

【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】0022

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0022】

NADH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NADH 0.2 mMを含む20 mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.5)2.8 mLを25℃で5分間予備加温後、1.2 mMの2,6-ジクロロフェノールインドフェノール(DCIP)水溶液を0.1 mL添加し、次いで、予め、酵素希釈液(200 mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.5))で希釈した酵素液0.1 mLを加え、反応を開始し、25℃で20秒毎に600 nm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、NADHデヒドロゲナーゼ溶液0.1 mLの代わりに酵素希釈液0.1 mLを加え、上記同様に操作を行って反応を開始し、25℃で20秒毎に600 nm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】0023

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0023】

<試験例1>

(サンプル1～10の酵素活性の測定)

酵素にダメージを与えるため紫外線(UVB)を100 mJ/cm²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2000～5000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-14、カタラーゼ、及びNADH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100%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名の健常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(メーク落とし・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

