

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開2022-27391
(P2022-27391A)

(43)公開日

令和4年2月10日(2022. 2. 10)

(51)Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 8/9728 (2017. 01)	A 6 1 K 8/9728	4 B 0 6 5
A 6 1 Q 5/00 (2006. 01)	A 6 1 Q 5/00	4 C 0 8 3
A 6 1 Q 5/02 (2006. 01)	A 6 1 Q 5/02	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/747 (2015. 01)	A 6 1 K 35/747	4 C 0 8 8
A 6 1 K 36/07 (2006. 01)	A 6 1 K 36/07	

審査請求 有 請求項の数 9 OL (全 17 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2020-192283(P2020-192283)	(71)出願人	519401712 オクスロ株式会社 東京都千代田区神田神保町三丁目10番4号
(22)出願日	令和2年11月19日(2020. 11. 19)	(74)代理人	110000729 特許業務法人 ユニアス国際特許事務所
(31)優先権主張番号	202010753830. 7	(72)発明者	堺 孝子 東京都千代田区神田神保町三丁目10番4号
(32)優先日	令和2年7月30日(2020. 7. 30)	(72)発明者	ヨン リー 東京都千代田区神田神保町三丁目10番4号
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)	(72)発明者	ジェームズ ウエイ 東京都千代田区神田神保町三丁目10番4号

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 髪の毛のダメージを修復し、頭皮の老化を遅らせる松茸発酵物、組成物及びその使用

(57)【要約】

【課題】本発明は、松茸の使用との技術分野に関し、具体的には、髪の毛のダメージを修復し、頭皮の老化を遅らせる松茸発酵物、組成物及びその使用に関する。

【解決手段】本発明はラクトバチルス・ペントーサスにより松茸菌糸体を発酵させて松茸発酵物を得る方法及び当該方法で得られる松茸発酵物、特に、ラクトバチルス・ペントーサス G U F H S L - 6 9 を利用して、松茸 T 3 5 菌株の菌糸体を発酵させることで得られる松茸発酵物を提供する。当該発酵物における低分子有効成分の含有量は顕著に向上し、有効成分は頭皮により吸収されやすく、優れる頭皮と髪に対する滋養機能を発揮でき、パーマやカラーリングなどにより損傷した髪を修復し、頭皮の老化を遅らせることに使用できる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ラクトバチルス属細菌で松茸を発酵させることを含むことを特徴とする松茸発酵物の調製方法。

【請求項 2】

前記ラクトバチルス属細菌はラクトバチルス・ペントーサスであり、好ましくは、前記ラクトバチルス属細菌は、受託番号が CCTCC NO : M 2016001 であるラクトバチルス・ペントーサス GUFHSL - 69 であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記松茸は松茸菌糸体であり、好ましくは、前記松茸は、受託番号が CCTCC NO : M 2014671 である松茸 T35 菌株であることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記発酵の培地は、松茸と、炭素源と、窒素源とを含み、前記培地において、松茸と窒素源の質量比は 1 : (8 ~ 160) であり、好ましくは、前記培地において、松茸と炭素源の質量比は 1 : (5 ~ 100) であり、より好ましくは、前記培地において、前記松茸の質量体積百分率は 0 . 1 ~ 10 % であることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記炭素源は、糖を含み、前記窒素源は、有機窒素源を含み、好ましくは、前記炭素源は、グルコース、リボース、ラクトース、ガラクトース、フラクトース、スクロース、マルトース、マンノース、トレハロース、マンニトール、ソルビトールから選択される 1 種又は複数種であり、前記有機窒素源は、ペプトン、ラブ・レムコ末、酵母エキス粉末から選択される 1 種又は複数種であることを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記発酵の培地は、松茸 0 . 1 ~ 10 %、グルコース 5 ~ 30 %、ペプトン 5 ~ 15 %、ラブ・レムコ末 5 ~ 15 %、酵母エキス粉末 2 ~ 8 %、リン酸二カリウム 0 . 1 ~ 0 . 5 %、硫酸マグネシウム 0 . 1 ~ 0 . 5 %、硫酸マンガン 0 . 1 ~ 0 . 3 % といった質量体積百分率の成分を含み、好ましくは、前記ラクトバチルス属細菌を前記培地に接種して、25 ~ 40 で発酵し、より好ましくは、前記ラクトバチルス属細菌の接種量は $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ cfu / ml 前記培地であり、前記発酵は 12 ~ 72 h の静置発酵であることを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法により調製された松茸発酵物。

【請求項 8】

頭皮と髪に用いる組成物であって、質量比が (5 ~ 1) : 1 である松茸発酵物とオキナワモズク抽出物を含み、前記松茸発酵物は請求項 7 に記載の松茸発酵物であることを特徴とする前記組成物。

【請求項 9】

頭皮と髪のケア製品の調製における、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法、或いは請求項 7 に記載の松茸発酵物、或いは請求項 8 に記載の組成物の使用。

【請求項 10】

請求項 7 に記載の松茸発酵物又は請求項 8 に記載の組成物を含み、好ましくは、前記製品は洗髪製品又はヘアケア製品であり、前記松茸発酵物の前記製品における質量百分率は 0 . 5 ~ 15 % であることを特徴とする頭皮と髪のケア製品。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】**

10

20

30

40

50

【 0 0 0 1 】

本発明は、松茸の使用との技術分野に關与し、具体的には、松茸発酵物の調製方法、当該調製方法により調製された松茸発酵物、当該松茸発酵物を含む組成物及びその使用に關与する。

【 背景技術 】**【 0 0 0 2 】**

社会の発展と生活ペースの加速に伴い、人々の生活と仕事のプレッシャーの増加は、頭皮と髪に健康に悪影響を及ぼしている。また、近年、カラーリングやパーマをする人が増えてきているが、カラーリングやパーマは、髪や頭皮にダメージを与え、髪の毛の強度を低下させ、頭皮の老化を加速させる。髪と頭皮の健康に対する人々の懸念に因って、髪と頭皮に対して滋養・ケア機能を備える洗髪製品・ヘアケア製品を開発することは重要な意味を持つ。

10

【 0 0 0 3 】

松茸 (*Tricholoma matsutake*) は、学名がトリコロマ・マツタケであり、「松茸、合菌、台菌」とも呼ばれ、担子菌門、キシメジ科に属し、松やクヌギなどの樹木と相利共生する外生菌根菌であり、独特の濃厚な香りを持つ。松茸は、さまざまな栄養素や機能性活性成分が豊富な野生の食用・薬用菌であり、キノコ中の珍宝とみなされ、「キノコの王様」や「山のダイヤモンド」という美称があり、抗腫瘍、免疫力の強化、血糖値の制御、コレステロールと血中脂質レベルの低下など、多くの生理機能を備えている。

20

【 0 0 0 4 】

現在、松茸は、直接使用されるか、または溶媒や超音波により有効成分を抽出して使用される場合が多く、例えば、中国特許出願 CN 1 0 2 1 4 0 1 4 2 A では、洗浄、破碎、脱脂、水浸、濃縮、およびアルコール抽出などの抽出ステップによってマツタケにおける多糖類成分を抽出する、純度の高いマツタケ多糖類の抽出プロセスが開示されている。従来技術において、松茸を生物学的に発酵させる高付加価値加工に関する研究や報道が少ないため、松茸の機能性成分の使用が制限されている。従って、松茸を生物学的に発酵させる高付加価値加工の方法の開発、特に髪と頭皮に対して滋養・ケア効果を持つ松茸発酵物の開発は、松茸の使用価値の向上、そして、髪のダメージや頭皮の老化などの髪や頭皮の問題の緩和にとって重要な意味を持っている。

30

【 発明の概要 】**【 発明が解決しようとする課題 】****【 0 0 0 5 】**

本発明の目的は、松茸発酵物の調製方法、及び当該方法により調製された松茸発酵物を提供することであり、本発明の別の目的は、当該松茸発酵物の組成物及びその使用を提供することである。

【 0 0 0 6 】

本発明は、頭皮と髪を滋養・ケアし、傷んだ髪を修復する機能を有する松茸由来製品を得ることを目的とし、微生物を利用して松茸を発酵させ、松茸における有効成分を放出させ、さらに松茸における吸収・利用されにくい高分子有効成分を分解することで、松茸発酵物の頭皮と髪を滋養し、傷んだ髪を修復し、頭皮の老化を遅らせる作用を向上させる。

40

【 課題を解決するための手段 】**【 0 0 0 7 】**

具体的には、本発明の技術案は、以下のとおりである。

【 0 0 0 8 】

まず、本発明は、ラクトバチルス属細菌で松茸を発酵させることを含む松茸発酵物の調製方法を提供する。

【 0 0 0 9 】

本発明は研究過程において、発酵菌株が、松茸の発酵後の発酵物における有効成分の組成、含有量、及びその頭皮における経皮吸収効率や利用効率を大きく影響し、適切な発酵

50

菌株は、成長と代謝において松茸の成分による阻害を少なく受けるべきであり、これにより、松茸の構造及びその中の高分子有効物質を分解する機能を有し、さらに松茸を含む発酵システムで上記の機能を効果的に発揮できることを見出した。本発明は、発酵菌株に対する持続的なスクリーニングや検証により、松茸を含む発酵システムで迅速に成長・増殖でき、高い代謝活性を有し、松茸を効果的に分解して有効成分を放出させ、そして、発酵物の頭皮と髪を滋養し、傷んだ髪を修復し、頭皮の老化を遅らせる作用を向上させる発酵菌株を発見した。

【0010】

以上の方法に記載のラクトバチルス属細菌は、好ましくはラクトバチルス・ペントーサスである。

【0011】

本発明の好ましい一実施態様として、前記ラクトバチルス属細菌は、受託番号が CCTCC NO: M 2016001 であるラクトバチルス・ペントーサス (*Lactobacillus pentosus*) GUFHSL - 69 菌株である。

【0012】

ラクトバチルス・ペントーサス GUFHSL - 69 菌株は、既に中国発明特許 CN 105969680 B に開示されており、当該菌株は、貴州の伝統料理である発酵米麺から分離されたものであり、2016年1月4日付で中国典型培養物保蔵センター（略称：CCTCC、寄託機関の住所：中国、武漢、武漢大学、受託番号：CCTCC NO: M 2016001）に寄託された。中国特許 CN 105969680 B では、当該菌株がコレステロールと亜硝酸塩を低下させる機能を持つことが開示されているが、本発明において、同じ属、同じ種または性能の近い他の菌株と比較して、当該菌株が、松茸を含む発酵システムで迅速に成長・増殖でき、高い代謝活性を有し、松茸を効果的に分解して有効成分を十分に放出させ、発酵物の頭皮と髪を滋養し、傷んだ髪を修復し、頭皮の老化を遅らせる作用を向上させることが予期せずに発見された。

【0013】

以上に記載の松茸は、松茸のいかなる部位、例えば、松茸の子実体や菌糸体に由来してもよい。松茸の子実体と比較して、松茸の菌糸体は生物学的発酵などの再生可能な方法で入手でき、かつ有効成分の含有量が高い。本発明に記載の松茸は、好ましくは、松茸菌糸体である。

【0014】

本発明において、松茸は発酵システムにおいて発酵基質として使用され、松茸菌糸体は不活化処理をしてから発酵システムに添加する必要がある。

【0015】

本発明に記載の松茸菌糸体は、好ましくは受託番号が CCTCC NO: M 2014671 である松茸 (*Tricholoma matsutake*) T35 菌株の菌糸体である。ラクトバチルス・ペントーサス GUFHSL - 69 を利用して、以上に記載の方法により、松茸 T35 菌糸体を発酵させて得られる発酵物は、低分子有効成分が豊富で、頭皮での経皮吸収性が良好で、より優れた頭皮と髪を滋養し、傷んだ髪を修復し、頭皮の老化を遅らせる機能を有する。

【0016】

受託番号が CCTCC NO: M 2014671 である松茸 (*Tricholoma matsutake*) T35 菌株は、すでに中国特許 CN 105039170 A により開示され、当該菌株は、生物学的発酵法により大量の菌糸体を得ることができる。松茸を発酵基質とすること以外にも、本発明に記載の発酵物の発酵基質は、発酵菌株によって利用される炭素源及び窒素源を含む。

【0017】

本発明は、発酵基質における松茸、窒素源、及び炭素源の割合（特に松茸と窒素源の割合）を合理的に制御することで、発酵菌株の成長をより良く促進できるとともに、発酵菌株の松茸およびその有効成分に対する分解活性を向上できることを見出した。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 8 】

以上に記載の発酵の培地は、松茸と、炭素源と、窒素源とを含み、前記培地において、前記松茸と前記窒素源の質量比は 1 : (8 ~ 1 6 0) である。

【 0 0 1 9 】

以上に記載の発酵の培地において、前記松茸と前記炭素源の質量比は 1 : (5 ~ 1 0 0) である。

【 0 0 2 0 】

以上に記載の発酵の培地において、前記松茸の質量体積百分率は 0 . 1 ~ 1 0 % である。本発明は、松茸の過剰な添加により、発酵物における有効成分の含有量がさらに増加することはなく、反って発酵菌株の代謝および分解活性に悪影響を及ぼしやすいことを見出した。

10

【 0 0 2 1 】

以上に記載の発酵の培地において、前記松茸の質量体積百分率 (g : m l) は、好ましくは 0 . 1 ~ 5 % である。

【 0 0 2 2 】

以上に記載の発酵培地の炭素源は、糖を含み、窒素源は、有機窒素源を含む。

【 0 0 2 3 】

具体的には、炭素源は、好ましくは、グルコース、リボース、ラクトース、ガラクトース、フラクトース、スクロース、マルトース、マンノース、トレハロース、マンニトール、ソルビトールから選択される 1 種又は複数種である。有機窒素源は、好ましくは、ペプトン、ラブ - レムコ末、酵母エキス粉末から選択される 1 種又は複数種である。

20

【 0 0 2 4 】

松茸及び発酵菌株とより良く配合できる、好ましい炭素源と窒素源の組み合わせについては、炭素源はグルコースであり、窒素源はペプトン、ラブ - レムコ末、酵母エキス粉末である。

【 0 0 2 5 】

以上に記載の発酵培地において、さらに無機塩等を含んでも良い。

【 0 0 2 6 】

具体的には、発酵培地は、以下のような成分 (g : m l) を含む：松茸 0 . 1 ~ 1 0 %、グルコース 5 ~ 3 0 %、ペプトン 5 ~ 1 5 %、ラブ - レムコ末 5 ~ 1 5 %、酵母エキス粉末 2 ~ 8 %、リン酸二カリウム 0 . 1 ~ 0 . 5 %、硫酸マグネシウム 0 . 1 ~ 0 . 5 %、硫酸マンガン 0 . 1 ~ 0 . 3 %。当該培地は、発酵菌株の成長・代謝活性を確保するとともに、発酵菌株による松茸基質の分解を促進して、頭皮と髪を滋養し、傷んだ髪を修復し、頭皮の老化を遅らせる機能を有する低分子有効成分を生成させることができる。

30

【 0 0 2 7 】

具体的には、前記方法は、前記ラクトバチルス属細菌を発酵培地に接種して、25 ~ 40 で発酵させることを含む。本発明では、発酵菌株が、高温条件に耐えて成長・発酵できるが、発酵温度を 25 ~ 40 に制御すると、発酵物における低分子有効成分の含有量を確保するのに、より有利であることが発見された。

【 0 0 2 8 】

以上に記載の発酵温度は、発酵菌株の適切な成長温度に応じて調整することができる。例えば、ラクトバチルス・ペントーサス G U F H S L - 6 9 について、発酵温度は、好ましくは 3 0 ~ 3 7 である。

40

【 0 0 2 9 】

以上に記載の発酵過程において、前記ラクトバチルス属細菌の接種量は $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ c f u / m l 前記培地であり、前記発酵は 1 2 ~ 7 2 h の静置発酵である。

【 0 0 3 0 】

本発明は、以下のステップを含む松茸発酵物の調製方法を提供する。

(1) ラクトバチルス・ペントーサス種液を調製する；

(2) ラクトバチルス・ペントーサスの種液を 1×10^7 c f u / m l 培地の接種量で上

50

述発酵培地に接種し、30～37 の二酸化炭素インキュベーターで36～48 h 静置発酵する；

(3) 滅菌した後、発酵液を固液分離して、分離された発酵上澄み液又は発酵上澄み液の乾燥物を、前記松茸発酵物とする。

【0031】

本発明は、さらに以上に記載の調製方法により調製された松茸発酵物を提供する。

【0032】

本発明は、頭皮と髪に対するケア効果をさらに向上させるために、以上に記載の松茸発酵物に基づき、当該松茸発酵物を含有する組成物をさらに開発した。本発明は、上述微生物発酵法により調製される松茸発酵物が、オキナワモズク(C L A D O S I P H O N O K A M U R A N U S)抽出物と相乗作用を発揮でき、両者の組み合わせにより、頭皮と髪に対する滋養・修復効果が顕著に向上することを見出した。

【0033】

この知見に基づき、本発明は、質量比が(5～1)：1である松茸発酵物とオキナワモズク(C L A D O S I P H O N O K A M U R A N U S)抽出物を含む、頭皮と髪に用いる組成物を提供する。当該質量比で併用することで、両者はより優れる相乗作用を発揮できる。

【0034】

オキナワモズク(C L A D O S I P H O N O K A M U R A N U S)抽出物と併用する松茸発酵物は、好ましくは受託番号がC C T C C N O : M 2 0 1 4 6 7 1である松茸(T r i c h o l o m a m a t s u t a k e) T 3 5の発酵物であり、両者は、明らかな相乗作用を発揮でき、より優れる頭皮と髪を滋養し、傷んだ髪を修復し、頭皮の老化を遅らせる機能を有する。

【0035】

本発明に記載のオキナワモズク抽出物は、当分野の常法により抽出して得られるか、又は市販で購入できる。

【0036】

さらに、本発明は、頭皮と髪のケア製品の調製における、前記調製方法、或いは前記松茸発酵物、或いは前記組成物の使用を提供する。

【0037】

本発明は、前記松茸発酵物又は前記組成物を含む製品を提供する。

【0038】

本発明に記載の製品は、好ましくは、洗髪製品又はヘアケア製品であり、シャンプー、ヘアトニック、染毛剤、コンディショナー、整髪料、ヘアクリーム、ヘアローションを含むが、これらに限定されるものではない。

【0039】

好ましくは、前記松茸発酵物の前記製品における質量百分率は0.1～15%である。

【0040】

本発明の一実施態様として、前記製品は洗髪製品であり、前記洗髪製品は、さらに当分野で許容される洗髪製品のベースを含む。

【0041】

好ましくは、前記ベースは、重量部が下記の通りの成分を含む：陰イオン界面活性剤10～20部、両性界面活性剤1～10部、ココミドM E A 0.5～5部、ナトリウムジリノレアミドプロピル P G - ジモニウムクロリドホスフェート0.1～3部、昆布抽出物0.1～2部、グアーヒドロキシプロピルトリモニウムクロリド0.1～2部、ステアラミドプロピルジメチルアミン0.1～2部、ポリクオタニウム1～6部、ココイル加水分解ダイズタンパク質0.1～0.5部、香料0.05～0.5部、防腐剤0.01～0.2部、脱イオン水40～80部。

【0042】

以上に記載の洗髪製品において、前記陰イオン界面活性剤は、好ましくは、ラウレス硫酸

10

20

30

40

50

アンモニウム、ミリストイルメチルタウリンナトリウム、ラウリル硫酸アンモニウムの1種又は複数種であり、前記両性界面活性剤は、好ましくは、ラウラミドプロピルベタイン、ジメチルドデシルベタイン、イミダゾリンの1種又は複数種であり、前記ポリクオタニウムは、好ましくは、ポリクオタニウム - 53 とポリクオタニウム - 47 の1種又は複数種である。

【発明の効果】

【0043】

本発明の有益な効果は、下記の通りである。

【0044】

1) 本発明は、微生物を利用して松茸菌糸体を発酵させ、松茸における頭皮と髪を滋養し、パーマやカラーリングなどにより損傷した髪を修復する等の機能を有する有効成分を十分に放出させ、松茸の有効成分の利用率を向上させる、松茸資源をより深く開発する新たな方法を提供する。

10

【0045】

2) 本発明は、微生物発酵により松茸菌糸体及びそれにおける高分子物質の効率的な分解を実現でき、得られた松茸発酵物は、頭皮での経皮吸収が可能な低分子有効成分が豊富で、頭皮と毛包の代謝に十分な栄養素を提供し、効果的に頭皮と髪を滋養し、損傷した髪を修復し、頭皮の老化を遅らせることができ、ヘアケア製品における使用価値が高く、頭皮と髪の健康問題の解決にとって重要な意味を持っている。

【0046】

3) 本発明は、松茸発酵物とオキナワモズク (CLADOSIPHON OKAMURANUS) 抽出物を配合することにより頭皮と髪に用いる組成物を得ており、当該組成物において、松茸発酵物とオキナワモズク (CLADOSIPHON OKAMURANUS) 抽出物が相乗的に作用して、頭皮と髪に対する滋養・修復効果をさらに向上させる。

20

【発明を実施するための形態】

【0047】

以下の実施例は、本発明を説明するためのものであり、本発明の範囲を制限するためのものではない。

【0048】

以下の実施例において、特に説明のない限り、使用される実験方法は、いずれも常法である。

30

【0049】

以下の実施例において、特に説明のない限り、使用される材料は、いずれも商業ルートから入手できるものである。以下の実施例及び比較例で使用される松茸菌糸体は、中国特許出願CN 102805281Bに開示された受託番号がCCTCC NO: M 2014671である松茸 (Tricholoma matsutake) T35菌株の菌糸体である。受託番号がCGMCC No. 1.12935であるラクトバチルス・プランタルム、受託番号がCGMCC No. 1.3637であるラクトバチルス・ペントーサス、及び受託番号がCGMCC No. 1.12935であるラクトバチルス・プランタルムは、中国微生物菌種寄託管理委員会普通微生物センター (China General Microbiological Culture Collection Center) から購入できる。

40

【0050】

以下の実施例で使用されるオキナワモズク抽出物は、XIYA BIOTECHNOLOGY CO., LIMITEDから購入したものである。

【0051】

実施例1

本実施例では、以下の方法により調製された松茸発酵物を提供する。

(1) ラクトバチルス・ペントーサスGUFHSL-69の種液の調製

ラクトバチルス・ペントーサスGUFHSL-69 (CCTCC NO: M 201600

50

1) を液体MRS培地に接種して、37 の二酸化炭素インキュベーターで20hインキュベートした。

4000r/min、4 の条件で10min遠心させて集菌し、最後に同体積のPBS保護剤(NaCl 0.8%、KH₂PO₄ 0.02%、Na₂HPO₄ 0.115%、トリプトン1%、及びグルタミン酸ナトリウム0.1%)で菌体を再懸濁させた。

(2) 発酵

ステップ(1)で得られた種液を 1×10^7 cfu/ml培地の接種量で発酵培地に接種して、37 の二酸化炭素インキュベーターで48h静置培養した。

発酵培地は、松茸菌糸体0.5%を含有する発酵培地であり、発酵培地の組成(質量体積百分率、g:ml)は、松茸菌糸体0.5%、グルコース10%、ペプトン8%、ラブ-レムコ末5%、酵母エキス粉末3%、リン酸二カリウム0.1%、硫酸マグネシウム0.2%、硫酸マンガン0.1%であった。

10

(3) 発酵物の抽出

発酵が完了した後、滅菌して、12000r/min、4 で20min遠心させ、上澄み液を取り出した。

【0052】

実施例2

本実施例では、以下の方法により調製された松茸発酵物を提供する。

(1) ラクトバチルス・ペントーサスGUFHSL-69の種液の調製

ラクトバチルス・ペントーサスGUFHSL-69(CCTCC NO:M 2016001)を液体MRS培地に接種して、37 の二酸化炭素インキュベーターで20hインキュベートした。

20

4000r/min、4 の条件で10min遠心させて集菌し、最後に同体積のPBS保護剤(NaCl 0.8%、KH₂PO₄ 0.02%、Na₂HPO₄ 0.115%、トリプトン1%、及びグルタミン酸ナトリウム0.1%)で菌体を再懸濁させた。

(2) 発酵

ステップ(1)で得られた種液を 1×10^7 cfu/ml培地の接種量で発酵培地に接種して、30 の二酸化炭素インキュベーターで48h静置培養した。

発酵培地は、松茸菌糸体2%を含有する発酵培地であり、発酵培地の組成(質量体積百分率、g:ml)は、松茸菌糸体2%、グルコース10%、ペプトン8%、ラブ-レムコ末5%、酵母エキス粉末3%、リン酸二カリウム0.1%、硫酸マグネシウム0.2%、硫酸マンガン0.1%であった。

30

(3) 発酵物の抽出

発酵が完了した後、滅菌して、12000r/min、4 で20min遠心させ、上澄み液を取り出した。

【0053】

実施例3

本実施例では、以下の方法により調製された松茸発酵物を提供する。

(1) ラクトバチルス・ペントーサスGUFHSL-69の種液の調製

ラクトバチルス・ペントーサスGUFHSL-69(CCTCC NO:M 2016001)を液体MRS培地に接種して、37 の二酸化炭素インキュベーターで20hインキュベートした；

40

4000r/min、4 の条件で10min遠心させて集菌し、最後に同体積のPBS保護剤(NaCl 0.8%、KH₂PO₄ 0.02%、Na₂HPO₄ 0.115%、トリプトン1%、及びグルタミン酸ナトリウム0.1%)で菌体を再懸濁させた。

(2) 発酵

ステップ(1)で得られた種液を 1×10^7 cfu/ml培地の接種量で発酵培地に接種して、30 の二酸化炭素インキュベーターで48h静置培養した。

発酵培地は、松茸菌糸体0.1%を含有する発酵培地であり、発酵培地の組成(質量体積百分率、g:ml)は、松茸0.1%、グルコース10%、ペプトン8%、ラブ-レムコ

50

末 5 %、酵母エキス粉末 3 %、リン酸二カリウム 0.1 %、硫酸マグネシウム 0.2 %、硫酸マンガン 0.1 %であった。

(3) 発酵物の抽出

発酵が完了した後、滅菌して、12000 r/min、4 で 20 min 遠心させ、上澄み液を取り出した。

【0054】

実施例 4

本実施例では、重量部が下記の通りの成分、即ち、実施例 1 の松茸発酵物 1.5 部、オキナワモズク (CLADOSIPHON OKAMURANUS) 抽出物 0.5 部からなる、頭皮と髪に用いる組成物を提供する。

【0055】

実施例 5

本実施例では、組成 (質量百分率) が、実施例 1 の松茸発酵物 2 %、シャンプーベース 98 % であるシャンプーを提供する。

ただし、シャンプーベースの組成 (質量百分率) は、以下の通りであった。

ラウレス硫酸アンモニウム 15 %、ミリストイルメチルタウリンナトリウム 3 %、ラウラミドプロピルベタイン 6 %、ステアラミドプロピルジメチルアミン 0.2 %、ココミド MEA 0.5 %、ポリクオタニウム - 47 2 %、昆布 (LAMINARIA JAPONICA) 抽出物 1 %、ココイル加水分解ダイズタンパク質 0.1 %、ナトリウムジリノレアミドプロピル PG - ジモニウムクロリドホスフェート 0.2 %、グアーヒドロキシプロピルトリモニウムクロリド 0.2 %、香料 0.1 %、ブチルカルバミン酸ヨウ化プロピニル 0.1 %、脱イオン水 72 %。

【0056】

実施例 6

本実施例では、組成 (質量百分率) が、実施例 2 の松茸発酵物 0.5 %、シャンプーベース 99.5 % であるシャンプーを提供する。

シャンプーベースの処方実施例 5 と同じである。

【0057】

実施例 7

本実施例では、組成 (質量百分率) が、実施例 3 の松茸発酵物 10 %、シャンプーベース 90 % であるシャンプーを提供する。

シャンプーベースの処方実施例 5 と同じである。

【0058】

実施例 8

本実施例では、組成 (質量百分率) が、実施例 4 の組成物 2 %、シャンプーベース 98 % であるシャンプーを提供する。

シャンプーベースの処方実施例 5 と同じである。

【0059】

比較例 1

松茸菌系体を取り、その重量の 6 倍の脱イオン水を加え、37 で抽出し、抽出時間を 12 h とした。濾過して上澄み液を取り、その重量の 2 倍のエタノールを添加して 30 で 36 h 静置沈殿させた。12000 r/min で 20 min 遠心させ、上澄み液を取り出した。

【0060】

比較例 2

本比較例では、松茸発酵物を提供するが、その調製方法と実施例 1 の相違点は、ラクトバチルス・ペントーサス GUFHSL-69 (CCTCC NO: M 2016001) を受託番号が CGMCC No. 1.10636 であるラクトバチルス・ペントーサスに置き換えたことだけであった。

【0061】

10

20

30

40

50

比較例 3

本比較例では、松茸発酵物を提供するが、その調製方法と実施例 1 の相違点は、ラクトバチルス・ペントーサス G U F H S L - 6 9 (C C T C C N O : M 2 0 1 6 0 0 1) を受託番号が C G M C C N o 1 . 3 6 3 7 であるラクトバチルス・ペントーサスに置き換えたことだけであった。

【 0 0 6 2 】

比較例 4

本比較例では、松茸発酵物を提供するが、その調製方法と実施例 1 の相違点は、ラクトバチルス・ペントーサス G U F H S L - 6 9 (C C T C C N O : M 2 0 1 6 0 0 1) を受託番号が C G M C C N o 1 . 1 2 9 3 5 であるラクトバチルス・プランタルムに置き換えたことだけであった。

【 0 0 6 3 】

比較例 5

本比較例では、シャンプーを提供するが、その組成（質量百分率）は、比較例 1 の松茸抽出物 2 %（実施例 5 のシャンプーと比較して、抽出と発酵に用いる松茸菌系体の質量が等しく、そして、抽出された上澄み液に、発酵上澄み液の体積と同様になるまでに水を加えた）、シャンプーベース 9 8 % であった。

シャンプーベースの処方は実施例 5 と同じである。

【 0 0 6 4 】

比較例 6

本比較例では、組成（質量百分率）が、比較例 2 の松茸発酵物 2 %、シャンプーベース 9 8 % であるシャンプーを提供する。

シャンプーベースの処方は実施例 5 と同じである。

【 0 0 6 5 】

比較例 7

本比較例では、組成（質量百分率）が、比較例 3 の松茸発酵物 2 %、シャンプーベース 9 8 % であるシャンプーを提供する。

シャンプーベースの処方は実施例 5 と同じである。

【 0 0 6 6 】

比較例 8

本比較例では、組成（質量百分率）が、比較例 4 の松茸発酵物 2 %、シャンプーベース 9 8 % であるシャンプーを提供する。

シャンプーベースの処方は実施例 5 と同じである。

【 0 0 6 7 】

比較例 9

本比較例では、組成（質量百分率）が、オキナワモズク（C L A D O S I P H O N O K A M U R A N U S）抽出物 2 %、シャンプーベース 9 8 % であるシャンプーを提供する。

シャンプーベースの処方は実施例 5 と同じである。

【 0 0 6 8 】

比較例 10

本比較例では、組成（質量百分率）が、実施例 1 の松茸発酵物 1 . 5 %、アナメ（A G A R U M C R I B R O S U M）抽出物 0 . 5 %、シャンプーベース 9 8 % であるシャンプーを提供する。

シャンプーベースの処方は実施例 5 と同じである。

【 0 0 6 9 】

実験例 1 松茸発酵物における低分子ペプチドの含有量の分析

本実験では、実施例 1 ~ 3 及び比較例 1 ~ 4 の松茸発酵物又は松茸抽出物における低分子有効成分の含有量を、具体的に以下のように分析した。

実施例 1 ~ 3 の松茸発酵物及び比較例 1 の松茸抽出物、比較例 2、3 及び 4 の松茸発酵物を取り、分画分子量が 1 0 0 0 である濾過膜を採用して濾過した後、クーマシーブリリア

10

20

30

40

50

ントブルーキットにより濾液における低分子ペプチドの含有量を測定した。

【 0 0 7 0 】

低分子ペプチドの含有量の測定結果を表 1 に示した。表 1 の結果から明らかなように、実施例 1 の松茸発酵物における低分子ペプチドの含有量は、比較例 1 の松茸抽出物、ならびに、比較例 2、3 及び 4 の松茸発酵物より顕著に高く、これは、実施例 1 ~ 3 の調製方法を採用することで、松茸菌糸体における低分子ペプチドをより十分に放出させることができることを示している。

【表 1】

表 1 低分子ペプチドの含有量

	低分子ペプチドの含有量 (発酵又は抽出された菌糸体が 1 g である場合)
実施例 1	2.5 mg
実施例 2	2.2 mg
実施例 3	2.1 mg
比較例 1	1.1 mg
比較例 2	1.5 mg
比較例 3	1.3 mg
比較例 4	1.3 mg

【 0 0 7 1 】

実験例 2 松茸発酵物の頭皮滋養・保湿効果の分析

本実験例は、実施例 1 ~ 3 及び比較例 1 ~ 4 の松茸発酵物の頭皮滋養・保湿効果を、具体的に以下の方法により分析した。

パネラー 70 名を選択して、群あたり 10 名として 7 群に分け、頭皮において 5 * 5 cm を選択して髪を削げ、実験用の頭皮を露出させ、ドイツの C K 社製の皮膚水分量計 C o r n e o m e t e r C M 8 2 5 により、上述の実施例 1 ~ 3 の松茸発酵物、並びに、比較例 1 の松茸抽出物及び比較例 2 ~ 4 の松茸発酵物を、露出した頭皮に使用した。使用を開始する前に、皮膚水分量計により、一定の温度と一定の湿度(21 と 40 % 湿度)の条件で、各被験者の頭皮の水分含有量を測定し、使用した後の初期値(T0)、及び使用した 30 分(T1)後と 8 時間(T2)後の頭皮の水分含有量の変化を測定し、その測定結果を表 2 に示した。表 2 の測定結果から明らかなように、実施例 1 ~ 3 の松茸発酵物を使用する場合、使用した 30 min 後の皮膚の水含有量は、比較例 1 ~ 4 と比べた顕著に高くなっており、そのうち、実施例 1 の効果は最も良好であり、これは、松茸発酵物が、頭皮を滋養・保湿でき、頭皮に十分な水分を与え、頭皮の老化を遅らせることを示している。

【表 2】

表 2 頭皮の水分含有量の検測

実施例／比較例	T0-初期値 (%)	T1-30min (%)	T2-8h (%)
実施例 1	34.3	47.6	47.2
実施例 2	34.9	46.6	46.3
実施例 3	35.1	46.0	45.7
比較例 1	35.1	38.2	37.9
比較例 2	35.2	43.9	43.3
比較例 3	35.6	43.6	43.2
比較例 4	35.3	39.6	39.2

【0072】

実験例 3 シャンプーのパーマやカラーリングによって損傷した髪に対する修復効果の実験

実施例及び比較例のシャンプーのパーマやカラーリングにより損傷した髪に対する修復効果を検証するため、25 - 60歳の過去1年間にパーマやカラーリングをして、髪がパーマやカラーリングの過程で損傷したパネラー100名を選択して、群あたり10名として10群に分け、それぞれ実施例5～8及び比較例5～10のいずれかのシャンプーを提供し、使用時間を2ヶ月、使用頻度を、2日おきに1回使用するにして、当該シャンプーの髪を強化する効果を検討した。実験を開始する前に、パネラーの髪の破断強度を測定し、シャンプーを2ヶ月使用した後、髪の破断強度を測定して、髪の強度の変化を比較した。実験では、インストロン5565万能材料試験機により髪の強度を測定した。具体的な測定方法は、測定しようとする髪のサンプルを取り、まず、温度 20 ± 2 、相対湿度 $65 \pm 3\%$ の大気雰囲気中で24h平衡化した後、当該大気雰囲気中で、髪チャック部長さ150mm、引張速度500mm/minで測定を行い、パネラー一人あたり20本の髪サンプルに対してそれぞれ測定を行って、各群のパネラーの平均値を取るであった。その結果を表3に示した。

【表 3】

表 3 髪の破断強度

破断強度 (cN/dtex)	実施例				比較例					
	5	6	7	8	5	6	7	8	9	10
使用前	1.27	1.29	1.26	1.25	1.29	1.32	1.35	1.32	1.27	1.26
使用后	1.57	1.5	1.45	1.63	1.38	1.46	1.5	1.43	1.30	1.53
使用前後の強度の 向上率 (%)	23	16	15	30	7.0	10.6	0.11	8.3	2.3	21

【0073】

表3の結果から明らかなように、実施例5～8のシャンプーのパーマやカラーリングにより損傷した髪に対する修復効果は、比較例5～10より顕著に優れており、これは、実施例1～3の松茸発酵物及び実施例4の組成物が、パーマやカラーリングにより損傷した髪の強度を顕著に向上させることができることを示している。

20

30

50

【 0 0 7 4 】

実験例 4 シャンプー試用効果の実験

各実施例及び比較例のシャンプーの髪・頭皮に対する滋養効果を検証するため、25 - 60歳のパネラー100名を選択して、群あたり10名として10群に分け、それぞれ実施例5～8及び比較例5～10のいずれかのシャンプーを提供し、使用時間を2ヶ月、使用頻度を、2日おきに1回使用するにして、当該シャンプーの指通り、柔軟性、保湿性、かゆみ止め、及び汚れ除去効果を測定した。測定した性能を6つのレベルに設定した。具体的には、6は極めて良好を、5は良好を、4はやや良好を、3は普通を、2はやや不良を、1は不良を示す。各群のパネラーの測定結果の平均値を取り、測定指標と結果を表4に示した。

10

【表4】

表4 シャンプーの試用効果

測定項目	実施例				比較例					
	5	6	7	8	5	6	7	8	9	10
指通り	5.5	5.3	5.2	5.8	3.8	4.5	4.6	4.2	2.3	5.3
柔軟性	5.6	5.4	5.3	5.8	3.9	4.3	4.3	4.1	2.6	5.4
保湿性	5.5	5.3	5.1	5.7	4.0	4.7	4.6	4.3	3.0	5.3
かゆみ止め効果	5.3	5.2	5.1	5.6	3.7	4.6	4.5	4.2	2.7	5.2
汚れ除去効果	5.5	5.2	5.0	5.6	3.9	4.5	4.5	4.2	2.5	5.1

【 0 0 7 5 】

表4の結果から明らかなように、実施例5～8のシャンプーは、指通り、柔軟性、保湿性、かゆみ止め、及び汚れ除去効果における試用効果が、比較例5～10より顕著に優れており、これは、実施例1～3の松茸発酵物及び実施例4の組成物が、シャンプーの洗髪効果を顕著に向上でき、頭皮及び髪に対して効果的な滋養、保湿および抗菌等のケア効果を発揮でき、髪の質と健康状態を顕著に改善できることを示している。

30

【 0 0 7 6 】

上記において、一般的な説明及び具体的な実施形態で本発明を詳しく説明したが、本発明に基づき、いくつかの補正や改善を行い得ることは、当業者にとって明らかである。従って、本発明の趣旨から逸脱しない範囲で行われるこれらの補正や改善は、いずれも本発明の保護しようとする範囲に属する。

【 手続補正書 】

【 提出日 】 令和3年12月21日(2021.12.21)

40

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

ラクトバチルス属細菌で松茸を発酵させることを含み、前記ラクトバチルス属細菌はラクトバチルス・ペントーサスであり、それは、受託番号が CCTCC NO : M 2 0 1 6 0 0 1 をもつラクトバチルス・ペントーサス G U F H S L

50

- 69を含むことを特徴とする松茸発酵物の調製方法。

【請求項2】

前記松茸は松茸菌系体であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記発酵の培地は、松茸と、炭素源と、窒素源とを含み、前記培地において、松茸と窒素源の質量比は1：(8～160)であることを特徴とする請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記炭素源は、糖を含み、前記窒素源は、有機窒素源を含むことを特徴とする請求項3に記載の方法。

【請求項5】

前記発酵の培地は、松茸0.1～10%、グルコース5～30%、ペプトン5～15%、ラブ-レムコ末5～15%、酵母エキス粉末2～8%、リン酸二カリウム0.1～0.5%、硫酸マグネシウム0.1～0.5%、硫酸マンガン0.1～0.3%といった質量体積百分率の成分を含むことを特徴とする請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

請求項1～5のいずれか1項に記載の方法により調製された松茸発酵物。

【請求項7】

頭皮と髪に用いる組成物であって、質量比が(5～1)：1である松茸発酵物とオキナワモズク抽出物を含み、前記松茸発酵物は請求項6に記載の松茸発酵物であることを特徴とする前記組成物。

【請求項8】

頭皮と髪のケア製品の調製における、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法、或いは請求項6に記載の松茸発酵物、或いは請求項7に記載の組成物の使用。

【請求項9】

請求項6に記載の松茸発酵物又は請求項7に記載の組成物を含むことを特徴とする頭皮と髪のケア製品。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0068

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0068】

実施例9

本実施例では、組成(質量百分率)が、実施例1の松茸発酵物1.5%、アナメ(AGARUM CRIBROSUM)抽出物0.5%、シャンプーベース98%であるシャンプーを提供する。

シャンプーベースの処方実施例5と同じである。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0072

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0072】

実験例3 シャンプーのパーマやカラーリングによって損傷した髪に対する修復効果の実験

実施例及び比較例のシャンプーのパーマやカラーリングにより損傷した髪に対する修復効果を検証するため、25～60歳の過去1年間にパーマやカラーリングをして、髪がパーマやカラーリングの過程で損傷したパネラー100名を選択して、群あたり10名として10群に分け、それぞれ実施例5～8及び比較例5～9、実施例9のいずれかのシャンプーを提供し、使用時間を2ヶ月、使用頻度を、2日おきに1回使用するにして、当該シャ

10

20

30

40

50

ンブーの髪を強化する効果を検討した。実験を開始する前に、パネラーの髪の破断強度を測定し、シャンプーを2ヶ月使用した後、髪の破断強度を測定して、髪の強度の変化を比較した。実験では、インストロン5565万能材料試験機により髪の強度を測定した。具体的な測定方法は、測定しようとする髪のサンプルを取り、まず、温度 20 ± 2 、相対湿度 $65 \pm 3\%$ の大気雰囲気中で24h平衡化した後、当該大気雰囲気中で、髪チャック部長さ150mm、引張速度500mm/minで測定を行い、パネラー一人あたり20本の髪サンプルに対してそれぞれ測定を行って、各群のパネラーの平均値を取るであった。その結果を表3に示した。

【表3】

表3 髪の破断強度

破断強度 (cN/dtex)	実施例				比較例					実施例
	5	6	7	8	5	6	7	8	9	9
使用前	1.27	1.29	1.26	1.25	1.29	1.32	1.35	1.32	1.27	1.26
使用后	1.57	1.5	1.45	1.63	1.38	1.46	1.5	1.43	1.30	1.53
使用前後の強度の 向上率 (%)	23	16	15	30	7.0	10.6	0.11	8.3	2.3	21

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0073

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0073】

表3の結果から明らかのように、実施例5～8及び9のシャンプーのパーマやカラーリングにより損傷した髪に対する修復効果は、比較例5～9より顕著に優れており、これは、実施例1～3の松茸発酵物及び実施例4の組成物が、パーマやカラーリングにより損傷した髪の強度を顕著に向上させることができることを示している。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0074

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0074】

実験例4 シャンプー試用効果の実験

各実施例及び比較例のシャンプーの髪・頭皮に対する滋養効果を検証するため、25-60歳のパネラー100名を選択して、群あたり10名として10群に分け、それぞれ実施例5～8及び比較例5～9、実施例9のいずれかのシャンプーを提供し、使用時間を2ヶ月、使用頻度を、2日おきに1回使用するにして、当該シャンプーの指通り、柔軟性、保湿性、かゆみ止め、及び汚れ除去効果を測定した。測定した性能を6つのレベルに設定した。具体的には、6は極めて良好を、5は良好を、4はやや良好を、3は普通を、2はやや不良を、1は不良を示す。各群のパネラーの測定結果の平均値を取り、測定指標と結果を表4に示した。

20

30

40

【表 4】

表 4 シャンプーの試用効果

測定項目	実施例				比較例					実施例
	5	6	7	8	5	6	7	8	9	9
指通り	5.5	5.3	5.2	5.8	3.8	4.5	4.6	4.2	2.3	5.3
柔軟性	5.6	5.4	5.3	5.8	3.9	4.3	4.3	4.1	2.6	5.4
保湿性	5.5	5.3	5.1	5.7	4.0	4.7	4.6	4.3	3.0	5.3
かゆみ止め効果	5.3	5.2	5.1	5.6	3.7	4.6	4.5	4.2	2.7	5.2
汚れ除去効果	5.5	5.2	5.0	5.6	3.9	4.5	4.5	4.2	2.5	5.1

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0075

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0075】

表 4 の結果から明らかなように、実施例 5 ~ 8 及び 9 のシャンプーは、指通り、柔軟性、保湿性、かゆみ止め、及び汚れ除去効果における試用効果が、比較例 5 ~ 9 より顕著に優れており、これは、実施例 1 ~ 3 の松茸発酵物及び実施例 4 の組成物が、シャンプーの洗髪効果を顕著に向上でき、頭皮及び髪に対して効果的な滋養、保湿および抗菌等のケア効果を発揮でき、髪の本質と健康状態を顕著に改善できることを示している。

 フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
A 6 1 K	36/03	(2006.01)	A 6 1 K	36/03		
A 6 1 P	17/16	(2006.01)	A 6 1 P	17/16		
C 1 2 N	1/14	(2006.01)	C 1 2 N	1/14	F	
C 1 2 N	1/20	(2006.01)	C 1 2 N	1/20	F	
			C 1 2 N	1/20	A	

Fターム(参考) 4B065 AA30X AA71X BB03 BB15 BB16 BB19 BB28 BB29 BC03 CA50
 4C083 AA031 AA032 AA111 AA112 AC242 AC642 AC682 AC692 AC712 AC782 AC792 AD132 AD412 CC31
 CC38 DD23 DD27 EE12 EE28 EE29 FF01
 4C087 AA01 AA02 BC56 CA10 MA17 MA63 NA14 ZA89
 4C088 AA08 AA13 AC16 AD22 BA05 CA03 CA25 MA17 MA63 NA14 ZA89