

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
IPC分類：

A6
B6

本案已向：

日本 國(地區) 申請專利，申請日期： 案號： 有 無主張優先權
 1999年3月2日特願平11-53767

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明 (1)

技術領域

本發明為關於肌膚老化抑制劑和 / 或膚質改善劑，及由該肌膚老化抑制劑和 / 或膚質改善劑所構成之抑制肌膚老化和 / 或改善膚質用化粧品。

背景技術

自以往，在取得防止皺紋、鬆弛、乾燥肌膚等麻煩原因之肌膚老化及膚質惡化等美容效果之目的下，乃於廣泛之化粧品中配合防止老化之素材。

於化粧品中所配合之防止老化之素材可大致區別成過氧化脂質抑制劑及細胞賦活劑。

具有過氧化脂質抑制作用之素材有 α -羥基酸、維生素 A、 β -胡蘿蔔素、維生素 B₁₂、維生素 E、或 Puraltin、Puratonin 等色素類、黃岑、芸香苷、芝麻萃取物、茶萃取物等。另一方面，細胞賦活劑已知有 Muminex、乙醇酸、 γ -胺基酸、唾液酸、蜂王膠、當藥萃取物、日本當藥、高麗參萃取物等。已知細胞賦活劑為促進膠原合成之材料、具有膚質改善作用之材料等。

促進膠原合成之材料已知有轉化生長因子 β 1、血小板生長因子、基本纖維母細胞生長因子、類胰島素生長因子 1 等各種生長因子及絲蛋白等。

具有膚質改善作用之材料已知有尿囊素、蘆薈萃取物、人參萃取物、胎盤萃取物、牛血液除蛋白質、醱酵代謝物等。

已報導羥基脯胺酸衍生物為藉由令鼠肝臟破碎物之耗

五、發明說明(2)

氧量增加，而可利用作為可保持肌膚彈性之化粧品（特開平 1-131107），但一切關於鼠肝臟破碎物耗氧量增加與對於肌膚之效果關係、及作為化粧品之有效性數據則未示出，且由該報告並無法結論出羥基脯胺酸衍生物可有效作為化粧品。

迄今，並無實際證明羥基脯胺酸或羥基脯胺酸之衍生物可有效作為化粧品之報告。

已有於增強保濕效果之目的下，於粘蛋白（特開平 5-339140）、或甘胺酸甜藥鹼與吡咯烷酮羧酸或其鹽（特開平 9-871262）等中添加胺基酸之化粧品報告。於該報告中，雖舉出羥基脯胺酸作為胺基酸之例，但關於羥基脯胺酸作為化粧品之效果的一切數據並未被示出。

並未知羥基脯胺酸及羥基脯胺酸之 N-醯基衍生物為具有促進表皮細胞增殖之活性，於纖維母細胞中促進膠原合成之活性，且並未知利用該活性之化粧品材料。

更且，迄今仍未知使用微生物所製造之羥基脯胺酸之化粧品。

發明之揭示

本發明之目的為在於提供具有肌膚老化抑制作用和 / 或膚質改善作用之表皮細胞增殖促進劑、纖維母細胞之膠原合成促進劑、表皮之水分保持機能改善劑等之肌膚老化抑制劑和 / 或肌質改善劑，及含有該肌膚老化抑制劑和 / 或膚質改善劑之抑制肌膚老化和 / 或改善膚質用化粧品。

五、發明說明 (3)

本發明者等人，對於具有保濕效果、肌膚老化抑制作用及膚質改善作用且安全性高之化粧品進行致力檢討，結果於羥基脯胺酸或其 N-醯基衍生物中發現效果，並且到達完成本發明。

即，本發明為關於以下之 (1)~(14)。

(1) 一種肌膚老化抑制劑和 / 或膚質改善劑，其為以羥基脯胺酸或羥基脯胺酸之 N-醯基衍生物或其鹽作為有效成分。

(2) 一種如上述 (1) 記載之肌膚老化抑制劑和 / 或膚質改善劑，其特徵為羥基脯胺酸或羥基脯胺酸之 N-醯基衍生物相對於全重量為含有 0.01~5 重量%。

(3) 一種如上述 (1) 或 (2) 記載之肌膚老化抑制劑和或膚質改善劑，其中羥基脯胺酸之 N-醯基衍生物為 N-乙醯基化衍生物或 N-丙醯基化衍生物。

(4) 一種如上述 (1)~(3) 任一項記載之肌膚老化抑制劑和 / 或膚質改善劑，其中羥基脯胺酸為由順式-4-羥基-L-脯胺酸、順式-4-羥基-D-脯胺酸、順式-3-羥基-L-脯胺酸、順式-3-羥基-D-脯胺酸、反式-4-羥基-L-脯胺酸、反式-4-羥基-D-脯胺酸、反式-3-羥基-L-脯胺酸及反式-3-羥基-D-脯胺酸所組成群中所選出之羥基脯胺酸。

(5) 一種如上述 (1)~(4) 任一項記載之肌膚老化抑制劑和 / 或膚質改善劑，其中羥基脯胺酸為由微生物所產生的羥基脯胺酸。

五、發明說明(4)

(6)一種如上述(5)記載之肌膚老化抑制劑和/或膚質改善劑，其中微生物為由來自屬於 *Amycolatopsis* 屬、指狀孢子囊 (*Dactylosporangium*) 屬及鏈霉菌 (*Streptomyces*) 屬所選出之微生物之導入脯胺酸第3位氫氧化酶或脯胺酸第4位氫氧化酶基因之微生物。

(7)一種如上述(1)~(6)任一項記載之肌膚老化抑制劑和/或膚質改善劑，其中肌膚老化抑制劑和/或膚質改善劑為表皮細胞之增殖促進劑。

(8)一種如上述(1)~(6)任一項記載之肌膚老化抑制劑和/或膚質改善劑，其中肌膚老化抑制劑和/或膚質改善劑為纖維母細胞之膠原合成促進劑。

(9)一種如上述(1)~(6)任一項記載之肌膚老化抑制劑和/或膚質改善劑，其中肌膚老化抑制劑和或/膚質改善劑為表皮之水分保持機能改善劑。

(10)一種如上述(1)~(6)任一項記載之肌膚老化抑制劑和/或膚質改善劑，其中肌膚老化抑制劑和/或膚質改善劑為形成皺紋之抑制劑或改善劑。

(11)一種如上述(1)~(10)任一項記載之肌膚老化抑制劑和/或膚質改善劑，其中肌膚為人類之肌膚。

(12)一種抑制肌膚老化和/或改善膚質用化粧品，其為含自上述(1)~(11)任一項記載之肌膚老化抑制劑和/或膚質改善劑。

(13)一種如上述(12)記載之化粧品，其中羥基脯胺酸或羥基脯胺酸之N-乙醯基衍生物或其鹽為N-乙醯羥基脯

五、發明說明(⁵)

胺酸或其鹽。

(14)一種如上述(12)或(13)記載之化粧品，其為於化粧品中含有一種或二種以上選自卵磷脂、溶血卵磷脂及透明質酸之成分。

本發明所謂之肌膚老化抑制劑和/或膚質改善劑，為意指具有肌膚老化抑制作用或肌質改善作用之物質，或者，具有肌膚老化抑制作用與膚質改善作用兩者作用之物質。

本發明所使用之羥基脯胺酸可為脯胺酸為D體或L體、或羥基之位置為第3位或第4位、及其之立體異構物為順式或反式所構成的8種立體異構物。具體之羥基脯胺酸可列舉順式-4-羥基-L-脯胺酸、順式-4-羥基-D-脯胺酸、順式-3-羥基-L-脯胺酸、順式-3-羥基-D-脯胺酸、反式-4-羥基-L-脯胺酸、反式-4-羥基-D-脯胺酸、反式-3-羥基-L-脯胺酸及反式-3-羥基-D-脯胺酸。

羥基脯胺酸為以膠原中之主要構成胺基酸成分型式、或以彈性蛋白之構成胺基酸型式、廣泛存在於自然界中的一種胺基酸，例如可將來自豬及牛等動物之膠原予以酸解，並且依常法精製則可製造。

反式-4-羥基-L-脯胺酸可使用由Amycolatopsis屬或指狀孢子囊(Dactylosporangium)屬所單離之脯胺酸第4位氫氧化酶(特開平7-313179號公報)進行製造。又，順式-3-羥基-L-脯胺酸可使用鏈霉菌屬(Streptomyces)屬所單離之脯胺酸第3位氫氧化酶(特開平7-322885號公報)

五、發明說明 (6)

進行製造 [Bio-industry, 14, 31 (1997)]。

本發明中，使用微生物所製造之羥基脯胺酸，由可輕易取得更優良品質之物質方面而言為佳。

本發明所用之羥基脯胺酸的 N-醯基衍生物，可列舉上述各種羥基脯胺酸之立體異構物的 N-醯基衍生物。該 N-醯基衍生物之醯基雖無特別限制，但較佳為碳數 1~24 個、更佳為碳數 1~12 個、特佳為碳數 1~6 個之醯基，且具體而言列舉甲醯基、乙醯基、丙醯基、丁醯基、異丁醯基、戊醯基、特戊醯基、己醯基、庚醯基、辛醯基、壬醯基、癸醯基、十一醯基、十二醯基等。

羥基脯胺酸或羥基脯胺酸之 N-醯基衍生物之鹽可列舉鈉、鉀、鋰等之鹼金屬鹽、鈣、鎂等之鹼土金屬鹽、鉍鹽、單乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、三異丙醇胺等之胺之加成鹽及精胺酸、離胺酸等之鹼性胺基酸之加成鹽等。

羥基脯胺酸之 N-醯基衍生物可根據公知之方法進行調製。例如，羥基脯胺酸之 N-醯基衍生物可藉由令直鏈或分枝狀之碳數 1~24 個之飽和或不飽和脂肪酸，使用亞硫醯氯、光氧等鹵化劑，變換成氯化物、溴化物等鹵化物後，與前述之羥基脯胺酸縮合則可製造，或將脂肪酸變換成酸酐後，與羥基脯胺酸反應則可製造。

脂肪酸可列舉例如甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、異丁酸、戊酸、異戊酸、特戊酸、己酸、庚酸、辛酸、壬酸、癸酸、十一碳酸、十二碳酸等之單獨或組合的脂肪酸。

五、發明說明(7)

以下例示經由醯基鹵化物，製造羥基脯胺酸之N-醯基衍生物之方法。

將脂肪酸於二氯甲烷、氯仿、四氯化碳、苯、甲苯、二甲苯、正己烷等溶劑中分散，並於其中添加1~5倍當量之鹵化劑令其反應，取得脂肪酸鹵化物。其次，令羥基脯胺酸溶解或分散於溶劑中，並且將所得之溶液一邊保持於5~70℃，一邊將上述之脂肪酸鹵化物相對於羥基脯胺酸加入0.3~3.0倍當量，並且進行醯基化反應則可製造羥基脯胺酸之N-醯基衍生物。

使用醯基化反應所用之溶劑可列舉水、甲醇、乙醇、異丙醇、異丁醇、丙酮、甲苯、四氫呋喃、乙酸乙酯、N,N-二甲基甲醯胺、二甲基亞碸等，其可單獨或混合使用。將羥基脯胺酸於溶劑中溶解或分散時，視需要亦可將相對於羥基脯胺酸之0.8~2.0倍當量之氫氧化鈉、氫氧化鉀等之鹼性物質，於溶劑中溶解或分散亦可。

欲取得羥基脯胺酸之N-醯基衍生物之鹽時，於羥基脯胺酸之N-醯基衍生物為以鹽型式取得之情形中，可就其原樣進行精製，以游離型式取得之情形中，則可於適當之溶劑中溶解或懸浮，並且加入鹼令其形成鹽即可。

可使用例如結晶化、層析等通常之方法進行精製。

於本發明之肌膚老化抑制劑和/或膚質改善劑及含有彼等之抑制肌膚老化和/或膚質改善用化粧品中，可將順式/反式-4-羥基-L/D-脯胺酸、順式/反式-3-羥基-L/D-脯胺酸、或彼等之N-醯基衍生物或其鹽予以單獨

五、發明說明 (8)

或混合使用。

此些羥基脯胺酸或羥基脯胺酸之N-醯基衍生物或其鹽於肌膚老化抑制劑和/或膚質改善劑及化粧品中之含量，可視效果而於廣泛範圍中增減。此些化合物於肌膚老化抑制劑和/或膚質改善劑及化粧品中之含量，可列舉例如0.01~5重量%，且較佳為0.1~5重量%，特佳為0.5~3重量%。

於本發明中，所謂的肌膚老化作用和/或膚質改善作用可例示例如表皮細胞之增殖促進作用，纖維母細胞之膠原合成促進作用、表皮之水分保持機能改善作用、抑制或改善形成皺紋之作用等，但並非限定於此。又，肌膚可例如鼠、狗、貓、馬等玩賞動物等及人類之肌膚，但以人類肌膚為佳。

又，纖維母細胞之膠原合成促進劑、表皮之水分保持機能改善劑，以羥基脯胺酸之N-醯基衍生物為佳，且以N-乙醯基羥基脯胺酸為更佳。

於本發明之肌膚老化抑制劑和/或肌膚改善劑及由肌膚老化抑制劑和/或膚質改善劑所構成之抑制肌膚老化和/或改善膚質用化粧品中，除了上述之必須成分，視需要亦可含有通常化粧品材料所配合之成分。

配合成分可列舉例如固型油、半固型油、其他之保濕劑、軟化劑、水溶性高分小、油溶性高分子、各種界面活性劑、無機及有機顏料、聚矽氧烷或氟化合物所處理之無機及有機顏料、有機染料等之色劑、乙醇、紫外線

五、發明說明(9)

吸收劑、防腐劑、抗氧化劑、色素、增粘劑、pH調整劑、香料、血行促進劑、冷感劑、制汗劑、殺菌劑、肌膚柔軟劑、水等，且可在不損害本發明目的、效果之質、量之範圍內含有。

固型、半固型油可列舉凡士林、羊毛脂、微晶狀蠟、巴西棕櫚蠟、小燭樹蠟；椰子油脂肪酸、月桂酸、硬化牛脂脂肪酸等之高級脂肪酸；月桂醇、鯨蠟醇、硬脂醇、山嶺醇等之高級醇等。

液體油可列舉例如鱈梨油、橄欖油、荷荷巴油等之植物油；油酸、異硬脂酸等之脂肪酸；十六醇、油醇等之醇類；2-乙基己酸鯨蠟酯、肉豆蔻酸2-辛基十二酯、二-2-乙基己酸新戊二醇、三-2-乙基己酸甘油酯、油酸-2-辛基十二酯、肉豆蔻酸異丙酯、三異硬脂酸甘油酯、2-乙基己酸二甘油酯、長鏈醯基麩胺酸辛基十二酯等之酯油；二甲基聚矽氧烷、甲基氫聚矽氧烷、甲基苯基聚矽氧烷、八甲基環四矽氧烷等之矽油；流動石蠟、凡士林、角鯊烯、角鯊烷等之液狀烴油等。

保濕劑可列舉脂溶性保濕劑、低分子保濕劑及高分子保濕劑。

脂溶性保濕劑可列舉例如溶血卵磷脂、卵磷脂、膽固醇、膽固醇酯、神經鞘脂質、神經醯胺等。

低分子保濕劑可列舉絲胺酸、麩胺醯胺、山梨醇、甘露醇、甘油、吡咯烷酮-羧酸鈉、1,3-丁二醇、丙二醇、乳酸、乳酸鹽等。

五、發明說明 (10)

高分子保濕劑可列舉透明質酸、透明質酸鈉、彈性蛋白、藻酸、粘多糖類、聚乙二醇、聚元冬胺酸鹽、水溶性幾丁質等。

軟化劑可列舉例如長鏈醯基麩胺酸膽固醇酯、羥基硬脂酸膽固醇、12-羥基硬脂酸、硬脂酸、玫瑰酸、羊毛脂脂肪酸膽固醇酯等。

界面活性劑可列舉例如聚氧乙烯(簡稱為POE)鯨蠟醚、POE硬脂酸酯、POE山梨糖醇酐單月桂酸酯、甘油脂肪酸酯、聚甘油脂肪酸酯、聚氧乙烯硬化蓖麻油等之非離子界面活性劑；潔爾滅、氯化硬脂醯三甲基銨、氯化二鯨蠟基二甲基銨、氯化山嶺醯基三甲基銨等之陽離子界面活性劑；2-椰子基-N-羧甲基-N-羥乙基咪唑啉甜菜鹼、醯胺醋酸甜菜鹼等之兩性界面活性劑；高級醇硫酸鹽、高級醇醚硫酸鹽、長鏈脂肪酸鹼金屬鹽、長鏈脂肪酸鹼土金屬鹽、長鏈脂肪酸鹼性胺基酸鹽、N-長鏈醯基胺基酸、N-長鏈醯基胺基酸鹽等之陰離子界面活性劑。

水溶性高分子可列舉例如羧甲基纖維素、甲基纖維素、羥甲基纖維素、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、黃蓍膠、鹿角膠、糊精、糊精脂肪酸酯、羧乙烯基聚合物、咕吨酮膠、明膠、藻酸鈉、阿拉伯膠等之化粧品所泛用之水溶性高分子。

油溶性高分子可列舉聚乙烯吡咯烷酮·二十碳烯共聚物、聚乙烯吡咯烷酮·十六碳烯共聚物、硝基纖維素、高級聚矽氧烷等化粧品所泛用之油溶性高分子。

五、發明說明 (11)

有機及無機顏料可列舉例如矽酸、無水矽酸、矽酸鎂、滑石、絹雲母、雲母、高嶺土、紅色氧化鐵、粘土、膨潤土、鈦被膜雲母、羥基氯化鈹、氧化鋯、氧化鎂、氧化鋅、氧化鈦、氧化鋁、硫酸鈣、硫酸鋇、硫酸鎂、碳酸鈣、碳酸鎂、氧化鐵、群青、氧化鉻、氫氧化鉻、異極礦及碳黑及其複合體等之無機粉體；聚醯胺、聚酯、聚丙烯、聚苯乙烯、聚胺基甲酸酯、乙烯基樹脂、脲樹脂、苯酚樹脂、氟樹脂、矽樹脂、丙烯酸樹脂、蜜胺樹脂、環氧樹脂、聚碳酸酯樹脂、二乙烯基苯·苯乙烯共聚物、絲粉、纖維素、CI顏料黃、CI顏料橙等之有機粉體；及此些無機粉體與有機粉體之混合粉體等。

有機粉體可使用硬脂酸鈣等之金屬肥皂；鯨蠟基磷酸鋅鈉、月桂基磷酸鋅、月桂基磷酸鈣等之烷基磷酸多價金屬鹽；N-月桂醯-β-丙胺醯鈣、N-月桂醯-β-丙胺醯鋅、N-月桂醯甘胺酸鈣等之醯基胺基酸多價金屬鹽；N-月桂醯-牛磺酸鈣、N-棕櫚醯-牛磺酸精胺酸、Nα-硬化牛脂脂肪酸醯基精胺酸等之N-醯基鹼性胺基酸；N-月桂醯甘胺醯甘胺酸等之N-醯基多肽；α-胺基辛酸、α-胺基月桂酸等之α-胺基脂肪酸；聚乙烯、聚丙烯、尼龍、聚甲基丙烯酸甲酯、聚苯乙烯、二乙烯基苯·苯乙烯共聚物、四氟化乙烯等之樹脂粉體等。

紫外線吸收劑可列舉例如對胺基苯甲酸、對二甲胺基苯甲酸辛酯等之對胺基苯甲酸衍生物；2-羥基-4-甲氧基二苯酮、二羥基二甲氧基二苯酮等之二苯酮衍生物；

五、發明說明 (12)

對甲氧基肉桂酸乙酯、對甲氧基肉桂酸辛酯等之甲氧基肉桂酸衍生物；水楊酸辛酯、水楊酸高莖酯等之水楊酸衍生物；N-苯甲醯-0-甲基- α -脫氫酪胺酸2-乙基己酯等之 α -脫氫胺基酸衍生物；4-(3,4-二甲氧苯基)亞甲基-2,5-二氧基-1-咪唑烷丙酸2-乙基乙酯等之伸苳基乙內醯脲衍生物；尿刊酸、尿刊酸乙酯、4-第三丁基-4'-甲氧基二苯甲醯甲烷、2-(2'-羥基-5'-甲基苯基)苯並三唑等。

防腐劑可列舉對羥基苯甲酸甲酯等。

肌膚柔軟劑可列舉流動石蠟、凡士林、橄欖油、角鯊烷、羊毛脂、合成酯油等。

上述任一成分均可在不損害本發明目的、效果之範圍內配合，且較佳為0.01~5重量%、特佳為0.01~3重量%。

本發明中的表皮細胞增殖促進劑、纖維母細胞之膠原合成促進劑、表皮之水分保持機能改善劑、抑制或改善形成皺紋之藥劑等之肌膚老化抑制劑和/或膚質改善劑及化粧品，可採用溶液、乳化物、練狀混合物等型態。

又，於本發明之該肌膚老化抑制劑和/或膚質改善劑所構成之抑制肌膚老化和/或膚質改善用化粧品中，可包含洗面霜、洗面泡沫、清潔霜、清潔乳、清潔化粧品、按摩霜、冷霜、保濕霜、乳液、化粧品、髮膏、刮毛後用霜、防曬霜、日曬用油、沐浴乳、洗髮乳、潤絲精、護髮霜、養毛料、育毛料、髮霜、髮液、定型水、噴髮劑、染髮劑、漂髮劑、彩色潤絲精、彩色噴霧劑、固

五、發明說明 (13)

定波浪液、粉餅、蜜粉、眼影、手霜等。

又，肌膚老化抑制劑和 / 或膚質改善劑及由該肌膚老化抑制劑和 / 或膚質改善劑所構成之抑制肌膚老化和 / 或膚質改善用化粧品之型態，並無特別限定，可例如為乳液、乳霜、化粧水、髮膏、粉底、毛髮化粧品等。

本發明之肌膚老化抑制劑和 / 或膚質改善劑及由該肌膚老化抑制劑和 / 或膚質改善劑所構成之抑制肌膚老化和 / 或膚質改善用化粧品之使用方法，雖依據年齡、個人差異而不同，但期望令具有羥基脯胺酸或羥基脯胺酸之 N-醯基衍生物或其鹽之化粧品濃度為 0.01~5 重量%、較佳為 0.1~5 重量%、特佳為 0.5~3 重量%，並以 1 日 1 回~數回塗佈以 0.1~5 微升、較佳為 1~5 微升、特佳為 2 微升，但並非限定於此。

其次，列舉實施例，更加詳細說明本發明，但本發明並非被其所約制。

用以實施發明之最佳型態

實施例 1 含反式-4-羥基-L-脯胺酸之化粧品之調製

於精製水中，添加反式-4-羥基-L-脯胺酸（以下，亦簡稱為 Hyp、協和醃酵工業公司製）0.5 重量%、對羥基苯甲酸甲酯 0.1 重量%及甘油 0.17 重量%，並且混合熔解，調製成含有 Hyp 之化粧品（化粧品 1）。

實施例 2 含有反式-4-羥基-L-脯胺酸之化粧品之調製

於精製水中，添加 Hyp 3 重量%、對羥基苯甲酸甲酯 0.1 重量%及甘油 0.17 重量%，並且混合熔解，調製成含

五、發明說明 (14)

有 Hyp 之化粧品 (化粧品 2)。

實施例 3 含有 N-乙醯基 - 反式 - 4-羥基 - L-脯胺酸 之化粧品之調製

於精製水中，添加 N-乙醯基 - 反式 - 4-羥基 - L-脯胺酸 (以下，亦簡稱為 N-Acetyl-Hyp、協和醱酵工業公司製) 3 重量%、對羥基苯甲酸甲酯 0.1 重量% 及甘油 0.17 重量%，並且混合熔解，調製成含有 N-Acetyl-Hyp 之化粧品 (化粧品 3)。

實施例 4 含有膠原之化粧品之調製

於精製水中，添加膠原 (Collagen CLR、壽化學) 1 重量%、對羥基苯甲酸甲酯 0.1 重量% 及甘油 0.17 重量%，並且混合熔解，調製成含有膠原之化粧品 (化粧品 4)。

實施例 5 含有反式 - 4-羥基 - L-脯胺酸 及卵磷脂 之化粧品之調製

於精製水中，添加 Hyp 0.5 重量%、卵磷脂 [SLP-White H、True Lecithin 工業公司製] 0.05 重量%、透明質酸 (透明質酸 LP、協和醱酵工業公司製) 0.01 重量%、對羥基苯甲酸甲酯 0.1 重量% 及甘油 0.17 重量%，並且混合熔解，調製成含有 Hyp 及卵磷脂 之化粧品 (化粧品 5)。

實施例 6 含有反式 - 4-羥基 - L-脯胺酸 及溶血卵磷脂 之化粧品之調製

於精製水中，添加 Hyp 3 重量%、溶血卵磷脂 [Lysolecithin 協和、協和醱酵工業公司製] 0.01 重量%、對羥基苯甲酸甲酯 0.1 重量% 及甘油 0.17 重量%，並且

五、發明說明 (15)

混合熔解，調製成含有 Hyp 及卵磷脂之化粧品 (化粧品 6)。

實施例 7 含有反式-4-羥基-L-脯胺酸及卵磷脂之化粧品之調製

於精製水中，添加 Hyp 3 重量%、卵磷脂 [PC92H、True Lecithin 工業公司製] 0.05 重量%、透明質酸 (透明質酸 LP、協和醱酵工業公司製) 0.01 重量%、對羥基苯甲酸甲酯 0.1 重量%及甘油 0.17 重量%，並且混合熔解，調製成含有 Hyp 及卵磷脂之化粧品 (化粧品 7)。

實施例 8 含有反式-4-羥基-L-脯胺酸及卵磷脂之化粧品之調製

於精製水中，添加 Hyp 3 重量%、卵磷脂 [SLP-White H、True Lecithin 工業公司製] 0.05 重量%、透明質酸 (透明質酸 LP、協和醱酵工業公司製) 0.01 重量%、對羥基苯甲酸甲酯 0.1 重量%及甘油 0.17 重量%，並且混合熔解，調製成含有 Hyp 及卵磷脂之化粧品 (化粧品 8)。

以上，於實施例 1~8 中所調製之化粧品之組成，總結示於表 1。

五、發明說明 (16)

第1表 化粧品之組成

組成分(重量%)	化粧品							
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
Hyp	0.5	3	-	-	0.5	3	3	3
N-Acetyl-Hyp	-	-	3	-	-	-	-	-
膠原	-	-	-	1	-	-	-	-
卵磷脂 SLP	-	-	-	-	0.05	-	-	0.05
卵磷脂 PC92	-	-	-	-	-	-	0.05	-
溶血卵磷脂	-	-	-	-	-	0.05	-	-
透明質酸	-	-	-	-	0.01	0.01	0.01	0.01
對羥基苯甲酸甲酯	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
甘油	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17

Hyp: 反式-4-羥基-L-脯胺酸

N-Acetyl-Hyp: N-乙酰基-反式-4-羥基-L-脯胺酸

卵磷脂 SLP: 卵磷脂 [SLP-White H、True Lecithin工業(株)]

卵磷脂 PC92: 卵磷脂 [PC92H、True Lecithin工業(株)]

五、發明說明 (17)

實施例 9 於人類纖維母細胞中促進膠原合成之活性
合成膠原之測定為根據「Collagene實驗法」(永井等
人著、講談社 Scientific), 以下列方法進行。

將來自人類新生兒之纖維母細胞(三光純藥公司製),
使用添加 10%胎牛血清之 DMEM 培養基 [Virology, 8, 396
(1959)], 於 37°C、5%CO₂ 之條件下定期培養後, 添加 ³H
標幟甘胺酸及受驗物質, 並再培養 72 小時。尚, DMEM 培
養基為使用於日水製藥公司製之『Gulbecco 修飾法之
Eagle 培養基「Nissui」[®]』中, 添加麩胺醯胺 4 毫莫耳
/ 公升、碳酸氫鈉適量、HEPES 10 毫莫耳 / 公升、青黴
素 G 鉀 50 U/ml、鏈黴素 50 微克 / 毫升、胎牛血清 10% 的
培養基。

於所得之培養液中, 添加 500 微莫耳 / 公升苯基甲烷
磺醯氟 (PMSF) 後, 將細胞及培養基回數, 並以超音波弄
碎, 取出蛋白質。

於該萃取液中添加 100 微莫耳 / 公升牛血清白蛋白 (BSA)
及 10% 三氯乙酸 (TCA) 後, 以 300 rpm 離心分離 5 分鐘, 並
回收沈澱物。

於該沉澱物中, 以上述進行培養所用之培養容器底面
積每 1 cm² 8 微升地加入 0.2 莫耳 / 公升之 NaOH 將其溶解
後, 以等容量之 1 莫耳 / 公升磷酸緩衝液予以中和。

於所得之蛋白質溶液 100 微升中, 加入 25 毫莫耳 / 公
升氯化鈣 10 微莫耳 / 公升、62.5 毫莫耳 / 公升 L-乙基馬
來醯亞胺 2 微莫耳 / 公升、膠原酶 (和光純藥工業公司製

五、發明說明 (18)

； 膠原分析用) 20 單位，並於 37°C 進行 90 分鐘反應。

將該反應液以分子量 10,000 之超過濾予以分離，並測定過濾液之蛋白質部分的放射活性 (CDP)，將其作為新合成的膠原。測定未過濾之蛋白質部分的放射活性 (NCDP)，並且依據下述之式 1，算出膠原合成比。

相對的促進膠原合成之活性 (膠原合成之變化)，為以受驗物質相對於對照組之膠原合成比之相對值型式，依據下述之式 2 算出。

(式 1)

$$\text{膠原合成比} = \frac{\text{CDP}}{\text{CDP} + \text{NCDP}}$$

(式 2)

$$\text{相對的促進膠原} = \frac{\text{受驗物質之膠原合成比}}{\text{對照組之膠原合成比}} \times 100$$

合成之活性 (%)

結果示於表 2。

於 Hyp、N-Acetyl-Hyp 任一者均察見促進膠原合成之活性。

表 2 促進膠原合成之活性

受驗物質	0 mM	0.1 mM	1 mM
Hyp	100	108.3	117.1
N-Acetyl-Hyp	100	121.1	119.7

五、發明說明 (19)

實施例 10 於人類表皮細胞中的增殖活性

人類表皮細胞之增殖活性為根據全細胞攝入 [溴化 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑鎗] (MTT), 並以 570nm (參考值 = 650nm) 之波長將所生成的 MTT 甲臍 (MTT formazan) 量予以比色定量之 MTT 法 (細胞培養 III、4477-4482, (1984)) 為準進行測定。

即, 將來自人類新生兒之正常表皮角化細胞 (三光純藥公司製), 以 KGM 培養基 (三光純藥) 以 37°C、5%CO₂ 下進行定期培養, 並且添加 Hyp 及 N-Acetyl-Hyp, 培養 4 日。其次, 將磷酸緩衝液 (pH7.4、無鈣和鎂) 中溶解成 5 毫克 / 毫升濃度之 MTT 試藥, 以 1/10 量添加至培養液中, 再於 5%CO₂ 下、37°C 中培養 4 小時。將培養基除去後, 以含有 0.4 莫耳 / 公升鹽酸之異丙醇萃取細胞中的 MTT 甲臍, 並以 630nm 為對照測定 570nm 中的吸光度。

結果示於表 3。

於 Hyp、N-Acetyl-Hyp 任一者均察見表皮細胞之增殖活性。於 Hyp 則察見濃度依賴性的增殖活性。

表 3 表皮細胞之增殖活性

受驗物質	0mM	10mM	100mM
Hyp	100	111.6	135.1
N-Acetyl-Hyp	100	108.7	85.9

五、發明說明 (20)

實施例 11 於鼠表皮細胞中的增殖活性

由 3 日齡 C3H 鼠，依據谷垣等人之方法 [日皮會誌、1145-1152(1989)] 為準剝離表皮細胞。

將該表皮細胞以 0.25% 胰蛋白酶處理後，以 1500 rpm 離心分離 5 分鐘，取得細胞。將該細胞播種至添加 10% 胎牛血清之 DMEM 培養基中，並於 37°C 培養 1 日，調製鼠表皮細胞。

將該鼠表皮細胞，以加入受驗物質 (Hyp 或 N-Acetyl-Hyp) 之無血清 MCDB153 培養基培養 6 日後，將磷酸緩衝液 (pH 7.4、無鈣和鎂中溶解成 5 毫克 / 毫升濃度之 MTT 試藥，以 1/10 量添加至培養液中，再於 5% CO₂ 下、37°C 中培養 4 小時。除去培養基後，以含有 0.4 莫耳 / 毫升鹽酸之異丙醇萃取細胞中的 MTT 甲酯，並以 630 nm 為對照測定 570 nm 中的吸光度。

結果示於表 4。

於 Hyp、N-Acetyl-Hyp 任一者均察見表皮細胞之增殖活性。

表 4 表皮細胞之增殖活性

受驗物質	0 μ M	1 μ M	3 μ M	10 μ M
Hyp	100	88.6	107.5	126
N-Acetyl-Hyp	100	110.7	118.2	121.9

五、發明說明 (²¹)

實施例 12 水分保持機能之評價 (1)

為了察見實施例 1~8 所調製之化粧品 (1)~(8) 的膚質改善效果，乃以連續使用調查水分維持機能的變化。

(試驗方法)

以 23~28 歲的健康女性 4 名作為小組討論參加者 (Paneler)，以每日、早晚 2 回、歷 3 星期或 2 個月，於前腕彎曲部的受檢部位，將受檢化粧品各塗佈 2 微升 / 平方公分。

(評價方法)

經時性地，測定早上塗佈前的受檢部位之水分含量。測定機器為使用 SKICON-200 [IBS 公司製]，將探測器垂直於受檢部位，測定肌膚傳導度 (= 水分含量)。

測定值愈高則表示水分含量愈高。受檢部位之肌膚傳導度變化 (相對傳導度)，為以相對於無處理部位之傳導度變化之相對值型式，依據下述之式 3 算出。

(式 3)

$$\text{相對傳導度 (\%)} = \frac{\text{受檢部位之各日傳導度} - \text{無處理部位之各日傳導度}}{\text{受檢部位之 0 日傳導度} - \text{無處理部位之 0 日傳導度}} \times 100$$

結果示於表 5-1 及表 5-2。

Hyp、N-Acetyl-Hyp 均經由連續使用而增加肌膚的水分含量，並且察見水分維持機能的改善。又，N-Acetyl-Hyp 為具有提高膠原之改善效果。

五、發明說明²² ()

表 5-1 水分維持機能之改善

受驗物質	相對傳導度 (%)				
	0日後	14日後	28日後	42日後	56日後
精製水	100	96.9	94.5	88.7	93.8
化粧品(1)	100	125.2	119.8	111.1	109.6
化粧品(2)	100	127.5	118.2	108.6	110.3
化粧品(3)	100	238.2	226.9	233.5	186.3
化粧品(4)	100	133.3	134.5	130.8	121.5
化粧品(5)	100	157.8	124.6	132.4	127

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂線

五、發明說明²³ ()

表 5-2 水分維持機能之改善

受驗物質	相對傳導度 (%)				
	0日後	5日後	9日後	16日後	21日後
精製水	100	96.9	94.5	88.7	93.8
化粧品(4)	100	104.3	129.9	115.3	136.8
化粧品(6)	100	120.9	144.3	140.6	172
化粧品(7)	100	108.3	150.2	123.3	145.2
化粧品(8)	100	117	145.7	185.9	146.1

實施例 13 水分維持機能之評價 (2)

對於 N-Acetyl-Hyp 之水分維持效果，以單回處理評價其濃度依賴性。

(試驗方法)

以 23 ~ 32 歲的健康女性 12 名作為小組討論參加者，測定前腕彎曲部之受檢部位的水分含量後，將受驗物質各以 2 微升 / 平方公分塗佈並且放置。

3 小時後測定，並以塗佈前之水分含量為 100% 之相對

五、發明說明 (²⁴)

值進行評價。

結果示於表 6。N-Acetyl-Hyp 均於單回處理中顯示出濃度依賴性的水分維持效果。

第 6 表 N-Acetyl-Hyp 之水分維持機能

	精製水	N-Acetyl-Hyp			
		1%	3%	5%	10%
相對傳導度 (%)	91	100	129	186	189

實施例 14 膚質改善效果

於實施例 12 之實施時，製作參加者受驗部位之矽複製品 [使用商品名「Skin Cast」、山田粧業公司製]，並根據下述基準求出肌膚狀態之分數，評價膚質改善效果。

肌膚狀態分數：

分數 1：肌膚之皮溝不鮮明，察見剝落的角質。

分數 2：肌膚之皮溝稍不鮮明或一方向性強。

分數 3：雖察見肌膚之皮溝，但淺或者一方向性強。

分數 4：察見肌膚之皮溝或稍微為網孔狀。

分數 5：清楚察見肌膚之皮溝或為美麗的網孔狀。

結果示於表 7。與精製水塗佈部位相比較，化粧品 (1)~(5) 分數為上升 0.4~2.1，察見明顯的膚質改善。即，呈現肌理細膩之皮膚，可察見抑制或改善皺紋形成

五、發明說明 (25)

之效果。又，配合卵磷脂之化粧品(5)，比不配合之化粧品(1)之分數高，且取得使用感亦為提高之結果。

表 7 分數

受驗物質	分數
精製水	2.3
化粧品(1)	3.7
化粧品(2)	2.8
化粧品(3)	4.4
化粧品(4)	3.8
化粧品(5)	3.6

以上，本發明之肌膚老化抑制劑和 / 或膚質改善劑及化粧品，因為具有表皮細胞之增殖促進作用，纖維母細胞之膠原合成促進作用、表皮之水分保持機能改善作用、抑制或改善皺紋形成之作用等，故確認可有效抑制肌膚老化和 / 或改善膚質等。

五、發明說明 (26)

產業上之可利用性

若根據本發明，則可提供於肌膚之老化抑制作用和 / 或膚質改善作用等有效之肌膚老化抑制劑和 / 或膚質改善劑及化粧品。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

四、中文發明摘要(發明之名稱： 表皮細胞增殖促進劑、纖維母細胞之膠原合成促進劑及表皮水分保持機能提昇劑)

本發明為關於以羥基脯氨酸或羥基脯氨酸之N-醯基衍生物或其鹽作為有效成分之肌膚老化抑制劑和/或膚質改善劑，及含有該肌膚老化抑制劑和/或膚質改善劑之抑制肌膚老化和/或改善膚質用之化粧品。

英文發明摘要(發明之名稱： PROMOTER OF PROLIFERATION OF EPIDERMAL CELLS, PROMOTER OF COLLAGEN SYNTHESIS OF FIBROBLASTS AND LIGHTENING AGENT OF WATER-PRESERVATIVE FUNCTION OF EPIDERMIS)

The invention concerns to a skin-aged inhibitor and/or skin texture improve agent which containing hydroxy-proline or N-acyl derivative of hydroxy-proline or its salt as active ingredient, and cosmetics for inhibit skin-aged or improve skin texture which contains said skin-aged inhibitor and/or skin texture improve agent.

40 年 12 月 13 日 修正
公告本

0015808

申請日期	2000/3/2
案 號	89103664
類 別	A61K 2/48, 2/00

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書 I224010		
一、發明 名稱	中 文	表皮細胞增殖促進劑、纖維母細胞之膠原合成促進劑 及表皮水分保持機能提昇劑 (90年12月13日修正)
	英 文	PROMOTER OF PROLIFERATION OF EPIDERMAL CELLS, PROMOTER OF COLLEGEN SYNTHESIS OF FIBROBLASTS AND HIGHTENING AGENT OF WATER-PRESERVATIVE FUNCTION OF EPIDERMIS
二、發明人 創作	姓 名	1. 小林麻子 2. 高星千惠美 3. 神村彩子 4. 高橋知也 5. 田島美菜子 6. 牧元 隆 7. 竹越與一郎 (竹越与一郎) 8. 榊原敏弘
	國 籍 住、居所	1. 日本 2. - 8. 皆屬日本 1. 茨城縣つくば市(筑波市)御幸が丘2番地 協和醱酵工業株式會社 筑波研究所內 2. - 5. 皆同上 6. 東京都町田市旭町3丁目6番6號 協和醱酵工業株式會社 東京研究所內 7. 東京都千代田區大手町一丁目6番1號 協和醱酵工業株式會社 本社內 8. 東京都町田市旭町3丁目6番6號 協和醱酵工業株式會社 東京研究所內
三、申請人	姓 名 (名稱)	協和醱酵工業股份有限公司 (協和醱酵工業株式會社)
	國 籍	日本
	住、居所 (事務所)	東京都千代田區大手町一丁目6番1號
	代 表 人 姓 名	平田 正

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

裝 訂 線

90年12月(初)修正
補充

六、申請專利範圍

第 89103664 號「表皮細胞增殖促進劑、纖維母細胞之膠原合成促進劑及表皮水分保持機能提昇劑」專利案

(90年12月13日修正)

六、申請專利範圍：

1. 一種表皮細胞增殖促進劑，其係以羥基脯胺酸或羥基脯胺酸之 N-醯基衍生物或其鹽作為有效成分，該羥基脯胺酸或羥基脯胺酸之 N-醯基衍生物相對於全重量為含有 0.01~5 重量%。
2. 如申請專利範圍第 1 項之表皮細胞增殖促進劑，其中羥基脯胺酸之 N-醯基衍生物為 N-乙醯基化衍生物或 N-丙醯基化衍生物。
3. 如申請專利範圍第 2 項之表皮細胞增殖促進劑，其中羥基脯胺酸之 N-乙醯基化衍生物為 N-乙醯基羥基脯胺酸。
4. 如申請專利範圍第 1~3 項中任一項之表皮細胞增殖促進劑，其中羥基脯胺酸為選自順式-4-羥基-L-脯胺酸、順式-4-羥基-D-脯胺酸、順式-3-羥基-L-脯胺酸、順式-3-羥基-D-脯胺酸、反式-4-羥基-L-脯胺酸、反式-4-羥基-D-脯胺酸、反式-3-羥基-L-脯胺酸及反式-3-羥基-D-脯胺酸之羥基脯胺酸。
5. 如申請專利範圍第 1~3 項中任一項之表皮細胞增殖促進劑，其中羥基脯胺酸為由微生物所產生的羥基脯胺酸。

六、申請專利範圍

6. 如申請專利範圍第 5 項之表皮細胞增殖促進劑，其中微生物為由來自屬於 *Amycolatopsis* 屬、指狀孢子囊 (*Dactylosporangium*) 屬及鏈霉菌 (*Streptomyces*) 屬所選出之微生物之導入脯胺酸第 3 位氫氧化酶或脯胺酸第 4 位氫氧化酶基因之微生物。
7. 如申請專利範圍第 1 項中之表皮細胞增殖促進劑，其中肌膚為人類之肌膚。
8. 一種纖維母細胞之膠原合成促進劑，其係以羥基脯胺酸或羥基脯胺酸之 N-醯基衍生物或其鹽作為有效成分，該羥基脯胺酸或羥基脯胺酸之 N-醯基衍生物相對於全重量為含有 0.01~5 重量%。
9. 如申請專利範圍第 8 項之纖維母細胞之膠原合成促進劑，其中羥基脯胺酸之 N-醯基衍生物為 N-乙醯基化衍生物或 N-丙醯基化衍生物。
10. 如申請專利範圍第 9 項之纖維母細胞之膠原合成促進劑，其中羥基脯胺酸之 N-乙醯基化衍生物為 N-乙醯基羥基脯胺酸。
11. 如申請專利範圍第 8~10 項中任一項之纖維母細胞之膠原合成促進劑，其中羥基脯胺酸為選自順式-4-羥基-L-脯胺酸、順式-4-羥基-D-脯胺酸、順式-3-羥基-L-脯胺酸、順式-3-羥基-D-脯胺酸、反式-4-羥基-L-脯胺酸、反式-4-羥基-D-脯胺酸、反式-3-

六、申請專利範圍

- 羥基-L-脯胺酸及反式-3-羥基-D-脯胺酸之羥基脯胺酸。
12. 如申請專利範圍第 8~10 項中任一項之纖維母細胞之膠原合成促進劑，其中羥基脯胺酸為由微生物所產生的羥基脯胺酸。
13. 如申請專利範圍第 12 項之纖維母細胞之膠原合成促進劑，其中微生物為由來自屬於 *Amycolatopsis* 屬、指狀孢子囊 (*Dactylosporangium*) 屬及鏈霉菌 (*Streptomyces*) 屬所選出之微生物之導入脯胺酸第 3 位氫氧化酶或脯胺酸第 4 位氫氧化酶基因之微生物。
14. 如申請專利範圍第 8 項之纖維母細胞之膠原合成促進劑，其中肌膚為人類之肌膚。
15. 一種表皮水分保持機能提昇劑，其係以羥基脯胺酸或羥基脯胺酸之 N-醯基衍生物或其鹽作為有效成分，該羥基脯胺酸或羥基脯胺酸之 N-醯基衍生物相對於全重量為含有 0.01~5 重量%。
16. 如申請專利範圍第 15 項之表皮水分保持機能提昇劑，其中羥基脯胺酸之 N-醯基衍生物為 N-乙醯基化衍生物或 N-丙醯基化衍生物。
17. 如申請專利範圍第 16 項之表皮水分保持機能提昇劑，其中羥基脯胺酸之 N-乙醯基化衍生物為 N-乙醯基羥基脯胺酸。

六、申請專利範圍

18. 如申請專利範圍第 15~17 項中任一項之表皮水分保持機能提昇劑，其中羥基脯胺酸為選自順式-4-羥基-L-脯胺酸、順式-4-羥基-D-脯胺酸、順式-3-羥基-L-脯胺酸、順式-3-羥基-D-脯胺酸、反式-4-羥基-L-脯胺酸、反式-4-羥基-D-脯胺酸、反式-3-羥基-L-脯胺酸及反式-3-羥基-D-脯胺酸之羥基脯胺酸。
19. 如申請專利範圍第 15~17 項中任一項之表皮水分保持機能提昇劑，其中羥基脯胺酸為由微生物所產生的羥基脯胺酸。
20. 如申請專利範圍第 19 項之表皮水分保持機能提昇劑，其中微生物為由來自屬於 *Amycolatopsis* 屬、指狀孢子囊 (*Dactylosporangium*) 屬及鏈霉菌 (*Streptomyces*) 屬所選出之微生物之導入脯胺酸第 3 位氫氧化酶或脯胺酸第 4 位氫氧化酶基因之微生物。
21. 如申請專利範圍第 15 項之表皮水分保持機能提昇劑，其中肌膚為人類之肌膚。
22. 如申請專利範圍第 15 項之表皮水分保持機能提昇劑，其另含有一種或二種以上選自卵磷脂、溶血卵磷脂及透明質酸之成分。