

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2013 年 10 月 3 日(03.10.2013)



(10) 国際公開番号
WO 2013/146797 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 8/97 (2006.01) A61P 17/16 (2006.01)
A61K 8/60 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 31/7008 (2006.01) A61Q 19/02 (2006.01)
A61K 36/896 (2006.01) A61Q 19/08 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2013/058825

(22) 国際出願日: 2013 年 3 月 26 日(26.03.2013)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2012-076968 2012 年 3 月 29 日(29.03.2012) JP

(71) 出願人: 株式会社資生堂(SHISEIDO COMPANY, LTD.) [JP/JP]; 〒1040061 東京都中央区銀座 7 丁目 5 番 5 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 飯野 雅人(IINO, Masato); 〒2248558 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 Kanagawa (JP). 入山 俊介(IRIYAMA, Shunsuke); 〒2248558 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 Kanagawa (JP). 藤原 留美子(FUJIWARA, Rumiko); 〒2248558 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 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 青木 篤, 外(AOKI, Atsushi et al.); 〒1058423 東京都港区虎ノ門三丁目 5 番 1 号 虎ノ門 3 7 森ビル青和特許法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

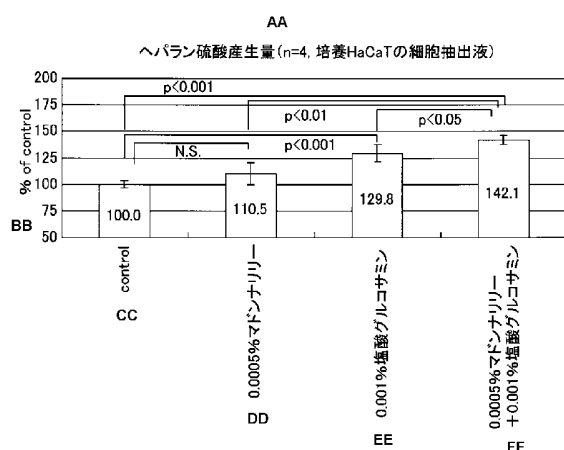
(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ

[続葉有]

(54) Title: HEPARAN SULFATE PRODUCTION PROMOTER

(54) 発明の名称: ヘパラン硫酸産生促進剤

図1



(57) Abstract: Provided is a heparan sulfate production promoter comprising a mixture of an extract of the Madonna lily (*Lilium Candidum*) and glucosamine.

(57) 要約: マドンナリリー (*Lilium Candidum*) エキスとグルコサミンとの混合物からなるヘパラン硫酸産生促進剤の提供。

AA Amount of heparan sulfate produced (n=4; cell extract of cultured HaCaT)
BB % of control
CC control
DD 0.0005% *Lilium Candidum*
EE 0.001% Glucosamine hydrochloride
FF 0.0005% *Lilium Candidum* + 0.001% glucosamine hydrochloride



(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,
GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT,
NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：ヘパラン硫酸産生促進剤

技術分野

[0001] 本発明は、マドンナリリー（*Lilium Candidum*）エキスとグルコサミンとの混合物からなるヘパラン硫酸産生促進剤を提供する。

背景技術

[0002] ヘパラン硫酸はグルコサミン、グルクロン酸、イズロン酸を構成糖とする線形多糖であり、動物の細胞表面や細胞外マトリクスでは複数のヘパラン硫酸鎖がタンパク質と共有結合した、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの形態で往々にして存在する。ヘパラン硫酸プロテオグリカンは多種多様な生理活性タンパク質、例えば細胞増殖因子、ケモカイン、サイトカイン、形態形成因子などと結合し、細胞分化、細胞増殖の調節、細胞の形態形成、細胞接着、相互認識、細胞浸潤の防護、創傷治癒の促進など、生体において様々な役割を果たしている。

[0003] 特に、ヘパラン硫酸プロテオグリカンはヘパリン結合性増殖因子（bFGF, HGF, VEGF, HB-EGF等）を細胞外に蓄積させる働きをすることで知られる。ヘパラン硫酸プロテオグリカンの1種であるパールカンは、表皮と真皮の境界部に存在する表皮基底膜にも存在し、皮膚では、ヘパリン結合性増殖因子を表皮基底膜に結合させることによって、表皮、真皮間の増殖因子の移動を制御している。また、表皮基底膜に存在するパールカンは、基底膜に結合している表皮基底細胞に対する増殖因子の作用も制御しており、表皮の良好な増殖・分化に必須であることが明らかにされている。その結果、ヘパラン硫酸の産生を亢進させることは、しわの予防や抑制にもつながることが明らかにされている（Experimental Dermatology Vol. 20, 10, Oct. 2011, PP.810-814：非特許文献1及びWO 2009/123215：特許文献1）。

更に、ヘパラン硫酸分解モデルではVEGFの透過性が増大し、血管新生が誘導されることが示されている（WO 2011/040496：特許文献

2)。紫外線によって真皮で血管新生が誘導され、真皮の変化が起こることが大じわ形成に重要であることが示されていることを併せると（特表2004-526758：特許文献3）、ヘパラン硫酸の分解は大じわ形成にも深く関与する。したがって、ヘパラン硫酸の産生促進は、長期日光暴露などによる大じわの予防にも効果的であることがわかる。

[0004] 老人性色素斑組織は露光部皮膚と比較して、基底膜のヘパラン硫酸が分解していることも明らかとされている（特許文献2）。同公報には、ヘパラン硫酸の分解に伴い、表皮で発現している血管内皮細胞増殖因子-A（VEGF-A）の制御が破綻し、これにより真皮の血管やリンパ管の変化により炎症を生じさせ、メラノサイトを活性化させメラノソームへのメラニン貯蔵を促進させることが記載されている。また、同公報には、真皮で発現している線維芽細胞増殖因子-7（FGF-7）の制御が破綻することで、メラノサイトから表皮細胞でメラノソームの受け渡しが進められることが記載されている。すなわち、ヘパラン硫酸の分解は、炎症によるメラノサイトの活性化とFGF-7制御の破綻によるメラノソーム受け渡し促進により、相乗的にメラノソームがケラチノサイトに蓄積すると考えられる。したがって、ヘパラン硫酸の産生を亢進させることは、しみ、くすみ、そばかすなどといった色素沈着の予防、抑制のための美白効果にもつながる。

[0005] ヘパラン硫酸は硫酸化やエピマー化などの修飾を受けて多様な構造になる。ヘパラン硫酸プロテオグリカンの生理学的な活性を担うのはオリゴ糖程度の鎖長であり、その糖鎖長と糖鎖配列、特異的な硫酸基の配置などが細胞の機能にとって重要であり、細胞の性質によって特異的なパターンを示し、特異的なタンパク質と相互作用する。したがって、ヘパラン硫酸は細胞特性の発現を担う。さらに、ヘパラン硫酸は呼吸性シンシチアウィルスをはじめとする様々なウィルスの細胞性受容体を担うことも示されている。

[0006] ユリエキスはWO 2009/123215（特許文献1）においてヘパラーゼ阻害効果が知られている。また、特開2011-225564（特許文献4）ではシワ、たるみ、シミ、ソバカス等の皮膚老化現象に対してすぐれた予防、改善効果を発揮

して、皮膚を若々しく健全な状態に保持し、又は改善するとともに、皮膚に対する刺激が少なく生体安全性にもすぐれた新規な美肌化及び美白成分をユリ科 (Liliaceae) ユリ属 (Lilium) に属する植物の蕾から得られ、エラスターゼ活性抑制作用、抗酸化作用、タンパク質糖化抑制作用及びチロシナーゼ活性抑制作用を有する抽出物を有効成分とする化粧料が知られている。特開2012-41284 (特許文献5) では抗老化作用、美白作用、抗酸化作用、痩身作用、抗炎症作用に優れたユリ科 (Liliaceae) ウバユリ属 (Cardiocrinum) 植物抽出物を有効成分として配合することにより、抗老化剤、美白剤、抗酸化剤、痩身剤及び抗炎症剤を提供することができた。しかし、グルコサミン塩酸塩と組み合わせてヘパラン硫酸産生促進することは知られていない。

[0007] グルコサミン塩酸塩は特開2003-261432 (特許文献6) においてアドバンスド・グリケーション・エンド・プロダクツ生成抑制剤と美白剤 (グルコサミンは成分の一つとして記載) を含有する皮膚外用剤が知られている。特開2002-128647 (特許文献7) ではグルコサミン及びその誘導体などから選択される1種又は2種以上のメラニン産生阻害作用を有する植物及び藻類抽出物から選択される1種又は2種以上と、ラベンダー抽出物を含有することを特徴とする皮膚美白効果が著しく改良された、皮膚外用剤が知られている。しかし、ヘパラン硫酸を産生促進したり、ヘパラーゼ阻害することは知られていない。

[0008] このように、ヘパラン硫酸はヒトおよび動物にとって重要な構成成分であり、様々な生理作用を有するが、その産生を促進する薬剤はあまり知られていない。

先行技術文献

特許文献

- [0009] 特許文献1: WO 2009/123215
特許文献2: WO 2011/040496
特許文献3: 特表2000-503660
特許文献4: 特開2011-225564

特許文献5：特開 2012-41284

特許文献6：特開 2003-261432

特許文献7：特開 2002-128647

非特許文献

[0010] 非特許文献1：Experimental Dermatology Vol. 20, 10, Oct. 2011, PP.810-814

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明の課題は、新規のヘパラン硫酸産生促進剤の提供にある。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者は鋭意検討の結果、マドンナリリー (Lilium Candidum) エキスとグルコサミンとの混合物がヘパラン硫酸産生促進効果を示すことを見出した。

したがって、本願は以下の発明を提供する。

(1) マドンナリリー (Lilium Candidum) エキスとグルコサミンとの混合物からなるヘパラン硫酸産生促進剤。

(2) 前記グルコサミンが塩酸グルコサミンである、(1) のヘパラン硫酸産生促進剤。

(3) (1) 又は (2) のヘパラン硫酸産生促進剤を美白成分として含有する、美白剤。

(4) (1) 又は (2) のヘパラン硫酸産生促進剤を抗老化成分として含有する、しわの形成の予防又は抑制剤。

(5) 美白剤である、(1) 又は (2) のヘパラン硫酸産生促進剤。

(6) しわの形成の予防又は抑制剤である、(1) 又は (2) のヘパラン硫酸産生促進剤。

(7) ヘパラン硫酸産生促進剤の製造のための、マドンナリリー (Lilium Candidum) エキスとグルコサミンとの混合物の使用。

(8) 前記グルコサミンが塩酸グルコサミンである、(7)の使用。

(9) ヘパラン硫酸産生促進剤が美白剤である、(7)又は(8)の使用。

(10) ヘパラン硫酸産生促進剤がしわの形成の予防又は抑制剤である、(7)又は(8)の使用。

(11) ヘパラン硫酸産生促進のための、マドンナリリー (*Lilium Candidum*) エキスとグルコサミンとの混合物の使用。

(12) 前記グルコサミンが塩酸グルコサミンである、(11)の使用。

(13) ヘパラン硫酸産生促進が美白のためである、(11)又は(12)の使用。

(14) ヘパラン硫酸産生促進がしわの形成の予防又は抑制のためである、(11)又は(12)の使用。

発明の効果

[0013] 本発明のヘパラン硫酸産生促進剤は、ヘパラン硫酸の産生を効率的に促進し得ることから、ヘパラン硫酸の分解、減少、欠乏に関連する様々な状態又は症状の改善、治療、予防、正常化のための使用、例えばしみ、そばかす、くすみの改善といった美白剤としての使用、しわ改善などの抗老化目的での使用、創傷治癒促進のための使用、その他、例えば細胞分化、細胞増殖の調節、細胞の形態形成、細胞接着、相互認識、細胞浸潤などにおける異常の正常化、などに好適に使用することができる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]ヘパラン硫酸の産生に及ぼす各薬剤の効果。

発明を実施するための形態

[0015] 本発明はマドンナリリー (*Lilium Candidum*) エキスと塩酸グルコサミンとの混合物からなるヘパラン硫酸産生促進剤を提供する。マドンナリリーはユリ科 (*Liliaceae*) に属するアジア原産の多年草の植物であり、自生及び栽培もされており、その増殖は球根を分けて行われる。マドンナリリーエキスは関節炎やリウマチ痛の処方に用いられ、また美容効果としてしわの防止に良いといわれている。

[0016] 上記抽出物は常法により得ることができ、例えばその起源となる植物の一部又は全部を抽出溶媒とともに常温で又は加熱して浸漬または加熱還流した後、濾過し、濃縮して得ることができる。抽出には、植物の葉、花、種子、根、莖、芽、枝、樹皮などのいずれの部位を用いても構わないが、球根からのエキスが好ましい。溶媒抽出の前に、抽出部位を乾燥させてもよい。抽出溶媒としては、通常抽出に用いられる溶媒であれば任意に用いることができ、例えば、有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、プロピレングリコール、1, 3-ブチレングリコール、グリセリン等のアルコール類、含水アルコール類、クロロホルム、ジクロルエタン、四塩化炭素、アセトン、酢酸エチル、ヘキサン等、あるいは水性溶媒、例えば水、生理食塩水、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液等を、それぞれ単独で、あるいは組み合わせて用いることができる。好ましくは、溶媒として、水、メタノール、エタノール、1, 3-ブチレングリコールから選ばれる1種または2種以上が好適に使用される。特に好ましくは、溶媒として、水、エタノール及び1, 3-ブチレングリコールの混合物が使用される。

[0017] 上記溶媒で抽出して得られた抽出物をそのまま、あるいは例えば凍結乾燥などにより濃縮したエキスを使用でき、また必要であれば吸着法、例えばイオン交換樹脂を用いて不純物を除去したものや、ポーラスポリマー（例えばアンバーライトXAD-2）のカラムにて吸着させた後、所望の溶媒で溶出し、さらに濃縮したものも使用することができる。

[0018] グルコサミンは化学名称を「2-アミノ-2-デオキシ-D-グルコース」とする「アミノ糖」の一種であり、グルコースの2位の水酸基がアミノ基に置換された構造を有し、甲殻類や昆虫に含まれるキチンの構成物質であることや、キチンのN-アセチル化体であるキトサンの存在が広く知られているが、哺乳類の生体内においてもN-アセチル化体（N-アセチルグルコサミン）としてヒアルロン酸をはじめとする種々のグルコサミノグリカンや糖タンパク質・糖脂質中に存在する。さらに、植物の醗酵、例えばトウモロコシを黒麹菌（*Aspergillus Niger*）の存在下で発酵したものに由来するものもあ

る。グルコサミンはキチンを塩酸により分解して得られる「塩酸グルコサミン」がほとんどであるが、「硫酸グルコサミン」も多く使用されている。本発明において好ましいのは塩酸グルコサミンである。

[0019] 本発明のヘパラン硫酸産生促進剤における、マドンナリリーとグルコサミンの混合物の含有量は、ヘパラン硫酸産生促進作用を有効に発揮するのに十分な量であれば特に限定されず、ヘパラン硫酸産生促進剤の用途に応じて適宜選択すればよい。一般には、ヘパラン硫酸産生促進剤全体に対するマドンナリリーの配合量は、乾燥重量（固形分質量）として、通常0.000001質量%～1質量%、中でも0.00001質量%～0.1質量%、特に0.0001～0.01とし、グルコサミンの配合量は、通常0.00001質量%～0.1質量%、中でも0.00005質量%～0.05質量%、特に0.0001質量%～0.01質量%とするのが好ましい。本発明のヘパラン硫酸産生促進剤におけるマドンナリリーとグルコサミンの比率は、マドンナリリーの量を乾燥重量として、10：1～1：100、好ましくは1：1～1：10、より好ましくは1：2としてよい。

[0020] 本発明に係るヘパラン硫酸産生促進剤は、常法に従って製剤化することができ、また皮膚外用剤を構成する成分としても調製可能であるが、通常医薬部外品を含む化粧品や医薬品等の皮膚外用剤等に用いられる成分、例えば油分、界面活性剤、粉末、色材、水、アルコール類、増粘剤、キレート剤、シリコーン類、酸化防止剤、紫外線吸収剤、保湿剤、香料、各種薬効成分、防腐剤、pH調整剤、中和剤等必要に応じて適宜配合される。他の成分は特に限定されず、医薬組成物の用途、剤型、投与形態等に応じて適宜選択すればよいが、例としては、医薬的に許容され得る担体及び／又は補助剤が挙げられる。補助剤としては、例えば希釈剤、結合剤、崩壊剤、増粘剤、分散剤、再吸収促進剤、矯味剤、緩衝剤、界面活性剤、溶解補助剤、保存剤、乳化剤、等張化剤、安定化剤、pH調製剤等が挙げられる。

具体例として、本発明のヘパラン硫酸産生促進剤を皮膚外用剤とする場合、外用剤に通常用いられる成分、例えば、美白剤、保湿剤、酸化防止剤、油

性成分、紫外線吸収剤、界面活性剤、増粘剤、アルコール類、粉末成分、色剤、水性成分、水、各種皮膚栄養剤等を、必要に応じて適宜配合することができる。さらに、エデト酸二ナトリウム、エデト酸三ナトリウム、クエン酸ナトリウム、ポリリン酸ナトリウム、メタリン酸ナトリウム、グルコン酸等の金属イオン封鎖剤、メチルパラベン、エチルパラベン、ブチルパラベン等の防腐剤、カフェイン、タンニン、ベラパミル、トラネキサム酸及びその誘導体、甘草抽出物、グラブリジン、カリンの果実の熱水抽出物、各種生薬、酢酸トコフェロール、グリチルリチン酸及びその誘導体又はその塩等の薬剤、ビタミンC、アスコルビン酸リン酸マグネシウム、アスコルビン酸グルコシド、アルブチン、コウジ酸等の美白剤、グルコース、フルクトース、マンノース、ショ糖、トレハロース等の糖類、レチノイン酸、レチノール、酢酸レチノール、パルミチン酸レチノール等のビタミンA誘導体類等も適宜配合することができる。

[0021] 上記成分は例示であり、これらに限定されるものではない。またこれら成分は、所望する形態に応じた処方に従い、適宜組み合わせて配合することが可能である。

[0022] 本発明のヘパラン硫酸産生促進剤の投与経路及び剤型はいずれも限定されず、その用途に応じて適宜選択すればよい。投与経路の例としては、局所投与（皮膚外用等）、経口投与、非経口投与（静脈投与、腹腔内投与等）、等が挙げられるが、抗老化剤や美白剤として使用する場合には皮膚外用剤として使用するのが好ましい。剤型としては、局所投与（皮膚外用材）の場合、溶液系、可溶化系、乳化系、粉末分散系、水-油二層系、水-油-粉末三層系等を、パッチ剤、軟膏、クリーム、乳液、化粧水、ゲル、エアゾール等にした形態が挙げられる。経口投与の場合、錠剤、コート錠、糖衣錠、顆粒剤、散剤、カプセル剤（例えばハード又はソフトゼラチンカプセル）等の固形製剤や、内服液剤、シロップ剤等の液体製剤（溶液、懸濁液）等の形態が挙げられる。非経口投与の場合、注射液等の形態が挙げられる。

[0023] 本明細書において、「美白」とは、ヘパラン硫酸の産生促進を介し、基底

膜のヘパラン硫酸の分解、減少に伴うメラノサイトの活性化の結果生ずるケラチノサイトでのメラノソームの蓄積による皮膚の黒色化を抑え、しみ、そばかす、くすみなどを改善することを意味する。本発明でいう「美白方法」とは特に断りのない限り、美容目的を意味するが、場合により、医療目的とする場合もある。

[0024] 本明細書において「抗老化」とは、ヘパラン硫酸の産生促進を介し、加齢や光老化による基底膜プロテオグリカンのヘパラン硫酸の分解、減少によるヘパラン硫酸結合性増殖因子に伴う皮膚変化、具体的には表皮分化異常、真皮血管新生、リンパ管拡張、エラスチン分解を抑制することで、皮膚のしわ、たるみ、硬化などを防止し、改善し、弾力のある若々しい健康な肌の状態を維持することを意味する。本発明でいう「抗老化方法」とは特に断りのない限り、美容目的を意味するが、場合により、医療目的とする場合もある。

[0025] 本発明のヘパラン硫酸産生促進剤は、しみ、そばかす、くすみの改善といった美白剤としての使用や、しわ改善などの抗老化目的での使用、創傷治癒促進のための使用に限定されず、ヘパラン硫酸の分解、減少、欠乏に関連するその他の様々な状態又は症状の治療、改善、予防、正常化などに用いることができる。ここで、ヘパラン硫酸の分解、減少、欠乏に関連する状態又は症状としては、細胞分化、細胞増殖の調節、細胞の形態形成、細胞接着、相互認識、細胞浸潤などにおける異常が考えられ、具体的には癌細胞の増殖又は転移、血管新生等が挙げられる。

[0026] 以上、本発明について具体例を挙げて説明したが、以上の具体例はあくまでも例示であり、本発明は特許請求の範囲を逸脱しない範囲において、任意の変更を加えて実施することが可能である。

[0027] 以下、実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されるものではない。

実施例

[0028] 24 ウェルプレートの各ウェルにヒト表皮細胞である H a C a T 細胞（入手先 : German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany）を 4 万細

胞ずつ播種し、10% FBS 含有 DMEM 培地で3日間培養した。各ウェルの培地を、活性成分としてマドンナリリーエキス（入手先：ガテフォッセ社）を乾燥重量にて0.0005%のみ含む試料、塩酸グルコサミン（TSI Health Sciences）を0.001%のみ含む試料、又はマドンナリリーエキス0.0005%と塩酸グルコサミン0.001%の混合物を含む試料を含有する同培地に置換し、さらに2日間培養した。PBSで1回洗浄した後、以下の組成の細胞破碎液を各ウェルに200 μ l加えてピペティングした後、凍結した。

10 mmol/L Tris-HCl pH 7.4、150 mmol/L NaCl、2 mmol/L エチレンジアミン四酢酸、250 μ mol/L フェニルメチルスルフォニルフルオリド、0.1 mmol/L N-エチルマレイミド、0.3% Nonidet P40、0.05% Triton X-100、0.3% デオキシコール酸ナトリウム、0.1% ドデシル硫酸ナトリウム、0.1% BSA

[0029] 24時間後、融解したサンプルをヘパラン硫酸 ELISA KIT（生化学バイオビジネス株式会社）に供してヘパラン硫酸量を測定した。その結果を図1に示す。試料を加えない10% FBS 含有 DMEM 培地のみで培養した場合のヘパラン硫酸量を100%として表した。データはt-testにより統計解析を行った。

[0030] 表1は図1に示されている結果の生データ及びその統計学的処理結果を示すものであります。コントロールの生データは99.0565、98.5847、97.1694、105.189であり、マドンナリリーエキス単独の生データは102.673、100.157、118.556、120.601であり、統計学的処理の結果Studentのt検定（両側検定）のP値は「0.108734」となり、有意水準5%（P=0.05）でみると、0.108734>0.05、すなわち両者の間でヘパラン硫酸の産生量については有意差なしとなる。

よって、マドンナリリーエキス自体は、ヘパラン硫酸の産生量に何ら影響を及ぼさないことが明らかであります。そして、図1や表1に示すとおり、このようなヘパラン硫酸産生促進活性を有しないマドンナリリーエキスはグ

ルコサミンと併用されることではじめて、コントロールと比べ有意水準 1 % 又は 5 % で有意差をもって ($P=0.000004$) ヘパラン硫酸産生活性を高めることがわかる。マドンナリリーエキスとグルコサミンとの併用は、塩酸グルコサミン単独と比較しても有意水準 5 % で有意差をもってヘパラン硫酸産生を高め ($P=0.029460$)、さらにマドンナリリー単独と比較しても有意水準 1 % 又は 5 % で有意差をもってヘパラン硫酸産生を高めることがわかります ($P=0.001386$)。なお、表から明らかなとおり、コントロールと塩酸グルコサミンとの間 ($P=0.000424$)、マドンナリリーと塩酸グルコサミンとの間 ($P=0.025858$)、塩酸グルコサミンとマドンナリリーエキス+グルコサミンとの間 ($P=0.029460$) でも全て $P<0.01$ 又は $P<0.05$ であり、有意差ありである。

[表1]

	ave	sd	P値 (vs コントロール)	P値 (vs マドンナリリー + グルコサミン)	P値 (vs マドンナリリー)	P値 (vs グルコサミン)
コントロール	100	3.55137	1.000000	0.000004	0.108734	0.000424
マドンナリリー	110.497	10.5697	0.108734	0.001386	1.000000	0.025858
塩酸グルコサミン	129.761	7.72685	0.000424	0.029460	0.025858	1.000000
マドンナリリー + 塩酸グルコサミン	142.145	4.02571	0.000004	1.000000	0.001386	0.029460

[0031] このように、マドンナリリーエキス単独では、コントロールと比べ、有意差は認められず、つまり、ヘパラーゼ阻害が知られているからといって、

ヘパラン硫酸を産生するとは限らないことが証明された。マドンナリリーエキスと塩酸グルコサミンとの混合物では、コントロールと比べ有意差が認められ、また、塩酸グルコサミン単独と比較しても有意差がみとめられ、さらにマドンナリリー単独と比較しても有意差がみとめられた。したがって、マドンナリリーと塩酸グルコサミンとの組合せによりヘパラン硫酸の産生促進が有意に効果を奏していることが認められた。

産業上の利用可能性

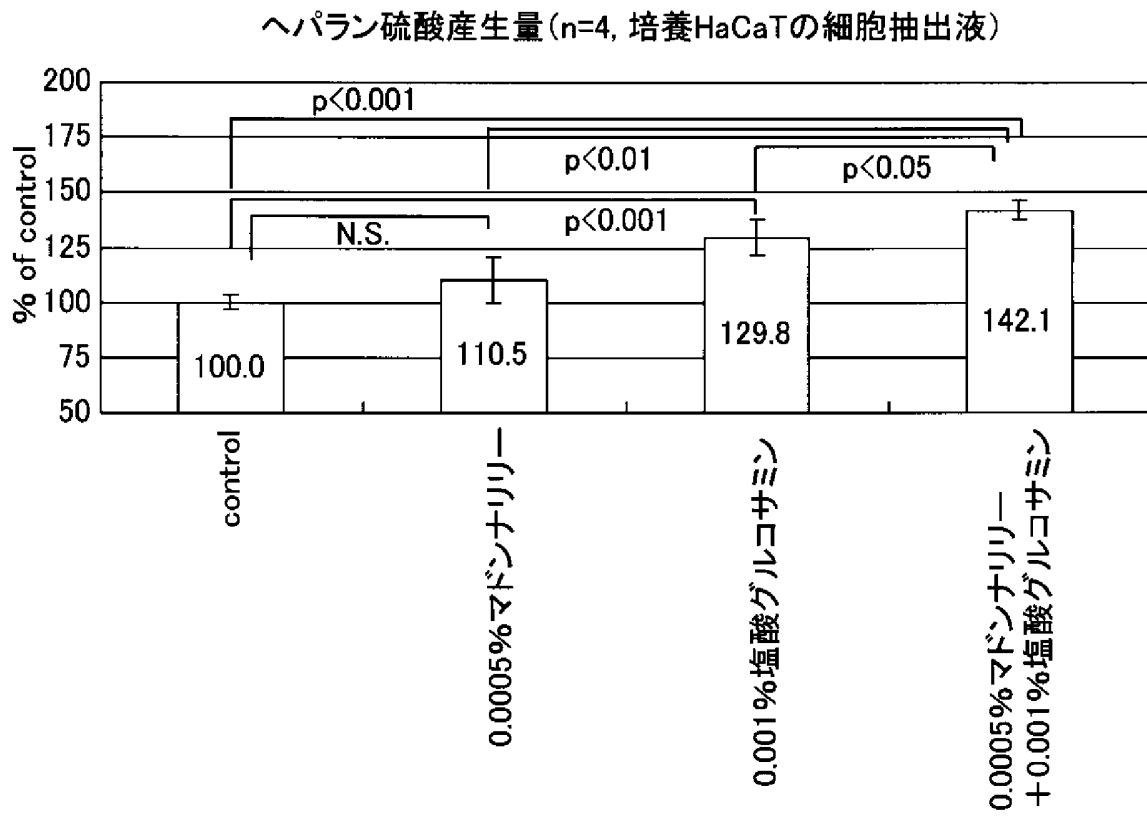
[0032] 本発明のヘパラン硫酸産生促進剤は、ヘパラン硫酸の産生を効率的に促進し得ることから、ヘパラン硫酸の分解、減少、欠乏に関連する様々な状態又は症状の改善、治療、予防、正常化のための使用、例えばしみ、そばかす、くすみの改善といった美白剤としての使用、しわ改善などの抗老化目的での使用、創傷治癒促進のための使用、その他、例えば細胞分化、細胞増殖の調節、細胞の形態形成、細胞接着、相互認識、細胞浸潤などにおける異常の正常化、などに好適に使用することができる。

請求の範囲

- [請求項1] マドンナリリー（*Lilium Candidum*）エキスとグルコサミンとの混合物からなるヘパラン硫酸産生促進剤。
- [請求項2] 前記グルコサミンが塩酸グルコサミンである、請求項1記載のヘパラン硫酸産生促進剤。
- [請求項3] 請求項1又は2に記載のヘパラン硫酸産生促進剤を美白成分として含有する、美白剤。
- [請求項4] 請求項1又は2に記載のヘパラン硫酸産生促進剤を抗老化成分として含有する、しわの形成の予防又は抑制剤。

[図1]

図1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/058825

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K8/97(2006.01)i, A61K8/60(2006.01)i, A61K31/7008(2006.01)i, A61K36/896(2006.01)i, A61P17/02(2006.01)i, A61P17/16(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, A61Q19/02(2006.01)i, A61Q19/08(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K8/97, A61K8/60, A61K31/7008, A61K36/896, A61P17/02, A61P17/16, A61P43/00, A61Q19/02, A61Q19/08 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2013 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2013 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2013 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP 2003-238343 A (Ichimaru Pharcos Co., Ltd.), 27 August 2003 (27.08.2003), claim 1; paragraphs [0010], [0018], [0112] (Family: none)	3 1, 2, 4
Y A	JP 2011-225564 A (Kyoei Chemical Co., Ltd.), 10 November 2011 (10.11.2011), claim 1; paragraphs [0001], [0065] (Family: none)	3 1, 2, 4
Y A	JP 8-133945 A (Noevir Co., Ltd.), 28 May 1996 (28.05.1996), claims; paragraphs [0015], [0018] (Family: none)	3 1, 2, 4
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 22 April, 2013 (22.04.13)		Date of mailing of the international search report 07 May, 2013 (07.05.13)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/058825

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	WO 2009/123215 A1 (Shiseido Co., Ltd.), 08 October 2009 (08.10.2009), paragraphs [0014], [0027], [0051]; fig. 9 & US 2011/0020477 A1 & EP 2295028 A1	4 1-3
Y A	JP 2008-195629 A (Naris Cosmetics Co., Ltd.), 28 August 2008 (28.08.2008), paragraphs [0002], [0032] to [0044] (Family: none)	4 1-3
Y A	JP 2004-83434 A (Rohto Pharmaceutical Co., Ltd.), 18 March 2004 (18.03.2004), claims; paragraphs [0013] to [0025] (Family: none)	4 1-3
Y A	JP 2004-83432 A (Rohto Pharmaceutical Co., Ltd.), 18 March 2004 (18.03.2004), paragraphs [0004], [0026] to [0032] (Family: none)	4 1-3

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))			
Int.Cl. A61K8/97(2006.01)i, A61K8/60(2006.01)i, A61K31/7008(2006.01)i, A61K36/896(2006.01)i, A61P17/02(2006.01)i, A61P17/16(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, A61Q19/02(2006.01)i, A61Q19/08(2006.01)i			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))			
Int.Cl. A61K8/97, A61K8/60, A61K31/7008, A61K36/896, A61P17/02, A61P17/16, A61P43/00, A61Q19/02, A61Q19/08			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
日本国実用新案公報 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年 日本国公開実用新案公報 1 9 7 1 - 2 0 1 3 年 日本国実用新案登録公報 1 9 9 6 - 2 0 1 3 年 日本国登録実用新案公報 1 9 9 4 - 2 0 1 3 年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
Y A	JP 2003-238343 A (一丸ファルコス株式会社) 2003.08.27, 請求項1、段落[0010]、[0018]、[0112] (ファミリーなし)	3 1、2、4	
Y A	JP 2011-225564 A (共栄化学工業株式会社) 2011.11.10, 請求項1、段落[0001]、[0065] (ファミリーなし)	3 1、2、4	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 2 2 . 0 4 . 2 0 1 3		国際調査報告の発送日 0 7 . 0 5 . 2 0 1 3	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (I S A / J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 金子 亜希	4 C 3 9 5 6
		電話番号 03-3581-1101 内線 3452	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y A	JP 8-133945 A (株式会社ノエビア) 1996.05.28, 請求項、段落[0015]、[0018] (ファミリーなし)	3 1、2、4
Y A	W0 2009/123215 A1 (株式会社 資生堂) 2009.10.08, 段落[0014]、[0027]、[0051]、図9 & US 2011/0020477 A1 & EP 2295028 A1	4 1-3
Y A	JP 2008-195629 A (株式会社ナリス化粧品) 2008.08.28, 段落[0002]、[0032]-[0044] (ファミリーなし)	4 1-3
Y A	JP 2004-83434 A (ロート製薬株式会社) 2004.03.18, 請求項、段落[0013]-[0025] (ファミリーなし)	4 1-3
Y A	JP 2004-83432 A (ロート製薬株式会社) 2004.03.18, 段落[0004]、[0026]-[0032] (ファミリーなし)	4 1-3