

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-237098

(P2010-237098A)

(43) 公開日 平成22年10月21日(2010.10.21)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 25/20	(2006.01)	GO 1 N 25/20	B	2 GO 4 O
A 6 1 B 5/00	(2006.01)	A 6 1 B 5/00	M	4 C 1 1 7

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2009-86664 (P2009-86664)	(71) 出願人	000001959
(22) 出願日	平成21年3月31日 (2009.3.31)		株式会社資生堂
			東京都中央区銀座7丁目5番5号
		(74) 代理人	100099759
			弁理士 青木 篤
		(74) 代理人	100077517
			弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100087871
			弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次
		(74) 代理人	100117019
			弁理士 渡辺 陽一
		(74) 代理人	100108903
			弁理士 中村 和広

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 角層評価方法及び抗肌荒れ成分選別方法

(57) 【要約】

【課題】角層構造の状態をバリアー性に関連付けて直接且つ定量的に評価することが可能な方法を提供する。

【解決手段】角層試料を示差走査熱量測定し、角層細胞間脂質構造の破壊に由来する吸熱ピーク、及び／又は、ケラチンタンパク質の変性に由来する吸熱ピークのピーク強度及び／又はピーク温度に基づいて評価を行なう。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

角層の状態を評価する方法であって、角層試料を示差走査熱量測定し、角層細胞間脂質構造の破壊に由来する吸熱ピーク、及び／又は、ケラチンタンパク質の変性に由来する吸熱ピークのピーク強度及び／又はピーク温度に基づいて評価を行なう、角層評価方法。

【請求項 2】

示差走査熱量測定を、昇温速度 0.2 K/分から 20 K/分の昇温下で行う、請求項 1 に記載の角層評価方法。

【請求項 3】

ケラチンタンパク質の変性に由来する吸熱ピークが、80℃以上、99℃以下の範囲に存在する、請求項 1 又は 2 に記載の角層評価方法。 10

【請求項 4】

角層細胞間脂質構造の破壊に由来する吸熱ピークが、56℃以上、70℃以下の範囲に存在する、請求項 1～3 の何れか 1 項に記載の角層評価方法。

【請求項 5】

角層細胞間脂質構造の破壊に由来する吸熱ピーク、及び／又は、ケラチンタンパク質の変性に由来する吸熱ピークのピーク強度が上昇した場合に、角層の状態が改善したと判断する、請求項 1～4 の何れか 1 項に記載の角層評価方法。

【請求項 6】

角層細胞間脂質構造の破壊に由来する吸熱ピーク、及び／又は、ケラチンタンパク質の変性に由来する吸熱ピークのピーク温度が高温側にシフトした場合に、角層の状態が改善したと判断する、請求項 1～5 の何れか 1 項に記載の角層評価方法。 20

【請求項 7】

抗肌荒れ成分を選別する方法であって、抗肌荒れ成分の候補化学物質を適用した角層試料について、請求項 1～6 の何れか 1 項に記載の角層評価方法により角層の状態を評価し、得られた評価結果に基づいて抗肌荒れ成分の選別を行う、抗肌荒れ成分選別方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、肌荒れ等の角層の状態を評価する方法、及び、皮膚外用剤に用いられる抗肌荒れ成分を選別する方法に関する。 30

【背景技術】**【0002】**

厚さが約 10～20 μm であって、皮膚最外層の組織である角層は、生体内に必須な水を保持し、生体外から有害物質の侵入を防ぐ皮膚のバリアー機能の主体である。中でも、主にセラミド、コレステロール、脂肪酸から形成される角層細胞間脂質は、バリアー機構に重要な働きをしていると考えられている。

【0003】

角層構造が破壊されてバリアー機能が損なわれると、肌荒れ等の症状が生じる。抗肌荒れ効果を有する皮膚外用剤は、破壊された角層構造を改善してそのバリアー機能を回復することにより効果を発揮する。よって、皮膚外用剤の開発分野では、皮膚外用剤に用いられる抗肌荒れ成分を選別するために、角層構造を直接且つ定量的に解析し、抗肌荒れ成分の候補物質が角層構造に与える効果を検証することが求められる。 40

【0004】

角層細胞間脂質の構造を解析する方法としては、X線回折法、赤外吸収法等が知られている。これらの方法を用いると、細胞間脂質の状態をおおよそ把握することができるものの、角層細胞間脂質の状態をバリアー性に関連付けて解析することができない。

【0005】

そこで、角層をスピンプローブ剤（スピンラベル剤）で処理することによって、角層の細胞間脂質の構造を評価することが可能な電子スピン共鳴（Electron Spin Resonance： 50

E S R) が注目されている。E S Rを用いて測定される角層の細胞間脂質の流動性は、秩序度 S として表される (非特許文献 1 参照)。しかしながら、生体外 (ex vivo) の E S R スペクトルから幾何学的手法を用いて得られる秩序度 S は、角層を界面活性剤で処理した場合でも変化量が微小であり、データのバラツキも大きい。

【0006】

これに対して、皮膚角層の E S R スペクトルを、コンピューターシミュレーション法を用いて解析することにより得られる秩序度 S_0 は、細胞間脂質の流動性の微妙な変化を検出することが可能であることが報告されている (非特許文献 2 参照)。しかしながら、角層の細胞間脂質の秩序度 S 及び S_0 の測定精度の更なる向上が求められている。

【0007】

一方、皮膚刺激性試験、経皮吸収試験、皮膚基礎科学研究等で用いられるウサギ、モルモット等の試験動物を代替する評価キットとして、培養皮膚 (表皮) モデルが知られている (非特許文献 3 参照)。このような培養皮膚 (表皮) モデルの皮膚 (表皮) 組織の構造を評価する方法としては、H & E 染色や免疫染色を用いる光学顕微鏡観察、透過型電子顕微鏡観察等が知られている (非特許文献 4 参照)。しかしながら、皮膚 (表皮) 組織の角層細胞間脂質の状態をバリアー性と関連付けて解析することができない。

【0008】

これらの技術に対して、特許文献 1 (特開 2008-39761 号公報) には、支持体に付着した角層をスピンプローブ剤 (スピンラベル剤) で処理し、電子スピン共鳴 (E S R) 測定を行うことにより、角層の細胞間脂質の秩序度や流動性の測定精度及び解析精度を向上させた角層評価方法が記載されている。しかしながら、本文献記載の技術では、角層の剥離に接着剤を使用しており、かかる接着剤が E S R 測定に対して与える影響を排除できない。また、角層細胞間脂質の秩序や流動性に関してスピンプローブ剤を用いて間接的に測定するため、スピンプローブ剤の角質への分布が不明であり、再現性や定量性に欠けるという課題もある。

【0009】

また、特許文献 2 (特開 2006-45186 号公報) には、グルコース、ラフィノース、或いはグルコースと少糖類を含有する皮膚の角層細胞におけるラメラ構造再生剤が記載されている。また、本文献には、被検物質によるラメラ構造の再生度合いを評価する際に、人工細胞間脂質に被検物質を加え、偏光顕微鏡下のマルターゼクロス上でのラメラ構造の総面積に基づいて評価を行ったことが開示されている。しかしながら、本文献記載の技術でも、角層の状態を定量的に評価することは困難である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献 1】特開 2008-39761 号公報

【特許文献 2】特開 2006-45186 号公報

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献 1】Int. J. Pharm., 197:193-202, 2000

【非特許文献 2】SPECTROCHIMICA ACTA PART A 63 816-820, 2006

【非特許文献 3】FRAGRANCE JOURNAL, 56-60, 2006-1

【非特許文献 4】Arch Dermatol Res, 285:466-474, 1993

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

従って、角層構造の状態をバリアー性と関連付けて、直接且つ定量的に評価することが可能な方法が求められていた。

本発明は以上の課題に鑑みてなされたもので、その目的は、角層構造の状態をバリアー性と関連付けて直接且つ定量的に評価することが可能な方法を提供すること、並びに、か

10

20

30

40

50

かる角層評価方法を用いることにより、皮膚外用剤に用いられる抗肌荒れ成分を効率的に選別することが可能な方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明者等は上記課題に鑑みて鋭意検討した結果、角層試料に対して示差走査熱量測定(differential scanning calorimetry: DSC)を行い、角層細胞間脂質構造の破壊に由来する吸熱ピーク、及び／又は、ケラチンタンパク質の変性に由来する吸熱ピークのピーク強度及び／又はピーク温度に基づいて評価を行なうことにより、角層構造の状態をバリアー性と関連付けて直接且つ定量的に評価することが可能となるのを見出して、本発明を完成させた。

10

【0014】

即ち、本発明の主旨は、角層の状態を評価する方法であって、角層試料を示差走査熱量測定し、角層細胞間脂質構造の破壊に由来する吸熱ピーク、及び／又は、ケラチンタンパク質の変性に由来する吸熱ピークのピーク強度及び／又はピーク温度に基づいて評価を行なう、角層評価方法に存する。

【0015】

ここで、示差走査熱量測定を、昇温速度0.2 K/分から20 K/分の昇温下で行うことが好ましい。

なお、ケラチンタンパク質の変性に由来する吸熱ピークは、好適には80℃以上、99℃以下の範囲に存在する。

20

また、角層細胞間脂質構造の破壊に由来する吸熱ピークは、好適には56℃以上、70℃以下の範囲に存在する。

【0016】

また、角層細胞間脂質構造の破壊に由来する吸熱ピーク、及び／又は、ケラチンタンパク質の変性に由来する吸熱ピークのピーク強度が上昇した場合に、角層の状態が改善したと判断することが好ましい。

また、角層細胞間脂質構造の破壊に由来する吸熱ピーク、及び／又は、ケラチンタンパク質の変性に由来する吸熱ピークのピーク温度が高温側にシフトした場合に、角層の状態が改善したと判断することも好ましい。

【0017】

30

本発明の別の主旨は、抗肌荒れ成分を選別する方法であって、抗肌荒れ成分の候補化学物質を適用した角層試料について、上述の角層評価方法により角層の状態を評価し、得られた評価結果に基づいて抗肌荒れ成分の選別を行う、抗肌荒れ成分選別方法に存する。

【発明の効果】

【0018】

本発明の角層評価方法によれば、角層構造の状態をバリアー性と関連付けて直接且つ定量的に評価することが可能である。

また、本発明の抗肌荒れ成分選別方法によれば、抗肌荒れ成分を効率的に選別することが可能である。

【図面の簡単な説明】

40

【0019】

【図1】 SDS処理後及びフィトステロール処理後の皮表水分量比を表わすグラフである。

【図2】 SDS処理後及びフィトステロール処理後のTEWL比を表わすグラフである。

【図3】 未処理ユカタンミニブタ角層のDSCプロファイルである。

【図4】 SDS処理ユカタンミニブタ角層のDSCプロファイルである。

【図5】 フィトステロール処理ユカタンミニブタ角層のDSCプロファイルである。

【図6】 評価例1～8及び比較評価例1、2の各角層試料に関してN=3で測定したDSCプロファイルにおける、角層細胞間脂質構造破壊に由来するピーク温度の平均値を示すグラフである。

50

【図 7】評価例 2（S D S 処理）、評価例 4（マカデミアナッツ油脂肪酸フィトステリル処理）、及び比較評価例 2（ジイソステアリン酸グリセリル処理）の角層試料の皮表水分量比を示すグラフである。

【図 8】評価例 2（S D S 処理）、評価例 4（マカデミアナッツ油脂肪酸フィトステリル処理）、及び比較評価例 2（ジイソステアリン酸グリセリル処理）の角層試料の T E W L 比を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0020】

本発明の角層評価方法は、角層試料に対して示差走査熱量測定を行い、角層細胞間脂質構造の破壊に由来する吸熱ピーク、及び／又は、ケラチンタンパク質の変性に由来する吸熱ピークのピーク強度及び／又はピーク温度に基づいて、角層の状態を評価することを特徴とする。

【0021】

示差走査熱量測定（differential scanning calorimetry：D S C）は、示差熱分析（differential thermal analysis：D T A）を改良した熱分析法であって、測定試料と基準物質との間の熱量の差を計測することで、融点やガラス転移点等の熱特性を求める方法である。

示差走査熱量測定はその原理によって熱流速型と熱補償型とに分けられ、本発明ではいずれを用いることも可能であるが、感度の点からは熱流速型が、分解能の点からは熱補償型が好ましい。

D S C 分析は示差走査熱量計（differential scanning calorimeter）を用いて行うことができる。示差走査熱量計は各社から販売されている。例としては、セイコーインスツル株式会社（S I I）製の DSC120 等が挙げられる。

【0022】

角層試料とは、生物（通常は哺乳類、好ましくはブタ、ヒト）の皮膚の角層を少なくとも含んでなる試料をいう。角層以外の組織や部位を含んでいてもよいが、評価の精度の点からは、試料の通常 50 質量％以上、好ましくは 80 質量％以上が角層であることが好ましく、角層のみからなることが最も好ましい。角層試料を生物から取得後、直ぐに本発明の角層評価方法に供してもよいが、乾燥下常温又は低温での保存や各種の処理後に使用してもよい。

【0023】

角層試料の示差走査熱量測定は、通常は昇温条件下で行う。

昇温速度は制限されないが、通常 0.2 K／分以上、好ましくは 0.5 K／分以上、より好ましくは 1 K／分以上、また、通常 20 K／分以下、好ましくは 10 K／分以下、より好ましくは 5 K／分以下の範囲が好適である。

走査温度範囲も制限されず、後述する所望の吸熱ピークが観察できる範囲であればよい。例としては、5℃付近から 130℃付近まで走査すればよい。

【0024】

示差走査熱量測定により、D S C プロファイルが得られる。D S C プロファイルは、通常は横軸に時間又は温度、縦軸に測定試料の発熱速度（熱流）をプロットして得られるもので、昇温過程における測定試料の発熱変化及び吸熱変化が、それぞれ発熱ピーク及び吸熱ピークとして現われる。

“Stratum Corneum Lipid Phase Transitions and Water Barrier Properties”, G. M. Golden, et al., Biochemistry, 1987, 26, 2382-2388（Golden 文献）にも記載のように、角層試料の示差走査熱量測定により得られた D S C プロファイルには、通常は 3 つの主要な吸熱ピークが現われる（なお、上記 Golden 文献ではブタの角層を用いている）。

これらのピークのうち、最も低温側に存在するピークが、角層細胞間脂質構造の破壊に由来する吸熱ピークであり、最も高温側に存在するピークが、ケラチンタンパク質の変性に由来する吸熱ピークであり、それらの間に存在するピークが、角層細胞間脂質とケラチンタンパク質との相互作用に由来する吸熱ピークである。

具体的に、ケラチンタンパク質の変性に由来する吸熱ピークは、通常80℃以上、好ましくは88℃以上、また、通常99℃以下、好ましくは97℃以下の範囲に存在することが好適である。

また、角層細胞間脂質構造の破壊に由来する吸熱ピークは、通常56℃以上、好ましくは58℃以上、また、通常70℃以下、好ましくは68℃以下の範囲に存在することが好適である。

【0025】

実施例にて後述するように、本発明者等は、角層試料のDSCプロファイルにおける、角層細胞間脂質構造の破壊に由来する吸熱ピーク、及び、ケラチンタンパク質の変性に由来する吸熱ピークのピーク強度及びピーク温度が、角層の状態を表わす皮表水分量及び経皮水分蒸散量（TEWL：Trans-Epidermal Water Loss）と相関を有し、ひいては、角層の状態を定量的に表わす指標として使用できることを見出した。

即ち、角層細胞間脂質構造の破壊に由来する吸熱ピークは、角層がよりダメージを受けているほど（即ち、皮表水分量が少なく、TEWLが多いほど）ピーク強度が低下し、ピーク温度が低温側にシフトする。逆に、角層が未破壊の状態に近く、もしくはダメージを修復した状態であるほど（即ち、皮表水分量が多く、TEWLが少ないほど）ピーク強度が上昇し、ピーク温度が高温側にシフトする。

また、ケラチンタンパク質の変性に由来する吸熱ピークの場合も同様に、角層がよりダメージを受けているほど（即ち、皮表水分量が少なく、TEWLが多いほど）ピーク強度が低下し、ピーク温度が低温側にシフトする。逆に、角層が未破壊の状態に近く、もしくはダメージを修復した状態であるほど（即ち、皮表水分量が多く、TEWLが少ないほど）ピーク強度が上昇し、ピーク温度が高温側にシフトする。

【0026】

従って、角層細胞間脂質構造の破壊に由来する吸熱ピークのピーク強度が低下し、及び／又は、ピーク温度が低温側にシフトしているほど、角層がよりダメージを受けた状態（即ち、肌荒れがひどい状態）であると判断することができる。逆に、ピーク強度が上昇し、及び／又は、ピーク温度が高温側にシフトしているほど、角層が未破壊の状態もしくはダメージを修復した状態（即ち、肌が健康な状態）であると判断することができる。

また、ケラチンタンパク質の変性に由来する吸熱ピークの場合も同様に、ピーク強度が低下し、及び／又は、ピーク温度が低温側にシフトしているほど、角層がダメージを受けた状態（即ち、肌荒れがひどい状態）であると判断することができる。逆に、ピーク強度が上昇し、及び／又は、ピーク温度が高温側にシフトしているほど、角層が未破壊の状態もしくはダメージを修復した状態（即ち、肌が健康な状態）であると判断することができる。

【0027】

具体的には、評価対象となる角層試料について得られたDSCプロファイルにおける、角層細胞間脂質構造の破壊に由来する吸熱ピーク、又は、ケラチンタンパク質の変性に由来する吸熱ピークを、未処理又は未破壊（Intact）の角層のDCS測定によって得られたDSCプロファイルの対応する吸熱ピークと比較し、ピーク強度及び／又はピーク温度の差に基づいて角層の評価を行なう。

【0028】

例えば、角層試料の吸熱ピークのピーク強度が、Intactの角層の吸熱ピークのピーク強度と比較して、どの程度低下しているか（ピーク強度の低下量）を求め、かかる低下量を所定の基準値と比較して、基準値よりも大きければ、評価対象の角層はダメージを受けた状態であると判断し、基準値よりも小さいか、或いは角層試料の吸熱ピークのピーク強度の方がIntactの角層の吸熱ピークのピーク強度よりも大きければ、評価対象の角層は未破壊の状態もしくはダメージを修復した状態であると判断することができる。

また、角層試料の吸熱ピークのピーク強度の低下量を、評価対象の角層のダメージの度合いを定量的に表す指標として、ピーク強度の低下量が大きいほど、角層のダメージの度合いが大きいと判断し、逆にピーク強度の低下量が小さいほど、角層のダメージの度合い

が小さいと判断してもよい。

【0029】

また、角層試料の吸熱ピークのピーク温度を、Intactの角層の吸熱ピークのピーク温度と比較して、どの程度低温側にシフトしているか（ピーク温度の低温シフト量）を求め、かかる低温シフト量を所定の基準値と比較して、基準値よりも大きければ、評価対象の角層はダメージを受けた状態であると判断し、基準値よりも小さいか、或いは角層試料の吸熱ピークのピーク温度の方がIntactの角層の吸熱ピークのピーク温度よりも高温側にシフトしていれば、評価対象の角層は未破壊の状態もしくはダメージを修復した状態であると判断することができる。

また、角層試料の吸熱ピークのピーク温度の低温シフト量を、評価対象の角層のダメージの度合いを定量的に表す指標として、ピーク温度の低温シフト量が大きいほど、角層のダメージの度合いが大きいと判断し、逆にピーク温度の低温シフト量が小さいほど、評価対象の角層のダメージの度合いが小さいと判断してもよい。

【0030】

なお、角層試料の評価は、角層細胞間脂質構造の破壊に由来する吸熱ピーク、及び、セラチンタンパク質の変性に由来する吸熱ピークのうち、何れか一方に基づいて行なってもよく、両方に基づいて行なってもよい。但し、少なくとも角層細胞間脂質構造の破壊に由来する吸熱ピークに基づいて評価を行うことが好ましい。

また、角層試料の評価は、吸熱ピークのピーク強度及びピーク温度のうち、何れか一方に基づいて行なってもよく、両方に基づいて行なってもよい。但し、少なくとも吸熱ピークのピーク温度に基づいて評価を行うことが好ましい。

【0031】

以上説明した、本発明の角層評価方法によれば、従来技術と比較して、例えば以下の利点が得られる。

即ち、例えば特許文献1記載の従来技術では、採取に用いる接着剤が角層に付着するという課題があったが、本発明の角層評価方法では測定に際し接着剤等を使用しないため、角層のみの情報を得ることができるという利点がある。

また、特許文献1記載の従来技術では、プローブ剤を用いた間接的な測定法であるという課題もあったが、本発明の角層評価方法ではプローブ剤を用いておらず、角層自体を直接測定できるという利点がある。

また、特許文献2記載の従来技術では、評価の定量性に欠けているという課題があったが、本発明の角層評価方法では角層構造の修復（再生）の程度を、吸熱ピーク温度又は吸熱ピーク高さでより定量的に評価できるという利点がある。

また、本発明の角層評価方法はin vitroの実験系であるため、角層の状態に影響を与える成分（例えば、皮膚外用剤に用いられる抗肌荒れ成分等）を選別する一次スクリーニング法としても適している。

【0032】

かかるスクリーニング法の一例である、本発明の抗肌荒れ成分選別方法は、抗肌荒れ成分の候補化学物質を適用した角層試料について、上述の角層評価方法により角層の状態を評価し、得られた評価結果に基づいて抗肌荒れ成分の選別を行う、抗肌荒れ成分選別方法に存する。

本明細書において「抗肌荒れ成分」とは、生物（通常は哺乳類、好ましくはブタ、ヒト）の皮膚に対して、肌荒れの改善及び／又は予防効果を有する任意の化学物質を指す。かかる化学物質は、皮膚外用剤の有効成分として有用である。

【0033】

本発明の抗肌荒れ成分選別方法の具体的な手順としては、まず、肌荒れのモデルとなるダメージを受けた角層試料（以下、ダメージ角層試料という。）を作製する。かかるダメージ角層試料としては、肌荒れを有する生体の皮膚から採取した角層試料を用いてもよいが、健全な未破壊状態の角層試料に対して物理的手段又は化学的手段（SDS塗付等）によりダメージを惹起して、人工的に肌荒れの状態を再現した角層試料を用いてもよい。

次いで、抗肌荒れ成分の候補化学物質を単独で、又は他の担体及び／又は賦形剤等と混合した製剤組成物の状態で、上述のダメージ角層試料に適用する。

続いて、抗肌荒れ成分の候補化学物質を適用したダメージ角層試料と、上述の角層評価方法により角層の状態を評価する。また、対照として、未処理のダメージ角層試料についても、上述の角層評価方法により角層の状態を評価する。

【0034】

こうして得られた角層状態の評価結果に基づいて、抗肌荒れ成分の候補化学物質の選別を行う。

即ち、抗肌荒れ成分の候補化学物質を適用したダメージ角層試料が、未処理のダメージ角層試料と比較して、角層のダメージの度合いが低く、角層の状態に修復が見られれば、その候補化学物質は、抗肌荒れ成分として有効であると判断することができる。

逆に、抗肌荒れ成分の候補化学物質を適用したダメージ角層試料が、未処理のダメージ角層試料と比較して、角層のダメージの度合いが同程度であり、角層の状態に修復が見られなければ、その候補化学物質は、抗肌荒れ成分として有効でないと判断することができる。

【0035】

以上説明した、本発明の抗肌荒れ成分選別方法によれば、抗肌荒れ成分の候補化学物質が角層構造に与える影響を、角層構造のバリアー性と関連付けて直接且つ定量的に評価することができ、荒れ肌・肌荒れの改善効果を有する抗肌荒れ成分を効率的に選別することができる。

【実施例】

【0036】

以下、本発明に関して実施例を用いて更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例によって制限されるものではなく、その主旨を逸脱しない範囲において、任意に変形又は修正を加えて実施することが可能である。

【0037】

〔参考例1：肌荒れ改善効果試験〕

恒温恒湿室（温度25℃、湿度50％）に健常な被験者20名が入室し、上腕内側部を石鹸洗浄した。30分間安静後、測定点を決定し、Corneometer CM825PC（CK COLOGNE社製）を用いて皮表水分量、Tewameter TM210（Courage + Khazaka社製）を用いてTEWL（Trans-Epidermal Water Loss：経皮水分蒸散量）をそれぞれ測定し、処理前の測定値とした。

次に、3％SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）水溶液300μLを、内径2cmのパッチテープに予め染み込ませた。実験的に肌荒れを惹起させるため、被験者の測定前に前記のパッチテープを30分間貼付した後、石鹸洗浄して30分安静後、同様に皮表水分量、TEWLを測定して、SDS適用後の測定値とした。

更に、SDS処理部位に対して、即時的な肌荒れ改善効果を評価するため、フィトステロールの0.25W/V％のエタノール溶液を塗布して30分後、同様に皮表水分量、TEWLを測定して、フィトステロール適用後の測定値とした。

測定した皮表水分量及び経皮水分蒸散量に関して、各処理後の測定値を処理前の測定値で除した比を算出し、SDSによる肌荒れとフィトステロールによる肌荒れ改善効果を評価した。

【0038】

SDS処理後及びフィトステロール処理後の皮表水分量比及びTEWL比を表わすグラフを、それぞれ図1及び図2に示す。

図1より、皮表水分量比はSDS処理により明らかに低下し、フィトステロール処理によってSDS処理前の数値へと回復傾向を示すことが分かった。

また、図2より、TEWL比はSDS処理により明らかに上昇し、フィトステロール処理によりSDS処理前の数値へと回復傾向を示すことが分かった。以上の結果から、SDS処理により実験肌荒れが惹起されたが、フィトステロールの適用により処理前の状態へ

即時的に改善傾向を示すことが分かった。

【0039】

〔実施例1：DSCプロファイルによる角層評価試験〕

ユカタンミニブタ角層2mgを採取し、DSC（示差走査熱量計）測定用70μL容の銀製セルに入れ、セル中に20μLの精製水を加えた後、蓋を被せてシーラーで完全に密封し、37℃で終夜インキュベートして未処理（Intact）角層試料とした。一方、別の銀製セル中に精製水20μLを封入し、対照試料とした。それぞれの試料を示差走査熱量計DSC120（SII社製）の測定部にセットし、5℃から130℃まで2℃/分の走査速度で昇温測定を行った。得られたDSCプロファイルより、3つの吸熱ピークのピーク温度等を読み取った。

10

図3に、未処理ユカタンミニブタ角層のDSCプロファイルを示す。昇温測定において、65.9℃に角層細胞間脂質構造の破壊に由来する吸熱ピークが、76.2℃に角層細胞間脂質とケラチンタンパク質との相互作用に由来する吸熱ピークが、92.5℃にケラチンタンパク質の変性に由来する吸熱ピークが、それぞれ出現していることが分かる。これらの吸熱ピークのうち、角層細胞間脂質構造の破壊に由来する吸熱ピーク及びケラチンタンパク質の変性に由来する吸熱ピーク、特に角層細胞間脂質構造の破壊に由来する吸熱ピークに着目した。

【0040】

次に、実験肌荒れを惹起させるSDS（ドデシル硫酸ナトリウム）水溶液を用いて、SDS処理角層を作製した。即ち、同由来のユカタンミニブタ角層2mgを3% SDS水溶液5mLに室温で1時間浸漬した後、精製水で十分にすすいで乾燥させた。このSDS処理角層を銀セルに封入し、37℃で終夜インキュベートしてから、上述と同様の条件でDSC測定を行った。

20

図4に、SDS処理ユカタンミニブタ角層のDSCプロファイルを示す。角層細胞間脂質構造の破壊に由来する吸熱ピークに関して図3と比較すると、ピーク強度が低下し、ピーク温度が5.6℃低温側にシフトして、60.3℃となっていることが分かった。この結果から、SDSによる角層細胞間脂質構造の不安定化により、角層細胞間脂質構造の破壊に由来する吸熱ピークの低温シフトが起きたと推察された。また、ケラチンタンパク質の変性に由来する吸熱ピークに関しては、ピーク強度が低下し、ピーク温度が1.4℃低温側にシフトして91.1℃となっていることが分かった。この結果から、SDSによる

30

【0041】

続いて、SDS処理角層に対するIntact状態への修復効果を評価するために、SDS処理ユカタンミニブタ角層2mgを、フィトステロールの0.25w/v%のエタノール溶液5mL中に室温で1時間浸漬した後、エタノールで10秒間すすいで乾燥させ、上記と同様に測定セルに封入し、37℃で終夜インキュベートして、上記と同様の条件でDSC測定を行った。

図5に、フィトステロール処理ユカタンミニブタ角層のDSCプロファイルを示す。角層細胞間脂質構造の破壊に由来する吸熱ピークに関して図4のSDS処理角層と比較すると、ピーク強度が増大し、ピーク温度が1.4℃高温側にシフトして62.1℃となっていることが分かった。この結果から、フィトステロールの適用により、実験肌荒れを想定したSDS処理角層からインタクトのDSCプロファイルへ回復傾向を示すことが分かった。この理由として、角層細胞間脂質の構成成分であるコレステロールの類似構造であるフィトステロールが角層中に浸透して角層細胞間脂質と相互作用することにより、SDSにより不安定化した角層細胞間脂質構造の安定化に寄与しているため、角層細胞間脂質構造の破壊に由来する吸熱ピークの高温シフトが起きたものと推察された。

40

以上の結果から、角層のDSCプロファイルの角層細胞間脂質構造の破壊に由来する吸熱ピークの温度の挙動を評価することにより、検討物質の角層細胞間脂質構造に与える影響を評価することが可能であることが分かる。

【0042】

50

ここで、以上のDSCプロファイルによる角層評価試験（実施例1）の結果を、前述の肌荒れ改善効果試験（参考例1）の結果と比較した。実験肌荒れを惹起させるSDSの適用によって脂質構造が乱れ不安定化したことにより、結果としてDSCプロファイルの角層細胞間脂質構造破壊に由来する吸熱ピークに低温シフトが起こり、角層水分量比の低下とTEWL比の上昇が起きたと考えられた。一方、SDS処理に加えフィトステロールを適用することにより、SDS処理角層に比較して、DSCプロファイルの角層細胞間脂質構造破壊に由来する吸熱ピークが高温シフトし、角層水分量比の上昇とTEWL比の低下がみられ、SDS処理前のインタクトの状態へ回復傾向を示していることから、DSCプロファイルによる角層評価試験の結果と肌荒れ改善効果試験の結果との間の相関性は高いと考えられる。即ち、実施例のDSCプロファイルによる角層評価試験によれば、細胞間脂質に与える影響を評価できると同時に、角層細胞間脂質構造の乱れによる肌荒れ又は肌荒れ改善効果に関するin vitroにおけるスクリーニング法としても用いることができる。

10

【0043】

[評価例1～8及び比較評価例1、2：実施例1のDSCプロファイルによる角層評価試験を用いた評価]

以下の評価例1～8及び比較評価例1、2の角層試料に対して、実施例1に記載のDSCプロファイルによる角層評価試験による評価を行った。

評価例1では、未処理の角層試料を用いた。

評価例2では、3% SDS水溶液中に室温で1時間浸漬処理した後、精製水で充分洗浄し、乾燥した角層試料を用いた。

20

また、評価例3～8及び比較評価例1、2では、評価例2と同様にSDS処理した角層試料を、それぞれ以下に示した物質中に室温で1時間浸漬した後、エタノールで10秒間洗浄し、乾燥した角層試料を用いた。

【0044】

評価例1：未処理（intact）角層

評価例2：3% SDS水溶液処理角層

評価例3：POEPOPフィトステリル処理角層

評価例4：マカデミアナッツ油脂脂肪酸フィトステリル処理角層

評価例5：N-ラウロイル-L-グルタミン酸ジ（フィトステリル・2-オクチルドデシル）処理角層

30

評価例6：N-ラウロイル-L-グルタミン酸ジ（コレステリル・オクチルドデシル）処理角層

評価例7：POEPOPPOEフィトステリル処理角層

評価例8：フィトステロール処理角層

比較評価例1：テトラ2-エチルヘキサン酸ペンタエリスリット処理角層

比較評価例2：ジイソステアリン酸グリセリル処理角層

【0045】

図6は、評価例1～8及び比較評価例1、2の各角層試料に関してN=3で測定したDSCプロファイルにおける、角層細胞間脂質構造破壊に由来するピーク温度の平均値を示すグラフである。評価例1の未処理（intact）角層に対して、評価例2ではSDS処理により、ピーク温度が約3.5℃低温シフトしたことが分かる。一方、SDS処理角層に対して、評価例3～8はステロール構造を有する油分を適用した場合、比較評価例1、2はステロール構造をもたない他の化粧品用汎用油分を適用した場合を、それぞれ示す。評価例3～8のステロール構造を有する油分の適用により、評価例2のSDS処理に比較して、いずれの処理においてもピーク温度が上昇し、評価例1の未処理（intact）が示す温度に近づく傾向を示すことが分かった。一方、比較評価例1、2のステロール構造を持たない他の汎用油分の適用では、吸熱ピーク温度の上昇は見られず、即時的な肌荒れ改善効果は見られなかった。

40

【0046】

これらの角層試料のうち、評価例2の3% SDS水溶液処理角層、評価例4のマカデミ

50

アナッツ油脂肪酸フィトステリル処理角層、比較評価例 2 のジイソステアリン酸グリセリル処理角層に関して、肌荒れ改善効果試験を行った。

図 7 及び図 8 は、評価例 2 (S D S 処理)、評価例 4 (マカデミアナッツ油脂肪酸フィトステリル処理)、及び比較評価例 2 (ジイソステアリン酸グリセリル処理) の角層試料の皮表水分量比及び T E W L 比をそれぞれ示すグラフである。

図 7 より、皮表水分量比は S D S 処理 (評価例 2) により明らかに低下し、マカデミアナッツ油脂肪酸フィトステリル処理 (評価例 4) により処理前の数値へ回復傾向を示すが、ジイソステアリン酸グリセリル処理 (比較評価例 2) ではあまり回復がみられないことが分かった。

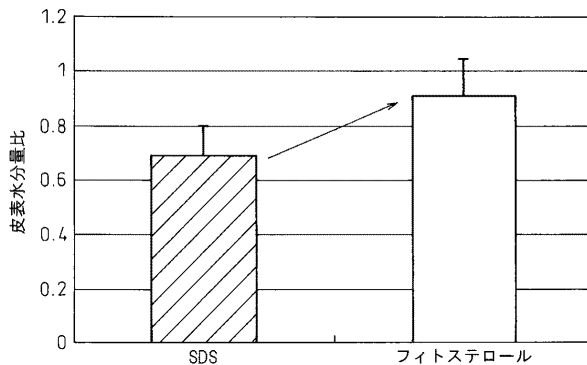
また、図 8 より、T E W L 比は S D S 処理 (評価例 2) により明らかに上昇し、マカデミアナッツ油脂肪酸フィトステリル処理 (評価例 4) により処理前の数値へ回復傾向を示すが、ジイソステアリン酸グリセリル処理 (比較評価例 2) ではあまり回復がみられないことが分かった。

以上の結果から、S D S 処理 (評価例 2) による実験肌荒れの惹起に対して、マカデミアナッツ油脂肪酸フィトステリルの適用 (評価例 4) により処理前の状態へ即時的に改善傾向を示すが、ジイソステアリン酸グリセリルの適用 (比較評価例 2) では即時的な改善傾向が見られないことが分かった。

10

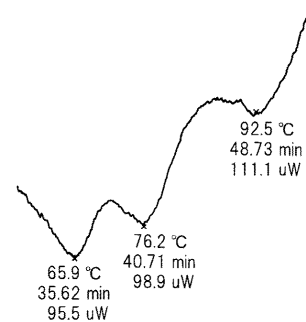
【図 1】

図 1



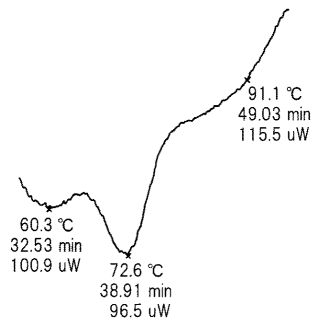
【図 3】

図 3



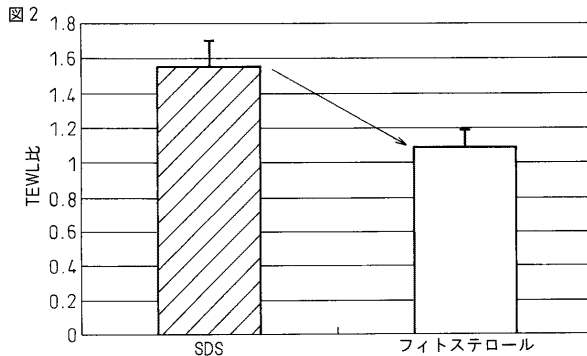
【図 4】

図 4



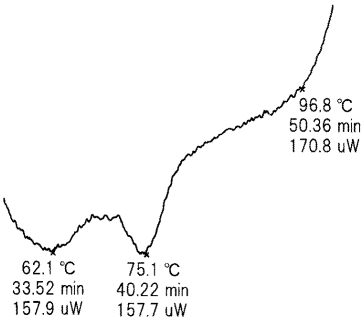
【図 2】

図 2



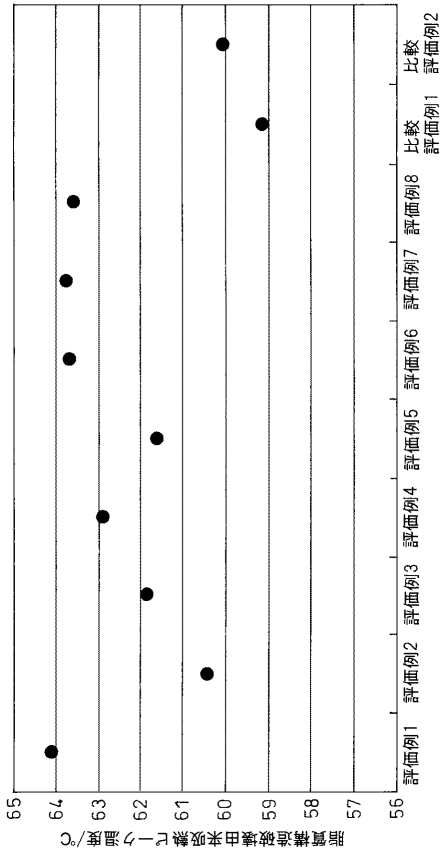
【図 5】

図 5



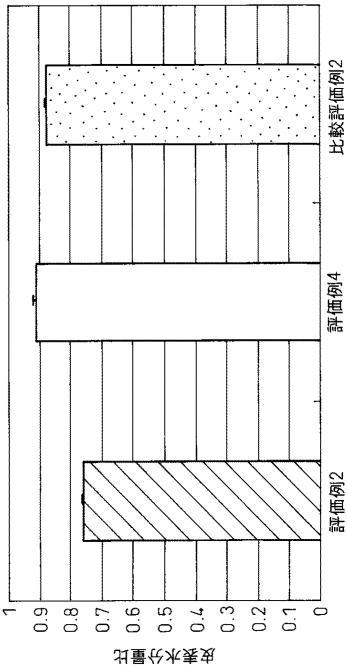
【図 6】

図 6



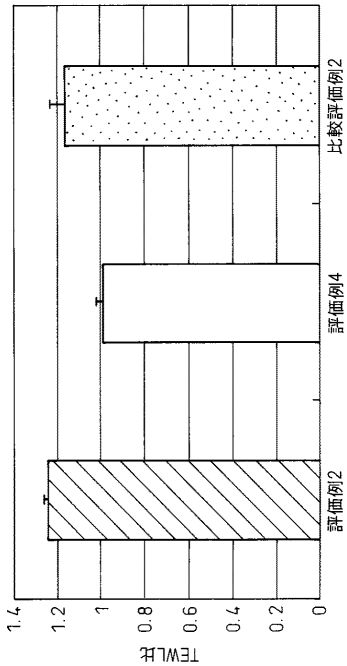
【図 7】

図 7



【図 8】

図 8



フロントページの続き

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(72)発明者 岡 隆史

神奈川県横浜市都筑区早渕 2-2-1 株式会社資生堂リサーチセンター（新横浜）内

(72)発明者 森 雄一郎

神奈川県横浜市都筑区早渕 2-2-1 株式会社資生堂リサーチセンター（新横浜）内

Fターム(参考) 2G040 BA26 CB12 EA02 EC08 HA11 HA12 HA16 ZA05

4C117 XA05 XB01 XB13 XD05 XE23

专利名称(译)	角质层评价方法和抗粗糙皮肤组合物分选方法		
公开(公告)号	JP2010237098A	公开(公告)日	2010-10-21
申请号	JP2009086664	申请日	2009-03-31
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社资生堂		
申请(专利权)人(译)	资生堂公司，有限公司		
[标]发明人	岡隆史 森雄一郎		
发明人	岡 隆史 森 雄一郎		
IPC分类号	G01N25/20 A61B5/00		
FI分类号	G01N25/20.B A61B5/00.M		
F-TERM分类号	2G040/BA26 2G040/CB12 2G040/EA02 2G040/EC08 2G040/HA11 2G040/HA12 2G040/HA16 2G040/ZA05 4C117/XA05 4C117/XB01 4C117/XB13 4C117/XD05 4C117/XE23		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 中村弘 中岛胜		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种能够直接和定量评估角质层结构状态的方法，与其阻隔性能相关。ZSOLUTION：在角质层样品上进行差示扫描量热法，根据由角质层细胞间脂质结构破坏引起的吸热峰和/或由改变引起的吸热峰峰值强度进行评价角蛋白和/或峰值温度。Z

【図 2】

