(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6572337号
(P6572337)

(45)発行日　令和1年9月4日(2019.9.4)　(24)登録日　令和1年8月16日(2019.8.16)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 31/015	(2006.01)	A61K	31/015	ZNA
A61K 36/28	(2006.01)	A61K	36/28	
A61K 36/53	(2006.01)	A61K	36/53	
A61K 36/324	(2006.01)	A61K	36/324	
A61K 31/045	(2006.01)	A61K	31/045	

請求項の数 3　(全 13 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-34784(P2018-34784)
(22)出願日　平成30年2月28日(2018.2.28)
(65)公開番号　特開2019-147777(P2019-147777A)
(43)公開日　令和1年9月5日(2019.9.5)
審査請求日　平成30年9月26日(2018.9.26)

早期審査対象出願

(73)特許権者　593106918
株式会社ファンケル
神奈川県横浜市中区山下町８９番地１
(74)代理人　100162396
弁理士　山田　泰之
(74)代理人　100122954
弁理士　長谷部　善太郎
(74)代理人　100194803
弁理士　中村　理弘
(74)代理人　100202430
弁理士　太田　千香子
(72)発明者　佐藤　暢彦
神奈川県横浜市戸塚区上品濃１２番１３号
株式会社ファンケル　総合研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】マイオカイン産生促進用組成物

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
カモミール精油、ローズマリー精油、ニュウコウジュ精油、メントール、酢酸リナリル、リナロール、α－ピネンおよびリモネンから選択される１種類以上の物質を有効成分として含有する、筋細胞における、マイオカインの１つであるＩＬ－６の産生促進剤（抗糖尿病剤および抗肥満剤を除く）。
【請求項２】
カモミール精油を有効成分として含有する、筋細胞における、マイオカインの１つであるＡｎｇｐｔｌ４の産生促進剤（抗糖尿病剤および抗肥満剤を除く）。
【請求項３】
カモミール精油、ローズマリー精油、ニュウコウジュ精油、メントールから選択される１種類以上の物質を有効成分として含有する、筋細胞における、乳酸によるマイオカインの１つであるＩＬ－６産生能の低下抑制剤（抗糖尿病剤および抗肥満剤を除く）。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、生体のマイオカイン産生を促進するための組成物に関する。
【背景技術】
【０００２】
骨格筋は、体重の４０％に相当する運動器官である。近年の研究により、単に運動に関

わるだけでなく、人体最大のホルモン分泌器官としての役割を有していることが明らかになってきている。筋肉から分泌される液性因子はＭｙｏｋｉｎｅ（マイオカイン）と総称されている。マイオカインは、オートクライン、パラクライン、エンドクラインに作用し、筋肉自身はもちろん血管、脂肪、皮膚、肝臓、腎臓、骨、脳、消化器官、免疫系器官など他臓器の生理機能に影響を与えていると考えられている（非特許文献１）。

ヒト培養骨格筋のセクレトーム解析から、３００以上の液性タンパク質がマイオカイン候補物質として挙げられている（非特許文献２）。マイオカインの中で最も代表的なものはインターロイキン－６（ＩＬ－６）であり、筋肉と多岐に渡る他臓器とのクロストークを担っていると考えられ（非特許文献１参照）、抗炎症作用や抗糖尿病作用（非特許文献３）、抗肥満作用（非特許文献４）など様々な作用が報告されている。ＩＬ－６を一つの指標として筋肉のマイオカインの産生量の変動を確認することができる。

【０００３】

その他のマイオカインとしては、アンジオポエチン様タンパク４（Ａｎｇｐｔｌ４）には抗肥満作用、インターロイキン－１５（ＩＬ－１５）には抗肥満作用や皮膚の抗老化作用、ｔｈｉｏｒｅｄｏｘｉｎ－１は抗酸化作用、Ｓｅｃｒｅｔｅｄ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａｃｉｄｉｃ ａｎｄ Ｒｉｃｈ ｉｎ Ｃｙｓｔｅｉｎｅ（ＳＰＡＲＣ）には抗がん作用が報告されている。また、脳由来神経栄養因子（Ｂｒａｉｎ－ｄｅｒｉｖｅｄ ｎｅｕｒｏｔｒｏｐｈｉｃ ｆａｃｔｏｒ：ＢＤＮＦ）は脳に作用して記憶・学習や情動の調節に関与していると考えられている。このように、マイオカインの多くは健康増進に寄与している。しかし、一般的に全身の筋量は加齢に伴い低下する。このため、マイオカインの全体量もまた加齢に伴い低下する。

【０００４】

現代社会において健康寿命を延ばすことは重要であり、そのために、マイオカインの分泌を維持・促進し、その健康増進効果を利用することは非常に有用な方法である。

また、マイオカインはその多くが恒常的に分泌されており、筋収縮や機械的刺激、インスリンなどの刺激によりその分泌量は変動しうることが知られている（非特許文献５）。

例えば、ＩＬ－６やＩＬ－１５など運動によって血中濃度が上昇することが多数のマイオカインについて報告されている（非特許文献６）。運動による健康・美容増進効果の一部はマイオカインによるものであると考えられる。しかしながら、近年、特に女性の運動習慣が減少し、中でも男女とも３０代は最も運動習慣が少ない年代であることが明らかになっており、高齢者のみならず若年層においても、マイオカイン分泌を簡便に促進する方法が健康・美容の両面から必要とされている。

しかしこれまで、マイカイオン産生促進を筋肉運動なしで促進する具体的な方法や、促進するための組成物は未だ提供されていない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００５】

【非特許文献１】Pedersen BK, Febbraio MA.Nat Rev Endocrinol. 2012 Apr 3;8(8):457-65.

【非特許文献２】Hartwig S他,Biochim Biophys Acta. 2014 May;1844(5):1011-7.

【非特許文献３】Karstoft K, Pedersen BK.Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2016 Jul;19(4):270-5.

【非特許文献４】Carey AL他, Diabetes. 2006 Oct;55(10):2688-97.

【非特許文献５】Manabe Y他,J Phys Fitness Sports Med. 2012;1(1):51-58.

【非特許文献６】Drenth JP他,J Appl Physiol (1985). 1995 Nov;79(5):1497-503.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００６】

本発明者は、筋肉運動に依存しないマイオカインの分泌促進方法を研究する過程で、植物由来の精油やメントール、酢酸リナリル、リナロール、α－ピネン、リモネンを含む組

成物に強いマイオカイン分泌促進作用が存在することを見いだし、本発明をなした。
すなわち、本発明は、マイオカイン産生促進作用を有する組成物を提供することを課題とする。
【課題を解決するための手段】
【０００７】
本発明の主な構成は、次のとおりである。
（１）カモミール精油、ローズマリー精油、ニュウコウジュ精油、メントール、酢酸リナリル、リナロール、α－ピネンおよびリモネンから選択される１種類以上の物質を有効成分として含有する、筋細胞における、マイオカインの１つであるＩＬ－６の産生促進剤（抗糖尿病剤および抗肥満剤を除く）。
（２）カモミール精油を有効成分として含有する、筋細胞における、マイオカインの１つであるＡｎｇｐｔｌ４の産生促進剤（抗糖尿病剤および抗肥満剤を除く）。
（３）カモミール精油、ローズマリー精油、ニュウコウジュ精油、メントールから選択される１種類以上の物質を有効成分として含有する、筋細胞における、乳酸によるマイオカインの１つであるＩＬ－６産生能の低下抑制剤（抗糖尿病剤および抗肥満剤を除く）。
【発明の効果】
【０００８】
本発明の組成物は、筋肉のマイオカイン産生を促進する作用を有している。また運動不足や血行不良によるマイオカイン産生能の低下を回復又は改善させ、マイオカイン産生を増強する。
筋肉組織の産生するマイオカインは、筋肉自身のみならず、血流などを介して脂肪組織、膵臓、免疫系組織、脳神経、骨など多臓器の生理機能を整え、抗筋萎縮、抗肥満、抗糖尿病、抗炎症、記憶力促進、神経再生、骨再生、抗がんなどの作用をもたらす。また、特に皮膚組織などを構成する線維芽細胞組織においては線維芽細胞を増殖させ、更に線維芽細胞の産生するコラーゲン量を増やす。
【図面の簡単な説明】
【０００９】
【図１】本発明の組成物０．０１質量％添加がマイオカイン産生を促進することを示すグラフである。
【図２】本発明の組成物０．０５質量％添加がマイオカイン産生を促進することを示すグラフである。
【図３】本発明の組成物０．３ｍＭ又は０．０３ｍＭ添加がマイオカイン産生を促進することを示すグラフである。
【図４】カモミール精油がマイオカイン産生を促進することを示すグラフである。
【図５】分化３日目の筋管組織で乳酸がマイオカイン産生を抑制することを示すグラフである。
【図６】分化７日目の筋管組織で乳酸がマイオカイン産生を抑制することを示すグラフである。
【図７】本発明の組成物が、乳酸による筋管組織のマイオカイン産生抑制を回復させることを示すグラフである。
【図８】筋管組織の産生するマイオカインを含む培養液が線維芽細胞の増殖を促進させることを示すグラフである。
【図９】筋管組織の産生するマイオカインを含む培養液が線維芽細胞のミトコンドリア膜電位を低下させることを示すグラフである。
【図１０】筋管組織の産生するマイオカインを含む培養液が線維芽細胞を含むコラーゲンゲルを収縮させることを示すグラフである。
【発明を実施するための形態】
【００１０】
本発明は、植物由来の精油及び／又はメントールを含有するマイオカイン産生促進用組成物に関する。

本発明の組成物について説明する。
本発明の組成物にあっては、筋肉のマイオカイン産生を促進する作用を示す成分は、植物由来の精油及び／又はメントールである。マイオカイン産生促進作用を示す精油又はメントールを１種以上含有する組成物をマイオカイン産生促進用組成物として用いることができる。
マイオカイン産生促進作用を示す精油としては、例えば成分として酢酸リナリル及び／又はリナロール及び／又はα－ピネン及び／又はリモネンを含むものであり、カモミール、ローズマリー、ニュウコウジュ、ハッカ、ラベンダー、オレンジから得られる精油が代表的なものである。

【００１１】
カモミール（学名：Matricaria recutita）は、キク科の1種の耐寒性一年草で、和名はカミツレである。カモミールは、ローマンカモミールとジャーマンカモミールの２種類が一般的に知られているが、本発明にあってはいずれの種類でも良い。カモミールの花から水蒸気蒸留法で精油を抽出したカモミール油を本発明に用いることができる。市販された精油を本発明に用いることができる。精油成分としては、ローマンカモミールはアンジェリカ酸イソブチル、アンジェリカ酸イソアミル、アンジェリカ酸メチル、イソブチル酸イソアミル、アンジェリカ酸２－メチルブチレートなど、ジャーマンカモミールはビサボロールオキサイドＡ、カマズレン、ｃｉｓ－ｔ－ディサイクロエーテル、ビサボロールオキサイドＢ、ビサボレンオキサイドなどを含む。

【００１２】
ローズマリー（学名：Rosmarinus officinalis L）は、地中海沿岸地方原産で、シソ科に属する常緑性低木で、和名マンネンロウともいう。植物全草から水蒸気蒸留法で抽出した精油を本発明において使用する。市販されたローズマリー精油を本発明に用いることができる。精油成分としては、α－ピネン、１,８－シネオール、カンファー、カンフェン、リモネンなどを含む。

【００１３】
ニュウコウジュ（乳香樹、学名：Boswellia carterii Birdw.）は、熱帯の乾燥地帯に自生する低木で、幹から採取した樹脂を乳香又は没薬と呼ぶ。本発明にあっては、乳香を水蒸気蒸留して得られる精油を「ニュウコウジュ精油」として、マイオカイン産生促進用の組成物に用いる。市販されたニュウコウジュ精油を本発明に用いることができる。精油成分としては、α－ピネン、α－ツエン、ｐ－サイメン、リモネン、サビネンなどを含む。

【００１４】
ハッカは、狭義には日本ハッカ（学名：Mentha canadensis var. piperascens）を意味するが、日本ハッカを含むハッカ属に分類されるスペアミントなどのいわゆる「ミント類」の植物を本発明にあっては、「ハッカ」という。本発明のハッカ由来の精油は、これらのミント類の全草を水蒸気蒸留した精油（ハッカ油）であれば本発明に使用できる。このようなハッカとしては、ニホンハッカ、セイヨウハッカ、スペアミント、ペッパーミント、ベルガモットミント、アップルミントなどを例示できる。本発明にあっては、食品又は化粧品原料或いは香料として市販されたものを用いることができる。

【００１５】
ラベンダー（学名：Lavendula angustifolia P. Miller）は、標高８００～１０００ｍ付近で栽培されるシソ科の多年草で、本発明にあっては、ラベンダーを水蒸気蒸留して得られる精油を「ラベンダー精油」として使用する。市販されたラベンダー精油を本発明に用いることができる。精油成分としては、酢酸リナリル、リナロール、ｃｉｓ－β－オシメン、テルピネン－４－オールなどを含む。

【００１６】
オレンジ類は、スイートオレンジ（学名：Citrus sinensis L. Osbeck)、ビターオレンジ（学名：Citrus aurantinum L.）、マンダリンオレンジ（学名：Citrus reticulata ）に大別されるが、本発明にあっては、これらオレンジ類の果皮を圧搾して得られる精油を

「オレンジ精油」として使用する。市販されたオレンジ精油を本発明に用いることができる。精油成分としては、スイートオレンジはリモネン、ｎ－オクタナールなど、ビターオレンジはリモネン、ミルセンなど、マンダリンオレンジはリモネン、γ－テルピネン、α－ピネン、ミルセン、β－ピネンなどを含む。

【００１７】

メントール（Ｍｅｎｔｈｏｌ）は環式モノテルペン、アルコールの一種の有機化合物で、ＩＵＰＡＣ命名法の系統名は　２－イソプロピル－５－メチルシクロヘキサノール　（２－ｉｓｏｐｒｏｐｙｌ－５－ｍｅｔｈｙｌｃｙｃｌｏｈｅｘａｎｏｌ）である（ＣＡＳ登録番号：２２１６－５１－５）。いわゆるハッカ臭を持つ、揮発性の無色結晶である。メントールにはいくつかのジアステレオマー、鏡像異性体があるが、本発明は、これらの異性体、或いは混合物であってもよい。そのうちのｌ－メントールは歯磨きやチューインガムなどの菓子類、口中清涼剤などに多用されるほか、局所血管拡張作用、皮膚刺激作用等を有するため、医薬品にも用いられる化合物である。

本発明にあっては、上記のハッカ精油から単離した精製メントールや、不斉合成法で得られる化学合成品であっても使用することができる。

本発明の組成物は、食品、医薬品、外用剤として使用できる。食品としては、通常の食品の他、栄養補助食品、機能性食品、健康食品、特定保健用食品等として使用しても良く、例えば、ジュースのような飲料に配合することもできる。

【００１８】

医薬品用途において、投与に関しては、有効成分を経口投与、非経口摂取、直腸内投与、注射等の投与方法に適した固体又は液体の医薬用無毒性担体と混合して、慣用の医薬製剤の形態で投与することができる。形態としては、例えば、粉末、散剤、顆粒、錠剤、カプセル、等の固形剤、溶液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤、凍結乾燥製剤、外用剤等が挙げられる。これらの製剤は常套手段により調製することが可能である。上記の医薬品用担体としては、例えば、グルコース、乳糖、ショ糖、澱粉、マンニトール、デキストリン、脂肪酸グリセリド、ポリエチレングルコール、ヒドロキシエチレンデンプン、エチレングリコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、アミノ酸、ゼラチン、アルブミン、水、生理食塩水等が挙げられる。必要に応じて、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、結合剤、等張化剤等の添加剤を適宜添加することも可能である。

【００１９】

本発明の組成物の投与量は、対象者の年齢、体重、症状、投与経路、投与スケジュール、製剤形態、等により、適宜選択決定される。経口投与の場合、１日あたり１～２４０ｍｇが好ましい。精油は０．００１～５０質量％、メントールは０．００１～１質量％を含む組成物を１日あたり、複数回投与する。

【００２０】

また、本発明の組成物は、外用剤として、乳液、クリーム、ローション、軟膏等に用いられる。特に限定されるものではないが、その剤型は水溶液系、可溶化系、乳化系、粉末系、油液系、ゲル系、軟膏系、エアゾール系、水－油２層系、水－油－粉末３層系等の剤型とすることができる。

【実施例】

【００２１】

以下に試験例を示し、本発明を具体的に説明する。

試験１．筋肉に対するマイオカイン産生促進作用確認試験

（１）試験方法

筋肉組織モデルとして培養横紋筋細胞によって形成された筋管組織を用いた。

１）筋管形成

培養マウス横紋筋細胞Ｃ２Ｃ１２株（ＤＳファーマバイオメディカル株式会社)を用い、筋管を形成させた。増殖用培地にはＦＢＳ１０％含有ＤＭＥＭ　ｈｉｇｈ　ｇｌｕｃｏｓｅ（ＧＩＢＣＯ）にペニシリン／ストレプトマイシン（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ/）を１％配合したものを用いた。Ｃ２Ｃ１２細胞の継代にはＴ７５フラスコを用い、１フ

ラスコ当たり細胞数が１．５×１０^{5}ｃｅｌｌｓとなるように播種した。
継代後２～３日で細胞密度がフラスコ面積の６０～７０％となったことを顕微鏡観察によって確認し、０．０５％　Ｔｒｙｐｓｉｎ－ＥＤＴＡを用いて細胞を剥離した。次いで、０．０２％のコラーゲン（株式会社高研）でコートした６－ｗｅｌｌ　ｐｌａｔｅに、１ウェル当たり細胞数が１．８×１０^{4}　ｃｅｌｌｓとなるように播種した。
その後細胞がコンフルエントに達したことを確認した後、増殖用培地を分化用培地に切り替えた。
分化用培地は、ＤＭＥＭ　ｈｉｇｈ　ｇｌｕｃｏｓｅ（ＧＩＢＣＯ）にＨｏｒｓｅ　ｓｅｒｕｍ２％含有させた培地に、非必須アミノ酸溶液（ＮＥＡＡ：Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）を１％、ペニシリン／ストレプトマイシンを１％添加したものを用いた。培地切り替えから３～７日後、筋管が十分形成されていることを顕微鏡で確認した。筋管組織が形成されたものを以下の試験に用いた。
なお、すべての細胞培養環境は３７℃、５％CO_2とした。
【００２２】
２）マイオカイン産生促進試験（ＩＬ－６）
上記で調製した分化３日目の筋管組織を用いてマイオカイン産生促進効果を試験した。
試験に用いた精油は、市販されている香料用の精油であって、ローズマリー精油（ＲＭ　ローズマリー油，香栄興業）、カモミール精油（ＲＭ　ローマカミツレ油，ＰＡＴＡＮ　＆　ＢＥＲＴＲＡＮＤ）、ニュウコウジュ精油（ニュウコウジュ油，山本香料），及びメントール（Ｌ－メントール，和光純薬工業)及び酢酸リナリル（和光純薬工業）、リナロール（和光純薬工業）、α－ピネン（和光純薬工業）、リモネン（和光純薬工業）を用いた。また陽性対照として、筋肉組織にマイオカイン産生を促進させることが明らかな合成ペプチド、ＭＧ－１３２（Ｚ－Ｌｅｕ－Ｌｅｕ－Ｌｅｕ－ＣＨＯ：Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｐｅｐｔｉｄｅ）を用いた。これらの添加成分は、分化培地に添加後超音波破砕装置にて均一に分散させた。
各精油及びメントールは、培地中の濃度が０．０１質量％及び０．０５質量％、酢酸リナリル、α－ピネン、リモネンは０．３ｍＭ、リナロールは０．０３ｍＭになるように添加し、１時間培養した後に新しい分化培地に入れ替え、その５時間培養後に培地の上清を回収し、マイオカインの変化を測定した。マイオカインの指標としてＩＬ－６量を測定した。ＩＬ－６の測定は、マウス・ラット可溶性タンパクＭａｓｔｅｒ　Ｂｕｆｆｅｒ　Ｋｉｔ（日本ベクトンディッキンソン）およびマウス可溶性タンパクＦｌｅｘ　ｓｅｔ　ＩＬ－６（日本ベクトンディッキンソン）を用いて、ＦＡＣＳ　Ｃａｌｉｂｕｒ（日本ベクトンディッキンソン）を用いて、回収した培地上清中に含まれるＩＬ－６タンパク質量を測定した。
【００２３】
３）マイオカイン産生促進試験（Ａｎｇｐｌｔ４）
上記で調製した分化３日目の筋管組織を用いて、脂質代謝に関わるマイオカインの１つであるＡｎｇｐｔｌ４の産生促進効果を遺伝子発現レベルで試験した。
試験に用いた精油は、市販されている香料用のカモミール精油を用い、分化培地に添加後超音波破砕装置にて均一に分散させた。
精油は、培地中の濃度が０．０１質量％、０．１質量％になるように添加し、１時間培養した後に新しい分化培地に入れ替え、その３時間培養後に細胞からＲＮＡを抽出した。ＲＮＡからｃＤＮＡへの逆転写には、ＰｒｉｍｅＳｃｒｉｐｔ　ＲＴ　ｒｅａｇｅｎｔ　Ｋｉｔ（タカラバイオ）及びＴａＫａＲａ　ＰＣＲ　Ｔｈｅｒｍａｌ　Ｃｙｃｌｅｒ　Ｄｉｃｅ（登録商標）ＧｒａｄｉｅｎｔＴＰ６００（タカラバイオ）を用いた。定量ＰＣＲ反応には、ＳＹＢＲ（登録商標）Ｐｒｅｍｉｘ　Ｅｘ　Ｔａｑ（商標）ＩＩ（Ｔｌｉ　ＲＮａｓｅＨ　Ｐｌｕｓ）（タカラバイオ）及びＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ　４８０　ｓｙｓｔｅｍ　ＩＩ（ロシュ・ダイアグノスティックス）を用いた。ハウスキーピング遺伝子としてβグルコシダーゼ（Ｇｕｓｂ）を用いた。なおマウス配列を基にしたＧｕｓｂ及びＡｎｇｐｔｌ４のプライマーの配列（配列１～４）を表１に示す。

【００２４】
【表１】

	Forward	Reverse
Gusb	CTGTGACCGATACGGGATTGTG(配列1)	ACCTCTAGGTGGTGCCGAAGTG(配列2)
Angptl4	GTTTGCAGACTCAGCTCAAGG(配列3)	CCAAGAGGTCTATCTGGCTCTG(配列4)

【００２５】
（２）試験結果
図１（０．０１質量％）、及び図２（０．０５質量％）に各精油及びメントールによるＩＬ－６産生量促進効果を測定した結果を示した。なお測定結果は対照（コントロール）の産生量を１とした相対値で示した。
図１、図２からローズマリー精油、カモミール精油、ニュウコウジュ精油、メントールはいずれもＩＬ－６の産生を促進することが確認できた。また、マイオカイン産生を促進させることが明らかな合成ペプチドＭＧ－１３２でも、毎試行ＩＬ－６産生の促進を確認できた。
図３に酢酸リナリル、リナロール、α－ピネン、リモネンによるＩＬ－６産生量促進効果を測定した結果を示した。なお測定結果はコントロールの発現量を１とした相対値で示した。
図３から明らかなように、酢酸リナリル、リナロール、α－ピネン、リモネンはいずれもＩＬ－６の産生を促進することが確認出来た。
図４にカモミール精油によるＡｎｇｐｔｌ４遺伝子の発現促進効果を測定した結果を記した。なお測定結果はコントロールの発現量を１とした相対値で示した。
図４からカモミール精油がＩＬ－６の産生のみならず、Ａｎｇｐｔｌ４遺伝子の発現をも促進することが確認出来た。
【００２６】
試験２．乳酸蓄積によるマイオカイン産生能抑制確認試験
乳酸蓄積による筋肉のマイオカイン産生能抑制を確認した。その試験について次に説明する。
（１）試験方法
試験１と同様に筋肉組織モデルとして培養横紋筋細胞によって形成された筋管組織を用いた。
１）筋管形成
試験１と同様に筋管を形成させた。これを試験に用いた。
【００２７】
２）乳酸負荷によるマイオカイン産生抑制の確認試験
上記で調製した分化３日目の筋管組織を用いて試験を行った。
【００２８】
３）乳酸負荷
分化誘導後３日後および７日後の筋管を乳酸０～４０ｍＭを含む培地で24時間培養した後培養上清を回収し、試験１と同様の方法で培地中のＩＬ－６を測定した。
【００２９】
（２）試験結果
図５（分化３日目）、図６（分化７日目）に、筋管の産生するＩＬ－６の測定結果を示す。
図５、６から明らかなように乳酸は筋肉のマイオカイン産生機能を抑制していることが確認できた。
【００３０】
試験３．乳酸蓄積によるマイオカイン産生能抑制試験
乳酸蓄積による筋肉のマイオカイン産生能抑制確認をした。その試験について次に説明する。
（１）試験方法

試験１と同様に筋肉組織モデルとして培養横紋筋細胞によって形成された筋管組織を用いた。

１）筋管形成

試験１と同様に筋管を形成させた。これを試験に用いた。

【００３１】

２）乳酸負荷によるマイオカイン産生抑制からの回復試験

上記で調製した分化３日目の筋管組織を用いて試験を行った。

【００３２】

３）乳酸負荷

分化誘導後３日後筋管を、乳酸２０ｍＭを含む培地で１時間培養、又は乳酸２０ｍＭと各精油又はメントール０．０１質量％を添加した培地で１時間培養後、新しい分化培地に入れ替え、その５時間培養後に培養上清を回収し、試験１と同様の方法で培地中のＩＬ－６を測定した。

【００３３】

（２）試験結果

図７に筋管の産生するＩＬ－６の測定結果を示す。測定結果は対照（乳酸、精油又はメントール無添加）の産生量を１とした相対値で示した。

図７から明らかなように、乳酸は筋肉のマイオカイン産生機能を抑制するが、精油又はメントールを添加することで、乳酸によるマイオカイン産生抑制作用を解消し、マイオカインの産生を促進することが明らかとなった。また乳酸蓄積に伴う機能低下を予防できることが明らかとなった。

【００３４】

以上の試験１、試験２、試験３の結果から植物由来の精油又はメントールは筋肉組織に作用してマイオカイン産生を促進させ、さらに運動不足や血行不良に伴う乳酸の蓄積による影響を解消する作用を有しているということができる。

【００３５】

試験４．マイオカインが線維芽細胞に及ぼす効果試験

筋肉組織近傍に存在する線維芽細胞に対する効果を確認した。

（１）試験方法

１）細胞培養

線維芽細胞としてＢＡＬＢ／３Ｔ３ｃｅｌｌ（継代２２回）を用いた。これをＴ２５培養フラスコ１枚に細胞密度1×10^{4}ｃｅｌｌｓ／ｃｍ^{2}になるように播種し、３日間培養した。次いで、０．０２５％　ｔｒｙｐｓｉｎ－ＥＤＴＡで細胞を剥離して回収し、さらに９６ｗｅｌｌ　ｐｌａｔｅ　５枚に、1×10^{4}ｃｅｌｌｓ／ｍｌで播種した。

コンフルエントの８０％に増殖した状態で、培地交換を行った。

交換用培地は、試験１に示したＣ２Ｃ１２細胞の分化用培地を用いて培養した７日目の培地を回収し、これを３Ｔ３細胞の培地に、表２に示した配合比率で混合した。

培地交換２４時間後にＣｅｌｌ　Ｃｏｕｎｔｉｎｇ　Ｋｉｔ－８(同仁化学研究所)を用いて細胞数を測定した。

【００３６】

【表２】

1	培地 (control)
2	7日目C2C12培地25%
3	7日目C2C12培地50%
4	7日目C2C12培地70%
5	7日目C2C12培地100%

【００３７】

２）線維芽細胞（３Ｔ３）のミトコンドリア活性の測定

線維芽細胞としてＢＡＬＢ／３Ｔ３　ｃｅｌｌ(継代２２回) を用いた。これをＴ２５

培養フラスコ１枚に細胞密度１×１０^{4}ｃｅｌｌｓ／ｃｍ^{2}になるように播種し、３日間培養した。次いで、０．０２５％　ｔｒｙｐｓｉｎ－ＥＤＴＡで細胞を剥離して回収し、さらにＴ７５フラスコ２枚に、０．８×１０^{4}ｃｅｌｌｓ／ｍｌで播種した。

コンフルエントの８０％に増殖した状態で、培地交換を行った。

交換用培地は、試験１に示したＣ２Ｃ１２細胞の分化用培地を用いて培養した７日目の培地を回収し、これを３Ｔ３細胞の培地に、表２に示した配合比率で混合した。

培地交換２４時間後にＭｉｔｏＰｒｏｂｅ（商標）ＪＣ－１アッセイ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　ｐｒｏｂｅｓ）によりミトコンドリア膜電位を測定した。

【００３８】

３）線維芽細胞(３Ｔ３)のコラーゲンゲル収縮測定

線維芽細胞としてＢＡＬＢ／３Ｔ３　ｃｅｌｌ（継代２２回）を用いた。これをＴ２５培養フラスコ１枚に細胞密度１×１０^{4}ｃｅｌｌｓ／ｃｍ^{2}になるように播種し、３日間培養した。次いで、０．０２５％　ｔｒｙｐｓｉｎ－ＥＤＴＡで細胞を剥離して回収し、さらにＴ７５フラスコ２枚に、０．８×１０^{4}ｃｅｌｌｓ／ｍｌで播種した。

コンフルエントの８０％に増殖した状態で、培地交換を行った。

培地交換６日後に細胞を剥離して回収し、表３に示す組成のコラーゲンゲルに播種した。培地は、試験１に示したＣ２Ｃ１２細胞の分化用培地を用いて培養した７日目の培地（Ｓｕｐ）を回収し、表４に示した配合比率で混合したものを各々添加した。

７日間培養し、コラーゲンゲルの収縮を観察して撮影し、得られた画像をＩｍａｇｅ－Ｊを用いてゲルサイズを測定し収縮率を算出した。

コラーゲンゲルの調製及び収縮測定は特開２０１１－１５７２８１号公報に記載された方法に従った。

【００３９】

【表３】

配合成分
FBS
DMEM (フェノールレッドフリー, 10%FBS)
3×DMEM
NHDF (5×10^{5}細胞/ml)
アテロコラーゲン (5mg/ml)

【００４０】

【表４】

1	培地 (コントロール)
2	7日目C2C12培地25%
3	7日目C2C12培地50%
4	7日目C2C12培地100%

【００４１】

（２）結果

１）細胞数

図８に測定結果を示す。

７日目のＣ２Ｃ１２細胞の分化用培地（Ｓｕｐ）の添加量に対応して線維芽細胞数が増加した。筋管組織から分泌されるマイオカインが線維芽細胞の増殖に寄与したものと考えられた。

【００４２】

２）ミトコンドリア膜電位

図９にＪＣ１の測定結果を示す。線維芽細胞(３Ｔ３)のミトコンドリア膜電位が、筋管培養上清（Ｓｕｐ）の濃度依存的に低下することが確認された。

【００４３】

３）コラーゲンゲル収縮

コラーゲンゲルの収縮状態を観察した結果得られた収縮率を図１０に示す。

線維芽細胞(３Ｔ３)入りコラーゲンゲルが、筋管培養上清（Ｓｕｐ）の濃度依存的に収縮することが観察された。

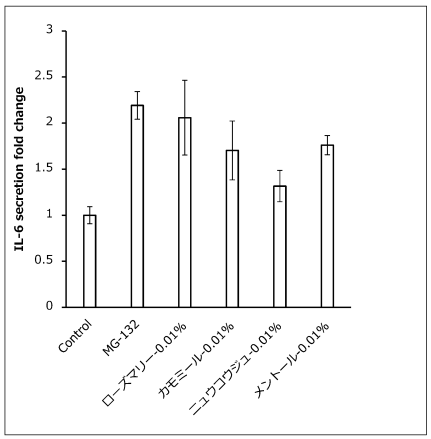
以上の試験結果から、次のことが明らかとなった。

筋管培養上清により、線維芽細胞(３Ｔ３)の増殖が起こり、ミトコンドリア膜電位の低下が認められた。これは筋管培養上清に含まれるマイオカインにより線維芽細胞賦活が起こり、細胞が増殖し、また増殖したことによりミトコンドリア膜電位の低下が起こったと考えられた。

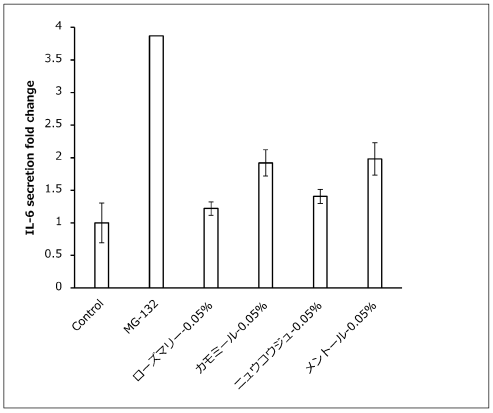
コラーゲンゲル収縮法は、Ｉ型コラーゲンゲル中に線維芽細胞を包埋し通常の培養条件下で培養を行うと、コラーゲンゲルの体積が収縮する現象が観察される。コラーゲンゲル収縮の程度は細胞数が多いほど、あるいは培地中の血清濃度が高いほど大きいことが知られている。また、高齢者由来の線維芽細胞では若齢者由来の線維芽細胞と比較してゲルの収縮能力が低下することが明らかになっており、真皮線維芽細胞包埋コラーゲンゲルの収縮能力の測定は、加齢に伴う真皮の弾力やハリ、たるみ予防改善用薬剤の評価方法として用いられている。筋管培養上清によるコラーゲンゲル収縮が認められたことは、筋管培養上清に含まれるマイオカインが、たるみなどの皮膚機能に関する抗老化作用を持つことが考えられた。

以上のことより、植物由来の精油又はメントールは、マイオカイン産生を促進し、さらに産生されたマイオカインは皮膚細胞賦活（増殖）に働くことにより、コラーゲンゲルを収縮させ、皮膚のたるみやシワを改善するものと考えられた。

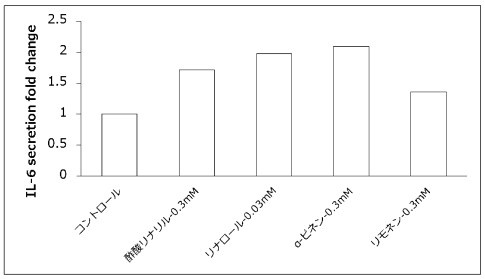
【図１】



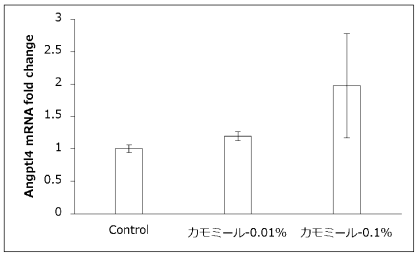
【図２】



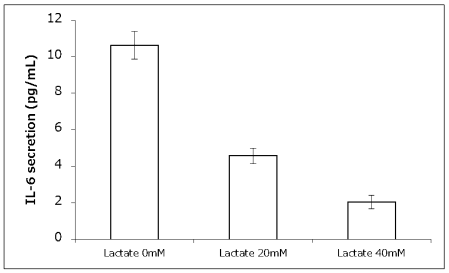
【図３】



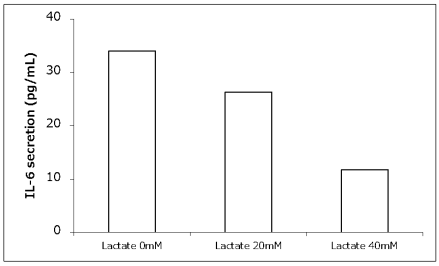
【図４】



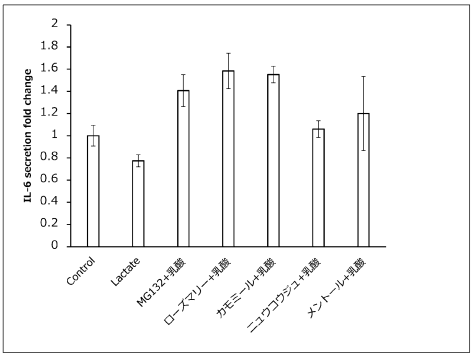
【図５】



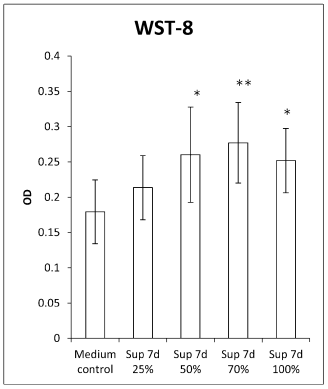
【図６】



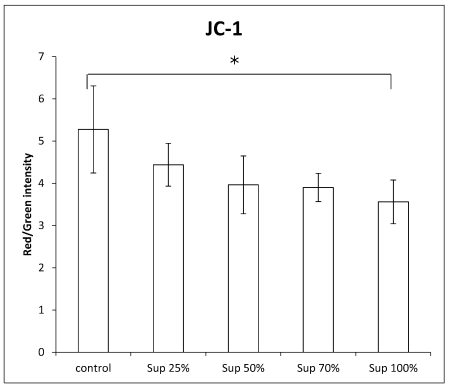
【図７】



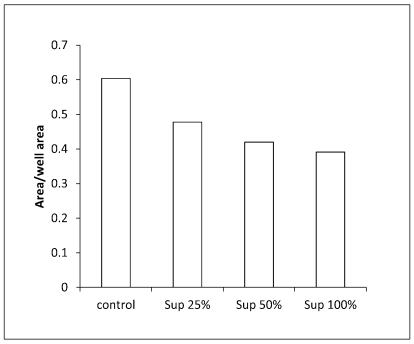
【図８】



【図９】



【図１０】



【配列表】
0006572337000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
A61K	***31/22***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	31/22	
A61P	***43/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	43/00	１１１
A61P	***21/00***	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	21/00	

(72)発明者　大石　奈帆子
神奈川県横浜市戸塚区上品濃１２番１３号　株式会社ファンケル　総合研究所内
(72)発明者　宮田　民恵
神奈川県横浜市戸塚区上品濃１２番１３号　株式会社ファンケル　総合研究所内

審査官　鈴木　理文

(56)参考文献　特開２００９－１５５２２７（ＪＰ，Ａ）
特開２０１０－１９５７２４（ＪＰ，Ａ）
特開２０１１－２３６１５６（ＪＰ，Ａ）
特開２０１３－０２３４３７（ＪＰ，Ａ）
特開２００５－１８７４３２（ＪＰ，Ａ）
韓国登録特許第１０－０８７３９４６（ＫＲ，Ｂ１）
韓国公開特許第１０－２０１６－０１１０８８７（ＫＲ，Ａ）
特開２００５－２０６５９６（ＪＰ，Ａ）
特表２００１－５０４５１０（ＪＰ，Ａ）
特表２００４－５０９９１３（ＪＰ，Ａ）
特表２０１５－５３０３７６（ＪＰ，Ａ）
Am. J. Chin. Med., ２０１５年, Vol.43, pp.731-742
Acta Vet. Brno, ２００９年, Vol.78, pp.121-127
Planta Med. Int. Open, ２０１７年, Vol.4 Iss.S01, Mo-P0-83, doi: 10.1055/s-0037-160813
3
Oncotarget, ２０１７年, Vol.8, pp.75114-75126
Eur. J. Pharmacol., ２０１３年, Vol.715, pp.46-55

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ　３１／０１５
Ａ６１Ｋ　３１／０４５
Ａ６１Ｋ　３１／２２
Ａ６１Ｋ　３６／２８
Ａ６１Ｋ　３６／３２４
Ａ６１Ｋ　３６／５３
Ａ６１Ｐ　２１／００
Ａ６１Ｐ　４３／００
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）