

(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2011-42628
(P2011-42628A)

(43) 公開日 平成23年3月3日(2011.3.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/045 (2006.01)	A 6 1 K 31/045	2 B 1 5 0
A 6 1 K 36/75 (2006.01)	A 6 1 K 35/78 K	4 B 0 1 7
A 6 1 K 8/34 (2006.01)	A 6 1 K 8/34	4 B 0 1 8
A 6 1 K 8/97 (2006.01)	A 6 1 K 8/97	4 C 0 8 3
A 6 1 Q 19/00 (2006.01)	A 6 1 Q 19/00	4 C 0 8 8

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-192501 (P2009-192501)
(22) 出願日 平成21年8月21日 (2009. 8. 21)

(71) 出願人 000004503
ユニチカ株式会社
兵庫県尼崎市東本町1丁目50番地
(74) 代理人 100077012
弁理士 岩谷 龍
(72) 発明者 白倉 義之
京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ
株式会社宇治事業所内
(72) 発明者 向井 克之
京都府宇治市宇治小桜23番地 ユニチカ
株式会社宇治事業所内
Fターム(参考) 2B150 DD42 DD56
4B017 LC03 LC04 LG02 LK06 LK23
LP01

最終頁に続く

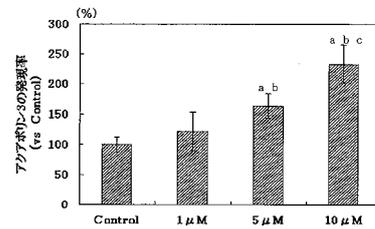
(54) 【発明の名称】 アクアポリン産生促進剤

(57) 【要約】

【課題】安全性が高く、継続して摂取しても副作用の無くアクアポリンの産生を促進する物質で、ドライマウス、ドライアイ、鼻腔乾燥に伴う出血、皮膚乾燥による掻痒感、気道乾燥による咳及び痰、肺水腫、脳浮腫、白内障、唾液分泌不全、メタボリックシンドローム、アトピー性皮膚炎、乾癬、乾皮症、魚鱗癬の予防若しくは治療に用いられるアクアポリン産生促進剤を提供すると共に、それらを含む皮膚外用剤、飲食品、医療品、飼料を提供する。

【解決手段】クリプトキサンチン及び/又はその誘導体を含むことを特徴とするアクアポリン産生促進剤であり、好ましくはクリプトキサンチン及び/又はその誘導体がカンキツ類由来のものある。

【選択図】 図1



a: $p < 0.05$ vs Control b: $p < 0.05$ vs 1 μM
c: $p < 0.05$ vs 5 μM

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

クリプトキサンチン及び/又はその誘導体を含有することを特徴とするアクアポリン産生促進剤。

【請求項 2】

クリプトキサンチン及び/又はその誘導体がカンキツ類由来のものである請求項 1 記載のアクアポリン産生促進剤。

【請求項 3】

カンキツ類が温州みかんである請求項 2 記載のアクアポリン産生促進剤。

【請求項 4】

皮膚のしみ、皺、肌荒れ、たるみなど、老化に伴っておきる皮膚の増悪の改善、又は保湿性の低下や体液分泌の低下などが原因となって発生するドライマウス、ドライアイ、鼻腔乾燥に伴う出血、皮膚乾燥による掻痒感、気道乾燥による咳及び痰、肺水腫、脳浮腫、白内障、唾液分泌不全、メタボリックシンドローム、アトピー性皮膚炎、乾癬、乾皮症、魚鱗癬の治療又は予防に用いられる請求項 1～3 記載のアクアポリン産生促進剤。

10

【請求項 5】

請求項 1～4 にいずれかに記載のアクアポリン産生促進剤を含有する皮膚外用剤。

【請求項 6】

請求項 1～4 のいずれかに記載のアクアポリン産生促進剤を含有する飲食品。

【請求項 7】

請求項 1～4 のいずれかに記載のアクアポリン産生促進剤を含有する医薬品。

20

【請求項 8】

請求項 1～4 のいずれかに記載のアクアポリン産生促進剤を含有する飼料。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は生体内のアクアポリン産生を促進するアクアポリン産生促進剤に関し、また皮膚外用剤、飲食品、医薬品、飼料、サプリメント等に配合し、アクアポリンの産生能力を高める事のできるアクアポリン産生促進剤に関する。さらに詳しくは皮膚中に存在するアクアポリンの産生を促進し、保湿性や柔軟性の向上に關与するものである。

30

【背景技術】

【0002】

皮膚は人間の体内と体外を仕切る器官であり、細菌類などの外敵に対する免疫機能や、体内の水分の保持作用など多岐にわたる機能を有している。また皮膚は大きく分けて表皮・真皮・皮下組織の3層の構造をとっている。表皮はさらに体の内側から順に、基底層、有棘層、顆粒層、角質層という4つの層で構成されている。基底層に存在する細胞はおおよそ14日間をかけた角質層直下まで移動し、さらに扁平な形態に変化しつつ14日間で角質層中を外側に向かって移動し、最終的には垢などの形となって剥離する。このターンオーバーを継続する事で多岐にわたる皮膚の機能を支えている。

40

【0003】

一方、ヒトでは13種同定されている水チャネルであるアクアポリンだが、その種類は現在3種に大別される。一つは水分子のみを透過させるアクアポリン、もう一つは水分子のほかにグリセリンなどの低分子を透過させるアクアポリン、最後の一つは機能が未知なものである。(非特許文献1)

【0004】

上記のように、皮膚の柔軟性、保水性の保持、外界からの異物の侵入の防御機構には、特に角質中の水分が重要である。角質は水の供給源となる血管を含まないため、角質への水の供給は主にアクアポリンの働きによる。

【0005】

このアクアポリンは、アクアグリセロポリン(アクアポリン3)と呼ばれ、水とグリセ

50

リンを皮膚に供給することによって皮膚の保水性を維持する役割を果たしていることが明らかとなっている。(非特許文献2)

【0006】

また老化によるアクアポリン発現量の減少などはその他の様々な疾患とも関係が深いことが知られている。例えば、ドライマウスやドライアイは分泌される唾液や涙の減少に伴って発生し、脳浮腫からの回復にはアクアポリンが必要であることも明らかとなっている。また脂肪細胞からのグリセロールの分泌を行うアクアポリン7、水晶体で発現しているアクアポリン0の減少に伴い白内障が発生する。(非特許文献3)

【0007】

従来知られたアクアポリン産生促進剤としては、ノウゼンハレン科植物より得られる抽出物やオールトランスレチノイン酸が知られている。(特許文献1、非特許文献4)

しかしながら、前記抽出物は効果を発揮させるには大量の投与が必要であったり、オールトランスレチノイン酸は使用を続けると腎不全や肝不全を引き起こすレチノイン酸症候群を引き起こす点で安全性に問題があるなど、安全で十分な効果を奏する化合物は知られていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】特開2004-168732号公報

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Agre P. Proc Am Thorac Soc, 3(1)、5-13、2006.

【非特許文献2】Hara-Chikuma M et al., Biol Cell. 97(7) 479-86 2005.

【非特許文献3】佐々木 成編「水とアクアポリンの生物学」 中山書店

【非特許文献4】Bellemere G et al., J Invest Dermatol. 128(3) 542-8 2008

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明の課題は、安全性が高く、継続摂取可能なアクアポリンの産生を促進する化合物を見出すことにある。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、このような課題を解決するために鋭意検討の結果、クリプトキサンチン及び/またはその誘導体がアクアポリンの産生促進作用を有することを見出し本発明に至った。

【0012】

すなわち、本発明の第一は、クリプトキサンチン及び/又はその誘導体を含有することを特徴とするアクアポリン産生促進剤を要旨とするものであり、好ましくはクリプトキサンチンがカンキツ類由来であり、さらに好ましくはカンキツ類が温州みかんである。

【0013】

本発明の第二は皮膚のシミ、皺、肌荒れ、たるみなどの老化に伴う皮膚の増悪やドライマウス、ドライスキン、鼻腔乾燥に伴う出血、皮膚乾燥による掻痒感、気道乾燥による咳及び痰、肺水腫、脳浮腫、白内障、唾液分泌不全、メタボリックシンドローム、アトピー性皮膚炎、乾癬、乾皮症、魚鱗癬の治療又は予防に用いられる事を要旨とするものである。

【0014】

本発明の第三は、前記したいずれかに記載のアクアポリン産生促進剤を含有する皮膚外

10

20

30

40

50

用剤、飲食品、医薬品、又は飼料を要旨とするものである。

【発明の効果】

【0015】

本発明によれば、アクアポリン産生促進作用が高いクリプトキサンチン及び/又はその誘導体含有しているため、少量の摂取で効果が得られ、安全性が高く、また皮膚外用剤や飲食品、医薬品、飼料などに配合した場合に配合設計が容易であるという作用効果を得ることが出来る。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】培養細胞NHEKへの - クリプトキサンチンの作用を示す図である。

10

【図2】培養細胞NHEKへのオールトランスレチノイン酸の作用を示す図である。

【図3】培養細胞NHEKへの - クリプトキサンチン及びその誘導体の作用を示す図である。

【図4】3次元ヒト皮膚モデルへの - クリプトキサンチンの作用を示す図である。

【図5】3次元ヒト皮膚モデルへのオールトランスレチノイン酸の作用を示す図である。

【図6】3次元ヒト皮膚モデルへの - クリプトキサンチン及びその誘導体の作用を示す図である。

【図7】 - クリプトキサンチン及びその誘導体の配合乳液の肌の水分量への影響を示す図である。

【発明を実施するための形態】

20

【0017】

以下、本発明を詳細に説明する。最初に第一の本発明であるアクアポリン産生促進剤について説明する。クリプトキサンチンはカロテノイドの1種である。本発明で用いられるクリプトキサンチンは、型でも型でもよく、特に限定されるものではない。また、本発明で用いられるクリプトキサンチンの誘導体としては、クリプトキサンチンから誘導される化合物であれば特に限定されず、例えばクリプトキサンチンの脂肪酸エステルなどが挙げられ、具体的には、ステアリルエステル、パルミトイルエステル、ミリストリルエステル、ラウリルエステルなどの誘導体も含まれる。

【0018】

本発明で用いられるクリプトキサンチン及び/又はその誘導体は、その由来については特に限定されないが、中でもカンキツ類由来のものが好ましい。本発明におけるカンキツ類とは、ミカン科などに属する植物を挙げることができる。より具体的には、温州みかん、イヨカン、夏みかん、オレンジ、カボス、カワバタ、キシウミカン、清見、キンカン、グレープフルーツ、ゲッキツ、三宝柑、シイクワサー、ジャバラ、スウィーティー、スダチ、ダイダイ、タチバナ、デコボン、ナツダイダイ、ハッサク、ネーブルオレンジ、バレンシアオレンジ、晩白柚、ヒュウガナツ、ブンタン、ボンカン、マンダリンオレンジ、ヤツシロ、ユズ、ライム、レモン、カラタチ（これらと同等又は類似の品種のものも含む）などを例示することができる。その中でも温州みかんがクリプトキサンチン及び/又はその誘導体の含有率が高く望ましい。

30

【0019】

40

本発明のアクアポリン産生促進剤においては、クリプトキサンチン及び/又はその誘導体含有する限りはその比率については限定されないが、例えばクリプトキサンチン及び/又はその誘導体を0.00001質量%以上100質量%以下、好ましくは0.0001質量%以上80質量%以下、更に好ましくは0.01質量%以上50質量%以下の割合で含有しておればよい。

【0020】

本発明のアクアポリン産生促進剤は、上記クリプトキサンチン及び/又はその誘導体含有していることにより、アクアポリンの産生を促進するものであり、その中でも特にアクアポリン3の産生をより効果的に促進することができる。

本発明のアクアポリン産生促進剤は、他のアクアポリン産生促進作用を有する物質と混

50

合してもよく、例えば、副作用を起こさない範囲内で、合成レチノイドや他のカロテノイド、オールトランスレチノイン酸などを適宜含有させることができる。またその他の成分を添加物として含んでいても良く、特に限定されるものではないが、例えば、ビタミンCなどの各種ビタミン類や、アミノ酸およびオリゴ糖、ミネラル等などが適宜含有させることができる。

【0021】

本発明のアクアポリン産生促進剤は、体内に取り込むことでアクアポリンの産生の促進作用を発揮するものであるため、その体内への取り込み方法は限定されるものではなく、例えば経口摂取でも経皮吸収でもよい。

【0022】

本発明のアクアポリン産生促進剤を摂取する方法としては、単独でそのまま摂取しても良いし、液体、乳化剤、ペースト、ゲル、粉末、錠剤、顆粒、ペレット、カプセル、シロップ、懸濁液、ドリンク、スティック、固形状などに加工して摂取してもよい。

【0023】

次に、上記したアクアポリン産生促進剤の製造方法について説明する。製造方法としては、カンキツ類を搾汁しその残さから、クリプトキサンチン及び/又はその誘導体を含む組成物を得る方法、カンキツ類に酵素を添加して酵素処理して、クリプトキサンチン及び/又はその誘導体を含む組成物を得る方法、及びカンキツ類に有機溶剤を添加し該有機溶剤中に、クリプトキサンチン及び/又はその誘導体を含む組成物を抽出する方法などが挙げられる。以下、順次これらの方法について説明する。なお、得られた組成物中にクリプトキサンチン及び/又はその誘導体が存在することは、例えば高速液体クロマトグラフィー（HPLC）等により定量的に確認することができる（実施例参照）。

【0024】

カンキツ類を搾汁した残さ、すなわち搾汁粕は、例えば、カンキツ類の果実をインライン搾汁機、チョッパーヘルパー搾汁機、ブラウン搾汁機などにより搾汁した後、パドル型又はスクルー型のフィニシャーなどで過又は篩別、または遠心分離によって果汁を調製した搾汁残渣を集めることにより調製される。

【0025】

酵素処理は、カンキツ類の果実そのまま、あるいはすりつぶし、破碎、粉碎、加熱、脱水、乾燥などの物理的処理を行なったもの、さらに上記のようにして得られる搾汁残渣に対して酵素を添加することにより行なわれる。

【0026】

酵素処理に使用する酵素としては、カンキツ類に含まれる有機物、特に細胞壁などを構成する生体高分子などを分解できることが出来るものであれば、特に限定されず、例えば、アミラーゼ、グルコアミラーゼ、セルラーゼ、ヘミセルラーゼ、ペクチナーゼ、マンナーゼ、キシラーゼ、プロテアーゼ、ペプチターゼ、リパーゼ、マレーションエンザイム（細胞壁崩壊酵素）などが用いられる。これらの中でも、糖質加水分解酵素であるセルラーゼ、ヘミセルラーゼ、ペクチナーゼ、マンナーゼ、キシラーゼ、マレーションエンザイムが、有効成分であるクリプトキサンチン及び/又はその誘導体含有量を高める効率が高く好ましい。

【0027】

添加する酵素剤は、これらの精製酵素を用いても良いし、これらの活性を示す微生物菌体や培養物、これらの粗精製物を用いても良い。これらの酵素は単独で用いても良いし、2種類以上の酵素を混合して用いてもよい。添加する酵素の量は特に限定されず、酵素の反応性に応じて添加すればよい。例えば、ペクチナーゼを用いる場合であれば、被処理物100gに対して1~100,000ユニットであることが好ましく、更に10~10,000ユニットであることがより好ましい。

【0028】

上記酵素を添加した後、攪拌などにより酵素と被処理物を均一に混合して酵素反応を進行させる。このときの反応温度としては酵素が失活せず、かつ腐敗の起こりにくい条件、

10

20

30

40

50

またクリプトキサンチン及び/又はその誘導体が喪失しない条件下で行うことが望ましい。具体的には、温度としては0～90、好ましくは0～80、更に好ましくは0～70である。反応のpHとしては酵素の至適条件下で行うのが望ましいことは言うまでもなく、pH2～12、好ましくはpH2.5～8である。反応時間としては使用する搾汁残渣と酵素の量に依存するが、通常1～48時間に設定するのが作業上好ましい。反応の際、この反応物を攪拌しながら反応を行っても良いし、静置反応でも良い。

【0029】

酵素処理終了後、酵素処理された反応物をそのまま本発明のアクアポリン産生促進剤として用いてもよいし、何らかの加工を行ってもよい。具体的には、反応物を固液分離した残さ、あるいはその残さを乾燥させたもの、固液分離せず反応物をそのまま乾燥させたものなどを用いてもよい。また溶剤や水、超臨界二酸化炭素などを用いて成分などを抽出したものをを用いてもよい。更に、引き続いて不純物類を取り除いてもよい。不純物の除去方法としては、例えば水洗浄、有機溶媒洗浄、シリカゲルカラムや樹脂カラム、逆相カラムなどを通す方法、活性炭処理、極性の異なる溶媒による分配、再結晶法、真空蒸留法などが挙げられる。特に酵素処理反応物を固液分離した後、固形分に再度水を添加・攪拌した後に固液分離する水洗浄は、酵素処理で生成した糖などの反応生成物を容易に除去できるため好ましい方法である。

【0030】

カンキツ類及び/又は上述したカンキツ類の酵素処理物に、有機溶剤を添加し該有機溶剤中に、クリプトキサンチン及び/又はその誘導体を含む組成物を抽出する方法において用いられる溶剤としては、原料であるカンキツ類又はその加工品よりアクアポリン産生促進作用を持つ画分が得られるものであれば、本発明の効果を損なわない範囲でいかなるものでもよい。また、一種類の溶剤を単独で用いても複数の溶剤を混合して用いてもよい。そのような溶剤としては、例えば、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノール等のアルコール類、エチレングリコール、プロピレングリコール、ブチレングリコール、グリセリン等の多価アルコール、アセトン、メチルエチルケトン等のケトン類、酢酸メチル、酢酸エチル等のエステル類、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル等のエーテル類、ジクロロメタン、ジクロロエタン、クロロホルム等のハロゲン化炭化水素類、ヘキサン、ペンタン等の脂肪族炭化水素類、トルエン等の芳香族炭化水素類、ポリエチレングリコール等のポリエーテル類、ピリジン類等が使用できる。これらのうち、エタノールは抽出されるクリプトキサンチン及び/又はその誘導体の抽出効率が高く好ましい。また、これらの有機溶媒で抽出する際には抽出効率を上げるために、例えば水、界面活性剤等の添加物を本発明の効果を損なわない範囲で加えることができる。さらに、上記有機溶媒による抽出のほか、超臨界抽出法も利用することができる。

【0031】

本発明の別の発明は、上記したようなアクアポリン産生促進剤を含む皮膚外用剤、飲食品、医薬品、及び飼料である。

【0032】

本発明の皮膚外用剤とは、例えば、乳液、クリーム、化粧水（ローション）、パック、洗浄剤、メーキャップ化粧料、頭皮・毛髪用品、分散液、軟膏、液剤、エアゾール、貼付剤、パップ剤、リニメント剤、オイル、リップ、口紅、ファンデーション、アイライナー、頬紅、マスカラ、アイシャドー、マニキュア・ペディキュア（及び除去剤）、シャンプー、リンス、ヘアトリートメント、パーマ剤、染毛料、ひげ剃り剤、石けん（ハンドソープ、ボディソープ、洗顔料）、歯磨き剤、洗口料などが挙げられる。

本発明のアクアポリン産生促進剤を含む皮膚外用剤においては、クリプトキサンチン及び/又はその誘導体を含む限りはその比率については限定されないが、例えばクリプトキサンチン及び/又はその誘導体を0.00001質量%以上100質量%以下、好ましくは0.0001質量%以上80質量%以下、更に好ましくは0.01質量%以上50質量%以下の割合で含有しておればよく、上記範囲であれば、十分にアクアポリン産生促進作用が得られる。

10

20

30

40

50

本発明のアクアポリン産生促進剤を含有する皮膚外用剤は、対象の年齢や肌の状態により異なるが、クリプトキサンチン及び/又はその誘導体としての使用量が、1日あたり、約0.000001~100gであることが好ましい。

【0033】

本発明の飲食品とは、一般飲食品に加えて、サプリメント、食品添加物、特定保健用食品、健康食品、機能性食品、医薬部外品など、すべての食品及び/又は飲料が含まれる。該食品及び/又は飲料は特に限定されるものではなく、例えば上記の医薬品的な形態のものに加え、パン、うどん、そば、ご飯等、主食となるもの、チーズ、ウインナー、ソーセージ、ハム、魚肉加工品等の食品類、アイスクリーム、クッキー、ケーキ、ゼリー、プリン、キャンディー、チューインガム、ヨーグルト、グミ、チョコレート、ビスケットなどの菓子類、ジャムなどの調味料類、果汁飲料、清涼飲料水、酒類、栄養ドリンク、コーヒー飲料、茶、牛乳などの飲料が挙げられる。

本発明のアクアポリン産生促進剤を含有する飲食品においては、クリプトキサンチン及び/又はその誘導体を含有する限りはその比率については限定されないが、例えばクリプトキサンチン及び/又はその誘導体を0.00001質量%以上100質量%以下、好ましくは0.0001質量%以上80質量%以下、更に好ましくは0.01質量%以上50質量%以下の割合で含有しておればよく、上記範囲であれば、十分にアクアポリン産生促進作用が得られる。

本発明のアクアポリン産生促進剤を含有する飲食品は、摂取者の体重や年齢や肌の状態により異なるが、クリプトキサンチン及び/又はその誘導体としての摂取量が、1日あたり、約0.000001~100gであることが好ましい。

【0034】

本発明の医薬品としては、注射剤、輸液、散剤、錠剤、顆粒剤、カプセル剤、丸剤、腸溶剤、懸濁剤、シロップ剤、内服液剤、トローチ剤、乳剤、外用液剤、湿布剤、点鼻剤、点耳剤、点眼剤、吸入剤、軟膏剤、ローション剤、座剤、経腸栄養剤などの形態で摂取することが出来る。

本発明のアクアポリン産生促進剤を含有する医薬品においては、クリプトキサンチン及び/又はその誘導体を含有する限りはその比率については限定されないが、例えばクリプトキサンチン及び/又はその誘導体を0.00001質量%以上100質量%以下、好ましくは0.0001質量%以上80質量%以下、更に好ましくは0.01質量%以上50質量%以下の割合で含有しておればよく、上記範囲であれば、十分にアクアポリン産生促進作用が得られる。

本発明のアクアポリン産生促進剤を含有する医薬品は、対象の年齢や肌の状態により異なるが、クリプトキサンチン及び/又はその誘導体としての投与量が、1日あたり、約0.000001~100gであることが好ましい。

【0035】

本発明の飼料とは、本発明のアクアポリン産生促進剤に、例えば、トウモロコシ、小麦、大麦、ライ麦などの穀類、ふすま、米ぬかなどのぬか類、コーングルテンミール、コーンジャムミールなどの粕類、脱脂粉乳、ホエー、魚類、骨粉などの動物性飼料類、ビール酵母などの酵母類、リン酸カルシウム、炭酸カルシウムなどのカルシウム類、ビタミン類、油脂類、アミノ酸類、糖類などを配合することにより製造することができる。飼料の形態としては、ペットフード、家畜飼料、養殖魚用飼料などに用いることができる。またペットフードとして用いる場合には、上記飲食品と同じ形態のものを用いても何ら問題がない。

本発明のアクアポリン産生促進剤を含有する飼料においては、クリプトキサンチン及び/又はその誘導体を含有する限りはその比率については限定されないが、例えばクリプトキサンチン及び/又はその誘導体を0.00001質量%以上100質量%以下、好ましくは0.0001質量%以上80質量%以下、更に好ましくは0.01質量%以上50質量%以下の割合で含有しておればよく、上記範囲であれば、十分にアクアポリン産生促進作用が得られる。

10

20

30

40

50

本発明のアクアポリン産生促進剤を含有する飼料は、対象の種や肌の状態により異なるが、例えば体重約60kgとすると、クリプトキサンチン及びノ又はその誘導体としての摂取量が、1日あたり、約0.000001~100gであることが好ましい。

【実施例】

【0036】

以下、本発明を実施例により具体的に示す。なお本発明はこの実施例によりその範囲を限定するものではない。なお、実施例中、特に断りのない限り、「部」は「質量部」を、「%」は「質量%」をそれぞれ意味する。

実施例中、
 - クリプトキサンチン及びノ又はその誘導体の含量の測定は、その粉体、濃縮残存物をサンプルとして用い(クリプトキサンチンの定量)又はその粉体、濃縮残存物を80、1Nの水酸化カリウム水溶液で60分処理することで全て クリプトキサンチン単体に変換したものをサンプルとして用い(クリプトキサンチン及びその誘導体を クリプトキサンチンのフリー体として定量)、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により行なった。すなわち、HPLC装置として、LC-10A(島津製作所製)を用い、Resolve C18(3.9x150mm、ウォーターズ社製)カラムを接続し、メタノールを等量加えた試料を導入した。移動相には、メタノール：酢酸エチル=7：3、カラム温度30、流速1.0ml/min、検出波長450nmで分析した。

【0037】

実施例1

温州みかんから果汁を絞った後の残さ(みかんジュース粕、水分率約90%)800gに飲食品加工用のペクチナーゼ酵素剤であるスミチームPX(新日本化学工業株式会社製、ペクチナーゼ5,000ユニット/g、アラバナゼ90ユニット/g)1gとセルラーゼ/ヘミセルラーゼ酵素剤であるセルラーゼY-NC(ヤクルト薬品工業株式会社製セルラーゼ30,000ユニット/g)1gを添加し、よくかき混ぜて室温8時間静置反応を行った。この反応液を遠心分離して上清を除去した後、水を添加して攪拌し、再度遠心分離により上清を除去した。この沈殿物を凍結乾燥機により乾燥し、ミキサー型粉砕機で粉砕・粉末化した。本粉末中には - クリプトキサンチン及びその誘導体(クリプトキサンチンのフリー体換算)が0.5質量%(クリプトキサンチン：0.1質量%、その誘導体：0.4質量%)が含まれていた。

得られた温州みかん粉末を重量の3倍量のエタノールで抽出し、得られた抽出液をエバポレーターで減圧濃縮した。濃縮後の残存物を本発明の皮膚外用剤とした。この皮膚外用剤には - クリプトキサンチン及びその誘導体(クリプトキサンチンのフリー体として換算)が2%(クリプトキサンチン：0.4質量%、その誘導体：1.6質量%)が含まれていた。

【0038】

実施例2

クリプトキサンチン(標準サンプル)を使用して正常ヒト表皮角化細胞(NHEK)に対するアクアポリン3発現促進作用を確認した。以下にその詳細を示す。

NHEK(クラボウ株式会社製)を 2.5×10^3 細胞/ウェルとなるように24ウェルプレート(IWAKI社製)に播種後、37で5%CO₂インキュベーター(ESPEC社製)で培養を行い、3日に一度培地(クラボウ株式会社製)交換を行いながら80%コンフルントになるまで培養を継続した。その後、先ほどの培地から血清を除いたものに、 - クリプトキサンチン(標準サンプル、四国八洲社製)を、培地添加後の濃度が、それぞれ0(溶媒コントロール)、1、5、10 μ MとなるようにDMSO(和光純薬社製)に溶解させた試料を添加し、細胞に培地を交換することで作用させた。対照群としては、すでにアクアポリン3の活性化作用が報告されているオールトランスレチノイン酸(和光純薬社製)を、培地添加後の濃度が、それぞれ0(溶媒コントロール)、1、5、10 μ MとなるようにDMSO(和光純薬社製)に溶解させた試料を添加し、同様の培養実験を行った。培地交換後24時間培養を行い、時間経過後培地をプレートから除去し、P

B Sで洗浄後、I S O G E N (ニッポンジーン社製)を各ウェル500 μ Lずつ添加し、懸濁することで細胞中のRNAを溶解させた。その後、RNAを抽出し、逆転写酵素(タカラバイオ社製)でcDNAを作成した。

作成したcDNAを用いてリアルタイムPCR(アプライドシステムズジャパン社製)を使用してアクアポリン3の遺伝子量の定量を行った。

【0039】

図1に -クリプトキサンチンの作用を示す。低濃度である1 μ Mではほとんどコントロールと差が無いが、5、10 μ Mでは有意に発現量が上昇したことから -クリプトキサンチンはアクアポリン3産生促進作用を有することが分かった。

【0040】

図2にオールトランスレチノイン酸の作用を示す。低濃度である1 μ Mではほとんどコントロールと差が無く、5、10 μ Mでは発現量が有意に上昇したが、 -クリプトキサンチンの発現量に比べて上昇幅が少なかった。

【0041】

実施例3

実施例1で得た皮膚外用剤を使用して実施例2と同様の実験を行った。すなわち誘導体を含む -クリプトキサンチン濃度2質量%(-クリプトキサンチンのフリー体換算)、及び -クリプトキサンチンを、培地に添加したときの濃度が、それぞれ0(溶媒コントロール)、1、5、10 μ Mとなるように調製した試料を培地に添加した。対照群としては、すでにアクアポリン3の活性化作用が報告されているオールトランスレチノイン酸(和光純薬社製)を、培地に添加したときの濃度が、それぞれ0(溶媒コントロール)、1、5、10 μ MとなるようにDMSO(和光純薬社製)に溶解し調製した試料を添加し、同様の培養実験を行った。この培養液を使用してアクアポリン3の発現量の測定を行った。培養・測定方法は実施例2と同様である

【0042】

実施例1で得た皮膚外用剤、及びオールトランスレチノイン酸のアクアポリン3の発現量の変化を図3に示す。誘導体を含む -クリプトキサンチンで培養した場合も実施例2で使用した -クリプトキサンチンで培養した図1と同様に、アクアポリン3の発現量が上昇していた。 -クリプトキサンチン単独と誘導体を含む皮膚外用剤による培養の間には発現量の有意な差は見られず、皮膚外用剤中に含有される誘導体もフリー体と同様にアクアポリン3の発現量を上昇させた。

【0043】

実施例4

実施例2の結果を受け、より生体に近いモデルである3次元ヒト皮膚モデル(TOYOBO社製)を使用して実施例2と同様の実験を行った。今回は経皮吸収作用のモデルということで、3次元ヒト皮膚モデルのカップに -クリプトキサンチン(標準サンプル、四国八洲社製)又はオールトランスレチノイン酸(和光純薬社製)が0(溶媒コントロール)、1、5、10 μ Mとなるように調製した溶液、

PBS 75%

1,3-ブチレングリコール 20%

界面活性剤 3%

試薬溶解液 2%

を一日6時間200 μ l塗布を行い、時間経過後にPBSで洗浄し、培養を行った。塗布は毎日行い、3日間培養を行った。その後、中央部の細胞をバイオプシーパンチで分離し、細胞のみを回収し、実施例2で用いたのと同様の方法でcDNAを作成した。

【0044】

図4に -クリプトキサンチンの作用を示す。1、5 μ Mではアクアポリン3の発現量が増加傾向にはあるが有意差は無かった。しかし10 μ Mでは発現が溶媒コントロールに対して有意に上昇し、 -クリプトキサンチンのアクアポリン産生促進効果を確認した。

【0045】

10

20

30

40

50

図5にオールトランスレチノイン酸の作用を示す。1、5 μM ではアクアポリン3の発現量が増加傾向にはあるが有意差は無かった。しかし10 μM ではコントロールに比べ発現量が有意に上昇したが、その上昇は - クリプトキサンチンの発現量よりも少なかった。

【0046】

実施例5

実施例3の結果を受け、実施例4と同様により生体に近いモデルである3次元ヒト皮膚モデルを使用して実験を行った。本実験は試薬溶解液を実施例1で作成した皮膚外用剤溶液に変えたほかは実施例4と同様であり、フリー体換算での - クリプトキサンチン濃度も実施例4の0（溶媒コントロール）1、5、10 μM になるように調製を行った。

10

【0047】

図6に皮膚外用剤の作用を示す。1、5 μM ではアクアポリン3の発現量が増加傾向にはあるが、有意差は無かった。しかし10 μM では発現量が溶媒コントロールに対して有意に上昇し、誘導体を含む皮膚外用剤のアクアポリン産生促進効果を確認した。

【0048】

実施例6

実施例1の抽出物を使用して以下の処方例を作成した。ただし、この処方例をもって本発明の範囲を限定するものではない。

処方例1 乳液

抽出物	1.00%	20
シヨ糖脂肪酸エステル	3.00%	
グリセリン	12.00%	
スクアラン	6.00%	
ジメチルシリコーンオイル	24.00%	
ポリプロピレングリコール	1.00%	
増粘剤	0.06%	
脱イオン水	47.62%	
防腐剤	0.20%	
エタノール	5.00%	
0.1%水酸化ナトリウム水溶液	0.12%	30

【0049】

実施例7

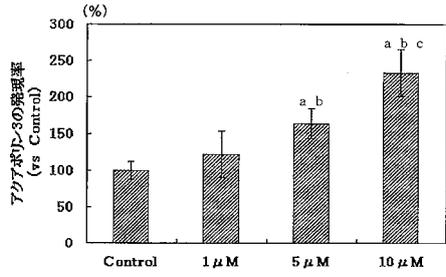
処方例1の乳液と、処方例1から抽出物を抜いた乳液（プラセボ）を用いて女性26人（35～54才）を対象に1ヶ月間の二重盲検法を用いた使用試験を行った。試験期間中温州みかん、柿、マンゴーなど - クリプトキサンチンを多く含む食品の摂取は禁止し、塗布は夜間に0.5g/日を上腕内側に行うこととした。試用期間終了後、コルネオメーター（CK社製）を使用して塗布部分の水分量の変化を試験の前後で測定を行った。なお試験前の両群間には水分量の有意な差は見られなかった。

【0050】

図7にその結果を示す。温州みかん抽出物を含有することで、水分量は処方例1を用いたほうが改善したと感じる者が多かった。また試験期間中の皮膚のトラブルや処方成分の劣化などは見られなかった。

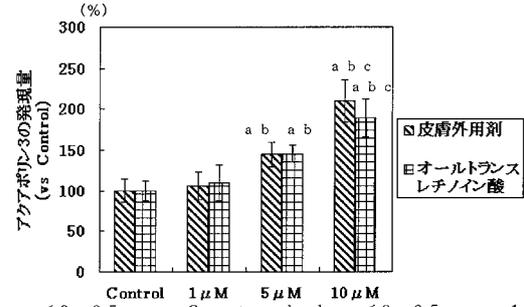
40

【 図 1 】



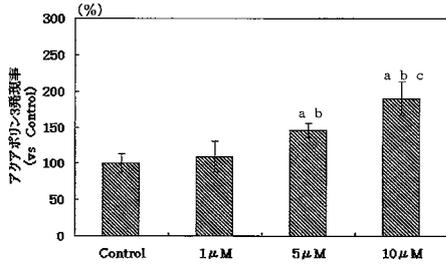
a : $p < 0.05$ vs Control b : $p < 0.05$ vs 1 μM
 c : $p < 0.05$ vs 5 μM

【 図 3 】



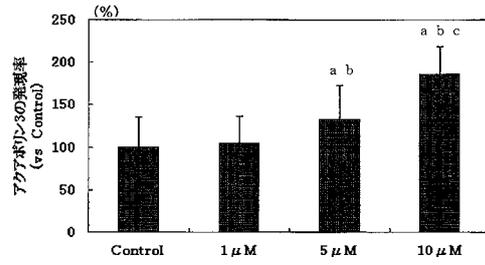
a : $p < 0.05$ vs Control b : $p < 0.05$ vs 1 μM
 c : $p < 0.05$ vs 5 μM

【 図 2 】



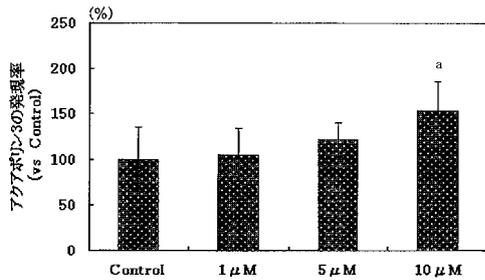
a : $p < 0.05$ vs Control b : $p < 0.05$ vs 1 μM
 c : $p < 0.05$ vs 5 μM

【 図 4 】



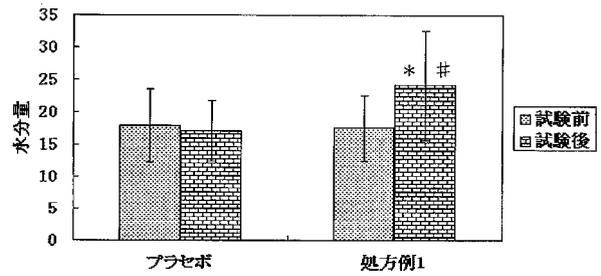
a : $p < 0.05$ vs Control b : $p < 0.05$ vs 1 μM
 c : $p < 0.05$ vs 5 μM

【 図 5 】



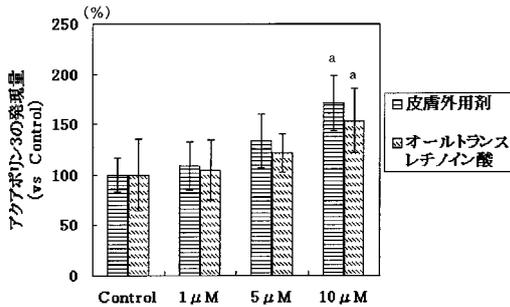
a : $p < 0.05$ vs Control b : $p < 0.05$ vs 1 μM
 c : $p < 0.05$ vs 5 μM

【 図 7 】



単位はコルネオメーター単位 (Corneometer unit)
 * $p < 0.05$ vs プラセボ
 # $p < 0.05$ vs 試験前

【 図 6 】



a : $p < 0.05$ vs Control b : $p < 0.05$ vs 1 μM
 c : $p < 0.05$ vs 5 μM

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 Q 19/08 (2006.01)	A 6 1 Q 19/08	4 C 2 0 6
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 17/16 (2006.01)	A 6 1 P 17/16	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 27/16 (2006.01)	A 6 1 P 27/16	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 1/02 (2006.01)	A 6 1 P 1/02	
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/04	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 2 3 L 1/30 (2006.01)	A 2 3 L 1/30	B
A 2 3 L 2/52 (2006.01)	A 2 3 L 2/00	F
A 2 3 K 1/16 (2006.01)	A 2 3 K 1/16	3 0 1 B
	A 2 3 K 1/16	3 0 4 C

Fターム(参考) 4B018 MD08 MD52 MD90 ME14 MF01 MF12
 4C083 AA111 AB032 AC022 AC102 AC122 AC471 AD042 AD152 AD222 CC02
 CC05 CC41 EE11 EE12
 4C088 AB62 AC04 BA23 BA32 MA52 MA63 NA14 ZA33 ZA34 ZA59
 ZA67 ZA89 ZC02
 4C206 AA01 AA02 CA13 MA01 MA04 MA72 MA83 NA14 ZA33 ZA34
 ZA59 ZA67 ZA89 ZC02