(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2008 年4 月24 日 (24.04.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/047758 A1

(51) 国際特許分類:
*A61K 31/136* (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
*A61K 8/41* (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
*A61K 8/49* (2006.01) *A61Q 19/02* (2006.01)
*A61K 31/5415* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2007/070077

(22) 国際出願日: 2007 年10 月15 日 (15.10.2007)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2006-283050
2006 年10 月17 日 (17.10.2006) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社林原生物化学研究所 (KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJO) [JP/JP]; 〒7000907 岡山県岡山市下石井１丁目２番３号 Okayama (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 三宅 正樹 (MIYAKE, Masaki) [JP/JP]; 〒7000907 岡山県岡山市下石井１丁目２番３号 株式会社林原生物化学研究所内 Okayama (JP). 河野 恵三 (KOHNO, Keizo) [JP/JP]; 〒7000907 岡山県岡山市下石井１丁目２番３号 株式会社林原生物化学研究所内 Okayama (JP). 佐能 吏 (SANO, Osamu) [JP/JP]; 〒7000907 岡山県岡山市下石井１丁目２番３号 株式会社林原生物化学研究所内 Okayama (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

WO 2008/047758 A1

(54) **Title:** ANTIINFLAMMATORY AGENT COMPRISING 2-AMINOPHENOL OR DERIVATIVE THEREOF AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 発明の名称: ２－アミノフェノール又はその誘導体を有効成分とする抗炎症剤

(57) **Abstract:** Disclosed is an anti-inflammatory agent having an excellent effect and having little adverse side-effects. The anti-inflammatory agent comprises 2-aminophenol or a derivative thereof as an active ingredient.

(57) 要約: 効果に優れ、副作用の少ない抗炎症剤を提供することを課題とし、２－アミノフェノール又はその誘導体を有効成分として含有する抗炎症剤を提供することによって、前記課題を解決する。

# 明 細 書

## 2－アミノフェノール又はその誘導体を有効成分とする抗炎症剤

### 技術分野

[0001] 本発明は抗炎症剤に関するものであり、とりわけ、2－アミノフェノール又はその誘導体を有効成分とする抗炎症剤に関するものである。

### 背景技術

[0002] 炎症反応は、病原体から生体を防御するための重要な生体防御反応のひとつではあるものの、生体組織に対してもダメージを与えることから、過剰な炎症反応はかえって有害である。特に自己免疫疾患やアレルギー性疾患など、病原体が存在しない炎症反応は全く有害である。そこで、炎症反応を抑制するため、多種多様の抗炎症剤が開発されており、例えば、アスピリン、ジクロフェナク、インドメタシン、メフェナム酸などの非ステロイド系抗炎症剤、プレドニゾロン、酢酸ヒドロコルチゾン、ジフルプレドナートなどのステロイド系抗炎症剤があげられ、これらはすでに医薬品として使用されている。

[0003] ところで、炎症反応による主な症状は、「痛み」と「腫れ」である。炎症反応に伴う「痛み」はプロスタグランジンにより惹起される。プロスタグランジンの生成にはシクロオキシゲナーゼ（COX）が必須であることから、その阻害剤（COX阻害剤）は鎮痛効果を発揮する抗炎症剤として有用である。COXは、アラキドン酸からプロスタグランジンを生成する酵素であり、2種類のアイソフォームが存在し、このうちCOX－1は、消化管、腎臓、血小板などにおいて構成的に発現しており、正常な生理機能の維持に欠かせない酵素である。一方、COX－2はインターロイキン－1α、腫瘍壊死因子α（TNF－α）などの炎症性サイトカインなどによって一過性に産生誘導され、炎症時に過剰発現する酵素であり、リウマチ、関節炎などの炎症性疾患や癌、胃潰瘍、アルツハイマー病、排卵分娩に関与していると報告されている。抗炎症剤としてのCOX阻害剤はCOX－2の活性阻害を目的としているものの、多くの抗炎症剤はCOX－1の活性をも阻害するため、腹痛などの副作用が問題となっている。そこで、COX－2選択的阻害剤が欧米を中心に開発され、胃腸障害や腎障害などの副作用が少なく、抗

炎症剤として有望であった。しかしながら、シンムラ等著、『心血管系におけるシクロオキシゲナーゼ(COX)－2は敵か，味方か？－COX－2ハザードの分子メカニズム－』、インフィラメーション・アンド・レジェネレーション、第25巻、第6号、第517乃至524頁、2005年に記載のとおり、COX－2選択阻害剤のロフェコキシブを投与した大腸腺腫性ポリープ患者に、心筋梗塞などの心血管系の疾患が発生する確率が高いことが報告され、COX－2選択的阻害剤の安全性が不安視されている。よって、日本ではいまだ医薬品として認可されていない。

[0004] 一方、炎症に伴う「腫れ」は、患部の血管が拡張し、白血球、リンパ球、マクロファージなどの免疫担当細胞が局所に集中することで起こる。血管の拡張は、一酸化窒素(NO)により誘導されることから、「腫れ」の症状を緩和するためには、NOの産生阻害剤が有用である。NOは、一酸化窒素合成酵素(NOS)が、L－アルギニンを酸化することにより産生される。NOSには非誘導型と誘導型の2種類が存在し、このうち誘導型NOS(iNOS)はマクロファージ、内皮細胞、平滑筋細胞等に多く存在しており、炎症反応における重要な因子である。すなわち、NOの産生を抑制するためには、iNOSの活性阻害剤やiNOSの産生抑制剤が有効であり、iNOS活性阻害剤としては、$N^G$－ニトロ－L－アルギニン－メチル－エステル、イソチオ尿素誘導体、2－イミノピペリジン、L－カナバリンなどが挙げられる。

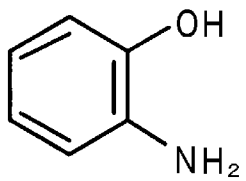
[0005] ところで、多くの炎症性疾患において、COX－2とiNOSが同時に過剰に発現しているという報告があり、炎症反応は上記2つの酵素の活性が大いに関わっていると考えられる。したがって、炎症症状を効率よく緩和するには、「痛み」と「腫れ」を引き起こすCOX－2とiNOSの活性を同時に抑制する必要がある。しかしながら、従来知られるCOX阻害剤又はNOS阻害剤は、酵素特異性が高く、COX又はiNOSのいずれかの活性を阻害するにすぎない。したがって、「痛み」と「腫れ」を同時に緩和することができる抗炎症剤が望まれている。

[0006] 一方、2－アミノフェノール(別名：クエスチオマイシンB)は、下記化学式1で示される化合物であり、酸化重合して、下記化学式2で示される2－アミノフェノキサジン－3－オン(別名：クエスチオマイシンA)に比較的容易に変換する。2－アミノフェノール又はその誘導体は、抗菌活性を持つ物質として古くから知られており、特に、2－アミ

ノフェノキサジン－3－オンは、強力な抗癌剤であるアクチノマイシンDの基本骨格としても知られている。モトハシ等著、『ポテンシャル・アンチツモア・フェノキサジンズ』、メディカル・リサーチ・レビュー、第11巻、第250乃至254頁、1991年には、2－アミノフェノキサジン－3－オン及びその誘導体が抗腫瘍活性を有していることが開示されており、特に、シマモト等著、『アンチツモア・エフェクツ・オブ・ア・ノベル・フェノキサジン・デリバティブ・オン・ヒューマン・リューケミア・セル・ラインズ・イン・ビトロ・アンド・イン・ビボ』、クリニカル・キャンサー・リサーチ、第7巻、第704乃至708頁、2001年にはその誘導体の一つの2－アミノ－4，4α－ジヒドロ－4α，7－ジメチル－フェノキサジン－3－オンが、各種の腫瘍細胞に対して細胞障害活性を示すことが開示されている。さらに近年、2－アミノフェノキサジン－3－オンは、特開2004－143101号公報ではウイルス性疾患の治療に、特開2005－272334号公報ではクラミジア症の治療に、特開2005－60325号公報ではヘリコバクター属が関与する消化器疾患の治療に有効であることが開示されている。しかしながら、2－アミノフェノール誘導体が抗炎症作用を有していることは知られていない。

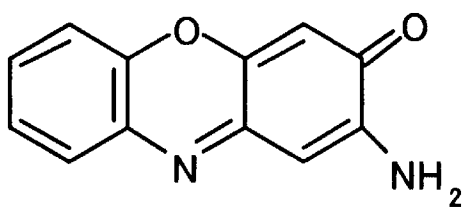
[0007] 化学式1:

[化1]




[0008] 化学式2:

[化2]



## 発明の開示

[0009] 本発明は、従来の抗炎症剤よりも副作用が少なく、「痛み」や「腫れ」などの炎症症状の改善効果の高い抗炎症剤を提供することを課題とするものである。

[0010] 本発明者等が鋭意研究したところ、2－アミノフェノール又はその誘導体は、シクロオキシゲナーゼ（COX）の活性を阻害することでプロスタグランジンE2の合成を阻害する作用、iNOSの産生を抑制することでマクロファージによる一酸化窒素の合成を阻害する作用、及び、肥満細胞の脱顆粒反応の抑制作用を合わせ持つことを発見した。また、2－アミノフェノール又はその誘導体は、メラニン生成細胞に対して、メラニン合成を阻害する作用、及び、コラーゲン産生を増強する作用を有することも発見し、本発明を完成するに至った。

[0011] すなわち、本発明は、2－アミノフェノール又はその誘導体を含有する抗炎症剤を提供することにより、前記課題を解決するものである。

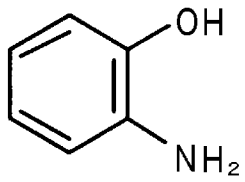
[0012] 本発明によれば、従来の抗炎症剤よりも副作用が少なく、また、炎症症状の緩和効果に優れる抗炎症剤を提供することができる。また、皮膚外用剤の形態の場合は、美白用化粧品として有用である。

## 発明を実施するための最良の形態

[0013] 本発明でいう2－アミノフェノールとは、下記化学式1で示される化合物であり、本発明の効果を発揮する限り、その起源や由来を問わず、市販品を用いることができる。本発明でいう2－アミノフェノールの誘導体とは、2－アミノフェノールの酸化重合体である下記化学式2で示される2－アミノフェノキサジン－3－オン及びそれを基本骨格とする誘導体を意味し、2－アミノフェノールと同等以上の効果を発揮する。2－アミノフェノキサジン－3－オンは、それを豊富に含む植物、細菌などから適宜の抽出・精製方法により製造したり、前駆体の2－アミノフェノールを酸化重合させて合成することができる。例えば、特開2003－2878号公報に記載の、2－アミノフェノールとフェリシアン化カリウムなどの3価の鉄イオンとを反応させる方法や、特開平2－193984号公報に記載の、2－アミノフェノールとヒト又はウシのヘモグロビンとを反応させる方法により、合成することができる。

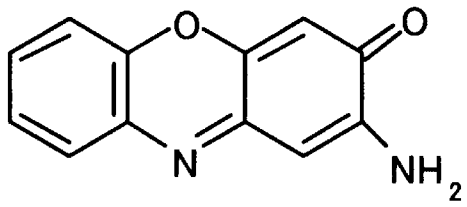
[0014] 化学式1：

[化3]




[0015] 化学式2:

[化4]

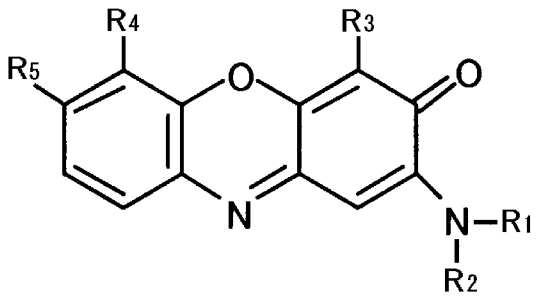



[0016] 本発明で用いられる2－アミノフェノキサジン－3－オンの誘導体としては、例えば、天然に存在する誘導体として、2－アミノ－7－ヒドロキシ－フェノキサジン－3－オン（下記一般式1において、$R_5$がヒドロキシ基、$R_1$乃至$R_4$が水素原子）、2－アミノ－7－メトキシ－フェノキサジン－3－オン（下記一般式1において、$R_5$がメトキシ基、$R_1$乃至$R_4$が水素原子）、2－アセチルアミノ－フェノキサジン－3－オン（下記一般式1において、$R_1$がアセチル基、$R_2$乃至$R_5$が水素原子）、2－アセチルアミノ－7－ヒドロキシ－フェノキサジン－3－オン（下記一般式1において、$R_1$がアセチル基、$R_5$がヒドロキシ基、$R_2$乃至$R_4$が水素原子）、2－（N－ヒドロキシ）アセチルアミノ－フェノキサジン－3－オン（下記一般式1において、$R_1$がアセチル基、$R_2$がヒドロキシ基、$R_3$乃至$R_5$が水素原子）、2－（2－ヒドロキシアセチル）アミノ－フェノキサジン－3－オン（下記一般式1において、$R_1$がヒドロキシアセチル基、$R_2$乃至$R_5$が水素原子）、2－アセチルアミノ－7－メトキシ－フェノキサジン－3－オン（下記一般式1において、$R_1$がアセチル基、$R_5$がメトキシ基、$R_2$乃至$R_4$が水素原子）、7－ヒドロキシ－2－（2－ヒドロキシアセチル）アミノ－フェノキサジン－3－オン（下記一般式1において、$R_1$がヒドロキシ

アセチル基、$R_5$がヒドロキシ基、$R_2$乃至$R_4$が水素原子)、2－アミノ－4，6，7－トリ－メトキシ－フェノキサジン－3－オン(下記一般式1において、$R_3$乃至$R_5$がメトキシ基、$R_1$及び$R_2$が水素原子)などがあげられる。また、人工的な手法により、糖を付加して配糖体にしたり、ポリエチレングリコールやプルランなどの水溶性ポリマーを結合させたりすることができる。

[0017] 一般式1:

[化5]




(ただし、$R_1$及び$R_2$は、それぞれ独立して、水素原子(H)、ヒドロキシ基(OH)、アセチル基($COCH_3$)、ヒドロキシアセチル基($COCH_2OH$)から選ばれ、$R_3$乃至$R_5$は、それぞれ独立して、水素原子(H)、ヒドロキシ基(OH)、メトキシ基($OCH_3$)から選ばれる。)

[0018] 本発明でいう一酸化窒素の合成阻害作用は、細胞におけるiNOSが量的に減少することによって発揮され、一酸化窒素の合成活性を有する細胞、例えば、マクロファージ細胞に本発明の化合物を添加して、当該細胞のiNOSの作用により産生するNO量を測定することにより調べることができる。マクロファージ細胞としては、マウス由来の細胞株RAW264．7細胞や、マウスなどの実験動物から採取して用いることができる。産生するNO量は常法のGriess法により測定できる。Griess法とは、NOをスルファニルアミドとN－(1－ナフチル)エチレンジアミンの混合物(Griess試薬)中に添加し、ジアゾ化カップリング反応により生成する赤色のアゾ色素を540nmの吸光度を測定することにより、NOの代謝物の$NO_2^-$を定量する方法である。

[0019] 本発明でいうシクロオキシゲナーゼ(COX)活性阻害作用は、COX－1又はCOX－2及びアラキドン酸存在下において、試験試料としての本発明の化合物を添加することによって、プロスタグランジン$E_2$(PGE2)の生成量を測定し、対照試料と比較す

ることによって確認することができる。50%阻害濃度($IC_{50}$値)は、非阻害の対照試料と比較し、PGE2合成を50%阻害するために必要な試験試料の濃度を表す。また、シクロオキシゲナーゼ活性を有する細胞に試験試料を添加して、PGE2の生成量を測定することによっても確認することができる。また、COX－1／COX－2比とは、COX－1に対してのIC$_{50}$値とCOX－2に対してのIC$_{50}$値の比であり、この値が大きいほど、COX－2に対しての選択的阻害剤であることを意味する。

[0020] 本発明でいうメラニンの合成を阻害する作用は、メラニン生成細胞、例えばマウスメラノーマ細胞株B16細胞に本発明の化合物を添加して適宜の期間培養し、細胞中のメラニン量を、例えば、400乃至500nmの範囲内の波長の吸光度を測定することにより定量することができる。

[0021] 上記のとおり、本発明で用いられる2－アミノフェノール又はその誘導体は、一酸化窒素合成阻害作用、シクロオキシゲナーゼ活性阻害作用や肥満細胞や好塩基性細胞の脱顆粒抑制作用を有していることから、抗炎症剤、抗アレルギー剤、抗アトピー剤の用途として、食品、化粧品、医薬部外品、医薬品としての多種多様の用途を有している。また、リンパ球T細胞のTh2細胞への分化促進作用も有することから、乾癬やリュウマチをはじめとする自己免疫疾患の予防剤・治療剤としても使用することができる。さらに、メラニン合成を阻害する作用やコラーゲン産生増強作用を有していることから、皮膚外用剤の形態をとる時は、抗エイジング作用を有する美白用・美肌用の化粧品として有用である。本発明を皮膚外用剤の形態にする場合、抗炎症剤に含まれる有効成分としての2－アミノフェノール又はその誘導体の含有量は、通常、0.00002乃至1%(w／w)、好ましくは0.0001乃至0.5%(w／w)であり、使用量としては、皮膚の症状に応じて適宜決定すればよく、1日1回乃至数回に分けて、通常、一回の使用量が皮膚1cm$^2$当たり0.1μg乃至10mg、好ましくは1μg乃至5mgである。

[0022] 上記皮膚外用剤には、2－アミノフェノール又はその誘導体以外の美白作用やコラーゲン産生増強作用を有する物質を適宜配合することができる。例えば、L－アスコルビン酸及びその塩類、アルコキシサリチル酸及びその塩類、トラネキサム酸及びその塩類、エラグ酸及びその塩類、リノール酸及びその塩類、コウジ酸及びその塩類、

レゾルシン、グルタチオン、システイン、ハイドロキノン、テトラヒドロクルクミノイド、又はそれらの誘導体などが挙げられ、これら美白作用を有する物質を含有する、カミツレ、藍などの植物抽出物を用いることができる。このうち、Ｌ－アスコルビン酸誘導体、コウジ酸又はトレハロースとの組合せは、美白作用及び／又はコラーゲン産生増強作用を相乗的に高めるので特に好ましい。

[0023] 上記成分の他に通常化粧品や医薬部外品、医薬品等に用いられる各種任意の成分を必要に応じて適宜配合することができる。例えば、水、エタノール、グリセリン、保湿剤、油性成分、乳化剤、乳化安定剤、増粘剤、防腐剤、粉体、顔料、色素、紫外線吸収剤、紫外線散乱剤、pH調整剤、香料、薬効成分等が挙げられる。

[0024] 本発明の皮膚外用剤は、一般の皮膚化粧料に限定されるものではなく、例えば、美白用途やシワ、小ジワやシミの改善用途、さらには、ほくろ、太田母斑、扁平母斑、日焼け、火傷、虫刺され、打撲、アトピー性皮膚炎などの治療用途の医薬部外品、医薬品等の皮膚外用剤全般を包含するものである。また、その剤形も特に限定されず、目的に応じて選択することができる、例えば、液状、粉末状、固形状、乳液状、クリーム状、ゲル状等のいずれでもよく、化粧水、美容液、乳液、クリーム、パック料、マッサージ料、洗顔料、クレンジング料、日焼け止め料等のスキンケア化粧品、ボディーパウダー、ボディーローション等のボディーケア化粧料、下地料、ファンデーション、白粉、コンシーラー、アイカラー、口紅等のメーキャップ化粧料、軟膏、エアゾール、添付剤等への適用が可能である。

[0025] 本発明を抗炎症剤に適用するには、上記皮膚外用剤以外にも、経口投与に適した形態であってよく、例えば、錠剤、トローチ、丸薬、水性懸濁液、油性懸濁液、分散性粉末又は顆粒、乳剤、ハードカプセル、ソフトカプセル、シロップ、エリキシルの形態が挙げられる。また、局所投与、非経口投与、吸入噴霧又は直腸投与によることもでき、これらに適した剤形とすることができる。

[0026] また、本発明の抗炎症剤は、上記の抗炎症作用を有する物質と併用することができ、さらに、他の作用を有する薬剤とともに投与することができる。例えば、アセトアミノフェン、フェナセチンなどの鎮痛剤、カフェインなどの増強剤、フェニルエフリン、フェニルプロパノールアミン、プソイドフェドリン、オキシメタゾリン、エピネフリン、ナファゾリン

、キシロメタゾリン、プロピルヘキセドリン及びレボーデスオキシエフェドリンなどの充血除去薬、コデイン、ヒドロコドン、カラミフェン、カルベタペンタン、デキストラメトルファンなどの咳止め薬、H2－アンタゴニスト、水酸化アルミニウム、水酸化マグネシウム、シメチコン、利尿薬、鎮痛性抗ヒスタミン薬、非鎮痛性抗ヒスタミン薬などが挙げられ、これらの1種又は2種以上と併用することができる。

[0027] 本発明の抗炎症剤は、多種多様の炎症性疾患に適用できる。炎症性疾患とは、炎症症状を呈する疾患を意味するものであり、例えば、関節リウマチ、リウマチ様脊椎炎、変形性関節炎、痛風性関節炎、大腸炎、小腸炎、クローン病、ギランバレー症候群、強皮症、繊維症、皮膚炎、乾癬、血管性浮腫、湿疹様皮膚炎、高増殖性皮膚疾患、糸球体腎炎、腎炎、胃炎、膵炎、結膜炎、鼻炎、歯肉炎、歯周病、アルツハイマー病、アテローム動脈硬化症、脈管炎、静脈炎、動脈炎、大動脈炎、PTCA後再狭窄、バイパス手術後再狭窄、移植拒絶反応、アナフィラキシー、敗血症、血栓症、虚血／再灌流障害、アトピーを含む各種アレルギー疾患などが上げられる。また、本発明の抗炎症剤は、PGE2の産生を抑制することから、とりわけ、骨破壊を伴う疾患、例えば、関節リウマチ、歯周病、骨粗鬆症などに有効である。また、本発明の抗炎症剤は、炎症性疾患の治療だけでなく、鎮痛剤、解熱剤、躁鬱病をはじめとする神経疾患の予防剤・治療剤などの用途でも利用できる。さらに本発明の抗炎症剤は、COX－2が過剰発現している各種の癌の治療剤として、公知の抗癌剤と併用して利用することができる。

[0028] 本発明の抗炎症剤は、医薬上許容可能な基材や添加剤や賦形剤を含む投与単位調合物の形で投与される。また、ヒトの疾患の治療又は予防のみならず、マウス、ラット、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、イヌ、ネコ、ニワトリなどの家畜、家禽やペット等にも適用できる。

[0029] 本発明の抗炎症剤における有効成分としての2－アミノフェノール又はその誘導体の含有量は、症状、剤形、投与形態、投与対象動物に応じて適宜決定すれば良く、通常0．0001乃至10％（w／w）、好ましくは0．0001乃至1％（w／w）である。また、投与量については、症状、剤形、投与形態に応じて適宜決定すれば良く、1日1回乃至数回に分けて、通常、1日の投与量が0．01μg乃至25mg／kg、好ましくは0．

1μg乃至5mg／kgである。

[0030] 以下、実験で本発明の詳細を説明する。

[0031] ＜実験1:2－アミノフェノキサジン－3－オンの合成＞

2－アミノフェノールを原料にして2－アミノフェノキサジン－3－オンを合成した。すなわち、550mg(5mmol)の2－アミノフェノール(和光純薬工業株式会社販売)を50mlの蒸留水に懸濁し、それに0．1N塩酸の225mlを加えた後、0．1N水酸化ナトリウム水溶液でpH7．0に調整した。この溶液に500mlの5mMフェリシアン化カリウム水溶液を攪拌しながら5分間かけて滴下し、さらに26℃で30分間反応させた。反応液を減圧下で乾燥して得られた固形物を450mlのメタノールに溶解し、遠心分離して未溶解の固形分を除去した後、再度減圧下で乾燥した。得られた固形物を200ml酢酸エチルに溶解し、200mlの0．005N塩酸水溶液を加え、攪拌した後、分液ロートで酢酸エチル層を回収した。この操作を3回繰り返した後、得られた酢酸エチル層を減圧下で液量が15mlになるまで濃縮し、これを常法にしたがい、シリカゲルクロマトグラフィーカラム(商品名『ワコーゲルC200』、和光純薬工業株式会社販売)及び逆相C30クロマトグラフィーカラム(商品名『デベロシルC30』、野村化学株式会社販売、又は、商品名『HW－40F』、東ソー株式会社販売)により精製し、2－アミノフェノキサジン－3－オン220mgを得た。

[0032] ＜実験2:マクロファージからのNO、PGE2産生抑制活性＞

マウスマクロファージ細胞株RAW264．7を、細胞濃度$1\times10^{6}$個／mlになるように、10%(v／v)ウシ胎児血清(以下、「FCS」と略記する)を補足したRPMI1640培地に浮遊させて、細胞浮遊液を調製した。これを96穴マイクロプレートに50μlずつ播種し、2－アミノフェノキサジン－3－オンを最終濃度1．6乃至100μMになるように添加し、さらに、誘導剤として2μg／mlリポ多糖及び10IU／mlIFN－γを添加し、上記培地を加えて液量を200μlとした。これを、37℃で2日間培養した後、生細胞数をカウントし、培地上清を常法のGriess法に供してNO量を、また、抗PGE2抗体を用いる「PGE2EIAキット」(アマシャムバイオサイエンス社販売)に供してPGE2量を測定した。比較例として、COX阻害剤であるインドメタシン(和光純薬工業株式会社販売)、アスピリン(和光純薬工業株式会社販売)、COX－2選択的阻害剤である

NS－398（和光純薬工業株式会社販売）を用意し、上記と同様にして実験を行なった。また対照として、上記試料を添加しない系を設けた。結果を表1に示す。なお、表1における「QA」は2－アミノフェノキサジン－3－オン（クエスチオマイシンA）、「NS」はNS－398、「IN」はインドメタシン、「AS」はアスピリンを意味し、各試料におけるNO産生量、PGE2産生量、マクロファージの増殖は、対照の測定値と比較した相対値で示した。

[0033] [表1]

| 濃度（μM） | NO産生量（%） | | | | PGE2産生量（%） | | | | マクロファージ増殖（%） | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | QA | NS | IN | AS | QA | NS | IN | AS | QA | NS | IN | AS |
| 0.16 | 85 | 90 | 86 | 101 | 76 | 4 | 4 | 98 | 117 | 95 | 102 | 103 |
| 0.31 | 78 | 89 | 84 | 102 | 45 | 4 | 4 | 99 | 121 | 97 | 104 | 100 |
| 0.63 | 70 | 87 | 81 | 102 | 13 | 2 | 4 | 79 | 127 | 99 | 108 | 95 |
| 1.3 | 54 | 85 | 82 | 93 | 6 | 1 | 3 | 47 | 127 | 102 | 117 | 85 |
| 2.5 | 32 | 85 | 80 | 95 | 1 | 1 | 1 | 33 | 119 | 100 | 120 | 86 |
| 5.0 | 19 | 88 | 80 | 90 | 3 | 5 | 2 | 8 | 112 | 105 | 122 | 89 |
| 10 | 14 | 84 | 78 | 86 | 2 | 2 | 1 | 3 | 86 | 110 | 120 | 89 |

[0034] 表1の結果に示すとおり、2－アミノフェノキサジン－3－オン（表1における「QA」）は、マクロファージの増殖を低下させることなく、NOの産生及びPGE2の産生を抑制した。一方、比較例の他の抗炎症剤は、PGE2の産生抑制効果は顕著であるものの、NOの産生抑制効果はあまり発揮されず、これらの従来の抗炎症剤は、「痛み」の改善効果は期待できるものの、「腫れ」の改善効果は期待できないことが示唆された。

また、本実験で得られた各細胞抽出液に含まれるiNOSの量を、抗iNOS抗体を用いるウエスタンブロッティング解析により調べたところ、濃度依存的に2－アミノフェノキサジン－3－オンによりiNOS量が減少した。よって、2－アミノフェノキサジン－3－オンによるNOの産生阻害活性は、iNOSの量を減少させることによって発揮されるものと考えられた。

[0035] ＜実験3：COX－1及びCOX－2阻害活性＞

上記実験2の結果を検証するために、PGE2の合成系に必須の酵素であるCOXの

酵素活性が阻害されるかどうか調べた。『COXインヒビタースクリーニングアッセイキット』(ケイマン社販売)により、COX－1又はCOX－2、及び、基質としてのアラキドン酸が存在する反応系に、試験試料として2－アミノフェノキサジン－3－オン又は2－アミノフェノールを後記表2の濃度となるように添加し、抗PGE2抗体を用いたEIAにより、生成したPGE2の量を測定し、COXの活性量とした。なお、対照として試験試料を添加しない系を設け、その測定値と比較することにより、COX－1又はCOX－2の残存活性率を求めた。また試験試料の各濃度での残存活性率をグラフにプロットし、$IC_{50}$の濃度を算出した。結果を表2に示す。

[0036] [表2]

| | 2－アミノフェノキサジン－3－オン | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 1.9μM | 3.8μM | 7.6μM | IC50 |
| COX-1 | 89% | 59% | 44% | 6.44μM |
| COX-2 | 95% | 37% | 29% | 4.83μM |
| | 2－アミノフェノール | | | |
| | 8μM | 16μM | 32μM | IC50 |
| COX-1 | 66% | 73% | 42% | 28.0μM |
| COX-2 | 72% | 60% | 47% | 27.7μM |

[0037] 表2の結果から明かなとおり、2－アミノフェノール及び2－アミノフェノキサジン－3－オンは、COX－1及びCOX－2の活性を阻害した。その効果は$IC_{50}$値で比較すると、モル比で4乃至6倍、質量比で2乃至3倍程度、2－アミノフェノキサジン－3－オンの方が優れていた。また、COX－1／COX－2比は、2－アミノフェノールが約1、2－アミノフェノキサジン－3－オンが約1．3であり、アスピリン(COX－1／COX－2比＝0．24)やインドメタシン(COX－1／COX－2比＝0．03)などの非ステロイド系のCOX阻害剤よりも、COX－2選択性が高く、2－アミノフェノール又は2－アミノフェノキサジン－3－オンを内服薬として患者に適用した場合、胃痛などの副作用が従来の非ステロイド系のCOX阻害剤と比べて軽度になることが期待され、それらは、抗炎症剤、解熱剤、鎮痛剤などの内服用の医薬品として有用である。

[0038] ＜実験4:好塩基球の脱顆粒反応抑制活性＞

2－アミノフェノキサジン－3－オン(クエスチオマイシンA)が、マクロファージからの

抗炎性メディエーターの遊離を阻害することが確認されたので、同様に炎症性メディエーターを遊離することが知られている好塩基球細胞への脱顆粒反応への影響を調べた。なお、脱顆粒率(%)及び脱顆粒抑制率(%)は、脱顆粒反応により細胞外に放出される顆粒中含まれるβ－ヘキソサミニダーゼ活性の測定に基づき、計算により求めた。

＜脱顆粒反応の測定に使用した細胞＞

IgEの架橋により脱顆粒反応を起こすことが知られているラットの好塩基球由来癌細胞RBL－2H3(ヒューマンサイエンス振興財団・研究資源バンク販売、カタログ番号「JCRB0023」)を、10%(v／v)FCSを補足したMEM培地(日水製薬社販売)で培養して使用した。

＜脱顆粒反応の誘発とβ－ヘキソサミニダーゼ活性の測定＞

この細胞を、常法によりトリプシン－EDTA処理してフラスコから回収し、細胞濃度が$5\times10^5$個／mlになるように、10%(v／v)FCSを補足したMEM培地に浮遊させて、細胞浮遊液を調製した。これを24穴マイクロプレートに400μlずつ播種し、5%(v／v)炭酸ガスインキュベーター内で、3乃至5時間培養後、0．625μg／mlの抗ジニトロフェノール(以下、「DNP」と略記する。)マウスIgE(シグマ－アルドリッチ社販売、10(v／v)%FCSを補足したMEM培地で希釈)を100μl／穴ずつ添加して細胞をIgEで感作した(抗DNP－IgE終濃度0．125μg／ml)。この細胞を、5%(v／v)炭酸ガスインキュベーター内で、1晩培養後、培養上清を吸引除去し、Siraganian緩衝液(119mM NaCl、5mM KCl、0．4mM $MgCl_2$、25mM ピペラジン－N，N´´－bis(2－エタンスルホニック酸)(PIPES)、40mM NaOH pH7．2)を500μl／穴ずつ添加して、各穴を2回洗浄した。0．1%ウシ血清アルブミン(BSA)、5．6mM グルコース、1mM $CaCl_2$を含むSiraganian緩衝液(以下、「BSAを含むSiraganian緩衝液」という)を、160μl／穴ずつ加え、37℃で、15分間加温した。被験試料として2－アミノフェノキサジン－3－オン(クエスチオマイシンA)、美白作用を有するアルブチン又はアレルギー性疾患治療剤のオキサトミド(陽性対照)の何れかを、表3に示す濃度となるように、BSAを含むSiraganian緩衝液で希釈し、その何れかを20μl／穴ずつ添加し、37℃で、15分間加温した(被験試料添加穴)。この

被験試料の何れかを添加した被験試料添加穴に、BSAを含むSiraganian緩衝液で50μg／mlとなるように希釈したDNP－アルブミン（シグマ－アルドリッチ社販売）を20μl／穴ずつ添加し、37℃で、15分間加温した。この24穴プレートを氷上で10分間冷却後、上清を採取して、その100μlを96穴マイクロプレートに分注し、当該上清中のβ－ヘキソサミニダーゼ活性を下記方法により測定した。また、これとは別に、陰性対照として、BL－2H3細胞を、抗体を含まないFCSを補足したMEM培地を使用した以外は、被験試料添加穴と同じ条件で培養、処理して、その上清のβ－ヘキソサミニダーゼ活性を測定した（IgE非感作穴）。また、このIgE非感作穴の一部は、培養上清を吸引除去後、BSAを含むSiraganian緩衝液を添加して、各穴を2回洗浄後、BSAを含むSiraganian緩衝液を200μl／穴ずつ加えて、－80℃で、凍結・解凍を2回繰り返し、細胞を破壊して、この破壊した細胞を含む液全量を回収し、1500rpmで、10分間遠心分離後、その上清100μlを96穴マイクロプレートに分注し、全顆粒抽出物としてβ－ヘキソサミニダーゼ活性を測定した。

＜β－ヘキソサミニダーゼ活性の測定法＞

採取した被験試料添加穴の上清、IgE非感作穴の上清又は全顆粒抽出物を加えた96マイクロプレートの各々の穴に、基質として1mM 4－ニトロフェニル－N－アセチル－β－D－グルコサニミド（PNAG）を含むクエン酸緩衝液（pH4．5）50μlずつ添加して、37℃で1時間保持し、0．1M炭酸ナトリウム（pH10．5）50μlずつ添加して反応を停止し、被験試料添加穴、IgE非感作穴又は全顆粒抽出物穴の吸光度として、A405－650の吸光度を測定し、脱顆粒率（%）及び脱顆粒抑制率（%）を、各々次数式1及び2にしたがって求めた。各被験試料添加時の脱顆粒反応の抑制の程度は脱顆粒の抑制作用が、『強い』（抑制率が50%以上）、『弱い』（抑制率が50%未満乃至30%以上）、『なし』（抑制率が30%未満乃至－30%以上）、『促進』（抑制率が－30%未満）の4段階で評価し、その結果を表3に示す。なお表3における「QA」は2－アミノフェノキサジン－3－オン（クエスチオマイシンA）、「AB」はアルブチン、又は、「OX」はオキサトミドを意味する。

[0039] 数式1：

[数1]

$$脱顆粒率(\%)=\frac{被験試料添加穴の吸光度-IgE非感作穴の吸光度}{全顆粒抽出物穴の吸光度-IgE非感作穴の吸光度}\times 100$$

[0040] 数式2:

[数2]

$$脱顆粒抑制率(\%)=\frac{被験試料非添加時の脱顆粒率-被験試料添加時の脱顆粒率}{被験試料非添加時の脱顆粒率}\times 100$$

[0041] なお、本実験では、β－ヘキソサミニダーゼ活性を指標に、脱顆粒率を求めたので、強いβ－ヘキソサミニダーゼ活性の抑制が認められた2－アミノフェノキサジン－3－オン(クエスチオマイシンA)にβ－ヘキソサミニダーゼ活性を直接抑制する作用がないことを、以下の方法により確認した。すなわち、上記実験で使用した最も高濃度の2－アミノフェノキサジン－3－オン(クエスチオマイシンA)を被験試料として使用し、脱顆粒反応抑制測定に使用した際の濃度と同じにするために、あらかじめBSAを含むSiraganian緩衝液で5倍に希釈したものを50μl／穴で96穴のマイクロウエルプレートに分注した。これとは別に、上記全顆粒抽出試料を50μl／穴で96穴のマイクロウエルプレートに分注した。これらの各穴に、1mM PNAGを含む0．1Mクエン酸緩衝液(pH4．5)を50μl／穴ずつ添加して、37℃、1時間加温した。0．1M炭酸ナトリウム緩衝液(pH10．5)を50μl／穴ずつ添加して反応を停止し、A405－650の吸光度を測定した。対照としてBSAを含むSiraganian緩衝液のみを添加して同様に測定をおこなった。β－ヘキソサミニダーゼ活性の阻害率(%)を次数式3にしたがって求めた。なお、測定は、被験試料及び全顆粒抽出試料について、各3穴を使用し、その平均を求めた。

[0042] 数式3:

[数3]

$$\beta-ヘキソサミニダーゼ活性阻害率(\%)=\frac{対照添加時の吸光度-被験物質添加時の吸光度}{対照添加時の吸光度}\times 100$$

[0043] [表3]

| 濃度 | 脱顆粒反応抑制の程度 | | |
|---|---|---|---|
| (μM) | QA | AB | OX |
| 0.63 | なし | ー | ー |
| 1.5 | ー | ー | なし |
| 5 | 弱い | ー | なし |
| 10 | 強い | ー | ー |
| 23 | 強い | ー | 弱い |
| 31.3 | 強い | なし | ー |
| 40 | 強い | ー | ー |
| 94 | ー | ー | 強い |
| 200 | ー | なし | ー |
| 500 | ー | なし | ー |
| 2000 | ー | なし | ー |

ー:試験を実施せず

[0044] 表3の結果から明かなとおり、2－アミノフェノキサジン－3－オンは、5μM以上で脱顆粒の抑制活性が認められ、10乃至40μMで強い脱顆粒反応の抑制活性が認められた。また、陽性対照のオキサトミドは23μM以上で脱顆粒の抑制活性が認められ、94μMでは強い抑制活性が認められた。アルブチンには脱顆粒の抑制活性は認められなかった。また、40μMの2－アミノフェノキサジン－3－オン添加時のβ－ヘキソサミダーゼ活性阻害率は－9．9%となり、溶媒として使用したDMSOを測定に使用した培地中の濃度では－8．6%となり、この物質自体やDMSOは当該酵素の活性を阻害しないことが確認されたので、この物質は好塩基球の脱顆粒反応自体を抑制することが明らかになった。この結果は、2－アミノフェノールや2－アミノフェノキサジン－3－オンなどの2－アミノフェノール誘導体は、好塩基球や肥満細胞などの脱顆粒反応を抑制するので、抗アレルギー剤として有用であることを物語っている。また、脱顆粒反応に引き続く炎症性に関わるメディエーターの放出も抑制されると考えられるので、2－アミノフェノールや2－アミノフェノキサジン－3－オンなどの2－アミノフェノール誘導体は、マクローファージを介する炎症反応のみでなく、好塩基球

や肥満細胞を介した炎症反応も抑制できることを物語っている。なお、具体的なデータは示さないが、試験試料の溶媒として使用したDMSOは、本実験における培養条件では、測定結果に影響を及ぼす細胞障害性は認められなかった。

[0045] ＜実験5:2－アミノフェノキサジン－3－オン又は2－アミノフェノールのメラニン合成阻害効果＞

マウスメラノーマ細胞株B16細胞(ATCC:CRL－6322)を10%(v／v)FCSを補足したRPMI1640培地で懸濁し、それを6穴プレートに$2.0\times10^{4}$個ずつ細胞を播種した。当該細胞が付着した後に、2－アミノフェノキサジン－3－オンを0.5μM、1μM、2μMの濃度になるように、2－アミノフェノールを1μM、2μM、4μMの濃度になるように、また、陽性対照としてのコウジ酸を0.5mM、1mM、2mMの濃度になるように添加し、常法にしたがって、5%$CO_2$雰囲気中で37℃で5日培養した。また、対照として、試料を添加しないものを用意した。培養後、細胞を回収し、それぞれの生細胞数をカウントした後、リン酸緩衝液で洗浄し、1N水酸化ナトリウム水溶液で溶解し、30分間煮沸し、常法にしたがい、市販のプレートリーダーにより、波長450nmの吸光度を測定し、あらかじめメラニン標準品(シグマ社販売)により同一の波長の吸光度を測定して作成した検量線により、試料中のメラニン量を算出した。一方、タンパク質量は常法のブラッドフォード法により測定し、蛋白質1mg当りのメラニン量を算出し、さらに、数式4にしたがって、メラニン量(%)を算出した。また、数式5にしたがって、生細胞数(%)を算出した。結果を表4に示す。

[0046] 数式4:

[数4]

$$\text{メラニン量}(\%)=\frac{(\text{各試料における蛋白質１ｍｇ当たりのメラニン量})}{(\text{対照における蛋白質１ｍｇ当たりのメラニン量})}\times100(\%)$$

[0047] 数式5:

[数5]

$$\text{生細胞数}(\%)=\frac{(\text{各試料における生細胞数})}{(\text{対照における生細胞数})}\times100(\%)$$

[0048] [表4]

| 試　料 | | メラニン量(%) | 生細胞数(%) |
|---|---|---|---|
| コウジ酸 | 0.5mM | 79 | 93 |
| | 1mM | 71 | 86 |
| | 2mM | 59 | 73 |
| 2－アミノフェノキサジン－3－オン | 0.5μM | 74 | 107 |
| | 1μM | 69 | 95 |
| | 2μM | 61 | 77 |
| 2－アミノフェノール | 1μM | 62 | 95 |
| | 2μM | 55 | 79 |
| | 4μM | 50 | 52 |

[0049] 表4の結果に示されるとおり、どの試料も高濃度ではB16細胞の増殖を阻害することから、増殖を阻害しない濃度で比較すると、2－アミノフェノキサジン－3－オン又は2－アミノフェノールは、コウジ酸に比べて1，000倍強いメラニン合成阻害作用を有していた。

[0050] ＜実験6：他の成分との併用効果＞

実験5と同様の方法で、2－アミノフェノキサジン－3－オンと、コウジ酸、トレハロース又はアスコルビン酸グルコシドとの併用効果を調べた。マウスメラノーマ細胞株B16細胞(ATCC：CRL－6322)を10%(v／v)FCSを補足したRPMI1640培地で懸濁し、それを6穴プレートに$2.0\times10^4$個ずつ細胞を播種した。当該細胞が付着した後に、下記表5に記載のとおり、実験1で合成した2－アミノフェノキサジン－3－オン、コウジ酸、トレハロース(商品名『トレハ』、株式会社林原商事販売)、アスコルビン酸－2－グルコシド(商品名『AA2G』、株式会社林原生物化学研究所販売)を添加し、常法にしたがって、5%$CO_2$雰囲気中で37℃で5日培養した。また、対照として、試料を添加しないものを用意した。培養後、細胞を回収し、リン酸緩衝液で洗浄し、1N水酸化ナトリウム水溶液で溶解し、30分間煮沸し、常法にしたがい、市販のプレートリーダーにより、波長450nmの吸光度を測定し、あらかじめメラニン標準品(シグマ社販売)により同一の波長の吸光度を測定して作成した検量線により、試料中のメラニ

ン量を算出した。一方、タンパク質量は常法のブラッドフォード法により測定し、蛋白質1mg当りのメラニン量を算出し、さらに、上記数式4にしたがって、メラニン量(%)を算出した。結果を表5に示す。

[0051] [表5]

| | 2－アミノフェノキサジン－3－オン（μM） | コウジ酸（mM） | トレハロース（mM） | アスコルビン酸－2－グルコシド（mM） | メラニン量（%） |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0.5 | － | － | － | 74 |
| 2 | 1 | － | － | － | 69 |
| 3 | 2 | － | － | － | 61 |
| 4 | － | 0.5 | － | － | 79 |
| 5 | － | 1 | － | － | 71 |
| 6 | － | 2 | － | － | 59 |
| 7 | － | － | 20 | － | 82 |
| 8 | － | － | 40 | － | 75 |
| 9 | － | － | 80 | － | 66 |
| 10 | － | － | － | 2 | 80 |
| 11 | － | － | － | 4 | 68 |
| 12 | － | － | － | 8 | 63 |
| 13 | 0.25 | 0.25 | － | － | 73 |
| 14 | 0.5 | 0.5 | － | － | 69 |
| 15 | 1 | 1 | － | － | 56 |
| 16 | 0.25 | － | 10 | － | 76 |
| 17 | 0.5 | － | 20 | － | 62 |
| 18 | 1 | － | 40 | － | 54 |
| 19 | 0.25 | － | － | 1 | 74 |
| 20 | 0.5 | － | － | 2 | 61 |
| 21 | 1 | － | － | 4 | 54 |

[0052] 表5の結果が示すとおり、コウジ酸、トレハロース、アスコルビン酸－2－グルコシドは単独でもメラニン合成阻害作用を有するところ、これらを3－アミノフェノキサジン－2－オンと併用することにより、相乗的なメラニン合成阻害効果を発揮した。また、これらの物質を併用した場合、細胞毒性が軽減され、生細胞率を高く維持したまま、メラ

ニン合成阻害効果が発揮された。

[0053] ＜実験7:パネルテスト(皮膚外用剤)＞

本発明の皮膚外用剤の抗炎症作用とメラニン合成阻害効果がすでに日焼けした皮膚に対して発揮するかどうかパネルテストで調べた。パネラー20名の腕に日光が照射されないように約10cm$^2$の遮光粘着テープを添付し、半日海水浴をした後、その遮光粘着テープを剥がし、この皮膚部分を日焼け前の状態とした。2－アミノフェノキサジン－3－オン(試料A)又は2－アミノフェノール(試料B)が配合されている後記実施例1の乳液又は対照として後記実施例1において2－アミノフェノキサジン－3－オン又は2－アミノフェノールが配合されていない乳液を日光が照射された腕の皮膚にそれぞれ、適当量を1日2回塗布してもらった。医師により、3日後に皮膚の炎症状態(痛み、腫れの有無)、7日後にメラニン沈着状態(皮膚の黒色度)を肉眼観察し、『効果あり』(日焼け前の状態に回復)、『やや効果あり』(日焼け前の状態までには回復していないものの、対照の乳液よりは効果に優れる)、『効果なし』(対照の乳液と同程度)、『悪化した』(対照の乳液よりも悪化した)の4段階評価で評価した。結果を表6に示す。

[0054] [表6]

| 評価 | メラニン合成阻害作用 | | 抗炎症作用 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 痛みの緩和作用 | | 腫れの緩和作用 | |
| | 試料A | 試料B | 試料A | 試料B | 試料A | 試料B |
| 効果あり | 5 | 3 | 11 | 8 | 9 | 7 |
| やや効果あり | 9 | 10 | 6 | 7 | 9 | 9 |
| 効果なし | 6 | 7 | 3 | 5 | 2 | 4 |
| 悪化した | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

[0055] 表6の結果が示すとおり、『効果あり』又は『やや効果あり』と判定したパネラーが、試料A(2－アミノフェノキサジン－3－オン)のメラニン合成抑制効果で70%、炎症抑制効果で85乃至90%を占めており、試料B(2－アミノフェノール)のメラニン合成抑制効果で65%、炎症抑制効果で75乃至80%を占めていた。この結果は、2－アミノフェノキサジン－3－オン又は2－アミノフェノールを含有する皮膚外用剤は、メラニン合成抑制作用及び抗炎症作用に優れることを示している。

[0056] ＜実験8：歯肉炎に対する治療効果＞

本発明の抗炎症剤が歯肉炎に対して治療効果を発揮するかどうかパネルテストで調べた。毎食後の歯磨きだけでは症状が改善しない歯肉炎患者18名を3群に分け、毎食後の歯磨きの後に、2－アミノフェノキサジン－3－オン（試料A）又は2－アミノフェノール（試料B）が配合されている後記実施例4の液剤10mlで1分間口中を漱いでもらった。また、対照として、2－アミノフェノキサジン－3－オン又は2－アミノフェノールを含まない液剤で同様に行った。2週間後に、医師の目視により、歯肉炎の状況を診断し、『効果あり』（歯肉炎がない状態に回復）、『やや効果あり』（試験前より歯肉炎が緩和された）、『効果なし』（試験前と比べて変化なし）、『悪化した』（試験前よりも悪化した）の4段階評価で評価した。結果を表7に示す。

[0057] [表7]

| 評　価 | 試料A | 試料B | 対照 |
|---|---|---|---|
| 効果あり | 1 | 0 | 0 |
| やや効果あり | 5 | 5 | 2 |
| 効果なし | 0 | 1 | 3 |
| 悪化した | 0 | 0 | 1 |

[0058] 表7に示す結果から明らかなように、試料A及び試料Bを用いた患者の歯肉炎の症状は軽減されたことから、2－アミノフェノキサジン－3－オン又は2－アミノフェノールは、歯肉炎の治療剤として有効であることが確認された。

[0059] ＜実験9：胃炎に対する治療効果＞

本発明の抗炎症剤が胃炎に対して治療効果を発揮するかどうかパネルテストで調べた。胃炎患者12名を3群に分け、2－アミノフェノキサジン－3－オン（試料A）又は2－アミノフェノール（試料B）が配合されている後記実施例5の錠剤を毎夕食後に服用してもらった。また、対照として、2－アミノフェノキサジン－3－オン又は2－アミノフェノールを含まない錠剤で同様に行った。1週間後に、医師により、胃炎の状況を問診により診断し、『効果あり』（胃炎がない状態に回復）、『やや効果あり』（試験前より胃炎が緩和された）、『効果なし』（試験前と比べて変化なし）、『悪化した』（試験前よ

りも悪化した)の4段階評価で評価した。結果を表8に示す。

[0060] [表8]

| 評 価 | 試料A | 試料B | 対照 |
|---|---|---|---|
| 効果あり | 1 | 0 | 0 |
| やや効果あり | 3 | 2 | 0 |
| 効果なし | 0 | 2 | 2 |
| 悪化した | 0 | 0 | 2 |

[0061] 表8に示す結果から明らかなように、試料A及び試料Bは胃炎の治療効果を発揮した。実験7及び8の結果は、2－アミノフェノキサジン－3－オン及び2－アミノフェノールが歯肉炎や胃炎などの炎症性疾患の治療剤として有効であることを示している。

[0062] ＜実験10:コラーゲン産生増強作用＞

アスコルビン酸存在下における2－アミノフェノキサジン－3－オンのコラーゲン産生増強作用をヒト胎児由来正常繊維芽細胞NHDFを使用して調べた。また、2－アミノフェノキサジン－3－オン単独でコラーゲン産生増強作用があるかどうかを併せて調べた。さらに、2－アミノフェノキサジン－3－オンにNHDF細胞に対する細胞障害性がないことを調べた。

＜試験試料＞

4mM 2－アミノフェノキサジン－3－オン(DMSOに溶解)を、10(v／v)%FCSを補足したダルベッコのMEM培地(日水製薬社販売、以下、「D－MEM」と略記す。)で希釈して、細胞培養に供した時の培地中の濃度が、表9に示す濃度になるように試験試料を調製した。

＜コラーゲン産生量の測定方法＞

NHDF細胞(クラボウ社販売、カタログ番号「KF－4001」)を、10(v／v)%FCSを補足したD－MEMに懸濁して$5\times10^5$細胞／mlに調製し、96穴マイクロプレートに50μl／穴ずつ播種した。アスコルビン酸として、培地中での安定性がアスコルビン酸よりも高いL－アスコルビン酸－2－グルコシド(株式会社林原商事販売、商品名『アスコフレッシュ』、以下、「AA－2G」と略記する)を使用した。37℃で1日培養後、

培養上清を除去し、試験試料の何れかと、100μM AA－2G（終濃度50μM）を含有する10（v／v）％FCSを補足したD－MEM培地、又は、AA－2Gを含まない10（v／v）％FCSを補足したD－MEM培地とを、各々100μl／穴ずつ添加し、37℃、5（v／v）％炭酸ガス存在下で3日培養後、培養上清を除去し、最初に添加したものと同じ濃度の被験試料と、100μM AA－2Gを含む又はAA－2Gを含まないD－MEM培地とを、新たに調製して、各々100μl／穴ずつ添加し、37℃、5（v／v）％炭酸ガス存在下でさらに3日間培養した。対照として、10（v／v）％FCSを補足したD－MEM培地又はAA－2Gを含む10（v／v）％FCSを補足したD－MEM培地のみを添加して、試験試料を添加した場合と同様に培養を行った。なお、全ての細胞培養液は、2－アミノフェノキサジン－3－オンの溶解に使用したDMSOの濃度が、一定（終濃度0．05（v／v）％）になるように調整した。これらの細胞の培養上清を除去後、1 mg／mlペプシン（Sigma社販売）を含む1M 酢酸溶液を50μL／穴ずつ添加し、プレートミキサーを使用して、室温で4時間振とうしてペプシンによる消化をおこなった。このペプシン消化物をピペッティングしながら1．5ml容チューブに回収し、Sircol Collagen Assay Kit（Biocolor社販売）のDye Reagntを200μl／チューブ添加後、室温で30分間転倒混和して反応させ、反応液を遠心後（4℃、15，000 rpm， 10分）、上清を完全除去して、沈澱物に50μlの1N NaOHを加えて溶解後、A560－650の吸光度を測定した。これとは別に、96穴マイクロウエルプレートに、5μg／穴乃至0．0395μg／穴になるように、2倍段階希釈したコラーゲン（KOKEN社販売）を添加し、ペプシン処理し、培養上清を除去した細胞と同様に、その消化物を処理し、A560－650の吸光度を測定して標準曲線を作製した。この標準曲線に基づき、細胞のペプシン消化物に含まれるコラーゲン量を算出して、その結果を表9に示す。なお、実験は1試験試料の濃度につき3穴を使用して行い、結果はその平均値で示した。また、表9における「QA」は2－アミノフェノキサジン－3－オン（クエスチオマイシンA）を意味する。

＜細胞障害性試験＞

上記コラーゲン測定と同様に試験試料と、AA－2G含有又は無含有の10（v／v）％FCSを補足したD－MEM培地で6日間培養した細胞の培養上清を除去後、リン

酸緩衝生理食塩水(PBS(－))で洗浄し、D－MEM培地で10倍に希釈したアラマーブルー(alamarBlue、TREK Diagnostic Systems社販売)液を200μl／穴添加し、37℃で90分培養後、蛍光強度(励起光:544nm、蛍光:590nm)を測定した。細胞生存率(%)は、試験試料を添加した穴の蛍光強度を、対照を添加した穴の蛍光強度で除し、100倍して求めた。その結果を表9に併せて示す。

[0063] [表9]

| QA濃度(μM) | コラーゲン産生量(μg／穴) | | 細胞生存率(%) | |
|---|---|---|---|---|
| | AA－2G添加 | AA－2G無添加 | AA－2G添加 | AA－2G無添加 |
| 0 | 0.78±0.16 | 0.54±0.08 | 100 | 100 |
| 0.125 | 1.32±0.45 | 0.66±0.05 | 100 | 101 |
| 0.25 | 1.64±0.21** | 0.64±0.06 | 100 | 103 |
| 0.5 | 1.57±0.18* | 0.63±0.07 | 92 | 99 |
| 1.0 | 1.03±0.22 | 0.71±0.10 | 79 | 92 |
| 2.0 | 0.58±0.06 | 0.70±0.16 | 73 | 88 |

*:P<0.05 **:P<0.01

[0064] 表9の結果から明らかなよう、培地に2－アミノフェノキサジン－3－オンとAA－2Gを加えて培養した場合には、0.125或いは0.25μMとなるように2－アミノフェノキサジン－3－オンの添加量に比例してコラーゲン産生が増加し、0.5と0.25μMとなるように添加した場合にはほぼ同量のコラーゲン産生が認められた。また、1μM以上となるように添加した場合には、0.5又は0.25μMとなるように添加した場合に比べて、コラーゲンの産生量が減少した。これに対して、AA－2G無添加の場合には、コラーゲン産生の増強は認められなかった。また、2－アミノフェノキサジン－3－オンの濃度が0.5μM以下の場合には、細胞生存率はいずれも92%以上となって、対照と最大8%程度の差しかなく、細胞障害性はないと判断した、これに対して1μM以上の濃度では、濃度に依存した細胞障害性が認められた。したがって、2－アミノフェノキサジン－3－オンが1μM以上の濃度では、NHDF細胞に対する細胞障害性によりコラーゲン産生増強作用の低下が発生したと思われる。

[0065] この結果は、2－アミノフェノールや2－アミノフェノキサジン－3－オンなどの2－アミノフェノール誘導体は、アスコルビン酸の存在下において、0.125μM以上の濃

度でコラーゲン産生を増強し、その効果は、0．25μM以上の濃度で顕著になることを物語っている。また、2－アミノフェノールや2－アミノフェノキサジン－3－オンなどのその誘導体を含有する皮膚外用剤は、コラーゲン産生増強作用に優れ、抗炎症や美白用のみでなく、抗シワ用やアンチエイジング用としても有用なことを物語っている。

[0066] 以下、実施例で本発明の実施の形態を説明する。

実施例 1

[0067] ＜乳液＞

| | | |
|---|---|---|
| A | アクリル酸メタクリル酸アルキル共重合体 | 0．2質量% |
| | キサンタンガム | 0．2質量% |
| | 精製水 | 73．0質量% |
| B | グリセリン | 3．0質量% |
| | エタノール | 17．0質量% |
| | 水酸化ナトリウム | 0．05質量% |
| | 精製水 | 2．5質量% |
| | アスコルビン酸リン酸マグネシウム | 3．0質量% |
| | エデト酸ニナトリウム | 0．05質量% |

実験1で製造した2－アミノフェノキサジン－3－オンまたは2－アミノフェノール（和光純薬工業株式会社販売）

1．0質量%

常法にしたがい、A成分を均一に加熱混合した後、冷却し、B成分を加えて皮膚外用剤を得た。

本品は、抗炎症効果に優れ、好塩基球やマストセルの脱顆粒反応を抑制する作用を有しているのでアトピー症の治療にも有効である。また、本品は、メラニンの合成を阻害し、コラーゲン産生を臓器用することから、皮膚に適用することにより、日焼けによる肌の炎症や、くすみ、シミ、ソバカス、シワ、小ジワの発生を抑制することから、透明感のある美しい肌にする乳液である。

実施例 2

[0068] ＜パック化粧料＞

| | | |
|---|---|---|
| A | ポリビニルアルコール | 16．0質量％ |
| | 無水ケイ酸 | 0．5質量％ |
| | ポリエチレングリコール | 0．5質量％ |
| | ポリオキシプロピレンメチルグルコシド | 5．0質量％ |
| | グリセリン | 5．0質量％ |
| | 精製水 | 60．94質量％ |
| B | エチルアルコール | 10．0質量％ |
| | 防腐剤 | 0．01質量％ |
| C | エデト酸ニナトリウム | 0．05質量％ |
| | 実験1で製造した2－アミノフェノキサジン－3－オンまたは2－アミノフェノール（和光純薬工業株式会社販売） | 1．0質量％ |
| | 精製水 | 1．0質量％ |

成分Aを混合し、70℃に加熱して溶解し、成分Bを混合し溶解した。冷却した後、成分Cを均一に分散し、パック化粧料を得た。

本品は、抗炎症効果に優れ、好塩基球やマストセルの脱顆粒反応を抑制する作用を有しているのでアトピー症の治療にも有効である。また、本品は、メラニンの合成を阻害し、コラーゲン産生を増強することから、皮膚に適用することにより、日焼けによる肌の炎症や、くすみ、シミ、ソバカス、シワ、小ジワの発生を抑制することから、透明感のある美しい肌にするパック化粧料である。

実施例 3

[0069] ＜歯磨＞

以下の処方で歯磨を製造した。

| | |
|---|---|
| 不溶性メタリン酸ナトリウム | 26．0質量％ |
| グリセリン | 25．0質量％ |
| 第2リン酸カルシウム | 15．0質量％ |
| ラウリル硫酸ナトリウム | 1．5質量％ |

| | |
|---|---|
| トラガントガム | 1．4質量％ |
| 香料 | 1．0質量％ |
| 実験1で製造した2－アミノフェノキサジン－3－オンまたは2－アミノフェノール（和光純薬工業株式会社販売） | 0．1質量％ |
| サッカリン | 0．1質量％ |
| 銅クロロフィリンナトリウム | 1．0質量％ |
| 水 | 28．9質量％ |

本品は、抗炎症効果に優れ、コラーゲン産生増強作用を有していることから、歯肉炎を軽減し、歯周病、歯槽膿漏の治療又は予防に適している。

実施例 4

[0070] ＜液剤＞

安定剤として1％（w／w）トレハロースを含む生理食塩水に、2－アミノフェノキサジン－3－オンを1μg／mlになるように、又は、2－アミノフェノールを0．1μg／mlになるように溶解し、常法にしたがって精密濾過して滅菌して液剤を得た。

本品は、COX阻害活性、一酸化窒素合成阻害活性及び脱顆粒抑制活性を有していることから、内服液、注射液、うがい薬として、リウマチ、歯周病、骨粗鬆症、胃炎、アトピー症を含むアレルギーなどの各種炎症性疾患、癌やアルツハイマー病の治療又は予防剤、鎮痛剤、解熱剤などに利用できる。

実施例 5

[0071] ＜錠剤＞

無水結晶性α－マルトース粉末（商品名『ファイントース』、株式会社林原商事販売）に2－アミノフェノキサジン－3－オン又は2－アミノフェノールを均一に混合し、常法によって打錠して、一錠200mg当り、2－アミノフェノキサジン－3－オン又を1μg、2－アミノフェノールを0．1μg含む錠剤を得た。

本品は、COX阻害活性、一酸化窒素合成阻害活性及び脱顆粒抑制活性を有していることから、経口投与により、リウマチ、歯周病、骨粗鬆症、胃炎、アトピー症を含むアレルギーなどの各種炎症性疾患、癌、アルツハイマー病の治療又は予防剤、鎮痛剤や解熱剤として利用できる。

## 産業上の利用可能性

[0072] 叙述のとおり、2－アミノフェノール又はその誘導体は、NO合成阻害作用、PGE2合成阻害作用及び脱顆粒反応抑制作用を有していることから、抗炎症剤、抗アレルギー剤などとして有用である。また、メラニン合成を阻害すること及びコラーゲン産生増強作用を有するから、美白、抗シワ、アンチエイジングなどを目的とした皮膚外用剤としても有用である。

# 請求の範囲

[1] 2－アミノフェノール又はその誘導体を有効成分として含有する抗炎症剤。

[2] 一酸化窒素の合成阻害、シクロオキシゲナーゼ活性阻害作用及び脱顆粒反応抑制作用を有する請求の範囲第1項記載の抗炎症剤。

[3] 美白用皮膚外用剤の形態及び／又は抗シワ用皮膚外用剤の形態であることを特徴とする請求の範囲第1項1又は第2項記載の抗炎症剤。

[4] 2－アミノフェノール誘導体が2－アミノフェノキサジン－3－オンであることを特徴とする請求の範囲第1項乃至第3項のいずれかに記載の抗炎症剤。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/070077

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
*A61K31/136*(2006.01)i, *A61K8/41*(2006.01)i, *A61K8/49*(2006.01)i, *A61K31/5415*(2006.01)i, *A61P29/00*(2006.01)i, *A61P43/00*(2006.01)i, *A61Q19/02*(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K31/136, A61K8/41, A61K8/49, A61K31/5415, A61P29/00, A61P43/00, A61Q19/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2007
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2007 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2007

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS(STN), REGISTRY(STN), MEDLINE(STN), BIOSIS(STN), EMBASE(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X<br>A | JP 2005-60325 A (Akio TOMOTA),<br>10 March, 2005 (10.03.05),<br>Full text<br>(Family: none) | 1,2,4<br>3 |
| X | JP 8-175959 A (Kao Corp.),<br>09 July, 1996 (09.07.96),<br>Full text<br>(Family: none) | 3 |
| A | JP 2005-272334 A (Akio TOMOTA),<br>06 October, 2005 (06.10.05),<br>Full text<br>(Family: none) | 1-4 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 05 November, 2007 (05.11.07) | 13 November, 2007 (13.11.07) |
| Name and mailing address of the ISA/<br>Japanese Patent Office<br><br>Facsimile No. | Authorized officer<br><br>Telephone No. |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/JP2007/070077

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| A | JP 2004-143101 A (Akio TOMOTA),<br>20 May, 2004 (20.05.04),<br>Full text<br>(Family: none) | 1-4 |
| A | JP 2002-193726 A (L'Oreal),<br>10 July, 2002 (10.07.02),<br>Full text<br>& EP 1205179 A1 & FR 2816502 A1<br>& US 2002/107282 A1 | 1-4 |
| A | JP 2000-510490 A (L'Oreal),<br>15 August, 2000 (15.08.00),<br>Full text<br>& EP 1001741 A1 & WO 99/32077 A1<br>& FR 2772607 A1 & US 6365135 B1 | 1-4 |
| A | JP 2000-508351 A (L'Oreal),<br>04 July, 2000 (04.07.00),<br>Full text<br>& WO 99/10318 A1 & EP 966434 A1<br>& FR 2767823 A1 & US 6423854 B1<br>& US 2002/161040 A1 | 1-4 |

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００７／０７００７７

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K31/136(2006.01)i, A61K8/41(2006.01)i, A61K8/49(2006.01)i, A61K31/5415(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, A61Q19/02(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K31/136, A61K8/41, A61K8/49, A61K31/5415, A61P29/00, A61P43/00, A61Q19/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

| | |
|---|---|
| 日本国実用新案公報 | １９２２－１９９６年 |
| 日本国公開実用新案公報 | １９７１－２００７年 |
| 日本国実用新案登録公報 | １９９６－２００７年 |
| 日本国登録実用新案公報 | １９９４－２００７年 |

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAPLUS(STN), REGISTRY(STN), MEDLINE(STN), BIOSIS(STN), EMBASE(STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

| 引用文献のカテゴリー＊ | 引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する請求の範囲の番号 |
|---|---|---|
| X | JP 2005-60325 A (友田　あき夫) 2005.03.10, 全文 | 1,2,4 |
| A | (ファミリーなし) | 3 |
| X | JP 8-175959 A (花王株式会社) 1996.07.09, 全文 | 3 |
| | (ファミリーなし) | |
| A | JP 2005-272334 A (友田　あき夫) 2005.10.06, 全文 | 1-4 |
| | (ファミリーなし) | |

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

| | |
|---|---|
| 国際調査を完了した日<br>０５．１１．２００７ | 国際調査報告の発送日<br>１３．１１．２００７ |
| 国際調査機関の名称及びあて先<br>日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）<br>郵便番号１００－８９１５<br>東京都千代田区霞が関三丁目４番３号 | 特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｃ　９４５０<br>伊藤　幸司<br>電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４５２ |

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

| 引用文献のカテゴリー＊ | 引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する請求の範囲の番号 |
|---|---|---|
| A | JP 2004-143101 A (友田　あき夫) 2004.05.20, 全文<br>(ファミリーなし) | 1-4 |
| A | JP 2002-193726 A (ロレアル) 2002.07.10, 全文<br>& EP 1205179 A1 & FR 2816502 A1 & US 2002/107282 A1 | 1-4 |
| A | JP 2000-510490 A (ロレアル) 2000.08.15, 全文<br>& EP 1001741 A1 & WO 99/32077 A1 & FR 2772607 A1<br>& US 6365135 B1 | 1-4 |
| A | JP 2000-508351 A (ロレアル) 2000.07.04, 全文<br>& WO 99/10318 A1 & EP 966434 A1 & FR 2767823 A1<br>& US 6423854 B1 & US 2002/161040 A1 | 1-4 |