

(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
2016 年 9 月 15 日(15.09.2016)



(10) 国際公開番号

WO 2016/143680 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 36/18 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)
A61K 8/97 (2006.01) A61P 17/16 (2006.01)
A61K 36/48 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 36/81 (2006.01) A61Q 17/04 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/056704
- (22) 国際出願日: 2016 年 3 月 4 日(04.03.2016)
- (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 2015-044851 2015 年 3 月 6 日(06.03.2015) JP
特願 2015-185298 2015 年 9 月 18 日(18.09.2015) JP
- (71) 出願人: サントリーホールディングス株式会社
(SUNTORY HOLDINGS LIMITED) [JP/JP]; 〒
5308203 大阪府大阪市北区堂島浜 2 丁目 1 番 4
0 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 北川 小百合(KITAGAWA, Sayuri); 〒
6190284 京都府相楽郡精華町精華台 8-1-1
サントリーワールドリサーチセンター内 Kyoto
(JP). 飯野 妙子(IINO, Taeko); 〒6190284 京都府相
楽郡精華町精華台 8-1-1 サントリーワ
ールドリサーチセンター内 Kyoto (JP). 岡田 亜砂
子(OKADA, Asako); 〒6190284 京都府相楽郡精華
町精華台 8-1-1 サントリーワールドリ
サーチセンター内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 小野 新次郎, 外(ONO, Shinjiro et al.); 〒
1000004 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号
新大手町ビル 206 区 ユアサハラ法律特許事
務所 Tokyo (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, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, 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,
IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH,
PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユー
ラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨー
ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: MATRIX METALLOPROTEINASE PRODUCTION INHIBITOR

(54) 発明の名称: マトリックスメタロプロテアーゼ産生抑制剤

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide an MMP-1 production inhibitor. An MMP-1 production inhibitor containing, as an active ingredient, an extract of at least one plant selected from the group consisting of ashwagandha (*Withania somnifera*), passion flower (*Passiflora incarnata*) and locust tree (*Robinia pseudoacacia*).

(57) 要約: MMP-1 産生の抑制剤を提供することを目的とする。 アシユワガンダ、トケイソウ、及びハリエンジュからなる群から選択される 1 又は 2 以上の植物抽出物を有効成分として含有する MMP-1 産生抑制剤。



WO 2016/143680 A1

明 細 書

発明の名称：マトリックスメタロプロテアーゼ産生抑制剤

技術分野

[0001] 本発明は、新規なマトリックスメタロプロテアーゼ産生抑制剤及び当該抑制剤を含む皮膚外用剤に関する。

背景技術

[0002] 皮膚は外側から角層、表皮、基底膜、及び真皮より構成されている。真皮は、細胞成分と、これらの細胞が産生する細胞外マトリックスと呼ばれる巨大分子の網目構造によって満たされている。細胞成分として、線維芽細胞、マクロファージ、肥満細胞、血管や神経の構成細胞の存在が知られており、細胞外マトリックスとして、コラーゲンやエラスチン等の線維性タンパク質、及びヒアルロン酸やプロテオグリカン等の多糖類などの存在が知られている。細胞外マトリックスとしてのコラーゲン線維は、真皮の乾燥重量の約70%を占めると言われており、皮膚のハリや弾力の維持に重要な役割を担っている。コラーゲン分子には20種類のサブタイプが存在するが、真皮に存在するコラーゲン線維の大部分はⅠ型コラーゲンである。

[0003] マトリックスメタロプロテアーゼ（Matrix Metalloproteinase：以下、「MMP」とする。）は、細胞外マトリックスの分解代謝に関与するタンパク質分解酵素である。MMPは、分子構造や基質特異性などの観点から、いくつかのサブタイプに分類されている。例えば、MMP-1はⅠ型コラーゲンの3重螺旋構造を分解し、MMP-2やMMP-9は基底膜を構成するⅣ型コラーゲンやゼラチンを分解する。MMPは真皮細胞外マトリックスの代謝をコントロールしているだけでなく、細胞の湿潤やサイトカイン等の生理活性分子の活性化にも深く関与しており、種々の疾患との関連性が報告されている。とりわけ皮膚においては、紫外線曝露や様々な炎症によりMMPが過剰に産生され、当該MMPがコラーゲンやエラスチンを分解・変性し、皮膚のシワやたるみの原因になることが明らかになっている。

[0004] これらの背景のもと、MMPの制御という観点から様々な検討が行われており、MMPの活性を阻害する植物抽出物などが多く報告されている（特許文献1及び2）。さらに、酵素の産生そのものを抑制し、MMPの作用を根本的に抑制することを意図した、酵母培養液を有効成分とするMMP-1産生抑制剤（特許文献3）、スルフヒドリル基を有する化合物及びジスルフィド結合を有する化合物を有効成分とするMMP-1産生抑制剤（特許文献4）などが報告されている。一方、近年、脂質や糖代謝を維持する遺伝子群の発現制御を担う核内受容体であるペルオキシソーム増殖剤応答性受容体（Peroxisome Proliferator-activated receptor、以下、「PPAR」とする。）のサブタイプの1つであるPPAR δ のアゴニストが、線維芽細胞においてUVB曝露によるMMP-1の産生を抑制することが示唆されている（非特許文献1）。

先行技術文献

特許文献

- [0005] 特許文献1：特開平7-196526号公報
特許文献2：特開平7-291873号公報
特許文献3：特開2009-24638号公報
特許文献4：特開2002-47178号公報

非特許文献

- [0006] 非特許文献1：SA Ham et al: Journal of Investigative Dermatology 133, 2593-2600 (2013)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] しかしながら、「UVBまでの短波長紫外線は真皮までほとんど透過しないため、真皮へ影響する紫外線は主にUVAである」（今川孝太郎他、「光が皮膚に与える影響」、日レ医誌（JJSLSM）第32巻第4号（2012）、第448頁22～24行）と記載されているように、通常的环境下に

において、皮膚が紫外線に曝露されたとしても、UVAを除くそのほとんどは真皮に到達することができないと考えられている。したがって、通常的环境下での真皮線維芽細胞によるMMP-1の産生は、真皮線維芽細胞に対するUVAの直接的な作用か、又はUVBに曝露された皮膚細胞により産生される炎症性サイトカインや活性酸素種（ROS）を介した間接的な作用によるものと考えられている。非特許文献1は、真皮由来の線維芽細胞にUVBを直接照射するものであり、皮膚がUVBに曝露される環境とは異なる。即ち、PPAR δ のリガンド剤が、通常的环境下で起こり得るMMP-1の産生を抑制することは、知られていない。本発明は、MMP-1産生の抑制剤を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 以上の事情の下、本願の発明者らは、様々な素材を探索し、MMP-1産生を抑制する活性を見出すことに着手した。その結果、特定の植物より調製した植物抽出物が、MMP-1産生を効果的に抑制することが判明した。かかる知見に基づいて、本発明を完成させた。

[0009] 本発明は、以下を提供する。

（1）アシュワガンダ、トケイソウ、及びハリエンジュからなる群から選択される1又は2以上の植物抽出物を有効成分として含有するMMP-1産生抑制剤。

（2）前記植物抽出物が溶媒を用いて抽出された植物抽出物である、（1）に記載のMMP-1産生抑制剤。

（3）前記溶媒がアルコールを含む溶媒である、（2）に記載のMMP-1産生抑制剤。

（4）前記MMP-1の産生が開始される前又は開始された後に適用する、（1）～（3）のいずれかに記載のMMP-1産生抑制剤。

（5）前記MMP-1が皮膚を構成する細胞により産生される、（1）～（4）のいずれかに記載のMMP-1産生抑制剤。

（6）前記細胞が真皮線維芽細胞である、（5）に記載のMMP-1産生

抑制剤。

(7) 前記MMP-1の産生が紫外線への曝露又は炎症に起因する、(1)～(6)のいずれかに記載のMMP-1産生抑制剤。

(8) 前記紫外線がUVBである、(7)に記載のMMP-1産生抑制剤。

(9) 表皮に適用する、(1)～(8)のいずれかに記載のMMP-1産生抑制剤。

(10) 皮下に適用する、(1)～(8)のいずれかに記載のMMP-1産生抑制剤。

(11) 皮膚の老化を予防又は改善するために用いられる、(1)～(10)のいずれかに記載のMMP-1産生抑制剤。

(12) 前記皮膚の老化がシワ又はたるみである、(11)に記載のMMP-1産生抑制剤。

(13) (1)～(9)のいずれかに記載のMMP-1産生抑制剤を含む皮膚外用剤。

(14) 皮膚外用剤の製造における、(1)～(9)のいずれかに記載のMMP-1産生阻害剤の使用。

(15) (1)～(12)のいずれかに記載のMMP-1産生抑制剤又は(13)に記載の皮膚外用剤を適用することを含んでなる、皮膚の非医療的な処置方法。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、アシュワガンダ、トケイソウ、ハリエンジュという特定の植物より得られる抽出物を用いることにより、MMP-1産生を顕著に抑制することが可能となる。このような抑制効果は、本願の発明者により見いだされた、紫外線曝露や炎症のような通常的环境下でのMMP-1産生の誘導に対しても効果的に作用した。本発明によれば、MMP-1産生に起因する真皮の細胞外マトリックス、特にコラーゲンの分解が抑制され、優れた老化防止効果が発揮される。即ち、老化防止効果に優れた皮膚外用剤が提供さ

れる。これに他の薬剤、例えば美白剤や抗酸化剤、抗炎症剤、細胞賦活剤、保湿剤、紫外線防止剤等を組み合わせることにより、更に高い老化防止効果が期待できる。上記のような優れた効果は、先行技術から予測することはできない。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1は、UVBを照射された表皮角化細胞によるIL-1 β の産生を示す。コンフルエントのヒト表皮角化細胞にUVBを0～60秒照射し、24時間後（◆）及び72時間後（■）の培地中のIL-1 β の濃度を定量した。

[図2]図2は、IL- β の存在下における真皮線維芽細胞によるMMP-1の産生を示す。コンフルエントのヒト真皮線維芽細胞をIL-1 β で24時間処理し、培地中のproMMP-1を定量し、MMP-1の産生量とした。

[図3]図3は、過酸化水素により誘導される活性酸素種（ROS）の産生抑制に対する植物抽出物の効果を示す。AG：アシュワガンダの抽出物、PF：トケイソウの抽出物、NAC：N-アセチルシステイン。**：P<0.01対コントロール、#：P<0.05対過酸化水素のみ添加、##：P<0.01対過酸化水素のみ添加。

発明を実施するための形態

[0012] <MMP-1産生抑制剤>

本発明は、植物抽出物を有効成分として含有する、MMP-1産生抑制剤を提供する。

[0013] 本発明において、植物抽出物とは、MMP-1の産生を抑制することのできる植物由来の抽出物を意味する。当該植物抽出物の原料となる植物は、様々な植物を対象とするスクリーニングにより見いだされた、アシュワガンダ（*Withania somnifera*）、トケイソウ（*Passiflora incarnata*）、及びハリエンジュ（*Robinia pseudoacacia*）からなる群から選択される1種又は2種以上とすることができる。以下、各植物について説明する。

[0014] アシュワガンダは、ナス科の植物であり、その葉や根はインドの伝統医療アーユルヴェーダで長寿の薬サラヤンとして古くから用いられている。本発明において、好ましくは根を用いることができる。トケイソウは、トケイソウ科の植物であり、その地上部はパッションフラワーといわれ、ヨーロッパでは神経不安や不眠症などに用いられるハーブである。本発明において好ましくは地上部を用いることができる。ハリエンジュは、ニセアカシアとも呼ばれるマメ科の植物であり、本発明においては好ましくは花を用いる。

[0015] 本発明で使用する植物抽出物の原料として用いる植物は、各植物について上記で説明した部位を用いることが好ましいが、これに制限されるものでなく、蕾、花、果実、果皮、種子、葉、枝、幹、樹皮、根、根皮、地上部、全草など全ての部位を使用することができる。また、上述の好ましい部位に加えて、上記の全ての内容から選択される1種又は2種以上を併せて用いてもよい。

[0016] 原料となる植物体は、生又は乾燥したものを用いることができ、必要により、粉碎、細切、粉末化等の加工をして用いることができる。また生薬として入手可能なものはそれを用いてもよい。

[0017] 植物抽出物は、原料となる植物から溶媒を用いて直接抽出することで得ることができる。当該抽出溶媒としては、特に限定されないが、水、アルコール、液状多価アルコール（例えば1, 3-ブチレングリコール、プロピレングリコール、グリセリン等）、ケトン類（例えばアセトン、メチルエチルケトン）、エステル類（例えば酢酸エチル、酢酸ブチル等）などが挙げられる。ここで、アルコールとして、炭素数が1～4の低級アルコールが好ましく、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノール等を例示することができる。これらの抽出溶媒は、単独で用いることができるし、2種以上を混合して用いることもできる。また、本発明において用いる溶媒には、得られる植物抽出物の抽出効率やMMP-1産生抑制作用が大きく損なわれない限り、任意の他の成分を含んでいてもよい。

[0018] 溶媒による植物抽出物の調製の一態様として、原料となる植物をアルコー

ルを含む溶媒で処理することにより、植物抽出物を得ることが挙げられる。アルコールの濃度は、得られる植物抽出物がMMP-1産生を抑制する効果を有する限り、特に制限されない。抽出溶媒中におけるアルコールの濃度は、約10～100容量%、好ましくは約10～70容量%である。アルコールを含む溶媒としては、アルコール水溶液を好適に用いることができる。本発明においては、安全性の観点から、アルコールとしてエタノールを用いることが好ましい。

[0019] 原料植物の抽出方法は、特に限定されるものではないが、公知の手段に従い、所望に応じて適宜設定することができる。例えば、溶媒中に原料植物を浸漬すること等によって溶媒を原料植物と接触させ、必要に応じ、静置保存、攪拌、又は加熱還流してもよい。抽出温度は、特に制限されるものではなく、溶媒の温度に応じて適宜設定すればよいが、操作上の観点から、溶媒の沸点以下とすることができる。また、必要に応じて、加圧や減圧等の条件を設定することもできる。

[0020] 抽出時間は、用いる植物原料の種類や抽出溶媒の種類及び使用量等により適宜設定すればよい。その使用量は、通常、原料植物1重量部に対して1～1000倍、好ましくは1～100倍、さらに好ましくは1～10倍とすることができ、抽出時間は、通常、約10分～1ヶ月程度、好ましくは10分～7日程度とすることができる。また、溶媒として熱水を用いる場合、その使用量は、通常、原料1重量部に対して1～1000倍、好ましくは1～100倍、さらに好ましくは1～10倍とすることができ、抽出時間は、通常、約10分～7日程度、好ましくは10分～1日程度、さらに好ましくは10分～1時間程度とすることができる。

[0021] 本発明の植物抽出物は、上記の抽出操作の後、抽出残渣を分離して抽出液の形態とする。この分離手段としては、公知の方法を用いることができ、例えば濾過、遠心分離などを用いることができる。本発明においては、上記抽出液のまま使用してもよい。或いは、MMP-1産生抑制作用の調整、輸送の簡便性、又は保存の簡便性等の様々な観点から、必要に応じて、前記抽出

液の濃縮物又は乾燥物（濃縮乾固物）を得、これを使用してもよい。濃縮は常圧又は減圧下で行うことができ、得られる濃縮液の容積を、濃縮前の抽出液の容積の約10～50容量%、好ましくは約10～30容量%に調整してもよい。乾固物は、抽出液を減圧下で乾燥させ、溶媒を除去することによって得ることができる。

[0022] また、植物抽出物は、上記した溶媒を用いる方法以外の方法によって調製することもできる。例えば、水蒸気蒸留や、超臨界抽出技術を用いた二酸化炭素抽出、さらには圧搾処理を施した後に得られる圧搾液（搾汁）および／又は残渣に溶媒を加えて抽出することで得られるもの、前記の圧搾液そのものも、本発明の植物抽出物の定義に含まれる。また、本発明の植物抽出物は、必要に応じ、カラムクロマトグラフィー等でその活性成分を分画精製してもよい。

[0023] 本発明のMMP-1産生抑制剤は、MMP-1が産生されるいずれの対象に適用することができ、それによりMMP-1の産生を抑制する。ここで、MMP-1産生抑制とは、MMP-1の産生を完全に抑制することに限定されるものではなく、MMP-1の過剰産生を抑制するなどのMMP-1産生の部分的な抑制で足りるものとする。本明細書において「対象」とは、哺乳動物を意味し、好ましくはヒトである。

[0024] MMP-1が産生される組織は、限定されないが、皮膚を例示することができる。よって、本発明のMMP-1産生抑制剤は、皮膚におけるMMP-1の産生の抑制に適用することができる。そして、皮膚は、角層、表皮、基底膜、及び真皮から構成されるが、MMP-1は主として真皮において産生される。よって、本発明のMMP-1産生抑制剤は、真皮におけるMMP-1の産生を抑制するために適用することができる。更に、真皮におけるMMP-1の産生は、真皮に存在する細胞により行われる。よって、本発明のMMP-1産生抑制剤は、真皮に存在する細胞によるMMP-1の産生を抑制するために適用することができる。また、真皮においてMMP-1を産生する細胞は主として線維芽細胞である。よって、本発明のMMP-1産生抑制

剤は、真皮に存在する線維芽細胞によるMMP-1の産生を抑制するために適用することができる。

[0025] 皮膚において、MMP-1は定常的に産生され、真皮の代謝制御に関与している。一方、MMP-1は、刺激によって過剰に産生され、様々な疾患に関与することも知られている。ここで、刺激とは、皮膚に関して例示するとすれば、紫外線及び炎症等が挙げられる。よって、本発明のMMP-1産生抑制剤は、皮膚の紫外線曝露又は皮膚の炎症により誘導される、真皮におけるMMP-1産生を抑制するために適用することができる。ここで、紫外線として、波長の異なるUVAとUVBの存在が知られている。UVAは表皮を通過して真皮にまで到達し、真皮の線維芽細胞に作用してMMP-1の産生を誘導すると考えられている。一方、UVBは、真皮にほとんど到達しないため、真皮の線維芽細胞に直接作用してMMP-1産生を誘導することはできないと考えられている。即ち、皮膚がUVBに曝露されることにより、真皮でのMMP-1の産生が誘導されるとすれば、更なる別の因子が関与していることが示唆される。本発明のMMP-1産生抑制剤は、皮膚のUVBへの曝露により誘導される、真皮におけるMMP-1産生を抑制するために好ましく適用することができる。

[0026] UVB曝露によるMMP-1産生への影響は、非特許文献1に報告されている。当該報告では、UVBを真皮の線維芽細胞に直接照射した検討がなされている。しかし、上記で説明したように、UVBを皮膚に照射したとしても、UVBは真皮へはほとんど到達しないため、非特許文献1の報告は通常的环境下において皮膚がUVBに曝露される条件を反映しているとはいえない。一方、本願の発明者は、UVB曝露により皮膚の表皮細胞（例えば、表皮角化細胞）がIL-1 β 及びROSを産生することを見出した。更に、外因性のIL-1 β が、真皮の線維芽細胞によるMMP-1産生を刺激することも見出した。また、皮膚においてROSが発生すると、MMP-1の産生を誘導するシグナルカスケード（MAPK）が活性化されることが知られている（Hyeon Ho Kim et al, Journal of Lipid Research 46, 1712-1720 (20

05))。これらの事項から、皮膚がUVBに曝露された場合、表皮細胞によりIL-1 β 及び／又はROSが産生され、当該IL-1 β 及び／又はROSが真皮の線維芽細胞によるMMP-1の産生を誘導することが示唆された。よって、本願のMMP-1産生抑制剤は、皮膚のUVB曝露により産生されるIL-1 β 及び／又はROSが媒介する真皮でのMMP-1産生を抑制するために適用することができる。そして、当該IL-1 β 及び／又はROSは表皮細胞により産生されたものであり、当該表皮細胞として表皮角化細胞が例示される。

[0027] 本発明のMMP-1産生抑制剤を適用する時期は特に制限されない。例えば、MMP-1の産生が開始される前に本発明のMMP-1産生抑制剤を適用すれば、MMP-1の産生を予防的に抑制することができる。別の例として、MMP-1の産生が開始された後に本発明のMMP-1産生抑制剤を適用すれば、MMP-1産生の程度を抑えることができる。このようなMMP-1の産生抑制作用によって、コラーゲン、特にI型コラーゲンの分解を防ぐことができる。

[0028] 本発明のMMP-1産生抑制剤の適用は、MMP-1の産生抑制効果が発揮される態様であれば、いずれの方法で行ってもよい。好ましくは、例えば、当該抑制剤を、塗布、貼付け、又は噴霧すること等により適用することができる。別の好ましい例として、当該抑制剤を皮下に注入することにより適用することもできる。しかし、これらの例に限定されるものではない。当該抑制剤の適用量は、MMP-1の産生を抑制するために有効な量であればよい。当該抑制剤の適用は、1日1回としてもよいし、数回に分けてもよい。また、適用期間は1日又はそれ以上の日数とすることができる。当業者は、当該抑制剤を適用する対象（例えば、ヒト）の状態（年齢、性別、症状など）、及びその他の事情を考慮し、当該抑制剤の適切な適用量、適用回数、及び適用期間を決定することができる。

[0029] 本発明のMMP-1産生抑制剤は、限定されないが、皮膚の老化の予防又は改善に適用することができる。MMP-1は、皮膚のI型コラーゲンの分

解を介して、細胞外マトリックスの分解又は変性に関与する。皮膚の細胞外マトリックスの分解又は変性は、皮膚のシワやたるみの原因となる。本発明のMMP-1産生抑制剤は、MMP-1の産生を抑制することができるため、例えば、皮膚のシワ又はたるみの予防又は改善に適用することができる。

[0030] <皮膚外用剤>

本発明によれば、上記で説明したMMP-1産生抑制剤を含有する皮膚外用剤が提供される。当該皮膚外用剤は、限定されないが、皮膚の老化の予防又は改善、並びに皮膚のシワ又はたるみの予防又は改善に適用することができる。

[0031] 本発明の皮膚外用剤の適用は、MMP-1の産生抑制効果が発揮される態様であれば、いずれの方法で行ってもよい。好ましくは、例えば、当該皮膚外用剤を、皮膚に塗布、貼付け、又は噴霧すること等により適用することができる。別の好ましい例として、当該皮膚外用剤を皮下に注入することにより適用することもできる。しかし、これらの例に限定されるものではない。当該皮膚外用剤の適用量は、MMP-1の産生を抑制するために有効な量であればよい。当該皮膚外用剤の適用は、1日1回としてもよいし、数回に分けてもよい。また、適用期間は1日又はそれ以上の日数としてもよい。当業者は、当該皮膚外用剤を適用する対象（例えば、ヒト）の状態（年齢、性別、症状など）、及びその他の事情を考慮し、当該皮膚外用剤の適切な適用量、適用回数、及び適用期間を決定することができる。

[0032] 本発明の皮膚外用剤は、許容される基材を更に含んでもよい。ここで、許容される基材としては、ヒトや動物に対する使用が許容されている成分を好ましい例として挙げるることができる。当該基材は、MMP-1産生抑制作用を著しく損なわないものであればよく、例えば、ビタミンE及びビタミンC等のビタミン類、水、アルコール、糖類、賦形剤、崩壊剤、結合剤、潤沢剤、乳化剤、緊張化剤(等張化剤)、緩衝剤、溶解補助剤、防腐剤、吸収促進剤、安定化剤、抗酸化剤、着色剤、矯味剤、香料、凝固剤、pH調整剤、増粘剤、エキス粉末、生薬、各種粉黛、キレート剤、無機塩、油剤、界面活性剤

、血行促進剤、抗菌・殺菌剤、各種動植物・微生物抽出物等が挙げられる。これらの基材から、意図する使用態様に適切なものを選択し、使用することができる。例えば、本発明の皮膚外用剤を化粧料とする場合、上記の基材から化粧料や医薬部外品において使用可能なものを選択し、配合することができる。例えば、本発明の皮膚外用剤を医薬品とする場合、上記の基材から外用医薬品において使用可能なものを選択し、配合することができる。

[0033] 本発明の皮膚外用剤は、意図する使用態様に則して適切な形態とすることができる。例えば、当該皮膚外用剤を化粧料として用いる場合、乳液、クリーム、化粧水、パック、フィルム、洗浄料、ファンデーション、軟膏、エアゾール等の形態にすることができる。別の例として、本発明の皮膚外用剤を医薬品として用いる場合、乳液、クリーム、水溶液、貼付け剤、フィルム、洗浄料、軟膏、エアゾール等の形態にすることができる。

[0034] 本発明の皮膚外用剤は、MMP-1の産生を抑制する作用を有する追加の成分と組み合わせて用いてもよい。当該追加の成分としては、例えば、美白剤、抗酸化剤、抗炎症剤、細胞賦活剤、保湿剤、紫外線防止剤等が挙げられる。ここで、組み合わせて用いるとは、当該追加の成分を本発明の皮膚外用剤に配合することだけでなく、当該追加の成分を本発明の皮膚外用剤と別の構成とし、本発明の皮膚外用剤を適用する前、後、又は同時に当該追加の成分を適用することを含む。

[0035] <その他>

本発明は、MMP-1産生抑制剤の製造における、植物抽出物の使用を提供する。本発明は、皮膚外用剤の製造における、MMP-1産生抑制剤の使用を更に提供する。本発明は、また、必要とする対象の皮膚に本発明のMMP-1産生抑制剤を適用することを含んでなる、非医療的な皮膚の処置方法を提供する。ここで、当該MMP-1産生抑制剤、植物抽出物、皮膚外用剤、及び対象の態様については、上述した通りである。そして、本明細書でいう「非医療的」とは、病気や疾患の治療等の医療的な処置を目的とするものではなく、外観上の老化、例えば、シワやたるみなどを予防又は改善するこ

とにより、皮膚の外観を美しくしたり、美しさを保つなどの化粧上又は美容上の処置を意図する。

実施例

[0036] 本実施例において、具体例を挙げて本発明を更に説明する。本実施例は、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

[0037] [試験例1] UVB照射による表皮角化細胞によるIL-1 β の産生

成人由来正常ヒト表皮角化細胞（NHEK-AD、クラボウ株式会社より購入）を用いて、UVBによる表皮角化細胞でのIL-1 β の産生について評価した。35mmの培養ディッシュに細胞を播種し、37℃、二酸化炭素濃度5vol%中にてコンフルエントになるまで培養した。0.130mJ/cm²のUVBを0～60秒間細胞に照射した。UVB照射後24時間及び72時間の培地から培養上清を回収し、培地中に分泌されたIL-1 β を定量した。IL-1 β 定量ELISA kit（R&D Systems社製）を用い、添付された説明書に従って、IL-1 β の定量を行った（図1）。

[0038] 表皮角化細胞によるIL-1 β の産生量は、UVBの照射時間が長くなるにつれて、増加することが示された。特に、UVBの照射時間が20秒を超えた場合、IL-1 β の産生量が増加することが明確になった。このような傾向は、UVB照射後24時間及び72時間のいずれにおいても観察された。また、UVB照射後72時間において、より多くのIL-1 β が蓄積していることが示された。

[0039] [試験例2] IL-1 β による真皮線維芽細胞によるMMP-1の産生

新生児由来正常ヒト皮膚線維芽細胞（NHDF-NB、クラボウ株式会社より購入）を真皮線維芽細胞として用いて、MMP-1の産生量を指標に検討を行った。24ウェルプレートに真皮線維芽細胞を播種し、37℃、二酸化炭素濃度5vol%中にてコンフルエントになるまで培養した。IL-1 β を最終濃度で0、30、100、300、1000pg/mLとなるように培地に添加し、24時間培養した。培養後、培養上清を回収し、培地中に

分泌された proMMP-1 を定量した。定量 ELISA Kit (R&D Systems 社製) を用い、添付された説明書に従って、 proMMP-1 の定量を行い (図 2)、 MMP-1 の産生量とした。

[0040] この結果より、 $\text{IL-1}\beta$ の存在により、真皮線維芽細胞において MMP-1 が産生することが示された。 MMP-1 の産生量は、 $\text{IL-1}\beta$ の濃度に伴って増加した。この結果と試験例 1 の結果を併せて考えると、皮膚が UVB に曝露されると、表皮角化細胞により $\text{IL-1}\beta$ が産生され、当該 $\text{IL-1}\beta$ が真皮線維芽細胞による MMP-1 の産生を誘導し、当該 MMP-1 がコラーゲンを分解するという一連のプロセスが示唆される。

[0041] [調製例 1] 植物由来の抽出物の調製

様々な植物を対象とするスクリーニングにより選択した 8 種の植物をエタノール抽出し、抽出物を得た。アシュワガンダ、トケイソウ、ハリエンジュ、サクナ、ギョリュウモドキ、アニス、セキガイチャ、及びセイヨウニワトコの破碎物それぞれを、重量の 10 (w/v) 倍量の 70 容量%エタノールに浸し、室温下、1 日 1 回攪拌操作を加えて 7 日間抽出した。その後、濾過により残渣を除去し、抽出液を得た。当該抽出液を濃縮後、凍結乾燥することにより各植物のエタノール抽出物を得た。当該植物抽出物を本実施例で用いた。

[0042] [試験例 3] MMP-1 産生抑制効果

MMP-1 産生の抑制における植物由来の抽出物の効果について検討した。 $\text{PPAR}\delta$ リガンド剤をポジティブコントロールとして、同様に検討した。新生児由来正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF-NB、クラボウ株式会社より購入) を真皮線維芽細胞として用いて、 MMP-1 の産生量を指標として検討を行った。

[0043] 24 ウェルプレートに真皮線維芽細胞を播種し、 37°C 、二酸化炭素濃度 5 vol % 中にてコンフルエントになるまで培養した。その後、以下の成分を添加した：

・ DMSO に溶解された $\text{PPAR}\delta$ リガンド剤 GW501516 (Enz

oLife Science社製)、

・DMSOに溶解された8種の植物それぞれより調製した植物抽出物(調製例1を参照)、又は

・添加なし(DMSO溶液のみ)。

添加した成分の培養液中の濃度は、GW501516に関しては25 nM、植物抽出物に関しては10 μ g/mL、DMSOに関しては0.1%とした。24時間培養した後、IL-1 β を最終濃度100 pg/mLで培地に添加した。ここで、DMSO溶液のみを添加したウェルの一部にはIL-1 β を添加しないものとし、これをコントロールとした。48時間培養後、培養上清を回収し、培地中に分泌されたproMMP-1を定量し、MMP-1の産生量とした。proMMP-1の定量は、定量ELISA Kit (R & D Systems社製)を用い、添付された説明書に従って行った。定量結果は、コントロールについてのMMP-1の産生量を100%とする相対値(%)として示した(表1)。

[0044] [表1]

	植物抽出物 添加濃度 (μ g/mL)	IL-1 β 添加濃度 (pg/mL)	MMP-1産生量 (相対値)
コントロール	0	0	100 $\pm$ 12.2
IL-1 β のみ添加	0	100	220.0 $\pm$ 9.2
GW501516 25 nM	0	100	165.2 $\pm$ 6.8
アシュワガンダ	10	100	147.1 $\pm$ 1.5
トケイソウ	10	100	200.2 $\pm$ 1.3
ハリエンジュ	10	100	205.6 $\pm$ 1.8
サクナ	10	100	240.2 $\pm$ 1.2
ギョリュウモドキ	10	100	256.4 $\pm$ 1.4
アニス	10	100	256.1 $\pm$ 9.4
セキガイチャ	10	100	281.8 $\pm$ 3.4
セイヨウニワトコ	10	100	417.6 $\pm$ 9.5

[0045] 真皮線維芽細胞に $IL-1\beta$ のみを添加すると、 $MMP-1$ の産生量は、およそ 220% (コントロールの 2.2 倍) となった。そして、 $IL-1\beta$ を添加する前に GW501516 で細胞を処理した場合、 $MMP-1$ の産生量は、 $165.2 \pm 6.8\%$ となった。このことから、 $IL-1\beta$ による $MMP-1$ の産生が、GW501516 により抑制されることが確認された。

[0046] 一方、本試験に供した 8 種類の植物由来の抽出物のうち、サクナ、ギョリュウモドキ、アニス、セキガイチャ、及びセイヨウニワトコより調製した 5 種類の植物抽出物で細胞を処理した場合、 $IL-1\beta$ のみを添加したものに比べて、 $MMP-1$ の産生量は却って高くなることが示された。これに対して、アシュワガンダ、トケイソウ、及びハリエンジュから調製した 3 種類の植物抽出物で細胞を処理した場合、 $IL-1\beta$ による $MMP-1$ の産生が強く抑制された。これら 3 種類の植物抽出物で処理した場合の $MMP-1$ の産生量はそれぞれ、 $147.1 \pm 1.5\%$ 、 $200.2 \pm 1.3\%$ 、及び $205.6 \pm 1.8\%$ であり、 $IL-1\beta$ のみを添加したものに比べて大幅に抑制された。とりわけ、アシュワガンダより調製した植物抽出物による $MMP-1$ 産生の抑制効果は、GW501516 による効果をも上回ることが確認された。試験に供した植物抽出物の中で、アシュワガンダ、トケイソウ、及びハリエンジュから調製した 3 種類の植物抽出物のみが $MMP-1$ の産生を強く抑制することは、全くの予想外であった。

[0047] [試験例 4] 植物抽出物による $MMP-1$ 産生抑制効果

試験例 3 において、 $MMP-1$ 産生を抑制することが確認された 3 種類の植物抽出物について、更に検討した。

[0048] これらの植物抽出物の培地中の濃度を $2.5 \mu g/mL$ 、 $5 \mu g/mL$ 、及び $10 \mu g/mL$ とする以外は、試験例 3 と同様の条件で試験した。 $MMP-1$ の産生量は、コントロールについての $MMP-1$ の産生量を 100% とする相対値 (%) として示した (表 2)。

[0049]

[表2]

	植物抽出物添加 濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	IL-1 β 添加濃度 (pg/mL)	MMP-1 産生量 (相対値)
コントロール	0	0	100 $\pm$ 4.4
IL-1 β のみ添加	0	100	445.8 $\pm$ 12.2
アシュワガンダ	2.5	100	233.2 $\pm$ 8.2
	5	100	185.5 $\pm$ 6.7
	10	100	122.2 $\pm$ 3.2
トケイソウ	2.5	100	265.7 $\pm$ 14.2
	5	100	309.7 $\pm$ 9.3
	10	100	321.3 $\pm$ 12.4
ハリエンジュ	2.5	100	287.7 $\pm$ 3.7
	5	100	309.1 $\pm$ 11.6
	10	100	322.7 $\pm$ 10.5

[0050] 真皮線維芽細胞に IL-1 β のみを添加すると、MMP-1の産生量は、およそ446%（コントロールの4.5倍に増加）となった。そして、本試験に供した3種類の植物抽出物はいずれも、試験した全ての濃度において、MMP-1の産生を顕著に抑制した。これらの結果から、アシュワガンダ、トケイソウ、及びハリエンジュより調製される植物抽出物は、優れたMMP-1産生抑制効果を有することが示された。

[0051] 以上より、通常的环境下で紫外線に曝露された皮膚において、UVBに曝露された皮膚細胞により産生される炎症性サイトカインを介する真皮線維芽細胞によるMMP-1の産生は、本発明により効果的に抑制されることが判明した。

[0052] [試験例5] 過酸化水素 (H_2O_2) により誘導される活性酸素種 (ROS) の産生抑制に対する植物抽出物の効果

ヒトの皮膚をUVBに曝露すると、過酸化水素 (H_2O_2) が発生することが知られている (Hyeon Ho Kim et al, Journal of Lipid Research 46, 1712-1720 (2005))。本試験においては、過酸化水素の刺激による活性酸素種 (ROS) の産生、及び植物抽出物によるROSの産生抑制について検討を行

った。

[0053] 24 ウェルプレートに真皮線維芽細胞を播種し、37℃、二酸化炭素濃度5 vol %中にてコンフルエントになるまで培養した。

その後、以下の成分を添加した：

- ・ DMSOに溶解された抗酸化剤N-アセチルシステイン（ナカライテスク社製）、

- ・ DMSOに溶解されたPPAR δ リガンド剤GW501516（Enzo Life Science社製）、

- ・ DMSOに溶解された植物抽出物（調製例1を参照）、又は

- ・ 添加なし（DMSO溶液のみ）。

添加した成分の培養液中の濃度は、N-アセチルシステインに関しては30 μ M及び300 μ M、GW501516に関しては25 nM、植物抽出物に関しては10 μ g/mL及び20 μ g/mLとし、DMSOに関しては0.1%とした。24時間培養した後、新しい培地に交換し、過酸化水素を最終濃度10 μ Mで培地に添加し、10分後の細胞内の活性酸素種レベルを定量し、ROS産生量とした。ROSの定量は、DCFDAアッセイキット（Abcam社製）を添付された説明書に従って使用することにより行った。DMSO溶液のみを添加したウェルの一部にはH₂O₂を添加しないものとし、これをコントロールとした。定量結果は、コントロールについてのROS産生量を100%とする相対値（%）として示した（図3）。

[0054] 成分を添加せず、過酸化水素を添加した細胞とコントロールの結果から、過酸化水素で細胞を刺激することによって、ROSの産生が誘導されることが確認された。そして、成分を添加せず、過酸化水素を添加した細胞についての結果と比較することにより、次の事項が示された：

- ・ アシュワガンダの抽出物及びトケイソウの抽出物により、ROSの産生が抑制された。いずれの抽出物も、20 μ g/mLの添加により、ROSの産生を有意に抑制した；

- ・ 抗酸化剤として知られるN-アセチルシステインによっても、ROSの

産生が抑制された。300 μ Mの添加量において、ROSの産生を有意に抑制した。なお、GW501516は、ROSの産生抑制効果を示さなかった。

[0055] 以上より、アシュワガンダの抽出物及びトケイソウの抽出物は、過酸化水素の刺激により誘導されるROSの産生を抑制することが明らかとなった。その効果は、抗酸化剤として知られるN-アセチルシステインの効果に匹敵する又はそれ以上である。

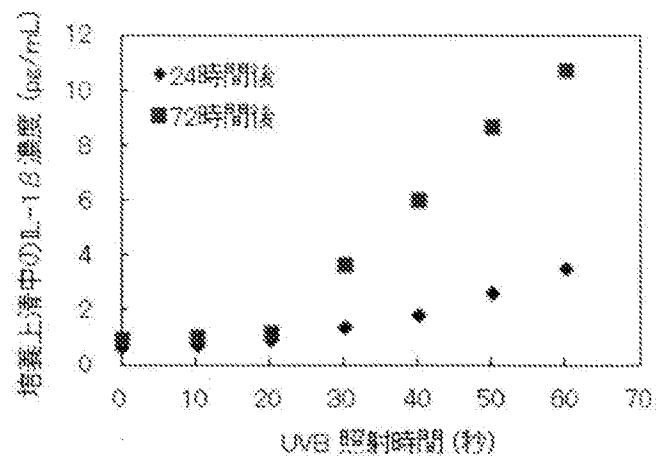
[0056] Hyeon Ho Kimら (Journal of Lipid Research 46, 1712-1720 (2005)) には、ヒトの皮膚が紫外線に曝露されると、過酸化水素が迅速かつ有意に産生されること、そして上昇したROSがシグナルカスケード (MAPK) の活性化に関与し、結果としてMMP-1の産生を誘導することが示唆されている。ここでは、更に、N-アセチルシステイン等の抗酸化剤がROSを捕捉し、当該カスケードの活性化に干渉することにより、MMP-1の産生を抑制する可能性も教示されている。これらの事項を上記の結果と併せて考えると、アシュワガンダ及びトケイソウは、過酸化水素により誘導されるROSの産生を抑制することによっても、MMP-1の産生を抑制することが示唆される。

請求の範囲

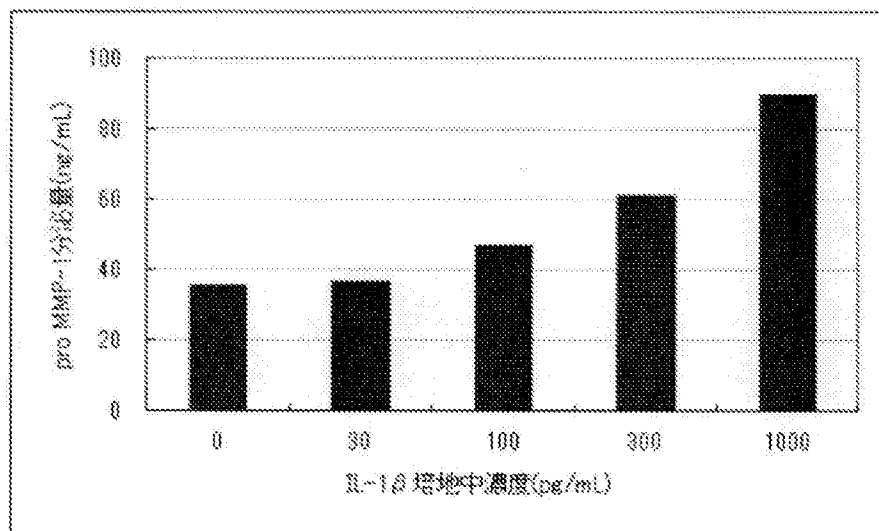
- [請求項1] アシュワガンダ、トケイソウ、及びハリエンジュからなる群から選択される1又は2以上の植物抽出物を有効成分として含有するMMP－1産生抑制剤。
- [請求項2] 前記植物抽出物が溶媒を用いて抽出された植物抽出物である、請求項1に記載のMMP－1産生抑制剤。
- [請求項3] 前記溶媒がアルコールを含む溶媒である、請求項2に記載のMMP－1産生抑制剤。
- [請求項4] 前記MMP－1の産生が開始される前又は開始された後に適用する、請求項1～3のいずれか1項に記載のMMP－1産生抑制剤。
- [請求項5] 前記MMP－1が皮膚を構成する細胞により産生される、請求項1～4のいずれか1項に記載のMMP－1産生抑制剤。
- [請求項6] 前記細胞が真皮線維芽細胞である、請求項5に記載のMMP－1産生抑制剤。
- [請求項7] 前記MMP－1の産生が紫外線への曝露又は炎症に起因する、請求項1～6のいずれか1項に記載のMMP－1産生抑制剤。
- [請求項8] 前記紫外線がUVBである、請求項7に記載のMMP－1産生抑制剤。
- [請求項9] 表皮に適用する、請求項1～8のいずれか1項に記載のMMP－1産生抑制剤。
- [請求項10] 皮下に適用する、請求項1～8のいずれか1項に記載のMMP－1産生抑制剤。
- [請求項11] 皮膚の老化を予防又は改善するために用いられる、請求項1～10のいずれか1項に記載のMMP－1産生抑制剤。
- [請求項12] 前記皮膚の老化がシワ又はたるみである、請求項11に記載のMMP－1産生抑制剤。
- [請求項13] 請求項1～9のいずれか1項に記載のMMP－1産生抑制剤を含む皮膚外用剤。

- [請求項14] 皮膚外用剤の製造における、請求項1～9のいずれか1項に記載の MMP－1 産生阻害剤の使用。
- [請求項15] 請求項1～12のいずれか1項に記載の MMP－1 産生抑制剤又は請求項14に記載の皮膚外用剤を適用することを含んでなる、皮膚の非医療的な処置方法。

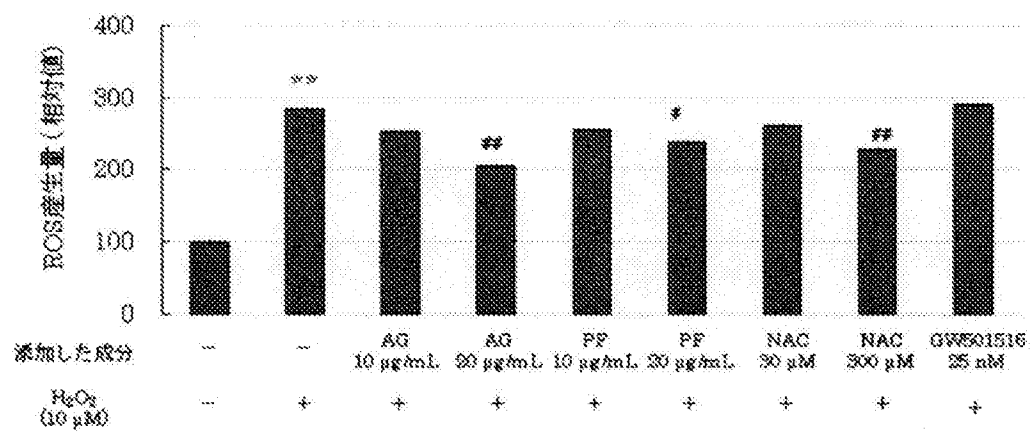
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/056704

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K36/18(2006.01)i, A61K8/97(2006.01)i, A61K36/48(2006.01)i, A61K36/81(2006.01)i, A61P17/00(2006.01)i, A61P17/16(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, A61Q17/04(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)

A61K36/18, A61K8/97, A61K36/48, A61K36/81, A61P17/00, A61P17/16, A61P43/00, A61Q17/04

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	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2010-83849 A (Tokiwa Phytochemical Co., Ltd.), 15 April 2010 (15.04.2010), claims 1, 2; preparation examples 1, 2; test examples 1, 2 (Family: none)	1-9, 11-15
X	JP 2001-58951 A (Shiseido Co., Ltd.), 06 March 2001 (06.03.2001), claim 2; paragraph [0027]; examples 1 to 13 & US 6514538 B1 claim 2; EXAMPLES, 1.Preparation of the Musali Extract; examples 1 to 13 & WO 2000/076473 A1 & TW 577748 B & CN 1313751 A	13-15



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
10 May 2016 (10.05.16)

Date of mailing of the international search report
17 May 2016 (17.05.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/056704

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2003-48812 A (Koei Perfumery Co., Ltd.), 21 February 2003 (21.02.2003), claims 1, 2; paragraph [0006]; table 2, example 2; paragraph [0045]; examples 8, 11 (Family: none)	1-9, 11-15
X Y	WO 2009/014315 A1 (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY), 29 January 2009 (29.01.2009), claims 1 to 3, 20; page 23, lines 7 to 19; page 28, lines 16 to 20 & KR 10-2009-0011428 A	1-5, 7, 9-15 6, 8
Y	WO 2014/043861 A1 (TSAO, Yeou-Ping), 27 March 2014 (27.03.2014), example 4 & JP 2015-530391 A & US 2015/0232523 A1 & EP 2897976 A1 & AU 2012390200 A & KR 10-2015-0058363 A & CN 104903346 A	6, 8
X	KR 10-2011-0001538 A (Kolmar Korea Co., Ltd.), 06 January 2011 (06.01.2011), claims 7 to 14; examples 1 to 7; prescription examples 1 to 6 (Family: none)	13-15

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K36/18(2006.01)i, A61K8/97(2006.01)i, A61K36/48(2006.01)i, A61K36/81(2006.01)i,
A61P17/00(2006.01)i, A61P17/16(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, A61Q17/04(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. A61K36/18, A61K8/97, A61K36/48, A61K36/81, A61P17/00, A61P17/16, A61P43/00, A61Q17/04

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	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (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 請求項の番号
X	JP 2010-83849 A (株式会社常磐植物化学研究所) 2010.04.15, 請求項 1, 2、製造例 1, 2、試験例 1, 2 (ファミリーなし)	1-9, 11-15
X	JP 2001-58951 A (株式会社資生堂) 2001.03.06, 請求項 2、段落[0027], 実施例 1-13 & US 6514538 B1, claim2, EXAMPLES 1.Preparation of the Musali Extract, Example 1-13 & WO 2000/076473 A1 & TW 577748 B & CN 1313751 A	13-15

☑ 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

10.05.2016

国際調査報告の発送日

17.05.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
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)

鳥居 福代

電話番号 03-3581-1101 内線 3439

4U

3436

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 請求項の番号
X	JP 2003-48812 A (香栄興業株式会社) 2003.02.21, 請求項 1, 2、段落[0006]、表 2 の実施例 2, 段落[0045]、実施例 8, 11 (ファミリーなし)	1-9, 11-15
X Y	WO 2009/014315 A1 (KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 2009.01.29, 請求項 1-3, 20, 第 23 頁第 7-19 行、第 28 頁第 16-20 行 & KR 10-2009-0011428 A	1-5, 7, 9-15 6, 8
Y	WO 2014/043861 A1 (TSAO, Yeou-Ping) 2014.03.27, 実施例 4 & JP 2015-530391 A & US 2015/0232523 A1 & EP 2897976 A1 & AU 2012390200 A & KR 10-2015-0058363 A & CN 104903346 A	6, 8
X	KR 10-2011-0001538 A (Kolmar Korea Co., Ltd.) 2011.01.06, 請求項 7-14、実施例 1-7、処方例 1-6 (ファミリーなし)	13-15