

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 3 部門第 2 区分

【発行日】平成 17 年 6 月 16 日 (2005.6.16)

【公開番号】特開 2003-171290 (P2003-171290A)

【公開日】平成 15 年 6 月 17 日 (2003.6.17)

【出願番号】特願 2002-201883 (P2002-201883)

【国際特許分類第 7 版】

A 6 1 K 35/64
 A 2 3 K 1/16
 A 2 3 K 1/18
 A 2 3 L 1/076
 A 2 3 L 1/30
 A 2 3 L 1/302
 A 6 1 K 7/00
 A 6 1 K 31/341
 A 6 1 P 17/00

【F I】

A 6 1 K 35/64
 A 2 3 K 1/16 3 0 2 B
 A 2 3 K 1/16 3 0 4 A
 A 2 3 K 1/18 A
 A 2 3 L 1/076
 A 2 3 L 1/30 A
 A 2 3 L 1/302
 A 6 1 K 7/00 H
 A 6 1 K 7/00 K
 A 6 1 K 7/00 N
 A 6 1 K 31/341
 A 6 1 P 17/00

【手続補正書】

【提出日】平成 16 年 9 月 21 日 (2004.9.21)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 2】

L - アスコルビン酸類及びローヤルゼリー類と共に、飲食品、特別用途食品、保健機能食品、化粧品、医薬部外品、医薬品、飼料、餌料、ペットフードの分野の何れかにおいて使用される 1 種又は 2 種以上の他の成分を含んでなる請求項 1 に記載のコラーゲン産生増強剤。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 7】

L - アスコルビン酸 2 - グリコシドが、少なくとも、L - アスコルビン酸 2 - グルコシ

ドを含有することを特徴とする請求項 6 に記載のコラーゲン産生増強剤。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項 1 0

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 1 0】

飲食品、特別用途食品、保健機能食品、化粧品、医薬部外品、医薬品、飼料、餌料、ペットフードの何れかであることを特徴とする請求項 9 に記載の組成物。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項 1 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 1 3】

ローヤルゼリー類と共に L - アスコルビン酸類を含有することを特徴とする請求項 1 2 に記載の T G F - 産生増強剤。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 0 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 0 8】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、線維芽細胞を用いて、上記の課題を解決するための検討と検索をかさねた結果、L - アスコルビン酸類とローヤルゼリー類とを組み合わせることにより、L - アスコルビン酸類によるコラーゲン産生を、L - アスコルビン酸類単独の使用ではその産生が認められない濃度、或いは、低い産生量しか認められない濃度において、ローヤルゼリー類を添加することにより、その産生が効率的に増強するという予想外の知見に到達した。また、その結果として、L - アスコルビン酸類の失活が進み、もはや単独ではコラーゲン産生が認められない場合であっても、ローヤルゼリー類を存在させることによって L - アスコルビン酸類の活性が増強され、コラーゲン産生が顕現することを独自の知見として見いだした。一方、線維芽細胞のコラーゲン産生は、線維芽細胞などから分泌されるトランスフォーミング グロース ファクター（以下、「T G F - 」と略記する。）により増強されることは知られていた。本発明者らは、この点にも着目してさらに研究を進めた結果、ローヤルゼリー類は線維芽細胞に対してアスコルビン酸類の存在下で、T G F - の産生を増強させ、加えて、真皮よりも皮膚の表面側に存在する表皮のケラチノサイトに対しては、ローヤルゼリー類単独で、T G F - の産生を増強させることを見いだした。このように、ローヤルゼリー類による L - アスコルビン酸類のコラーゲン産生増強機構の一つが、T G F - の産生の増強によることを確認して、ローヤルゼリー類及び / 又はローヤルゼリー類と L - アスコルビン酸類が、コラーゲン産生増強剤、T G F - 産生増強剤及び / 又はケラチノサイト増殖促進剤として有用であることを見出し、本発明を完成した。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 1 8】

本発明のコラーゲン産生増強剤は、ヒトを含む動物類に、経口的、或いは、経皮的のい

ずれの経路で投与した場合にも、その有効成分が速やかに生体内に吸収されて、真皮、組織、臓器などに存在する線維芽細胞におけるL-アスコルビン酸類によるコラーゲン産生を持続して増強するので、ヒトを含む動物類が当該コラーゲン産生増強剤を摂取すると、コラーゲンの産生が安定的に持続し、加齢に伴う老化や、紫外線をはじめとする因子によりダメージを受けた皮膚のコラーゲン産生能の低下を回復し、皮膚にはりやうるおいを与え、小ジワ・シワを除去し、皮膚の弾力を回復する効果を奏することができる。また、特に、経皮投与にあつては、L-アスコルビン酸類及びローヤルゼリー類が、真皮に存在する線維芽細胞や表皮に存在するケラチノサイトに速やかに到達し、TGF- β の産生を増強するなどして、L-アスコルビン酸類によるコラーゲン産生を持続して増強するとともに、ローヤルゼリーがケラチノサイトの増殖を促進して、その角化層を、強化して生体防御能を増強することから、加齢に伴う老化や、紫外線や有害微生物などをはじめとする因子によりダメージを受けた皮膚のコラーゲン産生能の低下を速やかに回復し、皮膚にはりやうるおいを与え、小ジワ・シワを除去し、皮膚の弾力を回復するのに極めて効果的である。しかも、本発明のコラーゲン産生増強剤は、ヒトを含む動物が簡便に利用できて、健康の維持・増進にも利用でき、例えば、強壮剤、TGF- β 産生増強剤、ケラチノサイト増殖促進剤、健康食品、健康補助食品、特別用途食品、保健機能食品、化粧品、医薬部外品、医薬品、飼料、餌料、ペットフード、雑貨などとしてもとりわけ有用である。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0019】

本発明のコラーゲン産生増強剤の摂取量又は投与量は、対象とするヒトをはじめとする動物やペットなどの種類、年齢、性別などによって異なるものの、L-アスコルビン酸としての重量換算で、体重1kgあたり、通常、0.1mg乃至0.25g、望ましくは、1mg乃至0.5g、ローヤルゼリーとしての重量換算で、体重1kgあたり、通常、0.5mg乃至2g、望ましくは、1mg乃至1g、経口的に、1日1回又は数回に分けて、効果に応じて、連日又は1日以上の間隔をおいて摂取するか、あるいは投与すればよい。経口的に投与される強壮剤、健康食品、健康補助食品、特別用途食品、保健機能食品、医薬部外品、医薬品、飼料、餌料、ペットフードなどでは、例えば、液剤、錠剤、粉末剤、顆粒剤、ペースト剤、シラップ剤、カプセル剤など、各々の用途に応じた形態のものを用いることができる。また、本発明のコラーゲン産生増強剤を、化粧品などの皮膚外用剤として皮膚に直接塗布する場合には、当該コラーゲン産生増強剤に使用されるL-アスコルビン酸類或いはローヤルゼリー類は、各々、L-アスコルビン酸或いはローヤルゼリーとしての重量換算で、皮膚外用剤全量中、0.001乃至20重量%、好ましくは、0.005重量%乃至15重量%であり、1日1回又は数回に分けて、効果に応じて、連日又は1日以上の間隔をおいて直接皮膚に塗ればよい。なお、L-アスコルビン酸類或いはローヤルゼリー類は、0.001重量%未満では、その効果は発揮され難くなり、30重量%を越える製品にあつては、製品の物性の面で好ましくない場合がある。また、当該皮膚外用剤は、例えば、ローション、乳液、クリーム、固形、粉末、ゼリー、パック、フェイスマスクなど、その使用目的に応じた形態のものとして用いることができる。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0021

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0021】

固形の形態の本発明のコラーゲン産生増強剤は、例えば、L-アスコルビン酸と非加熱処理ローヤルゼリーとを混合し、必要に応じて他の成分を更に混合した後、当該混合物を

、減圧乾燥、真空乾燥、温風乾燥などの通常の乾燥工程に供することにより得ることができる。また、例えば、同じ出願人による特開平 6 - 1 7 0 2 2 1 号公報に開示される無水 - トレハロースなどを賦形剤として利用することにより、通常の乾燥工程を経ることなく固状の形態の当該コラーゲン産生増強剤を得ることもできる。すなわち、結晶又は非結晶の - トレハロース無水物を、L - アスコルビン酸と非加熱処理ローヤルゼリーの混合物に添加し、当該混合物を、常温以下で静置すればよい。 - トレハロースの無水物を用いて通常の乾燥工程を経ずに調製されたものは、非加熱処理ローヤルゼリーによる L - アスコルビン酸類のコラーゲン産生を増強する作用はもちろんのこと、非加熱処理ローヤルゼリーが有する様々な作用の安定性がとりわけ優れているので、本発明に有利に利用できる。これら固状の形態の当該コラーゲン産生増強剤は、必要に応じて、粉碎機、造粒機、打錠機などを用いて、粉末、顆粒、錠剤など所望の形態にしたり、さらに必要に応じて、例えば、該粉末又は該顆粒をカプセルに充填して利用することも有利に実施できる。なお、本発明のコラーゲン産生増強剤の粉末化に使用する脱水剤は、ローヤルゼリーの活性を安定に保持しつつ、脱水できる可食性の脱水剤であればいずれでも良く、好ましくは、無水 - トレハロースの他に、無水 - トレハロース、無水マルトース、無水あるいは 1 含水の環状四糖などが例示される。

【手続補正 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 2 2】

本発明の組成物の形態には特に制限はない。望ましい食品としては、例えば、アイスクリーム、アイスキャンデー、シャーベットなどの氷菓、氷蜜などのシロップ、バタークリーム、カスタードクリーム、フラワーペースト、ピーナッツペースト、フルーツペーストなどのスプレッド及びペースト、チョコレート、ゼリー、キャンディー、グミゼリー、キャラメル、チューインガム、プリン、シュークリーム、スポンジケーキなどの洋菓子、ジャム、マーマレード、シロップ漬、糖菓などの加工果実ないしは加工野菜、まんじゅう、ういろう、あん、羊羹、水羊羹、カステラ、飴玉、米菓などの和菓子、醤油、粉末醤油、味噌、粉末味噌、マヨネーズ、ドレッシング、食酢、三杯酢、テーブルシュガー、コーヒーシュガーなどの調味料などが挙げられる。望ましい飲料の形態としては、例えば、合成酒、醸造酒、果実酒、洋酒などの酒類、ジュース、ミネラル飲料、炭酸飲料、乳酸飲料、乳酸菌飲料、スポーツドリンク、ドリンク剤、緑茶・紅茶・ウーロン茶などの茶飲料、コーヒー、ココアなどの清涼飲料などが挙げられる。望ましい化粧品の形態としては、例えば、ローション、乳液、クリーム、固形、粉末、ゼリー、パック、フェイスマスクなどの形態の、基礎化粧品、洗浄用化粧品、入浴用化粧品、口腔化粧品、日焼け・日焼け止め化粧品、メイクアップ化粧品、頭髮化粧品（発毛剤、育毛剤など）や、台所用洗剤のように肌に直接影響を及ぼす雑貨類などが挙げられる。以上のような本発明による組成物を製造するには、目的とする製品を慣用の製造方法にしたがって製造する過程の適宜の時期に本発明のコラーゲン産生増強剤を添加するか、あるいは、L - アスコルビン酸類とローヤルゼリー類とを個々に、適宜、添加すればよい。添加の時期に特に制限はないけれども、目的とする製品が加熱工程を経て製造されるもの場合には、L - アスコルビン酸類や他の熱に不安定な成分については、加熱工程の後、常温、望ましくは、3 0 以下に冷却した後に添加することにより、製造工程でのコラーゲン産生増強作用の減衰を防ぐことができる。以上のような本発明の組成物は、本発明のコラーゲン産生増強剤を、製品重量あたり、通常、0 . 0 1 重量 % 乃至 2 0 重量 %、望ましくは、0 . 1 重量 % 乃至 1 0 重量 % 含有する。

【手続補正 1 0】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 0 0 2 5 】

【実験 1】

< L - アスコルビン酸類 或いは ローヤルゼリー 類による コラーゲン 産生作用の検討 >

(1) アスコルビン酸類

アスコルビン酸類としては、L - アスコルビン酸ナトリウム（試薬特級 和光株式会社販売）を使用した。

(2) ローヤルゼリー類

本実験において、ローヤルゼリー類として非加熱処理ローヤルゼリー及び加熱処理ローヤルゼリーを使用した。非加熱処理ローヤルゼリーとしては、未加工のブラジル産ローヤルゼリー（水分 67 重量%、-20℃で保存。）を、使用の際に随時常温で解凍し、直後に必要量を小分けして用いた。また、加熱処理ローヤルゼリーは、前記非加熱処理ローヤルゼリーを、口径が 18 mm のガラス試験管に 5 g ずつ採取し、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃、90℃の処理の場合は、恒温槽の中で 30 分間保持し、100℃の処理の場合は、オイルバス中で 30 分間保持した。加熱処理後、直ちに、30℃以下に冷却して以後の実験に供した。

(3) ハムスター新生児線維芽細胞の調製

常法に従い、ハムスター新生児の背部皮膚を切開し、剥離した皮膚の切片から、線維芽細胞を単離した。以下、その方法を略記する。予め、デイスパーゼ（株式会社合同酒精販売）を、0.03 mM Ca^{++} を含むイーグルの MEM 培地（株式会社日水販売）に、500 単位 / ml となるように溶解した培地中に、当該切片を、4℃で一晩静置後、表皮と真皮を剥離した。剥離した真皮を、0.25% (v/v) となるようにコラゲナーゼ（株式会社天野製薬販売）を溶解したダルベッコの MEM 培地（株式会社日水販売、以下「D-MEM」と略記する。）中で、37℃で 1 時間保持した。その後、真皮の細片を、同培地中でピペティングすることにより、ハムスター新生児線維芽細胞の単細胞の懸濁液を調製後、遠心分離により、細胞を回収した。回収した細胞をリン酸緩衝食塩水に懸濁し、30 分放置後、線維芽細胞を含む上清を遠心分離して当該細胞を回収し、10% (v/v) の牛胎児血清（ギブコ BRL 社販売、以下「FCS」と略記する。）含有 D-MEM に再懸濁して、以後のコラーゲン産生量測定用の線維芽細胞として使用した。

(4) L - アスコルビン酸による コラーゲン 産生の測定

以下の細胞の培養は、37℃、5% (v/v) CO_2 濃度のインキュベーター中で行った。前記 (3) で調製したハムスター新生児の線維芽細胞懸濁液 3 ml を 6 ウェルのプレートに、 4×10^5 細胞 / ウェルとなるように蒔き込み、7 日間培養した。10% (v/v) の FCS を含有した D-MEM に、L - アスコルビン酸ナトリウムを、L - アスコルビン酸としての重量換算で、各々 0.0、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0、200.0 $\mu g / ml$ となるように溶解した。同様に、10% (v/v) の FCS を含有した D-MEM に、非加熱処理ローヤルゼリー又は加熱処理ローヤルゼリーを、各々 0.0、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0、200.0、500.0 $\mu g / ml$ となるように溶解した。当該 L - アスコルビン酸ナトリウム又はローヤルゼリーを溶解した各々の培地 5 ml を、当該線維芽細胞の培養上清を除去したウェルに加え、さらに、3 日間培養した。その後、各々のウェルの培養上清を、同一のアスコルビン酸、又は、ローヤルゼリー濃度に調製した培地 5 ml で置換し、3 日間培養した後、前記と同一のアスコルビン酸、或いは、ローヤルゼリー濃度の培地 1 ml と置換し、さらに 3 時間培養後、D-MEM に溶解した $[2, 3 - ^3H]$ プロリン（40 Ci / mmol、アマシャム社販売）を 3 μCi / ウェルとなるように添加し、一晩さらに培養した。本実験に使用した培地類（L - アスコルビン酸、或いは、ローヤルゼリー添加のものを含む）は、いずれも、0.22 μm のフィルターで濾過したものを使用した。

(5) 線維芽細胞の産生した コラーゲン に取り込まれた プロリン の定量

前記(4)で[2, 3-³H]プロリンの存在下で、ハムスター新生児の線維芽細胞を一晚培養した後、常法にしたがって細胞からコラーゲンを抽出し、取り込まれた[2, 3-³H]プロリンを定量した。プロリンの定量は、セオ・ジン キム(Seong-Jin Kim)ら、『ダーマトロジック サージェリー』(Dermatologic Surgery)、第24巻、第1054-1058頁(1998年)に記載された方法に基づいて行った。以下、その方法を略記すると、前記(4)で[2, 3-³H]プロリンを加えて一晚培養した細胞の上清を除去後の各ウェルに、トリプシン(ギブコBRL社販売)0.3ml/ウェルを添加し、37℃で10分間静置し、さらに、0.3mlのD-MEMを添加して、細胞を当該培地に懸濁した。当該細胞懸濁液を、遠心分離して上清を除去して線維芽細胞を回収し、当該細胞に、1mg/mlのペプシン(シグマ社販売)含有1M酢酸0.1mlを添加し、攪拌して混合し、室温で、4時間振盪した。次に、200μg/mlのタイプIコラーゲン(株式会社高研販売)含有0.5M酢酸0.8mlを添加し、3,000回転/分、4℃で5分間遠心分離後、上清を5M塩化ナトリウムで、0.15Mに調整し、12,000回転/分、4℃で10分間遠心分離した。上清を5M塩化ナトリウムで、0.45Mに調整し、3,200回転/分、4℃で30分間遠心分離後上清を除去した。さらに、沈澱に、20%(v/v)エタノール水溶液4mlを添加し、3,200回転/分、4℃で10分間遠心分離後上清を除去した。最後に、沈澱に、0.5M酢酸を0.25ml添加し、攪拌して、沈澱を懸濁し、その懸濁液を5mlのシンチレーション溶液に懸濁し、液体シンチレーションカウンターで、コラーゲンに取り込まれた³Hプロリンの量を常法に従って定量した。実験は、L-アスコルビン酸ナトリウム、ローヤルゼリーの各々の濃度について、3ウェルを使用して実験をおこなった。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0030

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0030】

実験1に示したように、L-アスコルビン酸単独ではその濃度が0.5μg/ml以上でないと、コラーゲン産生作用は認められないにもかかわらず、ローヤルゼリーを併用することにより、0.2μg/mlの濃度で、すでに、コラーゲン産生作用が認められる。実験で使用したローヤルゼリーには、L-アスコルビン酸は含まれていないので、この結果から、ローヤルゼリーは、L-アスコルビン酸以外の成分により、L-アスコルビン酸によるコラーゲン産生能を増強しており、また、コラーゲン産生作用に必要なL-アスコルビン酸の濃度を、L-アスコルビン酸単独の場合より低くする作用も有していることが確認された。加えて、L-アスコルビン酸が20.0μg/mlの濃度の場合、少なくとも、10μg/ml以上のローヤルゼリーを添加すれば、L-アスコルビン酸によるコラーゲン産生が、ローヤルゼリーにより増強されることが確認された。このことは、アスコルビン酸類が、生体内で分解を受け、単独での使用であれば、そのコラーゲン産生作用を発揮できない、乃至、産生能が低下する濃度となった場合でも、ローヤルゼリーを併用することにより、アスコルビン酸によるコラーゲン産生が増強され、当該コラーゲンの産生能が安定に維持できることを示すものである。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0032

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0032】

その結果を、ローヤルゼリー存在下及び非存在下でのL-アスコルビン酸2-グルコシドの添加量と、ハムスター新生児線維芽細胞によるコラーゲン産生の関係をL-アスコルビン酸類及びローヤルゼリーの何れも添加しない時の線維芽細胞のコラーゲン産生量を1

00とする相対値により、表3に示す。ハムスター新生児線維芽細胞は、ローヤルゼリー類の添加の有無に係わらず、L-アスコルビン酸2-グルコシドを無添加の場合には、コラーゲンの産生は、実験1の対象と同様に低いレベルであった。また、 $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度のアスコルビン酸2-グルコシドを添加した場合には、無添加に比してコラーゲン産生が増強され、さらに、ローヤルゼリー類の添加により、コラーゲンの産生量は増強された。一方、具体的なデータは示さないが、実験1では、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のL-アスコルビン酸を添加して3日間培養し、同一の培地で置換後さらに3日間培養した場合には、コラーゲン産生が認められたのに対して、陰性対照では、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ のL-アスコルビン酸を添加した培地で培養したにもかかわらず、3日間培養した後に、同一の培地で置換していなかったために、コラーゲン産生の増強は認められなかった。このことは、培地に溶解したL-アスコルビン酸2-グルコシドが、培地中で、L-アスコルビン酸に比して極めて安定であり、細胞に存在するグルコシダーゼにより徐々に、L-アスコルビン酸とグルコースに分解されるため、L-アスコルビン酸としての活性が7日間安定に持続したためと考えられ、ローヤルゼリー類とアスコルビン酸類とを組み合わせる際のL-アスコルビン酸2-グルコシドの優位性を示すものである。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0035

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0035】

ハムスター新生児線維芽細胞は、L-アスコルビン酸2-グルコシド及びローヤルゼリーの非存在下でも、約300ピコグラム（以下、「pg」と略記する。）/mlのTGF- β を産生していた。実験の結果は、このL-アスコルビン酸2-グルコシド及びローヤルゼリーの非存在下での線維芽細胞のTGF- β 産生量を100とする相対値により、表4に示す。線維芽細胞のTGF- β 産生量は、 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ のローヤルゼリーの添加では変化しなかった。一方、L-アスコルビン酸2-グルコシドをL-アスコルビン酸の重量換算で $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように溶解した培地を添加した場合には、無添加に比してTGF- β 産生が増強される傾向にあり、その産生量は、 $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ のローヤルゼリーの添加により、有意に増強された。このTGF- β の産生増強は、実験3に示す、ハムスターの新生児線維芽細胞のL-アスコルビン酸2-グルコシドによるコラーゲン産生のローヤルゼリーによる増強とよく相関しており、L-アスコルビン酸類によるコラーゲン産生をローヤルゼリー類が増強する機構の一つに、TGF- β の産生の増強を介する系が存在することを示している。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0037

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0037】

【実験5】

<ローヤルゼリーによるケラチノサイトのTGF- β 産生に与える影響の検討>

L-アスコルビン酸類による線維芽細胞のTGF- β の産生がローヤルゼリーによって増強されることが確認されたため、線維芽細胞の存在する真皮に隣接する表皮中のケラチノサイトについても、線維芽細胞へ影響を及ぼす可能性があると考えて、そのTGF- β の産生に対するローヤルゼリー及び/又はL-アスコルビン酸2-グルコシドの影響を、以下の方法で検討した。

(1) ケラチノサイト培養用培地

ケラチノサイトの培養には、エピライフ (Epilife) 培地 (カスケードバイオロジック インク社、米国: Cascade Biologics Inc., USA) に

、 0.06 mM Ca^{++} と増殖添加剤 H K G S (最終濃度： $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ ウシインシュリン、 $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ ウシトランスフェリン、 $0.5\text{ }\mu\text{M}$ ハイドロコチゾン、 0.2% ウシ脳下垂体抽出物) (カスケード バイオロジック インク社製、米国)、 100 単位/ml ペニシリン (明治製菓株式会社販売)、及び、 $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン (明治製菓株式会社販売) を添加したエピライフ + H K G S 培地を、ケラチノサイト用基礎培地として使用した。

(2) ハムスター新生児ケラチノサイトの調製

実験 1 と同様にして調製した 4 日齢ハムスター新生児の背部皮膚片から、表皮を剥離し、ハサミを用いて細切後、遠心分離により、沈澱を回収した。回収した沈澱に、 20 単位/ml の D N a s e (シグマ社販売) を添加し、室温で穏やかに 3 分間攪拌後、標準 M E M 培地 (株式会社日水販売、以下、「S - M E M」と略記する。) を添加して、更に 2 分間攪拌後、遠心分離により細胞を回収して、S - M E M に懸濁した。以下の細胞の培養は、 37°C 、 5% (v/v) CO_2 濃度のインキュベーター中で行った。

(3) ローヤルゼリーによる T G F - β 産生増強の測定

S - M E M に懸濁したケラチノサイトを、遠心分離して細胞を回収し、ケラチノサイト用基礎培地に再懸濁し、タイプ I V コラーゲンコート 96 ウエルマイクロプレート (ベクトン デキンソン社製) に、 1×10^4 細胞 / $100\text{ }\mu\text{l}$ / ウエルで蒔き込んだ。ケラチノサイトが、ウエルの底面に付着後、培養液を除去し、あらかじめ、ケラチノサイト用基礎培地に、実験 1 で使用したのと同じローヤルゼリーを、 $1000\text{ }\mu\text{g/ml}$ となるように溶解した溶液及び、それをケラチノサイト用基礎培地で 2 倍段階希釈して調製した、ローヤルゼリーを、各々 500 、 250 、 125 、 62.5 、及び $31.3\text{ }\mu\text{g/ml}$ 含有する試験液で置換した。3 日後に試験液を除去し、同一濃度のローヤルゼリーを含有する試験液を添加して、さらに、24 時間培養し、その上清中の T G F - β 量を、実験 4 と同様に T G F - β 1 E m a x I m m u n o A s s a y S y s t e m により測定した。ケラチノサイトは、L - アスコルビン酸類及びローヤルゼリー無添加の場合、約 70 pg/ml の T G F - β を産生していた。実験の結果は、この L - アスコルビン酸類及びローヤルゼリー無添加の場合の T G F - β 産生量を 100 とする相対値により、表 5 に示す。

(4) ローヤルゼリーによるケラチノサイトの増殖促進の測定

(3) の実験と同一の条件で同一の期間ケラチノサイトを培養し、その後さらに 3 日間培養を継続した後、アラマー ブルー (a l a m e r b l u e) (トレック ダイアゴノスティック システムズ インク社製：T R E K D I A G O N O S T I C S Y S T E M S I N C.) を $20\text{ }\mu\text{l}$ / ウエル添加し、 37°C で 3 時間保持した後で、フルオロスキアン II (F l u o r o s k a n I I、ラボシステムズ (Labsystems) 社製) を使用して、励起波長 544 nm 、蛍光波長 590 nm で蛍光強度を測定した。結果は、ローヤルゼリー無添加で培養したケラチノサイト量 (蛍光強度) を 100 とした相対値により、表 6 示す。

【手続補正 15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0046

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0046】

本品は、L - アスコルビン酸によるコラーゲン産生を増強する作用を示し、皮膚にうるおいを与え、皮膚の老化防止に奏効する、簡便に利用できかつ著効を示すコラーゲン産生増強剤である。また、本品は、適度な酸味により良好な呈味を示すので、日常的に利用する健康食品と有用であるばかりでなく、T G F - β 産生増強剤或いはケラチノサイト増殖促進剤としても利用できる。本品は、このまま経口的に摂取することも、又、水やその他の飲料などに溶解して摂取することも自由である。さらには、特別用途食品、保健機能食品、化粧品、医薬部外品、医薬品、飼料、餌料、ペットフード、雑貨などに配合して、こ

れらにコラーゲン産生作用、TGF- β 産生増強作用及び／又はケラチノサイト増殖促進作用を付与することも自由である。