

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3667771号  
(P3667771)

(45) 発行日 平成17年7月6日(2005.7.6)

(24) 登録日 平成17年4月15日(2005.4.15)

(51) Int.C1.<sup>7</sup>

F 1

A 61 K 7/48

A 61 K 7/48

A 61 K 7/00

A 61 K 7/00

A 61 K 7/00

C

H

請求項の数 3 (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願平10-515233  
 (86) (22) 出願日 平成9年9月18日(1997.9.18)  
 (65) 公表番号 特表2000-504036(P2000-504036A)  
 (43) 公表日 平成12年4月4日(2000.4.4)  
 (86) 國際出願番号 PCT/EP1997/005135  
 (87) 國際公開番号 WO1998/013017  
 (87) 國際公開日 平成10年4月2日(1998.4.2)  
 審査請求日 平成11年3月31日(1999.3.31)  
 (31) 優先権主張番号 08/721,874  
 (32) 優先日 平成8年9月27日(1996.9.27)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者  
 ユニリーバー・ナームローゼ・ベンノート  
 シャープ  
 オランダ国、エヌ・エル—3013・アー  
 ・エル・ロッテルダム、ヴェーナ・455  
 (74) 代理人  
 弁理士 川口 義雄  
 (74) 代理人  
 弁理士 伏見 直哉  
 (74) 代理人  
 弁理士 田中 夏夫  
 (72) 発明者  
 グレインジャー、スチュワート・ペイトン  
 アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・O  
 7652、パラマス、ヒルトン・プレイス  
 ・780

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】アミドとレチノイドを含有するスキンケア組成

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

次のものを含む皮膚コンディショニング組成物：

(a) 0.001%から10%までの、レチノール、レチニルエステルおよびそれらの混合物から成る群から選択される化合物；

(b) 0.0001%から50%までのラクタミド-モノエタノールアミド、C<sub>13</sub>-ヒドロキシ酸アミド、N-ヒドロキシエチル-2-ヒドロキシ-C<sub>16</sub>アミド、12-ヒドロキシ-N-(2-ヒドロキシエチル)オクタデカナミド、およびヒマシ油のモノエタノールアミドからなる群より選択されるヒドロキシ脂肪酸のアミド；ならびに

(c) 美容学的に許容される賦形剤。

10

## 【請求項 2】

レチニルエステルが、パルミチン酸レチニル、酢酸レチニル、プロピオン酸レチニル、リノール酸レチニルおよびそれらの混合物から成る群から選択される、請求項1の組成物。

## 【請求項 3】

成分(a)がレチノールである請求項1の組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 発明の分野

本発明は、アミドとレチノールまたはレチニルエステルを含有するスキンケア組成、ならびにそのような組成を皮膚に適用することを含む美容方法。

## 発明の背景

20

レチノール(ビタミンA)は人体において自然に生じる内因性化合物であり、正常な上皮細胞の分化にとって必須である。天然および合成のビタミンA誘導体は様々な皮膚疾患の治療に広く用いられており、皮膚修復あるいは再生剤として使用されてきた。レチノイン酸は様々な皮膚の状態、たとえば座瘡、しわ、乾癬、加齢斑および変色を治療するために用いられてきた。たとえば、Vahlquist, A.ら、J. Invest. Dermatol. Vol. 94, Holland D. B. と Cunliffe, W. J. (1990), p. 496-498; Ellis, C. N. ら、"Pharmacology of Retinols in Skin", Vaseline, Karger, Vol. 3, (1989), p. 249-252; Lowe, N. J. ら、"Pharmacology of Retinols in Skin", Vol. 3, (1989), p. 240-248; PCT特許願第WO93-19743号参照。

レチノールあるいはレチニルエステルの使用は、レチノイン酸よりも好ましいと考えられている。レチノールは内因性化合物である。レチノールのエステルは *in vivo* で加水分解してレチノールを生じる。レチノールおよびレチニルエステルはレチノイン酸よりも安全とみなされている。残念ながら、レチノールおよびレチニルエステルは、皮膚への恩恵を提供するという点ではレチノイン酸ほど有効ではない。

本発明は、一部には、ヒドロキシ脂肪酸のアミドとレチノールあるいはレチニルエステルの組合せがケラチノサイトの分化の相乗的阻害を生じるという発見に基づく。レチノールあるいはレチニルエステルと組合わせたヒドロキシ脂肪酸アミドの作用は、レチノイン酸の作用と類似していた。従って、レチノールあるいはレチニルエステルとヒドロキシ脂肪酸の混合物は、レチノイン酸類似の作用を有するが、レチノイン酸よりも使い易く、より安全に使用できる。

Thornfeldt(米国特許第5,057,501号)は、セスキテルペン化合物と、約0.025%から約35%までのモノカルボキシル脂肪酸、エステル、あるいはアミドを含有する組成による丘疹鱗屑性および湿疹性疾患の治療のための方法を開示している。当該組成はレチノイドも含みうる; Thornfeldtは、一部のレチノイド、すなわちイソトレチノイン、トレチノイン、エトレシン(これらはすべてレチノイン酸の立体型である)ならびにエトレチネート(トリメトキシフェニルレチノイン酸のエステル)が、丘疹鱗屑性疾患に対する効果を示したことを教示している。PCT特許願第WO/93-25177号(Procter and Gamble)は、特定の種類の非環式カルボキサミド冷却剤を含有し、且つレチノイン酸およびその誘導体(たとえば *cis* および *trans*)のようなレチノイドを含みうる、皮膚への局所適用のための組成を開示している。PCT特許願第WO/9403156号(Rhone Poulen)は、不潔な皮膚(たとえば丘疹、膿疱、あるいは面ぼうに罹患した皮膚)の治療と予防のための有効成分としてリノール酸あるいは誘導体を含有する局所組成を開示している; 当該組成は0.025から0.1%重量のトレチノインも含みうる。欧州特許願第0 388 275号(Pierre Fabre Cosmetique)は、アルキルカルボキサミドと亜鉛塩を含有する、脂漏を治療するための組成を開示しており、亜鉛塩はレチノイン酸亜鉛であってもよい。

Klaussら(米国特許第5,216,148号)は、皮膚の新生物、皮膚病、および皮膚の老化を治療し、予防するための特異的複合カルボキサミドの使用を開示している。Van Scottら(米国特許第4,380,549号)およびYula(米国特許第4,363,815号)は、ヒドロキシ酸あるいはそのアミドによる座瘡、乾燥、剥離性、落屑性の皮膚の治療を開示している。第EP 0 582 458号はN, N-(1,4Cアルキル)ラウラミドの使用を開示している。第EP 0 559 304号は、皮膚スムースニング剤として少なくとも25個の炭素原子のヒドロカルビル鎖を含むアミドの使用を開示している。Beauqueyら(米国特許第5,308,551号)は、多数の成分の中でも特に、8-16C脂肪酸の1-4Cアルカノールアミドを含有する皮膚洗浄およびコンディショニング組成を開示している。英国特許明細書第1,126,289号(Hoffmann-La Roche)は、ビタミンAアルコールあるいはビタミンAエ

ステル、乳化剤、およびモノカルボキシル酸のアルコールあるいはジアルキルアミド（たとえばN,N-ジエチルアセトアミド、N,N-ジメチルアセトアミドあるいはN,N-ジメチルホルムアミド）から選択される溶剤を含有する保存ビタミン製剤を開示している。当該ビタミン製剤はビタミン含量が非常に高く、すなわち最小濃度が250,000 I.U.ビタミンA/m1である。さらに、上記特許願第1,126,289号に開示されているアミドはメリナミドを包含しておらず、また言及してもいいない。

より早く出願され、1996年11月13日に公開された（本出願の優先日以降）ヨーロッパ特許願第EP0742005号（Unilever；優先日1995年5月8日）は、レチノールあるいはレチニルエステルと脂肪酸アミドの組合せを開示している。かかる特許願第EP0742005号はヒドロキシ脂肪酸のアミドについては教示していない。

上記に引用した技術は、レチノールあるいはレチニルエステルとヒドロキシ脂肪酸の相乗作用的配合に基づく皮膚コンディショニング組成を開示していない。上記に引用した技術のいずれも、レチノイン酸に代わる有効な代替物質の必要性を取り上げていない。

#### 発明の概要

本発明は、一部には、次のものを含む皮膚コンディショニング組成を包含する：

(a) 0.001%から10%の、レチノールおよびレチニルエステルから成る群から選択されるレチノイド；

(b) 0.0001%から50%の、ヒドロキシ脂肪酸のアミド；および

(c) 美容学的に許容される賦形剤。

本発明はまた、本組成を皮膚に局所的に適用することを含む、皮膚をコンディショニングする美容方法を提供する。さらに、本組成を皮膚に局所的に適用することを含む、レチノイン酸の皮膚への効果を模倣する美容方法を提供する。

本文中で使用するとき、「コンディショニング」という用語は、次のひとつまたはそれ以上の予防および治療を意味する；乾燥皮膚、光線損傷した皮膚、しわのできた外観、加齢斑、老化した皮膚、乾癬、アトピー性皮膚炎。該組成はまた、皮膚の色を白くするおよび/あるいは皮脂の排泄を抑制する、および/あるいは角質層の柔軟性を高める、および全般的に皮膚の質を高めるためにも有用である。該組成は皮膚の落屑と細胞増殖を改善するためにも使用できる。

本発明の製品中のヒドロキシ脂肪酸アミドが存在することは、レチノールあるいはレチニルエステルの機能を実質的に改善する、すなわちヒドロキシ脂肪酸アミドはレチノールあるいはレチニルエステルが細胞増殖に影響を及ぼす能力を実質的に高める。ヒドロキシ脂肪酸アミドは、単独で使用するときには、皮膚への恩恵の改善にほとんどあるいは全く影響しない；皮膚への恩恵の実質的な増強は、ヒドロキシ脂肪酸アミドをレチノールあるいはレチニルエステルと組み合わせたときにのみ実現される。

要するに、本発明は、少なくとも一部には、レチノールあるいはレチニルエステルとヒドロキシ脂肪酸アミドの相乗的相互作用の発見に基づく。

本発明に従って、レチノールあるいはレチニルエステルを含有する組成中に有効量のヒドロキシ脂肪酸を含めることにより、当該組成の機能が実質的に改善される。その代わりに、ヒドロキシ脂肪酸アミドを含まない同様の製剤の機能に匹敵するように、当該アミドを含有する組成中により低いレベルのレチノールあるいはレチニルエステルを含めることもできる。

#### 好ましい実施の形態の説明

本発明の組成は、最初の必須成分として、レチノール、レチニルエステルおよびそれらの混合物から成る群から選択される化合物を含む。

「レチノール」という用語は、中でも特にレチノールの次の異性体を含む：オール-trans-レチノール、13-cis-レチノール、11-cis-レチノール、9-cis-レチノール、3,4ジデヒドロ-レチノール。好ましい異性体はオール-trans-レチノール、13-cis-レチノール、3,4-ジデヒドロ-レチノール、9-cis-レチノールである。最も好ましいのは、広く市販されていることからオール-trans-

10

20

40

50

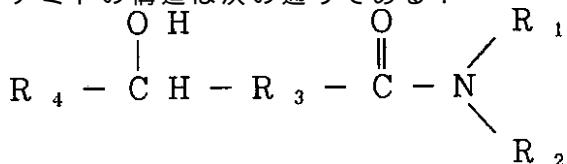
s - レチノールである。

レチニルエステルはレチノールのエステルである。「レチノール」の語は上記に定義した。本発明での使用に適するレチニルエステルは、レチノールのC<sub>1</sub> - C<sub>10</sub>エステル、好ましくはC<sub>2</sub> - C<sub>20</sub>エステル、最も好ましくは、より広く市販されていることからC<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>およびC<sub>10</sub>エステルである。レチニルエステルの例は次のものを含むがそれらに限定されない：パルミチン酸レチニル、ギ酸レチニル、酢酸レチニル、プロピオン酸レチニル、酪酸レチニル、吉草酸レチニル、イソ吉草酸レチニル、ヘキサン酸レチニル、ヘプタン酸レチニル、オクタン酸レチニル、ノナン酸レチニル、デカン酸レチニル、ウンデカン酸レチニル、ラウリン酸レチニル、トリデカン酸レチニル、ミリスチン酸レチニル、ペントデカン酸レチニル、ヘプタデカン酸レチニル、ステアリン酸レチニル、イソステアリン酸レチニル、ノナデカン酸レチニル、アラキドン酸レチニル、ベヘン酸レチニル、リノール酸レチニル、オレイン酸レチニル、乳酸レチニル、グリコール酸レチニル、ヒドロキシカプリル酸レチニル、ヒドロキシラウリン酸レチニル、酒石酸レチニル。

本発明において使用するための好ましいエステルは、最も広く市販されており、従って最も安価であることから、パルミチン酸レチニル、酢酸レチニルおよびプロピオン酸レチニルから選択される。

該レチノイドは本発明の組成において、0.001%から10%の量で、好ましくは0.01%から1%の量で、最も好ましくは0.01%から0.5%の量で用いられる。

本発明の組成の第二の必須成分はヒドロキシ脂肪酸のアミドである。ヒドロキシ脂肪酸のアミドの構造は次の通りである：



$R_1$ 、 $R_2$ および $R_4$ はそれぞれ独立して、水素およびヒドロキシル化されていてもよく、1から20個の炭素原子を含む脂肪族飽和または不飽和、直鎖または分枝炭化水素鎖から選択される；

$R_3$  は  $-(CH_2)_n$  であり、 $n$  は 0 から 18 までの整数である；

好ましくは、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_4$  はそれぞれ独立して 2 から 20 個の炭素原子、より好ましくは 2 から 15 個の炭素原子、最も好ましくは 3 から 13 個の炭素原子を含む。

好ましくは、ヒドロキシ酸アミドは - または - ヒドロキシ酸のアミド、すなわち  $n$  は 0 または 1 である。

本発明の組成に含めるべき最も好ましいヒドロキシ脂肪酸アミドは次のものである：ラクタミド - モノエタノールアミド、 $C_{13}$  - - ヒドロキシ酸アミド（2 - ヒドロキシ -  $C_{13}$  - アミド）、N - ヒドロキシエチル - 2 - ヒドロキシ -  $C_{16}$  アミド、12 - ヒドロキシ - N - (2 - ヒドロキシエチル)オクタデカナミド、およびヒマシ油のモノエタノールアミド。

該アミドは、0.0001%から50%、好ましくは0.01%から10%、最も好ましくは0.1%から5%の範囲の量で本発明の組成に含まれる。

## 美学的に許容される賦形剤

本発明に従った組成はまた、組成を皮膚に適用した時にその分布を促進するように、組成中のレチノールおよび/あるいはレチニルエステルならびにヒドロキシ脂肪酸アミドの希釈剤、分散剤あるいは担体として働くための美容学的に許容される賦形剤も含む。

水以外のあるいは水に加えての賦形剤は、液体または固体の皮膚軟化剤、溶剤、潤滑剤、増粘剤および粉末を含みうる。特に好ましい非水性担体は、ポリジメチルシロキサンおよび/あるいはポリジメチルフェニルシロキサンである。本発明のシリコーンは、25で10から10,000,000 mm<sup>2</sup>/s(センチストーク)の範囲の粘度を有するものである。特に望ましいのは低粘度と高粘度のシリコーンの混合物である。これらのシリコーンは、General Electric CompanyからビカシルSEおよびS

F ( V i c a s i l , S E a n d S F ) の商標名で、また D o w C o r n i n g C o m p a n y から 2 0 0 および 5 5 0 シリーズとして市販されている。本発明の組成において使用できるシリコーンの量は、組成の重量の 5 % から 9 5 % 、好ましくは 2 5 % から 9 0 % の範囲である。

美容学的に許容される賦形剤は通常、組成の重量の 5 % から 9 9 . 9 % 、好ましくは 2 5 % から 8 0 % を形成し、化粧品補助剤が存在しない場合は、組成の平衡を形成することができる。好ましくは、該賦形剤は、賦形剤重量で、少なくとも 5 0 重量 % 、より好ましくは少なくとも 8 0 重量 % の水である。好ましくは、水は、本発明の組成の重量の少なくとも 5 0 重量 % 、最も好ましくは 6 0 から 8 0 重量 % を構成する。

#### 任意の皮膚有益物質と化粧品補助剤

10

油あるいは油性物質は、主として用いる乳化剤の平均親水性 - 親油性比 ( H L B ) に依存して、油中水型乳剤あるいは水中油型乳剤のいずれかを提供するための乳化剤と共に存在しうる。

本発明の組成は好ましくは遮光剤を含む。遮光剤は、紫外線を遮蔽するために一般に用いられる物質を含む。例示化合物は P A B A の誘導体、ケイ皮酸塩およびサリチル酸塩である。たとえば、オクチルメトキシシンナメートおよび 2 - ヒドロキシ - 4 - メトキシベンゾフェノン ( オキシベンゾンとしても知られる ) が使用できる。オクチルメトキシシンナメートおよび 2 - ヒドロキシ - 4 - メトキシベンゾフェノンはそれぞれ、パーソル M C X ( P a r s o l M C X ) およびベンゾフェノン - 3 ( B e n z o p h e n o n e - 3 ) の商標名で市販されている。乳化剤中で使用される遮光剤の正確な量は、所望する日光の紫外線照射からの保護の度合に依存して変化する。

20

もうひとつの好ましい任意成分は、必須脂肪酸 ( E F A ) 、すなわちすべての細胞の原形質膜形成に必須である脂肪酸から選択され、ケラチノサイトにおいては E F A 欠損は細胞を過増殖性にする。 E F A の補充はこれを矯正する。 E F A はまた、表皮の脂質生合成を強化し、表皮のバリア形成のための脂質を供給する。必須脂肪酸は、好ましくはリノール酸、 - リノレン酸、ホモ - - リノレン酸、コロンビン酸、エイコサ - ( n - 6 , 9 , 1 3 ) - トリエノイック酸 ( t r i e n o i c a c i d ) 、アラキドン酸、ティムノドン酸、ヘキサエノイック酸およびそれらの混合物から選択される。

さらにもうひとつの好ましい任意成分は、アゾール、たとえばクリンバゾール、ビフォナゾール、クロトリマゾール、ケトコナゾール、ミコナゾール、エコナゾール、イトラコナゾール、フルコナゾール、テルコナゾール、ブトコナゾール、スルコナゾール、リオナゾールおよびそれらの混合物から選択される。アゾールは、 0 . 0 0 1 から 5 0 重量 % 、好ましくは 0 . 0 0 1 から 1 0 重量 % 、最も好ましくは 0 . 1 から 5 重量 % の量で本発明の組成に含まれうる。

30

皮膚軟化剤がしばしば本発明の化粧品組成に組み込まれる。そのような皮膚軟化剤のレベルは、組成全体の重量の 0 . 5 % から 5 0 % 、好ましくは 5 % から 3 0 % の範囲をとりうる。皮膚軟化剤は、エステル、脂肪酸およびアルコール、ポリオールならびに炭化水素のような一般的な化学物質カテゴリーに分類される。

エステルはモノエステルまたはジエステルである。脂肪ジエステルの許容しうる例は、アジピン酸ジブチル、セバシン酸ジエチル、ジイソプロピルジメレート、およびコハク酸ジオクチルを含む。許容しうる分枝鎖脂肪エステルは、ミリスチン酸 2 - エチル - ヘキシル、ステアリン酸イソプロピルおよびパルミチン酸イソステアリルを含む。許容しうる三塩基酸エステルは、トリリノール酸トリイソプロピルおよびクエン酸トリラウリルを含む。許容しうる直鎖脂肪エステルは、パルミチン酸ラウリル、乳酸ミリスチル、オレイルユルケート ( o l e y l e u r c a t e ) およびオレイン酸ステアリルを含む。好ましいエステルは、ココ - カプリル酸塩 / カプリン酸塩 ( ココ - カプリル酸塩とココ - カプリン酸塩の混合物 ) 、酢酸プロピレングリコールミリスチルエーテル、アジピン酸ジイソプロピルおよびオクタン酸セチルを含む。

40

適当な脂肪アルコールおよび酸は、 1 0 から 2 0 個の炭化水素を持つ化合物を含む。特に好ましいのは、セチル、ミリスチル、パルミチンおよびステアリルアルコールおよび酸の

50

ような化合物である。

ポリオールの中で皮膚軟化剤として使用しうるのは、直鎖および分枝鎖のアルキルポリヒドロキシリル化合物である。たとえば、プロピレングリコール、ソルビトールおよびグリセリンが好ましい。またポリプロピレングリコールやポリエチレングリコールのような重合体ポリオールも有用である。ブチレンおよびプロピレングリコールも、浸透強化剤として特に好ましい。

皮膚軟化剤として使用しうる例示としての炭化水素は、12から30個の炭素原子のいずれかに炭化水素鎖を持つものである。特定例は、鉱油、石油ゼリー、スクアレンおよびイソパラフィンを含む。

本発明の組成中のもうひとつのカテゴリーの機能成分は増粘剤である。増粘剤は通常、組成の重量の0.1%から20%、好ましくは0.5%から10%の量で存在する。例示としての増粘剤は、B.F.Goodrich Companyからカーボポル(Carbopol)の商標名で市販されている交差結合ポリアクリレート材料である。キサンタン、カラゲニン、ゼラチン、カラヤ、ペクチンおよびローカストビーンゴムのようなゴムの使用できる。特定の状況下では、増粘機能は、シリコーンあるいは皮膚軟化剤としても役立つ物質によって達成することができる。たとえば、10センチストーク以上の粘度を有するシリコーンゴムやステアリン酸グリセロールのようなエステルは二重の機能性を持つ。

粉末を本発明の化粧品組成に組み込むこともできる。これらの粉末は、白亜、滑石、カオリン、デンブン、スメクタイト粘土、化学的に修飾したケイ酸アルミニウムマグネシウム、有機的に修飾したモンモリロナイト粘土、水和ケイ酸アルミニウム、燻蒸シリカ、コハク酸オクテニルデンブンアルミニウム、およびそれらの混合物を含む。

他の補助的な少量成分も該化粧品組成に組み込まれうる。これらの成分は、着色剤、乳白剤および香料を含む。これら他の補助的少量成分の量は、組成の重量の0.001%から20%の範囲をとりうる。

#### 該組成の使用

本発明に従った組成は、主としてヒトの皮膚への局所適用のための製品として、特に皮膚をコンディショニングしてなめらかにし、しわのあるまたは老化した皮膚の発現を予防あるいは低減するための作用物質として意図されている。

使用の際には、少量の該組成、たとえば1から100mlを適当な容器あるいはアプリケーターから皮膚の露出部分に適用し、そのあと必要に応じて、手あるいは指あるいは適當な装置を用いて皮膚の上に広げるおよび/あるいは皮膚にすり込む。

#### 製品形態と包装

本発明の局所皮膚治療組成は、ローション、クリームあるいはゲルとして適宜に製剤することができる。該組成は、その粘度と意図された消費者による用途に合わせて適當な容器に包装することができる。たとえば、ローションあるいはクリームは、瓶あるいはロール・ボール(roll - ball)アプリケーター、あるいは推進駆動エアロゾル装置あるいは指操作に適したポンプ付き容器に包装することができる。組成がクリームである時には、チューブあるいは蓋付き広口瓶のような変形しない瓶あるいは絞り出し容器中で簡単に保存することができる。該組成はまた、米国特許第5,063,057号に述べられているようなカプセルに入れることもできる。

従って本発明はまた、本文中で定義したような美容学的に許容しうる組成を含む密閉された容器も提供する。

以下の特定実施例は本発明をさらに例示するものである。

レチノイドはSigmaから入手した。

#### 実験材料および方法

##### 細胞培養：

分離したケラチノサイトコロニーを作製するため、トリプシン処理によって新生児の包皮から分離したヒトケラチノサイトを、照射した3T3マウス線維芽細胞の存在下でダルベッコ改変イーグル(DME)Hams F12(1:1)培地/10%ウシ胎児血清にお

10

20

20

30

40

50

いて増殖させた。上記の条件下で細胞を第二継代まで成長させ、使用時まで凍結保存した。凍結第二継代ケラチノサイトを解凍し、上記の培地で平板培養して5日間増殖させたあと、0.15 mM Caを含む、Clonetics Corporation, San Diego, CAからの血清不含MCDB 153ベースの培地であるケラチノサイト増殖培地(KGM)、あるいは0.09 mM Caを含むGIBCOからのケラチノサイト血清不含培地(KSFM)に切り換えた。7日目に、細胞が80-90%集密性であった時に、トリプシン処理し、種々の実験のために血清不含培地で平板培養した。

#### トランスグルタミナーゼアッセイ

#### トランスグルタミナーゼアッセイとケラチノサイトの分化

表皮の末期分化の過程で、角化膜(CE)として知られる15 nmの厚さの蛋白の層が細胞周辺の内側表面に形成される。CEは、表皮で発現される少なくとも2つの異なるトランスグルタミナーゼの作用が触媒する。N-(グルタミル)リシンイソジペプチド結合の形成によって互いに架橋した多数の別個の蛋白から成る。トランスグルタミナーゼI(TGase I)は表皮の分化した層、特に顆粒層において豊富に発現されるが、分化していない基底表皮中には存在しない。それ故TGase Iは表皮ケラチノサイト分化の有用なマーカであり、TGase Iのレベルが高いことはより分化した状態を示唆する。以下の実施例では、TGase I抗体を用いたELISAベースのTGase Iアッセイを使用して、培養したケラチノサイトの分化の状態を評価した。

実施例1については、次の手順を用いた：

ケラチノサイト(上述したように培養した)を200 µlの培地において3,000細胞/ウェルの密度で96ウェルプレートで平板培養した。4日間インキュベーションしたあと、培地を被検化合物の入った培地に変えた(6レプリケート/試験)。細胞をさらに72時間培養し、その後培地を吸引して、プレートを-70°で保存した。冷凍室からプレートを取り出し、PBSで細胞を洗浄した。滅菌水100 µlを加え、細胞を-70°で凍結し、その後解凍することによりフリーズフラクチャー(凍結割断)した。細胞をPBS/3%BSA(洗浄緩衝液、ウシ血清アルブミン)と共に室温で(R/T)1時間インキュベートし、その後洗浄緩衝液の新鮮アリコートで洗浄した。洗浄緩衝液で1:2,000に希釈した。Biomedical Industriesから入手した一次抗体、モノクローナル抗ヒトトランスグルタミナーゼマウス抗体(IgG)50 µlと共に細胞を1時間、37°で培養し、その後洗浄緩衝液で2回洗浄した。次に、洗浄緩衝液で1:4,000に希釈した二次抗体(Fabフラグメント、Amershamから入手したペルオキシダーゼ結合抗マウスIgG)50 µlと共に細胞を1時間、37°でインキュベートし、洗浄緩衝液で2回洗浄した。細胞を基質溶液(0.1Mのクエン酸緩衝液、pH 5.0 10 ml中o-フェニレンジアミン4 mgおよび30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3.3 µl)と共に暗所で(アルミニウムホイル下で)5分間、R/Tでインキュベートした。4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 µlを加えて反応を停止した。プレート読み取り器において492 nmでサンプルの吸光度を読み取った。6個のレプリケートのうちで、4個は両方の抗体で処置し、2個は第二抗体だけで処理した(すなわち、酵素結合Abのバックグラウンド結合を測定するため)。各々の処置の読み取り結果からバックグラウンドを差し引き、両方の抗体に接触したレプリケートについての平均±標準偏差(s.d.)を算定して、TGase Iレベルを決定した。

実施例2については、次の手順を用いた：

ケラチノサイト(上述したように培養した)を200 µlの細胞培地において3,000細胞/ウェルの密度で96ウェルプレートで平板培養した。4日間インキュベーションしたあと、培地を被検化合物の入った培地に変えた(6レプリケート/試験)。細胞をさらに72時間培養し、その後培地を吸引して、プレートを-70°で保存した。冷凍室からプレートを取り出し、細胞をさらに凍結し、融解することによりフリーズフラクチャーして、PBSで3回洗浄した。細胞をTBS/5%BSA緩衝液と共に室温で(R/T)1時間インキュベートした。次に、37°で2時間、TBS/1%BSA緩衝液で1:200に希釈した、Biomedical Technologies Inc.から入手

10

20

30

40

50

したモノクローナル抗ヒトトランスグルタミナーゼ (IgG) マウス抗体 (一次抗体) 100  $\mu$ lと共に細胞を培養し、その後洗浄緩衝液 (TBS / 1% BSA / 0.05% トウイーン - 20) で6回洗浄した。次に、37℃で2時間、洗浄緩衝液中で1:4, 000に希釈したFabフラグメント、Amershamから入手したペルオキシダーゼ複合抗マウスIgG抗体 (二次抗体) 100  $\mu$ lと共に細胞をインキュベートし、洗浄緩衝液で3回、PBSで3回洗浄した。細胞を基質溶液 (0.1Mのクエン酸緩衝液、pH 5.0 10ml中o-フェニレンジアミン4mgおよび30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3.3  $\mu$ l)と共に暗所で (アルミニウムホイル下で) 5分間、RTでインキュベートした。4N H<sub>2</sub>S O<sub>4</sub> 50  $\mu$ lを加えて反応を停止した。プレート読取り器において492nmでサンプルの吸光度を読取った。6個のレプリケートのうちで、4個は両方の抗体で処置し、2個は第二抗体だけで処理した (すなわち、酵素結合Abのバックグラウンド結合を測定するため)。各々の処置の読取り結果からバックグラウンドを差し引き、両方の抗体に接触したレプリケートについての平均  $\pm$  s.d. を算定して、TGase Iレベルを決定した。

#### DNAアッセイ

細胞処置後に検出されたTGase Iのレベルは細胞数によって影響を受けた。すなわち細胞数が多いほど検出されたTGase Iのレベルが高かった。TGase Iのレベルを同じウエル中の細胞のDNA含量に対して標準化し、従って細胞数の差による変動を排除した。各々の細胞は事実上同一のゲノムを有しており、それ故同じ量のDNAを持つので、DNAの定量は、ケラチノサイト細胞数を含めて、細胞数の特に有用な指標である。従って1つのウエルの細胞の総DNA含量は、そのウエル中の細胞数に直接比例する。DNAの定量を用いて、TGaseデータを細胞数に対して標準化した。

ケラチノサイトを200  $\mu$ lの培地において3,000細胞 / ウエルの密度で96ウエルプレートで平板培養した。4日間インキュベーションしたあと、培地を被検化合物の入った培地に変えた (6レプリケート / 試験)。細胞をさらに72時間培養し、その後培地を吸引して、プレートを-70℃で少なくとも1時間半保存した。冷凍室からプレートを取り出し、30分間解凍した。100  $\mu$ l / ウエルのヘキスト (Hoechst) 染料 (最終濃度1  $\mu$ g / ml) を加えて、これを15分間インキュベートし、カバーして、その後蛍光光度計で読取った (ex. 360nmおよびem. 460nm)。染料溶液を除去し、TGaseアッセイのためにウエルをPBSで洗浄した。

#### 実施例1

レチノイン酸はケラチノサイトの分化状態を変化させる上でレチノールよりも有効であるレチノイン酸 (RA) とレチノール (ROH) を加えたあと、細胞のDNA含量に対して標準化したトランスグルタミナーゼレベルへの作用を検討し、その結果を表1に示す。

表1

処理	平均T <sub>Gase</sub> /DNA $\times 10^{-4}$ 土標準 偏差 (%対照)	p値 vs 対照 ${}^t$ M ROH	p値 vs 2.5 $\times 10^{-7}$ ${}^t$ M ROH	p値 vs 2.5 $\times 10^{-8}$ ${}^t$ M ROH	p値 vs 2.5 $\times 10^{-9}$ ${}^t$ M ROH
対照	2.44 $\pm$ 0.24 (100%)	-	0.001	0.001	0.001
2.5 $\times 10^{-7}$ M RA	0.16 $\pm$ 0.11 (7%)	0.001	0.001	0.001	0.001
2.5 $\times 10^{-7}$ M ROH	1.14 $\pm$ 0.22 (47%)	0.001	-	0.001	0.001
2.5 $\times 10^{-8}$ M RA	1.34 $\pm$ 0.40 (55%)	0.001	0.2	0.001	0.001
2.5 $\times 10^{-8}$ M ROH	1.89 $\pm$ 0.30 (77%)	0.001	0.001	-	0.001
2.5 $\times 10^{-9}$ M RA	1.87 $\pm$ 0.49 (77%)	0.001	0.001	0.784	0.001
2.5 $\times 10^{-9}$ M ROH	2.70 $\pm$ 0.59 (>100%)	0.001	0.001	0.001	-

n=3

検討したすべての濃度、すなわち  $2.5 \times 10^{-7}$  M、 $2.5 \times 10^{-8}$  M および  $2.5 \times 10^{-9}$  M のレチノイン酸は、エタノール対照群に比べてケラチノサイトの分化を低下させ、その程度は、対応する  $2.5 \times 10^{-7}$  M、 $2.5 \times 10^{-8}$  M および  $2.5 \times 10^{-9}$  M のレチノール処置の各々の程度よりも有意に大きかった。トランスグルタミナーゼレベルの低下は、レチノイン酸とレチノールの両方について用量依存的であった。これはレチノイン

10

20

30

40

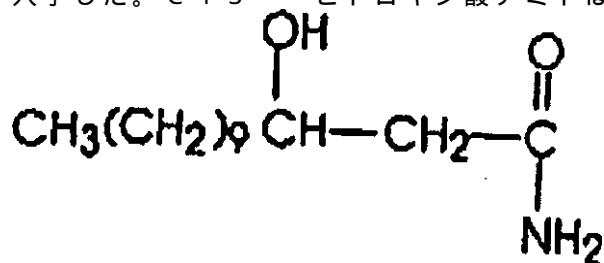
50

酸が表皮分化に対してレチノールよりも大きな阻害作用を持つことと一致する。

実施例 2

ヒドロキシ脂肪酸のアミドとレチノールは相乗的に作用し、ケラチノサイトの分化を阻害する

被検化合物での 72 時間の処置による、細胞の D N A 含量について標準化した T G a s e I レベルへの影響を検討した。アミドは Q u e s t I n t e r n a t i o n a l から入手した。C 13 - ヒドロキシ酸アミドは次の構造をもつ：



## 表2A

ケラチノサイトのTGase/DNA $\times 10^{-1}$ 土標準  
およびC<sub>13</sub>β-ヒドロキシ酸アミドの作用

処理	平均TGase/DNA $\times 10^{-1}$ 土標準 偏差 (%対照)	p値vs対照	p値vs2.5 $\times 10^{-7}$ M ROH RA	p値vs2.5 $\times 10^{-7}$ M RA	10 <sup>-8</sup> C <sub>13</sub> β- ヒドロキシ酸アミド に対するp値
対照	18.42 $\pm$ 1.88 (100%)	-	0.001	0.001	0.875
2.5 $\times$ 10 <sup>-8</sup> M RA	1.05 $\pm$ 1.05 (6%)	0.001	0.001	-	0.001
2.5 $\times$ 10 <sup>-8</sup> M レチノール	14.62 $\pm$ 2.99 (79%)	0.001	-	0.001	0.001
10 <sup>-8</sup> MC <sub>13</sub> β -ヒドロキシ酸アミド	18.53 $\pm$ 4.58 (101%)	0.875	0.001	0.001	-
2.5 $\times$ 10 <sup>-8</sup> M ROH +ヒドロキシ酸アミド	11.36 $\pm$ 2.43 (62%)	0.001	0.001	0.001	0.001

n=3

2.5 $\times$ 10<sup>-8</sup>Mのレチノイン酸はケラチノサイトのTGase Iレベルを抑制する上で非常に有効であった(対照レベルの6%への抑制)。2.5 $\times$ 10<sup>-8</sup>Mのレチノールはレチノイン酸ほど有効ではなく(79%)、10<sup>-8</sup>MのC<sub>13</sub>-ヒドロキシ酸アミドは、単独で使用した時、ケラチノサイトのTGase Iレベルに阻害作用を及ぼさなかった。しかし、2.5 $\times$ 10<sup>-8</sup>Mのレチノール+10<sup>-8</sup>MのC<sub>13</sub>-ヒドロキシ酸アミドは、ケラチノサイトのTGase Iを対照レベルの62%に抑制した。それ故、C<sub>13</sub> 50

- ヒドロキシ酸アミドとレチノールは、相乗的に作用してレチノイン酸の作用と同様にケラチノサイトの分化を抑制する。

被検化合物での72時間の処置による、細胞のDNA含量について標準化したT G a s e I レベルへの影響を検討した。「ラクタミドMEA」はラクタミドモノエタノールアミドである。この物質はC r o d a C h e m i c a l sより入手した。ラクタミドMEAは次の構造を持つ：

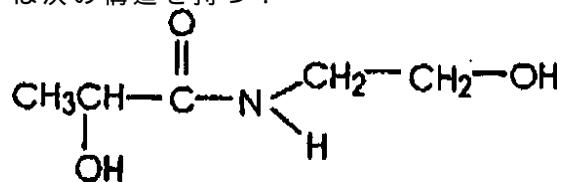


表2B

## ケラチノサイト分化へのレチノールおよびラクタミドMEAの作用

処理	平均T G a s e /D N A × 10 <sup>-4</sup> 土標準 偏差 (%対照)	p値vs対照 1 <sup>1</sup> M ROH	p値vs2. 5 × 10 <sup>-6</sup> M RA 1 <sup>1</sup> M RA	p値vs2. 5 × 10 <sup>-6</sup> M ラクタミド - MEA
対照	64. 11 ± 3. 19 (100%)	-	0. 110	0. 002
2. 5 × 10 <sup>-7</sup> M RA	46. 71 ± 7. 83 (73%)	0. 002	-	0. 001
2. 5 × 10 <sup>-7</sup> M レチノール	58. 47 ± 6. 25 (91%)	0. 110	-	0. 049
2. 5 × 10 <sup>-7</sup> M ラクタミド - MEA	55. 22 ± 2. 43 (86%)	0. 001	0. 311	0. 311
2. 5 × 10 <sup>-7</sup> M ROH+10 <sup>-6</sup> M ラクタミド -MEA	46. 29 ± 6. 79 (72%)	0. 001	0. 018	0. 024

n=3

2. 5 × 10<sup>-7</sup> M のレチノイン酸はケラチノサイトの T G a s e I レベルを抑制する上で有効であった（対照レベルの 73 %への抑制）。2. 5 × 10<sup>-7</sup> M のレチノールと 10<sup>-6</sup> M のラクタミド - M E A は、単独で使用した時、ケラチノサイトの T G a s e I レベルを抑制する上であまり有効ではなかった。しかし、2. 5 × 10<sup>-7</sup> M のレチノール + 10<sup>-6</sup> M のラクタミド - M E A は、ケラチノサイトの T G a s e I を対照レベルの 72 % に抑制した。ラクタミド - M E A とレチノールは、それ故、レチノイン酸の作用と類似し

10

20

30

40

50

て、ケラチノサイトの分化を抑制するように相乗的に働く。

実施例 1 および 2 は、レチノイン酸が用量依存的にケラチノサイトの分化を低下させたことを示している。実施例 1 および 2 では、レチノイン酸を陽性対照として、また分析したその他の化合物を比較する標準化合物として使用した。レチノールはケラチノサイトの分化を低下させる上で有効ではなかった。

しかし、実施例 1 および 2 での意外な結果は、レチノールあるいはレチニルエステルを、それ自体ではほとんどあるいは全く恩恵と及ぼさない化合物であるヒドロキシ脂肪酸のアミドと組合わせることにより、培養したケラチノサイトへのレチノールの作用をレチノイン酸に近いレベルまで増強できることであった。上記に認められた結果は、ヒドロキシ脂肪酸のアミドが、レチノイン酸の作用を模倣して、ケラチノサイトの分化を低下させるようにレチノールあるいはレチニルエステルと相乗的に作用することを示している。10

実施例 3 - 8 は本発明に従った局所組成を例示している。該組成は従来のようにして製造することができ、化粧品としての使用に適する。特に該組成は、しわのある皮膚、ざらざらした皮膚、乾燥した皮膚、薄片化した皮膚、老化した皮膚および／あるいは紫外線で損傷した皮膚に対しての、その外観と手触りを改善するための適用、ならびに健康な皮膚に対してのその劣化を防ぐあるいは遅らせるための適用に適する。

### 実施例 3

この実施例は、本発明の組成を組み込んだ高内相油中水型乳剤を例示する。

#### 実施例 3

20

	%W/W
レチノール	0.5
完全に水素添加されたヤシ油	3.9
C <sub>13</sub> β - ヒドロキシ脂肪酸アミド	5
Brij 92*	5
ペントン 38	0.5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.3
ブチル化ヒドロキシトルエン	0.01
香料	qs
水	100まで

30

\*Brij 92はポリオキシエチレン(2)オレイルエーテルである。

### 実施例 4

この実施例は、本発明の組成を組み込んだ水中油型クリームを例示する。

実施例4

	%w/w
パルミチン酸レチニル	0.15
鉱油	4
ラクタミドMEA	1
Brij 56*	4
Alfol 16RD*	4
トリエタノールアミン	0.75
ブタン-1, 3-ジオール	3
キサンタンゴム	0.3
香料	qs
ブチル化ヒドロキシトルエン	0.01
水	100まで

\*Brij 56はセチルアルコールPOE(10)である。

Alfol 16RDはセチルアルコールである。

## 実施例5

この実施例は、本発明に従った組成を組み込んだアルコール性ローションを例示する。

実施例5

	%w/w
パルミチン酸レチニル	0.15
N-ヒドロキシエチル-2-ヒドロキシ-C <sub>13</sub> アミド	0.1
エタノール	40
香料	qs
ブチル化ヒドロキシトルエン	0.01
水	100まで

## 実施例6

この実施例は、本発明の組成を含有するもうひとつのアルコール性ローションを例示する。

10

20

30

40

実施例 6

	%w/w
レチノール	0.15
N - ヒドロキシエチル - 2 - ヒドロキシ - C <sub>13</sub> アミド	0.1
エタノール	40
酸化防止剤	0.1
香料	q.s
水	100まで

10

## 実施例 7

この実施例は、本発明の組成を組み込んだサンケアクリームを例示する。

実施例 7

	%w/w
レチノール	0.01
1,2 - ヒドロキシ - N - (2 - ヒドロキシエチル)	0.1
オクタデカナミド	
シリコーン油 200 cts	7.5
グリセリルモノステアリン酸塩	3
セトステリルアルコール	1.6
ポリオキシエチレン - (20) - セチルアルコール	1.4
キサンタンゴム	0.5
バーソル 1789	1.5
オクチルメトキシシンナメート (PARSOL MCX)	7
香料	q.s
着色剤	q.s
水	100まで

20

30

## 実施例 8

この実施例は、本発明の組合せを含有する非水性スキンケア組成を例示する。

40

実施例8

	%w/w
レチノイン酸	0.15
ヒマシ油のモノエタノールアミド	1
シリコーンゴムSE-30 <sup>1</sup>	10
液状シリコーン345 <sup>2</sup>	20
液状シリコーン344 <sup>3</sup>	55.79
スクアレン	10
リノール酸	0.01
コレステロール	0.03
2-ヒドロキシ-n-オクタン酸	0.7
ビタミンEリノール酸塩	0.5
植物油	0.5
エタノール	2

10

20

<sup>1</sup> GECから市販されている、分子量50,000以上、25°Cでの粘度が10,000センチストーク以上であるジメチルシリコーンポリマー

<sup>2</sup> Dow Corning Corp. から市販されているジメチルシリコン環状五量体。

<sup>3</sup> Dow Corning Corp. から市販されているジメチルシリコン環状四量体。

---

フロントページの続き

(72)発明者 ロウリングス , アンソニー・ビンセント  
イギリス国、エム・ケイ・44・1・エル・エイ、ベッドフォード、シャーンブルック、コルワ  
ス・ロード、ツイン・ロッジズ・2

(72)発明者 スコット , イアン・リチャード  
アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07401、アレンデイル、パイン・ロード・9

審査官 榎本 佳予子

(56)参考文献 特開昭53-038637(JP,A)  
特開平06-032720(JP,A)  
特開平10-072334(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl.<sup>7</sup>, DB名)

A61K 7/00 - 7/50

CA(STN)

REGISTRY(STN)