

(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
2015 年 2 月 12 日(12.02.2015)



(10) 国際公開番号

WO 2015/020162 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 31/19 (2006.01) *A61P 17/00* (2006.01)
A61K 8/36 (2006.01) *A61P 17/02* (2006.01)
A61K 8/97 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61K 36/00 (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
A61K 36/18 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/070920
- (22) 国際出願日: 2014 年 8 月 7 日(07.08.2014)
- (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 2013-166326 2013 年 8 月 9 日(09.08.2013) JP
- (71) 出願人: 学校法人東京理科大学(TOKYO UNIVERSITY OF SCIENCE FOUNDATION) [JP/JP]; 〒1628601 東京都新宿区神楽坂一丁目 3 番地 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 磯濱 洋一郎(ISOHAMA, Yoichiro); 〒1628601 東京都新宿区神楽坂一丁目 3 番地 学校法人東京理科大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 中島 淳, 外(NAKAJIMA, Jun et al.); 〒1600022 東京都新宿区新宿 4 丁目 3 番 1 7 号
- H K 新宿ビル 7 階 太陽国際特許事務所 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, KE, KG, 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, 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, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロシア (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: AQUAPORIN 3 EXPRESSION ENHANCER AND TISSUE REPAIR ACCELERATOR

(54) 発明の名称: アクアポリン 3 の発現亢進剤及び組織修復促進剤

(57) Abstract: An aquaporin 3 expression enhancer and tissue repair accelerator containing ursolic acid as an active ingredient.

(57) 要約: ウルソール酸を有効成分として含有するアクアポリン 3 の発現亢進剤及び組織修復促進剤。



WO 2015/020162 A1

明 細 書

発明の名称 : アクアポリン 3 の発現亢進剤及び組織修復促進剤 技術分野

[0001] 本発明は、アクアポリン 3 の発現亢進剤及び組織修復促進剤に関する。

背景技術

[0002] アクアポリン (a q u a p o r i n : 以下 A Q P と略すことがある) は、アグレにより 1 9 9 2 年に発見された膜 6 回貫通タンパクで、細胞内の水分量を調節する水チャネルとして機能する重要なタンパクである。アクアポリンは細菌から哺乳類に至るまで普遍的に存在しており、これまでに哺乳類で、A Q P 0 から A Q P 1 2 まで 1 3 種類のアクアポリンが確認されている。

[0003] 水チャネルの一種であるアクアポリン 3 (A Q P 3) は、皮膚ケラチノサイトに多く存在し、水やグリセロールの輸送促進作用を示すことが知られており、皮膚の生理的保湿に重要な成分である。

また、アクアポリン 3 の発現は皮膚炎症部位で著明に低下しており、アクアポリン 3 の発現量の変動が種々の皮膚疾患に伴う乾燥症状の形成と密接な関係にあることが示唆されている。さらに、アクアポリン 3 はケラチノサイトの増殖又は遊走能の亢進にも関わり、創傷時の治癒促進に関与すると考えられている (例えば、特開 2 0 1 1 - 3 2 1 9 1 号公報参照)。

[0004] ウルソール酸 (u r s o l i c a c i d) は、5 環性トリテルペン酸の一種である。ウルソール酸は、メラニン産生抑制作用 (例えば、特開 2 0 1 3 - 3 2 3 0 0 号公報参照) や、抗酸化作用 (例えば、特開 2 0 1 2 - 5 1 9 4 0 号公報参照) を示すことが知られている。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、ウルソール酸がアクアポリン 3 の発現亢進作用又は組織修復促進作用を示すことは知られていなかった。

本発明の課題は、ウルソール酸の新たな用途を提供することである。

また、本発明の課題は、新規なアクアポリン 3 の発現亢進剤、及びアクアポリン 3 の発現亢進作用に基づく新規な生理活性剤を提供することである。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明は以下の通りである。

< 1 > ウルソール酸を有効成分として含有するアクアポリン 3 の発現亢進剤。

< 2 > ウルソール酸を有効成分として含有する組織修復促進剤。

< 3 > 組織修復促進が、潰瘍、褥瘡、外傷及び手術創からなる群より選ばれる少なくとも 1 種の肉芽形成促進である< 2 >に記載の組織修復促進剤。

< 4 > 植物からアルコールを用いて抽出したアルコール抽出液を得ることと、得られたアルコール抽出液を、アルコール、炭化水素及び水の混合液に混合分散させてアルコール層を得ることと、得られたアルコール層を、水に混合分散させて水不溶層を得ることと、を含む、ウルソール酸の製造方法。

< 5 > ウルソール酸を対象に投与することを含むアクアポリン 3 の発現亢進方法。

< 6 > ウルソール酸を対象に投与することを含む組織修復促進方法。

< 7 > 組織修復促進が、潰瘍、褥瘡、外傷及び手術創からなる群より選ばれる少なくとも 1 種の肉芽形成促進である< 6 >に記載の組織修復促進方法。

< 8 > 組織修復促進に使用するためのウルソール酸。

< 9 > 組織修復促進が、潰瘍、褥瘡、外傷及び手術創からなる群より選ばれる少なくとも 1 種の肉芽形成促進である< 8 >に記載の組織修復促進に使用するためのウルソール酸。

発明の効果

[0007] 本発明によれば、ウルソール酸の新たな用途を提供することができる。

また、本発明によれば、新規なアクアポリン 3 の発現亢進剤、及びアクアポリン 3 の発現亢進作用に基づく新規な生理活性剤を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]実施例2にかかるアクアポリン3の発現量に対するウルソール酸の作用を示す写真である。

[図2]実施例2にかかるアクアポリン3の発現量に対するウルソール酸の作用を示すグラフである。

[図3]実施例3にかかるケラチノサイトの遊走能に対するウルソール酸の作用を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0009] 本発明のアクアポリン3の発現亢進剤及び組織修復促進剤は、ウルソール酸を有効成分とした生理活性剤である。

本発明のアクアポリン3の発現亢進剤は、細胞に対して、アクアポリン3の発現亢進作用を有し、且つアクアポリン3の発現亢進作用に基づく組織修復促進作用を有する。

なお、本明細書では、特に断らない限り、アクアポリン3の発現亢進剤及び組織修復促進剤を「生理活性剤」と総称する。

[0010] 本明細書において「工程」との語は、独立した工程だけではなく、他の工程と明確に区別できない場合であってもその工程の所期の目的が達成されれば、本用語に含まれる。また本明細書において「～」を用いて示された数値範囲は、「～」の前後に記載される数値をそれぞれ最小値及び最大値として含む範囲を示す。

本発明において、組成物中の各成分の量について言及する場合、組成物中に各成分に該当する物質が複数存在する場合には、特に断らない限り、組成物中に存在する当該複数の物質の合計量を意味する。

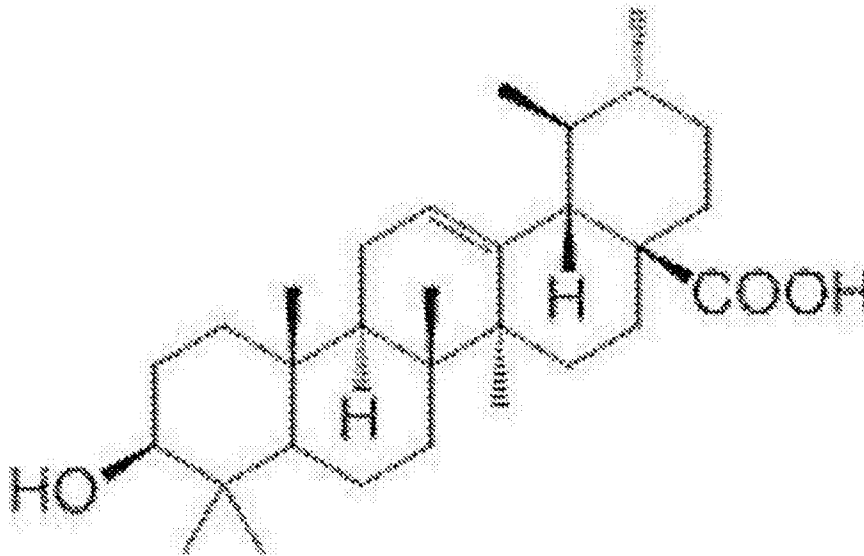
本明細書において「細胞」とは、アクアポリン3を発現する細胞であれば特に限定されない。具体的には、気道上皮細胞、腎上皮細胞、消化管上皮細胞及び皮膚細胞が挙げられる。皮膚細胞には、表皮細胞（ケラチノサイト）、色素細胞（メラノサイト）、ランゲルハンス細胞、 α 樹状細胞、メルケル細胞が含まれ、中でも表皮細胞（ケラチノサイト）が好ましい。

以下、本発明について説明する。

[0011] <生理活性剤>

本発明にかかる生理活性剤において有効成分となるウルソール酸は、化学式 $C_{30}H_{48}O_3$ （分子量456.7、CAS登録番号77-52-1）で表される化合物であり、以下の構造式で表される。

[0012] [化1]



[0013] ウルソール酸としては、一般的に用いられる合成物及び植物由来の抽出物等のいずれをも使用することができる。

ウルソール酸は、リンゴ、バジル、ビルベリー、クランベリー、エルダーフラワー、ペパーミント、ローズマリー、ラベンダー、オレガノ、タイム、サンザシ、プルーン等の植物由来の抽出物を用いることができる。

また、ウルソール酸は市販品を使用することができる。市販品としては例えば、Ursolic acid (SigmaArdrich社)、Ursolic acid (Santa Cruz社)、Ursolic acid (東京化成工業社)、ウルソール酸 (和光純薬工業社)等を挙げることができる。

[0014] ウルソール酸は、アクアポリン3の発現亢進作用を有するため、アクアポリン3の機能異常に起因する病態の治療のための医薬の有効成分として有用

である。

アクアポリン3の機能異常とは、健常な組織内細胞のアクアポリン3の状態とは異なる、病態下の組織内細胞のアクアポリン3の状態をいい、アクアポリン3の機能減退、細胞におけるアクアポリン3の数の減少等を含む。

ウルソール酸を有効成分として含有するアクアポリン3の発現亢進剤は、具体的には、組織修復促進剤として用いることができるが、これらの用途のみに限定されず、アクアポリン3を発現する組織や器官の疾病の予防及び治療のために用いることができる。

[0015] (アクアポリン3の発現亢進剤)

本発明にかかるアクアポリン3の発現亢進剤は、有効成分としてウルソール酸を含有する。これにより、アクアポリン3の発現亢進剤は、ウルソール酸未使用時に比べて、細胞中のアクアポリン3の発現を亢進させることができる。また、アクアポリン3の発現亢進剤は、組織修復を促進する作用を有する。

さらに、アクアポリン3の発現亢進剤には、皮膚水分保持機能向上、皮膚ターンオーバーの改善、皮膚の乾燥防止、乾燥等による肌荒れの改善、掻痒感の改善、美肌等の効果が期待できる。

[0016] アクアポリン3の発現亢進剤は、ウルソール酸の未使用時に比べて、細胞中のアクアポリン3の発現を亢進する作用を有するものであればよい。

細胞内のアクアポリン3の発現亢進作用は、特に限定されるものではないが、例えば、細胞中のアクアポリン3の発現量を測定することにより評価することができる。

評価方法としては具体的には、培養細胞、市販の三次元表皮モデル、テープストリッピング等で採取した角層由来の細胞又はアクアポリン3を発現する皮膚由来の表皮細胞株のアクアポリン発現量をウェスタンブロッティングにより測定する方法、PCR法及びノーザンブロット法によりアクアポリン3 mRNA発現量を測定する方法、ストップフロー法による細胞膜水透過性を測定する方法、標識グリセロールの細胞膜透過性を測定する方法等が挙

げられる。

[0017] アクアポリン3の発現亢進剤は、細胞内のアクアポリン3の発現量を測定した際に、ウルソール酸未使用時に比べて、アクアポリン3の発現量が、1.5倍～4倍に増加することが好ましく、2倍～4倍に増加することがより好ましく、3倍～4倍に増加することがさらに好ましい。

なお、アクアポリン3の発現量の測定方法は、Horie I et al., Biochem Biophys Res Commun, 387, 564-8, 2009に記載の方法に準じればよい。

評価に用いる培養細胞として、例えばケラチノサイト株DJ-M1細胞（理研細胞銀行）、Primary Human Keratinocyte Cells（ライフテクノロジーズ社）、正常ヒト表皮角化細胞（クラボウ社）等が挙げられる。

評価に用いる市販の三次元表皮モデルとしては、LaboCytte Epimodel（株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング）、EPI-200（クラボウ社）、TESTSKIN（TOYOBOK社）等が挙げられる。

[0018]（組織修復促進剤）

本発明にかかる組織修復促進剤は、有効成分としてウルソール酸を含有する。これにより、組織修復促進剤は、細胞の集合体である組織に生じた創傷の修復を、ウルソール酸未使用時に比べて促進させることができる。

細胞の集合体である組織としては、皮膚、気道、胃及び小腸等の消化管が挙げられ、好ましくは皮膚が挙げられる。

[0019] 創傷としては、火傷、凍傷、潰瘍、褥瘡、外傷及び手術創からなる群より選ばれる少なくとも1種が挙げられる。

また、組織修復としては、創傷部位の肉芽形成を促進させること、創傷部位の治癒（創傷治癒）を促進させること、気道及び消化管粘膜上皮の再生を促進すること等が挙げられる。

好ましくは、組織修復促進が、潰瘍、褥瘡、外傷及び手術創からなる群よ

り選ばれる少なくとも1種の肉芽形成促進であることが挙げられる。

[0020] 組織修復促進作用は、具体的には、ケラチノサイトの遊走能、動物の実験的外傷の修復能を測定することにより評価することができる。

例えば、ケラチノサイトの遊走能の評価は、特開2011-32191号公報の段落[0037]に記載の方法に準じて行えばよい。

[0021] 本発明にかかる生理活性剤を組成物の形態で用いる場合、当該組成物におけるウルソール酸の含有量は、剤型によって異なる。

一般に組成物の全質量に対して、好ましくは0.0000001質量%～1質量%であり、より好ましくは0.0001質量%～0.05質量%であり、特に好ましくは0.001質量%～0.01質量%である。

[0022] 本発明にかかる生理活性剤を使用する場合、生理活性剤の形態には特に制限はない。ウルソール酸の他、後述する他の成分（医薬や化粧品として許容可能な担体や、必要に応じた他の任意成分）を含む組成物の形態としてもよい。

組成物の形態としては、オイル組成物、乳化組成物、粉末組成物等が挙げられる。オイル組成物、乳化組成物、粉末組成物は、公知の方法に従い調製することができる。

[0023] 本発明にかかる生理活性剤は、経口的又は非経口的に投与することができる。アクアポリン3の発現亢進作用の観点から、非経口的に投与することが好ましく、具体的には、ウルソール酸を直接皮膚細胞へ投与可能な局所投与が好ましく、経皮投与がより好ましい。

本発明にかかる生理活性剤の投与量としては、剤型等によって異なるが、一般に、1日あたり、体重kgあたり、有効成分として1mg～15mgとすることができ、好ましくは2mg～10mgとすることができ、より好ましくは3mg～5mgとすることができる。

[0024] 本発明にかかる生理活性剤を含む組成物に含有される他の成分は、本発明の組成物の形態、目的等に応じて適宜選択することができる。他の成分の好適な例としては、例えば、乳化剤、その他の添加成分等が挙げられる。

[0025] その他の添加成分としては、上記成分の他、医薬品、機能性食品、化粧品等の分野において通常用いられる添加成分を、本発明の組成物に、その形態に応じて適宜含有させてもよい。他の添加成分は、その特性によって、油溶性又は水溶性の添加成分として、本発明の組成物に含有させることができる。

[0026] 例えば、その他の添加成分としては、グリセリン、1, 3-ブチレングリコール等の多価アルコール；グルコース、果糖、乳糖、麦芽糖、ショ糖、ペクチン、カップーカラギーナン、ローカストビーンガム、グアーガム、ヒドロキシプロピルグアガム、キサンタンガム、カラヤガム、タマリンド種子多糖、アラビアガム、トラガカントガム、ヒアルロン酸、ヒアルロン酸ナトリウム、コンドロイチン硫酸ナトリウム、デキストリン等の単糖類又は多糖類；ソルビトール、マンニトール、マルチトール、ラクトース、マルトトリイトール、キシリトール等の糖アルコール；塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム等の無機塩；カゼイン、アルブミン、メチル化コラーゲン、加水分解コラーゲン、水溶性コラーゲン、ゼラチン等の分子量5000超のタンパク質；グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、シスチン、メチオニン、リジン、ヒドロキシリジン、アルギニン、ヒスチジン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、プロリン、ヒドロキシプロリン、アセチルヒドロキシプロリン等のアミノ酸及びそれらの誘導体；カルボキシビニルポリマー、ポリアクリル酸ナトリウム、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、酸化エチレン・酸化プロピレンブロック共重合体等の合成高分子；ヒドロキシエチルセルロース・メチルセルロース等の水溶性セルロース誘導体；等を挙げることができ、その機能に基づいて、例えば機能性成分、賦形剤、粘度調整剤、ラジカル捕捉剤等として含んでもよい。

その他、本発明においては、例えば、種々の薬効成分、pH調整剤、pH緩衝剤、紫外線吸収剤、防腐剤、香料、着色剤等、通常、その用途で 사용되는他の添加物を併用することができる。

[0027] 生理活性剤は、医薬品、化粧品又は機能性食品等として用いることができる。

また、生理活性剤は、ヒト及び家畜に投与することができる。家畜としては、イヌ、サル、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ等が挙げられる。

[0028] なお、生理活性剤は、ウルソール酸を有効成分として含有するアクアポリン3の発現亢進方法に使用することができる。また、生理活性剤は、ウルソール酸を有効成分として含有する組織修復促進方法に使用することもできる。

[0029] <ウルソール酸の製造方法>

ウルソール酸の製造方法は、植物からアルコールを用いて抽出したアルコール抽出液を得ること（以下、「抽出工程」と称する。）と、得られたアルコール抽出液を、アルコール、炭化水素及び水の混合液に混合分散させてアルコール層を得ること（以下、「分離工程」と称する。）と、得られたアルコール層を、水に混合分散させて水不溶層を得ること（以下、「単離工程」と称する。）と、を含む。

これにより、高純度なウルソール酸を得ることができる。

また、ウルソール酸の製造方法は、抽出工程、分離工程及び単離工程以外の工程を含んでいてもよい。

[0030] 抽出工程は、植物からアルコールを用いて抽出した抽出物を得る工程である。好ましくは、抽出工程において、適度に切断又は粉碎した植物を、アルコールに分散させ、室温から加温下で抽出することによりアルコール抽出液を得ることが挙げられる。

抽出に用いるアルコールとしては、例えば50w/w%～100w/w%のメチルアルコール、20w/w%～100w/w%のエチルアルコール、10w/w%～100w/w%のプロパノール又は10w/w%～100w/w%のブタノールを用いてもよく、70w/w%～100w/w%のメチルアルコール又は50w/w%～100w/w%のエチルアルコールが好ましい。またアルコールの他に、ケトン類、例えばアセトン、液状の脂肪酸エ

ステル類、例えばリノール酸グリセライド及びグリコール類例えばエチレングリコール等を用いることもできる。抽出工程においてアルコール以外を用いた場合にも、以下に記載されるアルコールを用いた抽出工程、分離工程及び単離工程の条件を適用してよい。

[0031] 植物を切断又は粉砕する方法は、公知の方法により行えばよく、例えば植物が粉末状になるまで鋏又は臼を用いて切断又は粉砕する方法が挙げられる。

抽出温度は、室温から加温下であればよく、具体的には、 0°C ～ 100°C が挙げられ、 20°C ～ 90°C が好ましい。

抽出時間は、数分から数日間が挙げられ、例えば植物の色が抽出液に移るまでの間抽出を行えばよい。

[0032] また、抽出工程においては、必要に応じてアルコールを攪拌する攪拌工程を含んでいてもよい。攪拌速度は特に制限されるものではない。

アルコール抽出液は、例えば植物を濾過して抽出残渣を除去する濾過工程により得ることができる。

[0033] 分離工程は、得られたアルコール抽出液を、アルコール、炭化水素及び水の混合液に混合分散させてアルコール層を得る工程である。

得られたアルコール抽出液を、アルコール、炭化水素及び水の混合液（以下、「混合液」と称する。）に混合分散する場合には、必要に応じてアルコール抽出液及び混合液を攪拌する攪拌工程を含んでいてもよい。攪拌速度は特に制限されるものではない。

分離工程は、得られたアルコール抽出液を、混合液に混合分散した後に、アルコール層が分離するまでの一定時間放置し、アルコール層を分取するアルコール層分取工程を含んでいてもよい。アルコール層を分取する方法は特に制限はされず、公知の方法を採用することができる。

[0034] 単離工程は、得られたアルコール層を、水に混合分散させて水不溶層を得る工程である。

得られたアルコール層を水に混合分散する場合には、必要に応じてアルコ

ール層及び水を攪拌する攪拌工程を含んでいてもよい。攪拌速度は特に制限されるものではない。

単離工程は、得られたアルコール層を、水に混合分散したのちに、水不溶層が分離するまでの一定時間放置し、水不溶層を分取する水不溶層分取工程を含んでいてもよい。

水不溶層を分取する方法は特に制限はされず、公知の方法を採用することができる。

[0035] また、ウルソール酸の製造方法は、抽出工程、分離工程及び単離工程に加えて、得られた水不溶層から、ウルソール酸を精製する精製工程を含んでいてもよい。

ウルソール酸を水不溶層から精製する方法としては、限定されるものではなく、公知の方法を採用することができる。例えば、シリカゲル、アルミナ及び疎水クロマト担体を用いたカラムクロマト等を用いた方法が挙げられる。

[0036] 植物は、ウルソール酸を含有する植物であれば、未乾燥植物及び乾燥植物のいずれであってもよい。

未乾燥植物としては、生薬、ハーブ、果物等が挙げられる。

乾燥植物としては、天日乾燥又は凍結乾燥した植物のいずれであってもよいが、回収効率の観点より、天日乾燥した植物であることが好ましい。

[0037] 植物の種類としては、ウルソール酸を含有する植物であればいずれの植物であってもよい。例えば、シソ科、バラ科、ツツジ科、スイカズラ科等が挙げられる。

具体的には、シソ科のオドリコソウ亜科に属するケイガイ (*Schizonepeta tenuifolia* Briquet (var. *japonica* Kitagawa)) の花穂、シソ科のマンネンロウ属に属するローズマリー (*Rosmarinus officinalis* L.) 及びバラ科のナシ亜科リンゴ属に属するリンゴの皮等が挙げられる。

[0038] アルコールとしては、低級アルコール（メタノール、エタノール、プロピ

ルアルコール、イソプロピルアルコール等)、多価アルコール(グリセリン、プロピレングリコール等)等を挙げることができる。これらのアルコールは単独で用いてもよいし、2種類以上のアルコールを混合して用いてもよい。

また、アルコールとしては、低級アルコールが好ましく、メタノールが特に好ましい。

植物を分散するアルコールの量は、植物の全質量に対して約2倍量～100倍量、好ましくは3倍量～30倍量のアルコールを用いることができる。

[0039] アルコール、炭化水素及び水の混合液としては、体積基準で、アルコール：炭化水素：水が、1：1：1～5：2：1：1、2：2：1～1：1：2、又は3：2：1～3：2：2である混合液を用いることができる。

アルコールとしては、低級アルコール(メタノール、エタノール、プロピルアルコール、イソプロピルアルコール等)、多価アルコール(グリセリン、プロピレングリコール等)等を挙げることができるが、低級アルコールが好ましく、中でもメタノールを用いることがより好ましい。

炭化水素としては、ベンゼン、ヘキサン等が挙げられるが、ヘキサンを用いることが好ましい。

アルコール抽出液を混合分散する混合液の量としては、アルコール抽出液の全体積に対して約2倍量～100倍量、好ましくは10倍量～50倍量の混合液を用いることができる。

[0040] アルコール層を混合分散する水の量としては、アルコール層の全体積に対して約0.1倍量～2倍量、好ましくは0.5倍量～1.5倍量の水を用いることができる。

[0041] このようにして得られた水不溶層にはウルソール酸が含有されているため、水不溶層を構成する水不溶性成分を、そのまま本発明の生理活性剤として利用することができる。

実施例

[0042] 以下、本発明を実施例にて詳細に説明する。しかしながら、本発明はそれ

らに何ら限定されるものではない。

[0043] [実施例1：ウルソール酸の製造]

乾燥ケイガイ300g（ウチダ社製）にメタノール3000mlを加え、2時間かけて70℃で加熱抽出し、アルコール抽出液30gを得る。

得られたアルコール抽出液を、メタノール、ヘキサン及び水の混合液（210：90：70（容積基準））1000mlに混合分散させて、30分経過後、メタノール層を分液ロートにより分取し、蒸発乾固させる（メタノール層24g）。得られたメタノール層を、水500mlに混合分散させて、20分経過後、水不溶層を遠心により分取する（水不溶層3.8g）。得られた水不溶層を、積載容積200mLのシリカゲルカラムに供し、クロロホルム：メタノール：水（7：2：0.1）200mL、クロロホルム：メタノール：水（7：3：0.5）200mL及びメタノール200mLで順次溶出し、得られた第3分画から第4分画（溶出液量20mL～100mL）を分取、濃縮乾固させて、約100mgのウルソール酸を得た。

[0044] [実施例2：アクアポリン3の発現量に対するウルソール酸の作用]

ケラチノサイト株DJ-M1細胞（理研細胞銀行）は、10v/v%ウシ胎児血清（FBS）、100units/mlのペニシリン、100μg/mlストレプトマイシン、1v/v% MEM Non-Essential Amino Acids（GIBCO社）を含むMEM培地を用いて、5v/v%二酸化炭素、37℃で静置培養した。

ケラチノサイト株DJ-M1細胞をコンフルエンスー80%～90%まで培養後、MEM培地を、ウルソール酸（シグマアルドリッチ社）0.005mg/mlを添加した無血清培地に置換し、24時間静置して、ウルソール酸処理した細胞を得た。

ウルソール酸処理した細胞を、PBSで洗浄し、セルスクレイパーを用いて掻き取り、遠心してペレットを得た。

得られたペレットにLysis buffer（50mM Tris-HCl：pH7.5、150mM NaCl、5mM EDTA、1% NP

−40、0.1% SDS、0.5% deoxycholate、1% v/v protease inhibitor cocktail) (シグマアルドリッチ社) を0.05 ml 加え、ピペティングして可溶化し、再度、遠心して、その上清を細胞溶解液として得た。

細胞溶解液を試料として以下の通りポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 及びウェスタンブロットングを行った。

細胞溶解液10 μ l を、12 v/v% polyacrylamide gel でSDS-PAGEを行い、細胞溶解液に含まれる各種タンパクを各バンドに分離後、PVD F膜 (サーモサイエンス社) に転写した。

転写したPVD F膜は5%スキムミルク液中、室温で1時間振盪してブロッキングし、その後、1:1000に希釈した抗アクアポリン3 (AQP3) 抗体 (アロモン社) を用いて一次抗体反応 (4°C、overnight) を行い、0.1 v/v%のTween 20/PBSで洗浄した後、horseradish peroxidase (HRP) -標識抗ウサギIgG抗体 (1:20000) (サンタクルズ社) を用いて二次抗体反応 (室温、1 h) を行った。

さらに、メンブレンを洗浄後、ECL (登録商標) advance Western blotting analysis system (GE Healthcare Life Science社) を用いて抗体反応を検出した。

なお、polyacrylamide gel への試料のロード量が均一であることは、一次抗体に抗 β -アクチン抗体を用いた同様の実験で検証した。

[0045] 上述の方法により得られたアクアポリン3の発現量の測定結果を図1及び図2に示す。

図1は、ウェスタンブロットングにより得られたメンブレン (アクアポリン3に該当するバンド) の写真である。

図2は、ウェスタンブロットングの結果に基づき、各バンドのタンパク

量を画像解析装置（LAS-1000、フジフィルム社）にて定量化して得られたグラフである。なお、図2の縦軸はコントロールである β -アクチン量に対する、アクアポリン3の発現量の比率（%）を示しており、横軸はウルソール酸処理に用いたウルソール酸の添加量（M）を示す。

[0046] 図1及び図2の結果から明らかである通り、ウルソール酸添加により、アクアポリン3の発現亢進が認められた。

[0047] [実施例3：ケラチノサイトの遊走能に対するウルソール酸の作用]

ケラチノサイト株DJ-M1細胞のコンフルエントカルチャーのMSM培地を、ウルソール酸0.005mg/ml添加無血清培地に置換し、24時間培養した。

培養皿底部の細胞を200 μ lピペットチップの先端を接触させ、一定の圧力を維持したまま直線的に移動させることで細胞を剥離（scratch）し、このscratch幅を測定した（Initial Wound）。

無血清培地を、1v/v%FBS及び0.005mg/mlのウルソール酸を含む培地に置換後、さらに24時間培養し、再びscratch幅を測定した。

Scratch幅は1ディッシュ当たり5ヶ所で測定し、その平均値を1つのデータとした。

細胞遊走能は、Initial Woundと最終的なscratch幅との差（Relative Wound Healing Activity）として算出した。

[0048] 図3の結果から明らかである通り、ウルソール酸添加によりケラチノサイトの遊走能が促進され、in vitroの実験的創傷の回復が促進された。

[0049] [実施例4：ウルソール酸の製造]

乾燥ケイガイ（荊芥）300gをメタノールに分散し、メタノール抽出エキスを得た。その後、メタノール抽出液を、ヘキサン/水（7：3）で分配し、ヘキサン及び水に不溶性画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィ（メ

ルク社)により20分画した。

得られた各画分について、実施例1と同様にアクアポリン3の発現量に対する作用を確認した。その結果、 $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} = 7 : 2 : 0$ 、2で溶出した第3画分を構成する成分に強いアクアポリン3の発現亢進活性を認めた。

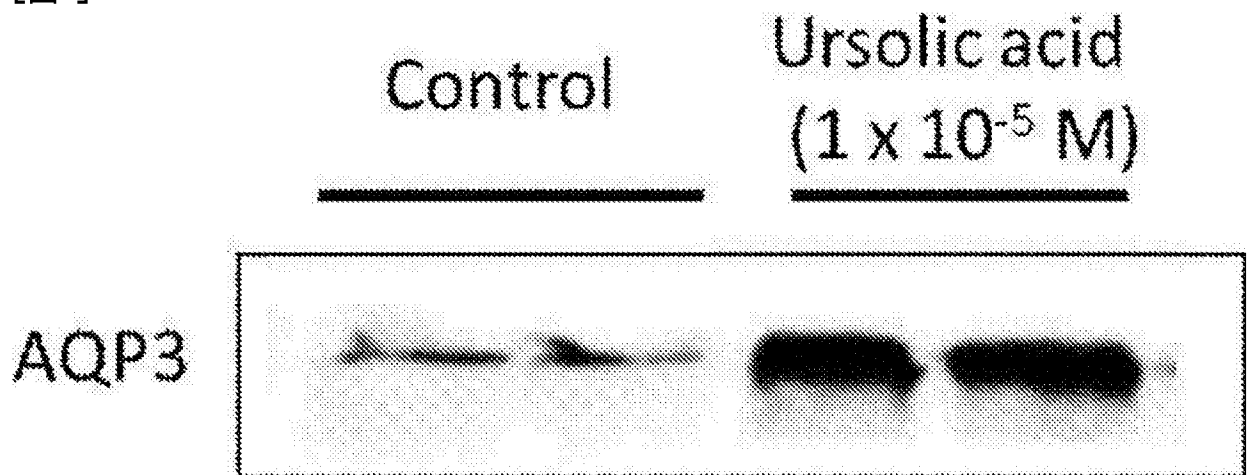
第3画分を構成する成分を、NMR及びFAB-MSを用いて構造解析した結果、当該成分はウルソール酸と同定した。

[0050] 2013年8月9日に出願された日本国特許出願2013-166326の開示は、その全体が参照により本明細書に取り込まれる。本明細書に記載された全ての文献、特許出願、および技術規格は、個々の文献、特許出願、および技術規格が参照により取り込まれることが具体的かつ個々に記された場合と同程度に、本明細書中に参照により取り込まれる。本発明の例示的实施形態についての以上の記載は例示および説明の目的でされたものであり、網羅的であることあるいは発明を開示されている形態そのものに限定することを意図するものではない。明らかなことではあるが、多くの改変あるいは変更が当業者には自明である。上記実施形態は発明の原理及び実用的応用を最もうまく説明し、想定される特定の用途に適するような種々の実施形態や種々の改変と共に他の当業者が発明を理解できるようにするために選択され、記載された。本発明の範囲は以下の請求項およびその均等物によって規定されることが意図されている。

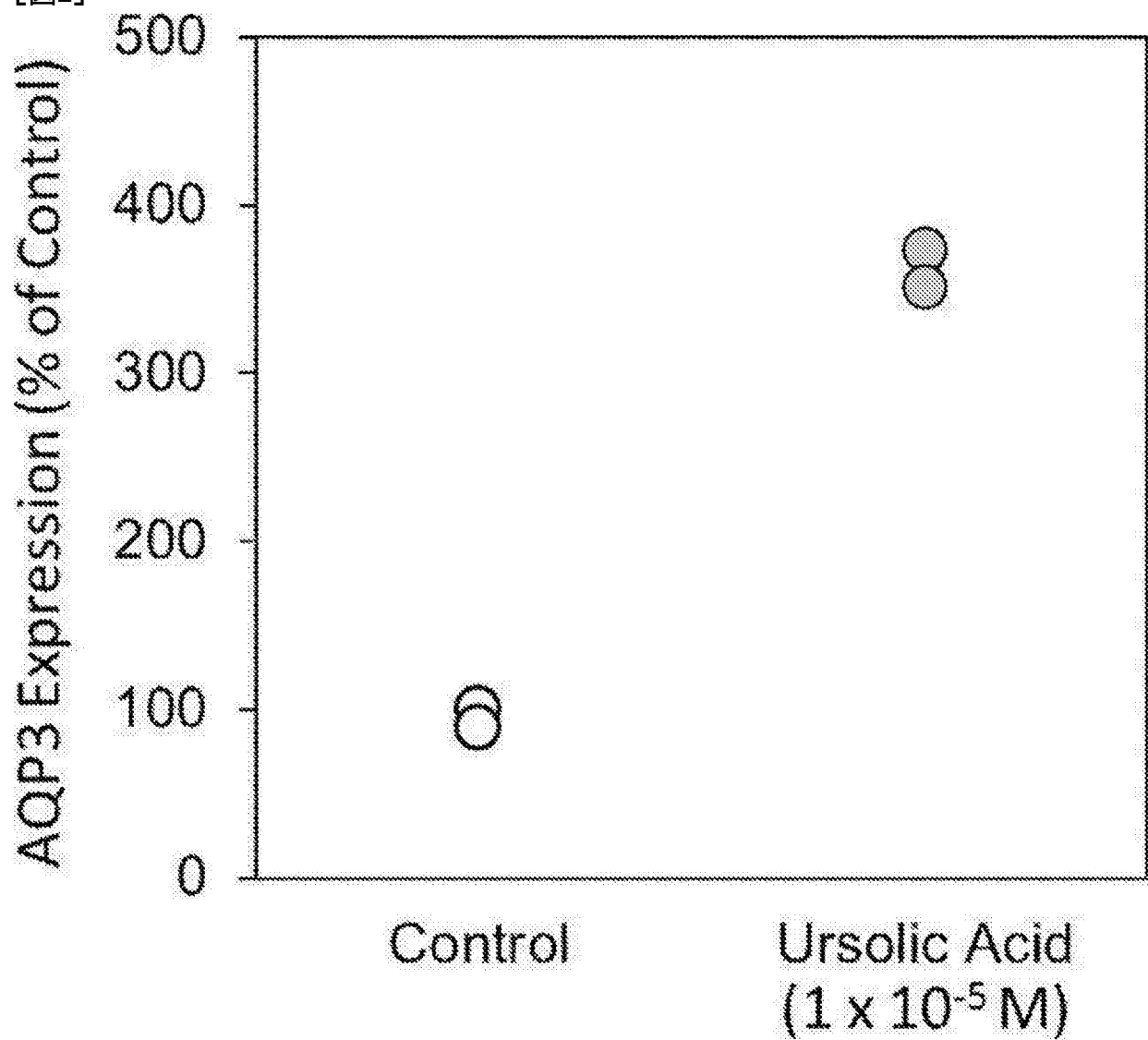
請求の範囲

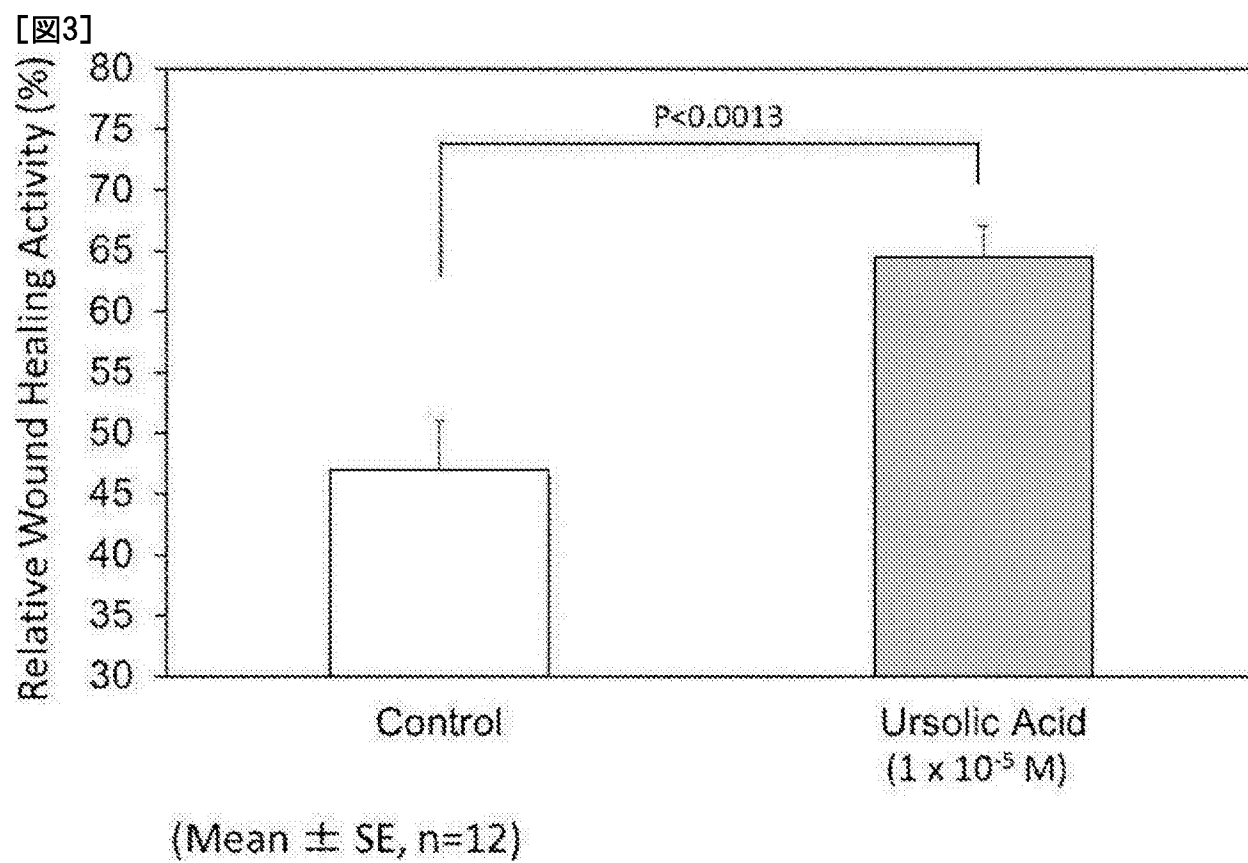
- [請求項1] ウルソール酸を有効成分として含有するアクアポリン3の発現亢進剤。
- [請求項2] ウルソール酸を有効成分として含有する組織修復促進剤。
- [請求項3] 組織修復促進が、潰瘍、褥瘡、外傷及び手術創からなる群より選ばれる少なくとも1種の肉芽形成促進である請求項2に記載の組織修復促進剤。
- [請求項4] 植物からアルコールを用いて抽出したアルコール抽出液を得ることと、
 得られたアルコール抽出液を、アルコール、炭化水素及び水の混合液に混合分散させてアルコール層を得ることと、
 得られたアルコール層を、水に混合分散させて水不溶層を得ることと、
 を含む、ウルソール酸の製造方法。

[図1]



[図2]





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/070920

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/19(2006.01)i, A61K8/36(2006.01)i, A61K8/97(2006.01)i, A61K36/00(2006.01)i, A61K36/18(2006.01)i, A61P17/00(2006.01)i, A61P17/02(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, A61Q19/00(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)

A61K31/19, A61K8/36, A61K8/97, A61K36/00, A61K36/18, A61P17/00, A61P17/02, A61P43/00, A61Q19/00

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	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

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

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDREAMIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MUKHERJEE, H. et al., Evaluation of the wound healing activity of Shorea robusta, an Indian ethnomedicine, and its isolated constituent(s) in topical formulation, Journal of ethnopharmacology, 2013, Vol.149, No.1, p.335-343, Available on line 6 July 2013, page 336, paragraph of 2.2, page 338, paragraph of 3.1, pages 339 to 340, paragraph of 3.5.1 to 3.5.3, pages 337 to 338, paragraph of 2.7.1 to 2.7.3	1-3
Y		4
Y	BUDAVARI, S., Editor, THE MERCK INDEX, Twelfth Edition, MERCK&CO., INC., 1996, p.1686-1687 [10027.Ursolic Acid], chemical structural formula, lower paragraph, line 7	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
17 October, 2014 (17.10.14)

Date of mailing of the international search report
04 November, 2014 (04.11.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/070920

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Yasutomo NISHIMORI, "Collagen Fiber Bundles and Wrinkling", Journal of Japanese Cosmetic Science Society, 2003, vol.27, no.4, pages 294 to 297, pages 296 to 297, '3. Ursolic Acid'	1-3
A	Nikko Chemicals Co., Ltd., "Jisedai no Kinosei Genryo Barnet-sha (America) no Shinseihin", Fragrance Journal, vol.31, no.3, 2003, pages 101 to 102, page 101, right column to page 102, 'Ceramide Sansei Sokushinzai'	1-3
A	JP 2009-545633 A (The Procter & Gamble Co.), 24 December 2009 (24.12.2009), claim 6; paragraph [0005] & US 2008/0059313 A1 & US 2012/0258185 A1 & EP 2056783 A & EP 2574328 A2 & WO 2008/027541 A2 & CN 101511331 A & AU 2007290406 A & MX 2009001927 A & BR PI0715932 A	1-3
A	RINGBOM, T. et al., Ursolic acid from Plantago major, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis, Journal of natural products, 1998, Vol.61, No.10, p.1212-1215, entire text	1-3
A	LIU, J., Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid, Journal of ethnopharmacology, 1995, Vol.49, No.2, p.57-68, entire text, particularly, page 63, '7.1 Anti-ulcer effects'	1-3
A	LIU, W. et al., Ursolic acid inhibits cigarette smoke extract-induced human bronchial epithelial cell injury and prevents development of lung cancer, Molecules, 2012, Vol.17, No.8, p.9104-9115, entire text	1-3

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. A61K31/19(2006.01)i, A61K8/36(2006.01)i, A61K8/97(2006.01)i, A61K36/00(2006.01)i,
A61K36/18(2006.01)i, A61P17/00(2006.01)i, A61P17/02(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i,
A61Q19/00(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（I P C））

Int.Cl. A61K31/19, A61K8/36, A61K8/97, A61K36/00, A61K36/18, A61P17/00, A61P17/02, A61P43/00, A61Q19/00

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 4 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 4 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 4 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/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

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 Y	MUKHERJEE, H. et al., Evaluation of the wound healing activity of Shorea robusta, an Indian ethnomedicine, and its isolated constituent(s) in topical formulation, Journal of ethnopharmacology, 2013, Vol.149, No.1, p.335-343, Available on line 6 July 2013 第 336 頁 2.2 の項、第 338 頁 3.1 の項、第 339～340 頁 3.5.1～3.5.3 の項及び第 337～338 頁 2.7.1～2.7.3 の項	1-3 4

☒ 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

1 7 . 1 0 . 2 0 1 4

国際調査報告の発送日

0 4 . 1 1 . 2 0 1 4

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
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）

島居 福代

4 U

3 4 3 6

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 3 9

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
Y	BUDAVARI, S., Editor, THE MERCK INDEX, Twelfth Edition, MERCK&CO., INC., 1996, p. 1686-1687 [10027. Ursolic Acid] 化学構造式の下段落 7 行目	4
A	西森康友, コラーゲン変性とシワ, 日本化粧品科学会誌, 2003, Vol. 27, No. 4, p. 294-297 第 296~297 頁「3. ウルソール酸」	1-3
A	日光ケミカルズ株式会社, 次世代の機能性原料 Barnet 社 (アメリカ) の新製品, フレグランスジャーナル, Vol. 31, No. 3, 2003, p. 101-102 第 101 頁右欄~第 102 頁「セラミド産生促進剤」	1-3
A	JP 2009-545633 A (ザ プロクター アンド ギャンブル カンパニー) 2009. 12. 24, 請求項 6、【0005】 & US 2008/0059313 A1 & US 2012/0258185 A1 & EP 2056783 A & EP 2574328 A2 & WO 2008/027541 A2 & CN 101511331 A & AU 2007290406 A & MX 2009001927 A & BR PI0715932 A	1-3
A	RINGBOM, T. et al., Ursolic acid from Plantago major, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis, Journal of natural products, 1998, Vol. 61, No. 10, p. 1212-1215 全文	1-3
A	LIU, J., Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid, Journal of ethnopharmacology, 1995, Vol. 49, No. 2, p. 57-68 全文、特に、第 63 頁「7.1 Anti-ulcer effects」	1-3
A	LIU, W. et al., Ursolic acid inhibits cigarette smoke extract-induced human bronchial epithelial cell injury and prevents development of lung cancer, Molecules, 2012, Vol. 17, No. 8, p. 9104-9115 全文	1-3