

(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2017-100974

(P2017-100974A)

(43) 公開日 平成29年6月8日(2017.6.8)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|---------------------------------|-----------------|-------------|
| A 6 1 K 35/74 (2015.01) | A 6 1 K 35/74 G | 4 C 0 7 6 |
| A 6 1 K 35/744 (2015.01) | A 6 1 K 35/744 | 4 C 0 8 7 |
| A 6 1 K 35/08 (2015.01) | A 6 1 K 35/74 A | |
| A 6 1 P 17/00 (2006.01) | A 6 1 K 35/08 | |
| A 6 1 P 43/00 (2006.01) | A 6 1 P 17/00 | |

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 7 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|-----------|------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2015-233966 (P2015-233966) | (71) 出願人 | 598045357 株式会社美養 |
| (22) 出願日 | 平成27年11月30日 (2015.11.30) | | 神奈川県横浜市港北区高田西二丁目2番 34号 |
| | | (74) 代理人 | 100071526 弁理士 平田 忠雄 |
| | | (74) 代理人 | 100124246 弁理士 遠藤 和光 |
| | | (72) 発明者 | 沼倉 萬里江 神奈川県横浜市港北区高田西二丁目2番 34号 株式会社美養内 |
| | | (72) 発明者 | 團 克昭 神奈川県横浜市港北区高田西二丁目2番 34号 株式会社美養内 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コラーゲン修復・排毒促進剤の製造方法

(57) 【要約】

【課題】コラーゲンの修復や排毒促進に有効な H s p 9 0、g p 9 6、H s p 7 0、g p 4 7 の発現誘導性能を有するコラーゲン修復・排毒促進剤の製造方法を提供する。

【解決手段】コラーゲン修復・排毒促進剤の製造方法は、複数種の乳酸菌を共生培養して乳酸菌生産物質を生成する工程と、乳酸菌生産物質に対して所定の割合でエタノール、天然アルカリ温泉水、及び乳酸菌を含む菌の代謝産物を混合する工程と、混合して得られた水溶液を所定の期間熟成する工程と、熟成して得られた水溶液中の沈殿物を濾過する工程と、を含む。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

複数種の乳酸菌を共生培養して乳酸菌生産物質を生成する工程と、
前記乳酸菌生産物質に対して所定の割合のエタノール、天然アルカリ温泉水、及び乳酸菌を含む菌の代謝産物を混合する工程と、
混合して得られた水溶液を所定の期間熟成する工程と、
熟成して得られた水溶液中の沈殿物を濾過する工程と、
を含むコラーゲン修復・排毒促進剤の製造方法。

【請求項 2】

前記濾過された水溶液を所定の希釈倍率で希釈する工程を更に含む、
請求項 1 に記載のコラーゲン修復・排毒促進剤の製造方法。

10

【請求項 3】

前記所定の希釈倍率は、400～600倍である、
請求項 2 に記載のコラーゲン修復・排毒促進剤の製造方法。

20

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、コラーゲン修復・排毒促進剤の製造方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

ヒト表皮には、様々な種類の細胞が存在し、それぞれが有効成分を取り込む働きをしたり、外敵からのバリアになったり、外部環境刺激に対応して生体防御機構を発揮している。この生体防御機構の中でも特に注目されている機構として熱ショックタンパク質（ヒートショックプロテイン（H s p : heat shock proteins）ともいう。）が知られている。この H s p は、細胞が熱や紫外線等のストレスにさらされたときに発現し、細胞を保護する。H s p には、様々な種類が存在し、定常状態では細胞内にごくわずかしが存在していないが、刺激に対応して大量に誘導されてくる。この H s p の発現を誘導する能力を有する物質を見出すことは、今後、様々な分野で有効活用されることが期待されている。

30

【0003】

従来、H s p に関する発明として、ヒートショックプロテイン発現誘導剤（特許文献 1）、ヒートショックプロテイン 70 産生誘導剤（特許文献 2）、皮膚外用剤（特許文献 3）が提案されている。

【0004】

特許文献 1 に記載されたヒートショックプロテイン発現誘導剤は、ユーパリノライド A 及び / 又は B（Eupalinolide A 及び / 又は B）からなるものであり、極めて強い H S P 70 の発現誘導が認められ、メラニン産生を抑制するとともに、脳梗塞やアルツハイマー病など脳疾患、潰瘍性大腸炎などの治療剤として有用であるとしている。

40

【0005】

特許文献 2 に記載されたヒートショックプロテイン 70 産生誘導剤は、亜鉛化合物を 10 m M 以上含有する培地で培養した酵母の菌体抽出物を有効成分とするものであり、上皮細胞でのヒートショックプロテイン 70 の産生誘導が可能となり、胃潰瘍、胃粘膜傷害を防止する医薬品に利用が可能であるとしている。

【0006】

50

特許文献3に記載された皮膚外用剤は、ヒートショックプロテイン、二価カルボン酸1種又は2種以上と水酸基価から算出した平均重合度が2～15のポリグリセリンとのオリゴマーエステル、及びグリセリン、平均重合度2～4のポリグリセリンからなる群から選択される1種又は2種以上を含有したものであり、H s p 7 0が皮膚に十分浸透して、肌状態を改善できるとしている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特開2013-71902号公報

【特許文献2】特開2014-108945号公報

【特許文献3】特開2015-124184号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

しかし、従来 of H s pに関する発明によると、H s p 7 0が発現するのみであるので、コラーゲンの修復や排毒促進に十分とはいえない。

【0009】

したがって、本発明の目的は、コラーゲンの修復や排毒促進に有効なH s p 9 0、g p 9 6、H s p 7 0、g p 4 7の発現誘導性能を有するコラーゲン修復・排毒促進剤の製造方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0010】

[1] 複数種の乳酸菌を共生培養して乳酸菌生産物質を生成する工程と、

前記乳酸菌生産物質に対して所定の割合のエタノール、天然アルカリ温泉水、及び乳酸菌を含む菌の代謝産物を混合する工程と、

混合して得られた水溶液を所定の期間熟成する工程と、

熟成して得られた水溶液中の沈殿物を濾過する工程と、

を含むコラーゲン修復・排毒促進剤の製造方法。

[2] 前記濾過された水溶液を所定の希釈倍率で希釈する工程を更に含む、前記[1]に記載のコラーゲン修復・排毒促進剤の製造方法。

[3] 前記所定の希釈倍率は、400～600倍である、前記[2]に記載のコラーゲン修復・排毒促進剤の製造方法。

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、コラーゲンの修復や排毒促進に有効なH s p 9 0、g p 9 6、H s p 7 0、g p 4 7の発現誘導性能を有するコラーゲン修復・排毒促進剤の製造方法を提供することができる。

【発明を実施するための形態】

【0012】

以下、本発明の実施の形態に係るヒートショックプロテイン発現誘導剤の製造方法の一例について説明する。なお、以下の説明では、ヒートショックプロテイン発現誘導剤をH s p発現誘導剤と略す場合がある。また、本実施の形態に係るH s p発現誘導剤は、コラーゲン修復・排毒促進剤でもある。「排毒」とは、食物などを介して摂取され、生体内で生成された毒性異物を体外に排出することをいう。「コラーゲン修復」とは、減少したり劣化したコラーゲンを元の状態に近づけることをいう。コラーゲン修復・排毒促進剤は、例えば、人体表面への塗布用、飲食用又は飲料用として固形状、紛体状、クリーム状、噴霧状又は液状等でもよい。

【0013】

(H s p発現誘導剤の製造工程)

複数種の乳酸菌を共生培養して乳酸菌生産物質を生成する。乳酸菌生産物質は、ラクト

10

20

30

40

50

バチルス菌属に属する乳酸菌、ビフィドバクテリウム菌属に属する乳酸菌、及びストレプトコッカス菌属に属する乳酸菌を用いるとともに、それら3属の乳酸菌から選択した1種又は2種以上の乳酸菌を用いて複数のグループを形成し、それらグループ毎に継代培養して共棲状態を維持し、この継代培養されたグループ単位の乳酸菌同士をさらに共棲培養して得た乳酸菌培養液を濾過した水溶液である。乳酸菌生産物質としては、例えば光英科学研究所製のものを用いることができる。

【0014】

次に、上記乳酸菌生産物質8～12質量%（一例として9.8質量%）に対してエタノールを8～12質量%（一例として9.8質量%）混合し、これに天然アルカリ温泉水73～83質量%（一例として78.4質量%）をさらに加え、最後に菌の代謝産物を1～3質量%（一例として2質量%）投入して第1の水溶液を生成する。菌の代謝産物としては、例えば、ラクトバチルス菌属に属する乳酸菌（例えば、高粱（穀物）由来の乳酸菌）、及び酵母菌を用い、共棲培養して得た乳酸菌代謝産物を濾過した水溶液を用いることができる。

10

【0015】

次に、第1の水溶液を、直射日光が当たらない屋内にて、常温（約25℃）の下、2週間に一度のペースで攪拌し、7年以上熟成させて第2の水溶液を生成する。第2の水溶液は、例えばpH3.2の酸性寄りの弱酸性の溶液であるが、pH3.0以上6.0未満の弱酸性の溶液でもよい。この第2の水溶液中に発生した沈殿物を濾過して得られた水溶液が第1のHsp発現誘導剤であり、コラーゲン修復・排毒促進剤でもある。長期熟成であればあるほど、粘質が増して、強烈な酸味と味にも深みが増すので、極力熟成を長め（理想は7年以上）にすることが望ましい。熟成が早い（3年未満）と酸味のある単なる薄いエタノールのような味になる。第1のHsp発現誘導剤の1回の製造量は、50リットル以上が熟成が進み易くなり、品質も安定するので望ましい。

20

【0016】

（評価）

次に、上記Hsp発現誘導剤の検体について、Hspの発現誘導能力を評価した。

【0017】

ヒト皮膚繊維芽細胞に検体を各段階希釈にて添加し、所定の時間後に細胞を回収して、細胞内のHspに関するmRNAレベルを定量PCR（Polymerase Chain Reaction）法を用いて測定した。

30

【0018】

すなわち、ヒト皮膚繊維芽細胞を細胞培養プレート（6well-plate）に分散し、温度37℃、CO₂濃度5%に設定したCO₂インキュベータ（恒温培養器）内で培養する。

【0019】

次に、各検体を希釈溶液（例えば培養液）で段階希釈（希釈倍率500倍、2500倍、12500倍）して培養液中に添加し、培養を継続させる。なお、希釈倍率500倍は一例であり、例えば400～600倍、450～650倍又は490～510倍とする。

【0020】

所定の時間（例えば4時間）刺激した後、培養液は除去し、細胞表面をPBS（リン酸バッファー）で洗浄する。次に、細胞からトータルRNA抽出用試薬を用いてトータルRNAを抽出する。詳細はTRIzol（登録商標）reagentのプロトコールに準ずる。

40

【0021】

次に、得られたトータルRNAの量を定量した後、所定量のトータルRNAに対してRT反応試薬を用いて逆転写反応（RT反応）によりcDNAを合成する。詳細はTakara PrimeScript master mix Kitに準ずる。

【0022】

次に、cDNAを鋳型として、各種熱Hsp-mRNA配列に則ったプライマーペア（別途合成済み）と、PCR反応液（SYBR green系）を用いて反応溶液を各検体に対して調整する。

50

【 0 0 2 3 】

次に、これらを96ウェルPCRプレートに分散し、定量PCR装置にセットする。定量PCR装置における専用のプログラムにより、各種Hsp-mRNAの元々存在した量をデルターデルターCT法により相対的に定量する。

【 0 0 2 4 】

(評価結果)

得られたmRNA発現量から各種検体のHsp発現誘導能力を評価する。各mRNA発現量は、細胞に何も処理を加えていないコントロール下でのmRNA発現量を1とした際の倍数で表示した。

【 0 0 2 5 】

熱ショックタンパク質は、Hsp104、gp96、Hsp90、Hsp70、Hsp60、Hsp47、Hsp32について、検討した。Hsp104は、異常タンパク質を再生する作用がある。gp96は、Hspの仲間であり、小胞体内で抗原の運搬や、細胞表面にまで抗原を提示する作用がある。Hsp90は、他のタンパク質を活性調節する作用がある。Hsp70は、最も代表的なHspであり、強力な細胞保護作用を有する。Hsp60は、タンパク質のフォールディング維持や膜透過の作用がある。Hsp47は、高等動物にのみ存在するものであり、コラーゲンの生産を助ける作用がある。Hsp32は、活性酸素を減らす作用がある。

【 0 0 2 6 】

mRNA発現量の測定結果を表1に示す。

【 0 0 2 7 】

【表1】

| 希釈倍率(倍) | mRNA発現量 | | | | | | |
|---------|---------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Hsp104 | gp96 | Hsp90 | Hsp70 | Hsp60 | Hsp47 | Hsp32 |
| 500 | 1.74 | 7.73 | 9.38 | 58.08 | 10.20 | 8.51 | 3.51 |
| 2500 | 4.17 | 0.88 | 0.98 | 1.69 | 0.96 | 1.54 | 1.82 |
| 12500 | 1.55 | 0.72 | 0.81 | 2.11 | 0.64 | 1.16 | 2.93 |

【 0 0 2 8 】

総括的には、500倍希釈すれば、何らかの刺激となって発現を上昇させる傾向が認められた。今回、Hsp104:gp96:Hsp90:70:60:47:32の遺伝子発現力を同時に測定した。この試みは今回初めてのことである。また、Hsp70以外のHspの結果が出たのも今回初めてのことである。

【 0 0 2 9 】

Hsp発現誘導剤は、gp96の遺伝子発現力も高かったことから、異物認識能力の向上、すなわち排毒効果が高くなったことが示唆された。Hsp47に関して遺伝子発現も認められた。このことにより、肌の張りに重要なコラーゲンのまき直しに關与するHspが活性化されたことが、示唆された。

【 0 0 3 0 】

Hsp70、90、gp96がリンクして細胞のレセプタクルに抗原提示することは知られている。例えば、抗原が浸入すると、マクロファージが異物として認識し、抗原を取り込む。これをHsp70、Hsp90が共同的にタンパク質に断片化し、小胞体(ER)に送り込む。小胞体に退避しているgp96が粗面小胞体を通り、マクロファージの細胞表面のレセプターに抗原として提示する。このことにより、キラーT細胞が認識し、異物を保有しているマクロファージを攻撃し叩く。キラーT細胞はここで認識したシグナルを他の同様のシグナルを提示している細胞にアタックして行く。以上のことはガン細胞より抗原+Hspを取り出してgp96、Hsp70、Hsp90を上手く活用した抗ガン剤の治療に応用研究されている。本発明者らは、Hsp発現誘導剤がgp96、Hsp7

10

20

30

40

50

0、H s p 9 0 の発現誘導性能が高いことを発見し、排毒促進剤に適用できると考えた。また、H s p 発現誘導剤が g p 4 7 の発現誘導性能が高いことを発見し、コラーゲン修復剤に適用できると考えた。すなわち、H s p 発現誘導剤は、コラーゲン修復・排毒促進剤に適用できるといえる。

【 0 0 3 1 】

H s p 発現誘導剤によれば、以下の効果を奏する。

- (1) 細胞ダメージの修復が優れている。
- (2) 粘膜組織の修復が優れている。
- (3) 潰瘍、腫瘍などの改善が期待できる。

すなわち、皮膚の紫外線ストレスに対する抵抗性をあげ、バリア機能の保持、炎症防止および修復などの効果が期待できる。

10

【 0 0 3 2 】

なお、本発明の実施の形態は、上記実施の形態に限定されず、種々な実施の形態が可能である。例えば、本実施の形態では、得られた H s p 発現誘導剤をコラーゲン修復・排毒促進剤に適用を説明したが、化粧品や肌状態を改善する皮膚外用剤でもよい。また、得られた H s p 発現誘導剤は、嗅剤、点眼液、点鼻剤、歯磨剤、育毛剤、養毛剤、入浴剤、石鹸、ボディソープ、シャンプー、メーキャップ化粧品（ファンデーション、口紅、眉墨、アイシャドー等）、皮膚用化粧品とも言われている基礎化粧品（洗顔料、クレンジング、化粧水、美容液、乳液、ジェル、クリーム、マスク・パック、サンスクリーン剤等）、布又は糸に H s p 発現誘導剤を含浸させたシート、紙に H s p 発現誘導剤を含浸させたシート、H s p 発現誘導剤含浸部材、ダイエット用機能素材、細胞老化抑制剤、痴呆症進行抑制剤、アルツハイマー病等の認知症進行抑制剤等に適用することができる。また、本発明の要旨を変更しない範囲内で、上記実施の形態の製造工程において、工程の追加、削除、変更、入替え等が可能である。

20

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 P 39/02 | (2006.01) | A 6 1 P | 43/00 | 1 1 1 | |
| A 6 1 K 47/10 | (2006.01) | A 6 1 P | 39/02 | | |
| | | A 6 1 K | 47/10 | | |

(72)発明者 高 田 敦士
神奈川県横浜市港北区高田西二丁目 2 2 番 3 4 号 株式会社美養内

(72)発明者 泉 円
神奈川県横浜市港北区高田西二丁目 2 2 番 3 4 号 株式会社美養内

Fターム(参考) 4C076 AA12 BB31 CC18 DD37A GG41
4C087 AA01 AA02 BA06 BC56 CA10 NA14 ZA89 ZC41