成物に用いることができる。

【0056】

本発明のもう一つの特徴によれば、抽出物は、白斑(vitiligo)のようなある種の白斑(leukoderma)によって引き起こされる脱色素した部分の端または周縁部を修正または弱める目的で化粧組成物に好都合に用いることができる。

【0057】

本発明によって特許請求される第四の主題は、本発明による抽出物を用い、化粧活性薬剤としてのブラソカトレア・マーセラ・コス(*Brassocattleya marcella* Koss)品種のランの抽出物を含む上記で定義した少なくとも1種類の化粧組成物の有効量を適用して、皮膚の色素斑点または色素過剰となった部分の着色を修正または弱め、白斑(leukoderma)によって生じた脱色素部分の端を弱め、または上記皮膚部分の色素沈着を均質化または肌色を明るくするための皮膚の化粧ケアの方法である。

【実施例】

【0058】

下記の実施例は、本発明を例示するものであり、その範囲を制限するものではない。

【0059】

実施例1：ブラソカトレア・マーセラ・コス(*Brassocattleya marcella* Koss)ラン抽出物の調製

【0060】

抽出物1：

50重量%のブチレングリコールによる茎および葉の抽出物を、24時間浸軟によって調製した後、濾過し、18時間冷却した後、濾過する。

濾液を集めて、その脱色素活性について試験している。

【0061】

抽出物2：

新鮮な茎および葉50gを、50/50の比率のブチレングリコール-水混合物中で室温にて緩やかに攪拌しながら48時間浸軟する。

混合物を濾過し、濾液を回収して、4に24時間保持する。

濾液を回収して、その脱色素活性について試験している。

【0062】

抽出物3：

抽出物を、好ましくはエタノール/水(70/30, v/v)からなる水-アルコール混合物によって茎と花の若枝から調製する。

濾過後に得られた溶液をロータリーエバポレーターで最初の容積の20%まで濃縮した後、再度濾過する。

得られた溶液を、実施例3による化粧組成物のような本発明による組成物に用いることができる。

【0063】

抽出物4：

ブラソカトレア・マーセラ(*Brassocattleya Marcella*)の葉および茎からなる植物材料を、水/エタノール(95/5, v/v)混合物によって20分間熱抽出した後、放冷する。

溶液を濾過した後、凍結乾燥する。得られた凍結乾燥物をブチレングリコールに入れ、1%乾燥重量で滴定する。

この抽出物を、実施例4および5による化粧組成物のような本発明による組成物に用いることができる。

【0064】

実施例2：正常なヒトメラニン細胞培養物に対するブラソカトレア・マーセラ・コス(*Brassocattleya marcella* Koss)抽出物の活性の測定

【 0 0 6 5 】

細胞培養

正常なヒトメラニン細胞 (N H M) は、健康な皮膚から成形手術によって得られた。

メラニン細胞を、Invitrogen製増殖培地、すなわちウシ下垂体抽出物 $50 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、E G F $5 \text{ ng} / \text{ml}$ 、および P d B u (フォルボール 1 2 , 1 3 - ジブチレート , Sigm a) $0.25 \mu\text{g} / \text{ml}$ を含む E 1 9 9 を補足した 9 0 % K - S F M 中に 10^6 個の細胞 / フラスコの量で 75 cm^2 フラスコに播種する。

【 0 0 6 6 】

コンフルエンスに到達したとき、N H M をリン酸緩衝食塩水 (P B S) で 3 回洗浄し、トリプシン化し、播種した後、直径が 1 0 0 mm のペトリ皿でコンフルエンスに達するまでインキュベーションする。

10

【 0 0 6 7 】

本発明の抽出物による処理

細胞を、

1 % (v / v) のブラソカトレア・マーセラ・コス (Brassocattleya marcella Koss) 抽出物 (実施例 1 の抽出物 1)、

1 % (v / v) の溶媒 (ブチレングリコール) = コントロール
の別々の条件下で 4 または 2 4 時間処理した。P D B u (フォルボール 1 2 , 1 3 - ジブチレート) を含まない増殖培地で 4 または 2 4 時間培養した後、総 R N A を抽出する。

【 0 0 6 8 】

20

試験した抽出物が、M T T 試験により用いた用量では非細胞傷害性であることは以前に明らかにされていた。

【 0 0 6 9 】

総 R N A の抽出

インキュベーションの後、培地を除去し、次いで、細胞を最初に洗浄することなく氷ベッドに入れる。

【 0 0 7 0 】

ドラフト (chemical hood) の下、細胞を機械的に分離し、R N A p l u s (QBiogene) 1 ml でリーシした後、あらゆるものをエッペンドルフ試験管に集める。

【 0 0 7 1 】

30

この後、総 R N A を、バイオアナライザーと RNA 6000 NanoLabChip キット (Agilent) を用いて分析する。

【 0 0 7 2 】

次いで、総 R N A について、Applied Biosystem High Capacity cDNA アーカイブ・キットを用いて逆転写段階を行い、相補性 D N A を得た。

【 0 0 7 3 】

目的とする潜在遺伝子に対する効果を、マルチ・ターゲット P C R を行う T a q m a n 低密度アレイ法 (Applied Biosystems の T L D A) を用いて測定することによって、複数の遺伝子について遺伝子発現の変化を定量的に測定することができる (更に詳細については、L.V. Abruzzo et al., Biotechniques, 2005, 38, 785-792 を参照されたい) 。

40

【 0 0 7 4 】

c D N A のそれぞれの $50 \mu\text{l}$ を「ユニバーサル・マスター・ミックス (Universal Master Mixt) 」緩衝液 $50 \mu\text{l}$ と混合し、得られた $100 \mu\text{l}$ をマイクロフルイディック・カード型 D N A チップに沈着させる。

【 0 0 7 5 】

これを 1200 g で連続して 2 回遠心分離した後、c D N A 沈着ラインを切断し、TLDA HT 7900 装置 (Applied Biosystems) に導入して、P C R を行う。

【 0 0 7 6 】

本発明者らは、このようにして N H M 遺伝子発現プロファイル並びに処理の影響下でのその可能な変化にアクセスできた。

50

【 0 0 7 7 】

結果

N H M 培養物を 1 % (v / v) ブラソカトレア・マーセラ・コス (*Brassicacattleya marcella* Koss) 抽出物 (実施例 1 の抽出物 1) によって 4 時間処理した後の分析 :

【 0 0 7 8 】

ブラソカトレア・マーセラ・コス (*Brassicacattleya marcella* Koss) 抽出物は、下記のイン・ビトロ効果を有していた :

- トランス・ゴルジ・ネットワーク (T G N) からメラノソームへの T R P (チロシン関連タンパク質) の導入に關与する A P 3 B 2 遺伝子 (アダプター関連タンパク質複合体 3 , - 2 サブユニット) の活性の減少 (この輸送段階は、メラノソームにおける T R P の活性化および放出に本質的である (*Pigment Cell Res* 13: 222-29, 2000 参照)) ;

10

- メラノソームの形成および輸送に關与するプロテイン G に結合した受容体をコードする G P R 1 4 3 遺伝子 (G タンパク質結合受容体 1 4 3) の活性の減少 (*Pigment Cell Res* 18: 227-233, 2005 参照) ;

- メラノソームの輸送にも關与する S N A R E タンパク質をコードする V A M P 2 遺伝子 (小胞関連膜タンパク質) またはシナプトブレビン 2 の活性の減少 (*Traffic* 7: 69-78, 2006 参照) ;

- メラニン合成の第一期に關与する酵素であるチロシナーゼをコードする T Y R 遺伝子の活性の減少 (*Physiol Rev* 84: 1155-1228, 2004 参照) ;

20

プロ色素沈着 M S H (メラニン形成細胞) の作用を調節する M C 1 R 遺伝子の活性の減少 (*Physiol Rev* 84: 1155-1228, 2004 参照) ;

- メラノソームの成熟 (ジヒドロキシインドールカルボン酸のメラニンへの重合) に關与するタンパク質 g p 1 0 0 および P m e 1 1 7、メラノソームの初期マーカーをコードする S I L V 遺伝子の活性の減少 (*Physiol Rev* 84: 1155-1228, 2004 参照) 。

【 0 0 7 9 】

N H M 培養物を 1 % ブラソカトレア・マーセラ・コス (*Brassicacattleya marcella* Koss) 抽出物 (実施例 1 の抽出物 1) によって 2 4 時間処理した後の分析 :

ブラソカトレア・マーセラ・コス (*Brassicacattleya marcella* Koss) 抽出物は、イン・ビトロで下記の効果を有していた :

30

- A P 3 のもう一つのアイソフォームである A P 3 M 2 遺伝子の活性の減少 ;
- M C 1 R 遺伝子の活性の減少 ;
- エキソサイトーシスのための膜融合を解するメラノソームの末梢膜局在化に關与する S N A R E ファミリーのタンパク質をコードするもう一つの遺伝子である S T O M L 2 遺伝子の活性の減少 ; および

- メラノソームのエキソサイトーシスに關与する S N A P 2 3 遺伝子の活性の減少。

【 0 0 8 0 】

S N A P 2 3、S T O M L 2 および V A M P 2 は、メラノソーム膜で相互局在化し、メラノソームと血漿膜の融合に關与している (*Traffic* 7: 769-78, 2006 参照) 。

40

【 0 0 8 1 】

生物活性に対する結論

ブラソカトレア・マーセラ・コス (*Brassicacattleya marcella* Koss) 抽出物は、メラニンの合成およびメラノソームの輸送および移動の両方に作用することによる皮膚色素沈着阻害活性を有していた。

【 0 0 8 2 】

実際に、この実験では、下記の効果が觀察されている :

- メラニン形成 (メラニンの合成、樹状突起におけるメラノソームの形成および輸送) の初期段階に關与する機構に対する 4 時間の作用、

- 色素沈着のその後の段階、特に隣接ケラチン細胞にメラニンを運ぶメラノソームの

50

輸送に対する 24 時間の作用。

【0083】

これらの 2 つの様式の作用は、メラニン合成および移動連鎖中相補性であり、従って、肌色を明るくしおよび / または皮膚の色素沈着欠損と闘うことを目的とする化粧組成物において活性薬剤として用いるための最も興味深い成分である。

【0084】

実施例 3 : 顔のしみ修正用エマルション

実施例 1 (抽出物 3) で調製したブラソカトレア・マーセラ・コス (Brassocattleya marcella Koss) 抽出物、および下記の活性薬剤 (重量 % で表示) を含むエマルションを調製した :

【0085】

【表 1】

ブラソカトレア・マーセラ・コス (Brassocattleya marcella Koss) 抽出物	3 %
ヒマワリ種子抽出物	2 %
ヒアルロン酸	2 %
賦形剤を適量加えて、全量を	100 %とした

【0086】

このクリームは、1 日 2 回局所塗布する。

【0087】

実施例 4 : 光皮膚症の皮膚の結果を修正するためのクリーム

実施例 1 (抽出物 4) で調製したブラソカトレア・マーセラ・コス (Brassocattleya marcella Koss) 抽出物、および下記の活性薬剤 (重量 % で表示) を含むエマルションを調製した :

【0088】

【表 2】

ブラソカトレア・マーセラ・コス (Brassocattleya marcella Koss) 抽出物	2 %	30
ジアセチルボルジン	1 %	
リリウム・カンディドゥム (Lilium candidum)	2 %	
グラブリジン	0.5 %	
アデノシン	0.1 %	
エクジステロン	0.2 %	
乳酸	1 %	
オート麦多糖類	2 %	40
ヒアルロン酸	2 %	
グリシルリチン酸アンモニウム	0.1 %	
アスコルビルグリコシド	2 %	
UVA + UVB フィルター	5 %	
賦形剤を適量加えて、全量を	100 %とした	

【0089】

このクリームを、朝および日光に露出する前に局所塗布する。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 0 】

実施例 5： 色素過剰反応の局所修正用の漿液

実施例 1（抽出物 4）で調製したブラソカトレア・マーセラ・コス（*Brassocattleya marcella* Koss）抽出物、および下記の活性薬剤（重量％で表示）を含む漿液を調製した：

【 0 0 9 1 】

【表 3】

ブラソカトレア・マーセラ・コス（ <i>Brassocattleya marcella</i> Koss）抽出物	2. 5 %	
ボルジン	1 %	
ジアセチルボルジン	2 %	10
エルゴチオネイン	0. 1 %	
クシェノール	0. 2 %	
ゲンチシン酸トコフェロール	0. 5 %	
アルコール	2 %	
乳酸	1. 5 %	
賦形剤を適量加えて、全量を	1 0 0 %とした	20

【 0 0 9 2 】

この漿液を、アプリーケーターを用いて局所塗布し、次いで 5 分後に朝に、実施例 4 によるクリームを塗布する。

【 0 0 9 3 】

夕方に、この漿液を、2 0 分間の間隔で 2 回用いる。

【 0 0 9 4 】

実施例 6： 修正用およびコンシーリングファンデーション

下記の活性薬剤（重量％で表示）を含むエマルションを調製した：

【 0 0 9 5 】

【表 4】

ブラソカトレア・マーセラ・コス（ <i>Brassocattleya marcella</i> Koss）抽出物	1 %	
ジアセチルボルジン	1 %	
アデノシン	1 %	
UVB フィルター	2 %	
二酸化チタン	2 %	
酢酸トコフェロール	0. 5 %	40
着色色素を含む賦形剤を適量加えて、全量を	1 0 0 %とした	

【 0 0 9 6 】

実施例 5 に記載の漿液または実施例 4 に記載のクリームの使用後に、ファンデーションを顔メイクアップとして塗布する。

フロントページの続き

- (72)発明者 ジャン クリストフ、アルシャンボル
フランス国ムン、エス/ロワール、リュ、パベ、ド、バンドーム、10
- (72)発明者 ジャン、ユベール、コシャル
フランス国オルレアン、リュ、シャボン、2ビス
- (72)発明者 クリステル、ラズ
フランス国オルレアン、リュ、オ、リニューオー、23
- (72)発明者 フレデリック、ポンテ
フランス国オルレアン、リュ、テュデル、54

審査官 石井 裕美子

- (56)参考文献 特開2004-067549(JP,A)
特開2004-307352(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 36/00 - 36/9068
A61K 8/00 - 8/99
A61P 17/16
A61Q 19/02
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)