

(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2018-183105

(P2018-183105A)

(43) 公開日 平成30年11月22日(2018.11.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	2G045
G01N 33/50 (2006.01)	G01N 33/50	4B063
G01N 33/68 (2006.01)	G01N 33/50	P
	G01N 33/68	

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2017-87843 (P2017-87843)	(71) 出願人	000226437 日光ケミカルズ株式会社 東京都中央区日本橋馬喰町1丁目4番8号
(22) 出願日	平成29年4月27日 (2017.4.27)	(71) 出願人	301068114 株式会社コスモステクニカルセンター 東京都板橋区蓮根3丁目24番3号
		(72) 発明者	横田 真理子 東京都板橋区蓮根3丁目24番3号 株式 会社コスモステクニカルセンター内
		(72) 発明者	矢作 彰一 東京都板橋区蓮根3丁目24番3号 株式 会社コスモステクニカルセンター内
		Fターム(参考)	2G045 CB09 DA14 DA36 FB02
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 皮膚刺激評価方法

(57) 【要約】

【課題】皮膚へのアレルギーの接触は炎症性応答を介して肌荒れを惹起することが知られているが、皮膚のバリア機能低下に伴う皮膚疾患患者では、皮膚から接触したアレルギーにより全身性アレルギー応答を惹起する可能性がある。また、ハウスダストは一般家庭にも存在するアレルギーであることから、日常的に暴露する可能性が高く、ハウスダストによる皮膚ダメージの緩和を目的とした防止剤を開発するための評価方法が求められている。

【解決手段】人工皮膚モデルに対して角層側からハウスダストを適用することで、炎症性応答の惹起、細胞生存率の低下、皮膚バリア機能の低下を見出し、さらにハウスダストとともに有効成分を角層側から適用することで、ハウスダストによる皮膚への刺激およびハウスダストによる刺激に対する改善作用を有する有効成分の評価が可能な方法を完成するに至った。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

人工皮膚モデルを用いた、ハウスダストによる皮膚刺激の評価方法。

【請求項 2】

人工皮膚モデルが、ヒトケラチノサイトの単離培養により正常な角化過程を経て角層機能を持つ再生表皮が形成された再生表皮モデルであることを特徴とする、請求項 1 に記載の評価方法。

【請求項 3】

人工皮膚モデルに適用するハウスダストとしては、ハウスダスト、ダニ培地抽出物、ダニ虫体抽出物、ダニ抽出物、ダニアレルゲン D e r f、ダニアレルゲン D e r p から選ばれる 1 種または 2 種以上を用いることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載の評価方法。

10

【請求項 4】

経皮水分蒸散量の変化を測定することを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の評価方法。

【請求項 5】

細胞生存率の変化を測定することを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の評価方法。

【請求項 6】

サイトカインの変化を測定することを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の評価方法。

20

【請求項 7】

サイトカインが、I L - 1、I L - 1 R A、I L - 1、T N F から選ばれる 1 種または 2 種以上であることを特徴とする請求項 6 に記載の評価方法。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の評価方法を用いて、ハウスダストによる皮膚刺激に対する改善作用を有する有効成分を評価する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、人工皮膚モデルを用いた、in vitroでの、ハウスダストによる皮膚刺激の評価方法に関する。

30

【背景技術】

【0002】

ハウスダスト(ダニ)はアレルギー症状を引き起こすアレルゲンとして一般認知度が高く、気管支喘息やアトピー性皮膚炎との関連が報告されている。さらに、このダニ由来のアレルゲンタンパクがプロテアーゼとして、気道上皮細胞や皮膚バリア機能を破壊することから、これら環境的バリア破壊誘導は、皮膚バリア異常、さらにはアトピー性皮膚炎との関連が懸念されている(非特許文献1)。

このように、皮膚へのアレルゲンの接触は炎症性応答を介して肌荒れを惹起することが知られているが、これに留まらずアトピー性皮膚炎の患者など皮膚のバリア機能低下に伴う皮膚疾患の患者では、皮膚から接触したアレルゲンにより全身性のアレルギー応答を惹起する可能性がある。ハウスダストは一般家庭にも存在するアレルゲンであることから、日常的に暴露する可能性が高く、ハウスダストによる皮膚ダメージの緩和を目的とした有効成分を開発するための評価方法が求められている。

40

【0003】

これまで、アレルゲンに対する皮膚バリア挙動の研究・解析は、動物実験による検討、ヒト摘出皮膚を用いた検討、あるいは皮膚科医による臨床症状からの報告が多くを占めていた。近年、動物実験に対しては動物愛護の観点から化粧品分野での使用が難しく代替法が求められている。さらに、ヒト摘出皮膚は個体差や安定供給の問題、さらに価格面も鑑みると、有効成分のスクリーニング等に簡便に使用できるものではない。

50

一方、人工皮膚モデルは近年皮膚評価の代替ツールとして非常に一般化しており、さらにバリア機能の強弱や色素細胞含有の有無など非常に多様化していることから、人工皮膚モデルを用いた代替法の開発が加速している。人工皮膚モデルを用いてヒト摘出皮膚と同様の挙動を確認できれば、簡便に使用可能な評価法として、ハウスダストによる皮膚への刺激に対する改善作用を有する有効成分の開発が加速することが期待される。

【0004】

例えば、非特許文献2では、テープストリッピング法により人工的に皮膚バリア機能を低下させたヒト摘出皮膚に対し、花粉のアレルゲンであるCry j 1を添加することで、経皮水分蒸散量(Trans epidermal water loss, TEWL)を指標として、皮膚バリア破壊が起こることが報告されている。しかし、この方法では、多検体を一度に評価できず、個体差があるので安定的に評価することもできず、さらにテープストリップ等の前処理によるアーティファクトの懸念もある。

これらの問題点に対し、人工皮膚モデルを用いることで、バリア機能が未熟なモデルも市販されていることから、最適なモデルを適宜選択して使用することが出来ると予測される。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】高井 敏明ら、アレルギー、2011、60(7):809-816

【非特許文献2】Kumamoto J et al., Arch Dermatol Res. 2016 Jan; 308(1):49-54.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、日常的に暴露する可能性が高いアレルゲンであるハウスダストによる皮膚への刺激、およびハウスダストによる刺激に対する改善作用を有する有効成分のスクリーニングを簡便に評価する方法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】

本発明者らは、ハウスダストを人工皮膚モデルの角層側から適用することで、炎症性応答の惹起、細胞生存率の低下、皮膚バリア機能の低下を再現できることを見出し、さらにハウスダストとともに有効成分を角層側から適用することで、これら一連の刺激応答を緩和する作用を確認したことから、ハウスダストによる皮膚への刺激およびハウスダストによる刺激に対する改善作用を有する有効成分の評価が可能な方法を完成するに至った。

【発明の効果】

【0008】

本発明に記載のハウスダストによる刺激評価方法を用いることで、従来はあまり注目されてこなかったハウスダストに起因する皮膚の炎症応答、細胞傷害、およびバリア機能低下に対して改善作用のある有効成分の有効性を簡便に行うことが出来る。つまり、従来アレルゲンに対する皮膚応答を改善する有効成分の評価は、血液検査を伴う臨床試験や、摘出皮膚を用いた試験など、ヒトに対して侵襲的な過程を伴うものであることから、簡便にまた複数検体を同時に比較評価することは困難であった。したがって、ハウスダストによる皮膚の刺激に対して改善作用のある成分および改善作用のある成分を含む外用組成物の開発を効率よく行うことが出来る。

【発明を実施するための形態】

【0009】

以下、本発明の構成を更に詳細に説明する。

本発明で人工皮膚モデルに適用するハウスダストとしては、一般家庭より採取して均一化したハウスダストを用いることもできる。また、市販品としては、I T E A 株式会社製のハウスダスト(ダニ)、ダニ培地抽出物、ダニ虫体抽出物、ダニ抽出物、ダニアレルゲンD e r f、ダニアレルゲンD e r p など、関東化学株式会社製のハウスダスト(ダニ)、ハ

10

20

30

40

50

ウスダスト(イヌ)、ハウスダスト(ネコ)、鳥居薬品株式会社製の治療用アレルゲンエキス皮下注「トリイ」ハウスダスト1:10、治療用アレルゲンエキス皮下注「トリイ」ハウスダスト1:100などを用いることもできる。特に限定されるものではないが、好ましいものとしてはI T E A株式会社製のハウスダスト(ダニ)が挙げられる。

【0010】

本発明で用いる人工皮膚モデルとしては、表皮等価物であればよく、ヒトケラチノサイトの単離培養により正常な角化過程を経て角層機能を持つ再生表皮が形成された再生表皮モデルを用いることができる。具体的には、E P I S K I N再生ヒト表皮モデル、R H E再生ヒト表皮モデル、R H P E再生ヒト表皮モデル(S k i n E t h i c社製)、皮膚3次元モデルE P I - 2 0 0・2 1 2・2 0 0 X・6 0 6・6 0 6 X・2 0 1・2 9 6、皮膚3次元モデルE F T - 4 0 0・4 1 2、皮膚3次元モデルM E L - 3 0 0・3 1 2・3 0 1・3 0 0 F T・6 0 6、皮膚3次元モデルM L N M - F T - A 3 7 5(M a t T e k社製)、T E S T S K I NTM L S E - h i g h M A T R E XTM L D M(T O Y O B O社製)、L a b C y t e E P I - M O D E L、L a b C y t e M E L A N O - M O D E L、(J - T E C社製)などが挙げられる。特に限定されるものではないが、特に好ましいものとしてはR H E再生ヒト表皮モデルが挙げられる。

10

【0011】

さらに、一般的にハウスダストによる皮膚の刺激応答は、特に皮膚バリア機能の低下したアトピー性皮膚炎などの疾患を有する患者で顕著であること、また非特許文献1に記載の通り、摘出皮膚を用いた試験ではアレルゲン暴露に対しテープストリッピング法で角層を剥離した皮膚バリア破壊モデルを用いて評価していることを鑑みると、アレルゲンの皮膚生細胞層への到達のしやすさから、特に限定されるものではないが、前記人工皮膚モデル構築に係る培養日数が短く、角層成熟度の低い、未熟モデルが好ましい。例えば、R H E再生ヒト表皮モデルにおいては、成熟モデルとして14日間培養した人工皮膚モデルが販売されているのに対し、未熟モデルとしては7日間培養した人工皮膚モデルが販売されている。

20

【0012】

本発明の評価方法を用いて測定可能な生理学的パラメータとしては、人工皮膚モデルから放出されるサイトカイン産生促進及び/又は抑制作用の評価、人工皮膚モデルのミトコンドリア代謝活性の増加及び/又は減少、人工皮膚モデル組織から抽出した各種遺伝子の発現の増加及び/又は抑制作用の評価、人工皮膚モデル組織中の細胞間脂質産生促進及び/又は抑制作用、人工皮膚モデルの組織学的評価などの評価を行うことができる。

30

サイトカインとしては、特に限定されるものではないが、インターロイキン、インターフェロン、T N F、T G F、F G F、K G F、H G F、I G F、エイコサノイド、S C F、M C P及びC S Fなどが挙げられるが、測定方法の簡便性、汎用性の点からインターロイキン1(I L - 1)、インターロイキン-1レセプターアンタゴニスト(I L - 1 R A)、インターロイキン-1(I L - 1)、腫瘍壊死因子(T N F : T u m o r N e c r o s i s F a c t o r)等が好ましい。これらを用いて評価することで、ハウスダスト暴露後の皮膚の炎症、老化、および色素沈着に対する影響を明らかにすることができる。

40

【0013】

さらに、ハウスダスト暴露の前後および同時に評価対象物質を人工皮膚モデルに処理することで、ハウスダストによる刺激に対する評価対象物質の軽減作用を評価することが可能である。評価対象物質は、主に化粧品及び/又は医薬品に利用できる成分を対象とし、そのまま人工皮膚モデルに塗布することもできるし、水、油性成分、各種溶媒などに溶解又は分散物として、更に乳化剤として適用することもできる。また、化粧品、例えば抗老化用化粧品、美白用化粧品、保湿用化粧品、サンスクリーン化粧品、トイレットリー製品、医薬品製剤なども塗布することができる。

人工皮膚モデルに塗布し、ハウスダストによる刺激の改善作用を評価するための化粧品及び/又は医薬品に利用できる有効成分としては、抗炎症剤、抗アレルギー剤、および皮

50

膚バリア機能改善剤などが挙げられる。

【実施例】

【0014】

ハウスダストとして、I T E A 株式会社より購入したハウスダスト(ダニ)を用いて評価を行った。また、ハウスダストによる刺激の改善作用を有する有効成分としては、抗炎症作用ならびに抗アレルギー作用を有することが知られているシソエキスパウダー(アミノアップ化学社製)を評価物質として評価を行った。

【0015】

実施例1．ハウスダストによる人工皮膚モデルの細胞傷害に対する緩和作用

1、試験の概要

ハウスダスト暴露による人工皮膚モデルの細胞傷害に対する、シソエキスの緩和作用を評価した。

2、実験方法

人工皮膚モデル(R H E 再生ヒト表皮モデルの7日間培養未熟モデル)に対してハウスダスト(I T E A 株式会社製「ハウスダスト(ダニ)」)およびシソエキスを適用し、48時間培養した。その後、人工皮膚モデルの細胞生存率をA l a m a r B l u e ^{T M}法により検出し、ハウスダストによる細胞傷害に対するシソエキスの緩和作用を、ハウスダストおよびシソエキスを適用していないモデル(コントロール)に対する生存率で表した。

なお、統計処理はS t u d e n t - t 検定を用いて解析を行った。

【0016】

3、結果

結果を表1に示した。コントロールモデルに対し、ハウスダストを適用したモデルでは、細胞生存率の有意な減少が認められた。一方、シソエキス適用による細胞生存率の変化は認められなかったが、ハウスダストを適用したモデルにシソエキスを適用することで、ハウスダスト適用により低下した細胞生存率の有意な改善作用が認められた。

つまり、シソエキスは、ハウスダスト適用による細胞傷害に対して顕著な緩和作用を示した。

【0017】

【表1】

ハウスダストによる細胞傷害緩和作用 (n=3)

ハウスダスト	シソエキス適用濃度 (%)	コントロールに対する生存率 (%)
適用なし	0	100.0 ± 8.6
	2	101.1 ± 4.4
適用あり	0	45.8 ± 0.2**
	2	96.5 ± 14.2##

ハウスダストおよびシソエキスを適用していないモデルに対する有意差: p** < 0.01

ハウスダストを適用、シソエキスを適用していないモデルに対する有意差: p## < 0.01

【0018】

実施例2．ハウスダストによる人工皮膚モデルの皮膚バリア機能低下に対する改善作用

1、試験の概要

ハウスダスト暴露による人工皮膚モデルの皮膚バリア機能低下に対する、シソエキスの改善作用を評価した。なお、皮膚バリア機能の指標として、経皮水分蒸散量(Trans epidermal water loss, TEWL)を用いて評価した。

2、実験方法

人工皮膚モデル(R H E 再生ヒト表皮モデルの7日間培養未熟モデル)に対してハウスダスト(I T E A 株式会社製「ハウスダスト(ダニ)」)およびシソエキスを適用し、48時間培養した。その後、皮膚バリア機能の指標としてTEWLを測定し(サイクロン水分蒸散計、日本アッシュ社製)、ハウスダストによる皮膚バリア機能低下に対するシソエキスの改善作用を、ハウスダストおよびシソエキスを適用していないモデル(コントロール)に

10

20

30

40

50

対する生存率で表した。

なお、統計処理は Student - t 検定を用いて解析を行った。

【0019】

3、結果

結果を表2に示した。コントロールモデルに対し、ハウスダストを適用したモデルでは、TEWLの有意な上昇が認められたことから、皮膚バリア機能の低下が確認された。一方、シソエキス適用により、ハウスダスト適用により上昇したTEWLの有意な低下が認められたことから、皮膚バリア機能の改善作用が確認された。

つまり、シソエキスは、ハウスダスト適用による皮膚バリア機能の低下に対して顕著な改善作用を示した。

【0020】

【表2】

ハウスダストによる皮膚バリア機能低下の改善作用 (n = 3)

ハウスダスト	シソエキス適用濃度 (%)	コントロールに対する生存率 (%)
適用なし	0	100.0 ± 3.6
	2	91.4 ± 2.3
適用あり	0	111.3 ± 6.0*
	2	97.5 ± 5.7#

ハウスダストおよびシソエキスを適用していないモデルに対する有意差: $p < 0.05$

ハウスダストを適用、シソエキスを適用していないモデルに対する有意差: $p \# < 0.05$

【0021】

実施例3. ハウスダストによる人工皮膚モデルの刺激に対する改善作用

1、試験の概要

ハウスダスト暴露による人工皮膚モデルの刺激に対する応答性の確認とシソエキスの改善作用を炎症関連因子および皮膚バリア機能関連因子の遺伝子発現を指標に評価した。

2、実験方法

人工皮膚モデル (RHE再生ヒト表皮モデルの7日間培養未熟モデル) に対してハウスダスト (ITEA株式会社製「ハウスダスト(ダニ)」) およびシソエキスを適用し、48時間培養した。その後、人工皮膚モデルからRNAを抽出し、DNAアレイ (3D - Gene、東レ社製) を行い、各種遺伝子発現に対する変化を検出した。各種遺伝子発現は、ハウスダストおよびシソエキスを適用していないモデル (コントロール) に対する発現比で表した。

【0022】

3、結果

結果を表3に示した。コントロールモデルに対し、ハウスダストを適用したモデルでは、炎症性サイトカイン関連遺伝子の発現増加、および皮膚バリア機能関連因子の発現低下が認められた。また、シソエキスを適用することで、両因子の改善作用が認められた。

つまり、シソエキスはハウスダスト適用による皮膚炎症誘導に対する改善作用を示した。さらに、皮膚バリア機能低下に対する改善作用を示したことから、これら因子の改善によって実施例2のTEWL改善への寄与が説明できる。

【0023】

10

20

30

40

【表 3】

炎症関連因子および皮膚バリア機能関連因子の遺伝子発現変化

	遺伝子	遺伝子発現比		
		コントロール	ハウスダスト	ハウスダスト+ 2%シソエキス
炎症性サイトカイン関連遺伝子	IL-1 α	1.00	2.21	2.06
	IL-1RA	1.00	5.78	2.17
	IL-1 β	1.00	5.94	5.63
	TNF- α	1.00	1.51	0.94
皮膚バリア機能関連遺伝子	フィラグリン	1.00	0.06	0.11
	セリンパルミトイルトランスフェラーゼ	1.00	0.91	1.40

【産業上の利用可能性】

【0024】

本発明の評価法を用いることで、これまで簡便に評価を行うことができなかったハウスダスト等のアレルゲン接触による皮膚症状を研究、明らかにする方法として有用であると共に、これら症状に対する生理活性成分の評価が可能になることから、これらを有効成分とした化粧品あるいは医薬品を提供することが可能になる。

フロントページの続き

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA05 QA18 QQ08 QQ21 QQ52 QQ61 QQ79 QR32 QR41
QR55 QR62 QR77 QS25 QS34 QS39 QS40 QX02 QX10