(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
A61K 7/48

(45) 공고일자 1999년09월15일
(11) 등록번호 10-0221412
(24) 등록일자 1999년06월28일

(21) 출원번호 10-1995-0011466
(65) 공개번호 특1995-0031035
(22) 출원일자 1995년05월10일
(43) 공개일자 1995년12월18일
(30) 우선권주장 9405741 1994년05월10일 프랑스(FR)

(73) 특허권자 로레알 조지안느 플로
프랑스공화국 파리 F-75008, 뤼 르와이얄 14
(72) 발명자 오베르 뤼시엥
프랑스공화국 06320 깝 다일 슈멩 뒤 방뛰샹 도메인 뒤 시그날 "레 오까이유"
마르뗑 리샤르
프랑스공화국 37290 부브레 로슈 꼬르봉 알레 뒤 끌로 뒤 뻰 8
(74) 대리인 김원호, 송만호

심사관 : 이유형

(54) 피부 노화를 방지하기 위한 화장품으로서의 방선균 추출물의 용도

요약

화장품으로서의 사상 박테리아 추출물의 용도.

본 발명에 따라서, 비-광합성 및 비 포자형성 사상 박테리아의 최소한 하나의 추출물은 피부노화를 방지할 수 있다고 생각되어지는 화장품의 제조를 위한 활성 성분으로서 사용되어진다.

치료의대상은 탄성 손실의 감소 및/또는 저지를 위한 피부의 사용과 모발의 백화를 감소 및/또는 저지하기 위한 두피에 투여모두를 포함한다.

명세서

[발명의 명칭]

피부 노화를 방지하기 위한 화장품으로서의 방선균 추출물의 용도

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 비-광합성 비-포자성 사상 박테리아 추출물의 피부 노화 방지를 위한 화장품으로서의 용도에 관한 것이다.

노쇠, 또는 환경 요인과 같은 다른 요인에 의하여서든, 피부 노화는 피부의 기계적 특성, 특히 신축성과 탄력성,의 저화와 함께 쭈극쭈글한 외양을 가져 오게 된다고 알려져 있다. 이와 같은 현상은 특히 탄성조직의 부정적인 변화, 특히 탄성 섬유의 숫자와 직경의 감소와 밀접히 관련되어 있다.

피부의 노화는 또한 피부 구성 성분의 전체적인 약화를 수반하여, 결과적으로는 피부가 쉽게 갈라지게 된다. 섬유아세포의 감소 및 이 세포의 활성도 손상은 피부 노화 프로세스중에 중요한 부분을 차지한다.

피부 표면에서, 이산화탄소를 배출하고 산소를 흡수하는 가스교환이 일어난다고, 또한 알려져 있다. 피부 호흡으로 알려져 있는 이러한 현상은 나이가 듦에 따라 감소되며, 이는 피부 활성이 감소되는 결과라고 생각되어 진다.

드디어, 본 발명자는 비-광합성 및 비-포자성 사상 박테리아의 추출물이, 피부에 사용하게 될 경우, 피부 노화를 감소 및/또는 연기하는 기능이 있다는 것을 발견하게 되었다.

이 추출물은 또한 두피에 바르게되면 멜라닌 생상 세포를 활성화시키며, 또한 결과적으로 피부 노화의 하나로 간주될 수 있는, 모발의 백화를 감소 및/또는 연기시키는 기능도 있다는 것도 발견하였다.

본 출원에 있어서, '박테리아 추출물'은 실제적인 박테리아 추출물 및 박테리아 배양 후 얻어지는 바이오매스(biomass) 양족 의미를 다 포함한다. 원하는 경우에 있어서는, 이 바이오매스는 부분적으로 탈수 및/또는 분쇄된 형태일 수 있다. 분명한 것은, 본 발명은 전체 바이오매스와 동일한 항-피부노화 특성을 갖는 바이오매스의 어떠한 분획이라도 이를 포함하는 추출물의 용도를 포함한다. 본 발명에 따라 사용되어지는 추출물은 또한 바이오매스로부터 얻어지는 유도체를, 예를 들어 아실화 유도체들, 을 포함한다.

본 발명의 박테리아 추출물들은 Bergey의 Manuel of Systematic Bacteriology, Vol. 3 Section 23, 9th ed., 1989의 분류에 따라 정의되어진 비-광합성 및 비-포자성 사상 박테리아로 선택되어진 박테리아의 추출물이다.

이 박테리아중에서, Beggiatoa 목에 속하는 박테리아들을 특히 예로 들수 있으며, 이중에서 특별히 Beggiatoa 속, 예를 들어 Arch. Microbiol. (1984) 137, 139-144에 주어진 정의에 따른 Beggiatoa alba의

여러 균주와 같은, 에 속하는 박테리아들이다. B. alba의 정의는 bergey's Manual, 8관에 언급된 Beggiatoa arachnoidea, B. gigantea, B. leptomigformis, B. minima 및 B. mirabilis를 포함함을 주의해야 한다.

(Beggiatoa 속과는 구별하기 힘들면서 관련되어 있다고 알려진) Vitreoscilla속에 속하는 박테리라, Flexithrix속 및 Leucothrix속에 속하는 박테리아가 더욱 포함되어진다.

상기한바와 같이 정의되었으며, 이리 여러번 언급된 박테리아는 일반적으로 수중 생태를 갖으며, 특히 해수 또는 온천에서 발견되어진다.

본발명에서 이용되어 지는 박테리아들로서는 다음과 같은 것들을 예로서 들 수 있다.

-Vitreoscilla beggiatoides (ATCC 43181)

-Beggiatoa alba (ATCC 33555)

-Flexithrix dorotheae (ATCC 23163),

-Leucothrix mucor (ATCC 25107).

본 발명의 박테리아 추출물을 제조하기 위하여, 상기한 박테리아를 통상의 방법에 따라 배양하고, 얻어지는 바이오매스를 분리하는 것이 가능하다. 한가지 바람직한 배양 공정은 프랑스 특허 FR-269,654에 개시되어 있다.

박테리아를 배양한 후, 예를 들어, 여과, 스크랩된 프리레이어(scraped prelayer)를 실린더내에서 건조, 원심 분리 및/또는 냉동 건조등과 같은 여러가지 통상적인 방법으로 바이오 매스를 분리/추출할 수 있다. 예를 들어 감압하에 80℃에서 행하는 예비 농축은 이 분리 과정을 증진시킬 수 있다.

박테리아 추출물은, 예를 들어 부분적으로 아실화된 유도체와 같은, 유도체의 형태에 이용되어질 수 있다. 아실화는 카르복실산무수물 또는 그의 아실클로라이드를 사용하여 행하여 진다. 예를 들어, 초산무수물, 아세틸클로라이드를 사용할 수 있다. 아실화 반응은 박테리아 바이오매스중에 존재하고 있는 1차 아민 또는 2차 아민의 최소한 아실화되도록 행한다. 아실화 시약의 양과 아실화 반응의 조건은, (예를 들어 포텐티오메트리)와 같은 표준 방법에 따라, 일차 아민 및 2차 아민기를 아실화 반응의 전후에 에세이하여 용이하게 정할 수 있다.

본 발명에 따라 사용되는 조성물에서, 박테리아 추출물은 조성물의 중량에 대하여, 박테리아 추출물의 건조 질량이 0.01 내지 2중량%, 바람직하게는 0.01 내지 1중량%되도록 하는 것이 바람직하다. 이 조성물들은 박테리아 추출물이, 예를 들어, 물, 유기 용매, 오일을 포함한 지질, 및 이들의 혼합물, 특히 에멀젼과 같은 적절한 수용체내에 분산된 형태로 존재하는 것을 포함한다.

이들은 수성 알콜 또는 올레오 알콜 로션, 겔, 액성 점성액의 에멀젼, 크림, 고체 스틱 또는 수용체 분산액의 형태내에 부분적으로 존재할 수 있다. 이들 조성물은 통상적인 방법에 의하여 제조될 수 있다. 이들은 상기한것중의 한형태내에 특별히 존재할 수 있도록 내용물들과 수용체를 포함한다. 이들은 부가적은 예를 들어, 적외선 흡수제, 수화제, 유리 라디칼 저해제, 에멀리언트, 격리제들과 같은 기타 활성 성분을 포함할 수 있다. 이들은 또한, 보존제, 향료들과 같은 통상적인 성분들을 포함할 수 있다.

이온성 또는 비이온성 지질을 사용한 수용체 분산의 형태로 조성물을 제조하기 위하여, 예를 들어 Bangham 등의 J. Mol. Bio. 13, 238(1965) 또는 프랑스 특허 제2,315,991 및 2,416,008호 등의 문헌에 개시되어 있는 바와 같이, 수성 매질에 분산된 구형체들을 제조하기 위하여 지질을 수용성 용액에서 교반하는 것과 같은, 통상의 방법으로 행하여지는 공정을 행할 수 있다. 이들 수용체 분산체를 제조하기 위한 또는 다른 방법은 1987년 발간된 INSERM/John Libbery Eurotext의 6 내지 18 페이지에 수록된 'Les liposome en biologie cellaire et pharmacolgie'[Liposomes in cell biology and pharmacology] 문헌에 개시되어 있다.

본 발명의주제는 상기한 박테리아 추출물을 피부 또는 두피에 바르는 것을 특징으로 하는, 피부 노화 방지제로서 화장품 치료 과정이다. 본 발명을 다음의 실시예를 통하여 설명하고자 한다. 그러나 본 발명이 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[실시예 1]

비-광합성 및 비-포자형성 사상 박테리아의 선택/순응 및 배양

본 과정은 프랑스 특허 제2,693,654호의 실시예 1에 개시되어 있는 방법에 따른 것으로, 상세한 방법은 다음과 같다.

프랑스의 Oriental Pyrenees 소재의 세인트 토마스 온천(Saint-Thomas spring)에서 나오는 온천수를 샘플로 하여, 탄소 공급원으로 아세트산나트륨을 사용하여 다양한 미생물 배양을 실행하였다.

-KI …… 0.010g

-H_2BO_3 …… 1g

-$AlCl_3 \cdot 6H_2O$ …… 0.050g

-$NiCl_2 \cdot 6H_2O$ …… 0.030g

따라서 비-광합성 및 비-포자성 사상 박테리아의 다양한 균주를 선택할 수 있었다. 따라서 분리된 사상 박테리아의 특성은 아래에 설명되어 있다.

- 격막으로 분리되는 세포를 함유한 2-3㎛ 지름의 필라멘트(trichomes),

- 연쇄체(hormogonia)의 생산
- 베이지-백색의 배양물
- 핑크색의 분리된 바이오패스
- 호기성
- 그람-음성
- 분해효소가 필요없음
- 폴리-β-하이드록시부티레이트 포함물

이들 특징으로 2개의 유전자인 베그지아토와 비트레오실라의 접촉면에 있는 이 균주를 분류하는 것은 현재의 기술 및 박테리아 분류학에서는 불가능하다. 이들 유전자가 매우 유사하다는 것은 이미 알려져 있다.

이 균주의 지수적 성장기에서 배양물을 직접 동결 냉동하여 -80℃로 저장할 수 있다. 이 균주는 37℃의 수조에서 해동시킬 수 있다.

고체 배지에서 여러 가지의 후속배양 후, 상기에서 지적된 배지에 순응된 균주를 고정하였다.

아세테이트 배지에서 배양하는 것은 응집을 초래하는 경향이 있지만, 글루코스 함유 액체 배지에서 배양하여 완전하게 분명한 필라멘트를 획득할 수 있게 만들었다.

최적의 배양온도는 26 내지 30℃이다.

접종물로 총부피 1%를 사용하여 동일한 액체 배지에서 4시간동안 후속배양으로 부양을 지속한다.

발효조에서 배양

교반되고(200회전/분) 및 폭기되는 600ℓ 발효조에서 배양시켰다.

배양 배지는 0.2g/ℓ의 폴리메틸실록산-형의 소포제(SILBIONE 97350RP®)를 첨가하여 상기에서 지적된 바와 같이 준비되었다. 온도는 26 내지 30℃, 바람직하게는 29℃로 조정되었다.

완전한 성장 사이클은 약 48 시간이었다. 획득된 수율은 리터당 건중량으로 1.4g정도이다.

폭기는 질량 유속기(mass flowmeter)로 최소 20% 용존 산소가 존재하도록 조정되었다.

바이오매스는 원심분리법으로 수확하였다.

이 공정은 5000×g 이상의 가속도를 얻을 수 있는 공업용 원심기에서 20℃에서 수행하였다.

얻어진 바이오매스는(예를 들어 오토클레이브에서 12℃에서 20분간 처리하는 것과 같은) 가열, 건조 냉동 건조 또는 냉동에 의하여 살균될 수 있다.

[실시예 2]

아실 유도체의 제조

박테리아 바이오 매스 100g에 32% 수산화 나트륨 155㎖를 첨가한다. 얻어진 혼합물을 4℃에서 2시간동안 교반한다. 다음에 무수 초산 117㎖를 가한다.

다음에 냉동건조를 행한다.

아실화 전후에 퍼클로릭산으로 포텐티오메트리방법으로 1차 및 2차아민을 검사하여 출발물질의 1차 및 2차 아민의 약 60%가 배양온도를 26℃로하여 물에 사는 미생물의 동정을 위한 통상의 조건하에서 1차 배양하였다.

아가 배지에서 소모(exhaustion)에 의해 분리된 박테리아 콜로니로 출발하여 주탄소원으로 글루코스를 함유한 배지에서 복재에 순응할 수 있는 순수한 배양물 중에서 미생물을 선택하였다.

사용된 배양 배지는 다음과 같다(표 2).

[표 2]

조성물	농도
자가분해 이스트 추출물 Biokar (ref. 112002)	2 g/ℓ
대두콩 파파인 펩톤 (유래 PPS-USP Biokar Ref. 11601)	2 g/ℓ
Heller 미립자	2 mℓ/ℓ
글루코스 무수물	2 g/ℓ
$CaCl_2 \cdot 10\ H_2O$	0.066 g/ℓ
증류수	100 mℓ

1N 수산화나트륨 또는 수산화칼륨을 첨가하여 pH를 7.15로 조정한 후 121℃에서 20분간 살균하였다.

증류수 1ℓ당 Heller 미립자의 조성은 다음과 같다 :

- ZnSO · 7HO ····· 1g
- MnSO · HO ····· 0.076g
- CuSO · 5HO ····· 0.003g

아세틸화되었음을 확인하였다.

같은 방법으로, 아세틸화 박테리아 추출물을 beggiatoa alba(ATCC 33555)의 배양액으로 부터 유래된 박테리아 바이오 매스의 출발물질로부터 제조한다.

[실시예 3]

크림

크림은 다음의 조성에 따른다.

- **실시예 1에서 얻어진 냉동 건조물** **0.05%**

- **카르보머(Carbomer) 940** **0.3%**

- **트리에탄올아민** **0.3%**

- **스테아린** **3.0%**

- **세틸 알콜** **2.0%**

- **자기-에멀젼능 글리세릴 모노스테아레이트** **3.0%**

- **대두유** **10.0%**

- **라놀린 알콜** **2.0%**

- **이소프로필 미리스테이트** **4.0%**

- **세틸 및 스테아릴 2-에틸헥산노에이트** **4.0%**

- **페하이드로스쿠알렌** **3.0%**

-파라핀 2.0%

-글리세롤 3.0%

-보존제 0.3%

-물 적량 100%

* 카르보머 940: 가교화된 폴리아크릴산을 나타내는 상품명

이 크림을 제조하기 위하여, 글리세롤, 보존제 및 물을 포함하는 수용상을 80℃로 가열하고; 여기에 카르보머 940을 분산시키고; 이것을 트리에탄올아민으로 중화시킨다. 80℃로 가열하여 균질화시킨, 지질상을 격렬하게 교반하면서 수용상에 가한다. 실시예 1의 냉동 건조물을 물 10g에 분산시키고 40℃하에 교반하면서 크림에 투입한다. 혼합물을 상온으로 냉각시킨다.

이 크림을 하루에 한번 또는 두번씩 얼굴과 목주변의 피부에 바른다. 충분기간동안 사용하면, 특별히 보다 젊게 보이는 피부를 얻을 수 있다.

[실시예 4]

피부용 밀크

이 밀크는 다음의 조성을 갖는다.

- 실시예 2에서 얻어진 냉동 건조된 아세틸화 유도체 0.1%

- 자기-에멀젼능 글리세롤 모노스테아레이트 3%

- 페트롤락툼 1.5%

- 액화 페트로락툼 2.5%

- 미강유 1.5%

-휘발성 실리콘 오일 5.0%

-카라이트 버터 3.0%

- 카르보머 940 0.2%

- 트리에탄올아민 0.2%

- 잔탄검 0.1%
- 글리세롤 3.0%
- 향료 0.1%
- 보존제 0.3%
- 물 적량 100%

이 밀크는 실시예 3에 기술된것과 유사한 방법으로 제조되어진다.

이 밀크를 얼굴에 바르면, 이 밀크는 태양에 노출된 개개인들에서 관찰되는 가속 피부 노화 효과를 저하시키어 준다.

[실시예 5]

두피용 조성물

이 밀크는 백발을 저지시키어 준다고 예상되어 진다.

a) 겔

이겔은 걸 다음의 조성을 갖는다.

- 활성 물질 5%를 포함하는 실시예 1의 냉동 분산물 1.0%
- 카르보머 940 0.5%
-트리에탄올아민 0.5%
- 프로필렌글리콜 3.0%
- 보존제 0.3%
- 에탄올 28%
- 물 적량 100%

날마다 바르는 것이 좋다.

b) 수성-알콜 분산액

이 분산액은 에탄올 35중량%를 포함하는 에탄올-물 혼합액에 실시예 2에 따라 얻어진 냉동 건조된된 아세틸화 유도체 0.5%를 포함한다.

[실시예 6]

크림

다음의 조성을 갖는 에멀젼을 실시예 3과 동일한 공정에 다라 제조하였다.

- 실시예 2에서 얻어진 냉동 건조된 아세틸화 유도체 0.125%

- 다음으로 구성되는 자기-에멀젼능 베이스

. **광유**

. **페트로락톰 코덱스**

. **오조케라이트** **20.000%**

. **글리세롤 올레이트**

. **액화 라놀린**

- 액화 페트로락톰 코덱스 **5.000%**

- 글리세롤 **5.000%**

- 알루미늄 스테아레이트 **0.500%**

- 다이포타슘 EDTA **0.050%**

- 황산 마그네슘 **0.700%**

- 보존제 (메틸 및 프로필 파라-히드록시벤조에이트) **0.200%**

-이미다졸리디닐우레아(보존제) 0.300%

-향료 0.300%

-물 적량 100%

[피부 내성 시험]

이 시험은 다음과 같은 Marzulli 및 Maibach의 시험법에 따라 실시한다 : (흡수를 촉진하기 위하여) 흡수 드레싱에 생성물 또는 감수성제를 함유시켜 피부에 3주동안 계속 발라주어, 만일 생성물이 감수성이 있는 것이면, 특이한 항체의 형성을 유발하는 것이 가능하도록 하여 준다.

상기 시험 2주일이 경과하면, 생성물을 다시 투여한다(방아쇄 시험).

만일 민감성이 나타나면, 아르기 반응이 나타난 것으로 간주한다.

[과정]

50명의 자원자를 대상으로 하여, 상기에서 제조한 크림을 사용하여, 다음의 방법에 따라 시험을 행하였다.

재료

시험 약물을 수용하는 면 콤푸레스가 합성 섬유 시트로 아르레기 항진 접착제 물질으로 부터 차폐된 구조로되어진 상품명 leukotest의 폐색 드레싱으로 생성물을 투여하고 피부 반응이 시험 표면에만 엄격하게 국한되도록 셀로판 링으로 감는다.

생성물의 투여

예비 시험없이, 패치를 건강한 피부에 투여한다.

투여는, 유발 기간동안 내내, 자원자의 왼쪽 어깨의 동일한 부위에 계속하여 실시하며; 이에 따라 피부의 동일한 부위에서는 생성물 0.1ml가 폐색 드레싱에 48시간동안 머물러 있게 되어, 일주인간 3번 투여되며, 3주간 계속된다; 투여는 부작용의 조짐이 나타나면 즉시 방아쇄 시험에서 중단한다.

2주간 시험기간의 경과후, 유발의 목적에 행한 부위(왼쪽 어깨)와 각 자원자의 오른쪽 어깨로 정의된 새로운 부위에 생성물을 마지막으로 투여하고; 폐색 드레싱들을 24시간동안 유지한다.

평가

유발기간 동안

각 투여전, 피부의 상태를 평가한다. 이 평가는 패치의 제거후 즉시 반복한다.

발열반응의 경우시, 생성물의 투여는 방아쇄 시험에서 즉시 중단하여야 한다.

방아쇄상 동안

각각각의 평가는 패치의 제거후, 즉시, 그리고 24시간 및 48시간 후 실시한다.

이 평가는 다음의 관찰으로 행하여진다.

-동일한 피부 부위에 9회 투여동안, 생성물의 누적에 따른 부작용의 어떤 징후가 없는지 여부;

-방아쇄 투여후,아르레기 진행의 어떠한 중요한 징후가 있는가 여부.

[평가의 범위]

임상의들은 다음의범위에 따라 피부 반응을 평가하였다.

홍반:

0 - 홍반 없음

1 - 약한 홍반

2 - 분명한 홍반

3 - 수종을 동반한 분명한 홍반

양진(Pruritus)

0 - 양진 없음

1 - 약한 양진

2 - 심한 양진

습진성 궤양

0 - 베지클 없음

1 - 베지클 존재

임상의들은 또한 자원자로부터의 어떠한 진술도 주목할 것이다.

[결과의 표현]

생성물에 의한 반응들을 다음과 같이 평가하였다 :

- 각각 유형의 피부 반응을 갖는 경우의 퍼센트로 나타내어 지는 일반적 판정;

- 관찰된 반응의 유형과 이의 정도의 유형을 계산한 보다 상세한 판정.

다음이 상기 요소들에 의하여 정의된다.

- 수포 또는 양진과 관련되거나 또는 관련없는 홍진에 국한된 반응의 외견으로 특징지어지는, 자극도의 크기;

- 방아쇄 주기 동안 특히 관찰되어지는 양진, 수포 및/또는 습진을 일반적으로 수반하는, 홍진성 반응으로나타내어 지는, 민감성도의 크기.

[시험 일정]

투여 일정은 다음과 같이 한다.

D 0 - 48시간 동안 첫번째 팻치의 투여,

D 2 - 결과의 판독과 두번째 패치의 투여,

D 4 - 결과의 판독과 3세째 패치의 투여,

D 7 - 결과의 판독과 4번째 패치의 투여,

D 9 - 결과의 판독과 5번째 패치의 투여,

D 11 - 결과의 판독과 6번째 패치의 투여,

D 14 - 결과의 판독과 7번째 패치의 투여,

D 16 - 결과의 판독과 8번째 패치의 투여,

D 18 - 결과의 판독과 9번째 패치의 투여,

D 21 - 결과의 판독,

D 35 - 24시간동안 생성물의 첫번째 투여,

D 36 - 패치의 1/2을 제거한후 결과의 판독,

D 37 - 패치 제거 24시간후 결과의 판독,

D 36 - 패치제거한후 48시간후 결과의 판독.

[결과]

[유발 기간]

50명의 자원자에서, 피부 반응이 전혀 검출되지 않았다.

[방아쇄 기간중]

50명의 자원자에서 피부 반응이 전혀 검출되지 않았다.

이 결과는 특히, 감수성물질로서 잠재능의 위험이 널리 알려진, 보존제와 향료가 존재하는 크림의 경우에 있어서서, 매우 의미 있다고 하겠다.

[실시예 7]

가스 교환 방법에 의한 피부호흡의 연구

이 시험의 원리는 주어진 시간에서, 피부의 장벽을 통하여 통과하는 산호와 이산화 탄소의흐름을 측정하는 것으로 이루어진다. 이를 수행하기 위하여, 실리콘 수지로 만들어진 원형 단면을 갖은 실린더 형상의 셀을 주형으로 제조한다. 팔의 피부에 셀의 열린 끝단을 대고, 탄성 끝으로 밀착시킨다.

시료(실시예 1의 냉동 건조물이 0.05% 함유된)를 약 2㎎/㎠의 양으로 투여한다. 그곳에 위치한 셀내에 갖혀진 공기의 부피는 약 8.8㎠이며, 갖혀진 공기에 접촉하는 피부의 면적은 12.6㎠이다.

0 시간에서, 두개의 셀을, 하나는 피부의 대조 부위에, 또 다른 하나는 피부의 치료 부위에 동시에 부착한다.

공기 시료 0.2㎖을 셀로부터, 매 10분마다 주사기로 채취한다. 셀의 변형성으로 채취된 공기의 부피에도 불구하고 셀내의 압력이 항상 일정하게 유지된다.

채취된 공기는 가스크로마토그래피로 분석한다.

시험은 20세에서 54세까지의(평균 나이 38세) 16사람에서 행하였다.

평균적으로 피부를 통한 이산화 탄소의 흐름은 27%증가, 산소의 흐름은 21%증가 하였음이 치료된 부위에서 치료되지 않은 부위에 비하여 관찰되었다.

[실시예 8]

인체 피부 섬유아세포 증식의 효과

섬유아세포를 한웰당 7,500세포수로 접종하여, 완전 영양 배지에서 배양한다.

시료는 실시예 2의 것이다.

이를 배양액에 여러 농도의 경우로 첨가한다. 그다음 배양의시간을 달리한 후 세포의 수를 측정한다.

시료의 농도를 50㎍/㎖로 처리한 세포의 수가 대조 웰에서의 세포의 수에 비하여 상대적으로 30% 증가되었음이 관찰되었다.

세포 상등액에서, ELISA기법으로 에세이를 행한 결과,엘라스틴 유전자(피부의 탄성력의 원천)을 활성화시켜준다고 알려진 인터루킨-12β가 확인되었다.

시료의 농도를 150㎍/㎖로 처리한 경우, 인터루킨 1β가 34.5pg/ml 발견되었다(대조군 : 5.5pg/ml).

더욱, 배양 베지(처리 및 대조 베지)에서 엘라스타제-형 활성도의 검색 결과 음성이었다.

[실시예 9]

엘라스타제 저해 시험

사용된 시료는 냉동 건조된 실시예 1의 것이다.

췌장 엘라스타제(시그마; 83U/mg;단백질;15mg/ml)의 활성은 시료의 존재 및 부재의 경우에서 측정한다.

이를 위하여, 엘라스타제(15mg 단백질/ml으로 희석한)을 트리에탄올아민 용액(Triton X100)으로 분산된 시료에 가한다.

엘라스타제의 활성도가 38%감소된것이 관찰된다.

시료를 반으로 휘석한 경우, 엘라스타제의 활성도는 31% 감소된다.

[실시예 10]

한달후 자원자의 투여 시험

시료를 0.05% 활성물이 존재하는 크림형태로 투여한다.이 크림은 실시예 3에 기술된 조성을 갖는다. 피부 평당 센티당 시료 생성물 2mg을 하루에 한번씩 안면부와 팔에 투여 한다.투여를 4주간 계속한다. 이 치료는 17명의 자원자에게 행하였다.

1.) 피부의 기계적 특성 측정

피부의 생물 기계적 특성(긴장성 Ue, 건강도 Ur, 탄성 Ur.Ue)을 Regal 및 Leveque, Bioeng, Skin 1:13-23(1985)에 개시된 장치를 사용하여, C. Escoffier et al. J. Invest. Dermatol. 93: 353-357(1989)에 기

술된 방법에 따라 측정한다.

측정은 접착제를 사용하여 피부에 탐침자를 부착하여 팔의 피부에서 행한다.

측정은 처음, 2주일후 및 4주일후 각각 실시한다.

긴장성 Ue의 경우, 2주후 23%의 증가가 관찰되었다(4주후 30%), 건장도 Ur인 경우, 동일한 경우 40%(4주에서는 43%)의 증가가 관찰되었다.

이것은 생성물이 피부에 생기계학적 특성, 특히 긴장성을, 치료 개시 2주일후부터의 짧은 시간내에 향상시킴을 의미한다.

2.) 주름에 대한 영향

주름에 대한 효과를 상 분석으로 조사하였다. 이 방법은 네가티브 복사(cow's feet라 불리워지는 눈두덩이에 인접된 부위에 존재하는 주름의 실리콘 인쇄)를 각각의 주름뒤에 그림자가 드리워지도록 간섭광으로 조사하는 것으로 행하여진다. 이 그림자를 Corcuff et al, J. of Soc. of Cosmet. Chem, 34, 177-190(1983) 및 Corcuff, Acta Stereologica 2(1) 85-88(1983)에 기술된 상분석으로 정량한다.

이 방법은 조사하는 주름살의 표면적을 측정할 수 있다. 주름의 표면적은 4주간의 치료후 상당히 감소되었음이 발견되었다.

동시에, 1 내지 9㎜의 주름의 숫자의 감소가, 주름살의 평균 길이가 1㎜이하로 짧게 감소된 것과 같이 나타났다.

3.) 피부 두께

팔에서 피부 두께의 효과는 Schnelltaster에서 얻을 수 있는, 눈금 메겨진 다이얼을 장착한 핀셋을 사용하여, 피부 겹 측정이라고 알려진 방법으로 평가하였다. 관련 문헌: Dykey et al., Arch. Dermatol. Res. 256-261, 1976).

2주후, 2%의 상당한 증가가 나타났으며, 치료 4주후 3.5%의 향상이 나타났다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

비-광합성 및 비-포자성 사상의 베그지아토알레스(Beggiatoales) 목 또는 비트로에실라(Vitreoscilla) 속에 속하는 미생물로 이루어진 군에서 선택된 최소한 하나의 박테리아의 추출물을 필수성분으로 포함하는 피부의 탄성 및 긴장성 향상, 피부 주름의 수 및 길이 감소, 노화에 의해 피부 두께 감소의 저해, 피부의 섬유아세포의 증식 자극, 또는 피부 호흡 증가의 적어도 하나의 용도에 알맞은 피부 노화 방지용 화장제.

청구항 2

상기 박테리아는 베기지아토아(Beggiatoa), 비트레오실라(Vitreoscilla), 필레크시트릭스(Flexithrix) 또는 레오코트릭스(Leucothrix) 속에 속하는 피부 노화 방지용 화장제.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 박테리아는 베그지아토아 알바 균주에서 선택되는 피부 노화 방지용 화장제.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 추출물은 박테리아의 배양 후 얻어지는 박테리아 바이오 매스이며, 상기 바이오 매스는 선택적으로 최소한 부분적으로 탈수, 또는 냉동 건조 또는 분쇄되는 피부 노화 방지용 화장제.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 추출물은 아실화 유도체의 형태인 피부 노화 방지용 화장제.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 박테리아 추출물은 전제 조성물 중에 건조 박테리아 추출물이 0.01 내지 2중량% 포함되는 조성물 형태로 투여되는 피부 노화 방지용 화장제.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 박테리아 추출물은 전제 조성물 중에 건조 박태리아 추출물이 0.01 내지 1중량% 포함되는 조성물의 형태로 투여되는 피부 노화 방지용 화장제.