(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2018-513164
(P2018-513164A)
(43)公表日　平成30年5月24日(2018.5.24)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61K 8/97	(2017.01)	A61K	8/97	4C083
A61Q 19/08	(2006.01)	A61Q	19/08	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 35 頁）

(21)出願番号	特願2017-554457 (P2017-554457)
(86)(22)出願日	平成28年4月15日 (2016.4.15)
(85)翻訳文提出日	平成29年12月12日 (2017.12.12)
(86)国際出願番号	PCT/FR2016/050895
(87)国際公開番号	WO2016/170256
(87)国際公開日	平成28年10月27日 (2016.10.27)
(31)優先権主張番号	1553518
(32)優先日	平成27年4月20日 (2015.4.20)
(33)優先権主張国	フランス(FR)

(71)出願人　517175600
ラボラトワール　クラランス
フランス国　７５８２３　パリ　セデックス　１７　アヴニュ　ドゥ　ラ　ポルト　デ　テルヌ　１２
(74)代理人　110000796
特許業務法人三枝国際特許事務所
(72)発明者　クルタン　オリヴィエ
フランス国　９２２００　ヌイイ　シュル　セーヌ　リュ　ジャック　デュリュ　７
(72)発明者　フィトゥーシ　リシャール
フランス国　７８６００　メゾン　ラフィット　リュ　デ　ラ　プロセシオン　４８

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物の単独の又は他の活性剤と組み合わせた汚染防止剤としての美容的使用

(57)【要約】
本発明は、皮膚に対する汚染の影響を抑制する及び／又は予防するための、ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物の単独の、又はサニキュラ・エウロペア抽出物及び／又はフルセラリア・ルンブリカリス抽出物及び／又はラプサナ・コンムニス抽出物と組み合わせた化粧品に関する。また、本発明は、ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物を単独で、又は他の活性剤と組み合わせて皮膚に適用することからなる、皮膚に対する汚染の影響を美容的に予防又は処置する美容方法に関する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
大気汚染の皮膚に対する悪影響からの皮膚の保護、及び／又は大気汚染によって誘導される皮膚症状の修復のための、ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物又はそれを含む組成物の、美容的使用。
【請求項２】
前記大気汚染が、酸化剤、一酸化炭素、炭化水素及び溶媒、二酸化硫黄、金属、ホルムアルデヒド、タバコの煙、浮遊する粒子状物質又は細塵、並びに電磁波から選択される、屋内又は屋外の汚染物質の存在に起因することを特徴とする、請求項１に記載の使用。
【請求項３】
以下の活性：
皮膚及び角質層の結合の増加、並びに皮膚のバリア機能の改善、
ケラチノサイト増殖及び分化プロセスのホメオスタシスの回復、
皮膚マトリクスの回復、
皮膚の保湿の予防及び回復、
皮膚細胞の結合の改善、
細胞間情報伝達の改善、
真皮表皮接合部の回復、
による、汚染によって誘導される劣化の予防及び／又は皮膚障害の回復のための、請求項１又は２に記載の使用。
【請求項４】
汚染によって引き起こされる皮膚老化の予防及び／又は補正、特にしわ及び小じわの予防若しくは補正、及び／又は輝きの維持、及び／又は保湿の増加、及び／又は落屑の調節、汚染に曝された皮膚の柔軟性の維持若しくは賦活のための、請求項１～３のいずれか一項に記載の使用。
【請求項５】
前記抽出物が前記植物の地上部の粉砕と、水性溶媒及び／又は有機溶媒による抽出とによって得られることを特徴とする、請求項１～４のいずれか一項に記載の使用。
【請求項６】
前記組成物が０．０１重量％～１０重量％の抽出物を含むことを特徴とする、請求項１～５のいずれか一項に記載の使用。
【請求項７】
前記組成物が、軟化剤、染料、皮膜形成活性剤、界面活性剤、香料、防腐剤、乳化剤、油、グリコール、ビタミンＥ等のビタミン、ＵＶ遮断剤を含むことを特徴とする、請求項１～６のいずれか一項に記載の使用。
【請求項８】
前記組成物が、ゲル、ローション、クリーム、エマルジョン、ミルク、スプレーの形態であることを特徴とする、請求項１～７のいずれか一項に記載の使用。
【請求項９】
前記抽出物をサニキュラ・エウロペア抽出物と併用することを特徴とする、請求項１～８のいずれか一項に記載の使用。
【請求項１０】
前記サニキュラ・エウロペア抽出物が、該植物の地上部の水溶性抽出物であることを特徴とする、請求項９に記載の使用。
【請求項１１】
前記抽出物又は前記抽出物の組み合わせが、フルセラリア・ルンブリカリス抽出物も含むことを特徴とする、請求項１～１０のいずれか一項に記載の使用。
【請求項１２】
前記フルセラリア・ルンブリカリス抽出物が海塩で富化したオリゴファーセレランを含むことを特徴とする、請求項１１に記載の使用。

【請求項１３】
前記抽出物又は前記抽出物の組み合わせが、ラプサナ・コンムニス抽出物も含むことを特徴とする、請求項１～１２のいずれか一項に記載の使用。
【請求項１４】
前記ラプサナ・コンムニス抽出物が、該植物の地上部の水性グリコールの抽出によって得られることを特徴とする、請求項１３に記載の使用。
【請求項１５】
適量の、
ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物を、単独で又はサニキュラ・エウロペア抽出物、及び／又はフルセラリア・ルンブリカリス抽出物、及び／又ラプサナ・コンムニス抽出物と組み合わせて、又は
前記抽出物若しくは前記組み合わせの１つを含む組成物
を皮膚に適用することを特徴とする、皮膚に対する汚染の影響を抑制する、及びそれを予防する美容ケア方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、皮膚に対する汚染の影響を抑制する及び／又は予防するための、ディオスピロス・メスピリフォルミス（Diospyros mespiliformis）抽出物の単独の、又はサニキュラ・エウロペア（Sanicula europaea）抽出物及び／又はフルセラリア・ルンブリカリス（Furcellaria lumbricalis）抽出物及び／又はラプサナ・コンムニス（Lapsana communis）抽出物と組み合わせた美容的使用に関し、また本発明は、ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物を単独で、又は他の活性剤と組み合わせて皮膚に適用することからなる、皮膚に対する汚染の影響を美容的に予防又は処置する美容方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
きれいな空気は、７８％の窒素、２１％の酸素、０．０９％のアルゴン及び０．１％の水蒸気と、二酸化炭素、水素及びオゾンを含む、幾らか微量の他の気体との混合物である。
【０００３】
大気汚染は、その成分の変化、又は有害な要素の添加によるきれいな空気の変化によって定義される。非常に概略的には、現在挙げられている汚染物質は、本来、工業、暖房及び交通によってもたらされると考えることができる。通常、汚染物質は７つの化学ファミリーに分類される：
オゾン又は窒素酸化物等の酸化剤は刺激物及びフリーラジカルジェネレーターである；
ほこりは、時に多環式炭化水素を固定する浮遊粒子である；それらの有害な役割は、温度及び空気の含水率によって変更され、酸性粒子は刺激性である；組織の水分供給及び酸素供給の低下が観察される；
有機化学製品は発癌性であり、それらは産業廃棄物及び自動車燃焼に由来する；
一酸化炭素は組織低酸素症をもたらし、その８０％は自動車に由来する；
炭化水素及び溶媒は、自動車汚染の５０％を占め、それらは毒性、刺激性、発癌性及び変異原性である；光の存在下で窒素酸化物と反応してオゾンを生成する；
二酸化硫黄は、暖房又は家庭用石油、及び石炭の燃焼生成物のうちの１つであり、皮膚のハイドロ脂質膜の変性及び皮膚刺激を引き起こす；
鉛、亜鉛、アルミニウム、水銀等の金属は、酵素反応に影響を及ぼすことにより細胞代謝を妨げる場合がある。それらはＤＮＡ傷害及び細胞脂質傷害を伴う酸化的損傷に関与する。
【０００４】
外部空気と連続する住居内部の空気もまた、生物学的起源（湿気及びカビのもと、菌体内毒素、アレルゲン等）、物理学的起源（ラドン、粒子、繊維等）及び化学起源（タバコ

の煙、アルデヒド、揮発性有機化合物、すなわちＶＯＣ、金属等）の場合がある、それ自体の汚染物質源を含む。

【０００５】

１９６９年、Harry Daniellは、喫煙者が非喫煙者より老けて見えることを認識した。彼は、後に喫煙としわの寄った皮膚との関連性をより客観的に分析することを可能にするしわを評価するシステムを開発し、このシステムによって第一印象を検証することができるようになった。後に、彼のシステムは様々な疫学的調査で使用された（非特許文献１）。

【０００６】

これらの疫学的調査は、慢性的な喫煙が皮膚の早期老化に関与する重要な環境要因であることを証明した（非特許文献２）。多くの生理病理学的機構が引用されている。角層の厚みの減少の一部は、タバコの煙による角質層の脱水によって説明されると考えられる（非特許文献３）。カルボキシヘモグロビン量を増加させ、バソプレッシンの分泌を促進しながら、チオシアネートを放出することにより、慢性的な喫煙はO_2の経皮的分圧の減少を伴う真皮の相対的な慢性虚血の原因である。その結果、皮膚代謝は変更され、すなわち、ジストロフィー性弾性線維及びプロテオグリカンが蓄積し、細胞外マトリクスタンパク質はメタロプロテアーゼによって更に分解され、コラーゲン合成が減少する。

【０００７】

喫煙と皮膚老化との関連性は、ＭＭＰ－１及びＭＭＰ－３のｍＲＮＡのより高い発現、またＩ型及びＩＩＩ型のコラーゲンの減少によって媒介されるようである（非特許文献４、非特許文献５）。

【０００８】

また、喫煙は、弾性線維症及び毛細管拡張症の拡大に関係しているようであり（非特許文献６）、これにはＭＭＰ－１発現の誘導に加えて他の分子経路が示されている。ＡｈＲ経路がタバコによって誘導される皮膚の早期老化プロセスにおいて役割を果たす可能性があることが最近示唆された（非特許文献７）。

【０００９】

皮膚は、その第１の機能が外部バリアである器官であり、様々な大気汚染物質と直接接触して、結果的に、大気汚染との皮膚の接触が、特に皮膚の老化を誘導する。

【００１０】

幾つかの研究は、皮膚又は皮膚細胞に対するオゾンの影響を検討した。オゾンは、太陽放射線と排気管排出ガスとの相互作用後に地表面で形成され得る汚染物質である。McCarthy et al.は、都市で測定される濃度のオゾンに正常ヒト表皮ケラチノサイト（ＮＨＥＫ）を曝露して、それらの影響を分析した。過酸化水素及びＩＬ－１αのレベルは増加するのに対し、ＡＴＰのレベルは減少する。最終的に、McCarthy et al.は、オゾンがＤＮＡ損傷を増加させると述べた（非特許文献８）。他の研究では、ネズミ科皮膚組織に対するオゾンの影響が検討され、これにより強力な酸化剤であるオゾンが皮膚の完全性に影響し得ることが示されている（非特許文献９）。同様に、オゾンがネズミ科の皮膚においてＭＭＰ－９発現を誘導し、マトリクスの再形成の役割を示すことが研究により分かっている（非特許文献１０）。

【００１１】

最近の疫学的調査は粒子状物質（ＰＭ）への曝露と、色素斑、またしわ等の皮膚老化の徴候の出現との直接的な関連を発見した（非特許文献１１）。周囲の粒子がこれらの悪影響を発揮する重要な機構はＲＯＳの生成である（非特許文献１２）。

【００１２】

さらに、粒子は、ＲＯＳを生成するようにミトコンドリア中に局在化してミトコンドリア障害による皮膚老化をもたらす可能性がある有機化学生成物及び金属の支持体として作用する場合がある（非特許文献１３）。皮膚老化を誘導する別の経路は、多環式芳香族炭化水素（ＰＡＨ）の経路の可能性がある。ＰＡＨは、都市部の空気中の粒子状物質の表面に吸着されて、ＡｈＲによって生体異物の代謝を活性化し得る（非特許文献１４）。

【００１３】
Ushio et al. (1999)によって行われた他の研究は、培養物中のケラチノサイトに対するディーゼル粒子の影響を試験した。高濃度のディーゼル粒子は、これらの細胞の成長及び移動に対する障害の原因である。
【００１４】
したがって、粒子は、皮膚の完全性に対して直接作用をするようである。さらに、この曝露は、ＩＬ－８分泌の増加を引き起こす。それが起こると、このサイトカインは炎症性皮膚反応に関与する。この研究は、ディーゼル粒子が、湿疹、アレルギー性皮膚炎又は乾癬等の炎症性皮膚障害の開始及び／又は発病に役割を果たす可能性があることを示唆する（非特許文献１５）。
【先行技術文献】
【非特許文献】
【００１５】
【非特許文献１】Daniell HW. Smoker's wrinkles. A study in the epidemiology of "crow's feet". Ann Intern Med 1971; 75:873-80
【非特許文献２】Morita A. Tobacco smoke causes premature skin aging. J Dermatol Sci 2007; 48:169-75
【非特許文献３】Freiman A et al. Cutaneous effects of smoking. J Cutan Med Surg 2004; 8:415-23
【非特許文献４】Yin L et al. Skin aging induced by ultraviolet exposure and tobacco smoking: evidence from epidemiological and molecular studies. Photodermatol Photoimmunol Photomed 2001; 17:178-83
【非特許文献５】Yin L et al. Alterations of extracellular matrix induced by tobacco smoke extract. Arch Dermatol Res 2000; 292:188-94
【非特許文献６】Kennedy C et al. Effect of smoking and sun on the aging skin J Invest Dermatol 2003; 120:548-54
【非特許文献７】Morita A et al. Molecular basis of tobacco smoke-induced premature skin aging. J Investig Dermatol Symp Proc 2009; 14:53-5
【非特許文献８】McCarthy JT et al. Effects of ozone in normal human epidermal keratinocytes. Exp Dermatol. 2013 May;22(5):360-1
【非特許文献９】Thiele JJ et al. Ozone-exposure depletes vitamin E and induces lipid peroxidation in murine stratum corneum. J Invest Dermatol 1997; 108:753-7
【非特許文献１０】Valacchi G et al. Induction of stress proteins and MMP-9 by 0.8 ppm of ozone in murine skin. Biochem Biophys Res Commun 2003; 305:741-6
【非特許文献１１】Vierkotter A et al. Airborne particle exposure and extrinsic skin aging. J Invest Dermatol 2010; 130:2719-26
【非特許文献１２】Donaldson K et al. Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure. Part Fibre Toxicol 2005; 2:10
【非特許文献１３】Li N, Sioutas C et al. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. Environ Health Perspect 2003; 111:455-60
【非特許文献１４】Menichini E. Urban air pollution by polycyclic aromatic hydrocarbons: levels and sources of variability. Sci Total Environ 1992; 116:109-35
【非特許文献１５】Ushio, H., K. Nohara, et al. (1999). "Effect of environmental pollutants on the production of pro- inflammatory cytokines by normal human dermal keratinocytes." Toxicol Lett 105 (1): 17-24
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１６】
したがって、屋外及び屋内の大気汚染物質が多くの荒れた皮膚症状、特に皮膚の厚み、

弾力、硬さ、若しくはその他、輝き（radiance）の変化、しわ及びくすんだ肌の色、又は更には色素斑の出現の原因のようである。これらの皮膚症状が表面的なままであり、病的ではないものの、ほとんどの個体は多かれ少なかれ汚染物質に曝露されており、それらの出現を予防又は抑制することを可能とし得る新規な化粧用製剤の開発が強く必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【００１７】

皮膚は身体の表面全体を覆い、成人では合計で約１．６平方メートルの表面積を有する非常に広範囲の器官であることが想起される。その機能は、外部環境から深部組織を保護することであり、また、特に、免疫、温度制御及び体液喪失において活動性を有する。皮膚は、３つの主要部分からなる。表皮と呼ばれる薄い浅部、真皮と呼ばれる内部肉厚部、及び皮下組織と呼ばれる深部脂肪部である。表皮は、表皮のおよそ９０％を構成する細胞であるケラチノサイトの分化の増加状態に相当する、その層形態の組織によって本質的に特徴づけられる。これらのケラチノサイトは、表皮の深層から表皮の外表面までを移動する。この移動中、ケラチノサイトは多数の生化学的な及び構造的な修飾を経る。その最も重要なものは角質化、すなわち細胞がケラチンを合成するプロセスである。表皮の最浅層にある角質層は、主として角質細胞と呼ばれる死細胞で構成され、特に外部攻撃に非常に強い。表皮は、皮膚の外部構造を構成する被膜上皮として定義され得る。表皮は、特に、強いフィラメント状タンパク質であるケラチンの産生によって皮膚を保護する。ケラチンは、部分的に皮膚の不透過性を担う。

【００１８】

真皮は「真皮表皮接合部」によって表皮とは隔てられている。真皮は、明確な境界を伴わずに、皮下組織によって深くまで続く。真皮の役割は、特に、皮膚の柔軟性及び強度を維持することである。また、真皮は、他の本質的な機能を担う。真皮の相当な血管形成は、表皮と栄養交換を行うことを可能にする。また、その血管形成は、皮膚の免疫防御の必須成分である、マクロファージ及び樹状細胞型の免疫細胞に富むことを可能とする。さらに真皮は、触覚を担う感覚受容器を有する神経が分布した組織である。最後に真皮は、治癒の現象と、並びに可溶性サイトカイン及び表皮に対する成長因子を合成することによるケラチノサイトの増殖及び分化の調節の現象に関与する。真皮は、線維芽細胞と、細胞外マトリクスを形成するコラーゲン、エラスチン及びプロテオグリカンの微小線維ネットワークとから本質的になる結合支持組織である。細胞外マトリクスは、線維芽細胞の接着性基質及び組織の機械的支持体である。

【００１９】

屋外及び／又は屋内の大気汚染の影響から皮膚を保護すること及び／又は修復することが意図される活性物質の同定を目標とする調査のなかで、出願人は、ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物が、皮膚へのホルムアルデヒド、タバコの煙、及び微粒子の影響に対して顕著な活性を有することを発見した（実施例１に記載される試験を参照されたい）。

【００２０】

したがって、本発明は、皮膚に対する汚染の影響の予防及び／又は修復に対する、ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物又はそれを含む化粧品組成物の美容的使用に関し、本発明による上記使用は健康な皮膚に対する適用に特に適している。

【図面の簡単な説明】

【００２１】

【図１】ホルムアルデヒドモデルで使用したＶｉｔｒｏｃｅｌｌ（Ｒ）曝露モデルを表す図である。

【図２Ａ】ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物で処理し、ホルムアルデヒドに曝露した表皮のモデルに対して行ったプロテオミクス研究の結果を提示する図である。

【図２Ｂ】ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物で処理し、ホルムアルデヒドに曝露した表皮のモデルに対して行ったプロテオミクス研究の結果を提示する図である。

【図３Ａ】ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物で処理し、タバコの煙に曝露した表皮のモデルに対して行ったプロテオミクス研究の結果を提示する図である。
【図３Ｂ】ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物で処理し、タバコの煙に曝露した表皮のモデルに対して行ったプロテオミクス研究の結果を提示する図である。
【図４Ａ】ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物で処理し、微粒子に曝露した表皮のモデルに対して行ったプロテオミクス研究の結果を提示する図である。
【図４Ｂ】ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物で処理し、微粒子に曝露した表皮のモデルに対して行ったプロテオミクス研究の結果を提示する図である。
【図５】様々な条件（非処理細胞対照、H_2O_2、レスベラトロール及び様々な濃度のサニクル抽出物）に曝露されたケラチノサイトのミトコンドリアＲＯＳレベルに対する効果を表すヒストグラムである。
【図６】様々な条件（非処理細胞対照、H_2O_2、レスベラトロール及び様々な濃度のサニクル抽出物）に曝露されたケラチノサイトの細胞ＲＯＳレベルに対する効果を表すヒストグラムである。
【図７】様々な条件（非処理細胞対照、H_2O_2、レスベラトロール及び様々な濃度のサニクル抽出物）に曝露されたケラチノサイトの細胞ＳＯＤの活性に対する効果を表すヒストグラムである。
【図８】様々な条件（非処理細胞対照、H_2O_2、レスベラトロール及び様々な濃度のサニクル抽出物）に曝露されたケラチノサイトのミトコンドリアＳＯＤの活性に対する効果を表すヒストグラムである。
【図９】様々な条件（非処理細胞対照、H_2O_2、レスベラトロール及び様々な濃度のサニクル抽出物）に曝露されたケラチノサイトの総グルタチオンレベルに対する効果を表すヒストグラムである。
【図１０】排ガス汚染に曝露し、フルセラリア・ルンブリカリス抽出物で処理した、又は処理していない皮膚組織片の皮膚保湿の程度を表すヒストグラムである。
【発明を実施するための形態】
【００２２】
本発明において、「健康な皮膚」の用語は、いかなる皮膚の病状も示さず、さらに、良好な状態である皮膚を意味する（化粧製品に関する、２００９年１１月３０日付の（EC）REGULATION No. 1223/2009 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCILの条項2.1.aによる）。
【００２３】
アフリカ黒檀とも呼ばれるディオスピロス・メスピリフォルミスは、カキノキ科の植物であり、非常に枝分かれした樹冠及び密集した葉を持ち、高さ４０ｃｍに達する場合があるアフリカ原産の常緑樹である。葉は互生葉序で単葉であり、全体及び花は白色から緑がかった黄色である。その果実は伝統的に、飲み物、又はコーンフラワーと混ぜて煮出し汁として消費される。
【００２４】
この植物は、特に、その抗生物質性のため、伝統的な治療薬の調製に使用され、また該植物は、生殖能の改善に、マラリア、梅毒、ハンセン病若しくは真菌症の治療に、又は駆虫剤としても使用される。葉煎じ薬は、熱、耳部感染及び創傷を治療するために使用される。
【００２５】
現在まで、皮膚に対する汚染の影響の予防又は修復におけるこの植物の活性は記載されていない。
【００２６】
出願人により、健康な表皮モデルに対してディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物で処理して又は処理せずに、様々な汚染物質に曝露して試験を行い、ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物の以下の効果を実証することを可能とした。
【００２７】

この抽出物は、角化外膜の構成マーカー（ホルネリン（hornerin）ＨＲＮＲ、低分子プロリンリッチタンパク質ＳＰＲＲ２Ａ、ＣＥ２Ｂ、ＬＣＥ３Ｄ）の発現の誘導によって皮膚バリアを強化して皮膚に対するホルムアルデヒドの悪影響を予防し、補正する。また、この効果は、角化外膜の主なタンパク質であるロリクリン（loricrin）の発現誘導の免疫組織化学検査による同定によって確認される。さらに、この抽出物は、ケラチノサイト増殖及び分化プロセスのホメオスタシスに関与するタンパク質であるＳＩＲＴ１の発現増加も誘導する。最後に、ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物は、炎症性症状を軽減させることによりホルムアルデヒドに曝された表皮を保護する。実際に、得られた結果は、炎症、アポトーシス及びマトリクス分解のマーカーが低発現されることを示す。サイトカインＩＬ－８、並びにマトリクスプロテアーゼであるＭＭＰ１及びＭＭＰ９のアッセイは、トランスクリプトーム（transcriptomic）研究の結果を裏付ける。

【００２８】

ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物は、それ以上炎症に関与する因子を誘引しないことによりタバコの煙に曝された表皮を保護する。実施例１において提示される試験の結果は、炎症、アポトーシス、及びマトリクス分解のマーカーが、抽出物の存在下で低発現されることを示す。サイトカインＩＬ１－α及びＩＬ－８、並びにＭＭＰ１のアッセイは、トランスクリプトーム研究の結果を裏付ける。さらに、ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物は、良好な保湿が維持されるのを可能とする（ＦＬＧ２、ＣＤ４４）。さらに、得られた結果は、表皮へのこの抽出物の使用は、タバコの煙の影響に対して、特にクローディン（claudin）１（ＣＬＤＮ１）及びデスモコリン（desmocollin）１（ＤＳＣ１）によって提供される細胞結合（cell cohesion）及び細胞間情報伝達、また真皮表皮接合部を維持及び回復することを可能とすることを示す（ＩＶ型及びＶＩＩ型のコラーゲンの遺伝子発現を維持又は回復する）。またこれらの試験は、上記皮膚が汚染物質に曝露される場合に、ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物が皮膚ホメオスタシスを維持することに寄与することを示す。

【００２９】

最後に、ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物は、大気粒子によるバリア機能の変性を予防及び修復する。これは、皮膚バリア機能に重要な役割を果たすロリクリンの発現の強い増加に起因する。粒子の存在によって変性された健康な表皮と粒子に曝露される前にディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物で処理された表皮との比較によって行われた試験は、後者が特にクローディン１（ＣＬＤＮ１）及びデスモコリン１（ＤＳＣ１）によって保証される良好な細胞結合及び良好な細胞間情報伝達を維持し、粒子の影響から保護されたその真皮表皮接合部を有することを示す（真皮表皮接合部の主要成分、ＩＶ型、ＶＩＩ型のコラーゲン、及びナイドジェンＩの遺伝子発現の増加）。

【００３０】

本発明により使用され得るディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物は、植物のいかなる部分由来であってもよく、植物の地上部が好ましく、より優先的には葉である。植物又は選ばれた部分からの抽出物の抽出は、粉砕並びに水性溶媒及び／又は有機溶媒、好ましくは水性溶媒による抽出によって実行され得る。

【００３１】

本発明の特定の一実施形態によれば、本発明により使用されるディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物は、下記工程によって得られるマルトデキストリンで安定化された水性葉抽出物である：

ディオスピロス・メスピリフォルミスの葉の粉砕、

水による抽出、

分離、

精製、

マルトデキストリンの添加、

濾過、

噴霧乾燥。

【００３２】
このように得られた抽出物は、特異臭を持つ黄色がかったオレンジ色からベージュ色の粉体であり、１％で水溶液に調製すると、そのｐＨは５．０～７．０になる。
【００３３】
ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物は、化粧品組成物に製剤化されることが好ましく、当業者は、その組成を如何にして抽出物の物理化学的性質に適合させるかわかるであろう。
【００３４】
上記化粧品組成物は、組成物の全重量に対して固体重量で０．０１％～１０％、好ましくは０．０１％～２％のディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物を含むことが好ましい。
【００３５】
従来、この組成物は、例として、限定を伴わずに、軟化剤、染料、皮膜形成活性剤、界面活性剤、香料、防腐剤、乳化剤、油、グリコール、ビタミンＥ等のビタミン、ＵＶ遮断剤等の既知の用途の、また化粧品組成物及び皮膚科学的組成物で使用される１以上の配合剤又は添加剤を更に含んでもよい。化粧品に関するこの知識により、当業者は所望の特性に応じて、本発明の組成物にどの配合剤をどのくらいの量で添加するかわかるであろう。
【００３６】
この組成物は、顔又は身体への適用以外に、何らの生薬製剤の制限（galenical restriction）も伴わずに美容学及び皮膚科学の分野の当業者に既知の任意の形態であってもよい。有利には、該組成物は、ゲル、ローション、クリーム、エマルジョン、ミルク、スプレー等の形態である。
【００３７】
したがって、本発明は、皮膚への損傷の影響、すなわち大気汚染によって引き起こされる皮膚に対する望ましくない目に見える症状からの皮膚の保護、及び／又は大気汚染によって引き起こされるこれらの皮膚症状又は障害の修復に対する、ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物又はそれを含む組成物の美容的使用に関し、大気汚染が屋内又は屋外の汚染物質の存在に起因するかどうかに関わらず、本発明による使用は有利であり、大気汚染は、特に周辺空気中のオゾン又は窒素酸化物等の酸化剤、一酸化炭素、炭化水素及び溶媒、二酸化硫黄、金属、ホルムアルデヒド、タバコの煙、浮遊する粒子状物質若しくは細塵、又は更には電磁波の存在に起因する汚染を含んでもよい。
【００３８】
より詳しくは、ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物又はそれを含む組成物の使用は、以下の活性：
皮膚及び角質層の結合の増加、並びに皮膚のバリア機能の改善、
ケラチノサイト増殖及び分化プロセスのホメオスタシスの回復、
皮膚マトリクスの回復、
皮膚保湿の回復、
皮膚細胞の結合の改善、
細胞間情報伝達の改善、
真皮表皮接合部の回復、
によって、汚染によって引き起こされる、皮膚に対する目に見える皮膚症状の出現若しくはその劣化の徴候を予防すること、及び／又は皮膚障害を修復することを可能にする。
【００３９】
これらの特性に基づいて、ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物又はそれを含む組成物の使用は、汚染によって引き起こされる皮膚老化、及びそれと関連する様々な皮膚症状の予防及び／又は制限及び／又は補正、特に、しわ及び小じわ（fine lines）の予防及び／又は補正、及び／又は輝きの維持、及び／又は保湿の増加、及び／又は落屑の調節、及び／又は汚染に曝された皮膚の柔軟性の維持若しくは賦活に対して特に有用である。
【００４０】

ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物又はそれを含む組成物の作用範囲を広げるため、その美容効果を強める及び／又は１以上の他の補足的な美容効果を有する他の化粧用活性剤と併用することが有利な場合がある。

【００４１】

したがって、化粧品組成物においてディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物を任意に１以上の他の抗酸化剤及び／又は汚染防止用美容物質と併用することは有利である。

【００４２】

これらの美容物質は次のものから選択されることが好ましい：

抗酸化特性（実施例２を参照されたい）、また角質層を強化する特性を有するため、皮膚バリア機能を有する、サニキュラ・エウロペア抽出物（フランス国特許第３００７９８０号）。そのため、この抽出物は、汚染に対する予防作用とディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物による皮膚の修復との両方を強化することを可能とする。

【００４３】

サニキュラ・エウロペアは、セリ科の草本（セリ科植物）であり、一般に下生えで成長する。

【００４４】

上記植物は、中サイズ（１５ｃｍ～５０ｃｍ）の無毛の多年生植物であり、その散形花序（３～５個の一様でない葉脈）の球状の外観によって容易に認識され得る。

【００４５】

上記植物は、サポニン、タンニン及び粘液に富むことが知られており、その治癒、収斂、及び創傷治癒の特性のために伝統医学において使用されている。

【００４６】

サニクル（sanicle）抽出物は、好ましくは地上部（葉、花及び茎）の水溶性抽出物である。有利には、この抽出物は地上部の水性アルコール抽出物であり、グリセロールで安定化されることが好ましい。

【００４７】

抽出物は、少なくとも下記工程を含むプロセスに従って得られる水性アルコール抽出物であることが好ましい：

地上部の乾燥、

粉砕、

エタノール／水（８０：２０）抽出、

濾過、

抽出溶媒の蒸発による真空下での濃縮、

濃度の調整（グリセロールの添加）。

【００４８】

サニキュラ・エウロペア抽出物は、特異臭を持つ黄褐色のわずかに粘性の液体である。該抽出物は、次の分析特性を有する：ｐＨ＝３．５～５．０、相対密度：１．０５０～１．２００、屈折率：１．３７０～１．４００、乾燥植物／抽出物比＝１／１０。

【００４９】

本発明により使用される化粧品組成物は、組成物の全重量に対する固体重量で０．０１％～１０％のサニキュラ・エウロペア抽出物を含むことが好ましい。

【００５０】

バルト海産の紅藻であるフルセラリア・ルンブリカリスの抽出物。該抽出物は、海塩で富化したオリゴファーセレラン（oligofurcellaran）を含むことが好ましい。オリゴファーセレランは、藻類から抽出された硫酸化ファーセレラン（ガラクトース及び脱水ガラクトース（anhydrogalactose））の解重合によって得られ、解重合に続いて、オリゴファーセレランを海塩で富化した溶液で再水和する。かかるタイプの抽出物は、Codif社よりＨｙｄｒａｎｏｖ　Ｐの名称で販売される。

【００５１】

このフルセラリア・ルンブリカリス抽出物は、皮膚保湿特性を有し、汚染による皮膚脱

水を予防又は補正することを可能とする（実施例３を参照されたい）。
【００５２】
上記化粧品組成物は、組成物の全重量に対する固体重量で０．０１％～１０％、好ましくは０．１％～２％のフルセラリア・ルンブリカリス抽出物を含むことが好ましい。
【００５３】
ラプサナ・コンムニス抽出物；キク科のラプサナ・コンムニスは、非常に広範囲に及ぶ１年生植物であり、道端及び他の大気汚染に曝される所で生育する。該植物は、手間の掛からない非常に強い植物である。
【００５４】
本発明による組成物で使用されるラプサナ・コンムニス抽出物は、植物の地上部の水性グリコール抽出によって得られる。そのようにして特異臭を持つ透明で茶色に着色した、以下の分析特性を有する液体が得られる。
含水率：１８％～２６％
ｐＨ：６～８
密度：１．０５５～１．０７５
屈折率：１．４２０～１．４４０。
【００５５】
この抽出物を使用する場合、およそ０．０１重量％～５重量％、好ましくは０．０１重量％～０．５重量％、最も好ましくは０．０１重量％～０．０５重量％の濃度で添加される。
【００５６】
また、本発明は、以下の組み合わせ、すなわち、
ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物及びサニキュラ・エウロペア抽出物、
ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物及びフルセラリア・ルンブリカリス抽出物、
ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物及びラプサナ・コンムニス抽出物、
ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物、サニキュラ・エウロペア抽出物及びフルセラリア・ルンブリカリス抽出物、
ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物、サニキュラ・エウロペア抽出物及びラプサナ・コンムニス抽出物、
ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物、フルセラリア・ルンブリカリス抽出物及びラプサナ・コンムニス抽出物、
ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物、サニキュラ・エウロペア抽出物、フルセラリア・ルンブリカリス抽出物及びラプサナ・コンムニス抽出物、
のうちの１つ又はそれを含む組成物の、皮膚に対する汚染の影響を抑制する及びそれを予防することに対する、特に大気汚染の皮膚に対する悪影響からの皮膚の保護、及び／又は皮膚障害、すなわち大気汚染によって引き起こされる皮膚に対する望ましくない眼に見える症状の修復に対する使用に関し、大気汚染が屋内又は屋外の汚染物質の存在に起因するかどうかに関わらず、本発明による使用は有利であり、大気汚染は、特に周辺空気中のオゾン又は窒素酸化物等の酸化剤、一酸化炭素、炭化水素及び溶媒、二酸化硫黄、金属、ホルムアルデヒド、タバコの煙、浮遊する粒子状物質若しくは細塵、電磁波の存在に起因する汚染であってもよい。
【００５７】
より詳しくは、本発明による上記組み合わせの１つ又はそれを含む組成物の使用は、以下の活性：
皮膚及び角質層の結合の増加、並びに皮膚のバリア機能の改善、
ケラチノサイト増殖及び分化プロセスのホメオスタシスの回復、
皮膚マトリクスの回復、
皮膚保湿の回復、
皮膚細胞の結合の改善、

細胞間情報伝達の改善、
真皮表皮接合部の回復、
によって、汚染によって引き起こされる、皮膚に対する目に見える皮膚症状の出現若しくはその劣化の徴候を予防すること、及び／又はこれらの皮膚症状若しくは皮膚障害を修復することを可能にする。

【００５８】

これらの特性に基づいて、本発明による上記組み合わせの１つ又はそれを含む組成物の使用は、汚染によって引き起こされる皮膚老化、及びそれと関連する様々な皮膚症状の予防及び／又は制限及び／又は補正、特にしわ及び小じわの予防及び／又は補正、及び／又は輝きの維持、及び／又は保湿の増加、及び／又は落屑の調節、及び／又は汚染に曝された皮膚の柔軟性の維持若しくは賦活に対して特に有用である。

【００５９】

最後に、本発明は、適量の、ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物を、単独で又はサニキュラ・エウロペア抽出物、及び／又はフルセラリア・ルンブリカリス抽出物、及び／又はラプサナ・コンムニス抽出物と組み合わせて、又は上記抽出物若しくは上記組み合わせの１つを含む組成物を皮膚に適用することを特徴とする、皮膚に対する汚染の影響を予防及び／又は修復する美容ケア方法に関する。

【実施例】

【００６０】

実施例１

ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物の汚染防止活性の実証は、単回又は反復の曝露の間、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでの再生表皮（reconstituted epithelia）の生物学的応答における屋内及び屋外の大気の様々な汚染物質の影響を特性評価することが可能な新規モデルの開発によって可能となった。

【００６１】

簡潔には、選択された研究モデルはＲＨＥ再生表皮（SkinEthic、フランス国リヨン）である。ＲＨＥ再生表皮は、ヒト本来の細胞から再生された表皮である。ケラチノサイトを、ポリカーボネート薄膜を含む挿入物（Ｎｕｎｃインサート０．５ｃｍ^2）上で無血清規定培地中、気液界面で培養する。

【００６２】

再生表皮の気液界面曝露モデルの樹立は、ｉｎ　ｖｉｖｏの状況に近い環境において、皮膚表皮細胞と環境汚染物質との間の相互作用の研究を可能にする。

【００６３】

３つのタイプの汚染物質、すなわち、ホルムアルデヒド、タバコの煙、粒子を表皮表面に適用した。

【００６４】

ホルムアルデヒドモデル

水に溶解された場合にホルモールとしてよく知られるホルムアルデヒドは、アルデヒドファミリーに属する非常に揮発性の有機化合物（ＶＯＣ）である。この物質は低分子量であり、周囲温度で気体になる特性を有し、現在、屋内環境においてしばしば発見される。

【００６５】

ホルムアルデヒドには非常に多くの発生源があり、中でも、タバコの煙、ロウソク、線香、暖炉、またガスレンジ、石油燃焼ストーブを含む燃焼発生源、及びホルムアルデヒド系成分を含む構築物及び装飾製品である。

【００６６】

研究のため、再生表皮モデルを２１００ｐｐｍ用量のホルムアルデヒドに曝露した。

【００６７】

その曝露を、試料に適した６ウェルＶｉｔｒｏｃｅｌｌ（Ｃ）曝露モジュールにおいて行う。このモジュールは、（ｉ）表皮の基部と栄養培地との間、及び（ｉｉ）頂部と生成された雰囲気（空気又は汚染物質（複数の場合がある））との間の接触を伴う、気液界面

を提供する２部で構成される（図１）：
挿入物（表皮）を受けるＡ部。維持培養培地（ＭＭ）は、水循環によって温度調節される（３７℃）モジュールの下部に堆積し、
気体雰囲気と組織表面との間の直接接触は、曝露モジュール及び汚染物質吸入突起のＢ部によって提供される。
【００６８】
空気流量、試料曝露時間、及び曝露頻度等の様々なパラメーターを、空気等の「対照」雰囲気で定義した。本工程の目的は、組織被害のない気液界面曝露に対する最も良好な条件を規定することであった。
【００６９】
タバコ煙モデル
ホルムアルデヒド及びアセトアルデヒドを含むアルデヒド類と多数の揮発性有機化合物とを含有する混合物であるタバコの煙は、市販のタバコから発生させた。１０×２０ｍｌを注射器で採取し、曝露チャンバーに導入した。表皮を３７℃で６０分間２００ｍｌのタバコの煙に曝露した。「対照空気（air-control）」を並行して調査した。
【００７０】
微粒子モデル
微粒子は、道路交通、より詳しくは自動車のディーゼルエンジン、また工業、農業及び燃焼（煙突、個人の暖房等）に由来する。マイクロメートルサイズの微細粒子は肉眼で見えない。空気中で測定されるのは、ＰＭ１０粒子（１０μｍ未満のサイズであり、細胞のサイズの６分の１～８分の１である）と、微粒子又はＰＭ２．５粒子（２．５μｍ未満のサイズ、細菌等）である。
【００７１】
研究のため、粒子（組成：下記表）を再生組織の表面に局所的に適用した。表皮を３７℃で６０分間粒子に曝露した。「対照空気」を並行して調査した。
【００７２】

【表１】

２つの大気汚染ＰＭ試料中の有機化合物

		濃度（ng／m^3）	
VOC		$PM_{2.5}$	$PM_{>2.5}$
ベンゼン		0.46	0.05
トルエン		1.81	0.07
エチルベンゼン		0.83	0.10
o－キシレン		3.47	0.07
123トリメチルベンゼン		1.17	0.71
トリメチルベンゼン		0.52	＜LQ
テトラメチルベンゼン		0.35	0.20
ペンタメチルベンゼン		0.29	＜LQ
合計		8.90	1.2
PAH			
ナフタレン	Nap	0.01	0.01
アセナフチレン	Ace	＜LQ	0.004
フェナントレン	Phe	0.02	0.01
フルオランテン	Flu	0.11	0.03
ピレン	Pyr	0.28	0.06
ベンゾ［a］アントラセン	BaA	0.19	＜LQ
クリセン	Chr	0.26	0.01
ベンゾ［b］フルオランテン	BbF	＜LQ	0.02
ベンゾ［k］フルオランテン	BkF	0.30	＜LQ
ベンゾ［a］ピレン	BaP	0.24	0.01
ジベンゾ［a,h］アントラセン	DahA	0.21	＜LQ
インデノ［1,2,3-c,d］ピレン	Ind	＜LQ	0.07
ベンゾ［g,h,i］ペリーレン	BghiP	0.37	＜LQ
合計		1.99	0.22

＜LQ＝定量限界未満;VOC= 揮発性有機化合物;
PAH= 多環式芳香族炭化水素

【００７３】

Ｓｋｉｎｅｔｈｉｃ（Ｒ）の再生表皮モデルに対するこれらの汚染物質の影響を特性評価することが様々な調査方法により可能になった：

定量的ＰＣＲにより行われるトランスクリプトーム法（１２６個の「表皮」遺伝子）、

免疫組織化学検査により行われるプロテオミクス法、

Ｅｌｉｓａ技術及びマルチプレックス技術を使用して培養培地をアッセイする方法。

【００７４】

汚染物質（ホルムアルデヒド、タバコの煙、粒子）によって誘導される表皮の機能及び構造の変性に関するディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物の保護効果の評価について、以下の試験を行った。

【００７５】

Ｓｋｉｎｅｔｈｉｃ（Ｒ）の再生表皮を、組織表面に適用されたディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物と併用して、又はそれと併用せずに各汚染物質で処理する。

【００７６】

試験したディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物は、下記工程によって得られたマルトデキストリンで安定化された水性葉抽出物である：

ディオスピロス・メスピリフォルミス葉の粉砕、

水による抽出、

分離、

精製、

マルトデキストリンの添加、

濾過、

噴霧乾燥。

【００７７】

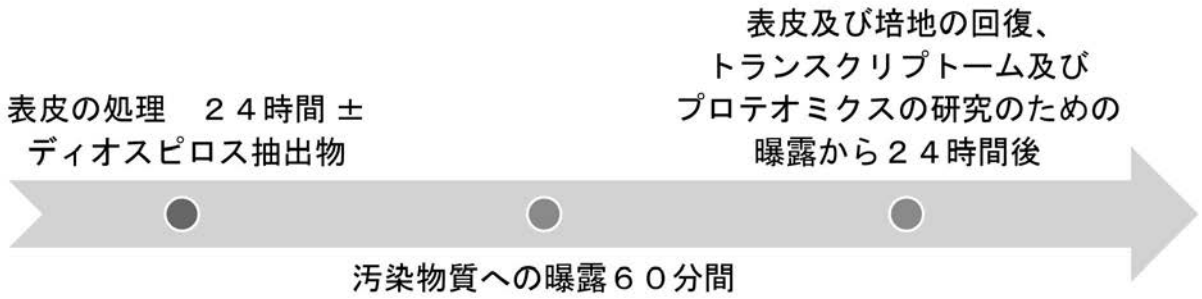
特性評価：黄色がかったオレンジ色からベージュ色の特異臭を持つ粉体；ｐＨ５．０～７．０の１％水溶液で調製。

【００７８】

処理の終わりに、ＲＴｑＰＣＲ及び表皮標的免疫標識によって遺伝子発現解析を行うために各表皮を保存した。培養培地をＥｌｉｓａ及びマルチプレックスアッセイに使用する。

【００７９】

【表２】



【００８０】

トランスクリプトーム研究：

トランスクリプトーム研究は、Ｓｋｉｎｅｔｈｉｃ（Ｒ）の再生表皮に対して定量的ＰＣＲ（ｑＰＣＲ）によって行われ、多数の遺伝子の発現を調査することを可能とする。ＲＮＡをＲＬＴバッファー、次にＱｉａｇｅｎ　ＲＮｅａｓｙ抽出マイクロキットを使用して抽出し、それらを後にアッセイし、その後、逆転写する。その後、プレート上で１２８個の表皮機能遺伝子に対してｑＰＣＲを実行する（Roche Diagnostics）。

【００８１】

結果を、フォールドチェンジ（ＦＣ）と呼ばれる２つの条件間の発現の差を計算することにより分析する。対照と比較した発現の増加はＦＣ１．５以上によって反映され、対照と比較した発現の減少はＦＣ０．７以下によって反映されるとする。

【００８２】

プロテオミクス研究：

プロテオミクス研究は、免疫組織化学検査によって行われ、多数のタンパク質の存在を調査することを可能とする。

【００８３】

再生表皮を１０％ホルマリン中で７２時間固定した後、脱水して、パラフィンブロックに包埋し、続いて５μｍの切片へと切断する。切片を脱パラフィンした後、アンマスキング（unmasked）し（Abcam）、続いて、膜を透過性にするため、及び結合部位を飽和させるため、０．１％のｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（Sigma）及び２％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ－Sigma）で１０分間処理する。

【００８４】

その後、切片をロリクリン及び４－ＨＮＥ（４－ヒドロキシノネナール）に対する一次抗体と共に１時間インキュベートする。

【００８５】

蛍光変換顕微鏡（Ｎｉｋｏｎ　Ｅｃｌｉｐｓｅ　５０ｉ）を使用して写真を撮る。

【００８６】

ＥＬＩＳＡによる、マルチプレックスによるアッセイ（ＬＵＭＩＮＥＸ　ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ）：

ＥＬＩＳＡ（酵素結合免疫吸着測定法（Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay）の頭文字）は、生物学的液体中のタンパク質を検出及び／又はアッセイすることを意図した免疫学的アッセイである。「サンドイッチ」アッセイ技術では、マイクロプレートのウェルは

、探索されている抗原を特異的に結合することができる捕捉抗体で被覆される。コーティングと呼ばれるこの操作の間、捕捉抗体は静電的相互作用によってウェルのプラスチックに結合する。その後、捕捉された抗原に結合可能なトレース（trace）抗体である二次抗体をウェルに添加し、結合していないトレーサー（tracer）抗体を濯いで除去する。トレーサー抗体は着色生成物の形成を触媒する酵素に結合される。したがって、結合したトレーサー抗体の分子の数が捕捉抗体によって固定化される抗原分子の数に依存することから、既知濃度の抗原を用いて作成した検量線に基づいて比色法によって反応を定量することができる。このアッセイは、ＩＬ－１α、及びＩＬ－８の存在の検出のために使用される。

【００８７】

フローサイトメトリーと組み合わせたＥＬＩＳＡの原理に基づくＬｕｍｉｎｅｘ技術は、少量の試料における多数のタンパク質又は核の標的を同時にアッセイすることを可能にする。該技術は、２つの蛍光色素の混合物によって着色されるポリスチレンビーズ又は磁気ビーズのいずれかであるミクロスフェアの使用を採用し、その比率は既知であり、各種ビーズについて完全に明らかにされている。

【００８８】

一旦、目的の分子がビーズ表面に結合されたら、後者を分析される試料と共にインキュベートする。ＥＬＩＳＡ型の実験プロトコルに従った後、流体ピペッティング及び管理モジュールにより、次々と（フローサイトメトリーに類似）液体管（liquid vein）へと懸濁液中のビーズを含む試料を吸引した後、２つのレーザーセット、すなわち、

各ビーズのカラーコードを特定するための赤いレーザー、

抗原－抗体相互作用を検出する及びアッセイすることを可能にするレポーター分子に結合された蛍光色素を励起させる緑のレーザー、

によって励起され、Ｌｕｍｉｎｅｘ上で読み取ることにより結果を得る。

【００８９】

この試験はＭＭＰ１、ＭＭＰ３及びＭＭＰ９の存在の検出に対して使用される。

【００９０】

結果

ホルムアルデヒドによるアッセイ

トランスクリプトーム研究：

【００９１】

【表３】

	ホルムアルデヒド（ＦＣ）＊	ホルムアルデヒド＋ディオスピロス（ＦＣ）＊＊
TLR3	3.41	0.14
IL8	7.16	1.24
CASP14	2.55	0.46
CASP9	2.28	0.19
MMP1	1.87	0.73
MMP9	3.76	0.27
SPRR2A	0.45	0.98
HRNR	0.33	2.02
LCE2B	0.70	1.36
LCE3D	0.70	1.44
SIRT1	0.07	0.62

（FC：フォールドチェンジ、２つの条件間の発現における違い；
＊対照と比較したホルムアルデヒド、＊＊ホルムアルデヒドと比較したディオスピロス）

【００９２】
プロテオミクス研究の結果を図２Ａ及び図２Ｂに提示する。
【００９３】
ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物は、角化外膜の構成マーカー（ホルネリンＨＲＮＲ、低分子プロリンリッチタンパク質ＳＰＲＲ２Ａ、ＬＣＥ２Ｂ、ＬＣＥ３Ｄ）の発現を増加させることにより、皮膚バリアに対する保護効果を呈する。これらの結果は、角化外膜の主なタンパク質であるロリクリンの免疫組織化学検査による同定で確認される。同様に、ケラチノサイト増殖及び分化プロセスのホメオスタシスに関与するＳＩＲＴ１の発現は、実質的に再増加される。
【００９４】
ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物は、それ以上炎症成分を誘引しないことによって、ホルムアルデヒドに曝される表皮を保護する。結果は、選択された実験条件下、ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物が存在する状態で炎症、アポトーシス及びマトリクス分解マーカーが低発現されていることを示す。ＩＬ８サイトカイン、並びにＭＭＰ１及びＭＭＰ９マトリクスプロテアーゼのアッセイは、トランスクリプトーム研究の結果を裏付ける。
【００９５】
タバコの煙によるアッセイ
トランスクリプトーム研究：
【００９６】
【表４】

	タバコ（ＦＣ）＊	タバコ＋ディオスピロス（ＦＣ）＊＊
TLR2	31.12	0.12
TLR4	43.41	0.04
IL8	4.89	1.64
MMP1	14.32	0.01
MT1G	2.30	0.05
FLG2	0.07	0.62
CD44	0.02	0.75
KRT1	0.03	0.52
KRT10	0.00	7.67
CLDN1	0.09	0.24
DSC1	0.01	5.46
COL4A1	0.02	1.00
COL7A1	0.03	0.5

（FC：フォールドチェンジ、２つの条件間の発現における違い；
＊対照と比較したタバコ、＊＊タバコと比較したディオスピロス）

【００９７】
プロテオミクス研究の結果を図３Ａ及び図３Ｂに提示する。
【００９８】
ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物は、それ以上炎症成分を誘引しないことにより、タバコの煙に曝される表皮を保護する。結果は、選択した実験条件下、抽出物が存在する状態で炎症、アポトーシス及びマトリクス分解のマーカーが低発現されていることを示す。ＩＬ１α及びＩＬ８のサイトカイン、並びにＭＭＰ１のアッセイは、トランスクリプトーム研究の結果を裏付ける。
【００９９】
また、ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物は、良好なレベルの保湿が維持され

ることを可能にする（ＦＬＧ２、ＣＤ４４）。
【０１００】
ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物による表皮の処理によって得られた結果は、特にクローディン１（ＣＬＤＮ１）及びデスモコリン１（ＤＳＣ１）によって提供される細胞結合及び細胞間情報伝達の良好な保全を維持する。
【０１０１】
ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物は、タバコの煙の影響から真皮表皮接合部を保全する。ＩＶ型及びＶＩＩ型コラーゲンのための遺伝子発現が保証される。
【０１０２】
粒子によるアッセイ
トランスクリプトーム研究：
【０１０３】
【表５】

	粒子（ＦＣ）＊	粒子＋ディオスピロス（ＦＣ）＊＊
TLR2	0.19	1.24
TLR3	0.29	1.30
TLR4	0.23	2.12
CRNN	0.45	1.33
LOR	0.79	4.98
CD44	0.30	1.08
EVPL	0.44	1.05
DSG1	0.47	0.82
DSC1	0.49	1.34
NID1	0.33	6.52
COL4A1	0.13	0.40
COL7A1	0.28	0.59

（FC：フォールドチェンジ、２つの条件間の発現における違い；
＊対照と比較した粒子、＊＊粒子と比較したディオスピロス）

【０１０４】
プロテオミクス研究の結果を図４Ａ及び図４Ｂに提示する。
【０１０５】
ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物は、粒子から皮膚のバリア機能を保護する。特に、バリア機能において重要な役割を持つロリクリンの発現は大幅に増加される。
【０１０６】
ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物による表皮の処理によって得られた結果は、特にクローディン１（ＣＬＤＮ１）及びデスモコリン１（ＤＳＣ１）による細胞結合及び細胞間情報伝達の保全を示す。
【０１０７】
ディオスピロス・メスピリフォルミス抽出物は、粒子の影響から真皮表皮接合部を保護する傾向がある。ＥＤＪ（ＩＶ型、ＶＩＩ型のコラーゲン及びナイドジェンＩ）の主要成分の遺伝子発現が増加される。
【０１０８】
実施例２
本研究の目的は、正常ヒトケラチノサイトの初代培養物における過酸化水素（H_2O_2）による酸化ストレスの誘導後にレドックス状態のパラメーターを評価することによる、

サニキュラ・エウロペア抽出物の抗酸化剤特性の特性評価である。

【０１０９】

試験した抽出物は、以下のように得られた水性アルコール抽出物である：
地上部の乾燥、
粉砕、
エタノール／水（８０：２０）抽出、
濾過、
抽出溶媒の蒸発による真空下での濃縮、
濃度の調整（グリセロールの添加）。

【０１１０】

特性評価：黄褐色の特異臭を持つわずかに粘性の液体。ｐＨ＝３．５～５．０、相対密度：１．０５０～１．２００、屈折率：１．３７０～１．４００、乾燥植物／抽出物比＝１／１０。

【０１１１】

Ｍｉｔｏｓａｆｅ（Ｒ）技術は、ミトコンドリアのレベルで活性剤の抗酸化効果を調査することを可能にする。この技術は、細胞生存率、細胞及びミトコンドリアの酸素フリーラジカルの産生、抗酸化防御の評価等のパラメーターの多重測定による生細胞中のミトコンドリア機能の総合研究からなる。９６ウェルプレートにおけるこれらの試験を、ヒト表皮細胞の初代培養に対して行う。

【０１１２】

以下を測定した：
ミトコンドリアの活性酸素種、
ＲＯＳ細胞産生レベル、
ミトコンドリア及び細胞のスーパーオキシドジスムターゼ（ＳＯＤ）、
総グルタチオン（酸化及び還元の形態）。

【０１１３】

ケラチノサイトでは、H_2O_2への曝露は、ミトコンドリアのＳＯＤ活性の過剰制御及びＲＯＳの細胞内蓄積をもたらす、ミトコンドリアＲＯＳ産生を増加させる。また、ミトコンドリアのＲＯＳ産生はＲＯＳの細胞内の増加に応じた総グルタチオンレベルの増加の原因である。ミトコンドリアＳＯＤ活性及びグルタチオンレベルの上方制御は、細胞内空間におけるＲＯＳ蓄積によって誘導される酸化ストレスに対抗する代償機構である。また、細胞ＳＯＤは直接の抗酸化機構でもある。それにもかかわらず、このモデルでは、H_2O_2への曝露によって細胞ＳＯＤが誘導されない。

【０１１４】

細胞ＲＯＳの産生による抗酸化特性：
Ｍｉｔｏｒｅａｄ　ＡｎｔｉＯｘ　ｃＲＯＳ方法論は、蛍光標識を使用する細胞活性酸素種（ＲＯＳ）に対する成分の抗酸化活性の定量からなる。

【０１１５】

はじめに、細胞を３７℃で３０分間、蛍光プローブと共に予備インキュベートした。洗浄後、抗酸化参照化合物である１０μＭのＴｒｏｌｏｘ又は非細胞毒性であるとされる濃度の抽出物と共に、酸化促進参照化合物である１００μＭのH_2O_2の存在下で細胞を同時インキュベートした。直ちに、細胞ＲＯＳ産生を６０分間に亘って記録した。蛍光をマイクロプレートリーダ（Varioskan-Thermo）を使用して、５分ごとに記録する。細胞を動態の間３７℃で維持した。全ての抽出物を４回繰り返して試験した。同時に、それらの効果を陰性対照（H_2O_2）及び陽性対照（Ｔｒｏｌｏｘ）と比較した。

【０１１６】

ミトコンドリアＲＯＳ産生による抗酸化特性：
Ｍｉｔｏｒｅａｄ　ＡｎｔｉＯｘ　ｍｔＲＯＳ方法論は、蛍光標識を使用するミトコンドリア活性酸素種（ＲＯＳ）に対する成分の抗酸化活性の定量からなる。

【０１１７】

細胞を参照抗酸化剤である１μＭのレスベラトロール、又は所定濃度の有効成分と共に３７℃で６０分間予備インキュベートした。

【０１１８】

次に、その細胞を抗酸化化合物の代わりに蛍光プローブと共に、３７℃で３０分間インキュベートした。洗浄後、細胞を参照酸化促進化合物である１００μＭの過酸化水素H_2O_2で処理した。直ちに、ミトコンドリアＲＯＳ産生を６０分間に亘って記録した。蛍光をマイクロプレートリーダ（Varioskan-Thermo）を使用して、５分ごとに記録する。細胞を動態の間３７℃で維持した。全ての抽出物を４回繰り返して試験した。同時に、それらの効果を陰性対照（H_2O_2）及び陽性対照（レスベラトロール）と比較した。

【０１１９】

細胞及びミトコンドリアのスーパーオキシドジスムターゼ活性による抗酸化特性：

Ｍｉｔｏｒｅａｄ ＲｅｄＯｘ ｃ／ｍｔＳＯＤ方法論は、細胞及びミトコンドリアのＳＯＤ活性の定量からなる。

【０１２０】

細胞を参照抗酸化剤である１μＭのレスベラトロール、又は所定濃度の有効成分と共に、３７℃で６０分間予備インキュベートした。細胞を、参照酸化促進化合物である１００μＭの過酸化水素H_2O_2で６０分間処理した。直後に細胞抽出液を調製し、－８０℃で保存した。酵素活性をマイクロプレートリーダ（Varioskan-Thermo）を使用して、蛍光法及び酵素法によって測定した。全ての抽出物を３回繰り返して試験した。同時に、それらの効果を陰性対照（H_2O_2）及び陽性対照（レスベラトロール）と比較した。

【０１２１】

総グルタチオンレベルによる抗酸化特性：

Ｍｉｔｏｒｅａｄ ＲｅｄＯｘ ＧＳＨｔｏｔ方法論は、総グルタチオンレベル（ＧＳＨ＋ＧＳＳＧ）の定量からなる。

【０１２２】

細胞を参照抗酸化剤である１μＭのレスベラトロール、又は所定濃度の抽出物と共に、３７℃で６０分間、予備インキュベートした。細胞を、参照酸化促進化合物である１００μＭの過酸化水素H_2O_2で６０分間処理した。直後に細胞抽出液を調製し、－８０℃で保存した。総グルタチオンレベルをマイクロプレートリーダ（Varioskan-Thermo）を使用して、蛍光法及び酵素法によって測定した。

【０１２３】

全ての抽出物を３回繰り返して試験した。同時に、それらの効果を陰性対照（H_2O_2）及び陽性対照（レスベラトロール）と比較した。

【０１２４】

結果

陰性及び陽性対照の効果を検証した。非処理細胞と比較したＲＯＳのミトコンドリア産生において、１００μＭのH_2O_2は、９．４倍という有意な増加を誘導する。１μＭのレスベラトロールは、ケラチノサイトにおいてH_2O_2によって誘導されるミトコンドリアＲＯＳの過剰生産を大きく減少させる（１．３倍近く（ｐ＝０．０１３））（図５）。

【０１２５】

サニクル抽出物は、H_2O_2によって誘導されるミトコンドリアＲＯＳレベルを有意に低下させ、有効抗酸化活性（０．００１％で１３％、ｐ＜０．０５、及び０．００５％で３８％、ｐ＜０．００１）を実証する。

【０１２６】

陰性及び陽性対照の効果を検証した。１００μＭのH_2O_2は、非処理細胞と比較して７．４倍の細胞ＲＯＳ産生レベルの有意な増加を誘導する。１０μＭのＴｒｏｌｏｘは、ケラチノサイトにおいてH_2O_2によって誘導される細胞ＲＯＳの過剰生産を大きく減少させる（１．７倍、ｐ＜０．００１）。

【０１２７】

２つの用量において、サニクル抽出物は、H_2O_2によって誘導される細胞ＲＯＳの産

生を有意に減少させる（平均４９％、ｐ＜０．００１）（図６）。

【０１２８】

ヒトケラチノサイトでは、非処理細胞と比較して、H_2O_2への曝露は、細胞ＳＯＤ活性の３０％近くの減少に対する有意ではない（ｐ＝０．０７５）傾向をもたらしたのに対し、非処理細胞と比較して、ミトコンドリアＳＯＤ活性を２１１％近く有意に（ｐ＝０．００６）増加させた。

【０１２９】

H_2O_2曝露に応答する非処理細胞と比較して、抗酸化参照化合物である１μＭのレスベラトロールは、細胞ＳＯＤ活性を４０％近く有意に（ｐ＝０．０３６）増加させた。さらに、１μＭレスベラトロールは、６６％近くまでH_2O_2によって誘導されるミトコンドリアＳＯＤ活性を有意に（ｐ＝０．０２１）減少させ、非処理細胞に匹敵するｍｔＳＯＤレベルを維持した。

【０１３０】

０．００１％のサニクル抽出物によるケラチノサイトの処理は、非処理細胞に匹敵する細胞ＳＯＤ活性をもたらす。０．００５％のサニクル抽出物は、H_2O_2によって誘導される細胞ＳＯＤ活性に関して、非処理細胞と比較して７６％（ｐ＝０．０１２）増加させ、細胞の酸化ストレスに応答する細胞抗酸化防御の上方制御を明らかにした（図７）。

【０１３１】

０．００１％のサニクル抽出物は、非処理細胞に匹敵するまでミトコンドリアＳＯＤ活性を回復させ、１μＭのレスベラトロールの効果と同じように、H_2O_2によるその誘導を８０％近く、大きく減少させた（ｐ＝０．００８）。

【０１３２】

０．００５％のサニクル抽出物は、H_2O_2によって誘導されるミトコンドリアＳＯＤ活性を維持した（図８）。

【０１３３】

非処理細胞と比較して、１００μＭのH_2O_2は、総グルタチオンレベルを２．９倍近くまで有意に（ｐ＝０．０４４）増加させ、H_2O_2によって誘導される酸化ストレスに応答するグルタチオンの上方制御を明らかにした。１μＭのレスベラトロールとの予備インキュベーションは、H_2O_2による処理後、総グルタチオンレベルを有意に（ｐ＝０．００６）低下させ（９４％）、非処理細胞に匹敵するまでレベルを回復させた。

【０１３４】

サニクル抽出物は、H_2O_2による処理後、（１μＭのレスベラトロールのように）非処理細胞に匹敵するレベルまで総グルタチオンレベルを有意に減少させた（図９）。

【０１３５】

結論

H_2O_2への曝露は細胞傷害の誘導物質であると同定され、初代ヒトケラチノサイトにおける酸化－還元平衡を損なった。ヒトケラチノサイトにおけるH_2O_2（１００μＭ、１時間）の影響を下記表に要約する。

【０１３６】

【表６】

酸化ストレス条件	レドックス状態に対する影響				
	cROS	mtROS	cSOD	mtSOD	GSHtot
H_2O_2　100μM、1時間	↗***	↗***	↘(ns)	↗**	↗**

*p＜0.05、**p＜0.01、***p＜0.001

【０１３７】

実験条件下では、H_2O_2はミトコンドリアＲＯＳを生成し、細胞内ＲＯＳの蓄積をもたらした。ミトコンドリアＳＯＤ活性の増加及び総グルタチオンレベルの増加は、ＲＯＳ産生の初期の増加を妨げるためのH_2O_2誘導性酸化ストレスに対する反応である。

【０１３８】

ミトコンドリアＳＯＤ及びＧＳＨの増加は、レトロアクティブループによって観察される細胞ＳＯＤの減少の直接の原因の可能性があり、処理によって誘導される外因性H_2O_2が、$O_2^{\cdot -}$をH_2O_2に変換する細胞ＳＯＤの活性を克服する、その活性における減少を説明する。

【０１３９】

H_2O_2への曝露と合わせたサニクル抽出物の効果を、下記表に要約する。

【０１４０】

【表７】

酸化ストレス条件	H_2O_2曝露に応答したレドックス状態に対する影響				
	cROS	mtROS	cSOD	mtSOD	GSHtot
サニクル0.001%	↘47%	↘13%	＝非処理細胞	＝非処理細胞	＝非処理細胞
サニクル0.005%	↘51%	↘39%	↗148%＞非処理細胞	=100μMH_2O_2	＝非処理細胞

【０１４１】

０．００１％のサニクル抽出物は、H_2O_2によって誘導されるミトコンドリア及び細胞のＲＯＳに関して有効な抗酸化剤である。結果として、サニクル抽出物は、ＳＯＤ抗酸化酵素及び非酵素抗酸化系であるグルタチオンを増加させる必要を減少する。

【０１４２】

さらに、０．００５％のサニクル抽出物は、H_2O_2の存在下で既に求められていた細胞ＳＯＤの活性を増加し、最初の抗酸化防御を強化する。

【０１４３】

実施例３

本研究の目的は、０．５％濃度のフルセラリア・ルンブリカリス抽出物の汚染防止効果を示すことである。

【０１４４】

このため、タバコの煙、ＣＯ、ＮＯ及びNO_2、SO_2のみならず、ベンゼン、アルデヒド、粒子、揮発性有機化合物（ＶＯＣ）、ポリ塩化ビフェニル（ＰＣＢ）、重金属等（Dupuis.E., 2006）の多くの汚染物質ストレスに共通の汚染要素を含む自動車排ガスによる汚染を選択した。

【０１４５】

この汚染の影響を、汚染に曝露されたヒト皮膚組織片上で測定した。

【０１４６】

材料及び方法

生物学的モデル

５８歳の白人の女性（レンヌのBiopredic International）の腹部形成術後に収集した直径１２ｍｍのヒト皮膚組織片。

【０１４７】

試験及び参照製品

試験した抽出物は、Codif社の市販製品Ｈｙｄｒａｎｏｖ　Ｐであり、これは海塩が富化されたオリゴファーセレランであり、硫酸化ファーセレラン（ガラクトース及び無水ガラクトース）の解重合によって得られ、その後、海塩が富化された溶液でもどされることが想起される。

【０１４８】

得られた抽出物を、水で０．５％まで希釈した。

【０１４９】

試験系

組織片の受理の後、組織片を周囲温度で１６時間に亘って安定化する。この安定化に続き、保湿の測定を製品の塗布前（Ｔ０）に行う。その後、皮膚フラグメントを、３０分間に亘って０．５％のフルセラリア・ルンブリカリス抽出物溶液で処理する。その後、これ

らの組織片を５時間に亘って自動車排ガスに曝露する。その後、それらの組織片を２０℃～２２℃で１８時間に亘り、緩衝長期培地（Ｈｅｐｅｓ）において気液界面でインキュベートする。１８時間後、保湿を測定する（Ｔ１）。これらの組織片上で行われた操作を、以下に概略的に表す。

【０１５０】

気体による処理

この試験で使用される気体は、粒子フィルタのないRenaultディーゼル車（１９８９）に由来し、標準的な気密バッグ（ブランドＳＫＣ、参照カタログ番号２３６－００５）を使用して収集される。

【０１５１】

表示では、気体の組成は下記である：

【０１５２】

【表８】

μｇ／ｍ³単位の濃度	
化合物	量
1－プロペン－2－メチル	1145.55
プロペン	1988.62
MEK	184.26
ヘキサン	53.66
1－ブテン－3－オン	49.42
2－ブテナール	46.34
ベンゼン	140.12
酢酸	181.60
トルエン	42.98
1－オクテン	21.28

μｇ／ｍ³単位の濃度	
化合物	量
オクタン	42.20
ヘプタン ,2,4－ジメチル	34.91
ノナン	27.87
デカン	23.90
デカン ,2,4,6－トリメチル	13.36
ウンデカン	15.56
エチルベンゼン	5.60
m＋pキシレン	17.11
オキシレン	5.88
アセトン	72.94

【０１５３】

保湿の測定

ａ．原理

皮膚保湿の程度を、ＣＭ　８２５　ＭＤＤ　Ｃｏｒｎｅｏｍｅｔｒｅ（Ｒ）（Courage & Khazaka）によって調査した。この測定器は、角質層の最も外側の皮膚層の含水率を特定することを可能とする。コルネオメーター（corneometer）の作動原理は、容量可変コンデンサとして設計された検出器の潜在力に基づく。測定ヘッド面は、皮膚に接して皮膚の含水率に従ってその容量を変える。これらの変化は、コンピューターに直接入力される。

【０１５４】

様々な方法が皮膚保湿の程度の測定に対して存在する。それらの中で、コルネオメトリー（corneometry）は美容学における従来の方法である。コルネオメーターは、検出器がその容量を角質層の最も外側の皮膚層の含水率に応じて変える潜在力に基づき、人間に対してｉｎ　ｖｉｖｏで直接に、角質層の保湿の程度に対する化粧用又は皮膚薬用の製品の効果を定量することを可能とする。

【０１５５】

ｂ．調査したパラメーター

保湿の程度を任意単位で表す。

【０１５６】
皮膚保湿値の増加は、製品の保湿効果を反映する。
【０１５７】
統計学的分析
Ｅｘｃｅｌソフトウェアを使用して処理前データを転送し、処理する。使用した検定は、対応スチューデントｔ検定である。２つの群間の差は、ｐ値が０．０５未満の場合に統計学的に有意であるとし、＊ｐ＜０．０５と表示する。
【０１５８】
結果
試験の条件下では、自動車排ガスへの曝露は、保湿の明らかな減少を引き起こす（図１：対照－ガスと比較した対照＋ガス）。
【０１５９】
フルセラリア・ルンブリカリス抽出物は、汚染によって誘導されるヒト皮膚の組織片において保湿の程度の低下から強力に皮膚を保護した（＋７８％）。
【０１６０】
これらの結果を図１０に示す。
【０１６１】
結論
汚染への曝露は、皮膚の保湿の程度の減少を引き起こす。
【０１６２】
０．５％のフルセラリア・ルンブリカリス抽出物は、ヒト皮膚組織片のレベルで汚染によって誘導される保湿の喪失から保護する。
【０１６３】
本発明による組成物の例

しわ防止用クリーム	％
カルボマー	０．３０
グリセリン	２．００
ジメチコーン	３．００
イソノニルイソノナノエート	８．００
セテアリルアルコール及びセテアリルグルコシド	３．５０
トコフェロール	０．０６
ステアリン酸グリセリル及びＰＥＧ－１００ステアレート	２．５０
炭酸ジカプリリル	４．００
水酸化ナトリウム	０．０８
タピオカデンプン	１．５０
バイオサッカライドガム－４	１．００
ランプサン	０．５０
フルセラリア・ルンブリカリス	１．００
ディオスピロス・メスピリフォルミス	０．５０
サニキュラ・エウロペア	０．５０
防腐剤	適量
ＥＤＴＡ二ナトリウム	０．１０
香料	適量
脱イオン水	適量で１００とする

【０１６４】

美容液	％
セテアリルエチルヘキサノエート	２．５０
ステアリルヘプタノエート	１．５０
カプリル酸／カプリン酸トリグリセリド	３．００
ＰＥＧ－２０セスキステアリン酸メチルグルコース	２．００

ジメチコーン	１．５０
トコフェロール	０．０２
アクリレート／Ｃ１０～Ｃ３０アルキルアクリレートクロスポリマー	０．２５
イソノニルイソノナノエート	３．００
Ｃ１２～Ｃ１５アルキルベンゾエート	２．５０
ヒドロキシエチルセルロース	０．１０
グリセリン	５．００
ブチレングリコール	２．００
エチルヘキシルグリセリン	０．２０
ＥＤＴＡ二ナトリウム	０．０５
トロメタミン	０．３０
ランプサン	０．５０
フルセラリア・ルンブリカリス	１．００
ディオスピロス・メスピリフォルミス	０．５０
サニキュラ・エウロペア	０．５０
防腐剤	適量
香料	適量
脱イオン水	適量で１００とする

【０１６５】

ｏ／ｗエマルジョン	%
セテアリルアルコール及びセテアリルグルコシド	３．５０
ステアリン酸グリセリル及びＰＥＧ－１００ステアレート	２．００
ステアレス－２１	０．５０
水素化ココグリセリド	２．００
シアバター	１．００
シクロメチコン	６．００
ＢＨＴ	０．０２
カルボマー	０．２０
グリセリン	５．００
水酸化ナトリウム	０．０４
シリカ	１．４０
酢酸トコフェリル	０．２０
ジメチコーン及びジメチコノール	０．５０
ランプサン	０．５０
フルセラリア・ルンブリカリス	１．００
ディオスピロス・メスピリフォルミス	０．５０
サニキュラ・エウロペア	０．５０
防腐剤	適量
ＥＤＴＡ四ナトリウム	０．０５
香料	適量
脱イオン水	適量で１００とする

【０１６６】

ＳＰＦ２０デイクリーム	%
エチルヘキシルグリセリン	０．２０
ＥＤＴＡ二ナトリウム	０．１０
キサンタンガム	０．２０
グリコール	５．００
アカシアセネガルゴム	０．０１
サリチル酸ブチルオクチル	５．００
ポリアクリル酸ナトリウム	０．５０

雲母	０．１０
セチルリン酸カリウム	０．５０
ブチルメトキシジベンゾイルメタン	３．００
オクトクリレン	２．７０
ホモサラート	１０．００
セテアリルアルコール及びセテアリルグルコシド	３．５０
Ｃ１２～Ｃ１５アルキルベンゾエート	８．００
タピオカデンプン	２．００
ランプサン	０．５０
フルセラリア・ルンブリカリス	１．００
ディオスピロス・メスピリフォルミス	０．５０
サニキュラ・エウロペア	０．５０
アルコール	３．００
防腐剤	適量
香料	適量
脱イオン水	適量で１００とする

【０１６７】

w／oエマルジョン	%
ＰＥＧ３０ジポリヒドロキシステアレート	４．００
水素化Ｃ１６～Ｃ１８トリグリセリド	５．００
ＰＥＧ－４５／ドデシルグリコール共重合体	１．２０
Ｃ８～Ｃ１０トリグリセリド	１９．００
流動石油ゼリー	８．００
グリコール	１０．００
ランプサン	０．５０
フルセラリア・ルンブリカリス	１．００
ディオスピロス・メスピリフォルミス	０．５０
サニキュラ・エウロペア	０．５０
防腐剤	適量
香料	適量
脱イオン水	適量で１００とする

【０１６８】

水性アルコールローション	%
グリコール	２．００
バッファー	０．４０
塩化ナトリウム	１．００
エタノール	５．００
ランプサン	０．５０
フルセラリア・ルンブリカリス	１．００
ディオスピロス・メスピリフォルミス	０．５０
サニキュラ・エウロペア	０．５０
トロメタミン	０．８０
防腐剤	適量
可溶化剤	適量
香料	適量
脱イオン水	適量で１００とする

【図１】

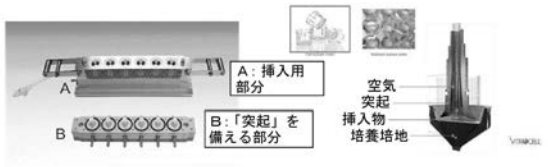


Figure 1

【図２Ａ】

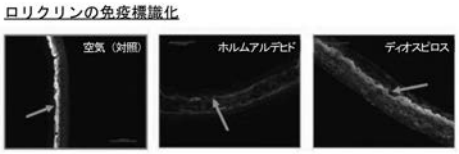


Figure 2A

【図２Ｂ】

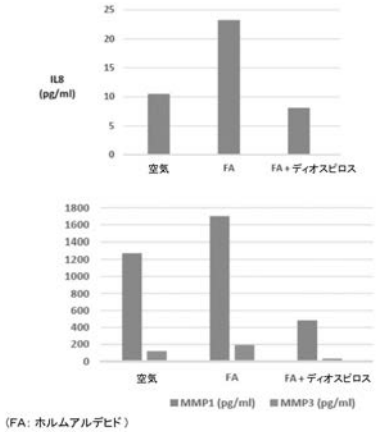


Figure 2B

【図３Ａ】

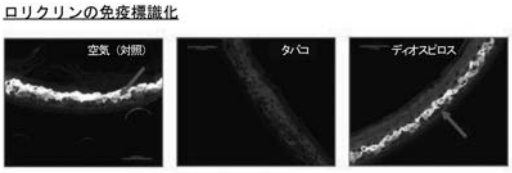


Figure 3A

【図３Ｂ】

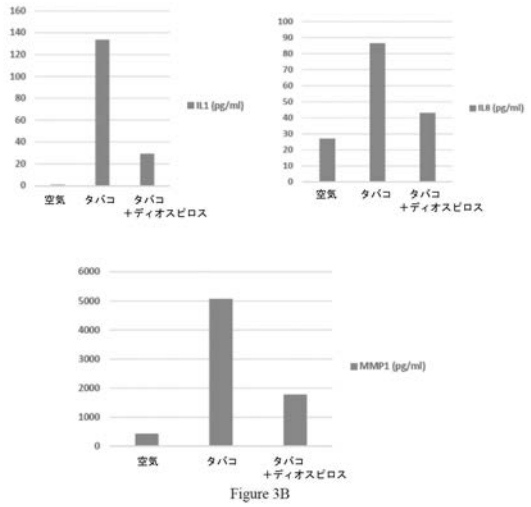


Figure 3B

【図４Ａ】

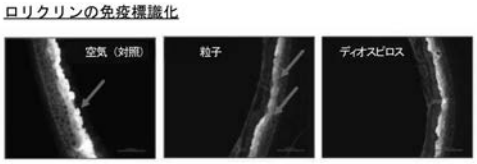


Figure 4A

【図４Ｂ】

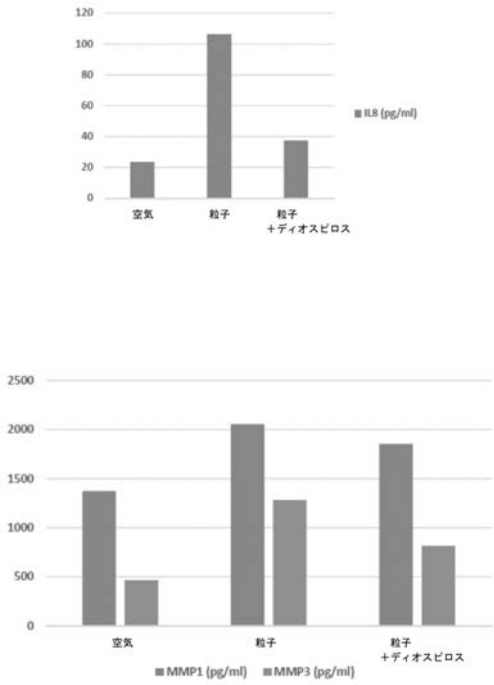


Figure 4B

【図５】

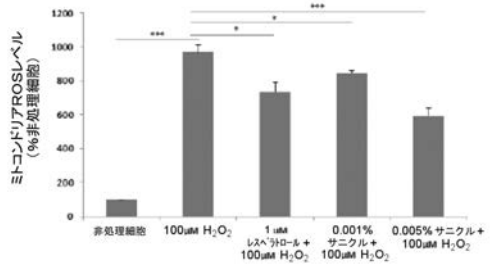


Figure 5

【図６】

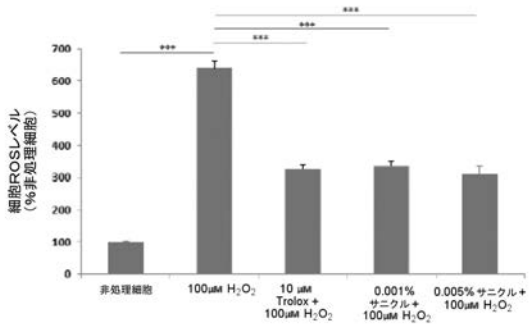


Figure 6

【図７】

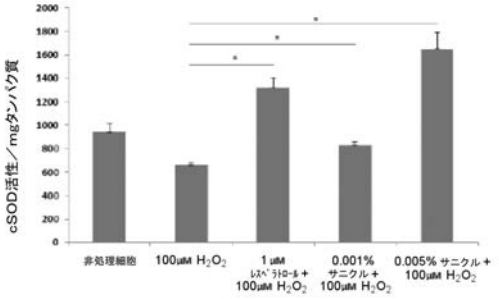


Figure 7

【図８】

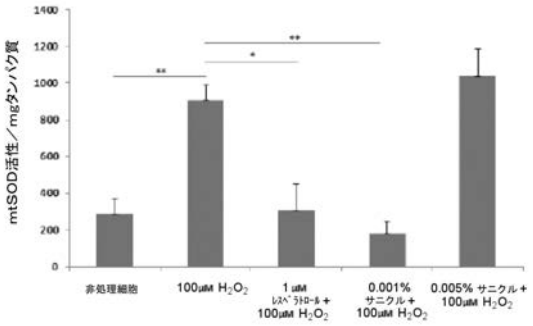


Figure 8

【図９】

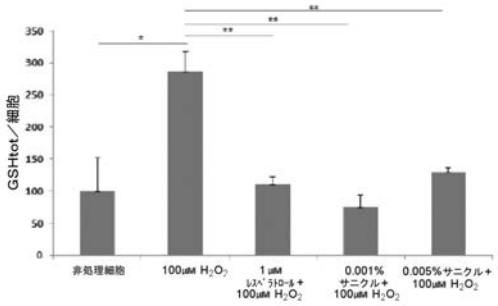


Figure 9

【図１０】

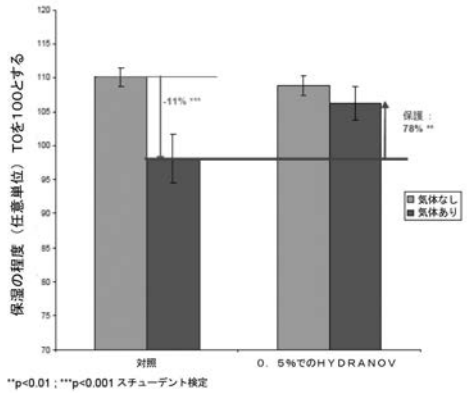


Figure 10

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2016/050895

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61Q17/00 A61K8/97
ADD.

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)
A61Q A61K

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)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE GNPD [Online] MINTEL; March 2015 (2015-03), "Anti-Pollution Day Screen Multi-Protection SPF 50", XP002753047, Database accession no. 3066485 the whole document -----	1-15
A	US 2009/035235 A1 (COURTIN OLIVIER [FR]) 5 February 2009 (2009-02-05) paragraph [0125]; claims 9-32 ----- -/--	1-15

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] 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	Date of mailing of the international search report
29 June 2016	02/09/2016

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Estañol, Inma

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2016/050895

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE GNPD [Online] MINTEL; May 2012 (2012-05), "Intense Hydration Youth Preserve Light Day Cream SPF 15", XP002753048, Database accession no. 1798499 the whole document -----	1-15
A	US 2013/216635 A1 (FLORENCE TIFFANY [US] ET AL) 22 August 2013 (2013-08-22) paragraphs [0005] - [0009] -----	1-15
A	DATABASE GNPD [Online] MINTEL; June 2010 (2010-06), "Anti-Dandruff Jackberry Hairwash", XP002753049, Database accession no. 1351170 the whole document -----	1-15
A	MABONA UNATHI ET AL: "Antimicrobial activity of southern African medicinal plants with dermatological relevance: From an ethnopharmacological screening approach, to combination studies and the isolation of a bioactive compound", JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY, ELSEVIER IRELAND LTD, IE, vol. 148, no. 1, 30 March 2013 (2013-03-30), pages 45-55, XP028554035, ISSN: 0378-8741, DOI: 10.1016/J.JEP.2013.03.056 page 47 -----	1-15
A	DANGOGGO ET AL: "Phytochemical Analysis and Antibacterial Screening of Leaves of Diospyros mespiliformis and Ziziphus Spina-Christi", J CHEM ENGINEERING, vol. 1, no. 1, January 2012 (2012-01), pages 31-37, XP002753050, page 32 -----	1-15
A	MOHAMED ET AL: "Bioactive Natural Products from Two Sudanese medicinal Plants Diospyros mespiliformis and Croton zambesicus", REC. NAT. PROD., vol. 3, no. 4, 2009, pages 198-203, XP002753051, pages 189-199 -----	1-15

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/FR2016/050895

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2009035235 A1	05-02-2009	AT 545406 T	15-03-2012
		CA 2605586 A1	26-10-2006
		EP 1871332 A1	02-01-2008
		ES 2383448 T3	21-06-2012
		FR 2884718 A1	27-10-2006
		JP 2008536903 A	11-09-2008
		US 2009035235 A1	05-02-2009
		WO 2006111666 A1	26-10-2006
US 2013216635 A1	22-08-2013	CN 103189046 A	03-07-2013
		US 2013216635 A1	22-08-2013
		US 2016074314 A1	17-03-2016
		WO 2012033634 A2	15-03-2012

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2016/050895

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. A61Q17/00 A61K8/97
ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
A61Q A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	DATABASE GNPD [Online] MINTEL; mars 2015 (2015-03), "Anti-Pollution Day Screen Multi-Protection SPF 50", XP002753047, Database accession no. 3066485 le document en entier -----	1-15
A	US 2009/035235 A1 (COURTIN OLIVIER [FR]) 5 février 2009 (2009-02-05) alinéa [0125]; revendications 9-32 ----- -/--	1-15

[X] Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

[X] Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
29 juin 2016	02/09/2016

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Español, Inma

1

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (avril 2005)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2016/050895

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	DATABASE GNPD [Online] MINTEL; mai 2012 (2012-05), "Intense Hydration Youth Preserve Light Day Cream SPF 15", XP002753048, Database accession no. 1798499 le document en entier -----	1-15
A	US 2013/216635 A1 (FLORENCE TIFFANY [US] ET AL) 22 août 2013 (2013-08-22) alinéas [0005] - [0009] -----	1-15
A	DATABASE GNPD [Online] MINTEL; juin 2010 (2010-06), "Anti-Dandruff Jackberry Hairwash", XP002753049, Database accession no. 1351170 le document en entier -----	1-15
A	MABONA UNATHI ET AL: "Antimicrobial activity of southern African medicinal plants with dermatological relevance: From an ethnopharmacological screening approach, to combination studies and the isolation of a bioactive compound", JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY, ELSEVIER IRELAND LTD, IE, vol. 148, no. 1, 30 mars 2013 (2013-03-30), pages 45-55, XP028554035, ISSN: 0378-8741, DOI: 10.1016/J.JEP.2013.03.056 page 47 -----	1-15
A	DANGOGGO ET AL: "Phytochemical Analysis and Antibacterial Screening of Leaves of Diospyros mespiliformis and Ziziphus Spina-Christi", J CHEM ENGINEERING, vol. 1, no. 1, janvier 2012 (2012-01), pages 31-37, XP002753050, page 32 -----	1-15
A	MOHAMED ET AL: "Bioactive Natural Products from Two Sudanese medicinal Plants Diospyros mespiliformis and Croton zambesicus", REC. NAT. PROD., vol. 3, no. 4, 2009, pages 198-203, XP002753051, pages 189-199 -----	1-15

1

Formulaire PCT/ISA/210 (suite de la deuxième feuille) (avril 2005)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°
PCT/FR2016/050895

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2009035235 A1	05-02-2009	AT 545406 T	15-03-2012
		CA 2605586 A1	26-10-2006
		EP 1871332 A1	02-01-2008
		ES 2383448 T3	21-06-2012
		FR 2884718 A1	27-10-2006
		JP 2008536903 A	11-09-2008
		US 2009035235 A1	05-02-2009
		WO 2006111666 A1	26-10-2006
US 2013216635 A1	22-08-2013	CN 103189046 A	03-07-2013
		US 2013216635 A1	22-08-2013
		US 2016074314 A1	17-03-2016
		WO 2012033634 A2	15-03-2012

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

(72)発明者 ウェーバー サンドリーヌ
フランス国 ９５８３０ コルメイユ アン ヴェキシン アリー デ シャン ５

Ｆターム(参考) 4C083 AA111 AA112 AA122 AB032 AB172 AB332 AB432 AC072 AC102 AC121
AC182 AC212 AC342 AC372 AC402 AC422 AC472 AC512 AC532 AC542
AC902 AD022 AD042 AD092 AD152 AD162 AD202 AD242 AD282 AD352
AD661 AD662 BB01 BB11 BB41 BB46 BB51 CC04 CC05 CC19
DD08 DD31 DD32 DD33 DD41 EE12 EE13 EE17