

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5329731号
(P5329731)

(45) 発行日 平成25年10月30日(2013.10.30)

(24) 登録日 平成25年8月2日(2013.8.2)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 36/48 (2006.01)	A 6 1 K 35/78 J
A 6 1 K 36/00 (2006.01)	A 6 1 K 35/78 X
A 6 1 K 38/55 (2006.01)	A 6 1 K 35/78 Y
A 6 1 K 8/97 (2006.01)	A 6 1 K 37/64
A 6 1 K 8/64 (2006.01)	A 6 1 K 8/97

請求項の数 8 (全 24 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2000-611925 (P2000-611925)	(73) 特許権者	501408961
(86) (22) 出願日	平成12年4月18日 (2000.4.18)		ラボラトワール エクспанシアン
(65) 公表番号	特表2002-542199 (P2002-542199A)		フランス国、92400 クルブヴォア、
(43) 公表日	平成14年12月10日 (2002.12.10)		アヴニュー ドゥ ラルシュ 10
(86) 国際出願番号	PCT/FR2000/001007	(74) 代理人	100080791
(87) 国際公開番号	W02000/062789		弁理士 高島 一
(87) 国際公開日	平成12年10月26日 (2000.10.26)	(74) 代理人	100125070
審査請求日	平成19年1月17日 (2007.1.17)		弁理士 土井 京子
(31) 優先権主張番号	99/04875	(74) 代理人	100136629
(32) 優先日	平成11年4月19日 (1999.4.19)		弁理士 鎌田 光宣
(33) 優先権主張国	フランス (FR)	(74) 代理人	100121212
前置審査			弁理士 田村 弥栄子
		(74) 代理人	100122688
			弁理士 山本 健二

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ルビンのペプチド抽出物およびそれを含有する医薬組成物、化粧品組成物または栄養組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ルピナス属植物のペプチド抽出物を含有する、メタロプロテアーゼ阻害剤において、ルピナス属植物のペプチド抽出物が、脂質を含まず、抽出物の乾燥重量あたりのペプチド含有量が50%以上で、糖質含有量が1%未満であり、ペプチドの分子量が10,000ダルトン未満である、メタロプロテアーゼ阻害剤。

【請求項 2】

メタロプロテアーゼが、コラゲナーゼおよびゼラチナーゼから選択される、請求項1に記載のメタロプロテアーゼ阻害剤。

【請求項 3】

(a) ルピナス属植物からタンパク質分画を抽出する工程、(b) タンパク質分画を酵素的に加水分解する工程、(c) ペプチド抽出物を回収する工程を含むメタロプロテアーゼ阻害剤の製造方法であって、工程(a)が、

(i) ルピナス属植物の脂質を含まない荒挽き粉を調製する工程、

(ii) 可溶性のタンパク質およびサッカリド分画を抽出する工程、または等電点により酸で沈殿させる工程を含み、

工程(a)の後、工程(b)の前にタンパク質分画の限外濾過を行う、請求項1または2に記載のメタロプロテアーゼ阻害剤の製造方法。

【請求項 4】

工程(b)の後、加水分解されたペプチド抽出物の限外濾過を行う、請求項3に記載の

製造方法。

【請求項 5】

請求項 1 または 2 に記載のメタロプロテアーゼ阻害剤を含有する、メタロプロテアーゼによるコラーゲン、ゼラチン、フィブロネクチン、ラミニンまたはエラスチンの過剰破壊に関連する皮膚傷害を化粧的に処置するための化粧品組成物。

【請求項 6】

皮膚傷害が、皮膚の内在性老化による皮膚傷害である、請求項 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

皮膚傷害が、太陽放射の作用での老化による皮膚傷害、ならびにタバコ、汚染およびストレスの有害効果による皮膚傷害である、請求項 5 に記載の組成物。

10

【請求項 8】

外部からの局所塗布用である、請求項 5 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、抗メタロプロテアーゼ活性、詳細には抗コラーゲナーゼ活性および抗ゼラチナーゼ活性を有する新規なペプチド抽出物に関する。本発明はまた、このような抽出物を含有する医薬組成物、化粧品組成物または栄養補給組成物 (nutraceutical composition) に関し、より詳細には、関節症、歯周炎もしくは潰瘍などの炎症性疾患を治療することを意図した医薬組成物、あるいは光線性の老化であっても、そうでなくともよい老化または外部からの攻撃 (タバコ、汚染など) によって加速される老化と闘うことを意図した化粧品組成物に関する。

20

【0002】

該医薬組成物、化粧品組成物または栄養補給組成物はまた、病理学的もしくは見苦しい、血管新生 (脈管増殖) (乾癬、腫瘍、全身紅色症 (erythrosis)、紅斑性挫瘡、しゅさ、レタノイン酸 (retanoic acid) などの刺激原による局所処理)、瘢痕化欠損 (cicatrizatization deficiency)、火傷、または歯のエナメル質の攻撃を治療することを意図している (Ch.M.Lapierre, Cours de biologie de la peau (Skin biology course) -COBIP INSE

RM U 346, Lyon 1999)。

【0003】

メタロプロテアーゼは亜鉛およびカルシウム依存性エンドペプチダーゼのファミリーであり、これらは、結合組織マトリックスの多様な成分を分解するといった一体としての特性を有する (S.Charvat の論文, Metalloproteinases et epiderme (Metalloproteinases and epidermis), 101-113 頁 No.248-98, 1998, LyonI)。

30

【0004】

メタロプロテアーゼはその基質の種類によって分類される: コラーゲナーゼ (繊維状コラーゲン: 例えば MMP - 1、MMP - 13、MMP - 8); ゼラチナーゼ (変性コラーゲン、ゼラチン: 例えば MMP - 2、MMP - 9); ストロメリシン類 (stromelysins) (フィブロネクチン、プロテオグリシン (proteoglycin): 例えば MMP - 3、MMP - 10)。メタロプロテアーゼは細胞外マトリックスの生理学的なりモデリング (低発現) または病理学的なりモデリング (強誘導) に用いられる。

40

【0005】

メタロプロテアーゼは特に瘢痕化過程に関与し、ダメージを受けた組織を除去する。

【0006】

MMP は無秩序に働き、その活性が制御されなければ、顕著な傷害を引き起す。

【0007】

更に、メタロプロテアーゼは、炎症性疾患 (特に、関節炎および歯周炎) などの特定の生物学的障害 (H.BIRKEDAL-HANSEN ら、Critical Reviews in Oral Biology and Medicine, 4(2): 197:250(1993))、老化過程、特に、太陽放射の作用に関連した老化過程 (MARTIN RIEGER; Allured's Cosmetics & Toiletries (登録商標), Vol.114, No.1/January 19

50

99 またはG.J.FISHER ら、The New England Journal of Medicine, Vol.337, No.20 pp.1419-1428, “Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light” およびG.J.FISHER ら、the Society for Investigative Dermatology, Inc. 1988, pp.61-68 “Molecular mechanisms of photoaging and its prevention by retinoic acid: ultraviolet irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that induce A-1-regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin in vivo”)、または急性および慢性の炎症 (XIE ら; J.Biol.Chem. 273:pp.11576-11582;1998) ならびに水疱形成疾患 (中毒性表皮壊死症)、炎症もしくは刺激の間の細胞過剰増殖と関連する病理、床ずれ、火傷および潰瘍に關与することが知られている。

【0008】

10

同じことが、血管新生の内皮細胞の増殖にも当てはまり、その炎症過程または病理過程 (乾癬、腫瘍) の増殖フェーズにおいて、該内皮細胞は、他の領域に移動するために、および微小管や毛細血管を形成するために、結合組織を破壊するMPPを必要とする (Controlling the vasculature: angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular targeting of gene therapy-T.P.D.FAN, R.JAGGAR および R.BICKNELL, TiPS-February 1995, Vol.16; Natural Products as angiogenesis inhibitors, D.H.PAPER, Planta Medical 64(1998) pp.686-695; Membrane-type matrix metalloproteinases in human dermal microvascular endothelial cells:expression and morphogenetic correlation-V.T.CHAN ら、J.I.D.111, pp.1153-1159,1998; Matrix metalloproteinases in blood vessel development in human fetal skin and in cutaneous tumors-T.V.KARELINA ら、J.I.D.;105, 411-417,1995; Vascular proliferation and angiogenic factors in psoriasis, J.D.CREAMER および J.N.W.N.BARKER, Clinical and Experimental Dermatology, 1995, 20,p.6-9)。

20

【0009】

上記疾患のある種の治療において、メタロプロテアーゼ、特に、コラゲナーゼ、ゼラチナーゼ、およびストロメリシンの阻害剤の役割も知られている。

【0010】

本発明の目的は、コラゲナーゼまたはゼラチナーゼタイプのメタロプロテアーゼの新規な広域範囲のスペクトルをもつ阻害剤を提供することであり、該阻害剤は、コラーゲンまたは他の細胞外支持巨大タンパク質の過剰な分解もしくは病理学的な分解に関連した状態または疾患、あるいはこれらのタンパク質分解酵素の過剰発現に関連した他の任意の疾患に罹患したヒトまたは哺乳動物の治療を可能とする。

30

【0011】

本発明の主題は、メタロプロテアーゼ、特に、コラゲナーゼまたはゼラチナーゼを阻害する活性を有することを特徴とするルピン (ルピナス (*lupinus*)) のペプチド抽出物である。ルピンの種類として、特に、アルカロイド含量の少ないアレス (Ares) 品種などの甘白 (sweet white) ルピン属のもの (*lupinus albus*) が挙げられる。

【0012】

本発明の主題は特に、DQ - ゼラチンに対して精製 *Clostridium histolyticum* コラゲナーゼを阻害する活性を有することを特徴とするルピン (ルピナス) の新規ペプチド抽出物であり、該活性は、特に、濃度 0.1% (w/v) 以上で、24時間で50%超である。

40

【0013】

一つの態様では、ルピンのこのペプチド抽出物は脂質が除去されている。

【0014】

有利には、該ペプチド抽出物はペプチドを少なくとも50%、好ましくは少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%含む。

【0015】

これらのペプチドはルピンのタンパク質分画の加水分解によって得られる。

【0016】

加水分解は、任意の適切な手段、特に酵素的加水分解によって行うことができる。

50

【 0 0 1 7 】

このようなルピンのペプチド抽出物の製造方法は以下の工程を含む：

- 脂質を含まないルピン粗挽き粉（ground lupin meal）、またはルピン微粉（micronized lupin flour）（脂質を含む）を調製する工程、
- 可溶性のタンパク質およびサッカリド分画を抽出する工程、または等電点に依り酸 pH（4 または 5）で沈殿させる工程、
- 必要に応じてタンパク質分画を分離する工程、
- タンパク質分画を加水分解する工程、および、必要に応じて濾過後、タンパク質抽出物を回収する工程。

【 0 0 1 8 】

本発明はまた、上記方法を用いて得ることができるタンパク質抽出物に関する。

【 0 0 1 9 】

概して、本発明は、脂質含有ルピン細粉、および糖類をも含有するペプチド抽出物を含む。

【 0 0 2 0 】

好ましくは、タンパク質抽出物は以下のアミノ酸組成を有する（アミノ酸全重量に対する重量％）。

【 0 0 2 1 】

【表 2】

アミノ酸	%／全アミノ酸
ASP	11.3
GLU	23.2
SER	5.1
HIS	1.7
GLY	3.4
THR	3.2
ALA	2.8
ARG	10.3
TYR	6.1
CYS-CYS	2.4
VAL	3.8
MET	0.2
PHE	7.0
ILE	3.3
LEU	7.9
LYS	3.7
PRO	4.4

【 0 0 2 2 】

本発明の主題はまた、上記ペプチド抽出物と、必要に応じて適切な生理学的に許容され得る不活性賦形剤とを含有する医薬組成物、化粧品組成物または栄養補給組成物である。

【 0 0 2 3 】

このような医薬組成物または皮膚化粧品組成物および栄養補給組成物は、コラーゲンの

過剰な破壊および／または支持組織の過剰な破壊に関連した状態または疾患に罹患したヒトまたは哺乳動物を治療することを特に意図している。このような組成物は予防剤または治療剤として使用できる。

【 0 0 2 4 】

これらの状態または疾患のうちで、例えば、関節症、歯周疾患、皮膚傷害に関連した疾患、炎症性疾患、腫瘍関連もしくは病理学的な血管新生（全身紅色症、紅斑性挫瘡、毛細管拡張症、しゅさ、乾癬など）、瘢痕化欠損、潰瘍、火傷、水疱形成疾患、および歯のエナメル質の攻撃が挙げられる。

【 0 0 2 5 】

本発明はまた、老化による皮膚傷害、例えば、太陽放射の作用によって引起される傷害（光老化（photoaging））あるいは皮膚の内因性の有害効果またはタバコの有害効果によって引き起こされる傷害を処置するための化粧品組成物に関する。

10

【 0 0 2 6 】

該医薬組成物、皮膚化粧品組成物または化粧品組成物は、一態様では、局所塗布用製剤の形態である。それ故、本発明の主題は、個体の皮膚表面にこのような組成物を塗布することを含む化粧的処置のための方法である。

【 0 0 2 7 】

本発明によるペプチド抽出物はまた、局所または局部使用のために、例えば、歯周疾患を治療する場合、歯周ポケットに直接送達されるように、ポリマー賦形剤またはデリバリーシステム中に包含または処方されてもよい。

20

【 0 0 2 8 】

別の態様では、該医薬組成物は経口投与用製剤の形態である。

【 0 0 2 9 】

これらの組成物は、概して、錠剤、カプセルまたは軟膏の形態に処方され得る。

【 0 0 3 0 】

栄養補給組成物または食品組成物の場合には、従来使用され得る形態が利用できる。

【 0 0 3 1 】

本発明は、例示として本明細書中、以下に記載の実施例を用いて説明される。

【 0 0 3 2 】

I - ルビンのペプチド抽出物の製造

30

I . 1 - 抽出物 A

- ルピントタンパク質の抽出と精製

本工程は、アルカリ性 pH で可溶な分画の水性可溶化、次いで不溶性成分からの分離を含む：

脂質を含まないルピン粗挽き粉を用い、1 / 10 (w / w) 相当の粉 / 水の比でタンパク質を pH 9 . 0 (水酸化ナトリウムの添加によって pH を調整) で抽出する。溶液を室温で 1 時間攪拌しながらインキュベートする。次いで、粉の不溶部をスピン - 乾燥によって可溶部から分離する。得られた固形残渣を洗浄する。可溶性の糖類およびタンパク質を含む可溶性分画を 1 0 0 0 0 ダルトンのカットオフ閾値を有する限外濾過モジュールで濾過し、可溶性糖類（限外濾過液）からタンパク質（保持物）を分離する。

40

【 0 0 3 3 】

- 酵素的加水分解によるペプチドの製造と精製：

タンパク質を含む限外濾過の保持物を濃度 1 0 0 g / l に調整し、次いで Alcalase（登録商標）（NOVO NORDISK）の存在下、pH 8 . 0、55 で約 3 時間加水分解する。加水分解後、酵素を 85 で 15 分間の加水分解によって変性させる。溶液が冷却するとすぐに、これに塩酸を加えて溶液を中和する。得られたペプチドをカットオフ閾値 1 0 0 0 0 ダルトンの限外濾過モジュールでの濾過に（diafiltration）によって精製する。次いで、得られる溶液をナノ濾過して、ペプチド分画を脱塩（塩化ナトリウムを除去する）し、ペプチド分画を濃縮する。最後に、3 % 活性炭を用いてペプチド溶液を脱色（50、1 時間）し、活性炭を濾過で除去する。

50

【 0 0 3 4 】

- ペプチド分画の滅菌とパッケージング：

パッケージングの前に、溶液を無菌的にマイクロ濾過（ $0.2\ \mu\text{m}$ ）し、次いで保存剤の存在下、濃度 10 % で滅菌容器に分配する。

【 0 0 3 5 】

I . 2 - 抽出物 B

脱色工程を削除すること以外は、抽出物 A を得るために実行した記載方法に従い、ペプチド抽出物 B を得る。

【 0 0 3 6 】

I . 3 - 抽出物 C

精製工程、限外濾過工程および脱色工程を削除すること以外は、抽出物 A を得るために実行した記載方法に従い、ルビンのペプチド抽出物 C を得る。

【 0 0 3 7 】

I I - ペプチド抽出物 A の分析

次いで、乾燥抽出物を分析する。

提示：

- 外観：非吸湿性均一粉末

- 色：オフホワイト

- 量：5 g

・化学組成

- 全糖含量（アントロンを用いる試験）：

< 1 %

- クロライド含量（SIGMAキット ref : 955 - 30）：6 %

- 水含量（100 、4時間）：

最大 8 %

- ペプチド含量：

85 %

・キャラクタリゼーション

- pH（溶液、20 g / l）：

7 . 0 6

- 溶解度（浸透水）：

> 100 g / l

【 0 0 3 8 】

10

20

【表 3】

表 1 -加水分解物のアミノ酸組成

アミノ酸	分子量 アミノ酸	濃度 mM	濃度 mg/l	粉末中 の%	%/全 アミノ酸
ASP	133.1	2.078	276.582	9.9	11.3
GLU	147.1	3.858	567.438	20.3	23.2
SER	105.1	1.196	125.647	4.5	5.1
HIS	155.2	0.270	41.904	1.5	1.7
GLY	75.1	1.114	83.624	3.0	3.4
THR	119.1	0.664	79.023	2.8	3.2
ALA	89.1	0.763	67.983	2.4	2.8
ARG	174.2	1.447	251.980	9.0	10.3
TYR	181.2	0.829	150.215	5.4	6.1
CYS-CYS	240.3	0.247	59.234	2.1	2.4
VAL	117.1	0.792	92.743	3.3	3.8
MET	149.2	0.029	4.327	0.2	0.2
PHE	165.2	1.044	172.469	6.2	7.0
ILE	131.2	0.621	81.410	2.9	3.3
LEU	131.2	1.481	194.307	6.9	7.9
LYS	146.2	0.626	91.448	3.3	3.7
PRO	115.1	0.935	107.619	3.8	4.4

2447.952

全体

87.4%

【0039】

III - インビトロでのルピンペプチド - 抽出物 A の抗コラゲナーゼ活性および抗ゼラチン分解活性

精製コラゲナーゼおよび基質（基質としてフルオレセインと結合したゼラチン）（EnzChek™ゼラチナーゼ/コラゲナーゼキット、MOLECULAR PROBES）の使用に基づく、スクリーニングタイプの生化学的なモデルにおいて、抗コラゲナーゼ活性をインビトロで測定した。*Clostridium histolyticum*からの精製コラゲナーゼをEnzChek™ゼラチナーゼ/コラゲナーゼキット（MOLECULAR PROBES）で得た。この酵素は、コラーゲンIV（表皮/真皮基底膜）およびゼラチンに二重機能性（double functionality）を有する。

【0040】

ブタ皮膚から精製し、フルオレセインと結合させたDQ - ゼラチンをEnzChek™ゼラチナーゼ/コラゲナーゼキット（MOLECULAR PROBES）で得た。

【0041】

0.05MのTris-HCl、0.15M NaCl、5mMのCaCl₂および0.2mMのアジ化ナトリウムからなる反応緩衝液（pH7.6）をEnzChek™ゼラチナーゼ/コラゲナーゼキット（MOLECULAR PROBES）で得た。

【0042】

ペプチド抽出物を反応緩衝液中に可溶化した。これを0.004；0.02；0.04；0.2および0.4%（w/v）で試験した。

【0043】

試験抽出物の希釈溶液を 1 mg / ml の D Q - ゼラチンおよび 0.2 Ru / ml のコラゲナーゼと共に室温で 1 時間、2 時間および 24 時間インキュベートした。

【0044】

「コラゲナーゼ + D Q - ゼラチン」混合物に対応する対照を並行してインキュベートした。

【0045】

各実験条件について、サンプル（以下「酵素無しのサンプル」と呼ぶ）を D Q - ゼラチンの存在下およびコラゲナーゼの非存在下でインキュベートした。

【0046】

各実験条件を 3 連で行った。

10

【0047】

1 時間、2 時間および 24 時間後、D Q - ゼラチンの分解に対応するシグナルを蛍光定量法（励起： 485 nm 、発光： 595 nm ）で測定した。各サンプルについて、「酵素無しのサンプル」で得た値を引いた。

【0048】

結果を蛍光単位 / サンプルとして、および対照群に対する変動の % として表した。

【0049】

データ群（対照群および処理群）を分散の因子解析（ANOVA 1、 $p < 0.05$ ）、次いで Dunnett 試験によって比較した。このように、抽出物の効果を対照群で得た効果と比較した。

20

【0050】

$0.004 \sim 0.2 \%$ （w / v）で試験したペプチド抽出物は、用量依存性の抗コラゲナーゼ活性および抗ゼラチン分解活性を有した。以下の表 2 に示したように効果は 24 時間時点で最大であった。

【0051】

【表 4】

表2

インキュベーション時間＝1時間

対照	0.004	0.02	0.04	0.2	0.4
16237	14161	11890	11205	11249	9434
14329	13561	11161	10863	9840	7544
15636	13965	11757	11344	11387	8878
15401	13896*	11603*	11137*	10825*	8619*
+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
976	306	388	248	856	971
100%	89	75	73	73	57

10

インキュベーション時間＝2時間

対照	0.004	0.02	0.04	0.2	0.4
24776	20526	13689	11000	7617	6853
22516	19597	6710	10406	6072	4933
23779	20144	13148	11349	7824	6467
23690	20089*	11182*	10918*	7171*	6084*
+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
1133	467	3883	477	957	1016
100%	85	55	48	33	27

20

インキュベーション時間＝24時間

対照	0.004	0.02	0.04	0.2	0.4
31653	12655	2583	2378	524	1154
29536	11531	1487	1442	484	467
29745	13008	2657	2713	693	927
30311	12398*	2242*	2178*	567*	849*
+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
1167	771	655	659	111	350
100%	41	7	7	2	3

30

結果を蛍光単位／サンプルとして表す。

太字：平均および標準偏差

*：対照群とは有意に異なる平均 ($p < 0.05$)。

40

【0052】

結論として、選択した実験条件下では、0.004と0.4% (w/v) との間で試験したタンパク質抽出物は用量依存性の抗ゼラチナーゼ/コラゲナーゼ活性を有していた。非特異的なコラゲナーゼと比較したルピンペプチドの良好な効果/用量/時間の比に特に注目する：例えば、24時間で、0.04%は、クロストリジウムコラゲナーゼのゼラチン分解活性を93%阻害し、2時間では52%阻害する。

50

【 0 0 5 3 】

同じペプチド抽出物による他の試験を濃度 0.01、0.05、0.1、0.5 および 1 % (w/v) で行い、結果を以下の表 3 および添付の図 1 にも示す。この図は、非特異的コラゲナーゼの阻害の動態 (kinetics) - ペプチド抽出物の濃度の影響を示す。y 軸はゼラチン分解活性 (%) を表し、x 軸はインキュベーション時間 (h) を表す。

【 0 0 5 4 】

【表 5】

表 3

インキュベーション時間 (h)	抽出物 A の濃度 (% w/v) /ゼラチン分解活性 (%)				
	0.01	0.05	0.1	0.5	1
1	89	75	73	73	57
2	85	55	48	33	27
4	79	38	29	14	12
6	69	27	21	8	9
24	41	7	7	2	3

【 0 0 5 5 】

選択した実験条件下では、0.01 と 0.5 % (w/v) との間で試験したペプチド抽出物は、用量依存性および時間依存性の抗ゼラチナーゼ/コラゲナーゼ活性を有する。

【 0 0 5 6 】

非特異的阻害剤 1, 10 - フェナントロリンを全ての試験で参照抗 MMP 製品として使用した。得られた結果は、予期したものと一致し、試験は有効であった。

【 0 0 5 7 】

I V - ヒト器官型モデル (organotypic model) における、ルビンペプチド - 抽出物 A の特異的抗コラゲナーゼ活性

皮膚老化はとりわけ、真皮のコラーゲン繊維の分解および他の巨大タンパク質の分解に続く皮膚の機械的性質の修飾によって特徴付けられる。この分解には、内因性コラゲナーゼが関与する (Grymes, R.A., Kronberger A. および Bauer E.A. -Collagenases in disease- in "Connective Tissue Diseases of the skin" Lapiere C.M. および Krieg T. 編、1993, 69-85 ; G.Fischer および J.Voorhees "Pathiophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light" および "Molecular mechanisms of photo aging and its prevention by retinoic acid: ultraviolet irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that induce A-1-regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin in vivo")。

【 0 0 5 8 】

抗コラゲナーゼ活性を有する製品は、皮膚老化の兆候と闘うことが想定され得る。

【 0 0 5 9 】

試験製品の抗コラゲナーゼ活性は、ヒト皮膚の器官型モデルにおいてインビトロで研究できる。試験の原理は以下のとおりである：切片への精製コラゲナーゼの塗布には内因性コラーゲン繊維の分解が伴う。次いで、マソン トリクローム (Masson trichrome) でコラーゲン繊維を染色する。精製コラゲナーゼによる内因性コラーゲン繊維の消化は、形態学的観察によって定性的に評価され、画像解析によって定量的に評価される。抗コラゲナーゼ活性を有する製品は、配置したコラーゲン繊維の完全性を該酵素の存在下で部分的または全体的に保存するであろう。

【 0 0 6 0 】

試験製品をそれらを使用するまで + 4 で保存した。

【 0 0 6 1 】

3 つの希釈溶液を試験した： 0 . 0 1 ; 0 . 1 および 1 % (v / v) 。

【 0 0 6 2 】

参照製品として用いたホスホラミドン (phosphoramidon) は、 S I G M A から得た。

【 0 0 6 3 】

精製コラゲナーゼ (I I I 型、分画 A) は、 S I G M A から得た。

【 0 0 6 4 】

ヒト皮膚切片をインキュベートするための培地 (以下「賦形剤」と呼ぶ) は、 0 . 0 1 M の塩化カルシウムを含有する 0 . 1 5 M T r i s H C l 緩衝液 (p H 7 . 5) であった。 10

【 0 0 6 5 】

試薬は、分析品質のものであり、他に記載していなければ、 C A R L O E R B A 、 G I B C O または S I G M A から得た。

【 0 0 6 6 】

皮膚切片を腹部形成手術後回収した手術の廃棄物から調製した。その個体は 3 0 歳の女性であった。直径 4 c m の皮膚外植片を調製した。それらをコルク支持体の上に置き、 - 8 0 で凍結した。クライオミクロトームを用いて厚さ 6 μ m の横断切片を調製した。それらをガラススライドに固定し、試験の間、賦形剤で水和した状態を維持した。

【 0 0 6 7 】

試験サンプルを全てエタノール中に取り、次いで、試験緩衝液中に希釈した。

・ペプチド抽出物の 2 つの最も薄い希釈溶液 (0 . 0 1 および 0 . 1 % v / v) において、エタノールの最終濃度を一定かつ 0 . 1 % (v / v) に等しく維持した。

・最も濃い希釈溶液 (1 %、v / v) において、エタノールの最終濃度を一定かつ 1 % (v / v) に等しく維持した。

・ 0 . 1 および 1 % (v / v) の「エタノール対照」を調製した。

・ホスホラミドンを直接賦形剤に取った。

ペプチド抽出物を 0 . 0 1 ; 0 . 1 および 1 % (w / v) で試験した。

ホスホラミドンを 10^{-3} M で試験した。

【 0 0 6 8 】

それ故、以下のサンプルが存在した：

抽出物：緩衝液；エタノール (0 . 1 % v / v または 1 % v / v) ；抽出酵素 (0 . 0 1 ; 0 . 1 および 1 %、w / v)、

酵素対照：緩衝液；エタノール (0 . 1 %、v / v) ；酵素、

エタノール対照 (酵素無し)：緩衝液；エタノール (0 . 1 % または 1 %、v / v)

、

参照製品：緩衝液；エタノール；酵素； 10^{-3} M ホスホラミドン。

【 0 0 6 9 】

試験製品の希釈溶液、エタノールの希釈溶液および参照製品の希釈溶液を 1 切片当たり 100μ l で皮膚切片に置き、37 で 10 分間ブレインキュベートした。次いで、賦形剤だけ (酵素無しの対照) または 50 国際単位 (I U) / m l のコラゲナーゼを含む賦形剤 (酵素対照) をしみこませたる紙片 (表面積 0.16 cm^2) を切片の上に置いた。スライドを湿気のあるチャンバーに 37 で 3 時間置いた。 40

【 0 0 7 0 】

インキュベーション後、切片をインキュベーション培地ですすぎ、マソン トリクロームで染色した。抽出物、エタノールまたは参照製品の存在および非存在下での酵素の活性を顕微鏡観察により評価し、以下のスキームに基づき点をつけた：

0 : ゼロ酵素消化
+ : 弱い酵素消化
+ + : 平均的酵素消化

+ + + : 強い酵素消化。

【 0 0 7 1 】

切片の写真を撮った。

【 0 0 7 2 】

試験製品、エタノールまたは参照製品の存在および非存在下でコラゲナーゼの活性を画像解析で評価した。染色切片の画像解析をビデオスクリーン上にデジタル化した：画像解析ソフトウェア (I M A G E N I A 2 0 0 0、B I O C O M (登録商標)) により、無傷のコラーゲン繊維が占める表面積を計算することが可能となった。結果を視野当たりの無傷コラーゲン繊維の割合として表した。

【 0 0 7 3 】

種々の濃度のエタノールにおける抽出物、および参照製品のコラゲナーゼ活性の阻害割合を以下の式を用いて計算した：

【 0 0 7 4 】

参照製品 (直接、賦形剤に取った) の場合、阻害割合を以下の式を用いて計算する：

【 0 0 7 5 】

$$\frac{(\% \text{コラーゲン繊維}) \text{参照製品} - (\% \text{コラーゲン繊維}) \text{酵素対照}}{(\% \text{コラーゲン繊維}) \text{エタノール対照} - (\% \text{コラーゲン繊維}) \text{酵素対照}} \times 100 (\% \text{コラーゲン繊維})$$

【 0 0 7 6 】

0 . 1 % (v / v) のエタノールを含有する賦形剤中に希釈した抽出物の場合、阻害割合を以下の式を用いて計算する：

【 0 0 7 7 】

$$\frac{(\% \text{コラーゲン繊維}) \text{参照製品} - (\% \text{コラーゲン繊維}) \text{酵素対照}}{(\% \text{コラーゲン繊維}) \text{エタノール対照} - (\% \text{コラーゲン繊維}) \text{酵素対照}} \times 100 (\% \text{コラーゲン繊維})$$

【 0 0 7 8 】

1 % (v / v) のエタノールを含有する賦形剤中に希釈した抽出物の場合、阻害割合を以下の式を用いて計算する：

【 0 0 7 9 】

$$\frac{(\% \text{コラーゲン繊維}) \text{参照製品} - (\% \text{コラーゲン繊維}) \text{酵素対照}}{(\% \text{コラーゲン繊維}) \text{エタノール対照} - (\% \text{コラーゲン繊維}) \text{酵素対照}} \times 100 (\% \text{コラーゲン繊維})$$

【 0 0 8 0 】

種々の濃度の抽出物の抗コラゲナーゼ活性をヒト皮膚の器官型モデルにおいて研究した。

【 0 0 8 1 】

コラゲナーゼの非存在下 (賦形剤対照) では、コラーゲン繊維は無傷であった。コラゲナーゼの存在下 (酵素対照) では、コラーゲン繊維はほとんど完全に分解された。この結果は予期したものであり、試験は有効であった。

【 0 0 8 2 】

参照製品として使用した 10^{-3} M のホスホラミドンはコラゲナーゼ活性を 16 % 阻害した。この結果は予期したものであり、試験の有効性を完全なものとした。

【 0 0 8 3 】

試験製品の中間の希釈剤として使用するエタノールを 0 . 1 および 1 % (v / v) で試験した。エタノールはコラゲナーゼによるコラーゲン繊維の分解に全く影響しなかった。

【 0 0 8 4 】

0 . 01 ; 0 . 1 および 1 % (w / v) で試験したペプチド抽出物は、コラゲナーゼの活性をそれぞれ、2、24 および 65 % 阻害した。形態学的観察は同一の結果を与えた。

【 0 0 8 5 】

結論として、選択した実験条件下では、ペプチド抽出物 A は低濃度でかなりの抗コラゲナーゼ活性を有した。

【 0 0 8 6 】

ペプチド抽出物、エタノールおよびホスホラミドンに関する、コラゲナーゼによる皮膚

10

20

30

40

50

コラーゲン繊維の消化の阻害の結果を以下の表に示す：

【 0 0 8 7 】

【 表 6 】

表 4

実験条件	濃度	酵素消化 (形態学的観察)	コラゲナーゼ 活性の阻害% (イメージ分析)
賦形剤対照	—	0	—
酵素対照	5 0 I V / m l	+++	0
ホスホラミドン (M)	10^{-3}	+	+
エタノール (%、v/v)	0. 1 1	+++ +++	0 0
ペプチド抽出物 (%、v/v)	0. 0 1 0. 1 1	+++ ++ +	2 2 4 6 5

0 : ゼロ酵素消化
+ : 弱い酵素消化
++ : 平均的酵素消化
+++ : 強い酵素消化

【 0 0 8 8 】

V - ルピンペプチド - 抽出物 A、B および C の抗メタロプロテアーゼ MMP - 2 およ
び MMP - 9 活性

MMP - 2、即ちゼラチナーゼ A、および MMP - 9、即ちゼラチナーゼ B は、細胞外マトリックスの特異的成分を分解するメタロプロテアーゼである：MMP - 2 は、ゼラチン (= 変性コラーゲン)、コラーゲン I、IV、VII および XI、フィブロネクチン、ラミニンならびにエラスチンを分解し；MMP - 9 は、ゼラチン、コラーゲン IV、V および XI V ならびにエラスチンを分解する。それらは、光老化および内皮細胞の増殖に重要な役割を担う。

【 0 0 8 9 】

精製ヒト MMP - 2 および組換えヒト MMP - 9 および基質 (基質としてフルオレセインと結合したゼラチン) (E n z C h e kTMゼラチナーゼ / コラゲナーゼ キット、M O L E C U L A R P R O B E S) の使用に基づく、スクリーニングタイプの生化学的モデルにおいて試験製品の抗 MMP - 2 活性および抗 MMP - 9 活性をインビトロで測定した。

【 0 0 9 0 】

ヒト繊維肉腫から精製した MMP - 9 を B O E H R I N G E R M A N N H E I M から得た。

【 0 0 9 1 】

組換えヒト MMP - 9 は R & D S Y S T E M S から得た。

【 0 0 9 2 】

ブタ皮膚から精製し、フルオレセインと結合した D Q - ゼラチンを E n z C h e kTMゼラチナーゼ / コラゲナーゼキット (M O L E C U L A R P R O B E S) から得た。

【 0 0 9 3 】

10

20

30

40

50

MMP - 2 の活性を研究するための反応緩衝液 (R B f 1) は、50 mM の T r i s - H C l 、 0 . 0 5 % (w / v) の T r i t o n X 1 0 0 および 5 mM の C a C l ₂ (p H 7 . 5) から成っていた。

【 0 0 9 4 】

MMP - 9 の活性を研究するための反応緩衝液 (R B f 2) は、50 mM の T r i s - H C l 、 0 . 0 5 % (w / v) の B r i j 3 5 および 5 mM の C a C l ₂ (p H 7 . 4) から成っていた。

【 0 0 9 5 】

試験製品および参照製品の調製

1 , 1 0 - フェナントロリンを反応緩衝液 R B f 1 および R B f 2 中に可溶化した。これを 8 および 8 0 μ g / m l で試験した。 10

【 0 0 9 6 】

ペプチド抽出物 A 、 B および C を反応緩衝液 R B f 1 および R B f 2 中に可溶化した。それらを 0 . 0 1 ; 0 . 1 および 1 % (w / v) で試験した。

【 0 0 9 7 】

MMP - 2

使用する前に、緩衝液 R B f 1 中に 2 . 5 mM に希釈した A P M A の存在下での 3 7 、 3 0 分間のインキュベーションにより、MMP - 2 を活性化した。

【 0 0 9 8 】

2 5 μ g / m l に希釈した D Q - ゼラチンおよび 1 . 2 5 μ g / m l に希釈した活性化 MMP - 2 と共に、試験製品または参照製品の希釈溶液を 3 7 で 2 4 時間インキュベートした。 20

【 0 0 9 9 】

「MMP - 2 + D Q - ゼラチン」混合物に対応する対照を並行してインキュベートした。

【 0 1 0 0 】

各実験条件について、サンプル (以下「酵素無しのサンプル」と呼ぶ) を D Q - ゼラチンの存在下および活性化 MMP - 2 の非存在下でインキュベートした。これらのサンプルによって、効果を評価するための方法 (蛍光定量法) と試験製品との干渉を測定することが可能となった。 30

【 0 1 0 1 】

各実験条件を 3 連で行った。

【 0 1 0 2 】

MMP - 9

2 5 μ g / m l に希釈した D Q - ゼラチンおよび 0 . 2 5 μ g / m l に希釈した MMP - 9 と共に、試験製品または参照製品の希釈溶液を 3 7 で 2 4 時間インキュベートした。

【 0 1 0 3 】

「MMP - 9 + D Q - ゼラチン」混合物に対応する対照を並行してインキュベートした。 40

【 0 1 0 4 】

各実験条件について、サンプル (以下「酵素無しのサンプル」と呼ぶ) を D Q - ゼラチンの存在下および MMP - 9 の非存在下でインキュベートした。これらのサンプルによって、効果を評価するための方法 (蛍光定量法) と試験製品との干渉を測定することが可能となった。

【 0 1 0 5 】

各実験条件を 3 連で行った。

【 0 1 0 6 】

2 4 時間後、D Q - ゼラチンの分解に対応するシグナルを蛍光定量法 (励起 : 4 8 5 n m 、 発光 : 5 9 5 n m) によって測定した。各サンプルについて、「酵素無しのサンプル 50

」で得た値を差し引いた。

【 0 1 0 7 】

結果を1サンプル当たりの蛍光単位として、および対照群に対する変動%として表した。

【 0 1 0 8 】

データ群（対照群および処理群）を分散の1因子解析（ANOVA 1、 $p < 0.05$ ）、次いでDunnett試験によって比較した。

【 0 1 0 9 】

結果を以下に示す：

V. 1 - 抗MMP-2活性

10

【 0 1 1 0 】

【表7】

ペプチド 抽出物	対照	MMP-2活性(%として)(1) / ペプチド抽出物の10重量%溶液の濃度 (%v/v)		
		0.01	0.1	1
C	100	119	111	43
A	100	152	151	68
B	100	110	98	77

20

(1) MMP-2阻害剤の非存在下における対照群に対して表された活性。

【 0 1 1 1 】

結論：

- ルピン抽出物Cの10重量%溶液は、0.01および0.1%(v/v)で試験され、抗MMP-2活性を有しない。1%(v/v)で試験すると、これは、MMP-2を57%阻害する。

30

- ルピン抽出物Aの10重量%溶液は、0.01~0.1%(v/v)で試験され、抗MMP-2活性を有しない。1%(v/v)で試験すると、これは、MMP-2を32%阻害する。

- 抽出物Bの10重量%溶液は、1%で試験され、MMP-2を23%阻害する。

- フェナントロリンは、8および80 μ g/mlで試験され、MMP-2の活性をそれぞれ、32および73%阻害する。この結果は、予期したものであり、この試験は有効である。

【 0 1 1 2 】

V. 2 - 抗MMP-9活性

【 0 1 1 3 】

40

【表 8】

ペプチド抽出物	対照	MMP-9 活性 (%として) (1) / ペプチド抽出物の 10 重量%溶液の濃度 (%v/v)		
		0.01	0.1	1
A	100	143	143	61
B	100	146	129	27

(1) MMP-9 阻害剤の非存在下における対照群に対して表された活性。

【0114】

結論：

- ルピン抽出物 A の 10 重量%溶液は、0.01 および 0.1 % (v/v) で試験され、抗 MMP-9 活性を有しない。1 % (v/v) で試験すると、これは、MMP-9 を 39 % 阻害する。

- ルピン抽出物 B の 10 重量%溶液は、0.01 および 0.1 % (v/v) で試験され、抗 MMP-9 活性を有しない。1 % (v/v) で試験すると、これは、MMP-9 を 73 % 阻害する。

フェナントロリンは、8 および 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で試験され、MMP-9 の活性をそれぞれ、80 および 76 % 阻害する。この結果は、予期したものであり、この試験は有効である。

【0115】

VI - UVA 線を放射したヒト繊維芽細胞における MMP-1、MMP-9 および MMP-3 の量へのルピンペプチドの効果の評価

単層培養のヒト皮膚繊維芽細胞に対して研究を行った。参照製品および試験製品の存在下で細胞を 37 で 1 時間プレインキュベートした。次いで、試験製品および参照製品の存在下に単回量 10 J / cm^2 の UVA を細胞に放射した。

【0116】

放射後直ちに、依然として試験製品および参照製品の存在下にて該細胞を 37 で 48 時間インキュベートした。

【0117】

種々の MMP を特異的 ELISA キット (Amersham) を用いて培養培地中で試験する。

【0118】

参照製品および試験製品

MMP の非特異的阻害剤である 1, 10 - フェナントロリンを 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で試験し、参照製品として使用した。

【0119】

10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のレチノイン酸 (retinoic acid) + 10 ng / ml EGF 混合物をその TIMP 1 (TIMP 1、MMP の組織阻害剤、MMP の生理学的な阻害剤) を誘導する能力のために用いた。

【0120】

10 % (w/v) のルピンペプチドを含有するストック溶液を脱イオン水中に調製した。この溶液を使用して希釈溶液を繊維芽細胞培養培地中に調製した。ルピンのペプチド抽出物を 0.5 ; 1 および 2 % (v/v) で試験した。

【0121】

参照製品および試験製品の非存在下に放射および非放射対照培養物を並行してインキュベートした。

【 0 1 2 2 】

データ処理

データ群（対照群および処理群）を分散の1因子解析（ANOVA 1、 $p < 0.05$ ）、次いでDunnett試験によって比較した。このようにして、参照製品および試験製品の効果を「放射細胞」群で得た効果と比較した。

【 0 1 2 3 】

結果：

結果を下記の表に示す。結果を「放射細胞」群に対する%として表す。

【 0 1 2 4 】

【表9】

	MMPの生産（%として）				
	対照細胞	放射細胞	放射細胞+ルピンペプチド （%、v/v）		
			0.5	1	2
MMP-1	24	100	4	3	3
MMP-9	41	100	17	2	0
MMP-3	88	100	3	0	2

【 0 1 2 5 】

結論：

1, 10-フェナントリリンは、 $80 \mu\text{g}/\text{ml}$ で試験され、放射繊維芽細胞によるMMP-1の分泌を99%阻害し、MMP-9の分泌を92%阻害し、MMP-3の分泌を97%阻害した。

【 0 1 2 6 】

$10 \mu\text{M}$ レチノイン酸 + $10 \text{ ng}/\text{ml}$ EGF混合物は、放射繊維芽細胞によるMMP-1の分泌を58%阻害し、MMP-9の分泌を67%阻害し、MMP-3の分泌を44%阻害した。

【 0 1 2 7 】

これらの結果は、予期したものであり、試験システムの反応性は有効であった。

【 0 1 2 8 】

$10 \text{ J}/\text{cm}^2$ の量の放射は、繊維芽細胞によって分泌されるMMP-1、MMP-9およびMMP-3のそれぞれの量を4.10倍、2.42倍および1.13倍増加した。これらの結果は、予期したものであり、UVA放射によるMMP-1、MMP-9およびMMP-3の誘導に関する試験システムは有効であった。

【 0 1 2 9 】

ルピンのペプチド抽出物は、0.5、1および2%（v/v）で試験され、繊維芽細胞によって分泌されるMMP-1の量をそれぞれ、96、97および97%減少させた（ $p < 0.05$ ）。

【 0 1 3 0 】

ルピンのペプチド抽出物は、0.5、1および2%で試験され、繊維芽細胞によって分泌されるMMP-9の量をそれぞれ、83、98および100%減少させた（ $p < 0.05$ ）。

【 0 1 3 1 】

ルピンのペプチド抽出物は、0.5、1および2%で試験され、繊維芽細胞によって分泌されるMMP-3の量をそれぞれ、97、100および98%減少させた（ $p < 0.05$ ）。

【 0 1 3 2 】

このように、選択した実験条件下では、ルピンのペプチド抽出物は、UVA-放射ヒト

10

20

30

40

50

皮膚繊維芽細胞による MMP - 1、MMP - 9 および MMP - 3 の産生に関してかなりの阻害特性を有する。

【 0 1 3 3 】

V I I - 局所使用のための処方例

割合を組成物の全重量として表す。ルピンのペプチド抽出物は、本発明による 10 重量 % 水溶液の形態、または粉末形態ペプチド抽出物にちなんだ凍結乾燥粉末の形態で使用される。

【 0 1 3 4 】

1. 正常皮膚用の紅い斑点に対し作用するクリーム

水	合計 100.000 になるまで必要量	10
ペンタエリトリチル テトラオクタノエート	15.0 ~ 5.0	
グリセリル ステアレート	10.0 ~ 2.0	
イソデシル ネオペンタノエート	10.0 ~ 2.0	
プロピレン グリコール	1.0 ~ 3.0	
デキストリン	1.0 ~ 3.0	
シクロメチコーン	1.0 ~ 3.0	
ダイズ (ダイズ グリシン) 抽出物	0.1 ~ 10.0	
ルピンのペプチド抽出物 (10 % 水溶液)	0.1 ~ 10.0	
二酸化チタン	1.0 ~ 3.0	
キャンデリアワックス (Euphorbia Cerifora)	1.0 ~ 3.0	20
コメ澱粉 (Oriza Sativa)	1.0 ~ 3.0	
ケン化できないダイズ (ダイズ グリシン) 油	0.01 ~ 10.0	
カプリル酸 / カプリン酸 トリグリセリド	0.5 ~ 5.0	
P E G - 100 ステアレート	0.5 ~ 5.0	
Sophora Japonica 抽出物	0.1 ~ 10.00	
ステアリン酸	0.5 ~ 1.0	
酢酸トコフェロール	0.1 ~ 1.0	
フェノキシエタノール	0.1 ~ 1.0	
C I 77891	0.1 ~ 1.0	30
キサンタンゴム	0.1 ~ 0.5	
ジメチコノール	0.1 ~ 0.5	
ポリアクリルアミド	0.1 ~ 0.5	
マイカ	0.1 ~ 0.5	
C e t e a r e t h - 20	0.1 ~ 0.5	
クロルフェネシン	0.1 ~ 0.5	
カルボマー	0.1 ~ 0.5	
オクチル パルミテート	0.1 ~ 0.5	
トロメタミン	0.1 ~ 0.5	
蜜蝋	0.1 ~ 0.5	40
C 13 - 14 イソパラフィン	0.1 ~ 0.5	
D E A セチル ホスフェート	0.1 ~ 0.5	
セチルアルコール	0.1 ~ 0.5	
グルコース	0.1 ~ 0.5	
フレグランス	0.1 ~ 0.5	
E D T A ニナトリウム	0.1 ~ 0.5	

【 0 1 3 5 】

2. 老化予防クリーム

水	合計 100.00000 になるまで必要量	50
---	-----------------------	----

ペンタエリトリチル テトラオクタノエート	3 . 0 ~ 1 5 . 0	
イソデシル ネオペンタノエート	3 . 0 ~ 1 5 . 0	
スクアレン	1 . 0 ~ 1 0 . 0	
デキストリン	1 . 0 ~ 1 0 . 0	
シクロメチコーン	1 . 0 ~ 1 0 . 0	
セテアリール (cetearyl) アルコール	1 . 0 ~ 1 0 . 0	
ルピンのペプチド抽出物 (1 0 % 水溶液)	0 . 1 ~ 1 0 . 0	
アスコルビル グルコシド	0 . 1 ~ 1 0 . 0	
グリセロール	1 . 0 ~ 1 0 . 0	
L a u r e t h - 2 3	1 . 0 ~ 1 0 . 0	10
ミリスチル ミリステート	1 . 0 ~ 1 0 . 0	
シクロペンタシロキサン	1 . 0 ~ 1 0 . 0	
ナイロン - 6	1 . 0 ~ 1 0 . 0	
アボカド フラン	0 . 0 1 ~ 1 0 . 0	
フェノキシエタノール	0 . 1 ~ 1 . 0	
セテアリール グルコシド	0 . 1 ~ 1 . 0	
フレグランス	0 . 1 ~ 1 . 0	
蜜蝋	0 . 1 ~ 1 . 0	
メチルパラベン	0 . 1 ~ 0 . 5	
クエン酸ナトリウム	0 . 1 ~ 0 . 5	20
ジメチコノール	0 . 1 ~ 0 . 5	
グリセリル ステアレート	0 . 1 ~ 0 . 5	
E D T A ニナトリウム	0 . 1 ~ 0 . 5	
プロピルパラベン	0 . 1 ~ 0 . 5	
水酸化ナトリウム	0 . 1 ~ 0 . 5	
アクリレート / C 1 0 - 3 0	0 . 1 ~ 0 . 5	
アルキル アクリレート クロスポリマー		
キサンタンゴム	0 . 1 ~ 0 . 5	
グルコース	0 . 1 ~ 0 . 5	
【 0 1 3 6 】		30
3 . 成熟皮膚用抗老化クリーム		
水	合計 1 0 0 . 0 0 0 0 になるまで必要量	
ペンタエリトリチル テトラオクタノエート	1 . 0 ~ 1 0 . 0	
イソデシル ネオペンタノエート	1 . 0 ~ 1 0 . 0	
水素化ココグリセリド	1 . 0 ~ 1 0 . 0	
Simmondsia Chinensis (ホホバ) 種子油	1 . 0 ~ 1 0 . 0	
スクアレン	1 . 0 ~ 1 0 . 0	
グリセロール	1 . 0 ~ 1 0 . 0	
シクロメチコーン	1 . 0 ~ 5 . 0	
セテアリールアルコール	1 . 0 ~ 5 . 0	40
ミリスチル ミリステート	1 . 0 ~ 5 . 0	
L a u r e t h - 2 3	1 . 0 ~ 5 . 0	
シリカ	1 . 0 ~ 5 . 0	
ルピンのペプチド抽出物 (1 0 % 水溶液)	0 . 1 ~ 1 0 . 0	
スクレロチウム (Sclerotium) ゴム	0 . 1 ~ 1 . 0	
アボカド フラン	0 . 0 1 ~ 1 0 . 0	
サリチル酸	0 . 1 ~ 1 0 . 0	
蜜蝋	0 . 1 ~ 1 0 . 0	
ポリアクリルアミド	0 . 1 ~ 1 . 0	
フェノキシエタノール	0 . 1 ~ 1 . 0	50

グリセリル ステアレート	0 . 1 ~ 1 . 0	
レチノール パルミテート	0 . 0 1 ~ 5 . 0	
セテアリアル グルコシド	0 . 0 1 ~ 5 . 0	
ナイロン - 6	0 . 0 1 ~ 5 . 0	
二酸化チタン	0 . 0 1 ~ 5 . 0	
フレグランス	0 . 1 ~ 5 . 0	
酢酸トコフェロール	0 . 1 ~ 5 . 0	
ソルビン酸カリウム	0 . 1 ~ 5 . 0	
メチルパラベン	0 . 1 ~ 5 . 0	
C 1 3 - 1 4 イソパラフィン	0 . 1 ~ 5 . 0	10
C I 7 7 8 9 1	0 . 1 ~ 5 . 0	
ジメチコノール	0 . 1 ~ 5 . 0	
プロピルパラベン	0 . 1 ~ 5 . 0	
水酸化ナトリウム	0 . 1 ~ 5 . 0	
L a u r e t h - 7	0 . 1 ~ 5 . 0	
セテアリアル アルコール	0 . 1 ~ 5 . 0	
セチル パルミテート	0 . 1 ~ 5 . 0	
ココグリセリド	0 . 1 ~ 5 . 0	
E D T A ニナトリウム	0 . 1 ~ 0 . 5	
C I 7 7 4 9 1	0 . 1 ~ 0 . 5	20
クエン酸	0 . 1 ~ 0 . 5	
【 0 1 3 7 】		
4 . 乾燥 ~ 非常に乾燥した皮膚用の紅い斑点に作用するクリーム		
水	合計 1 0 0 . 0 0 0 0 0 になるまで必要量	
ワセリン	1 . 0 ~ 1 0 . 0	
水素化ココグリセリド	1 . 0 ~ 1 0 . 0	
イソデシル ネオペンタノエート	1 . 0 ~ 1 0 . 0	
Simmondsia Chinensis (ホホバ) 油	1 . 0 ~ 2 . 0	
ブチレン グリコール	1 . 0 ~ 5 . 0	
セテアリアル アルコール	1 . 0 ~ 5 . 0	30
グリセロール	1 . 0 ~ 1 0 . 0	
スクアレン	1 . 0 ~ 1 0 . 0	
ルピンのペプチド抽出物 (1 0 % 水溶液)	0 . 1 ~ 1 0 . 0	
L a u r e t h - 2 3	1 . 0 ~ 1 0 . 0	
二酸化チタン	1 . 0 ~ 1 0 . 0	
ケン化できないダイズ グリシン	0 . 1 ~ 1 0 . 0	
(ダイズ) 油		
カプリル酸 / カプリン酸 トリグリセリド	1 . 0 ~ 5 . 0	
フェノキシエタノール	0 . 1 ~ 1 . 0	
セテアリアル グルコシド	0 . 1 ~ 1 . 0	40
ダイズ種子抽出物	0 . 1 ~ 1 0 . 0	
フレグランス	0 . 1 ~ 1 . 0	
Sophora Japonica	0 . 1 ~ 1 0 . 0	
酢酸トコフェロール	0 . 1 ~ 1 . 0	
キャンデリアワックス	0 . 1 ~ 1 . 0	
C I 7 7 8 9 1	0 . 1 ~ 0 . 5	
メチルパラベン	0 . 1 ~ 0 . 5	
マイカ	0 . 1 ~ 0 . 5	
プロピルパラベン	0 . 1 ~ 0 . 5	
エチルヘキシル パルミテート	0 . 1 ~ 0 . 5	50

クロルフェネシン	0.1 ~ 0.3
アクリレート / C 1 0 - 3 0	0.1 ~ 0.3
アルキル アクリレート クロスポリマー	
キサンタンゴム	0.1 ~ 0.3
E D T A ニナトリウム	0.1 ~ 0.3
水酸化ナトリウム	0.1 ~ 0.3

【 0 1 3 8 】

V I I I - 洗口液の例

割合を組成物の全重量として表す。ルピンのペプチド抽出物は、本発明による 1 0 重量 % 水溶液の形態、または粉末形態ペプチド抽出物にちなんだ凍結乾燥粉末の形態で使用される。

10

【 0 1 3 9 】

1 . ルピンの 1 0 % 水溶液ペプチド抽出物 + 殺菌剤 (トリクロサン (Triclosan)) + 抗プラーク剤 (G a n t r e z S 9 7 B F (登録商標))

ルピンのペプチド抽出物	2
エチルアルコール	1 0
グリセロール	1 0
水素化ヒマシ油	0.5
(4 0 モル E O でエトキシ化)	
(C r e m o p h o r c o 4 1 0)	
ポリ (メチル ビニル エーテル / マレイン酸)	0.2
(G a n t r e z S 9 7 B F (登録商標))	
水酸化ナトリウム	0.15
フッ化ナトリウム	0.05
シナモン - ミント着香剤	0.1
トリクロサン	0.03
塩化亜鉛	0.01
サッカリンナトリウム	0.01
着色剤 C . I . 1 6 2 5 5 (E 1 2 4)	0.0025
精製水	合計 1 0 0 になるまで必要量

20

30

【 0 1 4 0 】

2 . ルピンの 1 0 % 水溶液ペプチド抽出物 + 殺菌剤

ルピンのペプチド抽出物	2
エチルアルコール	1 0
グリセロール	1 0
水素化ヒマシ油	0.3
(4 0 モル E O でエトキシ化)	
(C r e m o p h o r c o 4 1 0)	
フッ化ナトリウム	0.05
シナモン - ミント着香剤	0.1
トリクロサン	0.03
塩化亜鉛	0.01
サッカリンナトリウム	0.01
着色剤 C . I . 1 6 2 5 5 (E 1 2 4)	0.0025
精製水	合計 1 0 0 になるまで必要量

40

【 0 1 4 1 】

3 . ルピンの粉末形態ペプチド抽出物 + 殺菌剤 (セチルピリジニウム クロライド)

ルピンのペプチド抽出物	1
エチルアルコール	1 0
グリセロール	8

50

水素化ヒマシ油	0 . 1	
(4 0 モル E O でエトキシ化)		
(C r e m o p h o r c o 4 1 0)		
フッ化ナトリウム	0 . 0 5	
シナモン - ミント芳香剤	0 . 1	
セチルピリジニウム クロライド	0 . 0 5	
塩化亜鉛	0 . 0 1	
サッカリンナトリウム	0 . 0 1	
着色剤 C . I . 1 6 2 5 5 (E 1 2 4)	0 . 0 0 2 5	
精製水	合計 1 0 0 になるまで必要量	10

【 0 1 4 2 】

I X - 練歯磨き例

割合を組成物の全重量として表す。ルピンのペプチド抽出物は、本発明による 1 0 重量 % 水溶液の形態、または粉末形態ペプチド抽出物にちなんだ凍結乾燥粉末の形態で使用される。

【 0 1 4 3 】

1 . ルピンの粉末形態ペプチド抽出物 + フッ化物

ルピンのペプチド抽出物	1	
モノフルオロリン酸ナトリウム	0 . 7 5	
フッ化ナトリウム	0 . 1 0	20
7 0 % ソルビトール	3 5	
強研磨力を有する合成シリカ	1 3	
弱研磨力を有する合成シリカ	5	
カルボキシメチルセルロース ナトリウム	1 . 6	
ラウリル硫酸ナトリウム	1	
メントール化着香剤	0 . 8 5	
酸化チタン	0 . 5	
水酸化ナトリウムアルカリ溶液	0 . 5	
チクロ ナトリウム	0 . 3	
メントール	0 . 1 5	30
サッカリン ナトリウム	0 . 0 7	
精製水	合計 1 0 0 になるまで必要量	

【 0 1 4 4 】

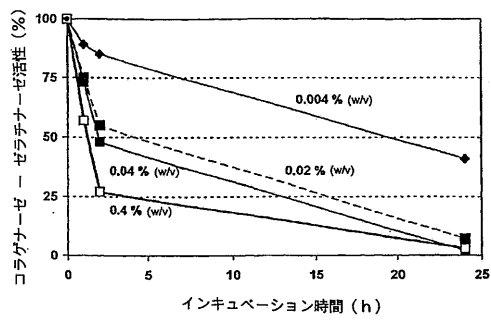
2 . ルピンの 1 0 % 水溶液ペプチド抽出物 + フッ化物

ルピンのペプチド抽出物	2	
モノフルオロリン酸ナトリウム	0 . 7 5	
フッ化ナトリウム	0 . 1 0	
7 0 % ソルビトール	3 5	
強研磨力を有する合成シリカ	1 3	
弱研磨力を有する合成シリカ	5	40
カルボキシメチルセルロース ナトリウム	1 . 6	
ラウリル硫酸ナトリウム	1	
メントール化着香剤	0 . 8 5	
酸化チタン	0 . 5	
水酸化ナトリウムアルカリ溶液	0 . 5	
チクロ ナトリウム	0 . 3	
メントール	0 . 1 5	
サッカリン ナトリウム	0 . 0 7	
精製水	合計 1 0 0 になるまで必要量	

【 図面の簡単な説明 】

【図 1】 図 1 は、非特異的コラゲナーゼの阻害の動態 - ペプチド抽出物の濃度の影響を示す。

【図 1】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 Q	17/00	(2006.01)	A 6 1 K	8/64	
A 6 1 Q	17/04	(2006.01)	A 6 1 Q	17/00	
A 6 1 Q	19/08	(2006.01)	A 6 1 Q	17/04	
A 6 1 P	17/00	(2006.01)	A 6 1 Q	19/08	
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	17/16	(2006.01)	A 6 1 P	17/02	
A 6 1 P	17/18	(2006.01)	A 6 1 P	17/16	
A 6 1 P	39/00	(2006.01)	A 6 1 P	17/18	
A 6 1 P	39/06	(2006.01)	A 6 1 P	39/00	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	39/06	
			A 6 1 P	43/00	1 1 1

(74)代理人 100117743

弁理士 村田 美由紀

(74)代理人 100163658

弁理士 小池 順造

(74)代理人 100174296

弁理士 當麻 博文

(72)発明者 ムジカ、フィリップ

フランス国、エフ - 7 5 0 1 8 パリ、リュ マルカデ 2 2 6

(72)発明者 ピッキリーリ、アントワヌ

フランス国、エフ - 2 8 2 3 0 エペルノン、リュ デュ プリュレ サン - トーマス 5 2 ビ
ス

(72)発明者 ポール、フランソワ

フランス国、エフ - 3 1 4 0 0 トゥールーズ、シュマン ドゥ マルペール 6 9

審査官 金子 亜希

(56)参考文献 特開 2 0 0 0 - 0 2 6 2 7 2 (J P , A)

国際公開第 9 9 / 0 4 5 9 0 0 (W O , A 1)

特開平 0 7 - 0 6 1 9 1 5 (J P , A)

特表 2 0 0 0 - 5 1 4 8 3 5 (J P , A)

国際公開第 9 8 / 0 4 7 4 7 9 (W O , A 1)

Nahrung , 1 9 9 6 年 , Vol.40 , No2 , Page.71-74

Amino acid composition of seed proteins of Lupinus albus , J. Agric. Food Chem. , 1 9 7
9 年 , Vol.27 , No.5 , Page.977-978

Period Polytech Chem Eng , 1 9 9 1 年 , vol.35 , Page.65-70

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 3 6 / 0 0

A 6 1 K 8 / 9 7

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)