



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106413677 B

(45)授权公告日 2019.09.24

(21)申请号 201580027329.X

福田惠温

(22)申请日 2015.04.13

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

(65)同一申请的已公布的文献号

利商标事务所 11038

申请公布号 CN 106413677 A

代理人 郑天松

(43)申请公布日 2017.02.15

(51)Int.Cl.

(30)优先权数据

A61K 8/60(2006.01)

2014-082524 2014.04.14 JP

A61K 8/44(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 8/49(2006.01)

2016.11.23

A61K 8/67(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

A61Q 19/02(2006.01)

PCT/JP2015/061373 2015.04.13

A61Q 19/08(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

(56)对比文件

W02015/159854 JA 2015.10.22

TW 201212925 A,2012.04.01,

(73)专利权人 株式会社林原

TW 201212925 A,2012.04.01,

地址 日本冈山县

CN 1674863 A,2005.09.28,

(72)发明人 河野惠三 宫田聪美 花谷利春

CN 101856313 A,2010.10.13,

审查员 楚翠翠

权利要求书1页 说明书24页

(54)发明名称

抗老化用皮肤外用剂

(57)摘要

本发明以提供用于预防或改善年龄的增加、老化导致的皱纹、细纹、松弛,色斑等,皮肤的外观上的问题,同时维持或亢进皮肤的屏障功能的抗老化用皮肤外用组合物作为课题,通过提供作为有效成分含选自腺苷N1-氧化物5'-磷酸、其类似物及其盐的1种或2种以上的抗老化用皮肤外用剂而解决了上述课题。

1. 抗老化用皮肤外用剂,其作为有效成分含有:
选自腺苷N1-氧化物5'-磷酸、腺苷N1-氧化物、3'- α -葡萄糖基腺苷N1-氧化物、5'- α -葡萄糖基腺苷N1-氧化物及它们的盐的1种或2种以上、和
乙二胺四醋酸和/或表没食子儿茶素没食子酸酯。
2. 权利要求1所述的皮肤外用剂,其还含有抗坏血酸2-葡萄糖苷。
3. 权利要求1所述的皮肤外用剂,其作为皮肤屏障功能亢进剂。
4. 权利要求2所述的皮肤外用剂,其作为抗皱纹剂。
5. 权利要求1所述的皮肤外用剂,其作为抗色斑剂。

抗老化用皮肤外用剂

【技术领域】

[0001] 本发明涉及抗老化用皮肤外用剂,具体而言,涉及作为有效成分,含有选自腺苷N1-氧化物5'-磷酸、其类似物及其盐的1种或2种以上的抗老化用皮肤外用剂。

【背景技术】

[0002] 永葆年轻是人类共同的普遍的的愿望,但随着年龄增加而人的皮肤上呈现皱纹、细纹、松弛,色斑等的变化为人类长期以来所经历,伴随年龄的增加皮肤也老化,皮肤上呈现皱纹、细纹、松弛,色斑等的外观上的变化,说起来是自然天理,认为不可避免。

[0003] 然而,近年,随着关于人的皮肤的结构或其新陈代谢的机制等的研究进展,伴随年龄的增加人的皮肤上呈现皱纹、细纹、松弛,色斑等的变化的原因或结构逐渐明了。即,如充分了解,皮肤由外侧的薄表皮(上皮组织)和其下层的厚的真皮(结缔组织)构成,表皮作为身体的最外层,抵御外界而保护生物体的同时防止内部的水分或营养分漏出到外界,另一方面,真皮主要具有成纤维细胞、胶原纤维(胶原)、弹性纤维(弹性蛋白)、蛋白聚糖等复合以三维状扩展的结构,担负给皮肤带来强度、伸展性及弹力的作用,但随着年龄的增加而皮肤中的皮脂或水分的量减少,则皮肤表面的角质层的保湿力丧失,变得容易发生干燥等导致的细纹或皮肤的粗糙。

[0004] 另外,人的表皮从外侧起由“角质层(角层)”、“颗粒层”、“棘层”、“基底层”构成,在基底层产生的表皮细胞(角质化细胞)依次向外侧移动而成角质层,最终剥落。更具体而言,角质化细胞在位于表皮的最内侧的基底层增殖,分化,被推至上层,最终成为位于表皮的最外侧的角质层(角层),成为垢而脱落。将此角质化细胞的增殖、移动、分化、脱落的一系列的的过程称为更新,通过角质化细胞以一定的周期更新,保持皮肤的恒定性,但伴随年龄的增加而皮肤的更新速度变慢,结果,发生皱纹或松弛或皮肤粗糙。皮肤的更新速度尽管随人的身体的部位而不同,但大致,健康的10多岁的人的皮肤更新约为20天,20多岁变成约28天,30多岁变成约为40天、40多岁变成20多岁的约2倍的约55天,50多岁变成约为75天(非专利文献1)。

[0005] 如上所述,伴随年龄的增加的皮肤的更新速度的延迟带来皱纹、松弛或皮肤粗糙,对于含从开始在意这些肌肤症状的30岁前后至50岁前的年龄层的所谓的老前(pre-aging)世代的皮肤,即使难以使其更新速度返回20多岁的正常的皮肤的更新速度,只要可通过任何手段使伴随年龄的增加的更新速度的延迟恢复,就可有效改善皱纹或松弛或皮肤粗糙(专利文献1)。从这样的观点来看,认为可通过促进角质化细胞的增殖、移动、分化、脱落的一系列的的过程的至少一过程来提高更新速度。但是,尚未有实用的解决手段被提供。

[0006] 角质层是角质细胞几重重叠构成的层,在角质细胞的最外层存在被称为守护角质细胞的内部的角质化包膜的由外皮蛋白等的各种各样的蛋白质构成的强固的膜。上述角质化包膜在皮肤的屏障功能中发挥重要的作用。皮肤的屏障功能降低,则由紫外线、特别是到达真皮的长波长的紫外线A波而存在于真皮的胶原、弹性蛋白、透明质酸等受损伤。另外,也已知如果皮肤的屏障功能降低,则皮肤干燥而保湿力降低,或皮脂的过量分泌被促进而诱

发大人粉刺,或导致更新紊乱。伴随年龄的增加,皮肤的屏障功能降低,由此引发皮肤的皱纹、细纹、松弛,色斑等(参照专利文献2及3)。

[0007] 皮肤的屏障功能是指,皮肤中的与所谓的被称为第1屏障的皮脂膜的功能成对比的,被称为第2屏障的角质层的功能、即防止自生物体外向生物体内的异物的侵入、或自生物体内向生物体外的过量的水分释放的功能、及由存在于与角质层邻接的表皮颗粒层的被称为紧密连接的细胞间粘接结构体隔开生物体之内和外的功能。

[0008] 另外,随年龄的增加而发生真皮中的成纤维细胞或透明质酸减少,或胶原的切断或弹性蛋白的变性,则形成皱纹,或皮肤的弹性降低而发生松弛或皮肤粗糙。作为具有支持胶原的纤维的作用的纤维的弹性蛋白发挥给皮肤张力或弹力的作用,弹性蛋白的减少与皱纹或松弛的形成关联(非专利文献2)。另外,分解胶原的基质金属蛋白酶-1已知是皱纹的原因(非专利文献3)。

[0009] 另外,内皮缩血管肽-1是促进黑色素细胞的活化或增殖的物质,已知是色斑的原因。再者,也有见解认为,自黑色素细胞向表皮细胞排出的黑色素未被表皮细胞顺利排出成为皮肤色素沉积(色斑)或皮肤的皮肤暗沉的原因(非专利文献4)。

[0010] 基于这些研究成果或见解,现在已提议多种从科学的见地合理预防或改善伴随年龄的增加而人的皮肤上呈现皱纹、细纹、松弛,色斑等的变化的所谓的抗老化用的皮肤外用剂(参照例如,专利文献4~10),人类进一步接近想要永葆青春的实现。但是,现在提议的抗老化用的皮肤外用剂只不过是追求实现多种可能性之中的极少一部分的可能性,发挥抗老化效果的不同的机制或使用方便性良好,也还包括制造的容易性的观点,现状依然期望从更多方面的角度提供新的抗老化用的皮肤外用剂。

[0011] **【现有技术文献】**

[0012] **【专利文献】**

[0013] 专利文献1:特开2012-056857号公报

[0014] 专利文献2:特开2004-091376号公报

[0015] 专利文献3:特开2008-007411号公报

[0016] 专利文献4:再公表专利第W02007/011066号公报

[0017] 专利文献5:特开2007-291102号公报

[0018] 专利文献6:特开2008-169196号公报

[0019] 专利文献7:特开2008-255020号公报

[0020] 专利文献8:特开2008-260721号公报

[0021] 专利文献9:特开2009-040690号公报

[0022] 专利文献10:特开2009-249306号公报

[0023] **【非专利文献】**

[0024] 非专利文献1:Farage等(编者)、“Textbook of Aging Skin”、Springer公司发行、2010年

[0025] 非专利文献2:小仓等、“日本化妆品技术者会志”、第44卷第4号、278~284页、2010年

[0026] 非专利文献3:Fisher等、“American Journal of Pathology”、第174卷第1号、101~114页、2009年

[0027] 非专利文献4:Gilchrest等、“Photochemistry and Photobiology”、第63卷第1号、1~10页、1996年

【发明内容】

[0028] 【发明要解决的技术课题】

[0029] 本发明鉴于上述以往技术的现状而完成,旨在提供用于预防或改善伴随年龄的增加呈现的人的皮肤皱纹、细纹、松弛,色斑等的变化的新的抗老化用皮肤外用剂。

[0030] 【解决课题的技术方案】

[0031] 本发明人为解决上述课题而重复锐意研究努力的结果,发现腺苷N1-氧化物5'-磷酸、其类似物及其盐通过发挥优良的抗老化效果、即,更新改善、皮肤的屏障功能的维持或亢进、皮肤中的纤丝聚集蛋白的表达增强、皮肤中的弹性蛋白的产生促进、皮肤中的基质金属蛋白酶-1的产生抑制、或者,皮肤中的内皮缩血管肽-1的产生抑制效果,发挥预防或改善伴随年龄的增加的皮肤皱纹、细纹、松弛,色斑等的抗老化效果,从而完成本发明。

[0032] 即,本发明通过提供作为有效成分含有选自腺苷N1-氧化物5'-磷酸、其类似物及其盐的1种或2种以上的抗老化用皮肤外用剂而解决了上述课题。

[0033] 另外,本发明人发现,通过抗坏血酸2-葡萄糖苷、表没食子儿茶素没食子酸酯及/或乙二胺四醋酸的联用而腺苷N1-氧化物5'-磷酸、其类似物及其盐的奏的抗老化效果显著地强化。

[0034] 【发明效果】

[0035] 由本发明的抗老化用皮肤外用剂可改善皮肤的更新,维持或亢进皮肤的屏障功能,增强皮肤中的纤丝聚集蛋白的表达,维持或亢进皮肤中的弹性蛋白的产生,抑制皮肤中的基质金属蛋白酶-1的产生,或者抑制皮肤中的内皮缩血管肽-1的产生,由此可有效预防或改善伴随年龄的增加的皮肤皱纹、细纹、松弛,色斑等。

[0036] 【实施方式】

[0037] 本发明的皮肤外用剂作为有效成分,含有腺苷N1-氧化物5'-磷酸、其类似物及其盐。这样的腺苷N1-氧化物5'-磷酸、其类似物及其盐无论其来源,可为从天然物纯化的,也可为化学合成的。本发明中所说腺苷N1-氧化物5'-磷酸的类似物,例如,可举出腺苷N1-氧化物或3'- α -葡萄糖基腺苷N1-氧化物、5'- α -葡萄糖基腺苷N1-氧化物、腺苷N1-氧化物5'-二磷酸、腺苷N1-氧化物5'-三磷酸等。另外,本发明中所说的腺苷N1-氧化物5'-磷酸的盐,例如,可举出腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠或腺苷N1-氧化物5'-磷酸钾等。在作用效果的方面,优选为腺苷N1-氧化物5'-磷酸、腺苷N1-氧化物、3'- α -葡萄糖基腺苷N1-氧化物及5'- α -葡萄糖基腺苷N1-氧化物,更优选为腺苷N1-氧化物5'-磷酸、腺苷N1-氧化物及3'- α -葡萄糖基腺苷N1-氧化物,特别优选为腺苷N1-氧化物5'-磷酸及腺苷N1-氧化物。另外,在光稳定性或溶解度的方面,腺苷N1-氧化物5'-磷酸比腺苷N1-氧化物更优选。由于腺苷N1-氧化物5'-磷酸的盐作为腺苷N1-氧化物5'-磷酸发挥作用,腺苷N1-氧化物5'-磷酸及其盐发挥同等的效果,但从溶解度的方面,腺苷N1-氧化物5'-磷酸的盐比腺苷N1-氧化物5'-磷酸更优选。这些化合物可含制造原料来源的成分或在合成过程发生的副产物,通常,以固体物换算,纯度优选95质量%以上,更优选98质量%以上,特别优选99质量%以上。(除非特别说明,在本说明书中将质量%简单表示为“%”。)

[0038] 以下,具体说明本发明的皮肤外用剂。

[0039] 通常,在本发明的皮肤外用剂的情况中,选自腺苷N1-氧化物5'-磷酸、其类似物及其盐的1种或2种以上的配合比例,一般而言,相对于皮肤外用剂的总质量,优选0.001~10.0%,更优选0.01~1.0%。如果这些配合量相对于皮肤外用剂的总质量不足0.001%,则会有上述有效成分的作用不充分地发挥的情况。相反,如果超10.0%,则有由于得不到与使用量成比例的效果而不优选的情况。

[0040] 本发明中使用的腺苷N1-氧化物5'-磷酸、其类似物及其盐由于其自身就发挥更新改善作用、皮肤的屏障功能的维持或亢进作用、皮肤中的纤丝聚集蛋白的表达的增强、皮肤中的弹性蛋白产生的维持或亢进、皮肤中的基质金属蛋白酶-1的产生抑制、或者,皮肤中的内皮缩血管肽-1的产生抑制作用,从而其单独可作为本发明的皮肤外用组合物的有效成分有利地利用。另外,也可随意与其他成分联用。

[0041] 腺苷N1-氧化物5'-磷酸、其类似物及其盐的奏的抗老化效果通过与抗坏血酸2-葡萄糖苷、表没食子儿茶素没食子酸酯及/或乙二胺四醋酸联用而显著地强化,所以这些也可作为本发明的皮肤外用组合物的成分有利地利用。

[0042] 再者,本发明中所说的更新改善是指将由“角质层(角层)”、“颗粒层”、“棘层”及“基底层”构成的成为人的表皮的基础的表皮细胞(角质化细胞)的增殖、移动、分化、脱落的一系列的过程(更新)保持为健全的状态。更具体而言,是指使伴随年龄的增加而变长的皮肤的更新周期变短。

[0043] 本发明的含有腺苷N1-氧化物5'-磷酸、其类似物及其盐作为有效成分的皮肤外用剂通过促进角质化细胞的分化,增强转谷氨酰胺酶活性,促进角质化包膜的产生,改善皮肤的更新,从而可有效预防或改善伴随年龄的增加的皮肤的皱纹、细纹、松弛,色斑等。另外,这样的皮肤外用剂由于强化皮肤的紧密连接功能,维持或亢进皮肤屏障功能,抑制水分释放,从而可有效预防或改善伴随年龄的增加的皮肤的细纹、松弛等。再者,本发明的皮肤外用剂由于可促进给皮肤张力或弹力的弹性蛋白的产生,抑制成为皱纹的原因的基质金属蛋白酶-1的产生,从而可有效预防或改善皱纹、松弛等。而且,本发明的皮肤外用剂由于可抑制内皮缩血管肽-1的产生,从而可有效预防或改善色斑等。

[0044] 另外,本发明的皮肤外用剂根据其具体的形态而可配合公知的成分。即,在皮肤外用剂的形态的情况中,通常,可在不损害本发明的期望的效果的范围配合可在皮肤外用剂中使用的成分的1种或2种以上。例如,适宜配合油成分、表面活性剂、防腐剂(抗菌剂)、香料、美白剂、保湿剂、增粘剂、抗氧化剂、螯合剂、紫外线吸收-散射剂、维生素类、氨基酸类、抗炎症剂、血行促进剂、海藻提取物、收敛剂、抗皱纹剂、细胞赋活剂、抗老化防止剂、育毛-发毛剂、经皮吸收促进剂、水、醇类、水溶性高分子、pH调整剂、发泡剂、粉体、药品-准药品-化妆品-食品用的添加剂、医药用-准药品用的有效成分等,根据常规方法制造皮肤外用剂即可。

[0045] 具体而言,作为油成分,可例示澳洲坚果油、蓖麻子油、橄榄油、可可油、椿油、椰油、木蜡、霍霍巴油、葡萄籽油、鳄梨油等的植物油脂类、貂油、卵黄油等的动物油脂类、蜜蜡、鲸蜡、羊毛脂、巴西棕榈蜡、小烛树蜡等的蜡类、流动石蜡、角鲨烷、微晶蜡、地蜡、石蜡、凡士林等的烃类、癸酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、山嵛酸、羊毛脂脂肪酸、亚油酸、亚麻酸、月桂酸、肉豆蔻酸、油酸、异硬脂酸等的天然及合成脂肪酸类、鲸蜡醇、硬脂基醇、己基癸醇、

辛基十二醇、月桂基醇、辛基醇、肉豆蔻基醇、鲸蜡基醇、胆甾醇、植物甾醇等的天然及合成高级醇类、肉豆蔻酸异丙基、棕榈酸异丙基、肉豆蔻酸辛基十二烷基、油酸辛基十二烷基、胆甾醇油酸酯等的酯类等。

[0046] 作为表面活性剂,可例示单月桂酸山梨坦、单棕榈酸山梨坦、倍半油酸山梨坦、三油酸山梨坦、单月桂酸聚氧乙烯山梨坦、单硬脂酸聚氧乙烯山梨坦、聚乙二醇单油酸酯、聚乙二醇烷酸酯、聚氧乙烯烷基醚、聚二醇二醚、月桂酰二乙醇酰胺、脂肪酸异丙醇酰胺、麦芽糖醇羟基脂肪酸醚、烷基化多糖、烷基葡萄糖苷、糖酯等的非离子性表面活性剂、亲油型甘油单硬脂酸酯、自身乳化型甘油单硬脂酸酯、聚甘油单硬脂酸酯、聚甘油烷酸酯、山梨坦单油酸酯、聚乙二醇单硬脂酸酯、聚氧乙烯山梨坦单油酸酯、聚氧乙烯鲸蜡基醚、聚氧乙烯化甾醇、聚氧乙烯化羊毛脂、聚氧乙烯化蜜蜡、聚氧乙烯固化蓖麻子油等的非离子表面活性剂、硬脂酸钠、棕榈酸钾、鲸蜡基硫酸钠、月桂基磷酸钠、棕榈酸三乙醇胺、聚氧乙烯月桂基磷酸钠、N-酰基谷氨酸钠、棕榈酸钠、月桂酸钠、月桂酸钠、月桂基硫酸钾、烷基硫酸三乙醇胺醚、土耳其红油、线性十二烷基苯硫酸、聚氧乙烯固化蓖麻子油马来酸、酰基甲基牛磺酸等的阴离子表面活性剂、氯化硬脂基二甲基苄基铵、氯化硬脂基三甲基铵、硬脂基三甲基铵氯化物、氯化苯扎铵、月桂基胺氧化物等的阳离子表面活性剂、盐酸烷基氨基乙基甘氨酸液、卵磷脂等的两性表面活性剂等。

[0047] 作为防腐剂(抗菌剂),可例示安息香酸及其盐类、水杨酸及其盐类、山梨酸及其盐类、脱氢醋酸及其盐类、以对羟基安息香酸烷基酯为首的对羟基安息香酸酯、2,4,4'-三氯-2'-羟基二苯基醚、3,4,4'-三氯二苯脲、六氯酚、氯化苯扎铵、苯氧基乙醇、扁柏酚、间苯二酚、乙醇、1,3-亚丁基二醇、感光素201号等。

[0048] 作为香料,可例示苯甲醛、苜基苯甲酸酯、苯基醋酸酯、檀香酚、丁香酚、百合醛、新铃兰醛、芳樟醇、2-甲基-3-(4-甲基苯基)-丙醛、麝香酮、肉桂醛、Belifix、甲基紫罗兰酮、甲酸香叶酯、龙涎酮(Iso E Super)、 γ -十一碳内酯、己基水杨酸酯、顺式-3-己烯基水杨酸酯、甲基二茉莉酸氢、四氢糠基3-巯基丙酸酯、KOVANOL、香兰素、香兰醛、老鹳草油、胡薄荷油、桦油、蒿油等。

[0049] 作为美白剂,可举出抗坏血酸或其衍生物及它们的盐类、烷氧基水杨酸类及其盐类、氢醌或其糖苷等的氢醌的衍生物、氨基环酸或其衍生物及它们的盐类、间苯二酚的衍生物、曲酸或其衍生物及它们的盐类、鞣花酸或亚油酸及它们的盐类、母菊提取物、四氢类姜黄素、蓝草提取物等。

[0050] 作为保湿剂,可例示赤藓糖醇、木糖醇、山梨糖醇、麦芽糖醇、甘油、亚丙基二醇、1,3-亚丁基二醇、聚甘油、聚乙二醇、二亚丙基二醇、1,2-戊烷二醇、异戊二烯二醇等的多元醇类、葡萄糖、麦芽糖、海藻糖、海藻糖的糖质衍生物、糊精、环糊精、有国际公开W0 02/10361号说明书中公开的环 $\{\rightarrow 6\}$ - α -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 3)- α -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 6)- α -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 3)- α -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow)的结构环状四糖、有特开平2005-95148号公报中记载的环 $\{\rightarrow 6\}$ - α -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 4)- α -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 6)- α -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow 4)- α -D-吡喃葡萄糖基-(1 \rightarrow)的结构环状四糖等的糖类、氨基酸、乳酸钠、吡咯烷酮羧酸钠等的天然保湿成分、糖原、豆角胶、木糖葡聚糖、椴籽籽、角叉菜胶、果胶、甘露聚糖、凝胶多糖、琥珀酰葡聚糖、半乳聚糖、皮肤素硫酸、角质素硫酸、软骨素、硫酸软骨素、硫酸粘多糖、硫酸角质素、壳多糖、乙酰肝素硫酸、透明质酸等的粘多糖类或这些粘

多糖类的水解物、丝或胶原等的蛋白质一肽或这些的水解物等的水溶性高分子物质、这些的盐类、二甲基聚硅氧烷、甲基苯基硅氧烷等的硅类、乳酸菌—双歧菌等的培养上清等。

[0051] 作为增粘剂,可例示藻酸钠、黄原胶、硅酸铝、椴椴种子提取物、阿拉伯胶、羟基乙基瓜尔胶、羧基甲基瓜尔胶、瓜尔胶、葡聚糖、黄蓍胶、淀粉、出芽短梗孢糖、壳多糖、壳聚糖、琼脂、纤维素、等的天然高分子物质、羟基丙基纤维素、甲基羟基丙基纤维素、甲基纤维素、羧基甲基纤维素、羟基乙基纤维素、可溶性淀粉、阳离子化纤维素、羧基甲基壳多糖等的半合成高分子物质、羧基乙烯基聚合物、聚乙烯基醇、聚乙烯基吡咯烷酮、乙烯基醇—醋酸乙烯基共聚物等的合成高分子物质等。

[0052] 作为抗氧化剂,可例示二丁基羟基甲苯、丁基羟基苯甲醚、没食子酸丙基、抗坏血酸、维生素E、儿茶素类、类黄酮类或这些的衍生物等。

[0053] 作为螯合剂,可例示依地酸二钠、乙二胺四醋酸盐、焦磷酸盐、六偏磷酸盐、柠檬酸、酒石酸、葡萄糖酸等。

[0054] 作为pH调整剂,可例示氢氧化钠、氢氧化钾、三乙醇胺、次氨基三乙醇、柠檬酸、柠檬酸钠、硼酸、硼沙、磷酸氢钾等。

[0055] 作为紫外线吸收—散射剂,可例示对氨基安息香酸系统紫外线吸收剂、邻氨基苯甲酸系紫外线吸收剂、水杨酸系紫外线吸收剂、桂皮酸系紫外线吸收剂、二苯甲酮系紫外线吸收剂、糖系紫外线吸收剂、3-(4'-甲基苯亚甲基)-d-樟脑、3-苯亚甲基-d,1-樟脑、尿刊酸、尿刊酸乙基酯、2-苯基-5-甲基苯并噁唑、2,2'-羟基-5-甲基苯基苯并三唑、2-(2'-羟基-5'-t-辛基苯基)苯并三唑、2-(2'-羟基-5'-甲基苯基苯并三唑、二亚苄基吡嗪、二茴香酰甲烷、4-甲氧基-4'-t-丁基二苯甲酰甲烷、5-(3,3-二甲基-2-亚降冰片基)-3-戊烷-2-酮、2-羟基-4-甲氧基二苯甲酮、辛基二甲基对氨基苯甲酸酯、乙基己基对甲氧基桂皮酸酯、氧化钛、高岭土、滑石等。

[0056] 作为维生素类,可例示维生素A及其衍生物、维生素B1及其衍生物、维生素B2及其衍生物、维生素B6盐酸盐、维生素B6三棕榈酸盐、维生素B6二辛酸盐、维生素B12、维生素B15及其衍生物等的维生素B类、抗坏血酸及其衍生物、 α -生长酚、 β -生长酚、 γ -生长酚、维生素E乙酸盐等的维生素E类、维生素D类、维生素H、泛酸、泛硫乙胺、维生素F、维生素K、维生素P及其衍生物、维生素U、阿魏酸、 γ -谷维素、 α -硫辛酸、乳清酸、辅酶Q10等或它们的衍生物等,也可为它们的盐类。

[0057] 作为氨基酸类,可例示甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、牛磺酸、色氨酸、胱氨酸、半胱氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、羟基脯氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸、组氨酸、赖氨酸、肉毒碱、瓜氨酸及它们的衍生物等,也可为它们的盐类。

[0058] 使用本发明的皮肤外用剂时的形态无特别限定,能以例如水溶液系统、增溶系统、乳化系统、粉末分散系统、固体条系统、水—油2层系统、水—油—粉末3层系统等各种的形态适用本发明的皮肤外用剂。另外,其具体的剂形也无特别限定,无药品、准药品、化妆品等的药事法上的区别约束。本发明的皮肤外用剂是指作为药品、准药品或化妆品适用于皮肤、口唇或头皮等的外皮及口腔内的剂,具体而言,可例示软膏、乳霜、乳液、洗液、精华液、果冻、凝胶、包装、洗发水、润洗液、护发液、罩、睫毛膏、眼线、育毛剂、唇膏(口红)、唇蜜、粉底、腮红、眼影、粉末、修指甲剂、皂、身体一肥皂、浴用剂、粉齿磨、润性齿磨、牙膏、水齿磨、药用齿磨、

口中清凉剂、口中清凉膜、漱口水、漱口药等。

[0059] 以下,通过实验说明本发明。

【实施例】

[0060] 【实验1:腺苷N1-氧化物5'-磷酸及其类似物给正常人表皮角质化细胞的更新带来的影响】

[0061] 将角质化细胞的增殖、移动、分化、脱落的一系列的过程称为更新,角质化细胞以一定的周期更新而保持皮肤的恒定性,伴随年龄的增加而皮肤的更新速度变慢,结果,发生皱纹或松弛或皮肤粗糙。其故认为、如果诱导角质化细胞的分化,更新速度会变快,由此可改善皱纹或松弛或皮肤粗糙。因此,在本实验中,将腺苷N1-氧化物5'-磷酸及其类似物的更新促进作用作为角质化细胞的分化诱导作用、产生角质化包膜的促进作用及转谷氨酰胺酶活性增强作用的指标进行评价。再者,实验根据“Hasegawa等、“Lipids”、第46卷第6号、529~535页、2011年”及“Sturniolo等、“The Journal of Biological Chemistry”、第278卷第48号、48066~48073页、2003年”进行。

[0062] 【实验1-1:对角质化细胞的分化的影响】

[0063] 向12孔板添加1ml用含有生长因子的角质化细胞用培养基(商品名“EpiLife”, Life Technologies公司制)调制成为 2.5×10^4 个/ml的浓度的正常人表皮角质化细胞,培养至细胞占孔的底面的一半程度的状态。其后,将培养基替换为不含生长因子的角质化细胞用培养基而培养2天,再者,将培养基各自替换为以表1所示的各浓度添加表1中记载的被验物质的不含生长因子的角质化细胞用培养基而培养3天。再者,将除了不添加被验物质以外同样培养的作为对照。显微镜下进行细胞形态的观察,根据以下的基准评价角质化细胞分化诱导能力。

[0064] 评分0:无变化

[0065] 评分1:显示扁平形态的细胞数是全体的50%以下

[0066] 评分2:显示扁平形态的细胞数是全体的50%以上

[0067] 评分3:细胞的大致全部取不规则的形态,确认一部分有光泽的细胞

[0068] 评分越大,表明细胞的分化越被促进。进行3次实验,求出其平均评分。将腺苷N1-氧化物5'-磷酸类似物对角质化细胞的分化诱导的作用示于表1。

[0069] 【表1】

[0070]

被验物质		评分
对照		0.0
腺苷 N1-氧化物 5'-磷酸钠	10 μ M	2.0
	20 μ M	3.0
	40 μ M	3.0
腺苷 N1-氧化物	10 μ M	2.0
	20 μ M	3.0
	40 μ M	3.0
3'- α -葡萄糖基腺苷 N1-氧化物	40 μ M	2.0
	80 μ M	2.0
	160 μ M	3.0
5'- α -葡萄糖基腺苷 N1-氧化物	200 μ M	2.0
	400 μ M	2.0
	800 μ M	3.0
腺苷	100 μ M	0.0
	200 μ M	0.0
	400 μ M	0.0
3'- α -葡萄糖基腺苷	200 μ M	0.0
	400 μ M	0.0
	800 μ M	0.0
5'- α -葡萄糖基腺苷	200 μ M	0.0
	400 μ M	0.0
	800 μ M	0.0

[0071] 从表1可知,在未添加被验物质的对照中见不到正常人表皮角质化细胞的形态的变化,与此相比,当腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠及腺苷N-1氧化物浓度为10 μ M时确认到形态变化,当为20~40 μ M时扁平的细胞进一步脱核而变小,细胞变得取不规则的形态,其中也确认到有光泽的细胞,分化在进行。当3'- α -葡萄糖基腺苷N-1氧化物及5'- α -葡萄糖基腺苷N-1氧化物的浓度各自为40~80 μ M及200~400 μ M时确认到形态变化,当各自160 μ M及800 μ M时扁平的细胞进一步脱核而变小,细胞变得取不规则的形态,其中也确认到有光泽的细胞,分化在进行。一方面,腺苷即使浓度为400 μ M,3'- α -葡萄糖基腺苷及5'- α -葡萄糖基腺苷即使浓度为800 μ M也确认不到形态变化。

[0072] 腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠、腺苷N-1氧化物、3'- α -葡萄糖基腺苷N1-氧化物及5'- α -葡萄糖基腺苷N1-氧化物在试验的浓度范围内均确认到角质化细胞的分化促进,该效果在腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠及腺苷N-1氧化物被确证到更强。这些结果表明,由于腺苷N1-氧化物5'-磷酸、其类似物及其盐促进角质化细胞的分化,从而作为更新改善剂有用。

[0073] 【实验1-2:给角质化包膜的产生带来的影响】

[0074] 角质化包膜在皮肤的屏障功能中实现重要的作用。如果皮肤的屏障功能降低,则引发皮肤的皱纹、细纹、松弛,色斑等。因此,在本实验中研究了腺苷N1-氧化物5'-磷酸及其类似物给角质化包膜的形成带来的影响。再者,实验根据“Hasegawa等、“Lipids”、第46卷第6号、529~535页、2011年”进行。

[0075] 除了以表2所示的各浓度添加表2中记载的被验物质以外,与实验1-1同样地培养正常人表皮角质化细胞。将培养的正常人表皮角质化细胞用磷酸缓冲生理盐水清洗1次之后,加0.5ml磷酸缓冲生理盐水而刮取附着于板上的细胞。向得到的细胞悬浮液加1/4液量的10%月桂基硫酸钠溶液而搅拌,于-80℃冷冻。解冻后,进行离心分离(12000×g,15分钟),将回收的细胞残渣用含有2%月桂基硫酸钠的磷酸缓冲生理盐水清洗1次之后,再进行离心分离(12000×g,15分钟),使回收的细胞残渣悬浮于含有2%月桂基硫酸钠及20mM二硫苏糖醇的磷酸缓冲生理盐水。将此细胞残渣悬浮液在沸腾水浴中煮沸1小时之后,测定310nm的吸光度而作为角质化包膜产生量。除未添加被验物质以外同样地处理而作为对照,同样地将310nm的吸光度作为100%,基于下述计算式,相对评价角质化包膜产生量。

[0076] 计算式:角质化包膜产生量(相对值%)=(被验物质添加样品的吸光度/对照的吸光度)×100

[0077] 实验进行3次,对对照进行Dunnett的多重比较检验。危险率 $p < 0.01$ 作为有显著差异,以*表示。将腺苷N1-氧化物5'-磷酸类似物对伴随角质化细胞的分化的角质化包膜的产生的作用示于表2。

[0078] 【表2】

[0079]

被验物质		角质化包膜产生量 (%)
对照		100.0
腺苷 N1-氧化物 5'-磷酸钠	25μM	178.7*
腺苷 N1-氧化物	25μM	178.7*
3'-α-葡萄糖基腺苷 N1-氧化物	200μM	141.4*
5'-α-葡萄糖基腺苷 N1-氧化物	600μM	148.8*
腺苷	400μM	101.7
腺苷 5'-磷酸	400μM	136.5
3'-α-葡萄糖基腺苷	800μM	104.2

[0080] 从表2可知,与未添加被验物质的对照比较,腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠及腺苷N1-氧化物在25μM的浓度,角质化包膜产生量提高至约180%,确认到显著的角质化包膜产生促进作用。另外,3'-α-葡萄糖基腺苷N1-氧化物在200μM的浓度确认到显著的角质化包膜产生促进作用。5'-α-葡萄糖基腺苷N1-氧化物在600μM的浓度确认到显著的角质化包膜产生促进作用。腺苷5'-磷酸在400μM的浓度确认到促进角质化包膜的产生的倾向。一方面,腺苷及3'-α-葡萄糖基腺苷即使各自在400μM及800μM的浓度也确认不到角质化包膜产生促进作

用。

[0081] 在试验的浓度,确证在腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠、腺苷N-1氧化物、3'- α -葡萄糖基腺苷N1-氧化物及5'- α -葡萄糖基腺苷N1-氧化物确认到角质化包膜的产生促进,该效果是腺苷N-1氧化物、腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠及3'- α -葡萄糖基腺苷N-1氧化物更强,腺苷N-1氧化物及腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠最强。这些结果表明,腺苷N1-氧化物5'-磷酸、其类似物及其盐促进角质化包膜的形成,从而作为更新改善剂有用。

[0082] 【实验1-3:给转谷氨酰胺酶活性带来的影响】

[0083] 转谷氨酰胺酶是催化蛋白质的交联的酶,与角质化包膜的形成相关。因而、通过增强转谷氨酰胺酶活性,促进角质化包膜的形成,从而可预防或改善皮肤的皱纹、细纹、松弛,色斑等。因此,在本实验中研究了,腺苷N-1氧化物5'-磷酸及其类似物给转谷氨酰胺酶活性带来的影响。再者,实验根据“Sturniolo等、“The Journal of Biological Chemistry”、第278卷第48号、48066~48073页、2003年”进行。

[0084] 除了以表3所示的各浓度添加表3中记载的被验物质以外,与实验1-1同样地培养正常人表皮角质化细胞。对于培养的正常人表皮角质化细胞,添加100 μ M的荧光素尸胺而静置4小时。其后,用磷酸缓冲生理盐水将细胞清洗1次,再者,用冷甲醇处理10分钟而固定细胞。用冷甲醇将细胞清洗3次之后,添加磷酸缓冲生理盐水。将由转谷氨酰胺酶摄入细胞的荧光素尸胺使用细胞成像工作站(Molecular Probes公司制)解析,将其荧光强度作为转谷氨酰胺酶活性。除未添加被验物质以外同样地处理而作为对照,其荧光强度设为100%,基于下述计算式,相对评价转谷氨酰胺酶活性。

[0085] 计算式:转谷氨酰胺酶活性(相对值%) = (被验物质添加样品的荧光强度/对照的荧光强度) \times 100

[0086] 实验进行3次,对对照进行Dunnett的多重比较检验。危险率 $p < 0.01$ 作为有显著差异,以*表示。将腺苷N1-氧化物5'-磷酸类似物对与角质化包膜产生相关的转谷氨酰胺酶活性的作用示于表3。

[0087] 【表3】

[0088]

被验物质	转谷氨酰胺酶活性 (%)
对照	100
腺苷 N1-氧化物 5'-磷酸钠	20 μ M 569*
腺苷 N1-氧化物	20 μ M 632*
3'- α -葡萄糖基腺苷 N1-氧化物	100 μ M 300
5'- α -葡萄糖基腺苷 N1-氧化物	400 μ M 404*
腺苷	400 μ M 360
腺苷 5'-磷酸	400 μ M 244
3'- α -葡萄糖基腺苷	400 μ M 269
5'- α -葡萄糖基腺苷	400 μ M 33

[0089] 从表3可知,与未添加被验物质的对照比较,腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠及腺苷N-1氧化物在20 μ M的浓度将转谷氨酰胺酶活性各自提高至约570%及约630%,确认到显著的转谷氨酰胺酶活性增强作用。另外,5'- α -葡萄糖基腺苷N-1氧化物在400 μ M的浓度确认到显著的转谷氨酰胺酶活性增强作用。3'- α -葡萄糖基腺苷N-1氧化物在100 μ M的浓度确认不到转谷氨酰胺酶活性增强作用,但5'- α -葡萄糖基腺苷N-1氧化物在400 μ M的浓度确认到效果,所以认为,对3'- α -葡萄糖基腺苷N-1氧化物以更高浓度使用确认到效果。腺苷、腺苷5'-磷酸、3'- α -葡萄糖基腺苷及5'- α -葡萄糖基腺苷在400 μ M的浓度确认不到转谷氨酰胺酶活性增强作用。

[0090] 在试验的浓度,在腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠、腺苷N-1氧化物及5'- α -葡萄糖基腺苷N-1氧化物确认到转谷氨酰胺酶活性的增强,确证该效果是腺苷N-1氧化物及腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠更强。这些结果表明,腺苷N1-氧化物5'-磷酸、其类似物及其盐有增强转谷氨酰胺酶活性的作用,作为更新改善剂有用。

[0091] **【实验2:腺苷N1-氧化物5'-磷酸及其类似物给对人上皮样细胞癌来源细胞的紧密连接功能强化作用带来的影响】**

[0092] 紧密连接有防止自生物体外向生物体内的异物的侵入或自生物体内向生物体外的过量的水分释放的功能。因而认为,通过强化紧密连接功能,与皮肤屏障功能的亢进或保湿关联。因此,在本实验中,研究了腺苷N-1氧化物5'-磷酸及其类似物给紧密连接带来的影响。再者,实验根据“Suzuki及Hara、“Journal of Nutrition”、第139卷第5号、965~974页、2009年”进行。

[0093] 向12孔插入杯各自添加各2ml用以表4所示的各浓度添加表4中记载的被验物质的培养基调制成为 1×10^5 个/ml的浓度的人上皮样细胞癌来源A-431细胞,培养至细胞占孔的底面全体的状态。使插入杯的内侧和外侧的培养液量各自达到2mL,确认无水面的变化,向插入杯的内侧作为透过物的模型添加作为荧光染料的荧光黄(Life Technologies)至成终浓度100 μ M。其后,测定插入杯的内侧和外侧各自的培养液中的荧光黄的荧光强度,由下述计算式,求出外侧的荧光强度对插入杯的内侧和外侧的荧光强度的和的比例,作为荧光黄的透过率。

[0094] 计算式:荧光黄的透过率(%) = {插入杯的外侧的吸光度 / (插入杯的内侧的吸光度 + 插入杯的外侧的吸光度)} $\times 100$

[0095] 除了不添加被验物质以外同样地处理而作为对照,将其荧光黄的透过率作为100%,基于下述计算式,相对评价紧密连接功能的强化导致的透过率的减少。

[0096] 计算式:荧光黄的相对透过率(相对值%) = (被验物质添加样品的透过率 / 对照的透过率) $\times 100$

[0097] 实验进行3次,对对照进行Dunnett的多重比较检验。危险率 $p < 0.01$ 作为有显著差异,以*表示。将腺苷N1-氧化物5'-磷酸类似物对人上皮样细胞癌来源细胞的紧密连接功能的作用示于表4。

[0098] **【表4】**

[0099]

被验物质		转谷氨酰胺酶活性 (%)
对照		100.0
腺苷 N1-氧化物 5'-磷酸钠	10 μ M	78.4
	20 μ M	62.3*
腺苷 N1-氧化物	10 μ M	71.6*
	20 μ M	71.3*
3'- α -葡萄糖基腺苷 N1-氧化物	200 μ M	112.3
	400 μ M	102.3
5'- α -葡萄糖基腺苷 N1-氧化物	200 μ M	97.1
	400 μ M	96.8
腺苷	200 μ M	77.1*
	400 μ M	67.4*
腺苷 5'-磷酸	200 μ M	90.6
	400 μ M	81.6
3'- α -葡萄糖基腺苷	200 μ M	94.5
	400 μ M	94.8
5'- α -葡萄糖基腺苷	200 μ M	94.2
	400 μ M	82.3

[0100] 从表4可知,与未添加被验物质的对照比较,腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠在20 μ M的浓度荧光黄透过率减少到约60%,确认到显著的紧密连接功能强化作用。另外,腺苷N-1氧化物在10~20 μ M的浓度确认到显著的紧密连接功能强化作用。再者,腺苷在200~400 μ M的浓度确认到显著的紧密连接功能强化作用。但是,3'- α -葡萄糖基腺苷N1-氧化物、5'- α -葡萄糖基腺苷N1-氧化物、腺苷5'-磷酸、3'- α -葡萄糖基腺苷及5'- α -葡萄糖基腺苷在200~400 μ M的浓度确认不到紧密连接功能强化作用。

[0101] 在试验的浓度范围,紧密连接功能强化作用,从效果的方面,优选为腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠、腺苷N-1氧化物及腺苷,更期望是腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠及腺苷N-1氧化物。这些结果表明,腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠及腺苷N-1氧化物有紧密连接功能的强化作用,从而作为皮肤屏障功能亢进剂及保湿剂有用。

[0102] 【实验3:腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠在正常人表皮角质化细胞中的纤丝聚集蛋白表达增强作用】

[0103] 作为对于皮肤的屏障功能的形成或水分保持发挥重要的作用的蛋白质之一已知纤丝聚集蛋白。纤丝聚集蛋白作为纤丝聚集蛋白原在表皮产生,这经分解而成为纤丝聚集蛋白,担负皮肤的屏障功能。另外,纤丝聚集蛋白再受分解而也作为天然的保湿因子发挥作用。再者,近年,纤丝聚集蛋白的表达降低和特应性皮肤炎的关联性被指出("Osawa等" "Allergology International",第60卷第1号1~9页、2011年)。从而在本实验中研究了腺

苷N1-氧化物5'-磷酸钠在正常人表皮角质化细胞中的纤丝聚集蛋白表达增强作用。再者，实验根据“Otsuka等、“The Journal of Allergy and Clinical Immunology”、第133卷第1号139~146页、2014年”进行。

[0104] 在6孔板中，用含有生长因子的角质化细胞用培养基(商品名“EpiLife”，KURABO公司制)将以 5×10^4 个/孔的浓度接种的正常人表皮角质化细胞于37℃培养4天。在第4天细胞占孔的80%时，通过每隔2天培养基更换为添加腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠至成2 μ M、5 μ M、10 μ M的EpiLife培养基而再培养4天来诱导纤丝聚集蛋白的表达。除了代替腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠而使用添加氯化钙至成0.5mM的EpiLife培养基以外，同样地培养正常人表皮角质化细胞而作为阳性对照。培养4天后，将细胞用Dulbecco-磷酸缓冲生理盐水清洗，添加0.1mL含蛋白分解酶抑制剂的SDS样品缓冲液(62.5mM Tris-HCl pH6.8、2%SDS、10%甘油、50mM DTT)，使用细胞刮具回收细胞。将回收的细胞煮沸10分钟后进行超声波破碎，用Pierce BCA蛋白测定试剂盒(ThermoFisher Scientific公司制)进行蛋白定量。将一定量(100 μ g/泳道)的样品由定法供于SDS-聚丙烯酰胺电泳，其后转印到PVDF膜。

[0105] 将PVDF转印膜使用BLOCK ACE(DS Pharma Biomedical公司制)封闭之后，使与作为第1抗体的小鼠抗纤丝聚集蛋白抗体(AKH1, Santa Cruz公司制、200倍稀释)或小鼠抗肌动蛋白抗体(MAB1501, Chemicon International公司制、20,000倍稀释)反应，接下来使与作为第2抗体的HRP标记抗小鼠免疫球蛋白抗体(P0447, Dako公司制、2,000倍稀释)反应。反应后，使用ECL Plus Western Blotting Detection System(GE Healthcare公司制)，在化学发光用膜Hyperfilm ECL(GE Healthcare公司制)上检测条带。检测的条带由图像解析软件“Image J”解析而数值化。

[0106] 数据以未添加被验物质的作为对照，其纤丝聚集蛋白/肌动蛋白的条带的强度比设为100%，将纤丝聚集蛋白的表达量以纤丝聚集蛋白/肌动蛋白的条带的强度比的升高率相对评价。将腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠给正常人表皮角质化细胞中的纤丝聚集蛋白的表达带来的的作用示于表5。

[0107] 【表5】

[0108]

被验物质	纤丝聚集蛋白相对表达量 (%)	
对照	100	
CaCl ₂ (0.5mM)	289	
腺苷 N1-氧化物 5'-磷酸钠	2 μ M	133
	5 μ M	206
	10 μ M	308

[0109] 从表5可知，与未添加被验物质的对照比较，腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠以添加浓度依赖性地使纤丝聚集蛋白的表达量升高，在10 μ M是308%，确认到与阳性对照的0.5mM的氯化钙同等水平的表达升高作用。这些结果表明，腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠导致的紧密连接功能强化作用的一部分经纤丝聚集蛋白的表达增强作用，本物质作为皮肤屏障功能亢进剂及保湿剂有用。

[0110] 再者，近年，随着皮肤屏障功能降低而外来的异物经皮肤侵入，结果指出，对外来

变应原的致敏变得容易成立与特应性皮肤炎的发病关联。此实验结果显示,腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠经纤维聚集蛋白的表达增强作用而还与特应性皮肤炎发病的防止关联。

[0111] 【实验4:腺苷N1-氧化物5'-磷酸类似物给对正常人皮肤成纤维细胞的弹性蛋白产生促进作用带来的影响】

[0112] 作为具有支持胶原的纤维的作用的纤维的弹性蛋白发挥给皮肤张力或弹力的作用,一但发生弹性蛋白的变性,则皮肤的弹性降低而与皱纹或松弛的形成关联。因而,通过促进弹性蛋白的产生,可预防或改善皱纹或松弛。因此,在本实验中,研究了腺苷N-1氧化物5'-磷酸及其类似物给弹性蛋白产生带来的影响。再者,实验根据“Syedain及Tranquillo、*“Journal of Biomechanics”*、第44卷第5号、848~855页、2011年”进行。

[0113] 向24孔板各自添加0.5mL使用含有10%牛胎儿血清的Dulbecco改良的Eagle培养基调制成 3×10^5 个/ml的浓度的正常人皮肤成纤维细胞,培养1天。将细胞用Dulbecco-磷酸缓冲生理盐水清洗后,通过以表5所示的各浓度添加表5中记载的被验物质的Dulbecco改良的Eagle培养基再培养2天来诱导弹性蛋白合成。其后,回收培养上清,将细胞用1mL的Dulbecco-磷酸缓冲生理盐水清洗后,添加0.1mL的0.25%胰蛋白酶及乙二胺四醋酸而于37℃处理2分钟而将细胞从板剥离。向板加0.5mL的Dulbecco-磷酸缓冲生理盐水,将得到的细胞悬浮液回收到1.5mL管,离心分离($3,000 \times g$,5分钟)而回收剥离的细胞。弹性蛋白的定量使用弹性蛋白比色定量试剂盒(BIOCOLOR公司制)进行。首先,使用回收的培养上清使细胞悬浮,添加0.16mL的1M草酸(试剂盒试剂)而于100℃反应1小时而使弹性蛋白增溶。添加0.66mL的弹性蛋白沉淀剂(试剂盒试剂)而颠倒混合15分钟,离心分离($10,000 \times g$,10分钟)而使蛋白质沉淀。向沉淀添加0.5mL的染色剂(试剂盒试剂)而颠倒混合90分钟,离心分离($10,000 \times g$,10分钟)而回收结合染料的沉淀。其后,添加0.25mL的染料分离剂(试剂盒试剂)而颠倒混合1小时,测定490nm的吸光度而算出每孔的弹性蛋白量。使用试剂盒附属品制成标准曲线。除未添加被验物质以外同样地处理而作为对照,同样地490nm的吸光度设为100%,基于下述计算式,相对评价弹性蛋白产生量。

[0114] 计算式:弹性蛋白产生量(相对值%) = (被验物质添加样品的吸光度/对照的吸光度) $\times 100$

[0115] 另外,为了确认在同条件下的细胞增殖,向96孔微平板各自添加0.1mL使用含有10%牛胎儿血清的Dulbecco改良的Eagle培养基调制成 2.5×10^5 个/ml的浓度的正常人皮肤成纤维细胞,培养1天。用Dulbecco-磷酸缓冲生理盐水清洗后,用以表5所示的各浓度添加表5中记载的被验物质的Dulbecco改良的Eagle培养基培养基培养2天。除去上清后,添加0.2mL用培养基10倍稀释的Alamar蓝,于37℃反应2小时而测定荧光强度(激发波长544nm,荧光波长590nm),除未添加被验物质以外同样地处理的对照的荧光强度设为100%而求出被验物质添加时的细胞数的变化率。

[0116] 实验进行3次,对对照进行Dunnett的多重比较检验。危险率 $p < 0.01$ 作为有显著差异,以*表示。将腺苷N1-氧化物5'-磷酸类似物对正常人皮肤成纤维细胞的弹性蛋白产生的作用示于表6。

[0117] 【表6】

[0118]

被验物质		弹性蛋白产生量 (%)	细胞数 (%)
对照		100.0	100.0
腺苷 N1-氧化物 5'-磷酸钠	1 μ M	98.0	104.0
	4 μ M	105.2	104.0
	10 μ M	121.2*	101.0
腺苷 N1-氧化物	1 μ M	108.8	99.0
	4 μ M	114.8	98.0
	10 μ M	118.4*	94.0
腺苷 5'-磷酸	10 μ M	114.4	101.0
	40 μ M	117.2	102.0
	100 μ M	120.0*	99.0

[0119] 从表6可知,与未添加被验物质的对照比较,腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠及腺苷N-1氧化物在10 μ M的浓度使弹性蛋白产生量提高到约120%,确认到显著的产生弹性蛋白的增强作用。另外,腺苷5'-磷酸在10~40 μ M的浓度有增强弹性蛋白产生的倾向,在100 μ M的浓度确认到显著的产生弹性蛋白的增强作用。再者,在本实验系统未见到对细胞增殖的影响。

[0120] 在试验的浓度范围,弹性蛋白产生促进作用,从效果的方面,优选为腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠、腺苷N-1氧化物及腺苷5'-磷酸,更期望是腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠及腺苷N-1氧化物。这些结果表明,腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠及作为其类似物的腺苷N-1氧化物有促进弹性蛋白产生的作用,从而作为抗皱纹剂有用。

[0121] 【实验5:腺苷N1-氧化物5'-磷酸及其类似物给对正常人皮肤成纤维细胞的基质金属蛋白酶-1产生抑制作用带来的影响】

[0122] 胶原被基质金属蛋白酶-1分解,胶原被分解,则皱纹形成,或皮肤的弹性降低而发生松弛。因而,通过抑制基质金属蛋白酶-1的产生,可预防或改善皱纹或松弛。在本实验中,研究了腺苷N-1氧化物5'-磷酸及其类似物给基质金属蛋白酶-1产生带来的影响。再者,实验根据“Fuller等、“Journal of Cosmetic Dermatology”、第5卷第1号、30~38页、2006年”进行。

[0123] 向96孔微平板各自添加0.1mL使用含有10%牛胎儿血清的Dulbecco改良的Eagle培养基调制成 2.5×10^5 个/ml的浓度的正常人皮肤成纤维细胞,培养至占孔的底面全体的状态。接下来,将培养基更换为无血清培养基而培养24小时,将以表6所示的各浓度添加表6中记载的被验物质再培养24小时。其后,添加人IL-1 β 至终浓度成1ng/ml,再培养24小时。进而,使用特异性ELISA试剂盒(R&D Systems公司制)检测培养上清中的基质金属蛋白酶-1,用四甲基联苯胺显色之后,测定450nm的吸光度。除未添加被验物质以外同样地处理而作为对照,对照中的培养上清中的基质金属蛋白酶-1设为100%,根据下述计算式,相对评价基质金属蛋白酶-1产生量。

[0124] 计算式:基质金属蛋白酶-1产生量(相对值%) = (被验物质添加样品的吸光度/对照的吸光度) \times 100

[0125] 另外,细胞数由细胞数测定试剂盒(染色法)测定,对照设为100%而求出被验物质添加时的细胞数的变化率。

[0126] 实验进行3次,对对照进行Dunnett的多重比较检验。危险率 $p < 0.01$ 作为有显著差异,以*表示。将腺苷N1-氧化物5'-磷酸类似物对正常人皮肤成纤维细胞的基质金属蛋白酶-1产生量的作用示于表7。

[0127] 【表7】

[0128]

被验物质		基质金属蛋白酶-1 产生量 (%)	细胞数 (%)
对照		100.0	100.0
腺苷 N1-氧化物 5'-磷酸钠	5 μ M	96.0	99.9
	10 μ M	83.1*	99.5
	20 μ M	31.8*	92.2
腺苷 N1-氧化物	5 μ M	86.6	98.5
	10 μ M	77.6*	94.6
	20 μ M	31.9*	94.4
3'- α -葡萄糖基腺苷 N1-氧化物	200 μ M	78.7*	103.8
	400 μ M	75.5*	104.5
	800 μ M	68.6*	97.4
5'- α -葡萄糖基腺苷 N1-氧化物	200 μ M	85.4*	108.1
	400 μ M	83.6*	102.1
	800 μ M	77.0*	102.6
腺苷	200 μ M	88.7	93.5
	400 μ M	93.4	87.4
	800 μ M	85.6	91.2
腺苷 5'-磷酸	200 μ M	99.5	93.7
	400 μ M	93.3	89.9
	800 μ M	90.3	96.0
3'- α -葡萄糖基腺苷	200 μ M	86.6	98.9
	400 μ M	87.1	101.1
	800 μ M	98.7	107.2
5'- α -葡萄糖基腺苷	200 μ M	89.9	104.0
	400 μ M	94.3	103.4
	800 μ M	87.7	93.4

[0129] 从表7可知,与未添加被验物质的对照比较,腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠在10~20 μ M的浓度使基质金属蛋白酶-1产生量减少到约80~30%,确认到浓度依赖性并且显著的产生抑制作用。腺苷N-1氧化物在5~20 μ M的浓度确认到同样的产生抑制作用。另外,3'- α -葡萄糖基腺苷N-1氧化物及5'- α -葡萄糖基腺苷N-1氧化物在200~800 μ M的浓度确认到浓度依赖性并且显著的产生抑制作用,但其效果是3'- α -葡萄糖基腺苷N-1氧化物比5'- α -葡萄糖基腺苷N-1氧化物强。腺苷、腺苷5'-磷酸、3'- α -葡萄糖基腺苷及5'- α -葡萄糖基腺苷确认不到显著的基质金属蛋白酶-1产生抑制作用。

[0130] 在试验的浓度范围,基质金属蛋白酶-1产生抑制作用,从效果的方面,优选为腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠、腺苷N-1氧化物、3'- α -葡萄糖基腺苷N1-氧化物及5'- α -葡萄糖基腺苷N1-氧化物,更期望是腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠及腺苷N-1氧化物。这些结果表明,腺苷N1-氧化物5'-磷酸、其类似物及其盐有抑制基质金属蛋白酶-1的产生的作用,作为抗皱纹剂有用。

[0131] 【实验6:腺苷N1-氧化物5'-磷酸及其类似物给对正常人表皮角质化细胞的内皮缩血管肽-1产生抑制作用带来的影响】

[0132] 内皮缩血管肽-1是促进黑色素细胞的活化或增殖的物质,已知是色斑的原因。再者,也有见解认为,从黑色素细胞排出到表皮细胞的黑色素未被表皮细胞顺利排出成为皮肤色素沉积(色斑)或皮肤的皮肤暗沉的原因。因而,通过抑制内皮缩血管肽-1产生,可预防或改善皮肤色素沉积(色斑)或皮肤的皮肤暗沉。因此,在本实验中,研究了腺苷N1-氧化物5'-磷酸及其类似物给内皮缩血管肽-1产生带来的影响。再者,实验根据“Ishida及Sakaguchi,“Biological&Pharmaceutical Bulletin”、第30卷第5号、928~934页、2007年”进行。

[0133] 在96孔微平板中,使用含有生长因子的角质化细胞用培养基(商品名“EpiLife”,Life Technologies公司制)增殖至正常人表皮角质化细胞占孔的底面全体的状态之后,将培养基替换为不含生长因子的角质化细胞用培养基而再培养2天。其后,将腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠添加至成10、20或50 μ M,静置6小时。用Hanks缓冲液清洗后,以40mJ/cm²的强度向细胞照射紫外线B波,加含有生长因子的角质化细胞用培养基而再培养24小时。进而,使用特异性ELISA试剂盒(R&D Systems公司制)检测培养上清中的内皮缩血管肽-1,用四甲基联苯胺显色之后,测定450nm处的吸光度。未添加腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠以外同样地处理而作为对照,对照中的培养上清中的内皮缩血管肽-1产生量设为100%,根据下述计算式,相对评价内皮缩血管肽-1产生量。

[0134] 计算式:内皮缩血管肽-1产生量(相对值%) = (被验物质添加样品的吸光度/对照的吸光度) \times 100

[0135] 另外,用亚甲基蓝测定细胞的增殖,对照设为100%而求出被验物质添加时的细胞数的变化率。

[0136] 实验进行3次,对对照进行Dunnett的多重比较检验。危险率 $p < 0.01$ 作为有显著差异,以*表示。将腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠对正常人表皮角质化细胞的内皮缩血管肽-1产生的作用示于表8。

[0137] 【表8】

[0138]

被验物质	内皮缩血管肽-1 产生量 (%)	细胞数 (%)
对照	100.0	100.0
腺苷 N1-氧化物 5'-磷酸钠	10 μ M	111.4
	20 μ M	103.6
	50 μ M	49.9*

[0139] 从表8可知,与未添加被验物质的对照比较,腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠有在20 μ M的浓度抑制内皮缩血管肽-1的产生的倾向,在50 μ M的浓度使内皮缩血管肽-1的产生量减少到

约50%，确认到显著的内皮缩血管肽-1产生抑制作用。再者，在本实验系统中未见到对细胞增殖的影响。

[0140] 结果表明，腺苷N1-氧化物5'-磷酸有内皮缩血管肽-1产生抑制作用，从而作为抗色斑剂有用。

[0141] 【实验7:表没食子儿茶素没食子酸酯和腺苷N1-氧化物5'-磷酸的联用给角质化细胞分化诱导带来的影响】

[0142] 实验是，除了以表8及表9所示的各浓度添加各自表8及表9中记载的被验物质以外，根据各自实验1-2及实验1-3记载的方法进行，研究了向化妆品联用作为抗氧化剂使用的表没食子儿茶素没食子酸酯导致的腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠对角质化包膜产生促进作用及转谷氨酰胺酶活性增强作用的影响。除未添加被验物质以外同样地处理而作为对照，各自基于下述计算式，求出相对于对照的角质化包膜产生量增加率及转谷氨酰胺酶活性增加率。

[0143] 计算式:角质化包膜产生量增加率(%) = {(被验物质添加样品的吸光度/对照的吸光度) × 100} - 100

[0144] 计算式:转谷氨酰胺酶活性增加率(%) = {(被验物质添加样品的荧光强度/对照的荧光强度) × 100} - 100

[0145] 各自的结果示于表9及表10(确认到效果的组合的增加率以*表示。)

[0146] 【表9】

[0147]

被验物质		角质化包膜产生量增加率(%)
腺苷 N1-氧化物 5'-磷酸钠	15μM	2.8
表没食子儿茶素没食子酸酯	1.6μM	28.0
	3.3μM	37.3
表没食子儿茶素没食子酸酯+15μM 的腺苷 N1-氧化物 5'-磷酸钠	1.6μM	43.1*
	3.3μM	59.2*

[0148] 【表10】

[0149]

被验物质		转谷氨酰胺酶活性增加率(%)
腺苷 N1-氧化物 5'-磷酸钠	15μM	0.0
表没食子儿茶素没食子酸酯	1.6μM	5.6
	3.3μM	19.0
	6.5μM	6.5
表没食子儿茶素没食子酸酯+15μM 的腺苷 N1-氧化物 5'-磷酸钠	1.6μM	73.2*
	3.3μM	109.8*
	6.5μM	99.2

[0150] 从表9及表10可知，当联用15μM的腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠和1.6~6.5μM的表没食子儿茶素没食子酸酯时，角质化包膜产生量增加率及转谷氨酰胺酶活性增加率均比各自单独添加腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠及表没食子儿茶素没食子酸酯时的增加率的简单加和更显著地增加。因此判断，腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠和表没食子儿茶素没食子酸酯的联用

有对角质化包膜产生促进作用及转谷氨酰胺酶活性增强作用的协同效果。另外,腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠和表没食子儿茶素没食子酸酯的摩尔比期望是15 μ M:6.5 μ M~15 μ M:1.6 μ M的范围、即,2.3:1~9.4:1。结果表明,向腺苷N1-氧化物5'-磷酸、其类似物及其盐配合表没食子儿茶素没食子酸酯的组合物协同地促进或增强角质化包膜的产生及转谷氨酰胺酶活性,从而作为抗色斑剂有用。

[0151] 【实验8:腺苷N1-氧化物5'-磷酸和乙二胺四醋酸的联用给紧密连接功能带来的影响】

[0152] 实验除了以表11所示的各浓度添加表11中记载的被验物质以外,根据实验2记载的方法进行,研究了向化妆品联用作为保存料使用的乙二胺四醋酸的导致的腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠盐对紧密连接功能强化作用的影响。除未添加被验物质以外同样地处理而作为对照,基于下述计算式,求出相对于对照的荧光黄的相对透过率的减少率。

[0153] 计算式:荧光黄的相对透过率的减少率(%) = 100 - {(被验物质添加样品的透过率/对照的透过率) × 100}

[0154] 结果示于表11(确认到效果的组合的减少率以*表示)。

[0155] 【表11】

[0156]

被验物质	荧光黄相对透过率减少率(%)
10 μ M腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠	21.6
3mM乙二胺四醋酸	-24.7
3mM乙二胺四醋酸+10 μ M腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠	17.0*

[0157] 从表11可知,尽管作为保存料在化妆品中使用的乙二胺四醋酸其自身就示减弱紧密连接功能的作用,但如果将腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠和乙二胺四醋酸联用,则确认到减弱乙二胺四醋酸的紧密连接功能的作用被大幅地缓和。另外,上述的结果显示,如果腺苷N1-氧化物5'-磷酸与乙二胺四醋酸的摩尔比是至少10 μ M:3mM以上、即,至少1:300以上,则即使在乙二胺四醋酸存在时,也可通过使用腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠,图充分的紧密连接功能的强化。结果表明,向腺苷N1-氧化物5'-磷酸、其类似物及其盐配合乙二胺四醋酸的组合物在紧密连接功能强化作用上示显著的效果,从而作为皮肤屏障功能亢进剂及保湿剂有用。

[0158] 【实验9:抗坏血酸2-葡萄糖苷和腺苷N1-氧化物5'-磷酸或其类似物的联用给基质金属蛋白酶-1产生带来的影响】

[0159] 实验除了以表12所示的各浓度添加表12中记载的被验物质以外根据实验5记载的方法进行,研究了向化妆品联用作为美白剂使用的抗坏血酸2-葡萄糖苷导致的腺苷N1-氧化物5'-磷酸类似物对抗皱纹作用的影响。除未添加被验物质以外同样地处理而作为对照,基于下述计算式,求出相对于对照的基质金属蛋白酶-1产生量减少率。

[0160] 计算式:基质金属蛋白酶-1产生量减少率(%) = 100 - {(被验物质添加样品的吸光度/对照的吸光度) × 100}

[0161] 结果示于表12(确认到效果的组合的减少率以*表示)。

[0162] 【表12】

[0163]

被验物质		基质金属蛋白酶-1 产生量减少率 (%)
抗坏血酸 2-葡萄糖苷	200 μ M	2.1
	2 μ M	2.9
腺苷 N1-氧化物 5'-磷酸钠	5 μ M	4.0
	10 μ M	16.9
	2 μ M	6.7
腺苷 N1-氧化物 5'-磷酸钠+200 μ M 抗坏血酸 2-葡萄糖苷	5 μ M	13.0*
	10 μ M	24.7*
	2 μ M	10.0
腺苷 N1-氧化物	5 μ M	13.4
	10 μ M	22.4
	2 μ M	11.3
腺苷 N1-氧化物+200 μ M 抗坏血酸 2-葡萄糖苷	5 μ M	24.4*
	10 μ M	36.3*

[0164] 从表12可知,当联用5~10 μ M的腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠或其类似物的腺苷N-1氧化物与200 μ M的抗坏血酸2-葡萄糖苷时,基质金属蛋白酶-1产生量减少率相比各自单独使用腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠、腺苷N-1氧化物及抗坏血酸2-葡萄糖苷时的减少率的简单加和更显著地增加。因此判断,腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠或腺苷N-1氧化物和抗坏血酸2-葡萄糖苷的联用有对基质金属蛋白酶-1产生抑制作用的协同效果。另外,腺苷N1-氧化物5'-磷酸或腺苷N1-氧化物和抗坏血酸2-葡萄糖苷的摩尔比期望是5 μ M:200 μ M~10 μ M:200 μ M、即,1:40~1:20。结果表明,腺苷N1-氧化物5'-磷酸、其类似物或其盐与抗坏血酸2-葡萄糖苷配合的组合物协同地抑制基质金属蛋白酶-1的产生,从而作为抗皱纹剂有用。

[0165] 【实验10:光给腺苷N1-氧化物5'-磷酸及其类似物带来的影响】

[0166] 皮肤外用剂被推定在其使用时曝光,所以其中所含的有效成分不仅不示光毒性、优选对于光稳定。光毒性是指,施用化学物质或其混合物后,施用的物质在曝光时反应而对皮肤的细胞呈现障碍的现象。在本实验中,测定并比较腺苷N1-氧化物5'-磷酸和作为其类似物的腺苷N1-氧化物及5'-葡萄糖基腺苷N-1氧化物对光的稳定性。

[0167] 对于表13中记载的被验物质25mg,向各自加调整到各pH的McIlvain缓冲液而至50ml,向根据试验数分的透明玻璃螺旋管瓶(5ml)各自分注各2.0ml。在荧光灯下(约4000Lux,温度28 $^{\circ}$ C),将分注各被验物质的透明玻璃螺旋管瓶以横躺的状态设置。对于腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠,则在实验开始时和自起8周后,对于腺苷N1-氧化物及5'-葡萄糖基腺苷N-1氧化物,则在实验开始时和自起8周后的每2周,取出1条分注被验物质的透明玻璃螺旋管瓶,使用HPLC进行分析。实验进行3次,从对于实验开始时的HPLC层析谱中的被验物质的峰面积的面积比,基于下述计算式算出各被验物质的平均残留率。表13示腺苷N1-氧化物5'-磷酸及其类似物对光的稳定性。

[0168] 计算式:被验物质的残留率(%)=(被验物质的在各pH的一定时间经过后的平均峰面积/被验物质的在各pH的实验开始时的平均峰面积) \times 100

[0169] 【表13】

[0170]

被验物质	pH	残留率 (%)				
		开始时	2 周	4 周	6 周	8 周
腺苷 N1-氧化物 5'-磷酸钠	4~5	100.0	/	/	/	93.0
	6~7	100.0	/	/	/	88.8
	8~9	100.0	/	/	/	96.9
腺苷 N1-氧化物	4~5	100.0	68.8	47.2	25.2	24.6
	6~7	100.0	90.6	81.6	71.3	66.2
	8~9	100.0	83.7	77.2	68.2	63.1
5'- α -葡萄糖基腺苷 N1-氧化物	4~5	100.0	51.7	27.3	9.7	9.8
	6~7	100.0	79.1	57.7	40.8	34.3
	8~9	100.0	70.7	47.8	35.4	24.0

[0171] 从表13可知,腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠在实验开始8周后,在pH4~9的条件下残留率是约89~97%,对于光非常地稳定。一方面,腺苷N1-氧化物在实验开始8周后,在pH6~9的条件下,残留率是约63~66%,在pH4~5的条件下,残留率是约25%,对于光不稳定。另外,5'-葡萄糖基腺苷N-1氧化物在实验开始8周后,在pH6~9的条件下,残留率是约24~34%,在pH4~5的条件下,残留率是约10%,对于光非常地不稳定。

[0172] 由于在太阳光照射下被预测比在荧光灯照射下更快速地分解,显示腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠在各种的pH条件下,与其类似物比较对于光更稳定的上述结果显示腺苷N1-氧化物5'-磷酸作为皮肤外用剂的有效成分更有用。

[0173] 再者,根据作为用于评价化学物质或其混合物的安全性的国际上认可的试验方法的OECD测试指南的“TG432:体外3T3NRU光毒性试验”进行试验的结果,腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠、腺苷N1-氧化物、3'- α -葡萄糖基腺苷N1-氧化物及5'- α -葡萄糖基腺苷N1-氧化物上确认不到光毒性。因此,含有腺苷N1-氧化物5'-磷酸、其类似物及其盐的皮肤外用剂被认为安全。

[0174] 以下,举实施例进一步详细地说明本发明,但本发明的技术范围不应被解释为受这些实施例的任何限定。

[0175] 【实施例1:化妆水】

[0176] 【配合处方】

[0177]

配合成分	(质量%)
(1) 甘油	4.0
(2) 亚丙基二醇	3.0
(3) 1,2-戊烷二醇	0.1
(4) 腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠	1.0
(5) 聚氧乙烯(20摩尔)油醇	0.5

(6) 虎耳草提取物	2.0
(7) 乙醇	5.0
(8) 香料	适量
(9) 纯化水	余量

[0178] 将上述配合处方的成分(1)乃至(4)溶解于纯化水(9)后,缓慢地添加成分(5)乃至(8)的混合物而混合,由此调制化妆水。本品由于配合了腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠,是促进皮肤的更新的优良的化妆水,作为在皮肤的屏障功能的维持或亢进作用、弹性蛋白产生的维持或亢进作用、抗皱纹作用、抗细纹作用、抗松弛作用、抗色斑作用上也优良的抗老化用化妆水有用。另外,由于配合了1,2-戊烷二醇,所以是防腐效果及保湿性优良的化妆水。

[0179] 【实施例2:乳液】

[0180] 【配合处方】

[0181]

配合成分	(质量%)
(1) 1,2-己烷二醇	5.0
(2) 辛基十二醇	4.0
(3) 腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠	0.1
(4) 抗坏血酸2-葡萄糖苷(株式会社林原销售、商品名“AA2G”)	2.0
(5) 聚氧乙烯油基醚(20E.0.)	1.0
(6) 硬脂酸	0.5
(7) 乳油木果油	2.0
(8) 密蜡	4.0
(9) 对羟基安息香酸酯	0.2
(10) 榲桉种子提取物	5.0
(11) 黄原胶	0.1
(12) 植酸	0.02
(13) 维生素E	0.01
(14) 纯化水	余量

[0182] 将上述的成分(1)、(3)、(10)、(11)及纯化水(14)混合而作为水相。接下来,将成分(2)、(5)~(9)、(12)及(13)加热、混合而作为油相。向油相添加水相,均一地混合之后,冷却,加成分(4)而均质地混合而得到乳液。本品由于配合了腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠及抗坏血酸2-葡萄糖苷,所以是促进皮肤的更新的优良的乳液,作为在皮肤的屏障功能的维持或亢进作用、弹性蛋白产生的维持或亢进作用、抗皱纹作用、抗细纹作用、抗松弛作用、抗色斑作用上也优良的抗老化用乳液有用。

[0183] 【实施例3:化妆用乳液】

[0184] 【配合处方】

[0185]

配合成分	(质量%)
(1) 硬脂酸	2.5
(2) 鲸蜡醇	1.5

(3) 凡士林	5.0
(4) 流动石蜡	10.0
(5) 聚氧乙烯油酸酯	2.0
(6) 醋酸生长酚	0.5
(7) 甘草酸二钾	0.2
(8) 聚乙二醇(1500)	3.0
(9) 腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠	0.1
(10) 表没食子儿茶素没食子酸酯	0.5
(11) 1,2-己烷二醇	0.1
(12) 纯化水	余量

[0186] 根据上述处方,将配合成分根据常规方法混合之后,再者,加适量的香料而制造乳液。本品由于配合了腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠及表没食子儿茶素没食子酸酯,所以是促进皮肤的更新的优良的乳液,作为在皮肤的屏障功能的维持或亢进作用、弹性蛋白产生的维持或亢进作用、抗皱纹作用、抗细纹作用、抗松弛作用、抗色斑作用上也优良的抗老化用乳液有用。

[0187] 【实施例4:化妆用乳霜】

[0188] 【配合处方】

[0189]

配合成分	(质量%)
(1) 硬脂酸	5.0
(2) 鲸蜡基醇	5.0
(3) 角鲨烷	8.0
(4) 凡士林	3.0
(5) 甘油三2-乙基己酸酯	7.0
(6) 二亚丙基二醇	6.0
(7) 甘油	4.0
(8) 腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠	0.1
(9) 依地酸二钠	0.01
(10) 亚丙基二醇单硬脂酸酯	3.0
(11) 聚氧乙烯(20) 鲸蜡基醇醚	3.0
(12) 1,2-己烷二醇	0.2
(13) 香料	适量
(14) 纯化水	余量

[0190] 向纯化水(14)加成分(6)乃至(9),加温到60℃,调制水相。另行、将成分(1)乃至(5)、(10)乃至(13)混合,加温到70℃而调制油相,添加到先调制的水相。将其根据常规方法乳化而制造乳霜。本品由于配合了腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠,所以是促进皮肤的更新的优良的乳霜,由于配合了依地酸二钠(乙二胺四醋酸二钠),所以稳定。作为在皮肤的屏障功能的维持或亢进作用、弹性蛋白产生的维持或亢进作用、抗皱纹作用、抗细纹作用、抗松弛作用、抗色斑作用上也优良,无粘糊而使用感也良好的抗老化用化妆乳霜有用。

[0191] 【实施例5:美容液】

[0192] 【配合处方】

[0193]

配合成分	(质量%)
(1) 麦芽糖醇	7.5
(2) 抗坏血酸2-葡萄糖苷(株式会社林原销售、商品名“AA2G”)	2.0
(3) 1,2-链烷二醇	5.0
(4) 聚乙二醇1500	1.0
(5) 乙醇	5.0
(6) 羧基乙烯基聚合物	0.4
(7) 聚丙烯酸钠	0.1
(8) 聚氧乙烯油基醚(20E.0.)	1.5
(9) 橄榄油	0.2
(10) 腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠	0.1
(11) 氢氧化钾	适量
(12) 香料	适量
(13) 纯化水	余量

[0194] 根据上述处方,将配合成分根据常规方法混合,调制美容液。由于配合了腺苷N1-氧化物5'-磷酸钠,所以本品是促进皮肤的更新的优良的美容液,作为在皮肤的屏障功能的维持或亢进作用、弹性蛋白产生的维持或亢进作用、抗皱纹作用、抗细纹作用、抗松弛作用、抗色斑作用上也优良,涂布到皮肤上也无粘腻感,使用感优良的抗老化用美容液有用。

[0195] 【工业实用性】

[0196] 如以上说明,由本发明的抗老化用皮肤外用剂可改善皮肤的更新,维持或亢进皮肤的屏障功能,增强皮肤中的纤丝聚集蛋白的表达,维持或亢进皮肤中的弹性蛋白的产生,抑制皮肤中的基质金属蛋白酶-1的产生,或者抑制皮肤中的内皮缩血管肽-1的产生,所以可有效预防或改善伴随年龄的增加的皮肤的皱纹、细纹、松弛,色斑等。本发明是对本领域有巨大贡献的有意义的发明。