

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6464485号
(P6464485)

(45) 発行日 平成31年2月6日 (2019.2.6)

(24) 登録日 平成31年1月18日 (2019.1.18)

(51) Int. Cl.	F I
C O 8 B 37/00 (2006.01)	C O 8 B 37/00 G
A 6 1 K 8/73 (2006.01)	A 6 1 K 8/73
A 6 1 Q 19/00 (2006.01)	A 6 1 Q 19/00

請求項の数 4 (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願2015-135966 (P2015-135966)
 (22) 出願日 平成27年7月7日 (2015.7.7)
 (65) 公開番号 特開2016-29150 (P2016-29150A)
 (43) 公開日 平成28年3月3日 (2016.3.3)
 審査請求日 平成29年9月22日 (2017.9.22)
 (31) 優先権主張番号 特願2014-145491 (P2014-145491)
 (32) 優先日 平成26年7月16日 (2014.7.16)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 309015019
 地方独立行政法人青森県産業技術センター
 青森県黒石市田中82番地9
 (72) 発明者 安保 亜衣子
 青森県青森市大字野木字山口221番地1
 O 地方独立行政法人青森県産業技術セン
 ター工業総合研究所内
 (72) 発明者 山口 信哉
 青森県青森市大字野木字山口221番地1
 O 地方独立行政法人青森県産業技術セン
 ター工業総合研究所内

審査官 石井 徹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高保水性プロテオグリカン、化粧品および高保水性プロテオグリカンの製造法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

プロテオグリカンにおいて、含有金属として、5重量%以上のナトリウムもしくはカリウムと、1重量%以下のカルシウムをそれぞれ乾燥重量として含むことを特徴とするプロテオグリカン。

【請求項 2】

プロテオグリカンにおいて、含有金属として、ナトリウムとカリウムを合計で5重量%以上と、1重量%以下のカルシウムをそれぞれ乾燥重量として含むことを特徴とするプロテオグリカン。

【請求項 3】

原料のプロテオグリカンを、アルカリ金属イオン型である強酸性陽イオン交換樹脂により処理することを特徴とするプロテオグリカンの製造法。

【請求項 4】

請求項 1 もしくは 2 に記載のプロテオグリカンを 0.01 質量% 以上含有することを特徴とする化粧品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、化粧品や飲食品などで使用されるプロテオグリカンに係り、特に保水性が改善された高保水性プロテオグリカン、高保水性プロテオグリカンを含む化粧品および

この高保水性プロテオグリカンの製造方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

肌を健康的に美しく保つために、乾燥を防ぎ、肌に潤いを与えるなどの手入れが必要である。そのため、肌に塗布するスキンケア製品や化粧品には保水性を有する物質を含んでいるものが多い。また、髪をつややかさを保つため、髪をケアする製品にも保水性物質は使用されている。保水性を有する物質として、グリセリンやセラミドなどの低分子化合物からヒアルロン酸やコラーゲンなどの高分子化合物などが挙げられる。近年、新たな保水性物質としてプロテオグリカンが注目されてきている。プロテオグリカンは保水性以外にも、EGF様作用などを有していることが明らかになってきている化合物である。

10

【0003】

プロテオグリカンは動物に存在し、結合組織の細胞外マトリックス中の基質を形成している。プロテオグリカンはグリコサミノグリカンとタンパク質の共有結合物の総称であり、一般の糖タンパク質に比べて、糖含量が極めて多いのが特徴である。プロテオグリカンは天然由来の高分子化合物であり、起源となる原料や抽出・製造条件により、分子量や含まれるアミノ酸や糖（中性糖、ウロン酸、アミノ糖など）の種類や量、比率も異なっており、さまざま分子種が存在する。

【0004】

プロテオグリカンを単独もしくは、キトサンやコラーゲン、ヒアルロン酸などと併用し、わた体に付着させて使用すること（特許文献1）、美容液や化粧品で、プロテオグリカンの保水性を補うため、10重量%以上のコラーゲンと併用すること（特許文献2）やアシル化アルカリ処理コラーゲンと併用することが行われている（特許文献3）。しかし、これらの方法では、わた体に付着させてもプロテオグリカン自体の保水能力は変わらず、保水能力を補うにはコラーゲンと併用しなければならないという煩わしさがある。また、水に不溶のコラーゲンを利用するため、透明または清澄な製品への利用は困難である。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開2002-255726号 公報

【特許文献2】特開平6-166616号 公報

30

【特許文献3】特開平6-179612号 公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

上記課題を鑑み、本発明は、コラーゲンとの併用をしないで保水性が改善された高保水性プロテオグリカン、この高保水性プロテオグリカンを含む化粧品、およびこの高保水性プロテオグリカンの製造法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

上記課題を達成するために、本発明の一つの態様は、原料のプロテオグリカンをアルカリ金属イオン型強酸性陽イオン交換樹脂にて処理することにより得られる高保水性プロテオグリカンであることを要旨とする。

40

【0008】

本発明の他の態様は、化粧品にこの高保水性プロテオグリカンを0.01質量%以上含有させることを要旨とする。

【0009】

本発明の更に他の態様は、5重量%以上のナトリウムもしくはカリウムと、1重量%以下のカルシウムをそれぞれ乾燥重量として含み、0.44w/v%水溶液にした場合、純水に対する相対粘度が26.5で5以上である高保水性プロテオグリカンであることを要旨とする。

50

【0010】

本発明の更に他の態様は、ナトリウムとカリウムを合計で5重量%以上と、1重量%以下のカルシウムをそれぞれ乾燥重量として含み、0.44w/v%水溶液にした場合、純水に対する相対粘度が26.5で5以上である高保水性プロテオグリカンであることを要旨とする。

【発明の効果】

【0011】

本発明により、コラーゲンとの併用をしないで保水性が改善された高保水性プロテオグリカン、この高保水性プロテオグリカンを含む化粧料およびこの高保水性プロテオグリカンの製造法が提供される。

10

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】本発明の、実施例2の高保水性プロテオグリカンの保水性の測定1に係り、原料の鮭由来プロテオグリカンの濃度と保水性の関係を説明するための図である。

【図2】実施例2の高保水性プロテオグリカンの保水性の測定1に係り、実施例1で得られた高保水性プロテオグリカンの保水性を、原料の鮭由来プロテオグリカンの保水性と比較するための図である。

【図3】実施例5の高保水性プロテオグリカンの保水性の測定2に係り、実施例4で得られた高保水性プロテオグリカンの保水性を、原料の鮭由来プロテオグリカンの保水性と比較するための図である。

20

【図4】実施例8の高保水性プロテオグリカンの保水性の測定3に係り、実施例7で得られた高保水性プロテオグリカンの保水性を、原料の鮫酢酸抽出プロテオグリカンの保水性と比較するための図である。

【図5】実施例11の高保水性プロテオグリカンの保水性の測定4に係り、実施例10で得られた高保水性プロテオグリカンの保水性を、原料の鮫アルカリ抽出プロテオグリカンの保水性と比較するための図である。

【図6】実施例14の高保水性プロテオグリカンの保水性の測定5に係り、実施例13で得られた高保水性プロテオグリカンの保水性を、原料の鮭由来プロテオグリカンの保水性と比較するための図である。

【発明を実施するための形態】

30

【0013】

以下、実施の形態をより具体的に説明する。

【0014】

プロテオグリカンの原料由来としては、牛、鶏、鯨などの哺乳類・鳥類の軟骨や、鮭、鮫、エイなどの魚類の軟骨であり、その種類を問わないものである。また、プロテオグリカンの抽出薬剤についても、酢酸などの有機酸や酸、アルカリ、グアニジン塩酸など様々あるが、本発明では抽出薬剤や温度や時間などの抽出・製造の条件も限定しないものである。

【0015】

本発明の高保水性プロテオグリカンの製造法としては、原料のプロテオグリカンをアルカリ金属イオン型の強酸性陽イオン交換樹脂にて処理することにより得る。強酸性陽イオン交換樹脂は、担体にスルホン酸基のイオン交換基が導入された水不溶性の高分子樹脂である。担体としてはスチレン系やフェノール系、ビニル系、アクリルアミド系などの合成樹脂やセルロース系、アガロース系、デキストラン系などがある。アルカリ金属イオン型は、強酸性陽イオン交換樹脂をナトリウム、カリウム、リチウムなどの周期表第1族に属するアルカリ金属のイオン型とし、アルカリ雰囲気によって用いる。金属イオン型としては数種の金属の混合物でも構わない。樹脂を使用する前には、常法により酸やアルカリなどで予備洗浄し、使用する金属イオン型に活性化する必要がある。

40

【0016】

高保水性プロテオグリカンの製造法としては、原料のプロテオグリカンを含む水溶液を

50

アルカリ金属イオン型強酸性陽イオン交換樹脂に接触させる。このとき原料のプロテオグリカンを含む水溶液について、原料のプロテオグリカン以外の物質、特にイオン性物質は入っていないほうが好ましい。もしくは、原料のプロテオグリカンを含む水溶液のイオン強度は低いほうが好ましい。

【0017】

アルカリ金属イオン型強酸性陽イオン交換樹脂の接触方法は、カラムなどに樹脂を充填し、原料のプロテオグリカンを含む水溶液をカラムに通過させる方式やバッチ式などがある。接触時間は、数分以上必要であり、接触する温度は室温以下が好ましい。使用するアルカリ金属イオン型強酸性陽イオン交換樹脂の量は、樹脂の種類により異なるが、出発原料となる元のプロテオグリカン 1 g 当たり、陽イオン交換樹脂の交換容量 2 meq 量相当の樹脂量に、安全率を乗じた以上の樹脂量は必要である。

10

【0018】

次に、アルカリ金属イオン型強酸性陽イオン交換樹脂と接触させたプロテオグリカンを経過などの方法により、樹脂から分離する。経過後のアルカリ金属イオン型強酸性陽イオン交換樹脂を水で洗浄し、樹脂に付着しているプロテオグリカンを回収する。得られたプロテオグリカンは、原料のプロテオグリカンより保水性が向上した高保水性プロテオグリカンである。樹脂から分離された状態は水溶液の状態であり、そのまま使用してもよいが、噴霧乾燥や凍結乾燥などにより粉末化してもよいし、アルコールやアセトンなどの有機溶剤により沈殿、風乾して、粉末化してもよい。

【0019】

20

得られた高保水性プロテオグリカンは、試料中に含まれる水分を除いた乾燥重量を基として、5重量%以上のナトリウムもしくはカリウムと、1重量%以下のカルシウムを含むプロテオグリカンであって、26.5で純水の粘度を1としたとき、0.44w/v%水溶液の粘度が5以上である高保水性プロテオグリカンである。

【0020】

もしくは、試料中に含まれる水分を除いた乾燥重量を基として、ナトリウムとカリウムを合計で5重量%以上と、1重量%以下のカルシウムを含むプロテオグリカンであって、26.5で純水の粘度を1としたとき、0.44w/v%水溶液の粘度が5以上である高保水性プロテオグリカンである。

【0021】

30

本発明の高保水性プロテオグリカンを化粧料の原料として用いることにより、保水性が向上した製品の提供が可能になる。化粧料としては、皮膚を健全な状態に保ち、肌をケアすることを目的としている皮膚用化粧品やトイレタリー用品などがある。皮膚用化粧品の例として、化粧水や美容液、乳液、クリーム、リップ類などが挙げられる。トイレタリー用品としては、シャンプー、リンス、入浴剤、石鹸などが挙げられる。また、本発明のプロテオグリカンは水溶性であることから、健康・美容飲料として飲料に容易に添加が可能であり、食品にも同様に適用できる。

【0022】

以下に実施例を示して本発明を具体的に説明するが、これは単に例示の目的で述べるものであり、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

40

【実施例1】

【0023】

(高保水性プロテオグリカンの製造1)

原料のプロテオグリカンは、市販の鮭由来プロテオグリカン((株)角弘プロテオグリカン研究所)を購入し、用いた。強酸性陽イオン交換樹脂(商品名: AG 50W-X8 resin(バイオラッド社))をガラス製カラムに充填し(内径2.5cm、高さ8.2cm)、1M塩酸60mLと脱イオン水150mLを順次流下して樹脂を洗浄した後、1M水酸化ナトリウム水溶液100mLを流下し、樹脂をナトリウムイオン型に活性化した。過剰の水酸化ナトリウムを除くため、脱イオン水200mLを流下した後、原料の鮭由来プロテオグリカン0.4gを脱イオン水30mLに溶解した溶液を、室温でカラム上

50

方から添加・流下した。その後、樹脂に脱イオン水を150 mL流下し、得られた溶出液約180 mLをエバポレーター（東京理科器械（株））にて濃縮した後、凍結乾燥し、0.37 gの白色綿状固体である高保水性プロテオグリカンを得た。

【実施例2】

【0024】

（高保水性プロテオグリカンの保水性の測定1）

実施例1で用いた原料の鮭由来プロテオグリカン0.30 g、0.20 g、0.10 gをそれぞれ脱イオン水100 mLに溶解し、原料の鮭由来プロテオグリカンの0.30 w/v%、0.20 w/v%、0.10 w/v%水溶液100 mLずつを得た。この原料の鮭由来プロテオグリカン水溶液100 mLずつをそれぞれ、透析用セルロースチューブ（外周9 cm×長さ35 cm、エーディア（株））に入れ、上下の口を封じ水中に浮遊させ、4の低温室で、水に対して透析した。水の交換は1週間に一度行った。吸水した透析用セルロースチューブの重量を不定期に30日間測定し、あらかじめ測定した透析用セルロースチューブ風袋重量を控除し、吸水・保水した重量を求めた。

【0025】

図1は、原料の鮭由来プロテオグリカンの保水性を測定した結果を示すものである。グラフの横軸は経過日数（日）を示し、縦軸は風袋重量を控除した透析用セルロースチューブ内液の重量（g）を示す。図1中のプロットのうち、「0.30 w/v%鮭由来プロテオグリカン」は原料の鮭由来プロテオグリカンの0.30 w/v%水溶液の重量変化を、「0.20 w/v%鮭由来プロテオグリカン」は原料の鮭由来プロテオグリカンの0.20 w/v%水溶液の重量変化を、「0.10 w/v%鮭由来プロテオグリカン」は原料の鮭由来プロテオグリカンの0.10 w/v%水溶液の重量変化を示す。いずれのプロテオグリカン濃度でも吸水・保水量は経過日数にほぼ比例して増えること、また、プロテオグリカン濃度が0.10 w/v%、0.20 w/v%、0.30 w/v%と高くなるほど吸水・保水量が多くなることが明らかとなった。

【0026】

原料の鮭由来プロテオグリカンと、実施例1で得られた高保水性プロテオグリカンそれぞれ0.20 gを、脱イオン水100 mLに溶解し、原料の鮭由来プロテオグリカンの0.20 w/v%水溶液100 mL、実施例1で得られた高保水性プロテオグリカンの0.20 w/v%水溶液100 mLを得た。この原料の鮭由来プロテオグリカンの0.20 w/v%水溶液100 mLと実施例1で得られた高保水性プロテオグリカンの0.20 w/v%水溶液100 mLをそれぞれ、透析用セルロースチューブ（外周9 cm×長さ35 cm、エーディア（株））に入れ、上下の口を封じ水中に浮遊させ、4の低温室で、水に対して透析した。水の交換は1週間に一度行った。吸水した透析用セルロースチューブの重量を不定期に30日間測定し、あらかじめ測定した透析用セルロースチューブ風袋重量を控除し、吸水・保水した重量を求めた。

【0027】

図2は、原料の鮭由来プロテオグリカンと、実施例1で得られた高保水性プロテオグリカンの保水性を測定した結果を示すものである。グラフの横軸は経過日数（日）を示し、縦軸は風袋重量を控除した透析用セルロースチューブ内液の重量（g）を示す。図2中のプロットのうち、「0.20 w/v%高保水性プロテオグリカン（実施例1、ナトリウムイオン型）」は実施例1で得られた高保水性プロテオグリカンの0.20 w/v%水溶液の重量変化を、「0.20 w/v%鮭由来プロテオグリカン」は原料の鮭由来プロテオグリカンの0.20 w/v%水溶液の重量変化を示す。30日間の測定結果を平均すると、1日当たりの重量の増加量は、原料の鮭由来プロテオグリカン2.7 g/日に対して、実施例1で得られた高保水性プロテオグリカンは7.5 g/日であった。原料の鮭由来プロテオグリカンと比較して、実施例1で得られた高保水性プロテオグリカンは約2.8倍の吸水・保水量があり、高保水性を有することが明らかとなった。

【実施例3】

【0028】

10

20

30

40

50

(高保水性プロテオグリカンの化学分析 1)

実施例 1 で得られた高保水性プロテオグリカンのタンパク質含量を、比色法であるローリー法にて、牛血清アルブミン（アクロス社）を標準物質とした検量線から求めたところ、5.7 重量%であった。ウロン酸含量を、比色法であるカルバゾール硫酸法にて、グルクロン酸（シグマ社）を標準物質とした検量線から求めたところ、35.5 重量%であった。原料の鮭由来プロテオグリカンについて同様に分析したところ、タンパク質含量は6.5 重量%、ウロン酸含量は34.6 重量%であった。これらの結果から、実施例 1 で得られた高保水性プロテオグリカンのタンパク質とウロン酸含量は、原料の鮭由来プロテオグリカンとほとんど変化がないことが明らかとなった。

【0029】

実施例 1 で得られた高保水性プロテオグリカンの水分含量は、熱天秤装置（Thermo Plus TG8210、（株）リガク製）にて、125 で試料重量が恒量となるまで加熱し、重量減少分を試料に含まれていた水分とした。その結果、実施例 1 で得られた高保水性プロテオグリカンの水分含量は13 重量%であった。同様に、原料の鮭由来プロテオグリカンの水分含量について分析したところ、17 重量%であった。

【0030】

実施例 1 で得られた高保水性プロテオグリカンの各金属含量を、キャピラリー電気泳動装置（Agilent 7100 キャピラリー電気泳動システム、アジレント・テクノロジー（株）製）を用いて定量した。各金属の定量法については、UV 吸収を有する緩衝液で満たしたキャピラリーカラムに、試料を注入して電圧をかけることで、試料中の各金属イオンを分離しながら移動させ、UV 検出部を通過する時の UV 吸収の減少分により検出するという間接吸光法を採用した。カラムにフューズドシリカキャピラリー（内径 50 μ m、有効長 56 cm、アジレント・テクノロジー（株）製）、緩衝液に陽イオン分析バッファ（Part No. 5064-8203、アジレント・テクノロジー（株）製）を用い、電圧 25 kV で、陽イオン標準液（5 ~ 100 ppm、Part No. 5064-8205、アジレント・テクノロジー（株）製）から作成した検量線より、ナトリウム、カリウム、カルシウム含量を求めた。実施例 1 で得られた高保水性プロテオグリカンについては、乾燥重量を基にして 0.174 重量%水溶液で測定したため、作成した検量線による各金属含量の測定下限は 0.29 重量%であった。測定の結果、ナトリウムは 6.5 重量%、カルシウムは 0.51 重量%であり、カリウムは検量線の測定下限より低い濃度であったため 0.29 重量%未満であった。原料の鮭由来プロテオグリカンについては、乾燥重量を基にして 0.166 重量%水溶液で測定したため、作成した検量線による各金属含量の測定下限は 0.30 重量%であった。原料の鮭由来プロテオグリカンについて同様に分析したところ、ナトリウムは 1.8 重量%、カルシウムは 5.6 重量%であり、カリウムは検量線の測定下限より低い濃度であったため 0.30 重量%未満であった。なお、上記金属含量は、実施例 1 で得られた高保水性プロテオグリカン中に含まれる水分含量（13 重量%）および原料の鮭由来プロテオグリカンに含まれる水分含量（17 重量%）をそれぞれ除去した乾燥重量を基に計算した。

【0031】

実施例 1 で得られた高保水性プロテオグリカンの相対粘度は、オストワルド相対粘度計（粘度計 No. 1、毛細管内径 0.5 mm、柴田科学（株）製）で、純水の粘度を基準として測定した。実施例 1 で得られた高保水性プロテオグリカン 25.0 mg を 5 mL の蒸留水に溶解し、この水溶液 5 mL をオストワルド相対粘度計に移し、粘度を測定した。実施例 1 で得られた高保水性プロテオグリカンの水分含量は 13 重量%なので、乾燥重量で換算すると、21.8 mg / 5 mL 水溶液となり、濃度は 0.44 w / v % となる。水温 26.5 の水槽中で純水の粘度を 1 としたとき、実施例 1 で得られた高保水性プロテオグリカンの相対粘度は 5.1 であった。原料の鮭由来プロテオグリカンについて同一の相対粘度計を用いて分析した。原料の鮭由来プロテオグリカン 26.3 mg を 5 mL の蒸留水に溶解し、この水溶液 5 mL をオストワルド相対粘度計に移し、粘度を測定した。原料の鮭由来プロテオグリカンの水分含量は 17 重量%なので、乾燥重量で換算すると、21

10

20

30

40

50

・ $8 \text{ mg} / 5 \text{ mL}$ 水溶液となり、濃度は $0.44 \text{ w} / \text{v} \%$ となる。水温 26.5 の水槽中で純水の粘度を 1 としたとき、原料の鮭由来プロテオグリカンの相対粘度は 4.4 であった。

【0032】

実施例 1 で得られた高保水性プロテオグリカンの $0.20 \text{ w} / \text{v} \%$ 水溶液の pH は 7.5 であり、原料の鮭由来プロテオグリカンの $0.20 \text{ w} / \text{v} \%$ 水溶液の pH は 6.2 であった。

【実施例 4】

【0033】

(高保水性プロテオグリカンの製造 2)

原料のプロテオグリカンは、市販の鮭由来プロテオグリカン((株)角弘プロテオグリカン研究所)を購入し、用いた。強酸性陽イオン交換樹脂(商品名:ダイヤイオンSK1B(三菱化学(株)))をガラス製カラムに充填し(内径 2 cm 、高さ 8 cm)、 1 M 塩酸 50 mL と脱イオン水 200 mL を順次流下して樹脂を洗浄した後、 1 M 塩化ナトリウム水溶液 100 mL を流下し、樹脂をナトリウムイオン型に活性化した。過剰の塩化ナトリウムを除くため、脱イオン水約 200 mL を流下した後、原料の鮭由来プロテオグリカン 0.31 g を脱イオン水 25 mL に溶解した溶液を、室温でカラム上方から添加・流下した。その後、樹脂に脱イオン水を 130 mL 流下し、得られた溶出液約 150 mL をエバポレーター(東京理科器械(株))にて濃縮した後、凍結乾燥し、 0.28 g の白色綿状固体である高保水性プロテオグリカンを得た。

【実施例 5】

【0034】

(高保水性プロテオグリカンの保水性の測定 2)

原料の鮭由来プロテオグリカンと、実施例 4 で得られた高保水性プロテオグリカンそれぞれ 0.20 g を、脱イオン水 100 mL に溶解し、原料の鮭由来プロテオグリカンの $0.20 \text{ w} / \text{v} \%$ 水溶液 100 mL 、実施例 4 で得られた高保水性プロテオグリカンの $0.20 \text{ w} / \text{v} \%$ 水溶液 100 mL を得た。この原料の鮭由来プロテオグリカンの $0.20 \text{ w} / \text{v} \%$ 水溶液 100 mL と実施例 4 で得られた高保水性プロテオグリカンの $0.20 \text{ w} / \text{v} \%$ 水溶液 100 mL をそれぞれ、透析用セルロースチューブ(外周 $9 \text{ cm} \times$ 長さ 35 cm 、エーディア(株))に入れ、上下の口を封じ水中に浮遊させ、 4 の低温室で、水に対して透析した。水の交換は 1 週間に一度行った。吸水した透析用セルロースチューブの重量を不定期に 30 日間測定し、あらかじめ測定した透析用セルロースチューブ風袋重量を控除し、吸水・保水した重量を求めた。

【0035】

図 3 は、原料の鮭由来プロテオグリカンと、実施例 4 で得られた高保水性プロテオグリカンの保水性を測定した結果を示すものである。グラフの横軸は経過日数(日)を示し、縦軸は風袋重量を控除した透析用セルロースチューブ内液の重量(g)を示す。図 3 中のプロットのうち、「 $0.20 \text{ w} / \text{v} \%$ 高保水性プロテオグリカン(実施例 4、ナトリウムイオン型)」は実施例 4 で得られた高保水性プロテオグリカンの $0.20 \text{ w} / \text{v} \%$ 水溶液の重量変化を、「 $0.20 \text{ w} / \text{v} \%$ 鮭由来プロテオグリカン」は原料の鮭由来プロテオグリカンの $0.20 \text{ w} / \text{v} \%$ 水溶液の重量変化を示す。30 日間の測定結果を平均すると、1 日当たりの重量の増加量は、原料の鮭由来プロテオグリカン $2.7 \text{ g} / \text{日}$ に対して、実施例 4 で得られた高保水性プロテオグリカンは $7.4 \text{ g} / \text{日}$ であった。原料の鮭由来プロテオグリカンと比較して、実施例 4 で得られた高保水性プロテオグリカンは約 2.7 倍の吸水・保水量があり、高保水性を有することが明らかとなった。

【実施例 6】

【0036】

(高保水性プロテオグリカンの化学分析 2)

実施例 4 で得られた高保水性プロテオグリカンのタンパク質含量を、比色法であるローリー法にて、牛血清アルブミン(アクロス社)を標準物質とした検量線から求めたところ

、5.2重量%であった。ウロン酸含量を、比色法であるカルバゾール硫酸法にて、グルクロン酸（シグマ社）を標準物質とした検量線から求めたところ、37.6重量%であった。原料の鮭由来プロテオグリカンについて同様に分析したところ、タンパク質含量は6.5重量%、ウロン酸含量は34.6重量%であった。これらの結果から、実施例4で得られた高保水性プロテオグリカンのタンパク質とウロン酸含量は、原料の鮭由来プロテオグリカンとほとんど変化がないことが明らかとなった。

【0037】

実施例4で得られた高保水性プロテオグリカンの水分含量を上記実施例3と同様に測定したところ、13重量%であった。また、実施例4で得られた高保水性プロテオグリカンの各金属含量を、上記実施例3と同様に測定した。実施例4で得られた高保水性プロテオグリカンについては、乾燥重量を基にして0.174重量%水溶液で測定したため、作成した検量線による各金属含量の測定下限は0.29重量%であった。測定の結果、ナトリウムは9.3重量%であり、カルシウムとカリウムは検量線の測定下限より低い濃度であったため、それぞれ0.29重量%未満であった。なお、上記金属含量は、実施例4で得られた高保水性プロテオグリカン中に含まれる水分含量（13重量%）を除去した乾燥重量を基に計算した。

【0038】

実施例4で得られた高保水性プロテオグリカンの相対粘度を実施例3と同一の相対粘度計を用いて分析した。実施例4で得られた高保水性プロテオグリカン25.0mgを5mLの蒸留水に溶解し、この水溶液5mLをオストワルド相対粘度計に移し、粘度を測定した。実施例4で得られた高保水性プロテオグリカンの水分含量は13重量%なので、乾燥重量で換算すると、21.8mg/5mL水溶液となり、濃度は0.44w/v%となる。水温26.5の水槽中で純水の粘度を1としたとき、実施例4で得られた高保水性プロテオグリカンの相対粘度は6.4であった。

【0039】

実施例4で得られた高保水性プロテオグリカンの0.20w/v%水溶液のpHは7.5であり、原料の鮭由来プロテオグリカンの0.20w/v%水溶液のpHは6.2であった。

【実施例7】

【0040】

（高保水性プロテオグリカンの製造3）

高保水性プロテオグリカンの製造にあたって、原料となるプロテオグリカン常法により鮫から調製した。市販の鮫軟骨粉末100gに対して、5%酢酸（関東化学）を1L加え、4で一晩攪拌した。遠心分離により固形分を除去し、溶液を得た。この溶液を分画分子量10万の限外ろ過膜（ミリポア社）を装着した卓上循環式濃縮装置（（株）トライテック）に通し、加水しながら、分子量10万以上の成分を集めた。残っている低分子成分を除去するため、透析用セルロースチューブ（エーディア（株））に分子量10万以上の画分を入れ、4の低温室で、水に対して3日間透析した。外液の水は定期的に交換した。透析用セルロースチューブ内の溶液を凍結乾燥し、固形分の重量を測定したところ、0.8gの白色綿状固体である鮫酢酸抽出プロテオグリカンを得た。

【0041】

強酸性陽イオン交換樹脂（商品名：AG 50W-X8 resin（バイオラッド社））をガラス製カラムに充填し（内径2.5cm、高さ8.2cm）、1M塩酸60mLと脱イオン水150mLを順次流下して樹脂を洗浄した後、1M水酸化カリウム水溶液150mLを流下し、樹脂をカリウムイオン型に活性化した。過剰の水酸化カリウムを除くため、脱イオン水約250mLを流下した後、原料の鮫酢酸抽出プロテオグリカン0.31gを脱イオン水30mLに溶解した溶液を、室温でカラム上方から添加・流下した。その後、樹脂に脱イオン水を170mL流下し、得られた溶出液約200mLをエバポレーター（東京理科器械（株））にて濃縮した後、凍結乾燥し、0.29gの白色綿状固体である高保水性プロテオグリカンを得た。

【実施例 8】

【0042】

(高保水性プロテオグリカンの保水性の測定 3)

原料の鯨酢酸抽出プロテオグリカンと、実施例 7 で得られた高保水性プロテオグリカンそれぞれ 0.10 g を、脱イオン水 50 mL に溶解し、原料の鯨酢酸抽出プロテオグリカンの 0.20 w/v % 水溶液 50 mL、実施例 7 で得られた高保水性プロテオグリカンの 0.20 w/v % 水溶液 50 mL を得た。この原料の鯨酢酸抽出プロテオグリカンの 0.20 w/v % 水溶液 50 mL と実施例 7 で得られた高保水性プロテオグリカンの 0.20 w/v % 水溶液 50 mL をそれぞれ、透析用セルロースチューブ (外周 9 cm × 長さ 35 cm、エーディア (株)) に入れ、上下の口を封じ水中に浮遊させ、4 の低温室で、水 10 に対して透析した。水の交換は 1 週間に一度行った。吸水した透析用セルロースチューブの重量を不定期に 30 日間測定し、あらかじめ測定した透析用セルロースチューブ風袋重量を控除し、吸水・保水した重量を求めた。

【0043】

図 4 は、原料の鯨酢酸抽出プロテオグリカンと、実施例 7 で得られた高保水性プロテオグリカンの保水性を測定した結果を示すものである。グラフの横軸は経過日数 (日) を示し、縦軸は風袋重量を控除した透析用セルロースチューブ内液の重量 (g) を示す。図 4 中のプロットのうち、「0.20 w/v % 高保水性プロテオグリカン (実施例 7、カリウムイオン型)」は実施例 7 で得られた高保水性プロテオグリカンの 0.20 w/v % 水溶液の重量変化を、「0.20 w/v % 鯨酢酸抽出プロテオグリカン」は原料の鯨酢酸抽出プロテオグリカンの 0.20 w/v % 水溶液の重量変化を示す。30 日間の測定結果を平均すると、1 日当たりの重量の増加量は、原料の鯨酢酸抽出プロテオグリカン 1.9 g/日に対して、実施例 7 で得られた高保水性プロテオグリカンは 5.1 g/日であった。原料の鯨酢酸抽出プロテオグリカンと比較して、実施例 7 で得られた高保水性プロテオグリカンは約 2.7 倍の吸水・保水量があり、高保水性を有することが明らかとなった。

【実施例 9】

【0044】

(高保水性プロテオグリカンの化学分析 3)

実施例 7 で得られた高保水性プロテオグリカンのタンパク質含量を、比色法であるローリー法にて、牛血清アルブミン (アクロス社) を標準物質とした検量線から求めたところ、4.5 重量%であった。ウロン酸含量を、比色法であるカルバゾール硫酸法にて、グルクロン酸 (シグマ社) を標準物質とした検量線から求めたところ、34.5 重量%であった。原料の鯨酢酸抽出プロテオグリカンについて同様に分析したところ、タンパク質含量は 5.9 重量%、ウロン酸含量は 33.8 重量%であった。これらの結果から、実施例 7 で得られた高保水性プロテオグリカンのタンパク質とウロン酸含量は、原料の鯨酢酸抽出プロテオグリカンとほとんど変化がないことが明らかとなった。

【0045】

実施例 7 で得られた高保水性プロテオグリカンの 0.20 w/v % 水溶液の pH は 7.5 であり、原料の鯨酢酸抽出プロテオグリカンの 0.20 w/v % 水溶液の pH は 4.2 であった。

【実施例 10】

【0046】

(高保水性プロテオグリカンの製造 4)

高保水性プロテオグリカンの製造にあたって、原料となるプロテオグリカンを常法により鯨から調製した。市販の鯨軟骨粉末 100 g に対して、0.05 M 水酸化ナトリウム溶液を 200 mL 加え、4 で一晩攪拌した。遠心分離により固形分を除去し、溶液を得た。この溶液を分画分子量 10 万の限外ろ過膜 (ミリポア社) を装着した卓上循環式濃縮装置 ((株) トライテック) に通し、加水しながら、分子量 10 万以上の成分を集めた。残っている低分子成分を除去するため、透析用セルロースチューブ (エーディア (株)) に分子量 10 万以上の画分を入れ、4 の低温室で、水に対して 3 日間透析した。外液の水

は定期的に交換した。透析用セルロースチューブ内の溶液を凍結乾燥し、固形分の重量を測定したところ、0.95 gの白色綿状固体である鮫アルカリ抽出プロテオグリカンを得た。

【0047】

強酸性陽イオン交換樹脂（商品名：AG 50W-X8 resin（バイオラッド社））をガラス製カラムに充填し（内径2.5 cm、高さ8.2 cm）、1 M塩酸60 mLと脱イオン水150 mLを順次流下して樹脂を洗浄した後、1 M水酸化ナトリウム水溶液40 mLを流下し、樹脂をナトリウムイオン型に活性化した。過剰の水酸化ナトリウムを除くため、脱イオン水約250 mLを流下した後、原料の鮫アルカリ抽出プロテオグリカン0.29 gを脱イオン水30 mLに溶解した溶液を、室温でカラム上方から添加・流下した。その後、樹脂に脱イオン水を170 mL流下し、得られた溶出液約200 mLをエバポレーター（東京理科器械（株））にて濃縮した後、凍結乾燥し、0.27 gの白色綿状固体である高保水性プロテオグリカンを得た。

【実施例11】

【0048】

（高保水性プロテオグリカンの保水性の測定4）

原料の鮫アルカリ抽出プロテオグリカンと、実施例10で得られた高保水性プロテオグリカンそれぞれ0.10 gを、脱イオン水50 mLに溶解し、原料の鮫アルカリ抽出プロテオグリカンの0.20 w/v %水溶液50 mL、実施例10で得られた高保水性プロテオグリカンの0.20 w/v %水溶液50 mLを得た。この原料の鮫アルカリ抽出プロテオグリカンの0.20 w/v %水溶液50 mLと実施例10で得られた高保水性プロテオグリカンの0.20 w/v %水溶液50 mLをそれぞれ、透析用セルロースチューブ（外周9 cm×長さ35 cm、エーディア（株））に入れ、上下の口を封じ水中に浮遊させ、4の低温室で、水に対して透析した。水の交換は1週間に一度行った。吸水した透析用セルロースチューブの重量を不定期に30日間測定し、あらかじめ測定した透析用セルロースチューブ風袋重量を控除し、吸水・保水した重量を求めた。

【0049】

図5は、原料の鮫アルカリ抽出プロテオグリカンと、実施例10で得られた高保水性プロテオグリカンの保水性を測定した結果を示すものである。グラフの横軸は経過日数（日）を示し、縦軸は風袋重量を控除した透析用セルロースチューブ内液の重量（g）を示す。図5中のプロットのうち、「0.20 w/v %高保水性プロテオグリカン（実施例10、ナトリウムイオン型）」は実施例10で得られた高保水性プロテオグリカンの0.20 w/v %水溶液の重量変化を、「0.20 w/v %鮫アルカリ抽出プロテオグリカン」は原料の鮫アルカリ抽出プロテオグリカンの0.20 w/v %水溶液の重量変化を示す。30日間の測定結果を平均すると、1日当たりの重量の増加量は、原料の鮫アルカリ抽出プロテオグリカン4.0 g/日に対して、実施例10で得られた高保水性プロテオグリカンは4.6 g/日であった。原料の鮫アルカリ抽出プロテオグリカンと比較して、実施例10で得られた高保水性プロテオグリカンは約1.2倍の吸水・保水量があり、高保水性を有することが明らかとなった。

【実施例12】

【0050】

（高保水性プロテオグリカンの化学分析4）

実施例10で得られた高保水性プロテオグリカンのタンパク質含量を、比色法であるローリー法にて、牛血清アルブミン（アクロス社）を標準物質とした検量線から求めたところ、10.5重量%であった。ウロン酸含量を、比色法であるカルバゾール硫酸法にて、グルクロン酸（シグマ社）を標準物質とした検量線から求めたところ、31.0重量%であった。原料の鮫アルカリ抽出プロテオグリカンについて同様に分析したところ、タンパク質含量は14.1重量%、ウロン酸含量は26.9重量%であった。これらの結果から、実施例10で得られた高保水性プロテオグリカンのタンパク質とウロン酸含量は、原料の鮫アルカリ抽出プロテオグリカンとほとんど変化がないことが明らかとなった。

【 0 0 5 1 】

実施例 10 で得られた高保水性プロテオグリカンの 0 . 2 0 w / v % 水溶液の p H は 7 . 8 であり、原料の鮭アルカリ抽出プロテオグリカンの 0 . 2 0 w / v % 水溶液の p H は 5 . 7 であった。

【実施例 1 3 】

【 0 0 5 2 】

(高保水性プロテオグリカンの製造 5)

原料のプロテオグリカンは、市販の鮭由来プロテオグリカン ((株) 角弘プロテオグリカン研究所) を購入し、用いた。強酸性陽イオン交換樹脂 (商品名 : ダイヤイオン S K 1 B (三菱化学 (株))) をガラス製カラムに充填し (内径 2 . 5 c m 、高さ 8 . 2 c m) 、 1 M 塩酸 6 0 m L と脱イオン水 1 5 0 m L を順次流下して樹脂を洗浄した後、 1 M 塩化カリウム水溶液 4 0 0 m L を流下し、樹脂を カリウムイオン型 に活性化した。過剰の塩化 カリウム を除くため、脱イオン水約 3 5 0 m L を流下した後、原料の鮭由来プロテオグリカン 0 . 3 0 g を脱イオン水 3 0 m L に溶解した溶液を、室温でカラム上方から添加・流下した。その後、樹脂に脱イオン水を 1 5 0 m L 流下し、得られた溶出液約 1 7 0 m L をエバポレーター (東京理科器械 (株)) にて濃縮した後、凍結乾燥し、 0 . 3 0 g の白色綿状固体である高保水性プロテオグリカンを得た。

【実施例 1 4 】

【 0 0 5 3 】

(高保水性プロテオグリカンの保水性の測定 5)

原料の鮭由来プロテオグリカンと、実施例 13 で得られた高保水性プロテオグリカンそれぞれ 0 . 2 0 g を、脱イオン水 1 0 0 m L に溶解し、原料の鮭由来プロテオグリカンの 0 . 2 0 w / v % 水溶液 1 0 0 m L 、実施例 13 で得られた高保水性プロテオグリカンの 0 . 2 0 w / v % 水溶液 1 0 0 m L を得た。この原料の鮭由来プロテオグリカンの 0 . 2 0 w / v % 水溶液 1 0 0 m L と実施例 13 で得られた高保水性プロテオグリカンの 0 . 2 0 w / v % 水溶液 1 0 0 m L をそれぞれ、透析用セルロースチューブ (外周 9 c m × 長さ 3 5 c m 、エーディア (株)) に入れ、上下の口を封じ水中に浮遊させ、4 の低温室で、水に対して透析した。水の交換は 1 週間に一度行った。吸水した透析用セルロースチューブの重量を不定期に 3 0 日間測定し、あらかじめ測定した透析用セルロースチューブ風袋重量を控除し、吸水・保水した重量を求めた。

【 0 0 5 4 】

図 6 は、原料の鮭由来プロテオグリカンと、実施例 13 で得られた高保水性プロテオグリカンの保水性を測定した結果を示すものである。グラフの横軸は経過日数 (日) を示し、縦軸は風袋重量を控除した透析用セルロースチューブ内液の重量 (g) を示す。図 6 中のプロットのうち、「 0 . 2 0 w / v % 高保水性プロテオグリカン (実施例 13 、カリウムイオン型) 」は実施例 13 で得られた高保水性プロテオグリカンの 0 . 2 0 w / v % 水溶液の重量変化を、「 0 . 2 0 w / v % 鮭由来プロテオグリカン 」は原料の鮭由来プロテオグリカンの 0 . 2 0 w / v % 水溶液の重量変化を示す。30 日間の測定結果を平均すると、1 日当たりの重量の増加量は、原料の鮭由来プロテオグリカン 2 . 7 g / 日に対して、実施例 13 で得られた高保水性プロテオグリカンは 7 . 3 g / 日であった。原料の鮭由来プロテオグリカンと比較して、実施例 13 で得られた高保水性プロテオグリカンは約 2 . 7 倍の吸水・保水量があり、高保水性を有することが明らかとなった。

【実施例 1 5 】

【 0 0 5 5 】

(高保水性プロテオグリカンの化学分析 5)

実施例 13 で得られた高保水性プロテオグリカンのタンパク質含量を、比色法であるローリー法にて、牛血清アルブミン (アクロス社) を標準物質とした検量線から求めたところ、7 . 0 重量 % であった。ウロン酸含量を、比色法であるカルバゾール硫酸法にて、グルクロン酸 (シグマ社) を標準物質とした検量線から求めたところ、4 0 . 6 重量 % であった。原料の鮭由来プロテオグリカンについて同様に分析したところ、タンパク質含量は

6.5重量%、ウロン酸含量は34.6重量%であった。これらの結果から、実施例13で得られた高保水性プロテオグリカンのタンパク質とウロン酸含量は、原料の鮭由来プロテオグリカンとほとんど変化がないことが明らかとなった。

【0056】

実施例13で得られた高保水性プロテオグリカンの水分含量を上記実施例3と同様に測定したところ、14重量%であった。また、実施例13で得られた高保水性プロテオグリカンの各金属含量を、上記実施例3と同様に測定した。実施例13で得られた高保水性プロテオグリカンについては、乾燥重量を基にして0.0645重量%水溶液で測定したため、作成した検量線による各金属含量の測定下限は0.78重量%であった。測定の結果、ナトリウムは1.7重量%、カリウムは12.0重量%であり、カルシウムは検量線の測定下限より低い濃度であったため0.78重量%未満であった。なお、上記金属含量は、実施例13で得られた高保水性プロテオグリカン中に含まれる水分含量(14重量%)を除去した乾燥重量を基に計算した。

10

【0057】

実施例13で得られた高保水性プロテオグリカンの相対粘度を実施例3と同一の相対粘度計を用いて分析した。実施例13で得られた高保水性プロテオグリカン25.3mgを5mLの蒸留水に溶解し、この水溶液5mLをオストワルド相対粘度計に移し、粘度を測定した。実施例13で得られた高保水性プロテオグリカンの水分含量は14重量%なので、乾燥重量で換算すると、21.8mg/5mL水溶液となり、濃度は0.44w/v%となる。水温26.5℃の水槽中で純水の粘度を1としたとき、実施例13で得られた高保水性プロテオグリカンの相対粘度は6.0であった。

20

【0058】

実施例13で得られた高保水性プロテオグリカンの0.20w/v%水溶液のpHは6.2であり、原料の鮭由来プロテオグリカンの0.20w/v%水溶液のpHは6.2であった。

【実施例16】

【0059】

(高保水性プロテオグリカンを含む化粧料の製造)

実施例1で得られた高保水性プロテオグリカンを含む美容液を試作した。実施例1で得られた高保水性プロテオグリカン6mg(水分含量13重量%)とビタミンC250mg、グリセリン10mLを蒸留水40mLに溶解し、ガラス瓶に入れ、完成である。得られた美容液は、無色透明、清澄であり、肌に塗布したとき、べたつき感がなくさらさらしているが、しっとり感が感じられるものであった。

30

【実施例17】

【0060】

次に、実施例1で得られた高保水性プロテオグリカンを含むクリームを試作した。実施例1で得られた高保水性プロテオグリカン5mg(水分含量13重量%)を水12mLに溶解し、オリブオイル10mL、乳化ワックス3gを混合し、広口のプラスチックの瓶に入れた。また、プロテオグリカンを含まないクリームを同様に試作した。水12mLにオリブオイル10mL、乳化ワックス3gを混合し同様に試作した。結果、両者のクリームを肌に塗布したとき、プロテオグリカンを含むクリームは、含まないクリームよりしっとり感が感じられるものであった。

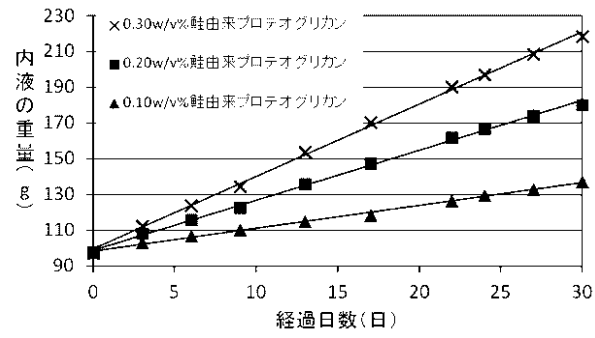
40

【産業上の利用可能性】

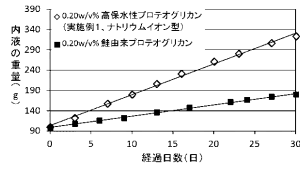
【0061】

本発明により保水性が改善された高保水性プロテオグリカンが提供されることにより、化粧料産業に広く利用されることが可能となる。

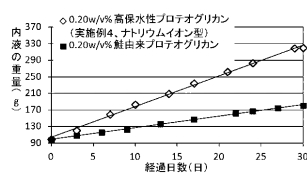
【図 1】



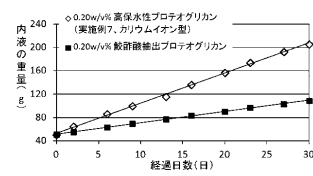
【図 2】



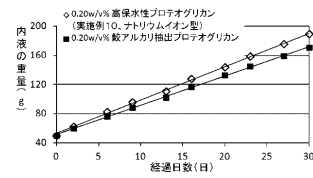
【図 3】



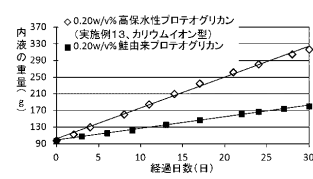
【図 4】



【図 5】



【図 6】



フロントページの続き

(56)参考文献 特開2001-172296(JP,A)
特開2007-008854(JP,A)
特開2003-268004(JP,A)
特開2009-185263(JP,A)
特開2002-255726(JP,A)
特開平06-166616(JP,A)
特開平06-179612(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C08B37/00

A61K8/73

A61K8/98

A61Q19/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CPlus/REGISTRY(STN)