

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-520166

(P2014-520166A)

(43) 公表日 平成26年8月21日(2014.8.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 8/60 (2006.01)	A 6 1 K 8/60	4 B 0 1 8
A 6 1 K 8/63 (2006.01)	A 6 1 K 8/63	4 C 0 8 3
A 6 1 Q 19/02 (2006.01)	A 6 1 Q 19/02	
A 2 3 L 1/30 (2006.01)	A 2 3 L 1/30	B

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2014-522735 (P2014-522735)
 (86) (22) 出願日 平成24年6月29日 (2012. 6. 29)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年11月8日 (2013. 11. 8)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2012/005211
 (87) 国際公開番号 W02014/003224
 (87) 国際公開日 平成26年1月3日 (2014. 1. 3)

(71) 出願人 513282342
 バイオスペクトラム アイエヌシー
 Bio Spectrum, Inc.
 大韓民国 462-806 ギョンギド
 ソンナムシ ユンウォング ダンジョンデ
 ロ519 11フロアー 1101ホ (サ
 ンデウォンドン ジョンアイエルアイネス
 プラッツ 3チャ)
 (3cha, Joong Il Eine
 s Platz, Sangdaewon
 -dong) 1101ho, 11th
 floor, 519, Dunchonde
 a-ro, Jungwon-gu, Seo
 ngnam-si, Gyeonggi-d
 o, 462-806 Republic
 最終頁に続く

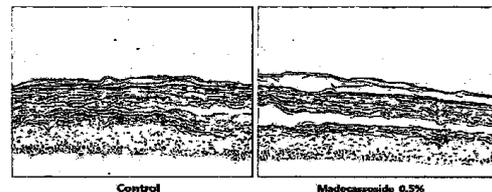
(54) 【発明の名称】 マデカソシドを含有する肌美白用組成物

(57) 【要約】

【課題】 肌美白用組成物の提供。

【解決手段】 本発明に係る肌美白用組成物は、マデカソシド(Madecassoside)を有効成分として含むことを特徴とする。マデカソシドを含む組成物は、肌への副作用なしに安全に用いることができるだけでなく、紫外線によって角質形成細胞で生成される肌の黒化サイトカインを抑制し、メラニン細胞そのもののメラニン生成を抑制して色素沈着阻害効果に優れているので、これらを有効成分として含有する組成物は、紫外線による肌色素沈着やしみ、そばかすなどの改善及び肌美白に非常に効果的である。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

マデカソシドを有効成分として含む肌美白用組成物。

【請求項 2】

前記マデカソシドは、肌のメラニン細胞のメラニン生成を抑制し、かつ、肌の角質形成細胞から分泌される肌の黒化サイトカイン P G E 2 を抑制することを特徴とする請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記マデカソシドが、全体組成物の重量を基準として 0 . 0 0 0 1 ~ 1 5 重量 % の含量にて含まれることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の組成物。

10

【請求項 4】

前記組成物は、肌美白を目的とする化粧品、薬剤または食品として用いられることを特徴とする請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記組成物が化粧品である場合に、溶液、懸濁液、乳濁液、ペースト、ゲル、クリーム、ローション、パウダー、石鹸、界面活性剤含有メイク落とし、オイル、粉末ファンデーション、乳濁液ファンデーション、ワックスファンデーション及びスプレーよりなる群から選ばれる剤形を有することを特徴とする請求項 4 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】**

20

【0001】

本発明は、マデカソシドを含有する肌美白用化粧品及び薬学的組成物に係り、さらに詳しくは、製品安定性に優れており、肌への副作用なしに安全に用いることができ、メラニン生成を抑制して色素沈着阻害効果に優れた肌美白用組成物に関する。

【背景技術】**【0002】**

人間の肌色は、肌内部のメラニン (m e l a n i n) 濃度と分布によって決定されるが、遺伝的な要因の他にも、太陽紫外線や疲労、ストレスなどの環境的または生理条件によっても影響を受ける。人体肌のメラニン細胞で生成されるメラニン色素は、黒い色素とタンパク質の複合形態を有するフェノール系高分子物質であり、紫外線により発生する肌損傷を遮断する重要な役割を果たしている。メラニン生合成には、メラニン細胞に存在するチロシナーゼの作用が最も重要であることが報告されている。チロシナーゼ (t y r o s i n a s e) は、アミノ酸の一種であるチロシン (t y r o s i n e) をメラニン重合体生成の中間産物であるドーパ (D O P A) 、ドパキノン (d o p a q u i n o n e) に転換することにより、肌の黒化の過程に核心的な役割を果たす。しかしながら、メラニンが産生される経路は知られているが、チロシナーゼが作用する以前段階であるメラニン合成を誘導するメカニズム (m e c h a n i s m) が何であるかについては未だに判明されていない (例えば、下記の特許文献 1 参照)。

30

【0003】

一方、これまで開発されている種々の美白物質がメラニン合成に核心的な役割を果たすチロシナーゼ抑制と後続する一連のメラニン合成経路を抑制して美白効果を発揮した。しかしながら、最近、美白剤の開発は、メラニン細胞そのもののメラニン生成を抑制できるだけでなく、メラニン細胞と隣り合っていて紫外線によってメラニン生成促進因子を分泌する角質形成細胞 (ケラチノサイト) の作用を抑制することにより美白効果を出す方向に研究されている (例えば、下記の特許文献 2 参照)。

40

【0004】

角質形成細胞とメラニン細胞との間の相互作用には種々のサイトカインが関与している。特に、これらの中でも、P G E 2 は、角質細胞から分泌されてメラニン細胞の c A M P 生成増加を通じてメラニン色素を促すのに重要な役割を果たすことが報告されている。かような P G E 2 を抑制可能な物質もまた、紫外線による肌色素沈着の防御に効果的な美白

50

剤として働くことができる。

【0005】

このようなメラニンの合成が肌内で過度に起こると、肌のトーンを暗くし、しみ、そばかすなどを発生したりもする。このため、肌内のメラニン色素の合成を阻害すれば、肌トーンを明るくして肌美白を実現することができるだけでなく、紫外線、ホルモン及び遺伝的な原因に起因して発生するしみ、そばかすなどの皮膚過色素沈着症を改善することができる。

【0006】

一方、従来には、ヒドロキノン(hydroquinone)やアスコルビン酸(ascorbic acid)、コウジ酸(kojic acid)、グルタチオン(glutathione)などのチロシナーゼに対して阻害活性を有する物質を用いて肌美白や皮膚過色素沈着症を改善していた。しかしながら、ヒドロキノンは、所定の美白効果を発揮するものの、肌への刺激が激しいため配合量を極少量に制限せねばならないという問題点があり、アスコルビン酸は酸化し易いためこれを配合した化粧品は変色、変臭されるなどの問題が発生し、コウジ酸は溶液内において不安全であるため化粧品の製造工程が複雑になってしまうという欠点がある。なお、グルタチオン、システインなどのチオール系化合物は特有の不快感を有するだけでなく、経皮吸収にも問題点があり、これらの配当体及び誘導体も極性が高いため化粧品の配合成分として用いることが困難である。加えて、ビタミンCの場合に水溶液状態で容易に酸化されて持続的な効果を出すことができないという問題点がある。この理由から、最近には、天然生薬抽出物を含む肌美白用組成物が開発されているが、ほとんどが色を有しているため配合上の問題点があり、有効成分が同定されていないため製品の製造に当たって同じ効果を期待することができないという問題点がある。

【0007】

そこで、本発明者らは、上記の問題点を解消するために、美白効果に優れており、安定性が高く、しかも、肌への副作用がない単一物質を開発するために鋭意努力したところ、本発明を完成するに至った。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Korean J. Medicinal Crop Sci. 18 (2) : 79, 85, 2010

【非特許文献2】Exp Dermatol. 2008 Nov; 17 (11) : 946-52

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の目的は、肌のメラニン細胞で生成されるメラニンの生成を抑制するだけでなく、肌の角質形成細胞から分泌される肌の黒化サイトカインPGE2を抑制して美白効果を示すマデカソシドを含む肌美白用組成物を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

上記の目的を達成するために、本発明の一態様によれば、本発明は、マデカソシドを含む肌美白用組成物を提供する。

【0011】

本発明の他の態様によれば、本発明は、前記マデカソシドを含む肌美白用組成物であって、化粧品組成物、薬剤学的組成物または食品組成物を提供する。

【0012】

本発明のさらに他の態様によれば、本発明は、前記肌美白用組成物を皮膚学的に許容可能な範囲で個体に投与して個体の肌を美白化させる方法を提供する。

10

20

30

40

50

【発明の効果】

【0013】

本発明によれば、マデカソシドは、角質形成細胞から分泌される肌の黒化サイトカインを抑制するだけでなく、メラニン細胞におけるメラニンの生成を抑制するので、肌美白効果を有する。また、人体安全性試験においていかなる毒性や刺激も発生しないので、人体に使用可能な安全な物質であることが判明された。したがって、本発明のマデカソシドは、肌美白のための化粧品、医薬または食品などに有効に使用可能である。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】肌の角質形成細胞とメラニン細胞を共同で培養するシステムを示す図である。

10

【図2】紫外線を照射した人工肌にマデカソシド0.5%を処理した後の人工肌のメラニン分布を対照群と比較した図である。

【発明を実施するための形態】

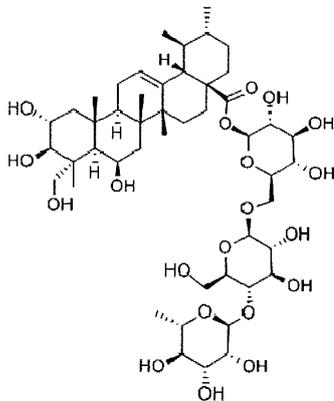
【0015】

本発明に係る組成物に有効成分として含まれるマデカソシド(Madecassoside)は、主としてツボクサ(*Centella asiatica*)に存在するトリテルペノイド(triterpenoid)系の物質であり、ケロイドの生成を低減させて傷治療を改善するものであると知られており、下記の化学式1の構造を有する。

【0016】

【化1】

20



30

【0017】

前記マデカソシドは、自然源(natural source)であって、ツボクサ(*Centella asiatica*(L.))などから抽出することができる。例えば、マデカソシドは、上記の自然源から当業界に公知の種々の抽出方法を用いて得ることができ、好ましくは、(a)水、(b)炭素数1~4の無水または含水低級アルコール(メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノールなど)、(c)前記低級アルコールと水との混合溶媒、(d)アセトン、(e)エチルアセテート、(f)クロロホルム、(g)1,3-ブチレングリコールまたはこれらの混合物を抽出溶媒として得ることができる。より好ましくは、メタノール及びエタノール水溶液を用いて抽出することができ、最も好ましくは、ブタノール水溶液を用いて抽出することができる。

40

【0018】

一方、本発明のマデカソシドは、上記の抽出溶媒だけではなく、他の抽出溶媒を用いても実質的に同じ効果を示す抽出物が得られるということは当業者にとって自明である。抽出溶媒の他に求められる具体的な抽出条件(温度、時間など)は、前記抽出溶媒の性質に応じて当業者が自明に選択及び調節することができる。

【0019】

また、本発明の抽出物は、上述の抽出溶媒による抽出物だけではなく、通常の前製過程を経た抽出物をも含む。例えば、所定の分子量カットオフ値を有する限外ろ過膜を用いた

50

分離、種々のクロマトグラフィ（大きさ、電荷、疎水性または親和性による分離のために製作されたもの）による分離など、さらに行われた種々の精製方法によって得られた分画も本発明の抽出物に含まれる。なお、本発明において用いられるマデカソシドは、化学的に合成して製造してもよく、商業的に製造された商品（例えば、クロマデックス社製のマデカソシド）であってもよい。

【0020】

本発明のマデカソシドは、既存の美白化粧品の原料として用いられているビタミンC（*vitamin C*）と比較して、美白物質スクリーニングに汎用される細胞内チロシナーゼ活性及びメラニン生成抑制効率が約50%以上優れている。また、本発明のマデカソシドは、肌の角質形成細胞から分泌される肌の黒化関係のサイトカインであるPGE2の生成を抑制する効果を有する。このため、本発明のマデカソシドは、肌のメラニン細胞及び角質形成細胞の両方に働いて細胞内メラニン生成を抑制し、肌の色素沈着を阻害する効果を有する。

10

【0021】

他方、本発明の上記化学式1のマデカソシドは、当業界において通常行われる置換基の付加または置換反応によって得られる誘導体のうち、肌の黒化誘導物質の抑制による肌美白効果を示す誘導体を含むということは、当業界の技術レベルを考慮して当業者に自明である。

【0022】

本発明の肌美白用組成物において、前記マデカソシドは、全体組成物の重量を基準として0.0001~15重量%の含量にて含まれる。前記マデカソシドの含量が0.0001重量%未満である場合には美白効果があまり得られず、前記マデカソシドの含量が15重量%を超える場合には含量の増大による効果の増加があまり見られず、剤形上の安定性が確保されないという問題点がある。より好ましくは、マデカソシドは、全体組成物に対して0.001~10重量%含まれる。

20

【0023】

ある好適な実現例として、本発明の肌美白用組成物は、肌美白を目的とする化粧料組成物として使用可能である。

【0024】

本発明の化粧料組成物は、有効成分としてのマデカソシドに加えて、化粧料組成物に汎用される成分を含み、例えば、抗酸化剤、安定化剤、溶解化剤、ビタミン、顔料及び香料などの通常の補助剤及び/または担体を含む。なお、前記化粧料組成物は、肌美白効果を増進するために皮膚吸収促進物質をさらに含んでもよい。

30

【0025】

本発明の化粧料組成物は、当業界において通常製造されるいかなる剤形にも製造可能であり、例えば、溶液、懸濁液、乳濁液、ペースト、ゲル、クリーム、ローション、パウダー、石鹸、界面活性剤-含有メイクアップ落とし、オイル、粉末ファンデーション、乳濁液ファンデーション、ワックスファンデーション及びスプレーなどに剤形化可能であるが、これらに限定されるものではない。より詳しくは、柔軟化粧水、栄養化粧水、栄養クリーム、マッサージクリーム、エッセンス、アイクリーム、クレンジングクリーム、クレンジングフォーム、クレンジングウォーター、パック、スプレーまたはパウダーの剤形に製造可能である。

40

【0026】

本発明の剤形がペースト、クリームまたはゲルである場合には、担体成分として、動物性油、植物性油、ワックス、パラフィン、澱粉、トラガント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコン、ベントナイト、シリカ、タルクまたは酸化亜鉛などが使用可能である。

【0027】

本発明の剤形がパウダーまたはスプレーである場合には、担体成分として、ラクトース、タルク、シリカ、アルミニウムヒドロキシド、カルシウムシリケートまたはポリアミド

50

パウダーが使用可能であり、特に、本発明の剤形がスプレーである場合には、さらにクロロフルオロヒドロカーボン、プロパン、ブタンまたはジメチルエーテルなどの推進剤を含んでいてもよい。

【0028】

本発明の剤形が溶液または乳濁液である場合には、担体成分として、溶媒、溶解化剤または乳濁化剤が用いられ、例えば、水、エタノール、イソプロパノール、エチルカーボネート、エチルアセテート、ベンジルアルコール、ベンジルベンゾエート、プロピレングリコール、1,3-ブチルグリコールオイル、グリセロール脂肪酸エステル、ポリエチレングリコールまたはソルビタンの脂肪酸エステルがある。

【0029】

本発明の剤形が懸濁液である場合には、担体成分として、水、エタノールまたはプロピレングリコールなどの液状の希釈剤、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトールエステル及びポリオキシエチレンソルビタンエステルなどの懸濁剤、微小結晶性セルロース、アルミニウムメタヒドロキシド、ベントナイト、アガーまたはトラガントなどが使用可能である。

【0030】

本発明の剤形が界面活性剤含有メーク落としである場合には、担体成分として、脂肪酸アルコールサルフェート、脂肪酸アルコールエーテルサルフェート、スルホコハク酸モノエステル、イセチオネート、イミダゾリニウム誘導体、メチルタウレート、サルコシネート、脂肪酸アミドエーテルサルフェート、アルキルアミドベタイン、脂肪酸アルコール、脂肪酸グリセリド、脂肪酸ジエタノールアミド、植物性油、ラノリン誘導体またはエトキシ化グリセロール脂肪酸エステルなどが使用可能である。

【0031】

本発明の化粧品組成物において、マデカソシドは、全体組成物に対して0.0001~15重量%、好ましくは、0.001~10重量%の含量にて含まれる。

【0032】

他の好適な実現例として、本発明の肌美白用組成物は、肌美白を目的とする薬剤学的組成物として使用可能である。

【0033】

本発明の薬剤学的組成物において、マデカソシドは、全体組成物に対して0.0001~15重量%、好ましくは、0.001~10重量%の含量にて含まれる。

【0034】

本発明の薬剤学的組成物は、薬剤学的組成物の製造に通常用いられる適切な担体、賦形剤及び希釈剤をさらに含んでいてもよい。

【0035】

本発明の薬剤学的組成物は、通常の方法に従い、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、懸濁液、エマルジョン、シロップ、エアロゾルなどの経口型剤形、軟膏、クリームなどの外用剤、座剤及び滅菌注射溶液などをはじめとして薬剤学的製剤に適したいかなる形にも剤形化して用いることができる。

【0036】

本発明に係る薬剤学的組成物は、マウス、ラット、家畜、人間などの哺乳動物に非経口、経口などの種々の経路にて投与可能である。例えば、経口、直腸または静脈、筋肉、皮下、子宮内硬膜または脳血管内(intracerebroventricular)注射によって投与可能である。このとき、非経口経路としては、経皮投与が好ましく、中でも、局所塗布が最も好ましい。

【0037】

前記製剤の投与量は、対象者の年齢、性別、体重、症状、投与方法によるが、外用剤の場合には1日当たりに1.0~3.0mlを1日につき1~5回塗布することを一ヶ月以上続けることが好ましい。なお、経口型剤形の場合にも患者の年齢、性別、体重によるが、0.1~100mg/kgを1日につき1回~数回投与してもよい。但し、これらの投

10

20

30

40

50

与量は、投与経路、疾病の軽重、性別、体重、年齢などに応じて増減可能である。このため、前記投与量は、いかなる面からみても本発明の範囲を限定するものではない。

【0038】

さらに他の好適な実現例として、本発明の肌美白用組成物は、肌美白を目的とする機能性食品組成物として使用可能である。

【0039】

本発明の食品組成物は、有効成分として、マデカソシドだけではなく、食品の製造に当たって通常的に添加される成分を含み、例えば、タンパク質、炭水化物、脂肪、栄養素、調味剤及び香味剤を含む。上述の炭水化物の例としては、モノサッカライド、例えば、ブドウ糖、果糖など；ジサッカライド、例えば、マルトース、スクロース、オリゴ糖など；及びポリサッカライド、例えば、デキストリン、シクロデキストリンなどの通常の糖及びキシリトール、ソルビトール、エリスリトールなどの糖アルコールが挙げられる。香味剤としては、天然香味剤（タウマチン、ステビア抽出物（例えば、レバウジオシドA、グリシリジンなど）及び合成香味剤（サッカリン、アスパルテムなど）が使用可能である。

10

【0040】

例えば、本発明の食品組成物がドリンク剤として製造される場合には、本発明のマデカソシドに加えて、クエン酸、液状果糖、砂糖、ブドウ糖、酢酸、りんご酸、果汁、トチュウ抽出液、なつめ抽出液、甘草抽出液などをさらに含めることができる。

【0041】

本発明の具体的な実施例において、マデカソシドに対する皮膚累積刺激試験を行ったところ、マデカソシドは天然物質であり、人体に無害な物質であることが判明された。このため、本発明のマデカソシドは、毒性及び副作用がほとんどないので長期に亘って安心して用いることができ、特に、上記の化粧品組成物、薬剤学的組成物及び食品組成物に安全に適用可能である。

20

【0042】

一方、本発明は、さらに、マデカソシドを含む肌美白用組成物を皮膚学的に許容可能な範囲で個体に投与して個体の肌を美白化させる方法を提供する。

【0043】

本発明において、「個体」とは、肌の黒化または紫外線、ホルモンまたは遺伝的な原因によって発生する皮膚過色素沈着を改善または予防しようとする人間をはじめとする哺乳動物、例えば、犬、豚、馬、牛などを意味する。

30

【0044】

本発明において、「投与」とは、ある適切な方法により個体に所定の物質を導入することを意味し、本発明の組成物の投与経路は、目的とする組織に達しうる限り、ある一般的な経路を介して経口または非経口投与可能である。なお、本発明の組成物は、活性物質が標的対象、例えば、細胞に移動可能な任意の装置によって投与可能である。

【0045】

上述の個体の肌の黒化または皮膚過色素沈着症が、本発明の前記方法による肌美白用組成物の個体内への投与によって改善、好転、予防または治療可能であるということは、上述の内容及び後述する実施例などを通じて当業界の通常の知識を有する者によって理解可能であるということはいうまでもない。

40

【0046】

以下、実施例を挙げて本発明を詳述する。これらの実施例は単に本発明をより具体的に説明するためのものであり、本発明の範囲がこれらの実施例によって制限されないということは本発明が属する技術分野において通常の知識を有する者にとって自明である。

【0047】

実施例1：マデカソシドによるB16メラノーマ細胞のメラニン生成抑制効果の測定

ラットの色素細胞（B16 melanoma cells）を用いてマデカソシド（シグマ社製）によるメラニン生成抑制効果を測定し、これをメラニンの生成を抑制すると知られているビタミンCによるメラニン生成抑制効果と比較した。

50

【0048】

具体的に、ミューリンメラノーマ (B-16 F10) 細胞を10%のウシ胎児血清 (FBS: fetal bovine serum) 入りダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) で6ウェルプレートに1ウェル当たり 1×10^5 個を接種した後、5%CO₂及び37℃の条件下で細胞がウェルの底面に約80%以上付着するまで培養した。培養後に培地を除去し、試料を適当な濃度に希釈された培地に処理し、5%CO₂、37℃の条件下で3日間培養した。マデカソシドの濃度範囲は、細胞毒性のない1μM、10μM、50μMにした。培地を除去した細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS: Phosphate buffered saline) で洗浄し、これをトリプシンで処理して細胞を回収した。回収された細胞は、血球計算器を用いて細胞数を測定した後、各処理群別の細胞数を同数にして2mLチューブに分注した後、5,000~10,000rpmにて10分間遠心分離し、上澄み液を除去してペレットを得た。この細胞ペレットを60℃で乾燥した後、10%ジメチルスルホキシド (DMSO) 入り1M水酸化ナトリウム液100μLを入れて60℃恒温槽において細胞内メラニンを得た。この液をもって、マイクロプレートリーダーで490nmにおける吸光度を測定して所定数の細胞当たりのメラニン量を求めた。その結果を下記表1に示す。

10

【0049】

【表1】

試料	処理濃度 (μM)	メラニン生成抑制率 (%)
ビタミンC	1	0
ビタミンC	5	0
ビタミンC	10	2
マデカソシド	1	5
マデカソシド	5	55
マデカソシド	10	65

20

30

【0050】

前記表1から明らかなように、同じ処理濃度で、マデカソシドがビタミンCよりも優れたメラニン生成抑制率を示した。

【0051】

実施例2: マデカソシドによる人体メラニン細胞のメラニン生成抑制効果の測定

人体メラニン細胞 (melanocyte) を用いてマデカソシドによるメラニン生成抑制効果を測定し、これをメラニン生成を抑制すると知られているビタミンCによる細胞内チロシナーゼ活性抑制効果と比較した。

【0052】

具体的に、カスケード・バイオロジックス社から購入したヒト表皮メラノサイト (新生児由来) 細胞を同社から購入したヒトメラノサイト成長サプリメントを含むミディアム254培地で培養した。すなわち、ヒト表皮メラノサイトを6ウェルプレートに1ウェル当たり 1×10^5 個接種した後、5%CO₂、37℃の条件下で細胞がウェルの底面に約80%以上付着するまで培養した。培養後に培地を除去し、試料を適当な濃度に希釈して培地に処理した後、5%CO₂、37℃の条件下で二日置きに一回ずつ培地を交換しながら5日間培養した。マデカソシドの濃度範囲は、細胞毒性のない1μM、5μM、10μMにした。処理が終わった後に培地を除去し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS: Phosphate buffered saline) で洗浄した後、これをトリプシンで処理して細胞を回収した。回収された細胞は、血球計算器を用いて細胞数を測定した後、各処理群別の細胞数を同数にして2mLチューブに分注した後、5,000~10,000rpm

40

50

pmにて10分間遠心分離し、上澄み液を除去してペレットを得た。この細胞ペレットを60℃で乾燥した後、10%ジメチルスルホキシド(DMSO)入り1M水酸化ナトリウム液100 μ lを入れて60℃恒温槽において細胞内メラニンを得た。この液をもって、マイクロプレートリーダーで490nmにおける吸光度を測定して所定数の細胞当たりのメラニン量を求めた。その結果を下記表2に示す。

【0053】

【表2】

試料	処理濃度 (μ M)	メラニン生成抑制率(%)
ビタミンC	1	0
ビタミンC	5	2
ビタミンC	10	6
マデカソシド	1	19
マデカソシド	5	28
マデカソシド	10	51

10

【0054】

前記表2から明らかなように、同じ処理濃度で、マデカソシドがビタミンCよりも優れたメラニン生成抑制率を示した。

20

【0055】

実施例3：紫外線によって誘導された角質形成細胞のPGE₂生成抑制効果の測定

人体角質形成細胞を用いてマデカソシドによるメラニン誘導サイトカインであるPGE₂抑制効果を測定した。

【0056】

具体的に、カスケード・バイオロジックス社から購入したヒト表皮メラノサイト(新生児由来)細胞を同社から購入したヒトメラノサイト成長サプリメントを含むミディアム254培地で培養した。すなわち、ヒト表皮メラノサイトを6ウェルプレートに1ウェル当たり1 \times 10⁵個接種した後、5%CO₂、37℃の条件下で細胞がウェルの底面に約80%以上付着するまで培養した。培養後に培地を除去し、試料を適当な濃度に希釈して培地に処理した後、5%CO₂、37℃の条件下で24時間前処理した後に、さらにリン酸緩衝生理食塩水(PBS: Phosphate buffered saline)に交換した後に、人工紫外線(UVB 20mJ)を照射した。紫外線の照射が終わった後にリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を除去し、マデカソシドが濃度別に処理された角質形成細胞培養液に交換し、さらに24時間培養した。細胞培養液を集めて培養液内の分泌PGE₂を商業的に販売されるPGE₂エリサキット(R&D)を用いて測定した。その結果を下記表3に示す。

30

【0057】

40

【表 3】

試料		処理濃度 (μM)	PGE 2 (ng/mL)
紫外線非照射群	無処理群	—	19
紫外線照射群	無処理群	—	54
	マデカソシド	10	55
	マデカソシド	50	45
	マデカソシド	100	39

10

【0058】

前記表 3 から明らかなように、紫外線の照射によって増大された PGE 2 の生成がマデカソシドによって処理濃度に依存的に減少することを確認することができた。

【0059】

実施例 4：角質形成細胞 - メラニン細胞共同培養システムで紫外線によって誘導されたメラニン生成抑制効果の測定

20

図 1 に示す角質形成細胞とメラニン細胞共同培養システムを用いて、マデカソシドによるメラニン生成抑制効果を測定した。具体的に、メラニン細胞を 12 ウェルに接種し、角質形成細胞はミリセル (MilliCell) に接種した。ミリセルに接種された角質細胞の付着を確認した後、マデカソシドを濃度別に処理した。1 日が経過した後に、培養液を除去し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に交換した後に UVB を照射した。その後、マデカソシドが濃度別に処理された培養液にさらに交換した後に、ミリセルをメラニン細胞が接種されている 12 ウェルに載せた。このような共同培養システムにおいては、ミリセルのフィルタ膜を介して培養液が互いに移動して、培養液内の物質による相互変化を観察することができる。

【0060】

30

処理が終わった後に培地を除去し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄した後、これをトリプシンで処理して細胞を回収した。回収された細胞は、血球計算器を用いて細胞数を測定した後、各処理群別の細胞数を同数にして 2 mL チューブに分注した後、5,000 ~ 10,000 rpm にて 10 分間遠心分離し、上澄み液を除去してペレットを得た。この細胞ペレットを 60 で乾燥した後、10%ジメチルスルホキシド (DMSO) 入り 1 M 水酸化ナトリウム液 100 μl を入れて 60 恒温槽において細胞内メラニンを得た。この液をもって、マイクロプレートリーダーで 490 nm における吸光度を測定して所定数の細胞当たりのメラニン量を求めた。その結果を下記表 4 に示す。

【0061】

40

【表 4】

試料	処理濃度 (μ M)	メラニン生成抑制率 (%)
マデカソシド	10	19
マデカソシド	50	28
マデカソシド	100	51

10

【0062】

前記表 4 から明らかなように、マデカソシドが濃度依存的にメラニン生成を抑制することが分かる。

【0063】

実施例 5：人工肌における美白効果の測定

人工肌は MEL-300-B (米国マテック社製) を購入して用い、試料は下記表 5 の含量にて含まれている人工肌培養液である EPI-100-LLMM (米国マテック社製) を 3 日置きに一回ずつ交換しながら 2 週間処理した。紫外線は、試料交換前に UVB 50 mJ の条件で照射した。処理が終わった組織は 10%ホルムアルデヒドに固定した後、さらにパラフィンで包埋した後に薄切して、メラニンの特異的に染色可能なフォントナ・マッソン (Fontana-Masson) 染色を行った。次いで、イメージ・プロ・プラスプログラム (メディア・サイバーネティクス社、米国) を用いて、所定の面積当たりのメラニン量を換算した。その結果を下記表 5 及び図 2 に示す。

20

【0064】

【表 5】

試験項目	対照群	コウジ酸 (0.5%)	マデカソシド 0.1%	マデカソシド 0.5%
メラニン濃度	4.9	3.8	4.3	3.7

30

【0065】

前記表 5 から明らかなように、マデカソシド処理群でメラニン分布が濃度依存的に減少していることが分かる。

【0066】

実施例 6：経口投与による美白効果

紫外線を照射する場合に人為的に肌の黒化過程を促すことができるため、動物試験に際して紫外線を照射した後、試験物質を経口や経皮で投与してその効果を測定することにより、その物質が実際に美白効果を有しているか否かを確認することができる。

40

【0067】

このため、本実施例においては、人間と同様に紫外線によって色素沈着が生じると知られている褐色モルモット (Tortoiseshell guinea pigs; Brown guinea pigs) を用いて、マデカソシドによる美白効果を測定した。6-7 週齢のギニー・ピッグを 1 群あたりに 8 匹ずつ正常群、UV 対照群、UV/マデカソシド投与群に分けて実験期間中に飼育した。正常群と UV 対照群には 0.5 ml の生理食塩水を経口投与し、UV/マデカソシド投与群には固形分を基準として体重 1 Kg あたりに 100 mg のマデカソシドを 0.5 ml 食塩水に混ぜて液体投与用注射器を用いて経口投与した。

50

【0068】

投与期間は合計で4週であり、1週当たりに5日間同じ時間に投与した。経口投与後に2週が経過した時点で、UV対照群、UV/マデカソシド投与群にSEランプ（波長290-320nm、東芝社製）でUVを照射した（合計の照射エネルギー量 = 1350mJ/cm²）。紫外線を照射してから2日または3日後に色素沈着が現れ、約2週後に肌色の変化を測定した。

【0069】

色差計（ミノルタCR2002色彩色差計）を用いて、肌の黒白の度合いを測定して効果を判定し、その結果を下記表6に示す。色の表示はL* A* B*表色系を用い、本実施例においてはL*値を目安とした。L*値は標準白板で校正し、L*値は1個所に5回以上繰り返し測定し、色素沈着を均等にした。

10

【0070】

【表6】

試料	美白効果 (L*)
UV対照群	0.52 ± 0.09
UV/マデカソシド	0.85 ± 0.08

20

【0071】

前記表6に示すように、マデカソシドを投与した群は、マデカソシドを投与しなかったUV/対照群に比べて、高い美白効果（L値が大きいほど肌色が明るい）が現れることを観察することができた。

【0072】

実施例7：マデカソシドの人体肌への安全性確認試験

7-1. マデカソシドを含む皮膚外用剤の製造

前記実施例によって美白効果に優れていると判明されたマデカソシドが人体肌にも安全であるか否かを確認するために、マデカソシド及びビタミンCをそれぞれ含有する皮膚外用剤を製造し、これによる皮膚安全性検証実験を行った。

30

【0073】

マデカソシドとビタミンCをそれぞれ含有する皮膚外用剤は、下記表7の成分含量にて製造した。下記表7において、対照群はチロシナーゼ阻害剤を含んでいない皮膚外用剤であり、それぞれ試験群1及び試験群2は、マデカソシドとビタミンCをそれぞれ含む皮膚外用剤である。

【0074】

皮膚外用剤の製造のために、精製水、グリセリン、ブチレングリコールを混合し、70で溶解し（水相部）、前記3成分とトリメタノールアミンを除く残りの成分を70で溶解した（油相部）。前記油相部を水相部に添加し、ホモキサー（日本特殊機化工業（株）社製）で攪拌して1次的に乳化させ、ここにトリメタノールアミンを最終的に添加した。混合液に生成された気泡を除去した後、室温まで冷却させて皮膚外用剤を製造した。

40

【0075】

【表 7】

成分	含量 (%)		
	対照群	試験群 1	試験群 2
精製水	72	72	72
グリセリン	8.0	8.0	8.0
ブチレングリコール	4.0	4.0	4.0
マデカソシド	0	1.0	0
ビタミンC	0	0	1.0
カプリリックカプリック トリグリセリド	8.0	8.0	8.0
スクワラン	5.0	5.0	5.0
セテアリールグルコシド	1.5	1.5	1.5
ソルビタンステアレート	0.4	0.4	0.4
セテアリールアルコール	1.0	1.0	1.0
トリメタノールアミン	0.1	0.1	0.1
総重量	100	100	100

10

20

【0076】

30

7-2. 皮膚累積刺激試験

前記実施例 7-1 に従い製造した各皮膚外用剤を用いて、健常な 30 名の成人を対象として上腕部に 1 日おきに合計 9 回の 24 時間の累積貼付を行うことによりマデカソシドが肌に刺激を与えるか否かを測定した。

【0077】

貼付は、フィンチャンパー（エピテスト（Epitest Ltd.）社製、フィンランド国）を用いて行った。チャンパに前記各皮膚外用剤を 15 μl ずつ滴下した後に貼付を行った。毎回肌に現れた反応の度合いを下記の実験式 1 を用いて点数化し、その結果を下記表 8 に示す。

【0078】

[実験式 1]

平均反応度 = [[反応指数 × 反応度 / 総被検者数 × 最高点数 (4 点)] × 100] ÷ 検査回数 (9 回)

40

【0079】

このとき、反応度において、± は 1 点、+ は 2 点、++ は 4 点の点数を与え、平均反応度が 3 未満であるときに安全な組成物であると判定した。

【0080】

【表 8】

試験物質	反応が現れた被検者数									平均 反応度
	1 週目			2 週目			3 週目			
	1 次	2 次	3 次	4 次	5 次	6 次	7 次	8 次	9 次	
	±/+/++	±/+/++	±/+/++	±/+/++	±/+/++	±/+/++	±/+/++	±/+/++	±/+/++	
対照群	1/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	0.09
試験群 1	1/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	0.09
試験群 2	1/-/-	1/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	-/-/-	0.13
被検者数	30	30	30	30	30	30	30	30	30	

10

【0081】

前記表 8 において、試験群 1 の場合に、±、+、++ に相当する人の数がそれぞれ 1 名、0 名、0 名であり、残り的人には反応が現れなかった。前記式によって計算すれば、 $[(1 \times 2) / (20 \times 4)] \times 100 / 9 = 0.13$ であり、平均反応度が 3 以下である 0.37 となって安全な組成物であると認められた。したがって、マデカソシド（試験群 1）を含む皮膚外用剤は、対照群やビタミン C を含む皮膚外用剤のようにはっきりとした累積刺激様相を示さず、人体肌に安全な物質であると認められた。

【0082】

下記に本発明の組成物のための製剤例を示す。

20

【0083】

製剤例 1：化粧品製剤

1. 柔軟化粧水	(含量：重量%)
マデカソシド	0.01
グリセリン	3.0
ブチレングリコール	2.0
プロピレングリコール	2.0
カルボキシビニールポリマー	0.1
エタノール	10.0
トリエタノールアミン	0.1
防腐剤、微量色素、微量香料、微量精製水	残部
合計	100.0

30

【0084】

2. 栄養化粧水	(含量：重量%)
マデカソシド	0.01
ミツロウ	4.0
ポリソルベート 60	1.5
ソルビタンセスキオレート	0.5
流動パラフィン	5.0
スクワラン	5.0
カプリリック / カプリクトリグリセリド	5.0
グリセリン	3.0
ブチレングリコール	3.0
プロピレングリコール	3.0
カルボキシビニールポリマー	0.1
トリエタノールアミン	0.2
防腐剤、微量色素、微量香料、微量精製水	残部
合計	100.0

40

【0085】

50

3 . 栄養クリーム	(含量 : 重量 %)	
マデカソシド	0 . 0 0 5	
ミツロウ	1 0 . 0	
ポリソルベート 6 0	1 . 5	
ソルビタンセスキオレート	0 . 5	
流動パラフィン	1 0 . 0	
スクワラン	5 . 0	
カプリリック / カプリクトリグリセリド	5 . 0	
グリセリン	5 . 0	
ブチレングリコール	3 . 0	10
プロピレングリコール	3 . 0	
トリエタノールアミン	0 . 2	
防腐剤、微量色素、微量香料、微量精製水	残部	
合計	1 0 0 . 0	
【 0 0 8 6 】		
4 . マッサージクリーム	(含量 : 重量 %)	
マデカソシド	0 . 0 0 5	
ミツロウ	1 0 . 0	
ポリソルベート 6 0	1 . 5	
ソルビタンセスキオレート	0 . 8	20
流動パラフィン	4 0 . 0	
スクワラン	5 . 0	
カプリリック / カプリクトリグリセリド	4 . 0	
グリセリン	5 . 0	
ブチレングリコール	3 . 0	
プロピレングリコール	3 . 0	
トリエタノールアミン	0 . 2	
防腐剤、微量色素、微量香料、微量精製水	残部	
合計	1 0 0 . 0	
【 0 0 8 7 】		30
5 . パック	(含量 : 重量 %)	
マデカソシド	0 . 0 0 5	
ポリビニールアルコール	1 3 . 0	
ソジウムカルボキシメチルセルロース	0 . 2	
アラントイン	0 . 1	
エタノール	5 . 0	
ノニルフェニルエーテル	0 . 3	
防腐剤、微量色素、微量香料、微量精製水	残部	
合計	1 0 0 . 0	
【 0 0 8 8 】		40
<u>製剤例 2</u> : 薬学的製剤		
1 . 散剤の製造		
マデカソシド	2 g	
乳糖	1 g	
上記の成分を混合し、気密布に充填して散剤を製造した。		
【 0 0 8 9 】		
2 . 錠剤の製造		
マデカソシド	1 0 0 m g	
トウモロコシ澱粉	1 0 0 m g	
乳糖	1 0 0 m g	50

ステアリン酸マグネシウム 2 m g

上記の成分を混合した後、通常の錠剤の製造方法に従い打錠して錠剤を製造した。

【 0 0 9 0 】

3 . カプセル剤の製造

マデカソシド 1 0 0 m g

トウモロコシ澱粉 1 0 0 m g

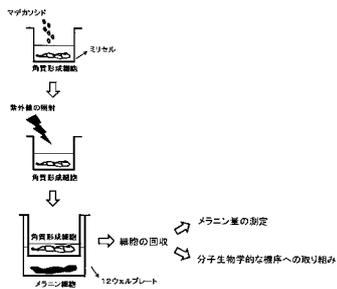
乳糖 1 0 0 m g

ステアリン酸マグネシウム 2 m g

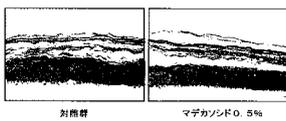
上記の成分を混合した後、通常のカプセル剤の製造方法に従いゼラチンカプセルに充填してカプセル剤を製造した。

【 図 1 】

角質形成細胞とメラニン細胞の共同培養システム



【 図 2 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2012/005211
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>A61K 8/60(2006.01)i, A61K 31/70(2006.01)i, A61Q 19/02(2006.01)i, A61P 17/00(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 8/60; A61K 8/64; A61K 8/63; A61K 31/7024; A61Q 19/02; A61K 8/67		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: whitening, madecassoside, cosmetic		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-1042712 B1 (CNPSKIN CO., LTD.) 20 June 2011 See the whole document.	1-5
A	KR 10-2006-0069349 A (BAYER CONSUMER CARE AG) 21 June 2006 See the whole document.	1-5
E	KR 10-2012-0105623 A (BIO SPECTRUM INC.) 26 September 2012 See the whole document.	1-5
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 19 FEBRUARY 2013 (19.02.2013)		Date of mailing of the international search report 21 FEBRUARY 2013 (21.02.2013)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer Seo Dae Jong  Telephone No. 82-42-481-8742

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2012/005211

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
KR 10-1042712 B1	20.06.2011	None	
KR 10-2006-0069349 A	21.06.2006	AU 2003-296799 A1 CA 2509421 A1 CA 2509421 C CN 1774257 A CN 1774257 C0 EP 1569672 A1 EP 1569672 B1 JP 04-643275 B2 JP 2006-516962 A KR 10-2011-0132629 A US 2006-0106206 A1 US 2008-0118581 A1 US 2012-0178706 A1 US 7402669 B2 US 8163706 B2 WO 2004-062678 A1	10.08.2004 29.07.2004 07.02.2012 17.05.2006 17.05.2006 07.09.2005 19.08.2009 10.12.2010 13.07.2006 08.12.2011 18.05.2006 22.05.2008 12.07.2012 22.07.2008 24.04.2012 29.07.2004
KR 10-2012-0105623 A	26.09.2012	None	

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA

(71)出願人 513282342

バイオスペクトラム アイエヌシー

Bio Spectrum, Inc.

大韓民国 462-806 ギョンギド ソンナムシ ユンウォング ダンチョンデロ519 1
1フロアー 1101ホ(サンデウォンドン ジョンアイエルアイネスプラッツ 3チャ)
(3cha, Joong Il Eines Platz, Sangdaewon-dong)
1101ho, 11th floor, 519, Dunchondea-ro, Jungwon-
gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, 462-806 Republic
of Korea

(74)代理人 100090398

弁理士 大淵 美千栄

(74)代理人 100090387

弁理士 布施 行夫

(72)発明者 バク ドック フーン

大韓民国 463-727 ギョンギド ソンナムシ ブンダング スネドン パークタウンデー
リムアパートメント103-303

(72)発明者 チョン ウン サン

大韓民国 443-370 ギョンギド スウォンシ ヨントング メタンドン 172-38

Fターム(参考) 4B018 LB10 MD61 ME14 MF01

4C083 AA082 AA112 AC022 AC102 AC122 AC172 AC352 AC422 AC442 AC542
AC852 AD042 AD092 AD112 AD202 AD272 AD391 AD392 AD531 AD532
AD642 CC04 CC05 CC07 CC12 CC22 CC23 DD08 DD17 DD23
DD31 DD41 EE16