

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710145807.4

A61K 8/84 (2006.01)

A61K 8/02 (2006.01)

A61K 31/80 (2006.01)

A61P 17/16 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 4 月 2 日

[11] 公开号 CN 101152129A

[22] 申请日 2007.8.24

[21] 申请号 200710145807.4

[30] 优先权

[32] 2006.8.24 [33] JP [31] 227237/2006

[71] 申请人 露珍细胞再生株式会社

地址 日本长野县

[72] 发明人 柴肇一 加藤真一 川添祐美

[74] 专利代理机构 北京华夏正合知识产权代理事务所

代理人 韩登营

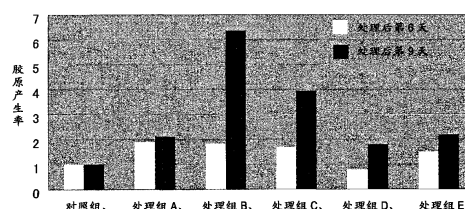
权利要求书 1 页 说明书 21 页 附图 7 页

[54] 发明名称

胶原产生促进剂、化妆材料和胶原的制造方法

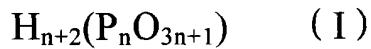
[57] 摘要

本发明的目的在于提供能够促进胶原产生的药剂及化妆材料、使用了这种药剂的制造方法，其中，所述能够促进胶原产生的药剂及化妆材料所使用的原料易于获得且其生物体亲和性优异。该目的通过含有多聚磷酸、其盐或其溶剂合物作为有效成分的促进胶原产生的药剂，含有这种药剂的化妆材料及包括将多聚磷酸、其盐或其溶剂合物投与给人或人以外的哺乳动物的工序的胶原制造方法得以解决。



1. 促进胶原产生的药剂，其含有多聚磷酸、其盐或其溶剂合物作为有效成分。

2. 如权利要求1所述的药剂，所述多聚磷酸以 H_2O 和 P_2O_5 作为构成分子， H_2O 与 P_2O_5 的摩尔比 (R) 为 $2 > R \geq 1$ ，含有1种或2种以上的下述通式 (I) 或 (II) 所示的直链状或环状的多聚磷酸，



式 (I) 和 (II) 中，n 分别独立表示 3~300 的整数。

3. 如权利要求2所述的药剂，式 (I) 和 (II) 中，n 为 10~89 的整数。

4. 如权利要求1所述的药剂，所述多聚磷酸为超磷酸。

5. 含有权利要求1或权利要求4所述药剂的化妆材料。

6. 胶原的制造方法，其包含将多聚磷酸、其盐或其溶剂合物投与给人或人以外的哺乳动物的工序。

胶原产生促进剂、化妆材料和胶原的制造方法

技术领域

本发明涉及含有多聚磷酸作为有效成分的胶原产生促进剂、胶原的制造方法及其应用制品。

背景技术

在衰老皮肤中，随着纤维芽细胞的活性降低，作为真皮基质成分的胶原纤维、弹性蛋白纤维、酸性粘多糖多发生质和量的变化。胶原纤维原本是富有弹性的纤维。但是，随着人体的衰老，在胶原纤维中形成交联，因此胶原纤维失去了弹性。结果，人的皮肤失去柔软性，产生皱纹和松弛。为了预防这种皮肤的衰老，公开了胶原产生促进剂（日本特开平 11-335293 号公报、日本特开 2000-191498 号公报、日本特开 2000-309521 号公报、日本特开 2001-316240 号公报、日本特开 2002-080340 号公报、日本特开 2002-087974 号公报及日本特开 2004-182710 号公报）。但是，任何胶原产生促进剂都具有不能有效地促进胶原产生、而且作为原料的药剂也难以获得等的问题。

另一方面，在日本特开 2000-79161 号公报（专利文献 1）中公开了含有多聚磷酸的用于促进新生骨组织形成的骨再生材料。但是，并没有记载多聚磷酸促进胶原产生。

另外，在日本特开 2004-543 号公报（专利文献 2）中公开了多聚磷酸与水溶性胶原的复合材料及其制造方法。而且，多聚磷酸-胶原复合体作为医疗材料易于利用，且可以有效地发挥多聚磷酸的组织再生促进作用。但是，也没有多聚磷酸促进胶原产生的相关记载。

专利文献 1：日本特开 2000-79161 号公报

专利文献 2：日本特开 2004-543 号公报

发明内容

本发明的目的在于提供能够促进胶原产生的药剂及化妆材料、使用了这种药剂的制造方法，其中，所述能够促进胶原产生的药剂及化妆材料所使用的原料易于获得且其生物体亲和性优异。

本发明鉴于上述课题而完成。而且，本发明基本上是以下述发现为基础：通过含有有效量的多聚磷酸的药剂可以有效地促进胶原的产生。而且，在食品等领域中也证实了多聚磷酸的生物体亲和性优异。因此，若利用该药剂，则可以使用生物体亲和性优异的药剂，促进胶原的产生、阻碍衰老现象等，因此可以将本发明的药剂有效地用于化妆材料等中。

本发明的优选方式涉及含有超磷酸的化妆材料。作为网孔状多聚磷酸钠的超磷酸的酸性度很强。因此，以前并没有将超磷酸混合到化妆品中。但是超磷酸由于酸性度很强，因此发挥使肌肤的老化角质脱落的剥皮效果。而且，如通过后述实施例所证实的那样，超磷酸具有胶原产生的功能。即，本发明的优选方式根据以下发现为基础：通过含有有效量的超磷酸，可以提供不仅具有剥皮效果，而且还可以促进胶原产生的化妆材料。

本发明的优选方式涉及胶原制造方法，该胶原制造方法包含将多聚磷酸、其盐或其溶剂合物投与给人或人以外的哺乳动物的工序。在该方法中，作为多聚磷酸优选超磷酸。另外，在人或人以外的哺乳动物中，优选人以外的哺乳动物，具体可以举出猪、猿、小鼠或大鼠等。即，可以将多聚磷酸等投与给对象使其产生胶原后，将产生的胶原适当地回收。

根据本发明，如通过后述实施例所证实的那样，可以提供能够有效促进胶原产生的药剂。另外，通过含有超磷酸作为有效成分，可以提供既具有剥皮效果，且还能够促进胶原产生的化妆材料。

胶原对于美白、抗衰老等具有效果，因此含有本发明药剂的化妆材料或化妆用面膜对于美白和抗衰老等有效。

附图说明

图 1 为表示在用于确定多聚磷酸钠分子量的凝胶过滤分析中洗脱时间和分子量关系的曲线。

图 2 为超磷酸钠的滴定曲线。

图 3 为表示创伤治愈模型的概念图。

图 4 是代替表示苏木素-伊红 (HE) 染色图的附图的照片。图 4 (A) 为对照组的 HE 染色低倍放大像。图 4 (a-1) 表示图 4 (A) 的矩形所包围部分的 HE 染色的高倍放大像。图 4 (a-2) 表示图 4 (A) 的矩形所包围部分的 azan 染色的高倍放大像。图 4 (B) 是多聚磷酸涂抹组的 HE 染色低倍放大像。图 4 (b-1) 表示图 4 (B) 的矩形所包围部分的 HE 染色的高倍放大像。图 4 (b-2) 表示图 4 (B) 的矩形所包围部分的 azan 染色的高倍放大像。

图 5 是代替表示原位杂交结果的附图的照片。图 5 (A) 表示对照组, 图 5 (B) 表示涂抹多聚磷酸的组, 图 5 (b) 为图 5 (B) 的部分放大图。

图 6 是代替表示利用各链长的多聚磷酸钠进行处理的 HDF 免疫染色像的附图的照片。将无处理的细胞作为对照组, 将利用含有全部短链、中链、长链多聚磷酸钠的混合物(平均链长 60、链长范围 3~300)处理的细胞作为处理组 A, 将利用短链多聚磷酸钠处理的细胞作为处理组 B, 将利用中链多聚磷酸钠处理的细胞作为处理组 C, 将利用长链多聚磷酸钠处理的细胞作为处理组 D, 将利用超磷酸钠处理的细胞作为处理组 E。

图 7 是代替表示利用图像分析软件 (Image-J) 分析图 6 的染色图像、将染色度定量化结果的附图的曲线。将无处理的细胞作为对照组, 将利用含有全部短链、中链、长链多聚磷酸钠的混合物(平均链长 60、链长范围 3~300)处理的细胞作为处理组 A, 将利用短链多聚磷酸钠处理的细胞作为处理组 B, 将利用中链多聚磷酸钠处理的细胞作为处理组 C, 将利用长链多聚磷酸钠处理的细胞作为处理组 D, 将利用超磷酸钠处理的细胞作为处理组 E。

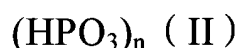
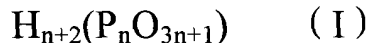
具体实施方式

本发明涉及基本上含有多聚磷酸、其盐或其溶剂合物作为有效成分的促进胶原产生的药剂。更具体地说，为促进胶原的产生，所述药剂是含有有效量的多聚磷酸、其盐或其溶剂合物的药剂。

[多聚磷酸]

如上所述，本发明的药剂含有多聚磷酸、其盐或其溶剂合物作为有效成分。而且，作为本发明的多聚磷酸，可以是具有通过正磷酸的脱水缩合形成的2个以上的 PO_4 四面体共有顶点的氧原子连接成直链状结构的直链状多聚磷酸、侧链中导入了有机基团的侧链状多聚磷酸、环状多聚磷酸、作为支链状的磷酸聚合物的多聚磷酸（超磷酸），也可以是它们的混合物或它们的衍生物。

本发明的药剂中作为多聚磷酸以 H_2O 和 P_2O_5 作为构成分子， H_2O 与 P_2O_5 的摩尔比（R）为 $2 > R \geq 1$ ，含有1种或2种以上的下述通式（I）或（II）所示的直链状或环状的多聚磷酸。



（式（I）和（II）中，n各自独立、表示3~300（3以上300以下）的整数。）另外，与上述多聚磷酸不同的样态为超磷酸。超磷酸通常是具有网孔状高级结构的多聚磷酸，其中，作为多聚磷酸构成分子的 H_2O 与 P_2O_5 的摩尔比（R）为 $1 > R > 0$ 。超磷酸中的磷原子的个数没有特别限定，可以举出3~300。

式（I）中的n优选为3~130的整数，更优选为10~89。

所使用的多聚磷酸的平均分子量为240以上25,000以下，优选为810以上7,300以下。需要说明的是，多聚磷酸的总量中，优选含有90wt%以上式（I）中的n为10~89（优选20~80）范围的式（I），其原因在于其胶原产生量高。

链长为1000以上的多聚磷酸不会以水溶液的形式存在，考虑到在水中难溶，因此未必优选。另外，由于在生物体内多聚磷酸的链长约为800，因此链长为800以下的多聚磷酸在生物体内具有与各种生

理功能相关的较高有效性 (K. D. Kumble and A. Kornberg, 哺乳动物细胞和组织中的无机多聚磷酸盐 (Inorganic polyphosphate in mammalian cells and tissues), The Journal of Biological Chemistry, Vol. 270, pp. 5818-5822, 1995)。本发明的多聚磷酸由于具有促进胶原产生的效果, 因此可以特别优选使用链长为 3~300 的多聚磷酸。另外, 如通过后述实施例所证实的那样, 为了促进胶原的产生, 优选使用链长为 20 以上的多聚磷酸。

“其盐”是指多聚磷酸的盐、特别是可药用的多聚磷酸的盐。在本说明书中“可药用的”是指对接受者无害的意思。本发明的多聚磷酸可以根据常规方法制成盐。作为其盐, 例如可以举出钠盐、钾盐、锂盐等碱金属盐; 钙盐、镁盐等碱土类金属盐; 铝盐、铁盐、锌盐、铜盐、镍盐、钴盐等金属盐; 铵盐等无机盐; 叔辛胺盐、二苄胺盐、吗啉盐、葡萄糖胺盐、苯基甘氨酸烷基酯盐、乙二胺盐、N-甲基葡萄糖胺盐、胍盐、二乙胺盐、三乙胺盐、二环己胺盐、N,N'-二苄基乙二胺盐、氯普鲁卡因盐、普鲁卡因盐、二乙醇胺盐、N-苄基-N-苯乙胺盐、哌嗪盐、四甲基铵盐、三(羟甲基)氨基甲烷盐等有机盐的胺盐。其中, 作为多聚磷酸的盐, 优选碱金属盐、更优选钠盐。本说明书中“其盐”不仅包括无水盐还包括含水盐。这些盐例如在生物体内发生电离, 与多聚磷酸同样地发挥功能。

“其溶剂合物”是指多聚磷酸的溶剂合物。作为溶剂合物可以举出水合物。本发明的药剂由于在大气中放置而发生重结晶, 因此有时会吸收水分、带有吸附水而成为水合物。形成这种溶剂合物时, 也包含在“其溶剂合物”中。它们的溶剂合物在生物体内发生电离, 与多聚磷酸同样地发挥功能。

本发明中使用多聚磷酸、其盐或其溶剂合物可以是 1 种, 也可以是多种的混合物。多种的多聚磷酸、其盐或其溶剂合物中包括聚合度不同的多聚磷酸、其盐或其溶剂合物, 分子结构不同的多聚磷酸、其盐或其溶剂合物以及金属离子不同的多聚磷酸盐。

多聚磷酸、多聚磷酸的盐、多聚磷酸的溶剂合物可以通过加热磷

酸的方法，在磷酸中添加五氧化磷的方法等通常使用的制造方法制造。

另外，链长为 20 以上的中长链多聚磷酸特别优选可以通过以下方法制造。首先，将六偏磷酸盐溶解在水中，达到浓度 0.1~20wt%、优选 9~11wt%。在该六偏磷酸水溶液中按照六偏磷酸溶液和乙醇的混合后的总液体量的 1/10~1/3 的容量、即六偏磷酸水溶液：乙醇达到 2:1~9:1 的体积比添加 87~100%乙醇、优选 96%乙醇。充分地搅拌该混合溶液，使用离心分离或滤器过滤等分离方法将析出的沉淀物与水溶液成分分离。如此分离的沉淀物为中长链多聚磷酸。接着利用 70%乙醇洗涤该多聚磷酸，之后使其干燥。通过这种分离操作获得的多聚磷酸的平均链长为 60~70，基本不含 10 以下的短链多聚磷酸。因此，其分子量分布以磷酸残基数计算为 10~150 左右。

多聚磷酸如日本特表 2004-537490 所记载那样，可以通过由磷酸制造多聚磷酸的方法制造，该方法包含以下步骤：（a）提供填充的色谱柱，该填充的色谱柱从下端延伸到上端，具有在该色谱柱的上端或上端附近配置 1 个以上的第 1 入口开口部和配置在该第 1 入口开口部下方的 1 个以上的第 2 入口开口部；（b）将含有磷酸的第 1 酸供给流体在 1 个以上的第 1 入口开口部处导入到色谱柱中；（c）将含有磷酸的第 2 酸供给流体导入到热空气流体形成热空气和酸的流体；（d）将热空气和酸的流体在 1 个以上的第 2 入口开口部处导入到色谱柱中；（e）使第 1 酸供给流体和第 2 酸供给流体的磷酸聚合形成多聚磷酸。六聚磷酸或七聚磷酸例如可以根据日本特开 2004-035348 号公报所记载的方法制造。

本发明的药剂中多聚磷酸的含量没有特别限定，例如相对于培养细胞为 0.001~0.5wt%，优选为 0.002~0.1wt%。另外，在组织内或经皮投与时，优选相比较于处理培养细胞的浓度为更高的浓度。因此，进行组织内或经皮投与时的多聚磷酸的含量可以举出 0.1~10wt%，更优选为 1~5wt%，最优选为 1~2wt%。将多聚磷酸作为金属封闭剂或抗氧化剂用于化妆材料等中时，一般来说以小于 1wt%的浓度使用，但为

了增大胶原生产,通过使用 1wt%以上,可以有效地促进胶原的产生。

多聚磷酸、其盐或其溶剂合物可以分别以单体或者与可药用的载体或稀释剂等混合,制成用于促进多聚磷酸产生的组合物。另外,多聚磷酸、其盐或其溶剂合物可以与可药用的添加剂混合,制成适于用于患部的形态的各种制剂。作为适于本发明药剂的制剂形态例如可以通过公知的方法适当地调制成为注射剂、外用液剂(注入剂、涂抹剂)、固体制剂(颗粒剂、微粒剂、散剂、软膏剂、片剂)、软膏剂等形态。

作为可药用的添加物,例如可以举出赋形剂、崩解剂或崩解辅助剂、结合剂、润滑剂、包衣剂、色素、稀释剂、基剂、溶解剂或溶解辅助剂、等渗剂、pH 调整剂、稳定剂、防腐剂、保存剂、分散剂、乳化剂、凝胶化剂、增粘剂、粘合剂、矫味剂等。

而且,含有本发明药剂和可药用载体等的组合物是对肌肤的抗衰老和美白有效的组合物。该组合物可以通过口服或非口服投与。

作为可药用的载体,例如可以举出适当选自赋形剂、稀释剂、润滑剂、结合剂、崩解剂、稳定剂和矫味除臭剂的载体。

作为赋形剂,例如可以举出乳糖、白糖、葡萄糖、甘露糖、山梨醇糖之类的糖衍生物;玉米淀粉、马铃薯淀粉、 α 淀粉、糊精之类的淀粉衍生物;结晶纤维素之类的纤维素衍生物;阿拉伯胶;葡聚糖;多糖之类的有机类赋形剂以及轻质硅酸酐、合成硅酸铝、硅酸钙、偏硅酸铝酸镁之类的硅酸盐衍生物;磷酸氢钙之类的磷酸盐;碳酸钙之类的碳酸盐;硫酸钙之类的硫酸盐等无机类赋形剂。

作为润滑剂,例如可以举出硬脂酸、硬脂酸钙、硬脂酸镁之类的硬脂酸金属盐;滑石;胶体二氧化硅;蜂胶、鲸蜡之类的蜡类;硼酸;己二酸;硫酸钠之类的硫酸盐;乙二醇;富马酸;苯甲酸钠;DL 亮氨酸;脂肪酸钠盐;月桂硫酸钠、月桂硫酸镁之类的月桂硫酸盐;硅酸酐、硅酸水合物之类的硅酸类以及上述淀粉衍生物。

作为结合剂,例如可以举出羟丙基纤维素、羟丙甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇和与上述赋形剂相同的化合物。

作为崩解剂,例如可以举出低取代度羟丙基纤维素、羧甲基纤维

素、羧甲基纤维素钙、内部交联羧甲基纤维素钠之类的纤维素衍生物；羧甲基淀粉、羧甲基淀粉钠、交联聚乙烯吡咯烷酮之类的化学修饰的淀粉·纤维素类。

作为稳定剂，例如可以举出对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯之类的对羟基苯甲酸酯类；氯丁醇、苄醇、苯基乙醇之类的醇类；洁尔灭；苯酚、甲酚之类的酚类；硫柳汞；脱氢醋酸和山梨酸。作为矫味除臭剂，例如可以举出甜味剂、酸味剂和香料等。作为稀释剂例如可以举出灭菌水、灭菌有机溶剂、水性淀粉等。

本发明药剂的使用量可以根据症状、年龄、性别、投与方法等进行适当调整。例如，如通过实施例所证实的那样，胶原产生由于优选多聚磷酸直接作用于皮肤的表皮或接近真皮细胞的部分，因此作为剂型优选制成涂抹剂或化妆材料，优选在每 1cm^2 皮肤表面上每次以 $1\text{mg}/\text{cm}^2$ （优选 $5\text{mg}/\text{cm}^2$ ）为下限、 $500\text{mg}/\text{cm}^2$ （优选 $50\text{mg}/\text{cm}^2$ ）为上限投与多聚磷酸。

本发明的优选方式涉及含有上述药剂的化妆材料。作为化妆材料，可以举出化妆水、乳液、乳霜、啫哩、美容液（精华素）、面膜化妆材料。含有有效量的本发明药剂的化妆材料由于可以促进涂抹有化妆材料的部位的胶原产生，因此认为可以维持年轻、健康的肌肤。

“化妆水”通常来说是为了清洁肌肤、保持皮肤健康而涂抹在皮肤表面上的透明液状的化妆材料。化妆水的基本功能是对皮肤的角质层补充水分和保湿成分，化妆水还具有使皮肤变得柔软的功能等。化妆水中可以举出使难溶于水中的物质溶解、稳定、将外观制成透明状态的化妆水；利用微胶囊或脂质毫微球的透明或半透明的化妆水；将一定百分比的油分乳化成 O/W（水包油型）的不透明化妆水以及混合水溶性高分子的化妆水等。本发明的处置方法中，可以根据其用途适当地利用公知的“化妆水”。

化妆水中，除了本发明的药剂之外，还含有例如以下的成分。即，在化妆水中混合含有 2 种以上的下述成分：离子交换水等，用于溶解水溶性成份、为角质层提供水分的精制水；乙醇、丙醇等，用于溶解

油溶性成份、杀菌、提供清凉感的醇；甘油、PEG、透明质酸等，用于角质层保湿的保湿剂；酯油、植物油等，用于提高保湿性和使用感的润滑剂（防止水分蒸发的油成分）；油醇聚氧乙烯醚等，用于使原料成分可溶的可溶化剂；柠檬酸、乳酸、氨基酸类等，用于调整制品的 pH 的缓冲剂；香子兰醛、橙子香精、柠檬香精、牛奶香精、香叶醇、沉香醇等用于添加香味的香料；对羟基苯甲酸甲酯、苯氧基乙醇等用于抑制微生物、防止腐败的防腐剂；用于着色的着色剂；金属离子封闭剂、紫外线吸收剂等用于防止退色或变色的防退色剂以及收敛剂，杀菌剂，活化剂，消炎剂或美白剂等药剂。

若将化妆水的总量作为 100wt%，可以含有 0.001~20wt% 的多聚磷酸、其盐或其水合物，优选含有 0.01~10wt%，更优选 0.1~5wt%，最优选 0.2~2wt% 左右。构成化妆水的多聚磷酸以外的各成分的量可以采用公知的成分量。例如，可以举出精制水 10~90wt%；醇 1~40wt%；保湿剂 1~20wt%；润滑剂 1~5wt%；可溶化剂 0~1wt%；缓冲剂 0~1wt%；其他药剂 0~10wt%。

化妆水基本上可以如下制造。即，在室温下溶解水溶性成份。将油溶性成份加热熔解，加入精制水混合。将该混合物与水溶性成份混合。之后，还可以加入色剂。然后通过过滤进行精制。需要说明的是，化妆水的成分还可以根据用途等按照公知的方法进行调整。

“乳液”是具有化妆水和乳霜的中间性质的化妆材料。一般来说是具有流动性的乳剂。乳液主要是为了保持皮肤的湿度平衡、保湿性和柔软性，用于为皮肤提供水分、保湿剂和油分等而使用的化妆材料。乳液中所含的成分与后述乳霜所含的成分相类似，但由于乳液具有流动性，因此与乳霜相比固体油分或蜡类的量很少。本发明的处置方法中，可以根据其用途适当地利用公知的“乳液”。

乳液可以含有例如 0.001~20wt% 的多聚磷酸、其盐或其水合物，优选含有 0.01~10wt%，更优选 0.1~5wt%，最优选 0.2~2wt%。

“乳霜”是将如水和油那样不能混合的液体中的一方作为分散相，以稳定的状态分散在另一方的分散介质的乳剂的一种。本发明的处置

方法中，可以根据其用途适当地利用公知的“乳霜”。作为这种乳霜，可以举出用于皮肤的保湿和柔软的润滑剂、用于促进血液循环的按摩霜、用于皮肤清洁的清洁霜、用于脱毛的脱毛膏、用于除臭的除臭乳膏和用于软化角质的角质软化膏等。

在乳霜中例如含有以下成分。即，作为乳霜中所含的水相成分，可以举出离子交换水等精制水；乙醇、丙醇等用于溶解油溶性成份、杀菌、提供清凉感的醇；甘油、PEG、透明质酸等，用于角质层保湿的保湿剂以及榅桲籽、果胶、纤维素衍生物等粘液质。

作为乳霜中所含的油相成分，例如可以举出鲨烯、液体石蜡、凡士林、固体凡士林等烃；橄榄油、扁桃油、可可脂、蓖麻油等油脂；蜂蜡、羊毛脂、希蒙得木油等蜡；硬脂酸、油酸、棕榈酸等脂肪酸，鲸蜡醇、硬脂醇等高级醇；IPM、甘油三酯、季戊四醇四酯等酯以及聚硅氧烷类等有机硅油等。

作为乳霜中所含的表面活性剂（乳化剂），可以举出单硬脂酸甘油酯、聚氧乙烯（POE）山梨糖醇酐脂肪酸酯、山梨糖醇酐脂肪酸酯、POE 烷基醚、POE·聚氧丙烯（POP）接枝共聚物等非离子性乳化剂和脂肪酸皂或烷基硫酸钠等阴离子性乳化剂。

除此之外，乳霜中还可以含有柠檬酸、乳酸、氨基酸类等用于调整制品的 pH 的缓冲剂；香叶醇、里哪醇等用于添加香味的香料；对羟基苯甲酸甲酯、苯氧基乙醇等用于抑制微生物、防止腐败的防腐剂；用于着色的着色剂；金属离子封闭剂、紫外线吸收剂等用于防止退色或变色的防退色剂；EDTA 等螯合剂；氢氧化钾、氢氧化钠等碱成分，维生素 E、维生素 C、二丁基羟基甲苯等抗氧化剂和收敛剂，杀菌剂，活化剂，消炎剂或美白剂等药剂。

乳霜中所含的各成分的量根据其种类或用途大不相同，在本发明的处置方法中，可以适当使用公知的量。

乳霜基本上可以如下制造。即，在 70℃ 左右的温度下加热水相成分。加热溶解油相成分，添加香料等，进行搅拌。然后，搅拌水相成分和油相成分，在 70℃ 左右的温度下使用混合机等进行乳化。之后实

施脱气、过滤和冷却。

啫喱是凝胶或溶胶等外观状态均匀、透明~半透明的化妆材料。本发明的处置方法中，可以根据其用途等适当地利用公知的“啫喱”。可以举出用于为皮肤补充水分、保湿的水性啫喱；用于维持皮肤的保湿、补充油分的油性啫喱；用于促进血液循环的按摩用水性啫喱及洗涤用的啫喱等。作为啫喱可以举出使用含有羧乙烯基聚合物、甲基纤维素等水溶性高分子的凝胶化剂制造的啫喱。还可以使用凝胶状的按摩油。

乳霜可以含有 0.001~20wt%的多聚磷酸、其盐或其水合物，优选含有 0.01~10wt%，更优选 0.1~5wt%，最优选 0.2~2wt%。

“美容液（精华素）”基本上与上述化妆水、乳液和乳霜具有相同的成分，可以举出含有油剂、可溶化剂、保湿剂、水和其它药剂的美容液。本发明的处置方法中可以使用公知的美容液。作为美容液中所含的油剂，可以举出橄榄油、山茶油、芝麻油、向日葵油、甜扁桃仁油、希蒙得木油等天然植物油；癸酸、肉豆蔻酸、油酸、异硬脂酸等脂肪酸的二甘油酯或三甘油酯等。这些油剂主要作为润滑剂发挥作用。

作为美容液中所含的可溶化剂，可以举出甘油脂肪酸酯、聚甘油脂肪酸酯、山梨糖醇酐脂肪酸酯和单硬脂酸丙二醇酯等丙二醇脂肪酸酯类，甘油、双甘油、乙二醇、丙二醇、1,3-丁二醇等多元醇等。需要说明的是，作为可溶化剂，优选使用甘油或双甘油，其原因在于提高按摩中的温热效果。作为美容液中所含的水，可以举出蒸馏水和去离子水。作为其它的药剂，可以举出杀菌剂、防腐剂、维生素类、植物来源的天然浸膏、色素、香料等。

构成美容液的各成分的量可以采用公知的成分量。例如，若将美容液的总量作为 100wt%，则可以含有 0.001~20wt%的多聚磷酸、其盐或其水合物，优选含有 0.01~10wt%，更优选 0.1~5wt%，最优选 0.2~2wt%。可以举出油剂 65~90wt%、可溶化剂 1~10wt%、保湿剂 1~30wt%、其它药剂 0~10wt%左右，剩余部分为水的例子。美容液可以根据公知的制造方法制造。

“面膜化妆材料”是为了皮肤的保湿、促进血液循环、清洁而涂抹在对象部位的化妆材料。面膜化妆材料一般来说可以举出胶体状、糊剂状、粉末状，有涂抹在脸上形成覆膜后将其剥离的、涂抹后擦掉的、涂抹后洗掉的等。粉末状的面膜化妆材料在使用时均匀地溶解或混悬在水等溶剂中后使用。另外，还可以是在制成眼膜等形状的无纺布或胶原片材中含浸化妆材料的面膜化妆材料，在使用时将上述无纺布等浸渍在化妆材料中使用的面膜化妆材料等。

“面膜化妆材料”可以含有例如 0.001~20wt%的多聚磷酸、其盐或其水合物，优选含有 0.01~10wt%，更优选 0.1~5wt%，最优选 0.2~2wt%。其他组成为面膜化妆材料中使用的公知的组成即可，可以根据公知的制造方法制造。

上述化妆材料可以分别根据通常使用的方法使用。这样，由于上述化妆材料含有有效量的多聚磷酸，因此具有促进胶原产生、美白肌肤和抗衰老的效果。

接着，说明投与多聚磷酸、其盐或其水合物的胶原制造方法。胶原通常使用从人类以外的皮肤等中进行提取的方法制造，但若使用本发明的制造方法则可以更有效果地制造胶原。

具体地说，将本发明的药剂、组合物等涂抹在家畜等的皮肤上，在其上按照常规方法采集胶原。这样，涂抹过本发明药剂的皮肤与通常的皮肤相比多量地含有胶原，因此可以有效地制造胶原。

在人类或人类以外的哺乳动物的创伤上适当涂抹本发明的药剂、本发明的组合物。这样，在该创伤部处胶原的产生被促进，因此具有创伤被完美治愈的效果。该药剂、投与量可以如上说明那样。

作为计算链状多聚磷酸的平均链长绝对值的方法有滴定法。该方法是一种末端基测定法，主要在确定链状磷酸盐的分子量中使用。在链状磷酸盐中，在末端基团上具有 1 个强酸性氢和 1 个弱酸性氢，中间部分具有 1 个强酸性氢。即，通过求出强酸性氢的量 (SA) 和弱酸性氢的量 (WA)，可以通过下式 (III) 求出链状磷酸盐的平均链长。即，平均链长 = $(2SA/WA)$... 式 (III)。另外，作为求出平均分子量

的相对值和分子量分布的方法,通常为使用 HPLC 的凝胶过滤色谱法。关于凝胶过滤色谱法的详细情况和计算结果在实施例中叙述。

[制造例 1]多聚磷酸钠的制备

如下所述,制备具有各种链长的多聚磷酸钠。(i)将 200g 食品添加物规格的六甲基磷酸钠(太平化学产业株式会社生产)溶解在 1,000ml 精制水中,在其中缓慢加入 96%的乙醇 50ml。(ii)充分搅拌所得溶液,在室温下放置 1 小时以上后,进行离心分离(10,000×g、10 分钟、25℃)使液体分为 2 层。(iii)取出上层移至其它容器中。(iv)将含有高分子量(长链)的多聚磷酸钠的下层回收,作为含有最大分子量的长链多聚磷酸钠的馏分(馏分 1)保存。

(v)在刚刚通过(iii)的操作分离回收的上层中进一步加入 50ml 的乙醇。对如此获得的溶液进行上述(ii)~(iv)所记载的操作。结果,由于所得下层含有比馏分 1 的分子量更小的多聚磷酸钠,因此将其作为馏分 2 保存。

对于通过(vii)前的操作获得的上层,进行上述(v)和(vi)的操作,将所得下层作为馏分 3 保存。(viii)重复 6 次上述(vii)的操作,保存此次获得的下层。将所得馏分分别作为馏分 4、5、6、7、8、9。

[实施例 1]

确定多聚磷酸钠的平均分子量和分子量范围

按上述分离操作的结果,将各个馏分分为 3 组进行混合,将各组作为长链多聚磷酸钠、中链多聚磷酸钠、短链多聚磷酸钠。混合馏分 1、2 的组为长链多聚磷酸钠、混合馏分 3~5 的组为中链多聚磷酸钠、混合剩余馏分 6~9 的组为短链多聚磷酸钠。另外,将混合全部馏分 1~9 的组作为含有全部分子量、分子量分布大的分割多聚磷酸钠。将上述各个馏分的混合物分别冷冻干燥,将乙醇完全除去后,获得各个链长的多聚磷酸钠粉末。通过下述滴定法和凝胶过滤法决定各组的平均链长和分子量分布。

以下记载通过滴定法测定上述长链、中链、短链多聚磷酸钠的平

均链长的方法的详细情况和结果。将长链、中链、短链多聚磷酸钠各 25g 溶解在 500ml 的水中，取出分解前用的溶液 5ml、分解后用的溶液 40ml。在分解前用的溶液中加入 5N 氢氧化钠溶液 0.04ml 将 pH 调整至约 12 后，利用 0.5mol/l 盐酸进行滴定，直至 pH 达到约 2.5。在分解后用溶液中加入 5N 盐酸 48ml 和水 280ml，煮沸 30 分钟水解，冷却后正确加至 400ml。在该溶液 10ml 中加入 5N 氢氧化钠溶液 2.2ml 将 pH 调整至约 11 后，利用 0.5mol/l 盐酸进行滴定，直至 pH 达到约 2.5。滴定使用自动滴定装置（平沼产业（株）COM-1500）。

若将上述分解前和分解后的两溶液中的滴定曲线的第一拐点至第二拐点的 0.5mol/l 分解前盐酸所需量（ml）作为 W、将分解后盐酸所需量（ml）作为 S 时，各自的平均链长如下所述。

长链多聚磷酸钠 = $(2 \times 5 \times 1.56) / 0.12 = 130$

中链多聚磷酸钠 = $(2 \times 5 \times 1.32) / 0.22 = 60.2$

短链多聚磷酸钠 = $(2 \times 5 \times 0.50) / 0.35 = 14.3$

以下显示使用利用 HPLC 的凝胶过滤色谱法对上述长链、中链、短链多聚磷酸钠进行分析的分析结果。HPLC 的分析条件如下。

分析仪器（HPLC）：岛津制作所生产 LC2010C

色谱柱：Shodex OHpak SB-803 HQ

柱温：30℃

溶剂：0.1M NaCl

流速：1ml/min

样品上样量：0.01ml

样品中多聚磷酸钠浓度：1%

利用上述条件下的凝胶过滤的分析结果为：长链多聚磷酸钠的洗脱时间为 7.95 分钟、中链多聚磷酸钠的洗脱时间为 8.50 分钟、短链多聚磷酸钠的洗脱时间为 9.17 分钟。通过该值制作平均链长的对数（log）与洗脱时间的关系的标准曲线（图 1）。结果可知，洗脱时间与链长的对数的关系如下式（IV）所示。链长（log）= $-0.7987 \times \text{洗脱时间} + 8.5001$ 式（IV）

根据该标准曲线计算长链、中链、短链多聚磷酸钠的凝胶过滤分析的洗脱开始时间（高分子量侧）和洗脱结束时间（低分子量侧），计算它们的分子量范围。将其结果示于表 1 中。需要说明的是，表 1 中无法计算是指处于标准曲线外，无法计算。

表 1 通过式 (IV) 计算的各链长的多聚磷酸的分子量范围

链长	洗脱开始时间 (分钟)	洗脱结束时间 (分钟)
长链	7.52	8.35
链长	无法计算	1.830955
(log)		
链长	无法计算	67.75713
中链	8.2	8.8
链长	1.95076	1.47154
(log)		
链长	89.281196	29.616927
短链	8.78	9.55
链长	1.487514	无法计算
(log)		
链长	30.726564	无法计算

通过利用上述滴定法和凝胶过滤法对分子量范围进行的分析，混合了馏分 1、2 的长链多聚磷酸钠的平均链长为 130、链长范围为 67.8 以上；混合了馏分 3~5 的中链多聚磷酸钠的平均链长为 60、链长范围为 29.6~89.2。混合了剩余馏分 6~9 的短链多聚磷酸钠的平均链长为 14、链长范围为 30.7 以下。

[实施例 2]

超磷酸钠的性质确认

关于在本实施例中使用的超磷酸钠，作为其分子特征已知有：当制成水溶液时显示 pH1~2 的强酸性，当利用氢氧化钠等碱溶液进行滴定时，在上述 pH 的酸性区域具有 pH 缓冲区域。由该事实出发，利用氢氧化钠水溶液滴定超磷酸钠水溶液，测定其 pH 变化，示于图 2

中。结果，在 pH 1~2 附近显示缓冲作用，确认具有超磷酸钠的性质。

[实施例 3]

多聚磷酸对胶原产生的增加

使用根据上述制造例获得的分割多聚磷酸钠，进行大鼠创伤部位的胶原产生评价试验。图 3 为创伤治愈模型的概念图。使用产后 6 周龄的 Wistar 系雄性大鼠，在乙醚麻醉下剃掉背部的毛发，沿着躯干的长轴以达到筋膜的深度切开 20mm。之后，将创伤中央的两端按照达到 5mm 的宽度各用 1 根线与筋膜缝合，制作纺锤形的创伤治愈模型（参照图 3）。实验组中在创伤部位上局部涂抹 1%多聚磷酸钠水溶液{含有通过上述制造例制备的全部短链、中链、长链多聚磷酸钠的调整前的多聚磷酸钠（平均链长 60、链长范围 3~300）}，在对照组中局部涂抹 1%磷酸缓冲液，分别涂抹 100mg，涂抹 5 天。在第 3 天和第 7 天使大鼠安乐死，将距离创伤中央 5mm 的组织如图 1 所示那样在筋膜上采集皮肤标本。根据常规方法将采集的皮肤标本福尔马林固定后，制作石蜡切片，对涂抹后第 7 天的标本进行苏木素-伊红(HE)染色和 AZAN 染色。另外，对涂抹后第 3 天的标本进行去石蜡后，利用原位杂交评价 I 型胶原 mRNA 的表达量。

利用原位杂交评价 I 型胶原 mRNA 的表达量

通过从大鼠组织中提取的 RNA 合成 cDNA，将其作为模板，使用 FW：5'-gaggggggtttctgtgtcct-3'（序列号 1）和 RV：5'-cgaggtagtctttcagcaacac-3'（序列号 3）的引物进行 PCR。

如此操作，获得含有一部分大鼠 I 型胶原基因的 DNA 片段。将该片段克隆到 pCRII-TOPO 载体（インビトロジェン公司生产）中，制作 pCRII-R I 型-胶原质粒。利用限制性酶 XhoI 切断该质粒，制成直链状，通过体外转录制作 Dig 标记 I 型胶原 RNA 探针。利用蛋白酶 K（2μg/ml）处理去石蜡的涂抹后第 3 天的标本（试样）10 分钟（室温），在 60℃下杂交 15 小时。此时的探针浓度为 500ng/ml，在含有 50%甲酰胺（FA）的 5×SSC（0.75M NaCl，60mM 柠檬酸钠，pH7.0）溶液中进行。之后，按照下表 2 的顺序进行洗涤，利用 BM-purple（ロッ

シユ公司生产)进行处理,从而将表达 I 型胶原 mRNA 的组织部分特异性染色。

表 2 洗涤工序

处理序号	洗涤溶液	处理时间	处理温度
1	2×SSC	5 分钟	室温
2	2×SSC	15 分钟	室温
3	50%FA、2×SSC	30 分钟	60℃
4	1×SSC	15 分钟	室温
5	0.5×SSC	15 分钟	室温
6	0.5M NaCl、30mM Tris-HCl (pH7.5)	5 分钟	室温
7	0.5M NaCl、30mM Tris-HCl (pH7.5)	5 分钟	室温
8	1.5%封闭剂 (コスモバイオ公司生产)	30 分钟	室温
9	抗 DIG 抗体	5 小时	室温
10	0.5M NaCl、30mM Tris-HCl (pH7.5)	5 分钟	室温
11	0.5M NaCl、30mM Tris-HCl (pH7.5)	5 分钟	室温

图 4 是代替表示苏木素-伊红 (HE) 染色图的附图的照片。图 4 (A) 为对照组的 HE 染色低倍放大像。图 4 (a-1) 表示图 4 (A) 的矩形所包围部分的 HE 染色的高倍放大像。图 4 (a-2) 表示图 4 (A) 的矩形所包围部分的 azan 染色的高倍放大像。对照组中的创伤部显示器质化的倾向,但淋巴球和巨噬细胞等炎症性细胞的浸润很显著,上皮的伸长很轻微。另外,azan 染色的结果表明 I 型胶原产生也几乎没有增加。图 4 (B) 是多聚磷酸涂抹组的 HE 染色低倍放大像。图 4 (b-1) 表示图 4 (B) 的矩形所包围部分的 HE 染色的高倍放大像。图 4 (b-2) 表示图 4 (B) 的矩形所包围部分的 azan 染色的高倍放大像。创伤部可见纤维芽细胞的增值·纤维的增生和成熟,通过 azan 染色的结果可知,与对照组相比明显地产生了很粗的胶原纤维。另外,在创伤的表层也基本未见炎症性细胞,创伤面基本被上皮覆盖。

图 5 是代替表示原位杂交结果的附图的照片。图 5 (A) 表示对照

组，图 5 (B) 表示涂抹多聚磷酸的组，图 5 (b) 为图 5 (B) 的部分放大图。对照组 (图 5 (A)) 基本未被染色，未见显著的 I 型胶原 mRNA 的表达；而多聚磷酸涂抹组 (图 5 (B)) 中，在低倍放大像中可见整个皮下组织染色，图 5 (b) (图 5 (B) 的矩形部分的放大像) 中，在与创伤断面的正常皮下组织相邻部分的纤维芽细胞的细胞质中有明显的 I 型胶原 mRNA 的表达。

由上述 HE 和 azan 染色像、对 I 型胶原 mRNA 进行原位杂交的结果可知，多聚磷酸导致了胶原的显著产生，多聚磷酸具有作为胶原产生促进材料的功能，由于其效果，带伤组织的修复提高。

[实施例 4]

多聚磷酸钠对人真皮纤维芽细胞的胶原产生促进效果的磷酸聚合度依赖性

使用人真皮来源的纤维芽细胞 (HDF)，研究多聚磷酸钠对胶原产生促进效果。按照每孔达到 25,000 个将 HDF 接种于 24 孔板中，使用 D-MEM 培养基 (sigma 公司生产) 在 37℃、5%CO₂ 下进行培养，直至细胞达到融合 (3 天)。之后，置换成含有 1% 牛血清的 D-MEM 培养基，进一步培养 6 天或 9 天。接着，将通过上述制造例制备的短链、中链、长链多聚磷酸钠 {平均磷酸聚合物 14 (短链)、60 (中链)、130 (长链)} 作为待测物质，分别按照最终浓度达到 1% 添加于 D-MEM 培养基中进行处理。另外，对于含有通过上述制造例制备的全部短链、中链、长链多聚磷酸钠的多聚磷酸钠 {平均链长 60、链长范围 3~300}，也与其他多聚磷酸钠以相同浓度进行相同处理。需要说明的是，作为对照，设置无处理组作为对照组。另外，通过各种多聚磷酸处理的处理组如下所示。

处理组 A：利用含有全部短链、中链、长链多聚磷酸钠的混合物 (平均链长 60、链长范围 3~300) 处理的细胞。

处理组 B：利用短链多聚磷酸钠处理的细胞。

处理组 C：利用中链多聚磷酸钠处理的细胞。

处理组 D：利用长链多聚磷酸钠处理的细胞。

处理组 E: 利用超磷酸钠处理的细胞。

对于利用各处理培养基培养 6 天或 9 天的细胞, 按照以下顺序进行 I 型胶原的免疫染色。各种处理组同样, 在第 4 天和第 7 天更换为含有待测物质的新鲜 D-MEM 培养基。另外, 以下的操作全部是对 24 孔板中的每个孔所进行的。

(i) 除去培养液, 加入 0.5ml 的 10% 中性缓冲甲醛液 (商品名: タナホルム、株式会社タナカ生产) 固定细胞。(ii) 加入 TBC-Ca (20mM Tris-HCl pH7.5、0.15M NaCl、1mM CaCl_2) 1ml, 洗涤细胞。(iii) 加入 1ml 甲醇, 在 -20°C 下放置 30 分钟。(iv) 加入 1ml 的 TBS-Ca 进行洗涤。(v) 加入含有 5% 脱脂奶粉的 TBS-Ca, 放置 50 分钟。(vi) 加入 1ml 的 TBS-Ca, 进行洗涤。(vii) 加入 0.15ml 经 TBS-Ca 按 1/150 稀释的含有 5% 脱脂奶粉的抗人 I 型胶原抗体 (多克隆抗体、ケミコン公司生产), 在室温下放置 50 分钟。(viii) 利用 1ml 的 TBS-Ca 洗涤 3 次。(ix) 对于之后的操作, 使用 DAKO Envision 系统 HRP (DAB) 试剂盒 (ダコ・サイトメーション株式会社), 根据该试剂盒的操作规程进行。利用 TBS-Ca 将与二抗结合的 DAKO 葡聚糖试剂稀释 5 倍, 加入 0.15ml 上述稀释液后放置 30 分钟。(x) 利用 1ml 的 TBS-Ca 洗涤 3 次。(xi) 加入在 DAKO 基质反应液 0.15ml 中混合有 DAKO 显色基质 3 μl 的液体, 进行约 10 分钟的显色反应。(xii) 利用蒸馏水洗涤 3 次使反应停止, 利用乙醇洗涤后, 用扫描仪读取染色像。对各处理组、使用作为图像分析软件的 Image-J (フリーウェア) 进行分析, 将染色度定量, 作为评价的指标。

图 6 是代替表示利用各链长的多聚磷酸钠进行处理的 HDF 免疫染色像的附图的照片。图 7 是代替表示利用图像分析软件 (Image-J) 分析图 6 的染色图像、将染色度定量化结果的附图的曲线。在进行定量时, 将各处理天数的对照组的染色强度作为 1, 将其它处理组的染色强度的相对值作为胶原产生率。由图 7 可知, 第 6 天时, 短链和中链多聚磷酸钠处理组 (处理组 B 和 C)、含有全部链长的多聚磷酸钠 (平均链长 60、链长范围 3~300) (处理组 A)、利用超磷酸钠处理

的细胞（处理组 E）相比较于长链多聚磷酸钠处理组（处理组 D）或无处理的对照组，胶原产生促进能力更高。另外，在处理第 9 天，短链多聚磷酸钠处理组（处理组 B）的促进能力最高（对照组的约 6.3 倍）、中链多聚磷酸钠（处理组 C）次之（对照组的约 4.9 倍）。含有其它分子量的多聚磷酸钠或超磷酸钠（处理组 E）与无处理的细胞（对照组）相比，具有 2 倍左右的胶原产生促进能力。由以上事实可知，多聚磷酸在链长 3~300 之间具有胶原产生促进能力，特别是在短链和中链多聚磷酸钠中胶原产生促进效果更高。另外可知，在无处理和磷酸处理组中，较其它处理组染色度显著地降低，胶原产生促进能力依赖于多聚磷酸钠分子本身。

产业实用性

本发明的药剂和化妆材料由于促进胶原的产生，因此可以在化妆品等领域中被优选利用。另外，超磷酸钠作为兼具剥皮效果和胶原产生促进的药剂有效。

序列表

<110> 露珍细胞再生株式会社 (Regenetiss Inc.)

<120> 胶原产生促进剂、化妆材料和胶原的制造方法

<130> RGT06-01P

<150> JP2006-227237

<151> 2006-08-24

<160> 2

<170> Patent In version 3.3

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 1

Gagggggttt ctgtgtcct 19

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 2

Cgaggtagtc ttcagcaac ac 22

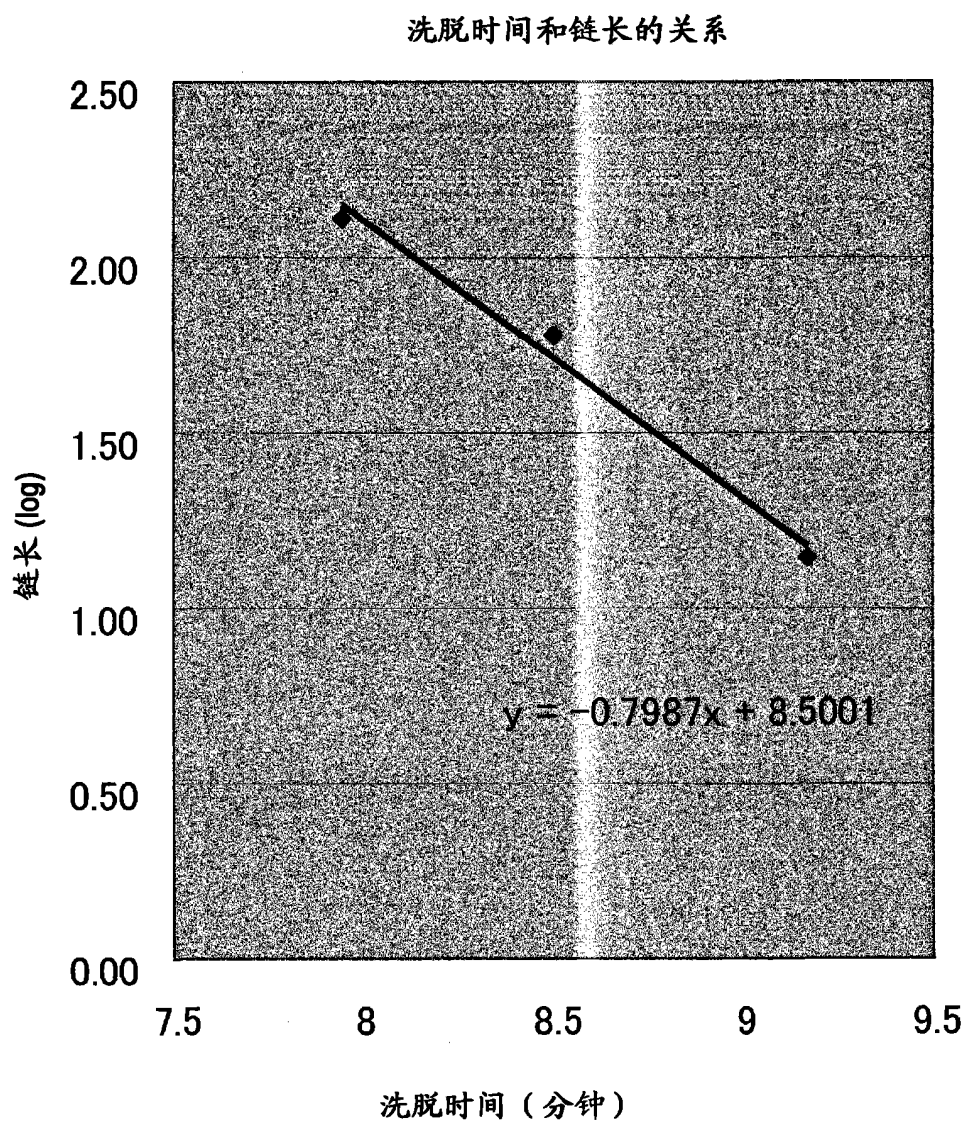


图 1

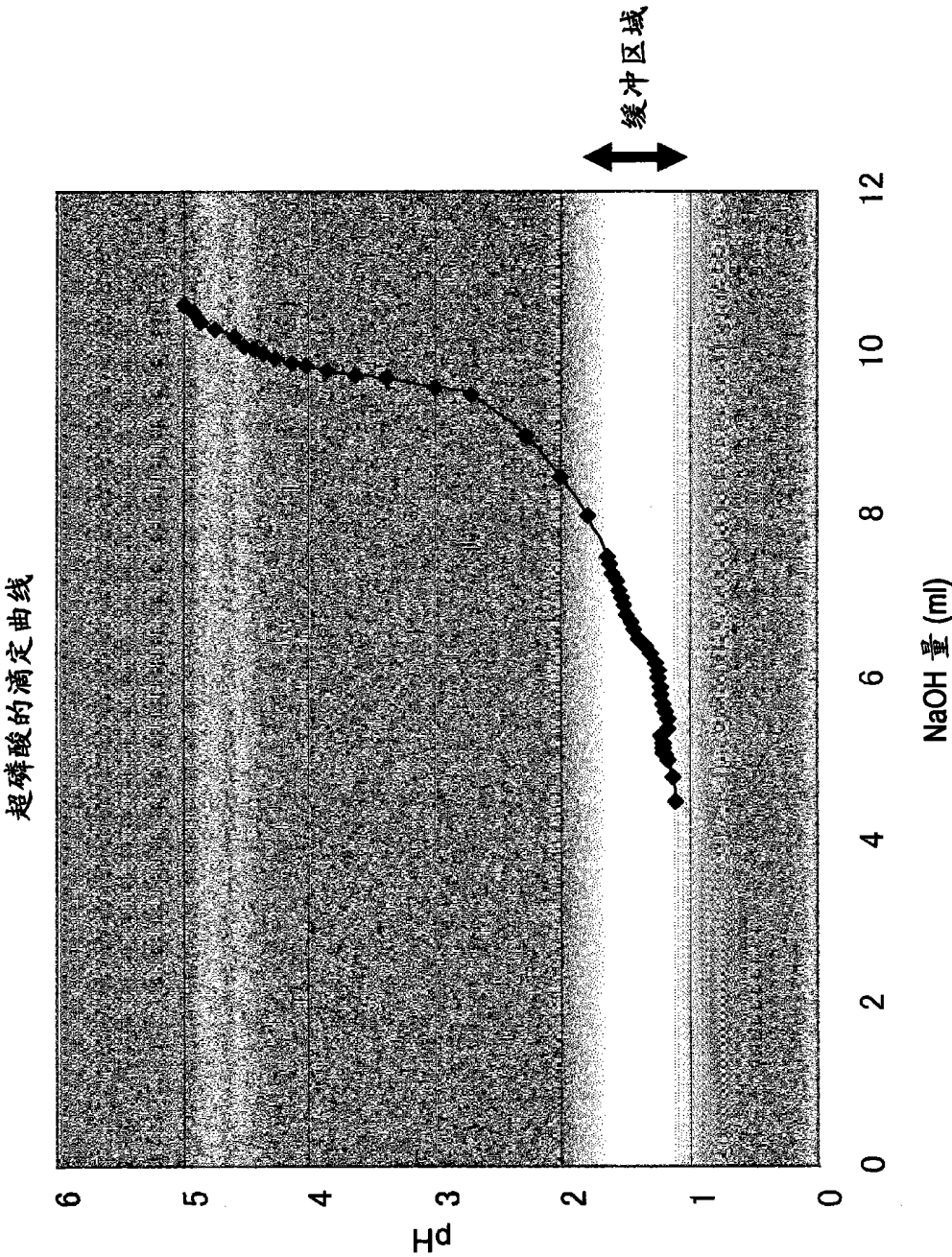


图 2

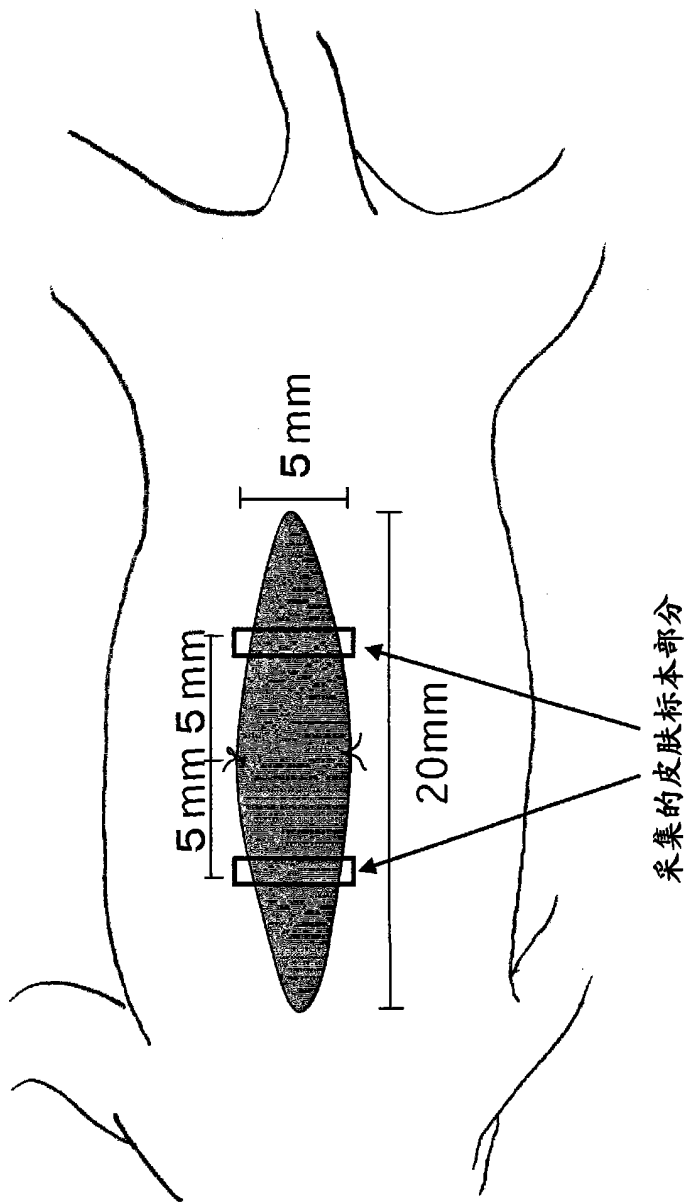


图 3

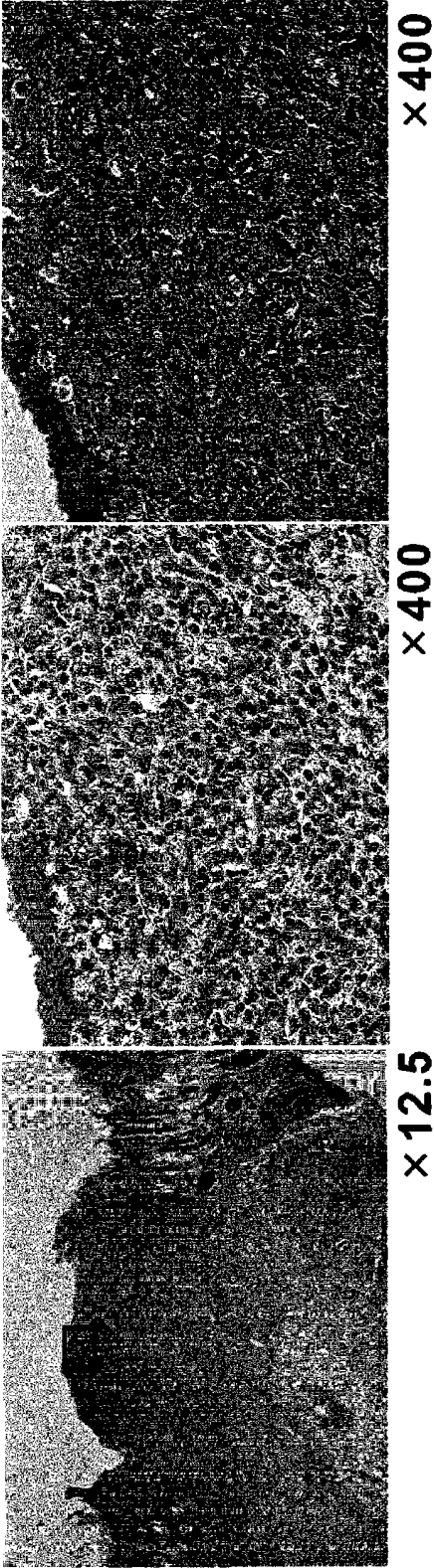
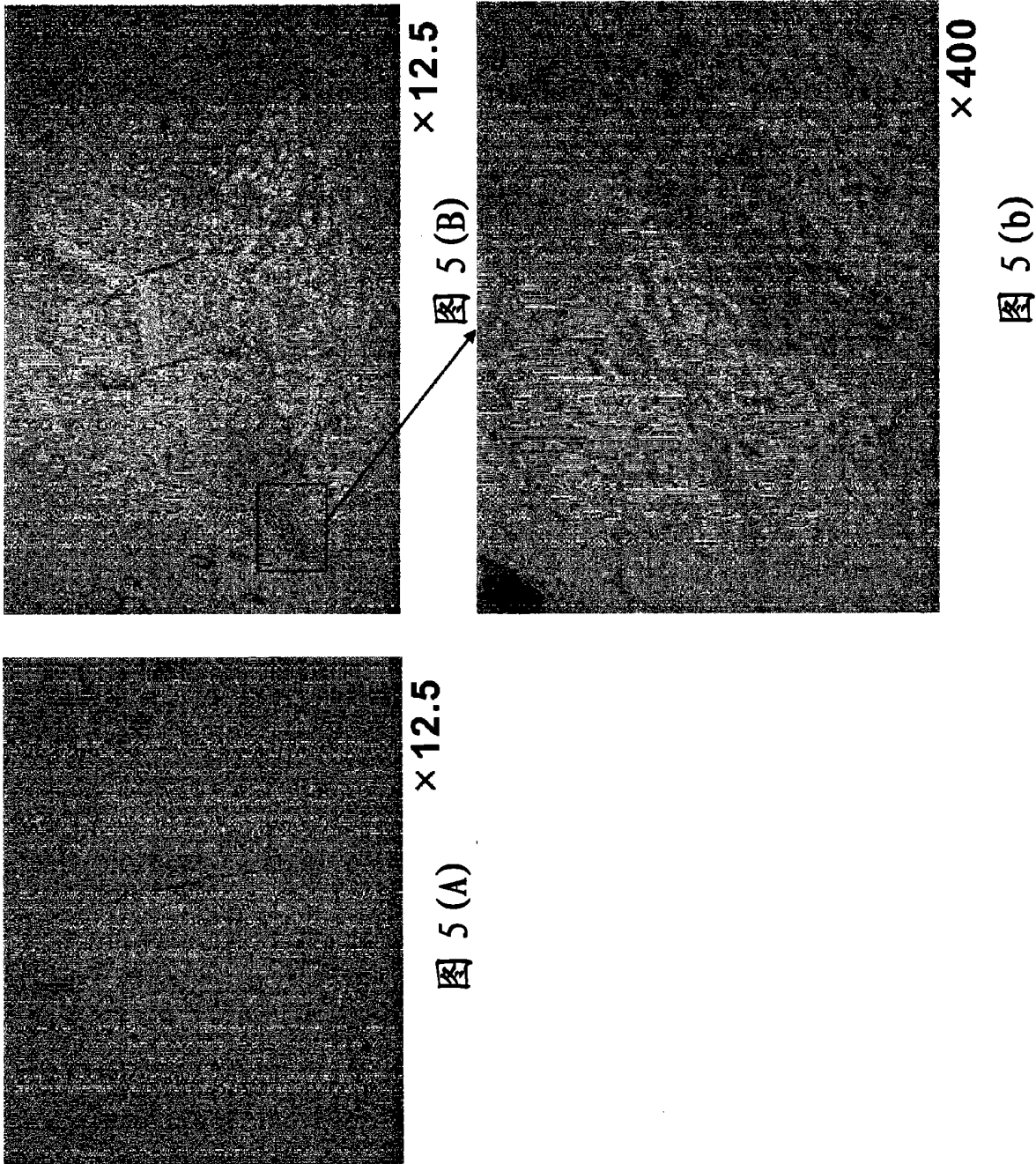


图 4 (A)



图 4 (B)



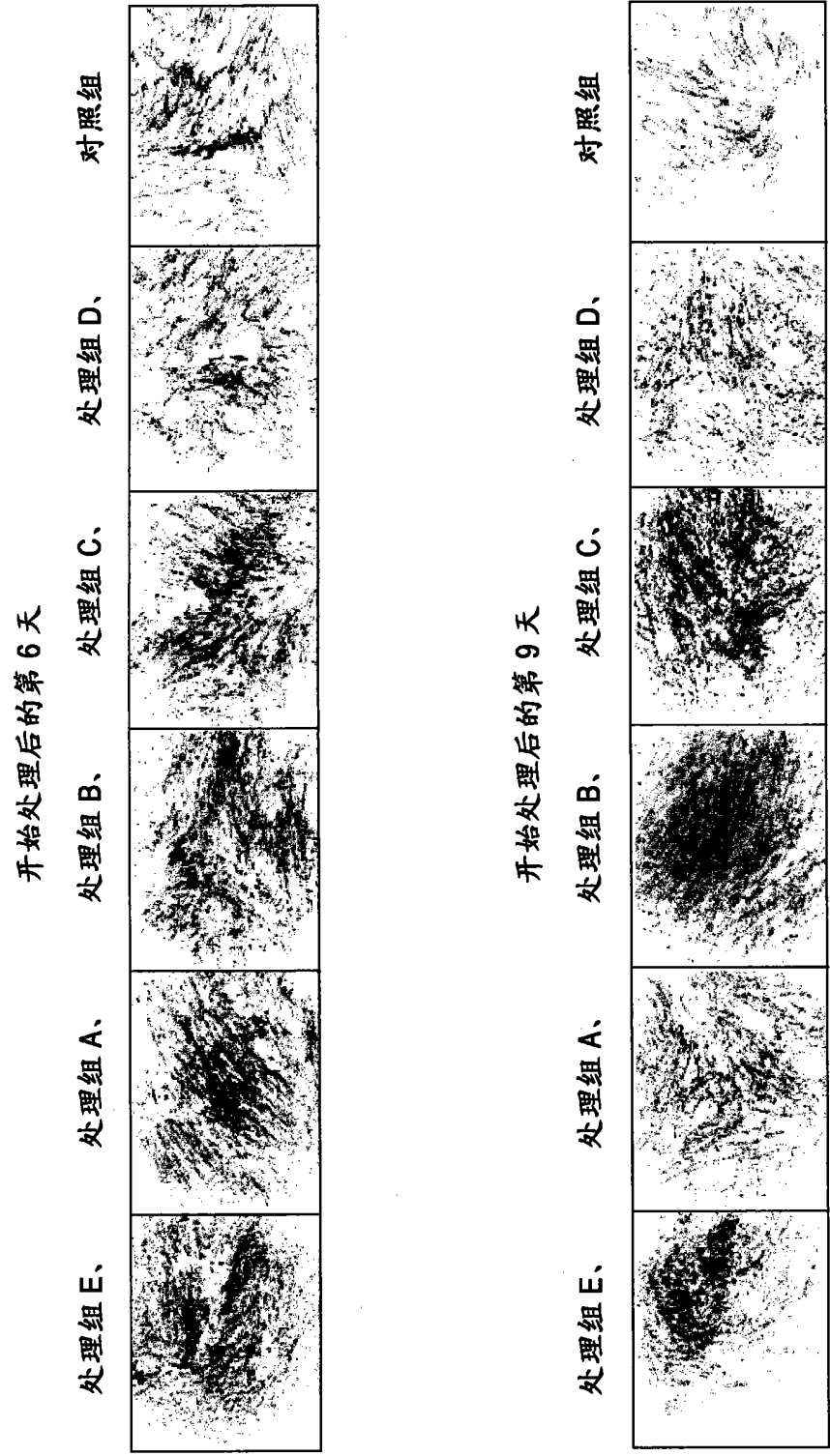


图 6

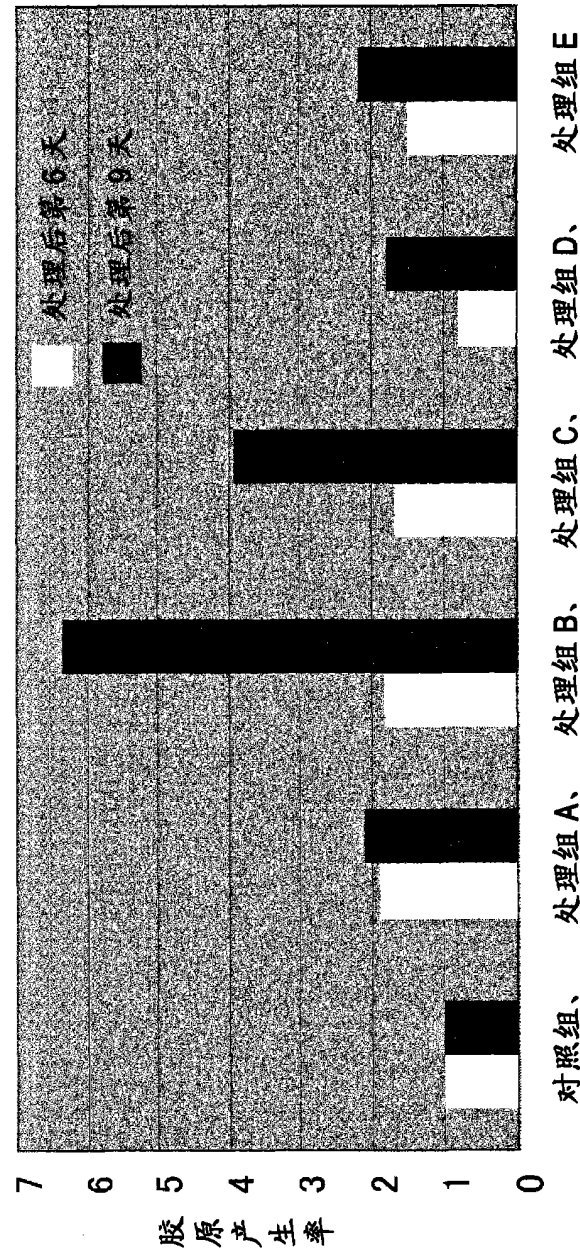


图 7