

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6777546号
(P6777546)

(45) 発行日 令和2年10月28日(2020.10.28)

(24) 登録日 令和2年10月12日(2020.10.12)

(51) Int.Cl.			F I		
A 6 1 K	8/9789	(2017.01)	A 6 1 K	8/9789	
A 6 1 K	8/60	(2006.01)	A 6 1 K	8/60	
A 6 1 Q	19/08	(2006.01)	A 6 1 Q	19/08	
A 6 1 Q	5/12	(2006.01)	A 6 1 Q	5/12	
A 2 3 L	33/105	(2016.01)	A 2 3 L	33/105	

請求項の数 8 (全 50 頁)

(21) 出願番号	特願2016-563262 (P2016-563262)	(73) 特許権者	516207182
(86) (22) 出願日	平成27年1月9日(2015.1.9)		コスモ インターナショナル イングレデ
(65) 公表番号	特表2017-502087 (P2017-502087A)		ィエンツ
(43) 公表日	平成29年1月19日(2017.1.19)		フランス国, エフー06250 ムージン
(86) 国際出願番号	PCT/FR2015/000011		, 855 アベニュー ドクトゥール モ
(87) 国際公開番号	W02015/104484	(74) 代理人	100114775
(87) 国際公開日	平成27年7月16日(2015.7.16)		弁理士 高岡 亮一
審査請求日	平成29年12月21日(2017.12.21)	(74) 代理人	100121511
(31) 優先権主張番号	14/00051		弁理士 小田 直
(32) 優先日	平成26年1月10日(2014.1.10)	(74) 代理人	100202751
(33) 優先権主張国・地域又は機関	フランス (FR)		弁理士 岩堀 明代
前置審査		(74) 代理人	100191086
			弁理士 高橋 香元

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】化粧品組成物、皮膚科学組成物、または栄養化粧品組成物に使用するショ糖エステルを有効成分として含有する植物抽出物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

- 植物の部位の乾燥と、
- 粉碎と、
- エタノールのような脂肪族アルコールの共溶媒を添加した超臨界二酸化炭素溶媒を用いた抽出と、これに続き、
- 必要に応じて行う脱溶媒和と、これに続き、
- 必要に応じて行う、1つ以上の適切な方法による精製と
を含む、炭素数1~10のアシル基を有し、中程度に有極性から無極性のショ糖エステル1つ以上を主として含むことを特徴とする、ブドウホオズキ(Physalis peruviana)の萼からの植物抽出物の調製プロセス。

【請求項2】

抗炎症性活性を除き、皮膚、粘膜または皮膚付属器の見栄えを改善するため、または皮膚と粘膜の乾燥を予防、且つ/或いはこれに抗するために、皮膚、皮膚付属器および粘膜に対して生物学的に活性化有効成分として使用するための、炭素数1~10のアシル基を有し、中程度に有極性から無極性のショ糖エステル1つ以上を主として含むことを特徴とする、請求項1に記載の調製プロセスによって得られる、ブドウホオズキ(Physalis peruviana)の萼からの植物抽出物。

【請求項3】

抗炎症性活性を除き、皮膚、粘膜または皮膚付属器の見栄えを改善するため、老化およ

び/または光老化の皮膚兆候を予防、且つ/或いはこれに抗するため、皮膚の弾力および張りの喪失に抗するため、または皮膚の色素を除去するために、皮膚、皮膚付属器および粘膜に対して生物学的に活性な有効成分として使用するための、炭素数1~10のアシル基を有し、中程度に有極性から無極性のシヨ糖エステル1つ以上を主として含むことを特徴とする、請求項1に記載の調製プロセスによって得られる、ブドウホオズキ (Physalis peruviana) の萼からの植物抽出物。

【請求項4】

有効成分として、請求項2または3に記載の植物抽出物を、適切な生理学的媒体中に含有することを特徴とする、化粧品組成物。

【請求項5】

前記有効成分が、前記組成物の全重量当たり、 10^{-6} ~ 50重量%の濃度で存在することを特徴とする、請求項4に記載の組成物。

【請求項6】

局所投与に適し、主にオイル、水アルコールまたは水溶液の形態で、或いは油中水型エマルジョンまたは水中油滴型エマルジョンまたは多相エマルジョンの形態で、或いはクリーム剤、懸濁液、または散剤の形態で存在し、前記組成物はほぼ流体または固体であっても良く、クリーム剤、ローション剤、ミルク、シャンプー、美容液 (serum)、軟膏剤、ゲル、ペースト、泡沫 (foam)、またはスティックのような形態であっても良いことを特徴とする、請求項4または5に記載の化粧品組成物。

【請求項7】

皮膚、粘膜または皮膚付属器の見栄えを改善し、または老化および/または光老化の皮膚兆候を予防し、且つ/或いはこれに抗することを意図して摂取される栄養化粧品組成物を調製するための、単独または他の有効成分との併用における、請求項2に記載の植物抽出物の、前記組成物の全重量当たり、 10^{-6} ~ 50重量%で含まれている有効量の使用。

【請求項8】

皮膚、粘膜または皮膚付属器の見栄えを改善し、または老化および/または光老化の皮膚兆候を予防し、且つ/或いはこれに抗することを意図して摂取される栄養化粧品組成物を調製するための、単独または他の有効成分との併用における、請求項3に記載の植物抽出物の、前記組成物の全重量当たり、 10^{-6} ~ 50重量%で含まれている有効量の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、化粧品、皮膚科学、栄養化粧品の分野に関連する。

【0002】

本発明は、化粧品、皮膚科学、または栄養化粧品組成物に活性成分として使用する、炭素数1~10のアシル基を有し、中程度に有極性から無極性のシヨ糖エステル1つ以上を主として含む、ナス科ホオズキ属 (Solanaceae family, of the Physalis genus) の多くの植物のうちの1種類の植物の萼からの植物抽出物に関する。本発明はまた、上記と同一用途の、植物抽出物の精製シヨ糖エステル、または合成シヨ糖エステルに関する。本発明は、さらに、有効成分として、植物抽出物または合成シヨ糖エステルを適切な生理学的媒体中に含有する、化粧品組成物、皮膚科学組成物、または栄養化粧品組成物に関する。最後に、本発明は、かかる植物抽出物の合成法にも関する。

【背景技術】

【0003】

化粧品組成物、皮膚科学組成物、および栄養化粧品組成物は予防的または治癒的に保湿および表皮のバリアー機能を改善し、治癒を促進し、皮膚色素を脱失し、皮膚の老化に抗するように設計されている。

【0004】

皮膚は体表面全体をカバーして外的環境に対して本質的にバリアーとして機能する複数の層 (真皮、増殖層、角質層) から成る重要器官である。このバリアー機能は、角質層の状

10

20

30

40

50

態および表皮角化細胞の増殖と分化とのバランスに主として依存している表皮の質に特に基づいている。

【0005】

角化細胞は90%の皮膚の表層（表皮）と皮膚付属器（爪、髪、体毛）で構成される細胞である。これらは水不溶性繊維状蛋白質の1つであるケラチンを合成して皮膚に不浸透性と外部保護を与える。表皮の区分は細胞分化により基底層から上層まで、そしてアポトーシスにより鱗屑と呼ばれる死んだ細胞の層を形成する角質層まで、角化細胞の形態を基準として4つの層に区分される。この層は保護バリアーを形成して器官からの水分損失を低減させる。角化細胞は常に再生される。基底層から角質層へ移動するには約1か月を要するが、角化細胞の過剰増殖（乾癬症）が起こった場合にはこのプロセスは加速する。

10

【0006】

角化細胞の分化調節は皮膚のバリアー機能またはしわの形成においての皮膚老化発現処理で起こる生物学的プロセスである。乾癬、にきび、しわなどの複数の皮膚の障害に対して作用する化粧品用および皮膚科学用有効成分として認められているレチノイド類（レチノード、レチノイン酸など）（非特許文献20、21）は角化細胞の分化をも能動的に抑制する。しかしながら、このことで皮膚の炎症が起こるため、研究機関は炎症性でない角化細胞の分化を抑制する新たなレチノイド様活性剤の探求を進めている（非特許文献22）。

【0007】

線維芽細胞は結合組織に存在する細胞であり、時には支持細胞とも呼ばれる。この細胞は真皮で主に認められ整合性および柔軟性を有する。この細胞はまた、プロテオグリカンと糖タンパク質を分泌する。この細胞は、主としてコラーゲンおよびエラスチンと、フィブリリン1を含むフィブリリンを分泌する。

20

【0008】

フィブリリン1は三員環を有するタンパク質ファミリーに属する糖タンパク質であるが、その制御は未だ解明されていない。これは線維芽細胞と角化細胞により分泌される。また、弾性および非弾性の細胞外マトリックスにおけるミクロフィブリルの主たるエレメントを構成する。このことから、フィブリリン1は繊維の形成に寄与し、この機能および構造特性は結合組織の弾性において、特に真皮表皮接合部のレベルで本質的な役割を果たす。事実、これにより表皮細胞は真皮の弾性繊維に付着している。

30

【0009】

真皮では、加齢に伴い、増殖、生合成および細胞外マトリックスとの交換が低下し、支持繊維の定性的および定量的劣化に伴い、線維芽細胞の活性低下が認められる。

【0010】

偏平化は真皮表皮接合部のレベルで現れ、代謝交換の低下およびしわの形成に繋がる真皮およびアンカリング（anchoring）繊維エレメントの希薄化と併せて、これら2つの領域（真皮と表皮）の間の凝集力の低下につながる。線状皮膚萎縮症は急速に起こる皮膚の非常に強い伸展で発症して、コラーゲン性組織および構造糖タンパク質の主な変化に関連して線維芽細胞を損傷させる。線状皮膚萎縮の形成は特許文献1に記載された治癒遅延と細胞とマトリックスとの接触消失に繋がる線維芽細胞の代謝の変容と見られる。

40

【0011】

エラスチンと共に、フィブリリン1は張りと弾力（非特許文献9、10）、アンチエイジング（非特許文献11、12、13、14、15）のメカニズムにおける活性のプロセスに関連するタンパク質として記述されることがあり、紫外線（非特許文献16、17、18）による老化促進のバイオマーカーとして、および/または線状皮膚萎縮症などの特定の瘢痕性プロセスの処理に主に使用される。従って、フィブリリン1の合成の活性化は内因的要因、つまり遺伝的または時間的にプログラムによる、或いはUV照射、タバコ、汚染などの酸化ストレス、および瘢痕形成の治療の外因的要因による老化した皮膚治療に役立つ可能性がある。

【0012】

50

従って、線維芽細胞および角化細胞は主にフィブリリン1の分泌経路で張り、弾力、細胞凝集力を制御する皮膚の生物学的プロセスにおいて、また皮膚の癬痕および老化プロセスにおいて重要な役割を果たす。

【0013】

老化に伴い、皮膚は乾燥する。特に50歳を超える高齢被験者には乾燥症発症または粘膜の乾燥がしばしば見られ、皮脂の少ない分泌量、ホルモンの変動または表皮経路の水分の流れ低下などに関連する。

【0014】

続いて、乾燥肌の2つの古典的な症状である皮膚のかゆみと突っ張り感を感じる。乾燥肌にさせる条件としては、光化学療法および湿疹により誘発された乾燥症がある。口腔乾燥症とも呼ばれる口を乾燥させる条件としては、シェーグレン症候群または首への照射療法がある。最後に、粘膜の乾燥が起こる条件としては、眼球の乾燥、膣の乾燥がある。

10

【0015】

一般的に、皮膚の乾燥と老化の問題に取り組むために外用剤を皮膚バリアーの回復に使用する。これには保湿剤、膜形成剤、スクアレンなどの皮膚バリアーを再建できるレチノイド型分子および薬剤を含む。

【0016】

本発明は、植物抽出物中に存在するか、或いは合成されたショ糖エステルのあるカテゴリが、皮膚、皮膚付属器および粘膜に対し、主として保湿、表皮のバリアー機能を改善し、皮膚の老化兆候を予防し、且つ/或いはこれに抗するという、興味深い生化学的、生物学的活性を示すという発見を主に構成する。

20

【0017】

ショ糖エステルは、炭素数がおおむね有意な(例えば、炭素数1~22)1つ以上のアシル基と糖のアシルエステルである。一般に、かかる糖はショ糖であり、その用語はショ糖エステルまたはスクロエステルである。ショ糖エステルは糖のエステル化度およびアシル基の性質に基づいて調節可能な両親媒性的な性質を有している。

【0018】

また、無害性、無味、無香、非イオン性などの数多くの利点のため、表面活性剤セクターの産業に対し、代替的な解決法を提供する。ショ糖エステルは表面活性剤としての応用範囲が広く、例えば食品加工、洗剤、化粧品、薬品の分野がある。

30

【0019】

市場におけるショ糖エステルは主に合成品であり、生合成の解明はおおいに進展し、環境に配慮した技術と完全に天然の製品が得られる(非特許文献1、2)。天然のショ糖エステルも存在するが、産業部門からは過小評価されている。事実、ナス科(Solanaceae)には、よく知られた代表例としてNicotiana tabacum(タバコ)とSolanum lycopersicum(トマト)があり、潜在的捕食者に対抗する防御機構としてショ糖エステルを合成して毛状突起に保存することが知られている(非特許文献3、4)。

【0020】

天然のショ糖エステルを考えた場合、研究所では、かかる分子の治療活物質としての使用については疑問視されている。ショ糖エステルには抗細菌、抗炎症、駆虫などの生物学的活性があり、薬物の多剤耐性を調節する(非特許文献5、6)。合成ショ糖エステルと比較すると、天然のショ糖エステルのアシル基は芳香族(安息香酸など)である場合もある(非特許文献7)。抗腫瘍剤としての芳香族ショ糖エステルに関する多くの医薬品科学研究は多く存在する(非特許文献8)。

40

【0021】

特許文献2は皮膚を通して生物活物質の浸透を増大させるショ糖エステルの使用について記述している。合成して得るこのショ糖エステルはショ糖モノラウリン酸エステルであり、または主要な脂肪酸がラウリン酸(C12)であるヤシ脂肪酸のエステルの混合物である。

【0022】

50

特許文献3は、グルコシルセラミドまたはセラミドと組み合わせた長鎖（炭素数22を超える）を有する特定の合成グルコースエステルは、皮膚の濡れ性、柔軟性、弾力などを向上させ、有用であることを記述している。

【0023】

特許文献4は、植物または植物の部位を示すことなく、植物抽出物が皮膚の乾燥を処理する化粧品において、また洗剤として有用であることを記述している。ここで抽出した溶媒は本質的に有極性であり、極性分子の抽出に繋がる。

【0024】

特許文献5は肌を白くしてしみを減らすブドウホオズキ (*Physalis peruviana*) 抽出物の使用について記述している。この文書はブドウホオズキ (*Physalis peruviana*) の果実の使用について記述している。

10

【0025】

Franco L Aらの文書「Actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones obtenidas de calices de *Physalis peruviana* L」、*Biomedica*, vol. 27, 1 January 2007は、ブドウホオズキ (*Physalis peruviana*) の萼から得られる抽出物の抗炎症活性を開発研究するため、その抽出プロセスを記述している。

【0026】

E.M Taleo Barrientosらの文書である「Anti-inflammatory effect of the ether extract and major fraction of *Physalis peruviana* calyces in acute TNBS-induced colitis」、Abstract of the 6th European Congress of pharmacology, 2012は、ブドウホオズキ (*Physalis peruviana*) の萼から得られる抽出プロセスを記述し、2つの新しいショ糖エステルが結腸レベルで抗炎症活性を有することを示している。

20

【0027】

特許文献6は、老化に抗する化粧品において、主としてalkenkegiである、ホオズキ属 (*Physalis*) 抽出物の使用を記述している。活性分子の抽出プロセスは有極性かつ親水性の抽出であり、また抽出された分子は有極性であり、主としてポリフェノールの、ウィタノライド (*withanolides*) および糖である。

【0028】

Desai N Bらの文書である「Sucrose esters - an interesting class of substances for cosmetics」、*Parfumerie und kosmetik*, Huethig, Heidelberg, DE, vol.66, No. 10, 1 January 1985は、化粧品にとって重要な合成ショ糖エステルを記述している。表1は炭素数12~18のアシル基を有するショ糖エステルを記述する。このショ糖エステルには保湿、スムージング、抗刺激活性が有ると考えられており、化粧品および医薬品の分野で低刺激性クレンザーを得るのに役立つ。

30

【0029】

主として抗菌、抗炎症性、抗寄生虫性についての治療的および表面活性性質に加え、炭素数1~10のアシル基を有し、中程度に有極性から無極性のショ糖エステルが、皮膚、粘膜または皮膚付属器に対し、化粧品、皮膚科学、または栄養化粧品としての活性を有するとの記載はない。

【先行技術文献】

40

【特許文献】

【0030】

【特許文献1】国際特許第WO2001/007006号

【特許文献2】欧州特許第0280414号

【特許文献3】日本国特許第61271205号

【特許文献4】特開2001-122731号公報

【特許文献5】特開2011-051920号公報

【特許文献6】仏国特許第2 896 155号

【非特許文献】

【0031】

50

【非特許文献1】 Les esters de sucres : voies de synthese et potentialites d' utilisation, Piccicuto et al. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2001, 5, 209-219

【非特許文献2】 Domaines d' applications des sucroesters et sucroglycerides, Mir eille Cecchin, DESS ingenierie documentaire, rapport bibliographique, 2001.

【非特許文献3】 Preparative isolation and structural characterization of sucrose ester isomers from oriental tobacco, Jia et al. *Carbohydrate Research* 2013, 372 , 73-77

【非特許文献4】 Characterization of 2,3,4,3'-tetra-O-acylated sucrose esters associated with the glandular trichomes of *Lycopersicon typicum* King et al. *J. Agric. Food Chem.* 1993, 41, 469-473

10

【非特許文献5】 New Multidrug resistance modulators from *Atractylodis lanceae* Rhizoma Murakami et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2000, 10, 2629-2632

【非特許文献6】 Labdanes ans sucrose Ester from *Physalis sordida*, Maldonado et al. *J. Nat. Prod.* 2006, 69, 1511-1513

【非特許文献7】 Oligosaccharide esters from the roots of *Polygala arillata*, Kobayashi et al. *J. Nat. Prod.* 2000, 63, 1066-1069

【非特許文献8】 Synthesis and antitumor activity of lapathoside D and its analogs, Panda et al. *Eur. J. Med. Chem.* 2012, 53, 1-12

【非特許文献9】 Direct inhibition of elastase and matrix metalloproteinases and stimulation of biosynthesis of fibrillar collagens, elastin, and fibrillins by xanthohumol (*Journal of Cosmetic Science*, Volume 61, Issue 2, Pages 125-132, Journal 2010.)

20

【非特許文献10】 From elastin to elastic fibers, part I. The in vitro effects of a natural dipeptide on the biological cascade.

【非特許文献11】 A novel anti-ageing mechanism for retinol: induction of dermal elastin synthesis and elastin fibre formation *International Journal of Cosmetic Science* Volume 33 Issue 1 Pages 62-69 Journal 2011

【非特許文献12】 Matrix proteins of the papillary dermis - primary targets of intrinsic dermal aging? *Global Ingredients & Formulations Guide 2009* Pages 131-142 Conference 2009

30

【非特許文献13】 Matrix proteins of the papillary dermis - primary targets of intrinsic dermal aging? *IFSCC Magazine* Volume 11 Issue 3 Pages 225-229 Journal 2008

【非特許文献14】 Fibrillines et fibrillinopathies, Gwenaelle Collod et al., *Medecine et Science* n° 10, vol. 12, p. 1077 -1086, octobre 1996

【非特許文献15】 Les filaments perles : structure, fonctions et maladies associees, Eric Hanssen et al., *Medecine et Science* n° 3, vol. 17, p. 327 -335, mars 2001

【非特許文献16】 Stiff skin syndrome cause found, P.J. Couke et al., 18 mars 2010

40

【非特許文献17】 Fibrillin Assembly Requires Fibronectin, L. Sabatier et al., *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 20, 846-858, February 1, 2009.

【非特許文献18】 Dissecting the Fibrillin Microfibril: Structural Insights into Organization and Function, S. A. Jensen et al., *Structure Review* 20, Cell Press, February 8, 2012

【非特許文献19】 Type VII collagen gene expression by human skin fibroblasts and keratinocytes in culture: influence of donor age and cytokine responses, Y.K. Chen et al., *J Invest Dermatol.* 1994 Feb;102(2):205-9.

【非特許文献20】 Epidermal growth factor and multiplication of cultured human epidermal keratinocytes, *Nature* 1977, 265, 421-423

50

【非特許文献 2 1】Retinoid-Responsive transcriptional changes in epidermal Keratinocytes, Cellular Physiology 2009, 220, 427-439

【非特許文献 2 2】Silybin from Silybum Marianum Seeds inhibits confluent-Induced keratinocytes differentiation as effectively as retinoic acid without inducing inflammatory cytokine, Journal of clinical biochemistry and nutrition, 2009, 45, 178-184.

【非特許文献 2 3】Epigenetic-aging-signature to determine age in different tissues, Carmen M. Koch and Wolfgang Wagner, AGING October 2011, Vol. 3 No 10)

【非特許文献 2 4】Aging is associated with highly defined epigenetic changes in the human epidermis, Raddatz et al. Epigenetics & Chromatin 2013, 6:36

10

【非特許文献 2 5】Aging, rejuvenation and epigenetic reprogramming : resetting the aging clock, Rando TA, Chang HY, the Glenn Laboratories for the Biology of Aging, Stanford University School of Medicine, Cell. 2012 Jan 2; 148(1-2):46-57. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.003.

【非特許文献 2 6】Epigenetic control of aging, Munoz-Najar U., Sedivy JM., Department of Molecular Biology, Cell Biology and Biochemistry, Brown University, Providence, Rhode Island USA, Antioxid Redox Signal 2011 Jan 15; 14(2):241-59. Doi: 10.1089/ars.2010.3250.Epub 2010 Nov 22.

【非特許文献 2 7】Epigenetics and aging, D' Aquila P., Rose G., Bellizzi D., Passarino G., Department of Cell Biology, University of Calabria, Rende Italy, Maturitas 2013 Feb; 74(2): 130-6. Doi: 10.1016/j.maturitas.2012.11.005. Epub 2012 Dec 12.

20

【非特許文献 2 8】Epigenetic factors in aging and longevity, Gravina S., Vijq. J., Department of Genetics, Albert Einstein College of Medicine, Bronx New-York USA, Pflugers Arch. 2010 Jan; 459(2): 247-58. Doi: 10.1007/s00424-009-0730-7. Epub 2009 Sep 19.

【非特許文献 2 9】Modulation of gene expression as a new skin anti-aging strategy, Talbourdet S., Sadick NS., Lazou K. et co., LVMH Recherche - Parfums Christian Dior, France, J. Drugs Dermatol. 2007 Jun;6(6 suppl):s25-33.

【非特許文献 3 0】Experimental approaches to the study of epigenomic dysregulation in ageing, Thompson RF., Fazzari MJ., Grealley JM., Department of Genetics and Center for Epigenomics, Albert Einstein College of Medicine, Bronx New-York USA, Exp.Gerontol. 2010 Apr;45(4):225-68. Doi: 10.1016/j.exger.2009.12.013. Epub 2010 Jan 10.

30

【非特許文献 3 1】KH Choi et al, Exp Mol Med, 37, 546, 2005.

【非特許文献 3 2】Ginger RS et al., Arch Dermatol Res 297 :235-241, 2005; Rawlings AV and Matts PJ, JID, 124 :1099-1110, 2005.

【非特許文献 3 3】Revue dans Proksch E et al, Exp Dermatol, 17 :1063-1072, 2008.

【非特許文献 3 4】Hitomi K. Transglutaminases in skin epidermis, Eur J Dermatol, 2005,15 :313.

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0032】

【課題を解決するための手段】

【0033】

発明者らは、植物抽出物からの特定の中程度に有極性から無極性までのシヨ糖エステルが、フィブリリン1の活性化に対して生物学的活性、特に角化細胞の分化に対して抑制作用を有することに、特に着目した。また驚くべきことに、かかるシヨ糖エステルはコラーゲンI、III、IV、エラスチン、フィブリリン1、インボルクリン (involucrin)、メラニン、フィラグリン (filaggrin) などの複数の生物学的標的に対して生物学的活性を示す。

50

【0034】

このことから、本発明の発明者らは、驚くべきことに老化、保湿、色素脱失に関連する複数の生物学的標的を活性化できる新たな植物由来の有効成分に着目した。発明者らは主として、線維芽細胞および角化細胞によりフィブリリン1の合成を活性化および/または角化細胞の分化を抑制し、またコラーゲンI、III、IV、エラスチン、フィブリリン1、インボルクリン、メラニン、フィラグリンなどの複数の生物学的標的に対して生物学的に作用し、その結果として皮膚、粘膜および皮膚付属器の見栄えを改善し、内因的および/または外因的皮膚老化の発現を予防し、且つ/或いはこれに抗し、特に線状皮膚萎縮の場合には治癒プロセスを補助し、さらには皮膚、粘膜および/または皮膚付属器の乾燥を予防し、且つ/或いはこれに抗し、また皮膚の色素脱失を可能とする新たな植物由来有効成分について研究した。

10

【0035】

本発明において、「有効成分の有効量」とは、求める結果、すなわち、皮膚、皮膚付属器および/または粘膜に対して生物学的活性を得ることを可能とするために必要な活性分子の量という意味である。本発明において、本発明の植物抽出物が主に有効成分としてショ糖エステルを構成することから、この用語は「植物抽出物の有効量」または「ショ糖エステルの有効量」として理解される。

【0036】

「有効成分」とは、1つ以上のショ糖エステルまたは1つ以上のショ糖エステルを主として含む植物抽出物という意味である。

20

【0037】

「局所適用」とは、本発明の有効成分、またはそれを含む組成物を皮膚、粘膜または皮膚付属器の表面に適用したり塗り広げたりすることを言う。

【0038】

「化粧品的または皮膚科学的に許容される」とは、本発明の有効成分またはこれを含む組成物が、アレルギー反応または中毒反応を引き起こさずに、皮膚または粘膜に接触するのに適しているという意味である。

【0039】

「生理学的に適している、または許容される」とは、組成物が毒性、不適合性、不安定性、アレルギー反応を起こさずに皮膚に取り込まれるか注入され、組成物が粘膜、皮膚付属器(爪、髪、体毛)、頭皮および哺乳類、より詳しくはヒトの皮膚と接触しての局所または経皮使用に適しているという意味である。

30

【0040】

「生理学的に適しているまたは適切な媒体」或いは「適切な添加剤」とは、水性アルコール溶液または水溶液、油中水型エマルジョン、水中油滴型エマルジョン、マイクロエマルジョン、水性ゲル、無水ゲル、美容液(serum)、ベシクルの分散物、粉末という意味であり、これらだけに限定するものではない。この生理学的に許容される環境は、慣例的に組成物の添加剤と呼ばれるものを形成する。

【0041】

「生理学的に活性」とは、「本発明の有効成分の活性に特徴的なin vivoとin vitroにおける活性を持つもの」を言う。

40

【0042】

「老化の皮膚症状」とは、しわと小じわ、しぼんだ皮膚、薄くなった皮膚、弾力の欠如および/または皮膚の緊張、輝きを無くした肌のくすみ、皮膚の色素沈着、毛髪変色、爪の斑点、紫外線(UV)照射された皮膚の内部劣化などの変容した外観で体系的に現れない皮膚の内部変容などの老化による皮膚および付属器の外観に関連する全ての変容という意味である。

【0043】

「主として含む」とは、植物マトリックスの抽出で得たショ糖エステルが植物抽出物に主として存在する、つまり、重量で50%を超えている、好ましくは80%を超えている、さらに

50

好ましくは90%から100%であるという意味である。

【0044】

「合成シヨ糖エステル」とは、化学的、生化学的、または生物工学的合成により半合成または合成で得るシヨ糖エステルという意味である。

【0045】

本発明の第1の目的は、皮膚、皮膚付属器および粘膜に対して生物学的に活性な有効成分として使用するための、炭素数1~10のアシル基を有し、中程度に有極性から無極性のシヨ糖エステル1つ以上を主として含む、ナス科ホオズキ属 (Solanaceae family, of the Physalis genus) の多くの植物のうちの1種類の植物の萼からの植物抽出物である。

【0046】

好ましくは、本発明は、皮膚、皮膚付属器および粘膜に対し、抗炎症活性以外の生物学的活性を示す有効成分として使用するための、炭素数1~10のアシル基を有し、中程度に有極性から無極性のシヨ糖エステル1つ以上を主として含む、ナス科ホオズキ属 (Solanaceae family, of the Physalis genus) の多くの植物のうちの1種類の植物の萼からの植物抽出物を含む。

【0047】

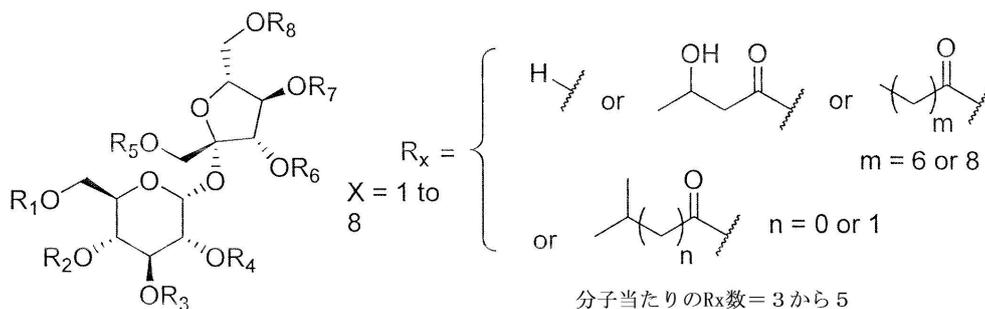
この生物学的活性は、詳細には、皮膚、粘膜および皮膚付属器の見栄えを改善し、内因的および/または外因的皮膚老化の発現を予防し、且つ/或いはこれに抗し、特に線状皮膚萎縮の場合には治癒プロセスを補助し、さらには皮膚、粘膜および/または皮膚付属器の乾燥を予防し、且つ/或いはこれに抗し、また皮膚を色素脱失させる。

【0048】

好ましい実施態様では、炭素数1~10のアシル基を有する1つ以上の中程度に有極性から無極性のシヨ糖エステルは下記の一般式を有する。

【0049】

【化1】



【0050】

一般式で記述される炭素数1~10のアシル基を有し、中程度に有極性から無極性のシヨ糖エステルは、全抽出物の重量で50%から100%、好ましくは全抽出物の80%から100%、さらに好ましくは全抽出物の重量で100%が植物抽出物に存在する。これらの量は、本発明の植物抽出物に存在するシヨ糖エステルの生物学的活性の検査を可能とする実施例1、2、3に基づく。

【0051】

下記の実施例に示すように、炭素数1~10のアシル基を有し、中程度に有極性から無極性のシヨ糖エステルを80%から100%含む植物抽出物を得ることは可能である。また、得られた各種シヨ糖エステルを分離し、上記の単一のシヨ糖エステルから精製された抽出物を得ることも可能である。

【0052】

本発明の好ましい実施態様では、植物抽出物は、下記のシヨ糖エステルを1つ以上含む。

【0053】

- 3-O-(2-メチル-1-オキソプロピル)-D-フルクトフラノシル(1 2)-3,4-ビス(2-メチ

10

20

30

40

50

- ルプロパノエート)-2-デカノエート- -D-グルコピラノシド
- 3-O-(3-メチル-1-オキソブチル)- -D-フルクトフラノシル(1 2)-3,4-ビス(2-メチルプロパノエート)-2-デカノエート- -D-グルコピラノシド
- 3-O-(3-メチル-1-オキソブチル)- -D-フルクトフラノシル(1 2)-3-(2-メチルプロパノエート)-2-デカノエート- -D-グルコピラノシド
- 3-O-(2-メチル-1-オキソプロピル)- -D-フルクトフラノシル(1 2)-3,6-ビス(2-メチルプロパノエート)-2-デカノエート- -D-グルコピラノシド
- 3-O-(2-メチル-1-オキソプロピル)- -D-フルクトフラノシル(1 2)-3-(3-メチルブタノエート)-2-デカノエート- -D-グルコピラノシド
- 3-O-(2-メチル-1-オキソプロピル)- -D-フルクトフラノシル(1 2)-3,4-ビス(2-メチルプロパノエート)-2-デカノエート- -D-グルコピラノシド
- 3-O-(2-メチル-1-オキソプロピル)- -D-フルクトフラノシル(1 2)-3,4-ビス(2-メチルプロパノエート)-2-オクタノエート- -D-グルコピラノシド。

10

【0054】

本発明のさらに好ましい実施態様では、植物抽出物は、下記のシヨ糖エステルを1つ以上含む。

【0055】

- 3-O-(2-メチル-1-オキソプロピル)- -D-フルクトフラノシル(1 2)-3,4-ビス(2-メチルプロパノエート)-2-デカノエート- -D-グルコピラノシド
- 3-O-(3-メチル-1-オキソブチル)- -D-フルクトフラノシル(1 2)-3,4-ビス(2-メチルプロパノエート)-2-デカノエート- -D-グルコピラノシド。

20

【0056】

本発明の好ましい実施態様では、植物抽出物はブドウホオズキ (Physalis peruviana) の萼から得たものである。

【0057】

本発明の第2の目的は、皮膚、皮膚付属器および粘膜に対して生物学的に活性な有効成分として使用するための、本発明の植物抽出物または合成により得た、炭素数1~10のアシル基を有し、中程度に有極性から無極性のシヨ糖エステルに関する。

【0058】

好ましい実施態様では、本発明は、皮膚、皮膚付属器および粘膜に対し、抗炎症活性以外の生物学的活性を示す有効成分として使用するための、本発明の植物抽出物または合成により得た、炭素数1~10のアシル基を有し、中程度に有極性から無極性のシヨ糖エステルに関する。

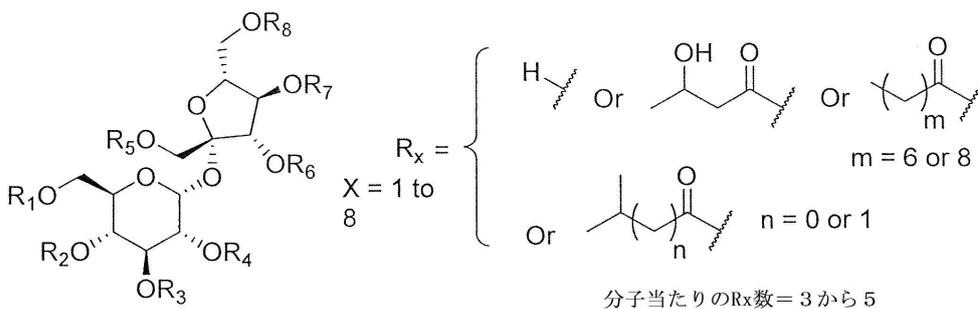
30

【0059】

好ましい実施態様では、炭素数1~10のアシル基を有する中程度に有極性から無極性のシヨ糖エステルは、下記の一般式を有する。

【0060】

【化2】



40

分子当たりのRx数= 3から5

【0061】

事実、化粧品組成物、皮膚科学組成物、栄養化粧品組成物中で活性剤として使用できる、

50

炭素数1~10のアシル基を有し、中程度に有極性から無極性のシヨ糖エステルは、下記のいずれかに由来する。

【0062】

- 炭素数1~10のアシル基を有し、中程度に有極性から無極性のシヨ糖エステルの混合物を主として含む抽出物か、または精製後に、炭素数1~10のアシル基を有し、中程度に有極性から無極性の単一のシヨ糖エステル量を得ることができる、ナス科ホオズキ属 (Solanaceae family, of the Physalis genus) の多くの植物のうちの1種類の植物の萼からの抽出プロセスか、

- 炭素数1~10のアシル基を有し、中程度に有極性から無極性の1つ以上のシヨ糖エステルの合成。当業者は、各種周知の方法により、個々にシヨ糖エステルを合成し、本発明のシヨ糖エステル由来の有効成分を構成することができる。

10

【0063】

炭素数1~10のアシル基を有し、中程度に有極性から無極性のシヨ糖エステルは、炭素数1~10の1つ以上のアシル基とシヨ糖のアシルエステルである。

【0064】

本発明の第3の目的は、有効成分として、本発明の植物抽出物または本発明の合成シヨ糖エステルを適切な生理学的媒体中に含有する、化粧品組成物、皮膚科学組成物、または栄養化粧品組成物に関する。

【0065】

本発明の組成物は、局所投与、経口、直腸、膈内、鼻、耳介、気管支投与、非経口投与に好適な各種の製剤の形態で配合することができる。

20

【0066】

第1の変異形として、各種の製剤が局所投与に適すように構成され、これには、クリーム剤、乳剤、ミルク、軟膏剤、ローション剤、油、グリコール、水アルコールまたは水溶液、散剤、貼付剤、スプレー剤、その他の外用を意図した生成物が含まれる。

【0067】

第2の変異形としては、各種の製剤が経口投与に適すように構成される。シヨ糖エステルを含む植物抽出物は、食品成分または補助食品の形態で実施できる。本発明において、補助食品は、カプセル剤、植物性ソフトカプセルまたはゼラチンソフトカプセルの形態でもよい。かかる補助食品は、植物抽出物の重量で0.01%から100%を含んでもよい。

30

【0068】

化粧品用または皮膚科学用の組成物は局所投与に好適な調製方法で最もよく配合される。

【0069】

食品用途、栄養補助用、またはコスメティック用（化粧品食品 (cosmeto-food) またはニュートリ コスメティック (nutri-cosmetic) またはニュートラコスメティック (nutracosmetic)）としては、組成物は経口投与に好適な調製方法で最もよく配合される。これは賦形剤を含まないでシヨ糖エステルおよび合成シヨ糖エステルを主に含む植物抽出物により完全に構成することも可能であり、上記の一般式に有利に対応する。

【0070】

より詳しくは、本発明の組成物は局所投与することを意図している。従って、この組成物は化粧品的または皮膚科学的に許容可能な、つまり皮膚および皮膚付属器と適合する媒体を含み、全ての化粧品的または皮膚科学的剤型をカバーする。この組成物は本質的にクリーム、油中水型エマルジョンまたは水中油滴型エマルジョンまたは多相エマルジョン、溶液、懸濁液、ゲル、ミルク、ローション、またはパウダーでもあり皮膚、唇および/または皮膚付属器に塗るのに適している。この組成物は溶媒、増粘剤、希釈液、表面活性剤、抗酸化剤、着色剤、防腐剤、香水などの製剤に必要な賦形剤を含む。これらはヘルス生成物および/またはメイクアップ生成物として使用される。

40

【0071】

本発明の組成物は、特にヘアケアで主にシャンプー、コンディショナー、トリートメントローション、スタイリングジェルまたはクリーム、毛髪修復用ローション (hair restruc

50

turing lotion)、マスクなど用の組成物から成る。本発明の化粧品組成物は、後でリンスをする、またはリンスしない適用を含む主にトリートメントであり、シャンプーの形態でも使用される。本発明の組成物は、抗ふけトリートメントで効果的に使用できる。またブラシまたは櫛で塗布する染毛やマスカラの形態でも特にアイラッシュ、アイブロー、または髪に使用できる。

【0072】

加えて本発明の組成物は、適用を意図している分野で普通に使用されている添加物と溶媒、増粘剤、希釈液、抗酸化剤、着色剤、サンスクリーン、人工日焼け用薬剤、顔料、充填剤、防腐剤、香水、臭気吸収剤、医薬または美容活物質、エッセンシャルオイル、ビタミン、必須脂肪酸、表面活性剤、皮膜形成性高分子などの製剤に必要な添加物を含む。

10

【0073】

発行元がThe Personal Care Products Council, Inc., Washington, D.C.であるThe INCI Dictionary & Handbook ("International Nomenclature of Cosmetic Ingredients 13th Ed. 2010)はスキンケア産業で一般的に使用され、かつ本発明の組成物への追加的成分としての使用が好適であり、すべて網羅されていないが幅広い数の美容および医薬成分を記述している。

【0074】

追加的成分のクラスのすべてを網羅している例ではないが次の成分を含む：治癒剤、抗老化剤、抗しわ剤、保湿剤、無痛化薬、抗菌剤、抗寄生虫剤、抗真菌剤、防カビ剤、静真菌剤、殺菌剤、静菌剤、抗菌剤、抗炎症剤、抗そう痒性剤(anti-pruriginous agents)、
 麻酔剤、抗ウイルス剤、角質溶解薬、抗フリーラジカル剤、抗脂漏薬、抗フケ剤、皮膚の分化、増殖、色素沈着の調整剤、浸透推進剤、剥離剤(desquamative agents)、メラニン合成刺激または抑制剤、美白剤(depigmenting, lightening, bleaching)、色素沈着促進剤(propigmenting agent)、人工日焼け用薬剤(self-tanning agents)、NO-シターゼ防止剤、抗酸化剤、フリーラジカルをトラップする薬および/または大気汚染防止、抗糖化剤、安定剤、真皮または表皮組織高分子の合成を刺激する薬および/またはそれらの損傷を防止または抑制する薬、コラーゲン合成を刺激する薬、エラスチン合成を刺激する薬、デコリン合成を刺激する薬、ラミニン合成を刺激する薬、デフェンシン合成を刺激する薬、シャペロン合成を刺激する薬、アクアポリン合成を刺激する薬、ヒアルロン酸合成を刺激する薬、合成を刺激する薬、脂質および角質層(セラミド、脂肪酸など)成分の合成を刺激する薬、コラーゲン分解を抑制する薬、エラスチン分解を抑制する薬、線維芽細胞増殖を刺激する薬、角化細胞増殖を刺激する薬、脂肪細胞増殖を刺激する薬、メラニン細胞増殖を刺激する薬、角化細胞分化を刺激する薬、脂肪細胞分化を刺激する薬、アセチルコリンエステラーゼを抑制する薬、グリコサミノグリカン合成を刺激する薬、DNA補修剤、DNA保護剤、かゆみ止め、敏感肌のトリートメントおよび/またはケアの薬、肌リファーマング剤(skin refirming agents)、抗伸張マーク剤、収斂剤、皮脂産生を制御する薬、真皮弛緩薬、治癒共補助剤(coadjuvant healing agents)、再上皮形成(reepithelialisation)を刺激する薬、共アジュバント再上皮形成剤、サイトカイン成長因子、鎮静剤、抗炎症薬、毛細血管微小循環および循環に作用する薬、血管新生を刺激する薬、血管透過性を抑制する薬、細胞代謝に作用する薬、真皮表皮接合部の改善を意図した薬、
 発毛を誘導する薬、発毛を抑制または遅延させる薬、筋肉弛緩薬、公害防止および/または抗ラジカル剤、脂質分解を刺激する薬、スリミング剤、抗セルライト剤、微小循環に対して作用する薬、細胞の代謝に対して作用する薬、洗浄剤、ヘアスタイリング剤、発毛剤、サンスクリーン、トータルスクリーン、補正剤、洗剤、医薬品、乳化剤、エモリエント剤、有機溶媒、防腐剤、脱臭活物質、生理的に許容可能な培地、界面活性剤、研磨剤、吸収剤、香水などの美学的要素、色素、染料、着色剤、天然着色剤、エッセンシャルオイル、感覚剤、美学的収斂剤、抗アクネ剤、凝集防止剤、消泡剤、抗酸化剤、結合剤、有機添加物、酵素、酵素阻害剤、酵素インダクタ、コエンザイム、キレート剤、植物派生物および植物抽出物、エッセンシャルオイル、海水抽出物、バイオ発酵プロセスおよび/またはバイオ技術から得た薬、ミネラル塩、細胞抽出物、サンスクリーン(紫外線Aおよび/ま

20

30

40

50

たはB光線に対して活性な鉱物または有機紫外線防御剤)、セラミド、ペプチド、緩衝剤、充填剤、キレート剤、化学的添加剤、着色剤、化粧品殺生物剤 (cosmetic biocides)、変性剤、薬用収斂剤、外用鎮痛剤、皮膚形成特性と組成物の持続性を向上するポリマーなどの皮膚形成剤、第四級誘導体、持続性を向上させる薬、透過剤、pH制御因子と調整剤 (例えばトリエタノールアミン)、推進薬、還元剤、封鎖剤、皮膚漂白および/または美白剤、皮膚コンディショニング剤 (多種多様なものと閉塞剤 (occlusive) を含む湿潤剤)、湿度を維持する物質、アルファヒドロキシ酸、ベータヒドロキシ酸、湿潤剤、表皮の加水分解酵素、無痛化薬および/または修復剤、肌処理剤、抗しわ剤、目のたるみを少なくする、または処理する薬、剥離剤、増粘剤、柔軟剤、ゲルポリマ、ビタミンおよびその派生物、湿潤剤、ピーリング薬剤、無痛化薬、皮膚の治療剤、リグナン、防腐剤 (つまり

10

【0075】

加えて、これらの追加的成分の性質は本発明の活物質の便益に対して副作用と持つことはない。これらの追加的成分は例えば植物抽出物またはバイオ発酵のプロセスから得た天然または合成のものである。The INCI Dictionary & Handbookには追加的な例が記載されている。

20

【0076】

かかる追加的成分は下記から成る群から選択される: アミノ糖、グルコサミン、D-グルコサミン、N アセチルグルコサミン、N-アセチル-D-グルコサミン、マンノサミン、N アセチル D マンノサミン、ガラクトサミン、N アセチルガラクトサミン、ビタミンB3およびその派生物、ナイアシンアミド、デヒドロ酢酸ナトリウム、デヒドロ酢酸およびその派生物、植物ステロール、サルチル酸を含む、ヘキサミジン、アルカノイルジヒドロキシプロリンを含む、大豆の抽出物およびその派生物、エクオール、イソフラボン類、フラボノイド、フィタントリオール、ファルネソール、ゲラニオール、ピサボロール、ペプチドおよびその派生物、ジ 、トリ 、テトラ 、ペンタ 、およびヘキサペプチドおよびその派生物、lys-thr-thr-lys-ser、パルミトイル-lys-thr-thr-lys-ser、カルノシン、N-アシルアミノ酸を含む、レチノイド、レチニルプロピオナート、レチノール、レチニルパルミタート、酢酸レチニル、レチナール、レチノイン酸、水溶性ビタミン、アスコルビン酸、ビタミンC、アスコルビルグルコシド、パルミチン酸アスコルビル、リン酸アスコルビルマグネシウム、リン酸アスコルビルナトリウム、ビタミンおよびその塩と派生物、プロビタミンおよびその塩と派生物、エチルパンテノール、ビタミンBおよびその派生物、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB6、ビタミンB12、ビタミンKおよびその派生物、パントテン酸およびその派生物、パントテニルエチルエーテル、パンテノールおよびその派生物、エチルパンテノール、デクспанテノール、ピオチン、アミノ酸およびその塩と派生物、水溶性アミノ酸、アスパラギン、アラニン、グルタミン酸、水不溶性ビタミン、ビタ

30

40

50

、アスコルビルグルコシド、ピリドキシン、アロエベラ、テルペンアルコール、アラントイン、ピサボロール、グリチルリチン酸2カリウム、グリセロール酸、ソルベトール酸、ペンタエリトリトール酸、ピロリドン酸およびその塩、ジヒドロキシアセトン、エリトルロース、グリセルアルデヒド、タルタルアルデヒド、クローブ エッセンシャルオイル、メンソール、カンファー、ユーカリ精油、オイゲノール、乳酸メンチルエステル、ハマメリス水 (witch hazel distillate)、エイコセン・ビニルピロリドン共重合体、ヨードプロピルブチルカルバメート (iodopropyl butylcarbamate)、多糖、必須脂肪酸、サリチル酸塩、グリシルレチン酸、カロチノイド、セラミドおよび擬似セラミド、複雑な脂質、シアバター (Shea Butter) のような自然起源の一般的なオイル、アンズの油、月見草油、スモモの油、ヤシの油、monoi oil (ココナッツオイル)、カカイナッツオイル、ハイドロキノン、1'HEPES、プロシステイン、0 オクタノイル 6 D マルトース、メチルグリシン二酢酸の二ナトリウム塩、ジドスゲニンおよびDHEAの派生物などのステロイド、デヒドロエピアンドロステロン (DHEA) および / または前駆体または化学的或いは生物学的派生物、N - エチルオキシカルボニル - 4 - パラ - アミノフェノール、ブルーベリー抽出物、植物ホルモン、Saccharomyces cerevisiae酵母エキス、藻エキス、大豆の抽出物、ルピン、メーズ (maize) および / または豆、アルベリンおよびその塩、特に、クエン酸アルベリン、ナギイカダおよびセイヨウトチノキの抽出物ならびにこれらの組合せ、メタプロロテイナーゼ阻害薬、Schinus molle抽出物。

10

【0077】

あらゆる状況において、当業者は、本発明の組成物から求めた有益な特性に悪影響を与えない方法で、これらの添加物およびその比率を確実に選択しなければならない。

20

【0078】

本発明の好ましい実施態様では、化粧品組成物、皮膚科学組成物、または栄養化粧品組成物は、有効成分組成物の全重量当たり重量で 10^{-6} ~ 50%を含む。

【0079】

有効成分または植物抽出物の有効量は、求める結果、すなわち、保湿や表皮のバリアー機能を改善し、皮膚と粘膜の乾燥を予防し、且つ / 或いはこれに抗し、皮膚老化の発現に抗し、治癒プロセスを補助し、皮膚の色素を脱失するのに必要な量に対応する。抗炎症活性は、特許請求の範囲の皮膚科学的作用範囲から除外される。

【0080】

有利な実施態様では、本発明の組成物における有効量または有効成分含量は組成物の全重量当たり重量で 10^{-6} ~ 25%であり、より好ましくは組成物の全重量当たり重量で 10^{-6} ~ 10%である。

30

【0081】

指示有効量は実施例21 ~ 23に正確に与えられた結果に基づく。従って有効量は抽出物のショ糖エステル濃度と、必要の場合に実施した希釈とに従う上記の比率において変化する。

【0082】

より有利な実施態様では、化粧品組成物は局所投与に適しており、主にオイル、水アルコールまたは水溶液の形態で、或いは油中水型エマルジョンまたは水中油滴型エマルジョンまたは多相エマルジョンの形態で、或いはクリーム剤、懸濁液、または散剤の形態で存在し、かかる組成物はほぼ液体または固体であっても良く、それはクリーム剤、ローション剤、ミルク、シャンプー、美容液 (serum)、軟膏剤、ゲル、ペースト、泡沫 (foam)、或いはスティックのような形態であっても良い。

40

【0083】

本発明の第4の目的は、皮膚、粘膜または皮膚付属器の見栄えを改善し、皮膚と粘膜の乾燥を予防し、且つ / 或いはこれに抗し、老化および / または光老化の皮膚兆候を予防し、且つ / 或いはこれに抗し、弾力の喪失および皮膚の張りに抗し、色素を脱失する美容処理プロセスであり、上記の本発明の化粧品組成物の有効量を皮膚および / または髪の毛の表面に適用することを含むプロセスである。

【0084】

50

本発明の化粧品組成物の色素脱失作用は、メラニン産生に対して抑制効果を有することに留意されたい。

【0085】

本発明の第5の目的は、皮膚、粘膜または皮膚付属器の病理学的乾燥状態に関する皮膚科学的処理に使用して治癒を促進することを目的とした、単独または他の有効成分との併用における、本発明の植物抽出物または本発明の合成のシヨ糖エステル⁶の有効量である。

【0086】

好ましい実施態様では、本発明は、抗炎症活性を例外として、皮膚、粘膜または皮膚付属器の病理学的乾燥状態に関する皮膚科学的処理に使用して治癒を促進することを目的とした、単独または他の有効成分との併用における、本発明の植物抽出物または本発明の合成のシヨ糖エステル⁶の有効量を含む。

10

【0087】

また、有効量は実施例21~23において正確に得た結果に基づいている。主としてコラーゲンIII、コラーゲンIV、フィブリリン1を基にした試験は組成物の全重量当たり重量で少なくとも 10^{-6} %の有効量の同定を可能にする。

【0088】

本発明の第6の目的は、皮膚、粘膜または皮膚付属器の見栄えを改善し、皮膚と粘膜の乾燥を予防し、且つ/或いはこれに抗し、老化および/または光老化の皮膚兆候を予防し、且つ/或いはこれに抗すことを意図して摂取される栄養化粧品組成物を調製するための、単独または他の有効成分との併用における、本発明の植物抽出物または本発明の合成のシヨ糖エステル⁶の有効量の使用である。

20

【0089】

最後に、本発明の第7の目的は、1つ以上のシヨ糖エステルを含む植物抽出物または有効成分を調製するプロセスである。

【0090】

抽出物は植物の全体または植物の特定部分(葉、種、茎、根、萼、花卉、果実など)を使用して実施する。

【0091】

具体的には、本発明はSolanaceae科、Physalis属の、好ましくはPeruviana種の多くの植物の1つの萼を使用する。

30

【0092】

当業者に周知の抽出および生成方法を使用して皮膚、皮膚付属器および粘膜に対して生物学的活性を有する前記のシヨ糖エステルを含む本発明の植物抽出物を調製する。

【0093】

本発明の植物抽出物についての調製プロセスは下記に詳しく記述する。

【0094】

植物およびその部分は野から摘み、慣行栽培、養液栽培、水耕栽培にて採取する。

【0095】

すべて網羅されていないが、当業者に周知の主として有機溶媒を使用して、多少便宜に配慮した植物抽出物から粗抽出液を調製するプロセスは個体/液体の植物抽出プロセスで実施される。抽出プロセスはバッチ、半連続、連続での単一接点(single-contact)であり得る。このプロセスは並流または向流である複数段をも含む。このことはパルス化または加圧下での超音波、マイクロ波、熱磁気誘導、電場による支援で行われる。

40

【0096】

植物マトリックスは事前の乾燥と、粉碎または凍結粉碎、flash detente(瞬間開放)、さらにはインスタント調製圧力降下(instant controlled pressure drop)で調製することができる。また、植物マトリックスは、目的の分子を最大限に放出するため、酵素によっても処理できる。

【0097】

シヨ糖エステルの抽出には、下記の溶媒を使用することができる。

50

【 0 0 9 8 】

- 炭化水素類で、分枝型か直鎖型かで、ヘキサン、シクロヘキサンなど芳香か環式の脂肪族
- ジクロロエチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類
- メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノールなどのアルコール類
- エチレングリコール、プロピレングリコール、1,2-および1,3-プロパンジオール、ブタンジオール、グリセロールなどのグリコール類
- アセトン、メチルイソブチルケトン、メチルエチルケトンなどのケトン類
- ジエチルエーテル、メチルtert-ブチルエーテル、エチルtert-ブチルエーテル、テトラヒドロフラン (THF)、メチルTHFなどの脂肪族または環状エーテル類
- 2-メトキシ-1-メチルエチルアセタート、2-(2-ブトキシエトキシ)エタノールおよびそのアセタートなどのグリコールエーテル類
- 酢酸エチル、乳酸エチル、プロピオン酸エチル、オレイン酸エチル、ステアリン酸メチル、オレイン酸オレインなどのエステル類で、酸は1つ以上の長鎖を有し、アルコールは1つ以上の長鎖を有する
- 1-(4-スルホブチルエーテル)-3-メチルイミダゾリウム硫酸水素塩、1-エチル-3-メチルイミダゾリウムビス(トリフルオロメタンスルホニル)イミドなどのイオン液体
- 共溶媒が有無での二酸化炭素などの超臨界流体
- 植物油などのagro-溶媒、リモネンまたはピネンなどのテルペン
- また、これら溶媒の組合せ。

【 0 0 9 9 】

得られた抽出物は、主に水-水抽出、遠心分離、(例えば、活性炭または漂白粘土での脱色を用いる)吸着、昇華、結晶化、主に液膜かき取型の蒸留、遠心分子蒸留、さらには膜質での濾過などの種々の方法で精製できる。

【 0 1 0 0 】

使用する蒸留技術に基づき、必要であれば濾過および脱溶媒和ステップを実施する。

【 0 1 0 1 】

好ましい実施態様では、粗植物抽出液は次の溶液の1つを用いて得られる。つまりアルコールが例えばエタノール、植物油、好ましくは精製またはエステル様カプリル酸/グリセリンカプリン酸などの脂肪族アルコールであり、アルコールの共溶媒を添加したシクロヘキサン、酢酸エチル、超臨界二酸化炭素である。

【 0 1 0 2 】

よって、本発明の植物抽出物の調製プロセスは下記のステップを含む。

【 0 1 0 3 】

- 植物の部分の乾燥、
- 粉砕、
- 適切な有機溶媒を用いた抽出と下記の、
- 必要であれば脱溶媒和と下記の、
- 必要であれば1つ以上の適切な方法での精製。

【 0 1 0 4 】

好ましい実施態様では本発明のプロセスは下記のステップを含む。

【 0 1 0 5 】

- 植物の部分の乾燥、
- 凍結粉砕、
- アルコール、植物油、またはエステルなどの共溶媒の有無での酢酸エチル、クロヘキサン、エタノール、超臨界二酸化炭素を用いた抽出、
- 結晶化または吸着による精製、
- 必要であれば濾過、
- 必要であれば脱溶媒和。

【図面の簡単な説明】

【0106】

【図1】図1Aは、ウチュバ抽出物の細胞毒性を示す。図1Bは、ウチュバ抽出物によるコラーゲンIの発現の再確立を示す。

【図2】図2Aは、コラーゲンIの産生に対するウチュバ抽出物の効果を示す。図2Bは、コラーゲンIIIの産生に対するウチュバ抽出物の効果を示す。

【図3】図3Aは、ウチュバ抽出物によるコラーゲンIV発現の大幅な上昇を示す。図3Bは、ウチュバ抽出物によるエラスチン発現の再確立を示す。

【図4】図4Aは、ウチュバ抽出物によるメチル化の割合の低下を示す。図4Bは、ウチュバ抽出物によるフィブリリン1の発現の再確立を示す。

【図5】図5Aは、フィラグリンの免疫標識の結果を示す。図5Bは、インボルクリンの免疫標識の結果を示す。

【図6】ウチュバ抽出物による皮膚の色素脱失作用を示す試験の結果を示す。

【実施例】

【0107】

本発明の別の利点と特徴は図を用いて示し、全てを網羅していないが実施例により理解が深まるであろう。

【0108】

実施例1: Physalis peruvianaの萼からの植物抽出物の調製

事前に果実から分離させて乾燥させたPhysalis peruvianaの萼は、1 mmグリッド付きのパウダーを造る造粒ミルで破碎する。粒子サイズは、ほぼ500 μmである。

得られたパウダー(50 g)はセルロースシンブル(cellulose thimble)に置き、次にソックスレー抽出器に置く。

抽出に使用した溶媒はエタノール96%(50 ml)であり、抽出サイクルは約20回である。溶媒媒質中の抽出物はRotavapor(ロータリーエバポレーター)で蒸発させ、媒質を除去する。

これにより、最終的に57%のショ糖エステルを含むPhysalis peruvianaの萼から11.0 gの抽出物が取れる。

【0109】

実施例2: Physalis peruvianaの萼からの植物抽出物の調製

事前に果実から分離させて乾燥させたPhysalis peruvianaの萼は、1 mmグリッド付きのパウダーを造る造粒ミルで破碎する。粒子サイズは、ほぼ500 μmとする。

得られたパウダー(50 g)はセルロースシンブル(cellulose thimble)に置き、次にソックスレー抽出器に置く。

抽出に使用した溶媒は酢酸エチルであり、抽出サイクルは約20回である。溶媒媒質中で得られた抽出物は水を用いてオンカラム液-液抽出法(on-column liquid-liquid extraction)で温度を20 ~ 65 にして向流抽出で精製し、水溶性分子を除去する。次に酢酸エチルと抽出物を含む有機相はRotavaporで蒸発させて溶媒を除去する。

洗浄された抽出物はポリフェノール、ウィタノリド(withanolides)、遊離糖類が無い状態とする。

これにより、最終的に89.0%のショ糖エステルを含むPhysalis peruvianaの萼から6.2 gの抽出物が取れる。

【0110】

実施例3: Physalis peruvianaの萼からの植物抽出物の調製

事前に果実から分離させて乾燥させたPhysalis peruvianaの萼は1 mmグリッド付きのパウダーを造る造粒ミルで破碎する。粒子サイズはほぼ500 μmとする。得られたパウダー(50 g)は超臨界流体抽出器に置いた。

抽出に使用した溶媒はエタノールなどの脂肪族アルコールの共溶媒を添加した二酸化炭素である。

抽出パラメータは、圧力75 bars ~ 200 bars、温度35 ~ 50、CO₂流量2 kg/h ~ 20 kg/h

10

20

30

40

50

、CO₂に対して1%~5%エタノールである。

溶媒媒質中で得られた抽出物は活性炭または漂白粘土で脱色、冷間結晶化、さらに濾過して蒸発させる。

これにより、最終的にPhysalis peruvianaの萼から87.6%のショ糖エステルを含む85.5gの抽出物が取れる。

必要であれば、99.9%のクロマトグラフィー純度でPhysalis peruvianaの萼の抽出物を得るために、こうして得られた抽出物液膜かき取型、または遠心分子蒸留によって精製することができる。

【0111】

実施例4: Physalis peruvianaの萼から得た植物抽出物のショ糖エステルの精製

10

実施例1で得られたPhysalis (1 g)の萼から得られる抽出物を、6 mlのCH₃CN/H₂O溶媒混合液に溶解する。10 mLの同じCH₃CN/H₂O混合液1:1で洗浄された固相抽出(SPE)(C18、10g)により、シンプル(thimble)で濾過する。

得られた溶出液は充填剤溶媒に関連し、画分1(300 mg)を得る。

続けて荷重のかかったシンプルはCH₃CN/H₂O溶媒グラジエント7:3(20 mL)および1:0(20 mL)に基づき順次溶出して画分2(500 mg)と画分3(100 mg)を得る。

画分1、画分2、画分3はHPLC-DAD-DEDLで分析し、初期の抽出物のクロマトグラムと比較する。

画分1はポリフェノール化合物、ウィタノリド、いくつかのフィサリン(physaline)、糖などの極性化合物を含む。

20

画分2はショ糖エステルを含む。

画分3は脂質画分である。

画分2(500 mg)は、H₂O/CH₃CN溶媒グラジエント(35分で3:7から0:1へ)で分取HPLC(C18、50x150 mm、5 μm)による画分を行い、画分を得る。

- 画分IIIb(4分~14分の溶出)
- 画分I(14分~18分の溶出、230mg)
- 画分II(18分~25分の溶出、200mg)
- 画分IIIa(25分~35分の間)

画分IIIaおよびIIIbの画分を合わせ、画分IIIの画分(50 mg)を得る。

得られた画分の成分は下記の通りである。

30

画分I:

化合物1、3-O-(2-メチル-1-オキソプロピル)-D-フルクトフラノシル(1 2)-3,4-ビス(2-メチルプロパノエート)-2-デカノエート-D-グルコピラノシド

画分II:

化合物2、3-O-(3-メチル-1-オキソブチル)-D-フルクトフラノシル(1 2)-3,4-ビス(2-メチルプロパノエート)-2-デカノエート-D-グルコピラノシド

画分III: 前記以外の化合物で主に下記を含むショ糖エステル

- 3-O-(3-メチル-1-オキソブチル)-D-フルクトフラノシル(1 2)-3-(2-メチルプロパノエート)-2-デカノエート-D-グルコピラノシド
- 3-O-(2-メチル-1-オキソプロピル)-D-フルクトフラノシル(1 2)-3,6-ビス(2-メチルプロパノエート)-2-デカノエート-D-グルコピラノシド
- 3-O-(2-メチル-1-オキソプロピル)-D-フルクトフラノシル(1 2)-3-(3-メチルブタノエート)-2-デカノエート-D-グルコピラノシド
- 3-O-(2-メチル-1-オキソプロピル)-D-フルクトフラノシル(1 2)-3,4-ビス(2-メチルプロパノエート)-2-ノナノエート-D-グルコピラノシド
- 3-O-(2-メチル-1-オキソプロピル)-D-フルクトフラノシル(1 2)-3,4-ビス(2-メチルプロパノエート)-2-オクタノエート-D-グルコピラノシド。

40

【0112】

実施例5: 皮膚細胞の発現プロファイルに対する画分I、II、IIIの効果

画分I、II、IIIの効果は正常ヒト表皮角化細胞およびヒト真皮線維芽細胞のモデルに対す

50

るトランスクリプトーム分析で研究されている。この包括的な転写物の発現分析をAffymetrix GeneAtlas (商標) プラットフォームおよび36,000の転写物と変異体を含むU219「完全ヒトのトランスクリプトーム」チップを使用して、4時間から24時間のインキュベーション後に実施した。

【0113】

【表1】

1. 生体モデル

正常ヒト表皮角化細胞 (NHEK)

- 細胞型: 正常ヒト表皮角化細胞 (NHEK)
- 培養条件: 37° C, 5% CO₂
- 培地: 表皮成長因子 (EGF) 0.25ng/ml、脳下垂体抽出物 (PE) 25 μg/ml、ゲンタマイシン 25 μg/ml を補充した Keratinocyte-SFM
- 試験培地: ゲンタマイシン 25 μg/ml を補充した Keratinocyte-SFM

10

正常ヒト真皮線維芽細胞 (NHDF)

- 細胞型: 正常ヒト真皮線維芽細胞 (NHDF)
- 培養条件: 37° C, 5% CO₂
- 培地: レグルタミン 2 mM、ペニシリン 50 U/ml、ネーストレプトマイシン 50 μg/ml、ウシ胎児血清 (FCS) 10% を補充した DMEM
- 試験培地: レグルタミン 2 mM、ペニシリン 50 U/ml、ネーストレプトマイシン 50 μg/ml、FCS 1% を補充した DMEM

20

【0114】

2. 試験された化合物

【0115】

【表2】

試験された化合物	外見/貯蔵	貯蔵液	試験された濃度
画分 I	・スラリー ・ +4° C で貯蔵	DMSO 中での 50mg/ml	0.8 μg/ml
画分 II	・スラリー ・ +4° C で貯蔵	DMSO 中での 50mg/ml	0.8 μg/ml
画分 III	・スラリー ・ +4° C で貯蔵	DMSO 中での 50mg/ml	0.8 μg/ml

30

40

【0116】

3. 培養と処理

細胞は24時間、培地に導入して栽培し、さらに24時間、試験培地でインキュベーションした。続けて培地は試験化合物の含有または未含有 (対照) の試験培地で取り替えて、細胞を4時間または24時間インキュベーションした。全ての条件はn=3で完了した。インキュベーション後に培養上清を除去し、細胞層をPBS溶液で洗浄した。プレートは直ちに -80 で凍結乾燥した。

【0117】

4. Affymetrix

U219チップの使用についての原則 - ディファレンシャル発現分析

50

- ターゲットの調製

各サンプルの全RNAはサプライヤーの勧めるプロトコールに基づくTriPure Isolation Reagentを使用して抽出した。RNAの質と量はキャピラリー電気泳動装置 (Bioanalyzer 2100, Agilent) で評価した。

RNA増幅法およびビオチン化RNA類似体 (RNAa) の合成は「GeneChip 3' IVT Express」キット (Affymetrix) を使用して実行した。一本鎖の相補的DNA (cDNA) はoligo(dT)存在下における全RNAの逆転写で合成した。DNAポリメラーゼの作用により二本鎖cDNA (dsDNA) を合成した。続けてビオチン化RNAをビオチン化リボヌクレオチド類似体存在下でcDNAから合成した。塩、酵素、遊離ヌクレオチドを除去する磁気ビーズをベースにした精製ステージ後、ビオチン化RNAは100-120ヌクレオチドをピークとする35から200ヌクレオチドのフラグメントに加水分解された (フラグメント化標的)。

フラグメンテーション前後に合成ビオチン化RNAの品質管理はキャピラリー電気泳動装置 (Bioanalyzer 2100, Agilent) で実施した。

- マーキングおよびハイブリダイゼーション

このステップは「3' IVTアレイ用のGeneAtlas (商標) ハイブリダイゼーション、洗浄、染色キット」 (Affymetrix) を用いて実施した。

Affymetrix U219チップ (36,000の転写物と変異体) 上でのフラグメント化RNAaのハイブリダイゼーションは45分で20時間、「GeneAtlas fluidics station」ハイブリダイゼーションステーション (Affymetrix) 上で実施した。ハイブリダイゼーション (BioB、BioC、BioD) のコントロールプローブおよびpolyA RNAコントロール (Lys、Phe、Dap) をハイブリダイゼーション中に追加した。フィコエリスリンと直接的に結合するハイブリダイゼーションのコントロールプローブはマーキングステップがどこであれ、ハイブリダイゼーションの有効性を確かなものにする。polyA RNAコントロールを使用してマーキングの質を検証する。

次に、マーキングは3つのステップで実施した (中間洗浄ステップも) :

- ストレプトアビジン複合体の固定 - チップ上のハイブリダイズされたRNAaにおけるフィコエリトリン
- ビオチンと結合した抗ストレプトアビジン抗体によるこの複合体の認識
- 信号の増幅を可能にするフィコエリトリンと結合したストレプトアビジンの添加。

【0118】

5 データプロセス

生のデータをMicrosoft Excelで転送および処理した。

グループ間比較は対応のない相対学生t検定 (unpaired bilateral Student's t-test) を使用して実施した。統計分析はn=5として解釈するが、n<5の場合は計算データを参考目的でのみ提供している。

用いられる式:

【表3】

平均値の標準誤差: $SE_{ave} = \text{標準偏差 (Sd)} / \sqrt{n}$

平均値の標準誤差 (SE ave) は実際の母集団の平均値に関してサンプルの平均値の偏差を表す。SE aveはサンプルサイズの平方根でSdを割って求める。

生存率: $\text{生存率 (\%)} = (DO_{\text{compound}} / DO_{\text{control}}) \times 100$

【0119】

6 結果

「倍変化」の分析をエクセルで実施して、それに続けてIngenuity IPA (相互パスウェイ

10

20

30

40

50

分析、Interactive Pathway Analysis) ソフトウェアでの機能分析を行った。この分析では生物機能(プロセス)において有意に調整された遺伝子をまとめて扱うことができる。

線維芽細胞(NHDF)の分析

画分(I、II、III)で処理された線維芽細胞のトランスクリプトームプロファイル分析によれば、特に画分IIにより、遺伝子の発現調節を示した。

画分IIの場合、フィブリリン1(FBN1)のコード遺伝子の発現調節は非常に興味深い。事実、この遺伝子の発現は4時間(3.27倍)、24時間(8.24倍)のように経時的に有意に高くなる。

フィブリリン1(細胞外マトリックスの主成分)は線維芽細胞によって分泌され、ミクロフィブリルの重要な成分を構成する。これは主としてエラスチン繊維の集合に関与し、皮膚の弾性において重要な役割をする。

10

角化細胞(NHEK)の分析

3つの画分(I、II、III)で処理された角化細胞のトランスクリプトームプロファイル分析によれば特に画分IIIにより遺伝子の発現調節を示した。

3つの画分(I、II、III)による角化細胞の処理は角化細胞の分化タンパク質のコード遺伝子、KRT1、IVL、DSG1、DSC1、SPRR2A、SPRR2E、SPRR1A、SPRR2D、CALML5、SBSN、KRTDAPについて発現抑制を誘発した。

この効果により、画分I、II、IIIが角化細胞に対する抗分化効果の存在推定を可能にする。

下記の実施例では、本発明の有効成分は組成物の質量での 10^{-6} ~3%範囲の有効量において各種組成物に存在する。

20

【0120】

実施例6: 経口投与する組成物

シヨ糖エステルを含むPhysalis peruvianaの萼から得られる抽出物は経口用組成物に組み込まれ、毎日50 mgから200 mgの抽出物の投与を可能とする。

1) ソフトカプセルの形態の抗老化用組成物

- 実施例に従ったPhysalis peruvianaの萼から得られる抽出物1 または 2または3
30 mg
- アルガン油 60 mg
- 不飽和物中のリッチな麦芽油 300 mg
- ビタミンB群(B1, B2, B3, B5, B6, B9, B12) RDAの100%の適量 (q.s.f)
- トコトリエノール RDAの50%の適量 (q.s.f)
- ビタミンE
- ミツロウ
- 大豆レシチン
- 食用ゼラチン
- グリセリン ソフトカプセル1個となるように適量 (q.s.f)

30

この組成物は、1日当たり4~6カプセル投与される。

2) 錠剤の形態の肌の張り用組成物

40

- 実施例に従ったPhysalis peruvianaの萼から得られる抽出物1または2または3
25 mg
- 硫化アミノ酸が豊富な穀物抽出物(麦、ソバ、米、キノア) 200 mg
- キレート形態の亜鉛 RDAの100%の適量 (q.s.f)
- ビタミンC RDAの50%の適量 (q.s.f)
- 魚軟骨由来のグリコサミノグリカン 200 mg
- グルシデックス (Glucidex) IT 19 (圧縮剤) 1錠が800 mgとなるように適量

50

この組成物は毎日5~8タブレット投与される。

3) チョコレート風味のシリアルバーでの実施例

- 実施例に従った *Physalis peruviana* の萼から得られる抽出物1 または 2または3
200 mg
- リコペン 6 mg
- アスタキサンチン 4 mg
- フコキサンチン 4 mg
- マイクロカプセル剤中のルテイン 4 mg
- マイクロカプセル化トコトリエノール ビタミンEのRDAの100%の適量 (q
.s.f) 10
- ダークチョコレート、オリゴフルクトース、糖、フルクトースシロップ、
脂肪分低減ココアパウダー、クランチシリアル、
脱脂粉乳、アーモンド、グリセロール、ソルベトール、
植物油、グリコースシロップ、香料、
加糖練乳、大豆レシチン、脂肪酸のモノおよび
ジグリセリド、カラメルシロップ、
マルトデキストリン、塩、ソルビン酸カリウム、
トコフェロール バー1個が50 gとなるように適量
(q.s.f) 20

この組成物は1日1回投与される。

4) バニラ風味の乳飲料における実施例

- 実施例に従った *Physalis peruviana* の萼から得られる抽出物1 または 2または3
200 mg
- ポリフェノールが豊富な緑茶の抽出物 100 mg
- ビタミンB群 (B1, B2, B3, B5, B6, B9, B12) RDAの100%の適量 (q.s.f)
- 亜鉛、マグネシウム、セレンウム RDAの100%の適量 (q.s.f)
- 脱脂粉乳、香料、フルクトース、卵白、
使用済みバニラシード、糖、キャラメル、カロテン、
キサンタンゴム、アスパルテーム、アセスルファムカリウム、
大豆レシチン、マルトデキストリン 小袋 1袋が30 gとなるように適
量 (q.s.f) 30

この組成物は1日1回投与される。

【 0 1 2 1 】

実施例7: 化粧品組成物 顔用デイクリーム

【 0 1 2 2 】

【表4】

INCI名	質量での%
フェーズA	
水	適量 (q. s. f) 100
カルボマー	0.25
フェーズB	
ブタンジオール	2.00
フェノキシエタノール	qs
フェーズC	
ステアレス-2	0.40
ステアレス-10	1.20
セテアリアルアルコールおよびリン酸ジセチルおよびセテス-10 リン酸	4.00
セテアリアルアルコール	1.00
アゾン	2.50
シクロヘキサシロキサンおよびシクロペンタシロキサン	2.00
コハク酸ジエチルヘキシル	7.00
フェーズD	
ソルビン酸カリウム	0.10
フェーズE	
水	3.00
水酸化ナトリウム	0.40
フェーズF	
(実施例1、2、または3の)本発明の有効成分	2.00

10

20

30

【0123】

40

手順:

フェーズAを量り、攪拌せず30分間膨張させる。フェーズAを湯煎で75 に加熱する。フェーズBを量り、混合する。フェーズCを量って湯煎で75 に加熱する。フェーズBをフェーズAに添加する。よく混合する。連続攪拌中にフェーズA+BにフェーズCを注入する。よく均質化させる。即座に、フェーズDを添加する。フェーズEを添加して、よく均質化する。フェーズFを添加して、よく均質化する。

【0124】

実施例8: 化粧品組成物 顔用ジェルフォーム

【0125】

【表 5】

INCI 名	質量での%
フェーズ A	
水	適量 (q. s. f) 100
セチルヒドロキシエチルセルロース	0.30
フェーズ B	
カルボマー	0.40
水	20.00
フェーズ C	
グリセリン	3.00
エチルおよびメチルおよびプロピルパラペン	0.30
フェーズ D	
ミネラルオイル	4.00
ポリソルベート 20	1.00
炭素数 12~15 の安息香酸アルキル	2.00
炭素数 10~30 のアルキルアクリレートクロスポリマー	0.30
フェーズ E	
ソルビン酸カリウム	0.10
フェーズ F	
水	5.00
水酸化ナトリウム	0.50
フェーズ G	
(実施例 1、2、または 3 の) 本発明の有効成分	1.00

10

20

30

【0126】

手順:

連続攪拌中にフェーズAを分散させる。水中にUltrez 10を散らし、30分間膨張させる。完全溶解するまでフェーズCを加熱する。フェーズAとフェーズBとを混合する。フェーズCをフェーズ(B+A)に添加する。連続攪拌中にフェーズDをフェーズ(A+B+C)に添加する。フェーズEを添加する。フェーズFにより中和する。フェーズGを添加して混合する。

40

【0127】

実施例9: 化粧品組成物 美容液 (serum) 型

【0128】

【表 6】

INCI 名	質量での%
フェーズ A	
水	適量 (q. s. f) 100
カルボマー	0.25
フェーズ B	
ブタンジオール	3.00
フェノキシエタノール	0.20
フェーズ C	
ポリソルベート 20	0.50
エチルヘキサン酸セテアリル	2.00
ミリスチン酸 PPG-3 ベンジルエーテル	0.50
アクリレート/炭素数10~30のアルキルアクリレートク ロスポリマー	0.20
シクロペンタシロキサン	1.00
フェーズ D	
ソルビン酸カリウム	0.10
フェーズ E	
水酸化ナトリウム	0.45
水	4.00
フェーズ F	
(実施例 1、2、または 3 の) 本発明の有効成分	1.00
フェーズ G	
香料	0.10

10

20

30

【 0 1 2 9 】

手順:

水中にカルボマーを散らし、15分間膨張させる。フェーズBを混合する。フェーズBをフェーズAに注入して均質化する。続けてフェーズCを量り、連続攪拌中にフェーズA+Bに添加する。1時間膨張させる。即座に、連続攪拌中に以前のフェーズにフェーズDを添加する。フェーズEにより中和する。攪拌する。

続けてフェーズFを添加する。連続攪拌中に少なくとも1時間、これを混合してからフェーズGを添加する。よく混合する。

40

【 0 1 3 0 】

実施例10: 顔用ナイトクリーム

【 0 1 3 1 】

【表7】

INCI名	質量での%
フェーズA	
水	適量 (q. s. f) 100
カルボマー	0.40
フェーズB	
グリセリン	3.00
エチルおよびメチルおよびプロピルパラペン	0.30
フェーズC	
セテアリルアルコールおよびポリソルベート 20	1.0
セテアリルアルコール	1.00
ミリスチン酸 PPG-3 ベンジルエーテル	1.0
ジメチコン	2.50
イソノナン酸イソトリデシル	5.00
フェーズD	
ソルビン酸カリウム	0.10
フェーズE	
水酸化ナトリウム	0.40
水	4.00
フェーズF	
(実施例1、2、または3の) 本発明の有効成分	1.00
フェーズG	
香料	0.10

10

20

30

【0132】

手順:

フェーズAを量り、30分間膨張させる。フェーズAを湯煎で75 に加熱する。完全可溶化までフェーズBを加熱する。フェーズBをフェーズAに添加する。フェーズCを湯煎で75 に加熱する。連続攪拌中にフェーズA+BにフェーズCを添加する。フェーズDを添加してよく均質化させる。55 でフェーズEにより中和する。まずフェーズFを、次にフェーズGを添加してよく均質化させる。

40

【0133】

実施例11: ボディークリーム

【0134】

【表 8】

INCI 名	質量での%
フェーズ A	
水	適量 (q. s. f) 100
カルボマー	0.4
フェーズ B	
グリセリン	3.00
エチルおよびメチルおよびプロピルパラペン	0.30
フェーズ C	
ソルビタンステアレート	2.00
ミネラルオイル	4.00
アジピン酸 PPG-3 ベンジルエーテル	1.00
G グリセリルステアレートおよび PEG100 ステアレート	3.00
フェーズ D	
ソルビン酸カリウム	0.10
フェーズ E	
水酸化ナトリウム	0.40
水	4.00
フェーズ F	
(実施例 1、2、または 3 の) 本発明の有効成分	2.00
フェーズ G	
香料	0.10

10

20

30

【 0 1 3 5 】

手順:

フェーズAを湯煎で75 に加熱する。完全可溶化までフェーズBを加熱する。フェーズBをフェーズAに添加する。フェーズCを湯煎で75 に加熱する。連続攪拌中にフェーズCをフェーズA+Bに添加する。フェーズDを添加してよく均質化させる。55 でフェーズEにより中和する。フェーズFを添加してよく均質化させる。

【 0 1 3 6 】

実施例12: ローション

【 0 1 3 7 】

40

【表 9】

INCI 名	質量での%
フェーズ A	
水	適量 (q. s. f) 100
フェーズ B	
ブタンジオール	5.00
フェノキシエタノール	0.20
フェーズ C	
ポリソルベート 20	2.00
ミリスチン酸 PPG-3 ベンジルエーテル	0.10
フェーズ D	
ソルビン酸カリウム	0.10
フェーズ E	
(実施例 1、2、または 3 の) 本発明の有効成分	1.00
フェーズ F	
香料	0.10

10

20

【 0 1 3 8 】

手順:

フェーズAを量る。フェーズBを量り、混合する。連続攪拌中に30分間、フェーズBをフェーズAに添加する。フェーズCを量り、混合液が均質化するまで混合する。連続攪拌中にフェーズA+BにフェーズCを添加する。以前の混合液にフェーズDを添加する。連続攪拌中に以前の混合液にフェーズEを添加する。よく均質化させる。フェーズEを量り、混合して以前の混合液に添加する。連続的に混合する。

30

【 0 1 3 9 】

実施例13: デイクリーム

【 0 1 4 0 】

【表 10】

INCI 名	質量での%
フェーズ A	
水	適量 (q. s. f) 100
カルボマー	0.2
フェーズ B	
ブタンジオール	2.00
フェノキシエタノール	1.30
フェーズ C	
グリセリルステアレートおよび PEG100 ステアレート	1.00
カプリル/カプリン酸トリグリセリド	4.00
フェーズ D	
アクリレート/炭素数 10~30 アルキルアクリレートクロスポリマー	0.20
ミリスチン酸 PPG-3 ベンジルエーテル	1.00
ジメチコン	1.00
フェーズ E	
ソルベート	0.10
フェーズ F	
水酸化ナトリウム	0.40
水	4.00
フェーズ G	
(実施例 1、2、または 3 の) 本発明の有効成分	2.00
フェーズ H	
香料	0.10

【 0 1 4 1 】

手順:

フェーズ A : 水中に Ultrez 10 を注入し、30 分間膨張させる。フェーズ B を量り、60 で融解させる。フェーズ A を湯煎で 75 に加熱する。フェーズ C を量り、湯煎で 75 へ加熱する。連続攪拌中 (Staro s=500 rpm) に、フェーズ C をフェーズ A に添加する。無作為にフェーズ A+B にフェーズ B とフェーズ D を添加して、これにフェーズ E を添加する。よく均質化させる。45 に冷却してフェーズ F を添加する。35 でフェーズ G を添加してよく均質化させる。フェーズ H を添加してよく均質化させる。

【 0 1 4 2 】

実施例 14: ボディー用液体

【 0 1 4 3 】

10

20

30

40

【表 1 1】

INCI 名	質量での%	
フェーズ A		
水	5.00	
カルボマー	0.30	
フェーズ B		
水	適量 (q. s. f)	10
	100	
ヒドロキシエチルセルロース	0.40	
フェーズ C		
ブタンジオール	3.00	
フェノキシエタノール	1.30	
フェーズ D		
炭素数 12~15 の安息香酸アルキル	2.00	20
カプリル/カプリン酸トリグリセリド	3.00	
ポリソルベート 20	1.00	
ミリスチン酸 PPG-3 ベンジルエーテル	1.00	
アクリレート/炭素数 10~30 のアルキルアクリレートクロスポリマー	0.20	
フェーズ E		
ソルベート	0.10	30
フェーズ F		
水酸化ナトリウム	0.50	
水	5.00	
フェーズ G		
(実施例 1、2、または 3 の) 本発明の有効成分	2.00	
フェーズ H		
香料	0.10	40

【 0 1 4 4 】

手順:

フェーズ A : 水中に Ultrez 10 を注入し、30 分間膨張させる。プロペラ式混合機 (300rpm) で攪拌中、フェーズ B を注入して 1 時間膨張させる。プロペラ式混合機 (300rpm) で攪拌中にフェーズ A をフェーズ B に添加して、よく均質化させる。フェーズ C を量って攪拌し、フェーズ D を量って混合する。フェーズ A+B にフェーズ C を添加する。フェーズ A+B+C にフェーズ C を添加する。よく均質化させる。続けてフェーズ E、フェーズ F、フェーズ G、最

後にフェーズHを添加する。pH = 6.2.

【 0 1 4 5 】

実施例15: ナイトクリーム

【 0 1 4 6 】

【表 1 2】

INCI 名	質量での%
フェーズ A	
水	5.00
カルボマー	0.30
フェーズ B	
水	適量 (q. s. f) 100
ヒドロキシエチルセルロース	0.40
フェーズ C	
ブタンジオール	3.00
フェノキシエタノール	1.30
フェーズ D	
ミリスチン酸 PPG-3 ベンジルエーテル	1.00
アクリレート/C10-30 アルキルアクリレートクロスポリマー	0.20
フェーズ E	
ソルベート	0.10
フェーズ F	
水酸化ナトリウム	0.50
水	5.00
フェーズ G	
(実施例 1、2、または 3 の) 本発明の有効成分	2.00
フェーズ H	
香料	0.10

【 0 1 4 7 】

手順:

フェーズA : 水中にUltrez 10を注入し、30分間膨張させる。プロペラ式混合機 (300rpm) で攪拌中、フェーズBを注入して1時間膨張させる。プロペラ式混合機 (300rpm) で攪拌中にフェーズAをフェーズBに添加して、よく均質化させる。フェーズCを量って攪拌し、フェーズDを量って混合する。ブレード型混合機 (300 rpm) で攪拌中、フェーズA+BにフェーズCを添加する。フェーズA+B+CにフェーズDを添加する。よく均質化させる。続けてフェーズE、フェーズF、フェーズG、最後にフェーズHを添加する。よく均質化させる。

【 0 1 4 8 】

実施例16: 抗伸張マーククリーム

【 0 1 4 9 】

10

20

30

40

【表 1 3】

INCI 名	質量での%	
フェーズ A		
水	5.00	
カルボマー	0.30	
フェーズ B		
水	適量 (q. s. f)	10
	100	
ヒドロキシエチルセルロース	0.40	
フェーズ C		
ブタンジオール	3.00	
フェノキシエタノール	1.30	
フェーズ D		
炭素数 12~15 の安息香酸アルキル	2.00	20
カプリル/カプリン酸トリグリセリド	3.00	
ポリソルベート 20	1.00	
ミリスチン酸 PPG-3 ベンジルエーテル	1.00	
アクリレート/炭素数 10~30 のアルキルアクリレートクロスポリマー	0.20	
フェーズ E		
ソルベート	0.10	30
フェーズ F		
水酸化ナトリウム	0.50	
水	5.00	
フェーズ G		
(実施例 1、2、または 3 の) 本発明の有効成分	2.00	
フェーズ H		
香料	0.10	40

【 0 1 5 0 】

手順:

フェーズ A : 水中に Ultrez 10 を分散し、20 分間膨張させる。フェーズ B を混合して完全な希釈になるまで 60 に加熱する。連続攪拌中にフェーズ B をフェーズ A に添加する。フェーズ A+B を加熱する。フェーズ C を量り、75 に加熱する。連続攪拌中にフェーズ C をフェーズ A+B に添加する。注意深く均質化してフェーズ D を添加する。フェーズ E を添加する。50 でフェーズ F により中和する。フェーズ G および H を 35 で添加して NaOH で pH6.3 に調節す

る。

【 0 1 5 1 】

実施例17: ヘアーローション

【 0 1 5 2 】

【表 1 4】

INCI 名	質量での%
フェーズ A	
塩化セトリモニウム	1.00
クエン酸	0.22
クエン酸三ナトリウム	1.20
ソルベート	0.10
水	適量 (q. s. f) 100
フェーズ B	
メチルパラベン	0.20
PPG5 セテスー20	2.00
フェーズ C	
(実施例 1、2、または 3 の) 本発明の有効成分	1.00
フェーズ D	
ポリソルベート 20	1.00
香料	0.10

10

20

30

【 0 1 5 3 】

実施例18: モイスチャライジング メイクアップ

【 0 1 5 4 】

【表 15】

INCI 名	質量での%	
Phase A		
水	適量 (q. s. f) 100	
苛性カリ	1.3	
ポリソルベート 80	0.1	10
フェーズ B		
二酸化チタン	6.00	
タルク (talc)	3.05	
黄色酸化鉄	1.8	
赤色酸化鉄	1.00	
黒色酸化鉄	0.15	
Phase C		20
プロピレングリコール	4.00	
ケイ酸アルミニウムマグネシウム	1.00	
フェーズ D		
プロピレングリコール	2.00	
カルボキシメチルセルロースナトリウム	0.12	
フェーズ E		
アジピン酸 Di-PPG-3 ミリスチルエーテル	12.00	30
ネオペンタン酸イソステアリル	4.00	
セテアリルアルコール、セテス-20 リン酸、リン酸ジセチル	3.00	
ステアレス-10	2.00	
セチルアルコール	0.62	
ステアレス-2	0.5	
フェーズ F		
(実施例 1、2、または 3 の) 本発明の有効成分	3.00	40

【 0 1 5 5 】

実施例 19: リップクリーム (バーム)

【 0 1 5 6 】

【表 16】

INCI 名	質量での%
Phase A	
水	適量 (q. s. f) 100
ソルビン酸カリウム	0.10
硫酸マグネシウム	0.70
フェーズ B	
セチルジメチコンコポリオール	3.00
メチルパラベン	1.00
トリベヘニン	0.30
ミリスチン酸 PPG-3 ベンジルエーテル	2.00
Argania spinoa 核油	19.00
Phase C	
(実施例 1、2、または 3 の) 本発明の有効成分	0.50
フェーズ D	
香料	0.10

10

20

【0157】

手順:

フェーズAを85 に加熱する。フェーズBを混合して85 に加熱する。連続攪拌中 (Staro s=3000 rpm、続けて1200 rpm) に、ゆっくりとフェーズAをフェーズBに添加する。80 で予熱したフェーズCを添加して均質化する。35 でフェーズDを添加する。注入する。

30

【0158】

実施例20: ヘア保護スプレー

【0159】

【表 17】

INCI 名	質量での%
フェーズ A	
水	適量 (q. s. f) 100
エタノール	10.00
ポリソルベート 20	0.40
塩化セトリモニウム	1.00
フェーズ B	
ブタンジオール (および) ヒマワリ種子 (Helianthus annuus) 抽出物	5.00
防腐剤	Qs
フェーズ C	
(実施例 1、2、または 3 の) 本発明の有効成分	3.00
フェーズ D	
水	0.50
水酸化ナトリウム	0.05

【0160】

手順:

フェーズAを量り、ブレード型攪拌機 (s=300rpm) でフェーズAを混合する。フェーズBを添加し、混合してフェーズCを添加する。フェーズDでpHを5.0~5.5に調整する。

【0161】

実施例21: ウチュバ (Uchuva) 抽出物の抗老化および若返り作用を示す試験

実施例21~23に関する図ではウチュバ抽出物はEUcと短く表記する。実施例21~23の全てにおいてウチュバ抽出物はクロマトグラフィー純度99.9%の実施例3に示す抽出プロセスから得られたものである。

真皮は表皮をしっかりと支え、栄養分を含む。これは主として線維芽細胞とコラーゲン、エラスチン、また基本物質と呼ばれる物質を主として含む細胞外マトリックスを含む。これらの成分は線維芽細胞により合成される。真皮表皮接合部は表皮と真皮との間の結束性を確かなものにする。

コラーゲンは皮膚の細胞外マトリックスのタンパク質の大部分を占める。今日までに20種類のコラーゲンが同定され、IからXXとして記される。真皮全体にほぼ全部が存在するコラーゲン (つまりは、真皮の70%~80%の乾燥重量を構成するコラーゲン) は真皮全体の細胞外マトリックスを形成するI型とIII型のコラーゲンである。真皮は加齢と伴に薄くなり、しわが肌の表面に現れる。その結果、皮膚の整合性および外部からの力学的な攻撃に対する抵抗においてコラーゲンがはたす重量な役割を考慮するとコラーゲンの中でも、特にI型とIII型のコラーゲンの合成の刺激は皮膚老化の信号を相殺する有効な方法と見られる (review by Tzaphlidou M., Micron 35 (2004) 173-177)。

【0162】

- コラーゲンIおよびIIIターゲット

コラーゲンIは皮膚に力学的抵抗を与える最重要のコラーゲンである。

脊椎動物の90%のコラーゲンはこのタンパク質である。これは (鉄筋コンクリート補強ほ

10

20

30

40

50

どの)骨格を構成して、より一般的には共通の結合組織を構成する。これは骨、皮膚、腱、角膜、内臓に見られる。

【0163】

1 - 若い細胞と比較した古い細胞の研究

下記の研究により、真皮の細胞外マトリックスの本質的要素であるコラーゲンIの発現に対するウチュバ抽出物の効果研究が可能になった。

- 方法

複製老化による若いまたは老化したNHDF(正常ヒト真皮線維芽細胞)を96ウエルプレートに導入して5%CO₂、37℃、24時間、インキュベーションした。

この細胞を試験生成物の存在下で24時間、処理した。

続けて細胞をフォルマリンで固定して、タンパク質の発現は免疫蛍光法で検出した。

蛍光マーキングは自動化顕鏡法(Arrayscan Cellomics™)を用いて画像化し定量した。

蛍光はコンパートメント分析生体応用により定量した。

【0164】

- 細胞毒性の事前評価

化合物は24時間、細胞との接触を維持した。比色試験の最後の3時間にRocheのすぐに使えるWST1を培地に導入した。

この試薬はバイオレット指示薬(violet indicator)であるテトラゾリウム塩を含んでいる。またこの試薬は代謝的に活性な細胞の小細胞により、イエロー指示薬(yellow indicator)であるホルマザンに開裂する。このことから黄色の着色の度合いは生きた細胞の数に比例する。吸光度の測定は450 nmで実施する。

試験により、90%未満のコントロールエレメントは生成物の細胞毒性の可能性を示唆する(グラフ上の緑線で示す)と考えられる。またこのことは細胞の代謝活性が低下したことも示している。75%未満は有意な細胞毒性を示す(グラフ上の赤線で示す)。

加えて顕微鏡で細胞を観察して、その形態の観察と比較とを実施した。

結果を図1Aに示す。

ウチュバ抽出物は100から20ppm範囲の試験された強い濃度では細胞毒性を示すが、2ppmからは毒性が少ない。

【0165】

試験対象とする濃度:

ウチュバ抽出物は下記の濃度2 - 1 - 0.5 ppmで試験をした。

結果は図1Bに示す。

ウチュバ抽出物により若い細胞でコラーゲンIの発現が再確立される。若い細胞ではコラーゲンIの発現は均質ではない。一部の細胞は高いマーキングを示す一方、その他は低いマーキングを示す。複製老化した細胞ではウチュバ抽出物により再活性化した発現は、処理した細胞においてより均質である。

最も低い濃度が活性化であるという事実は、最も高い濃度がタンパク質合成に影響を与える細胞毒性が少ないという事実により説明できる。

【0166】

- 結論

ウチュバ抽出物はタンパク質発現を若い細胞で観察される発現に再確立することで、皮膚老化のターゲットであるコラーゲンIに対して作用する成分である。

【0167】

2 - 線維芽細胞におけるコラーゲンI産生に対するウチュバ抽出物の効果評価

使用した材料および方法

- 試験システム

説明: 3から6の継代培養でのヒト線維芽細胞モデル(NHDF)

培地: DMEMグルコース4.5 g/L + 1% NEAA + 10% SVF

培養条件: 37°C、5% CO₂

【0168】

10

20

30

40

50

- 線維芽細胞の培養法および処理

- ニュートラルレッド (neutral red) の試験による細胞毒性の評価

NHDF細胞はD0に96ウエルプレートに、ウエル当たり 4×10^3 の細胞の率で導入する。これをD1に48時間、完全培地で培養する。

試験対象の活物質の濃度は抽出物の%で表す。試験対象の生成物の貯蔵液は20%濃度 (w/v) でジメチルスルホキシド (DMSO) 中で調製した。第1の希釈は1/1000とした。最終DMSO濃度の0.1%を維持しながら下記の希釈を1/2とした。

NR試験をD3に実施する：培地は取り除き、細胞は37 に予熱した250 μ LのPBSで洗浄した。200 μ Lのニュートラルレッドを細胞に添加する。37 で3時間のインキュベーション後、ニュートラルレッドを含む培地を取り除き、細胞を37 に予熱した2x200 μ LのPBSで洗浄する。100 μ Lのrevelation溶液 (50%エタノール-1%酢酸) を添加し、細胞は45分間、連続攪拌して、日に当たらない周囲温度でインキュベーションした。均質化後、D0540nmを測定する。

注記： ニュートラルレッド溶液の調製： ニュートラルレッド貯蔵液は超純水中の0.4%で調製する (この溶液は15日間、4 で保存)。即座に、完全培地で1/80に希釈して、使用前に3000毎分回転数 (rpm) で10分間、遠心する。

【 0 1 6 9 】

- MTT (メチルチアゾリールテトラゾリウム) 試験による代謝活性の評価

NHDF細胞はD0に96ウエルプレートにウエル当たり 4×10^3 の細胞の率で導入する。これをD1に48時間、完全培地で培養する。

試験対象の活物質の濃度は抽出物の%で表す。抽出物の貯蔵液は20%濃度 (w/v) でのDMSO中で調製した。第1の希釈は1/1000とした。最終DMSO濃度の0.1%を維持しながら下記の希釈を1/2とした。

MTT試験をD3に実施する： 培地は完全培地中の0.5g/Lで100 μ LのMTTにより取り替える。37 、5%、CO₂で3時間のインキュベーション後、MTT容積は100 μ LのDMSOで取り替える。均質化後、D0540nmを測定する (ニュートラルレッドを用いた前記試験について記載した量状態)。

【 0 1 7 0 】

- 調製法および試験された生成物

試験対象の生成物の説明： ウチュバ抽出物

上記の最初の2つの試験後、試験対象の生成物の3つの濃度、8.10-5%(0.8 ppm)、16.10-5% (1.6 ppm)、32.10-5% (3.2 ppm) が実施すべき残りの試験について選択される。

【 0 1 7 1 】

- ELISA法による培養上清におけるコラーゲンIの用量

細胞はD0に6ウエルプレートに、ウエル当たり 25×10^3 の細胞の率で導入する。これをD1に48時間、完全培地で培養する。

試験対象の活物質の濃度は抽出物の%で表す。抽出物の貯蔵液は20%濃度 (w/v) でのDMSO中で調製した。第1の希釈は1/1000とした。(抽出物の最も高い濃度でのDMSO濃度に対応する) 最終DMSO濃度の0.016%を維持しながら下記の希釈をした。

48時間後、培養上清を回収して 80 で保存する。

コラーゲンI用量をELISAキットの供給元の指示書に従って投与する (Tecommedical)。

【 0 1 7 2 】

48時間培養での線維芽細胞によるコラーゲンIの産生に対するウチュバ抽出物の効果：

【 0 1 7 3 】

10

20

30

40

【表 18】

104細胞に関するコラーゲンI (ng) の量を示す表:

条件	条件による細胞数 (x104)	ng/10 ⁴ DO1 細胞中のコラーゲンIの量	ng/10 ⁴ DO2 細胞中のコラーゲンIの量	ng/10 ⁴ DO3 細胞中のコラーゲンIの量	ng/10 ⁴ DO4 細胞中のコラーゲンIの量	平均	標準偏差
2.5 x 10 ⁴ 細胞/ウエル1/5に希釈							
コントロールエレメント	14	49.4	48.1	49.7	49.0	49.0	0.71
DMO [骨ミネラル密度]コントロールエレメント	16	47.5	48.9	46.0	50.5	48.2	1.93
ウチュバ抽出物(EUc)	12	57.6	69.8	64.8	59.5	63.0	5.5
8x10 ⁻⁵ %	12	63.8	63.8	65.5	63.0	64.0	1.06
ウチュバ抽出物(EUc)	13	52.7	56.1	47.3	50.2	51.6	3.74
16x10 ⁻⁵ %							
ウチュバ抽出物(EUc)							
32x10 ⁻⁵ %							

10

【0174】

この結果によりコントロールエレメントと比較した場合、(8.10⁻⁵%と16.10⁻⁵%での)低濃度のウチュバ抽出物により48時間処理された線維芽細胞においては、29%および30%のコラーゲンIの有意な上昇が観察される。

(32.10⁻⁵%での)高濃度では線維芽細胞によるコラーゲンIの産生は対照の条件に近い値へ低下する。この低下については高い濃度における細胞毒性の開始により説明できる。結果を図2Aに示す。

20

【0175】

3- 線維芽細胞によるコラーゲンIIIの産生に対するウチュバ抽出物の効果評価

細胞はD0に6ウエルプレートに、ウエル当たり25x10³の細胞の率で導入する。これをD1に48時間、完全培地で培養する。

試験対象の活物質の濃度は抽出物の%で表す。抽出物の貯蔵液は20%濃度(w/v)でのDMSO中で調製した。第1の希釈は1/1000とした。(抽出物の最も高い濃度でのDMSO濃度に対応する)0.016%で最終のDMSO濃度を維持しながら下記の希釈をした。

【0176】

【数1】

EUc
8 x 10⁻⁵ %

EUc
16 x 10⁻⁵ %

EUc
32 x 10⁻⁵ %

30

【0177】

48時間後、培養上清を回収して 80 で保存する。

コラーゲンIII用量はELISAキットの供給元の指示書に従って投与する(SunRed)。

【0178】

48時間培養で線維芽細胞によるコラーゲンIIIの産生に対するウチュバ抽出物の効果

下記の表は104細胞に関するコラーゲンIII(μg)の量を示す: _

40

【0179】

【表 19】

$\mu\text{g}/10^4$ D04 細胞中のコラーゲン III の量	平均	AND
コントロールエレメント	0.78	0.21
DMO [骨ミネラル密度]コントロールエレメント	0.82	0.17
ウチュバ抽出物 (EUC) $8 \times 10^{-5}\%$	0.9	0.34
ウチュバ抽出物 (EUC) $16 \times 10^{-5}\%$	1.17	0.11
ウチュバ抽出物 (EUC) $32 \times 10^{-5}\%$	0.86	0.06

10

【0180】

この結果の分析は濃度上昇がウチュバ抽出物で誘発されたコラーゲンIIIの産生に依存することを強調する。濃度 $16 \cdot 10^{-5}\%$ (コントロールエレメントと比較して+50%)において産生は最大である。

抽出物の最大濃度 ($32 \cdot 10^{-5}\%$) において、線維芽細胞によるコラーゲンIIIの産生はコラーゲンIを産生する場合の対象条件レベルに近いレベルに縮小する。この観察はこの濃度での細胞毒性の存在を確認するものである。

結果を図2Bに示す。

【0181】

4 - コラーゲンIIIターゲットに対するウチュバ抽出物の効果評価

20

コラーゲンは線維芽細胞で合成されたMECの主成分 (約70%) である。線維性 (I、II、III、V、XI) および非線維性 (IX、XII、XIV、XVI) コラーゲンの2つがある。コラーゲン繊維は柔らかく、組織での張力に抗している。形状は波状のビームであり、厚さや長さが変化する。IV型のコラーゲンは特別である。またこれは基底膜 (緻密層) の「主要なネットワーク」を形成する。これは細胞接着、増殖、移動、血管新生 (黒色腫) に関連する。これはインテグリン受容体との相互作用部位である。これは基板とMEDとの接点にある (S Pasco et al., Cancer Detection and Prevention, 29,260, 2005)。ラミニンIと共にコラーゲンIVは組織の構造的および機能的維持のための基底膜の構造を構成するネットワークを形成する。

ウチュバ抽出物の $4 \cdot 10^{-5}\%$ と $8 \cdot 10^{-5}\%$ との2つの濃度について試験を実施した。

30

【0182】

48時間での線維芽細胞で生成された細胞外マトリックスのタンパク質の量の評価

免疫細胞学によるコラーゲンIV発現の検出

細胞はD0にMillicell 8ウエルスライドに、 $400 \mu\text{l}$ の完全培地 $4 \cdot 10^3$ の細胞の率で導入する。これをD1に48時間、完全培地で培養する。試験対象の活物質の濃度は抽出物の%で表す。抽出物の貯蔵液は20%濃度 (w/v) でのDMSO中で調製した。第1の希釈は1/1000とした。最終DMSO濃度の0.1%を維持しながら下記の希釈をした。48時間後、アルコール/酸混合物で細胞を固定する。続けて細胞を1時間、1/50にPBS + BSA/tweenで希釈された抗コラーゲンIV抗体 (Rockland) でマークする。次にウエルスライドはPBSで2回、洗浄する。特定のマーキングの明瞭化は1時間、1/100にPBS + BSA/tweenで希釈されたFITC連結二次抗体 (S 40
anta-Cruz) で実施される。次に、スライドはPBSで2回、PBSで洗浄し、RotiMount Fluore + DAPI (Roth) 取付け液体でスライドとカバーガラスで挟む。
BX- 60落射蛍光顕微鏡 (Olympus, Japan) に接続したDP72カメラ (Olympus, Japan) で緑色と青色の写真を撮る。

2人の観察者で写真を調べて蛍光強度のスコアリングを0 (ゼロのマーキング) から4 (非常に高いマーキング) の直線目盛で行った。

同時にラムノース濃度はコラーゲンIVの発現についての正のコントロールエレメントとしてこの試験に統合した。事実、ラムノースおよびラムノースを含む多糖類は線維芽細胞においてコラーゲンの合成を誘導すると記述されている²²。結果は図3Aに示す。

測定結果の分析はウチュバ抽出物で48時間の処理が為された線維芽細胞においてコラーゲ

50

ンIV発現の大幅な上昇（約+300%）を示す。コラーゲンIV発現の上昇の振幅はラムノースで得たものに匹敵する。

【0183】

5 - エラスチンターゲットに対するウチュバ抽出物の効果評価

エラスチンはMECの組成物に使用される（ラミニンやフィブロネクチンのように）構造糖タンパク質である。これは構造繊維状蛋白質のファミリーのタンパク質である。特にこれは成長期に線維芽細胞により分泌され、弾性を有する。この合成は年齢とともに低下し、エラスチンは伸びないコラーゲンに置き換わる。線状皮膚萎縮は力学的制約に関連して、このプロセスの身近な例である。第2の例は皮膚老化である。

細胞外マトリックスでは：

エラスチンは初めにプロエラスチンとして、次にトロポエラスチンとして線維芽細胞により細胞外スペースで合成され分泌される。これは弾性繊維およびフィブリリンの主要な（90%未満）成分である。このことから、共有架橋結合により弾性繊維を形成するエラスチンおよびフィブリリンに関連するコラーゲンは細胞外マトリックスの主要な成分である。エラスチンの総産生は思春期あたりで停止する。その後、利用可能なエラスチンは年齢とともに低下する。

劣化：

エラスチンの劣化は線維芽細胞によって分泌される酵素、エラスターゼの作用に関連している。エラスターゼの酵素作用は1アンチトリプシンにより抑制される。劣化の抑制はエラスチンの安定性を増加するようにバランスさせる。

役割：

エラスチンを特徴づけるハッキリとした特色がある：エラスチンは細胞を結合させ生物組織を形成する。このことから皮膚、肺、血管、結合組織、特定の腱と軟骨の正しい機能はエラスチンの特徴と密接に関連している。名前が示すように、エラスチンは弾性である。同一の直径であれば輪ゴム5倍以上の弾性がある。切れるまで伸ばした場合には正常時の長さの150%まで延びる。このことから、これは細胞を伸ばすことができ、伸ばした後は元の状態に復元する柔軟性がある。

真皮：

エラスチンは皮膚の真皮に存在して支持体として作用する。例えば老化すると真皮の弾性と緊張力が失われ、下にある筋肉の収縮に適応できなくなり、しわが現れる。加えて、紫外線被曝はエラスチンの劣化を速める。

【0184】

老化した細胞と比較した若い細胞の研究

下記の研究により、エラスチンタンパク質の発現に対するウチュバ抽出物の効果についての研究が可能となる。

【0185】

方法

複製老化により若いまたは老化したNHDF（正常ヒト真皮線維芽細胞）を96ウエルプレートに導入して5%CO₂、37℃、24時間、インキュベーションした。

この細胞を試験生成物の存在下で24時間、処理した。続けて細胞をホルマリンで固定して、タンパク質の発現は免疫蛍光法で検出した。蛍光マーキングは自動化顕鏡法（Arrays can Cellomics™）を用いて画像化し定量した。蛍光はコンパートメント分析生体応用により定量した。

【0186】

細胞モデル：

- 若い細胞： 若年ドナー（25才）のNHDF
- 複製老化による老化： 老化ステージまで数回にわたり培養された若年ドナーのNHDF

10

20

30

40

50

結果を図3Bに示す。

ウチュバ抽出物により、若い細胞のタンパク質レベルを僅かに超えてエラスチン発現が再確立される。

【0187】

結論

得られた結果からウチュバ抽出物はvivoで外挿されるvitroでの弾性の向上を示す。

【0188】

6 - DNAのメチル化ターゲットに対するウチュバ抽出物の効果評価

メチル化はヒストンのN末端の修飾である。これはリジンかアルギニンかのいずれかで実施できて1つ、2つ、または3つのメチル基の付加で実現できる。これはメチル化残基と付加基の数とに依存して、転写の活性化または制御に関連する。長時間静的であると考えれば、ヒストンのメチル化はアセチル化およびリン酸化と比べてより安定しているが、動的プロセスに係る可逆的修飾である。ますます増え続けるヒストンデメチラーゼが同定されている。一般的にこのタイプの修飾はアセチル化に対抗し、かつリジンの脱アセチル化はメチル化の前に起こらねばならない。この対抗はヘテロクロマチン（一般に表現可能でなく、特定の重要なアミノ酸でメチル化）と真正染色質領域（一般に表現可能で、アセチル化）との間の特定の動的バランスの確立に繋がる。例えばヒストンH3のリジン9はメチル化した時に周囲のクロマチンの制御に関連することが知られている。このメチル化はタンパク質HP1で認識され、これは従ってメチル化H3上で固定する。HP1は周囲のヌクレオソームのヒストンH3のリジン9をメチル化できるSuv39タンパク質、ヒストンメチルトランスフェラーゼを引き付ける。このことからヒストンH3のメチル化の仕組み、クロマチンの縮合の仕組みを段階的に観察できる。しかしながら、このヘテロクロマチン侵入はH3の遭遇するリジン9が既にアセチル化しているならば停止する。これにより、競争的バランスが発現クロマチンドメインと抑制クロマチンドメインとの間に確立する。アセチル化またはメチル化レジンは各種タンパク質ドメインで認識されるので、ヒストン尾部（histone tail）の修飾は各種タンパク質クラス動員に繋がるエピジェネティック「マーク」の役割を果たす。またクロマチンのレベルで特定の因子の動員には、すでに関連しているヒストンおよびタンパク質の修飾の事前の存在を必要とする。従ってヒストンのコードはクロマチンに関連した別の因子により解釈され、これはタンパク質をクロマチンに動員するかどうかを決定する修飾ヒストンと別の因子との相互作用の組合せである。老化は生物の全ての組織に影響する。このプロセスは、複数の出版物（非特許文献23～30）に記載があるように、DNAの特定のシトシン残基のレベルでのメチル化の変化のようなエピジェネティック修飾に関連している。老化、細胞分裂の蓄積、劣化した高分子におけるエピジェネティック修飾の役割は加齢表現型に寄与している。予測不可能な環境事象もDNAのメチル化、ヒストンのメチル化およびアセチル化などのエピジェネティック機構によってこの表現型を修飾する。エピジェネティック修飾の潜在的な可逆性により、それらは老化に関連した状態の処理に関する魅力的なターゲットになる。

【0189】

老化した細胞と比較した若い細胞の研究

観測されたタンパク質の発現の再活性機構を理解するために、本来の性質として老化した細胞に対するDNAのメチル化の分析を行った。事実、細胞の老化の特徴の1つはCpGジヌクレオチドに含まれるシトシンのレベルでのDNAにおけるメチル化ゾーンの蓄積である。これはプロモータの不活性化および特定の遺伝子の発現の低下に繋がる。

【0190】

- 方法

複製した本質的に若いまたは老化したNHDF（正常ヒト真皮線維芽細胞）は6ウエルプレートに導入してサブコンフルエンス（subconfluence）まで5%CO₂、37℃でインキュベーションした。この細胞を試験生成物の存在下で24時間、処理した。続けて細胞はトリプシンの存在下で取り外してから溶解した。ゲノムDNAはエタノールで共沈させた。Enzoキットを使用してDNAのメチル化速度をELISAで測定した： 5 メチルシトシンDNA ELISAキット。

値は結果が見やすい50%から表す。

【0191】

細胞モデル：

- 若い細胞： 若年ドナー（25才）のNHDF
- 複製老化による老化： 老化ステージまで数回にわたり培養された若年ドナーのNHDF。細胞毒性の事前評価に続き、ウチュバ抽出物は2 - 1 - 0.5 ppm濃度で試験する。
- 結果： 結果を図4Bに示す。

【0192】

結論

得られた結果からウチュバ抽出物により、老化した皮膚モデルにつて試験された3つの濃度でメチル化の割合を低下させることが可能である。

10

【0193】

7 - フィブリリン1ターゲットに対するウチュバ抽出物の効果評価

フィブリリン1は弾性繊維に関連し、その集合に寄与するミクロフィブリルを構成するタンパク質である。

【0194】

老化した細胞と比較した若い細胞の研究

方法

若いNHDF（正常ヒト真皮線維芽細胞）を96ウェルプレートに導入して5%CO₂、37℃、24時間、インキュベーションした。外因性老化の細胞は24時間中に照射に間を取った3回のUVA放射線と、1回のUVB放射線で照射された。この細胞を試験生成物の存在下で照射に間を取り24時間、処理した。続けて細胞をホルマリンで固定して、タンパク質の発現は免疫蛍光法で検出した。蛍光マーキングは自動化顕鏡法（Arrayscan Cellomics™）を用いて画像化し定量した。蛍光はコンパートメント分析生体応用により定量した。

20

【0195】

細胞モデル：

- 若い細胞： 若年ドナー（25才）のNHDF
- UVA/B-：誘発老化 若年ドナーのNHDF、UVAおよびUVB放射線で照射される

【0196】

試験された生成物

細胞毒性の事前評価に続き、ウチュバ抽出物は2 - 1 - 0.5 ppm濃度で試験する。

30

【0197】

結果

結果を図4Bに示す。

0.5ppmのウチュバ抽出物により若い細胞に同等か、またはそれ以上のレベルにフィブリリン1の発現が再確立される。

【0198】

- 抗老化および若返り作用に関する一般的な結論

老化すると合成低下と増加した劣化が原因でコラーゲン繊維と弾性繊維は変化する。ウチュバ抽出物が細胞若返りに作用することを示すために、コラーゲンIおよびエラスチンについては内因的（複製老化）で老化、または、フィブリリン1については繰り返されるUV放射線による外因的で老化（光老化）した細胞のこれらの繊維構造に関連するタンパク質の発現は定量された。

40

ウチュバ抽出物により、これらのマーカーの発現が再確立される。

この研究ではウチュバ抽出物は若いコントロールエレメントとの比較で完全にタンパク質の発現を再確立する。これは観察された効果の目的となる。異常な過剰発現は無く、ウチュバ抽出物は皮膚の生物学的平衡を尊重する。

また同時に、この特性に認められるラムノースなどの未処理細胞に関してウチュバ抽出物は線維芽細胞コラーゲンIVの発現を著しく増大させる。加えてコラーゲンIIIの量はウチュバ抽出物による線維芽細胞の治療中に増大する。これらの結果は再緻密化と構造レベル

50

でのアンチエイジングの有効性を強化する。

DNAのメチル化の分析においては、ウチュバ抽出物はこの実験で一様な結果を示す。つまり試験された3つの濃度でメチル化が低下している。この効果は若返り効果がある細胞外マトリックスについてタンパク質の発現を再活性化させるこの生成物の作用機序に関する情報を提供している。

その結果としてウチュバ抽出物は抗老化、若返り、抗老化生物活性を示す成分または有効成分である。これはタンパク質発現を若い細胞で観察される発現に再確立することで皮膚老化の3つのターゲットに一貫して作用する。また成熟細胞におけるDNAのメチル化への作用のように、これはエピジェネティックに対する革新的な活性を示す。最後に、これは細胞外マトリックスのタンパク質の合成に対する有効性により深部の抗老化作用を示す。

10

【0199】

実施例22: ウチュバ抽出物による皮膚の表皮の保湿および構成作用を示す試験

フィラグリンはプロフィラグリン（フィラグリンの10-12モノマーおよびNH₂-末端S-100調節タンパク質の反復）という前駆体の形をした顆粒層で合成される。これが現れるのが終末分化中に起こるプロフィラグリンの脱燐酸およびタンパク質分解後なので、このタンパク質の検出は表皮の終末分化の状態に関連している。

1) フィラグリンはマクロフィブリルのパケット形成中にケラチンの凝集に寄与する。

2) フィラグリンのモノマーは角化層の成分である（CE; 角質細胞の細胞膜の内部表面に沈着したエンベロープ: intercorneocytary脂質マトリックスを伴う皮膚の遮水特性に寄与する）。

20

3) モノマーは角質層の最上層で完全に分解して、表皮の水和維持に重要な吸湿性のアミノ酸（NMFまたは天然保湿因子）の混合物を産生する（非特許文献31）。

乾燥症または皮膚の乾燥がある病態（アトピー性皮膚炎、魚鱗癬）でプロフィラグリンおよびフィラグリンの低下が検出された（非特許文献32）。

Prokschらによれば（非特許文献33）、フィラグリンのモニタリングと発現はバリアー機能および/または角質層の水和レベルをモニタリングする良い方法である。これは皮膚科学ジャーナルで上層の水和マーカーとして有意である唯一の実マーカーである。それにもかかわらず臨床的には、これはTEWL（経皮水分蒸散量、transepidermal water loss）測定後に通過するマーカーである。

フィラグリンおよびロリクリンと同様にインボルクリンは終末分化マーカーである。これはトランスグルタミナーゼ（TGM）の特にTGM1のターゲットである角化エンベロープ（CE）のタンパク質である。インボルクリンは角化エンベロープ形成の初期の段階と、CE形成の後半の段階でTGM1によりオリゴマ化され、インボルクリンはセラミド³⁵に関連する。マーキングはとげ状の層の上層から顆粒層およびSCの最初の層の内側までの表皮に局在する。

30

【0200】

- ヒトの皮膚の外植体に対するウチュバ抽出物の局所治療の効果

- 材料および方法:

説明: 女性、白人、51歳の哺乳類であるヒト皮膚の外植体（Biopredic - 35000 RENN ES）

40

数: 直径が1cmである脱脂皮膚の9つのパンチの調製

培養の条件: 37°C, 5% CO₂

培地: グルコースの、抗生物質を補充した4.5g/Lの DMEM培地（ペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリシン）

【0201】

- 試験された生成物

実施例3で得たウチュバ抽出物はパラフィンオイルに0.05%および0.01%（w/v）に希釈した。トリグリセリドC8C10 55/45溶媒（コード EC-09-271）を使用した。

【0202】

- 外植体の培養法および処理

50

受け取った外植体は脱脂した。直径が1 cmある円形皮膚ディスクを1つのパンチの使用で得た。6つのウエルプレート上に直径が1.6 cmであるステンレススチールのグリッドを5 mlの培地に配置した。表皮を空気にさらしながら、各外植体は培地に浸すためにグリッドに付ける。外植体は48時間、培地を変えずに培養する。D0とD1とに試験する10 µLの製剤の局所投与をして各種の処理を実施した。実験条件全てについて3つのパンチで繰り返した。

対照外植体を処理外植体と同じ方法で培養した。処理は濃度が0.05%である10 µLのトリグリセリド溶媒で実施した。

【0203】

- in situでの免疫標識

培養終了期間の後で、外植体を収集してメスを使って2つの等しく分けた。最初の半分について液体窒素で冷却したイソペタンを使用してTeck TM細胞(Sakura)で凍結して、次に免疫標識を待ちながら 80 で維持した。残りの半分は4%緩衝ホルマリンで維持した。クリオトーム(cryotome)を使用して各外植体の5 µmの厚さの断面を造った。PBSでの再水和作用の後、溶液(PBS-BSA-Tween)中で調製された一次抗体溶液で断面を1時間、インキュベーションした。連続洗浄後、一次抗体が商用形態の100分の1でのFITCプローブに連結した二次抗体により明瞭化した。細胞核をDAPI蛍光塗料でマークした。

皮膚片はポリ リジントレイを使用して収集した。

【0204】

- 顕微鏡観察

それぞれの皮膚片は20倍でのOlympus BX60落射蛍光顕微鏡を使用して観察した。Cell Fソフトウェアで操作されるOlympus DP72カメラを使用して各片について2枚の写真を取った。写真のネガは次の手順で同定した： マーキングの日付 処理条件 画像数 マーカー。DAPI核マーカーを使用して細胞核の対比染色(counterstaining)を行った。画像処理ソフトウェアを使用したスライディングカラー(sliding colour)により、細胞核の色を青から赤に変更した。表皮のそれぞれの処理条件については10倍の倍率でのマーキング強度のスコア法がある。評価スケールは次の通りである：

非常に低いマーキング	1
低いマーキング	2
中程度のマーキング	3
高いマーキング	4

得られたデータは分析し、溶媒対照条件と比較する形での棒グラフで示した。

【0205】

- 結果

全てのマーキングは表皮の上層レベル(表皮のとげ状および/または顆粒状および/または角膜)で局在していた。

- フィラグリンの免疫標識

スコア法の結果は図5Aのグラフに示した。

フィラグリンのマーキング発現データ分析により、用量増加は溶媒対照群と比較して0.01%(+21%)および0.05%(+37%)で、ウチュバ抽出物により処理された外植体の蛍光量に依存することが示された。

【0206】

- インボルクリンの免疫標識

スコア法の結果は図5Bのグラフに示した。インボルクリンのマーキング発現データ分析により、有意な用量増加は対照群と比較して0.01(+64%)および0.05%(+86%)で、ウチュバ抽出物により処理された外植体の蛍光量に依存することが示された。

【0207】

- 結論

この研究の結果から、ウチュバ抽出物を用いて48時間培養した皮膚の外植体の局所処理は皮膚の水和およびバリアー効果に関するタンパク質の発現増加に繋がることが示された(

10

20

30

40

50

フィラグリン、インボルクリンのそれぞれで)。ウチュバ抽出物による発現の増加はフィラグリン、インボルクリンと比較してインボルクリンにおいてかなり有意である。これらのタンパク質の最大の発現は0.05%の濃度で常に観察された。この結果から、本発明のウチュバ抽出物は表皮に関する構成および保湿活性プロフィールを提示する。

【0208】

実施例23: ウチュバ抽出物による皮膚の色素脱失作用を示す試験

ウチュバ抽出物の色素脱失効果の可能性については正常ヒト上皮メラニン細胞 (NHEM) のモデルを使用して実験を行った。メラニン合成に対するウチュバ抽出物の効果はL チロシンで刺激される条件下で10日間のインキュベーション後に評価した。この実験で参照阻害分子はリポ酸である。この作用機構はMITF転写因子(小眼症関連転写因子)の発現の阻害を必要とする。この転写因子はチロシナーゼの発現の主要な調節因子であり、この阻害はメラニン合成に関わる酵素であるチロシナーゼ発現の抑制をもたらす。メラニン細胞は24ウェルプレートに播き、24時間、培地で培養した。続けて、この培地はL チロシン (1 mM) を補充し、化合物または参照 (5 µg/mlで試験されたりポ酸) (刺激コントロールエレメント) を含有する、または含有しない培養培地 (PMA free HMGS-2 + ペニシリン50U/ml ストレプトマイシン50 µg/mlを補充した培地254) で取り替えた。非刺激コントロール状態を同時に作った。次に合計10日間のインキュベーションで、3日間と7日間のインキュベーション後に細胞の処理を反復した。インキュベーション後、0.5 N NaOH溶液でメラニンを細胞の溶解により抽出した。サンプルの光学密度 (OD) は405nmで測定され、外因的なメラニンの範囲 (0.39から100 µg/mlの基準を含むメラニンの曲線) との比較でメラニンの量は測定された。その結果はメラミンの µg/ml、刺激コントロールエレメント、阻害のパーセンテージなどで表された。1 mMで試験されたL チロシンでの正常ヒト上皮メラニン細胞 (NHEM) の処理は、メラミン合成を強く刺激した。5 µg/mlで試験された参照のリポ酸はL チロシンで誘導された刺激を強く阻害した (108%阻害)。この効果は期待されたものであり試験の検証を可能とした。

10

20

予備的な細胞毒性試験後に試験をした研究におけるウチュバ抽出物の濃度は選択された:

【表20】

- 細胞型:	培地中の NHEM	
- インキュベーション時間:	72 + 96 + 72 時間	
- 評価パラメータ:	MTT の還元および顕微鏡下の形態学的観察 処理終了時にホルマザンの青い結晶への変換がコハク酸デヒドロゲナーゼ (succinate dehydrogenase) (ミトコンドリア酵素) の活性に比例する MTT (テトラゾリウム塩) の存在下で細胞をインキュベーションした。DMSO の添加による細胞の解離およびホルマザンの可溶化後に生細胞数と代謝活性を表す光学密度 (OD) を 540nm のマイクロプレートリーダー (VERSAmax, Molecular Devices) で測定した。	

30

従って試験の残りの部分で保持する濃度は0.5 - 1.6 - 5 µg/mlであり、5.10⁻⁵、16.10⁻⁵、5.10⁻⁵%にそれぞれ対応している。本試験の実験条件下で5 µg/mlで試験されたウチュバ抽出物はメラニンの合成を相対的に抑制した (40%抑制)。0.5と1.6 µg/mlでの試験では化合物は効果を示さない。この結果は図6に示す。本試験の実験条件下でウチュバ抽出物は最も強い試験された濃度 (5 µg/ml) でのみ観察される中程度の色素脱失効果を示した。

40

下記の表は実施例21 23で試験されたウチュバ抽出物の濃度の対応関係を示す (組成物の全重量当たり重量でppmおよび%)。

【0209】

【表 2 1】

ターゲット トコラーゲ ン	TESTED CONC. ppm	TESTED CONC. %	
コラーゲン I	0.8	8.10 ⁻⁵	
	1.6	16.10 ⁻⁵	
	3.2	32.10 ⁻⁵	
コラーゲン I	0.5	5.10 ⁻⁵	
	1	10.10 ⁻⁵	10
	2	20.10 ⁻⁵	
コラーゲン III	0.8	8.10 ⁻⁵	
	1.6	16.10 ⁻⁵	
	3.2	32.10 ⁻⁵	
コラーゲン IV	0.4	4.10 ⁻⁵	
	0.8	8.10 ⁻⁵	
	0.5	5.10 ⁻⁵	
エラスチン	1	10.10 ⁻⁵	
	2	20.10 ⁻⁵	
	0.5	5.10 ⁻⁵	20
フィブリリ ン-1	1	10.10 ⁻⁵	
	2	20.10 ⁻⁵	
	0.5	5.10 ⁻⁵	
メチル化レ ベル	1	10.10 ⁻⁵	
	2	20.10 ⁻⁵	
	100	0.01	
フィラグリ ン	500	0.05	
	100	0.01	
	500	0.05	30
インボルク リン	0.5	5.10 ⁻⁵	
	1.6	16.10 ⁻⁵	
	5	50.10 ⁻⁵	
メラニン			

【 図 1 】

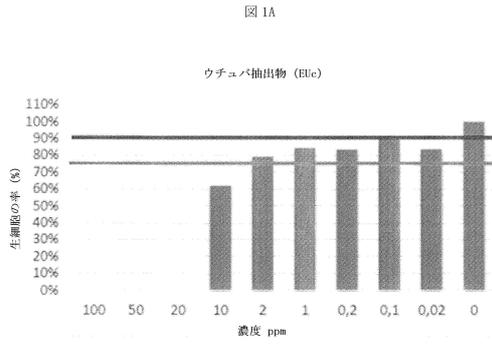
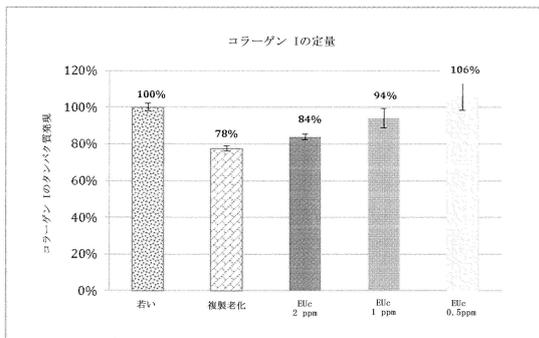


図 1B



【 図 2 】

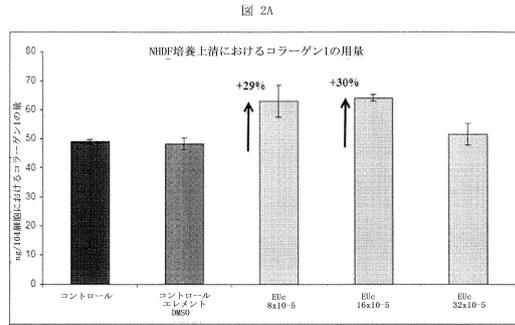
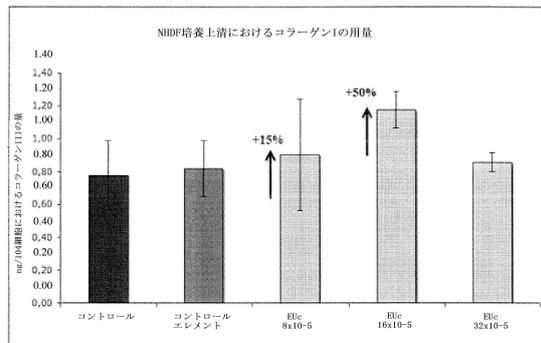


図 2B



【 図 3 】

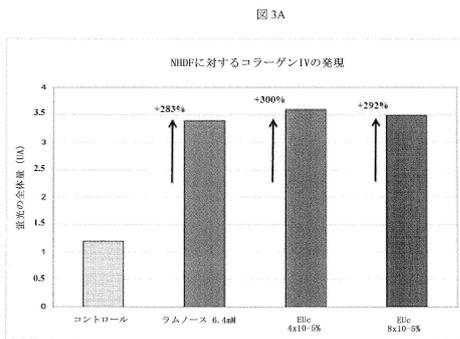
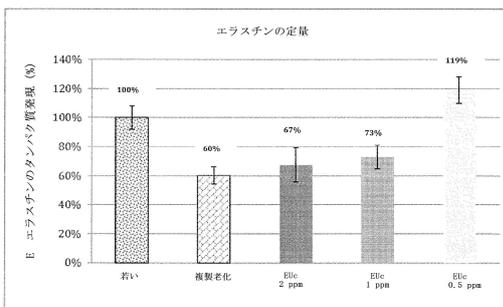


図 3B



【 図 4 】

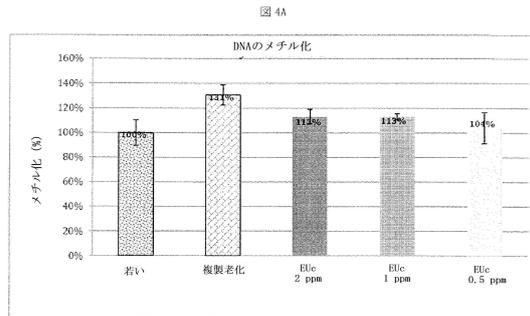
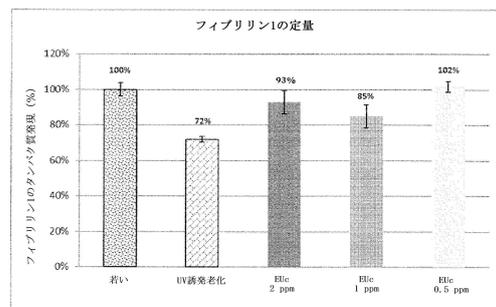


図 4B



【 図 5 】

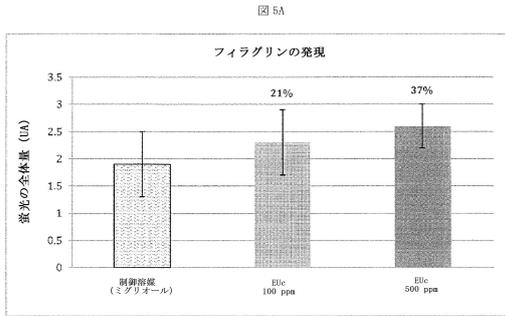
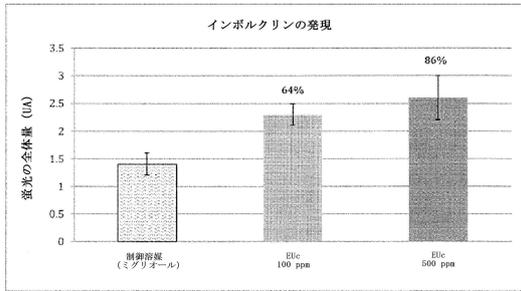
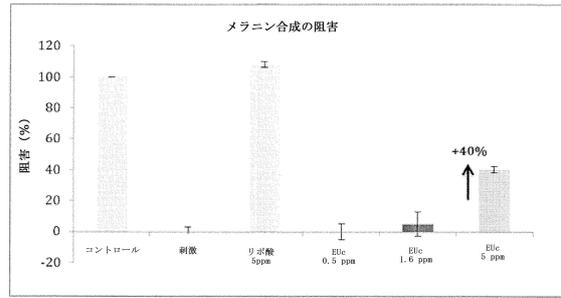


図 5B



【 図 6 】



フロントページの続き

- (72)発明者 ラヴィーユ, レミ
フランス国, エフ - 0 6 3 4 0 ドゥラップ, 4 7 1 ルート ドゥ ラ コル カレピエ
- (72)発明者 シシェッティ, エスメラルダ
フランス国, エフ - 0 6 1 3 0 グラス, 2 6 シュマン デ カストール
- (72)発明者 ガルニエ, セバステア
フランス国, エフ - 0 6 6 5 0 ル ルレ, 3 3 テール シュマン デ コンブ
- (72)発明者 ドゥルル, レスリー
フランス国, エフ - 8 3 2 7 0 サン マクシマン ラ サント ボーム, ヌメロ 5 レジダン
ス ル カレ サン ジャン, 1 4 4 トラベルス サン ジャン
- (72)発明者 マンゾーン, ジェラル
フランス国, エフ - 0 6 4 6 0 サン ヴァリエ ドゥ テイエ, ロティスマン デュ ラルガド
ゥー, シュマン カレール デュ ラルガドゥー
- (72)発明者 ボルソット, ジェレミー
フランス国, エフ - 0 6 0 0 0 ニース, 7 3 シュマン デュ オー マニャン

審査官 高 美葉子

- (56)参考文献 中国特許出願公開第102586377(CN, A)
特開2001-122731(JP, A)
特開2008-150314(JP, A)
TALERO BARRIENTOS E M; MOTILVA SANCHEZ V; OCAMPO BUENDA Y C ET AL, ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF THE ETHER EXTRACT AND MAJOR FRACTION OF PHYSALIS 以下備考, EPAR 2012, 2012年, P 1, PERUVIANA CALYCES IN ACUTE TNBS-INDUCED COLITIS, URL, <http://www.pa2online.org/abstracts/vol10issue3abst610p.pdf>
FRANCO L A; ET AL, ACTIVIDAD ANTINFLAMATORIA DE EXTRACTOS Y FRACCIONES OBTENIDAS DE CALICES DE PHYSALIS PERUVIANA L, BIOMEDICA, REVISTA DEL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD, 2007年 1月 1日, VOL:27, PAGE(S):110 - 115

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 8 / 0 0 - 8 / 9 9

A 6 1 Q 1 / 0 0 - 9 0 / 0 0

C A p l u s / B I O S I S / M E D L I N E / K O S M E T (S T N)