

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 3 部門第 2 区分

【発行日】平成28年10月13日 (2016.10.13)

【公開番号】特開2015-101540(P2015-101540A)

【公開日】平成27年6月4日 (2015.6.4)

【年通号数】公開・登録公報2015-036

【出願番号】特願2013-240549(P2013-240549)

【国際特許分類】

A 6 1 K 8/64 (2006.01)

A 6 1 K 8/86 (2006.01)

A 6 1 Q 19/00 (2006.01)

A 6 1 Q 19/08 (2006.01)

【F I】

A 6 1 K 8/64

A 6 1 K 8/86

A 6 1 Q 19/00

A 6 1 Q 19/08

【手続補正書】

【提出日】平成28年8月24日 (2016.8.24)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 2 2】

N A D H デヒドロゲナーゼは以下の方法にて測定した。すなわち、基質である N A D H 0 . 2 m M を含む 2 0 m M トリス塩酸緩衝液 (p H 7 . 5) 2 . 8 m L を 2 5 で 5 分間予備加温後、1 . 2 m M の 2 , 6 - ジクロロフェノールインドフェノール (D C I P) 水溶液を 0 . 1 m L 添加し、次いで、予め、酵素希釈液 (2 0 0 m M トリス塩酸緩衝液 (p H 7 . 5)) で希釈した酵素液 0 . 1 m L を加え、反応を開始し、2 5 で 2 0 秒毎に 6 0 0 n m の吸光度の減少を 4 分間測定した。

盲検として上記において、N A D H デヒドロゲナーゼ溶液 0 . 1 m L の代わりに酵素希釈液 0 . 1 m L を加え、上記同様に操作を行って反応を開始し、2 5 で 2 0 秒毎に 6 0 0 n m の吸光度の減少を 4 分間測定した。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 2 3】

< 試験例 1 >

(サンプル 1 ~ 1 0 の酵素活性の測定)

酵素にダメージを与えるため紫外線 (U V B) を $100\text{ mJ} / \text{cm}^2$ となるように照射したのち、前記酵素液にヒートショックプロテインと重量平均分子量が 2 0 0 0 ~ 5 0 0 0 であるポリエチレングリコールとを表 1 の濃度 (w / v) となるように添加し、3 時間後のカリクレイン - 5、カスパーゼ - 1 4、カタラーゼ、及び N A D H デヒドロゲナーゼの酵素活性を測定した。コントロールを 1 0 0 % としたときの各サンプルの酵素活性を算出し % で表示した。また、紫外線を照射しない場合の各酵素の活性はコントロールに対し 1

70～180%であった。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0027

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0027】

< 試験例2 >

(酵素と肌状態の関連性)

カリクレイン-5の酵素と肌状態の関連性を把握するため、前記のように、60名の健康者の顔部の角層細胞を採取し、酵素活性を測定し、酵素活性の高さから低中高群を設定し、低い群、高い群で肌の明るさ、毛穴の目立ち、しわ、及び肌の凹凸(ムラ)に差が認められるか観察した。

肌の明るさは、洗顔後(メイク落とし・洗顔)、室温 22 ± 2 、湿度 $50 \pm 5\%$ の条件下にて安静にし、右の頬下部を分光測色計CM-2600d(コニカミノルタオプティクス株式会社)にて L^* 値を測定し、5回測定を行い、平均値を求めた。

毛穴の目立ち、しわ、及び肌の凹凸は、前記と同様に洗顔を行い、前期条件下で安静にした後、顔 正面および左右斜めの3部位について、VISIA Evolution(Canfield Scientific Ltd.)を用いて、毛穴スコア、凹凸及びシワの個数を測定した。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0028

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0028】

図1～4に酵素活性が低い群、高い群における、肌の明るさ(L^* 値)、毛穴の目立ち(毛穴スコア)、しわの数、及び肌の凹凸(ムラ)の結果を示す。酵素活性が高い群は低い群に比べ、肌が明るく、毛穴スコアが低く毛穴が目立ちにくく、しわの数が少なく、凹凸が少ないことが観察された。従って、酵素活性の向上が肌状態の改善に繋がることが判った。また、カスパーゼ-14、カタラーゼ、及びNADHデヒドロゲナーゼにおいても同様に、酵素活性の向上が、肌状態の改善に繋がることが確認された。

【手続補正5】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図1】

カリクレイン-5活性と肌の明るさ

