

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3676813号
(P3676813)

(45) 発行日 平成17年7月27日(2005.7.27)

(24) 登録日 平成17年5月13日(2005.5.13)

(51) Int. Cl.⁷

F I

A 6 1 K 7/00
A 6 1 K 35/78
A 6 1 P 17/00
A 6 1 P 43/00

A 6 1 K 7/00 K
A 6 1 K 35/78 C
A 6 1 P 17/00
A 6 1 P 43/00 1 1 1

請求項の数 13 (全 11 頁)

| | |
|---|---|
| <p>(21) 出願番号 特願平8-524724 (86) (22) 出願日 平成8年2月16日(1996.2.16) (65) 公表番号 特表平11-500432 (43) 公表日 平成11年1月12日(1999.1.12) (86) 国際出願番号 PCT/FR1996/000256 (87) 国際公開番号 W01996/025143 (87) 国際公開日 平成8年8月22日(1996.8.22) 審査請求日 平成15年2月6日(2003.2.6) (31) 優先権主張番号 95/01840 (32) 優先日 平成7年2月17日(1995.2.17) (33) 優先権主張国 フランス (FR)</p> | <p>(73) 特許権者 エル・ヴェ・エム・アッシュ ルシエルシ ユ フランス国 ナンテール 9 2 7 5 2 2 5 リュ デ ペリエ</p> <p>(74) 代理人 弁理士 安富 康男</p> <p>(74) 代理人 弁理士 古谷 信也</p> <p>(72) 発明者 フレデリック ボンテ フランス国 クールブヴォワ 9 2 4 0 0 5 プラス シャラス</p> <p>(72) 発明者 マルク デュマ フランス国 コローンブ 9 2 7 0 0 5 4 リュ ド ランデュストリ 最終頁に続く</p> |
|---|---|

(54) 【発明の名称】 ベルトレティア抽出物を含有する化粧用又は薬用、特に皮膚科用組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

化粧学的に有効な量のベルトレティア抽出物を有効成分として含有し、前記抽出物が化粧学的に許容される賦形剤に分散してなることを特徴とする化粧用組成物。

【請求項 2】

コラーゲンの合成促進又は抗フリーラジカル活性を有し、皮膚の癬痕改善、皮膚の老化現象の抑制、しわの予防若しくはその深さの減少、皮膚の引き締め、又は、表皮 - 真皮接合部の構造及び特性の増強のための請求項 1 記載の化粧用組成物。

【請求項 3】

コラーゲン I 又はコラーゲン IV の合成促進のための組成物である請求項 2 記載の化粧用組成物。

【請求項 4】

薬学的に有効な量のベルトレティア抽出物を有効成分として含有し、前記抽出物が薬学的に許容される賦形剤に分散してなることを特徴とする薬用組成物。

【請求項 5】

コラーゲンの合成促進又は抗フリーラジカル活性を有し、皮膚の癬痕並びに皮膚の生物力学的特性及び表面の外観の改善、皮膚の引き締め、表皮 - 真皮接合部の構造及び特性の増強、皮膚の老化現象の抑制を目的とした薬用組成物である請求項 4 記載の薬用組成物。

【請求項 6】

ベルトレティア抽出物の濃度は、組成物の全重量に対して、0.0001 ~ 1 重量%の範

10

20

囲である請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7】

抽出物は、ベルトレティアの、樹皮の抽出物、木の實の抽出物、及び、木の實の果皮の抽出物からなる群より選択されるものである請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8】

ベルトレティア抽出物は、水、アルコール、塩素系溶媒、有機エステル、及び、これらの溶媒の混合物を基礎とする混合溶媒からなる群より選択される極性溶媒を用いて抽出して得るものである請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 9】

極性溶媒は、水、メタノール、エタノール、及び、これらの溶媒の混合物を基礎とする混合溶媒からなる群より選択されるものである請求項 8 記載の組成物。 10

【請求項 10】

ベルトレティア抽出物は、サポニンに富むものである請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 11】

アスコルビン酸、マデカシン酸、アシアチン酸、マデカソサイド、アシアチコサイド、
- 1 - プロテイナーゼ阻害剤、コラゲナーゼ阻害剤、エラスターゼ阻害剤、リジン、プロリン、2 - オキソグルタレート及びジンセノサイド R₀ からなる群より選択される有効物質を更に含有する請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 12】 20

ベルトレティア抽出物は、ベルトレティア・エクセルサ抽出物である請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 3 及び 6 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の化粧用組成物を、人体に外用として局部的に塗布することを特徴とする化粧方法。

【発明の詳細な説明】

本発明は、本質的に、ベルトレティア (Bertholletia) 抽出物を含有する化粧用又は薬用組成物、特に皮膚科用組成物に関する。

更に詳しくは、本発明は、特にコラーゲンの合成促進又は抗フリーラジカル活性を有し、特に皮膚の老化現象の抑制、肌の引き締め、癬痕改善又はコラーゲン不足に伴う種々の病状治療を目的とした、化粧剤としての又は化粧用若しくは薬用組成物、特に皮膚科用組成物製造のための、ベルトレティア抽出物の使用、及び、上記抽出物を含有する化粧用又は薬用組成物に関する。 30

ベルトレティアは、サガリバナ科に属し、ベルトレティア・エクセルサ (Bertholletia excelsa) とベルトレティア・ノビリス (Bertholletia nobilis) という 2 つの非常に似通った種を含む属である。これらは南アメリカ、特にブラジルの熱帯地方で見られる樹木である。高さは 30 ~ 40 メートルに達する。一般にはブラジルクルミ又はブラジルクリノキと呼ばれている。この 2 種類の木の実は類似点が多く、実際に混同されることがある。これらは食用である。

これらについては、特にパウル H . メンシエ (Paul H. Mensier) 著、パウル・レシェバリエ (Paul Lechevaliers) 社出版、パリ、1957 年の「ディクシヨネア・デ・ユイル・ベジタル 40

(Dictionnaire des Huiles Végétale)

(植物油辞典)」で記述されている。

アマゾンでは、ベルトレティア・エクセルサの幹の樹皮は、特にサポニンを含有するため、肝臓の病気を抑制する煎じ薬として使用されている。その実から採れる油脂は石鹼の製造に使用できる (R . E . シュルツ (R.E. Schultes) ら、「ザ・ヒーリング・フォレスト (The healing forest)」、ディスコリツ・プレス (Discorides Press)、ポートランド、オレゴン、米国、1990、2 巻、225 ~ 226 頁)。

今回、ベルトレティアの抽出物が、特に肌ケア用の化粧品として極めて有用であることを 50

見いだした。

特に、ベルトレティア抽出物は、コラーゲン、特にI型又はIV型のコラーゲン（以下、「コラーゲンI」又は「コラーゲンIV」と略記）の合成において驚くべき活性を有することを見いだした。

周知のように、皮膚は本質的にコラーゲンIを含有する。コラーゲンIは、真皮中で最も数の多い細胞である繊維芽細胞により合成される蛋白質である。この蛋白質は、支持的役割を果たし、真皮の流動学的性質、特にその張り、及び、その構造の維持に関する役割を持つ（E. U. クカルツ (E.U. KUCHARZ)、「ザ・コラーゲン：バイオケミストリー・アンド・パトフィジオロジー (The collagens : Biochemistry and pathophysiology)」、シュプリンガー・フェルラーク (Springer Verlag)、ベルリン、1992)。また、老人は若者よりも真皮の繊維芽細胞におけるコラーゲンの分泌量が少ないことが分かっている (M. デュマス (M. DUMAS)ら、Mech. Ageing Dev.、73巻 (1994)、179~187頁)。従って、年と共に、皮膚の流動学的性質や日々受ける圧力に対する応答が衰える。皮膚は拡張して、伸びに対する応答が乏しくなり、張りを失い、皺が深くなる。

同じく周知のように、コラーゲンIVは表皮-真皮接合部の主要コラーゲンである。この主題に関する参考文献としては、ブリッガマン R. A. (Briggaman R.A.) 著、「バイオケミカル・コンポジション・オブ・ザ・エピダーマル-ダーマル・ジャンクション・アンド・アザー・ベースメント・メンブラン (Biochemical composition of the epidermal-dermal junction and other basement membrane)」、J. Invest. Dermatol. 出版、78巻 (1982)、1~6頁、又は、P. フェランド (P. Verande) 著、「ラ・ジオクショ・デルモエピデルミク

(La jonction dermoépidermique)」、

エセルム・イン・セミネール・エセルム
(Inserm in Séminaire Inserm)

出版、214巻 (1991)、83~100頁がある。

このコラーゲンIVは稠密層に存在するもので、細胞の固着に関与し、表皮ケラチン細胞により合成される。基底板は、表皮ケラチン細胞につながる固着細繊維 (コラーゲンVII) と真皮コラーゲンの細繊維 (コラーゲンI及びIII) をつなぎとめるものである。この基底板はコラーゲンIVからなり、2つの皮膚の仕切りの機能的な界面維持に必要である。また、コラーゲンIVは癒痕化の過程において重要な役割を果たし、良質な癒痕組織の形成を可能にする。

更に、ベルトレティア抽出物は、顕著な抗フリーラジカル活性、即ち、遊離基捕捉剤として働くことを見いだした。皮膚上での遊離基捕捉剤としての有利な効果は、近年、F. J. ライト (F.J. Wright)、J. Appl. Cosmetol.、13巻 (1995)、41~50頁で述べられている。

さて、フリーラジカルは、老化現象、特に皮膚における老化現象に関与し、皮膚の質と特性を変更するものと理解されている。この主題に関する文献としては、I. エメリット (I. Emerit) 著、フリー・ラジカル・アンド・エイジング (Free radicals and ageing)、I. エメリット、B. チャンス (B. Chance) 編、ビルクハウザー・フェルラーク (Birkhauser Verlag)、バ-ゼル、1992年、328~341頁で紹介されている。

以上のように、ベルトレティア抽出物はコラーゲン合成やフリーラジカルに対して活性を有するため、皺や皮膚の基礎組織のゆるみなどの皮膚の老化現象の抑制、又は、癒痕の改善に有用である。

従って、本発明の主要な目的は、皮膚の老化を予防・治療して皮膚を引き締めることや癒痕改善のために効果的であり、フリーラジカルに対する効果を持つ化粧用又は薬用、特に皮膚科用組成物の新規製剤を提供するという新規の技術的課題を解決することにある。

本発明の別の主要な目的は、特に化粧業界や製薬業界において工業的規模で利用できる簡便な方法により、新規の上記技術的課題を解決することにある。

従って、第一の特徴によると、本発明は、特に抗フリーラジカル活性を有する化粧用試薬としての、特に肌ケアのためのベルトレティア抽出物の使用に関する。

10

20

30

40

50

本発明のある態様によると、ベルトレティア抽出物、好ましくはベルトレティア・エクセルサ抽出物は、コラーゲン、特にコラーゲンⅠ又はコラーゲンⅣの合成促進又は抗フリーラジカル活性を有し、特に生物力学的特性及び皮膚表面の外観だけでなく皮膚の癢痕の改善、皮膚の引き締め、皮膚の老化現象の抑制、コラーゲン不足に伴う種々の病状の治療を目的とした化粧用又は薬用組成物、特に皮膚科用組成物の製造に用いられる。

ある有利な態様によると、ベルトレティア抽出物は、皮膚の老化、特に皺を抑制する効果を有し、皺の予防やその深さの減少を目的とする組成物の製法に用いられる。

別の有利な態様によると、ベルトレティア抽出物は、この植物の樹皮、好ましくはベルトレティア・エクセルサの幹から採れる抽出物である。

別の有利な態様によると、ベルトレティア抽出物は、ベルトレティアの果実、即ち、木の果実、より好ましくはベルトレティアの木の果実の果皮、より好ましくはベルトレティア・エクセルサの木の果実の果皮から採れる抽出物である。

好ましくは、ベルトレティア抽出物は以下で示す方法により得られるが、これらのみ限定されるものではない。

最初の抽出は、水、好ましくは1～4個の炭素原子を有するアルコール、好ましくは1～2個の炭素原子を有する塩素系溶媒、好ましくは3～6個の炭素原子を有する有機エステル、及び、これらの溶媒の混合物を基礎とする混合溶媒からなる群より好適に選択される極性溶媒を用いて、上記植物の樹皮又は木の果実、好ましくは幹の樹皮又は木の果実の果皮において行う。

より好ましくは、上記最初の抽出に用いる溶媒は、水、メタノール、エタノール、メタノール/水の混合物又はエタノール/水の混合物、クロロホルム及びジクロロメタンからなる群より選択されるものである。更に好ましくは、上記溶媒は、水、メタノール、エタノール又はこれらの溶媒の混合物である。

上記抽出溶媒に対する樹皮又は木の果実、好ましくは木の果実の果皮の比率は、特に限定されず、通常は1：5～1：20重量部である。

上記抽出は、一般に室温から使用溶媒の沸点までの温度で行う。

上記最初の抽出は、大気圧下で2～4時間かけて還流下で行うのが好ましい。また、上記抽出溶媒中で2～4時間の低温浸漬により行うのも好ましい。

抽出終了後、抽出物を含む溶媒相をろ過し、減圧下で濃縮及び/又は蒸発・乾燥させて、本発明による最初のベルトレティア粗抽出物を得る。この粗抽出物は、当業者に周知の種々の方法により精製することができる。

特に、サポニンを本発明のベルトレティア抽出物中に多く含有させることを望む場合、以下に示す方法が用いられるが、決してこれに限定されるものではない。上記最初の抽出により得られる抽出物を蒸発乾燥させ、残渣をメタノールに溶解させる。得られた溶液をアセトンに注ぎ込み、生じた沈殿物をろ過により回収する。好ましくは、この沈殿物は乾燥後、脱塩水を用いて透析を行う。最後に生成物を凍結乾燥することで、サポニンに富む本発明のベルトレティア乾燥抽出物が得られる。

上述した抽出過程は、特にベルトレティア・エクセルサ種に適用できる。

第二の特徴によると、本発明は更に、化粧学的に有効な量のベルトレティア抽出物、好ましくはベルトレティア・エクセルサ抽出物を有効成分として含有し、好ましくは上記抽出物が化粧学的に許容される賦形剤に分散してなることを特徴とする化粧用組成物に関する。

ある好ましい態様によると、上記化粧用組成物は、コラーゲン、特にコラーゲンⅠ又はコラーゲンⅣの合成促進又は抗フリーラジカル活性を有しており、特に皮膚の老化現象の抑制又は皮膚の引き締めを目的としている。このような組成物は、例えば、皺の予防又はその深さの減少を目的とした組成物として好適に用いられる。

第三の特徴によると、本発明は更に、コラーゲン、特にコラーゲンⅠ又はコラーゲンⅣの合成促進又は抗フリーラジカル活性を有する薬用組成物、特に皮膚科用組成物で、薬学的に有効な量のベルトレティア抽出物、好ましくはベルトレティア・エクセルサ抽出物を有効成分として含有し、上記抽出物が薬学的に許容される賦形剤に分散してなることを特徴

10

20

30

40

50

とする薬用組成物に関する。

ある好ましい態様によると、上記組成物は皮膚の癬痕の改善、又は、コラーゲン不足に伴う、又は、フリーラジカルの存在に起因する様々の病状の治療を目的とする。

第四の特徴によると、本発明はまた、好ましくは化粧学的又は薬学的に許容される賦形剤に分散されたベルトレティア抽出物、特にベルトレティア・エクセルサ抽出物を、化粧又は薬用治療にあたって化粧学的又は薬学的に有効な量で塗布することを特徴とする化粧治療方法又は薬用治療法、特に皮膚の治療法をも扱う。上記塗布は、好ましくは皮膚の該当箇所への局所的な塗布である。現時点で特に好ましい化粧用又は薬用塗布は、以上の記述、実施例に関する以下の記述、及び、請求の範囲から導かれる。濃縮抽出物に関しても同様のことが言える。

10

上記特徴のいずれにおいても、ベルトレティア抽出物、好ましくはベルトレティア・エクセルサ抽出物は、目的組成物の全重量に対して0.0001~1重量%の濃度で用いられるのが好ましい。より好ましくは、目的組成物の全重量に対して0.01~0.25重量%の濃度である。

また、上記特徴のいずれにおいても、本発明による組成物は、アスコルビン酸、マデカシン酸(madecassic acid)、アシアチン酸(asiatic acid)、マデカソサイド(madecassoside)、アシアチコサイド(asiaticoside)、-1-プロテイナーゼ阻害剤、レチノイン酸等のコラゲナーゼ阻害剤、エラスターゼ阻害剤、リジン、プロリン、2-オキシグルタレート及びジンセノサイドR₀からなる群より選択される有効物質を更に含有することが好ましい。

20

本発明の他の目的、特徴及び利点については、いくつかの実施例についての以下の記述から明らかになるが、本発明はこれら実施例にのみ限定されるものではない。

実施例においては、他に記載がなければ、百分率は重量百分率で、抽出物の量は乾燥重量で表される。

実施例 1

サポニンに富む、ベルトレティア・エクセルサの幹の樹皮からのメタノール抽出物の調製
ベルトレティア・エクセルサの幹の樹皮をすりつぶして粉末状にし、得られた粉末49gを500mlのメタノール中で2時間浸漬させる。この混合物を全て3時間還流し、放置冷却後にガラスフィルターにてろ過を行う。得られたろ液が本発明による最初の抽出物であり、以下においては抽出物I₁とする。この最初の抽出物を蒸発乾固し、14.7gの残渣を100mlのメタノールに溶解させる。この溶液を500mlのアセトンに注ぎ込み、得られた沈殿物をろ過する。次に、この沈殿物を水酸化カリウム等の固形状脱水剤で乾燥させて、1.33gの乾燥した生成物を得る。次いで830mgのこの生成物を4日間、9mlの脱塩水により透析したのち、凍結乾燥を行い、サポニンに富む本発明の抽出物(抽出物I₂とする)182mgを得る。

30

実施例 2

サポニンに富む、ブラジリアン・ベルトレティア・エクセルサの木の實の果皮からのメタノール抽出物の調製

市販されているブラジリアン・ベルトレティア・エクセルサの木の實の果皮を集めて、粗くすりつぶしてから粉砕する。

40

得られた粉末状の果皮100gを30分間の還流下、1リットルのメタノールで連続的に3回抽出する。

孔径0.45µmのろ紙を用いてそれぞれの抽出液をろ過し、3つの抽出液を合わせる。合わせた抽出液を回転式蒸発器を用いて濃縮し、乾燥した膜を得る。

この膜を水で振蕩し、得られる乳状液を凍結乾燥する。

これにより、サポニンを多く含有する本発明の果皮の抽出物(抽出物I₃とする)を5g得る。この抽出物の収率は5%である。

実施例 3

実施例 1により得られた、ベルトレティア・エクセルサの幹の樹皮からメタノール抽出物(抽出物I₂)の、培養ヒト繊維芽細胞によるコラーゲン合成に対する活性の証明

50

繊維芽細胞の培養

顔の美容整形中の60歳女性由来の顔面の皮膚を用いて、体外培養法によって健康な成人真皮の培養繊維芽細胞を調製する。

2 mmol/lのL-グルタミン(ギブコ(Gibco))及び10 v/v%のウシ胎児血清(ギブコ)を添加したE199培地(ギブコ)で、5%の二酸化炭素を含む37°Cの加湿大気下にて、上記繊維芽細胞が集密的になるまで培養する。コラーゲン含量を評価するために、0.1%のトリプシン及び0.02%のEDTAを含むpH7.2のリン酸緩衝溶液(PBS)を用いて、集密状態にある最初の培養細胞を集め、その細胞を、上記のものと同じ培地を入れた96穴マイクロカルチャープレート(ファルコン(Falcon))に、1ウェルあたり 10^4 個の繊維芽細胞密度で植えつける。

10

植えつけてから24時間後、上記培地を取り除き、血清を含まず25 μmol/lのL-アスコルビン酸のナトリウム塩を加えたこと以外は上述のものと同じ組成を有する培地と取り替える。また、この新しい培地は、処理培地であれば試験生成物(抽出物I₂)を含有するが、コントロール培地の場合にはこれを含有しない。次いで37°Cで更に48時間培養を行う。試験生成物(抽出物I₂)は、DMSOに溶解させてから培地に添加する(培地中のDMSOの最終濃度は0.1 v/v%である)。

細胞の生存度

培養の終了時点で、上記培地を取り除き、デニゾットF.(Denizot F.)らのジャーナル・オブ・イムノロジー・メソッド(J. Immunol. Methods)、(1986)89巻、271~277頁の記載に従って、MTT細胞生存度試験を行った。フェノールレッドを含まないE199培地(ギブコ)で、0.5 mg/mlのテトラゾリウム塩(3-[4,5-ジメチルチアゾル-2-イル]-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロマイド即ちMTT)を含有する溶液100 μl中、37°Cで3時間、細胞の培養を行う。次に、各ウェルに100 μlのイソプロパノールを添加し、生存細胞により形成される暗色のホルマザンブルー誘導体を溶解させる。540 nmで吸光度を測定する。

20

コラーゲンの測定

繊維芽細胞が分泌したI型コラーゲンは、細胞と会合するか、又は、生成物(抽出物I₂)の有無に関わらず培養48時間後の無血清培地に放出されており、その総量を、デュマスM.(Dumas M.)ら、Mech. Ageing Dev.(1994)73巻、179~187頁、及び、グリモードJ.P.(Grimaud J.P.)ら、メソツツ・オブ・エンジマチック・アナリシス(Methods of Enzymatic Analysis)、ベルマイヤーH.U.(Bermeyer, H.U.)編、VCH出版、バインハイム(1986)、186~201頁に記載されているELISA法により測定する。

30

音波処理により水中で均一化した無血清培養培地と残余細胞を集めて、プラスチック製の免疫プレート(NUNC)のウェルに移動し、+4°Cで24時間培養し分泌したコラーゲンを付着させる。この培養期間中に、プロテアーゼ阻害剤(エチルマレイイミド、フェニルメチルスルフォニルフルオリド、及び、エチレンジアミンテトラアセテート、各最終濃度は1 mM)を添加する。次にプレートをPBSで洗浄する。同様の洗浄過程をプレートの各処理後に行う。

非特異的結合を防ぐために血清アルブミンを加えて4°Cで24時間培養し、次いで、抗ヒトI型コラーゲンウサギ抗体(パスツール研究所、リヨン、フランス)を加えて22°Cで1.5時間置き、その結合抗体をアルカリホスファターゼと結合した抗ウサギのヤギIgG(エテルチム(Interchim)、モンリュソン、フランス)と反応させる。アルカリホスファターゼによってパラニトロフェニルリン酸エステル(シグマ)から生成したパラニトロフェノールの吸光度は、405 nmの測定により行った。精製ヒトI型コラーゲン(ジャックボーイ研究所(Institut Jacques Boy)、フランス)の検量線を用いて、吸光度よりコラーゲンのナノグラム量が得られる。

40

統計

コラーゲン量(平均値±標準偏差、n=6)を、未処理のコントロール培養のコラーゲン量と比較する。0.05以下のp値に関するこの比較の有意性は、ステューデントのt検

50

定により評価する。

結果

コラーゲン I の合成促進度の百分率 A は、コントロール培養（試験生成物を含まない）が分泌したコラーゲン I の量 C_0 と、処理培養における量 C_1 を比較し、次式に基づいて算出する。

$$A = \frac{C_1 - C_0}{C_0} \times 100$$

結果を以下の表 I に示す。

表 I

| 培養 | %生存度 /コント ロール | 繊維芽細胞分泌コラー ゲン I (ng/10000細胞 /48時間) | % 促進度 A | 有意性 |
|---|---------------------|--|---------------|-----|
| 生成物非含有 のコントロール 培養 | 100 | 924 | 0 | |
| 本発明の 生成物 I ₂ 1 μg/ml | 100 | 1359 | +47 | S* |
| 本発明の 生成物 I ₂ 2.5 μg/ml | 100 | 2163 | +134 | S* |

S* = 有意

表 I の結果より、まず、処理培養における細胞の生存度は、コントロール培養のものと比較しても大きく変わらないことが分かる。従って、抽出物 I₂ は細胞毒性を有しない。この表では、繊維芽細胞のコラーゲン I 分泌量は、ng / 10000 細胞 / 48 時間の単位で表している。

表 I より、ベルトレティア・エクセルサのメタノールによる抽出物は、繊維芽細胞によるコラーゲン I 合成に対して有意な促進活性を示すことが分かる。

以上より、ベルトレティア・エクセルサ抽出物は、しわを扱う場合には、皮膚の老化の抑制を目的とし、局部的にコラーゲン合成の増加が必要な製品、又は、皮膚瘢痕の改善のために適用することが可能である。

実施例 4

本発明のベルトレティア・エクセルサの木の実の果皮からのメタノール抽出物（抽出物 I₃）の、培養ヒト表皮ケラチン細胞によるコラーゲン IV 合成に対する活性の証明

表皮ケラチン細胞の培養

顔の美容整形中の 60 歳白人女性由来のヒト表皮ケラチン細胞を、EGF（上皮成長因子）と脳下垂体抽出物（ギブコ、フランス）を添加したギブコ表皮ケラチン細胞用成長培地 SFM-K にて培養する。上記細胞を培養ウェル当たり 30000 個の割合で、この SFM-K 培地に接種する。

24 時間後に、上記接種培地を回収し、EGF と脳下垂体抽出物を含有しないこと以外は同じ基礎培地を 50 分の 1 に希釈した SFM-K 培地と取り替える。次いで試験生成物（DMSO 溶液）を 48 時間かけて異なる濃度で加える。コントロール培養には試験生成物の溶媒、即ち DMSO（最終濃度は 0.1%）を同量加える。

培養上清を回収し、前掲のデュマス M.ら、メカニズム・オブ・エイジング・アンド・デベロップメント (Mechanisms of Ageing and Development)、1994年、73巻、179~187頁に記述された周知のELISA法でコラーゲンIVを定量分析する。用いた抗ヒトコラーゲンIV抗体は、パスツール研究所、リヨン、フランス提供のものである。同時に、シグマ(フランス)社製のBCAキットを用いるビシニコニン酸法により、蛋白質の定量分析を行う。

得られた結果を以下の表IIに示す。

表II

| 生成物 | コラーゲンIV ng/ 蛋白質 100 μ g | 活性百分率 | 有意性 |
|---|--------------------------------|-------|-----|
| DMSOコントロール | 1. 499 \pm 0. 635 | | |
| 本発明の生成物 I ₃ 1 μ g/ml | 2. 983 \pm 0. 613 | +99 | S* |
| 本発明の生成物 I ₃ 10 μ g/ml | 3. 153 \pm 0. 732 | +110 | S* |

S* = 5%レベルの有意

表IIの結果より、試験抽出物は培養ヒト表皮ケラチン細胞によるコラーゲンIV合成を大きく促進することは明らかである。従って、それを用いることによって、一つには、表皮-真皮接合部、真皮と表皮の間の交換部位、及び、ケラチン細胞の分化の過程に非常に重要な部位についての構造及び特性を増強することができる。

実施例 5

ベルトレティア・エクセルサの木の実の果皮からのメタノール抽出物が有する抗フリーラジカル活性の証明

ここでは、実施例2の抽出物 I₃を用いる。この試験は、ヒポキサンチン/キサンチンオキシダーゼつまりHX/XO系によるフリーラジカルの攻撃を受けた健常人の表皮ケラチン細胞の細胞生存度の測定に基づく。

培養内の生成物の有無に関わらず細胞生存度の増加は、M. S. ノエル-ハドソン (M. S. Noël-Hudson)

ら、インターナショナル・ジャーナル・オブ・コスメチック・サイエンス (International Journal of Cosmetic Science)、1990年、12巻、105~114頁に記述された方法と類似の方法により評価するが、その文献によってその内容全てをここに含むものとする。

試験手順

包皮の表皮ケラチン細胞を、EGFとウシ脳下垂体抽出物を添加したギブコ社(フランス)製K-SFM培地で培養する。培地は集密状態になるまでに一日置きに取り替える。トリプシン処理の後、96ウェルプレートに1ウェル当たり20000個の濃度で上記細胞を投入する。2日間、K-SFM培地で増殖させる。

HO/XO系(シグマ、フランス)をpH7.4のハックス液に加えたものを、8mUXU/mlと80 μ gヒポキサンチン/mlの濃度で使用する。

細胞洗浄後、上記HO/XO系を添加し、150分間細胞と接触させたのち、ウェルを空にし細胞を洗浄して反応を終了する。

試験生成物を含むものと含まないものの細胞生存度を上の実施例3で述べたようなMTT比色分析により測定する。

試験生成物、ここでは実施例2の抽出物 I₃を1.25 μ g/mg又は5 μ g/mgのD

10

20

30

40

50

M S O 溶液で、H O / X O の酸化ストレス以前 4 8 時間、及び、ストレス中に投与する。
得られた結果を以下の表 III に示す。

表 III

| 生成物 | H O / X O 非含有時の細胞生存度 | H O / X O 含有時の細胞生存度 | 有意性 |
|--|----------------------|---------------------|-----|
| コントロール | 1 0 0 % | 4 0 % | |
| 本発明の抽出物 I ₃ 1. 2 5 μ g / m l | 1 0 0 % | 5 6 % | S * |
| 本発明の抽出物 I ₃ 5 μ g / m l | 1 0 0 % | 8 1 % | S * |

10

S * = 5 % レベルの有意

表 III より以下のことが明らかになる：

- a) 本実験条件下では、H O / X O 系は細胞の 6 0 % を殺し、4 0 % のみが残存する。 20
- b) 本発明の抽出物 I₃ は 1 . 2 5 μ g / m l の濃度で、H O / X O 系の毒性から表皮ケラチン細胞を強力に保護し、コントロール培養の 4 0 % に対し、5 6 % の細胞が残存する。この保護は有意差があり、本発明の抽出物 I₃ の抗フリーラジカル特性を証明するものである。
- c) 5 μ g / m l ではこの特性は更に有意差が大きく、コントロールの 4 0 % に対し、8 1 % の細胞が残存する。

以上より、本発明のベルトレティア抽出物を用いると、多数の細胞が残存するので、上記抽出物の抗フリーラジカル特性と、その肌ケアに対する有用性が明らかとなった。

ベルトレティア・エクセルサ抽出物は、コラーゲン合成を促進する特性を持つので、上述したように化粧用又は薬用組成物、特に皮膚科用組成物における有効成分として好適に用 30

化粧用組成物の種々の配合例を以下に示す：

実施例 5

肌引き締め用マッサージゲル

実施例 1 のベルトレティア・エクセルサの樹皮の抽出物 I₂ 0 . 1 g
 エタノール 5 g
 グリセロール 2 g
 プロピレングリコール 2 g
 カルボポール 9 4 0 (C a r b o p o l 9 4 0) ^R 1 . 2 5 g

防腐剤と必要に応じて香料を含有する水性賦形剤 合計で 1 0 0 . 0 0 g 40
 水性賦形剤の一部は、カルボポールと共にゲルの部分製造に使用し、その残りは他の成分との混合に使用する。得られる溶液にゲルを加えて、マッサージゲルとなるゲル化組成物を得る。

このマッサージゲル組成物は、2 カ月間にわたり週に三度、胸部に用いられる。

実施例 6

肌引き締め用全身化粧水

実施例 1 のベルトレティア・エクセルサの樹皮の抽出物 I₁ 0 . 5 g
 エタノール 1 g
 ヒアルロン酸 0 . 5 g
 防腐剤及び所望により香料を含有する水性賦形剤 合計で 1 0 0 . 0 0 g 50

最初に抽出物を可溶化剤に溶解させ、次にヒアルロン酸が加えられた水性賦形剤に加える。

このローションは、腹部や大腿部等のゆるみに過敏な部位に、三週間にわたり用いることが出来る。

実施例 7

抗しわ乳液

| | |
|---|-------------------|
| 実施例 1 のベルトレティア・エクセルサの樹皮抽出物 I ₂ | 0 . 0 2 5 g |
| 芳香性乳化賦形剤 | 合計で 1 0 0 . 0 0 g |

実施例 8

治療用組成物

| | |
|--|-------------------|
| 実施例 1 のベルトレティア・エクセルサの樹皮の抽出物 I ₁ | 0 . 5 g |
| W / O 型の乳化賦形剤 | 合計で 1 0 0 . 0 0 g |

10

実施例 9

引き締め用美肌クリーム

| | |
|---|-------------------|
| 実施例 1 のベルトレティア・エクセルサの幹の樹皮抽出物 I ₂ | 0 . 1 g |
| アジアチコサイド | 0 . 0 5 g |
| アスコルビン酸リン酸塩 (マグネシウム塩) | 0 . 1 g |
| プロリン | 0 . 0 5 g |
| 防腐剤含有の乳化賦形剤 | 合計で 1 0 0 . 0 0 g |

このクリームは一日に一度か二度、三週間にわたって塗布すると、若い肌の張り と 弾力性、輝きを回復する。

20

実施例 10

抗老化クリーム

| | |
|---|-------------------|
| 実施例 2 のベルトレティア・エクセルサの木の実の果皮抽出物 I ₃ | 0 . 1 g |
| アスコルビン酸リン酸マグネシウム | 1 g |
| ヒアルロン酸 | 1 g |
| 防腐剤含有の芳香性乳化賦形剤 | 合計で 1 0 0 . 0 0 g |

このクリームは一日に一度か二度、三週間にわたって首や顔の下部に局部的に塗布すると、若い肌の張り と 弾力性、輝きを回復する。

実施例 11

抗しわ用顔面ケアクリーム

| | |
|---|-------------------|
| 実施例 2 のベルトレティア・エクセルサの木の実の果皮抽出物 I ₃ | 0 . 1 g |
| - トコフェロール | 0 . 0 5 g |
| ビタミン C のリン酸マグネシウム塩 | 0 . 1 g |
| マデカソサイド | 0 . 1 g |
| ビタミン A パルミテート | 0 . 0 0 3 g |
| 防腐剤及び所望により香料を含有する水性賦形剤 | 合計で 1 0 0 . 0 0 g |

このクリームは従来の方法により製造し、一日に一度か二度、三週間にわたって顔のしわに塗布すると、しわを取り除いたり小さくしたりするので、若い肌の張り と 弾力性、輝きを回復できる。

30

40

フロントページの続き

- (72)発明者 カトリン ラヴォー
フランス国 ターンクー 5 1 4 3 0 1 6 グランド リュ
- (72)発明者 ジョルジュ マシオ
フランス国 レインス 5 1 1 0 0 1 アンパース デュ レバン

審査官 岩下 直人

- (56)参考文献 国際公開第94/06402(WO, A1)
特開平4-207161(JP, A)
特開平5-17336(JP, A)
特開平5-262635(JP, A)
特開平10-203992(JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
- A61K 7/00
A61K 35/78
A61P 17/00
A61P 43/00 111