

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6215206号
(P6215206)

(45) 発行日 平成29年10月18日 (2017.10.18)

(24) 登録日 平成29年9月29日 (2017.9.29)

(51) Int. Cl.		F I	
A 6 1 K	8/9789	(2017.01)	A 6 1 K 8/9789
A 6 1 K	8/63	(2006.01)	A 6 1 K 8/63
A 6 1 K	8/49	(2006.01)	A 6 1 K 8/49
A 6 1 Q	19/08	(2006.01)	A 6 1 Q 19/08
A 6 1 Q	19/02	(2006.01)	A 6 1 Q 19/02

請求項の数 8 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-527063 (P2014-527063)
 (86) (22) 出願日 平成24年8月20日 (2012.8.20)
 (65) 公表番号 特表2014-524466 (P2014-524466A)
 (43) 公表日 平成26年9月22日 (2014.9.22)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2012/006594
 (87) 国際公開番号 W02013/027984
 (87) 国際公開日 平成25年2月28日 (2013.2.28)
 審査請求日 平成27年8月13日 (2015.8.13)
 (31) 優先権主張番号 10-2011-0084701
 (32) 優先日 平成23年8月24日 (2011.8.24)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(73) 特許権者 506213681
 株式会社アモーレパシフィック
 AMOREPACIFIC CORPORATION
 大韓民国 ソウル特別市 中区 ▲清▼漢
 川路 100
 100 Cheonggyecheon-
 ro, Jung-gu Seoul 1
 35-920 Republic of
 Korea
 (74) 代理人 110000556
 特許業務法人 有古特許事務所

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 緑茶成分を含有する化粧品組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

緑茶サポニン、緑茶ポリフェノール及び緑茶幹細胞培養産物を有効成分として含有する化粧品組成物であって、

前記緑茶ポリフェノールは、緑茶葉から抽出されたEGCG (Epigallocatechin gallate) であり、

皮膚保湿用若しくは皮膚バリア強化用、又は皮膚美白用若しくは皮膚の色素沈着抑制用であることを特徴とする、化粧品組成物。

【請求項 2】

前記緑茶サポニンは、緑茶種の皮から抽出して糖残基を除去してなることを特徴とする請求項 1 に記載の化粧品組成物。 10

【請求項 3】

前記緑茶サポニンまたは緑茶ポリフェノールは、組成物の総質量を基準にして、それぞれ 0.001 ~ 1 質量% の範囲で含有されることを特徴とする請求項 1 に記載の化粧品組成物。

【請求項 4】

前記幹細胞は、カルス由来のものであることを特徴とする請求項 1 に記載の化粧品組成物。

【請求項 5】

前記幹細胞培養産物は、幹細胞株、そのライセート、その抽出物、及びその培養液から 20

なる群より選ばれる一種または二種以上の混合物であることを特徴とする請求項1に記載の化粧料組成物。

【請求項6】

前記幹細胞培養産物は、組成物の総質量を基準にして、0.01～10質量%の範囲で含有されることを特徴とする請求項1に記載の化粧料組成物。

【請求項7】

フィラグリン(Filaggrin)遺伝子を活性化させることを特徴とする請求項1に記載の化粧料組成物。

【請求項8】

インターロイキン6(IL6)遺伝子を活性化させることを特徴とする請求項1に記載の化粧料組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、緑茶成分を含有する化粧料組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、植物の全能性(totipotency)を用いた植物細胞培養技術の発展に伴い、植物由来の機能性二次代謝産物(secondary metabolite)に対する関心が高まりつつある。当該二次代謝産物は、多様な生理活性を有することが知られており、高機能性化粧品の新規な原料として植物幹細胞由来の抽出物質が注目を浴びている。この技術を用いれば、天然に存在するが、化学的合成方法では得られにくかった高機能性活性物質を経済的に生産することができるという点から、これまで用いることのできなかつた新規な成分を開発し応用できるようになることが期待されている。その他、酵素処理(enzyme treatment)を活用した物質変換技術(active transformation technology)といったバイオプロセスを活用した素材開発も活発に行われてきている。最近、機能性化粧品に対する消費者からの様々な要求に応じられるような、新機能性素材や関連技術の発展が十分ではなかったという点から、無数の多様な新機能性成分を作り出すことのできる植物幹細胞技術や、酵素処理といったバイオプロセスを利用した化粧品は、多様な皮膚効能、特に抗老化効能部分において高い人気を集めるものと考えられる。

20

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】韓国公開特許第10-2011-0023483号公報

【特許文献2】韓国公開特許第10-2011-0031801号公報

【特許文献3】韓国特許第10-0659138号公報

【特許文献4】韓国特許第10-0589716号公報

【特許文献5】特開2009-507826号公報

【発明の概要】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明者らは、皮膚副作用を誘発しない天然植物由来の成分であり且つ皮膚老化防止及びしわ改善効果に優れる化粧料の開発のために鋭意研究を繰り返した結果、緑茶成分を含有すればその効果が高くなることを確認した。

【0005】

したがって、本発明の目的は、植物由来の成分を用いて皮膚安全性に優れ、且つ皮膚老化防止及びしわ改善効果に優れる化粧料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】

【0006】

50

前記目的を達成するために、本発明は、緑茶サポニン及び緑茶ポリフェノールからなる群より選ばれる一種以上を有効成分として含有する化粧品組成物を提供する。

【0007】

本発明の一実施例において、前記組成物は、緑茶幹細胞培養産物をさらに含有してよい。

【0008】

また、本発明の一実施例において、前記緑茶サポニンは、緑茶種の皮から抽出して糖残基を除去してなるものであってよい。

【0009】

また、本発明の一実施例において、前記緑茶ポリフェノールは、緑茶葉から抽出したEGCG (Epigallocatechin gallate) であってよい。

【0010】

また、本発明の一実施例において、前記緑茶サポニンまたは緑茶ポリフェノールは、組成物の総重量を基準にして、それぞれ0.001~1重量%の範囲で含有されていてよい。

【0011】

また、本発明の一実施例において、前記幹細胞は、カルス由来のものであってよい。

【0012】

また、本発明の一実施例において、前記幹細胞培養産物は、幹細胞株、そのライセート、その抽出物、及びその培養液からなる群より選ばれる一種または二種以上の混合物であってよい。

【0013】

また、本発明の一実施例において、前記幹細胞培養産物は、組成物の総重量を基準にして、0.01~10重量%の範囲で含有されていてよい。

【0014】

また、本発明の一実施例において、前記組成物は、抗老化用組成物であってよい。

【0015】

また、本発明の一実施例において、前記組成物は、皮膚保湿用または皮膚バリア強化用組成物であってよい。

【0016】

また、本発明の一実施例において、前記組成物は、フィラグリン (Fillagrin) 遺伝子を活性化させるものであってよい。

【0017】

また、本発明の一実施例において、前記組成物は、皮膚美白用または皮膚の色素沈着抑制用組成物であってよい。

【0018】

また、本発明の一実施例において、前記組成物は、インターロイキン 6 (IL 6) 遺伝子を活性化させるものであってよい。

【0019】

また、本発明の一実施例において、前記組成物は、皮膚弾力強化用または皮膚しわ改善用組成物であってよい。

【0020】

また、本発明の一実施例において、前記組成物は、カタラーゼ (Catalase) 遺伝子を活性化させるものであってよい。

【発明の効果】

【0021】

本発明の化粧品組成物は、皮膚に対する安全性に優れ、且つ遺伝子活性化といった皮膚中の生物学的メカニズムの改善に卓越した効果を奏し、抗老化用化粧品組成物として有用である。また、本発明において用いた緑茶成分は、老化によって低下していた遺伝子活性を再び上昇させ、コラーゲンの生合成を濃度依存的に増大させるため、老化した皮膚を根

10

20

30

40

50

本的に改善させ、且つ、コラーゲンを供給することで張りや艶のない皮膚に張りや艶を与えることができ、皮膚の弾力増進と共に老化を予防することができるという効果がある。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】フィラグリン、インターロイキン 6、カタラーゼに対する遺伝子発現量を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0023】

以下、本発明について詳述する。

【0024】

なお、本発明において用いられる技術用語及び科学用語に対し、特にその定義がなされていないならば、この発明の属する技術分野における通常の知識を有する者が通常に理解している意味を持つものとする。

【0025】

本発明は、緑茶サポニン (Saponin) 及び緑茶ポリフェノール (polyphenols) からなる群より選ばれる一種以上を有効成分として含有する化粧品組成物を提供する。前記組成物は、緑茶 (Camellia Sinensis) 幹細胞培養産物をさらに含有してよい。

【0026】

本発明の緑茶サポニン (Saponin) は、緑茶種の皮から巨大分子量の粗サポニン (crude saponin) を抽出し、酵素で糖残基 (moiety) 間を切断して除去することで肌に吸収されやすくなって高効能を示す成分に転換させたものを用いる。

【0027】

本発明の緑茶ポリフェノール (polyphenols) は、緑茶葉に最も豊富な EGCG (epigallocatechin gallate) であって、緑茶葉を温水にて抽出してから固形化したパウダー成分を用いる。

【0028】

前記緑茶サポニンまたは緑茶ポリフェノールは、組成物の総重量を基準にして、それぞれ 0.001 ~ 1 重量%、好ましくは 0.01 ~ 0.5 重量% の範囲で含有されていてよい。各成分の含有量が 0.001 重量% 未満の場合は、皮膚細胞の再生及び抗酸化効果を期待しにくい。また、1.0 重量% を超過した場合は、それ以上効能を大きく増大しないため、その原料効率性が悪くなり、さらには、難溶性である緑茶サポニンとポリフェノールを剤形中に安定して担持するために、各種の溶媒を組み合わせることで化粧品組成物としての価値を落とすことがある。

【0029】

前記緑茶幹細胞は、最近脚光を浴びている植物幹細胞培養技術を用いて得ることができる。緑茶の種子、葉、幹、根などから全能性を有するカルス (callus) を誘導した後、固体培養 (solid cell culture) して幹細胞株 (stem cell line) を確立し、懸濁培養 (suspension cell culture) にて有効成分を大量生産した後、抽出して得る。

【0030】

前記培養産物としては、誘導された幹細胞株そのもの、そのライセート、その抽出物、及びその培養液からなる群より選ばれる一種または二種以上の混合物であってよい。前記抽出物は、抽出方法において制限はないが、例えば、前記植物の組織外植体 (tissue explant) に由来する細胞株の植物性培養方法にて抽出して用いることができる。本発明の製造例 1 では、葉由来のカルスから得た幹細胞培養液と幹細胞株のライセート (lysate) とを同時に獲得して用いたが、緑茶の胚 (embryo)、形成層、前形成層に由来のカルスを培養して得た幹細胞株、そのライセート、その抽出物、またはその培養液を用いても、本発明と同じ結果が得られる。

【0031】

10

20

30

40

50

前記培養産物は、緑茶幹細胞から抽出して分離/精製して得たアミノ酸などを有効成分として含有してよく、本発明において用いられた抽出物は、皮膚老化とともに活性が低下する核心遺伝子の活性を再び増加させることで、皮膚老化に根本的に対応することができるようにする。また、皮膚でコラーゲン合成を増大させることで皮膚真皮層の弾力繊維を増大させてしわを改善または緩和する効果を奏し、さらには、皮膚老化の原因でもあった活性酸素を除去したりもする。その結果、皮膚老化の根本的な原因である遺伝子活性の低下を解決し、且つ酸化的ストレスをブロックすることで総合的な抗老化効果を奏するようになる。

【0032】

前記幹細胞培養産物は、組成物の総重量に対して0.01~10重量%の範囲で含有され、好ましくは、0.1~5重量%の範囲で含有される。含有量が0.01重量%未満である場合は、遺伝子の再活性化による抗老化効果を期待しにくく、また10重量%を超過した場合は、それ以上効能が大きく増大しないため、その原料効率性が大きく低下するようになる。

10

【0033】

本発明の前記化粧品組成物は、抗老化用組成物である。

【0034】

また、本発明の前記化粧品組成物は、皮膚保湿用、皮膚バリア強化用、皮膚美白用、色素沈着抑制用、皮膚弾力強化用、抗酸化用、またはしわ改善用組成物である。

【0035】

ヒトの皮膚を構成する細胞は、表皮の大部分を占めているケラチノサイト(keratinocyte)、メラニン生成を担うメラニン形成細胞(melanocyte)、真皮の大部分を占めている繊維芽細胞(fibroblast)といった三つの細胞に大別される。ケラチノサイトは、皮膚水分の蒸発を抑える保湿や、外部からの有害因子に対して皮膚を守るバリア機能と深く関連しており、またメラニン形成細胞は、肌の色やトーンを決めるとともにしみやそばかすを生じさせたりする。また、繊維芽細胞は、コラーゲンのような弾力繊維を産生する細胞であって、皮膚弾力、皮膚しわと深く関連している。皮膚遺伝学の研究を総合的に分析してみたとき、3種の細胞のそれぞれに対し、年を取るにつれてその活性が最も大きく低下する遺伝子を研究した結果、ケラチノサイトではフィラグリン(Filaggrin)遺伝子、メラニン形成細胞ではIL-6遺伝子、繊維芽細胞ではカタラーゼ(Catalase)遺伝子が皮膚老化と最も深く関連していることを確認した。

20

【0036】

フィラグリンは、ケラチノサイトの分化マーカーであって天然保湿因子の前駆物質として知られており、インターロイキン-6は、低メラニン形成因子(hypomelanogenic factor)であってメラニン形成細胞に作用してメラニン生成を阻害することが知られている。カタラーゼは、細胞内で発生する過酸化物を分解する酵素である。

【0037】

したがって、前記三つの核心の皮膚遺伝子を活性化させると、肌年齢をより若い年齢の肌状態に戻すことができるという考えから本発明を着目した。

40

【0038】

本発明の組成物は、フィラグリン遺伝子を活性化させる効果がある。フィラグリン遺伝子が活性化すると、皮膚の水分蒸発を抑制する保湿効果を奏し且つ外部からの有害因子から皮膚を守る皮膚バリアが強化する効果がある。

【0039】

本発明の組成物は、インターロイキン-6(IL-6)遺伝子を活性化させる効果がある。IL-6遺伝子が活性化すると、肌色や肌トーンが明るくなって皮膚美白効果があり、且つ、シミやそばかすの生成が抑制されることで皮膚の色素沈着が抑制されるという効果がある。

50

【0040】

本発明の組成物は、カタラーゼ (Catalase) 遺伝子を活性化させる効果がある。カタラーゼ遺伝子が活性化すると、コラーゲンの生成が促進されることで皮膚弾力が良くなり、且つ、皮膚しわが改善するという効果がある。

【0041】

本発明の化粧品組成物としては、例えば、基礎化粧品、メーキャップ化粧品、毛髪用化粧品、ボディ用化粧品などが挙げられ、その剤形は特に制限されず、目的するところに応じて適宜選択すればよい。

【0042】

例えば、前記化粧品組成物は、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、せっけん、界面活性剤含有クレンジング、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、及びスプレーなどで剤形化することができるが、必ずしも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、ローション、ボディローション、栄養クリーム、マッサージクリーム、モイスチャークリーム、ハンドクリーム、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、ゲル、パッチ、水中油 (O/W) 型、油中水 (W/O) 型などの基礎化粧品、リップスティック、メーキャップベースまたはファンデーションなどのポイントメーキャップ化粧品、シャンプー、リンス、ボディークレンザー、歯磨きまたは口腔洗浄剤などの洗浄料、ヘアトニック、ジェルまたはムースなどの整髪剤、養毛剤または染毛剤などの毛髪用化粧品組成物にて剤形化されてよい。

【0043】

前記化粧品組成物は、化粧品学的に許容し得る媒質または基剤を含む。前記化粧品組成物は、局所適用に適したあらゆる剤形にて提供されていてよく、例えば、溶液、ゲル、固体または練り無水生成物、水状物に油状物を分散させて得たエマルジョン、懸濁液、マイクロエマルジョン、マイクロカプセル、微細顆粒球またはイオン型 (リボソーム) 及び/または非イオン型の小胞性分散剤の形態、クリーム、スキン、ローション、パウダー、軟膏、スプレー、またはコンシーラースティックの形態が挙げられる。また、これらの組成物は、当該分野の通常の方法にて製造されていてよい。

【0044】

本発明の剤形が溶液または乳濁液の場合は、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、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチルグリコール、グリセロール脂肪族エステル、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挙げられる。

【0045】

本発明の剤形が懸濁液の場合は、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のような液状の希釈剤、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のような懸濁液剤、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、寒天またはトラガカントなどが用いられてよい。

【0046】

本発明の剤形がペースト、クリーム、またはゲルの場合は、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、トラガカンド、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用いられてよい。

【0047】

本発明の剤形がパウダーまたはスプレーの場合は、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、またはポリアミドパウダーが用いられてよく、特にスプレーの場合は、更に、クロロフルオロヒドロカーボ

10

20

30

40

50

ン、プロパンノブタン、またはジメチルエーテルのような推進剤を含んでいてよい。

【0048】

本発明の剤形が界面活性剤含有クレンジングの場合は、担体成分として、脂肪族アルコールサルフェート、脂肪族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硫酸、アルキルアミドペタイン、脂肪族アルコール、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用いられていてよい。

【0049】

本発明において、前記化粧品組成物は、更に粘増剤を含んでいてよい。本発明の化粧品組成物に含まれる粘増剤としては、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルヒドロキシグアニン、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシビニルポリマー、ポリクォータニウム、セテアリルアルコール、ステアリン酸、カラギナンなどが用いられていてよく、好ましくは、カルボキシメチルセルロース、カルボキシビニルポリマー、ポリクォータニウムから選ばれた1種以上が用いられていてよく、より好ましくは、カルボキシビニルポリマーが用いられていてよい。

10

【0050】

本発明の一実施態様における前記化粧品組成物は、必要に応じて適切な各種の基剤または添加剤を含有してよく、これらの成分の種類と量は、発明者によって適宜選定されるものとする。必要に応じて許容し得る添加剤を含有してよく、例えば、当業界においては通常の防腐剤、色素、添加剤などの成分を更に含んでいてよい。防腐剤としては、具体的にフェノキシエタノール(Phenoxyethanol)または1,2-ヘキサンジオール(1,2-Hexanediol)などが挙げられ、香料としては、人工香料などが挙げられる。

20

【0051】

また、本発明の化粧品組成物は、水溶性ビタミン、油溶性ビタミン、高分子ペプチド、高分子多糖、スフィンゴ脂質及び海草エキスからなる群より選ばれた組成物を含んでいてよい。その他添加してよい配合成分としては、油脂成分、保湿剤、エモリエント剤、界面活性剤、有機及び無機顔料、有機粉体、紫外線吸収剤、防腐剤、殺菌剤、酸化防止剤、植物抽出物、pH調整剤、アルコール、色素、香料、血行促進剤、冷感剤、制汗剤、精製水などが挙げられる。

30

【0052】

なお、その他添加していてもよい配合成分は、これらに限定されるものではなく、また、前記いずれの成分も本発明の目的及び効果を損なわない範囲内で配合可能なものとする。

【0053】

次いで、下記の実施例、比較例、参考例、製造例、及び試験例を通じて本発明をより具体的に説明する。なお、下記の実施例、比較例、参考例、製造例、及び試験例は、本発明についての理解を助けるために例示したものに過ぎず、本発明の範疇及び範囲がこれらに限定されるものではない。

40

【0054】

[製造例1]有効成分の抽出

緑茶の葉に傷を付け、それをカルス誘導用培地(表1)にて培養してカルスを誘導した。培養15日後にカルスが誘導され始め、培養30日経過後にカルス層が分離し始めた。カルス層を分離した後、生長率の良い白くて砕けやすい部分を誘導培地と同一の新しい培地で21日ごとに継代した。このとき、カルス誘導用培地の組成は、下記の表1のとおりである。培地に生長調節剤としてオーキシン(Auxin)を1~3mg/Lの濃度で添加した。培養は25±1に調節された暗室で実施された。

【0055】

【表 1】

	組成	含量 (mg/L)
無機塩	KNO_3	1011.1
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	121.56
	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	10
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	113.23
	KI	0.75
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025
	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	130.44
	H_3BO_3	3
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25
	FeNaEDTA	36.7
ビタミン	イノシトール (Myo-inositol)	450
	チアミン-HCl	20
	ニコチン酸	2
	ピリドキシン-HCl	2
	アスコルビン酸 (L-ascorbic acid)	100
	クエン酸	150
植物ホルモン	オーキシシン	1~3
	ジベレリン酸	0.5
アミノ酸	カゼイン加水分解物	500
ショ糖		30,000
活性炭		100
ゲルライト (gelrite)		4,000

10

20

30

【0056】

前記のようにカルスを誘導して選別した後、選別されたカルスを固体培地 (Guchefa社製) で培養して、安定して生長する幹細胞株を選別した。本発明において用いた固体培地はMS培地であって、他の培地に比べて、 NO_3-N 、 NH_4-N 、及びKの含量が非常に高い培地である。固体培地の組成は、下記の表2のとおりである。

【0057】

【表 2】

	組成	含量 (mg/L)
無機塩	NH_4NO_3	1 6 5 0
	H_3BO_3	6.2
	CaCl_2	3 3 2.2
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
	$\text{Na}_2\text{-EDTA}$	3 7.2 6
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2 7.8
	MgSO_4	1 8 0.7
	$\text{MnSO}_4 (\text{H}_2\text{O})$	1 6.9
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
	KI	0.83
	KNO_3	1 9 0 0
	KH_2PO_4	1 7 0
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
ビタミン	イノシトール (Myo-inositol)	1 0 0
	ニコチン酸 (Nicotinic acid)	0.5
	ピリドキシン (Pyridoxine) · HCl	0.5
	チアミン (Thiamine) · HCl	0.1
アミノ酸	グリシン (Glycine)	2

10

20

【0058】

選別された幹細胞株を糖及び成長ホルモンが含有された懸濁培養液（表3）で培養した。下記の表3は、幹細胞株を培養した懸濁培養液の組成を表すものである。

【0059】

【表 3】

	組成	含量 (mg/L)
無機塩	KNO_3	1011.1
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	121.56
	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	10
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	113.23
	KI	0.75
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025
	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	130.44
	H_3BO_3	3
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25
	FeNaEDTA	36.7
ビタミン	イノシトール (Myo-inositol)	200
	チアミン-HCl	20
	ニコチン酸	2
	ピリドキシン-HCl	2
	アスコルビン酸 (L-ascorbic acid)	100
	クエン酸	150
植物ホルモン	オーキシン	1~3
	ジベレリン酸	0.1
アミノ酸	アスパラギン酸	133
	アルギニン	175
	プロリン	115
	グリシン	75
スクロース		20,000

【0060】

前記懸濁培養液で培養された細胞から外部の液相で排出された種々の活性成分の混合物を得た。更に培養された細胞の細胞壁を破壊することで溶出された成分も一緒に取得した。

【0061】

緑茶サポニンの場合、緑茶種の皮から抽出して酵素で処理して取得し、緑茶ポリフェノールの場合、緑茶葉を温水で抽出、濃縮する過程を繰り返して高純度EGCGを取得した。

【0062】

[試験例1] コラーゲン合成促進効果

ヒト繊維芽細胞を24ウェル(well)平板培養器で培養した後、それぞれ10ppm(参考例1)、5ppm(参考例2)、1ppm(参考例3)、0ppm(比較例1)の緑茶幹細胞から抽出した抽出混合物が含まれた培地に置き換えた。培養3日目に10%のウシ胎児血清が含有された培地であるDMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)を各ウェル当たり0.5mlずつ添加した後、L[2,3,4,5-³H]-プロリン10μCiを添加した。24時間経過後、各ウェルに入っている培地と細胞を掻き集めて5%トリクロロ酢酸(Trichloroacetic acid: TCA)溶液に入れて水洗した後、比較例1の試験管は4で保管し、フェニ

10

20

30

40

50

ルプロパノイドの各濃度別の参考例及び実施例の試験管にはI型コラーゲナーゼ (type I collagenase) 1 unit / μ lを入れて、37 で90分間培養した。

【0063】

その後、すべての試験管に50%トリクロロ酢酸を0.05mlずつ添加して、4 で20分間放置した後、それぞれ12,000rpmで10分間遠心分離して、それぞれの上澄液と沈殿物を液体シンチレーション計数器 (LSC: Liquid Scintillation Counter) でCPM (Count Per Minute) 値を得て、次式1に基づいて、参考例、比較例に対してコラーゲン生合成値 (RCB: Relative Collagen Biosynthesis) を測定し、その結果を下記の表4に表した。

10

【0064】

【数1】

$$RCB(\%) = \frac{\text{コラーゲンcpm}}{(\text{全コラーゲンcpm} - \text{コラーゲンcpm}) \times 5.4 + \text{コラーゲンcpm}} \times 100$$

【0065】

【表4】

	緑茶幹細胞抽出物 (ppm)	コラーゲン生合成の比率 (RCB) (%)
参考例1	10	180
参考例2	5	149
参考例3	1	122
比較例1	0	100

20

【0066】

表4に見られるように、緑茶幹細胞から抽出した成分混合物が繊維芽細胞のコラーゲン生合成を濃度依存的に増加させることが分かった。

30

【0067】

下記の表5は、緑茶サポニン (実施例1)、緑茶ポリフェノール (実施例2)、緑茶幹細胞と緑茶サポニンとの混合物 (実施例3)、緑茶幹細胞と緑茶ポリフェノールとの混合物 (実施例4)、緑茶サポニンと緑茶ポリフェノールとの混合物 (実施例5)、緑茶幹細胞と、緑茶サポニン、及び緑茶ポリフェノールとの混合物 (実施例6) に対して、コラーゲン生合成値 (RCB: Relative Collagen Biosynthesis) を測定し、その結果を表したものである。

【0068】

【表5】

	緑茶成分抽出物 (ppm)	コラーゲン生合成の比率(RCB) (%)
比較例1	0 (none)	100
参考例1	緑茶幹細胞 (10 ppm)	180
実施例1	緑茶サポニン (1 ppm)	140
実施例2	緑茶EGCG (10 ppm)	135
実施例3	緑茶幹細胞+緑茶サポニン	235
実施例4	緑茶幹細胞+緑茶EGCG	215
実施例5	緑茶サポニン+緑茶EGCG	190
実施例6	緑茶幹細胞+緑茶サポニン+緑茶EGCG	270

10

【0069】

[試験例2] 遺伝子活性化効果

皮膚細胞における緑茶幹細胞、緑茶サポニン、緑茶ポリフェノールのそれぞれの効能を確認するために、正常ヒトケラチノサイト(Normal Human Keratinocyte、NHK)と正常ヒト繊維芽細胞(Normal Human Fibroblast、NHF)を用いた。繊維芽細胞の場合、繰り返しの継代培養を通じて細胞老化を誘発した複製セネッセンスモデル(replicative senescence model)を用いて評価した。

20

【0070】

遺伝子として、ケラチノサイトの場合はフィラグリンとインターロイキン 6、繊維芽細胞の場合はカタラーゼを選定した。

【0071】

緑茶幹細胞、緑茶サポニン、緑茶ポリフェノールは、各対象細胞別に細胞毒性を評価した後、80%以上の細胞生存を見せる濃度以下で試験を行った。各細胞に対して緑茶幹細胞、緑茶サポニン、緑茶ポリフェノールをそれぞれ処置してから24時間後に細胞を収去し、10mlのリン酸塩緩衝液(Phosphate Buffered Saline、PBS)で細胞を2回洗浄し、トリゾール(Trizol reagent、Invitrogen、Carlsbad、CA、USA)を用いて細胞中の全RNA(total RNA)を分離した。分離したRNAをキアゲン社製のRNAキット(Qiagen RNeasy kit、Qiagen、Valencia、CA)を用いてもう1回精製した後、先の分離されたRNAから、インビトロジェン社製の逆転写キット(Superscript Reverse Transcriptase(RT) II kit、Invitrogen、Carlsbad、CA)を用いてcDNAを合成し、リアルタイム逆転写重合酵素連鎖反応(real time-reverse transcription polymerase chain reaction、Q-RT-PCR)でフィラグリン、インターロイキン 6、カタラーゼのそれぞれの遺伝子発現変化を定量的に分析した。遺伝子発現パターンの変化はアプライドバイオシステム社製のタックマン遺伝子発現システム(TaqMan(登録商標) gene expression assay kit、Applied Biosystems、Foster City、CA)を用いて評価した。用いられたプライマーは、フィラグリン:Hs00856927_g1;インターロイキン 6:Hs00174360_m1;カタラーゼ:Hs00156308_m1である。各細胞においてフィラグリン、インターロイキン 6、カタラーゼが発現した量をReal-Time PCRで確認した結果を表6に表した。

30

40

【0072】

【表 6】

		フィラグリン 遺伝子	I L-6 遺伝子	カタラーゼ 遺伝子
比較例 2	対照群 (none)	1	1	1
実施例 4	緑茶幹細胞 (100 ppm)	1.8	3.5	1.2
実施例 5	緑茶サポニン (1 ppm)	1.5	1.6	1.4
実施例 6	緑茶 E G C G (10 ppm)	5.5	1.4	1.0
実施例 7	緑茶幹細胞 + 緑茶サポニン	4.2	5.5	3.3
実施例 8	緑茶幹細胞 + 緑茶 E G C G	8.8	5.1	2.8
実施例 9	緑茶サポニン + 緑茶 E G C G	7.2	4.4	3.0
実施例 10	緑茶幹細胞 + 緑茶サポニン + 緑茶 E G C G	10.3	8.2	5.5

10

20

30

40

【0073】

表 6 に見られるように、緑茶幹細胞培養産物（実施例 4）、緑茶サポニン（実施例 5）、緑茶 E G C G（実施例 6）が皮膚核心遺伝子の発現を増加させることを確認することができた。緑茶幹細胞の場合、I L - 6 遺伝子の発現を特に増加させ、緑茶サポニンの場合

50

、カタラーゼ遺伝子の発現を特に増加させ、緑茶EGCGはフィラグリン遺伝子発現量の増加に特に有効であった。そして、これらの成分を組み合わせる実施例7ないし実施例10の実験を行っており、2種以上の成分を組み合わせた場合、シナジー効果を示し、特に3種をいずれも組み合わせた実施例10の場合、3種の遺伝子をいずれも大きく活性化させることで最適のアンチエイジング効果を示すことを遺伝子レベルで確認することができた。表6における遺伝子発現量を図1に示した。

【0074】

[試験例3] 皮膚安全性テスト

本発明に係る抗老化化粧料組成物の皮膚に対する安全性を評価するために、剤形例2の皮膚に対する刺激度合いを測定した。

10

【0075】

測定は、忠北大学校皮膚科病院で実施した。平均年齢33.2歳の健康な成人30人を対象にして、背中部位に48時間貼り付け、24時間にかけて皮膚反応を調べてみた。皮膚刺激の評価基準は、CTFAガイドライン(1981年)とFrosch & Klighmanの判定基準を参考にした。

【0076】

本発明に係る化粧料組成物としての下記の剤形例2を貼り付けた成人30人のいずれもが皮膚刺激を起こさなかった。このことから、本発明は皮膚安全性に極めて優れる組成物であるものと判断することができる。

20

【0077】

以下、本発明に係る化粧料組成物の剤形例について説明するが、下記に例示した剤形に限られず、その他の様々な剤形として応用可能であり、また、かかる剤形例は本発明を限定するためのものではなく、単に具体的に説明するためのものに過ぎない。

【0078】

[剤形例1] 柔軟化粧水(スキンローション)

下記の表7に表した組成にて通常の方法により柔軟化粧水を製造した。

【0079】

【表7】

成分	含量(重量%)
緑茶幹細胞培養産物	1.0
緑茶サポニン	0.1
緑茶ポリフェノール	0.1
グリセリン	3.5
オレイルアルコール	1.5
エタノール	5.5
ポリソルベート80	3.2
カルボキシビニルポリマー	1.0
ブチレングリコール	2.0
プロピレングリコール	2.0
防腐剤、香料	適量
精製水	残量
計	100

30

40

【0080】

[剤形例2] 栄養化粧水(ミルクローション)

下記の表8に表した組成にて通常の方法により栄養化粧水を製造した。

【0081】

50

【表 8】

成分	含量 (重量%)
緑茶幹細胞培養産物	1.0
緑茶サポニン	0.1
緑茶ポリフェノール	0.1
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
カルボキシビニルポリマー	0.1
蜜蝋	4.0
ポリソルベート60	1.5
カプリリック/カプリクトリ グリセリド	5.0
スクワラン	5.0
ソルビタンセスキオレエート	1.5
セテアリルアルコール	1.0
トリエタノールアミン	0.2
防腐剤、香料	適量
精製水	残量
計	100

10

20

【0082】

[剤形例 3] 栄養クリーム

下記の表 9 に表した組成にて通常の方法により栄養クリームを製造した。

【0083】

30

【表 9】

成分	含量 (重量%)
緑茶幹細胞培養産物	1.0
緑茶サポニン	0.1
緑茶ポリフェノール	0.1
グリセリン	3.5
ブチレングリコール	3.0
流動パラフィン	7.0
β グルカン	7.0
カルボマー	0.1
カプリリック/カプリクトリ グリセリド	3.0
スクワラン	5.0
セテアリルグルコシド	1.5
ステアリン酸ソルビタン	0.4
ポリソルベート60	1.2
トリエタノールアミン	0.1
防腐剤、香料	適量
精製水	残量
計	100

10

20

【0084】

[剤形例 4] マッサージクリーム

下記の表 10 に表した組成にて通常の方法によりマッサージクリームを製造した。

【0085】

【表 1 0】

成分	含量 (重量%)
緑茶幹細胞培養産物	1.0
緑茶サポニン	0.1
緑茶ポリフェノール	0.1
グリセリン	8.0
ブチレングリコール	3.0
流動パラフィン	45.0
β グルカン	7.0
カルボマー	0.1
カプリリック/カプリクトリ グリセリド	3.0
蜜蝋	4.0
セテアリルグルコシド	1.5
セスキオレイン酸ソルビタン	0.9
パラフィン	1.5
防腐剤、色素、香料	適量
精製水	残量
計	100

10

20

【0086】

[剤形例 5] パック

下記の表 1 1 に表した組成にて通常の方法によりパックを製造した。

【0087】

【表 1 1】

成分	含量 (重量%)
緑茶幹細胞培養産物	1.0
緑茶サポニン	0.1
緑茶ポリフェノール	0.1
グリセリン	4.0
ポリビニルアルコール	15.0
ヒアルロン酸抽出物	5.0
β グルカン	7.0
アラントイン	0.1
ノニルフェニルエーテル	0.4
ポリソルベート 6 0	1.2
エタノール防腐剤	適量
防腐剤、香料	適量
精製水	残量
計	100

30

40

【0088】

本発明の属する技術分野における通常の知識を有する者であれば、前記内容を基に本発

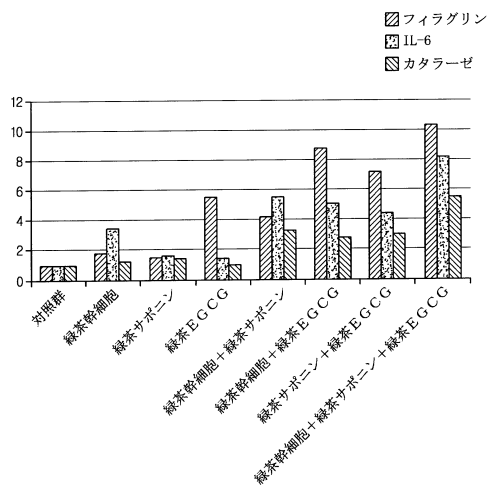
50

明の範疇内で種々の応用及び変形を行うことが可能であろう。

【0089】

以上、本発明の特定の部分を詳しく記述したが、本発明の属する技術分野の通常の知識を有する者にとって、かかる具体的な記述は、単に好適な具現例に過ぎず、本発明の範囲がこれらに制限されるものではないことは明らかである。よって、本発明の実質的な範囲は、特許請求の範囲及びその等価物によって定義されるものとする。

【図1】



フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
 A 6 1 Q 19/00 (2006.01) A 6 1 Q 19/00
- (72)発明者 カン, ヒョン ソ
 大韓民国 4 4 6 - 7 2 9 キョンギ-ド ヨンイン-シ ギフン-ク ボラ-ドン 3 1 4 - 1
 アモーレバシフィック アールアンドディー センター
- (72)発明者 カン, スン ヒョン
 大韓民国 4 4 6 - 7 2 9 キョンギ-ド ヨンイン-シ ギフン-ク ボラ-ドン 3 1 4 - 1
 アモーレバシフィック アールアンドディー センター
- (72)発明者 キム, ジ ヒョン
 大韓民国 4 4 6 - 7 2 9 キョンギ-ド ヨンイン-シ ギフン-ク ボラ-ドン 3 1 4 - 1
 アモーレバシフィック アールアンドディー センター
- (72)発明者 キム, ジ ソン
 大韓民国 4 4 6 - 7 2 9 キョンギ-ド ヨンイン-シ ギフン-ク ボラ-ドン 3 1 4 - 1
 アモーレバシフィック アールアンドディー センター
- (72)発明者 ナ, ヨン ジュ
 大韓民国 4 4 6 - 7 2 9 キョンギ-ド ヨンイン-シ ギフン-ク ボラ-ドン 3 1 4 - 1
 アモーレバシフィック アールアンドディー センター
- (72)発明者 チェ, ビョン グン
 大韓民国 4 4 6 - 7 2 9 キョンギ-ド ヨンイン-シ ギフン-ク ボラ-ドン 3 1 4 - 1
 アモーレバシフィック アールアンドディー センター
- (72)発明者 ハン, サン フン
 大韓民国 4 4 6 - 7 2 9 キョンギ-ド ヨンイン-シ ギフン-ク ボラ-ドン 3 1 4 - 1
 アモーレバシフィック アールアンドディー センター

審査官 駒木 亮一

- (56)参考文献 特表2009-507826(JP,A)
 特開2001-064155(JP,A)
 特開2007-197328(JP,A)
 米国特許出願公開第2006/0286062(US,A1)
 特表2009-508850(JP,A)
 米国特許出願公開第2003/0175234(US,A1)
 特開2002-293736(JP,A)
 韓国公開特許第10-2011-0031801(KR,A)
 特表2007-530574(JP,A)
 特開2011-026207(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 8 / 0 0 - 8 / 9 9
 A 6 1 Q 1 / 0 0 - 9 0 / 0 0
 A 6 1 K 3 6 / 0 0 - 3 6 / 0 5
 A 6 1 K 3 6 / 0 7 - 3 6 / 9 0 6 8
 A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2
 A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 4 8