

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-515132
(P2025-515132A)

(43)公表日 令和7年5月13日(2025.5.13)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 8/9717(2017.01)	A 6 1 K 8/9717	4 C 0 8 3
A 6 1 Q 19/08 (2006.01)	A 6 1 Q 19/08	
A 6 1 Q 19/00 (2006.01)	A 6 1 Q 19/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全28頁)			
(21)出願番号	特願2024-565068(P2024-565068)	(71)出願人	501105842
(86)(22)出願日	令和5年5月4日(2023.5.4)		ジボダン エス エー
(85)翻訳文提出日	令和6年12月27日(2024.12.27)		スイス国 1 2 1 4 ヴェルニエ、 シュ
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/061743		マン ド ラ パルフウムリー 5 番
(87)国際公開番号	WO2023/213918	(74)代理人	110003971
(87)国際公開日	令和5年11月9日(2023.11.9)		弁理士法人葛和国際特許事務所
(31)優先権主張番号	2206529.6	(72)発明者	ユモー, アン
(32)優先日	令和4年5月5日(2022.5.5)		フランス共和国 2 2 5 6 0 イル グラ
(33)優先権主張国・地域又は機関			ンド、アンス ド ポールジュラン
	英国(GB)	(72)発明者	ムニエ, マリー
(31)優先権主張番号	2210574.6		フランス共和国 5 1 1 1 0 ボマクル、
(32)優先日	令和4年7月19日(2022.7.19)		ルート デ バザンクール
(33)優先権主張国・地域又は機関		(72)発明者	スカンドレラ, アマディン
	英国(GB)		フランス共和国 5 1 1 1 0 ボマクル、
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ		ルート デ バザンクール
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 マストカルパス・ステラタス抽出物の調製方法

(57)【要約】
マストカルパス・ステラタス抽出物の調製方法、および当該抽出物の化粧用用途が開示されている。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下のステップを含むマストカルパス・ステラタス抽出物の調製方法：

- (i) マストカルパス・ステラタスを水抽出して第1液相と第1固相を得る；
- (ii) 高温での第1固相の酸加水分解；
- (iii) 相分離して、第2液相と第2固相を得る；および
- (iv) 第1液相と第2液相を組み合わせ、マストカルパス・ステラタス抽出物を得る。

【請求項 2】

水抽出の前に、マストカルパス・ステラタスが乾燥および/または切断および/または粉砕される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

水抽出は、マストカルパス・ステラタスを水、特に脱イオン水中で、約 2 ～ 10 %、より好ましくは約 4 ～ 5 % の濃度で、約 10 ～ 30 °C、より好ましくは約 20 °C の温度で、約 5 ～ 60 分間、より好ましくは約 15 分間浸軟させることを含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

第1液相と第1固相は、遠心分離、ふるい分け、およびろ過のいずれか1つ以上によって分離される、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

酸加水分解が、約 1 ～ 4 の pH、より好ましくは約 1.5 ～ 2.5 の pH、および最も好ましくは約 2 の pH で行われる、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

酸加水分解が、約 50 ～ 90 °C の温度で、より好ましくは約 70 ～ 90 °C の温度で、最も好ましくは約 80 °C の温度で行われる、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

酸加水分解後に、pH を約 4 ～ 8 の pH、より好ましくは約 4.5 ～ 6 の pH、特に約 5 の pH に調整するステップをさらに含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

ステップ (iii) の相分離は、遠心分離、ろ過、振動ふるい分け、および絞りの1つ以上を含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の方法で得られた、または、入手可能なマストカルパス・ステラタス抽出物。

【請求項 10】

請求項 9 に記載のマストカルパス・ステラタス抽出物と美容上許容される賦形剤を含む化粧用組成物。

【請求項 11】

スキンケア組成物である、請求項 10 に記載の化粧用組成物。

【請求項 12】

マストカルパス・ステラタス抽出物、特に請求項 9 に記載のマストカルパス・ステラタス抽出物、または請求項 10 もしくは 11 に記載の化粧用組成物を二重あごに局所適用するステップを含む、二重あごを低減する方法。

【請求項 13】

二重あごの低減のための、脂肪分解の促進のための、皮膚の弾力性の増加のための、コラーゲン合成の刺激のための、皮膚の水和のための、皮膚の老化の影響を低減するための、および/または皮膚の老化の影響の防止のための、請求項 9 に記載のマストカルパス・ステラタス抽出物または請求項 10 もしくは 11 に記載の化粧用組成物の、使用。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、マストカルパス・ステラタス抽出物の調製方法、こうして得られたマストカルパス・ステラタス抽出物、マストカルパス・ステラタス抽出物を含む化粧用組成物、およびその化粧品における使用に関する。

【背景技術】

【0002】

マストカルパス・ステラタスは、一般にカラギーナンモスまたはフォールスアイリッシュモスとして知られており、紅藻の海藻部門であるRhodophyceae部門の種である。マストカルパス・ステラタスは、潮間帯中部と潮間帯下部の岩石に一般的に生じる。それは、アイルランドとイギリスのほとんどの海岸で一般に見出される。他の記録された場所には、フランス（イギリス海峡、北東大西洋）、アイスランド、フェロー諸島、北ロシアからリオデオロ、カナダ（ニューファンドランド）から米国（ノースカロライナ）が含まれる。

10

【0003】

マストカルパス・ステラタスは円盤状のホールドファスト茎から生え、葉状体は、平らなコンドルス・クリスパスとは異なり、溝がついている。それは、高さ10～20cmまで成長し、二分法で枝分かれする。葉状体は軟骨状で赤褐色で、緑がかった色または紫がかった色をしている。成熟した藻類は、直径1mmまでの直立したフィラメント上に発達する生殖構造を示す。それは、色は赤褐色、紫色、または退色している。

【0004】

マイケル・ギリーによると、アイルランドの海藻採集に関する最も初期の記録は、修道士による12世紀の詩によって証明されている。2001年にアイルランドの海藻養殖市場を分析したところ、*M. stellatus*と*C. crispus*を合わせた推定年間国内海藻収穫量は100トン未満であった。*M. stellatus*は、配偶体の生活相の間に収穫される。これは、硫酸化カラギーナンが多い後の相では、その岩石から取り出すのが難しいためである。食品および医薬業界は、抗酸化特性、抗凝固特性、増粘特性、またはゲル化特性がある海藻に関心を持っている。*M. stellatus*のゲル化特性は、その健康特性と適用に加えて、生分解性フィルムを作ることができる。これは、食品の保存や機能性食品の開発において、プラスチックに代わる持続可能で食用の代替品となり得る。

20

【0005】

EP 1 743 628 A1は、25～50重量%のフロリドシドと10～25重量%のイセチオン酸との、質量比が1：5の組み合わせと担体を含む紅藻抽出物を含む化粧用組成物に関する。この組成物は、皮膚を水和し、および/または皮膚の老化を防止するために用いることができる。

30

【0006】

FR 2 946 878 B1は、メラニン生成阻害剤としてのフロリドシドまたは紅藻抽出物の化粧用用途に関する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

驚いたことに現在、特殊な抽出法を用いることで、脂肪溶解活性があり、皮膚の弾力性を増加することができるマストカルパス・ステラタス抽出物が得られ、二重あごを低減できることが見出された。

40

【課題を解決するための手段】

【0008】

したがって、第一の側面では、本発明は、マストカルパス・ステラタス抽出物を調製する方法を提供する。方法は、次のステップを含む：

(i) マストカルパス・ステラタスを水抽出して第1液相と第1固相を得る；

(ii) 高温での第1固相の酸性加水分解；

(iii) 相分離して、第2液相と第2固相を得る；および

(iv) 第1液相と第2液相を組み合わせ、マストカルパス・ステラタス抽出物を得る。

50

【0009】

第二の側面では、本発明は、本発明の方法によって得られた、または本発明の方法によって得られるマストカルパス・ステラタス抽出物に関する。

【0010】

第三の側面では、本発明は、本発明のマストカルパス・ステラタス抽出物と美容上許容される賦形剤とを含む化粧用組成物に関する。

【0011】

第四の側面では、本発明は、マストカルパス・ステラタス抽出物、特に本発明のマストカルパス・ステラタス抽出物または本発明の化粧用組成物を二重あごに局所適用するステップを含む、二重あごを低減する方法に関する。

10

【0012】

第五の側面では、本発明は、二重あごを低減するための、脂肪分解を増強するための、皮膚の弾力性を高めるための、コラーゲン合成を刺激するための、皮膚を水和するための、皮膚の老化の影響を軽減するための、および/または皮膚の老化の影響を防止するための、本発明のマストカルパス・ステラタス抽出物または本発明の化粧用組成物の使用に関する。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】図1は、AFM測定を示す。

【図2】図2は、写真で分析した2次元でのコラーゲン線維の配向の分布を示す。

20

【図3】図3は、マストカルパス・ステラタス抽出物を1%含むクリームを適用したボランティアの1人を対象としたAEVA HE（登録商標）測定の例示的な写真を示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明およびその好ましい特徴については、以下でより詳細に説明する。

疑義の回避のために、本発明の所与の側面、特色およびパラメータについて示される優先度、選択肢、具体的な特色および類似のものは、文脈が別段に示さない限り、本発明の同じまたは他の側面、特色およびパラメータについて示されるとおりの、任意の、または全ての他の、優先度、選択肢、具体的な特色および類似のものとの組み合わせにおいて開示されているものとしてみなされるべきである。

30

【0015】

本発明の方法は、マストカルパス・ステラタスを水抽出して、第1の液相と第1の固相を得ることを含む。

【0016】

水抽出は、マストカルパス・ステラタス植物全体に対して行うことができる。あるいは、茎および/または葉状体など、植物の特定の部分のみを使用することもできる。

【0017】

水抽出の前に、マストカルパス・ステラタスを乾燥させたり、および/または、細かく加工することができる。たとえば、切断もしくは粉碎もしくは圧搾もしくはみじん切り、または当業者に公知の任意のその他の適切な方法によって行うことができる。

40

【0018】

したがって、一態様では、マストカルパス・ステラタスは水抽出の前に乾燥される。藻類は、低温（約40℃など）のオープンや太陽の下など、任意の適切な方法で乾燥できる。乾燥藻類を使用すると、保管と物流が容易になる。代替的に、例えば、新鮮な藻類または冷凍藻類を使用することも可能である。

【0019】

一態様では、マストカルパス・ステラタスは、水抽出の前に、より小さな断片に加工され、特に切断および/または粉碎される。これにより、抽出プロセスの効率が改善する。好ましくは、水抽出の前に、マストカルパス・ステラタスを長さ約15~20mmの断片に加工する（例えば、断片は、以下のサイズ分布を有し得る：2360μmを超えると5~10

50

%、2360 μm 未満で1000 μm を超えると80～90%、1000 μm 未満で10～15%)。これにより、抽出プロセスを最適化できると同時に、最初の抽出ステップでカラギーナンを抽出する必要がなくなる。本発明の方法では、好ましくは、藻類に含まれる全てのカラギーナンは酸加水分解に供される。

【0020】

水抽出は典型的には、水、特に脱イオン水を使用して行われる。代替的には、例えば通常の水道水、またはグリセロール、プロパンジオール、エタノール、その他の極性溶媒などの添加剤を含む水、または緩衝液を使用することも可能である。

【0021】

一態様では、水抽出は、マストカルパス・ステラタスを水中、特に脱イオン水中で浸軟させることを含む。

10

【0022】

水抽出、特に水中での浸軟は、水中のマストカルパス・ステラタスの好適な濃度で行うことができる。

【0023】

一態様では、水抽出物は、マストカルパス・ステラタスを水中、特に脱イオン水中で、約2～10%、より好ましくは約4～5%、例えば約4.8%の濃度で浸軟させることを含む。

【0024】

本開示全体を通して、パーセンテージ(%)の表示は、特に明記されていない限り、重量パーセンテージ(w/w)を指す。

20

【0025】

水抽出、特に水中での浸軟は、室温で行うことができる。代替的には、わずかに高い温度または低い温度を使用することも可能である。

【0026】

一態様では、水抽出物は、マストカルパス・ステラタスを約10～30℃、より好ましくは約20℃の温度で浸軟させることを含む。

【0027】

水抽出、特に水中での浸軟は、使用する温度および/または濃度に応じて、好適な期間行うことができる。

30

【0028】

一態様では、水抽出物は、マストカルパス・ステラタスを約5～60分間、より好ましくは約15分間浸軟させることを含む。

【0029】

特定の態様では、水抽出物は、マストカルパス・ステラタスを水、特に脱イオン水中で、約2～10%、より好ましくは約4～5%の濃度で、約10～30℃、より好ましくは約20℃の温度で、約5～60分間、より好ましくは約15分間浸軟させることを含む。

【0030】

第1の液相と第1の固相は、任意の適切な方法を用いて分離することができる。好ましい方法は、例えば水抽出の規模によって異なり得るが、粒子サイズ、液相の粘度、または利用可能な機器などの他の因子によっても異なり得る。遠心分離、ふるい分け、および/またはろ過が特に好適な方法である。

40

【0031】

一態様では、第1の液相と第1の固相とが、遠心分離、ふるい分け、および濾過のうちの1つ以上によって分離される。

【0032】

第1相分離後、第1液相を好適な条件下で保管してもよい。たとえば、第1液相は、残りの抽出プロセスの間、光から保護されて、周囲温度で数時間(たとえば約3～4時間)保管できる。さらに、第1液相は、(極性)溶媒などの好適な安定剤を添加することによって安定化されてもよい。例えば、プロパンジオールを20%添加することで、第1液相

50

を安定化させることができる。

【0033】

第1固相の酸加水分解は、特に藻類材料に含まれるカラギーナンを加水分解するために使用される。

【0034】

第1固相の酸加水分解は、好適なpHで行ってもよい。所望の加水分解度に応じて、わずかに高いpHまたは低いpHを選択できる。

【0035】

一態様では、酸加水分解は、約1～4のpH、より好ましくは約1.5～2.5のpH、そして最も好ましくは約2のpHで行われる。

【0036】

好適な酸を添加することにより、所望のpHが得ることができる。硫酸、塩酸、クエン酸およびそれらの混合物が特に適している。

【0037】

一態様では、酸加水分解は、硫酸、塩酸、クエン酸またはそれらの任意の混合物を添加することを含む。

【0038】

マストカルパス・ステラタスと酸の比率は、所望の加水分解度に応じて調整することもできる。好適な割合は、例えば、約3～6%の硫酸、好ましくは約4.5%の硫酸である。

【0039】

酸加水分解は高温で行われる。所望の加水分解度に応じて、より高い温度またはより低い温度を選択することができる。

一態様では、酸加水分解は、約50～90℃の温度で、より好ましくは約70～90℃の温度で、最も好ましくは約80℃の温度で行われる。

【0040】

酸加水分解の持続時間は、所望の加水分解度に応じて調整することもできる。持続時間が長いほど、重合度は低くなる。

【0041】

一態様では、酸加水分解は、約1時間から3時間、より好ましくは約2時間の期間にわたって行われる。

【0042】

酸加水分解は、例えば、pHを上げたり、温度を下げたりすることによって停止できる。

【0043】

一態様では、本発明の方法は、酸加水分解後に、pHを約4～8のpH、より好ましくは約4.5～6のpH、特に約5のpHに調整するステップをさらに含む。

【0044】

pHは、好適な塩基、例えば水酸化ナトリウムなどのミネラル塩基を添加することで調整できる。

【0045】

酸加水分解後、必要に応じてpHを調整した後、相分離を行って第2の液相と第2の固相を得る。この相分離は、遠心分離、ろ過、振動ふるい分け、および/または絞り(wringing)など、任意の好適な手段で実現できる。

【0046】

したがって、一態様では、ステップ(iii)の相分離は、遠心分離、ろ過、振動ふるい分け、および絞りのうちの1つ以上を含む。

【0047】

任意に、第1液相と組み合わせる前に、好適な安定剤を第2液相に添加してもよい。例えば、第2液相は、例えば20%のプロパンジオールの(極性)溶媒を添加することによ

10

20

30

40

50

って安定化され得る。好ましくは、第1液相と第2液相の両方に同じ安定剤を用いる。

【0048】

最後に、第1の液相と第2の液相を組み合わせて、本発明のマストカルパス・ステラタス抽出物を得る。

【0049】

任意に、本発明のマストカルパス・ステラタス抽出物は、第1液相と第2液相を組み合わせた後、例えば0.3 μmまでろ過してもよい。

【0050】

任意に、本発明のマストカルパス・ステラタス抽出物は、第1液相と第2液相を組み合わせた後、例えば約60℃まで加熱してもよい。これにより、おそらくフィコエリトリンなどの色素が破壊され、抽出物のピンク色が低減され得る。

10

【0051】

以下の表は、本発明の第1液相、第2液相、およびマストカルパス・ステラタス抽出物の比較を示す。

【表1】

	第1液相	第2液相	本発明のマストカルパス・ステラタス抽出物
最終pH	6.06-6.77	4.84-5.21	5.45-6.10
乾燥物 (%)	0.98-1.51	2.19-2.43	1.63-1.78
フロリドシド (g/l)	0.87-1.72	0.25-0.74	0.83-0.86
シノリン (g/l)	0.13-0.20	0.03-0.07	0.07-0.11
総中性糖分 (g/l)	データなし	データなし	10.42

20

【0052】

マストカルパス・ステラタス抽出物は、使用目的や所望の濃度に応じて、そのまま使用することも、希釈または濃縮することもできる。

【0053】

本発明のマストカルパス・ステラタス抽出物は、好適な条件、例えば周囲温度で保管することができ、好ましくは光から保護されてもよい。

【0054】

30

本発明はまた、本発明の方法によって得られた、または本発明の方法によって得られるマストカルパス・ステラタス抽出物にも関する。

【0055】

当業者により理解されるであろうとおり、本明細書において使用される場合、「～から得ることができる」という用語は、抽出物は、植物から得られてもよく、または植物から単離されてもよく、または、例えば化学合成もしくは酵素による産生により、代替の供給源から得られてもよいことを意味する。一方、本明細書において使用される場合、「得られる」という用語は、抽出物が植物供給源から直接的に得られることを意味する。

【0056】

本発明のマストカルパス・ステラタス抽出物には、いくつかの有益な化粧用効果があることが見出されており、これは、インビトロ研究と臨床研究の両方で証明されている（下記の例を参照）。

40

【0057】

特に、マストカルパス・ステラタス抽出物は、二重あごを低減し、脂肪分解を促進し、皮膚の弾力性を高め、コラーゲン合成を刺激し、皮膚を水和し、皮膚の老化の影響を低減し、皮膚の老化の影響を防ぐことができることが見出された。

【0058】

マストカルパス・ステラタス抽出物は、皮膚に局所適用するのが有利である。

【0059】

さらなる側面では、本発明は、本発明のマストカルパス・ステラタス抽出物と美容上許

50

容される賦形剤とを含む化粧用組成物を提供する。本発明の化粧用組成物は、局所適用を目的としている。

【0060】

化粧用組成物中のマストカルパス・ステラタス抽出物の濃度は、所望の効果が得られるように選択されるべきである。

【0061】

ヒト皮膚における使用のための化粧用調製物の調製において一般に使用されるあらゆる賦形剤を、本発明において用いることができる。適切な賦形剤には、官能特性、皮膚への浸透、およびマストカルパス・ステラタス抽出物のバイオアベイラビリティに影響を与え得る成分が含まれるが、これらに限定されない。より具体的に言うと、それらは、水、油または界面活性剤などの液体を包含し、それらは石油、動物、植物または合成由来のもの、たとえばこれらに限定されないが、落花生油、大豆油、鉱油、ゴマ油、ヒマシ油、ポリソルベート、ソルビタンエステル、エーテルスルファート、スルファート、ベタイン、グリコシド、マルトシド、脂肪アルコール、ノノキシノール、ポロキサマー、ポリオキシエチレン、ポリエチレングリコール、デキストロース、グリセロール、ジギトニン等を包含する。

10

【0062】

皮膚へ局所的に適用するための製剤は、いかなる物理的形態をとってもよい。実例として化粧用組成物、および特にスキンケア組成物は、リポソーム組成物、混合リポソーム、オレオソーム、ニオソーム、エトソーム、ミリ粒子、マイクロ粒子、ナノ粒子および固体-脂質ナノ粒子、ベシクル、ミセル、界面活性剤の混合ミセル、界面活性剤-リン脂質混合ミセル、ミリスフェア、ミクロスフェアおよびナノスフェア、リボスフェア、ミリカプセル、マイクロカプセルおよびナノカプセル、ならびにマイクロエマルジョンおよびナノエマルジョンの形態であってよく、これらは、マストカルパス・ステラタス抽出物のより高い浸透性を達成するために添加することができる。

20

【0063】

化粧用組成物、および特にスキンケア組成物は、局所的な皮膚への適用または経皮的な適用に有用なあらゆる固体、液体、または半固体形態で製造することができる。よって、局所的なまたは経皮的な適用のこれらの調製物は、これらに限定されないが、以下を包含する：クリーム、多数のエマルジョン、たとえばこれらに限定されないが、水中油および/またはシリコーン型エマルジョン、油および/またはシリコーン中水型エマルジョン、水/油/水または水/シリコーン/水型エマルジョン、および油/水/油またはシリコーン/水/シリコーン型エマルジョン、マイクロエマルジョン、エマルジョンおよび/または溶液、液晶、無水組成物、水性分散体、油、ミルク、バルサム、泡、水性または油性ローション、水性または油性ゲル、クリーム、ハイドロアルコール溶液、ハイドログリコール溶液、ハイドロゲル、リニメント、セラ、石鹸、フェイスマスク、セラム、多糖類フィルム、軟膏、ムース、ポマード、ペースト、パウダー、バー、ペンシル、およびスプレーまたはエアロゾル（スプレー）、これらは、リーブオンおよびリンスオフ製剤を包含する。

30

【0064】

したがって、本発明はスキンケア組成物も提供する。

40

【0065】

本発明の化粧用組成物は、他の化粧用活性剤、例えば老化防止剤、保湿剤または水和剤をさらに含むことができる。

【0066】

一態様では、本発明の化粧用組成物は、WO 2020/201185に記載されているように、マンノース-6-リン酸とマンノースの混合物を含む老化防止剤をさらに含む。化粧用活性剤およびその態様および用途に関するWO 2020/201185の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0067】

50

さらに別の態様において、本発明は、マストカルパス・ステラタス抽出物、特に本発明によるマストカルパス・ステラタス抽出物、または本発明による化粧用組成物を二重あごに局所適用するステップを含む、二重あごを低減する方法も提供する。

【0068】

さらなる側面では、本発明は、二重あごを低減するための本発明のマストカルパス・ステラタス抽出物または本発明の化粧用組成物の使用にも関する。

【0069】

さらなる側面では、本発明は、脂肪分解を促進するための本発明のマストカルパス・ステラタス抽出物または本発明の化粧用組成物の使用にも関する。

【0070】

さらなる側面では、本発明は、皮膚の弾力性を高めるための本発明のマストカルパス・ステラタス抽出物または本発明の化粧用組成物の使用にも関連している。

【0071】

さらなる側面では、本発明は、コラーゲン合成を刺激するための本発明のマストカルパス・ステラタス抽出物または本発明の化粧用組成物の使用にも関連している。

【0072】

さらなる側面では、本発明は、皮膚を水和するための本発明のマストカルパス・ステラタス抽出物または本発明の化粧用組成物の使用にも関連している。

【0073】

さらなる側面では、本発明は、皮膚の老化の影響を低減するための本発明のマストカルパス・ステラタス抽出物または本発明の化粧用組成物の使用にも関連している。

【0074】

さらなる側面では、本発明は、皮膚の老化の影響を防止するための本発明のマストカルパス・ステラタス抽出物または本発明の化粧用組成物の使用にも関連している。

【実施例】

【0075】

本発明は、以下の非限定例によりさらに説明される：

【0076】

例1：マストカルパス・ステラタス抽出物

マストカルパス・ステラタスの乾燥物4.8%の水中の懸濁液を調製した（乾燥藻20 g + 浸透水396.67 g）。藻類材料を最初にハサミで長さ9 mmの薄片に切り、次に室温（22℃）で15分間攪拌しながら浸軟させた。バイオマス（=第1固相）と上清（=第1液相）をろ過（ワットマンフィルター、40 μm）によって分離した。1,3-プロパンジオールを上清に総量の20%の濃度で添加し、抽出物1を得た。次に、これを室温で保管し、抽出物2を調製する間、約3～4時間光から保護した。

【0077】

先の抽出の不溶性部分（=第1の固相）を、浸透水中の乾燥物の4.8%に再び懸濁した。次に、懸濁液を攪拌し、96%硫酸溶液でpH = 2に酸性化し、次いで、80℃に加熱した。酸加水分解は80℃で2時間続けた。2時間後、懸濁液を冷却し、10Mの水酸化ナトリウム溶液でpH = 5まで中和した。抽出物を遠心分離し（4500rpm、20℃、20分）、上清を固体から分離し、1,3-プロパンジオールを上清（=第2液相）に総量の20%の濃度で添加して抽出物2を得た。

【0078】

最後に、2つの抽出物1と2を組み合わせ、攪拌し、60℃になるまで加熱した。30分間加熱した後、混合物を即時に2.5 μmと0.3 μmで連続してろ過して、本発明によるマストカルパス・ステラタス抽出物を得た。

【0079】

このようにして得られた抽出物のpHは約5.45、乾燥質量含有量は約1.63%、ガードナー色は約2.1%、フロリドシド含有量は約0.86 g/lであった。

【0080】

10

20

30

40

50

例 2：ヒト線維芽細胞のトランスクリプトーム解析

正常なヒト皮膚線維芽細胞(NHDF)を、6ウェルプレートに1ウェルあたり300,000個の細胞で播種した。10% FCSで補充されたダルベッコの改良型イーグル培地で48時間培養した後、NHDFをリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で2回すすぎ、刺激前にFCSを含まない培地で一晚放置した。細胞を、マストカルパス・ステラタス抽出物で0.5%で刺激し、未処理の状態と比較した。6時間および18時間の刺激の後、エクストラクトオール法でトータルRNAを抽出した(Rio DC, Ares M Jr, Hannon GJ, Nilsen TWTRIzol (TRI試薬)を使用したRNAの精製。Cold Spring Harb Protoc. 2010 Jun;2010(6):pdb.prot5439. doi: 10.1101/pdb.prot5439.PMID:20516177)。RNAの品質を制御し、逆転写を行ってcDNAを取得した。RT-qPCRは、1ウェルあたり10 ngのcDNAを使用して、NHDFの皮膚弾力性に関与するさまざまな遺伝子のトランスクリプトーム発現を研究するために設計された特定のプレート上で行った。線維芽細胞で得られた遺伝子発現の結果は、PES1(ペスカディオロリボソーム生合成因子1)、GADD45A(成長停止およびDNA損傷誘導性アルファ)、およびHMBS(ヒドロキシメチルピランシターゼ)ハウスキーピング遺伝子に従って正規化された。データは、未処理状態に対する倍率変化で表される。

【0081】

結果

マストカルパス・ステラタス抽出物が皮膚の弾力性を改善できるかどうかを調べるために、マストカルパス・ステラタス抽出物で0.5%で処理した線維芽細胞についてトランスクリプトミクス研究を行い、皮膚の弾力性に関与するさまざまな遺伝子の発現を分析した。

【0082】

6時間の処置後、マストカルパス・ステラタス抽出物は、FBLN5、LOXL1、MFAP2などの弾性線維組織化に関与する遺伝子の発現をそれぞれ+34%、+32%、+10%有意に増加させた。それはまた、弾性線維の分解に関与するタンパク質をコードする遺伝子であるHPSEの発現を-53%減少させた。

【0083】

興味深いことに、マストカルパス・ステラタス抽出物で18時間処理した後でも、FBLN5とMFAP2の発現はそれぞれ+24%および+24%と有意に増加し、HPSEの発現は-40%減少した。

【0084】

マストカルパス・ステラタス抽出物はまた、COL3A1やCD44などの細胞外マトリックス構造に関与する遺伝子の発現をそれぞれ+33%と+58%刺激した。

【0085】

結果は、以下の表にまとめられている：

【表 2】

皮膚の弾力性の改善-トランスクリプトーム研究(倍率変化 対 未処置状態)						
時間	経路	遺伝子	変化の倍数	SEM	P 値	
6 h	弾性線維組織	FBLN5	1.344	0.01	0.0001	***
		LOXL1	1.318	0.03	0.0014	**
		MFAP2	1.103	0.03	0.0412	*
	分解	HPSE	-1.534	0.06	0.0183	*
18 h	弾性線維組織	FBLN5	1.243	0.08	0.088	#
		MFAP2	1.244	0.03	0.008	**
		MFAP5	1.063	0.02	0.081	#
	細胞外マトリックス	COL3A1	1.327	0.1	0.073	#
		CD44	1.579	0.21	0.098	#
	分解	HPSE	-1.401	0.06	0.0267	*

10

20

30

40

50

【0086】

このトランスクリプトミクス研究により、マストカルパス・ステラタス抽出物が皮膚の弾力性を改善する有望な候補であることが確認された。

【0087】

例3:ヒト皮膚外植片のプロテオーム解析

マストカルパス・ステラタス抽出物が皮膚の弾力性に及ぼす影響は、プロテオームレベルでさらに評価された。

【0088】

サンプル調製

若年ドナー（28歳）および成熟ドナー（59歳）からの皮膚外植片は、気液界面で生存率が維持された。若いドナーからの皮膚外植片は未処理のままにしておき、成熟ドナーからの皮膚外植片はマストカルパス・ステラタス抽出物で1%で局所処置を行い、未処置の状態と比較した。処置と培地（バイオプレディック・インターナショナルのMIL217C）は、5日間毎日更新された。この5日間の刺激の後、皮膚外植片をPBSで2回すすぎ、-80℃で凍結した。

【0089】

サンプル処理

せん断した組織を酸化ジルコニアビーズミックスに加え、700 μlのiST LYSEバッファ（デオキシコール酸、TCEP、クロロアセトアミド）を加えた。サンプルを2回のビーズビートサイクルで溶解した。ホモジネートをディアジェノードタンパク質抽出チューブに移し、共抽出した核酸とオルガネラをマイクロキャピテーションでせん断した（Bioruptor Pico、Diagenode）。iST LYSEバッファ（デオキシコール酸、TCEP、クロロアセトアミド）で煮沸することにより、タンパク質を可溶化、還元、アルキル化した。タンパク質濃度はBCA法によって測定された（Walker JM.タンパク質定量用のビシンコニン酸（BCA）アッセイ。Methods Mol Biol.1994;32:5-8. doi: 10.1385/0-89603-268-X:5.PMID:7951748.）。ペプチド抽出物は、iTS法（ステージチップ）に従って調製された。50 μgのタンパク質をLysCとトリプシンの混合物で消化した。ペプチドを混合モードの逆相陽イオン交換体SPE（固相抽出、PreOmics GmbH）で精製し、乾燥させ、100 μlの3%アセトニトリル-0.1%ギ酸水溶液に可溶化した。ペプチド濃度はBCA法を用いて測定した。

【0090】

LC-MS/MS

300ngのペプチドを各サンプルについて三通りに注入した。クロマトグラフィーは、C18（75 μm x 50 cm、材料2 μm）カラムを使用し、プレカラム上で3分間のトラッピングステップを行った後、300nl/分の流量で2.5%～35%のアセトニトリルの勾配を120分間かけて適用し、アルティメット3000（ダイオネクス）装置を用いて行った。データはQ-Exactive（サーモ）質量分析計を使用して取得した。MSスキャンは、70,000の解像度と60ミリ秒の累積時間で実行した。MS/MSスキャンは、各サイクルで最も強い10個のイオンに対して17,500の解像度で、蓄積時間は60ミリ秒で実施した。6545サイクルを実行したため、クロマトグラフィーピークあたり平均17サイクルであった。

【0091】

タンパク質同定

タンパク質は、SEQUEST-HTアルゴリズム（Tabb DL.SEQUESTファミリーツリー.J Am Soc Mass Spectrom 2015; 26 (11): 1814-1819. doi: 10.1007/s13361-015-1201-3）を使用して、ユニプロットから採掘されたヒトリファレンスプロテオームと消化に使用される酵素を収集したデータベースに対して同定した。検索パラメータは、酵素 = トリプシン（完全）、許容ミスクリアページ = 2、前駆体エラー許容値 = 10 ppm、フラグメントエラー許容値 = 0.02 Da、動的修飾=酸化（M）、脱アミド化（N/Q）、タンパク質末端修飾=アセチル化、静的修飾=カルバミドメチル（C）であった。

【0092】

偽発見率 (FDR) の決定は、パーコレーターアルゴリズム (Spivak M、Weston J、Bottou L、Kall L、Noble WS. ショットガンプロテオミクスデータセットからのペプチド同定のためのパーコレーターアルゴリズムの改良. J. Proteome Res. 2009 年 7 月 8 日 (7): 3737-45. doi: 10.1021/pr801109k. PMID: 19385687; PMCID: PMC2710313.) を使用して行った。

【0093】

SEQUEST-HTによって信頼度が低い状態で報告されたすべてのスペクトル (したがって同定されていないと見なされる) は、上記と同じデータベースに対してMS Amanda 2.0アルゴリズムによって再処理された。検索パラメータは、酵素 = トリプシン (完全)、許容ミスクリアページ = 2、前駆体エラー許容値 = 10 ppm、フラグメントエラー許容値 = 0.02 Da、動的修飾=酸化 (M) (P)、脱アミド化 (N/Q)、タンパク質末端修飾=アセチル化、Metロス、Metロス+アセチル、静的修飾=カルバミドメチル (C) であった。偽発見率 (FDR) の決定は、パーコレーターアルゴリズムを使用して行った。

10

【0094】

タンパク質の定量化

データは、プロテオームディスカバリー2.3ソフトウェア (サーモフィッシャーサイエンティフィック) のMinoraとフィーチャーマップパーを使用して処理した。ピーク積分パラメータは、取得後の再キャリブレーション=True (微細パラメータ)、最小トレース長=5、最小同位体数=2、同位体の最大デルタRT=0.2分、積分のPSM (ペプチド-スペクトルマッチ) 信頼度=高であった。

20

【0095】

クロマトグラフィーアライメントパラメータは、RTアライメント= TRUE、パラメータチューニング=ファイン、最大RTシフト= 5分、質量許容差10 ppmであった。特徴マッピングパラメータは、RT許容差 = 自動、質量許容差 = 自動、S/N しきい値 = 2 であった。

【0096】

統計分析は、プロテオームディスカバリー2.4ソフトウェア (サーモフィッシャーサイエンティフィック) の前駆体イオン定量(quantifier)ノードを使用して実行した。

【0097】

一般的な定量設定は、使用するペプチド = ユニーク+ RAZOR (ユニーク = 異なるタンパク質またはタンパク質グループで共有されていないペプチド、RAZOR = 複数のタンパク質グループが共有するペプチドであるが、ユニークなペプチドの数が最も多く、アミノ酸配列が最も長いタンパク質の定量にのみ使用される)、ペプチドの一意性についてタンパク質グループを検討する = True、チャンネルが欠落しているQuanの結果を拒否=Falseであった。前駆体定量設定は、面積に基づく前駆体存在量、最小数複製特徴= 50% (定量に使用するには、1つのグループのサンプルの少なくとも50%でペプチドが検出されなければならない) であった。正規化設定: 総ペプチド量 (同定されたすべてのペプチドについて、各注射における存在量値の総和を計算する。総存在量が最も多い注入を基準として、他のすべての注射における存在量値が注射ごとに一定の係数で修正される。これにより、最終的に総存在量はすべての注射で同じになる。)

30

40

【0098】

データ選択

最初の選択は、加齢によって有意に影響を受けるタンパク質 (成熟ドナー 対 若年ドナー) のみを選択し、マストカルパス・ステラタス抽出物 (処置された成熟ドナー 対 未処置の成熟ドナー) によって回復に向かわせることにより行った。今回のタンパク質セレクションでは、皮膚真皮の構造と弾力性に関与するタンパク質が同定され、5種類のタンパク質が注目された。

【0099】

結果

50

まず、若年ドナー（28歳）と成熟したドナー（59歳）を比較して、皮膚の老化がプロテオームに与える影響を評価した。MFAP4、TIMP1、FBLN5などの弾性線維組織化に関与するタンパク質（それぞれ-10%、-60%、-76%）や、COL1A1やCOL2A1などの真皮の他の構造タンパク質（それぞれ-75%）の発現が有意に減少していることが見出された。これにより、皮膚の老化が真皮構造に及ぼす悪影響が確認された。

【0100】

若年ドナーと比較した結果を以下の表にまとめる。

【表3】

老化の影響-プロテオミクス研究(倍数変化 対 若年ドナー)				
経路	遺伝子	変化の倍数	P値	
弾性線維組織	MFAP4	-1.098	<0.0001	***
	FBLN5	-1.756	<0.0001	***
真皮の構造と保護	TIMP1	-1.596	<0.0001	***
	COL1A1	-1.747	<0.0001	***
	COL2A1	-1.748	<0.0001	***

10

【0101】

次に、加齢により真皮構造が変化する成熟ドナーに対するマストカルパス・ステラタス抽出物の効果を調べた。若年ドナーと比較して減少していた上記の5つのタンパク質の発現は、マストカルパス・ステラタス抽出物で5日間処置した後に有意に増加することが見出された。実際、弾性組織の組織化に関しては、MFAP4、TIMP1、FBLN5の発現がそれぞれ+64%、+23%、+95%増加した。同様に、マストカルパス・ステラタス抽出物を使用すると、COL1A1とCOL2A1の発現がそれぞれ+17%と+14%増加した。

20

【0102】

成熟ドナーと比較した結果を以下の表にまとめる。

【表4】

皮膚の弾力性の改善-プロテオミクス研究(倍率変化 対 成熟ドナー)				
経路	遺伝子	変化の倍数	P値	
弾性線維組織	MFAP4	1.641	<0.0001	***
	FBLN5	1.953	<0.0001	***
真皮の構造と保護	TIMP1	1.229	<0.0001	***
	COL1A1	1.168	<0.0001	***
	COL2A1	1.141	<0.0001	***

30

【0103】

これらの結果は、マストカルパス・ステラタス抽出物が真皮の構造と弾性線維の組織化に有益であることをタンパク質レベルで確認する。

【0104】

例4 皮膚の生体力学的特性分析

サンプル調製

若年ドナー（19歳）および成熟ドナー（49歳）からの皮膚外植片は、気液界面で生存率が維持された。若年ドナーからの皮膚外植片は未処理のままにしておき、成熟ドナーからの皮膚外植片はマストカルパス・ステラタス抽出物で1%で局所処置を行い、未治療の状態と比較した。処置と培地は3日間毎日更新した。この3日間の刺激の後、皮膚外植片をPBSで2回すすぎ、OCT（商標）コンパウンドマウンティング培地で凍結保存し、厚さ20 μmの凍結切片とした。

40

【0105】

原子間力顕微鏡（AFM）によるヤング率分析

この研究で使用した原子間力顕微鏡は、付加型落射蛍光顕微鏡（Leica DMI8）を備えたBioscope Resolve（Bruker）である。この構成により、AFMプローブをサンプル

50

ル上に正確に配置できる。このユニークな組み合わせにより、機械取得から蛍光取得までの相関画像を取得することもできる。

【0106】

この研究では、QNM（定量的ナノメカニカルマッピング）Peakforce（登録商標）モードを使用した。AFMプローブは、0.4 N/mの理論上のばね定数、10 nm未満の曲率半径を担持する。毎回使用する前に、サファイア上でプローブのたわみ感度を測定し、そのばね定数も熱雑音法で校正した（Kim Y、Mandriota N、Goodnight D、Sahin O. 熱雑音法を用いたT字型原子間力顕微鏡カンチレバーの校正。Rev Sci Instrum.2020 Aug 1;91(8):083703. doi: 10.1063/5.0013091.PMID: 32872926; PMCID: PMC7413748.）。フォースの測定は空気中で行った（PBS 1X、バッチ番号：CP20-3404）。

10

【0107】

AFM測定は、図1に示すように、真皮にかかるフォースボリュームの取得を本質とする。画像の各ピクセルには、弾性係数（Ea）が抽出されるフォースインデンテーションカーブが対応している。一部の異常データはソフトウェアによって抑制されるため、エリアによって値の数が異なる場合がある。

【0108】

バイフォトリック顕微鏡によるコラーゲン線維組織解析

SHG（第2高調波世代）イメージングには、ZEISS LSM880倒立共焦点顕微鏡が使用された。使用したレーザーは、コヒーレント二光子パルスカメレオンレーザーであった。対物レンズは40倍の水対物レンズ「C-アポクロマート」であった。コラーゲンを画像化するために、サンプルを900 nmの波長で励起し、445 nmのフィルターで光を収集した。条件ごとに600 μm x 600 μmサイズの大きな画像を3枚作成した。

20

【0109】

データ分析は、画像Jと、画像あたり50 x 50 μmサイズの3つの表面上の平均グレイ値の分析を使用して行った。

【0110】

コラーゲン線維配向の研究は、Rozetaソフトウェアを使用して、画像あたり50 x 50 μmの3つの領域で行った。

【0111】

結果:皮膚の弾力性の回復

弾性率の測定により、皮膚の老化が表皮と真皮の両方に及ぼす影響が証明された。実際、49歳のドナーの弾性率は、19歳のドナーと比較して有意かつ強力に増加した。このことは、AFMプローブが、若年の皮膚と比較して、成熟した皮膚を変形させるのに高い力を必要とし、加齢とともに皮膚のしなやかさが失われることを意味する。

30

【0112】

しかし、マストカルパス・ステラタス抽出物を成熟皮膚表面に適用すると、表皮と真皮の弾性率が有意に低減し、肌のしなやかさが改善することを証明した。結果は、以下の表にまとめられている：

【表5】

40

皮膚のしなやかさ(弾性率(kPa))			
	若年の皮膚	成熟した皮膚	成熟した皮膚+マストカルパス・ステラタス抽出物 (1%)
平均	2.529	24.509	3.037
SEM	0.887	4.234	0.913
P値 対 若年の皮膚		<0.0001***	
P値 対 成熟した皮膚	0.05*		<0.0001***

【0113】

結果:真皮足場の回復

50

皮膚のしなやかさ/硬直特性は、主に真皮足場の組織化によって誘導される。加齢によって弾性率がどのように影響を受けるかを理解するために、真皮のコラーゲン線維の組織化を調べた。

【0114】

若年ドナーのコラーゲン線維は2次元組織を示すことが見出され、線維が少なくとも2方向に配向し、足場を構成していることを意味した。一方、成熟したドナーの真皮の線維は、より等方性の組織化を示していた。つまり、線維は主に一方向に配向しており、真皮の足場が失われていることを意味した。加齢に伴うコラーゲン線維の配向の変化は、足場の喪失につながり、皮膚のしなやかさの喪失に直接つながり得る。

【0115】

興味深いことに、成熟したドナーの皮膚外植片にマストカルパス・ステラタス抽出物を局所適用すると、コラーゲン線維の2D組織での再配向に繋がった。この二次元組織化は真皮足場の再組織化に有利に働き、AFMによって示された皮膚の生体力学的特性の改善を説明できる。図2は、写真で分析した2次元でのコラーゲン線維の配向の分布を示す。各方向で、バーが長いほど、それぞれの方向に配向する線維の数が多くなる。

【0116】

例5：脂肪分解活性

二重あごの形成に関与するもう1つの因子は、あごの脂肪組織の蓄積である。マストカルパス・ステラタス抽出物が脂肪組織の含有量を減らすことによって二重あごの体積を低減することができたかどうかを判断するために、成熟脂肪細胞を3Dマトリックスに埋め込んだ。

【0117】

ヒト成熟脂肪細胞の3D培養

成熟脂肪細胞は、ボディマス指数（BMI）が28.7 kg/m²の30歳の女性の皮下脂肪組織から得られ、インフォームドコンセントに基づいて組織が与えられた。成熟脂肪細胞は、コラゲナーゼによる消化後に皮下脂肪組織から単離した。単離した脂肪細胞を洗浄バッファで洗浄し、ペプチドヒドロゲルにカプセル化して、25 µlのサイズの3D脂肪細胞カプセルを形成した。脂肪細胞カプセルの形成は、内部標準化されたプロトコルに従い、カプセル間で約同数の脂肪細胞を有していた。次いで、細胞を安定化させるために37℃で24時間インキュベートした。0.5%のマストカルパス・ステラタス抽出物による処置は、培地を変更し、D0で開始した。培養培地は4日間の培養まで毎日交換した。培養培地を交換するたびに、細胞分泌物を収集し、遠心分離し、さらなる分析のために-80℃で凍結した。各培養条件は3通りに行った。

【0118】

グリセロールとアディポネクチンの細胞外分泌の定量化

72時間処理後の培養培地を採取した。アディポネクチンとグリセロールの濃度は、製造元の推奨に従って特定のキット（アディポネクチンキット、Duoset、DY1065、R&D Systems、グリセロールキット、Randox、GY105）に従ってそれぞれELISAアッセイと比色アッセイによって評価した。

【0119】

結果:グリセロール放出

脂肪細胞から放出されるグリセロールの評価は、72時間の処理後に脂肪細胞培養培地で行った。1 µMのイソプロテレノール（陽性対照）は、脂肪細胞に対する脂肪分解効果によりグリセロール放出を+196%有意に増加させ、このモデルを確認した。0.5%のマストカルパス・ステラタス抽出物も有意な効果を有し、72時間の処置後にグリセロールが+36%放出され、脂肪分解活性が証明された。

【0120】

結果は、以下の表にまとめられている：

10

20

30

40

50

【表 6】

グリセロール放出 (未処理の%)			
	未処理	イソプロテレノール	マストカルパス・ステラタス抽出物 (0.5%)
平均	100%	295.6	135.7
SEM	9.673	17.51	4.983
P値 対 未処理		0.05 *	0.05 *

【0121】

結果:アディポネクチン分泌

アディポネクチンは、成熟脂肪細胞から分泌される別の因子である。72時間の処置後、0.5%のマストカルパス・ステラタス抽出物がアディポネクチン分泌を+48%有意に増加させることが見出され、脂肪組織に対する溶解活性が確認された。

10

【0122】

結果は、以下の表にまとめられている：

【表 7】

アディポネクチン分泌 (未処理の%)		
	未処理	マストカルパス・ステラタス抽出物 (0.5%)
平均	100%	147.5
SEM	5.533	9.248
P値 対 未処理		0.05 *

20

【0123】

例6 臨床研究-皮膚の生体力学的特性、二重あごの低減、V字形の改善
処方

以下に説明する最初の組の臨床研究では、以下のINCI処方を有する化粧用製剤が使用された。

【0124】

AQUA/水、セチルアルコール、ステアリン酸グリセリル、PEG-75 ステアレート、CETETH-20、ステアレス-20、ネオペンタン酸イソデシル、マストカルパス・ステラタス抽出物、グリセリン、フェノキシエタノール、ジメチコン、フェノキシエタノール、メチルパラベン、プロピルパラベン、エチルパラベン、フレグランス

30

【0125】

プラセボ組成物では、マストカルパス・ステラタス抽出物は省略した。

より詳細には、以下である：

【表 8】

INCI	活性	プラセボ
水(AQUA)/水	88.30	87.30
セチルアルコール、グリセリルステアレート、ステアリン酸PEG-75、セテス-20、ステアレス-20	5	5
ネオペンタン酸イソデシル	4.5	4.5
マストカルパス・ステラタス抽出物	1	--
グリセリン	1	1
フェノキシエタノール	0.695	0.695
ジメチコン	0.3	0.3
フェノキシエタノール、メチルパラベン、プロピルパラベン、エチルパラベン	0.105	0.105
フレグランス	0.1	0.1

40

【0126】

パネルの説明

乾燥肌 (コルネオメトリー測定値 <70 a.u) で、目じりの小じわ(crow's feet)とあごの下垂が見られる44人のボランティアを対象とした単一施設研究を実施した。ボラン

50

ティアは、それぞれ次のように22人のボランティアからなる2つのグループに分けられた。

ー グループ1：マストカルパス・ステラタス抽出物を含むクリームを試験している平均年齢 49 ± 6 歳の女性22人

ー グループ2：プラセボクリームを試験している平均年齢 49 ± 5 歳の女性22人

【0127】

この研究は、Bio ECの標準運用手順に従い、「Guia para investigaciones con seres humanos」（人間に関する研究ガイドライン）で確立された規制および消費者安全科学委員会（SCCS）のガイドラインに従って実施された。

【0128】

ボランティアは、28日間、毎日朝と夕方に、夫々、マストカルパス・ステラタス抽出物を1%含有したクリームとプラセボクリームを適用した。

【0129】

この研究では、以下に説明するように、Cutometry（登録商標）分析とAEVA HE（登録商標）によるフリンジ保護を用いて生体力学的特性を分析した。

【0130】

Cutometer（登録商標）による皮膚の生体力学的特性測定

皮膚の機械的特性を測定することで、弾性組織構造（弾性線維、結合束の曲率、角質層のしわ）と粘性のように振る舞う(viscous-behaving)組織構造（間質液、内部付着物）の機能状態を査定できる。

【0131】

この研究は、Courage & KhazakaのCutometer（登録商標）MPA 580を使用して実施した。測定原理は吸引法に基づいている。デバイス内で負圧が発生し、皮膚がプローブの円筒形の開口部（直径2 mm）に引き込まれる。プローブの内部では、浸透深さは光学測定システムによって決定される。各吸引段階の後には緩和段階が続く。

【0132】

本研究では以下のプログラムを使用した。

ー サイクルの長さ：4秒（吸引：2秒、緩和：2秒）

ー 負圧：450 ミリバール

ー チャンバーの直径：2 mm

ー 測定エリア：目じりの小じわ

【0133】

負圧によって吸い上げられる皮膚の抵抗と元の位置に戻る能力は、各測定終了時に曲線として表示した。これらの曲線から、パラメータを計算できる。

ー 吸引段階では、負圧による皮膚の変形によって、まず弾性抵抗が決まり、次に粘性成分が決まり、これらが一緒になって肌の硬度を表す。

ー 緩和段階では、皮膚がすぐに回復することで皮膚の弾力性が決まり、皮膚が初期位置に戻るのが遅れると粘弾性成分が測定される。

【0134】

この研究では、以下のパラメータに焦点を当てた。

ー 吸引段階での皮膚の振幅を表すR0またはUf：同じ圧力では、皮膚が柔軟になるほど振幅が大きくなる。したがって、このパラメータは粘弾性の非必須性、つまり皮膚の硬度を評価する。

ー R5は正味弾性（ U_r/U_e ）を表す：緩和領域（ U_r ）の弾性部分を吸引領域（ U_e ）の弾性部分で割ったもの。

【0135】

これらのパラメータはD0とD28に測定された。

【0136】

AEVA HE（登録商標）による分析：二重あごの体積（V字形再成形）に焦点を当てる

ステレオイメージング技術と組み合わせた特許された（US7,821,649）のフリンジ投

10

20

30

40

50

影ユニットに基づいて、AEVA-HE（登録商標）システムは、しわの低減から体の再形成まで、さまざまな測定が可能である。それは、化粧用、美容、皮膚科の製品と処置の効果を定量化するように設計されている。

特に、それは、顔のたるみや二重あごの査定に使用できる。

【0137】

統計分析

インビボ研究について、Shapiro Wilk検定を使用して、生データがガウスの法則に従っているかどうかを検証した。正規分布データの場合、対応のないまたは対応のある学生t検定のいずれかを使用して平均値を比較した。非正規分布データの場合、対応のあるデータにはWilcoxon検定（対応あり）、対応のないデータにはKruskal-Wallis 検定に続いてMann-Whitney U検定（対応なし）を夫々使用した。

どのような統計的検定を使用しても、結果は次のように有意であると判断した。# $p < 0.1$ 、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 。

自己評価アンケートおよび毎日のログの結果の分析のために、カイ二乗検定がなされた（関連する回答の数を比較することからなる二分分析）。

【0138】

結果：皮膚の硬度と弾性の増加

最初の臨床研究では、マストカルパス・ステラタス抽出物（商標）を1%含むクリームまたはプラセボクリームを顔に適用した後、皮膚の皮膚生体力学的特性を測定した。28日間の適用後、Cutometer（登録商標）を使用して皮膚特性を評価し、R0およびR5パラメータを測定した。

【0139】

皮膚の硬度への影響：

28日間の適用後、R0パラメータの減少が観察された。これは、プラセボと比較してマストカルパス・ステラタス抽出物（-7%）での硬度が増加したことを示す。

さらに、マストカルパス・ステラタス抽出物の効果はプラセボ効果とは有意に異なり、以下のデータからわかるように、研究中に硬度が最大7倍まで有意に増加したことが見出された。

【表9】

	硬度効果 (R0)	マストカルパス・ステラタス抽出物 1% を含むクリーム (アクティブクリーム)	プラセボクリーム	アクティブ 対プラセボ
D0	平均 +/- SD (任意単位)	0.290 ± 0.040	0.278 ± 0.035	
D28	平均 +/- SD (任意単位)	0.271 ± 0.029	0.275 ± 0.041	
	D0に対する平均変動率	-7%	-1%	
	D0と比較した対応のある t検定	** $p < 0.01$	ns	
	対応のないt検定			# $p < 0.1$

【0140】

皮膚弾性への影響：

28日間の適用後、マストカルパス・ステラタス抽出物ではD0と比較してR5パラメータの有意な増加が観察された。プラセボでは、D0と比較してわずかな増加が見られた。測定ではさらに、以下のデータからわかるように、マストカルパス・ステラタス抽出物を含むクリームでは、プラセボクリームと比較して皮膚の弾性が改善された（+ 8%）こと

が示された。

【表 1 0】

	弾性 (R5)	マストカルパス・ステラタス抽出物 1% を含むクリーム (アクティブクリーム)	プラセボクリーム	アクティブ 対プラセボ
D0	平均 +/- SD (任意単位)	0.348 ± 0.059	0.375 ± 0.044	
D28	平均 +/- SD (任意単位)	0.374 ± 0.042	0.386 ± 0.042	
	D0に対する平均変動率	+8%	+3%	
	D0と比較した対応のあるt検定	** p<0.01	# p<0.1	
	対応のないt検定			# p<0.1

10

【0 1 4 1】

結果：二重あごの体積の減少

AEVA HE（登録商標）を使用して二重あごの体積への影響を測定した。

マストカルパス・ステラタス抽出物を1%含む活性クリームを28日間適用した後、二重あごの体積が明らかに低減したことが観察された。

20

【表 1 1】

	二重あご体積 [mm ³]	マストカルパス・ステラタス抽出物 1% を含むクリーム (アクティブクリーム)	プラセボクリーム	アクティブ 対プラセボ
D0	平均 +/- SD (mm ³)	587 ± 643.8	673.7 ± 278.8	
D28	平均 +/- SD (mm ³)	569 ± 647.3	683.0 ± 287.8	
	平均体積変化量 対 D0	-18 mm ³	+9 mm ³	
	D0と比較した対応のあるt検定	ns	# p<0.1	
	対応のないt検定			* p<0.05

30

【0 1 4 2】

図3は、マストカルパス・ステラタス抽出物を1%含むクリームを適用したボランティアの1人を対象としたAEVA HE（登録商標）測定の例示的な写真を示す。

【0 1 4 3】

結果：V字型の改善

40

この研究では、プラセボクリームに対して、マストカルパス・ステラタス抽出物を含むクリームを1日2回56日間適用した後、顔の楕円形に対するコラーゲンレベルをSiAscope（登録商標）で測定した。

28日および56日間の適用後、D0と比較して、マストカルパス・ステラタス抽出物を用いた、平均コラーゲンのそれぞれ+ 2.4%および+ 4.2%の有意な増加が観察された。プラセボでは、56日後にD0と比較してわずかな増加が見られた。マストカルパス・ステラタス抽出物を含む製品をプラセボと比較すると、マストカルパス・ステラタス抽出物はプラセボよりも28日後に3.4倍、56日後に2.8倍コラーゲンを改善できることが見出された。

【0 1 4 4】

50

データを以下の表に示す。

【表 1 2】

	コラーゲンレベル	マストカルパス・ステラタス抽出物 1% を含むクリーム (アクティブクリーム)	プラセボクリーム	アクティブ 対プラセボ
D0	平均 $\pm$ SD (任意単位)	142.21 $\pm$ 9.1	142.63 $\pm$ 12.5	
D28	平均 $\pm$ SD (任意単位)	145.67 $\pm$ 10.5	143.68 $\pm$ 11.6	
	D0に対する平均変動率	+2.4%	+0.7%	
	D0と比較した対応のあるt検定	**	ns	
	対応のないt検定			# p<0.1
D56	平均 $\pm$ SD (任意単位)	148.18 $\pm$ 11.5	144.72 $\pm$ 14.6	
	D0に対する平均変動率	+4.2%	+1.5%	
	D0と比較した対応のあるt検定	***	#	
	対応のないt検定			* p<0.05

10

20

【 0 1 4 5 】

さらに、ラインフィールド光コヒーレンストモグラフィー (LC OCT (登録商標)) を使用して、D0とD56において、顔の楕円形のレベルでの真皮線維ネットワークを説明した。LC-OCT (登録商標) は非侵襲的な皮膚イメージング技術で、高解像度の共焦点顕微鏡を組み合わせ顔の写真を撮り、コラーゲンの効果を視覚化する。

【 0 1 4 6 】

マストカルパス・ステラタス抽出物を1%含むクリームを56日間適用した後、顔のV字型に長いコラーゲン線維が現れることが明確に観察された。

一方、プラセボクリームを56日間適用した後、長いコラーゲン組織は観察されなかった。

さらに、顔の楕円形に対して糸で吊るして帯状に貼り付けた20 gの塊を適用する弾性試験を実施した。このテストはD0、D28、D56で実施した。

マストカルパス・ステラタス抽出物を1%含むクリームを28日および56日間適用した後、皮膚の調子(tonus)が高くなり、硬度が増すことが見出された。

プラセボクリームの場合、28日および56日の適用後に効果は観察されなかった。

【 0 1 4 7 】

例 7 臨床研究-皮膚水和

処方

以下に説明する第2のセットの臨床研究では、以下のINCI処方の化粧用ローションを使用した。

アクア/水、マストカルパス・ステラタス抽出物安息香酸ナトリウム

プラセボローションでは、マストカルパス・ステラタス抽出物は省略した。

より詳細には、以下である：

30

40

50

【表 1 3】

INCI	活性	プラセボ
水(AQUA)/水	98.50	99.50
マストカルパス・ステラタス抽出物	1	/
安息香酸ナトリウム	0.5	0.5

【0 1 4 8】

パネルの説明

頬に乾燥皮膚があり、水和レベルが〈50 a.u.のボランティア40人を対象とした単一施設研究が実施された。ボランティアは、次のようにそれぞれ20人のボランティアからなる2つのグループに分けられた。

ー グループ1：マストカルパス・ステラタス抽出物を含むローションを試験している平均年齢47±6歳の20人のボランティア

ー グループ2：プラセボローションを試験している平均年齢48±5歳の20人のボランティア

ボランティアは、マストカルパス・ステラタス抽出物を1%含むローションまたはプラセボローションを1日おきに56日間適用した。水和はラマン分光法を用いて評価した。

【0 1 4 9】

結果

前腕の水和レベルを評価するために、1日2回の適用を2か月間行った後、角質層の総含水量をラマン分光法で%で測定した。

マストカルパス・ステラタス抽出物を1%含むローションを56日間適用した後、角質層の総含水量がD0と比較して+41.9%と有意に増加したことが観察された。プラセボでは、56日後にD0と比較して有意な増加が示された。

比較すると、マストカルパス・ステラタス抽出物を1%含むローションは、56日後にプラセボと比較して皮膚の水和が+10.3%改善された。

【0 1 5 0】

データは以下の表に見出される。

【表 1 4】

SC TW単位の 平均総含水量 (a.u.)	1% マストカルパス・ステラタス抽出物			プラセボ			対応のない検定 対プラセボ
	平均 ± SD (任意単位)	平均変動 対D0	対応のある t検定 対D0	平均 ± SD (任意単位)	平均変動 対D0	対応のある t検定 対D0	
D0	29.47 ± 6.35			28.90 ± 9.52			
T24h	32.51 ± 10.48	+10.3%	ns	30.06 ± 10.56	+4.0%	ns	ns
D28	37.21 ± 9.09	+26.7%	**	34.73 ± 7.25	+20.2%	*	ns
D56	41.82 ± 7.12	+41.9%	**	38.04 ± 8.81	+31.6%	**	* p<0.05

【0 1 5 1】

例 8 ヒアルロニダーゼ阻害試験 (チューブ内(in tubo))

ヒアルロン酸ポリマーは、天然基質の存在下で、ヒアルロニダーゼによって溶解される。酵素阻害剤の存在は加水分解速度の低減につながる。試験した抽出物のヒアルロニダーゼ活性に対する阻害効果は、溶解していない基質の量を測定することにより、比濁法で決定された。

アッセイは96ウェルマイクロプレートで実施した。

【0 1 5 2】

以下のサンプルが試験された。

10

20

30

40

50

【表 1 5】

サンプル:	説明:
抽出物1	本発明の方法のステップ(i)で得られた第1の液相
抽出物2	本発明の方法のステップ(iii)で得られた第2の液相
本発明のマストカルパス・ステラタス抽出物	本発明の方法のステップ(iv)で得られた第1液相と第2液相の組み合わせ

【0 1 5 3】

各サンプル20 μlを、10 μlのマッキルベインバッファ（pH 4.6）と混合した。20 μlのヒアルロニダーゼと20 μlのヒアルロン酸を添加した。

溶媒、マッキルベイン緩衝液（pH 4.6）、およびヒアルロン酸で構成される陰性対照と、さらにヒアルロニダーゼを含む陽性対照も試験した。

さらに、それぞれのサンプル、バッファ、酵素を含むブランクサンプルを調製し、抽出サンプルごとに試験した。

サンプルはさまざまな濃度で試験した。希釈した各サンプルを3通りに実行した。

【0 1 5 4】

標準範囲のクロモグリク酸二ナトリウム（DSCG）を阻害薬の基準として使用した。

混合物を攪拌し、37℃で40分間放置した。

最後に、180 μlのCTAB（臭化セトリモニウム）をすべてのウェルに加え、加水分解されていないヒアルロン酸ポリマーを沈殿させた。

混合物を室温で20分間インキュベートし、600nmでの光学密度（OD）を分光光度計を使用して測定した。

【0 1 5 5】

阻害率は次のように計算される。

【数 1】

$$\% \text{ 阻害} = \frac{\text{OD(サンプル)} - \text{OD(ブランクサンプル)}}{\text{OD(陰性対照)} - \text{OD(陽性対照)}} * 100\%$$

【0 1 5 6】

これらの測定値に基づいて、IC₅₀、すなわちヒアルロニダーゼ活性が50%阻害されたサンプル濃度を計算した。結果を以下の表に示す：

【表 1 6】

サンプル:	IC ₅₀ :
抽出物1	10.8 μl/ml
抽出物2	8.4 μl/ml
本発明のマストカルパス・ステラタス抽出物	4.5 μl/ml

【0 1 5 7】

以上のように、本発明のマストカルパス・ステラタス抽出物のIC₅₀は、抽出物1および2のIC₅₀よりも有意に低く、本発明の抽出物で観察された相乗効果が明らかになっている。

【0 1 5 8】

例9：抗糖化活性試験（チューブ内）

糖化は、真皮の中心で起こり得る非酵素的な化学反応である。グルコース分子はタンパク質と反応し、これは、真皮（糖化タンパク質）の崩壊へと繋がる。糖化タンパク質は除去できないので蓄積する。ブドウ糖はコラーゲンとエラスチン線維の周りに固定されており、これらは硬くなり、結局壊れる（皮膚の弾性の喪失）。このプロセスは不可逆である。

抗糖化活性試験は、96ウェルのマイクロプレートで行われた。

例8と同じサンプルを、再びさまざまな濃度で試験した。希釈した各サンプルを3通りに実行した。

リン酸ナトリウム緩衝液とBSA（ウシ血清アルブミン）を含む陰性対照と、リン酸ナトリウム緩衝液、BSA、リボースを含む陽性対照も試験した。

【0159】

最後に、2つのブランクサンプルを調製し、それぞれの抽出サンプルについて試験した。

- ー リン酸緩衝液、BSA、抽出物を含む
- ー リン酸緩衝液、リボース、抽出物を含む

標準範囲のアミノグアニジンを阻害薬の基準として使用した。

各サンプル40 μlを、50 μlのBSAと10 μlのリボースと混合した。

【0160】

混合物を攪拌し、37℃で17時間インキュベートした。蛍光（FI）は、λ励起=340 nm、λ放射 = 420 nmで測定された。

抗糖化活性は次のように計算された。

【数2】

$$\% \text{ AGE 形成阻害} = \left[1 - \frac{\text{FI(サンプル)} - \text{FI(ブランクサンプル(リボースまたはBSA))}}{\text{FI(陽性対照)} - \text{FI(陰性対照)}} \right] * 100\%$$

【0161】

これらの測定値に基づいて、IC₅₀、すなわちAGEの形成が50%阻害されたサンプル濃度が計算された。結果を以下の表に示す：

【表17】

サンプル:	IC ₅₀ :
抽出物1	180.4 μl/ml
抽出物2	177.4 μl/ml
本発明のマストカルパス・ステラタス抽出物	39.4 μl/ml

【0162】

以上の結果から、本発明の抽出物に強い相乗効果が観察されたことが明らかになった。

【図面】

【図1】

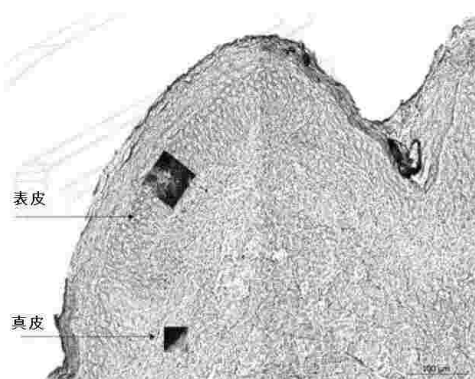


図 1

【図2】

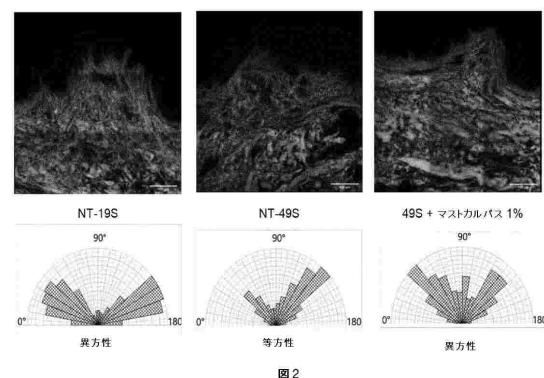


図 2

10

20

30

40

50

【 図 3 】

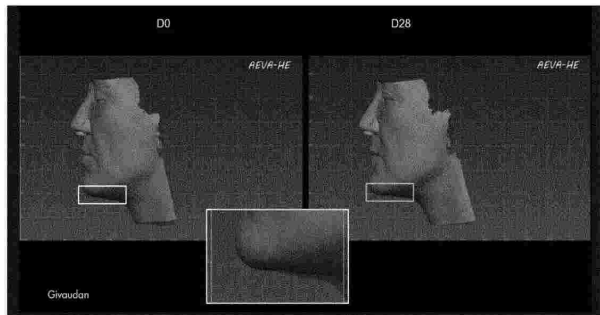


図 3

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/061743

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K8/9717 A61Q19/08
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K A61Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2016/181411 A1 (SEA6 ENERGY PVT LTD [IN]) 17 November 2016 (2016-11-17)	9-11
Y	paragraphs [0009], [0030], [0062]; example 5	1-13
Y	US 2015/274791 A1 (HALLDORSOTTIR SIGRUN MJOLL [IS] ET AL) 1 October 2015 (2015-10-01) paragraph [0034]; claims 1,3,29	1-13
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 July 2023

Date of mailing of the international search report

27/07/2023

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

Authorized officer

Weisser, Dagmar

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/061743

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FLÓREZ-FERNÁNDEZ NOELIA ET AL: "Green Extraction of Carrageenans from Mastocarpus stellatus", POLYMERS, vol. 14, no. 3, 1 February 2022 (2022-02-01), page 554, XP93065193, CH ISSN: 2073-4360, DOI: 10.3390/polym14030554 the whole document -----	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International application No	
Information on patent family members				PCT/EP2023/061743	
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2016181411	A1	17-11-2016	AU 2016261722	A1	07-12-2017
			BR 112017024102	A2	24-07-2018
			CA 2985593	A1	17-11-2016
			CN 107846905	A	27-03-2018
			EP 3294066	A1	21-03-2018
			ES 2789649	T3	26-10-2020
			HK 1251410	A1	01-02-2019
			HU E049599	T2	28-10-2020
			JP 6744331	B2	19-08-2020
			JP 2018516898	A	28-06-2018
			MY 178466	A	14-10-2020
			PH 12017502056	A1	30-04-2018
			PL 3294066	T3	07-09-2020
			US 2017334794	A1	23-11-2017
			WO 2016181411	A1	17-11-2016
			ZA 201708290	B	24-04-2019
US 2015274791	A1	01-10-2015	CA 2889934	A1	08-05-2014
			EP 2912187	A1	02-09-2015
			US 2015274791	A1	01-10-2015
			WO 2014068601	A1	08-05-2014

10

20

30

40

50

フロントページの続き

,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,D
E,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,S
M,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,
AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,
ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,L
A,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,P
H,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,
UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ドゥ ビズモン, オードリー

フランス共和国 2 2 5 6 0 イル グランド、アンス ド ポールジュラン

(72)発明者 レノー, ロマン

フランス共和国 3 1 4 0 0 トゥールーズ、ル デ サテリット 3、バティマン カナル ビオテーク 1

F ターム (参考) 4C083 AA111 AA112 AC072 AC122 AC132 AC172 AC182 AC312 AC352 AC402

AC422 AC482 AD152 BB42 BB51 CC02 CC04 CC05 DD23 DD31 EE12

FF01