

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6474418号
(P6474418)

(45) 発行日 平成31年2月27日 (2019. 2. 27)

(24) 登録日 平成31年2月8日 (2019. 2. 8)

(51) Int. Cl.	F 1
A 6 1 K 8/63 (2006. 01)	A 6 1 K 8/63
A 6 1 Q 19/02 (2006. 01)	A 6 1 Q 19/02
A 2 3 L 33/105 (2016. 01)	A 2 3 L 33/105 Z N A

請求項の数 3 (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願2016-548109 (P2016-548109)	(73) 特許権者	507175175
(86) (22) 出願日	平成27年1月23日 (2015. 1. 23)		インダストリー・アカデミック コーポレ
(65) 公表番号	特表2017-505308 (P2017-505308A)		ーション ファウンデーション, ヨンセイ
(43) 公表日	平成29年2月16日 (2017. 2. 16)		ユニバーシティ
(86) 国際出願番号	PCT/KR2015/000727		大韓民国 03722 ソウル ソデムン
(87) 国際公開番号	W02015/111953		ーク ヨンセイロー 50
(87) 国際公開日	平成27年7月30日 (2015. 7. 30)	(74) 代理人	100106002
審査請求日	平成28年7月22日 (2016. 7. 22)		弁理士 正林 真之
(31) 優先権主張番号	10-2014-0008415	(72) 発明者	ファン ジェ クワン
(32) 優先日	平成26年1月23日 (2014. 1. 23)		大韓民国 ソウル 121-901 マボ
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		ーグ サンガムサンーロ 1ーギル 57
(31) 優先権主張番号	10-2014-0008430		サンガム ワールドカップ パーク 6
(32) 優先日	平成26年1月23日 (2014. 1. 23)		ダンジ 612-1003
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		
前置審査			最終頁に続く

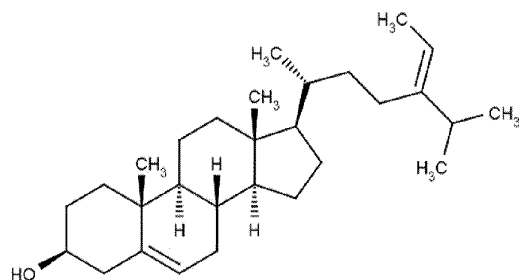
(54) 【発明の名称】 フコステロールを含有する皮膚美白又は皮膚保湿用組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

有効成分として、下記式 (1) で表されるフコステロールを単独で含有する、メラニンの生成の抑制又はチロシナーゼの活性の抑制による皮膚美白用化粧料組成物。

【化 1】

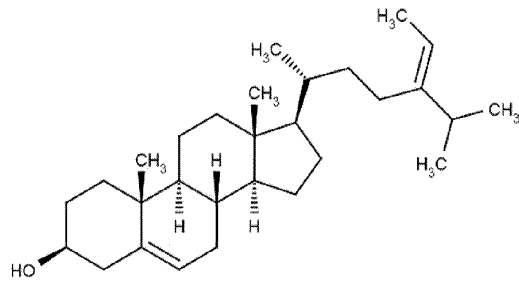


(1)

【請求項 2】

有効成分として、下記式 (1) で表されるフコステロールを単独で含有する、メラニンの生成の抑制又はチロシナーゼの活性の抑制による皮膚美白用食品組成物。

【化 2】



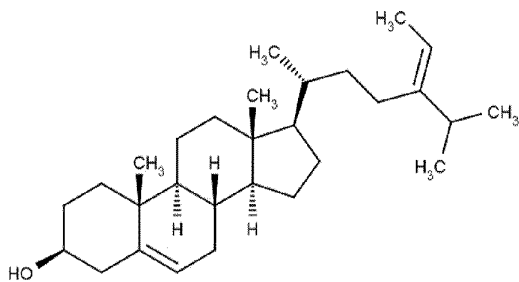
(1)

10

【請求項 3】

有効成分として、下記式（１）で表されるフコステロールを単独で含有する、メラニンの生成の抑制又はチロシナーゼの活性の抑制による皮膚美白用薬学的組成物。

【化 3】



(1)

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、大韓民国海洋水産部の支援下において、課題番号 D10906112H320000170 により行われたものであり、前記課題の研究管理専門機関は韓国海洋研究院、研究事業名は「海外海洋生物資源開発・活用基盤構築」、研究課題名は「インドネシア海洋バイオ資源の確保及び基礎生理活性分析」、主管機関は延世大学校産学協力団、研究期間は 2009 年 11 月 1 日～2012 年 6 月 30 日である。

30

【0002】

本特許出願は、2014 年 1 月 23 日に大韓民国特許庁に提出された大韓民国特許出願第 10-2014-0008415 号及び第 10-2014-0008430 号の優先権利益を主張しており、前記特許出願の開示内容はその全体内容が援用によって本明細書に含まれる。

【0003】

本発明は、フコステロール (fucosterol) の新規の用途に関し、より詳しくは、フコステロールを含有することを特徴とする皮膚美白又は保湿用組成物に関するものである。

40

【背景技術】

【0004】

ヒトの皮膚の色は、メラニン (melanin) 色素を作るメラノサイト (melanocyte) の活動性、血管の分布、皮膚の厚さ及びカロテノイド (carotenoid)、ヘモグロビン (hemoglobin) 等人体内外の色素含有有無のような様々な要因によって決定される。メラニン色素の形成には、遺伝的要因、ホルモン分泌、ストレスなどに関連した生理的要因及び紫外線などの環境的要因が影響を及ぼす（非特許文献 1）。

【0005】

メラニンの生成機構に重要な影響を及ぼすのはチロシナーゼ (tyrosinase) という酵素であり、これは、メラノサイト内のメラノソーム (melanosome) でチロシン (tyrosine)

50

の酸化過程に関与する。紫外線露出などにより、前記チロシナーゼが活性化され、チロシンに作用して、ドーパ（DOPA；3，4-ジヒドロキシフェニルアラニン）及びドーパキノン（DOPAquinone）を生成させる酸化過程によって、メラニン重合体が合成される（被特許文献2）

【0006】

メラニンは、皮膚の外角である表皮層に存在し、紫外線などから真皮以下の皮膚機能を保護すると同時に、皮膚生体内に生じたフリー・ラジカルなどを捉える役割を果たし、皮膚内タンパク質と遺伝子を保護する重要な機能を有している。しかし、メラニンが過剰生産されれば、シミ、ソバカスなどを形成するだけでなく、皮膚老化を促進し、皮膚癌誘発にも重要な作用をすることが知られている（比特許文献3）。

10

【0007】

シミ、ソバカス、色素沈着などの皮膚色素異常沈着症状と紫外線露出などにより発生された過度なメラニン色素沈着を治療又は低減させるために、従来からアスコルビン酸、コウジ酸（kojic acid）、アルブチン（arbutin）、ヒドロキノン（hydroquinone）、グルタチオン（glutathione）又はこれらの誘導体、チロシナーゼ阻害活性を有した物質を化粧品や医薬品に配合して使っている。しかし、これらは不十分な美白効果、皮膚に対する安全性問題、化粧品に配合時、剤形及び安定性問題などによりその使用が制限されている（非特許文献4）。従って、前記有効成分の問題点を解決するために安全性と安定性が立証された天然物由来の有効成分に関する要求が提起されている。

【0008】

20

皮膚の角質層（Stratum corneum）は、皮膚において最外角層に存在し、外部環境に直接接しており、外部の物理的・化学的ストレスから人体を保護するのに重要な障壁機能（barrier function）を担っている。このような障壁機能は、表皮の恒常性（homeostasis）によって保持される。表皮恒常性は、基底層の角質形成細胞（keratinocytes）の成長分裂と細胞移動による分化過程を通して最終分化（terminal differentiation）を経て、角質層と呼ばれる皮膚障壁を形成することによって、持続的な皮膚障壁機能を保持するものである（非特許文献5）。

【0009】

角質形成細胞の分化に伴い、保湿に影響を及ぼす2種類の要因を生成する。第一に、角質形成細胞が分化する間、その細胞膜は角質細胞膜（cornified envelope）という構造物に代替される。角質細胞膜は、ロリクリン（loricrin）、インボルクリン（involucrin）、フィラグリン（filaggrin）をはじめとする多様な構造タンパク質がトランスグルタミナーゼ（transglutaminases）という酵素によって架橋を形成した膜構造物であり、外部環境に対する皮膚保護機能の提供と共に、角質細胞内の水分蒸発を抑制する（非特許文献6）。角質細胞膜構造タンパク質とトランスグルタミナーゼは、角質形成細胞の分化により発現が開示されるので、分化因子（differentiation marker）として用いられる（非特許文献6）。従って、角質細胞膜と分化因子は保湿の指標として使用される。

30

【0010】

また、角質細胞の分化過程に角質形成細胞は、天然保湿因子（NMF；Natural Moisturizing Factor）を生成しながら皮膚障壁（skin barrier）としての機能を保有させる。天然保湿因子の生成に重要な源泉になるタンパク質としてはフィラグリンである。フィラグリンは、カスパーゼ14により親水性アミノ酸に分解され、天然保湿因子を形成する。天然保湿因子は、保水能力（water holding capacity）と大気中の吸湿力（moisture absorption）を提供することによって、皮膚内保湿力を保持する機能をする（非特許文献7）。従って、皮膚に適切な水準の天然保湿因子を保持することは、皮膚障壁機能を通じた皮膚健康に大変重要な要素である。

40

【0011】

フコステロールは、主に海藻類に多く含まれている物質であり、韓国、中国、日本などアジア地域の海岸に棲息する海藻類から多く発見されている。今まで、フコステロールの活性は、抗癌（非特許文献8）、抗糖尿（非特許文献9）、（抗酸化（非特許文献10）

50

、血中脂質成分改善（非特許文献 1 1）、コレステロール代謝改善（非特許文献 1 2）、抗菌（非特許文献 1 3）、抗かび（非特許文献 1 4）、及び抗老化（非特許文献 1 5）等が報告されている。しかし、フコステロールの皮膚美白活性及び保湿活性については今まで報告されていない実状である。

【0012】

本明細書全体にわたって多数の論文及び特許文献が参照され、その引用が表示されている。引用された論文及び特許文献の開示始内容はその全体として本明細書に参照のために援用され、本発明が属する技術分野の水準及び本発明の内容がより明確に説明される。

【先行技術文献】

【非特許文献】

10

【0013】

【非特許文献 1】Annu. Rev. Genet. 37:67-90, 2003

【非特許文献 2】J. Environ. Sci. Health. 23(2):105-161, 2005

【非特許文献 3】FASEB J. 21(4):976-994, 2007

【非特許文献 4】Dermatol. Ther. 20(5):308-313, 2007

【非特許文献 5】Korean J. Food. Sci. Technol. 43:458-463, 2011

【非特許文献 6】Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 6(4):328-340, 2005

【非特許文献 7】J. Cell Sci. 122:1285-1294, 2009

【非特許文献 8】Pharmacogn. Mag. 8(29):60-64, 2012

【非特許文献 9】Arch. Pharm. Res. 27(11):1120-1122, 2004

20

【非特許文献 10】Bioorg. Med. Chem. 17(5):1963-1973, 2009

【非特許文献 11】Biochem. Biophys. Res. Commun. 369(2):363-368, 2008

【非特許文献 12】New Phytol. 183(2):291-300, 2009

【非特許文献 13】J. Pharm. Biomed. Anal. 51(2):450-4555, 2010

【非特許文献 14】Nat. Prod. Res. 24(15):1481-1487, 2010

【非特許文献 15】Photochem. Photobiol. 89(4):911-918, 2013

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

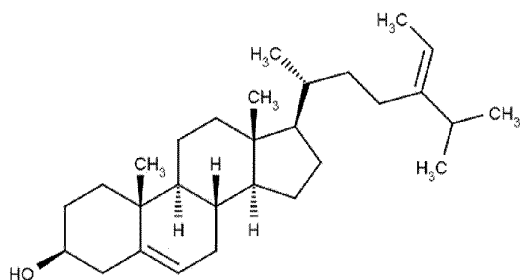
そこで、本発明者らは、天然物由来の美白活性又は保湿機能のある物質を探索していたところ、海藻類に含まれているフコステロールに、優れた美白活性及び保湿機能があることを明らかにすることによって、本発明を完成した。

30

【0015】

従って、本発明の目的は、下記の式（1）で表されるフコステロールを含有することを特徴とする美白用化粧品組成物を提供することにある。

【化 1】



(1)

40

【0016】

本発明の他の目的は、前記式（1）のフコステロールを含有することを特徴とする美白用食品組成物を提供することである。

【0017】

本発明のさらに他の目的は、前記式（1）のフコステロールを含有することを特徴とす

50

る美白用薬学的組成物を提供することである。

【0018】

本発明のさらに他の目的は、前記式(1)のフコステロールを含有することを特徴とする保湿用化粧品組成物を提供することである。

【0019】

本発明のさらに他の目的は、前記式(1)のフコステロールを含有することを特徴とする保湿用食品組成物を提供することである。

【0020】

本発明のさらに他の目的は、前記式(1)のフコステロールを含有することを特徴とする保湿用薬学的組成物を提供することである。

10

【0021】

本発明のさらに他の目的及び利点は、下記の発明の詳細な説明及び請求範囲によってより明らかになる。

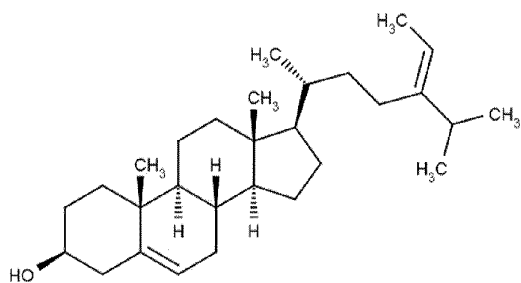
【課題を解決するための手段】

【0022】

本発明は、美白効能に優れた皮膚美白用組成物に関するものであり、さらに詳しくは、有効成分として、下記式(1)で表されるフコステロールを含有することを特徴とする皮膚美白用化粧品、食品及び薬学的組成物に関するものである。

【化2】

20



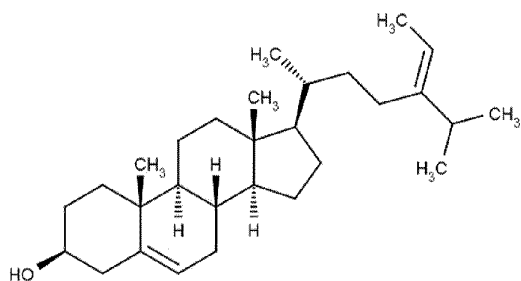
(1)

【0023】

本発明の他の一態様によれば、本発明は、保湿機能に優れた皮膚保湿用組成物に関するものであり、さらに詳しくは、有効成分として、下記式(1)で表されるフコステロールを含有することを特徴とする皮膚保湿用化粧品、食品及び薬学的組成物に関するものである。

30

【化3】



(1)

40

【0024】

以下、本発明の内容を詳細に説明する。

本発明の皮膚美白又は皮膚保湿用化粧品、食品及び薬学的組成物において、前記式(1)で表されるフコステロールは、海藻類など天然原料から抽出され、分離するか、化学的合成方法によって合成することができる。

【0025】

本発明の組成物で、前記フコステロールは、シルベチア・シリクオサ (Silvetia siliq

50

uosa)、マコンブ (*Saccharina japonica*)、ガゴメコンブ (*Kjellmaniella crassifolia*)、ワカメ (*Undaria pinnatifida*)、モズク (*Cladosiphon okamuranus*)、マツモ (*Ceratophyllum demersum*)、カジメ (*Ecklonia cava*)、ヒジキ (*Hizikia fusiformis*)、アラメ (*Eisenia bicyclis*)、ヘラヤハズ (*Dictyopteris prolifera*)、イシゲ (*Ishige okamurae*)、カヤモノリ (*Scytosiphon lomentaria*)、フクロノリ (*Colpomenia sinuosa*)、ホンダワラ (*Sargassum fulvellum*)、ヤナギモク (*Sargassum coreanum*)、アカモク (*Sargassum horneri*)、ウミトラノオ (*Sargassum thunbergii*)、ウガノモク (*Cystoseira hakodatensis*) などの海藻類から抽出し、分離したものであってもよい。

【0026】

また、前記フコステロールは、チャイブ (*Alliums choenoprasum*)、マホガニー (*Swietenia macrophylla*)、セイヨウハシバミ (*Corylus avellana*)、インドセンダン (*Azadirachta indica*)、金木犀 (*Osmanthus fragrans* var. *aurantiacus*)、楮実子 (*Fructus broussonetiae*)、サトウキビ (*Saccharum officinarum*)、アワ (*Setaria italica*) などの植物から抽出し、分離したものであってもよい。

【0027】

本発明のフコステロールは、シルベチア・シリクオサから抽出されていてもよい（＜実施例1＞参照）。

【0028】

本発明のフコステロールの分離及び精製は、シリカゲル (silicagel) や活性アルミナ (alumina) などの各種合成樹脂を充填したカラムクロマトグラフィー及び高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) 等を単独、又は並行して用いてもよいが、抽出及び分離精製方法が必ずしも前記方法に限定されるものではない。

【0029】

本発明の一実施例では、フコステロールの細胞毒性を調べるために、B16F10メラノーマ細胞にフコステロールを処理した後、MTT (3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド) 分析を通して細胞安全性を測定した。その結果、本発明のフコステロールは0~20 μ Mの濃度でB16F10メラノーマ細胞に対する毒性を示さなかった（＜実施例2＞参照）。

【0030】

本発明の他の一実施例では、B16F10メラノーマ細胞において、 α -メラニン細胞刺激ホルモン (α -MSH) でメラニン生成を促進した後、本発明のフコステロールを投与し、メラニン生成の抑制有無を測定した。その結果、本発明のフコステロールは、メラニンの生成を効果的に抑制することを確認した（＜実施例3、4＞参照）。

【0031】

本発明の他の一実施例では、B16F10メラノーマ細胞において、 α -MSHでチロシナーゼ活性を増加させた後、本発明のフコステロールを投与し、チロシナーゼ活性の抑制有無を測定した。その結果、本発明のフコステロールはチロシナーゼの活性を効果的に抑制することを確認した（＜実施例5＞参照）。

【0032】

本発明の他の一実施例では、B16F10メラノーマ細胞において、 α -MSHでチロシナーゼのタンパク質発現を増加させた後、本発明のフコステロールを投与し、チロシナーゼのタンパク質発現の抑制有無を測定した。その結果、本発明のフコステロールはチロシナーゼのタンパク質発現を効果的に抑制することを確認した（＜実施例6＞参照）。

【0033】

本発明の他の一実施例では、B16F10メラノーマ細胞において、 α -MSHでTRP-1とTRP-2のタンパク質発現を増加させた後、本発明のフコステロールを投与し、TRP-1、TRP-2のタンパク質発現の抑制有無を測定した。その結果、本発明のフコステロールはTRP-1、TRP-2のタンパク質発現を効果的に抑制することを確認した（＜実施例7＞参照）。

【0034】

本発明の他の一実施例では、B16F10メラノーマ細胞において、 α -MSHでMITFのタンパク質発現を増加させた後、本発明のフコステロールを投与し、MITFのmRNA発現の抑制有無を測定した。その結果本発明のフコステロールはMITFのmRNA発現を効果的に抑制することを確認した（＜実施例8＞参照）。

【0035】

従って、前記フコステロールは、美白活性に優れていることから化粧品組成物、食品組成物又は薬学的組成物の有効な成分として用いることができる。

【0036】

本発明のフコステロールは、角質細胞膜の形成を促進し、角質細胞分化を促進し、天然保湿因子を形成することによって、優れた皮膚保湿効能を提供する。

10

【0037】

本発明の一実施例では、角質形成細胞に、本発明のフコステロールを処理した後、角質細胞膜形成の有無を測定した。その結果、本発明のフコステロールは角質細胞膜形成を効果的に促進することを確認した（＜実施例9＞参照）。

【0038】

本発明の他の一実施例では、角質形成細胞において、本発明のフコステロールを処理し、ロリクリン、インボルクリン、トランスグルタミナーゼを含む分化因子の発現の増加有無を測定した。その結果、本発明のフコステロールはロリクリン、インボルクリン、トランスグルタミナーゼのような皮膚保湿関連分化因子の発現を効果的に増加させることを確認した（＜実施例10＞、＜実施例11＞参照）。

20

【0039】

本発明の他の一実施例では、角質形成細胞において、本発明のフコステロールを処理し、フィラグリンとカスパーゼ14の発現の増加有無を測定した。その結果、本発明のフコステロールはフィラグリンとカスパーゼ14発現を効果的に増加させることを確認した（＜実施例12＞、＜実施例13＞参照）。

【0040】

従って、前記フコステロールは、保湿機能に優れていることから化粧品組成物、食品組成物又は薬学的組成物の有効な成分として用いることができる。

【0041】

フコステロールは、本発明の皮膚美白用化粧品組成物及び皮膚保湿用化粧品組成物の有効成分として含まれてもよいが、その量は、美白作用又は保湿機能を達成するのに有効な量に特に限定されるものではなく、全組成物の総重量に対して、0.001～10重量%が好ましく、より好ましくは、0.01～5重量%で含まれる。含量が0.001重量%未満のとき、目的とする美白又は保湿効果を期待することができなく、10重量%を超えると安全性又は剤形上の製造に困難がある。

30

【0042】

本発明のフコステロールを有効成分として含有する皮膚美白用化粧品組成物及び皮膚保湿用化粧品組成物は、その剤形において特に限定されない。例えば、柔軟化粧水、収斂化粧水、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、アイエッセンス、クレンジングクリーム、クルレンジンポム、クレンジングウォーター、パック、ジェル、パウダー、ボディーローション、ボディークリーム、ボディーオイル、ボディーエッセンスなどの化粧品に剤形化される。

40

【0043】

また、本発明の皮膚美白用化粧品組成物は、美白効果を上昇させるために、前記したフコステロール以外に他の従来の美白成分、例えば、アルブチン、アスコルビン酸誘導体などの美白成分をさらに含有していてもよく、これら従来の美白成分の種類及び含量は当業者に周知されている。

【0044】

本発明の皮膚保湿用化粧品組成物は、保湿機能を上昇させるために、前記したフコステロール以外に他の従来の保湿成分をさらに含有していてもよく、これら従来の保湿成分の

50

種類及び含量は当業者に周知されている。

【0045】

また、本発明に係るフコステロールは、美白又は保湿を目的に食品組成物の形態で提供される。本発明の食品組成物は、一般食品 (conventional foods)、栄養補助剤 (nutritional supplements)、健康機能食品 (health function foods)、食品添加剤 (food additives) 及び飼料などのあらゆる形態を含んでもよく、ヒト又は家畜をはじめとする動物を取食対象とする。前記類型の食品組成物は、当業界に公示された通常の方法により多様な形態に製造することができる。

【0046】

例えば、一般食品として、これらに限定されないが、飲料 (アルコール性飲料を含む)、果実及びその加工食品 (例：果物の缶詰、瓶詰、ジャム、ママレードなど)、魚類、肉類及びその加工食品 (例：ハム、ソーセージ、コンビーフなど)、パン類及び麺類 (例：うどん、ソバ、ラーメン、スパゲッティ、マカロニなど)、果汁、各種ドリンク、クッキー、飴、乳製品 (例：バター、チーズなど)、食用植物油脂、マーガリン、植物性タンパク質、レトルト食品、冷凍食品、各種調味料 (例：韓国式味噌、醤油、ソースなど) 等に前記フコステロールを添加して製造することができる。また、栄養補助剤としては、これらに限定されないが、カプセル、タブレット、丸などに前記フコステロールを添加して、製造することができる。また、健康機能食品としては、これらに限定されないが、例えば、前記フコステロール自体を茶、ジュース及びドリンクの形態に製造して飲むことができるように液状化、顆粒化、カプセル化及び粉末化して摂取することができる。また、前記フコステロールを食品添加剤の形態として用いるためには、粉末又は濃縮液形態に製造することができる。また、前記フコステロールと美白又は保湿効果があると知られた公示の有効成分と共に混合して、組成物の形態に製造することができる。

【0047】

フコステロールは、皮膚美白用食品組成物及び皮膚保湿用食品組成物の有効成分として含まれていてもよい。その量は、美白作用又は保湿機能を達成するのに有効な量に特に限定されないが、全組成物の総重量に対して、0.01～100重量%が好ましい。本発明の食品組成物は、フコステロールと共に美白又は保湿効果があると知られた他の有効成分と共に混合して、製造することができる。

【0048】

本発明のフコステロールは、それ自体又は塩若しくは薬学的に許容可能な塩の形態で使用する。前記用語「薬学的に許容可能」とは生理学的に許容され、ヒトに投与されるとき、通常的にアレルギー反応又はこれと類似な反応を引き起こさないことを意味し、前記塩には、薬学的に許容可能な遊離酸 (free acid) によって形成された酸付加塩が好ましい。前記遊離酸には、有機酸と無機酸を使うことができる。前記有機酸は、これらに制限されないが、クエン酸、酢酸、乳酸、酒石酸、マレイン酸、フマル酸、ギ酸、プロピオン酸、シュウ酸、トリフルオロ酢酸、安息香酸、グルコン酸、メタスルホン酸、グリコール酸、コハク酸、4-トールエンスルホン酸、グルタミン酸及びアスパラギン酸が挙げられる。また、前記無機酸はこれらに制限されないが、塩酸、臭素酸、硫酸及びリン酸が挙げられる。

【0049】

一方、前記本発明の薬学的組成物は、前記フコステロールを単独で含有するか、又は一つ以上の薬学的に許容される担体、賦形剤又は希釈剤を更に含有していてもよい。薬学的に許容される担体には、例えば、経口投与用担体又は非経口投与用担体を更に含んでもよい。経口投与用担体はラクトース、デンプン、セルロース誘導体、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸などが挙げられる。また、非経口投与用担体は、水、適したオイル、食塩水、水性グルコース及びグリコールなどを含んでもよく、安定化剤及び保存剤をさらに含んでもよい。適した安定化剤には、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム又はアスコルビン酸などの抗酸化剤がある。適した保存剤には、塩化ベンザルコニウム、メチルー又はプロピルパラベン及びクロロブタノールがある。その他の薬学的に

許容される担体には、次の文献に記載されているものを参考にすることができる (Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995)。

【0050】

本発明の薬学組成物は、ヒトをはじめとする哺乳動物にいかなる方法でも投与することができる。例えば、経口又は非経口的に投与することができる。非経口的な投与方法には、これらに限定されないが、静脈内、筋肉内、動脈内、骨髄内、硬膜内、心臓内、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、腸管、局所、舌下又は直腸内投与であってもよい。

【0051】

本発明の薬学組成物は、前述するような投与経路により経口投与用又は非経口投与用製剤に剤形化することができる。経口投与用製剤の場合に、本発明の組成物は、粉末、顆粒、錠剤、丸剤、糖衣錠剤、カプセル剤、液剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁液などに、当業界に公示された方法を用いて剤形化することができる。例えば、経口用製剤は、活性成分を固体賦形剤と配合した後、粉碎し、適した補助剤を添加した後、顆粒混合物に加工することによって錠剤又は糖衣錠剤を得ることができる。適した賦形剤の例には、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、キシリトール、エリスリトール及びマルチトールなどを含む糖類とトウモロコシデンプン、コムギデンプン、米デンプン及びポテトデンプンなどを含むデンプン類、セルロース、メチルセルロース、ナトリウムカルボキシメチルセルロース及びヒドロキシプロピルメチルセルロースなどを含むセルロース類、ゼラチン、ポリビニルピロリドンなどとの充填剤が含まれていてもよい。また、場合に応じて、架橋結合ポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸又はアルギン酸ナトリウムなどを崩壊剤として添加していてもよい。

【0052】

また、本発明の薬学的組成物は、抗凝集剤、潤滑剤、湿潤剤、香料、乳化剤及び防腐剤などを更に含んでもよい。非経口投与用製剤の場合には、注射剤、クリーム剤、ローション剤、外用軟こう剤、油剤、保湿剤、ゲル剤、エアゾール及び鼻腔吸入剤の形態に当業界に公示された方法で製剤化することができる。これらの剤形は、全ての製薬化学に一般的に公示された処方書である文献 (Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975. Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 18042, Chapter 87: Blaug, Seymour) に記載されている。

【0053】

本発明の薬学的組成物の総有効量は、単一投与量で患者に投与してもよく、多重投与量で長期間投与される分割治療方法 (fractionated treatment protocol) により投与することができる。本発明の薬学組成物は、疾患の程度により有効成分の含量を別にするすることができる。非経口投与時は、前記フコステロールに対して、一日に体重 1 kg 当り、好ましくは 0.01~50 mg、さらに好ましくは 0.1~30 mg の量で投与するように、そして、経口投与時は、前記フコステロールに対して、一日に体重 1 kg 当り、好ましくは 0.01~100 mg、さらに好ましくは 0.1~50 mg の量で投与するように、1回~数回に分けて投与することができる。しかし、前記フコステロールの容量は、薬学的組成物の投与経路及び治療回数だけでなく、患者の年齢、体重、健康状態、性別、疾患の重篤度、ダイエット及び排せつ率など多様な要因を考慮して、患者に対する有効投与量が決定されるものである。このような点を考慮するとき、当分野の通常の知識を有した者であれば、前記フコステロールを美白のための特定の用途に係る適切な有効投与量を決定することができる。本発明に係る薬学組成物は、本発明の効果を示す限り、その剤形、投与経路及び投与方法に特に制限されない。

【発明の効果】

【0054】

前述のように、本発明のフコステロールは、メラニン生成及びチロシナーゼ活性を抑制することによって卓越した美白効果があるので、美白用化粧料組成物、食品組成物又は薬学的組成物の有効な成分として用いることができる。

【0055】

また、本発明のフコステロールは、角質細胞膜を形成し、角質形成細胞の分化を促進して、天然保湿因子を生成することによって、卓越した保湿機能があるので、保湿用化粧品組成物、食品組成物又は薬学的組成物の有効な成分として用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【0056】

【図1】B16F10メラノーマ細胞において、フコステロール処理による細胞毒性を測定した結果である。

【図2】B16F10メラノーマ細胞において、フコステロール処理によるメラニン生成阻害効果を定量的に測定した結果である。

【図3】B16F10メラノーマ細胞において、フコステロール処理によるメラニン生成阻害効果を顕微鏡で観測した結果である。

【図4】B16F10メラノーマ細胞において、フコステロール処理によるチロシナーゼ活性阻害効果を測定した結果である。

【図5】B16F10メラノーマ細胞において、フコステロール処理によるチロシナーゼのタンパク質発現量低減を測定した結果である。

【図6】B16F10メラノーマ細胞において、フコステロール処理によるTRP-1とTRP-2のタンパク質発現量低減を測定した結果である。

【図7】B16F10メラノーマ細胞において、フコステロール処理によるMITFのmRNA発現量低減を測定した結果である。

【図8】HaCaTヒト角質形成細胞において、フコステロール処理による角質細胞膜形成効果を測定した結果である。

【図9】HaCaTヒト角質形成細胞において、フコステロール処理による分化因子、ロリクリン、インボルクリン、トランスグルタミナーゼのmRNA発現量増加を測定した結果である。

【図10】HaCaTヒト角質形成細胞において、フコステロール処理による分化因子、ロリクリン、インボルクリン、トランスグルタミナーゼのタンパク質発現量増加を測定した結果である。

【図11】HaCaTヒト角質形成細胞において、フコステロール処理によるフィラグリンとカスパーゼ14のmRNA発現量増加を測定した結果である。

【図12】HaCaTヒト角質形成細胞において、フコステロール処理によるフィラグリンとカスパーゼ14のタンパク質発現量増加を測定した結果である。

【発明を実施するための形態】

【0057】

以下、本発明を実施例により詳細に説明する。しかし、下記の実施例は、本発明に対する理解を助けるために例示目的のために提供されたものであって、本発明の範囲がこれらに限定されるものではない。

【0058】

以下の全ての試験結果において、活性分析は3回以上繰り返して行っており、その結果は平、均±標準偏差で示した。統計分析はANOVA分析法(Scheff test)を用いており、*P値が0.05以下の場合や##P値と**P値が0.01以下の場合に統計的に有意であるものと判定した。

【0059】

〔実施例1〕フコステロールの抽出及び分離精製

乾燥シルベチア・シリクオサ500gをミキサーで粉碎し、粉碎したシルベチア・シリクオサ試料を4倍体積のn-ヘキサンに添加し、48時間室温で冷浸して抽出した。抽出された試料はワットマン2番ろ紙でろ過し、濾過された抽出液を真空回転濃縮器で濃縮し、溶媒成分を除去した後、約15.0gのシルベチア・シリクオサn-ヘキサン抽出物を得た。n-ヘキサン可溶抽出物15gをシリカゲルオープンカラム(70-230mesh, Merck& Co., Whitehouse Station, NJ, USA)に積載し、核酸及び酢酸エチルの混合した溶媒シス

10

20

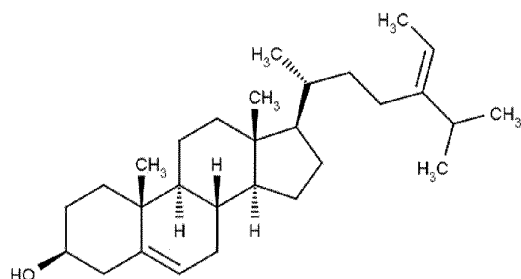
30

40

50

テムを用いて分取した。前記分取順に従って濃度こう配で40個の下部画分物に分けた後、そのうちの10番と30番の間の画分物から下記の式(1)で表される化合物であるフコステロールを分離(210mg)した。

【化4】



(1)

10

【0060】

〔実施例2〕メラノーマ細胞において、フコステロール処理による安全性効果

B16F10メラノーマ細胞を10%ウシ胎児血清が含まれたDMEM培地で培養した後、24ウェルプレートに、 2.5×10^4 cell/mL (最終体積1mL)で添加した。0.1、1、5、10、20 μ MのフコステロールをB16F10メラノーマ細胞にそれぞれ処理した。48時間処理後、培地を除去し、0.5mg/mLのMTT溶液を0.3mLずつ各ウェルに添加した後、培養器で4時間培養した。4時間後、MTT溶液を除去し、生成されたホルマザンにDMSO (dimethyl sulfoxide)を添加して溶解した後、570nmで吸光度を測定し、その結果を図1に示した。

20

【0061】

図1に示されるように、フコステロールをB16F10メラノーマ細胞に処理した結果、0~20 μ M濃度で細胞毒性を示さなかった。

【0062】

〔実施例3〕メラノーマ細胞でフコステロール処理によるメラニン生成の抑制効果

B16F10メラノーマ細胞を10%ウシ胎児血清が含まれたDMEM培地で培養した後、6ウェルプレートに 2×10^5 cell/mL (最終体積3mL)で添加した。24時間培養した後、培地を除去し、200nM α -MSH入りDMEM培地に溶解したフコステロールを、それぞれ5、10、20 μ M濃度で処理した。72時間後、6ウェルプレートで培養された培地を除去し、0.25%トリプシン-エチレンジアミン四酢酸 (trypsin-EDTA) 溶液を処理して細胞ペレットを回収し、1.5mLのチューブに移し、10,000rpmで10分間遠心分離して、上清を除去した。得られたペレットを60℃で乾燥し、1N NaOH 100 μ Lを添加し、細胞内メラニンを溶解した。この溶液をPBS (リン酸緩衝生理食塩水)で希釈した、ELISA判読機 (Versamax, Sunnyvale, CA, USA)で、405nmで吸光度を測定し、試料処理群のメラニン含量を求めた。このとき、フコステロールを添加しなかった細胞を対照群とし、対照群とフコステロールを処理した細胞のメラニン生成程度を測定した。下記の数式1により対照群対比メラニン含量を計算し、その結果を図2に示した。

30

40

【数1】

$$\text{対照群対比メラニン含量(\%)} = \frac{\text{各試験物質の吸光度}}{\text{対照群の吸光度}} \times 100 \quad (1)$$

【0063】

図2に示されるように、フコステロールは非常に優れたメラニン生成阻害効果を示した (** : $P < 0.01$)。

【0064】

〔実施例4〕メラノーマ細胞において、フコステロール処理によるメラニン生成抑制効果の顕微鏡観測

50

B 1 6 F 1 0 メラノーマ細胞を 1 0 % ウシ胎児血清が含まれた D M E M 培地で培養した後、6-ウェルプレートに 2×10^5 cell/mL (最終体積 3 mL) で添加した。24 時間培養した後、培地を除去し、 200 nM α -M S H 入り D M E M 培地に溶解したフコステロールを、それぞれ 5、 $20 \mu\text{M}$ 濃度で処理した。72 時間後、6-ウェルプレートで培養された培地を除去し、顕微鏡 (Olympus IX71 Model) で B 1 6 F 1 0 メラノーマ細胞を撮影し、その結果を図 3 に示した。

【0065】

図 3 に示されるように、フコステロールは α -M S H に誘導された B 1 6 F 1 0 メラノーマ細胞のメラニン生成を大きく阻害した。

【0066】

[実施例 5] メラノーマ細胞において、フコステロール処理によるチロシナーゼ活性の抑制効果

B 1 6 F 1 0 メラノーマ細胞を 1 0 % ウシ胎児血清が含まれた D M E M 培地で培養した後、6-ウェルプレートに 2×10^5 cell/mL (最終体積 3 mL) で添加した。24 時間培養した後、培地を除去し、 200 nM α -M S H 入り D M E M 培地に溶解したフコステロールを、それぞれ 5、10、 $20 \mu\text{M}$ 濃度で処理した。48 時間後、6-ウェルプレートで培養された培地を除去し、1% トリトン X-100 が含まれた P B S を添加して細胞を回収した。回収された細胞は、 $10,000 \text{ rpm}$ で 10 分間遠心分離した。上清のうち $150 \mu\text{L}$ を 96-ウェルプレートに添加し、L-ドーパ (L-3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン、L-D O P A) $50 \mu\text{L}$ を添加した。37℃で 30 分間培養した後、生成されたドーパクロムの量をマイクロプレートリーダー (Versa max, Sunnyvale, CA, USA) を利用して 475 nm で吸光度を測定した。このとき、フコステロールを添加しなかった細胞を対照群とし、対照群とフコステロールを処理した細胞のチロシナーゼ活性程度を測定した。下記の数式 2 により対照群対比チロシナーゼ活性を計算し、その結果を図 4 に示した。

【数 2】

$$\text{対照群対比チロシナーゼ活性含量(\%)} = \frac{\text{各試験物質の反応吸光度}}{\text{対照群の反応吸光度}} \times 100 \quad (2)$$

【0067】

図 4 に示されるように、フコステロールは非常に優れたチロシナーゼ阻害効果を示した (** : $P < 0.01$)。

【0068】

[実施例 6] メラノーマ細胞において、フコステロール処理によるチロシナーゼタンパク質発現の低減効果

B 1 6 F 1 0 メラノーマ細胞を 1 0 % ウシ胎児血清が含まれた D M E M 培地で培養した後、6-ウェルプレートに 2×10^5 cell/mL (最終体積 3 mL) で添加した。24 時間培養した後、培地を除去し、 200 nM α -M S H 入り D M E M 培地に溶解したフコステロールを、それぞれ 5、 $20 \mu\text{M}$ 濃度で処理した。24 時間後、細胞をプロテアーゼインヒビターカクテルが含まれた N P 40 緩衝溶液で溶解し、細胞から抽出されたタンパク質量をブラッドフォード (Bio-Rad proein assay dye reagent, Bradford) 試薬を用いて定量した。定量したタンパク質を 5 分間煮沸し、10% S D S - P A G E で電気泳動して分離し、分離されたタンパク質をニトロセルロース膜に伝達した。チロシナーゼの 1 次抗体を 2.5% ウシ血清アルブミンに 1 : 10000 の割合で希釈し、ニトロセルロース膜に伝達されたタンパク質と 20 時間室温で反応した。1 次抗体を反応した後、T B S T (tris-buffer saline tween20) を用いてニトロセルロース膜を 10 分間 3 回洗浄した。洗浄後、1 次抗体を認知する 2 次抗体 (anti-goat horseradish) を 2.5% ウシ血清アルブミンに 1 : 5000 になるように希釈し、ニトロセルロース膜と 2 時間室温で反応させ、T B S T を用いて 10 分ずつ 3 回洗浄した。タンパク質バンドは E C L ウェスタンブロットティング検出用試薬 (Amersham, Tokyo, Japan) を用いて発色し、G ; B O X E

10

20

30

40

50

F イメージシステム (Syngene, Cambridge, UK) により、発色されたタンパク質バンドを確認した。測定結果、チロシナーゼのタンパク質発現を確認しており、 α -チューブリンでタンパク質ロード量が一定であることを示した。

【0069】

図5に示されるように、フコステロールは、B16F10メラノーマ細胞でメラニン生成酵素であるチロシナーゼのタンパク質発現を低減した。

【0070】

[実施例7] メラノーマ細胞において、フコステロール処理によるチロシナーゼ関連TRP-1とTRP-2のタンパク質発現の低減効果

B16F10メラノーマ細胞を10%ウシ胎児血清が含まれたDMEM培地で培養した後、6ウェルプレートに 2×10^5 cell/mL (最終体積3mL) で添加した。24時間培養した後、培地を除去し、200nM α -MSH入りDMEM培地に溶解したフコステロールを、それぞれ5、20 μ M濃度で処理した。24時間後、細胞をプロテアーゼインヒビターカクテルが含まれたNP40緩衝溶液で溶解し、細胞から抽出されたタンパク質量をブラッドフォード試薬で定量した。定量されたタンパク質を5分間煮沸し、10%SDS-PAGEで電気泳動して分離し、分離されたタンパク質をニトロセルロース膜に伝達した。TRP-1とTRP-2の1次抗体を2.5%ウシ血清アルブミンに1:1000の割合で希釈し、ニトロセルロース膜に伝達されたタンパク質と20時間室温で反応した。1次抗体を反応した後、TBS-Tを用いてニトロセルロース膜を10分間3回洗浄した。洗浄後、1次抗体を認知する2次抗体 (anti-goat horseradish) を2.5%ウシ血清アルブミンに1:5000になるように希釈し、ニトロセルロース膜と2時間室温で反応し、TBS-Tを用いて10分ずつ3回にかけて洗浄した。タンパク質バンドは、ECLウェスタンブロッティング検出用試薬 (Amersham, Tokyo, Japan) を用いて発色し、G; BOX EFイメージシステム (Syngene, Cambridge, UK) を利用して発色されたタンパク質バンドを確認した。測定結果、TRP-1とTRP-2の発現を確認しており、 α -チューブリンでタンパク質ロード量が一定していることを示した。

【0071】

図6に示されるように、フコステロールはB16F10メラノーマ細胞において、メラニン生成酵素であるTRP-1とTRP-2のタンパク質発現を低減した。

【0072】

[実施例8] メラノーマ細胞において、フコステロール処理によるMITFのmRNA発現の低減効果

B16F10メラノーマ細胞を10%ウシ胎児血清が含まれたDMEM培地で培養した後、6ウェルプレートに 2×10^5 cell/mL (最終体積3mL) で添加した。24時間培養した後、培地を除去し、200nM α -MSH入りDMEM培地に溶解したフコステロールを、それぞれ5、20 μ M濃度で処理した。24時間後、TRIzol試薬 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて総RNAを分離した。分離された総RNAは、ナノドロップ (nano-drop, ND-1000) を利用して定量した。定量されたRNAを逆転写酵素 (reverse transcriptase) とPCR機械 (Applied biosystems, Fostercity, CA, USA) を利用してcDNAで合成した後、次の特定プライマーでPCRを行った：

GAPDH

フォワードプライマー：5' -ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' (配列番号1)

リバープライマー：5' -CCACCCGAGCCACATCGCTC-3' (配列番号2)

MITF

フォワードプライマー：5' -AGTCAACCTCTGAAGAGCA-3' (配列番号3)

リバープライマー：5' -CGTGTTTCATACCTGGGCACT-3' (配列番号4)

【0073】

PCR結果、増幅されたcDNAを1.5%アガロースゲルで電気泳動して分離し、G; BOX EFイメージシステム (Syngene, Cambridge, UK) を利用してcDNAバンドを確認し、その結果を図7に示した。

【0074】

図7に示されるように、フコステロールはB16F10メラノーマ細胞において、チロシナーゼ、TRP-1、TRP-2のタンパク質発現を調節するMITFのmRNA量を低減した。

【0075】

〔実施例9〕HaCaTヒト角質形成細胞において、フコステロール処理による角質細胞膜の形成効果

HaCaTヒト角質形成細胞を10%ウシ胎児血清が含まれたDMEM培地で培養した後、6-ウェルプレートに 2×10^5 cell/mL（最終体積3mL）で添加した。24時間培養した後、培地を除去し、DMEM培地に溶解したフコステロールを、それぞれ5、10、20 μ M濃度で処理した。96時間培養後、6-ウェルプレートで培養された培地を除去して細胞のペレットを回収し、1.5mLチューブに移し、10,000rpmで10分間遠心分離して、上清を除去した。得られたペレットを2%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）と20mM濃度のジチオトレイトール（DTT）を含有したトリス緩衝溶液を加え、煮沸し、340nmで吸光度を測定して、角質細胞膜形成効果を評価した。下記数式3により対照群対比角質細胞膜の形成程度を計算し、その結果を図8に示した。

【数3】

$$\text{対照群対比角質細胞膜形成量(\%)} = \frac{\text{各試験物質の吸光度}}{\text{対照群の吸光度}} \times 100 \quad (3)$$

【0076】

図8に示されるように、フコステロールは角質細胞膜の形成効果に優れ、保湿効果に優れていることが分かる（*：p<0.05）。

【0077】

〔実施例10〕HaCaTヒト角質形成細胞において、フコステロール処理によるロリクリン、インボルクリン、トランスグルタミナーゼのmRNA発現の増加効果

HaCaTヒト角質形成細胞を10%ウシ胎児血清が含まれたDMEM培地で培養した後、6-ウェルプレートに 2×10^5 cell/mL（最終体積3mL）で添加する。24時間培養した後、培地を除去し、DMEM培地に溶解したフコステロールを、それぞれ5、10、20 μ M濃度で処理した。24時間後、TRIzol試薬（Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）で総RNAを収穫し、逆転写した後、RT-PCR（reverse transcription-polymerase chain reaction）分析を次のように行った。まず、cDNA合成のために前記RNAを逆転写酵素（reverse transcriptase）で逆転写した。RT-PCRは次の特定プライマーで行っており、その結果を図9に示した：

GAPDH

フォワードプライマー：5'-TGACCTTGCCAGGGGTGCT-3'（配列番号5）

リバースプライマー：5'-CCACCCGAGCCACATCGCTC-3'（配列番号6）

ロリクリン

フォワードプライマー：5'-GGGTACCACGGAGGCGAAGGA-3'（配列番号7）

リバースプライマー：5'-ACTGAGGCACTGGGGTTGGGA-3'（配列番号8）

インボルクリン

フォワードプライマー：5'-GGGGCAGCTGAAGCACCTGG-3'（配列番号9）

リバースプライマー：5'-GAGACGGGCCACCTAGCGGA-3'（配列番号10）

トランスグルタミナーゼ

フォワードプライマー：5'-CTTCCGTCTGCGCACCCAG-3'（配列番号11）

リバースプライマー：5'-AGGCACAAACGACTGGCGCA-3'（配列番号12）

【0078】

図9に示されたように、フコステロール処理によりHaCaTヒト角質形成細胞において、ロリクリン、インボルクリン、トランスグルタミナーゼのmRNA発現が増加したことを確認することができた。従って、フコステロールは角質形成細胞で分化を促進するこ

とによって保湿効果に優れていることが分かる（＊： $p < 0.05$ 、＊＊： $p < 0.01$ ）。

【0079】

〔実施例11〕 H a C a T ヒト角質形成細胞において、フコステロール処理によるロリクリン、インボルクリン、トランスグルタミナーゼのタンパク質発現の増加効果

H a C a T ヒト角質形成細胞を10%ウシ胎児血清が含まれたDMEM培地で培養した後、6ウェルプレートに 2×10^5 cell/mL（最終体積3mL）で添加した。24時間培養した後、培地を除去し、DMEM培地に溶解したフコステロールを、それぞれ5、10、20 μ M濃度で処理した。24時間後、H a C a T ヒト角質細胞をプロテアーゼインヒビターカクテルが含まれたNP40緩衝溶液で溶解した。H a C a T ヒト角質細胞で抽出したタンパク質量は、ブラッドフォード（Bradford）法を利用して定量した。前記試料を5分間煮沸し、同量のタンパク質（20g）を10%SDS-PAGEで電気泳動して分離した。電気泳動後、分離されたタンパク質をニトロセルロース膜に伝達し、ウェスタンブロットを行った。1次抗体に反応した後、TBS-T（Tris-buffer Saline Tween20）を用いて10分間3回洗浄した。このとき、本発明で用いられた1次抗体の種類と希釈率は1：1000であった。2次抗体反応は、前記1次抗体反応を行った膜に2次抗体を添加し、室温で2時間反応した。このとき、2次抗体の希釈率は1：5000とした。タンパク質バンドは、ECLウェスタンブロットニング検出用試薬（Amersham, Tokyo, Japan）を用いて発色した。ロリクリン、インボルクリン、トランスグルタミナーゼのタンパク質発現を確認し、 α -チューブリンでタンパク質ロード量が一定であることを示した。

【0080】

図10に示されるように、フコステロール処理によりH a C a T ヒト角質細胞において、ロリクリン、インボルクリン、トランスグルタミナーゼのタンパク質発現が増加したことを確認することができた。従って、フコステロールはヒト角質形成細胞で分化を促進することによって保湿機能に優れていることが分かる。

【0081】

〔実施例12〕 H a C a T ヒト角質形成細胞において、フコステロール処理によるフィラグリンとカスパーゼ14のmRNA発現の増加効果

H a C a T ヒト角質形成細胞を10%ウシ胎児血清が含まれたDMEM培地で培養した後、6ウェルプレートに 2×10^5 cell/mL（最終体積3mL）で添加した。24時間培養した後、培地を除去し、DMEM培地に溶解したフコステロールを、それぞれ5、10、20 μ M濃度で処理した。24時間後、TRIzol試薬（Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）を用いて総RNAを収穫し、逆転写した後、RT-PCR（reverse transcription-polymerase chain reaction）分析を次のように行った。まず、cDNA合成のために前記RNAを逆転写酵素（reverse transcriptase）で逆転写した。RT-PCRは次の特定プライマーで行っており、その結果を図11に示した：

GAPDH

フォワードプライマー：5'-TGACCTTGGCCAGGGTGCT-3'（配列番号5）

リバースプライマー：5'-CCACCCGAGCCACATCGCTC-3'（配列番号6）

フィラグリン

フォワードプライマー：5'-AGTGCACTCAGGGGCTCACA-3'（配列番号13）

リバースプライマー：5'-CCGGCTTGGCCGTAATGTGT-3'（配列番号14）

カスパーゼ14

フォワードプライマー：5'-CGGGACTCACAACCAAGGA-3'（配列番号15）

リバースプライマー：5'-GGGTCCTTTGTTCTCTCTCG-3'（配列番号16）

【0082】

図11に示されるように、フコステロール処理によりH a C a T ヒト角質形成細胞において、フィラグリン、カスパーゼ14のmRNA発現が増加したことを確認することができた。従って、フコステロールは角質形成細胞でフィラグリンとカスパーゼ14発現量増

加を通して天然保湿因子を生成することによって保湿効果に優れていることが分かる（＊： $p < 0.05$ 、＊＊： $p < 0.01$ ）。

【0083】

〔実施例13〕H a C a Tヒト角質形成細胞におうて、フコステロール処理によるフィラグリンとカスパーゼ14のタンパク質発現の増加効果

H a C a Tヒト角質形成細胞を10%ウシ胎児血清が含まれたDMEM培地で培養した後、6ウェルプレートに 2×10^5 cell/mL（最終体積3mL）で添加した。24時間培養した後、培地を除去し、DMEM培地に溶解したフコステロールを、それぞれ5、10、20 μ M濃度で処理した。24時間後、H a C a Tヒト角質細胞をプロテアーゼインヒビターカクテルが含まれたNP40緩衝溶液で溶解させた。H a C a Tヒト角質細胞で抽出したタンパク質量はブラッドフォード（Bradford）法を利用して定量した。前記試料を5分間煮沸し、同量のタンパク質（20 g）を10%SDS-PAGEで電気泳動して分離した。電気泳動後、分離されたタンパク質をニトロセルロース膜に伝達し、ウェスタンブロットを行った。1次抗体に反応した後、TBS-T（Tris-buffer Saline Tween20）を用いて10分間3回洗浄した。このとき、本発明で用いられた1次抗体の種類と希釈率は1：1000であった。2次抗体反応は、前記1次抗体反応を行った膜に2次抗体を添加し、室温で2時間反応した。このとき、2次抗体の希釈率は1：5000とした。タンパク質バンドは、ECLウェスタンブロットニング検出用試薬（Amersham, Tokyo, Japan）を用いて発色した。フィラグリン、カスパーゼ14のタンパク質発現を確認したし、 α -チューブリンでタンパク質ロード量が一定していることを示した。

【0084】

図12に示されるように、フコステロール処理によりH a C a Tヒト角質形成細胞において、フィラグリン、カスパーゼ14のタンパク質発現が増加したことを確認することができた。従って、フコステロールは角質形成細胞でフィラグリンとカスパーゼ14発現量増加を通して天然保湿因子を生成することによって保湿効果に優れていることが分かる。

【0085】

本発明に係るフコステロールを有効成分として含有する皮膚美白用化粧料の剤形例を説明するが、本発明はこれを限定するためのものでない、具体的に説明するためのものである。前記皮膚美白効果に優れたフコステロールを持って、下記のような組成成分及び組成比により剤形例1～6の皮膚美白用化粧料組成物を通常の方法に随って製造した。

【0086】

＜剤形例1-化粧品＞

＜1-1＞栄養化粧水（乳液）

前記＜実施例1＞のフコステロールを下記の表1の栄養化粧水剤形の条件で通常の方法により栄養化粧水を製造した。

【0087】

【表 1】

配合成分	剤形例1－1 (重量%)
フコステロール	2.0
スクアラン	5.0
蜜ろう	4.0
ポリソルベート60	1.5
セスキオレイン酸ソルビタン	1.5
流動パラフィン	0.5
トリ(カプリン酸／カプリル酸)グリセリル	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
カルボキシビニルポリマー	0.1
トリエタノールアミン	0.2
防腐剤、色素、香料	適量
精製水	100まで

10

20

【0088】

<1－2> 柔軟化粧水（スキンローション）

前記<実施例1>のフコステロールを下記の表2の柔軟化粧水剤形の条件で通常の方法により柔軟化粧水を製造した。

【0089】

30

【表 2】

配合成分	剤形例1-2 (重量%)
フコステロール	2.0
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
カルボキシビニルポリマー	0.1
PEG12ノニルペニレテル	0.2
ポリソルベート80	0.4
エタノール	10.0
トリエタノールアミン	0.1
防腐剤、色素、香料	適量
精製水	100まで

10

20

【0090】

<1-3>栄養クリーム

前記<実施例1>のフコステロールを下記の表3の栄養クリーム剤形割の条件で通常の方法により栄養クリームを製造した。

【0091】

【表 3】

配合成分	剤形例1-3 (重量%)
フコステロール	2.0
ポリソルベート60	1.5
セスキオレイン酸ソルビタン	0.5
PEG60硬化ヒマシ油	2.0
流動パラフィン	10
スクアラン	5.0
トリ(カプリン酸／カプリル酸)グリセリル	5.0
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	適量
色素	適量
香料	適量
精製水	100まで

10

20

【0092】

<1-4>マッサージクリーム

前記<実施例1>のフコステロールを下記の表4のマッサージクリーム剤形の条件で通常の方法によりマッサージクリームを製造した。

30

【0093】

【表 4】

配合成分	剤形例1-4 (重量%)
フコステロール	1.0
蜜ロウ	10.0
ポリソルベート60	1.5
PEG60硬化ヒマシ油	2.0
セスキオレイン酸ソルビタン	0.8
流動パラフィン	40.0
スクアラン	5.0
トリ(カプリン酸／カプリル酸)グリセリル	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、色素、香料	適量
精製水	100まで

10

20

【0094】

<1-5> パック

前記<実施例1>のフコステロールを下記の表5のパック剤形の条件で通常の方法によりパックを製造した。

【0095】

30

【表 5】

配合成分	剤形例1-5 (重量%)
フコステロール	1.0
ポリビニルアルコール	13.0
ナトリウムカルボキシメチルセルロース	0.2
グリセリン	5.0
アルラントイン	0.1
エタノール	6.0
PEG12ノニルペニレテル	0.3
ポリソルベート60	0.3
防腐剤、色素、香料	適量
精製水	100まで

40

50

【0096】

<1-6>ジェル

前記<実施例1>のフコステロールを下記の表6のジェル剤形の条件で通常の方法によりジェルを製造した。

【0097】

【表6】

配合成分	剤形例1-6 (重量%)
フコステロール	0.5
エチレンジアミン酢酸ナトリウム	0.05
グリセリン	5.0
カルボキシビニルポリマー	0.3
エタノール	5.0
PEG60硬化ヒマシ由	0.5
トリエタノールアミン	0.3
防腐剤、色素、香料	適量
精製水	100まで

10

20

【0098】

<剤形例2-食品>

<2-1>健康食品の製造

前記<実施例1>のフコステロール 1000mg、ビタミンAアセテート70μg、ビタミンE 1.0mg、ビタミンB 10.13mg、ビタミンB2 0.15mg、ビタミンB6 0.5mg、ビタミンB1 20.2μg、ビタミンC 10mg、ビオチン10μg、ニコチン酸アミド1.7mg、葉酸50μg、パントテン酸カルシウム0.5mg、硫酸第1鉄を1.75mg、酸化亜鉛0.82mg、炭酸マグネシウム25.3mg、第1リン酸カリウム15mg、第2リン酸カルシウム55mg、クエン酸カリウム90mg、炭酸カルシウム100mg、塩化マグネシウム24.8mgを混合して製造することができ、その配合比を任意に変えて実施してもよく、通常健康食品製造方法により前記成分を混合した後、顆粒を製造して、通常の方法により健康食品組成物製造に用いることができる。

30

【0099】

<2-2>健康飲料の製造

前記<実施例1>のフコステロール1000mg、クエン酸1000mg、オリゴ糖100g、梅の実濃縮液2g、タウリン1gに精製水を加え、全体900mL。通常健康飲料製造方法により前記の成分を混合した後、約1時間85で攪拌加熱した後、得られた溶液をろ過し、滅菌された2L容器に取得し、密封滅菌した後、冷蔵保管し、健康飲料組成物製造に用いることができる。

40

【0100】

<2-3>チューインガム

ガムベース20重量%、砂糖76.9重量%、香料1重量%及び水2重量%と前記<実施例1>のフコステロール0.1重量%を配合して、通常の方法でチューインガムを製造した。

【0101】

<2-4>キャンディ

50

砂糖 60 重量%、水飴 39.8 重量%及び香料 0.1 重量%と前記<実施例 1>のフコステロール 0.1 重量%を配合して、通常の方法でキャンディを製造した。

【0102】

<2-5>ビスケット

薄力 1 級 25.59 重量%、中力 1 級 22.22 重量%、精糖 4.80 重量%、食塩 0.73 重量%、ブドウ糖 0.78 重量%、パームショートニング 11.78 重量%、アンモニウム 1.54 重量%、重曹 0.17 重量%、重亜硫酸ナトリウム 0.16 重量%、米粉 1.45 重量%、ビタミン B 0.0001 重量%、ミルク香料 0.04 重量%、水 20.6998 重量%、全脂粉乳 1.16 重量%、代用粉乳 0.29 重量%、第 1 リン酸カルシウム 0.03 重量%、散布塩 0.29 重量%及び噴霧乳 7.27 重量%と前記<実施例 1>のフコステロール重量%を配合して通常の方法でビスケットを製造した。

10

【0103】

<剤形例 3-医薬品>

<3-1>散剤

前記<実施例 1>のフコステロール 50 mg、結晶セルロース 2 g を混合した後、通常の散剤製造方法に従って機密包に充填して散剤を製造した。

【0104】

<3-2>錠剤

前記<実施例 1>のフコステロール 50 mg、結晶セルロース 400 mg、ステアリン酸マグネシウム 5 mg を混合した後、通常の錠剤製造方法に従って打錠して、錠剤を製造した。

20

【0105】

<3-3>カプセル剤

前記<実施例 1>のフコステロール 30 mg、乳清タンパク質 100 mg、結晶セルロース 400 mg、ステアリン酸マグネシウム 6 mg を混合した後、通常のカプセル剤製造方法に従ってゼラチンカプセルに充填して、カプセル剤を製造した。

【0106】

<3-4>注射剤

通常の注射剤製造方法により、活性成分を注射用蒸留水に溶解し、pH を約 7.5 で調節した後、前記<実施例 1>のフコステロール 100 mg、注射用蒸留水、pH 調節剤を混合して、2 mL 容量のアンプルに充填し、滅菌して、注射剤を製造した。

30

【0107】

(産業上の利用可能性)

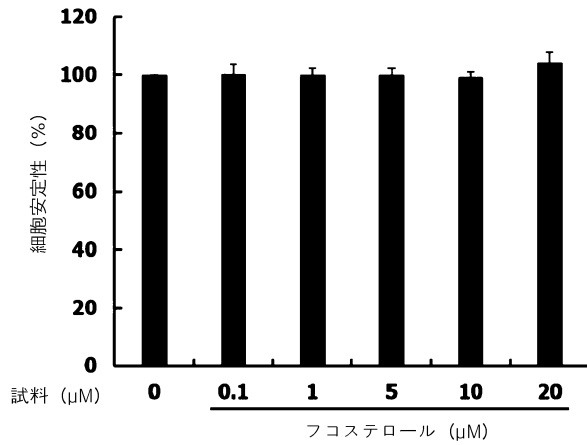
前記式(1)のフコステロールは、メラニン生成及びチロシナーゼ活性を抑制することによって卓越した美白効果があり、美白用化粧品組成物、食品組成物又は薬学的組成物を製造することができるので、産業上利用度が高い。

【0108】

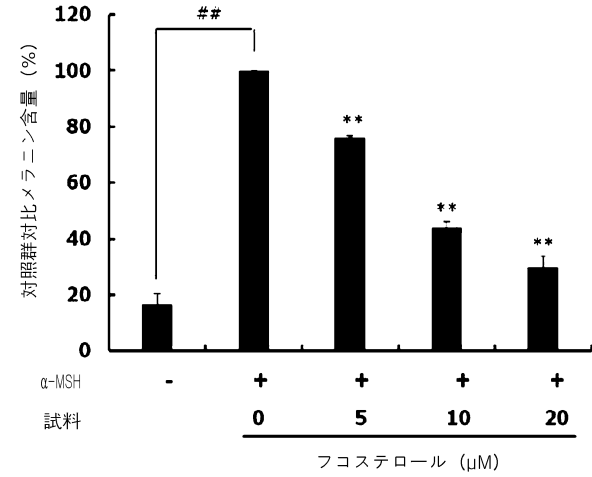
また、前記式(1)のフコステロールは、角質細胞膜形成、角質形成細胞分化促進及び天然保湿因子を生成することによって、卓越した保湿機能があり、保湿用化粧品組成物、食品組成物又は薬学的組成物を製造することができるので、産業上利用度が高い。

40

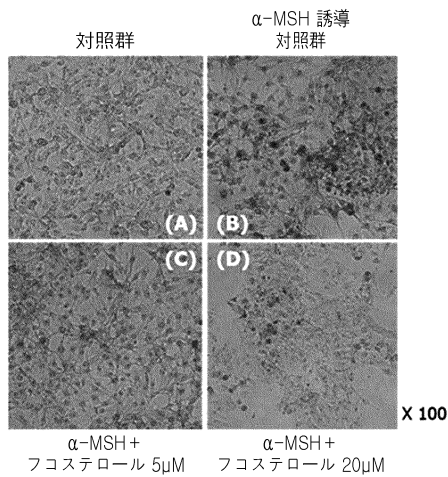
【図 1】



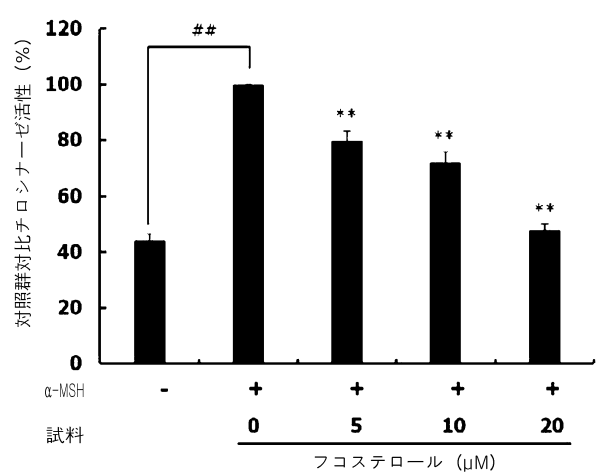
【図 2】



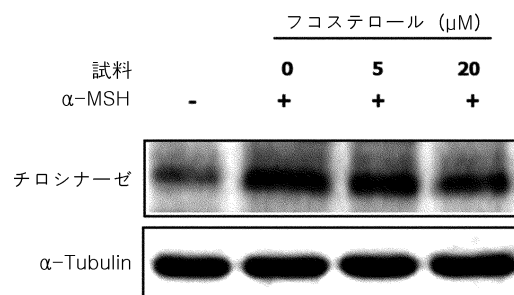
【図 3】



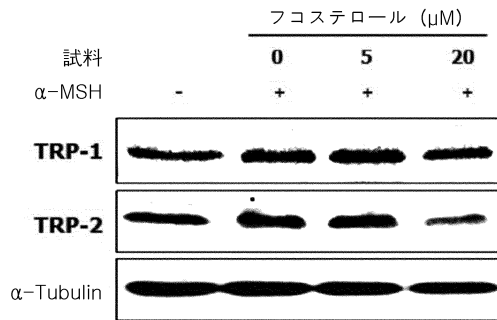
【図 4】



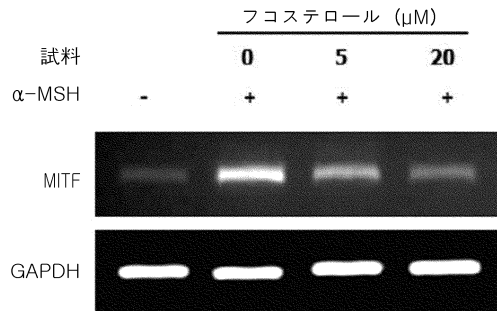
【図 5】



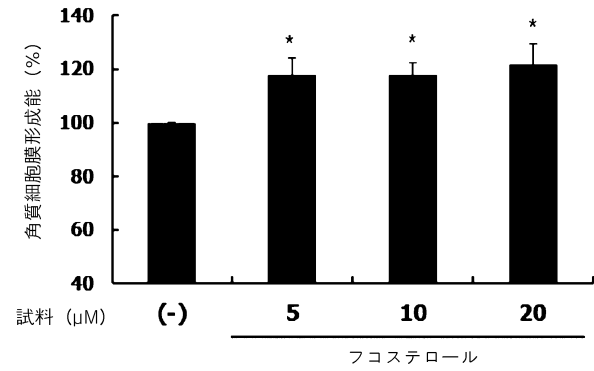
【図 6】



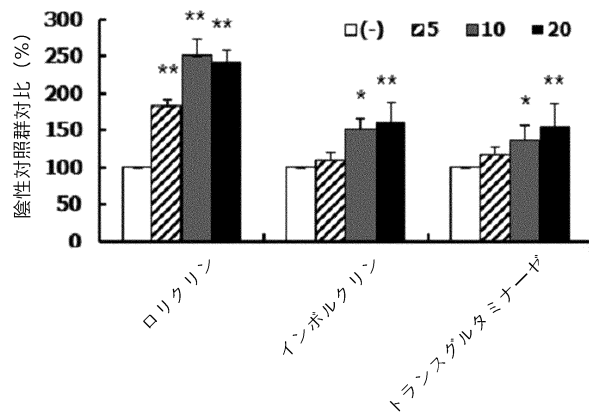
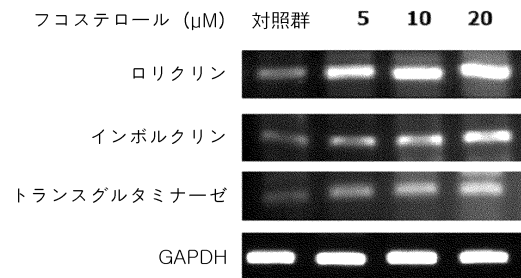
【図 7】



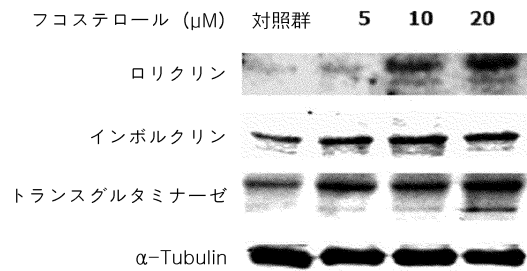
【図 8】



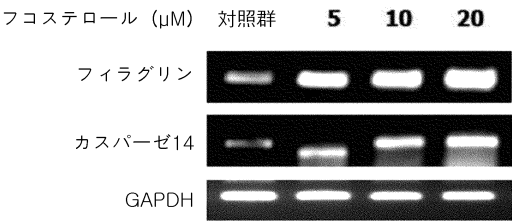
【図 9】



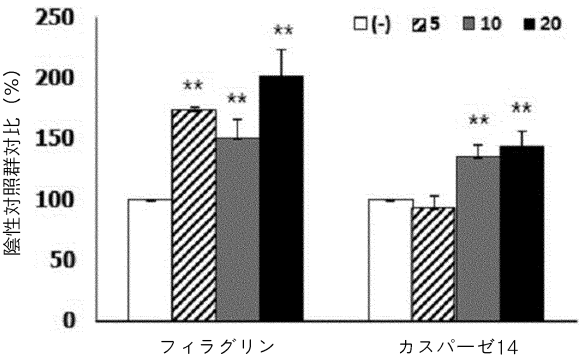
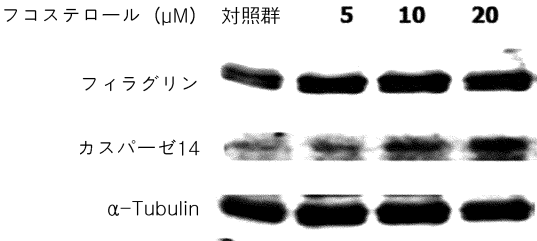
【図 10】



【図 1 1】



【図 1 2】



【配列表】

[0006474418000001.app](#)

フロントページの続き

(72)発明者 ウー ソン ウク

大韓民国 ソウル 158-758 ヤンチョング モクドンジュンアンブクロー 38 ロッ
テ キャッスル ウィナー アpartment 109-904

(72)発明者 キム チャン ヒ

大韓民国 ソウル 151-783 グッナクグ シンウォンロー 26 ドンブ アpartment
ント 103-203

(72)発明者 キム ミ ボ

大韓民国 ジェジュード 697-826 ソグウィポーシ シンソーロ 108ベオンーギル
3

審査官 松元 麻紀子

(56)参考文献 特開平11-001437 (JP, A)

韓国公開特許第10-2013-0136048 (KR, A)

国際公開第2013/184884 (WO, A1)

特開平10-316550 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 8/63

A23L 33/105

A61Q 19/02

Mintel GNPD

CAplus/REGISTRY (STN)

JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamIII)