

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 92117306

※ 申請日期： 92.6.25

※IPC 分類： A61K 36/00  
(2006.1)

壹、發明名稱：(中文/英文)

抗老化組合物

ANTI-AGING PREPARATION

貳、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

日商資生堂股份有限公司

SHISEIDO COMPANY, LTD.

代表人：(中文/英文)

池田 守男

MORIO IKEDA

住居所或營業所地址：(中文/英文)

日本國東京都中央區銀座 7 丁目 5 番 5 號

5-5, GINZA 7-CHOME, CHUO-KU, TOKYO 104-8010, JAPAN

國 籍：(中文/英文)

日本

JAPAN

參、發明人：(共 2 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 矢野 喜一郎

KIICHIRO YANO

2. 加治屋 健太郎

KENTARO KAJIYA

住居所地址：(中文/英文)

1. 日本國神奈川縣橫濱市都筑區早淵 2-2-1

資生堂股份有限公司研究中心(新橫濱)內

C/O SHISEIDO RESEARCH CENTER

(SHIN-YOKOHAMA)2-2-1, HAYABUCHI, TSUZUKI-KU,

YOKOHAMA-SHI, KANAGAWA 224-8558, JAPAN

2. 日本國神奈川縣橫濱市金澤區福浦 2-12-1

資生堂股份有限公司研究中心(金澤八景)內

C/O SHISEIDO RESEARCH CENTER

(KANAZAWA-HAKKEI)2-12-1, FUKUURA, KANAGAWA-KU,

YOKOHAMA-SHI, KANAGAWA 236-8643, JAPAN

國 籍：(中文/英文)

1. 日本 JAPAN

2. 日本 JAPAN

## 肆、聲明事項：

本案係符合專利法第二十條第一項第一款但書或第二款但書規定之期間，其日期為： 年 月 日。

本案申請前已向下列國家(地區)申請專利：

1. 日本；2002年06月25日；特願2002-185036

2.

3.

4.

5.

主張國際優先權(專利法第二十四條)：

【格式請依：受理國家(地區)；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 日本；2002年06月25日；特願2002-185036

2.

3.

4.

5.

主張國內優先權(專利法第二十五條之一)：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

3.

主張專利法第二十六條微生物：

國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

## 玖、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種抗老化劑，特別是抗老化皮膚外用劑，其特徵為含有抗老化作用，特別是具有發揮抗老化作用藥劑之有效成分。因其含有可呈現TSP-1誘導活性，並且造成血管內皮細胞死亡來阻止血管增生的特定藥劑之血管增生阻害劑及呈現血管增生阻害活性。

### 【先前技術】

近年來，不斷有關於皮膚老化研究。皮膚老化的原因雖然從概觀上來看，年紀的增長是重要的因素，此外，因乾燥、氧化、太陽光(紫外線)等所造成的影響也被列舉為關於皮膚老化的直接因素。皮膚老化的具體現象包括、含有透明質酸等的粘多糖類的減少，膠原的架橋反應及因紫外線所造成的細胞損傷等。

此外，以抑制、改善因皮膚傷害或因紫外線曝曬的皮膚老化所形成的肌膚的皺紋、細紋、鬆弛等為目的之各式各樣研究被實行，證實如促進透明質酸的生成(特開2001-163794)、間質金屬蛋白酶(MMP)的生成、活性的抑制(特表2000-503660號公報)、促進膠原的生成、酯酶的活性的阻害(特開平11-335235)等為有效之方法。再者，其研究結果，也發現透明質酸、胺基酸、各式各樣的多價醇類，醣類，甚至各式各樣的植物萃取物對於皮膚老化的抑制、改善具有功效。

這類的研究主要專注於表皮或表皮細胞，致力於皺紋的

抑制・改善；然而和此不同，直到最近，不斷有皮膚血管系的內皮細胞也和皮膚老化相關的推測報告。

本發明的課題為從皮膚血管系內皮細胞和皮膚老化關係之觀點，重新找出對於皮膚老化或抑制有效之藥劑。

#### 【發明內容】

經本發明者精心檢討的結果，發現特定的天然藥材，亦即大棗萃取物、御種人參萃取物、羅馬加密爾列萃取物、綠藻萃取物、芹菜萃取物、芫荽菜萃取物、薏苡仁萃取物、生絲萃取物等可阻害血管的增生，其結果為可有效地預防或抑制老化。

因此，本發明係提供一種血管增生阻害劑，其特徵為含有自大棗萃取物、御種人參萃取物、羅馬加密爾列萃取物、綠藻萃取物、芹菜萃取物、芫荽菜萃取物、薏苡仁萃取物、生絲萃取物所構成的群組中挑選而出的一種或多種複合藥劑。

更加詳細而言，本發明係提供一種抗老化劑，其特徵為含有自大棗萃取物、御種人參萃取物、羅馬加密爾列萃取物、綠藻萃取物、芹菜萃取物、芫荽菜抽出物、薏苡仁萃取物、生絲萃取物所構成的群組中挑選而出一種或多種複合藥劑。這種抗老化劑對於防止或抑制皺紋的形成，特別是由光老化而造成的皺紋，非常有效。

再者，本發明係關於一種為了抑制老化的方法，其為包含將上述血管增生阻害劑或抗老化劑塗抹於皮膚上所形成之方法。

皮膚的血管系為為了維持正常皮膚的構造和功能所必須的組織。此外，皮膚血管系也在毛髮生長的控制、因紫外線所造成皮膚損傷的鎮靜、因年齡增長所造成的皮膚老化、對於刺激和發炎的皮膚反應及組織修復等方面扮演著主要的角色。血管在正常成人皮膚上穩定的運作；但是，對於異常刺激，其迅速活化，並且伴隨著血管擴張和從既有的血管中形成新毛細血管的血管增生來反應。這些變化係依據前血管新生分子(血管增生促進因子)和抗血管新生分子(血管新生抑制因子)兩者之間的平衡。並且，據證實，正常皮膚中，內在性的血管新生抑制因子比血管新生促進因子優勢地運作。

血管內皮增殖因子(VEGF)雖被熟知為血管透過性因子；依據最近的研究，推測其亦為人類皮膚上主要血管增生促進因子。在正常的皮膚上，VEGF由角蛋白處少量分泌，和真皮微小血管內皮細胞上的特異接受器結合，借此確保內皮細胞的生存能力，依此來維持上部網狀構造的血管。研究發現，發炎或創傷治癒時之肥厚表皮上的VEGF，其值非常高；因此，為了沒有血管的表皮，導致在真皮上的血管增加和營養供給。

和VEGF相對的，在正常皮膚上以血管新生抑制因子扮演主要角色的是細胞外間質蛋白質凝血海綿硬蛋白家族的二類：TSP-1和TSP-2。TSP由數種含有基底層的角蛋白處而被發現，堆積在真皮-表皮間的基底膜領域，以防止表皮血管增生的自然抗血管增生阻害劑而作用。此外，研究也證

實，在血管增生和退化之際，TSP的出現也被調節著。

依據利用TSP-1、TSP-2等血管增生抑制因子的分離模型和常出現在皮膚上血管增生促進因子VEGF和血管增生抑制因子形質轉換模型所做的研究顯示，這些血管增生促進因子或血管增生抑制因子的階段性調節對於因紫外線所形成的損傷和皮膚的皺摺程度、刺激性皮膚反應及皮膚損傷的修復有著顯著的影響。

若將老鼠長時間用紫外線照射，會形成明顯的皺紋；但令人驚訝的是，在此時，伴隨著血管的擴大及分支的增加，也發現了皮下血管的顯著成長。另外，若將老鼠長時間用紫外線照射，發現其也增進了血管內皮增殖因子的出現。從這些事項來看，對於因紫外線照射等皮膚傷害所形成的皺紋而言，很明顯地血管內皮細胞的增生有著相當的影響；換言之，借著抑制血管內皮細胞的增生，而且促進血管內皮細胞的細胞死亡，明顯地可以抑制皺紋的形成。

在此，利用基於血管增生抑制因子TSP-1的血管增生阻害和基於血管內皮細胞的細胞機能異常誘導的血管增生阻害的雙方機構，篩選抑制皮膚老化候選藥劑的多數天然藥材的結果，發現了若干可誘導TSP-1，而且具有誘導血管內皮細胞凋亡的活性的天然藥材的存在。在這些天然藥材中，大棗抽出物、御種人參萃取物、羅馬加密爾列萃取物、綠藻萃取物、芹菜萃取物、芫荽菜萃取物、薏苡仁萃取物及生絲萃取物，呈現了於既有的技術中完全不知或未被預測的血管增生阻害作用和抗老化作用，特別是抗光老化作用。

### 【實施方式】

誘導血管新生抑制因子TSP-1的藥劑的篩選，如於下記的實施例，實驗1中的詳細記載來實行；於TSP-1促進子的下流中，使各種候選藥劑和導入以蟲螢光素酶為情報基因所結合的DNA結構體的HaCat細胞作用，進行蟲螢光素酶活性的測定，其具有蟲螢光素酶活性，將其當成TSP-1促進子活性，具有TSP-1促進子活性的藥劑，則選定為有效藥劑。

TSP-1誘導劑不盡然可誘導血管內皮細胞的死亡。例如，TSP-1誘導物質正控制組之線維芽細胞增殖因子(bFGF)和組織纖維蛋白溶酶原激活劑(TPA)在血管內皮細胞內無法誘導細胞的死亡。因此，為了不僅有TSP-1誘導，且可發揮TSP-1功能(血管內皮細胞的細胞死亡)的藥劑的標定，血管內皮細胞的細胞凋亡誘導藥劑的篩選，則當為二次篩選來實行。

血管內皮細胞的細胞凋亡誘導藥劑的篩選，對於細胞細胞凋亡活性測定的慣用方法，具體如在下記實施例，實驗2中詳細地記載來實行；使候選藥劑和適當的細胞培養培地中的血管內皮細胞作用，計數該細胞的細胞死亡，增進該細胞的細胞死亡的藥劑，則選定為有效藥劑。

其結果，發現以下的藥劑可誘導TSP-1，而且誘導血管內皮細胞的アポトーシス，可以阻害血管的增生。

大棗萃取物：棗類的果實抽出液。主成分除了皂角素、果糖等的糖類，有機酸類外，亦含有稱為環式AMP的核酸相關物質。環式AMP具有皮脂組織蛋白質的增生(再生)、

皮脂分泌調整等作用。

御種人參萃取物：別名叫做朝鮮人參的抽出液。主成分含有人蔘皂甘(ginsenoside)、氫黴素醇、 $\beta$ -欖烯等。人蔘皂甘有蛋白質、DNA合成促進作用的功用。

羅馬加密爾列萃取物：歐洲原產1年草的抽出液。主成分含有帖烯醇、母菊萹、壬酸等。乾燥的頭狀花有抗發炎、增進食慾的功用。

綠藻萃取物：由在淡水中生息的單細胞植物所得之抽出液。主成分富含胺基酸、維他命。具有細胞分裂作用、抗腫瘤作用。

芹菜萃取物：南歐原產的1年草之抽出液。主成分含有稱為洋芹甘的黃酮配糖體、甘露醇、香甘油內酯、環己六醇等。芹菜萃取物有降壓作用的功效。

芫荽菜萃取物：歐洲原產多年草的抽出液。主成分含有芹菜腦、肉豆冠醚等。芹菜腦有利尿作用。

薏苡仁萃取物：鳩麥種子的抽出液。主成分除了谷氨酸、白氨酸、酪氨酸等胺基酸外，亦含有薏苡仁酯。薏苡仁酯以抗腫瘤成分作用。

生絲萃取物：由家蠶所得絹纖維的抽出液。主成分含有約20種的胺基酸。其效能為具有細胞再生、促進新陳代謝等功用。

上述的萃取物可由通常的方法來獲得，例如將各萃取物的起源植物和抽出溶劑浸漬或加熱回流後，濾過・濃縮即可得。抽出溶劑的話，只要是平常抽出用時所用的溶劑，

均可任意使用，例如將水、甲醇、乙醇、丙二醇、1,3-丁二醇、丙三醇等醇類、含水醇類、氯仿、二氯乙烷、四氯化碳、丙酮、醋酸乙醚、環乙烷等有機溶劑，各自單獨使用或混合使用均可。將利用上述溶劑抽出所得的抽出液原封不動亦或濃縮後的抽出液，以如利用離子交換樹脂除去雜質或多孔聚合物(如Amberlite公司的XAD-2)管柱吸附後，利用甲醇或乙醇溶出，濃縮後的物質亦可使用。另外，如利用水/醋酸乙醚之分配法抽出而得的萃取物亦可使用。

關於本發明的上述藥劑對於因血管內皮細胞的新生、成長、增殖的老化之預防、抑制上極為有效。所謂因血管內皮細胞的新生、成長、增殖的老化是指因皮膚傷害或暴露於紫外線所形成的光老化。關於本發明的藥劑特別對於光老化的防止、抑制上極有效用。

所謂光老化一般是指對於反覆曝曬日光的結果，所發現皮膚的外觀及功能的變化。日光構成要素的紫外線(UV)，特別是中間部的紫外線(被稱為UV，波長290-320 nm)是主要引起光老化的部分。關於引起光老化所須必要的UV曝曬量，現階段還不知曉。但是，反覆曝曬可引起紅斑、曬傷程度的UV，通常和光老化有關聯。在臨床上，光老化可以被特定為皮膚粗糙、皺紋的形成、斑的成色、土色化、鬆弛的形成、毛細管擴張症的發病、黑子的發生、紫斑病的發病、容易受傷、萎縮、纖維症色素領域的發生、早期惡性腫瘤及惡性腫瘤的發病等。光老化通常發生於如臉、耳、頭、頸和手等習慣性曝曬於日光下的皮膚上。

另外、本發明血管增生阻害劑或抗老化劑中的阻害血管增生之藥劑的配合量，血管增生阻害劑全重量中，以乾燥物狀態0.0001~20.0的質量、0.0001~10質量為佳。

另外，關於本發明的血管增生阻害劑或抗老化劑，除了上述必要成分之外，在平常化粧品、醫藥品等皮膚外用劑中所使用的成分，如美白劑、保溼劑、抗氧化劑、油性成分、紫外線吸收劑、界面活性劑、增黏劑、醇類、粉末成分、色劑、水性成分、水、各種皮膚營養劑等，於必要時亦可適當的配合。

除此之外，乙二胺四乙酸二鈉、乙二胺四乙酸三鈉、檸檬酸鈉、聚磷酸鈉、偏磷酸鈉、葡糖酸等金屬封鎖劑；咖啡因，丹寧，戊脈安、凝血酸及其衍生物、甘草萃取物、甘草黃酮(glabridin)萃取物、花梨的果實熱水萃取物、各種天然藥材、酢酸生育酚、甘草酸及其衍生物或其鹽類等藥劑；維他命C、抗壞血酸鎂、抗壞血酸葡糖甘、對苯二酚葡糖甘、曲酸等美白劑；葡萄糖、果糖、甘露糖、蔗糖、海藻糖維生素A酸等醣類；維生素A、酢酸維生素A、棕櫚酸維生素A等維他命A類等，也可以適當的配合。

本發明的血管增生阻害劑或抗老化劑，只要是如軟膏、乳狀物、乳液、化粧水、面膜、澡劑等，於既有在皮膚外用劑上所使用的東西均可，藥劑型態並沒有特定。

#### 【實施例】

其次，利用實施例，更進一步詳細說明本發明。此外，本發明並不因此而被限定。配合量是指質量。

## 實驗 1.(一次篩選)

### TSP-1誘導劑的篩選

選用於TSP-1促進子的下流中，可穩定地在HaCaT細胞上導入以蟲螢光素酶為情報基因所結合的DNA結構體的細胞。將上述細胞在DMEM/F12(Invitrogen公司)(含有10%的FBS及1 mg/ml的激黴素B(Invitrogen公司))的培地上使其懸濁，24孔平板上以每一孔 $4 \times 10^4$ 細胞的量而播種。約30小時後，將培地更換至無血清DMEM/F12培地，在5%CO<sub>2</sub>、37度下培養25小時。之後，將候選藥劑之各種植物抽出乾燥物，以2%質量溶解於DMSO(和光純藥工業)後的物質，以培養液1000分之1、10000分之1和100000分之1的體積加入，培養24小時。除去上部澄清液後，用PBS洗淨細胞、利用Luciferase Assay System來實行蟲螢光素酶活性的測定。若其有蟲螢光素酶活性，則視為TSP-1促進子活性。其結果，實驗的各種植物萃取物中，含有大棗萃取物(1)、御種人參萃取物(2)、羅馬加密爾列萃取物(3)、綠藻萃取物(4)、芹菜萃取物(5)、芫荽菜萃取物(6)、薏苡仁萃取物(7)及生絲萃取物(8)等數種呈現有效的TSP-1促進子活性。利用這些天然藥材的實驗結果如圖1所示。控制組以使DMSO作用的物質來取代候選藥劑。

如上所述，TSP-1誘導劑不盡然可誘導血管內皮細胞死亡。因此，為了篩選不只有TSP-1誘導性，亦可發揮TSP-1功能(血管內皮細胞的細胞死亡)的藥材。我們更進一步實施二次篩選。

## 實驗 2.(二次篩選)

### 細胞凋亡誘導劑的篩選

將於一次篩選添加藥劑(1000分之1)、培養24小時後的培養上部澄清液添加於在氣室承物器上，約形成70%的共匯而培養而成的血管內皮細胞HMVEC(三光純藥)上後，培養24小時，檢討血管內皮細胞的細胞死亡誘導。細胞死亡係利用原位置細胞標示複合螢光之細胞凋亡偵測套件來偵測；細胞死亡誘導的計算係計算各別的藥劑添加群和控制組中，發生細胞死亡的細胞之比例來實行。計算方法係由各別的藥劑添加群和控制組的承物器，利用數位相機各別取得3個位置的影像，計算在各別影像中，相對於細胞核數的細胞死亡訊號，視為其比例。

其結果，實驗的各種植物萃取物中，很顯明地，大棗萃取物(1)、御種人參萃取物(2)、羅馬加密爾列萃取物(3)、綠藻萃取物(4)、芹菜萃取物(5)、芫荽菜萃取物(6)、薏苡仁萃取物(7)及生絲萃取物(8)可有效地誘導血管內皮細胞的細胞凋亡。利用這些天然藥材的實驗結果如圖2所示。利用培地(圖中，右棒：10000分之1；左棒：1000分之1)、DMSO(圖中，右棒：10000分之1；左棒：1000分之1)、和TSP-1(1000分之1)(Haematologic Technologies, Inc.)來取代候選藥材當作比較例，其作用的結果亦一併表示。

由以上二次篩選的結果，很明顯地，大棗萃取物、御種人參萃取物、羅馬加密爾列萃取物、綠藻萃取物、芹菜萃取物、芫荽菜萃取物、薏苡仁萃取物、生絲萃取物對於誘

導TSP-1，而且誘導血管內皮細胞的細胞凋亡上是有效。

大棗萃取物、御種人參萃取物、羅馬加密爾列萃取物、綠藻萃取物、芹菜抽出物、芫荽菜萃取物、薏苡仁萃取物、生絲萃取物等誘導TSP-1並誘導血管內皮細胞的細胞凋亡的藥劑，對於老化的抑制上是有效的。

**【圖式簡單說明】**

圖1，TSP-1誘導劑的篩選結果

圖2，細胞凋亡誘導劑的篩選結果

### 伍、中文發明摘要：

本發明係提供一種血管增生阻害劑及抗老化劑，其特徵為含有自大棗抽出物、御種人參萃取物、羅馬加密爾列萃取物、綠藻萃取物、芹菜萃取物、芫荽菜萃取物、薏苡仁萃取物、生絲萃取物所構成之群組中挑選而出之一種或多種藥劑。

### 陸、英文發明摘要：

An anti-angiogenesis preparation and an anti-aging preparation comprising one or more herbal medicine selected from the group consisting of *Zizyphus jujuba* Miller var. *inermis* Rehder extract, *Panax ginseng* C.A. Meyer extract, *Anthemis nobilis* Linne extract, *Chlorella vulgaris* Chick extract, *Aplum graveolens* Linne extract, *Petroselinum sativum* Hoffman extract, *Coix lacryma-jobi* Linne var. *ma-yuen* Stapf extract and *Bombyx mori* Linnaeus extract are provided.

拾壹、圖式：  
公告本

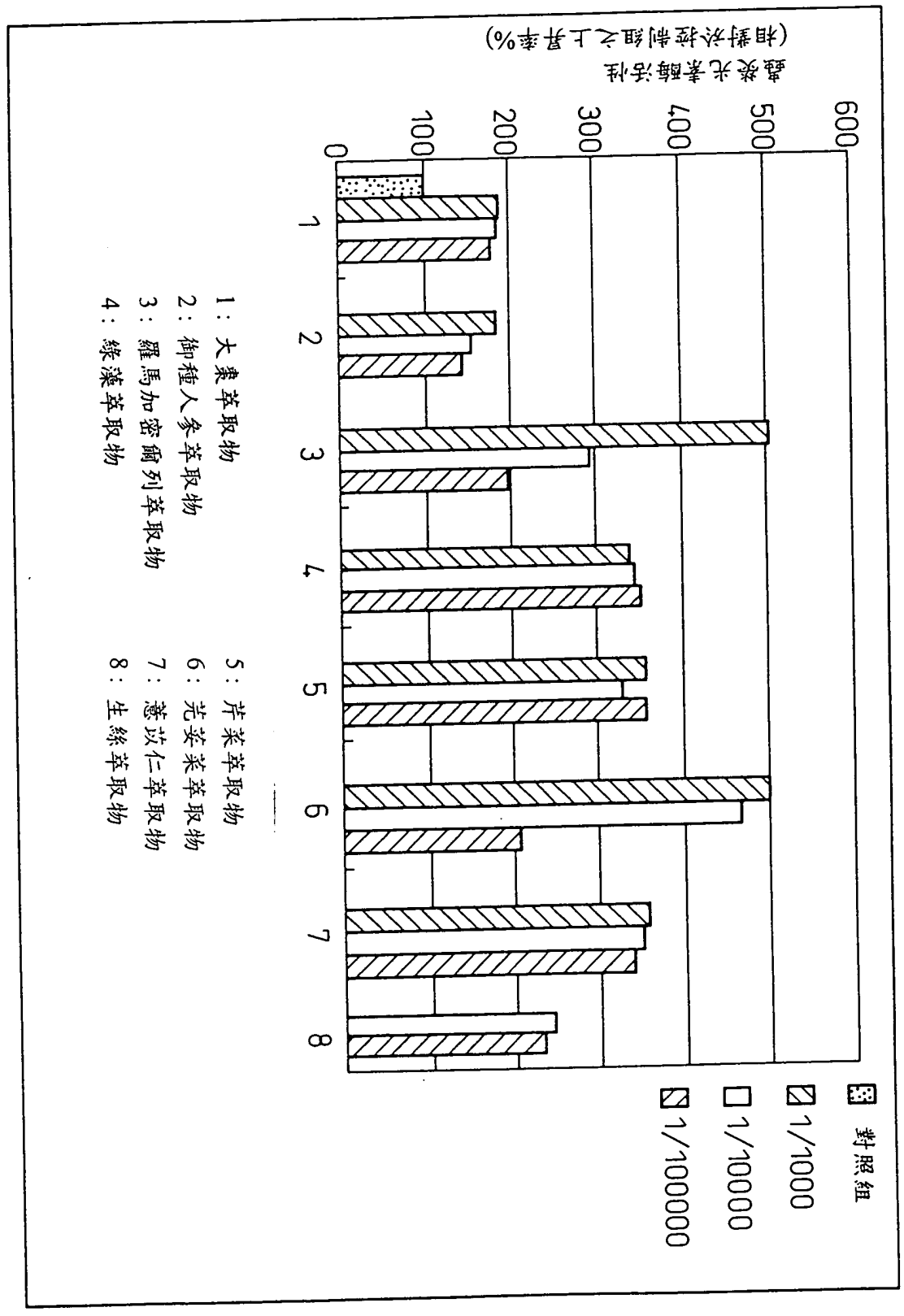


圖 1

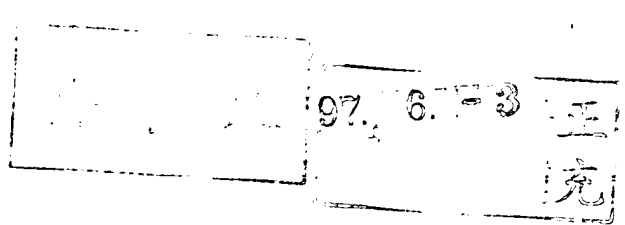
**柒、指定代表圖：**

(一)本案指定代表圖為：第( 1 )圖。

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：

(無元件代表符號)

**捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：**



### 拾、申請專利範圍：

1. 一種血管增生阻害劑，其特徵為含有自大棗萃取物 (*Zizyphus jujuba* Miller var. *inermis* Rehder)、羅馬加密爾列萃取物 (*Anthemis nobilis* Linne)、綠藻萃取物 (*Chlorella vulgaris* Chick)、芹菜萃取物 (*Aplum Graveolens* Linne)、芫荽菜萃取物 (*Petroselinum sativum* Hoffman)、薏苡仁萃取物 (*Coix lacryma-jobi* Linne var. *ma-yuen* Stapf)、生絲萃取物 (*Bombyx mori* Linnaeus) 中選出之一種或多種藥劑。
2. 一種抗光老化劑，其特徵為含有自大棗萃取物、羅馬加密爾列萃取物、綠藻萃取物、芹菜萃取物、芫荽菜萃取物、薏苡仁萃取物、生絲抽出物中選出之一種或多種藥劑。
3. 如申請專利範圍第2項之抗光老化劑，其可防止或抑制皺紋之形成。

修正  
補充  
九折三折

公告本

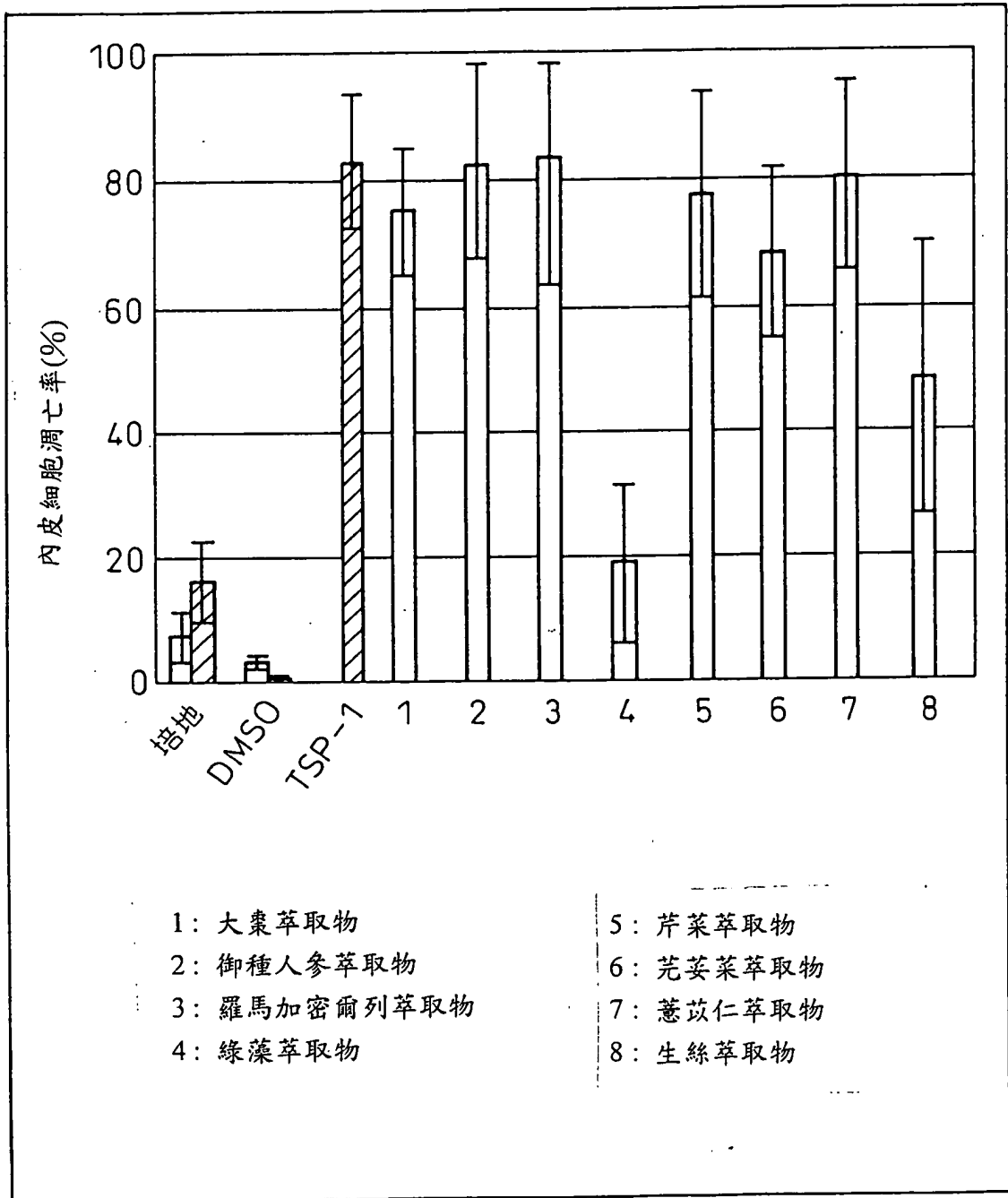


圖 2