

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-523976

(P2017-523976A)

(43) 公表日 平成29年8月24日(2017.8.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 8/64 (2006.01)	A 6 1 K 8/64	4 C 0 8 3
A 6 1 Q 19/08 (2006.01)	A 6 1 Q 19/08	

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 26 頁)

(21) 出願番号 特願2017-505241 (P2017-505241)
 (86) (22) 出願日 平成27年6月29日 (2015. 6. 29)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年3月24日 (2017. 3. 24)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2015/082712
 (87) 国際公開番号 W02016/015536
 (87) 国際公開日 平成28年2月4日 (2016. 2. 4)
 (31) 優先権主張番号 14/448, 401
 (32) 優先日 平成26年7月31日 (2014. 7. 31)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 517027468
 南京莎菲特生物科技有限公司
 SAFT Biotechnology
 Com. Ltd.
 中国江蘇南京市建▲イエ▼區嘉陵江東街1
 8號04幢7層715室
 Rm715, 7F, Building 4
 , No. 18, Jialingjiang
 East St., Jianye Di
 strict, Nanjing, Jian
 gsu 210000 P. R. C.

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】化粧品におけるサーファクチンの応用

(57) 【要約】

七つのアミノ酸で環状の構造を形成する天然環型のリポペプチドであり、且つ、皮膚の老化防止をし、防しわであり、化粧品の皮膚透過力を増加し(透過助剤)、発泡剤及び乳化剤等の機能を有する微生物バチルス・サブチリスに由来する生物表面活性剤biosurfactantのサーファクチン(surfactin)である。

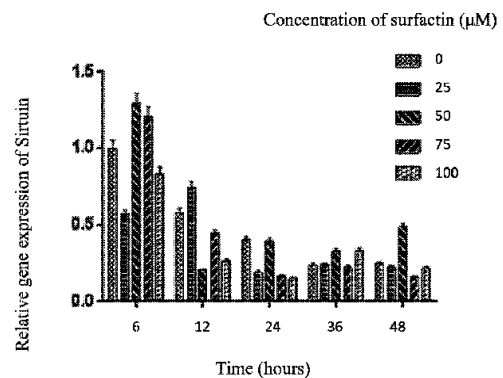


Figure 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

サーファクチン (surfactin) と、薬学的に許容される担持体 (vehicles)、賦形剤、希釈剤、補助剤等を含む化粧品組成物を使用者に有効投与量投与することを含む老化防止の治療方法。

【請求項 2】

前記サーファクチンは、シクロリポペプチドであり、ヒドロキシ脂肪酸に連結されるヘプタペプチド配列 (L)Glu - (L)Leu - (D)Leu - (L)Val - (L)Asp - (D)Leu - (L)Leu を含み、前記サーファクチンの脂肪酸末端における脂肪酸の分布は、

- (1) イソC13が3%より大きく、
- (2) n - C13が0.65%より大きく、
- (3) イソC14が17%より大きく、
- (4) n - C14が41%より少なく、
- (5) イソC15が11%より少ないことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記サーファクチンの前記脂肪酸末端における脂肪酸の分布は、

- (1) イソC13が10%より大きく、
- (2) n - C13が25%より大きく、
- (3) イソC14が35%より大きく、
- (4) n - C14が25%より小さく、
- (5) イソC15が3%より少ないことを特徴とする、請求項2に記載の方法。

20

【請求項 4】

前記サーファクチンの前記脂肪酸末端における脂肪酸の分布は、(1) イソC13が11%であり、(2) n - C13が26%であり、(3) イソC14が37%であり、(4) n - C14が24%であり、(5) イソC15が2%であることを特徴とする、請求項5に記載の方法。

【請求項 5】

前記サーファクチンの分子量が1022又は1036 Daであることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項 6】

前記サーファクチンは、その化学異性体を含むことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

30

【請求項 7】

前記老化防止化粧品組成物は、更にアルコール類、エステル類、複合多糖体、ナットオイル及びビタミンのうち少なくとも一つを含むことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項 8】

前記アルコール類は、C16 - 18アルコール、ブタンジオール、ペンタンジオール、オクタジオール、グリセリン、ヘキサデカノール、オクタデシルアルコール、ドコサノール及びプロピレングリコールのうち少なくとも一つを含むことを特徴とする、請求項7に記載の方法。

40

【請求項 9】

前記エステル類は、オリーブ油セチルアルコールエステル (OLIVEM 1000)、モノステアリン酸グリセリル (GSM (登録商標))、イソプロピルミリステート (IPM)、イソプロピルパルミテート (IPP) 及びトリグリセリドのうち少なくとも一つを含むことを特徴とする、請求項7に記載の方法。

【請求項 10】

前記複合多糖体は、キサンタンガム、シロキクラゲ多糖体、グルカン、センナ葉種多糖体のうち少なくとも一つを含むことを特徴とする、請求項7に記載の方法。

【請求項 11】

前記ナットオイルは、アルガン油、ククイナッツオイル、アボカドオイル、小麦胚芽

50

油、オリーブ油のうちの少なくとも一つを含むことを特徴とする、請求項7に記載の方法。

【請求項12】

前記ビタミンは、ビタミンA、ビタミンB、ビタミンC、ビタミンE、ビタミンF、ビタミンKのうちの少なくとも一つを含むことを特徴とする、請求項7に記載の方法。

【請求項13】

前記老化防止化粧品組成物は、繊維芽細胞の増殖、コラーゲンの増生又はサーチュイン1遺伝子の発現を促進するためのものであることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項14】

前記老化防止化粧品組成物は、紫外光による老化防止又は酸化防止のためのものであることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

10

【請求項15】

前記老化防止化粧品組成物は、マトリックスメタロプロテアーゼ (Matrix metalloproteinase) を抑制するためのものであることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項16】

前記マトリックスメタロプロテアーゼは、マトリックスメタロプロテアーゼ9タイプ (Matrix metalloproteinase 9) であることを特徴とする、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

サーファクチン (surfactin) と、薬学的に許容される担持体 (vehicles)、賦形剤、希釈剤、補助剤等を含み、サーファクチンの使用により皮膚透過力を増加させる組成物の調製方法。

20

【請求項18】

前記サーファクチンは、シクロリポペプチドであり、ヒドロキシ脂肪酸に連結されるヘプタペプチド配列 (L)Glu - (L)Leu - (D)Leu - (L)Val - (L)Asp - (D)Leu - (L)Leu を含み、前記脂肪酸末端における脂肪酸の分布は、

- (1) イソC13が3%より大きく、
- (2) n - C13が0.65%より大きく、
- (3) イソC14が17%より大きく、
- (4) n - C14が41%より少なく、
- (5) イソC15が11%より少ないことを特徴とする、請求項17に記載の方法。

30

【請求項19】

前記サーファクチンの前記脂肪酸末端における脂肪酸の分布は、

- (1) イソC13が10%より大きく、
- (2) n - C13が25%より大きく、
- (3) イソC14が35%より大きく、
- (4) n - C14が25%より小さく、
- (5) イソC15が3%より少ないことを特徴とする、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記サーファクチンの前記脂肪酸末端における脂肪酸の分布は、(1) イソC13が11%であり、(2) n - C13が26%であり、(3) イソC14が37%であり、(4) n - C14が24%であり、(5) イソC15が2%であることを特徴とする、請求項19に記載の方法。

40

【請求項21】

前記サーファクチンの分子量が1022又は1036Daであることを特徴とする、請求項17に記載の方法。

【請求項22】

前記サーファクチンは、その化学異性体を含むことを特徴とする、請求項17に記載の方法。

【請求項23】

前記皮膚透過力を増加する組成物は、更にアルコール類、エステル類、複合多糖体、ナットオイル及びビタミンのうちの少なくとも一つを含むことを特徴とする、請求項17に

50

記載の方法。

【請求項 2 4】

前記アルコール類は、C16 - 18アルコール、ブタンジオール、ペンタンジオール、オクタジオール、グリセリン、ヘキサデカノール、オクタデシルアルコール、ドコサノール及びプロピレングリコールのうち少なくとも一つを含むことを特徴とする、請求項23に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記エステル類は、セチルアルコールオリーブ油エステル (OLIVEM 1000)、モノステアリン酸グリセリル (GSM (登録商標))、イソプロピルミリステート (IPM)、イソプロピルパルミテート (IPP) 及びトリグリセリドのうち少なくとも一つを含むことを特徴とする、請求項23に記載の方法。

10

【請求項 2 6】

前記複合多糖体は、キサンタンガム、シロキクラゲ多糖体、グルカン、センナ葉種多糖体のうち少なくとも一つを含むことを特徴とする、請求項23に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記ナットオイルは、アルガン油、ククイナッツオイル、アボカドオイル、小麦胚芽油、オリーブ油のうち少なくとも一つを含むことを特徴とする、請求項23に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記ビタミンは、ビタミンA、ビタミンB、ビタミンC、ビタミンE、ビタミンF、ビタミンKのうち少なくとも一つを含むことを特徴とする、請求項23に記載の方法。

20

【請求項 2 9】

前記組成物は、化粧品の原料が皮膚を透過するように促進するためのものであることを特徴とする、請求項17に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記化粧品の原料は、コルチコステロイド (dexamethasone) であることを特徴とする、請求項29に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記化粧品の原料は、ヒアルロン酸 (hyaluronic acid) であることを特徴とする、請求項29に記載の方法。

30

【請求項 3 2】

前記化粧品の原料は、ガンマポリグルタミン酸 (Gamma - polyglutamic acid) であることを特徴とする、請求項29に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記化粧品の原料は、金ナノ粒子 (gold - nanoparticles) であることを特徴とする、請求項29に記載の方法。

【請求項 3 4】

サーファクチン (surfactin) と、薬学的に許容される担持体 (vehicles)、賦形剤、希釈剤、補助剤等を含む、サーファクチンを用いる乳化剤組成物の調製方法。

【請求項 3 5】

前記サーファクチンは、シクロリポペプチドであり、ヒドロキシ脂肪酸に連結されるヘプタペプチド配列 (L) Glu - (L) Leu - (D) Leu - (L) Val - (L) Asp - (D) Leu - (L) Leuを含み、前記サーファクチンの脂肪酸末端における脂肪酸の分布は、

40

(1) イソC13が3%より大きく、

(2) n - C13が0.65%より大きく、

(3) イソC14が17%より大きく、

(4) n - C14が41%より少なく、

(5) イソC15が11%より少ないことを特徴とする、請求項34に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記サーファクチンの前記脂肪酸末端における脂肪酸の分布は、

50

- (1) イソC13が10%より大きく、
- (2) n - C13が25%より大きく、
- (3) イソC14が35%より大きく、
- (4) n - C14が25%より小さく、
- (5) イソC15が3%より少ないことを特徴とする、請求項35に記載の方法。

【請求項37】

前記サーファクチンの前記脂肪酸末端における脂肪酸の分布は、(1) イソC13が11%であり、(2) n - C13が26%であり、(3) イソC14が37%であり、(4) n - C14が24%であり、(5) イソC15が2%であることを特徴とする、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

前記サーファクチンの分子量は、1022又は1036Daことを特徴とする、請求項34に記載の方法。

【請求項39】

前記サーファクチンは、その化学異性体を含むことを特徴とする、請求項34に記載の方法。

【請求項40】

前記乳化剤組成物は、更に脂肪酸グリセリド、脂肪酸ソルビタン、脂肪酸ショ糖エステル、脂肪酸プロピレングリコール、レシチンのうちの少なくとも一つを含むことを特徴とする、請求項34に記載の方法。

【請求項41】

前記乳化剤組成物は、発泡力を増加するためのものであることを特徴とする、請求項34に記載の方法。

【請求項42】

前記乳化剤組成物は、乳化作用を増加するためのものであることを特徴とする、請求項34に記載の方法。

【請求項43】

前記乳化剤組成物係は、なめらかさを増加するためのものであることを特徴とする、請求項34に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、サーファクチンの応用方法に関し、特に化粧品におけるサーファクチンの応用方法に関する。

【背景技術】

【0002】

1. ヒト皮膚の構造及びその老化因子

皮膚は、人体表面の主な器官であり、厚さは、部位、年齢及び性別によっては異なり、且つ皮膚の主な機能は、人体の第一の障壁であり、人体内部の組織が外在環境因子による損害、例えば、紫外線の照射、温度の変化、湿度の変化、懸濁粒子による損害及びウイルス又は細菌の人体への直截な進入を避けることができるので、皮膚は、外界因子の刺激を容易に受けて老化メカニズムを起動させ損傷された細胞を代謝する。

【0003】

(1) 細胞の老化及び遺伝子の欠け

老化作用は、細胞から徐々に組織と器官に影響を及ぼし、各部分の組織器官の構造と機能を徐々に衰退させる。Leonard Hayflickの1963年の研究において、冷凍貯蓄された人体分離細胞を培養してサブテストを行い、細胞が一定の回数分裂した後に歪みが発生したことを発現し、結果から、人体細胞がその分裂上限回数があり、細胞は約50回分裂した後にその分裂レート及び外観は、いずれも変化して、ランダムな分裂手段を生じて、粒状タイプ、ねじれタイプ等の不正常的な細胞外観をもたらしてアポトーシスを起こすことが発現される。この研究によると、生物体の生長周期が受精卵時に決められ、事前に既に生物体の生

10

20

30

40

50

命時計を設定して、ヒトとして、細胞が50回分裂することは、約120年間に達することができることが認められる。人体には細胞を複製時に欠かれるセグメントを複製し直すことができるテロメラーゼが無く、複数回の細胞複製、分裂途中で遺伝子が損なわれてしまうので、細胞の周期を制限し、当該制限がGlass Ceilingとも称され、この老化は、不可逆で且つ回避できないことである。

【0004】

(2) 紫外線

皮膚とその他の器官は、時間につれて老化するが、相違点は、皮膚が日常生活において環境因子による刺激を受けることで、人体のその他の組織と器官より皮膚の老化が激しい。多くの環境老化因子では、紫外線 (ultraviolet、UV) の照射が最も影響力を有する。紫外線の波長範囲が10~400nmであり、エネルギー範囲が3eVから124eVであり、波長によって、(1) 波長が315~400nmにあり、地球の大気層を直接透過して地表に照射でき、皮膚の真皮層を透過して、皮膚のダークスポット、老化及びしわをもたらしてしまい、透過力が三種類の波長で最も強い長波紫外線 (UV-A) と、(2) 波長が280~315nmにあり、皮膚の腫れ、熱さ、痛さ乃至脱皮又は類似な焼けつきの症状をもたらしてしまい、地球に照射する時に成層圏におけるオゾン層によって吸収され、極少の一部しかオゾン層を介して地表に到達しない中波紫外線 (UV-B) と、(3) 波長が100~280nmにあり、エネルギーが最も強くかなり危険な傷害力を有するが、波長が短くて大気層で吸収されるので、総太陽光の0.1%より少ないものしか地表に到達しなく、且つ一般的な遮蔽と日焼け止め及びガラス障壁によって効果的に阻止できる短波紫外光 (UV-C) という三種類の紫外線階層に分けられる。研究では、UV-Aがヒト皮膚の繊維芽細胞に対してマトリックスメタロプロテアーゼの産生を誘発し、マトリックスメタロプロテアーゼ家族は皮膚コラーゲン、エラスチン及び細胞間のマトリックス等の物質を分解し、皮膚を老化させ、UV-Aは、細胞内のフリーラジカルの濃度の向上を余儀なくさせ、高すぎる濃度は、細胞を早めに老化乃至アポトーシスさせることがあることが発現される。

10

20

30

40

50

【0005】

(3) フリーラジカル

フリーラジカル (Free radical) 理論は、現在科学界において最も承認される老化理論であり、1954年にアメリカリンカーン大学の医学院のDenham Harmam M.D. によって提出されたが重視されなく、20年間後、フリーラジカル理論は徐々に受けられ、現在既に老化理論の主流の一つになっており、1995年にDenham Harmamがノーベル医学賞に指名される。正常な原子は一对になる電子を有するが、フリーラジカルは、一对にならない電子を含む酸素原子物質である。電子が一对にならない状態において極不安定であるので、フリーラジカルは正常な原子の電子を移し、細胞で構成されたマトリックスを変化させ、細胞の死亡になってしまう。

【0006】

フリーラジカルの重要な由来は、自体の新陳代謝又は合成栄養素の外、老化を引き起こす由来は、環境汚染、紫外線、放射線、喫煙、殺虫剤及び多くの化学薬品であり、特に環境汚染 (自動車の排気、工場から排出されるSO₂) は、体内の大量の有害なフリーラジカルを増加する。

【0007】

フリーラジカル攻撃は、細胞膜損傷及びDNA損傷に分けることができる。ヒト細胞にとっては、酸素含有フリーラジカルは、スーパーオキシドアニオンO₂⁻、過酸化水素H₂O₂、水酸基フリーラジカルOH⁻等を含み、活性酸素分子と呼ばれる。過剰のフリーラジカルは、細胞膜における不飽和脂肪酸を攻撃しやすい。フリーラジカルが細胞膜における不飽和脂肪酸を攻撃する場合、過酸化脂質 (lipid peroxidase) を形成し、血管内壁の低密度リポタンパク質を酸化してプロスタサイクリンシンターゼ (prostacycline Synthetase) を抑制し、動脈硬化、糖尿病、関節炎、白内障、老化、冠状動脈疾患等を招く。フリーラジカルが細胞核に入り込んでDNAを攻撃すると、遺伝情報を変化させて更に癌を引き起こす。また、フリーラジカルは、老化遺伝子を誘導して老化作用の発生を促進することができ、

研究によると、癌、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋ジストロフィー、皮膚ダークスポットの沈積、しわの生成、黄斑、退行心臓病、卒中、潰瘍、リウマチ性関節炎及び多発性硬化等を含む約80%～90%の老化性、退化性疾患がフリーラジカルに相関することが指摘される。

【0008】

細胞のフリーラジカルに対する防御メカニズムは、細胞で合成される各種の酸化防止酵素、グルタチオンペルオキシダーゼ (glutathione Peroxidase、GPx)、スーパーオキシドディスムターゼ (superoxide Dismutase、SOD) 等の酵素と、グルタチオン (Glutathione、GSH) は、スーパーオキシドアニオン

【数1】



等の体内に自ら発生する物質を取り除くことができることである。研究報告によると、長生きの動物体内のSODの含有量が高いが、ヒトは現在知られる体内のSOD含有量が最も高い動物であることが指摘される。年寄老化、体質の変化、環境因素等はいずれも、体内の酸化防止酵素を不足にさせて更に老化を招く恐れがある。

【0009】

(4) 発炎反応

発炎反応は、組織が損なわれるか感染される場合に発生する反応である。先ず、肥満細胞 (Mast cell) は組織に到達して、内皮細胞に付着して、

(1) アミノ酸の衍生物であり、毛細管 (capillary) の透過性を増加させ、局所的血管を拡張させ、血漿 (plasma) 及び食細胞等の物質を通過させ、痒み及び過敏反応を引き起こすヒスタミン (Histamine) と、

(2) サイトカイン (cytokine) でターゲット細胞を殺し免疫システムを活性化し、リンパ細胞の増殖を加速化させ且つ病原体の増殖を阻止し、食細胞を吸引して行うことができる腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor、TNF) と、

(3) 毛細管を拡張させ、神経終末を膨張圧迫するとともに痛みを起し、発炎反応が過ぎた後に、死細胞及び体液で構成され通常マクロファージによって消化される (pus) を生じることがあるプロスタグランジン (Prostaglandin) とを放出する。

【0010】

特定の細胞因子は、COX - 1とCOX - 2を含む自体のシクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase、COX) を活性化する。COXは、アラキドン酸をPGE 2とPGF 2等のプロスタグランジンに大量転換する。最近、研究によれば、COX - 2については多数の正常な組織に存在が発現されないが、各種の癌病者において検出できることが発現され、腫瘍患者におけるCOX - 2の重要性を示した。又、COX - 2は、誘導酵素であり、マクロファージ又はその他の細胞を活性化し、炎症組織を充満することを機能とする。

【0011】

発炎箇所が熱感を発生する主因は、血管拡張剤又はヒスタミンが放出され、血管を拡張させまた血液の流量が増えるからである。ある細胞は、IL - 17 (Interleukin - 1 alpha) の炎性細胞因子、又は旧名インターロイキン (Inflammatory cytokines) 等の物質を放出する。特定の白血球ロイコトリエンを活性化してアレルギー誘発物質を阻止するためのものである。前記細胞因子は、細胞の走化性メカニズム及びインターフェロンを起動し宿主細胞が蛋白質の合成を行うことを中止するケモカインを更に含む。生長因子と細胞毒性分子が放出されて組織を治す可能性もある。上記物質が分泌時に周囲の細胞にも影響を及ぼし、細胞間のマトリックスが流失して更に老化する。

【0012】

上記の四つの老化成因から、皮膚が老化する途中、表皮層の角質細胞及び真皮層の繊維芽細胞の増生が遅くなることによって、皮膚内の真皮層細胞の外のマトリックスの大分子成分及び構造的タンパクが変化し、皮膚の皺を寄せることと、皮膚が薄くなることと、膚色

10

20

30

40

50

が暗くなることと、皮膚の弾性が低下することと、保湿度が低下する等の老化現象を招く。紫外線は、皮膚間葉プロテアーゼの生成を誘発し、皮膚コラーゲン及び弾性フィブリン組織を分解し、且つ紫外線は、細胞内のフリーラジカルの濃度の高めをもたらすこともあり、更に皮膚が発炎反応を発生して早めに老化することになってしまう。又、紫外線照射された後に、皮膚は、生活性酸化物質を発生し細胞膜、構造蛋白、核酸等の細胞構造を破壊し、最終に、皮膚細胞の癌化、死亡を招き、皮膚マトリックスを流失させ外表のしわの累積をもたらす。

【0013】

2. ヒト老化防止蛋白

研究によると、細胞がワインにおける化学的物質であるレスベラトロール (resveratrol) 又は熱量制限の刺激を受ける場合、サーチュイン familyを起動してその細胞周期を延長させることが指摘される。Sinclair及びそのMIT Leonard Guarente実験室から、酵母菌の中の特殊なサーチュイン蛋白は、二種類の特定の手段で老化過程に影響を及ぼし、サーチュインは、細胞における遺伝子の活性を調節制御しDNAにおける断裂を補うことに協力できることが発現される。

10

【0014】

Philipp Oberdoerffer、Sinclair実験室は、マイクロアレイプラットフォームを利用してマウス細胞で酵母菌サーチュイン遺伝子を検知して哺乳類動物のサーチュイン遺伝子配列を捜す。マウス研究結果によれば、脊椎動物には酵母菌におけるサーチュイン遺伝子に類似なものもあることも実証される。Oberdoerfferから、哺乳類動物システムにおけるサーチュインの一つの主な機能は遺伝子発現モードをモーターリングすることである。全ての遺伝子は全ての細胞に出るが、特定の時間に、僅かの遺伝子は活性化を必要とし、間違いの遺伝子が活性化されれば、細胞の損傷をもたらしてしまっアポトーシスに入るようにする。

20

【0015】

サーチュインは、発現が抑制される遺伝子を脱アセチル化し、環境因子による破壊を受けさせることがなく、抑制される遺伝子にオフ状態を維持させ、安定な細胞遺伝子を保持する。サーチュインは、協力してクロマチン (chromatin) を保存して、遺伝子とヒストン (histone) を共通収縮及び被覆して、アイドル状態を保持することができる。DNAが紫外光又はフリーラジカルで損なわれる場合に、サーチュインは、損なわれたところでDNAと協力してメカニズムを修補する。サーチュインの保護機能は、遺伝子が永久性傷害をもたらす前に、保護する効果を図るために、遺伝子と蛋白を被覆住することができる。サーチュインによって保護されないと、ヒストンは、ふわふわとして、保存抑制される遺伝子は、起動され直し、遺伝子が外界によって容易に干渉され損傷される。

30

【0016】

マウスが老化する場合に、DNAの損傷レートが増え、このような損傷は遺伝子の発現が管理制御を失うようにして、クロマチンはそのコントロールされずに解放される場合に、サーチュインは、協力して全遺伝子組の制御外れを制御管理する。この制御外れに活性化された多くの遺伝子は、老化表現型と直接に関連する遺伝子である。

【0017】

研究によると、サーチュインによって制御外れを制御管理されるマウス遺伝子は、老化のマウスに出現しつつあることが発現される。Oberdoerfferは、遺伝子が改造された一対のリンパ腫マウス動物モデルを利用して、マウスに追加のサーチュイン遺伝子コピーを与えたり、マウスにサーチュイン活性化剤 (activator) - - スベラトロールを飲食する場合に、マウスの平均寿命が24% ~ 46%延長されることが発現される。

40

【0018】

Leonard Guarenteの研究によれば、新たな薬物の使用によって、時間につれてサーチュインの新たな分配を安定にし、細胞を老化を避けるように保護する新たな手段があることが指摘される。このような特定のメカニズムに基づいて、DNAの損傷は老化を悪化させるが、DNAが損傷されるのそのものからではなく、遺伝子が調節制御に乏しいからのである。Oberdoerffer研究によると、この遺伝子の活性の調節制御過程がエピジェネティクス (Epi

50

genetics、エピジェネティクス)と呼ばれ、DNAにおける実質的な突然変異と異なることが指摘される。この原理の検証によって、サーチュインを刺激することで老化を逆転することが発現される。

【0019】

3. 皮膚透過増強剤 (Transdermal Penetration Enhancers、TPE)

新薬の研究は、金と時間がかかりかかるので、投与システムの開発は、益々重視されている。最も見られる投与手段は、経口投与と、皮下組織注射投与と、経皮投与とを含む。経口投与は、最も常用される投与手段であり、薬物が経口投与後、胃腸粘膜によって吸収され血液に入り、局所的又は全身の治療作用を達成する。経口投与の欠点は、薬物が体内で遅くてランダムに吸収されることにより、薬物が治療作用を達成できない。尚、薬物が血液に到達する前にまず肝臓を経ることは、薬物の効果が破壊され、肝臓に負担をもたらす。ある薬物は、腸内では吸収されなかったり刺激性をゆうしたりするので経口できない。経口投与の最大な欠点は、薬物が体内に副作用をもたらして、患者が吐き気、嘔吐等の身体上の不適応がする。もう一つの投与手段は、薬物を皮下に直接注入し、皮下毛細管によって吸収され全身に輸送される皮下組織注射法であり、そのメリットは、薬物が胃液と肝臓からの影響を受けずに、血管に直接入って身体の各部位を経て、治療目的を達成することができる。皮下組織注射法は、経口法より、投与の速度を大幅に向上させるが、注射投与を長期に頼る病者にとって、注射による痛み負担を長期に受ける。又、別の投与手段は、経皮投与システム (Transdermal Drug Delivery system、TDDS) であり、当該システムでは、薬物が皮膚によって吸収され、投与後、薬物は、予定の時間に、皮膚角質層を透過して毛細管によって浸透吸収された後に、血液に入って循環して働いて、更に全身治療の目的を達成する (Saunders et al.、1999)。

【0020】

経皮投与治療システムが有するメリットは、生産しやすく、コストが安価であり、恒定のレートで体内に進入でき、血液に安定な濃度を長時間維持でき、投与の頻度を減少し、低毒副作用であり、肝臓の首渡效應、薬物の代謝を低減し、投与の個体差異を減少し、生体の利用率及び小さい剂量で治療の効果を達成できる等のメリットを含む。又、経皮投与は、若い患者、老人又は投与しにくい患者に適合である。投与しやすく、問題がある時に直ちに除去して、投与を停止することができる。経皮投与が上記のメリットを有するので、このシステムが注目される。現在、経皮投与の開発研究は、既に局所のから全身の、ターゲット器官及び制御放出メカニズムへ発展しており、臨床に適用される (Shin et al.、2005)。

【0021】

経皮投与システムの最大な障碍は、皮膚の角質層であり、角質層 (stratum corneum、SC) は、皮膚の最上層であり、扁平長型の角質細胞からなり、角質細胞の四周は、層状の脂肪に囲まれ (Norlen、2001)、角質層の最も主要な機能は、外界物質が体内に進入することを阻止し、体内の水分の散失を防止し、皮膚最外層の障壁である (Bouwstra et al.、2003)。1973年に学者Breathnachらは、電子顕微鏡で角質層細胞の隙間に脂肪が充満されることを発現し、角質層の脂肪が皮膚障壁機能において重要な役割を果たすことを認め始める (Breathnach et al.、1973)。研究では、角質層の温度が上がる場合に、角質層の細胞間の脂肪の流動性が増加するにつれて、皮膚の経皮吸収浸透性もことも指摘される (Golden et al.、1987)。角質層における脂質を除去すれば、親水性及び両性薬品の皮膚に対する浸透性を著しく増加することができるが、脂肪親和性の薬物に対して著しい影響を有しない (Tsai et al.、2001)。

【0022】

経皮吸収の障碍問題を克服するには、皮膚に瞬間的な穴をもうたせ、薬物の吸収を促進するように外来のエネルギーを与え、よく見られる処理手段は、超音波 (ultrasound)、イオン導入 (iontophoresis)、マイクロニードルアレイ (microneedle array) 及び熱エネルギー (thermal energy) がある物理方法と、薬物の吸収を増加するように合成生物によって前駆体を転化してまた新陳代謝の禁止剤とともに投与する生物化学方法と、曲がっている双層の

脂質からなり、親水端が外へ向き疎水端が内にある双面親水サンドイッチを形成して、同時に脂質双層に嵌めることができる油性物質とリポソームの水相中に被覆できる水性物質のキャリアとすることができるリポソーム (liposome) を用いて薬物を被覆したり皮膚透過増強剤 (penetration enhancer) を添加したりする化学方法とを使用することができる。リポソームと細胞作用のメカニズムは、リポソーム膜の組成が細胞膜の組成のうちの一部と相互に交換する膜組成交換 (intermembrane transfer) と、リポソームが細胞膜に付着する吸着 (adsorption) と、リポソームが細胞膜と融合し、包容物を細胞内膜に送り込む融合 (fusion) と、リポソームが細胞によって細胞内に取り込まれる細胞内取り込み (phagocytosis、endocytosis) とがある。皮膚透過増強剤 (penetration enhancer) とは、薬物が皮膚を透過する速度及び含有量を加速化することができるが、皮膚に嚴重な刺激及び傷害をもたらさない物質を指す (Williams and Barry、1991)。皮膚透過増強剤は主に、規則的構造を乱して且つ流動性を向上させるように、角質層の脂質層 (intercelluar) に作用するとともに、ケラチン (keratin) に作用し、角細胞構造を緩ませ、角質層における薬物の溶解度を増加し、薬物吸収の目的を達成する (Walker and Smith、1996)。皮膚透過増強剤を添加することは、開発ポテンシャルをかなり有する浸透補助方法である (Saunders et al.、1999)。

10

20

30

40

50

【0023】

界面活性剤は、良好な皮膚透過増強剤であり、生物膜及び皮膚に対して浸透に協力する効果を有し (Lopez et al.、2000)、近年、既に広く薬物透過に適用される (Nokhodchi et al.、2003; Shokri et al.、2001)。2001年にNokhodchiらの研究では、界面活性剤であるアルキル硫酸塩 (sodium lauryl sulfate、SLS)、セチルトリメチルアンモニウム臭化物 (cetyltrimethylammonium bromide、CTAB) 及び塩化ベンザルコニウム (Benzalkonium Chloride) がマウスの皮膚の抗うつ薬Diazepamに対する吸収を促進できることが指摘された (Shokri et al.、2001)。Nokhodchiらのもう一つの抗うつ薬に関する研究では、界面活性剤であるアルキル硫酸塩 (sodium lauryl sulfate、SLS)、セチルトリメチルアンモニウム臭化物 (cetyltrimethylammonium bromide、CTAB) 及び塩化ベンザルコニウム (Benzalkonium Chloride) は、マウスの皮膚の抗うつ薬lorazepamに対する吸収を促進できることが指摘される (Nokhodchi et al.、2003)。サーファクチンは、人工合成の細胞膜、原生生物の細胞膜及び真核生物の細胞膜に対してかなりよい親和力を有する (Maget - Dana and Ptak、1995; Sheppard et al.、1991; Tsukagoshi et al.、1970b)。且つ、サーファクチンは、細胞膜との結合に対して高度選択性を有することは、サーファクチンがコレステロール (cholesterol) 及びリン脂質 (phospholipid) に対する親和力が高く、細胞膜の構造が、この二つの物質を主とするからである (Hosono and Suzuki、1985)。化学合成の界面活性剤と比較すると、サーファクチンがやさしくて、皮膚に傷害をもたらさない。

【0024】

一般的に従来の方法は、薬物又は栄養活性物質は、表皮の阻隔層 (即ち、角質層) だけまでに浸透し、効果が著しくない (0.3パーセントの効果しかに達成しない)。この問題を解決するために、多くの経皮吸収技術が研究開発されてきて、目的は、養分が皮膚表皮層及び真皮層細胞を透過するように、養分の浸透力を効果的に向上させるので、養分輸送方法は、皮膚保護科技の一つの研究重点になる。

【0025】

ヒト皮膚の角質層が薄い、その厚さは、10 - 25ミクロンであり、最も薄い角質層が上眼瞼にあり、ただ6ミクロンあるが、かなり「強靱」であり、皮膚の最も重要な保護層である。一般的な化粧品の原料は、経皮浸透は主に、汗管経由 (sweat duct) と、角質層に対する直接透過 (stratum corneum) と、毛嚢経由 (hair follicle) と三つのルートである。

【0026】

化粧品の原料は、黄金を例として、現代黄金美容研究によると、黄金は、解毒し、鎮静し、きれいにし及びしわを消すという機能を有し、使用後、肌に細胞因子を組み換えさせ

、生理機能、新陳代謝を促進し、油脂の分泌を平衡して且つ天然水分を保持して、外界に由来する過敏を抵抗できる。化粧品の原料に常用される金ナノ粒子は、大きさがヒト毛穴の200分の1に相当するので、金ナノ粒子含有皮膚保護品を用いて肌に塗布する場合は、金ナノ粒子が真皮層細胞に効果的で瞬間に入り込むことができることが期待される。

【0027】

金ナノ粒子が真皮層に進入した後、金ナノ粒子は、遺伝子のレベル上、真皮細胞をSOD、メタロチオネイン、EGF等を含むシリーズの活性物質を発生するように促進することを含む真皮細胞の機能を調節できる。SODは、ヒドロキシフリーラジカルを取り除くことができ、メタロチオネインは、又、皮膚細胞の紫外線による損傷を抵抗することもできるため、金ナノ粒子は、真皮細胞に対して老化を防止する効果を有する。金ナノ粒子が繊維細胞を刺激し、更に新たな細胞外マトリックス（ECM）を分泌合成し、繊維芽細胞をコラーゲン分泌するように刺激することができることと、繊維細胞を上皮成長因子（EGF）を呈示及び分泌するように刺激することで、ターゲット細胞特異の角化細胞生長因子（KGF）を分化すると同時に、皮膚の緊緻度を強化し、皮膚を滑らかにさせて弾力を充満させ、ぴかぴかと輝くことが示されるその他の研究もある。

10

【0028】

4. 生物乳化剤（Bioemulsifier）

サーファクチンは、抗細菌ペプチドとすることができるほか、サーファクチンは、更に生物乳化剤（bioemulsifier）である別の重要な役割を果たす。1999年にDeleuらは、クリーム分離及び凝集作用を抑制するテストにおいて、ituirn Aの効果がサーファクチンより良く、アルカン類の乳化効果のテストにおいて、アルカン類の乳化効果について、サーファクチンがituirn A及びFengycinより遥かに大きく、乳化効果が最も悪いのは化学合成されるアニオン界面活性剤であるラウリル硫酸ナトリウム（Sodium dodecyl sulfate、SDS）であることを発現した。その他の研究では、20mg/lのサーファクチンを添加することは、ディーゼル油の生物分解性を増加することができることが示され、且つ、更にpHは、サーファクチンのディーゼル油に対する乳化効果に影響を与え、pHを7.4に調整する場合、サーファクチンのディーゼル油に対する生物分解性が最も好ましいことが指摘される。

20

【0029】

5. 発泡剤

一般的な界面活性剤が有する乳化能力の他に、サーファクチンは、発泡力も有する（Raza findralambo et al.、1998）。発泡現象とは、サーファクチンは、気相及び液相の界面で激しく揺れて界面活性剤に空気を捕まえ、内に空気が含まれる薄膜を形成することを指す（Halling、1981）。Razafindralamboらは、ituirn Aと比較すると、サーファクチンは、優れた発泡効果を有し、両者の間の構造に関係することを推測し、サーファクチンがアニオン界面活性剤に属し、その脂肪酸の炭素鎖が短い、ituirn Aがノニオン界面活性剤であり、脂肪酸の炭素鎖が長いことも指摘される（Razafindralambo、et al.、1998）。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0030】

本発明は、サーファクチン（surfactin）による老化防止（又は防しわ）化粧品組成物の調製方法を提供することを目的とする。当該組成物は、シクロリポペプチド分子であり七つのアミノ酸（L-Aspartic acid、L-leucine、glutamic acid、L-leucine、L-valineと二つのD-leucines）からなる環状ヘプタペプチド（heptapeptide）構造であるサーファクチン及び薬学的に許容される担持体、賦形剤、希釈剤、補助剤等を含む。この環化ヘプタペプチドは、一つの - ヒドロキシ脂肪酸に連結され、イソテトラデカン（isoC14）ヒドロキシを主とする（17%～35%）；当該サーファクチンの脂肪酸末端における脂肪酸の分布は、（1）イソC13が3%より大きく、（2）n-C13が0.65%より大きく、（3）イソC14が17%より大きく、（4）n-C14が41%より少なく、（5）イソC15が11%より少ない。当該脂肪酸末端の脂肪酸の分布は、（1）イソC13が10%より大きく、（2）n-C13が25%より大きく、（3）イソC14が35%より大きく、（4）n-C14が25%より小さく、（5）イソ

40

50

C15が3%より少ないことが好ましく、当該脂肪酸末端の脂肪酸の分布以下列分布は、(1) イソC13が11%であり、(2) n-C13が26%であり、(3) イソC14が37%であり、(4) n-C14が24%であり、(5) イソC15が2%であることが最も好ましく、当該サーファクチンの分子量が1022又は1036Daであり、当該サーファクチンは、その化学異性体を含む。(中華民国特許出願号097137532を参照する。)。

【課題を解決するための手段】

【0031】

当該老化防止(又は防しわ)化粧品組成物は、更にアルコール類、エステル類、複合多糖体、ナットオイル及びビタミンを含んでもよい。当該アルコール類は、C16-18アルコール、ブタンジオール、ペンタンジオール、オクタンジオール、グリセリン、ヘキサデカノール、オクタデシルアルコール、ドコサノール及びプロピレングリコールのうち少なくとも一つを含む。当該エステル類は、セチルアルコールオリーブ油エステル(OLIVEM 1000)、モノステアリン酸グリセリル(GSM(登録商標))、イソプロピルミリスレート(IPM)、イソプロピルパルミテート(IPP)及びトリグリセリドのうち少なくとも一つを含む。当該複合多糖体は、キサンタンガム、シロキクラゲ多糖体、グルカン、センナ葉種多糖体のうち少なくとも一つを含む。当該ナットオイルは、アルガン油、ククイナッツオイル、アボカドオイル、小麦胚芽油、オリーブ油のうち少なくとも一つを含む。当該ビタミンは、ビタミンA、ビタミンB、ビタミンC、ビタミンE、ビタミンF、ビタミンKのうち少なくとも一つを含む。

10

【0032】

当該老化防止(又は防しわ)化粧品組成物は、繊維芽細胞の増殖を促進し、紫外光による老化を防止し、酸化を防止し、サーチュイン1遺伝子の発現を促進し、コラーゲンの増生を促進し且つマトリックスメタロプロテアーゼ9タイプ(Matrix metalloproteinase 9)であるマトリックスメタロプロテアーゼ(Matrix metalloproteinase)を抑制するためのものである。

20

【0033】

本発明は、更にサーファクチン(surfactin)による皮膚透過力を増加する組成物の方法を提供する。当該組成物は、シクロリポペプチドであり、ヒドロキシ脂肪酸に連結されるヘプタペプチド配列(L)Glu-(L)Leu-(D)Leu-(L)Val-(L)Asp-(D)Leu-(L)Leuを含むサーファクチン及び薬学的に許容される担持体、賦形剤、希釈剤、補助剤等を含む。当該サーファクチンの脂肪酸末端における脂肪酸の分布は、(1)イソC13が3%より大きく、(2)n-C13が0.65%より大きく、(3)イソC14が17%より大きく、(4)n-C14が41%より少なく、(5)イソC15が11%より少なく、当該脂肪酸末端の脂肪酸の分布は、(1)イソC13が10%より大きく、(2)n-C13が25%より大きく、(3)イソC14が35%より大きく、(4)n-C14が25%より小さく、(5)イソC15が3%より少ないことが好ましく、当該脂肪酸末端の脂肪酸の分布は、(1)イソC13が11%であり、(2)n-C13が26%であり、(3)イソC14が37%であり、(4)n-C14が24%であり、(5)イソC15が2%であることが最も好ましく、当該サーファクチンの分子量が1022又は1036Daであり、当該サーファクチンは、その化学異性体を含む。当該皮膚透過力を増加する組成物は、アルコール類、エステル類、複合多糖体、ナットオイル及びビタミンを含んでもよい。当該アルコール類は、C16-18アルコール、ブタンジオール、ペンタンジオール、オクタンジオール、グリセリン、ヘキサデカノール、オクタデシルアルコール、ドコサノール及びプロピレングリコールのうち少なくとも一つを含む。当該エステル類は、セチルアルコールオリーブ油エステル(OLIVEM 1000)、モノステアリン酸グリセリル(GSM(登録商標))、イソプロピルミリスレート(IPM)、イソプロピルパルミテート(IPP)及びトリグリセリドのうち少なくとも一つを含む。当該複合多糖体は、キサンタンガム、シロキクラゲ多糖体、グルカン、センナ葉種多糖体のうち少なくとも一つを含む。当該ナットオイルは、アルガン油、ククイナッツオイル、アボカドオイル、小麦胚芽油、オリーブ油のうち少なくとも一つを含む。当該ビタミンは、ビタミンA、ビタミンB、ビタミンC、ビタミンE、ビタミンF、ビタミンKのうち少なくとも一つを含む。

30

40

50

【0034】

当該皮膚透過力を増加する組成物は、コルチコステロイド（dexamethasone）、ヒアルロン酸（hyaluronic acid）、ガンマポリグルタミン酸（Gamma-polyglutamic acid）和金ナノ粒子（gold-nanoparticles）である化粧品の原料を皮膚を透過するように促進するためのものである。

【0035】

本発明は、更にサーファクチン（surfactin）による乳化剤組成物の調製方法を提供する。当該乳化剤組成物は、シクロリポペプチドであり、ヒドロキシ脂肪酸に連結されるヘプタペプチド配列（L）Glu - （L）Leu - （D）Leu - （L）Val - （L）Asp - （D）Leu - （L）Leuを含むサーファクチン及び薬学的に許容される担持体、賦形剤、希釈剤、補助剤等を含む。当該サーファクチンの脂肪酸末端における脂肪酸の分布は、（1）イソC13が3%より大きく、（2）n-C13が0.65%より大きく、（3）イソC14が17%より大きく、（4）n-C14が41%より少なく、（5）イソC15が11%より少なく、当該脂肪酸末端の脂肪酸の分布は、（1）イソC13が10%より大きく、（2）n-C13が25%より大きく、（3）イソC14が35%より大きく、（4）n-C14が25%より小さく、（5）イソC15が3%より少ないことが好ましく、当該脂肪酸末端の脂肪酸の分布は、（1）イソC13が11%であり、（2）n-C13が26%であり、（3）イソC14が37%であり、（4）n-C14が24%であり、（5）イソC15が2%であることが最も好ましく、当該サーファクチンの分子量が1022又は1036Daである。当該サーファクチンは、その化学異性体を含む。当該乳化剤組成物は、更に脂肪酸グリセリド、脂肪酸ソルビタン、脂肪酸シヨ糖エステル、脂肪酸プロピレングリコール、レシチンを含んでもよい。

10

20

【0036】

当該乳化剤組成物は、発泡力を増加し、乳化作用を増加し、なめらかさを増加するためのものであり、当該乳化剤組成物は、シャンプー、洗面乳、ハンドクリンザー及びボディークリーム等である清潔用品の発泡力を増加するためのものであり、当該乳化剤組成物は、ボディークリーム、美顔用クリーム、エッセンス、バリアクリーム等である化粧品の乳化力を増加するためのものである。当該乳化剤組成物は、シャンプー、洗面乳、ハンドクリンザー及びボディークリーム等である清潔用品のなめらかさを増加するためのものである。

30

【図面の簡単な説明】

【0037】

[図1] 異なる濃度のサーファクチンのマウスの胚胎繊維芽細胞（BALB/3T3 clone A31 Mus musculus embryo fibroblast）の長寿遺伝子（サーチュイン1遺伝子）mRNA発現に対する影響であり、マウスの胚胎繊維芽細胞を異なる濃度のサーファクチン（0、25、50、75、100 μ M）に培養し、培養時間が6、12、24、36、48時間である。

[図2] レスベラトロール（Resveratrol）、ペンタペプチド（Palmitoyl pentapeptide-3）及びサーファクチンの細胞の増殖に対する影響であり、マウスの胚胎繊維芽細胞を異なる濃度のサーファクチン（0、25、50、75、100 μ M）、レスベラトロール（0、5、10、20、30 μ M）とペンタペプチド（0、3、5、8、10 μ M）に培養し、培養時間が48時間である。

40

[図3] サーファクチンの光老化防止作用であり、異なる濃度のサーファクチンの紫外光照射された後のマウスの胚胎繊維芽細胞の生存率に対する影響であり、細胞が5J/cm²、10J/cm²及び15J/cm²の紫外光で照射された後に、25、50、75、100及び125 μ M濃度のサーファクチンを添加し、24時間培養した後に、MTT法で細胞の生存率をテストする。

[図4] サーファクチンのマウスの胚胎繊維芽細胞の酸化防止圧力に対する保護効果であり、細胞が100、150、200及び250 μ M濃度の過酸化水素で処理された後に、更に0、25、50、75及び100 μ M濃度のサーファクチンを添加し、24時間培養し、その後MTT法で細胞の生存率をテストする。

[図5] サーファクチンとペンタペプチドのマウスの胚胎繊維芽細胞の可溶性コラーゲン定量アッセイによって測定されるコラーゲン含有量（collagen dose）に対する影響であ

50

り、マウスの胚胎繊維芽細胞系が異なる濃度のサーファクチン（0、25、50、75、100 μM ）とペンタペプチド（0、3、5、8、10 μM ）24時間培養し、PBS：リン酸塩緩衝溶液であり、a、b、ab、c、dは、符号が同じであれば、統計上の差異がないことを表す。

[図 6] サーファクチン（SF）とペンタペプチド（PPP - 3）のマトリックスメタロプロテアーゼ（Matrix metalloproteinase 9）に対する抑制能力であり、マトリックスメタロプロテアーゼの量は、酵素免疫測定法（ELISA）によって測定され、マウスの胚胎繊維芽細胞は、それぞれ異なる濃度のペンタペプチド（0、3、5、8及び10 μM ）とサーファクチン（0、25、50、75及び100 μM ）に培養され、a、b、cは、符号が同じであれば、統計上の差異がないことを表す。

[図 7] サーファクチンが皮膚をコルチコステロイドを吸収するように促進するテストであり、実験は、PBS（ $\text{pH}=7.4$ ）100 μl 混合イソチオシアン酸（fluorescein isothiocyanate、FITC）標記されるコルチコステロイド（dexamethasone）を、1 cm^2 の無菌脱脂綿に添加して通気性テープでマウスの背部に固定するコントロールと、イソチオシアン酸で標記されるコルチコステロイドに0、0.2、0.5、1、2、5%のサーファクチンを添加して処理する実験群に分けられ、実験結果については、共焦点顕微鏡で観察してその蛍光の明度を検知し、図（A）～（F）は順に、コルチコステロイドに0、0.2、0.5、1、2、5%サーファクチンを添加することであり、SF：サーファクチンである。

[図 8] サーファクチンが皮膚を保湿因子ヒアルロン酸（HA）を吸収するように促進するテストである。実験は、PBS（ $\text{pH}=7.4$ ）100 μl 混合イソチオシアン酸（fluorescein isothiocyanate、FITC）で標記されるヒアルロン酸（hyaluronic acid）を、1 cm^2 無菌脱脂綿に添加し、通気性テープでマウスの背部に固定するコントロールと、イソチオシアン酸で標記されるヒアルロン酸に0、0.2、0.5、1、2、5%のサーファクチンを添加して一時間処理する実験群とに分けられ、実験結果については、共焦点顕微鏡でその蛍光の明度を検知する。図（A）～（F）は順に、ヒアルロン酸に0、0.2、0.5、1、2、5%のサーファクチンを添加することであり、SF：サーファクチンである。

[図 9] サーファクチンが皮膚を保湿因子（ HA -GPA）を吸収するように促進するテストであり、実験は、PBS（ $\text{pH}=7.4$ ）100 μl 混合イソチオシアン酸（fluorescein isothiocyanate、FITC）で標記されるヒアルロン酸（hyaluronic acid）を、1 cm^2 無菌脱脂綿に添加し、通気性テープでマウスの背部に固定するコントロールと、イソチオシアン酸で標記されるヒアルロン酸に0、0.2、0.5、1、2、5%のサーファクチンを添加して一時間処理する実験群とに分けられ、実験結果については、共焦点顕微鏡でその蛍光の明度を検知する。図（A）～（G）は順に、 HA -GPAに0、1%、2%、5%、10%、15%、20%のサーファクチンを添加することである。

[図 10] サーファクチンは、金ナノ粒子の皮膚経由吸収を促進する効果を有し、金ナノ粒子の量は、蛍光顕微鏡で測定され、緑の蛍光は、金ナノ粒子の存在を表し、サーファクチンが混合された金ナノ粒子実験群では、マウス（BALB/c）の真皮層に多くの金ナノ粒子が発現され、緑の光点は毛嚢自体蛍光（hair follicles autofluorescence）であり、Sc surface：角質層（Stratum corneum）の表面である。

[図 11] サーファクチンの乳化力分析であり、異なる濃度のサーファクチンを pH が6.4、7.4及び8.4の緩衝溶液に溶解し、2ml取り出して3mlディーゼル油を試験管に添加し、2分間振盪（vortex）し、室温下で24時間静置した後に、その乳化指数（emulsification index、 E_{24} ）を測定する。

[図 12] サーファクチンの発泡力分析であり、異なる濃度の粗純化サーファクチンを pH が7.4の緩衝溶液に溶解し、2分間振盪（vortex）した後に1時間静置した後に、発泡の高さを測定し、最大発泡密度（foam maximum density、MD）を計算する。

[図 13] サーファクチンの濃度と発泡の高度との間の関係を示す。

[図 14] サーファクチンの濃度と濁度（Turbidity%）との間の関係を示す。

[図 15] ポリマーと界面活性剤複合物（polymer - surfactant complex）に希釈した後に、サーファクチンを含有するシャンプーに沈殿の発生がある。

【 発明を実施するための形態 】

10

20

30

40

50

【0038】

本発明は、下記の実施例で示範して説明するが、本発明は、下記実施例によって制限されるものではない。以下、各実施例は、シクロリポペプチドであり、且つ ヒドロキシ脂肪酸 (beta - hydroxy fatty acid) (13 ~ 15個の炭素水素鎖が連結される) に連結されるヘプタペプチド配列 (L) Glu - (L) Leu - (D) Leu - (L) Val - (L) Asp - (D) Leu - (L) Leuを含み、当該脂肪酸のイソC14が約37%であるという特徴を有するサーファクチンで実施する。

【0039】

実施例一 サーファクチンのヒト皮膚及びマウスの胚胎繊維芽細胞に対する老化防止試験
実験材料と方法

1. 実験細胞株

ヒト皮膚繊維芽細胞 (CCD - 966SK) は、BCRC生物資源保存及び研究センターから購入され、 - 番号 : 60153である。

2. マウスBALB / 3T3胚胎 (BALB / 3T3Clone A31) は、BCRC生物資源保存及び研究センターより購入され、 - 番号 : 60009である。

3. 実験動物

国家実験動物センターによって購入される単一な性別のBALB / cByJNarl品系のマウスは、体重が約200 ~ 250グラムで、飼育条件が毎日12時間人工照射し、湿度75%と温度25 であり、エアコン設備を含む海洋大学生命科学動物室に飼育され、専門人によって気を配って十分な飼料及び飲用水を提供する。

4. 老化防止遺伝子の発現量のテスト

(1) ヒト及びマウスの遺伝子cDNA配列のクローニング

本実験は、TRIzol reagent (Invitrogen, USA) によってヒト皮膚繊維芽細胞及びマウスの胚胎繊維芽細胞のTotal RNAを抽出し、RNA電気泳動分析された後、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT - PCR) によってヒト皮膚繊維芽細胞サーチュイン1、サーチュイン3及びマウスの胚胎繊維芽細胞サーチュイン1遺伝子配列のクローニングを行い、遺伝子銀行 (GenBank) によって既知のサーチュイン遺伝子配列を捜し、GCG programによって相似性が高い配列を捜し、一対のプライマー (Primer) を設計し、ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase chain reaction, PCR) を行い、更に小さい一部の反応生成物を取って1.2%のコロイドによって電気泳動分析して、予期の遺伝子セグメントの大きさにふさわしい生成物が出る時に、残られる生成物が低融点寒天コロイドによって電気泳動された後に、所望のコロイドの生成物がコロイドによって上から下に切られ、コロイド抽出して純化された特定の大きさのDNAセグメントを取得し、この純化セグメントは、クローニングキャリアpGEM - T - easy vector (pGEM - T - easy cloning kit, Promega, USA) と接合反応を行い、更にコンピテントセルに転換し、最後に、少量培養された後に、クローニングキャリアを抽出し配列を決め、配列のデータをアメリカ生物情報センター (NCBI) ウェブのBLASTプログラムによって対比する。以上の工程によって正確な部分のヒト皮膚繊維芽細胞サーチュイン1、サーチュイン3及びマウスの胚胎繊維芽細胞サーチュイン1cDNA配列のクローニング株をクローニングした後、後続の実験を行うために、クローニング株を再びコンピテントセルに転換して複製し、高純度のプラスチドを抽出して保存する。

【0040】

(2) 細胞Total RNAの抽出

RNAは、自然環境においてRNaseの分解を容易に受けるので、実験前に用いられる器具を高温で滅菌し、オープンで乾燥しなければならない。操作中手袋及びマスクをつける。実験しようとする細胞実験群を取り、迅速に800 µLのTRIzolTM reagentを培養皿に入れ、洗浄された細胞液を滅菌Tubeに置き、用いられるTRIzolTM reagentの総体積の1 / 5のクロロホルム (Chloroform) を入れ、激しく30秒揺れ、室温下で15分間静置し、4 で13200 rpmで15分間遠心し、上清液を新たな1.5mL微量遠心管に抽出する。この時、RNAは、上清液の水層に溶解し、上清液を別のきれいな1.5mL微量遠心管に吸入し、用いられるTRIzolTM reagentの体積の1 / 2のイソプロパノール (Isopropanol) 及び高塩溶液 (1.2 M Sodium C

10

20

30

40

50

hloride及び0.8 M Sodium citrate) を入れ、均一に揺れた後に - 20 で30分間静置し、4 で13200 rpmで15分間遠心しRNAを沈殿し、上清液をゆっくり除去し、先ず800 μ Lの10%無水アルコールを入れて揺れて洗浄した後、4 で13200rpmで10分間遠心した後に、アルコールを100%除去する。上清液をゆっくり吸入除去し、55 でRNA沈殿物を5分間乾燥する。沈殿物を15 μ L DEPC水に溶解する。RNAを溶解するために55 で10分間に置き、最後に - 80 の冷凍冷蔵庫に貯蓄して待機する。

【 0 0 4 1 】

(3) RNAの濃度と純度の測量

分光光度計でOD260を測量し、RNAの濃度の標準が1 OD260 = 40 μ g of RNA / mLと計算し、その公式40 μ g \times dilute factor \times A260 = μ g / mLである。RNAの純度は、OD260 / OD280の比值として準拠にして、比値が1.9 ~ 2.0の間にある純度較高のRNA。

【 0 0 4 2 】

(4) 逆転写 (Reverse Transcription、RT)

5 μ g のTotal RNAを200 μ L微量遠心管に取り、DEPC水で総体積を13 μ Lに調整し、1 μ Lのoligo (dT) 18、10 mM dNTPs、置於氷上。再加入5 \times AMV buffer 4 μ l 及びAMV1 μ l (40 units / μ L) を入れ、均一に混合し、42 で60分間反応してcDNAを合成し、又70で10分間作用して反応を終止する。

【 0 0 4 3 】

(5) ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase chain reaction、PCR)

RTが作ったcDNA鋳型 (Template) を、Taq polymeraseでポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction、PCR) し増大分析する。1 μ LのcDNAを取り0.5 μ Lの10 mM dNTPs、2.5 μ l の10 \times PCRのbuffer、専一性のプライマー (Gene specific primer、GSP) を各0.5 μ L及び0.25 μ LのTaq polymeraseを入れ、二次滅菌水を二次滅菌し体積を25 μ Lに調整する。反応管をPCR反応器 (DNA thermal cycler ; Applied Biosystems2720 Thermal Cycler) に入れ、94 で2分間解離し、94 で30秒解離し、64 で30秒貼り付け、72 で1分間合成し、解離、貼り付け、合成工程が30個の循環繰り返した後に4 下に保存する。反応後のPCR生成物5 ~ 15 μ Lを取り、1.5%の寒天コロイドで電気泳動分析し、臭化エチジウム (EtBr) によって10分間染色した後に、水で約10分間退色し、撮影システムDigital Gel Image Systemに置き影像を取り、UN - SCAN - IT gel - Gel Analysis Software Version 6.1で定量分析する。

【 0 0 4 4 】

(6) ポリメラーゼ連鎖反応 (Real - time quantitative PCR) の即時な定量

蛍光染色SYBR green IによってDNAの二つの凹溝に嵌めることができ、ハロゲンランプの励起による蛍光の特性により、その蛍光値の量を検知する。SYBR green Iが二つのDNA上に嵌めされない場合に、蛍光背景の値が非常に低く、SYBR green IがPCR拡大の標的遺伝子セグメント上に嵌め始める場合に、蛍光値の信号は、相対的に高められる。非特異性プライマーの結合、又はGenomicDNAの汚染等の干渉の影響がなければ、PCR反応で合成される標的遺伝子の状態は、DNAの合成が二倍増倍の幾何学的増倍期 (Geometric phase) と、反応物が不足であり、遺伝子の合成が非二倍増倍の線形増加期 (Linear phase) と、最後反応物が使い尽し、失効であり、反応の終点に到達する高原期 (Plateau phase) とに分けられる。従って、標的遺伝子の組織器官における発現量を検知するには、PCR反応の幾何学増倍し増倍期で定量して意義を有する。Real - time quantitative PCRの原理は、異なる濃度の鋳型によって同じPCR 反応条件下で、高濃度の鋳型を含有する反応は、速く幾何学的増倍期に到達し、比較的に低濃度の鋳型は、遅く到達し、幾何学的増倍期の中点に到達する臨界PCRの循環数をCT (Thresholdcycle) と定義し、つまり、CT値は、鋳型の濃度の低減によって高まる。異なる濃度の標準品でPCR反応のCT値を同期定量し、ソフトウェアで標準曲線と回帰公式を描画し、内挿法で測定待ち試料に含まれる標的遺伝子の絶対発現量を換算する。同時に、MeltingCurveを得れば、標的遺伝子が拡大循環した後にmelting temperature 40 ~ 99 の連続的蛍光検知し、melting curveの結果を分析することは、プライマーが自行的に互いに補充する現象があるか又はプライマーの専一性を了解する

ことができ、実験定量の正確性を了解することにより正確的に役立つ。

96 well PCR plateを4 予冷の96 well PCR plate専用の製氷皿上に置き、それぞれ10 μ L SYBR green、各4 μ LのReal - time PCR 専一性プライマー（表一）を入れて、最後に2 μ L のRT生成物をPCR 反応の鋳型として入れ、96 well PCR plateの専用膜を貼り付けてから4 遠心機に置き1500 rpmで遠心3分間し、試料をPCR plateの底部に遠心する。PCR plateをPCRを即時に定量するPCR反応器中（Roche lightcycler 480 Real time PCR）に置き、95 で熱起動（Hot start）反応が5分間反応し、増幅反応（Amplification）が95 で30秒解離し、60 で30秒貼り付け、40個循環し、蛍光値を連続的に検知し、増幅される生成物は同じ解離温度であるかを判断するという反応条件を設定する。反応を完成した後に、反応データをRocheソフトウェアで分析する。実験によって得られたデータは、SPSS

10

【 0 0 4 5 】

【表 1】

プライマー	配列	ベ ー ス
マウス - RSP16-F	5' -CTGGGTATCTTGACTAAGCCTGAC-3'	24
マウス - RSP16-F	5' -AGTTCTCCACCTCCTTCTCAATCC-3'	24
マウス - RSIT1-F	5' -TGTGGCTCCATCCTACCT-3'	18
マウス - RSIT1-F	5' -CATTCCTGGGAC-3'	18
ヒト - GAPDH-F	5' -ATCAGGTGCATCGCCCTCTTT-3'	21
ヒト - GAPDH-R	5' -TCAGGCAAAAGCTTTCTCTCG-3'	21
ヒト - SIT1-F	5' -GGBGACTACTTGGACATYCTGGC-3'	23
ヒト - SIT1-R	5' -TTGCTCCACACATATTTCCRC-3'	22
ヒト - SIT3-F	5' -GGATTTGGAGCGACCAA-3'	20
ヒト - SIT3-R	5' -CGTGTCAGTGCTGTGTCGCT-3'	20
T7	5' -TAATACGACTCACTATAGGG-3'	20
SP6*	5' -ATTTAGGTGACACTATAGAAT-3'	21
Oligod (T) *	5' -TTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'	18

20

30

* は、逆方向プライマーである

表一Real - timePCRの専一性プライマー

表一におけるプライマーの配列表における番号は、以下のとおりである：

Mouse RSP16 - F： SEQ ID NO： 2； Mouse RSP16 - R： SEQ ID NO： 3； Mouse SIT1 - F： SEQ ID NO： 4； Mouse SIT1 - R： SEQ ID NO： 5； Human - GAPDH - F： SEQ ID NO： 6； Human - GAPDH - R： SEQ ID NO： 7； Human - SIT1 - F： SEQ ID NO： 8； Human - SIT1 - R： SEQ ID NO： 9； Human - SIT3 - F： SEQ ID NO： 10； Human - SIT3 - R： SEQ ID NO： 11； T7： SEQ ID NO： 12； SP6*： SEQ ID NO： 13； Oligo d (T) *： SEQ ID NO： 14。

40

結果

サーファクチンはマウスの胚胎繊維芽細胞の長寿遺伝子（サーチュイン1遺伝子）の発現と増殖を促進する

図1から、サーファクチンは、マウスの胚胎繊維芽細胞の長寿遺伝子（サーチュイン1遺伝子）の発現を促進することができ、マウスの胚胎繊維芽細胞に異なる濃度のサーファクチンを与える場合に、異なる濃度のサーファクチンは、サーチュイン1遺伝子の発現につ

50

いて、異なる効果を有し、マウスの胚胎繊維芽細胞にサーファクチンを6時間与えた後、50 μM 、75 μM のサーファクチンは、サーチュイン1遺伝子の発現を促進する効果を有し、マウスの胚胎繊維芽細胞にサーファクチンを12時間与えた後、25 μM のサーファクチンは、サーチュイン1遺伝子の発現を促進する効果を有し、マウスの胚胎繊維芽細胞にサーファクチンを36時間与えた後、50 μM 、100 μM のサーファクチンは、サーチュイン1遺伝子の発現を促進する効果を有し、マウスの胚胎繊維芽細胞にサーファクチンを48時間与えた後、50 μM のサーファクチンは、サーチュイン1遺伝子の発現を促進する効果を有する。50 μM のサーファクチンは、サーチュイン1遺伝子の発現に対する促進については、最も良い効果を有することが知られる。

図2は、レスベラトロール (Resveratrol)、ペンタペプチド (Palmitoyl pentapeptide - 3) 及びサーファクチンのマウスの胚胎繊維芽細胞の増殖に対する影響であり、図2から、サーファクチンは、マウスの胚胎繊維芽細胞増殖を促進する効果を有し、且つ、最も好ましくは、75 μM のサーファクチンが細胞増殖を促進する効果であり、次に好ましくは、50 μM のサーファクチンが細胞増殖を促進する効果であることが知られる。又、サーファクチンが細胞増殖を促進する効果は、レスベラトロールとペンタペプチドよりも好ましい。

【0046】

実施例二 サーファクチンは、光老化防止と酸化防止作用を有する

1. サーファクチンは光老化防止修正保護機能

細胞を皿に分けた後に、4時間培養して培養皿に固定させた後に、UV - A波長の紫外線ランプチューブを光ストレス由来とし、紫外光雑交箱で実験細胞にエネルギー密度が0J / cm^2 、10J / cm^2 及び15J / cm^2 照射し、照射後に25、50、75、100及び125 μM 濃度のサーファクチンを添加し、24時間培養し後に、MTT法で細胞の生存率をテストする。

図3から、サーファクチンは、光老化防止修正保護機能を有し、マウスの胚胎繊維芽細胞に10J / cm^2 の紫外光を照射した後に、25、50、75、100及び125 μM 濃度のサーファクチンはいずれも細胞の生存率を増加する効果を有し、且つ最も好ましくは、75 μM 濃度のサーファクチンの効果であり、マウスの胚胎繊維芽細胞に15J / cm^2 の紫外光を照射した後に、25、50、75及び100 μM 濃度のサーファクチンはいずれも細胞の生存率を増加する効果を有し、且つ、50 μM 濃度のサーファクチン効果が最も好ましいことが知られる。

2. サーファクチンは酸化防止修正保護機能を有する

マウスの胚胎繊維芽細胞を皿に分けた後に、4時間培養し培養皿に固定した後に、過酸化水素を酸化ストレス由来とし、細胞が100、150、200及び250 μM 濃度の過酸化水素で処理された後に、更に25、50、75及び100 μM 濃度のサーファクチンを添加し、24時間培養し、その後、MTT法で細胞の生存率をテストする。

図4から、サーファクチンは過酸化水素で処理されたマウスの胚胎繊維芽細胞の生存率を増加することができることが知られる。その中では、25、50、75 μM 濃度のサーファクチンはいずれも良い効果を有するが、75 μM 濃度のサーファクチンの効果が最も顕著である。

【0047】

実施例三 サーファクチンのマウスの胚胎繊維芽細胞のコラーゲンを長める効果

1. コラーゲン濃度分析

コラーゲン濃度分析キット (Sircol™ soluble collagen assay kit) で培養基におけるコラーゲンの総濃度を分析する。分析方法は以下のように簡略する。

分析待ち試料と異なる濃度の標準品0.1mLを1.5mL遠心管に置く。1mL dye reagentを入れて、振盪混合器で35min振盪する。12000rpmで10min遠心し、上清液を除去する。給水紙で遠心管のエッジの残留液をゆっくり除去し、沈殿物を触れてはならない。1mL Alkali reagentの溶解沈殿物を入れ、安定的に色を現れた後に0.2mLを取り出して96ホールプレートに置き、ELISA readerで吸光値570nmを読み取る。

2. サーファクチンはマウスの胚胎繊維芽細胞のコラーゲンを増加する効果を有する

図5から、サーファクチンは、マウスの胚胎繊維芽細胞のコラーゲンの増生を増加することができ、リン酸塩緩衝溶液 (Phosphate buffered saline、PBS) を与えて培養するコン

10

20

30

40

50

トロールより、25、50、75及び100 μ Mのサーファクチンは、細胞内のコラーゲンの増加については、いずれも良い効果を有するが、而100 μ Mの効果が最も好ましいことが知られる。ペントペプチド (Palmitoyl pentapeptide - 3、PPP - 3) は、細胞内のコラーゲンの含有量を増加することもできるが、その効果がサーファクチンと比べると、サーファクチンのほうが良いそうだ。

【0048】

実施例四 サーファクチンはマトリックスメタロプロテアーゼ (Matrix metalloproteinase 9) を抑制する効果を有する

1. マトリックスメタロプロテアーゼ (Matrix metalloproteinase 9) の抑制効果の測定
マウスの胚胎繊維芽細胞を培養して皿に分けた後に、商用活性防し物質3、5、8及び10 μ M Palmitoyl pentapeptide - 3) を入れることは、25、50、75及び100 μ Mサーファクチンを入れることと比べると、分析方式はAbnova MMP - 9 (Mouse) ELISA KitとELISA Readerで細胞におけるマトリックスメタロプロテアーゼ九型の濃度分析を行う。

2. サーファクチンはマトリックスメタロプロテアーゼを抑制する効果を有する

図6図から、50、75及び100 μ Mのサーファクチンはマトリックスメタロプロテアーゼを抑制する効果を有し、且つ、50 μ Mのサーファクチンの抑制効果が最も好ましいことが知られる。

【0049】

実施例五 サーファクチンは化粧品原料が皮膚を透過するように促進する

1. 実験方法

実験前、先ず背部に毛を剃る動作を行う。6 - 8週のマウスを麻酔剤Zoletilで腹腔内注射し麻酔し、動物を平らに横たわらせた後に、電気カミソリで背部の毛を柔らかく剃り、脱毛クリームで残りの体毛を除去する。動物を温暖ランプ付き籠 (cage) に置き、且つ飲水を与える。実験前、以Zoletilでマウスを麻酔する。実験は、PBS (pH = 7.4) 100 μ l混合イソチオシアン酸 (fluorescein isothiocyanate、FITC) で標記されるヒアルロン酸 (hyaluronic acid) 又はコルチコステロイド (dexamethasone) を、1cm²無菌脱脂綿に添加し通気性テープでマウスの背部に固定するコントロールと、ヒアルロン酸又はコルチコステロイドにそれぞれ0.2、0.5、1、2、5% surfactinを添加し処理する実験群とに分けられる。

一時間処理した後にCO₂窒息法でマウスを犠牲させ、アルコールで皮膚上に残られた薬品を除去し、マウスの背部の皮膚を刈って、Optimum cutting temperature compound (O.C.T) (SAKURA(R)、Japan) で包埋した後に凍結切片する (CM - 2000, Leica, Germany) 。

2. サーファクチンはコルチコステロイドを皮膚を透過するように促進することができる
図7から、サーファクチンは、コルチコステロイドを皮膚を透過するように促進することができ、蛍光の強度を観察することによって、各実験群におけるコルチコステロイドの皮膚透過量が分かることができ、蛍光の強度が強ければ強いほど、皮膚を透過するコルチコステロイドの量が多いことを表し、図7における (B)、(C)、(D)、(E) には、コントロール (A) より多い蛍光が見え、つまり、0.2、0.5、1、2%のサーファクチンはコルチコステロイドの皮膚透過量を増加することができることが知られる。

3. サーファクチンは皮膚を保湿因子ヒアルロン酸 (HA) を吸収するように促進する

図8から、サーファクチンは皮膚をヒアルロン酸を吸収するように促進することができ、蛍光の強度が強ければ強いほど、皮膚を透過するヒアルロン酸の量が多いことを表し、図8における (A) に見えらる蛍光の強度が最も強いことが表し、つまり、1%のサーファクチンが皮膚を保湿因子ヒアルロン酸を吸収するように促進する効果が最も好ましい。

4. サーファクチンは皮膚を保湿因子ガンマポリグルタミン酸 (Gamma - polyglutamic acid、 γ -GPA) を吸収するように促進する

図9から、サーファクチンは、皮膚を保湿因子 (γ -GPA) を吸収するように促進することができ、蛍光強度が強ければ強いほどものは、皮膚が吸収するガンマポリグルタミン酸の量が多いことを表し、図9における (B)、(C)、(D)、(E)、(F)、(G) はいずれ

10

20

30

40

50

もコントロール(A)より多い蛍光が見えることができ、つまり、1、2、5、10、10、15、20%のサーファクチンはいずれも皮膚がガンマポリグルタミン酸の量を吸収するように増加することができる。

5. サーファクチンは金ナノ粒子 (gold - nanoparticles、2nm) が皮膚経由吸収を促進する

金ナノ粒子とサーファクチンで混合してマウスの表皮に塗布した後に、時期を経て、皮膚を取り外して凍結切片し、金ナノ粒子が自発的に発行することができるので、直接に光学顕微鏡で金ナノ粒子が皮膚の表皮層と真皮層の蛍光含有量を観察する。結果から、伝統的なプロセスで乳化された皮膚保護クリームは、その内部構造がミセル状又はミセル状であるから、皮膚が金ナノ粒子を吸収することに不利であり、金ナノ粒子は表皮層のみで発現されることが示される。12.5ppmサーファクチンを添加した後に、金ナノ粒子を皮膚経由吸収する効果を著しく促進することができる(図10)。

以上の研究結果から、本願に係るサーファクチンは、化学合成された界面活性剤を取り換えて、経皮投与システムに広く適用することができる。

【0050】

実施例六 サーファクチンの乳化力分析

乳化指数が界面活性剤の重要な指標の一つであり、本発明はCooperらに用いられる方法を参考して、界面活性剤のディーゼル油に対する乳化指数を測定する。異なる濃度の粗純化サーファクチンをpHが6.4、7.4及び8.4の緩衝溶液に溶解し、2mlを抽出し3mlディーゼル油を試験管に添加し、2分間振盪(vortex)し、室温下で24時間静置し、乳化層の高さと溶液総高さの比値を測定し100%に乗じて当該測定待ち液の乳化指数になる。油の乳化能力は、乳化指数(emulsification index、 E_{24})で表され、ただし、 E_{24} の公式は、

【数2】

$$E_{24}(\%) = \frac{\text{乳化層の高さ}}{\text{溶液の総高さ}} \times 100\%$$

である。

図11から、サーファクチンはpH=7.4である場合に、好ましい乳化力を有し、且つ、サーファクチンはpH=7.4と160 μ g/ml濃度である場合に、最も好ましい乳化力を有することが知られる。

【0051】

実施例七 サーファクチンは発泡剤とすることができる

1. 発泡力分析

界面活性剤は低発泡性の特性を有し、本発明は、粗純化されるサーファクチンが発泡性を有するかどうかをテストすることである。Razafindralamboらに用いられる方法を参考し、異なる濃度の粗純化サーファクチンをpHが7.4の緩衝溶液に溶解し、二分間振盪(vortex)した後に1時間静置し、その泡の高さを測定する。発泡力は最大の発泡密度(foam maximum density、MD)で表され、総液体の高さを最大発泡高度で割って最大発泡密度を得る。

2. サーファクチンが発泡剤とすることができる

サーファクチンは、多くの生物特性を有し、一般的な界面活性剤が有する発泡及び乳化能力(Razafindralambo et al.、1998)を含む。発泡現象とは、サーファクチンが気相及び液相の界面中に存在し、激しく揺れて界面活性剤に空気を捕えさせ、内に空気が含まれる薄膜を形成する(Halling、1981)。本発明は、Bacillus subtilis THによるサーファクチンが発泡する活性を有するかをテストし、結果から、150 μ gより大きいサーファクチンを緩衝液に入れ、MD値が顕著に低下することがなく、最低なMD値が1.23(図12を参照する)であることが示され、脱イオン水に添加されるサーファクチンの濃度が既に臨界ミセル濃度(Critical micelle concentration、CMC)に達成し、サーファクチンがミセル状に形成され、単体のみが残って溶液に作用するからかもしれないと推測される。図13

は、サーファクチンの濃度と発泡の高さとの間の関係を示す。Razafindralamboらによって、サーファクチンの最低なMD値が0.10にも達することができ、伊枯草菌素より、サーファクチンが優れた発泡効果を有することが指摘され、両者の間の構造に関係し、サーファクチンがアニオン界面活性剤に属し、且つ、その脂肪酸の炭素鎖が短い、ituirn Aがノニオン界面活性剤であり、脂肪酸の炭素鎖が長いと推測される (Razafindralambo et al., 1998)。Bacillus subtilis THによるサーファクチンは発泡能力を有し、清潔剤、シャンプー、ハンドクリンザー等の個人保養品に適当に適用できる。

【0052】

実施例八 サーファクチンが潤滑剤とする

サーファクチンが洗浄時に冲洗時著しいなめらかさ (Flushing will show good sense of smooth) を現わすが、低濃度である場合に、コアセルベート (corecervate) 現象が起こることがある。

1. サーファクチンは濁度を低減することができる

(1) シャンプーの相対濃度を0.01 - 1.0に調整する

相対濃度 = シャンプー原液 (g) / (シャンプー原液 (g) + 水 (g))

(2) (1) 溶液420mlにおける透過率 (%、温度40) を測定し、その濁度 (Turbidity) (%) = 100 - 透過率 (%) を簡単に示す

図14から、清潔用品に常用される乳化剤 - ラウリルアルコールポリエーテル硫酸エステルナトリウム (sodium laureth sulfate) に比べると、本願のサーファクチンは、シャンプーの濁

度をより低減することができ、つまり、シャンプーのなめらかさを増加する。

2. サーファクチンはコアセルベート (corecervate) 現象が起こる。

サーファクチン於冲洗時會発現出色のなめらかさ (sense of smooth)、而在低濃度の情況下、會產生液滴 (corecervate) 現象。サーファクチンが洗浄時に著しいなめらかさ (sense of smooth) を現わすが、低濃度である場合に、コアセルベート (corecervate) 現象が起こることがある。

図15から、ポリマーと界面活性剤複合物 (polymer - surfactant complex) に希釈した後、即ち、コアセルベート (corecervate) 現象が発生し、サーファクチンを含むシャンプーは沈殿が発生するので、摩擦感 (friction sensitivity) を減少し、なめらかさ (sense of smooth) を増加する。

【0053】

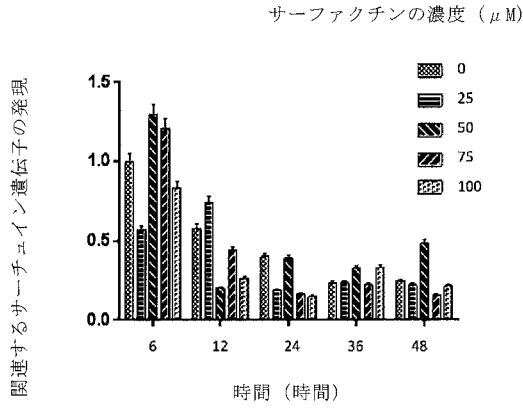
上記実施例及び図面はただ本発明の好ましい実施例だけであり、これによって本発明の実施の範囲を限定するものではなく、即ち、本発明の特許請求の範囲によって作る均等な変化と修飾であっても、本発明の特許範囲に属すべきである。

10

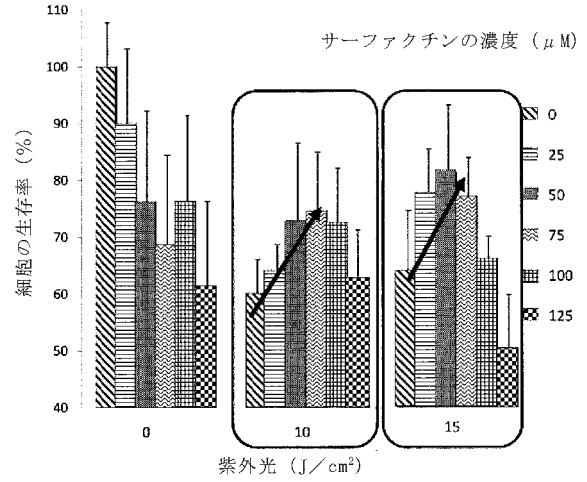
20

30

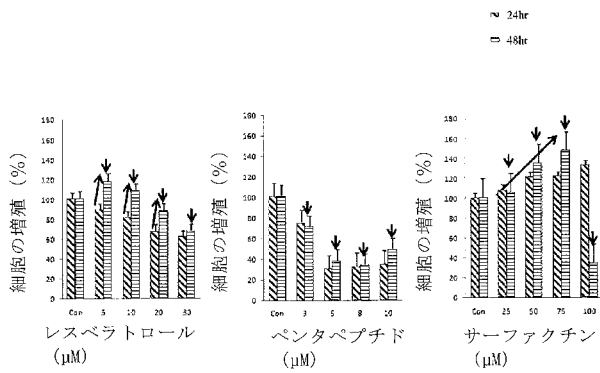
【 図 1 】



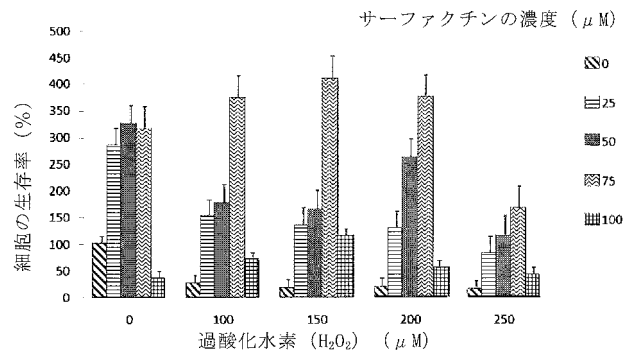
【 図 3 】



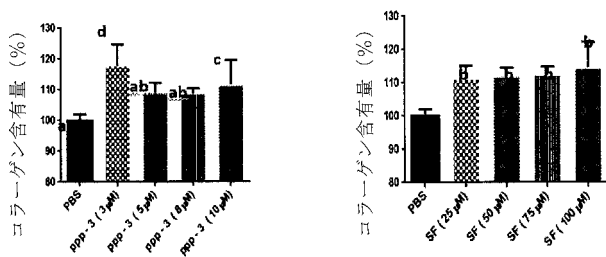
【 図 2 】



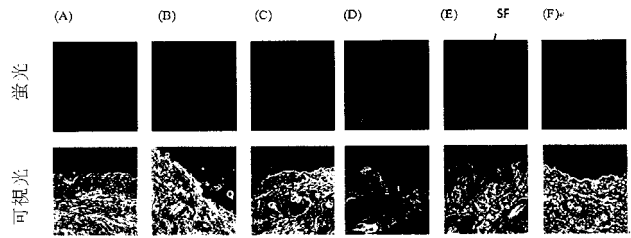
【 図 4 】



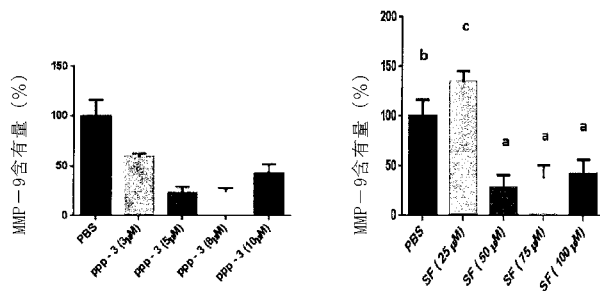
【 図 5 】



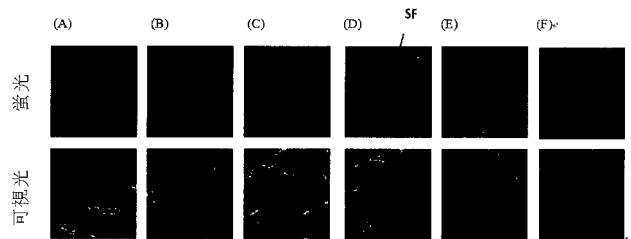
【 図 7 】



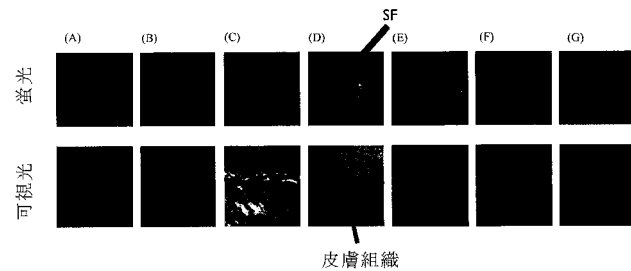
【 図 6 】



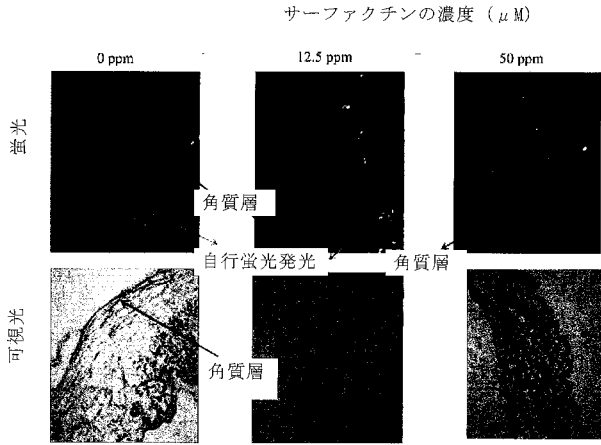
【 図 8 】



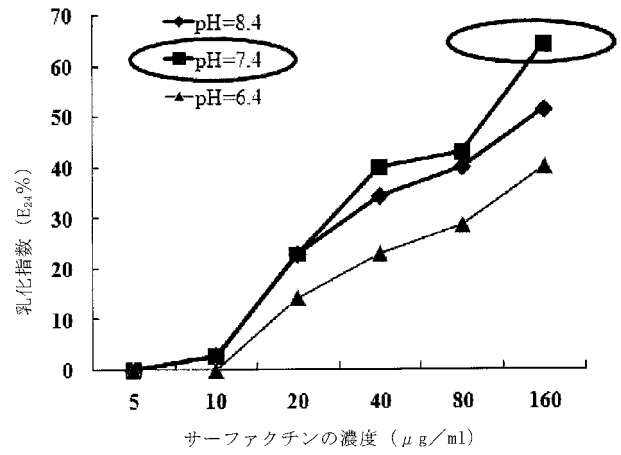
【 図 9 】



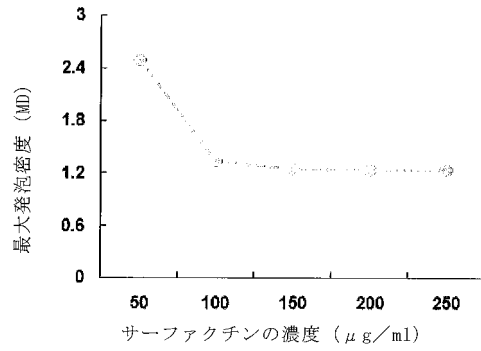
【 図 1 0 】



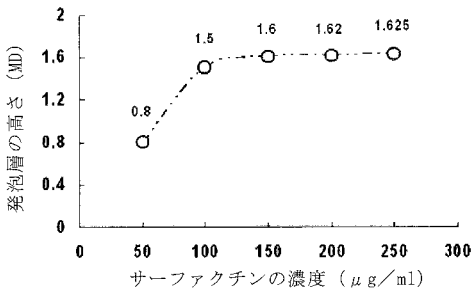
【 図 1 1 】



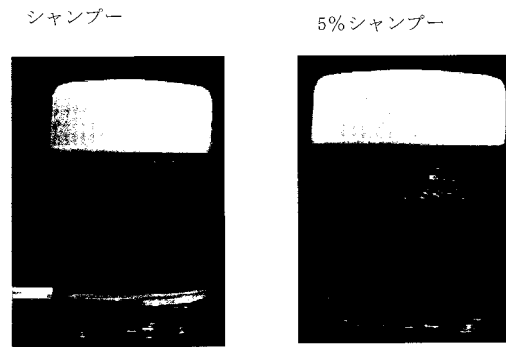
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】

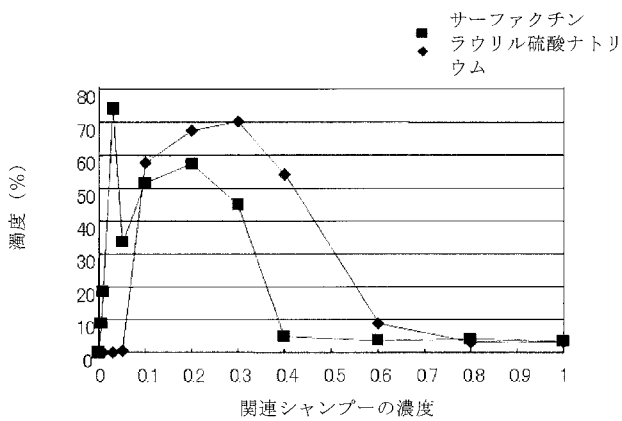


【 図 1 5 】



ポリマーと界面活性剤複合物

【 図 1 4 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2015/082712
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 8/54(2006.01)i; A61Q 19/08(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) A61K,A61Q Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MOABS,CNMED,CPRSABS,CNXT,CNABS,TWMED,HKABS,TWABS,CPEA,DWPI,SIPOABS,SGABS,AUABS,ILABS,STN,CA-ONLINE:antioxidant,surfactin,peptide,wrinkle,anti-aging,skin penetration,emulsifying		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 20110012699 A (AMOREPACIFIC CORP) 09 February 2011 (2011-02-09) See abstract	1,13,15-16
Y	KR 20110012699 A (AMOREPACIFIC CORP) 09 February 2011 (2011-02-09) See abstract	2-12,14
X	TW 200927764 A (UMO INC CO LTD) 01 July 2009 (2009-07-01) See page8 line12-14, page9 line5-page10 line1,page10 line 13-15	17-43
Y	TW 200927764 A (UMO INC CO LTD) 01 July 2009 (2009-07-01) See page9 line5-page10 line1	2-12,14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 25 September 2015		Date of mailing of the international search report 08 October 2015
Name and mailing address of the ISA/CN STATE INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE OF THE P.R.CHINA 6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer ZHANG, Lu Telephone No. (86-10)62412175

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2015/082712

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	20110012699	A	09 February 2011	None			
TW	200927764	A	01 July 2009	WO	2009044279	A2	09 April 2009
				WO	2009044279	A3	24 September 2009

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(71)出願人 517027479

陸振岡

Lu, Jenn - Kan

台灣新北市八里區龍米路一段462號16樓

16F., No. 462, Sec. 1, Longmi Rd., Bali Dist., New Taipei City, Taiwan

(74)代理人 100169904

弁理士 村井 康司

(74)代理人 100159916

弁理士 石川 貴之

(72)発明者 陸振岡

台灣新北市八里區龍米路一段462號16樓

(72)発明者 ワン シン - メイ

台灣, ピンタン カントリー, ピンタン シティ, ミンシェン ロード, ジェンノン レーン, ナンバー 1 - 5

(72)発明者 シュイ シュエン - ルイ

台灣, ニュー タイペイ シティ, シンジュワン ディストリクト, ジョンジェン ロード, レーン 347, ナンバー 29, 13 フロワー

Fターム(参考) 4C083 AA121 AB191 AB192 AC071 AC111 AC121 AC341 AC351 AC391 AC421
AC441 AD071 AD072 AD211 AD221 AD331 AD332 AD351 AD411 AD412
AD491 AD492 AD571 AD621 AD631 AD641 AD661 AD671 BB04 BB13
BB23 CC02 CC05 CC19 CC23 CC24 CC38 DD23 DD31 EE01
EE06 EE07 EE12 EE17