

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2020-2053

(P2020-2053A)

(43) 公開日 令和2年1月9日(2020.1.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 8/9789 (2017.01)	A 6 1 K 8/9789	4 B 0 1 4
A 6 1 Q 19/00 (2006.01)	A 6 1 Q 19/00	4 B 0 1 8
A 6 1 K 36/30 (2006.01)	A 6 1 K 36/30	4 B 0 5 0
A 6 1 P 17/18 (2006.01)	A 6 1 P 17/18	4 B 0 6 5
A 6 1 P 17/16 (2006.01)	A 6 1 P 17/16	4 B 1 1 7
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 14 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-122623 (P2018-122623)	(71) 出願人	592262543
(22) 出願日	平成30年6月28日 (2018. 6. 28)		日本メナード化粧品株式会社 愛知県名古屋市西区鳥見町2丁目130番地
		(72) 発明者	堀場 大生 名古屋市西区鳥見町2-7 日本メナード化粧品株式会社 総合研究所内
		(72) 発明者	足立 浩章 名古屋市西区鳥見町2-7 日本メナード化粧品株式会社 総合研究所内
		(72) 発明者	坂井田 勉 名古屋市西区鳥見町2-7 日本メナード化粧品株式会社 総合研究所内
		Fターム(参考)	4B014 GB08 GG09 GK03 GL04 GL06 GL11 GQ05
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コラーゲン産生促進剤、MMP阻害剤、メラニン生成抑制剤、細胞増殖促進剤、抗酸化剤、シワ改善剤、医薬品又は食品組成物

(57) 【要約】

【課題】 コラーゲン産生促進作用、MMP阻害作用、メラニン生成抑制作用、細胞増殖促進作用及び抗酸化作用に優れた新規な外用剤又は内用剤を提供する。

【解決手段】 ルリジサの抽出物は、優れたコラーゲン産生促進作用、MMP阻害作用、メラニン生成抑制作用、細胞増殖促進作用及び抗酸化作用を有し、安定性にも優れていた。ルリジサの抽出物は、皮膚の老化予防といった美容分野だけでなく、老化による機能低下の抑制、ガンの予防、治療等といった医療分野にも利用でき、食品、化粧品、医薬部外品及び医薬品等への応用が期待される。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ルリジサの抽出物を含有することを特徴とするコラーゲン産生促進剤。

【請求項 2】

ルリジサの抽出物を含有することを特徴とする MMP 阻害剤。

【請求項 3】

ルリジサの抽出物を含有することを特徴とするメラニン生成抑制剤。

【請求項 4】

ルリジサの抽出物を含有することを特徴とする細胞増殖促進剤。

【請求項 5】

ルリジサの抽出物を含有することを特徴とする抗酸化剤。

【請求項 6】

ルリジサの抽出物を含有することを特徴とするシワ改善剤。

【請求項 7】

ルリジサの抽出物を含有することを特徴とする医薬品。

【請求項 8】

ルリジサの抽出物を含有することを特徴とする MMP の亢進が原因で起こる各種疾患の予防改善用食品組成物。

10

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、コラーゲン産生促進剤、MMP 阻害剤、メラニン生成抑制剤、細胞増殖促進剤、抗酸化剤、シワ改善剤、医薬品又は食品組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

皮膚は、紫外線、乾燥、寒冷、熱、薬物等の様々な物理的及び化学的ストレスに日々曝されている。その結果、皮膚の機能低下が引き起こされ、様々な皮膚の老化現象が顕在化する。皮膚の老化現象の一つにシワがある。シワには、表皮性のシワと、真皮性のシワの二種類が存在することが知られている。表皮性のシワは小ジワと呼ばれ、皮膚の乾燥により、表皮角質中の水分量が低下することによって一時的に生じるシワである。一方、真皮性のシワは、太陽光線に含まれる紫外線や加齢によって形成されるシワである。その形成メカニズムとしては、紫外線や加齢による真皮線維芽細胞におけるコラーゲン合成能の低下や、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の増加によるコラーゲンの分解促進が挙げられる。

30

【0003】

乾燥に起因する表皮性のシワと真皮性のシワでは、組織学的形態、発症メカニズム、治療方法が異なり、紫外線や加齢により生じる真皮性のシワは、保湿効果を有する化粧品の使用によって改善することは困難である。

40

【0004】

これまでに、紫外線によって生じる真皮性のシワを改善することを目的として、加水分解アーモンドを有効成分とする皮膚のシワ形成防止・改善剤 (特許文献 1)、ジョチヨウケイ、テンキシ及びキセンウの抽出物を有効成分とする紫外線照射に起因するシワの改善剤 (特許文献 2) が報告されている。

【0005】

また、真皮には線維芽細胞やコラーゲンが存在し、I 型コラーゲンが全体の 80% を占める。I 型コラーゲンの他には、III、V、XII 及び XII 型コラーゲンの存在が知られている。シワやたるみの原因の一つとして、I 型コラーゲンの減少が挙げられる。従って、I 型コラーゲンの産生を促進させることがシワ・たるみの予防・改善に有効である

50

と考えられる。また、I型コラーゲンの産生促進は皮膚の創傷治癒の改善にも有効である。

【0006】

また、コラーゲンは、哺乳動物組織の約1/3を占める主要な構造タンパク質であり、軟骨、骨、腱、及び皮膚等の、多くのマトリックス組織の必須な成分である。MMPに属するコラゲナーゼ(MMP-1)により一箇所を切断されると、通常組織内では安定なコラーゲン分子は変性して一本鎖のゼラチンとなり、他の様々なプロテアーゼにより分解されるようになる。その結果、マトリックス組織の構造の完全性が失われてしまう。

【0007】

コラゲナーゼの阻害活性を有する素材として、例えば、カカオ豆皮であるカカオハスク抽出物(特許文献3)、バラ科オニチゴ抽出物(特許文献4)、ラクトフェリン(特許文献5)等が提案されている。皮膚老化や口腔衛生にますます関心が高まっている状況下で、副作用がなく、安全性が高い、コラゲナーゼ活性阻害作用の優れた素材を見出すことが求められている。

【0008】

また、線維芽細胞はコラーゲン等のタンパク質及びヒアルロン酸等のグリコサミノグリカンを生産して真皮結合組織を形成し、皮膚のハリを保っている。この結合組織が収縮力を失い、さらに弾力性を失う結果として皮膚のシワやたるみが発生すると考えられている。

【0009】

一般に、シミ、ソバカス、日焼け等に見られる皮膚の色素沈着は、ホルモンの異常や紫外線の刺激により、皮膚内に存在するメラニン色素生成細胞がメラニン色素を過剰に生成し、これが皮膚内に沈着することが原因と考えられている。このような色素沈着を防ぐ方法の一つに、メラニンの過剰な生成を抑制する方法が知られている。従来、色素沈着の治療には、内用や外用等において、アスコルビン酸(ビタミンC)等が用いられてきた(特許文献6)。

【0010】

加齢と共に表皮細胞の増殖・分裂能は低下し、表皮層自体は薄くなる(非特許文献1)。生体因子であるEpidermal Growth Factor(EGF/上皮細胞成長因子)や女性ホルモン(エストロゲン)は皮膚の表皮細胞増殖に働きかけるが、加齢と共にその分泌は低下する。このような加齢による表皮細胞代謝機能の低下は、皮膚のターンオーバー速度を遅らせ、肌荒れや皮膚の老化の原因となる。また、角層表面から剥がれ落ちる角層細胞が滞留することで、表皮内メラニンの排泄がスムーズに行われなくなり、色素沈着や肌のくすみの原因となる。さらに表皮の創傷治癒が遅くなること等も知られている。これらの現象の進行を防止あるいは改善するために、表皮細胞の増殖を促進させる成分の探索や、多くの皮膚外用剤の提案がなされてきた。

【0011】

また、皮膚は生体の最外層に位置し、紫外線等の影響により活性酸素が発生しやすい臓器であり、絶えずその酸素ストレスに曝されている。一方、皮膚細胞内には活性酸素消去酵素が存在しており、その能力を超える活性酸素が発生しないかぎり活性酸素の傷害から皮膚細胞を防御している。ところが、皮膚細胞内の活性酸素消去酵素の活性は加齢と共に低下することが知られており、活性酸素による傷害がその防御反応を凌駕したとき、皮膚は酸化され、細胞機能が劣化して老化が進行すると考えられる。また、皮膚以外の臓器においても、その活性酸素消去能を越える活性酸素に曝されたとき、機能低下が起こり老化したり、ガンや心筋梗塞等様々な生活習慣病が発症したりすると考えられる。そこで、活性酸素による傷害からの防御を目的として活性酸素消去剤や抗酸化剤が検討され、SODやカタラーゼ等の活性酸素消去酵素、SOD様活性物質等の活性酸素消去剤や抗酸化剤を含有した食品、化粧品、医薬部外品及び医薬品等が開発されている(特許文献7、8)。

【0012】

シソ目ムラサキ科ボラゴ属のルリジサ(*Borago officinalis*)は、

10

20

30

40

50

その植物油や種子油が、アトピー性皮膚炎の症状改善作用を有し、皮膚外用剤に適用されること（特許文献 9、10）や植物体の抽出物がセラミダーゼ活性阻害作用を有し皮膚外用剤に適用されること（特許文献 11）、肥満や糖尿の改善効果を有すること（特許文献 12）が知られている。しかしながら、これらのルリジサが、コラーゲン産生促進作用、MMP 阻害作用、メラニン生成抑制作用、細胞増殖促進作用及び抗酸化作用を有することは知られていなかった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0013】

【特許文献 1】特開 2000 - 119125 号公報

10

【特許文献 2】特開 2006 - 199611 号公報

【特許文献 3】特開平 3 - 44331 号公報

【特許文献 4】特開 2003 - 137801 号公報

【特許文献 5】特開平 5 - 186368 号公報

【特許文献 6】特開平 05 - 229931 号公報

【特許文献 7】特開平 9 - 118630 号公報

【特許文献 8】特開平 9 - 208484 号公報

【特許文献 9】特開平 11 - 322628 号公報

【特許文献 10】特開 2002 - 53428 号公報

【特許文献 11】特開 2017 - 124984 号公報

20

【特許文献 12】特表 2016 - 537422 号公報

【非特許文献】

【0014】

【非特許文献 1】Varani J et al., J Invest Dermatol, Vol. 3, pp 57 - 60, 1998

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

安全で安定性に優れ、コラーゲン産生促進作用、MMP 阻害作用、メラニン生成抑制作用、細胞増殖促進作用及び抗酸化作用に優れた素材が望まれているが、未だ十分満足し得るものが提供されていないのが現状である。

30

【課題を解決するための手段】

【0016】

このような事情により、本発明者らは鋭意検討した結果、ルリジサの抽出物が優れたコラーゲン産生促進作用、MMP 阻害作用、メラニン生成抑制作用、細胞増殖促進作用及び抗酸化作用を持ち、安定性においても優れていることを見出した。さらに、その抽出物を含有する外用剤又は内用剤が、安全で安定であり、コラーゲン産生促進作用、MMP 阻害作用、メラニン生成抑制作用、細胞増殖促進作用及び抗酸化作用に優れており、多機能性美容・健康用素材・医薬品と成り得ることを見だし、本発明を完成するに至った。

40

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明に用いるルリジサは、植物で、ハーブの一種であり、原産はヨーロッパ中部の地中海沿岸である。高さは 30 ~ 60 センチくらいになり、淡い緑色の葉や茎は白い毛で覆われていて、夏季に青色や白色の星型の花を咲かせる。

【0018】

本発明におけるルリジサの抽出物とは、シソ目ムラサキ科ボラゴ属のルリジサ（学名：Borago officinalis）が用いられ、部位としては、花、実、種子、葉、茎、根等の植物体の一部又は全草から抽出したものである。その抽出方法は特に限定されず、例えば、加熱抽出したものであってもよいし、常温抽出したものであってもよい。また、抽出には、植物体をそのまま使用してもよく、乾燥、粉碎、細切等の処理を行って

50

もよい。

【0019】

抽出方法は、特に限定されないが、水もしくは熱水、または水と有機溶媒の混合溶媒を用い、攪拌またはカラム抽出する方法等により行うことができる。抽出溶媒としては、例えば、水、低級アルコール類（メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール等）、液状多価アルコール類（1,3-ブチレングリコール、プロピレングリコール、グリセリン等）、ケトン類（アセトン、メチルエチルケトン等）、アセトニトリル、エステル類（酢酸エチル、酢酸ブチル等）、炭化水素類（ヘキサン、ヘプタン、流動パラフィン等）、エーテル類（エチルエーテル、テトラヒドロフラン、プロピルエーテル等）が挙げられる。好ましくは、水、低級アルコール及び液状多価アルコール等の極性溶媒が良く、特に好ましくは、水、エタノール、1,3-ブチレングリコール及びプロピレングリコールがよい。これらの溶媒は一種でも二種以上を混合して用いてもよい。特に好ましい抽出溶媒としては、水、または水-エタノール系の混合極性溶媒が挙げられる。溶媒の使用量については、特に限定はなく、例えばルリジサの全草（乾燥重量）に対し、10倍以上、好ましくは20倍以上であればよいが、抽出後に濃縮を行ったり、単離したりする場合の操作の便宜上100倍以下であることが好ましい。また、抽出温度や時間は、用いる溶媒の種類や抽出時の圧力等によって適宜選択できる。

10

【0020】

上記抽出物は、抽出した溶液のまま用いてもよいが、必要に応じて、本発明の効果を奏する範囲で、濃縮（減圧濃縮、膜濃縮等による濃縮）、希釈、濾過、活性炭等による脱色、脱臭、エタノール沈殿等の処理を行ってから用いてもよい。さらには、抽出した溶液を濃縮乾固、噴霧乾燥、凍結乾燥等の処理を行い、乾燥物として用いてもよい。

20

【0021】

本発明は、上記抽出物をそのまま使用しても良く、抽出物の効果を損なわない範囲内で、化粧品、医薬部外品、医薬品又は食品等に用いられる成分である油脂類、ロウ類、炭化水素類、脂肪酸類、アルコール類、エステル類、界面活性剤、金属石鹼、pH調整剤、防腐剤、香料、保湿剤、粉体、紫外線吸収剤、増粘剤、色素、酸化防止剤、美白剤、キレート剤、賦形剤、皮膜剤、甘味料、酸味料等の成分が含有されていてもよい。

【0022】

本発明は、化粧品、医薬部外品、医薬品、食品のいずれにも用いることができ、その剤形としては、例えば、化粧水、クリーム、乳液、ゲル剤、エアゾール剤、エッセンス、パック、洗浄剤、浴用剤、ファンデーション、打粉、口紅、軟膏、パップ剤、錠剤、カプセル剤、チョコレート、ガム、飴、飲料、散剤、顆粒剤、錠剤、糖衣錠剤、カプセル剤、シロップ剤、丸剤、懸濁剤、液剤、乳剤、坐剤、注射用溶液等が挙げられる。

30

【0023】

外用の場合、本発明に用いる上記抽出物の含有量は、固形物に換算して0.0001重量%以上が好ましく、0.001~10重量%がより好ましい。さらに、0.01~5重量%が最も好ましい。0.0001重量%未満では十分な効果は望みにくい。10重量%を越えると、効果の増強は認められにくく不経済である。

40

【0024】

内用の場合、摂取量は年齢、体重、症状、治療効果、投与方法、処理時間等により異なる。通常、成人1人当たりの1日の摂取量としては、5mg以上が好ましく、10mg~5gがより好ましい。さらに、20mg~2gが最も好ましい。

【0025】

次に本発明を詳細に説明するため、実施例として本発明に用いる抽出物の製造例、実験例及び処方例を挙げるが、本発明はこれに限定されるものではない。製造例に示す%とは重量%を、処方例に示す含有量の部とは重量部を示す。

【実施例1】

【0026】

50

ルリジサの抽出物の製造例

ルリジサの抽出物を以下のとおり製造した。製造例 1 ~ 4 において抽出材料にはルリジサの全草を用いた。

【0027】

(製造例 1) ルリジサの熱水抽出物の調製

ルリジサの乾燥物 10 g に 200 mL の水を加え、95 ~ 100 で 2 時間抽出した。得られた抽出液を濾過し、その濾液を濃縮し、凍結乾燥してルリジサの熱水抽出物を 1.4 g 得た。

【0028】

(製造例 2) ルリジサの 50% エタノール抽出物の調製

ルリジサの乾燥物 10 g を 200 mL の 50% エタノール水溶液に室温で 7 日間浸漬し抽出を行った。得られた抽出液を濾過した後、エバポレーターで濃縮乾固してルリジサの 50% エタノール抽出物を 1.1 g 得た。

【0029】

(製造例 3) ルリジサのエタノール抽出物の調製

ルリジサの乾燥物 10 g を 200 mL のエタノールに室温で 7 日間浸漬し抽出を行った。得られた抽出液を濾過した後、エバポレーターで濃縮乾固してルリジサのエタノール抽出物を 0.4 g 得た。

【0030】

(製造例 4) ルリジサの 1, 3 - ブチレングリコール抽出物の調製

ルリジサの乾燥物 10 g を 200 mL の 1, 3 - ブチレングリコールに室温で 7 日間浸漬し抽出を行った。得られた抽出液を濾過してルリジサの 1, 3 - ブチレングリコール抽出物を 1.92 g 得た。

【実施例 2】

【0031】

(処方例 1) 化粧水

処方	含有量 (部)	
1. ルリジサの熱水抽出物 (製造例 1)	2.0	
2. 1, 3 - ブチレングリコール	8.0	
3. グリセリン	2.0	30
4. キサンタンガム	0.02	
5. クエン酸	0.01	
6. クエン酸ナトリウム	0.1	
7. エタノール	5.0	
8. パラオキシ安息香酸メチル	0.1	
9. ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 (40E.O.)	0.1	
10. 香料	適量	
11. 精製水にて全量を 100 とする		

[製造方法] 成分 1 ~ 6 及び 11 と、成分 7 ~ 10 をそれぞれ均一に溶解し、両者を混合し濾過して製品とする。

【0032】

(比較処方例 1) 従来化粧水

処方例 1 において、ルリジサの熱水抽出物を精製水に置き換えたものを、従来化粧水とした。

【0033】

(処方例 2) クリーム

処方	含有量 (部)	
1. ルリジサの 50% エタノール抽出物 (製造例 2)	1.0	
2. スクワラン	5.5	
3. オリーブ油	3.0	50

4 . ステアリン酸	2 . 0	
5 . ミツロウ	2 . 0	
6 . ミリスチン酸オクチルドデシル	3 . 5	
7 . ポリオキシエチレンセチルエーテル (2 0 E . O .)	3 . 0	
8 . ベヘニルアルコール	1 . 5	
9 . モノステアリン酸グリセリン	2 . 5	
1 0 . 香料	0 . 1	
1 1 . パラオキシ安息香酸メチル	0 . 2	
1 2 . 1 , 3 - ブチレングリコール	8 . 5	
1 3 . 精製水にて全量を 1 0 0 とする		10
[製造方法] 成分 2 ~ 9 を加熱溶解して混合し、7 0 に保ち油相とする。成分 1 及び 1 1 ~ 1 3 を加熱溶解して混合し、7 5 に保ち水相とする。油相に水相を加えて乳化して、かき混ぜながら冷却し、4 5 で成分 1 0 を加え、さらに 3 0 まで冷却して製品とする。		
【 0 0 3 4 】		
(比較処方例 2) 従来のクリーム		
処方例 2 において、ルリジサの 5 0 % エタノール抽出物を精製水に置き換えたものを、従来のクリームとした。		
【 0 0 3 5 】		
(処方例 3) 乳液		20
処方	含有量 (部)	
1 . ルリジサのエタノール抽出物 (製造例 3)	0 . 0 1	
2 . スクワラン	5 . 0	
3 . オリーブ油	5 . 0	
4 . ホホバ油	5 . 0	
5 . セタノール	1 . 5	
6 . モノステアリン酸グリセリン	2 . 0	
7 . ポリオキシエチレンセチルエーテル (2 0 E . O .)	3 . 0	
8 . ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート (2 0 E . O .)	2 . 0	
9 . 香料	0 . 1	30
1 0 . プロピレングリコール	1 . 0	
1 1 . グリセリン	2 . 0	
1 2 . パラオキシ安息香酸メチル	0 . 2	
1 3 . 精製水にて全量を 1 0 0 とする		
[製造方法] 成分 1 ~ 8 を加熱溶解して混合し、7 0 に保ち油相とする。成分 1 0 ~ 1 3 を加熱溶解して混合し、7 5 に保ち水相とする。油相に水相を加えて乳化して、かき混ぜながら冷却し、4 5 で成分 9 を加え、さらに 3 0 まで冷却して製品とする。		
【 0 0 3 6 】		
(処方例 4) ゲル剤		40
処方	含有量 (部)	
1 . ルリジサの 1 , 3 - ブチレングリコール抽出物 (製造例 4)	1 . 0	
2 . エタノール	5 . 0	
3 . パラオキシ安息香酸メチル	0 . 1	
4 . ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 (6 0 E . O .)	0 . 1	
5 . 香料	適量	
6 . 1 , 3 - ブチレングリコール	5 . 0	
7 . グリセリン	5 . 0	
8 . キサンタンガム	0 . 1	
9 . カルボキシビニルポリマー	0 . 2	
1 0 . 水酸化カリウム	0 . 2	50

11. 精製水にて全量を100とする

[製造方法] 成分2~5と、成分1及び6~11をそれぞれ均一に溶解し、両者を混合して製品とする。

【0037】

(処方例5) パック

処方	含有量(部)	
1. ルリジサの熱水抽出物(製造例1)	1.0	
2. ルリジサの1,3-ブチレングリコール抽出物(製造例4)	5.0	
3. ポリビニルアルコール	12.0	
4. エタノール	5.0	10
5. 1,3-ブチレングリコール	8.0	
6. パラオキシ安息香酸メチル	0.2	
7. ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油(20E.O.)	0.5	
8. クエン酸	0.1	
9. クエン酸ナトリウム	0.3	
10. 香料	適量	

11. 精製水にて全量を100とする

[製造方法] 成分1~11を均一に溶解し製品とする。

【0038】

(処方例6) ファンデーション

処方	含有量(部)	
1. ルリジサの50%エタノール抽出物(製造例2)	1.0	
2. ステアリン酸	2.4	
3. ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート(20E.O.)	1.0	
4. ポリオキシエチレンセチルエーテル(20E.O.)	2.0	
5. セタノール	1.0	
6. 液状ラノリン	2.0	
7. 流動パラフィン	3.0	
8. ミリスチン酸イソプロピル	6.5	
9. カルボキシメチルセルロースナトリウム	0.1	30
10. ベントナイト	0.5	
11. プロピレングリコール	4.0	
12. トリエタノールアミン	1.1	
13. パラオキシ安息香酸メチル	0.2	
14. 二酸化チタン	8.0	
15. タルク	4.0	
16. ベンガラ	1.0	
17. 黄酸化鉄	2.0	
18. 香料	適量	

19. 精製水にて全量を100とする

[製造方法] 成分2~8を加熱溶解し、80 に保ち油相とする。成分19に成分9をよく膨潤させ、続いて、成分1及び10~13を加えて均一に混合する。これに粉碎機で粉碎混合した成分14~17を加え、ホモキサーで攪拌し75 に保ち水相とする。油相に水相をかき混ぜながら加え、乳化する。その後、冷却し、45 で成分18を加え、かき混ぜながら30 まで冷却して製品とする。

【0039】

(処方例7) 浴用剤

処方	含有量(部)	
1. ルリジサのエタノール抽出物(製造例3)	1.0	
2. 炭酸水素ナトリウム	50.0	50

3. 黄色 202 号 (1)	適量	
4. 香料	適量	
5. 硫酸ナトリウムにて全量を 100 とする		
[製造方法] 成分 1 ~ 5 を均一に混合し製品とする。		
【 0040 】		
(処方例 8) 軟膏		
処方	含有量 (部)	
1. ルリジサの熱水抽出物 (製造例 1)	5.0	
2. ルリジサの 1, 3 - ブチレングリコール抽出物 (製造例 4)	1.0	
3. ポリオキシエチレンセチルエーテル (30E.O.)	2.0	10
4. モノステアリン酸グリセリン	10.0	
5. 流動パラフィン	5.0	
6. セタノール	6.0	
7. パラオキシ安息香酸メチル	0.1	
8. プロピレングリコール	10.0	
9. 精製水にて全量を 100 とする		
[製造方法] 成分 3 ~ 6 を加熱溶解して混合し、70 に保ち油相とする。成分 1、2 及び 7 ~ 9 を加熱溶解して混合し、75 に保ち水相とする。油相に水相を加えて乳化して、かき混ぜながら 30 まで冷却して製品とする。		
【 0041 】		
(処方例 9) 散剤		
処方	含有量 (部)	
1. ルリジサの熱水抽出物 (製造例 1)	1.0	
2. 乾燥コーンスターチ	39.0	
3. 微結晶セルロース	60.0	
[製造方法] 成分 1 ~ 3 を混合し、散剤とする。		
【 0042 】		
(処方例 10) 錠剤		
処方	含有量 (部)	
1. ルリジサのエタノール抽出物 (製造例 3)	5.0	30
2. 乾燥コーンスターチ	25.0	
3. カルボキシメチルセルロースカルシウム	20.0	
4. 微結晶セルロース	40.0	
5. ポリビニルピロリドン	7.0	
6. タルク	3.0	
[製造方法] 成分 1 ~ 4 を混合し、次いで成分 5 の水溶液を結合剤として加えて顆粒成型する。成型した顆粒に成分 6 を加えて打錠する。1錠 0.52g とする。		
【 0043 】		
(処方例 11) 錠菓		
処方	含有量 (部)	40
1. ルリジサのエタノール抽出物 (製造例 3)	2.0	
2. 乾燥コーンスターチ	49.8	
3. エリスリトール	40.0	
4. クエン酸	5.0	
5. ショ糖脂肪酸エステル	3.0	
6. 香料	0.1	
7. 精製水にて全量を 100 とする		
[製造方法] 成分 1 ~ 4 及び 7 を混合し、顆粒成型する。成型した顆粒に成分 5 及び 6 を加えて打錠する。1粒 1.0g とする。		
【 0044 】		

(処方例 12) 飲料

処方	含有量(部)
1. ルリジサの熱水抽出物(製造例1)	0.05
2. ステビア	0.05
3. リンゴ酸	5.0
4. 香料	0.1
5. 精製水にて全量を100とする	

[製造方法] 成分2及び3を少量の水に溶解する。次いで、成分1、4及び5を加えて混合する。

【0045】

次に、本発明の効果を詳細に説明するため、実験例を挙げる。

【実施例3】

【0046】

実験例1 I型コラーゲン(COL1A1)及びMMP-1 mRNA発現量の測定

ヒト線維芽細胞NB1RGBを60mm dishに 1×10^5 個播種し、コンフルエントになった時点で、終濃度が1、もしくは $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ になるように試料を添加した。コントロールには、試料を希釈した溶媒を添加した。24時間培養後、総RNAの抽出を行った。細胞からの総RNAの抽出はRNAiso Plus(タカラバイオ)を用いて行い、総RNA量は分光光度計(NanoDrop)を用いて260nmにおける吸光度により求めた。mRNA発現量の測定は、細胞から抽出した総RNAを基にしてリアルタイムRT-PCR法により行った。リアルタイムRT-PCR法には、High Capacity RNA-to-cDNA Kit(アプライドバイオシステムズ)及びSYBR Select Master Mix(ライフテクノロジーズ)を用いた。すなわち、500ngの総RNAを逆転写反応後、PCR反応(95:15秒間、60:60秒間、40cycles)を行った。その他の操作は定められた方法に従い、COL1A1及びMMP-1 mRNAの発現量を、内部標準であるactin mRNAの発現量に対する割合として求めた。COL1A1発現率は、コントロールのCOL1A1 mRNAの発現量に対する試料添加群のCOL1A1 mRNAの発現量の比率として算出した。MMP-1発現率についても、同様に算出した。尚、各遺伝子の発現量の測定に使用したプライマーは次の通りである。

【0047】

COL1A1用のプライマーセット

AGGACAAGAGGCATGTCCTGGTT(配列番号1)

TTGCAGTGGTAGGTGATGTTCTG(配列番号2)

MMP-1用のプライマーセット

GGGAGATCATCGGGACAACCTC(配列番号3)

TGAGCATCCCTCCAATACC(配列番号4)

- Actin用のプライマーセット

CACTCTTCCAGCCTTCCTTCC(配列番号5)

GTGTTGGCGTACAGGTCTTTG(配列番号6)

【0048】

これらの実験結果を表1~2に示した。その結果、本発明のルリジサの抽出物には、優れたCOL1A1発現促進効果(コラーゲン産生促進効果)及びMMP-1発現抑制効果(MMP阻害効果)が認められた。特に、ルリジサの50%エタノール抽出物(製造例2)及びエタノール抽出物(製造例3)のCOL1A1発現促進やMMP-1発現抑制において顕著に効果が高かった。

【0049】

10

20

30

40

【表 1】

試料	試験終濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	COL1A1発現率 (%)
ルリジサの熱水抽出物 (製造例1)	1	118.0
	10	118.0
ルリジサの50%エタノール抽出物 (製造例2)	1	127.0
	10	150.0
ルリジサのエタノール抽出物 (製造例3)	1	115.0
	10	142.0

10

【0050】

【表 2】

試料	試験終濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MMP-1発現率 (%)
ルリジサの熱水抽出物 (製造例1)	1	92.0
	10	89.0
ルリジサの50%エタノール抽出物 (製造例2)	1	81.0
	10	50.0
ルリジサのエタノール抽出物 (製造例3)	1	94.0
	10	50.0

20

【0051】

実験例2 B16マウスメラノーマを用いたメラニン生成抑制試験

対数増殖期にあるB16マウスメラノーマを60mm dishに 3×10^4 個の細胞を播種し、各試料(終濃度 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$)及び10%FBSを含むEagle's MEM培地を加え、37、5%CO₂条件下にて5日間培養した。培養終了後に細胞をdishから剥離し、細胞を超音波破碎した後、4N NaOHを加え60で2時間の処理を行い、分光光度計で475nmの吸光度を測定した。尚、超音波処理後の細胞破碎液をLowryの方法(J. Biol. Chem., 193, 265-275, 1951)でタンパク定量し、タンパク量当りのメラニン量を比較することによって、メラニン生成抑制作用の指標とした。

30

【0052】

これらの試験結果を表3に示した。本発明のルリジサの熱水抽出物(製造例1)、50%エタノール抽出物(製造例2)及びエタノール抽出物(製造例3)は、優れたメラニン生成抑制作用を有していることが認められた。

【0053】

【表 3】

試料	メラニン生成抑制率 (%)
ルリジサの熱水抽出物 (製造例1)	15.1
ルリジサの50%エタノール抽出物 (製造例2)	16.6
ルリジサのエタノール抽出物 (製造例3)	17.3

40

【0054】

実験例3 細胞増殖促進試験

HacAT細胞を、0.1%FBSを含むDMEM培養液にて、96wellプレートに1wellあたり 5×10^3 個播種し、各試料を添加した後、37、5%CO₂条件下にて4日間培養した。細胞数の測定は、染色法により行った。すなわち、培養終了後、培養液を除き、メタノールを用いて細胞を固定した。続いて、0.1%メチレンブルーを

50

加え、1時間細胞の染色を行った。乾燥させた後、0.1N HClを各wellに100 μ Lずつ加えてよく攪拌させ、マイクロプレートリーダーを用いて650nmにおける吸光度を測定した。

【0055】

これらの実験結果を表4に示した。その結果、本発明のルリジサの熱水抽出物（製造例1）、50%エタノール抽出物（製造例2）及びエタノール抽出物（製造例3）は、優れた細胞増殖促進作用を示した。

【表4】

試料	試験終濃度 (μ g/mL)	細胞増殖率 (%)
ルリジサの熱水抽出物 (製造例1)	0.01	108.7
	0.1	109.9
ルリジサの50%エタノール抽出物 (製造例2)	0.01	126.8
	0.1	123.0
	1	122.2
ルリジサのエタノール抽出物 (製造例3)	0.01	130.3
	0.1	123.6
	1	148.7
	10	128.3

10

20

【0056】

実験例4 活性酸素消去作用

フリーラジカル捕捉除去作用の評価を行った。陽性対照としてはアスコルビン酸を用いた。フリーラジカルのモデルとしては、安定なフリーラジカルである、 α -ジフェニル- β -ピクリルヒドラジル（以下DPPHとする）を用い、試料と一定の割合で一定時間反応させ、減少するラジカルの量を波長517nmの吸光度の減少量から測定した。

【0057】

フリーラジカル捕捉除去作用の測定方法

各試料を、終濃度50 μ g/mL（アスコルビン酸は20 μ g/mL）となるように加えた1.0M酢酸緩衝液（pH5.5）2mLに無水エタノール2mL及び0.5mM DP PH無水エタノール溶液1mLを加えて反応液とした。また、油溶性の試料の場合は無水エタノール2mLに試料を加えて反応液とした。その後、37 $^{\circ}$ Cで30分間反応させ、水を対照として波長517nmの吸光度（A）を測定した。また、ブランクとして試料の代わりに精製水を用いて吸光度（B）を測定した。フリーラジカル捕捉除去率は、以下に示す式より算出した。

$$\text{フリーラジカル捕捉除去率 (\%)} = (1 - A / B) \times 100$$

【0058】

これらの試験結果を表5に示した。本発明のルリジサの熱水抽出物（製造例1）、50%エタノール抽出物（製造例2）及びエタノール抽出物（製造例3）は、安定で優れたフリーラジカル捕捉除去作用を有していることが認められた。

30

40

【表5】

試料	フリーラジカル捕捉除去率 (%)
ルリジサの熱水抽出物 (製造例1)	82.2
ルリジサの50%エタノール抽出物 (製造例2)	83.1
ルリジサのエタノール抽出物 (製造例3)	31.0
アスコルビン酸 (陽性対照)	85.3

【0059】

50

実験例 5 使用試験

処方例 1 の化粧水及び比較処方例 1 の従来化粧水を用いて、シワ、たるみがある 5 人（27～65 才）を対象に 1 ヶ月間の使用試験を行った。使用后、シワ、たるみの程度をアンケートにより判定した。

【0060】

その結果、本発明の抽出物を含有する皮膚外用剤により、シワ、たるみが軽減した。尚、試験期間中、皮膚トラブルは一人もなく、安全性においても問題なかった。また、処方成分の劣化についても問題なかった。

【産業上の利用可能性】**【0061】**

以上のことから、本発明のルリジサの抽出物は、優れたコラーゲン産生促進作用、MM P 阻害作用、メラニン生成抑制作用、細胞増殖促進作用及び抗酸化作用を有し、安定性にも優れていた。よって、本発明のルリジサの抽出物は、皮膚の老化といった美容分野だけでなく、老化による機能低下の抑制、ガンの予防、治療等といった医療分野にも利用でき、食品、化粧品、医薬部外品及び医薬品等への応用が期待される。

【配列表】

2020002053000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P 39/06 (2006.01)	A 6 1 P	39/06	4 C 0 8 3
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 7 4 C 0 8 8
A 2 3 L 33/105 (2016.01)	A 2 3 L	33/105	
C 1 2 N 1/00 (2006.01)	C 1 2 N	1/00	Z N A G
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N	5/071	
C 1 2 N 9/80 (2006.01)	C 1 2 N	9/80	Z
C 1 2 N 9/99 (2006.01)	C 1 2 N	9/99	
A 2 3 G 3/34 (2006.01)	A 2 3 G	3/34	1 0 2
A 2 3 L 2/52 (2006.01)	A 2 3 L	2/00	F
	A 2 3 L	2/52	

F ターム (参考) 4B018 LB01 LB08 LB10 MD61 ME06 ME14 MF01
 4B050 DD11 KK20 LL01 LL02 LL10
 4B065 AA93X AC20 BB40 CA41 CA44 CA46
 4B117 LC04 LG18 LK08 LL02
 4C083 AA082 AA111 AA112 AB032 AB232 AB242 AB312 AB352 AB432 AB442
 AC022 AC072 AC102 AC122 AC182 AC242 AC302 AC352 AC422 AC432
 AC442 AC482 AC542 AC842 AD092 AD272 AD352 AD512 CC04 CC05
 CC07 CC12 CC25 DD41 EE12 EE13 EE16
 4C088 AB12 AC01 AC03 AC04 AC05 AC11 BA08 CA03 MA52 MA63
 NA14 ZA89 ZB22 ZC21