

(19)日本国特許庁(JP)

**(12)特許公報(B2)**

(11)特許番号  
**特許第7028803号**  
**(P7028803)**

(45)発行日 令和4年3月2日(2022.3.2)

(24)登録日 令和4年2月21日(2022.2.21)

## (51)国際特許分類

A 6 1 K	8/9789(2017.01)	F I	A 6 1 K	8/9789
A 6 1 Q	19/02 (2006.01)		A 6 1 Q	19/02
A 6 1 K	36/61 (2006.01)		A 6 1 K	36/61
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

請求項の数 3 (全22頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2018-564090(P2018-564090)
(86)(22)出願日	平成29年2月17日(2017.2.17)
(65)公表番号	特表2019-516777(P2019-516777)
	A)
(43)公表日	令和1年6月20日(2019.6.20)
(86)国際出願番号	PCT/JP2017/006016
(87)国際公開番号	WO2017/145958
(87)国際公開日	平成29年8月31日(2017.8.31)
審査請求日	令和1年12月11日(2019.12.11)
(31)優先権主張番号	PCT/JP2016/000980
(32)優先日	平成28年2月24日(2016.2.24)
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)

(73)特許権者	000000918 花王株式会社 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番 10号
(73)特許権者	518445414 ボゴール アグリカルチャル ユニバーシ ティー インドネシア 16680 ウエスト ジ ヤワ, ボゴール, ダルマガ, ジェイエル . ラヤ ダルマガ キャンパス アイピー ビー,
(74)代理人	110000084 特許業務法人アルガ特許事務所
(72)発明者	橋本 宙 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 美白剤

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

Syzygium polyanthumまたはその抽出物を有効成分とするチロシナーゼ阻害剤。

## 【請求項2】

Syzygium polyanthumまたはその抽出物を有効成分とするメラニン生成阻害剤。

## 【請求項3】

Syzygium polyanthumまたはその抽出物を有効成分とする皮膚美白剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、皮膚美白に有効な素材に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

皮膚の色素沈着やシミ、ソバカス等は、一般に皮膚の紫外線暴露による刺激やホルモンの異常または遺伝的要素等によって皮膚内に存在する色素細胞（メラノサイト）が活性化されメラニン生成が亢進した結果生じるものと考えられている。このメラニン生成亢進のメカニズムは複雑であるが、メラニンは酵素チロシナーゼの作用により生合成されること、チロシナーゼのドーパオキシダーゼ活性はメラニン生成のメカニズムに深く関与していることが知られている（非特許文献1）。

## 【0003】

メラニン生成のメカニズムを標的とした美白剤が開発されている。例えば、酵素チロシナーゼの活性を抑制してメラニン産生を抑制する作用を有する皮膚美白剤として、アスコルビン酸、アルブチン、コウジ酸等（非特許文献2）、ならびに多様な植物エキスが報告されている。また、ドーパオキシダーゼ活性を抑制し、美白作用を有する植物エキスに関する多数の報告がある。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【文献】Biochimica et Biophysica Acta, 1247, 1-11 (1995)

Advanced Cosmetic Dermatology, IV. Clinical pharmacology of skin whitening agent ("Bihaku senryaku, IV. Bihakuzaino yakuri to rinsho" in Japanese,) NAN KODO Co., Ltd., p. 95-116 10

【発明の概要】

【0005】

本発明は、*Syzygium polyanthum*またはその抽出物を有効成分とするチロシナーゼ阻害剤を提供する。

本発明は、*Syzygium polyanthum*またはその抽出物を有効成分とするメラニン生成阻害剤を提供する。

また本発明は、*Syzygium polyanthum*またはその抽出物を有効成分とする皮膚美白剤を提供する。 20

【0006】

さらに本発明は、下記式(I)～(III)のいずれかで表される化合物を提供する。

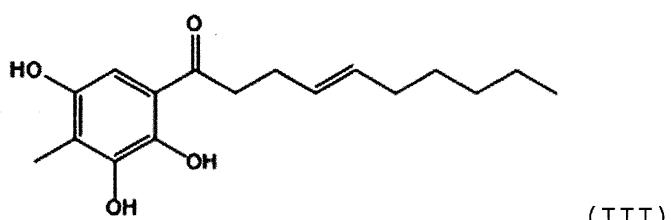
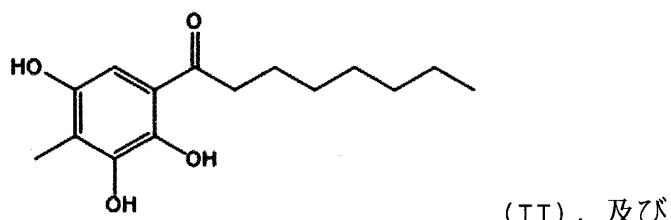
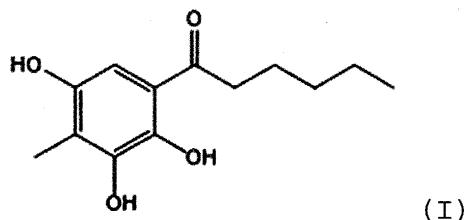
さらに本発明は、下記式(I)～(III)で表される化合物からなる群より選択される少なくとも1種を有効成分とするチロシナーゼ阻害剤を提供する。

さらに本発明は、下記式(I)～(III)で表される化合物からなる群より選択される少なくとも1種を有効成分とするメラニン生成阻害剤を提供する。

さらに本発明は、下記式(I)～(III)で表される化合物からなる群より選択される少なくとも1種を有効成分とする皮膚美白剤を提供する。

【0007】

【化1】



10

20

30

40

50

**【発明の詳細な説明】****【0008】**

本明細書中で引用された全ての特許文献、非特許文献、およびその他の刊行物は、その全体が本明細書中において参考として援用される。

**【0009】**

本発明は、チロシナーゼの阻害活性およびメラニン生成阻害活性を有し、皮膚美白に有効な素材を提供することに関する。

**【0010】**

本発明者らは、多くの研究を行った結果、チロシナーゼ活性を阻害し、皮膚メラノサイトにおけるメラニン生成を抑制する植物を見出した。また本発明者らは、当該植物から、チロシナーゼ活性を阻害し、または皮膚メラノサイトにおけるメラニン生成を抑制する活性を有する新規化合物を見出した。

10

**【0011】**

本発明は、チロシナーゼ阻害活性およびメラニン生成阻害活性を有する植物由来素材を提供する。これらの素材は、皮膚美白に有効である。

**【0012】**

本明細書において、「非治療的」とは、医療行為を含まない概念、すなわち人間を手術、治療または診断する方法を含まない概念、より具体的には医師または医師の指示を受けた者が人間に対して手術、治療または診断を実施する方法を含まない概念である。

**【0013】**

本明細書において、「予防」とは、個体における疾患もしくは状態の発症の防止、抑制または遅延、あるいは個体の疾患もしくは状態の発症の危険性を低下させることをいう。本明細書において、「改善」とは、疾患もしくは状態の好転、疾患もしくは状態の悪化の防止、抑制または遅延、あるいは疾患もしくは状態の進行の逆転、防止、抑制または遅延をいう。

20

**【0014】**

本発明で使用される*Syzygium polyanthum*は、Myrtaceae科に属する植物であり、インドネシアではSalamとも称される。*Syzygium polyanthum*は、従来、下痢、腹痛、糖尿病、二日酔い、乾癬、痒みなどに適用されており、またその葉は色味や香りづけとして米料理に混ぜて食されている。一方、Salamは従来、皮膚美白には用いられていなかった。

30

**【0015】**

本発明において、*Syzygium polyanthum*は、任意の部位、例えば該植物の全木、葉（葉身、葉柄を含む）、樹皮、木質部、枝、果実、果皮、種子、花（花弁、子房を含む）、根、またはそれらの組み合わせを使用することができる。好ましくは、葉が使用される。

**【0016】**

本発明において、*Syzygium polyanthum*は、上述したその植物体の任意の部位をそのまま、または切断、破碎、粉碎もしくは搾取して使用されてもよく、またはそれらの乾燥物が使用されてもよい。好適には乾燥物が用いられる。該乾燥物は、切断、破碎、粉碎もしくは粉末化されていてもよい。

**【0017】**

本発明で使用される*Syzygium polyanthum*の抽出物は、上述した*Syzygium polyanthum*の植物体の任意の部位をそのまま抽出した抽出物であってもよく、または当該植物体の部位を乾燥、切断、破碎、粉碎もしくは搾取したものから抽出した抽出物であってもよい。好適には、*Syzygium polyanthum*の葉の乾燥物からの抽出物、または該乾燥物を切断、破碎、粉碎もしくは粉末化したものからの抽出物である。

40

**【0018】**

当該抽出物を得るための抽出手段としては、例えば、固液抽出、圧搾抽出、液液抽出、浸漬、煎出、浸出、還流抽出、ソックスレー抽出、超音波抽出、マイクロ波抽出、攪拌等の通常の手段を用いることができる。これらの抽出手段は組み合わせてもよい。例えば、浸漬や固液抽出と液液抽出を組み合わせてもよく、または抽出時間を短縮する場合には、攪

50

拌を伴う固液抽出をおこなってもよい。

【0019】

当該抽出物の抽出のための溶媒としては、極性溶媒、非極性溶媒のいずれをも使用することができ、またはこれらを混合して用いることもできる。該抽出溶媒の例としては、水；1価もしくは多価のアルコール類；アセトン、メチルエチルケトンなどのケトン類；酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類；テトラヒドロフラン、ジエチルエーテルなどの鎖状および環状エーテル類；ポリエチレンギリコールなどのポリエーテル類；ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素などのハロゲン化炭化水素類；ヘキサン、シクロヘキサン、石油エーテルなどの炭化水素類；ベンゼン、トルエンなどの芳香族炭化水素類；ピリジン類；超臨界二酸化炭素；油脂、ワックス、その他オイルなどが挙げられる。上記に列挙した溶媒は、単独でまたは2種以上を組み合わせて使用することができる。溶媒の組み合わせの例としては、一価アルコールもしくは多価アルコールと水との混合溶媒が挙げられる。

10

【0020】

あるいは、植物抽出物は、異なる溶媒を用いた繰り返し抽出により調製されてもよい。

【0021】

一価アルコールの例としては、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール、アミルアルコール、ヘキサノール、ヘプタノール、オクタノール等が挙げられる。多価アルコールの例としては、エチレンギリコール、プロピレンギリコール、1,3-ブチレンギリコール、1,4-ブタンジオール、1,5-ペンタンジオール、1,6-ヘキサンジオール等の2価アルコール、およびグリセリン等の3価以上のアルコールが挙げられる。このうち、炭素数1～4の一価または多価アルコールが好ましく、または汎用性の点で1価アルコールおよび2価アルコールが好ましい。より好ましい例としては、メタノール、エタノール、1,3-ブチレンギリコール、n-プロパノール、イソプロパノール、n-ブタノール、イソブタノール、sec-ブタノールおよびt-ブタノールが挙げられ、メタノールおよびエタノールがさらに好ましい。

20

【0022】

一価アルコールもしくは多価アルコールと水との混合溶媒の例としては、上記に列挙した一価アルコールと水との混合溶媒、および上記に列挙した多価アルコールと水との混合溶媒が挙げられ、好ましくは、メタノール、エタノール、1,3-ブチレンギリコール、n-プロパノール、イソプロパノール、n-ブタノール、イソブタノール、sec-ブタノールおよびt-ブタノールから選択されるアルコールと水との混合溶媒が挙げられ、より好ましくは、メタノールもしくはエタノールと水との混合溶媒が挙げられる。

30

【0023】

一価アルコールもしくは多価アルコールと水との混合溶媒におけるアルコールの濃度は、好ましくは10容量%以上、より好ましくは20容量%以上、さらに好ましくは30容量%以上であり、かつ好ましくは90容量%以下、より好ましくは80容量%以下、さらに好ましくは70容量%以下である。あるいは、当該水／アルコール混合溶媒におけるアルコールの濃度の例としては、10～90容量%、10～80容量%、10～70容量%、20～90容量%、20～80容量%、20～70容量%、30～90容量%、30～80容量%、および30～70容量%が挙げられる。

40

【0024】

好ましい実施形態において、植物抽出物の抽出に使用される溶媒は、水、一価アルコール、多価アルコール、および一価アルコールもしくは多価アルコールと水との混合溶媒から選択され、より好ましくは水、メタノール、エタノール、またはメタノールもしくはエタノールと水との混合溶媒であり、さらに好ましくは水、メタノール、またはエタノールと水との混合溶媒である。

【0025】

当該メタノールもしくはエタノールと水との混合溶媒における、メタノールもしくはエタノールの濃度の例としては、10～90容量%、10～80容量%、10～70容量%、

50

20～90容量%、20～80容量%、20～70容量%、30～90容量%、30～80容量%、および30～70容量%が挙げられ、より好ましくは40～60容量%、さらに好ましくは50容量%が挙げられる。

#### 【0026】

抽出における溶媒の使用量としては、植物（乾燥質量換算）1gに対して1～100mLが好ましい。抽出条件は、十分な抽出が行える条件であれば特に限定されない。通常、溶媒がより低温であればより長時間、溶媒がより高温であればより短時間の抽出を行う。例えば、抽出時間は1時間以上が好ましく、4時間以上がより好ましく、他方、2ヶ月以下が好ましく、4週間以下がより好ましい。また例えば、抽出温度は、好ましくは0以上、より好ましくは5以上であり、かつ好ましくは溶媒沸点以下であり、10～80程度がさらに好ましいが、室温程度であってもよい。好ましい抽出条件の例としては、15～40で3日～4週間、50～70で1～10時間、などが挙げられるが、これらに限定されず、当業者によって適宜選択され得る。

10

#### 【0027】

上述の手順で得られた抽出物に対して、必要に応じて、植物抽出物の製造に一般的に用いられる精製処理、例えば、有機溶剤沈殿、遠心分離、限界濾過膜、高速液体クロマトグラフ、カラムクロマトグラフ、液液分配、ゲルろ過分離、活性炭等を用いた処理を行うこともできる。

#### 【0028】

上述の手順で得られた抽出物は、抽出液やその画分を単独または混合してそのまま用いてもよく、または適宜な溶媒で希釈した希釈液として用いてもよく、または濃縮エキス、乾燥粉末もしくはペースト状に調製して用いてもよい。

20

#### 【0029】

後述の実施例に示すとおり、*Syzygium polyanthum*の抽出物は、チロシナーゼ阻害活性、皮膚メラノサイトにおけるメラニン生成阻害活性を有し、皮膚のメラニン生成を抑制する（実施例1～2参照）。したがって、*Syzygium polyanthum*またはその抽出物は、チロシナーゼ阻害、メラニン生成阻害のための有効成分として使用することができる。あるいは、*Syzygium polyanthum*またはその抽出物は、皮膚におけるメラニン生成の抑制、皮膚美白などのための有効成分として使用することができる。

30

#### 【0030】

本発明によれば、*Syzygium polyanthum*およびその抽出物は、いずれかが単独で使用されても、または組み合わせで使用されてもよい。好ましい実施形態においては、*Syzygium polyanthum*の抽出物が使用される。

#### 【0031】

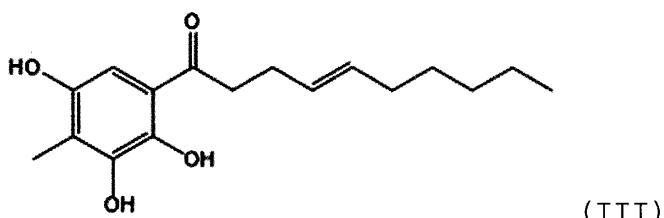
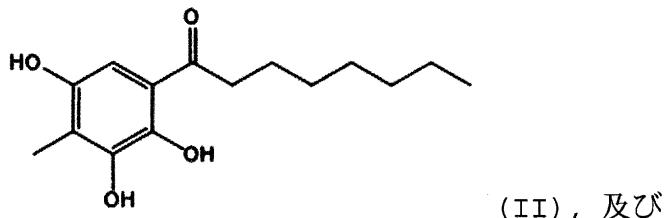
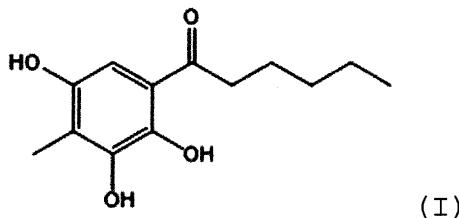
さらに本発明者らは、*Syzygium polyanthum*の活性成分として、下記式(I)～(III)で表される新規化合物を見出した。

#### 【0032】

40

50

## 【化2】



10

20

## 【0033】

式(I)～(III)で表される化合物は、チロシナーゼ阻害、メラニン生成阻害のための有効成分として使用することができる。さらに、これらの化合物は、皮膚におけるメラニン生成の抑制、皮膚美白などのための有効成分として使用することができる。本発明において、式(I)～(III)で表される化合物は、いずれか1種で使用されても、またはいずれか2種、もしくは3種を組み合わせて使用されてもよい。さらに本発明によれば、式(I)～(III)で表される化合物のいずれか1種、2種または3種を、*Syzygium polyanthum*および/またはその抽出物と組み合わせて使用してもよい。

## 【0034】

30

好ましくは、本発明で用いられる*Syzygium polyanthum*の抽出物は、*Syzygium polyanthum*の葉からの抽出物を含有する。

## 【0035】

したがって、一態様において、本発明は、*Syzygium polyanthum*またはその抽出物を有効成分とする、チロシナーゼ阻害剤を提供する。また本発明は、*Syzygium polyanthum*またはその抽出物を有効成分とする、メラニン生成阻害剤を提供する。さらに本発明は、*Syzygium polyanthum*またはその抽出物を有効成分とする、皮膚美白剤を提供する。

## 【0036】

別の態様において、本発明は、チロシナーゼ阻害剤、メラニン生成阻害剤、または皮膚美白剤の製造のための、*Syzygium polyanthum*またはその抽出物の使用を提供する。

40

## 【0037】

一実施形態において、当該剤は、*Syzygium polyanthum*またはその抽出物から本質的に構成され得る。

## 【0038】

別の態様において、本発明は、下記式(I)～(III)で表される化合物からなる群より選択される少なくとも1種を有効成分とする、チロシナーゼ阻害剤を提供する。また本発明は、下記式(I)～(III)で表される化合物からなる群より選択される少なくとも1種を有効成分とする、メラニン生成阻害剤を提供する。さらに本発明は、下記式(I)～(III)で表される化合物からなる群より選択される少なくとも1種を有効成分とする、皮膚美白剤を提供する。

50

**【 0 0 3 9 】**

別の態様において、本発明は、チロシナーゼ阻害剤、メラニン生成阻害剤、または皮膚美白剤の製造のための、下記式(Ⅰ)～(Ⅲ)で表される化合物からなる群より選択される少なくとも1種の使用を提供する。

**【 0 0 4 0 】**

一実施形態において、当該剤は、下記式(Ⅰ)～(Ⅲ)で表される化合物からなる群より選択される少なくとも1種から本質的に構成され得る。

**【 0 0 4 1 】**

一実施形態において、当該チロシナーゼ阻害剤、メラニン生成阻害剤または皮膚美白剤は、*Syzygium polyanthum*、その抽出物および式(Ⅰ)～(Ⅲ)で表される化合物からなる群より選択される1種以上を有効成分として含有し得る。10

**【 0 0 4 2 】**

また別の態様において、本発明は、チロシナーゼ阻害、メラニン生成阻害、または皮膚美白のための、*Syzygium polyanthum*またはその抽出物の使用を提供する。

さらに別の態様において、本発明は、チロシナーゼ阻害、メラニン生成阻害、または皮膚美白に使用するための、*Syzygium polyanthum*またはその抽出物を提供する。

また別の態様において、本発明は、チロシナーゼ阻害、メラニン生成阻害、または皮膚美白のための、下記式(Ⅰ)～(Ⅲ)で表される化合物からなる群より選択される少なくとも1種の使用を提供する。

さらに別の態様において、本発明は、チロシナーゼ阻害、メラニン生成阻害、または皮膚美白に使用するための、下記式(Ⅰ)～(Ⅲ)で表される化合物からなる群より選択される少なくとも1種を提供する。20

**【 0 0 4 3 】**

一実施形態において、当該チロシナーゼ阻害、メラニン生成阻害または皮膚美白には、*Syzygium polyanthum*、その抽出物および式(Ⅰ)～(Ⅲ)で表される化合物からなる群より選択される1種以上が使用され得る。

**【 0 0 4 4 】**

本発明による当該使用は、治療的使用であっても非治療的使用であってもよい。治療的使用の例としては、メラニンの過剰生成に起因する疾患（例えば肝斑、後天性真皮メラノサイトーシスなど）を罹患した者に対する使用が挙げられる。非治療使用の例としては、美容目的での皮膚メラニン生成阻害または皮膚美白のための使用が挙げられる。また例えば、非治療的使用は、他者に、医療行為としてではなく*Syzygium polyanthum*、その抽出物および式(Ⅰ)～(Ⅲ)で表される化合物からなる群より選択される1種以上を投与または摂取させるために、皮膚メラニン生成阻害または皮膚美白効果を謳ってそれらを提供することを含む。30

**【 0 0 4 5 】**

本発明において、*Syzygium polyanthum*、その抽出物、および式(Ⅰ)～(Ⅲ)で表される化合物は、ヒトおよび非ヒト動物のいずれに対しても使用することができる。非ヒト動物としては、非ヒト哺乳動物、鳥類などが挙げられ、非ヒト哺乳動物としては、例えば、類人猿、その他靈長類、マウス、ラット、ハムスター、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、およびコンパニオン動物などが挙げられる。40

**【 0 0 4 6 】**

本発明において、*Syzygium polyanthum*、その抽出物、および式(Ⅰ)～(Ⅲ)で表される化合物は、医薬品、医薬部外品、化粧料または食品等に対して、チロシナーゼ阻害、メラニン生成阻害、または皮膚美白の機能を付与するための有効成分として使用することができる。

**【 0 0 4 7 】**

当該医薬品（医薬部外品も含む）は、チロシナーゼ阻害またはメラニン生成阻害のための医薬品であり、*Syzygium polyanthum*、その抽出物および式(Ⅰ)～(Ⅲ)で表される化合物からなる群より選択される1種以上を、当該機能のための有効成分として含有する50

。さらに、該医薬品は、該有効成分の機能が失われない限りにおいて、必要に応じて薬学的に許容される担体、または他の有効成分、薬理成分等を含有していてもよい。

#### 【0048】

当該医薬品（医薬部外品も含む）の投与形態は、経口投与および非経口投与の何れであってもよい。該医薬品の剤形は、経口または非経口的に投与可能な剤形であれば特に限定されず、例えば注射剤、坐剤、吸入剤、経皮吸収剤、各種外用剤、局所製剤、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、液剤、シロップ剤等の何れでもよい。これらの種々の剤形の製剤は、*Syzygium polyanthum*、その抽出物および式(I)～(III)で表される化合物からなる群より選択される1種以上を、薬学的に許容される担体（例えば賦形剤、結合剤、增量剤、崩壊剤、界面活性剤、滑沢剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、嬌味剤、香料、被膜剤、希釈剤等）、他の薬効成分等と適宜組み合わせて、定法に従って調製することができる。10

#### 【0049】

当該医薬品（医薬部外品も含む）における*Syzygium polyanthum*またはその抽出物の含有量（乾燥物換算）は、特に限定されないが、好ましくは全質量中0.01質量%以上、より好ましくは0.1質量%以上、さらに好ましくは1.0質量%以上、さらにより好ましくは10質量%以上、なお好ましくは15質量%以上であり、かつ好ましくは95質量%以下、より好ましくは80質量%以下、さらに好ましくは60質量%以下である。さらに、当該含有量の例として、0.01～95質量%、0.01～80質量%、0.01～60質量%、0.1～95質量%、0.1～80質量%、0.1～60質量%、1.0～80質量%、1.0～60質量%、10～95質量%、10～80質量%、10～60質量%、15～95質量%、15～80質量%、および15～60質量%が挙げられる。20

#### 【0050】

当該医薬品（医薬部外品も含む）における式(I)～(III)で表される化合物の合計含有量は、特に限定されないが、好ましくは全質量中0.01質量%以上、より好ましくは0.1質量%以上、さらに好ましくは1.0質量%以上、さらにより好ましくは10質量%以上、なお好ましくは15質量%以上であり、かつ好ましくは95質量%以下、より好ましくは80質量%以下、さらに好ましくは60質量%以下である。さらに、当該含有量の例として、0.01～95質量%、0.01～80質量%、0.01～60質量%、0.1～95質量%、0.1～80質量%、0.1～60質量%、1.0～95質量%、1.0～80質量%、1.0～60質量%、10～95質量%、10～80質量%、10～60質量%、15～95質量%、15～80質量%、および15～60質量%が挙げられる。30

#### 【0051】

当該化粧料は、チロシナーゼ阻害、メラニン生成阻害、または皮膚美白のための化粧料であり、*Syzygium polyanthum*、その抽出物および式(I)～(III)で表される化合物からなる群より選択される1種以上を、当該機能のための有効成分として含有する。さらに、該化粧料は、該有効成分の機能が失われない限りにおいて、必要に応じて化粧料に許容される担体、または他の有効成分もしくは化粧成分、例えば、保湿剤、他の美白剤、紫外線保護剤、細胞賦活剤、洗浄剤、角質溶解剤、メーキアップ成分（例えば、化粧下地、ファンデーション、おしろい、パウダー、チーク、口紅、アイマーク、アイブロウ、マスカラ、その他）などを含有していてもよい。該化粧料の形態としては、皮膚外用投与、局所投与、または経口投与のための形態が挙げられる。40

#### 【0052】

当該化粧料は、*Syzygium polyanthum*、その抽出物および式(I)～(III)で表される化合物からなる群より選択される1種以上を、必要に応じて当該化粧料に許容される担体、他の有効成分、化粧成分などと組みあわせて、常法により製造することができる。

#### 【0053】

当該化粧料における*Syzygium polyanthum*またはその抽出物の含有量（乾燥物換算）は、特に限定されないが、好ましくは全質量中0.0001質量%以上、より好ましくは0.001質量%以上、さらに好ましくは0.01質量%以上、さらにより好ましくは0.

10

20

30

40

50

1質量%以上、なお好ましくは1.0質量%以上であり、かつ好ましくは6.0質量%以下、より好ましくは4.0質量%以下、さらに好ましくは2.0質量%以下、なお好ましくは1.0質量%以下である。さらに、当該含有量の例として、0.0001~6.0質量%、0.0001~4.0質量%、0.0001~2.0質量%、0.0001~1.0質量%、0.001~6.0質量%、0.001~4.0質量%、0.001~2.0質量%、0.001~1.0質量%、0.01~6.0質量%、0.01~4.0質量%、0.01~2.0質量%、0.01~1.0質量%、0.1~6.0質量%、0.1~4.0質量%、0.1~2.0質量%、0.1~1.0質量%、1.0~6.0質量%、1.0~4.0質量%、1.0~2.0質量%、および1.0~1.0質量%が挙げられる。

#### 【0054】

当該化粧料における式(I)~(III)で表される化合物の合計含有量は、特に限定されないが、好ましくは全質量中0.0001質量%以上、より好ましくは0.001質量%以上、さらに好ましくは0.01質量%以上、さらにより好ましくは0.1質量%以上、なお好ましくは1.0質量%以上であり、かつ好ましくは6.0質量%以下、より好ましくは4.0質量%以下、さらに好ましくは2.0質量%以下、なお好ましくは1.0質量%以下である。さらに、当該含有量の例として、0.0001~6.0質量%、0.0001~4.0質量%、0.0001~2.0質量%、0.0001~1.0質量%、0.001~6.0質量%、0.001~4.0質量%、0.001~2.0質量%、0.001~1.0質量%、0.01~6.0質量%、0.01~4.0質量%、0.01~2.0質量%、0.01~1.0質量%、0.1~6.0質量%、0.1~4.0質量%、0.1~2.0質量%、0.1~1.0質量%、1.0~6.0質量%、1.0~4.0質量%、1.0~2.0質量%、および1.0~1.0質量%が挙げられる。

10

#### 【0055】

当該食品は、チロシナーゼ阻害、メラニン生成阻害、または皮膚美白の機能を提供するための食品であり、*Syzygium polyanthum*、その抽出物および式(I)~(III)で表される化合物からなる群より選択される1種以上を、当該機能のための有効成分として含有する。該食品には、チロシナーゼ阻害、メラニン生成阻害、または皮膚美白をコンセプトとし、必要に応じてその旨を表示した病者用食品、および栄養機能食品、特定保健用食品、機能性表示食品等の保健機能食品が含まれる。

20

#### 【0056】

当該食品の形態は、固体、半固体または液状(例えば飲料)であり得る。食品の例としては、パン類、麺類、飯類、クッキー等の菓子類、ゼリー類、乳製品、スープ類、冷凍食品、インスタント食品、でんぶん加工製品、加工魚肉製品、その他加工食品、調味料、栄養補助食品、およびお茶やコーヒー飲料、果実飲料、炭酸飲料、ゼリー状飲料等の飲料、ならびにそれらの原料が挙げられる。あるいは、該食品は、錠剤、カプセル、顆粒、粉末、液剤、シロップなどの経口投与製剤の形態を有するサプリメントであってもよい。

30

#### 【0057】

当該食品は、*Syzygium polyanthum*、その抽出物および式(I)~(III)で表される化合物からなる群より選択される1種以上を、任意の食品材料または食品に許容される添加物(例えば溶剤、軟化剤、油、乳化剤、防腐剤、香料、甘味料、安定剤、着色剤、紫外線吸収剤、酸化防止剤、保湿剤、増粘剤、固着剤、分散剤、潤滑剤等)と適宜組み合わせて、定法に従って調製することができる。

40

#### 【0058】

当該食品中における、*Syzygium polyanthum*またはその抽出物の含有量(乾燥物換算)は、特に限定されないが、好ましくは全質量の0.0001質量%以上、より好ましくは0.001質量%以上、さらに好ましくは0.01質量%以上であり、かつ好ましくは5.0質量%以下、より好ましくは2.0質量%以下、さらに好ましくは1.0質量%以下である。さらに、当該含有量の例として、0.0001~5.0質量%、0.0001~2.0質量%、0.0001~1.0質量%、0.001~5.0質量%、0.001~2.0質量%、0.001~1.0質量%、0.01~5.0質量%、0.01~2.0質量%、および0.01

50

~10質量%が挙げられる。

#### 【0059】

当該食品中における式(I)～(III)で表される化合物の合計含有量は、特に限定されないが、好ましくは全質量の0.0001質量%以上、より好ましくは0.001質量%以上、さらに好ましくは0.01質量%以上であり、かつ好ましくは50質量%以下、より好ましくは20質量%以下、さらに好ましくは10質量%以下である。さらに、当該含有量の例として、0.0001～50質量%、0.0001～20質量%、0.0001～10質量%、0.001～50質量%、0.001～20質量%、0.001～10質量%、0.01～50質量%、0.01～20質量%、および0.01～10質量%が挙げられる。

10

#### 【0060】

なお別の態様において、本発明は、対象におけるチロシナーゼ阻害方法を提供する。また本発明は、対象におけるメラニン生成阻害方法を提供する。また本発明は、対象における皮膚美白方法を提供する。当該方法は、対象に、*Syzygium polyanthum*、その抽出物および式(I)～(III)で表される化合物からなる群より選択される1種以上を有効量で投与することを含む。当該方法は、治療的方法であっても非治療的方法であってもよい。

#### 【0061】

当該方法における対象としては、チロシナーゼ阻害、メラニン生成阻害、または皮膚美白が所望されるか、またはそれを必要とする動物が挙げられる。動物としては、上述したヒトおよび非ヒト動物が挙げられ、より好ましくはヒトである。あるいは、当該方法における対象としては、上述したヒトおよび非ヒト動物における、美白が所望されるか、またはそれを必要とする皮膚の部位（例えば、色素沈着、シミ、老人性色素班等を有する皮膚の部位、および皮膚の露光部）が挙げられる。

20

#### 【0062】

本発明はさらに、インビトロでのチロシナーゼ阻害またはメラニン生成阻害方法を提供する。当該インビトロ方法は、上述したヒトまたは非ヒト動物由来の組織もしくは細胞、例えば皮膚組織、3D培養皮膚、培養メラノサイト等の皮膚細胞、またはそれらの抽出液、あるいはチロシナーゼとその基質であるチロシンまたはL-ドーパを含有する反応液などを対象として行うことができる。

#### 【0063】

30

当該本発明の方法における投与の有効量は、対象におけるチロシナーゼ活性またはメラニン生成を抑制できる量であり得る。好ましくは、有効量とは、投与群におけるチロシナーゼ活性を、未投与群と比べて統計学的に有意に低下させることができる量である。また好ましくは、有効量とは、投与群における皮膚細胞（例えば、皮膚組織由来細胞、3D培養皮膚、培養メラノサイト）のメラニン量を、未投与群と比べて統計学的に有意に低下させることができる量である。また好ましくは、有効量とは、投与群におけるチロシナーゼ活性を、未投与群の50%以下、好ましくは70%以下に低下させることができる量である。また好ましくは、有効量とは、投与群におけるメラニン量を、未投与群の50%以下、好ましくは70%以下に低下させることができる量である。チロシナーゼ活性は、チロシナーゼと基質との反応生成物による反応液の色の変化を吸光度に基づき測定することで、決定することができる。メラニン量は、皮膚細胞から抽出したメラニンを含む溶液の色の濃さを吸光度に基づいて測定することで、決定することができる。しかしながら、上記の測定法は例示であり、チロシナーゼ活性や細胞のメラニン量の測定の手順は当業者に周知である。

40

#### 【0064】

本発明において、*Syzygium polyanthum*、その抽出物、および式(I)～(III)で表される化合物の投与量および投与計画は、対象の種、体重、性別、年齢、状態、または他の要因に従って、当業者により適宜決定されればよい。限定ではないが、*Syzygium polyanthum*またはその抽出物（乾燥物換算）の投与量は、例えば成人1人1日当たり、好ましくは0.0001mg以上、より好ましくは0.001mg以上、さらに好ましくは

50

0.01mg以上であり、さらにより好ましくは0.1mg以上であり、なお好ましくは1mg以上であり、なお好ましくは0.1g以上であり、なお好ましくは1g以上であり、かつ好ましくは10g以下、より好ましくは5g以下、さらに好ましくは1g以下である。あるいは、本発明による*Syzygium polyanthum*またはその抽出物(乾燥物換算)の投与量(成人1人1日当たり)は、例えば0.0001mg~10g、0.0001mg~5g、0.0001mg~1g、0.001mg~10g、0.001mg~5g、0.001mg~1g、0.01mg~10g、0.01mg~5g、0.01mg~1g、0.1mg~10g、0.1mg~5g、0.1mg~1g、1mg~10g、1mg~5g、1mg~1g、0.1g~10g、0.1g~5g、0.1g~1g、1g~10g、または1g~5gの範囲で選択され得る。上記の量を、例えば、1日に1回、2回または3回以上に分け、数週間~数ヶ月間継続して投与することが好ましい。

#### 【0065】

あるいは、本発明による式(I)~(III)で表される化合物の合計投与量は、限定ではないが、例えば成人1人1日当たり、好ましくは0.0001mg以上、より好ましくは0.001mg以上、さらに好ましくは0.01mg以上であり、さらにより好ましくは0.1mg以上であり、なお好ましくは1mg以上であり、なお好ましくは0.1g以上であり、なお好ましくは1g以上であり、かつ好ましくは10g以下、より好ましくは5g以下、さらに好ましくは1g以下である。あるいは、式(I)~(III)で表される化合物の合計投与量(成人1人1日当たり)は、例えば0.0001mg~10g、0.0001mg~5g、0.0001mg~1g、0.001mg~10g、0.001mg~5g、0.001mg~1g、0.01mg~10g、0.01mg~5g、0.01mg~1g、0.1mg~10g、0.1mg~5g、0.1mg~1g、1mg~10g、1mg~5g、1mg~1g、0.1g~10g、0.1g~5g、0.1g~1g、1g~10g、または1g~5gの範囲で選択され得る。上記の量を、例えば、1日に1回、2回または3回以上に分け、数週間~数ヶ月間継続して投与することが好ましい。

#### 【0066】

本発明はまた、例示的実施形態として以下の物質、製造方法、用途または方法を包含する。但し、本発明はこれらの実施形態に限定されない

#### 【0067】

- [1] *Syzygium polyanthum*またはその抽出物を有効成分とするチロシナーゼ阻害剤。
- [2] *Syzygium polyanthum*またはその抽出物を有効成分とするメラニン生成阻害剤。
- [3] *Syzygium polyanthum*またはその抽出物を有効成分とする皮膚美白剤。
- [4] チロシナーゼ阻害剤の製造のための、*Syzygium polyanthum*またはその抽出物の使用。
- [5] メラニン生成阻害剤の製造のための、*Syzygium polyanthum*またはその抽出物の使用。
- [6] 皮膚美白剤の製造のための、*Syzygium polyanthum*またはその抽出物の使用。
- [7] チロシナーゼ阻害に使用するための、*Syzygium polyanthum*またはその抽出物。
- [8] メラニン生成阻害に使用するための、*Syzygium polyanthum*またはその抽出物。
- [9] 皮膚美白に使用するための、*Syzygium polyanthum*またはその抽出物。
- [10] チロシナーゼ阻害のための、*Syzygium polyanthum*またはその抽出物の使用。
- [11] メラニン生成阻害のための、*Syzygium polyanthum*またはその抽出物の使用。
- [12] 皮膚美白のための、*Syzygium polyanthum*またはその抽出物の使用。
- [13] 対象に、*Syzygium polyanthum*またはその抽出物を有効量で投与することを含む、対象におけるチロシナーゼ阻害方法。
- [14] 対象に、*Syzygium polyanthum*またはその抽出物を有効量で投与することを含む、対象におけるメラニン生成阻害方法。
- [15] 対象に、*Syzygium polyanthum*またはその抽出物を有効量で投与することを含む、対象における皮膚美白方法。

- [16] 前記[10]~[12]において、好ましくは、前記使用は非治療的使用である。

10

20

30

40

50

[17] 前記〔1〕～〔16〕において、前記抽出物は、  
好ましくは水、メタノール、エタノール、またはメタノールもしくはエタノールと水との  
混合溶媒による抽出物であり、  
より好ましくは、水、メタノール、またはエタノールと水との混合溶媒による抽出物であ  
る。

[18] 前記〔17〕において、前記メタノールもしくはエタノールと水との混合溶媒は  
、好ましくは30～70容量%エタノール水溶液または30～70容量%メタノール水溶  
液である。

[19] 前記〔1〕～〔18〕において、前記*Syzygium polyanthum*は、好ましくは*Sy  
zygium polyanthum*の葉である。 10

#### 【0068】

[20] 下記式(Ⅰ)～(Ⅲ)のいずれかで表される化合物（ただし、*Syzygium polyan  
thum*またはその抽出物に含有された形態ではない）。

[21] 下記式(Ⅰ)～(Ⅲ)のいずれかで表される化合物と、薬学的に許容される担体  
、化粧料に許容される担体、化粧成分および食品に許容される添加物からなる群より選択  
されるいずれか1種以上とを含有する（ただし、該式(Ⅰ)～(Ⅲ)のいずれかで表され  
る化合物は*Syzygium polyanthum*またはその抽出物に含有された形態ではない）組成物  
。

[22] 下記式(Ⅰ)～(Ⅲ)で表される化合物からなる群より選択される少なくとも1  
種を有効成分とするチロシナーゼ阻害剤。 20

[23] 下記式(Ⅰ)～(Ⅲ)で表される化合物からなる群より選択される少なくとも1  
種を有効成分とするメラニン生成阻害剤。

[24] 下記式(Ⅰ)～(Ⅲ)で表される化合物からなる群より選択される少なくとも1  
種を有効成分とする皮膚美白剤。

[25] チロシナーゼ阻害剤の製造のための、下記式(Ⅰ)～(Ⅲ)で表される化合物から  
なる群より選択される少なくとも1種の使用。

[26] メラニン生成阻害剤の製造のための、下記式(Ⅰ)～(Ⅲ)で表される化合物から  
なる群より選択される少なくとも1種の使用。

[27] 皮膚美白剤の製造のための、下記式(Ⅰ)～(Ⅲ)で表される化合物からなる群  
より選択される少なくとも1種の使用。 30

[28] チロシナーゼ阻害に使用するための、下記式(Ⅰ)～(Ⅲ)で表される化合物から  
なる群より選択される少なくとも1種。

[29] メラニン生成阻害に使用するための、下記式(Ⅰ)～(Ⅲ)で表される化合物から  
なる群より選択される少なくとも1種。

[30] 皮膚美白に使用するための、下記式(Ⅰ)～(Ⅲ)で表される化合物からなる群  
より選択される少なくとも1種。

[31] チロシナーゼ阻害のための、下記式(Ⅰ)～(Ⅲ)で表される化合物からなる群  
より選択される少なくとも1種の使用。

[32] メラニン生成阻害のための、下記式(Ⅰ)～(Ⅲ)で表される化合物からなる群  
より選択される少なくとも1種の使用。 40

[33] 皮膚美白のための、下記式(Ⅰ)～(Ⅲ)で表される化合物からなる群より選択  
される少なくとも1種の使用。

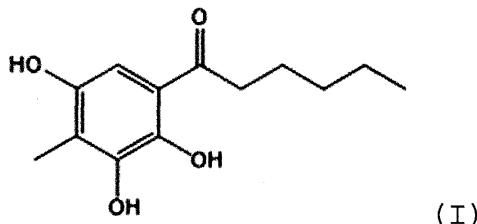
[34] 対象に、下記式(Ⅰ)～(Ⅲ)で表される化合物からなる群より選択される少  
なくとも1種を有効量で投与することを含む、対象におけるチロシナーゼ阻害方法。

[35] 対象に、下記式(Ⅰ)～(Ⅲ)で表される化合物からなる群より選択される少  
なくとも1種を有効量で投与することを含む、対象におけるメラニン生成阻害方法。

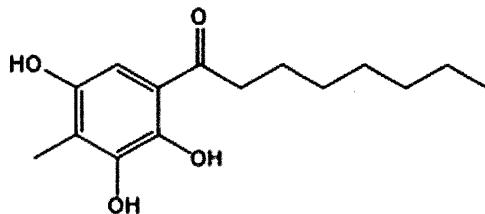
[36] 対象に、下記式(Ⅰ)～(Ⅲ)で表される化合物からなる群より選択される少  
なくとも1種を有効量で投与することを含む、対象における皮膚美白方法。

#### 【0069】

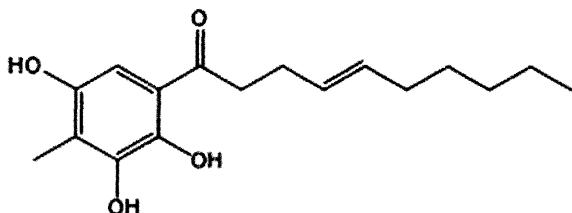
## 【化3】



(I)



(II), 及び



(III)

10

20

30

## 【0070】

[37] 前記〔1〕～〔19〕において、好ましくは、前記Syzygium polyanthumの抽出物は、Syzygium polyanthumの葉からの抽出物を含有する。

[38] Syzygium polyanthumまたはその抽出物を有効成分として最低0.01質量%かつ最高95質量%の濃度で含有する皮膚美白用製品。

[39] チロシナーゼ阻害活性を有する、〔38〕記載の皮膚美白用製品。

[40] メラニン生成阻害活性を有する、〔38〕記載の皮膚美白用製品。

[41] 水および／またはアルコール溶媒を用いて抽出されたSyzygium polyanthumの抽出物からなる、〔38〕記載の皮膚美白用製品。

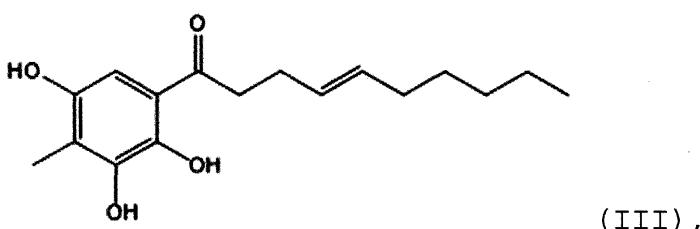
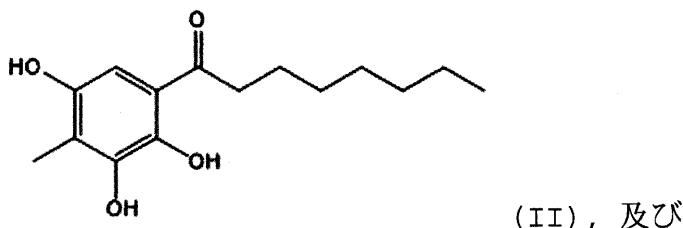
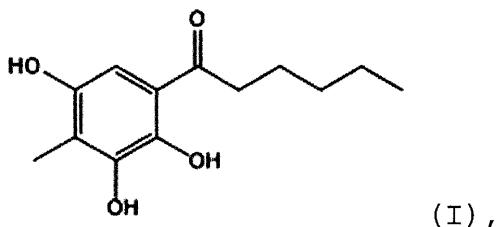
[42] 前記水および／またはアルコール溶媒の抽出物が葉に由来する、〔41〕記載の皮膚美白用製品。

[43] 下記式(Ⅰ)～(Ⅲ)で表される化合物からなる群より選択される少なくとも1種を有効成分として、成人1人1日当たり最低0.0001mgかつ最高10gの濃度で含有する皮膚美白用製品。

40

50

## 【化4】



10

20

30

40

〔44〕チロシナーゼ阻害活性を有する、〔43〕記載の皮膚美白用製品。

〔45〕メラニン生成阻害活性を有する、〔43〕記載の皮膚美白用製品。

〔46〕水および／またはアルコール溶媒を用いて抽出されたSyzygium polyanthumの抽出物からなる、〔43〕記載の皮膚美白用製品。

〔47〕前記水および／またはアルコール溶媒の抽出物が葉に由来する、〔46〕記載の皮膚美白用製品。

## 【実施例】

## 【0071】

(製造例1) Syzygium polyanthum水抽出物の調製

Syzygium polyanthumの葉(UD. Sari Alam社、Tawangmangu, Karanganyar, Central Java, Indonesia)50gに水500mLを加え、60°で4時間抽出し、濾過して粗抽出液を得た後、濃縮乾固して抽出固体分10gを得た。この抽出固体分を固体分濃度が62.5-10000ppm(w/v)になるようDMSOに溶解し、異なる濃度のSyzygium polyanthumの水抽出物溶液を調製した。

## 【0072】

(製造例2) Syzygium polyanthum 50%エタノール抽出物の調製

Syzygium polyanthumの葉(UD. Sari Alam社、Tawangmangu, Karanganyar, Central Java, Indonesia)50gに50%(v/v)エタノール500mLを加え、室温で7日間抽出し、濾過して粗抽出液を得た後、濃縮乾固して抽出固体分10gを得た。この抽出固体分を固体分濃度が62.5-10000ppm(w/v)になるようDMSOに溶解し、異なる濃度のSyzygium polyanthumの50%エタノール抽出物溶液を調製した。

## 【0073】

(製造例3) Syzygium polyanthumメタノール抽出物の調製

Syzygium polyanthumの葉(UD. Sari Alam社、Tawangmangu, Karanganyar, Central Java, Indonesia)500gにメタノール2.5Lを加え、室温で1日間抽出し、濾過して粗抽出液を得た後、濃縮乾固する過程を3日間行い、抽出固体分70gを得た。

## 【0074】

実施例1 チロシナーゼ活性アッセイ

50

*Syzygium polyanthum*抽出物のチロシナーゼ阻害活性を調べるためにチロシナーゼ活性アッセイを行った。

【0075】

(1) *Syzygium polyanthum*水および50%エタノール抽出物のチロシナーゼ阻害活性  
製造例1-2で調製した抽出物溶液70μLを96ウェルプレートに入れ、チロシナーゼ  
溶液30μL(333 unit/mL マッシュルームチロシナーゼ(SIGMA)の5  
0 mM リン酸バッファー溶液、pH 6.5)と基質溶液(2 mM L-DOPA)  
110μLを加えた。ポジティブコントロールとして抽出物の代わりにコウジ酸を使用した。反応液を37℃で30分間インキュベートした後、マイクロ  
プレートリーダーを用いて492 nm吸光度を測定し、さらにIC50値(50%阻害を示す最終濃度(乾燥物換算))を算出した。  
10

【0076】

(2) メタノール抽出物のチロシナーゼ阻害活性

製造例3で調製した*Syzygium polyanthum*のメタノール抽出物1 mgを50 μLのDM  
SOと550 μLのbuffer(50 mM リン酸水素二ナトリウム溶液、pH 6.5)  
に溶解させた。この抽出物溶液を、抽出物の最終濃度が500、250、125、62.5、  
31.25、15.625、7.8125、および0 μg/mLとなるように96ウェルプレート  
に入れ、bufferを用いて60 μLまで希釈した。当該96ウェルプレートの各ウェルにチロシナーゼ溶液30 μL(1 mg / 16 mL マッシュルームチロシナーゼ(SIGMA)  
のbuffer溶液、pH 6.5)と基質溶液(2 mM L-DOPA)110 μLを加えた。ポジティブコントロールとして抽出物の代わりにコウジ酸を用いた。反応液を37℃で30分間反応させた後、マイクロ  
プレートリーダーを用いて510 nm吸光度を測定し、さらにIC50値を算出した。  
20

【0077】

チロシナーゼ活性アッセイの結果を表1、2に示す。*Syzygium polyanthum*の水抽出物、50%エタノール抽出物、およびメタノール抽出物は、いずれもチロシナーゼ活性を阻害した。

【0078】

【表1】

サンプル	抽出溶媒	IC50/ ppm	
		Tyrosine	DOPA
<i>Syzygium polyanthum</i> (葉) 抽出物	水	156	305
<i>Syzygium polyanthum</i> (葉) 抽出物	50% (v/v) EtOH	73	95
コウジ酸	-	9	20

30

【0079】

【表2】

サンプル	抽出溶媒	IC50/ ppm	
		Tyrosine	DOPA
<i>Syzygium polyanthum</i> (葉) 抽出物	MeOH	37	105
コウジ酸	-	6	27

40

【0080】

実施例2 皮膚メラノサイトにおけるメラニン生成阻害

(1) 皮膚メラノサイトの培養

50

皮膚メラノサイトとしてB16メラノーマ細胞(DS pharma Biomedica 1)を使用した。B16メラノーマ細胞は、10%FBS添加DME M培地を入れた10cmディッシュを用いて、CO<sub>2</sub>インキュベーター(37℃、5%CO<sub>2</sub>)において培養した。培養後の細胞から5.0×10<sup>4</sup>cells/mLの細胞懸濁液を調製した。当該細胞懸濁液を998μLずつ24ウェルプレートに播種し、一晩CO<sub>2</sub>インキュベーター(37℃、5%CO<sub>2</sub>)において培養した後、製造例3で調製したSyzygium polyanthumのメタノール抽出物のDMSO溶液を2μLずつ添加して(抽出物の最終濃度:25および50μg/mL)さらに72時間培養した。ポジティブコントロールとして抽出物の代わりにアルブチン(730μM)を用いた。コントロールとしてDMSOを用いた。

## 【0081】

10

## (2) メラニン量の算出

(1)で調製した培養物の上澄みを回収し、96ウェルプレートに200μLずつ移した後、510nmで吸光度を測定した。コントロールに対する相対値を求ることで、細胞外相対メラニン量を算出した。

## 【0082】

## (3) 細胞毒性試験(MTT法)

MTT試験薬は、Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide(SIGMA)50mgをPBS(-)10mLに溶解させて調製した。(1)で調製した培養物に当該MTT試験薬を50μLずつ添加し、4時間反応させた。次に、MTT用イソプロパノールを1mLずつ添加し、アルミ箔をまいて室温で2時間反応した。反応後、全量を回収し、遠心分離(1.45×10<sup>3</sup>rpm, 1min)した後、上澄みを96ウェルプレートに150μLずつ移し、590nmで吸光度を測定した。コントロールに対する相対値を求ることで、相対細胞生存率(細胞毒性)を算出した。

20

## 【0083】

メラノサイトにおける細胞外相対メラニン量、および相対細胞生存率の結果を表3に示す。Syzygium polyanthum抽出物は、メラノサイトの細胞外メラニン量を濃度依存的に減少させた。一方、メラノサイトの細胞生存率は、高濃度のSyzygium polyanthum抽出物の存在下でも充分に高かった。

## 【0084】

30

## 【表3】

	<i>Syzygium polyanthum</i> 抽出物(μg/mL)		アルブチン (730 μM)
	25	50	
メラニン生成活性 (%)	69.7	59.2	21.3
細胞生存率 (%)	101	109	99

## 【0085】

## 実施例3 Syzygium polyanthum葉からの活性化合物の分離

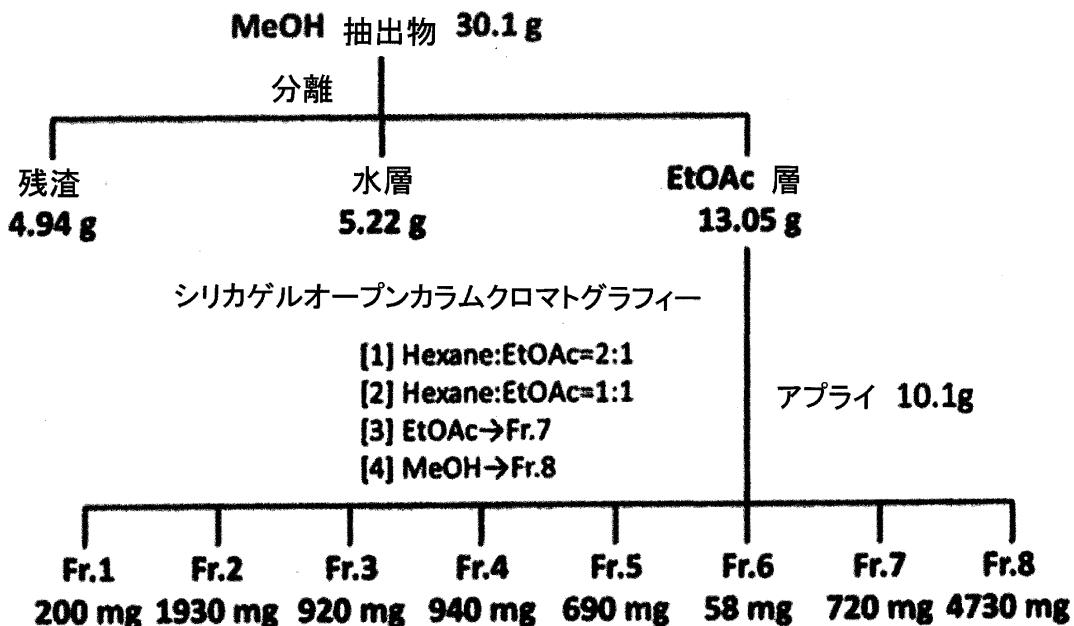
40

Syzygium polyanthum葉を小片に切断した後、黒い布で覆い、日光下で乾燥させ粉末にした。この粉末500gを2.5Lのメタノールで24時間静置抽出した。抽出は3回繰り返した。得られた抽出液を濾過し、エバボレーターで溶媒除去し、自然乾燥した。得られたメタノール抽出物に蒸留水を適量加え、スターラーで攪拌した後、等量の酢酸エチルを加え、分液漏斗を用いて酢酸エチル層と水層を得た。酢酸エチル層をエバボレーターで溶媒除去して乾燥後、ガラスカラム(80mm径×520mm長)にn-ヘキサン:酢酸エチル=2:1(v/v)で湿潤したシリカゲルを充填し、酢酸エチルに溶解してアプライした。溶離液はn-ヘキサン:酢酸エチル=2:1(v/v)、1:1(v/v)、酢酸エチル、メタノールの順に変化させ、8画分(Fr. 1~8)を得た。下記に分画のスキームを示す。

50

【0086】

【化5】



10

S. polyanthum 葉の MeOH 抽出物の分画スキーム

20

【0087】

得られた8画分をサンプルとして、実施例1(3)と同様の手順でチロシナーゼ活性アッセイを行った。各画分はそれぞれDMSO 600 μLに溶解し、終濃度が50、25、12.5 μg/mLとなるように96ウェルプレートに添加した。結果を表4に示す。Fr.4~5から強い活性が検出された。

【0088】

【表4】

IC50 (μg/mL)	Fr. 1	Fr. 2	Fr. 3	Fr. 4	Fr. 5	Fr. 6	Fr. 7	Fr. 8
Tyrosine	229.83	276.76	> 500	7.12	37.26	> 500	356.62	268.23
DOPA	> 500	486.18	> 500	63.28	79.14	> 500	> 500	> 500

30

【0089】

さらに8つの画分をHPLCで分析した結果、Fr.5からの化合物単離が有望であると考えられた。そこでFr.5を分取HPLCにかけた結果、HPLC分析で单一ピークを示す画分が単離された。これらの画分をNMRおよびMALDI-TOF-MS分析により構造解析した結果、以下の化合物1~3であることが明らかになった。

40

(分取HPLC条件)

Instrument: Jasco

Column: Inert Sustain C18.5 μm (4.6 × 250 mm)

Detector wavelength: 360 nm

Flow rate: 5.0 mL/min

Gradient program: MeOH:0.05%TEAaq.=60%:40% 100%:0%

(NMR)

Instrument: JEOL ECA600 NMR

50

S o l v e n t : C D<sub>3</sub>O D , C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O  
 S c a n : <sup>1</sup>H - N M R 8 , <sup>13</sup>C - N M R 1 0 0 0  
 ( M A L D I - T O F - M S )

I n s t r u m e n t : S I M A D Z U B I O T E C H A X I M A R E S O N A N C E  
 I o n mode : negative ion mode

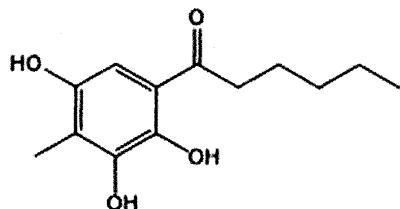
L o w : 1 0 0 +

P o w e r : 1 2 0

【 0 0 9 0 】

【 化 6 】

### 化合物 1



1 - (2, 3, 5-Trihydroxy-4-methylphenyl)hexane-1-one

10

Position	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)
1			103.8
2			160.0
3			163.7
4			102.2
4-Me	1.89 s		6.0
5			162.4
6	5.87 s		93.4
1'			206.2
2'	3.00 t	7.6	43.6
3'	1.63 quint	7.4	24.8
4'	1.33 m		31.6
5'	1.33 m		22.3
6'	0.90 t	7.2	13.0

20

30

$\lambda_{\text{max}}$  252, 292 nm; <sup>1</sup>H-NMR (METHANOL-D4, 600 MHz):  $\delta$  ppm 5.87 (1H, s, H-6), 3.00 (2H, t,  $J$  = 7.6 Hz, H<sub>2</sub>-2'), 1.89 (3H, s, 4-CH<sub>3</sub>), 1.63 (2H, quint,  $J$  = 7.4 Hz, H<sub>2</sub>-3'), 1.33 (4H, m, H<sub>2</sub>-4', H<sub>2</sub>-5'), 0.90 (3H, t,  $J$  = 7.2 Hz, H<sub>2</sub>-6'); <sup>13</sup>C-NMR (METHANOL-D4, 150 MHz):  $\delta$  ppm 206.2 (C-1'), 163.7 (C-3), 162.4 (C-5), 160.0 (C-2), 103.8 (C-1), 102.2 (C-4), 93.4 (C-6), 43.6 (C-2'), 31.6 (C-4'), 24.8 (C-3'), 22.3 (C-5'), 13.0 (C-6'), 6.0 (4-CH<sub>3</sub>)

MALDI-TOF-MS m/z 237.4 [M-H]<sup>-</sup>

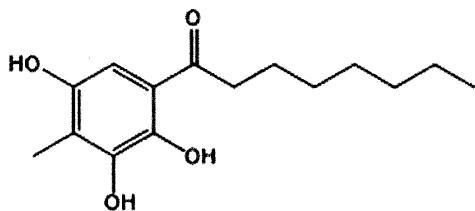
40

【 0 0 9 1 】

50

【化 7】

## 化合物 2



1- (2,3,5-Trihydroxy-4-methylphenyl)octane-1-one

10

Position	$\delta_H$ (ppm)	J(Hz)	$\delta_C$ (ppm)
1			103.8
2			160.0
3			163.6
4			102.2
4-Me	1.89 s		6.0
5			162.4
6	5.87 s		93.5
1'			206.3
2'	3.00 t	7.6	43.6
3'	1.62 quint	7.6	25.1
4'	1.31 m		29.3
5'	1.31 m		29.0
6'	1.31 m		31.6
7'	1.31 m		22.4
8'	0.88 t	7.2	13.1

$\lambda_{\max}$  252, 288 nm;  $^1H$ -NMR (METHANOL-D4, 600 MHz):  $\delta$  ppm 5.87 (1H, s, H-6), 3.00 (2H, t, J = 7.6 Hz, H<sub>2</sub>-2'), 1.89 (3H, s, 4-CH<sub>3</sub>), 1.62 (2H, quint, J = 7.6 Hz, H<sub>2</sub>-3'), 1.31 (8H, m, H<sub>2</sub>-4', H<sub>2</sub>-5', H<sub>2</sub>-6', H<sub>2</sub>-7'), 0.88 (3H, t, J = 7.2 Hz, H<sub>2</sub>-8');  $^{13}C$ -NMR (METHANOL-D4, 150 MHz):  $\delta$  ppm 206.3 (C-1'), 163.6 (C-3), 162.4 (C-5), 160.0 (C-2), 103.8 (C-1), 102.2 (C-4), 93.5 (C-6), 43.6 (C-2'), 31.6 (C-6'), 31.6 (C-4'), 29.0 (C-5'), 25.1 (C-3'), 22.4 (C-7'), 13.1 (C-3'), 6.0 (4-CH<sub>3</sub>)

20

30

MALDI-TOF-MS m/z 265.4 [M-H]<sup>-</sup>

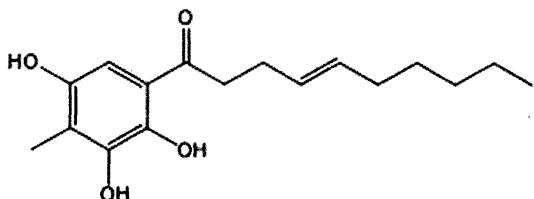
【0092】

40

50

## 【化 8】

化合物 3



(4E)-1-(2,3,5-Trihydroxy-4-methylphenyl)dec-4-en-1-one

10

Position	$\delta_H$ (ppm)	J(Hz)	$\delta_C$ (ppm)
1			103.8
2			160.0
3			163.6
4			102.2
4-Me	1.89 s		6.0
5			162.5
6	5.88 s		93.4
1'			205.3
2'	3.04 t	7.2	43.6
3'	2.37 q	7.3	22.8
4'	5.36 m		128.4
5'	5.36 m		130.2
6'	2.01 q	6.7	26.7
7'	1.27 m		29.2
8'	1.27 m		31.3
9'	1.27 m		22.3
10'	0.87 t	7.2	13.1

20

$\lambda_{\text{max}}$  252, 292nm;  $^1\text{H-NMR}$  (METHANOL-D4, 600 MHz):  $\delta$  ppm 5.88 (1H, s, H-6), 5.36 (2H, m, H-4', H-5'), 3.04 (2H, t, J = 7.2 Hz, H<sub>2</sub>-2'), 2.37 (2H, q, J = 7.3 Hz, H<sub>2</sub>-3'), 2.01 (2H, q, H<sub>2</sub>-6'), 1.89 (3H, s, 4-CH<sub>3</sub>), 1.27 (6H, m, H<sub>2</sub>-7', H<sub>2</sub>-8', H<sub>2</sub>-9'), 0.87 (3H, t, J = 7.2 Hz, H<sub>2</sub>-10');  $^{13}\text{C-NMR}$  (METHANOL-D4, 150 MHz):  $\delta$  ppm 205.3 (C-1'), 163.6 (C-3), 162.5 (C-5), 160.0 (C-2), 130.2 (C-5'), 128.4 (C-4'), 103.8 (C-1), 102.2 (C-4), 93.4 (C-6), 43.6 (C-2'), 31.3 (C-8'), 29.2 (C-7'), 26.7 (C-6'), 22.8 (C-3'), 22.3 (C-9'), 13.1 (C-10'), 6.0 (4-CH<sub>3</sub>)

30

MALDI-TOF-MS m/z 291.5 [M-H]<sup>-</sup>

40

## 【0093】

実施例 4 化合物 1 ~ 3 によるチロシナーゼ阻害およびメラニン生成阻害  
化合物 1 ~ 3 をサンプルとして、実施例 1 (3) と同様の手順でチロシナーゼ活性アッセイを行った。チロシナーゼ活性アッセイでは各化合物の終濃度を 100、50、25、12.5  $\mu\text{M}$  に調整し、IC50 値を算出した。また実施例 2 と同様の手順でメラニン生成阻害活性試験および細胞毒性試験を行い、化合物 1 ~ 3 を添加した皮膚メラノサイトの細胞外相対メラニン量、および相対細胞生存率を測定した。チロシナーゼ活性アッセイの結果を表 5 に、細胞外相対メラニン量および相対細胞生存率の測定結果を表 6 に示す。

## 【0094】

50

【表 5】

IC50 (μM)	化合物 1	化合物 2	化合物 3	コウジ酸
Tyrosine	125.34	480.51	83.98	64.58
DOPA	291.34	616.31	488.65	168.17

【0095】

【表 6】

サンプル	濃度 (μM)	メラニン生成活性 (%)	細胞生存率 (%)
化合物 1	200	13.6	64.9
	100	78.2	73.3
化合物 2	50	13.5	87.4
	25	99.0	95.0
化合物 3	100	11.4	72.9
	75	9.7	92.5
	50	27.2	99.8
	25	106.6	94.3
アルブチン	730	32.7	107.6

10

20

30

40

50

---

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

F I

A 6 1 P 43/00 1 1 1

株式会社研究所内

(72)発明者 堀田 光行

栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2606 花王株式会社研究所内

(72)発明者 岩村 真恵子

栃木県芳賀郡市貝町赤羽 2606 花王株式会社研究所内

(72)発明者 ダルスマン, ラティファ カシム

インドネシア 16680 ウエスト ジャワ, ボゴール, ダルマガ, ジェイエル. ラヤ ダルマガ  
キャンパス アイピービー, ボゴール アグリカルチャル ユニバーシティー内

(72)発明者 パツバラ, イルマニダ

インドネシア 16680 ウエスト ジャワ, ボゴール, ダルマガ, ジェイエル. ラヤ ダルマガ  
キャンパス アイピービー, ボゴール アグリカルチャル ユニバーシティー内

(72)発明者 ジアウハリ, エディ

インドネシア 16680 ウエスト ジャワ, ボゴール, ダルマガ, ジェイエル. ラヤ ダルマガ  
キャンパス アイピービー, ボゴール アグリカルチャル ユニバーシティー内

(72)発明者 ヘリヤント, ルディ

インドネシア 16680 ウエスト ジャワ, ボゴール, ダルマガ, ジェイエル. ラヤ ダルマガ  
キャンパス アイピービー, ボゴール アグリカルチャル ユニバーシティー内

(72)発明者 光永 徹

岐阜県岐阜市柳戸 1 - 1 国立大学法人 岐阜大学内

審査官 田中 雅之

(56)参考文献

特開平05-155750 (JP, A)

特開平05-155735 (JP, A)

特開2009-227612 (JP, A)

特開2003-055189 (JP, A)

特開2002-275026 (JP, A)

特開2001-316239 (JP, A)

韓国公開特許第10-2013-0052379 (KR, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 8 / 0 0 - 8 / 9 9

A 6 1 Q 1 / 0 0 - 9 0 / 0 0

A 6 1 K 3 6 / 0 0 - 3 6 / 9 0 6 8

A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0

C A p l u s / R E G I S T R Y ( S T N )