

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

**特開2014-234369  
(P2014-234369A)**

(43) 公開日 平成26年12月15日(2014.12.15)

(51) Int.Cl.

**A61K 31/728 (2006.01)**  
**A61P 17/16 (2006.01)**  
**A61P 43/00 (2006.01)**

F 1

A 61 K 31/728  
A 61 P 17/16  
A 61 P 43/00

テーマコード(参考)

4 C O 8 6

1 1 1

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号

特願2013-117333 (P2013-117333)

(22) 出願日

平成25年6月3日(2013.6.3)

(71) 出願人 000001421

キユーピー株式会社

東京都渋谷区渋谷1丁目4番13号

(72) 発明者 野村 義宏

東京都府中市晴見町3-8-1 国立大学  
法人東京農工大学内

(72) 発明者 川田 千夏

東京都府中市住吉町5丁目13番地の1  
キユーピー株式会社研究開発本部内

(72) 発明者 古木 崇大

東京都府中市住吉町5丁目13番地の1  
キユーピー株式会社研究開発本部内

(72) 発明者 栗原 仁

東京都府中市住吉町5丁目13番地の1  
キユーピー株式会社研究開発本部内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】経口用光老化改善剤

## (57) 【要約】

【課題】経口用光老化改善剤を提供する。

【解決手段】低分子ヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する経口用光老化改善剤。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

紫外線による皮膚のダメージを改善する経口用光老化改善剤であって、  
平均分子量10万以下のヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩を有効成分として  
含有し、  
紫外線により形成されたシワを改善することを特徴とする、  
経口用光老化シワ改善剤。

**【請求項 2】**

紫外線による皮膚のダメージを改善する経口用光老化改善剤であって、  
平均分子量10万以下のヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩を有効成分として  
含有し、  
紫外線による皮膚中のコラーゲン産生減少を改善することを特徴とする、  
経口用光老化コラーゲン産生減少改善剤。

**【請求項 3】**

紫外線による皮膚のダメージを改善する経口用光老化改善剤であって、  
平均分子量10万以下のヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩を有効成分として  
含有し、  
紫外線による表皮の肥厚化を改善することを特徴とする、  
経口用光老化表皮肥厚化改善剤。

**【請求項 4】**

紫外線による皮膚のダメージを改善する経口用光老化改善剤であって、  
平均分子量10万以下のヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩を有効成分として  
含有し、  
紫外線による皮膚中の分子量50万以上のヒアルロン酸量の減少を改善することを特徴と  
する、  
経口用光老化ヒアルロン酸分子量改善剤。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は、経口用光老化改善剤に関し、より詳細には、紫外線により誘発されるシワ形  
成の改善剤として有効な経口用光老化改善剤に関する。 30

**【背景技術】****【0002】**

皮膚は常に紫外線に曝露されており、長年かつ繰り返しの紫外線曝露によって皮膚の光  
老化が促進される。紫外線による皮膚の光老化は、主にコラーゲンの分解とヒアルロン酸  
産生の減少により、皮膚真皮の細胞外マトリックスの破壊が起こることに起因する。具  
体的には、紫外線暴露により、皮膚真皮の細胞外マトリックスの大半を占めるコラーゲンが  
切断されて顕著に減少するとともにコラーゲン線維束の乱れが生じ、皮膚の弾力性が失わ  
れ、シワが形成される。また、紫外線は、コラーゲンと同じく皮膚真皮の細胞外マトリッ  
クスの主要成分であるヒアルロン酸を作り出す線維芽細胞に損傷を与えるため、皮膚中の  
ヒアルロン酸の減少を引き起こし、肌のみずみずしさが減少することにより、皮膚が乾燥  
、肥厚化し、シワが形成される。 40

**【0003】**

一端形成されたシワは、自然に改善することは難しく、主にヒアルロン酸注射やレーザー  
治療といった外科的処置による治療が行われている。

**【0004】**

ヒアルロン酸は、生体、特に皮下組織に存在するムコ多糖類であり、その高い保湿機能  
により、化粧料の成分として広く利用されている。ヒアルロン酸は、光老化や紫外線によ  
り誘発されるシワ形成を抑制するための化粧料にも利用されており、例えば、ヒアルロン  
酸、紫外線吸収剤および抗酸化剤を配合した化粧料を皮膚に塗布することにより、日焼け

10

20

30

40

50

現象等の紫外線障害を抑制することが知られている（特許文献1）。

【0005】

しかしながら、従来の化粧料において、ヒアルロン酸は皮膚に潤いを与えるための保湿成分として使用されており、特許文献1の化粧料による紫外線障害の抑制効果も紫外線吸収剤および抗酸化剤により得られるものであるため、ヒアルロン酸のみを皮膚に塗布した場合、光老化や紫外線により誘発されるシワ形成を十分に抑制できない。また、ヒアルロン酸を塗布することでは、ヒアルロン酸注射やレーザー治療のように一度形成されてしまったシワを改善することはできない。

【0006】

さらに、化粧料や外科的処置によって光老化やシワへの効果が期待できるのは、塗布や10  
処置を行った皮膚の局所的な部分のみであり、広範囲の皮膚で光老化を改善するには不向きである。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特開2006-176449号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、光老化、特に紫外線により誘発され形成されたシワの改善に有効な経口用光20  
老化改善剤を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、低分子ヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩が、経口摂取により光老化を改善することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0010】

すなわち、本発明は、

(1) 紫外線による皮膚のダメージを改善する経口用光老化改善剤であって、  
平均分子量10万以下のヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩を有効成分として  
含有し、

紫外線により形成されたシワを改善することを特徴とする、  
経口用光老化シワ改善剤、

(2) 紫外線による皮膚のダメージを改善する経口用光老化改善剤であって、  
平均分子量10万以下のヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩を有効成分として  
含有し、

紫外線による皮膚中のコラーゲン産生減少を改善することを特徴とする、  
経口用光老化コラーゲン産生減少改善剤、

(3) 紫外線による皮膚のダメージを改善する経口用光老化改善剤であって、  
平均分子量10万以下のヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩を有効成分として  
含有し、

紫外線による表皮の肥厚化を改善することを特徴とする、

経口用光老化表皮肥厚化改善剤、

(4) 紫外線による皮膚のダメージを改善する経口用光老化改善剤であって、  
平均分子量10万以下のヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩を有効成分として  
含有し、

紫外線による皮膚中の分子量50万以上のヒアルロン酸量の減少を改善することを特徴と  
する、

経口用光老化ヒアルロン酸分子量改善剤、  
である。

【発明の効果】

10

20

30

40

50

## 【0011】

上記経口用光老化改善剤によれば、光老化、特に紫外線により誘発され、形成されたシワを改善することができる。また、上記経口用光老化改善剤によれば、皮膚中のコラーゲン産生減少を改善する効果、表皮の肥厚化を改善する効果、皮膚中のヒアルロン酸分子量の改善効果（皮膚中の分子量50万以上のヒアルロン酸量の減少を改善する効果）があるため、光老化の抑制に有効な新規製剤が提供される。

## 【0012】

また、上記経口用光老化改善剤は経口摂取するものであることから、生体内で作用することができるため、広範囲の皮膚で光老化を抑制することができる。

## 【図面の簡単な説明】

10

## 【0013】

【図1】図1は、(a)シワスコアの目視判定基準と、(b)目視判定基準に対応した背部皮膚を示す写真、である。

【図2】図2は、光老化改善作用の確認試験において、経口用光老化改善剤投与前（再群分け時）と投与4週間後の背部皮膚の状態を示す写真である。

【図3】図3は、光老化改善作用の確認試験において、(a)経口用光老化改善剤投与4週間後の背部皮膚組織標本をヘマトキシリン・エオジン(HE)染色した写真、(b)背部皮膚組織標本から測定した表皮厚を表すグラフ、である。

【図4】図4は、光老化改善作用の確認試験において、経口用光老化改善剤投与4週間後の皮膚中のI型コラーゲンを検出したウエスタンプロットのバンド、およびそのバンド強度を表すグラフである。

20

【図5】図5は、光老化改善作用の確認試験において、経口用光老化改善剤投与4週間後の皮膚中のヒアルロン酸分子量の分析における、アガロースゲル電気泳動パターンと、アガロースゲル電気泳動パターンを用いたデンシトメトリー解析の結果を表すグラフである。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0014】

以下、図面を参照しつつ、本発明を詳細に説明する。なお、本発明において、格別に断らない限り、「部」は「質量部」を意味し、「%」は「質量%」を意味する。

30

## 【0015】

## &lt;本発明の特徴&gt;

本発明の経口用光老化改善剤は、平均分子量10万以下のヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩を有効成分として含有することを特徴とする。

## 【0016】

40

## &lt;ヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩&gt;

本発明において、「ヒアルロン酸」とは、-D-グルクロン酸と-D-N-アセチルグルコサミンとの二糖からなる繰り返し構成単位を1以上有する多糖類である。すなわち、ヒアルロン酸は、-D-グルクロン酸の1位と-D-N-アセチル-グルコサミンの3位とが結合した2糖単位を少なくとも1個含む2糖以上のものである。また、「ヒアルロン酸の薬学的に許容される塩」としては、特に限定されないが、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、亜鉛塩、マグネシウム塩、アンモニウム塩等が挙げられる。

## 【0017】

40

## &lt;ヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩の由来&gt;

ヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩は、動物等の生体組織（例えば鶏冠、さい帯、皮膚、関節液等）から抽出されたものでもよく、あるいは、微生物、動物細胞または植物細胞を培養して得られたもの（例えばストレプトコッカス属の細菌等を用いた発酵法）、化学的または酵素的に合成されたもの等を使用することができる。

## 【0018】

50

## &lt;ヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩の純度&gt;

なお、本発明において使用するヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩の純度は、医薬品で使用できるレベルであればよく、好ましくは90%以上であればよく、より好ましくは95%以上であればよい。この純度は、カルバゾール硫酸法（例えば日本薬局方）にて測定されたグルクロン酸定量値から算出された値である。

#### 【0019】

カルバゾール硫酸法は、ホウ酸ナトリウム・硫酸溶液中にヒアルロン酸水溶液を加えて混和し、ヒアルロン酸を加熱分解した後冷却し、カルバゾール・エタノール溶液を加えて混和し、加熱後放冷した試料液の吸光度(530nm)を測定する方法である。同様に処理したD-グルクロノラクトンを用いて検量線を作成し、D-グルクロノラクトン換算値を算出した後、1.102を乗じてグルクロン酸定量値を求める。得られたグルクロン酸定量値に（ヒアルロン酸の分子量／グルクロン酸の分子量）を乗じてヒアルロン酸の含有量を算出する。

10

#### 【0020】

<ヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩の平均分子量>

また、本発明の経口用光老化改善剤で使用するヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩の平均分子量は、10万以下であり、光老化改善効果を十分に得られる点から、好ましくは7万以下であり、より好ましくは400～6万以下、さらに好ましくは1,000～5万である。

20

経口摂取されたヒアルロン酸が、どのような状態で皮膚に届き、どのようなメカニズムで皮膚に作用するのかは定かではないが、ヒアルロン酸の平均分子量が10万よりも大きいと、本願発明の光老化改善効果が得られない。

#### 【0021】

なお、本発明で規定されるヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩の平均分子量は、以下の方法により測定される。

#### 【0022】

<分子量の測定方法>

即ち、約0.05gの精製ヒアルロン酸を精密に量り、0.2mol/L濃度の塩化ナトリウム溶液に溶かし、正確に100mLとした溶液及びこの溶液8mL、12mL並びに16mLを正確に量り、それぞれに0.2mol/L濃度の塩化ナトリウム溶液を加えて正確に20mLとした溶液を試料溶液とする。この試料溶液及び0.2mol/L濃度の塩化ナトリウム溶液につき、日本薬局方（第十四改正）一般試験法の粘度測定法（第1法

30

毛細管粘度測定法）により $30.0 \pm 0.1$ で比粘度を測定し（式（1））、各濃度における還元粘度を算出する（式（2））。還元粘度を縦軸に、本品の換算した乾燥物に対する濃度(g/100mL)を横軸にとってグラフを描き、各点を結ぶ直線と縦軸との交点から極限粘度を求める。ここで求められた極限粘度をLaurentの式（式（3））に代入し、平均分子量を算出する（T.C. Laurent, M. Ryan, A. Pietruszkiewicz, :B.B.A., 42, 476-485(1960)）。

（式1）

40

比粘度

$$= \{(\text{試料溶液の所要流下秒数}) / (0.2\text{mol/L 塩化ナトリウム溶液の所要流下秒数})\} - 1$$

（式2）

還元粘度 = 比粘度 / (本品の換算した乾燥物に対する濃度(g/100mL))

（式3）

極限粘度

$$= 3.6 \times 10^{-4} M^{0.78}$$

M：平均分子量

#### 【0023】

<ヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩の含有量>

本発明の経口用光老化改善剤におけるヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩の

50

含有量は、ヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩が有効成分として機能しうる量であればよく、通常1質量%以上であり、好ましくは5～95質量%である。

#### 【0024】

##### <経口用光老化改善剤の光老化改善の効果>

本発明の経口用光老化改善剤は、経口投与により、紫外線暴露によって生じた皮膚の光老化を改善する。

皮膚は常に紫外線に曝露されており、長年かつ繰り返しの紫外線曝露によって皮膚の光老化が促進される。特に、顔や手のような直接紫外線を浴びるケースが多い露出部の肌の老化原因はほとんどが光老化であると考えられている。したがって、顔や手において光老化を改善することが重要である。

10

#### 【0025】

光老化の主な症状としては、深いシワの形成や、しみの発生であるが、本発明の経口用光老化改善剤は、特に紫外線により誘発され、形成されたシワを改善することができる。紫外線により誘発されるシワは、紫外線によってコラーゲンの分解とヒアルロン酸産生の減少により、皮膚真皮の細胞外マトリックスの破壊が起こることに起因する。

#### 【0026】

本発明の経口用光老化改善剤は、経口投与により、コラーゲンの産生を促進し、紫外線暴露によって減少した皮膚中のコラーゲン量を改善し、表皮の肥厚化を改善することができる。また、本発明の経口用光老化改善剤は、経口投与により、紫外線暴露によって起こる皮膚でのヒアルロン酸合成を促進し、皮膚中のヒアルロン酸分子量の改善効果（皮膚中の分子量50万以上のヒアルロン酸量の減少を改善する効果）があるため、光老化を改善する作用を有する。

20

#### 【0027】

##### <経口用光老化シワ改善剤の、シワを改善する効果>

本発明の経口用光老化シワ改善剤の、シワを改善する効果は、例えば、背部の正中線に対して垂直方向のシワを目視評価し、Inomata et al., 2003らの方法に基づいた判定基準を使ってシワスコアとして数値化することで確認することができる。シワスコアにおいて、経口用光老化改善剤の投与後にシワスコアがマイナスに変化していれば、シワが改善していると判断でき、さらにマイナスの値が1以上であれば顕著なシワ改善効果と言える。

30

#### 【0028】

本発明の経口用光老化改善剤を経口摂取することによって、紫外線により誘発され、形成されたシワが改善されるメカニズムについては必ずしも明らかではないが、本発明の経口用光老化改善剤を経口摂取することによって、皮膚真皮の細胞外マトリックスの主要成分であるコラーゲンとヒアルロン酸の産生が促進されることで、シワの改善につながるものと考えられる。

本発明の経口用光老化改善剤を経口摂取することによって、紫外線により切断されて顕著に減少し乱れていたコラーゲン線維束を修復し、皮膚の弾力性を改善させることができがシワの改善につながるものと考えられる。また、紫外線により線維芽細胞が損傷を受けることによって減少していた皮膚中のヒアルロン酸の産生を改善し、肌のみずみずしさを改善することがシワの改善につながるものと考えられる。

40

#### 【0029】

##### <経口用光老化コラーゲン産生減少改善剤の、コラーゲンの産生減少を改善する効果>

本発明の経口用光老化コラーゲン産生減少改善剤の、皮膚中のコラーゲン量の産生促進や減少抑制は、例えば、ウエスタンプロットティング、ELISA、アフィニティクロマトグラフィー等によるコラーゲン蛋白質の検出によって確認することができる。

#### 【0030】

本発明の経口用光老化改善剤によれば、皮膚中のコラーゲンの産生を促進し、紫外線暴露による皮膚中のコラーゲンの減少を抑制し改善する結果、光老化、特に紫外線により誘発されるシワの形成を抑制することができる。

#### 【0031】

50

本発明の経口用光老化改善剤を経口摂取することによって皮膚中のコラーゲンの産生が促進される作用機序については必ずしも明らかではないが、ヒアルロン酸を経口摂取したマウスの腸管上皮表面の受容体にヒアルロン酸が結合することが報告されている（Akira Asari, Tomoyuki Kanemitsu, Hithoshi Kurihara, Oral Administration of High Molecular Weight Hyaluronan (900 kDa) Controls Immune System via Toll-like Receptor 4 in the Intestinal Epithelium）。したがつて、本発明の有効成分であるヒアルロン酸またはその薬学的に許容できる塩を経口摂取すると、該ヒアルロン酸またはその薬学的に許容できる塩が腸管上皮表面の受容体に結合し、情報伝達された結果、皮膚の真皮線維芽細胞等でコラーゲンの産生が促進されたと推察される。

なお、ヒアルロン酸も皮膚真皮に含まれ、皮膚の水分を保持し保湿に寄与しているが、皮膚を保湿することだけでは、光老化で形成された深いシワを十分に改善することができない。

#### 【0032】

<経口用光老化ヒアルロン酸分子量改善剤の皮膚中の、ヒアルロン酸分子量の改善効果>

本発明の経口用光老化ヒアルロン酸分子量改善剤の、皮膚中のヒアルロン酸の分子量の改善効果は、皮膚中のヒアルロン酸を抽出し、例えば、ゲルろ過クロマトグラフィーや、アガロースゲル電気泳動を用いて評価することができる。

皮膚中のヒアルロン酸は、採取した皮膚を凍結粉碎し、タンパク質分解酵素処理を行った後、タンパク質を沈殿、除去することで得ることができる。

#### 【0033】

本発明の経口用光老化改善剤を経口摂取することによって、皮膚中のヒアルロン酸分子量が改善される作用機序については必ずしも明らかではないが、上述のとおり、ヒアルロン酸を経口摂取したマウスの腸管上皮表面の受容体にヒアルロン酸が結合することが報告されているため、本発明の有効成分であるヒアルロン酸またはその薬学的に許容できる塩を経口摂取すると、該ヒアルロン酸またはその薬学的に許容できる塩が腸管上皮表面の受容体に結合し、情報伝達された結果、皮膚の真皮線維芽細胞等でヒアルロン酸の産生が促進され、分子量50万以上のヒアルロン酸量を増加させるものと推察される。

#### 【0034】

<経口用光老化表皮肥厚化改善剤の、皮膚の肥厚化を改善する効果>

本発明の経口用光老化表皮肥厚化改善剤の、皮膚の肥厚化を改善する効果は、組織標本、例えばHE染色した組織標本において表皮部分の厚みを測定することによって評価することができる。

本発明の経口用光老化改善剤を経口摂取することによって、紫外線による皮膚の肥厚化が改善されるメカニズムについては必ずしも明らかではないが、上述のとおり、コラーゲンやヒアルロン酸の産生が促進され、皮膚の弾力性やハリが改善することによって肥厚化が改善されるものと推察される。

#### 【0035】

<光老化改善の効果を得られる範囲>

本発明の経口用光老化改善剤に使用するヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩は、上記のような作用機序により生体内で作用するため、本発明の経口用光老化改善剤は、広範囲の皮膚で光老化を改善することができる。

#### 【0036】

<経口用光老化改善剤に用いる他の原料>

本発明の経口用光老化改善剤は、有効成分であるヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩以外に、本発明の効果を損なわない範囲で、その他の原料を含むことができる。そのような原料の例としては水、賦形剤、抗酸化剤、防腐剤、湿潤剤、粘稠剤、緩衝剤、吸着剤、溶剤、乳化剤、安定化剤、界面活性剤、滑沢剤、水溶性高分子、甘味料、矯味剤、酸味料、アルコール類等が挙げられる。

10

20

30

40

50

## 【0037】

&lt;経口用光老化改善剤の剤形&gt;

本発明の経口用光老化改善剤の剤形は特に限定されないが、本発明の経口用光老化改善剤を経口摂取する場合、例えば錠剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、丸剤等の固形製剤、水剤、懸濁剤、シロップ剤、乳剤等の液剤等の経口投与剤が挙げられる。

## 【0038】

&lt;経口用光老化改善剤の摂取量&gt;

ヒアルロン酸またはその薬学的に許容される塩は生体物質であるため、多量に摂取しても副作用がない、またはきわめて低いと考えられるが、本発明の経口用光老化改善剤として摂取するヒアルロン酸及び／またはその塩の量は、一日当たり 10 mg ~ 1000 mg 10  
、好ましくは 100 ~ 500 mg を目安とすることができる。投与回数は、紫外線照射量や季節に応じて一日当たり一回もしくは複数回を選択できる。

## 【実施例】

## 【0039】

以下、実施例によって本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は実施例に限定されない。

## 【0040】

&lt;実施例 1、2 および比較例 1、2 &gt;

下記の各ヒアルロン酸をそれぞれ精製水に溶解させ、各経口用光老化改善剤を得た。  
なお、後述する試験例 1において、各ヒアルロン酸の投与量が 200 mg / Kg / 日となるように、マウスの平均体重及び平均飲水量から濃度を算出して、試験液を調製した。 20

実施例 1 :

ヒアルロン酸（平均分子量 5 万、白色粉末、キユーピー株式会社製）

実施例 2 :

ヒアルロン酸（平均分子量 8,000、白色粉末、キユーピー株式会社製）

比較例 1 :

滅菌精製水

比較例 2 :

ヒアルロン酸（平均分子量 20 万、白色粉末、キユーピー株式会社製）

## 【0041】

&lt;試験例 1 &gt;

試験例 1 では、ヒアルロン酸の光老化改善作用を確認し、該作用機序を解明するために、ヘアレスマウスに、紫外線照射（UV 照射）によりあらかじめシワを形成させた後、ヒアルロン酸を蒸留水に溶解させた水溶液を経口投与した。

## 【0042】

SKH1-E 系雄ヘアレスマウス（6 週齢）を皮膚水分量、皮膚粘弹性、体重により有意差のないよう群分けを行い、マウスの背部皮膚に 12 週間 UVB を照射し（総照射量 4.7 J/cm<sup>2</sup>）、シワ形成を行った。

その後、皮膚水分量、皮膚粘弹性、体重、シワの形成状態に偏りのないように再群分けを行い、実施例 1、2 および比較例 1、2 の経口用光老化改善剤の評価を、各群 n = 7 ~ 9 で行った。なお、対照として、同様に群分けを行った上で UV 照射を行わない「UV (-) コントロール群」をおいて、UV 照射の影響を確認した（表 1 参照）。 40

## 【0043】

再群分け後、経口用光老化改善剤の投与を 4 週間行った。1 回 / 日の頻度で、表 1 の経口用光老化改善剤を経口投与した。

## 【0044】

【表1】

試験群	UV 照射	経口用光老 化改善剤	ヒアルロン酸の投与量	ヒアルロン酸 の平均分子量
UV (-) コントロール群	なし	比較例1	—	—
UV (+) コントロール群	あり	比較例1	—	—
UV (+) 実施例1投与群	あり	比較例2	200mg/kg/日	20万
UV (+) 実施例2投与群	あり	実施例1	200mg/kg/日	5万
UV (+) 実施例3投与群	あり	実施例2	200mg/kg/日	8,000

## 【0045】

&lt;背部皮膚のシワスコア&gt;

背部皮膚のシワの改善度合いを評価するために、再群分け時および試験期間終了後にシワスコアの評価を行った。シワスコアは、図1に示した目視判定基準に基づき、群分けの内容を知らされていない者6人で行った。この判定基準はInomata et al., 2003らの方法に基づいている。なお、目視対象はマウスそのものではなく、撮影により得た写真である。

## 【0046】

背部皮膚の写真を図2に示す。また、シワスコアの変化を表2に示す。

図2より、UV(+)コントロール群では、UV(-)コントロール群と比較して、UV照射によって背部の正中線に対して垂直方向に深いシワが形成されており、UV照射による顕著なシワ形成の誘発が確認された。

一方、本発明の経口用光老化改善剤を投与した群（実施例1および実施例2投与群）では、UV(-)コントロール群と比較するとシワが形成されているが、4週間の投与後には、UV(+)コントロール群と比較してシワの深さは浅く、UV照射により誘発され、形成されたシワの改善効果が認められた。また、表2のシワスコアの変化からも、本発明の経口用光老化改善剤を投与した群（実施例1および実施例2投与群）では、シワスコアがマイナスに変化していることから、UV照射により誘発され、形成されたシワの改善効果が認められた。

## 【0047】

## 【表2】

試験群	経口用光老化改 善剤	ヒアルロン酸の 平均分子量	シワスコアの変化※ (平均値)
UV (-) コントロール群	比較例1	—	+0.06
UV (+) コントロール群	比較例1	—	+0.09
UV (+) 実施例1投与群	比較例2	20万	+0.33
UV (+) 実施例2投与群	実施例1	5万	-0.16
UV (+) 実施例3投与群	実施例2	8,000	-1.54

シワスコアの変化は以下の式から算出した

$$(\text{シワスコアの変化}) = (\text{4週間投与後のシワスコア}) - (\text{再群分け時のシワスコア})$$

## 【0048】

&lt;表皮厚の測定&gt;

試験期間終了後、マウスを解剖し、マウスの背部から皮膚を採取、固定し、常法に従つてパラフィン包埋、切り出し、薄切を行い、HE染色を施し、組織標本作製を行った。標本の全視野を観察し、代表的な部位の写真撮影をOLYMPUS CAMEDIA DIGITAL CAMERA C-3040 ZOOMにて行った。

HE染色標本を用いて基底層から顆粒層上層までの距離を表皮とみなし、フリーソフト「ものさし pix」で表皮の厚さを測定した。1匹当たり3視野の撮影を行い、写真1枚毎に10か所ずつ表皮の厚さを測定した。写真3枚の平均値を算出し、当該個体の表皮厚とした。背部皮膚組織標本をHE染色した写真を図3(a)に、表皮厚の測定結果を図3(b)に示す。

## 【0049】

図3(a)より、UV(+)コントロール群の表皮にはUV(-)コントロール群には見られない、細胞質部分のない死細胞が見られており、また表皮が肥厚していた。

10

20

30

40

50

図3(b)より、実施例1、2の経口用光老化改善剤を投与した群では、いずれもUV(+)コントロール群と比較して有意に表皮の肥厚化が改善されていた。

#### 【0050】

##### <皮膚中のI型コラーゲン量>

試験期間終了後、マウスの背部から皮膚を切除して取り出し、凍結粉碎したものを脱脂した後、弱イオン交換体を用いてコラーゲン画分の分離を行った。さらにBradford法に基づきタンパク質の定量を行い、タンパク質量を還元バッファー(0.2M Tris-HCl(pH6.8)/20% グリセロール/2%メルカプトエタノール)で希釈しそろえた上で試料を調製し、ウエスタンプロット法により、I型コラーゲン量を測定した。I型コラーゲンはコラーゲンの中でも皮膚中に含まれる主なコラーゲンである。

10

ここで、ウエスタンプロット法とは、ゲル電気泳動によって分子量にしたがい分離したタンパク質を転写膜に写し取り、さらに特定のタンパク質に対する抗体を用いて転写膜上で抗原抗体反応によって特定のタンパク質を発色させてその存在を肉眼観察する方法をいい、蛍光試薬で発色させる方法や、酵素反応を利用して発色させる方法など、多くの周知の手法が適用可能である。今回、I型コラーゲンを識別するために抗ブタ真皮由来I型コラーゲンウサギ抗血清を作製して一次抗体として使用し、二次抗体としてAnti-Rabbi IgG

HRP Conjugater (Promega社製)を用いてHRP反応を利用した化学発色反応を行った。結果を図4に示す。

20

#### 【0051】

図4に示すように、ウエスタンプロット法によりI型コラーゲン 1鎖のバンドが認められ、このバンド強度を、画像処理ソフトウェアImageJ(Wayne Rasband(NIH))を使用して測定し、コラーゲン量を定量した。

UV(+)コントロール群では、UV(-)コントロール群と比較してI型コラーゲン 1鎖の量が減少しており、UV照射による皮膚中のI型コラーゲン量の減少が認められた。一方、実施例1および実施例2投与群では、I型コラーゲン 1鎖の量はUV(+)コントロール群と比較して増加し、特に実施例2投与群(HA8千)では、I型コラーゲン 1鎖の量がUV(+)コントロール群と比較して顕著に増加した。

このように、本発明の経口用光老化改善剤の経口投与により、UV照射による皮膚中のI型コラーゲン量の減少は改善され、かつ、I型コラーゲン量が増加されたことが確認された。

30

#### 【0052】

##### <皮膚中のヒアルロン酸の分子量>

試験期間終了後、マウスの背部から皮膚を切除して取り出し、凍結粉碎後、タンパク質分解酵素処理を行った後、タンパク質を沈殿、除去することで試料を調製し、アガロース電気泳動により、ヒアルロン酸の分子量を測定した。なお、分子量マーカーとして150万、100万、70万、50万、21万、5万の分子量のヒアルロン酸(21万のヒアルロン酸は協和発酵バイオ株式会社製、その他はキユーピー株式会社製)をそれぞれ用いた。染色後のゲルを画像処理ソフトウェアImageJ(Wayne Rasband(NIH))を用いて解析した。

40

アガロースゲル電気泳動とアガロースゲル電気泳動パターンを用いたデンシトメトリー解析の結果を図5に示した。

#### 【0053】

図5の結果から、UV(+)コントロール群は、UV(-)コントロール群に比べて皮膚中ヒアルロン酸の分子量のピークが低分子側(5万~21万)へとシフトしていることが確認され、慢性的なUV照射によって、皮膚中のヒアルロン酸分子量が低分子化することが確認された。一方、UV照射マウスに本発明の実施例1(UV(+)HA5万群)および実施例2(UV(+)HA8千群)である経口用光老化改善剤を経口投与したことにより、皮膚中のヒアルロン酸分子量のピークが高分子側(21万以上)にシフトすることが示された。また、UV(+)コントロール群で減少していた分子量50万以上の画分が、本発

50

明の実施例 1 (UV (+) HA 5 万群) および実施例 2 (UV (+) HA 8 千群) である経口用光老化改善剤を経口投与したことにより顕著に増加していた。

これにより、本発明の経口用光老化改善剤により、皮膚中のヒアルロン酸分子量が改善されることが示された。

#### 【0054】

##### <実施例3>

実施例 1 で使用したヒアルロン酸（平均分子量 5 万のヒアルロン酸）を経口用光老化改善剤として使用して、下記の配合の散剤（顆粒剤）を製した。

#### 【0055】

##### [配合割合]

経口用光老化改善剤（平均分子量 5 万のヒアルロン酸）	10 %
乳糖	60 %
トウモロコシデンプン	25 %
ヒプロメロース	5 %
100 %	

10

#### 【0056】

##### <実施例4>

実施例 2 で使用したヒアルロン酸（平均分子量 8,000 のヒアルロン酸）を経口用光老化改善剤として使用して、下記の配合の錠剤を製した。

20

#### 【0057】

##### [配合割合]

経口用光老化改善剤（平均分子量 8,000 のヒアルロン酸）	25 %
乳糖	24 %
結晶セルロース	20 %
トウモロコシデンプン	15 %
デキストリン	10 %
乳化剤	5 %
二酸化ケイ素	1 %
100 %	

30

#### 【0058】

##### <実施例5>

ヒアルロン酸（平均分子量 2,000 のヒアルロン酸）を経口用光老化改善剤として使用して、内容物が下記の配合であるソフトカプセルを製した。

#### 【0059】

##### [配合割合]

経口用光老化改善剤（平均分子量 2,000 のヒアルロン酸）	20 %
オリーブ油	50 %
ミツロウ	10 %
中鎖脂肪酸トリグリセリド	10 %
乳化剤	10 %
100 %	

40

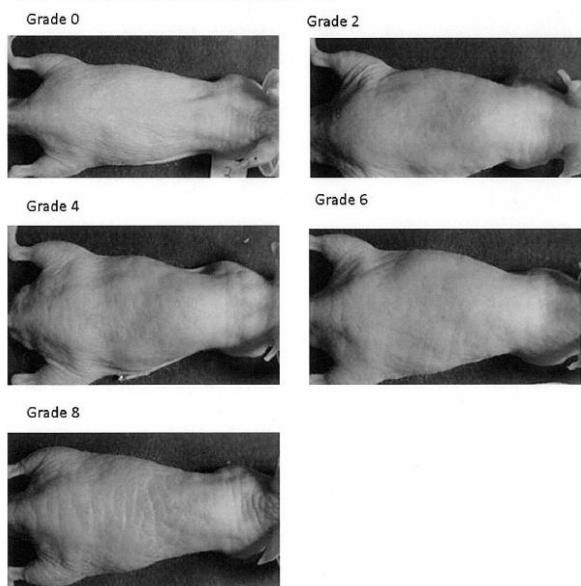
## 【図1】

(a) シワスコアの判定基準

シワ形成度	判定基準
0	No wrinkles (正中線に対して垂直なシワが無い)
2	A few shallow wrinkles across the back skin are observed occasionally (正中線に対して垂直で浅いシワがところどころ見られる)
4	Shallow wrinkles across the back skin are observed on the whole surface (正中線に対して垂直で浅いシワが背中全体に見られる)
6	Some deep, long wrinkles across the back skin are observed (正中線に対して垂直で深く長いシワが幾つか見られる)
8	Deep, long wrinkles across the back skin are observed on the whole surface (正中線に対して垂直で深く長いシワが背中全体に見られる)

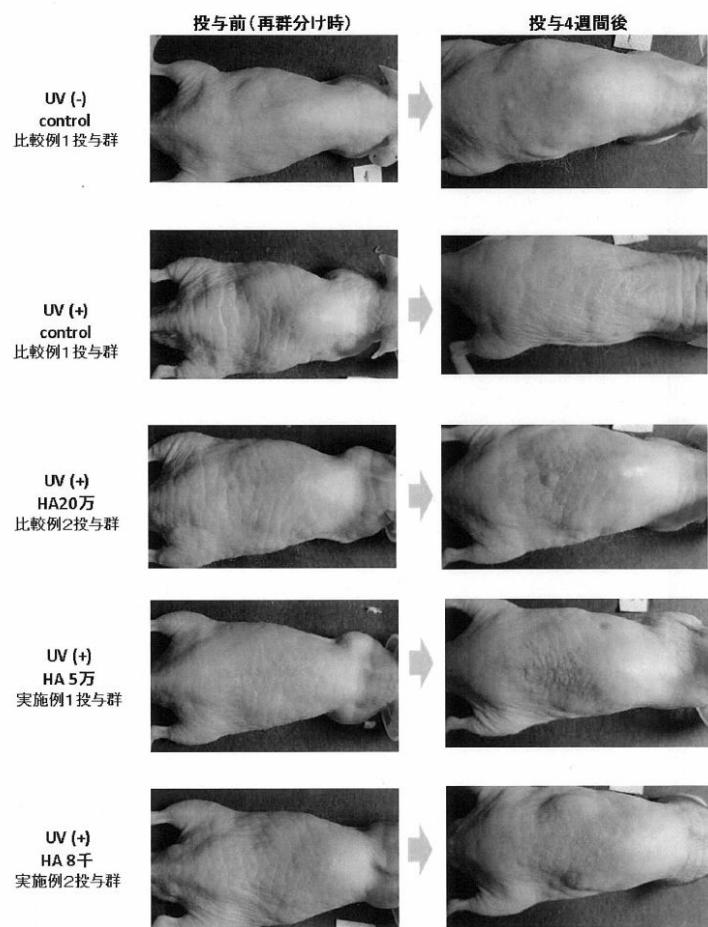
Inomata S *et al.*, J Invest Dermatol. 2003 Jan;120(1):128-34より一部改編

(b) 目視判定基準に対応した背部皮膚写真



## 【図2】

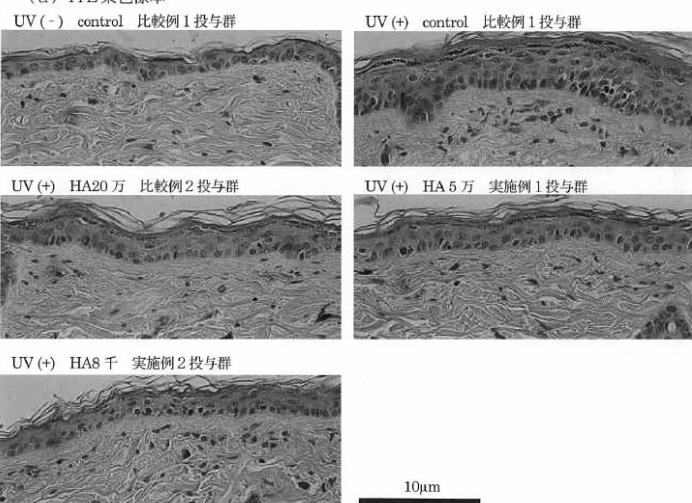
背部皮膚の状態



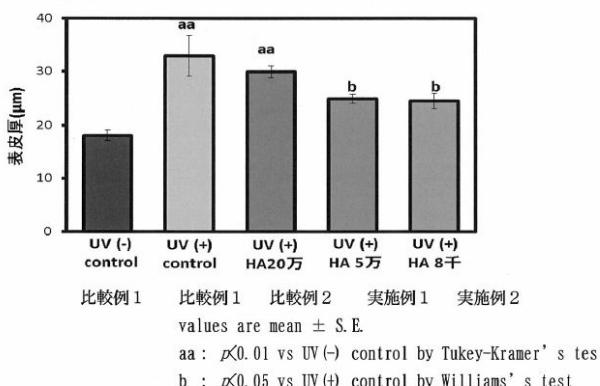
## 【図3】

HE染色標本を用いた背部皮膚の表皮厚

(a) HE染色標本

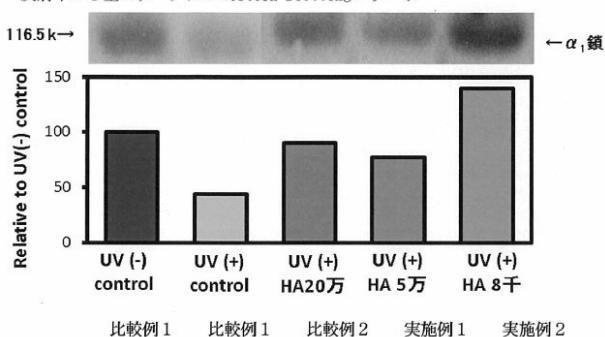


(b) 表皮厚



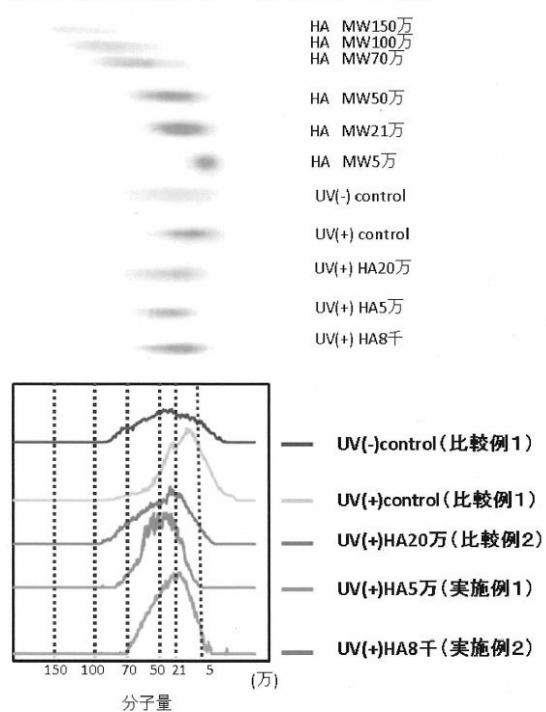
## 【図4】

皮膚中のI型コラーゲンのWestern Blottingパターン



【図5】

皮膚中のヒアルロン酸の分子量  
アガロースゲル電気泳動パターンとデンシトメトリー解析



---

フロントページの続き

F ターム(参考) 4C086 AA01 AA02 EA25 MA01 MA04 MA52 ZA89 ZC41