

明 細 書

発明の名称：発酵エキスを主原料とする皮膚改善剤

技術分野

[0001] 本発明は、麹菌、乳酸菌の２種類の微生物による発酵エキスを主原料とする皮膚用組成物、皮膚改善剤、保湿機能を有する皮膚改善剤の提供に関する。クレモリス乳酸菌（*Lactococcus cremoris*）自体やそれを用いて発酵させた発酵エキスを主成分とする皮膚改善用組成物としても良い。

背景技術

[0002] 皮膚は赤外線、紫外線、乾燥、熱、各種病原菌などの外的環境による影響や、自然老化、疾病・ウイルスといった内的環境の影響を受けます。それにより、しわ、しみ、かさつき、ざらつき、肌荒れといった現象が生ずることが知られている。これら皮膚の障害、老化現象などを改善・予防するために多くの研究がおこなわれ、皮膚用剤が開発され商品化されている。

[0003] 近年、微生物の働きによって発酵熟成させて得られる発酵エキ스가、健康の維持や増進に有用であるとしてその利用者や消費量が増えている。発酵エキスを含む食品・飲料物が古くから商品化されており、昨今では、ヒトが食品として摂取するのではなく、発酵エキスを主原料とした基礎化粧品なども商品化されている。

[0004] 植物発酵エキ스가有する薬理作用として、老化抑制作用が報告されている（特許文献１）。それ以外に、チロシナーゼの阻害作用（メラニン産生抑制作用）、AGEの生成抑制作用（抗糖化作用）、TNF- α およびNOの産生抑制作用（抗炎症作用）についても、報告されている（特許文献２）。ザクロ果汁の乳酸菌発酵物（特許文献３）や豆類抽出物の乳酸菌発酵物（特許文献４）を有効成分とするヒアルロン酸合成促進剤が報告されている。以上のように、皮膚に対する様々な有益な効果が期待されている。

先行技術文献

特許文献

- [0005] 特許文献1：特許第6013670号公報
特許文献2：特開2021-147361号
特許文献3：特開2013-245170号
特許文献4：特開2002-187838号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0006] これまでに麹菌、乳酸菌の2種類の微生物を、段階的に発酵させたエキスについては、なんらの知見は無い。また、ナノ型乳酸菌 (*Lactbacillus plantarum*) は、長野県木曽地方で食されるすんき漬け由来のもので、皮膚に対する効果などの知見には乏しい。
- [0007] 本発明者らは、様々な微生物の発酵エキス、発酵組成物に関する利用や効果について鋭意研究している。性質の異なる複数の微生物の発酵を個別・段階的に行うことで、有益な発酵エキスができるとの作業仮説を立てて、本発明に至ったものである。

課題を解決するための手段

- [0008] 本発明がその技術的課題を解決するために用いる技術的手段としては、次のようなものである。
- [0009] 麹菌、乳酸菌の2種類で発酵熟成させて得られるエキスを有効成分とする皮膚用組成物を提供するものである。乳酸菌は、*Lactococcus*属または*Lactobacillus*属としても良い。
- [0010] ニホンコウジカビ (*Aspergillus oryzae*) に水を加えて糖化させる一次発酵させ、その後に、乳酸菌 (クレモリス乳酸菌H6株 (*Lactococcus cremoris*)) を添加して二次発酵させ、その後に、ナノ型乳酸菌 (*Lactbacillus plantarum*) を添加して得られるエキスを有効成分とする皮膚用組成物を提供するものである。
- [0011] 前記一次発酵後にニホンコウジカビを殺菌させ、前記二次発酵後に乳酸菌を殺菌させ、その後に、ろ過することでニホンコウジカビ及び乳酸菌を除去したエキスを有効成分としても良い。ニホンコウジカビ (*Aspergillus oryza*

e) は、麴菌、米麴と呼称されることがある。

[0012] 前記皮膚用組成物を主成分とする保湿機能を有する皮膚改善剤としても良い。

[0013] 前記皮膚用組成物を主成分とするエラスターゼ活性阻害剤としても良い。

[0014] 前記皮膚用組成物を主成分とするコラーゲン産生促進剤としても良い。

[0015] 前記皮膚用組成物を主成分とする β -ヘキソサミニダーゼ活性抑制剤としても良い。また、前記皮膚用組成物を主成分とするエラスターゼ活性阻害剤、コラーゲン産生促進剤および β -ヘキソサミニダーゼ活性抑制剤である多面的な効果を有する皮膚改善用の組成物。

[0016] 前記皮膚用組成物を主成分とする皮膚外用組成物としても良い。

発明の効果

[0017] 本発明により、麴菌（ニホンコウジカビ（*Aspergillus oryzae*））、乳酸菌を個別、段階的に発酵過程を進めることができた。本発明の発酵プロセスでは、目的とする麴菌、乳酸菌以外の原料、添加物、添加剤を極力使用せず、微生物発酵により目的の麴菌および乳酸菌から産出される成分のみを最大限に引き出した発酵ろ液（発酵エキス、発酵組成物）を開発した。

[0018] この発酵エキス・発酵組成物は、皮膚機能を改善することや皮膚の障害などに対する予防効果が示唆される。また、これらの発酵過程の後に、ナノ型乳酸菌（*Lactbacillus plantarum*）を追加することで、上述の予防効果が増強できるものと予測される。

[0019] 以下、添付図面及び実施例を組み合わせる本発明を更に説明する。本発明は、実施例に限定されるものではない。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]本発明の米麴乳酸菌発酵液の製造工程を示す説明図

[図2]本発明の米麴乳酸菌発酵液（各種濃度）でのエラスターゼ活性を示すグラフ

[図3]本発明の米麴乳酸菌発酵液でのコラーゲン産出を示すグラフ

[図4]本発明の米麹乳酸菌発酵液での β -ヘキソサミニダーゼ活性抑制を示すグラフ

[0021] 本発明者は、麹菌、2種類の乳酸菌の微生物に着目して、下記に説明するように発酵エキス（SWO1, 本実施例の試験対象物）を得た。

[0022] 図1は、発酵工程を示す説明図である。

第一次発酵では、容量ベースで水約80から99%に対して麹菌（培地を含む）約1から20%として、それぞれを投入して混和させた後に、発酵させる。麹菌は、ニホンコウジカビ（*Aspergillus oryzae*）・国菌（NBRC 100959）とした。発酵温度は50℃～55℃として、発酵時間を17時間から22時間とした。

[0023] その発酵時間が経過したところで、温度を約90℃から120℃に上昇させて、その温度を10分間から20分間維持させることで、高温により当該麹菌を殺菌して、この発酵工程を停止させる。

[0024] 本発明で使用する麹菌の培地は、米でんぷん（粉体）を培地としている。第一次発酵では、麹菌の菌体外にある培地成分（米でんぷん成分）であるでんぷんを菌の酵素を利用してグルコースなどの単糖に分解して糖化する。1%米麹を用いた場合、発酵前はBrix0.0、グルコール濃度0.03%だったのに対し、発酵後はBrix0.8、グルコース濃度0.38%と増加していた。

[0025] この第一次発酵では、本件は麹菌が米でんぷんを分解するだけなので菌数自体は変化ないが、OD660は、0.50から1.50にまで数値が増加することが示された。これは、Brixの値が上昇していることと相関している。

[0026] 麹菌によって、麹菌の菌体外にある培地成分（米でんぷん成分）が糖化され、グルコースなどの単糖類に分解される。この単糖類は、その後に投与する乳酸菌の栄養分として使用されるために、麹菌及び乳酸菌由来ではない原料や添加物、添加剤を用いない発酵ろ液を作り出すことができる。

[0027] 次に、この発酵停止した発酵液にクレモリス乳酸菌SWO1株（*Lactococcus cremoris* SW01、（NITE BP-03847））を投入して、同乳酸菌によ

る発酵を進めるものとした。クレモリス乳酸菌SWO1株の投与量は全体量の0.01から1重量%とした。同乳酸菌の栄養源として、先ほど糖化されたグルコースなどが用いられる。同乳酸菌は、植物由来チーズのものであると知られている。クレモリス乳酸菌SWO1株 (*Lactococcus cremoris* (SWO1)) は、2023年3月3日に独立行政法人製品評価技術基盤機構・特許生物寄託センターに寄託した (NITE BP-03847)。

この乳酸菌を用いた二次発酵は、発酵温度は25℃～35℃として、発酵時間を17時間から22時間とした。その発酵時間が経過した後のOD660は、1.00～2.00となったことが示された。OD660の値から投与した乳酸菌の菌体も増加することが示された。OD660の値は、菌体数に依存しており、数値が増えることは菌体が増えることとなる。

[0028] その発酵時間が経過したところで、温度を約90から120℃に上昇させて、その温度を10分間から20分間維持させることで、高温により当該乳酸菌を殺菌して、この発酵工程を停止させる。

[0029] 発酵液のpHは3.5～4.5であり、この発酵エキスの透明度を上げるために、米残渣など不溶物を濾過した。

[0030] 濾過の程度は変化させることができ、濾過機能を強くする場合には、化石鉱物由来の珪藻土又は火山岩由来のパーライトなどのろ過助剤を用いる。濾過機能を弱める場合には、メッシュ濾過を選択する。

[0031] 本実施例では、濾過をした後のOD値は、1.00～2.00から0.00～0.05に変化した。すなわち、本濾過処理によって、残渣等の不溶物が除去させて、発酵ろ液（発酵エキス、発酵組成物）を取得することができる。

[0032] 最終ステップとして、上記の濾過した後の発酵液に、ナノ型乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum*) を0.01-0.05%の濃度とするように投与する。このナノ型乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum*) は殺菌乳酸菌（乳酸菌20-25%、他デキストリンの粉末）である。*Lactobacillus plantarum*は、すんぎ漬け由来として知られている。

- [0033] 一般的に、乳酸菌は殺菌すると凝集してしまうデメリットがある。その為ナノ型乳酸菌は、ナノ化処理（高圧ホモジナイズ処理）にすることでその凝集を抑え、原料としてハンドリングしやすくしている。濾過後、ナノ型乳酸菌を添加することで、発酵エキス（発酵組成物）の成分を安定化させることが可能になった。
- [0034] ナノ型乳酸菌由来の物質（細胞壁、核酸、タンパク質、糖類等）は、上皮（表皮）に対して免疫を強化することで恒常性の機能を正常に整えるなど有効な効果を有している可能性を鑑みて採用した。
- [0035] ナノ型乳酸菌（*Lactobacillus plantarum*）を添加することで、OD660は、0.00～0.05から0.25-1.00に変化する。その後、この発酵エキス（発酵組成物）を85から100℃で10から30分維持して、発酵液を殺菌した。これは2次汚染などによるコンタミを防止する為の腐敗防止で実施した。
- [0036] 次に、本発明に係る皮膚用組成物の機能または効果に関する試験を行った。まずは、エラスターゼ活性阻害試験（抗しわ試験）を実施した。
- [0037] 表皮の内側にある真皮は、主にコラーゲン、エラスチン、ヒアルロン酸によって構成される。エラスチンは真皮繊維芽細胞によって生成され、肌の柔軟性と弾力性を保持する重要な役割を果たしている。エラスチンはしなやかで伸縮性（弾性）があり、力を外すと元へ戻る性質を持つ「弾性線維」である。エラスチンがコラーゲンを束ねているという共存関係がある。
- [0038] エラスチン分解酵素であるエラスターゼは、炎症、加齢や紫外線、活性酸素、ストレスによる刺激によって誘導されることが知られ、エラスターゼによってエラスチンが分解されると、コラーゲンとエラスチンの架橋構造が脆くなり、肌の弾力が失われ、シワの原因となる。したがって、エラスターゼの活性を阻害することで、肌の真皮弾力とエイジングを回復または維持する効果が期待出来る。
- [0039] そこで、本実施例では、ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF-Ad)由来エラスターゼを用い、N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilideを基質として生成したnitroani

line量を測定することにより、エラスターゼ活性を評価した。エラスターゼ活性をもとに米麴乳酸菌発酵液SW01（以下SW01）試験対象物が有する肌真皮弾力保持及びエイジング機能（活性阻害率）を検討した。

[0040] ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF-Ad)由来エラスターゼ、および、基質とするN-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilideのみで反応させたものをコントロールとして、そのエラスターゼ活性を100%とした。本実験の反応条件は、37℃・2時間とした。なお、エラスターゼ阻害の標準薬剤であるホスホラミドンを50nM投与し、エラスターゼ抑制を示しており、本実験系が有効に機能していることを確認している。

[0041] その結果、コントロールと比較して、評価サンプルであるSW01を4 mg/mLの濃度添加した際、エラスターゼ阻害活性は14.9%($p<0.01$)であることが認められ、さらに濃度依存的に阻害活性が認められた（図2）。したがって、SW01は、エラスターゼ阻害活性を有し、肌の真皮弾力回復またはエイジング機能維持に寄与する効果を持つことが示唆された。

[0042] 次に、米麴乳酸菌発酵液SW01がコラーゲン産生を促進するか否かを試験した。ヒト皮膚線維芽細胞(NHDF-Ad)にSW01（サンプル）を添加し、72時間後の培養上清中のコラーゲン量についてELISA法を用いて測定した。その結果、コントロールと比較して、SW01を500 μ g/mL添加した試験区では、1細胞当たりのコラーゲン生産量が1.5倍増加していた（図3）。米麴乳酸菌発酵液SW01は、肌真皮層におけるコラーゲン産生を促進することが示された。

[0043] 上記の実験内容から、本発明に係る米麴乳酸菌発酵液SW01は、エラスターゼ抑制およびコラーゲン産生の促進という2つの効果を同時に奏することが示された。したがって、肌に、本発明に係る米麴乳酸菌発酵液SW01を与えることで真皮繊維芽細胞を増加させ、張りとし肌の構造を維持する効果を奏することが裏付けられる。

[0044] 次に、米麴乳酸菌発酵液SW01（サンプル）が抗炎症・抗アレルギーに寄与するか否かを試験した。脂肪細胞の細胞表面に結合したIgEが抗原により架橋されることで、ヒスタミンなどを含む顆粒球を細胞外へ放出して、これがア

レルギー反応を引き起こす原因となりことが知られている。

[0045] 試験対象物が、脱顆粒をどの程度抑制するについて、顆粒中に豊富に存在する β -ヘキソサミニダーゼの活性を測定することで脱顆粒を評価する。これにより試験対象物のアレルギー反応への効果を評価する。ラット好塩基球性白血球細胞 RBL-2H3 は、細胞表面に結合した IgE が抗原により架橋されることで、ヒスタミンなどを含む顆粒球を細胞外へ放出することが知られている。これを実験系として、I型アレルギーに対する抗アレルギー作用を持つ物質のスクリーニングとしての探索研究などに応用されている。本実施例では、RBL-2H3 細胞を抗原で刺激し、 β -ヘキソサミニダーゼの活性を測定することで脱顆粒の抑制を評価します（図4）。

[0046] コントロールとして滅菌水を滴下した場合の β -ヘキソサミニダーゼの活性を100%として、試験対象物である本発明の米麹乳酸菌発酵液SW01の添加により β -ヘキソサミニダーゼの活性がどの程度抑制されるかを、様々な添加量で測定した。また、ポジティブコントロールとして、ケルセチンを50 μ g/mlを用いた。ポジティブコントロールでは、 β -ヘキソサミニダーゼの活性が約40パーセントになり、本実験系が適当であることを示すことができた。米麹乳酸菌発酵液SW01を2.5 μ g/ml添加により、 β -ヘキソサミニダーゼの活性が約50パーセントとなった。米麹乳酸菌発酵液SW01が、 β -ヘキソサミニダーゼの活性を抑制して、抗アレルギー作用や抗炎症作用を奏することが示された。なお、図4のp値は、 $p < 0.01$ である。

[0047] 以上のことから、本発明である米麹乳酸菌発酵液SW01は、皮膚改善効果として、エラスターゼ活性阻害、 β -ヘキソサミニダーゼの活性阻害、および、コラーゲン産生促進といった皮膚改善に関する様々な効果を奏することが示された。皮膚改善には、皮膚における軽微な疾患である痒みや炎症の保健衛生上の予防をして未病改善することが含まれる。

受託番号

[0048] 独立行政法人製品評価技術基盤機構

郵便番号292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室

寄託日：2023年3月3日

受託微生物の名称:Lactococcus cremoris SW01

受託番号：BP-03847

[0049]

0-1	様式 PCT/RO/134 この寄託された微生物又はその他の生物 材料に関する表示 (PCT規則13の2)は、 右記によって作成された。	JPO-PAS i480
0-1-1		
0-2	国際出願番号	
0-3	出願人又は代理人の書類記号	C22164B
1	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載 された微生物又は生物材料に関連している。 。	
1-1	段落番号	0048
1-3	寄託の表示	
1-3-1	寄託機関の名称	NPMD (独)製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託セ ンター(NPMD)
1-3-2	寄託機関のあて名	日本国 〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室
1-3-3	寄託の日付	2023年 03月 03日 (03.03.2023)
1-3-4	受託番号	NPMD BP-03847
1-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国

受理官庁記入欄

0-4	この用紙は国際出願とともに受理した (はい/いいえ)	✓
0-4-1	権限のある職員	平川 優香

国際事務局記入欄

0-5	この用紙が国際事務局に受理された日	
0-5-1	権限のある職員	

請求の範囲

- [請求項1] 麹菌、乳酸菌の2種類で発酵熟成させて得られるエキスを有効成分とする皮膚用組成物。
- [請求項2] 麹菌、乳酸菌（*Lactococcus*属）の2種類で発酵熟成させて得られる発酵エキスを有効成分とする皮膚用組成物。
- [請求項3] ニホンコウジカビ（*Aspergillus oryzae*）に水を加えて糖化させる一次発酵させ、その後に、乳酸菌（クレモリス乳酸菌（*Lactococcus cremoris*）を添加して二次発酵させ、その後に、ナノ型乳酸菌（*Lactobacillus plantarum*）を添加して得られるエキスを有効成分とする、請求項1又は2に記載の皮膚用組成物。
- [請求項4] 前記一次発酵後にニホンコウジカビ（*Aspergillus oryzae*）を殺菌させ、前記二次発酵後に乳酸菌を殺菌させ、その後に、ろ過することでニホンコウジカビ及び乳酸菌を除去したエキスを有効成分とする、請求項3に記載の皮膚用組成物。
- [請求項5] 前記皮膚用組成物を主成分とする保湿機能を有する皮膚改善剤。
- [請求項6] 前記皮膚用組成物を主成分とするエラスターゼ活性阻害剤。
- [請求項7] 前記皮膚用組成物を主成分とするコラーゲン産生促進剤。
- [請求項8] 前記皮膚用組成物を主成分とする β -ヘキソサミニダーゼ活性抑制剤。
- [請求項9] 前記皮膚用組成物を主成分とする皮膚外用組成物。
- [請求項10] クレモリス乳酸菌（*Lactococcus cremoris*）を用いて発酵させた発酵エキスを主成分とする皮膚改善用組成物。

