

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4387464号
(P4387464)

(45) 発行日 平成21年12月16日(2009.12.16)

(24) 登録日 平成21年10月9日(2009.10.9)

(51) Int.Cl.	F I
C O 7 D 311/72 (2006.01)	C O 7 D 311/72 1 O 2
A 6 1 K 8/49 (2006.01)	A 6 1 K 8/49
A 6 1 Q 19/00 (2006.01)	A 6 1 Q 19/00
A 6 1 Q 19/08 (2006.01)	A 6 1 Q 19/08
A 6 1 Q 19/02 (2006.01)	A 6 1 Q 19/02

請求項の数 20 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平10-548872	(73) 特許権者	エル・ヴェ・エム・アッシュュ ルシエルシユ
(86) (22) 出願日	平成10年5月14日(1998.5.14)		フランス国 45800 サン ジャン
(65) 公表番号	特表2002-504098(P2002-504098A)		ド ブレイ, アヴェニュー ド ヴェルド
(43) 公表日	平成14年2月5日(2002.2.5)		ユン, 185
(86) 国際出願番号	PCT/FR1998/000958	(74) 代理人	特許業務法人安富国際特許事務所
(87) 国際公開番号	W01998/051679	(74) 代理人	弁理士 安富 康男
(87) 国際公開日	平成10年11月19日(1998.11.19)	(74) 代理人	弁理士 古谷 信也
審査請求日	平成17年4月22日(2005.4.22)	(72) 発明者	フレデリック・ボンテ
(31) 優先権主張番号	97/05907		フランス国 45100 オルレアン 5
(32) 優先日	平成9年5月14日(1997.5.14)		4, リュ テューデル
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トコフェロールエステル並びに化粧品及び医薬品でのその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

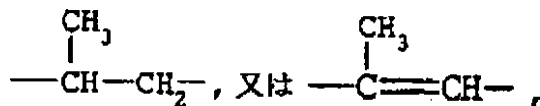
下記化学式(I)で表されることを特徴とするエステル:



式中:

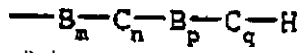
R₁、R₂及びR₃は、独立して、水素原子、メチル基を表し、

Aは、以下の基を表し:



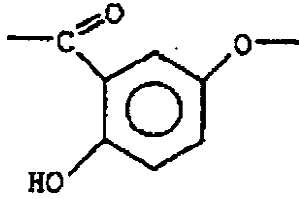
R₄及びR₅は同一であるか又は異なるものであり、それぞれ以下のかたちの分子鎖を表す:

:

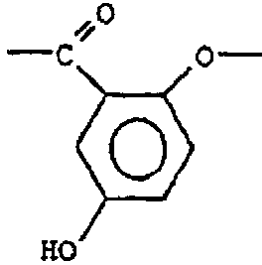


式中：

B は以下の基であり：



C は以下の基であり：



指数 m 、 n 、 p 及び q はそれぞれ 0 ~ 4 の範囲にある整数であるが、ただし、それらの合計 $m + n + p + q$ は 0 ~ 4 の範囲にある整数に限定される。

【請求項 2】

R_4 及び R_5 が水素を表すことを特徴とする請求項 1 記載のエステル。

【請求項 3】

基 R_4 及び R_5 のうち少なくとも 1 つが水素を表すことを特徴とする請求項 1 記載のエステル。

【請求項 4】

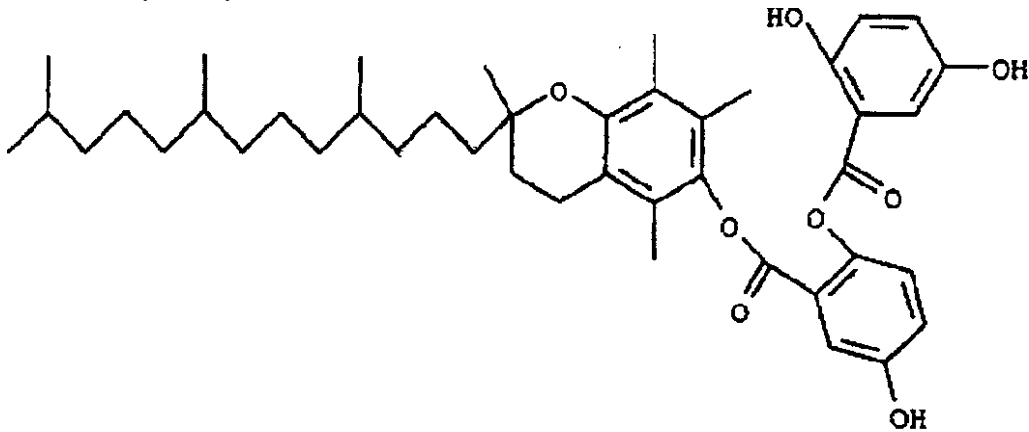
基 R_4 又は R_5 の一方が水素を表し、他方が 2, 5 - ジヒドロキシベンゾイル基を表すことを特徴とする請求項 3 記載のエステル。

【請求項 5】

アルファ - トコフェロール、ベータ - トコフェロール、ガンマ - トコフェロール、ゼータ 1 - トコフェロール、ゼータ 2 - トコフェロール、デルタ - トコフェロール、イータ - トコフェロール、イプシロン - トコフェロール 及び ビトコールのエステルからなる群より選択されることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のエステル。

【請求項 6】

以下の式 (II) を満たすエステル。



(II)

【請求項 7】

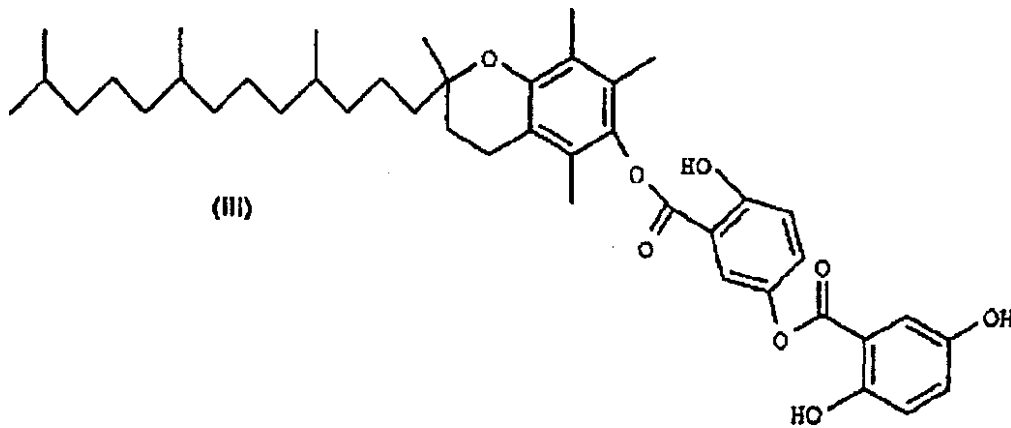
以下の式 (III) を満たすエステル。

10

20

30

40



10

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のエステルの少なくとも 1 つを化粧用有効成分として含有することを特徴とする化粧用組成物。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のエステルの少なくとも 1 つを薬用有効成分として含有することを特徴とする薬用組成物。

【請求項 10】

さらに化粧学的又は薬学的若しくは皮膚科学的に許容される少なくとも 1 つの油を含有する脂肪相を含むことを特徴とする請求項 8 又は 9 記載の組成物。

20

【請求項 11】

前記油は、ホホバ油、マカダミア油、リムナンセス (Limnanthes) 種子油、鉱油、並びに、トリグリセリド、又は、これらの混合物からなる群より選択される請求項 10 記載の組成物。

【請求項 12】

エステル濃度が、最終組成物の全重量に対して 0.001 重量% ~ 5 重量% の範囲にあることを特徴とする請求項 8 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の組成物。

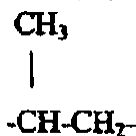
【請求項 13】

エステル濃度が、最終組成物の全重量に対して 0.1 重量% ~ 1 重量% の範囲にあることを特徴とする請求項 8 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の組成物。

30

【請求項 14】

R_1 、 R_2 及び R_3 がそれぞれメチル基を表し、
A が以下の基を表し：



R_4 及び R_5 が上述した意味を持つものである、請求項 1 に記載の化学式 I に相当するアルファ - トコフェロールエステルの少なくとも 1 つを有効成分として含有することを特徴とする請求項 8 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の組成物。

40

【請求項 15】

ビタミン A、B 1、B 6、B 12、E、C、PP、レチノイン酸、レチナール、レチノール及びそのエステル、サリチル酸及びその誘導体、2, 5 - ジヒドロキシ安息香酸、トコフェロール及びそのエステル、アジアチン酸 (asiatic acid)、マデカシン酸 (madecassic acid) 及びそのグリコシド含有エステル、アジアチコサイド (asiaticoside)、センテラ・アジアチカ (Centella asiatica) の抽出物、シーゲスベッキア・オリエンタリス (Siegesbeckia orientalis) の抽出物、プロアントシアニド (proanthocyanide) オリゴマー及びそのエステル、アスコルビン酸の誘導体、エリソルビン酸、微量成分 (oligoelement)、アルファ - ヒドロキシル化酸及びそのエステル、アミノ酸、セラミド、フォトセラミド (photoceramide)、エクジステロイド及びそのエステルからなる群より選択され

50

る少なくとも1つの他の有効成分を含有することを特徴とする請求項8～14のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項16】

前記化学式Iのエステルは、ビタミンAと組み合わせて使用されることを特徴とする請求項8～15のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項17】

請求項1～7のいずれか1項に記載の少なくとも1つのエステルを含む化粧剤。

【請求項18】

皮膚に対するフリーラジカルの有害な作用を回避し又は減少させ、吹き出物及び皮膚のチクチク感やヒリヒリ感を防止し又は治療し、ケラチン生成細胞の分化を促進し、表皮の標準保湿作用を回復させ、肌のきめの細かさを改善し、皮膚の老化作用を遅らせるか又は治療し、しわの発生や皮膚のたるみを遅らせるか又は治療し、過剰な色素沈着を薄くし、皮膚の老化によるしみを治療するための化粧用組成物であって、請求項17に記載の化粧剤を含む組成物。

10

【請求項19】

ラジカルや炎症に対する作用を持つか又は皮膚神経終末に対する麻酔作用を持つ皮膚科学用薬用組成物であって、請求項1～7のいずれか1項に記載の少なくとも1つのエステルを薬用有効成分の1つとして含有する組成物。

【請求項20】

最終組成物の0.001重量%～5重量%の範囲にある濃度で前記化学式Iのエステルを含有することを特徴とする請求項18又は19に記載の組成物。

20

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、新規物質であるトコフェロールエステル、化粧品及び医薬品、特に皮膚科学でのその使用に関するものであり、更に、それを含有する化粧用又は薬用、特に皮膚科学用の組成物にも関する。

先行技術の要約

アルファ-トコフェロール又はビタミンEは、通常ベータ-トコフェロール、ガンマ-トコフェロール及びデルタ-トコフェロール等の他の化合物とともに、多数の植物中に自然な状態で見出されることが知られている。

30

アルファ-トコフェロールは、本質的に、ビタミンE欠乏症の克服のために、又は、特に筋肉の衰えを克服するための栄養剤として用いられる。

また、抗酸化剤としても用いられるが、有効用量が多い。

本発明の要約

本発明においては、極めて驚くべきことで予想外のことであるが、新規のトコフェロールエステル、並びに、この新規トコフェロールエステルが、ラジカルや炎症に対して、また、ケラチン生成細胞の分化の改善、皮膚の保湿の改善、肌のきめの細かさの改善、抗老化作用、色素脱失作用、及び、皮膚神経終末に対する麻酔作用において強力な活性を発揮する事実を見出した。

すなわち、本発明は、ラジカルや炎症、老化に対して、また、色素脱失、ケラチン生成細胞の分化の改善、皮膚の保湿、肌のきめの細かさについて良好な活性を有し、かつ、特に局部又は全身適用による皮膚神経終末に対する麻酔作用をも有する有効物質であって、化粧用、薬用及び特に皮膚科学用組成物の調製において価値のある有効成分を構成するものを供給するという新規の技術的課題を解決しようとするものである。

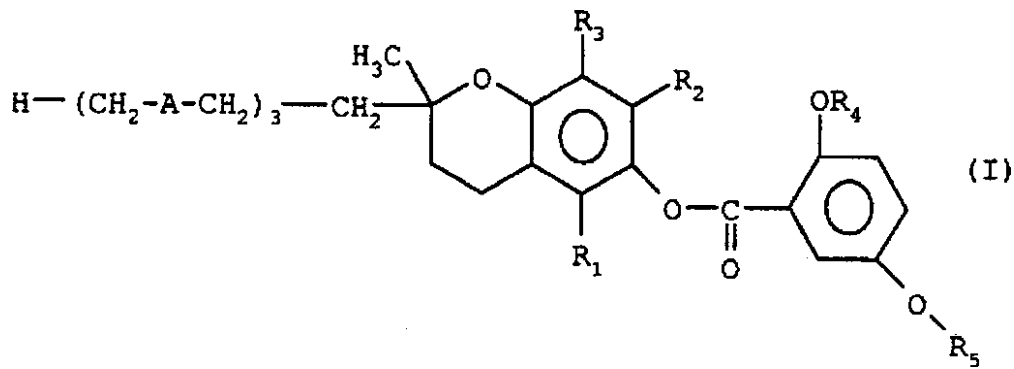
40

本発明は、この新規の技術的課題を、非常に簡便でかつ工業的規模での使用に適した手段により満足に解決するものである。

本発明の詳細な説明

すなわち第一の側面において、本発明は、下記化学式(I)で表されることを特徴とするエステルに関する：

50

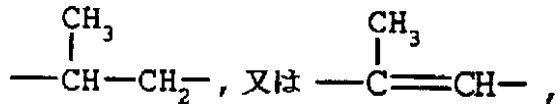


10

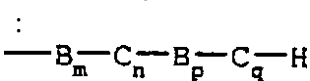
式中：

R_1 、 R_2 及び R_3 は、独立して、水素原子、メチル基を表し、

Aは、以下の基を表し：

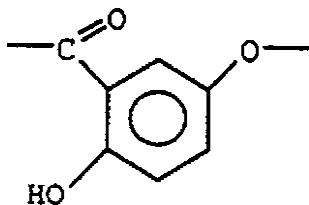


R_4 及び R_5 は同一であるか又は異なるものであり、それぞれ以下のかたちの分子鎖を表す

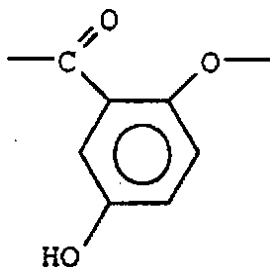


式中：

Bは以下の基であり：



Cは以下の基であり：



20

30

指数 m 、 n 、 p 及び q はそれぞれ0～4の範囲にある整数であるが、ただし、それらの合計 $m+n+p+q$ は0～4の範囲にある整数に限定される。

本発明の一態様において、上記エステルは、 R_4 及び R_5 が水素を表すことを特徴とする。

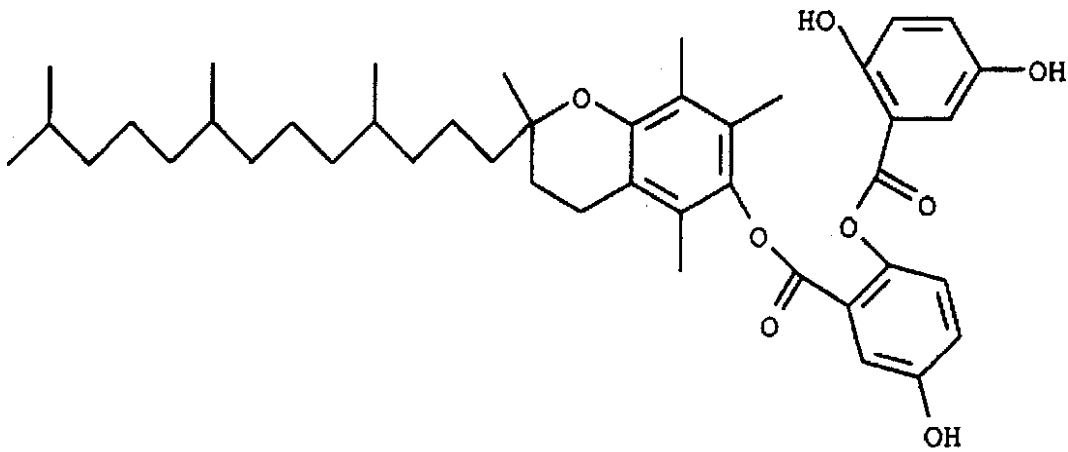
本発明の一態様において、上記エステルは、基 R_4 及び R_5 のうち少なくとも1つが水素を表すことを特徴とする。

40

本発明の一態様において、上記エステルは、基 R_4 又は R_5 の一方が水素を表し、他方が2,5-ジヒドロキシベンゾイル基を表すことを特徴とする。

本発明の一態様において、上記エステルは、アルファ-トコフェロール、ベータ-トコフェロール、ガンマ-トコフェロール、ゼータ-1-トコフェロール、ゼータ-2-トコフェロール、デルタ-トコフェロール、イータ-トコフェロール、イプシロン-トコフェロール及びトコールのエステルからなる群より選択されることを特徴とする。

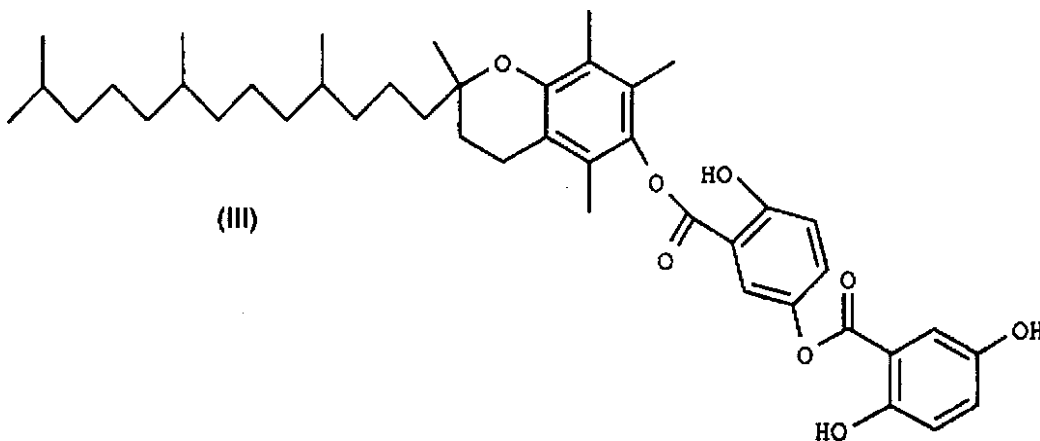
本発明の一態様において、本発明は、以下の式(II)を満たすエステルに関する。



10

(II)

本発明の一態様において、本発明は、以下の式 (I I I) を満たすエステルに関する。



20

以下では上記式 (I I) 及び (I I I) のエステルを、それぞれ式 (I I) 及び式 (I I I) のアルファ-トコフェロール 2, 5 - ジヒドロキシ安息香酸ジエステル、あるいは、「ジエステル A₁」及び「ジエステル A₂」という。

第二の側面において、本発明は、上述した式 (I) のエステルの少なくとも 1 つを有効成分として含有することを特徴とする化粧用又は薬用組成物、特に皮膚科学用組成物にも関する。

30

一態様において、上記組成物は、上述したエステルの少なくとも 2 つを混合物の状態で有効成分として含有することを特徴とする。

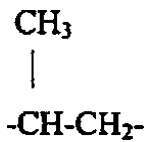
一態様において、上記組成物は、上記エステルが上記組成物の脂肪相に存在するものであることを特徴とする。

別の態様において、上記組成物は、上記脂肪相が化粧学的又は薬学的若しくは皮膚科学的に許容される少なくとも 1 つの油、特に、ホホバ油、マカダミア油、リムナンセス (Limnanthes) 種子油、特にリムナンセス・アルバ・ベンス (Limnanthes alba Benth) からのもの (Meadowfoam)、鉱油、並びに、トリグリセリド、特にカプリル酸及びノ若しくはカプリン酸に基づくトリグリセリド、又は、これらの混合物からなる群より選択される油を含有するものであることを特徴とする。

40

一態様において、上記組成物は、上記式 I のエステルの濃度が、最終組成物の全重量に対して 0.001 重量% ~ 5 重量% の範囲、好ましくは 0.01 重量% ~ 1 重量% の範囲にあることを特徴とする。

特別な一態様において、上記組成物は、R₁、R₂及びR₃がそれぞれメチル基を表し、Aが以下の基を表し：



R₄及びR₅が上述した意味を持つものである上記化学式Iに相当するアルファ-トコフェロールエステル、少なくとも1つを有効成分として含有することを特徴とする。

別の態様において、上記組成物は、少なくとも1つの他の有効成分、特に、ビタミンA、B1、B6、B12、E、C、PP、レチノイン酸、レチナール、レチノール及びそのエステル、サリチル酸及びその誘導体、特にその塩又はエステル、2,5-ジヒドロキシ安息香酸、トコフェロール及びそのエステル、特にトコフェロールリン酸エステル、アジアチン酸 (asiatic acid)、マデカシン酸 (madecassic acid) 及びそのグリコシド含有エステル、アジアチコサイド (asiaticoside)、センテラ・アジアチカ (Centella asiatica) の抽出物、シーゲスベッキア・オリエンタリス (Siegesbeckia orientalis) の抽出物、プロアントシアニド (proantocyanide) オリゴマー、特にブドウ種子から得られたもの、及びそのエステル、特にパルミチン酸及びステアリン酸エステル、アスコルビン酸の誘導体、特にそのリン酸エステル及びその塩、エリソルビン酸、微量成分 (oligoelement)、特に塩の状態のもの、具体的にはアスパラギン酸塩又はマグネシウム、セレン、亜鉛若しくは銅の塩化物の状態のもの、アルファ-ヒドロキシシル化酸、特にリンゴ酸、乳酸及び酒石酸、及びそのエステル、特にステアリルアルコール等の脂肪族アルコールとのエステル、アミノ酸、特にセリン、スレオニン、シトルリン及びNMF (天然保湿成分 (Natural Moisturizing Factor): K.Sakamoto, Cosmet. Toilet. (1984) 99 (3) 109-117) を構成するアミノ酸、セラミド、特に単独又は混合物で用いる2、3又は6セラミド、フォトセラミド (photoceramide)、特に小麦から抽出されたもの、並びに、エクジステロイド、特にエクジステロン、及びそのエステルからなる群より選択されるものを含有することを特徴とする。

10

20

別の特別な態様において、上記組成物は、上記式Iのエステルを、ビタミンA、好ましくはパルミチン酸エステル等のエステルの形態のものと一緒に使用することを特徴とする。

第三の側面において、本発明は、好ましくは上記化粧用組成物に配合された、少なくとも1つの上述した式Iのエステルの化粧剤としての使用にも関する。

30

化粧剤としてのその使用においては、上記式(I)のエステルは、皮膚に対するフリーラジカルの有害な作用を回避し又は減少させ、吹き出物及び皮膚のチクチク感やヒリヒリ感を防止し又は治療し、ケラチン生成細胞の分化を促進し、表皮の標準保湿作用を回復させ、肌のきめの細かさを改善し、しわの発生や皮膚のたるみ等の皮膚の老化作用を遅らせるか又は治療し、過剰な色素沈着、特に皮膚の老化によるしみを薄くするために用いられる。

フリーラジカルの有害な作用には、酸素から構成されるフリーラジカルによる特に有害な作用、すなわち皮膚構成物質、特にケラチン生成細胞等の細胞の膜脂質の過酸化作用が含まれる。酸素から構成されるこのフリーラジカルは、温度、日光、及び、自動車の排気ガスも含めた産業汚染物質の複合作用により、その濃度が汚染大気中でますます増加している。このフリーラジカルは皮膚の老化を加速させるが、その作用を、本発明のエステルを用いることで防止し又は治療し若しくは緩和することができる。

40

第四の側面において、本発明は、ラジカルや炎症に対する作用を持つか又は皮膚神経終末に対する麻酔作用を持つ薬用組成物、特に皮膚科学用組成物調製のための、上述した式Iのエステルの少なくとも1つの使用にも関する。

一態様において、上記組成物は最終組成物の0.001重量%~5重量%、好ましくは0.01重量%~1重量%を含有する。

第五の側面において、本発明は、特に最終組成物の0.001重量%~5重量%の範囲、好ましくは0.01重量%~1重量%の範囲にある濃度で上記式Iのエステルを含有する組成物として、上述した式Iのエステルの少なくとも1つを化粧品学的に有効な量で人間の

50

皮膚に局部的に適用することを特徴とする化粧的処置方法にも関する。

第六の側面において、本発明は、特に最終組成物の 0.001 重量% ~ 5 重量% の範囲、好ましくは 0.01 重量% ~ 1 重量% の範囲にある濃度で上記式 I のエステルを含有する組成物として、上述した式 I のエステルの少なくとも 1 つを治療上有効な量で人間の皮膚に局部的に適用することを特徴とする治療的処置方法にも関する。この治療的な用途において、本発明は、ラジカルや炎症に対する作用、又は、皮膚神経終末に対する麻酔作用を得ることを可能にする。

以上の記載から理解できるように、本発明の組成物は、化粧品、皮膚科学又は薬学での使用が許容される全ての剤型で調剤できる。特に、クリーム、ローション、エマルション又は実際にローションによって構成されうる。

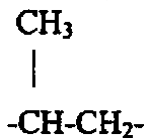
以下に各種実施例を用いて本発明を詳述するが、これらは単に例示のために掲げたものであるので、いかなる点でも本発明の範囲を限定するものではない。更に、添付した 1 の図面を参照する。

添付した 1 の図面の説明

添付した 1 の図面は、本発明の D H B T が試験濃度で抑制可能な細胞毒性を生み出すフリーラジカルの発生成分として用いた過酸化水素 (H_2O_2) 濃度を横軸に沿ってプロットし、標準ヒトケラチン生成細胞即ち K H n に対するニュートラルレッド試験により得られた細胞生存の百分率を縦軸に沿ってプロットしたグラフである。

実施例では、特に記載したもの以外は、百分率は重量基準で示し、温度は室温であって、気圧は大気圧であった。温度が記載されている時は、セ氏で表す。

実施例 1 : アルファ - トコフェロールと 2 , 5 - ジヒドロキシ安息香酸のエステルの合成
この反応は、2 , 5 - ジヒドロキシ安息香酸をアルファ - トコフェロールと反応させて、上記化学式 I を持つエステルを形成させることに基づくものである。その式中、A は以下の基を表し：



R_1 、 R_2 及び R_3 はそれぞれメチル基を表し；

R_4 及び R_5 は上述した意味を持つ。

より具体的には、このエステルの合成は以下のように行った。

半月型の攪拌機、温度計、冷却器及びディーンシュターク装置を備えた 2 リットルのフラスコに、アルファ - トコフェロール 172.3 g (0.4 モル)、キシレン 600 g 及び 2 , 5 - ジヒドロキシ安息香酸 123.2 g (0.8 モル) を満たした。

96% 硫酸 56 g を 25 で加えることにより、発熱反応が生じた。

得られた液体を約 7 時間のあいだ蒸留した。50 に冷却し、約 1000 g が乳化した後、クロロホルム 2500 g を加えてクロロホルム抽出を行った。

有機相を炭酸ナトリウムの 2% 水溶液 500 g と水 1500 g で洗浄した。この混合物を静置して、水相を分離した。

クロロホルム主体の有機相を蒸留して、89% 収率でアルファ - トコフェロールエステル 203.4 g を得た。アルファ - トコフェロールエステルは暗褐色の粘性液体という状態であった。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて面積比から判断すると、この液体は、トコフェロール 6.3%、アルファ - トコフェロール 2 , 5 - ジヒドロキシ安息香酸のエステル 49%、及び、他の物質 34% からなるものであった。

精製方法

半月型の攪拌機、温度計及び冷却器を備えた 2 リットルのフラスコに、先の工程で得られたアルファ - トコフェロール 2 , 5 - ジヒドロキシ安息香酸エステルを含有する粘性液体 180 g を、トルエン 600 g とともに満たした後、粉末状の活性炭を投入した。

活性炭と接触させて数時間が経過した後、活性炭をろ別してこの液体をきれいにし、トルエンを留去した。これによりアルファ - トコフェロール 2 , 5 - ジヒドロキシ安息香酸エ

10

20

30

40

50

ステル 116 g を得た。収率は 64 % であった。アルファ - トコフェロール 2, 5 - ジヒドロキシ安息香酸エステルは褐色の粘性液体という状態であった。

更なる HPLC 分析により、アルファ - トコフェロール 10.4 %、アルファ - トコフェロール 2, 5 - ジヒドロキシ安息香酸エステル 54 %、及び、他の物質 31 % であることが分かった。この分析は、エステルがアルファ - トコフェロール 2, 5 - ジヒドロキシ安息香酸のエステルであることを確認した。

アルファ - トコフェロールを用いて示したこの実施例は、他のトコフェロールを用いて困難なく実施可能であることが理解できよう。

実施例 2：純粋なアルファ - トコフェロール 2, 5 - ジヒドロキシ安息香酸モノエステルの製造

アルファ - トコフェロール 2, 5 - ジヒドロキシ安息香酸モノエステルは、40 ~ 60 の範囲という低めの温度で、2 時間 ~ 4 時間という短めの反応時間をかけて反応を行うこと以外は、実施例 1 に記載の合成条件を用いて好収率で得ることができる。

このような条件下で得られた主な反応生成物は、クロロホルム溶液という状態のアルファ - トコフェロール 2, 5 - ジヒドロキシ安息香酸のジエステル及びモノエステルの混合物である。これを以下では SC という。これらのエステルは以下の方法を用いて分離できる。

A - アルファ - トコフェロール 2, 5 - ジヒドロキシ安息香酸モノエステルの精製

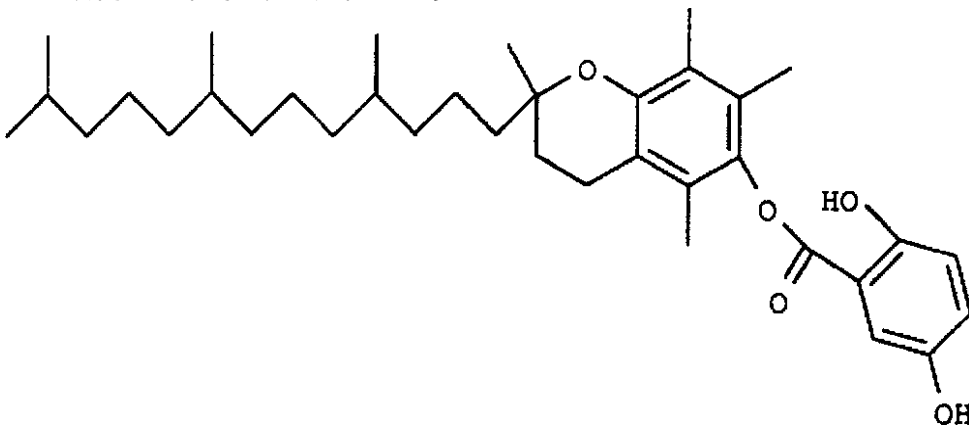
上で得られた 100 mg / mL のクロロホルム溶液 SC から、溶離液系としてヘキサン及び酢酸エチルの混合物（容積比で 80 / 20）と、例えば Merck F254 プレートを用いて、分取シリカクロマトグラフィーを行った。320 nm での UV 吸収により確認したフラクションを採取した。これを濃縮して乾燥した。アルファ - トコフェロール 2, 5 - ジヒドロキシ安息香酸モノエステルから構成される rf が 0.6 の生成物を得た。アルファ - トコフェロール 2, 5 - ジヒドロキシ安息香酸モノエステルは淡いベージュ色の粘性液体という状態であって、短波及び長波の UV 下で蛍光を発生し、クロロホルム及びエタノールに可溶であった。

その実験式は $C_{36}H_{54}O_5$ であって、分子量は 566 g であった。

その UV スペクトルは以下の max に特徴がある：330 nm、286 nm、277 nm。

電子衝撃質量分析（70 eV）により、以下の M^+ 特性フラグメントが得られた：566、430、416、301。

その展開した化学式は以下のようであった：



B - アルファ - トコフェロール 2, 5 - ジヒドロキシ安息香酸ジエステルの精製方法

100 mg / mL の上記クロロホルム溶液 SC から、溶離液系としてヘキサン及び酢酸エチルの混合物（容積比で 20 / 80）を用いて、例えば Merck F254 プレート上で分取シリカクロマトグラフィーを行った。320 nm での UV 吸収により確認した大部分のフラクションを採取して、これを濃縮し減圧下乾燥した。

2 種類のアルファ - トコフェロール 2, 5 - ジヒドロキシ安息香酸ジエステルの混合物、すなわち第二の 2, 5 - ジヒドロキシ安息香酸エステルが第一のエステルのオルト置換基

10

20

30

40

50

を構成するというジエステルであって、上記式 (I I) の「ジエステル A₁」と言及したものの、及び、第二の 2 , 5 - ジヒドロキシ安息香酸エステルが第一のエステルのメタ位の置換基であるジエステルであって、上記式 (I I I) の「ジエステル A₂」と言及したものの、から構成される r f が 0 . 4 5 の生成物を得た。

それぞれ式 (I I) 及び (I I I) を持つアルファ - トコフェロール 2 , 5 - ジヒドロキシ安息香酸ジエステルの混合物の特徴は以下のものである : r f が 0 . 4 5 の淡い黄土色の粘性液体、短波及び長波の UV 下での蛍光、クロロホルム及びエタノールに可溶。実験式は C₄₃H₅₈O₈ で分子量は 702、UV スペクトルは 338 nm、286 nm 及び 277 nm に m_{max} を持つ。電子衝撃質量分析 (70 eV) は、以下の M⁺ 特性フラグメントを与えた : 702、670、662、647、566、430、416、301。

10

例えば、ジエステル A₁ 及び A₂ は、以下の条件での溶離溶媒を用いて C - 18 シリカプレート (MERCK 製の F 254^R) 上でその混合物をクロマトグラフィーにかけて分離できる : 以下の体積比のメタノール / 水 / 酢酸 / テトラヒドロフラン : 88 . 4 / 7 . 6 / 3 . 92 / 0 . 08。

シリカカラムを用いて工業的な分取クロマトグラフィーによりこれら 2 つのジエステルを分離する目的では、溶離液としてヘキサンと酢酸エチルの 95 / 5 混合物を用いることが好ましい。

ジエステル A₁ は、分子イオン (702) 付近のフラグメントイオンの相対強度が以下のようである : 702 (10)、670 (70)、662 (14)、647 (22)。

ジエステル A₂ は、分子イオン (702) 付近のフラグメントイオンの相対強度が以下のようである : 702 (3)、670 (25)、662 (28)、647 (48)。

20

実施例 3 : フリーラジカルの細胞毒性に対するアルファ - トコフェロール 2 , 5 - ジヒドロキシ安息香酸エステルの保護作用の研究

1 . 試験原理

ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させた各種濃度のアルファ - トコフェロール 2 , 5 - ジヒドロキシ安息香酸 (以下では「DHBT」という) について、培養培地に存在する過酸化水素 (H₂O₂) により生じた各種濃度の酸素含有フリーラジカルに曝した標準ヒトケラチン生成細胞 (KHn) の培養株で試験を行った。

各試験濃度について、いわゆる「ニュートラルレッド」試験で細胞生存率を評価した。

この試験は、本質的に比較することからなる、すなわち :

30

- 過酸化水素は投入していないが、処置培養株と同じく DMSO に溶かした DHBT は投入した参考培養株 (コントロール) ;

- 過酸化水素は投入せず、DHBT の溶媒である DMSO のみを、DHBT で処置した培養株のものと同量で投入した培養株 (DMSO 参考) 。

DMSO に溶かして実際に試験に用いた DHBT は、実施例 1 で得られたアルファ - トコフェロール 2 , 5 - ジヒドロキシ安息香酸エステルの混合物であった。

2 . 試験手順

a) ケラチン生成細胞の由来

健康な皮膚から外科手術により採取した標準ヒトケラチン生成細胞 (KHn) を用いた。

b) 培養条件

40

上記 KHn を完全無血清培地 (SFM) (以下では SFM c という。Gibco 製) で保持した。細胞を連続的に 7 度培養して、その 7 度目に、KHn 細胞 (P7 という) を集めた。

c) 処理条件

無血清培地である Gibco 製の K - SFM 培地の 96 ウェル培養プレートにウェルあたり 1000 KHn の割合で P7 KHn 細胞を接種してから 24 時間後に、1 μM、5 μM、10 μM、25 μM、50 μM、75 μM 及び 100 μM という各種濃度の過酸化水素 (H₂O₂、Sigma、番号 H - 1009) で処理した。更に、上記濃度の H₂O₂ のそれぞれに関して、0 . 1 μg / mL、1 μg / mL 及び 10 μg / mL という 3 種類の濃度のトコフェロールゲンチジン酸で処理した。

50

KHn細胞を各種物質とともに、ハンクスの平衡塩類溶液（HBSS、Gibco製、番号：14175-053）中、37℃で1時間培養した。培養後、細胞をHBSS緩衝液で洗浄して、リソソームの活性を明らかにすることによる生死判断試験を構成するニュートラルレッド試験を行った。

d) ニュートラルレッド試験

この試験のため、ダルベッコリン酸緩衝液（PBS、Gibco製、番号：14190）で細胞を洗浄した。

この後、ウェルあたり200μLで、SFMc培地中1.25%（v/v）のニュートラルレッド溶液（水中0.4%の母液）と細胞を37℃で3時間培養した。

生存している細胞のみが赤色を帯びる。従って、光学密度という観点から測定した赤色の強度は、生存細胞の数に直接依存する。 10

培養後、細胞をPBSで洗浄した。

その後、50%エタノール+1%酢酸の混合物100μLを各ウェルに加えた。

プレートを15分間攪拌した。

次いで光学密度を分光測光法により540nmで測定した。

細胞生存率は以下の式を用いて、百分率で表示する。

$$\text{生存率 (\%)} = \frac{DO_{PH}}{DO_{TB}} \times 100$$

式中、DHB濃度の各値に関して、DO_{TB}は「コントロール」培養株の光学密度であり、DO_{PH}は過酸化水素（H₂O₂）を含む培養株の光学密度である。 20

3. 結果

得られた結果を以下の表Iにまとめる。

10
20
30
40

アルファートロコフェロール2, 5-ジヒドロキシ安息香酸 (DHBT) 及び酸素含有フリーラジカルの存在下における
培養K562細胞の生存率 (%)

表 1

No	DHBT		DHBT		DHBT		DHBT	
	平均	σ	0.1 $\mu\text{g/ml}$ 平均	σ	1 $\mu\text{g/ml}$ 平均	σ	10 $\mu\text{g/ml}$ 平均	σ
コントロール	100.00	6.82	100	2.82	100	2.45	100	4.21
DMSO参考			107.38**	1.11	103.85**	1.04	105.31**	3
H ₂ O ₂ 1 μM	108.25	8.13	110.47	3.66	99.88	1.36	103.67	3.66
H ₂ O ₂ 5 μM	106.93	6.2	109.88	0.45	106.87	0.67	107.67	3.11
H ₂ O ₂ 10 μM	109.04	8.44	102.85	8.47	103.74	2.26	111.99	2.44
H ₂ O ₂ 25 μM	95.16	6.39	94.16	20.07	99.21	4.49	112.35	4.59
H ₂ O ₂ 50 μM	85.33*	4.74	85.1*	2.75	86.52*	4.32	107.04	4.93
H ₂ O ₂ 75 μM	72.42*	11.4	85.37*	2.65	72.46*	3.32	90.73*	4.41
H ₂ O ₂ 100- μM	59.07*	8.9	68.4*	4.08	53.04*	6.87	85.71*	2.43

* 5%で有意の結果 ($p < 0.05$)

** DMSO参考培養株にはDHBTを投入せず、DMSOのみを投入した。

更に、添付した1の図面に同じ結果を曲線としてプロットした。

本発明のDHBTが試験濃度で抑制可能な細胞毒性を生起するフリーラジカルの発生成分

として用いる過酸化水素 (H₂O₂) の濃度を横軸に沿ってプロットする一方、標準ヒトケラチン生成細胞即ちKHnに対するニュートラルレッド試験で得られた細胞生存の百分率を縦軸に沿ってプロットした。

丸による曲線は、過酸化水素は含むがDHB Tは投入しなかった培養株に対応する。四角形による曲線は、DMSOに溶かした本発明のDHB Tを0.1 μg / 培地 1 mLの濃度で投入した培養株に対応する。三角形による曲線は、DMSOに溶かした本発明のDHB Tを1 μg / 培地 1 mLの濃度で投入した培養株に対応する。最後に、バツ印による曲線は、本発明のDHB Tを10 μg / 培地 1 mLの濃度で投入した培養株に対応する。DMSO参考に対応する培養株はDHB Tが投入されておらず、その溶媒であるDMSOのみが投入されていることに注意されたい。

10

表I及び添付した1の図面にプロットした曲線からは、過酸化水素を25 μM以上で用いると、細胞生存率が約100%から急速に落ち込むので、過酸化水素がケラチン生成細胞にとって毒性であることが分かる。

しかしながら、過酸化水素と10 μg / mLという濃度の本発明のDHB Tとで細胞を処理すると、過酸化水素の毒性はその濃度が75 μMになるすなわち濃度が3倍大きくなるまで観察されない。このことはケラチン生成細胞がフリーラジカルの攻撃に対する実質的な耐性を獲得し、この耐性が上記濃度のDHB Tにより達成されることを証明している。すなわちこのテストは、抗ラジカル作用が、具体的に言うと薬用組成物、特に皮膚科学用組成物、若しくは化粧用組成物を製造するために、又は、化粧剤として、特に有効であることを明らかにしている。

20

加えて、酸素含有フリーラジカルが皮膚脂質を過酸化物化することを考えれば、本発明は、皮膚の老化作用を効果的に予防し又は治療することを可能にする。特に、フリーラジカルに起因する上記効果、具体的には、大気汚染により生じる上記効果。

以下に化粧用又は薬用、特に皮膚科学用組成物の様々な実施例を掲げて本発明を説明するが、単に例示のために掲げるので、いかなる点でも本発明の範囲を限定するものではない。

実施例では、濃度はグラムで計算した。

実施例4：抗しわ用クリーム

このクリームは以下の有効成分を用いて調製した：

- 実施例1の精製トコフェロールエステル 0.1 g
- ホホバ油 2 g
- ゴマ油 3 g
- パルミチン酸エステル形のビタミンA 0.01 g
- グリセロール 2 g
- 水 + 防腐剤 + 界面活性剤 + 芳香剤 合計 100 g

30

このクリームは以下のようにして調製した。まず、ホホバ油とゴマ油を混合した中にトコフェロールエステルを溶かした後、ビタミンAのパルミチン酸エステルとグリセロールを加え、最後に、界面活性剤系を含んだ水相を加え、混合物を攪拌して均一にした。

以上により得られたクリームは、数週間にわたって夜に塗布すると、肌のきめを細やかにし、肌の色を明るくし、しわの外観を消失させる。

40

実施例5：エマルジョンタイプの抗老化用組成物

この組成物は以下の有効成分から調製した：

- 実施例2で製造したトコフェロール2, 5 - ジヒドロキシ安息香酸ジエステルの混合物 0.025 g
- 商品番号TEFOSE63^Rとして市販されているポリエチレングリコール6とポリエチレングリコール32のステアリン酸エステル 15 g
- パルミチン酸セチル 3 g
- セチルアルコール 3 g
- 2 - ヘキシル - 1 - ドデカノール 5 g
- グリセリン 3 g

50

- 2%カルボポール (Carbopol) 980^R ゲル 5 g
- 精製水 + 防腐剤 + 芳香剤 合計 100 g

このエマルションを調製するには、まず、トコフェロール2,5-ジヒドロキシ安息香酸ジエステルの混合物を脂肪相と混合して、完全に溶解させた。なお、上記脂肪相は、グリセリン、ポリエチレングリコールのステアリン酸エステル、パルミチン酸セチル、セチルアルコール及びオクチルドデカノールから構成されるものである。その後、精製水を攪拌下で加えてエマルションを形成させ、カルボポールを加えてエマルションをゲル化した。エマルション又はクリーム形成性組成物が得られたが、これは抗老化用ケアクリームとして数週間にわたり局部に塗布する。

実施例6：皮膚科学用ローションタイプの組成物

10

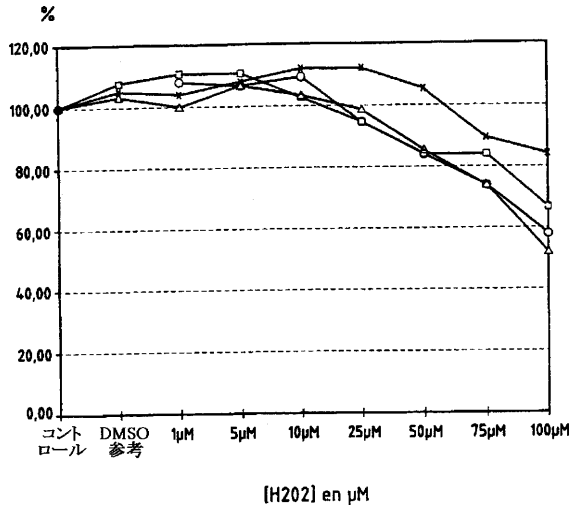
皮膚科学用組成物を以下の有効成分から得た：

- 実施例2で得られたトコフェロール2,5-ジヒドロキシ安息香酸ジエステルの混合物 0.5 g
- 無水エタノール 35 g
- 芳香性精製水 合計で100 g

まずジエステルを無水エタノールに混合した後、ローションが得られるように攪拌しながら精製水を加えることで、上記組成物を調製した。

このローションを皮膚に塗布すると、抗老化作用を呈し、皮膚のきめを細やかにし、肌の色を明るくした。

【図1】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K 31/355	(2006.01)	A 6 1 K 31/355
A 6 1 P 17/00	(2006.01)	A 6 1 P 17/00
A 6 1 P 17/16	(2006.01)	A 6 1 P 17/16
A 6 1 P 17/18	(2006.01)	A 6 1 P 17/18
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P 39/06	(2006.01)	A 6 1 P 39/06

(72)発明者 アレックス・ソノワ
 フランス国 4 5 1 0 0 オルレアン 2 , リュ ダニエル メイヤー

審査官 松波 由美子

(56)参考文献 特開平09 - 095414 (J P , A)
 特開平09 - 110710 (J P , A)
 特開昭53 - 127480 (J P , A)
 特開昭52 - 012167 (J P , A)
 特開昭63 - 130590 (J P , A)
 特開平05 - 271102 (J P , A)
 特開平08 - 127579 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C07D311/72
 A61K 8/49
 A61K 31/355
 A61P 17/00
 A61P 17/16
 A61P 17/18
 A61P 29/00
 A61P 39/06
 A61Q 19/00
 A61Q 19/02
 A61Q 19/08
 CAplus(STN)
 REGISTRY(STN)