

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5528126号
(P5528126)

(45) 発行日 平成26年6月25日(2014.6.25)

(24) 登録日 平成26年4月25日(2014.4.25)

(51) Int.Cl.	F 1	
A 6 1 K 33/10 (2006.01)	A 6 1 K 33/10	
A 6 1 K 33/02 (2006.01)	A 6 1 K 33/02	
A 6 1 K 8/19 (2006.01)	A 6 1 K 8/19	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
請求項の数 5 (全 12 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2010-2980 (P2010-2980)	(73) 特許権者	390011442 株式会社マンドム 大阪府大阪市中央区十二軒町5番12号
(22) 出願日	平成22年1月8日(2010.1.8)	(74) 代理人	110000280 特許業務法人サンクレスト国際特許事務所
(65) 公開番号	特開2011-140471 (P2011-140471A)	(72) 発明者	藤田 郁尚 大阪府大阪市中央区十二軒町5番12号 株式会社マンドム中央研究所内
(43) 公開日	平成23年7月21日(2011.7.21)	(72) 発明者	原 真也 大阪府大阪市中央区十二軒町5番12号 株式会社マンドム中央研究所内
審査請求日	平成24年9月18日(2012.9.18)	(72) 発明者	菅野 学 大阪府大阪市中央区十二軒町5番12号 株式会社マンドム中央研究所内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 TRPA1の活性抑制剤および活性抑制方法ならびに皮膚外用剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

TRPA1の活性を抑制する活性抑制剤であって、炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンを含有することを特徴とするTRPA1の活性抑制剤。

【請求項2】

TRPA1の活性を抑制する活性抑制剤であって、炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンに解離する物質が配合されていることを特徴とするTRPA1の活性抑制剤。

【請求項3】

前記炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンに解離する物質が、炭酸ナトリウムおよび炭酸水素ナトリウムからなる群より選ばれた少なくとも1種である請求項2に記載のTRPA1の活性抑制剤。

【請求項4】

TRPA1の活性を抑制する活性抑制方法(ただし、医療行為を除く)であって、炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンをTRPA1と接触させることを特徴とするTRPA1の活性抑制方法。

【請求項5】

アンモニアを含有する皮膚外用剤であって、炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンに解離する物質が配合されており、前記炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンに解離する物質が、炭酸ナトリウムおよび炭酸水素ナトリウムからなる群より選ばれた少なくとも1種であることを特徴とする皮膚外用剤。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、TRPA1の活性抑制剤および活性抑制方法ならびに皮膚外用剤に関する。さらに詳しくは、本発明は、ヒトの皮膚に用いられる皮膚外用剤などに有用であるTRPA1の活性抑制剤およびTRPA1の活性抑制方法ならびに皮膚外用剤に関する。

【背景技術】**【0002】**

パラベン類やアルカリ剤が配合された化粧料などの外用剤をヒトの皮膚に用いた場合、使用者によっては、皮膚に不快な刺激を感じることがある。前記パラベン類やアルカリ剤による不快な刺激は、一過性受容体電位チャンネル（以下、「TRPチャンネル」という）の1つであるTRPA1の活性化と関連していることが、本発明者らによって見出されている（例えば、特許文献1～3参照）。また、前記TRPA1は、細胞内のアルカリ化により活性化され、活性化されたTRPA1を介して痛覚が引き起こされることが、本発明者らによって見出されている（例えば、非特許文献1参照）。

10

【0003】

一方、近年、使用者の安全意識の高まりから、このような不快な刺激を与えないか、または不快な刺激が少ない外用剤が好まれる傾向にある。そのため、前記外用剤による皮膚に対する不快な刺激を抑制する物質や方法の開発が求められている。

【先行技術文献】

20

【特許文献】**【0004】**

【特許文献1】特開2008-79528号公報

【特許文献2】特開2009-82053号公報

【特許文献3】特開2009-225733号公報

【非特許文献】**【0005】**

【非特許文献1】藤田郁尚ら、「細胞内アルカリ化は、マウスのTRPA1の活性化を介した痛覚を引き起こす (Intracellular alkalization causes pain sensation through activation of TRPA1 in mice)」、[online]、2008年11月13日、第118巻、第12号、p.4049-4057、ザ・ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション (The Journal of Clinical Investigation)、[平成21年10月7日検索]、インターネット<URL: <http://www.jci.org/articles/view/35957>>

30

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0006】**

本発明は、前記従来技術に鑑みてなされたものであり、TRPA1の活性化を効果的に抑制するTRPA1の活性抑制剤を提供することを目的とする。また、本発明は、TRPA1の活性化を効果的に抑制するTRPA1の活性抑制方法を提供することを目的とする。さらに、本発明は、皮膚に対する刺激性が低い皮膚外用剤を提供することを目的とする。

40

【課題を解決するための手段】**【0007】**

すなわち、本発明の要旨は、

(1) TRPA1の活性を抑制する活性抑制剤であって、炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンを含有することを特徴とするTRPA1の活性抑制剤、

(2) TRPA1の活性を抑制する活性抑制剤であって、炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンに解離する物質が配合されていることを特徴とするTRPA1の活性抑制剤、

50

(3) 前記炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンに解離する物質が、炭酸ナトリウムおよび炭酸水素ナトリウムからなる群より選ばれた少なくとも1種である前記(2)に記載のTRPA1の活性抑制剤、

(4) TRPA1の活性を抑制する活性抑制方法であって、炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンをTRPA1と接触させることを特徴とするTRPA1の活性抑制方法、ならびに

(5) アンモニアを含有する皮膚外用剤であって、炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンに解離する物質が配合されていることを特徴とする皮膚外用剤に関する。

【発明の効果】

10

【0008】

本発明のTRPA1の活性抑制剤は、TRPA1の活性化を効果的に抑制するという優れた効果を奏する。また、本発明のTRPA1の活性抑制方法は、TRPA1の活性化を効果的に抑制するという優れた効果を奏する。さらに、本発明の皮膚外用剤は、皮膚に対する刺激性が低いという優れた効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】試験例1において、実施例1~4の各活性抑制剤中における炭酸アンモニウムの濃度、比較例1~4の各試料中におけるアンモニアの濃度または比較例5~8の各試料中における塩化アンモニウムの濃度と、細胞内pHとの関係を示すグラフである。

20

【図2】試験例2において、炭酸水素ナトリウムの濃度とTRPA1発現細胞における蛍光強度比_{活性抑制剤または精製水} / 蛍光強度比_{AITC}との関係を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0010】

1. TRPA1の活性抑制剤

本発明は、1つの側面では、TRPA1の活性を抑制する活性抑制剤であって、炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンを含有することを特徴とするTRPA1の活性抑制剤(以下、「活性抑制剤1」という)に関する。

【0011】

本発明者らは、炭酸イオンに解離する物質を単独で細胞に接触させたときの細胞内pHが、アンモニアを単独で細胞に接触させたときの細胞内pHと比べて低くなるが、炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンに解離する物質と、アンモニアとを混合し、得られた混合物を細胞と接触させたときには、アンモニアを単独で細胞と接触させたときと比べて、細胞内カルシウムイオン濃度が著しく低くなることから、炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンに解離する物質が、TRPA1の活性を抑制することを見出した。本発明は、これらの知見に基づくものである。

30

【0012】

前記活性抑制剤1によれば、炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンを含有しているので、前記活性抑制剤1をTRPA1と接触させることにより、TRPA1の活性を抑制することができる。

40

【0013】

また、前記活性抑制剤1は、皮膚に対する不快な刺激との関連性があるTRPA1の活性を有効に抑制するため、例えば、皮膚外用剤などに配合するための助剤として好適である。前記活性抑制剤1は、例えば、皮膚外用剤などに配合されることによって当該皮膚外用剤などによるヒトの皮膚に対する不快な刺激を抑制することが期待される。

【0014】

前記活性抑制剤1における炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンの濃度は、TRPA1の活性に対する抑制効果を十分に発揮させる観点から、0.001質量%以上が好ましく、0.01質量%以上がより好ましく、前記活性抑制剤の保存安定性の観点から、5質量%以下が好ましく、1質量%以下がより好ましい。

50

【0015】

本発明においては、前記炭酸イオンおよび炭酸水素イオンは、単独で用いられていてもよく、併用されていてもよい。炭酸イオンと炭酸水素イオンとが併用されている場合、前記炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンの濃度は、炭酸イオンと炭酸水素イオンとを合わせた濃度である。

【0016】

前記活性抑制剤1において、前記炭酸イオンおよび炭酸水素イオンは、例えば、水などの溶媒中で解離した状態で存在していてもよい。この場合、前記活性抑制剤1のpHは、前記溶媒中で炭酸イオンおよび炭酸水素イオンに解離した状態で存在させる観点から、2以上が好ましく、5以上がより好ましく、皮膚に対する負荷を抑制する観点から、13以下が好ましく、11以下がより好ましい。

10

【0017】

また、本発明の目的が妨げられない範囲内であれば、前記活性抑制剤1は、例えば、界面活性剤、アルコール、香料、キレート化剤などの他の成分を含有していてもよい。

【0018】

前記TRPA1の活性としては、例えば、イオン流束の調節能(例えば、細胞外から細胞内への陽イオンの輸送能など)、膜電位の調節能(例えば、電流の発生能など)などが挙げられる。前記活性は、TRPA1アゴニストがTRPA1に結合して当該TRPA1が活性化することによって発現する。

【0019】

前記陽イオンとしては、例えば、カルシウムイオン、ナトリウムイオンなどが挙げられる。

20

【0020】

また、前記TRPA1アゴニストとしては、例えば、アンモニア、アリルイソチオシアナート、ブラジキニン、シンナムアルデヒド、アリシン、アクロレイン、メントールなどが挙げられる。

【0021】

前記活性は、例えば、TRPA1アゴニストの結合に伴う細胞外から細胞内への陽イオンの流入を指標として用い、活性抑制剤とTRPA1アゴニストとTRPA1とを接触させたときの当該TRPA1を含む細胞内の陽イオン量に対するTRPA1アゴニストとTRPA1とを接触させたときの当該TRPA1を含む細胞内の陽イオン量の割合を算出し、活性抑制剤による陽イオン量の減少率を測定したり、あるいはTRPA1アゴニストの結合に伴う細胞内における電流の増加量などを指標として用い、活性抑制剤とTRPA1アゴニストとTRPA1とを接触させたときの当該TRPA1を含む細胞内の電流に対するTRPA1アゴニストとTRPA1とを接触させたときの当該TRPA1を含む細胞内の電流の割合を算出し、活性抑制剤による電流の減少率を測定することによって調べることができる。

30

【0022】

また、前記活性抑制剤1によるTRPA1の活性の抑制効果は、例えば、TRPA1を発現する細胞(以下、「TRPA1発現細胞」という)を用い、前記活性抑制剤1の存在下でTRPA1アゴニストと接触させたTRPA1発現細胞の細胞内pHと当該活性抑制剤1の非存在下でTRPA1アゴニストと接触させたTRPA1発現細胞の細胞内pHとの差異を比較すること、前記活性抑制剤1の存在下にTRPA1アゴニストと接触させたTRPA1発現細胞内におけるカルシウムイオン濃度と当該活性抑制剤1の非存在下でTRPA1アゴニストと接触させたTRPA1発現細胞内におけるカルシウムイオン濃度との差異を比較したり、あるいは前記活性抑制剤1の存在下でTRPA1アゴニストと接触させたTRPA1発現細胞内における電流と当該活性抑制剤1の非存在下でTRPA1アゴニストと接触させたTRPA1発現細胞内における電流との間の差異を比較することによって評価することができる。

40

【0023】

50

前記細胞内 pH は、例えば、pH 蛍光指示薬を TRPA1 発現細胞に導入し、細胞内 pH に応じた pH 蛍光指示薬の蛍光強度を調べる方法などによって測定することができる。前記 pH 蛍光指示薬としては、例えば、pH に応じて蛍光特性が変化する試薬であればよく、例えば、BCECF-AM などが挙げられる。

【0024】

前記カルシウムイオン濃度は、例えば、カルシウムキレート化剤に基づく蛍光試薬（以下、「蛍光カルシウム指示薬」ともいう）を TRPA1 発現細胞に導入し、細胞内のカルシウムイオンに前記蛍光カルシウム指示薬を結合させ、カルシウムイオンと結合した蛍光カルシウム指示薬の蛍光強度を調べる方法などによって測定することができる。前記蛍光カルシウム指示薬としては、カルシウムイオンと結合し蛍光カルシウム指示薬の量によってその蛍光特性が変化するのであれば特に限定されないが、例えば、FURA 2、FURA 2-AM、Fluo-3 などが挙げられる。

10

【0025】

また、前記電流は、例えば、パッチクランプ法などによって測定することができる。

【0026】

本発明は、別の側面では、TRPA1 の活性を抑制する活性抑制剤であって、炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンに解離する物質が配合されていることを特徴とする TRPA1 の活性抑制剤（以下、「活性抑制剤 2」という）に関する。

【0027】

前記活性抑制剤 2 を TRPA1 と接触させたとき、前記炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンに解離する物質から解離された炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンは、TRPA1 と接触する。そのため、前記活性抑制剤 2 によれば、TRPA1 の活性を効果的に抑制することができる。したがって、前記活性抑制剤 2 は、前記活性抑制剤 1 と同様に、例えば、皮膚外用剤などに配合するための助剤として好適である。また、前記活性抑制剤 2 は、例えば、皮膚外用剤などに配合されることによって当該皮膚外用剤などによるヒトの皮膚に対する不快な刺激を抑制することが期待される。

20

【0028】

前記炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンに解離する物質は、TRPA1 と接触させる際に、炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンに解離していればよい。前記炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンに解離する物質としては、例えば、炭酸塩、炭酸水素塩などが挙げられる。前記炭酸塩としては、例えば、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸アンモニウム、炭酸カルシウム、炭酸マグネシウムなどが挙げられる。また、前記炭酸水素塩としては、例えば、炭酸水素ナトリウム、炭酸水素アンモニウム、炭酸水素カリウム、炭酸水素カルシウムなどが挙げられる。これらのなかでは、水などの溶媒中で炭酸イオンおよび炭酸水素イオンに解離した状態で存在させる観点および前記活性抑制剤 2 の保存安定性の観点から、炭酸ナトリウムおよび炭酸水素ナトリウムからなる群より選ばれた少なくとも 1 種が好ましい。

30

【0029】

前記炭酸ナトリウムおよび炭酸水素ナトリウムは、例えば、本発明の TRPA1 の活性抑制剤を皮膚外用剤などに配合する場合には、皮膚への負荷を効果的に抑制する点で好適である。

40

【0030】

前記活性抑制剤 2 における前記炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンに解離する物質の濃度は、TRPA1 の活性に対する抑制効果を十分に発揮させる観点から、好ましくは 0.005 質量% 以上、より好ましくは 0.05 質量% 以上となり、前記活性抑制剤 2 の保存安定性の観点から、好ましくは 10 質量% 以下が、より好ましくは 2 質量% 以下となるように配合されることが望ましい。

【0031】

前記活性抑制剤 2 において、前記炭酸イオンおよび炭酸水素イオンに解離する物質は、水などの溶媒中に溶解した状態で存在していればよい。溶媒が水である場合、前記活性抑

50

制剤 2 の pH は、前記水中で炭酸イオンおよび炭酸水素イオンに解離した状態で存在させる観点から、2 以上が好ましく、5 以上がより好ましく、皮膚に対する負荷を抑制する観点から、1.3 以下が好ましく、1.1 以下がより好ましい。

【0032】

なお、前記活性抑制剤 2 には、本発明の目的が妨げられない範囲内であれば、例えば、界面活性剤、アルコール、香料、キレート化剤などの他の成分が配合されていてもよい。

【0033】

前記活性抑制剤 2 による TRPA1 の活性の抑制効果は、前記活性抑制剤 1 による TRPA1 の活性の抑制効果と同様の手法によって評価することができる。

10

【0034】

2. TRPA1 の活性抑制方法

本発明の TRPA1 の活性抑制方法は、TRPA1 の活性を抑制する活性抑制方法であり、炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンを TRPA1 と接触させることを特徴とする。

【0035】

本発明の TRPA1 の活性抑制方法によれば、炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンを用いるので、例えば、ヒトの皮膚をに存在する感覚神経に含まれる TRPA1、口腔などの粘膜下に存在する感覚神経に含まれる TRPA1 などの活性を効果的に抑制することができる。

20

【0036】

本発明においては、炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンの供給源として、前述した TRPA1 の活性抑制剤を用いて、炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンを TRPA1 と接触させることができる。

【0037】

炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンと TRPA1 との接触は、TRPA1 を含む部位、例えば、ヒトの皮膚を構成する細胞に TRPA1 の活性抑制剤を供給することによって行なうことができる。

【0038】

前記 TRPA1 と接触させる炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンの量は、TRPA1 の活性の抑制効果を十分に発揮させ、かつ皮膚への負荷を抑制することができる範囲で適宜設定することができる。

30

【0039】

なお、TRPA1 を含む部位、例えば、ヒトの皮膚における細胞に TRPA1 の活性抑制剤を供給する場合、当該 TRPA1 の活性抑制剤の供給時に加えて、ヒトの皮膚への前記 TRPA1 の活性抑制剤に含まれる炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンの浸透を促進する助剤をさらにヒトの皮膚における細胞に供給してもよい。

【0040】

本発明の TRPA1 の活性抑制方法による TRPA1 の活性の抑制効果は、前記活性抑制剤 1 または活性抑制剤 2 による TRPA1 の活性の抑制効果と同様の手法によって評価することができる。

40

【0041】

本発明の TRPA1 の活性抑制方法は、例えば、皮膚と接触したときに不快な刺激を与える皮膚外用剤を使用する時に行なうことにより、皮膚における細胞に含まれる TRPA1 の活性を抑制するので、皮膚などで引き起こされる不快な刺激を低減することができる。

【0042】

3. 皮膚外用剤

本発明の皮膚外用剤は、アンモニアを含有する皮膚外用剤であり、炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンに解離する物質が配合されていることを特徴とする。

50

【0043】

本発明の皮膚外用剤は、炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンに解離する物質が配合されているので、当該皮膚外用剤に含まれるアンモニアによるTRPA1の活性化が抑制され、皮膚に引き起こされる不快な刺激を低減することができる。

【0044】

なお、本明細書において、「皮膚外用剤」とは、皮膚に直接適用されるものをいう。前記皮膚外用剤としては、例えば、皮膚脱色剤（ボディブリーチング剤）などが挙げられる。

【0045】

本発明の皮膚外用剤におけるアンモニアの含有量は、アンモニアによる効果を十分に発現させる観点から、0.1質量%以上が好ましく、0.5質量%以上がより好ましく、皮膚に対する負荷を抑制する観点から、20質量%以下が好ましく、10質量%以下がより好ましい。

10

【0046】

本発明の皮膚外用剤において、前記炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンに解離する物質は、TRPA1と接触させる際に、炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンに解離していればよい。前記炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンに解離する物質としては、前記活性抑制剤に用いられる物質と同様の物質が挙げられる。前記炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンに解離する物質のなかでは、アンモニアによる皮膚への負荷を効果的に抑制する観点から、炭酸ナトリウムおよび炭酸水素ナトリウムからなる群より選ばれた少なくとも1種が好ましい。

20

【0047】

アンモニアに対する前記炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンに解離する物質の量は、アンモニア100質量部に対して、アンモニアによる皮膚への負荷を抑制する効果を十分に得る観点から、1質量部以上が好ましく、10質量部以上がより好ましく、皮膚外用剤の安定性の観点から、1000質量部以下が好ましく、200質量部以下がより好ましい。

【0048】

本発明の皮膚外用剤には、本発明の目的が妨げられない範囲で、例えば、界面活性剤、保湿剤、増粘剤、防腐剤、酸化防止剤、キレート化剤、油、アルコール、pH調整剤、香料、色素、紫外線吸収剤、紫外線散乱剤、ビタミン、アミノ酸、水などの他の成分が配合されていてもよい。

30

【実施例】

【0049】

以下に実施例により本発明を更に詳しく説明するが、本発明は、かかる実施例のみに限定されるものではない。

【0050】

(実施例1~4)

炭酸アンモニウムの濃度が1mM(実施例1)、5mM(実施例2)、10mM(実施例3)または50mM(実施例4)となるように、炭酸アンモニウムを25で精製水に溶解させた。その後、得られた水溶液のpHを、それぞれ、pH調整剤として塩酸を用いて7.4に調整して、活性抑制剤を得た。

40

【0051】

(比較例1~4)

アンモニアの濃度が1mM(比較例1)、5mM(比較例2)、10mM(比較例3)または50mM(比較例4)であるアンモニア水溶液(pH7.4)を調製し、試料を得た。

【0052】

(比較例5~8)

塩化アンモニウムの濃度が1mM(比較例5)、5mM(比較例6)、10mM(比較

50

例7) または50 mM (比較例8) となるように、塩化アンモニウムを25 で精製水に溶解させた。その後、得られた水溶液のpHを7.4に調整して、試料を得た。

【0053】

(試験例1)

(1) BCECF-AM導入細胞の調製

10質量%ウシ胎仔血清含有DMEM培地に、HEK293細胞を最終濃度が 4×10^7 細胞/mLとなるように懸濁し、細胞懸濁液を得た。得られた細胞懸濁液に、pH蛍光指示薬〔シグマアルドリッチ社製、商品名：BCECF-AM〕を最終濃度が $1 \mu\text{M}$ となるように添加し、混合物を得た。その後、得られた混合物を37 で1時間インキュベーションすることにより、HEK293細胞にpH蛍光指示薬を導入した。得られた細胞を標準緩衝液(組成：140 mM塩化ナトリウム、5 mM塩化カリウム、2 mM塩化マグネシウム、2 mM塩化カルシウム、10 mM HEPES、10 mMグルコース、pH 7.4に調整)で洗浄し、BCECF-AM導入細胞を得た。

10

【0054】

(2) 細胞内pHの測定

前記BCECF-AM導入細胞を、最終濃度が 3×10^7 細胞/mLとなるように前記標準緩衝液に懸濁し、細胞浮遊液を得た。前記細胞浮遊液を還流槽付の蛍光測定用装置の還流槽に入れ、37 で10分間プレインキュベーションした後、実施例1~4の活性抑制剤または比較例1~8の試料を前記細胞浮遊液に添加し、BCECF-AM導入細胞と実施例1~4の活性抑制剤または比較例1~8の試料とを接触させた。その後、BCECF-AM導入細胞中のBCECF-AMに基づく励起波長440 nmにおける蛍光強度と、前記BCECF-AM導入細胞中のBCECF-AMに基づく励起波長495 nmにおける蛍光強度とを測定した。

20

【0055】

なお、前記還流槽付の蛍光測定用装置として、CCDカメラを取り付けた倒立顕微鏡〔オリンパス(株)製、商品名：BX-71〕に還流槽を設け、かつシリンジから還流槽を通して試薬を還流するようにした装置を用いた。

【0056】

前記蛍光強度の測定は、実施例1~4の活性抑制剤または比較例1~8の試料と接触させたBCECF-AM導入細胞中のBCECF-AMに由来する励起波長440 nmにおける蛍光および励起波長495 nmにおける蛍光を前記CCDカメラで取り込み、取り込まれた蛍光を、画像処理解析ソフト〔スキャナリティックスインコーポレーテッド(Scanalytix Inc.)製、商品名：IPLab Ver. 5.0〕で解析することにより行なった。

30

【0057】

また、細胞内pHは、予め標準pH溶液を用いて作成した検量線と前記蛍光強度とを用いて算出した。なお、前記標準pH溶液として、緩衝液(組成：100 mMグルコン酸カリウム、20 mM塩化カリウム、10 mM塩化ナトリウム、10 mM HEPES、2 mM塩化マグネシウム、200 μM 塩化カルシウム、10 mMグルコース、20 μM ナイジェリシンナトリウム、pH 6.0、7.0、8.0または8.5に調整)を用いた。

40

【0058】

試験例1において、実施例1~4の各活性抑制剤中における炭酸アンモニウムの濃度、比較例1~4の各試料中におけるアンモニアの濃度または比較例5~8の各試料中における塩化アンモニウムの濃度と、細胞内pHとの関係を調べた結果を図1に示す。図1中、白三角は実施例1~4の活性抑制剤(炭酸アンモニウム)と接触させたときのBCECF-AM導入細胞の細胞内pH、黒丸は比較例1~4の試料(アンモニア)と接触させたときのBCECF-AM導入細胞の細胞内pH、白丸は比較例5~8の試料(塩化アンモニウム)と接触させたときのBCECF-AM導入細胞の細胞内pHをそれぞれ示す。

【0059】

図1に示された結果から、実施例1~4それぞれの活性抑制剤(炭酸アンモニウム)と

50

接触させた BCECF - AM 導入細胞の細胞内 pH は、比較例 1 ~ 4 の試料 (アンモニウム) と接触させた BCECF - AM 導入細胞および塩化アンモニウムと接触させた BCECF - AM 導入細胞それぞれの細胞内 pH と比べて低くなる傾向にあることがわかる。

【0060】

(製造例 1)

ヒト TRPA1 をコードする cDNA (GenBank アクセション番号: NM_007332 に示される塩基配列の 63 位 ~ 3888 位のポリヌクレオチド) を、哺乳動物細胞用ベクター [インビトロジェン社製、商品名: pcDNA3.1(+)] のクローニングサイトに挿入し、ヒト TRPA1 発現ベクターを得た。得られたヒト TRPA1 発現ベクター 1 μ g と、遺伝子導入用試薬 [インビトロジェン社製、商品名: PLUS Reagent (プラスリージェント)、カタログ番号: 11514-015] 6 μ L とを混合し、混合物 I を得た。また、遺伝子導入用カチオン性脂質 [インビトロジェン社製、商品名: リポフェクタミン (登録商標)、カタログ番号: 18324-012] 4 μ L と、血清使用量低減培地 [インビトロジェン社製、商品名: OPTI-MEM (登録商標) I Reduced - Serum Medium (カタログ番号: 11058021) 200 μ L とを混合し、混合物 II を得た。

10

【0061】

また、5 体積% 二酸化炭素の雰囲気中、37 $^{\circ}$ C に維持された直径 35 mm のシャーレ上の 10 質量% FBS 含有 DMEM 培地中において、 5×10^5 細胞の HEK293 細胞を 70% のコンフルエンスになるまで培養した。

20

【0062】

得られた細胞培養物に、前記混合物 I と混合物 II とを添加することにより、HEK293 細胞に前記ヒト TRPA1 発現ベクターを導入し、TRPA1 発現細胞を得た。

【0063】

(実施例 5 ~ 7)

炭酸水素ナトリウムの濃度が 10 mM (実施例 5)、5 mM (実施例 6) または 10 mM (実施例 7) となるように、当該炭酸水素ナトリウムを 25 $^{\circ}$ C で精製水に溶解させた。その後、得られた溶液の pH を、それぞれ、pH 調整剤として塩酸を用いて 7.4 に調整して、活性抑制剤を得た。

【0064】

(試験例 2)

前記試験例 1 の結果から、炭酸アンモニウムは、アンモニアおよび塩化アンモニウムと比べて細胞内 pH を上昇させる度合いが小さいため、細胞内のアルカリ化によって活性化される TRPA1 の活性への影響が低いと考えられる。そこで、炭酸アンモニウムと同様に炭酸イオンに解離する炭酸水素ナトリウムを用い、TRPA1 の活性への影響を調べた。

30

【0065】

(1) TRPA1 発現細胞への FURA 2 - AM の導入

前記製造例 1 で得られた TRPA1 発現細胞を、細胞内カルシウムイオン測定用試薬である FURA 2 - AM (インビトロジェン社製) を最終濃度 5 μ M で含む 10 質量% ウシ胎仔血清含有 DMEM 培地中で、室温で 60 分間インキュベーションすることにより、前記 TRPA1 発現細胞に FURA 2 - AM を導入した。

40

【0066】

(2) TRPA1 の活性の測定

前記 (1) において FURA 2 - AM を導入した TRPA1 発現細胞をのせたカバーガラスを蛍光測定用装置の還流槽に入れた。その後、前記還流槽中の TRPA1 発現細胞を緩衝液 [組成: 140 mM 塩化ナトリウム、5 mM 塩化カリウム、2 mM 塩化マグネシウム、2 mM 塩化カルシウム、10 mM グルコース、10 mM ヘプス塩酸緩衝液 (pH 7.4)] で洗浄した。

【0067】

50

また、アンモニアの濃度が10 mMとなるように、アンモニアと実施例5、実施例6または実施例7の活性抑制剤とを混合した。つぎに、得られた混合物を前記還流槽に入れ、前記活性抑制剤とアンモニアとTRPA1発現細胞に含まれるTRPA1とを接触させた。なお、還流槽内の溶液のpHを7.4となるように調整した。

【0068】

その後、前記還流槽において、TRPA1発現細胞に導入され、かつ細胞内のカルシウムイオンに結合したFURA2-AMに基づく励起波長340 nmにおける蛍光の強度（以下、「蛍光強度_{340nm}」という）およびTRPA1発現細胞に導入されたFURA2-AMに基づく励起波長380 nmにおける蛍光の強度（以下、「蛍光強度_{380nm}」という）を測定した。測定された蛍光強度_{340nm}および蛍光強度_{380nm}から、 $\text{蛍光強度比}_{\text{活性抑制剤}} = \frac{\text{蛍光強度}_{340\text{nm}} / \text{蛍光強度}_{380\text{nm}}}{\text{前記緩衝液を用いたときの蛍光強度}_{340\text{nm}} / \text{前記緩衝液を用いたときの蛍光強度}_{380\text{nm}}}$ を算出した。前記 $\text{蛍光強度比}_{\text{活性抑制剤}}$ は、（活性抑制剤を用いたときの $\text{蛍光強度}_{340\text{nm}} / \text{前記緩衝液を用いたときの蛍光強度}_{380\text{nm}}$ ）に基づいて算出した。

10

【0069】

また、前記活性抑制剤に代えて、TRPA1に対する既知のアゴニストであるアリルイソチオシアナート（20 μMアリルイソチオシアナート水溶液）を用いたことを除き、前記活性抑制剤を用いた場合と同様にして、 $\text{蛍光強度比}_{\text{AITC}}$ を算出した。前記 $\text{蛍光強度比}_{\text{AITC}}$ は、（アリルイソチオシアナートを用いたときの $\text{蛍光強度}_{340\text{nm}} / \text{アリルイソチオシアナートを用いたときの蛍光強度}_{380\text{nm}}$ - 前記緩衝液を用いたときの $\text{蛍光強度}_{340\text{nm}} / \text{前記緩衝液を用いたときの蛍光強度}_{380\text{nm}}$ ）に基づいて算出した。算出された $\text{蛍光強度比}_{\text{活性抑制剤}}$ と $\text{蛍光強度比}_{\text{AITC}}$ とから、 $\text{蛍光強度比}_{\text{活性抑制剤}} / \text{蛍光強度比}_{\text{AITC}}$ を算出した。

20

【0070】

なお、対照として、実施例5～7の活性抑制剤の代わりに精製水（比較例9）を用いたことを除き、実施例5～7の活性抑制剤を用いた場合と同様にして、 $\text{蛍光強度比}_{\text{精製水}} = \frac{\text{精製水を用いたときの蛍光強度}_{340\text{nm}}}{\text{精製水を用いたときの蛍光強度}_{380\text{nm}}}$ を算出した。算出された $\text{蛍光強度比}_{\text{精製水}}$ と $\text{蛍光強度比}_{\text{AITC}}$ とから、 $\text{蛍光強度比}_{\text{精製水}} / \text{蛍光強度比}_{\text{AITC}}$ を算出した。

【0071】

試験例2において、炭酸水素ナトリウムの濃度とTRPA1発現細胞における $\text{蛍光強度比}_{\text{活性抑制剤}}$ または $\text{精製水} / \text{蛍光強度比}_{\text{AITC}}$ との関係を調べた結果を図2に示す。

30

【0072】

図2において、「 $\text{蛍光強度比}_{\text{活性抑制剤}}$ または $\text{精製水} / \text{蛍光強度比}_{\text{AITC}}$ 」は、 $\text{蛍光強度比}_{\text{活性抑制剤}} / \text{蛍光強度比}_{\text{AITC}}$ および $\text{蛍光強度比}_{\text{精製水}} / \text{蛍光強度比}_{\text{AITC}}$ の総称を示す。また、図2において、試験番号1は活性抑制剤の代わりに精製水（比較例9）を用いたときの $\text{蛍光強度比}_{\text{精製水}} / \text{蛍光強度比}_{\text{AITC}}$ 、試験番号2は実施例5の活性抑制剤を用いたときの $\text{蛍光強度比}_{\text{活性抑制剤}} / \text{蛍光強度比}_{\text{AITC}}$ 、試験番号3は実施例6の活性抑制剤を用いたときの $\text{蛍光強度比}_{\text{活性抑制剤}} / \text{蛍光強度比}_{\text{AITC}}$ 、試験番号4は実施例7の活性抑制剤を用いたときの $\text{蛍光強度比}_{\text{活性抑制剤}} / \text{蛍光強度比}_{\text{AITC}}$ を示す。

40

【0073】

図2に示された結果から、実施例5～7の活性抑制剤を用いたときの $\text{蛍光強度比}_{\text{活性抑制剤}} / \text{蛍光強度比}_{\text{AITC}}$ が、精製水（比較例9）を用いたときの $\text{蛍光強度比}_{\text{精製水}} / \text{蛍光強度比}_{\text{AITC}}$ と比べて著しく小さくなっているため、炭酸水素ナトリウムをTRPA1に接触させた場合、アンモニアによるTRPA1を介した細胞内カルシウムイオン濃度の増加が抑制されることがわかる。したがって、これらの結果から、炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンにより、TRPA1の活性を抑制することができることがわかる。

【0074】

以上の結果より、炭酸アンモニウムや炭酸水素ナトリウムなどのように炭酸イオンに解離する物質により、TRPA1アゴニストによるTRPA1を介した細胞内カルシウムイ

50

オン濃度の増加が抑制されるため、炭酸アンモニウムや炭酸水素ナトリウムなどのように炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンに解離する物質は、TRPA1の活性を抑制する活性抑制剤として当該TRPA1に作用することがわかる。また、炭酸イオンおよび/または炭酸水素イオンにより、TRPA1の活性を抑制することができることがわかる。

【0075】

(処方例)

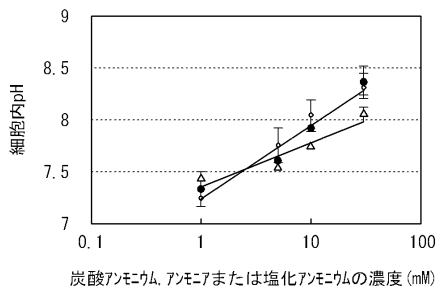
以下、本発明に係る皮膚外用剤の処方例を示す。

処方例1 ボディークリーニング剤

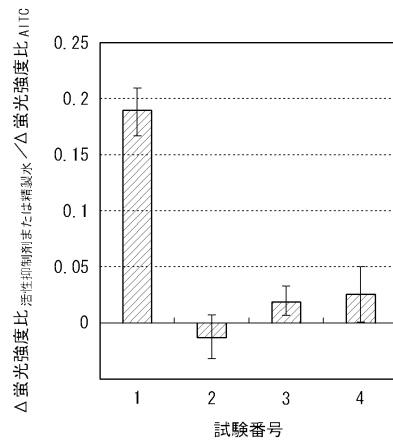
アンモニア	1 質量%
炭酸水素ナトリウム	1 質量%
(炭酸イオンおよび炭酸水素イオン換算量)	1 質量%
セタノール	4 質量%
ポリオキシエチレン(20)硬化ヒマシ油	2 質量%
ポリオキシエチレン(20)セチルエーテル	2 質量%
塩化セチルトリメチルアンモニウム	1 質量%
1,3-ブチレングリコール	3 質量%
過酸化水素	3 質量%
グリチルリチン酸ジカリウム	0.1 質量%
精製水	残部

10

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 Q 19/00 (2006.01) A 6 1 Q 19/00

(72)発明者 栗山 健一
大阪府大阪市中央区十二軒町5番12号 株式会社マングラム中央研究所内

(72)発明者 辻野 義雄
大阪府大阪市中央区十二軒町5番12号 株式会社マングラム中央研究所内

審査官 中尾 忍

(56)参考文献 特開2009-035500(JP,A)
特開2006-188672(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 6 1 K 3 3 / 1 0
A 6 1 K 3 3 / 0 2
A 6 1 K 8 / 1 9

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)