(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115023216 A
(43)申请公布日 2022.09.06

(21)申请号 202180010516.2
(22)申请日 2021.01.29
(30)优先权数据
2020-015642 2020.01.31 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.07.22
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2021/003381 2021.01.29
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/153780 JA 2021.08.05
(71)申请人 株式会社资生堂
地址 日本东京都
(72)发明人 宫泽和之 R·吉莱 B·麦卡锡 金丸哲也
(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
专利代理师 马妮楠 段承恩
(51)Int.Cl.
A61K 8/49(2006.01)
A61K 31/525(2006.01)
A61K 45/00(2006.01)
A61P 17/00(2006.01)
A61P 17/18(2006.01)
A61Q 19/00(2006.01)
A61K 36/02(2006.01)
A61K 8/27(2006.01)
A61K 8/29(2006.01)
A61K 8/67(2006.01)
A61K 33/24(2019.01)
A61K 33/30(2006.01)

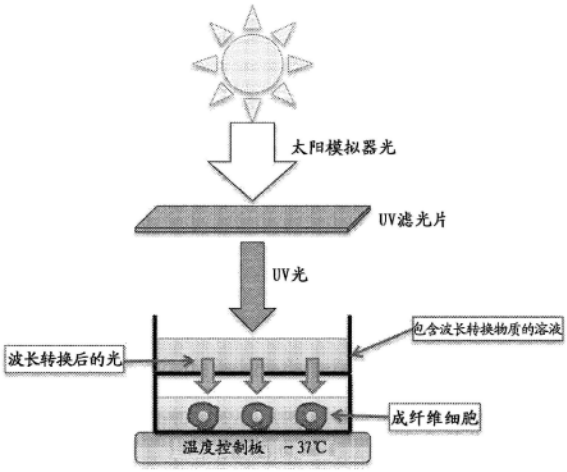
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

抗氧化剂或皮肤应激抑制剂

(57)摘要

本发明的目的是提供新的抗氧化剂或皮肤应激抑制剂。提供含有波长转换物质作为有效成分的抗氧化剂或皮肤应激抑制剂、含有这样的抗氧化剂或皮肤应激抑制剂的组合物和制品、以及用于在使用了它们的皮肤中抑制氧化和/或皮肤应激的方法。通过本发明，有效地利用紫外线而在皮肤细胞中抑制氧化和/或皮肤应激，从而可以对皮肤发挥有利的作用。



CN 115023216 A

1.一种抗氧化剂或皮肤应激抑制剂,其含有波长转换物质作为有效成分,

所述波长转换物质转换入射光所包含的紫外线的波长而放出与所述紫外线的波长相比长的波长的出射光。

2.根据权利要求1所述的抗氧化剂或皮肤应激抑制剂,所述紫外线在200nm～400nm具有峰波长。

3.根据权利要求1或2所述的抗氧化剂或皮肤应激抑制剂,所述出射光在450nm～700nm具有峰波长。

4.根据权利要求1～3中任一项所述的抗氧化剂或皮肤应激抑制剂,所述波长转换物质包含选自别藻蓝蛋白、C-藻蓝蛋白、R-藻蓝蛋白、藻红蓝蛋白、B-藻红蛋白、b-藻红蛋白、C-藻红蛋白、和R-藻红蛋白中的1种或多种藻胆蛋白;选自氧化锌荧光体、钛酸镁荧光体、和磷酸钙荧光体中的1种或多种无机荧光体;选自维生素A、β胡萝卜素、维生素K、维生素B1、维生素B2、维生素B6、维生素B12、叶酸、烟酸、番茄红素、栀子、红花、姜黄、胭脂虫红、紫苏、紫甘蓝、黄酮类、类胡萝卜素、醌型化合物、卟啉类、花色素苷类、和多酚类中的1种或多种成分;以及/或选自红色401号、红色227号、红色504号、红色218号、橙色205号P、黄色4号、黄色5号、绿色201号、绿色204号、蓝色1号、2,4-二氨基苯氧基乙醇盐酸盐、紫色201号、紫色401号、黑色401号、红色226号、黄色401号、黄色205号、蓝色404号、红色104号、和间氨基苯酚中的1种或多种色素。

5.根据权利要求4所述的抗氧化剂或皮肤应激抑制剂,所述波长转换物质包含选自别藻蓝蛋白、C-藻蓝蛋白、R-藻蓝蛋白、藻红蓝蛋白、B-藻红蛋白、b-藻红蛋白、C-藻红蛋白、和R-藻红蛋白中的1种或多种藻胆蛋白;选自氧化锌荧光体、钛酸镁荧光体、和磷酸钙荧光体中的1种或多种无机荧光体;以及/或选自维生素B1、维生素B2、维生素B6、和维生素B12中的1种或多种维生素B。

6.一种组合物,其含有权利要求1～5中任一项所述的抗氧化剂或皮肤应激抑制剂。

7.根据权利要求6所述的组合物,所述组合物为皮肤外用组合物,其用于通过使皮肤暴露于包含紫外线的光而在皮肤中的氧化和/或皮肤应激的抑制。

8.一种用于在对象的皮肤中抑制氧化和/或皮肤应激的美容方法,其包含:

将权利要求6或7所述的组合物涂抹于对象的皮肤;以及

使涂抹所述组合物后的皮肤暴露于包含紫外线的光。

9.一种制品,其含有权利要求1～5中任一项所述的抗氧化剂或皮肤应激抑制剂。

10.根据权利要求9所述的制品,所述制品用于通过使皮肤暴露于使包含紫外线的光通过了该制品后的光从而在皮肤中抑制氧化和/或皮肤应激。

11.一种用于在对象的皮肤中抑制氧化和/或皮肤应激的美容方法,其包含:

使包含紫外线的光通过权利要求9或10所述的制品;以及

使对象的皮肤暴露于所述通过光。

抗氧化剂或皮肤应激抑制剂

技术领域

[0001] 本发明涉及含有波长转换物质的抗氧化剂或皮肤应激抑制剂、含有这样的抗氧化剂或皮肤应激抑制剂的组合物和制品、以及用于在使用了它们的皮肤中抑制氧化和/或皮肤应激的方法。

背景技术

[0002] 作为由紫外线引起的对皮肤的有害影响，例如，有皮肤癌、光老化、斑、皱纹、炎症这样的不良影响，从健康、美容的观点考虑也是不优选的。

[0003] 因此，采取了大量用于对肌肤防御紫外线的对策。可举出例如，防晒剂的使用、在不接触日光那样的室内的活动、进行了抗UV加工的帽子、衣服、抗紫外线膜的使用等。

[0004] 现有技术文献

[0005] 专利文献

[0006] 专利文献1：日本专利第6424656号公报

[0007] 专利文献2：日本专利第6361416号公报

[0008] 专利文献3：国际公开第2018/004006号

[0009] 专利文献4：日本特开2018-131422号公报

[0010] 专利文献5：日本特开平5-117127号公报

[0011] 专利文献6：日本专利第4048420号公报

[0012] 专利文献7：日本专利第4677250号公报

[0013] 专利文献8：日本专利第3303942号公报

[0014] 专利文献9：日本特开2017-88719号公报

[0015] 专利文献10：国际公开第2018/117117号

发明内容

[0016] 发明所要解决的课题

[0017] 本发明的课题是提供利用了紫外线的波长的调制的新的抗氧化剂或皮肤应激抑制剂。

[0018] 用于解决课题的手段

[0019] 本发明人等为了能够对皮肤有用地利用紫外线而进行了深入研究。其结果发现，如果紫外线经由转换紫外线的波长的波长转换物质而照射到皮肤细胞，则氧化应激相关蛋白质的表达变化，想到了含有波长转换物质的抗氧化剂或皮肤应激抑制剂。

[0020] 本申请提供以下发明。

[0021] (1)一种抗氧化剂或皮肤应激抑制剂，其含有波长转换物质作为有效成分，

[0022] 上述波长转换物质转换入射光所包含的紫外线的波长而放出与上述紫外线的波长相比长的波长的出射光。

[0023] (2)根据(1)所述的抗氧化剂或皮肤应激抑制剂，上述紫外线在200nm～400nm具有

峰波长。

[0024] (3)根据(1)或(2)所述的抗氧化剂或皮肤应激抑制剂,上述出射光在450nm～700nm具有峰波长。

[0025] (4)根据(1)～(3)中任一项所述的抗氧化剂或皮肤应激抑制剂,上述波长转换物质包含选自别藻蓝蛋白、C-藻蓝蛋白、R-藻蓝蛋白、藻红蓝蛋白、B-藻红蛋白、b-藻红蛋白、C-藻红蛋白、和R-藻红蛋白中的1种或多种藻胆蛋白;选自氧化锌荧光体、钛酸镁荧光体、和磷酸钙荧光体中的1种或多种无机荧光体;选自维生素A、β胡萝卜素、维生素K、维生素B1、维生素B2、维生素B6、维生素B12、叶酸、烟酸、番茄红素、栀子(クチナシ)、红花(ベニバナ)、姜黄(ウコン)、胭脂虫红(コチニール)、紫苏(シソ)、紫甘蓝(赤キャベツ)、黄酮类(flavonoid)、类胡萝卜素、醌型化合物(quinoid)、卟啉类、花色素苷类、和多酚类中的1种或多种成分;以及/或选自红色401号、红色227号、红色504号、红色218号、橙色205号P、黄色4号、黄色5号、绿色201号、绿色204号(Pyranine Conc)、蓝色1号、2,4-二氨基苯氧基乙醇盐酸盐、紫色201号(Alizurine Purple SS)、紫色401号、黑色401号、红色226号(Helindone Pink)、黄色401号、黄色205号、蓝色404号、红色104号、和间氨基苯酚中的1种或多种色素。

[0026] (5)根据(4)所述的抗氧化剂或皮肤应激抑制剂,上述波长转换物质包含选自别藻蓝蛋白、C-藻蓝蛋白、R-藻蓝蛋白、藻红蓝蛋白、B-藻红蛋白、b-藻红蛋白、C-藻红蛋白、和R-藻红蛋白中的1种或多种藻胆蛋白;选自氧化锌荧光体、钛酸镁荧光体、和磷酸钙荧光体中的1种或多种无机荧光体;以及/或选自维生素B1、维生素B2、维生素B6、和维生素B12中的1种或多种维生素B。

[0027] (6)一种组合物,其含有(1)～(5)中任一项所述的抗氧化剂或皮肤应激抑制剂。

[0028] (7)根据(6)所述的组合物,上述组合物为皮肤外用组合物,其用于通过使皮肤暴露于包含紫外线的光而在皮肤中的氧化和/或皮肤应激的抑制。

[0029] (8)一种用于在对象的皮肤中抑制氧化和/或皮肤应激的美容方法,其包含:

[0030] 将(6)或(7)所述的组合物涂抹于对象的皮肤;以及

[0031] 使涂抹上述组合物后的皮肤暴露于包含紫外线的光。

[0032] (9)一种制品,其含有(1)～(5)中任一项所述的抗氧化剂或皮肤应激抑制剂。

[0033] (10)根据(9)所述的制品,上述制品用于通过使皮肤暴露于使包含紫外线的光通过了该制品后的光从而在皮肤中抑制氧化和/或皮肤应激。

[0034] (11)一种用于在对象的皮肤中抑制氧化和/或皮肤应激的美容方法,其包含:

[0035] 使包含紫外线的光通过(9)或(10)所述的制品;以及

[0036] 使对象的皮肤暴露于上述通过光。

[0037] 发明的效果

[0038] 本发明可以有效地利用紫外线而在皮肤细胞中抑制氧化和/或皮肤应激。基于由此对皮肤带来有利的作用这样的认识。此外,本发明对以往主要作为色素、颜料、紫外线散射剂、紫外线吸收剂、营养成分、抗氧化剂等而被利用的上述化合物提供新的用途。进一步,关于本发明,即使是迄今为止因为美容、健康上的理由而尽量避免了紫外线的人,有时也带来感觉想要积极地外出这样的生活品质的提高。

附图说明

[0039] 图1为实验1的示意图。

具体实施方式

[0040] 本发明的抗氧化剂或皮肤应激抑制剂含有波长转换物质作为有效成分。所谓波长转换物质，是指转换入射光所包含的紫外线的波长而放出与上述紫外线的波长相比长的波长的出射光的物质。

[0041] 紫外线可以包含UVA、UVB、UVC等。在某实施方式中，紫外线为在200nm～400nm具有峰的波长的光。此外，例如在太阳光这样的入射光中可以包含紫外线。或者，入射光可以为紫外线，也可以使用人工生成的紫外线。紫外线能够对皮肤带来各种作用。作为一例，已知紫外线引起晒斑、晒黑这样的晒伤、引起活性氧的生成、对细胞造成DNA的损伤。

[0042] 通过波长转换物质而放出的出射光与紫外线相比波长长，优选在500nm～700nm具有峰波长。出射光例如虽然没有限定，但是可以在450nm、460nm、470nm、480nm、490nm、500nm、510nm、520nm、530nm、540nm、550nm、560nm、570nm、580nm、590nm、600nm、610nm、620nm、630nm、640nm、650nm、660nm、670nm、680nm、690nm、700nm、或这些数值的任意的范围内具有1或多个峰，或可以为红色光、橙色光、绿色光、蓝色光等。在某实施方式中，波长转换物质在用200nm～400nm的激发光进行了激发时发出的光的主波长显示450nm～700nm，作为一例显示500nm～700nm。

[0043] 作为波长转换物质的例子，可举出以下成分：可举出别藻蓝蛋白、C-藻蓝蛋白、R-藻蓝蛋白、藻红蓝蛋白、B-藻红蛋白、b-藻红蛋白、C-藻红蛋白、R-藻红蛋白等藻胆蛋白；维生素A、β胡萝卜素、维生素K、维生素B1、维生素B2、维生素B6、维生素B12、叶酸、烟酸、番茄红素、栀子、红花、姜黄、胭脂虫红、紫苏、紫甘蓝、黄酮类、类胡萝卜素、醌型化合物、卟啉类、花色素苷类、多酚类等天然来源或合成成分；红色401号、红色227号、红色504号、红色218号、橙色205号P、黄色4号、黄色5号、绿色201号、绿色204号、蓝色1号、2,4-二氨基苯氧基乙醇盐酸盐、紫色201号、紫色401号、黑色401号、红色226号、黄色401号、黄色205号、蓝色404号、红色104号、间氨基苯酚等色素；掺杂在无机化合物中使其具有荧光的荧光体，例如，日本专利第6424656号所记载的包含非晶质二氧化硅粒子、铈、和磷和/或镁的蓝色荧光体和日本专利第6361416号所记载的包含对碱土金属硫化物与镓化合物的混晶物进行铕活化而得的化合物的红色荧光体、国际公开第2018/004006号所记载的氧化锌荧光体、日本特开2018-131422号所记载的氧化锌荧光体；日本特开平5-117127号所记载的无机荧光体；等。在某实施方式中，无机荧光体为选自下述荧光体中的1种或多种荧光体，所述荧光体为：将可以如ZnO:Zn、Zn_{1+z}、ZnO_{1-x}那样表示的氧化锌用国际公开第2018/004006号所记载的例如硫化锌、硫酸锌等硫化盐和/或硫酸盐这样的含硫化合物掺杂而得的荧光体、将$MgTiO_3$、Mg_2TiO_4这样的钛酸镁用锰掺杂而得的钛酸镁荧光体、和将$Ca(H_2PO_4)_2$、$CaHPO_4$、$Ca_3(PO_4)_2$这样的磷酸钙用铈掺杂而得的磷酸钙荧光体。

[0044] 波长转换物质可以从动物、植物、藻类等天然物通过提取等方法来获得，也可以通过化学合成这样的人工方法来获得。例如，藻胆蛋白可以通过将螺旋藻(Spirulina platensis)等蓝藻类、紫球藻(Porphyridium purpureum)等红藻类这样的藻类通过例如日本专利第4048420号、日本专利第4677250号、日本专利第3303942号等所记载的方法进行提

取来调制。氧化锌荧光体可以通过例如国际公开第2018/004006号、日本特开2018-131422号、日本特开平5-117127号所记载的方法来制造。钛酸镁荧光体可以通过日本特开2017-88719号所记载的方法来制造。磷酸钙荧光体可以通过国际公开第2018/117117号所记载的方法来制造。

[0045] 只要不损害本发明的波长转换效果，这些波长转换物质就可以由上面例示的成分构成，也可以包含上面例示的成分，可以单独使用也可以混合多种。例如，可以在上述藻胆蛋白、无机物荧光体中混合其它波长转换物质例如维生素B(维生素B1、维生素B2、维生素B6、维生素B12等)而以协同效果作为目标。然而，这些成分为例示，也可以使用发挥本发明的波长转换效果的任何物质。

[0046] 此外，只要不损害本发明的波长转换效果，本发明的抗氧化剂或皮肤应激抑制剂、组合物或制品中的波长转换物质的含量就没有特别限定，可以根据波长转换物质的种类、抗氧化剂或皮肤应激抑制剂或组合物的用途来适当确定。例如，在0.01～99.99重量％、0.1％～999重量％等范围内是任意的。

[0047] 所谓皮肤应激，是指皮肤、特别是表皮和真皮中的细胞受到的氧化应激。通常，皮肤的细胞通过活性氧(ROS)而受到损伤，引起炎症、皮肤屏障功能的降低。因此，所谓皮肤应激高的状态，是指通过活性氧而皮肤细胞蓄积了损伤的状态。活性氧通过细胞的电子传递系统的异常反应、紫外线照射而产生。如果向本发明的抗氧化剂或皮肤应激抑制剂照射紫外线则产生出射光，出射光通过使皮肤细胞中氧化应激相关蛋白质的表达变化，从而发挥抗氧化作用和/或皮肤应激抑制作用。作为氧化应激相关蛋白质，可举出AhR、AhRR、CYP1B1、和HMOX1等。抗氧化作用和/或皮肤应激抑制作用可以为通过紫外线而被诱发了的氧化应激和/或皮肤应激的抑制作用，也可以为因紫外线以外的原因而被诱发了的氧化应激和/或皮肤应激的抑制作用。本发明的抗氧化剂或皮肤应激抑制剂可以使用于任意的对象，也可以被应用于在室外等被暴露于紫外线的对象、受到氧化应激和/或皮肤应激的对象。

[0048] 芳香族烃受体(AhR)为属于bHLH-PAS(Basic Helix-Loop-Helix-Per-Arnt-Sim)家族的转录因子。AhR也已知二恶英(Dioxin)等芳香族烃成为配体，被活化而移动到核内，作为转录因子起作用，另一方面，通过UV被活化。通过被活化，从而使作为药物代谢酶的CYP1、谷胱甘肽S-转移酶-Y亚单位等与异生代谢有关的酶组的表达增加，并且将与ROS蓄积有关的途径活化。通过ROS蓄积，从而发生氧化应激，产生炎症细胞因子，并且发生氧化的DNA损伤。

[0049] 芳香族烃受体阻遏物(AHRR)作为抑制AhR的作用的阻遏物起作用。通过AHRR的表达增大从而AhR的活性被抑制，由此，药物代谢途径和ROS蓄积途径被抑制。

[0050] 细胞色素P4501B1(CYP1B1)为属于细胞色素P450超家族的酶，是与多环芳香族烃等的药物代谢有关的酶。通过UV照射而在角质形成细胞中表达增大。此外，通过AHR被活化，诱导氧化应激途径。

[0051] 血红素加氧酶1(HMOX1)为参与血红素代谢的起动步骤的酶。HMOX1将血红素分解为胆绿素。血红素为生命活动所必需的辅基，但从蛋白质游离了的血红素成为产生活性氧的有害的分子。因此，HMOX1的活化有助于氧化应激的降低和抗炎症。HOMX1通过UV照射等的氧化应激而被诱导。

[0052] 本发明的抗氧化剂或皮肤应激抑制剂和组合物的施与形态是任意的，但为了通过

使皮肤暴露于包含紫外线的光而皮肤中的氧化和/或皮肤应激的抑制，有时优选为药品、准药品、化妆品等皮肤外用剂。在使用本发明的抗氧化剂或皮肤应激抑制剂或组合物作为皮肤外用剂的情况下，剂型、涂抹法、施与次数等可以任意确定。例如，可以以化妆水、喷雾、油、霜、乳液、凝胶、防晒剂、晒黑剂这样的形态，定期或不定期地例如早晨、白天、傍晚等1天1次～数次，在外出、野外活动、海洋运动、滑雪等予想暴露于阳光之前等每次涂抹于皮肤。

[0053] 此外，本发明的抗氧化剂或皮肤应激抑制剂和组合物可以根据需要任意选择例如赋形剂、保存剂、增稠剂、粘合剂、崩解剂、分散剂、稳定剂、胶凝剂、抗氧化剂、表面活性剂、保存剂、油分、粉末、水、醇类、增稠剂、螯合剂、有机硅类、抗氧化剂、保湿剂、香料、各种药效成分、防腐剂、pH调节剂、中和剂等添加剂而并用。进一步，为了提高本发明的效果，也可以并用其它抗氧化剂或皮肤应激抑制剂等。

[0054] 此外，本发明也提供包含本发明的抗氧化剂或皮肤应激抑制剂的、用于抑制皮肤中氧化和/或皮肤应激的例如遮阳板、帽子、衣服、手套、屏幕膜、窗用喷雾、窗用霜、窗材料、墙壁材料这样的制品。与上述同样地，本发明的制品中的添加剂等的使用、制品的形态等也是任意的。

[0055] 此外，本发明也提供本发明的抗氧化剂或皮肤应激抑制剂、组合物或制品的制造方法。此外，也提供用于在对象的皮肤中抑制氧化和/或皮肤应激的方法，这里，该方法包含：将本发明的抗氧化剂或皮肤应激抑制剂或组合物涂抹于对象的皮肤、以及使涂抹上述抗氧化剂或皮肤应激抑制剂或组合物后的皮肤暴露于包含紫外线的光；或使包含紫外线的光通过本发明的制品、以及使对象的皮肤暴露于上述通过光，该抗氧化剂或皮肤应激抑制剂、组合物和制品转换入射光所包含的紫外线的波长而放出与上述紫外线的波长相比长的波长的出射光，优选使在200nm～400nm具有峰波长的紫外线通过而成为在450nm～700nm、作为一例在500nm～700nm具有峰波长的光。用于在对象的皮肤中抑制氧化和/或皮肤应激的方法有时以美容作为目的，而不是医生、医疗从业者使用的治疗方法。此外，本发明也提供包含向对象提示本发明的美容方法、抗氧化剂或皮肤应激抑制剂、组合物或制品的、支援对象的美容行为的美容咨询方法。

[0056] 实施例

[0057] 接下来通过实施例进一步详细地说明本发明。需要说明的是，本发明不限定于此。

[0058] 实验1：由各种波长转换物质的应用引起的基因表达的变化

[0059] 实验1-1：波长转换物质的调制

[0060] 如以下那样调制出波长转换物质。

[0061] (1)C-藻蓝蛋白

[0062] C-藻蓝蛋白(C-phycocyanin:Lina Blue)由螺旋藻(Spirulina platensis)提取物获得，吸收光谱在350nm具有峰波长，发光光谱在640nm和700nm具有峰波长。

[0063] (2)核黄素(维生素B2)

[0064] 核黄素(Riboflavin)也被称为维生素B2，吸收光谱在445nm具有峰波长，发光光谱在530nm具有峰波长。

[0065] (3)氧化锌荧光体

[0066] 使用了堺化学工业株式会社制的Lumate G。Lumate G为如国际公开第2018/004006号所记载地那样将ZnO用含硫化合物掺杂后进行烧成而得的氧化锌荧光体，吸收光

谱在365nm具有峰波长,发光光谱在510nm具有峰波长。

[0067] (4)钛酸镁荧光体

[0068] 使用了堺化学工业株式会社制的Lumate R。Lumate R为将$MgTiO_3$用锰进行掺杂而得的钛酸镁荧光体,吸收光谱在365nm具有峰波长,发光光谱在660～680nm的带具有峰波长。

[0069] 将(1)～(2)的波长转换物质溶解于水,调制出1%和5%的浓度的溶液。

[0070] (3)～(4)的波长转换物质分散于醇而调制出5%和10%的分散液。

[0071] 实验1-2:细胞试样的调制

[0072] 如以下那样调制出细胞试样。

[0073] 1.使用了Normal Human Epidermal Keratinocytes PromoCell社制的人皮肤角质形成细胞。将用液氮保存了的细胞悬浮液(1mL)供于热水浴(37℃)而解冻为小的冰颗粒残留的程度,接着用9mL的温KGM培养基进行了稀释。

[0074] 2.将稀释物温和混合后转移到T75烧瓶中,在37℃下孵育了一晚。

[0075] 3.第二天,将培养基更换为10mL的新鲜培养基。

[0076] 4.将培养基定期地(2～3天)更换,继续进行细胞的增殖。其间,使用显微镜观察细胞,确认了细胞以正确的形态增殖。

[0077] 5.在细胞达到约80%的汇合(confluent)后,将细胞传代。

[0078] 6.细胞的传代通过用10mL的温PBS将细胞洗涤1次后吸引来进行。

[0079] 7.将5mL的温胰蛋白酶加入到T75烧瓶中,用胰蛋白酶溶液覆盖烧瓶的底面在室温下放置1分钟后吸引。

[0080] 8.对于角质形成细胞,将烧瓶在37℃的烘箱内静置(最大)5分钟。使用显微镜观察细胞,确认到细胞小且为椭圆形。

[0081] 9.然后,轻轻地敲击T75烧瓶的侧面而使细胞游离。使用显微镜观察细胞,确认到细胞自由活动。

[0082] 10.对于角质形成细胞,再悬浮于5mL的温胰蛋白酶中和溶液,转移到灭菌50mL Falcon管。将烧瓶进一步用5mL的温FGM冲洗而加入到Falcon管从而确实地移动全部细胞。

[0083] 11.将细胞以10,000rpm离心5分钟(4℃),一边注意不打乱细胞颗粒一边除去了上清液。

[0084] 12.角质形成细胞以4×10^4细胞/孔(500μL)的浓度再悬浮于KGM,接种于胶原被膜玻璃底4孔室载玻片。

[0085] 13.将培养基每2～3天更换,使细胞增殖直到达到60～70%的汇合(根据实验的种类而不同)为止。

[0086] 14.在照射的24小时前,变更为不添加补充剂的培养基。

[0087] 实验1-3:紫外线的照射

[0088] 1.在照射的至少30分钟前接通太阳模拟器的电源而使灯变热。太阳模拟器为使用UG11滤光片的设定。UG11滤光片为仅使UVB通过而截止其它波长光的滤光片。通过了UG11滤光片的UV光在300nm～385nm具有峰波长。

[0089] 2.将温度控制板接通而设定为33℃。

[0090] 3.将在实验1-2中调制的细胞用温PBS洗涤1次。

[0091] 4.在各孔中加入0.5mL的加温了的Martinez溶液(145mM NaCl,5.5mM KCl,1.2mM $MgCl_2.6H_2O$,1.2mM $NaH_2PO_4.2H_2O$,7.5mM HEPES,1mM $CaCl_2$,10mM D-葡萄糖)。

[0092] 5.如图1所示那样,将细胞孔载置在板上,进一步在其上,将在实验1-1中调制的包含波长转换物质(1)～(4)的溶液0.4ml注入到24孔板的各孔中,以覆盖加有细胞的孔的方式载置,波长转换物质的溶液不与细胞溶液直接接触,UV光通过波长转换物质的溶液而被照射到细胞溶液

[0093] 6.以合计成为100mJ/cm^2的剂量的方式进行了照射。此外,作为对照,制作出在细胞孔上不载置波长转换物质的板而向细胞直接照射了UV光的试样、和不向细胞照射UV光而在暗处进行了培养的试样。

[0094] 7.照射后,将Martinez溶液与加温了的KGM(不添加补充剂)更换,将板返回到37℃的培养箱,孵育了24小时。

[0095] 实验2:微阵列

[0096] 实验2-1:RNA提取

[0097] 将在实验1-3中照射紫外线后孵育了24小时的细胞试样用500μl的温PBS洗涤,将PBS完全吸引。按照制品说明书使用Qiagen RNeasy Mini Kit prep(Qiagen,74106)而提取了RNA。

[0098] 实验2-2:微阵列

[0099] 使用Human基因表达用微阵列SurePrint G3 Human GE Microarray 8x60K Ver.3.0(Agilent technology),进行了在实验2-1中提取出的RNA的解析。按照Agilent Technology社提供的规程进行关于提取出的RNA的标记反应、扩增反应、精制、cRNA的定量而调制出杂交样品。将微阵列用AGILINT C MICROARRAY SCANNER观察,特定出通过波长转换物质的有无而表达显著降低或增加了的基因而示于以下。

[0100] [表1]

[0101]

基因名	Lina Blue	维生素B2	Lumate G	Lumate R
AhR	○	○	×	○
CYP1B1	○	○	×	○
AHRR	○	○	×	○
HMOX1	○	×	○	×

[0102] ○是指表达量显著变化了的基因,×是指未见表达量的变化的基因。AhR和CYP1B1的表达降低,AHRR和HMOX1的表达增加了。

[0103] 根据这些结果,通过对波长转换物质照射UV,从而显示出氧化和/或皮肤应激相关蛋白质的基因表达变化。由此,发挥抑制氧化和/或皮肤应激的效果。

[0104] 以上,对本发明的实施方式进行了说明。然而,本发明不限定于它们,化妆料、药品组合物等,能够在不超出发明的宗旨的范围适当变更。

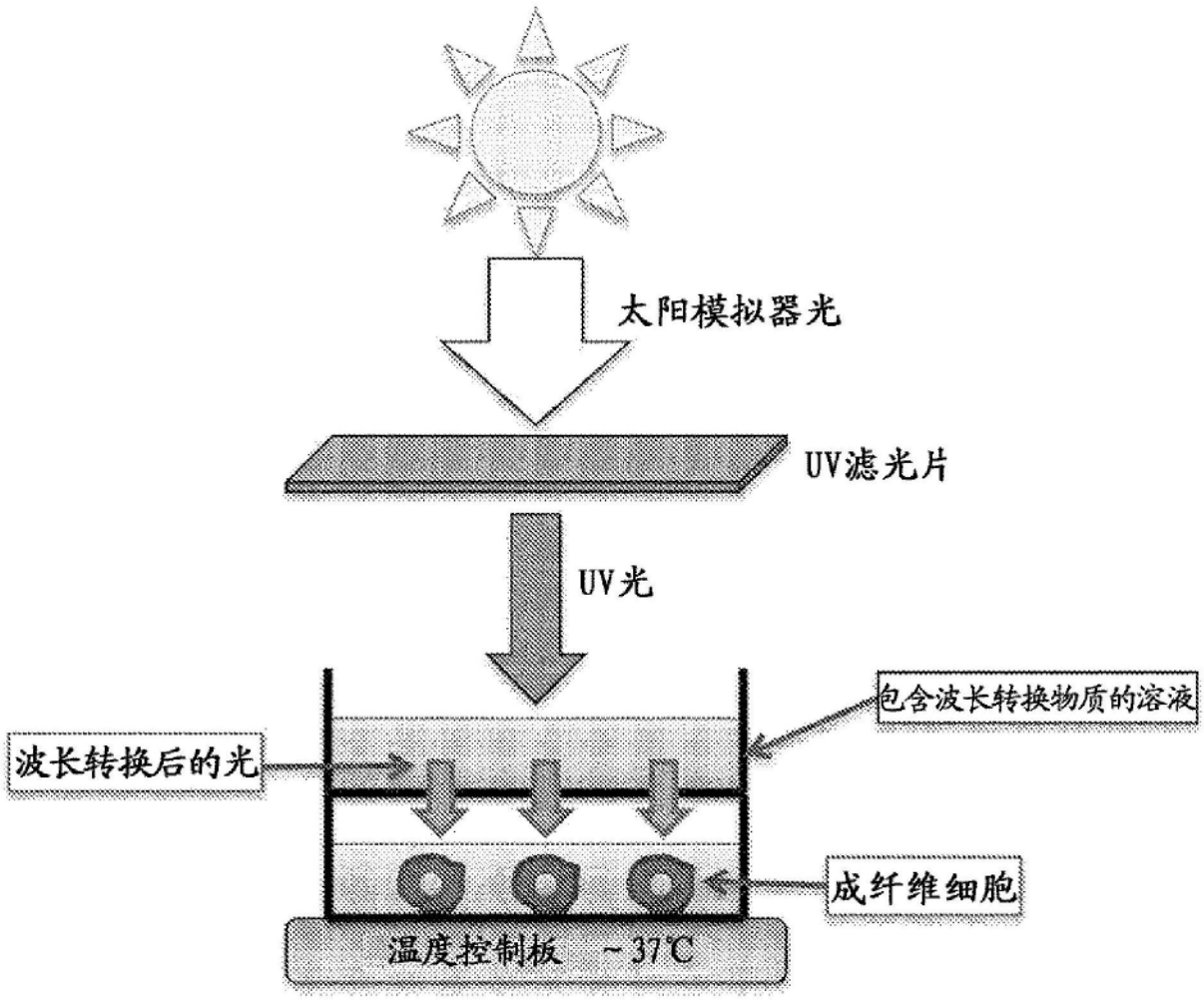


图1