

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5917344号
(P5917344)

(45) 発行日 平成28年5月11日(2016.5.11)

(24) 登録日 平成28年4月15日(2016.4.15)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	D
A 6 1 Q 19/00	(2006.01)	A 6 1 Q 19/00	
GO 1 N 27/447	(2006.01)	GO 1 N 27/26	3 O 1 A
GO 1 N 33/50	(2006.01)	GO 1 N 27/26	3 1 5 J
		GO 1 N 33/50	Q

請求項の数 10 (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2012-193771 (P2012-193771)
 (22) 出願日 平成24年9月4日(2012.9.4)
 (65) 公開番号 特開2014-48253 (P2014-48253A)
 (43) 公開日 平成26年3月17日(2014.3.17)
 審査請求日 平成27年6月17日(2015.6.17)

(73) 特許権者 000000918
 花王株式会社
 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番1
 〇号
 (74) 代理人 110000084
 特許業務法人アルガ特許事務所
 (74) 代理人 100077562
 弁理士 高野 登志雄
 (74) 代理人 100096736
 弁理士 中嶋 俊夫
 (74) 代理人 100117156
 弁理士 村田 正樹
 (74) 代理人 100111028
 弁理士 山本 博人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 評価方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

角層ケラチン中のセリン残基のリン酸化量を指標とする、角層の保湿状態の評価方法。

【請求項 2】

角層ケラチン中のセリン残基のリン酸化量の指標が、角層ケラチン中のリン酸化セリン残基量である請求項 1 記載の評価方法。

【請求項 3】

角層ケラチンが、ケラチン K 1 又はケラチン K 1 0 である請求項 1 又は 2 記載の評価方法。

【請求項 4】

角層ケラチンが、ケラチン K 1 0 である請求項 3 記載の評価方法。

【請求項 5】

リン酸化セリン残基量の定量方法が、角層から抽出したタンパク質を試料とする免疫化学的方法である請求項 2 ~ 4 のいずれかに記載の評価方法。

【請求項 6】

リン酸化セリン残基量の定量方法が、リン酸化セリン残基に特異的な抗体を用いる免疫化学的方法である請求項 5 記載の評価方法。

【請求項 7】

リン酸化セリン残基量の定量方法が、抗フォスホセリン抗体と抗ケラチン抗体とを組み合わせて用いる免疫化学的方法である請求項 5 又は 6 記載の評価方法。

10

20

【請求項 8】

免疫化学的方法が、ウェスタンブロッティング法、ドットブロッティング法又は E L I S A 法のいずれかである請求項 5 ~ 7 のいずれかに記載の評価方法。

【請求項 9】

免疫化学的方法が、ウェスタンブロッティング法である請求項 8 記載の評価方法。

【請求項 10】

保湿剤の評価方法であって、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の評価方法により評価される角層の保湿状態を指標とする評価方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、角層の保湿状態を判断する新規評価方法に関し、さらには該評価方法を利用した保湿剤の評価方法に関する。

【背景技術】

【0002】

従来、保湿剤の評価方法として、下記方法が用いられている。In vitro 試験としては、(1) 被評価物質を一定湿度環境下に放置し、吸水された水の重量を測定することにより評価する方法、(2) 被評価物質を水に溶解し、一定環境下での水分の蒸散を重量測定により評価する方法(例えば、特許文献 1 参照)、(3) 水分活性を測定する方法(例えば、非特許文献 1 参照)が挙げられる。また、in vivo 試験としては、被評価物質を皮膚に塗布して、塗布前後の水分量を皮膚の電気的特性等で測定する方法(例えば、特許文献 2 参照)が挙げられる。しかし、皮膚化粧料や医薬品の皮膚外用剤に配合する保湿剤の作用部位は角層であるところ、上記 in vitro による方法では、評価物質そのものの吸水量を測定することは可能であるが、角層中における角層構成成分と相互作用する水の評価はできず、上記 in vivo による方法では、角層構成成分と相互作用する水を評価しているのか、評価物質と相互作用する水を評価しているのかの判別ができなかった。

20

【0003】

これに対し、本出願人は特許文献 3 で、角層構成成分と相互作用する水を、I R スペクトル分析を用いて評価することで、角層の保湿状態を評価できることを報告した。この手法を利用して、天然保湿因子である乳酸カリウムが、角層構成成分であるケラチンのセリン残基の水酸基と水の相互作用を増加させることにより、角層において保湿作用を示すことも報告した(非特許文献 2)。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献 1】特開 2002 - 60335 号公報

【特許文献 2】特開 2007 - 45776 号公報

【特許文献 3】特開 2010 - 256104 号公報

【非特許文献】

【0005】

40

【非特許文献 1】フレグランスジャーナル臨時増刊 No. 9 フレグランスジャーナル出版、1988年 p. 137

【非特許文献 2】Experimental Dermatology, 20, 826-831, 2011

【非特許文献 3】Journal of Biological Chemistry, 263, 13333-13339, 1988

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

ケラチンのセリン残基の水酸基に関しては、その一部がリン酸化されていることが知られているが(非特許文献 3)、角層の保湿において重要となる角層構成成分と水との相互作用において、ケラチンのセリン残基の水酸基が具体的にどのように関わっているかは不明

50

であった。

上記実情において、角層構成成分と水との相互作用において重要な役割を担っていると思われるケラチンのセリン残基の状態に基いて、角層の保湿状態を評価する方法の開発が求められていた。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者等は上記実情に鑑み、鋭意研究した結果、角層構成成分であるケラチン中のセリン残基のリン酸化量と角層水分量に相関があること、角層構成成分と水との相互作用と角層構成成分のリン酸化が密接に関わっていることを見出し、本発明を完成したものである。

10

【0008】

即ち、本発明は、角層ケラチン中のセリン残基のリン酸化量を指標とする、角層の保湿状態の評価方法を提供するものである。

また、本発明は、保湿剤の評価方法であって、上記の方法により評価される角層の保湿状態を指標とする評価方法を提供するものである。

【発明の効果】

【0009】

本発明の方法により、角層構成成分と水との相互作用において重要な役割を担っていると思われる角層ケラチン中のセリン残基の状態に基いて角層の保湿状態が評価可能となり、該方法を用いることで、角層構成成分と相互作用する水の量が反映された保湿剤の評価が可能となる。

20

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】角層水分量とケラチンK10中のリン酸化セリン残基量の相関関係を示す図である。

【図2】角層硬さとケラチンK10中のリン酸化セリン残基量の相関関係を示す図である。

【図3】角層の脱リン酸化処理とケラチンと水の相互作用の関連性を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明の評価方法では、角層ケラチン中のセリン残基のリン酸化量を角層の保湿状態の指標として用いる。角層のタンパク質の主成分はケラチンであり、ヒト皮膚で発現しているケラチンは様々な分子種が報告されているが、角層において存在するものであればいずれの分子種を本発明の評価方法において利用することが可能である。角層中に存在する具体的な分子種として、ケラチンK10、K1、K11、K9、K2e、K5、K14、K15、K6a、K16、K6b、K17、K7、K19等が挙げられる。これらのうち本発明の評価方法では、角層に相対的に多く存在しているケラチンK10又はケラチンK1を用いるのが好ましく、特にケラチンK10が好ましい。

30

【0012】

角層ケラチン中のセリン残基のリン酸化量の測定方法は、特に限定されず従来公知の方法を用いることができる。具体的には、抗フォスフォセリン抗体を用いたウェスタンブロット法、ドットプロット法又はELISA法等の免疫化学的方法、ラマン分光スペクトルやIRスペクトル等におけるリン酸基特異的なピークを利用して測定する分光学的方法、その他、液体クロマトグラフィー、キャピラリー電気泳動等やリン酸を測定するキットを用いた計測方法が挙げられる。これらのうち、角層ケラチン中のセリン残基のリン酸化量を、角層ケラチン中のリン酸化セリン残基量として測定するのが好ましく、さらに免疫化学的方法が好ましく、さらにリン酸化セリン残基に特異的な抗体、例えば抗フォスフォセリン抗体を用いる免疫化学的方法が好ましく、特に抗フォスフォセリン抗体と抗ケラチン抗体とを組み合わせる免疫化学的方法が好ましい。また、当該免疫化学的方法としては、抗フォスフォセリン抗体と抗ケラチン抗体とを組み合わせることにより、ケラチン

40

50

中のセリン残基のリン酸化量が、分子種特異的（例えばケラチンK10やケラチンK1等）にも測定できることから、ウェスタンブロット法を用いるのが好ましい。

【0013】

本発明の評価方法に供する角層は、様々な形態のものを使用することが可能であり、例えば、皮膚から粘着テープやシアノアクリレートにより剥離した角層や、メス等により切取した踵等の足裏の角層を用いることができる。また、角層中のタンパク質の主成分はケラチンであることから、角層から抽出したタンパク質を角層ケラチンとして用いることができる。

【0014】

角層ケラチン中のセリン残基のリン酸化量、好ましくは角層ケラチン中のリン酸化セリン残基量は、角層水分量と正の相関性を有する。従って、コントロール（例えば、無処理時、保湿剤適用前、一定期間前等）の角層ケラチン中のリン酸化セリン残基量と、測定時（処理後、保湿剤適用後、一定期間経過後）の角層ケラチン中のリン酸化セリン残基量とを対比して、測定時のリン酸化セリン残基量が多い場合には、コントロールに比べて角質水分量が多いと判定することができる。

ここで、角層ケラチン中のリン酸化セリン残基量は、免疫化学的方法を用いた場合には、フォスフォセリン量/ケラチン量として得られるので、この値がコントロールに比べて高ければ、測定時の角質水分量がコントロールに比べて高いと判定できる。

【0015】

以下、免疫化学的方法、特にウェスタンブロット法を用いた場合を例に、本発明の評価方法を説明する。

【0016】

（角層からのタンパク質の抽出）

皮膚から採取された角層から定法によりタンパク質を抽出する。抽出条件については、特に限定されず、抽出溶媒、抽出時間等は採取した角層からのタンパク質の抽出効率に合わせて適宜最適化すればよい。

【0017】

（電気泳動及び膜への転写）

抽出したタンパク質を、定法に従ってアクリルアミドゲルで電気泳動し、次いでPVD F膜やニトロセルロース膜等のブロット膜に蛋白質を転写する。転写方法としては、電気転写等の方法が挙げられる。

【0018】

（免疫化学染色）

タンパク質を転写したブロット膜に抗フォスフォセリン抗体を処理し、免疫化学染色を行う。抗フォスフォセリン抗体は、角層ケラチン中のリン酸化セリン残基を認識する能力があれば、その由来に特に限定はなく、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもいずれでもよい。市販品が上市されているのでそれらを用いることが可能である。抗フォスフォセリン抗体処理後、酵素標識された2次抗体で処理し、次いで適当な発色基質を反応させて、抗フォスフォセリン抗体が認識したバンドを検出する。検出されたバンドは適当な方法によりそのバンド強度を測定する。

【0019】

バンド強度測定後、ブロット膜を洗浄してリプローブし、抗ケラチン抗体を用いて、上記と同様に処理してケラチンのバンドを検出し、そのバンド強度を測定する。用いる抗ケラチン抗体は、目的とするケラチンの分子種に応じて、各種市販品を使い分ければよい。

【0020】

抗フォスフォセリン抗体によるブロット像と抗ケラチン抗体によるブロット像とを照合し、目的とするケラチン分子種のバンド強度（ケラチンバンド強度）と、対応する位置の抗フォスフォセリン抗体のバンド強度（フォスフォセリンバンド強度）から、フォスフォセリンバンド強度/ケラチンバンド強度を求め、これを角層ケラチン中の目的とするケラチン分子種のリン酸化セリン残基量の相対的な目安とする。

10

20

30

40

50

【0021】

後述するように、フォスフォセリンバンド強度/ケラチンバンド強度の値は、角層水分量と相関しており、また角層ケラチンのリン酸化は角層ケラチンと水との相互作用に密接に関わっている。従って、本願の角層ケラチンのセリン残基のリン酸化量を指標とする角層の保湿状態の評価方法は、角層の保湿状態の有効な評価方法である。

【0022】

本発明の保湿剤の評価方法について説明する。本発明の評価方法は、上述した本発明の角層ケラチンのセリン残基のリン酸化量を指標として評価した角層の保湿状態に基いて保湿剤を評価する方法である。具体的には、被評価物質を角層に適用して、適用後の角層の保湿状態を、上述の本発明の評価方法に従って、適用前又は無処理角層の保湿状態と比較することにより行うことができる。または、各種の被評価物質を適用して、被評価物質間で角層の保湿状態を比較しても良い。角層に被評価物質を適用する際、角層として採取したものを使用する *in vitro* 系で行う場合、被評価物質を溶解させた溶液に角層を一定時間浸漬させれば良い。一方、*in vivo* 系で角層として腕や顔面等の角層を直接使用する場合は、適当な方法により被評価物質に浸漬させるだけでなく、塗布により処理することも可能である。評価に用いる角層は、そのままでも良いが、被評価物質による効果を判定しやすくするため、角層の保湿状態を低下させることが知られている処理を、予め評価に用いる角層に対して施しておいてもよい。また、角層の保湿状態を低下させる処理と同時に被評価物質を適用し、保湿状態の低下を抑制するという観点から被評価物質の保湿能力を判定してもよい。角層の保湿状態を低下させる処理としては、角層中の天然保湿因子(NMF)を抽出する処理である水抽出処理等が挙げられる。

【0023】

次に本発明及び好ましい実施態様を例示する。

<1>角層ケラチンのセリン残基のリン酸化量を指標とする、角層の保湿状態の評価方法。

【0024】

<2>角層ケラチンのセリン残基のリン酸化量の指標が、角層ケラチン中のリン酸化セリン残基量である<1>の評価方法。

<3>角層ケラチンが、ケラチンK1又はケラチンK10である<1>又は<2>の評価方法。

<4>角層ケラチンが、ケラチンK10である<1>~<3>の評価方法。

<5>リン酸化セリン残基量の定量方法が、角層から抽出したタンパク質を試料とする免疫化学的方法である<2>~<4>の評価方法。

<6>リン酸化セリン残基量の定量方法が、リン酸化セリン残基に特異的な抗体を用いる免疫化学的方法である<5>の評価方法。

<7>リン酸化セリン残基量の定量方法が、抗フォスフォセリン抗体と抗ケラチン抗体とを組み合わせる免疫化学的方法である<5>又は<6>の評価方法。

<8>免疫化学的方法が、ウェスタンブロッティング法、ドットブロッティング法又はELISA法のいずれかである<5>~<7>の評価方法。

<9>免疫化学的方法が、ウェスタンブロッティング法である<8>の評価方法。

<10>保湿剤の評価方法であって、<1>~<9>の評価方法により評価される角層の保湿状態を指標とする評価方法。

【実施例】

【0025】

以下、実施例によって本発明を詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0026】

試験例1(角層水分量と角層ケラチンのリン酸化量の相関)

健常男性40名を被験者として、角層水分量と角層ケラチンのリン酸化量の相関を以下に従って調べた。

10

20

30

40

50

角層水分量は、被験者の前腕屈側部を被験部位とし、スキンアナライザー（Model 3510；River Diagnostics BV社製）を用いて測定した。次いでその測定部位の角層を粘着テープで剥離し、尿素、SDS及びβ-メルカプトエタノールを含有する抽出溶媒に剥離した角層を粘着テープごと浸漬し、角層からタンパク質を抽出した。抽出したタンパク質を、常法に従い電気泳動し（SDS-PAGE）、PVDF膜に電気転写してウェスタンブロットティングに供した。

最初に、一次抗体としてマウス抗フォスホセリン抗体（Fitzgerald社製）、二次抗体として抗マウスIgG-ホースラッディシュパーオキシデース標識複合体（ヤギ由来：PIERCE社製）を反応させた後、Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate（PIERCE社製）を用いて発色させ、セリンがリン酸化されたタンパク質のバンドを検出した。次にこの転写膜の抗体を0.1Mグリシン-HClバッファー（pH 2.2）で洗浄し、リプローブした。次に、一次抗体としてウサギ抗ケラチンK10抗体（Abcam社製）、二次抗体として抗ウサギIgG-パーオキシデース標識複合体（ヤギ由来：PIERCE社製）を反応させた後、Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate（PIERCE社製）を用いてケラチンK10のバンドを検出した。ケラチンK10のバンド部分に相当するリン酸化セリンのタンパク質バンドの強度及びケラチンK10バンドの強度を解析ソフトMulti Gauge（富士フィルム社製）により数値化し、リン酸化セリンバンド強度/ケラチンK10バンド強度の値を算出し、この値をケラチンK10中のリン酸化セリン残基量の指標として、角層水分量との相関を検討した。

【0027】

角層水分量とケラチンK10中のリン酸化セリン残基量の相関を図1に示す。角層水分量とケラチンK10中のリン酸化セリン残基量は有意な正相関を示すことが分かった。このことは、ケラチンK10中のセリンのリン酸化量が増加すると角層水分量が増加することを示しており、角層ケラチンのセリンのリン酸化が角層水分量にとって重要であることを示すものである。

【0028】

試験例2（角層の硬さと角層ケラチンのリン酸化量の相関）

健常男性40名を被験者として、角層の硬さと角層ケラチンのリン酸化量の相関を以下に従って調べた。

角層の硬さは、被験者の前腕屈側部を被験部位とし、ビーナストロンタクタイルセンサー（Axiom社製）を用いて測定した。次いでその測定部位の角層を粘着テープで剥離し、実施例1と同様にして、セリンがリン酸化されたタンパク質のバンド及びケラチンK10のバンドを検出し、リン酸化セリンバンド強度/ケラチンK10バンド強度の値を算出し、この値を指標として、ケラチンK10中のリン酸化セリン残基量と角層の硬さの相関を検討した。

【0029】

角層の硬さとケラチンK10中のリン酸化セリン残基量の相関を図2に示す。角層硬さ（f）とケラチンK10中のリン酸化セリン残基量は有意な負相関を示すことが分かった。fの値は硬い物質であるほど高い値を示す。従ってこの結果は、ケラチンK10中のセリンのリン酸化量が増加すると角層の硬さが減少（＝角層が柔軟化）することを示しており、角層ケラチンのセリンのリン酸化が角層の硬さにとって重要であることが分かった。一般に、角層の水分量が増加すると角層が柔軟化することが知られており、この結果は上記水分量の結果と矛盾するものではなかった。

【0030】

試験例3（脱リン酸化処理が角層ケラチンと水の相互作用へ及ぼす影響）

角層ケラチン中のリン酸基の脱リン酸化が角層ケラチンと水との相互作用に影響を及ぼすか否かを評価した。尚、角層ケラチンと水との相互作用については、特許文献3に記載されている評価方法により評価した。

ヒト踵からナイフで角層を採取した後、1～2mm角に細断し、下記溶液に24時間浸漬させた。

10

20

30

40

50

(1) クエン酸バッファー (pH 4.8) のみ (コントロール)

(2) 酸性フォスファターゼ (ジャガイモ由来、シグマ社製) 20 unit / 0.7 ml

(3) 熱処理 (80℃、2時間処理) した酸性フォスファターゼ (ジャガイモ由来、シグマ社製) 20 unit / 0.7 ml

【0031】

浸漬後、角層を真空デシケーター中で乾燥させた後、ATR-IRスペクトルを測定した。次いで、角層をおよそ100%の重水環境下に1時間静置し、重水置換処理を行った。処理後、再度ATR-IRスペクトルを測定した。

これら角層をデシケーターで乾燥させた後、ATR-IRでスペクトルを取得した。測定したスペクトル中、ケラチンのセリンに由来するピークである 1340 cm^{-1} の吸光度をアミドIの吸光度を基準として補正した。補正した 1340 cm^{-1} の吸光度をもとに、[重水置換後の吸光度 / 重水置換前の吸光度]を算出し、吸光度変化率とした。算出した吸光度変化率を、上記の各種処理間で比較した。尚、吸光度変化率が高い (= 重水置換されていない) ほど、水との相互作用が低いことを意味する。

【0032】

結果を図3に示す。活性のある酸性フォスファターゼで処理した角層では、即ち角層ケラチン中のリン酸基を脱リン酸化した角層では、吸光度変化率がコントロールの吸光度変化率と比較して有意に高かった。一方、熱処理により失活させた酸性フォスファターゼで処理した角層では、吸光度変化率はコントロールと同等であった。これらの結果から、角層ケラチン中のリン酸基の脱リン酸化により水とケラチンの相互作用が低下すること、言い換えれば、角層ケラチン中のリン酸化、具体的には角層ケラチン中のリン酸化される残基であるセリン残基のリン酸化が、水とケラチンの相互作用 (角層の保湿) に密接に関わっていることを示しており、角層ケラチンのセリン残基のリン酸化量が、角層の保湿状態の評価の指標となり得ることを示している。

【産業上の利用可能性】

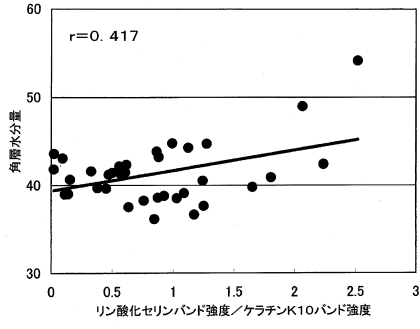
【0033】

本発明により、角層の保湿の本質である水とケラチンの相互作用に密接に関わる角層ケラチンのセリン残基のリン酸化に基いて角層の保湿状態を評価することが可能となり、これに基き、保湿剤の新しい評価方法を提供することが可能となる。

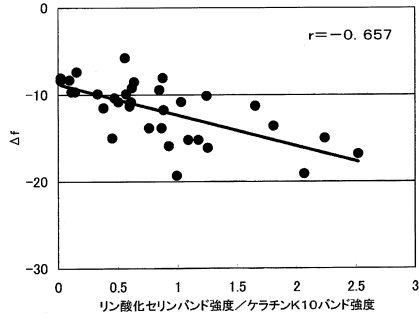
10

20

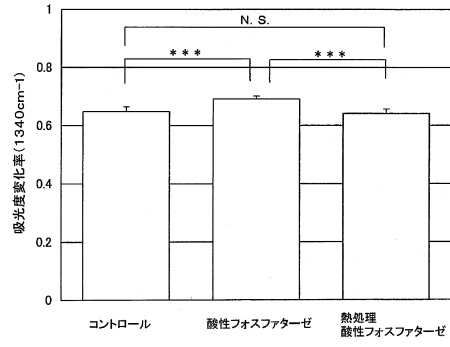
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



フロントページの続き

- (72)発明者 中川 典昭
神奈川県小田原市寿町5丁目3番28号 株式会社カネボウ化粧品内
- (72)発明者 酒井 進吾
神奈川県小田原市寿町5丁目3番28号 株式会社カネボウ化粧品内

審査官 大瀧 真理

- (56)参考文献 特開昭63-019013(JP,A)
特開2010-256104(JP,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48 - 33/98
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

专利名称(译)	评估方法
公开(公告)号	JP5917344B2 公开(公告)日 2016-05-11
申请号	JP2012193771 申请日 2012-09-04
[标]申请(专利权)人(译)	花王公司
申请(专利权)人(译)	花王公司
当前申请(专利权)人(译)	花王公司
[标]发明人	中川典昭 酒井進吾
发明人	中川 典昭 酒井 進吾
IPC分类号	G01N33/53 A61Q19/00 G01N27/447 G01N33/50
FI分类号	G01N33/53.D A61Q19/00 G01N27/26.301.A G01N27/26.315.J G01N33/50.Q G01N27/447.301.A G01N27/447.315.J
F-TERM分类号	2G045/CB09 2G045/DA35 2G045/DA36 2G045/FB03 4C083/CC02 4C083/EE07 4C083/EE12 4C083/EE50
代理人(译)	村田正树
其他公开文献	JP2014048253A
外部链接	Espacenet

摘要(译)

摘要：要解决的问题：提供一种基于角蛋白丝氨酸残基状态评价角质层防潮状态的方法。解决方案：在评价角质层的防潮状态的方法中，使用角质层角蛋白中的丝氨酸残基的磷酸化量作为指标。

(21) 出願番号	特願2012-193771 (P2012-193771)	(73) 特許権者	000000918
(22) 出願日	平成24年9月4日 (2012. 9. 4)		花王株式会社
(65) 公開番号	特開2014-48253 (P2014-48253A)		東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番10号
(43) 公開日	平成26年3月17日 (2014. 3. 17)	(74) 代理人	110000084
審査請求日	平成27年6月17日 (2015. 6. 17)		特許業務法人アルガ特許事務所
		(74) 代理人	100077562
			弁理士 高野 登志雄
		(74) 代理人	100096736
			弁理士 中嶋 俊夫
		(74) 代理人	100117156
			弁理士 村田 正樹
		(74) 代理人	100111028
			弁理士 山本 博人

最終頁に続く