

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5970184号
(P5970184)

(45) 発行日 平成28年8月17日 (2016. 8. 17)

(24) 登録日 平成28年7月15日 (2016. 7. 15)

(51) Int. Cl.		F I			
GO 1 N 33/50	(2006. 01)	GO 1 N	33/50	Z	
GO 1 N 33/15	(2006. 01)	GO 1 N	33/50	Q	
A 6 1 K 8/34	(2006. 01)	GO 1 N	33/15	Z	
A 6 1 Q 1/00	(2006. 01)	A 6 1 K	8/34		
		A 6 1 Q	1/00		

請求項の数 8 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2011-283045 (P2011-283045)	(73) 特許権者	000001959
(22) 出願日	平成23年12月26日 (2011. 12. 26)		株式会社 資生堂
(65) 公開番号	特開2013-134087 (P2013-134087A)		東京都中央区銀座7丁目5番5号
(43) 公開日	平成25年7月8日 (2013. 7. 8)	(74) 代理人	100099759
審査請求日	平成26年12月1日 (2014. 12. 1)		弁理士 青木 篤
		(74) 代理人	100077517
			弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100087871
			弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次
		(74) 代理人	100117019
			弁理士 渡辺 陽一
		(74) 代理人	100150810
			弁理士 武居 良太郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】化粧料の評価方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

角層を化粧料で湿潤した後乾燥させる過程における角層の厚さ変化を指標とした化粧料の評価方法。

【請求項 2】

角層を化粧料で湿潤した後乾燥させる過程における角層の厚さ変化が、角層の厚さ変化率を指標とした化粧料の評価方法であって、以下の工程：

化粧料塗布前の皮膚角層、単離角層、及び培養角層シートからなる群から選ばれる角層の細胞又は細胞層の厚さ(A)を計測する工程；

湿潤状態において細胞又は細胞層の厚さ(B)を計測する工程；

乾燥状態において細胞又は細胞層の厚さ(C)を計測する工程；

角層を湿潤した後乾燥させる過程における角層の厚さ変化率を式1により算出する工程；

$$\text{式 1) 角層の厚さ変化率} = (B - A) \times 100 / A - (C - B) \times 100 / C$$

を含んでなる、請求項1に記載の評価方法。

【請求項 3】

角層の厚さ変化率が、20%～150%の場合に、化粧料が皮膚改善効果を有すると判定する工程をさらに含む、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項 4】

角層の厚さ変化率が、25%～100%の場合に、化粧料が皮膚改善効果を有すると判

定する工程をさらに含む、請求項 1 から 3 のいずれか一つに記載の方法。

【請求項 5】

前記皮膚改善効果が、角層改善効果である、請求項 3 又は 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記角層改善効果が、角層透明度改善効果である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

環境に応じた適切な化粧品を評価する方法であって、
皮膚角層、単離角層、及び培養角層シートからなる群から選ばれる角層に対して化粧料を塗布する工程；

所望の温度及び所望の湿度において当該化粧料を乾燥させる工程

10

上記乾燥工程において、水分量（％）と、角層透過率（％）を測定し、プロット図を作成して近似曲線を取得する工程；

水を角層に塗布し、上記所望の温度と湿度 30％以上 90％未満の条件下において乾燥させる工程において得られた近似曲線（1）と、上記所望の温度と湿度 90％の条件下において乾燥させる工程において得られた近似曲線（2）との間の範囲に、上記工程で得られた近似曲線が含まれるか否かを判定する工程；並びに

上記範囲に、近似曲線が含まれた場合に、当該化粧料が、上記環境において適していると評価する工程

を含む、前記評価方法。

【請求項 8】

20

環境に応じた適切な化粧品を評価する方法であって、
皮膚角層、単離角層、及び培養角層シートからなる群から選ばれる角層に対して化粧料を塗布する工程；

所望の温度及び所望の湿度において当該化粧料を乾燥させる工程；

乾燥後の角層透過率を測定する工程；及び

当該角層透過率が 85％～100％である場合に、当該化粧料が、上記環境において適していると評価する工程

を含む、前記評価方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

本発明は、化粧料の評価方法に関する。好ましくは、本発明は、化粧料の皮膚改善効果、より好ましくは角層改善効果について評価する方法に関する。さらに本発明は、環境に応じた適切な化粧料の評価方法にも関する。

【背景技術】

【0002】

肌荒れは、湿度の低い冬期に良く発生するが、湿度の高い夏期にはあまり起こらず、健康な肌を保つために、保湿が必要であることは経験上知られていることである。一方で、透明度を有し、肌理の整った肌が美しい肌とされており、角層の透明度の評価方法や、角層透明度を高める薬剤の評価方法について研究がされており（特許文献 1 及び 2）、角層の透明度が角層細胞間脂質の構造と関連していることが示されている（特許文献 3）。健康で潤いを有する肌を保つために保湿が必要であること、及び透明度が美しい肌に必要であることが知られているが、角層の水分含量と皮膚の透明度や健康状態との関係については十分な研究がなされておらず、十分な知見が得られていなかった。

40

【0003】

一方で、角層細胞の完成度や皮膚状態を鑑別するために、角層細胞の面積と厚さを計測し、扁平指数を算出する方法が見いだされている（特許文献 4）。しかしながら、当該文献は、平常状態（非湿潤状態）における角層細胞の面積と厚さを計測しているに過ぎず、化粧水などで膨潤された状態の細胞の面積などを計測することは行われていなかった。

【先行技術文献】

50

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特開2005-249672

【特許文献2】特開2010-172200

【特許文献3】特開2010-175264

【特許文献4】特開2004-105700

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】日本化粧品学会誌Vol.31, No.1, pp.19-24 (2007)

【発明の概要】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

角層の水分含量と、美しく健康な肌との間の関係を明らかにし、その知見に基づき、美しく健康な肌を与えるような化粧料の開発を可能にする化粧料の評価方法が必要とされている。また、化粧料を販売する地域に合わせて、配合を変更することが行われており、販売地域の環境に対して適切な配合を含む化粧料を評価する方法が必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らが、角層の水分量と、美しく健康な肌との関係について、鋭意研究を行ったところ、水で湿潤された角層は不透明であり、乾燥するにつれて透明度が高くなる（図1）一方で、水で湿潤された角層は角層の皮膚バリア機能が低く、乾燥するにつれて皮膚バリア機能が高くなることが示された（図2）。角層の透明度及び皮膚バリア機能は、それぞれ、美しい肌及び肌の健康に寄与することから、これらの実験結果は、美しく健康な肌には、湿潤状態よりは、乾燥状態が必要であるという知見を得た。従来、美しく健康な肌には、保湿が重要であり、乾燥状態は避けるべきと考えられていたため、この知見は驚くべきものである。

20

【0008】

透明度と皮膚バリア機能とが角層水分量が減少するにつれ増加する原因について、調査を行ったところ、角層水分量の減少とともに角層のケラチン構造が秩序よく構造化していることその他、セラミド、コレステロール類、脂肪酸などから構成される細胞間脂質が秩序良く構造化してラメラ構造が安定化し、バリア機能を与えることが示された（図3）。

30

【0009】

次に本発明者らは、湿潤状態の角層を凍結乾燥することによりケラチン構造及びラメラ構造が崩れて透明度や皮膚バリア機能が悪くなった角層を、水で膨潤させて、次に通常の乾燥工程を経ることにより、透明度及び皮膚バリア機能が回復することを見出した（図4及び5）。これは、角層を水で膨潤させることにより、ケラチン構造及びラメラ構造を一度不安定化させ、乾燥工程においてケラチン構造及びラメラ構造が秩序良く再構成されるためと考えられる。

【0010】

これらの知見に基づき、本発明者らは、美しく健康な肌を得るためのスキンケアプロセスには、従来行われていたように単に保湿を行うものではなく、角層を湿潤状態におき、十分に膨潤させてケラチン構造及びラメラ構造を不安定化した上で、乾燥させてケラチン構造及びラメラ構造を再構成することが重要であるという結論に至り、化粧料がそのような作用を有するか否かを評価する方法を発明するに至った。

40

【0011】

より具体的に、本発明者らは、角層を湿潤させた後乾燥させる過程において、角層の透明度を改善する作用を有する液体が用いられた場合、角層細胞の面積の変化は少ないものの、細胞の厚さが変化し、角層の厚さの変化率が増加する一方、角層の透明度を改善しない液体が用いられた場合、角層細胞の厚さ及び面積はほとんど変化がないことを見出した（図6及び7）。ここで、角層の厚さ変化率とは、湿潤前の角層の厚さをA、湿潤後の角

50

層の厚さを B、乾燥後の角層の厚さを C とした場合、以下の式：

$$\text{角層の厚さ変化率 (\%)} = (B - A) \times 100 / A - (C - B) \times 100 / C$$

で表される指標である。この知見に基づき、本発明者らは、湿潤状態及びそれを乾燥させた際における皮膚角層、単離角層、及び培養角層シートからなる群から選ばれる角層の厚さを指標とすることで、塗布された化粧料の肌改善性を評価する方法に係る発明を完成させた。具体的に、本発明は、以下の発明に関する：

(1) 角層を湿潤した後乾燥させる過程における角層の厚さ変化を指標とした化粧料の評価方法

(2) 角層を湿潤した後乾燥させる過程における角層の厚さ変化が、角層の厚さ変化率を指標とした化粧料の評価方法であって、以下の工程：

化粧料塗布前の皮膚角層、単離角層、及び培養角層シートからなる群から選ばれる角層の細胞又は細胞層の厚さ (A) を計測する工程；

湿潤状態において細胞又は細胞層の厚さ (B) を計測する工程；

乾燥状態において細胞又は細胞層の厚さ (C) を計測する工程；

角層を湿潤した後乾燥させる過程における角層の厚さ変化率を下記式 1 により算出する工程；

$$\text{式 1) 角層の厚さ変化率 (\%)} = (B - A) \times 100 / A - (C - B) \times 100 / C$$

を含んでなる、項目 (1) 記載の評価方法。

(3) 角層の厚さ変化率が、20% ~ 150% の場合に、化粧料が皮膚改善効果を有すると判定する工程をさらに含む、項目 (1) 又は (2) に記載の方法。

(4) 角層の厚さ変化率が、25% ~ 100% の場合に、化粧料が皮膚改善効果を有すると判定する工程をさらに含む、項目 (1) から (3) のいずれか一つに記載の方法。

(5) 前記皮膚改善効果が、角層改善効果である、項目 (1) から (4) のいずれか一つに記載の方法。

(6) 前記角層改善効果が、角層透明度改善効果である、項目 (5) に記載の方法。

【0012】

本発明者らは、さらに乾燥工程について鋭意研究を行った結果、乾燥工程において湿度を変更することにより、角層透明度及び皮膚バリア機能が変化することを見出した (図 8 及び図 9)。具体的に水で膨潤させた角層を高湿度下で乾燥させた場合に、低湿度下で乾燥させた場合に比べて、角層透明度及び皮膚バリア機能の両方の点で優れていることを見出した。これは、高湿度下では、水の蒸発がゆっくり行われるため、ケラチン構造及びラメラ構造が秩序だてて再構成されるためと考えられる。したがって、化粧水に含まれる成分を調整して乾燥工程の速度を制御することにより、化粧料が、使用地域の環境、例えば気候 (つまり、販売地域の標準温度及び標準湿度) に適しているかを評価することが可能になる。

したがって、本願発明者らは、以下の発明を発明した。

(6) 環境に応じた適切な化粧料を評価する方法であって、

皮膚角層、単離角層、及び培養角層シート (メラニンを含まない) からなる群から選ばれる角層に対して化粧料を塗布する工程；

所望の湿度及び温度において当該化粧料を乾燥させる工程

上記乾燥工程において、水分量 (%) と、角層透過率 (%) を測定し、プロット図を作成して近似曲線を取得する工程；

水を角層に塗布し、上記所望の温度と湿度 30% 以上 90% 未満の条件下において乾燥させる工程において得られた近似曲線 (1) と、上記所望の温度と湿度 90% の条件下において乾燥させる工程において得られた近似曲線 (2) との間の範囲に、上記工程で得られた近似曲線が含まれるか否かを判定する工程；並びに

上記範囲に、近似曲線が含まれた場合に、当該化粧料が、上記環境において適していると評価する工程

を含む、前記評価方法。

(7) 前記近似曲線 (1) を得る際の条件の湿度の下限値が、60%、70% 及び 80%

10

20

30

40

50

からなる群から選択される、項目(6)に記載の評価方法。

(8)環境に応じた適切な化粧品を評価する方法であって、
皮膚角層、単離角層、及び培養角層シート(メラニンを含まない)からなる群から選ば
れる角層に対して化粧料を塗布する工程；
所望の温度及び所望の湿度において当該化粧料を乾燥させる工程
乾燥後の角層透過率を測定する工程；及び
当該角層透過率が85%~100%である場合に、当該化粧料が、上記環境において適
していると評価する工程
を含む、前記評価方法。

【発明の効果】

10

【0013】

本発明者らは、湿潤・乾燥過程における角層の厚さの変化が、湿潤・乾燥過程の後の角
層透明度に関連していることを見出した。したがって、本発明によれば、湿潤・乾燥過程
における角層の厚さを指標とすることにより、使用した液体が皮膚改善効果の点で有効か
否かを判定することが可能となり、製品開発の際の一次スクリーニングとして有用である
。また、本発明の別の態様によれば、化粧料が環境に応じて適切か否かを判定すること
になり、製品開発を容易にすることができる。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】図1は、角層水分量と角層全透過率との関係を示す図である。

20

【図2】図2は、角層水分量と水分蒸散量との関係を示す図であり、角層水分量が低下す
るにつれ角層の皮膚バリア機能が増加することを示す。

【図3】図3は、角層水分量と脂質秩序度との関係を示す図である。

【図4】図4は、凍結乾燥により荒れた状態の角層が、水に再浸潤することにより、角層
透明度が改善されることを示す図である。

【図5】図5は、凍結乾燥により荒れた状態の角層が、水に再浸潤することにより、皮膚
バリア機能が改善されることを示す図である。

【図6】図6は、角層シートを液体に浸潤させた際の角層シートの厚さの変化を示す図で
ある。10%グリセリン水溶液及び流動パラフィン+グリセリン+増粘剤水溶液を浸潤させ
た場合では厚さが増加し、乾燥後減少するものの、100%エタノールを浸潤させた場
合では厚さは変化しなかった。

30

【図7】図7は、凍結乾燥させた角層シートに対して液体を浸潤、乾燥させた際の、透明
度及び角層透過率効果を示す図である。10%グリセリン水溶液及び流動パラフィン+グ
リセリン+増粘剤水溶液で浸潤させた場合は、透明度が高く、角層透過率も高かったが
、100%エタノールで浸潤させた場合は透明度が低く、角層透過率も低かった。

【図8】図8は、湿度30%、湿度60%、及び湿度90%の条件下で、乾燥を行った際
の、水分量と角層全透過率との関係を示す図である。

【図9】図9は、湿度30%、湿度60%、及び湿度90%の条件下で、乾燥を行った際
の、皮膚バリア機能を示す図である。

【発明を実施するための形態】

40

【0015】

第一の態様として、本発明は、湿潤して乾燥させる過程における角層の厚さ変化率を指標
とした化粧料の評価方法を提供する。本評価方法により、化粧料の角層透明度改善効果、
角層改善効果、ひいては皮膚改善効果、美肌効果について、化粧料が評価され、これらの
効果について有用な化粧料をスクリーニングすることが可能となる。

【0016】

本発明において湿潤状態とは、化粧料を塗布して角層を十分に湿らせ、化粧料を角層に
十分に浸透させた平衡状態のことをいう。化粧料の種類に応じて湿潤状態に至る時間は異
なり、一概に湿潤状態になるまでにかかる時間について定義をすることはできないが、化
粧料を塗布後、少なくとも1分、好ましくは少なくとも5分、より好ましくは少なくとも

50

10分、さらに好ましくは30分以上化粧料が乾燥しないように維持した場合に湿潤状態にあるといえる。平衡状態にあればよいため、化粧料の塗布時間が上記時間より長くなることは、通常問題となることはない。

【0017】

本発明において角層の厚さ変化率とは、化粧料を塗布して乾燥させる過程において、皮膚角層、単離角層、及び培養角層シートからなる群から選ばれる角層の細胞又は細胞層の厚さをA、化粧料を塗布後の湿潤状態における当該角層の細胞又は細胞層の厚さをB、乾燥後における当該角層の細胞又は細胞層の厚さをCとした場合、下記式1)：

$$\text{式1) 角層の厚さ変化率(\%)} = (B - A) \times 100 / A - (C - B) \times 100 / C$$

により定義される。したがって、本発明の化粧料の評価方法は、好ましくは以下の工程：

化粧料塗布前の皮膚角層、単離角層、及び培養角層シートからなる群から選ばれる角層の細胞又は細胞層の厚さ(A)を計測する工程；

湿潤状態において細胞又は細胞層の厚さ(B)を計測する工程；

乾燥状態において細胞又は細胞層の厚さ(C)を計測する工程；

角層を湿潤した後乾燥させる過程における角層の厚さ変化率を式1により算出する工程；

を含む。本発明において、角層の厚さ変化率が20%を超える場合に皮膚改善効果が得られる。より好ましくは、角層の厚さ変化率の範囲の下限値は、20%、25%、30%及び40%からなる群から選ばれ、上限値は、特に限定されないが、膨潤限界の観点から、100%、120%、150%、及び200%からなる群から選ばれる場合に皮膚改善効果が得られる。

【0018】

本発明において、角層とは、皮膚角層、単離角層、や培養角層シートといった、生体の角層自体や、生体の皮膚から調製したもの、さらには細胞培養により得られたものすべてを意味する。

【0019】

皮膚角層とは、特にヒトの皮膚における角層をいい、本発明で皮膚角層を用いる場合、生体の皮膚の角層に直接化粧料が塗布されるin vivo方法である。皮膚の場所としては、身体の部位または領域のいずれであってもよく、顔面の頬、額、手甲および体幹などを挙げることができる。

【0020】

単離角層とは、所謂、外科的手段等の侵襲的な方法により取得されたものであってもよいが、化粧料の評価を目的とする場合には、簡易さや倫理の問題を理由に、非侵襲的な方法により皮膚から取得されるものが好ましい。非侵襲的な方法としては、当該技術分野で常用されているテープstrippingやスクラブ法等を挙げることができる(非特許文献1)。テープstrippingは、皮膚表層に粘着テープ片又はポストイット(住友3M製)を貼付、剥がすことで、皮膚の角層をその粘着テープにそのまま剥離することができるため、本発明において特に好ましい。

【0021】

テープstrippingの好ましい方法は、まず皮膚の表層を、適当なサイズ(例えば5×5cm)に切った粘着テープ片又はポストイットを皮膚表面の上に軽く載せ、テープ全体に均等な力を加えて平たく押さえ付け、その後均等な力で粘着テープを剥ぎ取ることで行われる。粘着テープは市販のセロファンテープなどであってよく、例えばScotch Superstrength Mailing Tape(3M社製)等が使用できる。また、ポストイットとしては住友3M社製 ポストイットカバーアップテープ等が使用できる。

【0022】

培養角層シートとは、in vitro培養により得られた角層のシートをいい、ヒト又は実験動物の皮膚から採取した皮膚組織を培養して維持したものから単離された角層シートや、線維芽細胞、又は幹細胞(例えば上皮幹細胞、胚性幹細胞、誘導多能性幹細胞)からin vitroで分化された線維芽細胞を、コラーゲン、フィブリン、ポリ乳酸などのポリマーや、

キチン、キトサン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸などの多糖類により構成された培養支持体上で培養して得られた三次元培養皮膚から得られた角層シートが含まれる。角層シートは、培養下で維持された皮膚組織から、カルシウムイオン及びマグネシウムイオン濃度を制御した生理食塩水中でタンパク質分解酵素によって処理する等の手法を用いて単離される。三次元培養皮膚として、LabCyte EPI-MODEL（株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング）から商業的に入手可能なヒト3次元培養表皮モデル製品が用いられる。

【0023】

本発明の別の態様では、本発明は、角層の厚さ変化率を指標として、化粧料の使用を評価する方法にも関する。具体的には、化粧料の使用方法を評価する方法は、以下の工程：

化粧料塗布前の皮膚角層、単離角層、及び培養角層シートからなる群から選ばれる角層の細胞又は細胞層の厚さ（A）を計測する工程；

湿潤状態において細胞又は細胞層の厚さ（B）を計測する工程；

乾燥状態において細胞又は細胞層の厚さ（C）を計測する工程；

角層を湿潤した後乾燥させる過程における角層の厚さ変化率を下記式1により算出する工程；

$$\text{式1) 角層の厚さ変化率(\%)} = (B - A) \times 100 / A - (C - B) \times 100 / C$$

を含む。当該発明において、角層の厚さ変化率が20%を超える場合に、その化粧料の使用により皮膚改善効果が得られる。より好ましくは、角層の厚さ変化率が20%超、25%超、30%超、40%超、又は50%超の場合に、化粧料の使用が適切であると判定することができる。上限については特に限定されるものではないが、膨潤限界の観点から100%未満、120%未満、150%未満、及び200%未満のなかから選択されるのが好ましい。皮膚角層に化粧料を塗布する化粧料の使用方法を評価する方法は、美容室や、化粧品店の販売店、エステサロンなどで行われるものである。

【0024】

角層の厚さは、一般的に角層の細胞層の厚さを指すが、角層の厚さの変化率を測定する観点からは、角層の細胞層の厚さのみならず、角層中の1の細胞の厚さを比較することで、角層の厚さの変化率を測定することができる。角層の厚さは、従来用いられている任意の方法を用いることができ、例えば蛍光顕微鏡又は原子間力顕微鏡を用いて計測することが可能である（特許文献4及び非特許文献1）さらには、マルチフォトン走査型レーザー顕微鏡、共焦点レーザー生体顕微鏡なども用いることができる。より具体的に、単離角層の細胞の厚さを計測する場合には、蛍光顕微鏡又は原子間力顕微鏡を用いて、扁平形状の角層細胞の厚さ方向の細胞膜から細胞膜までの長さを計測することにより、単離角層の細胞の厚さを計測することができる。同様に角層細胞層の厚さは、単離角層における積層している角層細胞の最下層細胞の細胞膜から、最上層の細胞の細胞膜までの長さを計測することにより、単離角層の細胞層の厚さを計測することができる。

【0025】

本発明において化粧料とは、皮膚に塗布される化粧料をいい、例えば化粧水、乳液、美容液、クリーム、ファンデーションなどをいうが、これらに限定されず、皮膚の改善を直接の目的とするものではないが、皮膚に塗布されるもの全てを含むことを意図し、例えば、日焼け止め剤、虫除け剤、脱毛剤、育毛剤なども包含するものとする。

【0026】

なお本発明の別の態様では、環境に応じた適切な化粧料を評価する方法にも関する。具体的には、以下の：

(1) 皮膚角層、単離角層、及び培養角層シートからなる群から選ばれる角層に対して化粧料を塗布する工程；

(2) 所望の温度及び所望の湿度において当該化粧料を乾燥させる工程

(3) 上記乾燥工程において、水分量(%)と、角層透過率(%)を測定し、プロット図を作成して近似曲線を取得する工程；

(4) 水を皮膚角層、単離角層、及び培養角層シート(メラニンを含有しない)からな

10

20

30

40

50

る群から選ばれる角層に塗布し、所望の温度及び湿度30%以上90%未満、好ましくは60%以上90%未満の条件下で乾燥させる工程において得られた近似曲線と、所望の温度及び湿度90%の条件下で乾燥させる工程において得られた近似曲線との間の範囲に、上記工程で得られた近似曲線が含まれるか否かを判定する工程；及び

(5) 上記範囲に、近似曲線が含まれた場合に、当該化粧品が、上記所望の環境において適していると評価する工程

を含む、環境に応じた適切な化粧品を評価する方法に関する。

【0027】

湿度60%において乾燥させた場合と、湿度90%において乾燥させた場合とで、皮膚バリア機能においては有意差が無かったため(図9)、上記(4)及び(5)の工程の代わりに、乾燥の終点において、所望の温度及び湿度60%の条件下で乾燥させた場合の角層全透過率に相当する85%より高い角層全透過率である場合に、当該化粧品が、上記所望の環境において適していると評価する工程を含む場合にも、環境に応じた適切な化粧品を評価することができる。この場合において、角層透過率が90%より高いことが好ましい。

【0028】

化粧品が乾燥する速度は、中に含まれる各種成分の量及び濃度により変化する。化粧品に含まれる成分には、基剤として水、エタノール、グリセリン、ポリエチレングリコールなどのアルコール類が含まれ、保湿剤としてグリシン、ベタイン、ピロリドンカルボン酸Naなどのアミノ酸類、フルクトース、マルチトール、マンニトール、トレハロースなどの糖類、さらに有効成分としてヒアルロン酸、コラーゲン、セラミドなど、そして賦形剤としてクエン酸ナトリウム、クエン酸、乳酸ナトリウム、防腐剤として安息香酸塩、ソルビン酸などが含まれているが、これらに限定されるものではない。この中で、特に揮発性成分は乾燥速度を早める一方で、溶質、特に親水性の物質、例えばポリエチレングリコールなどのポリマーは、乾燥速度を遅くするため、これらの成分及びその量の選択により、配合されて得た化粧品の乾燥速度が変化する。本発明は、これらの成分を配合して得た化粧品が、販売地域の環境に適しているか否かを評価することができる。

【0029】

本発明において、販売地域の環境とは、化粧品が販売される地域における環境、例えば気候、特に温度及び湿度のことをいい、これらの環境は、販売地域の季節によっても大きく変わるものである。したがって、本発明のより好ましい実施態様では、販売地域の各季節、例えば乾期又は雨期、又は春夏秋冬などの季節に応じて化粧品が適しているかを評価することが可能になる。

【0030】

本発明において、皮膚バリア機能は、経皮水分蒸散量(TEWL)によって評価される。TEWLは、角層を介した水の蒸散量を意味し、TEWLが低いほど、角層の皮膚バリア機能は高く、TEWLが高くなるにつれ、角層の皮膚バリア機能は低くなる。皮膚バリア機能と肌荒れとの関係は、特許文献2に記載されている。

【0031】

以下、具体例を挙げて、本発明を更に具体的に説明する。なお、本発明はこれにより限定されるものではない。

【実施例】

【0032】

実施例1：角層水分量に応じた角層の透明度の評価

(角層試料の調製)

12穴プレートの3次元ヒト表皮培養モデル(LabCyte EPI-MODEL、株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング)を、0.1%トリプシン溶液/等張リン酸緩衝液中で37℃で30分間インキュベーションすることにより、直径約10mmの角層シートを調製した。該角層シートを、恒温恒湿槽MTH-2200(三洋電機株式会社)を用いて、温度34℃で乾燥させて、様々な角層水分量を有する角層シートを取得し

10

20

30

40

50

た。

【0033】

(角層水分量の測定法)

水分量に関心のある角層の湿重量をメトラーなどで測定する。この際、必要時にはイオナイザー(STABLO, Shimadzu Corp. Nagoya, Japan)にて静電気除去を行う。重量測定は1秒ごとに1分間行い、その平均値とする。次に角層の絶乾重量を測定する。すなわち、角層を120度で2時間加熱し、大方の水分を除去する。次に、湿度0%の窒素ガス流に2時間さらしながら水分吸脱着装置(IGAsorp, Hiden Isochema Ltd., WA, UK)で絶乾状態にし、そのまま湿度0%状態の角層絶乾重量を水分吸脱着装置で測定する。そして、角層水分量を以下の式に基づき計算した。

角層水分量(%) = [(角層湿重量 - 角層絶乾重量)/(角層湿重量)] x 100

【0034】

(角層全透過率の測定)

本発明の透明度測定装置は、CIE(国際照明委員会)標準光源C規格の白色光源と、角層試料の保持具と、角層試料を透過しない光の遮光体としての暗幕と、角層試料を透過した光を均一化する積分球と、積分球から導かれた光の強度を測定する測光器とを含む。角層水分量を計測された角層シートを本発明の透明度測定装置に装着し、前記光源からの白色光を照射して前記角層シートを透過した光を積分球に導いて均一化された光の強度を測定した。結果は、全透過率、すなわち、前記角層シートを透過した光の強度の測定値を、角層シートを装着しないブランク状態で前記光源からの白色光を直接積分球に導いた光の強度の測定値で除算した百分率で表した(図1)。

【0035】

実施例2：角層水分量に応じた角層の皮膚バリア機能の評価

【0036】

(角層からの水分蒸散量の測定)

フランツセル(PermeGear, Inc., 米国)に乾燥処理後の角層シートを装着した。前記角層シートに対してレシーバー側を水で満たし、ドナー側を空に保つことにより、前記角層シートの上面を気相に、下面を液相に曝して、角層シートを気液界面に配置した。角層からの水分蒸散が安定する2時間後にVapoMeter(Delphin Technologies Ltd., フィンランド)をネールモードで水分蒸散量を測定した(図2)。

【0037】

実施例3：角層水分量に応じた角層の脂質秩序度の評価

(角層試料の調製)

12穴プレートの3次元ヒト表皮培養モデル(LabCytEPI-MODEL、株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング)を、0.1%トリプシン溶液/等張リン酸緩衝液中で37°Cで30分間インキュベーションすることにより、直径約10mmの角層シートを調製した。

(5DSAとの反応)

角層シートをガラス板(8mm x 70mm x 0.5mm)に貼り付け、スピンプローブである5-doxylstearic acid(5-DSA; Aldrich社製)0.001% 50mLで処理し、37 1時間反応させた後、水洗した。

(ESR測定)

MTH-2200を用いて角層シートを湿度60%、34 でインキュベーションを行い、開始から0時間、30分、1時間、1時間半、2時間、2時間半、3時間、5時間、18時間後にそれぞれESR測定を行った。測定はXバンドESR装置(JES-REIX; 日本電子製)を用いて室温で行った。尚、データ解析は従来から用いられている幾何学法によって秩序度Sを求めた。

測定条件は、以下の通りである。マイクロ波出力：10mW、磁場変調幅：0.2mT、時定数：1秒、掃引時間：8分。

【0038】

10

20

30

40

50

実施例 1 及び実施例 2 の結果により、角層水分量が減少するにつれ、角層の透明度及び皮膚バリア機能が増加することが示される。さらに実施例 3 の結果から、角層水分量の低下とともに細胞間脂質の秩序が改善することが示される。これは、乾燥するにつれて脂質が構造化することにより、角層の安定性が増加した結果である。したがって、十分に水にぬれた状態から適切な角層水分量まで減少することが、透明度が高く（美しく）かつ皮膚バリア機能が高い（健康な）肌に必要であることが分かる。

【 0 0 3 9 】

実施例 4 : 水の浸潤が角層の透明度に及ぼす影響の評価

実施例 1 の角層透明度の測定法を用いて、以下の試料：水で湿潤させた角層シート、水で湿潤させた後に恒温槽 (MTH-2200, Sanyo Electric, Tokyo, Japan) にて 34 度、湿度 60 % 条件下で 18 時間乾燥させた角層シート、水で湿潤させた後に凍結乾燥装置 (VD - 80、TAITEC 製) で -20 度に凍結後、同装置で 2 時間凍結乾燥させた角層シート、及び水で湿潤させた後に同様の凍結乾燥を行い、続いて再度水で湿潤させた後に湿度 60 % 条件下で 18 時間乾燥させた角層シートについて角層透明度を測定した (図 4)。水での湿潤及び再度の水での再湿潤は、水中に 18 時間配置することにより行った。

【 0 0 4 0 】

実施例 5 : 水の浸潤が角層の皮膚バリア機能に及ぼす影響の評価

実施例 2 の皮膚バリア機能の測定法において、以下の試料：水で湿潤させた角層シート、水で湿潤させた後に 34 °C、湿度 60 % 条件下で 18 時間乾燥させた角層シート、水で湿潤させた後に凍結乾燥装置 (VD - 80、TAITEC 製) で -20 °C に凍結後、同じ装置で 2 時間凍結乾燥させた角層シート、及び水で湿潤させた後に同様に凍結乾燥を行い、続いて再度水で湿潤させた後に 34 °C、湿度 60 % の条件下で乾燥させた角層シートについて角層透明度を測定した。水での湿潤及び再度の水での再湿潤は、水中に 18 時間配置することにより行った。

【 0 0 4 1 】

実施例 4 及び 5 の実験から、凍結乾燥によりダメージを受けている角層が、水に再浸潤されて、乾燥されることにより、凍結乾燥の代わりに湿度 60 % で乾燥された状態と同程度にまで角層の透明度及び皮膚バリア機能のいずれの点でも回復することが示され、水が浸潤して乾燥することにより、皮膚状態が改善することが示された。

【 0 0 4 2 】

実施例 6 : 角層の厚さの変化を指標とした皮膚改善効果についての試薬の評価

J テック表皮ヒト再構成モデル (角層シート) の実験前の厚さをノギス (ミットヨノギス No. 227-201) で測定した (各 1 箇所) (A)。角層シートを、さらに 10 % グリセリン水溶液、流動パラフィン (10 %)、グリセリン (10 %)、POE (60) 硬化ヒマシ油 (10 %)、カルボキシビニルポリマー (製品名: カーボポール 981 Lubrizol Advanced Materials, Inc.) (0.2 %)、KOH (0.1 %) の水溶液 (流パラ + グリセリン + 増粘剤水溶液)、及び 100 % エタノール中にそれぞれ 30 分間浸潤させ、浸潤の終了と同時に角層シートの厚さをノギスで同様に測定した (B)。

さらに 34 °C、60 % の条件下で 18 時間乾燥させて、角層シート測定を行った (C)。

これらの結果から角層シートの厚さ変化率 (%) を以下の式 1 :

$$\text{厚さ変化率 (\%)} = (B - A) \times 100 / A - (C - B) \times 100 / C$$

に基づき測定した。続いて乾燥後、角層シートの透明度を目視により判定した。角層シートの厚さ変化率及び透明度の結果を表 1 に示す。

【 0 0 4 3 】

【表 1】

サンプル	厚さ変化率 (%)	透明度
10%グリセリン水溶液	88.4	○
流動パラフィン+グリセリン+増粘剤水溶液	29.9	○
100%エタノール	3.9	×

【0044】

次にJテック表皮ヒト再構成モデル(角層シート)を凍結乾燥することにより、白く不透明の角層シートを取得した。この凍結乾燥角層シートを10%グリセリン水溶液、流動パラフィン(10%)、グリセリン(10%)、POE(60)硬化ヒマシ油(10%)、カルボキシビニルポリマー(製品名;カーボポール981 Lubrizol Advanced Materials, Inc.)(0.2%)、KOH(0.1%)の水溶液(流動パラフィン+グリセリン+増粘剤水溶液)、及び100%エタノール中に30分間浸潤し、液体を取り除いた後に、34、湿度60%の雰囲気下で18時間乾燥させて、撮影した(図7)。

10

【0045】

10%グリセリン水溶液及び流動パラフィン+グリセリン+増粘剤水溶液中で浸潤した場合には、透明度の高い角層が得られた一方で、流動パラフィンで浸潤した場合には、透明度が低いままの角層が得られた。(株)村上色彩技術研究所の分光光度計HR100を用いて透過率を測定した。また、表1との比較により、角層の厚さ変化率が20%以上の場合に透明度の高い角層が得られることが分かった。角層の透明度が高いほど皮膚の状態が優れているといえるため、液体への浸潤から乾燥における角層の細胞又は細胞層の厚さ変化率を指標とすることにより、皮膚の改善状態を評価することが可能になる。

20

【0046】

実施例7：乾燥工程における湿度に応じた角層の透明度の変化

実施例1の実験の乾燥工程を、湿度30%、60%、及び湿度90%で行うことにより、水分量(%)に対して角層全透過率をプロットした(図8)。図8より、高湿度で乾燥させた場合に、角層の透明度がより改善することが示された。この実験により、環境に応じた適切な化粧品を評価する方法がサポートされる。すなわち、所望の湿度及び温度において試験化粧料を乾燥させる工程で得られる水分量(%)に対して角層透過率(%)をプロットしてプロット図を作成して近似曲線を取得し、この近似曲線が、水を角層に塗布し、上記所望の温度と湿度30%以上90%未満の条件下において乾燥させる工程において得られた近似曲線(1)と、上記所望の温度と湿度90%の条件下において乾燥させる工程において得られた近似曲線(2)との間の範囲に含まれれば、角層の透明度を改善する適切な化粧品と評価することができる。好ましくは、近似曲線(1)を得る際の条件の湿度の下限値が、60%、70%及び80%からなる群から選択される下限値の場合に、より適切な化粧品と評価することができる。

30

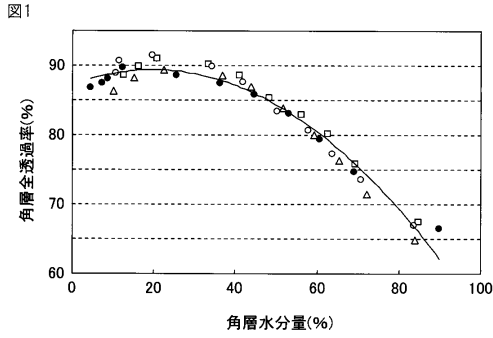
【0047】

実施例8：乾燥工程における湿度に応じた角層の皮膚バリア機能の変化

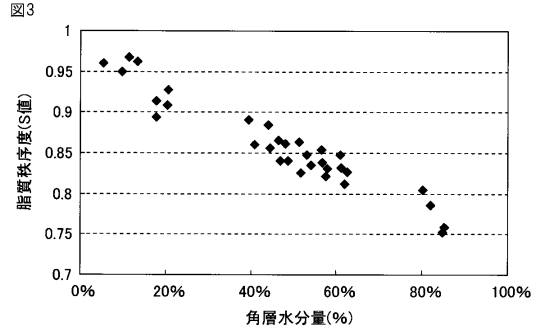
実施例2の実験の乾燥工程を、湿度30%、60%、及び90%で行い、水分蒸散量を測定した(図9)。この図より、高湿度で乾燥させた場合に、角層の皮膚バリア機能が改善することが示され、そして湿度60%で乾燥させた場合と90%で乾燥させた場合とでは、その皮膚バリア機能に対する影響は少ないことが示された。

40

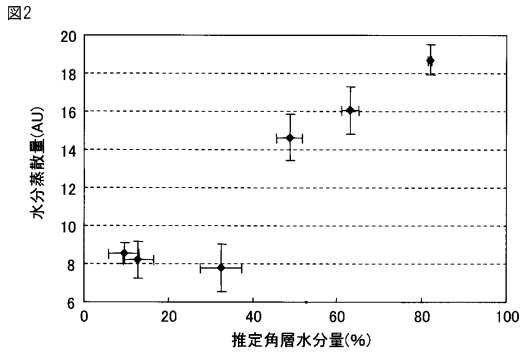
【 図 1 】



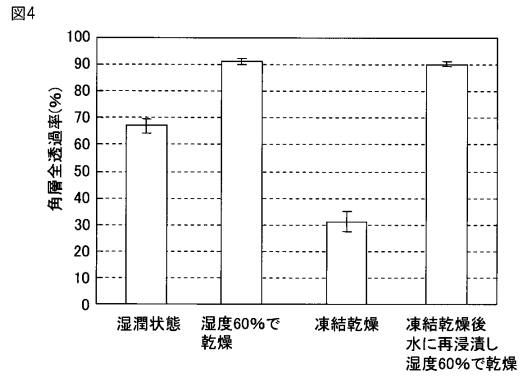
【 図 3 】



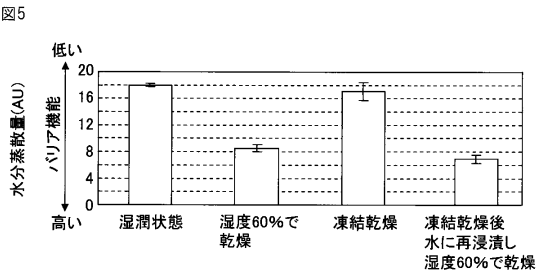
【 図 2 】



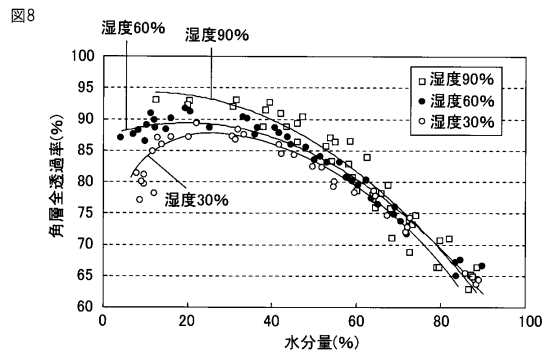
【 図 4 】



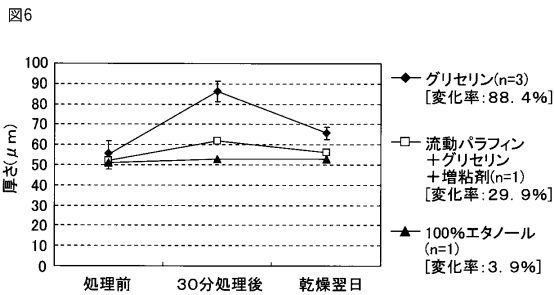
【 図 5 】



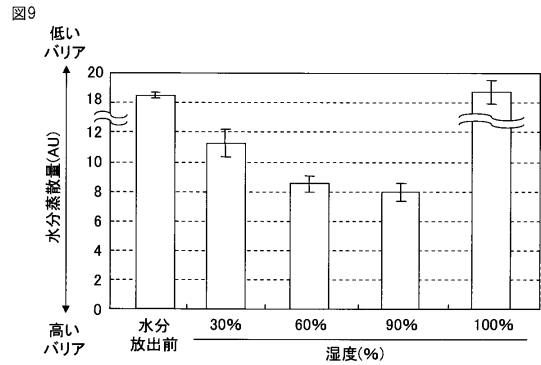
【 図 8 】



【 図 6 】



【 図 9 】



フロントページの続き

(74)代理人 100166165

弁理士 津田 英直

(72)発明者 岩井 一郎

神奈川県横浜市都筑区早渕2-2-1 株式会社資生堂 リサーチセンター(新横浜)内

(72)発明者 八木 栄一郎

神奈川県横浜市都筑区早渕2-2-1 株式会社資生堂 リサーチセンター(新横浜)内

審査官 加々美 一恵

(56)参考文献 特開2005-249672(JP,A)

特開平10-323184(JP,A)

特開2010-271163(JP,A)

特開2010-223609(JP,A)

欧州特許出願公開第01730440(EP,A1)

COSMETIC STAGE, 2009年, Vol.3, No.5, p27-31

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/15

G01N 33/48-33/98

A61K 8/34

A61Q 1/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)