

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006 年 6 月 29 日 (29.06.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/068212 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 31/352 (2006.01) *A61P 17/10* (2006.01)
A61K 8/49 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61K 8/97 (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
A61K 36/18 (2006.01) *C07D 311/62* (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/023575
- (22) 国際出願日: 2005 年 12 月 22 日 (22.12.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2004-371402
2004 年 12 月 22 日 (22.12.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): キッ
コーマン株式会社 (KIKKOMAN CORPORATION)
[JP/JP]; 〒2788601 千葉県野田市野田 2 5 0 番地 Chiba
(JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 斉藤 実 (SAITO,
Makoto). 葛西 浩一 (KASAI, Kouichi). 金森 智子
(KANAMORI, Tomoko). 有井 雅幸 (ARII, Masayuki).
- (74) 代理人: 津国 肇 (TSUKUNI, Hajime); 〒1050001 東京
都港区虎ノ門 1 丁目 2 2 番 1 2 号 S V A X T S ビ
ル Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO,
RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可
能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: LIPASE INHIBITOR AND PREVENTIVE/REMEDY FOR SKIN DISEASES

(54) 発明の名称: リパーゼ阻害剤及び皮膚疾患の予防・治療剤

(57) Abstract: It is intended to provide a lipase inhibitor containing, as the active ingredient, "proanthocyanidin" or "a cranberry extract containing proanthocyanidin"; a preventive/remedy for skin diseases caused by bacterial lipase; and foods, drinks, drugs or cosmetics containing the same.

(57) 要約: 本発明は、「プロアントシアニジン」又は「プロアントシアニジンを含むクランベリー抽出物」を有効成分とする、リパーゼ阻害剤、細菌性リパーゼに起因する皮膚疾患の予防・治療剤、及び、これらを含む飲食品、医薬品または化粧品を提供する。

WO 2006/068212 A1

明 細 書

リパーゼ阻害剤及び皮膚疾患の予防・治療剤

技術分野

- [0001] 本発明は、主としてリパーゼ阻害剤及び細菌性リパーゼに起因する皮膚疾患の予防・治療剤に関する。

背景技術

- [0002] 細菌性リパーゼに起因する皮膚疾患として、例えば、皮膚に存在する微生物プロピオニバクテリウム・アクネス(*Propionibacterium acnes*, 以下、*P. acnes*と記載する)が産生するリパーゼに起因する炎症性のニキビ、吹出物やおでき、面疔などの炎症性湿疹や、皮膚常在菌のリパーゼ活性の亢進が原因となるふけ症、脇臭等の体臭の発生などが挙げられる。

- [0003] ニキビの原因は、*P. acnes*が産生するリパーゼによって脂肪が分解される結果、分離した脂肪酸による炎症の惹起や*P. acnes*自身の増殖促進効果によってさらに炎症が増悪するためと考えられている(特許文献1参照)。また、脂肪酸が酸化された過酸化脂肪酸の働きにより、さらにニキビが悪化すると考えられている。

従来より、ニキビの予防・治療のために植物抽出物が有効であることは公知であり、例えばコケモモ(*Vaccinium vitis-idaea* L.)抽出物及びその抽出分画物より選択した1種又は2種以上を含有してなる微生物性リパーゼ阻害剤(特許文献2参照)、プロアントシアニジンを含むニキビ予防および治療用皮膚外用剤(特許文献3参照)が知られている。

特許文献1:特開2004-244379号公報

特許文献2:特開2002-97147号公報

特許文献3:特開2004-115466号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0004] 本発明は、新規なリパーゼ阻害剤及び細菌性リパーゼに起因する皮膚疾患の予防・治療剤の提供を課題とする。

課題を解決するための手段

[0005] 本発明者らは、クランベリー抽出物がリパーゼ阻害剤及び細菌性リパーゼに起因する皮膚疾患の予防・治療剤として有用であることを見出した。また本発明者らはクランベリー抽出物中の有効成分を分画し、それがプロアントシアニジンであることを確認し、本発明を完成した。すなわち、本発明は、以下に関する。

1. プロアントシアニジンを含む有効成分とする、リパーゼ阻害剤。
2. プロアントシアニジンを含むクランベリー抽出物を有効成分とする、リパーゼ阻害剤。
3. リパーゼが*Propionibacterium acnes*由来である、1. または2. 記載のリパーゼ阻害剤。
4. 上記1. ～3. のいずれか1項に記載のリパーゼ阻害剤を含む、飲食品、医薬品または化粧品。
5. プロアントシアニジンを含む有効成分とする、細菌性リパーゼに起因する皮膚疾患の予防・治療剤。
6. プロアントシアニジンを含むクランベリー抽出物を有効成分とする、細菌性リパーゼに起因する皮膚疾患の予防・治療剤。
7. 細菌性リパーゼに起因する皮膚疾患がニキビ、吹出物、おでき、面疔、ふけ症、脇臭である、上記5. または6. 記載の予防・治療剤。
8. 上記5. ～7. のいずれか1項に記載の予防・治療剤を含む、飲食品、医薬品または化粧品。

発明を実施するための最良の形態

[0006] 1. プロアントシアニジンを含む有効成分とするリパーゼ阻害剤：

本発明は、プロアントシアニジンを含む有効成分とする、リパーゼ阻害剤である。リパーゼとしては、細菌性リパーゼ、具体的には*P. acnes*などの皮膚常在菌を由来とするものが挙げられる。

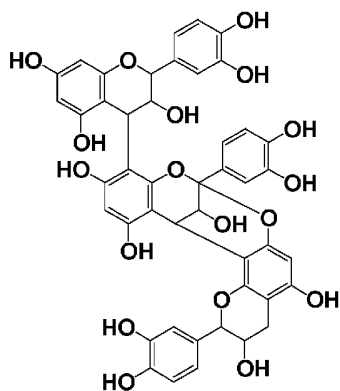
プロアントシアニジンとは、フラバン-3-オールまたはフラバン-3, 4-ジオールを構成単位として、4位-6位又は4位-8位で縮合もしくは重合により結合した化合物群をいう。

[0007] なお、本発明のプロアントシアニジンには、構成単位の3量体、4量体さらに10量体以上からなる高分子のプロシアニジン、プロデルフィニジン、プロペラルゴニジン等のプロアントシアニジン、およびそれらの立体異性体等も含まれる。

また本発明のプロアントシアニジンには、構成単位間の結合の一つ以上が、4位－6位又は4位－8位の炭素－炭素結合に加えて2位－7位水酸基の炭素－酸素結合（エーテル結合）を有する、すなわち、構成単位が互いに2つの結合（A型結合）を介して結合している構造を有するプロアントシアニジン、いわゆる、A型プロアントシアニジンも含まれる。A型プロアントシアニジンは、クランベリーや落花生などに多く含まれている。

[0008] 本発明においては、これらのプロアントシアニジンの中でも、リパーゼ阻害剤としての効果の点から、プロアントシアニジン5量体～9量体の混合物、又はプロアントシアニジン3量体～7量体の混合物等の多量体を使用することが特に好ましい。

本発明のプロアントシアニジンの一例として、A型プロアントシアニジン3量体を次式に示す。



[0009] 本発明のプロアントシアニジンは、単離精製された純品であってもよく、また、プロアントシアニジンを含む植物抽出物であってもよい。植物抽出物は、ブドウ、カキ、リンゴ、マツ、落花生、くり、アズキ、クランベリー等のプロアントシアニジンを含む植物体を、水や有機溶媒で抽出することにより得られる。

植物抽出物を更に減圧留去、スプレードライ、あるいは凍結乾燥等に従事することにより溶媒を除去し、プロアントシアニジン含量を高めることができる。

プロアントシアニジンを含む有効成分とするリパーゼ阻害剤は、飲食品、医薬品または

化粧品に添加して、経口あるいは非経口的に使用できる。プロアントシアニジンは、重量として、例えば、1mg～10g／成人／日であることが好ましく、更に好ましくは10 mg～1g／成人／日となるように添加すればよい。

- [0010] 2. プロアントシアニジンを含むクランベリー抽出物を有効成分とする、リパーゼ阻害剤：

また本発明は、プロアントシアニジンを含むクランベリー抽出物を有効成分とする、リパーゼ阻害剤である。リパーゼとしては、細菌性リパーゼ、具体的には*P. acnes*などの皮膚常在菌を由来とするものが挙げられる。

クランベリーとは、ヨーロッパ、北アメリカ両大陸を原産とする小果樹であり、本発明では、その原種及び栽培品種が使用できる。栽培品種としては、アメリカのウインスコニン州の原産でツツジ科スノキ属マクロカルポン種 (*Vaccinium macrocarpon*) 又はオキシコカス種 (*Vaccinium oxycoccus*) の樹高約20cm程度の果樹で、品種名はクラウリー (Crowley)、スティーブンス (Stevens)、ベンレアー (Benlear)、ピルグリム (Pilgrim)、アーリーブラック (Early black)、バークマン (Bergman) などがある。

- [0011] 「プロアントシアニジンを含むクランベリー抽出物」(以下単に「クランベリー抽出物」という)とは、リパーゼ阻害活性を有するクランベリー抽出物であり、且つプロアントシアニジンを含む組成物をいう。ここで、プロアントシアニジンとしては、上記のとおり、構成単位の3量体、4量体さらに10量体以上からなる高分子のプロシアニジン、プロデルフィニジン、プロペラルゴニジン等のプロアントシアニジン、およびそれらの立体異性体が挙げられる。

該抽出物は、プロアントシアニジンを含む条件で、クランベリーの植物体を抽出することにより得られる。クランベリーの種子、果実、果肉、果皮類などの組織が抽出原料として利用可能である。また、クランベリー果汁または果汁濃縮物も、本発明のクランベリー抽出物に含まれる。

上記の抽出原料を、水又は有機溶媒等を用いて適当な条件下で抽出することにより、リパーゼ阻害活性を有する組成物が得られる。有機溶媒とは例えば、メタノール、エタノール、イソプロパノール、*n*-ブタノール等の水溶性アルコール類、アセトン、エチルメチルケトン、アセトニトリル、1, 4-ジオキサン、*N*, *N*-ジメチルホルムアミド(D

MF)、酢酸等である。水溶性有機溶媒は単独で用いてもよいが、任意の比で水と混合して用いてもよい。

- [0012] 上記で得られたクランベリー抽出物を本発明の有効成分として使用することもできるが、更に、抽出物の活性を更に高めるため、セファデックス、ポリアミド、シリカゲル、ODS等を用いたカラムクロマトグラフ、セルロース膜等を用いた膜分離、酢酸エチル-水等を用いた液液分離、酵母等の微生物の添加による不純物の分解など精製・分離操作を行ってもよい。実施例に示す通り、クランベリー抽出物中のプロアントシアニジンがリパーゼ阻害活性を有しているので、精製・分離操作に際しては、プロアントシアニジン含量を高める条件を採用することが好ましい。

クランベリー果汁の濃縮を行う場合は、液膜流下式、TASTE式、限外濾過法、逆浸透膜法、凍結乾燥法、減圧下濃縮する方法などいずれの方法でも濃縮することができる。

プロアントシアニジンを含むクランベリー抽出物を有効成分とするリパーゼ阻害剤は、飲食品、医薬品または化粧品に添加し、経口あるいは非経口的に使用できる。クランベリー抽出物は、抽出物の乾燥重量として例えば10mg～100g／成人／日、好ましくは100mg～10g／成人／日となるように添加すればよい。

- [0013] 3. 細菌性リパーゼに起因する皮膚疾患の予防・治療剤

また本発明は、プロアントシアニジン又はクランベリー抽出物を有効成分とする、細菌性リパーゼに起因する皮膚疾患の予防・治療剤である。プロアントシアニジン及びクランベリー抽出物は、リパーゼ阻害活性を通じて、細菌性リパーゼに起因する皮膚疾患の予防または治療効果を発揮することができる。細菌性リパーゼとは、例えば、*P. acnes*などの皮膚常在菌を由来とするリパーゼである。皮膚疾患とは、例えば、*P. acnes*などの皮膚常在菌由来のリパーゼに起因するニキビ、吹出物、おでき、面疔、ふけ症、脇臭等の体臭の発生などである。

プロアントシアニジンを経口あるいは非経口的に摂取すればよい。また、クランベリー抽出物を皮膚疾患の予防・治療剤として使用する場合、抽出物の乾燥重量として例えば1mg～10g／成人／日、好ましくは10mg～1g／成人／日程度の量を、服用者が経口あるいは非経口的に摂取すればよい。また、クランベリー抽出物を皮膚疾患の予防・治療剤として使用する場合、抽出物の乾燥重量として例えば1

0mg～100g／成人／日、好ましくは100mg～10g／成人／日程度の量を、服用者が経口あるいは非経口的に摂取すればよい。上記の摂取量は、摂取者の体調、性別、年齢、摂取の目的（予防、治療または症状軽減等）に応じて適宜設定すればよい。

- [0014] また本発明は、上記した皮膚疾患の予防・治療剤を含有する、飲食品、医薬品または化粧品である。本発明の剤を飲食品として使用する場合、プロアントシアニジン又はクランベリー抽出物を、適当な飲食品、例えば飲料、菓子、調味料、惣菜に添加すればよい。また、本発明の剤は、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、シロップ剤またはドリンク剤タイプの機能性食品として使用することもできる。

本発明の剤を医薬品として使用する場合、プロアントシアニジン又はクランベリー抽出物を他の成分とともに経口剤、皮膚外用剤または注射剤などとして製剤化することができる。経口剤としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、シロップ剤、ドリンク剤等が、非経口剤としては無菌溶液剤、懸濁液剤等の注射剤、軟膏剤、クリーム、水剤等の外用剤等が挙げられる。製剤化において使用される他の成分とは例えば、賦形剤、統合剤、潤滑剤、膨化剤、甘味料、被覆剤、香料、防腐剤、酸化防止剤、緩衝剤等である。また、カプセル剤の場合は、上記の材料に加えて油脂のような液体担体を含むさせることもできる。

- [0015] 本発明の剤を化粧品として使用する場合は、プロアントシアニジン又はクランベリー抽出物を、通常使用される基材とともに化粧品として調製すればよい。その使用方法としては、皮膚に塗布することが好適である。

実施例

- [0016] 以下、実施例により、本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。実施例ではまず、クランベリー抽出物を試料として、細菌性リパーゼ阻害活性及び皮膚疾患（ニキビ）に対する治療効果を確認した。次いで、クランベリー抽出物中の有効成分を分画し、それがプロアントシアニジンであることを確認した。尚、実施例中の数値の単位は、特に断りのない限り重量％である。

- [0017] 実施例1

〔クランベリー抽出物のリパーゼ阻害活性評価試験〕

以下の方法により、クランベリー抽出物の、細菌性リパーゼ阻害活性を評価した。

(1) 細菌性リパーゼの調製

白金耳にて掻き取ったヒト皮脂を煮沸脱気した後冷却した生理食塩水10mLに分散し、うち1mLを嫌気性菌用GAM寒天培地(ニッスイ)に塗布した。

塗布後、32℃、48時間培養して*P. acnes*の単一コロニーを得た。得られたコロニーを、嫌気性菌用GAM液体培地(ニッスイ)にて32℃、48時間培養した。菌体を遠心回収した後に50mM Tris-HCl(pH7. 4)にて2回分散洗浄し、同緩衝液中にて氷冷下において超音波破碎して*P. acnes*由来のリパーゼを含む粗酵素液を得た。

[0018] (2) クランベリー抽出物の調製

スティーブンス(Stevens)種を主としたクランベリーを用いて以下の抽出物を調製し、試験試料とした。

a) クランベリー果汁濃縮液

新鮮な生のクランベリー果実1000gを、搾汁機にて搾汁した後、減圧下に濃縮した。濃縮液として、100gを得た。このクランベリー果汁濃縮液の固形分は50%、総ポリフェノール含量1. 3%、総プロアントシアニジン含量0. 5%、総アントシアニン含量0. 2%であった。

b) クランベリー抽出濃縮液

新鮮なクランベリー果実の搾汁残渣200gに熱水2リットルを加えて2時間90℃に加熱し、固液分離して、抽出液を得た。この抽出液を、減圧下に濃縮し、濃縮液8gを得た。このクランベリー果汁濃縮液の固形分は50%、総ポリフェノール含量4. 8%、総プロアントシアニジン含量2. 3%、総アントシアニン含量0. 6%であった。

c) 高純度クランベリー抽出物

クランベリー果実の果汁濃縮液(固形分50%、総ポリフェノール含量1. 3%)50gを、セパピーズ(200g)を用いたカラムクロマトグラフィーにて精製した。カラムクロマトグラフィーは、果汁濃縮液をイオン交換水250mlで希釈後、カラムに吸着させ、イオン交換水で洗浄、ついで70%エタノール水溶液で溶出した。ポリフェノールを含む画分を集めた後、減圧下濃縮し、ついで凍結乾燥して、粉末1. 6gを得た。この高純度クランベリー抽出物の総ポリフェノール含量は34. 2%、総プロアントシアニジン含量

12. 6%、総アントシアニン含量2. 4%であった。

[0019] (3)リパーゼ阻害活性試験

上記(1)のリパーゼ含有粗酵素液に、試験試料として(2)で調製したクランベリー抽出物を各種濃度で加え、クランベリー抽出物のリパーゼ阻害活性を評価した。リパーゼ活性は、4-methylumbelliferyl-oleate(4-MU-oleate;Sigma社)を用いた蛍光測定法により測定した。

[0020] まず、4-MU-oleate、粗酵素液及び試験試料を共存させ、遊離した4-methyl-umbelliferone(4-MU)の蛍光強度を測定した(Ex, 355nm:Em, 460nm)。遊離した4-MU量は4-MUで作製した検量線から算出し、1分間あたりの遊離4-MU量としてリパーゼ活性を評価した。それぞれのリパーゼ活性はStudent t検定をもちいて有意差検定を行い、コントロールとの差を評価した。結果を表1に示す。

[0021]

表 1

P.acnes 由来リパーゼ阻害活性試験(n=5)					
試料名	濃度	遊離 4MU (pmol/min)			
		Mean	SD	^{b)} p(t-TEST)	^{c)} 阻害率(%)
クランベリー 果汁濃縮液 (%)	^{a)} 0.00000	128.74 ± 7.38		1.000	0.0
	0.00625	116.40 ± 5.02		0.033	9.6
	0.01250	105.20 ± 3.19		0.001	18.3
	0.02500	56.66 ± 3.73		0.000	56.0
	0.05000	30.54 ± 22.98		0.000	76.3
	0.10000	18.40 ± 4.20		0.000	85.7
クランベリー 抽出濃縮液 (%)	^{a)} 0.00000	115.28 ± 44.44		1.000	0.0
	0.00625	66.76 ± 6.23		0.074	42.1
	0.01250	51.93 ± 18.49		0.039	55.0
	0.02500	54.13 ± 11.52		0.037	53.0
	0.05000	42.05 ± 2.32		0.017	63.5
	0.10000	32.59 ± 0.70		0.010	71.7
高純度 クランベリー 抽出物 (mg/mL)	^{a)} 0.00000	113.21 ± 3.03		1.000	0.0
	0.00313	120.89 ± 3.41		0.002	9.2
	0.00625	101.95 ± 2.60		0.000	23.5
	0.01250	72.67 ± 7.38		0.000	45.4
	0.02500	45.81 ± 6.03		0.000	65.6
	0.05000	42.61 ± 5.43		0.000	68.0
^{a)} 試験未添加におけるリパーゼ活性を示す。 ^{b)} 試料未添加のリパーゼ活性に対する有意差。 ^{c)} 試料未添加のリパーゼ活性阻害率を 0%とした相対値。					

いずれの試験試料も、濃度依存的に*P. acnes*由来リパーゼ阻害活性を示した。実施例1によりクランベリー抽出物がリパーゼ阻害剤として有用であることが示された。

[0022] 実施例2

〔皮膚疾患(ニキビ)に対する評価試験〕

以下の方法により、クランベリー抽出物を含む試験飲料の、皮膚疾患(ニキビ)に対する効果を評価した。

(1) 試験飲料

スティーブンス(Stevens)種を主としたクランベリー果汁に、果糖、酸味料などを配合し、以下組成の飲料(1本125ml)を調製した。

組成: エネルギー 68kcal、たんぱく質 0g、脂質 0g、炭水化物 17g、ナトリウム 86mg、ビタミンC 37.5mg、クランベリー由来の化合物(キナ酸 800mg、総ポリフェノール含量 211mg、総プロアントシアニジン含量 41mg、総アントシアニン含量 9mg)。

[0023] (2) 試験対象者

試験対象者は、肌荒れや吹き出物、ニキビなどの自覚を持つ30歳代の健常成人女性とした。なお、試験実施に際しては、ヘルシンキ宣言の精神に則り、事前に試験の趣旨および内容を十分に説明し書面による同意を得た。

試験対象者を、年齢や体格、肌質、体質などの属性を考慮し事前の肌測定後、クランベリー果汁濃縮液飲料を摂取する試験群(女性12名、 35.5 ± 0.6 歳)または特に飲料の摂取を指定しない季節変動計測のための対照群(女性12名、 35.1 ± 0.5 歳)の2群に、事前の肌状態ができるだけ均等になるように割り付けた。

[0024] (3) 試験スケジュールおよび摂取方法

試験群には試験飲料を毎日朝・夕1本ずつ、1日計2本摂取させた。試験期間は4週間で、各試験項目の測定は、摂取前、摂取2週間後、摂取4週間後の3回行った。試験期間中の生活は、試験飲料の摂取以外は、特に制限事項は設けなかった。

[0025] (4) 有効性の評価

有効性の評価は、美容専門家(美容に関する専門知識を有する人)による肌状態の診断によって実施した。

a) 美容専門家による肌診断

美容専門家による肌診断は、視診・触診を実施し、肌状態を診断した。視診による診断項目は、「ニキビ・吹き出物」、「透明感」、「シミ・ソバカス」、「赤み」、「きめのよさ」、の5項目、触診による診断項目は、「しっとりさ」、「なめらかさ」、「総合的肌状態」の3項目とした。診断項目の判定基準は、非常に悪い(1点)、かなり悪い(2点)、やや悪い(3点)、どちらでもない(4点)、やや良い(5点)、かなり良い(6点)、非常に良い(7点)の7段階で、スコアに置き換えて評価した。なお、美容専門家による肌診断において、視診・触診を行う専門家は、試験対象者がどの群に属しているか分からないように配慮した。結果を表2に示す。

[0026]

表 2

美容専門家による肌診断				
診断項目	被験者群	摂取前	摂取 2 週間後	摂取 4 週間後
しっとりさ (触診)	試験群	3.6±0.2	4.2±0.2*	5.0±0.2** #
	対照群	3.6±0.3	4.3±0.2*	4.3±0.2**
なめらかさ (触診)	試験群	3.5±0.2	4.7±0.3**	5.2±0.1** #
	対照群	3.6±0.3	4.3±0.3*	4.5±0.3*
ニキビ・吹き出物 (視診)	試験群	4.3±0.5	5.1±0.4	5.4±0.4*
	対照群	4.8±0.5	5.5±0.3	5.3±0.4
透明感 (視診)	試験群	4.4±0.3	4.5±0.3	4.5±0.2
	対照群	4.3±0.3	4.0±0.3*	3.9±0.3
シミ・ソバカス (視診)	試験群	4.3±0.4	4.6±0.3	4.9±0.3
	対照群	3.6±0.4	3.9±0.4	3.9±0.4
赤み (視診)	試験群	4.4±0.4	4.5±0.3	5.2±0.4*
	対照群	4.8±0.4	4.8±0.3	5.2±0.4
きめのよさ (視診)	試験群	3.3±0.2	4.3±0.2**	4.3±0.2**
	対照群	4.1±0.3	4.4±0.3	4.3±0.3
総合的肌状態	試験群	3.8±0.2	4.8±0.2**	5.0±0.2** ##
	対照群	4.1±0.3	4.3±0.2	4.2±0.2
平均値±標準誤差 * 摂取前との有意差 (対応のある t 検定、p<0.05) ** 摂取前との有意差 (対応のある t 検定、p<0.01) # 対照群との有意差 (Student の t 検定、p<0.05) ## 対照群との有意差 (Student の t 検定、p<0.01)				

試験群において、ニキビ・吹き出物(視診)および赤み(視診)において有意な改善が観察された。また、しっとり感、滑らかさなど総合的な肌状態の改善が認められた。クランベリー抽出物がニキビに対する治療効果を有することが示された。

[0027] 実施例3

〔P. acnesの生育阻害試験〕

実施例1で調製したクランベリー抽出物を試料とし、以下の方法によりP. acnesの生育阻害試験を行った。

実施例1で得たP. acnesの単一コロニーを嫌気性菌用GAM液体培地10mLに植菌し、32℃で48時間静置培養した菌液を、煮沸脱気した生理食塩水にて10倍希釈し、うち1mLを10cm²シャーレに固化した嫌気性菌用GAM寒天培地に対しコンラージ棒にて均一塗布した。直径18mmの滅菌濾紙に対し、所定の濃度の試料水溶液を浸透させ、菌体を塗布した寒天培地の中央に静置した。32℃で48時間培養後、菌生育が阻害されて形成される円の直径を比較することにより、静菌作用を評価した。なお、陽性対照品として塩化ベンザルコニウムを用いた。結果を表3に示す。

[0028]

表 3

P. acnes 生育阻害試験		
試料名	濃度 (%)	阻止円の形成
クランベリー果汁濃縮液	10	形成されない
	20	形成されない
クランベリー抽出濃縮液	10	形成されない
	20	形成されない
高純度クランベリー抽出物	10	形成されない
	20	形成されない
塩化ベンザルコニウム	3	形成された (阻止円径 43mm)

その結果、いずれの試験試料(クランベリー果汁濃縮液、クランベリー抽出濃縮液、高純度クランベリー抽出物の各10%および20%水溶液)においても、P. acnesに対する生育阻害は認められなかった。よって、クランベリー抽出物はP. acnesに対する抗菌作用を有していないことが示された。

実施例2におけるクランベリー抽出物によるニキビの治療効果は、P. acnesの生育阻害ではなく、P. acnesのリパーゼ阻害によって発揮されたと考えられる。

[0029] 実施例4

〔クランベリー抽出物中の有効成分の分画〕

上記のリパーゼ阻害活性試験系を用いてクランベリー抽出物中の有効成分を分画

し、それがプロアントシアニジンであることを確認した。

実施例1記載のクランベリー果汁濃縮液40gを、アンバーライトXAD7HP(50ml)を用いたカラムクロマトグラフィーに供し、非吸着及びイオン交換水100mlで溶出した画分を、減圧下濃縮した後、凍結乾燥し、「非ポリフェノール画分」10.0gの粉末を得た。該粉末中の総ポリフェノール含量は0.1%、総プロアントシアニジン含量0.0%、総アントシアニン含量0.0%であった。さらに、「非ポリフェノール画分」を溶出した後のカラムから、70%エタノール水溶液100mlで溶出した画分を減圧下濃縮した後、凍結乾燥し、「ポリフェノール画分」0.5gの粉末を得た。該粉末中の総ポリフェノール含量は59.0%、総プロアントシアニジン含量33.1%、総アントシアニン含量7.3%であった。

[0030] 次に、上記の「ポリフェノール画分」を、Journal of the Science Food and Agriculture (81: 1306-1313, 2001)に記載の方法で分画した。すなわち、「ポリフェノール画分」2gをセファデックスLH20(300ml)を用いたカラムクロマトグラフィーに供し、イオン交換水、50%エタノール水溶液、エタノール、エタノールとメタノールの1:1混合溶液、メタノール、80%アセトン水溶液の6種類の溶液(各800ml)で順に溶出し、それぞれの画分を減圧下濃縮した後、凍結乾燥し、以下6種の分画物を得た。

- [0031] (1)イオン交換水で溶出した「ヒドロキシ桂皮酸画分」0.51g
(2)50%エタノール水溶液で溶出した「アントシアニン画分」0.46g
(3)エタノールで溶出した「フラボノール配糖体画分」0.12g
(4)エタノールとメタノールの1:1混合溶液で溶出した「プロアントシアニジン単量体～2量体画分」0.15g
(5)メタノールで溶出した「プロアントシアニジン3量体～7量体画分」0.32g
(6)80%アセトン水溶液で溶出した「プロアントシアニジン5量体～9量体画分」0.22g

上記で調製した計8種の分画物について、実施例1記載の方法でリパーゼ阻害活性試験を実施し、各試験試料の50%阻害濃度(IC50値)を求めた。なお、IC50値が小さいほど阻害活性が強いことを示す。結果を表4に示す。

[0032]

表 4

P. acnes 由来リパーゼ阻害活性試験	
試料名	IC50 (μ g/ml)
クランベリー果汁濃縮液	67.9
非ポリフェノール画分	—
ポリフェノール画分	9.2
ヒドロキシ桂皮酸画分	—
アントシアニン画分	—
フラボノール配糖体画分	—
プロアントシアニジン単量体～2量体画分	—
プロアントシアニジン3量体～7量体画分	3.7
プロアントシアニジン5量体～9量体画分	1.6
—：阻害率が低かったため、IC50 値を算出できなかった。	

[0033] クランベリー果汁濃縮液の分画物のうち、「ポリフェノール画分」、特に、「プロアントシアニジン3量体～7量体画分」および「プロアントシアニジン5量体～9量体画分」に P. acnes由来リパーゼに対する強い阻害活性があることが認められた。プロアントシアニジンがリパーゼ阻害剤として有用であることが示された。

[0034] 実施例5

実施例1で得たクランベリー抽出物を有効成分として、細菌性リパーゼに起因する皮膚疾患の予防・治療剤を含有する飲食品、医薬品または化粧品を調整することができる。

<錠剤タイプの内服剤または機能性食品>

クランベリー抽出物10mg、乳糖80mg、トウモロコシデンプン8mg、ステアリン酸マグネシウム2mg、以上を1錠分として常法により錠剤化する。この錠剤は、内服用の医薬品または機能性食品として使用できる。

<硬質カプセルタイプ内服剤または機能性食品>

クランベリー抽出物50mg、バレイショデンプン6mg、軽質無水ケイ酸4mg、ステアリン酸カルシウム1mg、乳糖80mg、以上を1錠分として含むカプセルを常法により得る。

[0035] <皮膚外用剤>

下記成分(5)、(6)および(7)の一部を加熱混合し、75℃に維持した混合物を、下記成分(1)～(4)を加熱混合し、75℃に維持した混合物に徐々に加え、これを冷却

しながら成分(7)の残部で溶解した成分(8)および(9)を加え、軟膏を得る。

(成分) (%)

(1)ステアリン酸 18.0%(2)セタノール 4.0%(3)dl- α -トコフェロール 0.2%(4)フェノキシエタノール 0.5%(5)トリエタノールアミン 2.0%(6)グリセリン 5.0%(7)精製水 残量(8)高純度クランベリー抽出物 1.0%(9)グリチルリチン酸ジカリウム 0.5%

[0036] <皮膚塗布用化粧品>

下記成分(1)～(6)を混合溶解した溶液と、成分(7)～(10)を混合溶解した溶液とを混合して均一にし、化粧水を得る。

(1)グリセリン 10.0%(2)1,3-ブチレングリコール 6.0%(3)高純度クランベリー抽出物 30.0%(4)クエン酸 0.1%(5)クエン酸ナトリウム 0.3%(6)精製水 残量(7)ポリオキシエチレン(60E.O.)硬化ヒマシ油 0.5%(8)エチルアルコール 8.0%(9)パラオキシ安息香酸メチル 0.1%(10)香料

産業上の利用可能性

[0037] 本発明によれば、プロアントシアニジンを含む成分とする、クランベリー抽出物由来の新規なリパーゼ阻害剤、及びこれを有効成分とする、細菌性リパーゼに起因する皮膚疾患の予防・治療剤並びにこれを含有する飲食品、医薬品または化粧品を提供することができる。

請求の範囲

- [1] プロアントシアニジンを含む有効成分とする、リパーゼ阻害剤。
- [2] プロアントシアニジンが、プロアントシアニジン5量体～9量体である請求項1記載のリパーゼ阻害剤。
- [3] プロアントシアニジンが、プロアントシアニジン3量体～7量体である請求項1記載のリパーゼ阻害剤。
- [4] プロアントシアニジンを含むクランベリー抽出物を有効成分とする、リパーゼ阻害剤。
- [5] プロアントシアニジンが、プロアントシアニジン5量体～9量体である請求項4記載のリパーゼ阻害剤。
- [6] プロアントシアニジンが、プロアントシアニジン3量体～7量体である請求項4記載のリパーゼ阻害剤。
- [7] リパーゼが*Propionibacterium acnes*由来である、請求項1～6の何れかに記載のリパーゼ阻害剤。
- [8] 請求項1～7のいずれか1項に記載のリパーゼ阻害剤を含む、飲食品、医薬品または化粧品。
- [9] プロアントシアニジンを含む有効成分とする、細菌性リパーゼに起因する皮膚疾患の予防・治療剤。
- [10] プロアントシアニジンが、プロアントシアニジン5量体～9量体である請求項9記載の皮膚疾患の予防・治療剤。
- [11] プロアントシアニジンが、プロアントシアニジン3量体～7量体である請求項9記載の皮膚疾患の予防・治療剤。
- [12] プロアントシアニジンを含むクランベリー抽出物を有効成分とする、細菌性リパーゼに起因する皮膚疾患の予防・治療剤。
- [13] プロアントシアニジンが、プロアントシアニジン5量体～9量体である請求項12記載の皮膚疾患の予防・治療剤。
- [14] プロアントシアニジンが、プロアントシアニジン3量体～7量体である請求項12記載の皮膚疾患の予防・治療剤。

- [15] 細菌性リパーゼに起因する皮膚疾患がニキビ、吹出物、おでき、面疔、ふけ症、脇臭である、請求項9～14の何れかに記載の予防・治療剤。
- [16] 請求項9～15のいずれか1項に記載の予防・治療剤を含有する、飲食品、医薬品または化粧品。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/023575

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/352 (2006.01), **A61K8/49** (2006.01), **A61K8/97** (2006.01), **A61K36/18** (2006.01), **A61P17/00** (2006.01), **A61P17/10** (2006.01), **A61P43/00** (2006.01), **A61Q19/00** (2006.01), **C07D311/62** (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K31/352, A61K8/49, A61K8/97, A61K36/18, A61P17/00, A61P17/10, A61P43/00, A61Q19/00, C07D311/62

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2006	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2006

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	JP 9-291039 A (MARUZEN SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA), 11 November, 1997 (11.11.97), Full text; Particularly, Par. No. [0013]; experimental example 11; examples 4 to 17 & WO 97/23210 A1 & EP 815857 A1	1-3, 8, 16 4, 7, 9, 15 5, 6, 10-14
X A	JP 2002-230 A (KIKKOMAN CORP.), 08 January, 2002 (08.01.02), Full text; particularly, examples 1, 2 (Family: none)	8, 16 1-7, 9-15
X	JP 2004-161623 A (NOEVIR KABUSHIKI KAISHA), 10 June, 2004 (10.06.04), Full text; particularly, Par. Nos. [0008], [0017], [0025], [0036]; table 2 (Family: none)	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06 March, 2006 (06.03.06)

Date of mailing of the international search report
20 March, 2006 (20.03.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/023575

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP 2004-131500 A (ATENIA KABUSHIKI KAISHA), 30 April, 2004 (30.04.04), Full text; particularly, Par. Nos. [0017], [0019] (Family: none)	1, 4, 8 2, 3, 5-7, 9-16
Y A	JP 2001-335499 A (ICHIMARU PHARCOS INC.), 04 December, 2001 (04.12.01), Full text; particularly, Par. Nos. [0009] to [0011] (Family: none)	1, 7-9, 15, 16 2-6, 10-14
Y A	JP 2002-97147 A (NOEVIR KABUSHIKI KAISHA), 02 April, 2002 (02.04.02), Full text; particularly, Par. No. [0002] (Family: none)	1, 7-9, 15, 16 2-6, 10-14
Y A	JP 2003-192605 A (FANCL KABUSHIKI KAISHA), 09 July, 2003 (09.07.03), Full text; particularly, Par. No. [0004] (Family: none)	1, 7-9, 15, 16 2-6, 10-14
E,X E,A	JP 2006-16367 A (SUNTORY LTD.), 19 January, 2006 (19.01.06), Full text; particularly, Par. No. [0017] (Family: none)	1-3, 8, 16 4-7, 9-15

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. **A61K31/352** (2006.01), **A61K8/49** (2006.01), **A61K8/97** (2006.01), **A61K36/18** (2006.01), **A61P17/00** (2006.01), **A61P17/10** (2006.01), **A61P43/00** (2006.01), **A61Q19/00** (2006.01), **C07D311/62** (2006.01)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K31/352, A61K8/49, A61K8/97, A61K36/18, A61P17/00, A61P17/10, A61P43/00, A61Q19/00, C07D311/62

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2006年
日本国実用新案登録公報	1996-2006年
日本国登録実用新案公報	1994-2006年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y A	JP 9-291039 A (MARUZEN SEIYAKU KK) 1997.11.11, 全文, 特に, 段落番号【0013】, 実験例 11, 実施例 4-17 & WO 97/23210 A1 & EP 815857 A1	1-3, 8, 16 4, 7, 9, 15 5, 6, 10-14
X A	JP 2002-230 A (KIKKOMAN CORP) 2002.01.08, 全文, 特に, 実施例 1, 2 (ファミリーなし)	8, 16 1-7, 9-15

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.03.2006

国際調査報告の発送日

20.03.2006

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小堀 麻子

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

4 P

3645

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2004-161623 A (NOEVIR KK) 2004.06.10, 全文, 特に, 段落番号【0008】【0017】【0025】【0036】, 表 2 (ファミリーなし)	1-16
Y A	JP 2004-131500 A (ATENIA KK) 2004.04.30, 全文, 特に, 段落番号【0017】【0019】 (ファミリーなし)	1, 4, 8 2, 3, 5-7, 9-16
Y A	JP 2001-335499 A (ICHIMARU PHARCOS INC) 2001.12.04, 全文, 特に, 段落番号【0009】 - 【0011】 (ファミリーなし)	1, 7-9, 15, 16 2-6, 10-14
Y A	JP 2002-97147 A (NOEVIR KK) 2002.04.02, 全文, 特に, 段落番号【0002】 (ファミリーなし)	1, 7-9, 15, 16 2-6, 10-14
Y A	JP 2003-192605 A (FANCL KK) 2003.07.09, 全文, 特に, 段落番号【0004】 (ファミリーなし)	1, 7-9, 15, 16 2-6, 10-14
EX EA	JP 2006-16367 A (SUNTORY LTD) 2006.01.19, 全文, 特に, 段落番号【0017】 (ファミリーなし)	1-3, 8, 16 4-7, 9-15