

US005397773A

米国特許 [19]
ドンジス

[11] 特許番号 : 5,397,773

[45] 特許期日 : 1995年3月14日

[54] 酵母抽出物含有光防護複合組成物

[76] 発明者 : 米国テキサス州ヒュース
トン ロジャーデール通 3008 号
バイロン A ドンジス

[21] 申請番号 : 31,758

[22] 受付日 : 1993年3月15日

関連申請情報

[63] 1989年11月9日 435,032 番、
特許番号 5,223,492 の一部の
続き

[51] 国際 Cl.6.....A61K 35/72

[52] 米 Cl. 514/54;424/195.1;
424/520

[58] 調査分野.....514/54;424/195.1,520,
424/93 R, 93 S, 59

[56] 関連資料
刊行物

Elmets 他、Photodermatol, Photoimmunol, Pho-
tomed 9(3):113-120(1992), Abstract BA 96:8624.

Daniels 他、J. Invest.Dermatol.,(1961)37:351-357

Gilchrest 他、J.Am. Acad. Dermatol., (1981)
5:411-422

Koh 他、光化学と光生物学(1990)

51:765-779

Krutman 他、光化学と光生物学(1988)

Toews 他、J. Immuno.,(1980)124:445-453

Rae 他、J.Dermatol. Surg.Oncol., (1989)

15:1199-1202

Kiistala 他、J.Investigative Dermatol(1967)

48:466-477.

Elmets 他、J.Investigative Dermatol(1982)

79 :340-345

Elmets IN : »Pharmacology of the Skin »,

Mukhtar, ec., CRC Press, 1992, pp.389-416

Primary Examiner-Douglas W. Robinson

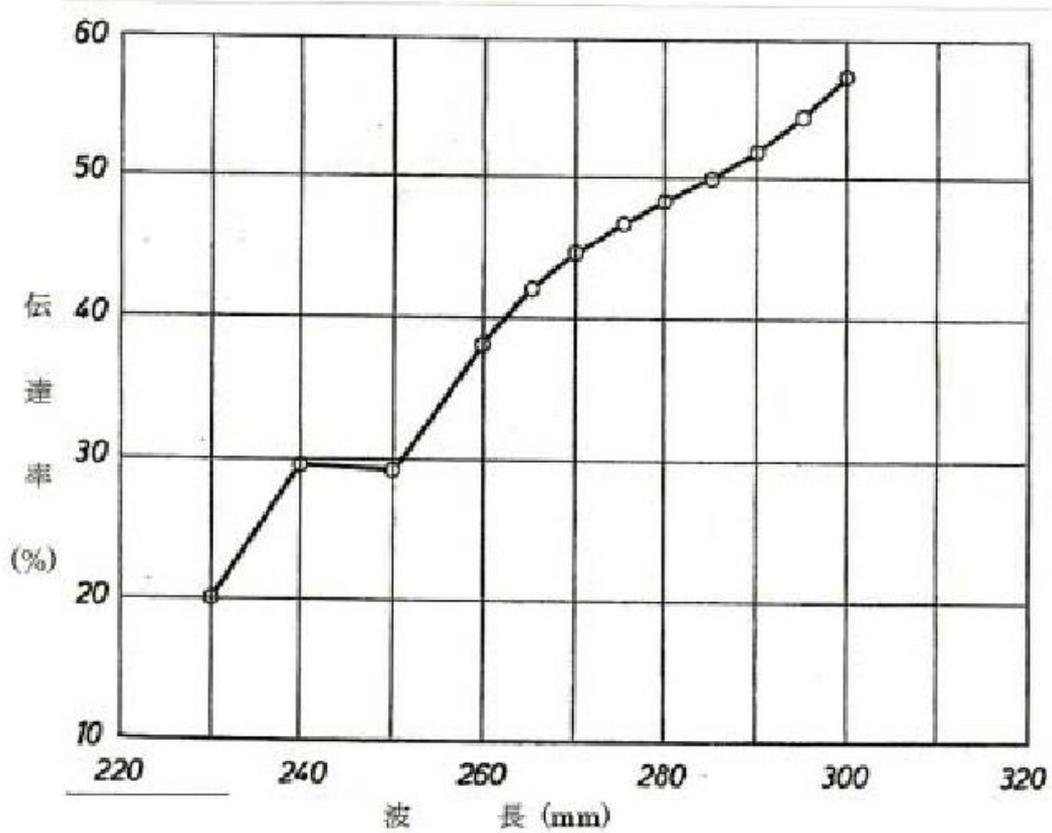
Assistant Examiner-Jean C. Witz

Attorney,Agent, or Firm-Butler &Binion;

Sue Z. Shaper

[57] 要約

グラフ1



酵母抽出物含有光防護

複合組成物

これは 1989 年 11 月 9 日に受理された米国パテント申請番号 435,032、その後認可された米国パテント番号 5,223,491 の部分的継続であり、ここでは全ての目的で引用される。

発明の範囲

この発明は、紫外線による皮膚の損傷影響を防護する方法に関するものである。より具体的にはこの発明は日光によるダメージから皮膚を防護する酵母高分子グルカン含有の複合組成物を含有する化粧品の使用に関わるものである。

発明の背景

日光や紫外線照射物体への肌の露出は人体に有害な影響を与えることは良く知られている。紫外線への短期露出は紅斑や日焼けの原因となり、UV 誘発 DNA 損傷のもとである角化細胞発症原因の基となる。紫外線への長期露出は皮膚の鱗状細胞や基底細胞腫瘍の病因となり、悪性メラノーマ（黒色肉腫）を誘発することがやはり良く知られています。ごく最近の研究では、UV 照射が免疫応答に大きな影響を及ぼすことが示されている。特に UV 照射が皮膚のランゲルハンス細胞に致命的な影響を与えた。

これらの理由から、上述した日光や紫外線照射によるダメージ影響から人間の皮膚を防護することが強く望まれる。更に、効果的な光防護成分を含有した外用化粧品を利用することが望まれる。

発明の概要

現在の発明は日光や紫外線暴露によるダメージ影響から皮膚を防護する新規な方法を示したものである。この発明での光防護方法は、酵母抽出物、望ましいのは高分子グルカンで、より望ましいのは大部分がベータ 1-グリコシド結合鎖を持つベータグルカンを用いた。この発明の方法では、酵母グルカンを外用塗布剤に混入し、

防護効果を発揮した。現在の発明である光防護酵母抽出物は、化粧品や現存の日焼け止め剤と結合して使用する。

数値の概要

グラフ 1 は光伝達率に関する酵母細胞壁抽出物の影響をグラフで示した。

具体的内容の説明

酵母抽出物

酵母細胞は抽出前に超音波あるいは別の方法で酵母細胞壁物質を調合するために分解される。望ましいのはサッカロマイセス族酵母で、最適なのはパン酵母や醸造用酵母を含むサッカロマイセス・セレビスシアエ種酵母である。酵母細胞や酵母細胞壁は既知の人工的な方法、望ましいのは酵母細胞壁グルカン抽出に関する米国パテント申請番号 435,032 に記載されている方法で抽出される。グルカンはこれらの方法で調合するか、あるいは市販の物を手に入れることができる。高純度酵母細胞壁グルカンは基本的に蛋白質や菌毒素を含まず、ベータ 1,3 グリコシド主鎖を有する高分子グルカンで構成されたものが望ましい。

光防護成分

現在の発明の光防護方法は単純な形としては、皮膚への外用に適した担体中の懸濁調剤としてのグルカンの適用を含めて溶液、懸濁液、ローション、クリームあるいは軟膏である。

グルカンを成分とした混合物は、保湿剤や、皮膚に浸透する複合成分や香料、着色剤のような成分も含まれる可能性がある。優先する内容は、グルカンをリップバーム、日焼け止めローション、化粧品などに混入され、これら商品に光防護品質を付与することである。光防護成分とはオクチル・メトキシ・桂皮やベンゾフェノンなどの日焼け止

めとして知られる成分も含まれ、付加的に7-デヒドロ・コレステロールのようなコレステロールも含まれる。一例として、グルカン成分を含む光防護ローションは下記のものを含む。含有し得る：グルカン、水、プロピレングリコール、アボカドオイル、ステアリン酸イソセチル、オクチル・メトキシ桂皮、ポリソルベイト 60、マレイン酸大豆油、ステアリン酸、液体シリコン、酢酸セチル、ビタミン E 塩、モノステアリン酸グリコール、モノステアリン酸プロピレングリコール、ソルビタン・ステアリン酸塩、パルミチン酸ビタミン A、ベンゾフェノン-3、シリコンワックス、トリエタノールアミン、diazolidinylurea、メチル・パラベン、ラノリン・アルコール、2 ナトリウム・エデト酸塩、934 カーボマー、およびプロピル・パラベン。本発明の光防護方法は、オンス（28 グラム）あたり概算 0.01 から 1 ミリグラム、より優先的にオンス（28 グラム）あたり 0.01 から 1 ミリグラムの酵母細胞壁グルカン複合体を使用する。本発明の方法では、酵母細胞壁グルカンを含む成分を日光や紫外線に皮膚を晒す前に外用塗布する。UV が原因の日焼けを減少させるためには、日焼け細胞の産生を防止する目的でグルカン混入光防護調剤による皮膚の事前処置が有効であり、ランゲルハンス細胞を UV 照射が原因の逆作用から防護するのに効果的である。

例

この発明は、以下に述べる例を参考として理解でき得るであろう。

例 1

酵母抽出物の調合

乾燥酵母（500 グラム）に摂氏 50 度から 60 度に熱した 1.5N の水酸化ナトリウム液 2.4 リットルを加える。この混合物を、酵母が完全

に懸濁するまで攪拌する。この混合物を 30 分間放置して粘度を約 15psi にする。室温で定温させた後、この混合物を 5000xG で 15 分間遠心分離器にかける。上澄みを取り除き、総量 1 リットルの蒸留水中で再度懸濁させた。この水洗は二回を二回繰り返し、合計三回洗浄した。

すすいだペレットを、3%のグレシヤル酢酸中で 85°C 一時間加熱して再度懸濁させた。この酸混合物は上記の条件で遠心分離にかけ、上澄みを除去した。ペレットを上述した総量 1 リットルの蒸留で洗浄した。上澄みを除去し、ペレットを総量 1 リットルの純エタノール中で懸濁させた。残留物を上述条件で再度遠心分離した。エタノール洗浄は、合計 2 回のエタノール洗浄を繰り返し、次にペレットを再度 0.5 リットルの純エタノールで懸濁した。このエタノール混合物を、このエタノール混合物を Buchner ファンネル中でグラスファイバーのフィルターで濾過し、残留エタノールを挿出した。Buchner ファンネルからできる濾過残留固形物を大きなガラス皿の上で潰し広げ、4 時間から 5 時間かけて自然乾燥し、一定の分画を形成するようにした。この凝固物を一定の重量になるまで、摂氏 40°C で約 24 時間真空中乾燥する。この抽出物は約 50 グラムであった。

例 2

光防護剤としての典型的酵母グルカン混合物の使用

例 1 で調合した酵母グルカン調剤はヒトの皮膚で光防護効果を検証するための実験で利用された。油性水溶乳液 1 オンス（28 グラム）あたり 1 ミリグラムの酵母グルカンを加えた。

18 歳から 40 歳までの、II 型か III がたの日光敏感肌を持った健康な成人に様々な試験調剤を通常の市販製品と同じように使用することを指示した。

実験は下記のグループで行った。

1. 処置しないコントロール群
2. 処置せずに皮膚を UV 照射した群
3. 親水油性乳液(O/W)
4. O/W 中 7-デヒドロコレステロール (DHC)
5. DHC+市販 2 種の日焼け止め製品
{7.5%オクチル・メトキシ・桂皮+
3%ベンゾフェノン (SS) +O/W}
6. DHC+酵母細胞壁グルカン(G)+O/W
7. DHC+G+SS+O/W

皮膚の試験範囲、前腕の表皮 5x5 センチメートルは選択された試験物で毎日または二日に一度処置された。事前処置した（コントロール群の）皮膚とその周辺は、1日あたりで紅斑が生じる最小限の量（MED）の 1.5 倍の UVB に 4 日間連続で晒した。UV 照射の 4 日間を通して外用調剤試験物を用いた処置を行った。試験物は、UV に晒す 15 分から 30 分前に塗付した（MED はそれぞれの個体の背中に照射部が MED に達したと思われるまで徐々に照射量を増加することで算出した）。UV 照射源は波長が UVB の範囲となる放射の FS72 太陽光ランプを 4 個並べた。出力は国際灯 IL700 ラジオメーターと UVB 光感知装置（UBV photo-detector）で監視した。皮膚上皮検体は、J. Invest. Dermatol. 誌 48:466-477 1967 で Kustala 等が記述している吸引で起こる火ぶくれの頂部を取り除くことで得られた。火ぶくれは片方の腕の処置部分で UV に暴露した直後に起こり、もう一方の腕では UV 暴露後 1 週間で現れた。

HLA-A-DR-陽性で CD1a-陽性細胞は、J. Invest. Dermatol. 誌で Elmet 他が記述している手順のあとで anti-HLA-A-DR（カリフォルニア州サニーベイル Becto-Dickinson 製）と anti-CD1a（ニュージャージー州リリタン、

Ortho Pharmaceutical 製 OKT6）モノクローナル抗体で、それぞれの火ぶくれで覆われた部分で確認された。

日焼け細胞は、ヘマトキシリンとエオシンを用いた通常の方法でシミが出る上皮部分を 4 μm のホルマリンで固定した部分で確認された。

HLA-DR 陽性で CD1a 陽性のランゲルハンス細胞は、1 ミリ平方メートルあたりのランゲルハンス細胞数平均を決定することで上皮検体表面中で定量した。5 つの高性能（400 倍）顕微鏡視野を蛍光処置後ニコン製免疫蛍光顕微鏡で調査した。全ての検体はブラインド手法でテストした。陽性反応変色細胞は細胞数を測定する基準として使用した。UV を照射する前に賦形剤のみの影響を調査するための事前検証をした。賦形剤だけで処置した皮膚と処置しない皮膚とでは、HLA-A-DR 陽性と CD1a 陽性のランゲルハンス細胞で差は観察されなかった（データ未開示）。

上皮のリニア mm あたり平均日焼け細胞数は 10 ヶ所をアメリカンオプティカル製高性能（400 倍）顕微鏡で調査することで定量した。核が無いか異角化した核を持ったエオシン好性変色細胞の存在は日焼け細胞数を算出する基準として使った。全ての検体はブラインド手法で判定された。事前の学習が行われ、その中で UV 照射をせずに賦形剤単体の影響を調べた。日焼け細胞の数は賦形剤で処置した群としない群で差は観察されなかった。（データは表示せず）

処置しない皮膚を最小限の 1.5 倍の UVB に 4 日間連続で UVB に晒した時は、視認する限り紅斑の現れ方はおだやかであった。親油性水溶液単体あるいは親油性水溶液の中に 7-デヒドロコレステロールを加えて事前処置した皮膚では処置しない皮膚よりも紅斑反応が生じた。

紅斑の結果

日焼け止めなしで酵母抽出物を含有した調剤では

UV 誘引の紅斑に対して部分的な防護を示した。検体には穏やかな紅斑が観察されたが、置しないで UV を照射した皮膚のそれよりも明らかに少なかった。市販の日焼け止めを含有した混合物では UVB が誘発する紅斑に対して完全な防護を示した。

ランゲルハンス細胞への影響

試験対象の混合物のランゲルハンス細胞濃度と形態学への影響についての評価は、皮膚検体を HLA-DR と CD1a ランゲルハンス細胞表現マーカーに対するモノクロナール抗体で着色した。表 1 にあるように、親油性水溶液単体で処置あるいは乳液に 7-デヒドロコlesteroールを加えたもので処置した検体では、陽性着色した細胞で UV 照射実験の完了後ただちに著しい減少があった。この減少の規模は、処置しない外皮検体に UV 照射したものと同様であった。検体のうち残ったこれら陽性染色した細胞の形態学は、樹状突起が欠落し、形態学的に顕著な異型（奇形）を示した。

親油性水溶液に 7-デヒドロコlesteroールと酵母抽出物を加えたもので事前処置した検体では UV 照射による有害影響に対するランゲルハンス細胞の部分的防護が観察された。表 2 が示すように、UV 暴露直後の HLA-DR 陽性と CD1a 陽性ランゲルハンス細胞は非処置群で有意に減少した。酵母抽出物単体を含んだ混合物で事前処置した検体ではランゲルハンス細胞の減少は緩和された。より大きな緩和は、日焼け止め単体を含んだ混合物で、市販の日焼け止めと酵母抽出物の両方を含んだ混合物で最大の防護効果が得られた。表 3 が示すようにランゲルハンス細胞母集団に酵母抽出物の及ぼす光防護効果は事前処置後一週間経過してもなお明らかであった。三つの発見は、UV 暴露後の上皮細胞が組織学的により正常な状態に戻るのを酵母抽出物が促進することを示唆している。光防護調剤は日焼け細胞の配置に対する防護能も評価された。

表 3

事前処置	UV 照射	HLA-DR 陽性	CD1a 陽性
		ランゲルハンス細胞濃度	ランゲルハンス細胞濃度
せず	—	746.3±54.3	705.4±79.3
せず	+	465.9±73.8	388.6±99.1
酵母抽出物	+	560.8±73.8	538.0±57.8

* データは 10 検体から $m \text{ m}^2 \pm \text{SEM}$ のランゲルハンス細胞の平均濃度を表す

表 1

事前処置	UV 照射	HLA-DR 陽性	CD1a 陽性
		ランゲルハンス細胞濃度	ランゲルハンス細胞濃度
せず	—	639.2±25.6	626.2±14.2
せず	+	371.4±30.0	263.3±38.3
O/W	+	341.6±32.2±	288.2±43.3
DHC	+	321.7±30.0	288.2±40

* データは 5 検体から $m \text{ m}^2 \pm \text{SEM}$ のランゲルハンス細胞の平均濃度を表す

表 4 が示すように、直線mmあたりの異角化細胞数の平均は紫外線暴露によって有意に増加した。親油性水溶液による皮膚の事前処置による日焼け細胞数に対する影響はなかった。しかしながら、親油性水溶液に 7-デヒドロコレステロールを加えたものでは直線 mm あたりの日焼け細胞数のおだやかな減少となった。表 5 が示すように、酵母抽出物を含んだ調剤での皮膚の事前処置では日焼け細胞形成 62%減少した。市販の日焼け止めを含んだ 2 種類の調剤は UV 照射が誘引する日焼け細胞産生を完全に防護した。

表 2

事前処置	UV 照射	HLA-DR 陽性	CD1a 陽性
		ランゲルハンス細胞 濃度	ランゲルハンス細胞 濃度
処置せず	—	746.5±56.8	766.6±52.7
処置せず	+	321.3±89.9	173.7±92.7
酵母抽出物	+	477.9±69.8	423.5±93.2
日焼け止め	+	695.9±70.4	707.9±70.8
日焼け止め+	+	747.8±77.0	733.1±87.5

酵母抽出物**

*データは 10 検体から $m \text{ m}^2 \pm \text{SEM}$ のランゲルハンス細胞の平均濃度を表す

**データは 9 検体から $m \text{ m}^2 \pm \text{SEM}$ のランゲルハンス細胞の平均濃度を表す

表 4

事前処置	UV 照射	UV 暴露後時間	日焼け細胞数
処置せず	—	—	1.0±0.3(6)
処置せず	+	直後	36.4±1.3(5)
O/W	+	直後	38.0±1.5(4)
DHC	+	直後	23.8±4.3(4)
O/W	+	7 日目	5.4±2.0(5)
DHC	+	7 日目	5.8±2.1(5)

*データは直線 $m \text{ m}^2 \pm \text{SEM}$ のランゲルハンス細胞の平均濃度を表す。

検体数はカッコ内に示す。

表 5

事前処置	UV 照射	UV 被爆直後の	UV 被爆後 1 週間の
		日焼け細胞 a	日焼け細胞 b
処置せず	—	1.5±0.4	1.2±0.2
処置せず	+	33.4±6.4	14.8±11.2
酵母抽出物	+	13.6±7.2	1.4±0.4
日焼け止め	+	1.8±0.4	1.4±0.2
日焼け止め+	+	1.8±0.4	2.0±0.4

酵母抽出物

*a データは 10 検体から上皮 $m^2 \pm SEM$ あたりの日焼け細胞の平均濃度を表す。ただし UV 単体で処置した群では 9 検体。UV 照射群のうち 1 検体の有する日焼け細胞数は算定不能なほど多数であったので計算から除外した。

b データは、UV 単体処置群を覗いて 9 検体から上皮 $m^2 \pm SEM$ あたりの日焼け細胞の平均濃度を表す。UV 処置群では 7 検体を表す。UV 単体処置群のうち 2 検体の有する日焼け細胞数は算定不能なほど多数であったので計算から除外した。

例 3

日焼け止めとしての酵母抽出物水溶液

市販の酵母細胞壁抽出物をミリリットルあたり 250 マイクログラム (100 万分の 250 グラム) の水溶液として調剤した。溶液を通過する紫外線ランプの異なった波長の照射は分光器で測定した。グラフ 1 で示すように、波長 270nm (活動抑制の最大限波長) のエネルギーが酵母溶液調剤で吸収され、この材料が効果的な日焼け止めであることを示した。

申請者の主張

- UV 照射の悪影響から皮膚を防護する方法；1 オンス (約 28 グラム) あたり 0.01 から 20 ミリグラムの酵母 β グルカンを含む酵母細胞壁抽出物を皮膚に外用塗付する。
- 主張 1、酵母グルカンの大部分はベータ 1,3 グリコシド連鎖体を含む。

- 主張 2、混合物中の酵母グルカンはオンスあたり 0.02 から 20 ミリグラムである。
- 主張 3、混合物中の酵母グルカンはオンスあたり 0.01 から 10 ミリグラムである。
- 主張 3、混合物中の酵母グルカンはオンスあたり 0.01 から 10 ミリグラムである。
- 主張 1、酵母細胞壁抽出物は不水溶性である。
- UV 照射の悪影響から皮膚を防護する方法は酵母グルカンからなる酵母細胞壁抽出物とコレステロールを含有する混合物を適量外用塗付することを含む。

----- 以上 -----

パテント 5,397,773 に関する参考文献

省略