

明 細 書

発明の名称：

皮膚バリア機能の低下抑制又は改善用組成物、4型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善用組成物及び皮膚バリア機能の低下抑制又は改善作用を有する物質のスクリーニング方法

技術分野

[0001] 本発明は皮膚バリア機能の低下抑制又は改善用組成物及び4型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善用組成物に関する。また、本発明は、皮膚バリア機能の低下を抑制又は皮膚バリア機能を改善する方法及び4型コラーゲンの発現の低下を抑制又は当該発現を改善する方法に関する。本発明はまた、皮膚バリア機能の低下抑制又は改善作用を有する物質のスクリーニング方法等に関する。

背景技術

[0002] 皮膚は、大きく分けて表面から表皮、真皮の2層から構成されている。表皮は、深層から基底層、有棘層、顆粒層、角層の4つの層から構成されており、基底層は基底膜を介して真皮と接着している。基底膜は、4型コラーゲン、7型コラーゲン等の成分で構成されており、表皮の基底層と真皮とを結合させる等の働きがあるが、加齢に伴いその機能が低下する。

[0003] 皮膚には、外部からの生体への異物の侵入を防いだり、体内の水分が皮膚から過剰に蒸発することを防ぐことで皮膚の水分を維持したりするバリア機能がある。加齢等の原因で皮膚バリア機能が低下すると、乾燥肌等の原因となる。特許文献1には、アスパラサスリネアリスの抽出物等を含む皮膚バリア機能改善剤が記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2009-256244号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、皮膚バリア機能の低下を抑制又は当該機能を改善することができる皮膚バリア機能の低下抑制又は改善用組成物を提供することを目的とする。本発明はまた、4型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善用組成物を提供することを目的とする。また、本発明は、皮膚バリア機能の低下を抑制又は当該機能を改善する方法、及び、4型コラーゲンの発現の低下を抑制又は当該発現を改善する方法を提供することを目的とする。さらに、本発明は、皮膚バリア機能の低下抑制又は改善作用を有する物質のスクリーニング方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者は、上記課題を解決するために研究を行った結果、皮膚細胞において4型コラーゲンの発現の低下を抑制又は当該発現を改善することによって、皮膚バリア機能の低下が抑制又は当該機能が改善されることを見出した。本発明者は、かかる知見に基づきさらに研究を行い、本発明を完成するに至った。

[0007] 本発明は、これに限定されるものではないが、以下の皮膚バリア機能の低下抑制又は改善用組成物、4型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善用組成物等を包含する。

〔1〕バラ科バラ属植物の抽出物、ブドウ種子及び／又は果皮の抽出物、ヤロウィア（*Yarrowia*）属酵母の抽出物、ツバキ科ツバキ属植物の抽出物、バラ科シモツケソウ属植物の抽出物、並びに、シソ科ハッカ属植物の抽出物からなる群より選択される1種以上の抽出物を有効成分として含む、4型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善を介した皮膚バリア機能の低下抑制又は改善用組成物。

〔2〕バラ科バラ属植物がバラ、ヤロウィア（*Yarrowia*）属酵母がヤロウィア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）、ツバキ科ツバキ属植物がチャノキ、バラ科シモツケソウ属植物がセイヨウナ

ツユキシソウ、シソ科ハッカ属植物がセイヨウハッカである、上記〔１〕に記載の皮膚バリア機能の低下抑制又は改善用組成物。

〔３〕バラ科バラ属植物がデルフィニジン型アントシアニン、ロザシアニン化合物及びロザデルフィン化合物からなる群より選択される１種以上の化合物を含むバラ花卉、ツバキ科ツバキ属植物がチャノキの葉、バラ科シモツケソウ属植物がセイヨウナツユキシソウの花、シソ科ハッカ属植物がセイヨウハッカ全草である、上記〔１〕又は〔２〕に記載の皮膚バリア機能の低下抑制又は改善用組成物。

〔４〕マンサク科マンサク属植物の抽出物及び／又はオオバコ科オオバコ属植物の抽出物を有効成分として含む皮膚バリア機能の低下抑制又は改善用組成物。

〔５〕マンサク科マンサク属植物がハマメリス、オオバコ科オオバコ属植物がセイヨウオオバコである上記〔４〕に記載の皮膚バリア機能の低下抑制又は改善用組成物。

〔６〕マンサク科マンサク属植物がハマメリスの葉、オオバコ科オオバコ属植物がセイヨウオオバコ種子である上記〔４〕又は〔５〕に記載の皮膚バリア機能の低下抑制又は改善用組成物。

〔７〕基底膜機能の低下抑制又は改善を介して皮膚バリア機能の低下を抑制又は皮膚バリア機能を改善する、上記〔４〕～〔６〕のいずれかに記載の皮膚バリア機能の低下抑制又は改善用組成物。

〔８〕基底膜機能の低下抑制又は改善が４型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善を介したものである、上記〔７〕に記載の皮膚バリア機能の低下抑制又は改善用組成物。

〔９〕基底膜機能の低下抑制又は改善剤を有効成分として含む皮膚バリア機能の低下抑制又は改善用組成物。

〔１０〕基底膜機能の低下抑制又は改善剤が４型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善を介して基底膜機能の低下を抑制又は基底膜機能を改善するものである、上記〔９〕に記載の皮膚バリア機能の低下抑制又は改善用組成物。

〔11〕バラ科バラ属植物の抽出物、ブドウ種子及び／又は果皮の抽出物、ヤロウシア（*Yarrowia*）属酵母の抽出物、ツバキ科ツバキ属植物の抽出物、マンサク科マンサク属植物の抽出物、バラ科シモツケソウ属植物の抽出物、オオバコ科オオバコ属植物の抽出物、並びに、シソ科ハッカ属植物の抽出物からなる群より選択される1種以上の抽出物を有効成分として含む4型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善用組成物。

〔12〕バラ科バラ属植物がバラ、ヤロウシア（*Yarrowia*）属酵母がヤロウシア・リポリティカ（*Yarrowia lipolytica*）、ツバキ科ツバキ属植物がチャノキ、マンサク科マンサク属植物がハマメリス、バラ科シモツケソウ属植物がセイヨウナツユキソウ、オオバコ科オオバコ属植物がセイヨウオオバコ、シソ科ハッカ属植物がセイヨウハッカである、上記〔11〕に記載の4型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善用組成物。

〔13〕バラ科バラ属植物がデルフィニジン型アントシアニン、ロザシアニン化合物及びロザデルフィン化合物からなる群より選択される1種以上の化合物を含むバラ花卉、ツバキ科ツバキ属植物がチャノキの葉、マンサク科マンサク属植物がハマメリスの葉、バラ科シモツケソウ属植物がセイヨウナツユキソウの花、オオバコ科オオバコ属植物がセイヨウオオバコ種子、シソ科ハッカ属植物がセイヨウハッカ全草である、上記〔11〕又は〔12〕に記載の4型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善用組成物。

〔14〕皮膚外用剤である上記〔1〕～〔13〕のいずれかに記載の組成物。

〔15〕化粧品である上記〔1〕～〔14〕のいずれかに記載の組成物。

〔16〕4型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善により皮膚バリア機能の低下を抑制又は皮膚バリア機能を改善するための、バラ科バラ属植物の抽出物、ブドウ種子及び／又は果皮の抽出物、ヤロウシア（*Yarrowia*）属酵母の抽出物、ツバキ科ツバキ属植物の抽出物、バラ科シモツケソウ属植物の抽出物、並びに、シソ科ハッカ属植物の抽出物からなる群より選択され

る1種以上の抽出物の使用。

〔17〕皮膚バリア機能の低下を抑制又は皮膚バリア機能を改善するための、マンサク科マンサク属植物の抽出物及び／又はオオバコ科オオバコ属植物の抽出物の使用。

〔18〕4型コラーゲンの発現の低下を抑制又は前記発現を改善するための、バラ科バラ属植物の抽出物、ブドウ種子及び／又は果皮の抽出物、ヤロウイア (*Yarrowia*) 属酵母の抽出物、ツバキ科ツバキ属植物の抽出物、マンサク科マンサク属植物の抽出物、バラ科シモツケソウ属植物の抽出物、オオバコ科オオバコ属植物の抽出物、並びに、シソ科ハッカ属植物の抽出物からなる群より選択される1種以上の抽出物の使用。

〔19〕バラ科バラ属植物の抽出物、ブドウ種子及び／又は果皮の抽出物、ヤロウイア (*Yarrowia*) 属酵母の抽出物、ツバキ科ツバキ属植物の抽出物、バラ科シモツケソウ属植物の抽出物、並びに、シソ科ハッカ属植物の抽出物からなる群より選択される1種以上の抽出物を投与する、4型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善により皮膚バリア機能の低下を抑制又は皮膚バリア機能を改善する方法。

〔20〕マンサク科マンサク属植物の抽出物及び／又はオオバコ科オオバコ属植物の抽出物を投与する、皮膚バリア機能の低下を抑制又は皮膚バリア機能を改善する方法。

〔21〕バラ科バラ属植物の抽出物、ブドウ種子及び／又は果皮の抽出物、ヤロウイア (*Yarrowia*) 属酵母の抽出物、ツバキ科ツバキ属植物の抽出物、マンサク科マンサク属植物の抽出物、バラ科シモツケソウ属植物の抽出物、オオバコ科オオバコ属植物の抽出物、並びに、シソ科ハッカ属植物の抽出物からなる群より選択される1種以上の抽出物を投与する4型コラーゲンの発現の低下を抑制又は前記発現を改善する方法。

〔22〕インビトロで、ヒト表皮角化細胞を、被験物質を含む培地又は上記被験物質を含まないコントロール培地で培養する工程、及び、上記被験物質を含む培地で培養した皮膚細胞及びコントロール培地で培養したコントロー

ル皮膚細胞における4型コラーゲン発現量を比較する工程を含み、上記被験物質を含む培地で培養した皮膚細胞における4型コラーゲン発現量が、上記コントロール皮膚細胞における4型コラーゲン発現量より多い場合に、上記被験物質を皮膚バリア機能の低下抑制又は改善作用を有する物質として選択する、皮膚バリア機能の低下抑制又は改善作用を有する物質のスクリーニング方法。

発明の効果

[0008] 本発明により、皮膚バリア機能の低下を抑制又は当該機能を改善することができる皮膚バリア機能の低下抑制又は改善用組成物を提供することができる。また、本発明によれば、4型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善用組成物を提供することができる。また、本発明によれば、皮膚バリア機能の低下を抑制又は当該機能を改善する方法、及び、4型コラーゲンの発現の低下を抑制又は当該発現を改善する方法を提供することができる。本発明によれば、皮膚バリア機能の低下抑制又は改善作用を有する物質のスクリーニング方法を提供することができる。

発明を実施するための形態

[0009] 本発明の第一の態様は、バラ科バラ属植物の抽出物、ブドウ種子及び／又は果皮の抽出物、ヤロウィア（*Yarrowia*）属酵母の抽出物、ツバキ科ツバキ属植物の抽出物、マンサク科マンサク属植物の抽出物、バラ科シモツケソウ属植物の抽出物、オオバコ科オオバコ属植物の抽出物、並びに、シソ科ハッカ属植物の抽出物からなる群より選択される1種以上の抽出物を有効成分として含む4型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善用組成物である。本発明の第一の態様の4型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善用組成物を、本発明の第一の態様の組成物ともいう。

上記の抽出物は、4型コラーゲンの発現の低下を抑制又は当該発現を改善する作用を有する。4型コラーゲンの発現の低下抑制は、4型コラーゲンの発現低下の進行を抑えること、4型コラーゲンの発現を維持すること、4型コラーゲンの発現低下の程度を軽減（緩和）すること等を含む。4型コラーゲ

ンの発現の改善は、4型コラーゲンの発現を回復させること等を含む。回復は、少なくとも部分的に回復させることを含む。4型コラーゲンの発現には、4型コラーゲンをコードする遺伝子の発現及び4型コラーゲンのタンパク質レベルでの発現が含まれ、これらのいずれか又は両方であってよい。4型コラーゲンは、好ましくはヒトの4型コラーゲンであり、より好ましくはヒト4型コラーゲン α 1鎖である。ヒト4型コラーゲン α 1鎖は、遺伝子4型コラーゲンA1 (COL4A1) にコードされるタンパク質である。一態様において、本発明の4型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善用組成物は、ヒト4型コラーゲン α 1鎖の発現の低下を抑制又は当該発現を改善することによって、ヒトにおける4型コラーゲンの発現の低下を抑制又は当該発現を改善するために使用することができる。

[0010] 紫外線等の外的要因や、加齢等の内的要因によって、4型コラーゲンの発現は低下（発現量が減少）する。

後記の実施例に示されるように、表皮角化細胞において4型コラーゲンの発現低下を抑制又は発現を改善すると、皮膚の経上皮電気抵抗値 (TEER) の低下が抑制又は改善された。これは、皮膚バリア機能の低下が抑制又は皮膚バリア機能が改善されたことを示す。4型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善によって皮膚バリア機能の低下が抑制又は当該機能が改善された詳細なメカニズムは定かではないが、4型コラーゲンは基底膜の成分であることから、4型コラーゲンの発現の低下を抑制又は改善することによって、基底膜の機能の低下が抑制又は当該機能が改善され、皮膚の恒常性が維持された結果皮膚バリア機能の低下が抑制又は当該機能が改善されたと推定される。従って、基底膜機能の低下を抑制又は当該機能を改善することによって、皮膚バリア機能の低下を抑制又は皮膚バリア機能を改善することができると期待される。上記の植物又は酵母の抽出物は、優れた4型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善作用を有することから、基底膜機能の低下を抑制又は当該機能を改善するために使用することができる。

4型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善効果の観点から、本発明の第一の

態様の組成物において、上記の抽出物は、バラ科バラ属植物の抽出物、ブドウ種子及び／又は果皮の抽出物、並びに、バラ科シモツケソウ属植物の抽出物からなる群より選択される１種以上であることが好ましい。

[0011] 皮膚バリア機能とは、外部からの生体への異物の侵入を防いだり、体内の水分が皮膚から過剰に蒸発することを防ぐことで皮膚の水分を維持したりする、皮膚のバリア機能をいう。皮膚バリア機能の低下抑制は、皮膚バリア機能の低下の進行を抑えること、皮膚バリア機能を維持すること、皮膚バリア機能の低下の程度の軽減（緩和）すること等を含む。皮膚バリア機能の改善は、皮膚バリア機能を回復させること等を含む。皮膚バリア機能の低下は、加齢による皮膚バリア機能の低下、紫外線曝露による皮膚バリア機能の低下等であってもよい。

[0012] 上記のように、基底膜機能の低下抑制又は改善により、皮膚バリア機能の低下を抑制又は当該機能を改善することが可能となる。

本発明の第二の態様は、基底膜機能の低下抑制又は改善剤を有効成分として含む皮膚バリア機能の低下抑制又は改善用組成物である。本発明の第二の態様の皮膚バリア機能の低下抑制又は改善用組成物を、以下では本発明の第二の態様の組成物ともいう。

[0013] 基底膜の機能として、表皮と真皮をつなぐ機械的支えや、表皮と真皮の間の物質交換の選択的フィルターなどの機能が知られている。４型コラーゲン等の基底膜成分の発現の低下を抑制又は当該発現を改善することは、基底膜機能の低下抑制又は改善に有効である。

基底膜機能の低下抑制又は改善剤は、基底膜機能の低下抑制又は改善作用、例えば、基底膜の構成成分の発現の低下抑制又は改善作用を有するものであればよく、特に限定されない。基底膜機能の低下抑制又は改善剤は、好ましくは、４型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善を介して基底膜機能の低下を抑制又は基底膜機能を改善するものである。基底膜機能の低下抑制又は改善剤には、例えば、４型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善作用を有する上記の植物又は酵母の抽出物を使用することができる。一態様において、基

底膜機能の低下抑制又は改善剤として、バラ科バラ属植物の抽出物、ブドウ種子及び／又は果皮の抽出物、ヤロウニア（*Yarrowia*）属酵母の抽出物、ツバキ科ツバキ属植物の抽出物、マンサク科マンサク属植物の抽出物、バラ科シモツケソウ属植物の抽出物、オオバコ科オオバコ属植物の抽出物、並びに、シソ科ハッカ属植物の抽出物からなる群より選択される１種以上の抽出物を使用することができる。

上記の抽出物の中でも、基底膜機能の低下抑制又は改善剤として、バラ科バラ属植物の抽出物、ブドウ種子及び／又は果皮の抽出物、並びに、バラ科シモツケソウ属植物の抽出物からなる群より選択される１種以上が好ましい。

[0014] 本発明の第三の態様は、バラ科バラ属植物の抽出物、ブドウ種子及び／又は果皮の抽出物、ヤロウニア（*Yarrowia*）属酵母の抽出物、ツバキ科ツバキ属植物の抽出物、バラ科シモツケソウ属植物の抽出物、並びに、シソ科ハッカ属植物の抽出物からなる群より選択される１種以上の抽出物を有効成分として含む、４型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善を介した皮膚バリア機能の低下抑制又は改善用組成物である。本発明の第三の態様の皮膚バリア機能の低下抑制又は改善用組成物を、以下では本発明の第三の態様の組成物ともいう。

本発明の第三の態様の組成物において、上記の抽出物は、ブドウ種子及び／又は果皮の抽出物、ヤロウニア（*Yarrowia*）属酵母の抽出物、ツバキ科ツバキ属植物の抽出物、並びに、バラ科シモツケソウ属植物の抽出物からなる群より選択される１種以上であることが好ましい。

[0015] 本発明の第四の態様は、マンサク科マンサク属植物の抽出物及び／又はオオバコ科オオバコ属植物の抽出物を有効成分として含む皮膚バリア機能の低下抑制又は改善用組成物である。本発明の第四の態様の皮膚バリア機能の低下抑制又は改善用組成物を、以下では本発明の第四の態様の組成物ともいう。

本発明の第四の態様の組成物は、好ましくは、マンサク科マンサク属植物の抽出物を有効成分として含む。

[0016] 本発明の第三の態様の組成物及び第四の態様の組成物で使用される上記の抽

出物は、4型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善作用を有する。これにより、基底膜機能の低下抑制又は改善が可能となる。一態様において、本発明の第三の態様及び第四の態様の皮膚バリア機能の低下抑制又は改善用組成物は、基底膜機能の低下抑制又は改善を介して皮膚バリア機能の低下を抑制又は皮膚バリア機能を改善するために使用することができる。また、本発明の第四の態様の皮膚バリア機能の低下抑制又は改善用組成物は、4型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善を介した基底膜機能の低下抑制又は改善を介して、皮膚バリア機能の低下を抑制又は皮膚バリア機能を改善するために使用することができる。一態様において、本発明の第四の態様の皮膚バリア機能の低下抑制又は改善用組成物は、4型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善により皮膚バリア機能の低下を抑制又は改善するために使用することができる。

[0017] 以下では、本発明の第一の態様の4型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善用組成物、第二の態様、第三の態様及び第四の態様の皮膚バリア機能の低下抑制又は改善用組成物を、まとめて本発明の組成物ともいう。本発明の組成物においては、上記の抽出物を2種以上組み合わせて有効成分として使用してもよい。

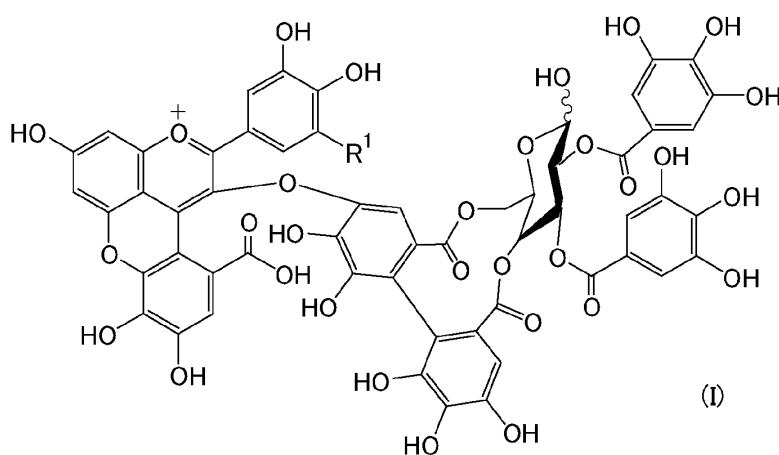
[0018] 本発明において、バラ科バラ属 (*Rosaceae Rosa*) 植物は、*Rosa hybrida* (学名) に代表されるバラ科バラ属のバラである。バラ科バラ属植物として、デルフィニジン型アントシアニン、ロザシアニン化合物及びロザデルフィン化合物からなる群より選択される1種以上の化合物を含むバラが好ましく、花卉にデルフィニジン型アントシアニン、ロザシアニン化合物及びロザデルフィン化合物からなる群より選択される1種以上の化合物を含むバラがより好ましい。中でも、花卉にデルフィニジン型アントシアニンを含むバラが好ましい。

[0019] デルフィニジン型アントシアニンは紫色や青色を呈する花卉に多く含まれている色素である。デルフィニジン型アントシアニンとして、デルフィニジン、マルビジン、ペチュニジン、又はそれらが糖、アシル基などで修飾された

化合物が挙げられる。デルフィニジン型アントシアニンを含むバラとして、青系又は藤色系の色調を呈するバラ、例えば、サントリーブルーローズアブローズ（登録商標）等の品種のバラが挙げられる。バラにデルフィニジン型アントシアニンが含まれることは、例えば、特許5697040号公報等に記載の方法で、HPLCで確認することができる。

[0020] ロザシアニン化合物は、ロザシアニンA1、ロザシアニンA2及びロザシアニンBからなる群より選択される1以上の化合物である。ロザシアニン化合物を含むバラは、上記の化合物を1種以上含むバラであればよいが、好ましくは、ロザロザシアニンA1、ロザデルフィンA2及びロザデルフィンBを含むバラである。ロザシアニンA1は、下記一般式(Ⅰ)において、R¹が水素原子である化合物であり、ロザシアニンA2は、下記一般式(ⅠⅠ)において、R²が水素原子である化合物であり、ロザシアニンBは、下記一般式(ⅠⅠⅠ)において、R³が水素原子である化合物である。

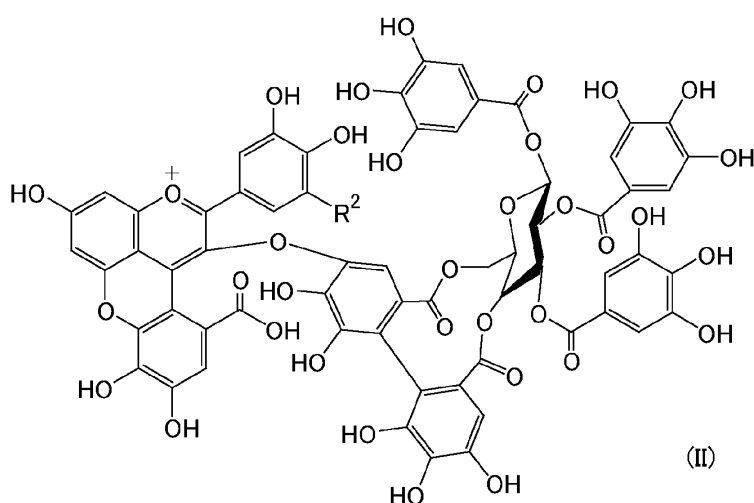
[0021] [化1]



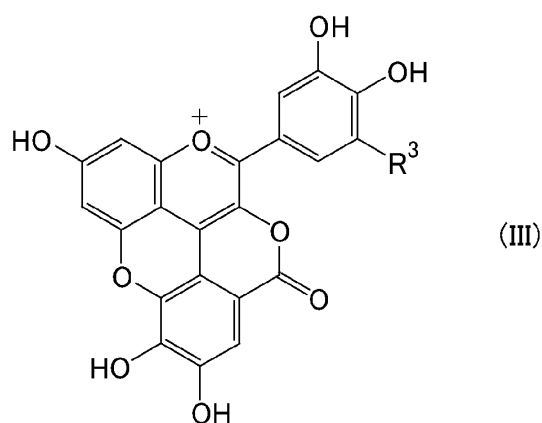
[0022] (上記式中、グルコースの1位の水酸基の配位(波線)は α 体と β 体の互変異性であることを示す。R¹は、水素原子又は水酸基を表す。)

[0023]

[化2]

[0024] (上記式中、 R^2 は、水素原子又は水酸基を表す。)

[0025] [化3]

[0026] (上記式中、 R^3 は、水素原子又は水酸基を表す。)

[0027] ロザシアニン化合物を含むバラとして、青系又は藤色系の色調を呈するバラ、例えば、マダムビオレ、パープルレイン、ラバンデ、マンハッタンブルー、シャンテリーレース、ブルームーン、タソガレ、シャルルドゴール、バイオレットドリー、ブルーリボン、アオゾラ、レディエックス、ブルーバユー、スターリングシルバー等の品種のバラが挙げられる。これらのバラは、花卉にロザシアニン化合物を含むため好ましい。

[0028] ロザデルフィン化合物は、ロザデルフィンA 1、ロザデルフィンA 2 及びロ

ザデルフィンBからなる群より選択される1以上の化合物である。ロザデルフィン化合物を含むバラは、上記の化合物を1種以上含むバラであればよいが、好ましくは、ロザデルフィンA1、ロザデルフィンA2及びロザデルフィンBを含むバラである。ロザデルフィンA1は、上記一般式(1)において、 R^1 が水酸基である化合物であり、ロザデルフィンA2は、上記一般式(11)において、 R^2 が水酸基である化合物であり、ロザデルフィンBは、上記一般式(111)において、 R^3 が水酸基である化合物である。

[0029] 上記ロザデルフィン化合物は野生種のバラには存在せず、フラボノイド3', 5'-水酸化酵素をコードする遺伝子(以下、フラボノイド3', 5'-水酸化酵素遺伝子ともいう)を遺伝子組換え等の手法で導入したバラや、遺伝子組換えバラを親として得られるフラボノイド3', 5'-水酸化酵素遺伝子を有するバラにおいて青色色素であるデルフィニジンが合成され、これにガレートやテリマグランジン類が結合して生成する化合物である。

[0030] 上記ロザデルフィン化合物を含むバラとして、フラボノイド3', 5'-水酸化酵素遺伝子を、遺伝子組換え等の手法で導入したバラ、及び、このような遺伝子組換えバラを親として得られるフラボノイド3', 5'-水酸化酵素遺伝子を有するバラを使用することができる。このようなバラとして、例えば、サントリーブルーローズアプローズ(登録商標)等の品種のバラを使用することができる。サントリーブルーローズアプローズ(登録商標)の花弁には、ロザシアニンA1、ロザシアニンA2及びロザシアニンB並びにロザデルフィンA1、ロザデルフィンA2及びロザデルフィンBが含まれていることが知られている(例えば、WO2010/110382)。サントリーブルーローズアプローズ(登録商標)は、サントリーフラワーズ株式会社(日本国、東京都)より入手することができる。フラボノイド3', 5'-水酸化酵素遺伝子を有するバラは、WO2010/110382等に記載の方法で作製することもできる。フラボノイド3', 5'-水酸化酵素遺伝子としては、WO2004/020637に記載されている植物由来の遺伝子が挙げられ、例えばスミレ属パンジー(スミレ属ブラックパンジー(Vio

la spp. cv Black Pansy) 等) 由来のフラボノイド 3', 5' -水酸化酵素遺伝子等が好ましい。フラボノイド 3', 5' -水酸化酵素遺伝子を有するバラは、花卉にロザデルフィン化合物を含むため好ましい。なお、本明細書中に記載された学術文献及び特許文献の全ては、参照として本明細書に組み入れられる。

[0031] バラにロザシアニン化合物及び／又はロザデルフィン化合物が含まれることは、例えば、WO2010/110382、WO2015/178385等に記載の方法で、HPLC-TOF-MSにより確認することができる。

[0032] ブドウ種子及び果皮は、ブドウ科ブドウ属 (Vitaceae Vitis) 植物のブドウ (学名 Vitis spp.) の種子及び果皮である。ブドウの品種は特に限定されないが、例えば、カベルネ・ソーヴィニヨン、コンコード、メルロー、マスカットベリーA等の黒ブドウ；シャルドネ、甲州等の白ブドウ等が挙げられる。中でも、シャルドネ又は黒ブドウが好ましく、黒ブドウがより好ましく、カベルネ・ソーヴィニヨン、メルロー等がさらに好ましい。ブドウ種子及び／又は果皮の抽出物におけるブドウは、1種であってもよく、2種以上であってもよい。ブドウ種子及び／又は果皮の抽出物は、好ましくはブドウ種子及び果皮の抽出物である。

[0033] ヤロウィア (Yarrowia) 属酵母として、ヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) が好ましい。ヤロウィア (Yarrowia) 属酵母の抽出物は、好ましくは、ヤロウィア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica) の抽出物である。

[0034] ツバキ科ツバキ属 (Theaceae Camellia) 植物として、チャノキ (学名 Camellia sinensis) が好ましい。

マンサク科マンサク属 (Hamamelidaceae Hamamelis) 植物として、ハマメリス (学名 Hamamelis virginiana) が好ましい。

バラ科シモツケソウ属 (Rosaceae Filipendula) 植物として、セイヨウナツユキソウ (学名 Filipendula ulmar

i a) が好ましい。

[0035] オオバコ科オオバコ属 (Plantaginaceae Plantago) 植物として、セイヨウオオバコ (学名 Plantago major) が好ましい。

シソ科ハッカ属 (Lamiaceae Mentha) 植物として、セイヨウハッカ (学名 Mentha x piperita) が好ましい。

[0036] 植物抽出物の調製には、上記植物の任意の部位、例えば、根、根茎、茎、葉、枝、樹皮、花、種子 (種皮、胚芽、胚乳、胚軸、子葉等を含む)、果実 (果肉、果皮を含む)、又はこれらの複数の組み合わせを使用することができる。この植物の任意の部位を溶媒で抽出することにより植物抽出物を製造することができる。

植物抽出物を作製するのに好ましい部位として、例えば、以下の部位が挙げられる。本発明における植物抽出物としては、植物の下記部位の抽出物が好ましい。

バラ科バラ属植物は、花、特に花卉が好ましい。ブドウは、種子及び／又は果皮を使用し、好ましくは種子及び果皮を使用する。ツバキ科ツバキ属植物、マンサク科マンサク属植物は、葉が好ましい。バラ科シモツケソウ属植物は、花が好ましい。オオバコ科オオバコ属植物は、種子が好ましい。シソ科ハッカ属植物は全草が好ましい。

上記植物の部位は、そのまま抽出工程に付されてもよく、粉碎、切断又は乾燥された後に抽出工程に付されてもよい。本発明において植物抽出物は、上記植物をそのまま抽出した抽出物であってよいが、該植物を粉碎、切断又は乾燥したものから抽出した抽出物であってよい。好ましくは、上記植物を粉碎、切断又は乾燥したもののからの抽出物である。

[0037] 植物抽出物を得るための植物の抽出方法は特に限定されず、植物成分の抽出に用いられる通常の抽出方法により得ることができる。抽出方法は適宜設定することができ、抽出条件も特に限定されない。例えば、上記植物を常温又は加温下にて溶媒 (抽出溶媒) で抽出することにより植物抽出物を得ること

が好ましい。植物抽出物の調製において、原料である上記植物はそのまま抽出工程に付されてもよく、粉碎、切断又は乾燥された後に抽出工程に付されてもよい。

[0038] 植物抽出物の調製に用いる抽出溶媒は適宜選択することができ、植物成分の抽出に通常用いられるものを使用することができる。抽出溶媒として、例えば水；メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール等の炭素数1～5の1価アルコール；エチレングリコール、プロピレングリコール、1，2－ブチレングリコール、1，3－ブチレングリコール、1，4－ブチレングリコール、2，3－ブチレングリコール等の炭素数2～5の多価アルコール；アセトン、メチルエチルケトン等のケトン；酢酸メチル、酢酸エチル等のエステル；テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル等の鎖状及び環状エーテル；ポリエチレングリコール等のポリエーテル；スクワラン等が挙げられる。これらは単独で用いてもよいし、2種以上を組み合わせた混合溶媒（混合液）を用いてもよい。炭素数1～5の1価アルコールとして、炭素数1～4のものが好ましく、炭素数2～4のものがより好ましく、エタノールがさらに好ましい。炭素数2～5の多価アルコールとして、炭素数2～4の2価又は3価のアルコールが好ましく、2価のアルコールがより好ましく、1，3－ブチレングリコールがさらに好ましい。中でも、抽出溶媒として、水、炭素数1～5の1価アルコール、炭素数2～5の多価アルコール、これらの2種以上の混合溶媒が好ましく、水、炭素数2～4の1価アルコール又はその水溶液、炭素数2～4の2価アルコール又はその水溶液がより好ましく、水、エタノール、エタノール水溶液、1，3－ブチレングリコール、1，3－ブチレングリコール水溶液がさらに好ましく、水、エタノール水溶液又は1，3－ブチレングリコール水溶液が特に好ましい。一態様において、エタノール水溶液及び1，3－ブチレングリコール水溶液は、エタノール又は1，3－ブチレングリコール濃度が10～98体積％が好ましく、30～90体積％がより好ましく、30～70体積％がさらに好ましい。本発明における植物抽出物として、上記の溶媒抽出物を好適に使用することができる。

- [0039] 抽出に際して酸又はアルカリを添加し、抽出溶媒のpHを調整してもよい。抽出後には、植物残渣（抽出後の植物体又はその部分）を抽出液から除去することが好ましい。植物残渣を抽出液から除去する方法は特に限定されず、ろ過、遠心分離等の公知の分離手段が挙げられる。
- [0040] 植物の抽出方法の一例として、例えば以下の方法が使用できる。植物をそのまま又は乾燥させて、細碎し、抽出溶媒を重量で0.1～30倍量加え、常圧下、室温で好ましくは10分～15日、より好ましくは30分～10日、さらに好ましくは1時間～7日抽出するか、又は、抽出溶媒の沸点付近で好ましくは10分～1日（より好ましくは10分～2時間）程抽出してからろ過してろ液を得る。抽出の際は、静置してもよく、適宜攪拌を行ってもよい。また、得られたろ液（植物抽出液）をそのまま植物抽出物としてもよく、必要に応じ希釈、濃縮又は乾燥等してもよい。
- [0041] 本発明においては、抽出により得られた植物抽出液をそのまま植物抽出物として用いることができる。また、本発明の効果を損なわない限り、公知の方法により希釈、濃縮又は乾燥して、希釈液、濃縮物や粉末としてもよく、ペースト状に調製して用いることもできる。乾燥方法として、例えば、凍結乾燥、噴霧乾燥等が挙げられる。さらに、上記の植物抽出液、その濃縮物や乾燥粉末等について、本発明の効果を損なわない範囲で、必要に応じて、さらに脱臭、脱色等の精製を行ってもよい。このような精製方法は、通常の手段を任意に選択して行えばよい。
- 本発明における植物抽出物は、上記のような抽出方法で得られた各種溶媒抽出液、その希釈液、その濃縮物又はその乾燥粉末、これらの精製物を含む。
- また、抽出物は、抽出溶媒とは異なる溶媒で希釈又は溶解させて用いることもできる。
- また、上記の植物抽出物は市販されており、市販品を使用することもできる。
- [0042] ヤロウィア（*Yarrowia*）属酵母の抽出物は、ヤロウィア（*Yarrowia*）属酵母の菌体又は菌体培養物の抽出物であることが好ましい。菌

体又は菌体培養物の抽出物として、菌体又は菌体を含む菌体培養物（好ましくは菌体培養液）に、自己消化処理や酵素分解処理等の菌体破碎処理を行って、酵母菌体内容物を培養液中等に溶出したもの（菌体破碎物）、菌体破碎処理を行った菌体又は菌体培養物（菌体破碎物）から菌体残渣を除去したものが挙げられる。好ましくは、菌体又は菌体を含む菌体培養物（好ましくは菌体培養液）を自己消化処理したものである。菌体破碎物やこれから菌体残渣を除去したものには、必要に応じて加熱処理等の殺菌処理等を行ってもよい。上記の酵母の抽出物は、このような殺菌処理等が行われたものであってよい。ヤロウシア（*Yarrowia*）属酵母の抽出物の形態は特に限定されないが、例えば、ペースト状、懸濁状、エキス状、液状、粉末状等が挙げられる。

[0043] 一態様において、バラ科バラ属植物の抽出物として、バラ（好ましくは花卉）のエタノール抽出物又はエタノール水溶液抽出物が好ましい。

ブドウ種子及び／又は果皮の抽出物として、ブドウ種子及び／又は果皮のエタノール抽出物又はエタノール水溶液抽出物が好ましい。

ツバキ科ツバキ属植物の抽出物として、チャノキ（好ましくは葉）のエタノール抽出物又はエタノール水溶液抽出物が好ましい。

マンサク科マンサク属植物の抽出物として、ハマメリス（好ましくは葉）の1, 3-ブチレングリコール抽出物又は1, 3-ブチレングリコール水溶液抽出物が好ましい。

バラ科シモツケソウ属植物の抽出物として、セイヨウナツユキソウ（好ましくは花）の1, 3-ブチレングリコール抽出物又は1, 3-ブチレングリコール水溶液抽出物が好ましい。オオバコ科オオバコ属植物の抽出物として、セイヨウオオバコ（好ましくは種子）のエタノール抽出物又はエタノール水溶液抽出物が好ましい。

シソ科ハッカ属植物の抽出物として、セイヨウハッカ（好ましくは全草）のエタノール抽出物、エタノール水溶液抽出物、又は熱水抽出物が好ましい。

[0044] 本発明の組成物の形態は特に限定されず、粉末状、顆粒状、ペースト状、固

形状等であってもよく、液状であってもよく、適宜選択することができる。
本発明の組成物には、本発明の効果を損なわない限り、上記の抽出物に加えて、その他の成分を配合することができる。その他の成分としては、例えば、後述する化粧品、飲食品、医薬品、医薬部外品等に使用し得る成分が挙げられる。

本発明の4型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善用組成物、皮膚バリア機能の低下抑制又は改善用組成物は、一例として、剤の形態で提供することができるが、本形態に限定されるものではない。当該剤をそのまま組成物として、又は、当該剤を含む組成物として提供することもできる。一態様において、本発明の組成物は、4型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善剤、皮膚バリア機能の低下抑制又は改善剤ということもできる。

[0045] 本発明の第一の態様の4型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善用組成物は、対象の4型コラーゲンの発現の低下を抑制又は当該発現を改善するため、好ましくは対象の皮膚における4型コラーゲンの発現の低下を抑制又は当該発現を改善するために使用される。本発明の第二の態様、第三の態様及び第四の態様の皮膚バリア機能の低下抑制又は改善用組成物は、対象の皮膚バリア機能の低下を抑制又は当該機能を改善するために使用される。

本発明の組成物は、例えば、皮膚バリア機能の低下、基底膜の機能低下又は4型コラーゲンの発現低下に起因する不具合の予防又は改善のために使用することができる。このような不具合として、例えば、肌の乾燥、かゆみ、かさつき、敏感肌、肌荒れ等が挙げられる。一態様において、本発明の組成物は、皮膚バリア機能の低下抑制若しくは改善、又は、皮膚における4型コラーゲンの発現の低下抑制若しくは改善により、肌の乾燥、かゆみ、かさつき、敏感肌、肌荒れ等を予防又は改善するために使用され得る。不具合の予防は、発症の防止、発症の遅延、発症率の低下等を包含する。不具合の改善は、症状の軽快、症状の好転、症状の進行抑制等を包含する。

[0046] 本発明の組成物は、化粧品、飲食品、医薬品、医薬部外品等様々な用途に使用することができる。本発明の組成物は、それ自体が、4型コラーゲンの発

現の低下抑制又は改善のため、又は、皮膚バリア機能の低下抑制又は改善のための化粧品、飲食品、医薬品又は医薬部外品等であってもよく、又は、該化粧品、飲食品、医薬品又は医薬部外品等に配合して使用される素材又は製剤等であってもよい。

[0047] 本発明の組成物は、例えば、皮膚外用剤として好適に使用される。皮膚外用剤は、化粧品、医薬品、医薬部外品を含み、好ましくは化粧品である。

本発明の組成物は、皮膚外用剤以外の医薬品又は医薬部外品として使用することもできる。

別の実施態様においては、本発明の組成物を飲食品とすることも好ましい。

本発明の組成物を化粧品、医薬品、医薬部外品等の皮膚外用剤、飲食品等とする場合について以下に説明する。

[0048] 本発明の組成物等を皮膚外用剤とする場合、剤形等は特に限定されず、例えば溶液、乳液、クリーム、ゲル、粉末、エアゾール、ミスト、カプセル及びシート等任意の形態とすることができる。皮膚外用剤は、好ましくは化粧品である。化粧品の製品形態も特に限定されず、例えば、洗顔料、メイク落とし、化粧水、美容液、パック、乳液、クリーム、日焼け止め等のスキンケア化粧品；ファンデーション、化粧下地、口紅、アイシャドー、アイライナー、マスカラ、アイブロー、頬紅、ネイルエナメル等のメイクアップ化粧品；ヘアシャンプー、ヘアリンス、整髪料、染毛料、育毛剤等の毛髪化粧品；石けん、ボディソープ等の洗浄料；入浴剤等が挙げられる。

[0049] 上記化粧品には、本発明の効果を損なわない範囲で、化粧品に許容される担体、添加剤等の成分、例えば、水、アルコール類、油剤、界面活性剤、増粘剤、金属セッケン、ゲル化剤、粉体、キレート剤、水溶性高分子、皮膜形成剤、樹脂、包接化合物、抗菌剤、消臭剤、塩類、pH調整剤、紫外線吸収剤、上記以外の動植物・微生物由来の抽出物、角質溶解剤、酵素、ホルモン類、他のビタミン類、保湿剤、殺菌剤、抗炎症剤、香料等の1又は2以上を適宜含有させることができる。化粧品は、一般的な製造法により製造することができる。例えば、有効成分に使用される上記の抽出物と、上記の化粧品に

使用し得る成分 1 又は 2 以上とを混合した後、所望の形態に加工することによって得ることができる。

[0050] 皮膚外用剤を医薬品又は医薬部外品とする場合、本発明の効果を損なわない範囲で、医薬品又は医薬部外品に許容される担体、添加剤等の成分を使用してもよい。そのような成分として、例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、抗酸化剤、着色剤等の 1 又は 2 以上が挙げられ、これらは必要に応じて使用できる。

[0051] 本発明の組成物は、上述した皮膚外用剤以外の医薬品、医薬部外品とすることもできる。このような医薬品又は医薬部外品は、経口投与されてもよく、非経口投与されてもよい。医薬品又は医薬部外品は経口投与製剤（内服剤）又は非経口投与製剤の形態とすることができる。経口投与製剤の剤形としては、液剤、錠剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、糖衣錠、カプセル剤、懸濁液、乳剤、チュアブル剤等が挙げられる。非経口投与製剤の剤形としては、注射剤、輸液剤等が挙げられる。このような医薬品又は医薬部外品には、医薬品又は医薬部外品に許容される担体、添加剤等の成分を使用してもよい。そのような成分として、例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、抗酸化剤、着色剤、矯味剤等の 1 又は 2 以上が挙げられ、これらは必要に応じて使用できる。医薬品、医薬部外品は、一般的な製造法により製造することができる。例えば、有効成分に使用される上記の抽出物と、医薬品又は医薬部外品において使用し得る成分の 1 又は 2 以上とを混合した後、所望の形態に加工することによって得ることができる。

[0052] 本発明の組成物を飲食品とする場合、飲食品は特に限定されず、例えば、一般的な飲食品、健康食品、機能性表示食品、特定保健用食品等が挙げられる。飲食品の形態も特に限定されない。上記健康食品、機能性表示食品、特定保健用食品は、例えば、液剤、錠剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、糖衣錠、カプセル剤、懸濁液、乳剤、チュアブル剤、流動食等の各種製剤形態とすることもできる。

[0053] 上記飲食品には、本発明の効果を損なわない範囲で、飲食品に許容される成

分、例えば、他の飲食品材料、飲食品に配合される添加剤等を配合してもよい。このような飲食品は、一般的な製造法により製造することができる。例えば、飲食品の製造において、飲食品材料等に、本発明において有効成分に使用される上記の抽出物を配合すればよい。

[0054] 本発明の組成物が、皮膚外用剤、皮膚外用剤以外の医薬品又は医薬部外品、飲食品等のいずれの形態の場合も、有効成分に使用される上記抽出物の含有量は、該組成物中に、例えば、該抽出物の乾燥物換算の重量として、0.000001～100重量%が好ましく、0.000001～100重量%がより好ましく、0.00001～10重量%がさらに好ましい。上記含有量は、2種以上の抽出物を含む場合は、その合計の含有量である。

[0055] 本発明の組成物の使用量は、特に限定されず、皮膚バリア機能の低下抑制又は改善効果、4型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善効果が得られるような量（有効量）であればよく、対象者の状態、体重、性別、年齢又はその他の要因に従って適宜設定することができる。本発明の組成物の使用量は、化粧品等の皮膚外用剤であれば、例えば、成人（60kg）1人当たり1日当たり、有効成分に使用される上記の抽出物（乾燥物換算）として、例えば、0.01～500mgが好ましい。医薬品又は医薬部外品を経口投与する場合の投与量は、例えば、成人（60kg）1人当たり1日当たり、上記の抽出物（乾燥物換算）として、例えば、0.01～500mgが好ましい。飲食品であれば、その摂取量は、例えば、成人（60kg）1人当たり1日当たり、上記の抽出物（乾燥物換算）として、例えば、0.01～500mgが好ましい。上記量の抽出物を、単回又は複数回に分けて摂取又は投与することができる。上記の抽出物の量は、2種以上の抽出物を使用する場合は、その合計量である。上記抽出物を含む皮膚外用剤を皮膚に適用するタイミング、飲食品、医薬品又は医薬部外品を摂取又は投与するタイミング等は特に限定されない。

[0056] 本発明の組成物の適用対象（投与対象ということもできる）としては、特に限定されず、ヒト又は非ヒト哺乳動物等に適用することができるが、ヒトが

好ましい。適用対象としては、例えば、皮膚バリア機能の低下抑制又は改善を希望する又は必要とする対象、4型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善を希望する又は必要とする対象等が挙げられる。このような対象として、例えば、肌の乾燥、かゆみ、かさつき、敏感肌、肌荒れを実感する人が挙げられる。本発明の組成物は、その形態、剤形等に応じて自体公知の種々の方法で摂取又は投与することができる。一態様において、本発明の組成物は、皮膚に適用することが好ましい。

[0057] 本発明の組成物の有効成分に使用される上記の抽出物は、対象の4型コラーゲンの発現の低下を抑制又は当該発現を改善するために使用することができる。上記の抽出物は、対象の皮膚バリア機能の低下を抑制又は皮膚バリア機能を改善するため、好ましくは4型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善により皮膚バリア機能の低下を抑制又は皮膚バリア機能を改善するために使用することができる。

[0058] 本発明は、以下の使用及び方法も包含する。

4型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善により皮膚バリア機能の低下を抑制又は皮膚バリア機能を改善するための、バラ科バラ属植物の抽出物、ブドウ種子及び／又は果皮の抽出物、ヤロウィア（*Yarrowia*）属酵母の抽出物、ツバキ科ツバキ属植物の抽出物、バラ科シモツケソウ属植物の抽出物、並びに、シソ科ハッカ属植物の抽出物からなる群より選択される1種以上の抽出物の使用。

バラ科バラ属植物の抽出物、ブドウ種子及び／又は果皮の抽出物、ヤロウィア（*Yarrowia*）属酵母の抽出物、ツバキ科ツバキ属植物の抽出物、バラ科シモツケソウ属植物の抽出物、並びに、シソ科ハッカ属植物の抽出物からなる群より選択される1種以上の抽出物を投与する、4型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善により皮膚バリア機能の低下を抑制又は皮膚バリア機能を改善する方法。

[0059] 皮膚バリア機能の低下を抑制又は皮膚バリア機能を改善するための、マンサク科マンサク属植物の抽出物及び／又はオオバコ科オオバコ属植物の抽出物

の使用。

マンサク科マンサク属植物の抽出物及び／又はオオバコ科オオバコ属植物の抽出物を投与する、皮膚バリア機能の低下を抑制又は皮膚バリア機能を改善する方法。

[0060] 4型コラーゲンの発現の低下を抑制又は当該発現を改善するための、バラ科バラ属植物の抽出物、ブドウ種子及び／又は果皮の抽出物、ヤロウシア（*Yarrowia*）属酵母の抽出物、ツバキ科ツバキ属植物の抽出物、マンサク科マンサク属植物の抽出物、バラ科シモツケソウ属植物の抽出物、オオバコ科オオバコ属植物の抽出物、並びに、シソ科ハッカ属植物の抽出物からなる群より選択される1種以上の抽出物の使用。

上記1種以上の抽出物を投与する4型コラーゲンの発現の低下を抑制又は当該発現を改善する方法。

[0061] 上記抽出物は、好ましくは皮膚に投与（適用）され、皮膚バリア機能の低下を抑制又は当該機能を改善するため、皮膚における4型コラーゲンの発現の低下を抑制又は当該発現を改善するため、又は、基底膜機能の低下を抑制又は当該機能を改善するために使用することができる。一態様において、上記抽出物は、皮膚バリア機能の低下、基底膜の機能低下又は4型コラーゲンの発現低下に起因する不具合の予防又は改善のために使用することができる。上記抽出物は、例えば、皮膚バリア機能の低下抑制若しくは改善、又は、皮膚における4型コラーゲンの発現の低下抑制若しくは改善により、肌の乾燥、かゆみ、かさつき、敏感肌、肌荒れ等を予防又は改善するために使用され得る。

[0062] 上記使用及び方法において、上記の抽出物、これを投与する対象、抽出物の投与量及びこれらの好ましい態様等は、上述した本発明の組成物におけるものと同じである。上記抽出物は、そのまま使用してもよく、その他の成分と組み合わせて使用してもよい。本発明の組成物を使用してもよい。上記の抽出物は上述した皮膚外用剤、飲食品等の形態で使用することができる。

上記使用は、治療的使用であってもよく、非治療的使用であってもよい。上

記方法は、治療的な方法であってもよく、非治療的な方法であってもよい。
非治療的とは、医療行為、すなわち人間の手術、治療又は診断を含まない概念である。

- [0063] 本発明の別の態様は、上記抽出物の、皮膚バリア機能の低下抑制又は改善用組成物を製造するための使用；上記抽出物の、4型コラーゲンの発現の低下抑制又は改善用組成物を製造するための使用でもある。抽出物及びこれらの好ましい態様等は、上述した本発明の組成物におけるものと同じである。
- 本発明のさらに別の態様は、皮膚バリア機能の低下を抑制又は皮膚バリア機能を改善するための、基底膜機能の低下抑制又は改善剤の使用；基底膜機能の低下抑制又は改善剤を投与する、皮膚バリア機能の低下を抑制又は皮膚バリア機能を改善する方法でもある。
- 基底膜機能の低下抑制又は改善剤及びその好ましい態様は、上記と同じである。

- [0064] 本発明は、皮膚バリア機能の低下抑制又は改善作用を有する物質のスクリーニング方法も包含する。本発明のスクリーニング方法について説明する。
- 本発明の皮膚バリア機能の低下抑制又は改善作用を有する物質のスクリーニング方法は、インビトロで、ヒト表皮角化細胞を、被験物質を含む培地又は上記被験物質を含まないコントロール培地で培養する工程、及び、上記被験物質を含む培地で培養した皮膚細胞及びコントロール培地で培養したコントロール皮膚細胞における4型コラーゲン発現量を比較する工程を含み、上記被験物質を含む培地で培養した皮膚細胞における4型コラーゲン発現量が、上記コントロール皮膚細胞における4型コラーゲン発現量より多い場合に、上記被験物質を皮膚バリア機能の低下抑制又は改善作用を有する物質として選択する。

- [0065] 本発明のスクリーニング方法では、インビトロで、ヒト表皮角化細胞を、被験物質を含む培地又は上記被験物質を含まないコントロール培地で培養する。ヒト表皮角化細胞は市販されており、市販品を使用することができる。
- 被験物質は特に限定されず、例えば、植物抽出液、細胞抽出液、細胞培養上

清、発酵生産物、タンパク質、ペプチド、ビタミン類、合成化合物等が挙げられる。これらは既知物質であってもよく、新規物質であってもよい。

[0066] インビトロで、ヒト表皮角化細胞を、被験物質を含む培地又は上記被験物質を含まないコントロール培地で培養する工程を、培養工程ともいう。上記被験物質を含む培地で培養した皮膚細胞（被験皮膚細胞ともいう）及びコントロール培地で培養したコントロール皮膚細胞における4型コラーゲン発現量を比較する工程を、4型コラーゲン発現量比較工程ともいう。

[0067] 培養工程において、ヒト表皮角化細胞を培養する条件は特に限定されず、公知の条件を採用すればよい。被験物質を含む培地は、被験物質を培地に混合することにより調製することができる。培地は、ヒト表皮角化細胞の培養に使用されるものを使用することができ、市販品を使用してもよい。培地の一例として、HuMedia-KB2培地（クラボウ社製）、DMEM培地等が挙げられる。培地には、インスリン、ヒトEGF、ハイドロコチゾン、血清、抗菌剤等を添加してもよい。培養時間は特に限定されず、培養条件等により適宜設定すればよい。コントロール培地には、被験物質を含有しない以外は、被験物質を含有する培地と同じ培地を使用すればよい。例えば、被験物質を含む培地又はコントロール培地中で、ヒト表皮角化細胞を好ましくは1～72時間、より好ましくは3～48時間培養すればよい。

培養工程において、紫外線照射、酸化ストレス負荷等のストレス負荷を行ってもよい。例えば、紫外線照射、酸化ストレス負荷等のストレス負荷条件で培養を行うと、当該ストレスによる皮膚バリア機能の低下抑制又はストレス下での皮膚バリア機能の改善により有効な成分をスクリーニングすることができる。

[0068] 培養工程の後に、4型コラーゲン発現量比較工程を行う。上記の培養後に、上記被験物質を含む培地で培養した皮膚細胞及びコントロール培地で培養したコントロール皮膚細胞における4型コラーゲン発現量を比較する。上記被験物質を含む培地で培養した皮膚細胞における4型コラーゲン発現量が、上記コントロール皮膚細胞における4型コラーゲン発現量より多い場合に、上

記被験物質を皮膚バリア機能の低下抑制又は改善作用を有する物質として選択する。

[0069] 4型コラーゲン発現量は、4型コラーゲンをコードするmRNA量又は4型コラーゲンのタンパク質量を測定することにより行うことができる。mRNA又はタンパク質量の測定は、公知の方法で行うことができる。

4型コラーゲンをコードするmRNA量は、定量PCR、ノーザンブロットイング、マイクロアレイ、蛍光プローブを用いたライブイメージング等により測定することが可能である。4型コラーゲンのタンパク質量は、免疫化学アッセイ、質量分析等により測定することが可能である。免疫化学アッセイとして、Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)、ウエスタンブロットイング等が挙げられる。タンパク質量の測定には、市販のELISAキット (MyBioSource社製) 等を使用することもできる。ヒトの4型コラーゲンの塩基配列やアミノ酸配列 (ORF) は公知であり、塩基配列 (mRNA) はAccession No. AH002741として、公共のデータベースであるGenbankに登録されている。当業者であれば、4型コラーゲンをコードするmRNA量を測定するためのプライマーの設計や合成、DNAの増幅等を容易に行うことができる。

[0070] 上記のように、4型コラーゲンの発現の低下を抑制又は当該発現を改善することによって、皮膚バリア機能の低下抑制又は改善が可能となる。このため、コントロール皮膚細胞における4型コラーゲン発現量よりも、被験皮膚細胞における4型コラーゲンの発現量が多い場合には、当該被験物質を皮膚バリア機能の低下抑制又は改善作用を有する物質であると判定することができる。上記スクリーニング方法によれば、皮膚バリア機能の低下抑制又は改善作用を有する物質のスクリーニングを行うことができる。

実施例

[0071] 以下、本発明を実施例によりさらに詳しく説明するが、これにより本発明の範囲を限定するものではない。

[0072] <調製例 1>

植物由来の抽出物を調製した。抽出に用いた植物及びその部位は以下の通りである。

(1) バラ (*Rosa hybrida*、品種「サントリーブルーローズアプローズ」(登録商標)、サントリーフラワーズ(株)) : 花卉

(2) ブドウ (*Vitis spp.*) (カベルネ・ソーヴィニヨン) : 種子及び果皮

(3) チャノキ (*Camellia sinensis*) : 葉

(4) ハマメリス (*Hamamelis virginiana*) : 葉

(5) セイヨウナツユキソウ (*Filipendula ulmaria*) : 花

(6) セイヨウオオバコ (*Plantago major*) : 種子

(7) セイヨウハッカ (*Mentha x piperita*) : 全草

上記のバラ(品種「サントリーブルーローズアプローズ」)は、花卉にデルフィニジン型アントシアニン、ロザシアニンA1、ロザシアニンA2及びロザシアニンB並びにロザデルフィンA1、ロザデルフィンA2及びロザデルフィンBを含む青系のバラである。

[0073] 上記(1)～(7)の植物の破砕物を、溶媒に浸し抽出した。より詳細には、上記(1)、(2)、(3)、(6)、(7)については、植物の破砕物を重量の10倍量の30～90vol%エタノール水溶液に浸し、室温下、1日1回攪拌操作を加えて10分～7日間抽出して、抽出液を得た。上記(4)、(5)については、エタノール水溶液の代わりに1,3-ブチレングリコール水溶液を使用し、上記方法で抽出した。

[0074] 得られた抽出液から、ろ過により植物残渣を除去し、ろ液を植物抽出液として得た。

得られた植物抽出液をエバポレーターで濃縮後、凍結乾燥することにより各植物の抽出物を粉末として得た。当該粉末状の植物抽出物(バラ花卉抽出物、ブドウ種子及び果皮抽出物、チャノキ葉抽出物、ハマメリス葉抽出物、セ

イヨウナツユキソウ花抽出物、セイヨウオオバコ種子抽出物、セイヨウハツカ抽出物)を、抽出物サンプルとして後記の評価に用いた。

[0075] <調製例2>

ヤロウィア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*) 抽出物は、ヤロウィア・リポリティカを培養し、自己消化させた後、加熱殺菌除菌操作を行うことで、粉末状のヤロウィア・リポリティカ抽出物を得た。後記の実施例では、ヤロウィア・リポリティカ抽出物には、上記粉末を抽出物サンプルとして用いた。

[0076] <実施例1>炎症刺激時における、4型コラーゲンの過剰発現が皮膚バリアに及ぼす影響

CMVプロモータの下流にCOL4A1 (RefSeq ID: NM_001845.6)を組み込んだプラスミド(以下、COL4A1プラスミド)を作製した。推奨プロトコールに従い、COL4A1プラスミド、Lipofectamine 3000 Reagent (Thermo Fisher Scientific社製)を、Opti-MEM (登録商標) Reduced Serum Media (Thermo Fisher Scientific社製)(以下、Opti-MEM)を用いて希釈し、プラスミド濃度が異なる2種の溶液(以下、Opti-MEM溶液)を作製した(プラスミド濃度: $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 又は $20 \mu\text{g}/\text{mL}$)。なお対照として、プラスミドの代わりにOpti-MEMを添加した溶液も作製した。

[0077] HuMedia-KG2 (以下、推奨培地) (クラボウ社製)を用いて、正常ヒト成人表皮角化細胞(クラボウ社製)を24well用Cell Culture Inserts (Millipore社製)に 3×10^4 細胞/ $200 \mu\text{L}$ /ウェルの濃度で播種した後、速やかに $10 \mu\text{L}$ の上記いずれかのOpti-MEM溶液を添加した。なお、24穴プレート(AGCテクノグラス(株)製)内には $900 \mu\text{L}$ の推奨培地を添加した。続いて、30分後に、一部の群に対してのみ、終濃度が $100 \mu\text{M}$ となるよう過酸化水素水(ナカライテスク(株)製)を添加した(H_2O_2 処理)。播種4時間後、推

奨培地に交換した。播種24時間後に CaCl_2 添加により培地中 Ca^{2+} 濃度を1.41mMまで高めた推奨培地（以下、変則推奨培地）に交換した。2～3日おきに変則推奨培地を用いて培地交換を行った。

[0078] 播種96時間後、120時間後、144時間後にミリセルERS-2（Merck社製）を用いて経上皮電気抵抗値（TEER（ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ））を評価した。また播種144時間後にisogen（（株）ニッポンジーン製）を用いて細胞を溶解した後、mRNAを抽出した。その後、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit及び、RNase Inhibitorを用いてcDNAを合成、TaqMan Fast Universal PCR Master Mix（いずれもThermo Fisher Scientific社製）、プライマーを用いて定量PCRを行い、ヒト4型コラーゲンA1（COL4A1）の発現量を評価した。なお、内因性のコントロールにはEukaryotic 18S rRNAを用いた。

[0079] COL4A1発現量を測定するためのプライマー（COL4A1）、内因性のコントロールを定量するためのプライマー（Eukaryotic 18S rRNA）には、それぞれ#Hs00266237_m1、#Hs99999901_s1（いずれもThermo Fisher Scientific社製）を使用した。

[0080] 結果を表1及び表2に示す。表1に、プラスミド非添加かつ H_2O_2 非処理群（ H_2O_2 （-）、プラスミド（-））のCOL4A1発現量を1としたときのCOL4A1の遺伝子発現量を示す。表1及び2において、 H_2O_2 （+）は、 H_2O_2 処理を行った群である。プラスミド（-）はCOL4A1プラスミド非添加、プラスミド（+）はCOL4A1プラスミド添加を示す。＊は、有意差（ $p < 0.05$ ）があったことを示す（Dunnett's test（vs プラスミド非添加かつ H_2O_2 処理群））。 H_2O_2 刺激に伴い、COL4A1発現量の低下が見られたが、COL4A1プラスミドを導入することで、 H_2O_2 刺激群に対して、有意かつ用量依存的な発現の低下抑制又は

改善が確認された（*： $p < 0.05$ ）。

[0081] [表1]

	H ₂ O ₂ (-), プラスミド(-)	H ₂ O ₂ (+), プラスミド(-)	H ₂ O ₂ (+), プラスミド(+)	H ₂ O ₂ (+), プラスミド(+)
H ₂ O ₂	-	H ₂ O ₂ 100 μ M	H ₂ O ₂ 100 μ M	H ₂ O ₂ 100 μ M
プラスミド	-	-	プラスミド 0.05 μ g	プラスミド 0.20 μ g
COL4A1発現量	1.00	0.61	25.70 *	86.39 *

[0082] 表2に、播種144時間後のTEERの値を示す。*は、有意差（ $p < 0.05$ ）があったことを示す（Dunnett's test（vs プラスミド非添加かつH₂O₂処理群））。H₂O₂刺激に伴い、TEERの有意な低下が見られたが、COL4A1プラスミドを導入することで、H₂O₂刺激群に対して、用量依存的かつ高用量群においては有意なTEER改善作用が確認された（*： $p < 0.05$ ）。

[0083] [表2]

	H ₂ O ₂ (-), プラスミド(-)	H ₂ O ₂ (+), プラスミド(-)	H ₂ O ₂ (+), プラスミド(+)	H ₂ O ₂ (+), プラスミド(+)
H ₂ O ₂	-	H ₂ O ₂ 100 μ M	H ₂ O ₂ 100 μ M	H ₂ O ₂ 100 μ M
プラスミド	-	-	プラスミド 0.05 μ g	プラスミド 0.20 μ g
TEER($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	51.00 *	38.33	44.19	50.06 *

[0084] <実施例2～9>抽出物サンプルの4型コラーゲン遺伝子発現の低下抑制又は改善作用の評価

推奨培地を用いて、正常ヒト成人表皮角化細胞（クラボウ社製）を12穴プレート（AGCテクノグラス社製）に 5×10^4 細胞/mL/ウェルの濃度で播種し、48時間培養した。抽出物サンプルを含む推奨培地に交換してサンプル処理を開始した後、サンプル処理開始から30分後に、終濃度が100 μ Mとなるよう過酸化水素水（ナカライテスク（株）製）を添加した。過酸化水素水処理開始から3時間後に、抽出物サンプルを含まない推奨培地に交換した。サンプル処理開始時より48時間後にRLT Buffer（1% 2-メルカプトエタノール含有）を用いて細胞を溶解及び回収した後、RNeasy Mini Kit及びRNase-Free DNase Set（いずれもQiagen社製）を用いてmRNAを抽出した。その後、実施例1と同じ方法により、cDNA合成、定量PCRを行い、COL4A1の発現量を評価した。

- [0085] コントロールについては、抽出物サンプルの代わりに、ジメチルスルホキシド（DMSO）を終濃度が0.1%となるよう添加した推奨培地で処理した以外は、上記と同じ方法で細胞を培養し、過酸化水素水を添加し、COL4A1の発現量を評価した。
- [0086] 実施例2～9で使用した抽出物サンプルは、調製例1及び2で調製したバラ花卉抽出物、ブドウ種子及び果皮抽出物、チャノキ葉抽出物、ハマメリス葉抽出物、セイヨウナツユキソウ花抽出物、セイヨウオオバコ種子抽出物、ヤロウニア・リポリティカ抽出物又はセイヨウハッカ抽出物である。抽出物サンプルは、超純水又はDMSOに溶解させて培地に添加した。培地中の抽出物サンプルの濃度は、5～20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。なお、超純水に溶解させた場合は、別途DMSOを添加し、いずれの抽出物サンプルを含む推奨培地もDMSO終濃度が0.1%となるようにした。
- [0087] 実施例2～9の結果（N＝3～4の平均値）を表3に示す。表3に示す結果は、コントロールのCOL4A1の発現量を100%とした場合の、抽出物サンプルで処理した細胞におけるCOL4A1の発現量の相対値（%）である。＊は、コントロールに対して有意差（ $p < 0.05$ ）があったことを示す（Student's t-test）。なお、抽出物サンプル（被験物質）の濃度が5～20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で、COL4A1の発現が最も高かった場合の結果を表3に示した。バラ花卉抽出物、ブドウ種子及び果皮抽出物、チャノキ葉抽出物、ハマメリス葉抽出物、セイヨウナツユキソウ花抽出物、セイヨウオオバコ種子抽出物、ヤロウニア・リポリティカ抽出物、セイヨウハッカ抽出物について、コントロールに対してCOL4A1の発現の低下を抑制又は当該発現を改善する有意な効果が確認された（＊： $p < 0.05$ ）。
- [0088]

[表3]

	サンプル	COL4A1発現量	有意差
実施例2	バラ花卉抽出物	277%	*
実施例3	ブドウ種子及び果皮抽出物	248%	*
実施例4	チャノキ葉抽出物	155%	*
実施例5	ハマメリス葉抽出物	151%	*
実施例6	セイヨウナツユキソウ花抽出物	271%	*
実施例7	セイヨウオオバコ種子抽出物	142%	*
実施例8	ヤロウィア・リボリティカ抽出物	147%	*
実施例9	セイヨウハッカ抽出物	178%	*

[0089] <実施例10～15>抽出物サンプルの皮膚バリア機能低下抑制又は改善作用の評価

抽出物サンプルを含む推奨培地を用いて、正常ヒト成人表皮角化細胞をMillicell Cell Culture Insertsに 3×10^4 細胞/ $200 \mu\text{L}$ /ウェルの濃度で播種した。播種より30分後に、終濃度が $100 \mu\text{M}$ となるよう過酸化水素水を添加した。播種から4時間後、抽出物サンプルを含まない推奨培地に交換した。播種より24時間後に変則推奨培地に交換した。その後、実施例1と同じ方法により、経上皮電気抵抗値(TEER)を評価した。

[0090] コントロールについては、抽出物サンプルを含む推奨培地の代わりに、DMSOを終濃度が0.1%となるよう添加した推奨培地を用いた以外は、上記と同じ方法で細胞を培養し、過酸化水素水を添加し、経上皮電気抵抗値を評価した。

[0091] 実施例10～15で使用した抽出物サンプルは、調製例1及び2で調製した表4に示す抽出物である。抽出物サンプルは、超純水又はDMSOに溶解させて培地に添加した。培地中の抽出物サンプルの濃度は、 $5 \sim 20 \mu\text{g/mL}$ とした。なお、超純水に溶解させた場合は、別途DMSOを添加し、いずれの抽出物サンプルを含む推奨培地もDMSO終濃度が0.1%となるようにした。

[0092] 結果(N=4～6の平均値)を表4に示す。表4に示す結果は、コントロールのTEERを100%とした場合の、抽出物サンプルで処理した細胞にお

けるTEERの相対値（％）である。なお、抽出物サンプル（被験物質）の濃度が5～20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、及び測定時間が播種後96～144時間の範囲で、TEERの値が最も高かった場合の結果を表4に示した。6種の抽出物でTEERの低下を抑制又は改善する高い効果が確認され、さらに、ブドウ種子及び果皮抽出物、チャノキ葉抽出物、ハマメリス葉抽出物、セイヨウナツユキソウ花抽出物、ヤロウシア・リポリティカ抽出物については、コントロールに対して有意な変化が確認された（*： $p < 0.05$ ）（Student's t-test）。

[0093] [表4]

	サンプル	TEER	有意差
実施例10	バラ花卉抽出物	117%	
実施例11	ブドウ種子及び果皮抽出物	119%	*
実施例12	チャノキ葉抽出物	114%	*
実施例13	ハマメリス葉抽出物	123%	*
実施例14	セイヨウナツユキソウ花抽出物	135%	*
実施例15	ヤロウシア・リポリティカ抽出物	117%	*

[0094] 上記の植物の抽出物及びヤロウシア・リポリティカの抽出物は、皮膚バリア機能の低下を抑制又は当該機能を改善する作用を有することが明らかとなった。