

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)公開番号

特開2024-166824

(P2024-166824A)

(43)公開日 令和6年11月29日(2024.11.29)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 8/9789(2017.01)	A 6 1 K 8/9789	4 C 0 8 3
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C 0 8 8
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
A 6 1 P 17/16 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 K 36/61 (2006.01)	A 6 1 P 17/16	
審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全10頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号 特願2023-83196(P2023-83196)

(22)出願日 令和5年5月19日(2023.5.19)

(特許庁注:以下のものは登録商標)

1. T W E E N

(71)出願人 000000918

花王株式会社

東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番
10号

(74)代理人 110000084

弁理士法人アルガ特許事務所

(72)発明者 我部 有

東京都中央区日本橋茅場町1-14-1
0 花王株式会社内

(72)発明者 山口 さゆり

東京都中央区日本橋茅場町1-14-1
0 花王株式会社内

(72)発明者 川端 慶吾

東京都中央区日本橋茅場町1-14-1
0 花王株式会社内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 肌のくすみ改善剤

(57)【要約】

【課題】ロリクリンの発現を促進する、ロリクリン発現促進剤、角層形成促進剤及び肌のくすみ改善剤の提供。

【解決手段】ユーカリ又はその抽出物、及び桃又はその抽出物を有効成分とするロリクリン発現促進剤。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ユーカリ又はその抽出物、及び桃又はその抽出物を有効成分とするロリクリン発現促進剤。

【請求項 2】

ユーカリ又はその抽出物、及び桃又はその抽出物を有効成分とする角層形成促進剤。

【請求項 3】

ユーカリ又はその抽出物、及び桃又はその抽出物を有効成分とする肌のくすみ改善剤。

【請求項 4】

ユーカリ又はその抽出物と桃又はその抽出物の質量比（ユーカリ又はその抽出物の固形分換算 / 桃又はその抽出物の固形分換算）が 0.01 以上 300 以下である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の剤。 10

【請求項 5】

製剤形態が皮膚外用剤である請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ロリクリン発現促進剤、角層形成促進剤及び肌のくすみ改善剤に関する。

【背景技術】

【0002】

皮膚の水分保持能改善、肌荒れの防止及び改善、並びにしわの形成やきめ模様の減少等の皮膚老化の予防改善には、皮膚の表皮細胞に作用し、表皮細胞の角化を促進し、健全な角層の形成を促して、外界からの刺激や生体を防御するための角層バリア機能を健全にすることがよいとされている。 20

また、健全な角層の形成は肌のくすみの改善にもつながる（非特許文献 1）。肌のくすみとは、顔全体又は目のまわりや頬等の部位に生じる現象であり、肌の透明感が減少して暗く見える状態で、境界は不明瞭である。肌のくすみの発生要因は複数考えられているが、その一つに角層の肥厚等による透明性（光透過性）の低下が挙げられる（非特許文献 2）。

【0003】

角層の肥厚とは角層の厚さが正常より厚くなった状態を示し、角層重層化ともいう。角層が肥厚する原因としては、加齢、乾燥、紫外線等の影響によりターンオーバーが乱れ角層細胞の形成や剥離に異常が生じることが考えられる。ここで、ターンオーバーとは、基底層におけるケラチノサイト（表皮角化細胞）の増殖と、角化の過程、角層の剥離の連続した繰り返しのことをいう。このケラチノサイトは、角化の過程において基底細胞、有棘細胞、顆粒細胞、角層細胞と順次外部に向かって変化しながら、各層を形成している。そして、有棘層上層から顆粒層にかけてコーニファイドエンベロープ（CE）を構成する蛋白質が合成されている。さらに角層に至る過程で、酵素トランスグルタミナーゼによってケラチノサイトの細胞膜にインボルクリン、ロリクリン、シスタチン等の基質蛋白質が結合し、不溶化した CE が形成される。さらに不溶化した CE にはセラミド等が共有結合し、角層バリア機能の基礎を形成する。最終的には角層の表層に至る過程で、角質細胞の接着力が低下し、垢となって剥がれ落ちる。 40

従ってターンオーバーの乱れは、異常な角層の形成と剥離が異常な不全角化を引き起こし、角層の肥厚の一因となる。従来、ターンオーバーの乱れに起因する皮膚トラブルに対しては、セラミドを含有するクリーム等により解決してきた。しかし、表皮細胞の角化を促進し、角層の健全化を促す改善作用は十分ではなく、健全な角層の形成を促進する成分の開発が望まれている。

【0004】

上記基質蛋白質のうちロリクリンは CE の主要成分であり、天然保湿因子の形成をはじめ種々の角層機能に関わる。ロリクリン遺伝子変異による疾病はロリクリン角化症と総称 50

され、角化の異常を伴うびまん性の角質肥厚等の症状がみられる（非特許文献3）。ヒト表皮角化細胞の株細胞であるHaCaT細胞にロリクリン遺伝子をトランスフェクションすると終末角化と関連するプログラム細胞死に陥り、ロリクリンが正常な角化に重要な分子であることも報告されている（非特許文献4）。従って、表皮細胞におけるロリクリンの発現促進は、ケラチノサイトの正常角化及び健全な角層の形成を促して、角層の肥厚を改善し、その結果、肌のくすみの改善を図ることができると考えられる。近年、ロリクリンは表皮細胞の分化マーカーとして着目されている。

【0005】

一方、フトモモ科ユーカリ属のユーカリ（*Eucalyptus globulus*）は、その抽出物がインボルクリン発現促進による角層形成促進作用を有し、皮膚の水分保持能の改善（保湿効果）、毛穴目立ちの改善に有用であることが報告されている（特許文献1）。

10

また、バラ科スモモ属の桃（*Prunus persica*）について、その抽出物がインボルクリン産生促進作用を有し、表皮角質細胞の正常化による乾燥肌、荒れ肌、アトピー性皮膚炎、乾癬などの皮膚症状の予防・改善に有用であることが報告されている（特許文献2）。

しかしながら、ユーカリと桃の併用によるロリクリン発現に対する作用については何ら報告されていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

20

【0006】

【特許文献1】特開2007-277149号公報

【特許文献2】特開2008-7412号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】T. Ishida et al. J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn. 54 (3): 258-63 (2020)

【非特許文献2】長沼雅子 日本化粧品学会誌 Vol. 39, No. 4, pp. 275-285 (2015)

【非特許文献3】A. I-Yamamoto. J. Dermatol. Sci. 31 (1): 3-8 (2003)

【非特許文献4】K. Yoneda et al. J. Dermatol. 37 (11): 956-964 (2010)

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、ロリクリンの発現を促進する、ロリクリン発現促進剤、角層形成促進剤及び肌のくすみ改善剤を提供することに関する。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者は、上記課題に鑑み鋭意検討したところ、ユーカリ抽出物と桃抽出物を組み合わせると、ロリクリンのタンパク質発現を相乗的に増強し、これらが角層形成促進及び肌のくすみの改善に有用であることを見出した。

40

【0010】

すなわち、本発明は、以下の1)~3)に係るものである。

1) ユーカリ又はその抽出物、及び桃又はその抽出物を有効成分とするロリクリン発現促進剤。

2) ユーカリ又はその抽出物、及び桃又はその抽出物を有効成分とする角層形成促進剤。

3) ユーカリ又はその抽出物、及び桃又はその抽出物を有効成分とする肌のくすみ改善剤。

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、ロリクリンの発現促進により、健全な角層の形成を促し、また肌のく

50

すみを改善することができる。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本明細書において、「ユーカリ」とは、フトモモ科ユーカリ属のユーカリ (*Eucalyptus globulus*) を指す。

「桃」とは、バラ科スモモ属の桃 (*Prunus persica*) を指す。

上記植物の使用部位としては、例えば、全草、全木、葉、茎、芽、花、蕾、樹木、木質部、樹皮、根、根茎、仮球茎、塊根、地衣体、葉状体、種子、果実、樹脂、核、又はこれらの混合物等が挙げられる。植物の使用部位として、ユーカリの場合、好ましくは葉、花、果実であり、より好ましくは葉である。桃の場合、好ましくは葉、花、果実、核であり、より好ましくは葉である。

10

【0013】

斯かる植物は、そのまま若しくはそれを圧搾することにより得られる搾汁、植物体自身を乾燥した乾燥物若しくはその粉碎物、或いはこれらから抽出した抽出物として用いることができるが、抽出物として用いるのが好ましい。

【0014】

抽出物としては、上記植物を常温又は加温下にて抽出するか、或いはソックスレー抽出器等の抽出器具を用いて抽出される各種溶媒抽出物、超臨界二酸化炭素等の超臨界抽出によって得られる抽出物、その希釈液、その濃縮液又はその乾燥末等が挙げられる。

抽出手段は、特に限定されないが、例えば、浸漬、煎出、浸出、還流抽出、超音波抽出、マイクロ波抽出、攪拌等の通常的手段を用いることができる。

20

【0015】

抽出のための溶媒には、極性溶媒、非極性溶媒のいずれをも使用することができる。溶媒の具体例としては、例えば、水；1価、2価又は多価のアルコール類；アセトン、メチルエチルケトン等のケトン類；酢酸メチル、酢酸エチル等のエステル類；ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン等の鎖状又は環状のエーテル類；ポリエチレングリコール等のポリエーテル類；ヘキサン等の飽和又は不飽和の炭化水素類；ベンゼン、トルエン等の芳香族炭化水素類；ジクロロメタン、クロロホルム、ジクロロエタン、四塩化炭素等のハロゲン化炭化水素類；ピリジン類；ジメチルスルホキシド；アセトニトリル；二酸化炭素、超臨界二酸化炭素；油脂、ワックス、その他のオイル類；並びにこれらの混合物が挙げられる。好適には、水、アルコール類及びその水溶液が挙げられ、アルコール類としてはメタノール、エタノール、1,3-ブチレングリコール、n-プロパノール、イソプロパノール、n-ブタノール、イソブタノール、sec-ブタノール、t-ブタノール等が挙げられ、好ましくはエタノール、1,3-ブチレングリコールであり、より好ましくは1,3-ブチレングリコールである。

30

【0016】

上記アルコール類の水溶液におけるアルコール類の濃度(25における容量パーセント、以下% (v/v) と表記)は、好ましくは12% (v/v) 以上、より好ましくは15% (v/v) 以上、さらに好ましくは18% (v/v) 以上であり、また、好ましくは99.8% (v/v) 以下、より好ましくは90% (v/v) 以下、さらに好ましくは85% (v/v) 以下である。

40

また、ユーカリ抽出物の場合、アルコール類の濃度は、好ましくは30% (v/v) 以上、より好ましくは40% (v/v) 以上、さらに好ましくは45% (v/v) 以上であり、また、好ましくは99.8% (v/v) 以下、より好ましくは90% (v/v) 以下、さらに好ましくは85% (v/v) 以下である。

桃抽出物の場合、アルコール類の濃度は、好ましくは12% (v/v) 以上、より好ましくは15% (v/v) 以上、さらに好ましくは18% (v/v) 以上であり、また、好ましくは85% (v/v) 以下、より好ましくは55% (v/v) 以下、さらに好ましくは45% (v/v) 以下である。

【0017】

50

抽出における溶媒の使用量としては、上記植物（乾燥質量換算）1 g に対して1 ~ 100 mL が好ましく、3 ~ 50 mL がより好ましい。

抽出条件は、十分な抽出が行える条件であれば特に限定されないが、例えば、抽出時間は、好ましくは1時間以上、より好ましくは3時間以上であり、また、好ましくは2ヶ月以下、より好ましくは5週間以下、より好ましくは3週間以下である。

抽出温度は、好ましくは0 以上、より好ましくは5 以上であり、また、好ましくは溶媒沸点以下、より好ましくは90 以下である。通常、低温なら長時間、高温なら短時間の抽出を行う。

【0018】

抽出物は、化粧品や医薬品上許容し得る規格に適合し、本発明の効果を発揮するものであれば粗精製物であってもよい。また、必要に応じて、液々分配、固液分配、濾過膜、活性炭、吸着樹脂、イオン交換樹脂、澱出し等の公知の技術によって不活性な夾雑物の除去、脱臭、脱色等の処理を施すことができる。

また、さらに公知の分離精製方法を適宜組み合わせることでこれらの純度を高めてもよい。精製手段としては、例えば、有機溶剤沈殿、遠心分離、限界濾過膜、高速液体クロマトグラフやカラムクロマトグラフ等が挙げられる。

【0019】

抽出物は、そのまま用いてもよく、適宜な溶媒で希釈した希釈液として用いてもよく、或いは濃縮エキスや乾燥粉末としたり、ペースト状に調製したものでよい。また、凍結乾燥し、用時に、通常抽出に用いられる溶剤、例えば水、エタノール、1, 3 - ブチレングリコール、水・エタノール混液、水・1, 3 - ブチレングリコール混液等の溶剤で希釈して用いることもできる。また、リポソーム等のベシクルやマイクロカプセル等に内包させて用いることもできる。

【0020】

後記実施例に示すように、ユーカリ抽出物と桃抽出物の組み合わせは、ロリクリンの発現を促進する。しかもその促進作用は、ユーカリ抽出物と桃抽出物それぞれ単独での作用と比べて優れ、且つ、それぞれ単独で添加した際の効果の相加を超え、相乗的効果である。上述したとおり、ロリクリンの発現が促進されれば、ケラチノサイトの正常角化及び健全な角層形成が促される。これにより、肌のくすみの改善効果が期待される。

よって、ユーカリ又はその抽出物と、桃又はその抽出物の組み合わせは、ロリクリン発現促進剤、角層形成促進剤、肌のくすみ改善剤（以下、「ロリクリン発現促進剤等」とも称す）となり得、ロリクリンの発現を促進するため、角層の形成を促進するため、肌のくすみを改善するために使用することができ、またロリクリン発現促進剤等を製造するために使用することができる。

ここで、「使用」は、ヒト若しくは非ヒト動物への使用であり得、治療的使用であっても非治療的使用であってもよい。「非治療的」とは、医療行為を含まない、すなわち人間を手術、治療又は診断する方法を含まない、より具体的には医師、又は医療従事者もしくは医師の指示を受けた者が人間に対して手術、治療又は診断を実施する方法を含まない概念である。本発明において、非治療的使用としては、美容的又は審美的な目的での上記植物又はその抽出物の使用等が挙げられる。

【0021】

本明細書において、「ロリクリン発現促進」とは、ロリクリンの遺伝子レベルでの発現促進及びタンパク質レベルでの発現促進が包含される。遺伝子レベルでの発現促進には、ロリクリンをコードするmRNAの発現におけるmRNAへの転写促進等が含まれ、タンパク質レベルでの発現促進には、mRNAの翻訳における促進等が含まれる。これらのうち、本発明ではタンパク質レベルでの発現促進が好ましい。

なお、ヒトのロリクリンは、315個のアミノ酸より構成され、その分子量は約26 kDaである。

【0022】

「角層形成促進」とは、ケラチノサイトの正常な角化が促され、健全な角層（角質層）

10

20

30

40

50

の形成が促進されることを意味する。ここで、健全な角層とは、皮膚のターンオーバーが健全である角層を意味し、具体的には基底層におけるケラチノサイトの増殖と表層からの角層の剥離のバランスが取れ、角層の肥厚が見られない角層を意味する。

【0023】

「肌のくすみ」とは、角層の肥厚等により肌の透明感が減少して暗く見える状態を意味する。肌のくすみが生じる部位は、例えば、顔全体、眼のまわり、頬、額、首元、手の甲、足の甲等である。また、「改善」とは、状態の好転、状態の悪化の防止又は遅延、あるいは状態の悪化の進行の逆転、防止又は遅延をいう。

【0024】

本発明において、ユーカリ又はその抽出物、及び桃又はその抽出物は、どちらを先に投与しても、同時に投与してもよい。両剤を同時に投与しない場合、両剤の投与間隔は、ユーカリ又はその抽出物、又は桃又はその抽出物のロリクリン発現促進作用の増強効果を奏するかぎり適宜選択しうる。

ユーカリ又はその抽出物、及び桃又はその抽出物を組み合わせてなる剤は、これらを配合剤として一の剤型に製剤化したものでも、また単独に製剤化したものを同時に又は間隔を空けて別々に使用できるようにしたキットであってもよい。

【0025】

本発明のロリクリン発現促進剤等は、それ自体、ロリクリンの発現を促進するため、角層の形成を促進するため、肌のくすみを改善するための医薬品、医薬部外品、化粧品であってもよく、或いは当該医薬品、医薬部外品、化粧品に配合して使用される素材又は製剤

10

20

【0026】

当該医薬品（医薬部外品を含む、以下同じ）は、ユーカリ又はその抽出物、及び桃又はその抽出物を、ロリクリンの発現を促進するため、角層の形成を促進するため、肌のくすみを改善するための有効成分として含有する。さらに、該医薬品は、該有効成分の機能が失われない限りにおいて、必要に応じて薬学的に許容される担体、又は他の有効成分、薬効成分等を含有していてもよい。

医薬品の投与形態は任意であるが、好ましくは非経口投与である。非経口投与のための剤形としては、皮膚外用、経皮、経粘膜、経鼻、経腸、注射、坐剤、吸入、貼付等の各製剤が挙げられる。このうち、好適な製剤形態は皮膚外用剤であり、具体的には、軟膏、乳化液、クリーム、乳液、ローション、ジェル、エアゾール等の形態が挙げられる。

30

【0027】

当該化粧品は、ユーカリ又はその抽出物、及び桃又はその抽出物を、ロリクリンの発現を促進するため、角層の形成を促進するため、肌のくすみを改善するための有効成分として含有する。さらに、該化粧品は、該有効成分の機能が失われない限りにおいて、必要に応じて化粧料に許容される担体、又は他の有効成分、化粧成分等を含有していてもよい。

化粧品の好ましい例としては、顔、ボディ用の化粧料（例えば、ローション、ゲル、クリーム、パック等）、メイクアップ用化粧料、顔又はボディ用の洗浄料等が挙げられる。

【0028】

斯かる医薬品や化粧品の各製剤は、ユーカリ又はその抽出物、及び桃又はその抽出物を、必要に応じて薬学的に又は化粧料に許容される担体、上述した他の有効成分、薬効成分、化粧成分等と組み合わせて、常法に従って製造することができる。

当該薬学的に又は化粧料に許容される担体としては、例えば、各種油剤、界面活性剤、ゲル化剤、緩衝剤、防腐剤、酸化防止剤、溶剤、分散剤、キレート剤、増粘剤、紫外線吸収剤、乳化安定剤、pH調整剤、色素、香料等が挙げられる。

当該他の有効成分、薬効成分、化粧成分としては、例えば、植物抽出物、殺菌剤、保湿剤、抗炎症剤、抗菌剤、角質溶解剤、清涼剤、抗脂漏剤、洗浄剤、メイクアップ成分等が挙げられる。

【0029】

上記の医薬品や化粧品の製剤中のユーカリ又はその抽出物の含有量は、製剤の形態に応

40

50

じて異なるため一概には言えないが、例えば製剤の総量を基準として、固形分換算で、好ましくは0.00006質量%以上、より好ましくは0.0001質量%以上、よりさらに好ましくは0.0002質量%以上であり、また、好ましくは0.006質量%以下、より好ましくは0.002質量%以下、よりさらに好ましくは0.0006質量%以下である。

また、上記の医薬品や化粧品の製剤中の桃又はその抽出物の含有量は、製剤の形態に応じて異なるため一概には言えないが、例えば製剤の総量を基準として、固形分換算で、好ましくは0.00003質量%以上、より好ましくは0.00006質量%以上、よりさらに好ましくは0.0003質量%以上であり、また、好ましくは0.006質量%以下、より好ましくは0.0018質量%以下、よりさらに好ましくは0.0006質量%以下である。

10

【0030】

本発明のロリクリン発現促進剤等において、ユーカリ又はその抽出物と桃又はその抽出物の比率は、ロリクリン発現促進の観点、角層形成促進の観点から、その質量比〔ユーカリ又はその抽出物の固形分換算/桃又はその抽出物の固形分換算〕で、好ましくは0.01以上、より好ましくは0.1以上、よりさらに好ましくは0.8以上であり、また好ましくは300以下、より好ましくは30以下、よりさらに好ましくは4以下である。また、該質量比〔ユーカリ又はその抽出物の固形分換算/桃又はその抽出物の固形分換算〕は、好ましくは0.01~300、より好ましくは0.1~30、よりさらに好ましくは0.8~4である。

20

【0031】

ユーカリ又はその抽出物の投与量又は使用量は、本発明の効果を達成できる量であり得る。当該投与量又は使用量は、対象の種、体重、性別、年齢、状態、又はその他の要因に従って変動し得るが、皮膚外用剤等の非経口の場合には、成人(60kg)1人当たり1回、ユーカリ又はその抽出物の固形分換算での使用質量として、好ましくは0.0012 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上、より好ましくは0.002 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上、よりさらに好ましくは0.004 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上であり、また好ましくは0.12 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以下、より好ましくは0.04 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以下、よりさらに好ましくは0.012 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以下である。また、桃又はその抽出物の投与量又は使用量は、成人(60kg)1人当たり1回、桃又はその抽出物の固形分換算での使用質量として、好ましくは0.0006 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上、より好ましくは0.0012 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上、よりさらに好ましくは0.006 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上であり、また好ましくは0.12 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以下、より好ましくは0.036 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以下、よりさらに好ましくは0.012 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以下である。

30

本発明では斯かる量を1日に1回~複数回に分けて、1日間以上、好ましくは7日間以上、より好ましくは14日間以上、よりさらに好ましくは42日間以上、反復・継続して投与又は使用し得る。

【0032】

本発明のロリクリン発現促進剤等を投与又は使用する対象としては、それを必要とする若しくは希望するヒト又は非ヒト動物等であれば特に限定されない。対象の好ましい例として、ロリクリン発現促進、角層形成促進、肌のくすみ改善を所望するヒトが挙げられる。非ヒト動物としては、類人猿、その他霊長類等の非ヒト哺乳動物等が挙げられる。

40

また、本発明のロリクリン発現促進剤等を投与又は使用する部位としては、特に限定されないが、好ましくは顔、頸、腕、手の甲、指、脚、足の甲等が挙げられる。

【実施例】

【0033】

実施例1 ロリクリン発現促進作用

植物抽出物

ユーカリエキスは、ユーカリの葉を80%(v/v)の1,3-ブチレングリコール水溶液で抽出したものをを用いた(丸善製薬社製、ユーカリ抽出液BG-KA。固形分濃度0

50

． 2 % (w / v)) 。

ピーチリーフエキスは、桃の葉を 20 % (v / v) の 1 , 3 - ブチレングリコール水溶液で抽出し、最終的に 40 % (v / v) の 1 , 3 - ブチレングリコール水溶液に調製したものをを用いた (一丸ファルコス社製、ピーチリーフリキッド B (登録商標)) 。固形分濃度 0 . 6 % (w / v)) 。

【 0 0 3 4 】

実験用細胞培養

細胞は、正常ヒト表皮角化細胞 (新生児包皮由来 ; クラボウ) をを用いた。細胞の増殖培養には E p i L i f e M e d i u m , w i t h 6 0 μ M c a l c i u m (T h e r m o F i s h e r) に H K G S (T h e r m o F i s h e r) を添加して使用した。また、素材の添加培養として、E p i L i f e M e d i u m , w i t h 6 0 μ M c a l c i u m に H K G S K i t (B P E 及び E G F 不含、T h e r m o F i s h e r) を添加して使用した。細胞培養は 37 ° C 、 5 % C O ₂ の環境下で常法に従って行った。

10

【 0 0 3 5 】

タンパク質の抽出とロリクリン発現解析

正常ヒト表皮角化細胞を、6 穴プレート (コラーゲンコート ; C o r n i n g) に 1 . 5 × 1 0 ⁵ c e l l s / w e l l の密度で播種し、増殖培地にて 1 日培養した後、素材添加培地に置き換えさらに 1 日培養した。翌日、80 % (v / v) 1 , 3 - ブチレングリコールに溶解したユーカリエクス (0 . 3 % (v / v) の濃度で添加) と 40 % (v / v) 1 , 3 - ブチレングリコールに溶解したピーチリーフエキス (0 . 1 % (v / v) の濃度で添加) を添加し、48 時間培養した後、PBS で 1 回洗浄、P r o t e a s e / P h o s p h a t a s e I n h i b i t o r C o c k t a i l (C e l l S i g n a l i n g) を 1 0 0 倍希釈で添加した R I P A b u f f e r (S I G M A) に溶解し細胞を回収した。細胞懸濁液はホモジナイズ (超音波破碎) を行い、遠心 (1 5 , 0 0 0 × g , 1 0 m i n) 処理後、上清を回収した。その後、P i e r c e (登録商標) B C A P r o t e i n A s s a y K i t (T h e r m o F i s h e r) を用いてタンパク質定量を行った。検出には 8 ~ 1 0 μ g のタンパク質を要した。

20

サンプルを N u P A G E (登録商標) 4 - 1 2 % S D S (s o d i u m d o d e c y l s u l f a t e) - p o l y a c r y l a m i d e g e l (T h e r m o F i s h e r) をを用いた電気泳動により分離し、P V D F 膜に転写後、5 % (w / v) スキムミルクを含む T B S - T (T w e e n 2 0 0 . 1 % (w / v)) で 1 時間ブロッキングし、ブロッキング溶液で 2 0 0 0 倍希釈した一次抗体 (A n t i - L o r i c r i n a n t i b o d y ; a b c a m) を用いて 4 ° C で一晩インキュベートした。PBS - T で 1 5 分 3 回洗浄後、ブロッキング溶液で 4 0 0 0 倍希釈した二次抗体 (抗ウサギ I g G 抗体 (H R P 標識) ; D a k o) を用いて室温下で 1 時間インキュベートした。PBS - T で 1 0 分 3 回洗浄後、発光試薬 S u p e r S i g n a l (登録商標) W e s t D u r a E x t e n d e d D u r a t i o n s u b s t r a t e (T h e r m o F i s h e r) を用いて、検出器 (A m e r s h a m I m a g e r 6 0 0) にて撮影を行った。バンド濃度は、A m e r s h a m I m a g e r 6 0 0 を用いて定量した。測定データは、対照群の値を 1 としてロリクリンのタンパク質発現量を相対的に評価した。

30

40

結果を表 1 に示す。

【 0 0 3 6 】

【表 1】

添加素材	ロリクリン発現量 (対照群を 1 とした相対表示)
対照群	1.00±0.21 **
ユーカリエクス (0.3%)	1.94±0.37 *
ユーカリエクス (0.3%) +ピーチリーフエキス (0.1%)	4.53±1.62
ピーチリーフエキス (0.1%)	2.21±0.14 *

(*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$ (vs. ユーカリエクス+ピーチリーフエキス)、Tukey にて検定)

【 0 0 3 7 】

表 1 から明らかなように、ユーカリエクスとピーチリーフエキスを併用して添加した群では、ユーカリエクスとピーチリーフエキスをそれぞれ単独で添加した群よりも相乗的にロリクリンの発現が促進されることが確認された。

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 36/736 (2006.01)	A 6 1 K 36/61	
A 6 1 Q 19/00 (2006.01)	A 6 1 K 36/736	
	A 6 1 Q 19/00	
F ターム (参考)	4C083 AA111 AA112 CC02 CC04 CC05 CC07 CC11 CC23 DD08 DD22 DD23 DD27 DD31 EE12 FF01	
	4C088 AB52 AB57 AC05 BA08 BA09 BA10 CA03 CA06 CA08 MA13 MA17 MA22 MA28 MA31 MA32 MA55 MA56 MA59 MA60 MA63 MA66 NA05 NA14 ZA89 ZC02 ZC75	