

【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21年1月15日(2009.1.15)

【公開番号】特開2007-176835(P2007-176835A)

【公開日】平成19年7月12日(2007.7.12)

【年通号数】公開・登録公報2007-026

【出願番号】特願2005-375332(P2005-375332)

【国際特許分類】

A 6 1 K 8/97 (2006.01)

A 6 1 Q 19/00 (2006.01)

【F I】

A 6 1 K 8/97

A 6 1 Q 19/00

【手続補正書】

【提出日】平成20年11月19日(2008.11.19)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ミカン科ミカン属ダイダイの果皮(トウヒ)を極性溶媒で抽出して得られた抽出物、もしくは該抽出物を分画、精製して得られた分画精製物を皮膚外用剤に含有させる皮膚外用剤の製造方法において、表皮角化細胞をカルシウムを 0.1 ~ 0.2 mM 含有する液体培地で 0.1 ~ 12  $\mu$ m の微細孔を有する支持体上でコンフルエントになるまで培養し、しかる後、カルシウムイオンを 1 ~ 2 mM 含有する液体培地で培養して得られる表皮角化細胞層膜を、前記抽出物又は分画精製物で処理した場合に、該表皮角化細胞層膜の物質透過性を抑制する作用を有することを確認し、該作用を有する抽出物又は分画精製物を皮膚外用剤に含有せしめることを特徴とする、皮膚外用剤の製造方法。

【請求項 2】

前記極性溶媒が含水エタノール又は含水 1, 3 - ブタンジオールであることを特徴とする、請求項 1 に記載の皮膚外用剤の製造方法。

【請求項 3】

前記分画精製物が、前記抽出物から極性溶媒を除去し、しかる後に酢酸エチルと水を加え、液-液抽出し、酢酸エチル層を取り、該酢酸エチル層の溶媒を除去して得られたものであることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の皮膚外用剤の製造方法。

【請求項 4】

前記表皮角化細胞がヒト由来のものであることを特徴とする、請求項 1 ~ 3 何れか1項に記載の皮膚外用剤の製造方法。

【請求項 5】

未処理の表皮角化細胞層膜に比して、TER (Transepithelial Electrical Resistance) 値が 10 % 以上増加する場合、前記皮膚外用剤が、前記表皮角化細胞層膜の物質透過性を抑制する作用を有することであることを特徴とする、請求項 1 ~ 4 何れか1項に記載の皮膚外用剤の製造方法。

【請求項 6】

前記皮膚外用剤が、皮膚バリア機能改善用であることを特徴とする請求項 1 ~ 5 何れか1項に記載の皮膚外用剤の製造方法。

## 【請求項 7】

ミカン科ミカン属ダイダイの果皮を極性溶媒で抽出して得られた抽出物、もしくは該抽出物を分画、精製して得られた分画精製物を、含有するヘスペリジンの量を指標として、皮膚バリア機能を向上させるのに充分な量で配合することを特徴とする、皮膚外用剤。

## 【請求項 8】

前記抽出物又は分画精製物中のヘスペリジン含有量が 0.05 ~ 0.1 質量% となるように 50 % エタノール水溶液を添加して調整したものを 0.01 ~ 1 質量% 含有することを特徴とする、請求項 7 に記載の皮膚外用剤。

## 【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0001

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0001】

本発明は、皮膚外用剤とその製造方法に関し、詳しくは皮膚バリア機能を向上させる皮膚外用剤とその製造方法に関する。

## 【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0006

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0006】

本発明は、この様な状況下為されたものであり、皮膚そのもののバリア機能を向上させる手段を提供することを課題とした。

## 【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0007

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0007】

この様な状況に鑑みて、本発明者らは、皮膚そのもののバリア機能を向上させる皮膚外用剤を簡便に得る手段を求めて鋭意研究努力を重ねた結果、表皮角化細胞をカルシウムイオンを 0.1 ~ 0.2 mM 含有する液体培地で 0.1 ~ 12  $\mu$ m の微細孔を有する支持体上にコンフルエントになるまで培養し、しかる後に、カルシウムイオンを 1 ~ 2 mM 含有する液体培地で培養することにより、皮膚バリア機能を簡便に評価できる表皮角化細胞層膜が得られること、またこの表皮角化細胞層膜に、ミカン科ミカン属ダイダイの果皮（トウヒ）を極性溶媒で抽出して得られた抽出物、もしくは該抽出物を更に分画、精製して得られた分画精製物を、前記表皮角化細胞層膜の存する液体培地中に含有せしめることにより、表皮角化細胞層膜のバリア機能が向上すること、更にこの抽出物を皮膚外用剤に含有せしめることにより、簡便に皮膚そのもののバリア機能を向上させる皮膚外用剤が得られることなどを見出し、本発明を完成させた。すなわち、本発明は、以下に示す通りである。

## 【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0008】

(1) ミカン科ミカン属ダイダイの果皮（トウヒ）を極性溶媒で抽出して得られた抽出物、もしくは該抽出物を分画、精製して得られた分画精製物を皮膚外用剤に含有させる皮

膚外用剤の製造方法において、表皮角化細胞をカルシウムを0.1～0.2 mM含有する液体培地で0.1～12 μmの微細孔を有する支持体上でコンフルエントになるまで培養し、しかる後、カルシウムイオンを1～2 mM含有する液体培地で培養して得られる表皮角化細胞層膜を、前記抽出物又は分画精製物で処理した場合に、該表皮角化細胞層膜の物質透過性を抑制する作用を有することを確認し、該作用を有する抽出物又は分画精製物を皮膚外用剤に含有せしめることを特徴とする、皮膚外用剤の製造方法。

(2) 前記極性溶媒が含水エタノール又は含水1,3-ブタンジオールであることを特徴とする、(1)に記載の皮膚外用剤の製造方法。

(3) 前記分画精製物が、前記抽出物から極性溶媒を除去し、しかる後に酢酸エチルと水を加え、液-液抽出し、酢酸エチル層を取り、該酢酸エチル層の溶媒を除去して得られたものであることを特徴とする、(1)又は(2)に記載の皮膚外用剤の製造方法。

(4) 前記表皮角化細胞がヒト由来のものであることを特徴とする、(1)～(3)何れか1つに記載の皮膚外用剤の製造方法。

(5) 未処理の表皮角化細胞層膜に比して、TER (Transepithelial Electrical Resistance) 値が10%以上増加する場合、前記皮膚外用剤が、前記表皮角化細胞層膜の物質透過性を抑制する作用を有するとすることを特徴とする、(1)～(4)何れか1つに記載の皮膚外用剤の製造方法。

(6) 前記皮膚外用剤が、皮膚バリア機能改善用であることを特徴とする(1)～(5)何れか1つに記載の皮膚外用剤の製造方法。

(7) ミカン科ミカン属ダイダイの果皮を極性溶媒で抽出して得られた抽出物、もしくは該抽出物を分画、精製して得られた分画精製物を、含有するヘスペリジンの量を指標として、皮膚バリア機能を向上させるのに充分な量で配合することを特徴とする、皮膚外用剤。

(8) 前記抽出物又は分画精製物中のヘスペリジン含有量が0.05～0.1質量%となるように50%エタノール水溶液を添加して調整したものを0.01～1質量%含有することを特徴とする、(7)に記載の皮膚外用剤。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0010】

本発明の皮膚外用剤の製造方法は、ミカン科ミカン属ダイダイの果皮(トウヒ)を極性溶媒で抽出して得られた抽出物、もしくは該抽出物を更に分画、精製して得られた分画精製物を皮膚外用剤に含有させる皮膚外用剤の製造方法において、表皮角化細胞をカルシウムを0.1～0.2 mM含有する液体培地で0.1～12 μmの微細孔を有する支持体上でコンフルエントになるまで培養し、しかる後、カルシウムイオンを1～2 mM含有する液体培地で培養して得られる表皮角化細胞層膜を、前記抽出物又は分画精製物で処理した場合に、該表皮角化細胞層膜の物質透過性を抑制する作用を有することを確認し、該作用を有する該抽出物又は分画精製物を皮膚外用剤に含有せしめることを特徴とする。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0011】

前記、ミカン科ミカン属ダイダイの果皮(トウヒ)の抽出物の製造に用いる溶媒としては極性溶媒が挙げられ、水、エタノールやイソプロパノール等のアルコール類、アセトン、メチルエチルケトン等のケトン類、アセトニトリルなどのニトリル類、ジエチルエーテルやテトラヒドロフラン等のエーテル類、酢酸エチルや蟻酸メチル等のエステル類、1,

3 - ブタンジオール、プロピレングリコール等の多価アルコール類が好ましく例示できる。これらは単独でも複数を混合して用いても良い。抽出に際しては、植物体乃至はその加工物1質量部に対して、1～10質量部の溶媒を加え、室温であれば数日間、沸点付近の温度であれば数時間、所望により攪拌を加え、浸漬すればよい。浸漬後、所望により濾過などで不溶物を除去し、必要に応じて溶媒除去などを行い用いることができる。更に、これらを液-液抽出、イオン交換樹脂やシリカゲルを担体としたクロマトグラフィーなどを用いて分画精製物とすることもできる。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0012】

かくして得られた抽出物又は分画精製物は表皮角化細胞をカルシウムを0.1～0.2 mM含有する液体培地で0.1～12  $\mu\text{m}$ の微細孔を有する支持体上でコンフルエントになるまで培養し、しかる後、カルシウムイオンを1～2 mM含有する液体培地で培養し、さらに前記抽出物又は分画精製物を含有する、或いは含有しない液体培地で培養して得られる表皮角化細胞層膜を用い、それぞれの細胞層膜で隔てられた二室のチャンバーの一室に指標物質を充填し、被検物質の他室への移動の程度が、前記抽出物又は分画精製物の有無において、前記抽出物又は分画精製物を含有する培養液で培養した細胞層膜における物質の透過性の抑制作用を有する分画を求め、かかる作用が皮膚外用剤への配合において十分に効果を奏するとは、この作用が10%以上の抑制作用を示すことであり、かかる濃度を決定し、皮膚外用剤への配合量が決定される。0.1～12  $\mu\text{m}$ の微細孔を有する支持体としては、コーニング社やミリポア社より、ポリエチレンテレフタレート製、ポリカーボネート製、カラーゲン処理ポリテトラフルオロエチレン製の膜が市販されているので、これらを購入して使用することができ、好ましい。これらを用いた測定方法に関しては以下に一例を示す。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0013】

< 表皮角化細胞層膜を介しての物質の移動の抑制による皮膚バリア機能の測定 >

凍結正常ヒト表皮角化細胞(NHEK)(倉敷紡績株式会社製)を解凍し、0.15 mM - Ca含有培養液(Humedia-KG2; 倉敷紡績株式会社製)にて、37、50%二酸化炭素雰囲気下で培養した。この正常ヒト表皮角化細胞(NHEK)をMillicell Tissue Culture Plate(ミリポア社製)にコーニング社製トランスウェル(直径12 mm、ポリエチレンテレフタレート0.4  $\mu\text{m}$ ポア)をセットし、上層0.5 ml、下層0.5 mlの前記培養液を入れ、 $2 \times 10^5 / \text{cm}^2$ で播種し、さらに72時間培養した。

コンフルエントになったことを確認し、1.45 mM - Ca含有 - Humedia - KG2培地に交換し、その後96時間培養した。その後、被検試料である抽出物を含有する培養液に交換して、培養を継続し、1日後、2日後、3日後にTER(Transepithelial Electrical Resistance)値( $\text{m}^2$ )を測定する。被検試料含有培養液の添加時のTER値に対する、一定時間後のTER値を測定することによって、前記阻害濃度が決定される。

この様な阻害濃度は簡易的にヘスペリジンの含有量によって推定できる。これはトウヒ中に含まれる皮膚バリア機能を向上させる作用を有する成分がヘスペリジンと類似した溶出挙動を示すためである。前記の皮膚外用剤への配合において十分に皮膚バリア機能を向上しうる抽出物又は分画精製物としては、ヘスペリジンの含有量が0.05～0.1質量

%のものが好ましく例示できる。かかる抽出物又は分画精製物を、0.01～1質量%、好ましくは0.05～0.5質量%含有せしめることにより、皮膚バリア機能を向上せしめる皮膚外用剤とすることができる。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0014】

前記測定において、10%以上の抵抗値の増加が認められる場合に、本発明の皮膚外用剤に含有させるのに適切な抽出物又は分画精製物の濃度であると判断した。この時、被検試料の力価が一定になるように抽出物又は分画精製物を水、50%エタノール水溶液、50%1,3-ブタンジオールなどで希釈して配合することもできる。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0015

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0015】

本発明の皮膚外用剤に於いては、前記のミカン科ミカン属ダイダイの果皮(トウヒ)の抽出物又は分画精製物以外に、通常化粧品や皮膚外用医薬で使用される任意成分を含有することが出来る。この様な任意成分としては、例えば、マカデミアナッツ油、アボガド油、トウモロコシ油、オリーブ油、ナタネ油、ゴマ油、ヒマシ油、サフラワー油、綿実油、ホホバ油、ヤシ油、パーム油、液状ラノリン、硬化ヤシ油、硬化油、モクロウ、硬化ヒマシ油、ミツロウ、キャンデリラロウ、カルナウバロウ、イボタロウ、ラノリン、還元ラノリン、硬質ラノリン、ホホバロウ等のオイル、ワックス類、流動パラフィン、スクワラン、プリスタン、オゾケライト、パラフィン、セレシン、ワセリン、マイクロクリスタリンワックス等の炭化水素類、オレイン酸、イソステアリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、ベヘン酸、ウンデシレン酸等の高級脂肪酸類、セチルアルコール、ステアリルアルコール、イソステアリルアルコール、ベヘニルアルコール、オクチルドデカノール、ミリスチルアルコール、セトステアリルアルコール等の高級アルコール等、イソオクタン酸セチル、ミリスチン酸イソプロピル、イソステアリン酸ヘキシルデシル、アジピン酸ジイソプロピル、セバチン酸ジ-2-エチルヘキシル、乳酸セチル、リンゴ酸ジイソステアリル、ジ-2-エチルヘキサン酸エチレングリコール、ジカプリン酸ネオペンチルグリコール、ジ-2-ヘプチルウンデカン酸グリセリン、トリ-2-エチルヘキサン酸グリセリン、トリ-2-エチルヘキサン酸トリメチロールプロパン、トリイソステアリン酸トリメチロールプロパン、テトラ-2-エチルヘキサン酸ペンタンエリトリット等の合成エステル油類、ジメチルポリシロキサン、メチルフェニルポリシロキサン、ジフェニルポリシロキサン等の鎖状ポリシロキサン、オクタメチルシクロテトラシロキサン、デカメチルシクロペンタシロキサン、ドデカメチルシクロヘキサンシロキサン等の環状ポリシロキサン、アミノ変性ポリシロキサン、ポリエーテル変性ポリシロキサン、アルキル変性ポリシロキサン、フッ素変性ポリシロキサン等の変性ポリシロキサン等のシリコン油等の油剤類、脂肪酸セッケン(ラウリン酸ナトリウム、パルミチン酸ナトリウム等)、ラウリル硫酸カリウム、アルキル硫酸トリエタノールアミンエーテル等のアニオン界面活性剤類、塩化ステアリルトリメチルアンモニウム、塩化ベンザルコニウム、ラウリルアミンオキサイド等のカチオン界面活性剤類、イミダゾリン系両性界面活性剤(2-ココイル-2-イミダゾリニウムヒドロキサイド-1-カルボキシエチロキシ2ナトリウム塩等)、ベタイン系界面活性剤(アルキルベタイン、アミドベタイン、スルホベタイン等)、アシルメチルタウリン等の両性界面活性剤類、ソルビタン脂肪酸エステル類(ソルビタンモノステアレート、セスキオレイン酸ソルビタン等)、グリセリン脂肪酸類(モノステ

アリン酸グリセリン等)、プロピレングリコール脂肪酸エステル類(モノステアリン酸プロピレングリコール等)、硬化ヒマシ油誘導体、グリセリンアルキルエーテル、POEソルビタン脂肪酸エステル類(POEソルビタンモノオレート、モノステアリン酸ポリオキエチレンソルビタン等)、POEソルビット脂肪酸エステル類(POE-ソルビットモノオレート等)、POEグリセリン脂肪酸エステル類(POE-グリセリンモノイソステアレート等)、POE脂肪酸エステル類(ポリエチレングリコールモノオレート、POEジステアレート等)、POEアルキルエーテル類(POE2-オクチルドデシルエーテル等)、POEアルキルフェニルエーテル類(POEノニルフェニルエーテル等)、ブルロニック型類、POE・POPアルキルエーテル類(POE・POP2-デシルテトラデシルエーテル等)、テトロニック類、POEヒマシ油・硬化ヒマシ油誘導体(POEヒマシ油、POE硬化ヒマシ油等)、ショ糖脂肪酸エステル、アルキルグルコシド等の非イオン界面活性剤類、ポリエチレングリコール、グリセリン、1,3-ブタンジオール、エリスリトール、ソルビトール、キシリトール、マルチトール、プロピレングリコール、ジプロピレングリコール、ジグリセリン、イソプレングリコール、1,2-ペンタンジオール、2,4-ヘキシレングリコール、1,2-ヘキサジオール、1,2-オクタンジオール等の多価アルコール類、ピロリドンカルボン酸ナトリウム、乳酸、乳酸ナトリウム等の保湿成分類、グアガム、クインスシード、カラギーナン、ガラクトン、アラビアガム、ペクチン、マンナン、デンプン、キサンタンガム、カードラン、メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、メチルヒドロキシプロピルセルロース、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、グリコーゲン、ヘパラン硫酸、ヒアルロン酸、ヒアルロン酸ナトリウム、トラガントガム、ケラタン硫酸、コンドロイチン、ムコイチン硫酸、ヒドロキシエチルグアガム、カルボキシメチルグアガム、デキストラン、ケラト硫酸、ローカストビーンガム、サクシノグルカン、カロニン酸、キチン、キトサン、カルボキシメチルキチン、寒天、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、ポリアクリル酸ナトリウム、ポリエチレングリコール、ベントナイト等の増粘剤、表面を処理されていても良い、マイカ、タルク、カオリン、合成雲母、炭酸カルシウム、炭酸マグネシウム、無水ケイ酸(シリカ)、酸化アルミニウム、硫酸バリウム等の粉体類、表面を処理されていても良い、ベンガラ、黄酸化鉄、黒酸化鉄、酸化コバルト、群青、紺青、酸化チタン、酸化亜鉛の無機顔料類、表面を処理されていても良い、雲母チタン、魚鱗箔、オキシ塩化ビスマス等のパール剤類、レーキ化されていても良い赤色202号、赤色228号、赤色226号、黄色4号、青色404号、黄色5号、赤色505号、赤色230号、赤色223号、橙色201号、赤色213号、黄色204号、黄色203号、青色1号、緑色201号、紫色201号、赤色204号等の有機色素類、ポリエチレン末、ポリメタクリル酸メチル、ナイロン粉末、オルガノポリシロキサンエラストマー等の有機粉体類、パラアミノ安息香酸系紫外線吸収剤、アントラニル酸系紫外線吸収剤、サリチル酸系紫外線吸収剤、桂皮酸系紫外線吸収剤、ベンゾフェノン系紫外線吸収剤、糖系紫外線吸収剤、2-(2'-ヒドロキシ-5'-t-オクチルフェニル)ベンゾトリアゾール、4-メトキシ-4'-t-ブチルジベンゾイルメタン等の紫外線吸収剤類、エタノール、イソプロパノール等の低級アルコール類、ビタミンA又はその誘導体、ビタミンB<sub>6</sub>塩酸塩、ビタミンB<sub>6</sub>トリパルミテート、ビタミンB<sub>6</sub>ジオクタノエート、ビタミンB<sub>2</sub>又はその誘導体、ビタミンB<sub>12</sub>, ビタミンB<sub>15</sub>又はその誘導体等のビタミンB類、 $\alpha$ -トコフェロール,  $\beta$ -トコフェロール,  $\gamma$ -トコフェロール, ビタミンEアセテート等のビタミンE類、ビタミンD類、ビタミンH、パントテン酸、パンテチン、ピロロキノリンキノン等のビタミン類、フェノキシエタノール等の抗菌剤などが好ましく例示できる。これらを常法に従って処理することにより、本発明の皮膚外用剤は製造することが出来る。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0016】

本発明の皮膚外用剤は、前記本発明の製造方法に従って製造されたものであり、前記ミカン科ミカン属ダイダイの果皮（トウヒ）の抽出物又は分画精製物を、表皮角化細胞層膜の透過性を10%以上抑制するに足る量、好適にはヘスペリジンの含有量が0.05～0.1質量%のものを0.01～1質量%含有することを特徴としている。この様な透過性の抑制効果について、効果を確認した後に配合されるので、ロット毎の力価の変動が無く、生化学的に安定した皮膚外用剤とすることができる。通常、生薬等の植物体などの抽出物を含有する皮膚外用剤において、有効成分の含有量が生薬等の産地や季節により異なるため、生理化学的効果が大きく異なってしまう場合があったが、本発明の皮膚外用剤では生理学的效果は、生薬等の抽出物を含有する形態においても安定している。

## 【手続補正13】

## 【補正対象書類名】明細書

## 【補正対象項目名】0020

## 【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0020】

電流の抵抗値による皮膚バリア機能の測定

凍結正常ヒト表皮角化細胞（NHEK）（倉敷紡績株式会社製）を解凍し、0.15 mM - Ca 含有培養液（Humedia-KG2；倉敷紡績株式会社製）にて、37、50%二酸化炭素雰囲気下で培養した。この正常ヒト表皮角化細胞（NHEK）をMillicell Tissue Culture Plate（ミリポア社製）にコーニング社製トランスウェル（直径12 mm、ポリエチレンテレフタレート0.4 μmポア）をセットし、上層0.5 ml、下層0.5 mlの前記培養液を入れ、 $2 \times 10^5 / \text{cm}^2$ で播種し、さらに72時間培養した。コンフルエントになったことを確認し、1.45 mM - Ca 含有 - Humedia-KG2 培地に交換し、その後96時間培養した。その後、実施例1のトウヒ抽出物を $10^{-5} \text{ v/v} \%$ となるように培養液中に添加した培養液に交換して、培養を継続し、1日後、2日後、3日後にTERを測定した。抽出物の添加時のTER（Transepithelial Electrical Resistance）値（ $\text{m}^2$ ）に対する、一定時間後のTER値の割合（%）で示した。結果を図1に示す。さらに、前記実施例1において、作製したヘスペリジン含有量の低い比較品1に関しても同様の測定を実施した。結果を図2に示す。

## 【手続補正14】

## 【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】

下記に示す処方に従って、本発明の皮膚外用剤である乳液を作製した。即ち、（A）の各成分を混合し、80 に加熱した。一方、（B）の各成分を80 に加熱した。（A）の混合物に（B）の混合物を加えて攪拌して乳化させ、更に（C）を加えて中和し、その後35 にまで攪拌、冷却し、実施例3の乳液を作製した。実施例3の乳液において、実施例1のトウヒ抽出物を水に置換した比較例1も作製した。

## 【手続補正15】

## 【補正対象書類名】明細書

## 【補正対象項目名】0024

## 【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【0024】

## （試験例1）

健常な成人男子5名の上腕内側部に1 cm × 1 cmの3部位を設定し、未処置部位のT

EWL 値を測定した。次いで、サージカルテープ（３Ｍ社製）により、浸潤液が出るまでテープストリッピングを繰り返し、テープストリッピング直後のTEWL 値を測定した。TEWL 値の測定後、１部位には実施例３のトウヒ抽出物含有乳液、もう一部位には比較例１を塗布し、残りの１部位は何も塗布しないで放置した。このサンプル塗布を１日３回行い、サンプル塗布４８時間後に再度TEWL 値を測定し、テープストリッピング直後からのTEWL の回復状況を評価した。結果を、図３に示す。

【手続補正１６】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】００２５

【補正方法】変更

【補正の内容】

【００２５】

図３の結果より、テープストリッピング後に、何も塗布しない未処置に対して、比較例１を塗布した部位では、若干の回復の促進が認められたが、トウヒ抽出物を含有した実施例３の乳液においては、損傷されたバリア機能の回復の顕著な促進が認められ、本発明のスクリーニング方法で、バリア能の向上効果の認められたトウヒ抽出物に関して、ヒトの皮膚においても皮膚バリア能の回復効果が認められた。

【手続補正１７】

【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】

【図１】実施例２の結果を示す図である（トウヒ抽出物）。

【図２】実施例２の結果を示す図である（比較品１）。

【図３】試験例１の結果を示す図である。